

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（I）

## 目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方of科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 576



## プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発

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** MS, LC/MS, 各種 LC 及び NMR を用いたバイオ医薬品の確認試験法, 糖鎖解析法, 高次構造評価法, 生物学的性質評価法, 及び抗体医薬品の不均一性評価法の開発を行った. また, 組織培養インフルエンザ由来ヘムアグルチニン抗原の性状・免疫原性評価を行った.

### 分担研究者

- |                             |      |
|-----------------------------|------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所            | 川西 徹 |
| (2) キリンビール(株)医薬カンパニー生産技術研究所 | 石川リカ |
| (3) 中外製薬(株)分析技術研究部          | 古賀明子 |
| (4) (財)化学及血清療法研究所菊池研究所菅原敬信  |      |
| (5) アステラス製薬(株)製剤研究所         | 山口秀人 |
| (6) 大日本住友製薬(株)研究本部          | 木村 徹 |
| (7) 協和発酵工業(株)バイオフロンティア研究所   | 矢野敬一 |
| (8) 大阪大学大学院理学研究科            | 長谷純宏 |
| (9) 近畿大学薬学部                 | 掛樋一晃 |
| (10) 名古屋市立大学大学院薬学研究科        | 加藤晃一 |

### A. 研究目的

ゲノム情報やバイオインフォマティクスなどの革新的創薬技術を活用した画期的な新規バイオ医薬品開発が進み, 非常に多くの製品が上市されるようになってきた. しかしその一方で, バイオ医薬品の我が国の開発力の低下が指摘されており, 特性解析・品質評価に必要な解析技術も欧米に依存しているのが現状である. 世界的にバイオ医薬品の開発競争が激化する中で, 日本の国際競争力を高めるため, あるいは, 優れた医薬品を迅速に臨床の場に提供するためには, バイオ医薬品開発の初期段階から承認審査に至る開発全般に渡る迅速化・効率化, とりわけ, 品質面における特性解析・評価技術の開発, 規格及び試験法の国内整備, 並びに国際調和が望まれている. 本研究は, プロテオミクスの技術を中心とした最先端のタンパク質特性解析技術を取り入れて, 迅速かつ効率的なバイオ医薬品の特性解析・品質評価法の開発を行うものである.

平成 18 年度は, 1) 質量分析(MS)及びタンデム質量分析(MS/MS)を用いたペプチド性医薬品の確認試験法, 2) 各種 LC, MS 及び NMR を用いた抗体医薬品の酸化, N 末端のピログルタミン酸形成, 及び N 結合型糖鎖などに起因する不均一性の評価法, 3) 誘導体化及び LC を用いた糖鎖解析法, 4) cross-link 試薬等を用いた高次構造解析法, 5) リン酸化プロテオーム解析を基盤とした生物学的性質評価技術の開発, 並びに 6) 組織培養インフルエンザワクチンの開発に関する研究を行った.

### B. 研究方法

#### (1) MS 及び MS/MS を用いた確認試験法

インスリン及びインスリンアナログ (インスリンリスプロ, インスリンアスパルト, インスリングラルギン及びアルギニンインスリン) を intact のまま, あるいは還元アルキル化後シリンジインフュージョンまたは HPLC (カラム: C8; 移動相: 0.1 % ギ酸 / 2~90 % CH<sub>3</sub>CN; 流速 0.5 µl/min) で四重極飛行時間型質量分析装置 (Qstar Puler i, Applied Biosystems) に導入し, ポジティブイオンモードでマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトルを測定した.

#### (2) 抗体医薬品の不均一性評価法

##### 1) 疎水 HPLC (HIC) 及び LC/MS による酸化体評価法

完全ヒト型 IgG1 抗体 (重鎖 34 と 83 番目 (Fab 領域), 及び 256 と 432 番目 (Fc 領域) に Met 残基を有する) をパパイニン消化により Fab と Fc に切断後, HIC (カラム: Butyl-NPR; 移動相: 0~2 M 硫酸アンモニウム / 20mM トリス緩衝液; 流速: 0.5 ml/min)



を行った。tert-Butylhydroperoxide (TBHP, 終濃度 0.4~10%)を用いて強制酸化体を調製し、非酸化及び酸化 Fc ピークの割合から酸化体を定量した。Met 残基の酸化部位は、還元アルキル化した強制酸化体のトリプシン消化物の LC/MS/MS により決定した。

## 2) LC/MS を用いたピログルタミン酸形成評価法

N 末端が Glu であるヒト化モノクローナル抗体 (抗体 1E) を 2 種の緩衝液中で熱加速処理し、還元アルキル化後、Lysylendopeptidase (Lys-C) 消化し、逆相 HPLC/ESI-TOF-MS によりマッピングした。該当 N 末端フラグメントの 1 価, 2 価イオンのピーク強度からピログルタミン酸形成率を算出した。別途、遺伝子工学的に N 末端がピログルタミン酸であるヒト化モノクローナル抗体 (抗体 1pE) を作製した。

## 3) MS を用いたグリコフォーム評価法

CHO 細胞由来 IgG1 を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理した後、Lys-C で Fab と Fc に断片化した。Protein A カラムで Fc を精製し、LC/MS (カラム: C4; 移動相; ギ酸/CH<sub>3</sub>CN; MS: イオントラップ質量分析計, Bruker) を用いて質量を測定した。

## 4) NMR による各グリコフォームの高次構造解析

抗体産生細胞を炭素源および窒素源が <sup>13</sup>C および <sup>15</sup>N で標識された培地で培養し、ポリペプチド鎖と糖鎖が安定同位体標識された IgG を調製した。IgG をパパインで限定分解して Fc を調製し、各種グリコシダーゼあるいはグリコシルトランスフェラーゼを用いて様々なグリコフォームを持つ IgG を調製した。NMR 測定は JEOL ECA-920 (日本電子) 及び Avance 600, DMX-500 (Bruker) を用いて 37°C もしくは 52°C にて行った。

