

であったこと、観察期間画3ヶ月と短期間であったことなども要因と考えられた。

以上の結果から、日本で承認時に提出する製造販売後調査の基本計画書を作成するうえにおいて、既に国外で同一医薬品が販売されている場合や類似の医薬品が販売されている場合は、それらの AERS データを事前に解析することにより、調査時に注目すべき副作用や副作用発現器官等を予測でき、重点的に調査すべき項目の設定や患者さんの安全確保に繋がることを期待できるものと考えられた。

#### C-7 泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用

現在、公的機関として公開されている米国 FDA の大規模な自発報告有害事象データベース AERS を用い、泌尿器科領域で使用される薬剤 A において報告された有害事象 (AE) に対しシグナル検出を行い、その結果を検討した。

薬剤 A は過活動膀胱における尿意切迫感、頻尿及び切迫性尿失の改善薬であり、膀胱平滑筋においてムスカリン M3 受容体拮抗作用を示すことにより、膀胱の緊張状態を抑制し、過活動膀胱に伴う諸症状を改善する薬剤である。今回は、薬剤 A に注目しシグナル検出を行うとともに、薬剤 A と同様に過活動膀胱治療に用いる薬剤 B および薬剤 C との比較も行った。

2005 年第 1 四半期から 2007 年第 2 四半期で FDA に報告された症例は 617, 377 例であり、そのうち薬剤 A が被疑薬として報告された症例は 1, 843 例であった。薬剤 A が被疑薬として報告された症例でシグナル検出を行った結果、32 事象がシグナルとして検出され、SOC 別では主に胃腸障害、眼障害、呼吸器、胸郭および縦隔障害、腎および尿路障害であった。

本研究では薬剤 A と同様に過活動膀胱治療薬である薬剤 B および薬剤 C との比較も試みた。薬剤 B および薬剤 C が被疑薬として報告された症例は、999 例および 1, 446 例であった。同種同効薬 3 剤のシグナル検出は、薬剤 A 単独 1, 803 例、薬剤 B 単独 990 例および薬剤 C 単独 1, 435 例とそれら 3 剤が併用されなかった症例 (611, 319 例) を比較した。その結果、PRR 値の大きさに差異はあるものの薬剤 A と薬剤 C で検出された AE は同様であると思われるが、薬剤 B の結果は他の 2 剤とは異なっていた。

以上、今回は薬剤 A に注目し、PRR、報告例数および  $\chi^2$  値を用いてシグナル検出を行ったが、PRR は、注目する医薬品のみ AE が報告された場合には算出できないという欠点があるものの、統

計学の知識が無くとも理解しやすいという点において有用であると考えられた。

薬剤 A が被疑薬として報告された症例でのシグナル検出の結果、SOC 別で最も多く検出されたのは腎および尿路障害の 12 事象であり、これらのはほとんどは原疾患に関連する事象と考えられた。その他の SOC 分類では呼吸器、胸郭および縦隔障害、眼障害などがあり、その中には薬剤 A の添付文書からは未知の事象が散見された。

過活動膀胱に対して使用される同種同効薬 3 剤の比較では、同じカテゴリに分類される薬剤でもシグナルとして検出される事象が異なっていた。

以上、AERS を用いてシグナル検出を行う場合、添付文書で注意喚起されていない事象についても情報を得られるという点において有用であると考えられた。しかしながら、AERS に限って言えば投与期間と AE の発現時期や投与中止による AE の転帰など重要な情報が不足していることも事実であり、またこのシグナルが、注目する薬剤の副作用 (薬剤との関連性が否定できない AE) と判断できるか否かは更なる吟味が必要であることを十分理解し、情報を利用する必要があると考えられた。

#### C-8 抗菌薬の安全性モニタリングの検討

医薬品の製品価値は有効性と安全性の両面から評価されるものであり、安全性の面から製品価値の最大化をはかるには、重篤な副作用の発現リスクをできる限り早い段階で予測し、その発現をできる限り予防するための適正な使用方法を確立することが重要である。

重篤な副作用の発現リスクを早期に予測するという目的において、米国 FDA が公開している大規模副作用症例データベースである AERS は極めて有用であると考えられる。本研究では、抗菌薬の安全性モニタリングの検討として、既存の類薬が少な状況下で、類薬の副作用に関する情報を自社薬の副作用発現予測に役立てる方法について検討を行った。

先行発売された類薬 X で生じた副作用及びそれに関連する副作用 (以下、特定副作用群とする) に関して、AERS データから利用できる背景因子 (性、年齢、体重) 別にシグナルの有無について検討を行った。

2004 年の第 2 四半期 (04Q2) から 8 四半期分 (2 年間) のデータを検討した結果、04Q3~05Q1 の連続する 3 四半期においてシグナルが検出された。そこで、背景因子のカテゴリー別に検討を行った。

背景因子として、体重群別 (60kg 未満、60kg 以上)、年齢層別 (20 歳未満、20 歳以上 65 歳未満、

65 歳以上)では、シグナルは検出されなかったが、性別では、男性でシグナルが検出され、女性では検出されず、注目している特定副作用群の報告率は男性において高い傾向が示唆された。

先行類薬 X で生じた特定副作用群に関して、その発現に影響を及ぼす可能性のある背景因子の検討を行った。AERS データから利用可能な背景因子として、性に関してシグナル検出結果が異なったことから、注目している副作用群の発現には性(男性)が影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上、AERS データ等大規模副作用データベースを副作用の発現に関与しうる背景因子を探る目的で活用することは、医薬品の安全管理上有用であると考える。

### C-9 海外規制機関の医薬品安全性情報データベースの構築と 2007 年の海外規制機関の安全性情報

WHO、米国 FDA、EU EMEA、英国 MHRA、カナダ Health Canada、豪州 TGA、NZ MEDSAFE 等の海外規制機関からの医薬品安全情報を元にデータベースを構築し、構築したデータベースの情報をもとに、2007 年の海外規制機関の安全性情報に関する動向について検討した。

2007 年に、データベースに登録した海外規制機関情報は合計 249 件であった。情報ソースとしては、米 FDA からの情報が 86 件と最多で、以下英 MHRA 55 件、Health Canada 38 件、WHO 27 件、EU EMEA 26 件、豪 TGA 13 件、NZ MEDSAFE 4 件であった。

#### 1) 安全性情報の対象となった原因別医薬品

原因別医薬品としては、チアゾリジン系 2 型糖尿病薬(rosiglitazone と pioglitazone)27 件が掲載された。続いて epoetin 高濃度治療による心血管系事象 9 件、MRI 用造影剤 gadodiamide 8 件であった。医薬品分類では、糖尿病関連 12 件、HIV 関連 12 件、SSRI 関連 4 件であった。また副作用分類では、心血管系 30 件、感染症 19 件、不整脈 13 件、自殺関連 12 件であった。

#### 2) 販売中止や回収事例

2007 年の海外規制機関の報告によると 8 医薬品が市場から撤退した。Aprotinin(販売一時停止：失血予防、輸血必要性を減少させる薬剤：死亡リスク)、Buflomedil(回収：末梢閉塞性動脈疾患またはレイノー病：自殺リスク)、Tegaserod：(使用制限：消化管運動機能改善薬：心臓発作などのリスク)、Nimesulide(使用制限：非ステロイド性抗炎症薬：肝障害リスク)、Iumiracoxib(販売一時停止：骨関節炎治療薬：肝毒性リスク)、Veralipride(販売許可取消：女性のほてり治療：

神経系障害リスク)、Pergolid：(回収：パーキンソン病治療薬：重篤な心弁膜症 発症リスク)、Nelfinavir：(EMS 混入で回収：HIV 治療薬：催奇形性リスク)の販売中止や回収が報告された。

#### 3) 米国 FDA “Drug Safety Newsletter”

米国 FDA は 2007 年から Drug Safety Newsletter の発行を開始した。Drug Safety Newsletter では、AERS データベースのレビューにもとづいた情報提供と共に、市販後の臨床研究や薬剤疫学研究などにもとづく情報提供を行っている。AERS への症例報告の事例として、[‘Viagra’] を服用した男性患者が突発難聴を発現した症例報告が文献発表された。このことを受け、AERS データベースにおけるすべての PDE5 阻害薬について、難聴の市販後報告を検索した。因果関係は証明されていないものの、PDE5 阻害薬使用と突発難聴発現の間に強い時間的関連性が認められたことから、この薬剤クラスの添付文書を改訂する十分な根拠としている。また Drug Safety Newsletter では、新規承認薬(new molecular entity：NME)の市販後の安全性情報に関する報告も行なうとしている。

他の事例として、ボツリヌス毒素の使用(FDA により承認された使用および適応外使用)後に生じた呼吸困難や死亡を含む全身性の有害反応の報告を受け、これに関する進行中レビューに関する早期伝達等を行っている。

2007 年の海外医薬品の安全性に関する主な動きとして、rosiglitazone と pioglitazone の心不全リスクについて FDA は枠組み警告の表示を決定し、MHRA と EU EMEA は安全性に関する声明を発表した。また、FDA は大規模比較試験のレビューやメタアナリシスから SSRI 使用で小児と青年の自殺念慮/自殺企図のリスクが 2 倍に増加すると結論し、リスクベネフィットを考慮して全 SSRI の添付文書ラベルに枠組み警告を表示するように指示した。2007 年の海外医薬品の安全性情報全般として、販売中止や回収と共に添付文書ラベルへの枠組み警告の増加が認められた。

### C-10 海外規制機関における市販後医薬品の安全性情報の評価・活用

本研究では、海外規制機関の自発報告データベースと自発報告にもとづく安全性情報、市販後明らかになる副作用の性質、および自発報告等から市販後明らかに安全性情報の評価手法、市販後明らかになった安全性情報をどのように公衆衛生に還元していくか等を最近の事例をもとに検討した。

米国は AERS (Adverse Event Reporting System) データベースに 1997 年以降の国内外のデータ約

230 万件を有しており、年間 34 万件が新たに追加され、そのデータは web に一般公開されている。AERS のデータは安全性情報として活用されており、例として、AERS に報告された ADHD 治療薬による小児の心突然死の報告に基づき、FDA は 2005 年 2 月に安全性警告を発し、その後、諮問委員会を開いて詳細な検討を行っている。また、最近では Drug Safety Newsletter の発行し、その中で比較的詳しく AERS への症例を報告している。

英国は Yellow Card データベースとして、1964 年以降の英国内の 50 万件の副作用報告のデータを有し、年間約 18,000 件の新規報告がある。Yellow Card データベースは、要約のみを一般公開しており、詳細データは研究利用を申請し、審査後に利用を認めている。EU は、EudraVigilance データベースを 2001 年に開始したが、2006 年末時点で約 70 万件のデータが含まれる。報告数は増加中で、2006 年には市販後報告 28 万件が追加された。

市販後に明らかになる副作用の性質として、ビスホスホネートによる顎骨壊死は、静注投与を行っている患者が侵襲的歯科処置を受けることがリスク因子であることが明らかとなった。2003 年に初めて報告されたが、現在までに 2,400 例以上が報告されている。また、初の選択的接着分子阻害薬であり、多発性硬化症治療薬の natalizumab は、2004 年 11 月に米国で迅速承認されたが、2005 年 2 月に進行性多巣性白質脳症 (PML) 3 例の報告により一時販売停止となった。PML を監視する特別プログラムの下に販売が再開されたが、PML 発症のメカニズムは明らかにされていない。慢性骨髄性白血病の治療薬であるチロシンキナーゼ阻害薬 imatinib は、米国で 2003 年に承認されたが、2006 年に 10 人の重篤な心不全が報告された。Imatinib は心筋に発現する Abl を阻害し、小胞体ストレス応答経路を活性化し、細胞死が誘導すると考えられている。市販後の安全性監視においては、安全性をリスクベネフィットの観点から評価するために統計的な解析も重要である。海外規制機関情報の具体例では、高齢者の非定型抗精神病薬の使用による脳血管系事象のリスク増加のメタアナリシス [オッズ比 3.23 (95%CI [1.43~7.70]) ]、妊娠後期の SSRI の使用による新生児遷延性肺高血圧症のリスク増加の症例対照研究 [オッズ比 5.1 (95%信頼区間 [1.9~13.3]) ]、aprotinin による心臓手術の失血予防における腎有害事象リスクの増加傾向 [傾向スコアによる調整オッズ比 (対無治療群) 2.41 (95%信頼区間 [1.49~3.90]) ] 等があった。

