

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法の確立

令和3年度 総括研究報告書

研究代表者 坂元 政一

令和3（2021）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法の確立 -----	2
研究代表者 坂元 政一	
研究分担者 藤井 俊輔	
 (資料) -----	13
Fig. 1 ミロエストロール、デオキシミロエストロール及びクワクリンの構造	
Fig. 2 間接競合 MPs-EIA の概略図	
Fig. 3 BI 法の概略図	
Fig. 4 PEs-タンパク質コンジュゲートを固相化した間接競合 ELISA 様アッセイ 1 の概略図	
Fig. 5 PEs-biOVA を固相化した競合 ELISA 様アッセイ 2 の概略図	
Fig. 6 最適化した間接競合 MPs-EIA における KWA の検量線	
Fig. 7 競合 ELISA 様アッセイ 2 における ME の検量線	
Fig. 8 KWA-biOVA の(A)安定性と(B)特異性の評価	
Fig. 9 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 における KWA の検量線	
Fig. 10 競合 ELISA 様アッセイ 2 における KWA の検量線	
Fig. 11 (A) KWA-bimAb 2H2 又は、(B) KWA-bimAb 1D2 を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 における KWA の検量線	
Table 1 MPs-EIA の信頼性の評価	
Table 2 添加回収試験 MPs-EIA の正確性の評価	
Table 3 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 の信頼性の評価	
Table 4 競合 ELISA 様アッセイ 2 の信頼性の評価	
 II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	28

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究)

総括研究報告書

プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法の確立

研究代表者 坂元 政一 九州大学薬学研究院薬学研究院生薬学分野 准教授

研究要旨

マメ科のプエラリア・ミリフィカはタイ全土に分布する植物であり、強力な植物エストロゲン(PEs)を産生する。しかし、近年、その貯蔵根を原材料とした健康食品が美容効果を謳い文句に日本国内の女性に浸透しており、それらの摂取により女性特有の生理作用に対する健康被害が報告されている。そこで、その原因物質として挙げられる PEs のミロエストロール(ME)、デオキシミロエストロール(DME)及びクワクリン(KWA)に関し、磁気ビーズイムノアッセイ (MPs-EIA)とバイオインプリンティング(BI)を用いた検出法の二つの手法を用いてプエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法を確立することを本研究の最終目標としており、本年度は、昨年度十分量得られなかった DME の精製および MPs-EIA と BI 法を用いた系の確立を目指した。

先ず、昨年度、十分量単離のできなかった DME の単離精製を各種カラムクロマトグラフィーにより行った。しかし、高純度な DME を~2 mg しか得ることが出来なかった。そのため、当初の3年計画(平成31年度—令和3年度)を2年計画(平成31年度—令和2年度)に変更し、ME と KWA に対して MPs-EIA と BI を用いた検出法を確立することに変更した。

ME に対する MPs-EIA の確立では、調製した ME と MPs とのコンジュゲート(ME-MPs)が抗 ME モノクローナル抗体(mAb 1H1)と非特異的に吸着すること起因する高いバックグラウンドの抑制に向けた研究に取り組んだ。しかし、mAb 1H1 の MPs に対する非特異的吸着を抑制することはできなかった。本現象は、他の抗体(mAb)では認められなかったため、mAb 1H1 の物性に問題解決の糸口があることが予想された。一方、KWA に対する MPs-EIA の確立では、その信頼性、正確性及び安定性を確認後、植物サンプルやプエラリア・ミリフィカ含有健康食品サンプル中の KWA を実測し、その確立した検出系の有用性を示した。

BI を用いた検出法においては、ME では遊離の ME に対して約 50%の競合阻害が認められ、現在も ME の検出系の確立を目指した研究を遂行している。一方、KWA では、系の確立からサンプルを用いた KWA の実測まで完結し、プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法を確立した。

研究分担者 藤井 俊輔 長崎国際大学
健康管理学部・講師

A. 研究目的

マメ科のプエラリア・ミリフィカはタイ全土に分布する植物であり、強力な植物エストロゲン(PEs)を産生することから、タイ国内では古くから閉経期の「若返り」を求めて使用されている。しかし、近年、その貯蔵根を原材料とした健康食品が美容効果を謳い文句に日本国内の女性に浸透しており、それらの摂取により女性特有の生理作用に対する健康被害が報告されている。その原因物質として、PEsのミロエストロール(ME)、デオキシミロエストロール(DME)及びクワクリン(KWA)が挙げられる(Fig. 1)。特に、MEやDMEは、女性ホルモン様作用が大豆イソフラボンの数百倍～数千倍強い(1)。そのため、PEsの迅速且つ簡便な検出法の確立が健康被害の未然防止策と成り得る。

近年、申請者らはME、DME及びKWAをそれぞれ認識するモノクローナル抗体を調製し、ELISAや免疫クロマトグラフィーに応用した(2-6)。しかし、それでも分析時間には改善の余地が残った。そこで、本研究では磁気ビーズイムノアッセイ(Fig. 2, MPs-EIA)とバイオインプリンティング(BI)の二つの手法を用いて分析時間の改善を図り、従来法を凌駕するプエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法を確立する。

今年度は、これまでに十分量得られなかったDMEの精製とMPs-EIAとBI法を用いた系の確立を目指した。

磁気ビーズを用いたMPs-EIAは生体

分子を分離する手法として幅広く利用されている。MPsを用いることでインキュベーション時間を短縮し、分離・洗浄を効率化することができるため、様々なターゲット分子に対する高感度且つ迅速な測定法の開発がなされてきた(7-9)。多くの場合、ターゲット分子に対する抗体をMPsに修飾し、無標識のターゲット分子と酵素標識したものをを用いた間接競合法により検出を行う。つまり、抗体をMPsに修飾する過程と抗原に酵素を標識する過程が必要になるが、これは抗体-抗原間の親和性を下げ、感度と特異性を減少させる原因となりうる。この問題を解決するため、近年、ターゲット分子で直接修飾されたMPsに基づく免疫測定法を開発した(10)。これにより、非効率的な酵素標識の過程を省略することでき、従来法と比較し、分析時間の短縮が可能となった。更に、MPs-EIAは、対象化合物とMPsのコンジュゲートを用いて、溶液中に拡散させた状態で抗原-抗体反応が進行する。そのため、MPsの優れた懸濁性と大きな表面積によりELISAと比較し大幅な分析時間の短縮が期待できる。

BI法の原理は、1970年代後半に確立された分子インプリンティング法に基づいており、タンパク質などのバイオポリマーを用いてその内部に作った標的分子に対する相補的な空隙を分子認識能に利用する方法である。その手順はシンプルで、(i) 酸性条件下において、HRPの折り畳み構造を解く。次に、(ii) 鑄型となるPEs分子を加え、変性したHRPとの分子間相互作用を促し、PEs結合部位を有する立体配置を形成させる。そして、(iii) 中和後、新

たに形成された高次構造を安定化させるため二官能性試薬(グルタルアルデヒド等)を用いて HRP を架橋する。最後に、(iv) 透析により鑄型 PEs 分子を取り除くといったものである (Fig. 3)。本法は、動物を用いる必要が無く、抗体作製と比べて操作が極めて簡単である。このことは、バイオインプリンティング技術の特筆すべき長所の一つである。一方で、この技術を用いた低分子化合物の分析法は、カビ毒の aflatoxin B1 を認識する卵白アルブミン (OVA) (11) や deoxynivalenol と zearalenone を同時認識するウシ血清アルブミン (BSA) (12) など、数報に限られているのが現状である。

