

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

目 次

第3分野

課題番号

20030917A KH31028	非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価	吉岡澄江 …… 1
918A KH31029	ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発	能美健彦 …… 10
919A KH31030	バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発	川崎ナナ …… 18
920A KH31031	医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究	棚元憲一 …… 27
921A KH31032	動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究	大野泰雄 …… 33
922A KH31033	医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発	藤本純一郎 …… 43
923A KH31034	創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立	井上 達 …… 48
924A KH31035	新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究	合田幸広 …… 58
925A KH31036	医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究	頭金正博 …… 67
926A KH31037	多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発	山崎利雄 …… 74
927A KH31038	食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立	山本茂貴 …… 83
928A KH32081	DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究	阿曾幸男 …… 90

第4分野

929A KH41039	ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立	小熊恵二 …… 97
930A KH41040	小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究	奥山虎之 …… 101
931A KH42074	熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究	名和行文 …… 105
932A KH42075	新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究	山崎俊夫 …… 115

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

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

研究要旨 バイオ医薬品の特性解析, 品質規格, 及び同等性・同質性評価に関する研究として, 1) 製造工程変更に関する研究, 2) 構造決定, 及び物理的・化学的性質評価法としての糖鎖構造解析法の開発と糖タンパク質の糖鎖解析, 3) タンパク質・リガンド相互作用解析に基づく生物学的性質評価法の開発と, エリスロポエチンの新機能解析, 4) 不純物, 及び目的物質関連物質試験に関する研究, 並びに 5) インフルエンザワクチンの同等性・同質性評価を行った。

分担研究者

- | | |
|-----------------------|------|
| 1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 新見伸吾 |
| 2) 利根工業(株)医薬カンパニー生産本部 | 石川リカ |
| 3) 中外製薬(株)生物技術研究部 | 吉澤 博 |
| 4) 持田製薬(株)製剤研究室 | 猶塚正明 |
| 5) 日本ケイヨーエス(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 |

A. 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解析, 品質評価, 及び同等性・同質性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) バイオ医薬品の製造工程変更に関する研究
- (2) バイオ医薬品の構造決定・物理的・化学的性質評価法としての糖鎖構造解析法に関する研究
- (3) バイオ医薬品の生物学的性質評価法の開発とエリスロポエチン (EPO) の新機能解析
- (4) 不純物及び目的物質関連物質評価法の開発
- (5) インフルエンザワクチンの同等性同質性評価

B. 研究方法

(1) IgG 培養条件の変更

IgG 産生クローンを, 1L fermentor (600 mL working volume, LH Fermentation, UK)を用いてパーフェュージョン・カルチャーを行なった。培養においては pH と浸透圧を狭い範囲に維持するため, 新鮮培地を1時間に1度, 細胞当たり一定のフィードレート ($165 \mu\text{L}/10^6 \text{cells/day}$) で加えた。グルコース濃度及び溶存 CO_2 (pCO_2) を変化させるため, 異なる濃度のグルコース, NaCl, NaOH を含む培地を使用した。具体的には, pCO_2 を増やす時にはフィード培地の NaOH 濃度を高くし NaCl 濃度を低くした。培養条件 (グルコース濃度及び pCO_2 濃度) 変更後, 培養が pseudo-steady state に到達してから分析用に 7 回連続してサンプルを採取した。

(2) 構造決定法, 及び物理的・化学的性質評価法の開発—糖鎖解析

1) 糖鎖

HPLC-PAD, MALDI-TOFMS (Voyager-DETM STR BioSpectrometry), エドマン分解法を用いた。また, 糖鎖とレクチンの相互作用は BIACORE 2000 を用いて解析した。センサーチップは, CM5 及び Type SA を使用した。レクチンは, ラップズイセンレクチン, コンカナバリンA, インゲンマメアグルチニン, E4 小麦胚芽アグルチニン, デイゴマメアグルチニン, アメリカヤマゴボウマイトジェン, チョウセンアサガオアグルチニン, イヌエンジュレクチンI, セイヨウニワトコレクチン, ヒイロチャワンタケレクチン, 酵母フコース特異性レクチン, エンドウマメアグルチニン, マッシュルームアグルチニン, ジャックフルーツアグルチニン, 及びバンデリアマメアグルチニンを用いた。

2) 糖鎖結合部位, 及び部位特異的糖鎖不均一性解析

LC/MS には Paradigm (Michrom BioResource)/ Qstar Pulsar I (Applied Biosystems)を用いた。

3) 糖タンパク質解析

キャピラリー電気泳動装置は Beckman P/ACE5010 型を使用し, DB-17 キャピラリー中に 20 mM 酢酸緩衝液

(pH5.0)を泳動用緩衝液として充填して印加電圧・25kVで分析を行った。

(3) 生物学性質の評価法

1) タンパク質・リガンド相互作用解析

等温滴定型熱量計 MCS-ITC (MicroCal 社) のセル中のタンパク質溶液にリガンド溶液である HCl を滴定して、pH 変化によるタンパク質の構造変化を誘導し、この際の熱の出入りを測定した。解析は Origin for DSC (MicroCal 製) 及び自作のプログラム DDC2 及び pHfit を用いて行った。

2) EPO の新機能解析

マウス胚の着床後の発生過程での EPO 及び EPO 受容体の発現は、マウス胎生 6, 6.5 日の脱落膜体, 7, 8 日目の脱落膜と胚, 9 日目から 12 日目の胎児について RT-PCR により解析した。EPO シグナルを阻害することによる着床後のマウス胚の発生阻害は、妊娠 6 日目の母親の腹部を切開し、子宮内の胚周囲の脱落膜部位に 16 または 7.6 mg/ml の抗 EPO 抗体 R2 もしくは 4.1mg/ml の可溶性 EPO 受容体を投与後、縫合し、3~4 日後 (胎生 9, 10 日目), 脱落膜, 胎児について発生の進行状況を実体顕微鏡で観察することで解析した。さらに組織を固定した後、組織切片を作製し、抗 EPO 抗体で染色もしくは TUNEL 染色することで、発生の異常が見られないかを観察した。

