

雌雄共に WH-WT に発生することが知られている所見が WH-TG においても確認されたことから、WH-TG は WH-WT の特徴を備えていることが示唆された。

[増村] 雄 *gpt delta* マウスの肝臓および精巣における自然突然変異の特徴と加齢の影響を分析した。肝臓における主要な点突然変異は G:C to A:T 変異であり、大部分が CpG での変異であった。CpG における G:C to A:T 変異の原因としてメチル化シトシンの脱アミノ化が考えられている。また、G:C to T:A 変異も主要な変異タイプであったが、G:C to T:A 変異は酸化的 DNA 損傷によって誘発される変異の一つと考えられている。点突然変異頻度は加齢とともに増加したが変異スペクトルの特徴に明らかな差はみられなかった。これは、自然突然変異の原因となる内因性および外因性の変異原の種類が週齢によらずほぼ一定であることを示唆している可能性がある。精巣では加齢による点突然変異の蓄積が見られず、変異スペクトルは肝臓と同様の特徴を示したことは、内因性変異原の寄与度が大きいことを示唆しているかもしれない。*Pol κ KI* マウスの自然突然変異頻度は、52 週齢の雄雌ともに *Pol κ WT* よりも高い値を示した。TLS 型 DNA ポリメラーゼは DNA 損傷部位での DNA 合成を担っており、不活化によって変異誘発に対する感受性が増加することが示唆された。*Pol κ KI* 肝臓で見られた主要な変異は G:C to T:A 変異、次いで G:C to C:G、G:C to A:T 変異と、G:C 塩基対に生じた変異が 7 割以上であり *Pol κ WT* と異なっていた。自然突然変異の原因としては、酸化的 DNA 損傷等の内因性変異原、食餌由来の外因性変異原等の関与が考えられる。今回の結果から、肝臓において G:C 塩基対の塩基置換変異を誘発する DNA 損傷のエラーフリーな損傷乗り越えに *Pol κ* が関与しており、自然突然変異を抑制していることが示唆された。*Pol κ KI* マウスでは低用量の変異原の長期曝露の影響を高感度に検出できる可能性が示唆された。

[竹入]本年度は MMC および CDDP の投与実験が計画通りに進行中であり、来年度において DNA 傷害および遺伝子突然変異頻度のデータを採取する予定である。

(2) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本]変異原性試験はいかに生体内での状況を反映できるかが問題で、本研究課題では、継続して細胞分裂の経過を観察するライブセルイメージングの手法を一つの糸口と考える。まず、

ダウノルビシンによる小核の形成過程と小核を持つ細胞のその後の運命を解析し、次に、その変異原性を他の薬剤と同一条件で比較するため、従来法の IC50 に替わる新たな細胞毒性評価基準として「細胞周期の長さの変化」を適用した。具体的には、薬剤にさらした状態での細胞周期の長さが、未処理の場合の 1.5 倍になる濃度 ($ECC_{1.5}$) を設定し、その濃度で 24 時間曝露した後の小核の形成頻度を比較した。この方法は、細胞をカウントしたり、小核が形成されるまで薬剤の濃度を上げる必要もないため、毒性が少ないとされるチミジンでも 310 nM で細胞周期の遅延を計測することができた。逆に、S 期の同調に用いられるアフィディオリンは 250 nM で遅延が観測されたが、細胞周期を 1.5 倍に延長する濃度 ($ECC_{1.5}$) に 24 時間曝しても小核の形成頻度の上昇は観察されず、その有効性を示すことができた。

「山田」用いたエームス試験菌株は原理的には GC 塩基対で生じる突然変異しか検出できないが、今回得られた突然変異のスペクトラムでは同じ株のゲノムで AT 塩基対にも突然変異が生じていたので、ゲノム全体を調べれば菌株は 1 つでよいということになる。また、従来の方と比較して必要なプレート数は 10 分の 1 になる計算であり、次世代シーケンサー自体はまだ高価であるが、その他のコストはかなり削減できるものとする。ホールゲノムシーケンスの手法は、原理的には表現型によるセレクションが不要であり、コロニーは数個解析できればよいので、生育阻害が強い化学物質にも適用できる。シーケンサーのコストが下がればゲノムサイズが大きいヒトの DNA に応用できる可能性が高まると考えている。ホールゲノムシーケンスの手法を変異原性試験として実施する場合に重要になるのは、用いた用量に対して何個の突然変異が生じた場合に「変異原性がある＝陽性」と判定するかということと考える。エームス試験で陰性とされているケミカルで処理して得られた復帰変異コロニーについてもゲノムの解析が必要と思われる。

[須井] 検討 1 : S9 mix 存在下で得られた結果から、用いる菌数を減らすという条件だけでは、改良法 FAT の感受性は向上しないことが示唆された。S9 mix 存在下では、変異原性を有する代謝産物の生成量や安定性が被験物質により異なるため、今回のような結果が得られたと考えられる。検討 2 : 本培養を行うことにより、S9 の有無に関わらず全体的に復帰変異コロニー数の増加が認められたが、S9 mix 非存在下では、増

加の程度は被験物質処理群の方が大きかったのに対して、S9 mix 存在下においては、媒体処理群の方が大きかった。しかし、いずれの条件でも、本培養後における処理群の復帰変異コロニー数は本培養前と比べて非常に大きな値となっていることから、本培養を行うことにより、黄変ウェル出現に必要な復帰変異菌が十分量得られることが示唆された。

[平田] 特異抗体を作製する際にはリコンビナントの発現蛋白を抗原とする方法が一般的であるが、今回全ペプチド配列から抗原決定基となり得る配列部位をアミノ酸の立体構造をもとに推測して合成し、力価および特異性の高い抗体を得ることができた。

(3) Pig-a アッセイの標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

○反復投与毒性試験への組み込みプロトコールの検討および単回投与試験との比較

CP[千蔵] RBC *Pig-a* assay よりも検出感度の高い PIGRET は、反復投与試験のように投与用量が低下する試験系においても CP 反復投与による *in vivo* 突然変異誘発性を検出できることが示唆された。陰性対照群の 1 例で認められた投与期間中に *Pig-a* 変異頻度が高値となる事象は、対応策を検討すべき今後の課題と考える。

EMS[伊東] EMS を反復経口投与したラット末梢血中の全赤血球における *Pig-a* 遺伝子 MF は、中および高用量において、投与 2 週目から増加傾向を示し、100 mg/kg/day 投与群では、投与 4 週目に陰性対照群に比べて明らかに高い値を示した。同様の結果は、Dobo ら () も報告しており、EMS による遺伝子突然変異誘発性を *Pig-a* アッセイで検出できることが確認された。加えて、100 mg/kg/day という反復投与毒性試験としても成立する用量で EMS の遺伝子突然変異誘発作用を検出できることが判明した。以上のことから、*Pig-a* アッセイを一般毒性試験へ組み込むことで、被験物質の一般毒性に加えて、遺伝子突然変異誘発性についても検討することが可能であると考えられる。また、PIGRET アッセイは *Pig-a* アッセイに比べて、より早期に EMS による遺伝子突然変異誘発作用を検出できることが示された。

Pig-a アッセイおよび PIGRET アッセイは、レポーター遺伝子を外部から導入したトランスジェニック動物を用いる試験と違って、高価な動物を使用する必要が無いこと、操作が

簡便であること、反復投与毒性試験に組み込みが可能であること、および単回投与の 1 週間後には判定が可能であること等の多くの利点を有しており、*In vivo* における遺伝子突然変異の検出試験として早期に確立されることが望まれる。

MMS[武藤] PIGRET アッセイの方が *Pig-a* アッセイよりも短期間かつ高感度に遺伝毒性リスクを評価する手法として期待され、反復投与毒性試験への組み込みも可能であると考えられた。また、単回投与試験の短期遺伝子突然変異試験としての有用性が示唆された。

MDA[真田] MDA の反復投与では、*Pig-a* アッセイ及び PIGRET とともに媒体対照群と比較しわずかな MF の増加が認められ、そのピークは投与 14 日目と、7 日目であった。赤血球は骨髄内で突然変異が生じ末梢血に出てくるまでに 1 週間程度要することが知られており、PIGRET 法と比べ、変異体の蓄積が検出されるまでに時間を要したと考えられる。

MDA は単回投与での *Pig-a* アッセイ、PIGRET、および骨髄細胞を用いた小核試験においても陽性の結果は得られず、MDA の遺伝毒性は単回投与で検出されにくいものと考えられる。MDA による遺伝子損傷には代謝物が関与することを示唆する *in vitro* 遺伝毒性試験の結果がある一方で、発がん物質として知られる diethylnitrosamine は、28 日間反復投与試験で肝臓での染色体異常は認められるが、造血細胞での小核誘発及び *Pig-a* 遺伝子突然変異は認められないという報告がある。MDA が本評価系では遺伝毒性が検出されなかったのは、遺伝毒性作用に肝代謝物が関与しているためと考えられる。

