

硬化樹脂の安定性を検討した。その結果、流路深さが 100 μm 以上のチャンネルでは、硬化樹脂が流出することが明らかとなった。

一方、抗体固相化に用いる微小ポリスチレンビーズ径、抗体濃度、抗体吸着時間の検討では、各直径のマイクロビーズに対し、各濃度の抗ヒト IgE 抗体を経時的に反応させた。そして反応終了後のマイクロビーズを用いてイムノアッセイ系を行ない、最適な抗体固相化条件について検討を行った。その結果、対し、50 $\mu\text{g/ml}$ の抗ヒト IgE 抗体を終夜反応させた 1 μm のマイクロビーズを用いたイムノアッセイが最も高感度であることが明らかとなった。次に、ビーズ濃度の検討においては、各濃度の 1 μm のマイクロビーズを含んだ光硬化性樹脂をマイクロチャンネルに導入した後マスクパターンによる照射を行い、形成された硬化パターンの送液に対する安定性について検討を行った。その結果、10% までのマイクロビーズ濃度において、送液に対して安定な硬化パターンが得られることが明らかとなった。上記の最適化した条件を用いて、ヒト IgE マイクロチップイムノアッセイの検討を行った。その結果、1ng/ml のヒト IgE が測定時間 15 分で目視確認できることが明らかとなった。

③ヒト HLA-A2 Tg ラット作成においては、ヒト HLA-A2 (0201) および $\beta 2$ -microglobulin (HuB2m) 遺伝子の配列をもとに、クローニング用のプライマーを作成、両側のプライマーに EcoRI site 或いは XhoI site を設け、理化学研究所バイオリソースセンターから購入した cDNA 断片を鋳型にして、それぞれの遺伝子を増幅後、クローニングを行い精製、pCAGGS ベクターの EcoRI site 或いは XhoI site に挿入して、pCAGGS-HLA-A2、pCAGGS-HuB2m プラスミドを作成した。シークエンスを行い、HLA-A2、HuB2m 遺伝子を発現ベクターであることを確認した。また、制限酵素である PstI と BamHI を用いて、37°C、1 時間を処理の後、1% の Agarose ゲルにて、電気泳動を行い、その断片のサイズを確認した。さらに、ハムスター卵巣由来細胞株の CHO に Invitrogen 社の Lipofectamine LTX+Plus を用いて、pCAGGS-HLA-A2、pCAGGS-HuB2m、或いは両方のプラスミドの遺伝子導入を行い、3 日後、細胞を回収して、BD Pharmingen 社の FITC-抗ヒト HLA-A2 抗体、PE-抗ヒト $\beta 2$ -microglobulin 抗体を用いて染色した後、FCM にて、その発現

の確認を検討し、細胞表面および細胞質内に僅かな発現が確認できた。

④遺伝子改変ラットの移植医療への応用研究においては、近交系 DA ラットへの EGFP DA-Tg をドナーとする同種同系移植実験の結果、皮膚は全例拒絶、異所性心臓移植では、雌ラットでは全例生着、雄ラットでは、移植ラット中 4 割程に、慢性拒絶反応により 50 日以内に移植心を拒絶するものがある事を見いだした。しかしながら、近交系 F344 をレシピエントとする、同移植実験では、皮膚、心臓ともに拒絶反応は全く観察されなかった。(DA x F344)F1 をレシピエントとして、局所、移植片対宿主反応 (local GvH reaction) を応用した、*in vivo* 細胞傷害性反応を用いて解析した結果、EGFP-F344 Tg、あるいは (DA x EGFP-F344 Tg)F1 由来細胞の EGFP に対し、特異的な細胞傷害性 T 細胞は誘導される事が明らかとなった。

⑤慢性移植腎症に深く関わっている glycoalyx 傷害の移植腎障害へ及ぼす影響の検討においては、正常ヒト腎生検組織を用い、鉄コロイド染色を行う際の PH 条件を 1.5, 2.5, 4.0, 7.0 で検討したところ、pH1.5 で最適の染色性が得られることが確認された。従って、腎糸球体および傍尿細管血管内皮細胞の glycoalyx は酸性糖鎖であることが確認された。次に、慢性移植腎症・C4d 陽性移植腎患者の生検における染色性を正常腎と比較検討したところ、正常では糸球体内皮細胞、傍尿細管血管内皮細胞および尿細管細胞の brush border に染色性が認められるのに対し、C4d 陽性移植腎患者の生検では、糸球体内皮細胞の glycoalyx の染色性は保たれているにもかかわらず、傍尿細管血管内皮細胞ではほとんど染色性は失われていた。一方、慢性移植腎症の腎生検組織では、傍尿細管血管内皮細胞のみならず、糸球体内皮細胞においても染色性が失われていることが確認された。

慢性移植腎症の原因であるシクロスポリンが glycoalyx 傷害をきたすかどうか、さらに、glycoalyx に対して保護的に作用することが期待されるヘパリンの glycoalyx 傷害に与える影響についても検討を加えるために、ラットシクロスポリン腎症モデルを作成し、pH1.5 で鉄コロイド染色を行った。正常ラット腎に比して、シクロスポリン腎症では、糸球体内皮細胞

では染色性は保たれていたが、傍尿細管血管内皮細胞の染色性が失われていた。また、近位尿細管の brush border の染色性も失われ、傍尿細管血管内皮細胞および近位尿細管 brush border における glycocaryx 障害がシクロスポリン腎毒性によりもたらされることが示唆された。また、シクロスポリン腎症モデルラットをヘパリンを連日皮下投与したところ、上記の glycocaryx 障害は緩和されることが確認された。一方、シクロスポリン腎症モデルでは、糸球体における glycocaryx は変化を認めなかったため、糸球体基底膜における主たる酸性 glycosaminoglycan はヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)のシクロスポリン腎症モデルでの発現を検討した。正常ラットシクロスポリン腎症モデルラットヘパリン治療群のいずれも HSPG 発現に差を認めなかった。

D. 考察

近年、検査技術の進歩により、古典的血清学的交差試験によって検出できない微量の抗ドナーHLA抗体を flow cytometry cross match 法、シングルビーズ法などにて検出できるようになり、抗ドナー抗体関連拒絶反応の病態と臨床的病理解析が進みつつある。しかし、弱い抗ドナー抗体或いはリスト上ない抗体の検出は現存の方法では完全には検出できないことは、正確な測定を行う上で問題点となっている。ゲノム解読により遺伝子・タンパク質情報が整備され、様々な HLA 抗原が同定されてきている。また、それらの人種ごとの多様性の情報も整備されており、最新のバイオインフォマティクス技術を利用することにより、人種差、特異性、親和性、抗原性、安定性などを考慮した抗 HLA 抗体検出のための HLA 抗原設計も可能になってきている。さらに、優れたデータマイニング技術も開発され、複雑な抗体の交差反応データからでも、高精度の分類予測が可能となってきている。それに加え、エナジートランスファーなどを利用した簡便な Homogeneous な検出系が、検出機器の発展とともに次々に開発され、簡便性、感度、精度、スループット、コストなどが急激に改善されてきている。このような環境の中、本研究では、最新の遺伝子・タンパク質情報、バイオインフォマティクス技術、検出技術を高度に統合することにより、画期的な抗 HLA 抗体検出用プロテインチップの開発を行うことを目的としている。

①本年度、慢性移植腎症の発症に関わる抗 HLA 抗体診断用プロテインチップの開発のために、主に、パブリックに公開されている HLA に関する多様性の情報を収集し、日本人の多様性、抗原特異性、抗原性、安定性などを考慮し、検出に最適な HLA の抗原領域の決定を行い、代表的な HLA として、HLA-DR4 および HLA-A2 を選択し、これらを中心に研究を行った。HLA-DR4 および HLA-A2 に関して、日本人に多いアリルタイプと頻度を、公共のデータベースや論文情報をもとに調査し、それらの傾向から、ターゲットとするアリルを絞り込んだ。抗原設計のために、公表されているすべてのアリルのアミノ酸配列を用いてマルチプルアライメントを行い、ターゲット HLA のコンセンサス配列を決定した。HLA-DR4 および HLA-A2 が、他の HLA-DR や HLA-A に対し、特異的に検出できる領域を絞り込むため、HLA-DR および HLA-A 内でのマルチプルアライメントを行った。また、ターゲット HLA のアミノ酸配列の親水性、疎水性、抗原性、アクセスビリティなどを調査し、抗原としての適正を有しているかどうかを確認し、パブリックにある立体構造データベースを元に、設計した領域が、立体構造的に抗原として提示されやすい場所かどうか検討した。

今回、精製を行った5つのリコンビナントタンパク質は、回収率が悪いものの、比較的高純度で精製できているのが確認できた。銀染色の結果より、最終溶出画分のタンパク濃度は数 μ ~数十 μ g/ml 程度と推定され、トータル量で、数十 μ ~数百 μ g 程度あると考えられる。この量は、この後行う予定である抗原としての適正確認に、必要な量を満たしていた。しかしながら、回収率の悪さや、不溶化の問題が残っているため、タグの種類や場所、タンパク質のサイズ、抗原設計場所、精製方法、タンパク質発現系などの検討が、さらに必要と思われる。

②今回、免疫マイクロチップについて、光硬化性樹脂濃度、マイクロチャネルサイズ、樹脂硬化パターンニング、抗体固相化条件等諸条件の最適化を行なった。その結果、マイクロチップイムノアッセイによりヒト IgE 抗体の測定を行なうことができた。この測定感度としては、マイクロプレート法と同程度以上のものであり、しかも、総測定時間15分と従来法より短時間で完了し、操作も簡便であった。従って、この後行う予定である、HLA 抗原ミミックの適正確認

において、免疫マイクロチップは十分使用に耐えうると判断された。しかしながら、より高感度かつ定量的に抗HLA抗体の検出を行なうためには、蛍光検出系やビオチン-アビジン系等の検討が必要と思われる。また、さらに簡易かつ安価に取り扱いが可能となるようなチップデザイン、材質、検出装置などの検討が、さらに必要と思われる。