## (3) 糖鎖解析法

受精後 18 時間のゼブラフィッシュ (Danio rerio, 日本動物株式会社) 胚から卵黄及び卵膜を取り除き、無水ヒドラジン 60°C で 50 時間反応させて切り出した糖鎖を、再 N-アセチル後、Dowex 50W-X2 (H<sup>+</sup>型) で脱塩し、ピリジルアミノ (PA) 誘導体とした。ヒト脳組織由来タンパク質画分から N-glycanase F により切り出した糖鎖、並びに、細胞 (5 x 10<sup>5</sup> cells) 可溶性画分タンパク質から O 結合型糖鎖自動切り離し装置 (AutoGlycoCutter-1, 島津製作所) を使用して切り出した O 結合型糖鎖は、2-アミノ安息香酸 (2-AA) で誘導体化した。

## (4) 高次構造評価法

### 1) LC/MS 及び cross-link 試薬を用いた評価法

最も出現頻度の高い一次配列をもつ遺伝子組換え型 Interferon- $\alpha$  (CIFN) を種々の条件 (37°C, 50°C 及び 70°C で 24 時間放置, あるいは 8 M Urea 中 60 °C 及び 80 °C で 3 時間放置) で処理して高次構造を変化させ、cross-link 試薬で修飾し、SDS-PAGE を行った。また、トリプシン消化物の LC/MS (カラム: C18; 移動相: 0.1 % TFA / 3~90 % CH<sub>3</sub>CN; MS: API4000 system, Applied Biosystems) を行った。Cross-link 試薬として Bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS<sup>3</sup>), Sulfo-DST, DGS 及び Sulfo-EGS を用いた。

### 2) イオンモビリティを利用した評価法

イオンモビリティ質量分析計 (MS: Synapt, Waters; 分離モード: Ion Mobility Spectrometry/TOF MS) を用いて変性及び intact CIFN を分析した。

## (5) リン酸化プロテオーム解析を利用した生物学的性質評価法

ProteoExtract All-in-One Trypsin Digest Kit (CARBIOCHEM) を用いて  $\alpha$ -カゼインをトリプシン消化し、チタニアカラム (Titansphere TiO<sub>2</sub>, GL サイエンス) を用いて HPLC を行った。MS 装置は LTQ-Orbitrap (ThermoFisher), 同定検索エンジンは Mascot (Matrix Science) もしくは Sequest (ThermoFisher), データベースは SwissProt を使用した。リン酸化ペプチドの定量には、EZQ Phosphopeptide Quantification kit (Molecular Probes) を用いた。

## (6) 組織培養インフルエンザワクチンの開発 (HA 抗原の性状・免疫原性評価)

50 L 培養槽を用いて大量に培養した MDCK 細胞に、インフルエンザウイルス (2003/2004 年シーズンのワクチン株 A/NewCaledonia/20/99 株) を接種し、3~4 日後、細胞及び細胞の破砕物を除去した後ウイルスを含む培養液を限外ろ過膜で濃縮し、シヨ糖密度勾配遠心でウイルスを精製した。可溶化後、ワクチン抗原となるヘムアグルチニン (HA) を精製し、ゲルろ過分析 (カラム: G-3000SWXL TOSOH), 超遠心分析 (Beckman-Coulter XL-A/I, 35000rpm x 50min, 4°C), 電子顕微鏡観察 (PTA による Negative 染色) を行った。免疫原性は、ddY マウス (8 週齢, メス, 8 匹/群) にワクチン (HA 抗原量として 1, 0.2, 0.04  $\mu$ g) を 2 回接種 (0.3 週, 後足の Foot Pad) し、5



週後に採血して HI 価を測定して評価した。HI 価は、希釈した血清にウイルス抗原を加えて反応させた後ニワトリ血球を加え、血球凝集を阻害する血清の最大希釈倍数を求めた。

#### 倫理面への配慮：

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。また、ヒト由来の生体試料を用いた場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

### C. 研究結果

#### (1) MS 及び MS/MS を用いた確認試験法

MS 及び MS/MS は、質量測定及びアミノ酸配列解析に利用されていることから、バイオ医薬品の確認試験法としての応用が期待されている。そこで、確認試験法としての MS 及び MS/MS の可能性を評価する目的で、はじめに、インスリン (0.1 ~ 0.3 mU) を用いて MS を行った (Fig. 1A)。最もピーク強度の高い 5 個イオンの  $m/z$  値 (有効数字小数点第 2 位) からモノアイソトピック質量を計算したところ、理論モノアイソトピック質量との差は 0.5 Da (0.24 ~ 0.34 Da) 以内であった。また、分析精度 (6 回測定) は 8 ppm 以下であった。

つぎに、種々の条件を用いてインスリンの CID-MS/MS を検討した結果、6 個イオンを前駆イオンとした場合は、5 個イオンを選択した場合に比べて、検出されるイオンの種類が多いこと、コリジョンエネルギー (CE) 30eV よりも 40eV の方が検出されるイオンの種類が多いこと、また、適切な条件を設定すれば、ピーク強度は低い、末端部分のフラグメントに相当するイオンが確認できることが明らかとなった。さらに、各種インスリンアナログのプロダクトイオンスペクトルを比較したところ、改変部に由来するフラグメントを確認できることが分かった。特に、同一質量でアミノ酸配列が異なるインスリン及びインスリンリスプロを識別できることが確認された (Fig. 1B, C)。さらに、インスリン及びインスリンアナログを還元アルキル化し LC/MS/MS を行うことによって、A 鎖及び B 鎖それぞれの質量及びアミノ酸配列の違いを反映したフラグメントを観察できることが確認された。

