

果が得られた。以上の結果から、TDDC を用いた in vitro アッセイ系において、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。

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

ダイゼインの存在下ではマウス CD4⁺T 細胞は I 型ヘルパーT 細胞への分化が促進され、II 型ヘルパーT 細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。

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

PLNA 法は主として溶液で行うことになっているが、化粧品原料として用いられるカルミンは生理食塩液には溶解せず、懸濁液のまま適用した。カルミンのうちいくつかは、溶媒対照に比べて PLN 細胞数を 2 倍以上と明らかに増加させた。懸濁粒子が刺激となる起炎性か感作性による反応かを明らかにするため、試料を 2 回投与した。その結果、カルミンを適用した場合のみ PLN 数が増加した。また、カルミンを投与したときの血清 IgE は高い傾向はあるものの、明確な差は見られなかった。香粧品用のカルミンにはアルミニウムが含まれており、これがアジュバントとして働き、感作性を高めている可能性がある。一般に感作性があると報告されている OVA においても PLNA 法では血清 IgE に有意な上昇はなく、アジュバントを用いていないためと考えられた。

E. 結論

[1] 我々はポリクローナル抗体を用いたコチニール由来タンパクの ELISA 定量法を確立した。その定量法は、化学発光検出により、カルミン酸の色素に影響されことなく、コチニール色素中の夾雑タンパクの定量が可能であった。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。

香粧品原料の金属不純物の分析法を確立した。しかし、種々の性質の原料が存在することから、分解条件については原料に応じて変化できるようにすることが必要である。香粧品に含有される可能性のある食品タンパク質成分や植物性汎アレルゲンに対する抗体を広く作製し、検出・定量系の構築を進め、その応用として種々の変動解析を行った。化粧品に含まれるヒアルロン酸およびアセチル化ヒアルロン酸については、その物理的性状についての記載義務はないが、分子量およびアセチル化の度合いについては大きなバラツキが観察された。

[II] 香粧品原材料及び添加物（約 300 品目）の qNMR スペクトルライブラリ及び qNMR スペクトル検索システムの作成を行った。本システムを Web 上に公開することにより、香粧品原材料等の試料中の化合物の同定及び含量推定、品質管理を効率的に行うことが可能となると考えられる。

[III] THP-1 細胞株を用いた抗原感作性評価法の構築に成功するとともに、本評価法を用いることでコチニール色素のハプテンとしての抗原提示作用を明らかにした。香粧品成分等がヒト CD4⁺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 T 細胞を用いることで同様の方法により香粧品成分の影響を解析することが可能であると考えられる。PLNA 法により、カルミンの感作性が検出できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表（総発表論文 16 件）

- 1) 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).
- 2) 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).

- 3) Iwamoto T, Yamada K, Shimizu M, Totsuka M, Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 925-929 (2011).
 - 4) Jin M., Iwamoto T., Yamada K., Satsu H., Totsuka M., Shimizu M., Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor-mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(7), 1283-1289 (2011).
 - 5) Masuko S., Higashi K., Wang Z., Bhaskar U., A. M., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., Ozonolysis of the double bond of the unsaturated uronate residue in low-molecular-weight heparin and K5 heparosan, *Carbohydr. Res.*, 346, 1962- 1966 (2011).
 - 6) Higashi K., Ly M., Wang Z., Masuko S., Bhaskar U., Sterner E., Zhang F., Toida T., Dordick J. S., Linhardt R. J., Controlled Photochemical Depolymerization of K5 Heparosan, a Bioengineered Heparin Precursor, *Carbohydr. Polym.*, 86, 1365- 1370 (2011).
 - 7) Ly M., Leach F. E. 3rd, Laremore T. N., Toida T., Amster I. J., Linhardt R. J., The proteoglycan bikunin has a defined sequence, *Nat. Chem. Biol.*, 7, 827-833 (2011).
 - 8) Higashi K., Hosoyama S., Ohno A., Masuko S., Yang B., Sterner E., Wang Z., Linhardt R. J., Toida T., Photochemical Preparation of a Novel Low Molecular Weight Heparin. *Carbohydr Polym.* 87, 1737-1743 (2012).
 - 9) Matsumoto A., Hosoyama S., Higashi K, Toida T.: "Simultaneous determination of uronates found in polysaccharides from natural products by HPLC with fluorometric detection." *Carbohydr. Res.*, 358, 82-88 (2012).
 - 10) Zhao X, Yang B, Solakyildirim K, Joo EJ, Toida T, Higashi K, Linhardt RJ, Li L. : Sequence analysis and domain motifs in the porcine skin decorin glycosaminoglycan chain., *J. Biol. Chem.*, 288, 9226-9237 (2013).
 - 11) 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, 789-795 (2013).
 - 12) 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 para in obese, diabetic KK-A^y mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, 434, 486-491 (2013).
 - 13) Moriyama T., Yano E., Suemori Y., Nakano K., Zaima N., Kawamura Y., Evaluation of Hypoallergenicity of Various Miso Pastes Manufactured in Japan., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 59, 462-469 (2013).
 - 14) 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, 2371-2377 (2013).
 - 15) Hatano, R Yamada K, Iwamoto T, Maeda N, Emoto T, Shimizu M and Totsuka M. 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).
 - 16) 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).
2. 学会発表 (総発表数 27 件)
- 1) 秋山卓美, 植野麻美, 内野正, 田原麻衣子, 杉本直樹, 五十嵐良明: 化粧品中フェノキシエタノール及びパラベン類の qNMR 等を用いた短時間簡便分析法. 日本薬学会第 133 年会 (2013.3)
 - 2) 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)
 - 3) 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質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 (2013.11).
- 4) 大月典子, 杉本直樹, 多田敦子, 伊藤裕才, 東村豊, 山田敬子, 竹内正樹, 中川誠, 伊藤澄夫, 穂山浩: コチニール色素中の夾雑アレルゲンタンパク質検出法の確立. 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会 (2012.10).
 - 5) 中島光一, 箕川 剛, 張 慧利, 森本隆司, 伊藤澄夫, 山川有子, 穂山 浩: コチニール色素中のタンパク質検出のための前処理法開発, 日本食品化学学会第19回総会・学術大会 (2013.8)
 - 6) 穂山浩, 海老澤元宏: 低分子の化合物の食物アレルギー, 第50回日本小児アレルギー学会 (2013.10).
 - 7) Hiroshi Akiyama: Food additive regulations in Japan, ACS annual meeting, (2013.4)
 - 8) 穂山浩: 食品添加物のリスク管理と分析法について, 食品薬学シンポジウム (2013.11)
 - 9) 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).
 - 10) 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).
 - 11) 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).
 - 12) 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).
 - 13) 五十嵐良明, 久世哲也, 佐藤信夫, 安田純子, 林 正人, 武知めぐみ, 高野勝弘, 宮澤法政, 小島 尚, 坂口 洋, 藤井まき子: 生活用品試験法 化粧品試験法 鉛不純物. 日本薬学会第 133 年会 (2013. 3)
 - 14) 小濱とも子, 五十嵐良明. 化粧品中の微量鉛不純物の分析法設定に関する検討. 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11)
 - 15) 片山茂, 久木田卓弥, 穂山浩, 中村宗一郎 (信大院農, 国立衛研): THP-1 由来樹状細胞の抗原提示能を指標としたアレルゲン性評価法の確立 日本食品化学学会 第 18 回総会・学術大会(2012.6)
 - 16) 小俣洋奈, 久木田卓弥, 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ゲン性評価法の確立 第 26 回日本動物細胞工学会 2013 年度大会 (2013. 7)
 - 17) 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)
 - 18) 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)
 - 19) Establishment of an in vitro screening assay for allergenicity of proteins using dendritic cells differentiated from THP-1 Takuya Kukita, Shigeru Katayama, Hiroshi Akiyama, Soichiro Nakamura, ISNFF2012 (2012.12)
 - 20) 森山達哉: リコンビナント・アレルゲン及び抗アレルゲン抗体を用いた抗原解析 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム (2012.5)
 - 21) 末森佑輔, 木下恵利, 矢野えりか, 崎川貴文, 財満信宏, 森山達哉, 河村幸雄: 大豆クラス2 食物アレルゲン Glym4 の精製, 特性解析及びモノクローナル抗体作製 日本農芸化学学会大会 (2013.3)
 - 22) 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)
 - 23) 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)
 - 24) 藤井まき子, 佐藤あんな, 増田年紀, 小泉直也, 渡辺善照, 五十嵐良明, 穂山浩: Popliteal lymph node assay (PLNA 法) によるコチニール色素の抗原性評価とその問題点. 日本薬学会第 134 年会 (2014. 3)
 - 25) Mamoru Totsuka: Modulation of T-cell and B-cell functions by dietary polyphenols. 2013 Annual