(4) 規格試験法—不純物及び目的物質関連物質試験

モノクローナル抗体溶液を 5%ポリアクリルアミドゲル, 弱陽イオン交換クロマトグラフィー (ProPac WCX-104x250mm, Dionex), SEC-HPLC(TSKgel G3000 SWXL, TOSO, 7.8x300mm), MALDI-TOFMS, 及び ESI-MS で解析した。また、トリプシン消化物のペプチドマッピングを行った。糖鎖については、N-グリカナーゼにより切り出した糖鎖を蛍光試薬 (APTS) 後アミドカラム Amide-80 HPLC で分析する方法, 及び HPAEC-PAD によるシアル酸測定法を用いて解析した。さらに、SDS-PAGE を行った。

(5) 同源性・同質性評価

イヌ腎臓由来の株化細胞 (Madin-Darby Canine Kidney; MDCK) は、スピナーフラスコまたはシェーカーフラスコを用いて無血清培地 (T7m) で培養した。これにインフルエンザウイルスを m.o.i.=0.001 で接種し、同時にトリプシンを添加した。次いで、培養温度を 34°C に下げ、更に 3~4 日間培養を続け、細胞数と生存率、ウイルス抗原量 (ELISA), HA 価 (0.5%ニワトリ血球の凝集) をモニターした。トリプシンの品質は SDS-PAGE, ゲルろ過法, スキムミルクゲル分解法, 及び合成基質分解法で評価した。トリプシンインヒビターの活性はスキムミルクゲル分解抑制法, 及び Reverse Zymography 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト尿より精製されたトロンボモジュリンを試料として用いた。ヒト尿は、提供者が特定さ

れない方法で提供され、なおかつ直ちにプールすることによって個人を特定できない状態にして研究に用いた。採血は、インフォームドコンセントのもとに所属する機関のボランティアから採血し使用した。動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査の承認を得て行った。

C. 研究結果, 及び考察

(1) 製造工程に関する研究

培養工程において生じる乳酸などの副産物の悪影響を最小化し、改良した培養工程を確立するため、CHO 細胞及び CHO 細胞が産生する IgG へのグルコース及び CO₂ 濃度の影響について、培地のフィード率, pH, 浸透圧をコントロールしたパーフュージョン培養槽を用いて調べたところ、高いグルコース濃度 (14.1±0.6mM) では、グルコースは主に乳酸に変換され、グルコースからの乳酸産生量は 220mmHg までの CO₂ 濃度の影響を受けないことが明らかになった。このとき CO₂ 濃度の増加に伴い、細胞の見かけの Growth rate は低下したが (0.021/h→0.009/h), IgG 産生量は殆ど変化しなかった。これに対して、グルコース濃度を低濃度 (6mM) に変化させると、培地中のグルコース濃度は <0.1mM になり、~50mmHg CO₂ では細胞の Growth rate は 26% 高くなることが分かった (p<0.05)。ピルビン酸から CO₂ への変換の代謝シフトにより、乳酸生産/グルコース取り込み比は 1.51 から 1.14, アラニン比生産速度は 17.7 から 0.56 mmol/10⁶cells/h に低下した。CO₂ 濃度が 140mmHg までの範囲で増加したとき、グルコース制限下では 1.7 倍の高い Growth rate を示した (0.022/h vs 0.013/h)。しかし、220mmHg までの CO₂ 濃度では、グルコース制限下の CHO 細胞に対する良好な効果が失われ、Growth rate は 0.008/h に急激に低下し、IgG 生産量は高グルコース条件下に対し 15% 低下することが明らかになった (p<0.01)。各培養条件で生産された IgG の構造物性評価を行うことにより、グルコース濃度や CO₂ 濃度が IgG の翻訳後修飾 (糖鎖構造など) に与える影響を明らかにする必要があると思われる。

(2) 構造決定法, 及び物理的・化学的性質評価法に関する研究 —糖鎖構造解析

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、翻訳後修飾は宿主細胞の性質に委ねて合成される。特に活性, 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最も受けやすく、最終産物の糖鎖構造を解析することは重要である。本研究では、各種 LC, MS, 電気泳動法を利用した新しい糖鎖構造, 糖鎖結合部位, 部位特異的糖鎖構造解析法, 及び糖タンパク質解析法を開発し、スロンボポエチン (TPO), ヒト尿中から精製した

可溶性トロンボモジュリン (uTM), アポリポプロテイン B100 (ApoB100) 等の糖鎖解析を行った。

1) 糖鎖解析

① HPAEC-PAD を用いた TPO の O 結合糖鎖解析

TPO は、巨核系細胞の分化と増殖刺激により血小板生産を促進する 332 個のアミノ酸で構成される糖タンパク質で、N 結合糖鎖の他に複数の O 結合糖鎖が存在することが知られている。CHO 細胞で発現した TPO の N 結合糖鎖については、これまでに全構造および結合部位ごとの構造を解析し、分岐構造が結合部位ごとに異なることを明らかにしている。O 結合糖鎖については、昨年度、アルカリ処理で遊離した後、HPAEC-PAD 法で分析する方法を検討し、一部のペプチド断片に結合している O 結合糖鎖プロファイルが、TPO 分子全体より得られた O 結合糖鎖プロファイルと異なる知見を得ている。そこで今回、結合部位ごとの O 結合糖鎖プロファイリングを行い、その不均一性を調べた。

はじめに、昨年度開発した O 結合糖鎖プロファイル分析法について、分解物生成の低減、簡便性の向上を検討し、より簡便で糖鎖の分解を最低限に抑制した方法に改良することができた。この試験系の繰り返し 3 回試験の併行精度は、メインピークの面積百分率 (%) の相対標準偏差として 1.1%、合計面積値の相対標準偏差として 4.2% であった。

つぎに、トリプシン消化物によるペプチドマップ法、アミノ酸配列分析、及び LC/MS 分析により、ペプチドマップ上で O 結合糖鎖結合部位を含むピークを同定し、単一または複数箇所に O 結合型糖鎖結合部位を含む 5 種のペプチド断片が分離されていることを確認した。O 結合糖鎖プロファイリングを行った結果、TPO の O 結合糖鎖の主な構造である NeuAco2-3GalB1-3GalNAc, GalB1-3(NeuAco2-6)GalNAc 及び NeuAco2-3GalB1-3(NeuAco2-6)GalNAc の存在比率がそれぞれ異なっていることが明らかになり、TPO は結合部位ごとに糖鎖の不均一性が異なることが明らかになった。

