

は認めなかったが、粉状の不溶物の量には違いがあった。水を入れない No.7 及び 8 では赤色の沈殿や濁りがあり、分解が不十分であった。水の量が多い No.9 でも少し赤色の沈殿があった。No.1、2 及び 6 では黄色溶液となり、少量の白色不溶物が浮遊または沈殿していた。No.5 はそれらよりは微量微小なにごりがあり、No.3 及び 4 ではこうした不溶物はほとんど認めなかった。ここでは、赤色 3 号及びそのアルミニウムレーキの分解液としては No.3 の組成が最も良いと判断した。

他の赤色色素あるいは別色色素、及びそれらのアルミニウムレーキに対し本酸混液での分解法を適用した。すなわち、試料 0.1 g を分解容器にとり、水 5 ml、過酸化水素 2 ml、硝酸 2 ml 及び塩酸 1 ml を順に加えた後、密封し、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、放冷後、超純水で 20 ml に定容後、ICP-MS で金属を定量した。試料溶液から換算して 1 µg/g 検出されたものを含有金属とした。分解後の溶液の状態は、赤色 2 号及び 102 号は無色透明、赤色 3 号は黄色透明となった。しかし、赤色 104 号(1)、105 号及び 106 号では白色～黄色の沈殿と濁りが生じた。亜鉛はほとんどの色素に含まれており、多く定量された赤色 3 号及び 104 号では約 10 µg/g であった。赤色色素のうち 104 号及び 105 号 (1) には定量限界レベルではあるが、クロムが検出された。青色 1 号、黄色 5 号にはニッケルを 1.0 及び 4.8 µg/g 認めた。緑色 3 号は他の色素よりは多種の金属が検出され、特に Mn が数百 µg/g と大量に認められた。

アルミニウムレーキ分解後の溶液について観察したところ、赤色 104 号について黄色不溶物を認めたが、他の色素については著しい不溶物や析出物は認めなかった。各色素のアルミニウムレーキで検出される金属の種類は、レーキ前の色素とほとんど差はないが、新たに Sn 及び Ba を 1～3 µg/g 検出するものがあった。亜鉛の量が若干減少、クロムの量が増えるものが多かった。

3. 鉱物由来原料

試験した酸化亜鉛及び酸化チタンは一次粒子径 20～30 nm の粒状の化粧品原料であり、ZnO-1 及び TiO2-1 は表面処理加工していないのに対し、ZnO-2 及び TiO2-2 は製剤中での凝集を抑え分散性を良くするよう表面処理加工されている。セリサイト、マイカ、タルクは天然由来の鉱物の粉末である。

上記色素及びアルミニウムレーキと同様の酸

混液を用いてマイクロウェーブ分解したところ、いずれも白色の粉末沈殿が残り、溶解したような状態ではなかった。アルミニウムレーキとは異なり、成分の大部分を鉱物が占めることから、分解液としてはこれらを溶解する酸の添加が必要であった。口紅中の Pb の定量法と同様の酸混液にして分解したところ、若干の粉末状不溶物があるもののほとんど溶解した。各種鉱物由来材料について、加熱条件を変更せず、硝酸・フッ化水素酸混液を用いてマイクロウェーブ分解して試験溶液を調製し、定量した。

酸化亜鉛及びシリカの不純物のごく微量であった。シリカ中の亜鉛はわずかであるが、酸化チタンには数十 µg/g 混入していた。また酸化チタンには一定量の鉛が定量され、表面処理の有無で検出される金属量に大きな差はなかった。タルクには Mn と Ba が検出された。セリサイト及びマイカは Mn と Ba の濃度が高い他、セリサイトには Sb、マイカには Sn や Pb が認められた。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

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、保湿効果を有するとされる大豆タンパク質、大豆エキス、豆乳エキス等として、化粧品に含有されている大豆のアレルゲンの一つである Betv1 ホモログ Glym4 (PR-10 ファミリー) について、昨年から引き続き、多様な抗体の作製を行った。今年度は特に、変性 Glym4 に対して反応する抗体の取得を目的として、SDS にて変性させたリコンビナント Glym4 を免疫して抗体を得た。得られた抗血清から抗体を IgG 精製し、変性抗原に対する反応性や特異性を確認した。その結果、変性 Glym4 に対して良好に反応する抗体が得られた。

また、現在所有の種々の Glym4 に対する抗体 (ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体) を種々組み合わせてサンドイッチ ELISA を構築した。いくつかの組みあわせによって、サンプル濃度依存的に吸光度の上昇する定量系が構築できたが、感度が低く、現時点では高感度なサンドイッチ ELISA 系の構築には至っていない。Glym4 に関しては大豆の重要な抗原であるため、引き続き定量系の構築を目指して検討する。

次に、主要な植物汎アレルギーであるプロフィリンに対しても、対応するペプチドを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。大豆やトマトのプロフィリンに関してもリコンビナントから抗体を得た。これらの反応

性に関しては先のペプチド抗体と同様に幅広い反応性を示し、植物汎プロフィリン抗体として使用出来ることが示された。ただし、この抗体を用いた検出では、25kDa 付近にも明瞭な反応バンドが検出されるものが多かった。これはプロフィリンの2量体である可能性が考えられたが、現時点では確証は得られていない。

これらの植物汎アレルゲン抗体を用いて、様々な条件における変動解析を行った。一例として、トマトのプロフィリンに関しては、未熟のものと完熟のものを比べたところ、未熟のトマトの方がプロフィリンが多いことが判明した。一方、昨年度作製した汎アレルゲンのソーマチンライクプロテインに関しては反対に、未熟と比べて完熟の方が著しくアレルゲンが増大した。このように原料として使用するトマトの熟成度合によってもアレルゲン性が異なることが判明した。

また、香粧品としては大豆などの食品素材がプロテアーゼ処理や発酵処理などが行われ、発酵大豆エキスを等として使用されることが多い。そこで、そのモデルとして発酵大豆食品(味噌)におけるこれらの大豆アレルゲンの変動を解析した。その結果、多くの大豆アレルゲンは発酵過程で分解されることが判明した。しかしながら、アレルゲンによっては発酵過程でも分解されにくいものがあることも判明し、そのような分解耐性のアレルゲンに対して特に注意すべきことが明らかとなった。また、作製した抗体群を用いて、ガンマ線照射大豆でのアレルゲンの変動解析を行ったところ、照射によってアレルゲンレベルが増加することはないということも明らかとなった。

香粧品に配合されることの多い食品素材タンパク質の存在を検出・定量しうる抗体群の作製や ELISA 系の構築を行った。今回は大豆、米・米ぬか、トマトについて検討した。実際にこれらの食品素材は香粧品に多用されており、感作のリスクも否定できない。そこでこれらの食品素材から抗血清を作製し、抗原に対して力価の上昇を確認することが出来た。得られた抗血清が、もとの粗抽出物タンパク質のうち、何に反応するのかイムノブロットにて反応性を確認したところ、大豆抗体の場合はオレオシンと思われる分子サイズ約 22kDa のタンパク質を、トマトに関しては分子サイズ約 12kDa の Lipid Transfer Protein(LTP)と思われるタンパク質を主に認識することが明らかとなった。米+米ぬかに関しては抗体価の上昇を確認したが、反応タンパク質の解析に関しては今後検討する予定

である。

これらの抗体を用いて、今後、香粧品中の食品抗原の検出や定量を行う系を構築するが、大豆に関しては直接 ELISA (抗原固相化 ELISA) 及びサンドイッチ ELISA とともに構築に成功した。トマト及び米+米ぬかに関しては、現在、抗体の精製を進めている。

1-4 香粧品中アセチルヒアルロン酸の分析

1. ヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸の分別定量法の確立

2 ppm 付近のシグナルから水酸基のアセチル化度および N-アセチル基メチルシグナルの強度から分別可能なことが明らかである。また確立した方法による HPLC を用いたヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸の分析結果を示す。炭酸ナトリウムでけん化することによりアセチルヒアルロン酸が分析可能であることが明らかになった。

2. ヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸の抗原性試験：試験した結果を示す。

今回の調査の結果、顕著な抗原性は観察されなかったが引き続き調査することが望ましいものと考えられた。

3. 化粧水に含まれるヒアルロン酸：調査した 5 種の国産化粧水からは 60~250 ug/mL のヒアルロン酸が検出された。また分子量は 20~150 kDa と大きな違いが見られた。

乳液に含まれるヒアルロン酸：調査した 4 種の国産乳液からは、0~500 ug/mL のヒアルロン酸が検出された。また分子量はいずれも 150 kDa であった。

[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ーの構築

1) qNMR スペクトルライブラリーへの登録物質

ライブラリーへの qNMR スペクトルの登録は昨年度の方法に準じた。ただし、食品添加物製品等の混合物等で複雑なシグナルパターンのスペクトルの場合、主成分のシグナルが特定可能な場合に限り、特定できた化合物の含量又は純度を求めてデータ化した。

昨年度は香粧品 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 252 品目をライブラリーに登録した。この際、スペクトルパターンによる品質管理を可能とするため、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。また、qNMR スペクトルデータを線スペクトル型の2次元データ(csv形式)とすることによって、スペクトルパターンの一貫性による検索が可能となることを示した。

2) qNMR スペクトルによる品質管理

食品添加物「モウソウチク抽出物」を例に品質管理が可能かどうか検討した。

既存添加物名簿収載品目リストには、モウソウチク抽出物は、「モウソウチク (*Phyllostachys heterocycla* Mitf.) の茎の表皮から得られた 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノン($C_8H_8O_4$)を主成分とするものである。」と示されている。入手できた食品添加物「モウソウチク抽出物」は液体 2 製品、粉末 1 製品である。これら 3 製品について qNMR 条件下で測定したスペクトルを示す。DSS- d_6 、DMSO 及び HOD のシグナル(δ 0 ppm, 2.5 ppm, 3.4 ppm)以外に、液体 2 製品は共にエタノールのシグナル(δ 1.1 ppm, 3.5 ppm, 4.4 ppm)が観察されるのみであった。一方、粉末 1 製品は δ 3~7 ppm に複雑なパターンのシグナルが観察された。いずれも 2,6-ジメトキシ-1,4-ベンゾキノンに由来するシグナルは観察されなかった。このように qNMR スペクトルではクロマトグラフィー等の分離分析を必要とせず、その内容物を確認できる。また、モウソウチク抽出物製品のシグナルを正確に保存可能であることから、パターン変動を指標とした品質管理に応用可能であると考えられた。