Conference of Korean Nutrition Society (Seoul, Korea), (2013. 11).

26)石原 惟志、ベミンジョン、清水 誠、戸塚 護:ダイゼインによる2型ヘルパーT細胞(Th2)への機能分化の抑制. 日本農芸化学会 2013 年度大会、(2013.3).

27)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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許 なし、2. 実用新案登録 なし

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

平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

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。ラット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 排泄量の増加が認められた。

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、DDAH 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。DDAH は全身に広く分布し、ADMA に対する基質特異性が高く、動物においては ADMA の約 90%を、ヒトでは約 80%を速やかに分解する。DDAH には DDAH1 と DDAH2 の 2 つのアイソフォームが存在する。DDAH1 の組織分布が主に脳・腎臓・肝臓・脾臓であるのに対し、DDAH2 は心臓・腎臓・胎盤に発現が認められている。ADMA は主に腎臓や肝臓で代謝を受けると考えられて

おり、これら組織では DDAH1 が高発現している。したがって、DDAH1 は生体内の ADMA 量を規定している可能性がある。また、CKD モデルである 5/6 腎臓摘出ラットにおいて、アデノウイルスベクターを用いた DDAH1 の過剰発現により、ADMA 低下、クレアチニンクリアランスの改善、尿細管線維化の抑制が認められたことから、DDAH1 は ADMA を低下させることで腎機能を制御していると考えられる。

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/年、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。

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 法にて取得した。DDAH1 cDNA 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。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 $\mu\text{g/mL}$)、SMTC (10 μM) 及び CPM (1 μM) を含む溶液を High Control ([High])、CPM (1 μM) 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 μM 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整した ([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] 群の蛍光強度から [Low] の蛍光強度を除算した。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) DDAH1 過剰発現アデノウイルス

DDAH1 過剰発現アデノウイルスを健常ラットに静脈内投与し、各種臓器における DDAH1 mRNA 発現量及び DDAH 活性並びに血漿中 ADMA 濃度を測定した。

3) 糖尿病性腎症モデルの特性解析

I 型糖尿病モデルとして、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルラットを用いた。このモデルは、8 週齢の Sprague Dawley (SD) ラットを用いて、STZ を 60 mg/kg 腹腔内投与し、投与 1 週間後、頸静脈血の血糖値が 300 mg/dL 以上の動物を糖尿病発症とみなして作製した。対照として STZ を投与していない同週齢の SD ラットを用いた。一方、II 型糖尿病モデルとしては、7 週齢の Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットを用い、対照として同週齢の Zucker-lean ラットを用いた。これらのラットを代謝ケージで 24 時間飼育して尿を採取し、尿タンパク、尿中アルブミンの測定を行った。

腎臓 DDAH 活性は、新鮮凍結腎臓を懸濁、抽出液に Citrulline 発色液を加えて測定した。

血漿中及び尿中 ADMA 濃度は、内部標準物質として ADMA の重水素置換体 (ADMA- d_7 (Cambridge Isotope Laboratories) を用い、血漿及び尿をアセトニトリルにより除タンパクした後、LC-MS/MS により測定した。

4) ラット摘出血管弛緩作用評価

(1) 使用動物

6 週齢の雄性 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に設置した。95% O_2 、5% CO_2 で通気した 37°C 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 ($10^{-9}\sim 10^{-5}\text{ M}$) 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。

5) 血管内皮細胞 guanylate cyclase 活性測定 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 活性化を血管内皮細胞で調べた。

Human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) をヒット化合物 100 $\cdot\text{M}$, 10 $\cdot\text{M}$ で 30 min 刺激した時の cyclic GMP 濃度を RIA (ヤマサ) で測定した。Positive control には ANP 100 pM を用いた。

(倫理面への配慮)

組換え DNA の実験は、国立循環器病研究センターの組換え DNA 実験委員会が年度毎に承認された研究計画に従って遂行した。

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、循環器病研究センターの委員会に提出あるいは、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、トーマスエー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

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 (E1 画分)。そのため、本画分を透析処理 (PBS、4℃、24 時間) したサンプルを以後の試験に利用する DDAH1 タンパク (hDDAH1) とした。

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

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。このうち 4 化合物 (TOA-01~04) が濃度依存性 (3、10、30 及び 50 μ M, $n=2$)、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. DDAH1 発現アデノウイルスを用いた検討