MPs-EIA と BI を用いた検出法により迅速性の優れた PEs の品質評価法を確立する。

B. 研究方法

1. DME の精製

DME の精製はシリカゲル(Silica gel 60, ナカライテスク, Kyoto, Japan)、オタクデシル基結合シリカゲル(ODS、Cosmosil 75C18-OPN, ナカライテスク, Kyoto, Japan)、Sephadex LH-20 (Cytiva, MA, USA) 及び分取用 HPLC を用いた各種カラムクロマトグラフィーにより行った。

2. 植物及びサプリメント抽出物の調製

各植物及びサプリメントサンプルを 50 mg 精秤し、メタノール 1 mL を加え 30 分間超音波処理した。その後、遠心 (10000 rpm, 4°C, 10 分間) し、上清を採取した。これを 5 回繰り返す、溶媒を除去したものに、メタノール 1 mL を正確に加えて溶

解させたものを抽出物とし、使用時まで -20°C で保存した。

3. MPs-EIA の確立

3.1. PEs-MPs の作製

MPs には、表面にアミノ基が修飾されている異なる 3 種類の MPs [SiMAG-Amine beads (chemicell GmbH, Germany); SupraBead-Amine (Recenttec, Taipei); FG beads NH2 beads (Tamagawa, Japan)] とカルボキシル基の修飾されている MPs [Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen, USA)] を用いた。アミノ基が修飾された MPs では、カルボニルジイミダゾール(CDI)を介した方法とマンニッヒ反応を用いてコンジュゲートの調製を行い、カルボキシル基が修飾された MPs では、結合アミノ基を増やしてから、マンニッヒ反応と CDI を介した方法を用いた方法を用いた

CDI を用いた方法では、PEs を CDI と共に DMF で溶解後、遮光、室温で 3 時間攪拌することで PEs を活性化させた。次に、MPs (50 µL : 1.5 mg 相当) を 1.5 mL シリコナイズチューブに分注しに懸濁した。磁気スタンド (Dynamag™-Spin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて分離・洗浄後、PBS に懸濁させ、反応後の PEs 溶液を加えて室温で 24 時間緩やかに攪拌した。その後、精製水による磁気分離・洗浄を行い、1% BSA 溶液を加えて室温で 4 時間緩やかに攪拌した。その後、PBS による磁気分離・洗浄を行い、終濃度 10 µg/mL となるように PBS で懸濁し、4°C にて保存した。

マンニッヒ反応を用いた方法では、PEs とホルムアルデヒド溶液(37%)を混和後、

MPs (1.5 mg 相当を)添加し、24 時間攪拌した。この際、PEs の添加量で MPs への結合数を制御した。その後、上記同様 1%BSA 溶液でブロッキングを行い、その後、PBS による磁気分離・洗浄を行い、終濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように PBS で懸濁し、4°Cで保存した。

PEs-MPs の成否は MPs-EIA より得られた吸光度から判断した。

3.2. 間接競合 MPs-EIA

イムノプレート (F96 Maxisorp Nunc-immuno plate, Thermo fisher scientific Nunc A/S, Roskilde, Denmark)に PBS で懸濁した PEs-MPs (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 、競合物質及び一次抗体を各々 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつこの順に分注し、37°Cで 30 分間インキュベートした。磁気プレート上にプレートを 3 分間静置し、溶液をピペットにて取り除き、TPBS を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注した。これを 3 回繰り返し、溶液を取り除いた (以下、「磁気分離・洗浄」) 後、TPBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗マウス IgG ヤギ抗体溶液を二次抗体として 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、30 分間インキュベートした。磁気分離・洗浄後、基質溶液の TMB 溶液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注し、15 分間インキュベート後、1 M の硫酸を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注した。その後、磁気プレート上にプレートを 1 分間静置し、上清を 150 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ別のイムノプレートに移した。プレートリーダー (MultiscanTM FC Microplate Photometer, Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)でこの溶液の 450 nm における吸光度(OD_{450})を測定した。

3.3. 間接 MPs-EIA

間接競合 MPs-EIA と同様に PBS で懸濁した PEs-MPs を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注後、一次抗体のみを 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ分注した。以下は競合的 MPs-EIA と同様である。

4. BI を用いた検出法の確立

4.1. BI 法

HRP もしくは OVA (1 mg) に DW (1 mL) を加え、室温で 1 分間攪拌して溶解させた。その後、HCl (0.1 M, 150 μL) を加えることで pH 3 に調整し、室温で 10 分間攪拌した。続いて、標的分子溶液 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 20% (v/v) MeOH, 100 μL) を加え、室温で 10 分間攪拌した。そして、NaOH (0.1 M, 200 μL) を加えることで pH 8 に調整した後、GA (1% (v/v), 100 μL) を加え、4°Cで 30 分間攪拌した。4°Cで一晩静置した後、透析を 4°Cで 48 時間行い、PEs-biHRP 及び PEs-biOVA 溶液を得た。この時、標的分子溶液の代わりに 20% (v/v) MeOH を加えることで nonPEs-biPROs 溶液を得た。それぞれ使用時まで 4°Cで保管した。

4.2. KWA-HSA の作製

Kwa (2.5 mg) と CDI (3.4 mg) を sdDMF (250 μL) に溶解し、遮光、室温で 3 時間攪拌した。その後、HSA (4.8 mg) を 50 mM carbonate buffer (2 mL) に溶解した溶液に加え、室温で一晩攪拌した。そして、DW に対して透析を 4°Cで 48 時間行った後、凍結乾燥により KWA-HSA (3.8 mg) を得た。使用時まで -20°Cにて保存した。

4.3. KWA-HRP の作製

KWA (1.9 mg) と CDI (2.2 mg) を sdDMF (200 μ L) に溶解し、遮光、室温で 3 時間攪拌した。その後、HRP (4.0 mg) を 50 mM carbonate buffer (2.1 mL) に溶解した溶液に加え、室温で一晩攪拌した。そして、DW に対して透析を 4°C で 48 時間行った後、凍結乾燥により KWA-HRP (3.0 mg) を得た。使用時まで -20°C にて保存した。

4.4. PEs-タンパク質コンジュゲートを固相化した間接競合 ELISA 様アッセイ 1 (Fig. 4)

50 mM carbonate buffer (pH 9.6) に溶解した PEs-タンパク質のコンジュゲート (2 μ g/mL) をイムノプレートに 100 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄 (以下、「洗浄」) した後、各ブロッキング液を 300 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。ブロッキングを行わない時はこの操作を省略した。続いて、競合物質の PEs (in 5% (v/v) MeOH) を 50 μ L/well、一次抗体を 50 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、作製した PEs-biOVA 又は nonPEs-biOVA を T-PBS でそれぞれ希釈したものを 100 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、T-PBS で 4000 倍希釈した一次抗体 (anti-OVA antibody [6C8]) を 100 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、T-PBS で 20000 倍希釈した二次抗体 (anti-mouse IgG1 goat antibody (HRP)) を 100 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液 (TMB) を 100 μ L/well 分注し、37°C で 20 分間イ

ンキュベートした。その後、H₂SO₄ (1 M) を 100 μ L/well 分注し、プレートリーダーにより OD₄₅₀ を測定した。

4.5. PEs-biOVA を固相化した競合 ELISA 様アッセイ 2 (Fig. 5)

50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した各濃度の PEs-biOVA 又は nonPEs-biOVA をイムノプレートに 100 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、BSA (1% (w/v) in PBS) を 300 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートし、ブロッキングを行った。ブロッキングを行わない時は、この操作を省略した。競合物質の PEs (in 5% (v/v) MeOH) を 50 μ L/well、標的分子-HRP を 50 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、PBS で希釈した標的分子 - HRP を 100 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液 (TMB) を 100 μ L/well 分注し、37°C で 20 分間インキュベートした。その後、H₂SO₄ (1 M) を 100 μ L/well 分注し、プレートリーダーにより OD₄₅₀ を測定した。

C. 研究結果及び考察

各種クロマトグラフィー (シリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー及び HPLC) を駆使し、プエラリア・ミリフィカの根皮 (~20 kg) より精製を試みた。その結果、高純度な DME が約 2 mg 得られたものの MPs-EIA 及び BI を用いた検出法のいずれにおいても不十分な量であった。これは、DME と ME の構造類似性による極性の近さや DME の不安定性が単

離を困難にした原因と推測される。DME は時間の経過とともに分解し、ME に変換されることが報告されている。このことから、DME を得るためにはより多くの原材料を要することが判明した(13)。令和 2 年 5 月までに高純度なものが十分量得られなかったため、当初の 3 年計画(平成 31 年度—令和 3 年度)を 2 年計画(平成 31 年度—令和 2 年度)に変更し、ME と KWA に対して MPs-EIA と BI を用いた検出法を確立することに変更した。

ME の検出を目的とした MPs-EIA の確立に関しては、MPs (4 種類)及び ME と MPs の(ME-MPs)コンジュゲートの調製方法を検討し、mAb 1H1 の MPs に対する非特異的吸着を抑制する方法を模索した。MPs には、表面にアミノ基が修飾されている異なる 3 種類の MPs [SiMAG-Amine beads (chemicell GmbH, Germany); SupraBead-Amine (Recenttec, Taipei); FG beads NH₂ beads (Tamagawa, Japan)]とカルボキシル基の修飾されている MPs [Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen, USA)]を用いた。アミノ基が修飾された MPs では、マンニッヒ反応と CDI を介した方法を用いてコンジュゲートの調製を行い、カルボキシル基が修飾された MPs では、結合アミノ基増やしてから、マンニッヒ反応と CDI を介した方法を用いた方法を用いたが、いずれの場合も mAb 1H1 の MPs に対する非特異的吸着を抑制することはできなかった。この現象は、他の抗体 (mAb)では認められないため、mAb 1H1 の物性に問題解決の糸口があることが予想される。そのため、新たな抗 ME mAb を作製することが解決への近道だと考える。

KWA の検出を目的とした MPs-EIA の確立では、昨年度までに KWA-MPs を用いて MPs-EIA の最適化を検討していた。そこで、今年度は、信頼性、正確性及び安定性の評価と植物サンプルやプエラリア・ミリフィカ含有健康食品サンプル中の KWA の定量を確立した MPs-EIA により行った。最適条件下で間接競合 MPs-EIA を行った結果、KWA の検量域が 2.44—78.1 ng/mL であり、検出限界が 1.90 ng/mL と高感度であった(Fig. 6)。また、Inter-、Intra-assay 試験における良好な最大変動係数(10%以下)及び ELISA による定量値との高い相関性から本系の高い信頼性が示唆された(Table 1)。更に、添加回収試験においては、92.4—115.5%の範囲で KWA を回収することができ、本系が植物抽出物中の夾雑物の影響を受けず、試料溶液中の KWA を正確に定量可能であることが示唆された(Table 2)。併せて、検討した最適条件において分析時間が ELISA の 1/3 以下であることから、従来法にかわる新たな迅速且つ簡便な分析手法として有用であることが示唆された。

ME の検出を目的とした BI を用いた検出法の確立においては ME を鑄型分子として BI 法を行い、ME-biHRP 及び ME-biOVA を調製した。ME-biHRP は、アッセイ 1 (Fig. 4)の方法で、また、ME-biOVA は、ME-cBSA コンジュゲートを固相化したアッセイ 1 (Fig. 4)及び ME-HRP を用いたアッセイ 2 (Fig. 5)の方法により ME に対する分子認識能を評価した。アッセイ 1 により活性を評価した結果、ME-biHRP には ME の認識能がないことが判明した。また、アッセイ 1 による ME-biOVA の ME 認識

能の評価では、固相化する PEs-タンパク質コンジュゲートに ME-cBSA を用いたことによる ME-biOVA の cBSA に対する非特異的吸着が原因となり、競合阻害が見られなかった。しかしながら、アッセイ 2 による ME 認識能の評価では、遊離の ME に対して約 50%の競合阻害が認められた。そこで、ME の濃度を振って検量線の獲得を試みた結果、0.78–12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で ME の定量が可能であることが判明した(Fig. 7)。次年度を目途にこの系の確立、完結を目指している。

BI を用いた KWA 検出系の確立では、まず、KWA-biHRP を調製し、アッセイ 1 により KWA 認識能を評価した。その結果、KWA に対する認識能は認められず、KWA-biHRP をアッセイ 1 のプローブとして用いることはできないことが判明した。一方、OVA を用いた KWA-biOVA では、KWA-HSA コンジュゲートを固相化したアッセイ 1 及びアッセイ 2 の両方で遊離の KWA に対する競合阻害が認められた。

そこで、アッセイ 1 による KWA 定量分析法を開発した。まず、固相化コンジュゲートとして用いる KWA-HSA を CDI を介して作製した。続いて、固相化 KWA-HSA と KWA-biOVA を用いたアッセイ 1 の最適化を行った。その結果、KWA-biOVA の濃度は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、イムノプレートは 96 Well ELISA Microplate, PS, MICROLON®, F-Bottom; greiner bio-one (Kremsmünster, Germany) を使用し、ブロッキングを行わないことが最適な条件であることが判明した。そして、この条件下で固相化 KWA-HSA と KWA-biOVA を用いたアッセイ 1 を行い、KWA-biOVA 作製

時の最適な透析液は 5% (v/v) Gly in PBS であり、4°C で 5 日間保存可能であること、更に、biOVA は DZE や GNE などのイソフラボン骨格を有する化合物に対する交差反応性を有することが確認された (Fig. 8)。これらの条件の下、KWA の濃度を振ってアッセイ 1 を行った結果、検量域は KWA 濃度 4.69–75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LOD は 4.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることが判明した(Fig. 9)。その検量域におけるウェル間及びプレート間の測定値の CV は最大でそれぞれ 7.4%、7.5%であることから、本系の高い信頼性が確認された。また、これを用いてプエラリア・ミリフィカ抽出物中の KWA 定量を行い、8 サンプル中 7 サンプルにおいて定量可能であり、そのうち 6 サンプルにおいては、間接競合 ELISA で得られた値と比較して、その値が大きくなった (Table 3)。

続いて、固相化した KWA-biOVA と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 による KWA 定量分析法を開発した。まず、KWA-HRP を CDI を介して作製した。次に、固相化 KWA-biOVA と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様試験の最適化を行い、ブロッキングを BSA (1% (w/v) in PBS) で行い、biOVA 濃度が 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、KWA-HRP 濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の組み合わせが最適な条件であることが判明した。この条件下で固相化 KWA-biOVA と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 を行ったところ、その検量域は KWA 濃度 3.91–62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LOD は 2.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であることが判明した(Fig. 10)。また、その検量域におけるウェル間及びプレート間の測定値の CV は最大でそれぞれ 8.7%、

7.0%であり、本系の高い信頼性が認められた。更に、この定量系を用いてプエラリア・ミリフィカ抽出物中の Kwa 定量を行ったところ、8 サンプル中 6 サンプルにおいて定量ができ、そのうち 5 サンプルにおいて、その値が間接競合 ELISA で得られた値よりも大きくなった (Table 4)。

最後に、様々なタンパク質への BI による KWA 認識能の付与を行った。その結果、モノクローナル抗体である mAb 2H2 と mAb 1D2 にも KWA 認識能の付与を行えることが判明した。そこで、それぞれの biPROs と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 の最適化を行ったところ、KWA-bimAb 2H2 と KWA-bimAb 1D2 の濃度が 225 µg/mL、KWA-HRP の濃度が 50 µg/mL の組み合わせが最適であることがわかった。続いて、最適化した条件の下 KWA-bimAb 2H2 と KWA-bimAb 1D2 並びに KWA-HRP を用いたアッセイ 2 による KWA 検量域の検討を行った結果、それぞれ KWA 濃度 2.34–37.5 µg/mL (LOD: 0.75 µg/mL)、2.34–75 µg/mL (LOD: 0.65 µg/mL) であることが判明した (Fig. 11)。また、バイオインプリンティングが MAbs の抗原認識能に及ぼす影響を検討したところ、KWA-bimAbs がバイオインプリンティングにより獲得した新たな分子認識能と引き換えに従来の抗原認識能を失うことが示唆された。

D. 結論

KWA、ME 及び DME はマメ科クズ属植物プエラリア・ミリフィカ特有の成分であり、古くからタイやミャンマーで美容・健康を保つための薬として使用されてき

た。また、プエラリア・ミリフィカにはこうしたエストロゲン作用の他にも、抗骨粗鬆症作用や抗腫瘍作用等の薬効を有することも明らかになっており、非常に興味深い薬用植物である。近年では更年期障害の改善や、美肌効果を目的としたサプリメントにプエラリア・ミリフィカが使用されており、こうした製品は今日の日本でも簡単に入手することが可能である。しかしながら、サプリメント中の不均一な分量から生じる健康被害や、基原植物の信憑性が疑われる製品が問題視されている。特にプエラリア・ミリフィカ含有健康食品による健康関連相談は 2015 年以降に集中しており、2017 年 4 月までに寄せられた 209 件のうち 200 件近くが 2015 年以降に報告されていることから、プエラリア・ミリフィカ特有成分である KWA、ME 及び DME の検出はこれらの問題解決に繋がる重要な課題である。

これまでこれらの定量分析法として HPLC や間接競合 ELISA などの手法が開発されてきたが、コスト面や分析時間、操作の煩雑さ等、何かしらの問題を抱えていた。これを解決する手法として、本研究では MPs を用いた免疫学的測定法「MPs-EIA の開発」と「BI を用いた検出法の開発」に取り組んだ。MPs は優れた懸濁性と大きな表面積といった性質を有するため、短時間での PEs の測定が期待できる。また、BI を用いた検出法では、いとも簡単に分子認識能を有するタンパク質の創出が可能であり、抗体に取って代わる可能性を秘めている。

本年度は、昨年度十分量得られなかった DME の精製および MPs-EIA と BI 法を

用いた系の確立を目指した。

先ず、昨年度、十分量単離のできなかった DME の単離精製を各種カラムクロマトグラフィーにより行った。しかし、高純度な DME を~2 mg しか得ることが出来なかった。

ME に対する MPs-EIA の確立では、調製した ME-MPs が抗 ME モノクローナル抗体(mAb 1H1)と非特異的に吸着することに起因する高いバックグラウンドの抑制に向けた研究に取り組んだ。しかし、mAb 1H1 の MPs に対する非特異的吸着を抑制することはできなかった。原因として他の抗体(mAb)では認められないため、mAb 1H1 の物性に問題解決の糸口があることが予想された。一方、KWA に対する MPs-EIA の確立では、その信頼性、正確性及び安定性を確認後、植物サンプルやプエラリア・ミリフィカ含有健康食品サンプル中の KWA を実測し、その有用性を示した。

BI を用いた検出法においては、ME では遊離の ME に対して約 50%の競合阻害が認められ、検量線の獲得に成功した。そのため、現在も ME の検出系の確立を目指した研究を遂行している。一方、KWA では、系の確立からサンプルを用いた KWA の実測まで完結し、プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法を確立した。

現在も市場にはプエラリア・ミリフィカを原材料とした健康食品があふれており、健康被害を少しでも減らすためには PEs を指標とした安全性の評価が求められる。本研究における PEs の迅速な検出法の確立は、原材料のプエラリア・ミリフィカを扱う販売事業主の安全性管理への

負担を軽減し、その使用拡大が健康被害の未然防止に繋がる可能性を秘めている。今後は、開発した KWA を指標とした品質評価法の社会への実装を目指す。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sakamoto S, Eto R, Nuntawong P, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Fujii S, Tanaka H, Morimoto, S.

“Kwakhurin-magnetic particles conjugates enabled fast enzyme immunoassay for the detection of kwakhurin in *Pueraria candollei*”, *Phytochem. Anal*, **31**(6): 930-936 (2020).

2) Phaisan S, Yusakul G, Nuntawong P, Sakamoto S, Putalun W, Morimoto S, Tanaka H.

“Immunochromatographic assay for the detection of kwakhurin and its application for identification of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham” *Phytochem. Anal.*, in press (2021).

3) Juengsanguanpornasuk W, Yusakul G, Kitisripanya T, Krittanaiia S, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Putalun W.

“Quantification of methylisomiroestrol, a phytoestrogen of *Pueraria candollei*, by enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with a high-performance liquid chromatography” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **192**: 113674 (2021).

2. 学会発表

(国内学会)

1) 坂元 政一、衛藤 亮太、Poomraphie Nuntawong、Gorawit Yusakul、Waraporn Putalun、藤井 俊輔、田中 宏幸、森元 聡 “磁気ビーズ免疫アッセイを用いたプエラリア・ミリフィカに含有するクワクリンの定量分析法の確立” 日本薬学会 第 141 年会、広島国際会議場、JMS アステールプラザ(広島)、2021 年 3 月 26-29 日、27P02-044

(国際学会)

2) Sakamoto S, Eto R, Nuntawong P, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Fujii S, Tanaka H, Morimoto S. “Development of magnetic particles-based enzyme immunoassay for the detection of kwakhurin in *Pueraria candollei*” 3rd International Conference on Traditional Medicine, Phytochemistry and Medicinal Plants (TMedPM-2020) (Online Meeting), November 2-4, 2020 (poster) E-poster 2

3) Minami K, Yusakul G, Fujii S, Sakamoto S, Morimoto S. “Bioimprinting technique for the quantitative analysis of kwakhurin” 3rd International Conference on Traditional Medicine, Phytochemistry and Medicinal Plants (TMedPM-2020) (Online Meeting), November 2-4, 2020 (poster) E-poster 4

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

H. 参考文献

1) Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **94**(5): 431-443 (2005).

2) Yusakul G, Togita R, Minami K, Chanpokapaiboon K, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Tanaka H, Sakamoto S, Morimoto S. *Fitoterapia*, **133**: 23-28 (2019).

3) Krittanai S, Kitisripanya T, Udomsin O, Tanaka H, Sakamoto S, Juengwatanatrakul T, Putalun W. *Biomed Chromatogr*, **32**: e4330 (2018).

4) Yusakul G, Kitisripanya T, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Putalun W. *J Nat Med*, **71**: 641-650 (2018).

5) Kitisripanya T, Inyai C, Komaikul J, Krittanai S, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Morimoto S, Putalun W. *J Nat Med*, **71**: 659-664 (2017).

6) Kitisripanya T, Krittanai S, Udomsin O, Juthasit K, Komaikul J, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Morimoto S, Putalun W. *Planta Med*, **83**(10): 855-861 (2017).

7) Haukanes BI and Kvam C. *Bio/Technology*, **11**: 60-63 (1993).