欧米では閉経後女性のホルモン補充療法 (HRT)

が広く普及していたが、2002 年に大規模無作為化比較試験の Women's Health Initiative 試験における浸潤性乳癌のリスク増加 [ハザード比 1.26 (95%信頼区間 [1.00~1.59]) ]、年間 10,000 人あたり 8 人の発症に相当] の結果公表後、HRT の処方数が急速に減少した。これに伴い、最近 50 歳以上の女性のエストロゲン陽性乳癌が減少しているとの報告があり、統計的評価が公衆衛生に与える重要性を示していると考えられる。

以上、承認前にも安全性の検討は行われるが、医薬品の安全性確保は市販後の情報収集に多くを頼っている。自発報告データベースにもとづく安全性シグナルの検出は各国で重要と考えられているが、検出された副作用に関する情報をその後どのように収集、評価していくかも重要な課題である。一方、安全性に関する情報を、どの時点でどのように医療関係者や患者に伝えるべきであるのかも重要な課題である。

C-11 米国「連邦食品医薬品化粧品法」と EU Pharmacovigilance Guideline Vol. 9A における医薬品安全性管理

米国及び欧州で規制化されつつある医薬品安全性リスク管理計画とリスク最小化計画作成について、その背景と規制内容の調査を行った。

(1) 米国では、2007 年 9 月 27 日に Food and Drug Administration Amendments Act of 2007 (FDAAA) が制定され、医薬品安全性対策強化を目的として FDCA 等の法律が改定された。FDAAA は、市販後副作用による健康被害発生の問題解決を目的として、Institute of Medicine (IOM) 勧告をもとに制定された。医薬品安全性リスク管理に関する FDCA の主要改訂点としては、1) 当局権限の強化 (市販後試験実施指示、Labeling 変更指示権)、2) Risk Evaluation and Mitigation Strategies (REMS) 作成の義務、3) 当局義務としての市販後リスク検出と解析技術の確立、4) 情報の透明性と公開化を目的とした医薬品の安全性リスク伝達、5) 当局義務としての大規模副作用症例データベース AERS の定期的検索と内容の公開などがあげられる。特に医薬品に懸念される安全性上の潜在的リスクがあると当局が判断した場合は、安全性リスク管理計画として REMS の提出が義務付けられたことが重要である。REMS には、7 年後までのリスク管理計画に加え、その医薬品を安全に使用するための患者や医療関係者への情報提供、リスクを最小化するための計画の策定、及び定期的見直しと修正が求められている。

(2) 欧州ではファーマコヴィジランスガイドライン (Vol. 9A) が 2007 年 4 月に最終化された。同

文書はタイトルが示すとおりガイドラインでそれ自体は法律ではないが、ファーマコヴィジランス関連の法律の解釈と運用規則を定めた文書であるため、実質的に規制と同等と考えられる。医薬品安全性管理に関しては、Vol. 9A の Part I、Section 3 にリスク管理文書である EU-RMP の提出が義務付けられた。EU-RMP の内容は、ICH E2E に基づく安全性検討事項および医薬品安全性監視計画からなる Part 1 と、必要に応じて作成される安全性リスク最小化活動 (Risk Minimisation Activities) の Part 2 から成っている。EU-RMP は新成分の申請時、またはこれまでの承認条件と異なる剤型等の申請時に提出が求められている。また、製品ライフサイクルのどの時期においても当局の要求により提出が必要とされている。リスク最小化活動には、リスク低減のための情報提供、計画の定期的見直しと修正が求められている点は米国の REMS と同様である。

欧米における医薬品安全性管理計画の規制の目指すところは、ICH E2E と同様に医薬品のライフサイクルを通じての安全性リスク管理であり、開発段階から市販後を通じて医薬品固有のリスクを同定し、リスク最小化のための対策の立案が求められている。その実現には、リスク検出のための科学的基盤の強化とともに、現在の開発・市販後が分離された組織体制にも変化が必要と思われる。欧米に遅れることなく日本においてもより積極的な医薬品安全性リスク管理・リスク低減対策が実施されることが望まれる。

## C-12 欧米における医薬品副作用リスク対応の動向

医薬品の副作用リスク低減を目指して活発に活動している欧米の状況を把握することは、我国における医薬品の副作用リスクを考える上においても重要と考え、その状況を調査しまとめた。

### (1) 米国 Institute of Medicine による FDA の活動の評価と提言

米国 FDA は、IOM に対して FDA の活動に対する業績評価および課題、今後の公衆衛生の推進と確保のあるべき姿についての諮問し、IOM の専門委員会は 2006 年 9 月に多岐に渡る 25 項目の提言をまとめた。この提言を受けて米国議会で法律改正 (FDAAA) がなされ、その中の FDCA 改正では IOM から提言された多くの項目が取り入れられた。

### (2) リスクマネジメントのための新しい枠組みに向けて (MHRA)

英国の規制当局 MHRA は、医薬品開発における環境の変化について下記の 4 点を挙げ、今後の展望を示している。

1) 革新的な新薬の早期承認に対する圧力に対して、出きるだけ早く治験規模から治療母集団規模への移行のための新たな戦略を考えるよう指摘している。

2) 化学合成品から生物製剤の開発が増加しているが、特異的に作用する Mab 製剤を 500 倍の安全域をとってヒトへ投与したにも関わらず、予想外の事態に陥った TGN1412 の事例をあげ、従来の延長線上で開発を進めることへ警鐘としている。

3) 医薬品の有効性と経済性への関心が高まっているが、費用対効果の定量的根拠や当局/医師/患者によるリスク/ベネフィットの決定など医療経済的なデータの収集が望まれる。

4) リスクとベネフィットに関してメディア情報を含め混乱がみられる。医薬品情報の正確さが求められている。

### (3) EC におけるリスク低減に関する新法

2004 年からリスク低減に関する EC 独自の研究が進み、より良い公衆衛生を目指す戦略として EU で 2010 年までに新法施行が予定されている。

### (4) 欧州規制機関からの問題指摘

#### 1) EMEA からの問題指摘

Safety Specification 作成については重要な潜在的リスクの特定と不足している重要な情報の入手が大切であり、それを正しく速やかに実施することが重要であること、Pharmacovigilance Plan 作成については、十分な市販後の安全性データの収集が重要であり、必要に応じて日常の活動に追加すべき活動も検討すべきであり、その為には最善の科学的手法導入が望ましいとしている。Risk Minimization については、承認ラベリングにもとづいた薬剤の使用が最も適切であると考えられ、適応通りに使用することが結果として安全で効率的な使用に繋がることになり、その為には情報提供を含む日常活動、そして追加の活動も考慮すべきとしている。そして Risk Management Plan の適応範囲については、新規の作用機序であったり、長期の有効性が不明であったりする場合には、薬剤特性を考慮しつつ何をリスクとしてマネジメントするかを特定する必要があるとしている。

#### 2) MHRA からの問題指摘

2007 年半ばまで約 100 Risk Management Plan の評価が行われたが、いくつかの共通した要改善点が示されている。Safety Specification では、投与患者数・投与期間・患者背景、治験における対象集団の適格性、誤投与・乱用・適応外使用等の可能性を網羅するよう検討すべきであること。安全性を評価する上では、既知の事象よりも不明の事象に焦点を当てること、長くて複雑な説明資

料は不要であり、Kaplan-Meier プロットなど統計的手法をもっと活用すること、重要なリスクと潜在的なリスクを明確にすること等が指摘されている。こうした活動を限られた資源で行うに当たり、規制と科学、そして IT の活用と人材の必要性が重要な点として指摘された。

### C-13 医薬品安全性情報の診療ガイドラインへの適用と薬物療法に対する外来患者の姿勢

#### (1) 医薬品安全性情報の診療ガイドラインへの適用

診療ガイドラインは、医療において医療者と患者が適切な判断を行う上で重要な役割を担う。しかし、診療ガイドラインではこれまで薬物療法の有効性に重点が置かれてエビデンスが集約されており、安全性情報の扱いについては十分とはいえない。国内ガイドライン(患者向け含む)における薬物療法の安全性に関する記述内容を明らかにすることを目的とした。

喘息診療ガイドラインを例として、喘息の長期管理に関する薬物療法の推奨薬剤であるフルチカゾン(吸入ステロイド薬)、サルメテロール(ベータ2刺激薬)、テオフィリン(キサンチン誘導体)、ザフィルルカスト(抗アレルギー薬)の安全性情報について、国内外の機関からの安全性情報などを調査し比較検討した結果、当該薬剤について、ガイドライン作成時の文献等の情報収集の対象期間以降に安全性情報が出されたケースは多かったが、ガイドライン作成時の情報収集対象期間内であっても、国内外の安全性情報が発出されているが記載がないケースも見られた。

患者向けガイドラインではさらに安全性情報の記載が限られていたが、過度の不安を頂かせる可能性も否定できない。どのレベルまで注意喚起すべきか、用語、表現についてもその適切性を検討する必要がある。薬剤の市販後の安全性情報は適切な治療を行う上で重要な情報であり、ガイドラインへの適切な反映は大きな課題であると考えられた。

#### (2) 外来患者の薬物療法に対する姿勢と事故回避行動への認識

外来患者における薬物療法は、患者の関与が大きいことから、医薬品の事故防止には患者の主体的参加が必要である。本研究では薬に関する事故回避につながる患者行動の意識を明らかにするため、外来患者を対象とした質問紙を開発し、実施可能な行動及び患者側の特性を検討した。

米国の啓発資料や高槻市市民アンケート調査結果等を元に作成した質問紙案を用いて半構造化インタビュー(n=11)を行い、薬物療法に対する姿勢

(4下位領域、19項目)、事故回避行動(9項目)に関する無記名の自記式質問紙暫定版を作成し、大阪府高槻市内の薬局5施設において調剤を受けに来る成人患者を対象に横断的調査を実施した。

配布394枚中、356枚回収し、有効回答数340枚(86%)であった。計量心理学的検討により姿勢項目からは19項目中15項目を採用し、「医師との協働」「医療への障壁感」「薬剤師の活用」「理解とチェック」の4因子、行動項目からは「単独行動」「対医療者行動」の2因子が抽出された。下位尺度の信頼性( $\alpha=0.57\sim 0.70$ )及び収束的妥当性(重複修正後相関係数 $r=0.29\sim 0.62$ )は「理解とチェック」と「単独行動」を除き基準を満たしていた。また、弁別的妥当性は全項目で基準を満たした。各下位尺度得点(5点満点)の中央値は、姿勢で「理解とチェック」(4.8)が最も高く、次いで「医師との協働」(4.5)、「薬剤師の活用」(4.3)であった。行動では「対医療者行動」(3.3)が「単独行動」(2.5)よりも高かった。「医師との協働」及び「理解とチェック」の同時的妥当性は、APIの2下位尺度との相関( $r=-0.27, 0.24$ )により、「単独行動」及び「対医療者行動」の既知集団妥当性は医療事故経験の有無による群間比較により確認された。姿勢と行動の下位尺度に関しては、「理解とチェック」は「単独行動」と、「薬剤師の活用」は「対医療者行動」と強く関連していた。また、姿勢、行動共に年齢との関連が見られた。

尺度の妥当性は概ね良好であったが、「理解とチェック」と「単独行動」については項目の見直しが必要であった。姿勢の下位尺度得点の高さは薬物療法に対する患者の意識の高さ、またはバイアス、天井効果が考えられた。患者側の特性として年齢による影響が示唆された。以上の結果は具体的な患者参加の方法を検討する一助になると考えられた。

#### D. まとめ

本年度の主な研究成果としては、

- 1) 現在、唯一公開されている米国FDAのAERSデータベース11年分、1997年～2007年第2四半期まで報告数約230万件のデータを取り込み、データの整合、重複の除去(多くの問題解決を必要とした)を行い、日本で使われている医薬品の副作用の解析に適する1,765,970症例を持つリレーショナルデータベースを構築した。
- 2) 使用医学用語の過去のMedDRAバージョン間での整合を図り(英語準拠)、副作用、症例の記載に矛盾のないデータベースを構築した。医学用語の日本語も併記した。
- 3) 解析手法の検討として、大規模自発報告デー

