

vitro および in vivo における代謝活性等を解析した。また、CYP3A4 投与マウスへ薬剤を投与した際の肝障害の程度を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、各分担研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

C. 研究結果

C-1. shRNA 発現 Ad ベクターの作成

Ad Δ VA ベクターならびに HD-Ad ベクターへ shRNA 発現カセットを搭載して遺伝子発現抑制能を評価した結果、従来の Ad ベクターと比較し、効率良く目的遺伝子の発現を抑制可能であることが明らかとなった。また、複数の shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターは従来の Ad ベクターよりも効率的に標的遺伝子の発現を抑制することも示された。したがって、上記 Ad ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。

C-2. 新規 Ad 発現ベクターの in vitro および in vivo 動態学的評価

ヒト CYP3A4 やヒト CYP2C9 を過剰発現させるアデノウイルス (AdCYP3A4、AdCYP2C9) を作製し、それらを HepG2 細胞へ過剰発現させることにより、各種薬剤の反応代謝物が生成されること、そしてそれにより細胞死が生じることが明らかとなった。したがって、本実験系は in vitro における簡便な薬物評価系として有用であることが示唆された。

C-3. CYP3A4 発現改良型 Ad ベクターの作製と機能評価

これまでに我々が独自に開発した肝障害誘導能の低い Ad ベクターへヒト CYP3A4 cDNA を搭載したベクターの開発を行い、本ベクターをマウス

へ投与したときの CYP3A4 蛋白質の発現ならびに肝障害を評価した。その結果、投与 2 日目のマウスの肝ミクロソームにおいて、コントロールのヒト肝ミクロソームと比較して、同程度のヒト CYP3A4 活性が認められた。また、ベクター自身による肝障害は投与 2 日目では観察されず、4 日目でも従来の Ad ベクターより有意に低かった。従って、Ad ベクターの投与 4 日以内であれば、薬物誘発性肝障害評価への応用が可能であることが示唆された。そこで次に導入したヒト CYP3A4 の代謝活性を測定した結果、Ad-CYP3A4 投与マウスの肝ミクロソームにおける CYP3A4 活性 (デキサメタゾン 6β 水酸化活性) は、ポジティブコントロールとして用いたヒト肝ミクロソーム (HLM) のヒト CYP3A4 活性と同等以上であることが明らかとなった。さらに、in vivo での CYP3A4 活性もみとめられた。したがって、Ad-CYP3A4 を投与することにより、マウス生体内においても有意なヒト CYP3A4 活性が認められることが示された。

次に BSO と Ad-CYP3A4 の併用投与したマウスにアセトアミノフェンを投与し、本モデル評価系の有用性を検討した。その結果、Ad-CYP3A4 投与マウスにおいてアセトアミノフェン投与による有意な肝障害の上昇は認められなかった。また、フルタミドを投与した際にも、Ad-CYP3A4 投与マウスの有意な肝障害の上昇は認められなかった。

また、カルバマゼピン、アミオダロン、トログリタゾンを用いても、CYP3A4 によって生成される反応性代謝物が肝障害に与える影響について、検討を行った。しかし、Ad-CYP3A4 発現マウスにおける肝障害誘導能の顕著な増強は、どの薬剤投与の場合でもみとめられなかった。

D. 考察

これまでに数多くの shRNA 発現 Ad ベクターに関する研究が報告されており、優れたノックダウン効率が報告されている。しかしながら Ad ベクターは既存の遺伝子導入ベクターの中で最も高い遺伝子発現効率を有しており、その遺伝子導入効率から考えると、それらのノックダウン効率は

必ずしも高いとは言えない。昨年度および本年度の研究で、VA-RNA 欠損 Ad ベクターあるいは HD-Ad ベクターに shRNA を搭載することで、RNAi 効果が増強されることを世界に先駆けて証明した。つまり、Ad ベクターによる RNAi 誘導効果が低い原因の一つとして VA-RNA による阻害が考えられた。

標的遺伝子の発現を特異的に抑制可能な RNAi は、今や生命科学において必要不可欠な基盤技術である。これまでに報告されている shRNA 発現 Ad ベクターは、単一の Ad ベクターにひとつの shRNA 発現カセットを搭載している場合が大部分を占める。このような shRNA 発現 Ad ベクターでは、より高効率な遺伝子発現抑制が要求される場合、または、複数の遺伝子を同時に抑制したい場合には多量の Ad ベクターを作用させる必要があり、副作用を引き起こす危険性が高まると考えられる。そこで本研究では shRNA 発現 Ad ベクターを用いて高効率かつ安全に RNAi を誘導することを目的に、複数の shRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターの開発を試みた。

同一遺伝子に対する shRNA 発現カセットを 4 単位搭載した Ad ベクターでは、shRNA 発現カセットを 1 単位搭載した Ad ベクターと比較して、RNAi 効果の増強が確認された。本 Ad ベクターを用いることにより、少量の Ad ベクターで RNAi 誘導が可能となり、副作用の少ない条件で RNAi 誘導が達成できるものと考えられる。

また、本研究ではげっ歯類の GCSH をノックダウンするための shRNA を発現するカセットを 4 単位搭載した Ad ベクター AdGCSH-shRNAx4 を作製し、その機能解析を *in vitro* および *in vivo* で行った。その結果、培養細胞、マウスの双方において γ GCSH のノックダウンが可能であることが示された。なお、げっ歯類のグルタチオン抱合活性はヒトの 10~20 倍であるため、ヒトと同程度の解毒能を有するげっ歯類を作出するにはマウス肝臓グルタチオン量を 10%以下に低下させることが望まれるが、本ベクターの投与では、マウス肝臓のグルタチオン量は 5 割程度しか抑制されていなかった。今後、ベクター投与量やノックダウン

に要する時間等、詳細に検討する必要があると思われる。一方、GCS の特異的阻害剤である BSO を用いることで、未処理マウスと比較し、肝グルタチオン量は 15~20%程度まで抑制可能であることが明らかとなった。したがって、本剤と Ad-sh γ GCSHx4 との併用することで、ヒトの解毒能を有するマウスを作製することは十分に可能であると期待された。

さらに本研究では、我々が独自に開発した、非特異的な Ad タンパク質の発現を抑制可能な改良型 Ad ベクターにヒト CYP3A4 遺伝子を搭載した Ad-CYP3A4 を作製した。本ベクター投与により従来のベクター同様にマウス肝臓においてヒト CYP3A4 を発現させることに成功した。更に、従来の Ad ベクターでは Ad 投与 2 日目には炎症反応による肝障害が誘発されるが、本 Ad ベクターでは Ad 投与 2 日目における肝障害は全く認められないことも明らかにした。したがって、Ad ベクター投与 4 日以内であれば、薬物誘発性肝障害評価への応用が可能であることが示唆された。更にマウス肝臓において発現が確認されたヒト CYP3A4 蛋白質が代謝活性を有していることを、肝ミクロソームを用いた *in vitro* での検討ならびにマウス末梢血を用いた *in vivo* での検討により明らかにした。本結果は、発現ベクターを用いて代謝活性を有するヒト CYP3A4 をマウスに過剰発現させた世界初の成果である。なお、代謝活性は少なくとも Ad 投与 8 日目まで保持されたことから、本 Ad ベクターを投与し、1 週間程度であれば、ヒト薬物誘発性肝障害評価への応用が可能であることが示唆された。今後、ヒト CYP3A4 のみならず、他のヒト CYP 分子種を過剰発現する Ad ベクターを開発し、げっ歯類に同時に投与・強制発現させることで、より多くの薬剤を対象とした毒性評価が可能になるものと期待される。

さらにグルタチオン合成酵素阻害剤 BSO と Ad-CYP3A4 の併用投与により、ヒトの代謝能を模倣したマウスが作製できているものと考え、このモデルマウスの有用性を検証した。しかし、ヒト CYP3A4 により代謝され、肝障害を誘発することの

知られているアセトアミノフェンを投与しても肝障害の有意な増加は認められなかった。その原因の一つとして、内在性マウス代謝酵素活性の低下が考えられる。今回評価に用いたアセトアミノフェンは *in vitro* ではヒト CYP1A2、CYP3A4、CYP2E1 により代謝を受け、肝毒性を示す代謝物が生成することが知られているが、一方でヒト *in vivo* では CYP2E1 の寄与が大きいという報告もある。従って今後は、本モデル動物を用いて、ヒト CYP3A4 による代謝寄与の大きい薬剤についてマウス *in vivo* 毒性スクリーニングを実施したいと考えている。同様にフルタミドについても、他のコントロール群と比較して、Ad-CYP3A4 投与群で有意な肝障害は認められなかった。ただしフルタミドの場合、経口投与溶液の調整法を改善することで、現状を改善できる可能性がある。さらにフルタミドの代謝産物である FLU-1 (5-アミノ-2-ニトロベンゾトリフルオリド) を毒性試験に用いることも検討中である。これまで *in vitro* (代謝酵素発現系) による検討では、FLU-1 はより直接的にヒト CYP3A4 による代謝を受け、肝障害を誘発する代謝物が生成すると考えられている。従って、フルタミドに比べ、FLU-1 はヒト CYP3A4 による代謝的活性を受け、肝障害を示す可能性が考えられる。

本年度はさらに肝毒性発現に関与するその他の化合物についても評価を進めた。カルバマゼピンによる肝障害マウスモデルは、既に我々の先行研究において野生型のマウスを用いて確立されている。全く同様の条件で検討を行ったが、肝障害を惹起することが出来なかった。さらに、CYP3A4 の発現による影響も認められなかった。この原因は不明であるが、アデノウイルスベクターにより肝障害発症に係る炎症・免疫系が何らかの影響を受けたことが推察された。

アミオダロンについては、最近 Lu らによって報告されている方法によっては肝障害を惹起することができなかった。この結果について、考えられる原因としては LPS の製造 lot が異なっていること以外に原因が考え難く、詳細は不明であ

る。また、反復投与により ALT 値の減少が認められたことからアミオダロンおよびその代謝物による CYP の阻害により、肝障害性の代謝物の産生が低下した可能性が示唆された。トロバフロキサシン+LPS による肝障害モデルの報告において (Shaw et al., *Toxicol. Sci.*, 100: 259-266, 2007.) トロバフロキサシンを 200 mg/kg 投与したときよりも 150 mg/kg 投与したときの方が ALT 値が高いという結果が示されている。これらを考慮し、投与量を下げる検討を行った。すなわち、アミオダロンの投与量を Roth らと同じ 300 mg/kg と、さらに下げた 200 mg/kg にて再度検討を行ったものの、ALT 値の上昇は認められなかった。今後も、様々な実験条件の検討により ALT 値が顕著に上昇する投与条件を設定する必要がある。

トログリタゾンについては、アデノウイルスベクターにより遅延型の ALT 値の上昇が認められた。7日間以内の連投であれば、トログリタゾンに起因すると推定される肝障害が認められたと考えられる。しかし、肝障害発症の原因として炎症・免疫関連因子の検討結果を解析するためには、ウイルスベクターのみでの影響を考慮する必要がある、極めて複雑な解釈になることが予想された。よって、本検討条件における ALT の上昇について検討を進めることが困難になった。最近の我々の研究結果や、論文報告から、獲得免疫系が肝障害に発症に係ることが示唆されているために、CD4+ の解析に適する BALB/c を用いたが、自然免疫系が反応しやすい C57BL/6 を用いた検討を行っておく必要があると考える。

E. 結論

- (1) VA-RNA は shRNA 発現 Ad ベクターにおける RNAi 効果を阻害していることが示された。また、Ad Δ VR ベクターならびに HD-Ad ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。
- (2) 非特異的な Ad タンパク質の発現を抑制可能な改良型 Ad ベクターにヒト CYP3A4 遺伝子を

搭載した Ad-CYP3A4 を作製し、本ベクターが肝障害誘導能の低いベクターであることを明らかにした。また、本ベクターをマウスへ投与した結果、マウス肝臓でヒトと同程度の代謝活性を有するヒト CYP3A4 を発現させることに成功した。また、その活性は少なくとも1週間程度持続することが明らかとなった。本結果は、発現ベクターを用いて代謝活性を有するヒト CYP3A4 をマウスに過剰発現させた世界初の成果である。さらに、本 Ad ベクターを投与後、1週間程度であれば、薬物誘発性肝障害評価への応用が可能であることが示唆された。

- (3) アセトアミノフェン、フルタミド、カルバマゼピン、アミオダロン、トログリタゾンという5つの肝毒性が報告されている薬物を用いて、マウス *in vivo* においてヒト CYP3A4 により肝障害の発症に差異が認められるか検討を行った。しかし、現段階ではいずれの薬物においても肝障害の明確な増悪・緩和は認められず、評価系を確立するには至らなかった。今後は、被験薬やウイルスベクター投与条件のさらなる変更等により継続して検討を進める予定である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Kakuni M., Morita M., Matsuo K., Katoh Y., Nakajima M., Tateno C., Yokoi T. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, 214, 9-18, 2012.
- 2) Higuchi S., Yano A., Takai S., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 130, 4-16, 2012.
- 3) Yano A., Higuchi S., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver in mice. *Toxicology*, 293, 107-114, 2012.
- 4) Kobayashi M., Higuchi S., Ide M., Nishikawa S., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Th2 cytokines-mediated methimazole-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, 32, 823-833, 2012.
- 5) Higuchi S., Kobayashi M., Yano A., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J. Appl. Toxicol.*, 32, 815-822, 2012.
- 6) Iwamura A., Fukami T., Hosomi H., Nakajima M., Yokoi T. CYP2C9-mediated metabolic activation of losartan detected by a high sensitive cell-based screening assay. *Drug Metab. Dispos.*, 39, 838-846, 2011
- 7) Hosomi H., Fukami T., Iwamura A., Nakajima M., Yokoi T. Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, 39, 1388-1395, 2011
- 8) Motegi Y., Katayama K., Sakurai F., Kato T., Yamaguchi T., Matsui H., Takahashi M., Kawabata K., Mizuguchi H. An effective gene-knockdown using multiple shRNA-expressing adenovirus vectors. *J Control Release.*, 153, 149-153, 2011
- 9) Machitani M., Katayama K., Sakurai F., Matsui H., Yamaguchi T., Suzuki T., Miyoshi H., Kawabata K., Mizuguchi H. Development of an adenovirus vector lacking the expression of virus-associated RNAs. *J Control Release.*, 154, 285-289, 2011
- 10) Machitani M., Yamaguchi T., Shimizu K., Sakurai F., Katayama K., Kawabata K., Mizuguchi H. Adenovirus vector-derived

VA-RNA-mediated innate immune responses. *Pharmaceutics*, 3, 338-353, 2011.

- 11) Yamaguchi, T., Kawabata, K., Kouyama, E., Ishii, K. J., Katayama, K., Suzuki, T., Kurachi, S., Sakurai, F., Akira, S., and Mizuguchi, H. Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 17286-17291, 2010
- 12) Hiroko Hosomi, Sho Akai, Keiichi Minami, Yukitaka Yoshikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. An in vivo drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and γ -glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicology in Vitro*, 24, 1032-1038, 2010

F-2. 学会発表

- 1) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: ENHANCEMENT OF ADENOVIRUS VECTOR-MEDIATED RNAi EFFECT BY LACKING VA-RNA EXPRESSION: 第 18 回日本遺伝子治療学会総会、熊本、2012 年 6 月 28-30 日
- 2) 町谷充洋、櫻井文教、立花雅史、形山和史、松井勇人、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: アデノウイルス由来小分子 RNA の欠損による shRNA 発現アデノウイルスベクターにおける RNAi 効果の増強: 第 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌、2012 年 7 月 4-5 日
- 3) 町谷充洋、櫻井文教、形山和史、松井勇人、鈴木孝幸、立花雅史、水口裕之: ウイルス由来小分子 RNA が Short-hairpin RNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果に及ぼす影響に関する検討、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 28-30 日
- 4) 久野 周一、田代 克久、清水 かほり、櫻井 文教、立花 雅史、松村直哉、金 淳二、横井 毅、水口 裕之: ヒト CYP3A4 発現アデノウイルスベクターの開発および薬物誘発性肝障害評価への応用に関する検討、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
- 5) 横井 毅: 薬物性肝障害の予測試験系とバイオマーカー、第 16 回薬物動態談話会セミナー、三島、2012 年 8 月 22-23 日
- 6) 横井 毅: 特異体質性薬物性肝障害の前臨床基礎研究. シンポジウム「薬物性肝障害-最新知見を基に-」、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月 17-19 日
- 7) 矢野 梓、深見達基、中島美紀、横井 毅: 薬物性肝障害の発症機序の解明研究、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月 17-19 日
- 8) 横井 毅: 特異体質性薬物性肝障害モデル. シンポジウム「医薬品開発に貢献した疾病モデル-成果と課題、今後の期待-」、第 59 回日本実験動物学会総会、別府、2012 年 5 月 24-26 日
- 9) 横井 毅: 薬物誘発性肝障害における代謝と免疫の役割、第 26 回日本薬物動態学会ワークショップ、東京、2012 年 4 月 22-23 日
- 10) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅: カルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウス作製およびメカニズム解析、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日
- 11) Tsuyoshi Yokoi: Approaches to predict drug-induced liver injury. 4th Asia-Pacific ISSX Meeting, Symposium, Tainan, Taiwan, April, 2011
- 12) 横井 毅: 特異体質性薬物毒性の回避戦略、第 25 回日本薬物動態学会ワークショップ、東京、2011 年 5 月
- 13) 横井 毅: 薬物誘発性免疫毒性研究の新展開と反応性代謝物の役割、第 18 回 HAB 研究機構学術年会、東京、2011 年 5 月
- 14) 櫻井文教、水口裕之: マイクロ RNA による遺

- 伝子発現制御系を付与した組換えアデノウイルスの開発、第 84 回日本生化学会、京都、2011 年 9 月
- 15) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: Development of a virus-associated RNA-deleted adenovirus vector., American Society of Gene & Cell Therapy, 14th Annual Meeting 2011, Seattle, WA, USA, May, 2011
- 16) 町谷充洋、形山和史、櫻井文教、立花雅史、山口朋子、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: アデノウイルス由来小分子 RNA (VA-RNA) の機能解析に向けた新規ベクターの開発、第 21 回アンチセンスシンポジウム・第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム、大阪、2011 年 9 月
- 17) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: Development of adenovirus vector lacking virus-associated RNA expression、第 17 回日本遺伝子治療学会総会、福岡、2011 年 7 月
- 18) 清水かほり、櫻井文教、立花雅史、水口裕之: マイクロ RNA を利用してウイルス遺伝子の非特異的な発現を抑制可能な新規アデノウイルスベクターの開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月
- 19) 水口裕之: 次世代アデノウイルスベクターの開発と生命科学研究への応用 (第 10 回日本 DDS 学会永井賞受賞講演) 第 26 回 DDS 学会、大阪、2010 年 6 月
- 20) 横井 毅: 代謝物を考慮した薬物誘導性肝障害の予測試験系の検討、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会、沖縄、2010 年 6 月
- 21) 細見浩子、深見達基、岩村 篤、中島美紀、横井 毅: CYP3A4 による代謝的活性化を考慮した薬物誘導性肝障害の高感度試験系 日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京、2010 年 12 月
- 22) 岩村 篤、深見達基、細見浩子、中島美紀、横井 毅: アデノウイルスベクターを用いた CYP2C9 による代謝的活性化の高感度評価系の構築 日本動物実験代替法学会第 23 回大会、東京、2010 年 12 月
- 23) 町谷充洋、形山和史、櫻井文教、山口朋子、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: Virus-associated RNA (VA-RNA) 欠損アデノウイルスベクターの開発と機能評価、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 発明の名称 : VA-RNAs が発現しないアデノウイルスベクター
- 出願番号 : 特願 2011-48013 号
- 出願日 : 2011/3/4
- 出願人 : 国立大学法人 大阪大学
- 発明人 : 水口裕之、形山和史

アデノウイルスベクターを駆使した 薬物誘発性肝障害モデル動物の開発

独立行政法人医薬基盤研究所
幹細胞制御プロジェクト
水口 裕之

今年度は肝障害誘導能の低い改良型ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクターを作製し、本ベクターの *in vitro* および *in vivo* におけるヒト CYP3A4 代謝活性を評価した。また、Ad-CYP3A4 を投与したマウスへ肝障害を誘導することが知られている薬剤（アセトアミノフェンやフルタミド）を投与し、本マウスを用いた薬物評価系が有用かどうか検討した。

研究分担者

- (1) 金沢大学医薬保健研究域薬学系 教授
横井 毅
- (2) 大阪大学大学院薬学研究科 准教授
櫻井 文教
- (3) 小野薬品工業株式会社薬物動態グループ
松村 直哉

A. 研究目的

本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた遺伝子発現制御系を駆使して、薬物誘発性肝障害予測を可能にする簡便なモデル動物作成法の開発を行う。具体的には、(1) *in vivo* 肝臓で簡便かつ効率良く候補遺伝子の発現抑制（ノックダウン）を達成するための RNA 干渉 (RNAi) 誘導 Ad ベクターを開発し、(2) ヒトと齧歯類の肝薬物代謝活性の種差（ヒト<<齧歯類）をなくすために、関連酵素の高効率ノックダウンあるいは強制発現が可能な Ad ベクターを開発する。これにより、ヒトと同程度の解毒能を有するげっ歯類を簡便に作成することが可能となれば、ヒト肝における代謝的活性化による毒性発現を実験動物で再現することが可能となり、新薬開発のスピード化ならびにコスト削減につながる事が期待される。

B. 研究方法

- B-1. ShRNA 発現 Ad ベクターの開発
ヘルパーディペンデント Ad ベクター (HD-Ad) へ shRNA 発現カセットを搭載し、遺伝子発現抑制効果を検証した。
- B-2. アデノウイルスベクター発現制御系の開発
肝障害誘導能の低い改良型 Ad ベクターへ CYP3A4 遺伝子を搭載した新規 Ad ベクターを作製し、ベクター自身の肝障害誘導能を解析した。
- B-3. ヒト CYP3A4 発現アデノウイルスベクターの機能評価
ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクターの *in vitro* および *in vivo* での発現や代謝活性を検証した。
- B-4. アデノウイルスベクター発現制御系を駆使した遺伝子評価系の開発
グルタチオン合成阻害剤 (BSO) と Ad-CYP3A4 を投与したマウスへ肝障害を誘発することの知られる薬剤を投与し、その時の肝障害について解析した。
- B-5. 新規アデノウイルス発現ベクターの *in vitro* および *in vivo* 動態学的評価
Ad-CYP3A4 投与マウスへカルバマゼピン、アミオダロン、トログリタゾン投与した際の肝障害

について解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、各分担研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

C. 研究結果

C-1. shRNA 発現 Ad ベクターの作成

本年度は全てのウイルス遺伝子を欠損させた HD-Ad ベクターについて遺伝子発現抑制能について検証を行った。その結果、HD-Ad ベクターへ shRNA カセットを搭載することで従来の Ad ベクターと比較し、効率良く目的の遺伝子の発現を抑制可能であることが明らかとなった。昨年度および今年度の結果から、VA-RNA は shRNA 発現 Ad ベクターにおける RNAi 効果を阻害していることが示された。また、Ad ΔVR ベクターならびに HD-Ad ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。

C-2. アデノウイルスベクター発現制御系の開発

本年度は、我々が独自に開発した肝障害誘導能の低い Ad ベクターへヒト CYP3A4 cDNA を搭載したベクターの開発を行い、本ベクターをマウスへ投与したときの CYP3A4 蛋白質の発現ならびに肝障害を評価した。その結果、マウス肝ミクロソームの CYP3A4 活性は、コントロールのヒト肝ミクロソームと比較して、同程度であった。さらに、その発現は Ad-CYP3A4 投与 14 日目まで持続することが分かった。また本ベクター自身では、投与 2 日目における肝障害は全く認められなかった。しかしながら、Ad ベクター投与 6 日目以降は、従来の Ad ベクターよりは軽度であるが、肝障害が認められた。従って、Ad ベクターの投与 4 日以内であれば、薬物誘発性肝障害評価への応用が可能であることが示唆された。

C-3. ヒト CYP3A4 発現アデノウイルスベクターの機能評価

Ad ベクターにより導入したヒト CYP3A4 の代謝活性を評価するため、*in vitro* CYP3A4 活性を測定した。その結果、Ad-CYP3A4 投与マウスの肝ミクロソームにおける CYP3A4 活性（デキサメタゾン 6β 水酸化活性）は、ポジティブコントロールとして用いたヒト肝ミクロソーム (HLM) のヒト CYP3A4 活性と同等以上であることが明らかとなった。なお、ヒト HLM と同程度の CYP3A4 活性は少なくとも Ad ベクター投与 8 日後まで持続しており、14 日目においても HLM の 7 割程度の活性があることも明らかとなった。

次に *in vivo* における CYP3A4 活性を測定した。その結果、Ad-CYP3A4 投与マウスの血漿中では、他のコントロール群と比較し、ヒト CYP3A4 の特異的代謝産物である 6β 水酸化デキサメタゾンの AUC_{0-∞} (血中濃度-時間曲線下面積) はおよそ 2 倍に増大していた。したがって、Ad-CYP3A4 を投与することにより、マウス生体内においても有意なヒト CYP3A4 活性が認められることが示された。

C-4. アデノウイルスベクター発現制御系を駆使した遺伝子評価系の開発

予備検討から、グルタチオン合成酵素阻害剤 BSO を飲水投与することでマウス肝臓中のグルタチオン量を有意に減少できることが明らかとなった。そこで、BSO と Ad-CYP3A4 の併用投与したマウスにヒト CYP3A4 による代謝を受け、肝障害を誘発することの知られている薬剤アセトアミノフェンを投与し、本モデル評価系の有用性を検討した。その結果、Ad-CYP3A4 投与マウスにおいてアセトアミノフェン投与による有意な肝障害の上昇は認められなかった。また、アセトアミノフェン同様、ヒト CYP3A4 による代謝を受け、肝障害を誘発することの知られている薬剤フルタミドを投与したが、Ad-CYP3A4 投与マウスの有意な肝障害の上昇は認められなかった。

C-5. 新規アデノウイルス発現ベクターの *in*

vitro および in vivo 動態学的評価

本検討では薬物性肝障害の原因薬物として知られるカルバマゼピン、アミオダロン、トログリタゾンを用いて、CYP3A4 によって生成される反応性代謝物が肝障害に与える影響について、検討を行った。カルバマゼピン、アミオダロンに関する検討を行ったが、Ad-CYP3A4 発現マウスへどちらの薬剤を投与しても肝障害レベルに変化はみとめられなかった。

次にトログリタゾンに関する検討を行った。BALB/c (雌性 8 週齢)マウス にトログリタゾン (1,000 mg/kg in corn oil/day) を 12 日間連続経口投与した。Ad ベクター はトログリタゾン投与開始 1 日後に投与した。血漿中 ALT 値を測定した結果、AdCYP3A4 群では早い段階から、AdGFP 群では、10 日目以降で ALT 値の上昇していた。そこでトログリタゾンを経口投与し、投与 8 日目の AdCYP3A4 群において、ALT 値の有意な上昇が認められた。最近の研究から、薬剤投与による肝障害モデルマウスにおいて、炎症・免疫関連因子の関与が証明されている。そこで炎症・免疫性因子の mRNA を測定した結果、IL-6、IFN-g、FasL、TLR9、Stat3 の発現も上昇傾向が認められたことより、免疫系が活性化していると推定された。しかし、対象群として Ad ベクターと溶媒である corn oil の影響を検討した結果、CYP3A4 および GFP のいずれの Ad ベクター系のみで ALT 値が上昇した。したがって、上述した実験で得られた肝障害性が、Ad による影響を排除できないことが考えられた。

D. 考察

これまでに数多くの shRNA 発現 Ad ベクターに関する研究が報告されており、優れたノックダウン効率が報告されている。しかしながら Ad ベクターは既存の遺伝子導入ベクターの中で最も高い遺伝子発現効率を有しており、その遺伝子導入効率から考えると、それらのノックダウン効率は必ずしも高いとは言えない。昨年度および本年度の研究で、VA-RNA 欠損 Ad ベクターあるいは HD-Ad

ベクターに shRNA を搭載することで、RNAi 効果が増強されることを世界に先駆けて証明した。つまり、Ad ベクターによる RNAi 誘導効果が低い原因の一つとして VA-RNA による阻害が考えられた。

また本年度は、我々が独自に開発した改良型 Ad ベクターにヒト CYP3A4 遺伝子を搭載した Ad-CYP3A4 を作製した。本ベクター投与により従来のベクター同様にマウス肝臓において代謝活性を有するヒト CYP3A4 を発現させることに成功した。本結果は、発現ベクターを用いて代謝活性を有するヒト CYP3A4 をマウスに過剰発現させた世界初の成果である。なお、代謝活性は少なくとも Ad 投与 8 日目まで保持されたことから、本 Ad ベクターを投与し、1 週間程度であれば、ヒト薬物誘発性肝障害評価への応用が可能であることが示唆された。今後、ヒト CYP3A4 のみならず、他のヒト CYP 分子種を過剰発現する Ad ベクターを開発し、げっ歯類に同時に投与・強制発現させることで、より多くの薬剤を対象とした毒性評価が可能になるものと期待される。

さらに本年度はグルタチオン合成酵素阻害剤 BSO と Ad-CYP3A4 の併用投与により、ヒトの代謝能を模倣したマウスが作製できているものと考え、このモデルマウスの有用性を検証した。しかし、ヒト CYP3A4 により代謝され、肝障害を誘発することの知られているアセトアミノフェンやフルタミド、トログリタゾン等を投与しても肝障害の有意な増加は認められなかった。その原因の一つとして、内在性マウス代謝酵素活性の低下が考えられる。例えば、今回評価に用いたアセトアミノフェンは in vitro ではヒト CYP1A2、CYP3A4、CYP2E1 により代謝を受け、肝毒性を示す代謝物が生成することが知られているが、一方でヒト in vivo では CYP2E1 の寄与が大きいという報告もある。また、Ad ベクターによる肝障害発症にかかわる炎症・免疫系が何らかの影響を受けた結果、肝障害発現に至らなかった可能性が考えられる。従って今後は、本モデル動物を用いて、ヒト CYP3A4 による代謝寄与の大きい薬剤についてマウス in vivo 毒性スクリーニングを実施する必要がある。

さらに肝障害発現に関与する免疫系の解析も更に検討する必要があると考えられる。

E. 結論

- (1) VA-RNA は shRNA 発現 Ad ベクターにおける RNAi 効果を阻害していることが示された。また、Ad Δ VR ベクターならびに HD-Ad ベクターは shRNA 発現による標的遺伝子ノックダウンに向けた基盤ベクターとして有用であることが示された。
- (2) 改良型 Ad ベクターにヒト CYP3A4 遺伝子を搭載した Ad-CYP3A4 をマウスへ投与した結果、マウス肝臓でヒトと同程度の代謝活性を有するヒト CYP3A4 を発現させることに成功した。本結果は、発現ベクターを用いて代謝活性を有するヒト CYP3A4 をマウスに過剰発現させた世界初の成果である。
- (3) アセトアミノフェン、フルタミド、カルバマゼピン、アミオダロン、トログリタゾンという5つの肝毒性が報告されている薬物を用いて、マウス *in vivo* においてヒト CYP3A4 により肝障害の発症に差異が認められるか検討を行った。しかし、現段階ではいずれの薬物においても肝障害の明確な増悪・緩和は認められず、評価系を確立するには至らなかった。今後は、被験薬やウイルスベクター投与条件のさらなる変更等により継続して検討を進める予定である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Kakuni M., Morita M., Matsuo K., Katoh Y., Nakajima M., Tateno C., Yokoi T. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, 214, 9-18, 2012.
- 2) Higuchi S., Yano A., Takai S., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Metabolic activation and inflammation reactions involved in

carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 130, 4-16, 2012.

- 3) Yano A., Higuchi S., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver in mice. *Toxicology*, 293, 107-114, 2012.
- 4) Kobayashi M., Higuchi S., Ide M., Nishikawa S., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Th2 cytokines-mediated methimazole-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, 32, 823-833, 2012.
- 5) Higuchi S., Kobayashi M., Yano A., Tsuneyama K., Fukami T., Nakajima M., Yokoi T. Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J. Appl. Toxicol.*, 32, 815-822, 2012.

F-2. 学会発表

- 1) Mitsuhiro Machitani, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hayato Matsui, Tomoko Yamaguchi, Takayuki Suzuki, Hiroyuki Miyoshi, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi: ENHANCEMENT OF ADENOVIRUS VECTOR-MEDIATED RNAi EFFECT BY LACKING VA-RNA EXPRESSION: 第18回日本遺伝子治療学会総会、熊本、2012年6月28-30日
- 2) 町谷充洋、櫻井文教、立花雅史、形山和史、松井勇人、鈴木孝幸、川端健二、水口裕之: アデノウイルス由来小分子 RNA の欠損による shRNA 発現アデノウイルスベクターにおける RNAi 効果の増強: 第28回日本 DDS 学会学術集会、札幌、2012年7月4-5日
- 3) 町谷充洋、櫻井文教、形山和史、松井勇人、鈴木孝幸、立花雅史、水口裕之: ウイルス由来小分子 RNA が Short-hairpin RNA 発現アデノウイルスベクターによる RNAi 効果に及ぼす影響に関する検討、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月28-30日

- 4) 久野 周一、田代 克久、清水 かほり、櫻井 文教、立花 雅史、松村直哉、金 淳二、横井 毅、水口 裕之：ヒト CYP3A4 発現アデノウイルスベクターの開発および薬物誘発性肝障害評価への応用に関する検討、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
- 5) 横井 毅：薬物性肝障害の予測試験系とバイオマーカー、第 16 回薬物動態談話会セミナー、三島、2012 年 8 月 22-23 日
- 6) 横井 毅：特異体質性薬物性肝障害の前臨床基礎研究. シンポジウム「薬物性肝障害-最新知見を基に-」、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月 17-19 日
- 7) 矢野 梓、深見達基、中島美紀、横井 毅：薬物性肝障害の発症機序の解明研究、第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月 17-19 日
- 8) 横井 毅：特異体質性薬物性肝障害モデル. シンポジウム「医薬品開発に貢献した疾病モデル-成果と課題、今後の期待-」、第 59 回日本実験動物学会総会、別府、2012 年 5 月 24-26 日
- 9) 横井 毅：薬物誘発性肝障害における代謝と免疫の役割、第 26 回日本薬物動態学会ワークショップ、東京、2012 年 4 月 22-23 日
- 10) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：カルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウス作製およびメカニズム解析、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

バイオ医薬品の合理的品質管理技術の開発と標準化

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
川崎 ナナ

研究要旨 バイオ医薬品の合理的品質管理技術の開発と標準化を目的として、①品質管理、②新規基材、③ウイルス安全性、④免疫原性に関する研究を実施し、①クオリティー・バイ・デザイン手法を用いたバイオ医薬品の品質管理戦略構築の具体的方法を提示した。また、糖鎖試験に適用される各種分析法について、酸性糖鎖試験法等としての適用可能性及び留意事項を明らかにした。さらに、ELISA等を用いた生物活性試験の信頼性確保の要件を明らかにした。②日本で開発された組換えタンパク質生産用基材であるトランスジェニックカイコについて、バイオ医薬品生産系としての有用性を示すと共に、品質管理に重要なバンクの作製と評価法を提示した。③ウイルス試験の簡便化・高感度化に資する代替人工ウイルス様粒子を設計・調製した。④免疫原性評価の標準的手法の一つである電気化学発光法を用い、抗薬物抗体測定系を構築した。品質管理試験法の標準化に関する研究成果をもとに、抗体糖鎖標準的試験法を公表した。また、表面プラズモン共鳴法を用いた生物活性試験法の日局参考情報原案を提出した。

研究分担者

- | | |
|----------------------------|-------|
| (1) 国立衛研生物薬品部 | 橋井 則貴 |
| (2) 国立衛研生物薬品部 | 原園 景 |
| (3) 国立衛研生物薬品部 | 鈴木 琢雄 |
| (4) 協和発酵キリン(株)生産本部 | 柳原 繁弘 |
| (5) 中外製薬(株)CMC 開発部 | 岡本寿美子 |
| (6) 一般財団法人 化学及血清療法研究所 | 鳥飼 正治 |
| (7) アステラス製薬(株)バイオ・ド・プロジェクト | 森 啓太郎 |
| (8) 大日本住友製薬(株)技術研究本部 | 佐藤 貴之 |
| (9) 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 村上 弘次 |
| (10) 第一三共(株)製薬技術本部 | 古賀 淳一 |
| (11) (株)住化分析センターファーマ大阪事業所 | 岩田 美紀 |
| (12) 武田薬品工業(株)CMC 研究センター | 前田 瑛起 |
| (13) 武田薬品工業(株)CMC 研究センター | 濱地 芳典 |
| (14) (株)東レリサーチセンター | 水野 保子 |
| (15) 持田製薬(株)製剤研究所 | 大庭 澄明 |
| (16) 国立衛研生物薬品部 | 石井 明子 |
| (17) 東レ(株)ケミカルプロセス技術部 | 田中 貴 |
| (18) (独)農業生物資源研究所 | 瀬筒 秀樹 |
| (19) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 | 伊藤 孝司 |
| (20) 群馬大学大学院工学研究科 | 武田 茂樹 |
| (21) 国立衛研生物薬品部 | 遊佐 敬介 |
| (22) 一般社団法人 日本血液製剤機構 | 坂井 薫 |
| (23) 国立衛研生物薬品部 | 新見 伸吾 |
| (24) 中外製薬(株)臨床企画推進部 | 西宮 一壽 |

A. 研究目的

バイオ医薬品の医療上の重要性は増す一方であり、バイオ医薬品開発に対する政府、製薬業界・関連企業及び国民の期待は大きい。厚生労働省は医薬品産業支援と革新的医薬品開発推進の方針を示し、バイオ医薬品開発に関連して、サイエンスとリスクマネジメントプロセスを取り入れたクオリティー・バイ・デザイン(QbD)手法による原薬の開発と製造、非臨床安全性評価、ヒト初回投与試験安全性確保に関するガイドラインを相次いで発出した。

しかし、バイオ医薬品開発には、生体を合成系に利用すること、有効成分がタンパク質であることなどに起因する品質・安全性上の課題が多く存在するため、ガイドラインに述べられた一般原則や新規概念の具現化には、実験科学をベースとした具体的手法の提示が必要である。

