

15 カ国でアモトサレン法がルーチンで使用されており、そのうち 14 カ国では血小板も処理されている。これらの国のうち、スイスは 2011 年 11 月に全ての血液センターでアモトサレン法で処理した血小板製剤の製造を開始した。また、フランス本土では血小板は 1 センターのみで変化はないが、メチレンブルー処理血漿についてヘモビジュランスの結果、アレルギー反応が多いとの理由でフランス保健製品衛生安全庁 (AFSSAPS) が本年度中の使用中止を勧告したため、血漿にアモトサレン法を導入するセンターが増加した。一方、ドイツではアモトサレン法処理血小板製剤が早い段階で承認されているが、現時点で血小板製剤にルーチンで使用しているセンターは無い。

なお、上記表には記載されていないが、本年 2 月 1 日にイスラエルがアモトサレン法処理血小板と血漿を承認したとのプレスリリースが発出されている。

2. 実施中の主な臨床試験について

Ongoing Clinical Studies (2010 to 2013)

Trial Name & Location	Product	Target no. of patients	2009	2010	2011	2012	2013
"PREPARES" Trial – Sanquin, The Netherlands (5 sites + 1 site in Norway, + 4 sites in Canada, 2012)*	PLT in plasma	618					
IPTAS Trial, Italy (6 sites, Government sponsored)*	PLT in PAS	828					

(TerumoBCT 社提供資料)

①PREPARES

オランダのサンキン財団を主体としてオランダ、ノルウェー、カナダで実施されている、全血採血由来のリボフラビン処理血小板製剤と通常の血小板製剤のランダム試験 (患者登録終了予定: 2013 年末)

②IPTAS

イタリア政府が実施している、添加液 (PAS) で置換してリボフラビン法またはアモトサレン法で処理した血小板製剤と、通常の血小板製剤との比較試験 (同: 2014 年末)

PREPARES はメーカー主導ではなく症例数が多いこと、また、IPTAS は同じプロトコールで、リボフラビン法及びアモトサレン法で処理した血小板の臨床試験が実施されることから、これらの試験の動向を注目しているところである。

3. 日本赤十字社における検討状況等について

①リボフラビン法 (Mirasol)

・CaridianBCT 社がテルモ社に買収され TerumoBCT 社となったことにより、テルモ社の有する安全性部門や研究開発部門の協力を得ることができるようになった。現在、今後の承認申請に必要となる AFSSAPS に提出された安全性に関するデータの整理を依頼している。

・日本赤十字社において、製剤としての規格や品質について決定するための試験を実施しているが、平成 22 年 3 月の本委員会に報告した凝集塊の発生という問題については、未だ解決できていない。日本赤十字社の検討ではかなりの確率で凝集塊が発生するのに対し、他の国では類似した凝集塊の発生はないとの報告を受けている。現在、TerumoBCT 社と密接に連絡を取りながら、解決策を探っているところである。

・新興再興感染症対策としてウエストナイルウイルス (WNV) の低減化について検討したところ、日本赤十字社のデータと TerumoBCT 社のデータに乖離があることが明らかとなった。乖離の原因を特定するため、種々の WNV 株について低減化率を測定した結果、細菌と同様、使用した株により低減化率に差が生じることが明らかとなり、ヒトから分離された Uganda1937 株に対しては、十分な低減化効果があることが再確認された。

Study Summaries

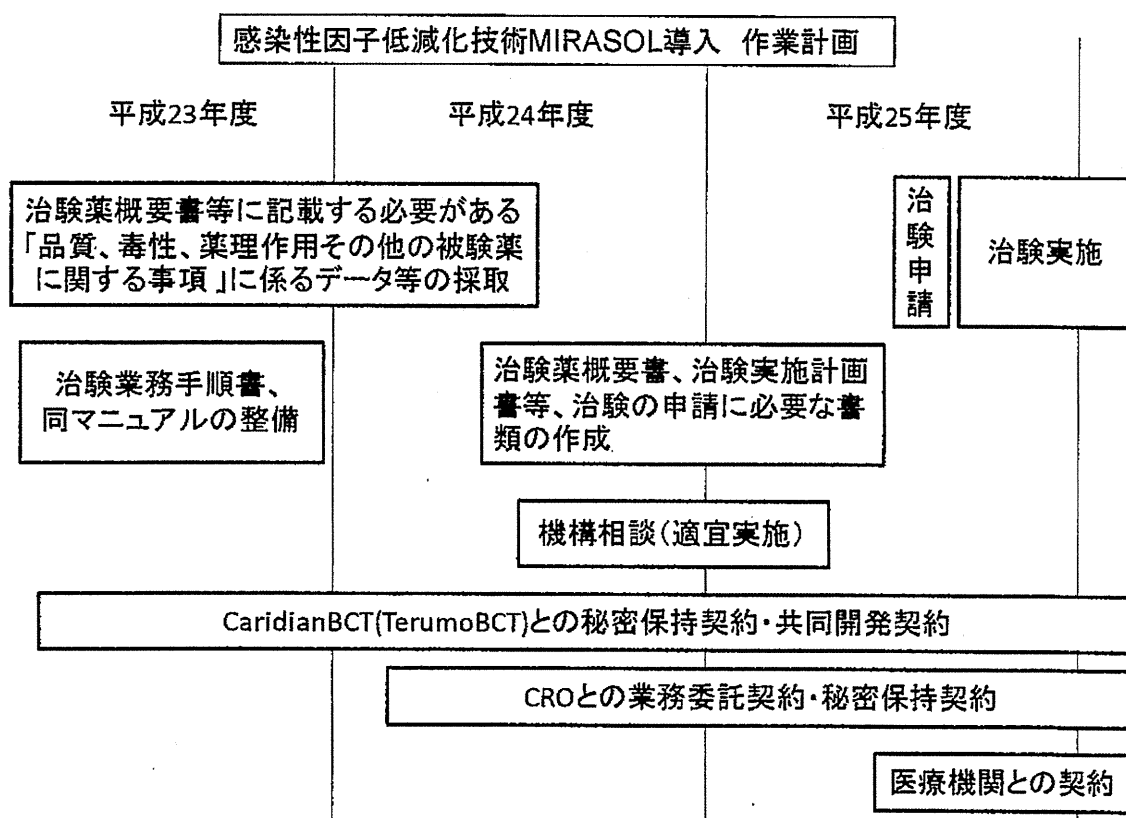
	US Center for Disease Control	L.A.B.S. at Bonfils	Colorado State University
Viral Strain	NY-99 Flamingo	Uganda 1937 ATCC# VR-1510	NY-99 (4122)
Test System	96-well plate TCID ₅₀ /mL	24-well plate TCID ₅₀ /mL	6-well plate PFU/mL
Reporter Cells	Vero	Vero	Vero
Reduction Levels	3.0-4.0 Logs	≥ 5.1 Logs	1.5 Logs

(TerumoBCT 社提供資料)

②アモトサレン法(Intercept)

- ・BioOne 社が精算されたため、現在、Cerus 社と直接情報交換を行っている。
- ・アモトサレン法の処理キットには、日本における需要の 8 割以上を占める 10 単位製剤の規格に合うものがなく、また、アモトサレンの吸着除去処理に長時間を要することなどから、現状の処理キットを日本に導入することは困難であるが、10 単位製剤に最適化した処理キットの開発について検討したいとの話があった。

4. 今後の予定



厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
(分担) 研究報告

ウイルス不活化・不活化能の評価法の開発

研究分担者 遊佐 敬介 (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長)

