

200838017A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化
及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成21 (2009) 年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化
及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成21 (2009) 年 4月

目 次

I. 総括研究報告

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究	1
山口 照英	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

14

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
平成20年度総括研究報告書

血液製剤の安全性確保のための技術開発と標準化及び
血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究要旨

血液製剤のウイルス安全性確保のための基盤技術開発を目的とした研究を実施し、以下のよう
な成果が得られた。

1) 昨年に引き続いて各国の血漿分画製剤のウイルス安全性に関する動向調査を行い、EU では主
として新興感染症対策として、積極的なウイルス不活化工程の導入が行われていることが明らか
になった。また、病原体不活化に関する費用対効果等に多様な意見が出されているが、新興感染
症対策としての有用性についてはコンセンサスが得られつつある。

2) 効率的なウイルス不活化法やウイルス除去法の開発を目指し、新たなウイルス不活化法とし
て、昨年検討したペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の作用機序の解明
を行った。PFOA による赤血球の溶血への影響を解析した。PFOA は赤血球を濃度依存的に溶血
する作用があることを明らかにした。有効濃度はウイルス不活化と同等であった。また、PFOA
による溶血は1分以内に起こり、また溶血は脱脂肪酸ウシ血清アルブミンにより阻害された。以
上の結果から、PFOA は強い界面活性剤としての作用により、ウイルスのエンベロープを除去し
感染性を不活化しているものと考えられた。また、PFOA による不活化において目的タンパク質
の変性が起きていないことを明らかにした。

3) E 型肝炎ウイルス(HEV)およびバルボウイルス B19(PV-B19)の安全性確保を目的として、
HEV 及び PV-B19 参照品作製に関する基盤研究を行った。HEV についてブタ由来4株、培養由
来1株、及び陰性コントロールとしてサンプルの希釈に用いた血清の計6種を一組とすることと
した。B19のパネルは、Genotype 1、2の2株について、それぞれ高タイター(1010 IU/mL)、
低タイター(105 IU/mL)の2種及び陰性コントロールとして希釈に用いた血清の計5種を一組
とすることとした。

研究協力者

内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
生田和良 大阪大学 微生物病研究所
萩原 克郎 酪農学園大学獣医学部
柚木幹弘 株式会社ベネシス 大阪研究所
安江 博 (独) 農業生物資源研究所

ルスの同定とその検出法の開発により着実に
向上してきている。特に、1990年代後半より、
血清学的検査や問診に加えて各国で原料血漿
のウイルススクリーニングとして核酸増幅試
験(NAT)が実施される様になり、その安全
性は飛躍的に増してきている。しかしながら、
NATのように現在最も感度が良いとされる検
出法を用いても、非常にまれな頻度ではあるが、
検査をすり抜けたウイルス陽性血液製剤によ

A. 研究目的

血液製剤の安全性は長年にわたる病原ウイ

り感染が起こることが報告されてきている。また、ウインドウ期の HCV や HIV 陽性血漿では、現在最も高感度なウイルス検出手段とされる NAT を用いて個別検体の検査を行っても検出出来ないほど低濃度の混入でも、輸血による感染が成立することも報告されている。

また、Solvent/Detergent 処理やナノフィルトレーションなどいくつかの有効なウイルス不活化・除去法が、血液製剤の製造工程に導入され、その安全性は格段に増してきている。しかし、製品によってはこれらの処理が適さない場合等もあり、より有効なウイルス不活化・除去法が開発できれば製剤毎の製造工程の選択の幅が広がり、より合理的な安全性確保対策が可能になると考えられる。また、輸血用血液製剤では、血漿分画製剤に適用されているようなウイルス不活化工程を採用することが困難な場合も多く、全く異なるアプローチが必要であり、これまで、複数のウイルス不活化法を開発中である。

HEV に関しては血清学的及び NAT による検出手法が確立しているが、その輸血による感染リスクについてはここ数年いくつかの報告があるが、これまで十分なデータの蓄積がなかった。従って、HEV 検出試験法の標準化や検出手法の評価には、参照品やセロコンバージョンパネルの作成が望まれている。

E 型肝炎ウイルスの安全性確保を目的として、NAT 等の検出手法の標準化に用いるための参照品を作製する。このためにブタに HEV を感染させた検体を原料として用いる。さらに、感染させたブタのセロコンバージョンパネルを作製を目指す。これらの、参照品やセロコンバージョンパネルを用いて HEV の NAT 等による検出手法の評価等への適用について諸条件を明らかにする。

本年度は、血液製剤の安全性確保を目的として、①輸血用血液製剤のウイルス不活化法の開発動向についての文献をはじめとして、様々な角度から検討を行った。

②新規ウイルス不活化法として、強い作用のあることを昨年度見出した PFOA の有用性を明らかにすることを目的として赤血球の溶血への作用を解析するとともに、医薬品への望ましくない作用が無いかについて検討を行った。

また、③HEV の参照品作成のための基盤研究として、SPF ブタに投与して得た複数の HEV 陽性試料の参照品作製のための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向調査

ウイルス不活化に関する文献情報をはじめ、各種公開情報を収集し、調査研究を行った。

2. ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

(1)ヒト赤血球を 3000 x rpm で、10 分間遠心して沈殿させ、パフィーコート除去した。さらに、リン酸緩衝塩溶液 (PBS) で 3 回洗浄操作を繰り返すことにより、洗浄赤血球を得た。

洗浄赤血球は沈殿した赤血球容量の 50 倍の PBS(-)に懸濁した。赤血球液に種々の濃度の PFOA を添加し、温度や pH 等を変化させた条件でインキュベートした。反応後、遠心して上清のヘモグロビン量を 570nm の吸光度より求めた。

