

## 試験条件

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：内径 0.53 mm，長さ 30 m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ用 6 % シアノプロピルフェニル-メチルシリコーンポリマーを厚さ 3  $\mu$ m に被覆する。

なお，必要ならば，ガードカラムを使用する。

カラム温度：40  $^{\circ}$ C を 20 分間，その後，必要ならば毎分 10  $^{\circ}$ C で 240  $^{\circ}$ C まで昇温し，240  $^{\circ}$ C を 20 分間保持する。

注入口温度：140  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

検出器温度：250  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

キャリアーガス：ヘリウム

流量：35 cm/秒

スプリット比：1 : 5

## システム適合性

システムの性能：標準溶液につき，上記の条件で試験するとき，それぞれのピークの分離度は 1.0 以上である。（注：被検物質が複数の場合）

システムの再現性：標準溶液につき，上記の条件で試験を 3 回繰り返すとき，被検物質のピーク面積の相対標準偏差は 15 % 以下である。

## 操作条件（2）

### 試験条件

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：内径 0.53 mm，長さ 30 m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ用 5%フェニルーメチルシリコーンポリマーを厚さ約 5  $\mu$ m に被覆する。なお，必要ならば，内径 0.53 mm，長さ 5 m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ用 5%フェニルーメチルシリコーンポリマーを被覆したガードカラムを使用する。

カラム温度：35  $^{\circ}$ C を 5 分間，その後，毎分 8  $^{\circ}$ C で 175  $^{\circ}$ C まで昇温し，必要ならば，次に毎分 35  $^{\circ}$ C で 260  $^{\circ}$ C まで昇温する。その後，260  $^{\circ}$ C を 16 分間保持する。

注入口温度：70  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

検出器温度：260  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

キャリアーガス：ヘリウム

流量：35 cm/秒

スプリット比：スプリットレス

## システム適合性

システムの性能：標準溶液につき，上記の条件で試験するとき，それぞれのピークの分離度は 1.0 以上である。（注：被検物質が複数の場合）

システムの再現性：標準溶液につき，上記の条件で試験を 3 回繰り返すとき，被検物質のピーク面積の相対標準偏差は 15 % 以下である。

## 操作条件（3）

### 試験条件

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：内径 0.32 mm，長さ 30 m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ用ポリエチレングリコール 20M を厚さ 0.25  $\mu$ m で被覆する。なお，必要ならば，ガードカラムを使用する。

カラム温度：50  $^{\circ}$ C を 20 分間，必要ならば，その後，毎分 6  $^{\circ}$ C で 165  $^{\circ}$ C まで昇温し，165  $^{\circ}$ C を 20 分間保持する。

注入口温度：140  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

検出器温度：250  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

キャリアーガス：ヘリウム

流量：35 cm/秒

スプリット比：1 : 5

システム適合性

システムの性能：標準溶液につき，上記の条件で試験するとき，それぞれのピークの分離度は 1.0 以上である。（注：被検物質が複数の場合）

システムの再現性：標準溶液につき，上記の条件で試験を 3 回繰り返すとき，被検物質のピーク面積の相対標準偏差は 15 % 以下である。

厚生科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究

—エンドトキシン試験法の信頼性の確認に関する研究—

分担研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部長

**研究要旨** 医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンは、現在リムルステストのみによって管理されようとしているがそのためにリムルス試験が、ヒトに対するエンドトキシンの作用を的確に反映していることが保証されなければならない。化学合成品リピドA類縁体化合物中に、完全に無毒性（発熱性、炎症性メディエータ産生能、致死毒性等）であるにもかかわらず、活性型エンドトキシンと同様の強力なリムルス活性を示す物質が存在することを見出した（アセチル化 506, 3'-メチル 406、及び数種のサクシニル化合物）。さらに天然に存在する歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来のエンドトキシンは、リムルス反応は通常のサルモネラ LPS に比較して約百分の一であるにもかかわらず、ヒト細胞の活性化 TNF- $\alpha$  産生能）はサルモネラ LPS よりも強い活性を示すことがわかった。一方、種々のエンドトキシンアンタゴニストは活性型エンドトキシンのマクロファージ、B細胞等の活性化に対して強力な抑制作用を示したが、リムルス活性化に対しては拮抗的に作用しないことを明らかにした。またリムルス活性をはじめ、マウスの系でも強力な活性を示すにもかかわらず、ヒト細胞に対してはまったく活性を示さない幾つかの化合物を見出した。以上の結果、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子と、リムルス反応のエンドトキシン認識分子であるカプトガニの凝固因子のエンドトキシン認識構造・認識機構に大きな差があることを見出し、リムルス反応のみでエンドトキシンの管理を行うことの危険性を示唆した。

A. 研究目的

医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンの汚染は重大な問題である。微生物と人類との共存関係は永久のものであり、従って細菌毒素に対する対策は近年の O157 の例を引くまでもなく不可欠である。エンドトキシンは現在リムルステスト（部分的には発熱性物質試験）によって管理されているが、この方法はエンドトキシンの種類によっては毒性との間に相関性が得られないこと

や、エンドトキシン以外のリムルス反応陽性物質の存在が明らかになりつつあることから、医薬品等の安全性が脅かされる危機に晒されている。本研究ではリムルステストの擬陽性・擬陰性を基礎的に明らかにすることによるエンドトキシン試験法及び発熱性物質試験法の正しい評価と改良法の検討、並びに毒性、特にヒトに対する作用を的確に反映できる新規方法の開発等の基礎的研究を行い、国民の福祉に資するものである。

## B. 研究方法

化学合成リピド A の調製：化学合成活性型のリピド A として *E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516)、前駆体構造 (406) は第一化学工業 (株) を用いた。一方、部分サクシニル化リピド A 類縁体、さらにはモノサッカライドリピド A は当研究室において化学合成を行った。

リピド A の化学修飾：エンドトキシンアンタゴニストのサクシニル化リピド A 前駆体 (s406) は、5 mg のリピド A 前駆体 ( $P_2O_5$  存在下で十分乾燥) を 300  $\mu$ l の無水ピリジン中で 200 mg の無水コハク酸と共に懸濁し、密封容器中で 60  $^{\circ}$ C、3 時間の反応により得た。アセチル化は同様にそれぞれ 5 mg のリピド A 試料 ( $P_2O_5$  存在下で十分乾燥) を 200  $\mu$ l の無水ピリジンと 200  $\mu$ l の無水酢酸に溶解し、少量のジメチルアミノピリジン存在下で一夜放置後透析、凍結乾燥した。脱 O-アシル化は同様に 5 mg のリピド A 試料 ( $P_2O_5$  存在下で十分乾燥) を密封容器中で無水ヒドラジンに懸濁後 60  $^{\circ}$ C、30 分反応させた。反応液はアセトン沈殿で回収した。それぞれの反応生成物は Liquid secondary-ion mass spectrometry (LSI/MS) (VG ZAB-2SEQ spectrometer) により確認した。

*P. gingivalis* リピド A の調製：*P. gingivalis* LPS は熱フェノール・水で抽出した。リピド A は LPS を 1% 酢酸で 100  $^{\circ}$ C、90 min 処理後、クロロフォルム/メタノール (1 / 1) で抽出した。その後、Dowex 50 (+H)、及び Sephadex LH-20 (Pharmacia) により精製リピド A を得た。遊離精製リピド A は塩酸沈殿法により脱塩し、トリエチルアミン塩として可溶化した。

TNF- $\alpha$  産生活性：マウス (BALB/C) 腹腔マクロファージ ( $2 \times 10^6$  cells/ml) もしくは J774.1 細胞に試料を加え、37  $^{\circ}$ C、6 時間培養後上清中に遊離される TNF- $\alpha$  を測

定した。ヒト由来 THP-1 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/ml) は 100 ng/ml の PMA と 0.1  $\mu$ M 1,25-dihydroxy vitamin  $D_3$  で、また U937 細胞は 100 ng/ml の PMA で分化後試料を加え、24 時間培養で上清に遊離される TNF- $\alpha$  を測定した。産生 TNF- $\alpha$  は L929 細胞に対する毒性によって定量した。

発熱活性：1.7-2.5 kg のウサギを用い、日本薬局方に準じて試験を行った。一群 3 羽を用い、体重 kg 当たり 0.2 ml の試験溶液を耳静脈より投与し、体温上昇の平均を算出した。

リムルス活性：定量的なリムルス測定試薬 (Endospeccy; 生化学工業) を用いて、試料と同量のリムルス試薬を 37  $^{\circ}$ C、30 分反応後、合成基質から遊離する p-nitroaniline の発色により測定した。

マイトジェン活性：マウス (BALB/C) 脾臓細胞 ( $4 \times 10^6$  cells/ml) をマイトジェンと 37  $^{\circ}$ C、48 時間培養後、 $[^3H]$ thymidine (0.2  $\mu$ Ci/well) を加えてさらに 24 時間培養し、取り込まれた放射線活性を測定した。

致死毒性：C57BL/6 マウスに 12 mg の D-galactosamine を腹腔内投与して感作した後、直ちに 0.1 ml のパイロジェンフリーの水に溶解した試料を静注し、翌日の致死を調べた。

## C. 研究結果

### 種々のエンドトキシンのリムルス活性と発熱性等の毒性との関係

エンドトキシンの検出は従来ウサギの発熱性によって管理されてきたが、近年はリムルス活性に移行しようとしている。そこでリムルス活性がすべて正しくエンドトキシン活性を反映するのかどうかを明らかにするために、種々の天然由来のエンドトキシン、及び化学合成、化学修飾したエンドトキシン活性中心リピド A 類縁体を用いて、それらの発熱性、リムルス活性、及び

エンドトキシンの代表的な活性であるマクロファージからの TNF- $\alpha$  産生誘導活性、B細胞マイトジェン活性、マウス致死毒性を検討した。その結果代表的な天然エンドトキシンである大腸菌、及びサルモネラ由来の LPS はリムルス活性、及びその他のいずれのエンドトキシン活性測定系においても非常に強力な活性を示し、従ってこれらのエンドトキシンの検出は発熱性試験、リムルステストいずれによっても管理できることがわかった。その他のグラム陰性菌として緑膿菌、コマモナス テストステロニ等のエンドトキシン活性も同様に測定したが、ここで調べたいずれの天然由来のエンドトキシンにおいても同様の相関を示す結果が得られた。さらに化学合成の大腸菌型、サルモネラ型のリピドAも非常によい相関活性が得られた。しかし化学合成リピドA類縁体の中の前駆体構造 (図1) のアセチル化体や部分サクシニル化体、さらにはモノサッカライドリピドA類縁体が完全に無毒性でまったくエンドトキシン活性を示さないにも係わらず、大腸菌型のリピドAと同等、あるいはそれに近い強力なリムルス活性を示した。代表的な例としてアセチル化前駆体構造のエンドトキシン活性のうちリムルス活性を図2に、発熱活性を図3に示し、それを前駆体構造、及びサクシニル化体と比較して示した。この図から前駆体自身はリムルス活性発熱活性いずれも示すが、サクシニル化体は両活性ともまったく示さず、一方アセチル化体は発熱活性は示さないが、強いリムルス活性を表すことが明らかになった。

