

む 19 種を条件として、処理時間約 75 秒(CPU 2.8GHz)で 441 種類のシグナルを検出した。また、Pioglitazone(販売名 30 種)、Troglitazone(同 3 種)に対しても検索条件に依存せず同様に 65~75 秒で検出された。以上の結果は、販売名等同意語による検索・検出処理が必要となる解析において、SIGMA 検索技術が有効な処理手法であると考えられた。また、XML 化した AERS 2,491,926 件(3.92GB)のデータに対して XML 検索システム Shunsaku(CPU 1.6GHz サーバ 3 台構成)を用いて有害事象報告の検索を実施した。検索条件に寄らず 7~10 秒で有害事象の詳細を得ることが出来た。以上、本システムは、将来的に XML 化が考えられる有害事象報告を含む医療関連情報への適用の有用性が考えられた。

### C-2 医薬安全性情報の臨床的評価

医薬安全性情報の臨床的評価として、パーキンソン病(PD)に対する麦角系ドパミンアゴニスト(DA)と心臓弁膜症のリスク解析とその後の対応について検討した。近年、DA 使用中の PD 患者での心臓弁膜症発現のリスクが EU において相次いで報告されたことを受け、日本での潜在的な心臓弁膜症の有病率を明らかにすること、さらに、日本でも心臓弁膜症のリスクが示唆されたことから、副作用の早期発見を目的とした心エコー検査に着目し、PD 病患者に対する心エコー検査の実施割合を明らかにすることを目的とした。

2種の DA の比較調査の結果として、Cabergoline 群では心逆流の発生がコントロール群に比べ有意に高く、さらに Cabergoline の投与量が多いこと及び長期投与が弁膜症のリスク因子であることが示唆されたが、ペルゴリド群での弁逆流の増加は有意ではなかった。

健康保険組合のレセプトデータベースの調査結果として、登録基準に合致した 849 例のうち、Cabergoline 使用患者は 75 例、Pergolide 使用者は 24 例であった。Cabergoline 群で心エコー検査の実施は 9 例、Pergolide 群では 6 例であり、麦角系 DA 非使用群と比較し、Cabergoline 群では実施割合に有意差は認められなかったが(RR, 1.62; 95%CI, 0.84 to 3.14)、Cabergoline 群では有意に高かった(RR, 3.38; 95%CI, 1.61 to 7.06)。添付文書改訂以降の継続及び新規使用患者では Cabergoline 群では 29 例であり、うち検査を受けたものは 5 例(17.2%)、Cabergoline 群では 9 例中 4 例(44.4%)であった。心エコー検査の有無で属性を比較したところ、Cabergoline 群及び Cabergoline 群共に、傷病名に心臓系疾患( $p < 0.000$ ,  $p = 0.022$ )があることが有意に高かったが、年齢、性別、その他の属性での有意差は認められなかった。

以上、日本においても、cabergoline による心逆流

のリスクが示唆されたが、Pergolide 群での弁逆流の増加は有意ではなかった。日本における Pergolide の推奨用量は、EU 及び米国と比べて低いことが、Pergolide 群における心臓弁膜症の有病割合に差がなかった理由と考えられる。日本での一般的な Cabergoline を用いた治療では、心臓弁膜症との関連性は極めて低いと思われる。さらに、レセプトデータベースを用いて心エコー検査実施回数を算出したところ、添付文書改訂後でも心エコー検査を実施されていない患者が多数を占めることが示唆された。心エコー検査の実施割合は副作用のリスクが高いと考えられる Cabergoline 群よりも Pergolide 群の方が高く、このことは、医師の行動に対して添付文書の改訂以外の要因が影響していると考えられる。医薬品の副作用等の安全性情報は市販後、臨床において使用された結果明らかになる場合が多いことから、安全性情報の早期発見に加え、得られた情報を臨床の医療提供者や患者にどのように伝えるかを検討することが重要であると考えられる。

### C-3 内分泌領域における副作用情報の評価と活用

大規模臨床試験により内分泌領域で使用された医薬品(経口剤)の副作用が問題となったが、その後、経皮剤を用いるとそれらの副作用が低減する報告がなされている。本研究では疾患 X に使用された経口剤と経皮剤の副作用出現の比較検討を、AERS のデータベースを用いたシグナル検出により行った。得られたシグナル検出の結果から、1) 経口剤と経皮剤の両投与経路の合計、及び何れかの経路の医薬品による副作用のシグナル検出を行った結果、両投与経路の合計において、乳癌が最も高い BCPNN 値を示したが、これは投与経路別の検討から多くは経口剤によるものであることが推定された。2) 2002 年第 2 四半期から 2008 年第 1 四半期までの 6 年間のデータを年度毎に投与経路別に検討した結果、シグナル検出数は 2003 年度以降年々増加傾向にあり、ほぼ全期間において経口剤が経皮剤を上回っていた。3) 大規模臨床試験で報告されている①乳癌、②脳卒中、③心疾患(冠動脈疾患)、④静脈血栓症を副作用症状別に分け、経口剤と経皮剤のシグナル検出を比較検討した結果、乳癌に関する副作用においては、経口剤が報告件数及びシグナル検出数共に経皮剤より大きい値を示し、静脈血栓症に関しては、報告件数はそれ程多くはないが、経口剤のみでシグナルが 7 項目検出された。その他の副作用では、明確な相違はみられなかった。4) 経口剤と経皮剤が市販されている成分 C のシグナル検出結果を投与経路別に検討した結果、報告件数は経皮剤の方が多くにも拘わらず、経口剤においてのみシグナルが乳癌を含む 3 項目検出された。

以上、本研究で対象とした副作用は、医薬品が投与された総例数に関する情報がなため、発現率は不明であるが、今回の検討から、経口剤の方が経皮剤より、副作用、特に乳癌に関する発現が他の副作用に比べて多いことが推察された。経皮剤において、乳癌の発生が相対的に少ない理由は明らかではないが、経口剤に比して、血中濃度のC<sub>max</sub>が低く、血中からの消失が緩やかであることが一因になっている可能性が考えられる。今回の結果から、データベースを用いてシグナル検出を行うことにより、医薬品の副作用の特徴を捕えることが可能であり、データベースを用いたシグナル検出は、副作用研究において重要な役割を担うと考えられた。

#### C-4 精神神経領域における副作用情報の評価と活用

精神神経領域における副作用情報の評価と活用として、AERSを用いてアルツハイマー型認知症治療薬の安全性シグナル(特に心臓障害)について検討した。認知症治療薬として、塩酸ドネペジル、ガランタミン、メマンチン、リバスチグミン(以下、ART、GRT、MEM、RIV)を対象とした。2007年のAERSデータは303,580例で構成されていた。このうち、各認知症治療薬の報告数は、ART:797例、MEM:479例、RIV:274例、GRT:142例であった。各製剤とも神経系障害の報告数が多く認められ、心臓障害に関しては、ARTで5番目、MEMで6番目、GRTで6番目、RIVで7番目と報告数が多かった。心臓障害に関する安全性シグナルは、ARTについては洞性徐脈、トルサードポアン(TdP)、洞不全症候群、房室ブロックで認められ、このうちTdPについては未知の事象であった。その他、MEMでは房室ブロック(第一度、第二度、完全)、僧帽弁逸脱、左脚ブロック、洞性徐脈、心室性期外収縮、急性心筋梗塞で、GRTでは徐脈(洞性含む)、RIVでは徐脈、心拡大、左脚ブロックでそれぞれシグナルが認められた。心臓障害が報告された症例背景について、各製剤ともに平均年齢が76歳以上であり、男女比が0.7倍前後と共通していた。また、RIVを除き、USからの報告が多かったが、日本で販売されているARTについては、US報告数の半分にあたる報告がJPからなされていた。併用薬は、平均で6~8剤が併用され、種類としては認知症治療薬、抗血小板剤、抗精神病薬、高血圧治療薬、高脂質血症治療薬などが共通していた。また、心不全、狭心症、各種不整脈、高血圧等の心臓障害に関係する合併症が各治療薬の症例に認められた。各治療薬ともAERS2007年に報告された症例数の10~15%程度が転帰死亡を含む報告で、心臓障害の症例数に対する転帰死亡を含む症例の報告率は21~30%で、また転帰死亡の症例数に対する転帰死亡の心

臓障害の症例数の割合は18%~48%であった。

全ての治療薬で心臓障害の安全性シグナルが検出され、ARTに特有のリスクではないことが確認できた。また、心臓障害の症例要約から、高齢者に用いられる機会が多く、合併症・併用薬が多いことが推察された。高齢者は、一般に生理機能が低下していることから慎重な使用が望まれる。全薬剤において安全性シグナルとして検出された徐脈については、基礎疾患に心障害や電解質異常、QT延長・徐脈を起こすことが知られている薬剤の併用時に、徐脈からQT間隔の顕著な延長を来し、致死性不整脈であるTdPを発現する可能性があることから、特に注意が必要であると考えられる。また、転帰死亡の報告に占める心臓障害での死亡の割合は、RIVを除き30%以上であったこと、特にARTでは約半数が心臓障害での死亡であったことから、副作用としての心臓障害の発生を予防できれば、アルツハイマー型痴呆患者における生命予後の延長に大きく貢献できるものと考えられた。

#### C-5 眼科領域における副作用情報の評価と活用

新薬上市前にPharmacovigilance Planを策定する際、既に市販された類薬がある場合は、リスクを特定する上でClass Effectの検討が重要である。本研究では眼科領域における副作用情報の評価と活用として、自社開発品のClass Effectを評価する上で、AERSデータが有用な情報源として利用可能であるかを検討することを目的とした。

各PG系緑内障治療点眼薬が、被疑薬として報告された件数及びシグナルとして検出された事象数は、Latanoprost 1,516件、162事象、Travoprost 281件、35事象、Bimatoprost 458件、56事象であった。検出されたシグナル陽性事象を吟味すると、2剤以上に共通する事象は多く認められたものの、「眼刺激」のような点眼剤特有の事象や「眼圧上昇」等の原疾患に関連する事象が多く含まれ、報告数の多さ、PRRの高さからだけではノイズが多すぎClass Effectの評価は困難であった。

ノイズを取り除き、Class Effectの評価を適切に行うため、対照集団を設定し、PG系緑内障治療点眼薬の副作用報告状況との比較を行った。対照集団には、同じ緑内障治療点眼薬の中からPG系薬剤とは薬理作用が異なり、かつ、点眼薬に特化して検討できるよう同一成分の全身薬のない薬剤を選択した。AERSデータにおける報告件数も加味し、炭酸脱水酵素阻害薬であるDorzolamideと $\alpha_2$ 作働薬であるBrimonidineを選択した。報告件数及びシグナル陽性事象数は、Dorzolamide 299件、55事象、Brimonidine 367件、72事象であった。

自社開発品の安全性情報ならびに類薬の公表文

献等より注目する2つの事象、「黄斑浮腫」及び「虚血性心疾患」について、PG系緑内障治療点眼薬の Class Effectであるか否かを検討した。これらの事象は、いずれも自社開発品では発現の認められていない副作用であるため、PG系緑内障治療点眼薬の Class Effectと判断された場合、自社のpotential riskと特定されることになる。

AERSデータにおいて黄斑浮腫は、PG3剤ともにシグナルとして検出され、薬剤毎の報告件数及びPRR値は、Latanoprost 88件、236.22、Travoprost 7件、83.97、Bimatoprost 6件、44.06であった。一方、薬効群の異なる対照集団ではシグナル陰性であったことより、黄斑浮腫はPG系緑内障治療点眼薬の Class Effectと考えられた。なお、88件報告のあったLatanoprostにおいて、その報告状況を時期別に検討した結果、発売後2年間に報告が集中するという偏りが認められた。

虚血性心疾患に関しては、PTとして狭心症、心筋梗塞を用いて解析を行った。狭心症はPG3剤ともにシグナル陰性であったが、対照集団のBrimonidineはシグナル陽性であった。心筋梗塞はすべての薬剤でシグナル陰性であった。以上のことから、虚血性心疾患はPG系緑内障治療点眼薬の Class Effectとは考えられなかった。

以上、AERSデータは、その大部分が重篤症例であり、また、データが不完全、Case番号の異なる重複症例、報告バイアス等の問題点も存在する。したがって、利用においてはいくつかの工夫や注意が必要であるものの、その膨大な情報は貴重であり、他の情報源と組み合わせることで有用な知見を得ることができると考えられた。

#### C-6 薬剤使用下における肝機能障害に関する検討

医薬品は、臨床試験で安全性が確認されているが、市販後に数多くの様々な症状の患者に使用され、かつ様々な併用薬が組み合わさった時に初めて見出される副作用もあり、そのため市販後に市場から撤退する薬剤も存在する。医薬品のグローバル化に伴い、同時に複数の国において同様の副作用が発生する危険性もあり、出来るだけ早期の段階で副作用を見出す技術の開発が求められている。

本研究では、薬剤の副作用発現リスクを検出する目的でAERSデータの利用可能性について検討を行った。医薬品の発売中止の理由として最も頻繁な肝障害に注目し、AERSデータから肝障害で発売中止となった薬剤と同種薬効群の市販されている薬剤を対照に、肝障害に関連した副作用シグナルの検出を検討した。具体的には、肝障害で発売中止となった糖尿病薬、ニューキノロン系(NQ)抗菌薬について検討した。

糖尿病薬については、肝障害に含まれる有害事象で「シグナルあり」となったものが発売中止薬で多く、そのPRRも高値であった。したがって、「シグナルあり」となった有害事象についてPRR値に注目することで薬剤の発売中止を予測できる可能性が考えられた。一方、NQ抗菌薬でも、発売中止薬において「シグナルあり」となった有害事象のPRRは高値であったが、その数は必ずしも販売継続中の薬剤に比べて多くなかった。しかしながら、肝壊死、肝不全といった肝毒性に関係する重篤な有害事象に関しては、発売中止薬のPRRが高値であることが認められた。

以上、糖尿病薬ではシグナルを見出した肝障害関係の有害事象数とPRRの値が薬剤の発売中止と関連していた。一方、NQ抗菌薬では肝障害関係の有害事象数では関連性を見出せなかったが、重篤な肝障害に分類される有害事象のPRRについては対象薬よりも高値であることが認められた。薬剤の発売中止の判断には報告数という量的な要素のみならず、副作用との関連性の強さという質的な要素もあるため、すべての薬剤に適用できないが、上記の結果から、たとえば肝障害を有する一部の薬剤ではAERSデータを用いたシグナル検出により、副作用発現上の特徴を見出せると考えられた。

#### C-7 血液及び腎領域における副作用の解析

AERSを用いた副作用情報の解析として、基礎疾患の影響を除外する解析方法を検討することを目的に、血液及び腎領域における副作用の解析を行った。米国自発報告有害事象データベース(AERS)を用いた解析は、発症頻度の低い副作用の検討のための貴重な情報源であるが、様々なバイアス要因の混入が避けられないため、その解釈は容易ではない。二次性疾患に対する治療薬は投与対象者がその疾患の原因である基礎疾患罹患者に限定されるため、基礎疾患の有無が解析上大きなバイアス要因となる。そこで、副作用を評価する上で基礎疾患の影響を除外する解析方法を検討することを目的とし、腎不全を基礎疾患とする二次性疾患として二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)の治療薬であるシナカルセット塩酸塩(Cinacalcet)について、投与薬剤の適応情報を利用したシグナル解析方法を検討した。また、シグナル陽性事象については、薬効との関連性を検討するため作用機序の異なる他のSHPT治療薬である活性型ビタミンD製剤、Paricalcitolとの比較を行った。

解析した結果、全体では658事象中61事象がシグナル陽性であり、薬剤あるいは適応症と関連すると考えられる事象の他、腎不全と関連する事象が上位を占めた。腎不全患者集団の解析でのシグナル陽性事象は47事象あったが、腎不全に特徴的な事象は少数で、全体的にPRRは低値であった。また、作

用機序の異なる SHPT 治療薬である Paricalcitol について同様の解析を行ったところ 74 事象がシグナル陽性となり、Cinacalcet と共通の事象は 17 事象であった。これらの共通事象のうち Cinacalcet で PRR 高値を示す事象は Paricalcitol でも高値を取り主薬の効果と関連すると考えられるものが多いのに対して、前者で PRR が比較的低値を示す事象では、後者での PRR が 1 に近い値を取るものが多く、これらは主作用とは異なる機序によって発現している事象である可能性が考えられた。

以上の結果から、AERS データによる二次性疾患の副作用解析において、投与薬剤の適応情報を用いて抽出した基礎疾患罹患者集団での解析は、基礎疾患の影響を排除するために有効であると考えられた。部分集団解析の結果を単独で解釈することは危険であるが、全体解析の結果と併せて考察することは個々の事象の考察上では有用な情報を与えると考えられた。また、作用機序の異なる同効薬剤について同様の解析を行い、両者の結果を薬理的考察と併せて検討することは各事象を解釈する上で有意義であると考えられた。

#### C-8 泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用

本研究では、泌尿器科領域における副作用情報の評価と活用として、大規模有害事象データベースである AERS を用いて統計学的手法により検出された安全性シグナルの中から、未知のシグナルと思われる事象を絞りこみ、更にその中から新たに安全確保措置を検討すべき事象の候補を特定する方法を確立すること、具体的には企業中核データシート (CCDS) の安全性部分 (CCSI) に追記する事象候補の選定方法を確立することを目的とした。

手順としては、1) AERS データより、シグナルを検出する。2) 検出された事象から新規シグナルに該当する事象を選定する。3) 選定された事象につき、社内データベースに入力されている個別症例を抽出し、それらの症例を得られている情報量に応じてカテゴリー分類を行い、カテゴリー別の症例数を評価する方法を用いた。研究対象薬剤としては、過活動膀胱における尿意切迫感、頻尿及び切迫性尿失禁を改善する薬剤 A を選定した。

解析を実施した 2008 年 6 月 8 日時点で FDA が公開していた有害事象情報が 2007 年第 4 四半期までであったため、1997 年から 2007 年第 4 四半期に FDA に報告された有害事象を対象にシグナルを検出した。

シグナル検出の閾値を越えたシグナルから、更に検討すべき事象を選別するために、「CCSI に記載されている有害事象」、「CCSI に掲載されている有害

事象に関連した事象」、「薬効欠如」、「基礎疾患」、「非特異的な事象」、「早急に検討すべき有害事象」、「継続検討する有害事象」、「既に別の方法で評価されている有害事象」の 8 カテゴリーに分類した。その結果をもとに「早急に検討すべき有害事象」に該当した事象を症例レベルまで掘り下げて評価する対象とした。

上記カテゴリー分類で「早急に検討すべき有害事象」として選択した事象について、Case series analysis を実施した。方法としては、各事象について社内データベース内の個別症例を改変 Edwards 基準に基づいて、各症例の情報量および根拠性の強さから Index case、Informative case、Inadequate case の 3 つに分類し、以下の基準を満たしたものを CCSI への追記の必要性を検討する事象として選択した。

- ・ 最低 1 例以上の Index case を含み、
- ・ かつ、Index case および Informative case の数が以下の基準を満たす。
  - ① 重篤度に関係なく合計で 10 例以上
  - ② または、重篤症例の合計が 5 例以上
  - ③ または、死亡または生命を脅かすと評価された症例の合計が 3 例以上

医学的な判断により、必要であれば上記の基準を満たさなくても CCSI 収載を検討することとした。

当該期間に FDA に報告された症例は 1,847,404 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 2,274 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した結果、45 事象がシグナルとして検出された。これらの事象を研究方法の項で述べた 8 つのカテゴリーに分類した。その結果、「早急に検討すべき有害事象」としては、緑内障、閉塞隅角緑内障、胃不快感、眼圧上昇、認知症の 5 事象であった。「早急に検討すべき有害事象」につき、社内データベースにおける集積件数を検討した結果、胃部不快感 24 件 (重篤なし)、認知症 13 件 (重篤 4 件)、閉塞隅角緑内障 3 件 (重篤 2 件)、緑内障 3 件 (重篤 1 件)、眼圧上昇 3 件 (重篤なし) であった。

これらの 5 事象について、改変 Edward 基準を用いてエビデンスの強さについて更なる検討を行なった。その結果 5 事象のうち、認知症と胃部不快感の 2 事象が CCSI への追記の必要性を検討する事象の基準を満たした。なお、閉塞隅角緑内障、緑内障、洞不全症候群については、基準を満たさなかったため CCSI 追記は今回検討しないこととしたが、今後とも発現状況をモニターすることとした。

以上の検討から、用いたいくつかの基準に関してはさらに検討を要するものの、今回検討したプロセスは、AERS から検出されたシグナルから早急に検討を

要するリスクを特定し、評価するための一つの手法として有用であり、実際の業務に用いることが出来ると考えられた。

#### C-9 海外規制機関の副作用データの解析と評価

本研究では、海外規制機関の副作用データの解析と評価として、FDAの有害事象報告システムAERSを通じて収集された情報が新たな重要な安全性情報につながった例を中心に、どのようなエビデンスに基づき有害事象との因果関係が判断され、添付文書改訂が行われたかを検討した。医薬品に関連する重篤な皮膚反応として、多型紅斑(EM)、スティーブンス・ジョンソン症候群(SJS)、中毒性表皮壊死症(TEN)が広く知られており、その発症には免疫系が関与していると考えられている。発生頻度は100万人あたり年間数人と非常に低く、症例の収集には大規模な市販後報告データが有用である。

Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  阻害薬であるInfliximab、Etanerceptは炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ を阻害する生物製剤で、関節リウマチなどが適応とされている。これらの薬剤が承認された1998年からAERS検索日までに、重篤な皮膚反応がそれぞれ21件、22件報告され、そのうちSJS/TENがそれぞれ6件、9件あった。両薬剤とも約7割の症例に併用薬があったが、複数の症例で両薬剤使用との間に妥当性のある時間的関連性がみられ、投与中止後による皮膚反応の消失、さらに再投与後の再発症例があること、及び唯一の投与薬の事例もあったことから、両薬剤と重篤な皮膚反応との関連が支持された。その結果、添付文書に有害事象として重篤な皮膚反応が追加された。両薬剤より後に承認されたAdalimumabでも重篤な皮膚反応の報告があり添付文書改訂の必要性については継続して検討されている。

Modafinilはナルコレプシーなどの過度の眠気に対する覚醒効果を適応とする医薬品であり、最近9年間で同薬に関連した重度の皮膚反応の症例が6例報告されていた。一部の症例では併用薬があったが、6例すべてで同薬の服用との時間的関連性、臨床経過の詳細、投与中止での消失や再投与での再発等により同薬の使用との関連が支持され、添付文書に重篤な皮膚反応に関する太字警告が追加された。

構造が類似した薬剤で、同様な重篤な皮膚反応のリスクが生じる例として、ヒト白血球抗原アレルHLA-B\*1502の保有者においてCarbamazepineの使用に伴うSJS/TEN発現リスクが高いことが確認されたが、構造が類似したPhenytoinについてもHLA-B\*1502の保有者でリスクが高いことが報告されている。また、Lenalidomideの投与に伴う重篤な皮膚反応発現症例も報告されており、その中にはThalidomideとの交差過敏性が示唆される症例がある。

医薬品に関連する重篤な肝障害:薬物性肝障害の症状は、他の原因による肝炎と似ており特異的な徴候や症状がほとんどないため市販後調査における診断が難しい。Natalizumab及びAtomoxetineについて報告された肝障害の症例についても、薬物と無関係な症例も多かったが、薬剤の投与と肝障害発現・消失の時間的關係、他の原因(ウイルス性肝障害、併用薬など)の除外、肝生検の結果などが精査され、再投与後に再発症例もあったことから、数例が因果関係ありと判断されて、両薬とも添付文書の警告に肝障害が追加された。

以上、市販前には明らかでなく、市販後に多数の患者が使用するようになって初めて発現が報告される有害事象に関しては、一つ一つの症例について患者の症状、臨床検査値や生検の結果、使用開始・中止との時間的関連性、併用薬などの精査を経て、その医薬品の使用と有害事象との因果関係が判断される。AERSデータベースで収集された症例をもとにしたこのような有害事象の検討は、学術論文なども併せて、医薬品の安全性確保にきわめて重要であると考えられる。

