

いるのではないかと考えた。活動電位および静止膜電位に及ぼす MCT 阻害の影響を検討した。MCT 阻害薬 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) は孤束核ニューロン活動電位の振幅を僅かにしかし有意に投与前振幅の $90.2 \pm 3.6\%$ まで減少させた。膜電位には著明な影響を与えなかった。膜電位固定法で測定された保持電流は CHCA によって -2.7 ± 1.3 pA ($n = 9$) だけシフトした。CHCA は孤束刺激誘発興奮性シナプス後電流 (eEPSC) の振幅を有意に減少させた ($IC_{50} = 342.5$ μ M; 1 mM での抑制率, $52.6 \pm 3.1\%$; $n = 9$; $P < 0.001$)。この減少は僅かだが有意な PPR の減少を伴った。AMPA 誘発電流の振幅は CHCA により $30.0 \pm 7.0\%$ まで減少した。薬理学的単離下, 背内側孤束核電気刺激により誘発された抑制性シナプス後電流の振幅は CHCA により有意に減少したが, その抑制率は CHCA による上記の eEPSC 振幅抑制率に比べ有意に低値であった。高頻度刺激 (1 Hz) 下, CHCA による eEPSC 振幅抑制率は 0.1 Hz 刺激時より有意に高値を示した。細胞外 glucose の除去により eEPSC 振幅は有意にかつ著明に減少したが (投与前の $13.5 \pm 6.3\%$; $n = 6$; $P < 0.01$), lactate (20 mM) 投与によってこの抑制は有意に減弱した (投与前の $48.0 \pm 10.8\%$; $n = 10$)。この抑制減弱作用は, CHCA 存在下にほぼ消失した (投与前の $19.0 \pm 4.8\%$; $n = 9$; glucose 除去のみの抑制率と比較し $P = 0.480$)。海馬 CA1 ニューロンにおいて, CHCA (1 mM) は, シャーファー側枝電気刺激による eEPSC 振幅の著明な減少 (投与前の $16.3 \pm 1.4\%$; $n = 4$; $P < 0.05$) に加え, 保持電流の著明な内向きシフト (-32.8 ± 9.1 pA; $n = 6$) を引き起こした。

3. 脳虚血時マイクログリアを標的とした創薬基盤確立

細胞傷害マーカーである PI の取り込みでは, NMDA 処置 1 日後には, 錐体細胞層および顆粒細胞層領域で強い PI 蛍光が認められた。このとき, NeuN 陽性細胞も同領域において観察されたが, NMDA 処置前のものと異なる小さく凝集した染色像が観察された。NMDA 処置 3 日および 5 日後に NeuN 免疫活性が経時的に減少すること, またこの減少が PI 蛍光の消失と平行であることが示された。クロドロン酸によってあらかじめマイクログリアを除去した培養海馬スライスにおいては, PI 蛍光の消失と同様, NeuN 免疫活性の消失も抑制された。以上より, PI 蛍光の消失および NeuN 免疫活性の消失のいずれもが傷害を受けた神経細胞がマイクログリアによって貪食・除去された結果であると考えられた。PI 蛍光の消失を指標として, マイクログリアによる傷害細胞の貪食・除去に関与する細胞内情報伝達を検討した。主要な 3 つの MAP キナーゼ経路の選択的阻害薬存在下における NMDA 処置後の PI 蛍

光消失を調べたところ, p38 MAP キナーゼ阻害薬 SB203580 存在下においてのみ, 濃度依存的に PI 蛍光の消失が抑制された。また, 傷害部位集積の指標として算出した P/R ratio に SB203580 存在下および非存在下の両者間で差は認められなかった。よって, SB203580 は貪食の過程を阻害したと考えられ, このことから, p38 MAP キナーゼの活性化はマイ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が示唆された。グルコサミンおよび N-アセチルグルコサミンに関して検討したところ, グルコサミンは神経細胞傷害後の PI 蛍光の消失に対して有意な抑制効果を示し, その効果は濃度依存的であった。一方, N-アセチルグルコサミンは高濃度 (20 mM) で使用した場合でも PI 蛍光の消失に影響を与えなかった。また, グルコサミンは濃度依存的にマイクログリアの傷害部位への集積を抑制した。これらのことから, グルコサミンによる傷害細胞の貪食抑制効果の少なくとも一部は, マイクログリアの傷害部位集積の抑制の結果である可能性が考えられた。

4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立

Fluoxetine による BDNF 産生は, ATP 及び P2Y1 受容体依存的であった。アストロサイトを ATP 及び P2Y1 受容体作用薬 2MeSADP で刺激すると, BDNF の発現が亢進し, これは fluoxetine 刺激により惹起される BDNF 産生よりも早い時間経過であった。また, セロトニン刺激による BDNF 発現亢進は, アストロサイトでは誘発されなかった。Fluoxetine がアストロサイトの細胞外 ATP 濃度に与える影響を, 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 及び細胞外 ATP 分解量を指標として調べた。Fluoxetine (30 μ M) は, 非常にゆっくりとしたタイムコースでアストロサイト $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ, これは suramin によりほぼ消失した。従って, fluoxetine は ATP/P2 受容体系シグナルを亢進させることが示唆された。アストロサイトは恒常的に細胞外に ATP を放出しているが, これは ecto-nucleotidase (NTPDase) により分解される。そこで, fluoxetine による細胞外 ATP 濃度上昇が, NTPDase 阻害に依存するか否かを明らかにするため, fluoxetine の細胞外 ATP の分解量に与える影響を検討した。アストロサイトに fluoxetine (30 μ M) を前処理し, その後 ATP を加えると, ATP の分解は有意に抑制され, 100 μ M fluoxetine では ATP は 30% 分解されたに過ぎなかった。従って, fluoxetine は, ATP の分解を抑制することにより, 細胞外 ATP 濃度亢進及び P2Y1 受容体シグナル系を亢進させ, BDNF を産生していることが示唆された。実際, fluoxetine による BDNF の産生は, NTPDase 阻害薬 ARL67156 により再現された。

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

5-1. 「ミクログリアの医薬品治療ターゲットとしての可能性探求およびミクログリアを対象とした *in vitro* 評価実験系の確立」

初代培養ミクログリアを LPS で 6 時間処理すると、培養液中の IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α の濃度が有意に上昇した。ミクログリアをミノサイクリンで 1 日前処理しておく、これらのサイトカイン濃度上昇が有意に抑制された。P4 ラット SVZ において、T cell は血管周囲に集積していた。SVZ に比較して大脳皮質側のほうが実質への浸潤度が高かった。IFN γ のみが神経幹細胞の増殖を促進する傾向を示した。IL-1 β , TNF α は Tuj1(+) 細胞の出現率を上昇させた。また、オリゴデンドロサイトはニューロンよりも分化に時間がかかる事がわかったため、10 日間、リコンビナント サイトカイン存在下で培養を継続したところ、IL-1 β を適用した群で、O4(+) 細胞の出現率が上昇した。

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

NFA による EAAT1 電流調節作用の電位依存性は、L-Glu を基質とした場合より L-Asp を基質とした場合のほうが大きかった。細胞外 Cl⁻ イオン濃度を 103 mM から 30 mM にした場合、E_{rev} (EAAT1) のシフトは NFA 存在下より非存在下のほうが大きかった事から、NFA は I_{Cl⁻} 成分を増強していないことがわかった。ただし、基質を L-Asp とした場合のみ、NFA の作用に Cl⁻ イオン動態が関与していることが明らかとなった。細胞外 Na⁺ イオンを 96 mM から 24 mM にした場合、I-V 曲線は完全に一致し、NFA による電位依存的な EAAT1 電流調節作用は消失した。また、L-Asp, L-glu のどちらを基質にしても作用に差はなかった。さらに、細胞外 H⁺ イオン濃度が減少するに連れ、交差電位は過分極方向にシフトし、NFA による EAAT1 電流調節作用の電位依存性に変化が認められた。基質存在下、NFA は主成分を H⁺ イオンとする新たな電流を惹起していることがわかった。この作用は、L-Asp と L-glu のどちらを基質にしても差はなかった。

6. 病態時のグリア関連因子の高速・高感度トポロジー解析

6-1. 単一イオンチャネル機能測定系の構築

ヘキサデカンに溶解した脂質をウェルに吹き付けるとギガオームの抵抗値が得られた。しかしながら、この条件下でプロテオリポソームを加えても全くチャネル活性は観察されなかった。ピペットの先端に小さな泡を作り、ヘキサデカンのバルクに接触させて余分なヘキサデカン/脂質を除去した。適当な条件まで除去するとウェル上に単一の脂質二分子膜に相当する黒膜が形成された。さらにアガロースで膜を安定化した。

この条件下では長時間(～数十分)のイオンチャネル活性測定も可能であり、電位変化にも安定であった(-100～+100 mV)。電位を+60 mV に固定し、ATP (100 μ M)を加えたところ、単一 P2X₄ 受容体イオンチャネルの電流が得られた。

6-2. GPCR 型グリア因子のトポロジー解析

初代培養ラット大脳皮質アストロサイトに発現する P2Y₁ 受容体及び GABA_B 受容体の解析を行った。これらの受容体はヘテロダイマーを形成する事が知られており、それぞれ、P2Y₁ 受容体/A₁ 受容体及び GABA_B 受容体サブユニット 1(a or b)/ 2 を形成する。現在、P2Y₁ 受容体及び GABA_B 受容体各ヘテロダイマーのサブユニット間の構造学的知見はほとんど無い。精製 P2Y₁ 受容体を基板上に作成した脂質二分子膜に再構成して観察したところ、膜内を二次元平面方向に移動し、その構造も非常にフレキシブルであった。サブユニットと思われる二つの塊が一箇所で結合している構造が観察され、二つのサブユニットの角度はリガンド非存在下では一定ではなかった。GABA_B 受容体はリガンド非存在下での二量体様構造はフレキシブルでサブユニット間の角度は多様であった。

6-3. BTL 膜中の脂質ラフト様構造の解析

これまで AFM を用いたラフト様脂質ドメインの観察ではカベオラ構造が観察されていない。我々は生体膜の条件に近い脂質組成を用いればカベオラ様の構造も含む細胞膜に類似した構造を示すのではないかと考え、ブタ脳より抽出した BTL を用いた。BTL で作成した SUV をマイカ上へ展開した場合、ドメインの中に平坦なもののほか、凸状のドメインが観察された。NBD-cholesterol (1 wt%)を加えて cholesterol 含有ドメインを蛍光ラベルし、ドメインを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところほとんどのドメインがナノメートルスケールの大きさであると考えられた。続いて AFM で観察されたドメインのサイズを定量した。ドメインの約 90%が直径 100 nm 未満であり、蛍光像の結果と一致していた。マイカ表面を poly-D-lysine で覆い、正に荷電させた状態での BTL 膜では平面ラフト様ドメインは大きな変化はなかったが、凹状の構造をしたドメインが多く観察された。凸状のドメインは他の膜よりも数 nm ～数十 nm 程度高かったが、凹状のドメインの深さは膜表面より最も深い部分までが約 1 nm であった。

D. 考察

1. 病態時の脊髄ミクログリアと創薬基盤の確立

PDGF-BB が脊髄後角ミクログリアの PDGFR β を特異的にリン酸化し、強力かつ長期的な機械的アロディニア症状を誘発することを明らかにした。PDGF の生体内半減期は非常に短いため、PDGF-BB が脊髄内で何らかの可塑的变化を引き

