

10.2 陰性対照調製液

陰性対照調製液は陰性対照物質をそのまま用いる。

10.3 陽性対照調製液

調製濃度： 2 mg/mL
 調製方法： CP を秤量し、生理食塩液（日本薬局方、株式会社大塚製薬工場）を加え溶解させる。
 調製頻度： 用時に調製する。

11. 被験物質及び対照物質の投与

（SOP：GTX/373, GTX/415）

11.1 被験物質及び陰性対照物質

投与経路： 静脈内
 投与経路の選択理由： 臨床適用経路に従う。
 投与方法： ディスポーザブル注射筒、留置針、延長チューブ（エクステンションチューブ）及びインフュージョンポンプ（BS-8000, Braintree Scientific Inc.）を用いて尾静脈内に投与する。
 投与方法の選択理由： ラットの静脈内投与では通常用いられる方法である。
 投与回数： 1日1回（単回投与）。Day 1に単回投与する。
 投与回数の選択理由： 一般的に小核試験でよく用いられているため。
 投与容量： 20 mL/kg
 投与液量は、最新の体重を基に個別に算出する。
 投与速度： 1 mL/kg/min
 投与時刻： 09：00～15：00

11.2 陽性対照物質

投与経路： 経口
 投与経路の選択理由： 「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」に例示されているため。
 投与方法： ディスポーザブルラット用胃ゾンデ及び注射筒を用いて経口投与する。
 投与方法の選択理由： ラットの経口投与では通常用いられる方法である。
 投与回数： 1日1回（単回投与）。Day 2に単回投与する。
 投与回数の選択理由： 「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」に例示されているため。

投与容量： 10 mL/kg
投与液量は、最新の体重を基に個別に算出する。

投与時刻： 09：00～15：00

12. 試験系

種： ラット

系統： CrI：CD (SD)

性： 雄

体重

繁殖生産者出荷時： 190 ～ 270 g

検疫馴化開始時： 171 ～ 283.5 g

週齢

検疫馴化開始時： 7 週齢

投与開始時： 8 週齢

入手日： 2011 年 4 月 5 日

入手動物数： 60 匹

使用動物数： 54 匹

繁殖生産者及び所在地： 日本チャールス・リバー株式会社

〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735

動物選択の理由： 事前に実施された小核試験に用いるげっ歯類の動物種の一つとしてラットを使用しており、毒性情報がある。また、株式会社新日本科学は SD 系ラットを用いる小核試験の手法を確立しており、背景データを集積しているため、詳細は「17.2 投与量及び骨髄採取時期設定の根拠」を参照する。

13. 飼育条件

(SOP：GTX/189, GTX/310, GTX/541, HTL/303)

飼育室： 557 号室

温度： 許容範囲 19～25°C

湿度： 許容範囲 30～70%

換気回数： 15 回/時間

照明： 1 日 12 時間 (07：00～19：00 点灯) の人工照明
(観察のため上記の照明時間以外に点灯/消灯する場合を除く)

飼育ケージ

材質： ステンレス (サスペンド式個別ケージ)

大きさ： 325 mm (D) × 195 mm (W) × 180 mm (H)

収容数：	1 匹／ケージ
飼料：	固型飼料（CE-2，日本クレア株式会社）を自由に与える。使用するロットについて日本クレア株式会社より分析結果を入手し，SOP の基準値の範囲内であることを確認する。
飲水：	水道法水質基準に適合した水を自動給水装置（Edstrom Industries, Inc.）を用いて自由に摂取させる。社団法人鹿児島県薬剤師会試験センターで年 4 回実施する検査の結果を入手し，SOP の基準値の範囲内であることを確認する。
環境エンリッチメント：	おもちゃ（ビー玉）を常時供与する。
清掃及び消毒	
飼育室：	床を毎日清掃及び消毒する。
架台，ケージ，給餌器，おもちゃ，トレイ及びクリーンマット：	架台，ケージ，給餌器，おもちゃ，トレイ及びクリーンマットはオートクレーブ滅菌処理（121℃，30 分間）済みのものを使用する。クリーンマットは週 2 回以上，トレイは 2 週に 1 回以上交換し，架台，ケージ，給餌器及びおもちゃは，原則として交換を行わない。
落下細菌検査：	株式会社新日本科学 安全性研究所で年 4 回実施する落下細菌検査の結果を入手し，SOP の基準値の範囲内であることを確認する。

14. 動物の識別法

（SOP：GTX/502）

個体：	検疫馴化期間中は色素塗布法（アニマルカラー，日本ラビット株式会社）で ACN（Acclimation Number）により識別を行い，群分け以降は耳パンチ法で動物番号により識別する。
ケージ：	検疫馴化期間中は試験番号，ACN，性別及びバーコードを表示したケージカードを使用する。群分け以降は試験番号，群，投与量，性別，動物番号及びバーコードを表示したカラーケージカードを使用する。