② MALDI-TOFMS を用いた uTM の O 結合糖鎖の解析

糖鎖除去反応と各種機器分析の組み合わせによる迅速かつ高感度な糖鎖構造解析を目的とし、MALDI-TOFMS、及びプロテインシーケンサーを利用した O 結合糖鎖の解析を検討した。解析対象として uTM を用いた。

トリプシンおよび Lys-C 消化物の逆相 HPLC を実施し、各フラクションの MALDI-TOFMS 分析と、N 末端アミノ酸配列分析を行いペプチドを同定した。Val467 を N 末端とするペプチドについて O-glycosidase 消化を行ったところ、分子量が 712.4Da 減少し、別途行った糖鎖構造解析で明らかとなっていた新規構造糖鎖の脱シアロ硫酸化リンケージ 4 糖 (SO₄-3GlcAB1-3GalB1-3GalB1-4Xyl) が結合していることが確認された。他の

ペプチドについても同様に O-glycosidase 消化と MALDI-TOFMS 分析により解析し、TM の O 結合糖鎖を推定することができた。

③ レクチン固定化センサーチップを用いた N 結合糖鎖解析

各種レクチンを固定化したセンサーチップを使用した BIACORE による相互作用解析に基づく糖タンパク質の糖組成、糖鎖構造の簡易測定法の開発を行った。まず、基礎検討として、レクチンを固定化したセンサーチップの耐久性について検討したところ、センサーチップ上にレクチンを結合させる場合、至適量が存在し、至適量付近では、結合量の変化は、測定結果に大きな影響を及ぼさないことが確認された。このことは、レクチンを固定化する際に、一定量のレクチンを固定化するのが困難であるという問題点を回避できる可能性を示唆するものであると考えられる。また、測定の際のレクチンの結合能の減少は、0.3~0.4%/回と小さく、連続した測定において結果を比較することが十分可能であると思われ、糖鎖及び糖たん白質を迅速且つ簡便に評価し得る可能性が示された。

本方法を CHO 細胞、NS0 細胞、及び Sf21 細胞で発現された遺伝子組換え肝細胞増殖因子の糖鎖構造解析に応用した結果、産生細胞による糖鎖プロファイルの差異を検出可能であることが明らかになった。このことは、糖タンパク質の糖鎖プロファイルが異なれば、レクチンに対する結合プロファイルも異なることを示しており、糖タンパク質の糖鎖プロファイルの差異を評価する方法として応用できる可能性が示されたと考えている。本法がどの程度の糖鎖プロファイルの差異まで検出可能であるか等、本法の持つポテンシャルについて、さらに詳細な検討を行いたい。

他に糖鎖解析法として、遊離糖鎖を 2-アミノ安息香酸(2-AA)により標識し、ポリマーベースのアミノカラムを用いて順相分配モードで分析する方法、2アミノピリジン標識化と 2D 糖鎖マッピング法、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS で解析する方法を検討した。

2) 糖鎖結合部位の同定と部位特異的糖鎖不均一性の解析

① LC/MS/MS

LC/MS を用いたペプチドマッピングは、ペプチドと糖ペプチドを分離しながらオンラインで糖ペプチドに関する分子量情報が得られることからよく利用されているが、ペプチド混合物の中から糖ペプチドを分離し特定することが難しいとされている。現在、インソースフラグメンテーションやプリカーサーイオンスキャンにより糖鎖に特徴的な分子イオン (*m/z* 204, 366 など) を確認することで糖ペプチド由来のイオンを判別する方法が用いられているが、プリカーサーイオンやフラグメントパターンを得るため、別途分析が必要となる。

