

製品がヒト体内に移植されることを考えた場合、免疫原性を示しうる異種動物抗原糖鎖を検出する方法を開発するとともに、現行の方法で製造された各種幹細胞への異種動物抗原糖鎖混入の有無を確認しそれらの混入原因を明らかにしておくことは、高品質で安全性の高い細胞加工製品の開発・実用化を推進するための基盤として極めて重要である。

本研究ではヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖を検出する方法の開発ならびに開発した方法を用いて、iPS 細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入の有無について調査した。また、異種動物抗原糖鎖の混入原因を調査した結果についても報告する。

B. 研究方法

B.1. ヒト培養癌細胞の培養

ヒト培養胃腺癌細胞 MKN45 は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて培養した。細胞は PBS で 3 回洗浄後、0.025%トリプシン/PBS 液を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、細胞を剥離させ、15mL チューブに回収した。5 分間遠心分離(800 rpm)して細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心分離(800 rpm)し、上清の PBS を捨て細胞を回収した。

B.2 iPS 細胞の培養

2 種類の iPS 細胞 (Toe, UTA-1) はマイトマイシン C 処理したマウスフィダー細胞 (MEF, Reprocell) を播種した培養ディッシュ上で血清代替物 (Knockout Serum Replacment: KSR) を含む培養液を用いて培養した。細胞は PBS で 3 回洗浄後、PBS/1 mM-EDTA を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、コロニーを形成する細胞のみを剥離させた。剥離させた細胞は 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800 rpm)し細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心(800 rpm)

した。遠心分離後、上清の PBS を捨て細胞を回収した。

B.3. ヒト培養癌細胞による NeuGc の細胞内取り込み

ヒト培養胃腺癌細胞 MKN45 は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて 50%コンフルエント状態まで培養した後、PBS で 3 回洗浄し、血清を含む培養液を除いた。次に NeuGc を 0.4mg/mL の濃度で含む DMEM 培養液を用いて培養した。培養後、PBS で 3 回洗浄後、0.025%トリプシン/PBS 液を加え 37°C で 5 分間静置後、培養ディッシュ全体を水平方向に叩きながら、細胞を剥離させた。剥離させた細胞は 15mL チューブに回収した。5 分間遠心(800 rpm)し細胞を回収した。上清を捨て新たに PBS10mL を加えて細胞を分散させながら洗浄し、5 分間遠心(800 rpm)した。遠心分離後、上清の PBS を捨て細胞を回収した

B.4 細胞総タンパク質分画の調製

培養細胞を 1 M EDTA を含む PBS 中に懸濁し、2 M Thiourea および 5 M Urea 水溶液、1 M DTT および Benzoyl-DL-homocysteine 溶液を加え室温でインキュベート後、12000 g、15 分間遠心分離後の上清を回収した。回収した上清に 5%酢酸、5%水、5%トリエチルアミンを含むアセトン溶液を加え、沈殿したタンパク質を遠心分離し回収した。得られた沈殿は 75%エタノールにて洗浄し細胞総タンパク質とした。

B.5. N-結合型糖鎖の遊離と蛍光標識

総タンパク質分画を SDS、2-メルカプトエタノール、NP-40 を 1%ずつ含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) で懸濁した後、N-glycanase F (2 unit) を加え、37°C で 12 時間酵素反応を行った。反応後、冷エタノールを加え 12000 g で 15 分間遠心分離し上清を濃縮乾固し、N-結合型糖鎖として回収した。糖鎖を含む試料に 2 アミノ安息香酸および NaBH₃CN をそれぞれ 3%含む 2%ホウ酸/4%酢酸ナトリウム/メタノール溶液を

100 μ l 加えて 80°C で 1 時間加温した。反応後 SephadexLH-20 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶出される蛍光性画分を回収し細胞タンパク質由来糖鎖とした。

B.6. iPS 細胞のシアル酸分析

細胞あるいは培養細胞より回収した N-結合型糖鎖混合物の凍結乾燥物に水に 10 μ L と 0.2 M HCl (10 μ L)を加え、80 °C で 40 分間加水分解を行った。加水分解後、室温まで冷却後、0.7 M DMB 試薬(80 μ L)加え、50 °C で 150 分間誘導体化反応を行った。反応後、10 μ L を HPLC に注入し、シアル酸分析を行った。ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 型蛍光検出器を使用し、流速は 0.9 ml/min とした。カラムは逆相分配(ODS)カラム(COSMOSIL 5C18-AR-II; 4.6 x 150 mm)を用い、検出波長は励起波長 375 nm、蛍光波長 448 nm とした。溶出は 2 %MeCN/14 %MeOH 溶液を用い、アイソクラティック溶出にて行った。

B.7. セロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の分析

ポンプには Shimadzu LC10-ADVP、検出器には Waters 2475 型蛍光検出器を使用し、流速 0.5 mL/ min で分析した。カラムは LA-Serotonin (Japan Oil Mills, 4.6 x 150 mm)を用い、カラム温度は 25 °C とした。検出は励起波長(Ex) 350 nm、蛍光波長(Em) 425 nm により行った。移動相の溶液 A には水、溶液 B には 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 2 分間溶出液 B 5 %とし、溶出液 B が 37 分後に 75 %となるように直線グラジエント溶出を行い、その後 10 分間で溶出液 B が 100 %となるようにした。

B.8. MALDI-TOF MS

装置には AXIMA-Resonance (Shimadzu 製)を用い、リニア/ネガティブイオンモードにより測定した。試料は DHB/メタノール溶液と等量混合し試料プレート上で風乾させた。

C. 研究結果

C.1 ヒト培養細胞のシアル酸分析

ヒト体内において免疫原性を示す異種動物抗原糖鎖としては、N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) や α Gal エピトープ (Gal α 1-3Gal) が知られており、血清中の抗体との反応により炎症状態の惹起や拒絶反応を引き起こすことが知られている。特に、NeuGc についてはヒト以外の動物種に広く分布していること、細胞膜表面への非特異的吸着だけでなく、単糖として細胞内に取り込まれ、糖鎖生成に利用される可能性があることが報告されている。本項では異種動物抗原糖鎖として NeuGc に着目し、細胞中の NeuGc を定量的に検出する方法について検討した。