(3)細胞毒性：PFOA の細胞毒性は、96 well plate に播種 1 日後の Vero 細胞の上清を除去し、2% 牛胎児血清 (FCS) を含む DMEM 培地で希釈した PFOA 溶液を 100 μ l を加えて 1 日培養後、WST-8 10 μ l を加えて 2 時間培養し、OD577 の吸光度により測定した。

(4) G-CSF の生物活性に及ぼす PFOA 処理の影響を明らかにするために、RPMI 1640 培地に溶かした 50 μ g/ml G-CSF に終濃度 5mM 及び 10mM となるように PFOA を添加し、10 分間、室温に放置した。速やかに終濃度 5mg/ml となるよう脱脂脂肪酸ウシ血清アルブ

ミン (BSA) を添加した。その後、脱塩カラムにて PFOA を除去した。PFOA 処理した G-CSF および PFOA なしの同様の条件で処理した G-CSF を調製し、G-CSF 依存性増殖を示す NFS60 細胞を用いて G-CSF の活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた細胞はいずれも樹立された継代培養細胞であり、倫理面に関する問題はない。また、ヒト試料を用いた検討は研究倫理委員会の承認を受けた上で行った。また、ヒト正常血漿及びヒト正常血清は市販品を用いた。

C. 研究結果

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

2007 年カナダで開かれた病原体不活化に関するコンセンサス会議 (Consensus conference on pathogen inactivation sponsored by the Canada Blood Service and Hema-Quebec, 2007) のアウトラインが公開されている。このコンセンサス会議を結論に対していくつかの提言が出されている (McCullough: Transfusion 47,349-353, 2007)。

コンセンサス会議では過去における HIV のパンデミック感染の経験から、血液製剤の安全性確保に対する対策が非常に進んでいるとの認識に立っている。すなわち、輸血後の HIV 感染や HBV 感染のリスクはそれぞれ $1/900000 \sim 1/7800000$ 、及び $1/77000 \sim 1/1100000$ と推計されており、きわめて低いリスクと認識されている。このように輸血後感染症の発症が非常に低減化されていることから、コンセンサス会議の結論としては、輸血用血液製剤に残存している感染症リスクを低減化するために、現時点での全面的な感染因子不活化技術を導入することに否定的な結論が導かれている。しかし、この結論が今後も輸血用血液製剤の安全性を最大限にするための方策とし

て継続すべきかどうか問題であると McCullough は述べている。

McCullough は特に既存の安全対策の問題点として次のような点を指摘している。

- 1) 非常に高感度化されている現在の感染因子のスクリーニング検査は既知の因子に対しては現在の最先端の科学技術が取り入れられているが、スクリーニングの対象となっていない感染因子に対しては十分な対応が取れているとは考えられないとしている。例えば、ウエストナイルウイルスのような新興感染症の発症が起こった場合に、試験法の確立までは十分に安全性が担保されているとは言いがたいとされている。他の事例は、地域的に流行している感染症への対応が挙げられる。例えば、レユニオン島でのチクングニヤウイルスの流行時には不活化処理された血液製剤の供給が行われている。この流行はチクングニヤウイルスを媒介する蚊の変異が大きな要因となったとされている。
- 2) 現在の輸血用血液製剤の安全対策は、全ての感染因子を検査の対象としているわけではないために、デング熱、ヒトヘルペスウイルス-8 (HHV-8)、バベシア(原虫)、シャーガス病(原虫)などへの対応はできていない。また、サイトメガロウイルス (CMV) への対応も十分とはいえない。CMV 感染の防止には、白血球除去や CMV 抗体(IgM)スクリーニングが適しているといわれている。
- 3) 新興感染症のアウトブレイクが起こった場合に対して、輸血用血液製剤に対して新たな試験法が開発されるまでは、輸血を受ける患者が感染の危険にさらされることになる。
- 4) 無菌性試験の欠点も大きな問題とされている。細菌感染を防止するためのいくつかの取り組みが行われているが、完全ではない。
- 5) ドナーセクションに関連する問題点も指摘されている。マラリア流行地等からの帰国者のリスクも存在するという。

上記の5つのMcCulloughのあげている懸念

については、全てがわが国に当てはまるわけではない。例えば、特定の地域に流行している感染症の伝播の防止対策として、わが国では輸血前の問診で渡航歴の確認を行っており、渡航歴による献血制限を設けている。

一方、上記“コンセンサス会議”の結論として新興感染症の脅威がある場合には、対象感染症に対するスペクトルの広い不活化技術の導入が合理的であり、かつ実行可能な対策であることが提言されている。McCullough もこの点については同意しており、予防的措置の有用性が不活化技術に関してはコンセンサスが得られつつあると考えられる。

2. 各国で採用されている輸血用血液製剤の病原体不活化法

新鮮凍結血漿に対する病原体不活化法として Solvent/detergent (S.D.) 処理が開発されているが、FDA の承認は受けていない。また、EU 内のいくつかの国で S.D.処理が採用されているが、目的はエンベロープを持つウイルスのみの不活化である。メチレンブルーと可視光による不活化は、多くのウイルスと細菌をターゲットにしており、EU 内のいくつかの国で採用されている

他の DNA をターゲットとする病原体不活化技術としては、リボフラビン (ビタミン B2) と UV 光による方法が、血小板、血漿、赤血球をターゲットして採用されている。これ以外にも amotosalen と US 照射法が血小板と血漿に、アルキル化剤が赤血球製剤の病原体不活化法として開発されているが、これらは昨年の調査で明らかになっている。

3. ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討-溶血への影響

ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)は様々な基材の耐水性表面加工原料として用いられている界面活性剤で、そのポリマーは耐水性に優れている。血漿分画製剤のウイルスの不

