

調べた結果。25 nM でコントロール (1.2%) の約 2 倍となり、薬剤の濃度に依存して上昇し、100 nM では 2 倍 (14.4%) までになった。また、処理群は細胞周期はそのまま、100 nM 処理において最初の分裂が起こるまでの時間が長くなっていた。100 nM 処理後の小核の形成頻度は、薬剤除去後も上昇し、24 時間後に 25% に達した後、小核を持つ細胞の割合は減少し 3% まで下がった。ECC1.5 で 24 時間処理し、除去後 24 時間での小核の形成頻度は、マイトマイシン C とダウノルビシンについては 10 倍以上になったのに対して、細胞同調に用いられているアフイディコリン、チミジンでは上昇しなかった。DMSO、phenol、capsaicin、ES について ECC1.5 をもとめたところ、307 μ M、2.6 mM、125 μ M、2.8 mM であった。この濃度で 24 時間処理した細胞の 48 時間培養後の小核形成頻度はいずれも 1.2-1.4% であった。

[山田] YG7108 における ENU を用いた Ames 試験の復帰変異コロニー数は、用量 0、50、250 μ g/plate に対して、プレート当たり平均 17、3,250、8,953 個だった。一方、ゲノム上で検出された突然変異の数は各用量 4 つのコロニーからの合計が、1、35、229 個とほぼ用量に相関していた。検出された突然変異の 5% は AT から GC へのトランジションであったが、残りはすべて GC から AT へのトランジションだった。TA1535 における ENU を用いた Ames 試験で得られた復帰変異コロニーのゲノム DNA を調べた結果、いずれも *hisG46* に変異が確認された。塩基置換は、GC から AT が 80% 以上で、それ以外は AT から GC のみであった。一方 LB 培地で得られたコロニー由来のゲノム DNA では塩基置換として、GC から AT へのトランスバージョンが 90% 程度であった。本試験法で、1 菌株で複数の突然変異が検出できることが分かった。また、標的配列以外の場所で行われる挿入・欠失変異 (フレームシフト) も検出された。

[須井] 菌数を従来の 0.1 倍量および 4 倍量に変更し陽性反応への影響を調べた結果、S9 mix 存在下では、被験物質により強い陽性反応が認められる濃度は異なっていたが、S9 mix 非存在下では、2 化合物とも通常の 0.1 倍量の菌液の場合に最も強い陽性反応が認められた。前培養を行うことにより、2 菌株ともに全体的に復帰変異コロニー数が増加した。また、増加の程度は、2 菌株ともに被験物質処理した時の方が大きかった。さらに、AF-2 および B[a]P について、従来の 1/10 の菌数を処理した後に本培養を行

った結果、従来法よりも低用量から陽性結果が得られた。また、TA100 と TA1535 の組み合わせにおいては、計測可能な復帰変異コロニーが平板上に認められた。

[平田] 試験採血により抗体力価が十分にあることを確認した (抗血清 $\geq \times 8,000$) のち、OY1002/1A2 および NM2009 の菌体上清について、ウェスタンブロットを行った。CYP1A2 を発現する株では約 50,000 kDa のバンドが検出されたのに対して、陰性対照の CYP1A2 を発現しない親株 NM2009 株ではバンドは検出されなかった。また、種が違う代謝酵素を用いて、化合物の最小検出感度を比較した結果、代謝活性化にラットの S9mix を使用した Ames 試験では TA98 で nM オーダー、ヒト型薬物代謝酵素を発現する umu 試験菌株 OY1002/1A2/pKJE7 では μ M オーダーであった。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラットともに ES 高用量群で体重増加抑制が認められた。病理組織学的検索の結果、F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラットともに、高用量群の肝臓において肝細胞の単細胞壊死、oval cell の浸潤及び核分裂像が高頻度に認められた。主要臓器における ES 特異的 DNA 付加体量は、F344 *gpt delta* ラット及び野生型 F344 ラットともに、ES-3' -8-dG、ES-3' -N2-dG 及び ES-3' -N6-dA は肝臓において低用量群から検出され、投与量依存的に増加した。腎臓及び肺においても付加体が検出されたが、その生成量は肝臓の 1/10 以下であった。また、ES を投与した F344 系 *gpt delta* ラットの肝臓において、高用量群でのみ遺伝子突然変異頻度の有意な上昇が認められ、合わせて細胞増殖活性の亢進と p38/Erk 経路の活性化及び PP2A のリン酸化も観察された。病理組織学的検索を実施した化合物未処理の F344 *gpt delta* ラット (雄) において、副腎の pheochromocytoma の発生率が野生型 F344 ラットと比較して有意な高値を示した。

[藤居] F344 系雄ラットにおける B[a]P 投与の 28 日間反復投与の結果、*gpt* 点突然変異体頻度は骨髄、肝臓、大腸のいずれにおいても用量依存的に増加した。投与終了翌日 (Day 29) に採材した骨髄、肝臓および大腸について小核試験を実施したところ、骨髄、末梢血で用量依存的な小核誘発が認められた。肝臓および大腸での小核誘発は認められなかった。臓器サンプリン

グ時期による差異は点突然変異体頻度では認められなかったが、骨髓と末梢血の小核は最終投与翌日より3日後 (Day 31) で出現頻度が低下する傾向が認められた。

[高木] いずれの *gpt delta* Tg ラットでも、背景系統と比較して体重増加抑制が確認された。血液学的検査において、SD-Tg 雄で赤血球数が、Slc:WistarHannover/Rcc-Tg 雌で白血球数が減少、血液化学的検査では、アルカリホスファターゼ、トリグリセリド、アルブミンなど有意なパラメーターの変動が観察された。病理組織学的検査ではいずれの系統にも心臓線維化、肝臓の小肉芽腫と細胞浸潤など通常も観察される所見があった。SD-Tg には長期飼育で確実に観察される慢性腎症、下垂体過形成が確認された。

[竹入] Pol κ KI および Pol κ^+ に、MMC 投与群で、 γ H2AX フォーカスを持つ骨髓細胞および末梢血小核保有赤血球の出現頻度が有意に増加し、さらに pol κ KI の方が pol κ^+ より高い反応性を示した。CDDP 投与群は、両マウスともに小核頻度および突然変異頻度が増加した。マウス間の比較では、突然変異頻度には両マウス間で有意な変化は見られなかったが、小核頻度は pol κ KI の方がより高い値を示した。

[増村] *gpt delta* マウスの点突然変異頻度は、肝臓では加齢に伴って有意に増加したが、精巣では有意な増加は認められなかった。*gpt delta* マウスの欠失変異は、104 週齢の肝臓でのみ有意に増加した。加齢に特徴的と考えられる変異タイプはなかった。52 週齢の肝臓と精巣における欠失変異頻度は、Pol κ KI と Pol κ^+ で同等であった。さらに、B[a]P を投与したマウスの大腸における点突然変異体頻度は用量依存的に増加したが、Pol κ KI と Pol κ^+ の間に明らかな差は認められなかった。

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

①反復投与毒性試験への組み込みプロトコールの検討および単回投与試験との比較

[千蔵] CP

単回投与では CP 投与に起因した体重変動、一般状態、血液学的検査及び血液生化学的検査について、CP に起因した変化は認められなかった。*Pig-a* アッセイでは14日後に、PIGRET 法では7日後に統計学的に有意な *Pig-a* MF の変化が認められた。一方、28 日間反復投与では高用量群で24 日後以降有意な体重増加抑制が認められ、28 日目に一部で死亡が認められた。血液生化学的