DDAH1 過剰発現アデノウイルス 1.5×10^{10} IFU/mL を投与したラットの肝臓において DDAH1 mRNA 発現の増加が認められたが、その他の臓器で増加は認められなかった。DDAH 活性も、 1.5×10^{10} IFU/mL 投与ラットの肝臓においてのみ上昇傾向が認められ、腎臓では上昇が認められなかった。また、血漿中 ADMA 濃度はいずれの投与群においても変化は認められなかった。

5. I 型糖尿病性腎症モデルラットの特性解析

I 型糖尿病モデルとして汎用されている STZ 誘発糖尿病 ラットを用いて病態の特性解析を行った。その結果、STZ ラットは対照ラットと比較し、尿タンパク、尿中アルブミンともに著しく増加していた。次に、糖尿病性腎症発症における ADMA の役割を明らかにするために、糖尿病発症後の血漿中 ADMA 濃度、尿中 ADMA 排泄量の変化について検討を行った。血漿中 ADMA 濃度は、STZ ラットと対照ラットに大きな違い

は認められなかった。一方、尿中 ADMA 排泄量は、STZ ラットにおいて対照ラットと比較し糖尿病発症 4 週間から有意に増加が認められ、8、12 週間ではさらに増加した。STZ ラットにおいて尿中 ADMA 排泄量が増加する原因を明らかにするために、ADMA の分解酵素である DDAH の腎臓における活性を検討した。その結果、STZ ラットの腎臓 DDAH 活性は、対照ラットと比較し、低下傾向を示した。

6. II 型糖尿病性腎症モデルラットの特性解析

II 型糖尿病モデルである ZDF ラットを用いて病態の解析を行った。ZDF ラットの尿タンパク及び尿中アルブミンは、経週の増加を示したが、対照ラットでは、加齢による尿タンパクの顕著な増加は認められなかった。血漿中 ADMA 濃度、尿中 ADMA 排泄量の週齢変化を検討した結果、血漿中 ADMA 濃度は、ZDF ラット、対照ラット共に同様の推移を示した。尿中 ADMA 排泄量は、ZDF ラットにおいて、経週の増加を示したが、対照ラットでは、加齢による尿中 ADMA 排泄量の増加は認められなかった。尿中 ADMA 排泄量が増加している原因を明らかにするために、DDAH の腎臓における活性を検討した。その結果、38 週齢における ZDF ラットの腎臓 DDAH 活性は、対照ラットと比較し顕著に低下していることが明らかとなった。最後に、臨床において観察される糖尿病性腎症病理所見との類似性を確認するため、ZDF ラットの腎臓病理学的評価を行った。38 週齢の ZDF ラットの腎臓は、腎盂の拡張、糖尿病性糸球体硬化 (びまん性メサンギウムの増生、結節性及び滲出性の糸球体病変)、円柱、尿細管の拡張、再生 (萎縮)、グリコーゲン変性、間質の線維化を示し、臨床において観察される糖尿病性腎症と同様な病理所見が認められた。

7. ADMA による血管弛緩障害作用の評価

ラット摘出血管での DDAH1 活性化作用を有する化合物を処置した場合には、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。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。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。

8. 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

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。前述した検討と同じ 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。このことから、TOA-03 は細胞内 ADMA 低下作用を有し、ACh の作用を回復させる可能性が示唆された。

9. 2 化合物についての NO 活性化の検討

ヒット 2 化合物 100 $\cdot$ M, 10 $\cdot$ M で HUVEC を刺激して細胞内 cyclic GMP 濃度を測定したところ、positive control の ANP では投与後 1000 倍の増加が認められたが、ヒット 2 化合物では cGMP の増加は認めなかった。

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。また全てではないが類似構造化合物で官能基の違いによる DDAH1 活性化反応の有無も観察されている。

アデノウイルスを用いた検討では、今回用いた投与量は、肝臓において目的遺伝子を導入することは可能であったが、腎臓では目的遺伝子を導入できないことが明らかとなった。また、血漿中 ADMA 低下作用も弱いため、DDAH1 の腎保護作用を評価するためには、導入効率のさらなる向上が必要であることが示唆された。

I 型及び II 型糖尿病ラットを用いた検討では、両モデル動物において、対照ラットと比較し腎機能の指標である尿タンパク、尿中アルブミンともに有意な増加を示したことから、糖尿病性腎症を発症していると考えられた。血漿中 ADMA 濃度に大きな変化は認められなかったが、尿中 ADMA 排泄量は糖尿病ラットにおいて対照ラットと比較し有意に増加した。その原因の一つとして、腎臓 DDAH 活性の低下が関与している可能性が示唆された。本モデルにおける腎臓 DDAH 活性は DDAH アイソフォームの区別が考慮されていないが、腎臓では DDAH1 の発現量が多いとされ、その発現は再吸収に大きく寄与する近位尿細管に認められる。したがって、本モデルで認められた尿中 ADMA 排泄量の増加は、尿細管における再吸収障害に加え、尿細管における DDAH1 の活性低下による機序に起因する可能性

が考えられた。

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、並びに eNOS 障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、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。

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。

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 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。糖尿病モデルラットを用いた検討では、腎機能障害が発症していること、DDAH1 活性低下により ADMA が上昇している可能性を見出した。

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機序を明確にするとともに、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) Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H, and Mochizuki N. Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. **Oncogene** 32(45):5292-301 2013
- (2) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. **J. Clin. Invest.** 122: 1416-1426, 2012
- (3) 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 Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. **Development.** 140(19):4081-90, 2013
- (4) 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
平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 臨床研究として多価ボツリヌストキソイドワクチン接種を 4 地域 48 名のボツリヌス研究者及び抗毒素製造従事者等のボランティア被験者について実施した。1 か月間隔で 3 回初回の 1 年後に 4 回目のワクチン接種により被接種者に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確認された。製造 7 年を経過後の製造時と同じ品質管理試験実施の結果、大きな経時的変化は認められなかった。一方、ワクチン接種者について健康調査表による副作用解析では、接種部位の軽度の腫脹・発赤・搔痒感などの副作用を一部に認めたが、重大な有害事象は認められなかった。これらの臨床研究の結果から、本ワクチンは高い抗毒素抗体の誘導能と安全性が確認された。

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。しかし、現在、世界中で承認販売されているボツリヌストキソイドワクチンはない。ここで、ボツリヌス毒素のような毒素性感染症の予防にはトキソイドワクチン接種が最も有効であることは疑いない。このため、平成 18 年に厚生労働研究班によって、多価ボツリヌストキソイドワクチン (Lot 4) が製造された。本臨床研究の目的はこの平成 18 年に厚生労働研究班の製造したワクチンの有効性・安全性を実証することにある。