起こしていることを示唆している。PDGF・BB により、ミクログリアの PDGFR β が特異的にリン酸化されることが判明した。過去の多くの報告では、中枢神経系における PDGF 受容体は、オリゴデンドロサイト前駆体や一部のアストロサイト、ニューロンにおいて発現することが示されており、ミクログリアでの発現を示したものはない。PDGF・BB 脊髄腔内投与後、ミクログリア細胞数の有意な増加とごく軽度の形態変化を認めた。これらの変化は IFN γ 投与モデルに比べると小さいものであった。すなわち、ミクログリアの PDGFR β は機械的アロディニア発現に関与する因子である一方、活性化型ミクログリアに特徴的な形態的变化にはさほど関与しないと考えられる。minocycline を用いて、その PDGF・BB 誘発性機械的アロディニアに対する効果を検討したところ、ほぼ完全に機械的アロディニアの発現が抑制された。また、minocycline は、PDGF・BB によるミクログリア PDGFR β のリン酸化自体には影響しなかったことから、PDGFR β の下流シグナルを抑制することが示唆される。以上の結果より、末梢神経損傷後に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、痛覚情報伝達物質としてミクログリアに作用し、アロディニア発症契機となることが明らかとなった。

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

Glucose 除去による eEPSC 振幅抑制に対する lactate の減弱作用が CHCA により消失した事実は、MCT 依存的モノカルボン酸輸送が CHCA によって選択的に抑制される可能性を示している。従って、本研究の結果は、興奮性シナプス伝達の維持、特にポストシナプスの AMPA 受容体の反応性の維持が輸送されたモノカルボン酸由来のエネルギーに大きく依存していることを示唆するものである。CHCA による振幅抑制が高頻度シナプス伝達下でさらに増大した結果は、シナプス伝達の頻度に伴い、モノカルボン酸由来エネルギー依存性が高まると解釈される。孤束核ニューロンの活動電位や静止膜電位がシナプス伝達に比して CHCA の影響を僅かしか受けなかった事実、および、海馬ニューロンが CHCA により大きな内向き電流を示した事実は、活動電位や静止膜電位の維持におけるモノカルボン酸由来エネルギーの関与が孤束核ニューロンではわずかである可能性、さらに、その依存度が脳内の異なる部位では異なっている可能性を示すものである。以上より、高頻度シナプス伝達の維持に必要となるエネルギーが、シナプス周囲アストロサイトに由来するモノカルボン酸の局所的な輸送および供給によって賄われており、この機構によってシナプスおよび周囲アストロサイト突起部が細胞体や他の部位とは独立した自給的単位を形成している可能性が示された。本研究結果は、

ニューロンの正常なシナプス伝達の維持に必要となるエネルギーの大部分が、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うることを明らかにした。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。

3. 脳虚血時ミクログリアを標的とした創薬基盤確立

NMDA 処置後の培養脳スライスにおいて、PI 蛍光消失が傷害を受けた神経細胞がミクログリアに貪食・除去された結果であることが確かめられた。本研究において、p38 MAP キナーゼを阻害することによって、ミクログリアの傷害部位集積を阻害することなく、傷害細胞の貪食・除去が抑制されることが示された。最近、変性軸索の残骸の貪食・除去に p38 MAP キナーゼが関与することが報告された。ミクログリアにおける p38 MAP キナーゼの活性化は貪食に先行して起こることから、p38 MAP キナーゼの活性化はミクログリアが貪食活性を獲得するために必要であり、その活性維持には必要ないとしている。本研究においても、p38 MAP キナーゼの活性化が貪食活性の獲得や維持にどのように関与するのか、今後検討すべきである。グルコサミンがミクログリアによる傷害細胞の除去を有意に抑制した。また、グルコサミンは傷害部位へのミクログリアの集積に対しても有意な抑制効果を示したことから、PI 蛍光消失抑制の少なくとも一部は、傷害部位集積の抑制によるものであることが示唆された。本研究結果から、グルコサミンによる傷害細胞除去の抑制が、集積と貪食の両方を抑制することによるのかについては不明だが、分散培養細胞を用いた実験系でグルコサミンによる貪食抑制が報告されていることを考慮すると、貪食過程自体に対しても抑制効果を発揮している可能性は十分に考えられる。

4. 気分障害時のグリア細胞特性と評価基盤の確立

Fluoxetine により惹起されるアストロサイトの BDNF mRNA の発現は、ATP/P2Y $_1$ 受容体系を亢進させることに起因していた。また、fluoxetine はセロトニン系の亢進ではなく、ATP/P2 受容体系を亢進させることにより、BDNF 産生を引き起こしている可能性が強く示唆された。アストロサイトは恒常的に細胞外に ATP を放出している。Fluoxetine は、濃度依存的に細胞外 ATP の分解を抑制する作用を示したことから、NTPDase 阻害作用を有することが示唆された。また、NTPDase 阻害薬の ARL67156 により、fluoxetine 様の BDNF 発現がアストロサイトで再現できた。以上、fluoxetine は ATP/P2Y $_1$ 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。

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

ミノサイクリンは初代培養マイクログリアの LPS 誘発サイトカイン産生を有意に抑制した。この結果は、ミノサイクリンが確かにマイクログリアの活性化を抑制することを示している。P4 ラット SVZ において、T cell は特に血管周囲に集積していたが、その数は SVZ に集積しているマイクログリアに比較すると非常に少ない。従って、ミノサイクリン腹腔内投与によって引き起こされたニューロン新生、オリゴデンドロサイト新生の抑制は、主にマイクログリア活性化抑制を介したものであると推察される。Neurosphere は神経幹細胞および神経系前駆細胞によって構成されている。IFN γ のみに神経幹細胞・前駆細胞の増殖を促進する作用が確認された。これまで IFN γ に関しては増殖を抑制するという報告が多い。しかし、IFN γ は濃度によって作用ベクトルが変わることが報告されている。生後初期 SVZ においては、IFN γ 濃度のわずかな増減によって、幹細胞・前駆細胞の増殖が調節されている可能性も考えられる。IL-1 β はニューロンとオリゴデンドロサイト前駆細胞の出現率を有意に上昇させた。TNF α はニューロンの出現率を有意に上昇させた。この結果は、活性化マイクログリアがサイトカイン分泌を介してニューロン新生、オリゴデンドロサイト新生を調節している可能性を支持するものである。IL-1 β とニューロン新生については、これまで促進と抑制の双方の報告がある。IL-1 β がニューロン新生を抑制するメカニズムの下流で働く NF- κ B シグナリング経路は神経幹細胞においてのみ活性化されるが、神経前駆細胞では活性化されないという報告もある。従って、神経幹細胞と神経前駆細胞の比率によって実験の out put が変わってくる事が予想される。我々のデータは IL-1 β が神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進する可能性、生後初期 SVZ ではこの経路が活性化状態である可能性を示唆している。TNF α とニューロン新生についてもやはり促進と抑制の双方の報告がある。TNF α の場合、濃度が 1 オーダー変わるだけでも作用が異なる例があるため、非常に限局された条件でのみニューロン新生が促進される可能性が考えられる。TNF α の受容体は TNF-R1 と TNF-R2 の二種のサブタイプがあるが、ニューロン新生においてはそれぞれ異なる機能を担っている。生後初期 SVZ における

TNF-R の発現についても検討する必要がある。

IL-1 β がオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化を進行させ、その標的細胞が比較的分化のすすんだオリゴデンドロサイト前駆細胞であることも報告されている。我々の実験系においても比較的分化の進んだオリゴデンドロサイト前駆細胞が標的であることが予想される。NFA による EAAT1 電流調節作用のメカニズムの一端が明らかとなった。基質によって異なる影響を認めたのは細胞外 Cl $^-$ 濃度を変化させた場合のみであった。従って、基質による電位依存性の大きさの違いには Cl $^-$ イオン動態が関与していることが推察される。また、NFA の作用は細胞外 Na $^+$ イオンに依存していることも明らかとなった。さらに、付加的な H $^+$ 電流の活性化が関与していることも明らかとなった。NSAIDs は臨床で広く用いられている薬物であるが、精神症状などの副作用をしめす場合が報告されている。本研究は NSAIDs の薬理を明らかにするために重要な知見である。

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

単一イオンチャネルのトポロジーに対応する機能解析を行うため、単一イオンチャネル測定系を構築した。今回は二つのチャンバー間に脂質二分子膜と再構成したイオンチャネルを用意し、voltage clamp した状態でイオンチャネルを介して流れる電流値を測定した。電位を +60 mV に固定し、ATP (100 μ M) を加えたところ、単一 P2X $_4$ 受容体イオンチャネルの電流が得られた。電流値は 1~2 pA であり、過去の報告に相当する値であった。グリア因子はイオンチャネルだけでは無く、多くの GPCR を発現しており、これらのトポロジーや生理機能に関連する構造変化を観察して機能発現メカニズムを明らかにする事はグリア因子をターゲットとした創薬研究に不可欠である。アストロサイトに発現及び機能する代謝型グルタミン酸受容体は活性化に伴って二量体間の距離を変化させる事から、P2Y $_1$ 及び GABA $_B$ 受容体でも AFM 観察により活性に伴うサブユニット間の変化(距離、角度など)が観察できる可能性が考えられる。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。GABA $_B$ 受容体についても今後、更に詳細に検討を進める予定である。脂質ラフトは神経伝達でも非常に重要な要素であり、その特性や各種受容体との相互作用メカニズムを調べる事は非常に重要である。特に、脂質ラフトのうちカベオラは中枢神経系ではほとんどの神経細胞で観察されないため、一種のグリア因子として捉える事ができる。AFM を用いたラフト様脂質ドメインの観察には in vitro の細胞膜モデルである脂質組成[sphingomyelin, dioleoyl phosphatidyl- choline (DOPC), cholesterol]が用いられる。この条件下では確かに平面ラフト様のドメイン構造ができるものの、カベオラの

様な構造が観察される事は報告されていない。BTLで作成したSUVをマイカ上へ展開した場合、ドメインの中に平坦なもののほか、凸状のナノメートルスケールのドメインが観察された。AFMで観察されたドメインのサイズは直径100 nm未満であった。現在推定されている細胞膜上の脂質ラフトのサイズは100 nm以下である事とも一致している。ドメインの面積と高さを計測したところ、1,000 nm²より面積の大きなドメインでは高さの大きなものが数多く含まれていた。細胞膜の脂質ラフトは平面ラフトと呼ばれるタイプとカベオラのような大きく屈曲した構造に分けられる。今回マイカ上で観察された凸状のドメインは細胞質側のカベオラ構造を反映するものであると推定した。マイカ表面をpoly-D-lysineで覆い、正に荷電させた状態でのBTL膜では平面ラフト様ドメインは大きな変化はなかったが、凹状の構造をしたドメインが多く観察された。凸状のドメインは他の膜よりも数nm～数十nm程度高かったが、凹状のドメインの深さは膜表面より最も深い部分までが約1 nmであった。BTL膜がマイカによって支持されているにも関わらず凹みができるのは、マイカ表面に形成される水分子のクラスターが存在する層が約1 nm程度あるためであると考えられた。

E. 結論

神経因性疼痛において重要な役割を担うミクログリアの機能分子として、新たにPDGF受容体の存在が示された。さらに、PDGFが、末梢神経損傷後に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てミクログリアに作用する情報伝達物質としての機能を果たしアロディニア発症の契機となりうることを初めて明らかにした。

アストロサイトからニューロンへのMCTを介したエネルギー供給が、シナプス後ニューロンのシナプス応答の維持に必要なエネルギー源となっている可能性が明らかになった。脳梗塞や脳虚血における酸素・血統供給の低下に対し、アストロサイト由来のエネルギー供給を増加することによって正常なシナプス伝達機構を維持する戦略を取る上で、MCT分子は、グリア創薬の重要な標的分子になりうると期待される。