15. 検疫馴化

（SOP：GTX/371）

動物は検疫馴化開始日から 7 日間の検疫馴化を行う。検疫馴化期間中の観察及び検査の頻度並びに方法の詳細については、「17.3 観察及び検査項目」を参照する。

検疫馴化期間中に被験物質の評価に適さないと判断した動物については，Day 2 に炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

16. 動物の群分け

(SOP : GTX/153)

検疫馴化終了日に群間で体重に偏りが生じないように、体重の層別無作為化 (MiTOX システム, Ver.2.0, 三井造船システム技研株式会社) によって群分けする。

群分け時の余剰動物については、Day 2 に炭酸ガス吸入法で安楽死させる。

17. 小核試験

(SOP : MUT/012)

17.1 試験群構成

陰性対照群 1 群, 被験物質群 3 群, 陽性対照群 1 群

群	被験物質及び 対照物質	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	投与 経路	動物数 (動物番号)
						24 時間及び 48 時間
1	生理食塩液 ^{a)}	—	—	20	静脈内	12 (1~12)
2	AcPepA (MPS-390)	20	1	20	静脈内	12 (13~24)
3	AcPepA (MPS-390)	40	2	20	静脈内	12 (25~36)
4	AcPepA (MPS-390)	80	4	20	静脈内	12 (37~48)
5	CP ^{b)}	20	2	10	経口	6 (49~54)

a) 陰性対照, b) 陽性対照 (Day 2 に単回投与する)

17.2 投与量及び骨髄採取時期設定の根拠

事前に非 GLP 下で実施された AcPepA のラットを用いた小核試験試験¹⁾では、急速投与 20 mg/kg, 持続投与 60 mg/kg (計 80 mg/kg) において、被験物質投与に起因すると考えられる一般状態の異常はみられなかった。本剤の臨床での投与は 1.2 mg/kg/hour の 3 時間持続投与を想定している。従って、臨床想定用量の 10 倍を超える量として 80 mg/kg/日を高用量に設定し、以下公比 2 で減じた 40 mg/kg, 20 mg/kg の計 3 用量を設定した。

被験物質群及び陰性対照群 (単回投与) における骨髄採取時期は、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」に従い、単回投与後約 24 及び 48 時間とする。なお、陽性対照群 (単回投与) における骨髄採取時期については、株式会社新日本科学では投与後約 24 時間の陽性対照群の背景データの蓄積があるため、投与後約 24 時間に 1 回とする。

17.3 観察及び検査項目

(SOP : GTX/125)

骨髄採取までに動物が瀕死状態であると試験責任者が判断した場合、その動物は炭酸ガス吸入法により安楽死させる。なお、陽性対照群については、Day 1 の投与前の一般状態観察及び体重測定は実施するが、Day 2 に単回投与のためこれらのデータは評価に用いない。

17.3.1 一般状態

(SOP : GTX/151, GTX/374)

例数 : 全例

観察頻度

検疫馴化期間中 : 毎日 1 回以上

投与期間中 :

被験物質群及び陰性対照群

投与日に 4 回 (Day 1 の投与前, 投与後約 0.5, 2 及び 6 時間)
以上

陽性対照群

Day 1 の被験物質群及び陰性対照群の投与前に 1 回
投与日に 4 回 (Day 2 の投与前, 投与後約 0.5, 2 及び 6 時間)
以上

投与期間終了後 : Day 2 及び 3 の骨髄採取前に 1 回

観察方法 : 生死の確認とあわせて一般状態観察を行う。

17.3.2 体重

(SOP : GTX/377)

例数 : 全例

測定時期

検疫馴化期間中 : 検疫馴化開始日及び検疫馴化終了日に 1 回

投与期間中 : 投与前に 1 回

投与期間終了後 : Day 2 及び 3 の骨髄採取前に 1 回

測定方法 : 電子天秤 (GX-4000, 株式会社エー・アンド・デイ) で測定する。

17.4 骨髄採取及び骨髄塗抹標本の作製

最終投与後約 24 時間及び 48 時間に骨髄細胞を採取し、塗抹標本を作製する。陰性対照群及び被験物質群については投与後 24 時間時点の生存例について動物番号の小さい方から 5 例について骨髄細胞を採取する。投与後 48 時間時点で残りの全生存例について骨髄細胞を採取する。陽性対照群については投与後 24 時間時点で全生存例について骨髄細胞を採取する。まず、動物を炭酸ガス吸入法により安楽死させる。右側の大腿骨を取り出し両端を切断し、約 1.0 mL の