8) Stejskalová E, Horáková P, Vacek J, Bowater RP, Fojta M. *Anal Bioanal Chem*, **406**: 4129-4136 (2014).

9) Sun Y, Li Y, Meng X, Meng X, Qiao B, Si Z, Hu P, Lu S, Ren H, Liu Z, Zhang Y, Meng L, Zhou Y. *Sens. Actuators B Chem*, **252**: 633-640 (2017).

10) Sakamoto S, Wada S, Morita Y, Yamaguchi T, Tanaka H, Morimoto S. *Talanta*, **194**:731-736 (2019).

11) Gutierrez RAV, Hedström A, Mattiasson B.

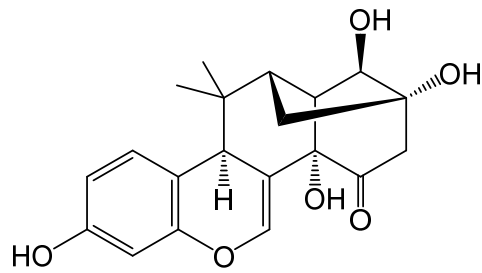
Biotechnol. Rep, **11**: 12-17 (2016).

12) Beloglazova N, Lenain P, Tessier M, Goryacheva I, Hens Z, Saeger SD. *Talanta*, **192** :169-174 (2019).

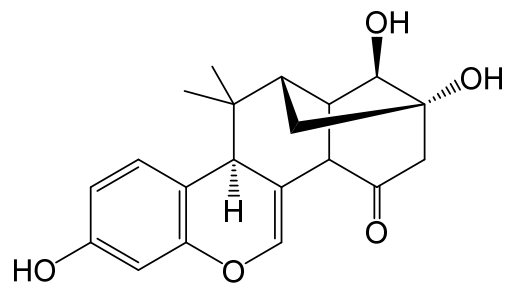
13) Udomsin O, Juengwatanatrakul T, Yusakul G, Putalun W. *J. Funct. Foods*, **19**: 269-277 (2015).

Figure 1

(A)



(B)



(C)