検査についても CP 投与に起因したものと考えられる変化が観察された。*Pig-a* MF については、*Pig-a* アッセイ、PIGRET いずれの方法でも有意な変化はなかった。

[伊東] EMS

単回経口投与では PIGRET 法による *Pig-a* MF は、720 mg/kg で投与後1週目に顕著な高値を示し、投与後2週目には半減したが、陰性対照群より高い値を示していた。360 mg/kg では、投与後1および2週目とも陰性対照群の約2倍程度の *Pig-a* MF を示した。28 日間反復経口投与では *Pig-a* アッセイによる、*Pig-a* MF は、投与2週目から増加傾向を示し、100 mg/kg で最終投与の翌日において陰性対照群の約3倍の値を示した。

[武藤] MMS

単回投与では、*Pig-a* アッセイでは投与14日後から、PIGRET 法では投与7日後から *Pig-a* MF が増加した。28 日間反復投与では、*Pig-a* アッセイではいずれの採血ポイントでも、MMS が誘発する遺伝子変異原性は検出されなかった。PIGRET 法では、30 mg/kg の投与群において、投与開始7および28日後、有意に *Pig-a* MF が増加した。末梢血小核評価との組合せの検討については、単回投与試験では、50 mg/kg で有意ではないが MN-RET の出現頻度の増加傾向が認められ、100 mg/kg にて有意に増加した。200 mg/kg では強い骨髓抑制が認められた。28 日間反復経口投与試験では、30 mg/kg の投与量で末梢血小核の出現頻度に増加傾向が認められたが有意ではなかった。

[真田] MDA

単回投与では *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法いずれにおいても、明らかな *Pig-a* MF の増加は認められなかった。反復投与後の HIS49/CD59 法による *Pig-a* MF の結果、MDA 投与群では、投与14日目において13 mg/kg 以上の投与群で用量依存的に *Pig-a* MF の増加が認められた。投与7日目及び28日目における *Pig-a* MF は、40 mg/kg 投与群のみで、増加傾向を示した。PIGRET 法による *Pig-a* MF の結果、MDA 投与群では、投与7日目において、13 mg/kg 以上の投与群で用量依存的に *Pig-a* MF の増加が認められ、40 mg/kg 投与群で 23.9×10^{-6} で最も高値を示した。投与14日目では40 mg/kg 投与群のみで 11.2×10^{-6} と有意な *Pig-a* MF の増加が認められたが、投与28日目では *Pig-a* MF の増加は認められなかった。

② *Pig-a* アッセイによる放射線遺伝毒性評価

単回照射群においては、2 Gy 照射後2週目に

成熟マウスにおいて大きく増加した *Pig-a* MF は照射後 4 週で低下した。幼若群では認められた *Pig-a* MF の増加は非常に小さかった。4 Gy 照射群の *Pig-a* MF は、成熟群では変化が見られなかったが、幼若群では照射後 2 週、4 週目に、個体差は大きいものの大きな増加がみられた。28 日間連続照射群においては、いずれの照射群でも幼若群において連続する *Pig-a* MF の増加が認められ、それらは放射線照射量と正の相関を示し、28 日間の照射終了後、緩やかに正常状態への回復が見られた。成熟群においては、ほとんど変化が認められなかったが、20 mGy/22h/day の照射群において、照射終了後 6 週目に 1 個体のみ強い *Pig-a* MF の増加が認められた。

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

PIGRET 法では、ENU 単回投与後 1 週目で強い *Pig-a* MF の上昇が認められたが、従来の *Pig-a* アッセイではほとんど変化が認められなかった。投与後 2 週目において、*Pig-a* アッセイ及び PIGRET 法の両方で強い *Pig-a* MF の増加が認められたが、PIGRET 法ではより強く検出した。投与後 4 週目においても 2 週目と同様の遺伝毒性を検出した。*gpt* 変異体頻度は、*Pig-a* MF 同様、溶媒投与群と比較して共に同程度に上昇した。

D. 考察

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] この手法では、細胞をカウントしたり、小核が形成されるまで薬剤の濃度を上げる必要もないため、毒性が少ないとされるチミジンでも 310 nM で細胞周期の遅延を計測することができた。S 期の同調に用いられるアフディコリンは 250 nM で遅延が観測されたが、細胞周期を 1.5 倍に延長する濃度 (ECC1.5) に 24 時間曝しても小核の形成頻度の上昇は観察されず、小核誘発を適切に評価できることが示された。*phenol* については、*in vitro* 小核試験で、*capsaicin* については、Ames 試験で陽性との報告があるが、*in vivo* の試験ではいずれの化合物も陰性とされている。今回の結果はいずれも陰性で、*in vivo* の結果と一致していたことになる。

[山田] 今回得られた突然変異のスペクトラムが多様であったことから、ゲノム全体を調べれば菌株は 1 つでよいと考えられた。また、従来の方法と比較して必要なプレート数は 10 分の 1 になる計算であり、次世代シーケンサー自体

はまだ高価であるが、その他のコストはかなり削減できるものと考ええる。エームス試験で陰性とされているケミカルで処理して得られた復帰変異コロニーについてもゲノムの解析が必要と思われる。表現型によるセクション無しに得られたコロニーで、同様の試験が実施できることがわかった。

[須井] S9 mix 存在下で得られた結果から、用いる菌数を減らすという条件だけでは、改良法 FAT の感受性は向上しないことが示唆された。いずれの条件でも、本培養を行うことにより、黄変ウェル出現に必要な復帰変異菌が十分量得られることが示唆された。菌の生育に影響を及ぼし合う組み合わせが存在したことから、混合菌液の導入は FAT の感受性の向上にはつながらない。

[平田] 特異抗体を作製する際にはリコンビナントの発現蛋白を抗原とする方法が一般的であるが、今回全ペプチド配列から抗原決定基となり得る配列部位をアミノ酸の立体構造をもとに推測して合成し、力価および特異性の高い抗体を得ることができた。*umu* 試験ではシャペロンプラスミド pKJE7 を導入していない OY1002/1A2の方が高感度であった。S9mix を使用している Ames 試験の方が、CYP が発現している株で実施した *umu* 試験よりも感度が高かったことについては、化合物に対する酵素の感受性に種差があること等が挙げられる。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] ①F344 *gpt* delta ラットにおいて、ES の発がん標的臓器である肝臓では、高用量群において肝細胞の単細胞壊死、oval cell の浸潤及び核分裂像が高頻度に認められた。これらの変化は野生型 F344 ラットにおいても同様に認められ、遺伝子型間で差は認められなかった。ES 特異的 DNA 付加体は両遺伝子型の肝臓において低用量群から検出され、投与量依存的に増加したが、各付加体の生成量も両遺伝子型で一致したことから、ES の生体内分布や代謝活性化過程に遺伝子型間の差はないと考えられた。ES の突然変異誘発性には p38/Erk 経路の活性化を介した細胞増殖活性の亢進が寄与することが明らかになった。

②F344 *gpt* delta ラット及び野生型 F344 ラット各 50 例の病理組織学的検索を実施した。遺伝子型間における自然発生腫瘍スペクトラムの違いについて、さらなるデータの蓄積が必要と考

えられた。

[藤居] B[a]P による点突然変異は評価した全ての臓器で、小核は骨髓および末梢血で増加認められ、サンプリング時期を最終投与翌日としても検出力に問題はなく、B[a]P の遺伝毒性は本法で検出可能であると確認できた。突然変異試験に種々の試験の統合が可能であることが示唆された。骨髓など、毒性が強い場合に休薬することにより急激に細胞増殖が起こる組織や、ターンオーバーの早い組織においては、反復投与後のサンプリング時期は休薬期間を設けない方がむしろ検出力が高まることも考えられた。

[高木] 血液学および血液科学的検査結果において確認された有意なパラメーターの変動は、週齢等の相関性がないことから偶発的な変動であると判断した。病理組織学的検査では、*gpt delta* ラットにおいてそれぞれの背景系統に発生することが知られている所見が確認され、特徴を備えていることが示唆された。

[竹入] Pol κ は MMC および CDDP によって誘発される DNA 損傷を抑制する何らかの機能をもち、pol κ を不活性化させることでクロスリンク剤に対する感受性が増加したと考えられた。CDDP によって誘発された突然変異については変異スペクトラム解析を追加することで、より詳細な情報が得られると考えられる。

[増村] *gpt delta* マウス（雄）の肝臓および精巣における自然突然変異の特徴と加齢の影響を分析した。*gpt delta* マウスは、104 週齢時には加齢による変異蓄積とは異なる老化現象によって欠失変異が増加した可能性が考えられた。Pol κ KI マウスは自然突然変異のうち塩基置換突然変異に対してのみ高い感受性を示すことが示唆された。今回の結果から、肝臓において G:C 塩基対の塩基置換変異を誘発する DNA 損傷のエラーフリーな損傷乗り越えに Pol κ が関与しており、自然突然変異を抑制していることが示唆された。Pol κ KI マウスでは低用量の変異原の長期曝露の影響を高感度に検出できる可能性が示唆された。

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

○反復投与毒性試験への組み込みプロトコールの検討および単回投与試験との比較

従来の *Pig-a* アッセイよりも検出感度の高い PIGRET は、反復投与試験のように投与用量が低下する試験系においても CP 反復投与による *in*

vivo 突然変異誘発性を検出できることが示唆された。EMS による遺伝子突然変異誘発性を *Pig-a* アッセイで検出できることが確認され、*Pig-a* アッセイを一般毒性試験へ組み込むことで、被験物質の一般毒性に加えて、遺伝子突然変異誘発性についても検討することが可能であると考えられる。また、PIGRET アッセイは *Pig-a* アッセイに比べて、より早期に EMS による遺伝子突然変異誘発作用を検出できることが示された。*Pig-a* アッセイおよび PIGRET アッセイは、レポーター遺伝子を外部から導入したトランスジェニック動物を用いる試験と違って、高価な動物を使用する必要が無いこと、操作が簡便であること、反復投与毒性試験に組み込みが可能であること、および単回投与の 1 週間には判定が可能であること等の多くの利点を有しており、*In vivo* における遺伝子突然変異の検出試験として早期に確立されることが望まれる。*Pig-a* アッセイは PIGRET 法と比べ、変異体の蓄積が検出されるまでに時間を要すると考えられる。MDA のように代謝物が遺伝毒性を示す化合物の場合、単回投与で検出されにくいことがあるようだ。

○*Pig-a* アッセイによる放射線遺伝毒性評価

放射線照射によって生じる遺伝毒性を *Pig-a* アッセイにより評価が可能であることが明らかになった。低線量および中線量長期間照射群の幼若群においては、照射日数に相関して *Pig-a* MF の上昇が見られた。これは、本アッセイが遺伝毒性の蓄積性も含めて評価可能であることを反映したものと考えられる。

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

ラットにおいてもマウスと同様に *Pig-a* および *gpt* 変異体頻度はよく相関性を示すことが明らかになった。

E. 結論

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] 核・染色体を可視化した m5S 細胞を用いて細胞分裂を継続的に観察することで、変異原物質による小核の形成過程、並びに、その後を細胞系譜上で追跡することができた。さらに、各薬剤について、細胞周期を 1.5 倍に遅延する濃度 (ECC_{1.5}) を指標にすれば、小核形成頻度の比較が可能で、 μ M 以下の濃度で薬剤の効果も評価できる。細胞周期を進行させながら、薬剤を 1 細胞周期分暴露させる手法は、*in vivo* の条件をよく反映していた。

[山田] Ames 試験で得られた復帰変異コロニ

一の全ゲノム配列を次世代 DNA シークエンサーで解析し、1 菌株でも 5 菌株で得られていた以上のハザード情報を得られ、試験管やプレートなどのコストが大幅に節約できた。さらに、被験物質で処理した細菌を表現型によるセレクション無しに得たコロニーから調製したゲノム DNA でも同様の結果が得られた。

[須井] FAT (S9 mix 存在下) で陽性反応が最も強く認められる菌数は化合物により異なること、本培養を行うことにより誘発される復帰変異ウェル数が増加することが示唆された。従来の 1/10 の菌数を用いて処理を行った後、続けて本培養を行うことにより、FAT の感受性の向上が認められた。

[平田] 力価の高い特異的な抗体が作製できたので、キットに用いる菌株の最適な培養条件を迅速に決定することが可能になる。*umu* 試験菌株として、ヒト型薬物代謝酵素を発現する株を使用することで種差を反映した試験結果を得ることができた。このような微生物を用いる遺伝毒性試験によって実験動物の削減に寄与できると考えられる。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立と *Pig-a* アッセイの統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

[石井] F344 *gpt* delta Tg ラットと野生型 F344 ラットの ES への反応性は生物学的に同等と考えられた。*gpt* delta Tg ラットを用いた一般毒性・遺伝毒性統合試験系は、遺伝毒性メカニズムに関する情報が得られる有用な遺伝毒性試験系であると考えられた。

[藤居] F344 系統 *gpt* delta Tg ラットを用いた突然変異試験における臓器サンプリング時期は、最終投与翌日でも問題がないことが示唆され、Tg 動物を用いる突然変異試験に他の指標を統合する際に有用な知見と考えられた。サンプリング時期により小核試験の結果に差異が見られたことから、統合法におけるサンプリング日の設定には留意すべきと考えられた。本統合法を用いて、B[a]P による突然変異と小核誘発がいずれも検出可能であることが確認された。

[高木] 6 カ月飼育し各種検査を実施した結果、Slc:WistarHannover/Rcc-Tg(*gpt* delta) ラットは元の系統である Wistar Hannover 系ラットと同様な背景データを有する動物として、統合型毒性試験系として有用なモデル動物であることが示唆された。さらに、SD-Tg(*gpt* delta) と同

様な背景データを有する動物であり、統合型毒性試験系として有用なモデル動物であることが明らかになった。

[竹入] Pol κ を不活性化したマウスは、既知変異原物質の中でクロスリンク剤である MMC、CDDP に対して高感受性を示すことが示され、*in vivo* 遺伝毒性評価系としての可能性が示唆された。

[増村] マウスにおける自然突然変異の蓄積には臓器特異性があり、加齢の影響は点突然変異と欠失変異で異なる。Pol κ KI マウスは自然突然変異の中でも塩基置換変異について高感受性であることが示された。