#### 細胞系とリムルス活性に対するエンドトキシンアンタゴニスト作用

我々の研究室で開発した幾つかのエンドトキシンアンタゴニストがどのエンドトキシン作用を抑制するかを調べた。アンタゴニストとしてはサクシニル化リピドA前駆

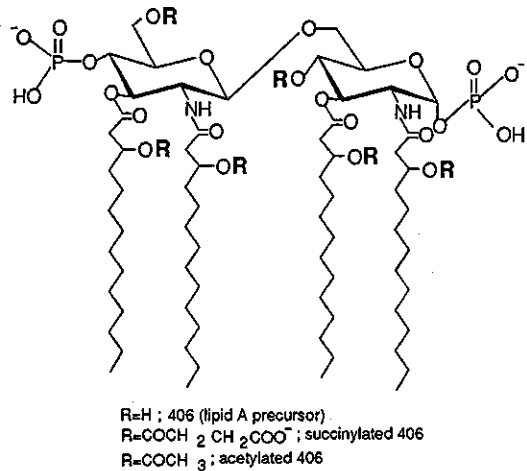


図1. リピドA前駆体とその化学修飾体の構造

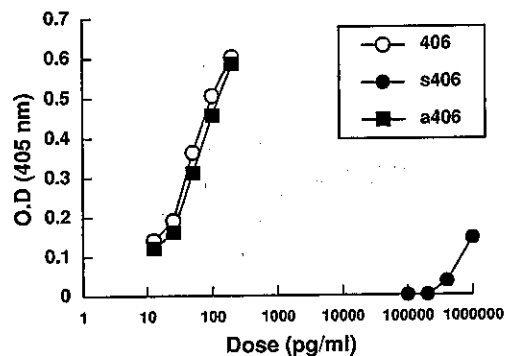
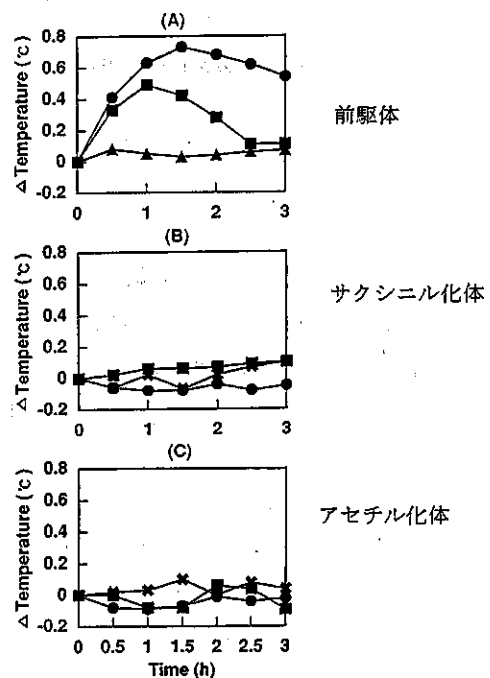
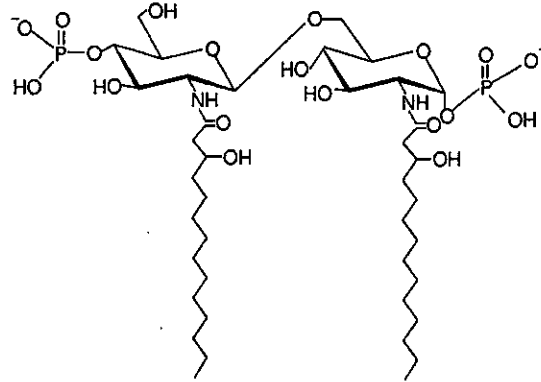


図2. リピドA前駆体及びそのサクシニル化、アセチル化合物のリムルス活性

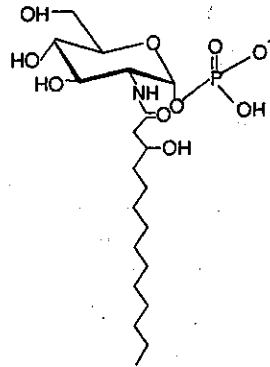


▲, 0.01  $\mu$ g/kg; ●, 0.1  $\mu$ g/kg; ■, 1  $\mu$ g/kg; ×, 10  $\mu$ g/kg  
図3. リピドA前駆体及びそのサクシニル化、アセチル化合物のウサギ発熱活性

体、アルカリ処理による脱アシル化大腸菌リポドA、モノサッカライドリポドA類縁体を用いた (図4)。



脱アシル化リポドA



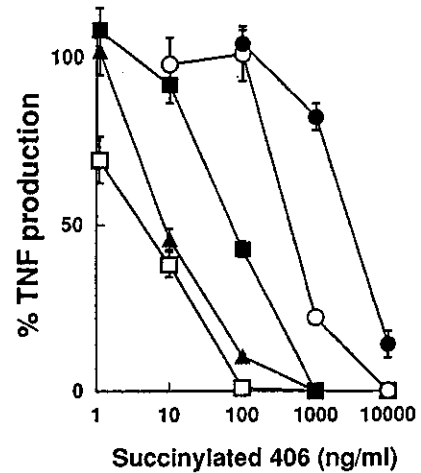
モノサッカライドリポドA

図4. アンタゴニストの化学構造

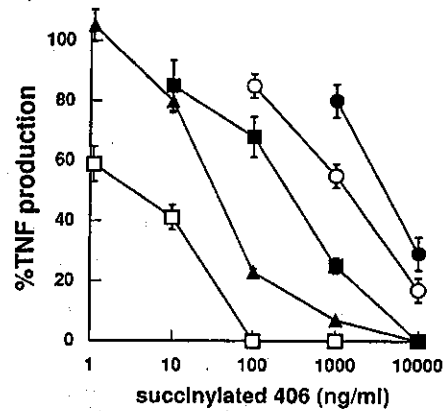
エンドトキシン作用としてはヒト及びマウスのマクロファージ系細胞からの TNF- $\alpha$  産生誘導活性、マウスのB細胞マイトジェン活性といった細胞系に対するエンドトキシン作用とリムルス活性に対する抑制作用を指標とした。いずれのアンタゴニストもヒト、マウスに係わらず細胞系に対するエンドトキシンの作用を強く抑制し、特にサクシニル化リポドA前駆体は1 : 1の比率においても強い抑制作用を示した。図5にサクシニル化前駆体によるヒト及びマウス細胞からのエンドトキシンによる TNF- $\alpha$  産生誘導活性に対するアンタゴニスト活性

を示した。

(A)