B. 研究方法

- 1. 品質管理試験
多価ボツリヌストキソイドワクチンの安定性評

価にあたって、平成 18 年に製造し、厚生労働研究班が行った試験の中から、平成 23 年に無菌試験、無毒化試験及び A, B, E 及び F 型毒素のうち A 型に対する力価試験など一部試験を行った。さらに、一般試験 (たん白量含量、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 (力価試験 (モルモット、血中抗毒素価定量法及び毒素攻撃法)、力価試験 (マウス、毒素攻撃法)) について、製造後 7 年目の平成 25 年度に安定性を評価するために試験を実施し、経時的な変化について評価した。

- 2. 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や製造等に関わる被験者として、4 地域 48 名 (A : 9 名、B : 15 名、C : 15 名、D : 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、ワクチンを以下の免疫スケジュールに沿って投与を行った。その際、毎回接種後の健康調査表による副作用解析を行った。

- 3. 免疫スケジュール

4 地域 48 名の被験者にワクチンを 4 週間隔で 3 回接種した。また初回接種から 1 年後にワクチンの追加接種を行った。採血は、ワクチン接種時 (1-4 回目) と 3 回目と 4 回目ワクチン接種 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。

4. ELISA

プレートに A, B, E および F 型神経毒素を吸着させ 37°C 2 時間静置した。洗浄後 4°C 一晚ブロッキングを行い、被験血清を 64 倍から 131,072 倍まで 2 倍段階 12 希釈した。各希釈血清を加え、37°C 2 時間静置した。各プレートを洗浄後標識ヤギ抗ヒト IgG (H+L) を加え、37°C 2 時間静置した。各プレートを洗浄後、発色基質を加え 37°C 30 分間静置後反応を止め、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 とした。

5. 血清中和抗体価の測定（参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製及び被接種者血清の毒素中和抗体価測定）

1) 参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製

臨床研究開始前に本ワクチンを接種していた 6 名のボランティアから得られた血清をプールして、マウス中和法によりボツリヌス毒素中和抗体価を測定した。マウス中和法は A, B, E 及び F 型標準抗毒素を 0.2 IU/mL を中心として 5 希釈作製し、プールした被接種者血清は原液から 3 倍間隔で 5 希釈作製した。各型標準抗毒素に対する相対値から、毒素中和抗体価を求め、これを参照ヒトボツリヌス抗毒素血清と定めた。

2) 被接種者血清の毒素中和抗体価測定

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 A, B, E, F 型標準抗毒素を階段希釈し検量線用とした。被験者血清は原液を使用した。試験毒素量は A, B, E, F 型それぞれ定めた。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、反応させた後、ラットの左側腓腹

筋に 0.1 mL ずつ 5 匹に投与し、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。ラット中和本測定に用いた CMAP 法では 0.01 IU/mL 以上の毒素中和抗体価を測定し、0.01 IU/mL 未満の場合は測定限界以下とした。

（倫理面への配慮）

ボツリヌス毒素ワクチン接種とその効果を調べるための採血や臨床材料を扱うため、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）。

C. 研究結果

1. 品質管理試験

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。無菌試験では、菌の発育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°C 保存（非加温）及び 37°C 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、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、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% 死亡するワクチン用量を算出した。50% 死亡点となるワクチン用量は 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。

2. 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

1) 接種者の背景

接種者それぞれの接種時の背景として、性別、年齢、体重、診察前の体温、過去の接種歴の有無、合併症の有無、アレルギーの有無、既往歴の有無、家族歴等を調べた。特に偏りのある背景ではなかった。

2) 安全性

(1) 有害事象の内訳

有害事象は、いずれも非重篤であった。有害事象のうち、疲労、腹痛、鼻漏、咳嗽、歯周病、鼻咽頭炎は、いずれも本剤との因果関係は否定された。有害事象は、注射部位関係、全身性関係に分類された。主な有害事象は注射部位疼痛、注射部位そう痒感、注射部位腫脹、注射部位紅斑であった。また、有害事象の発現件数は1回目接種と2回目接種には差は認められなかったが、3回目接種では半分に減少した。

(2) 副作用発現状況

副反応はすべて非重篤であった。副反応も、注射部位関係と全身性関係に分類できる。主な副反応は注射部位疼痛、注射部位そう痒感、注射部位腫脹、注射部位紅斑であった。

(3) 中止事例について

これまでに臨床研究を中止した症例が4症例存在する。その内訳は、臨床研究と直接関係のない理由で協力できなくなった症例が2例、診療研究責任医師の判断によって中止を決定した症例が2例である。その内訳は、トキソイド蛋白質以外のワクチン構成成分に対すると推測されるアルザス反応惹起例とワクチン接種による抗体産生の増強と推察されるII型アレルギー反応による皮膚炎症例である。

(4) 副反応や有害事象の発生状況

副反応や有害事象の発生状況については、延べ138回のワクチン接種を通じて、積極的な治療を要する高度な有害事象は認められなかった。医師の診察を要する中等度の有害事象が1例、その他は接種部位の発赤や皮内反応部位の発赤・掻痒また接種と直接関係のない軽症の上気道炎など軽症の有害事象であった。現在までに研究協力登録者48名中、臨床研究と直接関係のない理由で協力を継続できなくなった者は2名、臨床研究責任医師の判断によって中止を決定したものは2名であった。

3. ELISA 法による血清中の抗ボツリヌス毒素(A, B, E および F 型)抗体価の測定

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時的にELISAにより測定した。

ボツリヌストキソイドワクチン接種経験者(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)。

4. 血清中和抗体価の測定(参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製及び被接種者血清の毒素中和抗体価測定)

1) 参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製

参照血清の毒素中和抗体価はA型0.6 IU/mL、B型0.61 IU/mL、E型0.25 IU/mL及びF型0.24 IU/mLであった。

2) 被接種者血清の毒素中和抗体価測定

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、ワクチン4回目接種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。

さらに、ラット中和CMAP法により血清中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ワクチン4回目接種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。

D. 考察

多価ボツリヌストキソイドワクチン(Lot 4)は平成18年に製造され7年が経過しているため、製剤の安定性が保たれているかを、製造時行われた試験を再実施して評価した。その結果、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、チメロサルがワクチン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。無菌性、無毒性が担保されており、安全性に問題はないと考えられた。また、力価試験において、抗体産生による毒素防御効果が製造直後の試験と有意差が認められない結果となり、有効性についても問題はないと考えられる。

