

合タンパク質として発現するようにファージ遺伝子へ導入しパッケージングを行った。

2) ローヤルゼリー (RJ) タンパク質に対する抗体の作製と検出

ローヤルゼリー (RJ) から抽出した粗タンパク質画分をウサギに免疫し、得られた抗血清からアフィニティー精製または IgG 精製し、得られた精製抗体を用いてサンドイッチ ELISA の構築を試みた。

【III】 NMR による香粧品原材料及び添加物の定量分析法の開発～ qNMR スペクトルライブラリーの構築

1) 試薬および試液

生薬、香粧品、抗生物質、毒物、PRTR 物質、多環芳香族炭化水素、食品添加物については対応する市販試薬グレードのものを用いた。その他特に断りのない限り、標準物質あるいは標準品グレードのものを用いた。

2) 装置および器具

核磁気共鳴装置 (NMR) はオートサンプラー付き JNM-ECA (600 MHz, 400MHz, 日本電子株式会社(現: 株式会社 JEOL RESONANCE)), qNMR および qNMR 多変量解析のケミカルシフト値は、1,4-BTMSB- d_4 または DSS- d_6 を基準シグナル (0 ppm) とし、 δ 値を ppm 単位で表した。

なお、ウルトラマイクロ天秤は XP2U (メトラート株式会社), またはこれと同等以上の性能のものを用い、試料の秤量値は最小目盛 0.0001 mg まで読み取った値を用いた。

標準液および試料溶液の調製には、化学用体積計 (50 mL メスフラスコ, 10-500 μ L マイクロシリンジ) および電動オートピペッター (マルチピペット Xstream (エッペンドルフ株式会社), 10 mL (不確かさ $\pm 0.4\%$), 1-5 mL (不確かさ $\pm 0.5\%$)) を用いた。

3) qNMR 測定

3-1) qNMR 標準液の調製および濃度校正

qNMR 標準液の調製および標準液中の qNMR 基準物質 (qNMRref) の濃度校正は既報に準じた。すなわち、qNMR 基準物質約 10 mg を精密に量り取り、acetone- d_6 50 mL に定容したものを qNMR 標準液とした。qNMR 用標準液中の qNMR 基準物質の濃度を下記に従い、CRM の一つである DEP または PHP により校正して求めた。DEP または PHP 約 10 mg を精密に量り取り、qNMR 標準液 1.0 mL に溶解した。この溶液 0.6 mL を NMR 試験管 (5 mm ϕ \times 200 mm, 和光純薬工業製) に封入したものを qNMR 基準物質濃

度校正用試料溶液とした。この溶液を qNMR に付し、DEP または PHP および qNMR 基準物質に由来するシグナル面積、分子量、濃度等を式 (1) に代入し、qNMR 用標準液中の qNMR 基準物質の濃度を校正した。

$$W_{qNMRref} = \frac{M_{qNMRref} \times I_{qNMRref}}{H_{qNMRref}} / \frac{M_{DEPorPHP} \times I_{DEPorPHP}}{H_{DEPorPHP} \times W_{DEPorPHP}} \times \frac{P_{DEPorPHP}}{100} \quad \text{--- (1)}$$

ただし、W = 濃度 (mg/mL), M = 分子量 I = 特定基のシグナル強度面積, H = 特定基のプロトン数, P = 純度 (%)。

3-2) qNMR スペクトルライブラリ登録化合物の純度測定

$$P_{com} = \frac{I_{com} / H_{com}}{I_{qNMRref} / H_{qNMRref}} \times \frac{M_{com} / W_{com}}{M_{qNMRref} / W_{qNMRref}} \times 100 \quad \text{--- (2)}$$

ただし、W = 濃度 (mg/mL), M = 分子量 I = 特定基のシグナル強度面積, H = 特定基のプロトン数, P = 純度 (%)。

対象化合物 (com) を約 10 mg 精密に量り取り、予め調製した qNMR 標準液 1.0 mL に溶解した。これらの溶液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料溶液とした。この試料溶液を qNMR に付し、qNMR 基準物質のシグナル強度面積、対象化合物に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、調製濃度を式 (2) に代入し、対象化合物の純度を算出した。

また、qNMR 標準液を用いず、qNMR 基準物質と対象物質を精密に秤量し、重溶媒に溶解して測定する場合は、qNMR 基準物質のシグナル強度面積、対象化合物に由来するそれぞれの特定シグナルの相対面積、分子量、秤量値を式 (3) に代入し、対象化合物の純度を算出した。

$$P_{com} = \frac{I_{com} / H_{com}}{I_{qNMRref} / H_{qNMRref}} \times \frac{M_{com} / w_{com}}{M_{qNMRref} / w_{qNMRref}} \times P_{qNMRref} \quad \text{--- (3)}$$

ただし、w = 秤量値(mg), M = 分子量 I = 特定基のシグナル強度面積, H = 特定基のプロトン数, P = 純度(%).

この一連の操作を 1~3 試行し, 各シグナルより算出された純度値の平均を最終的に対象化合物の純度値として表した.

3-3) qNMR 測定条件および解析処理

qNMR 測定条件の基本情報は Table 2 に示した. qNMR データ解析には, 得られた Free Induction Decay (FID) 信号データを定量解析ソフトウェア(日本電子株式会社 (現: 株式会社 JEOL RESONANCE), Alice2 for qNMR) に導入して自動処理した. すなわち, このソフトウェア上で, qNMR データをフーリエ変換および自動位相調整を行い, qNMR 基準物質および対象化合物の特定シグナルの積分範囲設定等を設定後, 予め入力した qNMR 基準物質および対象化合物の濃度または秤量値, 分子量, 特定基のプロトン数の化合物情報から自動解析処理を行い, 定量値 (純度%) を式(2)または式(3)に従い算出した.

4) qNMR スペクトルライブラリーへの登録

対象化合物名, 製品名, 組成式, 構造式, 質量, Lot No., CAS No.等の情報と濃度(または秤量値), 純度等をデータセット化した(Fig. X). また, 得られた対象化合物の qNMR スペクトルデータについて, 化学シフト(ppm)およびスピン結合情報の他, すべてのシグナルについての化学シフト(ppm)と分子内シグナル強度比(signal top int. %)をXY座標に展開した線スペクトル型の 2 次元データを作成した. これらの情報を Excel 形式に対象化合物毎にまとめた. これを csv 形式に出力し, qNMR スペクトルライブラリーへの登録することとした.

また, フルスペクトルデータおよび FID データについては, 今後リレーショナルリンクするため, 同一フォルダ内に生データとして保存した.

【III】 化粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

1-1 T 細胞機能分化への影響を指標とした化粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発 (戸塚)

マウス由来のナイーブ (抗原未感作) CD4⁺ T

細胞を, 抗 CD3 ϵ 抗体および抗 CD28 抗体を用いた T 細胞レセプター (TCR) への刺激を加えることにより活性化する実験系において, 被検試料として大豆イソフラボン (ダイゼイン) を用い, その添加の影響を解析した.

CD4⁺T 細胞の機能分化への被検試料の影響を解析するために, BALB/c マウス脾臓から磁気ビーズ法 (MACS 法) で調製した CD4⁺ T 細胞を 12-well プレートに 1.0×10^6 cells/well となるように播き, 0-50 μ M のダイゼインの存在下で, プレートに固相化した抗 CD3 ϵ 抗体(10 μ g/mL)と, 培地中に添加した抗 CD28 抗体(2 μ g/mL)を用いて活性化した. 5 日間培養後, T 細胞を回収し, 24-well プレートと 96-well プレートのそれぞれに 5.0×10^5 cells/well または 1.0×10^5 cells/well となるように播き, 固相化抗 CD3 抗体(10 μ g/mL)と, 培地中の抗 CD28 抗体(2 μ g/mL)によって再刺激を行い, 72 時間後の培養上清中のサイトカイン産生量を測定した.

また, CD4⁺T 細胞の初期応答を解析することにより, 機能分化過程の T 細胞の状態を調べた. 上記と同様にマウス脾臓から調製した CD4⁺T 細胞を 24-well プレートと 96-well プレートのそれぞれに 5.0×10^5 cells/well または 1.0×10^5 cells/well となるように播き, 0-50 μ M のダイゼインを含む培地(0.1% DMSO 含有)で抗体を用いた TCR への刺激を行った. 培養 7 日目まで経時的に回収した培養上清と細胞を, それぞれサイトカイン産生量と mRNA 発現量の測定に用いた.

培地中のサイトカイン量は酵素免疫測定法 (ELISA 法) にて行った. サイトカイン, 転写因子の mRNA 発現の解析は, 細胞から抽出した総 RNA に対して逆転写反応により cDNA を合成し, それぞれの mRNA に特異的なプライマーを用い, 定量的 PCR 法にて定量した.

C. 研究結果及び考察

[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

1)市販の試薬中の夾雑タンパク濃度の測定

確立した系を用いて, 市販の試薬中の夾雑タンパク濃度を測定した. 2 社のカルミン酸について検討したところ (カルミン酸 A およびカルミン酸 B), カルミン酸 A からは 7.32 ng/g 検出され, カルミン酸 B は定量限界以下 (< 4.0 ng/g) であった.

