

【はじめに】

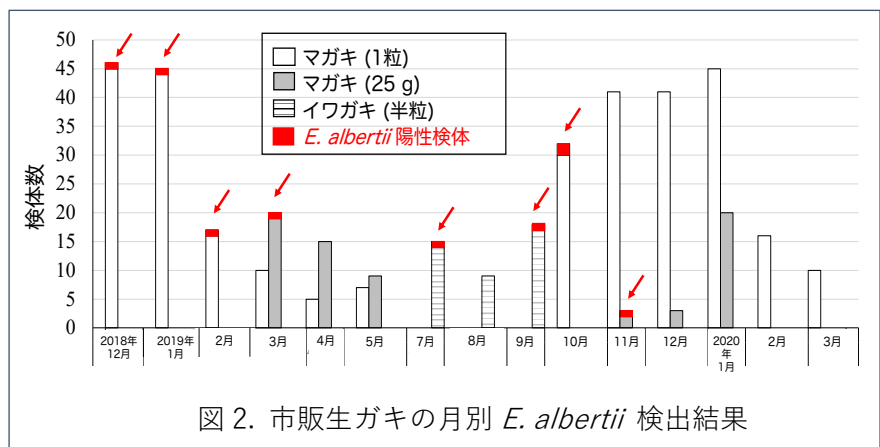
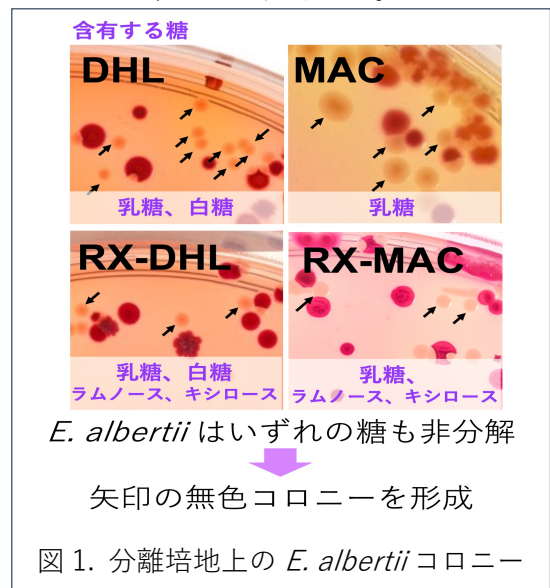
国民が食品から被る危害として、最も身近なもののひとつが食中毒である。衛生微生物部第二室では、食品や添加物等の衛生微生物学的試験及び検査並びにこれらに必要な研究が進められている。講演者は、主に食中毒細菌の検査法に関する研究を地方自治体と連携して進めている。本講演では、新興食中毒細菌 *Escherichia albertii* の調査・研究および病原微生物特異的遺伝子検出法の開発についてご紹介する。

【新興食中毒細菌 *Escherichia albertii* に関する調査・研究】

E. albertii は、2003年に新たに命名された新興食中毒細菌である。本菌は、生化学性状等が他菌種と似ているため、長らく大腸菌や赤痢菌などと誤同定されてきた。本菌特異的遺伝子検出法が開発されたことにより、国内外において多様な動物や鳥類での保菌や、食肉、野菜および環境水等の本菌汚染が報告されてきた。ヒトへの感染では、国内で *E. albertii* 集団食中毒事例が発生しており、患者数 100 名を超える事例も複数報告されている。しかし、本菌の食品における検査法が整備されておらず、原因食品不明の事例が多い。そこで、食中毒事例対応に資する検査法の確立を目的とし、研究を開始した。

(1) *E. albertii* 特異的分離培地の開発：細菌性食中毒の検査においては、原因細菌を食品から分離することが重要となる。多くの *E. albertii* 株は、乳糖、白糖、ラムノースおよびキシロースを分解しない。そこで、下痢症検査で使用される乳糖や白糖含有寒天培地（hydrogen sulfide lactose 培地：DHL およびマッコンキー培地：MAC）にラムノースおよびキシロースを添加し（RX-DHL および RX-MAC）、*E. albertii* コロニーは無色、大腸菌を含むその他のコロニーは赤く発色する培地を開発した¹（図 1）。

(2) カキにおける *E. albertii* 汚染実態調査：次に、(1)の培地を活用し、魚介類のカキの本菌汚染を調査したところ、国内の様々な産地の生食用マガキおよび生食用イワガキから本菌が季節に関係なく分離された（図 2）。分離株は本菌の主要な病原因子であり、腸管に接着するインチミン遺伝子（*eae*）を保有した。定量試験では、いずれも検出限界以下であったものの、低温管理などの徹底が重要であることが改めて示された²。



(3) *E. albertii* 特異的リアルタイム PCR 法の開発：次に、従来の *E. albertii* 特異的遺伝子検出法は、マルチプレックス PCR 法や Nested PCR 法が主流であり、迅速性に欠いていたため、リアルタイム PCR 法の開発に取り組んだ。*E. albertii* 特異的遺伝子上にプライマーおよびプローブを設計した。特異性試験では、食品に含まれる多様な細菌や食中毒細菌では陰性であり、食中毒事例由来株を含む多数の *E. albertii* 株は陽性であった。感度試験では、検出限界が 2-3 log CFU/mL と優れていた³。なお、(1) および (2) にて開発した方法は、多機関の協力自治体と共に実施したコラボレイティブスタディにおいて、食品からの *E. albertii* の検出に優れることを確認した。

¹ Arai S, et al., Evaluating methods for detecting *Escherichia albertii* in chicken meat. *J. Food Prot.* 2021, 84(4): 553-562.

² Arai S, et al., Detection of *Escherichia albertii* in retail oysters. *J. Food Prot. J.* 2022, 85(1): 173-179.

³ Arai S, et al., Development of a novel real-time polymerase chain reaction assay to detect *Escherichia albertii* in chicken meat. *Foodborne Path. Dis.* 2022, 19(12): 823-829.

【食中毒原因微生物特異的遺伝子検出法の開発】

ヒトに食中毒を引き起こす病原体は、細菌の他にもウイルス、寄生虫、原虫など多様だが、多くの病原体において遺伝子検出法がスクリーニングや同定に用いられているため、その開発について紹介する。

(1) *Kudoa hexapunctata* および *Kudoa*

neothunni 特異的 multiplex PCR 法の開発：近年、マグロの生食に伴う有症苦情事例が多数報告されており、寄生虫が原因と推定されている。食中毒の原因食品となった魚肉を観察すると、図 3 のように星型の寄生虫の粘液胞子が観察される。

Kudoa hexapunctata と *Kudoa neothunni* は、マ

グロの筋肉内に寄生する。形態が類似しており、鏡検での鑑別が困難なため、より簡便な識別方法として multiplex PCR 法の開発を検討した。遺伝子配列の精査の結果、28S rRNA 上に両クドア属寄生虫特異的プライマーを設計した。開発した PCR 法を食中毒原因残品に用いたところ、遺伝子シーケンスにて *K. hexapunctata* および *K. neothunni* が陽性となり粘液胞子が確認された検体では各標的クドア属寄生虫特異的バンドが形成された。一方、その他のクドア属寄生虫などが陽性となった検体では、multiplex PCR 陰性となった。開発した multiplex PCR 法を多様な産地の市販クロマグロ肉に応用したところ、供試した天然クロマグロおよび養殖クロマグロの多くが *K. hexapunctata* 陽性となった。食中毒の発症には約 10^5 コピー以上が必要とされるため、PCR 陽性検体中の粘液胞子の量を算出したところ、メジマグロ（クロマグロの幼魚）1 検体では 6.2×10^5 胞子/g と数多くの粘液胞子が含まれていた⁴。

