

201433008A (1/7)

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）

医薬品・医療機器の実用化促進のための  
評価技術手法の戦略的開発  
(H26-創薬-一般-008)

平成26年度 委託業務成果報告書  
第1/7分冊 総括研究報告書

テーマ3 研究成果の活用

業務主任者：斎藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部  
担当責任者：高柳 輝夫 ヒューマンサイエンス振興財団

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）による委託業務として、国立医薬品食品衛生研究所（斎藤嘉朗）及び研究分担責任者が実施した平成26年度「医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

## I. 委託業務成果報告（総括）

医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の

戦略的開発 . . . . . 1

齋藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

研究成果の活用（成果発表会開催等の成果活用） . . . . . 51

高柳 輝夫（ヒューマンサイエンス振興財団）

## III. 学会等発表実績及び研究成果の刊行物別刷

各テーマの分冊に掲載のため、略

# I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

医薬品・医療機器の実用化促進のための評価技術手法の戦略的開発

総括責任者 齋藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

研究要旨

本研究は、医薬品・医療機器メーカーにおける開発現場のニーズに基づいて、戦略的にテーマ設定された、非臨床段階における主として安全性に関する標準的評価法を、医薬品関係として5種、医療機器関係で2種、それぞれ新規開発することにより、本邦における医薬品・医療機器開発の効率化を行い、幅広い医薬品・医療機器開発の底上げを図ると共に、試験系として広く実用化することを目的とする。H26年度は評価系の構築を主として行った。全6テーマの研究内容と成果は、以下の通りである。また、平成27年2月26日に、公開で成果発表会を開催した。

**①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築**

非臨床試験段階で、医薬品候補化合物の安全性等を適切に評価できるバイオマーカー (BM) は、医薬品開発の効率化をもたらすとされる。本研究は、非臨床試験段階において、主として腎・肝障害発症の指標となりうる内在性分子候補を探索すると共に、その BM 候補としての選定において、適格性に影響を及ぼす重要な因子の解明により、BM の標準的評価法を構築することを目的とした。モデル動物の血液を用いたメタボロミクス解析結果に基づく実践的検討を主として行い、腎障害や体内薬物動態の評価につながりうる複数の BM 候補を見いだした。さらに有意差が認められる代謝物から BM 候補を絞り込む際には、多変量解析やクラスター解析が有用であると考えられ、また選定には、変動幅、再現性、共通性、背景としての個体差等、統計学的な数値、病理診断結果や生物学的な関連性等が重要であると考えられた。また副作用 BM の診断方法の開発も行った。

**② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立**

遺伝毒性試験の標準的組合せとして、*in vitro* 遺伝子突然変異試験 (Ames 試験) と、数種類の *in vivo* 試験法から2つ以上を選択して遂行する規定が、ICH S2(R1)ガイドラインに追加された。しかし試験の組み合わせに関する十分なデータはなく、標準的評価スキームの構築が求められている。本研究は、特徴的な遺伝毒性化合物について評価を行い、化合物のリスクを勘案した最適な試験法の組合せを確立する。今年度は、2-ニトロアニソール (ラット膀胱発がん物質)、タモキシフェン (抗腫瘍剤・ラット肝発がん物質)、ジメチルヒドラジン (ラット大腸がん発がん物質) を対象に組合せ試験を実施した。結果を総合的に考察し、『未知化合物について実施する試験の組合せの第一選択は、エンドポイントと標的臓器が異なる、小核試験 (末梢血もしくは骨髄) と TG 試験 (肝臓) が高い感度を示す』という仮説を得た。

**③新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発**

インフュージョン (IF) 反応は、抗体医薬品等の薬剤投与中または開始後24時間以内に現れる症状であり、医薬品開発段階で予測する適切な *in vitro* 試験系はない。その発症機序の一部は IgE 依存的であり、牛肉等のアレルゲン上の糖鎖構造 ( $\alpha$ -Gal) に対する IgE が、キメラ抗体上の  $\alpha$ -Gal と交差反応して発症する。本研究は、牛肉アレルギー患者血清を用いて、血清中 IgE のセツキシマブへの交差反応性を検討するとともに、ヒト化培養マスト細胞株を

用いる独自の試験法 (EXiLE 法) 等により、牛肉アレルギー患者血清中 IgE の、セツキシマブ等による架橋を調べることによる IgE 依存的な IF 反応の *in vitro* 予測系を確立する。本年度は、牛肉アレルギー患者血清中 IgE がセツキシマブ重鎖の  $\alpha$ -Gal と結合することを示すと共に、モデル抗原を用いて EXiLE 法の条件検討を行ない、IgE の結合性と架橋活性とは必ずしも一致しないことを示した。また、ヒト単球様培養細胞株の樹状細胞様細胞への分化条件の検討を行ない、各種マーカー抗原の発現により分化を確認した。

#### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

標的分子に選択的に作用するといわれる分子標的薬においても様々な副作用が認められるが、その一部は標的分子と異なる生体分子に作用するオフターゲット効果である。本研究は、オフターゲット効果のうち、発現レベル変化の評価法を確立する。今年度は、SNIPER 法によるプロテインノックダウンをモデル実験系として、タンパク質発現の網羅的プロテオーム解析及びユビキチン化タンパク質の網羅的解析を行った。網羅的プロテオーム解析より、ユビキチン化の網羅的解析が、分解を運命づけられているタンパク質を多数、感度良く選択的に解析できることが示されたが、ユビキチン化部位の周辺のアミノ酸配列に検出が左右されることも明らかとなった。また、標的タンパク質の表面に結合できるヘリカルペプチドとユビキチンリガーゼに結合するリガンドとをつなぐことで標的タンパク質の分解を誘導できる膜透過性複合ペプチドを開発した。さらに、オフターゲット効果を生む機序を解明するプラットフォームを創出するために、クラスター化させることにより高い親和性を保持した多価型ペプチドライブラリーを基盤上に数百のレベルで合成する技術を確立した。

#### ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

肝臓での動態、代謝、毒性試験に近年汎用されるようになった新たな肝細胞資源と新規培養基材等とを組み合わせることで、よりヒト肝に近い培養環境の動態、代謝、毒性試験及び薬効評価に汎用される肝細胞培養系の供給を目指し、研究を行った。その結果、コラーゲンビトリゲル薄膜チャンバー (ad-MED ビトリゲル) を用いた培養法は、創薬段階における開発化合物の肝代謝評価へ応用できる可能性が示唆された。また、ヒトキメラマウス由来へパトサイト PXB-cells は、長期間にわたり肝機能を維持し、それぞれの移植ドナー肝細胞が固有に持つ性質を有していると考えられ、*in vitro* 試験利用に有用なヒト肝細胞ソースとなり得ることが示された。また HDL 産生トランスポーター ABCA1 の肝型発現誘導が ad-MED ビトリゲルや肝培養細胞ソースの評価に利用できる可能性が示された。