③移植腎拒絶反応の病態に、抗ドナー抗体関連とTリンパ球関連型、両者の混在型があることは周知のことであった。しかし、抗ドナー抗体関連型拒絶反応に関しては、移植直後の超急性拒絶反応と数日以内に発症する促進型拒絶反応を除いて臨床病理学的解析は行われていなかった。HLA検査法の改良と抗体関連型拒絶反応に関する傍尿細管毛細血管へのC4d陽性沈着など病理学的診断法の進歩により、抗体関連型拒絶反応の病態と臨床に関する知識が最近の10年間で劇的に進歩した。慢性移植腎症の発症には、抗体関連型慢性拒絶反応、とりわけ抗ドナー特異的抗体が深く関わっていると報告されている。抗HLA抗体産生機序の解明のために、ヒトHLA発現する動物モデルを用いる検討が必要となる。今回予定していたヒトHLA-B27 Tgラットの入手が困難であったため、自らヒトHLA-A2 Tgラットを作成することに変更した。当該ヒトHLA-A2 Tgラット作成するため、発現ベクターであるpCAGGSベクターにヒトHLA-A2(0201)およびヒト β 2-microglobulin (HuB2m) 遺伝子への組み換えを行い、各発現カセットを作製した。また、作成したpCAGGS-HLA-A2、pCAGGS-HuB2m発現カセットプラスミドを制限酵素切断後電気泳動による確認を行った。さらに、ハムスター卵巣由来細胞株のCHOを用いて、発現カセットの遺伝子導入を後の細胞表面のタンパク発現パターンについて検討したところ、細胞表面および細胞質内に僅かな発現が確認できました。今後、ヒトHLA-A2及びヒト β 2-microglobulin発現カセットを用い、Tgラットの作製に移る予定である。また、既に確立されたラット慢性移植腎症モデルであるF344 to Lewisへの腎移植系を基盤に、ヒトHLA-A2発現Tg F344ラットをドナーとし、Lewisラットに移植後、抗HLAクラスI抗体投与群とIgGコントロール抗体投与群を分け、抗ドナー抗体関連とTリンパ球関連型について、細胞・液性免疫の慢性移植腎症の関わりを明らかにしていく予定である。

④遺伝子改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 発現動物、特に本研究の主要な研究テーマである、移植臓器の慢性拒絶反応に於ける、抗主要組織適合抗原抗体の免疫学的意義を解明する為に、EGFP発現ラット、ならびにヒトHLA-A2発現ラットの果たす役割は大変大きいものと考えられる。特に、本研究の最終目標である、プロテインチップの移植医療への診断評価、応用研究には極めて重要である。

⑤慢性移植腎症に深く関わっているglycocalyx傷害の移植腎障害へ及ぼす影響の検討においては、正常ヒト腎生検組織、慢性移植腎症移植腎組織およびラットシクロスポリン腎症モデルを用いて、慢性移植腎症傷害の進展にglycocalyx障害が関与する可能性が示唆された。特に、慢性移植腎症における尿細管間質障害にシクロスポリンの腎毒性が関与していることが示唆された。

E. 結論

①本研究で精製した5つのリコンビナントタンパク質 (DRB4-1、DRB4-2、DRB4-3、A2-2、A2-3) を用いて、実際に抗原としての適正評価を行うこととした。今回、カイコ蛹破碎後可溶化した溶液の1/7を用いて精製を行ったので、適正評価の結果、抗HLA抗体の検出系の検討に利用できるものであれば、残り全部を精製し、研究に用いる予定である。また、回収率の悪さや、不溶化の問題の解決策の検討も行う予定である。さらに、他のHLA抗原の設計も必要に応じて行っていく予定である。

②抗HLA抗体を正しく検出するため、HLAタンパク抗原基板上の固相化および抗体認識部位構造の保持等の予備実験として、免疫マイクロチップ法にてマイクロチップイムノアッセイによりヒトIgE抗体の測定を行なうことができた。

③抗HLA抗体産生機序の解明のために、ヒトHLA-A2トランスジェニックラット作成するための遺伝子発現カセットの作製および遺伝子発現の確認ができた。このシステムを利用した移植モデルラットの作製が成功すれば、抗HLA抗体産生機序の解明において大きく貢献できるものと思われる。

④EGFP発現動物に於ける、EGFPのマイナー抗

原としてしての振舞を、免疫学的に明らかにする目的で、二種類の EGFP 発現ラットの評価を行った。F344 を基本とする EGFP 発現ラットでは、移植免疫学的な反応が、細胞傷害性 T 細胞の活性化によってのみ検出されること、SD ラットを起源とする DA ラットへの戻し交配法では、SD 由来マイナー抗原の可能性は除外出来ないが、心臓移植モデルでは、慢性拒絶反応を示す事が明らかとなった。今後、EGFP を標的とした慢性臓器移植モデルを確立し、ヒト HLA-A2 発現ラットとの交配により、慢性臓器拒絶反応に於ける抗 HLA 抗体の診断意義を更に詳細に解析する。

⑤移植腎における glycocaryx 障害は、移植腎傷害のマーカーとなる可能性がある。

本年度は、主に上記 5 つのテーマにおいて、研究を進めてきた。プロテインチップによる抗 HLA 抗体の検出およびその発生機序の解明ができれば、慢性移植腎症の発症に関わる抗体関連型慢性拒絶反応の病態が解明され、移植腎障害機序の最大の危険要因である拒絶反応の予防と治療対策において非常に有用である。本研究の成果は移植腎永久生着の可能性を広げる画期的な診断法・治療法であると考えられ、今後テーラーメイドの移植医療の確立および腎移植の発展に寄与することが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawasaki M, Iwasaki M, Koshiha T, Fujino M, Hara Y, Kitazawa Y, Kimura H, Nomura K, Uemoto S, Li X-K, Tanaka K. Gene-expression profile analysis of the peripheral blood mononuclear cells from tolerant living donor liver transplanted recipients. **Int Surg** (In press).

2) Pan X-C, Guo L, Deng Y-B, Naruse K, Kimura H, Sugawara Y, Makuuchi M. Further Study of Anti-ICOS Immunotherapy for Rat Cardiac Allograft Rejection. **Surgery Today** (in press).

3) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Kimura H, Takahara S, Nakayama T, Ezaki T, Li X-K. Survival of skin allografts is prolonged in mice with a dominant-negative H-Ras.

Transpl Immunol 18(4):302-6; 2008.

4) Morita M, Fujino M, Li X-K, Kimura H, Nakayama T, Taniguchi M, Sugioka A. Spontaneous tolerance involving natural killer T cells after hepatic grafting in mice. **Transpl Immunol** 18(2): 142-5; 2007.

5) Hara Y, Funeshima-Fuji N, Fujino M, Tokunaka K, Abe F, Sato Y, Hatakeyama K, Takahara S, Ezaki T, Kimura H, Li X-K. A novel chemical compound, NK026680, targets dendritic cells to prolong recipient survival after rat liver grafting. **Transplantation** 84(3):407-414; 2007.

6) Kitazawa Y, Fujino M, Wang QX, Kimura H, Azuma M, Kubo M, Abe R, Li X-K. Involvement of the PD-1/PD-L1 pathway in CD4+CD25+ regulatory T cells activity to suppress alloimmune responses. **Transplantation** 83(6):774-782; 2007.

7) Satoh E, Li X-K, Hara Y, Ogata K, Guo L, Kitazawa Y, Funeshima-Fuji N, Satoh T, Miyagi T, Sugiura W, Yamamoto N, Teramoto K, Arii S, Kimura H. Sensitization to enhanced green fluorescence protein minor histocompatibility antigen by gene transduction into dendritic cells and peritoneal macrophages. **Transplant Immunol**. 2007; 18: 73-84.

8) Imamura, R., Y. Isaka, N. Ichimaru, S. Takahara, and A. Okuyama. 2007. Carbamylated erythropoietin protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury without stimulating erythropoiesis. **Biochem Biophys Res Commun** 353:786-792.

9) Imamura, R., T. Moriyama, Y. Isaka, Y. Namba, N. Ichimaru, S. Takahara, and A. Okuyama. 2007. Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1alpha. **Transplantation** 83:1371-1379.

1 0) Takabatake, Y., Y. Isaka, M. Mizui, H. Kawachi, S. Takahara, and E. Imai. 2007. Chemically modified siRNA prolonged RNA interference in renal disease. **Biochem Biophys Res Commun** 363:432-437.

1 1) Xue, F., Y. Isaka, S. Takahara, R. Imamura, C. Suzuki, N. Ichimaru, P. Michieli, and T. Takahara. 2007. HGF-MSP chimera protects kidneys from ischemia-reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun** 363:451-456.

1 2) Isaka, Y., Y. Takabatake, S. Takahara, E. Imai. 2007. Gene therapy targeting kidney disease. **Res. Adv. in Nephrol Dial Transplant** 1: 15-23.

1 3) C. Suzuki, Y. Isaka, Y. Takabatake, H. Tanaka, M. Koike, M. Shibata, Y. Uchiyama, S. Takahara, and E. Imai. 2008. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. **Biochem Biophys Res Commun** 368:100-106.

1 4) 高原 史郎 腎臓移植の成績は本当に向上したのか **臨床泌尿器科** vol. 6 no. 12 95-101, 2007

1 5) 清水一彦、江崎太一： マウス転移腫瘍モデルにおける脾臓内リンパ管分布の特徴、**リンパ学**, 30 巻 : 49-52, 2007.

2. 学会発表

1) Funeshima-Fuji N, Fujino M, Kimura H, Nakayama T, Ezaki T, Takahara S, Li X-K. Attenuate alloimmune response by blockade ras/mitogen-activated protein kinase pathway in T cell. 13th Congress of the European Society For Organ Transplantation World Transplant Congress 2006; Prague, Sept. 30 - Oct. 4, 2007.

2) Adachi K, Kitazawa Y, Kimura H, and Li X-K. Selective Targeting of Regulatory T cells with Superagonistic anti-CD28 antibodies promotes experimental transplantation tolerance. The 42nd World Congress of

International Society of Surgery, Montreal, Aug. 26-30, 2007.

3) 李 小康、北沢祐介、東 治人、猪阪義隆、高原史郎 活性化FoxP3陽性Treg細胞の動態および免疫反応抑制の機序について 第35回日本臨床免疫学会総会 大阪 平成19年10月18日-20日.

4) 原義明、舟島直子、徳中一寛、安部史紀、佐藤好信、畠山勝義、木村廣光、李 小康 新規免疫抑制化合物NK026680:その樹状細胞を介した免疫抑制メカニズムの検討 第107回日本外科学会定期学術集会 大阪 平成19年4月11日-13日.

5) Horiuchi Y, Otsu M, Kiyokawa N, Migita O, Ogata T, Li X-K, Onodera M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Nakauchi H, Kuratsuji T. TOWARDS CLINICAL GENE THERAPY FOR CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE: OPTIMIZATION OF GENE TRANSDUCTION INTO HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS 第13回日本遺伝子治療学会 名古屋 平成19年6月28日-30日.

6) 北沢祐介、猪阪義隆、高原史郎、李 小康 GvHDの発症およびSuperagonistCD28抗体の抑制効果におけるFoxP3陽性Treg細胞の動態 第34回日本臓器保存生物医学会定期学術集会札幌 平成19年11月16-17日.

7) 北沢祐介、李 小康、猪阪義隆、高原史郎 SuperagonistCD28抗体によるTreg細胞の増殖とGvHDの抑制効果 第43回日本移植学会総会 仙台 平成19年11月22日-24日.

8) Haba R, Tsuji A, Li X-K, Fuji-Funeshima N, Nozawa I, Kimura H. Expression of Foxp3 in a subset of rat dendritic cells (DCs), plasmacytoid DC, generated from a long-term culture of bone marrow cells (BMC) driven by FLT3-ligand and IL-6. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle, Washington, May 30-June 3, 2007,

9) Haba R, Tsuji A, Li X-K, Fuji-Funeshima N, Nozawa I, Kimura H. Further study of gene transduction into a subset of rat dendritic

cells (DC) generated from a long-term culture of bone marrow cells: Apparent resistance of plasmacytoid DC to gene transduction by adenoviral vectors. The 10th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Seattle, Washington, May 30-June 3, 2007,

1 0) Haba R, Fuji-Funeshima N, Tsuji A, Li X-K, Nozawa I, Kimura H. Expression of Foxp3 in rat plasmacytoid dendritic cells (DCs) generated from a long-term culture of bone marrow cells (BMC) driven by Flt3-ligand and IL-6. The 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, August 21-25, 2007.

1 1) 高原史郎 臓器移植法とコーディネーター実務実施への影響について シンポジウム 第40回日本臨床腎移植学会 (石川県)

1 2) 高原史郎 腎臓疾患の診断学の向上と治療学の確立 講演 第18回東海北陸腎不全治療研究会 (名古屋市)

1 3) 高原史郎 大阪府で行われた腎移植に関する実態調査 統計調査報告 第68回大阪透析研究会 (大阪市)

1 4) 高原史郎 日本における腎移植とTDM セミナー 第56回日本医学検査学会 (宮崎県)

1 5) 高原史郎 免疫機序で語る異分野疾患「移植」 シンポジウム 第35回日本臨床免疫学会 (吹田市)

1 6) 高原史郎 生体腎移植の現状と適応 特別講演 大阪透析医会 (大阪市)

1 7) 清水一彦、江崎 太一: マウス転移腫瘍モデルにおける脾臓内リンパ管分布の特徴, 第31回日本リンパ学会総会・シンポジウム1, 仙台, 2007年6月8日

1 8) 北原秀治、江崎太一: B16メラノーマにおける腫瘍血管新生の特徴とその抑制機構の解析 第16回日本癌病態治療研究会、東京、2007年6月28日

1 9) Kitahara Shuji, Abe Hiroyuki, Ezaki Taichi. Characterization of abnormal angiogenesis in B16BL/6 melanoma. 1st Combined International Meeting for Japanese, American and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgens, Hawaii, October 10-13, 2007.

2 0) 江崎 太一 局所変化に伴う内皮と中皮の相関性は? 第113回日本解剖学会総会・シンポジウム13, 大分, 2008年3月27日

2 1) 遠藤千穂、江崎 太一、牛木辰男: アジュバント誘導性腹膜腫瘍の形態学的解析 第113回日本解剖学会総会, 大分, 2008年3月27日

2 2) Nakamura Ayako, Morikawa Shunnichi, Shimizu Kazuhiko, Ezaki Taichi. Reticuloendothelial system components act as a hematopoietic niche during extramedullary hematopoiesis in the liver. 第113回日本解剖学会総会, 大分, 2008年3月27日

2 3) 北原秀治、森川俊一、清水一彦、菊田幸子、江崎太一 B16BL/6 melanoma を用いた腫瘍血管新生の解析 第113回日本解剖学会総会, 大分, 2008年3月27日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) WO 2007/074756 免疫分析マイクロチップ、免疫分析用キット及び免疫分析方法

2. 実用新案登録

なし

3. その他

弱毒生ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究

所 属 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部
研究者 大隈 邦夫

研究要旨：

弱毒生ウイルスワクチンを代表して、痘そうワクチン LC16m8 の品質及び生産性向上に関する研究並びに安全性及び有効性に関する非臨床または臨床研究を行い、現行ワクチンの高い安全性と有効性を確認した。また、品質向上に関する検討課題を提案した。

分担研究者：

倉根一郎

国立感染症研究所 ウイルス第一部

佐多徹太郎

国立感染症研究所 感染病理部

森川 茂

国立感染症研究所 ウイルス第一部

西條政幸

国立感染症研究所 ウイルス第一部

高瀬凡平

防衛医科大学校 防衛医学研究センター

金谷泰宏

防衛医科大学校 防衛医学研究センター

齋藤智也

慶應義塾大学 医学部

横手公幸

財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部

A. 研究目的

乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 は、世界保健機関 (WHO) の天然痘撲滅活動で中心的な役割を果たした Lister 株をウサギ初代腎細胞で低温馴化することにより橋爪らが開発した国産の弱毒痘そうワクチンである。このワクチンは 1973～1974 年に種痘研究班により約 90,000 例の小児への接種が実施され、そのうち約 10,000 例については詳細な臨床症状観察が実施され、従来のワクチン株と比較して同等の有効性と高い安全性が確認された。1975 年には国の製造承認を得ている。しかしながら、翌年にわが国では痘そうワクチンの定期接種が中止されたため、このワクチンが世間一般に広く使用される機会はなく、更に、1980 年の WHO による天然痘撲滅宣言により法律的にも種痘 (痘そうワクチン接種) が廃止されたため、その後長い間製造されることもなかった。ところが、2001 年 9 月の米国同時多発テロ等により

世界情勢が変化し、生物化学兵器によるテロの危険性が高まっていることを受けて、天然痘ウイルスによる生物テロ対抗薬として、痘そうワクチン LC16m8 の再製造が行われている。

本研究では、弱毒生ウイルスワクチンを代表して、生物テロ対抗薬として国家備蓄用に製造されている痘そうワクチン LC16m8 について、品質、生産性の向上の研究並びに安全性及び有効性に関する非臨床及び臨床的な研究成績を取得することを目的とした。更に、LC16m8 株について最近の科学水準において必要な追加解析に関する調査を実施することも目的とした。このためには、国内外の痘そうワクチン及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、LC16m8 株に関する更なる科学的データを集積し、現行ワクチンの品質向上の検討課題を明らかにするとともに、非臨床及び臨床両面から安全性と有効性に関する成績を取得することを目的とした。

B. 研究方法

a) 弱毒生ウイルスワクチン (痘そうワクチン) の力価試験、特性解析、有効性及び安全性評価に関する研究-細胞培養痘そうワクチンの温度感受性試験法に関する研究-

昭和 55 年度より保存されている乾燥痘そうワクチンの力価推移データを解析し、ポック形成単位測定法の精度を調査した。感染研と化血研で、参照細胞培養痘そうワクチン、化血研製造の乾燥細胞培養痘そうワクチン 3 ロットを用いて、ポック形成単位測定法とプラーク形成単位法による力価測定の比較を行なった。

b) 皮膚合併症である種痘性湿疹のリスク評価動物モデルの構築検討

ヒトのアトピー性様皮膚炎と類似した症状を自然発症する NC/Nga マウスの耳介の皮膚炎部に、ワクチニアウイルス株 (WR, Lister) を塗布接種後 15 日間観

察し、観察期間中、体重測定、皮膚炎症状評価を実施した。接種後8日及び15日目に安楽死させ解剖し、左右の耳介及び左右の顎下リンパ節を採取した。各マウスの耳介及び顎下リンパ節について病理組織学的検査を行なった。

c) 弱毒生ウイルスワクチン（痘そうワクチン）の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究-細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究-

LC16m8株は、B5R遺伝子の変異によりVero細胞での増殖が極めて悪いため、Vero細胞で効率良く増殖し温度感受性に関してはLC16m8株と同等の性質を持つLC16m0株（m0#2）を用いた。m0#2および温度感受性クローンL0#6をVero E6細胞に感染後40.5°Cで培養してウイルスを回収し、Vero E6細胞に感染後35°Cで培養して高力価のウイルスを得た。この40.5°C培養、35°C増幅のステップを繰り返し5回行い、温度感受性のリバート出現の有無を検討した。また、非許容温度でのアポトーシス誘導等に関して検討した。

温度感受性のないクローンL0#4 DNAからPCRにより9-14kbpの全長をカバーするampliconを作製し、LC16m0株感染細胞に導入して温度感受性の相補が可能か否かにより責任遺伝子部位のマッピングを行った結果、ウイルス遺伝子のright側60kbp領域にマッピングされた。そこで、この領域をより詳細に検討した。

d) 細胞培養痘そうワクチンLC16m8の霊長類におけるサル痘発症予防：長期予防効果に関する検討
カニクイザルを用いたサル痘ウイルス感染動物モデルを用いて、高度弱毒痘そうワクチンLC16m8により誘導されるサル痘発症阻止効果が、長期にわたり維持されるか否かを検討した。具体的には、3頭のカニクイザル（LC16m8群）にLC16m8を投与し、その6ヶ月後に 10^6 PFUのサル痘ウイルスZr-599株を皮下接種経路で感染させた。また、2頭（Lister群）には天然痘ワクチンLister株を投与し、同様に処置した。1頭（Naive群）にはワクチン投与せずにZr-599株を感染させた。

e) 痘そうワクチンLC16m8の疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

1. 痘そうワクチンLC16m8接種者における心膜炎副作用についての検討

約8000名の対象者に、LC16m8接種前、接種当日、接種後14日後に臨床症状を問診により評価した。また、血清troponin T値を接種前、接種後30日後に測定した。また、通常の12誘導心電図を接種前、接

種後30日、接種後90日に測定した。

2. Protein Chipを用いた痘そうワクチンLC16m8の免疫原性（抗体特異性を中心）についての調査

成人における痘そうワクチン接種者のうち善感と判定された者より、4世代（A群：1975年以降の出生、B群：1969-1975年の間に出生した者、C群：1962-1968年の間に出生した者、D群：1961年以前に出生した者）に分けて対象者を抽出し、接種前および接種後30日における血清を得て中和抗体価の測定を行った。中和抗体価の測定はPlaque Reduction Neutralization Testにより行い、50%のプラーク減少時の抗体価を算出した。前出のC及びD群の対象者中、 $PRN_{LC16m8}^{post}/_{pre} < 4$ かつ $PRN_{dryvax}^{post}/_{pre} > 4$ を満たす者を対象とし、米国の試験受託機関ImmPORT社に委託してワクチニアウイルス株WRを抗原とするProtein chip解析を実施した。比較対照群として北米のワクチニア免疫グロブリン（VIG）を用いた。

f) 有効性の維持の基礎的検討

乾燥細胞培養痘そうワクチンLC16m8の安定性評価を行い、長期保管安定性に関するデータを取得した。さらに、精度の高い品質試験成績を蓄積するために、力価試験法やマーカー試験等生ウイルスに関わる主要な検査項目についての検討を行った。

g) 動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究

国内外の痘そうワクチン製剤及びワクチニアウイルスの研究動向を調査評価し、現在日本の国家備蓄用に製造されている痘そうワクチンLC16m8について動物モデルを用いて想定されるワクチンの使用時（早期免疫、免疫持続）に関する有効性評価の検討を行った。加えて、今後検討すべき検討課題を明らかにした。

C. 研究結果

a) 弱毒生ウイルスワクチン（痘そうワクチン）の力価試験、特性解析、有効性及び安全性評価に関する研究-細胞培養痘そうワクチンの温度感受性試験法に関する研究-

20年以上にわたって保存されている、乾燥痘そうワクチンの経年力価推移を二次回帰すると $R^2=0.93$ と高い値を示した。しかし、SD値がボックス形成単位測定法の許容誤差範囲の0.3以上の年度があることが明らかになった。ボックス形成単位測定法とプラーク形成単位法による力価測定の比較では、

平行線定量法による参照細胞培養痘そうワクチンに対する相対力価は、両測定法でほぼ一致した。ばらつきはプラーク法が優れていた。相関解析から、両測定法は有意な相関を示したが、両測定法による力価はプラーク法の方が若干高かった。

b) 皮膚合併症である種痘性湿疹のリスク評価動物モデルの構築検討

ヒトのアトピー性様皮膚炎と類似した症状を自然発症する NC/Nga マウスを用いて、種痘性湿疹リスク評価動物モデルを構築するための検討を実施した。アトピー性様皮膚炎部へ塗布接種した結果、WR 接種群において耳の皮膚病変の悪化（潰瘍、痂皮形成とそれに伴う好中球浸潤）や接種部位からのウイルス伝播（自家接種）が見られた個体があった。また、その病理組織学的検査において、ワクシニアウイルス感染を示唆する封入体様の変化が接種部位以外でも認められた。これらの結果より、本法で採用した WR ウイルスと皮膚病変部への塗布接種の組合せにより種痘性湿疹誘導の可能性が示唆された。

c) 弱毒生ウイルスワクチン（痘そうワクチン）の力価試験、特性解析、遺伝子機能解析に関する研究-細胞培養痘そうワクチンの温度感受性に関する研究-

LC16m8 株の温度感受性に関する遺伝子、非許容温度での増殖率の低下の機構を明らかにするために、Vero 細胞で効率良く増殖する LC16m0 株を用いて温度感受性の安定性、責任遺伝子のマッピング等に関して解析した結果、LC16m0 株の温度感受性は極めて安定した性質であることが分かった。m0#2 を L0#4 の遺伝子で相補させて得た温度非感受性ウイルス感染細胞でアポトーシス遅延効果が見られた。また、ある阻害剤処理により、非許容温度で m0#2 による CPE の出現が認められた。温度感受性責任遺伝子のマッピングでは、ウイルス遺伝子の right 側 60kbp 領域に複数の温度感受性責任遺伝子があることが分かった。さらに詳細に検討すると nuc 135k-150kbp と nuc 159k-170kbp の領域に責任遺伝子が存在した。

d) 細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予防：長期予防効果に関する検討

サル痘発症予防効果が長期間持続するか否かを検討した結果、Naive 群個体では重篤なサル痘を発症したが、LC16m8 群では、サル痘ウイルスの接種部位に軽い潰瘍が認められるのみで、それ以外のサル痘症状は認められなかった。さらに、Lister 群では、サル痘ウイルス接種部位に紅斑が認められたものの、潰瘍性病変は認められず、サル痘症状は全く認められなかった。LC16m8 の霊長類におけるサル痘発症予

防効果は比較的長期にわたり持続することが確認された。

e) 痘そうワクチン LC16m8 の疫学的有効性及び安全性評価に関する研究

1. 痘そうワクチン LC16m8 接種者における心膜炎副作用についての検討

痘そうワクチン LC16m8 を接種した約 8000 名の成人を対象に、心膜心筋炎の頻度につき、臨床症状、血清 troponin T 値及び心電図所見から再検討した結果、全対象者中、心膜心筋炎を示唆する臨床症状を有する者は認められなかった。また、内 346 名については、無症候性の LC16m8 被接種者には血清 troponin T 値の異常 (>0.01 ng/ml) を認める者や心膜心筋炎に特徴的な ST 上昇等の心電図所見は認められなかった。

2. Protein Chip を用いた痘そうワクチン LC16m8 の免疫原性（抗体特異性を中心）についての調査

痘そうワクチン接種履歴の異なる対象者の既存免疫に与える LC16m8 の影響を評価するために、WR 株を抗原ウイルスとする Protein Chip を用いて抗体の抗原認識解析を行った結果、1970-1975 年に出生した群 (B 群) については A27 に対して、1969 年以前に出生した群 (C、D 群) は A10、H3、D13、I1 に対して強い反応性を示した。

LC16m8 ワクチン接種後 (A 群)、Lister 接種後 (B 群の LC16m8 接種前)、Lister 接種後に LC16m8 ワクチンでブースター接種をする場合 (B 群の LC16m8 接種後) で、強く惹起される抗体サブセットの共通性は高く、また、VIG や天然痘罹患後の血清との主要抗原の共通性が高かった。

f) 有効性の維持の基礎的検討

痘そうワクチンの長期保管における安定性評価に関する検討を行った結果、旧千葉血清研究所製造の国家備蓄終了品では最長 60 箇月目まで、化血研製造ロットでは最長 24 箇月目まで明らかな力価低下等の品質の変化は認められなかった。合せて、ゴム栓の凍結保管安定性を日局 15 の輸液用ゴム栓試験法に従い評価した結果、溶出液の性状、泡立ち、pH、KMnO₄、蒸発残留物、紫外吸収スペクトルについて異常は認められなかった。また、精度の高い品質試験成績を蓄積するために、力価試験法やマーカー試験等、生ウイルスに関わる主要な検査項目についての検討を行った。

g) 動物モデルを用いた痘そうワクチンの安全性及び有効性に関する基礎的研究

再製造した痘そうワクチン LC16m8 を用いて実施した有効性評価動物実験において、LC16m8 ワクチンは天然痘撲滅に使用された Lister 株と同様に、単回投与で免疫後早期からの高い防御効果とその効果を長期間持続可能な優れた痘そうワクチンであることを示す成績が得られた。その免疫後早期の感染防御効果は、細胞性免疫を主要な役割を担い、加えて非特異的な自然免疫の関与を示唆する成績を得た。

D. 考察

本研究では、弱毒生ウイルスワクチンを代表して、乾燥細胞培養痘そうワクチン LC16m8 の品質向上及び生産方法の研究、並びに安全性及び有効性に関する非臨床または臨床的研究を実施した。

まず、LC16m8 株の特性解析については、温度感受性の解析とその責任遺伝子の探索を実施し、LC16m8 株の温度感受性は極めて安定な形質であり、その責任遺伝子は2つ以上存在することを示唆する成績を得た。今後の研究により、温度感受性遺伝子の同定とそれに続く LC16m8 株の安全性機序(弱神経毒性等)の解明が期待される。

動物モデルを用いた安全性リスク評価については、構築検討を継続中の種痘性湿疹評価動物モデルは、近年増大しているアトピー性様皮膚炎や湿疹患者及びその既往歴者に対する本ワクチンの安全性リスク分析ツールとして期待される。

健康成人への使用実績においても、過去小児で行われた臨床研究の結果を良く再現する LC16m8 ワクチンの高い安全性を示す成績を得た。更に、今回の疫学的調査で臨床症状、血清検査(Troponin T 測定)、心電図より実施した心膜炎副作用の詳細調査において、異常が確認されなかったことから、近年米国で問題となっている NYCBH 株由来のワクチン接種に起因する心筋炎に対するリスクが LC16m8 では低い可能性が示唆された。更に詳細な心電図所見の検討を行い、コントロール群との比較により LC16m8 接種群の心電図変化を明らかにし、無症候性心膜心筋炎の頻度の調査も今後行う予定である。

有効性評価においては、サルとマウスでの発症抑制効果評価実験が実施され、LC16m8 が天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回投与で十分な中和抗体が誘導されていない免疫後早期から高い防御効果を発揮し、その効果を長期間持続可能な優れた痘そうワクチンであることを示した。更に、その免疫後早期の感染防御効果は、細胞性免疫が主要な役割を担い、加えて非特異的な自然免疫の関与が示唆された。今後より長期的な評価成績(免疫後1年)を取得予定である。

次に、健康成人への使用実績においても、再製造した LC16m8 ワクチンは過去小児で行われた臨床研

究結果を良く再現する高い抗体陽転率を示した。更に、LC16m8 ワクチン接種により誘導される抗体の認識抗原は、過去の接種履歴(特に、使用されたワクチン株の抗原性)と関連することが示唆された。なお、天然痘ワクチン LC16m8 による初回接種、過去の Lister 株による接種、LC16m8 によるブースター接種で上昇する抗体プロファイルは、VIG や天然痘罹患後の抗体プロファイルと主要な抗原について高い共通性を示しており、LC16m8 ワクチンの天然痘に対する防御効果を支持する結果が得られた。

製造・品質管理工程における研究では、生物学的製剤基準に示されている現行のマーカー試験である増殖温度感受性試験や力価測定試験法について、最近の科学水準での再解析・評価が実施され、代替試験法の提案がなされた。特に、痘そうワクチンの力価試験法等の代替試験法検討では、本研究で得られた成績をもとに、生物学的製剤基準の改正の方向で検討を進めた結果、平成20年度の改正により、ブランク試験法が採用される見通しとなった。更に、マーカー試験のボックサイズを測定する試験法でも、発育鶏卵を使用するため、マーカー試験の代替法も早期に結論を出して生物学的製剤基準の改正に関する提案をする必要がある。

製剤の保存安定性評価については、乾燥細胞培養痘そうワクチンは、生物学的製剤基準に既定されている -20°C 以下で保存した場合、規格試験に関しては60箇月までは安定であることが示されたが、ワクチンの品質を担保するためには、安全性を評価するための追加試験法の構築検討や力価試験法及びマーカー試験等の試験方法の更なる向上が望まれる。

E. 結論

2002年より化血研で製造され生物テロ対抗薬として国家備蓄されている痘そうワクチン LC16m8 は、近年、健康成人へ接種されているが、過去の小児での臨床研究成績と同様に、種痘後脳炎、皮膚合併症や心筋炎などの重篤な副作用は発生しておらず、高い安全性が再確認されている。

有効性については、サルやマウスを用いた感染・発症阻止実験を実施し、この LC16m8 ワクチンが天然痘撲滅時に主力を担ったワクチン株である Lister 株と同様に、単回投与で免疫後早期から高い防御効果を発揮し、その効果を長期間持続可能な優れた痘そうワクチンであることが示された。また、健康成人への使用実績においても、高い抗体獲得率を示した。

痘そうワクチン LC16m8 は長期保存しても力価は安定であることが示されたが、長期保管後のワクチン品質の担保に関しては、今後も品質確認に重要な試験法の精度向上や追加試験法の確立等の検討が必

要である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

特に無し。

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子 の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
研 究 者 井上 達

研究要旨 チオレドキシシン (TRX) など抗酸化反応性活性酸素種消去分子の作用過程における分子レベル、細胞生物学レベル、及び個体レベルでの生体異物反応への関与を、スルフォラファンを共通修飾モデル物質として基盤的検討を行い、別途推進しているニュートリジノミクスの基本情報と併せて、抗酸化活性酸素消去過程における各レベル毎の分子シグナルの解明と、遺伝子発現情報との統合を達成する。これと平行して、酸化ストレスの関与が知られる脳虚血障害、糖尿病などの疾患や老化に対する抗酸化効能を有する化合物や抽出物の効果的なスクリーニングを行い、新たな医薬品の開発の展望を明らかにする。以上を基軸として、TRX 誘導物質のスクリーニング (現在ヨモギ凍結乾燥物を中心に検討)、及びバイオマーカー検索のための電気化学発光免疫測定法を用いた測定系の開発、並びに先行商品開発の一環としての健康食品並びに電解還元水の開発を各部門間で相互協力の下に有機的に推進している。

分担研究者

- | | |
|------------------------|------|
| (1) 京都大学ウイルス研究所 | 淀井淳司 |
| (2) レドックス・バイオサイエンス株式会社 | 杉田憲治 |
| (3) 三光純薬株式会社 研究開発部 | 藤松慎一 |
| (4) 常盤薬品工業株式会社 開発研究所 | 森岡恒男 |
| (5) 日本トリム | 樺山 繁 |

A. 研究目的

高齢化社会への移行に伴い、脳虚血障害、糖尿病などの生活習慣病を持っている人口が増加しており、高齢者がよりよい健康を保ち、社会活動を行うことがこれからの社会には必要である。生活習慣病や老化には酸化ストレスが関与していることが知られている。内因性の抗酸化物質を誘導することにより、これらの病気や老化の進行を遅らせることが期待できる。本研究では、そうした視点から、抗がん性、抗老化作用で知られる酸化ストレス応答性活性酸素種消去分子、とくにチオレドキシシン (TRX) 類の高発現を促す物質を探索するためのTRX誘導機構の解析研究並びに、TRX類誘導過程における生体異物各種相互作用に関する基盤研究と、誘導物質のスクリーニング、バイオマーカーの確立と測定系並びに機能評価系などの応用研究開発の両面から研究をすすめ、身体の活性を惹起し、身体・皮膚の老化を予防し、健康寿命の延伸に資する医薬品開発や健康増進食品の開発を目的としている。尚、対応する生体の遺伝子解析をすすめ

るニュートリジノミクスによる遺伝子プロファイリングのデータベース化も補助金型基盤研究として同時に推進する。

具体的な研究課題としては、創薬課題基盤研究では、第一にTRXなど抗酸化活性酸素種消去分子の作用過程における生体異物相互作用について、個々の分子レベルの研究、特にTRXに關与するセレンを含む微量金属の挙動解析、細胞生物反応レベルでの研究、特にマクロファージなど、及び個体レベルでの研究、特に活性酸素種消去関連遺伝子改変動物における反応性研究を国立医薬品食品衛生研究所 (衛研) 受託研究として実施する。創薬課題基盤研究の第二には、本研究に傾注されるTRX誘導物質の探索研究との表裏一体の関係をもって誘導機構を解析する基盤研究を実施する。酸化ストレスが関与する脳虚血障害・糖尿病などの疾患や老化などに対する防護作用を有する新たな医薬品の開発を目指す。即ち、TRXの発現はPC12細胞において神経成長因子NGFによって誘導され、その誘導の調節にはcyclic AMP応答配列および転写因子CREBが重要であることを明らかにした。さらに、NGFによるPC12細胞の神経突起の伸長およびNGFによるシグナル伝達にTRXが役割を果たす。TRX遺伝子のヘミンや親電子化学物質による活性化機構には抗酸化物質応答配列antioxidant responsive element (ARE)を介した転写因子Nrf2による調節が重要である。TRX遺伝子は、グルタチオン系の酵素群、

第二相の薬剤代謝遺伝子群やヘムオキシゲナーゼ-1と共通の転写制御機構を持ち、TRXとこれらの遺伝子がある種の酸化ストレスに対して協調して生体防御に働いていることが考えられる。これらの事実をふまえて、1) TRXの作用の分子機構の基礎研究、2) TRXの様々な病態における防護作用の検討、3) TRX誘導物質の開発の検討を行うことを目的とする(誘導機構研究)。

他方、個別課題開発研究としては、誘導物質のスクリーニング系を開発する立場から、引き続いて化合物や天然物質抽出物由来の化合物のin vitro試験管内暴露系によるスクリーニングを行うこと(ライブラリー・スクリーニング)、TRXの遺伝子発現誘導性を有する候補物質のスクリーニングに関連して対応するバイオマーカーの検索とハイスループットな測定系の開発を進める研究(バイオマーカーと測定系開発)、抗酸化分子の発現を促す抽出成分や候補物質の有効性開発、即ち、食品はもちろん化粧品に酸化ストレス能を付与することは、皮膚の老化の予防や疾患の治療の補助に役立つと期待される。本研究では、生体内で酸化還元反応を制御するTRXに注目し、抗酸化物質や抗酸化誘導物質を配合した食品や化粧品の開発を目指すこと(有効性研究)、種々の評価エンドポイントを用いた抗酸化分子の機能評価法の開発、即ち新しい予防・治療医薬あるいは機能性食品、化粧品等の開発には、その機能の解析と評価法は不可欠であるので、TRXなどの抗酸化分子の発現と活性酸素除去作用、DNAレベルでの酸化損傷保護作用に着目した評価系を確立すること(評価法開発)の4課題を計画する。

尚、補助金型で推進するニュートリジノミクスは、モデル化学物質に対する生体反応として、チオレドキシンの遺伝子欠損動物や過剰発現動物における種々の酸化的ストレス対照物質の投与後のプロファイリングと対比しつつ、候補物質の発現遺伝子データベースを構築し、比較検討することにより、薬物創生研究のメカニズム解明への展望を同時に切り開き、ペプチドミミック創薬等への展望をも切り開くことの期待されるものである。

B. 研究方法

各研究課題の研究遂行方法としては、創薬課題基盤研究として、TRXなど抗酸化活性酸素種除去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析及び関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用(衛研受託研究)と、TRX誘導物質の解析(誘導機構研究)の2点を設定し、個別課題開発研究としては、TRX誘導物質のスクリーニ

ング(ライブラリー・スクリーニング)、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発(バイオマーカーと測定系開発)、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発(有効性研究)、抗酸化分子の機能性評価法の開発(評価法開発)の4課題を設定し、それぞれ分担協力の下に、以下の要領で研究を行った。

I. 創薬課題基盤研究

当研究課題としては、衛研受託研究と、京都大学ウイルス研究所 淀井研究室における補助金型研究による誘導機構研究、さらに補助金型で施行されるニュートリジノミクス研究の3課題から成る。

1 衛研受託研究 衛研受託研究では、TRXなど抗酸化活性酸素種除去分子の作用過程における関連微量元素の挙動解析及び関連分子高発現性食品や化学物質の探索と応用の課題の一環として、まず1-1. 研究対象物質となるモデル物質の選定に引き続き、1-2. 分子レベル、特に微量元素の挙動に関する研究、1-3. 細胞生物学的レベルでの取り組み、1-4. 個体レベルでの研究の4課題を設定した。即ち、

1-1 モデル候補物質の選定：抗酸化性の期待される種々の物質及び毒性参照物質としての化学物質、抗酸化参照物質としての化粧品、等を選定し、レドックス・バイオサイエンス社の開発した酵母アッセイ系などスクリーニング系を用いて、モデルとなりうる候補物質を選定し、必要に応じて次年度以降の研究に取り組むこととした。

1-2 分子レベルでの研究：抗酸化システムで重要な役割を果たす金属酵素について、結合金属の側から、HPLC/HR-ICP-MS法(微量元素の超高感度分析装置である二重収束型ICP-MS(HR-ICP-MS)を、HPLCとオンラインで直結させた方法)を駆使し、微量元素の存在状態がTRX発現によって変動するか否かについて、酸化ストレスを与えない定常状態での野生型、過剰発現(TRX-Tg)マウスやノックアウト(TRX-KO)マウスで比較検討を行った。さらに、抗酸化ストレスに関連するS(硫黄)含有化合物につき、HPLC/HR-ICP-MSを用いた分析法の確立を目的とした。試料としては、酸化ストレスに対して感受性が高いとされる骨髄細胞及び肝臓を用いた。

1-3 細胞生物学的レベルでの研究：今年度は昨年度の基礎的検討の結果開発されたラット好塩基球白血病細胞(RBL-2H3細胞)を用い、酸化ストレスとしてt-BuOOHを添加して抗原添加時の β -hexosaminidase

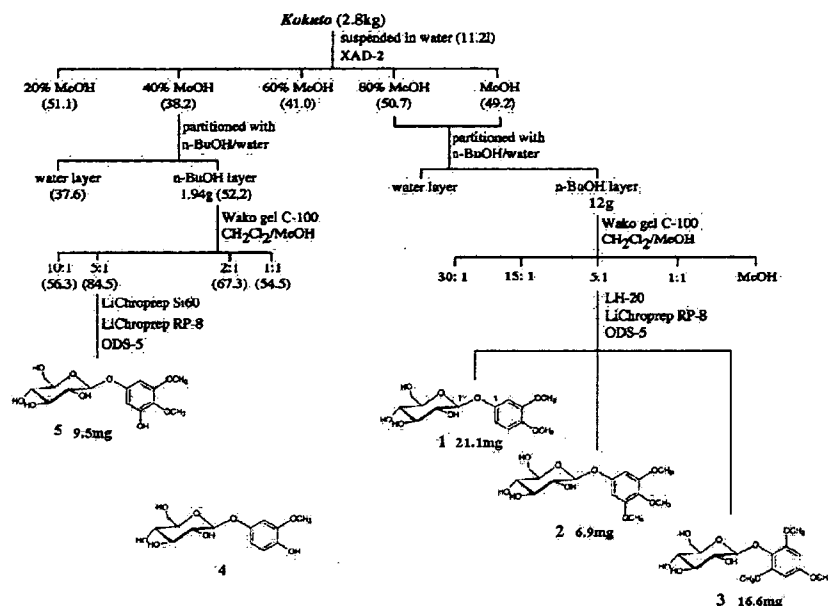


図 1: Isolation of compound 1-9

放出量を指標とする方法を *in vitro* スクリーニング法として選択した。また活性試験を行うサンプルとして抗酸化性を持つ成分を含有することが分担研究者から報告されており、かつ水溶性である黒糖を選択し、分担研究者の森岡氏(常盤薬品工業株式会社)より提供された黒糖抽出物 (0-10 mg/mL) または琉球大学農学部和田教授、高良助教より提供を受けた黒糖由来成分 (図 1 : 1-5¹) を *t*-BuOOH と同時添加し、 β -hexosaminidase 放出抑制効果を指標として活性試験を行った。

1-4 個体レベルでの研究: 酸化ストレスの生体異物応答を個体レベルで明らかにすることを目的として、TRX に注目し、このものの過剰発現マウスやノックアウトマウス、それぞれの実験動物を導入し、まず自然状態におけるそれらの育成経過など、基礎的実験条件の採取をおこなうこととした。尚、実験動物は、いずれも淀井教授の下で作成され、衛研に供与されたものであり、C57BL/6 背景で作成され、当所にて 20 代以上にわたって系統維持をしているヒト TRX 導入 Tg マウス、及び I29 系統で作成された後、当所にて 20 代以上にわたって C57BL/6 背景に戻し交配して系統維持している TRX-KO マウス (ヘテロ欠失: ホモ欠失マウスは胎生致死) を用いることとした。さらに、TRX-Tg マウスの定常状態での遺伝子発現を野生型のそれと比較することで見出される

差異が、本研究課題におけるバイオマーカーの可能性であることを意図して、Affymetrix の Mouse Genome 430 2.0 Array (45,101 プローブセット) を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うこととした。

2 誘導機構研究 2-1.として、TRX 誘導物質の誘導機構解析を行う。このため、漢方薬や植物などの抽出成分について TRX の遺伝子発現誘導活性を指標に、誘導成分の抽出を行う。抽出物からの成分については有効成分の解析を行う。得られた候補物質についてその有効性を細胞レベルで検討する。さらに、細胞死、細胞増殖への検討を行う。2-2.として、TRX 関連分子遺伝子改変動物の作成を行い、発現形質の解析に正確を期する。

2-1 TRX 誘導物質の開発: 植物に含有される成分について TRX の遺伝子発現誘導活性を指標に K562 細胞などを利用したスクリーニングを行い、誘導成分の抽出を行った。抽出物からの成分については有効成分の解析を行った。得られた候補物質についてその有効性を細胞レベルで検討する。さらに、細胞死、細胞増殖への検討を行った。蛋白、mRNA 発現変動解析、傷害防護試験や動物での発現誘導の実験系において TRX の誘導について検討する。また、レドックス・バイオサイエンス社と共同で、これらの誘導候補物質の投与により、動物レベルでの誘導を検討する実験系の構築を行った。

2-2 TRX 関連分子遺伝子改変動物の作成と発現形質の解析: TRX の発現を低下させることにより、TRX がどのような生命現象や遺伝子発現の制御に関わっているかの分子機構を明らかにするために、TRX を

¹ 1: 3,4-dimethoxyphenyl- β -D-glucoside,
 2: 3,4,5-trimethoxyphenyl- β -D-glucoside,
 3: 2,4,6-trimethoxyphenyl- β -D-glucoside,
 4: 4-hydroxy-3-methoxyphenyl- β -D-glucoside,
 5: 3,4-dimethoxy-5-hydroxyphenyl- β -D-glucoside

過剰発現させた細胞やRNAi法によりノックダウンした細胞を用いて、細胞周期や細胞死に対する影響を観察した。さらにその機構の解析を行った。さらにTRXのnegative regulatorとして報告を行っている thioredoxin binding protein-2 (TBP-2)について、TBP-2ノックアウトマウス、TBP-2トランスジェニックマウスを作成しているが、これらのマウスにおけるTRXに対する影響の解析や代謝に及ぼす影響についての解析を行った。

- 3 **ニュートリジノミクス研究** ニュートリジノミクス (NGX) の探索に先立って、種々の遺伝子用量のTRX遺伝子改変動物を用いた定常状態におけるグローバル遺伝子発現のプロファイリングを整備することとした。TRX-KOマウス及びTRX-Tgマウス、それぞれのヘミアリル変異マウスを各3匹、またこれと同腹の野生型マウスをそれぞれ3匹ずつ、計12匹の大腿骨から別個に採取した骨髓細胞を用いて検索を行った。即ち、それぞれの検体から抽出した総RNAを鋳型として2本鎖cDNAを合成し、さらにこれを鋳型にビオチンラベルcRNAを合成、断片化を行い、Gene chipにハイブリダイゼーションさせて解析した。Chipは、AffymetrixのMouse Genome 430 2.0 Array (45,101プローブセット)を用い、Affymetrix GCS/FSにて測定することとした。

II. 個別課題開発研究

個別課題開発研究としては、TRX誘導物質のスクリーニング (ライブラリー・スクリーニング)、抗酸化分子関連の新規バイオマーカーに対する測定系の開発 (バイオマーカーと測定系開発)、抗酸化分子高発現を促す新しい健康増進食品の開発 (有効性研究)、抗酸化分子の機能性評価法の開発 (評価法開発) の4課題を設定した。即ち、

- 1 **ライブラリー・スクリーニング** 化合物や天然物質抽出物のソースから、TRX発現誘導活性を指標にした *in vitro* スクリーニング系によるTRX誘導物質の探索と、発現バイオマーカーの抽出を行う。スクリーニングされたTRX誘導物質候補は、培養細胞、実験動物への投与実験によってその有効性評価を検討する。また、様々な病態におけるTRX高発現の意義についても検討する。

具体的な研究課題としては、スクリーニング系および評価系を共有している京都大学ウイルス研究所と共同し、①TRX誘導物質のスクリーニング、及び②TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の

解明に関する研究を行った。

- 2 **バイオマーカー・測定系開発** バイオマーカー探索と測定系構築の準備の一環として、TRXの遺伝子発現誘導活性を有する候補物質のスクリーニングに関連して対応するバイオマーカーについて、1) 検索に必要な関連情報の収集、2) 測定系構築の準備を行うこととした。尚、TRXの測定法について、従来法である酵素免疫測定法 (ELISA) に対して、高感度でかつ広域にわたる濃度検出力を有し、ハイスループット測定に対応可能な電気化学発光免疫測定法 (electro chemiluminescence immuno assay: ECLIA) を原理とする自動免疫測定装置、ピコルミ®システムを用いた測定法の導入を検討することとした。方法の概略は、以下の通りである。即ち、抗ヒトADF (ATL-derived factor-11モノクローナル抗体) を結合した磁気感受性ビーズを固相とし、電気化学発光的变化で発光するルテニウム (Ru) 錯体を標識した抗ヒトADF-12モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ法にて検討した。また抗原は、遺伝子組み換えヒトTRX-1を用いた。実際の反応様式は、(第一反応) 抗ADF-11抗体固相磁気ビーズとTRX-1が結合する。B/F分離を行い、ビーズを洗浄した後、(第二反応) 抗ヒトADF-12抗体を反応させる。ビーズ洗浄後、電極上にて電気エネルギーを加えるとTRX-1を介してサンドイッチ状に結合したRu標識ADF-12抗体量に応じてルテニウム錯体が発光する。この発光量を測定することで、TRX-1の濃度が計測可能となる。
- 3 **有効性研究** 本年度はサトウキビから作った沖縄産黒糖 (含蜜糖) に含まれる非ショ糖成分の抗酸化性に注目した。イネ科多年草のサトウキビ搾汁を精製せずに加熱乾燥した黒糖は、ショ糖以外にもポリフェノール類など植物由来の成分を含み、その成分に由来する有用性として抗酸化性、脂質代謝改善、抗菌などが報告されている。また、黒糖は食品、化粧品、医薬品添加物として使用され安全性が高い。共同研究者に抗アレルギー活性の評価を依頼し、成分分析と分画を試みた。
① **沖縄産黒糖 (含蜜糖) に含まれる非ショ糖成分の精製** 沖縄産黒糖から非ショ糖成分を抽出し、その成分分析を行った。黒糖の非ショ糖成分は、定法に従い抽出した。すなわち、沖縄産黒糖5 kgを水 25 Lに溶解し、非極性ポリスチレン系樹脂 (アンバーライトXAD) に通じて非極性成分を吸着させ、水洗により水溶性の糖質を除去し、アルコール性溶媒に

より非シヨ糖成分を流出させ、減圧濃縮して、非シヨ糖画分として黒糖抽出物（以下、USE: Unrefined Sugar Extract）を得た。

② 黒糖抽出物の抗酸化能・抗アレルギー能の計測 抗酸化能評価として汎用される安定ラジカル 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) の還元能を指標としたスクリーニング系を用い、USEの抗酸化能を確認した。更に、得られたUSEについて、ラット好塩基球白血球細胞（RBL-2H3細胞）の脱顆粒抑制を指標としたスクリーニング評価を共同研究者（衛研）に依頼し、抗アレルギー活性を示唆する結果を得た。

③ 黒糖抽出物の精製 USEに含まれる上述の活性成分の特定を目指し、USEをLC/MSにより分析した。LC/MSのLC部は Waters 2525, 2767シリーズ、MS部は Waters/Micromass ZQ を用いた。分析方法として、黒糖抽出物を10%メタノールに溶解し、移動相として0.2%ギ酸/メタノール系のグラジエント法を用いた。USEを吸着樹脂によりさらに分画し、分画物の成分分析を行った。分画物と、含まれるフェニルグルコシド類について、共同研究者に抗アレルギー活性の評価を依頼した。

4 評価法開発 活性酸素除去作用およびDNA酸化損傷保護作用のあることが知られている日本トリム社製品の電解還元水と、TRXなどの抗酸化分子あるいはその活性誘導物質による、細胞レベルでの作用比較、相乗効果比較を、酸化ストレス下における活性酸素種（ROS）の消去能、DNA酸化損傷度、細胞死などを指標に行う。

日本トリム社製品の電解還元水は、その活性酸素除去作用およびDNA酸化損傷保護作用から、糖尿病誘発物質であるアロキサンの膵臓β細胞損傷の保護効果、血液透析誘発性赤血球機能低下抑制などに効果があることをこれまで報告してきた。また、活性酸素消去能をもつ白金ナノ粒子を添加すると、その作用が増強し、細胞のがん化を抑制することも明らかにしてきた。この電解還元水の活性酸素除去作用およびDNA酸化損傷保護作用を評価する系と、京都大学ウイルス研究所およびレドックス・バイオサイエンス株式会社が既に確立しているTRXおよびTRX誘導物質の評価系との関連づけのため、電解還元水とTRXあるいはTRX誘導物質の両評価系で検討する。また、電解還元水がTRXあるいはTRX誘導物質と相乗作用があるかどうかを検討する。今年

度は、溶媒に電解還元水を用いることで、蒸留水を用いるよりも、TRXの活性を高めることが出来るのか、以下3点を指標として検討した。①TRXによるインスリン還元活性、②血漿中でのTRXの二量体化、③培養細胞株を用いた胃粘膜細胞の保護効果試験。

（倫理面への配慮）

本研究では、野生型並びに人為的に遺伝子改変を施した動物を使用することによって、酸化的ストレスに対する生体影響を的確かつ他では得られない方法を駆使することで研究の目的を達成することを計画している。従ってここで用いられる実験動物の取り扱いについては、世界保健機関で動物を用いる生物医学研究のための国際指針を設け、これらに配慮するに至った動物愛護の問題に端を発して、動物の福祉の観点から必要な、動物の不安や苦痛の排除もしくは低減など、格段の配慮に努めることを要請されるに至った世界的背景に鑑みて、これを当申請者グループの研究にも全面的に取り入れて研究を推進することが求められている。こうした視点は、かねてより厚生労働省の努力を傾けている課題でもあり、その構成研究機関としての国立医薬品食品衛生研究所としての責任の上からも、本研究参加機関の各研究者にその理解と遵守を求めていくことが重要と考え、必要な小委員会の設置と定められた動物実験指針に基づいた研究遂行の趣旨説明などを実施し、もって動物実験に関する倫理面への配慮に努める方針をもって研究を実施した。

C. 研究結果

各研究課題について、それぞれ研究者の有機的な分担協力の下に研究を進め、以下の結果を得た。

1. 創薬課題基盤研究

- 1 衛研受託研究 受託4課題について推進し、以下の成果を得た。
 - 1-1 モデル候補物質の選定：抗酸化性の期待される種々の物質及び毒性参照物質としての化学物質、抗酸化参照物質としての化粧品、等を選定し、さらにレドックス・バイオサイエンス社の開発した酵母アッセイ系などスクリーニング系を用いて、モデルとなりうる候補物質を選定、必要に応じて次年度以降の研究に取り込むこととした。さしあたり物質の選定が進むまでの間、モデル物質として、スルフォラファン（CAS No. 4478-93-7）、ゲラニルゲラニルアセトン（CAS No. 6809-52-5）、並びにヘミン（CAS No.

16009-13-5) をスクリーニング対象に加え、以降の研究の参照物質とすることとした。選定したスルフォラファンは、入手の上、希望分担研究者への配分体制を準備した。

1-2 分子レベルでの研究：骨髄細胞ホモジネート上清を HPLC/HR-ICP-MS法により分析し、野生型、TRX-Tgマウス、TRX-KOマウス（ヘテロ欠失）間で比較した。TRX-KOでZnの結合量が多いピークが一本認められ、Znの結合量に興味をもたれたが、各群で大きな違いは見られなかった。次いで、低分子量のS含有化合物の分析条件の確立を行った。その条件を用いて骨髄細胞と肝臓の分析を実施した。両者において本質的にはS化合物は同じと考えられたが、骨髄細胞においてはGSH(trace)とGSSGに加えて未同定のピークが認められた。

1-3 細胞生物学的レベルでの研究：ラット好塩基球白血病細胞（RBL-2H3細胞）に対する黒糖抽出物の細胞毒性を検討した結果、4 mg/mLまでは細胞毒性を示さなかったが、5 mg/mLでは約50%の生存率を示し、7 mg/mL以上では生存率はほぼ0%だった（図2）。3回の試験のIC50の平均値は5.5 mg/mL、標準偏差は1.0 mg/mLであった。黒糖抽出物はバッファーに溶解すると黄色に発色し、 β -hexosaminidase放出量測定に影響を与える恐れがあるため、バッファーに溶解させた0-1000 μ g/mLの黒糖抽出物の405 nmの吸光度を測定したところ、50 μ g/mLまでは顕著な増加を示さなかったが、100 μ g/mLでは0.04、1000 μ g/mLでは約0.4と、明らかな影響が見られた。上記の結果より、 β -hexosaminidase放出量測定に影響のほとんどない、50 μ g/mL以下の濃度の黒糖抽出物を用いて活性試験を行った。すると濃度依存的に放出量が抑制され、50 μ g/mLでは約70%の抑制率を示した（図3）。3回の試験のEC50の平均値は25 μ g/mL、標準偏差は14 μ g/mLであった。なお、LDH放出量を測定して細胞毒性への影響も検討したが、黒糖抽出物は1000 μ g/mLの濃度でも細胞毒性を示さず、かつLDH放出量測定に影響しなかった。次に黒糖由来成分1-5について細胞毒性を検討した結果、黒糖抽出物より強い細胞毒性を示し、IC50は1が427 μ M、2が165 μ M、3が822 μ M、4.5が約7 μ Mと、4.5が非常に強い細胞毒性を示した（数字は図1に対応）。このうち、黒糖抽出物中にも含有されていることが報告されている3,4-dimethoxyphenyl- α - β -D-glucoside（図1：1）0-400 μ Mを用いて活性試験を行ったとこ

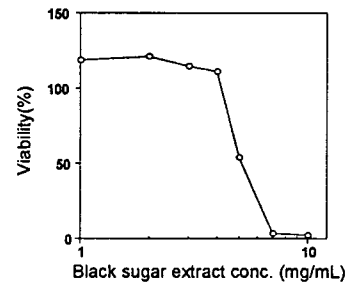


図2. Effect of black sugar extract concentration on viability of RBL-2H3 cells. Data are means of 3-6 data.

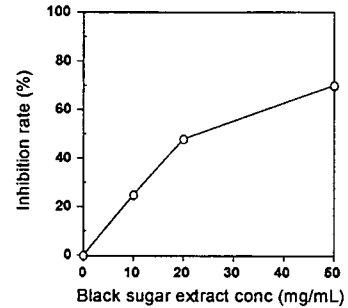


図3. Effect of black sugar extract concentration on inhibition rate. Data are means of 3 experiments.

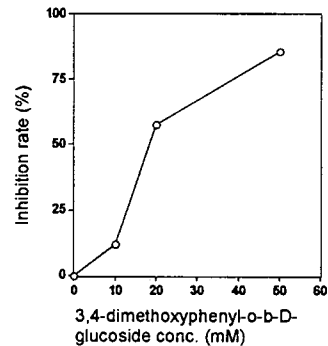


図4. Effect of 3,4-dimethoxyphenyl-O- β -D-glucoside concentration on inhibition rate. Data are means of 4 or 5 values.

ろ、細胞毒性の見られない50 μ Mまでは濃度依存的に放出量が抑制され、50 μ Mでは約86%の抑制率を示した（図4）。EC50は26 μ M (8 μ g/mL)であった。一方、100 μ M以上ではコントロールよりも β -hexosaminidase放出量が増加する傾向が見られた。

1-4 個体レベルでの研究：TRX-Tgマウスの造血前駆細胞数は、野生型に比べて有意に低値を示し、逆にTRX-KOマウスでは、野生型に比べてより未分化なCFU-S-13では有意に高値を示し、比較的分化型のCFU-S-9でも増加傾向にある（図5）。また、TRX-Tgマウスの造血幹細胞動態は、野生型に比べて抑制されていた（図6）。このTRX-Tgマウスの定常状態での遺伝子発現を野生型のそれと比較することで見出される差異が、本研究課題におけるバイオマーカーとなりうる可能性があることに着目して、昨年

度に引き続き、各遺伝型3匹の骨髓細胞由来の mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析を進めた。得られた発現強度について、データに付随する解析信頼度を考慮し、同一群内のデータ毎の補正処理をおこなったデータに基づく主要因解析の結果、遺伝型によって分離する要因をより感度高く見出すことができた (component #2: eigenvalue 1.135)。この要因に寄与率の高い遺伝子として843プローブセットを抽出した。また、3匹ずつの発現強度データによるT検定を行い、遺伝型による有意差 ($P < 0.001$) の見られた遺伝子として1,063プローブセットを抽出した。これら抽出した遺伝子リストは、Gene Ontology (GO) 解析により、酸化的ストレス関連分子を含むカテゴリーに特徴が見られたほか、p21^{waf1}を含む細胞周期関連分子17遺伝子、Bcl2関連分子を含む apoptosis 関連分子9遺伝子なども含まれていた。

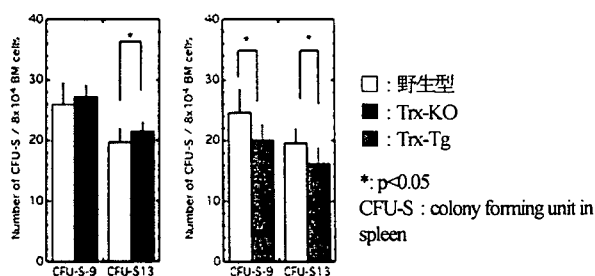


図5 TRX 遺伝子改変マウスの造血幹・前駆細胞数

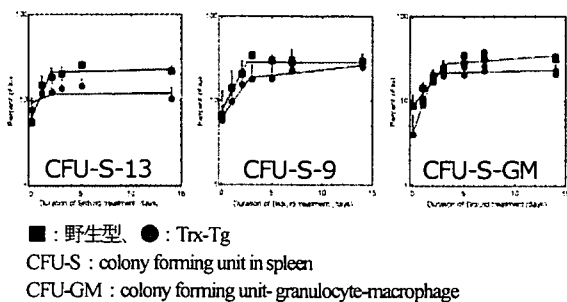


図6 TRX-Tg マウスの造血幹・前駆細胞動態解析

2 誘導機構研究

2-1 **TRX誘導物質医薬品の開発:** TRX誘導物質の誘導機構解析を行った。即ち、植物などの抽出成分についてTRXの遺伝子発現誘導活性を指標に、誘導成分の抽出を行ったところ、ヨモギおよび青じそからの抽出物に強い誘導活性を認めた。青じその抽出物について解析したところ、そのTRX誘導成分は、香り成分ペリラルデヒドであることを同定した。ペリラルデヒドは蛋白、RNA レベルでTRXを誘導し、

またマウスへの投与によっても誘導が見られた。その誘導体や他の香り成分を用いて、活性と構造連関について検討した。

2-2 TRX関連分子遺伝子改変動物の作成と発現形質の

解析: TRX関連分子遺伝子改変動物の作成を行った。即ち、TRXのノックダウンにより細胞周期停止が起こり、その機構は、細胞周期制御蛋白の発現調節によることを明らかにした。さらに、過酸化水素や抗癌剤シスプラチンによる細胞死を増強することを明らかにした。また、TBP-2トランスジェニックマウスにおいて、TRXのインシュリン還元活性が低下していることを明らかにした。さらにその糖および脂質代謝における形質を明らかにした。

3 **ニュートリジノミクス研究** ニュートリジノミクスの探索に先立って、個体差や年齢差などに起因するグローバル遺伝子発現プロファイリングや、種々の遺伝子用量のTRX遺伝子改変動物を用いた定常状態におけるグローバル遺伝子発現のプロファイリングの整備を進めた。さらに、昨年度に選定したモデル候補物質としてのスルフォラファンについて、野生型マウスへの投与を行い、定常状態における無処置マウスとの比較や、造血障害性機序に酸化的ストレスが関与することを明らかとしたベンゼン曝露に対して、急性応答から充分回復したあとの状態での比較を行うことで、ベンゼンの遷延性障害に対するスルフォラファンの効果についての予備検討を進めた。