牛胎児血清 (FBS) で骨髄細胞を遠心管に洗い出す。その後、1000 rpm (209×g) , 5 分間室温で遠心分離 (卓上多本架遠心機 ; KS-8300, 株式会社久保田製作所) し、上澄みを捨てる。残った上澄みに骨髄細胞を懸濁させ、脱脂洗浄済みのスライドガラスに少量の細胞浮遊液を滴下し、カバーガラスを用いて塗抹標本を作製する。塗抹標本は動物につき 2 枚以上作製する。標本を十分に乾燥させた後、メタノールで 5 分間固定する。次に、1 mg/mL (0.1%) のアクリジンオレンジ水溶液を 1/15 mol/L ゼーレンゼンりん酸緩衝液 (pH6.8) で 40 µg/mL (0.004 w/v%) に希釈 (25 倍希釈) した染色液を塗抹標本に 1 滴滴下し、カバーガラスをかけて、ただちに蛍光装置付き生物顕微鏡 (BX-51, オリンパス株式会社) で観察する。

17.5 評価に用いる動物数

陰性対照群及び被験物質群については投与後 24 時間で骨髄を採取した 5 例については全て評価に用いる。投与後 48 時間について 5 例以上骨髄を採取した場合は、動物番号が小さい順に各群 5 匹を評価に用いる。陽性対照群について、5 例以上骨髄を採取した場合は、動物番号が小さい順に各群 5 匹を評価に用いる。なお、5 例以上観察できなかった群のデータは参考値として取り扱う。評価に用いなかった標本については試験終了までに廃棄する。

17.6 骨髄塗抹標本の観察

標本はコード化し、観察はブラインド法で行う。最終倍率 600 倍で、個体あたり 2000 個の幼若赤血球 (immature erythrocyte : IE) を観察し、2000 個の IE における小核を有する幼若赤血球 (micronucleated immature erythrocyte : MNIE) の出現頻度 (MNIE%) を求める。また、骨髄細胞の増殖抑制の指標として、個体あたり 500 個の全赤血球 [幼若赤血球+成熟赤血球 (mature erythrocyte : ME)] を観察し、全赤血球における幼若赤血球の割合 (IE%) を求める。

18. 統計学的手法

(SOP : MUT/012, CPU/105)

小核を有する幼若赤血球の出現数について、陰性対照群と各被験物質群及び陽性対照群との間で Kastenbaum and Bowman (有意水準=片側 5%) の方法による有意差検定を行う。また、幼若赤血球の割合 (IE%) については、陰性対照群と各被験物質群との間で Dunnett の多重比較検定 (有意水準=両側 1%) を行い、陰性対照群と陽性対照群との間では Student の t-検定 (有意水準=両側 1%) を行う。これらの検定には SAS ソフトウェア (SAS for Windows, Release 9.1, SAS Institute Inc.) を使用する。

19. 文献

- 1) 川口恵未 : AcPepA のラット小核試験。スギ生物科学研究所株式会社, 試験番号 : FBM09-8542, 最終報告書, 2009 年

20. 結果の判定

(SOP : MUT/012)

20.1 試験成立

陰性対照及び陽性対照の MNIE%及び IE%が当施設の背景データの Mean \pm 3SD の範囲内にあるとき試験成立とする。

20.2 試験結果の判定

小核を有する幼若赤血球の出現数について、陰性対照群と比較し、被験物質群で有意な増加が認められた場合に陽性と判定し、それ以外の場合は陰性と判定する。なお、最終的な判定は、試験条件下での生物学的妥当性も考慮して行う。幼若赤血球の出現頻度 (IE%) については、陰性対照群と比較して有意な減少が認められた場合は、被験物質に骨髄細胞の増殖抑制があるものと判定する。

21. 結果の表示

原則として個体あたり、観察した IE 数、MNIE 数、MNIE%及び IE%を表示する。また、各群については平均値、標準偏差、最小値及び最大値を表示する。また、一般状態及び体重についても表示する。

22. 試験成績の報告

本試験の成績について、最終報告書の草案を試験委託者に 1 部提出する。最終報告書 (和文) についてはその写し 1 部を試験委託者に提出する。

別添 1

被験物質に関する資料

被験物質の特性

被験物質の安定性

調製液の安定性

調製液の濃度測定

別添 2

表

1) 一般状態

2) 体重

3) 個体あたりの MNIE 数、IE 数、MNIE%及び IE%

4) 各群の平均値、標準偏差、最小値及び最大値

添付資料

信頼性保証陳述書

23. 記録及び資料の保存

(SOP : CPU/202)

記録及び資料は、以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する。

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

試験スケジュール

被験物質及び対照物質に関する記録, 資料

試験系に関する記録, 資料

飼育条件に関する記録, 資料

検疫馴化記録

投与記録

一般状態観察記録

体重測定記録

標本作製記録

小核の観察及び測定記録

最終報告書草案

最終報告書

その他, 試験に関する資料

24. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は、試験計画書変更書を作成し、変更箇所及びその理由を明確にする。

25. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

鳥越 直彦



2011年 4月 4日

鳥越 直彦

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

大島 洋次郎



2011年 4月 4日

大島 洋次郎

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認致します。

試験委託者 医療法人さわらび会福祉村病院 長寿医学研究所

岡田 秀親



2011年 4月 12日

岡田 秀親

別添 A

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定方法総ページ 3 枚

調製液中の AcPepA (MPS-390) 濃度測定方法

(SOP : BIO/023)