データベース AERS を対象に Proportional Reporting Ratio (PRR) や Reporting Odds Ratio (ROR) を用いてシグナル検出をする際の層または多重性の影響を検討すると共に解析プログラムを開発した。

4) AERS データベースを用いた副作用情報の解析として、定型及び非定型抗精神病薬の有害事象の解析、Gd 造影剤と腎性全身性線維症に関する検討、血液及び腎領域における副作用情報の解析、内分泌領域における副作用情報の評価と活用、リウマチ領域における副作用情報の評価と活用、泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用、抗菌薬の安全性モニタリングの検討等を行った。

5) 海外規制機関の安全性情報の解析、評価として、海外規制機関(米国 FDA, 英国 MHRA, カナダ Health Canada, 豪 TGA, ニュージーランド MEDSAFE, EU EMEA) 及び WHO から出された安全性情報に関する海外規制機関安全性情報データベースを構築し、2007 年の海外規制機関の安全性情報、及び海外規制機関情報における市販後医薬品安全性情報の評価・活用について検討した。

6) 医薬品の安全性監視計画の検討として、米国「連邦食品医薬品化粧品法」と EU Pharmacovigilance Guideline Vol. 9A における医薬品安全管理、及び欧米における医薬品副作用リスク対応の動向を調査すると共に、日本の医療現場での医薬品安全性の確保に関する検討として、医薬品安全性情報の日本の診療ガイドラインへの適用、及び薬物療法に対する外来患者の意識調査を行った。

7) 本年度の研究成果は平成 20 年 2 月 1 日国立近代美術館講堂で HS の研究成果普及事業として研究成果を発表した。

以上、本研究では、HS の共同研究により副作用を未然に防止するための監視方法として、大規模副作用症例データベースから個々の医薬品の副作用シグナルの検出方法等について検討した。

医薬品の価値は、有効性と安全性のバランスによって決定される。医薬品は承認にあたり、承認条件として使用成績調査あるいは製造販売後臨床試験など実地医療に近い形での追加試験が課せられる場合が多い。これらの試験では症例数から、副作用の頻度、発現率などの解析が可能であるが、通常 3000 例程度であるため、安全性検討には検出力が不十分である。特に安全性に関しては、市販後の膨大な安全性データがあつて初めて真に科学的な評価が可能になる。現在、世界の医薬品の安全性に関する状況は大きく変わり、臨床現場での安全性データをグローバルに集め、その評価に基づいて医薬品を使用する時代になって

いる。2007 年には、チロシンキナーゼ阻害薬 (trastuzumab, imatinib) による心毒性、長期使用時の rofecoxib による心血管事象、チアゾリジン系糖尿病薬 rosiglitazone による心不全の副作用に対し、欧米各国の規制機関は臨床試験、メタアナリシス、コホート研究などの解析結果に基づいて医薬品の安全性勧告、規制、安全情報を出している。また、世界各国の規制機関は、市販後の安全性情報を広く収集し、膨大なデータを公開するようになってきている。本研究で用いた副作用症例データベース AERS は、米国 FDA が米国内で販売されている医薬品について、世界中からの副作用報告を義務化し、これらの副作用症例をデータベース(11 年分、報告数約 230 万件、AERS において、日本は米国に次いで 2 番目に報告数が多い)として公開しているものである。医薬品の安全性に関する現在の最大の課題の 1 つは、これら大規模な安全性データをいかに解析し、活用するかが世界的な課題となっている。このデータベースは自発報告である弱点を持つが、年間 34 万件的膨大なデータは貴重であり、統計学的にも悉皆的な性格を持ち、その解析は医学的にも統計学的にも新しい研究領域である。臨床試験のような介入試験のみが医薬品の評価ではなく、IT 技術を駆使し、現実の大量データからも精度は落ちるが、科学的な推論は可能であり、その解析(大規模である現実データからの科学的な帰納的推論)は、市販後の医薬品の安全性確保において最も重要な課題であると言える。

自発報告に基づく副作用データの解析・評価は、米国科学アカデミーの報告書(2006 年 9 月)でも指摘されているように、世界的にも開発途上の重要な研究課題である。日本の医薬品の安全性確保のために、HS 研究の共同研究の利点を生かし、本研究を積極的に推進していきたい。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 竹村玲子, 森川 馨. 市販後の医薬品の副作用  
-海外の安全性情報から-, ファルマシア, 2007. 43(11), 1085-1090

### 2. 学会発表

- 1) 森川 馨, 廣瀬有紀子, 今宮麻奈, 高本哲義, 田崎武信, 竹村玲子. 自発報告に基づく大規模副作用症例データベース (AERS) を用いた抗精神病薬の解析. 日本薬学会第 128 年会(2008)
- 2) 竹村玲子, 大塚 文, 小嶋 靖, 太田有子, 芦澤一英, 森川 馨. 海外の安全性情報にみられる市販後の医薬品の副作用. 日本薬学会第

128 年会(2008)

3) 芦澤一英, 小嶋 靖, 大塚 文, 太田有子, 森川 馨. 海外における医薬品安全性情報に関する最近の動向(2007 医薬品安全性情報から).

日本薬学会第 128 年会(2008)

4) 今宮麻奈, 佐賀野修一, 芦澤一英, 竹村玲子, 森川 馨. 自発報告に基づく大規模副作用症例データベース (AERS) を用いた HIV 治療薬の解析 (II). 日本薬学会第 128 年会(2008)

5) 道廣幸三, 大家正芳, 森川 馨. Gd 含有 MRI 造影剤の腎性全身性線維症と AERS による解析. 日本薬学会第 128 年会(2008)

6) 高見廣行, 松倉竹雄, 森川 馨. Microsoft Office Access による副作用シグナル検出システムの作成. 日本薬学会第 128 年会(2008)

7) 都地昭夫, 長谷川貴大, 田崎武信, 森川 馨. 質的交互作用検定の多地域共同治験への応用. SAS ユーザー会学術総会(2007)

8) 馬場裕子, 落合俊充, 山田忠明, 田崎武信, 森川 馨. MMRM 解析と LOCF 解析の比較. SAS ユーザー会学術総会(2007)

9) 山田忠明, 北西由武, 田崎武信, 森川 馨. Co-primary endpoints に対する多重性の調整. SAS ユーザー会学術総会(2007)

10) 浜口和人, 土屋佳英, 田崎武信, 森川 馨. 群逐次デザインの再考. SAS ユーザー会学術総会(2007)

#### F. 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

#### G. 協力研究者

あすか製薬(株) 臨床開発センター 高見廣行  
アステラス製薬(株) 信頼性保証本部

ファーマコヴィジランス部 木村 徹  
エーザイ(株) 信頼性保証本部・安全管理部  
道廣幸三

参天製薬(株) 品質保証・環境監査本部

安全性管理室 秋山良司  
塩野義製薬(株) 中村明洋, 本田圭一

長谷川貴大, 小林典弘, 深野寛司  
シミック(株) 高本哲義, 廣瀬有紀子, 萩原大二郎  
(株)タクミインフォメーションテクノロジー

佐賀野修一  
NPO 法人ヘルスサービス R&D センター(CHORD-J)  
青木則明

本研究を実施するに当たり, ご協力を頂いた方々に感謝致します。

## グリア細胞をターゲットとした創薬のための評価科学 基盤の確立

所属 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

研究者 佐藤 薫

研究要旨 病態時のグリア細胞特性をもとにした創薬標的の探索、グリア細胞に特化した医薬品評価・開発基盤の確立を試みた。その結果、神経因性疼痛、脳虚血、気分障害をターゲットとするグリア細胞関連創薬標的を見いだし、グリア創薬に重要な基盤技術を確立した。

### 分担研究者

井上 和秀 九州大学大学院薬学研究院・医療薬科学部門・薬効解析学分野・痛覚伝達  
鳥光 慶一 NTT物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部  
加藤 総夫 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 神経科学研究部 神経生理学研究室  
南 雅文 北海道大学大学院薬学研究院薬理学研究室  
小泉 修一 山梨大学医学部薬理学講座

### A. 研究目的

近年、グリア細胞が様々な中枢機能を積極的に調節していることが明らかとなりつつある。また種々の病態時にグリア細胞が激変すること等の状況証拠から、中枢神経疾患がグリア細胞の機能変調に起因している可能性も示唆されている。このように、グリア細胞は創薬標的として高いポテンシャルを有するが、グリア細胞を標的とした医薬品開発はほとんど行われていない。本研究は、病態時のグリア細胞特性を基にした創薬標的の探索およびグリア細胞に特化した医薬品評価・開発基盤の確立という多角的なアプローチにより中枢神経疾患治療薬開発において「グリア創薬」を新たな選択肢とするための道筋をつける。本年度は、①病態時のグリア細胞特性をもとにした創薬標的の探索、②グリア細胞に特化した医薬品評価・開発基盤の確立、の二点を目的とした。井上班は「病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立」を遂行した。井上らは脊髄内ミクログリアの活性化とそこに過剰発現するATP受容体サブタイプP2X4の刺激が、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) を介して神経因性疼痛を発症することを発表した。そこで、「ミクログリアのP2X4受容体が過剰発現するメカニズム」を転写制御の観点から検

討した。加藤班は「脳虚血・脳低酸素症におけるシナプス周囲グリア細胞応答分子機構の解明」を遂行した。ニューロンの特異的脆弱性に起因するさまざまな神経変性疾患の発症に、局所的な低酸素あるいは虚血状態によって誘発される代謝ストレス性障害が重要な役割を果たしている。そこで、延髄孤束核を用いて、乳酸を介したアストロサイトからニューロンへのエネルギー供与がシナプス伝達において担う役割を解析し、低酸素あるいは虚血状態でのアストロサイトからニューロンへのエネルギー供与機構、そのエネルギーがどのような機能維持に用いられるのかを検討した。南班は「脳虚血時のミクログリアを標的とした創薬基盤確立」を遂行した。南らは、すでに脳虚血時、活性化したグリア細胞が産生するケモカインが脳細胞傷害の増悪に関与することを明らかにしている。そこで、ケモカイン MIP-1 $\alpha$  の NMDA による産生誘導機構について検討した。また、環境に応じて極めて変化しやすい性質を有するグリア細胞の検討のため、脳スライス培養系を採用した。脳スライス培養系はグリア細胞の活性化状態が機能的にも、形態学的にも脳内の環境に近く、脳内での細胞構築が比較的保持されているため細胞間相互作用の研究に適している。小泉班は「気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立」を遂行した。抗うつ薬の作用機序として神経新生が新たに注目されている。そこで、神経新生に関与する神経栄養因子であるBDNF及びアストロサイトを切り口とし、臨床的に効果が確認されているSSRI型抗うつ薬 fluoxetine のアストロサイトに対する影響を精査し、抗うつ効果におけるアストロサイトの役割及びうつ病とアストロサイト機能変調との関連性を解明し、アストロサイトを標的とした創薬の可能性を探ることを目的とした。鳥光班は「病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析」を遂行した。グリア創薬を達成するため、薬剤標的となるグリア関連因子の構造を詳細に解析する基盤技術構築を試みた。本研究では原子間力顕微鏡(Atomic Force



Microscopy, AFM)を用い, P2X<sub>4</sub> 受容体をモデルに, 生理的環境下でのトポロジー解析, 細胞内外のドメイン構造の同定を行った. 佐藤班は「病態時のグリア細胞特性とその創薬ターゲットとしての評価科学基盤の確立」を遂行した. グルタミン酸 (L-glu) トランスポーターはシナプス伝達を終結させるとともに, 細胞外 L-glu 濃度を低値に保ち神経細胞を興奮毒性から保護する. L-glu トランスポーターの変調は様々な神経疾患に関与していることが知られているため, L-glu トランスポーター調整物質を探索した. また, スライス培養系でグリア細胞特異的に薬理的評価を行うため, ウィルスベクターによってグリア細胞を特異的に標識した前脳スライスの培養法確立を試みた.