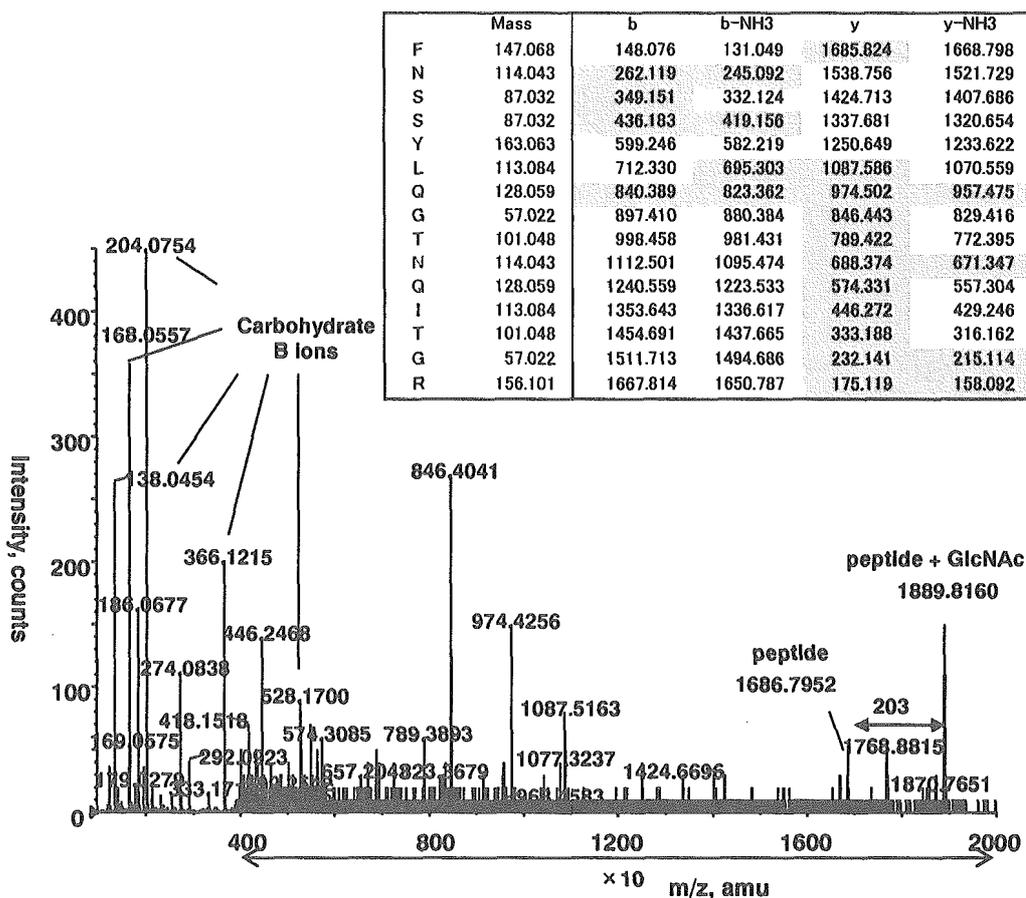


Fig. 1. 糖ペプチド 1495-1509, m/z 1200.4(+3) のプロダクトイオンスペクトル。表、ペプチド FNSSYLQGTNQITGR から得られることが予想される b 及び y イオン

本年度我々は、データ依存的 MS/MS スペクトルを解析することで糖ペプチド由来イオンをより正確に選択し、さらには結合ペプチド配列を決定出来ることを見出した。

モデル糖タンパク質として、アミノ酸 4536 残基、19 箇所 (Asn7, 158, 956, 1341, 1350, 1496, 2212, 2533, 2752, 2955, 3074, 3197, 3309, 33331, 3384, 3438, 3868, 4210 及び 4404) の推定 N 結合糖鎖結合部位を持つ巨大糖タンパク質 ApoB100 を用い、トリプリン及びキモトリプシン消化物の LC/MS/MS によるペプチドマッピングを行った。プロダクトイオンスキャンの中から、糖ペプチドの指標となる [HexNAc]⁺ (m/z 204.05-204.15) のピークだけを抜き出すことによって、ペプチド及び糖ペプチド混合物の TIC から糖ペプチドの溶出位置を特定することができた。また、プロダクトイオンスペクトル上の糖鎖関連イオンからシアル酸結合の有無を判別することが可能であった。さらに、ペプチドからも b および y イオンが生成することから、ペプチド部分の帰属も同時に可能であることが明らかになった。TOFMS 測定で得られた実測値と、アミノ酸配列より求めた N 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドの理論分子量と各種糖鎖の理論分子量の和を対比させながら、糖ペプチドイオンを帰属することができた。その

一例として、Fig. 1 に 35 分に溶出されたペプチド (m/z 1200.4³⁺) のプロダクトイオンスペクトルを示す。図中の表はこのペプチド FNSSYLQGTNQITGR から得られることが予想されるフラグメントイオンを示している。網掛け部分は Fig. 1 中に確認されたイオンである。糖鎖構造は TOFMS で得られた糖ペプチドの分子量 (3598.2Da) からペプチドの理論分子量 (1684.8Da) を差し引いて得られた分子量 (1913.4Da) を基に、シアル酸が 1 分子結合した 2 本鎖糖鎖であることが推定された。同様に、糖ペプチドに由来するすべてのプロダクトイオンスペクトルを解析した結果、ApoB100 の糖鎖結合部位とそれぞれの部位に結合する糖鎖を明らかにすることが出来た。本分析法は様々な糖タンパク質の糖鎖結合部位、及び部位特異的糖鎖不均一性解析に応用可能であると思われる。

② エドマン分解

N 末端アミノ酸配列分析において、糖鎖が結合しているアミノ酸は未修飾アミノ酸と同様にエドマン分解されるが、逆相 HPLC での分離時に溶出位置が異なり、糖鎖結合部位のアミノ酸では PTH アミノ酸として定量される回収値が糖鎖の結合していない場合と比較して大きく減少するため、糖鎖結合位置を判断することが

できる。そこで、neuraminidase 消化、並びに Asp-N 消化を行い、結合糖鎖の非還元末端のシアル酸による不均一性をなくすとともに、断片化によって N 末端アミノ酸配列分析における PTH アミノ酸の回収量向上を試みた。この結果、Asp471 を N 末端アミノ酸とする C 末端ペプチドを得ることができた。C 末端ペプチドの N 末端アミノ酸配列分析の結果、合成ペプチドと比較して分析サイクル 4, 10, 12, 16 および 18 で PTH アミノ酸の回収量が著しく低下していることが明らかとなった。これらの分析サイクルは uTM のアミノ酸配列の Ser474, Ser480, Thr482, Thr486 及び Thr488 に相当することから、これらの位置に糖鎖が結合していると判断された。また、Thr488 では PTH アミノ酸の回収量が他の結合推定部位ほど低下していなかったことから、Ser474, Ser480, Thr482 及び Thr486 と比較して、糖鎖の結合している割合が少ないと考えられた。本分析により、uTM の O 結合糖鎖の結合位置を同定することができた。

3) 糖タンパク質解析

糖タンパク質混合物のモデルとしてウシ胎児、新生児及び成獣期の血清中の酸性糖タンパク質画分を用いて、キャピラリー電気泳動により糖タンパク質を分離することを検討した。今回用いた分析法では、pH 5.0 の酢酸緩衝液を泳動用緩衝液として使用して電気的導入法により血清を導入しているため、等電点が pH5.0 以下のタンパク質成分が導入され、血清中の主要なタンパク質であるアルブミンは分析を妨害しないことが確認された。今回の方法により、ウシ胎児血清、ウシ新生児の血清、及び成牛の血清中の酸性タンパク質が成長につれて変化し、フェツインが著しく減少することを明らかにすることができた。

さらに、キャピラリー電気泳動により血清中の酸性タンパク質画分を分離し、SDS-PAGE により分析した結果、酸性糖タンパク質画分はキャピラリー電気泳動の場合と同様に成長につれてタンパク質の存在比に顕著な変化が見られることがわかった。すなわち、ウシ胎児血清から得られたフェツイン画分は 62 kDa 付近に主要なバンドを示し、その移動度は市販のフェツインとほぼ同じであったが、生後 10 日以内のウシでは 40 kDa および 43 kDa に 2 本の新しいバンドが出現し、フェツインの相対量は著しく減少していることが明らかとなった。成牛になると、62 kDa および 43 kDa のバンドは消失し、40 kDa のバンドのみが明瞭に観察された。以上のようにキャピラリー電気泳動と SDS-PAGE の組み合わせにより、糖タンパク質の分離が可能となり、糖タンパク質の分布の変化を明らかにすることが確認された。

(3) 生物学的性質評価法に関する研究

1) タンパク質・リガンド相互作用

ほとんど全てのタンパク質は特定のリガンドを識別

することで分子機能を発現する。タンパク質とリガンドとの相互作用を解析・解明することは、医薬品の開発や評価をする上で大変重要である。しかし、タンパク質の立体構造やタンパク質・リガンド複合体の立体構造が X 線結晶解析などで明らかになっても、その相互作用を定量的に予測することは現在のところ困難である。また、実際のタンパク質・リガンド相互作用を熱力学的に最も精密に評価可能な熱測定法は、現在のところ、限られた結合定数の範囲内での解析にしか利用できず、特に結合定数の小さな「弱い結合」に関する解析は困難である。本研究では、これらの困難を克服するために、各種のリガンドとタンパク質との相互作用を熱力学的に精密に測定する手法の開発を行った。平成 14 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、かつ、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する、新しい精密熱測定法の開発を試みた。今年度はこの新しい手法を、酸滴定熱量測定法 (Isothermal acid-titration calorimetry) として確立し、タンパク質の構造転移に伴う熱力学量変化が精密に測定できることを明らかにした。

Ribonuclease A の 35~45°C の酸滴定熱量測定の結果、このタンパク質の立体構造の pH 転移の midpoint pH (pH_d) および転移に伴うエンタルピー変化は、温度依存性を持つことがわかった。pH 転移に伴う熱容量変化 ΔC_p とファントホッフエンタルピー ΔH^{FH} は、40°C でそれぞれ $8 \pm 2 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ 、 $330 \pm 20 \text{ kJ mol}^{-1}$ であった。これらの値は、解析ソフト DSC により評価した値及び酸滴定熱量測定により直接測定したエンタルピー変化と誤差範囲内で一致した。このことは、この pH 転移が 2 状態転移であるという仮定が正しいことを支持するとともに、酸滴定熱量測定によって、タンパク質の熱力学的安定性の pH 変化が正しく測定されていることを示すものである。

つぎに、Cytochrome c の 40°C における pH 転移を測定したところ、未変性状態 (N 状態) から変性状態 (D 状態) への転移に比べて、N 状態と MG 状態のエンタルピーの差は小さいことがわかった (Fig. 2)。これまで、N-MG 転移が熱転移としては観測されないためにエンタルピー変化が小さいと予想はされていたが、今回、この転移に伴うエンタルピー変化の直接測定に成功した。15~50°C における N-MG 転移を酸滴定熱量測定法で観測した結果、N-MG 転移のエンタルピー変化は温度が下がるとともに減少していくことがわかった。15°C ではエンタルピー差は 8 kJ/mol、50°C では 77 kJ/mol と観測された。酵素・阻害剤の結合や抗原・抗体結合など生体内の分子間の可逆的な結合・解離に伴うエンタルピー変化の多くは数十 kJ/mol 程度のエンタルピー変化を示すこと、また多くのタンパク質・リガンド相互作用が pH 依存性を持っていることから考えて、pH を変化させることにより、タンパク質・リガンド複合体の結合状態と解離状態の間の pH 転移を測定することにより、複合体の安定性につ

いての精密な熱力学的評価が可能となることが十分に期待できる。

今後、中性あるいはアルカリ側で酸滴定を行う場合、溶液中に溶存している炭酸イオンや OH⁻イオンによる中和熱を正確に補正することが必要となる。この補正の方法を確立することで、酸滴定熱量測定法の適用範囲は更に広がる可能性がある。

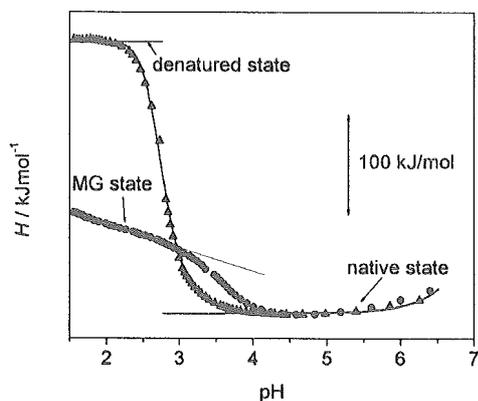


Fig. 2 40°Cにおける cytochrome c の酸転移. ▲は 20 mM KCl 中の N-D 転移, ●は 500 mM KCl 中の N-MG 転移

2) EPO の新機能解析

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。本年度は EPO の子宮における役割について解析した。

マウス着床後の胚を含む脱落膜体での EPO 及び EPO 受容体 mRNA の発現を解析した結果、胎生 6, 6.5 日の脱落膜体では EPO 受容体 mRNA の発現は観察されたが、EPO mRNA の発現は観察されなかった。胎生 7 日目になると胎児で EPO 受容体だけではなく、EPO mRNA の発現も検出できるようになった。この結果から、胎児が EPO を産生する前に存在する EPO 受容体は母親由来の EPO を受け取ることで、胚発生に重要な機能を持っている可能性が考えられた。

つぎに、胎生 6 日目の脱落膜体に抗 EPO 受容体、もしくは可溶性 EPO 受容体を投与して EPO シグナルを遮断して、その胚発生への影響について検討したところ、胎生 6 日目の脱落膜体 EPO の機能を阻害することで 3-4 日後には 50-60% の脱落膜体は貧血で小さくなり、そのうち 18-25% では脳の異常を伴う発生阻害が観察された。実体顕微鏡による観察では、3 日後には可溶性 EPO 受容体投与群に明らかな胎児の発生の遅れが観察される場合があったが、熱変性可溶性 EPO 受容体投与のコントロール群ではいずれも正常な発生が観察された。4 日後の観察では抗 EPO 抗体投与により、卵黄嚢の発達不全と体節数の少ない胎児が観察された。また

抗 EPO 抗体を投与することで脳胞の発生不全が見られ、中脳部の屈曲が見られない胎児が観察された。さらに、組織切片を作製して組織の観察を行った結果、脱落膜に関しては胎生 6 日に EPO シグナルを遮断した系では血管洞網の形成が抑制されていることが明らかになった。EPO シグナルを遮断した系では 3 日後に神経上皮の形成異常が観察される場合があり、抗 EPO 受容体抗体で染色される細胞も少なく、死んでいる細胞が多く確認され、明らかな発生異常が観察された。

以上のことから、着床後の比較的早い段階では、母親の EPO が脱落膜を介して胎児の発育を支える因子として機能している可能性が示唆された。

(4) 規格試験法に関する研究—目的物質由来不純物・目的物質関連物質試験法

バイオ医薬品の品質評価において、分析方法を選択し、試験法を最適化するには、目的物質、目的関連物質及び不純物を相互に分離することに重点をおくことが必要である。また、目的物質関連物質、不純物については、それぞれ個別の若しくは総量での規格値を適切に設定することが必要とされている。従って、HPLC や電気泳動等の分析手法により minor peak あるいは minor band が見出された際には、目的物質関連物質なのか、目的物質由来不純物なのか、またはその他の不純物（宿主由来不純物、製造工程由来不純物等）なのかを確認することが必要である。特にタンパク質は、製造・保存条件等により、糖鎖の相違（シアル酸の有無等）、脱アミド化、タンパク質の内部切断、アミノ酸の修飾（N 末端、内部のアミノ酸）、目的物質の aggregation あるいは fragmentation 等が生じ、目的物質と等電点の異なる分子が出現する可能性がある。一般に、等電点の異なる分子を分析するには、等電点電気泳動と弱陽イオン交換クロマトグラフィーが利用されることが多い。そこで、本年度は等電点電気泳動と弱陽イオン交換クロマトグラフィーを用いてモノクローナル抗体（等電点は塩基性）を分析し、出現したマイナーピークが目的物質関連物質なのか、目的物質由来不純物なのかについて検討することを通じて、モノクローナル抗体を品質評価する際のイオン交換クロマトの重要性について検討した。

組換え型モノクローナル抗体を等電点電気泳動し、CBB 染色したところ、pI8.65~pI9.30 の間に主バンドが認められた。主バンドより等電点の低い領域はスメアとなっており、明確なバンドは認められなかった。また、デンストグラムは、相互のピークの分離や理論段数等が良好ではなく、等電点電気泳動を用いて目的物質関連物質、不純物等を定量する為には、かなり工夫が必要であると考えられた。次いで、陽イオン交換 HPLC を用いて、本モノクローナル抗体を分析した。強陽イオン交換 HPLC でしたところ、one peak として検出されたが、弱陽イオン交換 HPLC (WCX-10, Dionex) では、分子の表面荷電やその分布に基づいて

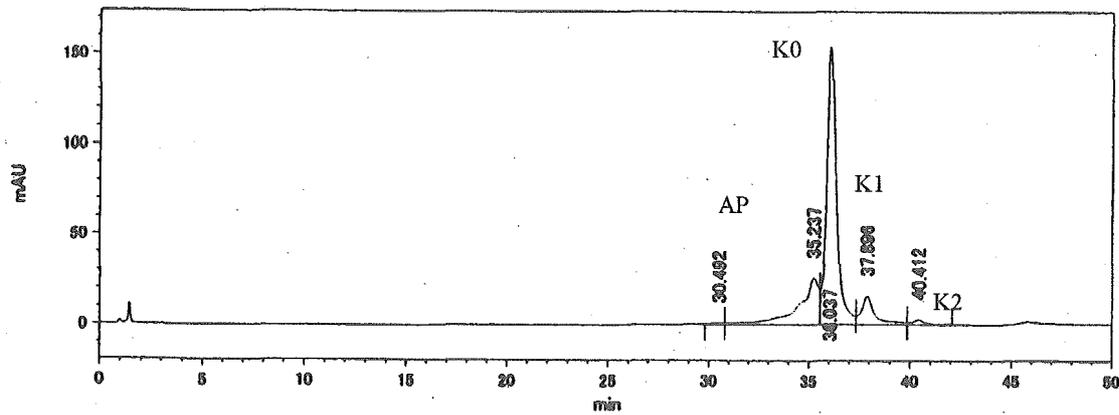


Fig. 3 モノクローナル抗体の陽イオン交換クロマトグラム

少なくとも4つのピーク (AP, K0, K1, K2) が検出された (Fig. 3).

そこで、陽イオン交換クロマトグラムで認められたピークが、目的物質関連物質なのか、目的物質由来不純物なのかを明らかにする目的で、AP, K0, K1, K2のピークを分取した後、濃縮し、物理的・化学的性質を比較した。AP, K0, K1, K2について、非還元及び還元電気泳動 (CBB染色及び銀染色)、ペプチドマッピング、ELISA及びBIACOREによる抗原抗体 binding affinity、SEC-HPLC、遊離SH基の同定、ジスルフィド結合位置同定、糖鎖マッピング、シアル酸の定量、質量分析 (MALDI TOFMS, ESI-MS)、及び等電点電気泳動等を行ったが、明確な差は認められなかった。しかし、カルボキシペプチダーゼBを用いて、モノクローナル抗体を経時的に酵素消化したところ、K2, K1のピークが徐々に減少し、最終的にはK0のピークになったことから、K1, K2はモノクローナル抗体のC末端にリジン残基が各々1個、2個付加したもので、K0はリジン残基の付加していない分子であると推定された。以上のことから、これらは目的物質関連物質であると考えられた。さらに、モノクローナル抗体の苛酷試験を実施すると、弱陽イオンクロマトにおいて、AP付近のピークが増大することが確認され、これらのピークは、抗原に対する binding affinity が低下していたことから、目的物質由来不純物であると考えられた。

以上のことより、モノクローナル抗体を開発する際には、イオン交換クロマトを用いて目的物質関連物質及び目的物質由来不純物量の恒常性を管理することが重要であると考えられた。