この検討で用いたカルミン酸サンプルはいずれも 10 mg 由来のカルミン酸から限外ろ過によって抗原となりにくい低分子分画を除き, 100 μ L に濃縮したものをサンプルとして使用した. す

なわち、いずれの試薬も、カルミン酸 10 mg/mL 以下の濃度では、夾雑タンパクは検出できないものと考え、この後に行う添加回収実験は、測定に影響を与えない 1 mg/mL のカルミン酸溶液を使用することとした。

2) コチニールタンパクの添加回収試験

確立した方法の性能を評価するために、市販のカルミン酸試薬 2 種を用いて添加回収試験を行った。各試薬、1 mg/mL の水溶液中に、1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL の濃度でコチニール由来タンパクを混入させ、化学発光による測定を行ったところ、日内および日差間で 89-109% の回収率が得られ、ELISA 法による定量では良好な真度を得られた。定量法の精度については、日内変動で 1.6-8.7%、日差変動では 5.1-8.6% という良好な値を得ることができた。

3) 市販のコチニール色素中のコチニール由来夾雑タンパクの定量

定量法の真度と精度が確認されたので、実際に市場に流通しているコチニール色素原体を使って、そこに含まれる夾雑アレルゲンタンパクの定量を行った。コチニール色素 10 mg 中に含まれる夾雑タンパクについて二度の定量を行ったところ、いずれも検出限界以下であった。

本実験により、コチニール色素原体に含まれる夾雑タンパクの定量が可能となった。検出方法に化学発光法を選択した根拠は、発色法と比較して検出感度が上昇したことにあるが、他にも理由がある。カルミン酸は赤い色素であり、400 nm から 600 nm の間に吸収波長が存在するため、TMB による発色法の検出波長である 450 nm 付近への影響が懸念されていた。その一方で Luminol 試薬による発光法の検出波長は 650 nm であり、色素の影響を受けないという点からも、化学発光法の有利性は高いと考えられた。

コチニール由来夾雑アレルゲンタンパクの定量には、2 社のカルミン酸試薬中のタンパクを定量したが、A 社のカルミン酸より 7.32 ng/g の濃度で定量値を得られ、B 社は検出限界以下であった。qNMR による本研究室の純度測定の結果では、試薬 A がカルミン酸 73%、試薬 B が 22% であった (Personal communication)。カルミン酸の濃度とタンパクの定量を併行した結果はこの 2 例しかないが、カルミン酸濃度の高いほうが、夾雑タンパクがわずかに検出されたことから、カルミン酸濃度とタンパク量が相関している可能性が想定された。

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) 検量線

標準混合原液を 1% 硝酸で希釈し、0.1~100 ng/ml (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml) の標準混合液を調製した。

それぞれの金属の検出限界濃度を求めた。Al と Zn は 2.5 ng/ml、Fe はマス数 56 で 1 ng/ml、マス数 57 で 2.5 ng/ml、Cr はマス数 52 で 0.25 ng/ml、他の金属については 0.1 ng/ml 以下であった。これらの濃度以上では検量性はいずれも良好な直線性を示した。

金属標準混合原液 (10 ppm) 0.2 ml を分解容器に入れ、方法に従ってマイクロウェーブ処理した後、希釈し、ICP-MS で測定した。Al 及び Fe についてはバックグラウンド値が高いこと、回収値もばらつきが大きいことから、今回の定量からは除外した。10 種の金属の定量値を表 2 に示した。分解液は 20 ml 定容時 (×1) よりも希釈した方が正確な定量値を示し、×5 希釈したときを最適とした。

検出感度や回収された定量値から、以降 Cr の測定マス数は 53、Ni については 60 を選択することとした。

2) 各種原料の分析

化粧品に配合が認められている色素のうち、赤色系の 5 種 (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分析した。口紅中の Pb を定量する方法を米国 FDA が報告しているが、これを若干変更した方法が衛生試験法・注解に収載される予定である。今回はこの方法を適用した。マイクロウェーブ分解後、赤色 3 号と赤色 105 号 (1)、及びそれらのアルミニウムレーキについては不溶物が残存した。他の色素については明らかな不溶物はなかった。

アレルギー性が明らかな Ni、Cr 及び Co に加え、感作症例が報告されている金属のうち Cu と Mn を、更に Pb を定量した。ほとんどの赤色色素ではこれらの金属を検出しなかった。赤色 105 号 (1) とそのアルミニウムレーキについては Ni、Cr 及び Cu が 1.3~2.6 µg/g 検出された。

コチニール色素、カルミン及びカルミン被覆雲母チタンについて同様に分解処理して分析した。コチニール色素については化粧品原料として用いられている方が試薬として販売されているよりも Cu 及び Mn の定量値は低かった。カルミンについては、試薬と食品添加物用どちらも同程度の Cu が定量された。化粧品原料として用いられているものはこれらよりも Cu の量は高く、Mn も検出されたが、いずれの金属も 10 µg/g 以下であった。Ni、Cr 及び Co については定量限界以下であった。カルミン被覆雲母チタンについ

ては分解液に濁りが認められた。Ni は 20 $\mu\text{g/g}$ を超える量が、Cr も 20 $\mu\text{g/g}$ 程度定量された。Pb は 3.3 $\mu\text{g/g}$ 、Mn は 100 $\mu\text{g/g}$ を超える量が検出された。化粧品は主として皮膚に塗布して用いることから、特に経皮曝露による安全性が確保されていなければならない。化学物質による接触皮膚炎は遅延型アレルギーとして知られ、ホルムアルデヒドやパラフェニレンジアミンのような有機化学物質、あるいはニッケルやクロムなどの無機物質が原因物質である。最近問題となった加水分解コムギ末を配合した石けんによるアナフィラキシーショックは、原因物質がタンパク質で即時型アレルギーである。コチニール色素によるアレルギーは当初不純物として含まれるタンパク質が原因とされていたが、それ自体のアレルギー性も懸念されている。化粧品による新たなアレルギーを発症させないように、アレルギーに関する安全性評価法を確立すること、及びこれらの原料や添加物の品質が確保されることが重要である。

医薬部外品原料規格において、品質管理のための純度試験に重金属や As 等の限度値が規定されている。Ni、Cr 及び Co はアレルギーを起ししやすい金属として知られているが、アレルギーという毒性学の観点から不純物の限度量は規定されていない。そこで、化粧品中の金属(成分あるいは不純物)を原因とする金属アレルギー発症防止の観点からの規格設定の必要性を明らかにするため、赤色色素を例に金属の定量を行った。

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、赤色 3 号と赤色 105 号(1)、及びそれらのアルミニウムレーキについては不溶物を生じ、分解不十分であった。よってこれらには Ni、Cr 及び Cu が 1.3~2.6 $\mu\text{g/g}$ 検出されているが、正確性に欠ける。日本化粧品工業連合会編法定色素ハンドブックでは、これらの色素は酸に不溶で耐性が悪いと記載されている。一般に金属分析では、試料に酸を加えて灰化するが、これらの色素については別の溶液化が求められる。分析した金属については、色素とそのアルミニウムレーキの間で定量値に差はほとんどなかったが、Al を添加しており不純物混入の可能性が高くなっている。今後他の金属についても分析し、この可能性を精査する。

コチニール色素及びカルミンについて、用途の異なるもので金属量に差があるか検討した。コチニール色素は化粧品に用いられているものが試薬よりも Cu 及び Mn の定量値は低かった。金属に関しては、化粧品原料が精製し純度を高

めていると思われた。試薬及び食品添加物用カルミンの Cu 含有量は 1 $\mu\text{g/g}$ 以下であるが、化粧品原料として用いられているものは 8.5 $\mu\text{g/g}$ と高く、Mn も検出された。原料の製造会社は異なるため、この差は明らかではない。一方、コチニール色素及びカルミン中の Ni、Cr 及び Co はいずれも定量限界以下であり、これらの色素による金属アレルギーの発症は考えにくい。カルミン被覆雲母チタンについては、マイクロウェーブ処理後の分解液に濁りが認められ、雲母やチタンの一部が溶解せずに残ったものと思われる。Ni が 20 $\mu\text{g/g}$ 超、Cr が 18.2 $\mu\text{g/g}$ 、Pb は 3.3 $\mu\text{g/g}$ 検出され、Mn については 100 $\mu\text{g/g}$ を超える量が検出された。これらの結果は、雲母やチタンに一定量の金属が含まれていることを示唆する。酸に溶解しない等の色素の分解条件については、更に検討する必要がある。今回のデータはいずれも 1 回試験の結果であることから、他の金属も含めて繰り返し試験する予定である。それらから得られた値と臨床、基礎データを照らし合わせて、規格の設定の必要性を考えることが重要である。

1-3 化粧品原材料や添加物中の食物アレルギー物質の免疫化学的手法の開発

植物汎アレルギーに対する抗体の作製と検出・定量の試み

まず、植物間での交差反応性の原因となりうる代表的な汎アレルギー群のうち、大豆エキス、豆乳エキス等として、化粧品に含有される可能性のある大豆のアレルギーの一つである Betv1 ホモログ Glym4 (PR-10 ファミリー) について、多様な抗体の作製を行った。リコンビナント Glym4 に対して反応するウサギポリクローナル抗体やマウスポリクローナル抗体は、イムノプロットによる大豆や豆乳、各種大豆加工食品中の本分子の検出に良好に使用できた。また、サンプルを固相化した直接 ELISA に関しても良好に使用することが可能であった。しかし、プロテイン G によって精製した IgG 抗体とその標識抗体を組み合わせて構築したサンドイッチ ELISA では、うまく検量線が得られなかった。モノクローナル抗体では Glym4 に反応するクローンが 2 つ得られた。現在、腹水作製や反応特異性などを検討している。フェージ抗体に関しては、リコンビナント Glym4 に反応するフェージをクローン化した。native な Glym4 に対する反応性は弱かった。そこで、大豆種子より native な Glym4 を精製し、それを抗原として抗体作製を進めている。