## B. 研究方法

### 1. 病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立

#### (井上班)

Wistar rat から抽出したゲノム DNA から PCR 反応で P2X<sub>4</sub> 受容体遺伝子の上流 1967 塩基の配列を増幅し配列決定した. 配列内に存在すると推定される転写調節因子結合部位を web プログラムを用いて検索した. クローニングした全長の配列, 又は推定レチノイン酸応答配列を含む 175 塩基を除去した配列を pGL3 luciferase reporter vector に組み込み, これを 1321N1 アストロサイトーマ細胞に遺伝子導入した. 細胞をレチノイン酸で刺激し誘導されるホタルルシフェラーゼ活性を測定し, 導入した配列のプロモーター活性を検討した. ミクログリアの培養方法, 生化学的及び分子生物学的検討: 既報通り (Tsuda et al., Nature 2003). 細胞内カルシウム測定: 既報通り, fura2 法を用いた. P2X<sub>4</sub> 受容体の発現変化は, 定量的 PCR 及び Western blotting により解析した. 神経因性疼痛モデル動物の作製は 8~12 週齢 Wistar 系雄性 rat を用い Chungらの方法 (Kim and Chung 1992) を改変して行った. 片側の L5 腰椎神経 (L5 脊髄神経) を結紮しその末梢側で神経を切断後, 翌日より触刺激に対する痛み行動惹起の 50% 閾値を von Frey filament を用いた Up and down 法により測定した. 薬物は atRA を 10mg/ml の濃度で 1 日 1 回経口投与した.

### 2. 脳虚血・脳低酸素症におけるシナプス周囲グリア細胞応答分子機構の解明 (加藤班)

#### 2-1 延髄孤束核電子顕微鏡観察

3 週齢 Wistar rat を用いて, 正常電顕と抗 GLAST 抗体と抗 GLT1 抗体を用いた免疫電顕を行った.

#### 2-2. 延髄孤束核微小シナプス電流観察

Wistar rat (P21-P24) を吸入麻醉下に断頭し, 脳幹を摘出した. 氷冷下, 厚さ 400 µm の冠状断スライスを作成し人工脳脊髄液中に灌流維持した. 孤束核小型細胞から興奮性シナプス後電流を薬理的単離下に記録した. 刺激実験においては孤束求心線維上に極間 100 µm の同心円刺激電極を置いて刺激した. 阻害薬・遮断薬は灌流形を用いてチャンバー内に直接投与した. 作動薬は人工脳脊髄液に溶解し, 記録細胞の灌流上流でスライスの近傍 (数 100 µm) に設置した投与用ガラスピペット (内径 0.6 µm) から直接スライスに適用した. 細胞膜電流はパッチクランプ専用アンプで記録し, AD変換システムを用いてコンピュータのハードディスクに保存した. 記録されたニューロンが受け取るシナプス入力の種類および ATP に対する応答と, ニューロンの形態の関係を検討するため, 電気生理学的記録時に近赤外微分干渉顕微鏡による細胞体像を撮像してハードディスクに記録した.

### 3. 脳虚血時のミクログリアを標的とした創薬基盤確立 (南班)

#### 3-1. 脳スライス培養系の作製

P2-P3 の Wistar/ST rat 大脳皮質-線条体領域スライスを多孔質膜 (Millcell-CM) 上に静置し 10-11 日培養した.

#### 3-2. Real-time RT-PCR

NMDA 処置後, 所定の時間で回収したスライスから, total RNA を抽出し real-time RT-PCR 法により, MIP-1 $\alpha$  mRNA を相対的に定量した.

#### 3-3. RT-PCR

total RNA を上述の real-time RT-PCR と同様のプライマーを用いて PCR 反応を行い, 得られた PCR 産物をエチジウムブロマイド含有アガロースゲル上で電気泳動後, 紫外線照射によりバンドを可視化した.

#### 3-4. 免疫染色

MIP-1 $\alpha$  および各細胞種のマーカータンパクとの免疫二重染色を行った. 一次抗体にはウサギ抗ラット MIP-1 $\alpha$  抗体, マウス抗 NeuN 抗体, マウス抗 OX-42 抗体, マウス抗 GFAP 抗体を用いた. シグナルは共焦点顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) を用いて可視化した.

### 4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立 (小泉班)

アストロサイトの培養方法, 生化学的及び分子生物学的検討: 既報通り (Koizumi et al., PNAS, 2003). 細胞内カルシウム測定: 既報通り, fura2 法及び fluo4 を用いたレーザー共焦点法を用いた.

### 5. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジ

## 一解析(鳥光班)

### 5-1. P2X<sub>4</sub>受容体タンパク質の精製

1321N1 アストロサイトーマ細胞を用いて P2X<sub>4</sub> 受容体を発現する細胞株を樹立した。この細胞から精製 P2X<sub>4</sub> 受容体タンパク質を得た。

### 5-2. 精製 P2X<sub>4</sub> 受容体の三量体の解析

精製 P2X<sub>4</sub> 受容体が三量体を維持した状態で存在する事を確認するため native-PAGE 及び SDS-PAGE を行った。

### 5-3. 原子間力顕微鏡(AFM)による P2X<sub>4</sub> 受容体構造の解析

オリンパス NVB-500 高速 AFM システム, サンプル測定基板としてマイカを用いた。カンチレバーには BL-AC7 EGS-A2 (ばね定数 0.1 N/m, 振幅頻度 800~1000 kHz)を用い, タッピングモードで測定を行った。高速 AFM 測定中の ATP 刺激は caged-ATP を紫外線照射により uncage する事により行った。

## 6. 病態時のグリア細胞特性とその創薬ターゲットとしての評価科学基盤の確立(佐藤班)

### 6-1. L-glu トランスポーター調整物質の探索

生後 3 日令 Wistar rat 大脳皮質アストロサイトを 96 穴プレートに初代培養した。被検化合物で 24 時間処理し, L-glu 取り込み量を測定した。

### 6-2. グリア細胞を特異的に標識した前脳スライス培養法の確立

#### 6-2-1. グリア細胞特異的標識及び観察系の確立

1) 生後 1-3 日令 SD rat subventricular zone (SVZ) では活発に神経新生が起こっている。このうち, グリア前駆細胞は大脳皮質表面に向かって放射状方向に遊走し, 神経前駆細胞は radial migratory stream (RMS) を遊走する。そこで, 生後 1-3 日令 SD rat 脳 SVZ に eGFP tag を組み込んだ retrovirus (NIT-eGFP retrovirus) を注入し, 1-7 日後に新生細胞の遊走経路を確認した。また, 放射状に遊走した新生細胞について分化マーカー蛋白質 (A2B5, O4, GFAP など) の発現を免疫組織学的に確認した。また, time lapse imaging を試みた。2) グリア細胞のうち, 幹細胞でもあるラジアルグリアとその成熟細胞であるアストロサイトに特異的に発現している GFAP で駆動する hGFAP プロモーターと DsRed tag を組み込んだ lentivirus (F-hGFAP::DsRed lentivirus) を用いてラジアルグリア・アストロサイトの特異的標識を試みた。生後 3 日令 SD rat 大脳皮質初代培養系に F-hGFAP::DsRed lentivirus を適用し細胞種特異的マーカーの発現を確認した。さらに,

F-hGFAP::DsRed lentivirus を生後 1-3 日令 SD rat 脳 SVZ に注入し, ラジアルグリア特異性を確認した。

#### 6-2-2. 前脳スライス培養系の確立

生後 1-3 日令 SD rat 前脳矢上面スライス標本を作製し Millicell-CM 上に静置し, 最適培地を探索した。また, スライス培養系において薬理的検討が可能かどうかについて海馬スライス培養系を用いて確認した。

#### 6-2-3. グリア細胞を特異的に標識した前脳スライス培養法の確立

上記培養前脳矢上面スライス標本において, NIT-eGFP retrovirus および F-hGFAP::DsRed lentivirus を SVZ に滴下し 3 日間培養し標識細胞の分化・遊走を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては各研究施設が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および各研究施設が保持する遺伝子組換え実験安全管理規則に準拠した。

## C. 研究結果

### 1. 病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立

#### (井上班)

#### 1-1. ラット P2X<sub>4</sub> 受容体遺伝子上流配列のクローニングと転写調節因子結合配列の解析

P2X<sub>4</sub> 遺伝子 mRNA 転写開始位置から -79 の位置にレチノイン酸受容体認識配列(DR1)が見いだされた。また, P2X<sub>4</sub> 遺伝子プロモーター領域はレチノイン酸に応答した。

#### 1-2. ラット初代培養ミクログリアにおけるレチノイン酸刺激による P2X<sub>4</sub> 受容体発現量の増加

ラット初代培養ミクログリアを, RXR, RAR アゴニスト 9-cisRA, RAR アゴニスト atRA で 3 時間処置すると, P2X<sub>4</sub> mRNA は 160~180% 増大した。9-cisRA の作用は RXR アンタゴニスト HX531 により抑制された。単独では有意な増大が見られなかった RXR および RAR の合成アゴニスト PA024 (100 nM), Am80 (100 nM) も共添加 (10 nM) により相乗的な増大作用を引き起こした。9-cisRA (1 μM) 処置 24 時間後, P2X<sub>4</sub> タンパク質も有意に増加した。さらに ATP (10 μM) 誘起細胞内カルシウム濃度上昇は 9-cisRA により増強されることを確認した。

### 1-3. ミクログリアで観察されたレチノイン酸による P2X4 受容体発現増大と神経因性疼痛発症との関連性の検討

対照群では術後から 4 日目にかけて神経損傷側の後足で徐々に痛みが誘発されたが(痛み閾値の低下), 神経傷害 2 日前より atRA を投与した群では術後 2 日目において痛み閾値の低下はほぼ最大となった。レチノイン酸投与群において神経損傷側脊髄内での P2X4 発現量増大が認められた。

## 2. 脳虚血・脳低酸素症におけるシナプス周囲グリア細胞応答分子機構の解明(加藤班)

### 2-1. 延髄孤束核におけるプレシナプスおよびポストシナプス構造とアストロサイト突起の微細形態的關係

グルタミン酸トランスポーター分子 GLAST ならびに GLT-1 の抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察では、非対称型興奮性シナプス構造のほとんどすべてが GLAST もしくは GLT-1 のいずれかを強発現するアストロサイト突起に密接に接していた。この結果は、延髄孤束核において、アストロサイト突起からニューロンのシナプス構造への何らかの物質授受の場としてシナプスが機能していることを示唆している。

### 2-2. モノカルボン酸トランスポーター阻害薬がシナプス伝達に及ぼす影響

アストロサイトはグリコーゲンを持ち、嫌氣的にピルビン酸を合成し、これを乳酸に変換した上でモノカルボン酸トランスポーター(MCT)を介して細胞外に輸送しニューロン内に取り込ませ、これをニューロンはピルビン酸に変換して TCA サイクルの基質とする。2-1 の結果に基づき、MCT を介したアストロサイトからニューロンへのエネルギー供給のシナプスにおける役割を検討した。

#### 2-2-1. 活動電位非依存的自発グルタミン酸放出に及ぼす MCT 阻害の影響

MCT 阻害薬  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA, 1 mM) はテトロドトキシン存在下に観察される微小興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic potential, EPSC) の頻度を速やかに有意に減少させた。この効果は NaCN (ミトコンドリア電子伝達系を抑制) によって、自発的活動電位非依存的放出がほとんど影響を受けないという結果と対照的であった。以上の結果は局所的なシナプス伝達におけるアストロサイト由来の乳酸が重要な役割を担っていることを示唆している。

#### 2-2-2. 活動電位非依存的自発 GABA 放出に及ぼす MCT 阻害の影響

孤束核ニューロン微小抑制性シナプス後電流に関しては  $\alpha$ -CHCA による自発的伝達物質放出の抑

制は観察されなかった。

### 2-2-3. シナプス前放出確率におよぼす MCT 阻害の影響

一次求心線維から孤束核小型ニューロンへのシナプス伝達におけるグルタミン酸放出確率は、同シナプスの短期可塑性の指標である paired-pulse ratio (PPR, 100 ms 間隔で一次求心路を刺激した際に生じる1回目の EPSC 振幅に対する2回目のその比) によって評価される。 $\alpha$ -CHCA は孤束刺激誘発 EPSC 振幅を著明に減少させたが、この時、PPR には変化がなかった。この結果は、上記の MCT 阻害による EPSC 頻度の減少は、放出確率の減少以外の機構で起こっている可能性を示唆する。