本試験に用いる測定法は株式会社新日本科学 安全性研究所でバリデーションを実施した¹⁾。

1. 標準物質

被験物質を標準物質として使用する。

2. 使用試薬

(SOP : BIO/250)

名称	等級	製造者
アセトニトリル	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
トリフルオロ酢酸 (TFA)	HPLC 用	和光純薬工業株式会社
超純水	Milli-Q システムにて精製した水。	

3. 測定機器

名称	型式	製造者	SOP
HPLC システム	島津 10A	株式会社島津製作所	BIO/273
検出器	島津 SPD-10A	株式会社島津製作所	BIO/273
データ処理装置	LCsolution	株式会社島津製作所	BIO/273

4. 移動相の調製

(SOP : BIO/250)

以下の割合で調製する。

4.1. 移動相 A の調製

超純水 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

4.2. 移動相 B の調製

アセトニトリル 1000 mL と TFA 1 mL を混合し、超音波減圧処理により脱気する。

5. 標準溶液の調製 (n = 1)

次表に従い、正確に標準溶液を調製する。

標準溶液名	採取物	採取量	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
S	被験物質	10 mg	超純水	40	250
STD	S	2 mL	超純水	50	10

6. 試料溶液の調製 (n=2)

調製液をよく転倒混和した後、次表に従い正確に採取し、超純水を用いて正確に試料溶液を調製する。

試料溶液	採取液 (生理食塩液調製液)	採取量 (mL)	使用液	調製量 (mL)	調製濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
T1	1 mg/mL 調製液	1	超純水	100	10
T2	2 mg/mL 調製液	1	超純水	20	100 [t2]
	t2	1	超純水	10	10
T3	4 mg/mL 調製液	1	超純水	40	100 [t3]
	t3	1	超純水	10	10

[] 内は、調製途中の溶液名。

7. 測定法

7.1. HPLC 測定条件

検出器： 紫外吸光光度計 (測定波長：215 nm, AUX レンジ：2.0 AU/V)

カラム： YMC-Pack Pro C18 RS (5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d.; 株式会社ワイエムシィ)

カラム温度： 40°C

試料温度： 5°C

移動相 A： 0.1%TFA 水溶液

移動相 B： 0.1%TFA アセトニトリル溶液

移動相の送液： 移動相 A 及び移動相 B の混合比を以下のように直線的に変えて濃度勾配制御する。

注入後からの時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0 \rightarrow 5	70 \rightarrow 50	30 \rightarrow 50
5.01 \rightarrow 10	20	80
10 \rightarrow 20	70	30

流量： 1.0 mL/min

注入量： 20 μL

面積測定範囲： 5分

7.2. システムの再現性

測定の開始時に、標準溶液 STD (調製濃度：10 $\mu\text{g/mL}$) を 6 回繰り返して測定し、AcPepA (MPS-390) のピーク面積の相対標準偏差 (RSD) が 2.0%以下であれば適とする。

8. 調製液濃度の算出

標準溶液 STD を 2 回測定後，試料溶液 T1～T3 を 1 回ずつ測定する．得られた標準溶液のピーク面積と調製濃度から LCsolution により検量線（一点検量線法）を作成し，試料溶液中の AcPepA（MPS-390）濃度を求め，次式により調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度，含有率及び安定性を算出する．

調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度（mg/mL）

$$= \text{試料溶液中の AcPepA（MPS-390）濃度（}\mu\text{g/mL）} \times \text{希釈倍率} \times 10^{-3}$$

含有率（%） = 調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度（mg/mL） / 目標濃度（mg/mL） × 100

安定性（%） = 保存期間後の調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度平均値（mg/mL） /
調製直後の調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度平均値（mg/mL） × 100

9. 測定結果の取扱い

ピーク面積，試料溶液濃度及びシステムの再現性は，データ処理装置から出力された値を用いる．その後の計算には，表計算ソフト Excel を用いる．算出される数値の表示桁数は以下のとおりとし，数値の丸め方は必要桁の 1 桁小さい桁で四捨五入する．

ピーク面積：	小数点以下 1 桁
濃度値：	有効数字 5 桁
Mean：	計算前の数値と同じ桁数
百分率表示値：	小数点以下 1 桁

10. 参考文献

- 1) 山田聡美：調製液中の AcPepA（MPS-390）濃度測定法バリデーション試験，株式会社新日本科学 安全性研究所，試験番号 SBL861-005，最終報告書，2011 年

アナフィラトキシン C5a 阻害ペプチドの抗炎症機序の解析

分担研究者 岡田則子 名古屋市立大学医学研究科

研究協力者 朝井鈴佳、牧優希、小田中瑞夕

研究要旨 我々の開発した相補性ペプチド創出技術を用いて補体 C5a アナフィラトキシンをターゲットとしてその活性を阻害できる相補性ペプチド候補の検討をおこなってきた。その結果、阻害活性ペプチド AcPepA および AmidPep11 を見いだしており、その阻害する生物活性のさらなる検討を進めた。その結果、AcPepA はヒト好中球分画を用いての C5a 刺激による細胞内 Ca 濃度の上昇の阻止活性や、敗血症のリスク因子である炎症性サイトカイン IL-6 や TNF- α の放出の阻害活性があることが確認された。

A 研究目的

生体内に微生物感染などが生じた場合、それらを異物として認識し、排除するための様々な生体防御反応が生ずる。このうちの1つが、血液中の補体の活性化である。補体が活性化すると中間産物として C5a が産生され、これがマスト細胞からのヒスタミン放出を刺激し、血管透過性を高めたり、好中球やマクロファージを活性化して炎症局所に遊走、集積させ、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインを放出させる機能を持つ。これらの機能は、通常の生体防御において重要であるが、重度の感染症やアレルギー反応などが原因で、C5a が過剰産生されるとアナフィラキシーショックや敗血症などを引き起こすと考えられる。そこで、この事態を防ぐ為に C5a 阻害ペプチドの開発を行って来た。それらのうち、PepA および Pep11 は C5a の活性部位のひとつである PL37 部分に対する相補性ペプチドであり、PL37 に結合してその活性を制御することが期待されている。さらに C5a 阻害ペプチド AcPepA は、これまでにサルのエンドトキシンショック死を完全に回避させたり、新生児ブタの CLP ショックを有意

に抑制できることが判明しているので、さらなるアナフィラトキシン C5a 制御の病理生理学的意義を in vitro で検討することを目的とした。

B 研究方法

Complementary Peptides

阻害ペプチドとしては、PepA の N 末端をアセチル化した AcPepA および C11 の C 末端をアミド化した AmidC11 を使用した。PepA のアセチル化により阻害活性が上昇する事がモルモットの皮内反応など in vivo 解析で確認されている。また、AmidC11 もブタ CLP 実験で効果が認められている。

Ca mobilization in Neutrophils

好中球膜上の C5aR に C5a が結合すると、細胞内シグナル伝達を介した小胞体からの Ca 放出や、Ca チャネルを介した Ca 流入が起こり、細胞内 Ca 濃度が上昇する。このことから、C5a や C5a 阻害ペプチドにより、好中球内に見られる Ca 濃度変化を測定した。

<操作方法>

採血後、好中球分離

↓
 Fura2-AM をロード
 ↓
 poly-L-lysine-coated 4well slide glass に
 400 μ /well で播く
 ↓
 4°C, 1h, incubate 後 ARGUS HiSCA
 Calcium imaging system にて C5a 及び阻害ペプ
 チドを添加した場合の細胞内 Ca 濃度の変動を
 測定した。

Expression of CD11b on Neutrophils

好中球膜上に存在する CD11b はインテグリン α M 鎖として知られ、好中球上では CD18 とともに Mac-1(CD11b/CD18,CR3)を形成する。C5a や LPS による刺激によってその発現が増強されるとの報告があるので、好中球膜上の CD11b 発現量を測定した。

<操作方法>

採血後、サンプルを添加
 37°C, 30min incubate
 ↓
 白血球分離
 ↓
 FITC 標識された α-CD11b 抗体を添加
 ↓
 CD11b に結合した抗体の量をフローサイトメーターにて測定

