

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が行われた。

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、1.0%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、20μL）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）を少容量（200μL）ないしは大容量（1000μL）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 μL 添加し、37℃ 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℃ 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。

7) 分子クローニング

フェレット血液を材料にフィコール分離法により末梢血単核細胞 (PMBC) を得た。TRIzol 法により全 RNA を抽出し、得られた全 RNA からランダムプライマーにより cDNA を合成した。

CD11c については、cDNA を得るのに先行して、ヒト CD11c のタンパク質立体構造情報や構成アミノ酸を基に抗原性を予測して部分アミノ酸配列を選択し、人工 DNA 合成により CD11c 部分 DNA 配列を合成した。この配列を大腸菌発現ベクター pET22(Novagen) に挿入し発現コンストラクトを構築した。この発現コンストラクトを *E. coli* BL21(DE3) 株に遺伝子導入し、IPTG 濃度・温度・誘導時間などの発現誘導条件を検討、さらに封入体として発現した CD11c を精製した。また、フェレット IL-6, IL-4, INF- α の配列情報を基に人工遺伝子合成し、部分配列を取得した。この配列を大腸菌発現ベクター pET22(Novagen) に挿入し免疫用抗原作製の発現コンストラクトを構築した。またフェレット CD3, CD8 α , IFN γ , TNF α 発現ベクターを購入し、リポフェクション法により CHO 細胞へ遺伝子導入し、発現検討した。

C. 研究結果

1) ウイルス同定・分離・継代

2011~2012 シーズンに簡易診断キット陽性の患者検体 182 例に含まれるウイルスの型・亜型を定量 PCR 法で検討した結果、H1N1pdm : 0 例、H3 : 100 例、B (山形系統) : 14 例、B (ビクトリア系統) : 53 例、未検出 : 15 例であった。続いて H3 株陽性検体 48 例からウイルスの分離・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 株選択し、2 代目および 8 代目のウイルスを増殖させ、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)。この結果は、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 N273 株および N382 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、N284 株 (P221P/L および N225N/D)、N316 株 (A138A/S および N225N/D)、N321 株 (P221P/L および N225N/D)、N337 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 N316 株で 3 代目に D151D/N が、N273 株では 9 代目に T148A、N382 株でも 9 代目に T149I のアミノ酸変異が認められた (表 2)。

さらにこのようなアミノ酸変異と抗原性との相関性を 2010、2011、2012 シーズンのリファランス株 (Niigata、Yamaguchi、Victoria) に対する抗血清を用いて検討した (表 3)。その結果、Niigata および Yamaguchi 株に対する抗血清を用いた場合には、リファランス株と 2 管以上の抗原性の違いを示した株は認められたが、分離シーズンと同じ 2012 シーズンのリファランス株である Victoria の抗血清を用いた場合には、リファランス株との抗原性の相違は認められなかった。今回検討した分離株は 2011～2012 シーズン株であることから、継代によって生じたアミノ酸変異は抗原性にほとんど影響がないことが示唆された。

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。継代中、HA 価が高く推移していた株 (N337 株) の 2 代目と 8 代目、および、HA 価が低く推移していた株 (N316 株) の 2 代目と 8 代目、さらに HA 価が高い N273 株の 8 代目と低い N321 株の 2 代目、合計 6 株を感染株に用い、感染後に誘導される特異的抗体応答を検討した (図 2)。その結果、HA 価に関わらず、各株間での抗体誘導能に有意差は認められなかった。そのためこれらの株のマウスにおける免疫原性は同等であることが示唆された。

4) フェレット感染条件の構築

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、効率的に免疫を誘導できるフェレットの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。フェレットに 9 回継代した N337 株 (N337C9) を片鼻から大容量感染モデルとして 1mL ないしは少容量感染モデルとして両鼻に 100 μ L ずつの 200 μ L の 2 つの感染条件で、経時的に気道のウイルス価および抗体価を測定した。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、両感染モデル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、大容量感染モデルで少容量感染モデルより高い傾向が認められたが、その後は経時的な減少が認められた (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。しかしながら両感染モデルにおける感染後の体重の経時的変化では、大容量感染モデルの体重増加率が少容量感染モデルと比較し顕著に低いことが明らかとなった (図 4)。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、少容量感染群において、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、大容量感染群では、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 5)。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なかったが、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 抗体応答を経時的に検討した。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 抗体価も経時的に検討

したが、HI 価と同様、感染 2 週をピークに経時的にわずかな減少が認められ、感染容量の違いによる抗体応答の有意な差異は認められなかった（図 6）。これらの結果は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大容量の感染で認められていたため、大容量感染モデルでは、広域に感染が広がっていたことを示唆している。また、大容量感染の方が有意差はなかったものの、少容量よりも抗体価が高い傾向にあったこと、ならびに大容量であることで、技術的なバラつきが少ないことが予測されるため、抗体応答を検討するための条件として、大容量感染モデルを用いることとした。

5) 臨床分離株を感染させたフェレット抗血清を用いた抗原性解析

続いてリファランス株と抗原性が同類である 6 株を各株 3 匹ずつのフェレットに感染させ、抗血清を採取し、各株およびその継代株を用いた抗原性解析を行った（表 5）。その結果、N284、N316、N321 株を感染させたフェレット抗血清では、各株ならびにその継代株に対する抗原性の違いは認められなかったが、N273、N337、N382 株を感染させたフェレットでは他の株との抗原性の違いを検出した。興味深いことに、N273、N337、N382 株の抗血清で N284 株およびその継代株の抗原性を解析した場合には、継代株の方が抗原性の違いが顕著になっている傾向が認められたのに対し、N284、N316、N321 株の抗血清を用いた場合には、継代前の株だけでなく継代株をも抗原性の違いが検出できないという結果であった。すなわち、リファランス株を用いて各株の抗原性を解析した場合には、全ての株が類似の抗原性と認識されるが、各株の抗血清を用いた場合には、必ずし

も抗原性が一致し得ないことが示された。現在、これらの株の不活化抗原を用いてフェレットに免疫した場合に同様な結果が認められるかどうかを検討している。

6) 臨床分離株に対するフェレット抗血清を用いた各シーズン由来の分離株の抗原性解析

引き続き、臨床分離株 6 株を感染させた抗血清を用いて、2010～2011 シーズンに分離された 4 株、2011～2012 シーズンに分離された、感染株以外の 10 株、2012～2013 シーズンに分離された 4 株、計 18 株の抗原性解析を行った（表 6）。その結果、2010～2011 シーズンに分離された 4 株中 3 株では抗原性の顕著な違いが認められなかったのに対し、2012～2013 シーズンに分離された株では N273、N337、N382 株の抗血清で抗原性の違いが顕著な株が認められた。しかし、N284、N316、N321 株の抗血清を用いた場合には、これらの株の抗原性の違いが検出できないフェレット血清が認められた。また、抗血清の株と同じ 2011～2012 シーズンに分離された株の中でも N273、N337、N382 株の抗血清を用いた場合に抗原性の顕著な違いを認めた株もあった。以上の結果は、同シーズンに分離された株でリファランス株と同類の抗原性を有する株であっても、それらの抗血清で抗原性試験を行った場合に、抗原性の違いの検出感度に差があり、さらに個々のフェレットの違いも認められることが示された。