### 2-2-4. 活動電位非依存性・Ca<sup>2+</sup>依存性グルタミン酸放出に及ぼす MCT 阻害の影響

孤束核小型ニューロンの約 70% で P2X 受容体からの Ca<sup>2+</sup>流入依存性かつ複数小胞性の放出によって生じる高振幅 EPSC を特徴とするグルタミン酸放出がおこる。P2X 受容体作用薬  $\alpha$ , $\beta$ -methylene ATP ( $\alpha\beta$ mATP, 100  $\mu$ M) の投与によって微小 EPSC の頻度の顕著な増加と高振幅 EPSC の発生が観察されたニューロンでは、 $\alpha$ -CHCA が  $\alpha\beta$ mATP によって発生する微小 EPSC の頻度、振幅ともに有意に抑制した。

## 3. 脳虚血時のミクログリアを標的とした創薬基盤確立(南班)

NMDA 処置 (50  $\mu$ M, 3 時間) によって、MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現は、処置後 6 時間から 9 時間でピークに達する一過性の発現上昇を示した。また、MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現量は、NMDA 濃度依存的に増加し、90%以上の神経細胞が傷害を受ける NMDA 30-50  $\mu$ M で頭打ちとなった。NMDA 処置後 3 時間から 9 時間において MIP-1 $\alpha$  タンパク質も顕著に誘導されていることも免疫染色で確認した。NMDA 処置による MIP-1 $\alpha$  産生は主としてミクログリアで惹起されることが免疫二重染色により示された。大脳皮質-線条体領域スライス培養系では、培養 5 日目から 8 日目まで clodronate (CLO) (100  $\mu$ g/ml) を処置することで、Iba1 陽性ミクログリアの数が control 処置群と比較して 13% にまで減少することを明らかにした。この条件下で NMDA 処置 6 時間後の MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現は顕著に抑制された。LPS (100 ng/ml, 3 時間) 処置に関しても、CLO によるミクログリアの選択的除去によって MIP-1 $\alpha$  mRNA 誘導の顕著な抑制が認められた。神経細胞を選択的に除去し同様の検討を行ったところ、NMDA 処置による MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現上昇は認められなかった。LPS 処置で

は、神経細胞除去の有無にかかわらず、MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現の顕著な増加が認められた。以上の結果から、NMDA 処置によるミクログリア MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現上昇は、傷害された神経細胞からのシグナルを介するのに対し、LPS は直接ミクログリアに作用することが示唆された。脳スライス培養系における NMDA 誘発 MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現は JNK 阻害薬 SP600125 によって有意に抑制され、p38 阻害薬 SB203580 存在下では有意に増加した。一方、ERK の上流に位置する MEK の阻害薬 U0126 によっては影響を受けなかった。

#### 4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立 (小泉班)

各種 P2/adenosine 受容体 agonist である ATP, ADP, AMP, adenosine, UTP 及び UDP によって引き起こされる、ラット海馬アストロサイトでの BDNF mRNA の発現変化を real time RT-PCR 法により検討した。ATP, ADP, AMP, adenosine (各 100  $\mu$ M, 2 時間)により BDNF mRNA 発現量が有意に増加した。またその効果は adenosine で強く認められた。UTP および UDP (各 100  $\mu$ M) では BDNF mRNA 発現に変化は認められなかった。adenosine の反応は 10  $\mu$ M より濃度依存的に観察され、刺激後 2 時間で最大となりその後 4 時間で元のレベルに戻る一過性のパターンを示した。Fluoxetine も BDNF mRNA 発現を誘導したが、3  $\mu$ M から濃度依存的な増加をもたらした。有意な増加を示したのは刺激 24 時間後であった。fluoxetine 24 時間前処置後、adenosine で 2 時間刺激すると、効果は相乗的に増大した。

#### 5. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析 (鳥光班)

##### 5-1. P2X<sub>4</sub> 受容体タンパク質の精製

精製 P2X<sub>4</sub> 受容体を native-PAGE, SDS-PAGE で解析したところ、P2X<sub>4</sub> 受容体は三量体を保った状態で精製されている事を確認した。

##### 5-2. P2X<sub>4</sub> 受容体の AFM 観察

P2X<sub>4</sub> 受容体は無刺激の場合には三量体構造が観察されず、円形もしくは三角形に近い構造(直径: 12.4 $\pm$ 0.3 nm, 高さ: 2.5 $\pm$ 0.2 nm, (n = 205))で一部に短い線状の構造をもつものとして観察された。一方、ATP 刺激後(1 mM, 30 分)には顕著な三量体構造が観察され(直径: 15.2 $\pm$ 0.1 nm, 高さ: 3.5 $\pm$ 0.1 nm (n = 200)), 中央部分にチャンネルの細胞外側のポアと思われる構造も観察された。

##### 5-3. P2X<sub>4</sub> 受容体構造変化のリアルタイム観察

高速 AFM を用いて ATP 刺激後の構造が受容体

の構造変化によって引き起こされたものである事を確認した。

##### 5-4. P2X<sub>4</sub> 受容体のドメイン構造の同定

P2X<sub>4</sub> 受容体のどの部分が細胞外、膜貫通及び細胞内ドメインに相当するののかについて、ペプチド-N-グリコシダーゼ F 処置、脂質二重膜への再構成、細胞内ドメインを認識する抗体処置などにより検討したところ、円形(刺激前)及びトライポット状構造(ATP 刺激後)は細胞外ドメイン、線状の構造は細胞内ドメインであることが示された。

##### 5-5. ATP 結合による細胞外ドメインの変化

ATP は P2X<sub>4</sub> 受容体の細胞外ドメインに結合する事から細胞外ドメインの構造変化を調べた。無刺激の条件(刺激前)では細胞外ドメインは中心から周囲に向かって少し下向きに傾いていたが、ATP 刺激後には上向きに立ち上がっていた。ATP 刺激に伴うリップ-フロップ様変化は、約 25° の変化であり、他の受容体での変化と近い値であった。

##### 5-6. 脂質二重膜と FRET

さらなる AFM 利用技術の検討や、蛍光共鳴エネルギー移動反応(FRET)の適用可能性について基礎検討を行った。

#### 6. 病態時のグリア細胞特性とその創薬ターゲットとしての評価科学基盤の確立 (佐藤班)

##### 6-1. L-glu トランスポーター調整物質の探索

エストロゲン受容体(ER)の阻害薬かつ部分作用薬 tamoxifen (Tam) が 1 pM から有意なアストロサイト L-glu トランスポーター阻害作用を呈することを見いだした。阻害作用は 10 min 適用でも引き起こされた。この作用は ER 阻害薬 ICI182,780, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害薬 LY294002, mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケード阻害薬 U0126 でほぼ完全に阻害された。

##### 6-2. グリア細胞を特異的に標識した脳スライス培養系の確立

###### 6-2-1. グリア細胞特異的標識及び観察系の確立

生後 1-3 日令 SD rat 脳 SVZ で NIT-eGFP retrovirus に標識された新生細胞は RMS に遊走していく細胞集団と放射状に遊走していく細胞集団との二群に明確に分かれた。放射状に遊走した新生細胞はグリア前駆細胞マーカー(A2B5), オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー(O4), アストロサイトマーカー(GFAP)を発現していたことから、これらがグリア前駆細胞およびグリア細胞であることが確認された。また、標識細胞遊走の time lapse imaging に成功した。大脳皮質初代培養系に

F-hGFAP::DsRed lentivirus を適用したところ、DsRed 陽性細胞のほぼ 100% が GFAP 陽性であった。F-hGFAP::DsRed lentivirus を生後 1-3 日令 SD rat 脳 SVZ に注入したところ、ラジアルグリア特有の形態を持つ細胞が標識された。

#### 6-2-2. 前脳スライス培養系の確立

生後 1-3 日令 SD rat 前脳矢上面スライス標本を各種培養条件で培養したところ、N2 1%, B27 1%, L-glutamine 2 mM, D-glucose 33.3 mM, Kynucleic acid 0.5 mM を含む Neurobasal 培地が最適であることを見いだした。

#### 6-2-3. グリア細胞を特異的に標識した前脳スライス培養法の確立

前脳培養矢上面スライス標本の SVZ に NIT-eGFP retrovirus を培養初日に滴下し、標識細胞を時間経過を追って(～6 日間)観察したところ、RMS を遊走する群と放射状に遊走する群とに分かれた。放射状に遊走する新生細胞がグリア前駆細胞およびグリア細胞であることを確認した。同様に F-hGFAP::DsRed lentivirus を SVZ に滴下したところ、脳室に接触する標識細胞には幹細胞マーカー Nestin が発現し確かにラジアルグリアであること、遊走するに従い Nestin 発現量が低下することを確認した。

### D. 考察

#### 1. 病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立(井上班)

P2X4 遺伝子の上流配列はレチノイン酸応答配列を有していることを見だし、レチノイン酸がその配列を介してプロモーター活性を促進することを確認した。さらにレチノイン酸は初代培養ミクログリアの P2X4 mRNA 量を増加させることを明らかにした。レチノイン酸受容体 RAR 及び RXR のアゴニストの同時処置によって P2X4 mRNA の発現量が相乗的に増加したことから、RXR のアンタゴニストによって 9-cisRA の効果が抑制されたことから、レチノイン酸による P2X4 受容体発現増強は核内受容体である RAR, RXR を介していることが示唆された。またレチノイン酸処置による P2X4 受容体タンパク質の発現量増大、ATP 誘起細胞内カルシウム濃度上昇の増大も確認し、この作用が P2X4 受容体機能亢進に結びつくことを確認した。さらに、神経因性疼痛モデルラットにおいて、アロディニア症状の形成がレチノイン酸経口投与で促進され、同時期に神経損傷側脊髄内 P2X4 タンパク質量が増大していた。以上の結果よりレチノイン酸はミ

クログリア核内受容体に作用して P2X4 受容体の転写を活性化し、ミクログリア P2X4 受容体の機能亢進をもたらすアロディニア発症を促すと考えられた。この考えは、脊髄損傷時にレチノイン酸合成酵素が周辺組織において増加する(Mey et al., 2005)という報告により支持される。

#### 2. 脳虚血・脳低酸素症におけるシナプス周囲グリア細胞応答分子機構の解明(加藤班)

孤束核シナプスにおいて、 $\alpha$ -CHCA 1 mM による MCT の阻害は、自発 EPSC 頻度および振幅の減少ならびに誘発 EPSC 振幅の減少を引き起こした。この結果は、MCT を介したアストロサイトからのエネルギー供給が、シナプス局所の特異的な活動に用いられている事実を示す。誘発 EPSC 振幅の減少は PPR の変化を伴わなかったため、誘発 EPSC 振幅の減少はシナプス後膜の受容体の変化を示唆する。 $\alpha$ -CHCA 適用前後において EPSC 振幅を詳細に分析すると、全体の振幅が低振幅方向にシフトするのではなく、主な変化は大きな振幅を持つイベント頻度の特異的減少によるものであった。これは、シナプス後機構の関与を否定するものであるが、今後、シナプス後受容体の感受性変化の有無を決定しうるさらに積極的な実験を行う。MCT の阻害は、ニューロン終末における利用可能なグルタミン酸分子の量を減少させている可能性もある。本研究の結果は、MCT によってアストロサイト突起からシナプス前終末に輸送される乳酸が減少することによって H<sup>+</sup>-ATPase の活性が低下し、小胞の酸性化およびグルタミン酸輸送が阻害され、1小胞から放出されるグルタミン酸量が極めて小さい、または、ほとんどない状態になり検出可能な微小シナプス後電流が発生しなくなる、とも解釈される。以上のシナプス後電流の変化は、同時時間の NaCN 投与によっては観察されず、シナプス局所においてアストロサイトが供給するエネルギーが、シナプス伝達の特異的な機能のためのエネルギー源となっている可能性を強く支持する。

#### 3. 脳虚血時のミクログリアを標的とした創薬基盤確立(南班)

脳スライス培養系を用いて NMDA による神経細胞傷害後、一過性の MIP-1 $\alpha$  産生が惹起されること、その mRNA 発現は細胞傷害の程度に伴って増加することから、NMDA による神経細胞傷害が MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現増加を誘導している可能性が示唆された。NMDA 誘発神経細胞傷害時、MIP-1 $\alpha$  の産生はミクログリアにおいてのみ観察されたこと、ミクログリアあるいは神経細胞を特異的に除去した培養スライ