細胞中の NeuGc を検出する方法としては簡便で特異的かつ高感度な方法が望まれる。細胞中の NeuGc を特異的に検出する方法としては、複合糖質糖鎖を含む試料を塩酸あるいは酢酸加水分解し、遊離したシアル酸を 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) により蛍光標識化し、HPLC を用いて分析する方法が挙げられる。NeuAc および NeuGc 標品を DMB で蛍光標識化し逆相 HPLC を用いて分析した結果を Fig. 1a に示す。NeuGc が約 7.5 分、NeuAc が約 10 分に観察され、両シアル酸分子種を完全に分離し定量することが可能であった。一方、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて培養したヒト培養胃腺癌細胞 MKN45 細胞の (1×10^6 cell) の凍結乾燥物に水に 10 μ L と 0.2 M HCl (10 μ L) を加え、80 °C で 40 分間加水分解を行い、DMB により蛍光標識化し分析した。結果を Fig. 1b に示す。細胞のシアル酸を直接分析する場合、細胞に含まれるタンパク質等の妨害等が考えられるが、約 10 分に NeuAc のピークのみ観察され、特異的に細胞中のシアル酸を分析できることがわかった。また、MKN45 は NeuGc を豊富に含むウシ胎児血清を 10%含む DMEM 培養液で培養さ

れているにもかかわらず、NeuGc は検出限界以下であった。

C.2 iPS 細胞のシアル酸分析と NeuGc 混入原因の追跡

現在、iPS 細胞の培養では培養液および添加物を含め完全ヒト化への流れが主流となりつつあり、免疫原性を示す異種動物抗原糖鎖の混入も低減すると考えられる。しかしながら、iPS 細胞の初期培養でマウス胎児繊維芽細胞由来のフィーダー細胞 (MEF)、異種動物成分を多く含む血清代替物 (KSR) 等を用いて培養された細胞に関しては、培養環境の完全ヒト化への以降後も異種動物抗原糖鎖を含む可能性を否定できない。本項では前項に引き続き異種動物抗原糖鎖として NeuGc に着目し、培養過程において、MEF と KSR を用いて培養されたヒト iPS 細胞 (Toe、UTA-1) のシアル酸分析を行い、NeuGc 混入の有無について調査した。

Toe と UTA-1 のシアル酸分析の結果を Fig.2 に示す。Toe では総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 12%、UTA-1 は 6%であった。ウシ胎児血清を含む培養液で培養され MKN45 中の NeuGc 含量が検出限界以下であったことを考えると、2 種類の iPS 細胞で NeuGc 比率の高さは iPS 細胞の培養環境に起因すると考えられた。

次に iPS 細胞への NeuGc の主たる混入原因と考えられる MEF と KSR についてシアル酸分析を行った。結果を Fig.3 に示す。MEF では総シアル酸に占める NeuGc の存在比は 6%であったが KSR は 51%であり、NeuGc を多く含むことがわかった。KSR 中の NeuGc の存在形態については、糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質糖鎖の非還元末端にグリコシド結合を介し存在する場合と遊離の NeuGc として存在することが考えられる。そこで、KSR を分子量により分画できるフィルターを用いて、分子量 3000 以上と 3000 以下に分画し、両分画について同様にシアル酸分析を行った。結果を Fig.4 に示す。分子量 3000 以上と 3000 以下のいずれの分画でも総シアル酸に占める NeuGc の存在

比は 50%以上であり、NeuGc が糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質糖鎖の非還元末端に存在する場合と遊離の NeuGc、遊離オリゴ糖などとして存在すると考えられた。培養環境からの NeuGc の混入経路としては、NeuGc を持つ糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質の細胞表面への吸着あるいは細胞内への取り込み、遊離 NeuGc あるいは複合糖質として取り込まれた NeuGc が細胞内での生合成に利用された可能性が考えられる。

C.3 ヒト培養細胞の遊離シアル酸の細胞内取り込み

哺乳類の細胞内における NeuGc は、シアル酸転移酵素の基質ドナーとして合成された CMP-NeuAc が CMP-NeuAc 水酸化酵素により水酸化され CMP-NeuGc が産生される。この CMP-NeuGc はシアル酸転移酵素により利用され種々の複合糖質糖鎖末端に付加される。一方、ヒト細胞内では CMP-NeuAc 水酸化酵素が不活性化され機能しておらず、CMP-NeuGc が合成できないため、NeuGc を持つ複合糖質は観察されない。しかし、CMP-NeuGc は遊離 NeuGc と CMP 合成酵素の作用により合成されること、シアル酸転移酵素は CMP-NeuGc を基質として認識することが知られている。すなわち、細胞外から取り込まれた遊離 NeuGc あるいは細胞内で NeuGc を持つ複合糖質から生じた NeuGc から CMP-NeuGc を生合成し、種々の複合糖質糖鎖末端に付加する可能性が考えられる。すなわち、iPS 細胞中に観察された NeuGc の混入経路として、細胞外から NeuGc あるいは NeuGc を持つ複合糖質を取り込み、それらを生合成に利用することが考えられるが、それらの経路の可能性については殆ど解析されていない。本項では、ヒト胃腺癌細胞 MKN45 をモデルに用い、NeuGc を含む培養液を用いて細胞培養を行い、細胞内への NeuGc の取り込みの有無について解析した。

培養液に 0.4mg/mL の NeuGc を含む培養液を用いてヒト胃腺癌細胞 MKN45 を 0、3、6 日間培養し、細胞内シアル酸量を定量した。結果を Fig.5 に示す。培養 0 日目では Fig.1 の結果と同

様に NeuGc は検出限界以下であった。一方、培養 3 日目では総シアル酸の約 8%、6 日目では総シアル酸の 18% が NeuGc として検出された。このように、細胞外に遊離 NeuGc が存在する場合、NeuGc が培養期間依存的に細胞内に取り込まれることがわかった。

