

ム溶液 (20 mg/mL) 0.50 mL を添加し、次いで精製水 0.5, 0.45, 0.425, 及び 0.40 mL を加えて混和し、ヘパリンナトリウム中に OSCS がそれぞれ 0, 2.0, 3.0, 及び 4.0% (w/w) 含む共同検定用試験溶液とした。共同検定用試験溶液はキャピラリー電気泳動装置を用いて測定し、OSCS のピーク面積を求めた。

4.2 DS

4 mg の DS を 1.0 mL の精製水に溶解し、DS 溶液 (4.0 mg/mL) を調製した。この液 0, 0.025, 0.050, 及び 0.10 mL にヘパリンナトリウム溶液 (20 mg/mL) 0.50 mL を添加し、次いで精製水 0.5, 0.475, 0.45, 及び 0.40 mL を加えて混和し、ヘパリンナトリウム中に DS がそれぞれ 0, 1.0, 2.0, 及び 4.0% (w/w) 含む共同検定用試験溶液とした。共同検定用試験溶液はキャピラリー電気泳動装置を用いて測定し、DS のピーク面積を求めた。

結 果

1. OSCS の分析

1.1 特異性

ヘパリンナトリウム 20 mg を 1.0 mL の精製水に溶解し、この液 0.5 mL に精製水 0.5 mL を加え 10 mg/mL の濃度とし、FDA から公開されている分析条件に従って測定した。その結果、ヘパリンナトリウムに由来するピークは 5.8 分をピーク頂点とし、5.0~6.5 分に泳動された (Fig. 2a)。次に、ヘパリンナトリウム溶液 (20 mg/mL) 0.5 mL と OSCS 溶液 (4.0 mg/mL) 0.125 mL と精製水 0.375 mL を添加したものを試験溶液 (5.0% OSCS) として測定した。測定の結果、OSCS に由来するピークは、5.5 分をピーク中心として泳動されたが、ヘパリンナトリウムのピークと完全に分離しなかった (Fig. 2b)。

1.2 検出限界

OSCS を 0.5~5.0% (w/w) になるようにヘパリンナトリウムに添加した溶液を測定し、本分析法の検出限界を確認した。Fig. 3 に示すように、OSCS 含量が 1.5% では OSCS を確認することができたが、OSCS が 1.0% では確認することができず、本試験法の検出限界は 1.5% 程度と判定された。

1.3 直線性、範囲

0.5~10% (w/w) の OSCS を添加したヘパリン

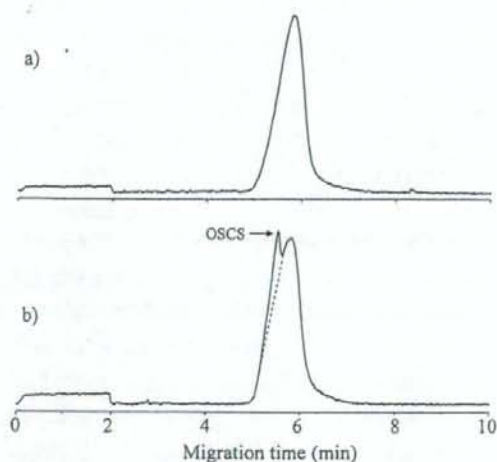


Fig. 2 キャピラリー電気泳動法による OSCS 検出の特異性

a) 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液, b) 5.0% (w/w) の OSCS を 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液に添加した溶液。

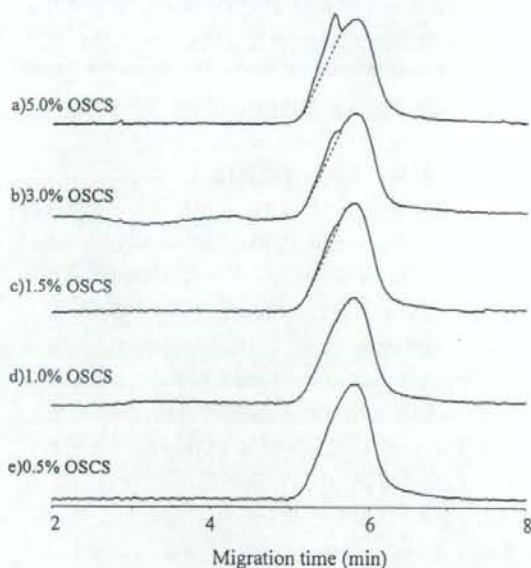


Fig. 3 OSCS を含むヘパリンナトリウムのエレクトロフェログラム

a)~e) : 10 mg/mL のヘパリンナトリウム溶液に 0.5~5.0% (w/w) の OSCS を添加した試験溶液。

ナトリウム溶液を用いて、キャピラリー電気泳動装置により測定した。OSCSのピーク面積は、1.5～10%の範囲で直線性が確認され、その相関係数は0.9758であった。

1.4 真度並びに精度

OSCSを10.0% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を用いて、添加回収率(真度)を求めたところ、添加回収率は41% (RSD=2.18%)であった。また、OSCSを5.0% (w/w) になるように添加したヘパリンナトリウム溶液を用いて、1試験日内に6回測定を行った。1試験日内のOSCSピーク面積の再現性(併行精度, n=6)は、相対標準偏差(RSD)として1.36%であった(Table 1)。一方、異なる6試験日におけるOSCSピーク面積の再現性(室内再現精度)は相対標準偏差(RSD)として2.17%であった(Table 1)。

1.5 キャピラリー電気泳動法における特異性及び検出限界に関する共同検定

3機関において、OSCSを2.0, 3.0及び4.0% (w/w) になるようにヘパリンナトリウム溶液に添加し、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。

Table 1 キャピラリー電気泳動によるOSCS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 ^a	41 % (RSD= 2.18 %)
併行精度 ^b	1.36 %
室内再現精度 ^b	2.17 %
特異性	Fig.2 参照
検出限界	1.5 % (w/w)
定量限界	1.5 % (w/w)
直線性	$Y = 36663X - 367.1$ ($R^2 = 0.9758$)
範囲	1.5・10.0 % (w/w)

^a 10.0% OS CSを用いた(n=6)。

^b 5.0% OS CSを用いた(n=6)。

OSCSに由来するピークは、いずれの機関でも5.4～6.3分に観察された。各機関で得られたOSCSのピーク面積をTable 2に示す。全機関で2.0%以上のOSCSを確認することができたが、ヘパリンナトリウムのピークと分離が十分でないため、2.0%以下のOSCSを検出することは難しく、本分析法の検出限界は2.0%程度と判断された。

2. DSの分析

2.1 特異性

ヘパリンナトリウムに5.0% (w/w) のDSを添加して測定したところ、DSに由来するピークは、6.5分をピーク中心とし6.2～7.0分に観察され、ヘパリンナトリウムのピークとDSのピークを完全に分離することができた(Fig. 4)。

2.2 検出限界

ヘパリンナトリウムに対するDSの濃度が1.0～

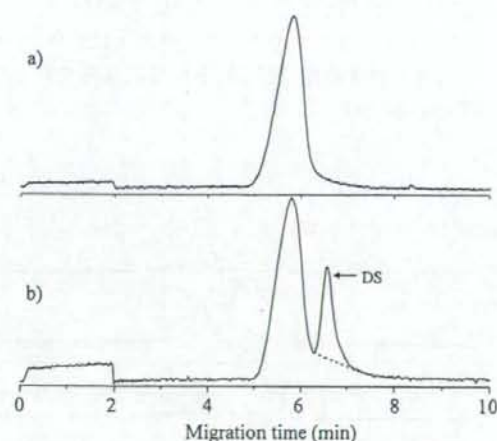


Fig. 4 キャピラリー電気泳動法によるDS検出の特異性

a) 10 mg/mLのヘパリンナトリウム溶液, b) 5.0% (w/w) のDSを10 mg/mLのヘパリンナトリウム溶液に添加した溶液。

Table 2 キャピラリー電気泳動を用いるOSCS限度試験共同検定結果

OSCS % (w/w)	ピーク面積値		
	機関 A	機関 B	機関 C
2.0	6902	36665	7457
3.0	9290	78759	17481
4.0	15336	124710	29949

10.0%になるように試料溶液を調製し、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定したとき、1.0%のDSを確認することができた。したがって、検量線のデータ（下記参照）から検出限界は1.0%と判定された（Fig. 5）。

2.3 直線性、範囲

1.0~10% (w/w) のDSを添加したヘパリンナトリウム溶液を用いて、キャピラリー電気泳動装置により測定した。DSのピーク面積は、1.0~10%の範囲で直線性が確認され、その相関係数は0.9991であった（Fig. 6）。

2.4 真度並びに精度

DSを1.0% (w/w) 含むヘパリンナトリウム溶液を用いて、添加回収率（真度）を求めたところ、添加回収率は82% (RSD=1.78%)であった。また、同溶液を用いて、1試験日以内に6回測定を行った。1試験日以内でのDSピーク面積の再現性（併行精度、n=6）は、相対標準偏差（RSD）として2.15%であった（Table 3）。一方、異なる試験日におけるDSピーク面積の再現性（室内再現精度、n=6）は相対標準偏差（RSD）として2.48%であった（Table 3）。