(B)



LPS 濃度 : ●, 10  $\mu\text{g/ml}$ ; ○, 1  $\mu\text{g/ml}$ ; ■, 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ; ▲, 0.01  $\mu\text{g/ml}$ ; □, 0.001  $\mu\text{g/ml}$ ; (A) マウス腹腔マクロファージ, (B) THP-1 細胞

図5. サクシニル化リポドA前駆体のアンタゴニスト活性

一方、これらのアンタゴニストはいずれもリムルス活性に対しては抑制を示さず、アゴニストに対して千倍量のアンタゴニストを加えてもまったく抑制しないことがわかった。

#### ヒト細胞に対するエンドトキシン活性とリムルス活性との相関

エンドトキシンの管理はヒトに対する毒作用を防御することが最終目的であることから、リムルス試験が正しくヒトに対するエンドトキシン作用を反映するかどうかは

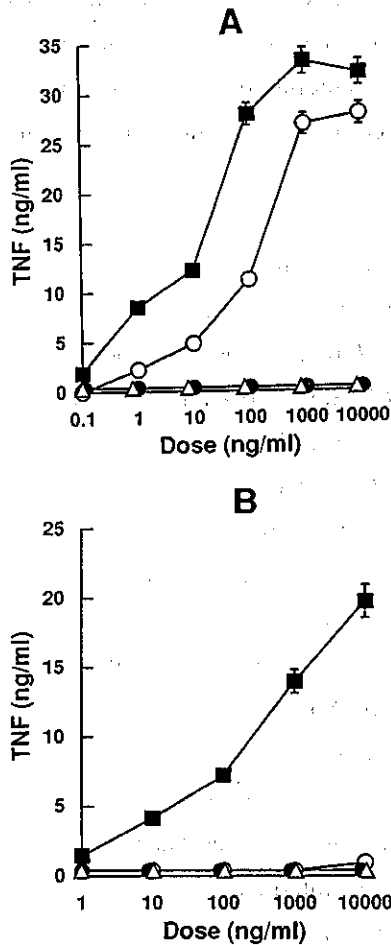
エンドトキシン試験において極めて重要なことである。ここではヒト細胞としてマクロファージ系の細胞に分化させた THP-1、及び U937 細胞を用い、エンドトキシン刺激による TNF- $\alpha$  産生誘導活性、及び転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化を指標として、リムルス活性との比較を行った。調べた種々のエンドトキシンの中で多くのものは両方の活性により相関が得られたが、前項で示したようにリムルス活性のみ発現する化合物はヒト細胞に対しても作用を示さなかった。またそれ以外でも、リピドA前駆体、及び天然のサルモネラ由来のリピドAが強力なリムルス活性を示すにも係わらず、ヒト細

胞に対してはまったく作用を示さないことが明らかになった。図6に前駆体のヒト、及びマウス細胞に対する TNF- $\alpha$  産生誘導活性を示す(リムルス活性は図5を参照)。

それ以外に天然に存在する歯周病原菌である *P. gingivalis* 由来のエンドトキシンは、リムルス反応は通常のサルモネラ LPS に比較して約百分の一であるにもかかわらず、ヒト細胞の活性化 (TNF- $\alpha$  産生能) はサルモネラ LPS よりもむしろ強い活性を示すことがわかった。

#### D. 考察

エンドトキシンの管理において、現在最も優れた方法と考えられているリムルス法は確かに感度としては最もよいものの、エンドトキシンを毒性物質という本質的な活性面から捉えるときに、幾つかの矛盾点、問題点があることが明らかになってきた。本研究により種々のエンドトキシンの構造活性相関を調べた結果、リムルス試験が毒性、特にヒトの系への作用と一致しない種々の例外が見つかったが、現在のところ幸いなことに天然の LPS では大きな矛盾点は見られない。しかし試験を行ったエンドトキシンは数種であり、天然に存在する菌種の数を考えるならば限りなくゼロに近い。化学修飾や化学合成リピドA類縁体の中にはリムルステストが必ずしも本質的なエンドトキシン活性である生体に対する毒性を反映しないものが多く存在することが明らかになったことから、エンドトキシン活性は非常に微細な構造変化によって、活性が変化すること、さらには種特異性を発揮することが示唆された。このことはすなわち、自然界にはこのようなリムルス活性のみでは検出・測定することが不可能なヒトに対する毒性エンドトキシンが存在する可能性を示唆している。現在世界的にエンドトキシン管理はリムルス活性のみによ



■, *S. abortus equi* LPS; ○, 406; ●, s406; △, a406

(A) マウス腹腔マクロファージ、(B) THP-1 細胞

図6. リピドA前駆体によるヒト及びマウス細胞の活性化

て行われようとしているが、ここで得られたデータを考えるならば、今後このような例外的なエンドトキシンが自然界にも存在する可能性を常に考えておく必要があると思われる。

#### E. 結論

医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンは、現在リムルステストのみによって管理されようとしている。本研究ではこの原始生物の反応を利用したリムルス試験が、はたして本当にヒトに対するエンドトキシンの作用を的確に反映できるかどうかを明らかにするために、種々のエンドトキシンを使用してそれらの活性・構造相関研究を行うことにより、リムルステストの擬陽性・擬陰性を基礎的に明らかにすることによるエンドトキシン試験法及び発熱性物質試験法の正しい評価と改良法の検討、並びに毒性、特にヒトに対する作用を的確に反映できる新規方法の開発等の基礎的研究を行った。その結果、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子と、リムルス反応のエンドトキシン認識分子であるカプトガニの凝固因子のエンドトキシン認識構造・認識機構に大きな差があることを見出し、リムルス反応のみでエンドトキシンの管理を行うことの危険性を示唆した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kato, H., T. Iida, Y. Haishima, A. Tanaka, & K. Tanamoto. Chemical structure of lipid A isolated from Flavobacterium meningosepticum lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 180, 3891-3899, 1998
2. Tanamoto, K. Production of nontoxic lipid A by chemical modification and its antagonistic effect on LPS action. *Prog. Clin.*

*Biol. Res.* 397, 269-280, 1998.