○*Pig-a* アッセイによる放射線遺伝毒性評価 [堀端]

放射線照射によって生じる遺伝毒性を *Pig-a* アッセイにより評価が可能であることが明らかになった 2 Gy 照射群以外では、すべて幼若マウスの方が強く遺伝毒性を検出したことは、幼若動物では造血サイクルが亢進しており、造血幹細胞の細胞分裂が成熟マウスと比較して高く、そのため、必然的に DNA 複製が頻繁に行なわれることで DNA 損傷がより多くの突然変異として固定された結果であると考えられる。高線量単回照射群で、照射後 2 週目が MF の上昇のピークでその後低下したことは、高線量放射線によって不可逆的かつ致命的な損傷が生じ、細胞その

ものが死滅した結果かもしれない。低線量および中線量長期照射群の幼若群においては、照射日数に相関して *Pig-a* MF の上昇が見られたことは、本アッセイが遺伝毒性の蓄積性も含めて評価可能であることを反映したものと考えられる。

○ *gpt*-delta トランスジェニックラットを用いる *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法 [堀端]

PIGRET 法では投与後 1 週目で高い *Pig-a* MF が見られたが、これは PIGRET 法の標的細胞が幼若赤血球、すなわち造血幹細胞から赤血球へ分化した直後の状態であり、造血幹細胞で生じた突然変異がより早い段階で表現型として現れた結果であると考えられる。一方、従来の *Pig-a* アッセイでは投与後 2 週目で陽性になっている。従来の *Pig-a* アッセイでは、標的細胞は全赤血球であることから、DNA 損傷誘導前に分化していた赤血球も含まれるため、このような遺伝毒性の表現型への発現タイムラグが生じていると考えられる。

E. 結論

(1) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] ES を投与した F344 *gpt* delta ラットと野生型 F344 ラットの血液学的検査、血清生化学的検査、主要臓器の病理組織学的検索および ES 特異的 DNA 付加体解析を実施した結果、F344 *gpt* delta ラットと野生型 F344 ラットの ES への反応性は生物学的に同等と考えられた。雄性 F344 *gpt* delta ラット及び野生型 F344 ラットの 104 週間飼育を行い、各 50 例について病理組織学的検索を実施した結果、体重、臓器重量および副腎の pheochromocytoma の発生率等に差が認められた。

[藤居] F344 系統 *gpt* delta ラットを用いた突然変異試験に小核試験（末梢血、骨髄、肝臓、大腸）を組み込んだ統合型毒性試験法について検討を行った。B[a]P を 28 日間経口投与し、最終投与翌日および 3 日後に骨髄、肝臓、大腸を採取して *gpt* アッセイおよび小核試験を実施したところ、いずれの組織においても点突然変異体頻度の増加が確認できたが、小核の誘発は認められなかった。また、サンプリング時期による結果の差異は殆どみられなかった。Tg ラットを用いた突然変異試験における臓器サンプリング時期は、最終投与翌日でも問題がないことが示唆され、Tg 動物を用いる突然変異試験に他の指標を統合する際に有用な知見と考えられた。

[高木] WistarHannover 系 *gpt* delta ラットと、そのバックグラウンドである WistarHannover 系ラットを 6 カ月飼育し各種検査を実施した結果、WistarHannover 系 *gpt* delta ラットは Wistar Hannover 系ラットと同様な背景データを有する動物として、統合型毒性試験系として有用なモデル動物であることが示唆された。

[増村] 雄 *gpt* delta マウスの肝臓と精巣における自然突然変異の特徴を分析した結果、加齢に特徴的な点突然変異のタイプは認められなかった。52 週齢の *Pol* κ KI マウスの肝臓における自然突然変異は G:C to T:A 変異を主とした G:C 塩基対の塩基置換変異が主であった。*Pol* κ KI マウスが突然変異高感受性であることが示唆された。

[竹入] *Pol* κ KI *gpt* delta マウスの高感度 *in vivo* 遺伝毒性評価系としての可能性を見極めるために既知変異原物質を用いた実験を実施中である。

(2) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] 核・染色体を可視化した m5S 細胞を用いて細胞分裂を継続的に観察することで、変異原物質による小核の形成過程、並びに、その後に細胞系譜上で追跡することができた。さらに、各薬剤について、細胞周期を 1.5 倍に遅延する濃度 (ECC_{1.5}) を指標にすれば、小核形成頻度の比較が可能で、 μ M 以下の濃度で薬剤の効果も評価できる。

「山田」エームス試験で得られた復帰変異コロニーの全ゲノム配列を次世代 DNA シークエンサーで解析し、1 菌株でも 5 菌株で得られていた以上の情報、例えば変異スペクトラム、が得られること、試験管やプレートなどのコストが大幅に節約できることが分かった。

[須井] FAT (S9 mix 存在下) で陽性反応が最も強く認められる菌数は化合物により異なること、本培養を行うことにより誘発される復帰変異ウェル数が増加することが示唆された。

[平田] 力価の高い特異的な抗体が作製できたので、キットに用いる菌株の最適な培養条件を迅速に決定できる。

(3) *Pig-a* アッセイの標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討としては、まず、*Pig-a* アッセイは化学物質のみならず、放射線照射によって生じる遺伝毒性が評価可能であることが示唆されたことから、他の毒性試験（単回投与毒性試験、反復投与毒性試験）の中で *in vivo* 突然変異誘発性を同時に評価できる試験

系として活用できる可能性が示唆された。さらに、幼弱赤血球を用いる PIGRET アッセイは *Pig-a* アッセイよりも短期間かつ高感度に遺伝毒性リスクを評価でき、ラットを用いた反復投与毒性試験への組み込みも可能であると考えられた。ラットにおいても、単回投与で短期に結果が出る遺伝子突然変異試験としての有用性が示唆された。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Matsuda, M. Takamune, M. Yamada, A pilot study for the mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, *Genes & Environ.*, in press
 - 2) M. Yamada, M. Shimizu, A. Katafuchi, P. Grúz, S. Fujii, Y. Usui, R.P. Fuchs, T. Nohmi, Erroneous nature of DNA polymerase III in *Escherichia coli* is responsible for the high spontaneous mutations in a *mutT* background, *Mol Microbiology*, 86, 1364- 1375 (2012)
 - 3) T. Nohmi, M. Honma, M. Yamada, K. Masumura, M. Yasui, K. Horibata, S. Fukushima, 2nd International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 34, 141-145 (2012)
 - 4) T. Nohmi, M. Yamada, K. Masumura, *In vivo* approaches to identify mutations and in vitro research to reveal underlying mechanisms of genotoxic thresholds, *Genes and Environment*, 34, 146-152 (2012)
 - 5) T. Kimoto, S. Chikura, K. Suzuki-Okada, X. Kobayashi, Y. Itano, D. Miura, Y. Kasahara, Effective use of the *Pig-a* gene mutation assay for mutagenicity screening: measuring CD59-deficient red blood cells in rats treated with genotoxic chemicals, *J. Toxicol. Sci.* 37, 943-955 (2012)
 - 6) A.D. Bailey, L.T. Gray, T. Pavelitz, J.C. Newman, K. Horibata, K. Tanaka, A.M. Weiner, The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PGBD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells. *DNA Repair*, 11, 488-501 (2012)
- ##### 2. 学会発表
- 1) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, A six months feeding study for WistarHannover *gpt* delta transgenic rat, SOT 52nd Annual Meeting, USA (2013.3)
 - 2) 山田雅巳, 高宗万希子, 増村健一, 能美健彦, 大腸菌 *mutM/mutY* 二重変異株のゲノムに蓄積した突然変異の3か月間の推移の次世代シーケンサーによる解析, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡(2012.12)
 - 3) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 山田雅巳, ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討8. 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
 - 4) 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代DNAシーケンサーを用いた変異原性試験の開発 -変異スペクトラムの特徴-, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
 - 5) 松田知成, 松田陽子, 高宗万希子, 山田雅巳, 次世代DNAシーケンサーを用いた変異原性試験の開発 -パイロット試験-, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
 - 6) 本山茂記, 竹入 章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, ベンゾ[a]ピレンの損傷乗り越え DNA複製におけるDNA polymerase κ の役割, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
 - 7) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, *gpt* delta ラットの13週間飼育試験, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
 - 8) 堀妃佐子, 下吉里実, 高柳智美, 増村健一, 山田雅巳, 藤居 互, F344系統 *gpt* delta ラットを用いた突然変異試験と小核試験(末梢血, 骨髄, 肝臓, 大腸)の統合法の検討, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)
 - 9) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 石井雄二, 梅村隆志, 高木久宜, 西川秋佳, 本間正充, 能美健彦, *gpt* delta マウスおよびラットを用いた自然突然変異および誘発突然変異の解析, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡(2012.11)

- 10) 石井雄二, 高須伸二, 松下幸平, 黒田 颯, 能美健彦, 小川久美子, 梅村隆志, 肝発がん物質エストラゴールの特異的 DNA 付加体定量解析ならびに遺伝子突然変異誘発性, 日本環境変異原学会第 41 回大会, 静岡 (2012. 11)
- 11) M. Yamada, K. Masumura, M. Takamune, T. Nohmi, Analysis of mutations accumulated in the genome of *E. coli* mutator strains using a next-generation DNA sequencer, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, China (2012. 10)
- 12) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions induced in liver and testis of aged *gpt* delta transgenic mice, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, China (2012. 10)
- 13) T. Nohmi, N. Toyoda-Hokaiwado, Y. Yasui, M. Takamune, M. Yamada, M. Muramatsu, K. Masumura, T. Ohta, T. Tanaka, Modulatory effects of capsaicin on *N*-diethylnitrosamine-induced mutagenesis and hepatocarcinogenesis in *gpt* delta rats, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, China (2012. 10)
- 14) K. Matsushita, Y. Ishii, S. Takasu, M. Jin, K. Kuroda, T. Nohmi, A. Nishikawa, K. Ogawa, T. Umemura, Spontaneous tumor spectra in male and female *gpt* delta rats on an F344 background. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012. 09)
- 15) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Characteristics of point mutations and deletions accumulated with aging of *gpt* delta transgenic mice, The 42nd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Poland (2012. 9)
- 16) M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, Mutation accumulation in the whole genome of *E. coli* mutator strains, UKEMS 35th annual meeting, UK (2012. 7)

以下の案件名 (案) で特許申請中 (2013/1/24 公開) である。
「磁気ビーズ濃縮法を利用した *Pig-a* 変異網状赤血球の測定法」

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ヒト iPS 細胞由来機能細胞を利用した 新規薬効評価系の構築

独立行政法人医薬基盤研究所
幹細胞制御プロジェクト
川端 健二

マウス iPS 細胞を OP9 細胞と共培養することにより、マスト細胞を分化誘導することに成功した。また、Swiss 3T3 線維芽細胞や stem cell factor (SCF) が iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化や増殖を促進することが示された。また、支持細胞との共培養法あるいは胚様体形成法により、ヒト iPS 細胞から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞が分化誘導可能となった。ヒト ES 細胞である KhES4 およびヒト iPS 細胞である Toe を腭分化させることによって、Insulin および PDX1 遺伝子の発現量が、他のヒト ES/iPS 細胞よりも高かったことから、KhES4 および Toe は腭分化能が高いことが明らかになった。神経細胞の細胞塊を浮遊培養で得たのち細胞外電位の測定を実施した結果、検出確率が単層培養時の 20%から 80%へと大きく改善したことから、ヒト iPS 細胞由来神経細胞は細胞塊を形成することでその機能が改善することが示唆された。

研究分担者

水口裕之 大阪大学大学院薬学研究科

木藤古孝行 株式会社リプロセル

浅井康行 株式会社リプロセル

A. 研究目的

近年、アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患の患者数は益々増加しており、社会問題となっている。アレルギー反応の主役はマスト細胞であり、抗アレルギー薬を新規に開発あるいは評価するには *in vitro* でマスト細胞を培養することが重要となるが、マスト細胞は *in vivo* では組織中に浸潤しているため、生体からマスト細胞を取り出し、培養することは非常に困難である。これまで、脱顆粒抑制薬 (=抗アレルギー薬) の評価は、ラット RBL-2H3 細胞等を用いて行われてきたが、種差がある、脱顆粒応答能にばらつきがある等の理由により薬効評価には十分な系とはいえない。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導し、免疫毒性評価系へ応用することを目指す。当該年度は、マウス iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立およびヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の確立を行った。また、iPS 細胞から分化誘導

したマスト細胞を創薬へ応用するには安定的に培養可能な培養条件の検討が必須である。そこで当該年度は iPS 細胞由来マスト細胞の大量培養法の開発を試みる。

これまでにヒト iPS 細胞から膵β細胞への分化誘導研究は多くなされているが、いまだに *in vitro* 分化誘導系において、ヒト膵β細胞と同程度のグルコース応答能を有したヒト iPS 細胞由来膵β細胞は作製できていない (Cell Stem Cell. 2013 Feb 7;12(2):224-37.)。そこで、我々は新たな膵関連遺伝子の導入あるいは新規低分子化合物を作用することによって、ヒト iPS 細胞から膵β細胞への分化促進を試みる。過去にヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cells; ヒト ES 細胞) 株によって、その膵分化能が大きく異なり、ヒト ES 細胞株間によって、膵分化させた後の細胞における PDX1 遺伝子発現量が 100 倍以上異なることが報告されている (Nat Biotechnol. 2008 Mar;26(3):313-5.)。したがって、ヒト iPS 細胞から高いグルコース応答能などの機能を有した膵β細胞を作製するための因子を探索するには、膵分化能の高いヒト ES/iPS 細胞株を選択し、実験を実施する必要がある。そこで、我々は 4 株のヒト ES 細胞ならびに 4 株のヒト iPS 細胞を膵分化させ、各細胞における膵関連遺伝子 (Insulin や PDX1 など) の遺伝子発現を解析した。

iPS 細胞技術については iPS 細胞自体の培養方法あるいは iPS 細胞から分化誘導をおこない様々

な機能細胞を得る手法に関しては活発に研究が進んでいるが、得られた機能細胞を適切に培養する手法の検討は今後の課題となっているため、iPS 細胞から得られた機能細胞はその機能が限定的である状況を生んでいるものと考えられる。本研究では iPS 細胞から分化誘導をおこなって得られた神経細胞を使用して、細胞が立体的な構造を取ることによってその機能が改善するかどうかの検討を実施した。

B. 研究方法

本研究は、研究代表者川端、分担研究者水口、木藤古の計3名で実施した。当該年度においては、主にマウス iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の確立、ヒト iPS 細胞から腭分化誘導法の開発、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質管理研究、を行った。方法の詳細は各分担報告書を参照されたい。

(倫理面への配慮)

本研究は、各研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

C. 研究結果

C-1. マウス iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いて薬物毒性評価系を構築する前に、マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞由来中胚葉系細胞を IL-3 および SCF 存在下で骨髄ストロマ細胞株である OP9 細胞と共培養することで、マウス iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導することに成功した。

C-2. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞から血液・免疫細胞を得るには、まず、血液前駆細胞を分化誘導する必要がある。ヒト ES 細胞あるいは iPS 細胞から血液前駆細胞を得る方法として、骨髄ストロマ細胞株である OP9 細胞などの支持細胞との共培養法や胚様体 (embryoid body : EB) 形成法などが汎用されている。そこで今年度は、まず、VEGF 存在下でヒト iPS 細胞と放射線照射した OP9 細胞あるいは

C3H10T1/2 細胞 (支持細胞) とを共培養することで血液前駆細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞株 201B7 を C3H10T1/2 細胞と共培養した結果、共培養 15 日目頃からヒト iPS 細胞由来のコロニーが隆起してできた嚢状構造の内部に血球様の球状細胞が出現してくる事が観察された。一方、OP9 細胞との共培養では、iPS 細胞由来の血球様細胞は観察されなかった。C3H10T1/2 細胞との共培養により得られた血球様細胞は、血液前駆細胞のマーカーである CD34 や CD43 を発現するような細胞であることがフローサイトメトリー解析により確認された。また、コロニーアッセイにより CD34⁺CD43⁺細胞は、血液コロニー形成能を有することが示された。以上の結果から、iPS 細胞株 201B7 から血液前駆細胞を分化誘導可能であることが示された。しかしながら、ヒト iPS 細胞株 Toe では、C3H10T1/2 細胞を用いても血球様細胞を得ることはできなかった。そこで次に、EB 形成法によりヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導も試みた。その結果、Tic 株と 201B7 株の両細胞株において分化誘導 6 日目以降において CD34 および CD43 を発現する細胞が検出された。また、EB 形成法により得られた CD34 陽性細胞は、血液コロニー形成能を有することもコロニーアッセイにより確認した。したがって、細胞株により血液前駆細胞への分化誘導法 (共培養、EB 形成法など) を選択する必要があることが示唆された。

