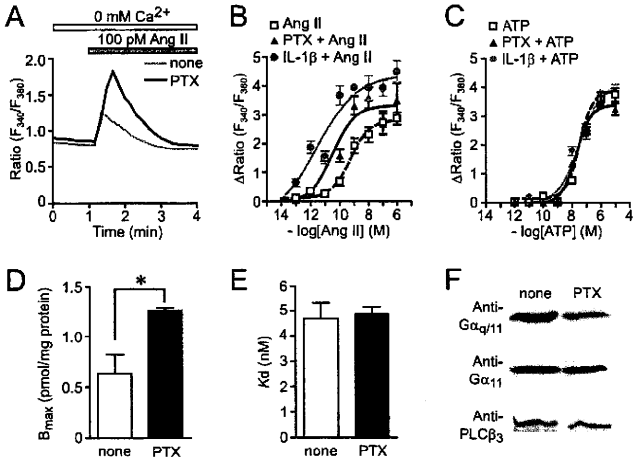

FIGURE 1. **PTX enhances Ca^{2+} responses by Ang II through AT1R up-regulation.** *A*, average time courses of Ca^{2+} response induced by Ang receptor stimulation with Ang II (100 pM) in control and PTX-treated cells. *B* and *C*, peak increases in $[Ca^{2+}]_i$ (*ΔRatio*) plotted against various concentrations of Ang II (*B*) and ATP (*C*) in control, PTX-treated, and IL-1β-treated cells. Cells were treated with PTX (100 ng/ml) or IL-1β (10 ng/ml) for 24 h before agonist stimulation. *D* and *E*, increases in AT1R density induced by PTX (100 ng/ml) for 24 h. The B_{max} (*D*) and K_d (*E*) values for Ang II binding were calculated with GraphPad Prism software. *F*, effects of PTX on expression of $G\alpha_{q/11}$ and $PLC\beta_3$. *, $p < 0.05$ *versus* PTX-untreated cells. *Error bars*, S.E.

PTX-induced increase in B_{max} was completely suppressed by CV11974 (1 μM, AT1R-selective blocker) but not by PD123319 (1 μM, AT2R-selective blocker) (data not shown). The K_d value was not affected by PTX (Fig. 1*E*), indicating that the PTX-induced enhancement of AT1R function is not explained by structural changes in AT1R. It has been reported that the increased expression of $G\alpha_{q/11}$ and $PLC\beta_3$ is involved in the enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} responses in the ischemic heart (40, 41). However, PTX did not affect the expression levels of $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, and $PLC\beta_3$ (Fig. 1*F*). These results suggest that the enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} release in PTX-treated cells is due to AT1R up-regulation but not up-regulation of components of the $G\alpha_q$-$PLC\beta$ pathway.

Because commercially available PTX contaminates with other endotoxins, including lipopolysaccharide, it is possible that other endotoxins contribute to enhancement of AT1R function. Thus, we examined the effects of denatured PTX or PTX purchased from another manufacturer (Sigma) on AT1R functions. Pretreatment of PTX with heat significantly reduced the enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} release induced by PTX (supplemental Fig. 1). In contrast, the Ang II-induced Ca^{2+} release was also enhanced by PTX purchased from Sigma as well as that induced by PTX from Calbiochem. These results suggest that PTX proteins *per se* induce AT1R up-regulation in cardiac fibroblasts.

IL-1β Production Induced by PTX Treatment—To examine whether PTX treatment induces production of a factor(s) that participates in up-regulation of AT1R, we performed microarray analysis of mRNAs from PTX-treated fibroblasts. For each gene, we calculated the average intensity in expression for both control and PTX-treated cells and plotted the ratio of these two induction values. Genes were chosen whose expression was at least 1.25-fold increased or decreased as compared with control cells. The probe sets of 405 genes showed significant changes by PTX treatment. Genes were then assigned to several groups according to their function, and we picked out 70 genes in the gene cluster that is termed "signal transduction" in the AmiGO data base (supplemental Table 2). PTX treatment selectively increased AT1R mRNA (Fig. 2*A*) but not other G protein-coupled receptors. Among genes increased by PTX treatment, IL-1α and IL-1β mRNAs showed a marked increase in expression (Fig. 2*A*). Real-time PCR confirmed the strong induction of IL-1β mRNA by PTX treatment (Fig. 2*B*). Although PTX is reported to increase IL-12 expression by inhibition of G_i signaling in T lymphocytes (42), PTX did not significantly increase mRNA expression of other cytokines (supplemental Table 1). Treatment with mastoparan-7 or the expression of WT $G\alpha_i$ or inhibitory polypeptides of G_i signaling ($G\alpha_i$-ct, a polypeptide that specifically inhibits receptor-G_i protein coupling (39); RGS4, a GTPase-activating protein that specifically binds the GTP-bound form of $G\alpha_i$ and $G\alpha_q$ (43); and GRK2-ct, a Gβγ (βγ subunit of heterotrimeric G protein)-sequestering polypeptide (44)) did not increase IL-1β mRNA expression (Fig. 2*B*). We also confirmed that the expression of $G\alpha_i$-ct did not enhance Ang II-induced Ca^{2+} release (data not shown), and the treatment with B-oligomer of PTX enhanced Ang II-induced Ca^{2+} release (Fig. 2*C*). Furthermore, ELISA revealed that the treatment with PTX actually increased the expression of IL-1β protein levels, whereas the expression of IL-1α protein was below the detection level in PTX-treated cardiac fibroblasts (Fig. 2*D*). These results suggest that PTX selectively induces IL-1β production, and G_i modification is not required for PTX-induced IL-1β production.

IL-1β Mediates PTX-induced Enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} Response—Because it has been reported that IL-1β increases AT1R density in cardiac fibroblasts (17, 45), the cells were treated with IL-1β. Treatment with IL-1β (10 ng/ml) enhanced Ang II-induced Ca^{2+} release (EC_{50} = 31 ± 26 pM) but not ATP-induced Ca^{2+} release, in rat cardiac fibroblasts (Fig. 1, *B* and *C*). These effects of IL-1β are similar to the effects of PTX treatment, and the enhancement by IL-1β seems to be consistent with the findings that PTX treatment increased the induction of IL-1β mRNA and protein. Thus, we examined whether PTX-induced IL-1β production participates in the enhancement of AT1R function. The PTX-induced IL-1β production was suppressed by the treatment with IL-1β siRNAs (Fig. 2*E*). The enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} release by IL-1β treatment was almost completely suppressed by anti-IL-1β neutral antibody (Fig. 2*F*), indicating that the antibody sufficiently inhibits IL-1β-mediated responses. The enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} release by PTX was also suppressed by anti-IL-1β antibody and IL-1β siRNAs (Fig. 2*G*), indicating that PTX-induced IL-1β secretion mediates the enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} release.

Involvement of NF-κB in PTX-induced IL-1β Expression—As the promoter regions of IL-1β and AT1R contain a putative NF-κB binding site (46–48), we next examined the involvement of NF-κB in PTX-induced IL-1β production. As shown in Fig. 3*A*, PTX-induced increase in IL-1β mRNA expression was suppressed by the treatment with Ro-106-9920, a selective inhibitor of IκB phosphorylation, and by the expression of a dominant negative IκB, IκBαm. Because Ro-106-9920 showed

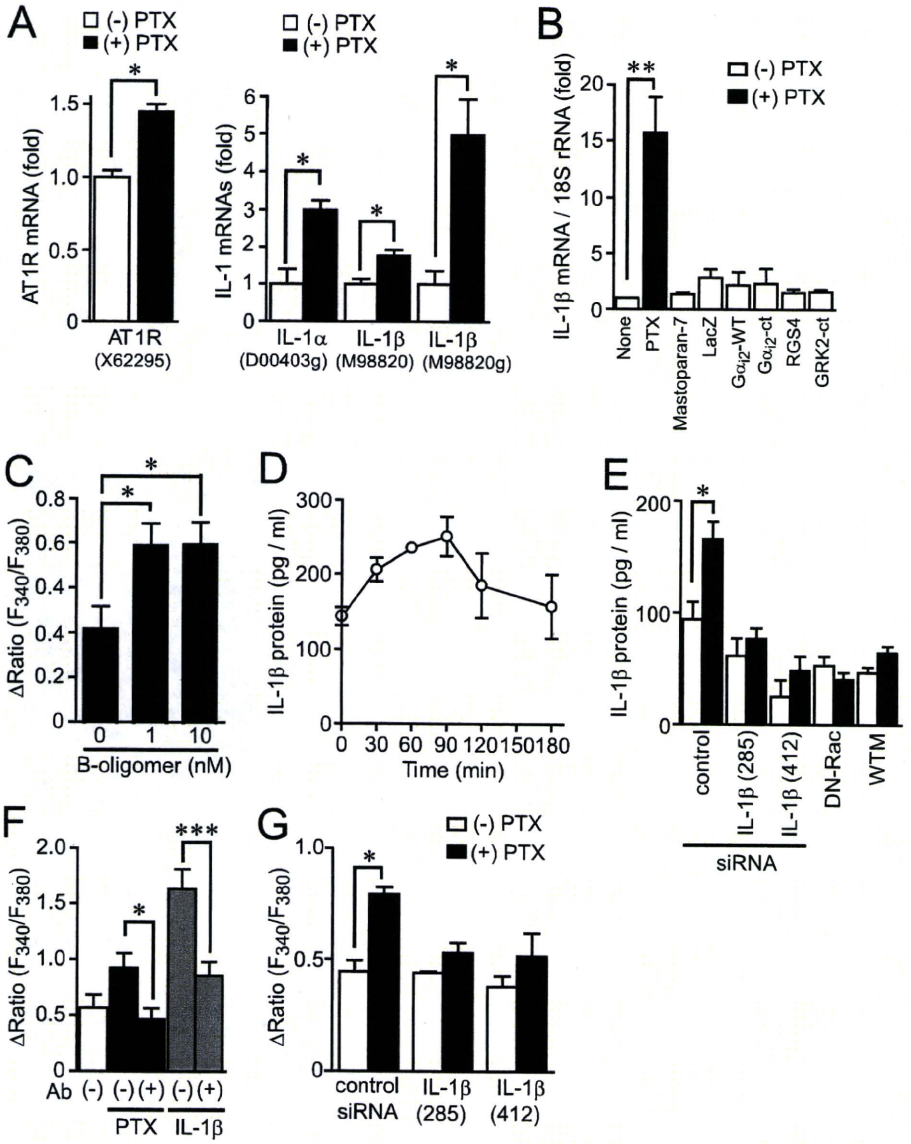

FIGURE 2. **Involvement of IL-1β production in PTX-induced enhancement of Ca^{2+} response by Ang II stimulation.** *A*, effects of PTX on the expression of AT1R, IL-1α, and IL-1β mRNAs. After cells were treated with PTX (100 ng/ml) for 24 h, total RNA was extracted. The expression of mRNAs was determined with microarray analysis. ID numbers of primer probe sets are shown in *parenthesis*. *B*, effects of respective reagents on IL-1β mRNA expression in cardiac fibroblasts. Cells were treated with PTX (100 ng/ml) for 24 h, treated with mastoparan-7 (10 μM) for 12 h, or infected with LacZ, WT $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{12}$-ct, RGS4, and GRK2-ct at 300 MOI for 48 h. The -fold increases were calculated by the values of untreated cells (none) set as 1. *C*, effects of B-oligomer of PTX on Ang II-induced Ca^{2+} releases. Cells were treated with B-oligomer (1 or 10 nM) for 24 h before Ca^{2+} measurement. *D*, time course of PTX-induced expression of IL-1β protein. *E*, effects of IL-1β siRNAs, DN-Rac, and wortmannin (*WTM*) on PTX-induced IL-1β production. Two different siRNAs were used. *F* and *G*, effects of IL-1β neutral antibody (*F*) or IL-1β siRNAs (*G*) on Ang II-induced Ca^{2+} responses in control, PTX-treated, or IL-1β-treated cells. Cells were treated with PTX (100 ng/ml) or IL-1β (1 ng/ml) for 24 h before Ang II (100 pM) stimulation with or without anti-IL-1β antibody (500 μg/ml). Cells were transfected with IL-1β siRNAs (100 nM) 48 h before PTX treatment. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ *versus* PTX-untreated, B-oligomer-untreated, control siRNA-treated, PTX-treated, or IL-1β-treated cells. *Error bars*, S.E.

cytotoxic effects at higher concentration, we could not increase the concentration to observe complete inhibition of the IL-1β induction. The enhancement of AT1R function by PTX was suppressed by Ro-106-9920 and IκBαm (Fig. 3*B*), and the PTX-induced increase in AT1R density was suppressed by IκBαm (Fig. 3, *C* and *D*). Because an inhibition of NADPH oxidase activity suppresses NF-κB activation and IL-1β production induced by $G\alpha_{13}$ activation (36), we next examined the involvement of NADPH oxidase. Treatment with PTX increased NF-κB-dependent luciferase activity (Fig. 3, *E* and *F*). This NF-κB activation was suppressed by the treatment with DPI or by the expression of dominant negative (DN)-Rac and DN-$p47^{phox}$, both of which are essential for NADPH oxidase activation (24), but not by p115-RGS, a $G\alpha_{13}$-inhibitory polypeptide (26). These results suggest that PTX induces NF-κB activation through Rac-NADPH oxidase pathway and that NF-κB mediates PTX-induced IL-1β production and AT1R up-regulation.

