

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

医薬安全科学部 第3室長
中村 亮介

1. 背景と目的

インフュージョン(IF)反応などの有害副作用を *in vitro* で予測することは非常に難しく、医薬品開発を阻害する一つの要因となっている。そのメカニズムの多くは不明だが、比較的理解が進んでいる一つの例として、抗体医薬品セツキシマブのケースが知られている。これは、ある種のマダニに感作された患者が、特殊な糖鎖構造(galactose- α -1,3-galactose)を認識する IgE を産生し、これが牛肉のアレルゲンやセツキシマブ上の類似構造と交差反応することによって起こると理解されている。一方我々は、近年、新たに樹立したヒト培養マスト細胞株を用いて抗原特異的応答を簡便かつ高感度に検出する試験法、IgE Crosslinking-induced Luciferase Expression (EXiLE)法]を開発した。本研究では、EXiLE 法等を用いて IF 反応惹起性の評価法を開発することを目的とする。

2. 研究の進捗と展望

島根県では牛肉アレルギー患者が多発していることから、島根大学医学部(森田栄伸教授)においてインフォームドコンセントの下で牛肉アレルギー患者血清を採取した。これらの患者血清は、牛肉特異的 IgE 試験に陽性を示し、その多くはセツキシマブに対しても結合性を示した。一方、これらの患者血清を用いた IgE の架橋に基づく抗原性の評価系を確立すべく、今年度は複数のモデル抗原を用いて条件検討を行なうとともに、共同研究先の企業(MeijiSeika ファルマ株式会社)への技術供与を行なった。次年度以降は、セツキシマブ等への実際の牛肉アレルギー患者血清の反応性を指標に、これらの糖鎖抗原が IgE の架橋において果たしている役割を、より生理的な条件下で解析することを目指す。その他、IgE が関与しない IF 反応のメカニズムに迫るべく、培養細胞を用いた *in vitro* 感作性試験系等の樹立にも取り組む。

新規培養基材等を用いた肝代謝・動態等評価系の開発

薬理部・第3室長

石田 誠一

1. 背景と目的

新規医薬品候補化合物の肝臓での動態、代謝、毒性を創薬プロセスの早期に効率よく予測できる試験系の開発が希求されて久しい。現在はヒト初代培養肝細胞が広く用いられているが、供給は海外に頼っているのが現状である。それらに代わるものとして、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、分化状態が未成熟なため代謝機能などの点で初代培養細胞に劣っており、未だ実用化に至っていない。一方で、HepaRG 細胞やキメラマウス由来ヒト肝細胞:PXB-cell 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。そこで、本研究ではこれらの新規培養肝細胞について、新規培養基材（コラーゲンビトリゲル膜チャンパー：ad-Med ビトリゲル等）を組み合わせた培養方法等を検討することで、ヒト初代培養肝細胞と同等性を有する再現性のより高い培養系を確立し、動態、代謝、毒性試験及び薬効評価への供給を目指した基盤的開発研究を実施している。

2. 研究の進捗と展望

HepaRG 細胞、PXB-cell の機能評価と ad-Med ビトリゲルを組み合わせた培養方法の条件検討を行った。指標としては、薬物代謝活性、代謝酵素誘導能、新たに発見したリポタンパク産生肝型トランスポーターの誘導能を用いた。ヒト凍結肝細胞、HepaRG 細胞、PXB-cell を ad-MED ビトリゲルに播種した後、シトクロム P450 分子種の酵素活性について検討した結果、CYP 特異的な代謝産物が検出されたことから、本法による開発化合物の肝代謝評価が可能であることが示唆された。今後、培養条件の検討を進め、培養器下面が培地の液相—液相培養法、空気の液相—気相培養法による機能改善について、従来の培養法と比較する。PXB-cell の機能解析を進めた結果、一部の代謝機能でドナー間差が認められた。肝型トランスポーターについては、ビトリゲル培養により発現・コレステロール応答性は維持された。細胞ソース間で発現応答に差があり、今後、培養条件等による発現応答の改善を検討する。

来年度以降は、他の培養基材、培養用培地についても検討を進め、ヒト初代培養細胞と同等性を実現するための培養系の確立を行う予定である。

平成26年における本研究班への参加研究機関・企業は以下の通り（順不同）。

研究分担：農業生物資源研究所、积水メディカル(株)、エーザイ(株)、フェニックスバイオ、興和
研究協力：東京大学、静岡県立大、崇城大、理化学研究所、産業技術総合研究所

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

医療機器部 第一室長
齋島 由二

1. 背景と目的

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。

そこで本研究では、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。

2. 研究の進捗と展望

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。その結果、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、新規血液バッグの素材候補である 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。簡易溶血性試験法は十分な基本性能を有することが確認されたことから、今後、その標準化を目指した研究を行う。

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、当該評価法の有用性を検証する。



201433008A (2/7)

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2/7分冊 研究分担報告書

テーマ1-1 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

担当責任者：前川京子 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
担当責任者：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：小松弘幸 (株)シミックバイオリサーチセンター
担当責任者：上田哲也 プレシジョン・システム・サイエンス(株)
担当責任者：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
担当責任者：楠原洋之 東京大学大学院薬学系研究科
担当責任者：河原崎正貴 (株)マルハニチロホールディングス

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）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（業務項目）

- テーマ総括 1
前川 京子（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）
- 腎障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築 13
前川 京子（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）
- 肝障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築、施設
間差まとめ 21
斎藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）
- 薬物性腎障害モデル動物の作製と表現型解析 27
小松 弘幸（(株) シミックバイオリサーチセンター）
- 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 35
上田 哲也（プレシジョン・システム・サイエンス（株））
- 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 41
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）
- 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 47
楠原 洋之（東京大学大学院薬学系研究科）
- 網羅的水溶性代謝物測定 51
河原崎 正貴（(株) マルハニチロホールディングス）

II. 学会等発表実績 61

III. 研究成果の刊行物・別刷 69

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

担当研究課題 テーマ総括 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

担当責任者 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

研究要旨 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、その開発が強く望まれる。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により、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り、背景因子の影響（雌雄差・食餌影響）、既存のBMとの比較（感度・特異度・早期診断性）、表現型や病理診断との相関性、動物種差を超えた普遍性に関する検討が重要と考えられた。

研究代表者

齋藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部長

研究分担者

小松弘幸 (株)シミックバイオリサーチセンター研究本部 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 本部長

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ス 中央研究所 副主管研究員

A. 研究目的

バイオマーカー（BM）は、「客観的に測定さ

れ、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と定義され（Biomarkers Definitions Working Group, Clin. Pharmacol. Ther., 69, 89-95, 2001）、医薬品開発の効率化、及び医薬品の適正使用に資するとして、その非臨床・臨床試験での使用が注目されている。特に、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、非臨床試験段階での「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る。

近年、質量分析計の発達により、組織や体液中に含まれる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。メタボロ

ーム BM は、プロテオーム BM のさらに下流で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、医薬品開発現場では、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、食の欧米化に伴い罹患率が急速に増えている腎疾患に対する有効性（病態の改善）を評価しうる BM についても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、生体内の内在性代謝物を用いた医薬品の体内動態を予測しうる BM は薬物相互作用リスクの検出に有用である。

以上の現状を踏まえ、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・代謝物を探索すると共に、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。また、臨床での利用がすでに始まっているゲノム BM の利用促進を目指して日本人におけ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* のタグ多型の迅速タイピング系を構築した。

本研究の遂行を通じて、副作用等の発現を予測・評価しうる BM の候補の選定やその測定手法の構築、及び実データでの解析過程で見いだされる問題点とその解決法等の副作用 BM 評価手法の開発につながる知見が得られると期待される。

B. 研究方法

B.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 Cr1:CD(SD) ラット (1 群 8 匹) に、用量依存的に急性尿細管壊死を惹起する 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。対照として、生理食塩水を投与したラットを用いた。各薬剤投与前 (0 時間)、及び最終投与から 6、24、96 時間後、無麻酔下で頸静脈から血液約 1 mL 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ともに、メタボローム解析に使用した。採尿は採尿ケージを用いて投与前 (投与 24 時間前から投与前までの蓄積尿)、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 時間から 24 時間までの蓄積尿)、96 時間 (投与 72 時間から 96 時間までの蓄積尿) を採取した。尿中の既存 BM として、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、初回投与の 5 日後に 24 時間絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹大動脈から放血安楽死させた後、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では、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。

B.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 Sprague-Dawley 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(日局メチルセルロース)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、網羅的に測定する予定である。

B.3 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、rs24422736)を対象とし、BIST (Beads in Single Tip) 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 での検出が可能であるかを検討した。

B.4 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

OATP (Organic anion transporting polypeptide) および CYP2C8 (Cytochrome P450 2C8) に着目し、阻害剤投与条件下で変動する BM を見出すために臨床試験を実施した。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て血漿サンプルとして凍結保存した。

B.5 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

phosphatidylserine (PS) のフリッパーゼであり、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、有機アニオントランスポーターである *Oatpla* (*Oapt1a1*~*Oatpla6*) ならびに *1b2* を欠損した *Oatpla/1b* クラスタノックアウトマウス (*Oatpla/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 時間以上絶食させイソフルラン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。

B.6 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

高血圧を背景とした、発症作用機序の異なる 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) を日本エスエルシーより購入し、1 週間馴化後本試験に供した。両モデル動物ともに、馴化期間は、食塩濃度 0.3%、その後 8.0 % (SHR/Izm, WKY/Izm) あるいは 4.0 % (Dahl-Iwai S, Dahl-Iwai R) 含有 AIN-93G を 8 週間自由摂取させた。

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、開腹して腹大静脈から全採血し EDTA 血漿及び血清を分離した。剖検は、採血後、速やかに肝臓、腎臓及び心臓を採取した。常法に従い、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、¹H-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。

<倫理面への配慮>

ヒト遺伝子解析研究は、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) 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。

ヒトを対象とした臨床研究は、「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)」及び細則を遵守し、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。

動物実験は、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、実験を行った。

遺伝子組み替え動物の利用に関しては、各実施機関の承認を得て実施した。

C. 研究結果

C.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剤に依存した。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 1 及び図 2 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 log₂ 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 3)。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 投与ラットの投与後 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 4 に示した。

C.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する予定である。

C.3 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 rs24422736 検出用 Primer セットで、遺伝子型が既知の DNA 8 種を BIST で解析した（図 5）。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 での安全性 BM の同時診断系の可能性を示すことができた。

C.4 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

臨床試験の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ー・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である（図 6）。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。

C.5 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 7 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。

C.6 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

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、明らかな病的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）との病的差異が明確であった。

尿中アルブミンを尿中クレアチニン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、血液生化学検査で特徴的な相違がみられたのは、腎機能を反映した血中尿素窒素(BUN)であり、疾患群は、対照群と比較して有意に高値であった。

摂取 8 週後のすべての尿サンプルについて、¹H-NMR を測定し、多変量解析手法の一つである主成分分析(PCA)および 2 群間の差異を識別する判別分析(O-PLS-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 8 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。

D. 考察

D.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

既知の3種の腎毒性物質を用いて、尿中の各種BMの変動について検討を行った結果、腎障害の部位、程度、時期によって反応するBMが異なることが明らかになった。尿中バイオマーカーを用いて腎臓の機能及び器質的障害を検出するためには複数のバイオマーカーを用いて総合的に判断することが重要であると考えられた。

一方、血清の脂質メタボローム解析により見出されたアムホテリシンBによる腎障害で有意に変動した脂質分子に関しては、各分子種の変動の時間推移を基に、病理変化や既知のBMとの比較を行い、BM候補になりうるかを検討する予定である。また、腎組織や尿中のメタボローム解析を行い、血清中の変動脂質分子種との相関性を比較することも、BM候補の選定に有用と考える。

D.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

タモキシフェンによる脂肪肝を伴う薬物性肝障害の早期診断、重篤化診断に用いるBM候補代謝物を同定にあたっては、肝組織の病理評価の結果や既知のBMの変動との関連を解析し、有意差の認められた代謝物BM候補から絞り込みを行う予定である。

D.3 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

BISTは、ビーズアレイをキャピラリーチップの中に封入した遺伝子多型検出法である。BISTを用いることで、1本の分注チップ内で多種の遺伝子多型を同時に解析でき、かつ、分注に使用するチップ内で全ての反応が行えることから、自動化が容易となる。これまでに開発したカルバマゼピン誘因性重症薬疹関連多型解析法で使用していないタグを選択して、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のタグ多型である2か所の遺伝子多型(rs2596560、rs24422736)について解析を行った。今後は、さらなる実用性を示すために、検体数の追加と、抗てんかん薬の薬疹に関連する複数の安全性BMの同時診断系を検討する。

D.4 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

肝臓における薬物代謝酵素およびトランスポーターの機能を予測する方法として、特異的基質(プローブ)および特異的阻害剤を用いた方法が有効であるが、当該タンパクの基質となるBMを見出すことができれば、薬物を投与することなくヒト生体における薬物動態を予測することができる。本研究では、OATPおよびCYP2C8に着目し、阻害剤投与条件下で変動するBMを見出すために臨床試験を実施し、血漿サンプルを用いたメタボローム解析を実施する予定である。将来的には、OATPおよびCYP2C8が関与する複雑な薬物間相互作用の予測等にも応用することを考えている。

D.5 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ノックアウトマウス(ホモ型)では、

野生型マウスならびにヘテロ型マウスに比較して、一部の血漿中脂質に変動が認められたことから、Atp8b1 は phosphatidylserine のフリッパーゼであるが、生体内では脂質の体内動態にも関与するものと期待される。今後は、同定された BM 候補が、トランスポーターの輸送機能の変動を反映した結果であり、トランスポーターの機能欠損により副次的に生じた結果ではないことを証明するため、機能解析による検証が重要と考えられた。

D.6 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

発症機序の異なる高血圧ラットに食塩を負荷することで、腎障害ラットモデルを作製した。その結果、Dahl 食塩感受性ラットに 4%食塩含有飼料を 8 週間摂取させることで、尿細管に著しい硝子円柱が生じることを認め、対照群である DIR/Eis 群との病理的差異が明確であり、今後の評価系として有用であることが判明した。また、尿の ¹H-NMR スペクトルの包括的なプロファイリング解析より、病態の特徴を把握することができた。尿の NMR-メタボリック・プロファイリングは、非侵襲かつ前処理を必要としないため、腎疾患評価の一手法として有用であることが示された。

E. 結論

各種モデル動物の血液のメタボローム解析を行い、対照群と比較して有意差が認められる代謝物を探索すると共に、BM 候補として絞り込む際の評価法を標準化するための検討を開始した。薬物性肝障害・腎障害の BM、及び腎疾患の病態改善の BM 探索においては、背景因子の影響（雌雄差・食餌影響）や既存の BM との比較（感度・特異度・早期診断性）、表現型や病

理診断との相関性、動物種差を超えた普遍性に関する検討が重要と考えられた。また、これらの検討にあたって、多変量解析やクラスター解析の手法が有用であることも示された。薬物動態ならびに有害事象に関連するトランスポーターの機能変動を検出する BM 探索においては、機能解析による検証が重要と考えられた。並行して実施している臨床試験では、内因性物質の変動とプローブ薬物の薬物動態を比較することで、効果的に BM を見出すことができると考えられる。さらに、安全性ゲノム BM の迅速な検出法の開発において、全自動機器による診断の可能性を示すことができた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y. : Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci.*, 2014; 141: 377-386.
- 2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Effects of sex, age, and fasting conditions on plasma lipidomic profiles of fasted sprague-dawley rats. *PLoS One.*, 2014; 9: e112266.
- 3) Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y. Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their

inter-individual variations.

Metabolomics, 2014; 10: 402-413.

- 4) 前川京子, 佐井君江: 薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型とその人種差. ファルマシア, 2014; 50(7): 669-673.

学会発表等

- 1) Saito Y, Saito K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Inoue M, Kumagai Y, Pappan K, Maekawa K.: Metabolomic profiles in rat blood vary between genders, ages and fasting conditions, and their qualitative comparisons with human samples. 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition (2014. 11 San Diego, CA, USA).
- 2) 鈴木慶幸, 小松弘幸, 門田利人, 及川剛, 田口景子, 筑広紗弥香, 菅谷健, 齋藤明美: SD ラットのゲンタマイシン腎障害における尿中L-FABP と他の尿中腎障害バイオマーカーの比較. 第41回日本毒性学会学術年会(神戸, 2014. 7.)
- 3) T. Kadota, Y. Suzuki, H. Komatsu, K. Taguchi, T. Sugaya. Evaluation of Urinary L-FABP As a Nephrotoxicity Biomarker in Rats. 53th annual meeting, Society of Toxicology (Phoenix, USA, March, 2014)
- 4) Saito K, Urata M, Toyoshima K, Ishikawa M, Murayama M, Tajima Y, Senoo Y, Takemoto K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y.: Comparison of plasma lipidomic profile of humans with preclinical animals. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).
- 5) Maekawa K, Saito K, Pappan K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Murayama M, Kumagai Y, Saito Y.: Impact of gender, age, fed/fasted state of rats on their serum hydrophilic metabolites. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).
- 6) Ishikawa M, Saito K, Uebanso T, Maekawa K, Senoo Y, Murayama M, Tajima Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Fujii M, Shibazaki Y, Yoneyama H, Nammo T, Saito Y, Yasuda K.: Characterization of hepatic lipid profiles of insulin-dependent NASH and following cirrhosis using mouse model. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).
- 7) Maekawa K, Saito K, Ishikawa M, Minamino M, Kumagai Y, Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint symposium (2014.11, Busan, Korea).
- 8) 楠原洋之: 薬物トランスポーターの種差と遺伝子多型による医薬品体内動態の個人間変動. 第54回日本先天異常学会学術集会(2014. 7, 東京).
- 9) 楠原洋之: メタボロームによる薬物動態バイオマーカーの探索と薬物間相互作用の定量的解析への適用. 第5回杉山特別研究室理研公開シンポジウム(2015. 2, 東京).
- 10) 河原崎正貴, 鎌田彰, 矢口文, 江成宏之, 根本直: LDL-コレステロールが高めの成人男性に対する魚食の脂質代謝改善効果の検証, 日本農芸化学会2015年度大会(2015. 3)
- 11) 齋藤嘉朗, 齋藤公亮, 児玉進, 熊谷雄治, 前川京子: ヒト試料を用いたバイオマーカー

一研究のためのレギュラトリーサイエンス.
第 35 回日本臨床薬理学会学術総会
(2014. 12, 愛媛)

一トマーカー多型を対象としたタイピング
系の構築. 日本薬学会 135 回年会 (2015. 3,
神戸)

12) 前川京子, 水澤精穂, 北本綾, 北本卓也,
中村亮介, 杉山永見子, 上田真由美, 外園
千恵, 池田浩子, 矢上晶子, 松倉節子, 木
下茂, 村松正明, 古谷博和, 高橋幸利, 松
永佳世子, 相原道子, 関根章博, 日本 PGx
データサイエンスコンソーシアム, 斎藤嘉
朗. 日本人におけるカルバマゼピン誘因性
薬疹発症の危険因子 HLA-A*31:01 のサロゲ

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1.

腎障害モデル動物の血液生化学的検査 (BUN)
 8例の平均値と標準偏差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Control群
 に対して有意差あり (Dunnett's/Steel's test)

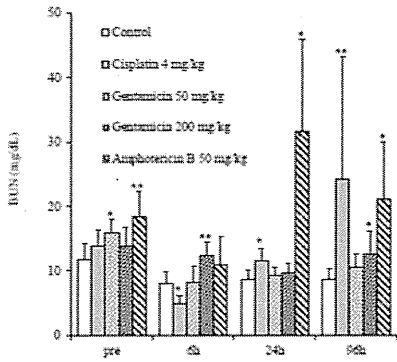


図2.

腎障害モデル動物の尿検査-KIM-1 (クレアチニン補正)
 8例の平均値と標準偏差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Control群
 に対して有意差あり (Dunnett's/Steel's test)

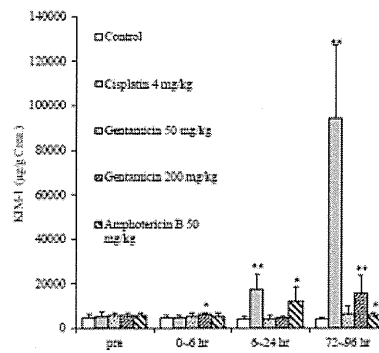


図3.

全薬剤による腎障害ラット血清中の脂質変動に関するクラスター解析
 C, 対照群, GLo, ゲンタマイシン低用量, GHh, ゲンタマイシン高用量,
 P, シスプラチン, A, アムホテリシンB

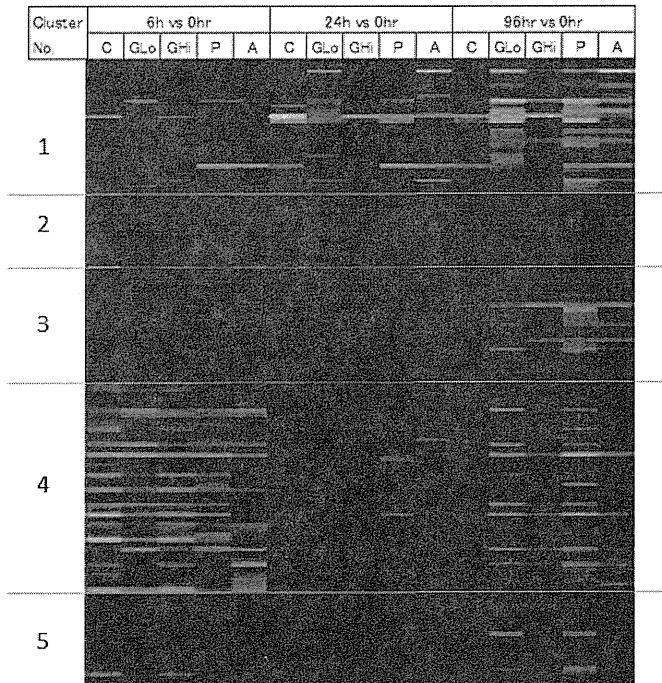


図4.

各薬剤投与による薬物性肝障害血清中の脂質分子種レベルの変動
 (クラスター2及び5に属する分子種1及び2)

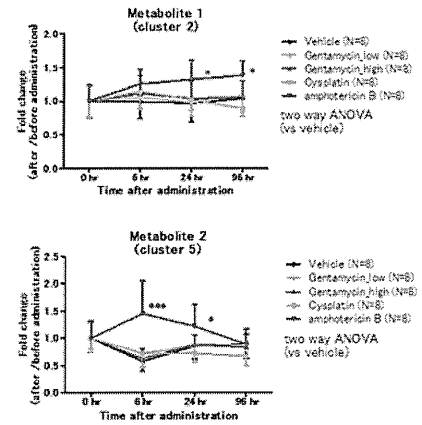


図5.

BIST遺伝子型判定結果
 (rs2596560, rs24422736)

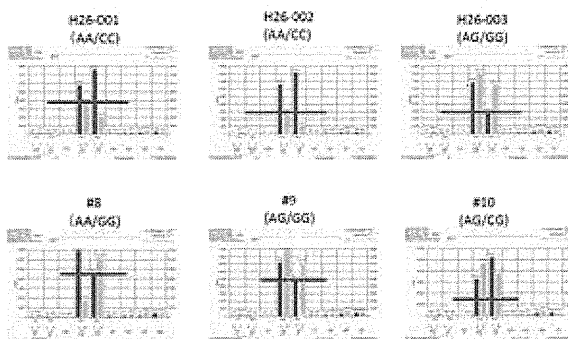


図 6.

代謝酵素・トランスポーターのプロープ・選択的阻害剤を用いた薬物動態の解析

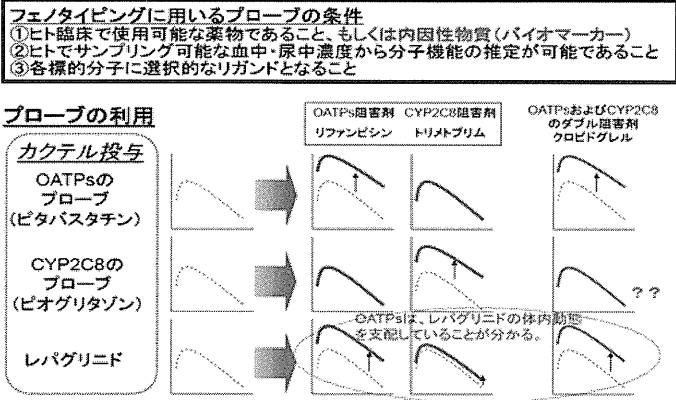


図 7.

Atp8b1ノックアウトマウスで有意にレベル変化を認めた脂質代謝物

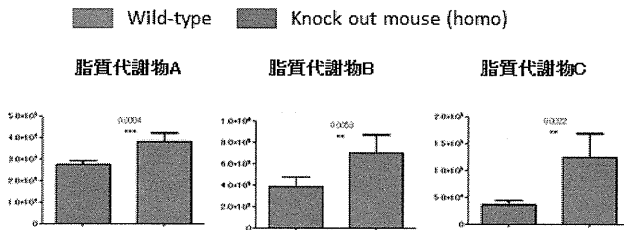
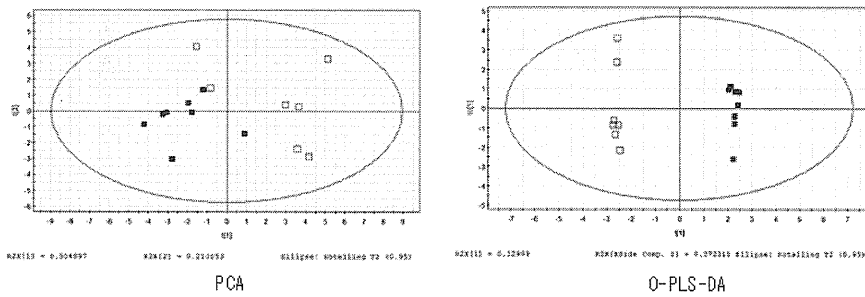


図 8.

尿のNMR-メタボリック・プロファイリングによるDIS/Eis群(疾患)とDIR/Eis群(対照)間の比較
(■:DIS/Eis, □:DIR/Eis)



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

担当研究課題 腎障害に関連するバイオマーカーの評価手法の構築

担当責任者 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

研究要旨 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、医薬品開発現場では、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。本研究は、非臨床段階において、腎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。今年度は、種々の薬物性腎障害を引き起こす薬剤を投与したラット血清のメタボロミクス解析を行い、同定した代謝物の多変量解析及びクラスター解析結果から、アムホテリシン B による薬物性腎障害モデル特異的に、生理食塩水投与の対照群と比較して有意に異なる変動パターンを示す脂質分子種を見出した。

研究協力者

斎藤嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部長
齊藤公亮 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官

A. 研究目的

非臨床試験段階で、予測性高く、医薬品候補化合物等の安全性等を適切に評価できるバイオマーカー（BM）は、非臨床段階での「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る。一方で、BM の適格性（確立）に関する評価要件のガイドラインは、1 例の概要案を除き世界的にもない。BM の探索・検証・利用を推進するためには、その適格性に関して、実データを反映した評価要件の明確化が必要である。

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、医薬品開発現場では、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。薬物性腎障害は、鎮痛薬、抗生物質、抗菌薬、抗がん薬などの広範な医薬品により引き起こされ、主な臨床経過として急性腎不全から人工透析に至る重篤副作用である。急性腎不全は、慢性腎不全と異なり、その原因を取り除くことにより、進行を止めることが可能であることから、早期発見と早期対応により重症化を防ぐことができる。臨床及び非臨床において血清中クレアチニン、血中尿素窒素等が、腎障害の BM として用いられてきたが、早期診断性や、特異度及び感度の面から十分と言い難く、最近、新たに 7 種類の新規 BM（尿中 Kim-1、尿中クラスタリン、尿中アルブミン、尿中 TFF3、尿中シスタチン C、尿中 β 2-マイクログロブリン、尿中総タンパク）について、既存 BM との併用が推奨されている。しかし、これらは、すべてタンパク質 BM であり、医薬品医療機器総