活化工程のひとつに S.D. 処理が用いられているが、昨年度の検討より PFOA は S.D.処理で用いられる界面活性剤に代わるウイルス不活化作用を持つ可能性があることから、PFOA のウイルス不活化作用機序を明らかにする目的で、ヒト赤血球の溶血への影響を検討した。

まず、ウイルス不活化に有効な濃度でヒト赤血球の溶血作用を有するかを明らかにした。ヒト赤血球の溶血反応により条件検討を行った。その結果、PFOA 5mM で処理したとき、時間は 30 秒以上で溶血が起こり、4.5 分以上ではヘムの変性が起こること(図1)、反応温度は0℃では溶血活性が低い。10-20℃では非常に高い活性を持っていることが明らかになった(図2)。また 30℃以上ではヘムの変性が認められること、さらに反応時の pH は 4、5 の酸性条件では溶血活性が低く、pH6-8 で溶血活性が高いことが明らかとなった(図3)。次に、界面活性剤を吸着する性質を持つ脱脂脂肪酸ウシ血清アルブミンが PFOA の溶血活性に及ぼす効果を検討したところ、0.2%までは影響が認められなかったが、1%以上の defatted BSA により PFOA の溶血活性は阻害されることが判明した(図4)。そこで、PFOA の反応停止には 1.5%の defatted BSA を用いることにした。

次に、血漿分画製剤のモデルとしてヒト顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の生物活性への影響を調べた。その結果、5ないし 10 mM PFOA による処理ではその生物活性に大きな影響を与えないことを明らかにした。

また、細胞へのウイルス感染試験に用いる 2% FCS 存在下で PFOA の細胞毒性を検討したところ、5mM 以上では細胞膜の溶解が観察され、細胞は完全に死滅したが、PFOA 1.25mM 以下では細胞の生存率に影響が認められなかった

4. E 型肝炎ウイルス (HEV) NAT 参照品作製のための基盤研究と HEV 濃縮法の開発

HEV およびパルボウイルス B19(PV-B19)の安全性確保を目的として、HEV 及び PV-B19 参照品作製に関する基盤研究を行った。HEV についてブタ由来 4 株、培養由来 1 株、及び陰性コントロールとしてサンプルの希釈に用いた血清の計 6 種を一組とすることとした。B19 のパネルは、Genotype 1、2 の 2 株について、それぞれ高タイター (1010 IU/mL)、低タイター (105 IU/mL) の 2 種及び陰性コントロールとして希釈に用いた血清の計 5 種を一組とすることとした。

以上のようなパネルを作製するために、SPF ブタに複数のジェノタイプの HEV を感染させ、感染が成立した後、糞便を集め、さらにろ過等を行い、精製した検体を原料とすることとした。参照品を調製するための HEV ジェノタイプパネルとしての評価を行うために、得られた検体についてその感染価、コピー数等の解析を行った。得られた検体は、十分なコピー数があることを明らかにし、ジェノタイプパネルとしての有用性を確認した。また、Parvovirus B19 パネルを作成するために、陽性血漿のウイルスコピー数等の解析を行った。

D. 考察

1. 血液製剤のウイルス安全性に関わる国際的動向

輸血用血液の安全性を確保するためウイルス不活化が大きな注目を集めている。しかし、現時点で実用化されているのは血漿製剤に対する S.D. 処理法及びメチレンブルー/照射法であり、血小板製剤に対しては S-59/長波長紫外線照射があげられる。しかし、赤血球製剤については臨床治験に入っているものもあるが、中止になったり未だ前臨床試験段階であったりと、実用化には今しばらく時間を要するのではと考えられる。特定の製剤のみ不活化が可能であるとしても、それは輸血用の血液製剤のウイルス安全性が担保されてとは言えないであろう。また、現行の方法に変わる技術開発や、

現行法のさらなる向上も試みられている。

2007 年カナダで開かれた病原体不活化に関するコンセンサス会議では輸血用血液製剤の病原体不活化に関する会議では、輸血用血液製剤の検査法の高感度化が十分達成されており、費用対効果を検討したときに病原体不活化を全面的に導入することに否定的な結論が出されていた。一方、このような結論に対する反論もあり、McCullough (Transfusion 47,349-353, 2007) は現時点での輸血用血液製剤の安全性に関する複数の懸念を挙げ、特に検査の行われていない病原体に関する安全性確保や新興感染症の対策としての病原体不活化技術の有用性を指摘している。

輸血用血液製剤の病原体不活化技術の導入の是非についていまだ十分なコンセンサスは得られていないが、新興感染症が発症した場合に対応としての有用性は立場が異なっても共通していると考えられる。今後、国内での検討においても、特に新興感染症発症に対する対応の面から積極的に検討をしていくことは有用と思われる。

2. ペンタデカフルオロオクタン酸(PFOA)によるウイルス不活化の検討

効率的なウイルス不活化法やウイルス除去法の開発の一環として、昨年度に引き続き PFOA を用いたウイルス不活化法の開発を行った。本年度は、昨年度検討した PFOA によるウイルス不活化機構を明らかにすることを目指した。

PFOA は、単独で強いウイルス不活化作用を示すが、この作用機構を明らかにするために、赤血球をモデルにして PFOA による溶血作用を解析した。PFOA はウイルス不活化と同じ作用濃度で赤血球の溶血を引き起こすことを明らかにした。また、作用 pH についてもほぼ同様のパターンを示す。さらに、溶血を引き起こす温度は 10℃でも十分な作用が認められることを見出した。PFOA による溶血作用は、

脱脂脂肪酸アルブミン添加により強く抑制されることも明らかになった。これらの作用は PFOA が非常に低いクラフトポイントを持つ界面活性化剤と考えられることを示している。

以上の結果より、PFOA によるウイルス不活化はその強い界面活性化剤としての作用であると結論された。また、モデルタンパク質として G-CSF を取り上げて、その生物活性に対する影響を調べたが、ウイルス不活化に必要な濃度、時間、温度では G-CSF の生物活性に影響は与えないことから、血漿分画製剤の不活化法として PFOA が有用であることが示された。

3. HEV NAT 参照品作製のための基盤研究と HEV 濃縮法の開発

E 型肝炎ウイルスの安全性確保を目的として、NAT 等の検出のための HEV 参照品作製に関する基盤研究を行った。すなわち、ブタに HEV を感染させた検体を原料として、参照品を調製するための HEV ジェノタイプパネルについてその感染価、コピー数等の解析を行い、ジェノタイプパネルとしての有用性を確認した。また、Parvovirus B19 パネルを作成するために、陽性血漿のウイルスコピー数等の解析から、参照パネルとしての有用性が明らかになってきた。

E. 結論

1. 昨年に引き続いて各国の血漿分画製剤のウイルス安全性に関する動向調査を行い、EU では主として新興感染症対策として、積極的なウイルス不活化工程の導入が行われていることが明らかになった。また、病原体不活化に関する費用対効果等に多様な意見が出されているが、新興感染症対策としての有用性についてはコンセンサスが得られつつある。

2. 新たなウイルス不活化法として、昨年検討した PFOA によるウイルス不活化の作用機序の解明のために赤血球の溶血への影響を解析

した。PFOA は強い界面活性剤としての作用により、ウイルスのエンベロープを除去し感染性を不活化しているものと考えられた。また、PFOA による不活化においてモデルとした医薬品タンパク質の生物活性に影響はないことを明らかにした。

3. HEV 及び PV-B19 の安全性確保を目的として、参照パネル作製に関する検討を行った。HEV についてブタ由来 4 株、培養由来 1 株、及び陰性コントロールとしてサンプルの希釈に用いた血清の計 6 種を一組とすることとした。B19 のパネルは、Genotype 1、2 の 2 株について、それぞれ高タイター (1010 IU/mL)、低タイター (105 IU/mL) の 2 種及び陰性コントロールとして希釈に用いた血清の計 5 種を一組とすることとした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry* 2008; 47:10132-54
2. Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T.: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals. *Biol Pharm Bull.* (in press)
3. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Qin Li, Kanayasu-Toyoda T, Ishii Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T, Morita I: A comparison of

- the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 2008; 314 :430-40
4. Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T.: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. *Immunology.* 2008; 126 :336-45
 5. Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T.: Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 2008; 144 :399-408
 6. Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Matsuishi-Nakajima Y, Kawanishi T, Yamaguchi T.: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 869 :20-30
 7. Suzuki T, Tamehiro N, Sato Y, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Shinozaki Y, Nishimaki-Mogami T, Hashimoto T, Asakawa Y, Inoue K, Ohno Y, Yamaguchi T, Kawanishi T.: The novel compounds that activate farnesoid x receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J Pharmacol Sci.* 2008; 107 :285-94
 8. Harashima M, Harada K, Ito Y, Hyuga M, Seki T, Ariga T, Yamaguchi T, Niimi S.: Annexin A3 Expression Increases in Hepatocytes and is Regulated by Hepatocyte Growth Factor in Rat Liver Regeneration, *J Biochem.* 2008; 143 :537-45
 9. Watanabe, K., Hyuga, S., Hyuga, M., Sekiguchi, A., Endo, M., Tsuda, T., Oikawa, T., Yamaguchi, T., and Hanawa, T.: Unkeito, a traditional Kampo formula, exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity. Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice – *J Trad Med.* (in press)
 10. Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T.: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides. *Methods Mol Biol.* 2009; 534 :1-10
 11. Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T.: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends Glycosci Glycotech.* 2008; 20 :97-116
 12. Satoh K, Iwata-Takakura A, Yoshikawa A, Gotanda Y, Tanaka T, Yamaguchi T, Mizoguchi H.: A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection. *Vox Sanguinis.* 2008; 95 :174-80
 13. 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience.* (in press)
 14. 山口照英, 石井明子: 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 *PHARMASTAGE* 2008; 7 :1-6
 15. 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, 木下充弘, 島 圭介, 山田真希, 山口照英: 質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法に関する研究. 医薬品研究 2008; 39(10) :627-46
16. 掛樋一晃, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究(第3報) キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不純物の分析. 医薬品研究 2008; 39(11) :713-20
17. 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(4) 合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日局標準品としての適用性の評価. 医薬品研究 2008; 39(11) :721-29
18. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫: 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望 その1 医薬品研究 2008; 39 :1-37
19. 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫: 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その2). 医薬品研究 2008; 39(6) :359-87
20. 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 靄島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(第1報) 1H-NMRによるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究 医薬品研究 2008; 39 :651-59
21. 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 有村雅敏, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(第2報) 1H-NMRによるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究 医薬品研究 2008; 39 :660-64
22. 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」 2008; 53 :1690-96
23. 山口照英, 石井明子: 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 (in press)
24. Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T: LC/MS of oligosaccharides, Glycoscience Lab. Manual., Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)
25. Itoh S, Takakura D, Kawasaki N, Yamaguchi T: 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)
26. 川崎ナナ, 石井明子, 荒戸照世, 山口照英: 抗体医薬品の構造及び品質特性解析 抗体医薬品製造の留意点~承認申請をふまえて~ サイエンス&テクノロジー社 (印刷中)

2. 学会発表

1. Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, and Mahito Nakanishi: CHARACTERIZATION OF NOVEL DEFECTIVE SENDAI VIRUS VECTORS CAPABLE OF PERSISTENT EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting (2008.5.31 Boston, USA)
2. Ken Nishimura, Manami Ohtaka, Hiroaki Segawa, Birei Furuta, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda,

- Teruhide Yamaguchi, and Mahito Nakanishi : CHARACTERIZATION OF NOVEL DEFECTIVE SENDAI VIRUS VECTORS CAPABLE OF PERSISTENT EXPRESSION OF THERAPEUTIC GENES. 第14回日本遺伝子治療学会総会 (2008.6.13 札幌)
3. Nishimura K, Ohtaka M, Segawa H, Furuta B, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Nakanishi M: Characterization of Novel Defective Sendai Virus Vectors Capable of Persistent Expression of Therapeutic Genes. ASGT 11th annual meeting, Boston (2008年5月)
 4. Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Minoru Tada, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi : Affinity of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins to neonatal fc receptor (FcRn) 日本薬物動態学会 第23回年会 2008年10月 熊本
 5. T. Suzuki, M. Kogi, M. Honma, S. Tanabe, T. Yamaguchi SNP and CGH array analysis on amplification profile of the c-myc gene. 第67回日本癌学会学術総会(2008年10月)
 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回日本生化学大会 合同大会 (2008.12.9-12) 神戸
 7. 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回大会合同大会 (BMB2008)、(2008年12月9-12日、神戸)
 8. 菊池 裕、中島 治、山崎 壮、手島玲子、棚元憲一、石黒直隆、山口照英 : ウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b が発現するスプライス変異型 GPI アンカー欠損プリオンタンパク質 mRNA の解析、2008年プリオン研究会、(2008.8.29-30、北海道上川郡新得町)
 9. 菊池 裕、遊佐精一、中島 治、手島玲子、山口照英 : GPI アンカー欠損型プリオンタンパク質産生に関与する低酸素誘導因子の発現解析、第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学大会合同大会、(2008, 12, 9-12) 神戸
 10. 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 : 糖鎖プロファイル指標とした細胞治療薬の特性解析、第8回日本再生医療学会総会 (2009.3.5・東京)
 11. 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 (2009.3.京都)
 12. 橋井則貴、川崎ナナ、中島 紫、伊藤さつき、山口照英 : d5-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回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸
 13. 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 (2009.3.京都)
 14. 原島 瑞、新見伸吾、原田佳呼、日向昌司、関泰一郎、有賀豊彦、山口照英 : ラット肝再生モデルにおいて HGF は肝細胞における AnnexinA3 の発現を促進させる。第15回肝細胞研究会。(2008.6.27・静岡)
 15. 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、斉藤千恵

- 子、布留川みな子、関泰一郎、有賀豊彦、山口照英：初代培養ラット肝細胞におけるグルコシルコイド依存的チロシナーミノトランスフェラーゼおよびトリプトファンオキシゲナーゼmRNAレベルの増加のプロテアソーム阻害剤による阻害。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。(2008年12月12日・神戸)
16. 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(2009.3.5・東京)
17. 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年6月)
18. 山口照英：Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics。第3回PMDA 国際バイオロジクスシンポジウム(PMDA 3rd International Symposium)(2009.2.12・東京)
19. 山口照英：バイオ医薬品の品質保証。東京大学セミナー(2008.5.19・東京)
20. 山口照英：バイオ後続品に対する日本のアプローチ。政策研究大学院大学バイオ医薬品の知的財産と評価に関するシンポジウム「セッション4：バイオ医薬品の安全性・有効性確保に関する規制」(2009.2.19・東京)
21. 山口照英：バイオ後続品の品質、安全性及び有効性の確保方策について。日本公定書協会第27回新薬審査部門定期説明(2008.10.16・大阪、10.21・東京)
22. 山口照英：バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための要件。バイオロジクスフォーラム第5回学術集会(2009.2.3・東京)
23. 山口照英：医薬品及び治験薬の品質保証と開発時のCMC研究・第5回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム(2008.12.12・東京)
24. 山口照英：核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保。第35回トキシコロジー学会学術年会(2008.6.26・東京)
25. 山口照英：臨床初期におけるバイオ医薬品の品質・安全性確保～バイオ医薬品の開発初期での品質・安全性確保。第2回APDDミニシンポジウム(2008.8.9・東京)
26. 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川崎ナナ、山口照英：プロタミンのMALDI-TOF MSにおけるマトリックスの影響。第56回質量分析総合討論会(2008.5.15・つくば)
27. 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(2009.3.京都)
28. 西村 健、大高真奈美、瀬川宏知、内田恵理子、塙(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(2008.12.9-12神戸)
29. 大高真奈美、西村健、瀬川宏知、内田恵理子、塙(古田)美玲、豊田淑江、山口照英、中西真人：持続発現型センダイウイルスベクターの性質検討とその応用。第56回日本ウイルス学会学術集会(2008.10.26-28岡山)
30. 田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、鈴木和博、山口照英：ヒト間葉系幹細胞における培養分化マーカー同定に関する遺伝子発現プロファイリング。BMB2008(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(2008.12.10))
31. 田邊思帆里、佐藤陽治、鈴木孝昌、樂 洋、鈴木和博、山口照英：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に関するゲノムプロファイリング。

- 日本ケミカルバイオロジー研究会第3回
年会(2008.5.19)
32. 日向昌司、日向須美子、原島 瑞、山口照英、新見伸吾: アネキシン A3 のノックダウンは HuH7 細胞の腫瘍形成を抑制する。日本薬学会第 129 年会(2009.3.京都)
33. 豊田淑江、石井明子、鈴木 浩子、李勤、田村悦臣、森田育男、山口照英: 血管内皮前駆細胞である Early EPC と Outgrowth Endothelial Cell の特性解析 第 81 回日本生化学会大会(2008 年 12 月 神戸)
34. 鈴木孝昌、小木美恵子、小原有弘、本間正充、田邊思帆里、山口照英: SNP および CGH アレイを用いた c-myc 遺伝子増幅に関する詳細解析。第 67 回 日本癌学会学術総会(2008.10.28)
35. 鈴木孝昌、田邊思帆里、小木美恵子、押澤正、佐藤陽治、山口照英、鈴木和博: ヒト間葉系幹細胞の染色体安定性の解析。第 8 回日本再生医療学会総会(2009.3.5・東京)
36. 鈴木浩子、石井明子、豊田淑江、田村悦臣、山口照英: ヒト臍帯血単核球由来 Outgrowth Endothelial Cell の特性指標の探索と機能解析 第 8 回日本再生医療学会総会 2009 年 3 月 東京
37. 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英: 抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体 FcRn との結合親和性比較。日本薬学会第 129 年会(2009.3.京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. PFOAによる赤血球溶血の時間的経過