培養海馬スライスを用い、神経細胞傷害後のPI蛍光を経時的に観察することで、ミクログリアによる傷害細胞の貪食を長期にわたって評価できる実験系を構築した。ミクログリアによる傷害細胞の貪食・除去にp38 MAPキナーゼが関与することが示唆された。また、細胞外に加えられたグルコサミンが傷害細胞の貪食・除去を抑制することが明らかとなり、その抑制効果の一部は、ミクログリアの傷害部位への集積を抑制することによるものである可能性が示唆された。

代表的SSRIであるfluoxetineのBDNF発現

亢進における分子メカニズムを明らかとした。Fluoxetineはアストロサイトの細胞外ATP分解酵素を阻害することにより、細胞外ATP濃度を高め、このATPがアストロサイトP2Y₁受容体を刺激することにより、BDNFが産生された。本結果は、アストロサイトが気分障害等精神疾患に関連していること、また治療薬の標的としてアストロサイトNTPDase及びP2Y₁受容体が有望であることを示唆する。

生後初期SVZにおいてミクログリアがサイトカインなど液性因子を介してニューロン新生やグリア新生を調節している可能性を明らかにした。また、ニューロン新生に関与するサイトカインとしてIL-1 β 、TNF- α 、オリゴデンドロサイト新生に関与するサイトカインとしてIL-1 β を見いだした。この結果は活性化ミクログリアが生体内の生理的条件下でニューロン新生・グリア新生を調節することを示す初めてのデータである。また、ニューロン新生を促進するミクログリアのキャラクタライゼーションを行う上で、生後初期SVZミクログリアが非常によいモデルとなることが示唆される。NFAによるEAAT1電流調節作用について詳細なメカニズムが明らかとなった。また、基質によって作用が異なる理由の一端が明らかとなった。

一分子のイオンチャネル測定システムの構築を行い、P2X₄受容体の測定に成功した。また、グリア因子であるGPCRとしてP2Y₁受容体とGABA_B受容体について解析を行ったところ、報告どおり二量体構造が観察された。脳全抽出脂質を用いて作成した脂質二分子膜の解析を行ったところ、BTL膜には平面ラフト様ドメインの他、大きな高さを持つカベオラ様の構造も含まれていた。また、細胞外から観察したカベオラの陥入構造に相当する構造の可視化に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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)
3. Tsuda M*, Toyomitsu E*, Kometani M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. *equally contributed. Mechanisms underlying fibronectin-induced upregulation of P2X₄R 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]
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. Masuda J, 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)
8. Mochizuki T, Tokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse

- K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M, The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca^{2+} influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J. Biol. Chem.*, 284 21257-21264 (2009)
9. 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).
 10. 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)
 11. Koizumi S, Synchronized Ca^{2+} oscillations in astrocytes. *FEBS J.* (in press)
 12. 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)
 13. Takahashi K, Ishii-Nozawa 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)
 14. 河西奈保子, Chandra S. Ramanujan, 篠崎陽一, 住友弘二, John F. Ryan, 鳥光慶一, 受容体タンパク質の一分子観察, *化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌* 8巻, 1号, 1-6 (2009)
 15. 篠崎陽一, 住友弘二, 津田誠, 小泉修一, 井上和秀, 鳥光慶一, 高速原子間力顕微鏡を用いた受容体の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. 津田誠, 井上和秀, ミクログリアと疼痛, 52 回日本神経化学会大会・シンポジウム, (2009.6 伊香保)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 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)
 5. Kuboyama K, Tsuda M, Naraki Y, Tsutsui M, Toyohara Y, Tozaki-Saitoh H, Shimokawa 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)
 6. 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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 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)
 18. 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)
 19. 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)
 20. Inoue K, Pain signalling through purinergic receptors of microglia. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7-8, Kyoto)
 21. Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Microglial purinoceptors in the spinal cord and pathological pain. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, (2009. 7-8, Kyoto)
 22. 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)
 23. 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)
 24. Inoue K, The function of microglia in neuropathic pain. 2009 European Glial Cell Meeting (Euroglia 2009), (2009. 9, Paris)
 25. Kato F, From synapse to behavior: New technologies and integrated physiology. 36th International Congress of Physiological Sciences (2009. 7, Kyoto).
 26. Kato F, Presynaptic P2X receptors as astrocyte-neuron interface, 36th International Congress of Physiological Sciences (2009. 7, Kyoto).
 27. 永瀬将志, 鈴木岳之, 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).
 28. 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).
 29. 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).
 30. 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).
 31. 加藤総夫, 永瀬将志, 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)
 32. 加藤総夫, 永瀬将志, 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)
 33. 小林速人, 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介し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)
 34. 片山貴博, 小林速人, 岡村敏行, 井手聡一郎, 上原孝, 南雅文, 培養海馬スライスを介し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)
 35. 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)

36. Koizumi S, Fujishita K, Nakao A, Inoue K, Neuron-microglia interaction mediated by multiple P2Y receptors. IUPS, (2009. 8, Kyoto)
37. 小泉修一, 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)
38. 小泉修一, 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)
39. Koizumi S, Glia and diseases. Japan-France Frontier of Sciences, (2010. 1, France)
40. 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)
41. 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ック酸, 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)
42. 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)
43. 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)
44. 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・バイオインターフェース講演(2009. 8, 東京)
45. 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)
46. 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)
47. 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 glutamate transporter EAAT1 through distinct mechanisms. SFN2009 (2009. 10, 米国シカゴ市)
48. 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)
49. 佐藤 薫, 重本-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)
50. 佐藤 薫, 重本-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)
51. 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)
52. Sumitomo K, Tamba Y, Shinozaki Y, Torimitsu K, Formation of liquid ordered domain on Si substrate using giant unilamellar vesicles ICSPM17, (2009. 12, Shizuoka)
53. 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)
54. 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)
55. 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)
56. 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)
57. 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)
58. 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)
59. 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)
60. 篠崎陽一, 住友弘二, 鳥光慶一, 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)

3. その他 なし

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

バイオ医薬品の特性解析及び品質・安全性評価法の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 山口 照英
研究期間 平成 19 年 4 月～平成 22 年 3 月

研究要旨 バイオ医薬品の品質に関する研究として、MS による確認試験法(第十六改正日本薬局方収載)及び標準的単糖試験法を策定した。また、CE や MS が糖鎖分析法及び抗体の不均一解析法として有用であることを確認した。安全性に関する研究として、PEI 磁気ビーズを利用した NAT 及び感染価の高感度測定法及び B19 に対する NAT を確立した。また、製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT 適用の利点と問題点を示すとともに、有効なウイルス除去、不活化工程となりうる系を開発した。

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所
(独)医薬品医療機器総合機構
協和発酵キリン(株)生産本部

中外製薬(株)分析技術研究部
(財)化学及血清療法研究所試作研究部
アステラス製薬(株)製剤研究所

大日本住友製薬(株)分析研究所
サーモフッシャーサイエンティフィック(株)
新潟大学理学部生物学科
近畿大学薬学部
国立医薬品食品衛生研究所
(株)ベネシス 大阪研究所
日本ケミカルリサーチ(株)研究センター
(財)化学及血清療法研究所菊池研究所

川崎ナナ
荒戸照世
石川リカ
柳原繁弘
古賀明子
中島和幸
山口秀人
三村尚志
北村 智
濱詰康樹
窪田雅之
長束俊治
掛樋一晃
内田恵理子
柚木幹弘
小紫嘉一
菅原 敬信
成瀬毅志

A. 研究目的

新規バイオ医薬品を早期に実用化へ結び付けるためには、バイオ医薬品開発の初期段階から承認審査に至る創薬全般に渡る迅速化・効率化が不可欠である。本研究では、最先端のタンパク質構造解析技術を取り入れた特性解析並びに規格及び品質試験法、並びにウイルス安全性に関する高感度・高精度な試験法の開発と試験法の標準化を行うことにより、バイオ医薬品開発の迅速化・効率化に資することを目的とする。

品質に関する研究では、1) 質量分析法(MS)を用いたペプチド・タンパク質性医薬品の確認試験法の標準化、2) 糖鎖試験法整備の一環としての単糖試験法の標準化、3) オリゴ糖試験法の標準化に向けた各種蛍光標識と

HPLC 並びに APTS 標識とキャピラリー電気泳動(CE)の有用性評価、及び、4) バイオ医薬品の物理的・化学的性質評価法としての MS の可能性の検証、を実施した。

安全性に関する研究では、1) 高感度ウイルス試験法の確立、2) 製造工程のウイルスクリアランス能評価への核酸増幅検査(NAT)の適用、3) 製造工程へのウイルス除去工程及びウイルス不活化工程の導入について検討した。

B. 研究方法

(1) 品質に関する研究

1) MS を用いた確認試験法の標準化

試料としてグルタチオン、ゴナドレリン、ヒトインスリン、ヒト成長ホルモン、及びヒト血清アルブミン(HSA)を用いた。

2) 単糖試験法の標準化

エポエチン(エポエチンアルファ及びエポエチンベータ混合物)及びアルテプラナーゼを用いた。中性糖及びアミノ糖は、4~7M の TFA 中 100℃で 2~4 時間加熱して遊離させた。遊離単糖を 2-アミノピリジン(2AP)、4-アミノ安息香酸エチル、または 2-アミノ安息香酸(2AA)により誘導体化した後、蛍光検出 HPLC によって、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMP)により誘導体化した後、UV 検出 HPLC によって、または誘導体化せずに PAD 検出 HPLC によって分析した。シアル酸は、0.05 M 塩酸または 2 M 酢酸中 80℃に加熱することにより、またはシアリダーゼ処理により遊離させた。遊離シアル酸を 1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン(DMB)誘導体化した後蛍光検出 HPLC により、または誘導体化せずに PAD 検出 HPLC により分析した。

3) オリゴ糖試験法

ウシ IgG からヒドラジン分解により N-結合型糖鎖を

切り出し, 2AA, 2-アミノベンズアミド (2AB), 及び 2AP により蛍光標識した後, 各種 HPLC による分離度を比較した. また, 抗体の糖鎖を N グリカナーゼ F で切り出し, 8-アミノピレン-1,3,6-トリスルフォネート (APTS) で蛍光誘導体化し, レーザー誘導蛍光検出 CE で分析した.

4) MS を用いた物理的・化学的性質の解析

糖鎖不均一性の異なる抗体, 及びヒト血清アルブミン等を用いた. 抗体は DTT で還元し, H 鎖を分取して実験に用いた.

(2) 安全性に関する研究

1) 高感度ウイルス検出法の確立

ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮・NAT による高感度検出法について C 型肝炎ウイルス (HCV) を用いて検討した. 感染性 PCR 法及び PEI 磁気ビーズを用いたウイルス強制感染系はマウス白血球ウイルス (MuLV) を用いて検討した. また, パルボウイルス B19 (B19) に対する NAT の確立と分析法バリデーションは, B19 陽性血漿及び NAT 試験用不活化 B19 を用いて検討した.

2) 製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT の適用に関する検討

アフィニティークロマトグラフィー工程 (protein A カラム) は MuLV, ナノフィルトレーション工程 (15nm ウイルス除去膜) は B19 とヒト E 型肝炎ウイルス (HEV) をモデルウイルスとし, 各工程のウイルス除去能 LRF (Log Reduction Factor) を NAT 及び感染性試験により評価した.

3) 製造工程へのウイルス除去工程及びウイルス不活化工程の導入に関する検討

ウイルス除去工程として, PEI 結合カラムを5種類作製し, 各カラムのタンパク質分離特性をアルブミン含有エポエチンとモノクローナル抗体を用いて, ウイルス除去能を MuLV を用いて比較した. また, ウイルス不活化工程として, インフルエンザウイルスをモデルウイルスに用いて Triton 処理, β -プロピオラクトン処理, UV 照射による不活化効果を検討した.