C-3. マウス iPS 細胞由来成熟マスト細胞の大量培養法の開発

ヒト iPS 細胞から分化誘導したマスト細胞を用いて薬物毒性評価系を構築する前に、マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞由来中胚葉系細胞を IL-3 および SCF 存在下で骨髄ストロマ細胞株である OP9 細胞と共培養することで、マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導を試みた。メイ・ギムザ染色およびトリウジンブルー染色の結果、iPS 細胞由来マスト細胞は、骨髄由来マスト細胞 (BMMC) と同様の染色像を示したことから、iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導可能であることが示された。また、サフラン O 染色の結果、BMMC は未熟なマスト細胞であるのに対し、iPS 細胞由来マスト細胞は、成熟マスト細胞であることが示唆された。さらに、顆粒のプロテアーゼ活性を測定したところ、iPS 細胞由来マスト細胞では BMMC と比較し、トリプターゼおよびカルボキシペプチダーゼ A 活性の増加が観察された。したがって、いずれの方法を用いて誘導した iPS 細胞由来マスト細胞でも BMMC と比較し、より成熟した細胞であることが示された。また、compound48/80 およびサブスタンス P 対

する脱顆粒能を検討した結果、iPS 細胞由来マスト細胞では、いずれも高い脱顆粒応答性を示した。さらに、顆粒のプロテアーゼ活性を測定したところ、BMMC と比較し、iPS 細胞由来マスト細胞では、トリプターゼおよびカルボキシペプチダーゼ A 活性の増強が観察されたことから、OP9 細胞との共培養法を用いることで、より酵素活性の高いマスト細胞が誘導可能であることが示された。これまでに BMMC を SCF の存在下で線維芽細胞株 Swiss3T3 と共培養することにより、マスト細胞の成熟化が促進されることが報告されている。そこで、Swiss3T3 細胞をフィーダー細胞とすることにより、iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化が促進するかどうかについて検討を行った。OP9 細胞を用いて誘導した iPS 細胞由来マスト細胞を Swiss3T3 細胞と 16 日間共培養することにより、サフラニン強陽性の細胞が得られた。また、OP9 細胞をフィーダー細胞とした時と比較し、Swiss3T3 細胞をフィーダー細胞とした場合では、種々の刺激に対する脱顆粒応答能の亢進が観察された。さらに、それぞれの細胞を電子顕微鏡下で観察した結果、OP9 細胞をフィーダー細胞とした時と比較し、Swiss3T3 細胞をフィーダー細胞とした場合では、顆粒の増大が観察された。以上の結果から、iPS 細胞由来マスト細胞は Swiss3T3 細胞と共培養することによりさらに成熟化が促進することが示された。また、共培養時の細胞数の変化について検討を行った結果、iPS 細胞由来マスト細胞を SCF 存在下で Swiss3T3 細胞と共培養することにより、細胞数が 10 倍程度増加した。以上の結果から、Swiss3T3 細胞や SCF はマスト細胞の成熟化だけでなく増殖も促進することが示された。

C-4. ヒト ES/iPS 細胞から膵 β 細胞様細胞への分化誘導方法

ヒト ES/iPS 細胞は内胚葉、膵前駆細胞、膵内分泌前駆細胞を介して膵 β 細胞様細胞へと分化することが知られている。ヒト ES/iPS 細胞から膵 β 細胞様細胞への分化誘導を行うために、過去の報告 (Nat Biotechnol. 2012 Feb 26;30(3):261-4.) の分化誘導方法を参考に分化させた。

C-5. ヒト ES/iPS 細胞由来膵 β 細胞における膵関連遺伝子の発現解析

膵分化能の高いヒト ES/iPS 細胞株を選択するために、本研究では 4 種類のヒト ES 細胞株 (H9、KhES1、KhES3、KhES4) および 4 種類のヒト iPS

細胞株 (Tic、Toe、201B6、201B7) から膵分化を上記のプロトコールにしたがって行った。その結果、ヒト ES 細胞である KhES4 から分化誘導した細胞における *PDX1* および *Insulin* 遺伝子の発現が他の 3 株のヒト ES 細胞 (H9、KhES1、KhES3) よりも最も高かった。ヒト iPS 細胞においては、Toe 由来膵 β 細胞様細胞の *PDX1* および *Insulin* 遺伝子の発現が最も高かった。しかしながら、KhES4 あるいは Toe 由来膵 β 細胞様細胞においても *Insulin* 遺伝子の発現量はヒト膵臓の 10%程度であり、ヒト膵 β 細胞に換算しておおよそ 0.1%程度しかない。以上の結果から、ヒト ES 細胞 KhES4 およびヒト iPS 細胞 Toe は高い膵分化指向性を有することが示された。

C-6. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質管理

細胞外電位の検出確率は、比較対象のシングルセル播種条件で 20% (5 ディッシュ中 1 ディッシュ) であったのが、細胞塊を形成させた条件では 80% (5 ディッシュ中 4 ディッシュ) まで増加した。測定される電位の性質に大きな差はみとめられなかった。

D. 考察

マウス iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導法を確立した。また、C3H10T1/2 細胞との共培養法あるいは EB 形成法により、ヒト iPS 細胞から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞を分化誘導することが出来た。今後、本手法によって得られたヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞を用いて、各種血液細胞への分化誘導法を確立する。これまで行われてきたマスト細胞に関する研究の多くは、BMMC を用いたものである。しかし、BMMC はサフラニン O 染色に対して陰性であり、compound48/80 あるいはサブスタンス P に対して脱顆粒応答性を有していないこと、顆粒蓄積量やプロテアーゼ活性が低いことから、未熟なマスト細胞と考えられている。それに対し、本手法によって分化誘導した iPS 細胞由来マスト細胞は、サフラニン O 染色に対して陽性であり、プロテアーゼ活性が BMMC と比較し有意に高いこと、compound48/80 あるいはサブスタンス P に対して脱顆粒応答性を有していた。以上の結果から、iPS 細胞から機能的なマスト細胞を分化誘導可能であることが示された。

現在までに、Swiss 3T3 細胞をフィーダー細胞として BMMC を SCF 存在下で培養することにより、マスト細胞の成熟化が促進されることが報告されている。今回、新たに OP9 細胞をフィーダー細胞として用いても、マスト細胞の成熟化が促進さ

れることが示された。しかしながら、いずれの方法を用いた場合でも、なぜマスト細胞が成熟化するのかが明らかになっていない。また、生体内で未熟なマスト細胞がどのようなシグナルを受容し成熟するのかについて解明が試みられているが、いまだ不明である。したがって、マスト細胞の成熟化に関与する因子を同定することが今後の研究課題である。マスト細胞の成熟化に関与する因子を同定することができれば、マスト細胞の *in vitro* 分化誘導系を利用した薬物アレルギー評価系の開発あるいは新規抗アレルギー薬の開発への貢献も期待される。

腭分化能の高いヒト ES/iPS 細胞を探索した。その結果、ヒト ES 細胞 KhES4 およびヒト iPS 細胞 Toe は高い腭分化能を示した。ヒト ES/iPS 細胞株によって、異なる腭分化能を有する理由として、各細胞におけるエピジェネティックな状態が異なることが考えられる。また、本研究で用いた種々のヒト ES/iPS 細胞の継代数は株によって異なるため、継代数による影響もあると予想される。今後は、腭分化を促進する因子を探索するにあたって、腭分化能の高い KhES4 株あるいは Toe 株を用いて検討を行う予定である。

神経細胞機能の指標の一つである細胞外電位の測定方法としては、測定容器にシングルセルのまま播種し、単層の状態での測定方法が一般的であったが、iPS 細胞由来神経細胞の場合は検出率が低い問題が存在していた。単層の培養状態では機能細胞が本来有している機能の一部が失われてしまっていることが明らかになりつつあり、iPS 細胞由来機能細胞においても単層の培養状態では一部機能が失われていることが予想される。一方で初代培養細胞等を使用した研究では細胞同士が立体的な構造を形成できる培養手法をとることで、機能が単層培養状態よりも改善したとの報告もある。そこで本研究では浮遊培養にて立体的な細胞塊を形成させた後に測定容器へ播種し、細胞外電位の測定を実施したが、単層培養状態よりも検出率が 20% から 80% へと改善した。これは細胞同士が立体的な構造をとることで細胞間の相互作用が変化し、細胞そのものの機能が改善したと考えられるが、細胞単体時よりも電極との接着状態が改善し検出感度が上昇した結果にすぎないとも考えられる。しかし、過去にラット海馬神経細胞を使用して細胞外電位を測定した

際には、単層培養時でも細胞外電位は高頻度で検出できていることから、電極との接着状態改善によることは否定できる可能性が高い。したがって iPS 細胞由来神経細胞は細胞塊を形成させることによりその機能が改善することが示唆され、他の iPS 由来機能細胞についての応用が期待される。

E. 結論

- 1) マウス iPS 細胞を OP9 細胞と共培養することにより、マスト細胞が得られた。
- 2) C3H10T1/2 細胞との共培養法あるいは EB 形成法により、ヒト iPS 細胞から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞が得られた。
- 3) Swiss 3T3 線維芽細胞や SCF は、iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化および増殖を支持することが示された。
- 4) ヒト ES 細胞 KhES4 およびヒト iPS 細胞 Toe は高い腭分化能を有していた。今後はこれらの株を用いて、グルコース応答能の高い腭 β 細胞の作出を目指す。
- 5) iPS 細胞由来神経細胞は細胞塊を形成することでその機能が改善する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., **Kawabata K.** Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)

G-2. 学会発表

1. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、**川端健二**：マウス iPS 細胞から成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発；日本薬学会第

133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日

2. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二：マスト細胞の成熟化に関する新規液性因子の同定；第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
3. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata. Characterization of mast cells generated by differentiation from mouse induced pluripotent stem cells., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

フェレットに対する免疫原性を基盤とした 細胞培養インフルエンザワクチン株選定法確立

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター
浅沼秀樹

研究要旨 臨床分離株から増殖性・抗原性・マウスに対する免疫原性を検討し、フェレットの感染に用いる株を決定した。続いてフェレットへの感染実験を行った。一方、フェレット分子の作製ならびにフェレットの抗原分子のクローニングも進めている。

研究分担者

- (1) 東海大・工学部 山口陽子
- (2) 国立感染症研究所 岸田典子
相内 章
永田典代
- (3) 東京化成工業株式会社 湯浅德行

A. 研究目的

インフルエンザは毎年流行する呼吸器感染症で、その対策にはワクチンが用いられている。しかしインフルエンザウイルスは、頻繁に遺伝子変異を繰り返し、それに伴って抗原性も変化するため、ワクチンの感染防御効果が低下する。現行のインフルエンザワクチンは、流行株と抗原性の一致したウイルス株の遺伝子を改変し、製造に用いる発育鶏卵での増殖性を高くした株を用いている。しかし近年、ワクチン作製用に準備される高増殖性のワクチン用種株は、発育鶏卵に馴化することで、その抗原性が野外株と大きく変わることが指摘されている。このような抗原性の変化は、ワクチン効果

を著しく低下させ、症状が重篤になるだけでなく、流行が広範囲に渡るため、経済的損失も大きい。そのため、現行の発育鶏卵に代わる抗原性を変化させない増殖媒体の開発が期待されている。

細胞培養系を用いたワクチン製造は、発育鶏卵よりも抗原性が維持されていると考えられており、近々には細胞培養系で製造したプレパンデミックワクチンも実用化される。しかし季節性ワクチンを細胞培養系で製造する場合、株選択の基準などは一切確立されていない。

現行のインフルエンザワクチン株を選定する場合、流行株やワクチン種株の抗原性を比較検討する。この評価にはフェレットの感染血清が用いられている。しかし、その特異抗体の反応性にも数値のばらつきがある。例えば、2009年に流行した A/H1N1pdm09 株の A/Narita/1/2009 株のフェレット抗血清は特異的 HI 価が 5120 であるのに対し、2007年にブタから分離された A/Swine/Michigan/01/2007 株の特異的 HI 価は 320 と 16 倍の差が認められている。また、同じ H3N2 株でも A/Perth/16/2009

株では特異 HI 価が 160 であるのに対し、A/Niigata/403/2009 株では 1280 と 8 倍の差が認められている。これは感染に用いるウイルス株の感染性ないしはフェレットの応答性に差異があることを示唆しているが、現在までにこの差異はワクチン株選定には問題視されていなかった。本研究ではこの差異が種ウイルスの適正にどのような影響を及ぼすのかを確認し、新しいインフルエンザワクチンの種ウイルスの選択基準になり得るかどうかの詳細を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 臨床検体

研究協力者の許斐（高橋医院）の協力により、簡易診断キットで A 型陽性の鼻腔スワブ 48 検体を用いた。臨床検体は定量 PCR で亜型の判定を行った。なお、ヒト材料の取り扱いに関しては、国立感染症研究所倫理委員会の承認を受け、個人情報の取り扱いに十分に配慮し行われた。

2) ウイルス分離・継代

ウイルスの分離・継代には MDCK 細胞を用いた。患者から採取した鼻腔スワブを培養細胞に接種し、経時的に観察、細胞変性効果が認められた後に、培養上清を回収、1%モルモットないしは 0.5%七面鳥赤血球を用い HA 力価を測定した。継代はウイルス液を同様に培養細胞に接種し 2 日後、細胞変性効果を確認し、回収後 HA 価を測定した。

3) ウイルスの性状解析

ウイルスの蛋白量の測定には micro-BCA 法を用い、HA 含有量は SDS-PAGE で検討した。アミノ酸解析はシーケンスを行い、抗原性解

析は 2009 年～2011 年にワクチン株と抗原性が類似した株に対するフェレット抗血清を用いて評価した。

4) 感染実験

マウス（BALB/c、メス、8～10 週齢）に麻酔をし、各ウイルス（ $1 \times 10^5 \sim 10^6$ TCID₅₀、20 μ L）を経鼻的に滴下し感染させ 4 週後、血清を回収、蛍光抗体法（ELISA）で抗体価の測定を行った。

フェレット（4～6 ヶ月齢、雌）は麻酔し、ウイルス（ 1×10^6 TCID₅₀）を小容量（200 μ L）ないしは大容量（1000 μ L）感染させ、経時的に鼻腔洗浄液および血清を回収した。

これら動物実験は国立感染症研究所の定める動物実験実施規定に則って行われた。

5) ウイルス価測定

MDCK 細胞を用いたプラークアッセイ法により、鼻腔洗浄液中のウイルス価を算出した。MDCK 細胞に希釈した鼻腔洗浄液あるいは気管拭い液を 200 μ L 添加し、37 $^{\circ}$ C の培養器内で 1 時間の吸着操作を行った。その後、細胞を洗浄しアガロース添加培地を重層して 37 $^{\circ}$ C で 40 時間培養した。アガロース培地を剥離したのちに、クリスタルバイオレット染色液で染色し、プラーク数を数え、ウイルス価の算出を行った。

6) ELISA による抗体応答の測定

血清あるいは鼻腔洗浄液中のウイルス特異的な抗体は ELISA 法により行った。抗原として、 β -プロピオラクトンにて不活化した N337C9 粒子を用いた。血清および鼻腔洗浄液は、原液から 2 倍の希釈系列を調製し、サンプルとした。検出はアルカリフォスファターゼ標識抗フェレット IgM あるいは IgG 抗体により行った。その後、基質として pNPP を添加しプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。陽性

と判断できるサンプルの最大希釈倍率を各抗体価とした。

C. 研究結果

1) ウイルス同定・分離・継代

簡易診断キットを用いて A 型陽性の患者検体 48 例に含まれるウイルスの亜型を定量 PCR 法で検討した結果、48 検体全て H3N2 型であった。続いてウイルスの分離・継代を試みた結果、45 株で 8 継代に成功した。継代による増殖性の変化を検討するため、継代毎の各株の HA 価を測定したが、変動はほとんど認められなかった (図 1)。このことから今回分離された H3N2 株は継代による増殖性に影響はないことが示唆された。

2) 分離株の性状解析

このように分離・継代された各株について、性状解析を行った。今回分離・継代された 45 株の HA 価を基準に 6 株選択肢、3 代目および 9 代目のウイルス蛋白量を検討した。その結果、HA 価にばらつきがあるにも関わらず、蛋白量・HA 含有量ともに HA 価との相関性は認められなかった (表 1)。以上の結果は、今回分離した株は、HA 価に違いはあるものの、蛋白量および HA 含有量とは相関しないことを示唆している。続いて HA および NA 分子の遺伝子解析によるアミノ酸配列の解析および抗原性試験を行った。その結果、HA では 273 株および 382 株で 9 代目までの継代にアミノ酸変異は認められなかったのに対し、284 株 (P221P/L および N225N/D)、316 株 (A138A/S および N225N/D)、321 株 (P221P/L および N225N/D)、337 株 (N216N/K) では 9 代目でそれぞれの変異が認められた。また NA では 316 株で 3 代目に D151D/N が、273 株では 9 代目に T148A、

382 株でも 9 代目に T149I のアミノ酸変異が認められた (表 2)。しかしながら、これらの変異は抗原性にはほとんど影響が認められなかった (表 3)。

3) 分離・継代株を感染させた場合の免疫原性

続いて各分離・継代株の免疫原性について、マウスを用いて検討した。最も HA 価が高い株 (337 株) の 3 代目と 9 代目、最も HA 価が低い株 (316 株) の 3 代目と 9 代目、さらに HA 価が高い 273 株の 9 代目と低い 321 株の 3 代目、合計 6 株を感染株に用い、抗体応答を検討した。その結果、各株間での応答性に有意差は認められなかった (図 2)。

4) フェレット感染実験

本研究ではフェレットにウイルスを感染させた後に誘導される免疫応答を基準にワクチン種ウイルスを選択することが目的であるが、もっとも効率的に免疫誘導能が確認できるフェレットに対する感染条件が不明である。そこで、基礎検討として、今回分離された株の性状解析の結果を基に感染株を選択し、容量の違いによる経時的なウイルス価ならびに免疫誘導能の検討を行った。その結果、鼻腔領域中における感染ウイルスの増殖は、感染 5 日目まで高いレベルで検出され、上気道あるいは下気道感染で差が認められないことが明らかとなった。気管拭い液中のウイルス価は、両群共に感染一日目に非常に高く、下気道感染群で上気道感染群より高い傾向にあるが、その後継時的に減少することが示された (図 3)。

このように感染容量の違いによる鼻腔ならびに気管のウイルス価に差は認められなかったが、下気道感染の方が体重の減少が顕著であった (結果非表示)。そのため、異なる感染条件における感染 3 日目の肺の病理を検討した

ところ、低用量接種群において、3頭とも肺組織病変は認められず、ウイルス抗原陽性細胞は検出されなかった。一方、高用量接種群では、3頭中2頭の気管および肺内気管支周囲の気管支腺に単核系細胞の浸潤を主体とした炎症性病変が認められ、この病変に一致してウイルス抗原陽性細胞が検出された(図4)。また、肺門リンパ節では、低用量接種群では明らかな炎症性反応を示す所見は無かったが、高用量接種群では濾胞構造は不明瞭となり、リンパ洞の拡張がみられた。

続いて血清のHI抗体応答を検討した。その結果、血清のHI価に感染容量の違いによる応答性の違いはほとんど認められず、大部分のフェレットで感染2週をピークに経時的にわずかな減少が認められた(表4)。また特異的IgGおよびIgMも経時的に検討したが、HI価と同様、感染容量による抗体応答の有意な差異は認められなかった(図5)。以上の結果から、感染容量の違いによるウイルス価および抗体応答にはほとんど違いが認められないが、肺の病変および体重減少は高容量の感染で認められていたため、高容量感染条件の方が、広域に感染が広がることが示唆される。

5) フェレット分子の精製およびフェレット分子に対する抗体の作製

フェレットの免疫応答の背景を検討するため、フェレット分子のクローニングとモノクローナル抗体の作製を同時進行させている。フェレットの抗体分子に対する抗体は製造されているが、他の分子に対する抗体はほとんど得られていない。そこで今回精製されたフェレットCD4およびCD8分子に対するモノクローナル抗体の作製と、樹状細胞マーカーのCD11c分子のクローニングを行った。その結果、フェレット末梢単核球由来の遺伝子からCD11c遺伝

子を抽出、大腸菌を用いて遺伝子導入し、蛋白の精製まで成功した。一方、モノクローナル抗体はCD4に対して5クローン、CD8に対して2クローンの候補クローンの獲得に成功した。抗体のサブタイプはIgGおよびIgMクラスであった。現在、得られた候補クローンのクローニングおよび抗体の結合性解析を行っている。

D. 考 察

本研究は、有用なワクチン株の選定方法を確立することを目的としている。そしてその指標を種ウイルスのフェレットに対する免疫原性から評価し、ワクチン効果との相関性を明らかにすることと、フェレットの免疫機能の背景を検討している。そのためまず、現行のワクチン選定の行程を踏まえ、野外株の分離から性状解析を行い、免疫原性を検討するための候補株の選択を進めた。

今回、臨床検体48例から分離されたウイルス株は全てH3N2亜型であり、性状解析の結果から抗原性や増殖性とHA価との相関性は認められなかった。そのためH3N2野外株のHA価は、株選択の要因とはならず、蛋白回収量やHA含有量、さらには変異の有無によって評価する必要があることが示唆される。HA価は赤血球との凝集反応で評価されるため、ウイルスのHA分子の構造、特に糖鎖の構造が赤血球との結合に影響を与えることが示唆されている。そのため、HA価が異なるにも関わらず、蛋白・HA含有量に差異が認められなかったことは、各ウイルス株のHA分子の構造に起因することが示唆される。そのため、このような構造の差異が免疫応答にどのような影響を与えるかについてマウスで検討した。その結果、抗体応答に差異は認められなかったが、HA価の低い株で免疫したマウスでは、抗体応答の個体

間でのバラつきが顕著であった（図2）。このような応答性の差異が、HA分子の構造に起因しているかどうかの検証も必要である。今後は再現性の検討および各ウイルスの糖鎖構造の検討を行う予定である。

このような結果を踏まえ、フェレットに感染させる株の選定を行ったが、その一方、フェレットの抗体応答を効果的に誘導できる感染条件は検討されていない。そこで感染容量に着目し高容量ないしは低用量で感染させた場合の免疫応答について検討した。その結果、気道のウイルス価や抗体応答と感染容量に相関性は認められなかった。しかし体重変化と肺病変は高容量で顕著であったため、感染の技術的差異を減弱させるには高容量で感染させる方が、安定した結果が得られると思われる。

また本研究では評価に用いるフェレットの免疫分子とそれに対する抗体の作製を試みている。すでに得られている抗体もあるため、今後は解析に応用可能であるかどうかを検討する。フェレット分子に対する抗体では、抗体のサブクラスに対する抗体が販売されており、今回の抗体応答の検討でもそれらを使用し有効性が確認できた。しかし他の分子に対する抗体がほとんど作製されていないため、免疫学的背景や応答を検討することができない。今回作製された抗体の有効性が確認できれば、本研究だけでなく、実験動物学の分野に大きく貢献できるであろう。

E. 結 論

2011～2012 シーズンの臨床検体から分離された H3N2 株の性状解析を行い、感染候補ウイルスを選択した。それらを用いマウスおよびフェレットに対する感染実験を行い、感染条件が決定した。引き続き、異なる株の感染実験によ

る応答性の違い、および不活化抗原の免疫実験による応答性の違いを検討する。またフェレット分子のさらなる探索およびモノクローナル抗体の作製を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

細胞培養もしくは鶏卵で製造されたインフルエンザワクチンの品質管理試験および免疫応答への影響

山本 典生、浅沼 秀樹、佐藤 佳代子、中内 美名、高橋 仁、許斐 奈美、相内 章、長谷川 秀樹、田代 真人

第 60 回 日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討

浅沼 秀樹、相内 章、佐藤 佳代子、許斐 奈美、岸田 典子、長谷川 秀樹、山本 典生、田代 真人

第 16 回 日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

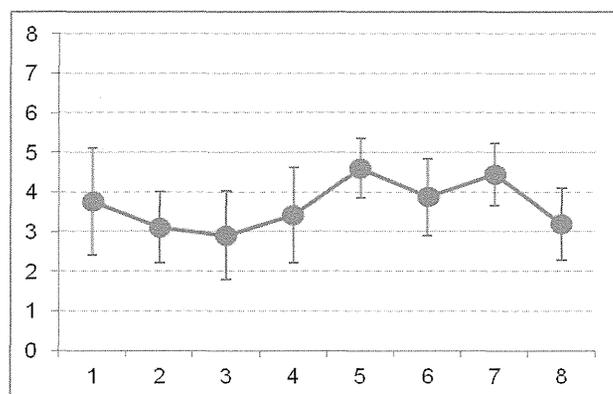
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし



継代数

図1 H3N2 陽性臨床検体 48 例から分離されたウイルスの継代に伴う HA 価の推移 (HA 価 ; 2ⁿ)

表1 様々な細胞分離・継代株における、蛋白収量、HA 含有量および感染価の比較検討

ID	HA 価 average	蛋白量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			HA 含有量 (%)			HA 含有量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			TCID ₅₀	
		C3	C9	(C9/C3)	C3	C9	(C9/C3)	C3	C9	(C9/C3)	C3	C9
N273	4.78	233	217	93.1	20.1	19.6	97.5	46.8	42.5	90.8	6.6	6.6
N284	4.56	185	211	114.1	25.1	37.9	151	46.4	80	172.2	7.4	6.5
N316	2.67	248	237	95.6	30.3	23.5	77.6	75.1	55.7	74.1	6.2	6.5
N321	2.67	213	217	101.9	28.1	30.7	109.3	59.9	66.6	111.3	6.5	6.1
N337	4.89	249	279	112	19.6	29	148	48.8	80.9	165.8	7.2	7.1
N382	4.44	ND	181		ND	30.9			55.9		6.5	6.6

表2 臨床検体分離株のアミノ酸解析

ID	HA			NA		
	Passage history			Passage history		
	0	3	9	0	3	9
273						T148A
284			P221P/L N225N/D			
316			A138A/S N225N/D			D151D/N
321			P221P/L N225N/D			
337			N216N/K			
382						T149I

※ ID382 virus has one AA insertion at a position 45, so 149T corresponded with 148T of other viruses.

表 3 臨床検体分離株の抗原性解析

株名	継代数	A/Niigata/403/09 Cell No.1	A/YAMAGUCHI/72/11 1 Cell No.2	A/Victoria/361/2011 Cell No.1
Niigata/403/09	MDCK2+2	640	640	640
Yamaguchi/72/11	MDCK1+2	640	1280	640
Victoria/361/2011	MDCK2+2	320	320	320
273-C3	MDCK3	640	640	640
273-C9	MDCK9	1280	1280	1280
284-C3	MDCK3	160	160	160
284-C9	MDCK9	160	160	160
316-C3	MDCK3	160	160	160
316-C9	MDCK9	320	640	320
321-C3	MDCK3	160	160	160
321-C9	MDCK9	320	320	320
337-C3	MDCK3	320	320	320
337-C9	MDCK9	1280	1280	1280
382-C9	MDCK9	640	640	320

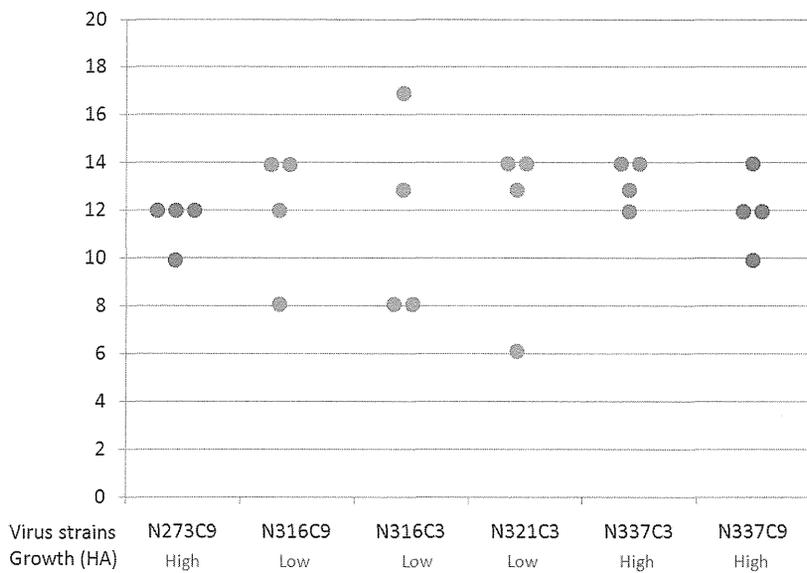


図 2 マウスに各分離・継代株を感染させた場合の抗体応答 (2nd)

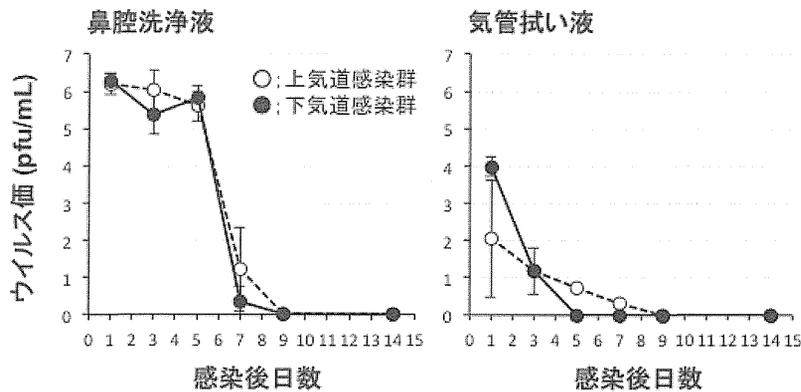


図 3 N337C9 株感染後の鼻腔あるいは気管のウイルス価の変動

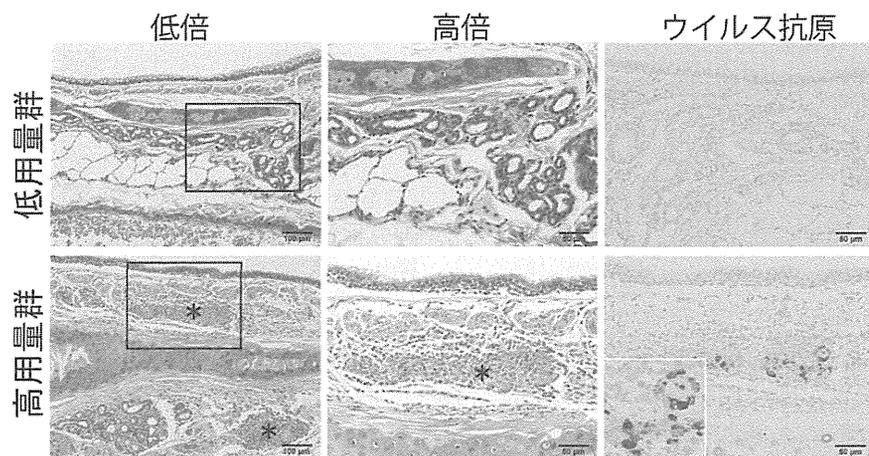


図4 接種3日目のインフルエンザウイルス感染に伴う肺病変像。上段 低用量接種群において組織病変とウイルス抗原陽性細胞は見られなかった。下段 高用量接種群では、肺内気管支周囲の気管支腺組織に炎症性反応がみられ (*), この病変に一致して、ウイルス抗原陽性細胞が存在した (下段右図、挿入図)。気管支上皮に感染を示す像は見られない。

表4 容量の異なる野外株 (H3N2 株) を感染させたフェレット血清の経時的 HI 価

Weeks after challenge	Ferret No.							
	Small volume (200 μ L)				Large volume (1000 μ L)			
	207	208	223	225	188	189	206	211
1w	80	80	80	80	160	80	160	80
2w	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
3w	2560	2560	2560	640	2560	1280	1280	2560
4w	2560	1280	2560	640	1280	1280	1280	1280
5w								
6w	1280	1280	1280	640	640	640	640	640
7w								
8w	1280	1280	1280	640	640	640	1280	640
9w								
10w	1280	640	1280	640	320	640	640	640
11w								
12w	1280	640	1280	640	320	640	640	320

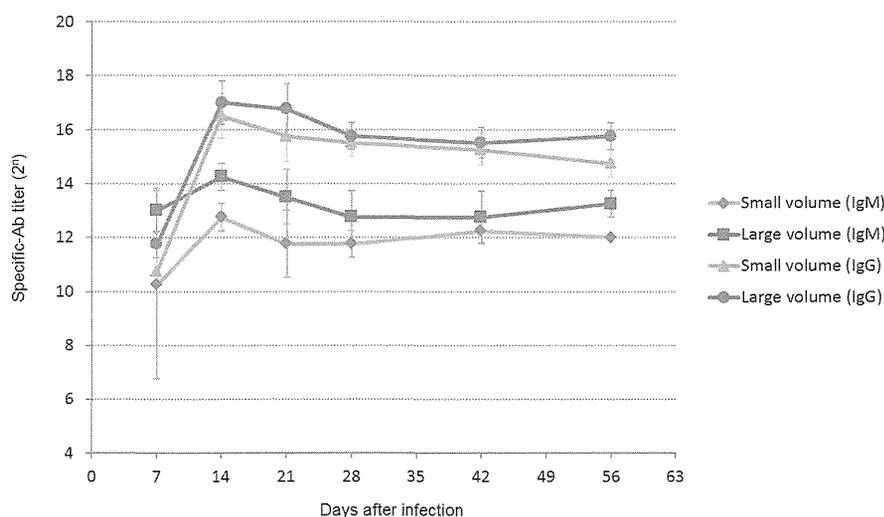


図5 容量の異なるウイルスを感染させたフェレットのIgG および IgM 応答の経時変化

化粧品原材料及び添加物の開発のための評価科学に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所
 穠山 浩

研究要旨 化粧品(医薬部外品)原材料及び添加物の安全性確保を確保するために、生化学的及び分析化学的の両面から、即時型アレルギーの発症に移行する抗原感作性を評価するための評価手法及び品質管理のための機器分析法を開発する。すなわち、in vivo, in vitro の抗原感作性評価手法、及び化粧品原材料及び添加物及びそれらの夾雑成分の自主管理可能な迅速・簡易な機器分析法を開発を検討した。ポリクローナル抗体を用いたコチニール由来タンパクのELISA 定量法を確立した。その定量法は、化学発光検出により、カルミン酸の色素に影響されることなく、コチニール色素中の夾雑タンパクの定量が可能である。赤色色素及び顔料中のNi, Cr, Co, 等アレルギーを起こしやすい金属及びPbを定量した。試料は硝酸とフッ化水素酸を加えマイクロウェーブ分解しているが、一部色素については不溶物があり、別の溶液化が必要であった。コチニール色素及びカルミンにはNi, Cr等は検出しなかったが、CuやMnは一定量検出した。qNMRを用いた絶対定量法が化粧品原材料及び添加物の品質管理に応用可能であると考え、様々な化学構造の有機化合物について、qNMR スペクトルライブラリー構築とその応用について検討した。化粧品 32 品目、食品添加物 17 品目、抗生物質 8 品目、天然物 18 品目、毒物 8 品目、芳香族炭化水素 18 品目、PRTR 物質 1 品目、農薬(一部重複を含む)150 品目、総数として 248 品目の qNMR スペクトルを測定し、ライブラリー化した。マウス CD4⁺T 細胞のみの培養系で、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を用いて TCR 刺激をすることで、この実験系に添加した被検試料が T 細胞の機能分化に与える影響を解析できることが明らかとなった。

研究分担者

- | | |
|-------------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 五十嵐良明 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所 | 杉本直樹 |
| (3) 千葉大学大学院薬学研究院 | 戸井田敏彦 |
| (4) 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 戸塚護 |
| (5) 近畿大学農学部 | 森山達哉 |
| (6) 花王株式会社安全性評価研究所 | 坂口斉 |
| (7) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 | 中川誠 |
| (8) 株式会社資生堂 | 山口雅彦 |
| (9) 株式会社 JEOL RESONANCE | 末松孝子 |
| (10) 花王株式会社解析科学研究所 | 小池亮 |
| (11) 和光純薬工業株式会社 | 山田裕子 |

A. 研究目的

近年、化粧品(医薬部外品)原材料及び添加物が生体内に免疫学的機序で感作され、化粧品あるいは食品の摂取により、アレルギー症状が惹起する事例が報告されており、従来では予想できない化粧品及び食品複合経路に起因する新

たな健康危害が起こっていると考えられる。実際に、小麦加水分解物を含有する医薬部外品・化粧品により感作され、小麦の食物アレルギーが発症される事故が社会問題となっている。この問題は、化粧品原材料及び添加物の品質・組成が薬事法により規制されているが、化学物質としては食品添加物と同一物質である場合や天然に存在する多種多様な物質も含まれており、暴露経路が経口摂取でなく、吸入や経皮等による健康危害発生の可能性も検討する必要があることを示している。また、化粧品の品質は、製造販売者の自主規格のみにより保証される場合が多く、不十分な成分組成の制御や品質異常等の人為的ミスに起因した健康危害も発生していると考えられる。このため、化粧品原材料及び添加物の安全性確保上、新しい抗原感作性の評価手法の開発が期待されている。また健康危害を事前に防止するためには科学的根拠に基づく、より高度な品質管理手法や分析法の開発が必須である。以上のことから、化粧品原材料及び添加物の健康危害を防止するためには、化粧品化学、食品化学、生化学、免疫学や機器分析学に精通している行政研究機関、関連企業及び大学が協力して、化粧品原材料及び添加物の抗原感

作性を評価手法の開発，及び品質管理可能な迅速・簡易な標準分析法の開発等の総合的な研究体制が必定と考えられる．本研究では，化粧品原材料及び添加物の抗原感作性の評価手法の開発，化粧品原材料及び添加物及びそれらの夾雑成分の自主管理可能な迅速・簡易な分析法を検討する．さらに，その安全性評価手法から得られた情報を基に化粧品原材料及び添加物の規格基準を検討する．

本研究班の構成は，レギュラトリーサイエンスとしての食品，医薬品にかかる問題をよく知る国立研究機関の研究者（穂山，五十嵐，杉本）と，品質が高い原材料及び高性能な機器の供給ができる化粧品・食品・試薬・機器の企業の研究者（坂口，中川，末松，小池，山田）と，先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者（戸井田，戸塚，森山）からなり，共同研究の形で効率的な研究の遂行をめざしている．

B. 研究方法

[1] 化粧品原材料及び添加物の規格試験法の開発

1-1 コチニール色素中夾雑タンパク質の定量

1) コチニール虫体由来タンパクの抽出

コチニール虫体由来のタンパクを粗抽出し，30 kD 以上の分画を精製した．

2) 市販カルミン酸試薬および市販コチニール色素中のアレルゲンタンパクの定量

市販カルミン酸試薬としてカルミン酸 A (Cat. 154942, MP Biomedicals, Santa Ana, CA) およびカルミン酸 B (Cat. 033-08251, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた．さらに市場に流通しているコチニール色素としてコチニール色素原体 (Lot. 110701, 色価 490, 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社, 大阪) を使用した．

各カルミン酸，コチニール色素は，秤量し，精製蒸留水 (DDW) に溶解した後，0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過した．その後，10 kD 以下の分子を限外ろ過で除外し，10 mg 相当カルミン酸・コチニール色素/100 μL となるように調製し，化学発光による定量を行った．

1-2 化粧品原材料中のアレルギー性金属の分析手法の確立

1) 試薬

金属標準液 (1000 ppm) は関東化学 (株) 及び和光純薬工業 (株) 原子吸光分析用を用いた．各金属標準液を混合，1%硝酸で希釈して 10 ppm の標準混合原液を調製した．硝酸 (超微量分析用)，フッ化水素酸 (超微量分析用) は和

光純薬工業 (株) から入手した．

2) 試料

化粧品原料として使用される赤色法定色素 (赤色 2 号，3 号，102 号，105 号 (1)，106 号) 及びそれらのアルミニウムレーキを供与された．コチニール色素は化粧品用及び市販試薬を，カルミンは化粧品用，食品添加物用及び市販試薬を入手した．カルミン被覆雲母チタンは化粧品用顔料として用いられているものを得た．

3) 器具及び装置

マイクロウェーブ分解装置は CEM 社 MARS5 を用いた．分解容器には EasyPrep テフロン製容器を用いた．誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) は，オクタポールリアクションシステム (OCR) セルを搭載した Agilent 社製 7500ce ICP-MS を用いた．試料は PFA マイクロフローネブライザ及び耐フッ酸シールドトーチシステムを用いて導入した．保存及び調製容器として DigiTUBEs (SCP SCIENCE 社) を用いた．

4) 試料溶液の調製

試料約 0.2 g を分解容器に入れ，硝酸 7 ml 及びフッ化水素酸 2 ml を加えて密栓した．1600 W (100%) のマイクロウェーブを照射して 25 分間で 200°C まで上昇させ，そのまま 30 分間保持した．放冷後，分解液は DigiTUBEs に移し，超純水で 20 ml に定容後，更に 5 または 10 倍希釈したものを試料溶液とした．

5) 定量

試料溶液を He モードの ICP-MS に導入し，各金属のマス数におけるピーク強度を積分時間 0.1 sec で 3 回測定した．1%硝酸を用いて調製した標準液 (0.1~100 ng/ml, ppb) を同時に測定して検量線を作成した．この検量線を用いて試料溶液の金属濃度を求め，試料中の濃度 ($\mu\text{g/g}$, ppm) を算出した．

1-3 化粧品原材料や添加物中の食物アレルゲン物質の免疫化学的手法の開発

1) 植物汎アレルゲンに対する抗体の作製と検出・定量の試み

大豆の Betv1 ホモログである Glym4 を His タグ融合タンパク質として大腸菌にて発現させ，キレートアフィニティーカラムを用いてリコンビナントを精製し，これをもとに常法通りウサギ及びマウスのポリクローナル抗体及びマウスモノクローナル抗体を作製した．さらに，マウスに免疫し，B 細胞より RNA を抽出し，これをテンプレートとして VH 鎖と VL 鎖に相当する遺伝子を PCR にて増幅し，これをリンカーを介して結合し，T7 ファージの外殻タンパク質との融