研究要旨

輸血用血液製剤におけるウイルス安全性を確保していくためにはウイルス特異的な不活化技術の開発が不可欠である。一般にエンベロープをもつウイルスは、有機溶剤/界面活性剤、低pH、加熱処理などによってその感染性を失いやすいことが知られている。それに対して非エンベロープウイルスは、このような物理・化学的な処理に比較的抵抗性である。本年度は非エンベロープウイルスであるネコカリシウイルスを取り上げ、そのウイルスの感染宿主域について、またヒト細胞に対して感染性を獲得する可能性について調べた。ネコカリシウイルスは、2008年、2009年に欧米で医薬品製造リアクターを汚染し、一時医薬品製造中止の原因となったベシウイルス 2117と同属のウイルスである。本研究によって、非エンベロープウイルスの不活化・不活化能の評価法の開発につながる基礎的なデータが得られた。

A. 研究目的

血漿分画製剤では、ウイルスが混入した場合でも、そのウイルスを不活化又は除去できるような工程（エタノール処理、加熱処理、SD(有機溶剤/界面活性剤)処理、ウイルス除去膜処理など）が2つ以上組み込まれているが、全血製剤や血液成分製剤は血球細胞を含むため、混入しているウイルスの不活化技術の開発は必ずしも容易ではない。特に非エンベロープウイルスは、エンベロープウイルスに比べて不活化に抵抗性であることが知られ

ている。血液製剤の安全性で特に重要なヒト感染ウイルスとして HIV, HTLV, HCV, HBV, B19があげられるが、エンベロープを持たないのは、このうちパルボウイルスB19である。B19は、*in vitro*でウイルスの簡便な複製培養系がいまだに開発されていない。そこで本研究では非エンベロープウイルスのモデルウイルスとして *in vitro*培養系のあるネコカリシウイルスを取り上げ、非エンベロープウイルスとして不活化や除去の実験モデルウイルスとして利用する目的で、その性質特にそ

の宿主域についてしらべた。その結果ヒトやマウス細胞には感染しなかったが、アフリカミドリザル細胞がFCVに対する感受性を示した。アフリカミドリザルのウイルスレセプターは、ヒトのものとよく似ているため、こうした動物種が介在することでウイルスがヒトにその感染宿主域を広げる可能性がある。そこでその点についても検討した。

B. 研究方法

ネコカリシウイルス(FCK) F9株、またウイルスストックは、ネコ腎由来のCR-FK細胞株を用いて調製した。FCK F9をCR-FK細胞に1時間感染させた後、37°C, 5% CO₂で培養した。培養開始後、36時間後に上清を回収し、2,400 r.p.m. で遠心した後0.45 μm のフィルターで濾過し、ウイルスストックとして-80°Cで保存した。

TCID₅₀ (tissue culture infectious dose)は、96 穴プレートに 3×10^3 個ずつ播種した細胞に10倍希釈系列ウイルス液 (100 μl) を加え、5日後にCPE (cytopathic effect)の有無を顕微鏡下で判定した。F9株の感染感受性は、HeLa, CV-1, Vero, CR-FK, NIH-3T3細胞を用いて調べた。

ミドリザル細胞に馴化したFCV ウイルスの分離は、CV-1, Vero, HeLa細胞を用いた。25-cm²の培養フラスコに細胞 (2.5×10^6) を播種し、12時間後、FCV F9を感染させた (100 TCID₅₀)。37°C, 5% CO₂で3日

ないし4日培養後、感染細胞の上清 1 ml を非感染細胞 (2.5×10^6) に感染させた。これを繰り返し、複製能が向上した5回継代ウイルスをCV-1細胞馴化ウイルスFCV_{CV}と名付けた。

C. 研究結果

(1) FCVの宿主域

FCVはエンベロープを持たない+鎖のRNAウイルスであり、直径30~38nmの正二十面体構造をもつ(図1)。FCVはネコ腎由来CR-FK細胞に感染し、よく複製する。FCV, poliovirus, sindbis virus の宿主域を調べてみたのが表1である。poliovirusはピコルナウイルス科のエンテロウイルスに属するRNAウイルスである。poliovirusは、ヒト細胞であるHeLa, 293T細胞によく感染する。またアフリカミドリザル細胞であるVero, CV-1細胞にもよく感染することがわかる。sindbis virusは、トガウイルス科アルファウイルス属に分類される(+)鎖RNAウイルスである。sindbis virus はヒトT細胞由来のJurkat細胞以外のものによく感染することがわかった。これに対し、FCVはヒト由来細胞であるHeLa, 293T細胞、マウス由来細胞であるNIH-3T3細胞には感染しない。ところがアフリカミドリザル腎由来のVero細胞とCV-1細胞には、ネコ腎由来細胞であるCR-FK細胞に比べてわずかであるが、感染することができた(表1)。

(2) CV-1細胞馴化株の分離

FCV F9株はわずかではあるが、アフリカミドリザル細胞であるVero細胞とCV-1細胞に感染することができた。そこで次にFCVが、ミドリザル由来の細胞に馴化できるかどうかを検討した(図2)。Vero細胞では、感染はするもののウイルスが上清に十分産生されず、ウイルスを継代することはできなかった(data not shown)。またヒト由来のHeLa細胞でもFCVは感染せず、そのため継代はできなかった。これに対してCV-1細胞ではFCV F9株を継代することができたが、1-2代目までは、ウイルス複製はするものの上清にはCR-FK細胞で継代した場合に比べて極めて低いウイルス量しか産生されなかった。ところが3回の継代後は、CR-FK細胞に匹敵するほどのウイルス量を産生するようになった。これは継代1から継代3の間にCV-1細胞へのウイルスの馴化が起きていたことを示している。CV-1細胞でFCV F9株を5回継代したものをCV-1細胞馴化分離株としてFCV_{CV}と名づけた(図2)。

この分離株をそれぞれの細胞に対して同じ感染条件下で感染させ、細胞変性効果(CPE)を比較してみると野生株であるFCV F9はCV-1細胞死を十分誘導できなかった。これに対し、CV-1細胞に馴化したFCV_{CV}はCV-1細胞内で激しく複製し、ほとんどの細胞にCPEを引き起こすことができることが明らかとなった(図3、図4)。ところがFCV_{CV}は、Vero細胞では

CV-1細胞で見られるような激しいウイルス複製は見られなかった。またヒト細胞であるHeLa、283T細胞でもCPEは見られなかった。従ってFCV_{CV}は、CV-1細胞で継代することによって、CV-1細胞にのみ馴化したといえることができる。

(3) ヒト細胞への馴化の試み

ウイルスは進化の過程で変異を起こし、宿主域を広げてきた。たとえば、イヌパルボウイルスは、1976年以前に感染の報告はなかったが、その後数年間で全世界に爆発的に広がった。イヌパルボウイルスのゲノムは、以前から知られていたネコパルボウイルスとよく似ていることからネコパルボウイルスの突然変異であると考えられている。カリシウイルスの一種であるFCVはネコのかかる代表的な呼吸器感染症を引き起こすウイルスである。ウイルスの感染力は強く、感染したネコと直接触れ合ったことによる感染、感染したネコのくしゃみ等による空気感染、感染したネコと人間との接触を介しての感染など多岐にわたる。もしアフリカミドリザルのように、容易にウイルス馴化が起きる動物種がネコとヒトに同時に接触する機会が多いと、ネコからヒトへ感染可能なウイルスの出現を仲立ちする可能性がある。そこでCV-1細胞とHeLa細胞を共培養し、そこにFCV_{CV}分離株を感染させ、HeLa細胞に感染可能なウイルスが出現するかどうか調べた。その結果30代まで継

代したが、HeLa細胞に感染可能なウイルスは出現しなかった (data not shown)

D. 考察

FCVは本来の宿主であるネコ細胞CR-FK細胞以外にアフリカミドリザル細胞CV-1, Vero細胞で感染性を示した。FCVは細胞表面のJAM1を感染レセプターとして細胞内に侵入する。そこでネコ、アフリカミドリザル、ヒトのJAM1のアミノ酸配列を比較した(図5)。ネコとアフリカミドリザルのJAM1の相同性は79.2%, アフリカミドリザルとヒトは96.3%, ヒトとネコは79.6%である。アフリカミドリザルとヒトのJAM1はアミノ酸残基が4つ異なっていることから、FCVがアフリカミドリザル細胞に感染の可否がレセプターのJAM1に依存するのだとすると、ウイルス複製に重要なアミノ酸残基は、アフリカミドリザルのAla⁷, Ser⁹⁰, Lys¹⁵⁴, Ile²⁵³であろうと推定される。どのアミノ酸残基が、FCVがCV-1やVero細胞への侵入に関与しているのかは、組み換えウイルスを使った実験によって明らかになると考えられる。

FCVは同じアフリカミドリザルの腎由来の細胞であるCV-1, Vero細胞に感染可能であったが、Vero細胞ではウイルスの継代はできなかった。この違いは、Vero細胞表面のJAM1の発現レベルが低いからであるという可能性と、Vero細胞では感染侵入後の細胞内での複製過程に阻害因子がある可能性、あるいは複製に必要な因子を欠いている可能性、あるいは必要な因子が十

分に発現していない可能性が考えられる。この点を解析するためには、CV-1とVero細胞表面のJAM1分子の発現レベルを比較する必要がある。また細胞侵入後にVero細胞に必要な因子がないのか、阻害因子があるかは、CV-1細胞とVero細胞の融合細胞にFCVが感染複製するかどうかを調べる必要がある。

FCVはCV-1細胞により継代することにより、わずか3回の継代でCV-1細胞に馴化し、CR-FK細胞並みに複製能を高めることがわかった。これはカリシウイルスが、いかに宿主に馴化し易いかを示したものである。この変化が感染侵入時のレセプターとの相互作用に起きているとすると、FCVのカプシドタンパク質であるVP1にアミノ酸変異を起こしている可能性が高く、この解析も今後必要である。

RNAウイルスはそのポリメラーゼのfidelityが低いため、変異ウイルスが出現し易いことが知られている。2008, 2009年に医薬品製造リアクター汚染を引き起こしたvesivirus 2117は、FCVと近縁のウイルスであるが、このウイルスの自然宿主は不明なままである。本来vesivirus 2117はヒトと接触のある自然宿主から医薬品製造に関わるヒトを介してCHO細胞を汚染したものと考えられているが、今回の実験によってFCVも医薬品製造用細胞を汚染する可能性がある。これを明らかにするためには、薬品製造用細胞に感染可能な変異ウイルスがどのような頻度で出現

するのかについて実験的に推定する必要がある。

一方、アフリカミドリザルのレセプターの構造はヒトのものと96.3%の相同性をもつことから、アフリカミドリザルに馴化したウイルスはヒト細胞に感染可能である可能性が考えられた。しかしアフリカミドリザル細胞とヒト細胞の共培養によって、ヒト感染カリシウイルスの出現は起きなかった。このことはヒト細胞への感染にはアフリカミドリザルに比べて高い種の壁が存在することを示唆している。

E. 結論

FCVはノロウイルスと近縁であるため、ノロウイルスの代替ウイルスとして使われることがあるが、血液製剤や組み換えタンパク質製造におけるモデルウイルスとしても有用であると考えられる。本研究ではFCVの宿主域を調べ、アフリカミドリザル腎由来細胞にも感染することが明らかになった。アフリカミドリザルの腎由来細胞はワクチン製造などにも多用される細胞であり、その点からもモデルウイルスの宿主域の解析は重要であると考えられる

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S.,

Yusa, K. *In vitro* and *In vivo* Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. *J. AIDS Clin. Res.* S2-004, 2011.

(2) 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ.

ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 42: 444-447, 2011.

(3) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴. バイオ医薬品の外来性感染物質について *Pharm. Tech. Jpn. in press.*

2. 学会発表

(1) Yusa, K., Yuan, Y., Maeda, Y., Hiromi, T., Monde, K., Harada, S. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. *International Union of Microbiological Societies, XV, International Congress of Virology, Sapporo, September 2011.*

(2) 原田恵嘉, 濱治有希, 遊佐敬介, 松下修三, 吉村和久. 抗HIV剤がEnv多様性に与える影響. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 11.30.2011.

(3) 中野雄介, 前田洋助, 遊佐敬介, 原田信志. コレセプター阻害剤によるCCR5のoligomerization 増強に關与する

CCR5領域の解析. 第25回日本エイズ
学会学術総会 東京 11.30.2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

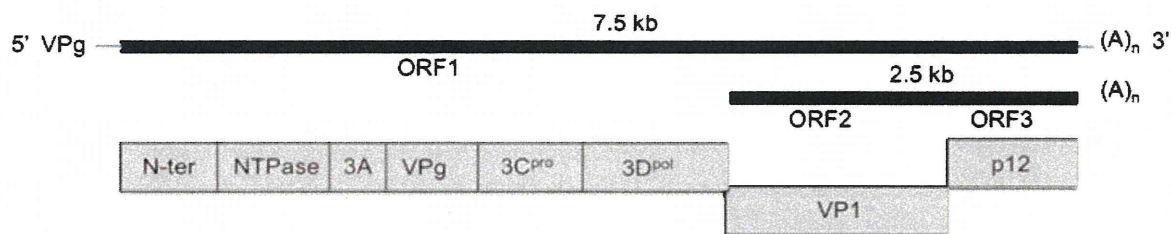


図1 FCV のゲノム構造とウイルスタンパク質

表1 細胞のウイルス感受性 (TCID₅₀)

cells	HeLa	293T	Jurkat	Vero	CV-1	NIH-3T3	CR-FK
virus							
poliovirus	10 ^{6.7}	10 ^{6.0}	<1	10 ^{7.3}	10 ^{6.0}	<1	<1
sindbis virus	ND	10 ^{6.7}	<1	10 ^{7.5}	10 ^{6.7}	10 ^{5.0}	10 ^{8.1}
FCV	<1	<1	<1	10 ^{4.0}	10 ^{3.7}	<1	10 ^{8.5}

*ND, not determined.

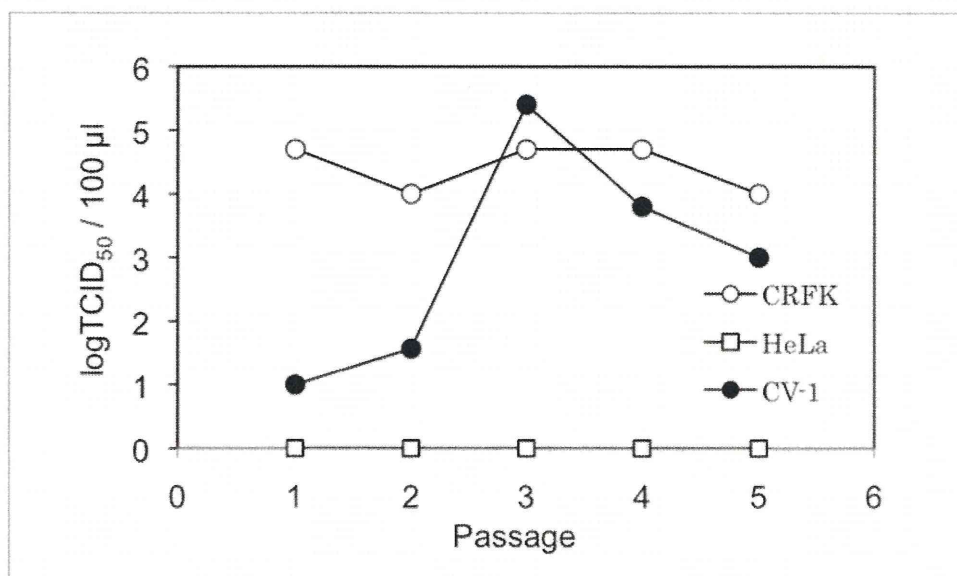


図2 CV-1細胞による継代によるFCV の馴化

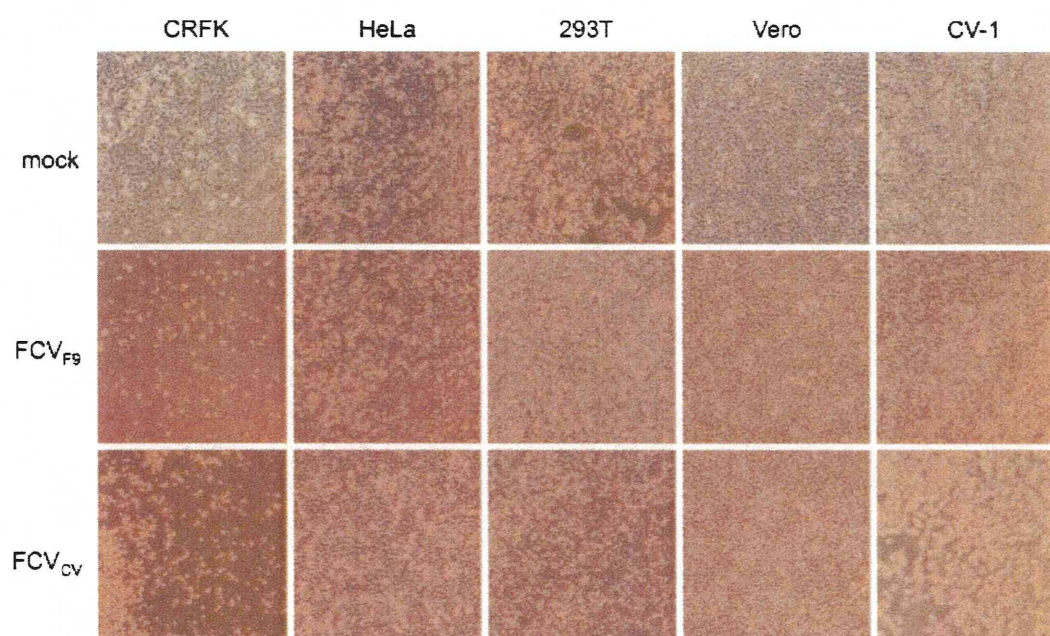


図3 分離したFCV_{CV} はCV-1細胞に感染し、強い細胞変性を引き起こす

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
Takao Hayakawa, Akiko Ishii-Watabe	Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity.	Michael Tovey.	Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals	John Wiley & Sons Inc.,	New Jersey, USA	2011	57-80

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ	バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第1回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状 v	<i>Pharm. Tech. Jpn.</i>	27(13),	99-104	2011
Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K.	<i>In vitro</i> and <i>In vivo</i> Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors.	<i>J. AIDS Clin. Res.</i>	S2	004	2011
遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ	ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	42	444-447	2011
遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴	バイオ医薬品の外来性感染物質について	<i>Pharm. Tech. Jpn.</i>	28	941-946	2012

【新連載】 バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ（第1回）

バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状

Current state in analysis of physicochemical properties of biopharmaceuticals

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ

NORITAKA HASHII, AKIRA HARAZONO, NANA KAWASAKI

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences

はじめに

バイオ医薬品は、糖尿病、肝炎、およびある種の血液関連疾患やがん治療などにおける標準的治療薬となっており、医療上の重要性は増す一方である。また、標準的治療法のない疾患への新たな治療法の提供、患者のQOLの向上、および医薬品産業の活性化を目標として、さらなる新規なバイオ医薬品の開発が進んでいる。新規なバイオ医薬品の早期実用化には、品質・安全性確保のための評価科学の進展が不可欠である。本シリーズでは、バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する現状を、物理的・化学的性質解析、生物学的性質解析・免疫化学的性質解析、不純物解析、外来性感染性物質安全性評価、製造工程評価、規格及び試験方法、免疫原性評価、および安定性評価等に分けて紹介する。

第1回は、バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析のための最新技術を、分析例を紹介しながら概説する。

1. 物理的・化学的性質解析

バイオ医薬品の有効性・安全性を確保するために、品質、すなわち、特性、製造方法、規格及び試験方法、安定性の評価は不可欠である。中でも特性は、製造工程開発／管理手法の開発や規格及び試験方法の設定の根拠となるものであり、開発段階では可能な限り広範囲かつ詳細に解析しなければならない。バイオ医薬品開発において明らかにすることが求められる特性は、構造・組成、物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質、および不純物などである。構造・組成と物理的・化学的性質を明確に区別することは難しいが、「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定について（平成13年5月1日、医薬審発第571号厚生労働省医薬局審査管理課長通知）」では、解析すべき構造・組成として一次構造や糖鎖などの構造が、物理的・化学的性質については、分子量・分子サイズ、

表1 物理的・化学的性質解析の項目および主な分析法

特性解析	項目		主な分析法	
物理的 化学的性質	分子量・分子サイズ		MS, HPLC, 超速心分析法, SDS-PAGE	
	不均一性	目的物質	グリコフォーム	IEF, CE, HPLC, MS
		分子変化体	意図的修飾	HPLC, CE, LC/MS, LC/MS/MS
			ジスルフィド結合 ミスマッチ体	LC/MS, LC/MS/MS, HPLC, SDS-PAGE
			酸化体	LC/MS, LC/MS/MS
			脱アミド体および アスパラギン酸の異性体	HPLC, IEF, LC/MS, LC/MS/MS
	高次構造解析	分光学的性質	NMR, X線結晶構造解析法, CD, FTIR	
		構造安定性	DSC	

MS, 質量分析法; HPLC, 高速液体クロマトグラフィー法; SDS-PAGE, ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法; IEF, 等電点電気泳動法; CE, キャピラリー電気泳動法; LC/MS, 液体クロマトグラフィー/質量分析法; LC/MS/MS, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法; NMR, 核磁気共鳴法; CD, 円偏光二色性測定法; FTIR, フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法; DSC, 示差走査熱量測定法

不均一性を示す性質として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) パターン、アイソフォームパターンおよび電気泳動パターン、ならびに高次構造等を示す性質として分光学的性質等が記されている (表1)。一次構造や糖鎖などの解析手法はほぼ確立されているといえるかもしれないが、物理的・化学的性質を解析するための新たな手法の開発は課題である。

2. 分子量・分子サイズ

分子量、分子サイズを解析する方法として、超遠心分析法、サイズ排除クロマトグラフィー法、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法などが用いられてきた。現在では、質量分析 (MS) 法により、質量を測定することが多い。MSによりペプチドおよびタンパク質医薬品の質量を測定するときには留意すべき点は、第十六改正日本薬局方参考情報¹⁾にまとめられている。

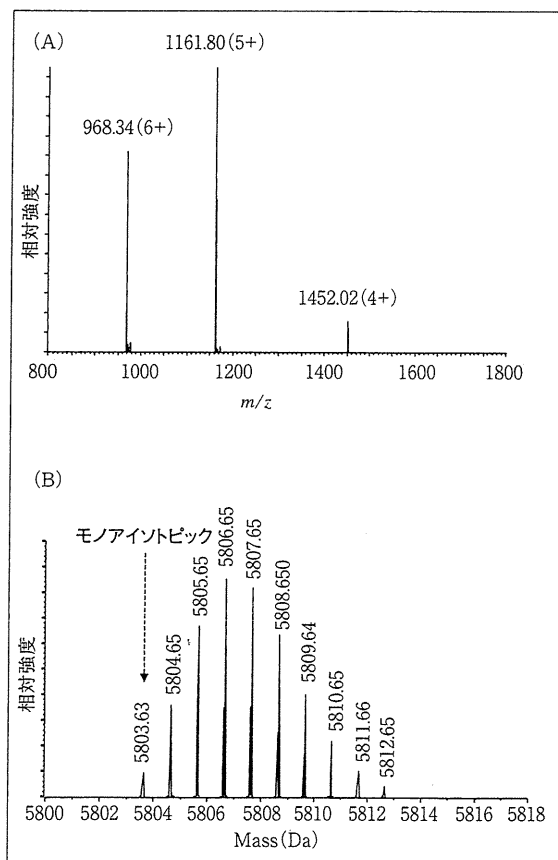


図1 ESI-MSによるヒトインスリンの質量測定
(A) マススペクトル, (B) デコンボリューションマススペクトル
MS装置, Qstar elite (Applied Biosystems), m/z 範囲, 800~2,000

図1 (A) は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MS により得られたヒトインスリンのマススペクトルである。ヒトインスリンは4~6価のイオンとして検出されている。図1 (B) は、(A) のデコンボリューションマススペクトルであり、モノアイソトピックピークから質量 (5803.6Da) を求めることができる。このようにMSは、従来の方法よりも、分子量に近い値を求めることができる。

3. 不均一性

バイオ医薬品は、細胞等の生合成過程を生産に利用しているため、分子構造上、不均一な分子種の集合体として産生される。これらの中で、DNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列を有し、かつ適切な翻訳後修飾を持つ分子種は「目的物質」とよばれる。目的物質であっても、不均一性をもつことがある。その代表例に、糖鎖の構造や結合位置の違いにより生じるグリコフォームがある。特性解析においては、糖鎖構造と活性等の関係を考慮しながら、適切な手法を用いてグリコフォームパターンを確認する必要がある。例えば、シアル酸結合医薬品の特性解析では、シアル酸結合数がタンパク質の血中半減期に影響することがあるので、シアル酸結合数に由来する不均一性プロファイル測定し、薬理プロファイルとの相関性を調べるのが望ましい。不均一性プロファイルを得る方法として、MS、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、および陰イオン交換クロマトグラフィー法などがある。

図2に、ESI-MSによって、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞産生ヒトエリスロポエチン (EPO) のグリコフォームを解析した例を示す。EPOは165個のアミノ酸からなる糖タンパク質であり、3カ所のN結合型糖鎖結合部位 (Asn24, 38および83) と1カ所のO結合型糖鎖結合部位 (Ser126) を有する。結合糖鎖の大部分はシアル酸付加糖鎖であり、そのシアル酸付加糖鎖の分布が活性に影響することが知られている²⁾。図2 (A) はマススペクトルで、EPOは10~16価のイオンとして検出されている。図2 (B) はデコンボリューションマススペクトルで、グリコフォームプロファイルと見なすことができるだろう。MSを用いたEPOのグリコフォーム解析より、①シアル酸付加数は11~14個であり、特に12および13個結合した分子種が多いこと、②アセチル化されたシアル

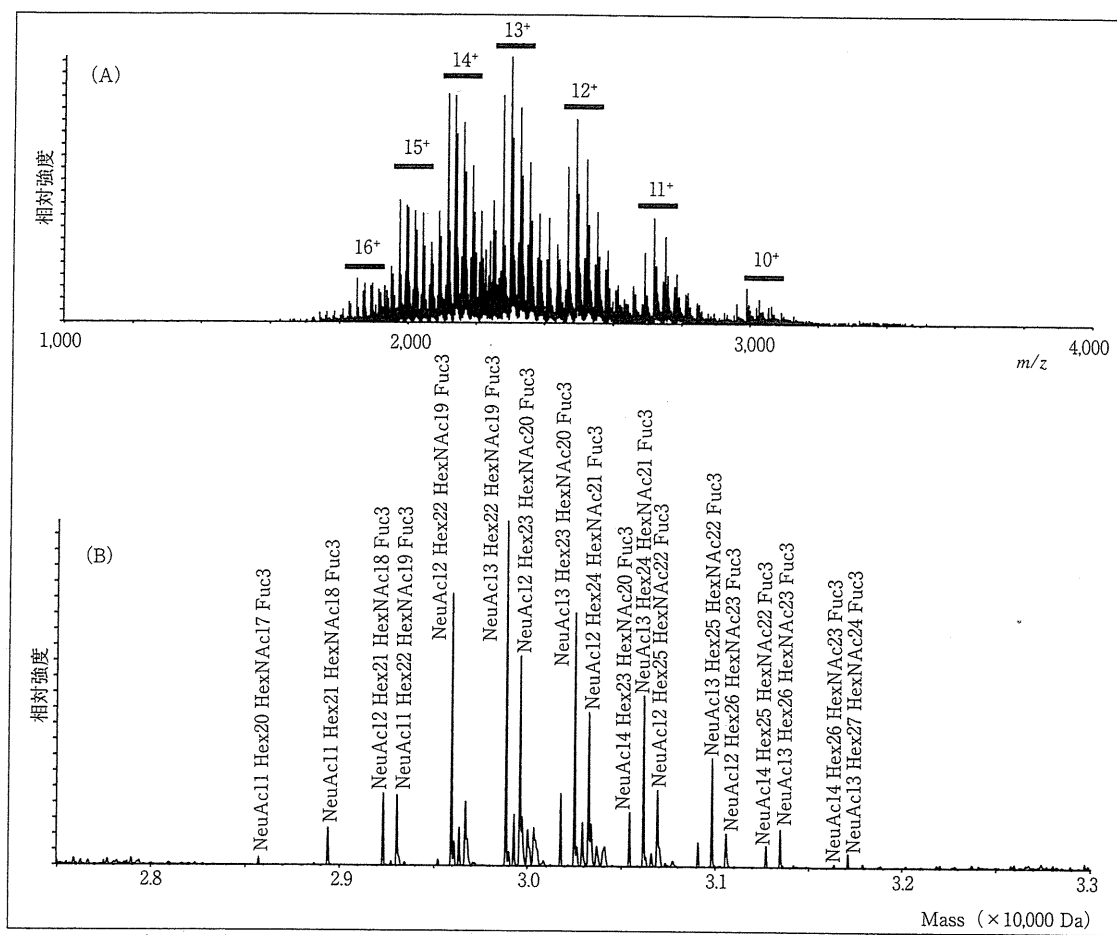


図2 CHO細胞産生EPOのグリコフォーム解析

(A)マスペクトル, (B)デコンボリューションマスペクトル

NeuAc, N-アセチルノイラミン酸; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; Fuc, フコース。

MS装置, Qstar elite (Applied Biosystems); m/z 範囲, 1,000~4,000。

酸がみられないこと, などがわかる。これまで, シアル酸結合タンパク質の特性解析では, 負電荷分子を分離する分析手法(等電点電気泳動, キャピラリー電気泳動など)を用いてシアル酸結合数の異なるグリコフォームのパターンを解析することが多かったが, MSでは, シアル酸付加程度に加えて, 糖組成, アセチル化の程度, および非ヒト糖鎖抗原であるN-グリコシルノイラミン酸の付加程度なども確認することが可能であり, 今後, 利用されるケースが増えるものと予想される。

目的物質が不均一性を有する糖鎖以外の例として, 意図的修飾を施した医薬品があげられる。PEG化タンパク質や薬物結合抗体医薬品では, 修飾分子の結合位置や結合数の違いによる不均一性が生じる。このような意図的修飾によって生じた不均一性は, キャピラリー電気泳動法, HPLC, MSなどにより解析されることが多いが, 修飾分子の特徴に合った解析手法を選択することが重要

である^{3,4)}。

バイオ医薬品の製造工程では, 目的物質以外に, 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, あるいは加水分解酵素などで断片化された切断体など, さまざまな「分子変化体」が生じる可能性がある。分子変化体のうち, 生物活性, 有効性および安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持つものは「目的物質関連物質」, また, 生物活性, 有効性および安全性の観点から目的物質に匹敵する特性を持たないものは「目的物質由来不純物」とよばれ区別される。分子不均一性解析では, 目的物質, 目的物質関連物質および目的物質由来不純物を区別すること, それらのプロファイルを求めておくことが重要である。抗体やリソソーム酵素製品のように末端のアミノ酸残基が欠失している分子種が混在する場合には, 末端アミノ酸配列解析を行うとともに, イオン交換クロマトグラフィーやMSなどにより不均一

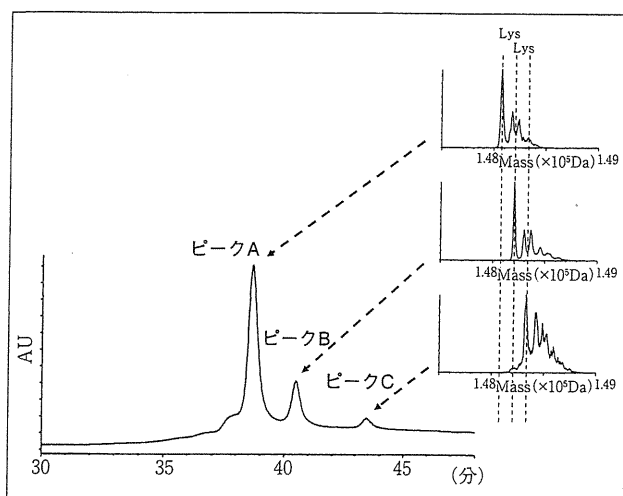


図3 CHO細胞産生ヒト抗体の不均一性解析

カラム, Agilent Bio MAb(0.1×50mm, 1.7mm); 流速, 0.8mL/分; UV, 280nm; A溶媒, 10mMリン酸ナトリウム水溶液 (pH6.6); B溶媒, 500mM塩化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム水溶液 (pH6.6); グラジエント条件, 5分間3%Bで流した後, 50分間かけて20%Bへ上昇させた。

性プロファイルを測定することが望ましい(目的物質由来不純物の解析手法については, 第3回で紹介する)。

分子変化体の解析例として, 弱酸性陽イオン交換クロマトグラフィーにより, CHO細胞産生ヒト抗体のH鎖のC末端リシン (Lys) 残基の欠失に由来する不均一性を解析した例を示す(図3)。ここでは検出されたピークA～Cを分取した後, MSにより質量を確認することで, C末端Lys残基の個数を確認している(ピークA, Lys残基をもたない分子; ピークB, Lys残基を1分子もつ分子; ピークC, Lys残基を2分子もつ分子)。また, ピーク面積比から, C末端Lys残基結合数の異なる分子の分布を確認している(ピークA, 72%; ピークB, 20%; ピークC, 8%)。

4. 分光学的性質

分光学的性質は, 目的物質の高次構造情報を得るために解析される。主な分析法として, 核磁気共鳴法(NMR), X線結晶構造解析法, 円偏光二色性測定法(CD) およびフーリエ変換赤外吸収スペクトル測定法(FTIR)などが用いられている。

NMRの測定法のうち, バイオ医薬品の高次構造解析に用いられる測定法は, 核オーバーハウザー効果(NOE) 測定法であり, 水素結合の位置や原子間の空間的距離を明らかにすることができる⁵⁾。NMRは, 生体内

の環境に近い状態で試料を測定できる点で優れているが, 現在のNMR装置で測定可能なタンパク質は, 分子量3万程度とされている。一方, X線結晶構造解析法は, タンパク質の分子量に関係なく測定できることから高次構造解析に汎用されているが, 糖タンパク質の結晶化が難しいなどの技術的な課題や, 必ずしも生体内における高次構造を反映していない場合があることに留意する必要がある。タンパク質中の二次構造(α ヘリックスや β シート)の有無についてはCDやFTIRにより解析されることが多い。

5. 構造安定性

タンパク質の構造安定性を解析する手法として, 示差走査カロリメトリー法(DSC)が知られている。DSCによりタンパク質の熱変性に伴う熱変化を測定することで, タンパク質の構造安定性を評価することができる。タンパク質の構造安定性は, 溶媒, pH, イオン強度および添加剤等により変化するので, バイオ医薬品の開発において, DSCは製剤処方最適化等に用いられることが多い。

バイオ医薬品の中には, サブユニットが会合し, 多量体を形成している品目も多いが, 多量体安定性を解析するための技術開発は発展途上である。そのため, 目的の多量体を形成しているか否か, その生物活性から推測されているのが現状である。多量体安定性が有効性・安全性に直接的に関係するバイオ医薬品の1つにインスリン製剤がある。遺伝子組換えヒトインスリン製剤は, 製剤中では主に六量体を形成しており, 投与後に皮下組織で拡散・希釈されることで, 六量体から二量体を経て単量体に解離し, 吸収された後に作用を発現する。多量体の安定性はインスリン単量体が血中に移行するまでの時間に影響を与えるものと考えられており, アミノ酸残基を置換して多量体安定性を変化させて作用発現時間や持続時間を調節した遺伝子組換えインスリンアナログ製剤が次々と開発されている。インスリンスペースリスプロ(リスプロ)は超速効型インスリンアナログであり, ヒトインスリンB鎖の28番目(B28)のProとB29のLys残基が置換されている。同じ超速効型に分類されるインスリングルリジン(グルリジン)は, B3のAsnおよびB29のLys残基がそれぞれLysおよびGlu残基に置換されている。これらの置換により多量体安定性が低下し単量体に解離

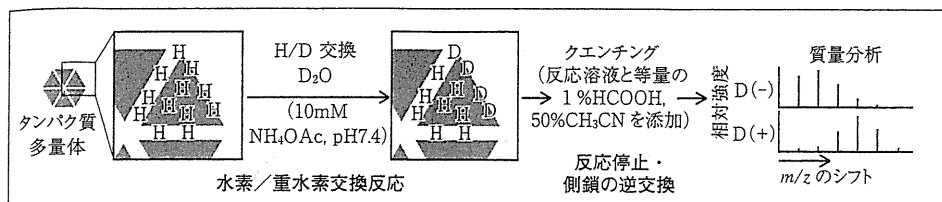


図4 HDX/MSによる多量体安定性解析の概要

重水中でタンパク質中の主鎖アミド水素原子(H)は、徐々に重水素(D)に置換される(HDX反応)。このとき、溶媒との接触の多い水素原子ほど速やかに置換される。交換された水素の数は質量の変化として質量分析計で検出される。交換反応性が特に高い官能基(-OH, -NH₂, -COOH, -SH, -CONH₂など)に取り込まれたDは、反応停止過程で加えられたH⁺により元に戻るため、最終的に検出されるのは主に主鎖のアミド基に取り込まれたDである。

しやすくなるため、超速効型インスリンアナログは速やかに作用を発現するとされている。持続型インスリンアナログであるインスリンスペースグルルギン(グルルギン)は、A21のAsnがGly残基に置換され、さらにB鎖のC末端に2分子のArg残基が付加されており、これらの置換によりグルルギンのpI(6.7)は他のインスリンアナログ(5~5.5)よりも高い。中性付近のpIをもつグルルギンは投与後、中性pHの皮下組織で析出するため微量体から単量体への解離が遅くなり、作用を持続すると考えられている。このように多量体安定性はインスリンアナログ製剤の有効性に影響を及ぼす重要な物理的・化学的性質の1つとなっており、簡便かつ迅速に多量体安定性の評価は重要である。

生体内のタンパク質は、柔軟性(揺らぎ)を保持した分子として存在しており、立体構造の揺らぎは多量体安定性に関係することが知られている。タンパク質の揺らぎ(動的構造)を解析する手法の1つとして、水素/重水素交換(HDX)反応とMSを組み合わせたHDX/MSがある^{6,7)}(図4)。重水中でタンパク質のアミド水素は徐々に重水素に交換される。交換された水素数は、反応溶液のpHを酸性(pH 2.5)に変えてHDX反応を停止した後、MSで分析することで質量変化数として確認することができる。一般に分子表面の溶媒と接触しやすいアミド水素ほど速く重水素に交換され、水素結合に関与する水素原子や分子内部に存在するアミド水素などの交換速度は遅いことから、HDX/MSにより多量体安定性の異なるインスリンアナログの揺らぎを比較できる。

図5は、超速効型、速効型、および持続型インスリンアナログ製剤のHDX/MSを行い、重水素交換数を時間に対してプロットした結果である⁸⁾。超速効型のリスプロおよびグルルギンはより多くの重水素を取り込み、持

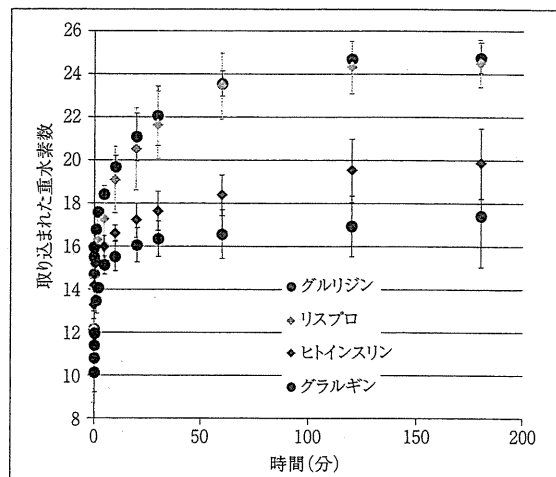


図5 インスリンアナログ製剤のHDX反応性

製剤原液を9倍容量の重水溶媒と混合して氷上でHDX反応後、反応液と同容量の1%酢酸/50%アセトニトリルで反応を停止させた。

トラップカラム, C18 trap; 溶媒, 0.1%酢酸, 50%アセトニトリル; MS装置, LTQ-FT(Thermo Fisher Scientific); 流速, 50μL/分

研究開発・生産を支援する総合技術力

医薬品のCMC関連分析はTRCにお任せ下さい。

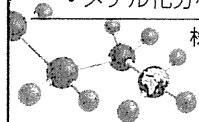
【申請資料の信頼性の基準(薬事法施行規則第43条)での抗体医薬品、たんぱく質医薬品の特性解析】

1 たんぱく質部分

- アミノ酸組成分析
- 末端アミノ酸配列解析
- N末端(ブロックN末端)及びC末端
- ペプチドマップの作成
- 全アミノ酸配列解析 Technology & Trust
- ジスルフィド架橋位置の解析
- 分子量測定(質量分析, ゲルろ過, SDS-PAGE)
- CDスペクトルの測定

2 糖部分

- 糖組成分析-中性糖, アミノ糖, シアル酸
- N-グリコシド型糖鎖の逆相、陰イオン交換による糖鎖マップの作成
- 糖鎖マップ法によるN-グリコシド型糖鎖の構造解析
- N-及びO-グリコシド結合糖鎖の結合位置の解析
- メチル化分析, NMR測定



株式会社東レリサーチセンター・医薬営業部
http://www.toray-research.co.jp

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町3-1-8
TEL:03-3245-5666 FAX:03-3245-5804

DM資料請求カードNo.287

表2 HDXパラメータ

	水素交換数			
	D_{∞}	D_s	D_m	D_i
ヒトインスリン	20.3	3.9	1.5	3.0
リスプロ	24.5	7.3	2.6	2.5
グルリジン	24.7	7.2	2.6	2.8
グルルギン	18.0	2.0	1.8	4.2

フィッティングに使用した式 $D_t = D_{\infty} - D_i \exp(-k_i t) - D_m \exp(-k_m t) - D_s \exp(-k_s t)$ (D_i : 反応開始から t min後の交換数, t : 反応時間 (min), D_{∞} : 最大交換数, $D_i/D_m/D_s$: 各群由来の交換数, $k_i/k_m/k_s$: 各群の水素の反応速度定数 (min^{-1})). 各アナログの反応速度定数, $k_s \leq 0.1$, $0.1 < k_m \leq 1$, $k_i > 1$

D_{∞} , 最大交換数; $D_i/D_m/D_s$, 交換速度が遅い/中間/速い水素数

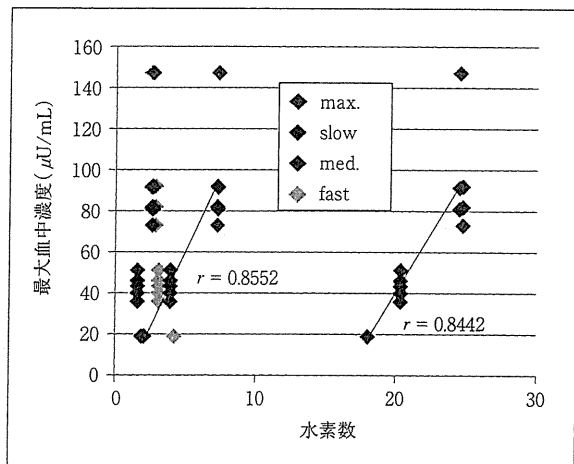


図6 HDXパラメータと最大血中濃度の相関性

Max., D_{∞} : slow/med./fast., $D_i/D_m/D_s$ (表2参照)。最大血中濃度の値は、以下の論文を参照した。Mudaliar *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22 (9): 1501-1506; Lindholm *et al.* (1999) *Diabetes Care* 22 (5): 801-805; Becker *et al.* (2008) *Clin. Pharmacokinet.* 47 (1): 7-20; EPAR "Product Information" (Apidra); Product Monograph (Humalog), Eli Lilly Canada; Heise *et al.* (1998) *Diabetes Care* 21 (5): 800-803; Lepore *et al.* (2000) *Diabetes* 49 (12): 2142-2148.

効型のグルルギンと中間型製剤の重水素取り込み数は少ない。インスリンアナログ製剤のHDX反応性から、多量体安定性を確認することができる。また、HDX反応による重水素交換数の経時変化は、擬一次反応速度式で表すこと(フィッティング)が可能であり、その式から重水素最大交換数や反応速度の異なる重水素数などのHDXパラメータを求めることができる(表2)。製剤間のHDXパラメータの比較から、HDX反応性の差には最大交換数(D_{∞})および交換速度の遅い水素数(D_s)を反映していることがわかる。さらに、HDXパラメータは最大血中濃度と相関があることが示唆された(図6)。

おわりに

本稿では、バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状と最新技術について、事例を紹介しながら概説した。近年、生物活性、血中安定性、免疫原性および分子標的性の改善を目的とした改変・融合タンパク質、糖鎖改変タンパク質、PEG化ペプチド・タンパク質、細胞毒性が高い低分子化合物をカップリングさせた抗体医薬品など、新しい分子構造をもつ医薬品が次々と開発されている。これらの医薬品には、新規な構造および高度な不均一性をもち、ヒトでの薬理作用や安全性の予測が難しいものも少なくない。物理的・化学的性質解析は、ファーストインマン試験の安全性確保のためにも重要性が増していくものと予想される。

参考文献

- 厚生労働省: 第十六改正日本薬局方 (http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/3-24kokujii_index.htm).
- Yanagihara S, Taniguchi Y, Hosono M, Yoshioka E, Ishikawa R, Shimada Y, Kadoya T, Kutsukake K.: Measurement of sialic acid content is insufficient to assess bioactivity of recombinant human erythropoietin., *Biol Pharm Bull*, 33, 1596-1599 (2010)
- Maeda, E., Urakami, K., Shimura, K., Kinoshita, M. and Kakehi, K.: Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin, *J Chromatogr A*, 1217, 7164-7171 (2010)
- Moosmann, A., Christel, J., Boettinger, H. and Mueller, E.: Analytical and preparative separation of PEGylated lysozyme for the characterization of chromatography media, and *J Chromatogr A*, 1217, 209-215 (2010)
- Ohno, A., Kawasaki, N., Fukuhara, K., Okuda, H. and Yamaguchi, T.: Time-dependent changes of oxytocin using (1)H-NMR coupled with multivariate analysis: A new approach for quality evaluation of protein/peptide biologic drugs, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 57, 1396-1399 (2009)
- Hamuro, Y. *et al.*: Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *J Biomol Tech*, 14, 171-182 (2003)
- Chitta, R. K., Rempel, D. L., Grayson, M. A., Remsen, E. E. and Gross, M. L.: Application of SIMSTEX to oligomerization of insulin analogs and mutants, *J Am Soc Mass Spectrom*, 17, 1526-1534 (2006)
- Nakazawa, S., Hashii, N., Harazono, A. and Kawasaki, N.: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal Biochem*, 420 (1), 61-67 (2011)

In vitro and *In vivo* Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors

Yosuke Maeda¹, Kazuhisa Yoshimura², Fusako Miyamoto³, Eiichi Kodama³, Shigeyoshi Harada², Yuzhe Yuan⁵, Shinji Harada¹ and Keisuke Yusa^{5*}

¹Department of Medical Virology, Graduate School of Medical Virology, Kumamoto University, Honjo 2-1-1, Kumamoto 860-5886, Japan

²Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan

³Division of Emerging Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

⁴Transfusion transmitted Diseases Center, Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Science, #26 Hua-Cai Road, Long-Tan-Si Industrial Park, Chenghua District, Chengdu, 610052 Sichuan Province, P. R. China

⁵Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, Kami-youga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

Abstract

Viral entry is one of the most important targets for the efficient treatment of Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients. The entry process consists of multiple molecular steps: attachment of viral gp120 to CD4, interaction of gp120 with CCR5 or CXCR4 co-receptors, and gp41-mediated fusion of the viral and cellular membranes. Understanding the sequential steps of the entry process has enabled the production of various antiviral drugs to block each of these steps. Currently, the CCR5 inhibitor, maraviroc, and the fusion inhibitor, enfuvirtide, are clinically available. However, the emergence of HIV-1 strains resistant to entry inhibitors, as commonly observed for other classes of antiviral agents, is a serious problem. In this review, we describe a variety of entry inhibitors targeting different steps of viral entry and escape variants that are generated *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: CD4-gp120 binding inhibitor; CCR5 antagonist; CXCR4 antagonist; Fusion inhibitor; Resistance; HIV-1

Introduction

The development of chemotherapy with antiretroviral agents has reduced the morbidity and mortality of Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals. Successful treatment of HIV-1-infected patients using chemotherapy is partly due to a combination of different classes of antiviral agents against the viral protease or reverse transcriptase. However, successful eradication of the virus from infected individuals has not been achieved by antiviral treatment, and is often limited by the emergence of drug-resistant HIV-1 strains [1-3]. These problems highlight the need to develop novel anti-HIV-1 drugs that target different steps of the viral replication process. Viral entry is currently one of the most attractive targets for the development of new drugs to control HIV-1 infection. Viral entry proceeds through Env

(gp120, gp41)-mediated membrane fusion, and consists of sequential steps: (i) attachment of viral gp120 to the CD4 receptor; (ii) binding of gp120 to CCR5 or CXCR4 co-receptors; and (iii) fusion of the viral and cellular membranes (Figure 1). A large number of inhibitors targeting different steps of the viral entry process have been developed, including peptides/peptide mimics, small molecules, and monoclonal antibodies (MAb).

Enfuvirtide (also known as T-20) was the first of a new class of drugs known as fusion inhibitors, which was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2003. Approval was given for the use of this drug in combination with other anti-HIV-1 medications to treat advanced HIV-1 infection in adults and children aged six years and older. The drug is an antiviral peptide that prevents HIV-1 entry by blocking gp41-mediated fusion [4-6]. Small compounds that can bind to the pockets of the extracellular loops of a coreceptor are expected to be potent antiviral agents. Several small-molecule CCR5 inhibitors have progressed through clinical development [7]. Maraviroc [8,9], a CCR5 antagonist, is the second entry inhibitor approved by the FDA in 2007 for treatment-experienced patients infected with a CCR5-tropic (R5-tropic) virus. Extensive research is currently underway to develop the next generation of entry inhibitors, however, the emergence of viral strains resistant to entry inhibitors, as well as other classes of antiviral

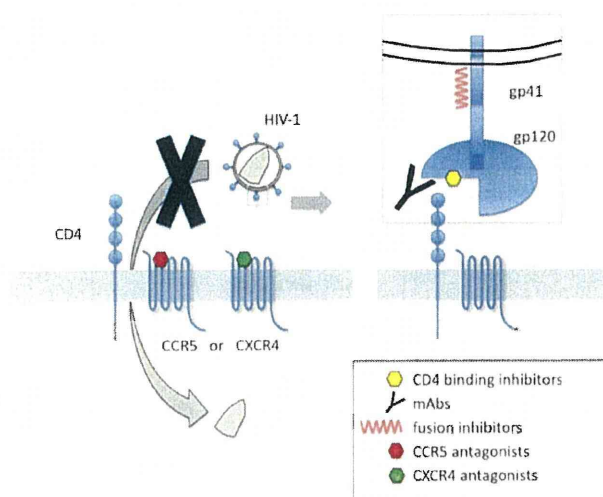


Figure 1: Molecular targets of inhibitors of HIV-1 entry into the target cell.

***Corresponding author:** Keisuke Yusa, Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, Kami-youga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan, Tel: +81-3-3700-1141 ext. 335; Fax: +81-3-3700-9084, E-mail: yusak@nihs.go.jp

Received October 18, 2011; Accepted December 02, 2011; Published December 05, 2011

Citation: Maeda R, Yoshimura K, Miyamoto F, Kodama E, Harada S, et al. (2011) *In vitro* and *In vivo* Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. J AIDS Clinic Res S2:004. doi:10.4172/2155-6113.S2-004.

Copyright: © 2011 Maeda R, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.