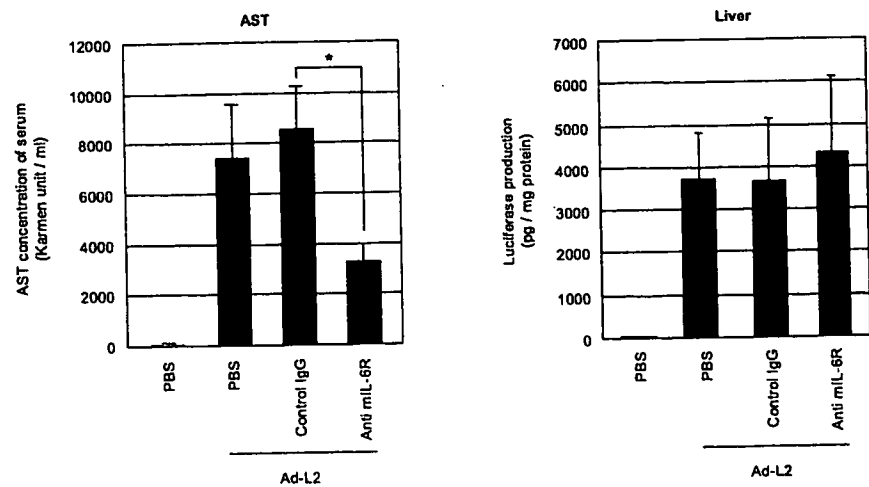


FIGURE 5. Effects of serum IL-6 on serum AST levels and liver luciferase production after the systemic administration of Ad-L2 into mice. C57BL/6 mice were i.p. administered 100 μ g per mouse of anti-IL-6R Ab (clone D7715A7), which was specific for blocking IL-6 signaling, or rabbit IgG as a control (clone; R3-34). Ad-L2 or AdK7-L2 (3.0×10^{10} VP) was i.v. injected into the mice 1.5 h later. Blood samples and liver tissue were collected 48 h after the injection of Ad-L2. The AST levels in the serum were measured using a Transaminase-CII kit. Luciferase production in the liver was measured by a luciferase assay system. All data represent the means \pm SD of three to four mice. *, $p < 0.01$.



after i.v. Ad administration is poorly understood. In the present study, although AdK7-L2 mediated higher luciferase expression and a higher accumulation of viral DNA in the liver than Ad-L2, it remains unclear why AdK7-L2 showed almost background levels of liver toxicity while Ad-L2 showed high toxicity. As reported previously, inflammatory cytokines, chemokines, and IFNs could be the mediators responsible for liver toxicity (2). IL-6 levels in the serum were the most strikingly different between AdK7-L2 and Ad-L2. Furthermore, IL-6 stimulated acute phase protein (serum amyloid A, fibrinogen, α_1 -anti-trypsin, and α_1 -acid glycoprotein) in rat and human hepatocytes (36, 37). Therefore, we next examined the effects of serum IL-6 on liver toxicity (Fig. 5). To do this, we used an anti-IL-6R Ab that inhibits the signal through the IL-6 receptor. The IL-6 receptor system consists of two functional molecules, an 80-kDa ligand-binding chain (IL-6R) and a 130-kDa nonligand-binding but signal-transducing chain (gp130). The anti-IL-6R Ab blocks the binding of IL-6 to the IL-6R (38, 39). The anti-IL-6R Ab or the control Ab was i.p. injected 1.5 h before the injection of Ad-L2. The AST levels in the serum and luciferase production in the liver were determined 48 h later. Administration of anti-IL-6R Ab significantly (~ 2 -fold) reduced Ad vector-mediated AST levels in the serum compared with PBS or the control Ab (Fig. 5A). Importantly, anti-IL-6R Ab injection did not interfere with luciferase production in the liver (Fig. 5B). These results suggest that IL-6 signaling is involved in liver toxicity after i.v. administration of an Ad vector.

Discussion

In this study we found that the fiber-modified Ad vector containing the K7 peptide, which has high affinity with heparin sulfate, shows much lower serum IL-6 and liver toxicity than the conventional Ad vector. This improved characteristic is likely involved with the reduced biodistribution of the vector to the spleen compared with that of the conventional Ad vector. RT-PCR analysis showed that the spleen, not the liver, is the major site of cytokine, chemokine, and IFN (IL-6, IL-12, TNF- α , RANTES, MIP-2, IFN- α , IFN- β , and IFN- γ) production and that splenic conventional DC are the major effector cells of the innate immune response (at least IL-6 and IL-12 production) after i.v. administration of Ad vectors. We also showed that IL-6 signaling is involved in part with liver toxicity in response to Ad vectors. Importantly, this fiber-modified Ad vector containing the K7 peptide maintained higher transduction efficiency in all the organs examined, and the liver transduction was higher than that of the conventional Ad vector. Although there have been some reports that modified Ad vectors such as the pe-

glylated Ad vector (18–21), the Ad vector containing the Ad type 35 fiber shaft and knob (40), and the triple mutant Ad vector with ablation of CAR, α_v integrin, and HSG binding (22) show decreased innate immune response and liver toxicity, these types of vector lose their transduction activity in vivo. To our knowledge, this is the first report of an Ad vector that maintains high transduction efficiency in vivo with reduced toxicity.

The fiber-modified Ad vector containing the K7 peptide has been developed to overcome the limitations imposed by the CAR dependence of Ad infection. Expanded and efficient gene transfer has been reported based on the use of mutant fiber proteins containing a stretch of lysine residues (23–25). However, there has been no report on the difference in gene transfer activity and toxicity in vivo between the conventional Ad vector and the fiber-modified Ad vector containing the K7 peptide. We have demonstrated that the fiber-modified Ad vector containing the K7 peptide mediates ~ 6 -fold higher mouse liver transduction in response to i.v. administration than the conventional Ad vector (Fig. 1A). The amounts of fiber-modified Ad vector DNA in the liver after i.v. administration were also 5-fold higher than those with the conventional Ad vector (Fig. 1B). It has been reported that the interaction between the Ad type 5 fiber and the HSG of a hepatocyte is involved in the accumulation in the mouse liver and the cynomolgus monkey liver of systemically administered Ad vectors (41, 42). This fiber-modified Ad vector might mediate more efficient gene transduction through a much higher affinity for HSG. In contrast, the amounts of fiber-modified Ad vector DNA in the spleen after i.v. administration were 56-fold lower than those of the conventional Ad vector (Fig. 1B). Biodistribution of viral DNA reflects the total of receptor-mediated uptake and nonspecific uptake. Luciferase production in the cells mainly reflects receptor-mediated uptake. We previously reported that most Ad DNAs are taken up in the liver nonparenchymal cells, not parenchymal cells, after i.v. administration (22). In this study, the conventional Ad vector would also be taken up in the macrophages and DC by nonspecific uptake, resulting in significantly higher Ad DNA and lower luciferase production in the spleen. In contrast, the fiber-modified Ad vector would be taken up more in the liver via receptor-mediated uptake and nonspecific uptake, resulting in significantly lower Ad DNA in the other organs, especially the spleen. Even though the amount of AdK7-L2 uptake in the spleen, heart, lung, and kidney was less than that of Ad-L2 uptake, the amount of receptor-mediated uptake in these organs would be similar between Ad-L2 and AdK7-L2, suggesting that these vectors showed similar levels of luciferase production in the organs other than the liver.

The initiation of inflammatory innate immune responses occurs after the systemic administration of Ad vectors to animals and humans, and this toxicity limits the utility of Ad vectors for gene therapy. Increased cytokine/chemokine production after the injection of Ad vectors has been reported to be due to the introduction of input Ad vectors to Kupffer cells in the liver and DC (15, 17, 43–46). Detailed analysis of the organs responsible for the expression of cytokines, chemokines, and IFNs by RT-PCR suggests that their production can mainly be attributed to spleen cells (especially splenic conventional DC), not liver cells (Figs. 3 and 4), which is consistent with the recent report of Bart et al. (47). Therefore, interference with spleen distribution of the Ad vector should provide a useful method for safer gene therapy.

TLRs, which are crucial to the recognition of pathogen-associated molecular patterns, are expressed on various types of immune cells including macrophages, DC, B cells, splenic types of T cells, and even on nonimmune cells such as fibroblasts and epithelial cells (48). For example, HSV and CMV (dsDNA virus) activate inflammatory cytokines and type I IFN secretion by the stimulation of TLR9 (49–53). The innate immune receptor to the Ad has not yet been identified. It has not even been determined whether TLRs are involved in Ad-mediated innate immune response *in vivo*, although it has been reported that TLR signals are not involved in the DC maturation induced by the Ad vector (46). As shown in Fig. 3B, cytokine production against the Ad vector occurred mainly in conventional DC. It is noted that the TLR9-mediated innate immunity responses to DNA virus are cell type-specific and limited to plasmacytoid DC (50). The unidentified sensor receptor(s) for double-stranded Ad DNA or Ad capsid protein in conventional DC might play a critical role in the expression of inflammatory cytokines/chemokines and type I IFN. Although we have previously reported that large amounts of conventional Ad vector accumulate in nonparenchymal cells, including Kupffer cells and liver sinusoidal (endothelial) cells (22, 54), the expression of mRNA of cytokines, chemokines, and IFNs in the liver was weak after administration of the Ad vector (Fig. 3B). A lack of putative sensor receptor(s) against Ad or the inability of sensor receptor(s) to recognize Ad due to the specific cellular disposition of Ad in Kupffer cells might result in a reduced production of cytokines/chemokines/IFNs in the liver.

Another interesting finding is that the fiber-modified Ad vector containing the K7 peptide showed almost background levels of AST activity, which reflects liver toxicity (Fig. 2B). Histological analysis supported this finding (Fig. 2C). Because the K7-modified Ad vector showed higher transgene activity and a higher accumulation of viral DNA into the liver (Fig. 1), the transduction and distribution of the vector into the liver did not participate in liver toxicity. The cytokines/chemokines play a major causative role in liver damage associated with systemic Ad infusion as well as in the induction of an antiviral immune response (2). Ad-induced cytokines/chemokines recruit immune effector cells (neutrophils, monocyte/macrophages, and NK cells) to Ad-transduced cells (mainly liver), resulting in acute hepatic toxicity. Shayakhmetov et al. (35) have reported that hepatocytes and Kupffer cells trigger IL-1 transcription in liver tissue after *i.v.* administration of Ad vectors and that interference of IL-1-signaling reduces liver toxicity. We speculated that IL-6 could be the main mediator for hepatic toxicity because IL-6 is one of the main cytokines in the early stages of inflammation, IL-6 production by the fiber-modified Ad vector was much reduced (approximately a quarter) compared with that by the conventional Ad vector, and all of the cytokines/chemokines/IFNs we examined (including IL-6) were mainly produced by the spleen, not the liver. Treatment of the anti-IL-6R Ab decreased liver toxicity (Fig. 5), suggesting that IL-6 plays at least

some role in liver toxicity induced by systemic injection of the Ad vector. Because the AST levels were only partially reduced by the treatment with the anti-IL-6R Ab, another mechanism such as IL-1 signaling, rapid Kupffer cell death (55, 56), activation of the liver endothelium (55), or other factors might be involved in the liver toxicity. Nevertheless, it is attractive that the K7-modified Ad vector did not show liver toxicity despite the higher transduction efficiency and higher accumulation of the vector into the liver (probably Kupffer cells).

Our present study provides new insight into the cellular biological mechanism related to the innate immune response and liver toxicity against the systemically administered Ad vector. Modification of vector tropism should contribute to safe gene therapy procedures.

Acknowledgments

We thank Misae Nishijima and Haiying Huang for their technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Muruve, D. A. 2004. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 15: 1157–1166.
- Nazir, S. A., and J. P. Metcalf. 2005. Innate immune response to adenovirus. *J. Investig. Med.* 6: 292–304.
- Yang, Y., H. C. Ertl, and J. M. Wilson. 1994. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1: 433–442.
- Yang, Y., F. A. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gonczol, and J. M. Wilson. 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4407–4411.
- Yang, Y., Q. Su, and J. M. Wilson. 1996. Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs. *J. Virol.* 70: 7209–7212.
- Morral, N., R. J. Parks, H. Zhou, L. C. G. Schiedner, J. Quinones, F. L. Graham, S. Kochanek, and A. L. Beaudet. 1998. High doses of a helper-dependent adenoviral vector yield supraphysiological levels of α_1 -antitrypsin with negligible toxicity. *Hum. Gene Ther.* 9: 2709–2716.
- Morsy, M. A., M. Gu, S. Motzel, J. Zhao, J. Lin, Q. Su, H. Allen, L. Franlin, R. J. Parks, F. L. Graham, S. Kochanek, A. J. Bett, and C. T. Caskey. 1998. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7866–7871.
- Schiedner, G., N. Morral, R. J. Parks, Y. Wu, S. C. Koopmans, C. Langston, F. L. Graham, A. L. Beaudet, and S. Kochanek. 1998. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 18: 180–183.
- Roberts, D. M., A. Nanda, M. J. Havenga, P. Abbink, D. M. Lynch, B. A. Ewald, J. Liu, A. R. Thorne, P. E. Swanson, D. A. Gorgone, et al. 2006. Hexon-chimeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature* 441: 239–243.
- Farina, S. F., G. P. Gao, Z. Q. Xiang, J. J. Rux, R. M. Burnett, M. R. Alvira, J. Marsh, H. C. Ertl, and J. M. Wilson. 2001. Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J. Virol.* 75: 11603–11613.
- Sakurai, F., H. Mizuguchi, and T. Hayakawa. 2003. Efficient gene transfer into human CD34⁺ cells by an adenovirus type 35 vector. *Gene Ther.* 10: 1041–1048.
- Vogels, R., D. Zuijdgheest, R. van Rijnsoever, E. Hartkoom, J. Damen, M. P. de Bethune, S. Kostense, G. Penders, N. Helmus, W. Koudstaal, et al. 2003. Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J. Virol.* 77: 8263–8271.
- Holterman, L., R. Vogels, R. van der Vlugt, M. Siewewerts, J. Grimbergen, J. Kaspers, E. Geelen, E. van der Helm, A. Lemckert, G. Gillissen, et al. 2004. Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J. Virol.* 78: 13207–13215.
- Liu, Q., and D. A. Muruve. 2003. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* 10: 935–940.
- Zhang, Y., N. Chirmule, G. P. Gao, R. Qian, M. Croyle, B. Joshi, J. Tazelaar, and J. M. Wilson. 2001. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol. Ther.* 3: 697–707.
- Clesham, G. J., P. J. Adam, D. Proudfoot, P. D. Flynn, S. Efstathiou, and P. L. Weissberg. 1998. High adenoviral loads stimulate NF- κ B-dependent gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Gene Ther.* 5: 174–180.
- Lieber, A., C. Y. He, L. Meuse, D. Schowalter, I. Kirilova, B. Winther, and M. A. Kay. 1997. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J. Virol.* 71: 8798–8807.

18. O'Riordan, C. R., A. Lachapelle, C. Delgado, V. Parkes, S. C. Wadsworth, A. E. Smith, and G. E. Francis. 1999. PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum. Gene Ther.* 10: 1349–1358.
19. Croyle, M. A., Q. C. Yu, and J. M. Wilson. 2000. Development of a rapid method for the PEGylation of adenoviruses with enhanced transduction and improved stability under harsh storage conditions. *Hum. Gene Ther.* 11: 1713–1722.
20. Croyle, M. A., H. T. Le, K. D. Linse, V. Cerullo, G. Toietta, A. Beaudet, and L. Pastore. 2005. PEGylated helper-dependent adenoviral vectors: highly efficient vectors with an enhanced safety profile. *Gene Ther.* 12: 579–587.
21. Mok, H., D. J. Palmer, P. Ng, and M. A. Barry. 2005. Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol. Ther.* 11: 66–79.
22. Koizumi, N., K. Kawabata, F. Sakurai, Y. Watanabe, T. Hayakawa, and H. Mizuguchi. 2006. Modified adenoviral vectors ablated for coxsackievirus-adenovirus receptor, α , integrin, and heparan sulfate binding reduce in vivo tissue transduction and toxicity. *Hum. Gene Ther.* 17: 264–279.
23. Wickham, T. J., E. Tzeng, L. L. Shears II, P. W. Roelvink, Y. Li, G. M. Lee, D. E. Brough, A. Lizonova, and I. Kovcsdi. 1997. Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J. Virol.* 71: 8221–8229.
24. Bouri, K., W. G. Feero, M. M. Myerburg, T. J. Wickham, I. Kovcsdi, E. P. Hoffman, and P. R. Clemens. 1999. Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction. *Hum. Gene Ther.* 10: 1633–1640.
25. Koizumi, N., H. Mizuguchi, N. Utoguchi, Y. Watanabe, and T. Hayakawa. 2003. Generation of fiber-modified adenovirus vectors containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. *J. Gene Med.* 5: 267–276.
26. Mizuguchi, H., N. Koizumi, T. Hosono, N. Utoguchi, Y. Watanabe, M. A. Kay, and T. Hayakawa. 2001. A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob. *Gene Ther.* 8: 730–735.
27. Maizel, J. V., D. O. White, and M. D. Scharff. 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36: 115–125.
28. Xu, Z.-L., H. Mizuguchi, A. Ishii-Watabe, E. Uchida, T. Mayumi, and T. Hayakawa. 2001. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 272: 149–156.
29. Huard, J., H. Lochmuller, G. Acsadi, A. Jani, B. Massie, and G. Karpati. 1995. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther.* 2: 107–115.
30. Wood, M., P. Perrotte, E. Onishi, M. E. Harper, C. Dinney, L. Pagliaro, and D. R. Wilson. 1999. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther.* 6: 367–372.
31. Worgall, S., G. Wolff, E. Falck-Pedersen, and R. G. Crystal. 1997. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum. Gene Ther.* 8: 37–44.
32. Liu, Q., A. K. Zaiss, P. Colarusso, K. Patel, G. Haljan, T. J. Wickham, and D. A. Muruve. 2003. The role of capsid-endothelial interactions in the innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 14: 627–643.
33. Schiedner, G., S. Hertel, M. Johnston, V. Dries, R. N. Van, and S. Kochanek. 2003. Selective depletion or blockade of Kupffer cells leads to enhanced and prolonged hepatic transgene expression using high-capacity adenoviral vectors. *Mol. Ther.* 7: 35–43.
34. Engler, H., T. Machemer, J. Philopena, S. F. Wen, E. Quijano, M. Ramachandra, V. Tsai, and R. Ralston. 2004. Acute hepatotoxicity of oncolytic adenoviruses in mouse models is associated with expression of wild-type E1a and induction of TNF- α . *Virology* 328: 52–61.
35. Shayakhmetov, D. M., Z. Y. Li, S. Ni, and A. Lieber. 2005. Interference with the IL-1-signaling pathway improves the toxicity profile of systemically applied adenovirus vectors. *J. Immunol.* 174: 7310–7319.
36. Castell, J. V., T. Geiger, V. Gross, T. Andus, E. Walter, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich. 1988. Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur. J. Biochem.* 177: 357–361.
37. Geiger, T., T. Andus, J. Klapproth, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich. 1988. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur. J. Immunol.* 18: 717–721.
38. Vink, A., P. Coulie, G. Warnier, J. C. Renauld, M. Stevens, D. Donckers, and J. Van Snick. 1990. Mouse plasmacytoma growth in vivo: enhancement by interleukin 6 (IL-6) and inhibition by antibodies directed against IL-6 or its receptor. *J. Exp. Med.* 172: 997–1000.
39. Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova, and K. C. Garcia. 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex. *Science* 300: 2101–2104.
40. Shayakhmetov, D. M., Z. Y. Li, S. Ni, and A. Lieber. 2004. Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J. Virol.* 78: 5368–5381.
41. Smith, T. A., N. Idamakanti, M. L. Rollence, J. Marshall-Neff, J. Kim, K. Mulgrew, G. R. Nemerow, M. Kaleko, and S. C. Stevenson. 2003. Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum. Gene Ther.* 14: 777–787.
42. Smith, T. A., N. Idamakanti, J. Marshall-Neff, M. L. Rollence, P. Wright, M. Kaloss, L. King, C. Mech, L. Dinges, W. O. Iverson, et al. 2003. Receptor interactions involved in adenoviral-mediated gene delivery after systemic administration in non-human primates. *Hum. Gene Ther.* 14: 1595–1604.
43. Schnell, M. A., Y. Zhang, J. Tazelaar, G. P. Gao, Q. C. Yu, R. Qian, S. J. Chen, A. N. Varnavski, C. LeClair, S. E. Raper, and J. M. Wilson. 2001. Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Mol. Ther.* 3: 708–722.
44. Morral, N., W. K. O'Neal, K. M. Rice, P. A. Piedra, E. Aguilar-Cordova, K. D. Carey, A. L. Beaudet, and C. Langston. 2002. Lethal toxicity, severe endothelial injury, and a threshold effect with high doses of an adenoviral vector in baboons. *Hum. Gene Ther.* 13: 143–154.
45. Reid, T., E. Galanis, J. Abbruzzese, D. Sze, L. M. Wein, J. Andrews, B. Randlev, C. Heise, M. Uprichard, M. Hatfield, et al. 2002. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res.* 62: 6070–6079.
46. Philpott, N. J., M. Nociari, K. B. Elkon, and E. Falck-Pedersen. 2004. Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF- α induction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6200–6205.
47. Bart, D. G., S. Jan, V. L. Sophie, L. Joke, and C. Desire. 2005. Elimination of innate immune responses and liver inflammation by PEGylation of adenoviral vectors and methylprednisolone. *Hum. Gene Ther.* 16: 1439–1451.
48. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
49. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 513–520.
50. Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 11416–11421.
51. Krug, A., A. R. French, W. Barchet, J. A. Fischer, A. Dzieonek, J. T. Pingel, M. M. Orihuela, S. Akira, W. M. Yokoyama, and M. Colonna. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21: 107–119.
52. Krug, A., G. D. Luker, W. Barchet, D. A. Leib, S. Akira, and M. Colonna. 2004. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103: 1433–1437.
53. Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, et al. 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3516–3521.
54. Koizumi, N., H. Mizuguchi, F. Sakurai, T. Yamaguchi, Y. Watanabe, and T. Hayakawa. 2003. Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and α , integrin-binding ablation. *J. Virol.* 77: 13062–13072.
55. Schiedner, G., W. Bloch, S. Hertel, M. Johnston, A. Molodtsov, V. Dries, G. Varga, N. Van Rooijen, and S. Kochanek. 2003. A hemodynamic response to intravenous adenovirus vector particles is caused by systemic Kupffer cell-mediated activation of endothelial cells. *Hum. Gene Ther.* 14: 1631–1641.
56. Manickan, E., J. S. Smith, J. Tian, T. L. Eggerman, J. N. Lozier, J. Muller, and A. P. Byrnes. 2006. Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors. *Mol. Ther.* 13: 108–117.