Rac Mediates PTX-induced IL-1β Production and AT1R Up-regulation—We have previously reported in rat neonatal cardiomyocytes that PTX increases basal Rac activity (26). Because the PTX-induced NF-κB activation and IL-1β production was suppressed by DN-Rac (Figs. 2 and 3), we next examined whether PTX increases Rac activity in cardiac fibroblasts. Rac was activated from 10 min after PTX treatment and still activated at 24 h after the treatment (Fig. 4*A*). We also found that PTX did not affect the activities of other small G proteins, Ras, Rap1, and RhoA (supplemental Fig. 2). It has been reported that phosphatidylinositol (PI) 3-kinase participates in PTX B-oligomer-induced antiapoptotic action against HIV-Tat infection in NK cells (49). We confirmed that PTX B-oligomer increased Rac activity in cardiac fibroblasts (supplemental Fig. 3). Pretreatment with wortmannin completely suppressed PTX-induced Rac activation (Fig. 4*B*). The activated Rac has been reported to translocate from cytosol to the plasma membrane through recognition of membrane phospholipids, such as PI 3-phosphate (PI-3-P), PI 4-phosphate, PI 5-phosphate, and PI 3,4,5-trisphosphate, through the carboxyl-terminal polybasic region of Rac (50–52). Confocal imaging revealed that PTX actually translocated GFP-fused WT Rac from cytosol to the plasma membrane, as observed with constitutively active Rac (Fig. 4*C*). Pretreatment with wortmannin inhibited PTX-induced membrane localization of Rac. To demonstrate the involvement of PI-3-P, $p40^{phox}$-

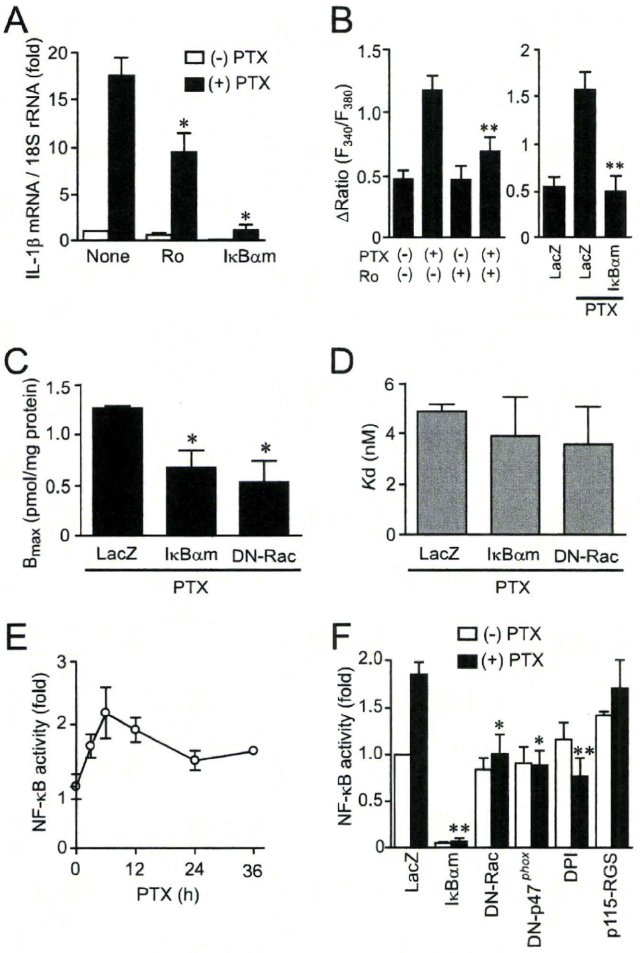

FIGURE 3. **Requirement of NF-κB for PTX-induced enhancement of Ca^{2+} response by Ang II stimulation.** *A*, effects of Ro106-9920 and IκBαm on PTX-induced IL-1β mRNA expression. Cells were pretreated for 20 min with Ro106-9920 (1 μM) or infected with IκBαm (100 MOI) for 48 h before the treatment of PTX (100 ng/ml) for 24 h. *B*, effects of NF-κB inhibitors on Ang II-induced Ca^{2+} responses in PTX-treated cells. *C* and *D*, effects of IkBαm and DN-Rac on PTX-induced increase in AT1R density. Cells were infected with adenoviruses expressing IkBαm or DN-Rac 24 h before PTX treatment. AT1R density was determined with receptor binding assay. *E*, time course of PTX-induced changes in NF-κB-dependent luciferase activity. *F*, effects of IκBαm, DN-Rac, DN-p47^{phox}, DPI, and p115-RGS on PTX-induced NF-κB activation. Cells were infected with LacZ, IκBαm, DN-Rac, DN-p47^{phox}, or p115-RGS at 100 MOI for 48 h or pretreated with DPI (5 μM) for 20 min before the addition of PTX (100 ng/ml) for 6 h. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ *versus* PTX-untreated or LacZ-expressing cells. *Error bars*, S.E.

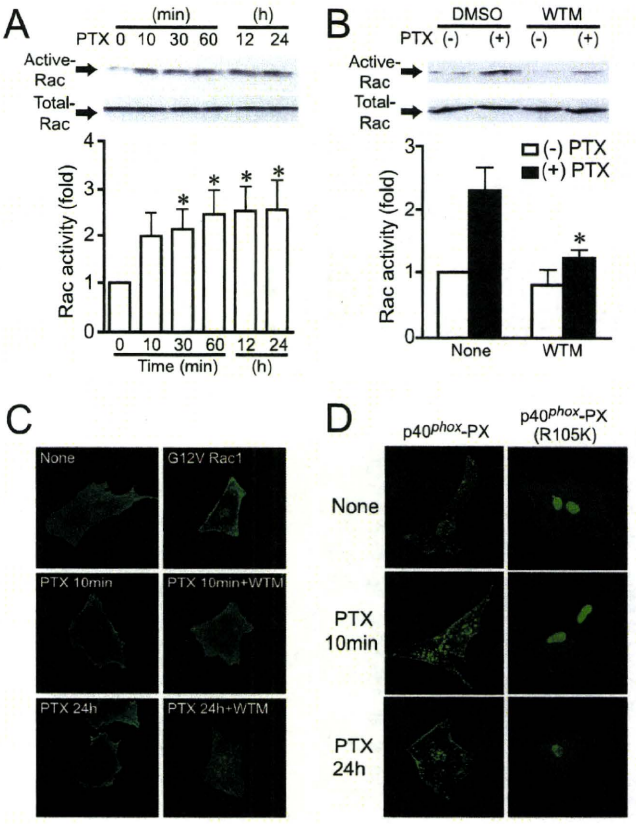

FIGURE 4. **PTX induces Rac activation.** *A*, time course of Rac activation induced by PTX (100 ng/ml). *B*, effects of wortmannin on PTX-induced Rac activation. Cells were pretreated with wortmannin (*WTM*; 100 nM) for 10 min before PTX stimulation. *C*, localization of GFP-fused wild type Rac and constitutively active Rac (*CA-Rac*) (G12V) with or without PTX stimulation. *D*, localization of GFP-fused PX domain of p40^{phox} (p40^{phox}-PX), and PI-3-P interaction-deficient mutant (p40^{phox}-PX (R105K)) with or without PTX treatment. *, $p < 0.05$ *versus* PTX-untreated cells. *Error bars*, S.E.

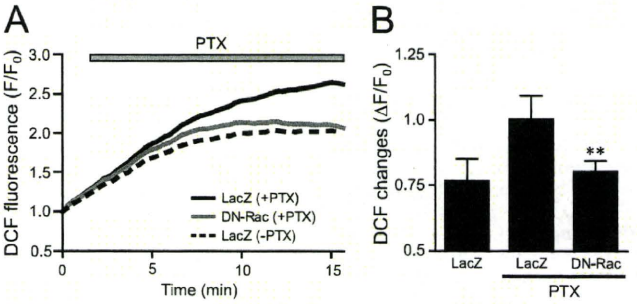

FIGURE 5. **Effects of DN-Rac on PTX-induced ROS production.** *A* and *B*, average changes (*A*) and peak increases (*B*) in PTX-induced F/F_0 of dichlorofluorescein from time course experiments. The increases in PTX-induced fluorescence of dichlorofluorescein were calculated by the value of maximal fluorescence intensity (*F*) during 20 min of stimulation and initial value of fluorescence, F_0. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ *versus* PTX-untreated or LacZ-expressing cells. *Error bars*, S.E.

PX, a specific marker for PI-3-P, was expressed (53). Under the basal condition, p40^{phox}-PX was predominantly localized in the PI-3-P-enriched early endosome and nucleus (Fig. 4*D*). Treatment with PTX for 10 min promoted the translocation of p40^{phox}-PX from early endosome to the plasma membrane. However, PTX did not affect the localization of p40^{phox}-PX (R105K), a mutant that cannot recognize PI-3-P. The localization of the PH domain of GRP1 (54), a marker for PI 3,4,5-trisphosphate, and that of the PH domain of PLCδ1, a marker for PI 4,5-bisphosphate, were not changed by PTX (data not shown). These results suggest that PTX-induced PI-3-P production through PI 3-kinase activation is required for translocation and activation of Rac.

Involvement of Rac in PTX-induced ROS Production—One of the targets for Rac is NADPH oxidase. Because the PTX-induced NF-κB activation was suppressed by DPI, DN-Rac, and DN-p47^{phox} (Fig. 3*F*), Rac-mediated activation of NADPH oxidase may participate in PTX-induced NF-κB activation. We found that PTX gradually increased dichlorofluorescein fluorescence intensity, indicating ROS production in cardiac fibroblasts (Fig. 5). The expression of DN-Rac completely sup-

pressed this ROS production, suggesting that PTX activates Rac and turns on a signaling cascade downstream of Rac.

Essential Role of Rac in PTX-induced AT1R Up-regulation—Because PTX-induced ROS production, NF-κB activation, and increase in AT1R density were inhibited by DN-Rac, Rac may play a central role in regulation of AT1R density. Inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (statins) are known to suppress the activity of Rho family G proteins by inhibition of isoprenylation (55). It has been reported that simvastatin inhibits Rac activity in the H9c2 cell line and rat neonatal cardiomyocytes (56, 57). Simvastatin is also reported to reduce AT1R density in vascular smooth muscle cells (58). Therefore, we examined whether simvastatin inhibits IL-1β-induced up-regulation of AT1R by inhibition of Rac. Treatment with simvastatin completely suppressed the IL-1β-induced Rac activation (supplemental Fig. 4). Consistent with this result, the IL-1β-induced up-regulation of AT1R was also suppressed by simvastatin and DN-Rac. The Ang II-induced Ca^{2+} release was also enhanced in IL-1β-treated cells, and this enhancement was completely suppressed by simvastatin. These results suggest that simvastatin suppresses IL-1β-induced up-regulation of AT1R by inhibition of Rac activity. To prove the requirement of Rac in AT1R up-regulation more directly, we used Rac1 siRNAs. Knockdown of Rac1 almost completely suppressed IL-1β-induced Rac activation (Fig. 6*A*), increase in AT1R density (Fig. 6*B*), and enhancement of AT1R-stimulated Ca^{2+} responses (supplemental Fig. 4). Thus, Rac1 may predominantly regulate AT1R up-regulation by agonist stimulation. Because IL-1β induces Rac activation and PTX-induced IL-1β production was completely suppressed by knockdown of Rac1 (Fig. 6*C*), we hypothesize that PTX-induced IL-1β production plays a role in amplification of Rac activation. Treatment with IL-1β siRNA suppressed the PTX-induced Rac activation at a late phase of activation (from 6 h after the treatment) but did not suppress Rac activation at an early phase of activation (Fig. 6, *D* and *E*). Furthermore, IL-1β siRNA also suppressed PTX-induced nuclear localization of NF-κB in a late phase but not an early phase (Fig. 6, *F* and *G*). These results suggest that PTX-induced IL-1β production participates in the sustained activation of Rac and NF-κB, which is essential for AT1R up-regulation.