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

Pig-a アッセイは、他の毒性試験（単回投与毒性試験、反復投与毒性試験）の中で *in vivo* 突然変異誘発性を同時に評価できる試験系として活用できる可能性が示唆された。幼若赤血球を用いる PIGRET アッセイは *Pig-a* アッセイよりも短期間かつ高感度に遺伝毒性リスクを評価できた。したがって、単回投与に PIGRET アッセイを組み込んだ場合、短期に結果が出る遺伝子突然変異試験としての有用性が考えられる。加えて、*Pig-a* アッセイは化学物質のみならず、放射線照射によって生じる遺伝毒性が評価可能であることも示唆された。また、*gpt*-delta Tg ラットを用いて Tg 変異試験と *Pig-a* アッセイの組み合わせ試験では、投与後 4 週目に採取した骨髓について、*gpt* アッセイと *Pig-a* アッセイでは同等に強い遺伝毒性が検出できた。*gpt*-delta Tg ラットにおいても PIGRET アッセイの方がより早期に、そしてより高感度に遺伝毒性を検出することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Kuroda, D. Hibi, Y. Ishii, S. Takasu, A. Kijima, K. Matsushita, K. Masumura, M. Watanabe, Y. Sugita-Konishi, H. Sakai, T. Yanai, T. Nohmi, K. Ogawa, T. Umemura, Ochratoxin A induces DNA double-strand breaks and large deletion mutations in the carcinogenic target site of *gpt* delta rats, *Mutagenesis*, 29, 27-36 (2014)
- 2) T. Kimoto, K. Horibata, S. Chikura, K. Hashimoto, S. Itoh, H. Sanada, S. Muto,

- Y. Uno, M. Yamada, M. Honma, Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody, *Mutation Research*, 755(2), 126-34 (2013)
- 3) K. Horibata, A. Ukai, T. Kimoto, T. Suzuki, N. Kamoshita, K. Masumura, T. Nohmi, M. Honma, Evaluation of *in vivo* genotoxicity induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, benzo[*a*]pyrene, and 4-nitroquinoline-1-oxide in the *Pig-a* and *gpt* assays, *Environ Mol Mutagen*, 54, 747-754 (2013)
 - 4) Y. Kawamura, H. Hayashi, Y. Kurata, K. Hiratsuka, K. Masumura, T. Nohmi. Evaluation of the genotoxicity of tamoxifen in the liver and kidney of F344 *gpt* delta transgenic rat in 3-week and 13-week repeated dose studies, *Toxicology*, 312, 56-62 (2013)
 - 5) T. Matsuda, M. Takamune, M. Yamada, A pilot study for the mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, *Genes & Environ.*, 35, 53-56 (2013)
 - 6) T. Nohmi, M. Yamada, K. Masumura, *In vivo* approaches to identify mutations and in vitro research to reveal underlying mechanisms of genotoxic thresholds, *Genes and Environment*, 34, 146-152 (2012)
 - 7) T. Kimoto, S. Chikura, K. Suzuki-Okada, X. Kobayashi, Y. Itano, D. Miura, Y. Kasahara, Effective use of the *Pig-a* gene mutation assay for mutagenicity screening: measuring CD59-deficient red blood cells in rats treated with genotoxic chemicals, *J. Toxicol. Sci.* 37, 943-955 (2012)
- ## 2. 学会発表
- 1) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, A one-year feeding study for WistarHannover *gpt* delta transgenic rat, SOT 53rd Annual Meeting, USA (2014.3)
 - 2) 石井雄二, 高須伸二, 黒田顕, 横尾諭, 木島綾希, 能美健彦, 小川久美子, 梅村隆志, 肝発がん物質エストラゴールが引き起こす細胞増殖活性の亢進と突然変異誘発性への寄与, 第30回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 徳島(2014. 1)
 - 3) 川喜多愛, 村田香織, 杉本憲治, 細胞周期遅延を指標にした細胞毒性評価と小核試験への応用, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
 - 4) 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代DNAシーケンサーを用いた、表現型によらない変異原性試験の開発, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山(2013.11)
 - 5) 堀端克良, 鶴飼明子, 木本崇文, 鴨下渚, 本間正充, ラットを用いた*Pig-a*アッセイとトランスジェニック突然変異試験の組合せに関する研究, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
 - 6) 増村健一, 豊田尚美, 榎藤洋一, 能美健彦, 本間正充, *gpt* deltaマウスを用いたENU誘発突然変異と全エクソンシーケンスによる経世代変異の検出, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
 - 7) 堀妃佐子, 田中康浩, 増村健一, 山田雅巳, 藤居互, F344系*gpt* deltaラットを用いた突然変異試験と小核試験(末梢血, 骨髓, 肝臓, 大腸)の統合法の検討, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
 - 8) 本山茂記, 竹入章, 松尾沙織里, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Grúz P, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, MitomycinCによるDNA二本鎖切断誘発に対するDNA polymerase kappaの*in vivo*における役割, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013.11)
 - 9) 堀端克良, 第6回IWGT報告および共同研究進捗報告:*Pig-a*アッセイ, MMS研究会第63回定例会, 岡山 (2013.11)
 - 10) 増村健一, 第6回IWGT報告および共同研究進捗報告:生殖細胞に影響を及ぼす変異原の同定, MMS研究会第63回定例会, 岡山 (2013.11)
 - 11) K. Horibata, S. Ishikawa, A. Ukai, A. Sugano, M. Honma, Establishment of human *Pig-a* assay and application to genotoxicity monitoring of cancer chemotherapeutic patients, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)
 - 12) K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, N. Osugi, Y. Ishii, T. Umemura, H. Takagi, A. Nishikawa, T. Nohmi, M. Honma, Spontaneous point mutations and deletions increased

with aging in *gpt* delta transgenic mice and rats, 11th International Conference on Environmental Mutagens, Brazil (2013.11)

- 13) 増村健一, 豊田尚美, 石井雄二, 梅村隆志, 能美健彦, 西川秋佳, 本間正充, *gpt* delta ラット肝臓における自然突然変異および加齢に伴う変異蓄積の検討, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜 (2013.10)
- 14) K. Masumura, Aging and accumulation of gene mutations: Identification of spontaneous mutations in the tissues of *gpt* delta transgenic mice, National Cancer Forum 2013, Thailand (2013.8)
- 15) 堀端克良, 共同研究報告II:*Pig-a*, MMS研究会第62回定例会, 諏訪 (2013.5)
- 16) H. Takagi, Y. Nozaki, A. Kawada, M. Yamada, K. Masumura, T. Nohmi, A six months feeding study for WistarHannover *gpt* delta transgenic rat, SOT 52nd Annual Meeting, USA (2013.3)
- 17) 須井哉, 川上久美子, 根岸沙記, 山田雅巳, ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験法の検討8. 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 18) 山田雅巳, 高宗万希子, 松田知成, 次世代DNAシーケンサーを用いた変異原性試験の開発ー変異スペクトラムの特徴ー, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 19) 松田知成, 松田陽子, 高宗万希子, 山田雅巳, 次世代DNAシーケンサーを用いた変異原性試験の開発ーパイロット試験ー, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 20) 本山茂記, 竹入 章, 和田直子, 寺社下浩一, 三島雅之, 新見直子, Petr Grúz, 増村健一, 山田雅巳, 能美健彦, ベンゾ[a]ピレンの損傷乗り越え DNA 複製におけるDNA polymerase κ の役割, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 21) 高木久宜, 野崎祐次, 河田昭彦, 山田雅巳, 増村健一, 能美健彦, *gpt* delta ラットの13週間飼育試験, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 22) 堀妃佐子, 下吉里実, 高柳智美, 増村健一, 山田雅巳, 藤居 互, F344 系統 *gpt* delta ラットを用いた突然変異試験と小核試験(末梢血, 骨髓, 肝臓, 大腸)の統合法の検討, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 23) 増村健一, 大杉直弘, 豊田尚美, 石井雄二,

