

- Higashio, K., Namba, M.: *Biochem Biophys Res Commun*, **279**(2), 500-4 (2000).
- 92) Miyazaki, M., Akiyama, I., Sakaguchi, M., Nakashima, E., Okada, M., Kataoka, K., Huh, N. H.: *Biochem Biophys Res Commun*, **298**(1), 24-30 (2002).
 - 93) Wang, P. P., Wang, J. H., Yan, Z. P., Hu, M. Y., Lau, G. K., Fan, S. T., Luk, J. M.: *Biochem Biophys Res Commun*, **320**(3), 712-6 (2004).
 - 94) Miyazaki, M., Masaka, T., Akiyama, I., Nakashima, E., Sakaguchi, M., Huh, N. H.: *Cell Transplant*, **13**(4), 385-91 (2004).
 - 95) Yamada, T., Yoshikawa, M., Kanda, S., Kato, Y., Nakajima, Y., Ishizaka, S., Tsunoda, Y.: *Stem Cells*, **20**(2), 146-54 (2002).
 - 96) Jones, E. A., Tosh, D., Wilson, D. I., Lindsay, S., Forrester, L. M.: *Exp Cell Res*, **272**(1), 15-22 (2002).
 - 97) Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M., Papst, P. J., Meacham, A. M., Zon, L. I., Terada, N.: *FEBS Lett*, **497**(1), 15-9 (2001).
 - 98) Chinzei, R., Tanaka, Y., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Kakinuma, S., Watanabe, M., Teramoto, K., Arii, S., Takase, K., Sato, C., Terada, N., Teraoka, H.: *Hepatology*, **36**(1), 22-9 (2002).
 - 99) Miyashita, H., Suzuki, A., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: *Cell Transplant*, **11**(5), 429-34 (2002).
 - 100) Choi, D., Oh, H. J., Chang, U. J., Koo, S. K., Jiang, J. X., Hwang, S. Y., Lee, J. D., Yeoh, G. C., Shin, H. S., Lee, J. S., Oh, B.: *Cell Transplant*, **11**(4), 359-68 (2002).
 - 101) Lavon, N., Yanuka, O., Benvenisty, N.: *Differentiation*, **72**(5), 230-8 (2004).
 - 102) Shirahashi, H., Wu, J., Yamamoto, N., Catana, A., Wege, H., Wager, B., Okita, K., Zern, M. A.: *Cell Transplant*, **13**(3), 197-211 (2004).
 - 103) Hu, A. B., Cai, J. Y., Zheng, Q. C., He, X. Q., Shan, Y., Pan, Y. L., Zeng, G. C., Hong, A., Dai, Y., Li, L. S.: *Liver Int*, **24**(3), 237-45 (2004).
 - 104) Teratani, T., Yamamoto, H., Aoyagi, K., Sasaki, H., Asari, A., Quinn, G., Terada, M., Ochiya, T.: *Hepatology*, **41**(4), 836-46 (2005).
 - 105) Ishii, T., Yasuchika, K., Fujii, H., Hoppo, T., Baba, S., Naito, M., Machimoto, T., Kamo, N., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I.: *Exp Cell Res*, **309**(1), 68-77 (2005).
 - 106) Imamura, T., Cui, L., Teng, R., Johkura, K., Okouchi, Y., Asanuma, K., Ogiwara, N., Sasaki, K.: *Tissue Eng*, **10**(11-12), 1716-24 (2004).
 - 107) Kumashiro, Y., Asahina, K., Ozeki, R., Shimizu-Saito, K., Tanaka, Y., Kida, Y., Inoue, K., Kaneko, M., Sato, T., Teramoto, K., Arii, S., Teraoka, H.: *Transplantation*, **79**(5), 550-7 (2005).
 - 108) Fair, J. H., Cairns, B. A., Lapaglia, M. A., Caballero, M., Pleasant, W. A., Hatada, S., Kim, H. S., Gui, T., Pevny, L., Meyer, A. A., Stafford, D. W., Smithies, O., Frelinger, J. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(8), 2958-63 (2005).
 - 109) Mitaka, T., Norioka, K., Nakamura, T., Mochizuki, Y.: *J Cell Physiol*, **157**(3), 461-8 (1993).
 - 110) Tateno, C., Yoshizato, K.: *Am J Pathol*, **148**(2), 383-92 (1996).
 - 111) Hino, H., Tateno, C., Sato, H., Yamasaki, C., Katayama, S., Kohashi, T., Aratani, A., Asahara, T., Dohi, K., Yoshizato, K.: *Biochem Biophys Res Commun*, **256**(1), 184-91 (1999).
 - 112) Gordon, G. J., Coleman, W. B., Hixson, D. C., Grisham, J. W.: *Am J Pathol*, **156**(2), 607-19 (2000).
 - 113) Suzuki, A., Zheng, Y., Kondo, R., Kusakabe, M., Takada, Y., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: *Hepatology*, **32**(6), 1230-9 (2000).
 - 114) Suzuki, A., Zheng Yw, Y. W., Kaneko, S., Onodera, M., Fukao, K., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: *J Cell Biol*, **156**(1), 173-84 (2002).
 - 115) Azuma, H., Hirose, T., Fujii, H., Oe, S., Yasuchika, K., Fujikawa, T., Yamaoka, Y.: *Hepatology*, **37**(6), 1385-94 (2003).
 - 116) Tsao, M. S., Smith, J. D., Nelson, K. G., Grisham, J. W.: *Exp Cell Res*, **154**(1), 38-52 (1984).
 - 117) Tsao, M. S., Grisham, J. W., Nelson, K. G., Smith, J. D.: *Am J Pathol*, **118**(2), 306-15 (1985).
 - 118) Marceau, N., Germain, L., Goyette, R., Noel, M., Gourdeau, H.: *Biochem Cell Biol*, **64**(8), 788-802 (1986).
 - 119) Blouin, R., Blouin, M. J., Royal, I., Grenier,

- A., Roop, D. R., Loranger, A., Marceau, N.: *Differentiation*, **52**(1), 45-54 (1992).
- 120) Krakowski, M. L., Kritzik, M. R., Jones, E. M., Krah, T., Lee, J., Arnush, M., Gu, D., Sarvetnick, N.: *Am J Pathol*, **154**(3), 683-91 (1999).
- 121) Shen, C. N., Slack, J. M., Tosh, D.: *Nat Cell Biol*, **2**(12), 879-87 (2000).
- 122) Sussman, N. L., Chong, M. G., Koussayer, T., He, D. E., Shang, T. A., Whisennand, H. H., Kelly, J. H.: *Hepatology*, **16**(1), 60-5 (1992).
- 123) Nagamori, S., Hasumura, S., Matsuura, T., Aizaki, H., Kawada, M.: *J Gastroenterol*, **35**(7), 493-503 (2000).
- 124) Strain, A. J., Neuberger, J. M.: *Science*, **295**(5557), 1005-9 (2002).
- 125) Faris, R. A., Konkin, T., Halpert, G.: *Artif Organs*, **25**(7), 513-21 (2001).
- 126) Habibullah, C. M., Syed, I. H., Qamar, A., Taher-Uz, Z.: *Transplantation*, **58**(8), 951-2 (1994).
- 127) Strom, S. C., Fisher, R. A., Thompson, M. T., Sanyal, A. J., Cole, P. E., Ham, J. M., Posner, M. P.: *Transplantation*, **63**(4), 559-69 (1997).
- 128) Fox, I. J., Chowdhury, J. R., Kaufman, S. S., Goertzen, T. C., Chowdhury, N. R., War-kentin, P. I., Dorko, K., Sauter, B. V., Strom, S. C.: *N Engl J Med*, **338**(20), 1422-6 (1998).
- 129) Muraca, M., Gerunda, G., Neri, D., Vilei, M. T., Granato, A., Feltracco, P., Meroni, M., Giron, G., Burlina, A. B.: *Lancet*, **359**(9303), 317-8 (2002).
- 130) Strom, S. C., Chowdhury, J. R., Fox, I. J.: *Semin Liver Dis*, **19**(1), 39-48 (1999).
- 131) Ohashi, K., Park, F., Kay, M. A.: *J Mol Med*, **79**(11), 617-30 (2001).
- 132) Gupta, S., Chowdhury, J. R.: *Semin Cell Dev Biol*, **13**(6), 439-46 (2002).
- 133) Laconi, E., Laconi, S.: *Semin Cell Dev Biol*, **13**(6), 433-8 (2002).
- 134) Stanworth, S. J., Newland, A. C.: *Clin Med*, **1**(5), 378-82 (2001).
- 135) Susick, R., Moss, N., Kubota, H., Lecluyse, E., Hamilton, G., Luntz, T., Ludlow, J., Fair, J., Gerber, D., Bergstrand, K., White, J., Bruce, A., Drury, O., Gupta, S., Reid, L. M.: *Ann N Y Acad Sci*, **944**, 398-419 (2001).
- 136) Grompe, M.: *J Inherit Metab Dis*, **24**(2), 231-44 (2001).
- 137) Bilir, B. M., Guinette, D., Karrer, F., Kumpe, D. A., Krysl, J., Stephens, J., McGavran, L., Ostrowska, A., Durham, J.: *Liver Transpl*, **6**(1), 32-40 (2000).
- 138) Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhardt, J. F., Muller, D., Lupien, P. J., Wilson, J. M.: *Nat Genet*, **6**(4), 335-41 (1994).
- 139) Ueki, T., Kaneda, Y., Tsutsui, H., Nakani-shi, K., Sawa, Y., Morishita, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., Takahashi, H., Okamoto, E., Fujimoto, J.: *Nat Med*, **5**(2), 226-30 (1999).
- 140) Zheng, Y. W., Taniguchi, H.: *Semin Liver Dis*, **23**(4), 337-48 (2003).
- 141) Allain, J. E., Dagher, I., Mahieu-Caputo, D., Loux, N., Andreoletti, M., Westerman, K., Briand, P., Franco, D., Leboulch, P., Weber, A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(6), 3639-44 (2002).
- 142) Dumble, M. L., Croager, E. J., Yeoh, G. C., Quail, E. A.: *Carcinogenesis*, **23**(3), 435-45 (2002).
- 143) Wege, H., Le, H. T., Chui, M. S., Liu, L., Wu, J., Giri, R., Malhi, H., Sappal, B. S., Kumaran, V., Gupta, S., Zern, M. A.: *Gastroenterology*, **124**(2), 432-44 (2003).
- 144) 立野知世, 吉里勝利: 蛋白質 核酸 酵素, **45**(13), 2085-2091 (2000).
- 145) Medvinsky, A., Smith, A.: *Nature*, **422**(6934), 823-825 (2003).
- 146) 立野知世, 吉里勝利: 実験医学, **23**(1), 193-197 (2005).

[ノ ー ト]

ラクトース修飾絹フィブロイン基材上の初代培養ラット肝細胞の形態および維持に及ぼす
インスリンとデキサメサゾンの作用

後藤 洋子^{*1}・新見 伸吾^{*2}

(受付 2005 年 1 月 14 日・審査終了 2005 年 4 月 11 日)

1 緒 言

蚕の作る絹の主成分は構造タンパク質の絹フィブロイン(SF)で、古来から繊維材料として用いられてきた。しかしながら、SF 水溶液を原料にフィルム、ゲル、スポンジ、粉末など多様な形態に成形できることから、バイオセンサー用酵素固定化担体^{1),2)}、人工血管³⁾、経口投薬剤^{1),4)}など SF のバイオ、医療分野への応用が検討されている¹⁾。とりわけ最近では細胞培養基材としての応用が注目され¹⁾、線維芽細胞^{1),5)}、表皮角化細胞⁶⁾、骨芽細胞⁷⁾の培養基材として SF が有望であることが示されている。

筆者らは SF の肝実質細胞(肝細胞)培養基材としての新しい利用を目的に、塩化シアヌル(CY)をカップリング試薬に用いて、ラクトースによる SF のアミノ酸残基の化学修飾を行った⁸⁾。これまでに赤池らによってラクトース置換ポリスチレン誘導体(PVLA)が合成され、優れた肝細胞培養基材として利用されており⁹⁾、また最近ではラクトースを導入した両親媒性ポリアクリルアミド共重合体¹⁰⁾や天然高分子多糖アルギン酸¹¹⁾の肝細胞培養基材への応用が報告されている。これら高分子基材に導入されたラクトースの β -ガラクトース残基が肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質レセプターによって認識され強く相互作用することにより、肝細胞の接着が引き起こされると考えられている^{9),11),12)}。新規に作り出したラクトース修飾 SF(Lac-CY-SF)を培養基材に用いて無血清条件下で初代ラット肝細胞の培養を行ったところ、対照試料として用いたコラーゲン基材に匹敵する接着性を示し、コラーゲン基材上の肝細胞に比べて Lac-CY-SF 基材上の細胞は伸展性の低い形態を示した⁸⁾。一方未修飾の SF 基材上では、ラット肝細胞の接着はほとんど観

察されなかった⁸⁾。

一般に初代培養ラット肝細胞において接着基材以外に各種液性因子が接着、形態、および維持に重要であることが知られている¹³⁾。中でもインスリンとデキサメサゾンはともに代表的なホルモン因子であり、肝細胞の接着および維持のため通常培地中に添加されている^{13)~15)}。しかしながら、ラクトースを修飾した各種高分子基材を用いた肝細胞培養系において、インスリンとデキサメサゾンが及ぼす作用についての報告は少ない。そこで本報ではインスリンおよびデキサメサゾン両方を 1 nM 濃度で添加した条件、あるいは 100 nM 濃度で添加した条件において、Lac-CY-SF を基材に用いてラット肝細胞の初代培養を行い、肝細胞の形態および維持の異同について顕微鏡による観察を行った。

2 実 験

2.1 試薬

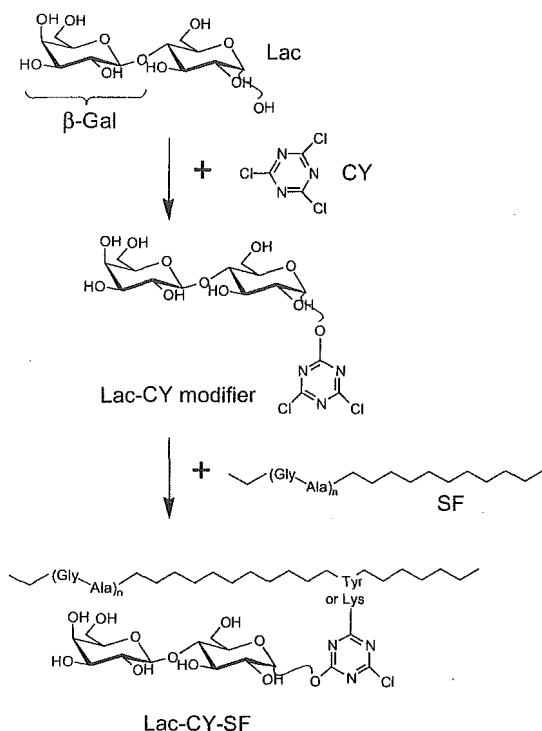
ラクトース一水和物と CY は和光純薬工業(株)製の市販品をそのまま使用した。Lac-CY-SF の作製に使用したほかの試薬も市販品をそのまま用いた。肝細胞培養用のウィリアムスの E 培地は、ICN Biomedicals Ins. 製の市販品から調製した。アプロチニンはタカラバイオ(株)製の市販品をそのまま使用した。高研(株)製のコラーゲンタイプ I-AC を使用して、対照試料のコラーゲン培養基材の作製を行った。肝細胞培養実験に必要なその他の試薬については、田中らの報告¹⁵⁾に従って入手した市販品をそのまま使用した。

2.2 Lac-CY-SF 培養基材の作製

原料の SF 水溶液は、従来の方法に従って家蚕の繭を精練して得た SF 繊維を、9M 臭化リチウム水溶液に溶解し透析による脱塩を行って調製した⁸⁾。Lac-CY-SF の作製は、Scheme 1 に示すように前報の方法⁸⁾に従って行った。最初に蒸留水 9 mL に溶解したラクトース一水和物 116 mg と、ジオキサン 3 mL に溶解した CY 60 mg をアルカリ条件下 4°C で反応させて、修飾剤を作製し

^{*1} (独)農業生物資源研究所(☎305-8634 つくば市大わし 1-2)

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所(☎158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)



Scheme 1. Preparation of Lac-CY-SF conjugates by chemical modification of silk fibroin (SF) with lactose (Lac) using cyanuric chloride (CY) as a coupling spacer.

た. この修飾剤溶液に 1.75% (w/v) に調製された SF 水溶液 6.9 mL (SF 含有量 121 mg) を加えて, 修飾剤と SF のアミノ酸残基との反応を 37°C で行うことで, 目的の Lac-CY-SF を作製した. なお, これまでの CY をカップリング試薬に用いたオリゴ糖による SF の化学修飾の検討から, SF のチロシン残基のフェノール性ヒドロキシル基およびリジン残基の ϵ -アミノ基が修飾剤との反応サイトと推定される^{8),16)}. 反応液を中和後, 蒸留水で透析して未反応の試薬との分離を行い, 得られた Lac-CY-SF 水溶液の濃縮を限外ろ過により行った. 濃縮した Lac-CY-SF 水溶液の一部を五酸化ニリンを用いて乾燥し, 収量 (144 mg) を求めた.

修飾前後の SF および SF とラクトースの混合物の ^1H NMR スペクトルの比較から, Lac-CY-SF における糖鎖の導入を確認した. またこれらの ^1H NMR スペクトルのピークの面積比より算出した Lac-CY-SF のラクトース含有量は, 前報と同様 17 wt% であった⁸⁾. 一方, β -ガラクトース残基を認識するヒマレクチンを Lac-CY-SF 水溶液に加えると, ヒマレクチンと Lac-CY-SF との複合体形成による水溶液の濁度上昇が観察されることから, Lac-CY-SF への糖鎖導入を定性的に確認した⁸⁾.

ろ過滅菌した 0.1% (w/v) と 1% (w/v) の Lac-CY-SF 水溶液各 0.2 mL を, 細胞培養用のプラスチックディッシュ (イワキ硝子 (株) 製 12 ウェル平底プレート, 直径

22.1 mm) に注入し, 1 時間静置してディッシュ表面に試料を吸着させることでディッシュへの試料コートを行った. 試料水溶液を除いた後, Dulbecco PBS (−) 緩衝液にて洗浄を行い, 試料コートディッシュを使用直前まで PBS 緩衝液で満たして保存した. 対照試料として用いたコラーゲンコートディッシュは, 0.03% (w/v) コラーゲン水溶液を用いて同様に吸着法にて作製した.

2.3 肝細胞培養実験

ラット肝細胞は, 体重 180~200 g のウィスター系ラットから Seglen のコラーゲナーゼ灌流法¹⁷⁾ により調製した. ウィリアムスの E 培地に 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンと 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アプロチニンを添加して調製した無血清培地を基本培地とした. 単離した肝細胞を 1 nM インスリンと 1 nM デキサメサゾンを含む基本培地に懸濁して, 播種細胞懸濁液とした. 6×10^4 cells/cm² の細胞密度になるように肝細胞懸濁液 0.7 mL を試料コートディッシュに加え, 培養を行った. 培養は 5% CO₂-30% O₂-65% 空気を気相として, CO₂ インキュベーター中で行った. 2.5 時間培養後基材に接着しなかった細胞を回収し, 培地を 1 nM インスリンおよび 1 nM デキサメサゾンを含む基本培地, あるいは 100 nM インスリンおよび 100 nM デキサメサゾンを含む基本培地と交換してさらに 3 日間培養を行った. 24 時間ごとに培地交換を行い, その直後細胞の形態を位相差顕微鏡 (ニコン (株) 製 DIAPHOT TMD) で観察した.