7) 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、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、現在モノクローナル抗体の作製を進めている。また、GenBank データベースより取得した配列情報よりフェレット IL-6, IL-4, INF- α の人工遺伝子合成し、大腸菌用発現ベクターを構築した。これらについては免疫用抗原調製の為、現在発現条件等の検討中である。CD3, CD8 α , IFN γ , TNF α については 4 種の哺乳類細胞用発現ベクターを調製し、リポフェクション法により CHO 細胞に遺伝子導入し、一過的な発現を検討した。各発現タンパク質の C 末端側に付加した His-tag に対するイムノブロットで発現を確認した後、恒常的発現株を構築した。

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、患者検体 182 例に含まれるウイルスの型・亜型を定量 PCR 法で検討した結果、H1N1pdm : 0 例、H3 : 100 例、B (山形系統) : 14 例、B (ビクトリア系統) : 53 例、未検出 : 15 例であった。そのうち H3N2 亜型 48 サンプルを継代し、性状解析を行ったところ、抗原性や増殖性と HA 価との相関性は認められなかった。この結果は 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を示唆している。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。このように 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大容量ないしは少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大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。

この感染条件でリファランス株と抗原性が類似している 6 株をフェレットに感染させて抗血清を獲得し、継代株の抗原性試験を行った。その結果、大部分の株で継代前後の抗原性に違いは認められなかったが、1 株 (N284 株) で部分的な抗原性を示唆する結果が得られた。この株はアミノ酸解析の結果から、P221P/L お

よび N225N/D の部分的変異を有することが明らかとなっており、抗原性の違いはこれに起因することが考えられたが、N321 株の継代株においても全く同じ変異が認められているにも関わらず、抗原性の違いは認められていないことから、他の要因による、ないしは変異アミノ酸の比率によって、検出の差異に繋がっていると考えられる。さらに同抗血清を用いて近年 3 シーズン由来の分離株の抗原性解析を行った結果、同じシーズン内で分離された株で、リファランス株と抗原性が類似していると判定された株であっても、分離株の抗血清を用いた場合には抗原性の違いが認められた。またこの検出感度は個々のフェレットによっても違いが認められ、本検査系には個体差も顕著に反映されることが明らかとなった。このように、様々な分離株を用いて抗血清を作製し、抗原性解析に用いると、より微細な抗原性の違いを検出できる可能性があることが示唆されるのと同時に、ワクチンシードの選択基準を構築することが重要であるにも関わらず、非常に困難であることも示唆された。現在、これらの分離株の不活化抗原を用いて抗血清を作製しており、感染によって認められた抗原性の検出感度が不活化抗原によっても再現されるかを検討中である。

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ている。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

臨床分離株を感染させたフェレット抗血清を用いて分離株の抗原性解析を行った結果、リファランス株での評価とは異なる結果が得られた。リファランス株はワクチンを決定する上で重要な情報となるが、分離株の抗血清を用いた抗原性解析の情報を加味することで、より精度の高いワクチン候補株の選定ができることが示された。その一方、ワクチン種株の選定方法が如何に難しいかということも同時に示されることとなった。引き続き、不活化抗原の免疫実験による応答性の違いや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. 健康危険情報

本研究により、現行のインフルエンザワクチンの株選定過程において、リファランス株の抗血清を用いた抗原性解析が行われているが、リファランス株と類似の抗原性と判断された株であっても、その株に対する抗血清では必ずしもリファランス株と同等の評価ができないことが明確になった。すなわち、ワクチン種株選定の重要な情報である抗原性解析にも多角的な解析を行わなければ有効なワクチン種株が選定できない。適切なワクチン種株の選定は、流行株の防御に非常に重要であるため、本結果を新たな情報として、これを基盤に引き続き検討することが望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoo W, Nakamura T, Asanuma H, Matsushita M. Molecular cloning, genomic structure and tissue distribution of EW135, a novel chicken egg white protein with group B scavenger receptor cysteine-rich domains. Immunogenetics. in press 2013

Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Full genome of ferret hepatitis E virus isolated in laboratory ferrets. Emerging Infectious Diseases. in press 2013

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 眞人 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 眞人 第 16 回 日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

H. Asanuma, A. Ainai, N. Nagata, N. Kishida, H. Takahashi, N. Konomi, Y.-Fujita Yamaguchi, M. Tashiro. Relationship between virus clearance and induction of nasal IgA after infection of ferrets with H3N2 influenza virus derived from clinical specimens. International Congress of Mucosal Immunology, 2013 July, Vancouver.

マウスモデルを用いた細胞培養型インフルエンザワクチンの有効性の解析 原田 勇一、中村 一哉、浜本 いつき、榎本 匡志、浅沼 秀樹、相内 章、田代 眞人、山本 典生 第 17 回日本ワクチン学会学術集会、津、2013

H. Asanuma. Contribution of virus clearances by nasal IgA in ferrets primed with H3N2 influenza virus derived from clinical specimens. 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013

H. 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

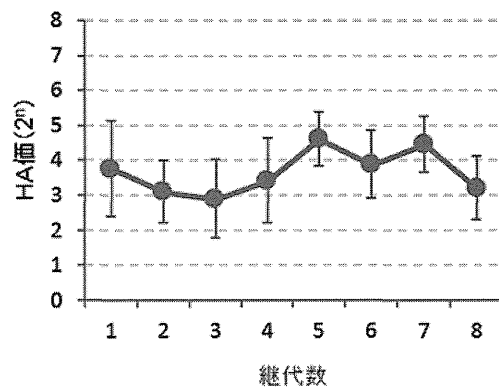


図1 臨床検体から分離されたH3N2ウイルス株の継代に伴うHA価の推移 (HA価:2nd)
臨床検体からMDCKを用いて、ウイルスを分離・継代した時のHA価を測定し、継代に成功した全45株の平均値と標準偏差を算出した。

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

Sample ID	蛋白量 (mg/mL)			HA含有量 (%)			HA含有量 (mg/mL)			TCID ₅₀	
	C3	C9	増加率 ¹⁾	C3	C9	増加率	C3	C9	増加率	C3	C9
N273	233	217	93.1	20.1	19.6	97.5	46.8	42.5	90.8	6.6	6.6
N284	185	211	114.1	25.1	37.9	151.0	46.4	80.0	172.2	7.4	6.5
N316	248	237	95.6	30.3	23.5	77.6	75.1	55.7	74.1	6.2	6.5
N321	213	217	101.9	28.1	30.7	109.3	59.9	66.6	111.3	6.5	6.1
N337	249	279	112.0	19.6	29.0	148.0	48.8	80.9	165.8	7.2	7.1
N382	ND ²⁾	181		ND	30.9			55.9		6.5	6.6

1) 増加率はC9/C3で算出した。

2) Not detect

表2 臨床検体分離株のアミノ酸解析

Sample ID	HA				NA			
	AA position(s)	Passage history			AA position(s)	Passage history		
		0	3	9		0	3	9
N273					148T			A
N284	221P			P/L				
	225N			N/D				
N316	138A			A/S	151D		D/N	
	225N			N/D				
N321	221P			P/L				
	225N			N/D				
N337	216N			N/K				
N382					149T*			I

* : 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 Cell No.2	A/Victoria/361/2011 Cell No.1
Niigata/403/09	CK2+2	640	640	640
Yamaguchi/72/11	CK1+2	640	1280	640
Victoria/361/2011	CK2+2	320	320	320
N273-C3	CK3	640	640	640
N273-C9	CK9	1280	1280	1280
N284-C3	CK3	160	160	160
N284-C9	CK9	160	160	160
N316-C3	CK3	160	160	160
N316-C9	CK9	320	640	320
N321-C3	CK3	160	160	160
N321-C9	CK9	320	320	320
N337-C3	CK3	320	320	320
N337-C9	CK9	1280	1280	1280
N382-C9	CK9	640	640	320