次に、細胞内に取り込まれた NeuGc が糖タンパク質糖鎖の生合成に利用されるかについて調べた。培養液に 0.4mg/mL の NeuGc を含む培養液を用いてヒト胃腺癌細胞 MKN45 を 6 日間培養後、細胞総タンパク質分画を調製し、総タンパク質分画中の N-結合型糖鎖の解析を行った。N-結合型糖鎖をセロトニンアフィニティクロマトグラフィーにより分画し得られたモノシアロ分画について MALDI-TOFMS にて解析した結果を Fig.6 に示す。NeuGc を含まない培養液を用いて培養した MKN45 では、 m/z 1832、1994、2035、2197、2238、2343、2400 が主たるモノシアロ糖鎖として観察され、何れも非還元末端に N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を 1 残基のみ持つ複合型糖鎖であった。一方、培養液に NeuGc を含む培養液を用いて培養した細胞では、NeuGc を含まない培養液を用いて培養した細胞で観察された NeuAc を 1 残基のみ持つ複合型糖鎖のシグナルより $\Delta m/z$ 16 大きな m/z 1848、2010、2051、2213、2254、2359、2416 のシグナルが観察された。これらのシグナルは何れも非還元末端に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) を 1 残基のみ持つ複合型糖鎖であった。以上の結果から、細胞内に取り込まれた NeuGc は細胞内での糖鎖生合成に利用されることがわかった。

現在、KSR 中に遊離 NeuGc が存在するか否かは明らかではないが、NeuGc を豊富に含むウシ胎児血清を含む培養液で培養された細胞では NeuGc が検出限界以下であるのに対し、KSR を用いて培養された iPS 細胞には数%以上もの NeuGc が観察されたことから、KSR 中の NeuGc はウシ胎児血清中の糖タンパク質に比べ効率よく糖鎖生合成に利用されると考えられる。

D. 考察

異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下、培養された iPS 細胞中に N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) や α Gal エピトープなどの通常ヒトでは観察されない異種動物糖鎖が観察された。一方、iPS 細胞の培養に用いる血清代替物 (KSR) 中には大量の NeuGc が観察され、KSR 中の NeuGc は遊離 NeuGc、オリゴ糖、糖ペプチド等の低分子の形で存在し、細胞内に取り込まれた後、糖鎖生合成に利用されると考えられた。一方、ヒト培養癌細胞に遊離 NeuGc を与えると、遊離 NeuGc が細胞内に取り込まれるとともに、糖タンパク質糖鎖の非還元末端に NeuGc を持つ糖鎖が観察された。以上の結果から、iPS 細胞で観察された NeuGc は、KSR などの異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下、細胞内に混入し、取り込まれた NeuGc は CMP-NeuAc 合成酵素の働きにより CMP-NeuGc へと変換されたのち、シアル酸転移酵素により糖鎖非還元末端に付加されたと考えられた。

E. 結論

本研究ではヒト細胞中の異種動物抗原糖鎖を検出する方法の開発ならびに開発した方法を用いて、iPS 細胞中の異種動物抗原糖鎖の混入の有無について調査した。また、異種動物抗原糖鎖の混入原因を調査した。その結果、異種動物抗原糖鎖を含む培養条件下、特に遊離 NeuGc を含む培養液等を用いて培養された細胞は、細胞内に遊離 NeuGc を取り込むこと、取り込んだ NeuGc を細胞内での糖鎖生合成に利用し、NeuGc を含む糖タンパク質糖鎖を合成しうることがわかった。ヒト細胞表面における NeuGc の発現は、血清中の抗 NeuGc 抗体により認識され、炎症状態を惹起することで癌細胞等の増殖に遊離な環境を与える要因になることも考えられていることから、iPS 細胞の安全性を考えた場合、NeuGc 混入のない培養条件の確立、混入した NeuGc のクリーニング法などについての方策についても今後検討する必要があると言える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Mitsui Y, Kakoi N, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K.

One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans. *Anal Biochem.* 2011 421, 595

Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 2011 879(27):2928-

Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.

Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. *J Chromatogr A.* 2011 1218(29):4772

Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.

Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution. *Anal Sci.* 2011 27(4):395.

Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.

Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection.

Biomed Chromatogr. 2011 25(5):588

2. 学会発表

木下充弘、能登啓介、奥田茜、小南有加、早川堯夫、掛樋一晃

エイジングマーカーとしての糖鎖の可能性

第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡

橋本浩志、仲西暁良、木下充弘、鈴木匡、早川堯夫、掛樋一晃

細胞外遊離 N-グリコシルノイラミン酸のヒト培養癌細胞への取り込み

第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡

原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

ヒト胃癌細胞中高フコシル化糖タンパク質のグライコプロテオーム解析

第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡

神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

ヒト胃癌細胞 MKN45 細胞は糖タンパク質由来の遊離糖鎖を細胞外へ分泌する

第30回日本糖質学会年会、平成23年7月11日、長岡

原沙弥香、山田佳太、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

ヒト胃癌細胞中の高フコシル化糖タンパク質の探索

第61回日本薬学会近畿支部、平成23年10月22日、神戸

神末和哉、大河原周平、山田佳太、岩塚欣也、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃

ヒト胃癌細胞 MKN45 による糖タンパク質由来遊離糖鎖の細胞外分泌

第61回日本薬学会近畿支部、平成23年10月22日、神戸

中辻佑強、岸本昌太、木下充弘、早川堯夫、荒井昭博、中村伸、掛樋一晃

マイクチップ等電気泳動法によるタンパク質
製剤の迅速解析技術の開発

第 61 回日本薬学会近畿支部、平成 23 年 10 月
22 日、神戸

神末和哉、木下充弘、掛樋一晃

CESI-MS によるペプチド・タンパク質分析
第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、
平成 23 年 11 月 11 日、鶴岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

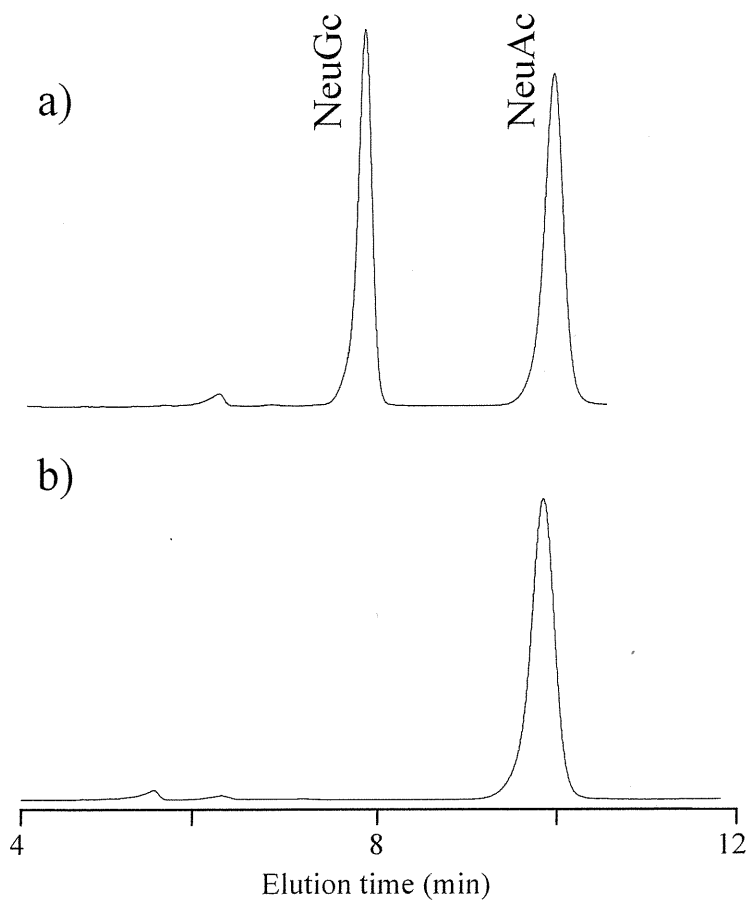
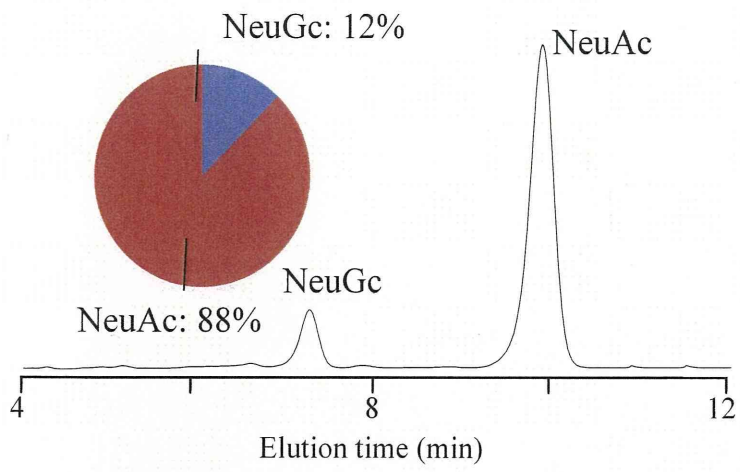


Fig.1. HPLC chromatogram of sialic acid analysis.

Analytical conditions: Column oven: 40 °C, Flow rate: 0.9 mL/min. Detection: Ex. 375 nm
Em. 448 nm, Elution: Acetonitrile:Methanol:Water=2:14:84

Toe cells



UTA-1 cells

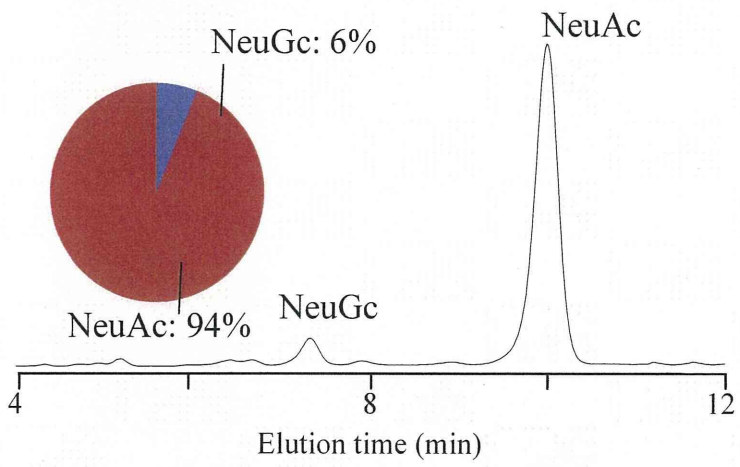
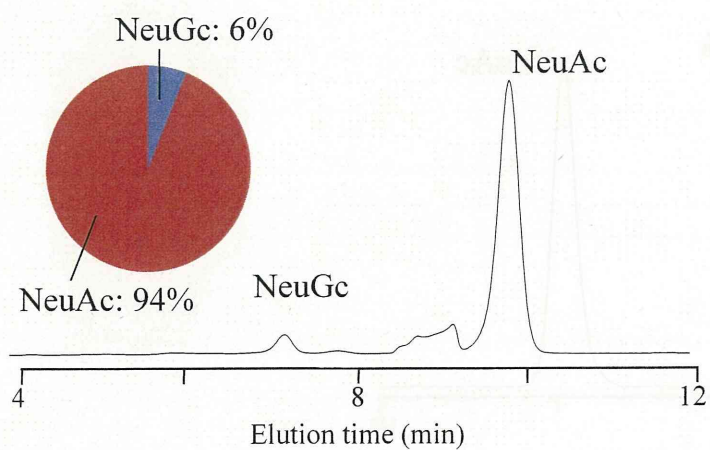


Fig.2. RP-HPLC analysis of sialic acid in two iPS cells.
Analytical conditions are the same as in Fig.1.

MEF



KSR

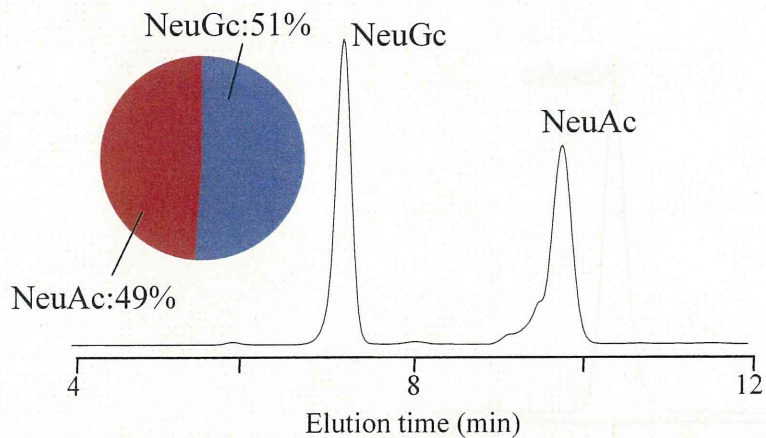
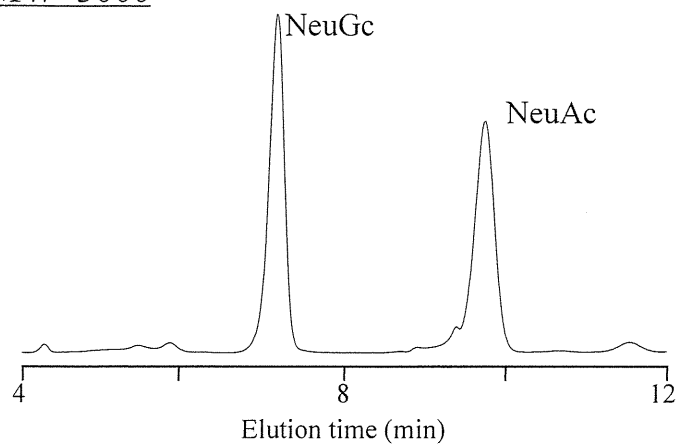


Fig.3. RP-HPLC analysis of sialic acid in MEF and KSR.
Analytical conditions are the same as in Fig.1.

MW>3000



MW<3000

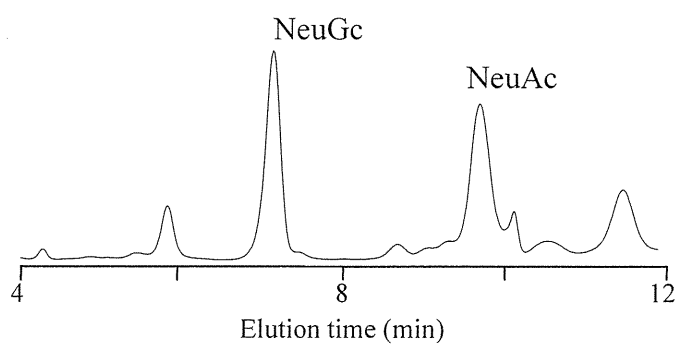


Fig.4. RP-HPLC analysis of sialic acid in KSR.
Analytical conditions are the same as in Fig.1.

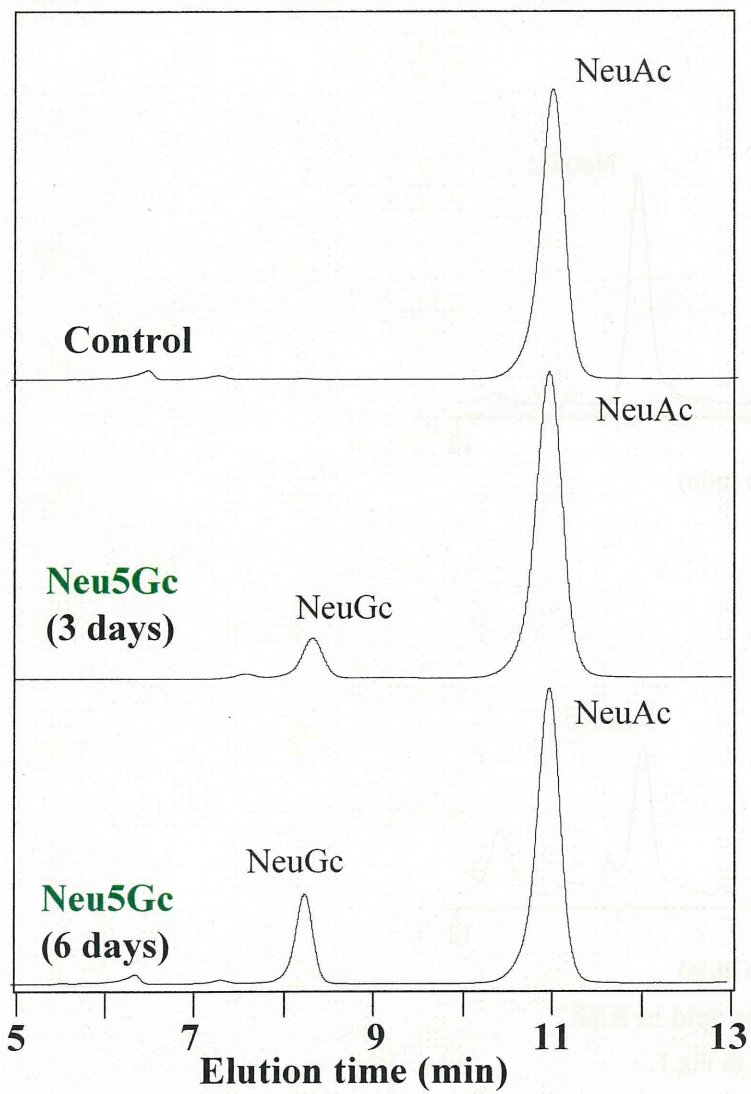


Fig.5. Uptake of Extracellular Free Neu5Gc in Human Gastric Cancer (MKN45). Analytical conditions are the same as in Fig.1.

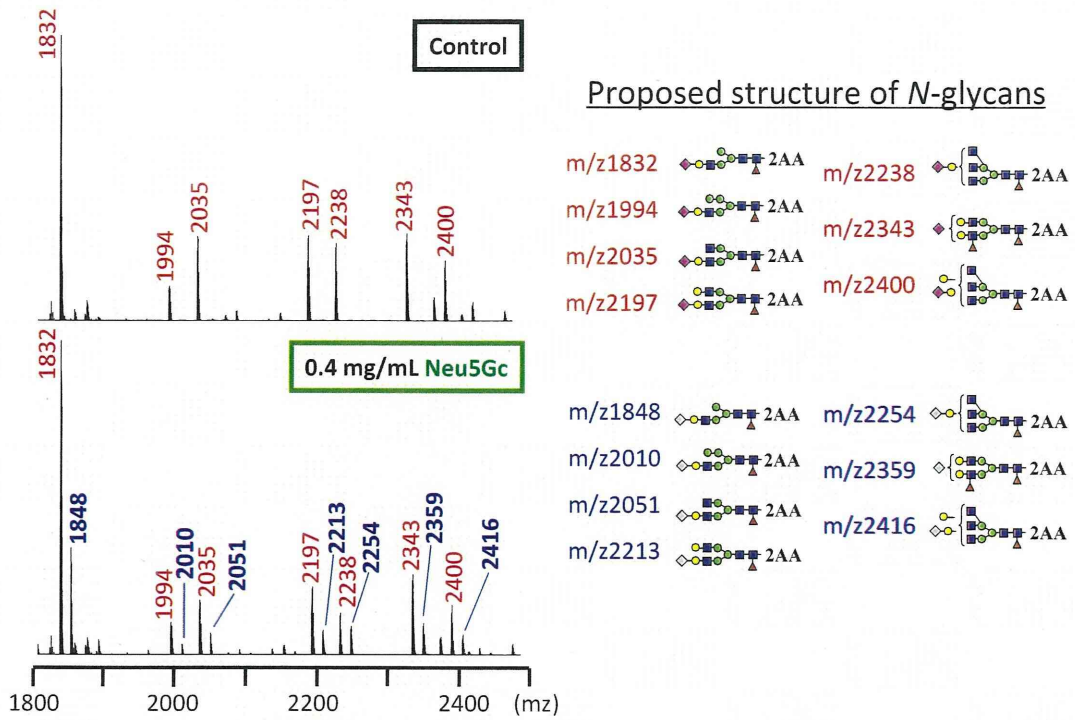


Fig.6 MALDI-TOF MS Analysis of Monosialo-N-glycans after uptake of extracellular Free Neu5Gc