Cytokine release from Neutrophils

C5a は好中球に働きかけ炎症性サイトカインの放出を引き起こし、炎症反応を増悪させる。特に、IL-6, TNF-α は好中球から産生されることが分

かっているため、これらのサイトカインレベルが AcPepA により抑制されるか検討した。

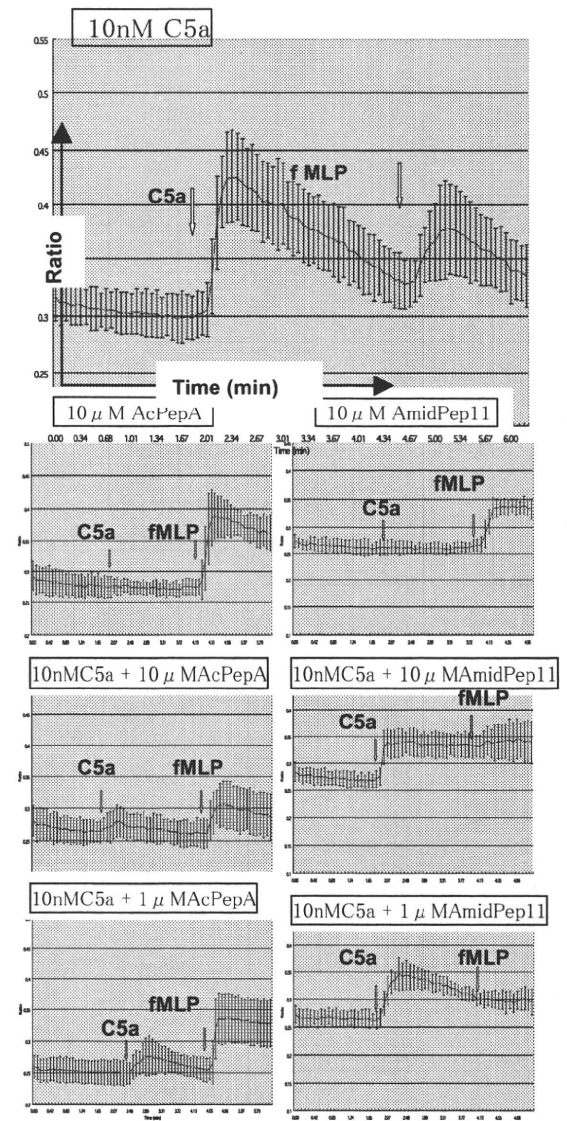
<操作方法>

採血後、好中球分離
 ↓
 サンプルを添加
 37°C, 24h incubate
 ↓
 上清中のサイトカインレベルを測定

C 実験結果

①

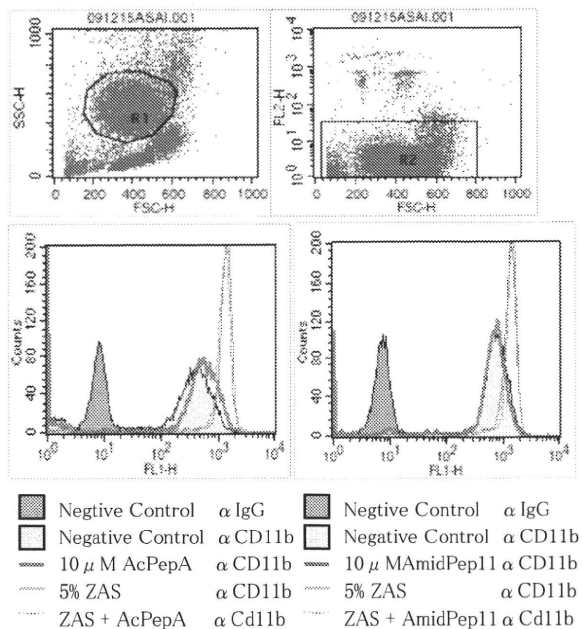
AcPepA は濃度依存性に好中球内 Ca 濃度を抑制することが確認できた。一方、AmidPep11 の抑制効果は AcPepA より軽度であった。



②

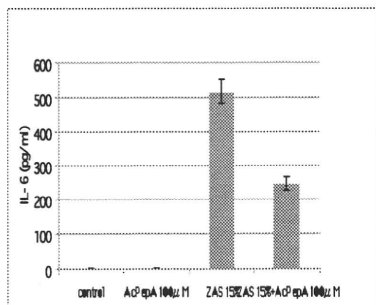
ヒト末梢血の好中球分画における C5a 刺激による CD11b 発現変化に及ぼす阻害ペプチドの影響を FACS 解析にて検討した。その結果、AcPepA, AmidPep11 とともに、C5a 刺激による CD11b 発現の増強を抑制する効果は見られなかった。

* ZAS(=Zymosan Activated Serum)を C5a source として用いた。

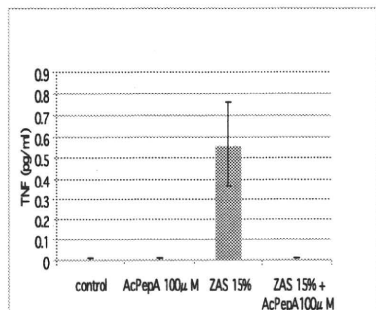


③

Concentration of IL-6



Concentration of TNF-α



* X軸:左から順に control, AcPepA100 μM, ZAS15%, AcPepA + ZAS。Y軸:濃度
AcPepA は好中球から放出される IL-6, TNF-α

の量を抑制した。

D 考察

AcPepA は好中球の細胞内 Ca 濃度上昇とサイトカイン放出の実験において、優れた抑制効果が得られた。

抑制効果が見られなかった CD11b 発現量の実験に関しては、C5a と阻害ペプチドの解離、血中の分解酵素による阻害ペプチドの分解が考えられるので、血中でのペプチド濃度を一定に保てる様な添加方法を検討する必要がある。また、AmidPep11 は濃度の再検討が必要である。

E 結論

アナフィラトキシン阻害ペプチドは C5a 存在下で好中球より放出される炎症性サイトカインの放出を阻害できることが確認された。これまでに敗血症動物モデルで確認されている炎症性サイトカインの放出には好中球が介在することが示唆されており、今回直接的なエビデンスが得られた。また、C5a のレセプターは2種類存在する事が明らかとなっており、特に HMGB1 放出には第2レセプターの存在が重要であるという報告もあり、これらのレセプターへの阻害ペプチドの関与を明らかにすることが必要と考える。