毒素中和抗体価との相関性を外挿するための参照とするために、毒素中和抗体価が明らかな参照ヒトボツリヌス抗毒素血清を作製し、そのマウス中和抗体価を測定した。型による違いはあるが、多くの被接種者で毒素中和抗体の産生が認められた。ワクチン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。血清抗体価データの統計的解析による有効性の検討では、の解析結果から、3 回接種後の抗体価は上昇が認められる確率が高いといえる。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、4 回目接種 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。

一方、ELISA で定量した血中抗体価については、3 回のワクチン接種で 4 つの毒素型全ての抗体が上昇したのは、過去のボツリヌストキソイド接種経験者であった。また今回が初めてのワクチン接種者は、4 つの毒素型のうち、いずれかの抗体価の上昇がみられたものの、全ての毒素型に対する抗体の上昇が観察された者は、わずかであった。しかし 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 4 回目接種時には、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 回のワクチン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。

ワクチンの被験者は 4 地域 48 名となり、目標症例数である 50 名に近い希望者を集めることができた。接種時の安全性に関しては、有害事象の大部分は接種部及び接種前に試験的に行った皮内接種部位の局所的異常であった。内容は疼痛、搔痒感、腫脹、発赤などであり、時速期間も 3、4 日と短いものであった。アレルギー反応に起因すると思われる 2 症例も 1 週間程度で回復し重篤な有害事象と判定された事例はなかった。

以上の臨床治験や品質管理試験等の 3 年間の試験研究の結果、平成 18 年に厚生労働研究班によって製造された多価ボツリヌストキソイドワクチン (Lot 4) は、その有効性・安全性を実証することができた。製造後 7 年を経ているこのワクチンは、少なくとも 7 年間の備蓄は可能であることが実証された。

今後、ボツリヌス毒素が生物兵器として利用された場合への備えとしてボツリヌスワクチンの次ロットを製造して、救急医療関係者や保健行政担当者に免疫を付与することで、これらの人々に対する防

疫体制の確立が可能である。また、少なくとも 7 年に 1 度のワクチン製造を行いそれを備蓄することで常にボツリヌス毒素に対する目撃記付与が可能で体制が構築できる。

本研究の実験のいくつかは現時点では実施途中であるが、結果が出次第論文にての発表を予定している。

E. 結論

多価ボツリヌストキソイドワクチンをボツリヌス研究者及び抗毒素製造従事者等のボランティア被験者に接種を 4 地域 48 名において実施した。追加接種を含めて都合 4 回のワクチン接種で、4 回目接種の 1 ヶ月後のほとんど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、品質に大きな経時的変化はほとんど認められなかった。一方、健康調査表による副作用解析では、接種部位の軽度の腫脹・発赤・搔痒感などの副作用を一部に認めたが、重大な有害事象は認められなかった。

これらの臨床研究の結果から、本ワクチンは高い抗毒素抗体の誘導能と安全性が確認された。

F. 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. 50th 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。

G. 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

高効率にC型肝炎ウイルス感染を阻止できる中和抗体の開発とその 解析

国立感染症研究所ウイルス第二部

脇田 隆字

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 輸血のスクリーニングが可能となり、HCVの新規感染は減少したが、ハイリスクグループや、肝移植時のHCV感染のリスクを軽減するためにHCVに対する中和活性の高い抗体を取得した。高い感染中和活性を有する抗体による免疫グロブリンの開発を目指す。

研究組織

- (1) 国立感染症研究所
脇田 隆字
- (2) 東レ株式会社医薬研究所
中村 紀子
- (3) 東レ株式会社医薬研究所
成見 英樹
- (4) 昭和大学医学部
伊藤 敬義
- (5) 東京医科歯科大学
朝比奈 靖浩
- (6) 株式会社抗体研究所
篠原みどり
- (7) 国立感染症研究所
Hussein Hassan Aly

A. 研究目的

輸血用血液および血液製剤のスクリーニングが可能となって、C型肝炎ウイルス(HCV)の新規感染者数は減少したが、一方で、医療従事者やウイルスキャリアの家族などハイリスクグループは潜在的な感染リスクがある。従って、針刺し事故などの際に免疫グロブリンによる感染予防が望まれている。また、HCV感染による肝不全に対する肝移植は患者に経済的、肉体的に大きな負担となるが、常に再感染のリスクがあり、再感染時には肝病変が急速に進行し重症化する場合がある。肝移植時にも感染中和活性の高い免疫グロブリン投与により再感染のリスクの軽減が期待できる。HCVキャリアの血液中に中和抗体が存在すること、ウイルスのE2蛋白質に対するモノクローナル抗体の中に感染中和活性を持つものがあること。さらにヒト肝細胞キメラマウスに対するHCV

感染を防御することが可能であることが明らかとなってきた。本研究ではHCVに対するさらに中和活性の高い抗体の取得をめざした。ファージライブラリー、リンパ節移植法、KMマウス、ウサギモノクローナル抗体などにより、複数の感染中和抗体を樹立することを目指とした。さらに、耐性ウイルスの取得などにより、抗体の感染中和阻止機構を解析した。

B. 研究方法

1. リコンビナントHCV E2 タンパク質の解析
膜貫通領域を欠失した分泌型のE2(384-714)の発現プラスミドをハエ由来S2細胞に遺伝子導入しE2タンパク質を作製した。アフィニティ精製およびゲル濾過による精製後、分子量、精製度について銀染色で確認した。精製E2蛋白質による感染阻害活性をHCVppおよびHCVccにより検討した。感染阻害活性を確認した精製E2蛋白質を用いて、結合する環状ペプチドをスクリーニングした。スクリーニングにより得られた4種類の環状ペプチドによるHCV感染阻害を解析した。

2. 抗体ファージライブラリーからのHCV中和抗体の単離

HCV罹患肝癌患者由来のリンパ球よりファージディスプレイ法によってHCVの感染を阻止する抗体を3種取得した。これら3種類のIgG抗体の高発現株を樹立し、感染中和試験に使用した。さらにscFv抗体の大腸菌発現ベクターを改変し、従来の10倍以上の発現効率の発現ベクターを構築した。この発現ベクターを使用し、感染中和評価用のscFv抗体を大量に調製した。また、今年度新たにHCV罹患患者由来のリンパ球から新規の抗体断片(Single Chain Fv(scFv))ファージライブラリーを作

製した。昨年度までの中和抗体の取得実績から、中和抗体のスクリーニング用抗原には昆虫細胞発現系で調製しウイルス粒子上の立体構造を保持した E2 リコンビナントタンパク質を使用した。