(5) 同等性・同質性評価法に関する研究

インフルエンザウイルスには、それまで流行していたウイルスとは抗原性の全く異なるウイルスが突然現れることがある (不連続変異)。現行のインフルエンザワクチンは、発育鶏卵を培養基材とするため、ワクチンの製造には親鳥の準備から始める必要があり、最短でも9ヶ月程度の時間を要する。一方、組織培養による方法では、約3ヶ月で製造が可能であり、汎流行ウ

イルスの出現時には迅速な対応が可能となる。また、現行ワクチンの製造には、ドーズ当たり1~2個の発育鶏卵を用いるため、廃卵の量が膨大であることから処理に伴う環境負荷も大きいことや、現行ワクチンにはわずかではあるが卵由来の不純物が残存しており、副作用との関連性も否定できないなどの問題がある。組織培養化により、これらの問題の解決が期待できる。そこで、インフルエンザワクチンの培養基材を現行の発育鶏卵よりMDCK細胞へ変更し、得られたウイルス及びワクチンの性状を評価して両者の同等性を検証することを目的として、MDCK細胞でのインフルエンザウイルスの培養条件、ウイルス増殖に必須のトリプシンの品質評価、トリプシンインヒビターの検出等の検討を行った。

トリプシン濃度とウイルス産生量との相関を確認するために、トリプシン0, 0.11, 0.23, 0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2 U/mLの各濃度について感染実験を行なった。その結果、細胞密度が 2.6×10^6 cells/mLでウイルスを接種した場合、トリプシン濃度0.9 U/mL (3日目) ~0.45 U/mL (5日目) で最もウイルスの産生量が高いことが確認された。

つぎに、SDS-PAGE、ゲルろ過法、合成基質分解法、及びスキムミルクゲル分解活性法、タンパク量の測定により、Sigma製ブタ由来精製トリプシン及びDifco製ブタ由来トリプシンの品質評価を行ったところ、Difco製ブタ由来トリプシンに比べて、Sigma製ブタ由来精製トリプシンの方が純度が高いことが明らかとなった。

MDCK細胞にインフルエンザウイルスを接種する際、培地に培養上清を添加すると、添加量に相関してウイルスの産生が阻害されることが分かった。この阻害因子をトリプシンインヒビターと想定して、スキムミルクゲル分解法を応用したトリプシンインヒビター測定系を構築した。この測定系を用いて、培養上清の膜分画々分のインヒビター活性を測定した結果、トリプシンインヒビターは100~10 kDa画分に濃縮されることが明らかになった。培養上清のReverse Zymographyでは、20~10 kDaの位置に少なくとも2本のバンドが確認されており、双方の結果に矛盾が無かった。100~10 kDa画分のウイルス増殖阻害能については現在検討を

行っており、予備的に阻害能があることを確認している。また、インヒビターの精製を試み、ヘパリンカラムに吸着することを確認した。今後、さらにインヒビターの詳細な性状を明らかにした上で、現行のインフルエンザワクチンとの同等性・同質性を評価していく予定である。

D. 結論

バイオ医薬品の特性解析、品質評価、及び同等性・同質性評価に関する研究を行い以下の知見が得られた。

- 1) IgG 産生 CHO 細胞の増殖、及び IgG 産生量は培地のグルコース濃度、及び CO₂ 濃度の影響を受けることが明らかになった。今後、これらの培養系の変化が糖鎖を含む翻訳後修飾に及ぼす影響を解析することが必要と思われる。
 - 2) 構造決定、及び物理的・化学的性質評価法として、各種 LC, MS, プロテインシーケンサー、キャピラリー電気泳動法、及び BIACORE 等を用いた糖鎖構造解析法を開発し、TPO, uTM, apoB100 等糖タンパク質の糖鎖構造を明らかにした。
 - 3) 生物学的性質評価法としてタンパク質・リガンド複合体の結合状態と解離状態の間の pH 転移を測定することにより複合体の安定性を評価する熱力学的評価法を開発した。また、エリスロポエチンが胎児の発育を支える因子として機能していることを見出した。
 - 4) モノクローナル抗体の目的物質由来不純物・目的物質関連物質試験法として、陽イオン交換 HPLC が有用であることを確認した。
 - 5) 同等性・同質性評価のための細胞培養インフルエンザワクチンの特性解析を行った。
- #### E. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) 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*, 251, HPLC of Peptides and Proteins, Edited by M. I. Aguilar, 263-274 (2003)
 - 2) Kawasaki, N., Hashii, N., Itoh, S., Hyuga, M., Kawanishi, T. and Hayakawa, T.: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, 48, 5-10 (2004)
 - 3) Hyuga, M., Hyuga, M., Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Niimi, S., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, In press.
 - 4) Hyuga, M., Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Ishii, A., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, (2004) In