Post-transcriptional downregulation of sarcolipin mRNA by triiodothyronine in the atrial myocardium

Susumu Minamisawa^{a,*}, Nobuyuki Uemura^{a,b}, Yoji Sato^c, Utako Yokoyama^a, Teruhide Yamaguchi^c, Kazuhide Inoue^c, Masamichi Nakagome^a, Yunzhe Bai^a, Hideaki Hori^a, Mitsuyuki Shimizu^b, Seibu Mochizuki^b, Yoshihiro Ishikawa^{a,d}

^a Department of Physiology, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan

^b Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

^c Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^d Departments of Medicine (Cardiology) and Cell Biology and Molecular Medicine, Cardiovascular Research Institute, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, 185 South Orange Avenue, MSB G611, Newark, NJ 07101, USA

Received 15 February 2006; accepted 9 March 2006

Available online 20 March 2006

Edited by Veli-Pekka Lehto

Abstract Thyroid hormone-mediated positive cardiotropic effects are differently regulated between the atria and ventricles. This regulation is, at least in part, dependent on sarcoplasmic reticulum (SR) proteins. Sarcolipin, a homologue of phospholamban, has been recently identified as an atrium-specific SR protein. The expression of sarcolipin mRNA was significantly decreased in the atria of mice with hyperthyroidism and in 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-treated neonatal rat atrial myocytes. Promoter activity and mRNA stability analyses revealed that thyroid hormone post-transcriptionally downregulated the expression of sarcolipin mRNA. The atrium-specific effect of thyroid hormone may occur in part through the regulation of atrial sarcolipin gene expression.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Thyroid hormone; Calcium; Gene expression; Cardiomyocyte; Sarcoplasmic reticulum

adrenergic signaling, and myofibrillar organization. In addition to its physiological role, the excess of thyroid hormone, or the state of “hyperthyroidism”, often induces pathological changes in the heart such as cardiac hypertrophy, sinus tachycardia and atrial arrhythmias including atrial fibrillation. The prevalence of atrial arrhythmias is much higher than that of ventricular arrhythmias in patients with hyperthyroidism, indicating that the atrial myocardium is more susceptible to rhythm disturbance by the excess of thyroid hormone than the ventricular myocardium. In this regard, it has been known that the responses to thyroid hormone differ between the atria and ventricles [2–4]. Kaasik et al. demonstrated that thyroid hormone activated sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ ATPase (SERCA) more in the atria than in the ventricles [3]. Shenoy et al. showed that the Ca²⁺ transporter proteins were differently regulated in the atria and the ventricles [4]. Several recent studies have suggested that abnormal intracellular Ca²⁺ homeostasis and perturbations in Ca²⁺ cycling play an important role in atrial fibrillation-induced atrial remodeling [5,6]. Therefore, the differential effect of thyroid hormone on the proteins involved in Ca²⁺ cycling may account for the occurrence of atrial rather than ventricular arrhythmias.

We have found that sarcolipin (SLN), a homologue of phospholamban (PLN), is specifically expressed in the atrial myocardium and skeletal muscle, but not in the ventricular myocardium [7]. SLN interacts with SERCA and regulates excitation–contraction coupling in the atrial and skeletal muscles [8]. Accordingly, SLN may play an important role in characterizing the chamber-specific physiological properties of the atria. The atrial chamber-specific expression of SLN could be primarily regulated at the transcriptional level. Our previous studies have demonstrated that SLN mRNA expression is increased during development, and decreased by hypertrophic remodeling of the atria [7,9] as well as in patients with atrial fibrillation [10]. However, the effect of thyroid hormone on the transcriptional regulation of the SLN gene in the heart has not been investigated, although thyroid hormone is known to regulate the transcription of the SR genes such as PLN and cardiac SERCA2 isoform (SERCA2a) in the heart [11–13]. In the present study, we examined the effect of thyroid hormone on the transcription of SLN gene in the atrial tissue and myocytes.

1. Introduction

Thyroid hormone plays an important role in normal cardiovascular development and exerts positive inotropic, lusitropic, and chronotropic effects on the heart [1]. These effects are mediated in part by regulating the transcription of the genes encoding proteins involved in Ca²⁺ cycling, ion transport, β-

*Corresponding author. Fax: +81 45 788 1470.

E-mail address: sminamis@med.yokohama-cu.ac.jp (S. Minamisawa).

Abbreviations: ANF, atrial natriuretic factor; CSQ2, cardiac caldesmon; EDD, end-diastolic left ventricular dimension; ESD, end-systolic left ventricular dimension; %FS, percent fractional shortening; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IVS, interventricular wall thickness; LVPW, left ventricular posterior wall thickness; MLC2a, atrial myosin light chain 2; NCX1, cardiac sodium calcium exchanger; PLN, phospholamban; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; RyR2, cardiac ryanodine receptor; SERCA, SR Ca²⁺-ATPase; SLN, sarcolipin; SR, sarcoplasmic reticulum; T3, 3,5,3'-triiodo-L-thyronine; TR, thyroid hormone receptor; TRE, thyroid hormone response element

2. Materials and methods

2.1. Animals

All treatments were approved by the Animal Protocol Committee of Yokohama City University School of Medicine. Hyperthyroidism was induced in ddY mice (Nippon SLC Inc.) at 6.5 weeks of age ($n = 5$) by intraperitoneally injecting 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) at a dose of 2 $\mu\text{g/g}$ body weight/day for 4 weeks. Hypothyroidism was induced in ddY mice at 3 weeks of age ($n = 5$) by feeding the animals with a 0.05% 5-propyl-2-thiouracil (PTU)-containing water for 8 weeks. Non-treated (euthyroid) mice ($n = 5$) were bred for the same period.

2.2. Transthoracic echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed as previously described [14].

2.3. Cell culture and stimulation with T3

Neonatal rat atrial myocytes were prepared as the same method described previously for neonatal rat ventricular myocytes [15]. Cardioblast H9C2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1% fetal calf serum (FCS) for 7 days after confluence. Neonatal rat atrial myocytes and H9C2 cells were treated with 1 nM of T3 for 24 h, and were then collected.

2.4. Northern blot and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses

Isolation of total RNA and Northern blot analysis were performed as previously described with modification [7,9,16]. Mouse cDNA probes including the SLN gene were used as reported previously [9]. The quantitative RT-PCR was performed by using SYBR Green PCR reagents (Applied Biosystems) as previously described [10]. The forward and reverse primer sequences of SLN were 5'-CTGAGG-TCCCTTGAGCCTG-3' and 5'-GGTGTGTCAGGCATTGTGAG-3', respectively.