スにおいては NMDA 誘発 MIP-1 $\alpha$  産生が抑制されたことから、ミクログリアでの MIP-1 $\alpha$  産生は、傷害を受けた神経細胞からミクログリアへの何らかのシグナルを介して惹起されている可能性が示唆された。NMDA 誘発 MIP-1 $\alpha$  mRNA 誘導に JNK が関与していることが明らかとなった。HIV-1 ウイルスタンパク Tat による MIP-1 $\alpha$  発現上昇に p38 が促進的に関与していることや、*Cryptococcus neoformans* 接種による Fc $\gamma$  受容体媒介性の MIP-1 $\alpha$  産生誘導には、Ras-MEK-ERK 系が関わっていることを鑑みると、ミクログリアでの MIP-1 $\alpha$  発現調節には、負荷される刺激によって様々な細胞内情報伝達系が関与しているものと考えられる。脳虚血患者の血液中では、MIP-1 $\alpha$  の濃度が増加することが報告されている。MIP-1 $\alpha$  の主要な受容体の1つである CCR5 に対して拮抗作用を示す TAK-779 が虚血性脳細胞傷害を軽減することや、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) において、抗 MIP-1 $\alpha$  抗体が有効であることなどを考え合わせると、虚血脳内における MIP-1 $\alpha$  産生を抑制することは、虚血性脳細胞傷害の軽減に繋がる可能性が考えられる。

#### 4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立 (小泉班)

Rat 海馬アストロサイトにおいて ATP, ADP, AMP, adenosine 刺激により速やかな BDNF mRNA 発現増加が認められ、その効果は adenosine で最も強いことが明らかになった。アストロサイトには ecto-ATPase, ecto-ADPase および 5'-nucleotidase が存在しており、ATP, ADP, AMP は代謝されて adenosine になる。したがって、BDNF mRNA 発現増加は adenosine によって引き起こされることが推測された。これまでアストロサイトでは、norepinephrine, serotonin, dopamine, glutamic acid などの神経伝達物質により BDNF 産生が一過的に起こることが報告されており、本研究と類似する。一方、fluoxetine 刺激は BDNF mRNA の発現を亢進させた。この作用は adenosine によって相乗的に増強された。気分障害時に BDNF 産生量が低下しているとされる臨床データを考慮すると、本研究結果は、SSRI がセロトニンの再取り込み阻害だけでなく、アストロサイトの BDNF 産生系に作用することにより治療効果を発揮している可能性を示唆する。おそらくアストロサイト由来 BDNF は神経機能亢進及び神経新生等を惹起し、気分障害を改善すると予想される。

#### 5. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析 (鳥光班)

本研究により、ATP による P2X<sub>4</sub> 受容体の構造変化が閉 → 開の構造変化モデルではなく、細胞外ドメインのダイナミックな構造変化を伴う変化である事が明らかとなった。刺激前ではサブユニット間の距離が近く、細胞外ドメインが下向きになっており、AFM では三量体構造が観察されない。一方、ATP 刺激により細胞外ドメインは上向きに変化し、これに伴いサブユニット間の距離が広がり、AFM で各サブユニットが識別/同定できるようになる。細胞外に起こるこのような変化が膜貫通ドメインにアロステリックな構造変化を誘導する事により、チャンネルポアが開くものと考えられる。

#### 6. 病態時のグリア細胞特性とその創薬ターゲットとしての評価科学基盤の確立 (佐藤班)

Tam による L-glu トランスポーター阻害作用は 1 pM という低濃度領域から観察されたことから、Tam とその作用メカニズムに関わる分子は医薬品ターゲットとして有望である。薬理的検討により ERs, PI3K カスケード, MAPK カスケードの関与が示唆された。我々は最近、エストロゲンが膜局在型 ER $\alpha$  (mER $\alpha$ ), PI3K を介して L-glu トランスポーターを阻害することを見いだした。よって、Tam は mER $\alpha$  の部分作用薬として作用している可能性が考えられる。NIT-eGFP retrovirus を用いれば、グリア前駆細胞およびグリア細胞に特化した検討が可能であることが示された。また、F-hGFAP::DsRed lentivirus のアストロサイト・ラジアルグリア特異性も確認された。特に P1-3 rat SVZ では F-hGFAP::DsRed がラジアルグリアを可視化することが示された。前脳スライス培養系においても上記 virus により、グリア前駆細胞、グリア細胞、ラジアルグリアが可視化された。以上の実験により確立した、グリア細胞を特異的に標識した前脳スライス培養系は、グリア前駆細胞、グリア細胞、ラジアルグリアを in vivo に近い状態で効率的、薬理的に評価できる in vitro 実験系である。

#### E. 結論

グリア細胞特性をもとにした創薬標的として、アロディニア症状において P2X<sub>4</sub> 受容体発現を調節するレチノイン酸受容体 (井上班), 低酸素あるいは虚血時の脳の脆弱性克服につながる、MCT を介したアストロサイトからニューロンへのエネルギー供給 (加藤班), 脳虚血時ミクログリアでのケモカイン MIP-1 $\alpha$  産生、その誘導を促す神経細胞からミクログリアへの情報伝達 (JNK など) (南班), 気分障害治療への有効性が見込まれるアストロサイトの BDNF 産生、その調節物質としての adenosine (小泉班), グルタミン酸

トランスポーター調節物質として tamoxifen (佐藤班) などを見いだした。また、グリア細胞に特化した医薬品評価・開発基盤技術として、極めて変化しやすいグリア細胞を *in vivo* に近い状態で評価可能な実験系である大脳皮質-線条体領域脳スライス培養系 (南班), ウィルスベクターによってグリア細胞を特異的に標識した前脳スライス培養系 (佐藤班) を確立した。さらに, AFM を用いたグリア関連因子のトポロジ-解析に成功し, 活性化メカニズムや病態時の役割の解明, 創薬に資する技術を確立した。(鳥光班)。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, Kato F, NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. *Pain*, 127 161-172 (2007)
2. Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X<sub>4</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, 55 604-616 (2007)
3. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K, UDP acting at P2Y<sub>6</sub> receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 446 1091-1095 (2007)
4. Ikeda H, Tsuda M, Inoue K, Murase K. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci*, 25 1297-1306, (2007)
5. Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K, Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience*, 147 153-63 (2007)
6. Tsuda M, Ishii S, Masuda T, Hasegawa S, Nakamura K, Nagata K, Yamashita T, Furue H, Tozaki-Saito H, Yoshimura M, Koizumi S, Shimizu T, Inoue K, Reduced pain behaviors and ERK activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. *J Neurochem*, 102 1658-1668 (2007)
7. Tsuda M, Hasegawa S, Inoue K, P2X receptors-mediated cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> activation in primary afferent sensory neurons contributes to neuropathic pain. *J Neurochem*, 103 1408-1416 (2007)
8. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Masuda T, Toyomitsu E, Tezuka T, Yamamoto T, Inoue K, Lyn tyrosine kinase is required for P2X<sub>4</sub> receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*, 56 50-58 (2008).
9. Inoue K, Koizumi S, Tsuda M, The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem*, 102 1447-1458 (2007)
10. 工藤佳久, 小泉修二, 和田圭司, 橋本謙二, グリア細胞を標的とする医薬品の創製. *日薬理誌*, 130 185-192 (2007)
11. 小泉修二, 藤下加代子, アストロサイトを介したニューロン-アストロサイト相互調節. *Brain and Nerve*, 56 707-715 (2007).
12. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K, Real-time single receptor/channel imaging of P2X<sub>4</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, under revision
13. Shinozaki Y, Siitonen AM, Sumitomo K, Furukawa K, Torimitsu K, Effect of Calcium Ions on Lipid Dynamics Analyzed with Fast Scanning Atomic Force Microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.* under revision
14. Furukawa K, Nakashima H, Kashimura Y, Torimitsu K, Novel "Lipid-Flow Chip" Configuration to Determine Donor-to-Acceptor Ratio-Dependent Fluorescence Resonance Energy Transfer Efficiency, *Langmuir*, 24 921-926 (2008)
15. Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K,  $\beta$ -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res*, 1150 108-120 (2007)
16. Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)

### 2. 学会発表

1. Inoue K, UDP, P2Y<sub>6</sub> and microglial phagocytosis. Gordon Research Conference "Apoptotic Cell Recognition & Clearance", Invited, (2007. 6, Lewiston, USA)
2. Inoue K, Tsuda M, Saito-Tozaki H, ATP receptor-dependent neuropathic pain: a mechanism of the modulation of pain sensation. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Invited, (2007. 7, Melbourne, Australia)
3. Inoue K, Microglial-dependent neuropathic pain: involvement of ATP receptors. 21st Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, invited, (2007. 8, Cancun, Mexico)
4. Inoue K, Microglial modulation of pain signaling. Neuro2007, invited, (2007. 9, Yokohama)
5. Ohsawa K, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S, Molecular mechanisms of ATP-induced microglial chemotaxis. Neuro2007, invited, (2007. 9, Yokohama)
6. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Kohsaka S, Inoue K. UDP, a novel mediator of microglial phagocytosis. Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
7. Yamada J, Hayashi Y, Inoue K, Kohsaka S, Nakanishi H, Inhibition of synaptic transmission precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
8. Masuda T, Tsuda M, Inoue K, Minocycline attenuates spinal microglia activation and tactile allodynia caused by interferon- $\gamma$ . Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
9. Kataoka A, Tsuda M, Inoue K. Involvement of NFAT in chemokine release from microglia induced by ATP. Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
10. Inoue K, Modification of pain sensation through

microglial ATP receptors. Second Joint Italian-German Purine Club Meeting, invited, (2007. 9, Leipzig, Germany)

11. Inoue K, Up-regulation of microglial P2X4 receptors in neuropathic pain state. APSN symposium on "Glial Activation and Function" Dalian, P.R. of China 2007, invited, (2007. 10, Dalian, China)
12. Tsuda M, Masuda T, Tezuka T, Kitano J, Yamamoto T, Inoue K. Src-family tyrosine kinase Lyn in microglia contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
13. Masuda T, Tsuda M, Shimoyama H, Inoue K. Intrathecal administration of interferon- $\gamma$  produces spinal microglia activation and long-lasting tactile allodynia. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
14. Fujita T, Tsuda M, Inoue K. Role of purinergic signaling in IL-6 release from cultured rat hippocampal astrocytes. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
15. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
16. 井上和秀, 神経損傷による病的疼痛発症メカニズム: ミクログリアが感覚情報のモーダルシフトを生む. 第12回グリア研究会, 特別講演, (2007年11月, 名古屋市)
17. 長谷川奈海, 井村泰子, 加藤総夫, ATP 受容体を介したアストロサイト-ニューロン連関機構の薬理学的解明. 第1回先端分子薬理学研究会(2007年11月, 東京)
18. 長谷川奈海, 井村泰子, 加藤総夫, ラット孤束核 P2Y1 受容体活性化グルタミン酸放出促進におけるアストロサイト ATP 放出の関与. 第81回日本薬理学会年会(2008年3月, 横浜)
19. 加藤総夫, 長谷川奈海, 和光未加, 井村泰子, アストロサイト放出ヌクレオチドによるダイナミックなシナプス伝達制御. 第81回日本薬理学会年会(2008年3月, 横浜)
20. 片山貴博, 岡村敏行, 大日方千紜, 上原孝, 南雅文, Neuronal injury induces the expression of multiple chemokines in astrocytes and microglia in organotypic cortico-striatal slice cultures, Neuro2007 (2007. 9, Yokohama)
21. 岡村敏行, 片山貴博, 松田知己, 永井健治, 木村宏, 内野茂夫, 高坂新一, 南雅文, Real time imaging study on injury-induced microglial activation in the hippocampal slice culture, Neuro2007 (2007. 9, Yokohama)
22. Minami M, Katayama T, Obinata C, Okamura T, Uehara T, Excitotoxic injury induces macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in rat cortico-striatal slice cultures, 37th annual meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
23. 小泉修一, 重本由香里, 多田薫, 篠崎陽一, 大澤圭子, 津田誠, 高坂新一, 井上和秀, 中枢神経傷害時の細胞外ヌクレオチドとミクログリアの食食作用(シンポジウム), GPCR 研究会(2007年5月, 東京)
24. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Jacobson K, Kohsaka S, Inoue K, Microrglial phagocytosis mediated by P2Y6 receptors. The 2<sup>nd</sup> Joint Italian-German Purine Club Meeting, (2007. 9, Leipzig, Germany)
25. 小泉修一, 最新の脳グリア細胞研究について 第1回山梨県C RPS研究会, (2007年11月, 山梨)
26. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Jacobson K, Kohsaka S, Inoue K. The "eat-me signal UDP" and microglial phagocytosis. (シンポジウム) 第81回日本薬理学会, (2008年3月, 横浜)
27. Fujishita K, Inoue K, Koizumi S. Upregulation of M1 muscarinic acetylcholine receptor in hippocampal neurons by astrocytic ATP. 第81回日本薬理学会, (2008年3月, 横浜)
28. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Jacobson K, Kohsaka S, Inoue K, The "eat-me signal UDP" and microglial phagocytosis mediated by P2Y6 receptors. US-Japan joint meeting for glia research, (2008. 3, Philadelphia, USA)
29. Furukawa K, Nakashima H, Kashimura Y, Torimitsu K, Selp -Spreading Supported Lipid Bilayer on Patterned Surface: Basic Properties and "Lipid-Flow Chip" Application 1st International Symposium of Nanomedicine, (2007. 4, Aichi, Japan)
30. Torimitsu K, Functional analysis of neurons and receptor proteins for device application, 1<sup>st</sup> International Symposium of Nanomedicine, (2007. 4, Aichi, Japan)
31. 篠崎陽一, 住友弘二, 鳥光慶一, GABA<sub>A</sub>受容体サブユニット構造の原子間力顕微鏡を用いた解析, 第81回日本薬理学会年会 (2008年3月, 神奈川)
32. 篠崎陽一, 住友弘二, 津田誠, 小泉修一, 井上和秀, 鳥光慶一, 原子間力顕微鏡を用いた P2X<sub>4</sub>受容体の一分子イメージング, ATP・アデノシン研究会 (2007年9月, 愛知)
33. Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, hGFAPプロモーター下流に DsRed をもつレンチウィルスを用いたアストロサイト特異的標識法の確立 Neuro2007 (2007. 9, Yokohama)
34. Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, Astrocyte-specific labeling with a recombinant lentiviral vector carrying DsRed protein driven by a human glial fibrillary acidic protein promoter. 2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2007. 10, San Diego, USA)
35. 佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤憲一, タモキシフェンと類縁化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用 第81回日本薬理学会年会 (2008年3月, 横浜)
36. Sato K, Matsuki N, Nakazawa K, Estrogens inhibit L-glutamate uptake by astrocytes by membrane estrogen receptor alpha. US-Japan joint meeting for glia research (2008. 3, Philadelphia, USA)

## 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



## バイオ医薬品の特性解析及び品質・安全性評価法の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部  
研究者 山口 照英

**研究要旨** 質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法を作成し、そのフィージビリティ・スタディ(実行可能性試験)を行った。糖鎖試験法としての蛍光標識法及び逆相 HPLC、並びに CE の有用性を確認した。エリスロポエチンの低比活性分子が HTP 工程によって除去されることを見出した。ウイルスクリアランス試験に NAT を導入するための条件を明らかにした。ウイルスクリアランス試験に用いるウイルス感染性の高感度検出法を開発した。ウイルス不活化条件検討のためのインフルエンザウイルスの感染価測定法を確立した。ヒト尿由来タンパク質についてパルボウイルス B19 に対するウイルス検査法を確立した。

### 分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所	川崎 ナナ
(独)医薬品医療機器総合機構	荒戸 照世
キリンファーマ(株)製造本部	石川 リカ
中外製薬(株)分析技術研究部	古賀 明子
(財)化学及血清療法研究所試作研究部	中島 和幸
アステラス製薬(株)製剤研究所	山口 秀人
大日本住友製薬(株)技術研究センター	濱詰 康樹
サーモフッシャーサイエンティフィック(株)	窪田 雅之
大阪大学大学院理学研究科	長束 俊治
近畿大学薬学部	掛樋 一晃
国立医薬品食品衛生研究所	内田恵理子
日本ケミカルリサーチ(株)研究センター	小紫 嘉一
(財)化学及血清療法研究所菊池研究所	菅原 敬信
(株)ベネシス 枚方研究所	柚木 幹弘

識法と液体クロマトグラフィー(HPLC)を組み合わせた手法の実用性を評価した。さらに、BHK 細胞により発現させたエリスロポエチン精製におけるヒドロキシアパタイト(HTP)工程の有用性評価及び糖鎖試験法に関する研究を行った。

ウイルス安全性に関する研究では、核酸増幅検査(NAT)のウイルスクリアランス試験への適用、ウイルス検出技術の高感度化・高精度化及び検出法の標準化、ウイルス不活化・除去に関する技術開発を目的とした。このために、ウイルスクリアランス試験に NAT を導入するための試料の処理条件を評価した。また、クリアランス試験に用いる感染性試験の高感度化に関する検討を行った。さらに、ウイルス不活化条件検討のためインフルエンザウイルスの感染価測定法を確立した。また、ヒト尿由来タンパク質についてパルボウイルス B19 に対するウイルス検査法の確立を行った。

### A. 研究目的

新規バイオ医薬品を早期に実用化に結び付けるためには、バイオ医薬品開発の初期段階から承認審査に至る創薬全般に渡る迅速化・効率化が不可欠である。本研究では、最先端のタンパク質構造解析技術を取り入れた特性解析・品質評価法の開発と品質試験法の標準化、並びにウイルス安全性に関する高感度・高精度な試験法の開発と試験法の標準化を行うことにより、バイオ医薬品開発の迅速化・効率化に資することを目的とする。

品質に関する研究では、質量分析(MS)を用いたペプチド・タンパク質性医薬品の確認試験法を作成、糖鎖試験法の標準化、及びエリスロポエチンの精製工程及び糖鎖試験に関する研究を行う。本年度は、MS を用いた確認試験法案を作成し、7 機関 15 試験室において空間再現性を確認することによって、本案の実行可能性を評価した。また、糖鎖試験法の標準化に向けて、各種蛍光標

### B. 研究方法

#### (1) 品質に関する研究

##### 1) MSを用いた確認試験法の標準化

**試料:** グルタチオン( $C_{10}H_{17}N_3O_6S_1$ : 単同位体質量 307.084, 平均質量 307.3)、ゴナドレリン( $C_{55}H_{75}N_{17}O_{13}$ : 単同位体質量 1,181.573, 平均質量 1,182.3)、遺伝子組換えヒトインスリン( $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ : 単同位体質量 5,803.638, 平均質量 5,807.6)、遺伝子組換えヒト成長ホルモン( $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ : 単同位体質量 22,111.0、平均質量 22,125)、及び遺伝子組換えヒト血清アルブミン( $C_{2936}H_{4590}N_{786}O_{889}S_{41}$ : 単同位体質量 66,395、平均質量 66,437)を用いた。

**装置:** ESI-MS 装置として、TOF 型: LCT (マイクロマス/ウォータース); Q-TOF 型: Qstar Elite (アプライドバイオシステムズ)、Ultima API (マイクロマス)、及び Synapt

HDMS(ウォーターズ);IT型:LCQ Deca, LCQ Advantage MAX及びLTQ(サーモフィッシャーサイエンティフィック)、Esquire HCT plus(ブルカー・ダルトニクス);FT-ICR型:LTQ-FT(サーモフィッシャーサイエンティフィック)を使用した。MALDI-MS装置として、TOF型:ABI 4800, Voyager DE RP及びVoyager DE-PRO(アプライドバイオシステムズ)、Autoflex II(ブルカー・ダルトニクス)、AXIMA-TOF<sup>2</sup>(島津製作所)を使用した。

**質量校正:** ESI-MS装置を使用した場合は、YOKUDELNA、Caffeine、MRFA、Ultramark 1621、NaI、NaICs、ES tuning Mix Pos、またはGlu-fibrinopeptideを用いた。MALDI-MS装置を使用した場合は、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(CHCA)、GRGDTPペプチド、angiotensin I、ACTH 18-39、bombesin、bradykinin fragment 1-7、angiotensin II、substance P、P<sub>14</sub>R、ACTH 1-17、somatostatin 28、bovine insulin、human insulin)、ubiquitin I、cytochrome C、myoglobin、apomyoglobin、carbonic anhydrase、trypsinogen、protein A、aldolase、またはBSAを用いた。

**測定方法:** ESI-MSでは、脱塩した試料を1~10  $\mu\text{mol/L}$  になるように溶媒に溶解し、ESIチップもしくは、HPLCにより試料を導入して質量を測定した。MALDI-MSでは、試料を1~10  $\mu\text{mol/L}$  になるように0.1% TFAに溶解し、マトリックスとして、ペプチド試料ではCHCAまたは2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)を、タンパク質試料ではシナピン酸(SA)を用いた。いずれもポジティブイオンモードで測定した。タンデム質量分析(MS/MS)は、プロトン化分子を前駆イオンとして選択して実行した。

**分子質量の計算:** 単同位体質量もしくは平均質量を求め、それぞれ単同位体質量理論値もしくは分子量と比較した。理論分子質量計算には、原子量 H:1.00794、C:12.0107、N:14.0067、O:15.9994、S:32.065を、同位体精密質量は <sup>1</sup>H:1.007825、<sup>12</sup>C:12.000000、<sup>14</sup>N:14.003074、<sup>16</sup>O:15.994915、<sup>32</sup>S:31.972072を用いた。

**システム適合性:** アンジオテンシンIの実測値と理論値の差などから判定した。

**還元アルキル化:** ピリジリエチル化、カルボキシアミドメチル化、またはカルボキシメチル化した。

**統計処理:** 分散分析により室内及び室外再現標準偏差を計算した。同一の研究機関及び同一試験者であっても、タイプの異なる装置を用いた場合は、異なる試験と見なした。

**測定機関(試験室数):** 国立医薬品食品衛生研究所(4)、キリンファーマ株式会社(4)、中外製薬株式会社(2)、アステラス製薬株式会社(1)、大日本住友製薬株式会社(2)、近畿大学(1)、島津製作所株式会社(1)

## 2) 糖鎖の修飾

**糖鎖の蛍光標識:** 2-アミノ安息香酸(AA)、2-アミノベンズアミド(AB)、及び2-アミノピリジン(PA)による蛍光標

識を検討した。

**糖鎖のHPLC:** サイズ分画HPLC(カラム:TSK-GEL Amido-80, 4.6x75 mm;溶離液:アセトニトリル溶離液/ギ酸アンモニウム, pH 4.4)、逆相HPLC(カラム:Cosmosil 5C18-P, 2x250 mm;溶離液:100 mM 酢酸アンモニウム, pH 4.0/1-ブタノール)、及び陰イオン交換HPLC(カラム:TSK-GEL DEAE-5PW, 7.5 x 75 mm;溶離液:酢酸アンモニウム, pH 9.0)を検討した。

## 3) エリスロポエチンの精製工程と糖鎖試験

HTPにより異性体を分画し、アプライ、パス、テーリング、再生各画分の性状を、SDS-PAGE、キャピラリー電気泳動法(CE)、等電点電気泳動法(IEF)、生物活性試験により比較した。また、各画分の糖鎖を糖組成分析及びCEにより比較した。

## (2) 安全性に関する研究

### 1) NATのウイルスクリアランス試験への適用

**遊離核酸消化:** 工程サンプル(グロブリン溶液)にCowpea mosaic virus由来のDNA/RNAを添加し、DNase又はRNaseによる消化を行った後に核酸抽出・増幅を行った。

**超遠心によるウイルス濃縮:** 工程サンプルにHAV(培養上清由来)とHCV(ヒト血漿由来)を添加し、超遠心操作前後のウイルスゲノム量をPCR法により測定してウイルス濃縮(回収)効率を検討した。

**ウイルス感染性の高感度検出法:** マウス白血病ウイルス(MuLV)をモデルウイルスとした。ポリエチレンイミン(PEI)結合磁気ビーズはIMMUTEX-MAG(JSR社)を、水溶性カルボジイミドEDC存在下、PEI(MW 70,000)とカップリングして作製した。PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮は、ウイルス液にPEI磁気ビーズを添加混合後、PEI磁気ビーズ画分からウイルスゲノムを抽出してリアルタイム定量RT-PCRで定量した。PEI磁気ビーズを用いた強制感染系は、ウイルス液とPEI磁気ビーズを混合しウイルスをビーズに結合させた後、M.dunni細胞に添加し、磁気プレート上で37°C、30分間感染させた。その後、通常通り培養して経時的に培地を回収し、ウイルスゲノムを抽出してリアルタイム定量RT-PCRにより定量した。また、S+L法による感染性試験は、PG4S+L細胞に同様に感染後、顕微鏡観察でフォーカス形成の有無により判定した。

### 2) ウイルス不活化条件の検討

インフルエンザウイルスをモデルウイルスとした。MDCK細胞を播種し、confluentに培養後、20  $\mu\text{g/mL}$  のトリプシン溶液とウイルス希釈液を加え、4日間培養した。細胞のNaphthol blue black染色、溶解後、630nmのODよりウイルス感染価(Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/mL)を求めた。不活化剤の細胞毒性は、不活化剤希釈液をウイルス液の代

わりに添加して同様に測定した。

### 3) NATによるウイルス検査法の確立

パルボウイルス B19 陽性血漿を生理食塩液で希釈後、ヒト尿由来たん白質に添加したものを検体とし、スマイテスト EX-R&D を用いてウイルス DNA を抽出した。スマイテスト パルボウイルス B19 遺伝子定性キットを用いてウイルス核酸を検出した。試験実施に当たり、試験法としての信頼性向上のため、ウラシル含有プラスミド調製し、このプラスミドを陽性対照として用いた。

#### 倫理面への配慮

ゼブラフィッシュの胚を用いた研究は、大阪大学動物実験規定に基づき、実験計画の承認を得て行った。感染性物質の取り扱い、各実施施設の「病原体等安全管理規程」に沿って実施し、遺伝子組み換え DNA の調製に関しては、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に沿った社内規定のもと実施した。ヒト由来ウイルス陽性血漿は匿名化された検体を使用した。

## C. 研究結果

### (1) 品質に関する研究

#### 1) MSを用いた確認試験の標準化

**確認試験法案の作成** イオン化方法として、ESI 及び MALDI を、分析計として Q 型、IT 型、TOF 型、及び FT-ICR 型を、ESI-MS の溶液として、酢酸、ギ酸、TFA 等を含む水、アセトニトリル、メタノールを、MALDI-MS のマトリックスとして、ペプチドには CHCA または DHB を、タンパク質には SA を選定し、確認試験法案を作成した。

**試験法案の実行可能性の検証1** 機関 A～G において、試験法案に基づいて、グルタチオン、ゴナドレリン、インスリン、ヒト成長ホルモン、及びヒト血清アルブミンの質量を測定した。インスリンは各機関で還元アルキル化した後、A 鎖及び B 鎖の質量を測定した。各機関の測定条件及び測定結果をそれぞれ表1及び表2にまとめる。

**グルタチオン** すべての機関において、単同位体質量を測定した。単同位体質量の実測値と理論値の差は、平均-0.01 Da(最大-0.05 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、0.042 Da(137 ppm)であった。

**ゴナドレリン** 1試験室を除いて単同位体質量を測定した。単同位体質量の実測値と理論値の差は、平均 0.00 Da(最大-0.14 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、0.061Da(52 ppm)であった。

**還元アルキル化ヒトインスリン A 鎖** 1試験室を除いて単同位体質量を測定した。単同位体質量の実測値と理論の差は、平均 0.00～0.17 Da(最大 0.87 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、0.21～0.28 Da(～

106 ppm)であった。

**還元アルキル化インスリン B 鎖** 11 試験室が単同位体質量を、また 3 試験室で平均質量を測定した。単同位体質量の実測値と理論値の差は、平均 0.03～0.20 Da(最大 0.61 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、0.17～0.30(～82 ppm)であった。

**ヒトインスリン** 4試験室が単同位体質量を測定し、9 試験室が平均質量を測定した。単同位体質量の実測値と理論値の差は、平均 0.34 Da(最大 1.2 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、0.60 Da(103 ppm)であった。また、平均質量の実測値と理論分子量の差は、平均-1.1 Da(最大-2.0 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、0.90 Da(155 ppm)であった。同位体存在比から推定したインスリンの単同位体分子の存在量は、天然存在比最大同位体分子の約 14%しかないことから、インスリンより分子量の大きなペプチドでは、単同位体ピークの検出は難しいと考えられ、単同位体質量が測定可能なペプチドは、分子量が 6,000 程度のものまでと考えられた。

**ヒト成長ホルモン** いずれの機関も平均質量を測定した。実測平均質量と理論値の差は、平均-6.4 Da(最大-32 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、10.8 Da(490 ppm)であった。ESI-MSI で得られた実測平均質量と理論値の差は、平均-0.2 Da(最大 2.3 Da)であり、室間再現性は、0.97 Da(44 ppm)であったが、MALDI-MS で得られた実測平均質量と理論値の差は、平均-16.3 Da(最大-32 Da)であり、室間再現標準偏差は 12.2 Da(552 ppm)であった。

**ヒト血清アルブミン** 全機関が平均質量を測定した。実測値と理論値の差は、平均-22 Da(最大-82 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、45 Da(677 ppm)であった。ESI-MS による測定では、実測値と理論値の差は平均 12 Da(最大 63 Da)、また室間再現標準偏差(相対標準偏差)は 22 Da(330 ppm)であり、ヒト成長ホルモンの結果と比べるとばらつきが大きかった。しかし、IT 型分析計を用いた試験室を除く 4 試験室(TOF 型分析計を使用)の実測値と理論値の差は平均 2.7Da、また室間再現標準偏差(相対標準偏差)は 3.0 Da(136 ppm)であり、質量誤差 500ppm 以内で測定できることが分かった。MALDI-MS による測定では、実測値と理論分子量の差は平均-55 Da(最大-91 Da)であり、室間再現標準偏差(相対標準偏差)は、34 Da(517 ppm)であった。分子量 60,000 を超えると、ESI-MS で測定した場合でも、実測値と理論値の差が大きくなることが確認された。

**試験法案の実行可能性の検証2** 機関 A(4)、B(3)、C(2)、D(1)、E(2)及び G(1)においてグルタチオン、ゴナドレリン、インスリン A 鎖及び B 鎖の MS/MS を2回ずつ行った。

**グルタチオン** IT 型分析計を用いたときにローマスカ

ットオフにより低  $m/z$  のイオン ( $y_1$ ,  $m/z$  76.0) が観測されなかつたことを除き、全ての推定  $b$  及び  $y$  イオンが観測された。

**ゴナドレリン** 予想されるフラグメントイオン  $b_{1,9}$  及び  $y_{1,9}$  の中で、2回とも検出できたイオンの数は、平均 13.2 個 (7~16 個) であった。また、各機関において規格として設定可能と判断されたイオンは、平均 10.2 個 (5~16 個) であった。

**還元アルキル化インスリン A 鎖** ビニルピリジル化した3機関は、いずれもプロトン化分子及びフラグメントイオンを観測することができたが、還元カルボキシメチル化した4機関では、プロトン化分子を検出できない、もしくは、プロトン分子を検出できてもフラグメントイオンを検出できない、という結果が得られた。インスリン A 鎖にはシステイン残基が4つあることから、還元アルキル化の方法が、MS 及び MS/MS に影響することが明らかになった。

**還元アルキル化インスリン B 鎖** いずれの還元アルキル化方法でも、5 個以上のフラグメントイオンを検出することができた。また、いずれの機関も、5~10 個前後のフラグメントイオンを規格として設定可能であると判断した。

## 2) 糖鎖試験法の標準化

はじめに、モデル糖タンパク質ウシγ-グロブリンからヒドラジン分解により切り出した *N*-結合型糖鎖を PA、AA、及び AB でそれぞれ標識し、蛍光強度と HPLC による分離能を比較した。その結果、PA 化糖鎖の蛍光強度は、AA 化糖鎖や AB 化糖鎖よりも約3倍程度高いことが明らかとなった。サイズ分画 HPLC によって展開したところ、分離能に顕著な差異は見られなかったが、逆相 HPLC における分離能は、PA 化糖鎖の方が、AA 化糖鎖や AB 化糖鎖よりも、顕著に優れていることが明らかとなった (図1)。また、PA 化糖鎖調製物中の蛍光性不純物は、ほとんどすべてが素通り画分付近に溶出しているのに対して、AA 化糖鎖と AB 化糖鎖では分析の障害となる可能性を持つ、不純物由来の大きなピークを生じることが確認された。PA は他の2試薬に比べて、感度及び分離能の面から優れていることが明らかとなった。

つぎに、PA の実用性を検証するために、PA 化と HPLC を用いてゼブラフィッシュ胚由来糖鎖及びウシ肺由来硫酸化糖鎖の構造解析を行った。未知構造を含む極微量の糖鎖を検出し、構造の決定まで行うことができたことから、PA 化と HPLC の実用性が実証された。

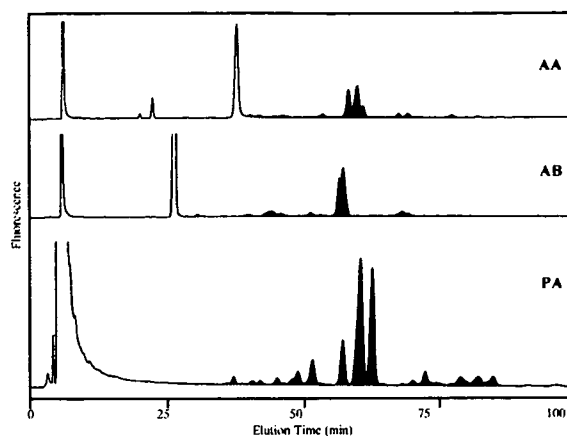


図1 逆相 HPLC による AA 糖鎖、AB 糖鎖及び PA 糖鎖の分離

## 3) エリスロポエチンの精製工程と糖鎖試験

HTP で分画したエリスロポエチンのそれぞれの画分の性状を比較したところ、パス画分の分子種は、テーリング画分に比べて、SDS-PAGE において高分子側にシフトしていること、CE において塩基性側のピークが減少していること、IEF において塩基性側のバンドが減少していること、*in vivo* 活性が 1.3 倍に増加していることが確認された。また、糖鎖の CE の結果、パス画分では、3 本鎖糖鎖が減少し、ラクトサミン構造をもつ 4 本鎖糖鎖が増加していることが明らかになった (図2)。

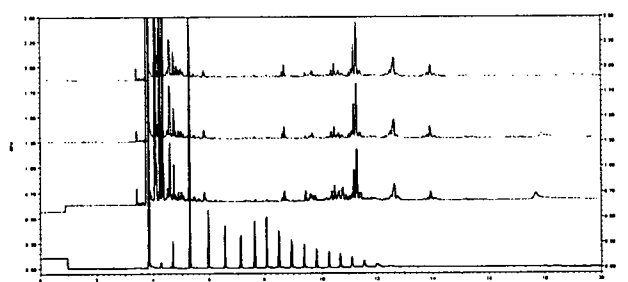


図2 エリスロポエチンの HTP 画分の糖鎖の CE.

上段：アプライ；中段：パス；下段：テーリング画分

## (2) 安全性に関する研究

### 1) NAT のウイルスクリアランス試験への適用

#### ① 共同研究の方針

バイオ医薬品の製造工程評価におけるウイルスクリアランス試験への NAT の適用に関する共同研究実施を検討した。NAT は感度が高く試験が簡便で、不活化工程と除去工程を区別して評価出来る利点があるが、緩衝液の影響が出やすく、感染性のない核酸断片も測定されることが欠点である。バイオ医薬品の製造工程中 NAT の適用が有用と考えられるのは、不活化と除去の両方を含むアフィニティークロマトグラフィー (Protein A 等) 工程とウイルス濾過工程である。モデルウイルスには、MuLV 及び低 pH で不活化されない MVM (マウス微小ウイルス) が