#### C-10 医薬品の安全性に向けた統計学的検討

医薬品の安全性に向けた統計学的検討として、副作用のシグナル検出に用いられるMHRAが開発したシグナル検出基準であるPRRを3つの観点(1. PRR対 $\chi^2$ 統計量の散布図とシグナル強度、2. PRRとバスケット分析、3. PRRを用いた2剤併用時のシグナル検出)から検討した。

薬A、有害事象を $\alpha$ としたAと $\alpha$ の組み合わせについての四分表を以下のように定義すると、

	有害事象 $\alpha$	その他の有害事象	合計
薬 A	$n_{11}$	$n_{1 \text{ others}}$	$n_{1 \text{ total}}$
その他の薬	$n_{\text{ others } 1}$	$n_{\text{ others others}}$	$n_{\text{ others total}}$
合計	$n_{\text{ total } 1}$	$n_{\text{ total others}}$	$n_{\text{ total total}}$

表から確信度、支持度、リフトは、以下のよう  
に与えられる。

$$\text{Confidence}(A \rightarrow \alpha)$$

$$= \frac{\Pr(A \cap \alpha)}{\Pr(A)} = \frac{n_{11} / n_{1 \text{ total total}}}{n_{1 \text{ total}} / n_{1 \text{ total total}}} = n_{11} / n_{1 \text{ total}}$$

$$\text{Support}(A \rightarrow \alpha)$$

$$= \text{Support}(\alpha \rightarrow A) = \Pr(A \cap \alpha) = \frac{n_{11}}{n_{\text{ total total}}}$$

$$\text{Lift}(A \rightarrow \alpha)$$

$$= \frac{\text{Confidence}(A \rightarrow \alpha)}{\text{Support}(\alpha)} = \frac{\Pr(\alpha | A)}{\Pr(\alpha)} = \frac{n_{11} / n_{1 \text{ total}}}{n_{\text{ total } 1} / n_{\text{ total total}}}$$

MHIRA が開発したシグナル検出基準は 3 つの要素で構成されるが、それらの要素は対数 PRR に対する対数  $\chi^2$  の散布図で視覚的に検討するのが有用である、PRR の 95%信頼区間の下限がシグナル強度として利用できる、そして PRR はデータマイニングのアソシエーション分析における Lift 指標と本質的に同じであることが分かった。

したがって、確信度は薬 A における有害事象  $\alpha$  の報告率、支持率は  $n_{11}$  の比率、リフトは比較対照の薬を全薬とした修正 PRR (FDA や Hochberg et al. の RR) に該当する。また、PRR を比較対照の観点からレビューすると ROR など他の代替指標が自然に導出される。

次に多剤併用時の安全性の評価を検討した。薬剤 A が使用されたもとの薬剤 B の  $PRR_{B|A}$ 、薬剤 A が使用されなかったもとの薬剤 B の  $PRR_{B|a}$ 、更にこれらの比  $PRR_{A \times B}$  ( $PRR_{B|A}/PRR_{B|a}$ ) とその 95%信頼区間を求め、その下限が 1 より大きい場合に薬剤 A と B の併用に対して「シグナルあり」と判断する方法を検討した。これを、2008 年の第 1 四半期までの AERS データベースに適用した。具体的には 1,999,424 件の自発報告、「悪性および詳細不明の呼吸器系および縦隔新生物」の有害事象を対象とし、計 147,696 通りの 2 薬剤組み合わせで併用シグナルを検討した。 $PRR_{A \times B}$  の 95%信頼区間の下限が 1 を越えたのは 8,581 通り (22.38%) の組み合わせであった。得られた組み合わせからのデータの絞り込みは、今後の課題である。また、AERS データの統計学的解析として、クラスタリングを検討した。AERS の解析により得られたシグナルの有無を用いて薬剤のクラスタリングを検討した。その結果、AERS で見出される一次のクラスタリング変数は、薬剤の特徴よりも、薬剤が投与される患者の疾患・病態に依存していることが示唆された。この結果を踏まえ、クラスターで共通するシグナルをバックグラウンドと考え、真に重要なシグナルを効率的に見出す方法をさらに検討する必要があると考えられた。

#### D. まとめ

医薬品の安全性は、有効性と異なり、市販後の医療現場での使用によりその特性が明らかにされていく。安全性は膨大な安全性データがあって初めて科学的な検討が可能になる。安全性の検討において、本研究で用いた米国 FDA の AERS は、公開されている世界規模での副作用データであり、報告数が年 34 万件、症例数で 12 年分計 1,999,456 件と膨大なデータであり、医薬品の安全性を考えるに上において価値の高いデータである。さらに、日本は米国に次いで 2 番目に報告数が多いことも、その活用がいかに重要であるかを示している。そして、現在の焦点はそ

れらのデータをいかに科学的に評価し、活用するかに移ってきている。

AERS は自発報告にもとづく副作用症例データベースであるが、この膨大なデータは日本の医薬品の安全性確保にとっても貴重なデータであり、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。

本研究では、AERS を用いて医薬品の安全情報を解析した。このようにグローバルに収集された大規模副作用症例データの解析は、世界の臨床現場での実態を把握し、医薬品の安全を確保する上において重要な知見をもたらすと考える。例えば、本研究成果で示したように、世界各国での抗精神病薬の併用や高齢者における適用外使用の臨床現場での実際の把握、また麦角系パーキンソン病治療薬による心弁膜症は、2004 年、2007 年の論文等により広く認識されるようになったが、AERS 上では Pergolide は 1985 年から、Cabergoline は 1998 年から継続して報告されており、医薬品の安全性確保にはこうしたグローバルに集められた大規模な副作用データベースの解析が重要であることを示している。しかし、ここで注意しておきたいことは、ここで得られた結果は、AERS が自発報告に基づくためバイアスの存在が考えられ、あくまで安全性のシグナルであり、因果関係を示したものではないことを強調しておきたい。現在の医薬品の安全性を考える立場は、これらの安全性シグナル (医療を受ける側の声なき声) に対して、現在のエビデンスから、また必要であれば新たなエビデンスを取り、この問いにどのように科学的に答え、医薬品の安全性の確保を考えていくかが重要であると言える。

今後、医薬品の安全性確保には、こうしたグローバルに集められた大規模な副作用データベースの積極的な活用と科学的な考察が必要であると言える。

今後の予定としては、開発した大規模副作用症例データ解析システムの高速度化、及び解析を容易とするためのグラフィカルな解析手法を開発すると共に、薬剤併用時の副作用の解析法をさらに検討する。また、臨床現場との接点を増やすため臨床医の研究協力者を増やし、多くの臨床領域に本システムを適用し、実際の医療現場での医薬品の安全性確保に役立つようシステムを改良する。さらに、これまでの研究成果を踏まえ、医薬品の安全性監視計画立案のための開発から市販後まで一貫した医薬品の安全性情報のライフサイクルマネジメントとしての安全性監

視計画のモデルを提言することを目標としている。

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 森川 馨, 牧内隆司, 長嶺敬彦. 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副作用の解析. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 2) 牧内隆司, 天沼喜美子, 森川 馨. 大規模副作用症例データベース(AERS) を用いた麦角系パーキンソン病治療薬の解析. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 3) 天沼喜美子, 小嶋 靖, 太田有子, 竹村玲子, 芦澤一英, 森川 馨. 海外規制機関からの医薬品安全性情報－エリスロポエチン製剤について－. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 4) 佐賀野修一, 牧内隆司, 森川 馨. AERS を用いた抗 HIV 治療薬の解析. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 5) 長野浩三, 宮原 寛, 牧内隆司, 森川 馨. オートマトン(SIGMA 技術)を用いた医薬品安全性情報の解析. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 6) 橋本公子, 野村明生, 秋山良司, 但馬 烈, 西畑利明, 森川 馨. FDA 大規模副作用症例データベース(AERS)を用いたプロスタグランジン系緑内障治療点眼薬の Class Effect の検討. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 7) 小林典弘, 田崎武信, 森川 馨. AERS データにおける薬剤のクラスタリング. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 8) 小嶋 靖, 大塚 文, 太田有子, 前田初代, 芦澤一英, 天沼喜美子, 森川 馨. 海外における医薬品安全性情報に関する動向(2008 年医薬品安全性情報から). 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 9) 芦澤一英, 小嶋 靖, 太田有子, 天沼喜美子, 森川 馨. 海外安全性情報にみられる医薬品の製剤的側面が関係した有害事象について. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 10) 太田有子, 小嶋 靖, 芦澤一英, 天沼喜美子, 森川 馨. カナダにおける市販後医薬品の安全性確保の取り組み. 日本薬学会第 129 年会(2009)
- 11) 森川 馨. 大規模副作用症例データベース AERS を用いた医薬品安全性情報の解析. 日本薬学会第 129 年会(2009) シンポジウム
- 12) 天沼喜美子, 芦澤一英, 森川 馨. 海外規制機関からの医薬品安全性情報. 日本薬学会第 129 年会(2009) シンポジウム
- 13) 田崎武信, 松村智恵子, 小林典弘, 長谷川貴大. 医薬品の安全性評価で想像力を活かすために. 日本薬学会第 129 年会(2009) シンポジウム

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

## 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

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。神経因性疼痛、脳虚血、うつ病においてグリア細胞が治療標的となりうることを明らかにした。また、トポロジー解析技術、脂質二重膜再構成技術を確立した。

### 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。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 P2X<sub>4</sub> 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活性化のメカニズムについて詳細に検討した。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。グリア細胞からニューロンへのエネルギー供給の分子機構と意義を解明し、低酸素もしくは虚血におけるニューロンへのエネルギー供給を維持してその細胞傷害を予防する薬物の開発基盤を得ることを目的として、本研究計画ではモノカルボン酸トランスポーター (MCT) 阻害がニューロン活動に及ぼす影響を詳細に解析した。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。脳組織の傷害部位周辺で活性化型ミクログリアが集積することが明らかになっている。集積した活性化型ミクログリアと他の細胞種(神経細胞、血管より浸潤したマクロファージや好中球、T 細胞など)との相互作用を元にした脳神経疾患治療薬の創製をめざし、ミクログリア集積のメカニズムと機能について検討した。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。SSRI の新しい作用機序としてBDNF(脳由来神経栄養因子)の産生亢進に関する知見が多く報告されるようになった。SSRI (fluoxetine) のアストロサイトに対する薬理作用を BDNF 産生の切り口から解析し、うつ病の分子病態とアストロサイトの関連性を明らかとし、アストロサイトを標的とした創薬の有用性を探った。佐藤班は受託研究として「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。中枢神経疾患治療への応用を目指し、ミクログリアと神経新生との関連の検討、てんかん治療への応用を目指した in vitro 評価実験系の確立、アストロサイトグルタミン酸 (L-glu) トランスポーター調節物質の探索を行った。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。井上らの報告により、神経因性疼痛においては、P2X<sub>4</sub> 受容体がある原因となるグリア関連因子である事が明らかとなっている。この受容体トポロジーについて解析をすすめる、機能との相関に関する研究を行った。また、創薬ターゲットとなるグリア関連因子が細胞膜に発現する受容体であることが多いため、均一な脂質二分子膜作成法について脂質小胞の利用を中心に検討した。

## 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

神経因性疼痛モデル動物の作製は 8~12 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い Chung らの方法を改変して行った。脊髄腔内カテーテル留置手術は Yaksh 等の方法を参考にした。IFN- $\gamma$  は 0.1 % BSA / PBS(-) 溶液を用いて希釈し、脊髄腔内カテーテルを介して投与した。痛み行動は von Frey filament を用いて評価し、触刺激に対する痛み行動惹起の 50% 閾値を Up and down 法により算出した。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:既報通りに行った。

### 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

Wistar 系ラット(P21-P24)から厚さ 400  $\mu$ m 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。孤束核小型細胞もしくは海馬 CA1 からシナプス後電流を薬理的単離下に記録した。孤束求心線維上、もしくは Schaffer 側枝上に極間 100  $\mu$ m の同心円刺激電極を置いて刺激した。阻害薬・遮断薬は灌流系を用いてチャンバー内に直接投与した。標的細胞局所的  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 投与は、パッチクランプ用ガラスピペットを用いて 1 分に 1 回 6-10 psi, 15 ms 投与した。MCT を選択的に阻害するため、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) を灌流液中に溶解して投与した。