3 結果と考察

インスリンおよびデキサメサゾン両方を 100 nM あるいは 1 nM 添加した条件において, Lac-CY-SF とコラーゲンの基材上で培養した肝細胞の形態を Figure 1 および Figure 2 に示す. 一般に 100 nM 濃度の添加では肝機能などに対する顕著なホルモン作用が認められるのに対し^{13),15)}, 1 nM 濃度の添加ではごく微弱なホルモン作用しか認められず肝細胞維持を目的に加えられる濃度である^{13),14)}.

インスリンおよびデキサメサゾンを培地に 100 nM 添加した条件においては, コラーゲン基材上の肝細胞は従来の報告¹⁴⁾ と同様に培養 1 日後伸展した形態を示し, 隙間のない敷石状の単層を形成した (Figure 1(c)). そしてコラーゲン基材上では 3 日間の培養期間中同じ細胞形態が観察された (Figure 1(c)). 同様に 100 nM 添加条件下, 濃度の異なる試料水溶液で作製した 2 種類の Lac-CY-SF 基材上の培養肝細胞はともに, 培養 1 日後コラーゲン基材上の細胞に比べ伸展の小さい形態で単層の島状集合体を形成し, 培養 3 日後も同じ形態を示した (Figure 1(a), (b)).

インスリンおよびデキサメサゾンを 1 nM 添加した条件下においても, 2 種類の Lac-CY-SF 基材上で培養し

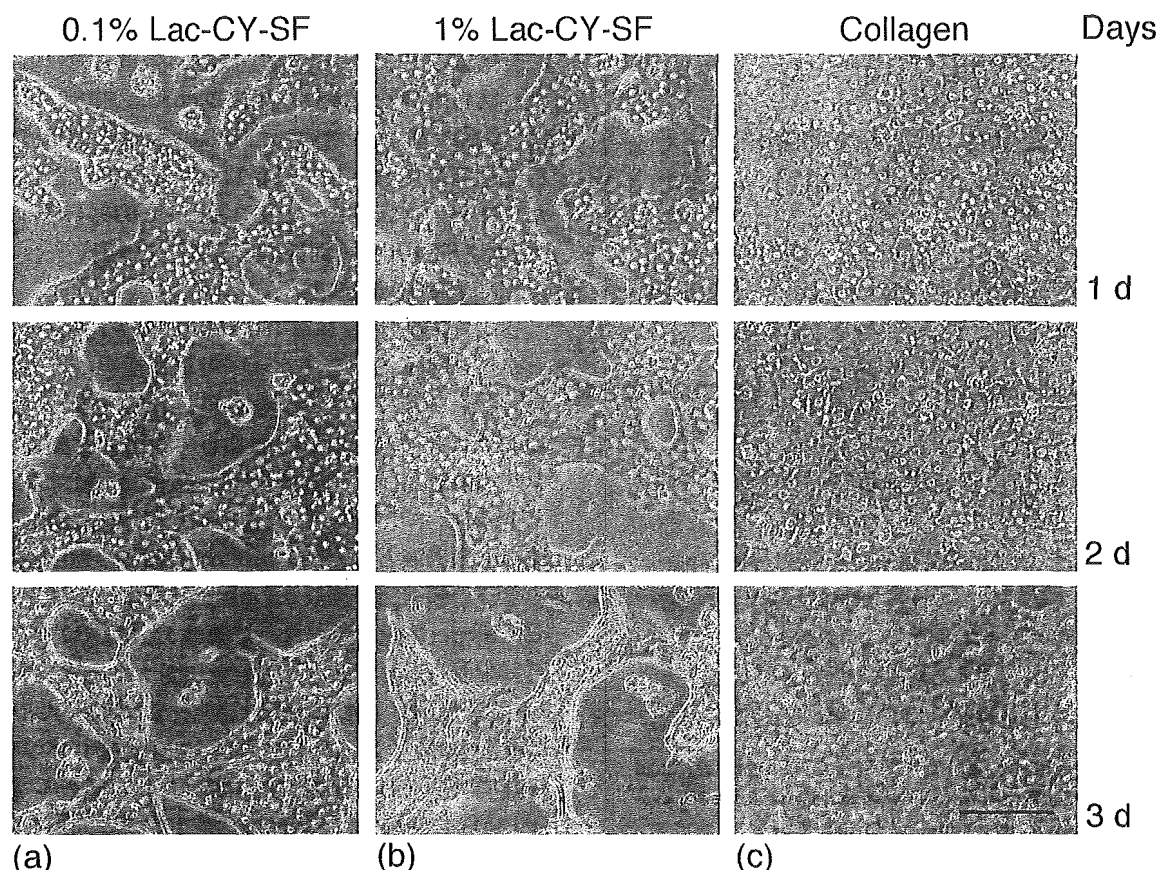


Figure 1. Phase-contrast micrographs of hepatocytes on the dishes coated with 0.1% (w/v) Lac-CY-SF (a), 1% (w/v) Lac-CY-SF (b), and collagen (c) after 1 day, 2 days, and 3 days of culture. The cells were cultured in the medium containing 100 nM insulin and 100 nM dexamethasone. Scale bar indicates 50 μ m.

た肝細胞は、100 nM 添加条件下と同様に培養 2 日後まで軽度伸展形態で単層の島状集合体を形成した (Figure 2(a), (b)). しかし培養 2 日を経過すると、Lac-CY-SF 基材から脱離した死細胞が培地中に多く観察されるようになり、3 日後基材上では軽度伸展形態を維持したままの小さな細胞凝集塊が観察された (Figure 2(a), (b)). 一方、コラーゲン基材上で 1 nM 添加条件下培養した肝細胞は培養 1 日後伸展形態を示し、わずかに穴状の空間を残して敷石状の単層を形成した (Figure 2(c)). しかしながら、培養 2 日後コラーゲン基材上の敷石状の接着細胞の上に、小さな粒状の死細胞が観察されるようになった。そして 3 日後には、へん平になって見えにくくなっている接着細胞の上で、かなりの数の小さな粒状の死細胞が観察された (Figure 2(c)). したがって 1 nM 添加条件下では、Lac-CY-SF 基材上ほど顕著でないもののコラーゲン基材上でも死細胞の増加が観察された。

これらの結果はコラーゲン基材上と同様に Lac-CY-SF 基材上においても、100 nM 添加条件は 1 nM 添加条件に比べ基材に細胞を維持する作用が強いことを示している。そして Lac-CY-SF 基材上で 2 日以上肝細胞を維

持するためには、培地への 100 nM 濃度のインスリンおよびデキサメサゾンの添加が必要と考えられる。

市販のプラスチック基材上の培養肝細胞は、デキサメサゾンのみの添加では伸展形態が抑制されるのに対し、インスリンのみの添加では伸展形態が誘導され、インスリンとデキサメサゾン両方添加の場合もインスリンの効果で伸展形態が誘導されることが報告されている¹⁸⁾。コラーゲンゲル膜上の培養肝細胞もインスリン添加条件下では伸展して敷石状の単層を形成するが、インスリンがまったく添加されていない条件では丸い形態を保持することが知られている¹⁹⁾。また赤池らは PVLA 基材上の培養肝細胞はインスリンおよびデキサメサゾン無添加条件下では小さく丸い形状を示すのに対し、1 nM インスリンと 10 μ M デキサメサゾン添加条件下では伸展形態を示すことを報告している²⁰⁾。したがってインスリンおよびデキサメサゾン 1 nM 添加条件下 Lac-CY-SF 基材上の培養肝細胞が軽度伸展形態を示すのは、インスリンの効果によると考えられるが、細胞維持に必要な 100 nM 添加条件下でも形態が変化しないことから Lac-CY-SF 基材上では添加濃度による細胞伸展性の影響はないと推定

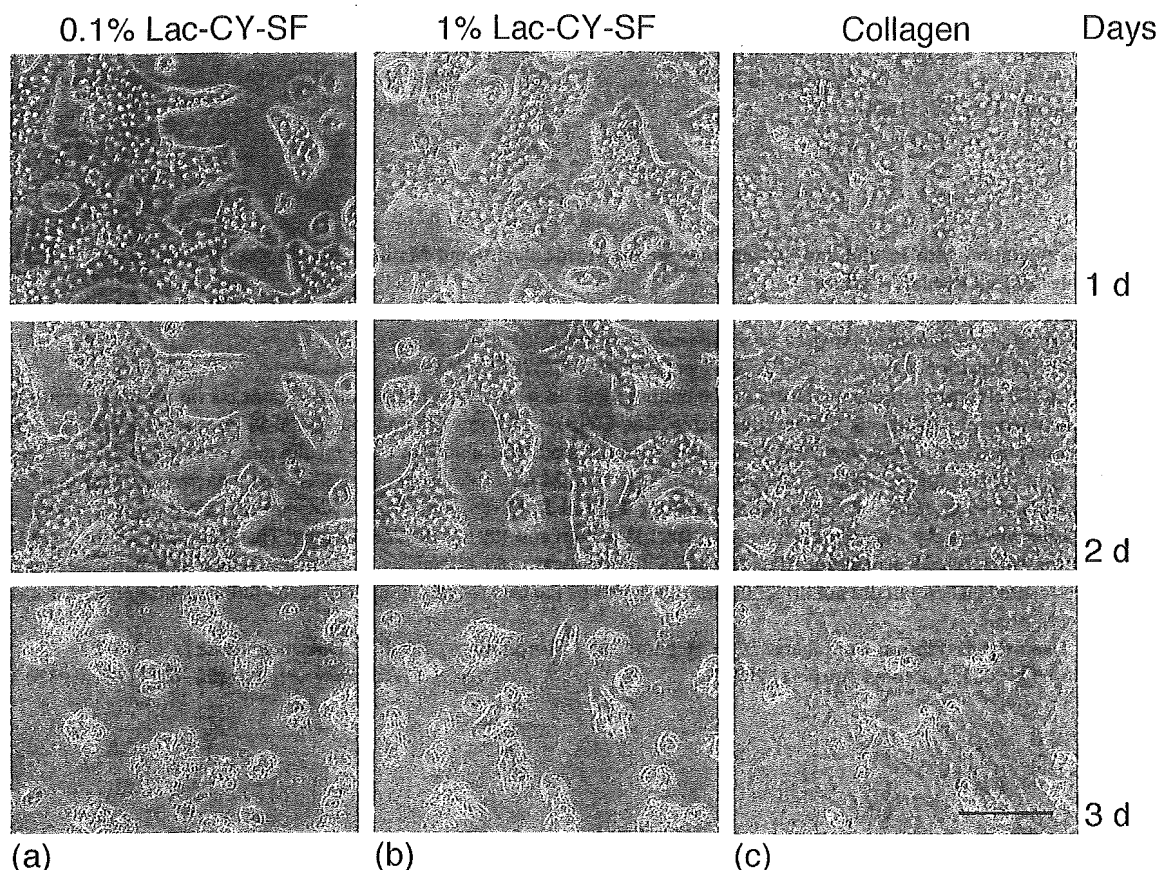


Figure 2. Phase-contrast micrographs of hepatocytes on the dishes coated with 0.1% (w/v) Lac-CY-SF (a), 1% (w/v) Lac-CY-SF (b), and collagen (c) after 1 day, 2 days, and 3 days of culture. The cells were cultured in the medium containing 1 nM insulin and 1 nM dexamethasone. Scale bar indicates 50 μ m.

される。

以上の結果より Lac-CY-SF を培養基材に用いた初代培養ラット肝細胞培養において、100 nM 添加系は 1 nM 添加系に比べ細胞形態には影響を及ぼさないが、細胞を維持する作用が強いことが示された。

なお前報で、0.1% (w/v) と 1% (w/v) の水溶液から作製した 2 種類の Lac-CY-SF 基材上の肝細胞接着量がほぼ等しいことを示したが⁸⁾、今回同じ培養条件であれば 2 種類の基材上で培養した肝細胞の形態も同じであることが観察された。これらの結果は、基材調製時に低濃度の 0.1% (w/v) 水溶液でディッシュ表面への Lac-CY-SF の吸着量が飽和に達した可能性を示唆する。

文 献

- 1) 朝倉哲郎, 出村 誠, 高分子, **47**, 390 (1998).
- 2) M. Demura and T. Asakura, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 598 (1989).
- 3) 坂部 寛, 伊藤 啓, 宮本武明, 野一色泰晴, 河 完植, 繊維学会誌, **45**, 487 (1989).
- 4) T. Hanawa, A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka, and M. Sugihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 872 (1995).
- 5) N. Minoura, S.-I. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**, 511 (1995).
- 6) B.-M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, and W. H. Park, *Biomaterials*, **25**, 1289 (2004).
- 7) S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 139 (2001).
- 8) Y. Gotoh, S. Niimi, T. Hayakawa, and T. Miyashita, *Biomaterials*, **25**, 1131 (2004).
- 9) S. Tobe, Y. Takei, K. Kobayashi, and T. Akaike, *Artif. Organs*, **16**, 526 (1992).
- 10) 西川雄大, 西川和孝, 大倉隆介, 西田 仁, 大久保 尚, 蒲池浩文, 松下通明, 藤堂 省, 下村政嗣, 高分子加工, **50**, 10 (2001).
- 11) J. Yang, M. Goto, H. Ise, C.-S. Cho, and T. Akaike, *Biomaterials*, **23**, 471 (2002).
- 12) G. Ashwell and J. Harford, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 531 (1982).
- 13) 中村敏一, “初代培養肝細胞実験法”, 学会出版センター, 東京 (1987), pp. 40–46.
- 14) 三浦 豊, “動物細胞工学ハンドブック”, 日本動物細胞工学会編, 朝倉書店, 東京 (2000), pp. 60–61.
- 15) K. Tanaka, M. Sato, Y. Tomita, and A. Ichihara, *J. Biochem.*, **84**, 937 (1978).
- 16) Y. Gotoh, M. Tsukada, S.-I. Aiba, and N. Minoura, *Int. J. Biol. Macromol.*, **18**, 19 (1996).

- 17) P. O. Seglen, *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976).
- 18) T. Christoffersen, M. Refsnes, G. O. Bronstad, E. Ostby, J. Huse, F. Haffner, T.-E. Sand, N. H. Hunt, and O. Sonne, *Eur. J. Biochem.*, **138**, 217 (1984).
- 19) G. Michalopoulos and H. C. Pitot, *Exptl. Cell Res.*, **94**, 70 (1975).
- 20) 赤池敏宏, 小林 明, 戸辺成四郎, 真栄田 篤, 人工臓器, **17**, 227 (1988).

[Notes]

Effects of Supplementation with Insulin and Dexamethasone on Morphologies and Maintenance of Rat Hepatocytes onto Lactose-Silk Fibroin Conjugates during Primary Culture

Yohko GOTOH^{*1} and Shingo NIIMI^{*2}

^{*1}*National Institute of Agrobiological Sciences (1-2 Ohwashi, Tsukuba 305-8634, Japan)*

^{*2}*National Institute of Health Sciences (1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)*

We investigated the effects of supplementation of the culture medium with insulin plus dexamethasone on rat primary hepatocytes cultured onto dishes coated with lactose-silk fibroin conjugates (Lac-CY-SF). Hepatocytes on the Lac-CY-SF conjugate-coated dishes showed no morphological differences between when they were cultured in the medium containing 1 nM insulin and 1 nM dexamethasone and when they were cultured in the medium containing 100 nM insulin and 100 nM dexamethasone. However, cell detachment from the conjugate-coated dishes was observed at 3 days of culture with 1 nM insulin and 1 nM dexamethasone, whereas cells were maintained on the conjugated-coated dishes through the 3 days cultivation with 100 nM insulin and 100 nM dexamethasone. Therefore, our results suggested that the supplementation with 100 nM insulin and 100 nM dexamethasone was more effective for the maintenance of hepatocytes on the Lac-CY-SF conjugates-coated dishes, but did not affect the morphologies of the hepatocytes compared to the supplementation with 1 nM insulin and 1 nM dexamethasone.

KEY WORDS Lactose-Silk Fibroin Conjugates / Rat Hepatocytes / Morphology / Insulin / Dexamethasone /

(Received January 14, 2005; Accepted April 11, 2005)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **62**(7), 326—330 (2005)]

ICH 遺伝子治療専門家会議 シカゴミーティングと今後の展望

山口照英

Teruhide YAMAGUCHI

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部長

1. はじめに

ICH(日米 EU 医薬品規制調和国際会議)は医薬品の承認申請に関わる規制を調和し、申請に必要な様々なデータ等の作成における不必要な重複を避け、医薬品開発のグローバルな促進とよりよい医薬品を一刻も早く患者の元に届けることを目的として活動を行っている。2005 年 11 月 7~11 日にかけてシカゴ市で開催された ICH ミーティングでは、有効性、安全性、品質、及び境界領域の 17 課題に関し討議が行われた。本稿では、遺伝子治療専門家会議が ICH 公開ワークショップとして開催した「腫瘍溶解性ウイルスワークショップ」の成果と、「遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクの最小化に関する ICH 見解(案)」作成のための議論を中心に、その活動について紹介したい。

2. 遺伝子治療専門家会議の活動

遺伝子治療専門家会議(Gene Therapy Discussion Group ; GT-DG)は、2002 年のワシントン D. C. 会議にて正式に発足した作業部会である。それ以前は、バイオテクノロジー医薬品専門家会議及び Ad hoc な遺伝子治療専門家会議として議論を重ねてきた。GT-DG では、周辺技術を含め急激に進歩する遺伝子治療薬をめぐる科学的な諸問題に柔軟に対処するために、公開ワークショップの開催や ICH ホームページ等を通じて得られた議論の成果を広く公開するとともに、新たな知見が得られた場合に迅速に対応していくというスタンスで活動を行っている。これまで GT-DG で取り上げた話題について表 1 にあげたが、非常に多岐にわたる科学的課題について議論を行ってきた。

シカゴ会議では腫瘍溶解性ウイルスの専門家を招聘し、公開ワークショップを開催した。本ワークショップでの発表及び議論に基づき、現時点での問題点の洗い出しを行った。また、「遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクの最小化に関する ICH 見解(案)」作成のための議論を行った。

表 1

ICH 遺伝子治療専門家会議で取り上げられた主なトピック

患者からの遺伝子治療用ベクターやウイルスの放出
遺伝子治療薬に含まれる増殖性ウイルスの検出とその手法(RCA or RCR)
遺伝子治療薬のためのウイルス参照品(Adenovirus type 5)
遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクを最小にするための方策
遺伝子治療用ベクターによる挿入変異の評価
腫瘍溶解性ウイルス(ワークショップ)
遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ(FDA ガイドライン案)
遺伝子治療用レンチウイルスベクター(EMA ガイドライン案)

3. 腫瘍溶解性ウイルス公開ワークショップ

腫瘍溶解性ウイルスの発見は非常に古く、悪性腫瘍患者がウイルス感染又は生ワクチンを接種された際に、腫瘍の縮小や寛解が認められたことから開発が始まった。腫瘍溶解性ウイルス開発は、腫瘍特異的に増殖する野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを用いた研究から、遺伝子改変技術を用いた病原性の除去や腫瘍指向性をより高めた制限増殖性ウイルスベクターを用いるものへと移行しつつある。腫瘍溶解性ウイルスの開発はここ数年急速に進展しており、多くの総説も書かれている。しかし、腫瘍溶解性ウイルスの臨床適用は未知・未経験の要素も多い領域であり、基礎となる科学的知見も十分に集積されていないことから、品質確保の方策、安全性や有効性評価のための動物を用いた非臨床試験のあり方、さらには臨床研究における安全性・有効性評価等を議論するために、この分野の専門家を招き今回の公開ワークショップを開催することになった。

本ワークショップでは、①腫瘍溶解性ウイルスの選択・設計(野生型・弱毒型・遺伝子組換え型)、②動物やヒトで期待される効果の評価、③ウイルス複製の腫瘍選択性、④臨床上的安全性、⑤動物試験に用いる適切な動物モデル、⑥腫瘍溶解性ウイルスの体外放出の測定法と実データについて議論が行われた。