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hayakawa T, Ishii-Watabe A	Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity.	Michael G. Tovey	Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals : Practical and Applied Considerations	John Wiley & Sons, Inc	New Jersey, USA	2011	57-72
早川堯夫	バイオ医薬品開発の主流を占める糖タンパク質.	早川堯夫, 掛樋一晃, 平林 淳	バイオ医薬品開発における糖鎖技術	シーエムシー出版	東京	2011	1-21
早川堯夫	第十六改正日本薬局方について	一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団	日本薬局方試験法ガイド	じほう	東京	2011	3-13
木下充弘, 掛樋一晃	糖タンパク質性バイオ医薬品に求められる分析技術	早川堯夫, 掛樋一晃, 平林 淳	バイオ医薬品開発における糖鎖技術	シーエムシー出版	東京	2011	191-208
早川堯夫	医薬品製造とウイルス安全性確認の基本的考え方	日本医薬品等ウイルス安全性研究会	医薬品の品質管理とウイルス安全性	文光堂	東京	2011	30-41

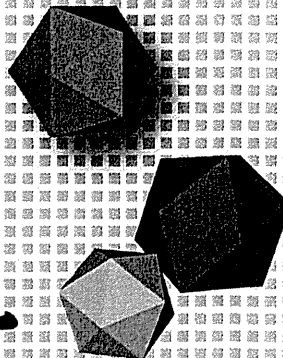
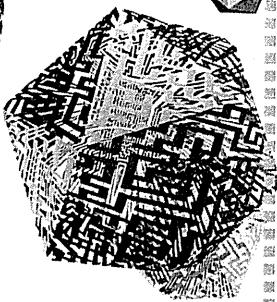
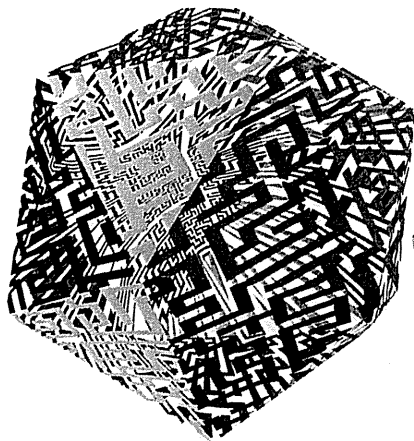
雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	頁	出版年
佐藤陽治, 黒田拓也	ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状	医学のあゆみ	239(14)	1460-5	2011
Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Jian Z, Saiki S, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R, Kurose H.	Cilostazol Suppresses Angiotensin II-induced Vasoconstriction via Protein Kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channel.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	31	2278-86	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針整備と主なポイント	再生医療	10	206-10	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―	再生医療	10	211-8	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―	再生医療	10	219-26	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(自己) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―	再生医療	10	227-37	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト(同種) iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―	再生医療	10	238-48	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―	再生医療	10	249-60	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の最終製品の品質管理―	再生医療	10	261-6	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について―	再生医療	10	267-72	2011

Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y.	AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells.	<i>Biochem J.</i>	437	345-55	2011
Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M.	TRPC3-mediated Ca ²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	409	108-13	2011
Yagi Y, Yamamoto S, Kakehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S.	Application of partial-filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases for the characterization of oligosaccharides in a therapeutic antibody.	<i>Electrophoresis.</i>	32(21)	2979-85	2011
Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F, Hayakawa T, Kusuda Furue M, Mizuguchi H.	Efficient Generation of Functional Hepatocytes From Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction.	<i>Mol Ther.</i>	20(1)	127-37	2012
Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa T, Mizuguchi H.	Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction.	<i>Stem Cell Res.</i>	8(2)	300-11	2012
Oyama T, Yodohsi M, Yamane A, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.	Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis.	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.</i>	879(27)	2928-34	2011
Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Fumimoto Y, Komoda H, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Daimon T, Hayakawa T, Matsuyama A.	HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	412(1)	50-4	2011
Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Sakurai F, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H.	Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction.	<i>PLoS One.</i>	6(7)	e21780	2011
Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S.	Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid.	<i>J Chromatogr A.</i>	1218(29)	4772-8	2011
Yodoshi M, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S	Affinity entrapment of oligosaccharides and glycopeptides using free lectin solution.	<i>Anal Sci.</i>	27(4)	395	2011
Suzuki T, Sasaki T, Yano K, Sakurai F, Kawabata K, Kondoh M, Hayakawa T, Yagi K, Mizuguchi H.	Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome.	<i>Virus Res.</i>	158(1-2)	154-60	2011
Sugio K, Sakurai F, Katayama K, Tashiro K, Ma H, Kawabata K, Kawase A, Iwaki M, Hayakawa T, Fujiwara T, Mizuguchi H.	Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences.	<i>Clin Cancer Res.</i>	17(9)	2807-18	2011

Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.	Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection.	<i>Biomed Chromatogr. Biomed Chromatogr.</i>	25(5)	588-93	2011
Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H.	Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX.	<i>Mol Ther.</i>	19(2)	19(2):400-7	2011
Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A.	Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits.	<i>Tissue Eng Part C Methods.</i>	17(2)	145-54	2011
Yamada K, Kakehi K.	Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use.	<i>J Pharm Biomed Anal.</i>	55(4)	702-27	2011
Yamada K, Kakehi K.	One-pot characterization of cancer cells by the analysis of mucin-type glycans and glycosaminoglycans.	<i>Anal. Biochem.</i>	421(2)	595-606	2012
早川 堯夫、水口裕之	i P S 細胞と創薬	<i>Brain and Nerve</i>	64(1)	47-57	2012
早川 堯夫	ヒト iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する 2 つの指針案	<i>医学のあゆみ</i>	239(14)	1466-73	2011
早川 堯夫	規制環境の整備を再生医療実用化の水先案内人、牽引力、推進力とするために	<i>医薬ジャーナル</i>	47(10)	2487-91	2011
早川 堯夫	第十六改正日本薬局方について	<i>Phar.Tech.Japan</i>	27(8)	7-14	2011

研究成果の刊行物・別刷

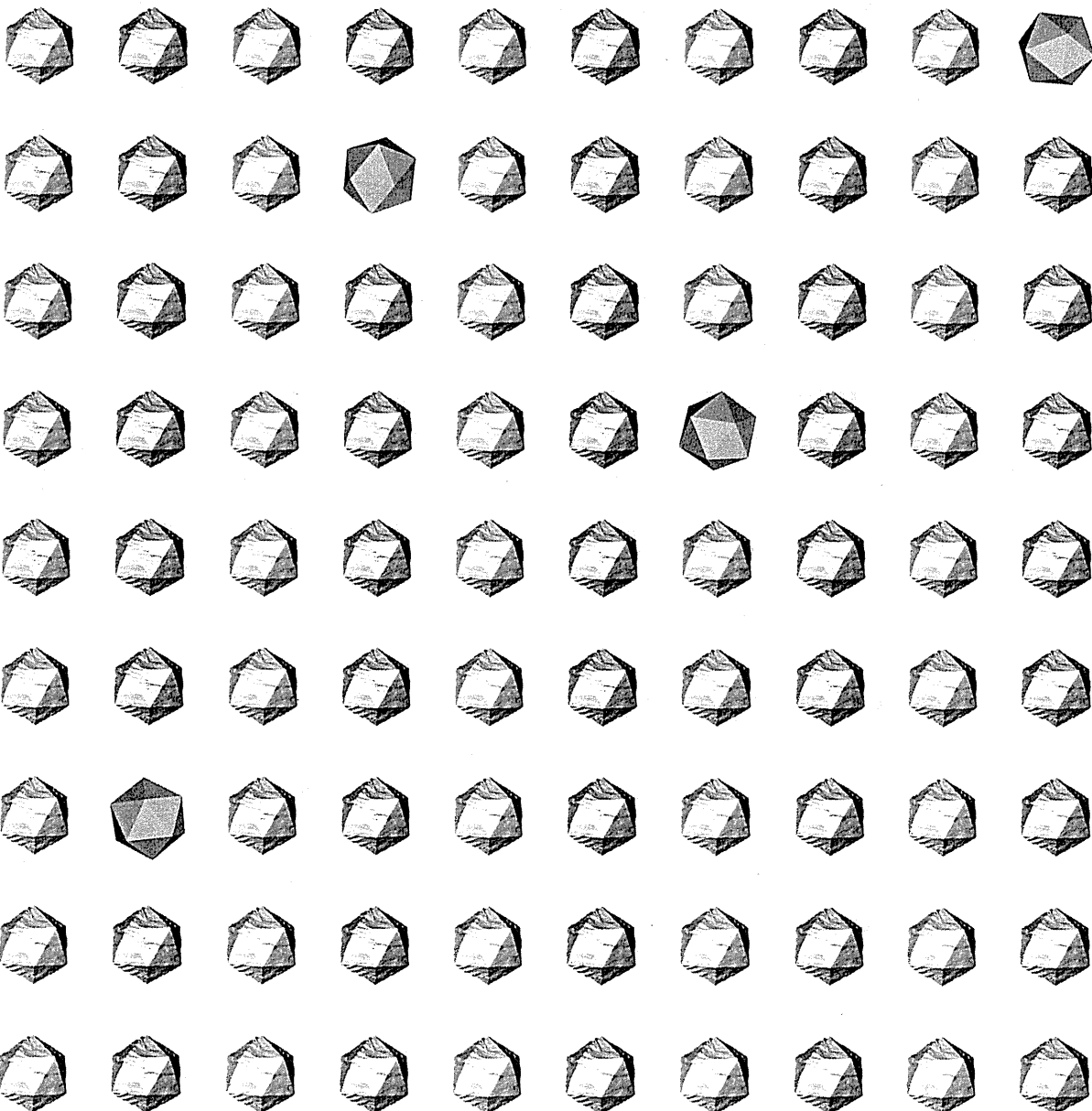


医薬品の品質管理と ウイルス安全性



編集▶

日本医薬品等ウイルス安全性研究会



第2章 医薬品に関するウイルス安全性確保と薬事法

1) 医薬品等の製造とウイルス安全性確認の基本的考え方

はじめに

医薬品や医療機器等の有効成分、添加剤、その他製造過程において使用される細胞や組織、培地の成分、カラムの担体、試薬などが、ヒトや動物等に由来する場合、留意すべき安全性上の極めて重要な課題の一つにウイルス汚染の可能性がある。ウイルス汚染が発生すれば、臨床使用において深刻な事態を招く可能性がある。したがって慎重かつその時点での最も進んだ学問や技術を駆使した科学的合理性に基づく安全性確保措置をとることにより、不測の事態を未然に防ぐことは、患者のために自明の理である。また、健康被害の未然防止に関する社会の強い関心や社会的要請に対する関係者としての義務でもある。個々の医薬品等へのウイルス安全性確保対策には、共通するものとケース・バイ・ケースで対応するべきものがある。本節では、これらの点を踏まえた医薬品等の製造とウイルス安全性確認の基本的考え方について概説する。

1. ウイルス安全性確認の対象

1) ウイルス安全性確認の対象となる医薬品等および製造関連物質

医薬品等の製造におけるウイルス安全性確認の対象となるものには、①有効成分または構成成分が生物起源由来の医薬品、医薬部外品、化粧品、医療機器、②生物起源由来の添加剤、③製造工程で使用される生物起源由来のもの（フィーダー細胞 feeder cells などの細胞や組織、培地の成分、酵素などの試薬、カラムの担体など）が挙げられる。有効成分が化学的方法により製造された化学物質であっても、生物起源由来のものを製造工程で使用した場合は、そのものが対象となる。

2) 有効（構成）成分が生物起源由来の医薬品等

有効（構成）成分が生物起源由来の医薬品等には、①血液製剤（有効・構成成分は血液、血小板、血漿、以下同様）、②血漿分画製剤（タンパク質）、③ヒト細胞組織利用医薬品等（細胞・組織）、④動物細胞組織利用医薬品等（細胞・組織）、⑤細胞基材由来タンパク質性医薬品（タンパク質）、⑥ヒト尿由来・組織由来医薬品（タンパク質）、⑦動物組織由来医薬品（タンパク質、各種有機化学物質）、⑧トランスジェニック動物由来医薬品（細胞・組織、タンパク質）、⑨遺伝子治療用医薬品（遺伝子）、⑩ワクチンなどがある。これらのウイルス安全性について留意すべき点については、共通する部分と、各製品の種類・特徴や製造方法によって、ケース・バイ・ケースで取り扱うべきもの

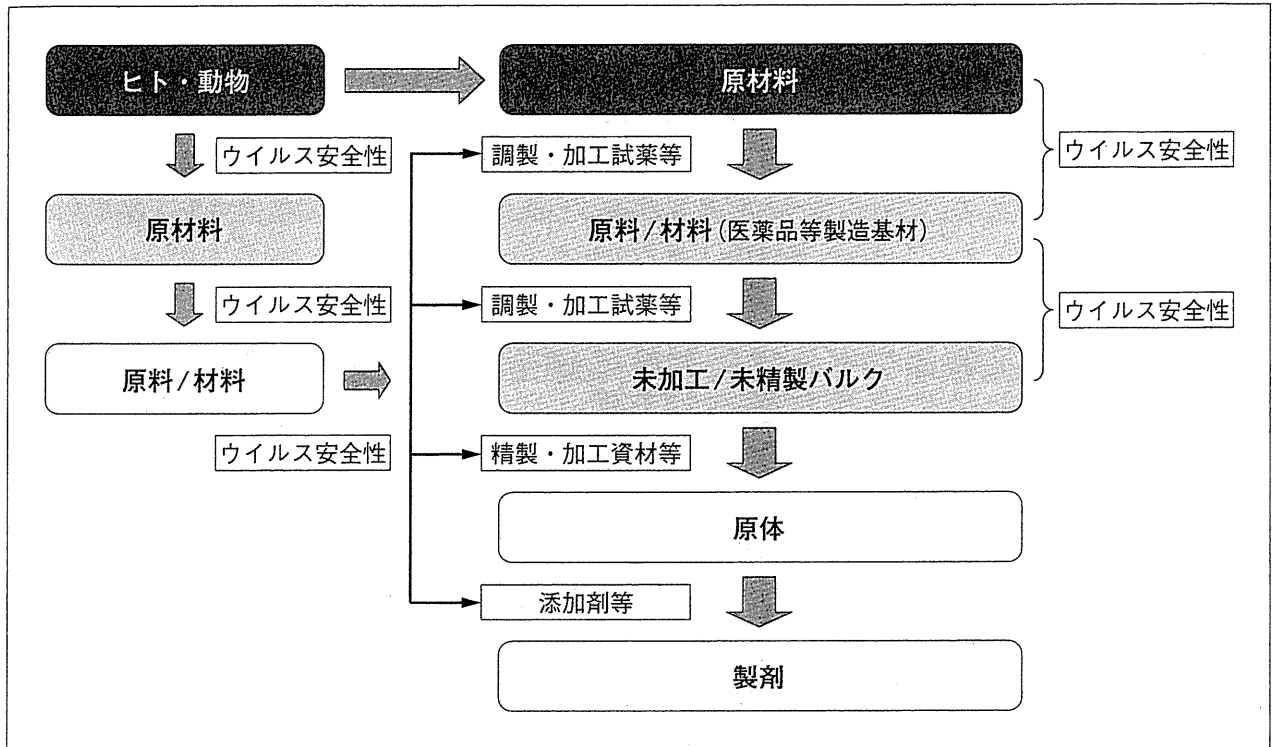
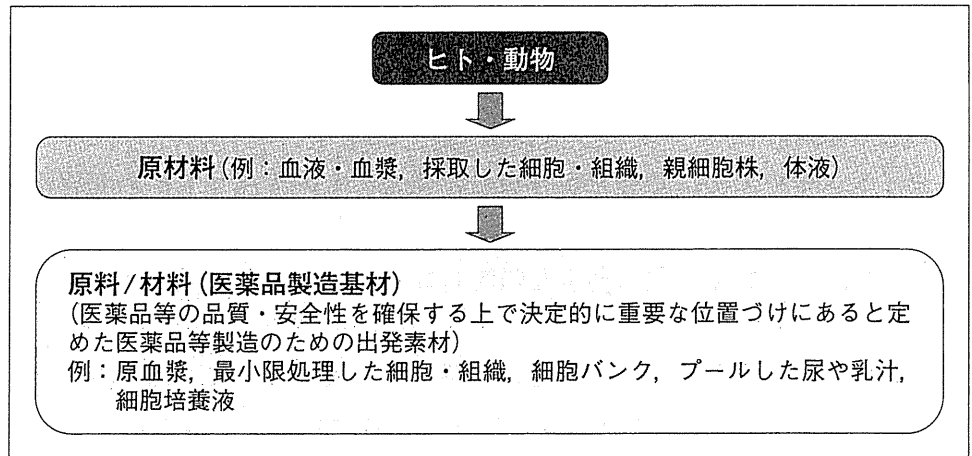


図1 ヒト・動物由来原材料/原料/材料/製品が関係する医薬品等製造のウイルス安全性

図2 原材料と原料/材料 (医薬品製造基材)



がある。また、ウイルスを素材とするウイルスベクターやワクチンは特殊なケースなので、本稿で述べたことが必ずしもあてはまらないことがある。

3) 医薬品等製造基材

図1には、ヒト・動物由来原材料/原料または材料/製品が関係する医薬品等製造の過程において主にウイルス安全性確認の対象となると想定されるもの、すなわち、ヒト・動物からの原材料、原料または材料(医薬品等製造基材)、未加工/未精製バルク、原薬、製剤を示している。

原薬、製剤のウイルス安全性が究極の目的であるが、この目的達成のために、まず、原料または材料(以下；医薬品等製造基材)での徹底した検討が重要であると考えられる。

本節では、医薬品等製造基材とは、医薬品等の品質・安全性を確保する上で決定的に重要な位置