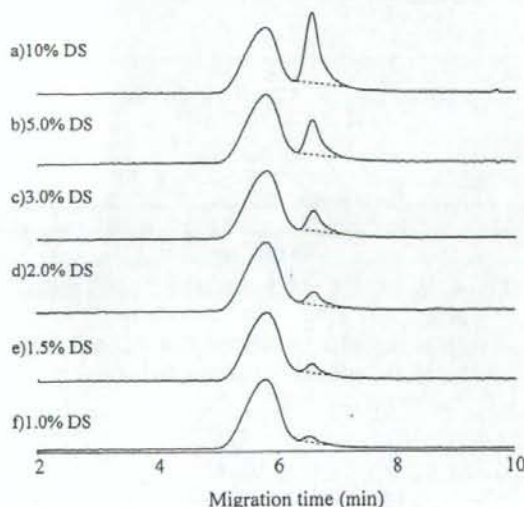


Fig. 5 DSを含むヘパリンナトリウムのエレクトロフェログラム

a)~f): 10 mg/mLのヘパリンナトリウム溶液に1.0~10.0% (w/w) のDSを添加した試験溶液。

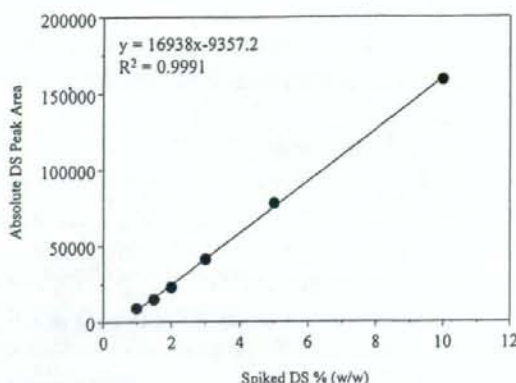


Fig. 6 キャピラリー電気泳動法によるDSの直線性

10 mg/mLのヘパリンナトリウム溶液に1.0~10.0% (w/w) のDSを添加したときのDSピークの絶対面積値をプロットした。

Table 3 キャピラリー電気泳動によるDS分析の分析能パラメータ

分析能パラメータ	結果
真度 ^a	82 % (SD=1.78 %)
併行精度 ^a	2.15 %
室内再現精度 ^a	2.48 %
特異性 ^b	Fig.4 参照
検出限界	1.0 % (w/w)
定量限界	1.0 % (w/w)
直線性	$Y = 16938X - 9357.2$ ($R^2 = 0.9991$)
範囲	Fig.6 参照 1.0・10.0 % (w/w)

^a 1.0 % DSを用いた(n=6).

^b 5.0 % DSを用いた(n=6).

2.4 キャピラリー電気泳動法における特異性及び検出限界に関する共同検定

3機関において、1.0、2.0及び4.0% (w/w) のDSを添加したヘパリンナトリウム試料溶液をキャピラリー電気泳動装置を用いて測定し、DSのピーク面積を求めた。DSに由来するピークは、6.5~7.8分の範囲に観察された。各機関で得られたDSのピーク面積をTable 4に示す。全機関で1.0%以上のDSを確認することができた。

Table 4 キャピラリー電気泳動を用いる DS 限度試験共同検定結果

DS % (w/w)	ピーク面積値		
	機関 A	機関 B	機関 C
1.0	24707	75734	54647
2.0	48633	153927	85043
4.0	78022	425538	142533

考 察

1. OSCS

FDA から公開されているキャピラリー電気泳動を用いる分析法では、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離は不完全であった。分析能パラメータの評価により 10% における添加回収率 (真度) は 41% (RSD=2.18%) であり、本試験法の OSCS に対する特異性は低かった。また、共同検定で得られた本試験法の検出限界は 1.5% 程度であることから、本試験法は、1.5% 程度の限度試験であり、OSCS の含量が 1.5% 以下であることを保証する試験法であると解釈された。OSCS は、有害事象の原因物質であると考えられていること、また、製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム中に検出されるべきではない。したがって、本試験法における規格は、「ヘパリンナトリウム中に OSCS に由来するピークが検出されないこと」が適当であると考えられる。OSCS については、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知薬食審査発第 0701001 号 (平成 20 年 7 月 1 日) において、「ヘパリンナトリウムに関する日本薬局方の一部改正に伴う取り扱いについて」として、NMR 法による限度試験 (0.5%) が規定された。しかしながら、キャピラリー電気泳動法を用いる試験法は 1.0% 未満の OSCS の混入を検出することができず、OSCS を対象としたヘパリンナトリウムの日本薬局方の純度試験法として、現状では採用できないと判定される。しかし、キャピラリー電気泳動はヘパリンナトリウム中に混入する OSCS を検出できる限られた分析法の一つであり、分析条件の検討によりヘパリンナトリウムと OSCS の分離が達成されれば、OSCS の限度試験として利用することは可能であると考えられる。

2. DS

近畿大学で実施した分析能パラメータ評価では、DS とヘパリンの識別が可能であること、また、1.0~10.0% (w/w) の範囲で直線性があることが確認された。再現性については併行精度が 2.15%、室内再現精度が 2.48% であり、定量性と特異性を有することが明らかにされた。また、共同検定の結果からも、キャピラリー電気泳動法による DS 分析を日本薬局方の試験法として、ヘパリンナトリウム中の DS の混入が 1.0% 以下であることを保障する限度試験として設定することは可能であると判断される。

国内 3 機関による共同検定の結果、キャピラリー電気泳動装置により DS とヘパリンナトリウムのピークを分離できること (同程度の特異性)、1.0% 以上の DS を検出できること (同程度の検出限界) が確認された。今回、共同検定に参加した 3 機関はキャピラリーカラムへの試料導入法としていずれも加圧法を使用した。試料導入法は加圧法の他、吸引法や落差法なども利用でき、他メーカーの装置を用いた場合でも同程度の検出限界を得るためには、分析に使用する試料量を規定することが重要である。例えば、「試料はヘパリンナトリウムのピーク強度がフルスケールの 10% となるように注入する」あるいは「試料はヘパリンナトリウムのピーク最大吸光度が 0.010~0.015 となるように注入する」などとし、今回と同様のバリデーションスタディを実施しなければならない。その結果、同程度の特異性と検出限界が確認できれば、DS を対象とするヘパリン純度試験法として有用である。

なお、DS の規制の必要性については、DS はヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制するべきとする意見と、これまでに毒性等の報告がなく、純度試験等により規制する必要はないとする意見があり、国際的にも見解が分かれている。しかし、DS はヘパリンを調製する際の原料

に含まれるため、ヘパリンの精製の指標として有用であると考えられる。今後、国内ヘパリンナトリウム中へのDSの含有量の実態を正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。

謝 辞

有益なご助言をいただきました、国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部鹿庭なほ子室長、独立行政法人医薬品医療機器総合機構早川堯夫顧問及び小嶋茂雄顧問、並びにヘパリンナトリウムをご供与いただきました日本バルク薬品㈱に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課鷗田淳専門官、鈴木克之主査、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田収氏、仁後知子氏に感謝いたします。また、有益なご討論をいただいた日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会、FDA、米国薬局方、欧州薬局方、及びヘパリンナトリウム製剤製造会社の関係各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は厚生労働省の支援によって行われ

たものである。

文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Sugahara, K.: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **12**, 321-349 (2000).
- 3) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., *et al.*: *Nat Biotechnol*, **26**(6), 669-675 (2008).
- 4) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., *et al.*: *N Engl J Med*, **358**(23), 2457-2467 (2008).
- 5) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr Res*, **306**(1-2), 35-43 (1998).
- 6) <http://www.usp.org/hottopics/heparin.html>.
- 7) http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Heparin_sodium_monograph_Revised.pdf.
- 8) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(23), 11327-11331 (1992).

ヘパリン純度試験に関する研究 (第4報)

合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日局標準品としての適用性の評価

 川崎 ナナ^{*1}, 橋井 則貴^{*1}, 杉本 直樹^{*2}, 高倉 大輔^{*1},
 秦 艶^{*1}, 細山 沙織^{*3}, 戸井田敏彦^{*3}, 山口 照英^{*1}

(受付:平成20年9月8日, 受理:平成20年10月27日)

Studies on the Heparin Purity Test (Part 4)

Evaluation of Synthesized Over-sulfated
Chondroitin Sulfate for JP Standard
 Nana KAWASAKI^{*1}, Noritaka HASHII^{*1}, Naoki SUGIMOTO^{*2},
 Daisuke TAKAKURA^{*1}, Yan QIN^{*1}, Saori HOSOYAMA^{*3},
 Tosihiko TOIDA^{*3} and Teruhide YAMAGUCHI^{*1}

緒 言

過硫酸化コンドロイチン硫酸 (Over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS) は, すべての水酸基が硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステルであり (Fig. 1), 米国やドイツにおいて急激な血圧低下やアナフィラキシー反応を引き起こしたヘパリンナトリウム製剤に含まれていた異物の本体として特定されている¹⁻³⁾. 米国等で発生した有害事象を受けて, 我が国でも緊急対応として, 日本薬局方 (日局) 各条ヘパリンナトリウム及び日本薬局方外医薬品規格 2002 各条ヘパリンカルシウムを一部改正し, 純度試験に ¹H-核磁気共鳴 (NMR) スペク

トル測定法を用いた OSCS の限度試験を追加することとなった^{4,5)}. これらの試験は約 0.5% の OSCS を限度値とする限度試験であり, システム適合性において, 検出限界相当の OSCS 標準品を含むヘパリン溶液の ¹H-NMR スペクトルを測定することにより, 分析システムの特異性と検出感度を確認することとされている. したがって, システム適合性確認のための日局 OSCS 標準品の確立は急務である.

国立医薬品食品衛生研究所では, OSCS 混入ヘパリンナトリウムから OSCS を精製し (OSCS-NIHS), FDA から入手した OSCS との構造特性の類似性を確認した上で, OSCS 限度試験設定のための OSCS 標準物質として用いてきた. しかし, OSCS が混入

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
 Division of Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 同上
 Division of Environmental Chemistry

^{*3} 千葉大学大学院薬学研究所 千葉市稲毛区弥生町 1-33 (〒263-8522)
 Graduate school of Pharmaceutical Sciences & Faculty of Pharmaceutical Sciences, 1-33, Yayoi-cho,
 Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

Corresponding author: Nana Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National
 Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
 E-mail: nana@nihs.go.jp

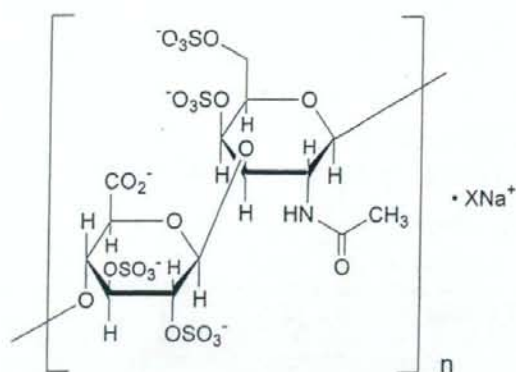


Fig. 1 OPCS の構造

したヘパリンナトリウムの供給には限りがあり、OSCS-NIHSを日局OSCS標準品として提供することは困難であることから、日局OSCS標準品を安定的に供給するための対策が不可欠となった。戸井田ら⁶⁾は、トリブチルアミン及び三酸化イオウピリジニウム錯体を用いてウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルを更に硫酸エステル化することにより、すべての水酸基が硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル (OSCS-T) を得ることに成功している。このOSCS-TとOSCS-NIHSの品質特性、すなわち、構造特性、純度、及びヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム限度試験条件下での分析結果に類似性が確認できれば、OSCS-Tを日局OSCS標準品として利用できる可能性が高い。本研究は、OSCS-Tの日局OSCS標準品としての適用可能性を明らかにすることを目的として、OSCS-NIHS及びOSCS-Tの品質特性を比較したものである。

実験方法

1. 試料

OSCS混入ヘパリンナトリウムは日本バルク薬品⁷⁾より供与された。ウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルはNew Zealand Pharmaceuticals (Palmerston, ニュージーランド)より購入した。ヘパリンナトリウムは、ニプロファーマ⁸⁾より供与された。ヘパリンカルシウムは味の素⁹⁾及び沢井製薬¹⁰⁾から供与された。3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-d₄ (TSP, 重水素化率98%)は、アルドリッチ社から購入した。重水 (重水素化率

99.9%) はアイソテック社より購入した。

2. OPCS-NIHSの精製

400 mgのOSCS混入ヘパリンナトリウムを1.0 mLの20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した液につき、陰イオン交換HPLCを行った⁷⁾。HPLC装置は、HITACHI Model D-7000 (日立ハイテクノロジー)を用いた。カラムは、ジエチルアミノエチル (DEAE) 基を結合させた多孔性親水ポリマーゲル (粒子径10 μm) を充てんしたTSKgel DEAE-5PW (21.5 mm I. D.×15 cm, 東ソー)を用いた。溶離液には、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) (A 溶媒) と、20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 M NaCl (B 溶媒) を用いた。流速は4 mL/min, またカラム温度は40℃に設定した。サンプル注入前及び注入後1分間はA 溶媒を送液した。次に、39分かけてB 溶媒を100%まで直線的に上昇させた。検出波長は230 nmとした。OSCSのピーク画分を分取し (Fig. 2A), 最終濃度70% (v/v) になるよう冷エタノールを加え、激しく攪拌した。氷上で30分静置した後、遠心分離 (4℃, 9,000×g, 15分間) によりOSCSを回収した。OSCSの沈澱を遠心濃縮装置で乾燥した後、1.0 mLの20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した。更に、同様に再度HPLCを行った。得られたOSCSのピークを分取し、エタノール沈澱によりOSCSを回収した後、沈澱を適量の超純水に溶解し、凍結乾燥してOSCS-NIHSとした。

3. OPCS-Tの合成

平均分子量約15 kDaのウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルナトリウムから、陽イオン交換カラムを用いてナトリウムを除去し、トリブチルアミン塩に交換した。凍結乾燥後、コンドロイチン硫酸エステルトリブチルアミン塩100 mgを20 mLジメチルスルホキシドに溶解し、500 mgの三酸化イオウピリジニウム錯体を加えた後、40℃にて6時間反応させた。反応終了後、水20 mLを加えて分子量10 kDaカットの透析チューブに移し、水に対して24時間透析して試薬を除去した後、凍結乾燥し、OSCS-Tとした。

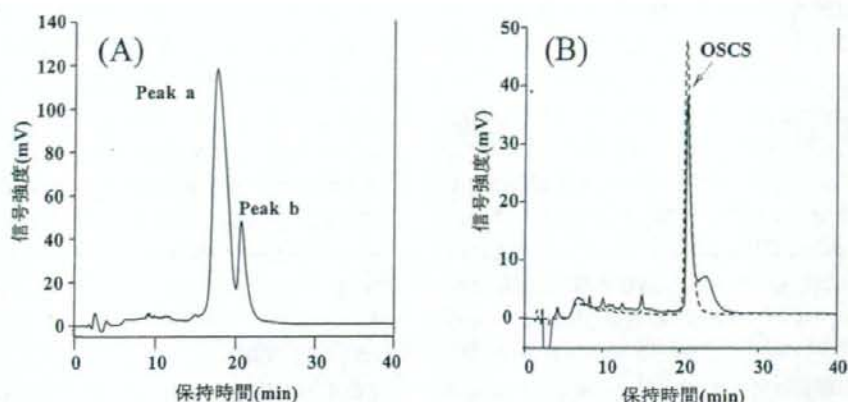


Fig. 2 陰イオン交換HPLCによるOSCSの精製

(A) ヘパリンナトリウムからのOSCSの精製. Peak a, ヘパリンナトリウム; peak b, OSCS.

(B) OSCS-Tの精製. 実線, OSCS-T; 破線, OSCS-NIHS.

4. DEAE-OSCS-Tの調製

OSCS-T約10mgを1.0mLの20mM Tris-HCl (pH 8.0)に溶解し、実験方法2.に準じてHPLCを行い、主なピークを回収した (Fig. 2B)。最終濃度70% (v/v)になるよう冷エタノールを加え、実験方法2.と同様に処理した後、凍結乾燥し、DEAE-OSCS-Tとした。

5. NMR

5.1 $^1\text{H-NMR}$

OSCS-NIHS, OSCS-T, 及びDEAE-OSCS-T 4.0 mgをそれぞれ最終濃度0.01% (w/v)のTSPを含む重水溶液 (TSP重水溶液) 0.60 mLに溶かして試料溶液とした。これらの液につきTSPを内部基準物質として日本薬局方一般試験法NMR <2.2I>に従い $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。装置は日本電子 (JEOL) のJNM-ECA 500 (500 MHz)を用いた。温度は33°Cに設定し、スピニングはオフとした。データポイント数は32,768とし、スペクトル範囲はDHOのシグナルを中心に ± 6.0 ppmとした。積算回数は32回、パルス角は 90° 、繰り返しパルス待ち時間は20秒、ダミーキャンは4回とした。ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor=0.2 Hz)を用いた。

別に、ヘパリンナトリウム又はヘパリンカルシウム20 mgを、0.10 mgのOSCS-NIHS又はOSCS-T

を含むTSP重水溶液0.60 mLに溶解した。これらの液につき、上記と同様の条件で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。

5.2 二次元NMR

1) ^1H Detected Multiple Quantum Coherence (HMQC)

OSCS-NIHS, OSCS-T及びDEAE-OSCS-T 4.0 mgをそれぞれTSP重水溶液0.60 mLに溶かしOSCS-NIHS, OSCS-T及びDEAE-OSCS-T試験溶液とした。この液につき、JEOL JNM-ECA 500を用いてHMQCスペクトルを測定した。データポイント数は $1,024 \times 256$ 、スペクトル範囲は ^1H 側を $\delta-1.0 \sim 6.0$ ppm、 ^{13}C 側を $\delta-10.0 \sim 200$ ppmとした。温度を33°C、繰り返しパルス待ち時間を1.5秒と設定し、ダミーキャンを4回行った。積算回数は128回とした。

2) $^1\text{H}-^1\text{H}$ Correlation Spectroscopy (COSY)

実験方法5.2 1)で調製したOSCS-NIHS, OSCS-T及びDEAE-OSCS-T試験溶液についてJEOL JNM-ECA 500を用いてCOSYスペクトルを測定した。データポイント数は $1,024 \times 512$ 、スペクトル範囲は $\delta-1.0 \sim 6.0$ ppmとした。温度を33°C、繰り返しパルス待ち時間を1.5秒と設定し、ダミーキャンを4回行った。積算回数は16回とした。

6. OSCS-T の OSCS-NIHS への換算

OSCS-NIHS 1.0 mg を最終濃度 0.001% (w/v) の TSP を含む重水溶液 (0.001% TSP 重水溶液) 1.0 mL に溶かし、OSCS-NIHS 原液 (1.0 mg/mL) とした。この液 0.08, 0.10, 0.15 及び 0.20 mL に、それぞれ 0.52, 0.50, 0.45 及び 0.40 の 0.001% TSP 重水溶液を加えて 0.08, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg/0.6 mL OSCS-NIHS 溶液とした。これらの液につき、スピニングをオフとし、25°C で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。装置は JEOL の JNM-ECA 600 (600 MHz) を用いた。データポイント数は 32,768。スペクトル範囲は δ 5.0 ppm を中心に ± 7.5 ppm、パルス角は 90°、繰り返しパルス待ち時間は 20 秒と設定し、ダミースキャンは 2 回行った。積算回数は TSP のシグナルの S/N 比 50 以上が得られる回数とし、ウィンドウ関数は指数関数 (Line broadening factor = 0.2 Hz) を用いた。測定後、ベースラインを基準として TSP 由来のシグナルの積分値 (δ 0.00 \pm 0.02 ppm) に対する OSCS-NIHS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの積分値 (ピーク中心 \pm 0.01 ppm) を求めた。y 軸を TSP のシグナルの積分値に対する OSCS-NIHS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの相対積分値として、また、x 軸を OSCS-NIHS 量 (0.08, 0.10, 0.15, 0.20 mg) として検量線を作成した。

別に、0.15 mg の OSCS-T に、0.001% TSP 重水溶液 0.60 mL を加えて OSCS-T 溶液とし、上記と同一条件で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。ベースラインを基準として TSP 由来のシグナルの積分値 (δ 0.00 \pm 0.02 ppm) に対する OSCS-T の *N*-アセチル基に由来するシグナルの積分値 (ピーク中心 \pm 0.01 ppm) を求め、先に作成した検量線から OSCS-NIHS 換算量 (mg) を求めた。

結 果

1. 陰イオン交換 HPLC

DEAE カラムを用いた陰イオン交換 HPLC (DEAE-HLPC) におけるグリコサミノグリカン硫酸エステル保持時間は、結合している硫酸エステルの数に影響され、硫酸エステルが 2 糖単位あたり 4 個結合している OSCS は、2~2.5 個結合しているヘパリンよりも後に溶出される (Fig. 2A)。OSCS-NIHS 及び OSCS-T の硫酸エステル化の度

合いを比較する目的で、DEAE-HPLC における OSCS-NIHS 及び OSCS-T の溶出パターンを比較した。主成分はほぼ同じ時間 (約 21 分) に溶出されことから、どちらも硫酸エステル化の度合いはほぼ同じであることが推定された。しかし、OSCS-T からは主ピークの後 (約 23 分) にマイナー成分が溶出され、UV 吸収から算出した主ピークに対するマイナーピークの割合は約 30% であった (Fig. 2B)。

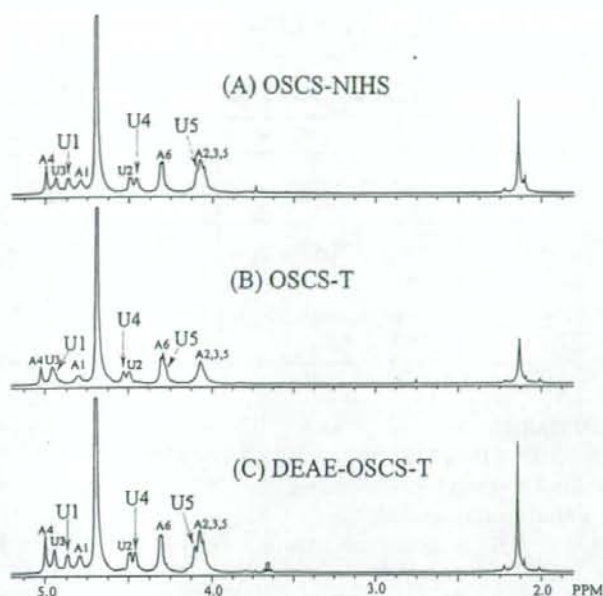
2. $^1\text{H-NMR}$

OSCS-NIHS 及び OSCS-T の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較したところ、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の *N*-アセチルガラクトサミンのプロトンに由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致するが、OSCS-T のグルクロン酸の 1, 4 及び 5 位のプロトンに相当する δ 4.94, 4.53 及び 4.28 ppm のシグナルは、OSCS-NIHS より低磁場にシフトしていることが明らかになった (Fig. 3A, 3B, Table 1)。

OSCS-NIHS は、NaCl を含む溶離液を用いた DEAE-HPLC により単一ピークのリチウム塩として回収されたものであるが、OSCS-T は水に対して透析したものであり、ナトリウムの割合が異なることや、マイナー成分が含まれていることなど、OSCS-NIHS とわずかな違いがある。これらの差異が化学シフトの違いの原因であることが推察されたので、OSCS-T から NaCl 含有溶離液と DEAE-HPLC により、主成分のリチウム塩 (DEAE-OSCS-T) を回収し、再度 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。その結果、OSCS-NIHS と DEAE-OSCS-T の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルはよく一致することが確認された (Fig. 3A, 3C, Table 1)。

3. HMQC 及び COSY

OSCS-NIHS 及び OSCS-T の HMQC スペクトルを比較したところ、OSCS-T のグルクロン酸の 1, 4 及び 5 位の ^1H と ^{13}C 以外の相関ピークの観測位置はほぼ一致していた (Fig. 4A, 4B)。また、OSCS-NIHS と DEAE-OSCS-T の HMQC スペクトルを比較した結果、すべての相関ピークが一致した (Fig. 4A, 4C)。一方、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の COSY スペクトルを比較したところ、主な相関ピークは一致したが、OSCS-T のスペク

Fig. 3 OSCS の $^1\text{H-NMR}$

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T.

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位;U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す.(例) A1: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位のプロトンの観測位置を示す.

Table 1 OSCS-NIHS, OSCS-T 及び DEAE-OSCS-T の化学シフト

Monosaccharide	NIHS	OSCS-T	DEAE-OSCS-T
4,6-<i>O</i>-sulfo-<i>N</i>-acetyl-galactosamine			
H1	4.80	4.80	4.80
H2	4.08	4.07	4.08
H3	4.08	4.08	4.08
H4	5.00	5.02	5.00
H5	4.06	4.06	4.05
H6	4.31	4.30	4.31
<i>N</i> -Acetyl	2.14	2.13	2.14
2,3-<i>O</i>-sulfo-glucuronic acid			
H1	4.86	4.94 ^a	4.87
H2	4.49	4.50	4.49
H3	4.94	4.96	4.95
H4	4.46	4.53 ^a	4.46
H5	4.10	4.28 ^a	4.10

^a OSCS-NIHS と比較して低磁場にシフトしていた OSCS-T のプロトンの化学シフト

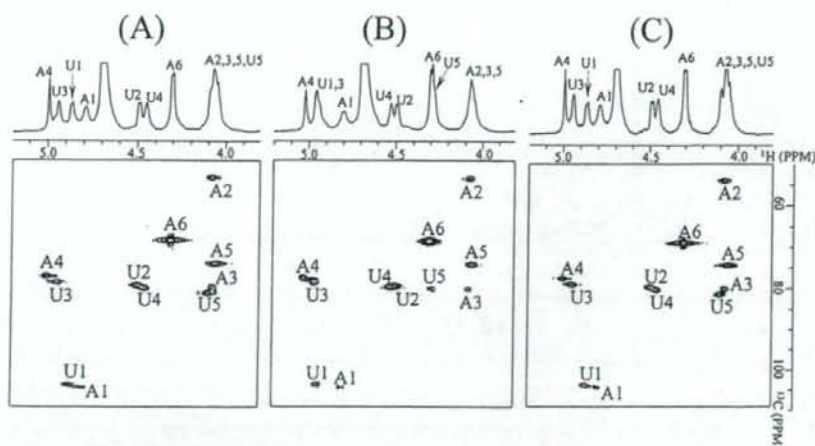


Fig. 4 OSCS の HMQC

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;

U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.

A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位; U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す.

(例) A1: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位の ^1H と ^{13}C の相関ピークの観測位置を示す.

トルの δ 4.92 と 4.06 ppm 及び δ 4.56 と 4.06 ppm の間に、OSCS-NIHS のスペクトルには認められない相関ピークが観察された (Fig. 5A, 5B). そこで、DEAE-OSCS-T の COSY 測定を行ったところ、これらの相関ピークは消失し、OSCS-NIHS のスペクトルとほぼ一致することが確認された (Fig. 5A, 5C). このことから、4.92 と 4.06 ppm 及び 4.56 と 4.06 ppm 間に観測された相関ピークは、OSCS-T に含まれていたマイナー成分に由来するシグナルであることが示唆された。この相関ピークは、硫酸エステル化されたヒアルロン酸の 3 及び 6 位が硫酸エステル化された *N*-アセチルグルコサミンの 1 位 (δ 4.92 ppm) と 2 位 (δ 4.06 ppm)、及び 2 位 (δ 4.06 ppm) 及び 3 位 (δ 4.56 ppm) の相関ピークの観測位置にほぼ一致することから⁸⁾、原料であるウシ気管軟骨由来コンドロイチン硫酸エステルナトリウムに混入していたヒアルロン酸が、硫酸エステル化されたものと推定された。以上のように ^1H -NMR, HMQC 及び COSY スペクトルから得られた化学シフトの比較から、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の主成分の構成糖と硫酸エステル基の結合位置はほぼ同じであると考えられた。

4. OSCS-T の OSCS-NIHS 量への換算

OSCS-T と OSCS-NIHS は品質特性上類似性があると考えられたことから、OSCS-T の OSCS-NIHS 含量に対する換算値を求めることとした。0.080, 0.10, 0.15 及び 0.20 mg の OSCS-NIHS を 0.001% TSP 重水溶液 0.6 mL に溶解した液につき ^1H -NMR スペクトルを測定し、TSP のシグナルの積分値に対する OSCS の *N*-アセチル基に由来するシグナルの相対積分値を y 軸として、また、OSCS-NIHS 量を x 軸としてプロットしたところ、直線性が確認された ($Y=4.8621X-0.01$, $R^2=0.9998$) (Fig. 6)。また 0.10 mg の OSCS-NIHS を 3 回測定したときの相対標準偏差は 1.0% であり、検量線から求めた真度は $99.1 \pm 1.0\%$ であった。この検量線を用いて、0.15 mg の OSCS-T を OSCS-NIHS 量に換算したところ、 0.12 ± 0.001 mg (OSCS-NIHS に対する相対純度 82%) であった。

5. ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムへ添加したときの OSCS の ^1H -NMR

OSCS-NIHS と OSCS-T の DEAE-HPLC 溶出パターン、 ^1H -NMR, HMQC 及び COSY スペク

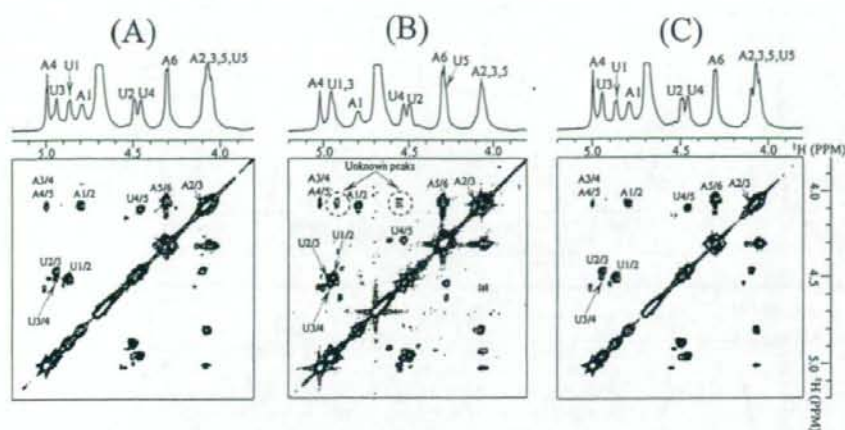
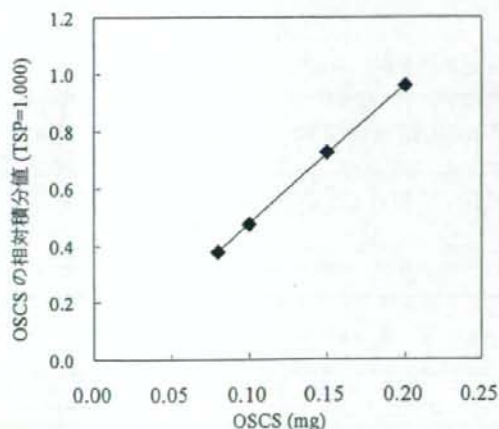


Fig. 5 OSCS の COSY

(A) OSCS-NIHS, (B) OSCS-T, (C) DEAE-OSCS-T

A, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine;U, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid.A1~A6, 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1~6 位; U1~U5, 2,3-*O*-sulfo-glucuronic acid の 1~5 位を示す。(例) A1/2: 4,6-*O*-sulfo-*N*-acetylgalactosamine の 1 位と 2 位の ^1H の相関ピークの観測位置を示す。Fig. 6 ^1H -NMR を用いた OSCS 定量試験における OSCS-NIHS の直線性

トル等にわずかな差異が認められたことから、これらの差異がヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム純度試験のシステム適合性評価に与える影響を調べた。システム適合性で用いる量に相当する 0.10 mg の OSCS-NIHS と DEAE 未処理 OSCS-

T を 20 mg のヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムに添加して ^1H -NMR スペクトルを測定し、OSCS の *N*-アセチル基のプロトンに由来するシグナルを比較した。その結果、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムのいずれにおいても、OSCS-NIHS 及び OSCS-T の *N*-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致し、シグナルの強度にも目立った差はないことが確認された (Fig. 7, 8)。

考 察

日局各条ヘパリンナトリウム及び日本薬局方外医薬品規格 2002 各条ヘパリンカルシウムの純度試験である OSCS の限度試験は、OSCS が混入しているヘパリンから精製した OSCS-NIHS を用いて確立されたものであり、特異性及び検出限界は、OSCS-NIHS を用いて評価されたものである。本研究では、OSCS-NIHS と合成 OSCS-T の構造特性、純度、及び限度試験結果等の品質特性を比較することによって、OSCS-T を日局 OSCS 標準品として使用することの妥当性を評価したものである。

OSCS-T の主成分の構造特性を OSCS-NIHS の

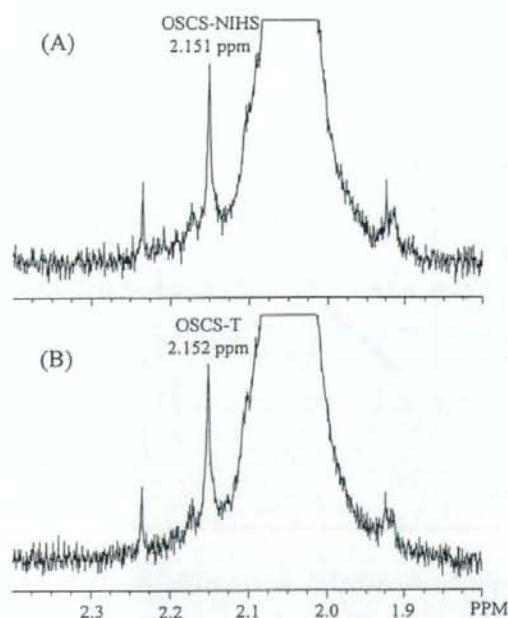


Fig. 7 ヘパリンナトリウムに添加されたOSCSの ^1H -NMRスペクトル (δ 1.8~2.4 ppm). OSCS-NIHS (A) 及び OSCS-T (B) の *N*-アセチル基に由来するピークの化学シフト.

構造特性と比較したところ、DEAE-HPLCにおける溶出位置、並びに DEAE で処理した後の ^1H -NMR, HMQC 及び COSY スペクトルが類似していたことから、両者の硫酸エステル結合数及び結合位置、並びに 2 糖構成単位はほぼ一致していることが明らかになった。

純度については、DEAE-HPLC, COSY 及び定量結果から、OSCS-T にはわずかに他の成分が混入していることが明かとなった。混入成分として、 ^1H -NMR 及び COSY スペクトルで得られた化学シフトから、原料に混入していたヒアルロン酸が硫酸エステル化されたものなどが推察された。しかし、OSCS の *N*-アセチル基のシグナルの面積強度から OSCS-T 量を OSCS-NIHS 量に換算することが可能であること、また、OSCS-T の OSCS-NIHS への換算量は 80% 以上であることから、OSCS-T は、システムの感度を評価するための標準品として利用可能であると判断された。

ヘパリンナトリウムやヘパリンカルシウムに OSCS-NIHS 及び OSCS-T を添加して ^1H -NMR

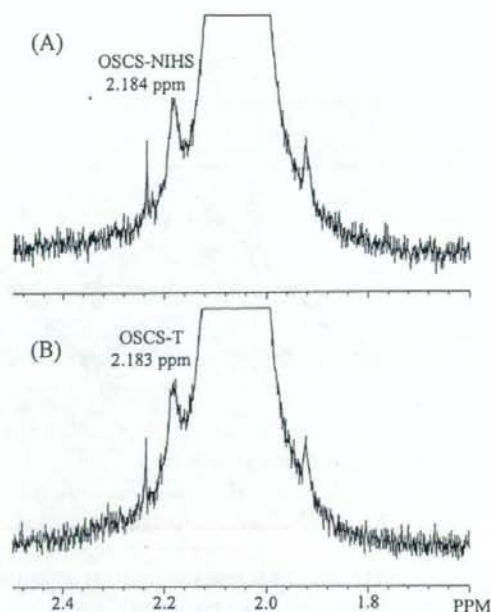


Fig. 8 ヘパリンカルシウムに添加されたOSCSの ^1H -NMRスペクトル (δ 1.6~2.5 ppm). OSCS-NIHS (A) 及び OSCS-T (B) の *N*-アセチル基に由来するピークの化学シフト.

を測定したとき、*N*-アセチル基に由来するシグナルの化学シフトはほぼ一致することが確認された。OSCS-NIHS 及び OSCS-T の限度試験結果は類似していたことから、システムの特異性の評価に OSCS-T を用いることには問題はないと判断された。

以上のように、OSCS-T にはマイナー成分として他のグリコサミノグリカン硫酸エステルが混入していること、並びに OSCS-NIHS とナトリウム含量が異なることが示唆されたが、これらの差異は、システムの感度及び特異性の確認に影響するものではないことが確認された。OSCS-T はシステム適合性確認のための日局 OSCS 標準品として用いることが可能であると思われる。

謝 辞

ヘパリンナトリウムをご供与いただいた日本バルク薬品㈱及びニプロファーマ㈱、ヘパリンカルシウムをご供与いただいた味の素㈱及び沢井製薬㈱、並びに OSCS 標準物質をご供与いただいた FDA に厚

くお礼申し上げます。また、本研究遂行にご協力いただきました厚生労働省医薬食品局審査管理課野田淳専門官、鈴木克之主査、監視指導・麻薬対策課風間秀元 GMP 指導官、独立行政法人医薬品医療機器総合機構品質管理部基準課上野清美課長、森田收氏、仁後知子氏にお礼申し上げます。

本研究の一部は、厚生労働省による支援、並びに平成 20 年度日本公定書協会の「日本薬局方標準品に関する研究（研究者戸井田敏彦）」により実施したものである。

文 献

- 1) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>.
- 2) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., et al.: *Nat Biotechnol*, **26**(6), 669-675 (2008).
- 3) Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., et al.: *N Engl J Med*, **358**(23), 2457-2467 (2008).
- 4) 「日本薬局方」平成 18 年厚生労働省告示第 285 号、平成 19 年厚生労働省告示第 316 号、平成 20 年厚生労働省告示第 285 号。
- 5) 「日本薬局方外医薬品規格 2002」平成 14 年医薬発第 0920001 号、厚生労働省医薬局長通知、平成 20 年 7 月 31 日薬食発第 0731015 号。
- 6) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G., Linhardt, R. J.: *Carbohydr Res*, **306**(1-2), 35-43 (1998).
- 7) Montgomery, R. I., Lidholt, K., Flay, N. W., Liang, J., Vertel, B., Lindahl, U., Esko, J. D.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(23), 11327-11331 (1992).
- 8) Suzuki, A., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T.: *Glycobiology*, **11**(1), 57-64 (2001).

癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 (その1)

新見 伸吾*, 原島 瑞*, 日向 昌司*, 山口 照英*, 早川 堯夫**

State and Perspective of Anti-Angiogenic Therapy to Cancer 1

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA*, Masashi HYUGA*,
Teruhide YAMAGUCHI* and Takao HAYAKAWA**

はじめに

血管新生は固形腫瘍の成長と進展において必須のステップであり、癌の主な死亡原因である。約30年前、Folkmanは腫瘍の増殖は血管新生のプロセスに依存していることを示した¹⁾。腫瘍が数ミリ以上の直径に達して進行するには血液を介した酸素及び栄養物の供給が必要であるが、両者の距離が離れているとその供給は困難である。そこで、腫瘍の成長及び進行には新しい血管の供給が必要であり、新しい血管新生のブロックにより腫瘍の成長を抑制できることを彼は提唱した。現在この概念は多くの研究により支持されている。その数年後、Gullinoは前癌状態の組織における細胞は血管新生能を獲得して癌になることを示し、血管新生の阻害は癌の抑制に用いることができることを提唱した²⁾。また、血管新生阻害療法が癌の治療法として有用であると考えられている理由は以下の点である。1個の腫瘍血管内皮細胞により約100個の腫瘍細胞が養われている。したがって、1個の腫瘍内皮細胞を死なせることにより、100個の腫瘍細胞を死なすことができる。腫瘍血管内皮細胞は正常細胞なので薬剤耐性を獲得

しないため、治療を中止後再発した場合でも最初と同じ血管新生阻害剤が有効なはずである。腫瘍細胞は多様であるため多種類の抗癌剤が必要であるが、血管内皮細胞は基本的に同じ性質をもつ正常細胞であるので、1種類の有効な阻害剤があらゆる腫瘍に有効である可能性がある。

過去30年で、一般的な血管新生、特に腫瘍の血管新生に対する我々の理解は急激に広がっており、ついに進行性の結腸直腸癌の治療に対し最初の抗血管新生治療薬としてBevacizumabが承認された。また、様々な抗血管新生治療薬を用いた60以上の臨床試験が行われている³⁻⁷⁾。

広く受け入れられている抗血管新生の作用機構は、これら薬剤が新しい血管の形成を阻害することにより腫瘍の成長と転移を抑制するというものである。残念ながら、最近の無作為臨床試験からの結果によると、利用が可能な抗血管新生治療薬を単独で用いても中程度の客観的な奏功しか示せず、生存率を長期間にわたり延長できなかった⁸⁻¹⁰⁾。しかし、化学療法剤との併用により、VEGFに対する抗体であるBevacizumabは転移性の結腸直腸癌の患者において、生存期間を5箇月も増加させた¹¹⁾。

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

** 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg. 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku
Tokyo 100-0013, Japan

このように血管新生治療薬と化学療法剤との併用が癌の治療法として有用であるのは、抗血管新生治療薬が腫瘍血管を正常な血管に改善し、酸素及び薬の腫瘍細胞に対するデリバリーを改善することによるという仮説が提唱されている。本稿ではこの新しい仮説に基づく抗血管新生治療として、たん白質及びペプチド単独あるいは化学療法剤との併用を用いた非臨床及び臨床研究の現状及び展望として腫瘍における血管新生に関する知見について概説する。なお、本稿は成書を参考にした^{3,4,7,12-17}。

1. 腫瘍の進行における血管新生の役割

成人において、正常に起きる新血管形成は女性の生殖器官及び創傷治癒に主に限定される。そうでない場合、成人における新血管形成は癌のような病理的な状況になる。最初の段階における腫瘍の成長には正常血管の取り込みが必要であるが、腫瘍血管が発達する以前には腫瘍は休眠している¹⁹。血管新生が起きるには、血管新生促進因子の効果が抗血管新生因子の効果を上回らなければならない。そのバランスが血管新生促進に傾くと、新しい血管の発達が促進され、腫瘍において血管新生を進行させるスイッチが入る¹⁹。

いったん血管が発達すると、腫瘍は転移の表現系に向かって急速に増殖し進行する。最近のデータによると、腫瘍、循環内皮細胞、内皮前駆細胞及び腫瘍細胞^{20,21}は増殖因子、サイトカイン、ホルモン²²及び浸潤促進活性を有する因子^{23,24}を遊離し、それらの因子により腫瘍の成長及び転移が促進されることが示唆されている。更に、腫瘍の血管系においては、これら細胞が新生血管を介して血管内に入り、その後離れた毛細血管から定着した転移性病巣に移動する際、転移性癌細胞播種のルートを提供する²⁵⁻²⁷。癌の進行における血管新生の役割は、腫瘍内の微小血管密度及び一定の領域における血管の数が、ある種の腫瘍型において予後因子となるだけでなく転移の進展とも相関することを示す研究から明らかになっている²⁸。

2. 腫瘍における血管新生の機構

腫瘍の血管形成は、少なくとも吸収、陥入、出芽（血管新生）、脈管形成という4種類の機構により起こる。腫瘍細胞は既存の血管を吸収してその周りで

増殖し、血管周囲にカフを形成する。しかし、重要な栄養物が限界以上に拡散するとカフは成長できず、腫瘍細胞の成長により生じる圧縮力により血管が崩壊する。あるいは、腫瘍により放出される増殖因子による既存の血管の肥大、管腔の分割といった一連のプロセスにより拡大した血管ネットワークが形成される。このような、陥入した微小血管の成長は腫瘍の成長、創傷治癒でも観察される²⁹⁻³²。

血管形成のなかで最も広く研究されている分野は、血管新生の機構であると考えられる。血管新生の機構及び血管新生促進因子の詳細については成書³³を参考にされたい。以下に血管新生の機構の要約を示す。血管新生の間、既存の血管は、正常細胞あるいは癌細胞から遊離される増殖因子に反応して透過性が亢進し、基底膜及び間質マトリックスの分解、周皮細胞の血管からの解離、内皮細胞の遊走及び増殖により血管の配列あるいは出芽が形成され、管腔は出芽の中で形成される。出芽の集合及び吻合により枝及びループが形成され、血流が形成される。これら未熟な血管は基底膜及び周皮細胞に取り込まれ、このプロセスはカナリゼーションと呼ばれる。正常な生理学的な血管新生の間では、これら血管は成熟細動脈、毛細血管、小静脈に分化する。一方、これら血管は腫瘍において未熟のままである³⁴⁻³⁷。最終的に、内皮前駆細胞から形成された血島が互いに連絡しあい、胎児の発育中に原始的な血管網が形成される。骨髄あるいは末梢血から動員される循環内皮前駆細胞は腫瘍及び他の組織における生後の脈管形成にも寄与する³⁸⁻⁴⁰。腫瘍の治療における最近の課題は、腫瘍の形成に対する血管新生促進の四つの機構それぞれについて相対的な役割を明確に理解し、癌の抗血管新生治療を最適化することである⁴¹。

3. 腫瘍血管の構造と機能

腫瘍の成長と転移において血管は重要な役割を果たしている。そして腫瘍血管系の構造及び機能は異常である。その内皮内面は不完全であり、開窓及び細胞間接合は喪失している。基底膜は不連続なものとして存在するかあるいは消失し、周囲の周皮細胞は欠如している。組織化された血管ネットワークの構造は消失している。血管ネットワークにおいてははっきりとした細動脈、小静脈、毛細血管が欠如しており、血管の間のつながりが不完全な場合がある。

血管には拡張及び収縮した領域があり、構造上、それらは蛇行状に横に広がり不規則な形をしている。また異常な分岐及びブラインド様の末端をしている。内皮細胞の配置は異常であり、一つの位置に広い隙間で分かれているか近くでお互い積み重ねられている。内皮細胞は共通の内皮マーカーに対する反応性が消失している。同様に、壁細胞のパターン及び機能も異常である。腫瘍に関連した周皮細胞は異常なたん白質発現と形態を示す。興味深いことに、異常な周皮細胞は内皮細胞と弱く結合しており、高い血管透過性の原因となっている。

このような血管の異常により、腫瘍の灌流は一樣でなく腫瘍の間質内圧は高くなる^{42,43}。高い間質内圧は腫瘍血管の透過性亢進の原因の一つともなる。通常、血管は血管内から外側へ液圧の勾配を維持することができるが、腫瘍ではこの勾配が消失して血管壁の外側と内側の圧力が同じになる。同様に、正常組織では、血管内の膠質浸透圧が外側に比べてはるかに高くなるが、腫瘍では血管の透過性亢進によりほとんど等しくなる。このような正常時とは逆の血管と腫瘍の間の勾配圧力の形成により、血管から腫瘍に対する高分子量治療薬のデリバリーが損なわれる。また、腫瘍の灌流が一樣でないことにより、化学療法剤だけでなく酸素、栄養物を含むすべての血液により運ばれる分子のデリバリーが損なわれる。腫瘍血管の障害及び先に述べた血管構造の異常により、腫瘍血管の透過性が亢進し腫瘍における血流が緩やかになる。その結果、低酸素とアシドーシスが起きる。低酸素は活性酸素のアペイラビリティを減少させ、薬物及び放射線療法に対する抵抗性が增加する。更に、遺伝子の不安定性が誘導され、血管新生及び転移に関与する遺伝子がアップレギュレートされる^{44,45}。更に、腫瘍に侵入する免疫細胞の細胞傷害性効果が損なわれる。このようにして、病的な腫瘍血管系により細胞傷害性治療及び宿主の免疫細胞から腫瘍が防御される。

4. 腫瘍における VEGF の発現

結腸直腸、肝細胞、肺、胸部、子宮内膜癌及び急性骨髄性白血病を含む多くの癌で VEGF 及びその受容体が過剰発現することがわかっている⁴⁶⁻⁴⁹。その意義については十分に理解されていない。VEGF の発現は結腸直腸癌、乳癌、小細胞及び非小

細胞肺癌の患者におけるネガティブな予後因子であることが示されている⁵⁰⁻⁵³。他方、胃癌及び子宮内膜腺癌の患者における研究では VEGF 発現と予後に相関はみつかっていない^{54,55}。

5. 血管新生阻害剤

様々な種類の血管新生阻害剤が発見あるいは開発されており、非臨床試験においてその有効性が示されている。以下にその血管新生阻害剤の非臨床試験の結果及びその作用機構について紹介する。なお、その中の主なものについて血管新生における作用部位を Fig. 1 に示す。

5.1 抗 VEGF 抗体

Kim らはマウス神経芽腫モデルにおける腫瘍の成長を抗 VEGF 中和抗体が完全に阻止することを初めて示した⁵⁶。モノクローナル抗体 (2C3) はマウスにおける腫瘍異種移植に対して抗腫瘍活性を有する。2C3 は VEGFR1 ではなく VEGFR2 と VEGF の相互作用をブロックする。2C3 は、齧歯類モデルに異種移植された多くのヒト腫瘍セルラインにおいてその腫瘍の増殖を抑制する⁵⁷。なお、その抑制効果は投与ルートあるいは腫瘍の位置に関係ない。アッセイした腫瘍型には横紋筋肉腫、グリア芽腫、平滑筋肉腫、結腸腺癌、肝芽腫、ウィルムス腫瘍、卵巣、前立腺、乳腺のがんが含まれる。一方、セルラインを用いた *in vitro* の研究では 2C3 は腫瘍細胞の増殖には影響を示さないことから、腫瘍の抑制は血管新生の阻害を介していることが示唆された⁵⁸。また、肝臓に転移性の直腸癌のマウスモデルの評価において、2C3 は肝臓に転移した癌の数を低下し大きさも小さくする⁵⁹。Bevacizumab は組換えヒト化抗 VEGF 抗体であり、VEGF のすべてのアイソフォームに対して強い親和性を有する⁶⁰。Bevacizumab は内皮細胞において増殖、血管の透過性、血管新生を含む VEGF により誘導される様々な作用を阻害する。Bevacizumab は数々の *in vivo* の腫瘍モデルにおいて腫瘍の成長を抑制し^{56,58,60,61}、特定の化学療法剤と相乗性を示す^{60,62}。

5.2 VEGF-Trap

In vivo における半減期を延長しながら、高い親和性を維持するために要求される条件を満たすことにより、薬物学的な性質を顕著に高める非常に強い親和性の VEGF ブロッカーが作られた。VEGF-

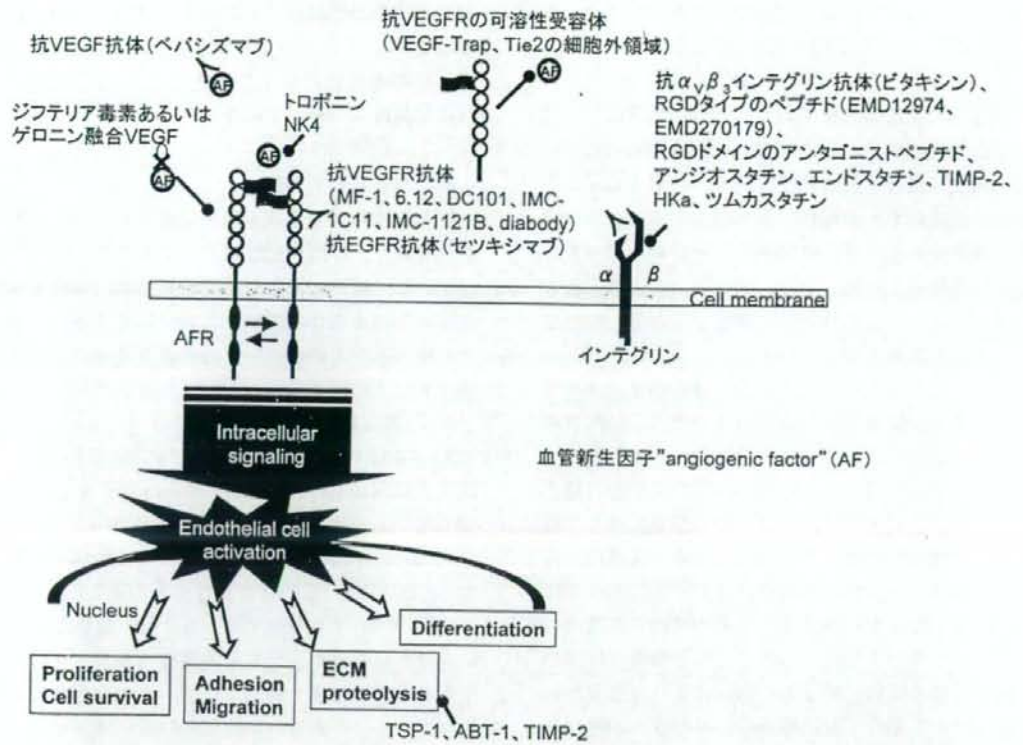


Fig. 1 血管新生阻害剤の作用部位

TrapはVEGFR1の誘導体であり、VEGFR1とVEGFR2両方の細胞外ドメインをIgGのFcフラグメントに融合したものである⁶³⁾。したがって、ヒトにおける免疫原性の可能性は最小限に抑えられている。この分子はBevacizumabと同様に細胞表面受容体からVEGFを遮蔽するが、BevacizumabよりもVEGFに対する親和性ははるかに高い^{63,64)}。VEGF-Trapはその高い親和性と*in vivo*における長い半減期から、最も強力な効果的なVEGFブロッカーの一つであり、マウス及びヒトVEGFに対する親和性はピコモルオーダーである⁶³⁾。VEGF-Trapの投与によりマウスメラノーマ、ヒト横紋筋肉腫及びラットグリオーマを含む様々な腫瘍セルラインの増殖及び血管新生が顕著に阻害される⁶³⁾。神経芽細胞腫の異種移植モデルにおいて、高投与量のVEGF-Trapで処理すると腫瘍の成長が阻害される⁶⁵⁾。その場合、腫瘍にはほとんど血液が供給されておらず、最も強く阻害された腫瘍では基本的に血管がなかった。腫瘍が形成される際、糸球体から構

成される球状の構造が血管枝に形成され、血液を供給することにより腫瘍の形成を促進すると考えられている。高濃度のVEGF-Trapはこの球状構造をアポトーシスにより退行させるが、低濃度のVEGF-Trap及び抗VEGF抗体では起こらない。この知見からVEGF-Trapによる血管系の退行は選択的であることが示唆される。この腫瘍成長の阻害は同じ腫瘍の治療に効果的でもあるVEGFR2の中和抗体であるDC101よりも10倍低い投与量で得られる⁶³⁾。

これら最初の知見はVEGF-Trapの効果を他の腫瘍系で研究している多くの報告で確かめられた。VEGF-Trapはマウス異種移植モデルで神経芽腫の阻害に効果的であり、その効果はVEGFのモノクローナル抗体における治療効果よりも大きい⁶⁵⁾。VEGF-Trapは既存の腫瘍血管系を縮小させ、その結果、定着した原発性腫瘍と転移性腫瘍は完全に縮小する⁶⁶⁻⁷⁰⁾。注目すべきことに、VEGFをブロックすると播種性の卵巣癌における血管の劇的な再

構成、腹水の蓄積の阻止がおき、播種性の癌の増殖が抑制される⁶⁷⁾。このような結果から、VEGFの強力なブロックは転移性の微小残存癌病変だけでなく巨大な癌の患者の治療に効果的であることも示唆された⁶⁶⁾。

5.3 可溶性 VEGF 及び Angiopoietin-1 受容体

先に述べた VEGF-Trap と基本的に同様な戦略が他にも行われている。EGFR1, EGFR2, Angiopoietin-1 の受容体である Tie-2 の細胞外領域をラット皮膚の腫瘍ウインドーチャンパーで評価すると腫瘍細胞のコンディション培地により誘導される角膜の血管新生が強く抑制され、乳腺腫瘍の増殖及び血管新生が減少した^{71,72)}。なお、EGFR2 の細胞外領域は *in vitro* において高い親和性で VEGF に結合し、濃度依存的に受容体の活性化をブロックし、VEGF による増殖と遊走の誘導を阻害する。

5.4 VEGFR 抗体

VEGFR1 を標的とする抗体である MF-1 及び 6.12 は、あらかじめ生着した異種移植リンパ腫の増殖を抑制する⁷³⁾。bFGF あるいは VEGF に富むマトリゲルプラグあるいはアルギニンに封入された腫瘍細胞を移植したマウスにおいて、VEGFR2 に特異的な抗体 (DC 101) は血管新生を減少させた⁷⁴⁾。また、同じ研究において DC 101 で処置後除去した腫瘍には血流が著しく低下していることから、血管新生及び血管の透過性が低下していることが示された。また、抗 VEGFR1 と抗 VEGFR2 抗体 (6.12 及び DC 101) を併用すると単独と比較して異種移植した腫瘍の増殖が大きく阻害される⁷⁵⁾。この結果から二つの VEGFR により開始される固有の血管新生促進シグナルがあることを示唆された。

ヒト化抗 VEGFR2 抗体である IMC-1C11 は内皮細胞表面の VEGFR2 細胞外ドメインに特異的に結合し、VEGF との相互作用をブロックし、細胞内チロシンキナーゼの活性化を阻止する⁷⁶⁾。IMC-1C11 は *in vitro* において VEGF により促進されるヒト内皮細胞の増殖及び VEGFR2 陽性の白血病細胞の遊走を阻害する。 *In vivo* で投与した場合、これらの抗体は VEGFR2 陽性ヒト白血病細胞を接種した NOD-SCID マウスの生存率を有意に延長する。IMC-1121B は第二世代の医薬品として作成された VEGFR2 を標的とする完全ヒトモノクローナル抗体であり、VEGFR2 に高親和性で結合して VEGF

との相互作用を効果的にブロックする。IMC-1121B は VEGF により促進される VEGFR の活性化、内皮細胞の遊走及び増殖も抑制する^{76,77)}。

VEGFR2 に特異的な IMC-1121B 及び EGFR3 に特異的な hF4-3C5 の可変領域遺伝子を用いて二重特異性抗体である diabody が構築されている⁷⁸⁾。Diabody は VEGFR2 及び VEGFR3 両方に対して濃度依存的に結合し、これら受容体と VEGF の相互作用をブロックする。 *In vitro* のアッセイにおいて、diabody は VEGF により促進される内皮細胞の遊走、内皮細胞の受容体と p42/p44 MAP キナーゼの活性化を中和する。これらの結果から、VEGFR2 と VEGFR3 両方の二重ブロックが効果的な癌治療のより有力なアプローチとなることが示唆された。

その他にも異なった VEGF 受容体に対して作成されたモノクローナル抗体が免疫不全マウスにおいて腫瘍の血管新生及びヒト腫瘍の成長を抑制する⁷⁹⁻⁸²⁾。

5.5 毒素を VEGF あるいはその受容体に結合したキメラ分子

毒素を VEGF あるいはその受容体に結合したキメラ分子の開発に取り組み試みがいくつかなされている。標的毒素は組換え法により VEGF165 あるいは VEGF121 をジフテリア毒素に融合することにより開発され、血管平滑筋細胞及び増殖している内皮細胞に対して極めて強い毒性を示すことが明らかになっている。この融合たん白質は CAM アッセイにおいて bFGF による新しい血管の増殖の誘導を完全に阻害する。更に、この融合毒素はマウスにおけるカボジ肉腫腫瘍の成長を顕著に後退させる⁸³⁾。毒素ゲロニンを連結させた VEGF121 を含む融合たん白質が細胞の増殖及びたん白質合成に及ぼす作用を検討した結果、その抑制作用は VEGFR1 及び VEGFR2 を過剰発現して増殖している内皮細胞と比べると HUVEC のほうが高い。VEGFR1 及び VEGFR2 を発現していない血管平滑筋細胞ではこのたん白質による抑制作用はみられない。ヒトメラノーマ及びヒト前立腺異種移植を融合たん白質で処理すると、腫瘍の容積が低下し、腫瘍床の赤血球細胞が溢出した腫瘍血管に対して血栓障害を起こす⁸⁴⁾。これらの基礎的研究は血管新生が関与する各種の疾患に対して融合たん白質が治療薬として有望である可能性を示しているが、抗体の産生と非標的に対す

る毒性作用を発現する可能性が問題となる。今後、免疫原性の少ない抗毒素の開発により、繰り返し投与、治療効果の改善が可能になると思われる⁸⁵⁾。

5.6 Angiostatin

AngiostatinはPlasminogenの38 kDaの断片であり、マウス腫瘍モデルで血管新生を阻害する⁸⁶⁾。Angiostatinは内皮細胞の増殖阻害及びアポトーシスの増加を介して腫瘍を休眠させる⁸⁷⁾。Angiostatinはマウスにおいて抗腫瘍及び抗血管新生の機能を有しており、これらの作用発現はアポトーシスの誘導を介している^{88,89)}。Angiostatinは“chorioallantoic membrane” (CAM) 漿尿膜アッセイにおける胎児の血管新生の阻害においても効果的である⁹⁰⁾。

Angiostatinの抗血管新生作用は、内皮細胞における受容体の候補であるATP合成酵素、アンジオモチン、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの相互作用を介している⁹¹⁻⁹⁴⁾。Angiostatinは内皮細胞の細胞周期のG2/M移行を抑制していることを示唆する研究もある⁹⁵⁾。Angiostatinはc-metに対する結合においてHGFと競合することによりHGF/c-metのシグナリングをブロックする⁹⁶⁾。

5.7 Endostatin

Endostatinはエラスターゼ及び他のプロテアーゼの作用によるコラーゲン XVIII のC末端における20 kDaの断片であり、強力な血管新生の阻害剤である。

Endostatinは内皮細胞の増殖、遊走を特異的に阻害し、Bcl-2及びBcl-XLのダウンレギュレーションにより内皮細胞のアポトーシスを誘導する⁹⁷⁻⁹⁹⁾。Endostatinはヒト臍静脈内皮細胞のVEGFにより誘導される遊走を阻害する¹⁰⁰⁾。EndostatinはVEGFR2と直接的に相互作用し、VEGFによるVEGFR2シグナルの促進を妨害する¹⁰¹⁾。

組換えEndostatinは腫瘍細胞のアポトーシスの増加及び血管新生の低下を介して多数の種類の腫瘍の成長を劇的に阻害する^{97,102)}。そして、Endostatinの繰り返し投与により、腫瘍の成長が投与期間内で阻害され、その後腫瘍は寛解に入る¹⁰³⁾。この結果から、Endostatinは薬剤耐性を誘導しない効果的な抗血管新生癌治療薬になる可能性が示唆された。

Endostatinの主要な活性の一つは内皮細胞の遊

走の阻害作用である¹⁰⁴⁾。これに関連し、Endostatinは内皮細胞の運動性に重要であるmatrix metalloprotease-2 (MMP-2) 前駆体の活性化、MMP-2及びMT1-MMPの触媒活性も阻害する^{105,106)}。

転写プロファイリング実験と組み合わせた*in vitro*の内皮細胞アッセイにおいて、Endostatinは細胞の遊走に関連したc-myc及び他の遺伝子発現を抑制することにより内皮細胞の遊走を阻害する^{98,107)}。

EndostatinはVEGF発現及びその活性をネガティブに調節することにより内皮細胞の遊走も阻害する。*In vitro*のマウス大動脈リングアッセイ及び*in vivo*のマウス腫瘍モデルにおいて、EndostatinはVEGF mRNA及びたん白質を顕著にダウンレギュレーションする¹⁰⁷⁾。EndostatinはVEGFR2と直接的に相互作用し¹⁰¹⁾、VEGFによる走化性の促進をブロックする¹⁰⁸⁾。

マウス循環内皮細胞におけるVEGF及びEndostatinの効果も解析されている¹⁰⁹⁾。アデノウイルスを用いてVEGFを発現させたマウスでは内皮細胞の数が上昇し、その上昇は組換えEndostatinにより低下する。また、Endostatinはマウスにおいて内皮細胞のアポトーシスを増加させる^{97,109)}。Endostatinは*in vitro*において内皮細胞の増殖、遊走及びコラーゲンに対する接着を阻害する^{110,111)}。これらの知見を総合的に考えると、Endostatinは*in vivo*において内皮細胞に直接作用することによりアポトーシスを誘導し殺細胞効果を有することが示唆された。

Endostatinはヘパリン結合たん白質であり、抗血管新生活性はヘパリン結合能を介している。Endostatin内のヘパリン結合モチーフが、Endostatinによる*in vitro*のVEGFあるいはbFGFによる内皮細胞遊走促進の阻害及び*in vivo*のCAMアッセイにおけるVEGFあるいはbFGFによる血管新生のブロックに関与する¹¹²⁾。

細胞表面におけるVEGFR2以外に、Endostatinの内皮細胞表面受容体の可能性がある分子として $\alpha_5\beta_1$ インテグリン¹¹³⁾及びヘパリン硫酸プロテオグリカンであるグリヒガン-1及び-4¹¹⁴⁾が同定されている。

5.8 Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (TSP-1) は最初に同定され