PTX Stimulates TLR4, Leading to Rac Activation—We next examined which receptor(s) functions as a target of PTX in cardiac fibroblasts. Because TLR4 is reported to work as a putative candidate receptor of B-oligomer (10), we examined whether stimulation of TLR4 is required for PTX-induced AT1R up-regulation in cardiac fibroblasts. Treatment with TLR4 siRNAs (si-88, si-1002, and si-1621) significantly decreased TLR4 mRNA levels but did not decrease AT1R mRNA levels (Fig. 7*A*). The PTX-induced enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} release and increase in Rac activity were completely abolished by TLR4 siRNA treatment (Fig. 7, *B* and *C*). In contrast, PTX-induced ADP-ribosylation of $G\alpha_i$ proteins was not suppressed but preferably enhanced by TLR4 knockdown (Fig. 7*D*). These results suggest that TLR4 mediates PTX-induced Rac activation and AT1R up-regulation, but TLR4 does not mediate PTX-induced ADP-ribosylation of $G\alpha_i$ proteins.

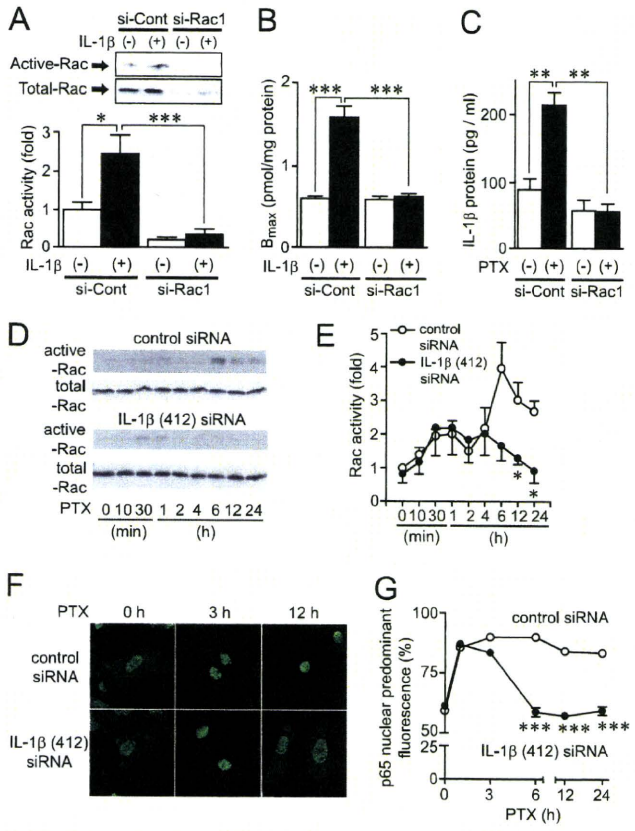

FIGURE 6. **Amplification of Rac-mediated signaling by PTX-induced IL-1β production.** *A*, cells were transfected with siRNAs for Rac1 (*si-Rac1*) or their randomized controls (*si-Cont*) for 72 h before 5-min stimulation with IL-1β (10 ng/ml). *B*, effects of si-Rac1 on the maximal increases in AT1R density by IL-1β stimulation. Cells were treated with IL-1β for 24 h before membrane preparation. *C*, effects of si-Rac1 on PTX-induced production of IL-1β proteins. Cells were treated with PTX (100 ng/ml) for 90 min. *D* and *E*, effects of IL-1β siRNA on PTX-induced Rac activation. Cells were transfected with IL-1β (412) siRNA (100 nM) for 48 h before treatment with PTX (100 ng/ml). *F* and *G*, effects of IL-1β (412) siRNA on PTX-induced nuclear localization of the NF-κB p65 subunit. More than 100 cells were scanned and quantified the subcellular localization of p65 using Photoshop (13, 27). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ *versus* IL-1β-treated or control siRNA-treated cells. *Error bars*, S.E.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated a novel action of PTX that enhances AT1R-stimulated Ca^{2+} response through AT1R up-regulation independently of ADP-ribosylation in rat cardiac fibroblasts. Using PTX as a powerful tool for analyzing the mechanism of AT1R up-regulation, we demonstrated that stimulation of TLR4 by PTX B-oligomer enhances AT1R function. Previous reports have suggested that Syk (spleen tyrosine kinase) and PI 3-kinase participate in TLR4-mediated responses (49, 59). We found that PTX-induced Rac activation was completely suppressed by inhibition of Syk (supplemental Fig. 3) and PI 3-kinase (Fig. 5), suggesting that Syk and PI 3-kinase mediate PTX-induced Rac activation. We also found that Rac-mediated NF-κB activation through ROS production plays a central role in the regulation of AT1R density. The PTX-induced NF-κB activation was suppressed by DPI and the dominant negative mutants of Rac and $p47^{phox}$ (Fig. 3). Because DPI is an inhibitor of NADPH oxidase and Rac and $p47^{phox}$ are essential compo-

nents of NADPH oxidase activation, the origin of PTX-induced ROS production may be NADPH oxidase. In addition, PTX induced degradation of IκBα proteins in a time-dependent manner, which was abolished by Rac inhibition (supplemental Fig. 3). Although molecular mechanism underlying ROS-mediated NF-κB activation is still unknown, this result implies that ROS-mediated inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphatases may be involved (60). Because the promoter regions of IL-1β and AT1R contain a putative NF-κB binding site, AT1R up-regulation may be induced by direct interaction of AT1R promoter with NF-κB. However, PTX-induced enhancement of Ca^{2+} response by AT1R stimulation was almost completely suppressed by anti-IL-1β antibody and IL-1β siRNAs (Fig. 2). Thus, IL-1β released from fibroblasts by PTX treatment may be the main mechanism of PTX-induced AT1R up-regulation. Furthermore, Rac1 inhibition suppressed PTX-induced IL-1β production, and IL-1β inhibition suppressed PTX-induced Rac activation at a late but not an early phase (Fig. 6). Thus, Rac-mediated IL-1β production may amplify Rac-dependent signaling through IL-1β-mediated Rac activation. These results suggest that PTX induces AT1R up-regulation through a TLR4 → PI 3-kinase → Rac → NADPH oxidase → ROS → NF-κB → IL-1β-dependent signal pathway (Fig. 8).

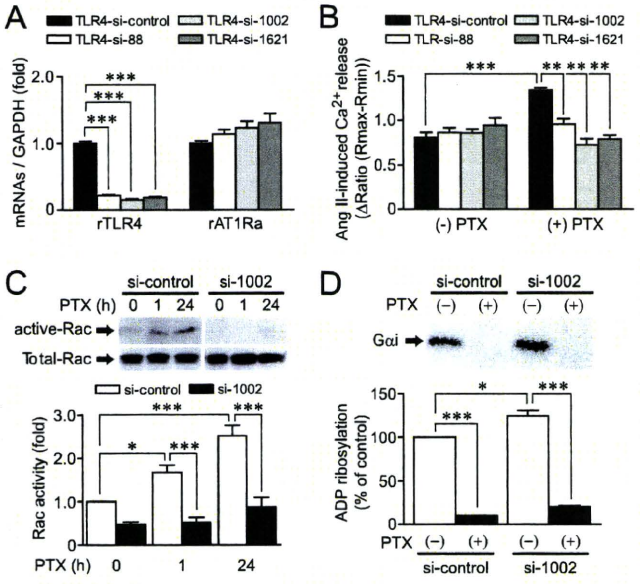

FIGURE 7. **Roles of TLR4 in PTX-induced Rac activation and ADP-ribosylation of G_i/G_o.** *A*, effects of TLR4 siRNAs on the expression of TLR4 and AT1R mRNAs. *B*, effects of TLR4 siRNAs on PTX-induced enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} responses. Cells were treated with PTX for 24 h after siRNA treatment for 48 h. *C*, effects of TLR4 siRNA (si-1002) on PTX-induced Rac activation. *D*, effects of TLR4 siRNA on PTX-induced ADP-ribosylation of $G\alpha_i$ proteins. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. *Error bars*, S.E.

We revealed that stimulation of TLR4 mediates PTX-induced AT1R up-regulation. It is thought that MyD88 and Trif-related adaptor molecule mediate TLR4-mediated NF-κB activation (32). However, it has recently been reported that oxidized LDL induces NADPH oxidase-dependent ROS production through TLR4 stimulation in macrophages (59). These authors have also demonstrated that Syk but not MyD88 is responsible for TLR4-mediated ROS production. In addition, another study has shown that stimulation of TLR4 by PTX B-oligomer induces activation of MyD88-independent signaling pathways (10). Thus, PTX induces stimulation of TLR4 that preferentially activates the Syk-dependent Rac signaling pathway.

PTX is frequently used as a specific tool to examine the involvement of G_i in cellular signaling. Abolishment of TLR4 by siRNA did not affect PTX-mediated ADP-ribosylation of G_i and G_o (Fig. 7*D*). Thus, PTX binds to two receptors; one is TLR4 that activates Rac and another is the binding site that liberates the A-protomer into cells. So far, the G_i/G_o-independent signaling pathway is not usually considered when PTX is used *in vitro* and *in vivo*. Because PTX activates Rac in addition to ADP-ribosylation of G_i and G_o, it is no longer thought that PTX is a specific inhibitor of receptor-G_i signaling.

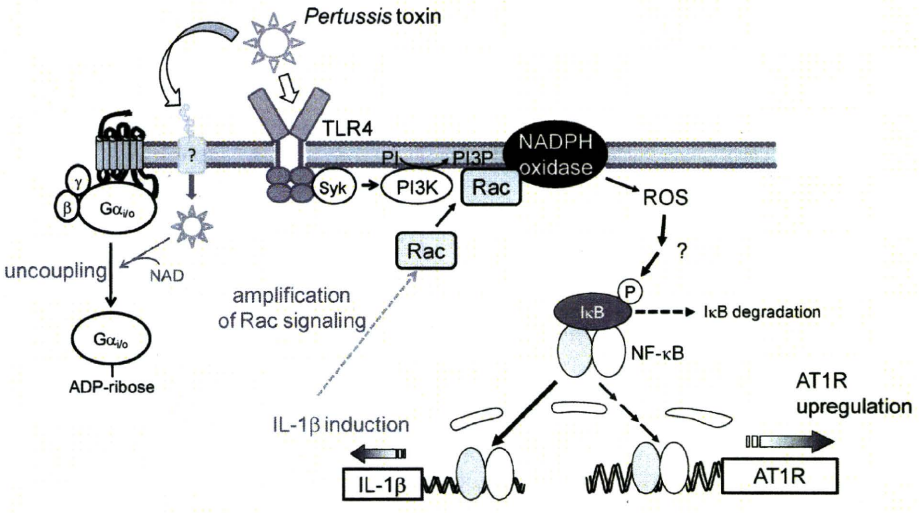

FIGURE 8. **Schema of TLR4-mediated AT1R up-regulation induced by PTX.** PTX induces ROS production through sequential activation of TLR4, Syk, PI 3-kinase (*PI3K*), Rac, and NADPH oxidase. Although the mechanism of NF-κB activation induced by ROS is still unknown, ROS mediate NF-κB-dependent expression of IL-1β. Induction of IL-1β also induces Rac activation through IL-1 receptor stimulation, leading to amplification of Rac-dependent signaling. Sustained activation of Rac may be required for PTX-induced AT1R up-regulation in rat cardiac fibroblasts. A-protomer of PTX enters the cells through unidentified binding site, and ADP-ribosylates G_i/G_o proteins.

Another important finding of this study is that Rac is a physiological mediator of AT1R up-regulation induced by IL-1β stimulation. The inhibition of Rac suppressed the increase in AT1R density and the enhancement of Ang II-induced Ca^{2+} response by IL-1β stimulation (Fig. 6 and supplemental Fig. 4). Because other agonists that up-regulate AT1R, such as Ang II and TNF-α, also increase Rac activity, Rac-mediated AT1R up-regulation may be a common mechanism among various stimuli. Statins are inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and appear

to have pleiotropic effects on the cardiovascular system that are independent of their ability to decrease serum cholesterol (14, 55). These include inhibition of cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction, anti-inflammatory effects, and antioxidative effects (55, 61). Recent studies have demonstrated that statins inhibit ROS production and myocardial apoptosis by inhibition of Rac (57). Up-regulation of AT1R is thought to be one of the features involved in cardiac remodeling. Thus, the present results suggest a novel mechanism in which statins inhibit cardiac fibrosis by inhibition of AT1R up-regulation in cardiac fibroblasts. Statins also inhibit Rho activity by inhibition of isoprenylation. However, we could not detect the activation of Rho, Ras, and Rap1 by PTX treatment (supplemental Fig. 2). Thus, inhibition of Rac is essential for the inhibition of AT1R up-regulation by statin.