### 3. 脳虚血時ミクログリアを標的とした創薬基盤確立

#### 3-1. 培養脳スライスの作製と薬物処理

生後 6-7 日齢の Iba-1-EGFP トランスジェニックマウスから厚さ 300  $\mu$ m の海馬スライスを作製し、多孔質膜 (Millcell-CM) 上に静置し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下、気液界面にて 10-11 日培養した。Propidium iodide (PI; 500 ng/ml) を加えた培地で 1 時間培養し、NMDA (50  $\mu$ M, 3 時間) 処置を行い、直後から EGFP および PI の蛍光を観察し、以降 7 日後まで観察を繰り返した。

#### 3-2. リポソーム封入クロドロン酸の調製と処置

卵黄由来ホスファチジルコリン:コレステロール 4:1 のリポソームにクロドロン酸溶液 (0.6 M) を封入した。培養 4 日目の海馬スライスにリポソーム懸濁液 10  $\mu$ l を上方より静かに滴下した。培養 7 日後クロドロン酸を洗い流した。培養 10-11 日後、NMDA 処置を行った。

#### 3-3. ミクログリア集積に関する検討

NMDA 処置前 (0 日) および 1-7 日後の EGFP の蛍光画像において、錐体細胞層および放線層より、

100  $\mu$ m  $\times$  200  $\mu$ m の領域の画像を取得し、錐体細胞層 (P, Stratum Pyramidale) と放線層 (R, Stratum Radiatum) との EGFP 蛍光強度の比を P/R ratio として表しミクログリア集積の指標とした。

### 3-5. 免疫組織化学および増殖細胞の染色

増殖細胞の染色には EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) をプローブとした。その後、抗 Iba1 抗体を用いて免疫染色を行った。

### 3-6. 海馬錐体細胞層の連続的観察

培養海馬スライスを NMDA 処置 2 日後から 5 日後まで連続的観察を行った。画像の取り込みは 30 分間隔で行った。

### 3-7. PI 蛍光陽性面積の測定

NMDA 処置 1-7 日後の海馬スライス全体の PI の蛍光画像より PI 蛍光陽性領域面積を定量した。

### 4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立

生後 1 日齢ラットから脳を摘出し、顕微鏡下、海馬組織を採取した。酵素処理の後、フラスコに播種し、3-4 日培養後、37°C で一晩振盪することによりアストロサイトの選別を行い、以降の実験に用いた。BDNF mRNA の測定は、定量的 real time RT-PCR 法により行った。BDNF 蛋白量はウェスタンブロッティング法により、また、細胞内カルシウムイオン濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) の解析には、fura-2 法を用いた。

### 5. 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

#### 6-1-1. ミクログリアの医薬品治療ターゲットとしての可能性探求

生後 0, 4, 10 日齢ラットにおいて、ミクログリアの分布、細胞数、形態の変化を観察した。ミクログリア活性を特異的阻害するミノサイクリンを生後 2 日齢ラットに 3 日間腹腔単回投与 (30 mg/kg)、新生細胞マーカー (KI-67)、神経細胞分化マーカー (DCX)、グリア分化マーカー (A2B5, O1, GFAP など) を免疫組織学的手法により確認した。また、脳室下帯 (SVZ) 周辺組織の細胞質画分を精製し、同マーカーのミノサイクリンによる発現変化について Western Blotting 法で確認した。ミノサイクリンを上記方法で適用したラットから採取した髄液、SVZ 周辺組織細胞質画分について、サイトカイン濃度を Bio-plex System (Bio-Rad) を用いて測定した。

#### 6-1-2. てんかん治療応用を目指したミクログリアの in vitro 評価実験系の確立

生後 6-10 日齢の Wistar 系ラットより 300  $\mu$ m の海馬切片標本作製しミリセルトランスメンブレン (millipore) 上に静置し、0-18 日間培養し最適の培養条件を検討した。培養海馬切片を

Alexa488-IsolectinB4 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下で 6-12 時間培養しマイクログリアの time lapse imaging を試みた。海馬切片標本を 50  $\mu\text{M}$  のピクロキシン存在下で 4-8 日間培養し免疫組織学的手法を用いて経時的に観察した。

**6-2. アストロサイトトランスポーター調節物質の探索**  
EAAT1 トランスポーター RNA (cRNA) をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、トランスポーターを発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。EAAT1 トランスポーターを介するイオン電流は卵母細胞を -50 mV に保持し、-120 mV へ周期的なステップパルスを加えた状態で、L-glu を用いて誘発した。また、電流電圧関係解析実験においては、卵母細胞を -50 mV に保持し、-120 mV から +60 mV まで 10 mV 間隔での周期的なステップパルスを加えた。これらの実験系において非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を適用した。

## 6. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析

### 5-1. 単層膜脂質小胞 (SUV) の作成

L- $\alpha$ -フォスファチジルコリンと脳由来フォスファチジルセリン (PC/PS) から単層膜脂質小胞 (small unilamellar vesicle, SUV) を作成した。

### 5-2. P2X<sub>4</sub> 受容体の脂質二分子膜への再構成

L- $\alpha$ -フォスファチジルコリンと脳由来フォスファチジルセリン (PC/PS, 1:1, 160  $\mu\text{M}$  in 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 100  $\mu\text{l}$ ) の SUV と P2X<sub>4</sub> 受容体タンパク質 (100 ng/ml, 100  $\mu\text{l}$ ) 及び n-オクチル- $\beta$ -D-グルコピラノシド(最終濃度 160 mM) を混合し、透析用ロッドのウェルに加え、ウェルを半透膜 (分子量 50 kDa) で覆った。ロッドは透析バッファー中で 5 日間振とうした。

### 5-3. P2X<sub>4</sub> 受容体の Ca<sup>2+</sup> 透過性及びエチジウムブロマイド (EtBr) 透過性の測定系の構築

脂質二分子膜へ再構成した受容体の Ca<sup>2+</sup> 透過性及びエチジウムブロマイド透過性を測定するため、プラスチックプレートに熱したテルモシリジ (25 ゲージ) を刺して約 500  $\mu\text{m}$  径の穴を作成した。その中にカルシウム指示薬 fluo-3 (50  $\mu\text{M}$ ) と DNA (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) の混合液 0.2  $\mu\text{l}$  を加えて穴の上下を n-デカンに溶解した PC/PS (2 mM) で覆い、5 分間静置した。脂質膜に 0.5  $\mu\text{l}$  のプロテオリポソームを加え、10 分間静置した。プロテオリポソームは測定バッファーで洗浄した。Ca<sup>2+</sup> イオン透過性の変化は 2 mM CaCl<sub>2</sub> の存在下/非存在下で検討を行った。

### 5-4. 大脳皮質アストロサイトからの DNA 精製

アストロサイトからの DNA 精製には ISOGEN(ニッポンジーン)を用いて行った。  
(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. 病態時の脊髄マイクログリアと創薬基盤の確立

IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与により、投与 1 日後から痛覚閾値が低下し、投与 14 日後まで持続的な閾値の低下が引き起こされた。IFN- $\gamma$  投与ラットの脊髄内で活性型 STAT1 (p-STAT) のシグナルが観察され、マイクログリアのマーカー OX-42 と二重染色された。脊髄由来初代培養マイクログリアは IFN- $\gamma$  受容体を発現し、IFN- $\gamma$  刺激による STAT1 の活性化も見られた。また、IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与により、脊髄マイクログリアの細胞増加および細胞体の肥大化・突起の短縮といった活性化に特徴的な変化が観察された。IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与動物の脊髄において、細胞増殖周期 S 期のマーカーである BrdU の陽性細胞数が有意に増加し (p<0.001)、そのほぼすべてがマイクログリアであった。さらに、マイクログリアの活性化を抑制する minocycline を IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与ラットに処置したところ、マイクログリアの活性化とアロディニア発症が共に抑制された。このことは、IFN- $\gamma$  は脊髄マイクログリアの持続的な活性化状態を誘発し、アロディニア発症に関与している可能性を示唆している。IFN- $\gamma$  受容体欠損マウスでは、末梢神経損傷によるアロディニアおよびマイクログリアの活性化が著明に抑制された。したがって、IFN- $\gamma$  シグナルが神経損傷による脊髄マイクログリアの活性化機構として必須であり、アロディニア発症に重要であることが示唆された。初代培養マイクログリアに IFN- $\gamma$  を処置することで Src ファミリーキナーゼ (SFK) の Lyn の発現が増加し、IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与によってもマイクログリアにおける Lyn の発現増加が認められた。さらに、IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与によりマイクログリア特異的に SFK の活性化が認められたことから、発現増加した Lyn は活性化型となっていることが示唆された。Lyn 欠損マウスに IFN- $\gamma$  を脊髄腔内投与したところ、野生型マウスと比較し、マイクログリアの形態変化や細胞増殖、さらにアロディニアの発現が有意に抑制された。さらに、

Lyn 欠損マウスでは、ミクログリアの活性化の抑制も観察された。以上の結果より、IFN- $\gamma$  によりミクログリア特異的に発現増加した Lyn チロシナーゼが、ミクログリアの細胞増殖に重要な細胞内情報伝達因子であることが示唆された。IFN- $\gamma$  で刺激した初代培養ミクログリアにおいて P2X<sub>4</sub> 受容体の発現が増加し、IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与ラットの脊髄ミクログリアにおいても同様の P2X<sub>4</sub> 受容体発現増加が認められた。P2X<sub>4</sub> 受容体欠損マウスでは IFN- $\gamma$  誘発アロディニアが有意に抑制された。したがって、IFN- $\gamma$  誘発性アロディニアの発症にミクログリアの P2X<sub>4</sub> 受容体の関与が確認された。

## 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

### (1) 孤束核および海馬ニューロン静止膜電位および活動電位波形に及ぼす MCT 阻害の影響

CHCA 1 mM の投与が静止膜電位、活動電位波形ならびに振幅に及ぼす影響を検討した。CHCA は静止膜電位を僅かに過分極させた。活動電位の頻度は僅かに減少したが、これは過分極によるものと考えられた。活動電位の波形に大きな変化はなかったがその振幅は僅かにしかし有意に減少した。孤束核および海馬 CA1 ニューロンを、-60 mV に維持したときの保持電流に及ぼす CHCA の効果を検討した。CHCA は、孤束核(NTS)において、膜電流記録上の保持電流にほとんど影響を及ぼさなかったのに対し、海馬ニューロン(Hippo)において、顕著な内向きの保持電流シフトを引き起こした。後者の応答のイオン機構の詳細は、海馬ニューロンが虚血・低酸素などに応答して示す無酸素性脱分極と類似した応答であり、このような機構の発現が脳部位によって異なる可能性を示しているとともに、それが低酸素脆弱性の差異の原因となっている可能性を示す。

### (2) シナプス伝達に及ぼす MCT 阻害の影響

孤束一次求心線維束を 0.1 Hz で刺激し、誘発興奮性シナプス後電流(eEPSC)を記録した。記録は picrotoxin 100  $\mu$ M、および strychnine 1  $\mu$ M 存在下 -60 mV に膜電位固定して行った。CHCA 1 mM は、著明に eEPSC 振幅を減少した。この作用はほぼ濃度依存的であり、本実験系における IC<sub>50</sub> は 343  $\mu$ M と推定された。ついで paired-pulse ratio (PPR)を求めた。CHCA による著明な eEPSC 振幅の減少は、PPR の著明な変化を伴わなかった。シナプス前終末からの神経伝達物質放出を実験的に減少させたところ、EPSC 振幅は CHCA とほぼ同程度の振幅減少を示したが、PPR 値は大きく増加した。この事実は、CHCA による

eEPSC 振幅の減少がシナプス前性の機構に対するよりもシナプス後性の機構に対する作用によって生じている可能性をさらに支持する。MCT を介したラクテート輸送がシナプス後ニューロンに影響を及ぼしている可能性をさらに検証する目的で、孤束一次求心線維刺激によって誘発される eEPSC と同時に、同一ニューロンから、シナプス後ニューロン直近から微量投与した AMPA によって誘発される AMPA 受容体電流を記録した。CHCA 1 mM は、EPSC 振幅および AMPA 受容体電流振幅のいずれをもほぼ同じ時間経過で著明かつ有意に抑制した。これは CHCA が、シナプス後ニューロンの AMPA 受容体応答を維持するのに必須であるという可能性を示している。上述の CHCA の作用が興奮性シナプス伝達に特異的である可能性を検討するため、抑制性シナプス後電流 IPSC に及ぼすその作用を検討した。CHCA は IPSC 振幅をわずかに抑制したが、その抑制率は EPSC 振幅の抑制率よりも有意に低値であった。また、CHCA は自発 IPSC 頻度にほとんど影響を及ぼさなかった。

## 3. 脳虚血時ミクログリアを標的とした創薬基盤確立

### 3-1. ミクログリアの傷害部位への集積

Iba1-EGFP トランスジェニックマウスより作製した培養海馬スライスに NMDA 処置を行い EGFP および PI の蛍光を連続的に観察した。時間の経過とともに PI 陽性細胞が多く見られる錐体細胞層での EGFP 蛍光が強くなっていく様子が観察された。これはミクログリアが傷害部位に集積していることを示していると考えられる。このとき、Apyrase 処理しても、傷害部位周辺においてミクログリアの集積が見られた。蛍光強度比(P/R ratio)で定量したところ、NMDA 処置 3-6 日後をピークとするミクログリアの集積が明らかとなった。よって、細胞外 ATP 以外のシグナルがミクログリアの傷害部位への集積に関わっていることが示唆された。チミジンアナログの EdU を用いて増殖細胞を標識し、各種細胞マーカーとの免疫蛍光二重染色を行った。NMDA 処置後 7 日間のいずれの時点においても、ミクログリアのマーカーである Iba1 のシグナルと増殖細胞を示す EdU のシグナルの共存はわずかしか見られなかった。NMDA 処置 2 日後より 5 日後までの 3 日間、同一視野において 30 分間隔での連続的な観察を行った。NMDA 処置により傷害を受けた錐体細胞層周辺でミクログリアの動きを観察したところ、離れた位置にあるミクログリアが PI 陽性細胞方向へと移動する様子が多く観察された。以上の結果より、ミクログリアの錐体細胞層への集積は、増殖よりも遊走の寄与が大きいことが示唆

された。

### 3-2. ミクログリアによる傷害細胞の除去

NMDA 処置 2 日後より 5 日後までの 30 分間隔での連続的な観察において、EGFP で蛍光標識されたミクログリアが、PI で蛍光標識された傷害細胞の核を取り囲み、それに引き続き PI 蛍光が消失する様子が観察された。これはミクログリアが傷害細胞を貪食し、除去している様子を示すものであると考えられた。NMDA 傷害後の 7 日間の同一スライスでの連続観察において PI 蛍光強度が時間経過とともに徐々に減少していく様子が観察された。リポソーム封入クロドロン酸(Lip-CLO)処置を行ったところ、PI 蛍光強度の減弱が観察されなかった。PI 蛍光陽性領域の面積を定量したところ、Lip-CLO 処置により PI 蛍光陽性面積の減少が有意に抑制された。さらに Lip-CLO 処置群では PI の蛍光が逆に時間とともに増加する傾向が見られた。これらの結果はミクログリアが傷害細胞除去を行っていることを示していると考えられる。Apyrase の処置により、PI 蛍光強度がより減弱する様子が観察された。細胞外 ATP の分解を促進すると傷害細胞の除去が促進される可能性が示された。

### 4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立

Fluoxetine は、アストロサイトにおいて、濃度依存的(0.1-30  $\mu\text{M}$ )に BDNF mRNA 発現量を亢進させた。また、その発現亢進は、fluoxetine 添加後 6-12 時間でピークとなった。Fluoxetine (30  $\mu\text{M}$ ) 刺激後、12 及び 24 時間後には、顕著な BDNF (mature 型) 蛋白質量の産生が惹起されていることも確認された。Paroxetine にも同様の作用が認められた。三環系抗うつ薬である imipramine にも弱いながらも同様の BDNF 発現亢進作用が認められた。これらの知見は、アストロサイトにおける BDNF の発現亢進が、抗うつ薬に共通して認められる薬理作用の一つである可能性を強く示唆するものである。Fluoxetine による BDNF 発現亢進作用には、セロトニン系の関与は非常に少なかった。アストロサイト間のコミュニケーションは、細胞外 ATP 及びその受容体 P2Y 受容体を介して行われている。従って、fluoxetine による BDNF 産生に対する細胞外 ATP の役割について検討した。Fluoxetine により誘導される BDNF mRNA 発現は、P2 受容体拮抗薬 suramin 及び ATP 分解酵素 apyrase によりほぼ消失した。アストロサイトを ATP で刺激すると、BDNF mRNA の発現誘導が認められた。従って、BDNF は ATP/P2Y 受容体システムを介して BDNF 発現を誘導することが明らかとなった。

## 5. 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

### 6-1-1. ミクログリアの医薬品治療ターゲットとしての可能性探求

ラット脳におけるミクログリアは、新生期では活性化型で増殖し、生後 10 日には静止型に移行することが明らかになった。特に、神経細胞やグリアの新生が盛んな SVZ 周辺に活性化型のミクログリアの集積が認められ、この集積は生後 10 日まで続いていた。生後 2 日齢ラットにミノサイクリンを投与すると、SVZ 周辺の新生細胞数は有意に抑制された(DCX, O1)。一方、ラジアルグリアに発現し、アストロサイトマーカーでもある GFAP については有意な発現低下が認められたが、成熟アストロサイトマーカーである S100 $\beta$  に変動は認められなかった。生後4日齢ラットの髄液中、SVZ 周辺組織中では IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  の濃度が血清中濃度と比較して高かった。ミノサイクリン投与群は対照群と比較して、IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  濃度が低下した。

### 6-1-2. てんかん治療応用を目指したミクログリアの in vitro 評価実験系の確立

10 日齢ラットから作成した海馬培養切片では 0 日目では、静止型のミクログリアと神経細胞が観察できた。しかし培養 1 日目には切片が膨潤した。培養 4 日目から 8 日目には膨潤が収まり、活性化型ミクログリアと神経細胞が観察できた。培養 14, 18 日目には神経細胞層へのミクログリアの集積が観察された。培養4日目には、Isolectine B4 で蛍光標識することにより培養切片上のミクログリアをリアルタイムに記録することができた。培養4日目の培養海馬切片にピクロトキシンを添加し、ミクログリア分布及び形態を観察したところ、ミクログリアの強い活性化が確認された。

6-2. アストロサイトトランスポーター調節物質の探索  
EAAT1 トランスポーター電流に対する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の作用を検討したところ、diclofenac (100  $\mu\text{M}$ -1 mM), indomethacin (300  $\mu\text{M}$ -1 mM), 及び niflumic acid (100  $\mu\text{M}$ -3 mM) が、保持電位 -50 mV における L-glu 誘発を濃度依存的に可逆的に抑制した。acetylsalicylic acid (aspirin) では、抑制作用は認められなかった。Diclofenac 及び niflumic acid による抑制は、非競合的であった。また、1 mM niflumic acid による抑制は、保持電位 -50 mV において強く、保持電位 -120 mV において弱くなり、3 mM niflumic acid においては保持電位 -120 mV において増強反

応が観察された。電流電圧関係解析実験において、1 mM niflumic acid は、L-glu 誘発 EAAT1 トランスポーター電流の平衡電位を過分極側に有意にシフトし、約 -80mV にて大きな内向き電流を惹起した。しかし、diclofenac によっては、保持電位による抑制率の相違、平衡電位のシフトは認められなかった。arachidonic acid は EAAT1 トランスポーター電流を抑制するとの報告がある。結合部位が飽和していると推察される濃度の arachidonic acid と niflumic acid あるいは Diclofenac を同時投与したところ抑制作用は有意に大きくなった。

## 6. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析

### 5-1. P2X<sub>4</sub> 受容体構造変化のリアルタイム観察

高速 AFM を用いた P2X<sub>4</sub> 受容体の連続的な構造変化を詳細に検討したところ、単なる閉・開状態の変化だけではない事が推察された。ATP 刺激前 (~0 sec) では球状に近い構造をしているが、ATP 刺激後には速やかに三量体に変化 (0.5 sec) し、その後更にサブユニット間の距離が増大して中心に大きなポア様の構造 (ポアダイレーション様構造) が観察された (2.0, 3.0 sec)。

### 5-2. P2X<sub>4</sub> 受容体のイオン透過性の検討

脂質二分子膜へ再構成した受容体のイオン透過性を確かめるため、測定溶液に 2 mM Ca<sup>2+</sup> が存在する条件で検討を行った。刺激前は fluo-3 由来の蛍光が全く観察されなかったが、ATP 刺激後、速やかに蛍光が増加した。これは ATP 刺激に伴い、P2X<sub>4</sub> 受容体のポアが開いて Ca<sup>2+</sup> が透過したことを示している。一方、この条件下での EtBr の透過性を検討したところ、ATP 刺激前後ではほとんど蛍光強度の変化は観察されなかった。しかしながら、Ca<sup>2+</sup> 非存在下での EtBr の透過性を検討したところ、刺激後に EtBr が透過し、内部の DNA と結合する事に由来する蛍光強度の増加が観察された。この結果は Ca<sup>2+</sup> 非存在下で、P2X<sub>4</sub> 受容体の透過性が変化すること、そして EtBr のような大きな分子を透過するようになることを示唆している。

### 5-3. Ca<sup>2+</sup> による P2X<sub>4</sub> 受容体のポアダイレーション様構造の調節

Ca<sup>2+</sup> の有無によって P2X<sub>4</sub> 受容体一分子のトポロジーにも変化があるかについて検討した。Ca<sup>2+</sup> 非存在下ではサブユニット間の距離が増大するポアダイレーション様の構造を示した。この構造は P2X<sub>4</sub> 受容体を PC/PS の脂質二分子膜に再構成したときにも同様であった。また、Ca<sup>2+</sup> 存在下では三量体構造のみが観察された。この構造は ATP 刺激直後の

構造とよく似ていた。

## 5-4. 一層の脂質二分子膜の形成

我々は PC/PS の SUV をマイカ基板に融合させる事で一層の脂質二分子膜を得た。形成された膜は時間とともに横方向で融合し、最終的に一つの大きな膜になった。本条件では脂質の塊などは見られず、均一な平面膜であるため、再構成したタンパク質の構造を観察する事に適していると考えられる。生体内には PC や PS のようなグリセリン脂質の他にコレステロール、スフィンゴミエリン、ガングリオシドなどを含んでおり、様々な種類の脂質によって細胞膜が構成されている。我々はブタ脳全抽出脂質 (brain total lipids, BTL) を用いて PC/PS と同様の手法を用いて平面膜を形成した。BTL 膜ではリン脂質膜と思われる部分の他に更に高いドメインが観察された。

## D. 考察

### 1. 病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立

IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与により、持続的な閾値の低下が引き起こされ、また、脊髄ミクログリアの活性化が観察された。免疫組織染色による解析より、IFN- $\gamma$  投与ラットの脊髄内で活性型 STAT1 (p-STAT) のシグナルが観察され、ミクログリアのマーカーである OX-42 と二重染色された。さらに、脊髄由来初代培養ミクログリアは IFN- $\gamma$  受容体を発現し、IFN- $\gamma$  刺激による STAT1 の活性化も見られた。さらに、IFN- $\gamma$  によるミクログリアの活性化およびアロディニア発症は、minocycline 同時投与により抑制された。これらの事実は、IFN- $\gamma$  は脊髄内でミクログリアの活性化を介して、アロディニア症状を誘発することを示している。さらに IFN- $\gamma$  受容体欠損マウスでは、末梢神経損傷によるアロディニア、ミクログリアの細胞体の肥大化・突起の短縮・細胞増加が著明に抑制された。したがって、IFN- $\gamma$  受容体を介する IFN- $\gamma$  のシグナルが神経損傷による脊髄ミクログリアの活性化機構として必須であり、その後のアロディニア発症に重要であることが示唆された。さらに、IFN- $\gamma$  脊髄腔内投与によりミクログリア特異的に Src ファミリーキナーゼ (SFK) の Lyn の発現が増加し、活性化が認められた。Lyn 欠損マウスに IFN- $\gamma$  を脊髄腔内投与したところ、ミクログリアの形態変化や細胞増殖、さらにアロディニアの発現が有意に抑制された。さらに、Lyn 欠損マウスでは、神経損傷によるミクログリアの増殖を含む活性化の抑制も観察された。これらのことは、IFN- $\gamma$  によりミクログリア特異的に発現増加した Lyn チロシンキナーゼが、IFN- $\gamma$  および神経損傷

によるミクログリアの細胞増殖に重要な細胞内情報伝達因子であることを示唆している。さらに、IFN- $\gamma$  誘発性アロディニアの発症にミクログリアの P2X<sub>4</sub> 受容体の関与が示唆された。以上の結果より、末梢神経損傷後に損傷側脊髄内で発現増加した IFN- $\gamma$  は、ミクログリアに特異的に作用し、Lyn の発現増加・活性化を介してミクログリアの形態変化や細胞増殖を誘発し、さらに P2X<sub>4</sub> 受容体の発現増加を介して、神経因性疼痛発症に重要な役割を果たしているものと考えられる。

## 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

MCT 阻害薬 CHCA を用いることによって低酸素抵抗性の高い孤立核ニューロンの電氣的活動と海馬のそれを比較し以下の事実を明らかにした。(1)細胞の膜電位の維持および活動電位生成など主に細胞体近傍で産生される ATP に依存する活動は、MCT の阻害によってほとんど影響を受けない。(2)興奮性シナプス伝達は、特にシナプス後機構に対する MCT の阻害作用によって、著明に抑制される。そして、(3)抑制性シナプス伝達は MCT の阻害によって影響を受けるがその程度はわずかである。これらの事実を総合すると、正常なグルコースおよび酸素供給がある状態においても、シナプス近傍の AMPA 受容体の反応性の維持は、その大部分がアストロサイトからのラクテート供給に依存しているという新しい可能性が示唆される。近年、免疫電子顕微鏡による微細形態解析によって、MCT の中でも特に専らニューロンに発現する MCT2 が、postsynaptic density シナプス後肥厚の構成タンパクである可能性が示されており、本研究成果は、そのシナプス後肥厚において MCT が担う重要な役割を示唆する重要な成果である。

## 3. 脳虚血時ミクログリアを標的とした創薬基盤確立

Iba1-EGFP マウスから作製した培養海馬スライスを用いることにより、ミクログリアの傷害部位への集積を連続的に観察することが可能となった。インビボにおける検討においても、虚血により海馬の神経細胞が傷害されると、錐体細胞層において活性化ミクログリアが多数見られることが報告されており、培養脳スライスを用いた検討は、ミクログリアの活性化機構の解明と、傷害部位への集積をはじめとする活性化型ミクログリアの役割を解明する上で有用な系であると考えられる。Apyrase の処置を行っても NMDA 処置後に観察されるミクログリア集積は抑制されなかった。P2 受容体を阻害した場合にも同様の結果が得られ、ミクログリアの傷害部位への集積には細胞外 ATP

による情報伝達の寄与が小さいことが示唆された。我々は、以前の研究において、ミクログリアの局所傷害部位への突起伸長は apyrase によって抑制されることを明らかにしてきた。局所傷害部位への突起伸長の検討は、傷害後 30 分以内の反応であり、傷害部位が非常に限局されている一方で、傷害部位への集積に関する検討では傷害後数日間の反応を調べており、また、傷害部位が海馬の神経細胞層の広範囲に渡ることが、このような結果の相違に繋がった可能性が考えられる。本研究で見られたミクログリアの集積が細胞増殖によるのか、あるいは遊走によるのかを調べたところ、ミクログリア集積は主に細胞増殖ではなく遊走により生じていることを示唆する結果が得られた。集積したミクログリアが有する機能のうち、傷害細胞の除去に着目した検討を行い、ミクログリアが傷害細胞の除去に関与していることを示唆する結果を得た。Apyrase を処置した結果から、細胞外ヌクレオチドはミクログリアの傷害部位への集積には関与しないが、傷害細胞の除去に対して抑制的に働いていることが示された。この結果は、ミクログリアの貪食作用に P2Y<sub>6</sub> 受容体が関与していることを報告した Koizumi らの研究とは異なる。P2Y<sub>6</sub> 受容体を阻害する RB2 の処置でも傷害細胞の除去が促進される結果を得ているが、Koizumi らの結果との差違についてはさらに詳細な検討が必要である。ミクログリアによる傷害細胞貪食の分子機構は未だほとんど不明のままであり、今後のさらなる研究の進展が望まれる。

## 4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立

Fluoxetine は濃度依存的(1-30  $\mu$ M)に、アストロサイトの BDNF mRNA・タンパク質の発現を更新させた。他の抗うつ薬(イミプラミン、パロキセチン、ミルナシプラン)も BDNF 増大作用を有していたことから、今回認められた作用は、抗うつ薬に共通した作用である可能性が高い。今回調べた抗うつ薬の中では fluoxetine が最も強い BDNF 発現亢進作用を有していた。また、fluoxetine によるアストロサイト BDNF 産生は、ATP/P2 受容体の活性化を介している可能性が示唆された。ごく最近、ATP がアストロサイトの BDNF mRNA を増大させることが報告された。Fluoxetine は ATP の放出を増大させる、または ATP 分解酵素を抑制する、ことにより、細胞外 ATP 濃度を増大させ、BDNF 産生を引き起こす可能性が示唆された。本研究結果は、SSIR がセロニンの再取り込み阻害だけでなく、BDNF 産生系、しかもアストロサイトに作用することにより、その治療効果を発揮している可能性を示唆する。これは、アス

トロサイト由来 BDNF が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可能性を示唆する結果と考えられる。

### 5. 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

神経細胞やグリアの新生が活発な新生期ラットの SVZ 周辺において活性化型ミクログリアの集積が観察された。ミノサイクリンによりミクログリアの活性を抑制すると、SVZ 周辺の新生細胞数は有意に抑制され、神経およびオリゴデンドロサイトへの分化も抑制されることが明らかになった。さらに、生後の SVZ 周辺、髄液中において、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、INF $\gamma$ 、TNF $\alpha$  濃度が高く、特に IL-6、TNF $\alpha$  の濃度が顕著に高いことが示された。ミノサイクリン投与により IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、INF $\gamma$ 、TNF $\alpha$  濃度が低下したことから、ミクログリアがこれらのサイトカインを介して SVZ 周辺の神経細胞およびグリアの新生・分化の制御に関与している可能性が示唆された。これらの知見は神経新生低下の関与が報告されている中枢神経疾患において、ミクログリアをターゲットとした、神経細胞およびグリアの新生・分化を制御する治療薬開発の糸口となるだろう。培養 4 日目の培養海馬切片にピクロキシンを適用し、てんかんモデルを作成したところ、ミクログリアが活性化型へ誘導された。苔状繊維の異常発芽形成におけるミクログリアの関与ならびに神経活動に及ぼす影響について、さらに検討を行う予定である。Niflumic acid による L-glu 誘発 EAAT1 トランスポーター電流の抑制作用は、電位依存性を示し、L-glu 誘発 EAAT1 トランスポーター電流の平衡電位を過分極側に有意にシフトしたのに対し、diclofenac による抑制作用は、電位非依存性で平衡電位のシフトが認められなかったことから、両者の抑制メカニズムは異なることが推察される。Diclofenac 及び niflumic acid による抑制は非競合的であったことから、両者による抑制作用は、EAAT1 の基質である L-glu に対する認識部位とは異なる部位を介して引き起こされると推察される。Arachidonic acid は、EAAT1 トランスポーター電流を、同じく非競合的に抑制するとの報告がある。結合部位が飽和していると推察される濃度の arachidonic acid と niflumic acid あるいは Diclofenac を同時投与したところ抑制作用が有意に大きくなったことから、両者は arachidonic acid とは EAAT1 分子の異なる部位を介して、EAAT1 トランスポーター電流を抑制している可能性が高い。以上の結果より、NSAIDs には異なるメカニズムの EAAT1 トランスポーター調整物質が含まれているこ

とが示唆された。

### 6. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析

#### P2X<sub>4</sub> 受容体の構造変化モデル

これまでの結果をまとめて、新たな P2X<sub>4</sub> 受容体構造変化モデルを提案した。非活性化状態の P2X<sub>4</sub> 受容体はサブユニット間の距離が近く、AFM では各サブユニットは同定できず、球状の構造が観察される。ATP 刺激に伴いサブユニット間の距離が増加し、三量体構造が観察されるが、その後の変化は、Ca<sup>2+</sup> によって制御される。Ca<sup>2+</sup> 非存在下ではサブユニットの距離は更に増加し、EtBr も透過する。Ca<sup>2+</sup> 存在下では ATP 刺激後速やかに Ca<sup>2+</sup> を透過するが、その後の透過は著しく遅くなる。トポロジーは三量体構造を示すがポアダイレーション様の構造は全く観察されなかった。この構造は ATP の添加時間によって変化しなかったため、これがポアが開いた状態か脱感作して閉じた状態かについては明らかにできていない。

#### 脂質二分子膜の作成

BTL 膜ではリン脂質膜と思われる部分の他に更に高いドメインが観察された。ラフト構造には飽和脂肪酸や親水性頭部に糖鎖が結合した脂質が集積するため、その他の部分より高く観察されるといわれる。おそらく我々はラフト構造をとらえたと思われる。最近の研究ではラフト/非ラフトへの受容体の局在と受容体活性との関連や疾患との関連性が報告されている。本技術は、脂質膜内の局在、特にラフト構造と受容体の局在との関連性について調べるために非常に有用である。

### E. 結論

神経陰性疼痛、脳虚血、うつ病においてグリア細胞が治療標的となりうることを明らかにした。また、グリア創薬に必須のトポロジー解析技術、脂質二重膜再構成技術を確立した。具体的には、神経因性疼痛発症における P2X<sub>4</sub> 発現増加にいたるメカニズムを明らかにした。また、アストロサイトからニューロンへの MCT を介したエネルギー供給は、興奮性シナプス伝達を維持する上で必須のエネルギー源となっている可能性が明らかになった。SSRI (fluoxetine) の作用機序の一部にアストロサイト BDNF の産生亢進が関連している可能性が示唆された。その発現亢進のメカニズムには、ATP が強く関連していることを明らかにした。神経傷害部位へのミクログリア集積に ATP が関与しないことが示唆された。また、傷害された神経細胞がミクログリアにより貪食・除去されている

ことを確認した。新生期には集積したマイクログリアがサイトカインなどの外部液性因子を介して神経細胞やグリアの新生・分化を調節している可能性も示した。アストロサイト・L-glu トランスポーター蛋白質分子自体に直接作用する調節物質として niflumic acid と Diclofenac を見いだした。グリア関連因子の活性化メカニズムや病態時の役割を明らかにし、病態およびその治療に資する技術を確認するための取り組みとして、P2X<sub>4</sub> 受容体トポロジー解析をすすめ、構造変化と機能の関連性について検討可能な実験系を確立した。また、機能検討に必須の膜内での機能解析に向け、基板上に一層かつナノスケールで平坦な脂質二分子膜を作成することに成功した。さらに、ラフト構造の可視化に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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)
2. Tsuda M, Ueno H, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Activation of dorsal horn microglia contributes to diabetes-induced tactile allodynia via extracellular signal-regulated protein kinase signaling. *Glia*. 56 378-386 (2008)
3. Tsuda M, Toyomitsu E, Komatsu T, Masuda T, Kunifusa K, Nasu-Tada K, Koizumi S, Yamamoto K, Ando J, Inoue K. Fibronectin/integrin system is involved in P2X<sub>4</sub> receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury. *Glia*. 56 579-85 (2008)
4. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K. P2Y<sub>12</sub> receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 28 4949-56 (2008)
5. Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. P2Y<sub>1</sub> receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia*. 57 244-257 (2009)
6. Fujishita K, Ozawa T, Shibata K, Tanabe S, Sato Y, Okuda T, Maeda S, Koizumi S. Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes, reveals its neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*. in press (2009)
7. 小泉修一, 井上和秀. 脳内グリア細胞におけるATPセンサーを介した情報伝達. *生化学*. 81 35-38 (2009)
8. 小泉修一. ATPを介したグリア・ニューロン相互作用. *細胞*. 40 12-16 (2008)
9. 小泉修一, 井上和秀. ニューロン・マイクログリア相互作用. *BioClinica*. 23 97-102 (2008)
10. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K. Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. *J Pharmacol Sci*. 107, 226-230 (2008)
11. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K. Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X<sub>4</sub> receptors. *PLoS Biol*. in press
12. Shinozaki Y, Sutonen 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*. 47(7) 6164-6167 (2008)
13. 鳥光慶二, 藤崎陽一, 河西奈保子, 住友弘一. 分子レベルでのかんぱく質の機能評価. *応用物理学会誌*. 第77巻, 第5号 530-533 (2008)

### 2. 学会発表

1. 井上和秀. ミクログリアと神経因性疼痛. 特定領域研究「グリア・ニューロン回路網による情報処理機構の解明」研究班公開シンポジウム. (2008. 1. 東京)
2. Inoue K. Modal shift of sensation through P2X<sub>4</sub> molecules expressed in microglia involving in neuropathic pain. International Symposium for Membrane Interface. (2008. 1. Fukuoka)
3. 井上和秀. 神経因性疼痛発症におけるマイクログリアとATP受容体の役割. 第1回熊本創薬シンポジウム. (2008. 2. 熊本)

4. 井上和秀. 神経因性疼痛発症におけるマイクログリアATP受容体の役割. 第22回高崎痛みの研究会. (2008. 3. 高崎)
5. 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀. ミクログリアに発現するATP受容体と神経因性疼痛. 第81回日本薬理学会年会 シンポジウム 招待. (2008. 3. 横浜)
6. 小泉修一, 最上由香里, 多田薫, 藤崎陽一, 大澤圭子, 津田誠, 高坂新一, 井上和秀. 私を食べてシグナル(UDPとマイクログリアの貪食作用). 第81回日本薬理学会年会 シンポジウム 招待. (2008. 3. 横浜)
7. 増田隆博, 津田誠, 井上和秀. 神経損傷によるマイクログリア活性化と神経因性疼痛におけるIFN- $\gamma$ の役割. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
8. 長谷川茂雄, 津田誠, 石井聡, 清水孝博, 井上和秀. 後根神経節の血小板活性化因子受容体は神経因性疼痛に関与する. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
9. 岡崎香, 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀. フィブロンекチンによるマイクログリアP2X<sub>4</sub>受容体のラフト・マイクロドメインへの移行. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
10. 小松孝行, 津田誠, 山本希美子, 安藤謙一, 井上和秀. 神経因性疼痛発症過程における骨髄フィブロンекチンの役割. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
11. 久保山和哉, 津田誠, 筒井正人, 豊平由美子, 齊藤秀俊, 下川文明, 柳原延孝, 井上和秀. TrpA1欠損マウスでの神経因性疼痛の緩和とマイクログリアの活性化の抑制. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
12. 豊満美加, 津田誠, 末谷美穂, 齊藤秀俊, 井上和秀. フィブロンекチンによるマイクログリアP2X<sub>4</sub>受容体発現増加におけるp53の役割. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
13. 齊藤秀俊, 津田誠, 富田広行, 井上和秀. 神経因性疼痛発症過程におけるP2Y<sub>12</sub>受容体の関与. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
14. 藤田拓美, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀. 海馬アストログリアおよび神経細胞の酸化ストレス障害に対するATPの防御機能. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
15. 片岡彩子, 齊藤秀俊, 吉賀結衣, 津田誠, 井上和秀. ミクログリアからのATP誘発ケモカイン放出におけるNFAT関与. 第81回日本薬理学会年会. (2008. 3. 横浜)
16. Inoue K. The regulation of expression of P2X<sub>4</sub> on microglia and very slow modulation of synaptic transmission by P2X<sub>4</sub>. 第85回日本生理学会大会シンポジウム. 招待. (2008. 3. 東京)
17. Inoue K. Neurons talk with microglia through nucleotides. 7th Dutch Endo-Neuro-Psycho Meeting Plenary lecture. invited. (2008. 6. Doorwerth)
18. Inoue K. Microglia listening to neurons through purinergic receptors. Purines 2008. Plenary lecture. invited. International Scientific Advisory Board (2008. 6-7. Copenhagen)
19. 井上和秀. 神経因性疼痛でのマイクログリアとATP受容体の役割. 日本ペインクリニック学会第42回大会, 特別講演. (2008. 7. 福岡)
20. Inoue K. Glial-neuronal interactions in neuropathic pain NeuPSIG Satellite Symposium to the Glasgow 2008 World Congress on Pain. Invited. (2008. 8. London)
21. Inoue K. P2X<sub>4</sub> molecules expressed in microglia involving in neuropathic pain. Organizer, Invited. (2008. 8. Glasgow)
22. 井上和秀. 痛み伝達におけるATP受容体の役割. 第19回 毒島神経薬理フォーラム. 招待. (2008. 8. 湯布院)
23. 井上和秀. 難治性疼痛治療を目指したトランスレーショナルサイエンス: エコファーームの実践. 生体機能と創薬シンポジウム2008. 招待. (2008. 9. 東京)
24. Inoue K, Koizumi S, Tsuda M. P2Y<sub>6</sub>-evoked microglial phagocytosis. XI WORKSHOP ON APOPTOSIS IN BIOLOGY AND MEDICINE. (2008. 9. Sendai)
25. 永瀬裕志, 鈴木広志, 加藤紀人, 孤東林シナプス活動の維持におけるモノカルボン酸トランスポーターの役割. 第82回日本薬理学会年会. (2009. 3. 横浜)
26. Koizumi S. Extracellular nucleotides regulate two different microglial functions. i.e., phagocytosis and chemotaxis. OIST symposium. (2008. 4. 沖縄)
27. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Tada-Nasu K, Shinozaki Y, Fujishita K, Ohsawa K, Tsuda M, Kohsaka S, Inoue K. Microglial nucleotide sensor P2Y<sub>6</sub> receptors and brain functions. 第31回日本神経科学会. (2008. 7. 横浜)
28. Fujishita K, Sueishi K, Takata F, Kataoka Y, and Koizumi S. Astrocyte to pericyte communication mediated by ATP. Society for Neuroscience. (2008. 12. Washington DC, USA)
29. Ozawa T, Fujishita K, Shibata K, Koizumi S. Antidepressants increase BDNF in astrocytes. 第82回日本薬理学会 (2009. 3. 横浜)
30. Koizumi S, Fujishita K. Glial function and ischemic brain injury. (シンポジウム) 第82回日本薬理学会. (2009. 3. 横浜)
31. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K. Effects of Tamoxifen on L-glutamate transporter. Neuroscience 2008 (2008. 9. Tokyo)
32. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K. Effects of

tamoxifen and the related compounds on L-glutamate transport activity of cultured astrocytes. Neuroscience2008 (2008. 11. Washington D.C., USA)

33. Shigemoto-mogami Y, Nakazawa K, Sato K. Microglia instructs neurogenesis and gliogenesis in the subventricular zone. 日本薬学会第 129 年会(2009. 3. 京都)
34. Takahashi K, Nakazawa K, Nozawa R, Ohno Y, Takeuchi T, Sato K. Inhibitory effects of NSAIDs on excitatory amino acid transporter EAAT1/GLAST in Xenopus oocytes 日本薬学会第 129 年会(2009. 3. 京都)
35. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Goldman JE, Nakazawa K. Establishment of the risk assessment system for the brain at an early postnatal stage. 第 82 回日本薬理学会(2008. 3. 横浜)
36. Sumitomo K, Shinozaki Y, Takagi D, Nakashima H, Kobayashi Y, Torimitsu K. AFM observation of membrane proteins suspended over CNT network, ICSPM-16 (2008. 12. Kanagawa, Japan)
37. Shinozaki Y, Sumitomo K, Torimitsu K. AFM imaging of pore opening/dilation-related structural changes in P2X4 receptors The 4th Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology (2008. 9. Hyogo, Japan)
38. Kasai N, Ramanujan CS, Shinozaki Y, Sumitomo K, Ryan JF, Torimitsu K. Reconstitution of ionotropic glutamate receptor and its structure. The 4th Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology (2008. 9. Hyogo, Japan)
39. Sumitomo K, Shinozaki Y, Kasai N, Nalashima H, Siitonen AM, Torimitsu K, Ramanujan CS, Ryan JF. AFM observation of membrane proteins suspended over nanowells: structural and functional analysis. The 4th Workshop of the UK-Japan Bionanotechnology (2008. 9. Hyogo, Japan)
40. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K. Single receptor/channel imaging of P2X4 receptor. Purines 2008 (2008. 6. Copenhagen, Denmark)
41. Torimitsu K. Development of Nanobio Interface using Neurons and Receptor Proteins. Asia-Pacific Symposium on Nanobionics (2008. 6. Wollongong, Australia)
42. 篠崎陽一, 住友弘二, 小泉修一, 津田誠, 井上和秀, 鳥光慶二, グリア細胞に発現するストレス応答に関わる ATP 受容体の解析, 第 13 回 神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム (2009. 1. 愛知)
43. 篠崎陽一, 住友弘二, 鳥光慶二, 原子間力顕微鏡を用いた NMDA 受容体の一分子観察 第 51 回神経化学学会年会, (2008. 9. 富山)
44. 篠崎陽一, 住友弘二, 津田誠, 小泉修一, 井上和秀, 鳥光慶二, P2X4 受容体のポア開閉及びボア拡大に関する構造変化の観察第 13 回 ATP・アデニン研究会 (2008. 9. 愛知)
45. 住友弘二, 篠崎陽一, 高木大輔, 中島寛, 小林慶裕, 鳥光慶二, CNT ネットワーク上での膜タンパク質の AFM 観察 第 69 回応用物理学会(秋季) (2008. 9. 愛知)
46. 篠崎陽一, 原子間力顕微鏡を用いた膜受容体の一分子イメージング 第 18 回 脳機能分子研究会 (2008. 5. 京都)

## 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** 品質に関する研究として、多機関共同で単糖試験法を作成し、標準的方法として十分な特異性及び直線性を有することを確認した。また、ATPS 標識とキャピラリー電気泳動法によるオリゴ糖試験法は、抗体製剤のロット分析及び工程分析に利用可能であることを確認した。さらに、MS 及び MS/MS は、確認試験だけでなくアミノ酸配列等様々な試験に応用できることが示唆された。安全性に関する研究として、製造工程のウイルスクリアランス評価への核酸増幅検査(NAT)の適用を検討し、NATによりウイルス除去工程と不活化工程とを区別できることを明らかにした。また、薬剤処理によるウイルス不活化工程の導入について検討し、 $\beta$ プロピオラクトン及び Triton 処理により効果的に不活化される条件を見いだした。さらに、パルボウイルス B19 の全ての遺伝子型が検出可能な NAT 試験法の確立と最適化を行った。

**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
協和発酵キリン(株)生産本部	柳原繁弘
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
	三村尚志
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
(株)ベネシス 大阪研究所	柚木幹弘
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	成瀬毅志

**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業全般に渡る迅速化・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並びに規格及び品質試験法、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、昨年度質量分析法(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して(独)医薬品医療機器総合機構日局原案作成委員会に提出した。現在、第16改正参考情報収載に向けた

審議が行われているところである。本年度は、糖鎖試

験法整備の一環として、標準的単糖試験法を作成し、単糖標準物質、エポエチン、アルテプララーゼを用いて、7機関共同検定により、特異性及び直線性を確認した。また、キャピラリー電気泳動(CE)を用いたオリゴ糖試験法の抗体製剤ロット試験及び工程管理への適用可能性、並びに昨年度作成した質量分析法の拡大を目指して、高分解能質量分析装置を用いたMSとタンデム質量測定(MS/MS)を検討した。

安全性に関する研究では、製造工程のウイルスクリアランス評価への核酸増幅検査(NAT)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、アフィニティークロマトグラフィー(Protein A)工程及びナノフィルトレーション工程におけるウイルスクリアランス試験へのNATの適用について検討した。また、薬剤処理によるウイルス不活化工程の導入について検討した。さらに、パルボウイルス B19 の全ての遺伝子型が検出可能な NAT 試験法の確立と最適化を検討した。