植物汎アレルギーのひとつであるソーマチン

ライクプロテイン (PR-5 ファミリー) に関しては、リコンビナント分子を精製し、ウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。得られた抗血清は、イムノブロットによって様々な野菜・果物中の本分子の検出に良好に使用できた。現在、ELISA 法への適用の可否について検討している。サクランボ (チェリー) のソーマチンライクプロテインを精製し、抗原として作製したウサギポリクローナル抗体はサクランボ (チェリー) の本分子を特異的に認識したが、他の様々な野菜・果物中の本分子の検出には使えなかった。

植物汎アレルゲンに対する各種抗体の作製と検出・定量の試みに関しては、いずれの抗体もイムノブロットや抗原固相化 ELISA での使用には用いることができたが、native な抗原に対する反応性に関しては差が見られた。特に、大豆 Bctv1 ホモログ Glym4 に関しては、リコンビナント分子と大豆から精製した native 分子とは、患者血清との反応性や酵素活性 (RNase 活性) の有無などが見られ、これらの分子はともに可溶性ではあるが立体構造の一部が異なる可能性を示唆した。従って、これらを抗原として作製した抗体の反応性も異なることが予測され、それらの反応性の違いを今後解析し、化粧品中の本分子の検出・定量に適した抗体の組み合わせを検討する必要がある。

植物汎アレルゲンのひとつであるソーマチンライクプロテイン (PR-5 ファミリー) に関しては、トマトの NP24 を抗原として作製した抗体において、様々な野菜・果物中の本分子の検出に用いることが出来たので、広範囲な野菜・果物由来の本汎アレルゲンの検出に使用することが可能と言える。

【II】 NMR による化粧品原材料及び添加物の定量分析法の開発~qNMR スペクトルライブラリーの構築

1) qNMR スペクトルライブラリーの構築

qNMR は、 $^1\text{H-NMR}$ で得られる化学シフトの異なる各シグナル面積比が各置換基に由来する水素原子の数の比を表す特性を応用した方法である。また、一次標準測定法の内、一次標準比率法 (物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測定できる方法) の資格を原理的に有することを特徴としている。qNMR では、測定対象の化合物のシグナルの面積と高さの情報が完全に保存され、S/N 比が 100 以上の試料濃度の時、誤差 $\pm 1\%$ 以内で精度良く定量分析または純度決

定が可能である。また同様に、数種の化合物が混在している場合においては、個々の分子上の原子核の構造情報と重積した複雑なスペクトルとなるが、それぞれの化合物の濃度情報は正確に保存される。すなわち、qNMR スペクトルは、単一物質、混合物に関わらず、シグナルの面積と高さの情報として化合物情報をすべて正確に保存できる点において、デジタルデータ化に適したスペクトルと言える。

qNMR スペクトルライブラリー構築に当たり、以下の 4 点について考慮した。

1. 国際単位系(SI)にトレーサブルな濃度 (純度)情報が算出可能であること。
2. データベース内に FID データをライブラリー化して包含すること。
3. 化合物名, 組成式, 質量, スペクトルデータ等の情報より検索可能であること。
4. 混合物中の化合物を同定できること。

1~4 の条件を満たすデータライブラリーとしてデータセットの設計を行った。すなわち、条件 1 および 2 としてデータはすべて SI にトレーサブルな qNMR 基準物質を内標準として測定し、各 FID データをライブラリー中に紐付けることとした。また、条件 3 および 4 については、化合物名, 製品名, 組成式, 質量, Lot No., CAS No.等の情報と調製濃度をデータセット化した。qNMR スペクトルデータについては、混合物中の化合物の検索・同定だけでなく定量を視野に入れ、既存 NMR データベースで採用されている化学シフトおよびスピン結合情報以外に、観察されたすべてのシグナルについての化学シフト (ppm) と分子内シグナル強度比 (signal top int. %) を XY 座標に展開した線スペクトル型の 2 次元データを検索用とし、これにフルスペクトルとして FID データをリンクすることとした。すなわち、XY 座標に観察される線スペクトルのシグナル頂点とのフィッティングの程度により、混合物中の化合物の同定だけでなく、Y 座標に展開されたシグナル強度より定量値の算出が可能となるものとした。

qNMR スペクトルライブラリーの構造を Fig. 2 に示す。また、Fig. 3 には、qNMR スペクトルライブラリーへの登録情報を例として示した。

2) qNMR スペクトル検索システムの構築

qNMR スペクトルデータをライブラリーに登録することによって、登録された化合物の同定と定量分析は、qNMR 測定だけでより正確、簡便且つ迅速に可能となると考えられる。

NMR 分析における最大の欠点は、化合物の

同定に NMR スペクトル解析の知識を必要とすることである。このため、知識のある熟練者であれば、得られた NMR スペクトルから瞬間的にその化学構造を推定することが可能であるが、NMR 測定の経験が殆どない場合は、得られた NMR スペクトルがどのような構造を示しているのか全く判断できない場合が多い。化学構造から半経験的計算により NMR スペクトルを推定するソフトウェア等があるが、推定スペクトルが実測スペクトルと完全に一致するほどの精度は得られていない。また、最近では、実測した NMR スペクトルより化学構造を推定するソフトウェアの開発も盛んであるが、非常に高価であるため、一般には利用できない状況にある。このような背景から、実際に、LC や GC 等のクロマトグラフ法が一般的な分析法であり多くの利用者がいるのに対して、NMR 分析は難しいと敬遠される傾向にある。この問題を解消することができれば、NMR が SI への計量トレーサビリティが証明された定量分析のツールの一つとして飛躍的な展開を始められると思われる。

我々が本研究で得た qNMR スペクトルが、上述の問題に対する一つの解答を既に導いている。すなわち、定量的な情報と共に測定条件、化合物情報を全て正確にデジタルデータとして保存されたデータと実測データを照合することによって、実測データに観察された化合物を単純に同定・定量分析が可能であることによる。しかしながら、このようなアプローチは他に例がないため検索エンジンも存在しないことから、我々は、NMR 未経験者でも構造解析と定量分析が簡単にできる qNMR スペクトル検索システムの構築を開始することとした。Fig. 4 に、qNMR スペクトル検索システムの概略図を示したが、その開発は①～④のパートに分けた。本研究では、①と②について実施した。

- ① qNMR スペクトルデータ測定
- ② ライブラリー登録
- ③ 検索エンジンの設定と検索結果の検証
- ④ 定量値の算出

3) qNMR スペクトルライブラリーへの登録

qNMR スペクトルライブラリーへの具体的な登録方法を Fig. 5 に示した。

まず、精密に量りつつ対象化合物と qNMR 基準物質を重溶媒に溶解させ、qNMR スペクトルを測定した。次に、厳密に定量性が確保された qNMR スペクトルデータを解析し、純度値または定量値を求めた。この時点では、qNMR ス

ペクトルデータがフルスペクトル形式であり、データ容量も大きく、検索にも利用しにくい。そこで、qNMR スペクトル上に観察されたシグナルの化学シフトと頂点を書き出し、XY 座標に展開した線スペクトルとした。これを化合物名、製品名、組成式、質量、Lot No., CAS No., 測定条件等の情報と共に Excel 形式で保存した。

今回、qNMR スペクトルライブラリーに登録した化合物は、市販標準品、標準物質、市販試薬あるいは製品として市場に流通が確認されたものである。このため、化粧品原材料となるもの以外に農薬、抗生物質、環境汚染物質、天然物、食品添加物等を含むこととなった。それぞれの内訳は、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 品目となった(平成 25 年 3 月 2 日現在)。さらに、qNMR スペクトルライブラリーの拡充を進めており、その総数は 250 品目を超える予定である。これには入手が困難、あるいは高価な希少化合物のスペクトルデータも含まれており、参照スペクトルとしても有用である。

現在、NMR スペクトルデータベースとして無償の SDBS だけでなく、Aldrich 等から有償のものが公開されている。しかし、本研究によりデータベース化した化合物は、上述の既存の NMR スペクトルデータベースには殆ど収録されていない。また、既存の NMR スペクトルデータベースでは、測定対象とする化合物からスペクトル情報を容易に得ることが可能であるが、収録されたスペクトルデータの測定条件が化合物毎に異なる、あるいは測定条件の詳細が不明であるため、実験者が得たスペクトル情報との一致度から化合物を推定することは可能であるものの、次いで濃度や純度を決定することは不可能である。この点において、本研究で得られた 248 品目の qNMR スペクトルデータは、測定条件を含めたすべての情報と定量性を備えたものとして非常に価値のあるものとなると考えられた。

【III】化粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

ダイゼイン存在下で分化させた CD4⁺T 細胞は、TCR に対する再刺激を行った際に、対照群と比べて Th1 において多く産生される IFN- γ 産生が亢進したのに対し、Th2 において多く産生される IL-4 産生が抑制された。ダイゼイン存在下で TCR 刺激を加えると、抗原提示細胞非存在

下においても CD4⁺T 細胞の Th1 への分化が促進され、Th2 への分化が抑制されることを確認できた。CD4⁺T 細胞の初期応答にダイゼインが与える影響を調べた。サイトカイン産生に関しては、IFN- γ の産生量は対照群とダイゼイン添加群で変化がなかったのに対して、IL-4 の産生量はダイゼイン添加群において著しく抑制されていることが明らかとなった。また mRNA 発現量においては、IFN- γ および Th1 特異的転写因子である T-bet の mRNA 発現量の上昇が明らかとなった。一方で、IL-4 および Th2 特異的転写因子である GATA-3 の mRNA 発現量は有意に低下していた。

本研究では、最終的に化粧品成分等がヒトの T 細胞の機能分化に与える影響を評価する実験系を確立することを目的とし、マウス由来 T 細胞をモデルとして実験系の構築を試みた。これまでに、卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの CD4⁺T 細胞を、抗原提示細胞と抗原 (OVA ペプチド) で活性化し、機能分化を誘導する実験系において、ダイゼインが Th1 分化を促進し、Th2 分化を抑制するという実験結果が得られていた。このような抗原特異性と抗原提示に必要な MHC 分子が明らかになっている実験系場合には、上記の様な抗原刺激が可能であるが、ヒト T 細胞は単一の抗原特異性を示すものではなく、このような刺激方法を用いることはできない。そこで、抗原提示細胞を用いずに T 細胞だけを培養し、抗体を用いて TCR に対する刺激を加えることで分化誘導する実験系の構築を行い、ダイゼインの効果を検討した。その結果、TCR 遺伝子導入マウスの T 細胞を用いた場合と同様に、ダイゼインは Th1 分化を促進し、Th2 分化を抑制するという働きを観察することができた。この方法は、ヒト末梢血単核球から CD4⁺T 細胞を単離し、同様に抗体を用いた刺激を行うことで、化粧品成分がヒト免疫系に及ぼす影響を解析できることを示唆している。今後は、実際にヒト末梢血単核球を用い、ダイゼインをモデルとして、その他の化粧品成分等の影響についても解析する予定である。

また、T 細胞の TCR 刺激に対する活性化の初期応答におけるダイゼインの効果を検討した結果から、ダイゼインが Th1 への機能分化を促進し、Th2 分化を抑制する働きは、T 細胞活性化の初期応答における Th2 応答の抑制が主な要因となっていることが示唆された。

E. 結論

[1] 化粧品原材料及び添加物の規格試験法の開

発

我々は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。

確立した定量法による、二社のカルミン酸試薬を用いた添加回収試験を行ったところ、良好な真度 (回収率; 89-109%) および精度 (日内変動 RSD; 1.8-8.4%, 日差変動 RSD; 5.1-8.6%) が得られた。また、コチニール色素 1 製品中のコチニール由来夾雑タンパクの定量を行ったところ、検出限界以下であった。

医薬部外品原料規格の純度試験はアレルギーの観点から不純物の限度量を規定していない。本研究では、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。カルミン被覆雲母チタンには Ni と Cr が 20 $\mu\text{g/g}$ 程度検出され、雲母とチタンに含まれていた可能性がある。今後分解条件等については更に検討が必要であり、天然鉱物由来の原料等について検討を進める予定である。

化粧品に含有される可能性のある植物性汎アレルゲンや RJ に対する抗体を作製し、検出・定量系の構築を進めた。今後は定量法の確立と化粧品からの抽出・前処理方法に関して確立する必要がある。プロテアーゼによって酵素処理した低分子化 RJ のアレルギー惹起性はきわめて低いため、今後、感作性の低減化が同様に確認できれば、有用な食品・化粧品素材となりうる。また、このようなプロテアーゼによる高度な分解が化粧品中の抗原性タンパク質を分解し感作性を低減化しうる一つの方法となりうることを示唆される。

[II] NMR による化粧品原材料及び添加物の定量分析法の開発~qNMR スペクトルライブラリーの構築

本研究では、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を開始した。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. 今後, qNMR スペクトルライブラリーへの化合物数を拡充すると共に, qNMR スペクトル検索システムのプロトタイプを作成し, NMR を用いた構想品の品質管理法に適用可能か検討する予定である.

【III】 化粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

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. これは, ヒト末梢血単核球から単離した T 細胞を用いた場合にも有効な方法であると考えられ, 化粧品成分等がヒトの免疫系に与える影響を評価する実験系として有効であることが期待される.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A.Nakamura, R. Adachi, S. Ohta, K. Ichihara, S. Mishima, R. Teshima: Effect of propolis components in propolis on differentiation of osteoblastic cell, submitted
- 2) K. Kondo, S. Obitsu, R. Teshima: α -Synuclein transmission is enhanced by leucine-rich repeat kinase 2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Pharm.Bull.* **34**, 1078-1084 (2011)
- 3) Furuno, T., Nakanishi, M.: Analysis of neuro-immune interactions by an in vitro co-culture approach. In "Neuropeptide: Methods and Protocol" (Ed. Walker, J.) in "Methods in Molecular Biology" vol 789, Springer, p171-180 (2011)
- 4) Hagiya M., Furuno T., Hosokawa Y., Lino T., Ito T., Inoue T., Nakanishi M., Murakami Y., Ito A.: Enhanced nerve-mast cell interaction by a neuronal short isoform of adhesion molecule-1, CADM1. *J.Immunol.*, 186, 5983-5992 (2011)
- 5) Inoh Y., Furuno T., Hirashima N., Kitamoto D., Nakanishi M.: Rapid delivery of small interfering RNA by biosurfactant MEL-A-containing liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 635-640 (2011) series, Springer, in press.
- 6) T. Iwamoto, K. Yamada, M. Shimizu, and M. Totsuka, Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(5), 925-929 (2011)
- 7) Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M: Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(7), 1283-1289 (2011)
- 8) Masuko S., Higashi K., Wang Z., Bhaskar U., A. M., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., "Ozonolysis of the double bond of the unsaturated uronate residue in low-molecular-weight heparin and K5 heparosan.", *Carbohydr. Res.*, **346**(13):1962-1966 (2011).
- 9) Higashi K., Ly M., Wang Z., Masuko S., Bhaskar U., Sterner E., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., "Controlled Photochemical Depolymerization of K5 Heparosan, a Bioengineered Heparin Precursor.", *Carbohydr. Polym.*, **86**(3):1365- 1370 (2011).
- 10) Ly M., Leach F. E. 3rd, Laremore T. N., Toida T., Amster I. J., Linhardt R. J., "The proteoglycan bikunin has a defined sequence.", *Nat. Chem. Biol.*, 7(11):827-833 (2011).
- 11) Higashi K., Hosoyama S., Ohno A., Masuko S., Yang B., Sterner E., Wang Z., Linhardt R. J., Toida T.: "Photochemical Preparation of a Novel Low Molecular Weight Heparin." *Carbohydr Polym.* **87**:1737-1743 (2012).

2. 学会発表

- 1) 大槻崇, 佐藤恭子, 阿部裕, 杉本直樹, 穂山浩: 定量 NMR を用いた加工食品中のアセスルファミカリウム分析法. 日本食品化学学会第 18 回総会・学術大会 (2012.6).
- 2) Tsutsumi, Y., Suematsu, T., Sugimoto, N., Tada, A., Ohtsuki, T.: Combining qNMR and Liquid Chromatography: Purity with High Reliability. 11th International Conference on the applications of Magnetic Resonance in Food 2012, (2012.6).
- 3) 杉本直樹, 田原麻衣子, 大槻崇, 多田敦子, 佐藤恭子, 河村葉子, 合田幸広, 五十嵐良明, 穂山浩: qNMR スペクトルデータベース構築の検討. 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会(2012.11)
- 4) 大槻崇, 佐藤恭子, 多田敦子, 杉本直樹, 合田幸広, 河村葉子, 穂山浩: qNMR の食品中の食品添加物分析への応用. 第 49 回全国衛生化学技術協議会年会(2012.11)

- 5) 森山達哉：「リコンビナント・アレルゲン及び抗アレルゲン抗体を用いた抗原解析」第24回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム (2012.5)
 - 6) 森山達哉：「食品素材の新規アレルゲンリスクについて」第55回食品新素材研究会特別講演(2012.7)
 - 7) 末森佑輔、木下恵利、矢野えりか、崎川貴文、財満信宏、森山達哉、河村幸雄：「大豆クラス2食物アレルゲン Glym4 の精製、特性解析及びモノクローナル抗体作製」日本農芸化学会大会 (2013.3)
 - 8) 大月典子, 杉本直樹, 多田敦子, 伊藤裕才, 東村豊, 山田敬子, 竹内正樹, 中川誠, 伊藤澄夫, 穂山浩、コチニール色素中の夾雑アレルゲンタンパク質検出法の確立、第104回日本食品衛生学会学術講演会, (2012.10)
 - 9) 石原 惟志、ベミンジョン、清水 誠、戸塚護：ダイゼインによる2型ヘルパーT細胞(Th2)への機能分化の抑制. 日本農芸化学会2013年度大会、(2013.3). (1) THP-1由来樹状細胞の抗原提示能を指標としたアレルゲン性評価法の確立片山茂¹, 久木田卓弥¹, 穂山浩², 中村宗一郎¹ (¹信大院農, ²国立衛研) 日本食品化学学会 第18回総会・学術大会(五島軒本店, 北海道), (2012.6)
 - 10) THP-1由来樹状細胞を用いたアレルゲン性評価法の開発, 久木田卓弥, 今井理恵, 片山茂, 穂山浩, 中村宗一郎, 日本農芸化学会中部支部第165回例会(名古屋大学シンポジオン) (2012.10).
 - 11) Establishment of an in vitro screening assay for allergenicity of proteins using dendritic cells differentiated from THP-1 Takuya Kukita, Shigeru Katayama, Hiroshi Akiyama, Soichiro Nakamura, ISNFF2012 (Courtyard King Kamehameha's Kona Beach Hotel, Kailua-Kona, Hawaii, USA), (2012.12)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 取得特許
なし
 2. 実用新案登録
なし

小豆郡における帯状疱疹発症の大規模疫学研究

独立行政法人 医薬基盤研究所
山西 弘一
平成 23 年 4 月～平成 25 年 3 月

研究要旨 香川県小豆郡で帯状疱疹の大規模疫学調査を実施した。50 歳以上の発症率は年間 1.07%であり、水痘皮内反応が帯状疱疹の発症、重症化、及び PHN のリスク指標となることが明らかになった。生活習慣・社会心理的因子の調査によって、帯状疱疹発症や PHN の危険因子を特定した。

研究分担者

- | | |
|--------------------|------|
| (1)大阪大学大学院 | 磯 博康 |
| (2)独立行政法人医薬基盤研究所 | 森 康子 |
| (3)奈良県立医科大学 | 浅田秀夫 |
| (4)一般財団法人阪大微生物病研究会 | 奥野良信 |

A. 研究目的

帯状疱疹は、水痘帯状疱疹ウイルス（以下 VZV）が再活性化した病態であり、高齢者ほど発症しやすいと言われている。少子高齢化が進む日本では、今後発症者が増加すると予測され、高齢者医療費の増大が懸念されている。

米国では水痘ワクチンの力価を高めたワクチンを用いて、大規模臨床試験（M. N. Oxman, et al.）が行われ、その結果を基に同ワクチンが帯状疱疹ワクチンとして承認されている。また、ACIP（米国予防接種勧告委員会）も 60 歳以上の人への帯状疱疹ワクチン接種を推奨している。

一方国内では、帯状疱疹ワクチンは承認されておらず、発症者の疾病負担及び医療費負担の軽減のために帯状疱疹ワクチンの開発が期待されている。また、これまで、水痘ワクチンを高齢者に接種すると水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）に対する細胞性免疫の増強効果が解明されているが（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）、細胞性免疫の程度と帯状疱疹発症の相関や免疫持続期間については検証されていなかった。

そこで我々は、将来の帯状疱疹ワクチン開発の

ための基礎的な検討を行うため、世界初となる特定地域での帯状疱疹の大規模疫学研究「平成 20 年度政策創薬総合研究事業 帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究」（以後、前研究）を実施し、この研究に引き続く形で本研究を実施した。

これら一連の研究において、帯状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間、生活習慣及び社会心理的要因と細胞性免疫の程度及び帯状疱疹発症との関係、VZV に対する免疫の程度と帯状疱疹発症の相関、細胞性免疫と液性免疫の各種抗体価の相関、及び免疫持続期間等を明らかにした。

B. 研究方法

(1) 本疫学研究の対象者と登録者数

本疫学研究対象者は、香川県小豆郡在住の 50 歳以上の男女 17,323 人（平成 20 年 10 月 1 日時点）のうち、12,522 人とし、テーマに応じて以下の 3 群に分けられた。

①テーマ A（目標登録者数 12,522 人）

電話による聞き取り調査。

②テーマ B（目標登録者数 5,685 人）

水痘皮内反応による細胞性免疫の測定

③テーマ C（目標登録者数 365 人）

(a) 水痘皮内反応及び IFN- γ ELISPOT 試験による細胞性免疫の測定

(b) gp-ELISA 価測定法、中和抗体価測定法、IAHA 価測定法による VZV に対する液性免疫の測定

調査期間は登録から3年間とする。(a) (b)は1年毎、計4回実施し、各種免疫間の相関等について検討した。

(2) 発症疑い者の調査

テーマA登録者に対して、帯状疱疹発症疑い者のスクリーニングのための電話による聞き取り調査を行い、発症疑い者に対して、発症時調査(①臨床症状の調査(発症時、回復時に実施)、②患部写真撮影(発症時、回復時に実施)、③帯状疱疹患部からの採材によるPCR試験(発症時に実施)、④細胞性免疫(IFN- γ ELISPOT試験)と液性免疫(gp-ELISA、IAHA、NT)の測定(発症時、回復時)、⑤痛みの調査(発症時から痛み消失まで最長6ヶ月間実施))を行った。

(3) 帯状疱疹の確定診断

調査開始後、医療機関にて「帯状疱疹である」または「帯状疱疹の疑いがある」と診断された発症者について、発症時及び回復時の調査ならびに各種検査結果に基づき、確定診断を行った。

(4) 皮疹の重症度の評価

帯状疱疹発症者について①紅斑の神経分節における面積比、②水疱・びらんの数、③潰瘍の有無、④融合水疱の有無、⑤皮疹が出現した神経分節数を基に皮疹の重症度をスコア化した。

(5) 急性期疼痛と皮疹重症度および知覚異常との関係についての検討

帯状疱疹発症者について、急性期疼痛の程度を経時的にグラフ化し、このグラフに基づいて疼痛スコア(AUC: area under curve)を求めた。この疼痛スコアと皮疹重症度スコア・知覚異常(知覚過敏、知覚鈍麻)との関係について検討した。

(6) 帯状疱疹後神経痛(PHN)と皮疹重症度および知覚異常との関係についての検討

発症から3ヶ月以上に渡って疼痛が持続するPHNの発症と、皮疹重症度スコアや知覚異常との関係について検討した。

(7) 水痘皮内反応結果に関連する因子の検討

対象者は健康に関するアンケートに回答し、かつ水痘皮内反応を実施した50歳から99歳までの男性2,573人、女性3,110人、計5,683人とした。

水痘皮内反応の結果は先行研究の判定方法に基づき、紅斑長径5mm未満を陰性、5mm以上10mm未満を擬陽性、10mm以上を陽性とし、10mm以上陽性を目的変数とした。また、浮腫についてはその長径に寄らず浮腫の有無を目的変数とした。

健康に関するアンケート調査によって得られた基礎疾患、喫煙、飲酒、家族歴、食生活、ストレスなどの身体的因子、生活習慣および社会心理的因子、全41因子を説明変数として、ロジスティック回帰分析を行った。この際、紅斑、浮腫共に年齢、性別、過去帯状疱疹罹患歴を交絡因子として調整した。また、男女別解析も行った。

(8) 生活習慣や社会心理的要因と帯状疱疹発症との相関

対象者は健康に関するアンケートに回答した50歳から103歳までの男性5,509人、女性6,850人、計12,359人とし、アンケート調査時をベースラインとして、その後の調査期間(約3年間)における帯状疱疹、及びPHN発症を追跡調査した。調査期間における帯状疱疹発症の有無(PCR試験によるVZV検出例を帯状疱疹発症と定義した)、PHN発症の有無(発症から3ヶ月以上疼痛が持続した者をPHN発症と定義した)とベースライン時における身体的因子、生活習慣および社会心理的因子、全41因子との関係を前向きに検討し、帯状疱疹発症に関連する危険因子を検討した。解析は発症の有無を目的変数として、健康に関する41因子を説明変数として、Cox回帰分析を行った。この際、年齢、性別、過去帯状疱疹罹患歴を交絡因子として調整した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床研究に関する倫理指針及び疫学研究に関する倫理指針を遵守し、(独)医薬基盤研究所の倫理審査委員会(山西、森)(平成20年11月11日)、(財)阪大微生物病研究会(奥野)の倫理審査委員会(平成20年8月23日)、奈良県立医科大学の倫理審査委員会(浅田)(平成20年12月12日)及び大阪大学の倫理審査委員会(磯)(平成21年2月12日)で承認を得た上で研究を行った。

また、テーマC登録者の調査項目の追加に伴い、それぞれの倫理審査委員会【医薬基盤研究所(平成23年11月21日)、阪大微生物病研究会(平成23年9月22日)、奈良県立医科大学(平成24年

2月15日)及び大阪大学(平成24年1月31日)】
で承認を得た。

C. 研究結果

(1) 観察期間と脱落者数

前研究から継続する平均観察期間は1,194日(3.00年)であり、期間中の脱落者数は800人であった。

(2) 発症者調査

带状疱疹の発症疑い679例中、535例が医療機関にて「带状疱疹」または「带状疱疹疑い」と診断された。そのうち531例の患部から生体試料を採取し、PCR試験を実施したところ、396例からVZV特異的なDNAが検出された。PCR試験結果に基づく带状疱疹の年間発症率は1.07%であった。

女性の年間発症率(1.27%)は、男性(0.83%)より高く、年齢階層別では、50-69歳群(0.87%)よりも70歳以上群(1.30%)のほうが高かった。性別・年齢階層別では、60-69歳の男性(0.55%)が最も低く、70-79歳の女性(1.47%)が最も高かった。