In conclusion, we demonstrated a novel action of PTX that induces AT1R up-regulation independently of ADP-ribosylation of G_i/G_o. This mechanism includes TLR4-mediated Rac activation, ROS production, and NF-κB activation. Activation of NF-κB induces IL-1β production, resulting in amplification of Rac signaling, which leads to increase in AT1R density. The involvement of the TLR4-Rac signaling pathway in the regulation of AT1R density will provide a possible novel target for inhibiting cardiac remodeling. In addition, we have provided pharmacologically important information indicating that PTX *per se* influences G protein-coupled receptor signaling independently of $G\alpha_i$ inhibition. Activation of the TLR4-Rac signaling pathway by PTX suggests that we should consider pharmacological actions of PTX in addition to a specific inhibitor of G_i/G_o-mediated signal transduction.

Acknowledgment—We thank Miyuki Toyotaka for analyzing the localization of the NF-κB p65 subunit.

REFERENCES

1. Katada, T., and Ui, M. (1982) *J. Biol. Chem.* **257,** 7210–7216
2. Kurose, H., Katada, T., Amano, T., and Ui, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258,** 4870–4875
3. Tamura, M., Nogimori, K., Yajima, M., Ase, K., and Ui, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258,** 6756–6761
4. Lando, Z., Teitelbaum, D., and Arnon, R. (1980) *Nature* **287,** 551–552
5. Linthicum, D. S., Munoz, J. J., and Blaskett, A. (1982) *Cell Immunol.* **73,** 299–310
6. Racke, M. K., Hu, W., and Lovett-Racke, A. E. (2005) *Trends Immunol.* **26,** 289–291
7. Jajoo, S., Mukherjea, D., Pingle, S., Sekino, Y., and Ramkumar, V. (2006) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317,** 1–10
8. Li, H., and Wong, W. S. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283,** 1077–1082
9. Melien, O., Sandnes, D., Johansen, E. J., and Christoffersen, T. (2000) *J. Cell Physiol.* **184,** 27–36
10. Wang, Z. Y., Yang, D., Chen, Q., Leifer, C. A., Segal, D. M., Su, S. B., Caspi, R. R., Howard, Z. O., and Oppenheim, J. J. (2006) *Exp. Hematol.* **34,** 1115–1124
11. Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., and Smith, R. D. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45,** 205–251
12. de Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T., Wright, J. W., and Unger, T. (2000) *Pharmacol. Rev.* **52,** 415–472
13. Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. (2006) *EMBO J.* **25,** 5305–5316
14. Brown, R. D., Ambler, S. K., Mitchell, M. D., and Long, C. S. (2005) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45,** 657–687
15. Villarreal, F. J., Kim, N. N., Ungab, G. D., Printz, M. P., and Dillmann, W. H. (1993) *Circulation* **88,** 2849–2861
16. Sakata, Y., Hoit, B. D., Liggett, S. B., Walsh, R. A., and Dorn, G. W., 2nd (1998) *Circulation* **97,** 1488–1495
17. Gurantz, D., Cowling, R. T., Varki, N., Frikovsky, E., Moore, C. D., and Greenberg, B. H. (2005) *J. Mol. Cell Cardiol.* **38,** 505–515
18. Nio, Y., Matsubara, H., Murasawa, S., Kanasaki, M., and Inada, M. (1995) *J. Clin. Invest.* **95,** 46–54
19. Yamani, M. H., Cook, D. J., Tuzcu, E. M., Abdo, A., Paul, P., Ratliff, N. B., Yu, Y., Yousufuddin, M., Feng, J., Hobbs, R., Rincon, G., Bott-Silverman, C., McCarthy, P. M., Young, J. B., and Starling, R. C. (2004) *Am. J. Transplant.* **4,** 1097–1102
20. Peng, J., Gurantz, D., Tran, V., Cowling, R. T., and Greenberg, B. H. (2002) *Circ. Res.* **91,** 1119–1126
21. Finkel, T. (1999) *J. Leukoc. Biol.* **65,** 337–340
22. Griendling, K. K., and Ushio-Fukai, M. (2000) *Regul. Pept.* **91,** 21–27
23. Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Sulciner, D. J., Gutkind, J. S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Finkel, T. (1996) *Biochem. J.* **318,** 379–382
24. Sumimoto, H. (2008) *FEBS J.* **275,** 3249–3277
25. Sulciner, D. J., Irani, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Goldschmidt-Clermont, P., and Finkel, T. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16,** 7115–7121
26. Nishida, M., Tanabe, S., Maruyama, Y., Mangmool, S., Urayama, K., Nagamatsu, Y., Takagahara, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Kobayashi, H., Sato, Y., Kawanishi, T., Inoue, R., Nagao, T., and Kurose, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 18434–18441
27. Fujii, T., Onohara, N., Maruyama, Y., Tanabe, S., Kobayashi, H., Fukutomi, M., Nagamatsu, Y., Nishihara, N., Inoue, R., Sumimoto, H., Shibasaki, F., Nagao, T., Nishida, M., and Kurose, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280,** 23041–23047
28. Pracyk, J. B., Tanaka, K., Hegland, D. D., Kim, K. S., Sethi, R., Rovira, I. I., Blazina, D. R., Lee, L., Bruder, J. T., Kovesdi, I., Goldshmidt-Clermont, P. J., Irani, K., and Finkel, T. (1998) *J. Clin. Invest.* **102,** 929–937
29. Sussman, M. A., Welch, S., Walker, A., Klevitsky, R., Hewett, T. E., Price, R. L., Schaefer, E., and Yager, K. (2000) *J. Clin. Invest.* **105,** 875–886
30. Ichiki, T., Takeda, K., Tokunou, T., Iino, N., Egashira, K., Shimokawa, H., Hirano, K., Kanaide, H., and Takeshita, A. (2001) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21,** 1896–1901
31. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) *Cell* **124,** 783–801
32. Chao, W. (2009) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296,** H1–H12
33. Kurose, H., Arriza, J. L., and Lefkowitz, R. J. (1993) *Mol. Pharmacol.* **43,** 444–450
34. Nishida, M., Sato, Y., Uemura, A., Narita, Y., Tozaki-Saitoh, H., Nakaya, M., Ide, T., Suzuki, K., Inoue, K., Nagao, T., and Kurose, H. (2008) *EMBO J.* **27,** 3104–3115
35. Nishida, M., Sugimoto, K., Hara, Y., Mori, E., Morii, T., Kurosaki, T., and Mori, Y. (2003) *EMBO J.* **22,** 4677–4688
36. Nagamatsu, Y., Nishida, M., Onohara, N., Fukutomi, M., Maruyama, Y., Kobayashi, H., Sato, Y., and Kurose, H. (2006) *J. Pharmacol. Sci.* **101,** 144–150
37. Chiloeches, A., Paterson, H. F., Marais, R., Clerk, A., Marshall, C. J., and Sugden, P. H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 19762–19770
38. Franke, B., Akkerman, J. W., and Bos, J. L. (1997) *EMBO J.* **16,** 252–259
39. Arai, K., Maruyama, Y., Nishida, M., Tanabe, S., Takagahara, S., Kozasa, T., Mori, Y., Nagao, T., and Kurose, H. (2003) *Mol. Pharmacol.* **63,** 478–488
40. Ju, H., Zhao, S., Tappia, P. S., Panagia, V., and Dixon, I. M. (1998) *Circulation* **97,** 892–899
41. Bai, H., Wu, L. L., Xing, D. Q., Liu, J., and Zhao, Y. L. (2004) *Chin. Med. J.* **117,** 88–93
42. He, J., Gurunathan, S., Iwasaki, A., Ash-Shaheed, B., and Kelsall, B. L. (2000) *J. Exp. Med.* **191,** 1605–1610
43. Maruyama, Y., Nishida, M., Sugimoto, Y., Tanabe, S., Turner, J. H., Kozasa, T., Wada, T., Nagao, T., and Kurose, H. (2002) *Circ. Res.* **91,** 961–969
44. Nishida, M., Maruyama, Y., Tanaka, R., Kontani, K., Nagao, T., and Kurose, H. (2000) *Nature* **408,** 492–495

45. Cowling, R. T., Gurantz, D., Peng, J., Dillmann, W. H., and Greenberg, B. H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 5719–5724
46. Monks, B. G., Martell, B. A., Buras, J. A., and Fenton, M. J. (1994) *Mol. Immunol.* **31,** 139–151
47. Kaiser, P., Rothwell, L., Goodchild, M., and Bumstead, N. (2004) *Anim. Genet.* **35,** 169–175
48. Cowling, R. T., Zhang, X., Reese, V. C., Iwata, M., Gurantz, D., Dillmann, W. H., and Greenberg, B. H. (2005) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289,** H1176–H1183
49. Zocchi, M. R., Contini, P., Alfano, M., and Poggi, A. (2005) *J. Immunol.* **174,** 6054–6061
50. Ueyama, T., Eto, M., Kami, K., Tatsuno, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Lennartz, M. R., Takeya, R., Sumimoto, H., and Saito, N. (2005) *J. Immunol.* **175,** 2381–2390
51. van Hennik, P. B., ten Klooster, J. P., Halstead, J. R., Voermans, C., Anthony, E. C., Divecha, N., and Hordijk, P. L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 39166–39175
52. Brown, G. E., Stewart, M. Q., Liu, H., Ha, V. L., and Yaffe, M. B. (2003) *Mol. Cell* **11,** 35–47
53. Honbou, K., Minakami, R., Yuzawa, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Kamakura, S., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2007) *EMBO J.* **26,** 1176–1186
54. Gray, A., Van Der Kaay, J., and Downes, C. P. (1999) *Biochem. J.* **344,** 929–936
55. Rikitake, Y., and Liao, J. K. (2005) *Circ. Res.* **97,** 1232–1235
56. Ichiki, T., Takeda, K., Tokunou, T., Funakoshi, Y., Ito, K., Iino, N., and Takeshita, A. (2001) *Hypertension* **37,** 535–540
57. Laufs, U., Kilter, H., Konkol, C., Wassmann, S., Böhm, M., and Nickenig, G. (2002) *Cardiovasc. Res.* **53,** 911–920
58. Ito, M., Adachi, T., Pimentel, D. R., Ido, Y., and Colucci, W. S. (2004) *Circulation* **110,** 412–418
59. Bae, Y. S., Lee, J. H., Choi, S. H., Kim, S., Almazan, F., Witztum, J. L., and Miller, Y. I. (2009) *Circ. Res.* **104,** 210–218
60. Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005) *Cell* **120,** 649–661
61. Maack, C., Kartes, T., Kilter, H., Schäfers, H. J., Nickenig, G., Böhm, M., and Laufs, U. (2003) *Circulation* **108,** 1567–1574

ARTICLES

バイオ医薬品開発における潮流と規制

Recent Progress in Biomedical Research & Development (Issues and Regulations)

第6回 最終回

バイオ治験薬の品質・安全性確保

Approaches for ensuring quality and safety of biological investigational medicinal products

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
石井明子，川崎ナナ
AKIKO ISHII, NANA KAWASAKI
National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals

はじめに

新薬開発が容易ではない状況を打破するべく提示されたFDAのクリティカルパスから6年，医薬品開発推進の動きは国内外で続いている。わが国でも，治験環境の充実を目的として，全国治験活性化3カ年計画，新たな治験活性化5カ年計画に続き，平成23年度には早期臨床試験の強化やグローバル臨床研究拠点の整備を含む「ポスト治験活性化5カ年計画」が公表される予定である[1]。また，有効な新薬を海外に遅れることなく審査承認できるよう，医薬品の開発時期を海外と同調させるための有力な手段である国際共同治験の推進を目的として，「国際共同治験に関する基本的考え方」が平成19年に通知として発出されている。

新薬の治験ではヒトに対する有効性・安全性が未知の薬物が投与されるため，実施に際して最も配慮すべき点は被験者の安全確保である。また，新薬開発を適切に進めていくためには，治験環境の整備に加えて，治験薬の品質保証に基づく治験データの信頼性確保が欠かせない。バイオ医薬品には，作用の種特異性が高く非臨床試験による安全性評価が難しいケースが少なくないこと，目的物質の構造に不均一性が存在し製造方法が品質に大きく影響することなど，化学合成医薬品とは異なる特徴がある。有用なバイオ医薬品を迅速に開発していくためには，これらの特徴を考慮しつつ，安全かつ効率的に治験を進める努力が必要である。本稿では，治験に用いられる被験薬としてのバイオ医薬品(組換えタンパク質医薬品)候補薬物をバイオ治験薬と称し，知識管理，科学的理解，ならびにリスクマネジメントをベースとする近年の医薬品の製法開発・品質管理の潮流を踏まえて，バイオ治験薬の品質・安全性確保について考察する。なお，本稿の内容は公的に入手可能な資料と国立医薬品食品衛生研究所における業務を通じて学んだことから考察した筆者の私見である。