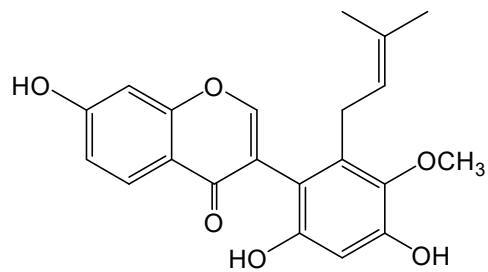


Fig. 1 ミロエストロール[ME, (A)]、デオキシミロエストロール[DME, (B)]及びクワクリン[KWA, (C)]の構造

Figure 2

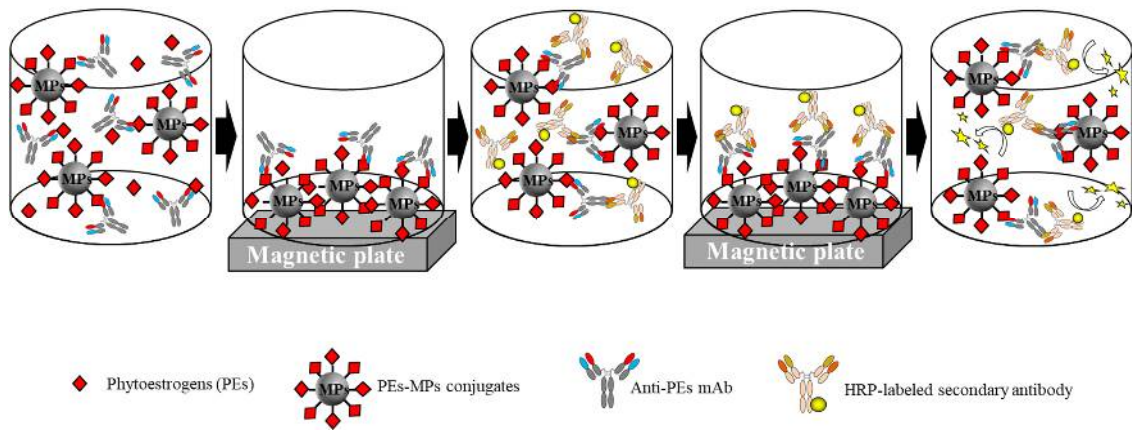


Fig. 2 間接競合 MPs-EIA の概略図

Figure 3

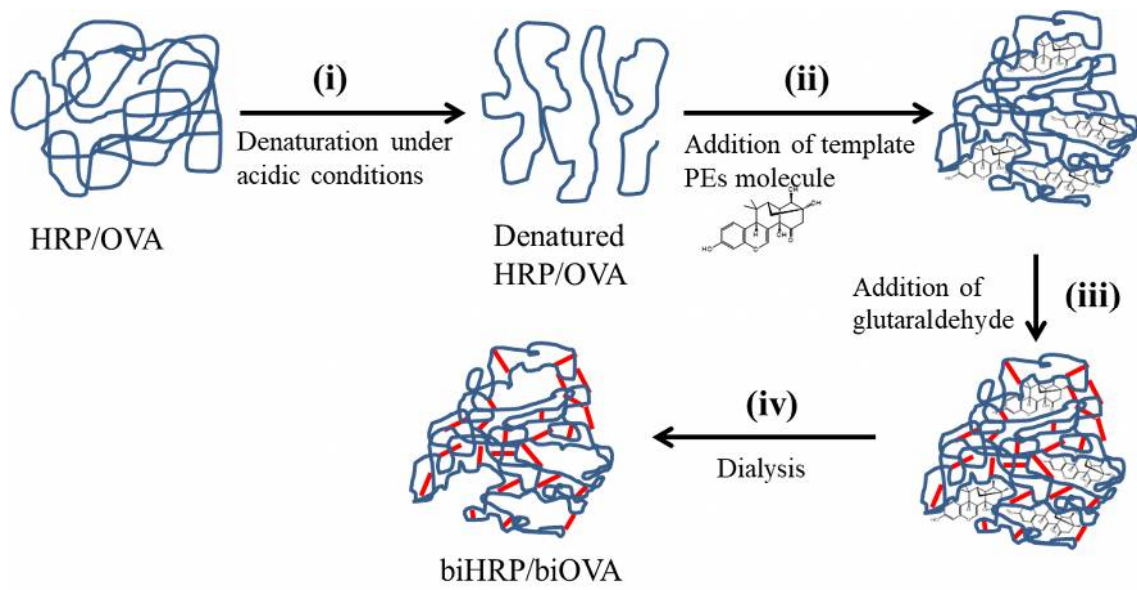


Fig. 3 BI 法の概略図

Figure 4

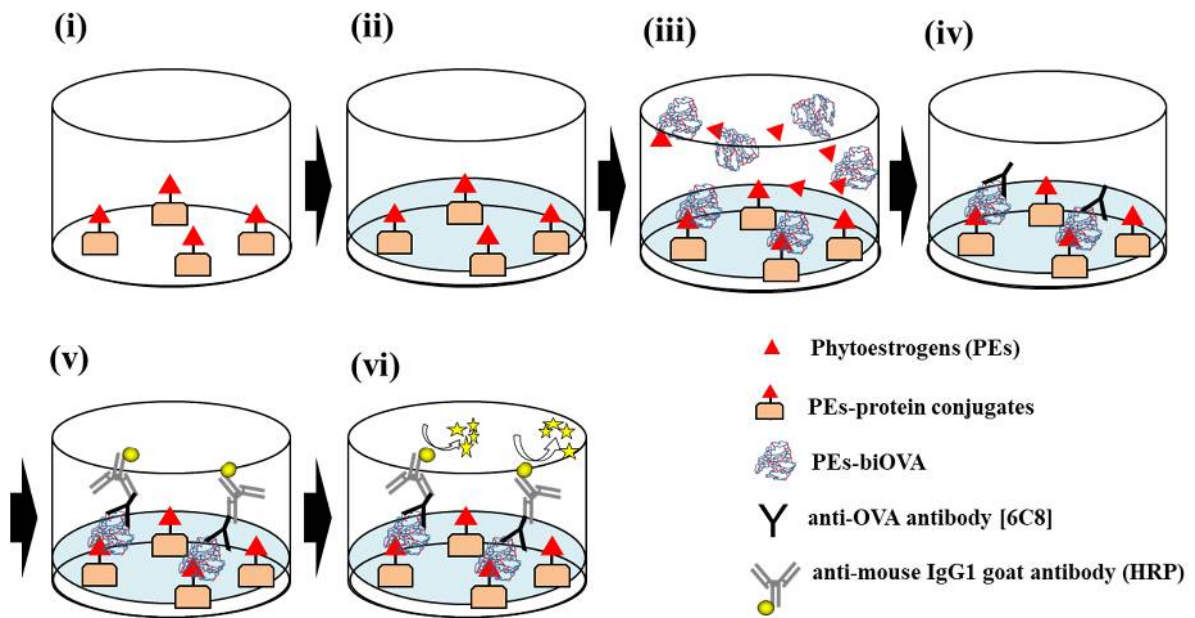


Fig. 4 PEs-タンパク質コンジュゲートを固相化した間接競合 ELISA 様アッセイ 1 の概略図

Figure 5

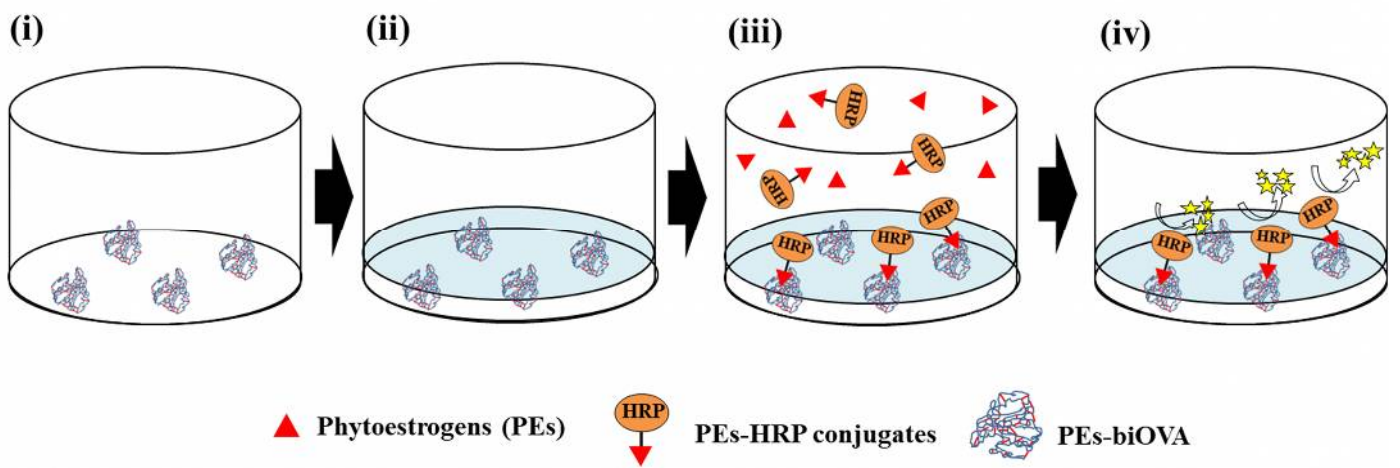


Fig. 5 PEs-biOVA を固相化した競合 ELISA 様アッセイ 2 の概略図

Figure 6

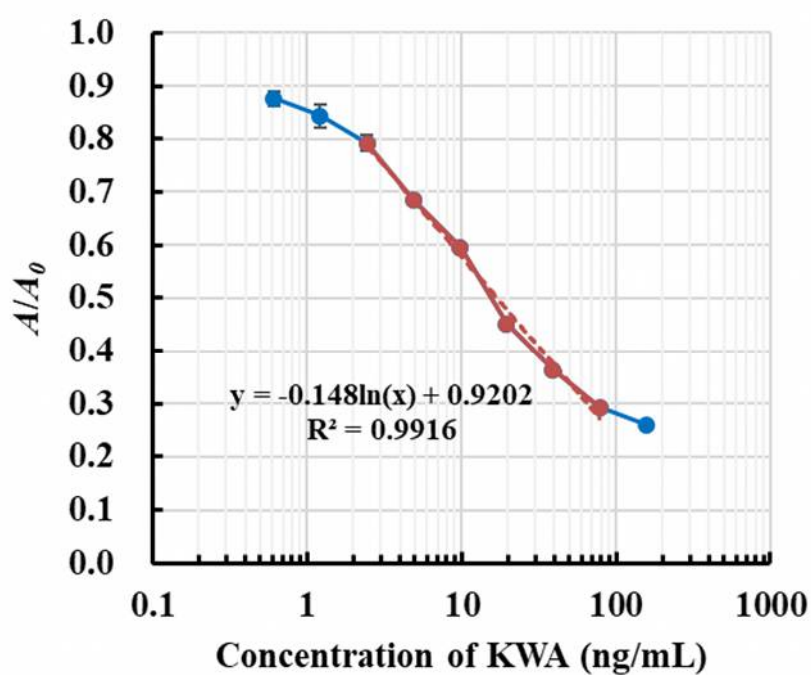


Fig. 6 最適化した間接競合 MPs-EIA における KWA の検量線

A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、 A_0 は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

Figure 7

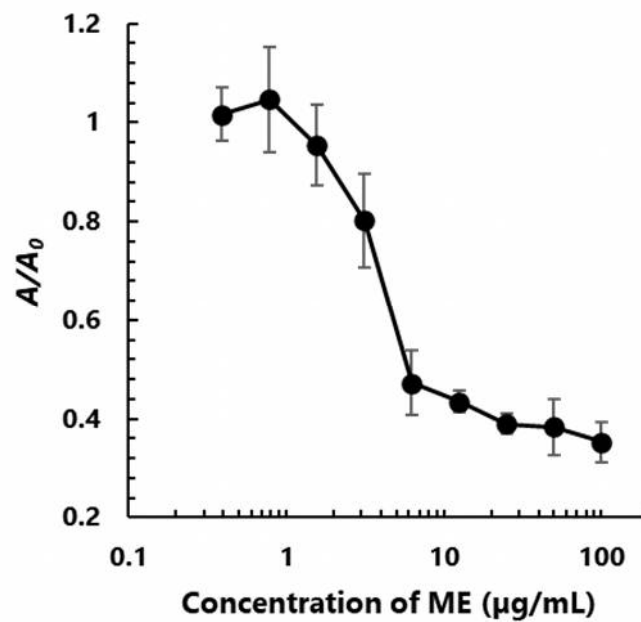
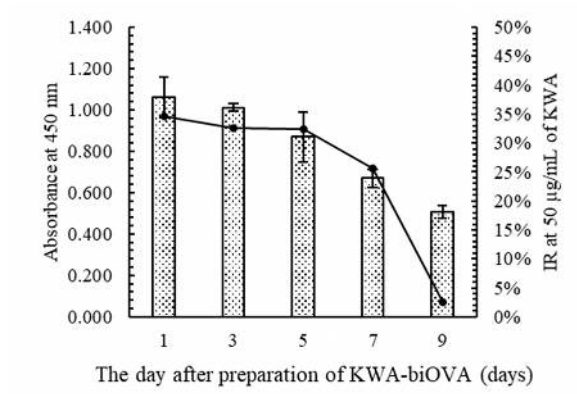