以上のことから、MS 及び MS/MS は特異性が高い確認試験法として利用可能であることが明らかになった。

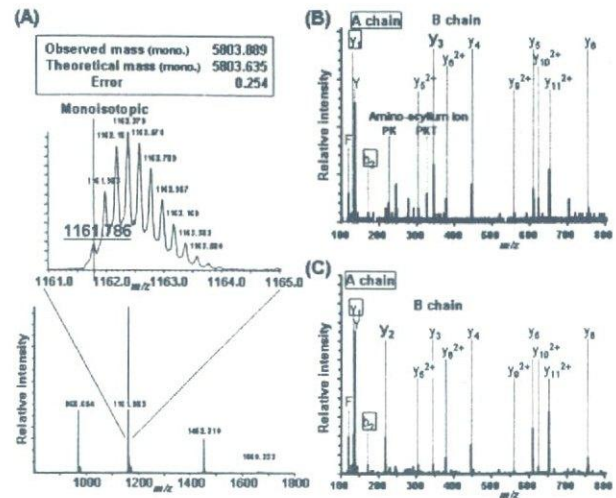


Fig. 1 (A) ヒトインスリンのマススペクトル  
(B) ヒトインスリンの MS/MS スペクトル  
(C) インスリンリスプロの MS/MS スペクトル

#### (2) 抗体医薬品の不均一性評価法

抗体医薬品には翻訳後修飾や保存中の構造変化によって生じる不均一性が存在することが知られている。これらの不均一性は、活性や抗原性等に影響を及ぼす可能性があることから、正しく評価することが重要である。そこで、酸化体、N 末端アミノ酸、及び糖鎖に起因する不均一性を評価する方法を検討した。

##### 1) HIC 及び LC/MS を用いた酸化体評価法

はじめに、製造中や保存中の Met 残基等の酸化によって起きる可能性がある構造変化の評価法として、HIC を検討した。コントロール及び強制酸化体 (0.4% TBHP) の HIC によって、酸化体と考えられるピークが観察されること、パパイン消化で Fab と Fc に切断することにより酸化体ピークの分離が向上すること、並びに強制酸化による変化は Fc でしか認められないことが明らかになった (Fig. 2)。本分析法における酸化体含量の添加回収率は 94% であった。また、コントロールと強制酸化体 (0.4% TBHP) の酸化体含量の相対標準偏差は 0.6 ~ 1.0% と良好であり、定量系として使用できると考えられた。

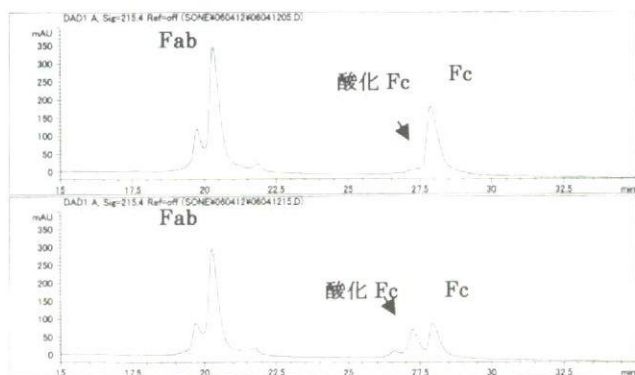


Fig. 2 コントロール(上段)及び0.4% TBHP 処理酸化体(下段)のHIC

つぎに、Fcが完全に酸化されている強制酸化体(10%TBHP)を用いて、酸化部位を特定した。トリプシン消化物のLC/MSの結果、強制酸化により59分(Met256を含むペプチド)及び79分(同Met432)付近のピークが消失し、55分(同酸化Met256)及び71分(同酸化Met432)付近に新たなピークが検出され、その他のピークについてほとんど変化は認められなかったことから、酸化部位は主にMet256及びMet432であると考察された。

## 2) LC/MSを用いたピログルタミン酸形成評価法

多くの抗体医薬品のN末端はGlnかGluである。N末端がGlnの抗体はピログルタミン酸を形成していることが知られているが、Gluのピログルタミン酸形成は注目されていなかった。そこで、はじめに、Gluのピログルタミン酸形成を評価する目的で、LC/MSを用いて抗体Eと抗体1pEのペプチドマッピングを行った。得られたN末端を含む二つのペプチドフラグメントのピークは十分に分離しており、Gluからのピログルタミン酸形成を確認できることを確認した。

つぎに、熱加速処理した抗体1Eのペプチドマッピングを行い、MSのピーク強度からピログルタミン酸形成率を算出した(Fig. 3)。その結果、様々な熱加速処理試料中にピログルタミン酸フラグメントが確認され、加熱温度が高いほどその割合が増加していること、また、この増加は緩衝液種や抗体によって異なることが明らかとなった。

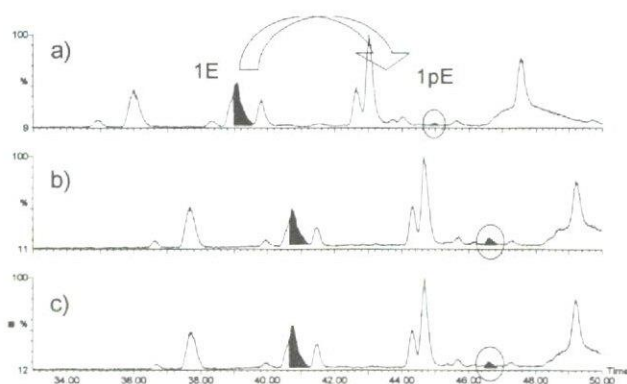


Fig. 3 抗体1Eの熱加速試料のペプチドマップ(TIC) a) 非加熱, b) 40°C-1M リン酸, c) 50°C-1M ヒスチジン

## 3) MSを用いたグリコフォーム評価法

ヒトIgG1のFc(分子量約50kDa)に結合しているN結合型糖鎖は、ADCC活性に影響を及ぼし、特に、コアに結合したフコース(Fuc)はADCC活性を低下させることが知られている。そこで、Fucの結合数の違いによって生じるグリコフォームをMSで識別可能かどうかを推定するために、主なN結合型糖鎖(複合型2本鎖)16種類の組合せで生じるFcの分子量分布をシミュレートしたところ、9Daの質量差を識別可能な質量分析計によって識別できることが判明した。しかし、分解能60,000の装置を使用しても、スキャンスピードの低下によって感度が下がり、デコンボリューション後、良好なスペクトルが得られなかった。そこで、非還元末端のガラクトース(Gal)をβ-ガラクトシダーゼにより除去して糖鎖を4種類に集約させた後、Lys-C消化によりFabとFcに断片化し、MSを行うことによって、3種のグリコフォームを識別することができた(Fig. 4)。得られた定量値と単糖組成分析の結果には整合性が認められ、グリコフォーム評価法として応用可能であることが確認された。

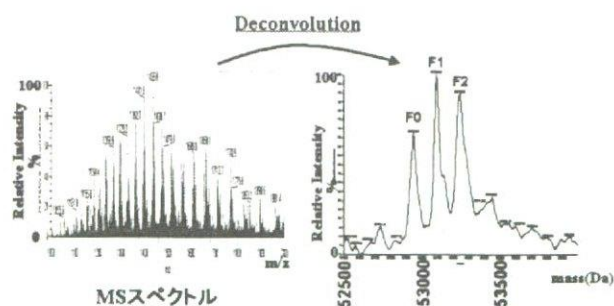


Fig. 4 抗体Fc領域の質量分析によるグリコフォーム測定



#### 4) NMRによる各グリコフォームの高次構造解析

糖鎖を<sup>13</sup>Cにて均一に標識したFcを対象として、920 MHz 超高磁場 NMR 装置を用いた超高分解能スペクトル計測 (2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-TOCSY, 3D HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSY, 3D <sup>13</sup>C-edited NOESY) を行い、糖鎖に由来する NMR シグナルを帰属した。これを基に、糖鎖構造を確認した各種グリコフォームの Fc の超高磁場 NMR を行い、糖鎖の非還元末端側に位置する Gal や N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基の除去は大きな構造変化を誘起しないが、Endo D により Fuc-GlcNAc の 2 糖にまで短鎖化すると、Fc レセプターの結合部位であるヒンジ領域下流にまで構造変化が及ぶことが判明した (Fig. 5 上段)。さらに、Fuc 残基の有無によって糖鎖結合 Asn297 の空間的近傍に構造の違いが認められること、Fuc 残基が存在しない場合、Tyr296 の NMR シグナルが顕著に広幅化していることが明らかとなった (Fig. 5 下段)。このことは、Tyr296 が何らかの化学交換を起こしていることを示しており、Fc レセプターとの親和性が向上する理由のひとつとしてこの揺らぎが関与している可能性が考えられた。以上のように、糖鎖構造が Fc の立体構造や運動性に影響を及ぼすことが判明した。

### (3) 糖鎖解析法

様々な糖鎖を用いて、蛍光標識法と LC による糖鎖のプロファイリング及び構造解析を行った。

受精後 18 時間の胚より調製した PA-糖鎖を陰イオン交換、順相分配、及び逆相 HPLC で分離して得られたフラクションに、α1-3/4 フコシダーゼに反応するフラクションがあることから、Lewis x 結合糖鎖の存在が示唆された。還元末端分析の結果、還元末端は、通常の N 結合型糖鎖の還元末端である N-アセチルキトビオース (GlcNAcβ1-4 GlcNAc) ではなく、GlcNAc と判明した。さらに、α1-3/4 フコシダーゼ、β1-4 ガラクトシダーゼ、β-N-アセチルヘキソサミニダーゼ、及びα-マンノシダーゼによる逐次消化、2 次元マッピング及び MALDI-TOFMS により、この糖鎖は、Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-2Manα1-6[Galβ1-4(Fucα1-3) GlcNAcβ1-2Manα1-3]Manβ1-4GlcNAc-と決定された。

ヒト脳腫瘍及び正常組織由来 N 結合型糖鎖を 2-AA 標識し、順相分配 HPLC 及び MALDI-TOFMS を行うことによって、両者の糖鎖プロファイルの違いを明らかにすることができた (Fig. 6)。さらに、脳腫瘍組織に特徴的な糖鎖は LacNAc が 1~4 残基

付加した polylectosamine 型糖鎖であることが判明した。また、各種培養細胞に発現している糖タンパク質の O 結合型糖鎖を同様に分析することによって、細胞毎の糖鎖の特徴を明らかにすることができた。

以上のように糖鎖の標識と各種 LC は糖鎖解析法として有用であることが確認された。

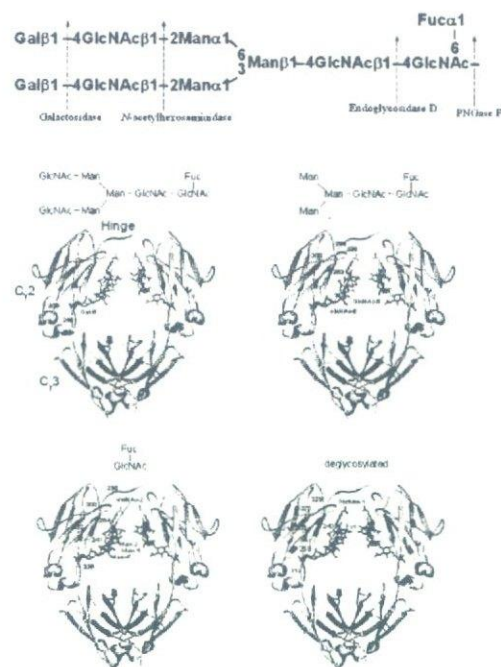


Fig. 5 グライコフォームが異なる抗体の NMR

上段：糖鎖のトリミングに伴って化学シフトを示した残基の Fc の立体構造上へのマッピング

下段：チロシン残基を選択的に <sup>15</sup>N 標識した Fuc(+) 及び Fuc(-) Fc の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトル



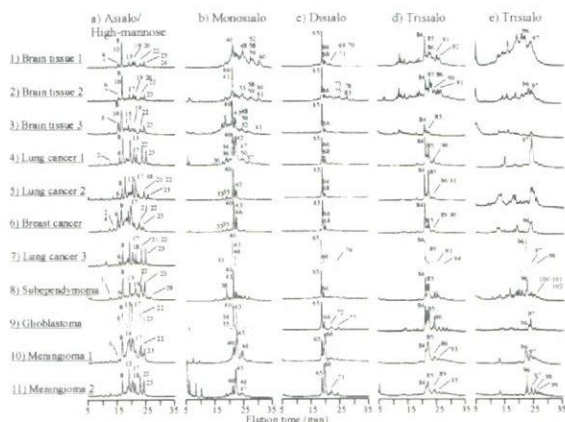


Fig. 6 ヒト正常及び脳腫瘍組織由来 N結合型糖鎖のプロファイル

#### (4) 高次構造解析

##### 1) LC/MS 及び cross-link 試薬を用いた評価法

CIFN をモデルタンパク質として、 $\alpha$  アミノ基と反応する各種 cross-link 修飾試薬を用いた立体構造形成確認試験を検討した。はじめに、SDS-PAGE において、非還元条件ではジスルフィド結合によって立体構造が保持されたまま泳動されるが、還元条件では立体構造が破壊されて移動度が小さくなること、また、CIFN が cross-link 試薬と反応した場合、立体構造が保持されるので、移動度は還元条件と非還元条件で変化しないことを利用して cross-link と高次構造の関係を評価した。その結果、分子内 cross-link の形成や二量体・多量体の形成は修飾試薬の spacer の長さに依存すること、また、変性させた CIFN では、分子内及び分子間 cross-link が形成されないことが明らかとなった。特に後者は、変性によって二次構造を構成する各ドメインの空間的な配置が変化したためであると考えられた。

つぎに、トリプシン消化物の LC/MS を行い、各ペプチドを定量した。その結果、分子間結合している CP#1 (K122-K134) 及び CP#5 (K36-K122) は、変性後でもそれぞれ 25 及び 40 % 残存しているが、分子内結合している CP#2 (K31-K135), CP#3 (K31-K134) 及び CP#4 (K134-K135) は 10% 程度しか残っていないことが明らかとなった (Fig.7)。

以上の結果は、CIFN と各種 cross-link 修飾試薬の間に立体構造特異性があること、並びに分子内 cross-link は変性による立体構造変化に対して鋭敏であることを示しており、CIFN の立体構造の特徴を cross-link 修飾試薬との反応性で定義することが可能と考えられた。本法によって、タンパク質性医薬品の簡便且つ詳細な高次構造確認試験法が設定できる可能性が示唆された。

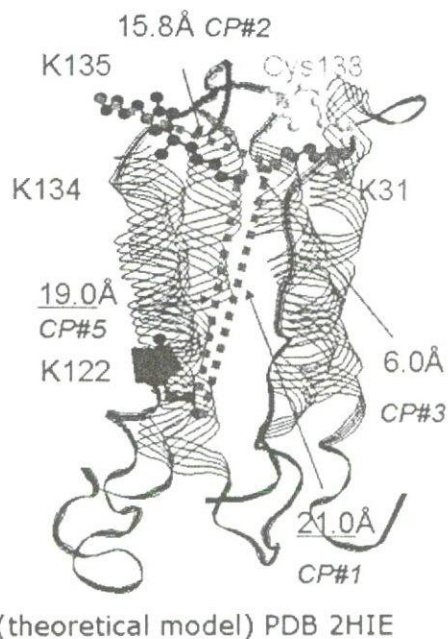


Fig. 7 インターフェロン $\alpha$ -2b を BS<sup>3</sup> で修飾した場合の 3次元マップ

##### 2) イオンモビリティを利用した評価法

intact 及び 4 M Urea で変性させた CIFN のマスペクトルを測定したところ、変性前及び変性後の平均価数は、それぞれ 13 価及び 10~11 価と異なることが明らかとなった。これは、変性することによってイオン化されやすい塩基性アミノ酸残基等が、より内側に埋没するように構造変化したことを示唆している。さらに、各イオンのモビリティを測定した結果、変性後  $m/z$  1,990 及び 1,780 付近のイオンのモビリティが相対的に小さくなっていることが判明した。これは変性により「かさ」が小さくなっている事を示唆していると考えられた。

##### (5) リン酸化プロテオーム解析を利用した生物学的性質評価法

$\alpha$ -カゼインのトリプシン消化物を用い、チタニアカラムからのリン酸化ペプチドの回収量に及ぼす移動相の影響を検討した。その結果、0.1 % TFA / 80 % CH<sub>3</sub>CN によって、非リン酸化ペプチドの回収が 1/50 程度に減少すること、また、この移動相にエンハンサーとして 20mg/ml の Lactic acid を添加することによって、回収率が 85% まで向上する上、リン酸化ペプチドに対する選択性が高くなることがわかった。

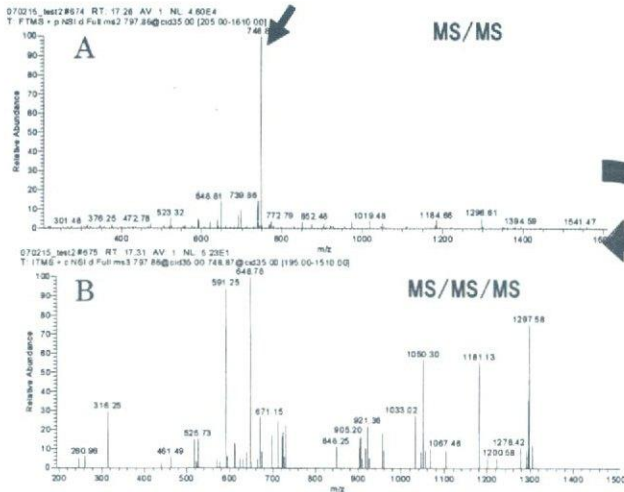


Fig. 8 ニュートラルロスを生じたリン酸化ペプチドのMS/MSスペクトルとMS/MS/MSスペクトル

従来、リン酸化ペプチド、特に Ser 残基がリン酸化されているペプチドの場合、MS/MSにおいてニュートラルロスを起こしたフラグメントが強く検出され、MS/MS/MS スペクトルから十分な内部配列情報を得ることができなかつた。今回、高感度な MS 装置を用いて、 $\alpha$ -カゼイントリプシン消化物のニュートラルロススキャンで得られた MS/MS/MS データを用いてデータベース検索をおこない、同定できるリン酸化ペプチドが増えることを確認した (Fig. 8)。