2.5. Cloning of mouse sarcolipin promoter

During the present study was prepared, the genomic sequence of mouse chromosome 9 including 5' flanking sequence of the SLN gene has been published (NCBI Accession No.: NT_039474). The primers for PCR amplification of 5' flanking sequence of the SLN gene were designed as based on the nucleotide sequence (forward: 5'-CAGCT-AACCAGGCACAACAA-3', reverse: 5'-CACTCAGGCTACCAAG-GACC-3'). A 2299-bp fragment between -2237 of the 5' flanking sequence and +62 of the non-coding exon 1 of the SLN gene was amplified and was subcloned into a pDrive vector (Qiagen). The nucleotide sequence was confirmed by direct DNA sequencing.

2.6. Promoter activity assay

The 2299-bp and fragments of the SLN promoter region was cloned into the promoter-less firefly luciferase expression vector, pGL3-Basic (Promega). This construct was named -2237/SLNluc. A shorter construct, -563/SLNluc, containing 563 upstream nucleotides from the putative transcriptional start site was made by self-ligation after digestion of *MluI* restriction enzyme. Neonatal rat atrial myocytes were incubated with serum-free medium for 24 h and then they were transiently co-transfected with 300 ng of each SLN promoter luciferase test plasmid and 75 ng of pRL-TK control plasmid (Promega), using FuGene 6 (Roche). Three hours after the transfection, the myocytes were incubated with or without T3 (1 nM) for 24 h, and the luciferase activity was measured with Dual-Luciferase Reagents (Promega).

2.7. mRNA stability assay

To determine whether T3 alters SLN mRNA stability, H9C2 cells were treated with 5 $\mu\text{g/ml}$ actinomycin D, a blocker for transcription, in the presence or absence of 1 nM T3 for up to 8 h. At the indicated times, total cellular RNA was prepared and analyzed by quantitative RT-PCR analysis.

2.8. SERCA activity

SERCA activity was measured as previously described [7].

2.9. Statistics

Data are expressed as means \pm S.E.M. Differences were considered significant at $P < 0.05$ (one- or two-way ANOVA with Student–Newman–Kuel's post hoc test).

3. Results

3.1. The expression of SLN mRNA was decreased in the atria of hyperthyroid mice

Serum concentrations of free triiodothyronine were >32.6 , 2.75 ± 0.17 , and 1.71 ± 0.12 pg/ml in hyperthyroid, euthyroid and hypothyroid mice, respectively. Hyperthyroidism was associated with significant increases in the left ventricle/body weight ratio and the atria/body weight ratio when compared with euthyroid mice (Fig. 1A and B). Transthoracic echocardiography revealed that heart rate, LV chamber size and LV ventricular wall thickness were significantly increased in hyperthyroid mice when compared with those in euthyroid mice (Fig. 1C–E). However, these parameters except heart rate were not different between hypothyroid and euthyroid mice (Fig. 1). Percent fractional shortening (%FS) was not different among three groups (Fig. 1F).

The expression of SLN mRNA was significantly decreased in the atria of the hyperthyroid mice when compared with both euthyroid and hypothyroid mice (Fig. 2A and B). The expression of SLN mRNA was slightly higher in the hypothyroid atria than the euthyroid atria, although the difference did not reach statistical significance. No SLN transcript was detected in the ventricles of both hyperthyroid and hypothyroid mice (data not shown). The expression levels of PLN, SERCA2a, cardiac sodium calcium exchanger (NCX1), RyR2, CSQ2, ANF and atrial myosin light chain 2 (MLC2a) mRNAs were also examined in these atria. We found that the expression level of PLN (Fig. 2C) and MLC2a (data not shown) RNAs were significantly decreased in the hyperthyroid mice.

SERCA activity in the hyperthyroid atria ($n = 4$) was significantly higher than that in the euthyroid atria ($n = 4$) (590 ± 66 nmol/mg protein/min and 270 ± 66 nmol/mg protein/min, respectively). SR Ca^{2+} ATPase activity was much higher in the atria than that in the ventricles (hyperthyroid: 142 ± 25 nmol/mg protein/min; euthyroid: 56 ± 20 nmol/mg protein/min).

3.2. Thyroid hormone downregulated the expression of SLN in neonatal rat atrial myocytes

To avoid a secondary effect of thyroid state-mediated hemodynamics on the expression of SLN mRNA, we examined the effect of T3 in cultured neonatal rat atrial myocytes. T3 decreased the expression of SLN mRNA by 20% ($P < 0.05$) in neonatal rat atrial myocytes that did not exhibit a significant enlargement in size, whereas T3 increased the expression levels of SERCA2a and NCX1 mRNAs by 80% ($P < 0.001$) and 37% ($P < 0.01$), respectively (Fig. 3A and B). PLN mRNA was undetectable in neonatal rat atrial myocytes in our experiments.

3.3. Thyroid hormone treatment did not suppress the SLN transcriptional activity, but accelerated SLN mRNA degradation

Transfection with -2237/SLNluc or -563/SLNluc resulted in a 40-fold increase in transcriptional activity in neonatal

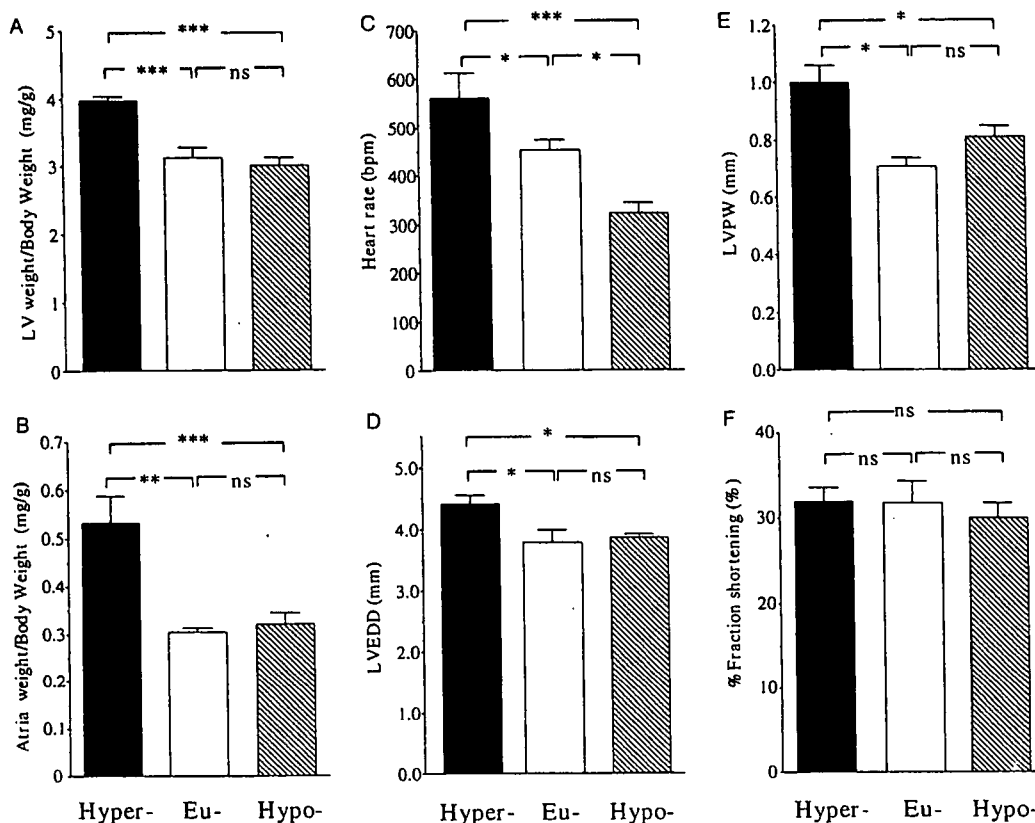


Fig. 1. Cardiac morphology and function in hyperthyroid and hypothyroid mice. (A) Left ventricle/body weight ratio; (B) atria/body weight ratio; (C) heart rate; (D) left ventricular end-diastolic diameter (EDD); (E) left ventricular posterior wall thickness (LVPW); (F) percent fractional shortening (%FS). The left ventricle/body weight ratio and the atria/body weight ratio were significantly increased in hyperthyroid mice. Transthoracic echocardiography revealed that heart rate, EDD and LVPW were significantly increased in hyperthyroid mice, whereas %FS was not different among three groups.

rat atrial myocytes when compared with an empty luciferase control plasmid. The transcriptional activity, however, was not changed in the presence or absence of T3 (Fig. 4A). We then examined the effect of T3 on SLN mRNA stability in H9C2 cells in the presence or absence of T3. The decay of SLN mRNA levels was greater in H9C2 cells in the presence of T3 for 4 and 8 h after actinomycin D treatment (Fig. 4B).

4. Discussion

The present *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that thyroid hormone decreased the expression of SLN mRNA in the atrial tissue and myocytes. To our knowledge, this is the first report showing that the expression of the SLN gene are regulated by thyroid hormone. Thyroid hormone binds to high-affinity nuclear receptors that consist of thyroid hormone response elements (TREs), resulting in activating or repressing gene transcription. The thyroid hormone repressed-genes generally contain one or more negative TREs. In the present study, we found four putative TREs in the SLN promoter region between -2237 of the 5' flanking sequence and +62 of the partial non-coding exon 1 of the SLN gene. However, our data indicated that these TREs were not responsible for the suppressive SLN transcription by thyroid hormone. Instead, we found that thyroid hormone accelerated the decay of the expression of SLN mRNA, suggesting that thyroid hormone

altered SLN mRNA stability and thus increased its degradation. In this regard, a number of studies have demonstrated that thyroid hormone post-transcriptionally downregulates the expression of several genes [17,18]. The *in vitro* study described here indicated that T3 (1 nM) was sufficient to decrease the SLN transcripts in cultured neonatal rat atrial myocytes, where the stresses such as tachycardia and increased afterload due to ventricular hypertrophy were eliminated. Therefore, we think that the excess of thyroid hormone directly downregulates the expression of SLN mRNA. However, the depressing effect of T3 on SLN mRNA levels on *in vitro* neonatal atrial cardiomyocytes was much less pronounced than the *in vivo* atrial tissues. Accordingly, we have demonstrated that local pressure overload or atrial fibrillation decreases the expression of SLN mRNA in the atria [9,10]. Since the hyperthyroid mice investigated here displayed cardiac hypertrophy and sinus tachycardia, we postulated that these stresses augmented the decrease in the expression of SLN mRNA in the *in vivo* atria.

On the other hand, the present study demonstrated that the hypothyroid mice exhibited no change in cardiac morphology and function except slower heart rates. Accordingly, we found that the expression of SLN mRNA was not significantly increased in the atria of hypothyroid mice. We assume that the expression of SLN mRNA would reach the maximal level in the adult atria even in the euthyroid state and that a decrease in thyroid hormone does not enhance SLN mRNA stability. There is an alternative possibility that the intensity and dura-

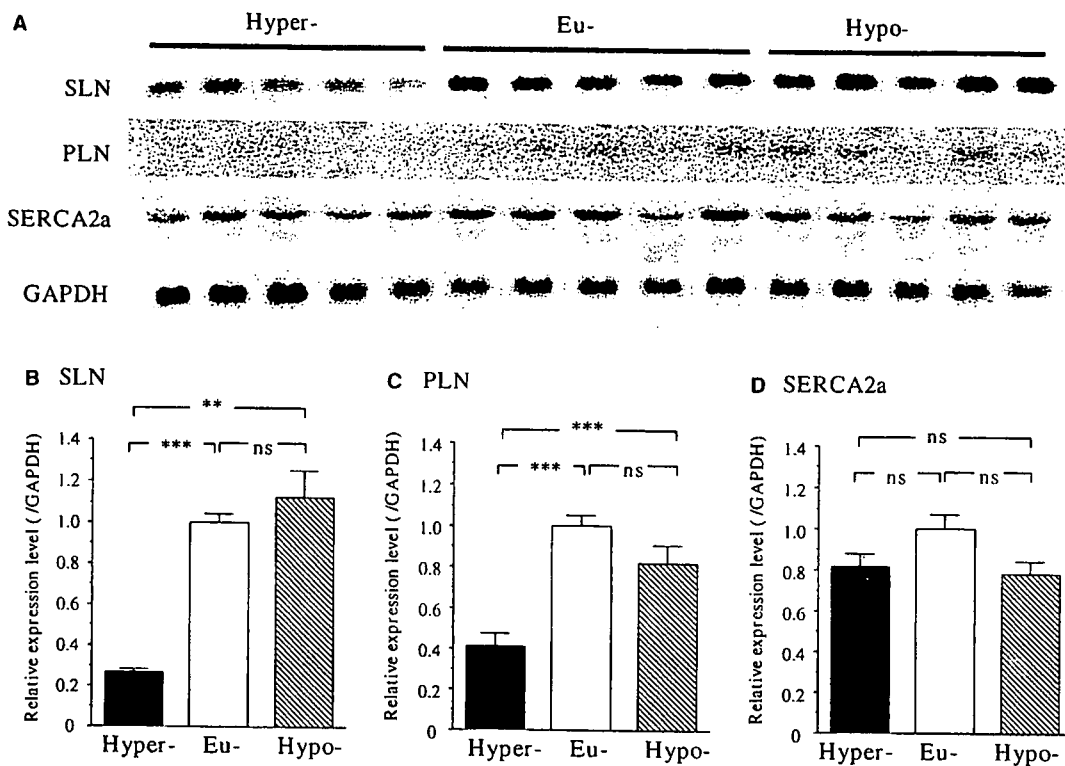


Fig. 2. The expression of SLN mRNA was decreased in the atrial myocardium of the hyperthyroid mice. (A) The raw data of the expression of SLN mRNA by Northern blot analysis. Ten μg of total RNA was loaded per lane. (B–D) The summary of Northern blot analyses. The expression levels of SLN and PLN mRNAs were significantly decreased in the atria of the hyperthyroid mice (Hyper-) when compared with euthyroid and hypothyroid mice (Eu- and Hypo-, respectively). The expression levels of SERCA2a mRNA were not different between three groups. Each signal intensity was standardized by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) used as an internal control. The data are presented as means \pm S.E.M. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant.

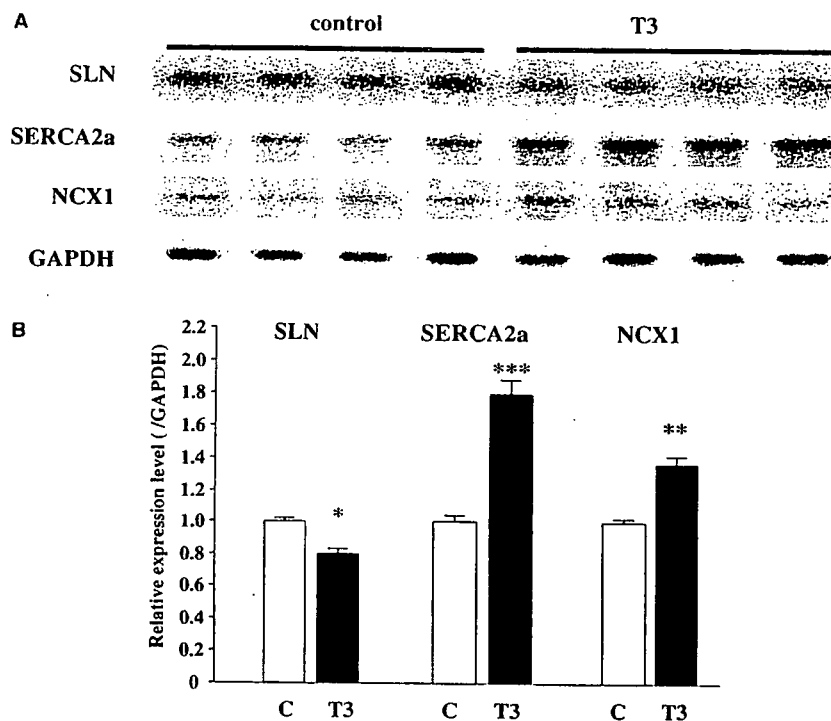


Fig. 3. Thyroid hormone treatment decreased the expression of SLN mRNA in neonatal rat atrial myocytes. (A) The raw data of the expression of SLN mRNA by Northern blot analysis. Ten μg of total RNA was loaded per lane. (B) The summary of Northern blot analyses. The expression level of SLN mRNA was significantly decreased in neonatal rat atrial myocytes in the presence of T3 (T3), whereas the expression levels of SERCA2a and NCX1 mRNAs were significantly increased by T3. Each signal intensity was standardized by GAPDH used as an internal control. The data are presented as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (C) Control myocytes in the absence of T3.

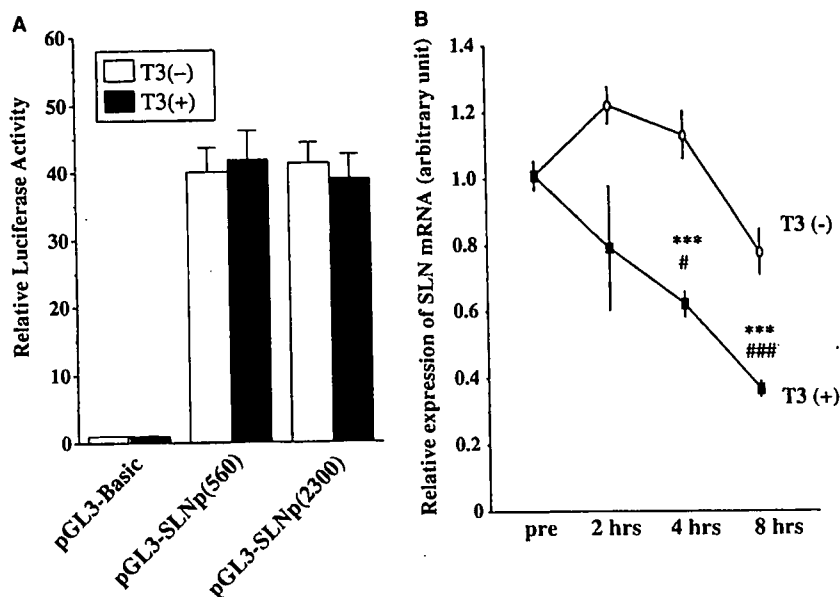


Fig. 4. Thyroid hormone treatment accelerated the decay of SLN mRNA. (A) The relative luciferase activity of the mouse SLN promoter in neonatal rat atrial myocytes. (B) The relative expression of SLN mRNA in H9C2 cells treated by actinomycin D. The luciferase activity was not changed in the presence or absence of T3. The decay of SLN mRNA levels was greater in H9C2 cells in the presence of T3 for 4 and 8 h after actinomycin D treatment. The data are presented as means \pm S.E.M. *** P < 0.001 versus T3(-). # and ###, P < 0.05 and P < 0.001 versus pre, respectively.

tion of the hypothyroid state were not enough to increase the expression of SLN mRNA in the present study.

A large body of evidence has indicated that thyroid hormone plays an important role in the expression of the SR Ca^{2+} genes [19–21]. It has been known well that PLN is downregulated by thyroid hormone, which was confirmed in the atria by the present study. The downregulation of PLN mRNA contributes to the positive inotropic effects mediated by thyroid hormone treatment. Like PLN, SLN also inhibits SERCA2a function and reduces SR Ca^{2+} stores [22]. Accordingly, the atrial tissues may be more sensitive to the stimulation of thyroid hormone than the ventricular tissues because of a decrease in SLN expression in addition to a decrease in PLN. It is of great interest that the downregulation of SLN mRNA by thyroid hormone would result in a decrease in SLN protein in the atria. In the present study, we could not show it, because it is difficult to obtain a SLN antibody probably due to the very short cytoplasmic region of the structure. Further investigation will be required to clarify whether thyroid hormone-mediated downregulation of SLN mRNA increases Ca^{2+} uptake in the atria and thus function.