Fig. 7 競合 ELISA 様アッセイ 2 における ME の検量線

A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、 A_0 は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

Figure 8

(A)



(B)

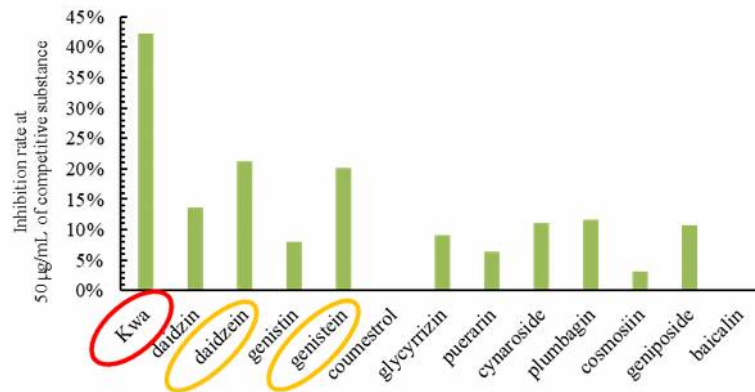


Fig. 8 KWA-biOVA の(A)安定性と(B)特異性の評価

Figure 9

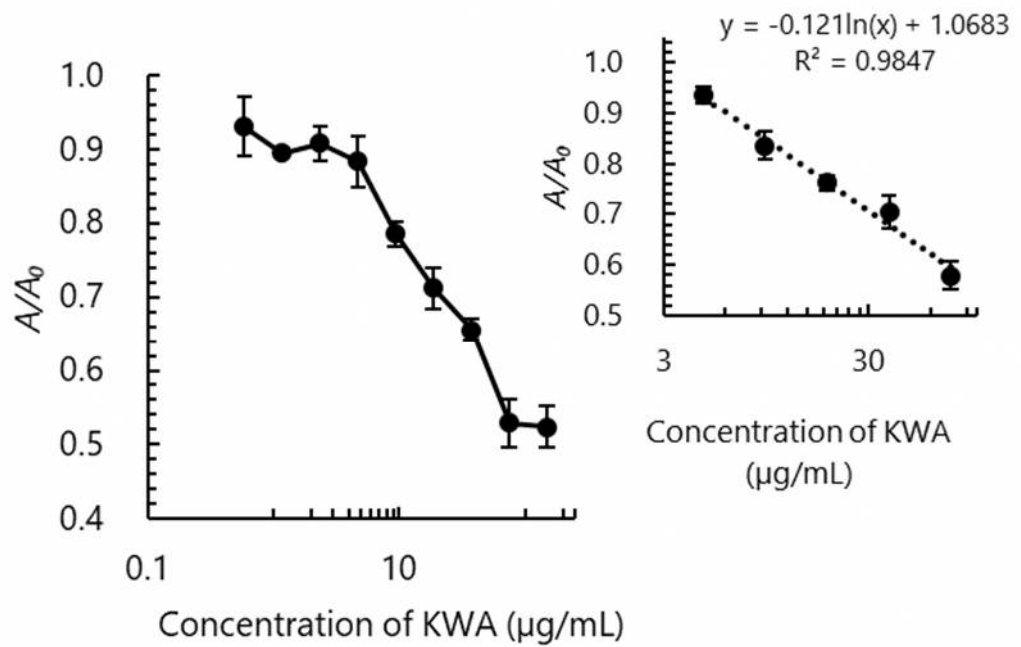


Fig. 9 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 における KWA の検量線

A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、 A_0 は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

Figure 10

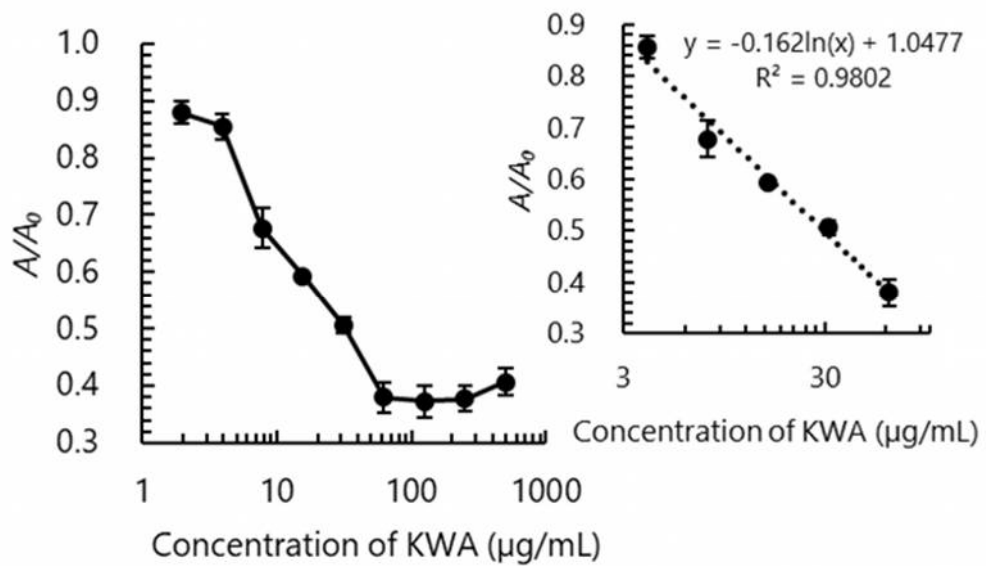


Fig. 10 競合 ELISA 様アッセイ 2 における KWA の検量線

A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、 A_0 は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

Figure 11

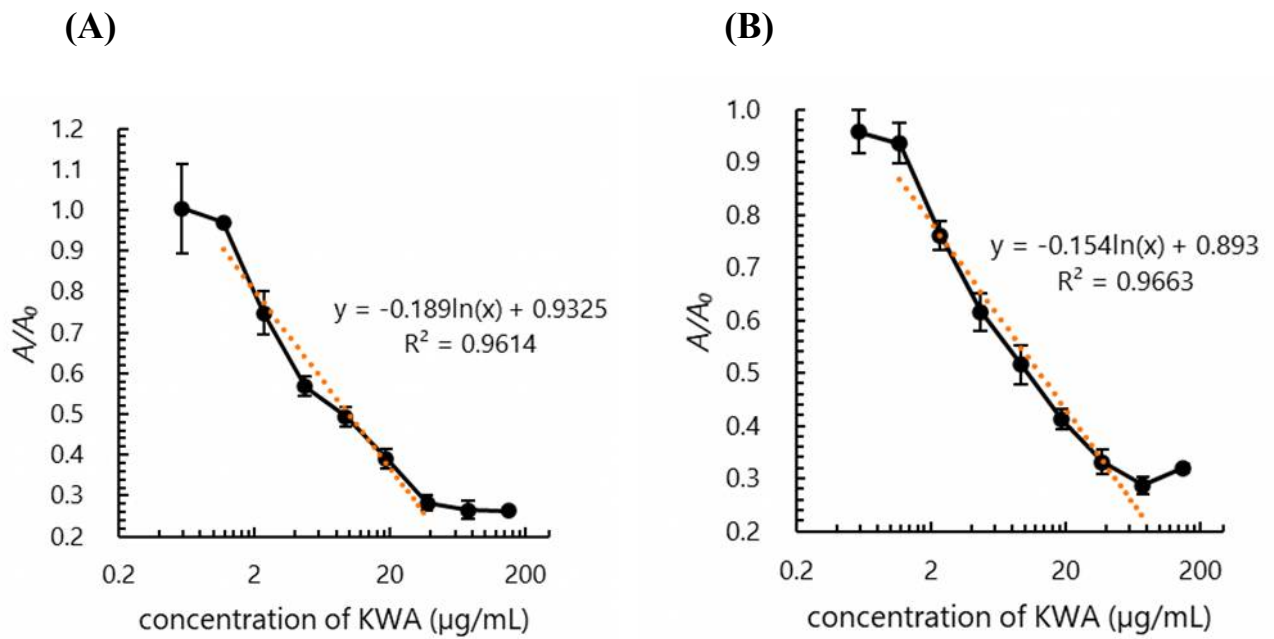


Fig. 11 (A) KWA-bimAb 2H2 又は、(B) KWA-bimAb 1D2 を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 における KWA の検量線