本研究では、これらの品質・安全性上の課題に取り組み、具体的な対応方策を見出すことを目的に、4つのテーマに分かれて、国研、企業及びアカデミア等が共同で、バイオ医薬品開発推進のための課題克服に取り組んでいる。4つのテーマは、①品質管理、②新規基材、③ウイルス安全性、④免疫原性であり、各テーマの目的は、①バイオ医薬品の品質管理戦略構築において QbD 手法を活用するための具体的方策の提示、ならびに、品質管理手法としての糖鎖試験法及び生物活性試験法の開発と標準化、②本邦発の新規基材であるトランスジェニック(Tg)カイコの有用性評価と工程管理手法の提示、③ウイルス安全性試験の簡便化に

資する非感染性ウイルス様粒子を用いた新規ウイルス試験法の開発，④免疫原性評価に用いられる抗薬物抗体測定法の標準化である。

本年度は，①QbD 手法を活用したバイオ医薬品品質管理戦略構築において実施されるリスクアセスメントおよびリスク対応の具体的方法の考察，QbD への利用が期待される抗体医薬品のプロセス解析工学(PAT)システムの開発，並びに糖鎖分析法及び非競合 ELISA 法の標準化，②医薬品候補モデルタンパク質の生産と特性解析を通じた新規基材としての Tg カイコの有用性評価，及び，バンク作製と管理手法の考察，③非エンベロープウイルスを模倣した人工ウイルス様粒子の設計と作製，④電気化学発光を用いた抗体医薬品に対する抗薬物抗体の測定方法の構築を行った。

B. 研究方法

1-1. QbD 手法によるバイオ医薬品の品質管理

(1)ICH ガイドライン Q8~Q11, ISO31000, 並びに A-Mab case study を参考にバイオ医薬品の品質確保に関するリスクアセスメントについて考察した。(2)実験計画法により，陰イオン交換カラム操作のモデルデザインスペースを作成した。カラムスイッチング法と LC/MS を組み合わせた PAT システムを構築し，培養工程への適用可能性を評価した。

1-2. 酸性糖鎖等試験法の開発及び標準化

(1) 試料

ヒト α 1 酸性糖タンパク質，抗体，並びに，代表一機関により遊離・精製した糖鎖及びシアル酸結合数毎に分画した試料を用いた。

(2) 分析条件の最適化

分析法として，2AB HILIC/FL，2AA IEX HILIC/FL，2AP RP LC/FL，HPAEC/PAD，APTS CE/FL，2AA CE/FL を選択した。糖鎖の遊離及び精製，誘導体化及び過剰試薬の除去並びに分離の条件の最適化を行った。

(3) 糖鎖プロファイルの評価

分画した試料を用いて，シアル酸結合数及びその他の構造の異なる糖鎖の分離を評価した。

1-3. 生物活性試験法の開発及び標準化

抗 TNF α 抗体医薬品の ELISA 条件を共同検定参加各機関でそれぞれ設定し，6 回測定を行った結果をもとに，良好な結果を得るための試験デザインおよびデータ解析手法，試験成立条件について検討した。また，ELISA と同様に結合性に関する分析法である表面プラズモン共鳴 (SPR) 法について，品質管理試験法として用いる際の留意点をまとめた。

2. 新規基材を用いて製造されるバイオ医薬品の品質安全性確保

(1)リソソーム病治療薬候補カテプシン A，及び，B 細胞リンパ腫治療薬抗 CD20 抗体を中部絹糸腺に発現する Tg カイコを作製し，組換えタンパク質の試験的製造と特性解析を行った。

(2) Tg カイコのバンク化手法について，カイコの系統維持に用いられている組織凍結法の適用可能性を検討した。

3. 新規ウイルス安全性評価系の開発

非エンベロープウイルスである E 型肝炎ウイルス(HEV)の外殻構造を構成するウイルスカプシドタンパク質の産生系を利用し，ウイルス様粒子を作製した。また，ウイルス除去膜のウイルスクリアランス評価を行い，感染性による評価と定量 PCR による評価の結果を比較した。

4. 免疫原性評価法の構築と標準化

モデル抗体医薬品(mAb)をウサギに免疫し，抗 mAb 血清を調製した。抗 mAb 血清から mAb をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーにより抗 mAb 抗体を精製した。mAb を SULFO-TAG 化及びビオチン化し，電気化学発光を用いた抗 mAb 抗体の測定系を設定した。ブロッキングには 3%BSA，抗 mAb 抗体の希釈には 1%BSA を用いた。マトリックス効果は，市販の正常ヒト血清を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

市販品を試料として用いていること，動物を使用していないことから，特に配慮を必要としない。

C. 研究結果

1-1. QbD 手法によるバイオ医薬品の品質管理

「立証された科学及び品質リスクマネジメントに基づく体系的な開発手法」である QbD 手法をバイオ医薬品に活用するための具体的方法について考察した。リスクマネジメントの初期段階で実施されるリスクアセスメントにおいて，「リスク特定」とは品質特性のリスト化，「リスク分析」とは生物活性，PK/PD，免疫原性及び安全性に及ぼす影響の大きさと不確かさを基にしたリスク算定，「リスク評価」とはリスクが受容可能かを判断すること，すなわち重要品質特性(CQA)を特定するプロセスであると考えられた(図 1)。

次に，抗体医薬品をモデルとしたリスク対応のケーススタディーを実施し，陰イオン交換カラム操作の重要工程パラメータ(CPP)を特定すると共

に、溶出液の電気伝導度と pH に関するモデルデザインスペースを構築した。

さらに、カラムスイッチング法を用いた抗体医薬品の製造工程モニタリングのためのプロセス解析工学システムを開発し(図 2)、培養液中の抗体の糖鎖不均一性の確認に適用できることを示した。

1-2. 酸性糖鎖試験法等の開発及び標準化

バイオ医薬品の品質管理に用いられる各種酸性糖鎖等分析法について、多機関共同研究にて分析条件の最適化を行い、各種分析法の特徴を明らかにし、試験法設定において留意すべき事項を検討した。

(1) 糖鎖の遊離

(i)還元状態で PNGase F を作用させる。(ii)還元アルキル化し、トリプシン消化した後、PNGase F を作用させる。(iii)トリプシン消化後、PNGase F を作用させる。(iv)還元アルキル化後、PNGase F を作用させる。(v)界面活性剤存在下、PNGase F を作用させる。などの条件で、ほぼ完全に糖鎖が遊離することを SDS-PAGE 及び MS にて確認した。

(2) 糖鎖プロファイリング

各分析法による糖鎖プロファイルを図 3 に示す。分画試料の分析データ及び/もしくは LC/MS のデータを基に各ピークのシアル酸結合数を推定した。テトラ、トリ、ジ及びモノシアロ糖鎖をそれぞれ、緑色、青色、赤色及び紫色の矢印で示す。

1) 2AB HILIC/FL (機関 A、B、C) 及び 2AB HILIC UPLC/FL (機関 D、C)

概ねシアル酸結合数毎に溶出され、さらにその他の構造の違いにより複数のピークに分離された(図 3 a、b、c)。UPLC を用いた場合、各ピークの分離が向上した(図 1d、e)。

2) 2AA IEX HILIC/FL (機関 E)

各ピークの分離は十分でなく、分析に時間がかかるが、シアル酸結合数毎に分離された(図 3 f)。

3) 2AP RP LC/FL (機関 F)

シアル酸結合数の異なる糖鎖が重なっていることが推測された(図 3 g)。

4) HPAEC/PAD (機関 G、H)

非常に多くのピークが認められ、シアル酸結合数ごとに溶出されていた(図 3 h、i)。

5) APTS CE/FL (機関 I、H、J)

シアル酸結合数の異なる糖鎖が重なって溶出した(図 3 j、k、l)。

6) 2AA CE/FL (機関 E)

ホウ酸錯体陰イオン形成を利用した 2AA CE/FL では、主要なテトラシアロ糖鎖とトリシアロ糖鎖が重なって溶出した(図 3 m)。

(3) 抗体由来糖鎖の CE/FL

頑健性・特異性の高い CE/FL 分析条件を得た。

1-3. 生物活性試験法の開発及び標準化

1-3-1. ELISA

非競合法 ELISA を用いた生物活性試験法に関し、試験条件設定法、及び、試験成立条件について検討した。

(1) 試験条件設定における実験計画法の有用性

選択した試験条件を同時に変動させ、一部実施法により最適化を行う方法、及び、試験条件をいくつかのブロックに分割し、完全実施法により最適化を行う方法の 2 種を用いたところ、どちらの方法でも良好な測定結果が得られる測定条件を設定することが出来た。

(2) 試験デザインおよびデータ解析手法

共同研究参加 6 機関でそれぞれ条件設定して実施した ELISA の結果を用い、試験デザインおよびデータ解析手法として、以下の方法について検討した(図 4)。

方法 1: 1 濃度の抗体試料について、検量線との比較により試料中の抗体の活性濃度を求め、相対力価を算出する方法

方法 2: 3 濃度の抗体試料について、検量線との比較により各試料中の抗体の活性濃度を求め、平均化して相対力価を算出する方法

方法 3: 標準品と試料の用量反応曲線から EC50 をそれぞれ算出し、EC50 シフトにより相対力価を算出する方法

方法 4: 平行線検定により力価を算出する方法

各機関の測定結果を上記の方法で解析した場合の試料の真度の一覧を表 1 に示した。(i)検量線を用いた定量では、複数濃度の試料による定量で良好な真度、精度が得られること、(ii)EC50 シフトによる定量では、重み付けを行うことで、検量線を用いた定量と同等以上の真度、精度となるケースが多いこと、(iii)平行線検定では検量線を用いた定量と同等の真度、精度であることが明らかになった。

(3) 各試験デザインに適した試験成立条件

上記の試験デザインおよびデータ解析手法で使用可能であると考えられた試験成立条件(下記(a)~(f))について検討した。

(a) QC 試料(既知濃度試料)を用いた試験成立の判定

(b) 試料の定量濃度の CV 値を用いた試験成立判定

(c) 検量線を用いて back-calculation した検量線用標準物質濃度の真度・精度を用いた試験成立判定

(d) 検量線の形状による試験成立判定

(e) 標準物質と試料の用量反応曲線の類似性

(f) 直線性、平行性の判定

試験デザインや解析手法によらず、試料の真度と QC 試料の真度には乖離が見られ、(a)は試験成立判定として適切でなかった。(b),(c)では良好な判定が出来た。(d)では検量線の形状を決める各パラメータの数値のばらつきが大きく、試験成立条件としての汎用性が低かった。(e)として、extra sum of square 法 (標準物質と試料に共通する回帰式を適用した場合と、個別の回帰を適用した場合の残差平方和を比較する方法)、及び、equivalence test (回帰式のパラメータ等に予め許容範囲を設定する方法)について検討した。extra sum of square 法では判定がデータのばらつきの影響を受けるため、equivalence test が適していると考えられた。また、(f)についても、データのばらつきが判定に影響した。

1-3-2. SPR

SPR 法を用いた結合性試験について、装置、測定法、データ解析法、品質管理試験への適用 (システム適合性の設定法等) に関する解説と留意点をまとめ、日本薬局方参考情報原案を作成した。原案は、日本薬局方原案審議委員会生物薬品委員会に提出した。

2. 新規基材を用いて製造されるバイオ医薬品の品質安全性確保

新規基材として開発が進む Tg カイコについて、モデルタンパク質の試験的製造と特性解析を通じた基材としての有用性評価、ならびに、バンキングシステムを中心とした工程管理手法の検討を行った。

(1) リソソーム病治療薬候補タンパク質カテプシン A を発現する Tg カイコを樹立し、15,000 頭での組換えタンパク質発現、精製に成功した。精製されたカテプシン A には、主にパウチマンノース型、及び、高マンノース型糖鎖が付加されており (図 5)、抗原性を示すことが懸念されるフコシル化糖鎖は検出されなかった。カテプシン A はマンノース受容体を介した細胞内への移行、及び、リソソーム酵素の活性化作用を有していた。また、細胞膜透過性ペプチドを付与したカテプシン A は、リソソーム病患者由来線維芽細胞において、蓄積シアル酸含有糖鎖の分解作用を示した。また、Tg カイコを用いて抗 CD20 抗体を生産し、その特性解析を行った。カイコ由来抗体は、CHO 細胞由来抗体と比較して、高い抗体依存性細胞傷害活性を示すことが明らかになった (図 6)。抗体の収量は、カイコ 1 頭あたり約 570 μg であり、細胞を用いた抗体医薬品の工業生産における培養上清約 1ml 分に相当した。

(2) カイコの系統維持の手法として確立されてい

る卵巣凍結保存・卵巣移植、精子凍結保存、及び、人工授精の方法に改良を加え、Tg カイコへの適用可能性を検討した。卵巣凍結保存・卵巣移植については、産卵率が 20%~54% となり、比較的高い受精卵産卵率が得られた。2 系統の凍結精子について人工授精を行った結果、受精率は 89%、92% となり、通常交尾と比べて遜色の無い結果が得られた。これらをマスター・トランスジェニック・バンクとし、冷蔵保存した卵をワーキング・トランスジェニック・バンクとするバンク化による管理が可能と考えられた (図 7)。

3. 新規ウイルス安全性評価系の開発

(1) ウイルスクリアランス評価試験の効率化のため、安全で微量でも検出され得る人工ウイルス粒子の作製を試みた。HEV の ORF2 遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを Tn5 細胞に感染させ、カプシドタンパク質を産生させた。培養上清に産生されたカプシドタンパク質は自己集合によってウイルス様粒子として回収された。上清中のウイルス様粒子を密度勾配遠心法等によって精製し、高純度のウイルス様粒子を得た (図 8)。このウイルス様粒子にウイルス粒子数をモニターするための DNA を取り込ませた。その結果、HEV のカプシドタンパク質からなるウイルス外殻を持ち、ウイルス粒子数モニター用の短鎖 DNA を内部に持つ人工ウイルス粒子を作製することができた。

(2) 核酸増幅法によるウイルス検出に関する技術的な問題点について検討を行った。感染価では検出限界以下であった HAV や B19 が、定量 PCR ではウイルス除去フィルター処理後のろ液中に比較的高濃度で観察されることが明らかになり、感染性評価法と PCR 法の違いが見出された。ろ液に含まれる DNA は、そのほとんどが 1.0kb 以下の断片であることが分かった。

4. 免疫原性評価法の構築と標準化

抗薬物抗体測定法の評価に用いるためのモデル抗薬物抗体として、ウサギ抗 mAb 血清約 40mL から抗 mAb 抗体を約 80 mg 精製した。常法に従って電気化学発光測定に用いる標識 mAb 等の各種試薬を調製し、抗 mAb 抗体の標準曲線を作成した結果、良好な濃度依存性を示し (表 4, 図 9)、定量限界は約 50 ng/mL であった。

ヒト血清のマトリックス効果を検討した結果、0.1%の添加で 10 分の 1 以下と著しく反応性が低下した。1%及び 10%のヒト血清添加により、反応性がさらに 2 分の 1 及び 3 分の 1 に低下した (表 4, 図 9)。このような反応性の低下は、ヒト血清の代わりにヒト IgG を用いた場合にも観察された。

しかし、ヒト血清の添加により反応性が低下した条件においても、約 100 ng/mL の抗 mAb 抗体を測定することができた。

D. 考察

1-1. QbD 手法によるバイオ医薬品の品質管理

リスク分析の際に考慮すべき安全性等への影響については、市販後に明らかになる可能性があることから、ライフサイクル全般にわたる品質安全性確保のためには、リスクアセスメントの継続的な実施が重要であると考えられた。また、デザインスペースの運用にあたり、許容範囲等の妥当性の説明方法が今後の課題であると考えられた。本研究により開発した工程解析工学システムは、培養条件の最適化やモニタリングに活用することが可能であり、QbD 手法による品質管理戦略に貢献するものと考えられる。

1-2. 酸性糖鎖等試験法の開発及び標準化

酸性糖鎖は、生体内半減期に影響を及ぼすことが知られており、エポエチンでは、糖鎖の分岐、ラクトサミン構造、結合様式なども *in vivo* 活性に影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで、酸性糖鎖の糖鎖試験では、このような構造の違い・変化を見分けられることが求められる。各種 HPLC 及び CE の分析条件を最適化し、適用可能性を評価した。

$\alpha 1$ 酸性糖タンパク質由来糖鎖には、シアル酸付加数及びフコース付加数の異なるバイアンテナからテトラアンテナ糖鎖が含まれている (図 3 参考図)。2AB HILIC (UPLC)/FL, HPAEC/PAD, 2AA IEX HILIC/FL は、シアル酸結合数の異なる糖鎖及びその他の構造の違いを見分けることが可能であることが示された。いずれの分析法も、比較的長い分析時間を要することから、試験設定の際には、目的の製品の糖鎖パターン及び見分けるべき糖鎖構造を基に、分析条件を設定する必要がある。また、方法選択に当たっては、各ピークの帰属方法も考慮する必要がある。

また、抗体由来糖鎖を用いて CE/FL を用いた中性糖鎖試験法の検討を行い、試験設定時に考慮すべき点を明らかにし、標準的試験法を作成した。

本年度末に実施した班会議では、(i)糖鎖試験は示性値または純度試験であると考えられ、有効性に関与する場合は示性値として、安全性に関与する場合は純度試験として取り扱われることになるのではないかと。(ii)定性及び定量的な試験としてシステム適合性を設定する必要があるのではないかと。(iii)糖鎖試験に用いる標準物質としては、検体の標準物質が最も推奨される。などが議論された。

1-3. 生物活性試験法の開発及び標準化

本研究で明らかになった、ELISA に適した試験デザインおよびデータ解析手法、試験成立条件について表 2 に示した。今回検討を行った試験成立条件について概観すると、検量線を用いた定量的な場合は、濃度ごとに判定基準となる真度、精度を設定することで、厳しい試験成立判定が可能と考えられる。しかし、それ以外の定量においては、データのばらつきが大きいほど判定が甘くなる方法が多い。判定が甘くなると、試験の不良により本来の活性と異なる数値となったケースの排除が困難になるため、equivalence test などによりどれだけ厳しく判定できるかが、試験法を設定する上での鍵となると考えられる。本研究成果をもとに、ELISA をバイオ医薬品の品質管理試験に適用する際の留意点をまとめ、日局参考情報原案を作成する予定である。

2. 新規基材を用いて製造されるバイオ医薬品の品質安全性確保

Tg カイコは、高マンノース型糖鎖の付加を必要とするタンパク質や、抗体依存性細胞傷害活性を期待する抗体医薬品の生産基材として有用であると考えられた。カテプシン A の糖鎖解析結果から、中部絹糸腺に発現させた組換えタンパク質には、抗原性が懸念される分岐型フコースを持つ糖鎖は付加されにくいと考えられた。抗体の発現量は、カイコ 1 頭分が動物細胞培養上清 1ml に相当することが明らかになったが、これについてはさらなる向上が望まれる。

Tg カイコのバンク化は、卵巣及び精子の凍結保存技術の改良により、実現可能と考えられた。作製された Tg バンクの評価・管理においては、表 3 に示すようなバンクの特性解析試験、純度試験、保存時の安定性評価を実施するとともに、作出された個体に関しても試験が必要と考えられる。

3. 新規ウイルス安全性評価系の開発

HEV カプシドタンパク質を利用して人工ウイルス様粒子を構築することができた。粒子内にモニター用の短鎖 DNA を取り込ませる効率は (< 1 copy/VLP)には改良の余地があり、DNA 取り込み時の詳細な条件検討が必要であると考えられた。

また、ウイルス除去フィルター処理後にも定量 PCR で検出された B19 の DNA は、そのほとんどが 1.0kb 以下の断片であったことから、ウイルスクリアランス能評価の際には、定量 PCR では、感染性のない DNA 断片も検出されていることを考慮する必要があると考えられる。

4.免疫原性評価法の構築と標準化

抗 mAb 抗体の測定系にヒト血清を添加した際に見られる反応性の低下 (表 4, 図 9) は, 抗原とした mAb の定常部に対して産生された抗 mAb 抗体がヒト血清中の IgG に結合することが原因と考えられた. ヒト IgG と結合する抗 mAb 抗体を除去し, mAb の可変部を認識する抗 mAb 抗体を用いて測定系を再検討することが次年度の課題である. なお, mAb の可変部のみを抗原として用いることによりこの問題を回避できる可能性が考えられたが, 本来の構造と異なる mAb を使用することから, 立体構造の変化に伴い抗原となるエpitepopeが変化している可能性及び Fc 領域に存在する糖鎖を認識する可能性のある抗体が産生されないなどの問題点が予想されたため, 本研究では採用しなかった. 実際, FDA は非公式とはしているものの, 可変部のみを抗原とする方法を推奨していない.

E. 結論

① 品質管理

クオリティー・バイ・デザイン手法を用いた品質管理戦略構築の具体的方法として, リスクアセスメントにおけるリスクの特定, 分析, 評価は, それぞれ, 品質特性のリスト化, 各品質特性の有効性/PK・PD/免疫原性/安全性への影響と不確かさの算定, 重要品質特性の選定, を行うプロセスであるとする考え方を提示した. また, 独自に開発したプロセス解析工学システムが, 培養工程で糖鎖不均一性をモニタリングする手法として有用であることを実証した.

酸性糖鎖の糖鎖プロファイリングに求められる要件を明らかにし, 酸性糖鎖の 2AB HILIC/FL, HPAEC/PAD, 2AA IEX HILIC/FL は, 酸性糖鎖試験法として適していることを確認した. また, 抗体糖鎖の標準的試験法を作成し公表した.

ELISA の試験条件設定における実験計画法の有用性, 良好な結果を得るための試験デザインおよびデータ解析手法, 各試験デザインで適した試験成立条件を明らかにした. また, SPR 法に関する日本薬局方参考情報原案を生物薬品委員会に提出した.

② 新規基材

本邦発の生産基材である Tg カイコは, 高マンノース型糖鎖付加を必要とする糖タンパク質や抗体依存性細胞傷害活性を必要とする抗体の生産に有用であることを明らかにした. また, 凍結卵巣・精子によるバンク化の手法及びその評価・管理手法を提示した.

③ ウイルス安全性

ウイルスクリアランス工程評価試験に用いられるモデルウイルスの代替となる人工ウイルスとして, E 型肝炎ウイルスのカプシドタンパク質を外殻に持ち, ウイルス粒子数モニター用の短鎖 DNA を内部に持つ人工ウイルス様粒子を設計・調製した.

④ 免疫原性

免疫原性評価の標準的手法の一つである電気化学発光法を用い, 良好な感度を有する抗 mAb 抗体測定系を設定することができた. ヒト血清を添加した場合, 反応性が低下するという問題が見出されたが, その測定感度は FDA の推奨値(250~500 ng/mL)を十分に満たしていた.

F. 研究発表

1) 海外

原著論文による発表	1 件
総説等の発表	1 件
学会発表	3 件

2) 国内

原著論文による発表	0 件
総説等の発表	6 件
学会発表	18 件

主な研究発表

海外: 総説等

- 1) Kuribayashi R, Nakazawa S, Kawasaki N: N-glycan profiling by LC/MS. Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD). <http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow.action>

海外: 学会発表

- 1) Itoh K, Nishioka S, Tsuji D, Maita N, Kobayashi I, Sezutsu H, Harazono K, Ishii A, Kawasaki N, Machii H: Transgenic silkworm as a novel therapeutic glycoenzyme resource for lysosomal storage diseases. 26th International Carbohydrate Symposium (ICS 2012) in Madrid, Spain(2012.7)
- 2) Niimi S: Risk factors, clinical consequence and mitigation of immunogenicity. Immunogenicity for Biopharmaceuticals & Biosimilars Asia (2012.10) Singapore
- 3) Niimi S: Requirement for Approval of Biotechnology-derived Pharmaceuticals in the Clinical trials from the Perspective of Immunogenicity-consideration Based on the Examination Reports 2nd Novel Immunotherapeutics. Summit Immunogenicity

国内：総説等

- 1) 原園 景, 橋井則貴, 栗林亮佑, 高久明美, 柳原繁弘, 西 基宏, 岡本寿美子, 津田祐理子, 中島和幸, 森啓太郎, 筑紫周子, 佐藤貴之, 四方 靖, 村上弘次, 掛樋一晃, 木下充弘, 神末和哉, 阪口-阿部 碧, 川崎ナナ: 抗体医薬品の標準的糖鎖試験法: 2-アミノベンザミド誘導体化及び親水性相互作用クロマトグラフィー/蛍光検出. (印刷中: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2013年4月号掲載予定)
- 2) 遊佐敬介: バイオ医薬品のウイルス安全性. バイオ(抗体)医薬品における不純物/凝集の評価・試験と免疫原性, ウイルス安全性への対応, サイエンス&テクノロジー, 270-278, 2012
- 3) 新見伸吾: バイオ医薬品の免疫原性予測方法. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, vol.44, 26-35 (2013)
- 4) 新見伸吾: バイオ医薬品の免疫原性が薬物動態, 有効性, 安全性に及ぼす影響とその軽減戦略. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, vol.44, 114-122 (2013)

国内：学会発表

- 1) 原園 景, 橋井則貴, 寺崎さち子, 栗林亮佑, 川崎ナナ: 液体クロマトグラフィー, キャピラリー電気泳動及び質量分析を用いた抗体医薬品糖鎖プロファイリング法の比較. 日本薬学会第133年会(2013.3) 横浜

- 2) 川崎ナナ, 中澤志織, 栗林亮佑, 多田 稔, 石井明子, 橋井則貴: バイオ医薬品ヒト初回投与試験のリスク低減に向けて -抗体医薬品作用機序の解析. 日本薬学会第133年会(2013.3) 横浜
- 3) 石井明子, 多田 稔, 川崎ナナ: トランスジェニックカイコを用いた抗体医薬品開発の可能性と課題. 日本薬学会第133年会シンポジウム「カイコを用いた新規医薬品と評価システムの開発」(2013.3) 横浜
- 4) 瀬筒秀樹: カイコの遺伝子工学と応用. 日本薬学会第133年会シンポジウム「カイコを用いた新規医薬品と評価システムの開発」(2013.3) 横浜
- 5) 伊藤孝司: トランスジェニックカイコを用いたリソソーム病治療薬の開発. 日本薬学会第133年会シンポジウム「カイコを用いた新規医薬品と評価システムの開発」(2013.3) 横浜
- 6) 新見伸吾: バイオ医薬品の免疫原性のリスク因子の予測・評価方法, 有効性及び安全性に及ぼす影響, リスクを低下させるための実践的開発・市販後調査を探る. 薬事エキスパート研修会, 第6回品質/科学技術特別研修(2012.9) (大阪, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 1件
 - 1) 特願 2013-005478 「抗 TNF α 抗体親和性ペプチド, ペプチドカラム, 及び抗 TNF α 抗体親和性ペプチドのスクリーニング方法」
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

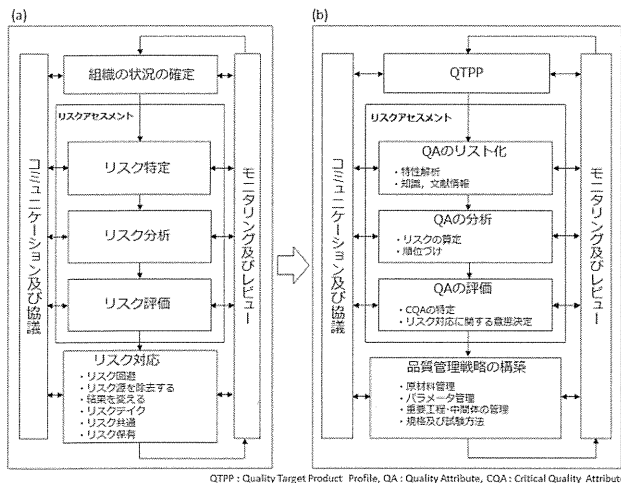


図1 ISO31000に示されているリスクマネジメントプロセス(a), 及び, バイオ医薬品品質保証におけるリスクマネジメントプロセスの例(b)

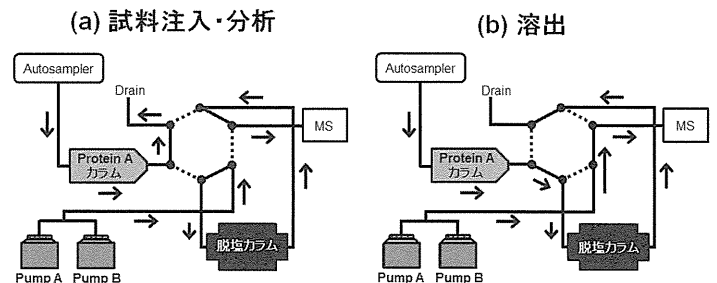


図2 カラムスイッチングと質量分析を用いた抗体医薬品の糖鎖不均一性解析のための工程解析工学システム

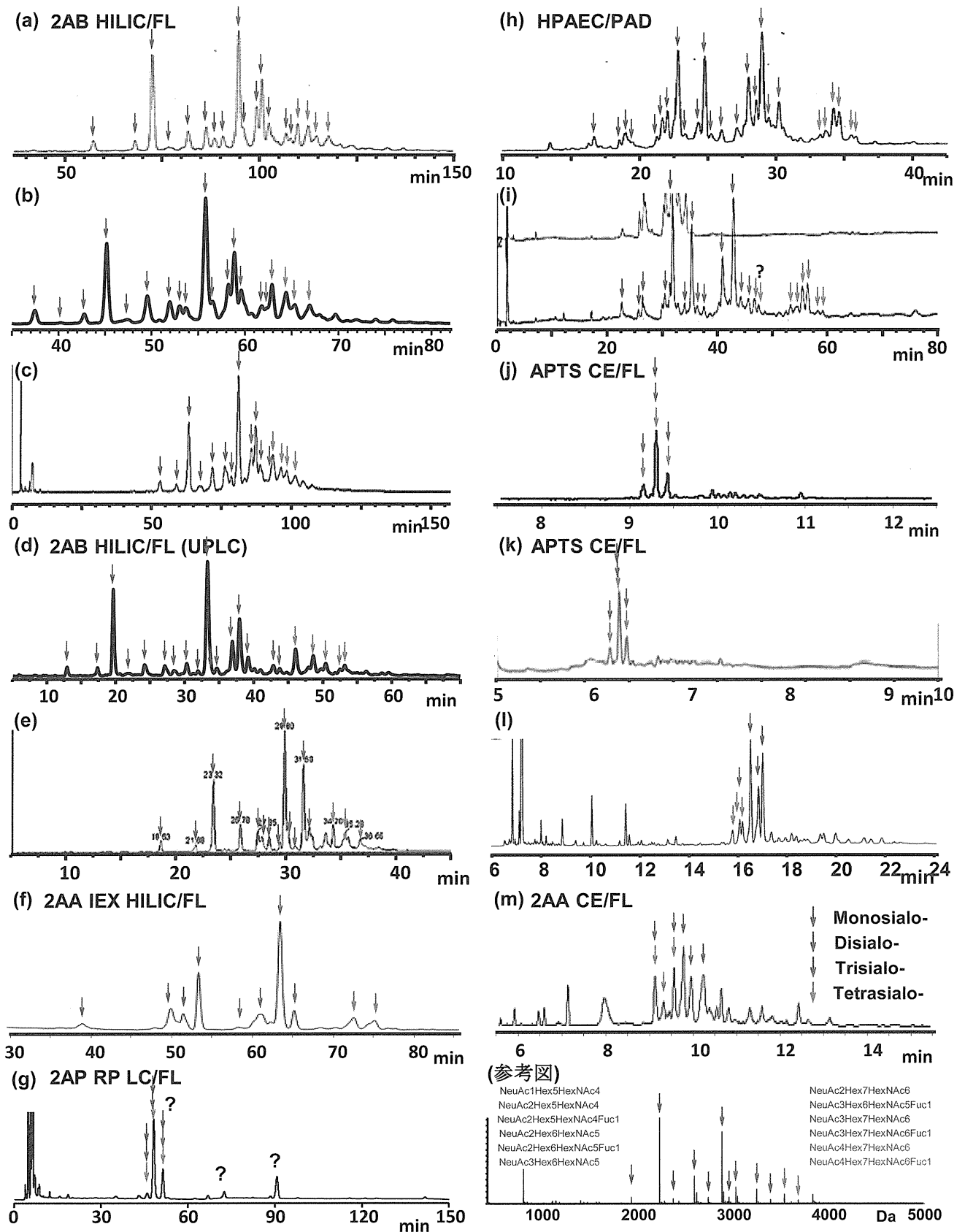
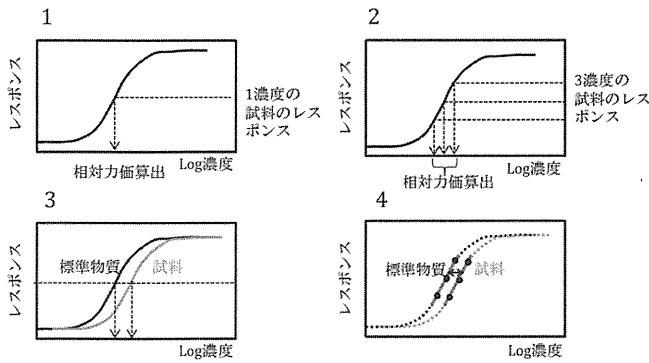


図3 各種分析法による $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質由来糖鎖の糖鎖プロファイリング

2AB HILIC/FL (a, b, c), 2AB HILIC UPLC/FL (d, e), 2AA IEX HILIC/FL (f), 2AP RP LC/FL (g), HPAEC/PAD (h, i), APTS CE/FL (j, k, l), 2AA CE/FL (m), 結合している糖鎖(参考図:ESI MS)



	検量線を用いた定量				EC50シフト (*3)				平行線検定 (*4)
	4-parameter		5-parameter		4-parameter		5-parameter		
	1濃度の試料 (*1)	3濃度の試料 (平均値) (*2)	1濃度の試料 (*1)	3濃度の試料 (平均値) (*2)	制約なし	制約あり	制約なし	制約あり	
機関A	平均 91.1	96.1	101.8	103.8	101.8	104.1	100.9	103.7	103.3
	SD 3.1	3.9	4.5	4.1	3.7	6.4	2.4	5.9	5.3
機関B	平均 94.5	97.1	96.4	97.8	104.3	95.7	104.5	94.2	98.4
	SD 8.0	6.8	10.4	7.7	3.2	9.1	3.9	9.4	7.4
機関C	平均 104.1	97.3	97.8	91.2	83.6	81.3	84.8	83.4	85.9
	SD 7.4	6.5	7.0	7.1	7.2	7.9	7.1	7.4	9.0
機関D	平均 94.8	105.5	97.4	102.8	103.7	103.2	102.9	103.0	102.9
	SD 1.6	1.4	1.5	1.2	5.3	6.4	6.3	6.5	5.8
機関E	平均 91.8	97.3	95.7	96.4	93.7	96.3	93.4	96.3	96.6
	SD 2.7	2.7	2.7	3.0	3.0	2.4	3.2	2.5	2.5
機関F	平均 97.8	101.9	100.2	99.4	99.1	99.2	99.2	99.2	99.4
	SD 2.7	2.7	2.7	2.2	2.7	2.2	2.3	2.1	2.2

括弧内の*番号は図4の1-4に対応

制約なし：標準物質と試料について個別に回帰してEC50値を比較

制約あり：標準物質と試料の回帰曲線の形状を同一としてEC50値を比較

図4 ELISAの試験デザインおよびデータ解析手法

表1 ELISA各機関での6回測定における真度の平均および真度のSD

(1) 試験デザインおよび解析方法

方法	留意点
検量線	複数濃度の試料より定量結果を得る 4-PL, 5-PLは適宜選択 重み付けは不要 試料の希釈方法, プレート配置に注意する
EC50シフト	多くのケースで重み付けが必要 4-PL, 5-PLで結果は同等
平行線検定	広い濃度範囲で直線であることが必要

(2) 試験成立条件

方法	条件	結果	留意点
検量線	試料の定量値のCV値	○	
	定量範囲における検量線用標準物質の真度のCV値	○	
	定量範囲における検量線用標準物質の真度	○	
	検量線の各パラメータの数値	×	ばらつきが大きい (特に5-PL)
EC50シフト	QC試料の真度	×	試料の希釈方法, プレート配置が重要
	パラメータの比を用いたequivalence test	○	5-PLでは値が大きく外れることがある
	残差平方和の比較	△	データのばらつきが大きいほど判定が甘い
	標準物質・試料の回帰曲線パラメータの数値	×	ばらつきが大きい (特に5-PL)
平行線検定	QC試料の真度	×	試料の希釈方法, プレート配置が重要
	直線性, 平行性	△	データのばらつきが大きいほど判定が甘い

(4-PL: 4-parameter logistic回帰, 5-PL: 5-parameter logistic回帰)

表2 ELISAの試験デザイン, 解析方法, 及び, 試験成立条件に関する研究結果概要

糖ペプチド(D328-W359)溶出画分のマスペクトル(43.2-44.0 min)

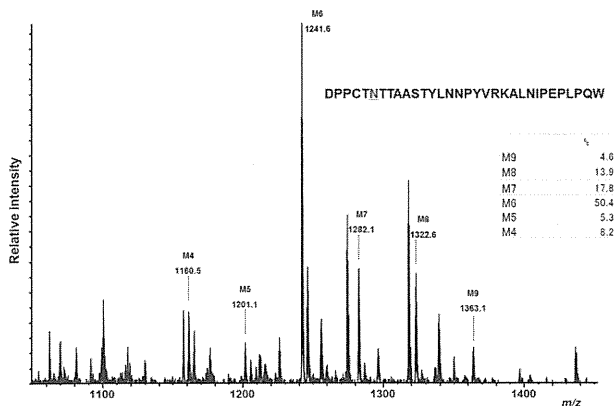


図5 カイコ発現カテプシンAの糖鎖解析

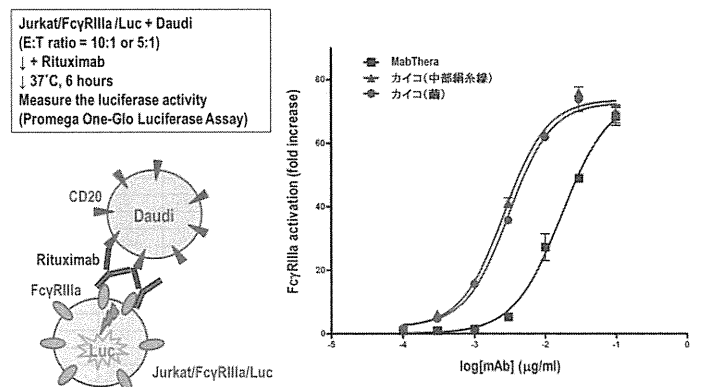


図6 カイコ由来抗CD20抗体のADCC活性