梅村隆志, 高木久宜, 西川秋佳, 本間正充, 能美健彦, *gpt* delta マウスおよびラットを用いた自然突然変異および誘発突然変異の解析, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)

- 24) 石井雄二, 高須伸二, 松下幸平, 黒田 顕, 能美健彦, 小川久美子, 梅村隆志, 肝発がん物質エストラゴールの特異的DNA付加体定量解析ならびに遺伝子突然変異誘発性, 日本環境変異原学会第41回大会, 静岡 (2012.11)
- 25) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Spontaneous point mutations and deletions induced in liver and testis of aged *gpt* delta transgenic mice, The 3rd Asian Conference on Environmental Mutagens, China (2012.10)
- 26) K. Matsushita, Y. Ishii, S. Takasu, M. Jin, K. Kuroda, T. Nohmi, A. Nishikawa, K. Ogawa, T. Umemura, Spontaneous tumor spectra in male and female *gpt* delta rats on an F344 background. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌 (2012.09)
- 27) K. Masumura, N. Osugi, N. Toyoda-Hokaiwado, T. Nohmi, Characteristics of point mutations and deletions accumulated with aging of *gpt* delta transgenic mice, The 42nd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Poland (2012.9)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

以下の案件名(案)で特許申請中
(2013/1/24 公開)である。

「磁気ビーズ濃縮法を利用した *Pig-a* 変異網状赤血球の測定法」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ヒト iPS 細胞由来機能細胞を利用した新規薬効評価系の構築

独立行政法人医薬基盤研究所
幹細胞制御プロジェクト
川端 健二
平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

ヒト iPS 細胞からマスト細胞や膵β細胞等の機能細胞を効率良く分化誘導できる技術を構築し、新規抗アレルギー薬や新規糖尿病薬を開発するための創薬基盤技術となり得ることを明らかにした。また、iPS 細胞から分化させた細胞の機能改善に関する基礎的知見を得た。

研究組織
(1)独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト 川端健二
(2)大阪大学大学院薬学研究科 水口裕之
(3)(株)リプロセル 木藤古孝行、浅井康行

A. 研究目的

近年、アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー性疾患の患者数は益々増加しており、社会問題となっている。アレルギー反応の主役はマスト細胞であり、抗アレルギー薬を新規に開発あるいは評価するには in vitro でマスト細胞を培養することが重要となるが、マスト細胞は in vivo では組織中に浸潤しているため、生体からマスト細胞を取り出し、培養することは非常に困難である。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導し、抗アレルギー薬評価系へ応用することを目指した。これまでにヒト iPS 細胞から膵β細胞への分化誘導研究は多くなされているが、いまだに in vitro 分化誘導系において、ヒト膵β細胞と同程度のグルコース応答能を有したヒト iPS 細胞由来膵β細胞は作製できていない。そこで、4 株のヒト ES 細胞ならびに 4 株のヒト iPS 細胞を膵分化させ、各細胞における膵関連遺伝子 (Insulin や PDX1 など) の遺伝子発現を解析した。さらに、iPS 細胞から分化誘導した細胞の機能を改善する技術についても検討した。

B. 研究方法

本研究は、研究代表者川端、分担研究者水口、木藤古の計 3 名で実施した。主にマウスあるいはヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法の確立ならびにマスト細胞への分化誘導法の開発、

ヒト iPS 細胞から膵β細胞分化誘導法の開発、ヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質管理研究、を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

C-1. マウス iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立

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

C-2. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞および成熟マスト細胞への分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞から血液・免疫細胞を得るには、まず、血液前駆細胞を分化誘導する必要がある。VEGF 存在下でヒト iPS 細胞と放射線照射した OP9 細胞あるいは C3H10T1/2 細胞 (支持細胞) とを共培養することで血液前駆細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞株 201B7 を C3H10T1/2 細胞と共培養した結果、共培養 15 日目頃からヒト iPS 細胞由来のコロニーが隆起してできた嚢状構造の内部に血球様の球状細胞が出現してくる事が観察

され、フローサイトメトリー解析により、これらの細胞は血液前駆細胞のマーカーである CD34 や CD43 を発現する血液前駆細胞であることが確認された。得られた血液前駆細胞をセルソーターにて分離後、IL-6 および SCF 含有メチルセルロース培地にて6週間培養することによりコロニーが得られ、RT-PCR 法にて詳細な解析を行った結果、FcεRI、c-kit、マスト細胞特異的酵素であるカルボキシペプチダーゼ等の発現が観察された。さらなる成熟化を目指し、得られたコロニーを回収後、IL-6 および SCF 含有培地でさらに培養した結果、マスト細胞特異的酵素であるトリプターゼを発現する細胞が得られた。

C-3. iPS 細胞由来成熟マスト細胞の機能評価

iPS 細胞由来マスト細胞では従来の骨髓由来マスト細胞 (BMMC) と比較し、トリプターゼおよびカルボキシペプチダーゼ A 活性の増加が観察された。また、compound48/80 およびサブスタンス P に対する脱顆粒能を検討した結果、iPS 細胞由来マスト細胞では、いずれも高い脱顆粒応答性を示した。さらに、iPS 細胞由来マスト細胞は Swiss3T3 細胞と共培養することによりさらに成熟化が促進されることが示された。

C-4. iPS 細胞由来成熟マスト細胞の大量培養法の開発に向けた基礎的検討

マスト細胞は、自己複製能を有し、SCF の受容体である c-kit を発現するなど、造血幹細胞と類似した特徴を有することから、造血幹細胞の分化や維持に重要な因子を中心に OP9 細胞と Swiss 3T3 細胞が共通に発現する液性因子について検討した。その結果、SCF、Ang-1 等を共通に発現することが明らかとなった。また、Wnt リガンドに関して詳細な検討を行った結果、Swiss 3T3 細胞と OP9 細胞は Wnt5a などの種々の Wnt リガンドを共通に発現することが示された。次に、iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化を Wnt シグナルが促進するか否かについて検討した。骨髓由来マスト細胞を用いた予備検討の結果、Wnt5a が骨髓由来マスト細胞の成熟化を促進することが示されていた。そこで、iPS 細胞由来マスト細胞を SCF、IL-3、Wnt5a 存在下で 20 日間培養後、マスト細胞特異的酵素活性や HDC mRNA 量を検討することによりマスト細胞の成熟度を評価した。その結果、マスト細胞特異的酵素活性の上昇が観察された。また、HDC mRNA 量が増加していたことから、Wnt5a は iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化を促進するこ

とが示された。

C-4. ヒト ES/iPS 細胞から膵 β 細胞様細胞への分化誘導方法

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

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

膵分化能の高いヒト ES/iPS 細胞株を選択するために、本研究では 4 種類のヒト ES 細胞株 (H9、KhES1、KhES3、KhES4) および 4 種類のヒト iPS 細胞株 (Tic、Toe、201B6、201B7) から膵分化を上記のプロトコールにしたがって行った。その結果、ヒト ES 細胞である KhES4 から分化誘導した細胞における *PDX1* および *Insulin* 遺伝子の発現が他の 3 株のヒト ES 細胞 (H9、KhES1、KhES3) よりも最も高かった。ヒト iPS 細胞においては、Toe 由来膵 β 細胞様細胞の *PDX1* および *Insulin* 遺伝子の発現が最も高かった。また、これらの細胞はグルコース濃度に応じた c-peptide の放出がみとめられ、優れたグルコース応答能を有していることが示された。以上の結果から、ヒト ES 細胞 KhES4 およびヒト iPS 細胞 Toe は高い膵分化指向性を有することが示された。

C-6. 低分子化合物 (ILV, PMA) を作用させることによるヒト ES/iPS 細胞から膵 β 細胞様細胞への分化促進

ヒト ES/iPS 細胞は内胚葉、膵前駆細胞、膵内分泌前駆細胞を介して膵 β 細胞様細胞へと分化することが知られている。これまでに indolactam V (ILV) を分化誘導 9 日目のヒト ES 細胞に作用させると、PDX1 陽性細胞の割合が約 2.5 % から約 26.9 % に向上することが報告されている (Nat Chem Biol. 2009 Apr;5(4):258-65)。そこで、ILV を用いた膵 β 細胞様細胞への分化誘導プロトコールの改良を行うために、Tic あるいは K4 由来膵前駆細胞に ILV と他の低分子化合物や液性因子を組み合わせて作用させ、膵 β 細胞への分化をさらに促進できるか調べた。その結果、ILV および PMA を用いて作製した Tic 由来 β 細胞において PDX

と insulin (INS) の遺伝子発現が有意に上昇していた。同様の結果がヒト ES 細胞である K4 でも確認された。また、ILV と PMA を膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞の段階で作用させたのち 25 日目まで培養した K4 および Tic 由来膵 β 様細胞をフローサイトメトリーにより C-peptide 陽性細胞の割合を評価した。その結果、ILV および PMA を用いて分化誘導を行うことによって、K4 由来膵 β 様細胞の C-peptide 陽性細胞の割合が 13.2 % から 19.5 % へと有意に上昇した。Tic 由来膵 β 様細胞においても ILV と PMA を作用させて培養することで C-peptide 陽性細胞の割合は 9.4 % から 10.9 % へと上昇した。ELISA 法を用いて、作製した膵 β 様細胞がグルコースに応答して C-peptide を放出できるかどうかを調べたところ、ILV および PMA を作用させて分化誘導した膵 β 様細胞において、high glucose 存在下での C-peptide 放出量は大きく増加した。ILV および PMA を作用させることによって、Tic 由来膵 β 様細胞では C-peptide 放出量比 (high glucose 存在下/low glucose 存在下) は 1.5 倍から 1.8 倍へと増加した。K4 由来膵 β 様細胞では ILV および PMA を作用させることによって、C-peptide 放出量比は 1.5 倍から 1.9 倍へと増加した。これらのことから、ILV と PMA は膵 β 様細胞への分化効率を高めるだけでなく、膵 β 様細胞の機能を向上させることが示された。

C-4. CM-mFLC を用いて培養することによるヒト ES/iPS 細胞から膵 β 様細胞への分化促進

ヒト ES/iPS 由来膵前駆細胞に ILV と PMA を作用させることで膵 β 様細胞への分化が促進されることが明らかになった。しかし、作製したヒト ES/iPS 由来膵 β 様細胞は生体内の膵 β 細胞と比較してグルコース応答 C-peptide 産生能などの機能が低かった。そのため、ヒト ES/iPS 細胞から作製した膵 β 様細胞のさらなる機能向上を目指した。マウス胎児膵臓は豊富に血液細胞を含んでおり、膵発生において血液細胞が重要な役割を果たす可能性が示唆されている (Diabetes. 2004 Aug;53(8):2143-52.)。そこで、マウス胎児肝臓細胞の培養上清 (conditional medium of mouse fetal liver cells ; CM-mFLC) を用いて、ヒト ES/iPS 細胞から高機能な膵 β 細胞を作製することを目指した。K4 あるいは Tic から分化誘導した膵 β 様細胞において、膵関連遺伝子の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、CM-mFLC を用いて分化誘導した K4 由来膵 β 様細胞において、膵 β 細胞のマーカーである INS、PDX、MafA、内分泌細胞のマーカーである NGN3

や NEUROD1 の遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に高かった。また、同様に Tic 由来膵 β 様細胞においても、膵関連遺伝子の発現量が上昇した。したがって、CM-mFLC は膵 β 様細胞への分化を促進できることが示唆された。

C-6. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の品質管理

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を浮遊培養にて立体的な細胞塊を形成させた後に測定容器へ播種し、細胞外電位の測定を実施したが、単層培養状態よりも検出率が 20% から 80% へと改善した。iPS 細胞由来神経細胞は細胞塊を形成させることによりその機能が改善することが示された。

D. 考察

マウスおよびヒト iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導法を確立した。また、C3H10T1/2 細胞との共培養法あるいは EB 形成法により、ヒト iPS 細胞から血液コロニー形成能を有する血液前駆細胞を分化誘導することが出来た。これまで行われてきたマスト細胞に関する研究の多くは、BMMC を用いたものである。しかし、BMMC はサフラニン O 染色に対して陰性であり、compound48/80 あるいはサブスタンス P に対して脱顆粒応答性を有していないこと、顆粒蓄積量やプロテアーゼ活性が低いことから、未熟なマスト細胞と考えられている。それに対し、本手法によって分化誘導した iPS 細胞由来マスト細胞は、サフラニン O 染色に対して陽性であり、プロテアーゼ活性が BMMC と比較し有意に高く、compound48/80 あるいはサブスタンス P に対して脱顆粒応答性を有していた。以上の結果から、iPS 細胞から機能的なマスト細胞を分化誘導可能であることが示され、新規抗アレルギー薬を探索するのに有用であることが示唆された。分化誘導の再現性・安定性の向上を目指し、OP9 細胞や Swiss 3T3 線維芽細胞が共通に産生する因子を同定することを試みた。マウス iPS 細胞から成熟度の高いマスト細胞を得るには Wnt5a が有用な因子であることを本研究により示しており、ヒト iPS 細胞からマスト細胞を分化誘導する際にも Wnt5a が有用である可能性がある。したがって、Wnt5a を用いたより簡便で安定した、ヒト iPS 細胞から成熟マスト細胞への分化誘導法の確立が期待される。

膵分化能の高いヒト ES/iPS 細胞を探索した結果、ヒト ES 細胞 KhES4 およびヒト iPS 細胞 Toe は高い膵分化能を示した。ヒト ES/iPS 細胞株によって、異なる膵分化能を有する理由として、各細胞におけるエピジェネティックな状態が異なることが考えられる。また、本研究で用いた種々

のヒト ES/iPS 細胞の継代数は株によって異なるため、継代数による影響もあると予想される。今後は、膵分化を促進する因子を探索するにあたって、膵分化能の高い KhES4 株あるいは Toe 株を用いて検討を行う必要があるだろう。高機能な膵β様細胞を作製するために、膵β様細胞への分化を促進できる低分子化合物の検討をおこなったが、ILV と PMA を組み合わせることで分化を促進できることを見出した。ILV および PMA はいずれも PKC シグナルを活性化することが知られているため、より強力に PKC シグナルを制御できるような操作を加えることで、膵β様細胞へのさらなる分化促進が期待できる。また、ヒト ES/iPS 由来膵β様細胞のグルコース応答インスリン産生能の向上を目指し、マウス胎児肝臓細胞の培養上清 (CM-mFLC) を用いてヒト ES/iPS 細胞から高機能な膵β様細胞への分化促進を試みた。その結果、CM-mFLC を用いてヒト ES/iPS 由来膵内分泌前駆細胞を培養することで膵β様細胞への分化が促進されることが示唆された。今後は高機能な膵β様細胞への分化を促進させる因子を特定することで、膵β細胞への分化メカニズムの解明だけでなく、移植可能な高機能な膵β様細胞の作製に繋がり、再生医療に貢献できることが期待される。分化誘導技術が十分に改善されたのち、膵β様細胞を大量に調整するための技術も開発したい。

神経細胞機能の指標の一つである細胞外電位の測定方法として、浮遊培養にて立体的な細胞塊を形成させた後に測定容器へ播種し、細胞外電位を測定した。その結果、単層培養状態よりも検出率が 20% から 80% へと改善した。これは細胞同士が立体的な構造をとることで細胞間の相互作用が変化し、細胞そのものの機能が改善したと考えられる。したがって iPS 細胞由来神経細胞は細胞塊を形成させることによりその機能が改善することが示唆され、他の iPS 由来機能細胞についての応用が期待される。

E. 結論

- 1) マウスおよびヒト iPS 細胞を支持 (フィーダー) 細胞と共培養することにより、マスト細胞が得られた。
- 2) 得られたマスト細胞は刺激物質に対し、従来の骨髄由来マスト細胞と比較しより高い脱顆粒応答能を示し、より成熟度の高いマスト細胞であることが明らかとなった。
- 3) Swiss 3T3 線維芽細胞や SCF は、iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化および増殖を支持することが示された。

- 4) Wnt5a を作用させることで、マウス iPS 細胞由来マスト細胞の成熟化が促進された。
- 5) ヒト ES 細胞 KhES4 およびヒト iPS 細胞 Toe は高い膵分化能を有していた。これらの株を用いて、グルコース応答能の高い膵β細胞が作出できることが示唆された。
- 6) 低分子化合物 ILV、PMA を用いることで膵β様細胞への分化が促進された。また、CM-mFLC を用いて培養することによっても、膵β様細胞への分化が促進された。しかしながら、ヒト膵β細胞よりも機能面で依然として劣っているため、今後も継続してグルコース応答能の高い膵β細胞の作出するための技術開発が必須であると考えられる。
- 7) iPS 細胞由来神経細胞は細胞塊を形成することでその機能が改善する可能性が示唆された。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., Kawabata K. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)
2. Taura A., Furuta K., Yamaguchi T., Kawabata K., Tanaka S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfil and Gfilb, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, in press
3. 山口朋子、川端健二、iPS 細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、*Biophilia 電子版*、2、21-25 (2013)

F-2. 学会発表

1. 平林玲子、山口朋子、田代克久、池田由美、水口裕之、川端健二：メチルセルロース法を用いたヒト ES/iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導；日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
2. 山口朋子、田代克久、池田由美、田中智之、水口裕之、川端健二：Wnt シグナルによるマスト細胞の成熟化；日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
3. 黒木亮、高山和雄、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之：膵臓-血液間相互ネットワーク

ークを利用したヒト iPS 細胞から脾 β 様細胞の作製；日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日

4. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata. Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling: 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日
5. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata. Maturation of mast cells by Wnt family proteins., 15th International Congress of Immunology, Milan, August, 2013
6. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二：マウス iPS 細胞から成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発；日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
7. 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二：マスト細胞の成熟化に関する新規液性因子の同定；第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
8. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata. Characterization of mast cells generated by differentiation from mouse induced pluripotent stem cells., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

川端健二、山口朋子（発明人）；成熟マスト細胞の作製方法及び得られた成熟マスト細胞；特願 2013-103582

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

国立感染症研究所 インフルエンザウイルス研究センター

浅沼秀樹

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨

臨床分離インフルエンザ株をフェレットに感染させた抗血清を用いて抗原性試験を行った結果、レファランスと類似抗原であるにも関わらず、感染株によって抗原性の認識が異なった。適切なワクチン種株の選択の難しさと選定法確立の重要性が示唆された。

研究組織

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

基準を、フェレットに対するウイルスの免疫原性を基盤に構築を試みた。

B. 研究方法

研究協力者の許斐(高橋医院)の協力により、患者検体からウイルスを分離した。なお、ヒト材料の取り扱いに関しては、国立感染症研究所倫理委員会の承認を受け、個人情報の取り扱いに十分に配慮し行われた。

分離株は各種試験によって性状が解析されたのち、マウスおよびフェレットの感染に用いた。

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

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

A. 研究目的

近年、インフルエンザワクチン作製用に準備される高増殖性のワクチン用種株が、発育鶏卵を介することで、鶏卵での増殖に適する変化をし、抗原性が野外株と大きく変わることが指摘されている。そのため、現行の発育鶏卵に代わる抗原性を変化させない細胞培養系を用いたワクチン製造が期待されている。しかし、季節性インフルエンザワクチンを培養細胞で製造する場合の検定基準等の詳細はいまだに確立されていないため、科学的根拠に基づく新たな株の選択基準が必要となる。そのため本研究では、細胞培養インフルエンザワクチンの株選定

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。

採取された鼻腔洗浄液等のウイルス価の測定にはプラークアッセイ法を用いた。また抗体価の測定は ELISA 法を行った。

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 例のうち、H3 型は 100 例であった。そのうち 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。各株の継代毎の HA 価を測定したが、変動はほとんど認められなかった。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

このうち 6 株を選択し、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。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。続いてアミノ酸配列の解析および抗原性試験を行った結果、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。しかしリファランス株に

対する抗血清を用いて抗原性を検討した結果では、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 との相違は認められなかった。そのため、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。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) 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

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。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。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。

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、H3N2 亜型 48 株を継代し、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。これは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が、抗体応答に差異は認められなかった。

このような結果を踏まえ、フェレットに分離株を感染させ、抗血清を獲得し、継代株の抗原性さらには他のシーズンも含め、野外株の抗原性解析を行った。今回フェレット感染に用いた6株はリファランス株と抗原性が類似していた。これらの感染株に対する抗血清で継代株の抗原性解析を行った結果、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、リファレ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。

E. 結 論

今回の結果から、分離株の抗血清を用いた抗原性解析の情報をワクチン選定に加味することで、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。

F. 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 真人 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

野外株より細胞培養インフルエンザワクチンの種候補株を選定する基準の検討

浅沼 秀樹、相内 章、佐藤 佳代子、許斐 奈美、岸田 典子、長谷川 秀樹、山本 典生、田代 真人 第 16 回 日本ワクチン学会学術集会、2012 年 11 月、横浜

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 真人、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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当

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

穂山 浩

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 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では、ヒト単球細胞株 THP-1 を用いた抗原感作性の評価系を確立した。自主管理可能な分析法の開発では、ICP-MS によるアレルギー誘因性金属の分析法の開発や qNMR による絶対定量法の適用及びライブラリー化等を行った。

研究組織

- | | |
|--------------------------|-------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 穂山浩 |
| (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 | 坂口齊 |
| (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(穂山、五十嵐、杉本)と、品質が高い原材料及び高性能な機器の供給ができる化粧品・食品・試薬・機器の企業の研究者(坂口、中川、末松、小池、山田)と、先端的な研究手法の開発が可能な大学の研究者(戸井田、戸塚、森山)からなり、共同研究の形で効率的な研究の遂行をめざしている。