3. ウサギモノクローナル抗体の取得

マウスの中和抗体が作製できたことから、同免疫方法によるウサギの中和抗体作製にも着手した。2種類の抗原を各2羽のウサギに免疫し、各免疫ウサギの脾臓から抗体遺伝子を抽出し、ファージディスプレイ法で E2 に特異的に結合するモノクローナル抗体を取得した。取得したモノクローナル抗体 (scFv) を感染研に送付し、感染研で HCV の感染中和能を測定した。scFv で感染中和が確認できたクローンについては IgG 産生細胞 (CHO 細胞) を構築し、IgG の感染中和試験も実施した。

4. HCV 中和抗体に対する耐性ウイルスの取得

ファージディスプレイで取得した感染中和抗体や既報の抗 E2 抗体と JFH-1 ウイルスを混合してから感染を繰り返すことにより感染中和抗体の取得を試みた。

5. HCV E2 タンパク質抗原で刺激したマウスリンパ節を移植した SCID マウスのリンパ球から作製したハイブリドーマの解析

ストレプトアビジンタグ化 E2 タンパク質 (HCV TH 株、遺伝子型 1b) を Balb/c マウスに免疫し、2 週間後にリンパ節を採取した。リンパ節を SCID マウスの腎皮膜下に挿入した。リンパ組織移植後、2 週間おきに 4 回、E2 タンパク質溶液を投与した。最終免疫の 4 日後に、SCID マウスより脾細胞を採取・調製し、ハイブリドーマを作製に用いた。

6. HCV 感染中和活性をもつモノクローナル抗体のエピトープ解析

HCV TH 株 E2 タンパク質を加熱変性し、ビオチン化モノクローナル抗体がこの変性抗原に結合するかを解析した。さらに HCV TH 株の E2 タンパク質配列をカバーするオーバーラップペプチドライブラリーを用いてエピトープ解析を行った。

7. HCV 抗体断片の PEG 化による安定化

ファージライブラリーから得た感染阻害活性の高いクローンについて、PEG 導入の進行度を解析した。

8. Naïve B 細胞における単一クローン増殖 (Clonality) 解析及び遺伝子発現解析

C 型慢性肝炎 (CH-C) 患者 33 例、健常人 20 例から PBMC を採取し、MACS を用いてナイーブ B と非ナイーブ B 細胞に分画した。

9. TPV 3 剤併用療法中 CH-C 患者における B

細胞活性化と抗ウイルス状態の解析

1 型高ウイルス量の CH-C 患者で TPV 3 剤併用療法を行った 30 例を対象とした。

1 0. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着分子の探索

JFH-1 株の NS5AC 末端へ蛍光蛋白を挿入し、T4290A と C7653T に変異導入することで粒子産生能を保持した蛍光蛋白 YFP 発現 HCV を構築した。さらに、高効率のスクリーニングシステムの構築をめざして J6/JFH1-EYFP 株を作成した。レプリコンアッセイの結果と照合し、HCV 複製増殖阻害活性は示さないが感染阻害活性を示した化合物を、エントリー阻害剤として抽出した。

1 1. 遺伝子型 4a の C 型肝炎ウイルス遺伝子の分離と解析

遺伝子型 4a の全長 HCV 遺伝子を患者血清から分離し、RT-PCR 法により増幅した。PCR で増幅した遺伝子断片をクローニングして、その塩基配列を解析した。さらにコンセンサス配列を用いて全長のウイルス遺伝子を結合して、サブジェノミックレプリコンおよび全長の HCV クローンを作製し、その複製増殖能を培養細胞で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究計画の実験計画は所属施設に提出されその承認を得ている。取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。取り扱うすべての DNA に関して組み換え DNA 実験計画を提出し承認を得ている。取り扱うすべての病原微生物 (感染性のウイルスを含む) に関しても取り扱い届けを提出し承認を得ている。ウイルスの遺伝子をクローニングした患者血清は、すべてその感染ウイルスの解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。

C. 研究結果

1. ハエ S 2 細胞で発現させた精製 E2 タンパク質は、SDS-PAGE 解析で還元状態では約 60 kDa の単一の分子量を示した。非還元状態では約 60 kDa の単量体とともに二量体および多量体と考えられるバンドを観察した。そこで、ゲル濾過法によりさらに単量体分画と単量体と二量体を含む分画に分離した。それぞれの分画の精製 E2 蛋白質は HCVpp および HCVcc 感染系とともに感染阻害活性を示した。

2. 抗体ファージライブラリーからの HCV 中和抗体の単離

高い感染中和能を持つ 3 種類の抗体の IgG と scFv の感染中和の結果、1 クローンは GT2a HCVcc の IC50 が scFv 抗体が $0.02 \mu\text{g/mL}$ 、IgG が $0.17 \mu\text{g/mL}$ であり、1 価の scFv が 2 価の IgG の約 10 倍の中和活性を示した。

3. ウサギモノクローナル抗体の取得

E2 リコンビナント抗原を免疫した 4 羽のウサギのうち、マウスで中和抗体産生能が認められた E2 リコンビナント抗原を免疫したウサギ 1 羽から高い感染中和能をもつモノクローナル抗体が取得でき、IgG 抗体発現細胞も樹立した。IgG 抗体の感染中和試験も感染研で実施した結果、IgG でも高い感染中和能が確認できた。

4. HCV 中和抗体に対する耐性ウイルスの取得

MBL-HCV1 抗体に対する耐性ウイルスは容易に樹立され、E2 配列の 417 番に変異を認めた。しかし、ファージディスプレイで取得した感染中和抗体に対する耐性ウイルスの取得は困難で、取得できたウイルスの変異部位は MBL-HCV1 抗体に対する耐性ウイルスの変異部位とは異なっていた。

5. HCV E2 タンパク質抗原で刺激したマウスリンパ節を移植した SCID マウスのリンパ球から作製したハイブリドーマの解析

リンパ節移植法によって免疫した SCID マウスからモノクローナル抗体を取得し、2 つのクローンが感染阻害活性を有していた。遺伝子型 1b の HCVpp に対して感染阻害活性を示す 2 つの抗体が遺伝子型 2a の HCVpp に対しても感染阻害活性を示した。

6. HCV 感染中和活性をもつモノクローナル抗体のエピトープ解析

モノクローナル抗体 A および C は線状エピトープを認識する抗体であることが示唆された。次に、モノクローナル抗体 A、C の線状エピトープを決定するために、HCV TH 株の E2 タンパク質の 10 個の連続するアミノ酸からなるペプチドを 3 アミノ酸残基ずつずらして合成したペプチドに対するモノクローナル抗体 A および C の反応性を検討した。その結果、モノクローナル抗体 A、C は、411I-420W (IQLINTNGSW) を認識した。