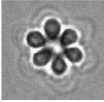
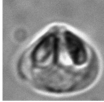
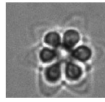
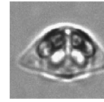
種	<i>Kudoa hexapunctata</i>		<i>Kudoa neothunni</i>	
形態				
宿主	主にクロマグロ (メジマグロ)		主にキハダマグロ	

図 3. マグロ筋肉中に寄生するクドア属寄生虫

(2) *astA* 特異的リアルタイム PCR 法の開発：下痢原性大腸菌は食中毒を引き起こす代表的な細菌だが、大腸菌の既知の病原因子の中でも、腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素 (EAST1) をコードする遺伝子 (*astA*) のみ保有する大腸菌 (*astA* 保有大腸菌) が原因の集団食中毒事例が国内で発生している。2020 年には埼玉県で学校給食中の *astA* 保有大腸菌を原因とする食中毒事例が発生し、3,453 人の患者が報告された。その前年には、新潟県にて *astA* 保有大腸菌を原因とする集団食中毒事例が発生し、新潟県保健環境科学研究所の調査によって患者便から *astA* 保有大腸菌血清型 O166 が分離された。しかし、食品からは原因菌が分離されなかったため、当該保健所から国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に

原因食品調査が依頼された。自治体での検査で使用されていた既存の *astA* 特異的 PCR 法を用いて検査したところ、PCR 陽性の食品が確認された。そこで、分離培養を実施したところ、PCR 陽性株が複数分離された。しかし、血清型別の結果、これら分離株は O166 ではなかったため、別の *astA* 特異的 PCR 法にてやり直し試験を実施したところ、先行して実施していた PCR 陽性食品および分離株の全てが偽陽性であることが判明した。

この食中毒事例での経験を元に、既報の *astA* 特異的 PCR 法を精査することとした。*astA* は全長 117 bp と短い遺伝子配列だが、その領域内に少なくとも国内外にて 8 セットのプライマーが報告されていた。さらに、*astA* の遺伝子配列には配列多型（バリエーション）が存在することが報告されているが、バリエーションごとの PCR の検出性の差を検討した報告はなく、いずれのプライマーも prototype と呼ばれる型を元に設計されていた。また、多様な細菌を用いた特異性試験などを詳細に検討した報告は存在しなかった。そこで、prototype からバリエーション 35 (v35) までが存在し、そのうち一部のバリエーションは機能していないことが想定されるとする最新の情報を元に、まずは国内の *astA* 保有細菌の *astA* バリエーションを調査することとした。全国の協力自治体から *astA* 保有株を分与いただき、*astA* 配列をシーケンスによって特定した。集団食中毒事例由来株等一部の株については、共通利用型機器の Illumina MiniSeq および Nanopore PromethION を用いて全ゲノム配列を外部の共同研究者と共同で決定し、*astA* の局在（染色体またはプラスミド）やコピー数を特定した。その結果、集団食中毒事例由来株が保有する *astA* の配列は、いずれも機能するバリエーションに属し、prototype を含めた多様なバリエーションによって構成されていた。また、散発下痢症や他の感染症の検査に付随して分離された株の一部は機能しないバリエーション保有株も認められた。そこで、機能する *astA* バリエーション特異的リアルタイム PCR 法（astArtPCR）の確立を目指すこととした。機能しないバリエーションに 1 塩基多型がある領域にプローブ等を設計した。設計した astArtPCR に加え、Ito ら、Muller ら、Yamamoto ら、Yatsuyanagi らの 4 種類の既存の *astA* 特異的 PCR 法も加えた合計 5 種類の PCR 法の特異性を試験した。機能しないバリエーション保有株は astArtPCR では陰性だが、その他の PCR 法では陽性または陽性と陰性の結果が混在していた。また、astArtPCR 陰性となった株について共通利用型機器の AXIMA を用いて菌種同定したところ、いずれもクレブシエラ属と同定された。その他 4 種類の PCR 法ではこれらのクレブシエラ属保有 *astA* 類似配列も一部では検出された。そのため、開発した astArtPCR は、大腸菌が保有する機能する *astA* に特異的であることが示唆された（表 1）。現在、astArtPCR 法を用いて市販食品中の *astA* 保有大腸菌の検出等を試験している。

