

図3. エポエチン中性糖/アミノ糖試験の直線性

**アルテプラゼの中性糖及びアミノ糖** 4種類の操作法では直線性が得られたが、6種類の操作法では直線性が得られなかった。直線性が得られなかった原因として、再*N*-アセチル化工程で使用した無水酢酸量が少なかったこと、添加剤のアミノ酸の存在により誘導体化が進まなかったこと、添加剤がHPLCの分離及びPAD検出に影響を与えたことなどが考えられた。直線性が得られた機関のFuc, GalNAc, GlcNAc, Gal及びMan含量の平均値は、タンパク質1 mol当たりそれぞれ、2.3、検出限界以下、6.3、4.5、及び10.6 molであった。エポエチンと比べて機関間のばらつきが大きく、添加物の影響が示唆された。

**アルテプラゼのシアル酸** 中性糖/アミノ糖同様に、加水分解やPAD法に対する添加剤の影響が見られた。直線性が得られた機関のタンパク質1 mol当たりのNeuAc含量は、約2.6~5 molで、NeuGcは検出されなかった。

## 2) オリゴ糖試験法(CE法)

抗体から*N*結合型糖鎖を切り出し、APTS標識後CEで分析することにより、5本の主糖鎖と複数のマイナー糖鎖が分離/検出されることを確認した(図4)。検出時間約8.3分及び9.3分のピークは、それぞれGal欠失2本鎖糖鎖(G0)標準物質及びガラクトース結合2本鎖糖鎖(G2)標準物質のピークと一致した。G0標準物質を添加したときの回収率は、100±10%の範囲内であり、G0,G1,G2比率が異なる2つの製剤サンプルをそれぞれ3:1,1:1,1:3の比率で混合した検体中のG0,G1,G2含量は、いずれも理論値の100±10%範囲内であった。さらに、500μg~125μgまでのタンパク質量の範囲で、良好な回収率が得られ、各ピークのピーク面積(%)の併行精度及び室内再現精度は、いずれも10%以下であった。

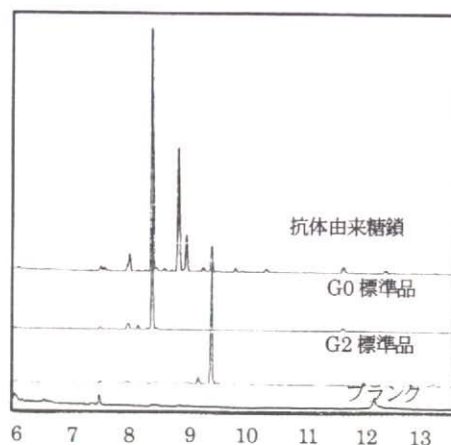


図4. APTS標識/CE法によって得られた抗体のオリゴ糖プロファイル

## 3) MS

FT-MSで質量を測定したときの精度は、分子量6,000までは0.01 Da以内、分子量70,000までは1 Da以内であり、昨年度実施した四重極やTOFMSによる測定に比べると、精度は飛躍的に向上した(図5)。また、分子量3,600 DaまでのペプチドのMS/MSスペクトルの質量精度は、0.005 Da以内であった。C末端側、N末端側双方のイオンによって、ほぼすべての配列情報を得ることができた。

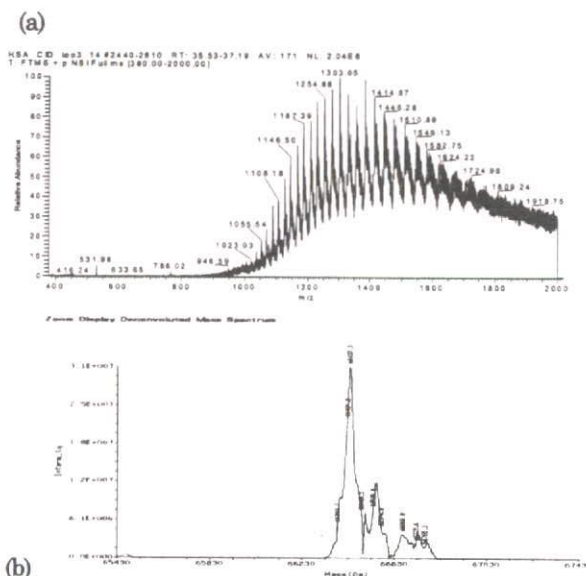


図5. ヒト血清アルブミンのESIスペクトル(a)及びDeconvolution処理スペクトル(b)

## (2) ウイルス安全性に関する研究

### 1) 製造工程のウイルスクリアランス評価へのNATの適用

#### 1.1) プロテインAカラムクロマトグラフィー工程

バイオ医薬品の製造工程でウイルスクリアランス試験への NAT の適用が有用と考えられる工程にはアフィニティークロマトグラフィー(Protein A 等)工程と、ウイルス濾過(ナノフィルトレーション)工程がある。アフィニティークロマトグラフィー工程は、ウイルス除去工程と不活性化工程の両方を含み、NAT の適用が合理的なクリアランスの評価に適していると考えられた。そこで、X-MuLV をモデルウイルスとしてモノクローナル抗体ハーベスト液に添加し、Protein A による精製工程のウイルスクリアランス能の NAT による評価を検討した。まず、予備検討として、ウイルスを添加する前の anti-CD45 モノクローナル抗体ハーベスト液についてX-MuLV のリアルタイムRT-PCRを実施した結果、 $4.8 \times 10^6$  copies/ml とバックグラウンドが極めて高いことが明らかとなった。これにより抗体ハーベスト液にはX-MuLV DNA 断片や内在性の妨害物質が混入している可能性が考えられた。そこで、ポリエチレンジアミン (PEI) 結合カラムがウイルスや DNA 断片を効率よく吸着することを利用して、PEI 結合カラムに抗体ハーベスト液をアプライし、カラム溶出液からウイルス核酸を抽出して同様にリアルタイム RT-PCR を実施したところ、 $6.3 \times 10^4$  copies/ml と2桁の低下が認められた。そこで、PEI カラム処理したモノクローナル抗体ハーベスト液を試料溶液に用いることとした。

次に、Profinia Protein Purification System を用いて、Protein A カラムに PEI カラム処理したモノクローナル抗体ハーベスト液 9ml に X-MuLV 1ml ( $10^8$  copies) を添加した試料溶液 10ml をアプライし、分画を行った。カラムから溶出・回収されたタンパク質の濃度は 0.1mg/ml、総タンパク質量は 0.3mg であった。この精製工程において、フロースルー (10ml)、洗浄 1 (15ml)、精製タンパク質溶出(4.5ml)、洗浄 2 (45ml)、クリーニング (45ml) の各フラクションを回収し、各画分 100 $\mu$ l からウイルス核酸を抽出して、各フラクションのウイルス量、Protein A カラムによるウイルスクリアランスについて検討した。その結果を表 1 に示す。Protein A カラムの Log Reduction Factor (LRF) は 2.14 であった。

表1 Protein A カラムによるウイルスクリアランスの NAT による評価

試料	Total Log copies	LRF
カラム添加試料	8.01	2.14
フロースルー画分	7.37	
洗浄画分1	7.12	
精製タンパク質溶出画分	5.87	
洗浄画分2	6.25	
クリーニング画分	6.62	
総回収ウイルス量	7.63	

精製タンパク質を回収するチューブにはあらかじめ 0.5ml の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を入れ、溶出と同時に中和を行った。この条件ではウイルスの感染性は低下しないが、pH 3.0 にすることでウイルスは不活化される。そこで、溶出画分について pH を 3.0 に下げた条件で定量 RT-PCR によりウイルスコピー数を算出したところ、コピー数は pH を下げても変化は認められなかった。このときウイルス力価は低下すると考えられ、酸処理によるウイルス力価の低下はウイルス除去によるものではなく、不活化によるものであり、NAT を実施することによって不活化と除去が区別できる可能性が示された。

## 1.2) ナノフィルトレーション工程

ウイルスクリアランス試験は通常感染価を指標として実施されるが、この方法では不活化と除去の両方の作用を持つ工程に対して、不活化と除去を区別して評価することは困難である。そこで、低 pH 条件下での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に NAT を導入することで、不活化能と除去能を区別化できるかどうかを検討した。

### ①パルボウイルス B19

B19 感染能はろ過後液 (3 時間) で検出限界以下に低下し、LRF が 3.8 以上を示した。15N nanofiltration を行わないホールド 3 時間液ではわずかに感染能が残っており 3.2 の LRF を示したが、20 時間のホールドでは検出限界以下に低下した。一方 B19 ゲノム定量では、ろ過後液 3 時間と 20 時間で LRF が 4.3 と 4.4 を示したが、ホールド 3 時間では 1.0 未満、20 時間で 1.1 の低い reduction を示した。これらの結果から、15N ろ過処理の感染能の消失は、ろ過によるウイルスの除去と低 pH による不活化の両方が関与していることが明らかになった(表 2)。

表2 B19 の低 pH 条件下での 15N ろ過膜処理による Q-PCR と感染価

Sample	Q-PCR		Infectivity	
	total Log copies	LRF	total Log TCID <sub>50</sub>	LRF
ストック ウイルス液	12.1		8.4	
バッファー置換ウイルス液	11.3		7.7	
15Nろ過直前液	11.4		7.1	
15Nろ過後液(3hr)	7.1	4.3	<3.3	≥3.8
15Nろ過後液(20hr)	7.0	4.4	<3.3	≥3.8
ホールド液(3hr)	11.1	<1.0	3.9	3.2
ホールド液(20hr)	10.3	1.1	<3.3	≥3.8

### ②HEV

HEV の感染能はろ過後液 (3 時間) で検出限界以下



に低下し、LRFが2.8以上を示した。15N nanofiltrationを行わないホールド液では3時間、20時間ともLRFは1.0未満であった。一方HEVゲノム定量では、ろ過後液3時間、20時間ともに検出限界以下に低下したが、ホールド3時間、20時間では1.0未満であり低pH条件下のみでは低下が見られなかった。これらの結果から、15Nろ過処理の感染能の消失はろ過によるウイルス除去によるもので、低pH条件下による不活化はないことが明らかになった(表3)。

表3 HEVの低pH条件下での15Nろ過膜処理によるQ-PCRと感染価

Sample	Q-PCR		Infectivity	
	total Log copies	LRF	total Log NDP	LRF
ストック ウイルス液	7.9		5.7	
バッファー置換ウイルス液	7.9		4.3	
15Nろ過直前液	7.8		5.1	
15Nろ過後液(3hr)	<3.8	≥4.0	<2.3	≥2.8
15Nろ過後液(20hr)	<3.8	≥4.0	<2.3	≥2.8
ホールド液(3hr)	7.9	<1.0	4.3	<1.0
ホールド液(20hr)	7.8	<1.0	5.1	<1.0

## 2) 薬剤処理によるウイルス不活化工程の検討

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βプロピオラクトン処理およびTriton処理によるウイルス不活化について検討した。

まず、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)を用いてβプロピオラクトン処理のLRFを測定した。2~8℃の温度条件でのLRFは約4.5で、βプロピオラクトン濃度0.05%以上に上げてウイルス不活化能に差はみられなかった(表4)。つぎに、モデルウイルスのTriton処理によるLRFを測定した。Triton処理はウイルスのスプリッティング方法としてワクチン製造工程に取り入れているため不活化処理として条件を至適化したわけではないが、スプリッティングとして採用した条件のLRFは7.3であった。

表4 βプロピオラクトン処理によるウイルス不活化

No.	検体名	Log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub>	LRF
Cont.	未処理	12.4	-
1	0.1% β-PL 2~8℃ 24h	8.1	4.3
2	0.05% β-PL 2~8℃ 24h	7.9	4.5
3	0.1% β-PL 37℃ 2h	4.7	6.7
4	0.05% β-PL 37℃ 2h	7.6	3.8
5	37℃ 2h	12.7	-0.3

## 3) パルボウイルス B19 NAT 検出の最適化

パルボウイルス B19 については、近年、従来の1型の遺伝子型以外に、2型および3型が報告されているが、従来の検出法では2型および3型については検出できないことから、すべての遺伝子型が検出可能なNAT試験法の確立と分析法バリデーションを行った。

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試験を実施した結果を表5に示した。この結果より得られたウイルス濃度毎の検出数、ウイルス濃度の対数および試験回数を統計計算ソフトのプロビット分析に入力し、95%検出限界を計算した結果、49.7copy/mLとなった。この結果は、従来の1型の遺伝子のみ検出する試験法での結果35.7copy/mLと同等であった。また、NAT試験用不活化ウイルスを用い、NAT試験を実施し、95%検出限界を計算した結果、524 copy/mLとなり、パルボウイルスB19陽性血漿(NAT試験用標準物質)に比べ1桁程度低い数値となった。

表5 検体中のパルボウイルス B19 濃度と検出数(新規の試験法)

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

+ 検出された、- 検出されず

## D. 考察

### (1)品質に関する研究

#### 1) 単糖試験法

8機関共同で標準的単糖試験法を作成し、多機関共同検定により特異性及び直線性を評価した。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、工程ごとに複数の標準的操作方法が示されているものである。

はじめに、単糖標準物質を用いて、誘導体化及びHPLC工程が標準的試験法及び局方収載試験法として適用可能であるかどうかを検証した。その結果、ほとんどの単糖間で分離度1.5以上の良好な分離が得られた。また、すべての単糖において、5~100倍の範囲内で濃度とピーク面積間に直線性が認められた。以上のことから、今回作成した誘導体化/HPLC工程における操作方法は、標準的試験法として適していると判断された。

つぎに、モデル糖タンパク質としてエポエチン及びアルテプラゼを用いて、単糖遊離、アセチル化を含む全工程を通しての直線性を調べた。エポエチンは、



シアル酸が結合した N-結合型糖鎖が 3 個及び O-結合型糖鎖が 1 個結合した糖タンパク質で、シアル酸含量が高く、O-結合型糖鎖を含む糖タンパク質のモデルとして選んだ。また、アルテプラゼは水に対する溶解性が低く、溶解補助剤として L-アルギニンが多量 (1 mg 当たり約 30 mg 前後) に含まれていることから、添加物を多量に含む試料のモデルとして選んだ。

エポエチンの単糖分析を行ったところ、いずれの操作方法を組み合わせても、5~20 倍の範囲内で試料量とピーク面積間に直線性が認められた。定量下限 (相対標準偏差 10%以内) は含量の少ない GalNAc 及び NeuGc から 10 µg 程度と考えられた。エポエチンに含まれている Fuc, GalNAc, Gal, GlcNAc, Man, NeuAc 及び NeuGc 含量の各機関の平均値は、タンパク質 1 mol あたり、それぞれ 2.9, 0.72, 18.2, 15.2, 8.6, 11.0 及び 0.17 mol であった。エポエチンに結合している N-結合型糖鎖は全て複合型糖鎖であることから、Man 含量の理論値はタンパク質 1 mol 当たり 9 mol となり、ほぼ一致した。また、Fuc の含量は、N-結合型糖鎖 1 本あたり 1 残基結合していることと一致した。Gal 残基は、N-結合型糖鎖 1 本あたり約 5 本となり、分岐が多いことや N-アセチルラクトサミンの繰り返し構造が含まれていることに一致した。Gal 残基は GlcNAc 残基または GalNAc に結合しているため、GlcNAc と GalNAc の合計と Gal 数との差は、キトピオース部分の 6 残基となるはずであるが、4.8 残基となった。これは、グルコサミンに結合した GlcNAc が遊離しにくいことを反映した結果と思われる。また、1 残基相当の GalNAc が検出されたことから、O-結合型糖鎖が 1 本結合していることを確認できた。各単糖の定量値の機関間の相対標準偏差は GalNAc, NeuAc 及び NeuGc を除き、10 %以内であった。GalNAc のばらつきの原因として、他の中性糖及びアミノ糖と比べて含量が少なかったことが考えられた。シアル酸の定量値にばらつきが見られたが、主な原因として遊離法の違いの他、標準に用いた NeuAc 及び NeuGc の純度の違いが考えられた。なお、O-アセチル化体を検出した機関もあったが、そのピーク強度は弱く、今回の共同研究の定量値に大きな差を与えるほどではなかった。NeuGc 含量はどの機関も NeuAc に対して 1.5%程度であった。

アルテプラゼの単糖分析では、いくつかの組み合わせで試料量と定量値に直線性が得られなかった。その原因として、大量に含まれている添加物 (アルギニン) が、酸加水分解工程や、N-アセチル化工程、及び誘導体化工程に影響を与えたものと考えられた。試料が多量の添加物を含む場合には、十分に脱塩してから試料を調製することが奨励される。試料量とピーク面積が原点を通る直線となった場合の Fuc, GalNAc, Gal, GlcNAc, Man, NeuAc 及び NeuGc 含量の平均は、タ

ンパク質 1 mol 当たりそれぞれ、約 2.3, 0.0, 6.3, 4.5, 10.6, 4.8 及び 0.0 であった。アルテプラゼには高マンノース型糖鎖 1 本と複合型糖鎖 1 もしくは 2 本結合していることから、GlcNAc, Gal 及び Man の値は概ね妥当と思われた。また、複合型糖鎖のほとんどに Fuc 残基が結合していることや、ほとんどの Gal 残基に NeuAc が結合していることが確認された。GalNAc が検出されなかったことから、O-結合型糖鎖は含まれていないことが確認された。

今回単糖試験法として採用したほとんどの操作方法が標準的試験法及び日局収載法として十分な特異性、及び直線性を有していることが確認された。しかし、モデル糖タンパク質を用いた共同検定により、修正すべき点があることも明らかになった。本年度は定量範囲を明らかにすることができたので、来年度は、精度及び真度の評価を行う予定である。

## 2) オリゴ糖試験法 (CE 法)

糖タンパク質性医薬品のオリゴ糖試験法として、CE 法、HPLC 法、PAD 法、ゲル電気泳動法などがよく用いられており、それぞれに適した様々な蛍光標識法がある (糖鎖を直接検出できる PAD 法を除く)。本年度は、抗体から切り出した糖鎖を AITPS で標識し、CE で分析する方法を検討した。本分析法は、優れた特異性、真度及び精度を有していることが確認され、品質試験、ロット分析及び工程分析として十分な性能を有していることが明かとなった。

## 3) MS

昨年度、四重極型 MS 及び TOF 型 (一部 FT-MS も使用) を用いて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、多機関による適用可能性の検証を行った。その結果、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 以内の誤差で質量を測定できるが、分子量が大きいタンパク質では誤差が大きくなるという結果が得られた。本年度は、高分解能の FT-MS を用いて分子量 7 万程度のタンパク質の質量測定を検討し、1Da 以内の誤差で測定できることを確認した。また、MS/MS により、分子量 3,600 Da のペプチドの配列解析ができることを確認した。今後、MS 及び MS/MS は、確認試験としてだけでなく、N 末端及び C 末端アミノ酸配列試験、不均一性試験等としても利用できることが示唆された。

## (2) 安全性に関する研究

### 1) 製造工程のウイルスクリアランス評価への NAT の適用



### 1.1) プロテイン A カラムクロマトグラフィー工程

不活化工程と除去工程の両方の機能を併せ持つアフィニティークロマトグラフィー (Protein A) 精製工程のウイルスクリアランス能評価への NAT の適用を検討した。モデルウイルスとして X-MuLV をスパイクした抗体バルクハーベスト液を用いた結果、Protein A カラムのクリアランス能は NAT で測定した結果 LRF が 2.14 であった。感染価は測定していないため、Protein A カラムのウイルス不活化能がどの程度かは不明であるが、Protein A のウイルス除去能はあまり高くないことが明らかになった。今回は Profinia Protein Purification System を用いて、システムの既存の洗浄・溶出プログラム、システム推奨の緩衝液を用いて Protein A カラム工程を実行したが、ウイルス除去能率は洗浄・溶出プログラムや使用する緩衝液によっても変わり得ると考えられる。また、Protein A カラム工程では酸性の溶出液でタンパク質を溶出することから、この pH を変化させた場合の工程のウイルスの不活化能と除去能を NAT で評価することにより独立して測定することも可能と考えられる。

一方、今回使用した抗体ハーベスト液は X-MuLV DNA のバックグラウンドが非常に高く、一度 PEI カラムを通してバックグラウンドを下げる必要があることである。これは感染価での測定では考えられないことであり、NAT の欠点と考えられる。NAT を適用するためにはあらかじめ試料の処理について検討する必要があると考えられる。

### 1.2) ナノフィルトレーション工程

核酸抽出液中の PCR 阻害因子の影響がでない蛋白を含まない系で、低 pH 条件下での 15N ろ過処理工程を B19 と HEV で検討し、低 pH によるウイルス不活化と 15N ろ過によるウイルス除去を区別できるかどうか検討した。

B19 の感染能の消失は除去と不活化の両方が関与していることが明らかになった。しかし 15N ろ過後液で感染能は検出限界以下になっているが Q-PCR で微量のゲノムが検出されており、これが intact なウイルス粒子であるのか、ウイルスの分解物であるのかどうかはわからない。ストックウイルス液中にフリーのゲノムが混在している場合、最初に超遠心によりウイルス粒子を沈殿に回収し、フリーのゲノムが存在すると思われる上清は廃棄していることから、バッファー置換ウイルス液中にストック液に混在しているフリーのゲノムが混入する可能性は低いと思われる。したがってろ過後液の微量のゲノムの検出は 15N ろ過処理時の低 pH によるろ過前液中のウイルス粒子の分解、加圧による物理的なウイルス粒子の分解、intact なウイルス粒子が 15N のフィルターをわずかに通過する可能性が考え

られ、今後の検討課題である。

HEV の感染能の消失は 15N ろ過による除去能のみによる結果が得られ、低 pH は HEV の不活化に影響しないことが明らかになった。HEV の感染経路は主に経口であり、胃液を通過することから、低 pH に抵抗性があると思われる。

### 2) 薬剤処理によるウイルス不活化工程の検討

$\beta$ -プロピオラクトン処理条件において  $\beta$ -プロピオラクトン濃度と不活化反応温度について検討を行った。その結果、2~8°C では  $\beta$ -プロピオラクトン濃度 0.1% と 0.05% の不活化効果に差はみられず、LRF は約 4.5 と考えられた。37°C では 0.1% と 0.05% の不活化能力に差がみられ、0.1% の LRF (6.7) は、0.05% の 2 倍程度、2~8°C よりも約 1.5 倍程度高い不活化効果が得られた。しかし、37°C 処理ではウイルス表面抗原である HA の ELISA 値の低下及びゲル濾過分析でウイルスの分解が確認されていることから、インフルエンザワクチン製造の迷入ウイルス不活化方法としては適していないと考えられた。 $\beta$ -プロピオラクトン処理によるウイルスの分解については、37°C 処理サンプルにおいて、 $\beta$ -プロピオラクトン自体の分解によるものと考えられる pH の低下がみられていたことから、pH の低下が HA 分子に影響を与えたものと考えられた。ウイルス株によっては、pH 7 以下で HA の分解が始まる可能性もあるため、 $\beta$ -プロピオラクトン処理では緩衝剤により pH 低下を抑える必要があることがわかった。

次に pH の低下を抑えるため、ウイルス液に 100mM PB を添加し、0.05% 濃度での  $\beta$ -プロピオラクトン処理を実施したところ、pH の低下は抑制され、HA-ELISA の低下及びウイルスの分解は抑えられた。2~8°C での LRF も約 4.5 でウイルス不活化効果に影響はなかった。

$\beta$ -プロピオラクトン処理後に Triton 処理を実施したウイルス液を調製し、卵を用いたウイルス不活化確認試験 (生物学的製剤基準) を実施したところ、インフルエンザウイルスは不活化されていることが確認された。現在のインフルエンザワクチンの不活化処理工程はホルマリンを用いられているが、不活化に要する時間は 1~4 ヶ月間と長い。従って、本研究の成果は、迷入ウイルスの不活化に加えインフルエンザウイルス自身も効果的に不活化できることが確認されたため、製造期間の短縮という二次的な効果も期待された。

### 3) パルボウイルス B19 NAT 検出の最適化

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および除去が困難なウイルスであり、万一原料にウイルスが混入した場合において、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。よって、ウイルスに対する安全性確保のためにヒト由来たん白質について本ウイル



スのNAT試験が実施されている。

近年、パルボウイルスB19の2型および3型の遺伝子型が、欧州の一部、南米およびサハラ以南のアフリカで確認されている。1型と異なる遺伝子配列を有する2型及び3型は、従来の方法では検出できない。そこで、ウイルスに対する安全性確保のためにヒト尿由来たん白質について本ウイルスの新たなNAT試験法の開発を行った。その結果、95%検出限界が49.7copy/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。

また、ウイルス粒子の表面たん白質を化学的、酵素的に処理し、ウイルス粒子の構造を維持したまま、感染性を失わせたNAT試験用の不活化ウイルスについて検証を行ったところ、NAT試験用の不活化ウイルスの表示値で、NAT試験用標準物質に比べ1桁程度低い数値となった。これについては、更なる検証が必要であるが、NAT試験用の不活化ウイルスは、NAT試験用標準物質との比較がなされれば、日々の試験で使用するランコントロールとして使用可能であり、試験実施者の安全性、試験実施施設の制約などの点から有用である。

## E. 結論

品質に関する研究として

- 1) 8機関共同で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工程からなり、工程ごとに複数の標準的操作方法が示されているものである。適用可能性評価の一環として、7機関共同で特異性及び直線性を確認したところ、標準的操作方法により概ね良好な特異性及び直線性がえら得るが、一部採用できない操作方法もあることが明らかになった。来年度は精度及び再現性を評価する予定である。
- 2) ATPS/CEによるオリゴ糖試験は、抗体製剤のロット分析及び工程分析として十分な性能を有していることが確認された。
- 3) 高分解能MSは、タンパク性医薬品の質量を僅かな誤差で測定できること、アミノ酸配列解析ができることを確認し、昨年度共同検定を実施した確認試験だけでなく、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

- 1) 医薬品製造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、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ついて検討した。NATの導入によりProtein Aカラム工程又は15Nろ過工程によるウイルス除去と低pHによるウイルス不活化とを区別できる利点があること、またNATの問題点も明らかにした。

- 2) インフルエンザウイルスをモデルウイルスとして薬剤処理によるウイルス不活化工程の導入を検討し、 $\beta$ 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。
- 3) ヒト尿由来タンパク質についてパルボウイルス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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) S. Itoh, D. Takakura, N. Kawasaki, and T. Yamaguchi: Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis if a glycoprotein. The protein Protocols Hand-book. Third Edition. Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. In press.
- 2) N. Kawasaki, S. Itoh, N. Hashii, A. Harazono, D. Takakura, and T. Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* **20**, 97-116 (2008)
- 3) 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」. **53**, 1690-1696 (2008)
- 4) N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, Y. Nakajima, T. Kawanishi, and T. Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney of systemic lupus erythematosus model mouse. Relative quantification of N-glycans by using isotope tagging method. *Immunology*, in press
- 5) S. Itoh, A. Hachisuka, N. Kawasaki, N. Hashii, R. Teshima, T. Hayakawa, T. Kawanishi, and T. Yamaguchi: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, **47**, 10132-10154 (2008)
- 6) N. Kawasaki, S. Itoh, N. Hashii, D. Takakura, Y. Qin, H. Xiaoyu, and T. Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, in press.
- 7) A Harazono, N Kawasaki, S Itoh, N Hashii, Y Matsuishi-Nakajima, T Kawanishi, and T Yamaguchi, Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 2008, 869(1-2): 20-30.
- 8) 原園 景, 川崎 ナナ, 伊藤 さつき, 小林 哲, 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 充宏, 島 圭介, 山田 真希, 山口 照英, 質量分析を用いたペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験法に関する研究, 医薬品研究 2008, 39 (10), 627-646.
- 9) T Arato, PK/PD and dose setting of monoclonal antibodies for NDAs in Japan. *Drug Metabolism Reviews* 40 (suppl 1)
- 10) 荒戸 照世, 抗体医薬品の研究開発ノウハウ集2008 第4章 抗体医薬品の臨床試験と製造販売後調査の留意点, (株)技術情報協会



- 11) Y Mori, T Hamuro, T Nakashima, T Hamamoto, S Natsuka, S Hase and S Iwanaga, Biochemical characterization of plasma-derived tissue factor pathway inhibitor: post-translational modification of free, full-length form with particular reference to sugar chain. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, 7(1): 111-120.
- 12) S Natsuka, Release of *O*-glycans by chemical methods, In *Experimental Glycoscience: Glycochemistry*, (ed. by Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H.,; Kawasaki, T., Hase, S.), 2008, Springer, 12-13.
- 13) S Natsuka, Separation of oligosaccharides by 2D HPLC, In *Experimental Glycoscience: Glycochemistry*, (ed. by Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H.,; Kawasaki, T., Hase, S.), 2008, Springer, 28-29.
- 14) S Natsuka, Equilibrium dialysis, In *Experimental Glycoscience: Glycochemistry*, (ed. by Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H.,; Kawasaki, T., Hase, S.), 2008, Springer, 132-133.
- 15) Yunoki M, Yamamoto S, Tanaka T, Nishigaki H, Tanaka Y, Nishida A, Kubo J, Tsujikawa M, Hattori S, Urayama T, Yoshikawa M, Yamamoto I, Hagiwara K, Ikuta K. *VoxSang.* 2008; 95: 94-100. Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters.
- 7) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島紫, 伊藤さつき, 山口照英: フェニルヒドラジンをを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析法による糖鎖の定量解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸 (2008. 12. 9-12)
- 8) 西村健, 大高真奈美, 瀬川宏知, 内田恵理子, 古田美玲, 豊田淑江, 山口照英, 中西真人: 細胞質持続発現型 RNA ベクターの性質検討と医療応用に向けた研究. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会, (BMB2008), 京都 (2008.12)
- 9) 押澤正, 豊田淑江, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 鈴木和博, 山口照英: カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 京都 (2008.12)
- 10) 長束優子, 長束俊治: 昆虫細胞を用いたヒト Dectin-1 糖鎖認識ドメインの発現. 第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (2008. 12.)
- 11) 村上祐治, 長束俊治: ヒドラ N-結合型糖鎖の構造解析. 第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (2008. 12.)
- 12) 長束俊治: 糖鎖分子多様性の生物学的意味を考える. 理研シンポジウム第12回生体分子の化学. 理研和光本所, (2009. 2. )
- 13) 古田美玲, 内田恵理子, 押澤正, 山口照英: 造血支持能を持つフィーダー細胞膜タンパク質のプロテオーム解析. 第8回日本再生医療学会総会, 東京 (2009.3)
- 14) 橋井則貴, 川崎ナナ, 篠原 聡, 秦 艶, 黄 笑宇, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖を指標とした細胞治療薬の特性解析. 日本薬学会第129年会, 京都 (2009. 3. 26-28)
- 15) 秦 艶, 橋井則貴, 川崎ナナ, 山口照英: 強陰イオン交換 HPLC を用いたヘパリンナトリウム確認試験及び限度試験に関する研究. 日本薬学会第129年会, 京都 (2009. 3. 26-28)
- 16) 原園 景, 川崎ナナ, 橋井 則貴, 山口照英: 低分子量ヘパリンの酸加水分解及び HPAEC-PAD を用いた確認試験及び純度試験法の検討. 日本薬学会第129年会, 京都 (2009. 3. 26-28)
- 17) 内田 恵理子: 医薬品のウイルス安全性確保: NAT による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発. 日本薬学会第129年会シンポジウム, 京都 (2009.3.28)

## 2. 学会発表

- 1) 山口 照英, 内田 恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京 (2008.6)
- 2) 長束俊治: 糖鎖の網羅的構造解析からシステム解析へ. 糖鎖機能研究会「分子レベルでの解明を目指して. 生理学研究所 (2008. 5.)
- 3) 長束俊治, 長島友美, 中北慎一, 長谷純宏: マボヤの糖タンパク質糖鎖の解析: シアル酸含有ムチン型糖鎖の発見. 第28回日本糖質学会年会, つくば国際会議場 (2008. 8.)
- 4) 久保純, 柚木幹弘, 生田和良: Prnovirus B19 の粒子径は塩濃度の影響を受けて変化する. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山(2008.10.26-28)
- 5) 浦山 健, Sompong Sapsutthipas, 辻川 宗男, 田中 宏幸, 柚木 幹弘, 安江 博, 萩原 克郎, 生田 和良. ブタから分離した4つのクラスターに属する HEV のゲノム全長配列, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡山 (2008.10.26-28)
- 6) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原 聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞の Thy-1 の糖鎖構造解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸 (2008. 12. 9-12)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 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- $\alpha$ が好中球由来活性酸素と関係なく血管内皮細胞の ICAM-1 産生を促した。神経ペプチド(PACAP)が海馬の酸化を防ぎ、老化に伴う記憶障害および脳虚血性神経細胞死を抑えた。核酸・核タンパク食の主成分 DNA-Na が抗酸化作用を有し、リウマチ様関節炎を改善した。

### 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。Nox (NADPH oxidase) は、免疫系、循環器系、神経系、消化器系、呼吸器系などの組織にも発現しており、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および老化との関連が指摘されている。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共に、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。

昨年度は、ヒト冠動脈血管内皮細胞を用いて川崎病の冠動脈瘤形成の鍵を握る TNF- $\alpha$  の Nox 系に対する影響を明らかにし、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こと、核酸・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ことを報告した。本年度は、1) 好中球の血管外遊出を担う接着分子 (ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1) の発現に対する TNF- $\alpha$  および好中球由来活性酸素の影響を、川崎病モデルマウスを作製して Nox2-KO マウスに適用すると共に、マウス血管内皮腫様細胞株を用いて解析した。次に、2) 神経ペプチド (PACAP: pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide) の老化に伴う記憶障害および脳虚血性神経細胞死に対する抑制効果を、PACAP-KO マウスおよび PACAP 輸送体に対するアンチセンスを用いて解析した。最後に、3) リウマチ様関節炎に対して改善効果を示す核酸・核タンパク食の有効成分の同定、および、消去するフリーラジカル種の同定を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 川崎病発症に於ける Nox の動態解析

##### 1) Nox2-KO マウスおよび好中球の調整

マウスは、野生型 (C57BL/6J) および同型の O<sub>2</sub> 生成能を欠く Nox2-KO マウスを用いた。好中球は、これらのマウスに 6% カゼインを腹腔投与し、5~7 時間後腹腔に浸潤した細胞を回収して比重遠心法 (Ficoll-Paque PLUS) にて分離後、PBS で洗浄した。

##### 2) 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 プロセス中で培養し、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、トリプシンによる蛋白質分解を行った。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、エンドスペー法 (生化学工業) を用いてエンドキシンの混入がないことを確認した。

##### 3) 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。精製した LCWE



(0.84 mg/mouse)を5~7週齢の野生型およびNox2-KOマウスに腹腔投与し、0~24時間後にネブタール麻酔下にて採血すると共に心臓、脾臓を摘出し、mRNAの発現解析に供した。一部の実験ではTNF- $\alpha$  (PeproTech: 0.1~500 ng/10 g mouse wt)を直接腹腔投与し、同様の操作を行った。

#### 4) UV $\gamma$ 2細胞に於けるICAM-1発現解析

マウス血管内皮腫様細胞株(UV $\gamma$ 2細胞)は5%FCSを含むDMEM培地中で培養し、週2回フラスコから剥離して継代した。実験には6穴プレートを用い、ほぼコンフルエントに達したUV $\gamma$ 2細胞を使用した。無血清DMEM培地中で2時間培養後、TNF- $\alpha$ (0.1~25 ng/ml)および好中球( $1 \times 10^6$  cells/well)を単独あるいは一緒にUV $\gamma$ 2細胞に添加した。1~24時間後PBSでプレートを洗浄し、ICAM-1 mRNAの発現解析に供した。

#### 5) mRNAの発現解析

mRNAの発現は、total RNA抽出後、逆転写によりcDNAを調整し、real-time PCRで解析した。マウスの心臓および脾臓は摘出後直ちに液体窒素中に回収して凍結破砕し、Trizol reagent (Invitrogen)を用いて、UV $\gamma$ 2細胞は培養後RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて、total RNAを抽出した。次に、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)によりcDNAに逆転写し、TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)を用いて $\Delta\Delta Ct$ 法で解析した。

## 2. 神経細胞死とフリーラジカル

### 1) マウスおよびペプチド

PACAP-KOおよび野生型マウス(C57BL/6J)は50~60日齢を若齢個体、180日齢以上を老齢個体として用いた。PACAP27はペプチド研究所より、PTS(peptide transporter system)-6 mRNAの3種の異なる領域に対するアンチセンスおよびランダムアンチセンスはMidland Certified Reagent Companyより購入した。

### 2) 酸化ストレス測定

フリーラジカルによる酸化ストレス度は、free radical electron evaluator (FREE: Health & Diagnostics Limited Co.)を用い、活性酸素代謝物(ROM: reactive oxygen metabolite)および生物学的抗酸化ポテンシャル(BAP: biological antioxidant potential)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した。データは100 mLあたりの0.08 mg H $_2$ O $_2$ の酸化力を1ユニット(U)として求めた。BAPは、チオシアン酸誘導体の酸化複合体(FeCl $_3$ -AT:茶褐色)に対し、サンプルの還元力による退色(FeCl $_2$ -AT:無色)として測定した。データはvitamin Cを標準とし、Fe $^{3+}$ からFe $^{2+}$ の還元量( $\mu$ mol/L)として示した。

### 3) イムノブロット解析

大脳をホモジェナイズした後、SDS-PAGEを行いPDVF膜に転写した。次に、抗酸化物質であるZn/Cu superoxide dismutase (SOD)、Mn SOD、Heme oxygenase (HO)-1、-2、に対する1次抗体、続いてHRP標識2次抗体を反応させ、ECL-plus法によりX線フィルム上に感光させ、画像解析ソフト(UN-SCAN IT gel)によりシグナル強度を定量化した。

### 4) *In situ* スーパーオキシド(O $_2^{\cdot-}$ )の検出

脳内のO $_2$ 検出はヒドロキシエチジウム(HEt)投与により行った。HEtはO $_2$ と反応して安定な赤色蛍光色素であるエチジウム(Et)になる。N $_2$ O/O $_2$ 吸入麻酔下、マウスにHEt(200  $\mu$ L; 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、直ちに脳を取り出して20%ショ糖溶液で置換し、凍結切片を作製した。この切片の海馬領域を励起波長546nmにて観察した。さらに、HEtシグナルの細胞内局在を明らかにするため、ミトコンドリアマーカーであるMn SODの免疫染色を行なった。

### 5) 電子顕微鏡観察

マウスを灌流固定した後、脳組織を取り出して1晩浸漬固定した。ビブラトームで30  $\mu$ mの厚さに薄切りし、1%四酸化オスmiumで1時間固定した。エタノール脱水後Epon樹脂に包埋して60~70 nmの厚さに薄切した。1%酢酸ウラニルと0.1%クエン酸鉛で電子染色した後、超薄切片は電子顕微鏡(日立H-7600)で観察した。

### 6) 受動的回避反応試験

受動的回避反応試験は田中らの報告に準じた(Tanaka S. *et al.* J Neurosci Res. 2006)。マウスを明室に移した後、スライディングドアを開放する。マウスは暗室へ移動するとすぐに電気ショックを与えられる。電気ショックを受けてから300秒以上暗室へ入らなかった個体を学習個体と見なし、学習するまでに暗室へ入った回数をカウントした。



### 7) PTS-6 アンチセンスの PACAP 血液脳関門輸送に対する影響

PTS-6アンチセンスの脳室内(icv)投与による影響を検討するため、麻酔下で頭蓋骨を取り除いてアンチセンス(100 ng)を投与した。24時間後に、<sup>131</sup>I-PACAP27もしくは<sup>131</sup>I(1.5 x 10<sup>5</sup> cpm)をicv投与し、10分後に脳を摘出して投与放射能に対する残留放射能の割合を算出した。

静脈内(iv)投与による影響を検討するため、麻酔下のマウスに PTS-6 アンチセンス(10 ng)、またはランダムアンチセンスを尾静注した。24時間後、<sup>131</sup>I-PACAP27 (2.5 x 10<sup>5</sup> cpm/ml)を頸静脈投与(2 ml/min)した。5分後に脳内放射能を測定し、<sup>131</sup>I-PACAP27 単独投与群の脳内放射能を100%として各群の値を算出した。

### 8) マウス一過性中大脳動脈閉塞(MCAO)モデル

マウスに PTS-6 アンチセンス(10 mg/mouse)を頸静脈投与した後、24時間後に中大脳動脈の血流を遮断(MCAO)し、脳虚血を惹起した。PACAP27 (5 nmol/kg)は MCAO 直後に頸静脈から投与した。神経症状は服部(Hattori et al, Stroke 2001)らに従い、脳虚血2時間後に評価した(0:正常、1:歩行は正常であるが断続的な前肢の非対称性、2:歩行の非対称性と側面から力に対する抵抗性の減少、3:回転運動または発作、4:自発運動無しもしくは死亡直前)。

### 9) 脳梗塞領域の測定

MCAO24時間後、深麻酔下で脳を摘出し、厚さ2 mm の連続冠状断脳切片を4枚作製した。切片は2% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride 溶液に37°C、30分間浸漬した。脳切片の吻側表面を写真撮影し、白く染め残された梗塞領域の面積を解析ソフト(NIH Image software)を用いて算出した。

## 3. 関節リウマチに対する核酸・核タンパク食の効果

### 1) 動物、給餌スケジュール

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3群に分けた後、無核酸・核タンパク餌(NF)、サケ白子より調整した核酸・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、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、血清中の活性酸素代謝物(ROM)を測定した。更に、関節を摘出して組織学的評価を行った。

### 2) 関節厚の計測

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%として0~3の4段階にスコア化した。悪化するほどスコアは高くなる。

### 3) 関節の組織学的評価

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。3日間浸漬固定した後、1%蟻酸にて1週間脱灰し、パラフィンブロックを作製した。4 μm の厚さに薄切した後、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なった。染色した組織切片は、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。関節に於けるIgG沈着は、抗マウスIgG抗体、ビオチン標識2次抗体と反応させた後、ABCおよびDAB法により発色させて解析した。

### 4) 関節および血清中の酸化ストレス評価

組織タンパク質中のチロシンは、NOラジカルによりニトロ化されて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になる。そこで、餌摂取終了時に関節を摘出し、常法に従って凍結ブロックを作製し、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。血中フリーラジカルによる酸化ストレスは、プロジェクト(2)で示した活性酸素代謝物(ROM)として測定した。

### 5) 核酸・核タンパク餌中の抗酸化力(BAP)測定

餌に添加した核酸・核タンパク餌および主成分であるDNA-Naとプロタミンの3種類の抗酸化力は、プロジェクト(2)に示したFREE法を用いて生物学的抗酸化ポテンシャル(BAP)として求めた。

### 6) 電子スピン共鳴(ESR)法によるフリーラジカルの測定

核酸・核タンパク餌が消去するフリーラジカル種を同定するため、ESR スピントラップ法を用いて以下の3種について検討した。O<sub>2</sub>ラジカルは、ヒポキサンチン・キサンチンオキシダーゼ反応を発生源とし、スピントラップ剤 DMPO(8%)、サンプルを混合し、1分後にESRにて測定した。NOラジカルは、NOラジカ



ル発生剤 NOC-7 (10 mM)、スピントラップ剤 carboxy-PTIO (200  $\mu$ M)、サンプルを混合した後、マイクロウェーブ照射し、ESR にて測定した。一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) は、スピントラップ剤 4-OH-TEMP (100 mM)、光増感剤 Rose Bengal (200  $\mu$ M) をサンプルに添加し、その後、一重項酸素を発生させるために LED 照射装置で緑色光を 1.3 J/cm<sup>2</sup> 照射し、ESR にて測定した。

各フリーラジカルの信号強度は、標準マーカーである MnO の ESR スペクトル (x) とそれぞれのフリーラジカルの基準となる ESR スペクトル (y) の比 (y/x) から算出した。各ラジカルの消去率は、溶媒 (DMSO) 添加時に対するサンプル添加時の信号強度の減少率として算出した。

(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: #2008-002、昭和大学: #07050; #08118; #08118; #08148)。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) LCWE 投与によるマウス脾臓での TNF- $\alpha$ 発現

TNF- $\alpha$  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 4 時間および 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- $\alpha$  mRNA の発現上昇が確認されたが (非投与群の約 6 倍)、Nox2-KO マウスでは認められなかった。従って、食細胞、特に、マクロファージ由来の活性酸素が TNF- $\alpha$  の産生を促している可能性がある。

#### 2) LCWE 投与によるマウス心臓での ICAM-1 発現

好中球は血管内皮細胞上に発現している ICAM-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。従って冠動脈瘤形成に於ける ICAM-1 の意義は大きい。そこで、LCWE 投与 4 時間および 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。野生型マウス心臓の ICAM-1 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。

#### 3) TNF- $\alpha$ 直接投与によるマウス心臓での ICAM-1 発現

TNF- $\alpha$  は好中球の活性酸素生成 (Nox2) を賦活化するが、この亢進した活性酸素が血管内皮細胞の ICAM-1 発現を促す可能性が報告されている (Fan J et al, J Biol Chem 2002)。しかし、阻害剤等を用いた間接実験であり、直接的な証明はなされていない。そこで、Nox2-KO マウスに直接 TNF- $\alpha$  を投与して検証実験を行った。TNF- $\alpha$  (0.1~500 ng/10g wt) を腹腔投与し、0~4 時間後に心臓を摘出して ICAM-1 mRNA の発現を 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、4 時間後には殆ど初期値に戻った。そこで、ピークを示した 1 時間および 2 時間後に於ける ICAM-1 mRNA の発現を野生型および Nox2-KO マウスの心臓と比較した。野生型マウスでは両時間とも TNF- $\alpha$  の用量に依存して ICAM-1 mRNA の発現が上昇し、驚いたことに、Nox2-KO マウスでも野生型に匹敵あるいはそれ以上の発現が認められた。従って、血管内皮細胞に於ける ICAM-1 の発現には好中球由来の活性酸素は関与しないことが証明された。

#### 4) UV $\gamma$ 2 細胞の ICAM-1 発現に対する TNF- $\alpha$ および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の影響

マウス心臓には血管内皮細胞に加え血管平滑筋や繊維芽細胞が存在する。これらの細胞も各種 Nox を発現し、TNF- $\alpha$  の影響を受ける。そこで、血管内皮細胞での ICAM-1 発現に焦点を絞って好中球由来活性酸素の影響を調べるため、マウス血管内皮腫様細胞株 (UV  $\gamma$ 2 細胞) を用いて in vitro 解析を行った。UV  $\gamma$ 2 細胞での ICAM-1 mRNA の発現は、TNF- $\alpha$  (0.1~25 ng/ml) 添加後、用量依存的に 2~3 時間後に最大値を示し、24 時間後はすべての TNF- $\alpha$  濃度に於いて低下した。

次に、血管内皮細胞での ICAM-1 発現に活性酸素が関与するか、O<sub>2</sub> の不均化生成物である試薬 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を UV  $\gamma$ 2 細胞に添加した。3 時間後、TNF- $\alpha$  は単独で強い ICAM-1 mRNA 発現活性を示した。しかし、0.1 mM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は単独では全く ICAM-1 mRNA の発現を促さず、TNF- $\alpha$  による発現を阻害した。

#### 5) UV $\gamma$ 2 細胞の ICAM-1 発現に対する好中球由来活性酸素の影響

野生型および Nox2-KO マウスから調整した好中球を UV  $\gamma$ 2 細胞に添加し、ICAM-1 発現に対する



好中球由来活性酸素の影響を解析した。予想に反して、野生型マウス好中球は、単独でも1~25 ng/mlのTNF- $\alpha$ に匹敵するICAM-1 mRNA発現活性を示した。この好中球によるICAM-1 mRNAの発現活性も、TNF- $\alpha$ による場合と同じく2時間後にピークを示し、6時間および24時間後には低下が認められた。Nox2-KOマウス好中球も単独で野生型マウス好中球に匹敵するICAM-1 mRNA発現活性を示した。これらの好中球と一緒にTNF- $\alpha$ を添加すると、TNF- $\alpha$ の用量に依存した更なるICAM-1 mRNAの発現上昇が認められた。これらの結果は、好中球由来の活性酸素が血管内皮細胞のICAM-1産生には関与せず、TNF- $\alpha$ が直接血管内皮細胞に作用することを示す。更に、好中球の顆粒成分がICAM-1の発現に関与する可能性を示唆している。

## 2. 神経細胞死とフリーラジカル

### 1) PACAPの酸化ストレスに対する影響

まず、PACAPがラジカル消去能を有するかin vitroで検討した。ROMおよびBAPの反応系にPACAP( $1 \times 10^{-15} \sim 10^{-4}$  M)を添加したが、いずれの濃度においてもROMおよびBAPには影響しなかった。次に、PACAPを静脈内投与してin vivoで検討した。PACAP(0.5, 5, 500 nmol/kg)を単回投与したところ、1時間後より濃度依存的に血中ROMの低下およびBAPの上昇が認められ、6時間継続した。500 nmol/kgでは、顕著なROMの低下とBAPの上昇、即ち、酸化ストレスの低下が認められた。

### 2) PACAP-KOマウスの酸化傷害

老化に伴う酸化傷害を評価するため、野生型およびPACAP-KOマウスの若齢個体、老齢個体に於ける脳内抗酸化物質の発現量を解析した。PACAP-KOマウスの若齢個体では、Mn SODおよびHO-1の発現量が有意に、老齢個体では顕著に低下した。次に、血中のROM値を比較した。生後10週齢の野生型およびPACAP-KOマウスではROMに差がなかったが、生後14~16週齢では、野生型に比べてPACAP-KOマウスのROMは有意に上昇した。

脳内酸化ストレスの細胞内局在を明らかにするため、O<sub>2</sub>発生部位をHEtを用いて顕微鏡観察した。生後180日齢のPACAP-KOマウスでは、野生型に比べて海馬CA1領域のHEtシグナルが顕著に増加しており、Mn SOD陽性反応(ミトコンドリアマーカー)と重なった。電子顕微鏡観察により、野生型および若齢PACAP-KOマウスの神経細胞は正常であったが、生後180日齢のPACAP-KOマウスでは、一部ミトコン

ドリアが凝集・変形しており、そこにライソソームが融合した自己食食像が観察された。

### 3) PACAP-KOマウスの記憶・学習試験

酸化障害が顕著に認められた海馬CA1領域は記憶や学習に強く関与する領域である。そこでPACAP-KOマウスの記憶・学習行動に異常がみられるか、受動的回避反応試験を行なった。生後180日齢までは、野生型およびPACAP-KOマウスとも学習・記憶に有意差は認められなかった。しかし、生後180日齢以上の老齢個体ではPACAP-KOマウスの学習能力に有意な低下が認められ、生後360日齢以上では、刺激24時間後に於ける記憶力も低下していた。

### 4) PTS-6アンチセンス投与による神経保護効果

PACAP輸送体であるPTS-6に対してアンチセンスを設計し、PACAPの脳内から血流への排出に対する影響を調べた。その結果、PTS-6アンチセンスの脳室内投与により、PACAP27の脳内残留量は2倍に増加した。また、PTS-6アンチセンスの静脈内投与も、PACAP27の脳内残留量を4倍に増加した。

そこで、PTS-6アンチセンスの静脈内投与による脳虚血傷害への影響を評価した。生理食塩水投与群と比較して、PTS-6アンチセンス投与群では有意に脳梗塞体積が減少した。更に、PTS-6アンチセンス前投与→PACAP27投与群では脳梗塞体積と神経症状が有意に減少した。

## 3. 関節リウマチに対する核酸・核タンパク食の効果

### 1) 体重および関節の経時的変化

HTLV-1 Tgマウスの体重は、NF群では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。これに対し、NP-0.6%群の体重は変化せず、NP-1.2%群は加齢に伴い増加した。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。

次に、HTLV-1 Tgマウスの後肢関節厚のスコアを比較したところ、NF群は10週齢より上昇し18週齢時で1.2であった。これに対し、18週齢時のNP-1.2%群のスコアは0であり、餌負荷期間中殆ど上昇せず改善効果が認められた。更に、後肢関節組織の形態変化を調べたところ、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%に減少した。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%と改善された。次に後肢関節のIgG染色を行なったところ、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%に減少した。以上のNP群に於ける改善効果は前肢関節でも認められた。

## 2) 酸化ストレスの評価

マウス関節組織の3-NT陽性反応は、野生型マウスでは殆ど認められないが、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を測定した。NF群は160Uであったが、NP-0.6%群は139Uと低値を示し、NP-1.2%群は125Uと有意に低下した。

## 3) 核酸・核タンパク餌の抗酸化力(BAP)

核酸・核タンパク原末と、その主成分であるDNA-NaおよびプロタミンのBAPを測定した。コントロールである超純水のBAP値は988 $\mu$ Mであった。それに対して、核酸・核タンパク原末は濃度依存的にBAP値が上昇し50 $\mu$ g/ml以上の濃度で有意差が認められ、2,500 $\mu$ g/mlでは8,195 $\mu$ Mと高値を示した。プロタミンのBAP値は、25~250 $\mu$ g/mlでは有意差がなかったが、750 $\mu$ g/mlの高濃度では1,401 $\mu$ Mと有意差が認められた。DNA-Naは濃度依存的にBAP値が上昇し、核酸・核タンパク原末よりも低濃度(25 $\mu$ g/ml以上)で有意差が認められ、750 $\mu$ g/mlでは8,841 $\mu$ Mと高値を示した。

## 4) 核酸・核タンパク餌のフリーラジカル消去

スピントラップ法を用いて、核酸・核タンパク原末を添加した際のO<sub>2</sub>ラジカル、NOラジカル、一重項酸素(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)をESR法で測定した。核酸・核タンパク原末のO<sub>2</sub>ラジカル消去率は2mg/mlで5.4%、16mg/mlで16.7%と低かった。一方、NOラジカルの消去率は、1.5mg/mlで23.5%、6mg/mlで35.3%と増加した。更に、一重項酸素を測定したところ、消去率は濃度依存的に増加し、0.05mg/mlで96.7%と高かった。

## D. 考察

### 1. 川崎病発症に於けるNoxの動態解析

川崎病急性期に血中TNF- $\alpha$ 濃度が上昇することが知られている。最近、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、冠動脈瘤形成にTNF- $\alpha$ 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)。更に、最も信頼され普及しているIVIG療法に耐性を示して冠動脈瘤を形成する患児に、TNF- $\alpha$ の中和抗体

(infliximab)を投与すると症状の改善が認められ、冠動脈瘤が消退することが報告されている(Stenbog EV et al, Scand J Rheumatol 2006)。冠動脈瘤の破裂は、好中球に多く含まれるエラスターゼによるエラスチンの切断が決定的である。従って、好中球の血管外遊出に対する活性酸素およびTNF- $\alpha$ の影響を解析することは、川崎病の発症機序を理解する上で重要である。

本年度は、血管内皮細胞のICAM-1発現に対する活性酸素およびTNF- $\alpha$ の影響を、川崎病モデルマウスおよびマウス血管内皮腫様細胞株(UV $\varphi$ 2細胞)を用いて解析した。ICAM-1は血管内皮細胞表面に発現している接着分子であり、好中球表面上のCD11b/CD18を認識する。TNF- $\alpha$ により亢進した好中球(Nox2)由来の活性酸素が血管内皮細胞上にICAM-1の発現を促し、好中球の血管外遊出を促進する可能性が報告されている(Fan J et al, J Biol Chem 2002)。しかし、Noxに対する阻害剤や還元剤を用いた間接実験で直接的な証明はない。そこで、Nox2-KOマウスを用いて解析を行った。川崎病モデルマウスを作製し、心臓に於けるICAM-1の発現を解析した結果、野生型ではLCWE投与4時間後から上昇し、24時間後でも持続していた。しかし、Nox2-KOマウスではICAM-1の発現は抑制されていた。TNF- $\alpha$ を直接投与した場合、野生型およびNox2-KOマウス、共に投与1時間後から用量依存的にICAM-1の発現上昇が認められ、両者に違いはなかった。同様の結果がUV $\varphi$ 2細胞を用いても得られた。UV $\varphi$ 2細胞にTNF- $\alpha$ を添加するとTNF- $\alpha$ 単独でICAM-1の発現を促した。興味深いことに、TNF- $\alpha$ 非存在下、好中球単独でも1~25ng/mlのTNF- $\alpha$ に相当するICAM-1の発現を促した。その発現量はNox2-KOマウス由来好中球でも野生型と同レベルであった。従って、好中球の血管外遊出の鍵を握る血管内皮細胞でのICAM-1発現は、TNF- $\alpha$ 単独で充分であり、好中球由来の活性酸素は無関係であることが判明した。TNF- $\alpha$ が直接UV $\varphi$ 2細胞のNox系を介してNF- $\kappa$ Bを活性化し、ICAM-1の発現に関与する可能性も残っている。しかし、試薬H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はICAM-1の発現を促さなかった。好中球の酸素非依存ICAM-1発現活性については、今後の課題である。

以上、LCWE投与後、脾臓でのTNF- $\alpha$ 産生および心臓でのICAM-1発現は、野生型マウスに比べNox2-KOマウスでは低下していた。しかし、TNF- $\alpha$ を直接投与した場合、Nox2-KOマウス心臓でのICAM-1発現は野生型マウス心臓での発現に匹敵していた。従って、マクロファージからのTNF- $\alpha$ 産生にNox2由来の活性酸素が関与する可能性が示唆され



た。マクロファージは TNF- $\alpha$  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の関与が注目されている (Su B, Nature Immunol 2005)。ペプチドグリカンである LCWE はマクロファージの Toll-like receptor 2 に結合後、シグナル伝達系を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、TNF- $\alpha$  の産生を促すと考えられる。来年度は、マクロファージの TNF- $\alpha$  産生に対する活性酸素の関与について解析し、血管炎発症との関連を明らかにする予定である。

## 2. 神経細胞死とフリーラジカル

PACAP は生体内の抗酸化能を上昇させ、酸化ストレス度を減少させる。しかし PACAP 自身に抗酸化作用はなく、間接的に抗酸化物質の発現を促して体内の酸化ストレス度を低減させることが推察された。そこで、抗酸化物質の発現を野生型および PACAP-KO マウスの若齢個体、老齢個体と比較した。その結果、ミトコンドリアに局在する Mn SOD と HO-1 の発現が PACAP-KO マウスで低下し、老齢個体では顕著に減少していた。

老齢 PACAP-KO マウスの海馬 CA1 領域では野生型に比べて HEt シグナルが顕著に増加し、Mn SOD 陽性反応(ミトコンドリアマーカー)と重なった。従って、老齢 PACAP-KO マウスの海馬神経細胞ではミトコンドリアに酸化傷害が蓄積される可能性が得られた。更に、海馬神経細胞の微細構造を電子顕微鏡で観察したところ、老齢 PACAP-KO マウスでは神経細胞内のミトコンドリアに形態異常が認められ、そこにリソソームが融合して自己食食を起こしている像が多数認められた。これらの結果から、PACAP が欠如するとミトコンドリアでの抗酸化物質の発現が低下し、ATP 産生過程に伴って生成されるフリーラジカルを処理できず、ミトコンドリアの障害、変形、自己食食が起きるのではないかと考えている。

海馬が記憶・学習行動に関わる領域であることから、野生型と PACAP-KO マウスの記憶・学習行動に違いがあるか受動的回避反応試験により解析した。生後 180 日齢までのマウスに関しては、学習・記憶とも有意差は認められなかった。しかし、生後 180 日齢以上の老齢個体では、PACAP-KO マウスに有意な学習能力の低下が認められ、360 日齢以上の個体では刺激 24 時間後の記憶力も低下した。

以上、脳内に発現する PACAP が老化に伴う海馬での酸化傷害を抑制すること、更に、以前、脳梗塞に対して神経保護作用を有することを示した。この事実は、脳内の PACAP 含有量を増やすことにより神経をフリーラジカルから保護できる可能性を示唆している。静脈内投与した PACAP27 の 0.066%、PACAP38

の 0.053% が血液脳関門を越えて脳内に移行することが報告されている。脳内への移行率が高いモルヒネでも 0.02% 以下であることから、PACAP 特異的輸送体の存在が指摘されていた。近年、脳内の血管内皮細胞に PACAP の血液脳関門輸送を担う PTS-6 が同定された。そこで、PTS-6 アンチセンスを作製し、脳室内投与および静脈内投与後の PACAP の脳内残留率を測定した。脳室内投与により PACAP27 の脳内残留量は 2 倍、静脈内投与により 4 倍増加した。

次に、PTS-6 アンチセンスの静脈内投与による脳虚血傷害への影響を調べた。生理食塩水投与群に比べ、PTS-6 アンチセンス投与群では有意に脳梗塞体積が減少し、PTS-6 アンチセンス前投与→PACAP27 投与群では脳梗塞体積と神経症状が有意に減少した。従って、PTS-6 アンチセンス投与は脳内から血流への PACAP27 の輸送を抑制して脳内 PACAP27 含有量を増やし、神経傷害を抑制したと考えられる。

以上、PACAP27 は、Mn SOD の発現を介して酸化傷害を発揮すると考えられる。更に、PTS-6 アンチセンスの投与は、PACAP27 の血流への輸送を阻害して脳内 PACAP 含有量を増やし、神経保護作用を高める可能性がある。フリーラジカルは中枢・末梢組織の損傷・炎症反応に伴って増加し、障害を引き起こすのみならず生活習慣病や老化とも深く関わることが知られている。PACAP27 のような内因性抗酸化物質調節作用を持つ生理活性ペプチドの機能解析を進めることは、幅広く酸化ストレスに起因する疾患の画期的な治療薬開発に繋がることを確信する。

## 3. 関節リウマチに対する核酸・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 HTLV-1 Tg マウスに、NF 餌および NP-0.6%、NP-1.2% を添加した餌を 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、酸化ストレスマーカーである 3-NT 染色、更に、血中の活性酸素代謝物 (ROM) を 3 群のマウスで比較した。その結果、NP-1.2% 含有餌がリウマチ様関節炎に対して改善効果があることが判明した。

次に、餌に添加した核酸・核タンパク原末の生物学的抗酸化ポテンシャル (BAP) を測定し、抗酸化能があることが判明した。そこで、核酸・核タンパクの主成分である DNA-Na とプロタミンの BAP を測定し、どちらが抗酸化能を有しているか検討した。その結果、核酸・核タンパクの抗酸化能は主に DNA-Na によることが分かった。しかし、核酸・核タンパクが消去するフリーラジカル種は不明であった。そこで、O<sub>2</sub>ラジカ



ル、NOラジカル、一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )の3種のフリーラジカルに対する影響を検討した。通常、フリーラジカルは極めて不安定であり、その検出は困難である。そこで、スピントラップ剤を用いて安定なラジカル種に変換してから測定するESRスピントラップ法を用いた。その結果、核酸・核タンパクは $\text{O}_2$ ラジカルを殆ど消去せず、僅かにNOラジカルを消去した。更に、核酸・核タンパクは濃度依存的に一重項酸素を消去し、0.05 mg/mlと低濃度で96.7%の一重項酸素を消去した。この結果より、核酸・核タンパクは一重項酸素と一部NOラジカルを消去することにより、抗酸化能を発揮することが明らかになった。

以上、核酸・核タンパクの長期摂取によるHTLV-1 Tgマウス関節炎の改善は、強い抗酸化能を持つ核酸・核タンパクの摂取がヒトの関節リウマチに対しても有効である可能性を示している。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になっている。本研究で示した核酸・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を軽減できるのみならず、フリーラジカルに起因する多くの疾患の改善にも貢献すると思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshida LS, Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Int. Immunopharmacol*, 8: 1377-1385 (2008).
- 2) Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Mori H, Sato A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Shioda S. Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is involved in suppression of edema in the ischemic brain. *Acta Neurochir Suppl*, (in press)
- 3) Dogrukol-Ak D, Kumar VB, Ryerse JS, Farr SA, Verma S, Nonaka N, Nakamachi T, Ohtaki H, Niehoff ML, Edwards JC, Shioda S, Morley JE, Banks WA. Isolation of peptide transport system-6 from brain endothelial cells: therapeutic effects with antisense inhibition in Alzheimer and stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29: 411-422 (2009).
- 4) Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of

## E. 結論

### 1. 川崎病発症に於けるNoxの動態解析

川崎病急性期に血中濃度が上昇するTNF- $\alpha$ が、好中球由来活性酸素と関係なく血管内皮細胞のICAM-1産生を促し、好中球の血管外遊出を担うことが分かった。マクロファージからのTNF- $\alpha$ 産生にNox2由来の活性酸素が関与する可能性が推定された。

### 2. 神経細胞死とフリーラジカル

PACAPは内因性抗酸化物質の調節因子として機能し、老化に伴う記憶障害を抑制すると考えられる。また、PTS-6アンチセンスによるPACAPの脳から血流への輸送阻害は虚血性神経細胞死に対して抑制効果を示した。

### 3. 関節リウマチに対する核酸・核タンパク食の効果

核酸・核タンパクの抗酸化作用は主成分であるDNA-Naに存在した。更に、核酸・核タンパクは一重項酸素と一部NOラジカルを消去することにより、リウマチ様関節炎の発症を抑制する可能性が示された。

inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 14638-14643 (2008).

- 5) Shioda S, Takenoya F, Yagi M, Wang L, Hori Y, Kageyama H. Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation. *Nutrition*, 24: 848-853 (2008).
- 6) Ao Y, Satoh K, Shibano K, Kawahito Y, Shioda S. Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from rutaceae. *J Clin Biochem Nutr*, 43: 6-12 (2008).
- 7) Seki T, Itoh H, Nakamachi T, Shioda S. Suppression of Ganglion Cell Death by PACAP Following Optic Nerve Transection in the Rat. *J Mol Neurosci*, 36: 57-60 (2008).
- 8) Boros A, Reglodi D, Herbert Z, Kiszler G, Nemeth J, Lubics A, Kiss P, Tamas A, Shioda S, Matsuda K, Pollak E, Molnar L. Changes in the Expression of PACAP-like Compounds During the Embryonic Development of the Earthworm *Eisenia fetida*. *J Mol Neurosci*, 36: 157-165 (2008).
- 9) Hernádi L, Pirger Z, Kiss T, Nemeth J, Mark L, Kiss P, Tamas A, Lubics A, Toth G, Shioda S, Reglodi D. The presence and distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor in the snail *Helix pomatia*. *Neuroscience*, 155: 387-402



- (2008).
- 10) Senga F, Yin L, Karasuno H, Ohtaki H, Nakamachi T, Satoh K, Shioda S. Minus charge stimulation prevents LPS-induced liver injury by reduction of nitric oxide. *J Clin Biochem Nutr*, 42: 222-227 (2008).
  - 11) Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Shioda S. Role of PACAP in ischemic neural death. *J Mol Neurosci*, 36: 16-25 (2008).
  - 12) 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*, 325: 513-519 (2008).
  - 13) 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*, 45: 2106-2115 (2008).
  - 14) Molnár L, Pollák E, Boros A, Shioda S, Nakajo S, Tamas A, Lengvári I, Reglodi D, Lubics A. PAC1 receptor localization in a model nervous system: light and electron microscopic immunocytochemistry on the earthworm ventral nerve cord ganglia. *Regul Pept*, 145: 96-104 (2008).
  - 15) 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) co-localizes with activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brains. *Regul Pept*, 145: 88-95 (2008).
  - 16) Kinno R, Kawamura M, Shioda S, Sakai KL. Neural correlates of noncanonical syntactic processing revealed by a picture-sentence matching task. *Hum Brain Mapp*, 29: 1015-1027 (2008).
  - 17) 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*, 145: 80-87 (2008).
  - 18) 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*, 145: 60-64 (2008).
2. 学会発表
- 1) Tsunawaki S and Yoshida LS. Expression of Nox family NADPH oxidases and enhanced ROS-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- $\alpha$ . Gordon Research Conference (meeting for Nox family NADPH oxidases) New London, New Hampshire, USA, June 1-6, 2008
  - 2) Nakamachi T, Ohtaki H, Nonaka N, William A. Banks, Shioda S. Neuroprotective effect of PACAP and the mechanisms: therapeutic effects in Stroke models. Showa University International Symposium for Life Science 5th Annual Meeting New Frontiers in Neuroscience: Transmitters/modulators in Health and Disease. (2008.9), 東京(シンポジウム)
  - 3) Ogawa T, Kuwagata M, Shioda S. Searching fetal origin for autism: the evidence of aberrant development of aminergic neurons in the rat fetal brain prior to the manifestation of clinical autism. Showa University International Symposium for Life Science 5th Annual Meeting New Frontiers in Neuroscience: Transmitters/modulators in Health and Disease. (2008.9), 東京(シンポジウム)
  - 4) Shioda S, Takenoya F, Yagi M, Wang R, Date Y, Makazato M, Kageyama H. Morphological analysis of neuropeptide W (NPW)-containing neurons in feeding regulation. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. (2008.11), Washington, DC
  - 5) Ohtaki H, Ylostalo J, Foraker JE, Robinson P, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. Human adult stem/progenitor cells from bone marrow (hMSCs) suppress ischemic neuronal death through microglia. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. (2008.11), Washington, DC
  - 6) Nakamachi T, Oshida K, Yofu S, Mori H, Watanabe J, Ohtaki H, Dohi K, Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates proliferation of reactive astrocyte *in vitro*. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. (2008.11), Washington, DC
  - 7) 養父佐知子, 中町智哉, 大滝博和, 松永政司, 首藤典正, 岩倉洋一郎, 塩田清二. 核蛋白摂取によるフリーラジカル抑制作用とリウマチ様関節炎の予防効果、第113回日本解剖学会総会



(2008.3.27-29)、大分

- 8) 養父佐知子、大滝博和、中町智哉、佐藤和恵、清水藍、松永政司、岩倉洋一郎、塩田清二。核タンパクの抗酸化能とその機構。第11回日本補完代替医療学会学術集会(2008.11.7-9)、神奈川県
- 9) 許善花、鈴木健、西原雅夫、杉正人、松永政司、サケ白子抽出物による抗酸化活性及びアンジオテンシンI変換酵素阻害活性。第11回日本補完代替医療学会学術集会(2008.11.7-9)、神奈川県

### 3. 図書

- 1) Arata T, Hosono T, Taketomi Y, Kageyama H, Nakamachi T, Shioda S. Increased behavioral activity with regular circadian rhythm in PACAP specific receptor (PAC1) transgenic mice. *Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-*, Springer-Verlag, (Tokyo), (2009) (*in press*)
- 2) Morikawa K, Dohi K, Yofu S, Mihara Y, Nakamachi T, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T. Expression and localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) specific receptor (PAC1R) after traumatic brain injury in mice. *Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-*, Springer-Verlag, (Tokyo), (2009) (*in press*)
- 3) Ogawa T, Kuwagata M, Shioda S. The search for a fetal origin for autism: evidence of aberrant brain development in a rat model of autism produced by prenatal exposure to valproate. *Transmitters and Modulators in Health and Disease -New Frontiers in Neuroscience-*, Springer-Verlag, (Tokyo), (2009) (*in press*)
- 4) Shioda S, Kageyama H, Takenoya F, Date Y, Nakazato M, Osaka T, Minokoshi Y. Regulation of energy homeostasis by GALP. *New Frontiers in Lifestyle-Related Diseases*, Springer (Tokyo), 47-53 (2008).
- 5) 養父佐知子、中町智哉、大滝博和、吉田文人、宇住晃治、平田博明、首藤典正、松永政司、岩倉洋一郎、塩田清二。核酸食による関節リウマチの予防・治療効果について。食品と科学 別冊、53-56 (2008)
- 6) 塩田清二。NPO法人KYG協会編 実業之日本社(東京)、核内栄養成分、(2008) PART5 日本での

最新研究例：リウマチ様関節炎；神経細胞  
68-69、72-73

### 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



## ノロウイルスおよびサポウイルス増殖阻害剤の評価システムの構築

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部  
研究者 片山 和彦

研究要旨;ノロウイルスの網羅的疫学調査、全長ゲノム配列解析を行い、リバーシジェネティクスに利用可能な全長ゲノムクローンを構築した。サポウイルスプロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価を行い、薬剤評価システム構築の可能性を示した。

### 分担研究者

- (1) 国立感染症研究所ウイルス第2部  
岡 智一郎
- (2) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター 本村 和嗣
- (3) 国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター 横山 勝
- (4) 株式会社 中部衛生検査センター  
小澤 一弘

### A. 研究目的

本研究の目標は、分子疫学調査、コンピュータ構造シミュレーション、分子生物学の融合により、ノロウイルス (NoV) を含むヒトカリシウイルスのウイルスプロテアーゼ、ポリメラーゼ (RdRp) の活性を阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供と、それらを実証するための評価システムの構築である。

具体的には、先ず分子疫学調査から得たヒトカリシウイルス (NoV を含む) 流行株の遺伝子配列を使用し、コンピュータシミュレーションで、ウイルスプロテアーゼ、RdRp 分子構造および活性発揮に重要な構造を予測する。次に、これらの情報公開を行い、阻害する抗ウイルス薬のデザイン基盤の提供すると同時に、既存の薬剤を評価するため、我々がサポウイルス (SaV) のプロテアーゼ活性発揮メカニズムを解析するために用いた *in vitro* 転写システムを利用した活性測定システムを構築する。このシステムに Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) を利用したシステムを導入する。BRET は、パーキンエルマー社によって提供されるレポーターシステムである。Green Fluorescence Protein

(GFP) と Renilla luciferase (rLuc) 間にウイルスプロテアーゼの切断モチーフ配列を挿入した融合蛋白質をデザインする。これが、ウイルスプロテアーゼによって切断されない状態では、GFP と rLuc の融合蛋白質として発現し、rLuc の基質 (セレントラジン) を添加すると、rLuc の発光と BRET 現象により近接する GFP の蛍光が観察される。しかし、GFP と rLuc 間がウイルスプロテアーゼによって切断されると両者が離れるため、rLuc の発光 (410nm) のみが検出される。このような BRET 現象の有無を利用してカリシウイルスプロテアーゼの活性を検出するシステムを構築できれば、ハイスループットな *in vitro* 薬剤評価システムを構築できる。

しかし、薬剤の細胞に与える影響、薬剤投与時のウイルス複製の細胞内動態を評価するためには、BRET を、我々が本年新たに開発した NoV のリバーシジェネティクスシステムに応用し、哺乳類細胞内でのウイルス複製阻害効果を検証しながら進める必要がある。特にポリメラーゼは、ウイルス複製時に単独ではなく、複数のウイルス蛋白質複合体として機能する可能性があり、リバーシジェネティクスシステムに応用した細胞内機能評価システム構築が必須である。

NoV に代表されるヒトカリシウイルスの感染症は、毎年数百万人規模の冬季急性胃腸炎患者を出すため社会的問題となっており、早急にウイルス流行の予防、制御を行う必要がある。これらのウイルスは培養細胞を用いた増殖系、モデル動物が無く、抗ウイルス薬開発が難航している。さらには現在 35 種類以上あるどの遺伝子型が流行しても良いように対策を立



る必要がある。本研究は、*in vitro*でのハイスループットスクリーニング及び、リバースジェネティックスシステムを利用した細胞内動態の評価まで、分子疫学、構造シミュレーション、分子生物学を有機的に結合した、新規抗ウイルス薬剤デザイン基盤の提供と、評価システム構築を目指す。

本年度は、多数の異なる遺伝子型が報告されている NoV、SaV のプロテアーゼ、RdRp の構造解析、活性発揮に必須なアミノ酸配列や立体構造を予測するため、実際にヒトの間で流行しているウイルスの遺伝子配列情報蓄積と、分子疫学調査、コンピュータシミュレーションによる構造解析を行い、活性発揮のカギを握る蛋白質の構造の解明と公開を目指す。

#### (倫理面への配慮)

組換え DNA 実験は全て組換え DNA 実験申請を行い、承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実行した。

### B. 研究方法、結果および考察

小澤分担研究者は、2007 年 1 月～2008 年 3 月までの期間内において全国の調理従事者の急性胃腸炎（食中毒含む）の流行が発生した全国 240 の施設から調理従事者糞便 5587 検体を収集し、ノロウイルス遺伝子陽性を呈した検体のうち NoV-RNA 量が 100 コピー以上であった検体 352 のサンプル（GI が 12 サンプル、GII が 340 サンプル）を対象として、NoV の遺伝子解析を行なった。NoV-RNA 量が 100 コピー以上であった 352 検体は 288 (81.8%) 検体が有症者由来、64 検体 (18.2%) が無症候者由来で、その内訳は GI が 12 検体 (3.4%)、GII が 340 検体 (96.6%) であった。遺伝子型は、GI が 5 種 (2, 3, 4, 8, 10) GII が 7 種 (2, 3, 4, 6, 13, 16 および新しい遺伝子型) であった。NoV 陽性例の 89% が GII/4 であったが、全種類の約半数におよぶ遺伝子型の入手に成功した。網羅的遺伝子解析における興味深い結果として、NoV に感染しながら発症しない無症候性感染者の存在が明らかになった。無症候者と有症者を比較した場合、便中に含まれるウイルス RNA 量、塩基配列解析対象とした Capsid N/S 領域の塩基配列、感染している genotype に有意な差は認められなかった。しかし、検討対象領域以外の非

構造タンパク質領域の遺伝子配列に差があるかもしれない。今後の、プロテアーゼ、RdRp 領域の解析に期待がかかる。

本村分担研究者は、2006 年から 2007 年の間、あるいは 2006 年以前に他の研究施設において解析されたウイルス株の配列情報を収集し、本年度の研究で解析した NoV の全長塩基配列と合わせて進化系統樹解析を行なった。この解析により、2006-2007 に流行した NoV は GII/4 株であること、GII/4 株の起源と流行の動態を明らかにした。解析対象の GII/4 EU-2006b 株の 8 種の蛋白質には、過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が 27 箇所生じていた。興味深いことに、キャプシド VP1 蛋白質に生じた 7 つの変異は、全て粒子の最外郭に位置する P2 サブドメイン領域に集中していることが明らかにされた。一方、同時期に発生したが小規模な流行に留まったもう一つ新型 GII/4 変異株“EU-2006a 株”では、P2 領域の特異的なアミノ酸置換は 2 箇所のみであることが明らかにされた。これらの系統樹解析結果より、2005 年末に国内に出現した GII/4 EU-2006b 株は、1 年のうちに、それまでに存在していた多様な NoV 変異集団（2004-05 GII/4 変異型や GII/4 EU-2006a 株）と置き換わり、急速に広がったと考えられたのである。2006b 株は、それまで存在していた同類の NoV の中に対し、何らかの選択的優位性を獲得したウイルスの可能性はある。構造タンパク質領域のアミノ酸配列と横山分担研究者による構造タンパク質の構造解析の結果から、2006b 株は、ウイルス粒子の最外郭領域に 7 箇所もの変異をもつことが判明した。この領域は、ウイルスの抗原性や宿主側受容体との相互作用に重要な役割を果たすと推察されている。これらの点から、2006b 株は、2006 年当時での免疫逃避能力に優れ、ウイルスの感染・増殖能をバランスよく保持したウイルスである可能性が高いことが示唆された。また、2006b 株は、非構造蛋白質領域に計 20 箇所の変異が存在することも明らかにされた。これらの変異は、免疫逃避能を獲得すると同時に、ウイルスの感染・増殖能をバランスよく保持し、世界的な規模での流行を引き起こすのに関与している可能性がある。特に、プロテアーゼ、RdRp 領域の変異は活性の差異に関与する可能性があり、注目に値する。

横山分担研究者は、前述の NoV の構造タン



パク質の構造解析に加えて、NoV よりも *in vitro* での活性解析が先行している SaV のプロテアーゼの基質認識機構を、*in silico* における構造解析（コンピュータシミュレーション）を中心に解析した。その結果、SaV プロテアーゼの基質認識には、基質の P1 と P4 残基が必要であることが示された。また、基質 P4 残基に対応するプロテアーゼの基質結合ポケットの T30, E52, Y101, L103 および基質 P1 残基に対応する H31, H14, K112, R113 が重要であることが示された。これらの結果から、SaV のプロテアーゼによる切断には、P4 と Y101 の互いにスタッキング構造を形成、および P1 とプロテアーゼの正に帯電した領域との間で静電相互作用による基質認識が重要であることが示された。カリシウイルス科に属するウイルス、SaV や NoV のプロテアーゼには類似点が多く、同様の基質認識機構、切断機序を有する可能性が高い。横山分担研究者の解析結果は、来年度以降に予定されている NoV の解析に重要な示唆を与えた。

岡分担研究者は、NoV と SaV の増殖に必須なウイルスプロテアーゼの活性を *in vitro* で評価するため、NoV、SaV のポリプロテイン全長のプロセッシングを解析可能な系を構築し、さらに NoV、SaV プロテアーゼの基質認識に重要な切断部位上流アミノ酸の同定を行った。本研究によって NoV、SaV ORF1 ポリプロテイン全長を rabbit reticulocyte を用いた *in vitro* translation system で発現させることにより、ポリプロテインの翻訳後プロセッシングを包括的に検出する系の構築に成功した。本 *in vitro* 反応系は、翻訳反応中に阻害候補物質を添加することで、プロテアーゼ活性阻害物質のスクリーニングを行うことができるハイスループットシステムとなり得る。さらに本研究の結果から NoV と SaV ではプロテアーゼの切断機序は類似点ばかりではなく、部位認識に重要な基質側の因子（アミノ酸配列および組成）が異なる可能性も示されたため、NoV と SaV それぞれについて基質認識機構を解明することが阻害剤スクリーニングシステム構築に重要であることが示された。

## C. 結論

ノロウイルスの網羅的疫学調査、全長ゲノム配列解析を行い、リバーシジェネティクスに利用可能な全長ゲノムクローンを構築した。サボウイルスプロテアーゼ基質認識機構の *in silico* 解析、および *in vitro* 切断評価を行い、薬剤評価システム構築の可能性を示した。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Motomura, K., Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H; and the Norovirus Surveillance Group of Japan. ; Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *Journal of Virology*. 2008 Nov;82(22):11247-62

2) Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 53 (1): 49-52., 2009

3) Oka T, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiol Immunol In Press*

### 2. 学会発表

1) Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, and Takeda N. Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on sapovirus ORF1 polyprotein processing  
第14回国際ウイルス学会、トルコ、2008年8月10-15日。

2) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, and Takeda