7. HCV 抗体断片の PEG 化による安定化

抗体クローンの 2 種の抗体断片を、SUNBRIGHT GL2-200GS2 と反応させ、PEG が 1 分子導入された結合体比率が最も高い反応が得られた。抗体断片に PEG を 1 分子導入した分子は、導入前の 1/3 程度の抗原結合性を維持していた

8. Naïve B 細胞における単一クローン増殖 (Clonality) 解析及び遺伝子発現解析

Naïve B 細胞には、CH-C 患者、健康人ともに

Clonality は検出されなかった。非ナイーブ B 細胞には、CH-C 患者にのみ IgM 及び IgG クラスの Mono-clonality が確認された。

9. TPV 3 剤併用療法中 CH-C 患者における B 細胞活性化と抗ウイルス状態の解析

3 剤療法開始 1 週後、30 例中全例で HCV RNA は血清中に残存していたが、B 細胞中 HCV RNA は 27 例 (90%) で消失していた。

10. 蛍光タグ付加 HCV を用いた細胞吸着分子の探索

蛍光タグ付き HCV はウイルス粒子産生能を保持しつつ継代が可能で、flowcytometry などを用いることにより感染細胞を定量的に検出することが可能であることが示された。

High content analysis では、核周囲のウイルス蛋白染色を定量することにより簡便かつ迅速な蛍光蛋白発現細胞数の定量解析に成功した。抗 CD81 抗体を用いたエントリー阻害試験では、70% 以上の感染阻害を示した。400 個の低分子化合物をスクリーニングした結果、35 個が 50% 以上の感染阻害効果を示した。このうちレプリコンアッセイにおいて抗 HCV 活性を認めたものは 1 個で、残りの 34 個はエントリー過程を阻害している可能性が示唆された。

11. 遺伝子型 4a の HCV 遺伝子の分離を終了した。現在レプリコンの構築を終え、培養細胞に導入してコロニー形成実験を行っている。また、既報の ED43 株の遺伝子を手し、比較する予定である。

D. 考察

ファージディスプレイ法により取得した 3 種類の抗体はいずれも GT2a HCVcc の IC50 は $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であり高い感染中和能を持っていることがわかった。さらに耐性ウイルスの取得によりこれらの抗体の感染中和エピトープは構造エピトープと考えられまた、耐性が得られにくいことも明らかとなった。

リンパ節を採取し、SCID マウスにおいて作製したハイブリドーマの中から、遺伝子型 1b および 2a の HCV の感染を中和する活性を持つ 2 種類のクローン (A、C) を得た。これらのモノクローナル抗体は、アミノ酸残基 412-423 番 (epitope I と呼ばれている) を認識した。このエピトープを認識する抗体として、PA33、3/11 および MBL-HCV1 抗体が知られている。

Naïve B 細胞の段階で CD69、CD71、AID が異常高値を示しており、この Naïve B 細胞が異常活性化 B 細胞となり、単一クローン増殖として

検出されていることが推察された。

蛍光タグ付き HCV の感染性を確認し、イメージアナライザーで蛍光発現ウイルス感染細胞の核周囲の蛍光蛋白量をデジタル化して定量的に評価することにより、感染細胞数を定量的かつ高効率に検出する測定系を構築した。さらにランダム化合物ライブラリーを用いた感染阻害化合物の一次スクリーニングにより侵入特異的阻害剤としての可能性を有する化合物を同定した。

E. 結論

1. E2 蛋白質に結合する環状ペプチドを同定した。この中には感染阻害活性を有するものがあった。

2. 単離した中和抗体は 1 価の scFv 抗体の方が高い中和活性を持っており、scFv 抗体は治療用抗体の候補抗体構造の 1 つとなった。ただし scFv 抗体の保存安定性は極めて低いため、今後 scFv 抗体の安定性の向上を図る。PEG 化を実施し、抗体配列の改変による scFv 抗体の安定化を目指す。取得した 3 種類の抗体の IgG 高発現細胞株および scFv の大量調製方法を構築することができた。

3. 免疫ウサギからも感染阻害効果のあるモノクローナル抗体が取得でき、IgG 高発現細胞株も樹立した。

4. HCV E2 タンパク質で免疫したリンパ節を SCID マウスの腎皮膜下に移植し、追加免疫後、SCID マウス由来脾細胞を用いて作製したハイブリドーマから遺伝子型 1b および 2a の HCVpp の感染を阻害する 2 つのモノクローナル抗体を取得した。これらの抗体は遺伝子型 1a、1b および 2a の E2 タンパク質に結合することから、broadly neutralizing antibody であることが期待される。

5. HCV 感染阻害抗体クローンの scFv (CL+) 構造は、活性を保持して PEG 修飾をすることが可能である。医薬品としての実用化に向けて、更に、修飾部位と修飾分子の検討、生体内安定性確認を行うことで、薬効とコストの面から IgG に勝る構造が得られるかについて評価すべきである。

6. Naïve B 細胞の段階で CD69、CD71、AID が異常高値を示しており、この Naïve B 細胞が異常活性化 B 細胞となり、単一クローン増殖として検出されていることが推察された。

7. 蛍光蛋白発現 HCV 培養系を用いた High content screening assay を樹立し、侵入阻害剤としての可能性を有する低分子化合物を同定した。この新たなアッセイシステムは、HCV 生活環のあ

らゆるステップに対する阻害剤探索や薬効評価への応用が期待される。

8. 遺伝子型 4a の全長 HCV 遺伝子のクローニングに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology*. 2013 145(2):447-455.e4.

2. Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, Wakita T, Bukh J, Jones CT, Rice CM, Abrignani S, Tyrrell DL, Houghton M. A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. *PLoS One*. 2013;8(3):e59776.

3. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of Hepatitis C Virus Genotype 3a in Cultured Cells. *Gastroenterology*. 2013 144(1):56-58.

4. Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel Cell Culture-Adapted Genotype 2a Hepatitis C Virus Infectious Clone. *J Virol*. 2012 86(19):10805-20.

5. Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol*. 2012 56(5):308-17.

6. Omori R, Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Kajiwara A, Ito T, Kogo M and Imawari M. Effects of interferon- α -transduced tumor cell vaccines and blockade of programmed cell death-1 on the growth of established tumors. *Cancer Gene Therapy*, 19: 637-643, 2012

7. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* 19: 608-614, 2012.

8. Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K and Imawari M. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral*

Hepatitis 19: 254-262, 2012.

9. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. Microbiology Immunology; 56(1): 1-9, 2012.

2. 学会発表および講演など

1. T Wakita. Hepatitis C Virus Replication Models and Anti-viral Development. The 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR) Sapporo, Japan (2012, 4. 16-19)
2. T Wakita. Basic concepts of Hepatitis C, 1st Asian Conference on Hepatitis B and C, HIV and Influenza, Beijing Marriott Hotel City Wall, Beijing, China (2012, 5. 18-19)
3. T Wakita. Production of cell culture adapted HCV strain, International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Cancer, Peking University Center for Infectious Diseases Research, Beijing, China (2012, 6. 21)
4. T Wakita, T Date, S Kim, T Kato, Novel Cell Culture-Adapted Hepatitis C Virus Infectious Clone, 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)
5. Arai J, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Miyashita M, Morikawa K, Eguchi J, Nozawa H, Tomoe S, Yoshida H and Imawari M. Rapid disappearance of HCV from B cells by the combination therapy with telaprevir, pegylated interferon-alpha-2b and ribavirin is associated with high levels of interferon stimulating genes expression in B cells of patients with chronic hepatitis C. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Washington DC 2013.11.5)
6. Miyashita M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Nozawa H, Tomoe S, Morikawa K, Eguchi J and Imawari M. Abnormal activation of naïve B cells in patients with chronic hepatitis C. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (Boston 2012.11.11)
7. A Kusano-Kitazume, N Sakamoto, Y Okuno, K Mori, M Nakagawa, S Kakinuma, S Nitta, M Murakawa, S Azuma, Y Nishimura-Sakurai, A Matsumoto, M Hagiwara, Y Asahina, M Watanabe. Antiviral effects and action mechanism of novel N-(morpholine-4-carbonyloxy) amidine compounds against hepatitis C virus. 63th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, 2012, Boston, MA.
8. Aly HH, Watashi K, Watanabe N, Kato T, Wakita T. Construction of Hepatitis C virus genotype 4a clone. 19th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Palazzo del Cinema, Lido-Venice, Italy, (2012, Oct. 5-9)

9. Watanabe N, Date T, Aly HH, Aizaki H, Wakita T. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells. 19th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses, Venice, Italy, October 2012.

10. 宮下みゆき、伊藤敬義、打越 学、下間 祐、荒井 潤、森川 賢一、江口 潤一、吉田 仁、井廻道夫 Telaprevir/PegIFN/RBV3 剤併用療法中の C 型肝炎患者における B 細胞単一クローン増殖及び B 細胞免疫異常の変化 第 17 回日本肝臓学会大会 (東京 2013. 10. 9)
11. 伊藤敬義、打越 学、井廻道夫 テラプレビル 3 剤併用療法中の C 型慢性肝炎患者における B 細胞系免疫反応と抗ウイルス状態 第 49 回日本肝臓学会総会 (東京 2013. 6. 6) シンポジウム 1 C 型肝炎の治療最先端
12. 荒井 潤、伊藤敬義、宮下みゆき、打越 学、下間 祐、森川賢一、江口潤一、吉田仁、井廻道夫 テラプレビル 3 剤併用療法による C 型慢性肝炎患者 B 細胞中 HCV 動態と治療開始早期 ISG 上昇との関連 第 49 回日本肝臓学会総会 (東京 2013. 6. 7)
13. 宮下みゆき、伊藤敬義、打越 学、下間 祐、荒井 潤、森川賢一、江口潤一、吉田仁、井廻道夫 C 型慢性肝炎患者におけるナイーブ B 細胞異常活性化と B 細胞 Clonality 発現及びインターフェロン抵抗性との関連 第 49 回日本肝臓学会総会 (東京 2013. 6. 7)
14. 伊藤敬義 C 型慢性肝炎患者の免疫異常 第 48 回日本肝臓学会総会 (金沢 2012. 6. 6) ランチョンセミナー
15. 宮下みゆき、伊藤敬義、井口桃子、打越学、下間祐、荒井潤、井廻道夫 C 型慢性肝炎患者におけるナイーブ B 細胞の異常活性化 第 48 回日本肝臓学会総会 (金沢 2012. 6. 7) 一般演題 (ポスター)
16. 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、荒井潤、井廻道夫 IL28 マイナー genotype の C 型慢性肝炎患者における IFN 治療早期の補体反応性低下と IFN 治療法選択における血清 C3 動態測定の実用 第 48 回日本肝臓学会総会 (金沢 2012. 6. 6) オープンワークショップ

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

メタボロミクスを活用した 統合失調症と気分障害のバイオマーカー開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 疾病研究第三部
功刀 浩
平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 血液、脳脊髄液、死後脳のメタボロミクス解析を行い、統合失調症のバイオマーカーとして血中ベタイン濃度、脳内のジペプチド分子 A、糖鎖修飾分子 B が有力であり、うつ病では脳脊髄液中のカンナビノイド関連分子 C、細胞保護分子 S、ジペプチド分子 H、血漿中トリプトファンが有力であることを明らかにした。

研究組織

- (1) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所
疾病研究第三部 功刀浩
- (2) 東京大学医学部附属病院
岩本和也
- (3) ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ
株式会社 大橋由明

A. 研究目的

平成 23 年 7 月より精神疾患は 5 大疾病の 1 つに位置づけられたが、うつ病や統合失調症において実用化されている生物学的指標（バイオマーカー）は今のところない。客観的診断や早期発見を可能にするためには、バイオマーカーを開発することは厚生労働行政上急務である。

近年、ゲノムやトランスクリプトーム、プロテオーム解析によるバイオマーカー探索が本格化している。しかし、メタボロミクス解析による探索は未だに少ない。分担研究者のヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT)社は、独自開発した CE-MS 法によるメタボローム解析により、

糖尿病性腎症、非アルコール性肝炎、インフルエンザ脳症等の血液バイオマーカーの発見に成功している。うつ病に関しては、カンナビノイドに関連する分子であるエタノールアミンリン酸(EAP)がバイオマーカーとなる可能性を指摘した。また、分担研究者の岩本らも、HMT 社と共同で統合失調症の血漿試料のメタボロミクス解析を行い、ホモシステイン酸代謝経路の異常を検出し特許を申請している。そこで、本研究はこれらの独創的な知見について多数のサンプルで検証し、臨床での有用性について詳細な検討を行い実用化をめざす。また、網羅的メタボロミクス解析を行い、統合失調症やうつ病の新たなバイオマーカーを見出すことを目的とする。

B. 研究方法

- ①精神疾患死後脳のメタボロミクス解析
米国スタンレー財団の死後脳（統合失調症、大うつ病、双極性障害、健常者それぞれ 15 人）の海馬、大脳皮質（固定した脳切片）を用いて CE-MS 法によるメタボロミクス解析を行った。