腫瘍溶解性ウイルスの設計及び特性解析

現在使用されている腫瘍溶解性ウイルス開発では、腫瘍細胞内で選択的に複製する非組換えウイルスを用いる場合と遺伝子組換え型ウイルスを用いる場合がある。通常の遺伝子治療では、ベクター中の増殖性ウイルス(RCV)の検出が品質・安全性の観点から重要であるが、腫瘍溶解性ウイルスは制限複製能を持つことから、RCV検出よりも目的ウイルスの変化体をどのように検出するかについて議論が行われた。また品質の恒常性の観点から、ウイルス感染性力価ばかりでなく力価に対する粒子数の比を規格化することの必要性について、その重要度を含めた活発な議論が行われた。

非臨床試験

安全性評価や腫瘍溶解性ウイルスが目的とする効果が得られるか否かの評価に、動物モデルが有用であることは、多くの講演者の一致した意見であった。しかし、①腫瘍溶解性ウイルスの感染及び複製能に動物種特異性があること、②動物にヒト腫瘍(細胞)を移植した腫瘍モデル動物ではウイルスがヒト体内とは異なる指向性/分布を示すこと、③動物での免疫反応がヒトとは異なること等から、動物モデルの限界も指摘された。しかし、生体内分布や安全性/毒性の評価、臨床での投与経路や用法・用量の選択などに関して動物モデルが有用な情報を与え得るということについては、コンセンサスが得られた。腫瘍選択性に関しては、非腫瘍細胞培養株及び腫瘍細胞培養株を用いた試験又はヒト健康組織及びヒト腫瘍組織からの初代組織片培養を用いた試験の有用性について報告された。

臨床研究

腫瘍溶解性ウイルスの複雑な性質から、開発の基礎段階で十分に特性解析することが困難であり、また有用な動物モデルが必ずしも存在するわけではないことから、臨床研究の開始に当たっては多くの検討すべき課題があげられた。

今回のワークショップで取り上げられた臨床研究では、主に中等度以下(グレード1・2)の有害事象が観察されたことが報告された。また、その多くはインフルエンザ様症状であり、また一過性の臨床検査値異常及び投与部位の局所反応も報告された。しかしこれらの有害事象が、

腫瘍溶解性ウイルス特有の有害事象と捉えるべきではないとの意見も出された。

臨床薬物動態

臨床薬物動態の解析手法として被験者のモニタリングには、PCR・感染性力価試験のいずれも用いられている。いくつかの腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究において、血液中に検出されるウイルス量は投与直後と4～7日目にピークが認められた。このような2相性のピークは局所投与及び静注した場合のいずれでも観察されており、ウイルスの複製をモニターする手段となり得ることが指摘された。

用法・用量設定の必要性、腫瘍溶解性ウイルスに対する患者の中和抗体の影響などについて活発な議論が行われた。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの体外放出に関する予防措置についても議論が行われた。

腫瘍溶解性ウイルス開発の今後の展望

腫瘍溶解性ウイルスの開発の新たな流れとして、化学療法又は放射線療法と腫瘍溶解性ウイルス療法を組み合わせる併用療法の有用性が示唆されており、今後このような併用療法の開発も進むものと考えられる。腫瘍溶解性ウイルスの設計改良のアプローチとしては、免疫反応を活性化する遺伝子のウイルスゲノムへの挿入や、腫瘍細胞へのウイルスの感染能の増強などが行われている。また、殺腫瘍効果の作用機序を解明できるデータを得るための非臨床試験及び臨床研究の取り組みも行われている。特に、様々な腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究で具体的な進歩がみられていることは特筆すべき点である。

4. 遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクを最小にするための方策に関する ICH「見解(第2次案)」

今回の GT-DG では、「遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達リスクを最小にするための方策に関する ICH 見解(第2次案)」の議論が行われた。本見解案は、EMA が 1st ラポーターとして第2次案までの取りまとめを行い、今回はこの第2次案について討議した。本見解案は、遺伝子治療薬の生殖細胞への伝達リスクを評価するための非臨床試験の実施スキームの提示を目的としている。図1は、どのような試験を行う必要があるのかを示したフロー図である。本見解案作成の2nd ラポーターとして日本(筆者)が指名され、第3次案に反映すべき意見があれば、2006年1月までに2nd ラポーターに送付することとされた。送付された意見に基づいて第3次案を作成し、2006年6月の横浜会議で詳細な議論を行い、遅くとも2007年初めに最終案を取りまとめ ICH 運営委員会に報告する方針が確認された。また本見解案は、科学的な情報が十分に集積された段階でガイドライン作成につなげていくことも確認された。

5. GT-DG の今後の活動について

ICH GT-DG 活動では、遺伝子治療をめぐって取り組むべき課題がより明確になりつつあることや、ここに来て ICH 各極で遺伝子治療医薬品の規制当局への承認申請が出されていることへの早急な対応もあり、ICH「見解」の作成やガイドライン策定を見据えた議論も行われるようになってきている。また、EMA の「遺伝子治療用レンチウイルスベクター」ガイドライン案や FDA の「遺伝子治療を受けた患者の長期フォローアップ」ガイドライン案についても、GT-DG の場で活発な議論が行われてきており、これらの案の策定に当たっては、我々日本を含めた他極の意見が多く取り入れられている。我が国における遺伝子治療の臨床研究の数は欧米に比べて非常に少なく、臨床研究での情報は多くが海外に依存している現況であることは否めない。しかし、ここ数年は我が国においても遺伝子治療薬の開発が急速に進んでおり、

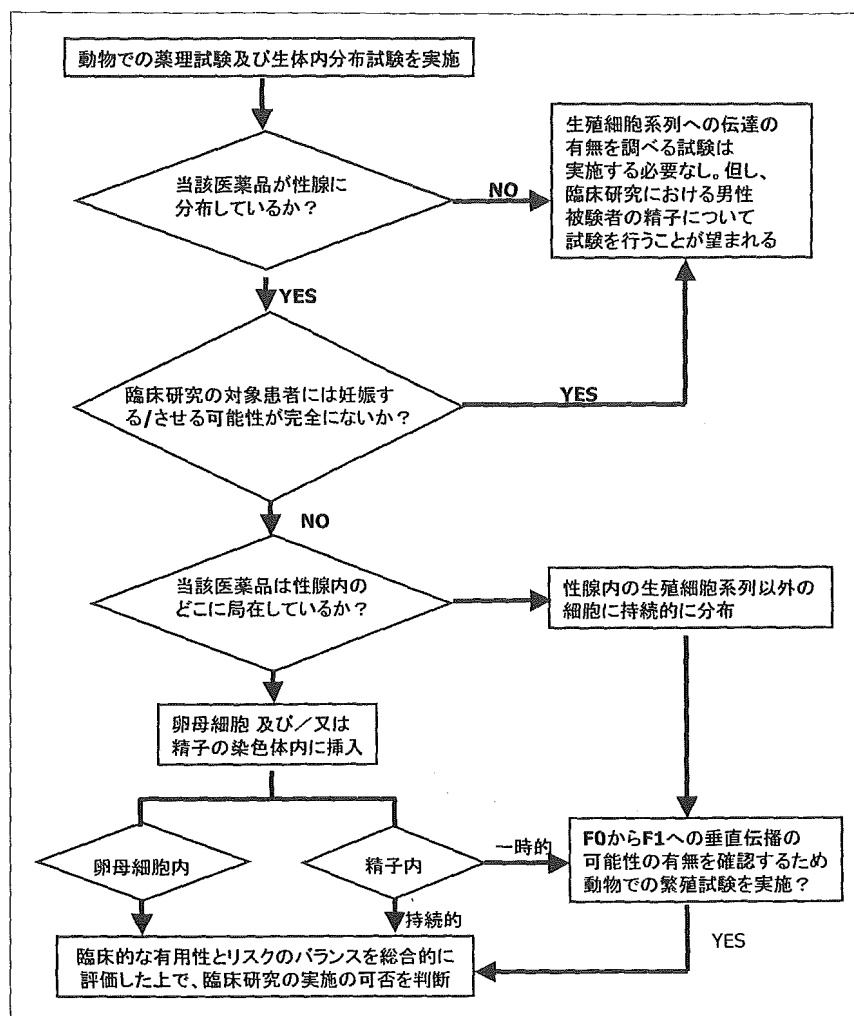


図1 遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達の有無を調べるための動物試験のフロー(案)

遺伝子治療薬に関する ICH 見解やガイドラインの策定が、我が国の遺伝子治療薬の開発の促進につながっていくと期待される。

原 著

C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための 第一次国内標準品の作製

水沢左衛子^{1)b)} 岡田 義昭^{1)a)b)} 堀内 善信^{2)b)} 田中 建志^{3)b)}
佐藤 功栄^{3)b)} 金子 健二^{4)a)b)} 佐々木祐子^{5)b)} 田中 利明^{6)a)}
伴野 丞計^{7)a)} 友水 健雄^{4)b)} 速水 照一^{5)a)b)} 土方美奈子^{8)b)c)}
平子 一郎^{9)a)b)d)} 真弓 忠^{10)a)} 三上 貢一^{11)a)b)e)} 三代 俊治^{8)a)b)}
宮本 誠二^{12)a)b)} 牟田 健吾^{12)b)} Thomas Weimer^{13)b)}
Todd Gierman^{14)b)} 小室 勝利^{15)a)} 山口 照英^{15)a)}

¹⁾国立感染症研究所血液・安全性研究部, ²⁾国立感染症研究所細菌第二部, ³⁾埼玉県赤十字血液センター,

⁴⁾日本製薬株式会社, ⁵⁾株式会社ベネシス, ⁶⁾バクスター株式会社バイオサイエンス事業部,

⁷⁾日本赤十字社血漿分画センター, ⁸⁾東芝病院研究部, ⁹⁾バイエル薬品株式会社, ¹⁰⁾自治医科大学,

¹¹⁾アベンティス ファーマ株式会社, ¹²⁾財団法人化学及血清療法研究所, ¹³⁾アベンティス ペーリング,

¹⁴⁾バイエルヘルスケア, ¹⁵⁾国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞薬品部,

^{a)}血液事業部会安全技術調査会 血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会

(委員長: 国立医薬品食品衛生研究所 山口照英),

^{b)}NAT 国内標準品作製のための共同研究グループ

^{c)}現国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部,

^{d)}現シェリング・プラウ株式会社, ^{e)}現バイエル薬品株式会社

(平成 17 年 1 月 5 日受付)