- press
- 5) Gotoh, Y., Niimi, S., Hayakawa, T., and Miyashita T, Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocytes attachment. *Biomaterials*, 25, 1131-1140 (2004)
 - 6) Takemura, T., Hojo, H., Nakahara, Y., Ishimizu, T., and Hase, S. : Application of Fmoc-amino Acid Carrying an Unmasked Carbohydrate to the Synthesis of the Epidermal Growth Factor-like Domain of Bovine Blood Coagulation Factor IX. *Org. Biomol. Chem.*, 2(1), 133-136 (2004)
 - 7) Takahashi, C., Nakakita, S, and Hase, S.: Conversion of Pyridylamino Sugar Chains to Corresponding Reducing Sugar Chains. *J. Biochem.*, 13, 51-55 (2003)
 - 8) Kajiya, A., Koyama, Y., Mita, T., Mega, T., Hase, S., Kawakami, T., Honda, E., Munakata, H, and Isemura, M.: Isolation of Lectins by Affinity Chromatography with Porcine Plasma Proteins Immobilized on Agarose. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 67, 2051-2054 (2003).
 - 9) Yasuda, Y., Matsuo, T., and Nagao, M.: Blockade of erythropoietin signal at the early postimplantation period inhibits the development of decidua and embryo in mice. *Congenital Anomalies*, 44, 9-17 (2004) In press
 - 10) Yasueda, S., Kimura, M., Ohtori, A., 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 Anal.*, 30, 1735-1742 (2003)
 - 11) Nakajima, K., Oda, Y., Kinoshita, M., Kakehi, K.: Capillary affinity electrophoresis for the screening of post-translational modification of proteins with carbohydrates. *J. Proteome Res.*, 2, 81-88 (2003)
 - 12) Akai, R., Kinoshita M., Kakehi, K., and Lee, Y. C.: A method for detecting O-glycanase in biological samples using a combination of MALDI-TOF mass spectrometry and time-resolved fluorometry. *Analyst*, 128, 440-446 (2003)
 - 13) Oda, Y., Senaha, T., Matsuno, Y., Nakajima, K., Naka, R., Honda, E., Furuta, I., Kinoshita, M., and Kakehi K.: A new fungal lectin recognizing alpha(1-6)linked L-fucose in the N-glycan. *J. Biol. Chem.*, 278, 32439-32447 (2003)
 - 14) Nakano, M., Kakehi, K., and Lee, Y. C.: Sample clean-up method analysis of complex-type N-glycans released from glycopeptide. *J. Chromatogr. A*, 1005, 13-21 (2003)
 - 15) Kakehi, K., Kinoshita, M. Oda, Y. and Abdul-Rahman B.: Lectin from bulbs of *Crocus sativus* recognizing N-linked core glycan: isolation and binding studies using fluorescence polarization. *Methods Enzymol.*, 362, 512-522 (2003)
 - 16) Kakehi, K., Kinoshita, M., and Yasueda, S.: Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 797, 347-355 (2003)
 - 17) Suzuki, T., Takahashi, T., Nishinaka, D., Murakami, M., Fujii, S., Hidari, K., Miyamoto, D., Li, Y-T., Suzuki, Y. : Inhibition of influenza A virus sialidase activity by sulfatide. *FEBS Lett.*, 553, 355-359 (2003)

- 18) Fujii, S.: Structural characterization of adenosine moiety in functional RNA molecules. *Nucleic Acids Research Supplement*, 3, 195-196 (2003)
- 19) Nakamura, S. and Kidokoro, S.: Isothermal acid-titration calorimetry for evaluating the pH dependent of protein stability. *Biophys. Chem.*, **109**, 229-249 (2004)
- 20) Karim, N. and Kidokoro, S.: Precise and continuous observation of cellulose-catalyzed hydrolysis of cello-oligosaccharides using isothermal titration calorimetry. *Thermochim. Acta*, **412**, 91-96 (2004)
2. 学会発表
- 1) 川崎ナナ, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖鎖のプロファイリングと構造解析. 第 53 回電気泳動学会シンポジウム (2003 年, 大阪)
- 2) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 蜂須賀暁子, 橋井則貴, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2 次元電気泳動及び LC/MS を用いたグライコーム解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第一回夏期シンポジウム (2003 年, 浜松)
- 3) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 横浜バイオテクノロジー懇談会平成 15 年度第 1 回リカレント講座「マススペクトロメトリーとプロテオミクス—蛋白質研究の最前線」(2003 年, 横浜)
- 4) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Jin Yuan, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akiko Ishii, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative oligosaccharide analyses by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 5) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Mawanishi, Takao Hayakawa: Oligosaccharide profiling of cell membrane by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 6) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Analysis of IgLON family protein in rat brain by gel electrophoresis and capillary LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 7) Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Jun-ichi Sawada: Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragments. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 8) Akiko Ishii-Watabe, Edwin Chang, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, John Cooke: Transcriptional profiling in nicotine-treated human microvascular endothelial cells. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 9) 川崎ナナ: 糖鎖関連医薬品の現状と課題. 第 3 回糖鎖科学名古屋拠点研究会 (2004 年, 名古屋)
- 10) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の質量分析. 日本薬学会第 124 年会 (2004 年, 大阪)
- 11) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 川西 徹, 早川堯夫: 糖鎖プロファイリングを用いた差異解析に基づくグライコーム解析. 日本薬学会第 124 年会 (2004 年, 大阪)
- 12) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2 次元電気泳動と LC/MS を用いたラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析. 日本薬学会第 124 年会 (2004 年, 大阪)
- 13) 原園 景, 川崎ナナ, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS/MS による apolipoprotein B100 の部位特異的糖鎖構造解析. 日本薬学会第 124 年会 (2004 年, 大阪)
- 14) Kidokoro, S.: the 58th Calorimetry Conference, Brigham Young University-Hawaii, 27 July-1 August, 2003
- 15) 中村茂芳, 城所俊一, 第 41 回日本生物物理学会年会, (2003 年, 新潟)
- 16) 中村茂芳, 城所俊一, 第 39 回熱測定討論会, (2003 年, 広島)
- 17) Nurul, K., 相馬聡, 城所俊一, 第 39 回熱測定討論会, (2003 年, 広島)
- 18) Hase, S., Nakakita, S., and Ikenaka, K.: Brain-type sugar chain BA-2 and galactosyltransferase. The 2nd International 21 Century COE Symposium on Integrated Eco Chemistry (2003 年, 兵庫)
- 19) Hase, S.: Brain-type sugar chains and β 1-4 galactosyltransferase. XVII International Symposium on Glycoconjugates (2003 年, インド)
- 20) Miyazaki, Y., Nakanishi, K., Mega, T., Hase, S., and Sorai, M.: Influence on Molecular Motion of Trypsin by Binding of Inhibitor Studied by Heat Capacity Measurement. The 58th Calorimetry Conference (2003 年, ハワイ)
- 21) Miyazaki, Y., Nakanishi, K., Mega, T., Hase, S., and Sorai, M.: Influence on Molecular Motion of Trypsin by Binding of Inhibitor Studied by Heat Capacity Measurement. The 3rd International Symposium on Slow dynamics in Complex Systems (2003 年, 仙台)
- 他
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 掛樋一晃: 特願2003-054732, グリコシド結合含有化合物中の糖の分離方法及びそれに用いる糖分離システム, 糖分離用試薬キット, 並びに糖分離用標準化試料
- 2) 掛樋一晃: 特願2003-122965, 物質を捕捉する機能を有する機能性ポリマー, 当該ポリマーを含む物質捕捉用キット, および当該ポリマーを利用した物質の回収方法
- 3) 掛樋一晃: 特願2003-188228, 酸性多糖の分析方法および酸性多糖類分析用キット
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社