In conclusion, the SLN transcripts in the atrial tissue and myocytes were post-transcriptionally downregulated by thyroid hormone. The atrium-specific effect of thyroid hormone may occur, at least in part, through the regulation of atrial SLN gene expression.

Acknowledgments: We are grateful to Tamayo Masuda, Mayumi Watanabe, and Qi Bin Jiao for excellent technical assistance. This work was supported in part by the Yokohama Foundation for Advanced Medical Science (to N. Uemura, S. Minamisawa and Y. Ishikawa), the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (to S. Minamisawa), the Vehicle Racing Commemorative Foundation (to S. Minamisawa), National Institute of Biomedical Innovation Grant MF-16, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (to Y. Sato), and the Japan–Korea Basic Scientific Cooperation Program (S. Minamisawa and Y. Sato).

References

- [1] Klein, I. and Ojamaa, K. (2001) Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.* 344, 501–509.
- [2] Izumo, S., Lompre, A.M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B. and Mahdavi, V. (1987) Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J. Clin. Invest.* 79, 970–977.
- [3] Kaasik, A., Minajeva, A., Paju, K., Eimre, M. and Seppet, E.K. (1997) Thyroid hormones differentially affect sarcoplasmic reticulum function in rat atria and ventricles. *Mol. Cell Biochem.* 176, 119–126.
- [4] Shenoy, R., Klein, I. and Ojamaa, K. (2001) Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281, H1690–H1696.
- [5] Ohkusa, T., Ueyama, T., Yamada, J., Yano, M., Fujumura, Y., Esato, K. and Matsuzaki, M. (1999) Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulatory proteins in the atrial tissue of patients with chronic atrial fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 255–263.
- [6] Van Gelder, I.C. et al. (1999) Alterations in gene expression of proteins involved in the calcium handling in patients with atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10, 552–560.
- [7] Minamisawa, S., Wang, Y., Chen, J., Ishikawa, Y., Chien, K.R. and Matsuoka, R. (2003) Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *J. Biol. Chem.* 278, 9570–9575.
- [8] MacLennan, D.H., Asahi, M. and Tupling, A.R. (2003) The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 986, 472–480.
- [9] Shimura, M., Minamisawa, S., Yokoyama, U., Umemura, S. and Ishikawa, Y. (2005) Mechanical stress-dependent transcriptional regulation of sarcolipin gene in the rodent atrium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 861–866.
- [10] Uemura, N. et al. (2004) Down-regulation of sarcolipin mRNA expression in chronic atrial fibrillation. *Eur. J. Clin. Invest.* 34, 723–730.
- [11] Kiss, E., Jakab, G., Kranias, E.G. and Edes, I. (1994) Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and myocardial relaxation. *Circ. Res.* 75, 245–251.

- [12] Khoury, S.F., Hoit, B.D., Dave, V., Pawloski-Dahm, C.M., Shao, Y., Gabel, M., Periasamy, M. and Walsh, R.A. (1996) Effects of thyroid hormone on left ventricular performance and regulation of contractile and Ca²⁺-cycling proteins in the baboon. Implications for the force-frequency and relaxation-frequency relationships. *Circ. Res.* 79, 727–735.
- [13] Holt, E., Sjaastad, I., Lunde, P.K., Christensen, G. and Sejersted, O.M. (1999) Thyroid hormone control of contraction and the Ca²⁺-ATPase/phospholamban complex in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 645–656.
- [14] Yoshida, M. et al. (2005) Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 280, 3500–3506.
- [15] Minamisawa, S., Sato, Y., Tatsuguchi, Y., Fujino, T., Imamura, S., Uetsuka, Y., Nakazawa, M. and Matsuoka, R. (2003) Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 1–4.
- [16] Minamisawa, S., Gu, Y., Ross Jr., J., Chien, K.R. and Chen, J. (1999) A post-transcriptional compensatory pathway in heterozygous ventricular myosin light chain 2-deficient mice results in lack of gene dosage effect during normal cardiac growth or hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 274, 10066–10070.
- [17] Kenessey, A. and Ojamaa, K. (2005) Ligand-mediated decrease of thyroid hormone receptor- α 1 in cardiomyocytes by proteasome-dependent degradation and altered mRNA stability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H813–H821.
- [18] Fukuyama, K. et al. (2003) Downregulation of vascular angiotensin II type 1 receptor by thyroid hormone. *Hypertension* 41, 598–603.
- [19] Kolar, F., Seppet, E.K., Vetter, R., Prochazka, J., Grunermel, J., Zilmer, K. and Ostadal, B. (1992) Thyroid control of contractile function and calcium handling in neonatal rat heart. *Pflugers Arch.* 421, 26–31.
- [20] Carr, A.N. and Kranias, E.G. (2002) Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid* 12, 453–457.
- [21] Dillmann, W.H. (2002) Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 12, 447–452.
- [22] Tupling, A.R., Asahi, M. and MacLennan, D.H. (2002) Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and impairs contractile function. *J. Biol. Chem.* 277, 44740–44746, (Epub 2002 Sep 16).

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臨床上の安全性、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、遺伝子治療をめぐる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、

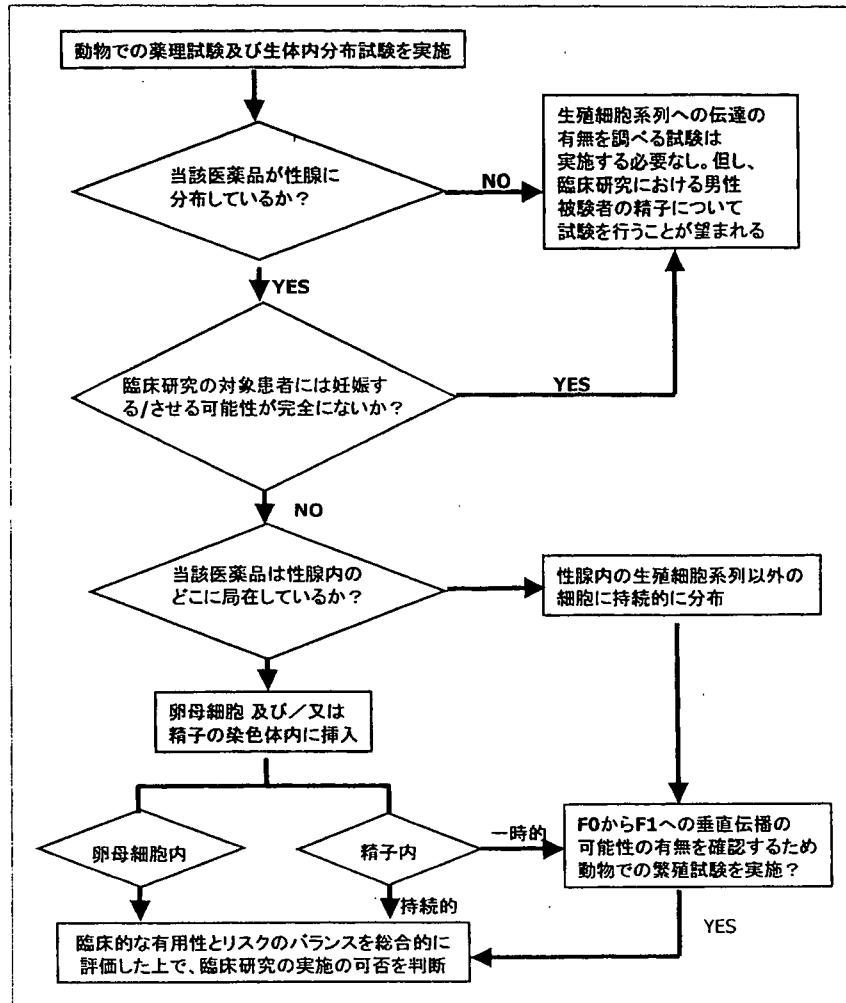


図1 遺伝子治療薬の生殖細胞系列への伝達の有無を調べるための動物試験のプロ-案)

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。



▶ 医薬品各条の改正点

生物薬品

山口 照英

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長

生物薬品の各条新規収載品目 および改正品目

生物薬品委員会の医薬品各条関係では、たん白質性/ペプチド性および高分子多糖性の新規収載品目の審議および既収載品目についての改正作業を行ってきた。

第十四改正日本薬局方(十四局)第一追補, 第二追補を経て, 第十五改正日本薬局方(十五局)に至るまで, 新規収載品目は8品目, 改正は9品目であった(表1)。これらのうち, 第十四改正日本薬局方第一追補(十四局第一追補)にはリゾチーム塩酸塩(十四局第一追補では塩化リゾチームとして収載)が新規収載された。第十四局改正日本薬局方第二追補(十四局第二追補)では, オキシトシン, セラペプターゼの新規収載が行われるとともに, オキシトシン注射液, カリジノゲナーゼ, パソプレシン注射液, ヘパリンナトリウム, ヘパリ

表1 生物薬品の各条新規収載品目および改正品目

新規収載品目	改正品目
リゾチーム塩酸塩	カリジノゲナーゼ
ゴナドレリン酢酸塩	オキシトシン注射液
セラペプターゼ	血清性性腺刺激ホルモン
バルナバリンナトリウム	注射用血清性性腺刺激ホルモン
オキシトシン	絨毛性性腺刺激ホルモン
セルモロイキン	注射用絨毛性性腺刺激ホルモン
テセロイキン	パソプレシン注射液
注射用テセロイキン	ヘパリンナトリウム
	ヘパリンナトリウム注射液

ンナトリウム注射液, 血清性性腺刺激ホルモン, 注射用血清性性腺刺激ホルモン, 絨毛性性腺刺激ホルモン(十四局第二追補では胎盤性性腺刺激ホルモンとして収載), 注射用絨毛性性腺刺激ホルモン(十四局第二追補では注射用胎盤性性腺刺激ホルモンとして収載)の改正が行われた。