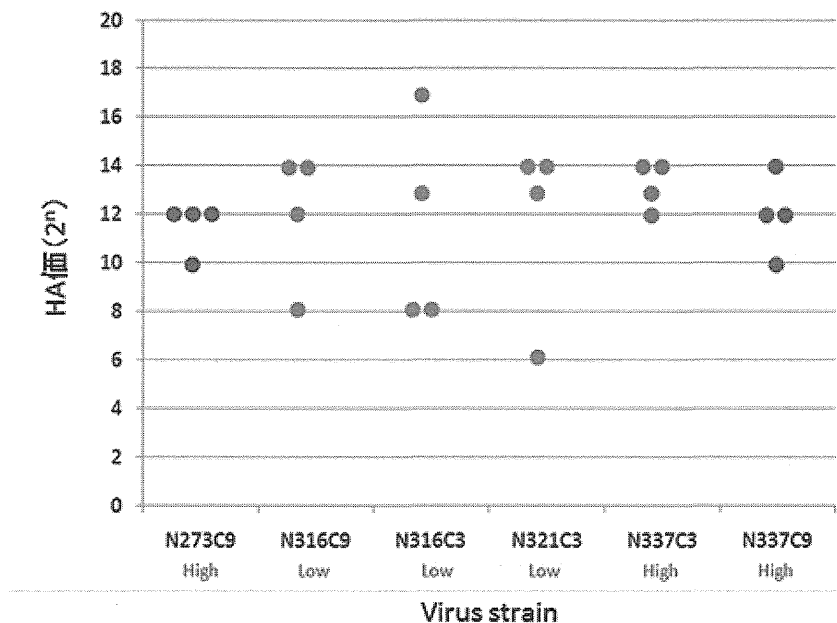


図2 マウスに各分離・継代株を感染させた場合の抗体応答(2ⁿ)
BALB/cマウスに各分離・継代株を感染し4週後、血清を採取し
ELISA法によって抗体価を測定した。抗体価測定法に関しては方法
に記載した。n=4

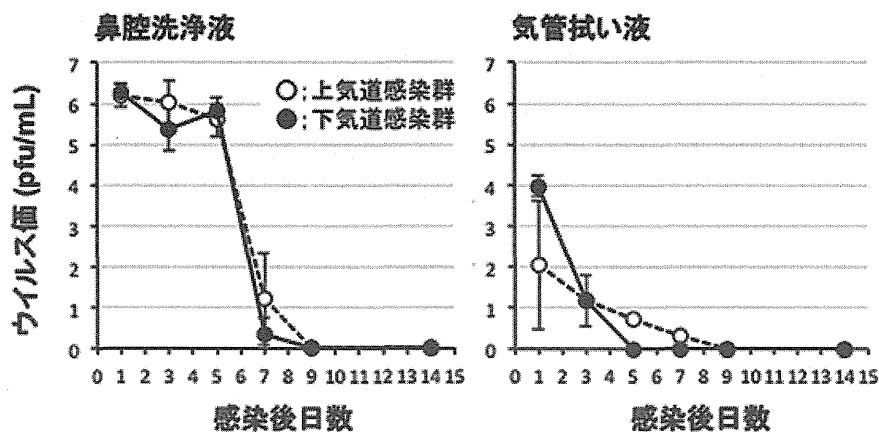


図3 N337C9株感染後の鼻腔あるいは気管のウイルス価の変動
フェレットに大容量(1mL)もしくは少容量(100μL x 2)のN337C9株を感染
させ、経時的に鼻腔洗浄液と気管拭い液を採取し、それぞれのウイルス
価をプラーク法で測定した。ウイルス価の測定法は方法に記載した。エ
ラーバーは標準偏差を示した。n=4

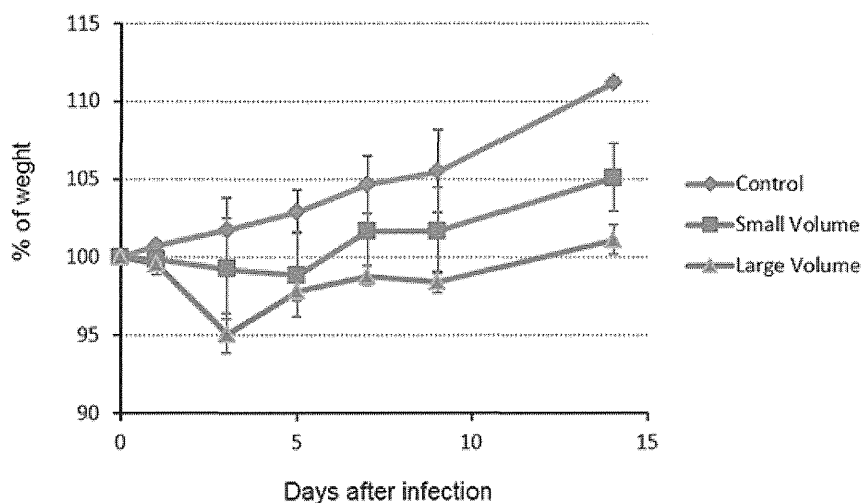


図4 異なる容量のウイルス株をフェレットに感染後の体重の経時的変化
 フェレットに容量の異なるウイルス株を経鼻的に感染させ、経時的に体重を測定した。Controlにはウイルス希釈に用いた0.1%BSA加PBSを1mL経鼻接種した。エラーバーは標準偏差を示した。n=4(コントロールは2)

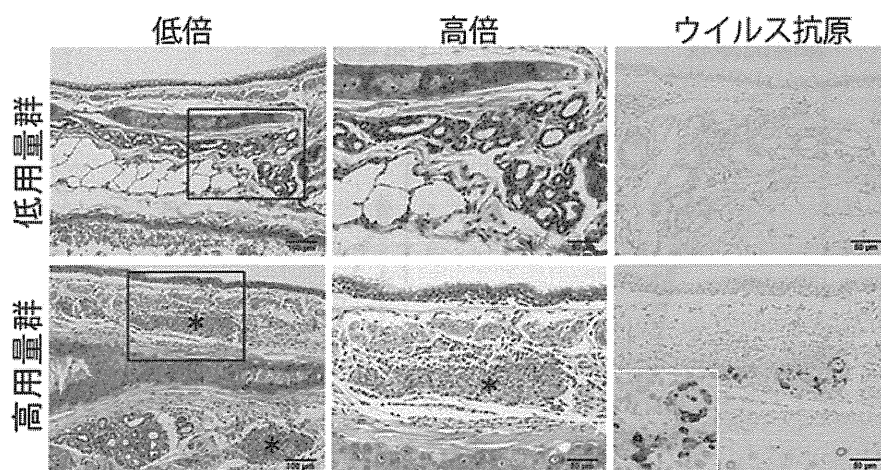


図5 接種3日目のインフルエンザウイルス感染に伴う肺病変像
 上段:少容量接種群において組織病変とウイルス抗原陽性細胞は見られなかった。下段:大容量接種群では、肺内気管支周囲の気管支腺組織に炎症性反応がみられ(*),この病変に一致して、ウイルス抗原陽性細胞が存在した(下段右図、挿入図)。気管支上皮に感染を示す像は見られない。