以上のように、リン酸化ペプチドの効率的濃縮と同定法の確立に成功した。

#### (6) 組織培養インフルエンザワクチンの開発 (HA 抗原の性状・免疫原性評価)

精製直後の HA 抗原は、ゲルろ過分析から、3 量体 (分子量約 20 万) であることが示唆されたが、排除限界を超えた位置に展開されたため、詳細な分析は困難であった。精製工程を経て最終的に得られた HA 抗原は、電顕観察により、形のそろった凝集体 (ロゼット) を形成していることが確認された。また、超遠心分析により、3 量体及び凝集体の沈降乗数は、それぞれ 8.7S 及び 31.0S と測定された。さらに、マウスを用いた免疫原性の評価系を構築し、組織培養インフルエンザウイルスより精製した HA 抗原、及び我国で製造されている 4 品目+海外メーカー1 品目の卵由来スプリットワクチンの免疫原性を評価したところ、MDCK 細胞由来 HA 抗原と卵由来スプリットワクチンとの間に免疫原性に有意な差はなかつた (Fig. 9)。

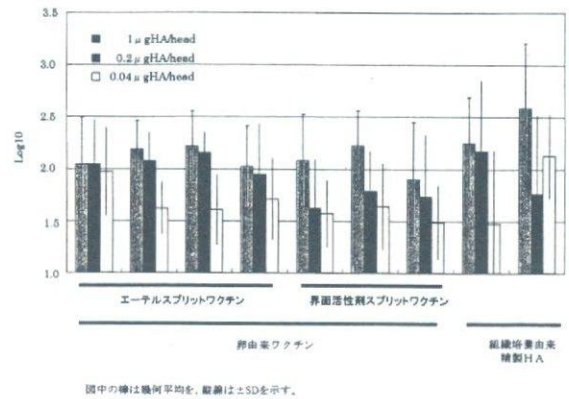


Fig. 9 組織培養由来 HA 及び卵由来インフルエンザワクチンの免疫原性の比較

#### D. 考察

バイオ医薬品の品質評価・試験法として、アミノ酸分析法、SDS-PAGE、等電点電気泳動法、及びペプチドマップ法などの国内整備・国際調和が進められ、日局第 15 改正に参考情報として掲載された。つぎに国内整備及び国際調和が期待される分析法は、MS 及び糖鎖試験法である。本研究では、MS、MS/MS 及び LC/MS がペプチド性医薬品の確認試験、不均一性評価、糖鎖解析、高次構造解析、及び生物学的性質評価に有用であり、評価法・試験法として応用可能であることを示した。本研究で得られた成果及び浮かび上がってきた課題は、MS を用いた試験法の標準化、並びに第 16 改正における参考情報としての掲載に役立つものと思われる。

糖タンパク質性医薬品の糖鎖の評価法及び試験法の整備は、製法変更前後の同等性/同質性評価、並びに先発品及び後続品間の同等性/同質性評価に関連して、現在、国際的にも最も要求が高まっている。本研究では、糖鎖の標識法及び各種 LC が、糖鎖プロファイルの違いを明らかにできること、また目的糖鎖の構造を解析できることを確認した。我々は、これまでの研究を通して、今回用いた 2-AA、PA に加え、2-アミノベンザミドを用いた標識法と各種 LC の組み合わせ、HPAEC-PAD 及びキャピラリー電気泳動等が、標準的糖鎖試験法として有用であると考えている。来年後以降、第 16 改正の参考情報としての掲載を念頭に、糖鎖試験法の標準化を図っていきたい。



バイオ医薬品評価において、適切な高次構造評価法、及び動物を用いない生物学的性質評価法の確立が課題とされている。昨年に引き続き本年度も MS や NMR を用いた様々な評価法を提案し、立体構造変化に起因する現象を解釈できることを確認した。今後、バイオ医薬品の品質保証や製剤の処方設計への適用が可能であると思われる。

近年の抗体医薬品開発はめざましく、我が国においても承認申請件数が増えている。抗体は Met 残基の酸化、N 末端におけるピログルタミン酸形成、重鎖 C 末端における Lys 残基の部分的な欠損、N 結合型糖鎖の構造などに由来する種々の不均一性をもつことが知られている。これらの不均一性は、活性や抗原性に影響を与える可能性があるため、抗体医薬品の構造を詳細に解析し、保存中の変化(安定性)を評価することが重要である。本研究では酸化体、N 末端のピログルタミン酸形成、及び糖鎖に起因する不均一性評価法を確立した。本研究の成果は、今後の抗体医薬品の特性解析及び規格及び試験法の設定に役立つものである。

現行のインフルエンザワクチンは発育鶏卵より生産しているが、ワクチンの製造に9ヶ月程度の時間を要すること、廃卵の処理に伴う環境負荷が大きいこと、残存する卵由来の不純物による副作用の心配があることなどの問題を抱えてことから、本研究では、培養基材を MDCK 細胞へ変更することを検討した。平成16年度は、MDCK 細胞がウイルスの増殖を阻害する物質を産生していることを見出し、平成17年度は、このウイルス増殖阻害因子を除去した効率的な培養方法を考案した。平成18年度は、得られたウイルスから HA を取得し、その性状をいくつかの手法を用いて解析した。得られた HA の物理的・化学的性質はほぼ理論値に近いものであったが、今後、性状を定量的に明らかにして恒常的に生産する方法を確立するためには、高分子量域での分析方法を検討していく必要がある。また、免疫原性の検討においては、組織培養インフルエンザウイルスより得た HA 抗原は、現行の卵由来ワクチンと同等の免疫原性を示したが、今後、より精度の高い系を構築する必要があるだろう。

## E. 結 論

MS, NMR 及び各種 LC 等を用いたバイオ医薬品の確認試験法、抗体医薬品の不均一性解析法、糖鎖解析法、高次構造評価法及び生物学的性質評価法の開発を行い、様々なバイオ医薬品を用いて応用可能性を実証した。さらに、組織培養インフルエンザウイルス由来 HA 抗原の性状・免疫原性は、現行の卵由来ワクチンと有意な差がないことを明らかにした。本研究の成果は、バイオ医薬品の特性解析及び規格及び試験法の制定に役立つものであり、承認申請/審査の迅速化効率化、試験法の国内標準化、局方収載、ガイドライン作成、及び国際調和などに貢献するものである。

## 協力研究者

原園 景(国立医薬品食品衛生研究所)、井浦貴文(キリンビール(株)医薬カンパニー生産技術研究所)、下山敦子(中外製薬(株)分析技術研究部)、西山清人、野内俊伸、恩智達文、遠藤昌文((財)化学及血清療法研究所菊池研究所)、平倉 穰、北村 聡、村田芳美(アステラス製薬(株)製剤研究所)、林 慎介(アステラス製薬(株)生物工学研究所)、左海 順(大日本住友製薬(株)研究本部)、斎藤誠嗣(協和発酵工業(株)バイオフロンティア研究所)、長束俊治(大阪大学大学院理学研究科)、木下充弘(近大薬学部)、山口芳樹(名古屋市立大院薬学部)

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kawasaki, N., Itoh, S., and Kawanishi, T.: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
2. Kawasaki, N., Itoh, S., and Yamaguchi, T.: LC/MS<sup>o</sup> for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press
3. Baba, M., Ma, B. Y., Nonaka, M., Matsuishi, Y., Hirano, M., Nakamura, N., Kawasaki, N., Kawasaki, N., and Kawasaki, T.: Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion, *J Leukoc Biol*, in press
4. Kawasaki, N., Itoh, S., and Yamaguchi, T.: LC/MS of oligosaccharides, *Glycoscience Lab. Manual*, Ed. Naoyuki Taniguchi, in press
5. 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質, 安全性評価. 早川堯夫監修, エル・アイ・シー(東京)印刷中

6. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 印刷中
  7. Ishimizu, T., Sano, K., Uchida, T., Teshima, H., Omichi, K., Hojo, H., Nakahara, Y., and Hase, S.: Purification and Substrate Specificity of UDP-D-xylose: $\beta$ -D-Glucoside  $\alpha$ -1,3-D-Xylosyl-transferase Involved in the Biosynthesis of the Xyl $\alpha$ 1-3Xyl $\alpha$ 1-3Glc $\beta$ 1-O-Ser on Epidermal Growth Factor-like Domains, *J. Biochem.*, 2007 in press
  8. Murakami, T., Natsuka, S., Nakakita, S., and Hase, S.: Structure Determination of a Sulfated N-Glycans, Candidate for a Precursor of the Selectin Ligand in Bovine Lung, *Glycoconj. J.*, 2007 in press.
  9. Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S. and Ikenaka, K.: Developmental Changes in the Expression of Glycogenes and the Content of N-glycans in the Mouse Cerebral Cortex, *Glycobiology.*, 2007 in press.
  10. Murakami, T., Natsuka, S., Nakakita, S., and Hase, S.: Structure Determination of a Sulfated N-Glycans, Candidate for a Precursor of the Selectin Ligand in Bovine Lung, *Glycoconj. J.*, 2007 in press.
  11. Matsumiya, S., Yamaguchi, Y., Saito, J., Nagano, M., Sasakawa, H., Otaki, S., Satoh, M., Shitara, K., and Kato, K.: Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human Immunoglobulin G1, *J. Mol. Biol.* (2007) in press
  12. Wada, Y., Azadi, P., Costello, C. E., Dell, A., Geyer, R., Kakehi, K., Karlsson, N. G., Kato, K., Kawasaki, N., Khoo, K., Kim, S., Kondo, A., Nakamura, K., Narimatsu, H., Novotny, M. V., Packer, N. H., Perreault, H., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G., Reinhold, V. N., Rudd, P. M., Suzuki, A., and Taniguchi, N.: Mass spectrometry of glycoprotein glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organization Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional study. *Glycobiology*, **17**, 411-422 (2007)
  13. 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知られば薬がわかる. 第9回, *Pharm. Tech. Japan*, **23**, 101-109 (2007)
  14. 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知られば薬がわかる. 第7回, *Pharm. Tech. Japan*, **23**, 81-87 (2007)
  15. 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前STEMを知られば薬がわかる. 第5回, *Pharm. Tech. Japan*, **22**, 91-99 (2006)
  16. Yanyang Zhao, Satsuki Itoh, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, and Jianguo Gu: Deletion of core fucosylation on  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin down-regulates its functions, *J. Biol. Chem.*, **281**, 38343-38350 (2006)
  17. Yanyang Zhao, Yakatoshi Nakagawa, Satsuki Itoh, Kei-ichiro Inamori, Tomoya Isaji, Yoshinobu Kariya, Akihiro Kondo, Eiji Miyoshi, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, Jianguo Gu: N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.*, **281**: 32122-32130 (2006)
  18. Ishimizu, T., Hashimoto, C., Kajihara, R., and Hase, S.: A Retaining Endo- $\beta$ -mannosidase from a Dicot Plant, Cabbage, *J. Biochem.*, **139**, 1035-1043 (2006)
  19. Ohashi, T., Cramer, N., Ishimizu T., and Hase, S.: Preparation of UDP-galacturonic Acid Using UDP-sugar Pyrophosphorylase, *Anal. Biochem.* **352**, 182-187 (2006)
  20. Yanagida, K., Natsuka S., and Hase, S.: Structural Diversity of Cytosolic Free Oligosaccharides in the Human Hepatoma Cell Line, HepG2, *Glycobiology*, **16**, 294-304 (2006)
  21. Ishimizu, T., and Hase, S.: Endo- $\beta$ -mannosidase, a Plant Enzyme Acting on N-Glycans, *TIGG*, **18(99)**, 39-47 (2006)
  22. Endo, M., Hase, S., Yamamoto, K., and Takagaki, K.: Endoglycosidases --- Biochemistry, Biotechnology, Application, Kodansha-Springer (2006)
  23. Naka R., Kamoda S., Ishizuka A., Kinoshita M., and Kakehi K.: Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography, *Proteome Res.*, **5(1)**, 88-97 (2006)
  24. Holland, M., Yagi, H., Takahashi, N., Kato, K., Savage, C., Goodall, M., and Jefferis, R.: Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis, *Biochim. Biophys. Acta. -General Subjects* **1760**, 669-677 (2006)
2. 学会発表
- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/MS<sup>n</sup>を用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第6回日本蛋白質科学年会 (2006, 4) 京都
  - 2) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Toru Kawanishi: Differential analysis



- of N-linked oligosaccharides in kidney of human systemic lupus erythematosus (SLE) model mouse by LC/MS. 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
- 3) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Nakajima, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi: Glycosylation analysis of IgLON family glycoproteins in rat brain by LC/MS<sup>n</sup> (II). 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress (2006, 6, 19) Kyoto
  - 4) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 川西 徹, 山口照英: LC/MS/MS を用いたヒト血清グライコプロテオームの解析. 日本ヒトプロテオーム機構第4回大会 (2006, 7, 18-19) 東京
  - 5) 野村一也, 水口惣平, 野村和子, 出嶋克史, 永石貴之, 村田大輔, 安藤恵子, 三谷昌平, 瀬古 玲, 山下克子, 泉川友美, 北川裕之, 菅原一幸, 川崎ナナ, 松石 紫, 榎 娟大, 成松 久: 遺伝子破壊による線虫糖鎖関連遺伝子の機能解析. 第 26 回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  - 6) 旭 美穂, 佐野琴音, 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 柳橋麻衣子, 宮本泰則, 小川温子: 肝再生過程におけるラット血漿フィブロネクチンの糖鎖構造. 第 26 回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  - 7) 吉田奈央, 竹原弥生, 佐野琴音, 向山恵津子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 穂山 浩, 吉岡靖雄, 米谷民雄, 小川温子: スギヒラタケレクチンの精製とその糖特異性. 第 26 回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  - 8) 馬場亮人, Ma Bruce Yong, 松石 紫, 川崎ナナ, 平野真, 川崎伸子, 川崎敏祐: レクチン jacalin による CD54 を介した T 細胞の活性化に関する研究. 第 26 回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  - 9) 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 中島 紫, 山口照英: 質量分析を用いたペプチド性医薬品の確認試験法の基礎的検討. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
  - 10) 橋井則貴, 川崎ナナ, 豊田雅士, 片桐洋子, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 梅澤明弘, 山口照英: 細胞治療薬の品質評価に関する研究: nanoLC/FTMS による細胞膜の N-グリコシルノイラミン酸の定量. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
  - 11) 石水毅, 橋本周子, 佐々木明子, 武田亮, 長谷純宏: 植物液胞酵素エンド- $\beta$ -マンノシダーゼの構造と機能. 日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  - 12) 長東俊治, 廣畑有紀子, 長島友美, 長谷純宏: 系統発生における N 結合型糖鎖の構造比較. 農芸化学会大会 (2007, 3, 25) 東京
  - 13) 大橋貴生, 石水毅, 秋田一雅, 長谷純宏: タンパク質複合体としてのペクチン合成酵素の同定. 第 2 回シンポジウム「植物プロテオーム研究の最前線」(2006, 11, 17) つくば
  - 14) 橋本有樹, 石塚 文, 木下充弘, 掛樋一晃, 片岡和夫: ヒト脳組織中糖鎖の網羅解析. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
  - 15) 山田佳太, 兵頭里美, 木下充弘, 掛樋一晃, 米沢 傑, 中田 博: 癌細胞のムチン型糖鎖の解析. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
  - 16) 橋本有樹, 石塚 文, 木下充弘, 掛樋一晃, 片岡和夫: 脳腫瘍組織の N 結合型糖鎖の構造解析. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
  - 17) Kazuaki Kakehi: Analysis of total glycans in cancer cells. A few applications to the analysis of clinical samples, *Frontiers in Glycomics: Bioinformatics and Biomarkers in Disease* (2006, 9, 11-13) Maryland
  - 18) 矢木宏和, 山田兼三, 山口芳樹, 高橋禮子, 内村健治, 神奈木玲児, 岡 昌吾, 川崎敏祐, 加藤晃一: 多次元 HPLC マップ法を利用した硫酸基転移酵素および糖転移酵素の分岐鎖特異性の解析. 第 4 回グライコミクス夏季シンポジウム (2006, 8, 9) 浜松
  - 19) 神谷由紀子, 塚越晴子, 山口芳樹, 高橋禮子, 荒田洋一郎, 笠井献一, 井原義人, 松尾一郎, 伊藤幸成, 市川瑠子, 河崎徳人, 山本一夫, 加藤晃一: カーゴレセプターによる糖タンパク質の小胞輸送を制御する分子間相互作用の構造的基盤. 第 6 回日本蛋白質科学会 (2006, 4, 26) 京都
  - 20) 関谷慎規, 山口芳樹, 加藤晃一, 田中耕一: MALDI 質量分析における PA 化糖鎖の還元. 第 54 回質量分析総合討論会 (2006, 5, 19) 大阪
  - 21) 山口芳樹, 笹川拓明, 神谷由紀子, 矢木宏和, 長野真弓, 高橋禮子, 加藤晃一: 920 MHz 超高磁場 NMR 装置を活用した複合糖質の精密構造解析. 第 26 回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
  - 22) 山口芳樹: 安定同位体利用 NMR 法による糖タンパク質の高次構造解析. *GlycoTOKYO 2006 シンポジウム* (2006, 8, 31) 横浜
  - 23) 大野恵里菜, 矢木宏和, 山口芳樹, 加藤晃一: O 結合型糖鎖の構造解析のための HPLC マップの構築. 平成 18 年度日本薬学会東海支部例会 (2006, 12, 2) 名古屋
- 他 41 件
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31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