G 研究発表

1 論文発表

- 岡田則子 アンチセンスペプチド理論より創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチド Nagoya Medical Journal 50:101-105(2009)
- Mohamed Hamed Hussein, Shin Kato, Tatenobu Goto, Ghada A. Daoud, Tetsuya, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Hajime Togari, Masaki Imai, Noriko Okada, Hidechika Okada An Acetylated Anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model. Mol Immunol 46:2825, 2009
- Asai, S., Kimbara, N., Tada, T., Imai, M., Campbell, W., Okada, H., Okada, N. Procarboxypeptidase R deficiency Causes

increased lethality in concanavalin A-induced Hepatitis in female mice. *Bio. Pharm. Bull.* 2010 (in press)

4 Farkas, I., Varju, P., Hrabovszky, E., Okada, N., Okada, H., Liposits, Z. Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochemistry Int.* 2008, 52: 846-856

5 Ohi, H., Tamano, M., Okada, N. Low CR1 (C3b receptor) level on erythrocytes associates with poor prognosis in hemodialysis patients. *Nephron Clinical Practice* 2008, 108: c23-c27

5 Hau, L., Campbell, W., Okada, H., Calpio, C., A., D., Imai, M., Okada, N. Designing complementary peptides with a genetic algorithm to a 10 amino acid peptide of the c-terminal of C5a anaphylatoxin. *Nagaya Med. J.* 2008, 49: 219-233

6 今井優樹、岡田則子 相補性ペプチドによる炎症の制御 *臨床検査* 52:917-920(2008)

2 学会発表

1 Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. Interruption of a cross-talk between the complement and coagulation cascade improves early outcomes after intraportal islet transplantation XXIII International Congress of the Transplantation Society Aug 15-19, 2010 Vancouver

2 Tokodai, K., Goto, M., Inagaki, A., Nakanishi, W., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. A strong candidate approach to prevent the instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical

islet transplantation Joint Meeting on IPITA-XTA 2009 Oct 12-16, 2009 Venice

3 Mohamed Hamed Hussein, Shin Kato, Tatenobu Goto, Ghada A. Daoud, Tetsuya, Ineko Kato, Satoshi Suzuki, Hajime Togari, Masaki Imai, Noriko Okada, Hidechika Okada An Acetylated Anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model 12th European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad *Mol Immunol* 46:2825, 2009

4 Mizuno, T., Mizuno, M., Morgan, B.P., Okada, N., Noda, Y., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Ito, Y.

Specific collaboration between rat membrane complement regulators, Crry and CD59, protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritonealdialysate fluid. 12th European Meeting on Complement in Human Diseases September 5-8, 2009 Visgrad *Mol Immunol* 46:2859-2860, 2009

5 今井優樹、Verera JC, Atkinson C, 太田里永子、岡田則子、Rapiserdo M, Tmolinson S 腫瘍細胞上の補体制御因子による T 細胞応答の制御 第46回補体シンポジウム講演集 46:24 (2009)8/21-22福岡

6 戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西渉、岡田則子、岡田秀親、里見進 C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膝島障害の抑制 第46回補体シンポジウム講演集 46:45-46(2009)8/21-22福岡

7 戸子台和哲、後藤昌史、稲垣明子、中西渉、岡田則子、岡田秀親、里見進 C5a を標的とした補体阻害ペプチド AcPepA 導入による移植後早期膝島障害の抑制 第45回日本移植学会抄

録集 45:38(2009)

8 Okada, H., Ono, F., Terao, K., Okada, A., Asai, S., Campbell, W., Mizue, Y., Suzuki, K., and Okada, N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. XXII international Complement Workshop Sept.28-Oct.2, 2008 Basel Molecular Immunology 45:4113, 2008

9 Tokodai, K., Goto, M., Imura, T., Kurokawa, Y., Okada, N., Okada, H., Satomi, S. C5a inhibitory peptide AcPepA is a clinically available candidate for preventing rapid loss of intraportally transplanted islets. XXII international Complement Workshop Sept.28-Oct.2, 2008 Basel

10 Okada, N. C5a anaphylatoxin inhibitor suppresses a lethal cytokine storm in monkeys injected with LPS. 12th Microbiology and Immunology conference of the Lioning medical association Oct.18-20, 2008 Donjuan 12; 2, 2008

11 岡田則子 アンチセンスペプチド理論の応用により創出したアナフィラトキシン阻害相補性ペプチドの研究 第59回名古屋市立大学医学会総会講演要旨 59:13(2008)12/7 名古屋 特別講演

