

バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

研究者 川崎ナナ

分担研究者

- | | |
|---------------------------------|------|
| 1) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 | 新見伸吾 |
| 2) キリンビール(株)医薬カンパニー生産本部生産技術センター | 井上 登 |
| 3) 中外製薬(株)生物技術研究部, *ゲノム抗体医薬研究部 | 吉澤 博 |
| 4) 持田製薬(株)製剤研究室 | 猶塚正明 |
| 5) 日本ケミカルリサーチ(株)研究センター | 和田 学 |
| 6) エーザイ(株)分析研究所 | 四方 靖 |
| 7) (財)化学及血清療法研究所菊池研究部 | 菅原敬信 |
| 8) 山之内製薬(株)創薬研究本部 | 森啓太郎 |
| 9) 住友製薬(株)製剤技術研究所 | 濱詰康樹 |
| 10) 大阪大学大学院理学研究科 | 長谷純宏 |
| 11) 近畿大学薬学部 | 掛樋一晃 |
| 12) 京都大学大学院生命科学研究科 | 永尾雅哉 |
| 13) 長岡技術科学大学工学部 | 城所俊一 |
| 14) 静岡県立大学薬学部 | 藤井 敏 |

要 旨

1) バイオテクノロジー応用医薬品 (バイオ医薬品)の構造決定法として、質量分析法等を用いたジスルフィド結合同定法、及び糖分析法を開発した。2) 物理的・化学的性質評価法として、表面プラズモン共鳴法とキャピラリー電気泳動法による糖鎖不均一性評価法、及び改良型電気泳動法の開発、並びに部分還元体の評価を行った。3) 生物学的性質評価法として、表面プラズモン共鳴法を用いた抗原抗体反応評価法、糖関連酵素活性測定法、及び酸滴定熱量測定法によるタンパク質・リガンド相互作用解析法を開発した。4) 新規バイオ医薬品としてエリスロポエチン部分ペプチド、及びウロキナーゼN末端断片の特性解析、並びに日本脳炎ウイルスの同等性評価を行った。

1. 研究目的

バイオテクノロジーの進展は目覚ましく、遺伝子組換え医薬品や細胞培養医薬品に引き続き、細胞治療用医薬品、トランスジェニック/クローン動物応用医薬品など、新しい技術に基づく医薬品が開発され、次々と実用化されようとしている。今後さらに、ゲノム・プロテオーム解析が進めば、これらの技術によって、続々と新たなタンパク質性医薬品が開発されてくるものと予想される。本研究の目的は、最先端の高度な分析技術を積極的に取り入れ、次々と開発されるバイオ医薬品に素早く適切に対応できる特性、品質、及び安全性等評価技術を開発することである。本年度は以下の研究を行った。

- 1) バイオ医薬品のジスルフィド結合、糖鎖、及び高次構造解析技術の開発
- 2) バイオ医薬品の不均一性、部分還元体、及び電気泳動分析等、物理的・化学的性質評価技術の開発
- 3) バイオ医薬品の抗原抗体反応、酵素活性、タンパク質-リガンド間相互作用等、生物学的性質評価技術の開発
- 4) 抗HIV活性を有するウロキナーゼN末端ペプチド、及びエリスロポエチン部分ペプチド等、新規バイオ医薬品の特性解析、及び日本脳炎ウイルスの同等性評価

2. 研究方法

(1) 構造決定

- 1) ジスルフィド結合同定法：ヒト尿由来可溶性トロンボモジュリン(TM)、MALDI-TOFMS、エドマン分解法

- 2) 糖分析法：スロンボポエチン(TPO), 甲状腺刺激ホルモン (TSH), キャピラリーグラファイトカーボンカラムを用いた LC/ESI-MS (CapGCC-LC/ESI-MS), HPAEC-PAD
 - 3) 高次構造解析：10日目の発育鶏卵の漿尿腔にインフルエンザウイルスを接種し 34℃で2日間培養後その漿尿液を採取し精製したウイルス粒子
- (2) 物理的・化学的性質評価法
- 1) 糖鎖不均一性評価法：各種モデル糖鎖, 及び糖タンパク質, キャピラリー電気泳動法, 表面プラズモン共鳴法
 - 2) 部分還元体の評価：最も出現頻度の高いアミノ酸を選択した一次構造をもつ遺伝子組換え型インターフェロン α (CIFN), 円二色法 (CD)
 - 3) 電気泳動分析：Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA)
- (3) 生物学的性質評価法
- 1) 抗原抗体反応：ヒト化抗副甲状腺関連タンパク質 (PTHrP)モノクローナル抗体, 表面プラズモン共鳴法
 - 2) 糖関連酵素活性測定：ピリジルアミノ (PA) 化, HPLC
 - 3) タンパク質・リガンド相互作用：リボヌクレアーゼ A, 示差走査型熱量計 (DSC), 酸滴定熱量測定法
- (4) 新規バイオ医薬品の特性解析
- 1) エリスロポエチン(EPO)部分ペプチド：
 - ①虚血に対する神経細胞死の防御活性：砂ネズミの前脳虚血モデル系に, 3分間虚血後の再灌流時からミニポンプで脳内に EPO ペプチドを投与し続け, 7日後, 受動回避実験と, 海馬 CA1 野の神経細胞数を測定した
 - ②EPO 依存的骨髄系細胞の増殖：MTT アッセイ
 - ③EPO 受容体への結合活性：表面プラズモン共鳴法
 - 2) ウロキナーゼ N 末端断片 (ATF)：SCID-hu マウスを用いた *in vivo* アッセイ等
 - 3) 日本脳炎ウイルスの同源性評価法：マウス脳由来, 及び Vero 細胞産生日本脳炎ウイルス

2. 研究成果, 及び考察

(1) 構造解析

遺伝子組換え医薬品の一次構造は人為的な制御が可能であるが, 糖鎖付加を含む翻訳後修飾, 及び高次構造はタンパク質自身や宿主細胞の性質に委ねて合成される。従って, 品質, 有効性, 及び安全性の確保には, 翻訳後修飾, 及び高次構造の解析は不可欠である。我々は, 各種 HPLC や質量分析法 (MS) を取り入れたバイオ医薬品のジスルフィド結合同定法と糖鎖解析法の開発, 及び X 線結晶解析法による高次構造解析を行った。

1) ジスルフィド結合

ジスルフィド結合はタンパク質の立体構造の保持, すなわち, 生物活性の保持に重要な役割を担っている。バイオ医薬品の製造段階において, 正しいフォールディングが行われたかどうかを評価する上でジスルフィド結合の同定は重要である。これまでは, 断片化ペプチドの同定やジスルフィド結合の確認に N 末端アミノ酸配列分析が用いられ, 解析に多くの試料と時間が費やされた。本研究では, MALDI-TOFMS をペプチド断片の同定に応用することで, 迅速化と微量化を図った。昨年度は TM を消化後, ペプチド断片を HPLC で分離し, 非還元及び還元条件下で MALDI-TOFMS 分析と N 末端アミノ酸分析を行い, 26 対中 17 対のジスルフィド結合位置を同定した。本年度は, エドマン分解及びアミノ酸配列分析も併用して, 結合位置未同定の 3 ペプチド(B, C 及び E)の結合位置を同定した。ペプチド C の N 末端 3 アミノ酸残基をエドマン分解により除去し, ペプチド断片を MALDI-TOFMS 分析した。非還元条件下では H332-Y337+C344-V345 (S-S 結合 \times 1) に相当するイオン(m/z 1014.3), 及びジスルフィド結合が開裂して生じた H332-Y337 (S-S 結合 \times 0) のイオン (m/z 796.3) が観測されたが, 還元条件下では, m/z 1014.3 のイオンが消失し, m/z 796.1 のイオンが観測された。また, N 末端アミノ酸配列分析から, HXYPNY 及び XV の配列が確認された。以上のことから, TM は, Cys333-Cys344 でジスルフィド結合が形成されていることが明らかとなった。同様にして, 他のジスルフィド結合を同定し, TM の全ジスルフィド結合を決定することができた。MALDI-TOFMS, エドマン分解法, 及びアミノ酸配列分析を用いたジスルフィド結合同定法は, 微量の試料から迅速に解析できる極めて有用な方法であり, 今後開発されてくるジスルフィド結合を多く含むタンパク質性医薬品のジスルフィド結合の解析にも有用であると思われる。

2) 糖分析

糖鎖は、活性、体内動態、及び安全性に影響を及ぼすことが知られている。糖鎖構造は、宿主細胞が持つ糖転移酵素の活性に依存するため、培養条件等の影響を受けやすい。従って、最終産物の糖鎖構造を解析することは重要であるが、糖鎖構造は複雑で解析が難しい。そこで、以下のような新規糖分析法を開発した。

① 単糖組成分析、及びN結合糖鎖

昨年度我々は、CapGCC-LC/ESI-MSを用いたN結合糖鎖解析法を開発した。単糖はカラムに保持され難く、イオン化もされ難いので、同分析法をそのまま単糖組成分析に利用することはできない。そこで、カラムへの保持とイオン化の促進を目的に単糖をPA化し、CapGCC-LC/ESI-MSで分析法する新しい単糖組成分析法を開発した。この際、重水素置換されたPA(d₄PA)化糖鎖を内部標準物質として用いることにより、良好な再現性を得ることができた。図1は主な単糖の分離パターンと、各単糖のマススペクトルである。各単糖が良く分離され、PA及びd₄PA単糖のイオンが確認された。モデル糖タンパク質フェツインの場合、1

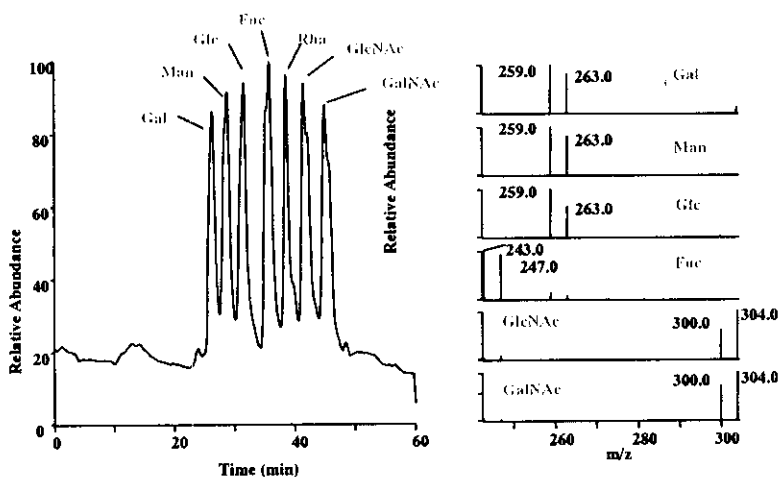


図1 (A) CapLC/MSによる単糖の分離
(B) 各ピークのマススペクトル

pmolで文献値とほぼ同じ結果を得ることができた。これまで単糖組成分析には50 pmol以上の試料が必要であったが、本分析法の開発により、微量での分析が可能となった。

さらに、CapGCC-LC/MSを用いたN結合糖鎖解析におけるESI-Q/TOFMSの導入を検討した。TSH由来糖鎖を分析した結果、糖鎖プロファイル作成と同時に、N結合糖鎖の構造解析に有用な高分解分子量測定、及び自動的糖配列分析ができることが確認された。ESI-Q/TOFMSの導入は有用性の向上に役立つことが確認された。

② O結合糖鎖

O結合糖鎖は、切り出すための適当な酵素がないことや、ヒドラジン分解による糖鎖の切り出しは危険性が高い上、糖鎖が一部分解することから、構造解析は難しいとされている。そこで、O結合糖鎖をβ-脱離により切り出し、得られた糖アルコールをHPAEC-PADで分析する方法を検討した。まず、TPOをトリプシン消化し、N結合糖鎖の還元末端GlcNAcにα1-6結合しているFucを認識するLCAレクチンカラムを使ってN結合糖鎖を持つペプチドのみを分離した。PNGaseFでN結合糖鎖を切り出した後、ペプチドをPVDF膜に吸着させ、水で洗浄してN結合糖鎖を除いた。PVDF膜からアルカリ処理(1M NaBH₄-0.05M NaOH, 10 mM 酢酸カドミウム, 10 mM EDTA 溶液中45°Cで18時間の反応)によってO結合糖鎖を遊離させ、酢酸ナトリウム溶液の濃度勾配によるCarboPac PA-1カラムを用いたHPAEC-PAD分析を行った。標準品糖鎖の溶出時間と比較することによって、主な糖鎖はNeuAcc2-3GalB1-3(NeuAcc2-6)GalNAcと推定された。また、本分析法は、結合部位ごとのO結合糖鎖を分析する方法としても有用であった。今後、N結合糖鎖の構造が異なる同一ペプチド上のO結合糖鎖の構造解析への応用も可能と考えられる。

3) 高次構造

タンパク質性医薬品の高次構造解析法としてX線結晶解析を検討した。インフルエンザウイルスの脂質二重膜からなるエンベロープに存在し、ウイルスの宿主への侵入に関与する三量体糖タンパク質ヘマグルチニン(HA)の解析を行った。A型インフルエンザウイルス株/WSN/33のからのH1型HAを精製し、沈殿剤としてPEG6000、及びMME-PEG2000を用いて結晶化のスクリーニングを行い、それぞれ針状結晶、及び層状の結晶が得られた。現在、より良い結晶とするために、塩を変えるAdditive Screen検索を行っている。また、沈殿剤として30%イソプロパノールの系で図2に示す大きさ0.5mmの結晶が得られており、この結晶による回折データの収集を計画している。

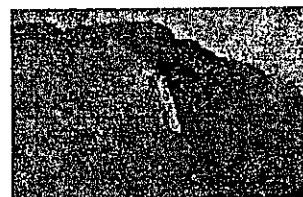


図2 H1型HAの結晶

(2) 物理的・化学的性質

1) 糖鎖不均一性

不均一性はバイオ医薬品の特徴の一つであり、これが最も問題となるのは糖タンパク質性医薬品の場合である。糖タンパク質は多様なグリコフォームの集合体で、その分布の変化は活性等に直接影響するため、恒常性の評価が重要である。これまで、グリコフォーム分布の恒常性は、等電点電気泳動法やキャピラリー泳動法により評価されてきたが、糖鎖の微妙な変化を捉えることはできなかった。本研究では、特定の糖鎖の部分構造を認識するレクチンを用いた表面プラズモン共鳴法、及びキャピラリー電気泳動法を利用した新しい糖鎖不均一性評価法を開発した。

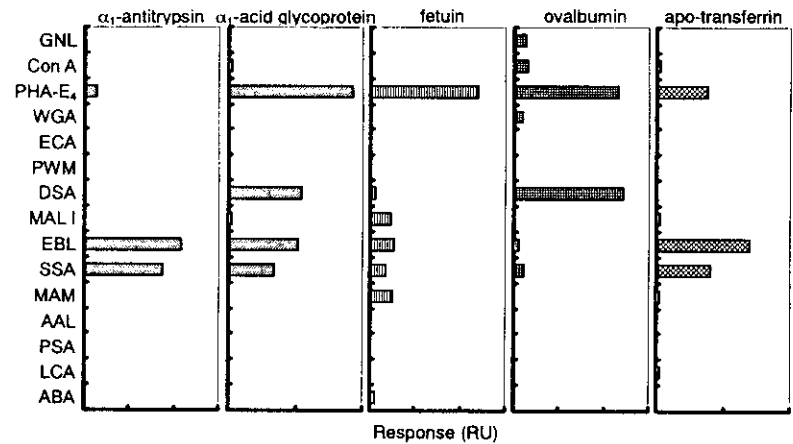


図3 各種レクチンに対する糖タンパク質の反応性

① 表面プラズモン共鳴法

昨年度に引き続き、センサーチップ上のカルボキシル基にレクチンタンパク質のアミノ基をアミド結合で結合させる方法を用いた。PA 化糖鎖を使用した検討では、概ねレクチンの特異性に合致した相互作用が得られることが確認された。そこで、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質、フェツイン、オポアルブミン、アポトランスフェリン、及びそれらの酵素消化物をレクチン固定センサーチップにアプライし、レクチンへの結合プロファイルを作成した(図3)。バイオ医薬品の品質評価に応用する場合は、参照標準品のレクチンとの相互作用プロファイルと被験物質のそれを比較することにより、恒常性評価、あるいは同等性/同質性評価に利用できると考えられる。今後、定量的な検討を行うため、使用するレクチンに対して適切な濃度を設定することが必要であると思われる。

② キャピラリー電気泳動法

数種のレクチンを組み合わせて、レクチンを含む緩衝液中で糖タンパク質糖鎖の混合物を分析することにより、糖鎖を一斉分類する方法を以下の通り提案した。1) 最初に蛍光標識された分析対象の糖鎖の混合物をレクチン非存在下測定する。2) 続いて、特異性がよくわかっているレクチン存在下の糖鎖の挙動を調べる。このレクチンが糖鎖 A を強く認識するとき、糖鎖 A の泳動時間はレクチンとの相互作用により著しく遅れる。一方、レクチンと相互作用をほとんど示さない糖鎖 C の泳動時間は影響を受けない。弱い相互作用を示す糖鎖 B は、レクチンとの相互作用の強さに応じて遅れて泳動される。3) 同様に糖鎖に対する特異性

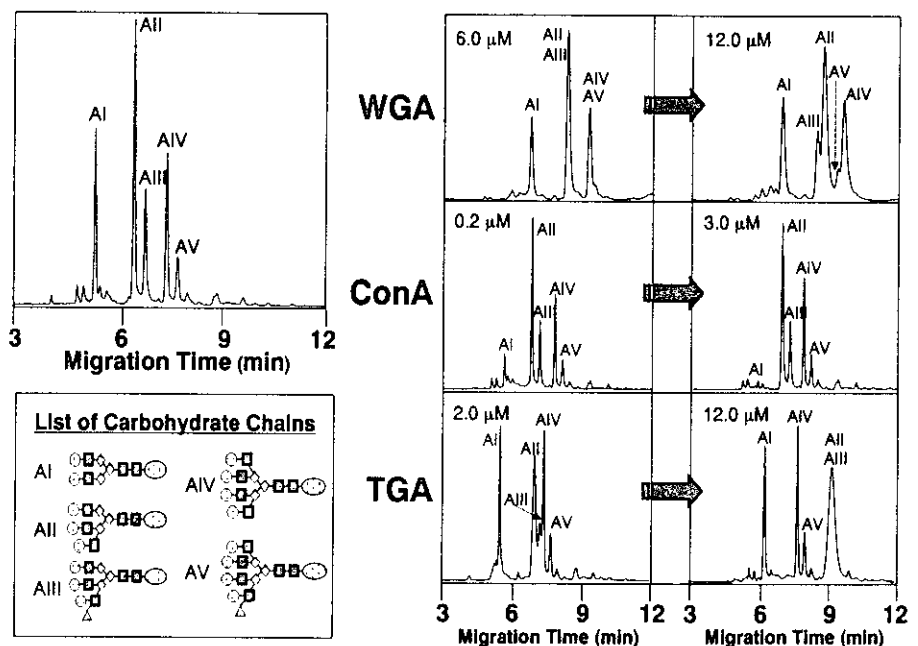


図4 Capillary affinity electrophoresis における α_1 -acid glycoprotein 糖鎖の挙動

の異なるレクチンを使って実験を繰り返す。特異性の異なるレクチンの組合せに対する親和性の差から、糖鎖糖鎖 A、B 及び C の構造に関する詳細な情報を入手できることになる。今回、この方法を用いて、フェツイン、 α 1-酸性糖タンパク質、及びオボムチン由来のすべての糖鎖を分類することに成功した(図4)。本分析法は、糖タンパク質糖鎖の機能を基本に、mM~nM の極めて幅広い範囲の糖鎖解析に対応できる方法であり、マイクロチップ化することにより自動化、及び大規模スクリーニングへの適用も容易である。バイオ医薬品の糖鎖の不均一性解析はもちろんのこと、細胞表面の病態特異的糖結合タンパク質や糖鎖の探索等への適用も期待される。

2) 部分還元体

部分還元体の立体構造の差異、及び部分還元体が多量体生成に与える影響について、CD、及び SDS-PAGE を用いて検討した。まず、CIFN、部分還元体である Cys₁-Cys₉₉還元体、及び Cys₂₉-Cys₁₃₉還元体の CD 測定を行った結果、二次構造を示す短波長側、及び三次構造を示す長波長側の CD スペクトルは、CIFN と Cys₁-Cys₉₉還元体の間では変化が見られず、この両者間では三次構造に違いがないことが示された。Cys₂₉-Cys₁₃₉還元体の CD スペクトルは CIFN と比較して 250-290 nm の範囲で円二色性が增大していることから、三次構造に違いがあることが示され、5本の α -ヘリックスの間隔が CIFN と比較して広がっているものと推察された。つぎに、部分還元体、ジスルフィド結合を介した二量体及び多量体、さらにジスルフィド結合を介さない二量体の含量を、還元及び非還元 SDS-PAGE により経時的に測定し、遊離 SH 基を持つ部分還元体が、ジスルフィド結合を介した多量体の生成に関与している可能性が示唆された。以上の結果から、ジスルフィド結合を持つバイオ医薬品の品質、及び安定性に、部分還元体が影響を与えることが推察され、部分還元体の定量法の確立がバイオ医薬品研究開発、品質管理の効率化のためにも重要であることが示された。

3) 電気泳動分析

SDS-PAGE は分子量分布、確認試験、及び不純物試験に広く用いられている。また、MS によるタンパク質構造解析のためのタンパク質分離手段としても利用されている。しかし、SDS-PAGE ゲルからタンパク質を抽出し、MS による構造解析を行う場合、混入した SDS によりイオン化が抑制されるため、感度が低下する。そこで、イオン化を抑制させることなく使用できる SDS の代替界面活性剤として、炭化フッ素系化合物の可能性を探った。炭素数 2~6 の炭化フッ素系化合物 (TFA, PFPA, HFBA, NFPA, UFHA) を用いて電気泳動すると、ゲルにアプライした複数のモデルタンパク質はいずれも適切に泳動されなかった。TFHA を用いた場合には、IgG (150kDa) よりも mt-PA (68kDa) の分子量の方が大きいという事実と反する泳動像が得られた。PFOA を用いた場合は、SDS 電気泳動と同様の泳動パターンを得ることができた。PFOA よりも炭素鎖の長い炭化フッ素系化合物は水に対する溶解性が低下し、電気泳動バンドが全体的に薄くなった。PFOA-PAGE は SDS-PAGE と同様に再現性も良好であったことから、バイオ医薬品の純度試験、確認試験や、MS 分析を目的とした泳動に使用できるものと考えられる。PFOA は、ESI-MS におけるタンパク質のイオン化抑制効果が SDS に比べて小さいことから、電気泳動ゲルから抽出したタンパク質を ESI-MS 分析する際に、より微量で分析できる可能性がある。

(3) 生物学的性質

生物学的性質は実験動物を用いて評価される場合が多いが、*in vivo* 実験は操作が煩雑で再現性が低く、対象医薬品ごとに個々の特性を考慮した評価法の確立が必要である。また、動物愛護の精神からも、代替法の開発が望まれている。我々は、物理化学的手法を取り入れた生物学的性質等評価法の開発を行った。

1) 抗原抗体反応

悪性腫瘍が産生する PTHrP は、骨からのカルシウム吸収、腎尿細管でのカルシウム再吸収を促進し、高カルシウム血症を惹起する。我々は悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療薬として、ヒト化抗 PTHrP モノクローナル抗体の開発を行っている。今回、アフィニティーの高いマウスモノクローナル抗体を元にヒト化抗体を作製し、可変領域に 1~4 個のアミノ酸置換を行い 20 余りのヒト化抗体候補を作製した。そして、代表的なヒト化抗体候補 ver. m (アミノ酸置換 2 箇所) 及び ver. q (アミノ酸置換 4 箇所) について、表面プラズモン共鳴法 (BIACORE) による評価を行い、他の 3 試験方法による評価結果との比較を行った。BIACORE を用いてヒト化抗体の PTHrP に対する抗原抗体反応の速度論的解析を行ったところ、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d から、アフィニティーはキメラ抗体に次いで ver. q が強いことが分かった。PTHrP に対する結合活性、*in vitro* における中和活性、高カルシウム血症モデルマウ

スでの *in vivo* 活性を調べたところ、ELISA による抗原結合活性評価、及び *in vivo* 活性評価によって、キメラ抗体、ver. m、及び q は同等と評価されたが、*in vitro* 中和活性評価では、キメラ抗体と ver. q はほぼ同等で、ver. m は低いという結果が得られた。以上のことから、BIACORE は他の評価方法では困難であった 3 種の抗体の区別が可能であることが明らかになった。本解析法は、今後続々と開発されることが予想されるヒト化抗体の抗原抗体反応評価法としても有用であると思われる。

2) 糖関連酵素の活性測定法の開発

これまでの糖関連酵素活性測定法は感度が低い上、単糖～数糖が基質として用いられるため、酵素の基質特異性を十分に反映した結果を得ることができなかつた。基質特異性を解析するためには、複雑かつ分子量の大きな糖鎖を基質として用いる必要がある。今回はモデルとしてペクチンの主要構成成分であるホモガラクトuronの生合成に関与しているガラクトuron酸転移酵素を用いて、蛍光標識した複雑な糖鎖を用いた糖関連酵素の活性測定法の開発を行った。まず、オリゴガラクトuron酸を PA 化し、重合度 4 から 27 のものを陰イオン交換 HPLC で分離した。酵素を UDP-GalA と PA 化オリゴガラクトuron酸 (DP14) とともにインキュベートすると、10 残基以上のガラクトuron酸を連続的に 1 残基ずつ転移した産物が生成されることが確認された。細胞壁多糖の生合成機構として、2 糖単位ごとの転移機構が提案されているが、本解析法により、1 残基ごとの転移であることが明らかになった。本研究の成果は、特異性の高い高感度糖関連酵素活性測定法の開発につながるものと期待される。

3) タンパク質・リガンド相互作用

タンパク質・リガンド相互作用の解析・解明は、医薬品開発と評価の上で大変重要である。しかし現在のところ、タンパク質・リガンド相互作用を熱力学的に評価できるのは一部の相互作用に限られ、結合定数の小さな「弱い結合」の解析は困難である。本研究は、実験的に「弱い相互作用」を解析すると同時に、計算機シミュレーションの結果と比較することにより、タンパク質・リガンド間の相互作用を定量的に予測計算する手法を開発することを目的とする。本年度は、タンパク質に対する最も一般的なリガンドであり、他のリガンドとの相互作用にも重要な寄与を持つ水素イオンとタンパク質との相互作用を直接測定できる酸滴定熱量測定法を検討した。酸滴定熱量測定法とは各 pH におけるタンパク質分子のエンタルピーを直接測定するために提案する新しい方法で、等温滴定型熱量計による酸滴定実験、酸滴定の pH 測定、希釈熱の補正、2 状態転移モデルでの解析の総称とする。タンパク質の熱変化に伴うエンタルピーは、DSC により精密な測定が可能である。今回の実験で用いたリボヌクレアーゼ A は、DSC による熱転移の実験で 2 状態転移することが確かめられており、pH 転移(酸変性)も同様に 2 状態転移であることが予想された。そこで、酸滴定熱量測定法を用いて、35～50℃のエンタルピーの pH 依存性を 2 状態転移モデルにより fitting し解析したところ、表 1 に示す結果が得られ、2 状態の理論モデルによって実験データが非常によく説明できることがわかった。また、これらの熱力学パラメータを、DSC により評価した熱力学パラメータと比較すると、実験誤差内で一致することが確認され、酸滴定熱量測定法によって、構造転移に伴うエンタルピー変化、水素イオン結合数変化、転移中点 pH が正確に測定可能であることが確認された。以上のように、タンパク質に結合する水素イオンの結合熱を直接測定する酸滴定熱量測定法を開発することができた。酸滴定熱量測定法は、pH 変化に伴って現れる様々な生化学現象に応用可能であり、特に、多くの水素イオン結合数の変化を伴うタンパク質・リガンド結合の解析に有効であると期待される。

表 1 酸滴定熱量測定により求めたリボヌクレアーゼ A の熱力学的パラメータ

温度(°C)	ΔH_{cal} (kJ/mol)	pH _d	Δv (pH _d)
35	273	2.54	2.5
40	340±5	2.83±0.03	2.3±0.1
45	330	3.22	2.1
50	340±10	3.66±0.03	1.6±0.1

(4) 新規バイオ医薬品の開発研究とその特性解析

1) EPO 部分ペプチド

我々は、EPO は、赤血球系細胞に作用するだけでなく、神経系細胞にも作用して、虚血性神経細胞死を防御することや、子宮内膜系においては、血管新生促進因子として機能することを見出し、多機能性を有していることを明らかにしてきた。本研究では EPO の AB-loop peptide に相当する 17 アミノ酸残基からなるペプチドの機能を解析した。ま

ず、砂ネズミの前脳虚血モデル系で、EPO 部分ペプチドを虚血後の再灌流時からミニポンプで脳室内に投与し続けたところ、受動回避実験、並びに海馬 CA1 野の神経細胞数計測実験のいずれによっても、EPO 部分ペプチドは濃度依存的な神経細胞死抑制効果を有していることが評価された。つぎに、Ep-FDC-P2 細胞を用いて EPO 部分ペプチドの赤血球系細胞の増殖活性を検討し、Ep-FDC-P2 細胞は EPO 依存的に増殖するが、EPO 部分ペプチドには影響されず、EPO 部分ペプチドは赤芽球系細胞の増殖を促進出来ないことが確認された。さらに、同じアッセイ系を用いて、EPO 部分ペプチドは赤血球系細胞の EPO 受容体に EPO が作用するのを競合阻害しないという結果が得られ、EPO 部分ペプチドは、神経細胞死の抑制作用を有するが、赤血球増殖には作用を示さないことが明らかになった。部分ペプチドは、簡単に高純度に合成できる点で優れており、新たな脳梗塞の治療薬として期待される。

2) 抗 HIV 活性を有するウロキナーゼアミノ末端断片 (ATF)

HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞は、種々の HIV 増殖抑制因子を産生する。我々はこれらのうちのの一つとして、CD8 陽性 T 細胞の培養上清から ATF を精製、同定した。ATF は、0.05 nM の低濃度から抗 HIV 活性を示し、ウイルス粒子の出芽抑制という今までにない作用機序を持っていることから、医薬品候補タンパク質として高い可能性があると考えられる。そこで、ATF を医薬品に応用するための評価を行った。はじめに、市販の抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を構築し、血中動態を測定したところ、ICR マウスに体重 1 kg 当たり 25 mg または 10 mg の ATF を皮下注射した場合の血漿中濃度は、それぞれ、6 時間後で 330 ng/ml、及び 70 ng/ml、12 時間後で 80 ng/ml、及び 25 ng/ml、24 時間後では 8 ng/ml、及び 2 ng/ml であった。急性毒性試験として ATF を 10 日間連続で投与し、開始から 20 日目まで観察を行ったところ、体重、形態、行動などに変化は認められなかった。ATF をさらに断片化したペプチドには抗 HIV 活性は認められなかった。また、CHO 細胞を用いた遺伝子組換え型 ATF の大量調製に成功した。今後、遺伝子組換え型 ATF を用いて、臨床応用に向けたさらなる試験を行っていきたいと考えている。

3) ウイルスの同等性

現行の日本脳炎ワクチンはマウス脳を培養基材として製造されているが、まれにマウス脳由来不純物に対するアレルギー反応が疑われる急性散在性脳脊髄炎の発症が認められる。また、ワクチンの安定供給、及び動物愛護の精神からも、培養基材の変更が望まれている。そこで、本研究では、Vero 細胞を培養基材とした日本脳炎ウイルスの大量培養法・精製法を開発すると同時に、両者の同等性を評価した。昨年度は、電子顕微鏡による観察、ショ糖密度勾配遠心、ゲルろ過、SDS-PAGE 及びレクチンプロットを用いて、物理的・化学的性状は同等であることを確認した。本年度は、免疫化学的性状における両者の同等性を評価した。まず、モルモットに免疫して得られる抗血清によるゲル内沈降反応、中和モノクローナル抗体による ELISA において、両者は同等の抗原性を示すことが確認された。抗原性が僅かに異なると思われる各種野生株に対する中和抗体価においても両者は同等な中和抗体価のパターン（中和スペクトル）を示した。また、動物を用いた発症防御試験においても、両ワクチンは同等の発症防御能を示し、日本脳炎ワクチン製造の培養基材を現行のマウス脳由来から Vero 細胞に変更してもワクチンの基本性状である抗原性及び免疫原性は同等であることが確認された。今回用いた一連の免疫化学的性状の評価方法はワクチン製剤の同等性評価の手段として有用であることが示され、他のワクチン製剤の同等性評価においても応用可能と考えられた。

4. まとめ

- 1) バイオ医薬品の構造決定法として、MALDI-TOFMS 等を用いたジスルフィド結合同定法、LC/MS、及び HPAEC-PAD を用いた糖分析法を開発した。また、X 線結晶解析を検討した。
- 2) 物理的・化学的性質評価法として、レクチンを用いた表面プラズモン共鳴法、及びキャピラリー電気泳動法による糖鎖不均一性評価法、並びに改良型電気泳動法を開発した。また、部分還元体の評価を行った。
- 3) 生物学的性質評価法として、表面プラズモン共鳴法を用いた抗原抗体反応評価法、糖鎖関連酵素活性測定法、及び酸滴定熱量測定によるタンパク質・リガンド相互作用解析法を開発した。
- 4) 新規医薬品として EPO 部分ペプチド、及び ATF の特性解析を行った。また、日本脳炎ウイルスの同等性評価を行った。

5. 研究発表 (誌上发表)

- 1) Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M., and Hayakawa, T.: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, in press.
- 2) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., and Hayakawa, T.: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, in press.
- 3) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 113-124 (2002)
- 4) Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 235-244 (2002)
- 5) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **968**, 89-100 (2002).
- 6) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., and Hayakawa, T.: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A*, **978**, 141-152 (2002)
- 7) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫: 糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究 (IV) エリスロポエチン製剤 その4. 衛研報告, **120**, 89-97 (2002)
- 8) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 770-774 (2003)
- 9) Niimi, S., Hyuga, M., Kazama, H., Inagawa, M., Seki, T., Ariga, T., Kobayashi, T., Hayakawa, T.: Activins A, AB and B inhibit hepatocyte growth factor synthesis by MRC-5 human lung fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1405-1408 (2002)
- 10) Kobayashi, T., Niimi, S., Fukuoka, M., Hayakawa, T.: Regulation of inhibin β chains and follistatin mRNA levels during rat hepatocyte growth induced by the peroxisome proliferator di-n-butyl phthalate. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1214-1219 (2002)
- 11) Niimi, S., Horikawa, M., Seki, T., Ariga, T., Kobayashi, T., Hayakawa, T.: Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 437-440 (2002)
- 12) Nagano, M., Nakamura, T., Niimi, S., Fujino, T., Nishimura, T., Murayama, N., Ishida, S., Ozawa, S., Saitou, Y., Sawada, Y.: Substitution of arginine for cysteine 643 of the glucocorticoid receptor reduces its steroid-binding affinity and transcriptional activity. *J. Cancer Lett.*, **181** 109-114 (2002)
- 13) Niimi, S., Oshizawa, T., Naotsuka, M., Ohba, S., Yokozawa, A., Murata, T., Hayakawa, T.: Establishment of a standard assay for human thrombomodulin and determination of the activity of the Japanese reference standard. *Biologicals*, **30** 69-76 (2002)
- 14) Sugawara, K., Nishiyama, K., Ishikawa, Y., Abe, M., Sonoda, K., Komatsu, K., Horikawa, Y., Takeda, K., Honda, T., Kuzuhara, S., Kino, Y., Mizokami, H., Mizyno, K., Oka, T., and Honda, K.: Development of Vero-derived Japanese encephalitis vaccine. *Biologicals*, **30**, 303-314 (2002)
- 15) Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Nakakita, S., Hase, S., Ichikawa, A., and Ikura, K.: Structural analysis of N-linked glycans in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.*, **131**, 807-813 (2002)
- 16) Nakakita, S., Ama, D., Natsuka, S., and Hase, S.: Analysis of oligosaccharides of glycoproteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.*, **303**, 206-209 (2002)
- 17) Yamagishi, M., Natsuka S., and Hase, S.: Co(II)-Regulated substrate specificity of cytosolic α -mannosidase. *J. Biochem.*, **132**, 253-256 (2002)
- 18) Akita, K., Ishimizu, T., Tsukamoto, T., Ando, T., and Hase, S.: Successive glycosyltransfer activity and enzymatic characterization of pectic polygalacturonate 4- α galacturonosyltransferase solubilized from pollen tubes of *Petunia axillaris* using pyridylaminated oligogalacturonate as substrates. *Plant Phys.*, **130**, 374-379 (2002)
- 19) Nakajima, K., Oda, Y., Kinoshita, M. and Kakehi, K.: Capillary affinity electrophoresis for the screening of post-translational modification of proteins with carbohydrates. *J. Proteome Res.* 2003, in press.
- 20) Tatsumi, Y. Yokoo, M., Senda, H. and Kakehi, K. Therapeutic efficacy of topically applied KP-103 against experimental tinea unguium in Guinea pigs in comparison with amorolfine and terbinafine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 3797 -3801 (2002)

- 21) Yasueda, S., Kimura, M., Ohtori, A., and Kakehi, K.: Analysis of an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate, in aqueous humor by combination of semi-micro HPLC and column switching method. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **30**, 1735 – 1742 (2002)
- 22) Nakajima, K., Oda, Y., Kinoshita, M., Masuko, T., and Kakehi, K. : Time-resolved fluorometric analysis of carbohydrates labeled with amino-aromatic compounds by reductive amination. *Analyst*, **127**, 972-976 (2002)
- 23) Sei, K., Nakano, M., Kinoshita, M., Masuko, T., and Kakehi, K. : Collection of alpha1-acid glycoprotein molecular species by capillary electrophoresis and the analysis of their molecular masses and carbohydrate chains. Basic studies on the analysis of glycoprotein glycoforms. *J Chromatogr A.*, **958**, 273-281 (2002)
- 24) Kawabata, A., Kinoshita, M., Kuroda, R., and Kakehi, K. : Capsazepine partially inhibits neurally mediated gastric mucus secretion following activation of protease-activated receptor 2. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, **29**, 360-361 (2002)
- 25) Kinoshita, M., Shiraishi, H., Muranushi, C., Mitsumori, N., Ando, T., Oda, Y., and Kakehi, K.: Determination of molecular mass of acidic polysaccharides by capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr.*, **16**, 141-145 (2002)
- 26) Kakehi, K., Kinoshita, M., and Nakano, M. : Analysis of glycoproteins and the oligosaccharides thereof by high-performance capillary electrophoresis-significance in regulatory studies on biopharmaceutical products. *Biomed Chromatogr.*, **16**, 103-15 (2002) Review.
- 27) Kakehi, K., Kinoshita, M., and Nakano, M.: Analysis of glycoproteins and the oligosaccharides thereof by high-performance capillary electrophoresis. -Significance in regulatory studies -. *Biomed. Chromatogr.*, **16**, 103-115 (2002)
- 28) Kinoshita, M., Shiraishi, H., Muranushi, C., Mitsumori, N. Ando, T. Oda, Y. and Kakehi, K.: Determination of molecular mass of acidic polysaccharides by capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.*, **16**, 141-145 (2002)
- 29) Kobayashi, T., Yanase, H., Iwanaga, T., Sasaki, R., and Nagao, M.: Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs. *Biochem., Biophys. Res. Commun.* **296**, 145-151 (2002)
- 30) 城所俊一, 生体ナノマシンと材料設計, まてりあ 41, 677-682 (2002)
- 31) 岩崎容子, 城所俊一 他著, ポストシークエンスタンパク質実験法 3 構造機能解析法の基礎 (大島泰郎 他編), 共立出版(2002)
- 32) Yamagata, Y., Nakamura, T., Meshitsuka, S., Abe, N., Nakano, H., Doi, T., Kobayashi, Y., Fujii, S., and Sekiguchi, M.: The crystal structures of Escherichia coli MufT proteins with and without manganese ions. *Acta Cryst.*, **A58** (Supplement), C116 (2002)
- 33) Fujii, S. : RNA motif database catalogued by kink parameters. *Nucleic Acids Research*, **Supplement 2**, 197-198 (2002)

6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願
 - ① 掛樋一晃, 白石弘之, 木下充弘 : オリゴ糖 (塩) の製造法 (特願 2002-153086)
 - ② 掛樋一晃, 中嶋和紀, 木下充弘 : 糖鎖-糖結合性タンパク質の相互作用の測定方法, および当該測定方法を用いた糖鎖および糖結合性タンパク質のスクリーニング方法, 当該測定方法に用いる測定用試薬, 並びに測定キット (特願 2002-305086)
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし