

- 1) 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)
- 2) 医薬品安全性確保に向けての市販後大規模副作用症例データの活用-向精神薬の適正使用と安全性情報-. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- II) 学会発表
 - 1) 森川 馨, 廣瀬有紀子, 今宮麻奈, 高本哲義, 田崎武信, 竹村玲子. 自発報告に基づく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解析. 日本薬学会第 128 年会(2008)
 - 2) 竹村玲子, 大塚 文, 小嶋 靖, 太田有子, 芦澤一英, 森川 馨. 海外の安全性情報にみられる市販後の医薬品の副作用. 日本薬学会第 128 年会(2008)
 - 3) 芦澤一英, 小嶋 靖, 大塚 文, 太田有子, 森川 馨. 海外における医薬品安全性情報に関する最近の動向(2007 医薬品安全性情報から). 日本薬学会第 128 年会(2008)
 - 4) 今宮麻奈, 佐賀野修一, 芦澤一英, 竹村玲子, 森川 馨. 自発報告に基づく大規模副作用症例データベース(AERS)を用いた HIV 治療薬の解析(II). 日本薬学会第 128 年会.(2008)
 - 5) 道廣幸三, 大家正芳, 森川 馨. Gd 含有 MRI 造影剤の腎性全身性線維症と AERS による解析. 日本薬学会第 128 年会(2008)
 - 6) 高見廣行, 松倉竹雄, 森川 馨. Microsoft Office Access による副作用シグナル検出システムの作成. 日本薬学会第 128 年会(2008)
 - 7) 都地昭夫, 長谷川貴大, 田崎武信, 森川 馨. 質的交互作用検定の多地域共同試験への応用.SAS ユーザー会学術総会 2007
 - 8) 馬場裕子, 落合俊充, 山田忠明, 田崎武信, 森川 馨. MMRM 解析と LOCF 解析の比較.SAS ユーザー会学術総会 2007
 - 9) 山田忠明, 北西由武, 田崎武信, 森川 馨. Co-primary endpoints の多重性調整.SAS ユーザー会学術総会 2007
 - 10) 浜口和人, 土屋佳英, 田崎武信, 森川 馨. 群逐次デザインの再考.SAS ユーザー会学術総会 2007
 - 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) 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. 日本日本薬学会第 129 年会(2009)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 芦澤 広, 菊池明男, 森川 馨. 抗 HIV 薬の腎関係イベントの解析. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- 22) 森川 馨, 石田和也, 牧内隆司, 佐藤耕一. AERS を用いた HAART 療法としての抗 HIV 薬併用データの解析. 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 130 年会(2010)
- 23) 森川 馨, 牧内隆司, 長嶺敬彦, 天沼喜美子. 大規模副作用症例データベース AERS を用いた抗うつ薬, 抗認知症薬, ADHD 治療薬及び lithium の安全性情報の解析. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- 24) 牧内隆司, 長嶺敬彦, 森川 馨. AERS を用いた抗てんかん薬における医薬品安全性情報の解析. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- 25) 道廣幸三, 宇田恒信, 森川 馨. FDA 大規模副作用データベース(AERS)を用いた医薬品安全監視の検討. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- 26) 高見廣行, 松倉竹雄, 森川 馨. AERS による内分泌領域で使用されている薬剤で発現した副作用の検討. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- 27) 天沼喜美子, 小嶋 靖, 太田有子, 大塚 文, 前田初代, 森川 馨. 向精神薬に関する海外の安全性情報. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- 28) 吉川剛兆, 深野木信一, 小林典弘, 長谷川貴大, 森川 馨. AERS を利用した医薬品の安全対策 -コルヒチンを例にして-. 日本薬学会第 130 年会(2010)
- III) HS研究成果普及啓発事業(平成 19, 20, 21 年度)
 - 1) FDA 大規模副作用症例報告データベース(AERS)を用いた医薬品安全性情報の解析(2008.2.1)
 - 2) 大規模副作用症例報告データベースを用いた医薬品安全性情報の解析 (2009.1.23)
 - 3) 大規模副作用症例報告データベースの解析とファーマコビジランス計画(2010.1.29)
- F. 知的所有権の出願・取得状況 なし

医薬品の安全性監視と安全性監視計画立案のための 医薬品安全性情報の解析、評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
研究者 森川 馨

研究要旨 公開されている米国FDAのAERSのデータベースを用い、精神神経領域、循環器領域、内分泌領域、眼科領域における医薬品の副作用を解析すると共に海外規制機関からの安全性情報やファーマコヴィジランス、また安全性データの統計解析法等、市販後の医薬品の安全性確保と安全性監視の観点から検討を行った。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部
森川 馨
- (2) 京都大学大学院・医学研究科社会健康医学系
専攻、健康情報学 中山健夫
- (3) あすか製薬㈱ 高見廣行
- (4) アステラス製薬㈱信頼性保証本部・ファーマ
コヴィジランス部 松本法幸
- (5) エーザイ㈱信頼性保証本部・安全管理部
宇田恒信
- (6) 協和発酵キリン㈱信頼性保証本部 関 利之
- (7) 参天製薬㈱研究開発本部 西畑利明
- (8) 塩野義製薬㈱信頼性保証本部・安全管理部
吉川剛兆
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部
天沼喜美子

A. 研究目的

医薬品の価値は、有効性と安全性のバランスで決まる。リスクを軽減できれば相対的にベネフィットが増すことになる。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。安全性は個々の患者背景、使用法、期間等で異なり、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。今日、世界各国の規制機関は、市販後の安全性データを収集し、公開するようになってきている。そして、焦点はそ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。米国FDAは、Adverse Event Reporting System (AERS)として世界規模で副作用データを集め、データベース(12年分約330万件)を公開している。一方、医薬品は承認にあたり、承認条件として使用成績調査あるいは製造販売後臨床試験など実地医療に近い形での追加試験が課せられている場合が多

いが、これらの試験では症例数が明確であることから、頻度、発現率などの解析が可能となるメリットはあるが、通常3,000例程度の規模であるため安全性監視には不十分である。他方、上記データベースは自発報告ではあるが、報告数が年44万件12年で計330万件と膨大なデータであり、医薬品の安全性を考えるに当たっては非常に価値の高いデータである。

一方、ICHから開発から市販後まで一貫した安全性情報のライフサイクルマネジメントとして安全性監視に関するガイドラインE2Eが提案され、厚労省からも医薬品安全性監視計画実施が通知されている(平成17年3月28日)。E2Eでは、すべての新医薬品について開発段階で特定されたリスクのほか、潜在的リスク、及び検討不十分なリスクについて、開発段階から安全性監視計画を事前に策定することが求められており、医薬品の安全性監視は製薬企業にとって今後の重要な活動になると考えられる。しかしながらリスク検出のための手法は確立されておらず、行政、製薬企業にとっての大きな課題となっている。本研究では、産官学の多くの領域の専門家と共同研究を行ない、これらの大規模副作用症例データベースの解析の検討を通じて、早期に対応策を発信して副作用を未然に防止するための監視方法、および開発から製造販売後までの一貫した安全性監視システムについて検討した。

B. 研究方法

B-1 FDA 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

米国FDAの大規模副作用報告データベース(AERS;12年分,1997年~2009年3rdQTR;2,489,587症例)に報告されている向精神薬の有害事象を解析した。抗うつ薬8種(clomipramine,

mirtazapine, floxetine, paroxetine, sertraline, venlafaxine, duloxetine, bupropion)、抗認知症薬 4 種 (donepezil, galantamine, rivastigmine, memantine)、ADHD 治療薬 3 種 (amphetamine, methylphenidate, atomoxetine)、気分安定薬 (lithium)、また抗てんかん薬として、valproate (VPA), carbamazepine (CBZ), phenytoin (PHT), topiramate (TPM), lamotrigine (LTG), gabapentin (GBP) の有害事象を報告数、Proportional Reporting Ratio (PRR)、併用薬等により解析した。

検討医薬品の副作用情報のシグナル検出基準として、MHRA の方法 (Proportional Reporting Ratio (PRR) ≥ 2 , $\chi^2 \geq 4$, $n_{11} \geq 3$) を採用し副作用の解析を行った。

B-2 医薬安全性情報の臨床的評価

医薬品安全性情報発出前後のパーキンソン病治療薬処方と心エコー検査の変化をレセプトデータベースを用いて評価した。解析には 2005 年 1 月から 2008 年 12 月までの健康保険組合のレセプトデータベース (累積患者数約 53 万人) を用いた。解析対象患者は levodopa, dopamine agonists, monoamine oxidase inhibitor のうち 1 種以上を処方された 30 歳以上の者とした。対象患者における年ごとのパーキンソン病治療薬の処方日数割合を算出した。更に、対象患者を case 群 (cabergoline and/or pergolide) 及び比較群に分け、添付文書改訂 (2007 年 4 月) 前後の心エコーの実施割合を比較した。更に添付文書改訂後の case 群を心エコーの有無で 2 群に分け、関連要因を検討した。解析には SPSS 16.0 版を使用し、カテゴリー変数にはフィッシャーの直接確率法、連続変数にはウィルコクソンの順位和検定を用いた (有意水準 (両側) < 0.05)。

B-3 内分泌領域における副作用情報の評価と活用

内分泌領域における副作用情報の評価と活用として、本年度はタンパク質製剤を取り上げた。用いた AERS データは、1997 年 Q4 から 2009 年 Q2 までのデータの重複処理を行った上で用いた。Microsoft Access 2003、Spotfire V2.2.0 等を用いて解析し、シグナル検出法として BCPNN (Bayesian Confidence Propagation Neural Network) 法あるいは PRR 法によりシグナルの検出を判定した。

B-4 Adverse Event Reporting System (AERS) を用いた安全性シグナルの評価方法および薬物相

相互作用の検討

薬剤と併用薬剤 7 種での安全性シグナルおよび薬物相互作用を AERS データを用いて検討した。2004 年 Q1 から 2009 年 Q2 までの AERS データをもとに、Phase Forward 社の Empirica Signal を用いて解析した。シグナル検出は、Multi-Item Gamma Poisson Shrinker (MGPS) 法により Empirical Bayes Geometric Mean (EBGM) および EBGM の 90% 信頼区間の下限 (EB05) と上限 (EB95) を算出し評価した。シグナル検出の評価基準は、FDA が用いている基準を参考に EB05 が 2 以上のときシグナルとした。薬物間相互作用のシグナル検出は Almenoff JS らの文献を参考にし、薬剤 A 単独でのシグナル検出結果と他剤が併用された時のシグナル検出結果より、「他剤併用時の EB05」/「薬剤 A の EB95」 (Interaction Signal Score, INTSS) が 1 より大きい場合に薬物間相互作用ありとした。

B-5 プロトンポンプインヒビターの医薬品安全監視の検討

検討薬剤は、代謝プロファイルの異なる 5 種のプロトンポンプインヒビター (ラベプラゾール、ランソプラゾール、オメプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾール) と抗血小板薬 (クロピドグレル) とし、関心事象をステント血栓症関連事象 (冠動脈再閉塞、冠動脈狭窄、ステント閉塞、ステント内冠動脈再狭窄) とした。安全性シグナルは、重複データを除外した 1994Q4 から 2008Q3 までの AERS データ (2,154,330 例 7,472,426 事象) を用い、Proportional Reporting Ratio (PRR)、 χ^2 値を算出し、 $PRR > 2$ 、 χ^2 値 > 4 、報告数 > 2 を安全性シグナル「有」とし、併用効果は、各単独使用時の PRR の和が、併用時の PRR を上回った場合に「有」と判定した。また、安全性シグナル・併用効果の判定は、クロピドグレルの処方目的をステント血栓症予防に絞込んだ場合 (18,507 例 75,784 事象) についても検討した。

B-6 血液及び腎領域における副作用情報の解析

難治性白血病治療としての血液幹細胞移植の前処置薬としての busulfan の経口製と静注製剤の静脈閉塞性間疾患 (VOD) 発現率の比較を検討した。投与経路変更の副作用抑制に関する解析には 1997 年 Q4 から 2008 年 Q4 までの全件データを用いた。なお、報告時期の違いにより発生する同一症例データの重複については、データ結合後に最新のもののみを選択した。解析対象薬剤は、busulfan の一般名あるいは商品名のいずれかと一致するものを併合して扱った。シグナルの評価

には PRR 法を用い、MedDRA の PT に準拠した AERS の有害事象名を単位として、Evans らの方法に従って行った。なお、投与経路間比較は PRR で行うことを基本としたが、両者の PRR の比は分母が共通な部分集団同士の比となるため、結果的には分子である各部分集団の報告割合 (RR) の比と同じになる。このため両者の比較は RR の比較により行った。

B-7 AERS を用いた加齢黄斑変性治療薬の安全性情報の検討

AERS データを用いて加齢黄斑変性治療薬の安全性情報を検討した。検討した加齢黄斑変性に使用される VEGF 阻害薬は、ペガプタニブ (国際誕生 2004 年 12 月)、ラニビズマブ (同 2006 年 6 月)、ベバシズマブ (同 2004 年 2 月、但し抗癌剤として) の 3 種類である。四半期毎に公開される AERS を、同一症例の重複を削除した上で統合し、2004. Q1~2008. Q4 の統合データベースとした。副作用発現状況の解析は Proportional Reporting Ratio (PRR) 法を用い、英国 MHRA の基準 (PRR \geq 2、 χ^2 値 \geq 4、 $n_{11}\geq$ 3) に従ってシグナルの有無を判定した。3 剤のうちベバシズマブは、オフラベルで眼科使用されているため、投与経路が眼科と判断できる場合のみ解析対象とした。

B-8 AERS を利用した医薬品の安全対策 — コルヒチンを例にして —

米 FDA の経口コルヒチン製剤と P-糖タンパク質 (P-gp) または強い CYP3A4 阻害剤の併用に関する警告を受け、経口コルヒチン製剤併用の影響を AERS データを用いて検討した。CYP3A4 および P-gp 阻害剤の選択は大野ら、杉山らの報告を参考にし、臨床用量において強力な CYP3A4 阻害剤 13 剤 (ケトコナゾール、ポリコナゾール、イトラコナゾール、テリスロマイシン、クラリスロマイシン、ネルフィナビル、サキナビル、リトナビル、ネファソドン、エリスロマイシン、ジルチアゼム、フルコナゾール、ベラパミル)、中程度の CYP3A4 阻害剤 4 剤 (シメチジン、ラニチジン、ロキシスロマイシン、フルボキサミン)、強い P-gp 阻害剤 9 剤 (クラリスロマイシン、エリスロマイシン、シクロスポリン、キニジン、ベラパミル、ケトコナゾール、ポリコナゾール、イトラコナゾール、リトナビル、テリスロマイシン) を選択した。比較のため同効薬として弱い CYP3A4 阻害剤 3 剤 (アジスロマイシン、ガチフロキサシン、フルオキセチン) を選択した。次に、それぞれの阻害剤について、コルヒチン、各阻害剤、そして併用時における有害事象報告数を集計し、併用時の「死亡シ

グナル」について PRR (Proportional Reporting Ratio) を用いて検討した。

B-9 海外規制機関の副作用データの解析と評価

海外規制機関の安全情報の解析、評価として、2009 年の海外からの医薬品安全性情報として、海外規制機関 (米国 FDA、英国 MHRA、カナダ Health Canada、豪 TGA、ニュージーランド MEDSAFE、EU EMEA) 及び WHO から出された重要と考えられた安全性情報、①抗てんかん薬による自殺傾向のリスク、②抗てんかん薬 valproate 使用に伴う先天性異常のリスク、③TNF 阻害薬による小児悪性腫瘍のリスクおよびセフェム系抗菌薬 cefepime と死亡率上昇の懸念について、それらの根拠となったエビデンスについて検討した。加えて、最近の FDA の安全対策としての REMS について、調査した結果をまとめた。

B-10 抗 HIV 薬の腎関係のイベント解析

抗 HIV 治療法としての多剤併用療法の 1 成分であるフルマ酸テノホビル ジソプロキシルを有効成分として含有する薬剤 (TDF 製剤) を対象として、腎関係イベント及びイベント報告症例の特徴を AERS データを用いて解析した。使用した AERS データは 1997Q4~2008Q4 とし、シグナル検出手法としては PRR 法を用いた。

B-11 HAART 療法としての抗 HIV 治療薬併用の統計解析

医薬品併用における副作用の解析法の検討として、抗 HIV 治療で広く行われている HAART 療法の解析を行った。注目した副作用は、乳酸アシドーシスと後天性リポジストロフィーとし、抗 HIV 治療薬 8 剤を説明変数とするロジスティック回帰 (SAS9.1.3) を用いて解析した。モデルは主効果として 8 剤と 2 次、3 次までの交互作用を検討した。

B-12 カナダにおけるファーマコヴィジランス — 自発報告システムと医療データベース

カナダは、有害反応報告の収集や大規模コホート研究に基づく積極的な安全性対策を行っている。そこで、最近 10 年間のカナダでの医薬品安全性対策の取り組みについて、カナダ保健省 (Health Canada) 及び州医療データベースについて調査・検討を行った。

C. 研究結果と考察

C-1 FDA 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

本年度は、医薬品安全性情報の解析として、向

精神薬を検討した。向精神薬は精神科の薬物治療において大きな位置を占めているが、併用や過量投与による有害事象が報告されており、各国の規制機関から安全性情報が出されている。本研究では、米国 FDA の大規模副作用報告データベース (AERS; 12 年分, 1997 年 ~ 2009 年 3rdQTR; 2, 489, 587 症例) に報告されている向精神薬の有害事象を解析した。

抗うつ薬は有害事象報告が多く、全体としてセロトニン症候群、自殺関連の報告が多く、PRR が高かった。三環系、四環系抗うつ薬では、QT 延長、不整脈等の PRR が高く、SSRI, SNRI では、薬剤離脱症候群、錯乱の報告が多かった。錯乱は高齢者での割合が高かった。抗認知症薬で特徴的な有害事象としては、洞性徐脈、房室ブロック等が報告されていた。一方、ADHD 治療薬では、頻脈、心拍数増加等が報告されており、機作が異なる atomoxetine では生殖器関連の事象の PRR が高かった。気分安定薬の lithium では中毒関連の報告が多く、腎性尿崩症や甲状腺・副甲状腺関連の有害事象の PRR が高かった。また、併用による有害事象としては、lithium におけるセロトニン症候群は抗うつ薬との併用、糖尿病・悪性症候群は、抗精神病薬 olanzapine, quetiapine, risperidone 等との併用が高い割合を占めていた。

一方、抗てんかん薬についても、各国の規制機関から有害事象のリスクについて安全性情報が出されている。検討した抗てんかん薬において、PRR 値が高い有害事象として VPA, CBZ, LTG, TPM では、先天奇形関連が報告され、特に VPA では高い PRR 値を示した。また、LTG, PHT では皮膚反応関連の有害事象が多く、LTG, PHT, CBZ では、ステーブンス・ジョンソン症候群のような重篤な皮膚反応が報告されていた。他の有害事象として、VPA では膵炎、血液障害、肝障害、CBZ では抗利尿ホルモン不適合分泌が原因と考えられる低ナトリウム血症、TPM では発汗障害や閉塞隅角緑内障等の眼科領域の有害事象、GBP では自殺関連有害事象が報告されていた。また、抗てんかん薬の適応に関しては、VPA, CBZ, PHT ではてんかんの適応が多かったが、LTG では双極性障害、GBP では疼痛関連、TPM では片頭痛への適応が多く報告されていた。適応別の有害事象としては、TPM での閉塞隅角緑内障等の眼科領域の有害事象は片頭痛で多く報告されており、GBP では双極性障害、うつ病で自殺関連事象の報告割合が高くなっていた。

以上、AERS は自発報告であるため、結果の解釈にはバイアスの存在に留意する必要があるが、AERS データの解析により、世界の医療現場からの

副作用報告の実際を知ることが出来る。このようなグローバルに集められた大規模データを科学的に解析し、臨床現場での医薬品の安全性確保に積極的に生かしていくことが重要であると考えられる。

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、医薬品安全性情報発出前後のパーキンソン病治療薬処方と心エコー検査の変化をレセプトデータベースを用いて評価を行った。パーキンソン病 (PD) 患者に広く用いられてきた麦角系ドパミンアゴニストのうち、cabergoline 及び pergolide による心弁膜症リスクが複数の疫学研究で指摘された。日本では 2007 年 4 月に添付文書が改訂され、上記 2 剤を第二選択薬とすること、処方前及び処方中に定期的な (6-12 カ月に 1 回以上) 心エコー検査を実施することが明記された。しかし、これらの医薬品安全性情報が臨床でどの程度実践されているかは不明である。

解析対象患者 222 人 (男性 41.0%, 平均年齢 [SD] 61.1 歳 [14.6]) のうち、case 群は 73 人、reference 群は 149 人。Cabergoline および pergolide の処方日数割合は減少傾向にあり (2005 年 24.2% から 2008 年 13.5%)、非麦角製剤が増加傾向にあった (7.3% から 21.4%)。

改訂前後の心エコーの実施割合は、case 群では、3/62 (4.8%) から 12/43 (27.9%) ($p=0.010$) に増加したが、reference 群では 11/103 (10.7%) から 12/109 (11.0%) ($p=1.000$) と変化がなかった。Reference 群に対する case 群の心エコーの実施割合は、改訂前では有意な違いはなかったが ($p=0.255$)、改訂後では高かった ($p=0.014$)。改訂後に cabergoline 又は pergolide の処方が 12 カ月以上継続していた 22 人のうち、心エコーが 2 回以上行われていた者は 2 名であった。改訂後の case 群において心エコー実施と関連する要因を探求したところ、改訂後の cabergoline 又は pergolide 処方期間が心エコー (+) sub 群で長かった。

添付文書改訂後 cabergoline 及び pergolide の処方は減少傾向にあり、心エコー実施割合は増加したことから一定の安全性情報の影響が認められた。ただし、心エコーの実施割合は 27% と多くはなく、添付文書に従った定期的な心エコーを実施されている者は更に少なかった。麦角系ドパミンアゴニストによる心弁膜症の副作用情報の注意喚起と心エコー検査の呼びかけが求められる。

C-3 内分泌領域における副作用情報の評価と活

用

内分泌領域における副作用情報の評価と活用として、本年度はタンパク質製剤を取り上げた。本剤は糖タンパク質であり、有害事象のトレーサビリティを確保するために、製剤 α 、製剤 β 及び製剤Uに別々の国際一般名が付与されている。日本では、バイオ後続品も先行バイオ医薬品と異なる一般名が付与されている。報告国としては、米国が最も多く、次いでフランス、日本、ノルウェーの順であった。投与された製剤は、製剤 α 、製剤 β がいずれも約4割を占め、残りの2割は製剤Uであった。殆どが皮下投与あるいは筋肉内投与であった。最も高いBCPNN値を示した副作用は「卵巣過剰刺激症候群」であった。

製剤間の比較を行った結果、性別及び年齢については製剤間の相違は認められなかった。遺伝子組換え製剤においては皮下投与が大部分を占めていたのに対して、製剤Uでは筋肉内投与が多かった。投与量については、製剤Uは遺伝子組換え製剤に比べて多い傾向があったが、製剤 α 、製剤 β の間には相違は認められなかった。投与期間については、3製剤間に殆ど違いはみられなかった。最も高いBCPNN値を示した副作用は、3製剤いずれも「卵巣過剰刺激症候群」であった。副作用の内容においても、3製剤間に大きな相違は認められなかった。また、経年的推移を検討した結果、2004年以降の年間副作用発生例数が2004年以前に比して数倍増加していた。2004年に遺伝子組換え製剤の皮下投与用プレフィルド剤が米国で発売されており、それ以降製剤 α 及び製剤 β による副作用が増加していた。プレフィルド剤のない製剤Uでの増加はみられなかった。2004年以降は、皮下投与のみ副作用発生例数が増加しており、また、1~4日間の投与期間で副作用の発生が増えていた。これらから、2004年以降の副作用増加はプレフィルド製剤による自己注射が原因となっている可能性が否定できないと考えられた。

経年的推移の検討から、本剤による副作用発生例数が2004年から増加していた。2004年には製剤 α 及び製剤 β のプレフィルド剤が販売開始されており、これが副作用増加の原因の1つとして推測され、AERSのデータベースの検討からも関連が示唆された。販売会社等の情報による2008年の売上金額は2002年の約30%増に留まっており、販売量の増加だけでこの副作用増加を十分に説明することはできないことから、2004年以降の副作用増加は主にプレフィルド剤発売によるものと考えられた。このような情報を市販後の安全性確保の生かしていくことが重要であると考えられた。

C-4 AERSを用いた安全性シグナルの評価方法および薬物相互作用の検討

2004年Q1から2009年Q2に報告された症例は1,878,555例、報告件数は4,886,772件あった。本研究では薬剤Aに注目し、併用薬は薬剤Aの添付文書併用注意欄を参考に、薬剤B(非ステロイド性消炎鎮痛剤)、薬剤C(痛風治療剤)、薬剤D(HMG-CoA還元酵素阻害剤)、薬剤E(ジギタリス配糖体製剤)、薬剤F(Ca拮抗剤)、薬剤G(利尿剤)および薬剤H(副腎皮質ホルモン剤)を選択した。薬剤Aに関する報告は6,976例、42,713件であり、薬剤Aとの併用時の報告件数が多かったものは薬剤Hで3,662件、薬剤Dで624件であり、最も少なかったものは薬剤Eで19件であった。

薬剤A単独で報告された事象数は4,275事象あり、そのうちシグナルとして検出された事象数は612事象であった。薬剤A単独で検出されるシグナルには原疾患に関連する事象や、薬剤Aの薬理作用によるものと思われる事象が比較的多く検出された。

次に、薬剤Aの多剤との併用時のシグナルは、Interaction Signal Score (INTSS)が1より大きい場合薬剤B、薬剤Eおよび薬剤F併用時ではシグナルは検出されなかった。薬剤Cおよび薬剤D併用時では筋骨格系および結合組織障害(MedDRA SOC)に関する事象が検出され、薬剤G併用時には子宮内胎児死亡(MedDRA PT)が検出された。また、薬剤H併用時には感染または移植時の合併症などが検出された。薬剤Cおよび薬剤Dについては、併用時に発現が予想された事象がシグナルとして検出されているが、それ以外の薬剤の併用時には予想された事象の検出は無かった。各薬剤単独使用時および薬剤Aとの併用時の報告事象、EB05およびINTSSを報告事象ごとに関連を検討した。INTSSが1以上(相互作用ありとされた事象)であった事象は併用時のEB05は全て2以上(シグナルあり)であった。一方の併用時のEB05が2以上の事象は必ずしもINTSSは1以上ではなかった。併用時のEB05が4以上でありINTSSが1未満の事象として、筋力低下、血液透析、眼筋麻痺、ミオパチー等が認められた。

薬剤Aと他剤を併用した時のシグナル検出結果を添付文書に記載されている事象と比較すると、併用薬7剤のうち2薬剤のみが添付文書の記載にある事象が検出され、3薬剤はシグナルが検出されず、さらに2薬剤は既知の事象が検出されなかった。本研究の結果を踏まえ、併用時のシグナルについては更なる検討が必要であると考えられる。

C-5 プロトンポンプインヒビターの医薬品安全監視の検討

近年、クロピドグレルとプロトンポンプインヒビターの併用により、心血管イベント等の発生リスクが増加するとの疫学調査結果が報告されている。また、海外規制当局からはクロピドグレルとプロトンポンプインヒビターの相互作用に関するアラートが出されており、英国 MHRA (2009年8月20日付) からは、治療上不可欠と考えられる場合を除き、プロトンポンプインヒビターとの併用を避けるよう製品情報を改訂すべきであると、FDA (2009年11月17日付) からは、Omeprazole との併用による効果減弱についての安全性情報が発出されている。なお、現時点で、クロピドグレルの海外の添付文書には Omeprazole との相互作用に関する記述がなされている。本研究では、クロピドグレルとプロトンポンプインヒビター併用が、クロピドグレルのステント血栓症にどのような影響があるかについて AERS に報告されたデータを用いて検討した。

プロトンポンプインヒビターは主に薬物代謝酵素の CYP2C19 で代謝されるが、この酵素には遺伝的に決定された活性の個人差があり、プロトンポンプインヒビターの血中動態・薬効に影響することが報告されている。また、プロトンポンプインヒビターの種類により、この酵素への依存度も異なっているため、CYP2C19 多型を考慮することが望ましいとされている。一方、抗血小板薬クロピドグレルはプロドラッグであり、CYP2C19 と 3A4 による 2 段階の代謝を受けて活性体となるが、CYP2C19 の活性が効果に影響することが報告されており、CYP2C19 を介したクロピドグレルとプロトンポンプインヒビターの相互作用の可能性が示唆されている。

検討薬剤は、代謝プロファイルの異なる 5 種の P (ラベプラゾール、ランソプラゾール、オメプラゾール、エソメプラゾール、パントプラゾール) と抗血小板薬 (クロピドグレル、CP) とし、関心事象をステント血栓症関連事象 (冠動脈再閉塞、冠動脈狭窄、ステント閉塞、ステント内冠動脈再狭窄) とした。クロピドグレルとプロトンポンプインヒビターまたはいずれかのプロトンポンプインヒビターの併用について、報告数、PRR、 χ^2 値、安全性シグナルの発生状況および併用効果を検討した。

ステント血栓症を想定した有害事象の安全性シグナルの発生状況は、処方目的の絞込みのない条件では、クロピドグレルとプロトンポンプインヒビターの併用群で安全性シグナルが認められ

た有害事象があったが、クロピドグレルを使用しているがプロトンポンプインヒビター非使用群でもシグナルが認められていることから、相互作用によるものか、それともクロピドグレル自体の影響によるものかを判断できないため、安全性シグナルありかつ各単独群の PRR を合算した値と、併用での PRR 値を比較し、併用効果を判定した。その結果、クロピドグレルとプロトンポンプインヒビター併用群、B とクロピドグレルの併用群、C とクロピドグレルの併用群で冠動脈再狭窄に併用による影響が認められ、さらに処方目的を絞り込んだ条件で併用による影響が D とクロピドグレル併用群で冠動脈再狭窄が認められた。プロトンポンプインヒビター全体で認められた併用効果であっても全てのプロトンポンプインヒビターで同様の結果が認められなかったことから、プロトンポンプインヒビター全体のクラス効果とは考え難く、また、主代謝経路に CYP2C19 が関与しない薬剤では併用効果が認められていないことから、代謝プロファイルの違いにより併用時のステント血栓症の予防効果が異なる可能性が示唆された。

クロピドグレルとプロトンポンプインヒビター併用が、クロピドグレルのステント血栓症の予防効果にどのような影響があるかについて AERS データを用いて検討した結果、全てのプロトンポンプインヒビターで同様の併用効果はなかったことから、予防効果の減弱と代謝プロファイルの関連性が示唆された。

C-6 血液及び腎領域における副作用情報の解析

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とともに、比較対照臨床試験を組むことが困難な既存薬剤の有害事象の情報を得るためにも有用であると考えられる。

近年難治性の白血病に対する治療として定着している血液幹細胞移植療法において、レシビエントの前処置薬として高用量の busulfan が用いられてきたが、従来 busulfan には経口製剤しかなく、強い消化管毒性による嘔吐の影響で吸収が一定せず血中濃度のコントロールが難しいため、静脈閉塞性間疾患 (VOD) を代表とする副作用が発現することも多かった。これを改善する目的で busulfan の静注製剤が開発され、その開発治験においては経口製剤との比較は行われておらず、また症例数の観点からも VOD 発現率の経口製剤との比較は困難であった。そこで AERS データでの静注製剤と経口製剤の PRR を比較することにより、擬似的に製剤変更による副作用発現頻度の比較

を行うことを試みた。

解析対象有害事象数 77,753,345 件中 busulfan 投与症例において発現していた有害事象の種類は 1,550 項目あったが、これらのうち PRR 法によるシグナル解析陽性となった有害事象は 369 項目であった。この解析において上位に来るものには原疾患および骨髄移植に伴うものが多かったが、その中で VOD は PRR 順で 18 番目、発現件数でも 171 件と強いシグナルを示していた。VOD の報告率 (RR) について注目すると、busulfan の製剤間の比較においては静注剤の RR は 0.015 と、経口剤の 0.031 に比して有意に低かった (χ^2 検定 $p < 0.0001$)。この傾向は、busulfan が移植を適応として投与された症例のみを解析対象とする部分集団解析においてさらに顕著で、静注剤と経口剤の RR はそれぞれ 0.013 と 0.033 であった。静注、経口の投与経路別の報告症例数を見ると静注剤は 2007 年以降急激に増加しているが、その報告の多くは日本由来のものであった。一方、投与経路別の RR の経年推移を見ると一定の傾向はなかったが、2004 年の報告において経口剤の RR が顕著に高かった。

AERS データを用いた副作用の解析において、VOD は PRR および報告頻度の高さから busulfan の重要なリスク因子であることが確認された。また、RR 自体は発症率を示すものではないが RR の比は発症率の比を反映すると考えられることから、VOD について静注剤の RR が経口剤よりも低いことは、静注剤では経口剤よりも VOD の発現率を低減できるという仮説を支持するものと考えられた。静注剤、経口剤間の経年推移の違いの理由は不明であるが、全体解析結果の解釈に本質的な影響を与えるものではないと考えられた。以上の結果より、AERS の解析は投与経路間の副作用比較にも有用な情報を与えると考えられた。

C-7 AERS を用いた加齢黄斑変性治療薬の安全性情報の検討

近年の高齢化に伴い、視力予後を長期に保つことが重要になっており、失明の主要原因を占める加齢黄斑変性に対する有用な治療法の確立は重要な課題である。本研究では AERS を用い、加齢黄斑変性治療薬として最近臨床使用可能となった抗血管新生薬 (VEGF 阻害薬) の安全性に関する問題点を検討することを目的とした。AERS を解析した結果、各 VEGF 阻害薬の報告件数は、ペガプタニブ 257 件、ラニビズマブ 1,113 件、ベバシズマブ 510 件であった。重篤症例である「15日報告」の 2007 年～2008 年における年次報告数の推移をみると、ペガプタニブは 51 件から 35 件に減少し、ラニビズ

マブは 384 件から 409 件に微増し、ベバシズマブは 136 件から 352 件と著明な増加が認められ、ベバシズマブのオフラベル使用の拡大が示唆された。SOC「眼障害」のシグナル陽性事象には、原疾患や投与方法 (硝子体注射) に関連すると思われるものが多かった。一方、SOC「眼障害」以外のシグナル陽性事象には、眼内炎、眼圧上昇など眼関連の事象も含まれ、眼内投与後の感染症である“眼内炎”は 3 剤ともにシグナル陽性であったが、その PRR 値はベバシズマブ 346.5 > ペガプタニブ 267.7 >> ラニビズマブ 28.6 であり、ベバシズマブでは、前房蓄膿、感染因子伝播など眼内炎関連のシグナル陽性事象が多かった。また、3 剤の中でラニビズマブは、脳血管発作、一過性脳虚血発作、虚血性脳卒中など脳卒中関連のシグナル陽性事象が多く、脳血管発作 114 件はラニビズマブの中で最多の報告数であった。米国では 2007 年 1 月にラニビズマブの脳卒中発生リスクに関する Dear Health Care Provider レターが発出され、AERS への報告に影響を与えた可能性があるため、脳血管発作の報告時期を検討したところ、レター発出直後の 2007 年 Q1～Q2 に報告数は多いものの、それ以降もコンスタントに報告されていた。また、VEGF 阻害薬の投与対象は高齢者が多く、脳卒中の背景発現率は高いと考えられることより、AERS を 60 歳以上の高齢者に限定して解析した。結果、全体集団で報告数の多かった脳卒中関連上位 3 事象は高齢者集団においてもシグナル陽性であり、ラニビズマブは脳卒中発現リスクを高める可能性が示唆されたが、高齢者集団の PRR 値は脳血管発作の 2.3 など高いものではなく、強いシグナルとは言えなかった。

以上、市販製品であるペガプタニブ、ラニビズマブの AERS での報告状況を添付文書情報と比較した結果、両者は概ね一致していた。一方、抗癌剤として市販されているベバシズマブは、AERS での報告状況よりオフラベル使用の拡大が示唆された。ベバシズマブで報告された有害事象の種類は他の 2 剤と同様であったが、“眼内炎”の報告が多く、適切な使用法が確立していないことによるものと推察された。このように、AERS を解析することで様々な臨床現場での使用に係わる安全性に関する気付きを得ることができ、多面的なリスクアセスメントが可能になるものと考えられる。

C-8 AERS を利用した医薬品の安全対策 — コルヒチンを例にして —

米 FDA は 2009 年 7 月 30 日に、単一成分の経口コルヒチン製品 (Colcrys) の承認にあたり、FDA の有害事象報告制度 (AERS) に報告された安全性

情報などを分析し、新たな安全性に関する懸念について通知した。その内容は、経口コルヒチンの使用に関連する死亡を169件確認し、その内、117件は治療域内の用量であり、そのうち60件は、クラリスロマイシンを併用していた患者であった。またクラリスロマイシンの併用では、コルヒチンのC_{max}、AUCはそれぞれ3.3倍、3.8倍と上昇していたことから、FDAはコルヒチンとP-糖タンパク質(P-gp)または強いCYP3A4阻害剤の併用に関して警告を行った。それを受け、国内で直ちに緊急報告を行うとともに、その他のP-gpまたはCYP3A4阻害剤についてもコルヒチンとの併用による死亡例の増加のシグナルについてAERSデータを検索した。

AERSデータ(1997年Q4~2009年Q1)にはコルヒチン使用全報告3,451件(うち、死亡報告548件、併用報告230件)で報告されていた。死亡報告548件のうち75報告がクラリスロマイシン併用報告であり、併用報告230件のうち86件でクラリスロマイシン併用報告であった。コルヒチンとそれぞれの阻害剤併用における「死亡シグナル」のPRRを検討した結果、併用時におけるPRRの95%信頼区間の下限が1を超えたのは、クラリスロマイシンとネファゾドンの2薬剤であり、それぞれの併用時のPRRは3.53および8.16と推定された。この結果は、コルヒチンとの併用において死亡の報告割合が増加していると考えられた。クラリスロマイシンでは、クラリスロマイシン未服薬時におけるコルヒチンの死亡のPRRが1.34であったのに対し、クラリスロマイシン服薬時におけるコルヒチンのPRRは4.74であり、クラリスロマイシンを併用することで、未併用と比べてコルヒチンの死亡報告割合が3.53倍になったと解釈される。一方、抗真菌薬、抗ウイルス薬は併用による副作用報告数自体が少なく、相互作用が周知されているためと考えられた。また循環器薬との併用による有害事象報告数は多いが、相互作用、死亡報告数は少なかった。

クラリスロマイシンとネファゾドンの2薬剤はコルヒチンとの併用によるPRRが有意であり、併用時の死亡シグナルが検出されたが、他の阻害剤については見出されなかった。国内にてクラリスロマイシンとの併用による死亡報告は発生していないが、国内では、コルヒチンの使用方法が欧米とは異なり、発作の早期に少量用いる方法が一般的であるためと考えられた。しかし、医薬品の安全性確保の観点から、今回のFDA通知を受け、P-gp及びCYP3A4阻害を有する薬剤との併用による薬物間相互作用の懸念について、添付文書改訂等により、現在得られている安全性情報、併用時

の臨床薬物動態データを追記し、注意喚起を行うべきであると考えられる。

C-9 海外規制機関の副作用データの解析と評価

医薬品は、市販後に数多くの患者に使用され、あるいは長期間の使用によって初めて現れる有害反応がある。また、海外では我国より新薬の承認が先行する場合も多い。さらに、近年海外の規制機関は市販後医薬品の安全性監視・対策を強化していることから、海外規制機関の発信する安全性情報は我国における医薬品の安全性確保にとっても極めて重要であると考えられる。ここでは、海外規制機関の副作用データの解析と評価として、2009年の海外からの医薬品安全性情報とその根拠となったエビデンスについて検討した。

1) 抗てんかん薬による自殺傾向のリスク

FDAは抗てんかん薬による自殺傾向のリスクについて解析するために製薬会社に無作為化比較試験(RCT)のデータの提出を要請し、得られた患者ごとのデータを用いて11種類の抗てんかん薬に関する199のRCT(総患者数43,892人)の統合解析を行った。その結果、抗てんかん薬投与群での自殺傾向のリスクはプラセボ群よりも約1.8倍有意に高いことが示された。このリスクは、抗てんかん薬使用患者530人につき自殺傾向の症例が約1人増加することに相当する。FDAは対策として、製造業者に対して添付文書の改訂と、Risk Evaluation and Mitigation Strategy(REMS, リスク評価・軽減対策)の一環としてのMedication Guide(患者向け医薬品ガイド)の作成を要請している。FDAの本解析は信頼性の高いものであることから、日本、EUなどでもこのエビデンスを根拠にして添付文書が改訂された。

2) 抗てんかん薬 valproate 使用に伴う先天性異常のリスク

複数の規制機関から、英国、オーストラリア、北米などの抗てんかん薬使用妊婦登録のデータを主な根拠にして、出生児の先天性奇形のリスクに関する警告情報が出された。これら妊婦登録の研究によると、妊娠第1三半期におけるバルプロ酸の高用量(1日1,100mg以上)での使用でリスクが高い。妊婦登録研究やコホート研究からの59試験の試験を統合したMeadorらの解析でも同様のリスクが示されている。対策として、医療従事者には患者に対する十分な情報提供を行うこと、患者には抗てんかん薬使用妊婦登録への登録すること等が推奨されている。FDAは製薬会社に対しMedication Guideの作成も要求している。

3) TNF阻害薬による小児悪性腫瘍のリスクおよび

セフェム系抗菌薬 cefepime と死亡率上昇の懸念

TNF 阻害薬使用に伴う小児悪性腫瘍のリスクが懸念されたことから、FDA では製薬会社からのデータ及び ARES を用いた解析を行ない、同薬の使用に伴う小児悪性腫瘍 48 症例を特定した。TNF 阻害薬 infliximab 及び etanercept 使用者でリンパ腫などの報告率が背景報告率より高いことがわかり、添付文書および Medication Guide の改訂を要求した。一方、セフェム系抗菌薬 cefepime では、cefepime と死亡率上昇が関連するという統合解析が学術雑誌に発表されたことから、FDA は製薬会社に追加データの提供を要請して独自に統合解析を行った(患者レベルの統合解析を含む)。その結果、統計的な有意差は見られず、cefepime は承認適応に対する適切な治療法であるという安全性情報が出されている。

4) FDA の最近の安全対策 REMS

2007 年の FDA 改革法によって、特定の医薬品の安全性確保に REMS が必要であると FDA が判断した場合には、製薬会社に対して REMS の策定を要求する権限が FDA に認められた。REMS によって実施される安全対策の項目には、①Medication Guide (患者向け医薬品ガイドの確実な配布)、②Communication plan (医療従事者に対する確実な情報伝達)、③Elements to Assure Safe Use (安全性確保のための項目)、④Implementation System (REMS を実施するためのシステム)、⑤Timetable (REMS が実施されているかを評価するタイムテーブル)がある。これまで承認された REMS は Timetable と Medication Guide だけのものが多いが、死亡や癌の進行のリスクのあるエリスロポエチン製剤(癌患者での貧血への適応に関して)や、視力障害のリスクが高い抗てんかん薬 vigabatrin に関しては、全ての項目を含む REMS が策定されて、承認され、それぞれ、ESA APPROSE Oncology Program, SHARE Program を通じて安全性の確保が図られている。

このような最近の海外の安全性情報や安全性確保の取り組みは、我国の医薬品の安全性対策にとっても有用であると考えられた。

C-10 抗 HIV 薬の腎関係イベントの解析

抗 HIV 多剤併用療法(1成分であるフマル酸テノホビル ジソプロキシル(TDF 製剤))を対象として、腎関係イベント及びイベント報告症例の特徴を AERS データを用いて解析した。TDF 製剤は、核酸系逆転写酵素阻害剤(NRTI)であり、尿細管への能動輸送により腎排泄される。副作用として、急性腎不全や重度の腎機能障害等の腎関係の副作用が知られているが、シグナルとなったイベン

トを PRR 順、報告頻度順のどちらで見ても本成分の特徴である腎関係のイベントが上位を占めていた。シグナルのうち PRR の高いものは、TDF 製剤特有のイベントであると考えられるが、HIV 感染症治療は多剤併用療法(HAART)であることから、TDF 製剤を含む HAART に特徴的なイベントであるとも解釈できる。NRTI はミトコンドリア毒性を有すると考えられているが、そのなかでも TDF 製剤はミトコンドリア毒性が低いとのデータもある。ミトコンドリア毒性について併用抗 HIV 薬の影響を見るため、HIV 集団(45,091 例)と全集団(2,235,199 例)でそれぞれ PRR 値を求めた。ミトコンドリア毒性の PRR は、全集団で 75.46、HIV 集団で 2.06 であり、HIV 集団では非常に低値であった。全集団と HIV 集団の双方で PRR を求めた場合、HIV 集団でも PRR が高いイベントは、HAART の影響が除かれた TDF 製剤特徴的なイベントである可能性が考えられる。腎尿細管障害(ファンコニー症候群など)が TDF 製剤の副作用として知られているが、HIV 集団における PRR 値は、ファンコニー症候群で 100.03(168 例)、腎尿細管障害で 21.80(119 例)であり、全集団で高い PRR 値を示した。これらイベントは HIV 集団でも高値であった。以上の結果は、多剤併用療法が行われる対象疾患の分析の際には、特徴的なシグナルであるか否かを判断する際には、特定した患者集団での分析が有用と考えられた。

報告されたイベントと合併症(併用薬剤の使用理由)の関係を調べたところ、腎関係のイベント(MedDRA/J の腎および尿路障害 SOC で集計)が報告されている症例は「糖尿病」の合併が多かった。TDF 製剤投与症例 8236 例中、糖尿病の合併「有」97 例(平均年齢 52 歳)、糖尿病の合併「無」8139 例(平均年齢 43 歳)でそれぞれ腎関係のイベント報告数は、50 例(52%)、1657 例(20%)であり、糖尿病の合併「有」の方が「無」に比べて腎イベントの報告割合が高かった(オッズ比 4.16、95%CI 2.78-6.22)。

糖尿病合併の有無別で報告されている腎イベントを比較するため、腎関係のイベントのオッズ比を求めたところ、個々のイベントで見るときには、糖尿病「有」のオッズ比がほとんどのイベントで高く、糖尿病の合併の影響は個々の報告イベントからは識別することができなかった。そこで、糖尿病に起因する腎イベント(糸球体系の障害)と TDF 製剤に起因する腎イベント(尿細管系の障害)をグループ化し、それぞれについてオッズ比を求めた。その結果、糖尿病に起因する腎イベントで特徴的な糸球体系の障害が糖尿病「有」で高かった(オッズ比 16.96、95%CI : 6.37~45.14)。

また、TDF 製剤特徴的な尿細管障害系のイベントは糖尿病「有」でやや高い程度であった（オッズ比 4.68、95%CI：3.07～7.15）。このことは糖尿病に特徴的なイベントに関しては、糖尿病合併の影響が見られていると考えられた。

以上、AERS のような大規模な安全性データベースを解析し、安全性情報を積極的に活用していくことは医薬品の安全性確保において有用であると考えられた。

C-11 HAART 療法としての抗 HIV 治療薬併用の統計解析

AERS データは、1997Q4～2008Q2 の CASE の重複を削除したデータ（約 207 万症例）を対象とし、注目した薬剤はヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NRTI）から Didanosine, Zalcitabine、Lamivudine、Stavudine の 4 剤、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤（NNRTI）から EFAVIRENZA の 1 剤、プロテアーゼ阻害剤（PI）から Indinavir、Saquinavir、Nelfinavir の 3 剤、合計 8 剤とした。乳酸アシドーシスと後天性リポジストロフィーについて、stepwise（変数増減）法によりモデルを決定した。報告数が 3 例以下のプロファイルは解析対象から除外した。

推定された回帰係数のモデルの当てはまりを Deviance と Pearson の統計量を用いて回帰診断を行った結果、Deviance、Pearson の両統計量は共に 1 を大きく超える値を示し、Overdispersion（過分散）が起きていた。そこで、疑似尤度にもとづく Overdispersion に対する調整を実施した。調整方法は、ロジスティック回帰における回帰係数が有意であるかを検定する際に使用される Wald 検定を利用し、回帰係数の有意性の検定を行った。Overdispersion の調整に用いた Wald 統計量を以下に示した。

$$\chi^2 = \left(\frac{\hat{\beta}_i}{\sqrt{\phi \cdot SE(\hat{\beta}_i)}} \right)^2$$

ϕ の推定値として、Pearson 統計量の値を自由度で割った値を用いた。Overdispersion の調整を行った結果、Overdispersion の調整を行っていない結果と比較して、ロジスティック回帰の各回帰係数の標準誤差が大きくなり、それに伴い p 値も大きくなった。

乳酸アシドーシスについてのロジスティック回帰では、Stavudine、Didanosine、Lamivudine の推定値が他の薬剤の推定値と比べて高く、乳酸アシドーシスの報告率に関連すると考えられた。また、後天性リポジストロフィーのロジスティック回帰では、Indinavir、Nelfinavir、Stavudine

の推定値が他の薬剤の推定値と比べて高くなっていた。これらの結果は、「抗 HIV 治療ガイドライン（2009 年 3 月）」で指摘されている内容と一致した。また、AERS データのような各セルの報告件数の大きな 2 値データの解析は、Overdispersion の問題を含み、Overdispersion の解決は AERS のような大規模データの解析においては本質的な問題である。また、AERS データでは、大きなアンバランスデータとなる。ここでは、これらの問題に対して、疑似尤度に基づく Overdispersion の調整を検討したが、大規模データの解析においてこれらの問題は本質的な問題である。今後ベイズ的アプローチ等を検討する必要がある。

C-12 カナダにおけるファーマコヴィジランス—自発報告システムと医療データベース

カナダは、有害反応報告の蓄積や大規模コホート研究による豊富な医薬品安全性情報を有し、近年は積極的な安全性対策を行っている。その具体的状況を明らかにするため、最近 10 年間のカナダでの医薬品安全性対策について、カナダ保健省（Health Canada）の取り組みと州医療データベース（DB）の活用を 2 点から検討した。

1) カナダ保健省の取り組み・有害反応報告の制度改善とその結果

カナダ保健省は、安全性情報伝達の徹底を目指して 2005 年にオンラインサイトの MedEffect を開設した。当サイトからは有害反応報告に関する説明や、Health Canada からの警告・注意喚起通知などの安全性情報を網羅的に入手できる。また、Canada Vigilance Program の下に有害反応制度の改善を開始した。2005 年以降オンラインでの有害反応報告のページが整備され、医療従事者や患者自身が直接報告できるシステムとなった。さらに保健省は、効果的な報告収集などを目的として地域センターを増設して計 7 か所となり、各地域の医師や患者が近くのセンターに有害反応報告を行えるようになった。これらの取り組みの結果、カナダ国内の有害反応の総報告件数は、1999 年の 5,688 件に対し 2008 年では 16,272 件と 10 年間で 3 倍近く増加した。

保健省は、主にこれらの収集された有害反応報告にもとづき多くの警告や注意喚起を行っており、安全性に関する情報伝達に関する最近の例としては、ボツリヌス毒素製剤の毒素拡散に対する警告がある。

2) 州医療 DB の活用・州医療 DB の概要と特徴

カナダには有害反応報告とは別の情報源として、各州が医療保険制度などの行政管理を目的として作成維持している州医療データベース（DB）

があり、研究に活用されている。これらの州医療DBは百万人規模の住民が登録される大規模DBであり、住民の出生、異動、死亡を随時反映させた最新データとなっている。基本的なDBは処方薬給付DB、病院サービスDB、医師サービスDBの3種類である。州医療DBは、大規模であること、住民識別番号（HSN）を用いて個々のDBをリンクできることなどの長所があり、サンプル数の少ない臨床試験とは異なり実際的な研究結果が得られる可能性がある。これらのDBの短所は、保健行政管理を目的とするため、登録情報の範囲が限られていることである。代表的なDBとしてサスカチュワン州、オンタリオ州のDBがある。

安全性研究への州医療DBの最近の活用例としては、高齢の糖尿病患者でのチアゾリジン系薬の使用と心血管系事象の関連を、オンタリオ州DBを用いて検討した後ろ向きコホート内症例対照研究（2007年）や、同じオンタリオ州DBを用いたGillらの認知症高齢者に関する研究（2007年）がある。後者では、認知症高齢者への抗精神病薬使用で死亡リスクの有意な上昇が示され、この知見から各国規制機関による抗精神病薬の添付文書改訂などの措置がとられた。

カナダでは、カナダ保健省によるCanada Vigilanceプログラムの他、各州に大規模な医療行政管理用のDBが存在し、DB間のリンクにより大規模かつ長期的な住民データが得られており、市販後医薬品の安全性研究に活用されている。また、これらの医療DBにもとづく実際的な研究は、各規制機関の安全性措置につながるエビデンスとして用いられている。我国でも、安全性対策のベースとなる有害反応報告のさらなる収集や医療DBの整備が望まれる。

D. まとめ

本研究では、FDAの大規模副作用報告データベースAERSを用いて、医薬品の安全性情報を解析した。本研究で示したように、グローバルに収集された大規模副作用データの解析は、個別の医薬品の有害事象の検出のみならず、併用による有害事象の検出、高齢者や新生児などのリスク集団の検討、適応に特徴的な有害事象など医薬品の安全性を考える上で多くの重要な知見を得ることができる。これらの知見はグローバルに集められた大規模データ330万件の威力であると共に大規模データ解析の重要性を示していると言える。しかし、一方でAERSが自発報告であるため、ここで示した結果はあくまで安全性のシグナルであり、個別の事象については安全性のさらなる科学的検討が必要であることに留意する必要がある。

以上、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、世界の医療現場での医薬品の

安全性の実際を知る上で極めて重要であり、臨床現場での医薬品の安全性確保に大きな役割を果たすと考えられる。今後の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症例データの積極的な活用と科学的な考察が必要であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 天沼喜美子, 森川 馨: 2008年の「医薬品安全性情報」から一免疫抑制薬使用に伴う感染症のリスクについて一, *The Japanese Journal of Antibiotics*, 62(5), 460-470 (2009)
- 2) 天沼喜美子, 森川 馨: 海外の医薬品安全性情報の入手と活用, *月刊薬事*, 52(1) 55-61 (2010)

2. 学会発表

- 1) 森川 馨, 牧内隆司, 長嶺敬彦, 天沼喜美子. 大規模副作用症例データベースAERSを用いた抗うつ薬、抗認知症薬、ADHD治療薬及びlithiumの安全性情報の解析. 日本薬学会第130年会(2010)
- 2) 森川 馨, 石田和也, 牧内隆司, 佐藤耕一. AERSを用いたHAART療法としての抗HIV薬併用データの解析. 日本薬学会第130年会(2010)
- 3) 牧内隆司, 長嶺敬彦, 森川 馨. AERSを用いた抗てんかん薬における医薬品安全性情報の解析. 日本薬学会第130年会(2010)
- 4) 芦澤 広, 菊池明男, 森川 馨. 抗HIV薬の腎関係イベントの解析. 日本薬学会第130年会(2010)
- 5) 道廣幸三, 宇田恒信, 森川 馨. FDA大規模副作用データベース(AERS)を用いた医薬品安全監視の検討. 日本薬学会第130年会(2010)
- 6) 高見廣行, 松倉竹雄, 森川 馨. AERSによる内分泌領域で使用されている薬剤で発現した副作用の検討. 日本薬学会第130年会(2010)
- 7) 天沼喜美子, 小嶋 靖, 太田有子, 大塚 文, 前田初代, 森川 馨. 向精神薬に関する海外の安全性情報. 日本薬学会第130年会(2010)
- 8) 吉川剛兆, 深野木信一, 小林典弘, 長谷川貴大, 森川 馨. AERSを利用した医薬品の安全対策一コルヒチンを例にして一. 日本薬学会第130年会(2010)

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

研究機関 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

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

神経系疾患治療薬の開発過程においては、評価手法開発と病態・発症メカニズム解明とが相乗的に展開している。このような状況下で産業界の自主努力に頼るだけでは研究開発を進めることは難しく、官民の研究資源を用いて独創的な医薬品創製技術開発を行う必要がある。我々はその先鋒を行くべく、グリア細胞を創薬標的とする『グリア創薬』に着手した。近年、多くの神経系疾患がグリア細胞の機能変調に関連していることが明らかとなったが、これまでにグリア細胞が創薬標的とされた例はほとんどない。これはグリア細胞が極めて性質を変化させやすい細胞であり、従来の評価系を適用できないからである。本研究班は、「各種病態時のグリア細胞特性を精査し病態との関連性を明らかとし、病態時のグリア細胞を標的とした医薬品評価及び開発方法の基盤を確立する」ことを目的とする。

B. 研究方法 国内患者数が多く、かつ罹患期間の長い「神経因性疼痛」「虚血障害」「気分障害」を評価系開発の端緒とした。

B-1. 神経因性疼痛におけるグリア創薬(井上) 神経因性疼痛動物モデルである DRG ニューロン直接損傷モデルを用いて、神経因性疼痛における病態マイクログリアの性質について詳細に検討した。ラット初代培養マイクログリアを用いてマイクログリアの制御機構を分子レベルで検討した。ここで見いだしたグリア因子に関しては上記動物モデルで実効性を確認した

B-2. 虚血障害におけるグリア創薬

アストロサイト(加藤) ニューロンのアストロサイト由来エネルギー依存性を検討するために、ラット延髄孤束核あるいは海馬急性脳ライスを用いてニューロン間の興奮性および抑制性シナプス伝達を記録し評価した。

マイクログリア(南) 新生仔ラット脳スライス培養を行った。虚血によるダメージは NMDA 処置により再現し、マイクログリアの挙動を検討した。マイクログリアの直接的関与を

検討するためにクロドロン酸でマイクログリアを除去した。

B-3. 気分障害におけるグリア創薬

アストロサイト(小泉) 抗うつ薬の薬効におけるアストロサイトの寄与、そのメカニズムを明らかにすることによりグリア創薬標的を検討した。選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)を初代培養アストロサイトに適用し脳由来神経栄養因子(BDNF)産生を定量した。また、細胞内カルシウム濃度を測定した。

マイクログリア(佐藤) マイクログリアと神経新生との関連について検討した。新生仔ラットにおいて神経新生、グリア新生が活発な脳室下帯(SVZ)を中心に、マイクログリアを観察した。ミノサイクリンが細胞増殖、ニューロン・グリア分化に及ぼす影響について検討した。上記検討を行ったラットの SVZ 画分中サイトカイン濃度を調べた。

B-4. グリア活性化制御因子の高速・高感度トポロジー解析(鳥光) グリア関連因子トポロジーを解析する事により、それら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確立を試みた。高速原子間力顕微鏡(AFM)一分子イメージングを行い、標的グリア因子の構造変化と機能の関連について検討した。受容体の細胞膜上挙動や機能に影響を与える細胞膜脂質構成を人工的に変動させた場合の分子挙動についても検討した。(倫理面への配慮)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、「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」(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

C-1. 神経因性疼痛におけるグリア創薬 神経因性疼痛は広範な病気に付随して引き起こされる難治性の痛みであるが、有効な薬物療法は確立されていない。我々は DRG ニューロン直接損傷モデルにおいて脊髄マイクログリアが活性化し P2X4 受容体発現を亢進していることを見いだした。P2X4 受容体を阻害することが神経因性疼痛を抑制することがわかった。P2X4 受容体発現はレチノイン酸、IFN γ により制御できることを明らかにした。脊髄後角ニューロンおよびアストロサイトから放出される PDGF が、マイクログリアに作用しアロディニア発症契機となることを明らかとした。その他の神経因性疼痛モデルにおいて ERK アンタゴニストが有効であることを明らかにした。神経因性疼痛においてはマイクログリア活性化制御が治療効果をもたらすことが明らかとなった。

C-2. 虚血障害におけるグリア創薬

アストロサイト 脳虚血(低血糖)・低酸素に対するニュー

ーロンの脆弱性は、神経細胞において嫌気的条件下での ATP 産生能がないことに起因している。そこで、アストロサイトから神経細胞への乳酸を介したエネルギー供与が、シナプス伝達において担う役割の解明を試みた。我々は、神経細胞の正常なシナプス伝達の維持に必要なエネルギーの大部分が、モノカルボン酸トランスポーター (MCT) によるアストロサイトからの乳酸輸送に依存すること、グルコース除去によって引き起こされるシナプス伝達抑制を乳酸が MCT 依存的にレスキューしていることを明らかにした。MCT 由来エネルギーへの依存度に部位差があることを示すデータも得た。

ミクログリア 海馬スライス培養系を用いて、「虚血時ミクログリア動態 *in vitro* 評価実験系」を確立し、ミクログリアの挙動と分子標的との同時検討を可能にした。本モデルを用いて、障害を受けた神経細胞にミクログリアが引き寄せられ、MIP-1 α を発現するという、一連の挙動を明らかにした。p38 MAPキナーゼの活性化はミクログリアによる傷害細胞の貪食において重要な役割を果たすこと、また傷害部位集積には関与しないことも示唆された。

C-3. 気分障害におけるグリア創薬

アストロサイト SSRI がアストロサイト NTPDases 阻害→アストロサイト周囲 ATP 上昇→P2Y 受容体→CaMK 活性化→CREB 活性化→BDNF 産生というアストロサイトを介した新たな抗うつ効果作用機序を見いだした。

ミクログリア 気分障害においてニューロン新生と治療効果との関連が注目されている。生誕直後の脳室下帯 (SVZ) では神経新生が非常に活発に起こっている。我々は、SVZ に一過的に活性化ミクログリアが集積し、細胞分裂を促進し、神経幹細胞からニューロン・オリゴデンドロサイト分化を促進していることを発見した (neurogenic microglia)。また、この作用に活性化ミクログリアから分泌される IL-1 β , TNF α が関与していることを明らかにした。

C-4. グリア活性化制御因子の高速・高感度トポロジー解析

ミクログリア活性化制御因子 P2X4 受容体を標的とした創薬を考慮し AFM 一分子イメージングを試みた。P2X4 受容体の Ca²⁺ 流入を伴う構造変化、開口チャンネルのポア散大のイメージングに成功した。また、P2X4 単一イオンチャンネル機能測定系の構築に成功した。グリア因子には多くの GPCR も含まれる。P2Y₁ 及び GABA_B 受容体のイメージングにも成功した。細胞膜脂質ラフト・受容体相互作用 に注目し、固定基盤上でのラフト、カベオラ状ドメインの再現に成功した。

D. 考察

D-1. 神経因性疼痛におけるグリア創薬

神経因性疼痛は病因によって異なる制御因子に着目する必要があることが明らかとなった。脊髄ミクログリア活性化の程度が、神経因性疼痛の重篤度評価、薬効評価の基準となることが期待される。

D-2. 虚血障害におけるグリア創薬

近年、神経変性疾患モデル動物において MCT の過剰発現が平均寿命を飛躍的に延長したとする報告がある。MCT を介したアストロサイトからニューロンへのエネルギー供給が、虚血・代謝障害などにおけるエネルギー欠乏時のニューロンの生存維持に寄与する可能性が高い。本実験系を用いてグリア細胞の MCT 分子

の働きを特異的に促進・制御する薬物開発を行えば虚血障害の克服につながる事が期待される。「虚血時ミクログリア動態 *in vitro* 評価実験系」により虚血時病態ミクログリアの複雑な動態を細かく切り分けてよりベネフィットの高い創薬標的を選択することが可能になった。

D-3. 気分障害におけるグリア創薬

Fluoxetine は ATP/P2Y₁ 受容体シグナルを介してアストロサイトにおける BDNF 発現を亢進させること、またその分子メカニズムとして NTPDase 阻害作用が重要であることが明らかとなった。今後、ATP/P2Y₁ 受容体刺激から BDNF 産生に至る細胞内分子メカニズムの解明、*in vivo* におけるアストロサイト BDNF 発現亢進の確認、さらにアストロサイトの BDNF 発現と抗うつ効果との関連性を明らかにする必要がある。生後初期 SVZ に集積している活性化ミクログリアが産生する IL-1 β , TNF α が神経新生・オリゴデンドロサイト新生を誘導していることを明らかにした。また、その標的が比較的分化の進んだ神経前駆細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞であることが示唆された。ミクログリアを介した神経新生・オリゴデンドロサイト新生を促進しうつ病治療効果を得られる可能性がある。

D-4. グリア活性化制御因子の高速・高感度トポロジー解析

単一イオンチャンネルのトポロジーに対応する機能解析を行うため、単一イオンチャンネル測定系を構築した。GPCR P2Y₁ 及び GABA_B 受容体の可視化に成功した。今後アゴニストやアンタゴニストの効果を検証していく予定である。また、カベオラ状の脂質構造の可視化にも成功した。以上の検討によって確立した一分子イメージング系は活性化により劇的に性質を変えるグリア細胞の膜脂質変化を反映させた条件下で drug screening を行うことを可能にすることが期待される。

E. 結論

神経因性疼痛、虚血障害、気分障害において病態グリア細胞特性を精査して『グリア創薬』標的候補分子を見いだした。これらの実験系をもとに病態グリア細胞制御に特化した医薬品評価及び開発基盤を構築した。病態グリア特性を考慮した drug screening に資する一分子イメージング技術を確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ikeda R, Takahashi Y, Inoue K, Kato F. NMDA receptor-independent synaptic plasticity in the central amygdala in the rat model of neuropathic pain. *Pain*, 127 161-172 (2007)
- Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X(4) and P2Y(12) receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia*, 55 604-616 (2007)
- Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 446 1091-1095 (2007)
- Ikeda H, Tsuda M, Inoue K, Murase K. Long-term potentiation of neuronal excitation by neuron-glia interactions in the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci*, 25 1297-1306 (2007)
- Shinozaki Y, Sato Y, Koizumi S, Ohno Y, Nagao T, Inoue K. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience*, 147 153-63 (2007)
- Tsuda M, Ishii S, Masuda T, Hasegawa S, Nakamura K, Nagata K, Yamashita T, Furue H, Tozaki-Saito H, Yoshimura M, Koizumi S, Shimizu T, Inoue K. Reduced pain behaviors and ERK activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. *J Neurochem*, 102 1658-1668 (2007)
- Tsuda M, Hasegawa S, Inoue K. P2X receptors-mediated cytosolic phospholipase A2 activation in primary afferent sensory neurons contributes to neuropathic pain. *J Neurochem*, 103 1408-1416 (2007)
- Tsuda M, Tozaki-Saito H, Masuda T, Toyomitsu E, Tezuka T, Yamamoto T, Inoue K. Lyn tyrosine kinase is required for P2X(4) receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*, 56 50-58 (2008)
- Inoue K, Koizumi S, Tsuda M. The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem*, 102 1447-1458 (2007)
- 工藤佳久, 小泉修二, 和田圭司, 橋本謙二, グリア細胞を標的とする医薬品の創製. *日薬理誌*, 130 185-192 (2007)
- 小泉修二, 藤下加代子. アストロサイトを介したニューロン・アストロサイト相互調節. *Brain and*

Nerve. 56 707-715 (2007).

12. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K, Real-time single receptor/channel imaging of P2X₄ receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, under revision
19. Shinozaki Y, Siitonen 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. under revision
14. Furukawa K, Nakashima H, Kashimura Y, Torimitsu K, Novel "Lipid-Flow Chip" Configuration to Determine Donor-to-Acceptor Ratio-Dependent Fluorescence Resonance Energy Transfer Efficiency. Langmuir, 24 921-926 (2008)
15. Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K, β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. Brain Res, 1150 108-120 (2007)
16. Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)
17. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Masuda T, Toyomitsu E, Tezuka T, Yamamoto T, Inoue K, Lyn tyrosine kinase is required for P2X₄ receptor upregulation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. Glia, 56 50-58 (2008)
18. 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)
19. 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 P2X₄ receptor upregulation in the spinal cord and neuropathic pain after nerve injury. Glia, 56 579-85 (2008)
20. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K, P2Y₁₂ receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. J Neurosci, 28 4949-56 (2008)
21. Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, P2Y₁ receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. Glia, 57 244-257 (2009)
22. 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)
23. 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)
24. 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)
25. 小泉修一, 井上和秀, ニューロン・ミクログリア相互作用. BioClinica, 23 97-102 (2008)
26. Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. J Pharmacol Sci, 107, 226-230 (2008)
27. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K, Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X₄ receptors. PLoS Biol. in press
28. Shinozaki Y, Siitonen 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)
29. 島光慶一, 篠崎陽一, 河西奈保子, 住友弘二, 単一分子レベルでのた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)
30. Tsuda M, Kuboyama K, Inoue T, Nagata K, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X₄ receptors in acute and chronic pain assays. Mol Pain 5:28 (2009)
31. Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Inoue K, Activation of P2X₇ receptors induces CCL3 production in microglial cells through transcription factor NFAT. J Neurochem., 108 115-25 (2009)
32. Tsuda M, Toyomitsu E, Kometsu M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, *equally contributed. Mechanisms underlying fibronectin-induced upregulation of P2X_{4R} expression in microglia: distinct roles of PI3K-Akt and MEK-ERK signaling pathways. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2009 Feb 27. [Epub ahead of print]
33. Tsuda M, Masuda T, Kitano J, Shimoyama H, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, *equally contributed. IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. Pro.Natl.Acad.Sci.USA., 106 8032-8037 (2009)
34. Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, *equally contributed. Antidepressants inhibit P2X₄ receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. Mol Pain. 5:20 (2009)
35. Hasegawa S, Kohro Y, Tsuda M, Inoue K, Activation of cytosolic phospholipase A2 in dorsal root ganglion neurons by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II after peripheral nerve injury. Mol Pain. 5:22 (2009)
36. Masuda T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Intrathecal delivery of PDGF produces tactile allodynia through its receptors in spinal microglia. Mol Pain. 5:23 (2009)
37. Mochizuki T, Takabe T, Arai K, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tomimaga M, The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. J. Biol. Chem., 284 21257-21264 (2009)
38. Fujishita K, Ozawa T, Shibata K, Tanabe S, Sato Y, Hisamoto M, Okuda T, Koizumi S, Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes, reveals its neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. Cell. Mol. Neurobiol., 29 1121-1129 (2009).
39. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K, Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X₄ receptors. PLoS Biology 7 e103 (2009)
40. Koizumi S, Synchronized Ca²⁺ oscillations in astrocytes. FEBS J. (in press)
41. 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)
42. Takahashi K, Ishii-Nowara R, Takeuchi K, Nakazawa K, Sato K, Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through different mechanisms. J. Pharmacol. Sci., 112, 113-117 (2010)
43. 河西奈保子, Chandra S, Ramanujan, 篠崎陽一, 住友弘二, John F. Ryan, 島光慶一, 受容体タンパク質の単一分子観察. 化学とバイオ・ナノシステム研究会誌 8 巻, 1号, 1-6 (2009)
44. 篠崎陽一, 住友弘二, 津田誠, 小泉修一, 井上和秀, 島光慶一, 高速原子間力顕微鏡を用いた受容体の単一分子イメージング. 日本薬理学会誌, 第 134 巻, 第 8 号, 68-72 (2009)

2. 学会発表

1. Inoue K, UDP, P2Y6 and microglial phagocytosis. Gordon Research Conference "Apoptotic Cell Recognition & Clearance". Invited, (2007. 6, Lewiston, USA)
2. Inoue K, Tsuda M, Saito-Tozaki H, ATP receptor-dependent neuropathic pain: a mechanism of the modulation of pain sensation. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Invited, (2007. 7, Melbourne, Australia)
3. Inoue K, Microglial-dependent neuropathic pain: involvement of ATP receptors. 21st Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, invited, (2007. 8, Cancun, Mexico)
4. Inoue K, Microglial modulation of pain signaling. Neuro2007, invited, (2007. 9, Yokohama)
5. Ohsawa K, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, Kohsaka S, Molecular mechanisms of ATP-induced microglial chemotaxis. Neuro2007, invited, (2007. 9, Yokohama)
6. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M,

7. Kohsaka S, Inoue K, UDP, a novel mediator of microglial phagocytosis. Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
8. Yamada J, Hayashi Y, Inoue K, Kohsaka S, Nakanishi H, Inhibition of synaptic transmission precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
9. Masuda T, Tsuda M, Inoue K, Minocycline attenuates spinal microglia activation and tactile allodynia caused by interferon- γ . Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
10. Kataoka A, Tsuda M, Inoue K, Involvement of NFAT in chemokine release from microglia induced by ATP. Neuro2007, (2007. 9, Yokohama)
11. Inoue K, Modification of pain sensation through microglial ATP receptors. Second Joint Italian-German Purine Club Meeting, invited, (2007. 9, Leipzig, Germany)
12. Inoue K, Up-regulation of microglial P2X₄ receptors in neuropathic pain state. APSN symposium on "Glial Activation and Function" Dalian, P.R. of China 2007, invited, (2007. 10, Dalian, China)
13. Tsuda M, Masuda T, Tezuka T, Kitano J, Yamamoto T, Inoue K, Src-family tyrosine kinase Lyn in microglia contributes to neuropathic pain after peripheral nerve injury. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
14. Masuda T, Tsuda M, Shimoyama H, Inoue K, Intrathecal administration of interferon- γ produces spinal microglia activation and long-lasting tactile allodynia. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
15. Fujita T, Tsuda M, Inoue K, Role of purinergic signaling in IL-6 release from cultured rat hippocampal astrocytes. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
16. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Joshi BV, Jacobson KA, Kohsaka S, Inoue K, UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
17. 井上和秀, 神経損傷による痛みの発症メカニズム: ミクログリアが感覚情報のモダリティシフトを生む. 第12回グリア研究会, 特別講演, (2007年11月, 名古屋市)
18. 長谷川奈海, 井村泰子, 加藤修夫, ATP 受容体を介したアストロサイト-ニューロン連関機構の薬理的解析. 第1回先端分子薬理学研究会(2007年11月, 東京)
19. 長谷川奈海, 井村泰子, 加藤修夫, ラット脳東核 P2Y₁ 受容体活性化グルタミン酸放出促進におけるアストロサイト ATP 放出の関与. 第81回日本薬理学会年会(2008年3月, 横浜)
20. 加藤修夫, 長谷川奈海, 和光未加, 井村泰子, アストロサイト放出ヌクレオチドによるダイナミックなシナプス伝達制御. 第81回日本薬理学会年会(2008年3月, 横浜)
21. 片山貴博, 岡村敏行, 大日方千枝, 上原孝, 南雅文, Neuronal injury induces the expression of multiple chemokines in astrocytes and microglia in organotypic cortico-striatal slice cultures. Neuro2007 (2007. 9, Yokohama)
22. 岡村敏行, 片山貴博, 松田知己, 永井健治, 木村宏, 内野茂夫, 高坂新一, 南雅文, Real time imaging study on injury-induced microglial activation in the hippocampal slice culture. Neuro2007 (2007. 9, Yokohama)
23. Minami M, Katayama T, Ohinata C, Okamura T, Uehara T, Excitotoxic injury induces macrophage inflammatory protein-1 α in rat cortico-striatal slice cultures. 37th annual meeting Society for Neuroscience, (2007. 11, San Diego, USA)
24. 小泉修一, 重本由香里, 多田薫, 篠崎陽一, 大澤圭子, 津田誠, 高坂新一, 井上和秀, 中枢神経傷害時の細胞外ヌクレオチドとミクログリアの食食作用(シンポジウム), GPCR 研究会(2007年5月, 東京)
25. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Jacobson K, Kohsaka S, Inoue K, Microglial phagocytosis mediated by P2Y6 receptors. The 2nd Joint Italian-German Purine Club Meeting, (2007. 9, Leipzig, Germany)
26. 小泉修一, 最新の脳グリア細胞研究について. 第1回山梨県CRPS研究会, (2007年11月, 山梨)
27. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Jacobson K, Kohsaka S, Inoue K, The "eat-me signal UDP" and microglial phagocytosis. (シンポジウム) 第 81 回日本薬理学会, (2008年3月, 横浜)
28. Fujishita K, Inoue K, Koizumi S, Upregulation of M1 muscarinic acetylcholine receptor in hippocampal neurons by astrocytic ATP. 第81回日本薬理学会, (2008年3月, 横浜)
29. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, Jacobson K, Kohsaka S, Inoue K, The "eat-me signal UDP" and microglial phagocytosis mediated by P2Y6 receptors. US-Japan joint meeting for glia research, (2008. 3, Philadelphia, USA)
30. Furukawa K, Nakashima H, Kashimura Y, Torimitsu K, Selp -Spreading Supported Lipid Bilayer on Patterned Surface: Basic Properties and "Lipid-Flow Chip" Application 1st International Symposium of Nanomedicine, (2007. 4, Aichi, Japan)
31. Torimitsu K, Functional analysis of neurons and receptor proteins for device application, 1st International Symposium of Nanomedicine, (2007. 4, Aichi, Japan)
32. 篠崎陽一, 住友弘二, 島光慶一, GABA_A受容体サブユニット構造の原子間力顕微鏡を用いた解析. 第81回日本薬理学会年会(2008年3月, 神奈川県)
33. 篠崎陽一, 住友弘二, 津田誠, 小泉修一, 井上和秀, 島光慶一, 原子間力顕微鏡を用いた P2X₄ 受容体の単一分子イメージング. ATP・アドノン研究会(2007年9月, 愛知)
34. Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, hGFAP プロモーター下流に DsRed をもつレンチウイルスを用いたアストロサイト特異的標識法の確立. Neuro2007 (2007. 9, Yokohama)
35. Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, Astrocyte-specific labeling with a recombinant lentiviral vector carrying DsRed protein driven by a human glial fibrillary acidic protein promoter. 2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2007. 10, San Diego, USA)
36. 佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤藤一, タモキシフェンと類似化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用. 第81回日本薬理学会年会(2008年3月, 横浜)
37. Sato K, Matsuki N, Nakazawa K, Estrogens inhibit L-glutamate uptake by astrocytes by membrane estrogen receptor alpha. US-Japan joint meeting for glia research (2008. 3, Philadelphia, USA)
38. 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)
39. Inoue K, Modal shift of sensation through P2X₄ molecules expressed in microglia involving in neuropathic pain. International Symposium for Membrane Interface, (2008. 1, Fukuoka)
40. 井上和秀, 神経因性疼痛発症におけるミクログリアと ATP 受容体の役割. 第1回熊本創薬シンポジウム, (2008. 2, 熊本)
41. 井上和秀, 神経因性疼痛発症におけるミクログリア・ATP 受容体の役割. 第22回崎崎痛みの研究会, (2008. 3, 宮崎)
42. 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)
43. 小泉修一, 最上由香里, 多田薫, 篠崎陽一, 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 とシグナルの食食作用. 第81回日本薬理学会年会 シンポジウム 招待, (2008. 3, 横浜)
44. 増田隆博, 津田誠, 井上和秀, 神経損傷によるミクログリア活性化と神経因性疼痛における IFN- α の役割. 第81回日本薬理学会年会, (2008. 3, 横浜)
45. 長谷川茂雄, 津田誠, 石井聡, 清水孝雄, 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)
46. 岡崎希, 津田誠, 齊藤秀俊, 井上和秀, ファブロンクチンによるミクログリア P2X₄ 受容体のラフマイドメインへの移行. 第81回日本薬理学会年会, (2008. 3, 横浜)
47. 小松孝行, 津田誠, 山本希美子, 安藤謙二, 井上和秀, 神経因性疼痛発症過程における骨髄フィブロブラスチンの役割. 第81回日本薬理学会年会, (2008. 3, 横浜)
48. 久保山和哉, 津田誠, 筒井正人, 豊平由美子, 齊藤秀俊, 下川宏明, 柳原延章, 井上和秀,

- Triply-NOS 欠損マウスでの神経因性疼痛の緩和とミ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)
48. 豊満笑加, 津田誠, 米谷美穂, 齊藤秀俊, 井上和秀, フィブロンectinによるミクログリア P2X4 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)
49. 齊藤秀俊, 津田誠, 宮田広行, 井上和秀, 神経因性疼痛発症過程における P2Y12 受容体の関与 第 81 回日本薬理学会年会 (2008. 3, 横浜)
50. 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)
51. 片岡彩子, 齊藤秀俊, 古賀結衣, 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)
52. Inoue K, The regulation of expression of P2X4 on microglia and very slow modulation of synaptic transmission by P2X4. 第 85 回日本生理学会大会シンポジウム, 招待 (2008. 3, 東京)
53. Inoue K, Neurons talk with microglia through nucleotides. 7th Dutch Endo-Neuro-Psycho Meeting. Plenary lecture, invited, (2008. 6, Doorwerth)
54. Inoue K, Microglia listening to neurons through purinergic receptors. Purines 2008, Plenary lecture, invited, International Scientific Advisory Board. (2008. 6-7, Copenhagen)
55. 井上和秀, 神経因性疼痛でのミクログリアと ATP 受容体の役割 日本ベインクリニック学会第 42 回大会, 特別講演 (2008. 7, 福岡)
56. Inoue K, Glial neuronal interactions in neuropathic pain. NeuPSIG Satellite Symposium to the Glasgow 2008 World Congress on Pain. Invited, (2008. 8, London)
57. Inoue K, P2X4 molecules expressed in microglia involving in neuropathic pain. Organizer, Invited, (2008. 8, Glasgow)
58. 井上和秀, 痛み伝達における ATP 受容体の役割 第 19 回 霧島神経薬理フォーラム, 招待 (2008. 8, 湯布院)
59. 井上和秀, 難治性疼痛治療を目指したトランスレショナルリサーチ: エコファーマの実践, 生体機能と創薬シンポジウム 2008, 招待 (2008. 9, 東京)
60. Inoue K, Koizumi S, Tsuda M, P2Y6-evoked microglial phagocytosis. XI WORKSHOP ON APOPTOSIS IN BIOLOGY AND MEDICINE, (2008. 9, Sendai)
61. 永瀬裕志, 鈴木岳志, 加藤総夫, 孤東核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)
62. Koizumi S, Extracellular nucleotides regulate two different microglial functions, i.e., phagocytosis and chemotaxis. OIST symposium, (2008. 4, 沖縄)
63. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Tada-Nasu K, Shinozaki Y, Fujishita K, Ohsawa K, Tsuda M, Kohsaka S, Inoue K, Microglial nucleotide sensor P2Y6 receptors and brain functions. 第 31 回日本神経科学会, (2008. 7, 横浜)
64. 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)
65. 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)
66. 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)
67. Sato K, Saito Y, Oka J-I, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of Tamoxifen on L-glutamate transporter. Neuroscience 2008 (2008. 9, Tokyo)
68. 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. Neuroscience 2008 (2008. 11, Washington D.C., USA)
69. 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)
70. 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)
71. 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)
72. 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)
73. 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)
74. 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)
75. 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)
76. 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)
77. Torimitsu K, Development of Nanobio Interface using Neurons and Receptor Proteins, Asia-Pacific Symposium on Nanobionics (2008. 6, Wollongong, Australia)
78. 篠崎陽一, 住友弘二, 小泉修一, 津田誠, 井上和秀, 鳥光慶一, 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)
79. 篠崎陽一, 住友弘二, 鳥光慶一, 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)
80. 篠崎陽一, 住友弘二, 津田誠, 小泉修一, 井上和秀, 鳥光慶一, P2X4 受容体のポア開閉及びポア拡大に関連する構造変化の観察 第 13 回 ATP・アデニン研究会 (2008. 9, 愛知)
81. 住友弘二, 篠崎陽一, 高木大輔, 中島寛, 小林慶裕, 鳥光慶一, CNT ネットワーク上での膜タンパク質の AFM 観察 第 69 応用物理学会(秋季) (2008. 9, 愛知)
82. 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)
83. 津田誠, 井上和秀, ミクログリアと疼痛, 52 回日本神経化学学会大会・シンポジウム, (2009. 6 伊香保)
84. Koga Y, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, Possible involvement of VASP phosphorylation in the P2Y6 receptor-induced phagocytosis of microglia. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
85. Yano T, Tsuda M, Tsujikawa T, Kohro Y, Inoue K, Activation of JAK2/STAT3 signaling pathway in spinal cord astrocytes induces neuropathic pain after peripheral nerve injury. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
86. Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, The possible effect on surface membrane P2X4 receptor expression in microglia by inhibition of V-ATPase activity. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
87. Kuboyama K, Tsuda M, Naraki Y, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shinokawa H, Yanagihara N, Inoue K, Spinal microglial activation and tactile allodynia after nerve injury are regulated by nitric oxide synthase. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
88. Fujishita K, Nakao A, Inoue K, Koizumi S, Mechanism underlying upregulation of P2Y6 receptors in microglia in kainate-induced injury model. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
89. Kometani M, Matsumura Y, Nagata K, Tsuda M, Inoue K, Analgesic action of clomipramine and maprotiline via P2X4 receptor inhibition. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
90. Toyomitsu E, Tsuda M, Inoue K, Fibronectin increases P2X4R protein expression on the surface of microglial cells. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
91. Shimoyama H, Tsukamoto K, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, Mechanisms of remitting neuropathic pain by activation of CB2 receptors. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
92. Kohro Y, Hasegawa S, Tsuda M, Inoue K, Mechanisms underlying P2X receptor-dependent regulation of neuropathic pain through cPLA2 in DRG neurons: role of PAF receptor and proinflammatory cytokines. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
93. Shiratori M, Yoshitake M, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K, Mechanisms of ATP-induced CXCL2 production and release in mouse microglial cell line, BV2. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
94. Masuda T, Tsuda M, Inoue K, Interferon-gamma receptor signals are required for spinal microglia activation and neuropathic pain after peripheral nerve injury. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
95. Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Inoue K, P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, invited, (2009. 7, Fukuoka)
96. Masuda J, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Spinal microglia mediate PDGF-induced tactile allodynia in rats. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
97. Imai T, Nakata E, Kawasaki T, Sakuma S, Yamakawa T, Inoue K, P2X4 receptor-mediated anti-allodynic effect by paroxetine: drug discovery of P2X4 receptor antagonist. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
98. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K, Localization of P2X4 receptors in lipid raft-like structure of in vitro model of cell membrane. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, invited, (2009. 7, Fukuoka)
99. Nishida M, Ogushi M, Suda R, Nakaya M, Inoue K, Kurose H, Down-regulation of angiotensin type 1 receptor by purinergic P2Y2 receptor stimulation through S-nitrosylation of nuclear factor κ B (NF- κ B). Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
100. Nishida M, Sato Y, Nakaya M, Inoue K, Inoue R, Mori Y, Kurose H, Formation of P2Y2 receptor-TRPC5-eNOS signal complex defines ATP-stimulated anti-hypertrophic responses in rat neonatal cardiomyocytes. Fukuoka Purine 2009: International Symposium on Purinergic Signalling in New Strategy of Drug Discovery: a satellite symposium for the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7, Fukuoka)
101. 井上和秀, 津田誠, 脊髄ミクログリア活性化と神経因性疼痛. 第 31 回日本疼痛学会 (2009. 7, 名古屋)
102. Inoue K, Pain signalling through purinergic receptors of microglia. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7-8, Kyoto)
103. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Microglial purinceptors in the spinal cord and pathological pain. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7-8, Kyoto)
104. 井上和秀, ミクログリアと神経因性疼痛 第 7 回整形外科痛みを語る会 (2009. 7, 福岡)
105. Inoue K, Purinergic signaling in microglia in neuropathic pain. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN) 2009/APSN 2009, Plenary lecture, (2009. 8, Busan)
106. Inoue K, The function of microglia in neuropathic pain. 2009 European Glial Cell Meeting (Euroglia 2009), (2009. 9, Paris)
107. Kato E, From synapse to behavior: New technologies and integrated physiology, 36th International Congress of Physiological Sciences (2009. 7, Kyoto).
108. Kato E, Presynaptic P2X receptors as astrocyte-neuron interface, 36th International Congress of Physiological Sciences (2009. 7, Kyoto).
109. 永瀬裕志, 鈴木岳志, 加藤総夫, シナプス伝達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 32 回日本神経科学学会 (2009. 9, 名古屋)
110. Nagase M, Kato F, Dependence of synaptic activity on monocarboxylate transport in the nucleus of the solitary tract of the rat. 36th International Congress of Physiological Sciences (2009. 7, Kyoto).
111. Nagase M, Noguchi J, Suzuki T, Kato F, Functional role of monocarboxylate transporter in maintaining synaptic transmission in the presence of glucose supply in the nucleus of the solitary tract, Society for Neuroscience Annual Meeting (2009. 10, Chicago).
112. Takagi S, Yu K, Kato F, Electrophysiological characterization of synaptic responses to chemical anoxia in different cranial motor nuclei in juvenile rats. Society for Neuroscience Annual Meeting (2009. 10, Chicago).
113. 加藤総夫, 永瀬裕志, シナプス伝達維持におけるアストロサイト由来乳酸の役割 第 37 回自律神経生理研究会 (2009. 12, 東京)
114. 加藤総夫, 永瀬裕志, モノカルボン酸トランスポーターを介したアストロサイトによるシナプス伝達の維持, 第 130 回日本薬学会 (2010. 3, 岡山)
115. 小林連人, 片山貴博, 岡村敏行, 井手聡一郎, 上原孝, 南雅文, 培養海馬スライスを用いたミクログリアによる傷害細胞の貪食に関する研究, 第 60 回日本薬理学会北部会, (2009. 9, 富山)
116. 片山貴博, 小林連人, 岡村敏行, 井手聡一郎, 上原孝, 南雅文, 培養海馬スライスを用いたミクログリアによる傷害細胞の貪食に関する検討, 第 83 回日本薬理学会年会 (2010. 3, 大阪)

117. Koizumi S. Cell-to-cell communication mediated by extracellular nucleotides in the CNS. A lecture in commemoration of receiving prize "Japan Academy Medal" Fukuoka Purine 2009. (2009. 7, Fukuoka)
118. Koizumi S, Fujishita K, Nakao A, Inoue K. Neuron-microglia interaction mediated by multiple P2Y receptors. IUPS. (2009. 8, Kyoto)
119. 小泉修二, ニューロン-グリア連関—アストロサイトの情報発信メカニズムを中心として—, (2009. 11, 東京大学新領域, 柏市)
120. 小泉修二, ニューロン-グリア連関, 第 25 回脳機能分子研究会, (2009. 12, 京都市)
121. Koizumi S. Glia and diseases. Japan-France Frontier of Sciences. (2010. 1, France)
122. Ozawa T, Fujishita K, Shibata K, Koizumi S. Mechanisms underlying fluoxetine-induced BDNF expression in astrocytes. 第 83 回日本薬理学会, (2010. 3, Osaka)
123. 高橋華奈子, 中澤憲一, 野澤(石井)玲子, 大野泰雄, 竹内幸一, 佐藤 薫, 非ステロイド性抗炎症薬であるニフルミク酸、ジクロフェナクは、異なるメカニズムを介してアストロサイトグルタミン酸トランスポーター-EAAT1/GLAST 電流を阻害する。第 4 回トランスポーター研究会 (2009. 5, 東京)
124. Sato K, Shigemoto-Mogami Y, Ohno Y. The relationship between the expression pattern of P2 receptors and functional roles of microglial cells in the postnatal SVZ Fukuoka Purine 2009 (2009. 7, 福岡)
125. 佐藤 薫, 新規グルタミン酸トランスポーター調節物質の開発, 第 30 回ヒューマンサイエンス・バイオインテグレーション講演(2009. 8, 東京)
126. Shigemoto-Mogami Y, Nakazawa K, Sato K. Microglia instructs neurogenesis and gliogenesis in the subventricular zone. 第 36 回国際生理学会世界大会 (IUPS 2009) (2009. 7, 京都)
127. 高木 淳平, 栗脇 淳一, 佐藤 薫, 鈴木 岳, Effects of SSRI on L-glutamate uptake activity of cultured astrocytes. 第 32 回日本神経科学大会 (2009. 9, 名古屋)
128. 佐藤 薫, James E. Goldman, 大野 泰雄, In vitro risk assessment system for the brain development at an early postnatal stage. 第 32 回日本神経科学大会 (2009. 9, 名古屋)
129. 佐藤 薫, 高橋 華奈子, 石井-野澤 玲子, 竹内 幸一, 中澤 憲一, 大野 泰雄, Two NSAIDs, niflumic acid and diclofenac, inhibit the human glutamate transporter EAAT1 through distinct mechanisms. SFN2009 (2009. 10, 米国シカゴ市)
130. Suzuki T, Takaki J, Kamiya Y, Nakamura Y, Mashino T, Sato K, Nakazawa K, Takahashi T, Haruyama A, Mori K, Iwai T, Oka J-I. Neuropharmacological effects of fullerene derivatives. SFN2009 (2009. 10, 米国シカゴ市)
131. 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野 泰雄, ミクログリアを介した新たな創薬の可能性—ミクログリアと神経新生・グリア申請との関連 日本薬学会 130 回年会シンポジウム(2010. 3, 岡山)
132. 佐藤 薫, 重本一最上 由香里, 大野 泰雄, 生後初期脳におけるミクログリアの役割 第 83 回 日本薬理学会 (2010. 3, 大阪)
133. 高木 淳平, 栗脇 淳一, 佐藤 薫, 鈴木 岳志, SSRI は培養アストロサイトグルタミン酸トランスポーターの取り込みを促進する。第 83 回 日本薬理学会 (2010. 3, 大阪)
134. Sumitomo K, Tamba Y, Shinozaki Y, Torimitsu K. Formation of liquid ordered domain on Si substrate using giant unilamellar vesicles ICSPM17. (2009. 12, Shizuoka)
135. Shinozaki Y, Sumitomo K, Furukawa K, Miyashita H, Tamba H, Kasai N, Nakashima H, Torimitsu K. AFM observation of membrane proteins suspended over nanoscale well ICSPM17. (2009. 12, Shizuoka)
136. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K. Direct visualization of single receptor dynamics: the relationship between molecular structure and physiology/pathology ISNM 2009-2. (2009. 11, Aichi)
137. Kasai N, Balois T, Ramanujan CS, Shinozaki Y, Sumitomo K, Ryan JF, Torimitsu K. Examination of reconstitution orientation of AMPA receptors in artificial lipid bilayer Neuroscience 2009. (2009. 10, Chicago, USA)
138. Baranovic J, Ramanujan C, Kasai N, Shinozaki Y, Torimitsu K, Ryan JF, AMPA receptors in laterally heterogeneous lipid bilayers Neuroscience 2009. (2009. 10, Chicago, USA)
139. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K. Localization of P2X4 receptors in lipid raft-like structure of in vitro model of cell membrane Fukuoka Purine 2009. (2009. 7, Fukuoka, Japan)
140. Shinozaki Y, Sumitomo K, Tsuda M, Koizumi S, Inoue K, Torimitsu K. Dynamic structural changes in single P2X4 receptors observed with fast-scanning atomic force microscopy IUPS2009. (2009. 7, Kyoto, Japan)
141. Kasai N, Ramanujan C, Baranovic J, Shinozaki Y, Shimada A, Sumitomo K, Ryan JF, Torimitsu K. Structural observation of a single, reconstituted ionotropic glutamate receptor IUPS2009. (2009. 7, Kyoto, Japan)
142. 篠崎陽一, 住友弘二, 島光慶二, Visualization of single N-methyl-D- aspartate receptor with atomic force microscopy, 第 83 回日本薬理学会年会, (2010. 3, 大阪)

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

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

神経系疾患治療薬の開発過程においては, 評価手法開発と病態・発症メカニズム解明とが相乗的に展開している。このような状況下で産業界の自主努力に頼るだけでは研究開発を進めることは難しく, 官民の研究資源を用いて独創的な医薬品創製技術開発を行う必要がある。我々はその先鋒を行くべく, グリア細胞を創薬標的とする『グリア創薬』に着手した。近年, 多くの神経系疾患がグリア細胞の機能変調に関連していることが明らかとなったが, これまでにグリア細胞が創薬標的とされた例はほとんどない。これはグリア細胞が極めて性質を変化させやすい細胞であり, 従来の評価系を適用できないからである。本研究班は, 「各種病態時のグリア細胞特性を精査し病態との関連性を明らかとし, 病態時のグリア細胞を標的とした医薬品評価及び開発方法の基盤を確立する」ことを目的とする。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「神経因性疼痛モデルでは, 脊髄内ミクログリアの活性化とそこに過剰発現する P2X4 受容体の刺激が, BDNF を介して神経因性疼痛を発症する」ことを発表した。この成果は本分野の研究発展を促し, P2X4 アンタゴニストやミクログリア活性化抑制剤が神経因性疼痛の治療薬となる可能性が示された。2005年, 神経因性疼痛モデルにおいて脊髄内 PDGF が神経因性疼痛の形成に直接的に影響することが報告された。しかし, 末梢神経損傷後に放出される PDGF の神経因性疼痛発症メカニズムは全く不明である。そこ

で本年度は, 神経因性疼痛における PDGF の役割・発症メカニズムを解明することを目的とした。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。脳虚血(低血糖)・低酸素に対するニューロンの脆弱性は, ニューロンにおいて, 嫌氣的条件下での ATP 産生能がないことに起因している。そこで, アストロサイトからニューロンへの乳酸を介したエネルギー供与が, シナプス伝達において担う役割の解明を試みた。その解析を通じて, 虚血時や低酸素時に, アストロサイトからニューロンにどのようなエネルギー供与がなされ, それが, どのような機能の維持に用いられるのかを明らかにし, 効率的に脳機能を維持する治療法を乳酸を基質とするモノカルボン酸トランスポーター(MCT)分子を標的としたグリア創薬として開発することを将来的目標とした。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。傷害部位や病変部位へのミクログリアの集積において, その分子機構は未だ不明な点が多く残されている。また, 集積した活性化型ミクログリアが神経細胞に対して与える影響については様々な報告がある。昨年度までの研究によって, 培養海馬スライスにおいて NMDA 処置により神経細胞選択的に傷害を与えたところ, ミクログリアが傷害部位に集積すること, またこのミクログリア集積には周囲からの遊走の寄与が大きいことを明らかにしてきた。また, リアルタイムイメージング等を用いることで, 傷害された神経細胞がミクログリアにより貪食・除去されることを示した。今年度は, ミクログリアによる傷害細胞の貪食・除去に関わる細胞内情報伝達機構を明らかにすることを目的とした。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。選択的セロトニン再取り込み阻害(SSRI)型抗うつ薬の新しい作用機序として BDNF 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。前年までに我々は, SSRI 型抗うつ薬 fluoxetine がアストロサイトにおいて BDNF 産生を亢進させることを明らかとした。本年は, fluoxetine による BDNF 発現様式及び発現の分子メカニズムを明らかとする。これらの結果をもとに, Fluoxetine の抗うつ作用機序におけるアストロサイトの役割及びうつ病とアストロサイトの機能変調と

の関連性を解明し、アストロサイトを標的とした創薬の有用性及び創薬の為の基盤を作ることを目的とした。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。「マイ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およびマイクログリアを対象とした in vitro 評価実験系の確立」および「中枢神経疾患薬物治療を目指したアストロサイトグルタミン酸トランスポーター蛋白質分子調節物質の探索」について引き続き検討した。昨年度、我々は生後初期に脳室下帯(SVZ)に集積した活性化マイクログリアが、ニューロン新生・グリア新生を調節している可能性を示すデータを得た。これは、マイクログリアを介したニューロン新生・グリア新生の制御という、新たな創薬ターゲットの創出につながる。本年度は、ミノサイクリンを用いた補足データの取得、活性化マイクログリアが放出するサイトカインとニューロン新生・グリア新生との関連についての検討を行った。また、NSAIDs であるナイフルミックス酸(NFA)と Diclofenac(Dic) が異なるメカニズムを介してアストロサイトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 トランスポーター電流を調節することを明らかにした。本年度は NFA の作用メカニズムをさらに詳細に検討した。

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。これは、グリア関連因子のトポロジーを解析する事により、それら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立するための取り組みのである。本年度は 1) 単一イオンチャネル機能測定系の構築、2) GPCR 型グリア因子のトポロジー解析、3) ブタ脳全抽出脂質(Brain Total Lipid, BTL)膜中の脂質ラフト様構造の解析、について更に詳細に解析を進めた。

B. 研究方法

1. 病態時の脊髄マイ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昨年度の通り。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- γ は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。マイ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(19-29 日齢) 孤束核ニューロンからホールセル・パッチクランプ法により膜電位あるいは膜電流を記録した。刺激電極を記録ニューロンへの求心線維上に置いてシナプス後電流を誘発し、その振幅を解析した。paired-pulse ratio, PPR を放出確率の変化の指標として用いた。AMPA は、記録ニューロン

の近傍に設置した微小ピペットより局所的微小圧投与した。一部の実験では海馬スライスを作成し CA1 から記録した。

3. 脳虚血時マイクログリアを標的とした創薬基盤確立

実験には生後 6-7 日齢 ddY マウスから作成した培養脳スライスを用いた。培養 10-11 日目、薬物および傷害細胞を蛍光染色する propidium iodide (PI; 500 ng/ml) を加えた培地で 24 時間培養し、NMDA 処置(50 μ M, 3 時間)により神経細胞に傷害を与えた。NMDA 処置前に PI 蛍光を記録し、以降 1 日ごとに 6 日後まで記録を続けた。培養 4 日—7 日目まで、クロドロン酸(100 μ M)で処理することでマイクログリアの除去を行った。免疫組織化学的検討は、定法に従って行った。マイクログリアの集積は NMDA 処置 6 日後の海馬スライスにおいて、抗 Iba1 抗体を用いた免疫染色によりマイクログリアを可視化し、錐体細胞層(P)および放線層(R)より、100 μ m \times 200 μ m の領域の緑色蛍光強度を定量し蛍光強度の比を P/R ratio として表した。NMDA 処置 1-6 日後の海馬スライスの PI 蛍光陽性領域の面積を、処置 1 日後の PI 蛍光を 100% とした割合を傷害細胞数の変化の指標として用いた。

4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立

ラット海馬初代培養アストロサイトを用いた。BDNF mRNA の測定は、Takara One-step RT-PCR kit, ラット BDNF mRNA に特異的なプライマーおよび Taqman プローブを用いた定量的 real time RT-PCR 法により行った。また、total RNA 量の補正のため GAPDH RNA 量も測定した。BDNF 蛋白量はウェスタンブロット法により、また、細胞内カルシウムイオン濃度([Ca²⁺]_i)の解析には、fura-2 法を用いた。細胞外 ATP の測定は、luciferin-luciferase 法により行った。

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(受託研究)

5-1. 「マイ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およびマイクログリアを対象とした in vitro 評価実験系の確立」

初代培養マイクログリアをミノサイクリンで前処理し(1-100 μ M, 24 時間)、LPS による活性化(1-10 ng/ml, 6 時間)への影響を検討した。活性化の程度は培養液中のサイトカイン濃度(IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , TNF α)を BioPlex サイトカインアッセイシステムにより測定し定量化した。T cell 特異的抗 CD3 抗体を用いた免疫組織化学的検討を行い、SVZ での T cell 浸潤度を確認した。胎生17日齢ラットより neurosphere を調整し、IL-1 α (1 ng/ml), IL-1 β (1 ng/ml), IL-6 (5 ng/ml), INF γ (1 ng/ml), TNF α (1 ng/ml)(ミノサイクリン投与により、髄液中、SVZ 周辺組織中濃度が低下したサイトカイン[昨年度データ]。SVZ 内濃度

に基づき設定。)のリコンビナント体により 24 時間処理し, BrdU assay 法(calbiochem)を用いて神経幹細胞の増殖能を検討した. neurosphere を上記 5 種のリコンビナント体で 4 日間処理し, Stem Cell functional Identification kit (R&D Systems) を用いて神経幹細胞の分化を定量化した.

5-2. 中枢神経疾患薬物治療を目指したアストロサイトグルタミン酸トランスポーター蛋白質分子調節物質の探索

EAAT1 トランスポーター電流測定法は常法に従った. 細胞外のイオン濃度を変えて電流電圧関係解析実験を行い, E_{rev} (EAAT1) のシフトから NFA の電流成分, I_{aa} , I_{Cl} に対する作用を推察した. 基質としては L-glu を用いた場合と L-Asp を用いた場合を比較検討した.

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

6-1. 単一イオンチャネル機能測定系の構築

Diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) 及びコレステロール(8:2, 10 mg) をヘキサデカンに溶解し, 10 分間超音波処理した. プラスチック板に穴(直径 < 1 mm)を作成し上部にフレキシバームを接着し, 下部は 2%アガロースでコートしたプラスチックディッシュに接着し, 上下のウェルを測定バッファーで満たし, 上のウェルから穴へ 1 μ l の脂質入りヘキサデカンを吹き付けた. 上下ウェル間の抵抗値がギガオームに達した事を確認したのち, 単層の脂質二分子膜を得た. 単一の脂質二分子膜へのイオンチャネルの再構成は事前に作成したプロテオリポソームを吹き付けてフュージョンする事で行った.

6-2. GPCR 型グリア因子のトポロジー解析

L- α -フォスファチジルコリンとブタ脳由来フォスファチジルセリン(PC/PS, 1:1, 160 μ M in 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 100 μ l) の SUV と P2X₄ または P2Y₁ 受容体及び GABA_B 受容体(100 ng/ml, 100 μ l) 及び n-オクチル- β -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, ウェルを半透膜で覆った. ロッドは透析バッファー中で 5 日間振とうし AFM 解析を行った.

6-3. BTL 膜中の脂質ラフト様構造の解析

ブタ脳全抽出脂質(Brain Total Lipid, BTL)を 250 μ g/ml でバッファーに溶解し, 超音波処理を行った. 得られた小胞は動的光散乱法で測定したところ直径約 100 nm であった. AFM 測定には基板としてマイカを用いた.

(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. ウィ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. 病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立

PDGF には PDGF-A 鎖, PDGF-B 鎖, PDGF-C 鎖, PDGF-D 鎖が 5 種類のアイソフォーム (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD) として PDGF ファミリーを構成している. 末梢神経損傷後に PDGF-B 鎖の発現が誘導されることが報告されていることから, 本研究では PDGF-BB を用いた. 正常ラットの脊髄腔内に PDGF-BB (0.1, 1, 10 pmol) を単回投与した後, 軽度機械刺激に対する後肢逃避閾値の低下が投与後 1 日目から認められ, 3 日目をピークとし, 14 日後まで持続した(機械的アロディニア). 逃避閾値の低下は用量依存的であった. PDGF-BB 10 pmol を単回脊髄腔内投与して 30 分後, 著明な p-PDGFR β 由来蛍光レベルの増加が観察された. また, PDGF-BB はミクログリア PDGFR β をリン酸化することが示された. 初代培養ミクログリアに PDGFR α および β 両サブタイプの mRNA 発現が認められた. さらに, 初代培養ミクログリアに PDGF-BB 50 ng/ml を 10 分間処置したところ, 細胞膜上 p-PDGFR β 免疫蛍光レベルが増加した. これらの結果より, ミクログリアには機能的 PDGF 受容体が発現していることが示唆された. PDGF-BB 10 pmol をラットに単回脊髄腔内投与後, 3 日目と 7 日目において脊髄後角におけるミクログリア細胞数は両日目とも有意に増加した. 細胞体の肥大化, 突起の短縮といった細胞形態の変化もある程度認められた. PDGF-BB (10 pmol) 投与前日から minocycline 100 μ g を 1 日 1 回ラット脊髄腔内に慢性投与したところ, PDGF-BB による機械的アロディニアの発現が有意に抑制された. 神経損傷後 4 日目のラットから L5 脊髄を摘出し, p-PDGFR β 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ, 損傷側の L5 脊髄後角ミクログリアにおいて p-PDGFR β 蛍光レベルの著しい増加が観察された.

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

アストロサイトはグリコーゲンを持ち, 嫌氣的にピルビン酸を合成し, これを乳酸に変換し MCT を介して細胞外に輸送し, さらに MCT を介してニューロン内に取り込ませ, これをニューロンはピルビン酸に変換して TCA サイクルの基質として用いる. ニューロンとアストロサイトの細胞膜が密接に接しているのはシナプス周囲においてのみである. そこで, MCT を介したアストロサイトからニューロンへのエネルギー供給がシナプスにおいて最も重要な役割を果たして