**B. 研究方法****(1) 品質に関する研究****1) 単糖試験法**

単糖標準物質として、L-フコース(Fuc)、N-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)、D-ガラクトース(Gal)、N-アセチル-D-グルコサミン、D-グルコース及びD-マンノース、N-アセチルノイラミン酸(NeuAc)及びN-グリコリコリルノイラミン酸(NeuGc)糖を用いた。モデルとしてエポエチン及びアルテプララーゼを用いた。

試料の用量を5点以上とり、分離度及び直線性を求めた。定量下限は、シグナル対ノイズ比、またはピーク面積の標準偏差と検量線の傾きから計算した。(共同検定参加機関：協和発酵キリン株式会社、中外製薬株

式会社、アステラス製薬株式会社、大日本住友製薬株式会社、大阪大学、近畿大学、及び国立医薬品食品衛生研究所；順不同)

## 2) オリゴ糖試験法(CE法)

抗体の糖鎖を N グリカナーゼ F で切り出し、8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS)で蛍光誘導体化、シアリダーゼ消化後(場合によってはさらに他のエキソグリコシダーゼ消化した後)、レーザー誘導蛍光検出 CE で分析した。

## 3) MS

電場型フーリエ変換質量分析装置 (FT-MS ; LTQ-Orbitrap)により分子量約 1,000 ~70,000 Da のペプチド/タンパク質の分子質量測定、及び約 4,000Da までのペプチドのタンデム質量分析 (MS/MS) を行い、質量分析精度とプロダクトイオンの検出数を求めた。

## (2) 安全性に関する研究

### 1) アフィニティークロマトグラフィー工程のウイルスクリアランス試験

被検試料に 1/10 量のウイルス液を添加したものをプロテイン A カラムにかけ、フロースルー画分、洗浄画分、精製タンパク質画分、Run 中の洗浄液、溶出後の洗浄液を回収した。被検試料として anti-CD45 モノクローナル抗体ハーベスト液を限外濃縮、濾過後にポリエチレンイミン (PEI) カラムを通したものをを用いた。ウイルス液として、持続感染細胞 (ATCC VR-1447, strain pNFS Th-1) より調製した異種指向性マウス白血病ウイルス (X-MuLV ;  $10^8$  copies/ml) をを用いた。得られた各画分よりウイルス核酸を抽出後、リアルタイム定量 RT-PCR により X-MuLV のコピー数を算出した。クロマトグラフィーは以下の条件で行った。

- ・ 試料溶液 : anti-CD45 モノクローナル抗体ハーベスト液 9 ml に X-MuLV 溶液 1ml を添加
- ・ カラム : Bio-Scale Mini Affi-Prep Protein A cartridge 1ml (Bio-Rad 社)
- ・ Flow rate : 1ml/min
- ・ wash volume : 15ml (1ml/min)
- ・ elution : 4column volume (4ml)
- ・ 結合/平衡化/洗浄緩衝液 : Profinia Desalting Buffer (pH 7.4)
- ・ 溶出/再生緩衝液 : 100mM Sodium Citrate (pH 3.0)

### 2) 低 pH とナノフィルトレーション工程のウイルスクリアランス試験

モデルウイルスとして血漿分画製剤の原料として使用できないパルボウイルス B19 陽性血漿及びブタ糞便由来 HEV 液を超遠心により沈殿に回収し、沈殿を蛋白を含まない低 pH バッファー (pH4.0) に溶解し、15N の nanofiltration によりろ過した。ろ過直前液、ろ過後液 (3 時間)、ろ過後液 (20 時間)、ろ過をせず低 pH

バッファーで 3 時間と 20 時間放置したホールド液 (3 時間)、ホールド液 (20 時間) のウイルス核酸の定量と感染能を測定した。

### 3) 薬剤処理によるウイルス不活化工程の検討

モデルウイルスとして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) を MDCK 細胞 CCL34 (ATCC 由来) で培養して増幅させた検体を 10mM PB, 0.14M NaCl pH7.4 に懸濁して用いた。モデルウイルスの不活化は以下の方法で行った。

- ・  $\beta$ -プロピオラクトン処理による不活化 :  $\beta$ -プロピオラクトンの添加濃度 0.1% と 0.05%、反応温度を 2 ~8°C と 37°C で  $\beta$ -プロピオラクトン処理した。
- ・ Triton 処理 : ウイルス液に TritonX100 を添加、インキュベーションしウイルスを不活化処理した。

処理前後のウイルス液の感染価を測定し、その差から LRF を算出した。感染価測定は以下の方法で行った。MDCK 細胞を播種し confluent に培養後、20 $\mu$ 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 ( $\text{Log}_{10}$ TCID50/mL) を求めた。

### 4) パルボウイルス B19NAT 検出の最適化

パルボウイルス B19 陽性血漿 (オランダ赤十字中央研究所、 $8.8 \times 10^6$  copy/mL) 又は NAT 試験用の不活化ウイルス NATrol parvovirus B19 (ZeptoMetrix、 $10^5$  copy/mL) を生理食塩液で希釈後、ヒト尿由来たん白質に添加調製し、検体とした。これらの検体よりウイルス DNA を抽出し、スマイテスト パルボウイルス B19 遺伝子定性キット ver.2 (医学生物学研究所) を用い、次のように検出した。ウイルスを抽出した溶液について PCR を行い、DNP 標識した DNA 断片を増幅する。アルカリ変性後、プローブ固定プレートに加え、プローブに増幅した DNP 修飾 DNA 断片を結合させた。次いで、HRP 標識抗 DNP 抗体で DNP を介し核酸断片を酵素修飾し、酵素反応による発色の有無によりウイルスの検出を行った。また、この時、抽出溶液に添加した内部コントロールにより、PCR による DNA 断片の増幅時の異常の有無を確認した。なお、従来の試験方法は、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、上記と同様に検出を行った。

種々の量のパルボウイルス B19 を添加したヒト尿由来たん白質を検体として、これらの検体についてウイルス DNA を抽出、次いで、ウイルス核酸の検出を繰り返し実施し、ウイルス濃度毎のウイルス検出回数を求めた。この結果から得られたウイルス濃度毎の検出数、ウイルス濃度の対数値及び試験回数をを用い、プロビット分析にて、95% 検出限界を計算した。

## 倫理面への配慮

市販品を試料として用いているので、特に配慮を必要としない。

## C. 研究結果

### (1) 品質に関する研究

#### 1) 単糖分析法

8 機関を対象に、標準的単糖試験法及び具体的操作方法等に関するアンケート調査を実施し、回答を基に標準的単糖試験法を作成した。本試験法は、単糖遊離、アセチル化、誘導体化及び HPLC の4工程からなり、工程ごとに標準的な複数の操作方法を示すものである。

中性糖及びアミノ糖試験では、遊離工程として、4~7M の TFA を用いて 100℃ に加熱する方法を採用した。また、酸加水分解条件での分解を補正するため、単糖標準物質も試料と同様に処理することとした。アセチル化法にはピリジンと 10~50  $\mu$ L の無水酢酸を用いる方法を採用した。遊離単糖の分離・検出方法として、簡便でより感度の高い HPLC を採用し、2-アミノピリジン (2-AP)、4-アミノ安息香酸エチル (ABEE)、及び 2-アミノ安息香酸 (2-AA) 誘導体化法と蛍光検出 HPLC を組み合わせた方法 (それぞれ AP 法、ABEE 法または AA 法)、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP) 誘導体化法と UV 検出 HPLC を組み合わせた方法 (PMP 法)、並びに誘導体せずに PAD 検出 HPLC を用いる方法 (PAD 法) を標準的方法として選んだ。定量法として、絶対検量線法と、脱試薬過程で回収率が低下する可能性がある場合を対象として Rha や ManNAc 等を用いた内標準法を設定した。

シアル酸の分析では、遊離工程として、0.05 M 塩酸や 4 M 酢酸中 80℃ に加熱する酸加水分解法及びシアリダーゼによる酵素消化法を採用した。シアリダーゼは、基質特異性が広く、 $\alpha$ 2-6 結合に対して活性の高い *arthrobacter ureafaciens* 由来の酵素を使用することとした。遊離したシアル酸は、1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン (DMB) 誘導体化後蛍光検出する方法 (DMB 法)、または未標識のまま PAD 検出する方法 (PAD 法) を用いて分析するものとした。

共同検定でははじめに、誘導体化及び HPLC 工程における7種類の操作方法の特異性及び直線性を、単糖標準物質を用いて評価した。1つの操作方法を2機関が担当した。

**アミノ糖中性糖試験法** AP, ABEE, AA, PMP 及び PAD 法を用いたときの Gal, Man, Fuc, Glc, GlcNAc, GalNAc, Rha, 及び ManNAc の分離度は、概ね 1.5 以上であった。いずれの方法でもピーク分離度の標準偏差は 0.2 以下であり、分離の再現性が高いこと、並びに濃度範囲の 5~100 倍ではほぼ原点を通る直線性が得られることが確認された。

**シアル酸試験法** DMB 法では NeuGc, NeuAc の

ピーク分離度は 2.0 以上であり、PAD 法では、20 以上であった。どちらの方法も、20~100 倍の濃度範囲で、ほぼ原点を通る直線となった。

つぎに、糖タンパク質のモデルとしてエポエチン及びアルテブラーゼを用い、試料量 5~20 倍の範囲で、試験法で示した様々な分析法の組み合わせにより、中性糖/アミノ糖分析 [4~7 M TFA による酸加水分解、10~50  $\mu$ L の無水酢酸を用いたアセチル化、及び誘導体化/HPLC (AP, ABEE, AA, PMP 及び PAD 法)]、並びにシアル酸分析 [酸もしくは酵素による遊離、及び誘導体化/HPLC (DMB 及び PAD 法)] を行い、直線性を調べた。

**エポエチンの中性糖/アミノ糖** いずれの方法を組み合わせても、各単糖は完全に分離し、ほぼ原点を通る直線が得られた (図 1~3)。定量下限は、最も少ない GalNAc の値から、0.24~10.2  $\mu$ g と考えられた。単糖標準物質で作成した検量線からタンパク質 1 mol 当たりの Fuc, GalNAc, Gal, GlcNAc 及び Man 単糖量 (mol) の平均は、それぞれ 2.9, 0.72, 18.2, 15.2 及び 8.6 mol と計算され、機関間の相対標準偏差は 10 % 程度であった (含量の少ない GalNAc を除く)。

**エポエチンのシアル酸** いずれの組み合わせを用いても、ほぼ原点を通る直線となった。定量下限は、0.18~10.4  $\mu$ g であった。NeuAc 及び NeuGc 含量の平均は、タンパク質 1 mol 当たりそれぞれ 11.0 及び 0.17 mol であり、相対標準偏差 (%) は、27.0 及び 13.7 であった。NeuAc に対して NeuGc が 1.5 % 程度含まれていた。

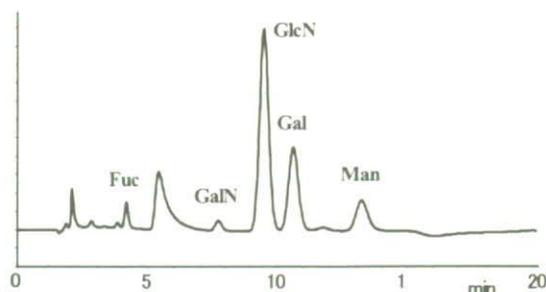


図1. PAD法で得られたエポエチン中性糖/アミノ糖のクロマトグラム

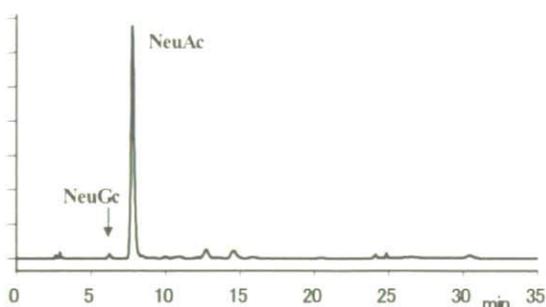


図2. DMB法で得られたエポエチンシアル酸のクロマトグラム