表4 臨床検体分離株の抗原性解析

Weeks after challenge	Ferret No.							
	Small volume (100μL x 2)				Large volume (1000μL)			
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	80	80	80	80	160	80	160	80
2	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560	2560
3	2560	2560	2560	640	2560	1280	1280	2560
4	2560	1280	2560	640	1280	1280	1280	1280
5								
6	1280	1280	1280	640	640	640	640	640
7								
8	1280	1280	1280	640	640	640	1280	640
9								
10	1280	640	1280	640	320	640	640	640
11								
12	1280	640	1280	640	320	640	640	320

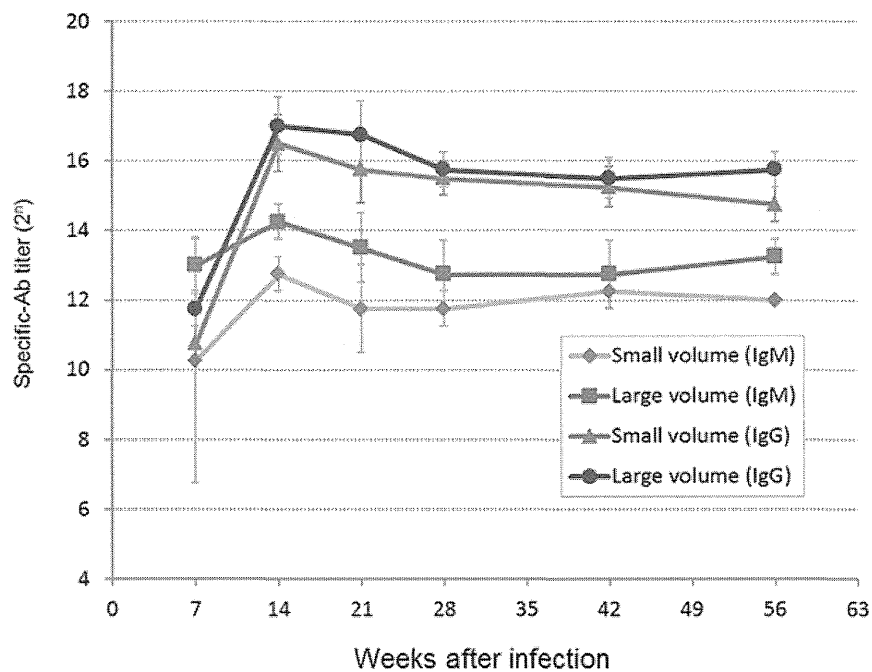


図6 ウイルス接種後の特異的IgGおよびIgM抗体の経時的変化
N337C9株を異なる容量で接種後、毎週血清を採取し、特異的IgGおよびIgM抗体をELISA法で測定した。抗体価の測定法は方法に記載した。エラーバーは標準偏差を示した。n=4

表5 臨床分離株を感染させたフェレットの抗血清を用いた抗原性解析

抗原	フェレット抗血清														
	N273C3			N284C3			N316C3			N321C3			N337C3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
N273C3	> 5120	1280	2560	> 5120	5120	2560	5120	2560	2560	> 5120	1280	2560	> 5120	> 5120	2560+
N273C9	5120	640+	1280	2560	2560	1280	2560	1280	1280	2560	640	1280	2560	5120	2560
N284C3	1280	320	640	1280	640	640	640	320	320+	640+	160+	640	640	1280	640+
N284C9	640+	160+	320+	640+	320+	320	320+	320	320	640	160	640	320+	1280	640
N316C3	2560	320	640	1280	1280	640	1280	640	640	1280	320	640+	640+	1280+	1280
N316C9	2560	2560	1280	1280+	2560	1280	2560	1280	1280	2560	640	1280	2560	5120	2560
N321C3	1280	320	1280	1280	1280	640	640	640	640	1280	320	1280	640+	1280	1280
N321C9	2560	640	1280	2560	2560	1280	1280	640+	1280	2560	640	1280	2560	2560	2560
N337C3	> 5120	1280	640	5120	5120	640	5120	2560	640	5120	1280	640	5120	5120	640
N337C9	640+	320	640	640	640	320+	640	320	640	640+	320	640	640	1280	640
N382C3	2560	640	1280	1280	1280	320+	640	640	640	1280	320	640	640	1280+	1280
N382C9	2560	640	1280	1280	1280	640	640	640	640	1280	320	640	640	1280+	1280

:感染株と2管差
 :感染株と3管差
 :感染株と4管差以上

表6 臨床分離株に対するフェレット抗血清を用いた各シーズン由来の分離株の抗原性解析

抗原	フェレット抗血清														
	N273C3			N284C3			N316C3			N321C3			N337C3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
273C3	> 5120	1280	2560	> 5120	5120	2560	5120	2560	2560	> 5120	1280	2560	> 5120	> 5120	2560+
284C3	1280	320	640	1280	640	640	640	320	320+	640+	160+	640	640	1280	640+
316C3	2560	320	640	1280	1280	640	1280	640	640	1280	320	640+	640+	1280+	1280
321C3	1280	320	1280	1280	1280	640	640	640	640	1280	320	1280	640+	1280	1280
337C3	> 5120	1280	640	5120	5120	640	5120	2560	640	5120	1280	640	5120	5120	640
382C3	2560	640	1280	1280	1280	320+	640	640	640	1280	320	640	640	1280+	1280
N130	2560+	640	1280+	2560	2560	1280	1280	1280	1280	2560	640	1280+	2560	2560	2560
N131	2560	320+	1280	2560	2560	1280	1280	1280	1280	2560	640	1280	2560	2560	1280
N133	2560+	640	1280	2560	2560	1280	2560	1280	1280	2560+	640	1280+	2560	2560+	1280+
N136	2560	320	320+	2560	1280	640	1280	640	320	1280+	320	640	1280+	1280+	640
N213	640	160	160	320+	320	80	320	160	160	320+	160	160	320	320	160
N214	640	160	160	640	320	80	320	160	160	640	160	160	320	320+	320
N242	> 5120	640	640	> 5120	2560	640	> 5120	2560	640	> 5120	640	640	5120	> 5120	640+
N244	5120	320+	640	2560	1280+	320	2560	1280	320+	1280+	640	640	1280	2560	640
N247	5120	640	640	2560	2560	640	2560	1280	640	2560	640	640	2560	2560	1280
N256	2560+	640	1280	2560	1280+	640	1280+	1280	640	2560	640	1280	2560	5120	1280
N257	5120	640	1280	2560	2560	1280	2560	1280	1280	2560+	640	1280	5120	5120	2560+
N265	2560+	640	1280	2560+	2560	640	2560	1280	640	2560+	640	1280	2560+	5120	1280
N279	5120	640	1280	2560+	2560	640+	2560	1280+	1280	2560+	640	1280	2560	5120	2560
N291	2560	320	640	1280	1280	640	1280	640	640	1280	320	640	1280	2560	1280
N415	1280	160+	160	640	640+	80+	640	320	160	640+	160+	160	640	640+	160
N416	640	160	80	320+	320+	80	320	160	80+	640	640	160	320	640	160
N417	640+	160+	160	640	640	80+	320+	320	160	640	320	160	640	640+	320
N418	320+	80+	160	320	320	80	160+	160	160	320	80+	160	160	320+	160

:2010～2011シーズンに分離された株
 :2011～2012シーズンに分離された株
 :2012～2013シーズンに分離された株
 :感染株と2管差
 :感染株と3管差
 :感染株と4管差以上

香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
亀山 浩

研究要旨 生理的条件下でBSAとカルミン酸が結合した。香粧品原材料中の各種金属の分析手法の確立を行った。香粧品原材料や添加物中に含まれる食物アレルギー物質を免疫化学的手法によって検出・定量する手法を構築した。最近香粧品に添加されることが多い動物性の多糖、ヒアルロン酸について、調査した。qNMRを用いた絶対定量法が香粧品原材料及び添加物の新しい品質管理手法の一つになると考え、天然由来の有機化合物、香粧品原料、食品添加物製品のqNMRスペクトルデータを取得した。本研究において取得したqNMRスペクトルデータは、500品目以上、約700製品となった。THP-1を樹状細胞様に分化誘導した細胞(TDDC)を用いてin vitroの抗原感作性の評価系を確立した。ヒト末梢血CD4⁺ T細胞のサイトカイン応答に与える香粧品原材料等の影響を解析した。

研究組織

- | | |
|--------------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 亀山浩 |
| (2) 国立医薬品食品衛生研究所 | 五十嵐良明 |
| (3) 国立医薬品食品衛生研究所 | 杉本直樹 |
| (4) 千葉大学大学院薬学研究院 | 戸井田敏彦 |
| (5) 東京大学大学院農学生命科学研究科 | 戸塚護 |
| (6) 近畿大学農学部 | 森山達哉 |
| (7) 花王株式会社安全性評価研究所 | 坂口斉 |
| (8) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 | 中川誠 |
| (9) 株式会社資生堂 | 山口雅彦 |
| (10) 株式会社 JEOL RESONANCE | 末松孝子 |
| (11) 花王株式会社解析科学研究所 | 小池亮 |
| (12) 和光純薬工業株式会社 | 山田裕子 |

A. 研究目的

近年、香粧品(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、香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香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、香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、香粧品の品質は、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、香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、香粧品原材料及び添加物の健康危害を防止するためには、香粧品化学、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、香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、香粧品原材料及び添加物の抗原感作性の評価手法の開発、香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香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(亀山、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] 香粧品原材料及び添加物の規格試験法の開発

1-1 カルミン酸とタンパク質の結合性

1. 試薬

カルミン酸は、MP Biomedical 社 (Santa Ana, CA, > 70%) を、Albumin, from Bovine Serum (BSA, > 99.9%) は和光純薬工業株式会社 (大阪) を用いた。

2. タンパク質との反応

カルミン酸、あるいは 4-アミノカルミン酸 (4-aminocarminic acid) を 1 mg/mL、あるいは 100 µg/mL の濃度でそれぞれ Phosphate Buffered, Saline ; PBS(-) に溶解した。一方、BSA は 0, 1.0, 10.0, 100.0 mg/mL の濃度で溶解し、一定の比率で混合した。混合液は 37°C で穏やかに回転させながら overnight (約 15 時間) 反応させた。反応液を透析膜内に入れ、PBS を外液として一昼夜透析して遊離カルミン酸を除いた。紫外可視分光光度計 (JASCO V-560、日本分光株式会社、東京) を用い、530 nm の吸光度を測定し、透析内液の色素を定量した。検量線の作成には、当初作製したカルミン酸および 4'-アミノカルミン酸溶液で 6 点以上の濃度を希釈調製したものを使用した。色素の濃度を定量した後、ゲル濾過分析を行った。BSA の濃度はゲル濾過分析後、BSA 特異的保持時間で溶出された 280 nm の吸光度を元に算出した。

3. ゲル濾過分析

分析機器は Agilent Infinity 1200 HPLC システム (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)、カラムは TSKgel SuperSW2000 (東ソー株式会社、東京) を用いた。分析条件は以下のとおりである。分析したデータは Agilent OpenLAB CDS Chemstation for HPLC (Agilent Technologies) で解析した。

4. 等吸収点の測定

カルミン酸 50 µM を溶解した 5 mM リン酸緩衝液 (pH6.8) 中に、BSA の最終濃度が、0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.025, 0.04, 0.05, 0.1 mM になるよう溶解した。この 8 段階の濃度の混合液について、紫外可視分光光度計を用い、波長範囲 350~600 nm の吸収スペクトルを測定した。

5. 蛍光測定による結合機序の解析

1 mg/mL (15 µM) の BSA 水溶液を 5 mL 調製し、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で overnight 透析した後、数段階希釈をして 280 nm の吸光度を測定した。この時の BSA のモル吸光係数 (43,824) より希釈倍率を計算し、透析外液を用いて、最終的に 1.5 µM の濃度になるよう調整した。カルミン酸、4'-アミノカルミン酸は上述の透析外液を用いて 1.0 mM に調製した後、0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 mM の 12 ポイントの濃度で調製した。

上述の BSA 溶液 3 mL とカルミン酸あるいは 4'-アミノカルミン酸溶液 250 µL を混合し、303K (30°C)、282 nm で励起される蛍光スペクトル (290-450 nm) を分光蛍光光度計 (F-2700、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京) でモニターした。同時に三回行った測定の平均値を測定値とし、同濃度で三連の計測を行った。

Quencher 各濃度における最大蛍光強度 (F_0) の変化 (蛍光消光) を常法により補正し、プロットした後に Stern-Volmer の公式を用い、Stern-Volmer 定数および蛍光消光定数を算出し、結合機序を推察した。

6. 等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter; ITC) を用いた熱力学的解析による結合機序の解析

75 mg/15 mL (~70 µM) の BSA 溶液を調製し、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) で overnight 透析を行った。透析後に 100 倍希釈をして吸光度を測定し、透析外液を用いて 50 µM に調製した。カルミン酸、4'-アミノカルミン酸は上述の透析外液を用いて 2.0 mM に調製した。(カルミン酸; 1.43 mg/1.452 mL、4'-アミノカルミン酸; 1.09 mg/1.110 mL)

等温滴定型熱量計 (MicroCal™ iTC₂₀₀ System, GE Healthcare lifescience, Sweden) のセル側 (被結合タンパク質) に 300 µL の 50 µM BSA を、リファレンスセルには 300 µL の超純水を、シリンジ側 (リガンド) に 60 µL 2 mM カルミン酸あるいは 4'-アミノカルミン酸溶液を充填し、25°C (297K) で、60 秒に 1 回、1 µL/2 second の滴下速度でリガンドを滴定し、結合に伴うリファレンスセルとの温度変化に対するサンプルセルへのフィードバック電力をモニタリングすることで、発熱あるいは吸熱反応の熱量変化を測定した。得られたサーモグラムより、リガンドを滴下するごとに発生する熱パルスを経験的に積分し、濃度に対してプロットしたグラフより、解離定数 (K_D)、結合ストイキオメトリー (サンプル分子上のリガンド結合部位の数; N)、エンタルピー (ΔH) の数値が得られ、それらの数値をもとにギブス結合自由エネルギー (ΔG)、エンタルピー (ΔS) を算出し、結合機序について推察した。

1-2 香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。硝酸 (超微量分析用)、塩酸 (有害金属分析用)、過酸化水素 (有害金属分析用)、フッ化水素酸

(超微量分析用) 及び超純水 (超微量分析用) は和光純薬工業 (株) から入手した。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。

2. 試料

化粧品原料として使用される法定色素として、赤色 2 号、赤色 3 号、赤色 102 号、赤色 104 号、赤色 105 号 (1)、赤色 106 号、青色 1 号、青色 2 号、黄色 4 号、黄色 5 号、及びそれらのアルミニウムレーキ、さらに、緑色 3 号、酸化亜鉛 (ZnO)、酸化チタン (TiO₂)、シリカ (SiO₂)、セリサイト、マイカ、タルクを入手し、試験に用いた。

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 DigiTUBE^s (SCP SCIENCE 社) を用いた。

4. 試料溶液の調製

試料約 0.1~0.2 g を分解容器に入れ、各種酸を加えて密栓した。1600 W (100%) のマイクロウェーブを照射して 25 分間で 180℃まで上昇させ、そのまま 10 分間保持した。放冷後、分解液は超純水で 20 ml に定容後、適宜希釈し試料溶液とした。

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 (µg/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ギー物質の免疫化学的手法の開発

近年、自然・天然指向の高まりから、植物成分が配合された化粧品が増加しているため、植物中のアレルギー分子によって経皮的に感作される危険性がある。そこで、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に関して、その抗体を作製し、化粧品中での存在を検出する手法の確立を試みた。昨年度は、植物汎アレルギーとして、PR-10 ファミリーに属する Betv1 ホモログ、PR-5 ファミリーに属するソーマチンライクプロテインに着目し、種々の抗体を作製し、簡易な直接 ELISA 法の確立に

成功した。今年度も引き続き大豆での Betv1 ホモログである Glym4 の抗体を作製した。特に今年度は、変性サンプル中の定量にも使用できるように、SDS にて変性させたリコンビナント Glym4 を抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗体の反応性確認の後、抗原を固相化したカラムにてアフィニティー精製を行い、現有の種々の抗体群 (マウスモノクローナル抗体やウサギポリクローナル抗体など) を組み合わせたサンドイッチ ELISA 系の構築を試みた。固相化抗体は IgG 精製やアフィニティー精製を行い、検出用抗体はペルオキシダーゼ (HRP) 標識した。

次に別の汎アレルギーとして、花粉や食品間で広い交差反応性を示すプロフィリンについて検討した。はじめに現有の植物プロフィリンに対して作製した抗体の反応性を検証した。これは、大豆のプロフィリンに対して作製した長鎖ペプチド抗体で、この抗体が他の主要な植物性食品素材のプロフィリンとどの程度反応するか、イムノブロットング法にて検討した。

また、プロフィリンに関しては、化粧品にも配合されることが多いトマトや大豆でのプロフィリン分子を His タグ付加リコンビナント分子として大腸菌にて発現させ、アフィニティー精製したものをウサギやモルモットに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。これらの抗体の反応性を ELISA やイムノブロットにて検証した。こうして得られた植物汎アレルギーに対する抗体を用いて、食品の加工法やガンマ線照射など、種々の処理に対してアレルギーが変動するかどうか変動解析にも応用し、アレルギーリスクの変動解析にも適用した。

1-4 化粧品中アセチルヒアルロン酸の分析

材料：分子量の異なる乳酸菌由来ヒアルロン酸 (平均分子量 2,000、50,000、および 300,000) とアセチルヒアルロン酸 (平均分子量 50,000) を用いた。また国内で販売されているヒアルロン酸・アセチルヒアルロン酸含有を謳う化粧品を購入して用いた。

ヒアルロン酸・アセチルヒアルロン酸の分別定量法：水分を除いた後アルコール沈殿法によりヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸を粗精製し、0.2 mol/L 炭酸ナトリウムで処理した前後でヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸を分別定量した。すなわちアセチルヒアルロン酸をアルカリ性でけん化することでヒアルロン酸に変換し、その前後で、元来存在するヒアルロン酸とともに放線菌由来ヒアルロン酸分解酵素により不飽和二糖に分解後、ポストカラム

HPLC により定量した。装置は以下の通りである：溶離液のポンプは島津製作所製 LC-10AD、カラムは東ソー製 TSKgel Sugar AXI (4.6 mm I.D. x 150 mm)を使用した。カラム反応槽は EYELA 社製 NTT2200、蛍光検出器は日本分光工業 (JASCO) 製 Intelligent Fluorescence Detector FP-2025、反応槽はフロム社製 REACTOR 522、インテグレーターは日立製作所製 Chromato Integrator D-2500 を使用した。

また分子量はシリカ系ゲル濾過カラムにより測定した。装置は以下の通りである：溶離液のポンプは日立製作所製 L-6000 Pump、カラムは昭和電工社製 OHpak SB-806M HQ (8 mm I.D. x 300 mm)、インテグレーターは日立製作所製 Chromato Integrator D-2500、検出器は島村計器製 YRD-880 を使用した。

NMR 測定：試料を乾燥後、重水に溶かし主にプロトン NMR を測定し、2 ppm 周辺に観測される N-アセチル基および O-アセチル基に由来するメチルプロトンの定量値から測定した。

サイトカインの分析：測定は PharMingen 社の OptEIA™ Set を用いて行った。

抗マウス各種サイトカインモノクローナル抗体を固相化緩衝液 (0.1 M carbonate、pH 9.5 もしくは 0.2 M sodium phosphate、pH 6.5) で至適濃度に希釈し、96 well マイクロプレートに 100 μ L/well 加え、4℃で一晩静置して 1 次抗体を固相化した。固相化の後に well 内を洗浄し、共雑物をブロッキングするために 10% FCS 含有 PBS を 200 μ L/well 加え、室温下 1 時間静置した。ブロッキングの後に well 内を洗浄し、脾細胞培養上清を 100 μ L/well 加え、室温下 2 時間静置して、1 次抗体と上清中サイトカインを抗原抗体反応させた。抗原 (1 次) 抗体反応の後に well 内を洗浄し、ビオチン標識抗マウス各種サイトカインモノクローナル抗体及びアビジン標識 HRP を 10% FCS 含有 PBS で至適濃度に希釈し、100 μ L/well 加え、室温下 1 時間静置して 1 次抗体と結合したサイトカインと 2 次抗体を抗原抗体反応させた。抗原 (2 次) 抗体反応の後に well 内を洗浄し、酵素反応の基質として、TMB 及び過酸化水素混合液を 100 μ L/well 加え、暗中室温下 30 分間反応させた。酵素反応の後に 1 M リン酸 50 μ L/well 加え反応を停止させ、450 nm の吸光波長を紫外可視マイクロプレートリーダー (E max、Molecular Devices 社) を用い、エンドポイントで測定した。サイトカイン量は濃度既知標準品を用いて検量線を作成して定量した。

[II] 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

一の構築

1) 試薬、試液等

NMR 基準物質には、hexamethyldisilane (HMD, 東京化成工業製)、1,4-bis(trimethylsilyl)-benzene- d_4 (1,4-BTMSB- d_4 , 和光純薬工業製、Tracesure)、2,2-Dimethyl-2-silapentane -5-sulfonate- d_6 sodium salt (DSS- d_6 , 和光純薬工業製、Tracesure) を用いた。qNMR 測定用重溶媒には、Isotec 製を用いた。NMR 基準物質 CRM であるジエチルフタレート (diethyl phthalate: DEP, NMJ CRM 4022-b, 純度 99.98 $\pm$ 0.09 w/w%, (独)産業技術総合研究所製)、または、フタル酸水素カリウム (potassium hydrogen phthalate: PHP, NMJ CRM3001a: 純度 100.00 $\pm$ 0.027 w/w%(独)、産業技術総合研究所製) を用いた。なお、PHP は、添付の使用法に従い、軽く砕いた後、120℃で約 1 時間加熱し、デシケーター中で放冷後、用事使用とした。昨年度に引き続き、qNMR スペクトルライブラリに香粧品等を登録した。

天然物、香粧品原料、添加物の成分については対応する市販試薬グレードのもの、食品添加物については流通品原体を用いた。

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)) 及び 400MR (400 MHz, Agilent Technologies)、qNMR および qNMR 多変量解析のケミカルシフト値は、HMD, 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。ウルトラマイクロ天秤は XP2U (メトラートレド株式会社)、またはこれと同等以上の性能のものを、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。

qNMR 標準液および試料液の調製には、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) の濃度校正は昨年度の報告に準じた。

3-2) qNMR スペクトルライブラリ登録物質の純度・含量測定

登録物質の純度・含量測定は昨年度の報告に準じた。

原則として、市販標準品又は試薬については、量り込み法により試料液を調製した。対象化合物約 5~10 mg 及び qNMR 基準物質(qNMRref) 約 1mg をサンプル瓶に精密に量り取り、重溶媒 1.0 mL を加えて混和する。この液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料液とした。

市販標準品又は試薬以外の香粧品原料、食品添加物、天然物等、或いは成分が明確でないものについては、適宜、溶液法により試料液を調製した。対象化合物約 5~10 mg 精密に量り取り、予め調製した qNMR 標準液 1.0 mL に溶解する。この液 0.6 mL を NMR 試験管に封入したものを試料液とした。

この試料液を 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、調製濃度より、対象化合物の純度又は含量 w/w%w を算出した。ただし、混合物等の成分のシグナルが特定できない場合は、純度又は含量測定を省略した。

3-3) qNMR 測定条件および解析処理

特に断らない限り、qNMR 測定条件は昨年度の報告と同条件とし、登録物質の qNMR 測定条件は、物質毎に保存した。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。

4) qNMR スペクトルライブラリへの登録

qNMR スペクトルライブラリへの登録は昨年度の報告に準じた。市販標準品又は試薬については、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。

市販標準品又は試薬以外の香粧品原料、食品添加物、天然物等については、その製品名、Lot No.を示し、主成分が同定できる場合に限り、主成分の組成式、構造式、質量、CAS No.等の情報と濃度又は純度をデータセット化した。

登録物質の qNMR スペクトルデータは、すべてのシグナルの化学シフト(ppm)とシグナル強度比(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(csv 形式)として保存した。すなわち、qNMR スペクトルライブラリには、物質情報と共に生データ(Raw data)、線スペクトル型の 2 次元データ(csv 形式)を登録した。

【III】 香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

1-1 ヒト単球系細胞株を用いた方法

ヒト単球系細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/ml) および interleukin-4 (IL-4, 20 ng/ml) を添加し 4 日間培養することにより TDDC への分化誘導を行った。形態変化およびフローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析(樹状細胞の特異マーカー: CD11c、DC-SIGN)によって樹状細胞への分化を確認した。BALB/c マウスから調製した骨髓細胞を GM-CSF 刺激下で 6 日間培養し、マウス骨髓由来樹状細胞(以下 mBMDC と称す)へ分化させた。得られた TDDC または mBMDC に対して、鶏卵主要アレルゲン Ovalbumin (OVA)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ハプテン抗原 DNP-BSA および TNP-BSA、カルミン酸およびカルミン酸-BSA、キシリトール、エリスリトールを用いて 3 日間抗原刺激を行った。カルミン酸-BSA はカルミン酸と BSA を混合し(モル比 5:1 または 25:1)、10K の遠心式フィルター(ミリポア社)により BSA に結合しなかったカルミン酸を除去し調製した。抗原提示能の指標として、抗原提示分子 MHC クラス II の構成分子 HLA-DR (mBMDC では I-Ab) および補助刺激分子 CD80、CD86 の発現量の変化をフローサイトメトリー FACSCalibur (Becton Dickinson 社)により測定した。このとき、Fc レセプターのプロッキングとして、FcR blocking reagent (MACS 社)を使用するとともに、使用抗体と同一の Isotype control 抗体をコントロールとして、各種マーカーの発現量を平均蛍光強度(Delta mean fluorescence intensity, MFI)として算出した。

抗原取り込み能は、FITC 標識 BSA を添加して 30 分間培養した後、フローサイトメトリーで蛍光強度を測定した。また、FITC 標識 BSA を添加して 4 h 培養した後、蛍光顕微鏡 EVOS fl (Life Technologies 社)により BSA の細胞内局在を観察した。核染色には NucBlue Live Cell Stain (Molecular Probes 社)を使用した。

1-2 T 細胞機能分化への影響を指標とした香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発(戸塚)

ヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞は CELL APPLICATIONS 社 (San Diego, CA, U.S.A) から購入した。CD4⁺T 細胞を、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を用いて 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(ゲニステイン、ダイゼイン、グリシテイン)を用い、その添加の影響を解析した。

ヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞を 24-well プレートに 1.0×10^6 cells/well となるように播き、

10 μ M あるいは 50 μ M のイソフラボン存在下で、プレートに固相化した抗ヒト CD3 抗体 (OKT3; BioLegend, San Diego, CA, U.S.A) (10 μ g/mL) と、培地中に添加した抗 CD28 抗体 (CD28.2; BioLegend) (2 μ g/mL) を用いて活性化した。培養 72 時間後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の測定は酵素免疫測定法 (ELISA 法) にて行い、インターフェロン γ (IFN- γ) は Human IFN- γ ELISA MAX Standard (BioLegend) を、インターロイキン 4 (IL-4) は BD OptEIA Set Human IL-4 (BD Biosciences, San Diego, CA, U.S.A) を用いて測定した。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。

(倫理面への配慮)

今回用いたヒト末梢血由来 T 細胞は、販売業者から購入したものであり、業者がドナーとこれを商品とすることに同意する契約を結んでおり、倫理的な問題には十分な配慮がなされている。

C. 研究結果

[1] 化粧品原材料及び添加物の規格試験法の開発

1-1 カルミン酸とタンパク質の結合性

①BSA と反応後のカルミン酸の定量

カルミン酸は水溶液では pH 3.0 - 4.0 を示し、最大吸収波長が 495 nm 付近に存在するが、pH 7.0 付近では長波長側にシフトすることが知られている。我々の条件で吸光スペクトルを測定したところ、PBS に溶解したカルミン酸の最大吸収波長は 530 nm であった。一方、BSA の最大吸収波長は 280 nm であり、可視部の波長には吸光を示さないことから、BSA とカルミン酸の反応液中のカルミン酸濃度は、530 nm の吸光度より算出する事とした。

0 および 10 mg/mL の BSA と 1 mg/mL のカルミン酸を反応させた溶液を PBS で透析したところ、BSA が存在しないカルミン酸単独の試料はすべて透析膜外に拡散した。10 mg/mL の BSA が存在した試料は透析膜内にカルミン酸が残留した。10 および 100 mg/mL の BSA をそれぞれ 1 mg/mL のカルミン酸と反応させ、透析した後に、530 nm の吸光度よりカルミン酸を定量した結果、10 mg/mL のカルミン酸存在下では 561.2 μ g/mL、100 mg/mL のカルミン酸存在下では 130.5

μ g/mL の濃度でカルミン酸が残留していた。これにより、カルミン酸は BSA の濃度依存的に結合量が増加する可能性が示された。

②ゲル濾過分析によるカルミン酸と BSA の結合

カルミン酸-BSA 結合物質を確認するために、両物質を反応させ、透析した後の試料をゲル濾過し、結合による分子量の増加を検討した。BSA は約 8.4 分、カルミン酸は約 13.2 分の保持時間でダイオードアレイ検出器 (Photodiode array detector; PDA) で検知された。両者を反応させた試料は BSA 単独同様、280 nm で検出されたが、保持時間はほぼ同じで、分子量の増加は認められなかった。しかしながら、8.4 分の時点で同時に 530 nm の吸収を認め、カルミン酸結合 BSA が存在する事が示された。このことにより、生理的条件下でカルミン酸は BSA と結合することが示された。また、その結合効率は移動相の塩濃度やカラムの圧力など物理的な作用により変化しやすいことから、二者間の結合は、静電相互作用を含む緩やかな結合により保たれている可能性が示唆された。

③カルミン酸と 4'-アミノカルミン酸との比較

カルミン酸-BSA 結合が静電相互作用によるものであれば、部分的に荷電の異なる 4'-アミノカルミン酸-BSA と結合効率の違いがみられることを予想し、比較を行った。

1 mg/mL のカルミン酸、あるいは 4'-アミノカルミン酸と 10 mg/mL の BSA を反応させ透析後に色素量を定量したところ、カルミン酸は 39.3 μ g/mL、4'-アミノカルミン酸は 18.2 μ g/mL であった。このことにより、負電荷の多いカルミン酸は水酸基がアミノ基に置換されている 4'-アミノカルミン酸より、BSA に対する結合能力が高い可能性が示唆された。

④カルミン酸-BSA の結合機序の解析

以降の実験は、結合機序の詳細を解析するために、溶媒による電荷変位の影響を最小限に留めるため、低塩濃度の緩衝液を用いて検討を行った。一定濃度のカルミン酸に 8 段階の濃度の BSA を反応させ、350 nm から 600 nm の吸収スペクトルを測定したところ、423 nm および 571 nm の波長に等吸収点が確認された。この波長における BSA とカルミン酸の吸光係数は等しく、吸光係数の異なる第三の物質は生成されていない。これによりカルミン酸と BSA の反応は、新たな物質の生成や化学変化を伴わない二つの物質のみで起こる相互作用である可能性が示唆された。

トリプトファンはアミノ酸側鎖のインドール環に励起光を照射すると蛍光特性を示すことが

知られている。BSA はアミノ酸配列の 134 番目と 213 番目にトリプトファンをもつことから、観察される蛍光強度の変化を数値化する事により、分子間相互作用について解析することができる。1.5 μM の BSA に最終濃度 0 – 61.5 μM のカルミン酸あるいは 4'-アミノカルミン酸を添加し、蛍光スペクトルを測定した。BSA 単独の溶液が最も高い蛍光強度を示し、カルミン酸の濃度依存的に蛍光強度が減弱した。4'-アミノカルミン酸でも同様の蛍光消光が認められた。このことによりカルミン酸と 4'-アミノカルミン酸は BSA に対する消光剤 (Quencher) であることが示された。蛍光スペクトルのピークを示した 342 nm の蛍光強度の値から消光率を算出し、Quencher 濃度とともにプロットしたところ、カルミン酸と 4'-アミノカルミン酸は同程度の消光挙動を示した。結合の強さ、あるいは特異性を推察するために蛍光消光、すなわち分子間エネルギーの失活過程の速度について Stern-Volmer の公式を用いて解析を行い、消光定数 (K_q) を算出した。

カルミン酸、4'-アミノカルミン酸ともにほぼ同程度の消光定数をえられたことにより、ほぼ同程度の速度で BSA と衝突し相互作用している可能性が示された。

カルミン酸および 4'-アミノカルミン酸と BSA の結合は発熱反応を伴うことが示された。さらにモル比当たりのエンタルピー変化を示すプロットに変換した。変換されたデータからリガンドモル当たりの結合量エンタルピー変化 (ΔH) が求められ、またフィッティングを行うことにより解離定数 (K_D) とストイキオメトリー (N) が求められた。また、ギブスの自由エネルギー変化の理論式より自由エネルギー変化 (ΔG)、エントロピー変化 (ΔS) が下記の式より求められた。

カルミン酸と 4'-アミノカルミン酸は同程度の発熱スパイクを示した。測定により得た解析値である結合ストイキオメトリー (N)、結合定数 (K_a)、結合エンタルピー変化はほぼ同等で、そこから求められたギブス自由エネルギー、エントロピー変化も同程度であった。

エンタルピー項 (ΔH) とエントロピー項 ($-T\Delta S$) を比較してみると、エンタルピー項が若干優位であった。このことからカルミン酸、4'-アミノカルミン酸ともに、ほぼ同様の機構で熱量交換を行い相互作用をしている可能性が示された。

1-2 香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。鉄 (Fe)、アルミニウム (Al) については ICP-MS での検出限界濃度が高く、多種の金属混合液で他の金属等による干渉なく定量することが困難であること、さらにアルミニウムレーキとして Al を成分中に含有することから、今回の検討からは外した。

ICP-MS による各金属の定量限界濃度は、1%硝酸 (ブランク) 溶液のカウント値の 10 倍を示すときの標準溶液設定濃度とした。Zn は 10 ng/ml、Se 5 ng/ml、Cr 0.25 ng/ml、Ni 0.5 ng/ml、Cu 1 ng/ml で、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。

2. 色素

口紅中の Pb を定量する方法を米国 FDA が報告しており、これを若干変更した方法が衛生試験法・注解 2015 に収載される。昨年度はこの方法を適用した結果、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、マイクロウェーブ分解後も赤色の溶液のままで、かつ結晶性の光沢不溶物が残存した。また、分解時にフッ化水素酸を使うことから、使用に制限があり試験を実施できない施設もあるとの意見もあった。このことから、本年度はフッ化水素酸を使わずにこれらの色素について良好な分解が得られるような条件を検討した。

赤色 3 号を検討対象物質として、種々の酸混合液での分解を行った。まず、硝酸・フッ化水素酸混液との比較として、硝酸・塩酸・過酸化水素・水混液で分解を行った。分解液には硝酸・フッ化水素酸混液で見られた結晶性の析出物は見られず、黄色に着色するものの透明溶液となった。本混液の組成を更に変更し、良好な分解が達成できるかどうか検討した。硝酸と過酸化水素混液、およびこれに水を追加した混液では硝酸・フッ化水素酸混液と同様に、赤色 3 号およびそのアルミニウムレーキを処理したときに赤色析出物が析出した。硝酸・塩酸・過酸化水素・水混液は調製時発泡することから、各酸および溶液の混和順番を変えて、状態変化が認められるかどうか観察した。塩酸の添加によって過酸化水素から発泡することから、水、過酸化水素、硝酸、塩酸の順に加え、激しい発泡を抑え、分解時の危険性を少なくさせることができた。硝酸・塩酸・過酸化水素・水混液の各酸等の混和比を種々変え、その混液で赤色 3 号およびそのアルミニウムレーキを処理した。その結果、いずれの酸混液でも黄色溶液となり析出物