H 知的財産権の出願登録状況

1 特許取得

『アナフィラトキシン C5a を不活性化するペプチド』特許権者:岡田秀親、岡田則子 特許第4106691号 平成20年4月11日

2 実用新案、その他

なし

アナフィラトキシン阻害ペプチドの活性分析に関する研究

研究分担者 今井 優樹 名古屋市立大学医学研究科

研究要旨 補体成分 C5a が過剰産生されるとアナフィラキシーショックや敗血症などを引き起こすため、敗血症治療薬として C5a の相補性阻害ペプチドである AcPepA が開発された。臨床開発にあたり、このペプチドの C5a 阻害ペプチド活性を *in vitro* で簡便に測定する方法を検討した。

A. 研究目的

C5a の相補性阻害ペプチドの開発にあたり、このペプチドによる C5a 機能阻害活性を簡便に測定することは重要な課題である。そこで、好中球の C5a レセプターの下流シグナルを中心に、AcPepA の C5a 阻害活性を検討した。

B. 研究方法

好中球膜上の C5aR に C5a が結合すると、細胞内シグナル伝達を介した小胞体からの Ca 放出や、Ca チャネルを介した Ca 流入が起こり、細胞内 Ca 濃度が上昇する。このことから、C5a や C5a 阻害ペプチドにより、好中球内に見られる Ca 濃度変化を測定した。Ca 指示薬として Fura-2-AM を用いた。採血後、好中球を分離した後、Fura2-AM をロードした。37 度で 30 分インキュベートした後、poly-L-lysine-coated 4well slide glass に 400 μ /well で播いたのち、ARGUS HiSCA Calcium imaging system で測定を行った。また、単球右傾培養細胞である U937 においても同様に測定を行った。

さらに、C5a は好中球に働きかけ炎症性サイトカインの放出を引き起こし、炎症反応を増悪させる。特に、IL-6, TNF- α は好中球から産

生されることが分かっているので、これらのサイトカインを測定した。採血後、好中球を分離した後、サンプルを添加し、37 度で 24 時間インキュベートし、上清中のサイトカインレベルをそれぞれの ELISA kit で測定した。

C. 研究結果

AcPepA は以前の結果と同様に、濃度依存性に好中球内 Ca 濃度を抑制することが確認できた。次に、同ロットの AcPepA による好中球から放出される炎症性サイトカインを調べたところ、C5a が多く含まれる 15% ザイモザン活性化血清では平均約 520pg/ml の IL-6 が産生されたのに対して、AcPepA 処置群は平均約 250 pg/ml と 50% 以上 IL-6 産生抑制した。同様に TNF- α 産生量においても 15% ザイモザン活性化血清処置により平均約 0.5pg/ml が産生されたのに対して、AcPepA 処置群は検出限界以下であった。

D. 考察

AcPepA は好中球の細胞内 Ca 濃度上昇だけでなく、炎症性サイトカインの放出においても、強力な抑制活性が認められ、AcPepA を大量合成し

た際の異なるロットにおける活性の違いなどを測定するのに有効であると考えられた。

E. 結論

症性サイトカイン IL-6 及び TNF- α の ELISA による測定は、AcPepA の活性分析に有効であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asai S, Kimbara N, Tada T, Imai M, Campbell W, Okada H, Okada N, Procarboxypeptidase R Deficiency Causes Increased Lethality in Concanavalin A-induced Hepatitis in Female Mice. *Biol Pharm Bull.*, in press

2. Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, Matsukawa Y, Imai M, Oliver N, Goldschmeding R, Aten J, Krediet RT, Yuzawa Y, Matsuo S, Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis patients with high peritoneal solute transport rate. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298: F721-733 (2010)

3. Okada N, Tsukamoto Y, Adachi K, Handharyani E, Soejoedono RD, Imai M, Okada A, Okada H, Rescue with an anti-inflammatory peptide of chickens infected H5N1 avian flu. *Nature Precedings*

2. 学会発表

1. Hussein MH, Kato S, Goto T, Daoud GAH, Kato I, Suzuki S, Togari H, Hashimoto T, Imai

M, Okada N, Okada H. An acetylated anti-C5a complementary peptide reduced cytokines and free radicals and prolongs survival time in a neonatal sepsis model. 12th European Meeting on Complement in Human Disease, September 5th-8th, 2009, Visegrád, Hungary

2. Imai M, Varela JC, Atkinson C, Ohta R, Okada N, Rapisardo M, Tomlinson S, Modulation of protective T cell immunity by complement inhibitor expression on tumor cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 p123, 2009年12月2-4日、大阪

3. 太田里永子, 今井優樹, Characterization of CTL downmodulation in patients with Chronic Active EpsteinBarr virus Infection (CAEBV). 第39回日本免疫学会総会・学術集会記録 p246, 2009: 246. 2009年12月2-4日、大阪

4. 今井優樹, Varela JC, Atkinson C, 太田里永子, 岡田則子, Rapisardo M, Tomlinson S, 腫瘍細胞上の補体制御因子による T 細胞応答の制御. 第46回補体シンポジウム抄録集 p24, 2009年8月21-22日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし