

ところ、現在喫煙群はもともと吸わない群に比べ、紅斑、浮腫共に陽性率が有意に高かった。男女別解析によると男性にのみ有意であった。なお、紅斑に関しては、現在喫煙群を喫煙量別に30本以上/日、20-29本/日、10-19本/日、1-9本/日に分類し検討すると、喫煙量が多い群ほど陽性率が高いことが分かった。

3) 睡眠時間: 睡眠時間について、8時間以上群と8時間未満群に分類し比較したところ、8時間以上群の浮腫の陽性率が有意に低かった。紅斑においても有意差は確認できなかったものの、陽性率が低い傾向が確認された。男女別解析によると男性にのみ有意であった。

4) 飲酒: 飲酒について、現在飲酒群、過去飲酒群、飲まない群の3群に分類し比較したところ、紅斑において、現在飲酒群は飲まない群に比べ陽性率が有意に低く、浮腫において、過去飲酒群は飲まない群に比べ陽性率が有意に低かった。

5) 基礎疾患: 基礎疾患の種類に寄らず、何らかの基礎疾患がある者はない者に比べ、紅斑の陽性率が有意に低かった。浮腫においても有意差は確認できなかったものの、陽性率が低い傾向が確認され、男女別解析によると、男性において、有意差が確認された。

6) 膠原病: 基礎疾患として膠原病がある者はない者に比べ、紅斑、浮腫共に陽性率が有意に低かった。男女別解析によると女性にのみ有意であった。

7) 話す頻度: 話す頻度について、毎日話す群とそれ以外の群に分類し比較したところ、毎日話す群の紅斑の陽性率が有意に高かった。男女別解析によると女性にのみ有意であった。

8) 興味・希望の有無: 興味・希望が「ない」と回答した群は「ある」と回答した群に比べ、紅斑の陽性率が有意に低かった。男女別解析によると女性にのみ有意であった。

9) 癌: 基礎疾患として癌がある者はない者に比べ、浮腫の陽性率が有意に低かった。男女別解析によると男性にのみ有意であった。

10) 睡眠満足度: 睡眠満足度について、「十分とれている」「まあまあとれている」「あまりとれていない・全くとれていない」の3群に分類し、男女別に解析したところ、男性においてのみ、「十分とれている」と回答した群は「あまりとれていない・全くとれていない」と回答した群に比べ、浮

腫の陽性率が有意に高かった。

11) 心の支えの有無: 心の支えの有無について、「大いに思う」「思う」「あまり思わない・思わない」の3群に分類し、男女別に解析したところ、女性においてのみ、「大いに思う」と回答した群は「あまり思わない・思わない」と回答した群に比べ、浮腫の陽性率が有意に高かった。

11. 縦断研究

帯状疱疹発症に関連する危険因子として以下の4因子が挙げられた。結果一覧を表8に示す。

1) 喫煙: 喫煙について、現在喫煙群と現在禁煙群の2群に分類し比較したところ、現在喫煙群の発症率が有意に低かった。現在喫煙群を喫煙量別に30本以上/日、20-29本/日、10-19本/日、1-9本/日に分類し検討したが、喫煙量と発症の関係については確認できなかった。なお、調査期間1年間の発症率で検討しても、有意差は確認されなかったものの、同様の傾向であることが確認された。

2) 睡眠満足度: 睡眠満足度について、「十分とれている」「まあまあとれている」「あまりとれていない・全くとれていない」の3群に分類し比較したところ、「十分とれている」と回答した群は「あまりとれていない・全くとれていない」と回答した群に比べ、発症率が有意に低かった。なお、調査期間1年間の発症率で検討しても、有意差は確認されなかったものの、同様の傾向であることが確認された。

3) 基礎疾患: 基礎疾患の種類に寄らず、何らかの基礎疾患がある者はない者に比べ、発症率が有意に高かった。なお、調査期間1年間の発症率で検討しても、有意差は確認されなかったものの、同様の傾向であることが確認された。

4) 癌: 基礎疾患の中でも、特に癌の者は発症率が有意に高かった。これは調査期間1年間の発症率で検討しても有意であった。

D. 考察

1. 登録時に実施した水痘皮内反応における陽性者の帯状疱疹発症のHRが0.12~0.25であったことから、水痘皮内反応が帯状疱疹発症のバイオマーカーとして、高発症リスク群の抽出に利用できることが示唆された。また、発症者の紅斑長径、浮腫長径が、未発症者と比較して小さいことも、これを支持する結果であった。以上

より、水痘皮内反応に關与する細胞性免疫の程度が低い者ほど帯状疱疹を発症しやすい可能性が示唆された。なお、紅斑の赤みの程度において、赤みが明らかである者のほうが僅かである者と比較して発症リスクが小さい傾向であったが、有意な差ではなかった。このことから、赤みの程度は、紅斑長径、浮腫長径と比較すると発症の代替指標として適していないと考えられる。

水痘皮内反応の測定値のうち、紅斑長径と浮腫長径との間には強い相関が見られた。本研究では、専門医の指導を受けた特定の者が統一された手法で水痘皮内反応の測定を担当しているため、測定値の信頼性は高いと考えられる。しかし、発症のバイオマーカーとして一般で用いる場合、測定者の感覚に左右される浮腫長径は、紅斑長径より測定値のばらつきが大きいと考えられるため、水痘皮内反応のパラメータとしては、測定が容易な紅斑長径が妥当であると考えられる。

登録から2年後に実施した検査の結果において、紅斑長径と各種抗体価との間に相関がなかったことから、細胞性免疫と液性免疫との間に相関はないものと推察される。また、水痘皮内反応は紅斑と浮腫ともに高齢者群ほど小さかったが、各種抗体価は高齢者群ほど高かった。このことから、細胞性免疫は加齢に伴い低下し、液性免疫は加齢に伴い上昇すると推測される。带状疱疹の発症状況の調査では、細胞性免疫の程度が低く、液性免疫の程度が高いと考えられる高齢者群に発症が多かったことから、带状疱疹の発症には、液性免疫より細胞性免疫が關与していると考えられる。

前年度の報告から約1年間の調査期間の成績を上積みしたが、性別、年齢別、四半期別の発症率に大きな変動はなかった。このことから本研究は途中段階であるが、信頼性の高い結果が得られているといえる。

しかし、水痘皮内反応陰性者の登録から2年間の発症リスクは、登録から1年間の発症リスクと比較して、やや低下していた。わが国には水痘の流行がある等、免疫の程度に影響を及ぼす様々な外的要因が存在するため、登録者の免疫の程度は、水痘皮内反応実施からの時間の経過に伴い、当初の測定値から変動している可能性が考えられる。そのため、水痘皮内反応を

発症のバイオマーカーとして用いる際には、より直近の結果を用いることで、発症リスクをより顕著に反映すると推測される。

2. 带状疱疹発症者について、皮疹の重症度・疼痛の程度と免疫との相関について検討した結果、VZV 特異的細胞性免疫の程度が低下している者の方が、皮疹や疼痛が重症化し易く、PHN に移行し易い傾向が明らかになった。一方、液性免疫は臨床症状に影響を及ぼさないことが示唆された。また、眼症状、神経麻痺などの合併症と免疫との相関については、現在のところ症例数が少ないため、明らかな結果は得られていない。今後、さらなる症例の蓄積により、細胞性免疫と臨床症状との相関がより明確になってゆくものと期待される。

3. 带状疱疹は、宿主に潜伏するVZVの再活性化により発症する。その再活性化には、VZV に対する細胞性免疫応答の低下が關与していると考えられている。今回我々は、大規模疫学調査により、60歳以上の健常人において加齢に伴いVZV 特異的な細胞性免疫応答が減少することを明らかにした。しかし、他の年齢層については検討されておらず、免疫低下が始まる年齢についても明らかになっていない。さらに、どの程度まで細胞性免疫が低下すれば带状疱疹を発症しやすくなるかについてもいまだ解明されておらず、今後の検討が必要である。

健常人において、初年度に比べ、二年目、三年目で有意に細胞性免疫応答が増強していた。带状疱疹発症時における細胞性免疫応答の変化について調べた結果、発症直後の細胞性免疫応答は健常人と比べて高い傾向を示す。しかし、回復時には、発症直後と比較して、有意に減少していた。このことから、带状疱疹発症による細胞性免疫の上昇は一時的である可能性が高い。一方、回復時に細胞性免疫応答が増強していた検体もある。带状疱疹発症から、検体採取までの時間の違いが検査結果に影響している可能性もあると考えられる。今後検討を行う必要がある。

4. 带状疱疹の発症は小児期の水痘既往歴や年齢、細胞性免疫の低下が危険因子であるといわれてきたが、本研究にて生活習慣や社会心理的要因との関連に言及することが可能となった。

今回、横断研究により水痘皮内反応と関連する

因子として、紅斑に関連する 8 因子と浮腫に関連する 9 因子が確認された。その中でも、紅斑及び浮腫に関連する共通因子として、健康状態、喫煙、睡眠時間、飲酒、基礎疾患、膠原病の 6 つが抽出され、健康状態が良いと自覚している者と喫煙者は陽性率が有意に高く、睡眠時間が長い者、飲酒者、何らかの基礎疾患がある者と膠原病の基礎疾患をもつ者は陽性率が有意に低かった。

縦断研究では、喫煙者と睡眠満足度が高い者において、帯状疱疹の発症リスクが有意に低く、基礎疾患のある者、特に癌の者が帯状疱疹の発症リスクが有意に高いことが分かった。

分担研究者奥野の研究成果により、水痘皮内反応と帯状疱疹発症の関係が既に示されている。そこに今回水痘皮内反応に関連する生活習慣及び社会心理的因子と帯状疱疹発症に関連する生活習慣及び社会心理的因子が確認されたことにより、図12のような、水痘皮内反応や帯状疱疹に関与する因子が明らかとなりつつある。

今回、帯状疱疹の発症と関連することが明らかとなった 4 因子は、それぞれ水痘皮内反応に影響を与える因子として確認されており、喫煙することと睡眠満足度が高いことについては、皮内反応検査を陽性にする因子であること(横断研究)と帯状疱疹リスクを下げる因子であること(縦断研究)の結果が得られており、皮内反応陽性者は帯状疱疹発症率が有意に低いという奥野の研究成果と一致する結果となった。同様に、基礎疾患と癌については、皮内検査を陰性にする因子であること(横断研究)と帯状疱疹リスクを上げる因子であること(縦断研究)の結果が得られており、皮内検査陰性者は帯状疱疹発症率が有意に高いという奥野の研究成果と一致する結果となった。

なお、喫煙については、帯状疱疹の発症を抑制する因子であることを支持する結果となったが、喫煙は一般的に肺がんや慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症の危険因子である事が証明されているため、今回の結果をもって、喫煙を推進する事はない。

水痘皮内反応を陰性にする因子として確認された睡眠時間が長いこと、飲酒、膠原病、興味・希望がないことは今後の前向き調査により、帯状疱疹の発症リスクを高める危険因子となりえる可

能性があり、水痘皮内反応を陽性にする因子として確認された健康状態が良いこと、話す頻度が多いこと、心の支えがあると感じていることは、帯状疱疹の発症リスクを下げる因子となり得る。今後、引き続き交絡因子の設定も考慮しつつ、前向きの検討を重ねることが重要であると考え

E. 結論

水痘皮内反応、とりわけ測定が容易な紅斑長径は帯状疱疹の発症リスクを示す指標として用いることができる。この指標によって高発症リスク群の選定が可能となり、効果的な予防策を講じることができる。

また、本研究によって、細胞性免疫の程度が高い者は低い者と比較して帯状疱疹を発症しにくいことなど、ワクチン開発に有益な疫学の知見が得られており、これらをもとに様々な予防策の検討が可能になる。

例えば過去の研究において、水痘ワクチンを高齢者に接種すると VZV に対する細胞性免疫の増強が確認された(平成 12 年厚生科学研究費補助金 帯状疱疹神経痛の予防を目的とする成人高齢者への水痘ワクチン接種による免疫増強に関する研究 M.Takahashi, et al.)という報告があり、本研究成果と組み合わせることで、細胞性免疫が低下した者に水痘ワクチンを接種することで細胞性免疫を増強し、帯状疱疹の発症を予防することが可能になると考えられる。しかしながら、水痘皮内反応による発症リスクの検討における適切な陽性基準の設定や、免疫の持続期間の検討など、まだ多くの課題がある。より信頼性の高い結果を得るためにも、引き続き調査を実施しデータを蓄積する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表 7件

1) Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Kumihashi H, Gomi Y, Ishikawa T, Okuno Y, MHRi Y, Asada H, Yamanishi K, Iso H, fHR the SHEZ Study group, The Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study: Rationale, Design, and Description of a Prospective CohHRt Study. J emidemiol 2012; 22(2): 167-174.

2) Matsuo K, Ishii Y, Quan YS, Kamiyama F, Asada H, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S:

Compositional optimization and safety assessment of a hydrogel patch as a transcutaneous immunization device.

Biol Pharm Bull 34: 1835- 40: 2011

3) Morito H, Ogawa K, Fukumoto T, Kobayashi N, Asada H: Drug-induced hypersensitivity syndrome followed by persistent arthritis.

J Dermatol 39:178-9: 2012

4) Hirobe S, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Morito H, Asada H, Takaya Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S: Clinical study of transcutaneous vaccination using a hydrogel patch for tetanus and diphtheria.

Vaccine 30, 1847-1854, 2012

5) Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Kumihashi H, Gomi Y, Ishikawa T, Okuno Y, Mori Y, Asada H, Yamanishi K, Iso H: The Shozu herpes zoster (SHEZ) study: rationale, design, and description of a prospective cohort study.

J of Epidemiology (2012 Feb 18. [Epub ahead of print])

6) Morito H, Kitamura K, Fukumoto T, Kobayashi N, Kuwahara M, Asada H: Drug eruption with eosinophilia and systemic syndrome associated with reactivation of human herpesvirus 7, not human herpesvirus 6
J Dermatol (in press)

7) Ogawa K, Morito H, Kobayashi N, Fukumoto T, Asada H: A case of drug-induced hypersensitivity syndrome involving multiple-drug hypersensitivity. J Dermatol, (in press)

2. 学会発表 2件

1)国内 口頭発表

発表タイトル:Investigation of VZV-immunity by large cohort study

発表者:Huamin Tang, Eiko Moriishi, Shigefumi Okamoto, Yoshinobu Okuno, Hiroyasu Iso, Hideo Asada, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori
学会名:第 26 回ヘルペスウイルス研究会 (2011.6.2-4; 大阪)

2)海外 ポスター発表

ポスター発表タイトル:A community-based survey of Varicella-Zoster virus-specific immune responses in the healthy elderly

発表者:Huamin Tang, Eiko Moriishi, Shigefumi Okamoto, Yoshinobu Okuno, Hiroyasu Iso, Hideo Asada, Koichi Yamanishi, Yasuko Mori
学会名:International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sep 11 - Sep 16, 2011; Sapporo, Japan)

3. 書籍

1) 浅田秀夫: 水痘, 皮膚疾患最新の治療, 南江堂, p185, 2011

2) 浅田秀夫: ヒトヘルペスウイルスの分類と臨床症状, ウイルス性皮膚疾患ハンドブック, 皮膚科臨床アセット 3, 中山書店, p34-38, 2011

3) 浅田秀夫: Kaposi 水痘様発疹症, ウイルス性皮膚疾患ハンドブック, 皮膚科臨床アセット 3, 中山書店, p50-54, 2011

4) 浅田秀夫:ウイルス感染とアレルギー, 1 冊でわかる皮膚アレルギー, 皮膚科サブスペシャリティシリーズ, 文光堂, p239-245, 2012

5) 浅田秀夫:「帯状疱疹」と思うが?, Common disease から入る皮膚疾患, 文光堂, p164-169, 2012

6) 浅田秀夫:帯状疱疹の合併症, What's new in 皮膚科学 2012-2013,メディカルレビュー社, p86-87, 2012

【編集】

1) 浅田秀夫(専門編集),古江増隆(総編集):, 皮膚科臨床アセット 3, ウイルス性皮膚疾患ハンドブック, 中山書店, p167, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 性別・年齢階層別の帯状疱疹発症者数及び年間発症率

年齢階層	男性		女性		全体	
	発症者数	年間発症率 (%)	発症者数	年間発症率 (%)	発症者数	年間発症率 (%)
50-59歳	25	0.83	36	1.06	61	0.95
60-69歳	22	0.47	63	1.24	85	0.87
70-79歳	36	1.01	65	1.40	101	1.23
80歳以上	21	0.99	45	1.26	66	1.16
合計	104	0.78	209	1.25	313	1.04

図1 四半期別の帯状疱疹発症率及び小豆郡における水痘発症数

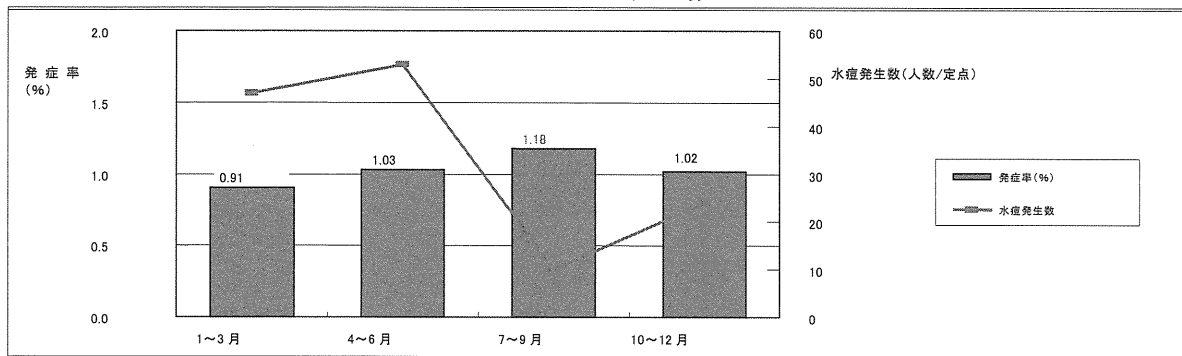


表2 紅斑長径による発症リスク

紅斑長径 カットオフ値	判定	登録者	発症者	発症率	HR	95%信頼区間
5mm	陰性	1,047	50	4.78	1	
	陽性	4,480	57	1.27	0.25	0.17-0.38
10mm	陰性	1,757	69	3.93	1	
	陽性	3,770	38	1.01	0.24	0.16-0.37
5mm未満	陰性	1,047	50	4.78	1	
5mm以上10mm未満	擬陽性	710	19	2.68	0.54	0.31-0.92
10mm以上	陽性	3,770	38	1.01	0.19	0.12-0.30
5mm以上10mm未満	擬陽性	710	19	2.68	1	
10mm以上	陽性	3,770	38	1.01	0.36	0.21-0.64
判定不能		158				

表3 浮腫長径による発症リスク

浮腫長径 カットオフ値	判定	登録者	発症者	発症率	HR	95%信頼区間
0mm	陰性	1,728	72	4.17	1	
	陽性	3,955	42	1.06	0.25	0.17-0.37
5mm	陰性	2,048	81	3.96	1	
	陽性	3,635	33	0.91	0.23	0.15-0.35
10mm	陰性	3,548	104	2.93	1	
	陽性	2,135	10	0.47	0.16	0.08-0.31
5mm未満	陰性	2,048	81	3.96	1	
5mm以上10mm未満	擬陽性	1,500	23	1.53	0.38	0.24-0.61
10mm以上	陽性	2,135	10	0.47	0.12	0.06-0.22
判定不能		2				

表4 紅斑の赤みの程度による発症リスク

紅斑の程度	登録者	発症者	発症率	HR	95%信頼区間
なし、僅か	1,402	58	4.14	1	
明らか	3,832	40	1.04	0.56	0.30-1.04
なし	678	33	4.87	1	
僅か	724	25	3.45	1.10	0.59-2.05
明らか	3,832	40	1.04	0.61	0.26-1.40
僅か	724	25	3.45	1	
明らか	3,832	40	1.04	0.55	0.30-1.03
判定不能	451				

図 2 紅斑長径と浮腫長径との相関

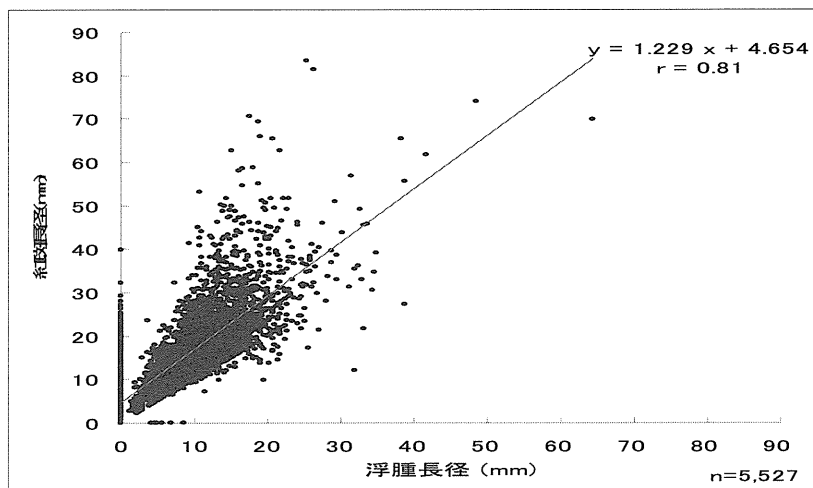
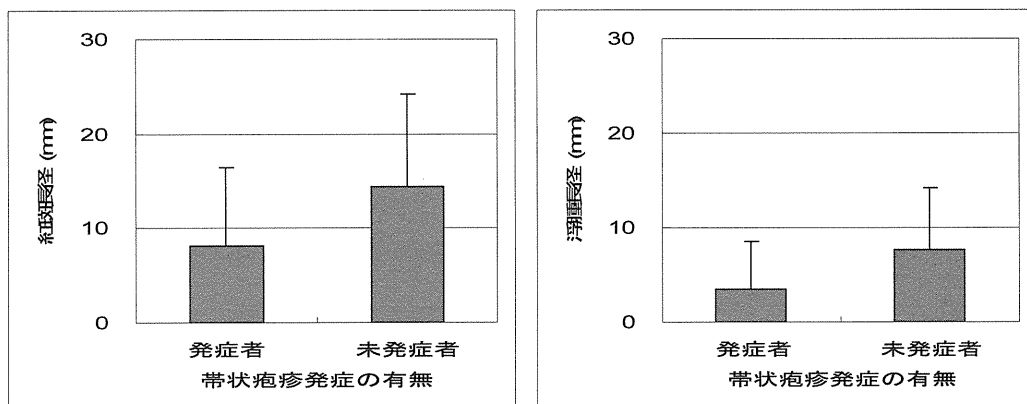


図 3 発症の有無別、紅斑長径、浮腫長径



		発症者	未発症者			発症者	未発症者
紅斑長径 (mm)	平均値	8.20	14.39	浮腫長径 (mm)	平均値	3.49	7.70
	標準偏差	8.25	9.80		標準偏差	5.01	6.47
人数		133	5,394	人数		140	5,545

表 5 性別・年齢階層別 登録から 2 年後の水痘皮内反応結果

年齢階層	性別	登録者数 (人)	紅斑長径 (mm)		紅斑短径 (mm)		登録者数 (人)	浮腫長径 (mm)		浮腫短径 (mm)	
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
60歳代	男性	46	17.48	11.81	14.14	9.78	46	10.57	8.55	8.84	7.23
	女性	44	24.15	16.25	17.90	10.92	44	13.29	13.82	10.01	10.05
	計	90	20.74	14.47	15.98	10.46	90	11.90	11.45	9.41	8.69
70歳代	男性	61	14.33	9.13	11.52	7.29	62	9.80	8.32	7.66	6.50
	女性	58	19.10	12.41	11.52	9.67	58	12.58	11.53	9.77	9.06
	計	119	16.65	11.07	13.21	8.67	120	11.14	10.05	8.68	7.88
80歳以上	男性	49	13.15	8.54	10.39	6.96	52	6.68	8.46	5.23	6.61
	女性	43	18.88	9.17	15.01	7.75	46	10.20	9.34	8.33	7.71
	計	92	15.83	9.25	12.55	7.66	98	8.34	9.01	6.68	7.28
全体	男性	156	14.89	9.92	11.94	8.10	160	9.01	8.54	7.21	6.86
	女性	145	20.57	13.04	15.87	9.59	148	12.05	11.65	9.39	8.95
	計	301	17.62	11.85	13.83	9.05	308	10.47	10.25	8.26	8.00

図4 登録から2年後の水痘皮内反応結果 紅斑長径 年齢階層別比較

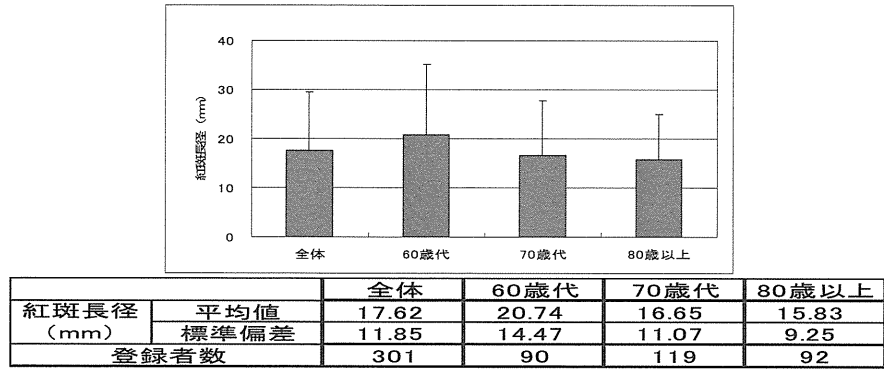


図5 登録から2年後の水痘皮内反応結果 浮腫長径 年齢階層別比較

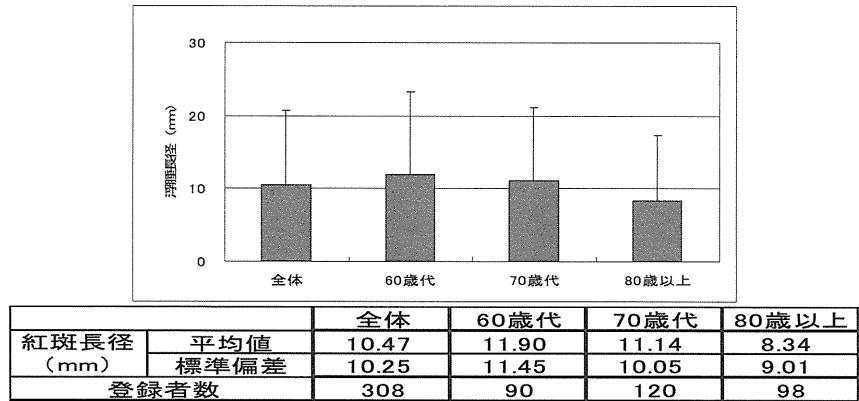


図6. 登録から2年後の各種抗体価の結果 性別比較

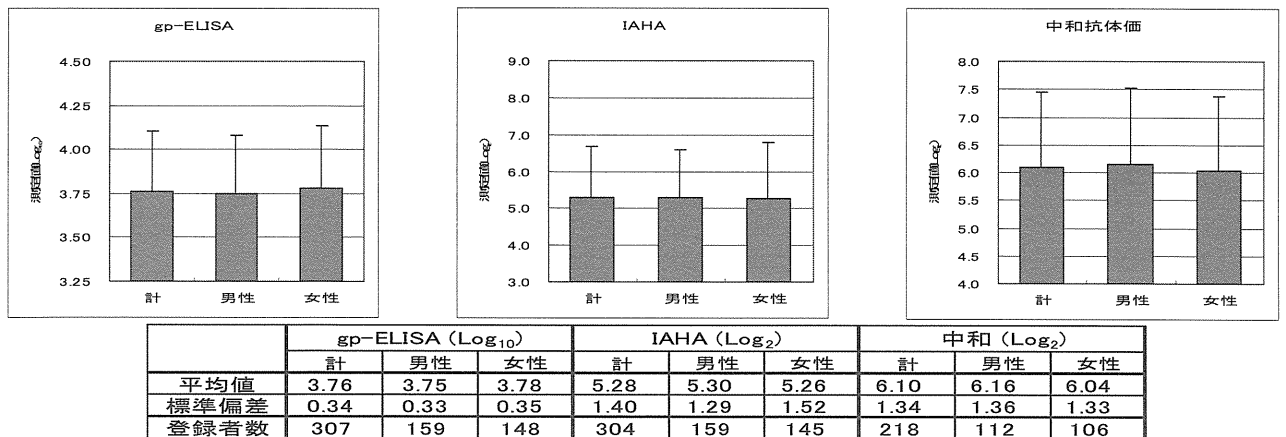


図7. 登録から2年後の各種抗体価の結果 年齢比較

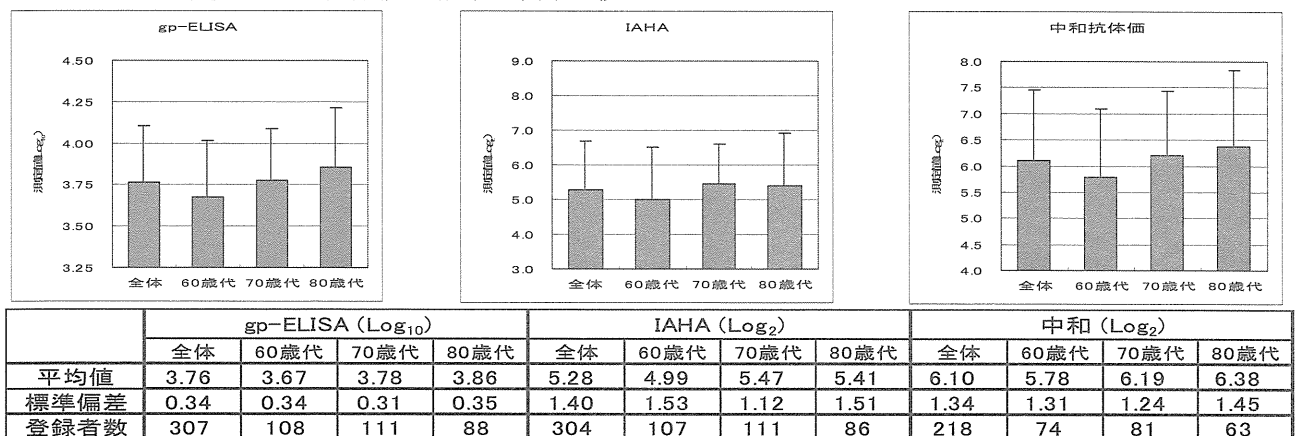


図8. IFN- γ ELISPOT 数の年齢別分布

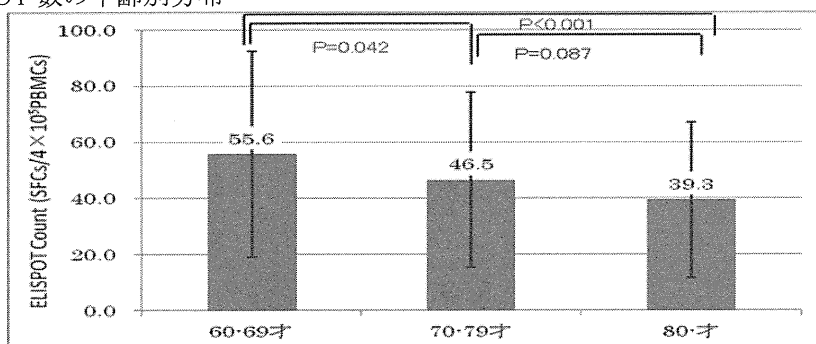


図9. 健常人におけるVZV特異的細胞性免疫応答の増強

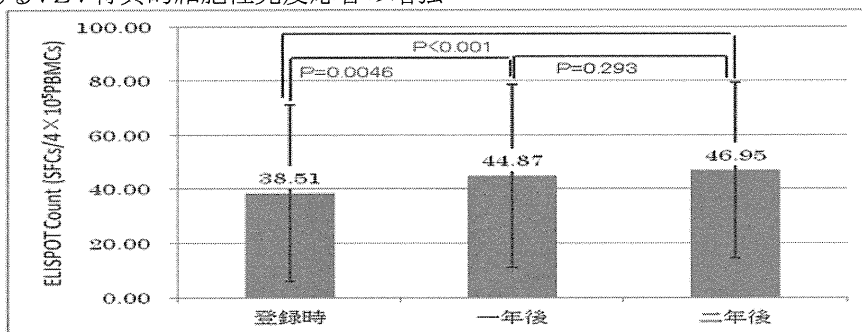


図10. 発症時におけるVZV特異的細胞性免疫応答の増強

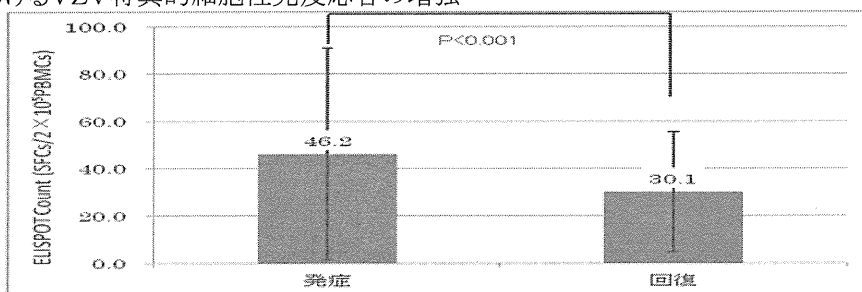


図11. 発症前後及び発症時のVZV特異的細胞性免疫応答の強度分布

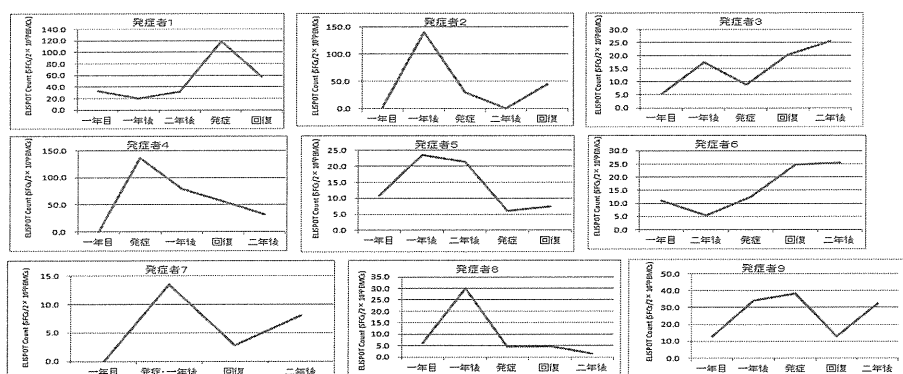


表6 水痘皮内反応(紅斑 10mm 以上陽性)と有意に関する因子(横断研究)

因子						男性					女性					
	母数	陽性者数	陽性率	HR	95%CI	母数	陽性者数	陽性率	HR	95%CI	母数	陽性者数	陽性率	HR	95%CI	
健康状態	とてもよい	607	452	74.5%	1.59	1.24-2.03	296	227	76.7%	2.15	1.49-3.08	311	225	72.3%	1.22	0.87-1.71
	まあよい	4,222	2,892	68.5%	1.21	1.02-1.44	1,876	1,297	69.1%	1.45	1.13-1.87	2,346	1,595	68.0%	1.03	0.81-1.31
	あまりよくない・よくない	698	426	61.0%	1.00	Ref.	325	187	57.5%	1.00	Ref.	373	239	64.1%	1.00	Ref.
喫煙	現在喫煙	968	749	77.4%	1.62	1.29-2.02	879	681	77.5%	1.68	1.28-2.16	90	63	70.0%	1.36	0.82-2.26
	過去喫煙	1,270	814	64.1%	1.06	0.87-1.31	1,185	755	63.7%	1.10	0.86-1.39	91	56	61.5%	1.08	0.67-1.75
	もともと吸わない	3,289	2,207	67.1%	1.00	Ref.	433	275	63.5%	1.00	Ref.	2,929	2,007	68.5%	1.00	Ref.
	30本以上/日	186	154	82.8%	1.90	1.24-2.90	181	150	82.9%	1.88	1.21-2.94	5	4	80.0%	1.54	0.16-14.6
	20-29本/日	314	253	80.6%	1.86	1.33-2.59	301	243	80.7%	1.89	1.32-2.70	13	10	76.9%	1.26	0.33-4.76
	10-19本/日	338	249	73.7%	1.45	1.07-1.95	305	222	72.8%	1.44	1.04-2.01	33	27	81.8%	1.74	0.70-4.29
	1-9本/日	130	93	71.5%	1.42	0.93-2.15	92	66	71.7%	1.58	0.94-2.65	38	27	71.1%	1.16	0.56-2.38
	やめた	1,270	814	64.1%	1.07	0.87-1.32	1,185	755	63.7%	1.10	0.86-1.39	85	59	69.4%	1.08	0.67-1.75
もともと吸わない	3,289	2,207	67.1%	1.00	Ref.	433	275	63.5%	1.00	Ref.	2,856	1,932	67.6%	1.00	Ref.	
睡眠時間	8時間以上	1,249	785	62.9%	0.90	0.78-1.04	712	446	62.6%	0.83	0.68-1.00	537	339	63.1%	0.99	0.81-1.22
	8時間未満	4,278	2,985	69.8%	1.00	Ref.	1,785	1,265	70.9%	1.00	Ref.	2,493	1,720	69.0%	1.00	Ref.
飲酒	現在飲酒	2,783	1,744	62.7%	0.66	0.75-0.99	1,773	1,221	68.9%	0.83	0.67-1.04	1,010	523	51.8%	0.89	0.74-1.07
	過去飲酒	253	159	62.8%	0.86	0.65-1.14	165	103	62.4%	0.89	0.61-1.30	88	56	63.6%	0.83	0.53-1.30
基礎疾患	飲まない	2,744	1,867	68.0%	1.00	Ref.	559	387	69.2%	1.00	Ref.	2,185	1,480	67.7%	1.00	Ref.
	有り	3,401	2,189	64.4%	0.86	0.76-0.98	1,545	998	64.6%	0.85	0.70-1.03	1,856	1,191	64.2%	0.87	0.73-1.04
CTD	無し	2,126	1,581	74.4%	1.00	Ref.	952	713	74.9%	1.00	Ref.	1,174	868	73.9%	1.00	Ref.
	有り	106	56	52.8%	0.56	0.38-0.84	27	15	55.6%	0.76	0.34-1.69	79	41	51.9%	0.51	0.32-0.82
話す頻度	無し	5,421	3,714	68.5%	1.00	Ref.	2,470	1,696	68.7%	1.00	Ref.	2,951	2,018	68.4%	1.00	Ref.
	毎日	3,957	2,764	69.9%	1.18	1.03-1.34	1,697	1,187	69.9%	1.15	0.95-1.38	2,260	1,577	69.8%	1.21	1.01-1.45
興味・希望	毎日	1,570	1,006	64.1%	1.00	Ref.	800	524	65.5%	1.00	Ref.	770	482	62.6%	1.00	Ref.
	有り	4,894	3,358	68.6%	1.00	Ref.	2,203	1,509	68.5%	1.00	Ref.	2,691	1,849	68.7%	1.00	Ref.
	無し	633	412	65.1%	0.83	0.69-0.99	294	202	68.7%	0.97	0.74-1.28	339	210	61.9%	0.72	0.57-0.92

* 交絡因子・・・年齢・性別・過去帯状疱疹罹患歴

表7 水痘皮内反応(浮腫の有無)と有意に関連する因子(横断研究)

因子						男性					女性					
	母数	陽性者数	陽性率	HR	95%CI	母数	陽性者数	陽性率	HR	95%CI	母数	陽性者数	陽性率	HR	95%CI	
健康状態	とてもよい	617	463	75.0%	1.43	1.12-1.83	299	235	78.6%	1.98	1.37-2.87	318	228	71.7%	1.10	0.79-1.53
	まあよい	4,335	3,026	69.8%	1.14	0.96-1.35	1,936	1,387	71.6%	1.38	1.07-1.78	2,399	1,639	68.3%	0.97	0.77-1.23
	あまりよくない・よくない	731	466	63.7%	1.00	Ref.	338	207	61.2%	1.00	Ref.	393	259	65.9%	1.00	Ref.
喫煙	現在喫煙	979	772	78.9%	1.33	1.06-1.67	889	709	79.8%	1.48	1.13-1.94	90	63	70.0%	0.93	0.58-1.48
	過去喫煙	1,326	869	65.5%	0.86	0.70-1.05	1,235	813	65.8%	0.97	0.76-1.24	91	56	61.5%	0.74	0.48-1.15
	もともと吸わない	3,378	2,314	68.5%	1.00	Ref.	449	307	68.4%	1.00	Ref.	2,929	2,007	68.5%	1.00	Ref.
	30本以上/日	188	155	82.4%	1.37	0.90-2.09	183	152	83.1%	1.43	0.91-2.24	5	3	60.0%	0.53	0.09-3.35
	20-29本/日	316	267	84.5%	1.83	1.28-2.61	302	258	85.4%	2.05	1.39-3.02	14	9	64.3%	0.65	0.21-1.99
	10-19本/日	342	253	74.0%	1.10	0.82-1.49	309	229	74.1%	1.21	0.86-1.69	33	24	72.7%	0.98	0.45-2.15
	1-9本/日	133	97	72.9%	1.22	0.80-1.85	95	70	73.7%	1.42	0.86-1.69	38	27	71.1%	1.10	0.53-2.25
	やめた	1,326	869	65.5%	0.87	0.70-1.06	1,235	813	65.8%	0.97	0.84-2.40	91	56	61.5%	0.74	0.48-1.15
もともと吸わない	5,683	2,314	40.7%	1.00	Ref.	449	307	68.4%	1.00	Ref.	2,929	2,007	68.5%	1.00	Ref.	
睡眠時間	8時間以上	1,315	820	62.4%	0.78	0.68-0.90	753	479	63.6%	0.75	0.62-0.90	562	341	60.7%	0.82	0.67-1.00
	8時間未満	4,368	3,135	71.8%	1.00	Ref.	1,820	1,350	74.2%	1.00	Ref.	2,548	1,785	70.1%	1.00	Ref.
飲酒	現在飲酒	2,590	1,865	72.0%	0.96	0.84-1.11	1,819	1,321	72.6%	0.96	0.77-1.19	771	544	70.6%	0.97	0.81-1.17
	過去飲酒	270	161	59.6%	0.71	0.54-0.93	179	105	58.7%	0.73	0.51-1.06	91	56	61.5%	0.74	0.50-1.16
基礎疾患	飲まない	2,823	1,929	68.3%	1.00	Ref.	575	403	70.1%	1.00	Ref.	2,248	1,526	67.9%	1.00	Ref.
	有り	3,538	2,345	66.3%	0.91	0.80-1.04	1,615	1,079	66.8%	0.80	0.65-0.97	1,923	1,266	65.8%	1.00	0.84-1.18
CTD	無し	2,145	1,610	75.1%	1.00	Ref.	958	750	78.3%	1.00	Ref.	1,187	860	72.5%	1.00	Ref.
	有り	110	57	51.8%	0.51	0.35-0.76	27	13	48.1%	0.47	0.21-1.05	83	44	53.0%	0.53	0.34-0.83
癌	無し	5,573	3,898	69.9%	1.00	Ref.	2,546	1,816	71.3%	1.00	Ref.	3,027	2,082	68.8%	1.00	Ref.
	有り	224	134	59.8%	0.74	0.56-0.98	124	69	55.6%	0.68	0.47-1.00	100	65	65.0%	0.88	0.57-1.35
睡眠満足度	無し	5,459	3,821	70.0%	1.00	Ref.	2,449	1,760	71.9%	1.00	Ref.	3,010	2,061	68.5%	1.00	Ref.
	十分	1,253	848	67.7%	1.09	0.89-1.34	628	436	69.4%	1.37	1.00-1.87	625	412	65.9%	0.94	0.72-1.23
心の支え	まあまあ	3,638	2,546	70.0%	1.01	0.85-1.20	1,636	1,180	72.1%	1.28	0.97-1.69	2,002	1,366	68.2%	0.87	0.69-1.09
	あまりとれていない・全くとれていない	792	561	70.8%	1.00	Ref.	309	213	68.9%	1.00	Ref.	483	348	72.0%	1.00	Ref.
心の支え	大いに思う	1,163	809	69.6%	1.19	0.94-1.50	375	256	68.3%	0.95	0.70-1.33	788	553	70.2%	1.48	1.05-2.08
	思う	3,982	2,778	69.8%	1.07	0.88-1.31	1,849	1,323	71.6%	0.98	0.75-1.28	2,133	1,455	68.2%	1.26	0.92-1.72
	あまり思わない・思わない	538	368	68.4%	1.00	Ref.	349	250	71.6%	1.00	Ref.	189	118	62.4%	1.00	Ref.

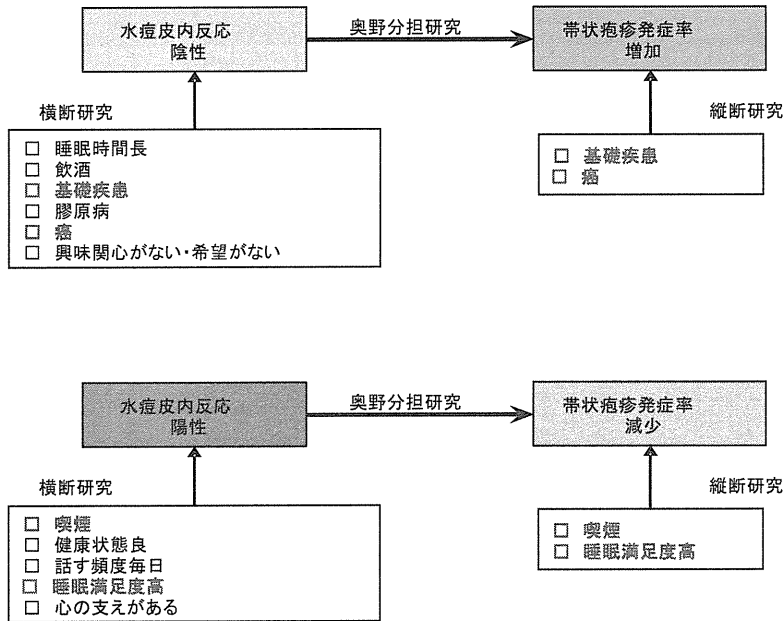
* 交絡因子・・・年齢・性別・過去帯状疱疹罹患歴

表8 带状疱疹発症に関連する因子(縦断研究)

因子	母数	1年以内発症				2年以内発症				
		発症者数	発症率	HR	95%CL	発症者数	発症率	HR	95%CL	
喫煙	現在喫煙	2,152	13	0.6%	0.54	0.29-1.01	24	1.1%	0.61	0.39-0.97
	現在禁煙	10,207	120	1.2%	1	Ref.	222	2.2%	1	Ref.
	30本以上/日	392	2	0.5%	0.443	0.10-1.94	3	0.8%	0.457	0.14-1.52
	20-29本/日	684	7	1.0%	0.886	0.36-2.16	10	1.5%	0.863	0.42-1.79
	10-19本/日	745	3	0.4%	0.344	0.10-1.17	8	1.1%	0.607	0.28-1.32
	1-9本/日	331	1	0.3%	0.254	0.04-1.87	3	0.9%	0.473	0.15-1.52
	やめた	2,762	28	1.0%	0.909	0.50-1.66	51	1.8%	1.065	0.68-1.68
もともと吸わない	7,445	92	1.2%	1	Ref.	171	2.3%	1	Ref.	
睡眠満足度	十分	3,001	27	0.9%	0.59	0.34-1.02	48	1.6%	0.58	0.38-0.88
	まあまあ	7,611	80	1.1%	0.70	0.45-1.10	152	2.0%	0.75	0.54-1.05
	あまり・全く	1,745	26	1.5%	1	Ref.	46	2.6%	1	Ref.
基礎疾患	有	7,575	88	1.2%	1.28	0.87-1.87	174	2.3%	1.54	1.15-2.05
	無	4,776	45	0.9%	1	Ref.	72	1.5%	1	Ref.
癌	有	417	9	2.2%	2.19	1.10-4.34	16	3.8%	2.09	1.24-3.51
	無	11,934	124	1.0%	1	Ref.	230	1.9%	1	Ref.

* 交絡因子・・・年齢・性別・過去带状疱疹罹患歴

図12 水痘皮内反応、带状疱疹発症、生活習慣及び社会心理的要因の関係



血管内皮機能改善に基づく糖尿病性腎症治療薬の開発

所属 国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部
研究者 望月直樹

研究要旨 DDAH1 活性化作用を有する化合物のスクリーニング系を構築し、化合物ライブラリー評価に着手した。候補化合物を培養細胞で検討できるシステムを構築した。

分担研究者

(1) トーアエイヨー株式会社 福島研究所 千葉俊樹

A. 研究目的

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) は、内因性 NO 合成酵素(NOS)阻害因子であり、糖尿病、高血圧、慢性腎臓病 (CKD) などで血漿中 ADMA 濃度が上昇していることから、心血管イベントのバイオマーカーとして注目されている。ADMA は血管内皮細胞の NOS (eNOS) を阻害するために血管内皮細胞が直接かかわる心血管系疾患 (CVD) の障害分子として認識されるだけでなく、腎臓系球体の毛細血管障害に起因する CKD の増悪にも関与することが知られている。健康人に ADMA を静脈内投与すると、腎血流量が低下し、腎血管抵抗が上昇する。したがって、ADMA 高値を示す糖尿病患者において ADMA を低下させることができれば、血管内皮機能の改善に基づき、糖尿病性腎症の発症及び進展を阻止できることが期待される。糖尿病性腎症は医療経済的に負担の大きい血液透析 (500 万円/人、日本国内年間推定 1.3 兆円の医療費がかかる) に至る糖尿病合併症として深刻な病態であり、その早期治療法の開発は急務である。しかし、糖尿病性腎症に有効な治療薬は未だになく、CKD の治療標的分子も不明な点が多く残されている。

ADMA 量は分解酵素 Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) により支配されている。DDAH は全身に広く分布し、ADMA に対する基質特異性が高く、動物においては ADMA の約 90% を、ヒトでは約 80% を速やかに分解する。DDAH には DDAH1 と DDAH2 の 2 つのアイソフォームが存在する。DDAH1 の組織分布が主に脳・腎臓・肝臓・脾臓であるのに対し、DDAH2 は心臓・腎臓・胎盤に発現が認められている。

本研究では ADMA 低下分子として DDAH1 に着目し、DDAH1 活性化剤の糖尿病性腎症治療薬としての有用性を確認すべく、DDAH1 活性化作用を有する化合物のスクリーニング及び糖尿病性腎症モデルの特性の解析に着手した。

B. 研究方法と材料

1) リコンビナント Human DDAH1 の作製及び化合物評価

1) リコンビナント Human DDAH1 の作製
Human DDAH1 遺伝子 (NM_012137) を Human Brain cDNA ライブラリー (TaKaRa) から PCR 法にて取得後、塩基配列を確認した。取得遺伝子を pGEX6p-1 (GE Healthcare Japan) に組み込み、GST 融合蛋白質発現用ベクターを構築した (DDAH1-pGEX6p-1)。

DDAH1-pGEX6p-1 を用いて、大腸菌 (BL21 (DE3) (Novagen)) を形質転換し、IPTG 添加 (0.5 mM, 30°C, 3.5 時間) を行った。大腸菌を回収後、グルタチオンセファロース 4 B を用いたアフィニティクロマトグラフィーによるタンパク精製後、PreScission Protease (GE Healthcare Japan) により GST 部分を切断した DDAH1 タンパクを取得した (E1 画分)。さらに本画分を透析処理 (PBS, 4°C, 24 時間) したサンプルを以後の試験に利用する DDAH1 タンパクとした。

2) DDAH1 活性評価

DDAH1 活性は基質である ADMA の分解に伴い生じる L-citrulline 産生量を指標とした。DDAH1 活性に対する過酸化水素 (H_2O_2) 及び塩化亜鉛 ($ZnCl_2$) の影響を検討する際は、DDAH1 タンパクに各薬剤を 15 分間処理した後、96 well plate に DDAH1 溶液及び ADMA (2 mM) 溶液を各 25 μ L/well 添加し、37°C で 20 時間 反応させた (50 μ L/well、反応溶液)。

化合物スクリーニングを行う際は、DDAH1 タンパクを H_2O_2 (0.3 mM) 及び $ZnCl_2$ (0.1 μ M) で 15 分間処理したものを、不活性化 DDAH1 として、評価化合物の DDAH1 活性に与える影響評価に用いた。96 well plate に不活性化処理した DDAH1 溶液を 25 μ L/well 添加後、評価化合物 (20 μ M) 及び ADMA (2 mM) を含む溶液を 25 μ L/well 添加し (50 μ L/well)、37°C で 20 時間 反応させた (反応溶液)。評価化合物はトーアエイヨー株式会社保有の化合物ライブラリー (約 16,300 化合物) を使用した。

3) L-Citrulline 産生量の測定及び結果解析
L-Citrulline 検出試薬として、Buffer 1 (5

mg/mL Antipyrine/50% (v/v) H₂SO₄) 及び Buffer 2 (8 mg/mL Diacetylmonoxime/5% (v/v) CH₃COOH) を調製し、評価当日に等量混合 (Buffer Mixture) する。50 uL/well の反応溶液に対して 250 uL/well の Buffer Mixture を添加する。60°C で 2 時間 反応後、VersaMax (Molecular Devices) にて 466 nm の吸光度を測定する。

結果の解析には不活性化 DDAH1 群を [Low]、未処理群を [High]、化合物処理群を [Data] とし、以下の式で DDAH1 活性回復率を算出した。

$$\frac{\text{DDAH1 活性}}{([\text{Data}] - [\text{Low}])} \times 100 \\ \text{回復率 (\%)} \\ ([\text{High}] - [\text{Low}])$$

2) 糖尿病性腎症モデルの作製及び特性解析

1) ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルラットの作製

8 週齢の SD ラットを用いて、STZ を 60 mg/kg 腹腔内投与した。投与 1 週間後、頸静脈より採血して血糖値を測定し、血糖値が 300 mg/dL 以上の動物を糖尿病発症とみなした。

2) 腎臓 DDAH 活性測定

腎臓を摘出し氷冷した生理食塩液で血液を洗い出した後、液体窒素により凍結保存した。組織 20 mg あたり 400 uL の割合で PBS + protease inhibitor cocktail 溶液を加え、ピーズホモジナイズ (20Hz、5 分間) した。その後 12000 g、10 分間遠心分離し、上清を組織抽出液とした。96 well plate に PBS を用いて 10 倍希釈した組織抽出液を 80 uL/well 分注した。80 mM ADMA (反応 well) または精製水 (コントロール well) を 1 uL 加えた後、十分に攪拌し、37°C で 2 時間反応させた。検量線として 0、25、50、100、200 uM L- Citrulline 溶液を 80 uL/well 分注した。すべてのサンプルにおいて duplicate で行った。反応後 1 well あたり 200 uL の Citrulline 発色液を加え攪拌し蓋をした。95°C で 15 分間反応させた後、室温で 10 分間冷却し 540 nm で吸光度を測定した。反応 well からコントロール well の吸光度を差し引いた値を用いて DDAH 活性値を算出した。

3) ADMA の生理作用と、候補化合物評価系の構築のための培養細胞系アッセイシステムの構築

(1) ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) の培養と eNOS リン酸化の検討: HUVECs は通常の血管内皮細胞培養溶液 (HuMedia-2 (血清と supplementary growth factor 含む)) で培養した。4-5 時間の血清飢餓の後に Angiopoietin1 (Ang1) 100 ng/ml で刺激して、eNOS のリン酸化を Western blot で確認した。リン酸化 eNOS の抗体は Cell

signaling 社の phospho-eNOS (S1177) を用いた。

4) DDAH を血管内皮細胞で安定に発現する系の構築: ヒト DDAH には、2 種類の遺伝子があり、組織特異性もあるが、腎臓血管内皮細胞では両者の発現が予想できるために、両者を発現すアデノウイルスの作製を行った。

Clontech 社の Adeno-X システムを用いて作製した。まず pShuttle ベクターに DDAH1-IRES-DsREdNLS (核移行シグナル付加 ExRed) cDNA を組み込んだ。同様に DDAH2 も組み込んだ。さらに pScel pCeul 消化でできたフラグメントを pAdenoX に挿入して pAdeno-X-DDAH1, DDAH2 をそれぞれ作製した。DDAH1 は Coding sequence ないに PacI サイトがあるために、アミノ酸変異の起きないように、TTAATTAA を TTGATTAA に変えるように変異を導入し PacI サイトを欠損した cDNA にした。

(倫理面への配慮)

組換え DNA の実験は、国立循環器病研究センターの組換え DNA 実験委員会で承認された研究計画に従って行った (承認番号 11-36-2)。

トーアエイヨー株式会社における実験動物の飼育管理及び動物実験 (動物を利用する試験研究) の計画・実施に際し、科学的及び動物福祉の観点からも遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき実施した。

C. 研究結果

1. リコンビナント human DDAH1 の作製

常法に従い各精製ステップで取得したサンプルを用い、精製リコンビナント DDAH1 の純度を電気泳動及び CBB 染色で検証した結果、リコンビナント DDAH1 をほぼシングルバンドの純度で回収することができた (E1 画分)。そのため、本画分を透析処理 (PBS、4°C、24 時間) したサンプルを以後の試験に利用する DDAH1 タンパクとした。

2. 化合物評価条件の設定

ADMA は糖尿病患者で高値であり腎機能障害進展因子である。慢性的な高血糖状態は内皮細胞における酸化ストレスを亢進させる。また、ADMA 分解酵素である DDAH1 の活性は酸化ストレス (H₂O₂) により減弱することが知られ、酸化ストレスによる DDAH1 不活性化が、生体内 ADMA 量の上昇、さらに腎機能障害に寄与すると推察される。また、亜鉛イオンは DDAH1 活性を制御している。亜鉛イオンは様々な酵素のほか、金属結合性タンパク質 (メタロチオネイン) と結合し生体内に存在するが、活性酸素種はこれらタンパク質から亜鉛イオンを遊離させ、細胞内亜鉛イオン濃度を上

昇させる。したがって、生体内では酸化ストレス因子の増加に伴い細胞内亜鉛イオン濃度が上昇し、DDAH1 活性の低減が、血管系の機能障害に繋がっている可能性もある。

そこで、これら生体内環境に近い条件（酸化ストレス下）で DDAH1 活性を回復させる化合物を探索すべく、取得した DDAH1 タンパクを用い、実験的に利用可能な酸化ストレス (H_2O_2) 及び亜鉛イオン ($ZnCl_2$ として利用) の DDAH1 活性に与える影響を検証し、以後の検討に適した評価条件の検証を実施した。

H_2O_2 及び $ZnCl_2$ の DDAH1 活性に与える影響を検証した結果、 H_2O_2 (0.1、0.3 及び 1.0 mM) に関しては、濃度依存的な DDAH1 活性の低下が観察され、その阻害率は約 20、40 及び 80% であった。一方、 $ZnCl_2$ に関しては、濃度に依存した DDAH1 活性の低下が観察されたが (0.1、1.0、10 μM)、1 μM の濃度で急激に DDAH1 活性の低下が観察された。さらに両薬剤を併用処理することにより、DDAH1 阻害活性の相加作用が確認された。以上、本評価系では H_2O_2 の処理濃度は単独で約 40% 程度の阻害活性を示す 0.3 mM、 $ZnCl_2$ の濃度は単独で約 20% 程度の阻害活性を示す 0.1 μM が適すると判断し、以後の DDAH1 の不活性化処理にはこれらの濃度の薬剤を併用した。

3. 化合物スクリーニング

H_2O_2 及び $ZnCl_2$ で不活性化させた DDAH1 タンパクを用い、化合物ライブラリー (トーアエイヨー株式会社、約 16,300 化合物) を対象として、DDAH1 活性回復作用を有する化合物探索スクリーニングを実施し、終了した。現在まで、真の DDAH1 活性回復作用を示す化合物は見いだされていない。

4. 糖尿病性腎症モデルラット

糖尿病性腎症に対する DDAH 活性化剤を評価するために、糖尿病性腎症モデルの作製に着手した。また、糖尿病患者において、血漿中 ADMA 濃度が高いほど糖尿病性腎症を発症する割合が高いことが報告されているが、糖尿病性腎症発症における ADMA の役割は不明な点が多い。そこで、糖尿病ラットにおける血漿中 ADMA 濃度、尿中 ADMA 排泄量の変化を検討した。

これまでに、I型糖尿病モデルとして汎用されている STZ 誘発糖尿病 (DM) ラットは、糖尿病性腎症を発症することが報告されている。糖尿病性腎症の臨床診断には、タンパク尿、アルブミン尿を用いることが糖尿病性腎症合同委員会より示されている。そこで、DM ラットにおける糖尿病発症 14 週後のタンパク尿、アルブミン尿を検討した。その結果、DM ラットは正常ラットと比較し、タンパク尿、アルブミン尿ともに著しく増加していた。

次に、糖尿病性腎症発症における ADMA の役割を明らかとするために、糖尿病発症 4、8、12 週間後の血漿中 ADMA 濃度、尿中

ADMA 排泄量の変化について検討を行った。血漿中 ADMA 濃度は、糖尿病発症 4、8、12 週間後において DM ラットと正常ラットに大きな違いは認められなかった。一方、尿中 ADMA 排泄量は、DM ラットにおいて正常ラットと比較し糖尿病発症 4 週後から有意に増加が認められ、糖尿病発症 8、12 週後ではさらに増加した。

DM ラットにおける尿中 ADMA 排泄量が増加する原因を明らかにするために、ADMA の分解酵素である DDAH の腎臓における活性を検討した。その結果、糖尿病発症 14 週後の DM ラットの腎臓 DDAH 活性は、正常と比較し低下傾向を示した。

5. Ang1 による eNOS のリン酸化への ADMA の影響

これまでに我々は HUVECs が confluent な状態培養して Ang1 で刺激すると Akt がより活性化することをつきとめていた。従って eNOS の燐酸化も同様におきると予想して、Ang1 刺激依存性におきる eNOS のリン酸化への ADMA の前処理の効果を調べた。ADMA の 24 時間間処理により、Ang1 依存性の eNOS のリン酸化は完全ではないが抑制傾向にあった。ADMA は今回の実験では 10⁻⁴M で行った。さらに、既報に示されるように (VEGF 依存性の Erk の活性化が ADMA の前処理によって抑制される) という結果から、Ang1 による Erk の活性化についても検討したところ、ADMA の 24 時間処理により Ang1 による Erk の活性化も抑制された。

Erk の活性化の抑制が観察されたので、スクラッチアッセイによる細胞運動への ADMA の影響を調べたが有無によって大きな差を認めなかった。

6. ADMA の分解のための DDAH の発現系の構築

本研究では DDAH1 あるいは DDAH2 の活性化促進薬の開発を目指しているが、DDAH1、DDAH2 の発現量の変化だけでも ADMA の抑制になるのではと考え、DDAH1 と DDAH2 の血管内皮細胞での発現を試みることにした。作製した AdenoX-DDAH1、-DDAH2 を 293A 細胞にトランスフェクションして、アデノウイルスの回収を行う状態である。IRES-exRedNLS による ExRed の発現を確認しているため、DDAH1、DDAH2 が 293A 細胞で発現している可能性が高く現在ウイルス回収を進めている段階である。

D. 考察

トーアエイヨー社では、スクリーニングに必要な ADMA 標品と精製 DDAH を準備することができた。スクリーニングを開始して間もないことにより、候補遺伝子を探求できていないが、系が確立されたことにより範囲を広げることで候補にたどり着くと考えている。

ADMAによる血管内皮障害の証左としてAng1によるeNOSのリン酸化の抑制を示すことができた。血管内皮細胞の障害として直接ADMAが関与する系はNOSの抑制であるが、eNOSのリン酸化まで抑制すると酵素-基質への影響だけでなく、直接酵素の活性化への影響もあることになる。従って、トーアエイヨー社がスクリーニングで得ると予想する化合物が、前者だけでなくeNOSのリン酸化に及ぼす効果も判定できる系となると考える。薬剤開発のためには、培養細胞系での確認と動物モデルでの検証が不可欠であるがトーアエイヨーで動物モデルは作製中であり、委託された培養系での候補化合物の効果の確認ができる段階になった。

ADMAの分解酵素DDAH1, DDAH2は病態では、不活性化している可能性もあり活性化の回復を目指して研究を開始した。しかし、DDAH1, DDAH2の発現量の増加によりADMAの増加抑制も期待できることから、血管内皮細胞でのDDAH1の増加によるADMAへの効果を検討すべきと考えた。このために、今年度はアデノウイルスを用いてDDAH1, DDAH2を発現する系の確立を目指した。アデノウイルスは、血管内皮細胞に効率よく感染するために、動物モデルでの検証も可能と予想している。トーアエイヨー社が作製するモデルにDDAHのウイルス感染でいかなる効果があるのかも検討できる。

本年度は一次スクリーニングによって候補化合物を得ることができなかったが、次年度に得られた段階で今年度確立したアッセイ系で確認作業を計画する。

E. 結論

DDAH1 活性能を有する化合物の評価系を構築し、実際に化合物ライブラリー評価に着手した。スクリーニングで得られたDDAH1、DDAH2 活性化化合物の検証を培養細胞で検討できるシステムを構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Wakayama Y, Miura K, Hisataka S, Mochizuki N. EphrinA1-EphA2 signal induces compaction and polarization of MDCK cells by inactivating ezrin through negative regulation of RhoA. *J. Biol. Chem.* 286: 44243-53, 2011

(2) Minami M, Koyama T, Wakayama Y, Fukuhara S, Mochizuki N. EphrinA/EphA signal facilitates insulin-like growth factor-I-induced myogenic differentiation through suppression of the Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in myoblast cell lines. *Mol.*

Biol. Cell 22:2,011508-3519, 2011

(3) Zhang J, Fukuhara S, Sako K, Takenouchi T, Kitani H, Kume T, Koh GY, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 Signal Augments Basal Notch Signal Controlling Vascular Quiescence by Inducing Delta-Like 4 Expression through AKT-mediated Activation of β -Catenin. *J. Biol. Chem.* 286: 8055-8066, 2011

2. 学会発表
特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

多価ボツリヌストキソイドワクチンの有効性及び安全性の検討

所 属 国立感染症研究所

研究者 山本 明彦

研究要旨 厚生労働研究班によって作製された多価ボツリヌストキソイドをボツリヌス研究者及び抗毒素製造従事者のボランティア被験者に接種するにあたり、品質試験を行って経時的変化がないことを確認した。このトキソイドを用いて、一般財団法人・化学及血清療法研究所のボツリヌス毒素関連従事者9名に対して、4週間隔2回の接種と採血を行った。被験者の血清中に含まれる各毒素型に対する抗毒素価をELISAで定量した。9名中7名がいずれかの毒素型に対する抗体価が上昇していた。一方、健康調査表による副作用解析では、接種部位の軽度の腫脹・発赤・搔痒感などの副作用を一部に認めたが、重大な有害事象は認められなかった。

研究分担者

- (1) 一般財団法人化学及血清療法研究所 銀永明弘、原川哲博
- (2) 大阪府立大学生命環境科学研究科 小崎俊司
- (3) 大阪大学医学系研究科 杉本 央

A. 研究目的

ボツリヌス毒素は、最も致死活性の高い物質であることから、ボツリヌス毒素は最も生物兵器として利用される可能性の高いものの一つと考えられている。生物兵器による被害は当初においては感染症として認知されることから、救急医療関係者や保健行政担当者が兵器に暴露されることが予想され、これらの人々に対する防疫体制の確立が肝要である。しかし、現在、世界中で承認販売されているボツリヌストキソイドワクチンはない。このため、2007年に厚生労働研究班によって、多価ボツリヌストキソイド(Lot 4)が製造された。今回、本トキソイドの有効性及び安全性を検討する目的で、臨床研究として研究者・抗毒素製造従事者に接種し、同時に採血を行って血中抗毒素価を測定した。また、製造から4年経過しているため、品質管理試験を実施し、経時的な変化を起こしていないか評価した。

B. 研究方法

1. 品質管理試験

多価ボツリヌストキソイドの安定性評価にあたって、2007年に製造し、厚生労働研究班が行った試験の中から、無菌試験、無毒化試験及びA,B,E及びF型毒素のうちA型に対する力価試験を生物学的製剤基準に準拠した方法で行った(表1)。

2. 被検者への研究説明、ワクチン接種と採血、副反応成績調査

ボツリヌス毒素研究に関わる研究者として、一般財団法人・化学及血清療法研究所のボツリヌス毒素関連従事者9名に対して、研究責任医師が臨床研究の目的及び実施要綱を十分に説明した。さらに、文書による同意を得た上で、沈降多価トキソイドを4週間隔で2回接種した。その際、初回ならびに2回目接種後の健康調査表による副作用解析を行った。2回のトキソイド接種前に、血液を5ml採血した。

3. ELISA法による血清中の抗ボツリヌス毒素(A,B,EおよびF型)抗体価の測定

血清中の抗ボツリヌス毒素抗体価の測定は、ELISA法にて実施した。

4. 統計解析

算出された血清中の抗ボツリヌス毒素抗体価を統計解析を行い、平均値、標準偏差、正規性の検討(Shapiro-Wilk検定)、最大値及び最小値を算出し、箱ひげ図を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究にかかわる試験は、研究組織のすべての研究室等から、所属するヒト倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. 品質管理試験

1) 無菌試験では、菌の発育は認められなかった。

2) 無毒化試験では2回の試験で毒素による症状及び体重減少は全く認められなかった。体重の推移は図1に示す。

3) 力価試験では、50%死亡点 0.0187 (54 倍希釈) (95%CI:0.012~0.028 (36~83 倍希釈)) であった (表 2)。この結果と 2007 年製造直後に行った試験結果 50%死亡点 0.0150~0.0157 (64~66 倍希釈) と比較したところ、統計学的に有意な差は認められなかった (表 3)。

2. 被検者への研究説明、ワクチン接種と採血、副反応成績調査

1) 接種者の背景

接種者 9 例の背景を以下に示す。

接種者背景項目	カテゴリ	症例数
性別	男	4
	女	5
	合計	9
年齢	20~30 歳未満	2
	30 歳以上 50 歳未満	4
	50 歳以上	3
	合計	9
過去の接種の有無	無	8
	有	1
	合計	9
アレルギーの有無	無	9
	有	0
	合計	9
既往歴の有無	無	3
	有	6
	合計	9
家族歴の有無	無	1
	有	8
	合計	9
基礎疾患の有無	無	9
	有	0
	合計	9
合併症の有無	無	9
	有	0
	合計	9

2) 安全性

(1) 副作用発現状況

副作用の発現件数は表 4 のとおりである。

すべての発現事象は、接種部位であることが認められ、軽度であった。

(2) 有害事象の内訳

有害事象の発現件数は表 5 のとおりである。

鼻咽頭炎は軽度であり、また、時間的關係より、本剤との因果關係は否定的と考えられた。

3. ELISA 法による血清中の抗ボツリヌス毒素(A, B, E および F 型)抗体価の測定

今回最小希釈倍数と決めた 16 倍希釈で初回接種時と 2 回目接種時の血清中に含まれる抗体価 OD_{450nm} 値に差が認められなかった場合は、検出限界以下とみなし <4 と表した (表 6)。A 型毒素に対する抗体価は 1 名のみが 10 であったが、他 8 名は <4 であった。B 型毒素に対する抗体価は 2 名が <4 であったが、他 7 名は 8-12 の範囲を示し、E 毒素に対する抗体価は 5 名が <4 であったが、他 4 名は 9-13 の範囲を示した。また F 型毒素に対する抗体価は 3 名が <4 であったが、他 6 名は 7-13 の範囲を示した。2 回の接種しか行っていないが、A 型は他の B, E および F 型に比べて抗体価の上昇が遅い傾向があった。

4. 統計解析

ELISA による抗体価測定の結果、A 型: 平均値 1.1、標準偏差 3.3、B 型: 平均値 7.4、標準偏差 4.5、E 型: 平均値 4.9、標準偏差 5.9、F 型: 平均値 7.0、標準偏差 5.5 となった (表 7)。正規性については全ての型で認められなかった。データの箱ひげ図は図 2 に示す。

D. 考察

多価ボツリヌストキソイド (Lot 4) は 2007 年に製造され 4 年が経過しているため、製剤の安定性が保たれているかを、無菌試験、無毒化試験及び力価試験を実施して評価した。その結果、無菌性、無毒性が担保されており、安全性に問題はないと考えられた。また、力価試験において、抗体産生による毒素防御効果が製造直後の試験と有意差が認められない結果となり、有効性についても問題はないと考えられる。

トキソイドの被験者への接種時の安全性に関しては、調査票収集症例 9 例、安全性解析対象症例 9 例において集計した結果、副作用発現件数は 2 回接種の合計で 17 件あった。また、本剤との因果關係が否定された有害事象は 2 回接種の合計で 1 件であった。

一方、血中抗体価については、ELISA で定量した。抗原となった A, B, E および F 型全てに高い抗体価を示したのは、1 名であった。全ての型に対する抗体価が検出限界以下となったのは 2 名のみで、他 6 名はいずれかの毒素型に対しての抗体が検出された。現在免疫途中であることから、今後全員の抗体価が上昇することが期待される。

E. 結論

今回 HS 研究で用いる多価ボツリヌストキソイドは製造から4年経過しているが、製造直後の試験と比較して経時的な変化は認められなかった。

このトキソイドを用いて、一般財団法人 化学及血清療法研究所のボツリヌス毒素関連従事者9名に対して、4週間隔2回の接種と採血を行った。被験者の血清中に含まれる各毒素型に対する抗毒素価を ELISA で定量した。9名中7名がいずれかの毒素型に対する抗体価が上昇していた。一方、健康調査表による副作用解析では、接種部位の軽度の腫脹・発赤・掻痒感などの副作用を一部に認めたが、重大な有害事象は認められなかった。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 2007 年厚生労働研究班が実施した試験と今回実施した試験の一覧

試験項目	試験実施年月日		
	厚生労働研究班 実施試験 2008.5.21	今回実施した試験 1 2011.4.25	今回実施した試験 2 2011.12.26
pH試験	○	-	-
たん白質含量試験	○	-	-
アルミニウム含量試験	○	-	-
チモサル含量試験	○	-	-
ホルムアルデヒド含量試験	○	-	-
無菌試験(直接法/MF法)	○(直接法)	○(MF法)	-
異常毒性否定試験(モルモット)	○	-	-
無毒化試験(加温・非加温[モルモット])	○	○(加温のみ)	○(加温のみ)
力価試験(モルモット)	○		
力価試験(マウス)	○	○(A型のみ)	-
血中抗毒素価測定(免疫動物)	○	-	-

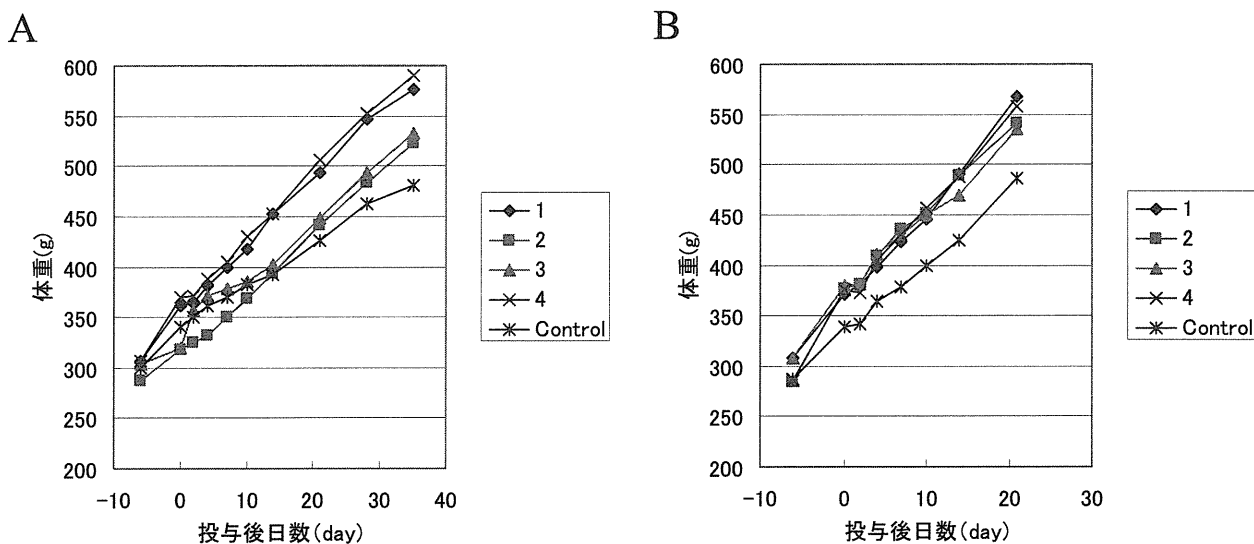


図 1. 無毒化試験における多価ボツリヌス毒素を接種したモルモットの体重の経過
A: 試験 1 B: 試験 2

表2. 力価試験結果

トキシイド希釈倍数	トキシイド原液を1としたときの量	N	死亡数
10	0.1	10	0
20	0.05	10	1
40	0.025	10	2
80	0.0125	10	8

50%死亡点 0.0187 (54 倍希釈)
 (95%CI:0.012~0.028 (36~83 倍希釈))

表3. 2007年厚生労働研究班における力価試験結果 (参考)

トキシイド希釈倍数	トキシイド原液を1としたときの量	N	死亡数
20	0.05	5	0
40	0.025	5	0
80	0.0125	5	4
160	0.00625	5	5

50%死亡点 0.0150 (66 倍希釈)
 (95%CI:0.007~0.033 (30~143 倍希釈))

トキシイド希釈倍数	トキシイド原液を1としたときの量	N	死亡数
20	0.05	5	0
40	0.025	5	2
80	0.0125	5	3
160	0.00625	5	4

50%死亡点 0.0150 (66 倍希釈)
 (95%CI:0.007~0.033 (30~143 倍希釈))

表 4. 副反応発現状況

MedDRA/JのPT(基本語)	1回目接種の件数					2回目接種の件数				
	計	軽度	中等度	重篤	不明	計	軽度	中等度	重篤	不明
筋力低下	2	2	0	0	0	2	2	0	0	0
注射部位そう痒感	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0
注射部位疼痛	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
注射部位腫脹	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
注射部位血腫	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	3	3	0	0	0	9	9	0	0	0

表 5. 有害事象

MedDRA/JのPT(基本語)	1回目接種の件数					2回目接種の件数				
	計	軽度	中等度	重篤	不明	計	軽度	中等度	重篤	不明
皮内反応部位紅斑	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
皮内反応部位腫脹	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
皮内反応部位発疹	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
鼻咽頭炎	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
合計	4	4	0	0	0	2	2	0	0	0

表 6. 被験者のボツリヌス抗毒素価

トキソイド2回注射後の抗体価

被接種者番号	A	B	E	F
2011	<4*	8	<4	<4
2736	<4	9	<4	13
4118	<4	8	<4	7
4835	<4	12	11	11
4873	<4	10	11	11
6500	<4	8	9	9
6812	<4	<4	<4	<4
9190	<4	<4	<4	<4
9560	10	12	13	12

*: \log_2

表 7. ボツリヌス多価トキソイド2回接種前血清の統計解析