A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、 A_0 は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

Table 1: MPs-EIA の信頼性の評価**(A)**

Concentration of KWA (ng/mL)	CV (%)	
	Intra- assay (n = 6)	Inter- assay (n = 5)
2.44	1.57	0.94
4.88	1.49	2.36
9.76	0.59	5.32
19.5	1.35	5.77
39.0	1.94	5.37
78.1	3.10	1.81

(B)

Sample name	MPs-EIA		icELISA	
	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)
<i>P. mirifica</i> root bark 1	2.35×10^{-2}	10.5	2.39×10^{-2}	5.4
<i>P. mirifica</i> root bark 2	4.71×10^{-3}	5.5	3.07×10^{-3}	8.6
<i>P. mirifica</i> root without bark	2.49×10^{-4}	3.1	2.59×10^{-4}	4.7
Supplement 1	ND	ND	2.61×10^{-5}	9.8
Supplement 2	1.09×10^{-2}	8.9	1.19×10^{-2}	5.5
Supplement 3	4.16×10^{-3}	2.4	6.01×10^{-3}	7.1
Supplement 4	6.13×10^{-4}	11.4	9.87×10^{-4}	8.5
Supplement 5	ND	ND	3.12×10^{-5}	8.1

(A) Intra- inter-assay 試験及び(B) MPs-EIA と間接競合 ELISA を用いた
KWA 定量値間の比較

Table 2: 添加回収試験による MPs-EIA の正確性の評価

Spiked amount of KWA (ng)	Measured amount of KWA (ng per 10 mg dry wt.)	CV (%)	Expected amount of KWA (ng per 10 mg dry wt.)	Recovery (%)
0	2525.45	5.4		
62.5	2583.20	8.1	2587.95	92.4
125	2669.82	6.9	2650.45	115.5
250	2768.99	3.6	2775.45	97.4
500	3009.50	5.3	3025.45	96.8
1,000	3565.49	5.1	3525.45	104.0

Table 3: 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 の信頼性の評価**(A)**

Concentration of KWA ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
	Intra-assay (n = 6)	Inter-assay (n = 3)
4.69	7.4	3.3
9.38	1.5	4.9
18.8	3.0	3.2
37.5	3.1	7.5
75.0	6.5	2.6

(B)

Sample name	BIを用いた検出法 (ELISA様アッセイ1)		icELISA	
	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)
<i>P. mirifica</i> root bark 1	1.56×10^{-2}	12.1	1.09×10^{-2}	8.2
<i>P. mirifica</i> root bark 2	1.22×10^{-3}	6.2	1.29×10^{-3}	0.4
<i>P. mirifica</i> root without bark	4.23×10^{-4}	11.8	1.94×10^{-4}	7.0
Supplement 1	9.19×10^{-5}	4.3	9.94×10^{-6}	10.3
Supplement 2	7.09×10^{-3}	7.5	6.23×10^{-3}	4.5
Supplement 3	2.04×10^{-3}	8.1	1.27×10^{-3}	5.0
Supplement 4	3.36×10^{-4}	8.7	2.38×10^{-4}	9.0
Supplement 5	ND	ND	5.73×10^{-6}	9.4

(A) Intra- inter-assay 試験及び(B) 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 と間接競合 ELISA を用いた KWA 定量値間の比較

Table 4: 競合 ELISA 様アッセイ 2 の信頼性の評価

(A)

Concentration of KWA ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	
	Intra- assay (n = 6)	Inter- assay (n = 3)
3.91	6.4	3.8
7.81	7.4	7.0
15.6	4.6	6.0
31.2	4.6	6.7
62.5	8.7	5.6

(B)

Sample name	BIを用いた検出法 (ELISA様アッセイ2)		icELISA	
	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)
<i>P. mirifica</i> root bark 1	1.43×10^{-2}	7.2	1.09×10^{-2}	8.2
<i>P. mirifica</i> root bark 2	1.11×10^{-3}	9.3	1.29×10^{-3}	0.4
<i>P. mirifica</i> root without bark	4.49×10^{-4}	9.0	1.94×10^{-4}	7.0
Supplement 1	ND	ND	9.94×10^{-6}	10.3
Supplement 2	9.65×10^{-3}	4.9	6.23×10^{-3}	4.5
Supplement 3	2.14×10^{-3}	9.3	1.27×10^{-3}	5.0
Supplement 4	4.12×10^{-4}	6.5	2.38×10^{-4}	9.0
Supplement 5	ND	ND	5.73×10^{-6}	9.4

(A) Intra- inter-assay 試験及び(B) 競合 ELISA 様アッセイ 2 と間接競合 ELISA を用いた KWA 定量値間の比較

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：著者氏名、論文タイトル名、書籍全体の編集者名、書籍名、出版社名、出版地、出版年、ページ

該当なし。

雑誌：発表者指名、論文タイトル名、発表誌名、巻号、ページ、出版年

1. Sakamoto, S., Eto, R., Nuntawong, P., Yusakul, G., Juengwatanatrakul, T., Putalun, W., Fujii, S., Tanaka, H., Morimoto, S.
“Kwakhurin-magnetic particles conjugates enabled fast enzyme immunoassay for the detection of kwakhurin in *Pueraria candollei*”, *Phytochemical Analysis*, Wiley, 2020, 31 (6), 930-936
2. Phaisan, S., Yusakul, G., Nuntawong, P., Sakamoto, S., Putalun, W., Morimoto, S., Tanaka, H.
“Immuno chromatographic assay for the detection of kwakhurin and its application for identification of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham” *Phytochemical Analysis*, Wiley, 2020, in press
3. Juengsanguanpornasuk, W., Yusakul, G., Kitisripanya, T., Krittanai, S., Juengwatanatrakul, T., Sakamoto, S., Putalun, W.
“Quantification of methylisomiroestrol, a phytoestrogen of *Pueraria candollei*, by enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with a high-performance liquid chromatography” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, Elsevier, 2021, 192, 113674

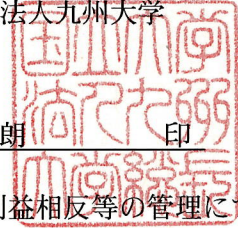
令和 3 年 2 月 15 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人九州大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 石橋 達朗



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法の確立

3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院薬学研究院・准教授

(氏名・フリガナ) 坂元 政一・サカモト セイイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること

令和 3 年 2 月 12 日

厚生労働大臣 殿

機関名 長崎国際大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 安東 由喜雄



次の職員の令和 2 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法の確立
- 研究者名 (所属部局・職名) 健康管理学部健康栄養学科・講師
(氏名・フリガナ) 藤井 俊輔 (フジイ シュンスケ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。