1. バイオ治験薬の品質・安全性確保の考え方

医薬品とは，治験を通じて有効性・安全性が確認され，確認された有効性・安全性を裏付ける物質特性として一定の品質を備えたものである。これに対して治験薬は，ヒトに対する有効性・安全性が未知であり，有効性・安全性を裏付ける品質特性やそれを作り出す製造工程も確定していない。有効性・安全性が未検証である治験薬の投与には本質的にリスクが潜在するため，治験薬の有効性・安全性確保のためには，それまでに得られた実証データや既存の知識をもとに当該治験薬の特徴を十分に理解してリスク要因を明らかにし，リスクを低減する方策を考えることが重要である。その上で，残存するリスク

表1 治験薬GMP(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)

第1 総則
1. 目的
1.1 治験薬の品質を保証することで，不良な治験薬から被験者を保護すること
1.2 治験薬のロット内及びロット間の均質性を保証することで，臨床試験の信頼性を確保すること
1.3 治験薬が開発候補として絞り込まれた段階においては，当該治験薬と市販後製品の一貫性を，治験薬の製造方法及び試験方法が確立した段階においては，当該治験薬と市販後製品の同等性を保証することで，市販後製品の有効性及び安全性並びに臨床試験の適切性を確保すること

表2 治験薬GMPに掲げられた目的に対応して，バイオ治験薬の品質・安全性確保に求められる要件

1.1 治験薬の特性を十分に理解して想定されるリスク要因を明らかにして，リスクの低減化を図ると共に，適切な工程管理・品質試験を設定すること
1.2 頑健性の高い製造方法を構築し，治験薬ロットの品質試験により品質の一定性を確認すること
(製造工程管理手法が確立されていない開発初期では，品質試験の重要性が高い)
1.3 製法変更時の同等性／同質性評価を適切に実施しながら開発を進めること

については，被験者への危害が生じないよう十分な対策を講じるべきである。

わが国には，バイオ治験薬の品質・安全性に特化したガイドラインはないが，治験薬の製造管理，品質管理等に関する基準(治験薬GMP)(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)が定められており，治験薬の品質管理に関して，医薬品開発をめぐる近年の動向を踏まえた規制当局の考え方を知る上で，大変参考になる事項が書かれている。治験薬GMPの冒頭に掲げられている3つの「目的」(**表1**)は，WHO-GMP／ヒト用治験薬ガイドラインの一般原則を原型とし[2]，治験薬の製造管理，品質管理を通じて目指すべき方向が明確に示されたものである。したがって，この「目的」を達成する方法を考えることが，ヒト初回投与試験から第Ⅲ相臨床試験を通じて，治験薬の品質・安全性確保に求められる要件を考える切り口の1つになると考えられる(**表2**)。

表3～5に治験および治験薬に関する規制環境整備の国際的動向を記載した。わが国の特徴は，治験届出制により治験が行われていること，治験薬の品質・安全性に特化したガイドラインが定められていないこと，ならびに，医薬品GMPとは独立して，早期探索的段階から第Ⅲ相まで治験の段階に応じた治験薬の品質保証を可能とする治験薬GMPが定められている点である。旧治験薬GMP(平成9年3月31日 薬発第480号)の改正により現在の治験薬GMPが策定された際，目的1.3(表2)に対応して，ベリフィケーションやクオリフィケーションの概念が取り入れられたことによって，治験の進展に応じた合理的な管理が認められることとなった。

GMPでは，あらかじめ規定された手順に従って製造工程が管理・記録され，品質規格に定められた適否の判

表3 治験および治験薬に関する規制環境整備の国際的動向

	日本	米国	EU
治験の実施許可	治験届出制	治験申請制	治験申請制(2004年より)
バイオ治験薬の品質安全性に関するガイドライン	無	有(表4参照)	有(表4参照)
治験薬のGMP[2]	治験薬GMPによる規制	医薬品GMPによる規制(21CFR 210&211) 治験薬のGMPに関するガイダンス(表5参照)	医薬品GMPによる規制(Directive 2003/94/EC) 治験薬のGMPに関する補遺(表5参照)

表4 欧米におけるバイオ治験薬の品質安全性に関するガイドライン

[米国]

1995年 Guidance for Industry：Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products
第1相臨床試験に用いられる治験薬の申請に関するガイダンス

2006年 Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies
探索的臨床試験に関するガイダンス
(CMCに関する記載を含む)

[EU]

2007年 Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-in-Human Clinical Trials with Investigational Medicinal Products EMEA/CHMP/SWP/28367/07
ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減に関するガイドライン

2008年 Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products EMEA/CHMP/BWP/398498/2005
バイオ治験薬のウイルス安全性に関するガイドライン

2010年 Guideline on the Requirement for Quality Documentation concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials(Draft) EMA/CHMP/BWP/534898/2008
バイオ治験薬の品質関連の記載事項に関するガイドライン案

表5 欧米における治験薬のGMPに関するガイドライン

[米国]	Guidance for industry : CGMP for phase 1 investigational drugs Guideline on the preparation of investigational new drug products(human and animal) 第Ⅱ相，第Ⅲ相試験に用いられる治験薬は後者のガイドラインの適用を受ける
[EU]	Good Manufacturing practices Annex 13 Manufacturing of investigational medicinal products

定基準を満たす製品が得られたことを確認・記録することをもって，品質が保証されたと判断される。しかし，どのような工程管理を行い品質試験を設定すれば製品の有効性・安全性を担保できるのか。これには画一的な答えはなく，製品の特性や開発段階に応じたケースバイケースの対応が必要である。一般に，第Ⅲ相試験までには製造方法および品質試験をほぼ確定することが求められるが，製造工程や品質特性への理解が十分でない開発初期には，どこまで特性解析を行い，どのように品質管理を行うべきか，また非臨床試験系の妥当性をどのように評価し，臨床試験に入るべきであろうか。

治験薬GMPに掲げられた3つの目的を達成するためのアプローチを考えるとき，科学とリスクマネジメントに基づくライフサイクル全期間に適用可能な医薬品の品質管理の戦略が述べられたICH Qトリオ(Q8，Q9，Q10)ガイドラインの考え方が参考になる。すなわち，治験薬の品質確保を1つのリスクマネジメントプロセスと考え，既存の知識と当該治験薬に関して得られている実験データをもとに治験薬の被験者への安全性に関するリスクアセスメントを行い，そのリスクを低減するための特性解析，品質試験の設定，製法開発，工程管理の設定をリスクコントロールと位置づける。治験薬の品質に関する情報を治験担当医師と共有することがリスクコミュニケーションであり，治験結果の次のステップへの反映がリスクレビューに相当すると考えることも可能ではないだろうか。

有効な品質リスクマネジメントのアプローチは，開発および製造中に潜在する品質問題を特定し，コントロールする予防的な手段を提供し，より高品質の医薬品を患者に提供することを可能とする。製品ライフサイクルの初期にあたる治験薬の品質管理は，リスクマネジメントを基本とし，目的とする製品品質プロファイル(QTPP：quality target product profile)の構築を目指した製造品質設計を行うことにより，治験の各段階で得られている知識レベルに応じた管理戦略の妥当性を説明することが可能と考えられる。知識管理と科学的理解に基

づくリスクマネジメントの重要性を踏まえ，バイオ治験薬の安全性に関する既存の情報を概説した上で，ヒト初回投与試験実施に際して求められる要件，および，市販製剤の製法確立・品質確保に向けて治験段階で検討していくべき事項を以下に考察する。

2．バイオ治験薬の安全性に関する概論

バイオ治験薬の安全性を考える上では，知識管理の1つとして，既承認バイオ医薬品あるいはバイオ治験薬に関して蓄積されてきた知見を整理し，リスク要因を考えることが有用である。バイオ治験薬の安全性は，初回臨床試験で被験者全員が多臓器不全に陥った抗CD28アゴニスト抗体TGN1412[3]の事故から得られた教訓なしに語ることはできないが，欧州医薬品庁（EMA）からは，TGN1412事故の原因検証とその後の議論を元に，初回臨床試験のためのリスク同定とリスク低減のためのガイドライン“Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products”が公表されており，バイオ治験薬の安全性を考える上で参考となる内容が書かれている。リスク要因として，作用機構，標的分子の性質，動物モデルの妥当性，の3点が重要であるとするこのガイドラインの記載を参考に，バイオ治験薬の安全性について，リスク要因として考慮すべき事項を以下に列挙する。各項目について，リスクが高いという知見がある場合，または，その内容が不明確な場合，有害作用が生じる可能性が懸念されるため，リスクを低減する対策が必要である。

(1)作用機構および標的分子の性質

化学合成医薬品では，標的外分子への作用や毒性のある代謝物への変換等によるoff-target効果が原因となって有害作用が生じるケースも比較的多いが，バイオ医薬品ではそのような例は稀であり，有効成分の過剰な薬理作用，すなわちon-targetな作用が有害作用の原因となるケースが多い。したがって，治験薬の有効性の根拠となる作用機構と用量反応性を十分に理解することが重要である。TGN1412により生じたサイトカイン放出症候群は過剰な薬理作用が原因であったケースと言えるであろう。その他に，t-PAによる出血傾向やインスリンによる低血糖等がこれにあたる。有害作用の出現頻度や出現までの投与期間を考えると治験では検出されない可能性があるが，免疫抑制作用を持つバイオ治験薬では，腫瘍形成や日和見感染の懸念がある。欧米で承認されていた抗CD11抗体efalizumabは，市販後にJCウイルスの再活性化により生じる進行性多巣性白質脳症を生じたことから，販売が中止された。

また，有効成分が複数の薬理作用を持つ場合，目的外の作用が生じ有害作用が生じる可能性がある。インターフェロンによる発熱等がその例である。細胞増殖因子としての作用を合わせ持つバイオ医薬品では，腫瘍形成のリスクが懸念される。

既承認のバイオ医薬品にはない新規な作用機構を持つバイオ治験薬では，非臨床試験結果からは予測が困難な有害作用が生じる可能性も否定できない。

有効成分の作用機構に関連して，標的分子の組織分布や機能等の性質もリスク要因として重要である。例えば，標的分子が標的組織外にも存在する場合，有害作用が生じることがある。抗EGFR抗体では，ざ瘡様皮疹や皮膚の乾燥等の皮膚症状が高頻度に生じることが知られているが，これは正常皮膚組織に存在するEGFRが標的となる結果とされる。CD28のように生理的なフィードバック機能を超えて標的分子を介した反応が進展する可能性がある場合は，注意が必要である。また，標的分子が複数の生理活性を持つ場合，目的外の作用が生じる可能性がある。抗TNFα抗体による結核再燃（TNFαの肉芽形成阻害作用の抑制による）がその例である。

作用機構に関連したリスクを考える際には，関連する作用機構を持つ薬物がヒトに投与された過去の例や，薬理作用を介した重篤な毒性発現のリスクを模倣しうる動物モデル（トランスジェニック動物，ノックインあるいはノックアウト動物などを含む）での実験結果を参照することも有用である。

投与量設定により回避することが難しい有害作用については，有害作用の出現が懸念されることを踏まえた観察と迅速な処置のための備えが，リスクへの対応として必要と考えられる。

(2)有効成分の構造

バイオ医薬品の多くは糖鎖を持つ糖タンパク質であるが，動物細胞で生産された糖タンパク質の糖鎖には，Gal(α1-3)GalあるいはNeuGcといった非ヒト型糖鎖が付加される可能性がある。非ヒト型糖鎖が問題となった例は多くはないが，Gal(α1-3)Galを含有する糖鎖をFab

領域に持つ抗体医薬品では，Gal(α1-3)Galに対するIgE抗体を保有する患者で過敏症反応が生じた例が報告されている[4]。治験薬が糖タンパク質である場合は，非ヒト型糖鎖の有無について調べ，安全性への影響を考えておく必要がある。

また，非臨床試験では評価ができないが，有効成分の構造によっては，ヒトに対する免疫原性が高い場合がある。血小板増加作用を持つトロンボポエチンの部分配列を持つPEG化MGDFの開発は，治験段階で中和抗体産生による重篤な血小板減少症が生じ，中止されている[5]。生体内生理活性タンパク質と同じあるいは類似の構造を持つバイオ医薬品に対して中和抗体が産生されると，内在性の生理活性タンパク質の作用をも抑制する結果，重篤な有害作用を生じる可能性があるため注意が必要である。