また、季節別での带状疱疹の発症率は、冬(1~3月)に最も低く(0.94%)、夏(7~9月)に最も高かった(1.18%)。

(3) 水痘皮内反応を用いた発症リスクの検討

テーマB登録者に対して登録時に実施した水痘皮内反応の結果によって、带状疱疹の発症リスクを比較した。

紅斑長径10mm以上を陽性、10mm未満を陰性にしたとき、陽性群のハザード比(以下HR)は0.27(95%信頼区間:0.19-0.37)であり、陽性者の発症リスクが有意に低かった。

観察期間1年間の場合と3年間の場合とでHRを比較すると、1年間の方がやや明確なHRを示したが、その後の期間においても陽性群の発症リスクが有意に低い結果であった。また、浮腫においても同様の傾向が認められた。

(4) 発症者と未発症者の水痘皮内反応の結果

テーマB登録者のうち、観察期間中に带状疱疹を発症した175人と、未発症であった5,508人について、登録時の水痘皮内反応の結果を比較したところ、紅斑長径8.55mm、浮腫長径3.85mmともに発症群が有意に小さい値を示した。

(5) 水痘皮内反応の検査結果

テーマC登録者について、登録から4回全ての検査を実施した者のうち、期間中に带状疱疹を発症しなかった260人の水痘皮内反応の紅斑長径を年度別に比較したところ、登録時から1年後、1年後から2年後に増大傾向が認められ、2年後から3年後には有意な変動が認められなかった。増大の原因は、同時期に起こった水痘流行の影響と、水痘皮内反応の同一部位への実施による促進反応の可能性が示唆された。

(6) 水痘皮内反応実施者と未実施者の発症リスク比較

登録時に水痘皮内反応を実施していないテーマA登録者と、水痘皮内反応を実施したテーマB登録者とで、登録後3年間の带状疱疹発症リスクを比較したところ、テーマB登録者のHRは0.98(95%信頼区間:0.80-1.20)であり、両者の発症リスクに有意な差はなかった。

(7) 液性免疫の測定結果

テーマC登録者に対して、登録から2年後及び3年後に実施した液性免疫の測定結果では、各種抗体価とも性別では差がなく、年齢階層別では高齢者群で高かった。これは、前研究での報告と同様の傾向であった。

(8) 急性期疼痛と皮疹重症度および知覚異常との関係

1) 皮疹重症度

带状疱疹発症者について、皮疹重症度スコア6未満の軽症群(n=192)と6以上の重症群(n=102)の2群間で、疼痛重症度を比較したところ、疼痛スコアは軽症群では 41.4 ± 4.7 、重症群では 82.9 ± 6.5 と、皮疹重症群で疼痛重症度が有意に高いことが判明した。

2) 知覚異常

①知覚過敏を伴った带状疱疹患者群(n=298)と知覚過敏を伴わなかった患者群(n=70)について、疼痛スコアを比較したところ、知覚過敏群で疼痛スコアが有意に高いことが明らかとなった(知覚過敏群: 67.2 ± 4.0 、非知覚過敏群: 22.9 ± 8.2)。

②知覚鈍麻を伴った带状疱疹患者群(n=91)と知覚鈍麻を伴わなかった患者群(n=277)に

ついて、疼痛スコアを比較したところ、知覚鈍麻群で疼痛スコアが有意に高いことが明らかとなった（知覚鈍麻群：80.3±7.3、非知覚鈍麻群：51.7±4.2）。

(9) PHN と皮疹重症度および知覚異常との関係

1) 皮疹重症度

帯状疱疹発症者について、皮疹重症度スコア 6 未満の軽症群 (n=192) と 6 以上の重症群 (n=102) の 2 群間で、PHN の発症率を比較したところ、軽症群で 6.3%、重症群で 27.5%と、皮疹重症群の方が高率に PHN に移行することが明らかとなった。

2) 知覚異常

①知覚過敏を伴った帯状疱疹患者群 (n=298) と知覚過敏を伴わなかった患者群 (n=70) について、PHN の発症率を比較したところ、知覚過敏群で 17.4%、非知覚過敏群で 5.7%と、知覚過敏を有する群の方が高率に PHN に移行することが明らかとなった。

②知覚鈍麻を伴った帯状疱疹患者群 (n=91) と知覚鈍麻を伴わなかった患者群 (n=277) について、PHN の発症率を比較したところ、知覚鈍麻群で 27.5%、非知覚過敏群で 11.2%と、知覚鈍麻を有する群の方が高率に PHN に移行することが明らかとなった。

③特に、知覚過敏・知覚鈍麻の両方が認められなかった患者 (n=46) では、PHN の発症率は 0%であった。一方、知覚過敏・知覚鈍麻のいずれかを有する患者では、発症率は 17.3%であった。

(10) 細胞性免疫応答測定のために用いた 2 種類の試験の各結果間における相関性

テーマ C 登録者に対して実施した 2 種類の細胞性免疫測定法の相関を確認したところ、前研究における結果と同様に IFN- γ ELISPOT 試験データと水痘皮内反応データとの間に弱い相関が見られた。

(11) 加齢による VZV 特異的細胞性免疫応答の変化

前研究でのデータから、加齢と共に IFN- γ ELISPOT 試験の値が低下することが示唆されている。そこで、本研究についてもその傾向が続いてみられているのか、テーマ C 登録者に対して実

施した試験データを用いて検討した。その結果、全研究と同様に、加齢に伴い測定値が低下する傾向が認められ、加齢による VZV 特異的な細胞性免疫応答の低下が明らかとなった。

(12) 男女別での VZV 特異的細胞性免疫応答の比較

テーマ C 登録者に対して実施した IFN- γ ELISPOT 試験データから VZV 特異的細胞性免疫応答の男女間の相違について検討し、男性の方が女性よりやや高いことを見出した。

(13) 帯状疱疹発症者の発症時における VZV 特異的細胞性免疫応答の変化

帯状疱疹発症者から発症時及び回復時（発症 3 ヶ月後）に採取した血液検体を用いて IFN- γ ELISPOT 試験を実施し、VZV 特異的細胞性免疫応答の相違について検討した。その結果、発症時における細胞性免疫応答が、回復時よりも高値であることが明らかとなった。

(14) 水痘皮内反応結果と関連する因子の検討

水痘皮内反応の結果と有意に関連する因子として、以下の 11 因子が挙げられた。以下本文中括弧内にオッズ比 (OR) と 95% 信頼区間を示す。

1) 健康状態

健康状態について、「とてもよい」、「まあよい」、「あまりよくない・よくない」と回答した 3 群に分類し比較したところ、「とてもよい」と回答した群は「あまりよくない・よくない」と回答した群に比べ、紅斑、浮腫共に陽性率が有意に高かった [紅斑: OR 1.59(1.24-2.03)、浮腫: OR 1.43(1.12-1.83)]。男女別解析によると男性にのみ有意であり、紅斑浮腫共に「とてもよい」と回答した群だけでなく、「まあよい」と回答した群も「あまりよくない・よくない」と回答した群に比べ有意に陽性率が高かった。

2) 喫煙

喫煙について、現在喫煙群、過去喫煙群、もともと吸わない群の 3 群に分類し比較したところ、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 [紅斑: OR 1.6281.29-2.02)、浮腫: OR 1.33(1.06-1.67)]。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[OR 0.78(0.68-0.90)]。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[OR 0.86(0.75-0.99)]、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[OR 0.71(0.54-0.93)]。

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[OR 0.86(0.76-0.98)]。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[紅斑:OR 0.56(0.38-0.84)、浮腫:OR 0.51(0.35-0.76)]。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[OR 1.18(1.03-1.34)]。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[OR 0.83(0.69-0.99)]。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[OR 0.74(0.56-0.98)]。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[OR 1.37(1.00-1.87)]。

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[OR 1.48(1.05-2.08)]。

(15) 帯状疱疹発症に関連する危険因子の検討

帯状疱疹発症に関連する危険因子として以下の8因子、PHN発症に関連する危険因子として以下の1因子が挙げられた。以下本文中括弧内にハザード比(HR)と95%信頼区間を示す。

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[HR0.58(0.40-0.84)]。また、非喫煙群、過去喫煙群、現在喫煙群の3群に分類し比較しても、現在喫煙群の発症率が有意に低かった[HR0.58(0.38-0.89)]。なお、過去罹患歴がある者を除外して検討しても同様の結果が確認された。

2) 野菜・大豆製品摂取頻度

摂取頻度について、「3回以上/日」「2回/日」「1回/日」「5-6回/週」「3-4回/週」「1-2回/週」「食べない」の回答を毎日摂取群とそれ以外の2群に分類し比較したところ、毎日摂取群はそれ以外の群に比べ、発症率が有意に高かった[野菜:HR1.58(1.14-2.20)、大豆製品:HR1.28(1.05-1.56)]。しかし、本結果は交絡因子について、帯状疱疹発症と関連があるものとして抽出された他の因子(喫煙、飲酒、生きが

い、基礎疾患、癌、兄弟帯状疱疹罹患歴、自己申告の健康状態を加えて検討した場合(以下、多変量解析)、有意差は確認されなかった。

3) 飲酒

飲酒について、「3 合以上/日」「2 合くらい/日」「1 合くらい/日」「1 合未満/日」「付き合い程度」「やめた」「もともと飲まない」の回答を、2 合以上/日群とそれ以外の 2 群に分類し比較したところ、2 合以上/日群はそれ以外の群に比べ、発症率が有意に低かった[HR0.63(0.41-0.98)]。しかし、喫煙の検討と同様に、現在飲酒群と現在禁酒群の 2 群、現在飲酒群、過去飲酒群と非飲酒群の 3 群に分類すると有意差は確認できず、量反応性は確認できなかった。