【III】 化粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

III-1 ヒト単球系細胞株を用いた方法

THP-1 細胞は 20 ng/ml PMA および 20 ng/ml IL-4 を添加し培養することで培養フラスコに接着し、樹状突起を有した典型的な樹状細胞様の形態を示すことを確認した。TDDC は、CD11c⁺、DC-SIGN⁺細胞であり、OVA 刺激によって抗原提示分子 HLA-DR、補助刺激分子 CD80、CD86 の発現が増加することをフローサイトメトリーにより確認した。mBMDC でも同様に、OVA 刺激により I-Ab の発現上昇が認められた。このことから、TDDC の抗原提示能を指標とした本アッセイが抗原感作性の評価法として有用であることが示された。

TDDC がハプテン抗原に対して抗原提示するか否かを明らかにするため、まずはじめにキャリアタンパク質 BSA の抗原性について検討した。FITC 標識 BSA を TDDC に添加すると、BSA が濃度依存的に TDDC に取り込まれることを顕微鏡観察により確認した。一方、HLA-DR および CD80/86

発現量は BSA を添加しても変化しなかったことから、BSA は TDDC によって取り込まれるが、抗原提示は行なわれないことが示された。これより、TDDC を用いたアッセイにおいて BSA がハプテン抗原のキャリアタンパク質として用いることができると判断した。次に、ハプテン抗原として知られる DNP-BSA、TNP-BSA に対する抗原感作性を評価した。その結果、HLA-DR および CD80/86 の発現が顕著に増加することを mRNA レベルと細胞表面蛋白レベルで確認した。このとき、白血球走化因子 IL-8 の産生量が増加することが示された。以上の結果から、TDDC はハプテン抗原を抗原として認識することが明らかとなった。

続いて、赤色着色料カルミン酸の抗原感作性について検討した。カルミン酸を単独で添加した場合では、HLA-DR、CD80/86 ともに発現上昇はまったく見られなかった。そこでハプテン化したカルミン酸-BSA (モル比 25:1) を添加したところ、mRNA レベルおよび細胞表面蛋白レベルともに HLA-DR と CD80/86 の発現は有意に増加した。一方、モル比 5:1 のカルミン酸-BSA では、顕著な増加は認められなかった。このとき、IL-8 の産生量においても、同様の結果が得られた。以上の結果から、TDDC を用いた in vitro アッセイにおいて、コチニール色素は樹状細胞によりハプテン抗原として認識され抗原提示されることが示唆された。

甘味料キシリトールとエリスリトールの抗原感作性について検討した。キシリトールを最大 100 μ M (終濃度) で TDDC に添加しても HLA-DR および CD86 発現量に変化は見られなかった。これに対して、エリスリトールにおいては、10-100 μ M (終濃度) の範囲で濃度依存的な HLA-DR の発現上昇が認められた。一方、CD86 発現量に顕著な変化は認められなかった。

III-2 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

ヒト末梢血由来 CD4⁺ T 細胞の抗 TCR 刺激に対する応答に対して、培地中に添加した大豆イソフラボンが与える影響を調べた。IFN- γ の産生量はゲンステイン 10 μ M および 50 μ M の添加で濃度依存的に有意に低下した。ダイゼイン 50 μ M およびグリシテイン 50 μ M でも IFN- γ 産生量は有意に低下したが、10 μ M では有意な差は認められなかった。一方、IL-4 産生については、ゲンステイン 50 μ M で有意な低下が認められ、10 μ M でも低下傾向が見られた。グリシテイン 10 μ M および 50 μ M の添加は IL-4 産生に影響を与えなかった。ダイゼイン 10 μ M の添加で有

意な低下が認められたが、50 μM では変化がなく、容量依存性は認められなかった。

また Th1 特異的転写因子である T-bet および Th2 特異的転写因子である GATA-3 の mRNA 発現量に対しては、いずれの大豆イソフラボンを追加した場合にも、有意な発現量の変化は観察されなかった。

D 考察

[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

本研究ではカルミン酸がハプテンとして感作を成立させる可能性について検討するために、BSA との結合の可能性、結合の機序について解析した。

カルミン酸と BSA は反応後、透析し遊離カルミン酸を除くと、BSA 濃度依存的にカルミン酸が透析チューブ内に保持されており、BSA に結合したカルミン酸が視覚化された。さらにゲル濾過分析を行った結果、本来は存在しない可視部の吸収を示す BSA 画分が検出され、結合の事実が示された。また、類縁体である 4'-アミノカルミン酸を用いて同様に処理したところ、4'-アミノカルミン酸に比してカルミン酸の方が BSA との結合量が多かったことより、分子周辺の電荷が結合形態に関与する可能性が想定された。

分子間相互作用を解析する手法の一つである蛍光消光による解析により、BSA に観察される蛍光が他の化学種であるカルミン酸の衝突により減衰する現象をとらえることができた。当初の目的は、消光剤であるカルミン酸が蛍光減衰速度を加速化する時間軸を交えた手法でより詳細な解析を行うことであったが、消光時間を含む解析は、使用した分析機器では不可能であった。そこで消光時間の測定を除き、一定時間内の蛍光強度の低下を指標として解析を行った。

本研究で消光剤として用いた、カルミン酸、4'-アミノカルミン酸は自身も蛍光を発する物質である。そのため補正值 η を算出し、消光率 F_0/F に η を乗じた値を濃度別にプロットし、補正消光率と消光剤濃度の相関係数 R^2 が 0.95 以上を示す範囲で 1 を切片とした回帰直線 $(F_0/F)_{\text{obs}} \cdot \eta = K_{\text{sv}}[Q] + 1$ を求めた。得られた回帰直線より消光剤 1 モル当たりの傾きを Stern-Volmer 定数とし、過去に報告のある BSA の消光寿命を引用し、消光定数 K_q を算出した。しかしながらこの S-V プロットの解釈は複雑で、厳密に見ると反応初期と後期では消光率の傾きが異なるとの考察を加えることもできた。分子の衝突、またはエネルギーの変移による励起の変化、あるいは励起状

態の錯体形成を伴う動的消光と、非蛍光性の化学種の生成による静的消光など、複数の消光機構が存在する可能性も考えられる。BSA には溶媒にさらされた表層の Trp134 と疎水性ポケットに位置する内包された Trp213 の二か所が存在し、反応の進行や消光剤の挙動がこれら 2 か所の蛍光源に与える影響について考察できるデータは現在のところ得られていない。また、消光剤と BSA の混合物の蛍光強度 (F_0) は、消光剤の蛍光強度を減じて補正した場合でも、消光剤の濃度と相関して最大蛍光波長が長波長側にシフトしており (342.5-353 nm)、これは消光剤が赤い色素である影響、あるいは BSA のコンフォメーション変化が伴う可能性など考えられるが、詳細を明らかにするには、消光寿命を含めた蛍光解析だけではなく、さらなる解析法、円偏光二色性スペクトル、表面プラズモン共鳴解析などの物理化学的手法を検討する必要がある。

しかしながら得られた消光定数 K_q はカルミン酸、4'-アミノカルミン酸ともにほぼ同程度 (8.3 or $9.7 \times 10^{12} \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) であった。通常、分子の拡散による衝突によって得られる K_q は 10^{10} 程度のオーダーであることから、BSA とカルミン酸、4'-アミノカルミン酸の結合はそれよりも強く、能動的に相互作用している可能性が示唆された。本実験では、両物質を混ぜ合わせた直後に蛍光消光が観察されており、混合してすぐに結合するということは、両物質は非常に結合しやすく、結合した状態がむしろ安定であると考えられる。

混合した直後に反応すること、また結合により安定した状態を得ることは ITC を用いた熱力学的解析でも明らかである。測定値より得られた物理量は結合エネルギー、エンタルピー項、エントロピー項ともに両リガンド間でほぼ同等であった。カルミン酸、4'-アミノカルミン酸ともにエンタルピー項とエントロピー項を比較すると、わずかにエンタルピー項のほうが優位であった。このことから BSA とカルミン酸、4'-アミノカルミン酸は分子間で積極的に会合しようという物理量がより優位に認められる状態で結合していることが考えられた。すなわち、互いに忌避された分子同士が結合する疎水結合のような形態ではなく、Van der Waals 力や水素結合を含む静電相互作用により安定的な状態を保っている可能性が示唆された。

2 種類のアントラキノン誘導体と BSA との結合機序の概要が明らかになったことでカルミン酸とタンパク質の挙動はさらに興味深いものになった。当初は分子の荷電分布の違いから、カルミン酸の結合機序がより明確になることを予

想して 4'-アミノカルミン酸を対照として用いたが、物理的解析の結果では 2 種類のアントラキノン誘導体の間では明らかな差異が認められていない。今後新たな誘導体を用いて同様の解析を行うことはもちろん、他の金属との錯体を形成する可能性や化学的にハブテンを生成する手法も検討しつつ、カルミン酸の免疫原性について解析を重ねる予定である。

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

香粧品は主として皮膚に塗布して用いることから、経皮曝露での健康被害に対して注意を払う必要がある。特に、アレルギー性接触皮膚炎は皮膚障害の症例として報告される。Ni、Cr、Co 等はアレルギー性接触皮膚炎を起こす原因金属としてよく知られている。香粧品中の金属が感作誘導した例は少ないが、既に感作された患者が含まれていた金属によって皮膚炎を惹起したという報告はある。いずれの場合でも、香粧品中のアレルギー性金属濃度をできるだけ少なくすることが求められる。

化粧品に用いられる色素は法定色素として決められているが、製造に当たって金属触媒等を使ったり、金属を配合したりするものがあり、金属不純物が混入する可能性がある。医薬部外品原料規格では純度試験に重金属や As 等の限度値が規定されている。製造工程上の品質管理の面からいくつかの金属については規定されているが、Ni、Cr 及び Co などアレルギー防止の観点から規格と試験法が設定されているものはない。

従来の重金属試験では湿式灰化法で処理した後、ろ過した溶液を呈色させ吸光度から鉛濃度に換算していたが、個別の金属を定量していなかった。そこで、操作中の外部からの汚染を防止し、多種多様な原料を溶解するためマイクロウェーブ分解法を採用するとともに、微量の金属を個別定量するよう ICP-MS を用いた。この方法は口紅中の鉛の分析に用いられているが、原材料によって最適なマイクロウェーブ分解条件、特に分解液を選定することが重要である。先に、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は硝酸とフッ化水素酸を加えてマイクロウェーブ処理すると析出物が生じることを明らかにしている。これらの色素は酸に不溶で耐性が悪いとされており、別の分解条件が課題とされた。赤色 3 号を対象に種々の酸混液について検討した結果、水 5 ml、過酸化

水素 2 ml、硝酸 2 ml 及び塩酸 1 ml を順に加えて分解するのが最も良かった。同液では赤色 2 号、102 号は溶解するものの、赤色 104 号(1)、105 号及び 106 号は白色～黄色の沈殿と濁りが生じた。青、黄色、緑色色素については多量の不溶物は残存しなかった。しかし、先の硝酸とフッ化水素酸の方が良好に溶解する色素もあり、今回検討した全ての色素に対し適用できる分解液を規定することはできなかった。また、天然鉱物や金属酸化物を主成分とする原材料については、硝酸・塩酸・過酸化水素・水混液ではほとんど溶けず、溶解のためにフッ化水素酸の添加は必須であった。マイクロウェーブ分解装置の性能にも差があり、分解に用いる酸の種類や組成、加熱条件を試験法として記載することは難しいと思われる。各試験機関で最適な分解条件で ICP-MS 分析用の試料溶液を調製するような試験法の記載をすることが望ましい。

Zn は外界にも比較的多く存在し、試験操作中で混入する。Zn のアレルギーの発症頻度は多くなく、他の毒性指標を用いたリスク評価が、安全面からの限度値を決める上で重要となる。Ni と Cr を定量限界レベルで含有する原材料があるが、Co を 1 µg/g 以上の濃度で含有するものはなかった。本濃度で含有する原料が皮膚アレルギーを発症させるかどうか判断できないが、皮膚アレルギーの診療に用いるパッチテストでの貼付濃度は、塩化コバルトが 1%、硫酸ニッケルが 2.5%、重クロム酸カリウムは 0.5%であり、これに比べると原料中の Cr や Ni 濃度は非常に薄い。感作を誘導する濃度は、感作した患者に皮膚反応を惹起させる濃度よりも高濃度が必要と考えられている。さらに、検出された金属の種類と量を考え合わせると、香粧品を原因とする皮膚アレルギーの発症防止を観点とした金属不純物の規定は現状必ずしも必要ないと考えた。

緑色 3 号は他の色素よりは多種の金属が検出され、特に Mn が大量に認められた。法定色素ハンドブックによれば、製造工程で重クロム酸カリウムまたは過マンガン酸カリウム塩が使用されることがあるとされ、純度試験に規定がある。今回はその規定値より高い濃度で検出されており、従来の試験法に原因があるのか不明である。各色素のアルミニウムレーキから検出された金属は、レーキ前の色素とほとんど差はないが、新たに Sn 及び Ba を検出するものがあり、製造工程での試薬等からの不純物について精査することが望まれる。

マイカ、セリサイト、タルクは化粧品に光沢や滑性等を付与するため添加される。これらは

雲母、滑石等天然鉱物を粉末にしたものであり、鉱石に含まれる金属組成そのものである。これらの鉱物に関する金属量についての報告はほぼ皆無であった。マイクロウェーブ分解して ICP-MS で分析する方法を適用した結果、Mn と Ba の濃度が高く、Sb、Sn や Pb など認められた。日米 EU 医薬品規制調和国際会議は、医薬品の金属不純物ガイドライン案をまとめており、リスクアセスメントの際の判断を容易とするよう金属をカテゴリーに分類している。毒性が非常に高い金属不純物としては As、Pb、Cd、Hg をクラス 1 として、Sb、Ba、Cr、Cu、Sn、Ni がクラス 3 とされている。これらは医薬品の経口経路でのリスク評価の必要性はないとされており、今回の調査結果からも、香粧品原材料について早急な規制は必要ないと思われた。適切な試験法を用いた金属不純物の調査結果は、経皮曝露でのリスク評価する上で有効な情報を提供するものであり、引き続きの調査研究が望まれる。

1-3 香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各種抗体の作製と検出・定量の試みに関しては、これまで多くの種類の抗体の作製を進めてきた。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。今回も SDS 化によって変性させた Glym4 を免疫して作製した抗体を得、イムノブロットや ELISA には有効に使用できた。しかし、複数の抗体を組み合わせる作製した Glym4 に対するサンドイッチ ELISA では、高感度な系の構築が困難であり、抗原の存在形態など何らかの抗原側の要因が関与している可能性を考えている。このように香粧品などの抽出しにくいサンプルからの抗原の効率的な抽出方法に関しては今後検討を必要とする。汎アレルギーのうち、プロフィリンに関しても広い反応性を示す抗体が複数得られ、現在これらを用いたサンドイッチ ELISA 系の構築を進めている。

こうして得られた植物汎アレルギー抗体を用いて、様々な要因における変動解析を行うことが可能であり、アレルギー性の変動要因の解析にとって有益な抗体ツールが整備出来たと考えている。実際に加工方法やガンマ線処理などの処置でアレルギー性の変動解析が可能となった。今後はより広い要因における植物汎アレルギーの変動解析を進めて行く必要がある。

香粧品に配合されることの多い食品素材タンパク質の存在を検出・定量しうる抗体群の作製や ELISA 系の構築をめざし大豆、米・米ぬか、

トマトについて検討した。このような粗抽出物を動物に免疫することによって得られた抗体は、ヒトにおいても感受性の高い抗原分子に対する抗体が得られることが示唆されるため、本研究の目的としては有益な手法と思われる。実際に、大豆の場合は抗原性の高いオレオシンを認識する抗体が得られ、トマトの場合も感受性の高い汎アレルギーである LTP に対する抗体が得られた。これらを半定量することにより、これらの食品成分を含む当該の香粧品のアレルギーリスクや感作リスクを評価しうる可能性が示唆される。米や米ぬかに関しては、米のとぎ汁からの経皮感作を示唆する症例報告があり、また香粧品に米や米ぬかのエキスを配合されたものが人気を得ていることからこれらの素材中の食品抗原検出・定量系の構築は意義があると考えられた。現在抗体作製が終了したので、今後は反応性の検討や定量系の構築を進める。

1-4 香粧品中アセチルヒアルロン酸の分析

今回新しくヒアルロン酸とアセチルヒアルロン酸を分別定量する HPLC と特異的酵素分解法を組み合わせた方法を確立した。

また今回調査した香粧品に含まれるヒアルロン酸の含量、分子量について調査した結果、大きなバラツキが観察された。中にはヒアルロン酸の痕跡も存在しないもやほとんど含有しない製品も散見された。また表示に「アセチルヒアルロン酸」または「アセチル化ヒアルロン酸」、「ナノ化ヒアルロン酸」の記載があり、その詳細は不明である。今後更に調査を進める必要がある。

【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ーの構築

昨年度に引き続き、qNMR スペクトルデータの登録を行うこととし、本年度は主に食品添加物、天然物を対象とした。本年度登録した物質を示した。qNMR スペクトルライブラリに登録した物質は、天然物については主に市販試薬(又は標準品)である。一方、食品添加物については、食品添加物原体(又は製剤)として市場に流通していたものを収集し保管していたものである。ライブラリに追加した内訳は、香粧品原料 2 品目、食品添加物 135 品目、天然物 116 品目、界面活性剤 15 品目、総数として 268 品目である(平成 26 年 2 月 5 日現在、一部品目の重複有り)。また、本年度は、1 品目について複数の製品が入手できた場合には、それらを可能な限り測定し登録したため、ライブラリ登録した製品の総数は 400 以上となった。昨年度と本年度に

qNMR スペクトルライブラリに登録した品目の総数は 500 以上、製品数は 700 以上となった。ライブラリに登録した物質には、希少物、非常に高価なもの、入手が困難なものも含まれており、スペクトルデータベースとしても有用であると思われる。

無償の SDBS だけでなく、Aldrich 等から有償の NMR スペクトルデータベースが公開されているが、合成原料や化成品のデータが殆どである。化粧品原料、食品添加物、天然物、農薬等、通常では入手困難な物質に特化したデータベースは我々の知る限り存在しない。また、qNMR 条件下で測定し、SI への計量トレーサビリティを考慮したスペクトルライブラリの構築もおそらく我々が初めてである。本研究において作成した qNMR スペクトルライブラリを公開すれば、国内外で唯一のものになると思われる。

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名からスペクトル情報を容易に得ることが可能であるが、測定対象としたスペクトルデータから化合物情報を得るのは未だ困難である。この問題を解決するため、本研究における qNMR スペクトルデータは、実験者が得たスペクトル情報とライブラリ情報の一致度から化合物を推定するシステムの構築を視野に入れて登録されている。すなわち、すべての品目・製品について、測定スペクトルとライブラリスペクトルの一致度を判定するアルゴリズムを設定しやすいうように、qNMR スペクトル情報は 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)としても保存されている。この点においても、本研究で得られた 500 品目以上の qNMR スペクトルデータは、非常に価値の高いものと言える。

【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. ヒト単球系細胞株を用いた方法

本研究では、化粧品原材料及び添加物の抗原感作性を評価する実験系を確立することを目的とし、ヒト単球細胞株 THP-1 を樹状細胞様に分化させた細胞を用いて実験系の構築を試みた。これまでに、各種タンパク質抗原（鶏卵主要アレルゲン Ovalbumin、Ovomucoid、牛乳主要アレルゲン β -lactoglobulin、小麦主要アレルゲン gliadin、ソバ主要アレルゲン Fag e1、Fag e2、スギ花粉主要アレルゲン Cry j1、ダニ主要アレルゲン Der f1）の抗原感作性が TDDC を用いたアッセイにより評価できることを明らかにしてきた。化粧品原材料及び添加物の多くは分子量数百以下の低分子物質であるが、一般的に、低分

子物質は単独では抗原性をもたないが、高分子のキャリアタンパク質と結合することで抗原感作性を示すことが知られている。そこで本研究では、TDDC を用いた本アッセイがハプテン抗原の評価法として有用であるか確認するとともに、近年アレルギー症状が多く報告されている赤色着色料カルミン酸の抗原感作性について検討した。BSA およびカルミン酸単独では抗原提示されなかったが、両者が結合したカルミン酸-BSA（モル比 25:1）の場合では抗原提示されることが示された。BSA は TDDC に取り込まれたことから、カルミン酸が BSA に結合することでエпитープが生じ、取り込まれたエпитープ領域が HLA-DR のような抗原提示分子によってナイーブ T 細胞に提示されることが推測される。ただし、両者のモル比が 25:1 と過剰な混合比でのみ抗原性が示されたことから、カルミン酸の抗原性はその着色度合いに比例することが示唆された。カルミン酸は赤色着色料として、口紅のような化粧品や、かまぼこやハムなどの加工食品等に幅広く使用されている。本研究の結果から、カルミン酸の抗原感作性については今後より一層の注意が必要であることが示された。

キシリトールやエリスリトールは飲料や菓子類などに甘味料として広く使われているが、近年、アレルギーの症例が報告されている。キシリトールとエリスリトールの抗原感作性について本アッセイを用いて検討したところ、エリスリトールにおいて HLA-DR の発現上昇が認められたが、補助刺激分子である CD86 の発現は認められなかった。樹状細胞のナイーブ T 細胞への抗原提示には補助刺激分子のシグナルが必須であることから、エリスリトール単独での抗原感作性は低いと考える。

本アッセイを用いることで抗原タンパク質と同様に、ハプテン抗原の抗原感作性を評価することが可能となった。カルミン酸のように生体中のキャリアタンパク質と結合することで抗原性を有することも想定されることから、本アッセイがハプテン抗原にも利用できることは大変有意義であるといえる。また、本アッセイは樹状細胞の抗原提示能を指標としており、抗原提示分子と補助刺激分子の挙動を検討することから、供試サンプルが樹状細胞に及ぼす影響について、より多くの情報を得ることができる。たとえば、エリスリトールのように、補助刺激分子の発現は増加させず、抗原提示分子のみ発現を増加させる化合物も見いだされた。この場合では、コンタミした LPS などにより補助刺激分子の発現が増加し、抗原感作性が生じることも

否定できない。エリスリトールの抗原感作性については、LPS と混合した系で評価するなど、さらなる検討が必要であるといえる。

III-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

本研究では、香粧品成分等がヒト 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、ヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞を活性化した際のサイトカイン応答に対する大豆イソフラボンの効果を検討した。

昨年度の本研究で、マウス脾臓由来の CD4⁺T 細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激して活性化することで IFN- γ および IL-4 産生が認められたため、同様の手法をヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞に応用した。その結果、IFN- γ および IL-4 の産生量はマウスの場合と比べて著しく低かった。この違いが生じた原因としては、マウスとヒトの種差による違い、脾臓細胞（マウス）と末梢血細胞（ヒト）の違い、用いた抗 CD3 抗体あるいは抗 CD28 抗体の刺激活性の違いなどが考えられる。

また、今回複数の取り扱い業者からヒト末梢血 CD4⁺T 細胞を購入して検討したが、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体刺激で活性化がほとんど認められない場合もあった。マウスの場合には、ある一つの系統の近交系マウスを用いれば、T 細胞の遺伝的背景は同一であり、同じ業者からの購入であれば、飼育環境もほぼ一定であるため、マウス体内で T 細胞が環境から受ける刺激にも大きな変化はないものと考えられる。一方、ヒト T 細胞の場合は各ドナーにより遺伝的背景、年齢、免疫系が経験してきた環境が異なるため、香粧品成分等の評価系の構築および標準化という観点においては、ドナーの個人差による変動が問題となる可能性がある。ナイーブな（機能的に未分化な）性質を保つヒト CD4⁺T 細胞株を樹立することができれば、評価系の構築において、非常に有効な手段となるものと考えられる。

マウス CD4⁺T 細胞においては、3 種の大豆イソフラボンの中でダイゼインにのみ、初期応答において Th2 応答を抑制することにより Th1/Th2 分化を Th1 優位な状態に誘導する活性をもつことが昨年度の研究で示された。今回のヒト T 細胞を用いた解析においては、ダイゼイン 10 μ M 添加時に IL-4 産生の低下が観察されたが、50 μ M では低下が認められず、上記のような活性は明確には認められなかった。これがマウスとヒトの種差によるものか、用いたマウス脾臓 T 細胞とヒト T 細胞の機能分化状態の違いによるものか、今後の検討が必要である。一方、

ゲンステインの添加で IFN- γ 産生、IL-4 産生ともに抑制された現象は、マウス T 細胞を用いた場合にも観察された現象である。これはゲンステインが T 細胞の活性化に重要なチロシンキナーゼの阻害活性をもつことによるものではないかと考えられる。

E. 結論

[1] 香粧品原材料及び添加物の規格試験法の開発

生理的条件下でカルミン酸あるいは 4'-アミノカルミン酸と BSA は結合した。結合カルミン酸量は BSA 濃度に相関し塩濃度に逆相関した。これらの相互作用により、BSA の持つ蛍光特性は減衰され、発熱反応を生じた。蛍光消光、熱力学的パラメータより、BSA とカルミン酸は Van der Waals 力や水素結合を含む静電相互作用により安定的な状態を保っている可能性が示唆された。

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量を規定していない。本研究では、色素及び天然鉱物中の Ni、Cr、Co 等のアレルギー性金属及び有害金属の分析法を開発した。硝酸を中心とした酸混液、あるいは原材料の性質に応じてフッ化水素酸等を加えたものを分解液として用い、装置の性能によって加熱条件を決めるようなマイクロウェーブ分解法にすることが必要とした。さらに、個別に微量金属を分析できるよう ICP-MS で定量することとした。各原料に検出される金属は、製造工程での触媒等の使用、あるいはもともとの鉱物の組成に影響することがわかった。しかし、皮膚アレルギーの発症防止の観点から、これら金属不純物の試験法や規制値を設定することは、現状必要ないと考えた。適切な試験法を用いた金属不純物の調査結果は、経皮曝露でのリスク評価する上で有効な情報を提供するものであり、引き続きの調査研究が望まれる。

香粧品に含有される可能性のある植物性汎アレルゲンに対する抗体を作製し、検出・定量系の構築を進めた。今後は実際の香粧品での検出や定量を進め、手法の妥当性を検証する必要がある。また、得られた汎アレルゲン抗体群は、アレルゲン性の変動解析に広く使用しうる有効な研究ツールとなりうる。また、香粧品に含まれることが多い食品素材に対する抗体についても、食物アレルギーを引き起こしうる一定の潜在的な感作リスクを評価しうるツールとして有効に使用できると考えられた。また様々な症例を精査することにより、今後も食物アレルギーを惹起しうる香粧品の経皮感作について注視す

る必要がある。

前処理法も含め、香粧品に含まれるヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸について調査した結果、顕著な抗原性は観察されなかった。また添加量、ヒアルロン酸の分子量など大きなバラツキがあり、また天然のヒアルロン酸のみならず誘導体化したヒアルロン酸の添加も予想された。今後更に調査を進めていく予定である。

【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ーの構築

昨年度に引き続き、本研究では、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。昨年度に取得した香粧品、食品添加物、天然物等、総数として 252 品目の qNMR スペクトルデータに対し、本年度は、天然物、界面活性剤、食品添加物製品等の 268 品目(別名による同一化合物の重複を含む)、約 400 製品の qNMR スペクトルデータを新たに取得した(2014 年 2 月 5 日現在)。その結果、2 年間の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。また、現時点においても qNMR スペクトルの取得は継続しており、更に 50 品目程度の追加が見込まれている。既存の NMR スペクトルライブラリには、無償の SDBS の他、有償のものがあるが、主に合成原料や化成品を対象としており、香粧品原料、天然物、食品添加物等に特化して 500 品目以上の実データを収集したライブラリは、我々の知る限り存在しない。なお、本研究班において、NMR スペクトル検索システム(dccnmr)の開発を別に行っている。これまでに取得したすべての qNMR スペクトルデータは dccnmr によって管理される予定である。

【III】 香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

THP-1 由来樹状細胞を用いた抗原感作性を評価するための *in vitro* 評価手法を確立し、これを用いて香粧品原材料及び添加物の安全性を簡便に評価することが可能となった。

昨年度の本研究で構築した、マウス脾臓由来 CD4⁺ T 細胞を抗体刺激で活性化し、添加した被検試料の T 細胞機能分化に与える影響の評価系を、ヒト末梢血 CD4⁺ T 細胞を用いて再構築した。ヒト細胞でも同様の評価系は可能であるが、一方でドナーの違いによる個人差を考慮する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriyama T, Yanagihara M, Yano E, Kimura G, Seishima M, Tani H, Kanno T, Nakamura-Hirota T, Hashimoto K, Tatefuji T, Ogawa T, Kawamura Y. "Hypoallergenicity and immunological characterization of the enzyme-treated royal jelly from *Apis mellifera*" *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(4):789-95 (2013).
- 2) Yoshimura Y, Nishii S, Zaima N, Moriyama T, Kawamura Y. "Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-A^y mice." *Biochem Biophys Res Commun.* 434(3):486-91 (2013).
- 3) Moriyama T, Yano E, Suemori Y, Nakano K, Zaima N, and Kawamura Y. "Evaluation of Hypoallergenicity of Various Miso Pastes Manufactured in Japan." *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 59(6):462-469 (2013).
- 4) Moriyama T, Yano E, Kitta K, Kawamoto S-I, Kawamura Y, Todoriki S, "Effect of Gamma-Irradiation on Soybean Allergen Levels." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77 (12) , p.2371-77 (2013).
- 5) 森山達哉：花粉－食物アレルギー症候群～花粉症に関連する新規な食物アレルギー～ 臨床栄養、124 巻 2 号, 150-151 (2014)
- 6) Ohtsuki, T., Sato, K., Furusho, N., Kubota, H., Sugimoto, N., Akiyama, H.: Absolute quantification of dehydroacetic acid in processed foods using quantitative ¹H NMR. *Food Chemistry*, 141, 1322-1327 (2013).
- 7) Yoshida, T., Terasaka, K., Kato, S., Bai, F., Sugimoto, N., Akiyama, H., Yamazaki, T., Mizukami, H.: Quantitative Determination of Carthamin in *Carthamus Red* by ¹H-NMR Spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, 61, 1264-1268 (2013).
- 8) 杉本直樹：NMR による天然有機化合物の正確な定量法の開発とその応用, 和漢薬, 724, 5-8 (2013).
- 9) 穂山 浩, 大月典子:カロテノイド摂取と食物アレルギー発症の予防, *Functional Food*, 6, 191-197 (2013).
- 10) Ryo Hatano, Kiyoshi Yamada, Taku Iwamoto, Nana Maeda, Tetsuro Emoto, Makoto Shimizu and

Mamoru Totsuka. Antigen presentation by small intestinal epithelial cells uniquely enhances IFN- γ secretion from CD4⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 435(4), 592-596 (2013).

2. 学会発表

- 1) 大月典子、杉本直樹、伊藤裕才、建部千絵、佐藤恭子、梅本尚之、深溝慶、穂山浩：カルミン酸とタンパクの反応性に関する検討、第106回日本食品衛生学会学術講演会 2013、沖縄
- 2) 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ギー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年、岡山
- 3) 森山達哉：食物アレルギーの多様性：花粉症関連の食物アレルギーを中心に 第60回日本栄養改善学会学術総会 研究自由集会（栄養士食物アレルギー研究会）（2013.9）
- 4) 渡部裕子、森山達哉：小豆による即時型アレルギーの2例 日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会（2013.12）
- 5) Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H.: Absolute quantitative analysis of preservatives in processed foods by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. 5th Asia-Pacific NMR Symposium (APNMR5) (2013.10).
- 6) 杉本直樹、田原麻衣子、大槻崇、多田敦子、伊藤裕才、佐藤恭子、五十嵐良明、合田幸広、穂山浩：qNMR スペクトルライブラリの構築. 第50回全国衛生化学技術協議会年会（2013.11）.
- 7) 大槻崇、佐藤恭子、杉本直樹、多田敦子、合田幸広、河村葉子、穂山浩：qNMR による添加物定量用試薬の規格試験法について. 第50回全国衛生化学技術協議会年会（2013.11）.
- 8) 石附京子、高田大、多田敦子、伊藤裕才、大槻崇、佐藤恭子、兎川忠靖、穂山浩、杉本直樹：PULCON 法とAQUARI法によるqNMRの定量精度の比較評価. 日本薬学会第134年会（2014.3）.
- 9) 杉本直樹：日本薬局方の第17改正に向けた最近の動き -核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用-. 日本薬局方セミナー, JASIS2013 (2013.9).
- 10) 片山茂、大月典子、穂山浩、中村宗一郎、) THP-1 由来樹状細胞のハプテン抗原を標的としたアレルギー性評価法の確立、小俣洋奈、

久木田卓弥、第26回日本動物細胞工学会 2013年度大会（2013.7）

- 11) 片山茂、小俣洋奈、大月典子、穂山浩、中村宗一郎：THP-1 由来樹状細胞の抗原提示能を指標としたコチニール色素のアレルゲン性評価、日本食品化学学会 第19回総会・学術大会（2013.8）
- 12) 小俣洋奈、片山茂、穂山浩、中村宗一郎：抗原提示能を指標とした抗原感作性評価法の構築、日本農芸化学学会 2014年度大会（2014.3）
- 13) 小俣洋奈、片山茂、大野史晃、真壁秀文、穂山浩、中村宗一郎：抗原提示能を有する THP-1 由来樹状細胞系の確立とその応用、第68回日本栄養・食糧学会大会（2014.5）
- 14) Mamoru Totsuka : Modulation of T-cell and B-cell functions by dietary polyphenols. 2013 Annual Conference of Korean Nutrition Society (Seoul, Korea), (2013. 11).
- 15) 戸塚 護：食品成分による T 細胞・B 細胞機能分化の制御. 日本農芸化学会関東支部 2013 年度第 2 回支部例会、(2014. 2).

H. 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

血管内皮機能改善に基づく糖尿病性腎症治療薬の開発

国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部
望月 直樹

研究要旨 DDAH1 活性化作用を有する化合物の評価系を構築し、DDAH1 活性化能を有する可能性のある 4 化合物 (TOA-01~04) を見出した。摘出血管を用いた検討の結果、化合物 TOA-03 に ADMA による血管弛緩障害に対する改善作用の可能性が示唆された。

研究組織

- (1) 国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部 望月直樹
(2) トーアエイヨー株式会社 福島研究所 千葉俊樹

A. 研究目的

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) は、内因性一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害因子であり、糖尿病、高血圧、慢性腎臓病 (CKD) などで血漿中 ADMA 濃度が上昇していることから、心血管イベントのバイオマーカーとして注目されている。ADMA は血管内皮細胞の NOS (eNOS) を阻害するために、血管内皮細胞が直接かわる心血管系疾患 (CVD) の障害分子として認識されるだけでなく、腎臓糸球体の毛細血管障害に起因する CKD の増悪にも関与することが知られている。健常人に ADMA を静脈内投与すると、腎血流量が低下し、腎血管抵抗が上昇する。したがって、ADMA 高値を示す糖尿病患者において ADMA を低下させることができれば、血管内皮機能の改善に基づき、糖尿病性腎症の発症及び進展を阻止できることが期待される。しかし、糖尿病性腎症に有効な治療薬は未だになく、CKD の治療標的分子も不明な点が多い。

生体内の ADMA 量は、その分解酵素 dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) により支配されていることから、そのアイソフォームの 1 つである DDAH1 を活性化する化合物によって ADMA 濃度を低下できれば、血管内皮機能を改善できると考えられる。ところで、糖尿病性腎症は医療経済的に負担の大きい血液透析 (500 万円/人、日本国内年間推定医療費 1.3 兆円) に至る糖尿病合併症として深刻な疾患である。我々は ADMA 低下薬 (DDAH1 活性化薬) が糖尿病性腎症治療に資すると考え、平成 23 年度より基礎研究を開始した。

前年度は DDAH1 活性化作用を有する化合物の

新規評価系を構築した。また、ラット II 型糖尿病性腎症モデルにおいて、腎臓の DDAH 活性の低下及び尿中 ADMA 排泄量の増加を確認した。本年度は新規に構築したスクリーニング系を用いて約 15 万化合物の評価を実施した。

B. 研究方法と材料

1) Human DDAH1 タンパクの作製及び化合物評価

(1) リコンビナント Human DDAH1 の作製

Human DDAH1 遺伝子 (NM_012137) を Human Brain cDNA ライブラリー (TaKaRa) から PCR 法にて取得し、塩基配列を確認した。取得した遺伝子を pGEX6p-1 (GE Healthcare Japan) に組み込み、GST 融合 DDAH1 発現プラスミドを構築した (pGEX6p-1-DDAH1)。本プラスミドで大腸菌 (BL21 (DE3) (Novagen)) を形質転換し、IPTG を添加した (0.5 mM、30℃、3.5 時間)。大腸菌を回収後、GSH でタンパクを濃縮し、PreScission Protease (GE Healthcare Japan) で GST を切断後、精製 DDAH1 (hDDAH1) として試験に用いた。

(2) DDAH1 活性評価 (CPM Assay)

DDAH1 活性は、基質である S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC) の分解に伴い生じる methanethiol が蛍光物質 (7-diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin; CPM) と反応することで生じる蛍光強度 (Ex/Em=380/485 nm) を指標とした。

0.02% Tween20 を含む PBS を assay buffer とした。hDDAH1 (25-46 μ g/mL)、SMTC (10 μ M) 及び CPM (1 μ M) を含む溶液を High Control ([High])、CPM (1 μ M) 溶液を Low Control ([Low]) とした。

化合物評価の際は、[High] に評価化合物を終濃度 30 μ M 濃度で添加した ([DDAH1]群)。さらに評価化合物の自家蛍光測定のため、[DDAH1]群から hDDAH1 を除いた組成の溶液を調製した

([Chem]群)。各群、反応開始直後から 90 分まで経時的にデータを取得した。

評価化合物はトーアエイヨー株式会社保有の化合物ライブラリー (約 15 万化合物) を使用し $n=1\sim 2$ で実施した。

(3) 結果解析 (CPM Assay)

[DDAH1] 群及び [Chem] 群の蛍光強度値から [Low] の蛍光強度値を除算した。次に [DDAH1] 群の蛍光強度値から [Chem] 群の蛍光強度値を除算した数値を解析に用いた。測定時間内 (0~90 分) での [High] の最大反応を 100% とし、全データの各測定時間における % of Control を算出し、評価化合物ごとに時間反応曲線を作成した。

2) ラット摘出血管弛緩作用評価

(1) 使用動物

6 週齢の雄性 Sprague Dawley (SD) ラットを日本エスエルシーより購入し、7~13 週齢で試験に供した。

(2) 摘出血管標本作製

ペントバルビタール (30 mg/kg, i. p.) 麻酔下で心臓上部から瀉血後、腹部大動脈を摘出した。95% O_2 、5% CO_2 で通気した Krebs 溶液 (mM: NaCl 118.4、KCl 4.7、 $MgSO_4$ 1.2、 KH_2PO_4 1.2、Glucose 10、 $NaHCO_3$ 25、 $CaCl_2$ 2.5) 下でリング標本作製後、マイクロマグナス装置 (UFER、いわしや岸本医科産業製) に設置した。95% O_2 、5% CO_2 で通気した 37℃ の Krebs 溶液でマグナス管内を満たし、張力を 1 g となるように調整後、1 時間以上平衡化させた。

(3) 血管弛緩作用評価及び群構成

アセチルコリン (ACh) の eNOS 由来弛緩作用を指標とした。0.1 μM フェニレフリン (Phe) で血管収縮を惹起させ、ACh の累積投与 (10^{-9} ~ 10^{-5} M) を行った (Control)。また、Phe 投与 1 時間前に ADMA (100 μM) を処置し、同様に ACh を評価した群 (ADMA 添加) に加え、以下に示した 2 検討の 2 群の評価、並びに比較を行った。

検討① L-アルギニン (L-Arg) を用いた検討
ADMA と同時に、L-Arg の 0.1 mM (ADMA + 0.1 mM L-Arg) または 1 mM (ADMA + 1 mM L-Arg) を処置した。

検討② CPM Assay にてヒットと判断された化合物 (TOA-02 及び TOA-03) を用いた検討

ADMA (100 μM) の処置 10 分前に、TOA-02 の 30 μM (ADMA + 30 μM TOA-02) または 100 μM (ADMA + 100 μM TOA-02)、及び TOA-03 の 10 μM (ADMA + 10 μM TOA-03) または 30 μM (ADMA + 30 μM TOA-03) を処置した。

3) DDAH1 活性化薬の血管内皮細胞への効果の検討

通常の血管内皮細胞培養液 (クラボウ) を用いて、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human umbilical venous endothelial cells: HUVEC) を継代培養した。また、血管内皮細胞 guanylate cyclase 活性を測定した。

DDAH1 活性化に伴って NOS の分解抑制により、NO 増加に伴う guanylate cyclase 活性化を HUVEC を用いて調べた。トーアエイヨーの in vitro のスクリーニング系でヒットした化合物の 4 種類のうちで、構造から薬剤への展開が可能と予測できた 2 化合物について 100 μM 、10 μM で 30 min 刺激した時の cyclic GMP 濃度を RIA (ヤマサ) で測定した (ヤマサ cGMP アッセイキットを用いた)。

4) 血管内皮細胞 DDAH1 発現量増加による血管内皮細胞の保護効果の vivo での検討

pNL5 (CAG promoter) loxpNeoloxP DDAH1-IRES EGFPplasmid を作製して、この遺伝子をもつトランスジェニックマウスを作製し、Tie2-Cre マウスと交配することで、血管内皮細胞特異的に DDAH1 を過剰発現するマウスを作製する計画とした。

(倫理面への配慮)

実験動物の飼育管理及び動物実験 (動物を利用する試験研究) の計画及び実施は、科学的及び動物福祉の観点から遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき行った。

C. 研究結果

1. リコンビナント human DDAH1 の作製

常法に従い各精製ステップで取得したサンプルを用い、hDDAH1 の純度を電気泳動及び CBB 染色で検証した結果、hDDAH1 をほぼシングルバンドの純度で回収することができた。そのため、本画分を透析処理したサンプルを以後の試験に供した。

2. CPM Assay の構築 (384 well plate)

CPM の溶解補助剤として 0.02% Tween20 を含む PBS を assay buffer とし、CPM 及び SMTc の最終濃度を 1 μ M 及び 10 μ M とすることで、十分な S/N 比及び well 間のバラツキを抑えた条件で、化合物評価が可能であることを確認した (Z' -factor>0.5)。

3. 化合物ライブラリー評価

構築した CPM Assay にて、化合物ライブラリー (約 15 万化合物) を対象とした DDAH1 活性化作用を有する化合物の探索スクリーニングを実施した (n=1, 30 μ M)。その結果、評価化合物による DDAH1 酵素反応の速度又は最大反応を上昇させる可能性のある 418 化合物が抽出された。

418 化合物を対象とした濃度依存性評価の結果 (3、10、30 及び 50 μ M、n=2)、4 化合物 (TOA-01~04) が濃度依存性を示し、DDAH1 活性化能を有する化合物としての可能性が示唆された。

4. ADMA による血管弛緩障害作用の評価

内因性 eNOS 阻害因子の ADMA を処置することで、ACh 投与による NO 放出は抑制され、血管弛緩作用は減弱すると考えられる。このため DDAH1 活性化作用を有する化合物を処置した場合、細胞内 ADMA レベルの低下による eNOS 阻害作用の減弱により ACh 投与による血管弛緩作用の回復が期待される。本検討では、まず細胞内 ADMA レベルに応じて ACh による血管弛緩作用に差異が見出されることを検討するために、ADMA の細胞内取り込みを競合阻害する L-Arg を用いた陽性対照試験を行った。その結果、ADMA 添加群では ACh の血管弛緩作用の減弱が認められたが、L-Arg を加えることで ACh の血管弛緩作用の減弱が解除された。

5. CPM Assay にてヒットと判断された化合物 (TOA-02 及び TOA-03) を用いた検討

細胞内 ADMA レベルに応じて ACh の血管弛緩作用に差異が見出されることが推察されたので、次に CPM Assay ヒット化合物を用いた検討を実施した。評価化合物は、構造展開可能性の高いと考えられた TOA-02 及び TOA-03 を用いた。前述の検討と同じ ADMA の濃度 (100 μ M) かつ処置時間 (1 時間) にて、TOA-02 及び TOA-03 の弛

緩作用改善効果を検証した。TOA-02 を用いた場合には、30、100 μ M のいずれの濃度においても ACh の血管弛緩作用減弱の解除は認められなかった。一方、TOA-03 を用いた場合、10 μ M では明確な作用は認められなかったが、30 μ M の処置により、ACh の血管弛緩作用の減弱の解除が認められた (10⁻⁶ M 時; Control 群: 98 $\pm$ 0.6%、ADMA 添加群: 64 $\pm$ 4%、ADMA+30 μ M TOA-03 処置群: 87 $\pm$ 1%)。このことから、TOA-03 は細胞内 ADMA 低下作用を有し、その結果、ACh の作用が回復した可能性が推察された。

5. DDAH1 活性化化合物による cGMP 産生への効果

トアエイヨーが in vitro スクリーニング系で得た二つの化合物 TOA-02、TOA-03 を HUVEC に 30 分作用させて、細胞内 cGMP の濃度を測定した。Positive control に用いた ANP は Guanylate Cyclase 活性化による顕著な cGMP の増加を認めたが、今回使用した二つの化合物では、cGMP は増加しなかった。

6. 血管内皮細胞特異的に DDAH1 を過剰発現するマウスの作製のための準備

pNL5loxP plasmid を基本骨格として、loxP-Neo-loxP-DDAH1-IRES-EGFP の plasmid をまず作製した。この発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、さらに、同時に pcDNA-Cre plasmid を同時にトランスフェクションすることで、DDAH1 と同時に IRES 依存性に EGFP が発現できることを確認した。

また本ベクターをトランスジーンとして、導入可能なように精製してトランスジェニックマウスを作製可能な状態にした。さらに、国立循環器病研究センターで飼育している血管特異的に Cre を発現する Tie2-Cre マウスを繁殖させて今後の実験に使用可能な状態にした。

D. 考察

CPM Assay による約 15 万化合物のスクリーニングから、DDAH1 活性化能を有する可能性のある 4 化合物 (TOA-01~04) を見出した。これら化合物の活性は自家蛍光による擬陽性ではないことを確認している。また類似構造化合物で官能基の違いによる DDAH1 活性化反応の有無を示すものも観察されている。

摘出血管を用いた検討では、ADMA による ACh 誘発血管弛緩作用の障害及び L-Arg による障害作用の解除が確認された。また、ADMA による血管弛緩作用の障害が認められる条件下にて、TOA-03 が ACh の作用を回復させた。CPM Assay

にてヒットした TOA-03 が効果を示したことから、細胞内 ADMA の低下、及び eNOS 阻害作用の抑制によってこの作用が認められたと考えられた。CPM Assay にてヒットした化合物の中に TOA-03 の類縁化合物も含まれており、また、自家蛍光による擬陽性の可能性は低いことから、類縁化合物との共通構造が ADMA 低下作用に寄与した可能性が考えられた。しかし、DDAH1 活性化以外の機序で薬効を示した可能性も考えられ、特に当試験は、ADMA の細胞内取り込み抑制作用を否定できない実験系であるために、結果の解釈に注意を要する。また、TOA-03 は溶解性が悪く、*in vivo* の検討に供しえない可能性があるため、活性を維持しつつ、溶解性を向上させるような構造展開が必要となる。今後はこれまでに構築済みである糖尿病性腎症モデル動物を用いて、糖尿病性腎症の発症・進展抑制作用の検証を加える。一方、TOA-02 では ACh の作用の回復は認められなかった。TOA-03 の結果と乖離した理由は不明だが、CPM Assay によって見出された化合物に TOA-02 の類縁化合物は存在せず、TOA-02 の構造の薬理作用発現への関与が明確でないため、今後の検討の優先順位は下がると考えられた。

以上、化合物スクリーニングから見出された 4 化合物のうち、少なくとも 1 化合物は DDAH1 活性化剤探索のリード候補化合物となる可能性が示された。今後、これら化合物の類似構造化合物を評価するとともに、異なる生化学的手法（低分子化合物-タンパク結合評価、ADMA 分解能の評価）による追加検証を行う予定である。血管内皮細胞での DDAH1 活性化により、eNOS を抑制する ADMA を分解し L-Arg 依存性の eNOS の活性化を期待して、トアエイヨーが化合物をスクリーニングした。NO が増加することにより血管内皮細胞の cGMP が増えることを期待して、得られた 2 化合物を培養血管内皮細胞に投与して cGMP を測定したが増加は認めなかった。ANP を陽性コントロールとして用いたために、化合物により微量な cGMP の増加があっても殆ど有意差のあるものではないと判断した。

培養細胞では、basal の eNOS 活性は cGMP の増加には拘わらない可能性も否定できないために、本実験の妥当性（NO 依存性の cGMP 測定が本化合物の DDAH1 活性増加による血管内皮細胞の eNOS activity を反映しているかの妥当性）については、検討の余地があると考えた。

また、これまで血管内皮細胞で DDAH1 が増加した場合の血管内皮細胞の保護効果については生体で検討したという十分な報告はない。したがって、今後この問題を解決するために、

本研究では、DDAH1 を血管内皮細胞特異的に発現して、血管保護効果を生体で検討可能な、トランスジェニックマウスを作製する準備を行った。

E. 結論

DDAH 活性を評価する新規評価系を立ち上げ、約 15 万化合物のスクリーニングを行った。その結果、DDAH1 活性化能を有する可能性のある 4 化合物（TOA-01～04）を見出した。摘出血管を用いた検討の結果、化合物 TOA-03 は ADMA による血管弛緩障害に対する改善作用を有する可能性が見出された。生体内において ADMA は腎機能障害に関与する可能性があることから、DDAH1 を制御することが腎症の新たな治療戦略になり得ると考えられる。今後、本研究から見出した化合物の構造活性相関の把握と最適化を行い、確立した糖尿病モデル動物を用いて DDAH1 活性化薬による糖尿病性腎症の発症・進展抑制作用を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kwon HB, Fukuhara S, Asakawa K, Ando K, Kashiwada T, Kawakami K, Hibi M, Kwon YG, Kim KW, Alitalo K, Mochizuki N. The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegf/c/Vegfr3 signaling in zebrafish. *Development*. 140(19):4081-90, 2013

(2) Ando K, Fukuhara S, Moriya T, Obara Y, Nakahata N, Mochizuki N. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *J Cell Biol.* ;202(6): 901- 16.

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

多価ボツリヌストキソイドワクチンの有効性及び安全性の検討

国立感染症研究所 細菌第二部
山本 明彦

研究要旨 多価ボツリヌストキソイドの今年度4回目接種を終えた被験者36名に発症防御レベル(0.2 IU/mL以上)の毒素中和抗体が産生され、副反応の発症率も低かった。本トキソイドは一般及び安全性試験の結果から製造後7年で品質に経時的な変化はほとんど認められなかった。

研究組織

- (1) 国立感染症研究所細菌第二部 山本明彦
- (2) 大阪大学大学院医学系研究科 杉本 央
- (3) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
小崎俊司
- (4) (一財)化学及血清療法研究所 銀永明弘
原川哲博

A. 研究目的

ボツリヌス毒素は、最も致死活性の高い物質であることから、ボツリヌス毒素は最も生物兵器として利用される可能性の高いものの一つと考えられている。生物兵器による被害は当初においては感染症として認知されることから、救急医療関係者や保健行政担当者が兵器に暴露されることが予想され、これらの人々に対する防疫体制の確立が肝要である。2007年に厚生労働研究班で製造された多価ボツリヌストキソイド(Lot 4)について、昨年度に引き続きその有効性及び安全性を検討する目的で、臨床研究として研究者・抗毒素製造従事者に接種し、同時に採血を行って血中抗毒素価をELISA法、マウス中和法及びラット中和法で測定した。また、その接種時の有害事象に関して、発生例と内容を評価した。本年度はさらに製造後7年目の本トキソイドの安定性を確認するために一般試験及び安全性試験を実施した。

B. 研究方法

1. 免疫スケジュール

ボツリヌス毒素研究に関わる研究者5グループ48名に沈降多価トキソイドを4週間隔で3回接種した。また初回接種から1年後に沈降多価トキソイドの追加接種を行った。採血は、トキソイド接種時(1-4回目)と3回目と4回目トキソイド接種1か月後の6回行った。血液を約10 ml採血した後、血清

を分離し抗体価測定時まで-20℃で保存した。

2. ELISA

96穴プレート(IWAKI: 3881-096)にA, B, EおよびF型神経毒素(0.5 µg/well/0.1 ml)を吸着させ、37℃2時間静置した。0.05% Tween20添加PBS[PBST: 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)-0.15 M NaCl]で5回洗浄後、1% Skim milk添加PBSを加え(0.2 ml/well)4℃一晩ブロッキングを行った。各プレートをPBSTで5回洗浄後、0.2% Skim milkを含むTBSTで被験血清を64(26)倍から131,072(217)倍まで2倍段階12希釈した。各希釈血清を加え(0.1 ml/well)、37℃2時間静置した。各プレートをPBSTで5回洗浄後、PBSTで希釈したperoxidase標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L)(1:10,000, Bio-Rad)を加え(0.1 ml/well)、37℃2時間静置した。各プレートをPBSTで5回洗浄後、0.4 mg/ml o-phenylenediamine-0.02%(v/v)過酸化水素含有50 mM クエン酸-100 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)を加え(0.15 ml/well)37℃30分間静置後、5 N 硫酸を加え反応を止め、マイクロプレートリーダーで490 nmの吸光度を測定した。各型神経毒素に対する抗体価は、各プレートにおいた陰性コントロール血清が示す吸光度の2倍の値となる最大希釈倍数を抗体価とした。陰性コントロールと差が認められなかった血清の抗体価は、32(25)とした。

初回接種時(0か月)から採血月をX軸にプロットし、抗体価は2ⁿで示し、指数(n)をY軸にプロットした。また各月抗体価の平均値と標準偏差をプロット上に付け加えた。図の作成には、解析ソフトGraphPad PTISM 5を用いた。

(倫理面への配慮)

ボツリヌストキソイド接種とその効果を調べるための採血を行うため、大阪大学、大阪府立大学、

(財)化学及血清療法研究所及び国立感染症研究所それぞれの研究倫理委員会へ本研究の分担するテーマに関する審査申請を行って承認を得て臨床研究を実施した(承認期間～H26年3月31日)。

3. 三回接種1ヵ月後及び追加接種1ヵ月後の被接種者血清の毒素中和抗体価測定

三回接種1ヵ月後及び追加接種1ヵ月後の被接種者血清の毒素中和抗体価はマウス中和法及びラット中和 CMAP 法により測定した。

マウス中和法では、まず各型試験毒素量の設定を行った。A、B、E 及び F 型の試験毒素の量を変化させて、各型標準抗毒素 0.2 及び 0.1 IU/mL と等量混合して反応させマウスの腹腔内に 0.5 mL 投与し、投与後 4 日間観察した。0.2 IU/mL では全数生存し、0.1 IU/mL では全数死亡する試験毒素量を求め、これを用いて被接種者血清の毒素中和抗体価を測定した。血清と各型試験毒素を等量混合し反応させた後にマウスの腹腔内に 0.5 mL 投与し、投与後 4 日間観察した。マウスが全数生存した場合、血清中の毒素中和抗体価は 0.2 IU/mL 以上、死亡していた場合は 0.2 IU/mL 未満であると判定した。

ラット中和 CMAP 法は S/D 系ラット (5 週齢、メス、SLC) を用いて行った。A 型標準抗毒素は 0.003～0.1 IU/mL まで 6 希釈、B 型標準抗毒素は 0.025～0.2 IU/mL まで 4 希釈、E 型標準抗毒素は 0.003～0.05 IU/mL まで 5 希釈及び F 型標準抗毒素は 0.003～0.1 IU/mL まで 6 希釈をそれぞれ作製した。被験者血清は原液を使用した。試験毒素量は A 型 10 マウス ipLD50/mL、B 型 60,000 マウス ipLD50/mL、E 型 60 マウス ipLD50/mL 及び F 型 600 マウス ipLD50/mL とした。希釈抗毒素及び血清を各型試験毒素とそれぞれ等量混合し、室温で 1 時間反応させた後、麻酔をかけたラットの左側腓腹筋に反応液を 0.1 mL ずつ 3 匹に投与した。投与 1 日後の CMAP を測定した。各型標準抗毒素の CMAP 振幅値から検量線を作成し、被験者血清の CMAP 振幅値を検量線に代入して毒素中和抗体価を算出した。

4. 多価ボツリヌス毒素イドワクチンの安定性評価試験

本毒素イドワクチン製造直後に厚生労働科学研究班が行った試験(生物製剤基準の沈降破傷風毒素イドの試験項目を参考)は、一般試験(たん白含量、pH、アルミニウム含量、ホルムアルデヒド含量、チメロサル含量及び無菌試験)、安全性試験(異常毒性否定試験及び無毒化試験)及び有効性試験(モルモット力価試験; 血中抗毒素価定量法

及び毒素攻撃法)、マウス力価試験(毒素攻撃法))を行った。今回本毒素イドワクチンの品質安定性を評価するにあたり、製造直後と同じ試験を実施し、経時的な変化について評価した。

5. 被検者への研究説明、ワクチン接種と採血、副反応成績調査

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

C. 研究結果

1. ELISA による抗毒素価の測定

被験血清の A、B、E および F 型神経毒素に対する抗体価を継続的に ELISA により測定した。

ボツリヌス毒素イド接種経験者(9 名/48 名)の一部は、初回免疫時にすでに抗体を保持していることから、A、B、E および F 型ともに抗体価のばらつきが見られたが、1 か月ごと 3 回のワクチン接種により、徐々に被接種者の抗体価平均値は上昇した。しかし、初回接種から 12 か月後の抗体価の平均値は、0 か月時と同程度にまで低下していた(A: 6.1、B: 7.3、E: 6.5、F: 7.0)。追加免疫 1 か月後の抗体価の平均値は、いずれの毒素型においてもこれまでの 3 回のワクチン接種で得られた抗体価よりも高い抗体価平均値を示した(A: 10.8、B: 14.1、E: 12.4、F: 14.4)。(図 1)

2. 三回接種1ヵ月後及び追加接種1ヵ月後の被接種者血清の毒素中和抗体価測定

マウス中和法により血清中の毒素中和抗体価を測定したところ、0.2 IU/mL 以上の毒素中和抗体価をもつ被接種者は、三回接種 1ヵ月後では 46 名中 A 型 9 名(20%)、B 型 14 名(30%)、E 型 12 名(26%) 及び F 型 17 名(37%)であった。追加接種 1ヵ月後では 40 名中 A 型 34 名(85%)、B～F 型 39 名(97.5%)であった(表 1)。

ラット中和 CMAP 法により血清のより微量の毒素中和抗体価を測定したところ、被接種者における毒素中和抗体価の平均値は三回接種 1ヵ月後では A 型 0.262 IU/mL、B 型 0.376 IU/mL、E 型 0.245 IU/mL 及び F 型 0.478 IU/mL であり、追加接種 1ヵ月後では、A 型 0.84 IU/mL、B 型 1.406 IU/mL、E 型 1.221 IU/mL 及び F 型 1.592 IU/mL であった(図 2)。

3. 多価ボツリヌストキソイドの安定性評価

一般試験において、たん白質含量は製造直後 117.8 µg/mL であったのに対し、製造 7 年目では 96.2 µg/mL であり、若干低下した。また、チメロサル含量は製造直後 8.8 ppm であったのに対し、製造 7 年目では 0.7 ppm であり、大きく低下した。その他の試験については、製造直後と大きな違いは認められなかった。

安全性試験において、異常毒性否定試験は適合であった。無毒化試験については、4℃保存（非加温）及び 37℃20 日間保存（加温）ともに異常は認められなかった。

有効性試験については以下のとおりであった。

モルモットを用いた力価試験（血中抗毒素価定量試験）では、トキソイドワクチンを 1~4 倍希釈して計 2 回免疫して得られた血清の毒素中和抗体価を測定した。その結果、各希釈トキソイドワクチン免疫群の A~F 型の毒素中和抗体価は全て 0.5 IU/mL 以上であった。また、トキソイドワクチンで免疫したモルモットを用いた力価試験（毒素攻撃試験）では、各希釈トキソイドワクチン免疫群に A~F 型毒素 $10^3 \sim 10^5$ LD₅₀ を腹腔内投与したが全て耐過した。

マウスを用いた力価試験はトキソイドワクチンを 5 用量に希釈して免疫し、免疫 5 週後に A~F 型毒素 10^2 LD₅₀ を腹腔内投与して 50% 死亡するトキソイドワクチン用量を算出した。50% 死亡点となるトキソイドワクチン用量は A 型 0.02、B 型 0.007、E 型 0.043 及び F 型 0.016 となり、製造直後の測定結果（A 型 0.016、B 型 0.006、E 型 0.039 及び F 型 0.011）と統計的に有意な差は認められなかった（表 2）。

4. 副反応や有害事象の発生状況

1) 平成 25 年度のボツリヌストキソイドワクチン接種対象者数は 36 名であった。内訳は第一期 3 回接種対象者が 3 名、第二期（第一期 3 回接種開始後 1 年）1 回接種対象者が 33 名であった。性別対象者構成は、男性 25 名、女性 11 名。年齢階層別構成は、60 歳代 4 名、50 歳代 12 名、40 歳代 6 名、30 歳代 6 名、20 歳代 12 名であった。

2) 第一期 3 回目接種一カ月以降に発現した有害事象：卵巣癌 1 名。

3) ワクチン接種前の皮内反応で I 型アレルギーを疑わせる皮疹を呈したため接種を中止したものが 1 名あった。

4) 第二期（4 回目）接種後の有害事象は、接種部位の発赤・鈍痛 6 名、皮内反応部位の発赤 4 名、

嘔気・嘔吐 1 名、腰痛 1 名で、無症状のものが 22 名。有害事象発現率は 30.3% であった。

5) 第一期 3 回接種対象者での有害事象は 2 回目接種後の皮内反応部位の発赤 1 名のみであり、有害事象発現率は 33.3% であった。

6) いずれの有害事象も軽微なものであった。また発現率は昨年度に報告した第一期 3 回接種における有害事象発現率と同様と判断された。

D. 考察

トキソイド被験者から 6 回の採血（4 週間隔で 3 回接種時、3 回目接種後 1 か月、さらに初回免疫時から 12 か月後の追加接種時とその 1 か月後）を行い、血清中の抗体価の推移を ELISA で測定した。初回接種時の抗体価の平均値は、いずれの毒素型においても検出限界値の 32(26) またはそれ以下であったが、1 か月ごとの 3 回の免疫により、各毒素型に対する抗体価が徐々に上昇した。初回接種から 12 か月後の追加接種時には、抗体価の平均値は初回接種時と同程度まで低下していたが、追加接種後 1 か月の抗体価は、大きく上昇した。

3 回のトキソイド接種により基礎免疫が確立され、さらに 12 か月後の追加接種によりブースター効果が発揮され、抗体価の上昇をもたらしたと考えられた。

今回の臨床研究において、トキソイド被接種者の血清中の毒素中和抗体価が発症防御レベルとされる 0.2 IU/mL 以上あるかどうかを有効性の指標として用いて評価した。三回接種 1 ヶ月後では 0.2 IU/mL 以上であったのは 20~37% であったのに対し、追加接種 1 ヶ月後では、85~97.5% とほとんどの被接種者で発症防御レベルの毒素中和抗体産生が認められた。

本トキソイドの安定性評価については、一般試験のチメロサル含量が減少していた。これは液状のワクチンでは通常認められるもので、チメロサルがトキソイドのバイアルあるいはゴム栓に吸着しているものと考えられる。安全性及び有効性試験については、現在まで得られた結果では製造時の試験結果と大きな変化は認められなかった。

E. 結論

本年度実施した多価ボツリヌストキソイド追加接種 1 ヶ月後の 36 名の被接種者において、発症防御レベルである 0.2 IU/mL 以上の毒素中和抗体の産生が認められた。また、多価ボツリヌストキソイドは製造 7 年を経過しているが、品質に経時的に大きな変化はほとんど認められなかった。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Torii Y., Kohda T., Sugimoto N., Kozaki S., Takahashi M., Ginnaga A., Yamamoto A., Clinical study of a tetravalent (type A, B, E, and F) botulinum toxoid vaccine in Japan. 50 th Interagency Botulism Research

Coordinating Committee, アナポリス, メリーランド, アメリカ, 2013年10月20～23日.

- 2) 鳥居恭司、幸田知子、杉本 央、小崎俊司、高橋元秀、銀永明弘、山本明彦、Clinical study of a new tetravalent (type A, B, E, and F) botulinum M toxoid vaccine. 第87回日本細菌学会総会、東京、2014年3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図1. ELISAによる血清中抗体価の継時的推移

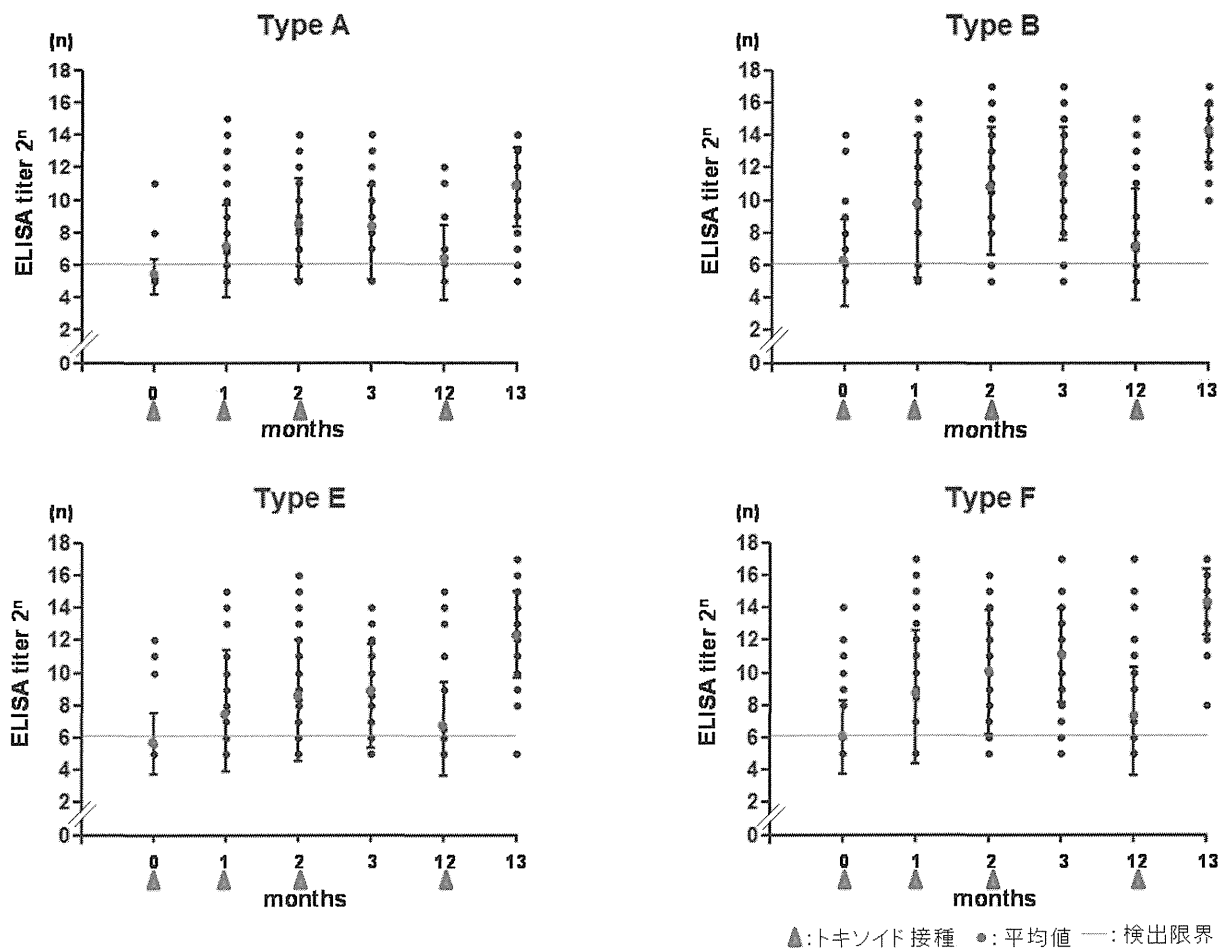


表 1. マウス中和法の測定結果

a. 三回接種 1 ヶ月後の血清中の中和抗体価が 0.2 IU/mL 以上あるいは未満であった被接種者の人数

	A型	B型	E型	F型
0.2IU/mL以上	9	14	12	17
0.2IU/mL未満	37	32	34	29

b. 追加接種 1 ヶ月後の血清中の中和抗体価が 0.2 IU/mL 以上あるいは未満であった被接種者の人数

	A型	B型	E型	F型
0.2IU/mL以上	34	39	39	39
0.2IU/mL未満	6	1	1	1

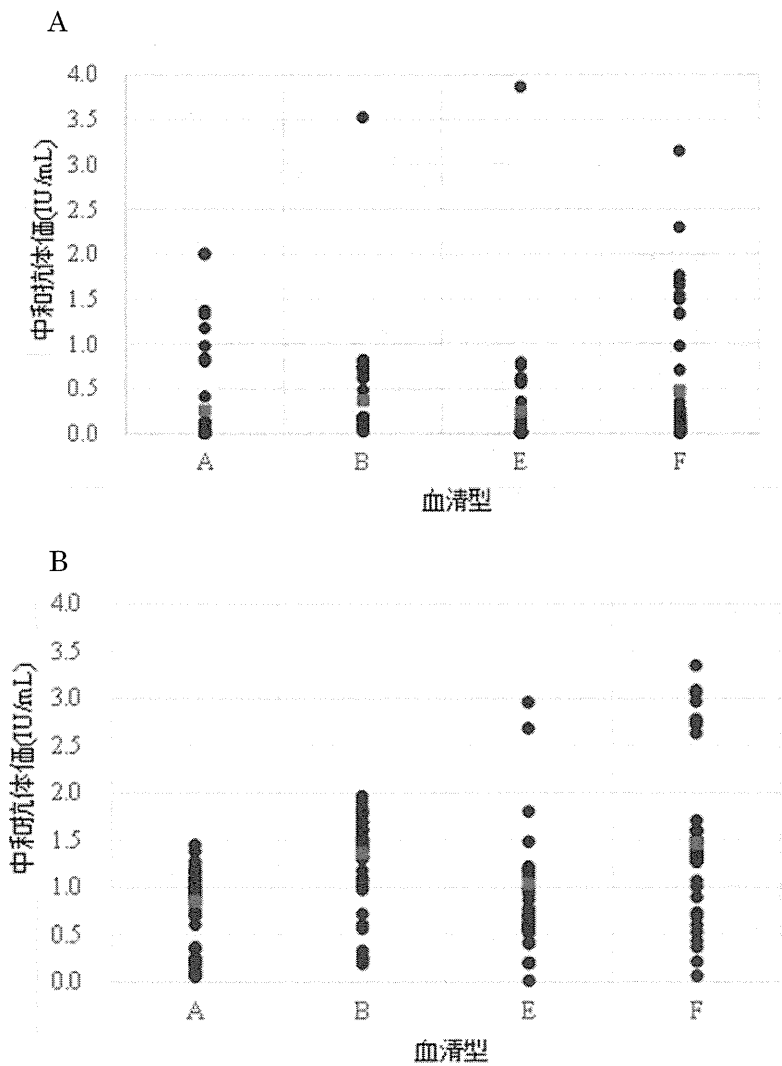


図 2. ラット中和 CMAP 法の測定結果

A : 三回接種 1 ヶ月後の被接種者血清中の中和抗体価

B : 追加接種 1 ヶ月後の被接種者血清中の中和抗体価

(● : 各被接種者の抗体価、■ : 平均値)