(3)不純物の種類と残存量，免疫原性

バイオ医薬品の原薬あるいは製剤に残存する不純物としては，製造工程由来不純物および目的物質由来不純物があり，それらが治験薬の安全性に影響する可能性を考慮すべきである。製造工程由来不純物としては，宿主細胞由来タンパク質や宿主細胞由来DNA，エンドトキシン(大腸菌を宿主とする場合)，培地成分，精製用カラムからの浸出物等がある。宿主細胞由来タンパク質の残存量が高い場合に免疫原性が増し，抗体出現率が高くなることが知られている。成長ホルモン後続品の開発においては，宿主細胞由来タンパク質の残存量が多い製剤を用いた治験で抗体産生率が高く，製法改良後の製剤では抗体産生率が低下したことが報告されている[6]。大腸菌を宿主とする場合，DNAの非メチル化CpG配列やエンドトキシンがアジュバントとして作用し，抗体産生を亢進させる可能性も考えられる。また，エリスロポエチン製剤では，ラバーストッパーからの浸出物が抗体産生を増強していた可能性が指摘されている[7]。ヒトに対する免疫原性は非臨床試験では評価ができないため，臨床試験において評価すべき項目の1つである。抗体産生による有害作用が生じないかについても注意が必要である。免疫原性は投与経路によっても異なり，皮下投与では静脈内投与に比較して，抗体産生が起こる可能性が高い。目的物質由来不純物に関しては，擬似抗原として免疫原性増強に関わる可能性が考えられる。不純物に対する免疫応答がインフュージョン反応につながる可能性もある。また，目的物質が酵素前駆体である場合に，すでに活性化されている分子種は目的物質由来不純物であり，その含量は限度値を定めて管理する必要がある。

(4)混入汚染物質

動物あるいはヒト細胞を生産基材とするバイオ医薬品では，細胞基材に存在する可能性のある内在性ウイルスや非内在性ウイルス，あるいは培養中に混入・増殖する可能性が懸念される外来性ウイルス等の感染性物質が製品に混入し，感染症が伝播する可能性が否定できない。バイオ医薬品生産に用いられている多くの細胞で，レトロウイルスあるいはレトロウイルス様粒子が存在することが知られている。これまでにバイオ医薬品でウイルス感染事故が起こった例は報告されていないが，動物あるいはヒト細胞を生産基材とする場合には，感染性物質混入のリスクを考え，ウイルスの混入否定試験を実施するとともに，ウイルス除去不活化の対策を講じることが必須である。

(5)細胞の使用経験

バイオ医薬品製造には，大腸菌，酵母の他，CHO細胞やSP2/0細胞，NS0細胞等の動物細胞がよく用いられている。生産性の向上やコストダウンを目的に新たな細胞基材の開発が進んでいるが，使用経験の少ない細胞を用いる場合，内在性ウイルスに関する安全性や翻訳後修飾の点で未知の要素があることを念頭におくべきである。

(6)非臨床試験の妥当性

バイオ医薬品の作用は標的特異性が高いため，標的分子の構造がヒトと動物で異なる場合は動物を用いた有効性・安全性の評価が困難である。そのため，非臨床試験では適切な動物種の選択が重要であり，標的分子，標的分子の構造上のホモロジー，分布，情報伝達経路，薬理効果の性質を考慮して，利用可能な動物種を見極める必要がある。反応性がない，あるいは反応性がヒトと異なる動物を用いた試験では，ヒトで予想される薬理作用を検出することができない，薬物動態および薬力学の解析結果の誤った解釈につながる，毒性作用を見出すことができないといったリスクがある。治験薬の薬理作用および毒性作用の評価を通じて，利用可能な動物種／モデルの妥当性が疑わしいと考えられた場合は，非臨床結果から予測されない問題が生じるリスクが増すと考えるべきである。バイオ医薬品の非臨床試験については，ICH S6ガイドラインとその補遺が参考になる。

動物モデルの妥当性を示すためには，下記のような点

についてヒトとの比較を行うことが考えられる。

- 標的分子の発現，分布，一次構造
- 薬力学
  - ・結合と占有率，細胞のシグナル伝達を含めた機能発現の結果
  - ・他の機能ドメインがある場合には，動物におけるそのドメインの機能に関するデータ
- 代謝および排泄等の薬物動態
- ヒトと動物の組織を用いた交差反応試験(例：モノクローナル抗体)

(7)使用される治験薬の適格性

医薬品開発の際には，開発の進展に伴い，製造方法の変更がしばしば行われる。バイオ治験薬の製法変更前後での品質の同等性／同質性については，ICH Q5Eガイドラインに従って評価を行う必要があるが，非臨床試験からヒト初回投与試験に移行する際に，製法変更が行われ，製品の品質に違いが生じた場合，特に安全性に関して，臨床上，悪影響がないことを十分に検証しなければならない。複雑な分子の場合は特に，製法変更により，恐らく特性解析では検出されないものの生物学的性質や臨床効果に影響し得るような微細な変化が有効成分に生じる可能性があるため，注意が必要である。このような懸念が生じることを避けるため，初期の臨床試験に用いられる治験薬は，非臨床試験に用いられた治験薬と同じ製造方法のものにすべきである。治験薬の適格性を評価するために用いられる試験法の妥当性にも注意が必要である。

3．ヒト初回投与試験の実施に際してバイオ治験薬に求められる要件

バイオ治験薬の安全性に関して考慮すべき事項を踏まえ，これら既存の知識から考えられるリスクを低減するため，ヒト初回投与試験の実施に際して最低限必要と考えられる要件として，次のようなものが考えられる。被験者の健康被害に直接つながるリスクを避けることが第一であり，微生物の混入否定が求められる。また，アレルギー反応の原因となる可能性や，有効成分の免疫原性を増強する可能性がある宿主細胞由来タンパク質等，製造工程由来不純物の含量が一定レベル以下であることを確認する必要がある。製造工程に添加される原料で，安全性への影響が懸念されるものがある場合は，その除去状況の確認も必要である。さらに，特性解析や非臨床試験結果等から設定された投与量が適切であり，設定どおりの量(力価)が投与されることを担保する必要がある。

(1)微生物の混入否定

①ウイルス安全性の確保

動物あるいはヒト細胞を生産宿主とする場合，ICH Q5Aガイドラインに準じたウイルス安全性確保のための対応が必須である。Q5Aではセル・バンクおよび未加工／未精製バルクにおけるウイルス試験，ならびに，精製工程に関するウイルスクリアランス工程評価試験が求められているが，ヒト初回投与試験前においても必須と考えられるのは，マスター・セル・バンクおよび未加工／未精製バルクのウイルス試験であろう。マスター・セル・バンクに関しては，レトロウイルス試験(感染性試験，電子顕微鏡観察，逆転写酵素活性等)，*in vitro*試験，*in vivo*試験，抗体産生試験等が必要である。未加工／未精製バルクに関しては，*in vitro*スクリーニング試験やNAT法等の試験を用いる。

②マイコプラズマ否定試験

マスター・セル・バンクを対象としたマイコプラズマ否定試験が必要である。日本薬局方参考情報20(バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験)が参考になる。

(2)製造工程由来不純物の残存量評価

①宿主細胞由来タンパク質

宿主細胞由来タンパク質(HCP：Host cell protein)は安全性に影響する可能性のある製造工程由来不純物であるため，治験に使用される製剤ロットあるいはその工程中間体での含量を測定する。通例，ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)が用いられるが，使用する抗HCP抗体について，残存する可能性のあるHCPの種類と検出可能なHCPの種類に関する検討によりその適格性を評価しておくことが望ましい。許容されるHCP残存量に関する明確な基準はないが，既承認バイオ医薬品に含まれる残存量を参考に1日投与量あたりのHCP量の基準を考えることも可能と考えられる。酵母を宿主とする場合は，アレルギー反応が生じた例も知られており，宿主細胞に応じた検討が必要と考えられる。

②宿主細胞由来DNA

宿主細胞由来DNAは，宿主細胞が大腸菌の場合は免疫応答を惹起し，安全性に影響する可能性も否定できない。その他の場合も精製度の目安として，治験に使用される製剤ロットあるいはその工程中間体での含量を測定する必要があると考えられる。サザンハイブリダイゼーションや定量的PCRが用いられるが，使用するプローブやプライマーの妥当性を検証しておくべきである。DNAの混入量に関しては，投与量あたり10ngを上限とするという考え方がWHOから示されている[8]。

(3)投与量の適切性の評価

治験薬が目的とする生物活性を有することを確認し，生物学的性質の特性解析や非臨床試験結果をもとに算出された投与量が適切に投与されることを担保する必要がある。そのため，信頼性のある力価測定法を確立して，治験に使用される製剤ロットに設定どおりの力価の治験薬が含まれていることを示す必要がある。力価測定法は，有効性と関連のある作用機構を反映したものであることが望ましい。力価は標準物質との効力比をもとに算出されるため，標準物質の設定も必要である。投与量が重量表示される場合でも，力価は測定し，比活性を確認する。

＜ヒト初回投与量の設定＞

初回投与量の設定はヒト初回投与試験の被験者の安全確保において，重要な要素である。用量設定には利用可能なすべての情報を考慮し，ケースバイケースの原則に基づいて行わなければならない。一般には，最も感受性の高い適切な動物種を用いて実施された非臨床安全性試験により求められた最大無作用量No Observed Adverse Effect Level(NOAEL)を，allometric factorまたは薬物動態学的解析に基づいて補正したものが，最も重要な情報となる。適切な投与量は，分子の特性や臨床試験のデザインに応じて，適切なsafety factorを用いてさらに補正することにより算出される。

2．バイオ治験薬の安全性に関する概論(1)～(7)についてリスク要因があると考えられた治験薬では，用量設定のためにその他の方法を考慮するべきであり，MABEL(Minimal Anticipated Biological Effect Level：推定最小薬理作用量)を用いる方法が推奨される。MABELは，ヒトで最小限度の生物学的影響が得られると予測される用量である。MABELの算出には，以下のような薬物動態／薬力学(PK/PD)データから利用可能なすべての*in vitro*および*in vivo*の情報を利用することができる。

i）ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における*in vitro*での標的分子との結合および占有率
ii）ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における*in vitro*での用量反応曲線と，適切な動物種における*in vivo*での用量反応
iii）適切な動物種への薬理量の投与

ヒトで有害反応が生じる可能性をさらに限定するため，MABELからのヒト初回投与量算出には，safety factorが適用される場合もある。その際には，有効成分の新規性，生物活性，作用機構，種特異性の程度，用量反応曲線の形，MABEL算出の不確かさなどのリスク要因を考慮する。用いたsafety factorの妥当性を示す必要がある。使用した方法(例：NOAEL，MABEL)により算出されたヒト初回投与量が異なる場合は，正当性が示されない限り，最も低い用量を用いることが妥当と考えられる。

(4)注射剤の製剤試験の実施

治験に用いられる製剤ロットに関して，一般的に注射剤に求められる試験が必要である。いずれも日本薬局方一般試験法を用いることができる。エンドトキシン試験(日本薬局方一般試験法<4.01>)，無菌試験法(日本薬局方一般試験法<4.06>)が必須である他，局方注射剤に求められている注射剤の不溶性異物検査(日本薬局方一般試験法<6.06>)，注射剤の不溶性微粒子試験(日本薬局方一般試験法<6.07>)に適合することは基本的な要件である。

4．臨床試験開始から承認申請へ：開発の進展に応じた治験薬の製造と品質評価

治験薬の製造と品質評価には，開発段階に応じた対応が必要である。開発初期では製造工程に関する検討や理解が十分でなく，製造工程管理による品質の一定性確保が十分でないと考えられることから，治験薬の品質の確認のため，また治験薬の品質の一貫性を示すために，治験に使用されるロットの品質評価が特に重要である(図1)。製造されたロット数が限られている場合などでは品質試験(規格及び試験方法)を設定することができず，特性解析結果を確認しておくに留まる可能性もあるが，特性解析は，製品の特性に関する理解を深めるためのみならず，製法変更が行われた際に，変更前後での同等性／同質性評価を適切に実施するためにも必要であるので，構造および物理的化学的性質の解析も可能な限り開発初期から実施するべきである。一般に，第Ⅲ相試験の開始前までには承認時の製造方法と品質試験が定められている必要がある。

治験薬を評価する段階は，市販製剤の製造工程管理，品質管理を検討する段階でもある。重要品質特性(CQA：critical quality attribute)の確定を進め，工程管理に役立てることが有用であろう。原薬および製剤のCQAは，目標製品品質プロファイルやこれまでに得られた知識に基づいて得られ，製品および工程開発の指針として利用される。バイオ医薬品原薬のCQAに関する考え方を図2に示した。想定されるCQAは，バイオ医薬品の品質特性に関する従来の知識から考えることができるが，有効性・安全性に関連する生物活性，製造工程の影響を受けやすい構造および物理的化学的性質，生物活性に影響する構造および物理的化学的性質が，製品ごとに明らかにすべきCQAであると考えられる。

(1)特性解析

①構造解析・構造確認

目的とする構造のタンパク質が得られていることを確認するため，アミノ酸配列を解析する。LC/MSを用いたペプチドマッピングが有用である。ペプチドマッピングは確認試験にも応用が可能であるため，開発初期であっても実施することが望ましい。分子内にCys残基を含む場合は，スルフヒドリル基およびジスルフィド結合を解析する。大腸菌のインクルージョンボディーに目的タンパク質を発現させ，還元，再酸化のステップが含まれる製品では特に，目的とする位置にジスルフィド結合が存在することを確認する必要がある。目的物質が糖タンパク質である場合は，糖組成・糖鎖構造を明らかにする。糖鎖が有効成分の体内動態や生物活性に影響すると考えられる場合は，開発初期からロットごとのデータを蓄積し，製法と糖鎖構造，動態あるいは活性との関連を明らかにしていくことが管理戦略構築のためにも有用である。

②物理的化学的性質

分子量・分子サイズ，アイソフォームパターン，電気泳動パターン，液体クロマトグラフィーパターン，および，分光学的性質(紫外可視吸収スペクトル，円偏光二色性，核磁気共鳴)等を必要に応じて解析する。製造工程による変動が大きい品質特性や，生物活性との関連の

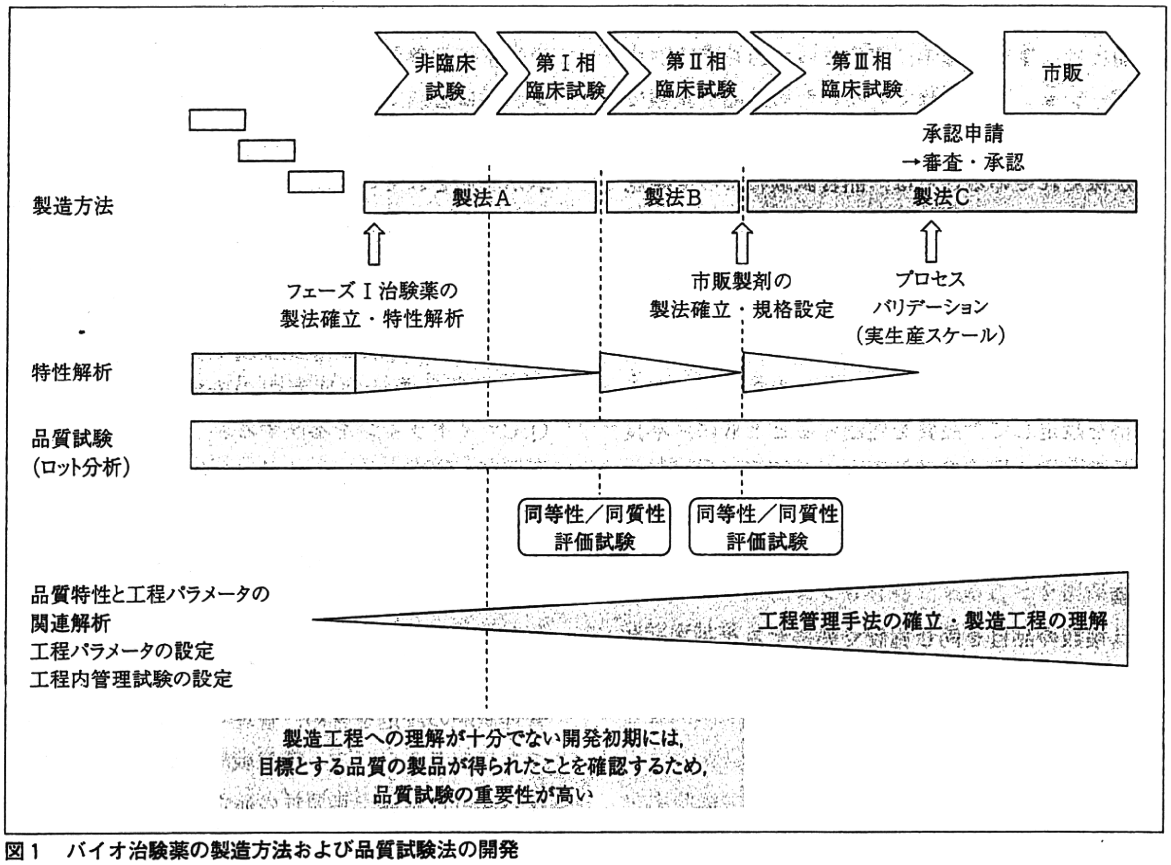

図1　バイオ治験薬の製造方法および品質試験法の開発

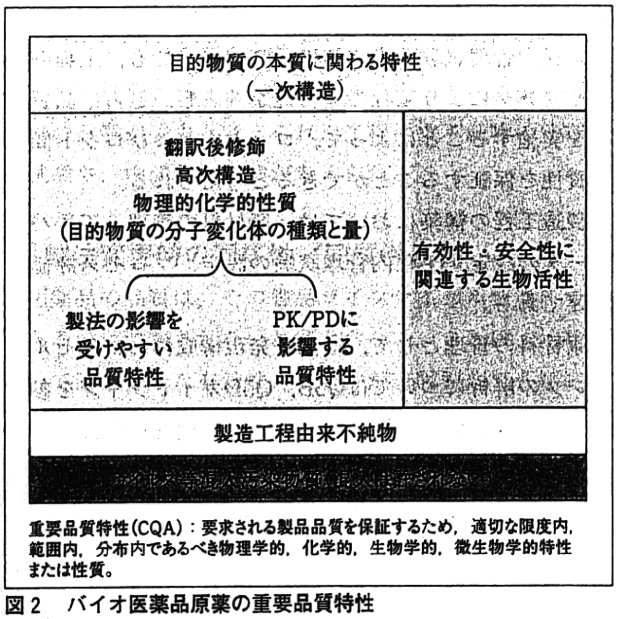

図2　バイオ医薬品原薬の重要品質特性

ある品質特性は，CQAであると考えられる。

③生物学的性質

生物活性の定性的，定量的評価は，作用機構の解析や臨床投与量の検討のために重要である。定性的評価としては，特異的な標的および標的外分子に対して生じる医薬品の作用の性質（影響の及ぶ範囲，増幅性，持続性，可逆性），さらにその下流の反応機構が含まれる。

定量的評価としては，用量反応曲線のタイプと傾き，すなわち，考えられる濃度の範囲で直線性が成り立つか，あるいは，非直線性か（最大効果でプラトーとなる，濃度変化以上に反応の変化が大きい，U型，ベル型），といった特徴が重要である。

④不純物

製造工程由来不純物として，宿主細胞由来タンパク質，DNA，培地成分，クロマトグラフィー用樹脂からの浸出物などの残存量を評価する。宿主細胞由来タンパク質は，製品の免疫原性に影響するため，十分に低減化されていることを評価する必要がある。

目的物質由来不純物としては，切断体，脱アミド体，異性体，ジスルフィド結合ミスマッチ体，酸化体，凝集体等がある。脱アミド体は活性に影響がない場合もあり，その場合は目的物質関連物質である。

(2)品質試験(規格及び試験方法)

開発初期には，工程管理手法が定まっておらず，プロセスバリデーションも行われていないため，品質試験による品質の確認が重要である。ロット内およびロット間の均質性が保たれていることは，品質試験によって確認することができる。承認申請時の規格及び試験方法は，ロット分析結果，安定性試験結果，非臨床試験および臨床試験のデータ等を考慮して設定する必要があるが，治験段階ではこれらのデータがそろっていない。したがって，その時点までに得られているデータから妥当と考えられる規格を設定して，品質を確認するとともに，不良ロットの検出に努めるべきである。

①原薬の品質試験

・確認試験

治験薬は複数の品目を同じ施設で製造するケースが多いと考えられるため，確認試験の実施が推奨される。ペプチドマッピングが望ましい。

・純度試験

安全性に影響すると考えられる不純物(宿主細胞由来タンパク質等)については，開発初期であっても規格を設定する必要がある。製造工程の中間体を試料とするほうが妥当なケースもあり，その場合は工程内管理試験として設定する。凝集体は抗体産生を誘導する可能性があるため，限度値を定めて含量を管理すべきである。

・糖鎖試験

特性解析において，糖鎖構造が体内動態や生物活性に影響するという知見が得られている場合は特に，糖鎖試験を設定する必要がある。

・力価試験

定められた量の治験薬を確実に投与するためには，製品の力価を測定する方法の妥当性が問われる。測定系が適格でない場合や，測定系の信頼性が十分検証されていない場合は，非臨床試験で用いられた用量が正確でなく，安全な用量に関して誤った解釈がなされてしまう可能性がある。また，力価の測定には，開発の早い段階から標準物質を整備することが重要である。

②製剤の品質試験

・無菌性試験

バイオ治験薬はほとんどが注射剤であるので，開発初期においても無菌性試験は必須である。

・エンドトキシン試験

無菌性試験と同様，開発初期においてもエンドトキシン試験は必須である。大腸菌を宿主とする製品で，工程内管理試験あるいは原薬の試験としてエンドトキシン試験が実施されている場合でも，製剤中のエンドトキシン残存量の測定が必要である。

③安定性試験

規格及び試験方法として設定された試験法を用い，実保存条件での治験期間中の安定性を担保する。ICH Q5Cガイドラインを参照する。

(3)製法開発，工程管理手法の構築

医薬品の品質は，製品になってから検証するものではなく，製品設計によって製品に組み込まれていることが望ましい。品質特性(特にCQA)と製造工程の関連を解析して工程の理解を深め，重要工程パラメータや工程内管理試験の設定を含め，管理手法を確立することが有用であると考えられる。管理戦略の構築においては，ウイルス安全性確保や無菌性の確保といった被験者の健康被害防止に直接つながる事項を最優先としつつ，宿主細胞由来タンパク質等の不純物の低減を図ることが合理的である。

工程内管理試験が未整備の段階であっても，工程のモニタリングにより工程の適切性を確認し，さらに品質試験を実施することによって，ロット内およびロット間の均質性を保証することができると考えられる。

製造工程の構築においては，原材料の管理，工程パラメータの設定，工程内管理試験の設定，プロセス評価が必要である。

原材料の管理として，遺伝子発現構成体およびセル・バンクの解析についてはQ5B，Q5Dガイドラインを参照し，出発原料であるセル・バンクの管理を適切に実施する。培養に用いる細胞の世代数については，開発初期には規定されていなくても差し支えないであろう。動物細胞あるいはヒト細胞を細胞基材とする場合は，治験開始前にセル・バンクのウイルス試験が必須である。精製工程に関するウイルスクリアランス工程評価試験も実施すべきであるが，セル・バンクのウイルス試験のほうが重要度は高いと考えられる。ウイルス安全性評価はQ5Aガイドラインに従って実施する。ヒトあるいは動物細胞を用いて製造されるバイオ治験薬の安全性確保において，ウイルス安全性評価が必須である一方で，製造工程の検

討を伴う初期の治験段階では，実施施設に制約があり実施に困難を伴うウイルスクリアランス工程評価試験を繰り返すことは必ずしも合理的でなく，安全確保と効率を見据えた適切な判断が必要である。バイオ治験薬のウイルス安全性について，2008年にEMAからガイドライン“Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products”が公表されている。このガイドラインでは，治験薬の特性を踏まえたウイルス安全性確保に関する考え方が述べられており，製造用細胞の特性と履歴，製造用細胞の特性解析の程度，製造工程におけるヒトや動物由来原料の使用状況，ウイルス迷入の可能性，製造用細胞に関する製造企業の経験，ウイルス除去工程に関する製造企業の経験，文献情報等を考慮して，治験の段階に応じた合理的な試験実施が可能であることが書かれている。

また，わが国では，生物由来原料基準により医薬品に使用される原料または材料に求められる要件が定められている。感染性物質混入のリスク低減のため，生物由来原料基準への適合性は事前に確認しておく必要がある。

工程パラメータの設定はCQAへの影響を中心に検討を行い，CQAに影響する工程パラメータを同定し，適切な範囲を検討する。開発初期では特に，立証された許容範囲として，各パラメータの許容範囲を独立して検討することでよいと考えられる。

工程内管理試験としては，原薬を用いた試験より工程内での試験が妥当と考えられた工程由来不純物の残存量の試験や，中間体の試験が考えられる。

(4)製法変更時の同等性／同質性確保

医薬品の品質は，その製品ライフサイクルを通して維持あるいは改善されなければならない。これは，治験によって確認された有効性・安全性が市販製剤でも継続して担保されるために必須の要件である。しかし，治験段階では，開発の進展に伴い，スケールアップを含め種々の製法変更が実施されるため，品質に影響が生じる可能性がある。より高発現の細胞株を製造に用いるため，セル・バンクの変更が行われることもしばしばである。そのため，有効性・安全性に悪影響がないことを見極めながら，製法の改良を進めていく必要がある。

治験薬GMPでは，その目的1.3に関連して，「一貫性(consistency)」とは治験薬と市販後製品の共通点ならびに相違点およびその因果関係が明確にされていることであり，「同等性(equivalency)」とは治験薬と市販後製品が品質，安全性および有効性について科学的に有意差が認められず，同等と判断しうること，と定義されている。バイオ医薬品では，目的物質の品質特性を高次構造や不均一性を含めて完全に解析することが困難であり，製法変更前後で品質が完全に同一であるとは判断できないため，同等性(equivalency)ではなく，ICH Q5Eガイドラインに従い，同等性／同質性(comparability)を評価する。

製造方法や試験方法を変更した場合は，その変更に伴う一連の文書を適切に保管してトレーサビリティーを保つ必要がある。また，ロットごとに，変更の際の比較評価試験に使用する量を勘案した上で，適切な量を参考品として保管しておく。

先に述べたとおり，非臨床安全性試験の結果が臨床試験に用いる治験薬でも有効であることを担保するために，非臨床試験と初回あるいは初期臨床試験は同じ製法のロットを用いることが望ましい。

5. 治験をめぐる今後の展望とバイオ治験薬の品質・安全性確保

治験に関する今後の動向として，探索的臨床試験の増加や，国際共同治験の増加が想定される。探索的臨床試験は開発候補薬物の絞り込みにも有用であると期待されており，平成22年に発出されたICH M3ガイドラインR2「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」において早期探索臨床試験の項が設けられ，わが国においても「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス(薬食審査発第0603001号 平成20年6月3日)」が発出される等，関連したガイドラインの整備も進んでいる。

近年のバイオ医薬品の開発においては，天然型タンパク質の一部の構造改変，複数のタンパク質の機能ドメインの融合，化成品との共有結合等により，非天然型の構造を持つ製品を開発するケースが増加している。このような場合に，目的に適う優れた特性を示す候補品の見極めに，探索的臨床試験が有用な可能性も考えられる。早期探索的臨床試験では，その後の治験薬との一貫性は重要視されないと考えられるが，リスク要因を考慮し初回投与量の適切な算出に資する体内動態に関する情報の取得，作用機構の解明と力価測定法の確立が重要であると考えられる。

一方，国際共同治験は，ドラッグラグが社会的に問題

視されていること，現状では海外メーカーが先導的に開発を進めているバイオ医薬品が多いことから，今後増加することが予想される。これまでにバイオ医薬品で国際共同治験が実施された例として，トラスツズマブの乳がんに対する術後補助化学療法の効能追加の例がある[9]。

国際共同治験を計画する場合の基本的な留意事項は，「国際共同治験に関する基本的考え方」に述べられているように，

・民族的要因が治験薬の有効性及び安全性に及ぼす影響
・国際共同治験のデザイン
・主要評価項目に関する参加地域間差
・有害事象の収集方法及び評価方法

である。

化学合成医薬品に関しては，安全性に影響する民族的要因として，薬物代謝酵素の活性低下・消失を伴う遺伝子多型の出現頻度が日本人と他人種で異なる例が報告されている[10]。バイオ医薬品に関しても，有効性や安全性に関わる因子の遺伝子多型などの人種あるいは民族的要因に関する検討を進め，わが国におけるバイオ医薬品開発のための治験を安全に実施するために考慮すべき点について明らかにしていくことも必要であると考えられる。

おわりに

現在，世界の医薬品市場におけるバイオ医薬品の割合は2割程度であるが，その市場成長率は医薬品市場全体の2倍であり，年率2桁の伸びを示している[11]。バイオ医薬品は，先端技術応用医薬品として生命科学の研究成果を社会に還元し，国民の健康・安心に貢献する重要な役割を担っている。わが国では治験の空洞化が言われて久しいが，治験環境の充実に加えて，治験薬の品質・安全性確保の合理的な方策確立により治験が安全かつ効率的に実施され，有用なバイオ医薬品が迅速に創出されることが期待される。本稿が，バイオ治験薬の品質・安全性確保に関する議論の端緒となれば幸いである。

■参考文献

1)「新成長戦略」について，平成22年6月18日，閣議決定［cited；Available from: http://www.kantei.go.jp/jp/sinseichousenryaku/sinseichou01.pdf］
2) 古田土真一：第2章 治験薬のGMPの医薬品GMPとの相違および三極の相違，治験薬GMPハンドブック，じほう(2009)
3) 山口照英，石井明子：次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について－TGN1412事故が医薬品開発に与えたインパクト，谷本学校「毒性質問箱」，10，1-33(2007)
4) Chung, C. H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q. T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B. A., Satinover, S. M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R. J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D. J., Platts-Mills, T. A.：Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med.* **358**：1109-1117(2008)
5) Li, J., Yang, C., Xia, Y., Bertino, A., Glaspy, J., Roberts, M., Kuter, D. J.：Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood.* **98**：3241-3248(2001)
6) EMA. Omnitrope；Scientific discussion. 2006［cited；Available from：http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-_Scientific_Discussion/human/000607/WC500043692.pdf］
7) Boven, K., Stryker, S., Knight, J., Thomas, A., van Regenmortel, M., Kemeny, D. M., Power, D., Rossert, J., Casadevall, N.：The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int.* **67**：2346-2353(2005)
8) Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J.：WHO Study Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007. *Biologicals.* **36**：203-211(2008)
9) 荒戸照世：第12章 バイオ医薬品(タンパク質性医薬品)の臨床試験における留意点，先端バイオ医薬品の評価技術，シーエムシー(2010)
10) Saito, Y., Maekawa, K., Ozawa, S., Sawada, J.：Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in east asians and their comparison with other ethnic populations. *Curr Pharmacogenomics.* **5**：49-78(2007)
11) 八木 崇：バイオ医薬品開発における潮流と規制 第1回 バイオ医薬品を取り巻く環境，PHARM TECH JAPAN，26(4)：37-44(2010)

Anal. Chem. **2010**, *82*, 7436–7443

Hyphenated Technique for Releasing and MALDI MS Analysis of O-Glycans in Mucin-Type Glycoprotein Samples

Keita Yamada,[†] Satomi Hyodo,[†] Mitsuhiro Kinoshita,[†] Takao Hayakawa,[‡] and Kazuaki Kakehi*,[†]

School of Pharmacy and Pharmaceutical Research and Technology, Kinki University

We developed an automatic apparatus for the release of O-glycans from mucin-type glycoproteins and proteoglycans (Matsuno, Y.-k.; Yamada, K.; Tanabe, A.; Kinoshita, M.; Maruyama, S.-z.; Osaka, Y.-s.; Masuko, T.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* 2007, *363*, 245–257. Yamada, K.; Hyodo, S.; Matsuno, Y. K.; Kinoshita, M.; Maruyama, S. Z.; Osaka, Y. S.; Casal, E.; Lee, Y. C.; Kakehi, K. *Anal. Biochem.* 2007, *371*, 52–61). The method allows rapid release of O-glycans as the reducing form within 10 min. In the present study, we connected the device to a MALDI-TOF MS spotter and achieved routine analysis of O-glycans in biological samples for clinical use after *in situ* derivatization of the released O-glycans with phenylhydrazine. We applied the method to the analysis of O-glycans expressed on MKN45 cells derived from human stomach cancer cells and found that MKN45 cells expressed characteristic trisialo-polylactosamine-type glycans as reported previously (Yamada, K.; Kinoshita, M.; Hayakawa, T.; Nakaya, S.; Kakehi, K. *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 521–537). We also applied the method to the analysis of O-glycans in serum samples. The present technique is the first attempt to use MS measurement for routine clinical diagnostic works.

The O-linked glycans (O-glycans) in glycoproteins are covalently linked to Ser/Thr residues of the core protein through *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) at their reducing ends. These glycans are often called as mucin-type glycans due to their predominant presence in tracheas and mucin secretory glands such as salivary glands. Currently, there are eight known core structures for O-glycans,[1] and a number of research works reported the aberrant glycan patterns in relation to the development and metastasis of malignancy.[2–4] Recently, Lebrilla and co-workers studied O-glycosylations in epithelial ovarian cancer cells and serum samples of breast cancer patients and proposed the use of O-glycans as clinical markers.[5,6]

Because various types of O-glycans are linked to the repeating Ser/Thr residues of Ser/Thr/Pro rich tandem repeating units of the core protein, direct analysis of the glycopeptides is difficult even if using the most newly developed analytical techniques such as mass spectrometry. Therefore, we have to release carbohydrate chains from the core proteins prior to the analysis. Various approaches to release glycans from the polypeptide backbone through the enzymatic or chemical procedures have been developed but have been a big challenge in the case of the analysis of O-glycans using a minute amount of glycoproteins.[1]

N-Glycanases (N-glycoamidases), the enzymes providing facile cleavage of asparagine-linked glycans (N-glycans), are revolutionary in the analysis of N-glycans.[7] In contrast, there is no enzyme which is capable of releasing a wide range of O-glycans from the core protein.[8] Therefore, we usually release O-glycans from the core proteins by chemical methods, typically by β-elimination with alkali in the presence of sodium borohydride or mild hydrazinolysis.[9,10]

N-Acetylgalactosamine (GalNAc) residues at the reducing end of mucin-type O-glycans are attached to Ser/Thr residues of mucin-type glycoproteins. To release the O-glycans, we usually use the alkali solution under mild conditions. However, if the GalNAc residues at the reducing end of the released glycans are substituted at the C-3 position, further degradation (i.e., peeling) tends to proceed. This is the most critical problem in the analysis of mucin-type O-glycans. Alkali-catalyzed β-elimination in the presence of sodium borohydride under mild conditions to prevent the "peeling" reaction is still the most common method for routine analysis of O-glycans,[11–13] and the method affords O-glycans as the reduced form (i.e., alditols). Consequently, the hemiacetal group at the reducing terminal is no longer available for chemical modification with fluorescent or UV-absorbing tags for their sensitive and high-resolution analysis. Royle and co-workers

* To whom correspondence should be addressed. Kowakae 3-4-1, Higashi-Osaka, 577-8502 Japan. Phone: +80-6-6721-2332. Fax: +80-6-6721-2353. E-mail: k_kakehi@phar.kindai.ac.jp.

[†] School of Pharmacy.

[‡] Pharmaceutical Research and Technology.

(1) Mechref, Y.; Novotny, M. V. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 321–369.
(2) Fuster, M. M.; Esko, J. D. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 526–542.
(3) Jensen, P. H.; Kolarich, D.; Packer, N. H. *FEBS J.* **2010**, *277*, 81–94.
(4) An, H. J.; Kronewitter, S. R.; De Leoz, M. L.; Lebrilla, C. B. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 601–607.
(5) Leiserowitz, G. S.; Lebrilla, C.; Miyamoto, S.; An, H. J.; Duong, H.; Kirmiz, C.; Li, B.; Liu, H.; Lam, K. S. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2007**.
(6) Kirmiz, C.; Li, B.; An, H. J.; Clowers, B. H.; Chew, H. K.; Lam, K. S.; Ferrige, A.; Alecio, R.; Borowsky, A. D.; Sulaimon, S.; Lebrilla, C. B.; Miyamoto, S. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 43–55.
(7) Takahashi, N. In *Handbook of Endoglycosidases and Glycoamidases*; Takahashi, N., Muramatsu, T., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1992; p 183.
(8) Umemoto, J.; Bhavanandan, V. P.; Davidson, E. A. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8609–8614.
(9) Merry, A. H.; Neville, D. C.; Royle, L.; Matthews, B.; Harvey, D. J.; Dwek, R. A.; Rudd, P. M. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 91–99.
(10) Cancilla, M. T.; Penn, S. G.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 663–672.

10.1021/ac101581n
Published on Web 07/29/2010