3. 安住聡子、棚元憲一 桂皮中に存在するエンドトキシン活性抑制物質の性状「エンドトキシン研究 1 ; 基礎と臨床」(近藤元治等編)、pp143-148、菜根出版、1998
4. 棚元憲一、エンドトキシンの除去と不活化「日本薬局方に準拠した滅菌法及び微生物殺滅法」(三瀬勝利等編)、pp44-62、日本規格協会、1998

5. Tanamoto, K. Induction of Prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. in: *Bacterial Pathogenesis. (Selected Methods in enzymology)* pp457-466, 1998

6. Tanamoto K. Induction of lethal shock and tolerance by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in D-galactosamine sensitized C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* in press.

##### 2. 学会発表

1. 細瀧和成、棚元憲一：ディスプレイザブル医療用具の非発熱性の確保に関する研究—放射線や化学薬剤を用いてのエンドトキシンの不活化—

日本医科器械学会 (1998.6)

2. Tanamoto K. and Azumi S. Lipid A forms which mediate the activation of C3H/HeJ mice.

The 5th International Conference of the Endotoxin Society (1998. 9)

3. Azumi S. and Tanamoto K. Protection of animals from endotoxemia by an inhibitor derived from cinnamon bark.

The 5th International Conference of the Endotoxin Society (1998. 9)

4. 室井正志、安住聡子、棚元憲一：マクロファージのエンドトキシン応答における血清の影響と種差

第72回日本細菌学会総会 (1999.3)



5. 棚元憲一、安住聡子：サルモネラ型リ  
ピドAはヒトマクロファージを活性化しな  
い

第72回日本細菌学会総会（1999.3）

新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査研究  
－ハイブリッド化医薬品の品質評価技術－

分担研究者 谷本 剛 国立医薬品食品衛生研究所  
大阪支所薬品試験部第二室長

**研究要旨** 酵素、ホルモン、サイトカインなどのタンパク質性医薬品の性状や機能を先端技術の応用で改変したハイブリッド化医薬品はその改変目的に応じて、新たに付与された性質や機能が評価される必要があり、そのための必要評価項目及びそれらに対する評価技術について調査した。ハイブリッド化技術によるタンパク質性医薬品の創製は、①物理的、化学的、生物学的因子に対する安定性の向上、②免疫原性、抗体反応性などの免疫学的性質の消失、③血中半減期の延長、④生理活性の増強、⑤標的指向性の向上など、タンパク質の性状や機能の改変、改善を目的としたものであることから、その品質評価には従来とは異なった新たな視点の導入が必要と考えられた。ジノスタチンスチマラマー（ZSS）と PEG 修飾組織プラスミノゲンアクチベーター（PEG-tPA）を例にしてその品質評価のあり方を検討し、構造的な特性を厳格に規定してそれが試験できるもの場合は、それによって機能的な特性は担保できると考えられたが、構造的な特性を厳格に規格化することが困難なものでは生物学的方法による機能的特性の試験がその品質評価に必要であると考えられた。PEG-tPA のように構造的な特性を厳密に評価することが困難なハイブリッド化タンパク質ではその機能的特性の一つである肝細胞への取り込み抑制を単離肝細胞を用いた細胞検定法で評価することが品質評価に有用であった。

分担研究者 谷本 剛  
国立医薬品食品衛生  
研究所 大阪支所  
薬品試験部第二室長

**A. 研究目的**

優れた薬理作用や生理作用をもつ酵素、ホルモン、サイトカインなど、多くのタンパク質性生理活性物質の存在とその性質が明らかにされるのに伴って、これらのタンパク質性物質を医薬品に応用する試みが積極的に試みられている。生体に微量しか存在しない生理活性タンパク質はバイオテクノロジーの応用で大量に調製することが可能になっており、供給面からの量的な問題は解決されていると考

えられる。しかし、酵素をはじめとした生理活性タンパク質はその化学的本質から一般に物理的にも化学的にも不安定であることが多く、このことは優れた薬理作用を有するタンパク質の従来からの製剤学的方法論による医薬品化において大きな障害となっている。さらに、外来性タンパク質は生体の精緻な防御機構によって速やかに不活化され、生物学的にも不安定なものであるが、このことはタンパク質を医薬品として投与する場合に大量療法の必要性を生み出し、予期せぬ重篤な副作用発現の原因ともなっている。現在、タンパク質工学的及び遺伝子工学的的方法論によるタンパク質の性状改変技術が開発され、特にバイオハイブリッド化技術によるタンパク質の性状改変が多く、多くのタンパク質で試みられるとともに、新薬開発にも応用されはじめた。この新技術で創られた医薬品の品質は、従

来の概念にはない製造方法によるものであるため、その品質評価には新たな視点の導入が必要となる。本研究では、バイオハイブリッド化技術で製されるタンパク性の新医薬品に対する品質評価のあり方とその品質評価技術の確立を目的にして検討を行った。本年度はバイオハイブリッド化医薬品に期待される機能上の利点とその利点をどのようにして評価すればその品質を担保しうるかについて調査研究を行った。

## B. 研究方法

バイオハイブリッド化技術を応用した改変タンパク質の製造例を文献的に調査し、医薬品として承認された事例についてその品質評価法を検証した。また、組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)を例にしてハイブリッド化 tPA を作製し、獲得される機能の評価法を実験的に検証した。

(1) tPA の PEG 修飾：塩化シアヌルで活性化したメトキシポリエチレングリコール (PEG) (1分子縮合体、平均分子量：約 5,000、シグマ社製) を用いて次のようにして修飾した。

tPA に 50 倍量 (重量比) の PEG を加え、pH8.5、0 ~ 4 °C で約 5 時間反応させる。反応液は 0.01 % Tween 80 を含むクエン酸緩衝液 (pH 3) で透析し、未反応

の PEG を除去する。次いで PEG 修飾 tPA を P-セルロースイオン交換クロマトグラフィーで精製し、PEG 6 分子で修飾された PEG 修飾体を調製する。

(2) tPA 活性の測定法：合成ペプチド基質 D-イソロイシル-プロリル-アルギニン-p-ニトロアニリドを基質にして pH8.4、37 °C で反応を行い、410nm の吸光度の増加を経時的に測定した。また、desA-フィブリノーゲン存在下プラスミノゲンに tPA を作用させ、生成したプラスミンが合成ペプチド基質 D-バリル-ロイシル-リジン-p-ニトロアニリドを加水分解して生じる 410nm の吸光度の増加を測定することによって、tPA のプラスミノゲンに対する活性とした。それぞれ 1 分間当りの吸光度の変化量を tPA 活性とした。

(3) PEG で修飾した tPA の生物学的安定性の検討：遺伝子組換えで産生した一本鎖 tPA および PEG 修飾 tPA をラット血漿に添加して、経時的に酵素活性の変動を測定した。また、<sup>125</sup>I で標識した tPA および PEG 修飾 tPA をラットに静注し、経時的に採血して放射活性の消長を追跡し、両酵素の血中動態を比較検討した。

(4) tPA 及び PEG 修飾 tPA の肝細胞への取り込み：単離ラット肝実質細胞を 0.5 % ウシ血清アルブミンおよび 0.1 % グルコースを含む Krebs-Henseleit 緩衝液に  $1 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で懸濁し、その 1

Table 1 ハイブリッド化されたタンパク質の種類

薬効群	タンパク質
抗腫瘍性	アルギナーゼ、アスパラギナーゼ、インターフェロン $\gamma$ 、インターロイキン2、ネオカルチノスタチン、フェニルアラニルアンモニアリアーゼ、トリプトファンナーゼ、腫瘍壊死因子、等
代謝異常疾患	アデノシンデアミナーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、デキストラナーゼ、ウリカーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、プリンスクレオシドホスホリラーゼ、インスリン、等
抗血栓性	組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼ、バトロキソピン、ヒルジン、プラスミノゲン、エラスターゼ、ストレプトキナーゼ、トリプシン、等
血液成分	血清アルブミン、アンチトロンビンⅢ、血液凝固因子Ⅷ、トロンピン、ヘモグロビン、ミオグロビン、顆粒球コロニー刺激因子、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、免疫グロブリン、等
その他	アルカリホスファターゼ、ラクトフェリン、リゾチーム、リパーゼ、リボヌクレアーゼ、大豆トリプシンインヒビター、プロテアーゼ、フェチュイン、スプスタンスP、等

Table 2 ハイブリッド化剤の種類

分類	ハイブリッド化剤
合成高分子	ポリ-L-アスパラギン酸、スチレンマレイン共重合体、ポリ-D-リジン、ポリ-L-リジン、D-グルタミン酸-D-リジン共重合体、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ピラン共重合体、等
天然高分子 (多糖類)	アガロース、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、プルラン、等

mL を 37 °C で 10 分間プレインキュベイトした後、<sup>125</sup>I で標識した tPA および PEG 修飾 tPA をそれぞれ 100μL (0.1μg、22 ~ 27 x 10<sup>6</sup> cpm) ずつ加え、一定時間インキュベイトした後、細胞を集め、Krebs-Henseleit 緩衝液で細胞を洗浄した後、細胞を破碎して放射活性を測定し、その放射活性を細胞内への tPA の取り込み量とした。

### C. 研究結果

#### 1. ハイブリッド化タンパク質の現状と特性

ハイブリッド化タンパク質の創製はすでに数多くの試みがあり、検討対象となったタンパク質には Table 1 に示すようなものがある。また、ハイブリッド化剤としても Table 2 に示したように合成高分子や天然高分子である多糖類など、多種類の物質が利用されている。

これらのタンパク質がハイブリッド化によって獲得した性状や機能についてまとめてみると概ね次のようなものであった。

- ①物理的、化学的、生物学的因子に対する安定性の向上
- ②免疫原性、抗体反応性などの免疫学的性質の消失または低減
- ③血中半減期の延長
- ④生理活性の増強
- ⑤標的指向性の向上

したがって、医薬品化に際してのタンパク質固有の多くの難点はハイブリッド化技術で克服される可能性が大きいものと考えられた。事実、Table 1 に示したほとんど全てのタンパク質はハイブリッド化によって種々の因子に対する安定性が大きく向上し、血中半減期などの体内

動態の改善を引き起こしていた。大腸菌由来 L-アスパラギナーゼやウシ小腸由来 アデノシンデアミナーゼなどの多くのタンパク質においては抗原性を消失させることに成功しており、それらの臨床的有用性を大きく飛躍させた。また、インスリンやサブスタンス P ではその生理活性を増強することができていた。

#### 2. 医薬品化されたハイブリッド化タンパク質

現在医薬品として承認されたハイブリッド化タンパク質には PEG でハイブリッド化したアデノシンデアミナーゼ、ヘモグロビンやスチレン-マレイン酸共重合体でハイブリッド化したネオカルチノスタチン (一般名: ジノスタチンステマラマー) などがある。前者は米国で承認されたものであり、後者のジノスタチンステマラマーは日本で開発、承認されたものである。

#### 3. ハイブリッド化医薬品の品質評価

ジノスタチンステマラマー (ZSS) を例にして、その品質評価法を考察した。

ZSS はクロモフォアと 113 個のアミノ酸からなるタンパク質で構成されたジノスタチン (別名: ネオカルチノスタチン) 1 分子に部分ブチルエステル化したスチレン-マレイン酸共重合体 2 分子を結合した平均分子量約 15,000 のハイブリッド化タンパク質である (Fig. 1)。ZSS のハイブリッド化部位はジノスタチンの抗腫瘍活性に必須でない N 末端のアラニン残基と 20 番目のリジン残基のアミノ基である。ハイブリッド化で獲得した ZSS の特性は抗腫瘍活性、腫瘍組織への集積性、生体内安定性の増強及び向上である。

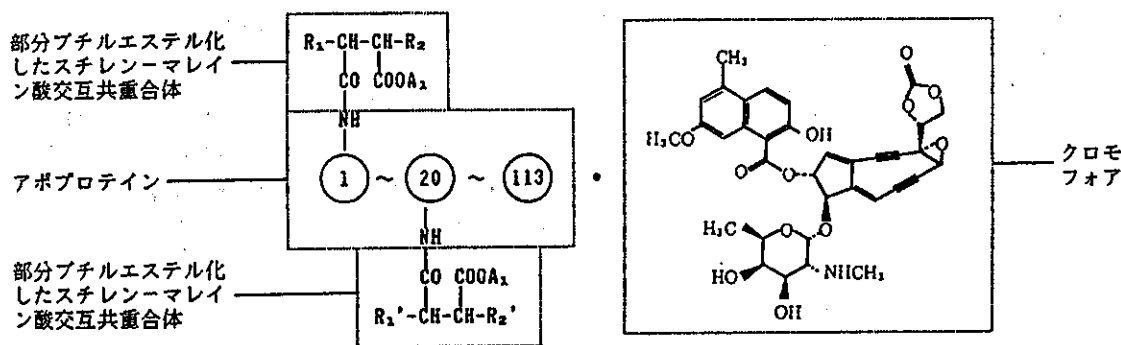


Fig. 1. ジノスタチンステマラマーの構造

これらの構造的、機能的特性を有する ZSS の品質評価においては次のような点に重点を置く必要があると考えられた。

- ①分子量サイズの確認
- ②ハイブリッド化剤の導入比
- ③ハイブリッド化部位の同定
- ④タンパク質、クロモフォア、ハイブリッド化剤の構成比
- ⑤薬理活性の強度
- ⑥組織集積性

上記①②③④の構造的特性は電気泳動、アミノ酸分析、ペプチドマッピング、アミノ酸配列、吸収スペクトルなどの生化学的分析法で対応できる。⑤⑥の薬効に関する機能的特性は本剤がハイブリッド化で獲得したものであり、本剤が有用なものとして位置づけられる大きな拠である。したがって、この点が本剤の品質評価に当たって最も重要なものと考えられる。しかし、この薬効上の特性は構造上の特性に依存するものであることから、①～④の構造的特性が厳格に規定できれば⑤⑥のような機能的特性は担保されることになり、品質評価のための試験としてこの機能的特性を試験する必要性はないかもしれない。一般にハイブリッド化タンパク質は高分子物質であり、構造的特性の厳格の規格化や試験法の設定が困難な場合も少なくない。このような場合には生物学的方法による機能的特性の試験がその品質評価に必要となってくる。本剤の場合では、例えば担癌培養細胞に対する細胞増殖抑制作用や担癌モデル動物における腫瘍組織への薬剤移行率などの生物学的方法による品質評価を考慮しなければならなくなる。

#### 4. tPAのPEG修飾による生物学的安定性の改善

6分子のPEGが導入されたPEG修飾tPAは、合成ペプチド基質に対して未修飾tPAの約70%の活性を保持し、プラスミノゲンに対しては約25%の活性を保持していた。PEG修飾tPAはセリンプロテアーゼ阻害剤であるジイソプロピルフルオロホスフェイトに対して抵抗性を示した。

tPAをラット血漿中でインキュベートすると、60分で約50%、180分で約70%の活性を失ったが、PEG修飾tPAは180分間インキュベートしてもその活性は失われなかった (Fig. 2)。

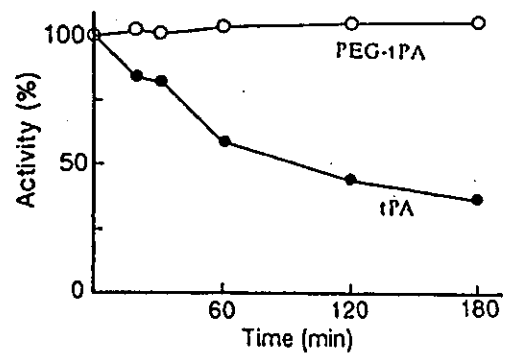


Fig. 2. tPA及びPEG修飾tPAのラット血漿中での安定性

$^{125}\text{I}$ で標識したtPAおよびPEG修飾tPAをラットに静注し、その生体内での消長を放射活性で追跡したとき、PEG修飾tPAの方が未修飾tPAより $^{125}\text{I}$ の消失速度は明らかに遅かった (Fig. 3)。このことからPEG修飾によってtPAの血中半減期は延長されることが明らかになった。この血中半減期の延長の機序はいくつか考えられるが、一つには肝臓での代謝分解の抑制が考えられる。そこで、tPAの肝臓での代謝に対するPEG修飾の影響を知るために、PEG修飾tPAの単離ラット肝実質細胞への取り込みを検討した。

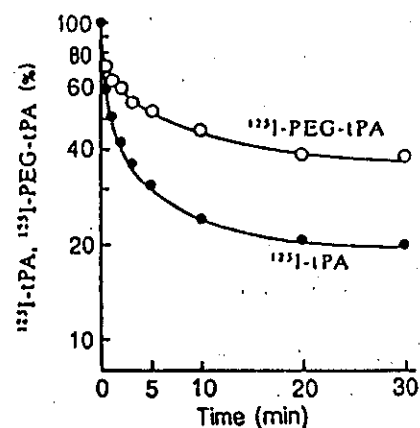


Fig. 3. tPA及びPEG修飾tPAのラットにおける血中半減期

Fig. 4に示すように、PEG修飾tPAは未修飾tPAに比べて肝実質細胞への取り込みが有意に低く、PEG修飾はタンパク質の肝細胞への取り込みを抑制することが示唆された。