#### ⑥ プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

溶血性試験は血液接触型医療機器に要求されるが、ISO/TC194/WG9 の国際試験において、日本の方法は諸外国の公定法に比して感度的に劣ることが判明した。また、DEHP 等の可塑剤は炎症誘導能を有するが、これを評価する *in vitro* 試験法はない。本研究は、感度及び操作性を向上させた簡易溶血性試験法と新たな炎症誘導能評価法の開発・普及を目指す。今年度は、溶血特性の異なる 8 種の標準材料を使用して簡易溶血性試験法の性能を 3 種の公定法と比較した。簡易溶血性試験法は各公定法と同等以上の感度で各検体の溶血能を探知できると共に、新規血液バックの素材候補 (DOTH/DINCH) 配合 PVC シートの溶血特性も評価可能であった。また、当該シートの溶血抑制能と可塑剤溶出量の間には明瞭な相関性が観察された。今後、その標準化を目指した研究を行う。また、可塑剤の炎症誘導能はヒト細胞に対する IL-6 産生誘導能を指標として評価できることが判明した。ATBC は炎症誘導能の低い代替可塑剤として利用できると共に、臨床使用条件下における TOTM 配合 PVC 製血液回路からの可塑剤溶出量は非常に低く、炎症誘導を惹起する可能性は低いことが示唆された。今後、製品レベル等の評価を行い、本評価法の有用性を検証する。

## 研究分担者

### ①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築

前川京子 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

小松弘幸 (株) シミックバイオリサーチセンター研究本部長

上田哲也 プレシジョン・システム・サイエンス (株) 診断システム開発本部マネージャー

杉山雄一 理化学研究所社会知創成事業イノベーション推進センター特別招聘研究員

楠原洋之 東京大学大学院薬学系研究科教授

河原崎正貴 (株) マルハニチロホールディング中央研究所主任

### ② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部室長

高木久宜 日本エスエルシー (株) 専務取締役

松元郷六 (一財) 残留農薬研究所副部長兼室長

真田尚和 科研製薬 (株) 新薬創生センター研究員

堀妃佐子 サントリービジネスエキスパート (株) 安全性科学センター課長

### ③新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

中村亮介 国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部室長

森田栄伸 島根大学医学部皮膚科学教室教授

### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

内藤幹彦 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医

薬部長

栗原正明 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部長

西川喜代孝 同志社大学生命医科学部教授

### ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

石田誠一 国立医薬品食品衛生研究所薬理部室長

最上知子 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部長

竹澤俊明 (独) 農業生物資源研究所上級研究員

柿木基治 エーザイ株式会社筑波研究所主任研究員

青山晋輔 積水メディカル (株) 薬物動態研究所試験研究部代謝グループ長

立野知世 (株) フェニックスバイオ研究開発部取締役研究開発部長

田辺宗平 興和 (株) 東京創薬研究所長

### ⑥プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法2種の開発

齋島由二 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部室長

鄭 雄一 東京大学大学院工学系研究科教授

柚場俊康 川澄化学工業 (株) 研究開発部研究開発三課長

坂口圭介 テルモ (株) 研究開発本部主席研究員

### ⑦研究成果の活用

高柳輝夫 (公財) ヒューマンサイエンス振興財団理事長

## A. 研究目的

本研究は、医薬品・医療機器メーカーにおける開発現場のニーズに基づいて、戦略的にテーマ設定された、非臨床段階における主として安全性に関する標準的評価法を、医薬品関係として5種、医療機器関係で2種、それぞれ新規開発することにより、本邦における医薬品・医療機器開発の効率化を行い、幅広い医薬品・医療機器開発の底上げを図ると共に、試験系として広く実用化することを目的とする。H26年度は評価系の構築を主として行った。全6テーマの研究内容と成果は、以下の通りである。

### ①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築

バイオマーカー (BM) は、医薬品開発の効率化及び適正使用に資するとして注目されている。非臨床試験段階で、予測性高く、医薬品候補化合物の安全性等を適切に評価できる BM は、「Stop or Go」決定を可能とするとともに、企業に莫大な損害をもたらす臨床試験における開発中止を阻止できることから、その開発が強く望まれている。近年、内在性代謝物を網羅的に測定するメタボロミクス解析が注目を集めている。表現型発現に直結しており、種特異性が低いことから、非臨床から臨床まで適用可能な安全性等の BM となりうると期待される。

腎障害や肝障害は、臨床試験における開発中止の主要原因であり、その発生を未然または早期に予測できる BM が必要とされている。また腎疾患に対する有効性 BM は、医薬品開発の迅速化・効率化を目指す上で有用と考えられる。一方、医薬品の体内動態を予測しうる内在性代謝物は薬物相互作用の検出に有用である。

以上より、本研究は、主として非臨床試験段階において、腎・肝障害発症の指標となりうる内在性分子候補、医薬品の薬物動態を反映しうる薬物トランスポーターの基質を探索すると共に、その BM 候補としての選定において、適

格性に影響を及ぼす重要な因子の解明により、BM の標準的評価法を構築することを目的とした。さらに、より利用しやすい BM の方法論確立のため、日本人におけるフェノバルビタール誘因性重症薬疹の発症と関連する、*HLA-B\*51:01* についてタグ多型を見だし、簡単安価に診断しうる迅速タイピング系を構築した。

### ② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

ICH ガイドライン S2 (R1) に、遺伝毒性試験の標準的組合せとして、*in vitro* 遺伝子突然変異試験 (Ames 試験) と、二つ以上の *in vivo* 試験法を選択して遂行するオプションが追加された。しかし、試験法により標的臓器、投与期間、サンプリング時期等が異なることから、実際にどの組み合わせが適切であるかに関しては十分なデータがなく、開発現場では標準的評価スキームの構築が求められている。本研究は、特徴的な化合物について異なる試験を実施し、化合物のリスク評価に最適な試験法の組み合わせを確立することを、3年間の目標とする。

具体的には、①F344 ラットに膀胱および腎臓発がんを引き起こす2-ニトロアニソール (2-NA) をモデル化合物として、感度、検出可能時期の点から最適な *in vivo* 試験法の組合せを検討するとともに、Ames 試験で陽性という既知の報告の検証を行う。さらに、培養細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験のデータも得る。②抗腫瘍剤であり、かつラット肝発がん物質でもあるタモキシフェン (TXF) を用いて、造血細胞を用いた *in vivo* 試験二種類に加えて、代謝物評価への有用性が期待される肝細胞を用いた小核試験を実施する。③Ames 試験陰性のラット結腸発がん物質 1、2-ジメチルヒドラジン



(DMH) を用い、当該物質による発がんの可能性を捕捉可能な二種類の *in vivo* 試験の組合せを検討する。

### ③新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

インフュージョン (IF) 反応は薬剤投与中または投与開始後 24 時間以内に現れる症状の総称であり、抗体医薬品などでしばしば発生する。そのメカニズムには不明な点が多いが、IgE 依存性のものと非依存性のものがある。IF 反応を開発段階で *in vitro* 試験により予測する手法はまだ確立されておらず、その手法の開発は医薬品開発に有用と考えられる。

IgE 依存性の IF 反応のうち有名なものは、ヒト・マウスのキメラ IgG1 抗体であるセツキシマブによるものである。米国では、セツキシマブによるアナフィラキシーのエピトープが galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -Gal 糖鎖) であること、この抗体保有者が牛肉などの獣肉アレルギーを起こすことを明らかにされている。エピトープである  $\alpha$ -Gal 糖鎖は、牛肉、豚肉などの獣肉にも含まれる。本研究では、まず牛肉アレルギー患者血清中の IgE がセツキシマブに反応するか否かを確認する。さらにヒト化培養ラットマスト細胞株を、アレルギー患者血清中の IgE で感作し、特異抗原を添加して Fc $\epsilon$ RI の架橋に基づくマスト細胞の活性化を簡便・高感度に測定しうる独自手法「EXiLE 法」を用いる。本研究では、IF 反応の原因となり得るアレルギー患者血清中 IgE の抗体医薬品等との交差反応性を評価するため、牛肉アレルギーを含む多種類のアレルギーの患者血清を用い、EXiLE 法等により評価系を構築することを目標とする。今年度は、まず卵白アルブミン (OVA) 等の各種

モデル抗原を用いた本手法の特徴と信頼性の評価を行なった。

また IF 反応には IgE 非依存性のものがあることを考慮し、バイオリジクス医薬品のアレルギー性を検出するための培養細胞を用いた試験系の構築も開始した。アレルギーの発症の第一段階は T 細胞の感作であり、その初期にはアレルギーによる樹状細胞の活性化のステップがあることから、本年度はヒト単球様培養細胞株から樹状細胞様細胞への分化技術の確立を行った。

### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

標的分子に選択的に作用するといわれる分子標的薬においても様々な副作用が認められているが、その一部は標的分子と異なる生体分子に結合して発現するオフターゲット効果であると考えられている。本研究では、分子標的薬のオフターゲット効果評価方法の標準化を目指して、タンパク質発現の網羅的プロテオーム解析とユビキチン化タンパク質の網羅的解析を行い、その評価方法の妥当性を検討する。またオフターゲット効果を厳密に評価するために、ペプチド工学を用いて標的分子をアイソザイムレベルまで峻別できる分解能を持った制御分子の開発に資するプラットフォーム技術を開発すること、並びにヘリカルペプチドをリガンドとして利用した新規膜透過性複合ペプチドの開発を行う。

### ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

創薬プロセスにおいて、新規医薬品候補化合物の肝臓での動態、代謝、毒性を早期に効率よ

く予測できる試験系の開発が希求されている。現在は主に初代培養肝細胞が用いられているが、ドナー間差や調製方法によるばらつきや供給量に限りがある。また、必ずしもヒト肝での動態、代謝、毒性が再現されてはいない。より安定した再現性の高い細胞の供給と培養方法の確立が必要である。iPS 細胞から分化誘導した肝細胞の開発が期待されているが、未だ分化状態が未成熟であり、代謝機能などの点で初代培養肝細胞に劣っている。一方で、HepaRG 細胞やキメラマウス由来ヒト肝細胞など実用性の高い新規培養細胞ソースが開発され、利用され始めている。本研究は、肝臓での動態、代謝、毒性試験に近年汎用されるようになった新たな肝細胞資源（HepaRG 細胞、ヒト化キメラマウス由来肝細胞等）と新規培養基材等とを組み合わせることで、よりヒト肝に近い培養環境の動態、代謝、毒性試験及び薬効評価に汎用される肝細胞培養系の供給を目指す。指標として、薬物代謝能、代謝酵素誘導能に加え、リポタンパク産生能や新たに発見した肝型トランスポーターの誘導能等を対象とする。

## ⑥プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

溶血性試験は血液接触型医療機器に要求される安全性試験の一項目であるが、世界的に標準化された評価法が存在しない。現在、当該試験の国際標準化を行うため、ISO/TC194/WG9 が国際ラウンドロビンテストを行っているが、日本のガイドライン法（MHLW 法）は諸外国が採用している公定法と比較して感度的に劣ることが判明した。また、血液透析回路等においては、長期治療に伴う慢性炎症を回避する必要があるが、その炎症誘導能を *in vitro* で評価する

試験法は確立されていない。

本研究では、これらの課題を解決することを目的として、感度及び操作性を向上させた簡易溶血性試験法と新たな炎症誘導能評価法の開発・普及を目指す。平成 26 年度は、我々が開発を進めている新規血液バッグ用素材やその他の標準品等を評価用材料として、家兎及び青酸化合物を用いることなく、高感度に溶血性を評価する簡易試験系を構築し、その性能を代表的な公定法と比較検討した。また、ヒト細胞からのサイトカイン放出を指標とする *in vitro* 炎症誘導能評価法を構築し、可塑剤溶出挙動との相関性を解析した。

## ⑦研究成果の活用

得られた成果を広く国民、特に実用化の担い手である企業研究者に発信し、新しい医薬品・医療機器の開発に資する官民共同研究を促進することを目的とする。

## B. 研究方法

### ①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築

#### 1) 腎障害モデル動物の作製と表現型解析、及び血漿メタボローム解析による腎障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

6 週齢の雄性 SD ラット（1 群 8 匹）に、3 種の薬剤、ゲンタマイシン（低用量・高用量）、シスプラチン、及びアムホテリシン B を投与し、腎障害モデルを作製した。生理食塩水投与ラットを対照とした。各薬剤投与前（0 時間）、及び最終投与から 6、24、96 時間後、血液を採取し、常法に従って血清を分離した。採取した血清は、尿素窒素（BUN）及びクレアチニンを測定すると共に、メタボローム解析に供した。尿は投与

前（投与 24 時間前から 0 時間までの蓄積尿）、投与後 6 時間（投与から 6 時間までの蓄積尿）、24 時間（投与 6-24 時間までの蓄積尿）、96 時間（投与 72-96 時間までの蓄積尿）を採取した。採取した尿中の N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAG）、グルコース（Glu）、総タンパク（TP）、クレアチニン及び Kim-1 (kidney injury molecule) を測定した。腎臓は、投与 5 日後に 24 時間絶食させ、麻酔下放血した後、採取した。常法に従い、病理検査を実施した。

血清メタボローム解析は、Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出した後、超高性能液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析計を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。

## 2) 肝障害モデル動物の作製、及び血漿メタボローム解析による肝障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

薬物性肝障害モデル動物は、肝脂肪化を惹起するタモキシフェンを用いて作製した。具体的には、6 週齢の SD ラット（一群 10 匹）にタモキシフェン（10mg/kg 及び 20 mg/kg）及びコントロール溶媒（メチルセルロース）を経口投与した。投与後 8 日目、15 日目、29 日目に前日から一晩絶食した後、EDTA-2K チューブを用いて腹大動脈から採血し、血漿を調製した。各採血ポイントで個体を安楽死させ、肝臓を採取した。

血漿メタボローム解析では、メタノールにより脂質を抽出した後、高速液体クロマトグラフ及びベンチトップ型 Orbitrap フーリエ変換質量分析計を用いて、網羅的に測定した。

## 3) バイオマーカー値を用いた、ヒト生体における薬物動態の予測法確立

非臨床から臨床への外挿性検討のため、有機アニオントランスポーター OATP (Organic anion transporting polypeptide) およびシト

クロム P450 の一種 CYP2C8 に着目し、阻害剤投与条件下で変動するバイオマーカーを見出すために臨床研究を実施した。24 名の健康成人を対象とし、レパグリニド、ピタバスタチン、ピオグリタゾンの 3 剤をカセット単回投与（試験 1、被験者 24 名）、3 剤カセット+クロピドグレル単回投与（試験 2、被験者 8 名）、3 剤カセット+リファンピシン単回投与（試験 3、被験者 8 名）、3 剤カセット+トリメトプリム（ST 合剤として）単回投与（試験 4、被験者 8 名）を行った。薬剤濃度測定及びメタボローム解析のために血液を遠心分離し、血漿サンプルとして凍結保存した。

## 4) 薬物動態関連蛋白質のノックアウト動物等の調製とメタボローム測定

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型 (PFIC1) の原因遺伝子である ATP8B1 遺伝子のマウスホモログである Atp8b1 に、PFIC1 で見出された変異 (G308V) を導入した遺伝子改変マウス（ホモ型、ヘテロ型）及び野生型マウスを対象とし、常法に従い、ヘパリン血漿を採取した。また、Oatp1a (Oatp1a1-Oatp1a6) 及び 1b2 を欠損した Oatp1a/1b クラスターノックアウトマウス (Oatp1a/1b KO, 8 週齢, 雄) 及び野生型マウス (Wt, 8 週齢, 雄) を対象とした。ノックアウトマウス及び野生型マウスは 3 週間の混在飼育の後、16 時間以上絶食させ、麻酔下において心臓採血を行い、常法に従い、EDTA 血漿を採取した。血漿中のメタボローム測定は、上記の腎障害ラットの血清中のメタボローム測定と同様の手法を用いた。

## 5) 高血圧発症腎疾患モデル動物の作製と包括的代謝物測定の検討

高血圧を背景とし、発症機序の異なる 2 種のラットを腎疾患モデル動物として用いた。自然

発症高血圧ラット (Spontaneous Hypertensive Rat) (SHR/Izm) (n=10) とその対照動物として Wistar Kyoto Rat (WKY/Izm) (n=10) (ともに雄性、入荷時 8 週令)、及び食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl-Iwai S) (DIS/Eis) (n=10) とその対照動物として食塩抵抗性ラット (Dahl-Iwai R) (DIR/Eis) (n=10) (ともに雄性、入荷時 4 週令) を用いた。

採尿 (16 時間蓄尿) は、高食塩飼料の給餌開始前に 1 回、給餌開始後は第 4 及び 8 週に行った。採尿の間、餌は与えず、水は自由に摂取させた。高食塩飼料を 8 週間摂取させた後、麻酔下で、腹大静脈から全採血し EDTA 血漿及び血清を分離した。採血後、速やかに肝臓、腎臓及び心臓を採取し、病理組織学的検査を実施した。

高塩分給餌開始前、給餌開始後第 4 及び 8 週時に得られた尿及び血清について、クレアチニン等の生化学的検査を実施した。高塩分給餌開始前、及び摂取 8 週後に得られた尿を対象とし、<sup>1</sup>H-NMR メタボリック・プロファイリングによる包括的代謝物解析を行った。

#### 6) 重篤副作用に関連する複数の安全性バイオマーカーの同時診断系の検討

抗てんかん薬であるフェノバルビタールによる薬疹の発症に関連する *HLA-B\*51:01* のタグ多型となりうる 2 か所の遺伝子多型 (rs2596560, rs2442736) を対象とし、BIST (Beads in Single Tip) 法を用いた迅速タイピング系を構築した。解析結果を TaqMan 法またはシーケンス法による結果と比較することで、BIST 法での検出が可能であるかを検討した。

#### ② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

##### 1) 2-ニトロアニソール (2-NA) の *gpt* 遺伝子

##### 突然変異試験 (*gpt* アッセイ : TG 試験の一種)

Slc:WistarHannover/Rcc-Tg (*gpt delta*) ラットに、0、87.5、175 または 350mg/kg 体重/day (1 日 1 回) の用量で、2-NA をコーン油に混和して 28 日間の反復強制経口投与を (各群 5 匹) 行った。陽性対照群として *N*-エチル-*N*-ニトロソウレア (ENU) を 50mg/kg 体重/day の用量で 5 匹に 5 日間 (1 日 1 回) の腹腔内投与を行った。合わせて、投与後の一般状態観察、体重、摂餌量、摂水量測定を実施した。投与終了後 3 日目に採材した。肝臓から RecoverEase™ DNA Isolation Kit でゲノム DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子点突然変異体頻度 (MF) の測定を行った。膀胱のゲノム DNA 抽出はフェノールクロロホルム抽出にて行った。Ames 試験はアセトンを溶媒とし、*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 および *E. coli* WP2uvrA 株を用いて、プレインキュベーション法を実施した。

##### 2) 2-NA の膀胱と肝臓におけるコメット試験および骨髄小核試験

発がん試験で用いられた系統である F344 ラットを用いて、2-NA を対象に実施した。両試験を同一動物で行うため、3 回強制経口投与を行った。さらに、28 日間反復経口投与された *gpt delta* ラット (上記 1)) から得た血液で、新規の *in vivo* 遺伝毒性試験である *Pig-a* assay を行った。また 2-NA はコメット試験において検出が困難な DNA 損傷を引き起こしている可能性も考えられたため、DNA 酸化損傷を検出する目的で hOGG1 (human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1) を用いたコメット試験を同時に実施した。

##### 3) 2-NA の TK アッセイ

培養細胞を用いた *in vitro* 遺伝子突然変異試験である TK アッセイを、代謝活性化系存在下及び非存在下で、2-NA を対象に実施した。ヒトリンパ芽球細胞 (TK6) を、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 µg/mL の用量の 2-NA で処理し、コールター

カウンターによる細胞濃度の計測により細胞毒性を、トリフルオロチミジン耐性を指標に突然変異コロニーを検出した。溶媒である DMSO を陰性対照に、アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸 (MMS、10 µg/mL) を陽性対照に用いた。

#### 4) タモキシフェン (TXF) を対象とする試験

6 週齢の雄性 SD ラットに 0.5% (w/v) メチルセルロースに懸濁させた TXF クエン酸塩を 250、125、62.5 及び 31.3 mg/kg の用量 (n=6) で 3 日間反復経口投与を行い、最終投与後 2 日目に末梢血小核試験、7、14 及び 28 日目に *Pig-a* assay、28 日目に肝臓小核試験を実施した。合わせて、投与後の一般状態観察、体重測定及び多染性赤血球数測定も実施した。

#### 5) 1、2-ジメチルヒドラジン (DMH) を対象とした試験

DMH を F344 系統 *gpt delta* 雄性ラットに 1 日 1 回、28 日間 (day1-28) の強制経口投与を行った。投与最終日の翌日 (day29) および 3 日後 (day31) に肝臓、大腸、骨髄を採材し *gpt* アッセイおよび小核試験を行った。投与前日 (day0)、day4、15、29 および day31 に末梢血を採取し、小核試験を行った。

### ③ 新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

#### 1) 牛肉アレルギー患者血清の収集

牛肉や豚肉の摂取後にアレルギー症状を示し、血清中牛肉特異的 IgE が陽性を示す 10 名、牛肉アレルギーの既往がなく、血清中牛肉特異的 IgE が陰性の健常人 4 名を対象として収集した。

#### 2) 牛肉アレルギー患者血清の結合性の解析

患者血清を用いてセツキシマブを抗原とした IgE 免疫ブロット法により、セツキシマブ特異的 IgE の有無を検討した。さらにセツキシマブを過ヨウ素酸処理して糖鎖を開裂し、患者血清中 IgE

の結合性の変化を検討した。

#### 3) 抗体および抗原

2 種の抗 OVA マウスモノクローナル IgE 抗体 (E-C1, E-G5) は購入した。OVA を 1 mg/ml に溶解し、ヒートブロックを用いて 90°C に 3 分間および 15 分間加熱し、氷中に急冷した。

#### 4) EXiLE 法

RS-ATL8 細胞を 96 ウェルプレートに  $5 \times 10^4$  cells/50 µl ずつ播種し、100 倍希釈した患者血清または 10 ng/ml の抗 OVA マウスモノクローナル IgE 抗体 (E-C1, E-G5) を添加して終夜培養した。滅菌 PBS によりウェルを洗浄後、10% の非働化ウシ胎児血清を含む MEM 培地に懸濁した抗原溶液で 3 時間細胞を刺激し、ルシフェラーゼによる発光量を測定した。細胞の活性化は、抗原未刺激時の発光量を 1 とする相対値で表し、2 倍をカットオフとした。

#### 5) EXiLE 法の技術移転

RS-ATL8 細胞の営利企業における使用にあたっては、その親株である RBL-SX38 細胞の権利者である、Harvard 大学 Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC) との調整が必要となる。今回、本研究実施のための RS-ATL8 細胞の使用について BIDMC に問題がないことを確認した上で、RS-ATL8 細胞の授受を行なった。また、EXiLE 法の技術習得のため、国立医薬品食品衛生研究所において、MeijiSeika ファルマ (株) および鳥居薬品 (株) の協力研究者への講習および実験見学を行なった。

#### 6) 樹状細胞様細胞株の分化

ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞の培養は、RPMI 1640 培地に終濃度 10% FBS、50 mM 2-mercaptoethanol 存在下、培養した。樹状細胞様細胞への分化誘導は、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および

Interleukin-4 (IL-4) をそれぞれ終濃度 20 ng/mL で THP-1 細胞に曝露し、72 時間培養することにより行った。その後、total RNA を抽出した。THP-1 細胞から樹状細胞様細胞への分化状態の評価は、形態観察および単球マーカー CD14、樹状細胞マーカー CD11c, CD209 の発現量の変動をリアルタイム RT-PCR 法による比較定量法を用いて解析することにより行った。

#### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法 開発

##### 1) LC/MS によるタンパク質発現の網羅的プロテオーム解析

エストロゲン受容体 (ER) のノックダウンを引き起こす SNIPER (ER) 処理によるタンパク質の量的変化を LC/MS により網羅的に解析した。ヒト乳がん細胞 MCF7 を  $1.2 \times 10^6$  cells/well の割合で 6 well plate に播種し、細胞接着後にコントロール溶媒 (DMSO) もしくは SNIPER (ER) で処理した。6 時間後、PBS で 1 度洗った後に細胞を溶解し、アセトン沈殿によりタンパク質を濃縮精製した。トリプシン処理でペプチド化した後、そのペプチドをカラム精製し、LC/MS でショットガン解析した。また、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。

##### 2) ユビキチン化タンパク質の網羅的解析

SNIPER 処理により細胞内タンパク質が分解される時にユビキチン化される (図 1) ことを利用して、ユビキチン化タンパク質の網羅的な MS 解析を行った (図 2)。この手法は、ユビキチンへ高い親和性で結合する人工タンパク質である TUBE (Tandem Ubiquitin Binding Entity) とユビキチン C 末端由来の GG (グリシン・グリシン) に対する特異的抗体を利用して、ポリユビキチン化されたタンパク質 (ペプチド) を濃

縮精製するので高感度で特異性が高いと期待される。

ヒト乳がん細胞 MCF7 を  $1.0 \times 10^7$  cells/well の割合で 10 cm dish に播種し、細胞接着後にコントロール溶媒 (DMSO) もしくは SNIPER (ER) で処理した。ユビキチン化タンパク質のプロテアソーム分解を防ぐため、阻害剤である MG132 も同時に処理した。4 時間後、PBS で洗浄後の細胞を溶解し、ビオチン化した TUBE とアビジン標識磁気ビーズを用いてユビキチン化タンパク質を濃縮精製した。トリプシン処理でペプチド化した後、抗 GG 抗体で免疫沈降し、ユビキチン化基質タンパク質由来のペプチドをさらに濃縮精製した。ペプチドをカラム精製し、LC/MS でショットガン解析した。また、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。

##### 3) 膜透過性複合ペプチドの合成研究

ER を標的タンパク質とした。ER のタンパク質表面に結合するペプチドは Peptidomimetic estrogen receptor modulators (PERMs) とした (図 3)。細胞膜を通過させるために膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンを用いた。PERM の C 末端に 7 つのアルギニンからなるオリゴアルギニン (R7) を結合させた複合ペプチド PERM-1-R7、PERM-3-R7 を合成した。さらに膜透過性を確認するために、フルオレセインでラベル化した FAM-PERM-1-R7、FAM-PERM-3-R7 も合成した。細胞膜を透過した PERM-1-R7、PERM-3-R7 が ER と結合することを確認するために、ER-コアクチベータ結合阻害能の評価、ER の転写阻害活性の評価を行った。

##### 4) 多価型ペプチドシート合成技術の確立

制御分子開発のためには多価型ペプチドライブラリー法を基本とする。多価型ペプチドライブラリーは、Lys 3 個から構成される核構造に

ペプチドライブラリー（ランダム化されたペプチド）が4本結合した構造をしている（図4）。本ライブラリーを標的分子のアフィニティークラムにかけ、強く結合した画分を回収後、順次ランダム化したポジションについてアミノ酸シーケンスを行なうことにより、最適結合モチーフを決定してゆく。本研究では、高い親和性を保持した配列既知の多価型ペプチドライブラリーを、セルロースシートあるいはスライドガラス等の基盤に数百のレベルで合成した（図5）。この際、スペーサーを介して結合した多価型ペプチドライブラリーの密度、ならびにシート面からの距離を標的タンパク質に対して立体的に最適化した。本シートを標識標的分子あるいは部位特異的変異体でブロックし、サブトラクションすることにより、結合親和性ならびに部位特異性に優れた結合モチーフを絞り込んだ。系を確立するために使用する標的分子としては、腸管出血性大腸菌が産生する主要な病原因子である Shiga toxin(Stx)を使用した。Stxには2種のファミリーが存在し、さらにStx1には3種の、Stx2には、7種の異型が存在しており、類似した分子を峻別する分子基盤の解析に有用である。

## ⑤ 新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

### 1) 新規肝代謝・動態等評価法の開発

ヒトキメラマウス由来ヘパトサイトPXB-cellsはフェニックスバイオ社より購入した。PXB-cellsをコラーゲンコートプレート及びad-MEDビトリゲル上で培養し、薬物代謝酵素の活性及び遺伝子発現の変化、誘導性の変化を観察した。また、ヒト肝細胞前駆細胞HepaRGをad-MEDビトリゲル上で培養し、薬物代謝酵

素の活性及び遺伝子発現の変化、誘導性の変化を観察した。

### 2) 新規基材を用いた肝代謝・動態等評価系の施設間差データのとりまとめ

ヒト凍結肝細胞をad-MEDビトリゲルで培養した後、ヒトにおけるチトクロームP450(CYP)代謝酵素活性についてPhenacetine(CYP1A2)、Tolbutamide(CYP2C9)、S-Mephenytoin(CYP2C19)、Bufuralol(CYP2D6)及びMidazolam(CYP3A4)を暴露させ代謝活性を検討した。

### 3) 新規基材を用いた肝代謝・動態等評価系構築と化合物を用いた評価

ヒト胆管がん由来細胞2株（肝内胆管がん由来TKKK細胞および肝外胆管がん由来TFK-1細胞）を理化学研究所バイオリソースセンターより購入して培養を開始するとともに、それぞれ十分なストックを調製して液体窒素中に凍結保存した。

### 4) キメラ動物由来ヒト肝細胞の特性解析

異なる3ドナー（ドナーA:Hispanic、2歳、女兒、ドナーB:Caucasian、2歳、女兒、ドナーC:African American、5歳、男児）由来の凍結ヒト肝細胞を用いてそれぞれ作製された置換率90%前後のヒト肝細胞キメラマウス(PXB-mouse)から2段階コラーゲンゼラグラフィーによりヒト肝細胞(PXB-cells)を回収した。PXB-cellsをI型コラーゲンコートプレート上で3週間培養し、アルブミン産生能、薬物代謝酵素{ヒト(h)CYP1A1, hCYP2C9, hCYP2D6, hCYP3A4, hUGT1A1, hUGT2B6}遺伝子発現量、CYP3A4活性、hCYP1A1, hCYP1A2, hCYP3A4の誘導能について解析を行った。

### 5) リポタンパク産生系に着目した肝細胞機能評価法の開発

HDL形成膜トランスポーターABCA1の肝型・

末梢型 mRNA バリエーションの発現ならびにコレステロールによる発現応答について、コラーゲンビトリゲル膜チャンバー (ad-Med ビトリゲル) 培養の影響、HepaRG 細胞での発現レベルと誘導能を評価した。

#### 6) リポタンパク産生の解析手法の確立

HDL の機能として、泡沫化したマクロファージからのコレステロール搬出能の測定法を検討した。また HDL の性状を、2次元電気泳動法を用いて解析する手法を検討した。

### ⑥プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

#### 1. 溶血性試験用材料

ISO/TC194/WG9 が実施している溶血性試験国際ラウンドロビンテスト用標準品であるポリエチレン (PE: 陰性対照)、Latex glove (LG: 弱陽性対照)、Buna rubber (BR: 弱陽性対照) 及び Nitrile glove (NG: 陽性対照) は Nelson Laboratories 社 (米国)・Michelle Lee 博士から提供された。非イオン性界面活性剤 Genapol X-080 含有ポリ塩化ビニル (PVC) シート (Y-1: 陰性対照、Y-2 及び Y-3: 弱溶血性陽性対照、Y-4: 強溶血性陽性対照) を調製した。di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、trioctyl trimellitate (TOTM)、4-cyclohexene-1,2-dicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) (DOTH)、1,2-cyclohexane dicarboxylic acid diisononyl ester (DINCH) 及び DOTH/DINCH 配合 PVC シートは川澄化学工業が T ダイ成形機により作製した。DEHP、TOTM、DOTH 及び DINCH の配合量は PVC に対する重量比 (PVC = 100 パーツ) として、それぞれ 55、85、55 及び 60.5 パーツとした。DOTH/DINCH の配合量は 40:16.5、25:33 及び 10:49.5 パーツとした。

#### 2) 公定法による溶血性試験 (表 1)

ISO/TC194/WG9 が実施している溶血性試験国際ラウンドロビンテストプロトコルに従い、ウサギ血液を利用して、ASTM 法/直接接触及び抽出液法 (インキュベーション時間: 3 時間)、NIH 法/直接接触法 (1 時間)、MHLW 法/抽出液法 (4 時間) により行った。

#### 3) 簡易溶血性試験 (表 1)

市販ウサギ脱線維血 1mL を遠心分離し、得られた赤血球画分を PBS で 3 回洗浄後、同容量の PBS に懸濁させて調製した。直接接触法及び抽出液法ともに MHLW 法に準じて行い、37°C インキュベーション開始 1、2 及び 4 時間後に試験混液 0.5 mL を採取し、Drabkin 試薬を添加することなく、その遠心上清 100  $\mu$ L の 415 nm における吸光度を測定して溶血性を評価した。

#### 4) PVC シートの溶血抑制能評価

オートクレーブ処理した各種 PVC シート (3.2 x 1cm, 厚さ 0.4mm) を滅菌済みスクリーキャップ付バイアル瓶に採取し、常法に従って調製したヒト MAP 又は SAGM 加濃厚赤血球液 (MAP/RCC, SAGM/RCC) 5mL を添加後、4°C 下 49 日間インキュベーションした。インキュベーション開始後 1 週間毎に血液 50 $\mu$ L を Eppendorf チューブに採取し、PBS 1mL を添加して緩やかに攪拌後、遠心分離し、Drabkin 試薬を添加することなく、その遠心上清 100  $\mu$ L の 415 nm における吸光度を測定し、溶血率を算出した。

#### 5) 炎症誘導能評価

11 種類の可塑剤等を牛胎児血清に終濃度 2.5 mg/mL で分散させた後、同血清を利用して濃度希釈系列を作製した。日本薬局方エンドトキシン標準品は培地を用いて希釈列を作製した。陰性対照としては、牛胎児血清及び培地を用いた。

上記試料 1 容量に対し、ヘパリン加ヒト血液



1 容量、培地 8 容量を加え、24 穴プレートを利用して 37°C で 24 時間インキュベーション後、培養上清中の IL-6 濃度を市販 ELISA キットにより測定した。

#### 6) 可塑剤溶出試験

上記 4 項において調製した血液試料 50  $\mu$ L を 1 週間毎にスクリーキャップ付試験管に採取し、1% NaCl 溶液 (1mL)、DEHP- $d_4$  (0.1 $\mu$ g) 及びヘキサン (1mL) を添加後、15 分間激しく振とう抽出し、室温下で遠心分離した。得られた上清に無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加して脱水し、常法に従って GC-MS/MS 分析に供した。

直径及び滅菌法の異なる数種の TOTM 配合 PVC 製体外循環回路用チューブを試料とした溶出試験においては、ISO3826-1 及び JIST3217:2011 を参考として充填抽出を行い、抽出液中の TOTM 濃度を LC-MS により定量した。

#### <倫理面への配慮>

本研究のヒト臨床材料を用いた研究は、

1) ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日、文部科学省・厚生労働省・経済産業省、平成 25 年 2 月 8 日全面改正)、2) 臨床研究に関する倫理指針 (平成 15 年 7 月 30 日、厚生労働省、平成 21 年 7 月 31 日全面改正)、を遵守し、所属研究機関および関係医療機関の倫理委員会の認可を受けた上で、被験者に対して文書による説明と合意の取得を行った後に実施した。

動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、各実施機関における「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物実験委

員会の承認のもと、動物愛護の精神に則って、実験を遂行した。

遺伝子組み替え動物の利用に関しては、各実施機関委員会等の承認を得て実施した。

Stx の調製については文部科学大臣確認を得て行った。

#### ⑦研究成果の活用

本年度は、研究課題の中から、実用化に際してより効率的に実施でき、評価に活用される研究成果を選定し、成果を発信する発表会を開催した。成果発表会の開催については、研究分担者の所属する公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (以下、「財団」という。) のホームページで広く国民向けに広報した。加えて、財団は賛助会員制度を保持しており、賛助会員の多くは製薬企業及び関連業種の企業であることから、財団の賛助会員に対して広報することにより、共同研究を実施する企業研究者の参加を促した。

## C. 研究結果

### ①新規低分子安全性バイオマーカー探索における標準的評価法構築

#### 1) 腎障害モデル動物の作製と表現型解析、及び血漿メタボローム解析による腎障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

腎毒性物質の初回投与から 5 日後に、腎剖検による病理検査を行った。器質的障害の程度は各薬物に依存した。血中及び尿中の既知の BM は、各薬剤による腎障害の部位、程度、時期特異的に変動した。例として、BUN 及び Kim-1 の変化をそれぞれ図 6 及び図 7 に示した。

血清メタボロミクス解析により 126 種のグリ

セロリン脂質、スフィンゴ脂質が同定された。各同定脂質分子につき、投与前のサンプル平均値に対する投与後の各サンプルの値の比を  $\log_2$  変換した後、各群の平均値を算出し、その値を用いて全薬剤の k-means cluster を実施した (図 8)。126 種の脂質分子は 5 つのクラスターに分割された。クラスター 2 に属する脂質分子は、アムホテリシン B 投与ラットにおいて、投与後のすべての時間群において投与前群と比較して増加する脂質分子群であり、対照群とは異なる変動を示した。クラスター 5 に属する分子群は、アムホテリシン B 投与ラットにおいて、投与後 6、24 時間群において投与前群と比較して増加する脂質分子群であった。クラスター 2 及びクラスター 5 に属する代表的な脂質分子種の変動を図 9 に示した。

## 2) 肝障害モデル動物の作製、及び血漿メタボローム解析による肝障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

タモキシフェンの連続投与により、肝脂肪化を伴う薬物性肝障害のモデル動物を作製し、連続投与後 8、15、19 日における血漿及び肝臓を採取した。まず、血漿を対象に、メタボローム解析を行い、各時間ポイントで対照群 (メチルセルロース投与ラット) とタモキシフェン投与ラットで有意にレベルの異なる代謝物を探索した。

## 3) バイオマーカー値を用いた、ヒト生体における薬物動態の予測法確立

非臨床から臨床への外挿性検討のため、レパグリニド、ピタバスタチン、ピオグリタゾン投与ヒト臨床研究における血漿サンプルを用い、固相カラム抽出をした上で液体クロマトグラフィ・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) により薬剤および代謝物の定量系を構築した。得ら

れた濃度推移データを用いて、レパグリニド (OATPs, CYP2C8 dual 基質)、ピタバスタチン (OATPs 基質) およびピオグリタゾン (CYP2C8 基質) の体内動態解析を進めている。本試験により OATPs と CYP2C8 の関与を分離評価しながらレパグリニドとクロピドグレルとの相互作用を定量的に解析することが可能となる (図 10)。同時に、コントロール条件下、OATP 阻害剤併用条件下および CYP2C8 阻害剤併用条件下の血漿サンプルをもとに、OATPs または CYP2C8 阻害により変動する内因性物質のメタボローム解析を開始した。

## 4) 薬物動態関連蛋白質のノックアウト動物等の調製とメタボローム測定

Atp8b1 deficient マウスの脂質メタボローム解析の結果、ヘテロ型ならびに野生型マウスと比較して、ホモ変異型で複数の脂質が変動していた。野生型マウスと比較してホモ変異型マウスで顕著に変動していた脂質代謝物の代表例を図 11 に示した。Oatp1a/1bKO マウスならびに野生型マウスの血漿検体に関しては、メタボローム解析を実施中である。

## 5) 高血圧発症腎疾患モデル動物の作製と包括的代謝物測定の見直し

発現機序の異なる 2 種の高血圧ラットに高食塩を負荷し、腎障害モデルを作製した。両モデルともに個体間差があるものの、SHR/Izm 群では、対照群である WKY/Izm 群との間で、病理学的に明らかな群間差は認められなかった。一方、DIS/Eis 群では、その対照群 (DIR/Eis 群) との病理的差異が明確であった。尿中アルブミン値を尿中クレアチニン値で除して比較すると、両モデルともに疾患群は各対照群と比較して有意に高値であり、腎糸球体機能の低下が認められた。また、血液生化学検査では、腎機能を

反映した血中尿素窒素 (BUN) に特徴的な相違がみられており、疾患群は、対照群と比較して有意に高値であった。

摂取 8 週後の全尿サンプルについて、<sup>1</sup>H-NMR 測定を行い、主成分分析 (PCA) および 2 群間の差異を識別する判別分析 (OPLS-DA) を行った。DIS/Eis 群及びその対照である DIR/Eis 群間の比較を図 12 に示す。多変量解析で 2 群を判別可能であり、病理学的病変の度合いに関連した群間内でのばらつきを把握できた。

#### 6) 重篤副作用に関連する複数の安全性バイオマーカーの同時診断系の検討

*HLA-B\*51:01* のタグ多型のうち、遺伝子型に従った増幅が認められた rs6933050 及び rs2442736 検出用 Primer セットで、遺伝子型が既知の DNA 8 種を BIST 法で解析した (図 13)。ベースラインの補正が必要であったが、遺伝子型と一致する結果が得られ、BIST 法での安全性 BM の同時診断系の有用性を示すことができた。

#### ② リスク評価のための信頼性の高い *in vivo* 遺伝毒性評価スキームの確立

##### 1) 2-ニトロアニソール (2-NA) の *gpt* 遺伝子突然変異試験 (*gpt* アッセイ : TG 試験の一種)

ラット肝臓における *gpt*MF は陰性対照群 (0 mg/kg 体重/day) で  $7.8 \times 10^{-6}$ 、低用量群 (87.5 mg/kg 体重/day) で  $27.7 \times 10^{-6}$ 、中用量群 (175 mg/kg 体重/day) で  $21.7 \times 10^{-6}$ 、高用量群 (350 mg/kg 体重/day) で  $34.9 \times 10^{-6}$  であった (図 14)。ANOVA-Dunnett's test により、低用量群と高用量群は陰性対照群と比較して有意に高かった。中用量群のみ有意差に達しなかった ( $p=0.08$ ) が、これは対照群の SD が大きいと思われる。膀胱のゲノム DNA は抽出量不足とパッケージング効率の低さのため点突然変異頻度の測定はできなかった。次に、Ames 試験では、

2,500 $\mu$ g/プレートを最高用量として、以下公比 2 で 5 用量について実施し、2-NA (78.1~625  $\mu$ g/プレート) で、TA100 株のみ溶媒対照群に比較して代謝活性化系非存在下 (-S9 mix) では約 4.5 倍、代謝活性化系存在下 (+S9 mix) では約 3.0 倍の用量依存的なコロニー数の増加が認められた。

##### 2) 2-NA の膀胱と肝臓におけるコメント試験および骨髄小核試験

骨髄小核試験、*Pig-a* assay、さらに肝臓および膀胱におけるコメント試験も含めて、結果は陰性であった。一方、hOGG1 で処理した細胞でのコメント試験の結果、2-NA 500 mg/kg 処理群で膀胱に強い DNA 損傷が認められた (図 15)。この損傷は抗酸化剤であるグルタチオンを 1,000 mg/kg の用量で同時に投与すると減少した (図 15)。同様のアッセイを実施したところ、肝臓では hOGG1 およびグルタチオン処理群は、いずれも未処理群と差がなかったことから、膀胱でのみ酸化 DNA 損傷が生じていることが示唆された (松元)。

##### 3) 2-NA の TK アッセイ

S9 代謝活性化系非存在下での *Tk* 遺伝子突然変異頻度は、陰性対照では  $6.0 \times 10^{-6}$  であり、2-NA 処理細胞では用量依的に増加し、0.9  $\mu$ g/mL で  $45.2 \times 10^{-6}$  だった。S9 代謝活性化系存在下での *Tk* 遺伝子突然変異頻度は、陰性対照では  $3.9 \times 10^{-6}$ 、2-NA 処理細胞では用量依的に増加し、0.9  $\mu$ g/mL では  $16.1 \times 10^{-6}$  だった。変異体コロニーのうちわけとしては、標準増殖コロニーよりも、遅延増殖コロニーが多く観察された。

##### 4) タモキシフェン (TXF) を対象とする試験

125 mg/kg 以上の TXF 処理群では各 1 例の死亡動物が認められ、62.5 mg/kg 以上の用量において投与 10 日目以降、用量依的な体重増加抑制が認められたことから、評価可能であると判断した。末梢血を用いた小核試験では、いず

れの用量においても、小核出現頻度の増加は認められなかった。同様に、*Pig-a* assay においても突然変異頻度の増加は認められなかった。一方で、肝臓における小核試験では、62.5 mg/kg 以上の用量で、用量依存的な小核出現頻度の増加が認められた (図 16)。

#### 5) 1、2-ジメチルヒドラジン (DMH) を対象とした試験

DMH 投与により、*gpt* MF の用量依存的かつ顕著な増加が大腸および肝臓で認められ、特に大腸で高頻度に検出された (図 17)。骨髄では DMH 投与による影響は認められなかった。小核誘発は大腸および肝臓で用量依存的かつ顕著な増加が認められたが、骨髄および末梢血においては認められなかった。

### ③新規培養細胞株を用いたインフュージョン反応惹起性の評価法開発

#### 1) 牛肉アレルギー患者血清の結合性解析

セツキシマブを抗原とした免疫ブロット法による解析で、牛肉アレルギー患者10名中8名

(P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P10) にセツキシマブに結合するIgEが検出された (図18)。これらの患者血清中IgEの結合は過ヨウ素酸処理したセツキシマブに対しては著明に減弱した。

#### 2) 加熱 OVA による IgE 架橋活性

別実験により、E-C1 抗体は OVA の 90°C による加熱の有無にかかわらずよく結合し、E-G5 抗体は加熱時間 (0, 3, 15 min) に伴って結合性が減少することを示した。そこで次に、EXiLE 法を用いて、両抗体の加熱 OVA による架橋活性を調べた (図 19)。すると、E-C1 は、非加熱 OVA により顕著なルシフェラーゼ発現が誘導された。IgE の結合性は加熱によってほとんど変化がなかったにもかかわらず、活性化誘導能は加熱に伴い著明に更新し、加熱 3 分では 10 pg/ml

ですでに活性化の目安となる無刺激時の 2 倍以上のルシフェラーゼ発現が認められた。加熱 15 分後には、用量応答曲線はさらに低濃度側へシフトし、より低濃度でより高い応答が観察された。

一方、E-G5 抗体は、OVA への結合性自体は認められているにもかかわらず、OVA 添加によるマスト細胞の活性化を誘導しなかった。

#### 3) 樹状細胞への分化誘導 (形態的变化)

バイオリジクス医薬品の感作性を培養樹状細胞を用いて *in vitro* で予測するため、ヒト単球様細胞株 THP-1 細胞を樹状細胞様へと分化させることを試みた。THP-1 細胞を PMA・IL-4 によって 72 時間処理することにより、樹状突起を有する細胞へと分化させることができた。図 20A に処理前、図 20B に処理後の細胞を示した。

#### 4) 樹状細胞マーカーの発現上昇

THP-1 細胞の PMA・IL-4 処理により、単球マーカーである CD14、樹状細胞マーカーである CD11c および CD209 (DC-SIGN) が、どのように発現変動するのかを RT-PCR 法により解析した。図 21 に示したように、PMA・IL-4 処理前と比較して、CD209 と CD11c はそれぞれ 82.1 倍、8.6 倍の発現上昇がみられた。CD14 には変化がなかった。

### ④分子標的薬のオフターゲット効果の評価法開発

#### 1) LC/MS によるタンパク質発現の網羅的プロテオーム解析

LC/MS 解析の結果として、全体で約 2,500 タンパク質の発現変化を解析することができた。しかし、各群 duplicate のサンプルに関して解析を行い、解析ソフトにより得られる p 値を