II. 個別課題開発研究

1 **ライブラリー・スクリーニング** 市販品を中心にした植物に含有される成分について、K562細胞およびHepG2細胞を用い、TRX遺伝子発現誘導活性を指標にしてスクリーニングを行った。即ち、京都大学ウイルス研究所と共同し、①TRX誘導物質のスクリーニング、及び②TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の解明に関する研究を進め、以下の結果を得た。

① **TRX誘導物質のスクリーニング** これまでにTRX誘導活性が明らかになっているヨモギ抽出物は入手困難であるため、容易に入手可能で、安価な原料を用いることで、様々な食品等に利用できる可能性を示すために、新たな抽出方法で抽出した凍結乾燥サンプルと、現行のサンプルとに対し、K562細胞(ヒト慢性骨髄性白血病株)を用いてルシフェ

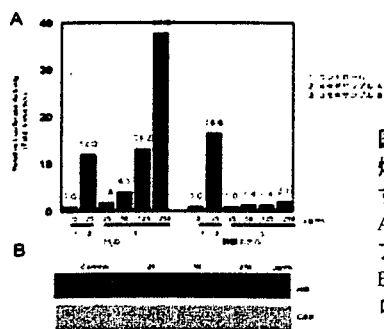


図7 ヨモギ凍結乾燥物はTRXを誘導する
A: ルシフェラーゼアッセイ
B: ウェスタンブロット法

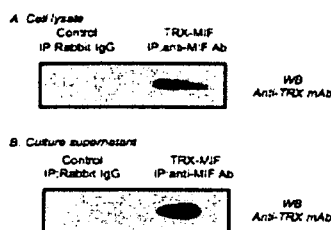


図8 免疫沈降法によりTRXとMIFはATL-2細胞内、細胞外で結合する
A: 細胞内画分、B: 培養上清

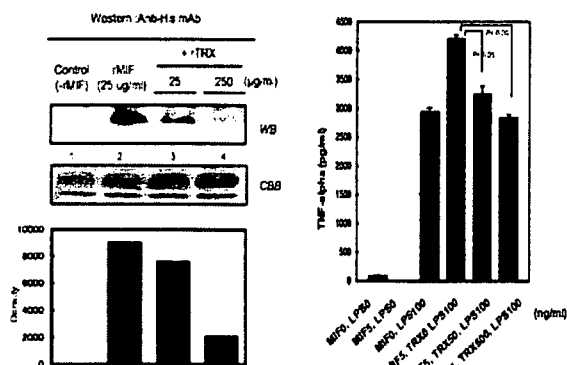


図9 TRXはMIFの細胞内取り込みを抑制する

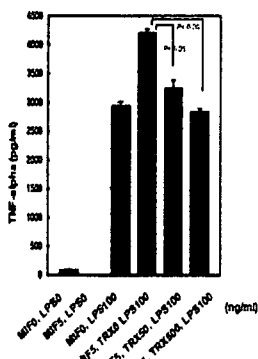


図10 TRXはMIFによるTNF-α産生を抑制する

レーザーアッセイにより比較した。その結果、水で溶解したサンプルでTRX誘導活性が顕著に見られた。また、現行のサンプルに対し、5倍以上の添加量で、同等の誘導活性が見られた。さらに、ウェスタンブロット法により、TRXタンパク質の誘導が確認された (図7)。

② TRXによるMIFを標的とした炎症制御機構の解明 TRXとMIFの相互作用を免疫沈降実験により確認した。その結果、ATL-2細胞内でTRXとMIFの相互作用を確認した (図8)。ATL-2細胞の培養液から牛血清アルブミンを除去し、培養することで細胞外にTRX、MIFが放出されることが知られており、本条件下で、細胞外に放出されたTRXとMIFの相互作用を免疫沈降実験により確認した (図8)。その結果、細胞外でもTRXとMIFは相互作用することが示された。また、表面プラズモン共鳴法を用いたBIAcoreによりTRXとMIFの濃度依存的な結合が確

認され、結合、解離速度および、アフィニティーをBIAevaluation software 3.1により解析した結果、 $k_a = 1.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, $k_d = 1.19 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, $K_D = 9.96 \times 10^9 \text{ M}$ であった。

次に、細胞内へのMIFの取込みをTRX存在下で確認した結果、TRX濃度依存的にATL-2細胞へのMIFの取込みを抑制した (図9)。

MIFによる炎症性サイトカインTNF-alphaの産生を調べるために、マクロファージ細胞(RAW264.7)を用いて、MIF、LPS刺激により産生するTNF-alpha産生をTRX存在下で検討した。その結果、TRX濃度依存的にTNF-alphaの産生を抑制することが明らかとなった (図10)。

- 2 バイオマーカー・測定系開発 TRXの遺伝子発現誘導活性を有する候補物質のスクリーニングに関連して対応する抗酸化分子関連の新規バイオマーカーの探索と、当該バイオマーカーの測定系の構築の準備を進めた。測定系構築の一環として、現在ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 法で測定されているTRXについて、ECLIA法であるピコルミ®システムにて測定法を検討した。結果、測定開始から約30分後に最初の結果が出力され、1時間当たり100テストの処理が可能であった。ELISAが約5時間を要するのに比べて、ハイスループットな測定系を実現した。また、分析感度についても、ELISAと同等以上の感度であった。

3 有効性研究

① 沖縄産黒糖 (含蜜糖) に含まれる非ショ糖成分の精製 沖縄産黒糖の非ショ糖成分の粗精製物として、定法に従い黒糖抽出物 (Unrefined Sugar Extract: USE) を得た。収量は黒糖の0.3~0.5%にあたる。

② 黒糖抽出物の抗酸化能・抗アレルギー能の計測 抗酸化能の指標である1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルの消去率は、USE 0.1mg/mlで70%、1mg/mlでは80%と濃度依存的に活性が認められた。共同研究者によって、RBL-2H3細胞の脱顆粒抑制を評価した結果、USEに濃度依存的な抗アレルギー活性が示唆された。

③ 黒糖抽出物の精製 活性成分の特定のため、USEのLCMSによる成分分析、分画を検討したところ、主な含有成分としてはメトキシフェニルグルコシド類が認められた。

USEのLCMS分析では、移動相条件は0.2%ギ酸/メタノール系を用い、溶媒比90:10から50:50を

40分でグラジエントした。UVとMSによる検出では、主要な成分として26種類の成分が確認できた。予測分子量と既報から、3,4-dimethoxy-5-hydroxyphenyl-O-β-D-glucoside (5)、3,4-dimethoxyphenyl-O-β-D-glucoside (1)、3,4,5-trimethoxyphenyl-O-β-D-glucoside (2)、2,4,6-trimethoxyphenyl-O-β-D-glucoside (3)の4つについては、それぞれのピークが確認できた (()内の数字は図1の構造式番号を示す)。これらメトキシフェニルグルコシド類は他成分と比較してピーク面積が大きいので、既報の通り比較的収量が多いことが示唆された。

USEを再び非極性樹脂に吸着させ、水 (Fr-1)、10%メタノール (Fr-2)、30%メタノール (Fr-3)、50%メタノール (Fr-4) と順次流出させてそれぞれの画分Fr-1~4を得た。Fr-1~4をLC/MSにより分析した結果、メトキシフェニルグルコシド類は30%エタノール画分 (Fr-3) 中に確認できた。水画分中 (Fr-1) には、残留した糖質が含まれた。

- 4 評価法開発 溶媒に電解還元水を用いることで、TRXの活性を高めることが出来るかについて、以下3点を指標として検討した。①TRXによるインスリン還元活性、②血漿中でのTRXの二量体化、③培養細胞株を用いた胃粘膜細胞の保護効果試験。その結果、①②に関しては、電解還元水の効果が認められなかったが、③に関しては、ある一定条件のもと相加効果が認められた。

① インスリン還元活性 TRXのインスリン還元活性に対する電解還元水の効果について検討した。IBA社製リコンビナントヒト型TRXを蒸留水、浄水、電解還元水 (定電流1A)、電解還元水 (定電流5A) でそれぞれ希釈し、室温15分置いた後、インスリン還元活性 ($\Delta OD_{650nm/min}$) を測定した。その結果、蒸留水が0.187、浄水が0.181、電解還元水 (定電流1A) が0.183、電解還元水 (定電流5A) が0.177であり、溶媒による活性の有意な差異は認められなかった。

② TRXの二量体化 TRXのダイマー形成による酸化型への変換 (=還元能の喪失) に対する電解還元水の阻害効果について検討した。まず、水道水には酸化剤の次亜塩素酸が入っていることから、蒸留水と比較して明らかに酸化型 (ダイマー) の比率の増加が認められた。一方、電解還元水は、浄水と比較して、その還元型と酸化型の比率に有意な差異を認めない。また天然水を電解還元してポトリングした

市販の「I'm fine[®]」を用いた比較も行ったが、明確な効果は認められなかった。

③ 胃粘膜細胞保護効果 細胞を用いた評価法として、TRXの胃粘膜細胞への保護効果試験で使用されている胃粘膜細胞株RGM1を用い、インドメタシンによる細胞障害に対する電解還元水の評価を行った。まず、蒸留水群においては、インドメタシンにより約2倍の吸光度の上昇が認められ、これにTRXを添加することで、この吸光度の上昇は半減した。次に、電解還元水 (定電流1A) 群においては、TRXを添加することによる吸光度の低下が、さらに顕著になった。一方、浄水や電解還元水 (定電流5A) においては、TRXを入れることによって、むしろ、インドメタシン単独よりも吸光度が増加する (=障害が進む) 傾向が見られた。

D. 考察

I. 創薬課題基盤研究

以下3課題について前項Cに述べたような成果をみたが、その個々の考察については、次の通りである。

- 1 衛研受託研究 以下の4課題に取り組み、前項Cにおけるような成果を得た。以下に個々の課題に関する考察を述べる。
 - 1-1 モデル候補物質の選定 : 課題で設定したモデルの選定は進行中であり、さしあたりスルフォラファンによるモデル実験を推進することにとどまった。
 - 1-2 分子レベルでの研究 : 酸化ストレスを与えない定常状態で、野生型、TRX-Tg、TRX-KOでの微量元素の存在状態を調べたところ、三者で大きな違いは認められなかった。骨髓細胞で見られた未同定のSピークの同定が必要であるが、量的には困難を伴うと予想される。
 - 1-3 細胞生物学的レベルでの研究 : 黒糖抽出物添加時にβ-hexosaminidase放出量抑制効果が見られたのは黒糖抽出物の有効成分によると思われるが、分担研究者らの分析により主要な成分の一つとして3,4-dimethoxyphenyl-o-β-D-glucosideが同定された。このため、この化合物の活性試験を行った結果、より強いβ-hexosaminidase放出量抑制効果が見られたため、活性成分の一つであることが明らかになった。しかし、黒糖抽出物中にはこの他にも分担研究者らによって同定された3,4,5-trimethoxyphenyl-o-β-D-glucosideなど他の成分も存在することが報告されて