

有用と考えられた。共同研究では、Protein A に MuLV をロード後、感染性試験と NAT を実施し、ウイルスの不活化、除去のウイルスクリアランス能を解析することとした。

② NAT 導入のための試料処理条件の検討

本年度は、NAT を導入するにあたっての試料処理条件を検討した。NAT は感染性と関係しない遊離核酸断片を検出する可能性があるため、核酸抽出操作の前に核酸断片を消化する必要がある。そこで工程サンプル組成が遊離核酸の消化及び抽出、増幅に干渉するかどうか、及びサンプル液を除去するためのウイルスの濃縮法を検討した。まず、工程サンプルに添加した DNA の回収量を未処理、DNase 緩衝液存在下、DNase 処理後で比較した結果、工程サンプルは DNase 処理に影響するが、工程サンプル原液においても約 3Log の消化能力を有しており、原液からの抽出操作は可能であった。一方、工程サンプルは RNA を添加した時の抽出・増幅に干渉し、RNase 処理緩衝液存在下及び RNase 処理後の RNA 回収量についても同様であり、抽出操作には工程サンプルを 100 倍希釈する必要があった(表3)。次に、超遠心によるウイルス濃縮を検討した。HAV は IgG による凝集塊誘導を行う方法、行わない方法のいずれもウイルス粒子のほぼ全量を沈殿画分に回収可能であった。一方、HCV は上清にほぼ全量が回収された(表4)。超遠心操作によるウイルス粒子の濃縮・回収は有効な手段であるが、ウイルス毎に条件を設定する必要があるが示された。

表3. DNase, RNase 消化条件での DNA/RNA の回収量 (Log)

| | Condition | Water | Neat | x10 diluted | X100 diluted |
|-----|--------------------|-------|------|-------------|--------------|
| DNA | Un-treated | 6.7 | 6.6 | 6.6 | 6.6 |
| | Added DNase buffer | 7.2 | 6.2 | 5.5 | 5.5 |
| | DNase digested | 2.1 | 3.2 | 3.8 | 3.6 |
| RNA | Un-treated | 6.5 | 2.6 | 4.6 | 6.3 |
| | Added RNase buffer | 6.4 | 2.3 | 4.1 | 6.1 |
| | RNase digested | 2.5 | 0.0 | 2.2 | 2.4 |

表4. 超遠心によるウイルス回収量 (Log)

| ウイルス | HAV (Picomaviridae) Non-enveloped ssRNA 22-30 nm | HCV (Flaviviridae) Enveloped ssRNA 40-60 nm |
|-----------|--|--|
| 遠心条件 | 150000g x 3 hrs 29941 rpm x 3 hrs (SW41Ti) | 72000 g x 2 hrs 20460 rpm x 2 hrs (SW41Ti) |
| Buffer 条件 | Globulin 含 抗 HAV 抗体 あり | Globulin 含 抗 HCV 抗体 なし |
| 遠心前 | 7.3 | 6.6 |
| 遠心上清 | 5.2 | <4.3 |
| 遠心沈殿 | 7.1 | 6.2 |

③ ウイルスクリアランス工程評価のためのウイルス感染性の迅速・高感度検出法

ウイルスクリアランス工程評価に用いる MuLV の感染性試験について、従来法よりも高感度で検出する方法として、細胞を用いたウイルス感染性試験と、PCR 法によるウイルスの迅速・高感度検出法の長所を組み合わせた感

染性 PCR 法の開発を行った。感染性 PCR 法は、MuLV を感受性細胞である M.dunni 細胞に感染後、細胞中で増幅したウイルスの核酸を抽出してリアルタイム定量 RT-PCR で検出する方法である。この際、MuLV は培養上清中に得られるので、上清中のウイルスを濃縮すればより迅速・高感度にウイルスを検出可能である。我々は、PEI 磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法が種々のウイルスの濃縮・高感度検出に有用であることを報告しているが、培養上清中の MuLV について PEI 磁気ビーズでの濃縮を検討した結果、効率よく結合・回収されることが確認された。また、感染性 PCR 法では細胞への感染効率がウイルスの検出感度に大きく影響することから、PEI 磁気ビーズと磁性プレートを利用した強制感染系 (magnetofection) の利用を検討した。その結果、感染性 PCR 法は従来の S+L-法より約 10 倍高感度に検出が可能であり、より短期間で検出できた。強制感染系を利用するとさらに 10 倍高感度に検出された(図3)。

| Virus (iu) | Day 1 | Day 3 | Day 6 |
|------------|-------|-------|-------|
| 10 | 0/3 | 0/3 | 3/3 |
| 1 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| 0.1 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| 0.01 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |

| Virus (iu) | Day 1 | Day 3 | Day 6 |
|------------|-------|-------|-------|
| 10 | 0/3 | 1/3 | 3/3 |
| 1 | 0/3 | 0/3 | 2/3 |
| 0.1 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| 0.01 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |

| Virus (iu) | Day 1 | Day 3 | Day 6 |
|------------|-------|-------|-------|
| 10 | 0/3 | 3/3 | 3/3 |
| 1 | 0/3 | 3/3 | 2/3 |
| 0.1 | 0/3 | 0/3 | 1/3 |
| 0.01 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |

図3 MuLVの感染性の検出法の比較

2) ウイルス不活化条件の検討

株化細胞を培養基材としたインフルエンザワクチンの開発において、ワクチンの安全性を高めるため、製造工程へ迷入ウイルスの不活化を目的としたウイルス不活化工程の導入を検討している。本年度は、インフルエンザウイルスをモデルに感染価測定系を構築し、不活化剤の影響を検討した。インフルエンザウイルス感染価測定系としては、MDCK 細胞を用いた系を構築した。インフルエンザウイルス A/Panama/2007/99 (2003/2004 年シーズンのワクチン株) について感染価を測定した結果、8.6Log₁₀TCID₅₀/mL であり、系の検出限界は、ウイルス液として 0.05mL を使用すると Log_{100.05}=1.3 (Log₁₀TCID₅₀/mL) であった。ウイルス不活化剤のウイルス感染価測定系への影響(細胞毒性)を検討した結果、使用する不活化剤によって細胞毒性の強さは異なるが、Log₁₀TCID₅₀/mL で 1.6~4.1 の細胞毒性がみられた(表5)。また、インフルエンザウイルスに種々の不活化処理を実施し、構築した系で処理前後の感染価を比較し、ウイルス不活化効果を確認した(表6)。

表5. インフルエンザウイルス感染価測定系への不活化剤・添加剤の影響(細胞毒性)

| | 細胞毒性 Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL |
|-----------------|---|
| 0.1% Tween20 | 1.6 |
| 40%ショ糖 | 2.3 |
| 0.05%β-プロピオラクトン | 2.1 |
| 2% Triton X-100 | 4.1 |

表6. インフルエンザウイルスへの不活化剤・添加剤の影響

| 不活化処理条件 | Log ₁₀ TCID ₅₀ /mL | LRV |
|----------------------------|--|-----|
| ウイルス液 | 11.9 | — |
| 0.05%β-プロピオラクトン処理 | 6.6 | 5.3 |
| 2% Triton X-100 処理 | 4.6 | 7.3 |
| 2% Triton X-100 処理→遠心 | 4.8 | 7.1 |
| β-プロピオラクトン、Triton 同時処理 | 4.6 | 7.3 |
| β-プロピオラクトン処理後、Triton 処理、遠心 | 4.1 | 7.8 |

3) NAT によるウイルス検査法の確立

パルボウイルス B19 はヒトへの病原性を有するウイルスの中で最も不活化及び除去が困難なウイルスであり、原料にウイルスが混入した場合、パルボウイルス B19 は製品に残存する可能性が憂慮されるウイルスである。そこで、ヒト尿由来タンパク質のウイルス安全性確保のためパルボウイルス B19 の NAT 試験方法の確立と分析法バリデーションを実施した。パルボウイルス B19 のウイルス核酸の抽出方法として、抽出原理の異なる 2 種の方法(カラム精製法または塩析)を比較した結果、カラム精製法では内部コントロールでの吸光度が減少することから、パルボウイルス B19 NAT 試験は核酸抽出を塩析法のスマイテスト EX-R&D で、検出をスマイテスト パルボウイルス B19 遺伝子定性キットで実施することとした。検出限界を求めるため、種々の濃度のパルボウイルス B19 を添加したヒト尿由来たん白質を検体として NAT 試験を繰り返し実施した結果を表 7 に示す。ウイルス濃度毎の検出数、及びウイルス濃度の対数値、試験回数をもとにプロビット分析を行った。その結果、95%検出限界が 35.7copy/mL となり、NAT 試験法として十分な検出感度であることが確認された。

表7. 検体中のパルボウイルス B19 濃度と検出数

| 実施番号 | 検体中のウイルス濃度(copy/mL) | | | | | | |
|---------|---------------------|-----|----|----|------|------|---|
| | 200 | 100 | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 0 |
| 1 | + | + | + | + | + | — | — |
| 2 | + | + | + | + | + | + | — |
| 3 | + | + | + | — | — | — | — |
| 4 | + | + | + | + | + | — | — |
| 5 | + | + | + | + | + | + | — |
| 6 | + | + | + | + | — | — | — |
| ウイルス検出数 | 6 | 6 | 6 | 5 | 4 | 2 | 0 |

+ : 検出 - : 検出されず

D. 考察

本研究では、品質に関する研究として、MS 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案の作成とその試験法案の実行可能性の検証、標準的糖鎖試験法作成のための蛍光標識法と HPLC 法の検証、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った。また、安全性に関する研究として、核酸増幅検査(NAT)のウイルスクリアランス試験への適用のための試料の処理条件の評価、クリアランス試験に用いる感染性試験の高感度化、ウイルス不活化条件の検討及びパルボウイルス B19 に対するウイルス検査法の確立に関する研究を行った。

(1) 品質に関する研究

1) MS の標準化

MS は、ペプチドや分子量 10 万以下のタンパク質の質量を測定できること、また、タンデム質量分析(MS/MS)により、アミノ酸配列等に関する情報が得られることから、近年、ペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験として取り入れられるようになってきた。しかし、現在、主なイオン化法として ESI 及び MALDI の 2 種類があること、分析計として Q 型、IT 型、TOF 型、FT-ICR 型など複数の装置があること、装置を開発したメーカーごとに推奨している質量校正用標準品が異なっていること、試験者によって測定方法が異なることなど、分析条件が大きく異なることから、試験結果の許容範囲や試験法としての実行可能性が明確にされていなかった。そのため、MS 装置や試験者に依存しない標準的試験法の整備と、実行可能性の範囲を明らかにすることが望まれてきた。

本年度は、MS 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案を作成し、多機関による実行可能性の検証を行った。その結果、本試験法によって、分子量 1,000 以下のペプチドでは単同位体質量 0.3 Da、分子量 1,000~6,000 のペプチドでは、単同位体質量を測定する場合は 300 ppm、平均質量/最大強度質量を測定する場合は 500 ppm、分子量約 22,000 までのペプチド及びタンパク質では、ESI の場合は 500 ppm、また、MALDI の場合は 2,000 ppm 以内の誤差で質量を測定できることが確認された。さらに、MS/MS によって、分子量 300~4,000 のペプチドから 5~10 のフラグメントイオンが再現性よく検出できることを確認し、MS 単独でペプチドを確認できない場合、MS/MS を確認試験として利用できることを確認した。以上のように、本年度の成果として本試験法の実行可能性が確認されてことから、今後、日局参考情報収載案として提案する予定にしている。

2) 糖鎖試験法の標準化

切り出した糖鎖を高感度で検出するためには、標識化が必要であり、蛍光標識が用いられることが多い。そこで本年度は、蛍光標識法として汎用性が高い PA 化、AA 化、

AB 化の蛍光強度と分離能を比較した。その結果、PA 化糖鎖は蛍光強度が強いこと、また、逆相 HPLC での分離能が非常に高く、多くの糖鎖を効率よく分離できることから、糖鎖分析手段として優れていることが確認された。PA は、我が国発のオリジナルという観点からも、プロモートされるべき手法であると考えられる。