倫理面への配慮

感染性物質の取り扱い「国立感染研究所病原体等安全管理規定」に沿って作成した規定のもとに実施した. ヒト由来ウイルス陽性血漿は匿名化された検体を用いた.

C. 研究結果

(1) 品質に関する研究

1) MS を用いた確認試験法の標準化

MS 8つの機関において, イオン化法として ESI また

は MALDI, 並びに質量分析計として四重極型, イオントラップ型, 飛行時間型, フーリエ変換磁場型 (FT) またはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型を用いて, 質量約 300~50,000 のペプチドまたはタンパク質医薬品の質量を測定した. その結果, 分子量 1,000 以下のペプチドでは単同位体質量 0.3 Da, 分子量 1,000~6,000 のペプチドでは, 単同位体質量を測定する場合は 300 ppm, 平均質量/最大強度質量を測定する場合は 500 ppm, 分子量約 22,000 までのペプチド及びタンパク質では, ESI の場合は 500 ppm, また, MALDI の場合は 2,000 ppm 以内の誤差で質量を測定できることが確認された. 高分解能測定ができる FT-MS で質量を測定したときの精度は, 分子量 6,000 までは 0.01 Da 以内, 分子量 70,000 までは 1 Da 以内であった.

MS/MS 各種装置を用いて, 分子量 300~4,000 のペプチドの MS/MS を行い, 検出されるフラグメントを比較した. その結果, 5~10 のフラグメントイオンが共通して, かつ再現性よく検出できることが確認された. また, FT-MS を用いて, 分子量 3,600 Da までのペプチドの MS/MS を行ったとき, スペクトルの質量精度は, 0.005 Da 以内であり, C 末端側, N 末端側双方のイオンによって, ほぼすべての配列情報を得ることができた.

2) 単糖試験法の標準化

中性糖及びアミノ糖分析 8つの機関において, 単糖組成分析法として一般的によく利用されている AP, ABEE, AA, PMP 及び PAD 法を用いて, エポエチンの単糖分析を行った. その結果, アミノ糖である GlcNAc 及び GalNAc, 並びに中性糖である Gal, Man, Glc の分離度は, いずれも概ね 1.5 以上であることが確認された. また, タンパク質と各単糖のピーク面積に 3 倍以上の濃度範囲で直線性が認められた. 異なる分析法間で単糖組成分析結果を比較したところ, 含量の少ない GalNAc を除き概ね同様な値が得られた.

同様にアルテプラナーゼの単糖分析を行ったところ, ABEE 法, PMP 法及び PAD 法では比較的良好な直線性が得られたが, その他の方法においては, 直線性が認められなかった. そこで, 併行精度を求めたところ, 多くの方法で概ね 10% 以下であったが, 2AP 法の GlcNAc 等, 2AA 法の Gal, 及び PMP 法の GlcNAc においては, 良好な再現性は認められなかった. つぎに真度を求めたところ, 直線性の認められた ABEE 法と PMP 法においては, いずれの糖でも 70~130%, また PAD 法においても Fuc を除き 70% 以上の真度が得られた. しかし, 2AP 法及び 2AA 法では, 十分な真度が得られない単糖が複数認められた. アルテプラナーゼにはアルギニンが添加されていることから, アルギニンが誘導体化や HPLC における分離等に影響していることが推定された.

シアル酸分析 DMB法及びPAD法により NeuGc及び NeuAcを分析したところ、ピーク分離度はそれぞれ2.0以上及び20以上であった。エポエチンのシアル酸を分析したとき、タンパク質含量とピーク面積には3倍以上の濃度範囲で直線性が認められた。これに対して、添加物を含むアルテプラゼのシアル酸を分析したとき、概ね良好な結果が得られるが、シアリダーゼ処理により遊離したシアル酸をDMB誘導体化したとき、添加物による影響を受けること、また、遊離シアル酸をPAD法で分析したとき、添加物に由来するピークが NeuAcと重なることが明らかとなった。添加物が含まれている場合は、誘導体化の反応液のpHや、分離の際のグラジエント条件を検討することによって、良好な直線性が得られることが確認された。改良法を用いて、DMB及びPAD法の併行精度及び真度を求めたところ、NeuAcの併行精度はいずれも5%以内であり、NeuAc及びNeuGcの真度は84~110%の範囲内であった。

3) オリゴ糖試験法

まず、ウシIgGから切り出した糖鎖を、2AP法、2AA法及び2AB法により分析し、得られた結果を比較した。その結果、2AP化糖鎖の蛍光強度は、2AA化糖鎖や2AB化糖鎖よりも約3倍程度高いこと、また逆相HPLCにおける分離能は、2AP化糖鎖の方が2AA化糖鎖や2AB化糖鎖よりも、顕著に優れていることが明らかとなった。

つぎに、抗体由来N結合型糖鎖をAPTS標識後CEで分析したところ、5本の主糖鎖と複数のマイナー糖鎖が分離/検出されることを確認した。G0の回収率は、100±10%の範囲内であり、また、G0,G1,G2の真度は100±10%範囲内であった。タンパク質量500µg~125µgの範囲で良好な回収率が得られ、各ピークのピーク面積(%)の併行精度及び室内再現精度は、いずれも10%以下であった。

4) MSによる物理的・化学的性質の解析

抗体H鎖のMSを行い、多価イオンのデコンボリューションにより質量プロファイルを得た。CEによる糖鎖プロファイルと比較したところ、プロファイルはよく似ていることが確認された。

(2) ウイルス安全性に関する研究

1) 高感度ウイルス検出法の確立

PEI結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を利用してNATによるウイルス検出を高感度化する方法を確立し、本法をヒト原料血漿中のC型肝炎ウイルスのNATによる高感度スクリーニングに利用できることを明らかにした。また、MuLVの感染性試験において、ウイルスを細胞に感染後、PCRで測定する感染性PCR法を確立した。さらにPEI磁気ビーズと磁場を

利用した強制感染系を確立し、この方法とPCR法を組み合わせることにより、従来法よりも短時間で10倍以上高感度に感染価を測定出来ることが明らかになった。一方、ヒトへの病原性を有するウイルスの中で製造工程での不活化・除去が最も困難なB19について、全ての遺伝子型を検出可能なNAT試験法の確立と最適化を行い、分析法バリデーションの結果、ヒト尿由来タンパク質中のB19の検出感度は49.7 copy/mlと十分な検出感度があることを確認した。また、感染性がないNAT試験用不活化B19をB19陽性血漿と同様にNATのランコントロールや自家標準品として使用可能であることが明らかになった。

2) 製造工程のウイルスクリアランス能評価へのNATの適用に関する検討

医薬品製造工程のウイルスクリアランス能評価は、通常、感染価を指標として実施されるが、より迅速・高感度に測定が可能なNATの適用を検討した。バイオ医薬品製造工程に共通で使用されるアフィニティークロマトグラフィー工程とナノフィルトレーション工程について検討した結果、NATではウイルスの除去能と低pH処理によるウイルス不活化能を区別して評価が可能であるという利点が明らかになった。一方、15nmのナノフィルトレーション工程は、ろ液中に含まれるウイルス由来の感染性のない短鎖DNA断片が定量PCR法で検出され、増幅サイズの短いNATではウイルス除去能が過小評価される可能性が明らかになった。ウイルスクリアランス能評価にNATを適用するには、試料中に混入しNATに反応する遊離核酸断片の前処理による除去や検出法の工夫が必要であるが、DNase処理、RNase処理、超遠心による濃縮により遊離核酸断片の除去を検討したところ、試料毎に条件を最適化する必要があることが判明した。

3-1) 製造工程へのウイルス除去工程の導入に関する検討

バイオ医薬品の製造工程に適用可能なウイルス除去カラム工程を開発するため、樹脂の異なる5種類のPEI結合カラムを作製した。アルブミン含有エポエチンとモノクローナル抗体を用いてカラムの分離特性を検討したところ、どのカラムでもアルブミンとモノクローナル抗体はカラムに結合しないが、エポエチンはカラムに結合することが判明した。また、モノクローナル抗体にMuLVをスパイクして各カラムのウイルス除去能を比較した結果、直鎖又は分岐鎖PEIを結合したSephacrose 6MBカラムはLRFが4以下であったが、分岐鎖PEIを結合したToyopearl AF-Carboxy-650M及びPOROS ALはLRFがいずれも6.65以上となり、これらのカラムは有効なウイルス除去工程となりうる可能性が示された。

3-2) 製造工程へのウイルス不活化工程の導入に関する

る検討

培養細胞を用いたインフルエンザワクチン製造工程への迷入ウイルス不活化工程の導入を検討するため、インフルエンザウイルスをモデルに感染価測定系を構築し、ウイルス不活化工程の条件の最適化を検討した。その結果、ウイルス不活化能 LRF は、 β -プロピオラクトン処理で 4.5、Triton 処理で 7.3 であった。また、これらの薬剤処理に耐性の高い B19 等のノンエンベロープ小径ウイルスの不活化工程として、UV 照射工程を検討したところ、LRF は 4.2 であり、高い不活化効果が得られることが明らかになった。

D. 考察

(1) 品質に関する研究

1) MS を用いた確認試験法の標準化

近年、ほぼすべてのバイオ医薬品の特性解析に MS 及び MS/MS が用いられており、規格及び試験法においても、MS 及び MS/MS が設定されるようになってきた。そこで、多機関で、現在繁用されている様々な型の質量分析装置を用いて、代表的なペプチド及びタンパク質医薬品の質量測定及び MS/MS を行い、標準的な確認試験法を作成した。本試験法は、第十六改正日本薬局方に参考情報として収載されることになった。

2) 単糖試験法の標準化

バイオ医薬品の多くは糖タンパク質であり、品質管理のための標準的単糖試験法の設定が望まれてきた。そこで、多機関で、単糖組成分析法としてよく利用されている方法、即ち、アミノ糖及び中性糖分析法としての 2AP、ABEE、2AA、及び PMP による誘導体化と HPLC を組み合わせた方法、並びに PAD 法、並びにシアル酸分析法としての DMB 法、及び PAD 法について、バイオ医薬品の単糖試験法としての可能性を検証し、標準的な単糖試験法を作成した。

3) オリゴ糖試験法

蛍光標識法として汎用性が高い 2AP 化、2AA 化、2AB 化を比較し、2AP 化糖鎖は蛍光強度及び逆相 HPLC での分離能に優れていることが分かった。また、ATPS 標識法と CE によるオリゴ糖試験は、優れた特異性、真度及び精度を有していることが確認された。本結果も参考として、今後、オリゴ糖試験法の標準化を検討していく予定である。

4) MS による物理的・化学的性質の解析

MS を用いて糖鎖による不均一性が存在する抗体医薬品の H 鎖の質量測定を行い、得られたプロファイル CE によって得られたオリゴ糖プロファイルと比較した。その結果、いずれからも同様なプロファイルが得られることが確認され、MS は抗体の糖鎖不均一性を簡単に解析できる方法として利用できることが明らかとなった。

(2) 安全性に関する研究

1) 高感度ウイルス試験法の確立

医薬品原料のウイルス安全性確保のため、高感度ウイルス試験法の確立を検討し、PEI 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を利用して HCV の高感度ウイルス検出法を確立した。また、PEI 結合磁気ビーズと磁場を利用した強制感染系を確立し、感染性試験と PCR 法と組み合わせることにより、従来法よりも迅速・高感度に感染価を測定できることを明らかにした。また、ヒト尿由来タンパク質について、B19 の全ての遺伝子型を検出可能な NAT 法を確立するとともに、NAT 試験用不活化 B19 についてランコントロールとしての有用性を確認した。

2) 製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT の適用に関する検討

医薬品製造工程のウイルスクリアランス能評価に NAT を適用することにより、感染性試験よりも迅速・高感度に測定が可能であり、ウイルスの除去と不活化を区別して測定できるという利点が明らかになった。一方、NAT は測定試料に含まれる感染性のない核酸断片を検出し、ウイルス除去能を過小評価する可能性があるという問題点があり、試料の前処理や短い核酸を検出しない検出系の設計が重要であること、NAT の阻害因子にも注意する必要があることが明らかになった。

3) 製造工程へのウイルス除去工程及びウイルス不活化工程の導入に関する検討

バイオ医薬品の製造工程に導入するウイルス除去工程として、PEI 結合カラムのタンパク質分離特性とウイルス除去効率を検討した。最適な担体を選択することにより PEI 結合カラムが抗体医薬品の製造工程に共通に利用可能な有効なウイルス除去工程となりうる可能性を示した。また、株化細胞を培養基材とした細胞培養インフルエンザワクチン開発において、ワクチンの安全性を高めるために製造工程へ迷入する恐れのあるウイルスの不活化工程の導入を検討し、高い不活化効果の得られる β -プロピオラクトン処理、Triton 処理、UV 照射条件を確立した。

E. 結論

バイオ医薬品の品質に関する研究として、MS を用いたペプチド及びタンパク質医薬品の確認試験法（第十六改正日本薬局方収載）、並びに糖タンパク質医薬品の標準的単糖試験法を作成した。また、HPLC 及び CE がオリゴ糖分析法として、また、MS が糖鎖による抗体の不均一性解析法として有用であることを確認した。

バイオ医薬品の安全性に関する研究として、PEI 磁気ビーズを利用した NAT 及び感染価の高感度測定法

及び B19 に対する NAT を確立した。また、製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT 適用の利点と問題点を示すとともに、有効なウイルス除去、不活化工程となりうる系を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakakita S, Sumiyoshi W, Miyanishi N, Natsuka S, Hase S, Hirabayashi J: Gas-phase pyridylation of saccharides: development and applications. *Anal. Chem.*, 79, 2674-2679
- 2) 原園 景, 川崎 ナナ, 伊藤 さつき, 小林 哲, 石川 リカ, 高井 俊紀, 古賀 明子, 岡本 寿美子, 山口 秀人, 濱詰 康樹, 佐藤 貴之, 窪田 雅之, 掛樋 一晃, 木下 充宏, 島 圭介, 山田 真希, 山口 照英, 質量分析を用いたペプチド及びたんぱく質性医薬品の確認試験法に関する研究, 医薬品研究 2008, 39(10), 627-646.
- 3) Y Mori, T Hamuro, T Nakashima, T Hamamoto, S Natsuka, S Hase and S Iwanaga, Biochemical characterization of plasma-derived tissue factor pathway inhibitor: post-translational modification of free, full-length form with particular reference to sugar chain. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, 7(1): 111-120.
- 4) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英, 荒戸照世: 第 10 章 抗体医薬品の構造その他の特性の解明. 抗体医薬品における規格試験法・製造と承認申請. 東京, サイエンス&テクノロジー, 2009. p.119-131.
- 5) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, 32(5) 796-800 (2009)
- 6) 荒戸照世: 抗体医薬品における規格試験と承認審査・申請の留意点. 抗体医薬品における規格試験法・製造と承認申請. 東京, サイエンス&テクノロジー, 2009. p.134-141.
- 7) 中島和幸: 抗体医薬品分析におけるキャピラリー電気泳動法による糖鎖プロファイリング法の評価, *PHARM STAGE*, 2010 年 2 月号
- 8) 梶 直孝, 木下充弘, 川崎ナナ, 山口照英, 早川堯夫, 掛樋一晃: 日本薬局方医薬品各条へパリンナトリウム純度試験へのキャピラリー電気泳動法の適用について, *薬学雑誌* 129(10) 1255-1264 (2009)
- 9) 内田恵理子, 山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保: 核酸増幅検査(NAT)による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発, *YAKUGAKU ZASSHI*, 130(2), 163-169 (2010)
- 10) 内田恵理子, 石井(渡部) 明子, 山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保, 臨床とウイルス, 35(4), 278-290 (2007)
- 11) Eriko Uchida, Mieko Kogi, Tadashi Oshizawa, Koei Satoh, Akiko Iwata, Mitsuhiro Murata, Mikio Hikata, Teruhide Yamaguchi: Optimization of the virus

concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses, *Journal of Virological Methods*, 143, 95-103 (2007)

- 12) Yunoki M, Yamamoto S, Tanaka T, Nishigaki H, Tanaka Y, Nishida A, Kubo J, Tsujikawa M, Hattori S, Urayama T, Yoshikawa M, Yamamoto I, Hagiwara K, Ikuta K. *VoxSang.* 2008; 95: 94-100. Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters.

他12件

2. 学会発表

- 1) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 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, 山口照英: ペプチド及びタンパク質性医薬品の質量分析試験の標準化に関する研究. 日本薬学会第 128 年会, (2008. 3. 26-28) 横浜
- 2) 長束俊治, 長谷純宏: N-結合型糖鎖の比較構造グライコーム解析. 第 27 回日本糖質学会年会 (2007. 8. 2-3) 福岡
- 3) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第 7 回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム, 大阪(2009, 12, 7,8)
- 4) 原園 景, 小林 哲, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 多田稔, 橋井則貴, 石井明子, 荒戸照世, 柳原繁弘, 八木有紀, 古賀明子, 津田祐里子, 木村美紀子, 崎田政志, 北村 智, 山口秀人, 三村尚志, 村田芳美, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 長束俊治, 掛樋一晃, 木下充弘, 渡部沙木絵, 山口照英: 糖タンパク質性医薬品の単糖試験法の標準化 薬学会第 130 回年会, 岡山 (2010, 3, 28-30)
- 5) Shunji Natsuka: Research of glycan diversity by quantitative glycan mapping. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸(2009, 10, 21-24)
- 6) 内田恵理子: 医薬品のウイルス安全性確保: NAT による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発. 日本薬学会第 129 年会, 京都 (2009 年 3 月)
- 7) 辻川宗男, 久保純, 田中宏幸, 山本すみ子, 浦山健, 服部眞次, 柚木幹弘, 生田和良: Parvovirus B19 Genotype 2 高レベル血漿中のウイルス粒子の性状, 第 57 回日本ウイルス学会(2009, 東京)
- 8) 久保純, 柚木幹弘, 生田和良: Parvovirus B19 の粒子サイズのダイナミズムとウイルス除去膜内での挙動, 第 47 回日本生物物理学会(2009, 徳島)

他 12 件

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

バイオ医薬品の特性解析及び品質・安全性評価法の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 山口 照英

研究要旨 バイオ医薬品の品質に関する研究として、多機関共同研究により、糖タンパク質医薬品の糖鎖試験法としての既存の単糖分析法の問題点を明らかにし、標準的単糖試験法を策定した。また、物理的・化学的性質の解析において、MSは、抗体の糖鎖不均一性評価法として利用できること、及び高分解能質量分析装置を用いることによって、わずかな誤差で質量を測定できることを確認した。バイオ医薬品の安全性に関する研究として、製造工程中のウイルス除去膜によるウイルスクリアランス能評価への核酸増幅検査(NAT)適用の問題点を明らかにした。また、ポリエチレンイミン結合カラムはバイオ医薬品製造工程で有効なウイルス除去工程、UV照射は有効なウイルス不活性化工程となりうることを明らかにした。さらにNATバリデーション試験における不活化パルボウイルスB19の有用性を示した。

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所	川崎ナナ
(独)医薬品医療機器総合機構	荒戸照世
協和発酵キリン(株)生産本部	柳原繁弘
中外製薬(株)分析技術研究部	古賀明子
(財)化学及血清療法研究所試作研究部	中島和幸
アステラス製薬(株)製剤研究所	北村 智
大日本住友製薬(株)分析研究所	濱詰康樹
サーモフッシャーサイエンティフィック(株)	窪田雅之
新潟大学理学部生物学科	長束俊治
近畿大学薬学部	掛樋一晃
国立医薬品食品衛生研究所	内田恵理子
(株)ベネシス 大阪研究所	柚木幹弘
日本ケミカルリサーチ(株)研究センター	小紫嘉一
(財)化学及血清療法研究所菊池研究所	成瀬毅志

した。本年度は、アルテプラゼを用いて、昨年度検討した単糖分析法の精度及び真度等を検証し、問題点を明らかにした上で標準的単糖試験法を作成した。また、抗体医薬品の糖鎖不均一性解析法、及びバイオ医薬品の物理的・化学的性質評価法としての質量分析法(MS)の可能性を検証した。

安全性に関する研究ではバイオ医薬品製造工程のウイルスクリアランス評価への核酸増幅検査(NAT)の適用、ウイルス不活化・除去に関する技術開発及びウイルス検出技術の高感度化・高精度化及び検出法の標準化を目的とした。本年度は、ウイルス除去膜による工程評価へのNATの適用に関する検討、バイオ医薬品製造工程へのウイルス除去カラム工程及びウイルス不活性化工程の導入に関する検討、パルボウイルスB19のNATによる検出と分析法バリデーションに関する検討を行った。

A. 研究目的

新規バイオ医薬品を早期に実用化へ結び付けるためには、バイオ医薬品開発の初期段階から承認審査に至る創薬全般に渡る迅速化・効率化が不可欠である。本研究では、最先端のタンパク質構造解析技術を取り入れた特性解析並びに規格及び品質試験法、並びにウイルス安全性に関する高感度・高精度な試験法の開発と試験法の標準化を行うことにより、バイオ医薬品開発の迅速化・効率化に資することを目的とする。

品質に関する研究では、一昨年度は質量分析法(MS)を用いたペプチド・タンパク質性医薬品の確認試験法を作成し、第16改正参考情報に収載されることとなった。昨年度は糖鎖試験法整備の一環として単糖試験法の標準化に着手し、単糖標準物質、エポエチン、アルテプラゼを用いて、誘導體化やHPLCを組み合わせた既存の様々な単糖分析法の特異性及び直線性を確認

B. 研究方法

(1) 品質に関する研究

1) 単糖試験法

単糖標準物質として、L-フコース (Fuc)、N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc)、D-ガラクトース (Gal)、N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc)、D-グルコース (Glc)、D-マンノース (Man)、N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) 及びN-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) 糖を用いた。併行精度は、アルテプラゼ 250 pmolの定量値より求めた (n=6)。真度は、それぞれ200, 500, 又は1000 pmolに相当する単糖標準物質の溶液をアルテプラゼ 250 pmolに添加した試料の定量値から求めた (n=3)。(共同検定参加機関：協和発酵キリン株式会社、中外製薬株式会社、アステラス製薬株式会社、大日本住友製薬株式会社、新潟大学、近畿大学、及び国立医薬品食品衛生研究所；順不同)

中性糖及びアミノ糖試験では、4~7 M の TFA を用いて 100°C に加熱して単糖を遊離した。酸加水分解条件下での分解を補正するため、単糖標準物質も試料と同様に処理した。アセチル化にはピリジンと 10~50 μ L の無水酢酸を用いた。遊離単糖の分離・検出方法として HPLC を採用し、2-アミノピリジン、4-アミノ安息香酸エチル、及び 2-アミノ安息香酸誘導体化法と蛍光検出 HPLC を組み合わせた方法（それぞれ 2AP 法、ABEE 法または 2AA 法）、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン誘導体化法と UV 検出 HPLC を組み合わせた方法（PMP 法）、並びに誘導体せずに PAD 検出 HPLC を用いる方法（PAD 法）を標準的方法として選んだ。定量法としては、ラムノースや *N*-アセチルマンノサミン等を用いた内標準法又は絶対検量線法を設定した。

シアル酸の分析では、0.05 M 塩酸や 2 M 酢酸中 80°C に加熱する酸加水分解法及びシアリダーゼによる酵素消化法によって遊離した。遊離したシアル酸は、1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン誘導体化後蛍光検出する方法（DMB 法）、または未標識のまま PAD 検出する方法（PAD 法）を用いて分析した。

2) MS

試料として、糖鎖不均一性の異なる抗体、及びヒト血清アルブミン(HSA)等を用いた。装置は Q-Tof2 (Micromass)及び Orbitrap (ThermoFisher scientific)を用いた。

(2) 安全性に関する研究

1) バイオ医薬品製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT の適用

アンチトロンビン製剤の実製造工程におけるウイルス除去膜 Planova-15N (孔径 15nm) 工程を模倣して、ウイルス除去膜工程前サンプルにパルボウイルス B19 (B19) をスパイクし、Planova-15N によるろ過前後の B19 ゲノムを PCR ELISA 法 (DIG ELISA 法; Roche; 増幅長 372bps) による NDP 半定量法と定量 PCR 法 (artus ParvoB19TM PCR Kit; Qiagen, 増幅長 72bps) で比較した。また、合わせて感染価も測定した。更に、ろ過前後の液から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動後、ゲルを 0.5Kb 以下、0.5~1.0Kb、1.0~2.0Kb、2.0~4.0Kb、4.0Kb 以上の 5 分画に分け、DNA を抽出し、Q-PCR 及び PCR ELISA 法で B19 ゲノムを測定した。各画分を Q-PCR 法で B19 ゲノム量を定量し、検体中に含まれる B19 DNA のサイズの比率を算出した。さらに抽出した DNA の 10 倍希釈系列を作成し、PCR ELISA 法による NDP 値を測定した。

2) ウイルス除去カラム工程の開発

次の 5 種類のポリエチレンイミン(PEI)結合カラム

を作製した。

- A : 直鎖 PEI-Sepharose 6MB (bed volume 1ml)
- B : 分岐鎖 PEI-Sepharose 6MB(1ml)
- C : 分岐鎖 PEI-Toyopearl AF-Carboxy- 650M (1ml)
- D : 分岐鎖 PEI-POROS AL (0.3ml)
- E : 分岐鎖 PEI-POROS EP (0.5ml)

モデルタンパク質としてエポエチン製剤 (ヒトアルブミン添加) と抗 CD45 モノクローナル抗体ハーベスト液を用いた。モデルウイルスは異種指向性マウス白血病ウイルス (X-MuLV ; 10^8 copies/ml) を用いた。

タンパク質分離特性の検討は、各カラム PBS(-)で洗浄後、カラム A~C にはモデルタンパク質溶液を各 1ml、カラム D,E は各 0.5ml アプライし、これを fraction 1 とした。アプライ後、PBS(-)でアプライ量と等量で 4 回フラクションを分取した。その後、カラムに結合したタンパク質を 3M NaCl/ 50 mM Glycine HCl で溶出し、等量で 3 回分取した。ウイルス除去試験では、抗 CD45 モノクローナル抗体ハーベスト液 5ml に X-MuLV 溶液 0.5ml を添加したものを試料としてアプライし、PBS(-)で溶出される fraction 2~4 をプールした。試料溶液と各カラムの溶出液に含まれる X-MuLV の量をリアルタイム定量 RTPCR 法により定量し、ウイルスのクリアランス能 LRF (Log Reduction Factor)を算出した。

3) ウイルス不活性化工程導入の検討

モデルウイルスとしてインフルエンザウイルス A/H5N1/Indonesia/05/2005-PR8-IBCDC- RG2 株を用いた。ウイルスの UV 照射処理は、UV の波長を 254nm に設定し、照射量はウイルス液の 254nm における吸光度あたり 200、500J/m² とした。照射によるウイルス不活性化能は以下のインフルエンザウイルスの感染価測定系を用いて確認した。

まず、MDCK 細胞を confluent に培養した 96 ウェルプレートより培養液を吸引除去後、150 μ L/ウェルの PBS で細胞を 2 回洗う。洗浄後、20 μ g/mL のトリプシン溶液を 50 μ L ずつ入れ、さらに各ウェルにウイルス希釈液を 50 μ L ずつ入れて 4 日間培養する。培養後、細胞を 10%ホルマリン溶液処理、Naphthol blue black 染色後、0.1N NaOH を加えて細胞を溶解させ、プレートリーダーにて 630nm の OD を測定する。ウイルス液を入れないコントロール細胞の OD₆₃₀ の平均値から 3SD を引いた値を下回るものをウイルス感染陽性として感染価 (Log₁₀TCID₅₀/mL) を求めた。

感染価の計算方法 :

$$|\log_{10}A - (a-50)/(a-b) \times 0.5| + \log_{10}0.05$$

(累積感染率 50%をはさむ前後の希釈倍率 (A,B) とその感染率 (a, b))

4) パルボウイルス B19 NAT 試験法の確立と分析法バリデーション

B19 NAT 試験法にはウイルス数既知の B19 陽性血漿又はウイルス数既知の NAT 試験用不活化 B19 (NATtrol parvovirus B19) を用いた。B19 試験法は、B19 を含む試料 0.1 mL からウイルス DNA を抽出後、スマイテスト パルボウイルス B19 遺伝子定性キット ver. 2 (医学生物学研究所) を用いて B19 の検出を行った。この時、抽出溶液に添加した内部コントロール (プライマー領域は同じで、ウイルスと異なるプローブ結合部位を持つ DNA 断片、プローブ固定プレートをウイルス検出用と内部コントロール検出用を用意) により、PCR による DNA 断片の増幅時の異常の有無を確認した。また、遠心分離によるウイルスの回収の検討は、尿由来たん白質に NAT 試験用不活化 B19 又は B19 陽性血漿を添加した試料 1 mL を 4°C、50,000×g で 15 時間遠心分離した後、上清を除き、沈殿としてウイルスを回収後、生理食塩液 0.1 mL に懸濁し、この溶液について B19 試験法で分析した。

倫理面への配慮

使用したウイルス陽性ヒト血漿は匿名化された検体を使用した。その他の試料は市販品を用いており、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果

(1) 品質に関する研究

1) 単糖試験法

中性糖及びアミノ糖分析 平成 20 年度の共同検定では、エポエチンについては良好な直線性が得られたのに対し、アルテプラゼについては直線性をはずれる分析法があった。分析法間の変動もエポエチンと比べて大きかったので、平成 21 年度はアルテプラゼを試料として、各分析法の併行精度と真度を求めた。その結果、併行精度は 2AP 法の GlcNAc 等、2AA 法の Gal、及び PMP 法の GlcNAc を除き、10% 以下であった。なお、2AP 法においては、内標準に用いた Rha に重なる試料由来ピークが認められ、正しく定量することができなかった。真度に関しては、ABEE 法と PMP 法において、いずれの糖でも 70% 以上 130% 以下で十分な値が得られた (Table 1)。PAD 法でも Fuc の 4 点と Man の 1 点を除き、70% 以上の十分な真度が得られた。しかし、2AP 法ではほとんどの糖について、また 2AA 法では半分の糖について、十分な真度が得られなかった。

シアル酸分析 平成 20 年度の共同検定において、アルテプラゼのシアル酸を測定したとき、DMB 法では十分な直線性が得られたものの、PAD 法では十分な直線性が得られなかった。この理由として、NeuAc のピークに妨害ピークが重なっていると考えられたの

で、平成 21 年度は、PAD 法については HPLC のグラジエント条件をより長いものに変更した。また、アルテプラゼ製剤には添加物としてアルギニンが含まれており、50 mmol/L 塩酸を用いた場合、添加物のために pH が十分に下がらないことから、平成 21 年度の測定では、2 mol/L 酢酸を用いて加水分解することにした。さらに、DMB 法については、遊離の際シアリダーゼを用いた場合に十分な真度が得られなかったため、酢酸を用いて再試験した。その結果、DMB 法と PAD 法における NeuAc の併行精度はそれぞれ 0.5~3.6% と 0.3~0.6% で、いずれも良好であった。また、NeuAc 及び NeuGc の真度はそれぞれ 84~105% 及び 88~109%、並びに 100~108% 及び 102~110% で、これも比較的良好であった (Table 2)。ただし、シアリダーゼ消化後に DMB 誘導体化した DMB 法では、全体的に真度が低い傾向にあった。

2) MS

電場型 FTMS である LTQ Orbitrap を用いて、タンパク質、ペプチドの精密質量分析、および MS/MS によるアミノ酸配列確認の精度を検討した。その結果、分子量 6 万のたんぱく質で 1 Da 以内の分析精度を確認できたほか、ペプチドについては MS、MS/MS とともに数ミリ Da の精度で分析が可能であった。

糖鎖 G0, G1, G2 の比率が異なる 2 つの抗体を DTT で還元し、H 鎖を分取した。H 鎖の質量分析を行い、多価イオンのデコンボリューションにより質量プロファイルを得た。昨年度得られた CE による糖鎖プロファイルと比較したところ、差異は認められなかった。

(2) ウイルス安全性に関する研究

1) バイオ医薬品製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT の適用

ウイルスクリアランス試験に PCR (NAT) 法を応用するための留意点を明らかにするために、ウイルス除去膜 (孔径 15nm) の B19 除去能を増幅長の異なる 2 種類の PCR 法 (定性的 PCR 法のひとつである PCR ELISA 法を用いた半定量法 (non-detectable end-point 法、以下 NDP 法) 及び、定量的 PCR 法 (Q-PCR) の異なる 2 種類の PCR 法を用いて比較するとともに、ろ過前後のサンプル中の B19 ゲノムの存在状態を調べた。その結果、ろ液中の感染価は検出限界以下であったが、Q-PCR 及び PCR ELISA 法では陽性となった。Planova-15N を用いたウイルスろ過における Q-PCR 法と PCR ELISA 法による LRF (Log Reduction factor) は 4.8/4.5 と 7.0/7.3 であり、約 2.5 Log の乖離があった。(Table 1)。

この原因として、PCR ELISA 法の増幅サイズは 372bp であるのに対し Q-PCR の増幅サイズは 76bp

と短いので、ろ液中に Q-PCR 法では増幅できるが、PCR ELISA 法で増幅できない B19 由来短鎖 DNA が多く存在する可能性が示唆された。B19 DNA 断片の存在について解析したところ、Planova 15N ろ過前液では B19 DNA の 90%以上がウイルス粒子中の全長ゲノム (5.6Kb) を含む長鎖 DNA であり、0.5Kb 以下の短鎖 DNA は 0.3%以下で、Q-PCR 及び PCR ELISA いずれもウイルス粒子中の DNA を検出していると思われた。一方、ろ液ではほぼ 90%が短鎖 DNA であり、4.0Kb 以上の長鎖 DNA は 2%以下であった。PCR ELISA 法は短鎖 DNA を増幅 (検出) しにくく、Q-PCR 法は逆に増幅 (検出) が可能であることから、本乖離が発生したと考えられた (Table 2)。

2) ウイルス除去カラム工程の開発

バイオ医薬品の製造工程に適用可能なウイルス除去カラム工程として、PEI が多種類のウイルスを吸着する性質を利用した PEI 結合カラムの作製を検討するため、PEI のアミノ基とのカップリング反応が可能な活性官能基を持ち、樹脂内部にもウイルスをトラップ可能な多孔質構造を持つ 4 種類の担体を選定し、直鎖または分岐鎖 PEI をカップリングして 5 種類の PEI 結合カラムを作製した。

各カラムについて、モデルタンパク質を用いて分離特性を検討した結果、いずれのカラムでもヒトアルブミンとモノクローナル抗体はカラムに結合しないが、エポエチンはカラムに結合することが判明した。ピークの分離はカラム C,D,E で優れていた。

各カラムのウイルス除去能をカラムに結合しないことが確認された抗体医薬品のモデルとして抗 CD45 モノクローナル抗体ハーベストを用い、モデルウイルスとしてバイオ医薬品の製造で汎用される CHO 細胞株に認められる内在性ウイルス様粒子のモデルである、マウス白血病ウイルス (X-MuLV) をスパイクして検討した。その結果、カラム C、D では抗体が溶出される素通り画分中のウイルスは検出限界以下で LRF は 6.65 以上と算出されたが、カラム A、B は素通り画分にウイルスが検出され、カラム A、B の LRF はそれぞれ 3.34、1.51 であった (Table 3)。

3) ウイルス不活化工程導入の検討

株化細胞を培養基材とした細胞培養インフルエンザワクチンの開発において、ワクチンの安全性を高めるため、製造工程へ迷入する恐れのあるウイルスの不活化を目的としたウイルス不活化工程の導入を検討している。前年度までに、ウイルス不活化工程として β -プロピオラクトン処理、Triton 処理の条件を検討したが、本年度はこれらの薬剤に対して耐性の高いパルボウイルス等のノンエンベロープ小径ウイルスの不活化

工程として UV 照射工程を検討した。

インフルエンザウイルスをモデルとして UV 照射処理を実施し、ウイルス不活化能を評価した。照射波長を 254nm に設定し、照射量はウイルス液の 254nm における吸光度あたり 200、500J/m² とし、ウイルス不活化能を比較した。200 J/m² のときの LRF は約 4.2 で、500J/m² まで UV 照射量をまで上げてウイルス不活化能に差はみられなかった (Table 6)。

UV 照射処理によるたん白質変性の影響を確認するために、UV 処理していない HA 抗原を免疫して得られた抗血清を用いた一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験) を実施したが、UV 照射処理前後で変化はみられなかった。次に、UV 照射処理有り、無しのウイルス液をそれぞれ精製し、得られた HA 抗原液のマウス免疫試験を実施し、誘導された抗体価を、ニワトリ赤血球を用いた凝集阻止活性 (HI 試験) で評価した。HI 試験には UV 照射処理有り、無しの HA 抗原を用い、各抗血清と反応させた。その結果、抗原の UV 照射処理にかかわらず、誘導された抗体力価に差はみられず、HI 試験に用いた抗原と抗血清の組み合わせ間でも差はみられなかった。

4) パルボウイルス B19NAT 試験法の確立と分析法バリデーション

パルボウイルス B19 (B19) はヒトへの病原性を有するウイルスの中で最も不活化および除去が困難なウイルスであり、万一原料にウイルスが混入した場合において、B19は製品に残存する可能性が憂慮されるウイルスである。よって、ウイルスに対する安全性確保のためにヒト尿由来たん白質について本ウイルスの NAT 試験が実施されている。

本研究ではこれまでにヒト尿由来たん白質に対する B19の NAT試験方法を開発し、試験法の分析法バリデーションを実施した。今年度は、開発した試験法のランコントロールとして、NAT試験用不活化 B19が使用可能か検討した。

まず、NAT試験用不活化 B19の安定性を検討した。NAT試験用不活化 B19を 5±3°C で 18 箇月保管後に、B19試験法により分析したところ、尿由来たん白質に NAT試験用不活化 B19を 1000 copy/mL 添加した試料では 100%、300 copy/mL 添加した試料には 50% 検出可能であり、5±3°C で 6 箇月保管後 (入手時、製造後 6 箇月経過) と同様であったことから、NAT試験用不活化 B19は 5±3°C の保管で 12 箇月以上安定であることが確認された。

次に、遠心分離による B19 の回収を B19 陽性血漿と不活化 B19 で比較した。その結果、遠心分離を行うことにより、NAT 試験用不活化 B19 は 10 倍、B19 陽性血漿は数倍から 10 倍の検出感度上昇が認められた、いずれも遠心によりウイルスが濃縮された (Table 7)。

D. 考察

(1) 品質に関する研究

1) 単糖試験法

中性糖及びアミノ糖の分析法にはいくつかの問題点があり、そのうちのいくつかは添加物であるアルギニンによる影響が原因であることが確認された。

平成 20 年度にアルテプラーゼの試料量とピーク面積との直線性を検討したとき、いくつかの方法では試料量が多くなるほど単糖含量の定量値が低くなる傾向が認められたことから、アルテプラーゼに含まれている添加物が、単糖の遊離、*N*-アセチル化、蛍光誘導体化、過剰試薬の除去、及び HPLC に影響を及ぼしている可能性が考えられた。特に、加水分解における糖の遊離とアミノ基のアセチル化が不十分であった可能性が考えられたので、平成 21 年度の共同研究では、トリフルオロ酢酸と無水酢酸の添加量を見直して、併行精度及び真度を求めた。その結果、それぞれの分析法では以下のように影響の受け方が異なっていることが明らかになった。

まず、2AP 法においては、内標準に用いたラムノースに重なる試料由来のピークが認められた。また、分析値のばらつきが大きく、添加物の影響を受けやすいことが示唆された。内標準として適切な物質を選択すれば試験法として利用できる可能性はあるが、2AP 法は HPLC の分析時間が 120 分以上であることから、積極的に選択すべき方法ではないと考えられた。

一方、2AA 法においては、*N*-アセチル化を行った場合には GlcNAc の真度が低かった。この原因は不明であるが、アセチル化の有無は分析結果に影響を及ぼさなかったため、アセチル化を特に行う必要はないと思われた。2AA 法では誘導体化後に過剰試薬を除去することもなく HPLC の分析を行えることから、分析の省力化には有効である。

PMP 法においては、ある試験条件では比較的良好な真度が得られたが、他方では真度が 100% を超えるという結果が得られた。これは、蛍光検出器よりも特異性の低い UV 検出器を用いたため、添加物の影響を受けたことが原因のひとつと考えられた。

PAD 法ではドリフト傾向が認められ、アルギニン濃度に依存して Fuc のピーク面積が減少した。PAD 法は添加物の影響を受けやすく、特に溶出時間の早い Fuc で影響が大きいことが示唆された。

以上より、いずれの方法も添加物が少ない場合は問題なく分析が可能なものの、多量の添加物を含む場合には分析に影響を及ぼす可能性があり、試料にあわせて分析条件を検討する必要があることが示された。

なお、単糖を誘導体化した後に過剰の試薬を除去するため、ABEE 法ではトルエン又はクロロホルム、PMP

法ではジブチルエーテル又はクロロホルムを用いた。トルエンやジブチルエーテルで十分な精度と真度が得られており、クロロホルムよりも毒性が低く環境へ負荷をかけないという点からも、トルエン又はジブチルエーテルの使用を標準的試験法として推奨したい。

シアル酸の分析においても、いくつかの問題が認められた。まず、遊離方法に関しては、平成 20 年度の検討において 50 mM 塩酸を用いた場合、アルテプラーゼの量が多いと添加物の影響により十分に pH が下がらず、遊離が十分にできなかったため、添加物の pH に対する影響を考慮する必要があった。2 M 酢酸やシアリダーゼを用いた場合には、特に問題は認められなかった。

次に誘導体化に関しては、DMB 法における誘導体化は酸性条件下で進行するので、試料溶液の pH が十分に低くないと誘導体化の効率が悪くなることが確認された。特にシアリダーゼによるシアル酸の遊離は弱酸性条件化で行うため、DMB 誘導体化に際して反応液を酢酸等で酸性にしておくことが重要であった。また、試料溶液の組成が誘導体化の効率に影響をあたえることから精度や真度等の確認が重要であり、影響が認められる場合には試料を希釈する、内標準を使用する等の方法を用いても良いと思われる。

さらに HPLC に関しては、PAD 法の場合、電気化学検出器は蛍光検出器より特異性が低いため、シアル酸定量において妨害ピークが検出されることがあった。このような場合は、妨害物質を排除するためのグラジエント条件を十分に検討する必要がある。DMB 法の場合は、HPLC について特に問題は認められなかった。

以上に述べた共同研究の結果から、今回検討した方法は各ステップを妨害するような物質が共存していない医薬品の単糖分析法としては適しているが、アルテプラーゼのように多量の塩基性物質が添加されている場合は、その影響を受けることが明らかとなった。中性糖及びアミノ糖の分析においては、単糖の遊離、アセチル化、誘導体化、過剰試薬の除去、及び HPLC の各ステップにおいて影響を受ける可能性があり、2AA、PMP 及び PAD 法のようにいくつかの操作過程を省略できる方法を選択するのもよいと思われるが、UV 検出器や電気化学検出器は添加物の影響を受けやすいため、十分に条件を検討すべきである。シアル酸の分析においてもいくつかの操作ステップで添加物の影響を受けることが明らかになった。とくに、酸加水分解によるシアル酸の遊離においては、反応液の pH に留意する必要がある。また、シアリダーゼ消化した場合、その後の DMB 誘導体化において蛍光標識化合物の収率が低くなることから、酢酸等の添加により誘導体化条件を適切に設定する必要がある。PAD 法においては、HPLC による分離が添加物の影響を受けやすいこと

から、分離条件の検討が必要である。以上の点に留意する必要はあるが、DMB 法及び PAD 法のどちらも、シアル酸の標準的試験法として適切であった。

2) MS

タンパク質医薬品の質量分析において、高分解能質量分析装置を用いることにより、分子量 6 万程度の HSA でもわずかな質量誤差で質量を測定できることが明らかになった。また、抗体医薬品の H 鎖の質量分析により、CE を用いたオリゴ糖プロファイリングと同様なプロファイルが得られることが確認され、糖鎖不均一性の解析にも利用できることが明らかとなった。MS は物理的・化学的性質評価法として、今後より幅広く利用されることが期待される。

(2) 安全性に関する研究

1) バイオ医薬品製造工程のウイルスクリアランス能評価への NAT の適用

バイオ医薬品のウイルス除去法として有力な手段であるウイルス除去膜工程のウイルス除去能を B19 スパイク試験で評価したところ、PCR ELISA 法と Q-PCR 法による評価において LRF の乖離が認められた。その原因として、15nm のウイルス除去膜ろ液中には感染性がないと思われる 4Kb 以下の中鎖 DNA が 98%以上存在することが明らかになり、短鎖 DNA が検出されるプライマーを用いた NAT 法はウイルス粒子の除去能において過小評価になる場合があることが判明した。非感染性の遊離 DNA を除くには DNase 処理も可能だが、粒子中のゲノムが分解する可能性があり、条件設定はむずかしいことが明らかになっている。また、超遠心により沈殿にウイルス粒子を回収する方法はろ液のようにウイルス粒子がきわめて少ない場合には回収率の問題がでてくると思われる。したがって長いサイズのゲノムを増幅できる NAT 法の開発、ウイルス粒子と遊離 DNA との分離が可能なレジンをを用いる方法等の開発が今後の課題であると思われる。また、工程のウイルス除去能を評価するウイルスクリアランス試験にこの NAT 法を応用する場合は、検体に含まれる DNA 小断片の影響を受けないプライマーの設計が必要である。

2) ウイルス除去カラム工程の開発

バイオ医薬品の製造工程に適用可能なウイルス除去カラム工程の開発のため、PEI 結合カラムの樹脂の検討を行った。5 種類のカラムを作製してタンパク質分離特性を検討したところ、どのカラムでもタンパク質の種類によってカラムに結合するものとならないものがあり、アルブミンとモノクローナル抗体カラムには結合しないが、エポエチンはカラムに結合することが

判明した。ウイルス除去カラムとして使用するには、目的とするタンパク質バイオ医薬品がカラムに結合せず、高いウイルス吸着能のあるカラムを選択することが必要である。今回の結果から、PEI カラムにウイルスが結合して除去できれば、モノクローナル抗体医薬品のウイルス除去工程として使用できる可能性が示唆された。また、各カラムのウイルス除去能を比較した結果、Sephacrose 6MB に直鎖又は分岐鎖 PEI を結合したカラム A 及びカラム B は、どちらも LRF が 4 以下であった。ウイルスの除去、不活化工程として頑健性のある工程としては LRF が 4 以上の工程とされることから、これらのカラムはいずれも頑健性のある除去工程とはいえない。一方、分岐鎖 PEI を結合した Tbyopearl AF-Carboxy-650M(カラム C)及び POROS AL(カラム D)は LRF がいずれも 6.65 以上となり、有効なウイルス除去工程となりうる可能性が示された。これら 2 種類のカラムのうち、カラム C は適度な溶出速度で分離可能であり扱いも容易であることから、ウイルス除去カラムの樹脂として最適であると判断した。今後、他のウイルスの除去能を検討する必要があるが、最近開発が著しいモノクローナル抗体医薬品に普遍的に使用可能なウイルス除去カラムとしての開発が期待される。

3) ウイルス不活化工程導入の検討

ウイルスワクチン製造工程に導入する不活化工程として、UV 照射処理条件を検討した。UV 照射は、照射する波長に対し吸収のある物質の影響でその効率が大きく変化すると考えられるため、あらかじめウイルス液の 254nm の吸光度を測定し、吸光度あたりの照射量で評価した。また、UV 照射処理ではたん白質の変性、特にワクチンの場合には抗原性の変化が懸念されることから、処理前後での抗原性の変化の有無を、SRD 試験及びマウス免疫試験で確認した。

ウイルス不活化能の評価は、ウイルス液の 254nm における吸光度あたりの UV 照射量 200、500J/m² で実施したが、LRV はそれぞれ約 4.2 で、UV 照射量を上げてもウイルス不活化能に差はみられなかった。UV 照射処理によるウイルス不活化では、ウイルスゲノムのサイズが小さい方がより不活化されやすい。UV 照射処理で不活化のターゲットとしているパルボウイルス等のノンエンベロップ小径ウイルスは、今回モデルウイルスとしたインフルエンザウイルスよりもゲノムサイズが小さいため、今回の検討結果と同等以上のウイルス不活化効果が期待される。

また、UV 照射による抗原性の変化の有無に関しては、SRD 試験で免疫沈降リングの形状、HA 抗原の測定値に変化がみられなかったこと及びマウス免疫試験で得られた抗血清の抗体価、抗原との特異性に差はみ

られなかったことから、UV 照射処理により、抗原性が変化するようなたん白質の変性は起こっていないと考えられた。

4) パルボウイルス B19 NAT 試験法の確立と分析法バリデーション

血液製剤を対象とした NAT 試験のガイドラインでは、NAT 試験実施時に、95% 検出限界を示すウイルス濃度の 3 倍量の濃度のウイルスを含む試料をランコントロールとして用いることが記載されている。ランコントロールには通常、ウイルス陽性血漿が用いられ、B19 試験法では 95% 検出限界が 49.7 copy/mL であることからランコントロールは 150 copy/mL の濃度の B19 陽性血漿を含む溶液となる。しかし、血液に比べウイルスの混入の可能性の少ない尿由来たん白質の NAT 試験のランコントロールとしてウイルス陽性血漿を用いるには、高度な封じ込めが可能な施設を必要とし、ウイルス陽性血漿の管理の必要性も生じる。そこで、高度に精製したウイルスの表面たん白質を化学的および酵素処理することで、ウイルスの宿主細胞へ感染性を失わせた NAT 試験用不活化 B19 をランコントロールとして用いることが可能かを検討した。その結果、NAT 試験用不活化 B19 は B19 試験法で検出でき、検出率はウイルス濃度依存的に上昇することを確認した。また、NAT 試験用不活化 B19 は B19 陽性血漿と同様、遠心分離により沈殿へウイルスが回収され、ウイルス核酸を含むウイルス粒子の構造を維持していることを確認した。さらに、 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ の保管で 12 箇月以上安定であることも確認された。従って NAT 試験用不活化 B19 は、感染性を有しないがウイルス核酸を含むウイルス粒子であり、B19 陽性血漿と同様、B19 試験法でウイルスの検出が可能であること、また、NAT 試験用不活化 B19 は $5 \pm 3^\circ\text{C}$ で保管でき、製造後 18 箇月間以上使用可能であった。

以上の結果から、NAT 試験用不活化 B19 は、ウイルス陽性血漿と同様にランコントロールとして用いることが可能である。ランコントロールとして使用する場合は、95% 検出限界が 524 copy/mL (NAT 試験用不活化 B19 の表示値) であることから、その 3 倍量の 1600 copy/mL の濃度で使用することとなる。さらに、NAT 試験用不活化 B19 を国際標準品など広く認められた標準品でウイルス量の評価をすることで、自家標準品として試験法変更時の検出感度の測定、試験法の交差汚染の否定、試験従事者の技術確認などに使用可能である。

E 結論

品質に関する研究として

- 1) 糖タンパク質性医薬品の中性糖及びアミノ糖の分析法に 2AP 法, ABEE 法, 2AA 法, PMP 法, 及

び PAD 法を選択し、二年間にわたって特異性、直線性、範囲、併行精度、及び真度を検討した。また、シアル酸の分析法には DMB 法及び PAD 法を選択して、同様に検討した。いくつかの方法については、アルテプラーゼに含まれる添加物、あるいは未知の原因によって併行精度及び真度が影響を受けた。これらの方法の頑健性には限界があり、誘導体化後の抽出条件や HPLC の分離条件に注意する必要があると考えられた。

- 2) 物理的・化学的性質の解析において MS は、抗体の糖鎖不均一性評価法として利用できること、また、高分解能質量分析装置を用いることによって、わずかな誤差で測定できることを確認した。

安全性に関する研究として

- 1) ウイルス除去膜の B19 除去能の評価試験において、ろ液中には感染性がない中鎖 DNA が多く存在することが明らかになり、短鎖 DNA を増幅可能なプライマーを用いた NAT 法で定量すると LRF が過小評価される問題点が明らかになった。ウイルスクリアランス試験に NAT 法を応用する場合は、検体中の DNA 小断片の影響を受けないプライマーの設計が必要である。
- 2) PEI 結合カラムのタンパク質分離特性とウイルス除去効率を検討し、最適な担体を選択することにより PEI 結合カラムが抗体医薬品の製造工程において有効なウイルス除去工程となりうる可能性を示した。
- 3) ワクチン製造工程への UV 照射によるウイルス不活化工程の導入をインフルエンザウイルスをモデルに検討し、UV 照射が有効なウイルス不活化能を示すこと、UV 照射してもウイルスタンパク質の抗原性には変化がないことを明らかにした。
- 4) 感染性がない NAT 試験用不活化 B19 は B19 陽性血漿と同様に NAT 試験のランコントロールや自家標準品として使用可能であり、B19 陽性血漿に比べ試験実施者の安全性、試験実施施設の制約などの点から有用であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川崎ナナ: 糖鎖関連医薬品の開発と分析化学, ぶんせき, 17-22 (2010)
- 2) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英, 荒戸照世: 第10章 抗体医薬品の構造その他の特性の解明. 抗体医薬品における規格試験法・製造と承認申請. 東京, サイエンス&テクノロジー, 2009. p.119-131.
- 3) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (5) 796-800 (2009)
- 4) 荒戸照世: 抗体医薬品における規格試験と承認審査・申請の留意点. 抗体医薬品における規格試験法・製造と承認申請. 東京, サイエンス&テクノロジー, 2009. p.134-141.
- 5) 中島和幸: 抗体医薬品分析におけるキャピラリー電気泳動法による糖鎖プロファイリング法の評価, *PHARM STAGE*, 2010年2月号
- 6) Takao Ohashi, Yuka Ikeda, Naotaka Tanaka, Shin-ichi Nakakita, Shunji Natsuka, Yuko Giga-Hama, Kaoru Takegawa: The och1 mutant of *Schizosaccharomyces pombe* produces galactosylated core structures of N-linked oligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 407-414 (2009).
- 7) 梶直孝, 木下充弘, 川崎ナナ, 山口照英, 早川堯夫, 掛樋一晃: 日本薬局方医薬品各条へパリンナトリウム純度試験へのキャピラリー電気泳動法の適用について, *薬学雑誌* 129 (10) 1255-1264 (2009)
- 8) 内田恵理子, 山口照英: 医薬品のウイルス安全

性確保: 核酸増幅検査 (NAT) によるC型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発, *YAKUGAKU ZASSHI*, 130 (2), 163-169 (2010)

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム, 大阪(2009, 12, 7-8)
- 2) 原園 景, 小林 哲, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 多田 稔, 橋井則貴, 石井明子, 荒戸照世, 柳原繁弘, 八木有紀, 古賀明子, 津田祐里子, 木村美紀子, 崎田政志, 北村 智, 山口秀人, 三村尚志, 村田芳美, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 長束俊治, 掛樋一晃, 木下充弘, 渡部沙木絵, 山口照英: 糖タンパク質性医薬品の単糖試験法の標準化 薬学会第130回年会, 岡山(2010, 3, 28-30)
- 3) 長束俊治, 「糖鎖の多様性を視る」, 比較グライコム研究会, 名古屋 (2009, 5)
- 4) Shunji Natsuka: Research of glycan diversity by quantitative glycan mapping. 第82回日本生化学会大会, 神戸(2009, 10, 21-24)
- 5) 辻川宗男, 久保純, 田中宏幸, 山本すみ子, 浦山健, 服部眞次, 柚木幹弘, 生田和良: Parvovirus B19 Genotype 2 高レベル血漿中のウイルス粒子の性状, 第57回日本ウイルス学会(2009, 東京)
- 6) 久保純, 柚木幹弘, 生田和良: Parvovirus B19の粒子サイズのダイナミズムとウイルス除去膜内での挙動, 第47回日本生物物理学会(2009, 徳島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table 1. Accuracy (mean \pm S.D., n=3) in the analysis of neutral and amino sugars from alteplase

method		Fuc	GalNAc	GlcNAc	Gal	Glc	Man
2AP	*1	36 \pm 8	23 \pm 4	42 \pm 16	37 \pm 10	36 \pm 7	60 \pm 17
	*2	108 \pm 15	84 \pm 6	102 \pm 46	93 \pm 4	98 \pm 9	92 \pm 11
ABEE	*3	85 \pm 1.3	79 \pm 3	76 \pm 19	83 \pm 2	86 \pm 5	77 \pm 5
	*4	88 \pm 1	85 \pm 4	93 \pm 16	95 \pm 9	80 \pm 5	112 \pm 19
2AA	*5	75 \pm 2	70 \pm 6	40 \pm 12	98 \pm 1	96 \pm 4	85 \pm 3
	*6	97 \pm 2	92 \pm 2	85 \pm 17	86 \pm 5	67 \pm 16	75 \pm 8
PMP	*7	92 \pm 1	99 \pm 1	105 \pm 2	91 \pm 1	92 \pm 6	96 \pm 2
	*8	128 \pm 6	112 \pm 4	110 \pm 5	124 \pm 14	127 \pm 11	117 \pm 7
PAD	*9	64 \pm 2	84 \pm 0.2	91 \pm 1	84 \pm 0.1	93 \pm 7	84 \pm 2
	*10	64 \pm 0.4	88 \pm 1	108 \pm 11	96 \pm 2	98 \pm 1	86 \pm 10

Table 2. Accuracy (mean \pm S.D., n=3) in the analysis of sialic acids from alteplase