生物薬品委員会の局方収載における各条審議のポイントと基本方針

生物薬品委員会の局方収載における各条審議は, 表2にあげた基本方針に沿って行った。これらの基本方針は, 十四局収載における基本方針に準じている。

④ 合理性に基づく規格および試験方法の設定

生物薬品の各条における試験項目や規格値の設定においては, ①品質の恒常性維持, ②科学の進歩に即応した品質確保, 品質管理, ③後続品に対する品質基準の規範となる規格・試験法の設定, ④同一原理の試験項目を重複させないなど, 設定する各条ごとに合理性に基づく試験項目の設定, ⑤簡便で精度の高い試験法への変更, ⑥実測値に基づいた規格値の設定などの観点から審議を行うこととした。

表2 生物薬品委員会の各条審議の基本方針

<p>1) 各条全体としての合理性に基づく規格および試験方法の設定</p> <p>2) 範囲のある含量規格の設定</p> <p>3) 性状の溶解性試験の見直し</p> <p>4) 試験動物の使用削減の観点からみた合理的試験法の設定</p> <p>① バイオアッセイ法から理化学的試験法や免疫化学的方法への移行</p> <p>② ヒスタミンおよびヒスタミン様物質、異常毒性否定試験などの設定の意義および必要性の見直し</p> <p>③ 毒性試験の設定の意義および必要性の見直し</p> <p>④ 発熱性物質試験のエンドトキシン試験への切り替え</p> <p>5) 比活性の独立示性値としての設定</p> <p>6) 純度試験などに液体クロマトグラフィー法の積極的活用、電気泳動法で試験を実施する際の検出感度の保証</p> <p>7) 血液凝固性物質、血液型物質などの設定の意義および必要性の見直し</p> <p>8) 同種同効医薬品の収載にあたっての調和</p>
--

② 範囲のある含量規格の設定

酵素製剤などの原薬については、単位質量当たりの活性について、上限値と下限値を設定する。このことにより、品質の恒常性の確保を目指す。

③ 性状の溶解性試験の見直し

たん白質やペプチド医薬品の特性から、有機溶媒などへの溶解性に関して、意義の乏しいものは削除することとし、合理的な性状を規定する。

④ 試験動物の使用削減の観点からの合理的試験法の設定

動物福祉やより合理的な試験法の採用を行うとの観点から、*in vivo*アッセイ法から*in vitro*アッセイ法や理化学的試験法などへの移行を図る。ヒスタミンやヒスタミン様物質試験や異常毒性否定試験などは、設定の意義や必要性を見直すこととした。発熱性物質試験からエンドトキシン試験への切り替えを進める。

⑤ 比活性の独立示性値としての設定

比活性は製品の特性を示す値であることから、純度試験として設定するのではなく、独立した示性値として設定することにした。

⑥ 純度試験などに液体クロマトグラフィー法の積極的活用、電気泳動法で試験を実施する際の検出感度の保証

液体クロマトグラフィー法などの技術進歩が著しいことから、純度試験などに積極的に活用していくこととした。その際、検出感度を設定し、保証していくことにした。

⑦ 血液凝固性物質、血液型物質などの設定の意義および必要性の見直し

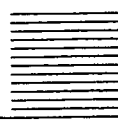
血液凝固物質や血液型物質の混入に関する試験項目については、起源からみて混入の可能性のないものについては見直すこととした。

⑧ 同種同効医薬品の収載にあたっての調和

インスリンや成長ホルモンなどの同種同効医薬品の収載にあたっては、試験項目や規格値について、合理的な場合に調和を図ることとした。

新規収載候補品目の策定

上記の十五局の収載方針の策定と並行して、継続審議中の各条審議に加えて、新規収載候補品目の策定を行った。候補品目の策定



にあたっては、保険医療上重要な医薬品としてオーファンドラッグの指定を受けた医薬品や市場で広く使用されている医薬品、さらには米国薬局方(USP)や欧州薬局方(EP)に掲載されているなど国際的にも広く使用されている医薬品から、候補とすべき品目を選定した。さらに、標準品の策定が可能な医薬品を候補品目とすることにし、20品目を新規収載候補品目とした。十五局では、このうちバルナパリンナトリウム、セルモロイキン、テセロイキンが収載されることになった。

収載品目別の概説と審議の経緯の要点

㊦ リゾチーム塩酸塩

リゾチームはムコ多糖分解作用をもつ酵素であり、溶菌活性を示す。リゾチーム塩酸塩の本質はニワトリ卵白より精製される塩基性ポリペプチドである。消炎酵素剤として用いられ、単味あるいは感冒薬に配合して用いられている。さらに、歯科領域などの小手術の止血時、点眼剤として慢性結膜炎、外用剤として皮膚科医用などにも幅広く臨床使用されている。

リゾチーム塩酸塩は医療用、一般用として広く使用され、品目数としても多数に上っている。日本薬局方外医薬品規格(局外規)に収載されていた品目であり、第十四局第一追補に収載された。

基原、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法を規定した。性状についてはエーテルへの溶解性の情報は意義が乏しいことから、水およびエタノールへの溶解性を記載することとした。確認試験では、ニンヒドリンによる呈色反応および参照スペクトルとの一致を規定した。純度試験として、局外規では、溶状、重金属、ヒ素、および窒

素を規定していたが、製造工程からヒ素を規定する意義は乏しいとして、原案ではヒ素の規定を除くことが提案された。審議の結果、ヒ素を規定する必要はないとされた。一方、窒素については示性値として設定すべきとして、純度試験から独立した示性値として規定することとし、幅をもつ規格値とした。定量法としては、迅速分析法の記載に従い *Micrococcus luteus* を基質として、その溶菌活性で規定することとした。局外規では、同様に溶菌活性を指標とする定量法を採用していたが、反応停止法が規定されていなかった。そこで、定量法として反応停止を含めて規定することにより、より精度の高い試験法を採用することとした。保存条件としては、気密容器で保存可能であり、冷所などの温度規定は必要とされた。

㊦ ゴナドレリン酢酸塩

ゴナドレリン酢酸塩は、ゴナドトロピン(LH, FSH)分泌促進作用をもつペプチドで、視床下部性腺機能低下症、ゴナドトロピン分泌不全を伴う下垂体性小人症、視床下部器質性障害、ゴナドトロピン単独欠損症の治療や下垂体性LH分泌機能検査薬として用いられる。

基原、性状、確認試験、施光度、pH、構成アミノ酸、純度試験、水分、定量法を規定した。性状について、水、メタノール、酢酸、エタノールに対する溶解性を規定した。確認試験として、紫外可視吸収スペクトルと赤外吸収スペクトルを採用し、参照スペクトルとの同等性を確認することとした。また、本品は酢酸塩であることから、酢酸を含むことを確認することとした。液体クロマトグラフィー法を用いた構成アミノ酸分析法を採用し、アルギニンに対する各構成アミノ酸の比を規定した。純度試験として、溶状を紫外可

視吸光度測定法を用いた350nmにおける吸光度を限度値として規定した。また、液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質の限度値を規格した。定量法として、生物活性試験に替えて、液体クロマトグラフィー法を採用し、ゴナドレリン酢酸塩標準品を基準としてゴナドレリン量を求めることとした。ゴナドレリン酢酸塩は、吸湿性があり、また光感受性もあるため遮光して、冷所、密封容器に保存することとされた。

一方、ゴナドレリン酢酸塩は現在のところ、製造しているのは1社のみであり、供給できる標準品が非常にわずかしくなく、受け入れ試験として吸湿性のある本品の水分含量の測定や他の項目を十分に試験するだけの量の確保が困難との報告があった。生物薬品では、各条に収載される製品で1社のみが製造しているものが増加してくることが予想され、標準品の策定においても特別の配慮が必要と考えられた。このため、標準品の試験として必ずしも必要と考えられない試験項目については、設定しないこととした。また使用量などが必要以上に多い項目については適切な量を用いるように変更することとした。確認試験として、質量分析法を用いた分子量の規定、およびゴナドレリン酢酸塩のペプチド配列を確認できるMS/MS分析(質量分析)を行うこととした。さらに、標準品の配布制限も行うこととした。

セラペプターゼ

セラチア属菌から製造されたたん白質分解活性を有する酵素であり、抗炎症作用を有する。手術後や外傷時の抗炎症作用、副鼻腔炎や気管支炎の消炎、喀痰喀出不全に対する治療を目的として内服で用いる。

基原、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法を規定した。SDSポリ

アクリルアミド電気泳動や免疫化学的手法を用いた確認試験の設定を要望したところ、金属プロテアーゼの特性を利用した方法が原案作成者より提案された。検討の結果、提案は適切であるとされ、定量法を準用した方法を規定することとした。原案では、重金属およびヒ素に対して独立した試験が規定されていたが、これらは純度試験として規定すべきとされた。とくに重金属に関しては実測値に基づき、より適切な規格(50ppmから20ppm)にすることとされた。定量法として、乳性カゼインの分解活性をトリクロロ酢酸可溶性画分のチロジン残基の増加を指標とする試験法により設定した。貯法としては気密容器とした。

バルナバリンナトリウム

ブタ腸粘膜由来のヘパリンを化学的に分解して得たヘパリンのナトリウム塩であり、血液中のアンチトロンビンⅢ(ATⅢ)を活性化することにより血液凝固阻止作用を発現する。血液透析や血液ろ過などの血液体外循環時の灌流血液の凝固防止を目的として使用されている。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、乾燥減量、分子量、分子量分布、硫酸エステル化の度合、総窒素、抗第Ⅱa因子活性、抗第Ⅹa因子活性・抗第Ⅱa因子活性比、定量法を規定した。基原に関して、ダルテパリンナトリウムの整合を図り、参考情報の「日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件」との対応から、原料を得る動物の表記に「健康な動物」と記載することとされた。原案では試験溶媒として用いていない、エタノール(95)およびエーテルへの溶解性について記載されていたが、意義は低いとして削除することとされ、エタノール(99.5)への溶解性を追加することとし



た。確認試験として、トルイジンブルーOの反応を用いた多糖類染色試験を設定するとともに、ナトリウム塩の定性反応を規定した。パルナパリンナトリウムは多くの分子量の異なるヘパリンナトリウムの集合体であることから、規格項目として分子量と分子量分布を設定し、分子量の項では平均分子量を規定することとした。分子量測定には「分子量測定用低分子量ヘパリン標準品」を用いることとした。ヘパリンナトリウムは、注射剤としても使用されることから「溶状」を設定した。硫酸エステル化は電位差滴定法を用いる試験法を採用した。原料のヘパリンナトリウムでは総窒素を規定していることから、総窒素の項を設定することとした。定量法は、標準品として低分子量ヘパリンを用い抗第Xa因子活性を指標とする試験法を採用し、1mg中の低分子ヘパリン単位を求めることとした。また、別に抗IIa因子活性の比活性を求め、抗第Xa因子活性・抗IIa因子活性の比を幅で規定することとした。貯法は密封容器とした。

㊦ オキシトシン

下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンで、化学合成により製造され、子宮収縮作用がある。子宮収縮の誘発、促進ならびに子宮出血の治療を目的とし、分娩誘発、微弱陣痛、弛緩出血などの治療に点滴静注あるいは筋注により用いられる。オキシトシン注射液は既収載であったが、その原薬の新規収載を行った。

基原、性状、確認試験、構成アミノ酸、純度試験、水分、定量法を規定した。性状について、規格・試験法で使用する溶媒について調査し、水、エタノール(99.5)、および塩酸試液への溶解性を規定した。確認試験として、吸収スペクトル法を採用し、参照スペクトルとの同等性を確認することとした。構成アミ

ノ酸を設定したが、血圧上昇成分であるバソプレシン様ペプチドが存在しないことを担保するために、オキシトシンに含まれないほかのアミノ酸の限度値を規定した。純度試験では、酢酸を幅規格で設定するとともに、類縁物質について規格値を設定した。定量法は、オキシトシン注射液で動物を用いた生物活性試験が規定されていたが、高速液クロマトグラフィー(HPLC)法に変更することとした。このために、オキシトシンの強制分解溶液を用いて、生物活性試験とHPLC法を比較し、両試験法に良好な相関関係が認められたことから、HPLC法の採用が妥当とされた。貯法温度は2~8℃とし、吸湿性をもつことから気密容器とした。

㊧ セルモロイキン

セルモロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるインターロイキン(IL)-2であり、進行腎細胞がん、悪性黒色腫、血管肉腫に点滴静注ないしは皮下投与される。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、酢酸アンモニウム、エンドトキシン、無菌、定量法が設定された。確認試験では、フォリン試薬を用いたたん白質としての反応性の確認、アミノ酸分析による構成アミノ酸、SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いた分子量、ペプチドマップ試験、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞の増殖活性の抗IL抗体による阻害を指標とする試験を設定した。アミノ酸分析の試験法は、第十四局第二追補参考情報アミノ酸分析法に準じた設定を行った。ペプチドマップ試験法の規格として、ピーク位置の同等性のみならず量的な同等性を確認するために溶出ピークの高さの同等性についても確認することとした。純度試験として、酵素免疫手法による大腸菌由来たん白質、SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いた重

合体，液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質のそれぞれの試験を設定した。重合体以外にSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離可能な不純物としては，大腸菌たん白質やメチオニル化体などのセルモロイキン類縁物質が考えられるが，これらは製造工程でSDSポリアクリルアミド電気泳動の検出限度以下となるとのデータが示された。したがって，重合体の試験法としてSDSポリアクリルアミド電気泳動を採用した。緩衝液成分として，酢酸アンモニウムを用いていることから，幅をもった規格として酢酸アンモニウム量を規定した。原案では発熱性物質が規定されていたが，エンドトキシンへ変更することとした。定量法として，IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞のセルモロイキン依存的な増殖活性を指標として，IL-2標準品を用いて定量する方法を採用した。また，別にたん白質量を測定し，比活性を求めることとした。貯法温度は， -20°C 以下とし，滅菌した気密容器を用いることとした。

㉞ テセロイキン

テセロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるメチオニル化IL-2であり，進行腎細胞がん，悪性黒色腫，血管肉腫などに点滴静注ないしは皮下投与される。

基原，性状，確認試験，pH，純度試験，エンドトキシン，比活性，定量法が設定された。確認試験として，IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験，構成アミノ酸分析法，SDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量，等電点電気泳動法を採用した。中和抗体を用いた生物活性抑制試験では，定量法を準用し，生物活性の中和率を規格として採用した。分子量および等電点の規格は，標準品を用いるのではなく標準物質から算出した分子量や等電点の値を規格として設定するこ

ととした。純度試験として，大腸菌由来たん白質，テトラサイクリン塩酸塩，デスマチオニル体，二量体，その他の異種たん白質，酢酸を設定した。大腸菌由来たん白質は，当初イムノラジオメトリックアッセイ法を採用していたがイムノエンザイモメトリック法に変更した。

テセロイキンは，メチオニル化体であるために，メチオニンがはずれたデスマチオニル化体の量を液体クロマトグラフィー法を用いて求めることにした。二量体およびその他の異種たん白質に関して，それぞれ液体クロマトグラフィー法を用いる試験法を採用した。定量法として，IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を採用し，IL-2標準品を用いて力価を求めることとした。また，別にたん白質量定量試験より，テセロイキンのたん白質量を求め，比活性を規格として採用した。貯法温度として -10°C 以下とし，密封容器に保存することとした。

㉟ 注射用テセロイキン

テセロイキン注射液として，基原，製法，性状，確認試験，pH，純度試験，乾燥減量，エンドトキシン，製剤均一性，不溶性異物，不溶性微粒子，無菌，定量法を規定した。確認試験として，テセロイキンの確認試験を準用し，IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験，およびSDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量の試験を規定した。定量法としては，同様に，テセロイキン定量法のIL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を準用することとした。貯法温度は，凍結を避けた 10°C 以下とし，凍結乾燥品であることから，密封容器に保存することとした。



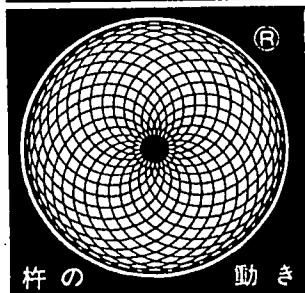
生物薬品各条審議のポイントと 生物薬品改正の基本方針と その対応

生物薬品改正の基本方針については最初に述べたが、この基本方針に沿った各条審議での対応については以下のとおりである。

ゴナドレリン酢酸塩およびオキシトシンでは当初、生物活性試験が規定されていたが、収載にあたって物理的定量法へ変更を行った。セラペプターゼの酵素製剤の原薬について、単位質量当たりの範囲のある含量規格の

設定を行うこととした。発熱性物質を規定していたセルモロイキンでは、エンドトキシンに替えることになった。また、リゾチーム塩酸塩では、試験法の見直しを行い、より精度の高い方法を採用した。また、全般的に規格値の見直しを求め、安定性を考慮した実測値に基づいた規格値を設定した。

今回の収載品目ではセルモロイキンとテセロイキンの同種同効医薬品を収載した。これらの審議にあたっては、共通の標準品を用いるものであり、各条の構成などの調和を図った。



杵の動き

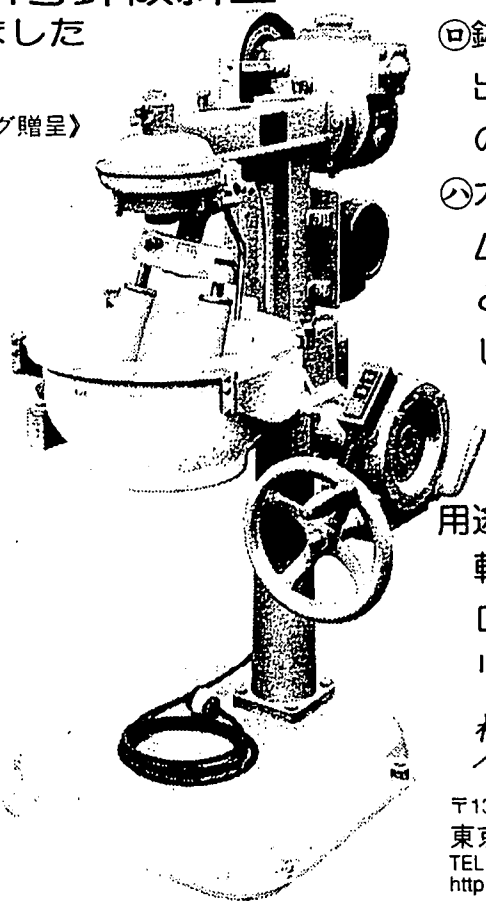
新しい小型機械 “第24号鉢傾斜型”が 出来ました

《カタログ贈呈》

攪拌・混合・ねり合せ作業を精密に組み合わせ、貴重な薬剤をムラなく安定して製造する機械として、大学医学部、病院、薬局にて長年ご愛用頂いています。小型石川式攪拌擂潰機にウオーム式機構の第24号型が開発され、ご好評を頂いております。

**AGA型用に
高純度アルミナ鉢・杵
新発売!!**

加熱型・冷却型もあります



標準第24号機に比べ

- ① ずっと静かな運転
- ② 鉢をハンドルで傾斜出来ますので鉢・杵の着脱が容易
- ③ 大型機と同じウオーム機構ですから一段と安定した作業を致します

用途

軟膏・散薬・顆粒・
ローション・パップ剤・
リニメント剤

株式会社 石川工場

〒135-0053

東京都江東区辰巳1-1-8

TEL 03-3522-1018 / FAX 03-3522-1017

http://www.ishikawakojo.jp