(平成 17 年 5 月 6 日受理)

ESTABLISHMENT OF THE FIRST NATIONAL STANDARD FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGY ASSAY FOR HCV RNA

Saeko Mizusawa^{1)b)}, Yoshiaki Okada^{1)a)b)}, Yoshinobu Horiuchi^{2)b)}, Takeshi Tanaka^{3)b)},
Koei Sato^{3)b)}, Kenji Kaneko^{4)a)b)}, Yuko Sasaki^{5)b)}, Toshiaki Tanaka^{6)a)},
Tsugikazu Tomono^{7)a)}, Takeo Tomomizu^{4)b)}, Shouichi Hayami^{5)a)b)}, Minako Hijikata^{8)b)c)},
Ichiro Hirako^{9)a)b)d)}, Makoto Mayumi^{10)a)}, Koichi Mikami^{11)a)b)e)}, Shunji Mishiro^{8)a)b)},
Seiji Miyamoto^{12)a)b)}, Kengo Muta^{12)b)}, Thomas Weimer^{13)b)}, Todd Gierman^{14)b)},
Katsutoshi Komuro^{15)a)} and Teruhide Yamaguchi^{15)a)}

¹⁾Department of Blood and Safety Research, The National Institute of Infectious Diseases,

²⁾Department of Bacteriology II, The National Institute of Infectious Diseases,

³⁾Japanese Red Cross Saitama Blood Center, ⁴⁾Nihon Pharmaceutical Co. Ltd.,

⁵⁾Benesis Corporation, ⁶⁾Baxter Limited BioScience, ⁷⁾Japanese Red Cross Plasma Fractionation Center,

⁸⁾Department of Medical Science, Toshiba General Hospital, ⁹⁾Bayer Yakuhin Ltd.,

¹⁰⁾Jichi Medical School, ¹¹⁾Aventis Pharma Co. Ltd.,

¹²⁾The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, ¹³⁾Aventis Behring Ltd., ¹⁴⁾Bayer Healthcare,

¹⁵⁾Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Science,

^{a)}Subcommittee on Safety for Plasma-Derived Products

(Chairman : Teruhide Yamaguchi, National Institute of Health Sciences),

^{b)}Working Group on the Establishment of National Standards for Nucleic Acid Technology Assay,

Present address ; ^{c)}Department of Respiratory Diseases, Research Institute,

International Medical Center of Japan., ^{d)}Schering-Plough K.K., ^{e)}Bayer Yakuhin, Ltd.

The First WHO International Standard for HCV RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) Assay (96/790) was established in 1997. The aim of our collaborative study was the establishment of the Japanese National Standard for HCV RNA calibrated against the WHO International Standard. The candidate materials were evaluated in the following two steps. First, titers of two HCV positive plasma (119 and 122) diluted in cryosupernatant were evaluated, and plasma 122 was chosen as the source plasma for the candidate for the national standard. Then, candidate 122 was prepared by diluting the source plasma to approximately 10^5 international units (IU)/ml in cryosupernatant. The relative potency of the candidate was measured against the International Standard by the end-point method. Seven laboratories from three countries participated in the collaborative study. Four laboratories used the Roche Amplicor assay (Version 1) and 3 laboratories used in-house PCR methods. There was reasonable agreement among the mean estimates from the laboratories. The overall mean potency of the candidate relative to the International Standard was $10^{5.00}$ ($10^{4.80} \sim 10^{5.20}$) IU/ml. The sample was accepted as the first Japanese national standard and assigned a titer of 100,000 IU/ml. Each vial of the National Standard contains 0.5 ml of HCV plasma (genotype 1b) diluted in cryosupernatant and should be stored at -80°C .

Key words : HCV, The WHO International Standard, National Standard, Nucleic acid technology (NAT) assay, Blood safety

1. はじめに

供血者のC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗体スクリーニングを実施したにもかかわらずヨーロッパとアメリカ合衆国では血漿分画製剤によるHCVの感染が報告された。これは、HCVに感染してから抗体が検出されるまでのウィンドウ期の血漿が原料血漿に混入していたためと考えられた¹⁾²⁾。そこで、血液製剤のより一層のウイルス学的安全性の確保を目的としてヨーロッパでは1999年7月1日から原料血漿プールでHCV-RNAの核酸増幅検査(NAT)を実施することになった。すでにイギリスをはじめオランダ、ドイツ、イタリア、アメリカ合衆国の各国では標準品やランコントロールを作製しており、NATを実施する施設で使用されていたが、HCV-RNA量がコピー数やgenome equivalent等まちまちの単位で表示されていたので、標準品のHCV-RNA量やNAT法の感度を相互に比較することが出来なかった。イギリスのNIBSCによってHCV-RNA

の国際標準品作製のための国際共同研究が組織され、1997年10月にWHO国際標準品(96/790)が制定され、国際単位を用いて各国参照品の力価を比較することが可能になった³⁾⁴⁾。わが国においては厚生省告示第427号によって、平成13年3月1日から製造され、又は輸入される血液製剤の原料血漿についてB型肝炎ウイルスDNA、C型肝炎ウイルスRNA及びヒト免疫不全ウイルスRNAに対するNATを実施しなければならないことに改められた。実際にはそれ以前に日本赤十字社の献血血液とすべての血漿分画製剤製造所の原料血漿プールについてHCV-RNAのNATが実施された。しかし、施設ごとにNAT法が異なり、自家標準品やキットの標準品の表示単位が統一されていなかったため、それぞれの施設での感度や精度を比較・評価することができなかった。国際単位で表示された広く認められた標準品を用いて感度や精度を測定することにより、施設間の比較や評価が可能になると考えられた。一方、国際標準品

はその配布数も限られており、国際標準品に対して較正された我が国独自の国内標準品の作製が望まれていた。そこで、血漿分画製剤の安全性確保対策の検討小委員会（以下、小委員会と略）はHCV-RNA量を国際単位で表示した国内標準品を作製するための共同研究を組織し、第一次HCV-RNA国内標準品を作製したので報告する。国際標準品はgenotype 1であるが、国内標準品は我が国で最も頻度の高いgenotype 1bとした。現在、さまざまなウイルスについて臨床や研究の場でNATが実施されているが、国内標準品として定められたものはまだない。その意味で、本標準品は我が国で初めて作製されたウイルスのNATのための国内標準品でもある。

2. 材料および方法

1) 国内標準品候補の原料血漿の選択

日本赤十字社より供与されたHBs抗原、抗HIV-1/2抗体、HBV-DNA、HIV-RNAのすべてが陰性で、HCV陽性の血漿の中から日本で最も高頻度に見られるgenotype 1bの2つの血漿（119と122）を標準品の原料候補とした。各原料血漿の一部を脱クリオプール血漿で約 10^6 国際単位（IU）/mlに希釈して -80°C で凍結・保存した試料を調製し、HCV-RNA国際標準品とともに参加施設に配布した。各施設は測定ごとに新しいバイアルの候補品を脱クリオ血漿で希釈して10倍希釈系列（ 10^{-1} から 10^{-7} ）を調製することとし、日を替えて2回定性的な方法でエンドポイントの測定を実施した。一重測定を原則としたが、日常的に二重測定を実施している場合は二重測定した（第1回測定）。このとき使用した国際標準品は小分けして -80°C に凍結保存して第2回測定に用いた。

2) HCV-RNA国内標準品候補の作製と評価

1) で選択した血漿122（PHA力価 2^{14} 、RNA量 $2\sim 3\times 10^6$ IU/ml、容量185ml）をあらためて約 10^6 IU/mlに脱クリオ血漿で希釈、0.5mlずつガラス瓶に分注し -80°C で凍結して、HCV-RNA国内参照品候補122（候補品）とし、参加施設に送付した。各施設は初回は10倍希釈系列で予備的なエンドポイントを測定し、より正確なエンドポイントの値を得るために2回目以降はそのエンドポイン

トをはさんで7段階の $10^{0.5}$ 希釈系列を測定ごとに調製し、日を替えて4回測定を実施した（第2回測定）。参加施設から返送された結果を集計して、HCV-RNA国内標準品候補のWHO国際標準品に対する力価を推定した。

3) 参加施設と測定方法

日常的にHCV-NATを実施している9施設（国内6施設、米国2施設、ヨーロッパ1施設）に候補品を配布し、7施設（国内5施設、米国1施設、ヨーロッパ1施設）から試験結果が返送された。核酸の抽出と増幅の方法は各施設の任意の方法で実施した。

4) 測定値の分析

候補品、国際標準品についてそれぞれのエンドポイント濃度の対数値の平均を求め、その比を国際標準品に対する候補品の対数相対力価とする。施設ごとに国際標準品に対する候補品の対数相対力価とその95%信頼区間を推定した。7施設から得られた対数相対力価の加重平均を求めて候補品の対数相対力価を推定した。対数相対力価の真数は国際標準品に対する候補品の相対力価を現すので、真数の値を国際標準品の力価に乗じて候補品の力価を推定した。

3. 結 果

1) 参加施設が実施した測定方法

血漿分画製剤製造所5施設（国内3、海外2）、公的機関1施設、その他1施設の合計7施設から結果が返送された。Table 1に参加施設を表すコード番号、抽出法、検出法を示す。4施設がアンプリコアHCV（Ver. 1）変法、2施設が自家法のnested PCR法、1施設が自家法のsingle PCR法を用いて測定した。反応当たりの試料の量は40～400 μl の血漿に相当した。

2) 原料血漿の選択

国内標準品は様々なNAT法に使用されるので、候補品にふさわしい原料を選択する目的で、第一回測定では2つのHCV陽性血漿119と122を希釈した試料を配布して測定した。大きな相違がなかったので、より多くの標準品の作製が可能のように容量の大きい血漿122を候補品の原料として選択した。血漿122のHCVコア領域の塩基

Table 1 Assays used in the collaborative study.

Laboratory	Assay	Extraction ^a	Eq. Vol. Amplified ^b
1	Amplicor	R&D	100
2	In-house single PCR	In-house NaI	40
3	Amplicor	Amplicor	50
4	Amplicor	R&D	100
5	Amplicor	QIAamp	400
6	In-house nested PCR	R&D	100
7	In-house nested PCR	R&D	100

a) R&D: Smt-test EX-R&D (Nippon Genetics Co. Ltd.)

Amplicor: Amplicor HCV version 1 (Roche)

QIAamp: QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN)

b) Eq. Vol. Amplified: the equivalent volume of sample that was amplified in an assay

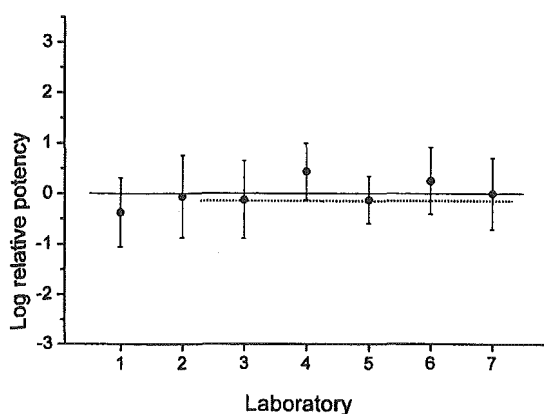


Fig. 1 Log relative potency of candidate 122 to the international standard (96/790). The laboratory code number and assay methods are explained in Table 1. The solid line indicates the mean log relative potency calculated from all data, -0.001 (-0.204 – $+0.201$). The dotted line indicates the mean log relative potency calculated from the data excluding those of the laboratories 1 and 2, $+0.066$ (-0.161 – $+0.292$).

配列を決定して genotype 1bであることを確認した。

3) 候補品 122 の国際標準品 (96/790) に対する力価の推定

あらためて候補品を送付し、7施設において 10^5 希釈系列で測定した(第2回測定)。5施設で独立の4回の測定、2施設で各2回繰り返し測定を独立に4回行った。エンドポイント法により国際標準品に対する候補品の対数相対力価を求め

Table 2 Estimated log potency of candidate 122 calibrated against the international standard (96/790). Overall (a) = the overall mean log potency calculated from all laboratories. Overall (b) = the overall mean log potency calculated from data excluding those of laboratories 1 and 2.

Laboratory	log ₁₀ IU/ml		
	Mean	Minimum	Maximum
1	4.63	3.94	5.31
2	4.94	4.12	5.75
3	4.88	4.11	5.66
4	5.44	4.88	6.00
5	4.88	4.41	5.34
6	5.25	4.59	5.91
7	5.00	4.29	5.71
Overall (a)	5.00	4.80	5.20
Overall (b)	5.07	4.84	5.29

た。なお、エンドポイントが最大希釈と同等となった場合は最大希釈をエンドポイントとした。また、不連続な陽性結果を含む場合は希釈率の高いほうをエンドポイントとした。施設毎に候補品の国際標準品に対する対数相対力価とその95%信頼区間を求め、全施設の測定結果を用いて候補品の国際標準品に対する対数相対力価を推定した。Fig. 1に示すように全施設の結果は誤差の範囲で一致し、国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{-0.001}$ であった。WHO国際標準品(96/790)の力価は 10^6 IU/mlであるから、候補品の力価は $10^{5.00}$ ($10^{4.80-5.20}$) IU/ml、即ち100,000 IU/ml

と推定された (Table 2).

参加7施設中, 施設1では測定4回中3回でエンドポイントが最大希釈と同等となった. また施設2では不連続な陽性結果が多く, 測定結果のばらつきが大きかった. そこで, この2施設を除く5施設の測定結果を用いて分析した結果, 5施設の結果は誤差の範囲で一致し, 国際標準品に対する候補品の対数相対力価の平均は $\log 10^{0.068}$ であった (Fig. 1). よって, 候補品の力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.84-5.29}$) IU/ml, 即ち 116,300 IU/ml と推定され, 全施設の結果を用いた分析結果と有意な相違は認められなかった (Table 2). 最尤法で本研究の測定値を分析すると候補品の推定力価は $10^{5.07}$ ($10^{4.86-5.30}$) IU/ml となり, 2つの分析法による推定値はよく一致した.

以上の結果から, 候補品 122 の国際標準品に対する力価は $10^{5.00}$ IU/ml と推定され, 力価 100,000 IU/ml の国内標準品として 1999 年 12 月に小委員会承認された.

4. 考 察

一般に個々の施設で国際標準品に対する2次標準品を作製すると新たな誤差が生じるので, 異なる2次標準品を用いて測定した結果を相互に比較するのは困難である. HCV-RNA NAT 試験において異なる施設間での測定値の比較や施設毎の検出感度の管理を実施するためには性状が詳しく調べてある広く認められた共通の標準品が必須である. 本共同研究によってわが国で初めて, 国際単位表示された HCV-RNA の国内標準品が制定された. 候補品の 95% 信頼区間は力価 $10^{5.00}$ IU/ml に対して $10^{4.80-5.20}$ IU/ml であった. また参加施設のなかの力価の最大は $10^{5.44}$ IU/ml (施設 4), 最小は $10^{4.63}$ IU/ml (施設 1) で $10^{0.81}$ 倍の相違であった (Table 2). これらの値はエンドポイントの測定を $10^{0.5}$ 倍希釈系列で実施したことを考慮すると十分に小さいといえる. これは本共同研究の参加施設を日常的に HCV-NAT を実施している信頼性の高い施設に限ったためと考えられる. 国内標準品は分与される予定であるので, 血液製剤の安全性確保のための NAT 試験法や診断薬の評価, 臨床

検査センターにおける HCV-RNA 検査の評価に広く用いられるようになれば, 相互の性能を容易に比較することが可能になり, 試験法・検査技術の向上が期待できる. 各施設で国内標準品を用いて繰り返し測定することにより有効検出限界の推定値を得ることが可能である. こうして得られた有効検出限界をもとに, たとえば 95% 陽性反応を得られる濃度と 50% 陽性反応を得られる濃度の標準品を常に測定に加えた測定結果を集積し, 継続的に各試験法の感度管理の精度向上を図ることが望まれる.

5. 結 論

血漿の HCV-RNA の NAT のための国内標準品を作製した. 国内標準品は HCV 抗体陽性の HCV genotype 1b 陽性血漿を脱クリオ血漿で希釈し, 0.5ml ずつバイアルに分注, -80°C で凍結保存したもので, その力価は 100,000 IU/ml である.

謝辞: 本研究で作製した国内標準品は国内献血血液から製造された. 本共同研究は厚生労働省科学研究費補助金「医薬安全総合研究事業, 血液製剤の安全性向上に必要な試験法評価法の開発と改良に関する研究」の助成により行われた.

文 献

- 1) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, Tankersley DL, Nedjar S, Mitchell FD, Biswas RM, Nübling CM, Willkommen H, and Lower J: Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet*, 345: 1173-1174, 1995.
- 2) Vrielink H, van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN: Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV-negative blood transfusion. *Vox Sang*, 68: 55-56, 1995.
- 3) Saldanha J, Lelie N, Heath A and WHO Collaborative Study Group: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *Vox Sang*, 76: 149-158, 1999.
- 4) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M and The Collaborative Study Group: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. *Vox Sang*, 78: 217-224, 2000.

品質に関するトピックの動向—Q9—**

檜 山 行 雄*

1. 品質リスクマネジメント (Q9)

品質リスクマネジメントの日本の代表は、業界側はエーザイの松村氏、行政側は筆者が担当しています。Q9のステップ2文書は、2005年2月の電話会議の後に合意しました。

Q9の位置づけを理解するためには、このトピックのICHでの取組みの経緯を理解することが重要です。Table 1に示すように2003年7月にGMPワークショップがブリュッセルで開催され、GMPシステムの調和に対し、様々な問題点及び期待が表明されました。その結果、「リスクマネジメントとサイエンスに総合的に立脚した製品のライフサイクルを通じた調和された医薬品クオリティシステム」というICHのビジョンが採択され、そのビジョンに向けて段階的に作業を進めていくことが合意されました。このビジョンの中にはサイエンス、リスクマネジメントというキーワードがあります。これはサイエンスに関しては製剤開発 (Q8) に期待し、リスクマネジメントはQ9が担当するということを意味します。

また、ライフサイクルという言葉も出てきます。これは、行政側からは審査から監視まで、企業側からは研究開発から上市後までを含みます。

ICHのビジョンに向けて、段階的に作業を進めていくことが合意された中の一つが品質リスクマネジメントに関するガイドライン (Q9) です。このガイドラインそのものでは新たな規制を導入しませんし、規制緩和を約束するものでもありません。この点がガイドラインとしての大きなポイントです。更にもう一点は企業の活動だけでなく、行政の活動にも言及しているところが特徴です。

2. 品質リスクマネジメント関連用語の定義

(Table 2)

「品質リスクマネジメント」とは、医薬品のライフサイクルにわたる品質リスクについてのアセスメント、コントロール、コミュニケーション、レビューからなる系統だったプロセスと定義されています。「リスクマネジメント」とは、一般的にリスクのアセスメント、コントロール、コミュニケーションの各作業に対し、品質マネジメント方針、手順、実施を体系的に適用することです。これを医薬品の品質分野に持ち込んできたものが品質リスクマネジメントです。

「リスク」は危害の発生の可能性とそれが発生したときの重大性の組み合わせと定義しています。これはISO 51番の定義を採用しています。「危害」は健康への被害、製品品質の不良又は安定供給の欠如による被害を含むと定義しています。「ハザード」は可能性のある危害の原因と定義しています。Table 2に示した定義はリスクに関し日常で我々が使う言葉とは異なっています。したがって、今後ガイドラインの精査をする際には定義を良く理解した上ですすめて欲しいと思います。

3. Q9 ガイドライン (Table 3)

ガイドラインは序文から参考文献まで8節に分かれ、最後に付属書が付いています。英語版は、既にICHのサイトに掲示されています。日本語訳に関しては現在、鋭意準備中ですので、終わり次第速やかにステップ2文書として掲示する予定です (平成17年7月1日発出)。

リスクマネジメントは「リスク管理」と日本語で訳されていますが、異義のリスクコントロールとの

* 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

** 当協会主催の第12回ICH即時報告会 (平成17年6月21日) における講演による。

Table 1 ICHでの取り組み

- 2003年 7月, ブラッセル会議
- 2003年 11月, 大阪会議 SCにて CP承認
- 2004年 3月, ロンドン会議 第一回 EWG
- 2004年 6月, ワシントン会議 第二回 EWG
- 2004年 11月, 横浜会議 第三回 EWG
- Step 2 文書 (案) 完成
- 2005年 3月 22日, SC承認/意見聴取開始
- 2005年 6月, パブリックコメント開始予定 (日本)

Table 2 品質リスクマネジメント関連用語の定義

- 品質リスクマネジメント
医薬品のライフサイクルにわたる品質リスクについてのアセスメント, コントロール, コミュニケーション, レビューからなる系統だったプロセス
- リスクマネジメント
リスクのアセスメント, コントロール, コミュニケーションの各作業に対し, 品質マネジメント方針, 手順, 実施を体系的に適用すること
- 製品ライフサイクル
製品の開発初期から承認前, 承認後を通じ, 製造販売中止に至るまでの全過程
- リスク(Risk)
危害の発生の可能性とそれが発生したときの重大性の組み合わせ(ISO/IEC Guide 51).
- 危害(Harm)
健康への被害. 製品品質の不良又は安定供給の欠如による被害を含む.
- ハザード(Hazard)
可能性のある危害の原因 (ISO/IEC Guide 51).

Table 3 目次

1. 序文
 2. 適用範囲
 3. QRMの原則
 4. 一般的なQRMのプロセス
 5. リスクマネジメントのツール
 6. QRMの医薬品業界及び規制当局における活動への組み込み
 7. 定義
 8. 参考文献
- 付属書 I (QRMの実践機会)

誤用を避けるためカタカナのリスクマネジメントを採用しています。このガイドラインは20数ページに及ぶものです。序文、適用範囲の次に定義を確認

しながら読むことをお勧めします。

このガイドラインの目的は、品質リスクマネジメントの適用範囲、原則、プロセスを定義し、道具の説明及び医薬品分野での活動事例、用語を定義するものです。つまり、リスクマネジメントが医薬品の品質分野によりよく取り入れられるためのガイドラインであってどの程度リスクを受け入れるべきか等の議論ではありません。

3.1 序文 (Table 4)

序文では現状の認識が記載されています。医薬品分野ではリスクマネジメントが十分使われていないこと、しかしリスクマネジメントが品質システムの有用な構成要素であるという認識はしていること、更に利害関係者により潜在リスクが異なるように認識や捕え方も異なることと記載されています。

このガイドラインに期待する事項としては、製品ライフサイクルを通じ、予防的な手段を提供することにより高品質の医薬品の供給を確実にするということが挙げられます。また、このガイドラインはICHのQ1から始まる他の品質文書とは独立して品質関連の要件を示しています。他のガイドラインを補完するためのベースとなる文書となることも期待されています。

Table 4 序文

現状

- 医薬品分野ではQRMが十分に貢献していない。
- しかし、QRMが品質システムの有用な構成要素としての重要性は認識されている。
- ステークホルダーにより潜在リスクが異なり、認識や捕え方も異なる。

期待

- ライフサイクルを通じ、予防的な手段を提供することにより、高品質の医薬品の供給を確実にする。
- ICHの他の品質文書とは独立し、品質関連の要件などを補完する基礎文書または知識源となる。

適用条件

- 現行の法規制の要件を超えた、新たな期待事項は創出されない
- 運用において、正式および略式の手法が許容される
- 薬事関連法規の遵守義務、業界と当局間のコミュニケーションは変わらない

ガイドラインの適用条件は、現行の法規制の要件を越えた新しい期待事項は出さないこと、リスクマネジメントの運用において、正式あるいは略式の手法が許されること、及び現行の薬事関連法規の遵守義務、業界と当局の間のコミュニケーションに関しては変わらないこと、の3点です。

3.2 適用範囲

ガイドラインの適用範囲は、Table 5に示すように原薬、溶剤、添加剤、包装及び表示材料を含めた医薬品原薬、医薬品製剤、生物起源由来医薬品、バイオテクノロジー応用医薬品などすべての医薬品です。製品に関しては、ライフサイクルにわたる開発、製造、流通、更に行政に関しては査察、承認申請あるいは審査に関して適用されます。

3.3 QRMの原則

このガイドラインでは、品質リスクマネジメントの重要な二つの原則が示されています。一つは品質に係わるリスクの評価は、最終的には患者への潜在的な危害と結びついていなければならないこと、すなわち患者の保護に帰結することが原則ということです。これはリスクマネジメントの対象が誰に対するリスクかという議論から出てきた結論です。

もう一つはリスクマネジメント一般に言えることですが、リスクマネジメントの実施にあたっての資源配分はリスクの程度に相応したものを用いるということです。

3.4 QRMのプロセス

Fig. 1及びTable 6に品質リスクマネジメントの一般的なプロセスを示します。リスクマネジメント

Table 5 適用範囲

- 原薬、医薬品製剤、生物起源由来医薬品、バイオテクノロジー応用医薬品
- 原料、溶剤、添加剤、包装および表示材料の使用
- 製品のライフサイクルにわたる開発、製造、配送、査察、承認申請/審査

ト・プロセスが開始すると次はリスクアセスメント、2番目はリスクコントロール、3番目はリスクコミュニケーション、そして最後はリスクレビューという系統的なプロセスとなります。更にFig. 1に示したリスクアセスメント、リスクコントロール、リスクコミュニケーションについてはそれぞれサブステップがあります。各要素のうち強調すべきものは個別に異なることと思われませんが、しっかりしたプロセスを作るために、これらすべての要素が適切なレベルで考慮されるべきです。

3.4.1 責任

意思決定者は、組織内のさまざまな機能及び部門にわたる品質リスクマネジメントの調整、リスクマネジメントの定義づけと経営資源の投入そしてプロセスの確実な実施という3つの義務を負います。

また、リスクマネジメントのチームに関してはそれぞれ適切な分野の専門家を入れたチームを作ります。Table 6に専従チームと記載してありますが、これはあくまでも理想的なケースであって必ずしも専従のチームを作らなければならないということではありません。

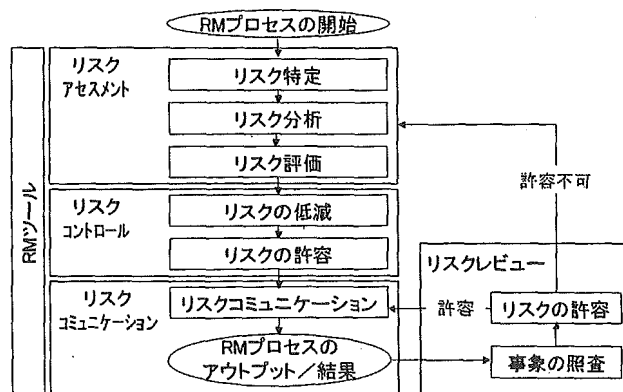


Fig. 1 一般的なQRMのプロセス

Table 6 一般的なQRMのプロセス

-
- 1 責 任
 - 意思決定者：
 - QRMを調整する義務
 - 定義づけ，経営資源投入の義務
 - プロセスの確実な実施の義務
 - 専従チーム
 - QRMに精通した者
 - 適切な分野の専門家
 - 2 QRMプロセスの開始
 - 何がリスクかを定義する
 - 背景情報・データを収集する
 - 意思決定者の関与を定義する
 - 推進者，投入資源を明確にする
 - 実施計画・成果物を明確にする
 - 3 リスクアセスメント
 - 「リスク特定」，「リスク分析」，「リスク評価」から構成される．リスクマネジメントのプロセスの中で，決定を支持する情報を整理し，組み立てる系統だったプロセス
 - うまくいかないかもしれないのは何か？
 - うまくいかない可能性はどれくらいか？
 - うまくいかなかった場合，結果（重篤性）は？
 - 4 リスクコントロール
 - 「リスク低減」，「リスク受容」の決定を含む．リスクマネジメントの決定を実施するための行動（ISO Guide73）
 - リスクは受容レベルを超えているか？
 - リスクの低減，抑制，回避に何が出来るか？
 - 利益，リスク，資源のバランスの程度は？
 - リスク抑制の結果，新たなリスクは発生しないか？
 - 5 リスクコミュニケーション
 - リスクおよびリスクマネジメントの情報を，意思決定者および他のステークホルダー（患者，医療従事者，規制当局，製薬業界等）の間で交換，共有すること
 - 情報：リスクの存在の有無，本質，形態，発生の可能性，重篤性，受容可能性，対応，検出可能性，その他の側面
 - 6 リスクレビュー
 - 新しい知見や経験を考慮に入れる，リスクマネジメントプロセスの一過程
 - 計画されたもの（製品レビュー，査察，監査，変更管理など）
 - 偶発的のもの（不良調査で判明した根本原因，回収など）
-

3.4.2 QRMプロセスの開始

リスクマネジメント・プロセスは，何がリスクかを定義する，背景情報・データを収集する，意思決定者の関与を定義する，推進者，投入資源を明確にする，実施計画・成果物を明確にする，という5項目から開始します。

3.4.3 リスクアセスメント

リスクアセスメントは，「リスク特定」，「リスク分析」，「リスク評価」の三つのステップから構成されています。

1 番目の「リスク特定」とは，リスクに関する質問，あるいは問題の記述で特定されているハザードに関する情報を集める段階です。この情報には過去のデータ，過去の事象あるいは論理的な分析，また，寄せられた意見や利害関係者からの懸念などが情報として含まれます。

2 番目の「リスク分析」は，特定されたハザードに関するリスクの推定です。「うまくいかないかもしれないのは何か？」，「うまくいかない可能性はどの程度であるか？」，「うまくいかなかった場合，結