B. 研究方法

[1] 香粧品原材料及び添加物の規格試験法の開発 コチニール色素中夾雑タンパク質の定量 コチニール虫体由来のタンパクを粗抽出し、30 kD 以上の分画を精製した。そのタンパク質分画をウサギに免疫しポリクローナル抗体を作成した。その抗体を用いて化学発光検出の ELISA を構築した。香粧品原材料中のアレルギー性金属の分析手法の確立 香粧品原料の不純物として、重金属は個別定量され

ておらず、アレルギー性を有する金属については基準そのものがない。規格設定のための試験法の開発および実態把握のため、各種色素および鉱物原料について、酸を加えてマイクロウェーブ処理による溶液化し、ICP-MSで分析した。カルミン酸とタンパク質の結合性 BSA と反応後のカルミン酸の定量は紫外可視分光光度計を用い、530 nm の吸光度を測定した。吸収スペクトルによる等級収点の解析、等温滴定型熱量計を用いた熱力学的解析による結合機序の解析、蛍光測定による結合機序の解析を行った。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 香粧品原材料や添加物中に含まれることが多い食品素材タンパク質や植物汎アレルギー (PR-10、ソーマチンライクプロテイン (PR-5)、プロフィリン) を精製または発現させ、ウサギ及びマウスのポリクローナル抗体及びマウスモノクローナル抗体、ファージ抗体等を作製した。抗血清を精製し、ウェスタンブロットでの反応性の確認やサンドイッチ及び直接 ELISA の構築を行った。香粧品原材料及び添加物の定量分析法の開発 市販されているヒアルロン酸及びアセチル化ヒアルロン酸含有化粧品(化粧水・乳液) 12 種についてヒアルロン酸およびアセチルヒアルロン酸の含有量を調べた。アセチルヒアルロン酸については新たに脱アセチル化して分析するための前処理法を考案し、ヒアルロン酸分解酵素による処理と組み合わせたポストカラム HPLC 法を検討した。また化粧品に含まれるヒアルロン酸・アセチルヒアルロン酸の分子量を測定し、それぞれについてマウス脾臓細胞によるサイトカイン産生に対するこれら多糖の影響を解析した。

[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ーの構築 香粧品原材料及び添加物 (約 300 品目) の qNMR スペクトルを測定しライブラリ化した。さらに qNMR スペクトル検索システムのプロトタイプを作成し、化合物検索が可能であることを確認した後、Web アプリケーションとして公開するためにプログラミングを行った。

[III] 香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発 培養細胞を用いた香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の確立 THP-1 を PMA および IL-4 存在下で 4 日間培養し、樹

状突起を有した CD11c および DC-SIGN 陽性の樹状細胞様 (TDDC) に分化させた。抗原提示分子 HLA-DR、および補助刺激分子 CD80/86 の発現上昇により抗原提示能を有することを確認した。THP-1 分化誘導後、DNP-BSA、TNP-BSA、および BSA を添加し 3 日間培養後、フローサイトメトリーおよびリアルタイム PCR 法にて HLA-DR および CD80/86 の発現量を測定した。培養上清を回収し、ELISA 法により IL-8 産生量の挙動を調べた。さらに飲食料品や化粧品に含まれ、アレルギー性が問題視されている赤色着色料コチニールについても検討した。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 マウス由来 CD4⁺T 細胞をモデルとして用い、抗 CD3 および抗 CD28 抗体を用いて T 細胞レセプターに対する刺激を加えることで機能分化を誘導する実験系の構築を行い、大豆イソフラボンのひとつであるダイゼインの影響を検討した。市販のヒト末梢血由来 CD4⁺T 細胞を用いて同様の方法で刺激を加え、大豆イソフラボンの影響を検討した。PLNA 法による香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発 コチニール色素及びカルミンについて、マウス Popliteal Lymph Node Assay (PLNA) 法による感作性評価が可能であるか試験した。被検物質を生理食塩水に溶解または懸濁し、後足に 1 回または 2 回皮下注射した後、膝窩リンパ節 (PLN) 細胞数の増加率を求めた。さらに、血清非特異的 IgE 量を ELISA 法により測定した。また、卵白アルブミン (OVA) を用いて、共存物質の感作性に与える影響を検討した。

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

(倫理面への配慮) 動物実験は国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会規定及び東京大学農学研究科倫理委員会の規定に従って行った。

C. 研究結果及び考察

[1] 香粧品原材料及び添加物の規格試験法の開発

コチニール色素中夾雑タンパク質の定量

確立した方法は化学発光検出により色素に影響されことなく定量可能で、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。定量下限は 400-800 pg/mL、検出限界は 50-100 pg/mL であった。

カルミン酸とタンパク質の結合性の評価

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。またカルミン酸と 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。熱力学的解析では、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している可能性が示された。

香粧品原材料中のアレルギー性金属の分析手法の確立

アルミニウムレーキ色素としてのカルミン中のアレルギー性金属は定量限界以下であった。鉱物原料では分解液にフッ酸を混和することが必須であった。雲母、マイカあるいは被覆雲母チタンについてはアレルギー性金属のニッケルおよびクロム等が一定量検出され、製品への汚染原因となることが示唆された。鉱物由来原料については、今後これら金属不純物に関する調査が引き続き必要である。

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

香粧品原材料や添加物中に含まれることが多い食品素材のうち、RJ に関しては主に MRJP1 を、大豆に関しては主にオレオシンや 7S グロブリンを、トマトに関しては主に LTP を、チェリーに関しては PR-5 を認識する抗体がそれぞれ得られ、これらを用いてサンドイッチ及び直接 ELISA 系が構築できた。

香粧品原材料及び添加物の定量分析法の開発

化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の含有量は、調査した 12 種の化粧水・乳液で大きく異なり、化粧水にはアセチルヒアルロン酸として、乳液中にはヒアルロン酸が主に含まれていた。また分子量についてもアセチルヒアルロン酸については 1~5 万程度であるのに対し、ヒアルロン酸は 5 千~30 万程度と様々な分子量分布を示した。

[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ーの構築

qNMR を用いた絶対定量法を香粧品原材料及び添加物の高度な品質管理に応用することを目的とした。香粧品、食品添加物、抗生物質、天然物、毒物、芳香族炭化水素、PRTR 物質及び農薬等について約 300 品目の qNMR スペクトルを測定した。得られた qNMR スペクトルは、化合物の構造情報と純度(絶対量)が正確に保存されたデジタルデータとして有用であることから、これらをライブラリ化することによって、香粧品等の高度な品質管理への応用が可能となると考えた。すなわち、試料のケミカルシフト及びシグナル強度を qNMR スペクトルライブラリに登録された化合物のそれとの一致度を求めるアルゴリズムを検討し、試料中の化合物の同定及び含量推定を行う qNMR 検索システムを作成した。

[III] 香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の開発

培養細胞を用いた香粧品原材料及び添加物の安全性評価手法の確立

TDCC の HLA-DR および CD86 の mRNA 発現量は、DNP-BSA、TNP-BSA の添加により顕著に上昇し、細胞表面の発現量においても上昇が認められた。また、IL-8 の産生が誘導されることを確認した。一方、BSA の添加では、HLA-DR および CD86 ともに発現上昇がまったく見られなかったことから、TDCC はハプテンを認識し抗原提示することが示された。コチニール色素のアレルゲン性について検討したところ、コチニール単独の添加では発現上昇が認められなかったのに対して、コチニールを BSA に混合し(モル比 25:1)、TDCC に添加したところ、HLA-DR 発現量は顕著に上昇した。また、IL-8 の産生においても、同様の結