3) エリスロポエチンの性状と糖鎖解析

HTP 工程は、糖鎖構造の違い及びこれに起因する電荷的性状の違いにより、エリスロポエチンのグリコフォームを分離できること、また、HTP 工程により、比活性の低い塩基性分子を除去できることが確認された。また、CE は、サイズ分画 HPLC に比べると、分離能が優れていること、分析時間が短いこと、誘導体の精製の必要がないことなど、優れた点を有しており、糖鎖試験法として優れていると考えられた。

(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

NAT をウイルスクリアランス試験に導入するにあたっての試料処理条件を検討した。グロブリン工程サンプルを用いた DNA/RNA 回収において、工程サンプルは DNA 回収にはほとんど干渉しないが、RNA 回収には明らかな干渉が認められた。干渉の原因はグロブリン、RNA 抽出時の RNase 活性の存在、工程サンプル中の RT-PCR 阻害因子などが考えられるが特定はできていない。このことよりサンプル毎に RNA/DNA 回収への影響を事前に評価しておく必要があることがわかった。一方、今回の超遠心条件で HAV は回収可能であったが、HCV は同じ Flaviviridae に属する BVD を回収する条件にもかかわらず回収されなかった。これは HCV がリポ蛋白と結合していることによる沈殿形成の低下が示唆された。ウイルス回収法としての超遠心法は有効な手段であるが、ウイルス毎にその条件を設定する必要があることが明らかになった。

また、ウイルスクリアランス工程評価に用いる MuLV の感染性の高感度検出法について検討した。MuLV を細胞に感染後、細胞で増幅したウイルスの核酸を抽出してリアルタイム定量 PCR で検出する感染性 PCR 法、培養上清中に得られる MuLV を PEI 磁気ビーズで濃縮する方法、MuLV の感染に PEI 磁気ビーズと磁気プレートを用いた強制感染系を利用する方法を組み合わせることで、MuLV の感染性を短期間で高感度に検出することが可能であることを示した。これらの手法は他のウイルスにも適用可能であると考えられ、ウイルスクリアランス工程評価を実施するうえで有用と考えられる。

2) ウイルス不活化条件の検討

現行のインフルエンザワクチンで行われている不活化確認試験は、孵化鶏卵を用いる方法であるが、株化細胞

で製造したワクチンへの迷入ウイルスの不活化確認の系としては適切ではない。そこで、MDCK 細胞を用いたインフルエンザウイルスの感染価測定系を構築し、これを迷入ウイルスの不活化確認系として応用した。今回、不活化剤の測定系への影響を確認したところ、不活化剤には細胞毒性があり、測定法への影響が懸念されるため、不活化を厳密に評価するためには、さらに工夫が必要であることが明らかになった。今後、この方法でインフルエンザウイルスの不活化条件を確立後、他のウイルスを用いてウイルス不活化能を確認する予定である。

3) NAT によるウイルス検査法の確立

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方法を確立した。分析法バリデーションを実施した結果、95% 検出限界が 35.7 copy/mL となり、試験法として十分な検出感度であることが確認された。

E. 結論

品質に関する研究として

- 1) MS 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、多機関共同研究により、実行可能性を確認した。
- 2) 糖鎖試験法としての蛍光標識法及び逆相 HPLC の実用性を実証した。
- 3) HTP 工程によって、エリスロポエチンの低比活性分子が除去できること、また、糖鎖試験として CE が優れていることを明らかにした。

安全性に関する研究として

- 1) NAT をウイルスクリアランス試験に適用するための条件を明らかにした。また、クリアランス試験評価のためのウイルス感染性の高感度検出法を確立した。
- 2) インフルエンザウイルスの感染価測定系を構築し、測定系への不活化剤の影響を確認した。
- 3) 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方法を確立した。

謝辞 本研究を行うに当たり、ゴナドレリン酢酸塩標準品を供与して頂いた財団法人日本公定書協会に厚く御礼申し上げます。エリスロポエチンの生物活性測定及び等電点電気泳動を実施して頂きました扶桑薬品工業(株)島田千明氏及び山本知史氏に感謝申し上げます。多機関共同研究に参加していただいた以下の研究協力者に心からお礼申し上げます。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 原園 景、伊藤さつき
小林 哲

キリンファーマ(株)製造本部 高井 俊紀
 中外製薬(株)分析技術研究部 岡本寿美子
 大日本住友製薬(株)技術研究センター 佐藤 貴之
 近畿大学薬学部 木下 充弘
 島津製作所(株) 島 圭介、山田 真希
 化学及血清療法研究所試作研究所 柴田 伸一
 藤 智子、村上 利夫

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T. Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses. *J Virol Methods*. Jul;143(1):95-103. (2007)
- 2) Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T : Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C α in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*. 211, 189-196 (2007)
- 3) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, and Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1160, 263-269 (2007)
- 4) Yamaguchi, T. Uchida, E. : Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*, 7, 203-208 (2007)
- 5) Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
- 6) Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production, *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
- 7) Ishii-Watabe, A., Kobayashi, T., Suzuki, T., Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*, 35, 247-257 (2007)
- 8) Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, and Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J Biol Chem.*, 282, 33507-33514 (2007)
- 9) Niimi, S., Harashima, Yamaguchi, T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, 3, 164-182 (2007)
- 10) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. *実験医学増刊号*, 25, 1127-1136 (2007)
- 11) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体医薬品の LC/MS. 「抗体医薬品の最前線」植田充美監修, シーエムシー出版, 東京, 105-115, (2007)
- 12) 山口照英: Gene Therapy Discussion Groupの動向につ

- いて. *医薬品研究*, 38, 50-59, (2007)
- 13) 内田恵理子, 石井(渡部)明子, 山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. *臨床ウイルス学会誌*, 35, 278-290 (2007)
- 14) 山口照英, 石井明子: 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について - TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト. 「谷本学校毒性質問答集」, サイエントリスト社, 東京, 10, 1-34, (2007)
- 15) 山口照英: ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について. *Bio Clinica*, 27, 67-74 (2007)
- 16) 内田 恵理子: 遺伝子治療薬開発の現状と品質・安全性確保における国際的動向, *Pharmstage*, 7(9), 1-5 (2007)
- 17) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, (in press)
- 18) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi : Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein. *The protein Protocols Hand-book*. Third Edition. Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. (in press)
- 19) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual*, Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)
- 20) Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko, Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp. Cell Res* 314:430-440 (2008)
- 21) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi : Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* (in press)
- 22) 石井明子, 鈴木琢雄, 川西 徹, 山口照英, 早川堯夫: 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保. *バイオ医薬品の品質・安全性評価(増補改訂版)* 印刷中
- 23) 山口照英, 内田恵理子: 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制に於ける国際動向. *Drug Delivery System* 22, 651-659 (2007)
- 24) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性. 印刷中
- 25) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience*. 印刷中
- 26) Moriguchi K, Takemoto T, Aoki T, Nakakita S, Natsuka S, Hase S: Free Oligosaccharides with Lewis x Structure Expressed in the Segmentation Period of Zebrafish Embryo. *J. Biochem.*, 142, 213-227 (2007)
- 27) Murakami T, Natsuka S, Nakakita S, Hase S: Structure determination of sulfated N-glycans that are candidates for precursors of the selectin-ligand in bovine lung. *Glycoconj. J.*, 24, 195-206 (2007)
- 28) Nakakita S, Sumiyoshi W, Miyanishi N, Natsuka S, Hase S, Hirabayashi J: Gas-phase pyridylation of saccharides: development and applications. *Anal. Chem.*, 79, 2674-2679 (2007)

2. 学会発表

- 1) 山口照英: 先端技術応用医薬品のウイルス等の安全性確保. 第47回日本臨床ウイルス学会, 特別講演 (2007.6.3.) 東京
- 2) 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿを用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本ヒトプロテオーム学会第5回大会(2007, 7, 30-31) 東京

- 3) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿ による目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. **第 27 回日本糖質学会年会** (2007, 8, 1-3) 福岡
- 4) 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英: トロンボポエチン(TPO)による, *in vitro* での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用. **第 28 回日本炎症・再生医学学会** (2007.8.3.) 東京
- 5) 山口照英: バイオ医薬品の新しい潮流. **第1回医薬品評価フォーラム** (2007.8.10.) 東京
- 6) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. **日本応用糖質科学会平成19年度大会**(2007.8.30) 平塚
- 7) 山口照英: 核酸増幅法(NAT)によるウイルス検出とそのバリデーション—HEV 検出への NAT 法開発にあたっての留意点—. **酪農学園大学ハイテクリサーチセンタープロジェクト公開シンポジウム** (2007.9.3.) 江別
- 8) 豊田淑江, 石井明子, 鈴木孝昌, 押澤正, 山口照英. トロンボポエチン(TPO)による, *in vitro* での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用. **第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会** (2007.12.11) 横浜
- 9) 内田恵理子, 小木美恵子, 村田充弘, 日方幹雄, 佐藤功栄, 岩田明子, 鈴木和博, 山口照英: ポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いた C 型肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法. **第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会** (2007.12.14) 横浜
- 10) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 中島 紫, 高倉大輔, 内田恵理子, 押澤 正, 山口照英: ヒトミエロペルオキシンダーゼの部位特異的糖鎖構造解析. **第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会** (2007. 12, 11-15) 横浜
- 11) 山口照英: 細胞の品質管理の立場から. **第 30 回日本造血細胞移植学会総会**(2008.2.29-3.1) 大阪
- 12) 豊田淑江, 石井明子, 山口照英: トロンボポエチン(TPO)の血管内皮前駆細胞(EPC)増幅作用における新しい役割. **第7回日本再生医療学会総会** (2008.3.13-14) 名古屋
- 13) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 放射照射による Op9 細胞の造血支持能の増強に関する分子の探索. **第7回日本再生医療学会総会** (2008.3.13-14) 名古屋
- 14) 橋井則貴, 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 中島 紫, 高倉大輔, 山口照英: 質量分析法を用いたグリコサミノグリカンの構造特性解析. **日本薬学会第 128 年会**, (2008. 3. 26-28) 横浜
- 15) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 山口照英: ペプチド及びタンパク質医薬品の質量分析試験の標準化に関する研究. **日本薬学会第 128 年会**, (2008. 3. 26-28) 横浜
- 16) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: LC/MS を用いた抗体医薬品の特性解析. **日本薬学会第 128 年会**, (2008. 3. 26-28) 横浜
- 17) 内田恵理子, 小木美恵子, 村田充弘, 日方幹雄, 佐藤功栄, 岩田明子, 鈴木和博, 山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保のためのヒト肝炎ウイルスの濃縮・高感度検出法の開発. **日本薬学会第128年会**, (2008. 3. 26-28) 横浜
- 18) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 造血支持能を担うストローマ細胞膜タンパク質の探索. **日本薬学会第128年会**, (2008. 3. 26-28) 横浜
- 19) 長東俊治, 廣畑有紀子, 長島友美, 長谷純宏: プラナリア N-結合型糖鎖の比較グライコーム解析. **第54回日本生化学会近畿支部会例会**(2007. 5. 19) 京都
- 20) Tomomi Nagashima, Shunji Natsuka, Shin-ichi Nakakita, Sumihiro Hase: Structure analysis of N-glycans from invertebrates with HPLC mapping method. **The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium** (2007. 7. 11-13) Sapporo, Japan
- 21) 長島友美, 長東俊治, 中北慎一, 長谷純宏: マボヤ N-結合型糖鎖の構造解析. **第 27 回日本糖質学会年会** (2007. 8. 2-3) 福岡
- 22) 伊藤慎, 長東俊治, 長谷純宏: 非還元末端由来機能性糖鎖ユニットの構造解析法の開発. **第 27 回日本糖質学会年会**(2007. 8. 2-3) 福岡
- 23) 長東俊治, 長谷純宏: N-結合型糖鎖の比較構造グライコーム解析. **第27回日本糖質学会年会**(2007. 8. 2-3) 福岡
- 24) 長東俊治, 伊藤慎, 長谷純宏: 非還元末端糖鎖ユニットを網羅的に解析する手法の開発. **第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会** (2007. 12. 14) 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

表 1 A. 装置及び測定方法 (ESI)

| 機関 | 装置 | 質量校正標準品 | 試料導入法 | 溶媒 | 流速 | 試料 | 濃度又は量 | スプレー電圧 |
|----|------|---------|------------------------|------------------|--------------------------------------|--|--|------------------|
| A1 | QTOF | S1 | Tip Syr HPLC, C8 | 1 1 E1, E2 | - 0.3 µl/min 0.5 µl/min | GSH, GnRH, Ins Ins A (PE, CAM), Ins B (PE, CAM, CW), hGH, HSA Ins A (CW) | 5, 5, 10 µM 20, 20, 10, 10 µM 20 pmol | 1600 V 2400 V |
| A2 | IT | S2 | Syr | 1 2 | 3 µl/min | GSH, GnRH, Ins, hGH, HSA Ins A (CW), Ins B (CW) | 5, 5, 10, 2, 8 µM 10, 10 µM | 2000 V |
| A3 | FT | S2 | Syr HPLC, C18 | 1 2 E1, E2 | 3 µl/min 3 µl/min | GSH, GnRH, Ins Ins A (CW), Ins B (CW) | 5, 5, 10 µM 10, 10 µM 10 pmol | 2000 V |
| B1 | IT | S3 | HPLC, C8 | E3, E4 | 0.2 ml/min | GSH, GnRH, Ins A (CAM), Ins B (CAM), Ins, hGH | 65, 17, 3.1, 3.1, 3.4, 1.8 nmol | 4000 V |
| B2 | TOF | S4 | HPLC, C8 | E3, E4 | 50 µl/min | GSH, GnRH, Ins A (CAM), Ins B (CAM), Ins, hGH, HSA | 16, 4.2, 0.8, 0.8, 1.7, 0.45, 0.15 nmol | 3000 V |
| B3 | IT | S2 | HPLC, C8 | E3, E4 | 0.2 ml/min | GSH, GnRH, Ins A (CAM), Ins B (CAM) | 65, 17, 3.1, 3.1 nmol | 5000 V |
| C1 | IT | S2 | Syr HPLC, C4 | 1 E5, E6 | 10 µl/min 20 µl/min 0.5 ml/min | GSH, GnRH, Ins B (CW) Ins, hGH, HSA Ins A (CW) | 10, 10, 10 µM 10, 10, 10 µM 4.3 nmol | 5000 V |
| C2 | QTOF | S4 | Syr | 1 | 5 µl/min | GSH, GnRH, Ins A (CW), Ins B (CW) | 1, 10, 10, 10 µM | 2500 V |
| C3 | TOF | S4 | Syr | 1 | 5 µl/min | Ins, hGH, HSA | 10, 10, 10 µM | 3000 V |
| D | QTOF | S5 | HPLC, C4 | E7, E8 | 0.25 ml/min | GSH, GnRH, Ins A (CAM), Ins B (CAM), Ins, hGH, HSA | 16, 4.2, 0.11, 0.11, 0.11 nmol, 5.6, 0.94 pmol | 5000 V |

質量校正標準品: S1: YOKUDELNA (JOEL), S2: Caffeine + MRFA + Ultramark1621, S3: ES Tuning Mix Pos (Agilent Technologies), S4: NaI, S5: NaIcs + Glu-Fib

表 1 B. 装置及び測定方法 (MALDI)

| 機関 | 装置 | 質量校正標準品 | マトリックス (濃度) | 試料 ^a | 試料濃度 | スポット法 | イオン化 |
|----|---------|---|---|--|--|-------------------------|---------------------|
| A4 | TOF/TOF | BK1-7, Angt II, P14R, ACTH18-39 Ins_B, CyC, apoMG, Ald, BSA Ald, BSA | CHCA 5 mg/ml* SA 5 mg/ml* | GSH, GnRH, Ins A (PE), Ins B (PE), Ins A (CAM, CW) Ins B (CAM, CW) Ins, hGH HSA | 25, 6.3 mM, 25, 25, 100, 100 µM 83, 12.5 µM 50 µM | Spot1 | N ₂ レーザー |
| B4 | TOF/TOF | BK1-7, Angt II, SubP ACTH1-17, ACTH18-39, So28 Ins, CyC, MG TX, ProA, BSA | CHCA 0.7 mg/ml* SA 飽和* | GSH, GnRH Ins A, Ins B Ins hGH, HSA | 1.6, 0.42 mM 31, 31 µM 86 µM 45, 15 µM | Spot2 Spot3 | N ₂ レーザー |
| E | TOF | GRGDTP, Angt I, ACTH18-39 MG, CA BSA | CHCA 25 mg/ml* DHB 60 mg/ml* SA 60 mg/ml* | GSH, GnRH, Ins A, Ins B, Ins GSH, GnRH, Ins A, Ins B, Ins hGH BSA | 1-10 µM 1-10 µM 100 µM ~30 µM | Spot4 Spot5 Spot5 | N ₂ レーザー |
| F | TOF | CHCA, Bombesin Angt II, ACTH18-39 ACTH18-39, So28 ACTH18-39, Ub1 Ins_B, Ub1 CyC, TX Ald BSA | CHCA 10 mg/ml* SA 5 mg/ml* | GSH GnRH Ins A Ins B Ins hGH HSA | 3 mM 0.85 mM 0.17 mM 0.17 mM 0.17 mM 45 µM 15 µM | Spot2 | N ₂ レーザー |
| G | TOF/TOF | CHCA CHCA, Angt II, Angt I CHCA, Angt II, ACTH18-39, ACTH7-38 Ins_II Ald BSA | CHCA 5 mg/ml* SA 10 mg/ml* | GSH GnRH Ins A, Ins B Ins hGH BSA | 1.6 mM 0.42 mM 10, 10 µM 10 µM 10 µM 10 µM | Spot4 Spot6 | N ₂ レーザー |

^a, 0.1% TFA/50% ACN に溶解, ^b, 2-PrOH:EtOH = 2:1, ^c, 0.1% TFA:ACN = 2:1, ^d, 0.3% TFA/50% ACN に加温して溶解, ^e, 0.1% TFA に溶解 (B4 を除く)

表 2. 分子量測定値の集計結果

| Sample | ESI | | | | | | | | | MALDI | | | | | | Average | S _m | S _g | |
|------------|------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------------|----------------|------|
| | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | C1 | C2 | C3 | D | A4 | B4 | E | F | G | | | | | |
| GSH | Mono | 307.08 | 307.17 | 307.08 | 307.04 | 307.05 | 307.0 | 307.08 | 307.09 | 307.04 | | 307.04 | 307.09 | 307.08 | 307.08 | 0.003 | 0.042 | | |
| | | 307.08 | 307.17 | 307.08 | 307.03 | 307.05 | 307.0 | 307.08 | 307.09 | 307.03 | | 307.04 | 307.09 | 307.09 | 307.09 | | | | |
| GnRH | Mono | 1181.58 | | 1181.58 | 1181.6 | 1181.43 | 1181.5 | 1181.54 | 1181.58 | 1181.6 | 1181.55 | 1181.64 | 1181.57 | 1181.57 | 1181.57 | 0.033 | 0.061 | | |
| | | 1181.6 | 1181.57 | 1181.58 | 1181.6 | 1181.43 | 1181.6 | 1181.54 | 1181.58 | 1181.6 | 1181.52 | 1181.66 | 1181.72 | 1181.57 | 1181.57 | | | | |
| Ins A (PE) | Mono | 2802.25 | | | | | | | 2802.19 | 2802.18 | | 2802.61 | 2802.05 | | 2802.25 | 0.007 | 0.21 | | |
| | | 2802.2 | 2802.25 | | | | | | 2802.19 | 2802.19 | | 2802.61 | 2802.04 | | | | | | |
| (CAM) | Mono | 2610.11 | | | 2610.20 | 2609.96 | | | | | 2610.21 | 2609.97 | 2609.69 | 2610.02 | 2610.09 | 0.19 | 0.21 | | |
| | | 2610.1 | 2610.11 | | 2610.60 | 2609.96 | | | | | 2610.04 | 2609.92 | 2610.28 | 2610.12 | 2610.12 | | | | |
| (CW) | Mono | 2614.01 | | 2614.11 | | | 2615.0 | | 2614.00 | | | 2614.27 | 2614.89 | | 2614.19 | 0.19 | 0.28 | | |
| | | 2614.0 | 2614.03 | 2614.11 | | | 2614.6 | | 2614.00 | | | 2614.20 | 2614.29 | | | | | | |
| Ins B (PE) | Mono | 3637.82 | | | | | | | 3637.74 | 3637.78 | | 3638.28 | 3638.41 | | 3638.00 | 0.039 | 0.30 | | |
| | | 3637.8 | 3637.82 | | | | | | 3637.74 | 3637.79 | | 3638.31 | 3638.29 | | | | | | |
| (CAM) | Mono | 3541.76 | | | 3541.8 | 3541.51 | | | | | 3541.73 | 3541.77 | 3542.08 | 3541.81 | 3541.75 | 0.095 | 0.17 | | |
| | | 3541.7 | 3541.76 | | 3541.8 | 3541.51 | | | | | 3541.72 | 3541.69 | 3541.54 | 3542.01 | 3541.64 | | | | |
| (CW) | Mono | 3543.74 | | 3543.80 | | | | 3543.90 | 3543.60 | 3544.14 | | 3544.10 | 3544.09 | | 3543.92 | 0.13 | 0.23 | | |
| | | 3543.7 | 3543.72 | 3543.29 | | | | 3543.92 | 3543.60 | 3544.20 | | 3544.05 | 3544.08 | | | | | | |
| Ins | Mono | 5803.60 | | 5803.82 | | | | | 5804.9 | | | | | 5803.63 | 5803.97 | 0.013 | 0.60 | | |
| | | 5803.6 | 5803.59 | 5803.82 | | | | | 5804.8 | | | | | 5803.62 | 5803.62 | | | | |
| Ave | | 5807.0 | | | 5807.2 | 5806.2 | | 5808.2 | | 5805.6 | 5805.6 | 5806.4 | 5807.7 | 5805.9 | | 5806.5 | 0.43 | 0.90 | |
| | | 5807.6 | 5807.0 | | 5807.2 | 5806.2 | | 5807.0 | | 5805.7 | 5805.8 | 5805.1 | 5807.7 | 5806.0 | | | | | |
| hGH | Ave | 22124 | 22124 | 22125 | 22124 | 22125 | | 22125 | | 22123 | 22125 | 22101 | 22097 | 22118 | 22101.9 | 22125 | 22118.4 | 2.6 | 10.8 |
| | | 22125 | 22125 | 22125 | 22124 | 22125 | | 22124 | | 22123 | 22125 | 22097 | 22093 | 22118 | 22112.8 | 22121 | | | |
| HSA | Ave | 66440 | 66500 | | | 66439 | | | 66447 | | 66346 | 66440 | 66405 | 66357 | 66419 | 66418 | 21 | 45 | |
| | | 66437 | 66439 | 66474 | | 66440 | | | 66440 | | 66346 | 66357 | 66408 | 66360 | 66381 | | | | |

抗フリーラジカル剤開発に向けた病態解析と科学的評価法の確立

所属 国立成育医療センター 母児感染研究部
研究者 網脇 祥子

研究要旨 川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α が好中球の活性酸素生成酵素 Nox2 を活性化して血管内皮細胞の ICAM-1 の発現を増強する。頭部外傷によりマイクログリアの Nox2 が発現誘導され、神経細胞死を引き起こす。核タンパク食が、リウマチ様関節炎に対して改善効果を持つ。

分担研究者

- (1) 日生バイオ株式会社 松永政司
- (2) 昭和大学医学部 塩田清二

A. 研究目的

好中球に発現している活性酸素生成酵素 Nox2 型 NADPH oxidase は、生体組織中最大の酸素ラジカル発生源であり、殺菌に用いられる。最近、プロトタイプである Nox2 のホモログ遺伝子が様々な組織に発見され Nox family NADPH oxidases (Nox1~Nox5) を形成することが明らかになった。免疫系、循環器系、神経系、消化器系、呼吸器系など多くの組織にもこれらの Nox が発見され、細胞増殖、血圧調整、殺菌など多くの生理機能を担っている。しかし、活性酸素は諸刃の剣であり、過剰あるいは不適切な生成は組織傷害を引き起こし、多くの疾患の病態形成に関与する可能性が指摘されている。

本研究では、川崎病、神経疾患、リウマチの各病態形成に於ける活性酸素の関与を明らかにするとともに、組織傷害をモニターできる科学的方法論を構築して抗フリーラジカル療法を目指す。

本年度は、1) 川崎病の冠動脈瘤形成に決定的な役割を演じる TNF- α が、血管内皮細胞と好中球、どちらの活性酸素生成系を亢進させて病態形成に至るか、川崎病モデルマウスを作製し、Nox2-knockout (KO) マウスに適用して解析した。次に、2) 神経救急疾患に於ける神経細胞死と活性酸素の関係性を明らかにする目的で、頭部損傷モデルマウスを作製し、Nox2-KO マウスに適用して解析した。最後に、3) ラジカル抑制作用を有する栄養補助食品の開発を目的とし、活性酸素が関与するリウマチ様関節炎に対してサケ白子由来核タンパクの摂取が有用であるか検討した。

B. 研究方法

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

1) ヒト冠動脈血管内皮細胞およびマウス好中球

ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC: 3 継代目) は Cambrex 社より購入した。血管内皮細胞用基礎培地に添加因子を加えて培養し、実験には 5 継代目の細胞を使用した。HCAEC に対する TNF- α の影響は、60%以上の培養密度に達した細胞に TNF- α (10 ng/ml) を添加し、6~24 時間後に解析した。野生型 (C57BL/6J) および同系の Nox2-KO マウスの好中球は、6%カゼイン (2 ml) を腹腔に注射し、5-7 時間後浸潤した細胞を、比重遠心法 (Ficoll-Paque PLUS) にて分離後、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。

2) 活性酸素 (O_2^- , H_2O_2) 生成測定

HCAEC の H_2O_2 生成は scopoletin 法を用いて定量した。TNF- α 処理および未処理の HCAEC を PBS で洗浄した後、1.2 mM $MgCl_2$ 、33.3 μM scopoletin、0.88 U/ml HRP を含む 5 mM glucose-PBS (PBSG) 中で 37°C、45 分間反応させた。次に、 H_2O_2 検量線と一緒に Mithras LB940 (Berthold) プレートリーダーで測定し、HCAEC の H_2O_2 生成量を求めた。 H_2O_2 生成活性は、nmol H_2O_2 /min/mg protein として求めた。

マウス好中球の O_2^- 生成は cytochrome c (cyt. c) 還元法にて測定した。1.2 mM $MgCl_2$ 、30 μM cyt. c を含む 37°C PBSG 中で PMA (100 ng/ml) 刺激し、二波長分光光度計 (Hitachi 557) で測定した。最大初速時に 200 U/ml の superoxide dismutase を添加して正味の cyt. c 還元量を求め、 O_2^- 生成活性 (nmol O_2^- /min/ 10^7 cells) とした。

3) LCWE の精製

LCWE (*Lactobacillus casei* cell wall extract) は、Lehman TJ らの方法 (Arthritis Rheum 1983) に準じて精製した。Group B *L. casei* (ATCC 1158) を MRS ブロス (Difco) 中で培養し、SDS を用いて細胞膜を破壊した後、十分に遠心洗浄を行い、DNase および RNase による核酸分解、トリプシンによるタンパク質分解を行った。その後、超音波破碎 (2 時間) により細胞壁を破碎し、遠心分画により上清を回収して LCWE 画分とした。LCWE 量はフェノール・硫酸比色定量法により求めた。更に、エンドスペシ法 (生化学工業) を用いてエンドトキシンの混入がないことを確認した。

4) 川崎病モデルマウスの作製

川崎病モデルマウスは、Hui-Yuen JS らの方法 (J Immunol 2006) に準じて作製した。LCWE (0.84 mg/mouse) および TNF- α (PeproTech: 5,000 U/10g weight) を 5~7 週令の野生型および同系の Nox2-KO マウスに腹腔投与し、0 時間から 24 時間にかけてネブタール (50 mg/kg) 麻酔下にて心臓、脾臓を摘出し、mRNA の発現を解析した。

5) mRNA の発現解析

HCAEC に於ける mRNA の発現は、total RNA 抽出後 (RNeasy Mini column, Qiagen)、逆転写 (PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit: Takara) により cDNA を調整し、各種 Nox (Nox1~Nox5)、活性調節因子 (p22, p67, p47, p41, p51)、Rac1、Rac2 に対する特異的プライマーセットを用いた PCR (Ex Taq Hot Start Version: Takara)、更に、real-time PCR ($\Delta\Delta C_t$ 法) (TaqMan Gene Expression Assays: Applied Biosystems) で解析した。Nox4 に関しては、更に、5 種類の splicing variants (Nox4A~Nox4E) を区別できるプライマーセットを用いて RT-PCR 法で解析した。マウス好中球、脾臓、心臓に於ける mRNA の発現は、total RNA 抽出後 (Trizol: Invitrogen)、RT-PCR (好中球に於ける Nox2) および real-time PCR (脾臓および心臓に於ける TNF- α および ICAM-1) で解析した。

6) タンパク質の発現解析

Kuroda らの方法 (Genes to Cells 2005) に従って HCAEC の核および膜画分を調整した。抗 Nox4 抗体は、isoform C を除き全ての splicing variants に共通する "loop region" 配列 (⁴⁹⁹SQTDGIQKIIGEK⁵¹¹) に対する合成ポリペプチドを用いて作製した。両画分 (10 μ g/lane) を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転

写し、抗 Nox4 抗体と反応させた。マウス好中球は、DFP (2 mM) 処理後超音波破碎し、遠心分画法により細胞膜およびサイトゾル画分を調整した。両画分 (1x10⁵ CE/lane) を SDS-PAGE で分離後 PVDF 膜に転写し、細胞膜因子 (Nox2, p22) およびサイトゾル因子 (p67, p47, p40) に対する 1 次抗体と反応させた。次に、HRP-標識 2 次抗体と反応させ、ECL-Plus (GE Healthcare) 処理後 X 線フィルム上に感光させて検出した。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

1) 頭部外傷モデルの作製

C57BL/6J 系統の野生型および Nox2-KO マウスはペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、脳定位固定装置にマウントした。頭部切開後、頭蓋骨の一部を局部切除し、露出した大脳皮質表面に cortical contusion injury (eCCI Model 6.3, Custom Design & Fabrication) のプローブをセッティングした。表面から 0.2 mm の深さまでプローブによる衝撃を瞬間的に加え、その後頭蓋骨を元に戻して縫合した。外傷直後、1 日、2 日後に動物を麻酔下で殺し、各解析に用いた。

2) ウエスタンブロットング解析

頭部外傷後、マウス脳内に於ける Nox2 発現の変化をウエスタンブロットング法で解析した。各動物はペントバルビタール麻酔下で断頭し、大脳を溶解バッファー中でホモジェナイズした。10 μ g/lane にて SDS-PAGE を行い、PDVF 膜に転写した。その後 Nox2 に対する 1 次抗体、HRP-標識 2 次抗体と反応させ、化学発光法により X 線フィルム上に感光させた。フィルムはスキャナーにて取り込み、画像解析ソフト (UN-SCAN IT gel) を用いてシグナル強度を解析した。

3) 免疫組織化学染色

頭部外傷後の Nox2 の発現局在を明らかにするため、野生型および Nox2-KO マウスを傷害後に頭尾外傷を施し、ペントバルビタール麻酔下にて左心室より生食を灌流して血液を除去し、2%PFA にて灌流固定した。直ちに脳を取り出し、20%ショ糖溶液で置換して凍結切片を作製した。抗 Nox2 抗体または酸化傷害マーカーである抗 3-nitrotyrosine (3-NT) 抗体を用いて ABC-DAB 法により発色させた。また細胞同定を行うため、細胞マーカーである CD11b (マイクログリア)、GFAP (アストロサイト)、NeuN (神経細胞) 抗体による多重免疫染色を行った。

4) *In situ* スーパーオキシド (O₂⁻) の検出

脳内の O₂⁻ 検出はヒドロキシエチジウム (HEt: Invitrogen) 投与により行った。HEt は O₂⁻ と反応して安定な赤色蛍光色素であるエチジウム (Et) となることが知られている。頭部外傷 2 日後の野生型および Nox2-KO マウスに、3.5%セボフレンを含む N₂O/O₂ の吸入麻酔下で HEt (200 μL; 1 mg/mL) を総頸静脈より投与した。1 時間後、ペントバルビタール麻酔下で灌流固定を行い、前述の手法に従い凍結切片を作製した。この切片の傷害領域を励起波長 546 nm にて観察した。さらに、Et シグナルの認められる細胞を同定するため、各細胞マーカーによる多重免疫染色を行った。

5) 頭部損傷領域の測定

外傷 2 日後、マウスをペントバルビタールにより深麻酔し、脳摘出後にブレインスライサー(室町機械株式会社)を用いて厚さ 2 mm の冠状断脳切片を作製した。切片は 2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride 溶液に 37°C、30 分間浸漬した。損傷部表面の写真を撮影し、白く染め残された損傷領域と欠損領域を合わせた面積を解析ソフト (Canbas10) により算出した。

6) データ表示と統計処理

数値は平均値±標準誤差により示した。統計処理は多群間比較においては ANOVA-Dunnett post hoc TEST を用い、2 群間比較では Student-t TEST を用いた。p 値は 0.05 以下を有意と見なした。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 動物、餌負荷スケジュール

野生型およびリウマチ様関節炎を自然発症する HTLV-1 Tg マウスは、6 週齢時に無作為に 3 群に分けた後、無核タンパク (NF)、サケ白子より調整した核タンパク (NP) を 0.6% もしくは 1.2% 含有した餌を 18 週齢までの 3 ヶ月間自由摂取させた。餌負荷期間中、マウスは 1 週間おきに体重、関節厚を計測した。餌負荷終了時に麻酔下で心臓採血を行い、血清中の rheumatoid factor (RF) と活性酸素代謝物 (ROM) を測定した。また、深麻酔下で関節を摘出し、組織学的評価を行った。

2) 関節厚の計測方法

マウスの関節径は、デジタル式ノギスを用い、前肢(手首)と後肢(足首)の長・短径を、餌負荷期間中、1 週間おきに 8 回計測した。関節厚は、体重増加に伴う関節の成長を考慮し、関節計測値を体重

で除して算出した。結果は、計測開始時を 100% とし 0~3 の 4 段階にスコア化した。

| スコア | 関節肥大率 |
|-----|--------|
| 0 | ≤ 100% |
| 1 | ≤ 110% |
| 2 | ≤ 120% |
| 3 | > 120% |

3) 組織化学的变化の評価

関節の組織学的変化を評価するため、ヘマトキシリン-エオシン染色とトルイジンブルー染色を行った。マウスは、餌負荷終了時に、ペントバルビタール麻酔下で 10% 中性緩衝ホルマリン液にて還流固定し、前肢と後肢関節を摘出した。関節を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて 3 日間浸漬固定した後、1% 蟻酸にて 1 週間脱炭した。その後は常法に従ってパラフィンブロックを作製し、4 μm の厚さに薄切し、染色した組織切片を山本らの報告 (Arthritis Rheum 1993) に従いグレード 0~4 の 5 段階に分けた。関節の炎症が悪化するほど、グレードが高くなる。

0: 組織変化なし

1: 滑膜細胞の肥厚

2: 炎症性細胞の浸潤、フィブリノイドの浸潤

3: パンヌス形成、骨や軟骨の破壊

4: リンパ小節の形成、血管新生

4) 関節の IgG 染色

関節リウマチ発症時、血中 IgG が上昇することが知られている。そこで関節に於ける IgG の沈着を調べるため、抗 IgG 抗体による免疫染色を行った。染色にはパラフィン切片を用いた。キシレンにより切片からパラフィンを除去し、0.3% 過酸化水素液に 30 分間浸漬した。抗マウス IgG 抗体、次に、ビオチン標識 2 次抗体と反応させた後、ABC および DAB 法により発色させた。

5) Rheumatoid factor (RF) 値の測定

関節リウマチの指標の一つである血清中の IgG (RF) 値は、レビス®リウマチ因子 IgG 型-マウス ELISA KIT (シバヤギ, 群馬) を用いて測定した。

6) 組織中の酸化ストレス評価

関節リウマチ発症の際、NO ラジカルが発生することが知られている。NO ラジカルとその過酸化物である peroxynitrite が生成されると組織タンパク質中のチロシンがニトロ化されて 3-nitrotyrosine (3-NT) が生じる。従って 3-NT は NO ラジカルに

よる細胞傷害の指標となる。そこで、関節組織中のフリーラジカルの局在を確認するため、抗 3-NT 抗体を用いて免疫染色を行った。マウスは3ヶ月間の餌摂取終了時に、麻酔下で2%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、前肢と後肢関節を摘出した。関節は、2%パラホルムアルデヒド液に1晩浸漬した後、14%EDTA液にて1週間脱灰した。その後は20%ショ糖に置換し、常法に従って凍結ブロックを作製した。組織はクリオスタットにて8 μm の厚さに薄切した。抗 3-NT 抗体、ビオチン標識2次抗体と反応させた後、ABC、DAB法により発色させた。

7) 血清中の酸化ストレス (ROM) 測定

血中フリーラジカルによる酸化ストレスは、free radical electron evaluator (FREE: Health & Diagnostics Limited Co., Italy) を用い、活性酸素代謝物 (ROM: reactive oxygen metabolite) として測定した。ROMは脂質過酸化物質であるヒドロキシペルオキシド (R-OOH) より生じるアルコキシラジカル (R-O \cdot) およびペルオキシラジカル (R-OO \cdot) を鉄 (Fe $^{2+}$ および Fe $^{3+}$) の酸化還元を利用して測定する。その結果として生じる芳香アミン (A-NH $_2$) のピンクの誘導体 ([A-NH $_2$] $^+$) を 546 nm で比色定量する。データは 100 mL あたりの 0.08 mg H $_2$ O $_2$ の酸化力をユニット (U) として示した。

8) 核タンパク餌中の抗酸化力 (BAP) 測定

核タンパク餌の抗酸化力を測定するため、FREE法を用いて biological anti-oxidant potential (BAP) を求めた。BAPの測定は、Fe $^{3+}$ の酸化還元反応を利用する。発色基質である thiocyanate 液に塩化第二鉄 (FeCl $_2$) を添加すると茶褐色に呈色する。抗酸化物質を添加すると溶液中の Fe $^{3+}$ が還元され Fe $^{2+}$ になり退色することを利用し、核タンパク餌の抗酸化能を比色定量した。データはビタミンC換算で μM として表した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、当該研究機関の動物実験指針に従い、動物実験委員会の承認の下に行った (国立成育医療センター: #0010、昭和大学: #07030; #07033)。動物愛護の観点に基づき無用なストレス、苦痛を動物に与えぬよう飼育環境に配慮し、麻酔薬の使用など適切に行った。更に、KOマウスの使用に関しては、当該研究機関の遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

1) HCAEC の H $_2$ O $_2$ 生成活性および TNF- α の影響

In vitro で培養したヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の活性酸素生成能について cyt. c 還元法 (O $_2$ \cdot^-) および scopoletin 法 (H $_2$ O $_2$) を用いて検討した結果、O $_2$ \cdot^- 生成は検出されず、自発的な H $_2$ O $_2$ 生成が認められた。6時間 TNF- α 存在下で培養すると、この自発的な H $_2$ O $_2$ 生成活性は 1.7 倍亢進し、24時間後も持続することが分かった。

2) HCAEC に於ける各種 Nox の mRNA 発現

HCAEC の H $_2$ O $_2$ 生成活性を裏付ける Nox family NADPH oxidases について解析した。まず、RT-PCR で mRNA の発現を解析したところ、酸化還元中心である各種 Nox 中、Nox1、Nox2、Nox4 は発現しているが、Nox3 と Nox5 の発現は認められなかった。発現していた各種 Nox を real-time PCR で解析した結果、Nox4 の発現が最大であり、Nox1 と Nox2 の発現はそれぞれ 1/79、1/752 であることが判明した。RT-PCR で調べた限り、各種 Nox の活性調節因子 (p22、p47、p67、p51) も発現していた。p41 の発現量は僅かであった。

Nox4 は、データベース上 5 種類の splicing variants (Nox4A~Nox4E) が登録されている。そこで、HCAEC に於ける Nox4 splicing variants の発現を調べるため、特異的プライマーセットを用いて RT-PCR を行った所、Nox4A および Nox4B の存在が確認されたが、Nox4C、Nox4D、Nox4E は検出されなかった。現在、Nox4A および Nox4B の mRNA 発現に対する TNF- α の影響を解析中である。

3) HCAEC に於ける Nox4 のタンパク質発現

mRNA の発現解析から、HCAEC では Nox4A および Nox4B の発現が判明した。この結果から、Nox4A および Nox4B が HCAEC の H $_2$ O $_2$ 生成を担う責任分子である可能性が高い。そこで、Nox4 タンパク質の発現を検証するため、Nox4C を除き全ての splicing variants を認識できる "loop region" に対する抗体を作製し、膜および核画分のイムノプロットを行った。その結果、膜および核画分に異なる分子量 (約 75 kDa および 68 kDa) のバンドが認められた。これらの分子量はアミノ酸配列から予想される理論値 (Nox4A: 67 kDa、Nox4B: 63 kDa) に近く、両バンドが Nox4A および Nox4B であることを示している。興味深いことに、Nox4A は p22 サブユニットと共に膜画分に局在しているが、Nox4B は p22 サブユニットを欠如し核画分に単独で局在していた。従って、

冠動脈血管内皮細胞では p22 と複合体を形成している Nox4A が H₂O₂ 生成活性を担っていると考えられる。現在、Nox4A タンパク質の発現に対する TNF- α の影響を解析中である。

4) Nox2-KO マウス好中球の解析

血管内皮細胞 (Nox4A) と好中球 (Nox2)、どちらの生成する活性酸素が血管炎の発症に関与しているか川崎病モデルマウスを作製し、この系を Nox2-KO マウスに適用した。その準備段階として、Nox2-KO マウスから得た好中球の解析を行った。PMA 刺激による O₂ 生成を cyt. c 還元法で定量したところ、野生型マウス好中球では約 50 nmol/min/10⁷ cells の O₂ 生成量が認められたが、Nox2-KO マウス好中球の O₂ 生成活性はゼロであり、Nox2 mRNA 発現もゼロであった。Nox2 型 NADPH oxidase の各構成因子 (Nox2, p22, p67, p47, p40) に対する抗体を用いて解析したところ、Nox2-KO マウス好中球では Nox2 分子が完全に欠損し、Nox2 と複合体を形成する p22 サブユニットも欠損していた。従って Nox2 は p22 サブユニットの安定化に寄与していると言える。サイトゾル因子 (p67, p47, p40) は野生型マウスと同程度に発現していた。

5) LCWE 投与によるマウス脾臓での TNF- α mRNA の発現

TNF- α が川崎病発症の鍵を握ることが報告されている (Hui-Yuen JS et al J Immunol 2006)。そこで、LCWE 投与 0 時間、4 時間、24 時間後、マウスから脾臓を摘出して real-time PCR で解析した。野生型マウスでは、4 時間後に一過性の TNF- α 産生の上昇が確認されたが (非投与群の約 6 倍)、Nox2-KO マウスの脾臓では認められなかった。従って、食細胞、特に、マクロファージが産生する活性酸素が TNF- α の産生を促し、川崎病の発症に関与している可能性がある。

6) LCWE 投与によるマウス心臓での ICAM-1 mRNA の発現

好中球は血管内皮細胞上に発現している ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) と接着しながら血管外へ遊走し、弾性板の崩壊を引き起こすと考えられる。従って血管炎発症に於ける ICAM-1 の意義は大きい。そこで、LCWE 投与 4 時間、24 時間後、心臓を摘出して ICAM-1 mRNA の発現量を real-time PCR で解析した。野生型マウス心臓に於ける ICAM-1 の発現は、LCWE 投与 4 時間後より増加し、24 時間後まで上昇した。Nox2-KO マウスでも

ICAM-1 の発現上昇が見られたが、野生型マウスほど顕著でなかった。従って、好中球の産生する活性酸素が血管内皮細胞に於ける ICAM-1 産生を促進し、川崎病の発症に寄与する可能性が考えられる。

7) TNF- α の直接投与によるマウス心臓での ICAM-1 mRNA の発現

活性の高い LCWE の調整に未だ成功していないため、LCWE 投与後、血中での上昇が認められている TNF- α の直接投与を試みた。TNF- α (5,000 U/10g weight) を腹腔投与し、0 時間、0.5 時間、1 時間、2 時間、4 時間後、心臓を摘出して ICAM-1 の発現量を real-time PCR で解析した。野生型マウスでは、0.5 時間後から ICAM-1 の発現上昇が認められ、1~2 時間でピークに達した。しかし、Nox2-KO マウスでは TNF- α を投与しても ICAM-1 の発現は上昇せず、野生型マウスの 1/20 以下であった。従って、血管内皮細胞に於ける ICAM-1 の発現に好中球の生成する活性酸素が大きく関与することが明らかになった。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

1) 頭部外傷後の Nox2 発現量の変化

頭部外傷後の Nox2 発現量をウエスタンブロッティング法で解析した。正常側では傷害前後で Nox2 シグナルの強度は殆ど変化しなかったが、外傷側では外傷 1 日から 2 日にかけて顕著な Nox2 シグナルの増強が認められた。しかし、Nox2-KO マウスでは、Nox2 シグナルは正常側、外傷側ともに認められなかった。免疫組織染色により、正常動物では微弱な Nox2 陽性反応が脳皮質に観察されたが、頭部外傷 2 日後では強い Nox2 陽性反応が外傷周囲部に認められた。外傷周囲部の Nox2 陽性反応は、主に CD11b (マイクログリアマーカー) および NeuN (神経細胞マーカー) 陽性反応と一致し、微弱な Nox2 陽性反応が GFAP (アストロサイトマーカー) 陽性反応と重なった。

2) Nox2 とフリーラジカル

頭部外傷後の脳内フリーラジカル産生に Nox2 が関与しているか、頭部外傷 2 日後の野生型および Nox2-KO マウスに HEt を投与し、脳内で観察される Et (O₂) シグナルを比較した。その結果、正常状態でも Nox2-KO マウスの O₂ シグナルは野生型に比べて有意に減少しており、野生型と異なり外傷 2 日後でも顕著な O₂ シグナルの上昇は認められなかった。蛍光多重免疫染色により、O₂ シグナルは Nox2 陽性反応と共存し、主に CD11b 陽性反応と重なった。また、微弱な O₂ シグナルが NeuN 陽性反応 (神

経細胞マーカー)と重なった。

3) Nox2 と酸化傷害

細胞障害により発生した O_2^- と NO ラジカルが反応すると酸化力の強い peroxynitrite が生成される。Peroxynitrite はアミノ酸のチロシン残基をニトロ化して 3-NT へと変性させる。従って 3-nitrotyrosine (3-NT) はフリーラジカルによる細胞傷害の指標となる。そこで、頭部外傷後の酸化傷害と Nox2 の関係を検討するため、抗 3-NT 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。野生型では頭部外傷 2 日後において強い 3-NT 陽性反応がマイクログリア、アストロサイト、神経細胞に認められた。一方 Nox2-KO マウスでは、微弱な 3-NT 陽性反応が神経細胞に局在した。

4) Nox2-KO マウスに於ける外傷領域と細胞死

野生型と Nox2-KO マウスに頭部外傷を施し、脳の欠損面積と遅発性神経細胞死を評価した。頭部外傷 2 日後の欠損面積を比較した結果、Nox2-KO マウス ($290.7 \pm 21.6 \text{ mm}^2$) では野生型マウス ($170.5 \pm 16.9 \text{ mm}^2$) に比べて有意に損傷領域が減少していた。次に、頭部外傷後に生じる二次的な細胞死を評価するため、遅発性神経細胞死を TUNEL 法により可視化した。野生型マウスでは外傷周囲部より深部の大脳皮質の層にまで TUNEL 陽性細胞が観察されたが、Nox2-KO マウスでは外傷周囲部のみ TUNEL 陽性細胞が認められ、その数も有意に減少していた。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

1) 体重の経時的変化

餌負荷期間中 (6~18 週齢) の体重を経時的に計測した。HTLV-1 Tg マウスの体重は、NF 群では 10 週齢まで増加したが、12 週齢時より徐々に減少し 16 週齢では餌負荷開始時より有意に減少した。それに対して、NP-0.6% 群の体重は餌負荷期間中、変化がほとんど見られなかった。しかし、NP-1.2% 群の体重は加齢に伴い徐々に増加した。一方、野生型マウスの体重は餌負荷期間中、3 群間で殆ど差は認められなかった。

2) 関節の肥大

次にマウスの関節厚を比較した。HTLV-1 Tg マウスの後肢関節のスコアを比較したところ、NF 群 ($n=20$) は 10 週齢より上昇し 18 週齢時で 1.2 ± 0.29 であった。一方、18 週齢時の NP-1.2% 群のスコアは 0 ($n=16$) であり、餌負荷期間中殆ど上昇しなかった。NP-0.6% 群のスコアも上昇したが、NF 群よ

り低値を示した。前肢においても同様の傾向が認められた。一方、野生型マウスのスコアは、3 群とも餌負荷終了時まで殆ど上昇しなかった。

3) 関節の組織学的変化

関節組織の形態変化に対する核タンパク負荷の影響を観察した。後肢に於いて、NF 群はグレード 4 の割合が 70% であったが、NP-0.6% 群は 44%、NP-1.2% 群は 28% とそれぞれ減少した。また、グレード 0 の割合が NF 群は 0% であったが、NP-0.6% 群は 14%、NP-1.2% 群は 27% と核タンパクの比率に依存して増加した。統計解析を行なったところ NF 群に対し、NP-1.2% 群には有意差が認められた。前肢に於いても、同様に、核タンパクの比率に依存してグレード 4 が減少し、グレード 0 が増加した。

次に後肢関節の IgG 染色を行なった。IgG 陽性反応は、野生型マウスの関節では殆ど認められなかった。HTLV-1 Tg マウスに於いて、NF 群の関節組織は 100% の個体が滑膜細胞に強い陽性反応を示したが、NP-0.6% 群は 60%、NP-1.2% 群は約 33% であった。また、前肢関節に於いても核タンパク負荷群の IgG 陽性反応は NF 群に比べて弱かった。

4) 血清中の rheumatoid factor (RF) 値

関節リウマチの指標の一つである血清中の RF 値を調べた。野生型マウスの RF 平均値は $13752 \pm 3295 \text{ mU/ml}$ だった。NF 群は $25815 \pm 3569 \text{ mU/ml}$ 、NP-0.6% 群は $26591 \pm 5493 \text{ mU/ml}$ と野生型に比べ高値を示した。一方、NP-1.2% 群は $19390 \pm 3562 \text{ mU/ml}$ と低値を示したが、有意な差ではなかった。しかし、NF 群、NP-0.6% 群の RF より低値であった。

5) 酸化ストレスの評価

マウス関節組織の 3-NT 免疫染色を行った。3-NT 陽性反応は、野生型マウスでは殆ど認められなかったが、HTLV-1 Tg マウスでは軟骨細胞に強い陽性反応が認められた。それに対し、NP-1.2% 群ではこの陽性反応が殆ど認められなかった。次に、餌摂取終了後、マウス血清中の酸化ストレス度を表す ROM 値を測定した。NF 群は $159.9 \pm 9.9 \text{ U}$ ($n=19$) であったのに対し、NP-0.6% 群は $139.1 \pm 10.4 \text{ U}$ ($n=11$) と低値を示し、NP-1.2% 群は $125.2 \pm 7.1 \text{ U}$ ($n=16$) と有意に低下した。

6) 核タンパク餌の抗酸化力 (BAP)

核タンパク餌の BAP を測定した。コントロールとして超純水の BAP を測定したところ、 $987.9 \pm 72.9 \text{ } \mu\text{M}$ ($n=6$) であった。それに対し核タンパク餌は濃

度依存的に BAP の値が上昇し、2500 µg/ml で 8194.5 ± 283.7 µM と高値を示した。更に、50 µg/ml 以上で P<0.01 の有意差が認められた。

D. 考察

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

川崎病は何らかの感染が引き金となって全身性の血管炎を発症し、急性期に血液中の TNF-α濃度が上昇することが報告されている。最近、*Lactobacillus casei* の細胞壁抽出物 (LCWE) をマウス腹腔に投与した川崎病モデルマウスを用いて、冠動脈瘤の形成に至る過程で TNF-αが決定的な役割を果たすことが報告された (Hui-Yuen JS et al, J Immunol 2006)。TNF-αは、好中球や血管内皮細胞の活性酸素生成能を亢進させることが報告されている。従って、冠動脈瘤に至る過程には2つの重要なステップが考えられる。つまり、1) 血中 TNF-αによる好中球および血管内皮細胞の活性酸素生成の亢進に起因する血管傷害と、2) LCWE 投与によるマクロファージからの TNF-α産生である。本研究では、これらのステップに於ける Nox の関与を解析し、血管炎発症との関連を明らかにして抗フリーラジカル療法を目指す。

ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) を解析した結果、食細胞と異なり自発的に活性酸素を生成し、TNF-αがその生成活性を増強することが分かった。HCAEC に於ける活性酸素生成の責任酵素として、酸化還元中心である各種 Nox および調節因子の発現を mRNA レベルおよびタンパク質レベルで解析した。その結果、Nox4 の発現が最大であり、5つの splicing variants (Nox4A~Nox4E) 中、Nox4A と Nox4B の発現が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認された。興味深いことに、Nox4A は p22 サブユニットと共に膜画分に局在し、Nox4B は単独で核画分に局在していた。従って、p22 と複合体を形成している Nox4A が血管内皮細胞の活性酸素生成を担っていると考えられる。TNF-αの影響に関しては今後解析して行く予定である。自発的な活性酸素生成は血管内皮細胞の増殖に必要である。しかし、この自発的な活性酸素生成が川崎病急性期に上昇するサイトカイン (特に TNF-α) により賦活化され、その酸化ストレスによって細胞成分や tight-junction を構築する構造タンパク質の酸化が進行し、血管内皮細胞の傷害、ひいては、動脈瘤を形成する可能性が考えられる。

マクロファージは TNF-α産生細胞として知られており、最近、食細胞の炎症性ケモカインの産生に対する活性酸素 (Nox2 型 NADPH oxidase 由来) の

関与が注目されている (Su B Nat Immunol 2005)。川崎病に於ける血管炎発症機序のタイムスケジュールとして、先ず感染による TNF-α産生が起こり、次に、血中 TNF-αによる血管傷害が考えられる。そこで、LCWE 投与後、脾臓に於ける TNF-α産生を real-time PCR で解析した。野生型マウスでは4時間後に一過性の TNF-α産生の上昇が認められ、Nox2-KO マウスでは認められなかった。従って、第一段階であるマクロファージからの TNF-α産生に Nox2 由来の活性酸素が関与する可能性が示された。

一方、冠動脈瘤の組織学的解析から病変部位に好中球の顕著な浸潤が他の炎症細胞に先行することが報告されている。活性化された好中球は大量の活性酸素を生成するだけでなく、顆粒内プロテアーゼを放出するため、冠動脈病変に至るまでの組織傷害に大きく影響すると考えられる。更に、病態が進行すると内弾性板や中膜平滑筋層などの動脈構築組織が弱体化し、冠動脈瘤が形成されることが指摘されている。この冠動脈瘤の破裂は、好中球に多く含まれているエラスターゼによる内弾性板を構成するエラスチンの切断が決定的である。

好中球の血管外への遊出には、好中球表面上に発現している CD11b/CD18 と血管内皮細胞上の ICAM-1 との接着が必須であり、ローリング、付着を経て血管外へ遊出し、内弾性板へ到着する。従って、LCWE 投与による心臓での ICAM-1 発現を解析することは重要である。解析した結果、4時間、24時間後、ともに野生型マウスでの発現が Nox2-KO マウスに比べて有意に高いことが判明した。TNF-αを直接投与したところ、野生型マウスでは0.5時間から2時間後まで大量の ICAM-1 産生が誘導されたが、Nox2-KO マウスでは殆ど誘導されなかった。

以上、HCAEC を用いた解析から、冠動脈血管内皮細胞に於ける自発的な活性酸素生成は Nox4A が担う可能性が示された。TNF-αは血管内皮細胞の活性酸素生成を増強したが、Nox4A の活性化である可能性が高い。又、Nox2-KO マウスを用いた解析から、冠動脈瘤発症の鍵を担う好中球の血管外遊出に必要な血管内皮細胞での ICAM-1 発現に、TNF-αによる好中球の活性酸素生成が大きく関与することが明らかになった。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

頭部外傷モデルを用い、外傷により誘導されるフリーラジカルの生成と細胞死誘導に於ける Nox2 の関与を検討した。これまでに神経細胞に於ける Nox2 陽性反応が報告されているが (Serrano F et al Brain Res 2003)、病態時に於ける発現は殆ど研究さ

れていなかった。本研究により、Nox2 は外傷側に於いて顕著に発現量が増加し、外傷領域周辺のマイクログリアと神経細胞に強い Nox2 陽性反応が認められた。マイクログリアはマクローファージ様の細胞であり、外傷周囲部に存在する活性化されたマイクログリアが Nox2 を高発現する結果は、従来の好中球の研究結果と合致する。

HEt 投与実験により、Nox2-KOマウスの脳内 O_2 シグナルは外傷前後通じて野生型よりも減弱していた。これらの結果は、Nox2 が正常時と外傷急性期に於ける脳内の O_2 生成に関与していることを意味している。さらに、 O_2 シグナルの多くが Nox2 陽性反応と重なり、主にマイクログリアに O_2 シグナルが認められたことから、外傷後における脳内の O_2 生成はマイクログリアの Nox2 を介した反応である可能性が高い。

酸化傷害マーカーである 3-NT 陽性反応は、野生型マウスでは神経細胞、マイクログリア、アストロサイトに強く認められた。しかし、Nox2-KO マウスでは神経細胞に僅かな 3-NT 陽性反応が認められるのみであった。野生型マウスでは外傷後に誘導される Nox2 由来の O_2 が、神経細胞、マイクログリア、アストロサイトに対して強い酸化傷害を与えたのに対し、Nox2-KO マウスでは O_2 生成が抑制されているため、酸化傷害も抑制されたと考えられる。また、Nox2-KO マウスでも微弱な 3-NT 陽性反応が神経細胞に認められた。これは神経細胞がミトコンドリアに豊富細胞であることから、ミトコンドリア由来の O_2 による酸化傷害だと考えられる。

Nox2-KO マウスでは頭部外傷による損傷領域面積が減少し、更に、外傷領域から離れた領域の神経細胞死も抑制されていた。これは Nox2 に由来する O_2 生成が、二次的な神経細胞死の引き金となっている可能性を意味する。救急医療において、重症頭部外傷患者における二次的脳損傷を抑えることが重要視されており、現在は脳低温療法が頻用されている。脳低温療法は脳を冷やすことで、代謝機能を一時的に低下させて活性酸素の生成を抑制する効果があることが近年報告された。おそらく脳低温療法はマイクログリアに於ける Nox2 の発現およびその活性を抑制していると考えられる。現在の技術では低体温療法にも限界があり、低温による免疫力低下などの副作用も認められる。

以上の結果をまとめると、頭部外傷急性期に於いて、Nox2 型 NADPH oxidase がマイクログリアを中心に誘導されて O_2 生成が亢進する。この亢進した O_2 生成は二次的脳損傷の拡大に大きく関与すると考えられる。従って、Nox2 の発現増加と活性化は

新しいフリーラジカル生成の指標・評価法となる可能性がある。更に、Nox2 の阻害によりフリーラジカルの発生源を抑えるという新規の治療戦略は二次的脳損傷を治療する薬剤や技術の開発へと繋がり、エダラボンのようなフリーラジカル消去剤との併用により更なる相乗効果が期待できる。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

本研究では、リウマチ様関節炎を自然発症するモデル動物 HTLV-1 Tg マウスを用いて NF、NP-0.6%、NP-1.2% を含有した餌を 6 週齢から 18 週齢まで長期負荷を行い、体重、関節厚の経時的変化を調べた。次に、餌負荷終了時、関節の病理組織学的変化、関節への IgG 沈着を比較した。更に、ラジカルに対する核タンパク摂取の効果を検討するため、酸化ストレスマーカーである 3-NT 染色を行い、血清中の活性酸素代謝物 (ROM) を調べた。

関節リウマチは関節炎を主徴とする自己免疫疾患の一つである。ヒト関節リウマチの主な症状は体重減少や関節肥大などである。本研究の結果、HTLV-1 Tg マウスの体重は、NF 群は 12 週まで増加したが、その後は徐々に減少した。これに反し、NP-1.2% 負荷群の体重は、加齢に伴い徐々に増加した。これは核タンパク負荷が HTLV-1 Tg マウスの体重減少を抑制することを示す。次に、HTLV-1 Tg マウスの前後肢関節厚を計測したところ、NF 群は 8 週齢よりそのスコアが増加した。このスコアの上昇は核タンパク濃度に依存して抑制された。HTLV-1 Tg マウスは 2 から 3 ヶ月で関節炎を発症すると報告されている。NF 群に認められた関節厚のスコアの上昇および体重減少はこれら関節炎の発症時期と一致し、核タンパク負荷はそれらの症状を顕著に抑制した。従って、核タンパク負荷は、関節炎に起因している HTLV-1 Tg マウスの体重減少および関節肥大を抑制すると考えられる。

そこで、NF 群と NP 群における体重や関節厚の違いが関節炎の変化と一致しているか、餌負荷終了時の関節を組織学的に検討した。NF 群は前肢、後肢ともに重篤な炎症所見であるリンパ小節の出現や骨・軟骨の破壊が明瞭に認められたが、NP-1.2% 群はこれらの所見が減少し、前・後肢ともに約 3 割の動物に病理所見を認めなかった。更に、リウマチ性関節炎の臨床診断の一つである IgG の上昇を関節の IgG 染色により調べた。NF 群の関節は、全個体が滑膜細胞を中心に強い IgG 陽性反応を示した。それに対し、NP 群は濃度依存的に IgG の陽性反応が低下した。更に、rheumatoid factor (RF) を測定したところ、NF 群では高値を示したが、NP-1.2% 群

では抑制傾向が認められた。これらの結果は、核タンパクの摂取が HTLV-1 Tg マウス関節炎の改善に貢献することを示している。

核タンパク餌による関節炎の改善メカニズムを明らかにするため、リウマチ様関節炎の増悪因子である酸化ストレスに対し核タンパクがどのような影響を及ぼすか検討した。酸化傷害マーカーである 3-NT の免疫染色を行ったところ、関節炎を発症した HTLV-1 Tg マウスの軟骨細胞で陽性反応が認められた。それに対し、核タンパクを負荷した HTLV-1 Tg マウスでは陽性反応が認められなかった。また、血清中の活性酸素代謝物(ROM)を測定したところ、NF 群で高値を示したが、NP 群では核タンパク濃度に依存して減少した。この結果は、核タンパク摂取により体内のフリーラジカルが減少したことを示している。関節リウマチ患者では、関節にマクロファージおよび好中球の浸潤が認められ、過酸化脂質等が蓄積する。それに伴い TNF- α 、IL-6 等の炎症性サイトカインが増加し、それらのシグナルを受けた細胞が活性化されてフリーラジカルを生成する。発生したラジカルは関節の組織傷害を引き起こし、また IgG を修飾して自己抗体、即ち、RF 生成の原因にもなっている。従って、NP 群に於いてリウマチ様関節炎が改善された要因の一つに、核タンパク摂取によるフリーラジカルの抑制が考えられる。

餌に添加した核タンパクの biological anti-oxidant potential (BAP) を測定した。その結果、核タンパクは濃度依存的に BAP 値が上昇し、コントロールと比較して 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上で有意差が認められた。この結果は、核タンパク餌が抗酸化能を有することを示している。マウスの 1 日あたりの餌摂取量が約 2 g であることから、NP-1.2% 摂取群のマウスの 1 日あたりの核タンパク摂取量は約 24 mg であると推測される。摂取した全ての成分が吸収されるとは考えにくい、50 $\mu\text{g/ml}$ と極めて低濃度で BAP を有意に

上昇させることから、核タンパク餌の摂取がフリーラジカルの生成を抑制したと考えられる。

関節リウマチに対する治療薬は多数開発されているが、薬剤の長期使用による副作用が QOL を低下させることが大きな問題となっている。本研究で示した、核タンパクによる代替医療が可能となれば、関節リウマチの進行や悪化を軽減できる可能性がある。更に、核タンパクの抗フリーラジカル作用を解明することで、関節リウマチのみならずフリーラジカルが原因となっている多くの疾患に対する代替医療が可能となるであろう。

E. 結論

1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

Nox4A が冠動脈血管内皮細胞に於ける自発的活性酸素生成を担い、川崎病急性期に血中濃度が上昇する TNF- α がこれを活性化して血管傷害の引き金になる可能性が得られた。又、Nox2-KO マウスを用いた解析から、冠動脈瘤発症の鍵を担う好中球の血管外遊出に必要な血管内皮細胞での ICAM-1 発現に、TNF- α 刺激による好中球由来の活性酸素が大きく関与することが明らかになった。

2. 神経細胞死とフリーラジカル

Nox2 は頭部外傷周囲部の主にマイクログリアで発現量が増加し、その O_2 生成の増加により頭部外傷後の二次的脳損傷を誘導することが示唆された。

3. 関節リウマチに対する核タンパク食の効果

サケ白子由来核タンパク摂取は、その抗酸化作用によりフリーラジカルを抑制し、HTLV-1 Tg マウスのリウマチ様関節炎に対し改善効果が認められた。このことより、核タンパクの摂取は、ヒト関節リウマチに対しても有用性があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nonaka N, Farr SA, Kageyama H, Shioda S, Banks WA. Delivery of galanin-like peptide to the brain: targeting with intranasal delivery and cyclodextrins. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 (in press)
- 2) Ashino T, Yamanaka R, Yamamoto M, Shimokawa H, Sekikawa K, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1

induction in macrophages. *Mol Immunol.* 2008;45:2106-2115.

- 3) Dohi K, Ripley B, Fujiki N, Ohtaki H, Yamamoto T, Goto Y, Nakamachi T, Shioda S, Aruga T, Nishino S. CSF orexin-A/hypocretin-1 concentrations in patients with intracerebral hemorrhage (ICH). *Regul Pept* 2008;145:60-64.
- 4) Matsuno R, Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Hayashi D, Takeda T, Nonaka N, Seki M, Nakamura M, Itabashi K, Shioda S. Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. *Regul*

- Pept 2008;145:80-87.
- 5) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Hayashi D, Matsuno R, Nonaka N, Itabashi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) colocalize with activity - dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brain. *Regul Pept* 2008;145:88-95.
 - 6) Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal M S, Toshinai K, Date Y, Gonzalez L J, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory Peptide-1 and -2. *J Biol Chem* 2007;282: 26354-26360.
 - 7) Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. *Peptides* 2007;28:1713-1719. Review.
 - 8) Inoue H, Ohtaki H, Nakamachi T, Shioda S, Okada Y. Block of Chloride Channel Attenuates Delayed Neuronal Cell Death Induced by Transient Forebrain Ischemia. *J Neurosci Res* 2007;58:1427-1435.
 - 9) Ohtaki H, Takeda T, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Matsuno R, Hodoyama M, Shioda S. 2007 Oxidative damage of DNA increases in mitochondria prior to nucleus after cerebral ischemia and trigger apoptotic neuronal cell death. *Neurosci Res.* 2007;58:349-355.
 - 10) Dohi K, Satoh K, Nakamachi T, Yofu S, Hiratsuka K, Nakamura S, Ohtaki H, Yoshikawa T, Shioda S, Aruga T. Does edaravone (MCI-186) act as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxid Redox Signal* 2007;9:281-287.
2. 学会発表
- 1) Seiji Shioda; Functional significance of PACAP on neuroprotection and neurodevelopment; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007/9/3-9/8) Manchester, VT.
 - 2) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Sachiko Yofu, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Akira Arimura, Seiji Shioda; NEUROPROTECTIVE MECHANISM OF PACAP ASSOCIATED WITH IL-6 SIGNALING; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007/9/3-9/8) Manchester, VT.
 - 3) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Sachiko Yofu, Jun Watanabe, Daisuke Hayashi and Seiji Shioda; Distribution of activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) and (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) in the mouse brain; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007/9/3-9/8) Manchester, VT.
 - 4) Jun Watanabe, Tomoya Nakamachi, Daisuke Hayashi, Masahisa Nakamura, Shigeo Nakajo and Seiji Shioda; THE ROLE OF PACAP IN ASTROGLIAL DIFFERENTIATION IN VIVO AND IN VITRO; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007/9/3-9/8) Manchester, VT.
 - 5) Daisuke Hayashi, Tomoya Nakamachi, Ryosuke Matsuno, Jun Watanabe, Seiji Shioda; Effect of PACAP on neuronal progenitor cells in vivo; 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides (2007/9/3-9/8) Manchester, VT.
 - 6) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Sachiko Yofu, Jun Watanabe, Daisuke Hayashi, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Akira Arimura and Seiji Shioda; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Attenuates Focal Cerebral Ischemic Injury via Bcl-2 and IL-6 Signaling; The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2007/11/3-7) San Diego CA
 - 7) Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Kenji Dohi, Sachiko Yofu, Jun Watanabe, Daisuke Hayashi, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Akira Arimura and Seiji Shioda; Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Attenuates Focal Cerebral Ischemic Injury via Bcl-2 and IL-6 Signaling; The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2007/11/3-7) San Diego CA
 - 8) Jun Watanabe, Tomoya Nakamachi, Daisuke Hayashi, Masahisa Nakamura, Shigeo Nakajo, Seiji Shioda; Involvement of beta isoform of protein kinase C in the PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes; The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (2007/11/3-7) San Diego CA
- 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

家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の 新規治療及び予防薬の開発

主任研究者 寺尾 恵治 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター

研究要旨 遺伝的に加齢黄斑変性疾患 (AMD) を自然発症するカニクイザルを用いた薬効評価系を確立し、国際的競争力のある新規治療及び予防薬候補物質の開発を行うことを目的とする。アキュメンバイオフーマ株式会社から AMD の新規治療薬候補物質として Rho-kinase 阻害剤である「ファスジル」の提供を受けて共同で開発を進める。九州大学大学院医学研究院眼科学分野の研究室は評価技術の提供と試験データの評価を担当する。今年度は治療候補薬の徐放化と並行して、初代培養細胞およびマウスを用いたファスジルの血管新生阻害に関わる有効性試験を実施するとともに、網膜黄斑変性カニクイザル家系から、実験に供試する9頭のカニクイザルを選抜し、病態の程度を眼底撮影所見および網膜誘発電位 (ERG) の測定結果から投薬実験の群わけを行った。

分担研究者

- (1) アキュメンバイオフーマ 鍵本忠尚
- (2) 九州大学大学院、医学研究院眼科学
石橋達朗
- (3) 九州大学大学院、医学研究院眼科学
畑 快右

A. 研究目的

AMD は欧米で高齢失明の最大の原因であり、日本でも緑内障、糖尿病網膜症について中途失明の要因となっている。AMD は加齢を元に発生する後局所の網膜-色素上皮-脈絡膜複合体のさまざまな病変のことで、脈絡膜新生血管を伴う Wet 型と伴わない Dry 型に分けられる。AMD アライアンス・インターナショナルの推定では、毎年世界で 50 万人が新たに AMD との診断を受け、世界の 2500-3000 万人が AMD の疑いがある。今後、日本を含む先進国各国で高齢化が進むことは確実であり、高齢者の QOL を支える観点から AMD 治療薬の開発は急務である。医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで見いだされた若年性網膜黄斑変性家系は、ヒトの加齢性網膜黄斑変性症の発症機序および治療法、予防法の開発に有用な唯一のモデル動物であり、本研究は、霊長類医科学研究センターで発見された世界で唯一の

AMD 疾患を自然発症するカニクイザルを用いて AMD の評価系を確立し、国際競争力のある新規治療薬の開発を目的とした有効性、安全性評価試験を実施する。

B. 研究方法

新規治療候補薬として開発を進めているファスジル (fasudil) の有効性をウシ網膜周皮細胞の初代培養系およびマウスを用い解析した。

In vitro の系では初代培養したウシ網膜周皮細胞を用いて、VEGF で誘導されるミオシン軽鎖のリン酸化と細胞増殖に及ぼすファスジルの阻害作用を western blotting と TdR の取り込みにより評価した。

In vivo の系では、マウスを用いて VEGF で誘導される血管新生へのファスジル添加の影響を調査した。

医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターで維持されている網膜黄斑変性家系のうち、眼底観察により発症が確認されている12頭について、眼底検査を実施し、新規治療薬候補であるファスジルの有効性、安全性評価実験に供試する9頭の網膜黄斑変性発症カニクイザルを選抜した。眼底観察および撮影の20分ほど前にトロピカミド・塩酸フェニレフリン(ミドリンP, 参天製薬株式会社)を動物の両眼に1-2滴滴下した。散瞳後に、塩酸ケタミン(ケトラ

ール 50, 三共製薬株式会社)の 10mg/kg(体重)を筋肉内に投与して全身麻酔し, 携帯用眼底カメラ(RC-2, 興和株式会社)により眼底の観察・記録を行った。

C. 研究結果および考察

A: 供試動物の選抜

昨年度の研究により霊長類医科学研究センターで維持しているカニクイザルの AMD モデルでは時間経過と共に病態が進行することが確認されている。評価対象とするファスジルは ADM の進行阻害効果が期待されているが、今回選抜した9頭(表1)を三群(無処置対照、低濃度投与、高濃度投与)に分けて、片眼に治療候補薬を他眼にプラシーボを投与することにより、病態進行を遅延させる薬効評価が可能と判断した(寺尾)。

B: 薬剤の徐放化:

徐放化技術で実績のある国内企業に委託し、薬剤の徐放化が完了した。AMDカニクイザルに投与するためのファスジル徐放製剤が完成している。(分担: 鍵本)

C: 薬効評価系の確立:

1) ドルーゼン発症サルおよび非発症サルの眼科的診断(カラー眼底写真撮影、眼底自家蛍光撮影)技術を確立した。現在眼底自家蛍光撮影によるドルーゼンの定量化を「定量値における信頼性(再現性)の確認」を含めて検討中である。

2) 上記結果を基にして「ドルーゼン定量法を用いた診断基準値の設定」を行う予定である。そのために、カラー眼底写真とドルーゼン定量値との相関性を検証する実験を継続中である。(分担: 石橋、畑、鍵本)

D: 薬剤の in vitro 薬効試験(薬効確認)

ウシ網膜周皮細胞の初代培養系にVEGFを添加して誘導されるミオシン軽鎖のリン酸化はファスジル添加により完全に阻害された(図1)。さらに、ファスジルはVEGFで誘導されるウシ網膜周皮細胞の分裂増殖もほぼ完全に抑制した(図2)。上記以外に、ファスジルがDry-AMDに効果があることを示唆するデータを得ているが、詳細については、現在特許出願準備中であるため、出願後に公表する。

(分担: 石橋、畑、鍵本)

E: 血管新生阻害作用(in vivo)

ファスジルはVEGFで誘導されるマウス角膜での血管新生をほぼ完全に抑制した(図3)。

F: 徐放製剤のIn-vivo溶出試験(徐放性確認)

眼内におけるファスジル徐放製剤の徐放性を確認するため、ウサギを用いた徐放剤投与試験を行った。

ウサギ硝子体内にファスジル徐放製剤を投与し、眼摘出を行った後、前房水、硝子体、および残存製剤に分離した。平成20年4月には委託業者での濃度測定の結果を得る予定である。その結果を基に、眼内での徐放製剤からの薬剤の溶出速度を計算し、AMDモデルカニクイザルへの投与量を決定する。

平成20年5月には、サルへの投与を実施予定である。

(分担: 石橋、畑、鍵本)

G: 薬剤の安全性試験

1) ファスジルをラットの硝子体内に投与した際の安全性を、ERG および HE 染色にて検討した。その結果、薬効濃度およびその数十倍の濃度においても、明らかな組織障害は認められなかった。

2) ファスジル徐放製剤をサルの硝子体内に投与した際の安全性をERGにて検討するため、コントロールとして、ファスジル徐放製剤を投与する前のサルのERG測定を行った。(分担: 石橋、畑、鍵本)

候補治療薬の徐放化に予想以上の時間がかかったことにより、治療実験の開始が大幅に遅れたが、本年度の上記成果により、治療候補薬ファスジルの有効性/安全性が実証されるとともに、安定した薬効評価技術が確立されたことにより、治療実験を開始する条件が整った。

E. 結論

新規な AMD 治療候補薬であるファスジルの有効性、安全性を初代培養細胞、マウス、ラットを用いて評価した。その結果、ファスジルが Dry-type ADM の進行を遅延させる薬効に加え、組織障害を指標とした十分の安全性を

併せ持つ有望な治療候補薬であることが実証された。また、徐放化治療薬を用いた薬効試験に供試するADM発症カニクイザルの選抜も終了しており、平成20年度初めには治療候補薬の投与量が決定することから、薬効評価を目的とした徐放化候補薬剤の眼球内投与を実施する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita T, Sakamoto T, Yamakiri K, Miura M, Enaida H, Ueno A, Atsumi I, Matsuhisa K, Sakamoto Y, Kida T, Ishibashi T. Polyactic acid for visualizing the vitreous body during vitrectomy. Investigative

Ophthalmology & Visual Science 2007, 48: 3277-3282

Kita T, Hata Y, Miura M, Kawahara S, Nakao S, Ishibashi T. Functional Characteristics of Connective Tissue Growth Factor on Vitreoretinal Cells. Diabetes, 2007, 56: 1421-1428

Hata Y, Miura M, Nakao S, Kawahara S, Kita T, Ishibashi T. Antiangiogenic properties of Fasudil, a potent Pho-kinase inhibitor. Jap J Ophthalmol. 2008, 52: 16-23.

G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

| 動物番号 | 性 | 年齢 | 黄斑部の斑点数(目測) | | 備考 |
|------------|---|----|-------------|------|----|
| | | | 右眼 | 左眼 | |
| 1320207092 | 雄 | 5 | 5 | 10 | 軽度 |
| 1320108093 | 雄 | 6 | 5 | 5~10 | 軽度 |
| 1310106057 | 雌 | 6 | 3 | 6 | 軽度 |
| 1319907042 | 雌 | 8 | 20 | 50 | 中度 |
| 1319912107 | 雌 | 8 | 5 | 10 | 軽度 |
| 1229402027 | 雄 | 13 | 5 | 5 | 軽度 |
| 1219303032 | 雌 | 14 | 10 | 10 | 軽度 |
| 1219307108 | 雌 | 14 | 3 | 5 | 軽度 |
| 1219211251 | 雌 | 15 | 3 | 5 | 軽度 |

表 1: 候補治療薬の有効性/安全性試験に供試する網膜黄斑変性発症カニクイザルリスト

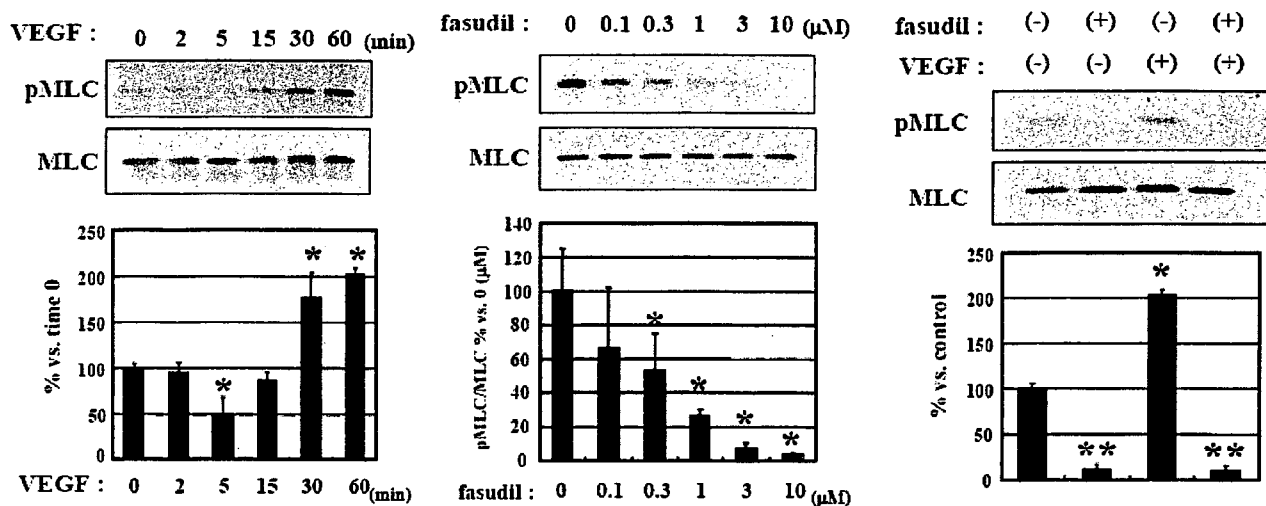


図 1: VEGF で誘導されるウシ網膜周皮細胞におけるミオシン軽鎖のリン酸化とファスジルの抑制効果