5mM PFOAを添加した後、1.5%脱脂肪酸BSAを展開して反応を止め、遠心し上清を得た。上清中の577nmの吸光度を求めた。

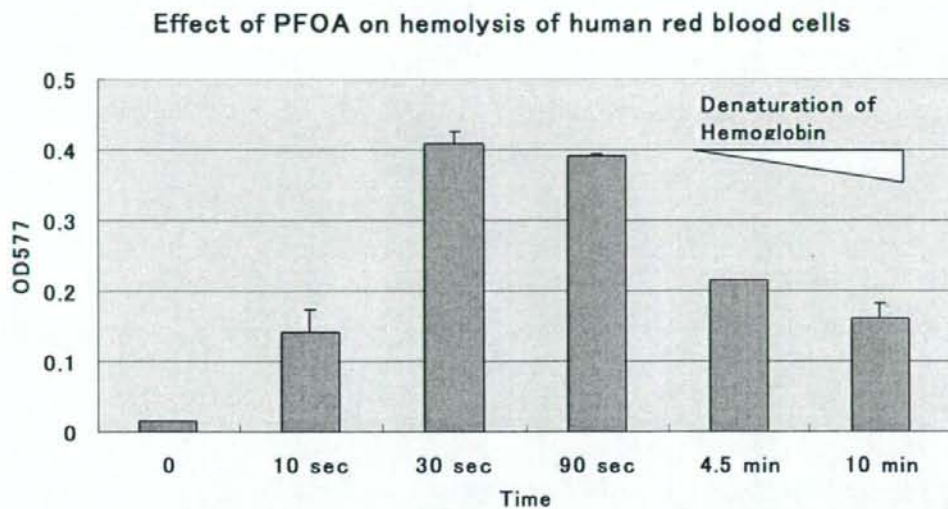


図2. PFOAによる赤血球溶血の温度の影響

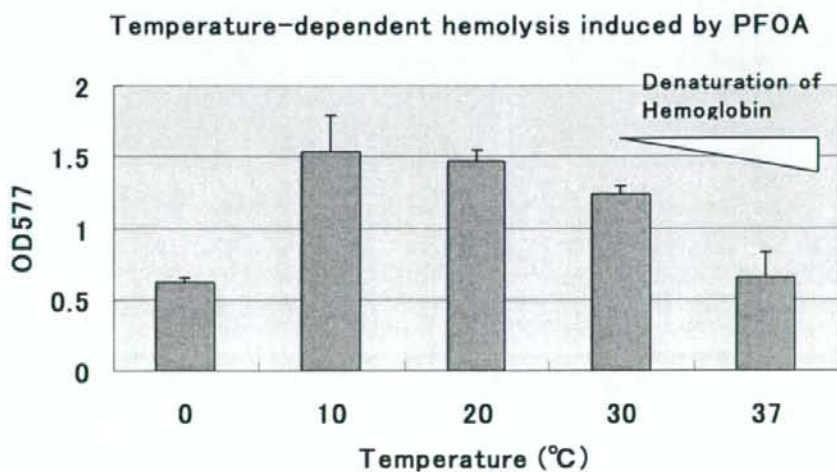


図3. PFOAによる赤血球溶血のpHの影響

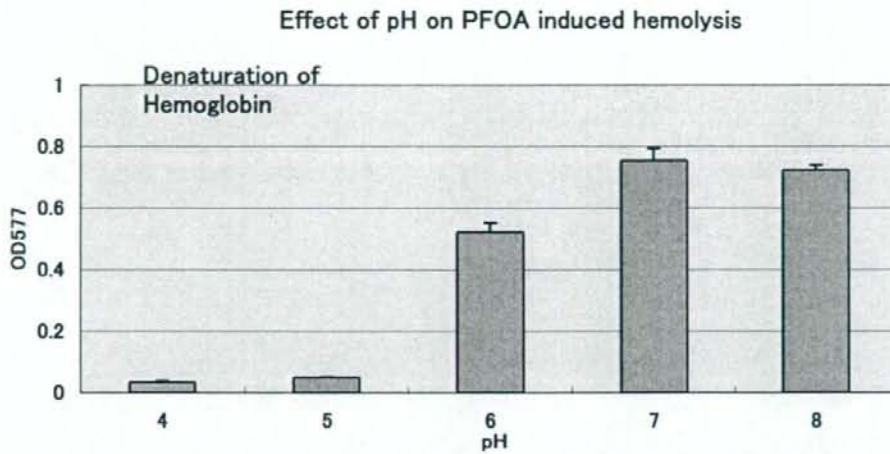
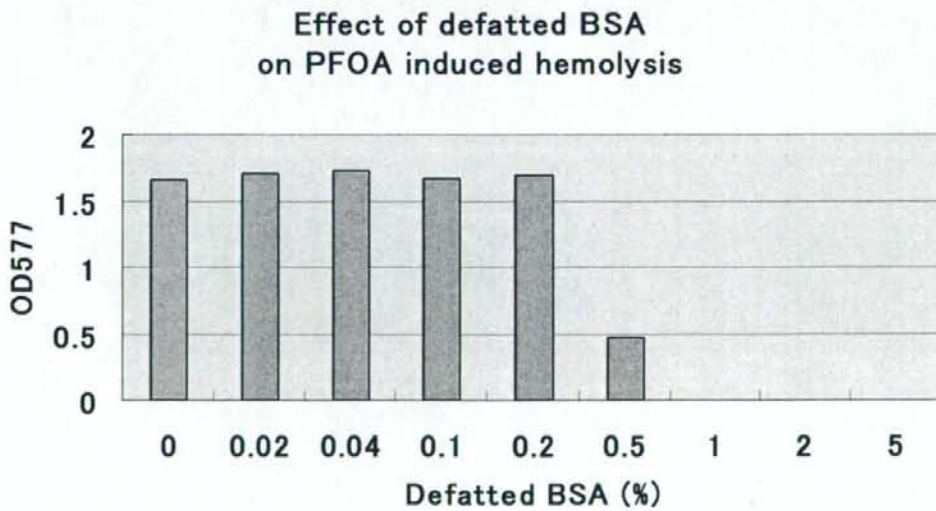


図4. PFOAによる赤血球溶血の脱脂肪酸 BSA による阻害



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Itoh S., Takakura D., Kawasaki N., Yamaguchi T.	Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein.	John Walker	The protein Protocols Hand-book. Third Edition.	Humana Press	U.S.A.	In press	
Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T.	LC/MS of oligosaccharides	Naoyuki Taniguchi	Glycoscience Lab. Manual.			In press	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, Y.	The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals.	Biol. Pharm. Bull			In press
Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T	LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides.	Methods in Molecular Biology	534	1-10	2009
Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.	Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method.	Immunology	126	336-345	2008
Kawasaki, N., Satsuki, I., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, T., Yamaguchi, Y.	Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein.	Trends in Glycoscience. Glycotech.	20	97-116	2008

Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N. Matsuishi- Nakajima, Y., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.	Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high- performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.	J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.	869	20-30	2008
Itoh S, Hachisuka A, Kawasaki N, Hashii N, Teshima R, Hayakawa T, Kawanishi T, Yamaguchi T.	Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry.	Biochemistry	47	10132- 101154	2008
川崎ナナ, 石井 明子, 山口照英	糖鎖と生物薬品	Journal Applied G lycoscience			印刷中
山口照英, 石井 明子	早期臨床開発段階でのバ イオ医薬品の品質・安全 性確保	臨床評価			印刷中

Alteration of *N*-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of *N*-glycans using an isotope-tagging method

Noritaka Hashii,^{1,2} Nana Kawasaki,^{1,2} Satsuki Itoh,¹ Yukari Nakajima,^{1,2} Toru Kawanishi¹ and Teruhide Yamaguchi¹

¹Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo, Japan, and ²Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology Agency (IST), Kawaguchi City, Saitama, Japan

doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02898.x

Received 19 March 2008; revised 28 May 2008; accepted 2 June 2008.

Correspondence: N. Kawasaki, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Email: nana@nihs.go.jp

Senior author: Teruhide Yamaguchi, email: yamaguch@nihs.go.jp

Introduction

Glycosylation is one of the most common post-translational modifications^{1,2} and contributes to many biological processes, including protein folding, secretion, embryonic development and cell-cell interactions.³ Alteration of glycosylation is associated with several diseases, including inflammatory responses and malignancies;⁴⁻⁶ for instance, significant increases in fucosylation and branching are found in ovarian cancer and lung cancer.⁷ Additionally, the carbohydrate structure changes from type I glycans (Gal β 1-3GlcNAc) to type II glycans (Gal β 1-4GalNAc) in

Summary

Changes in the glycan structures of some glycoproteins have been observed in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis. A deficiency of α -mannosidase II, which is associated with branching in *N*-glycans, has been found to induce SLE-like glomerular nephritis in a mouse model. These findings suggest that the alteration of the glycosylation has some link with the development of SLE. An analysis of glycan alteration in the disordered tissues in SLE may lead to the development of improved diagnostic methods and may help to clarify the carbohydrate-related pathogenic mechanism of inflammation in SLE. In this study, a comprehensive and differential analysis of *N*-glycans in kidneys from SLE-model mice and control mice was performed by using the quantitative glycan profiling method that we have developed previously. In this method, a mixture of deuterium-labelled *N*-glycans from the kidneys of SLE-model mice and non-labelled *N*-glycans from kidneys of control mice was analysed by liquid chromatography/mass spectrometry. It was revealed that the low-molecular-mass glycans with simple structures, including agalactobiantennary and paucimannose-type oligosaccharides, markedly increased in the SLE-model mouse. On the other hand, fucosylated and galactosylated complex type glycans with high branching were decreased in the SLE-model mouse. These results suggest that the changes occurring in the *N*-glycan synthesis pathway may cause the aberrant glycosylations on not only specific glycoproteins but also on most of the glycoproteins in the SLE-model mouse. The changes in glycosylation might be involved in autoimmune pathogenesis in the model mouse kidney.

Keywords: isotope-tagging method; liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry; systemic lupus erythematosus

carcinoembryonic antigen in colon cancer.⁸ Furthermore, an increase in biantennary oligosaccharides lacking galactose (Gal) was found on immunoglobulin G (IgG) in systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis,⁹⁻¹¹ and agalactoglycans are used for the early diagnosis of rheumatoid arthritis.¹²

Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease characterized as chronic and as a systemic disease, with symptoms such as kidney failure, arthritis and erythema. In addition to the known changes in glycosylation on IgG, there have been several reports on the association between glycosylation and inflammation in SLE and rheumatoid

arthritis.^{13–15} A deficiency of α -mannosidase II (α M-II), which is associated with branching in N-glycans, has been found to induce human SLE-like glomerular nephritis in a mouse model.¹⁶ Green *et al.* reported that branching structures of N-glycan in mammals are involved in protection against immune responses in autoimmune disease pathogenesis.¹⁷ Although there is no direct evidence that alteration of glycosylation is the upstream event in the pathogenesis of SLE, these findings suggest that changes in the glycan structure may be involved in the inflammatory-related autoimmune disorder. Glycosylation analysis may lead to the development of improved diagnostic methods and may help to clarify the carbohydrate-related pathogenic mechanism of inflammation in SLE.

Mass spectrometry (MS) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) are the most prevalent strategies for identifying disease-related glycans in glycomics.^{18–20} Aberrant glycosylations in some disease samples have been found by comparing mass spectra or chromatograms between normal and disease samples; however, because of the tremendous heterogeneities of the sugar moiety in glycoprotein as well as the low reproducibility of LC/MS, accurate quantitative analysis is difficult using MS and LC/MS alone. To overcome these problems, we previously developed the stable isotope-tagging method for the quantitative profiling of glycans using 2-aminopyridine (AP).²¹ After the glycans are released from sample and the reference glycoproteins are derivatized to pyridyl amino (d_0 -PA) glycans and to tetra-deuterium-labelled pyridyl amino (d_4 -PA) glycans, respectively, a mixture of both d_0 -PA and d_4 -PA glycans was subjected to LC/MS, and the levels of individual glycans were calculated from the intensity ratios of d_0 -glycan and d_4 -glycan molecular ions (Fig. 1a). Recently, alternative isotope-tagging methods using deuterium-labelled compounds, such as 2-aminobenzoic acid its derivatives, and permethylation, have been proposed by other groups.^{22–24} All of these studies prove the utility of isotope-tagging methods for the quantitative analysis of glycosylation.

In the present study, we used the isotope-tagging method to analyse changes in N-glycosylation in the disordered kidney in an SLE mouse model. We used an MRL/MpJ-lpr/lpr (MRL-lpr) mouse which lacks the Fas antigen gene.^{25–27} The MRL-lpr mouse is known to naturally develop SLE-like glomerular nephritis and is widely used in SLE studies. MRL/MpJ-+/+ (MRL-+/+) mice were used as controls.

Materials and methods

Materials

The kidneys of the SLE-model mice (MRL-lpr) and control mice (MRL-+/+) ($n = 3$) were purchased from Japan SLC, Inc. (Hamamatsu, Japan). Thermolysin (EC 3.4.24.27), originating from *Bacillus thermoproteolyticus*

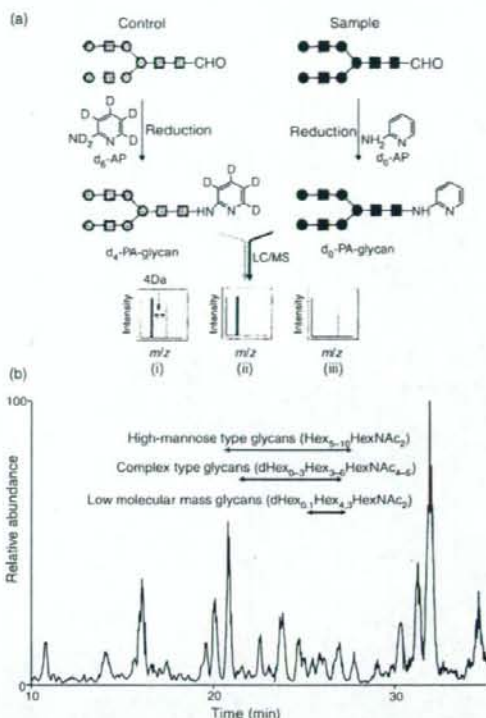


Figure 1. (a) Quantitative glycan profiling using the stable isotope-tagging method and liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). (i) sample = control, (ii) sample > control, (iii) sample < control. (b) Total ion chromatogram obtained by a single scan (m/z 700–2000) of the d_0 -glycan and d_4 -glycan mixture.

Rokko, was purchased from Daiwa Kasei (Shiga, Japan). Glycopeptidase A (PNGase A) was obtained from Seikagaku Kogyo Corporation (Tokyo, Japan). Non-deuterium-labelled 2-aminopyridine (d_0 -AP) and deuterium-labelled 2-aminopyridine (d_4 -AP) were purchased from Takara Bio (Otsu, Japan) and Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA), respectively.

Sample preparation

Mouse kidneys were filtered using a cell strainer (70 μ m; BD Biosciences, San Jose, CA) and contaminating blood cells in the kidney cells were burst in 140 mM NH_4Cl -Tris buffer (pH 7.2). The surviving kidney cells were washed three times with phosphate-buffered saline containing a mixture of protease inhibitors (Wako, Tokyo, Japan) and dissolved in guanidine-HCl buffer (8 M guanidine-HCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6) containing a mixture of protease inhibitors by vortexing at 4°. The protein concentration was measured using a 2-D Quant Kit (GE Healthcare