PEGでの修飾によるtPAの生体内安定性の向上は血漿中のインヒビターやプロテアーゼに対する抵抗性の獲得のみならず肝での代謝を受け難くなったためと考

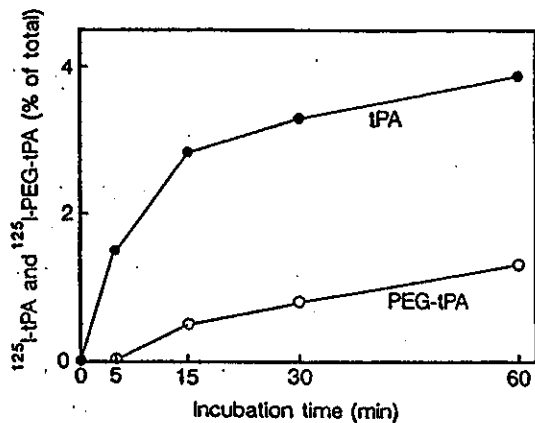


Fig. 4. tPA 及び PEG 修飾 tPA のラット単離肝実質細胞への取り込み

えられた。

tPA の分子量が 72,000 と大きく、更に 6 分子の PEG が導入されているため、ハイブリッド化部位の同定が容易でない。このような場合にはハイブリッド化で獲得される機能的特性を構造面から規定することは困難であり、生物学的方法での品質評価を試みる必要がある。本研究で実施した単離細胞を用いた機能的特性評価法はその一つの方法論になると考えられる。

### C. 考 察

有用なタンパク性医薬品の創製のためにタンパク質工学的及び遺伝子工学的的方法論によるタンパク質の性状改変技術が進歩し、特にバイオハイブリッド化技術によるタンパク質の性状改変による新薬も開発されるようになった。

ハイブリッド化技術によるタンパク性医薬品の創製は、①物理的、化学的、生物学的因子に対する安定性の向上、②免疫原性、抗体反応性などの免疫学的性質の消失、③血中半減期の延長、④生理活性の増強、⑤標的指向性の向上など、タンパク質の性状や機能の改変、改善を目的としたものであることから、その品質評価には従来とは異なった新たな視点の導入が必要となる。

本研究においては、バイオハイブリッド化医薬品に期待される機能上の利点とその利点をどのようにして評価すればその品質を担保しうるかについて二つのハイブリッド化タンパク質を例にして検討した。日本で開発、承認されたジノスタチンスチマラマー (ZSS) を例にした場合、

ZSS はタンパク質部分とクロモフォアとから成るジノスタチン 1 分子に部分ブチルエステル化したスチレン-マレイン酸共重合体 2 分子がハイブリッドした比較的低分子量 (約 15KD) 性の物質であり、ハイブリッド化部位も明確に同定されている。このことからハイブリッド化で獲得した抗腫瘍活性の増強や腫瘍組織への集積性などの薬剤特性は①分子量サイズの確認、②ハイブリッド化剤の導入比、③ハイブリッド化部位の同定、④タンパク質、クロモフォア、ハイブリッド化剤の構成比、などの構造的特性を厳格に規定し、試験できれば担保できると考えられる。しかし、PEG-tPA のように分子量が約 100KD の高分子物質であり、しかも導入されたハイブリッド化剤の分子数が多い場合には構造的特性の厳格な規格化や試験法の設定は困難になる。このような場合には生物学的方法による機能的特性の試験がその品質評価に必要となり、この例では生体内安定性向上をもたらす要因の一つと考えられる肝細胞への取り込み抑制を単離肝細胞を用いた細胞検定法で評価する方法の適用が一つの方法論になると考えられる。

### E. 結 論

酵素やホルモンなどのタンパク質性医薬品の性状や機能を先端技術の応用で改変したハイブリッド化医薬品はその改変目的に応じて、新たに付与された性質あるいは機能を評価する必要がある、そのための必要評価項目並びにそれらに対する可能な評価技術について調査した。また、血中動態の改善を目的としたハイブリッド化医薬品の品質評価法としての単離肝細胞培養系による試験法の有用性を検証した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 齋藤博幸、岩田美保、北島 文、谷本剛、岡田敏史、他 11 名：国立医薬品食品衛生研究所ペオニフロリン標準品の新規設定。医薬品研究, 1998, 29, 725-729.
- T. Tanimoto, K. Maekawa, S. Okada, C. Yabe-Nishimura: Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. Anal. Chim. Acta, 1998, 365, 285-292.
- Y. Hamada, C. Nishimura, N. Koh, F. Sakakibara, J. Nakamura, T. Tanimoto, N.

Hotta: Influence of Interindividual Variability of Aldose Reductase Protein Content on Polyol-pathway Metabolites and Redox State in Erythrocytes in Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 1998, 21 (6) 1014-1018.

4. 谷本 剛, 田頭洋子, 北島 文, 岡田 敏史, 他7名: 国立医薬品食品衛生研究所メシル酸ジヒドロエルゴトキシニン標準品の新規設定. *医薬品研究*, 1998, 29(4) 290-298.

5. 谷本 剛, 前川京子, 岡田 敏史, 渡辺典子, 陣ヶ尾政一, 目黒幸子: 日本薬局方L-トレオニンの薄層クロマトグラフ法による純度試験. *医薬品研究*, 1998, 29(4) 284-289.

## 2. 学会発表

1. H. Saito, T. Tanimoto, S. Okada, T. Handa: Role of Surface Structure in Apolipoprotein A-I Binding to Lipid Bilayers and Emulsions. 39th International Conference on the Biochemistry of Lipids, Sep. 1998 (Davos)

2. 谷本 剛, 前川京子, 岡田 敏史, 久保江理, 赤木好男: 糖尿病合併症発症と赤血球アルドース還元酵素レベルとの関連. 日本薬学会第118年会, 1998, 3.

3. 辻谷昌訓, 平田雅彦, 大桃善朗, 田中千秋, 谷本 剛: オキサゾール環を有する新規アルドース還元酵素阻害剤の合成とその阻害活性. 日本薬学会第118年会, 1998, 3.