4) 生きがい

生きがいの程度について、「大いに感じている」「感じている」「あまり感じていない」「全く感じていない」の回答を「大いに感じている」群とそれ以外の 2 群に分類し比較したところ、生きがいを大いに感じている群はそれ以外の群に比べ、発症率が有意に低かった[HR0.56(0.35-0.90)]。これは、癌の既往がある者や過去罹患歴がある者を除外しても同様の結果が確認され、また、多変量解析の場合も同様であった。

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、発症率が有意に高かった[HR1.38(1.10-1.72)]。これは、過去罹患歴がある者を除外した場合、多変量解析の場合も同様の結果が確認された。

6) 癌

基礎疾患の中でも、特に癌の既往者は発症率が有意に高かった[HR1.60(1.02-2.51)]。これは過去罹患歴がある者を除外した場合は同様の結果が確認されたが、多変量解析を行うと、有意差が確認されなかった。

7) 兄弟の帯状疱疹罹患歴

家族の帯状疱疹罹患歴の中で、唯一兄弟の帯状疱疹罹患歴がある者はない者に比べ、発症率

が有意に高かった[HR1.61[1.07-2.45]]。これは多変量解析の場合も同様の結果であったが、本人の過去罹患歴がある者を除外した場合は有意差が確認されなかった。

8) ライフイベント

「この 1 年間で、あなたが経験したことで、あてはまる項目はありますか?」という質問に対し、(1)仕事や生活環境の大きな変化(転職、退職、引越し、事故、盗難など)、(2)人間関係の変化(離婚、家族・親しい人の死亡、家族・親しい人とのトラブルなど)、(3)経済的にかなり困難な状況(収入の減少、借金など) (1)から(3)のいずれかがあったと回答した群(ライフイベント有群)といずれもない(ライフイベント無群)と回答した群の 2 群に分類し比較したところ、帯状疱疹の発症には有意差はなかった[HR0.98(0.79-1.21)]にも関わらず、PHN の発症率がライフイベント有群は有意に高かった[HR1.76(1.03-3.01)]。これは、帯状疱疹罹患患者 396 名のみで検討しても同様の結果であった[HR1.86(1.07-3.23)]。

D. 考察

(1)VZV に対する液性免疫及び細胞性免疫の測定と帯状疱疹との相関について

水痘皮内反応に関与する細胞性免疫の程度が高い者ほど帯状疱疹の発症リスクが低いことが明らかになった。この結果から、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、細胞性免疫の発症への関与を強く裏付けるものであり、上記を支持する結果であった。

水痘皮内反応の検査結果が、検査実施から 1 年間で発症リスクを示すことは、前研究の段階から示唆されていた。しかし、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、時間の経過に伴い、登録時に測定した登録者の免疫の程度が変動し、有意な HR を示さなくなるのではないかと懸念されていた。しかし、本研究 3 年間の観察期間において、陰性群と陽性群との間に、有意な HR が確認された。このことから、水痘皮内反応は実施後 3 年間の発症リスクを十分に示し得ることが示唆

された。

細胞性免疫の程度は加齢に伴い減衰する一方、液性免疫は加齢に伴い増強することが、前研究及び本研究から示唆された。また、本研究により高年齢群の発症リスクが高いことが明らかになった。これらの結果から、帯状疱疹の発症には液性免疫より細胞性免疫が強く関与していることが推察された。

テーマC登録者の水痘皮内反応は、年度によっては増大傾向が確認されたが、同一部位への反復接種による局所的な促進反応の影響であることが示唆された。水痘皮内反応実施群と未実施群の3年間の発症リスクに差がなかったことから、水痘皮内反応の実施によって全身的な細胞性免疫は上昇しないことが推察された。

(2) 帯状疱疹の痛み及び持続について

帯状疱疹発症者では、皮疹の重症度だけでなく、知覚過敏や知覚鈍麻などの知覚異常の有無が、急性期疼痛ならびにPHNの発症に影響を及ぼしていることが明らかとなった。特に、知覚過敏、知覚鈍麻の両方がみられなかった患者では、PHNへの移行が全く認められなかった点は、注目に値する。今回の結果から、帯状疱疹の診療においては、知覚過敏や知覚鈍麻の有無を正確に把握することが、予後を判定する上で非常に有用であることが判明した。

(3) IFN γ -ELISPOT 試験を用いた水痘帯状疱疹特異的免疫に関する検討

本研究で用いた2種類のVZV特異的細胞性免疫測定法による各結果間に相関が認められたが、その程度は弱いものであった。考えられる理由としては、2種類の測定法で用いた抗原が異なることや各測定における免疫学的作用機序が異なっていることなどが挙げられる。そのため、今後はどちらの試験方法がよりの確に帯状疱疹発症を予測でき得るのかについて検討する必要があると考えられる。

帯状疱疹は、宿主に潜伏するVZVの再活性化により発症する。その再発には、VZVに対する細胞性免疫応答の低下が関与していると考えられている。今回我々は、大コホートによる疫学調査により、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、細胞性免疫応答がどの程度ま

で抑制されることにより帯状疱疹発症に至るのかについては未だに不明であり、更なる検討が必要であると考えられる。

帯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回復時（発症3カ月後）より高値を示した。細胞性免疫応答の持続期間や高い細胞性免疫応答が再発の予防にどのように寄与するかも今後の検討課題になり得る。

(4) 生活習慣や社会心理的要因と水痘皮内反応結果及び帯状疱疹発症との相関について

帯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。

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。

一方、縦断研究においては、帯状疱疹発症と関連する8因子が確認された。その中でも、喫煙者と生きがいが大いにある者において、帯状疱疹の発症リスクが有意に低く、基礎疾患のある者、特に癌の既往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。本最終結果はこれまで中間報告として発表してきた帯状疱疹の発症に関連する危険因子とほぼ同様の結果であった。

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。また、生きがいについては、個人の価値観によるものであるため、帯状疱疹を予防する生活指導の具体策を講じる事はいささか困難であるが、生きがいを大いに感じる事が帯状疱疹の予防に繋がることを確認できた事は、今後のメカニズムを研究する上で評価に値すると考える。

また、PHN発症のリスク因子としては、唯一ライフイベントが関係することが示された。

これまでの海外の先行研究でも生活習慣と

PHN の関係を検討したものはなく、新たな知見が得られた。

E. 結論

本研究によって、日本人の高齢者における帯状疱疹の正確な発症率が明らかになった。その他、細胞性免疫が帯状疱疹の発症に関与することや、発症及び重症化の抑制に必要な細胞性免疫の程度、免疫の持続期間が明らかになるなど、ワクチン開発に有益な疫学の知見が得られており、今後、様々な発症予防策の検討が可能になる。

高齢者に既存の水痘ワクチンを接種することで、細胞性免疫が増強されることは、過去の研究（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 Takahashi M, et al. *Vaccine* **21**:3845-3853, 2003）によって、既に公知となっている。当該研究の結果を本研究結果と組み合わせると、水痘ワクチンの免疫増強効果は、帯状疱疹の発症及び重症化の抑制に有効なものであることが確認された。これによって、既存の水痘ワクチンを帯状疱疹の予防に利用できる可能性が大いに高まったといえる。

今後、これらの結果をもとに詳細な検討を重ね、国内初の帯状疱疹ワクチンが早期に開発されることを期待する。

F. 研究発表

1. 英文発表

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 Cohort Study. *J Epidemiol* **22**(2): 167-174. 2012

2) Tang H, Moriishi E, Okamoto S, Okuno Y, Iso H, Asada H, Yamanishi K, Mori Y: A community-based survey of varicella-zoster virus-specific immune responses in the elderly. *J Clin Virol* **55**(1): 46-50, 2012

3) Asada H, Nagayama K, Okazaki A, Mori Y, Okuno Y, Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Okeda M, Yano S, Kumihashi H, Gomi Y, Maeda K, Ishikawa T, Iso H, Yamanishi K: An inverse correlation of VZV skin-test reaction, but not antibody, with severity of herpes zoster skin symptoms and zoster-associated pain. *J Dermatol Sci* **69**(3): 243-9, 2013

4) Okuno Y, Takao Y, Miyazaki Y, Ohnishi F, Okeda M, Yano S, Kumihashi H, Gomi Y, Maeda K, Ishikawa T, Mori Y, Asada H, Iso H, Yamanishi K: Assessment of skin test with varicella-zoster virus antigen for predicting the risk of herpes zoster. *Epidemiol Infect* **141**(4):706-13, 2013

2. 邦文発表

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

7) 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

8) 浅田秀夫: ウイルス抗体価の読み方, 今日皮膚疾患治療指針, 医学書院, p147-150, 2012

- 9) 浅田秀夫: EB ウイルス関連リンパ腫とNK細胞リンパ腫, 今日の皮膚疾患治療指針, 医学書院, p751-753, 2012
- 10) 浅田秀夫: 思春期のウイルス感染症で重症化しやすいものは? 思春期の皮膚トラブルFAQ, 診断と治療社, p179-184, 2012
- 11) 浅田秀夫: 帯状疱疹, 高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス- 鑑別と治療のポイント, 医薬ジャーナル社, p153-157, 2013
- 12) 浅田秀夫: 単純疱疹, 皮膚疾患最新の治療 2013-2014, 南江堂, p173-174, 2013

3. 学会発表

- 1) 第 26 回ヘルペスウイルス研究会 (2011.6.2-4 ; 大阪) Investigation of VZV-immunity by large cohort study
- 2) 第 60 回日本ウイルス学会学術集会教育セミナー2 香川県小豆郡における帯状疱疹疫学研究 “SHEZ Study”
- 3) 第 23 回日本疫学会学術総会
喫煙習慣と帯状疱疹の発症との関連 Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study
- 4) 第 23 回日本疫学会学術総会
自覚的生きがいの程度と帯状疱疹発症との関連 Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study
- 5) International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sep 11 - Sep 16, 2011; Sapporo, Japan)
A community-based survey of Varicella-Zoster virus-specific immune responses in the healthy elderly

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

小豆郡における帯状疱疹発症の大規模疫学研究

独立行政法人 医薬基盤研究所
山西 弘一

研究要旨 香川県小豆郡で帯状疱疹の大規模疫学調査を実施した。50歳以上の発症率は年間1.07%であり、水痘皮内反応が帯状疱疹の発症、重症化、及びPHNのリスク指標となることが明らかになった。生活習慣・社会心理的因子の調査によって、帯状疱疹発症やPHNの危険因子を特定した。

研究分担者

- | | |
|---------------------|------|
| (1) 大阪大学大学院 | 磯 博康 |
| (2) 独立行政法人医薬基盤研究所 | 森 康子 |
| (3) 奈良県立医科大学 | 浅田秀夫 |
| (4) 一般財団法人阪大微生物病研究会 | 奥野良信 |

A. 研究目的

帯状疱疹は、水痘帯状疱疹ウイルス（以下VZV）が再活性化した病態であり、高齢者ほど発症しやすいと言われている。少子高齢化が進む日本では、今後発症者が増加すると予測され、高齢者医療費の増大が懸念されている。

米国では水痘ワクチンの力価を高めたワクチンを用いて、大規模臨床試験（M. N. Oxman, et al.）が行われ、その結果を基に同ワクチンが帯状疱疹ワクチンとして承認されている。また、ACIP（米国予防接種勧告委員会）も60歳以上の人への帯状疱疹ワクチン接種を推奨している。

一方国内では、帯状疱疹ワクチンは承認されておらず、発症者の疾病負担及び医療費負担の軽減のために帯状疱疹ワクチンの開発が期待されている。また、これまで、水痘ワクチンを高齢者に接種すると水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）に対する細胞性免疫の増強効果が解明されているが（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）、細胞性免疫の程度と帯状疱疹発症の相関や免疫持続期間については検証されていなかった。

そこで我々は、将来の帯状疱疹ワクチン開発のための基礎的な検討を行うため、世界初となる特定地域での帯状疱疹の大規模疫学研究「平成20年度政策創薬総合研究事業 帯状疱疹ワクチン開発のための疫学研究」（以後、前研究）を実施し、この研究に引き続く形で本研究を実施した。

これら一連の研究において、帯状疱疹の発生頻度と発症者における痛みの程度と持続期間、生活習慣及び社会心理的要因と細胞性免疫の程度及び帯状疱疹発症との関係、VZVに対する免疫の程度と帯状疱疹発症の相関、細胞性免疫と液性免疫の各種抗体価の相関、及び免疫持続期間等を明らかにした。

B. 研究方法

(1) 本疫学研究の対象者と登録者数：本疫学研究対象者は、香川県小豆郡在住の50歳以上の男女17,323人（平成20年10月1日時点）のうち、12,522人とし、テーマに応じて以下の3群に分けられた。

①テーマA（目標登録者数 12,522人）

電話による聞き取り調査。

②テーマB（目標登録者数 5,685人）

水痘皮内反応による細胞性免疫の測定

③テーマC（目標登録者数 365人）

(a) 水痘皮内反応及びIFN- γ ELISPOT試験による細胞性免疫の測定

(b) gp-ELISA 価測定法、中和抗体価測定法、IAHA 価測定法によるVZVに対する液性免疫の測定

調査期間は登録から3年間とする。(a) (b)は1年毎、計4回実施し、各種免疫間の相関等について検討した。

(2) 発症疑い者の調査

テーマA登録者に対して、帯状疱疹発症疑い者のスクリーニングのための電話による聞き取り調査を行い、発症疑い者に対して、発症時調査（①臨床症状の調査（発症時、回復時に実施）、②患部写真撮影（発症時、回復時に実施）、③帯状疱疹患部からの採材によるPCR試験（発症時に実

施)、④細胞性免疫 (IFN- γ ELISPOT 試験) と液性免疫 (gp-ELISA、IAHA、NT) の測定 (発症時、回復時)、⑤痛みの調査 (発症時から痛み消失まで最長 6 ヶ月間実施) を行った。なお、発症時及び回復時の調査ならびに各種検査結果に基づき、確定診断を行った。

(3) 帯状疱疹の確定診断

調査開始後、医療機関にて「帯状疱疹である」または「帯状疱疹の疑いがある」と診断された発症者について、発症時及び回復時の調査ならびに各種検査結果に基づき、確定診断を行った。

(4) 皮疹の重症度の評価

帯状疱疹発症者について①紅斑の神経分節における面積比、②水疱・びらんの数、③潰瘍の有無、④融合水疱の有無、⑤皮疹が出現した神経分節数を基に皮疹の重症度をスコア化した。

(5) 急性期疼痛と皮疹重症度および知覚異常との関係についての検討

帯状疱疹発症者について、急性期疼痛の程度を経時的にグラフ化し、このグラフに基づいて疼痛スコア (AUC: area under curve) を求めた。この疼痛スコアと皮疹重症度スコア・知覚異常 (知覚過敏、知覚鈍麻) との関係について検討した。

(6) 帯状疱疹後神経痛 (PHN) と皮疹重症度および知覚異常との関係についての検討

発症から 3 ヶ月以上に渡って疼痛が持続する PHN の発症と、皮疹重症度スコアや知覚異常との関係について検討した。

(7) 生活習慣や社会心理的要因と帯状疱疹発症との相関

対象者は健康に関するアンケートに回答した 50 歳から 103 歳までの男性 5,509 人、女性 6,850 人、計 12,359 人とし、アンケート調査時をベースラインとして、その後の調査期間 (約 3 年間) における帯状疱疹、及び PHN 発症を追跡調査した。調査期間における帯状疱疹発症の有無 (PCR 試験による VZV 検出例を帯状疱疹発症と定義した)、PHN 発症の有無 (発症から 3 ヶ月以上疼痛が持続した者を PHN 発症と定義した) とベースライン時における身体的因子、生活習慣および社会心理的因子、全 41 因子との関係を前向きに検討し、帯状疱疹発症に関連する危険因子を検討した。解析は発症の有無を目的変数として、健康に関する 41 因子を説明変数として、Cox 回帰分析を行った。この際、年齢、性別、過去帯状疱疹罹患歴を交絡

因子として調整した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臨床研究に関する倫理指針及び疫学研究に関する倫理指針を遵守し、(独) 医薬基盤研究所の倫理審査委員会 (山西、森) (平成 20 年 11 月 11 日)、(財) 阪大微生物病研究会 (奥野) の倫理審査委員会 (平成 20 年 8 月 23 日)、奈良県立医科大学の倫理審査委員会 (浅田) (平成 20 年 12 月 12 日) 及び大阪大学の倫理審査委員会 (磯) (平成 21 年 2 月 12 日) で承認を得た上で研究を行った。

また、テーマ C 登録者の調査項目の追加に伴い、それぞれの倫理審査委員会【医薬基盤研究所 (平成 23 年 11 月 21 日)、阪大微生物病研究会 (平成 23 年 9 月 22 日)、奈良県立医科大学 (平成 24 年 2 月 15 日) 及び大阪大学 (平成 24 年 1 月 31 日)】で承認を得た。

C. 研究結果

(1) 観察期間と脱落者数

前研究から継続する平均観察期間は 1,194 日 (3.00 年) であり、期間中の脱落者数は 800 人であった。

(2) 発症者調査

帯状疱疹の発症疑い 679 例中、535 例が医療機関にて「帯状疱疹」または「帯状疱疹疑い」と診断された。そのうち 531 例の患部から生体試料を採取し、PCR 試験を実施したところ、396 例から VZV 特異的な DNA が検出された。PCR 試験結果に基づく帯状疱疹の年間発症率は 1.07% であった。

女性の年間発症率 (1.27%) は、男性 (0.83%) より高く、年齢階層別では、50-69 歳群 (0.87%) よりも 70 歳以上群 (1.30%) のほうが高かった。性別・年齢階層別では、60-69 歳の男性 (0.55%) が最も低く、70-79 歳の女性 (1.47%) が最も高かった。(図 1)

また、季節別には、帯状疱疹発症は冬に最も少なく、春から徐々に増加し、夏にピークを迎え、冬に向けて徐々に減少する傾向が見られた。(図 2)

(3) 水痘皮内反応を用いた発症リスクの検討

テーマ B 登録者に対して登録時に実施した水痘皮内反応の結果によって、帯状疱疹の発症リスクを比較した。

紅斑長径 10mm 以上を陽性、10mm 未満を陰性にしたとき、陽性群のハザード比 (以下 HR) は 0.27 (95% 信頼区間: 0.19-0.37) であり、陽性