表 1. *astA* 特異的 PCR 法の検出性

検出対象	<i>astA</i> rtPCR	Ito ら	Muller ら	Yamamoto ら	Yatsuyanagi ら
大腸菌保有 <i>astA</i> 配列					
機能する <i>astA</i>	+	+/-	+/-	+/w+	+
機能しない <i>astA</i>	-	+	+	+/-	+
クレブシエラ保有 <i>astA</i> 類似配列	-	+/-	+/-	+/-	+w+
2019年新潟県の事例分離株	-	-	-	-	+

+/-: 陽性または陰性、w+: 薄いバンドを形成

⁴ Arai S, et al., Detection of *Kudoa hexapunctata* and *Kudoa neothunni* from retail raw tuna in Japan using a novel duplex polymerase chain reaction. Parasitol. Int. 2020, 75:102048.

MEMO

A series of horizontal dotted lines for writing.

新興感染症診断用核酸増幅検査薬の信頼性確保に向けた取り組み

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・第四室長
築茂 由則

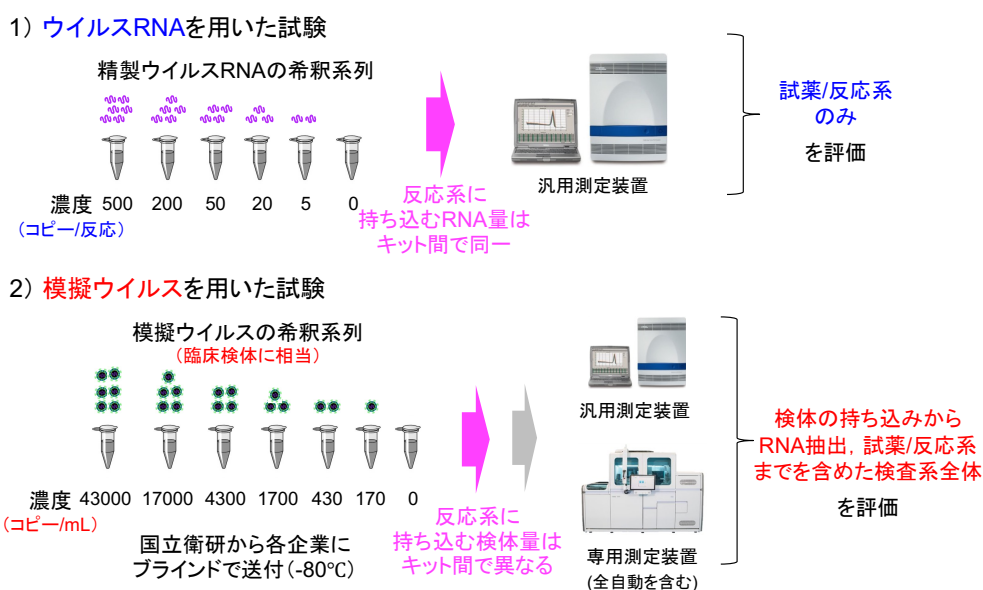
【はじめに】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) パンデミック発生時には、我が国でも PCR 法や等温増幅法を基本原理とする多数の核酸増幅検査薬 (Nucleic acid amplification test : NAT 検査薬) が緊急で開発され、COVID-19 の診断に利用された。パンデミック初期においては、NAT 検査薬の性能を評価するための臨床検体の入手が困難な状況であり、かつ、緊急に使用を認める必要があったことから、簡易的な臨床性能の評価結果に基づいて使用の可否が判断され、多くは研究用試薬 (薬事未承認) という位置づけで使用が許可された。これを踏まえ、遺伝子医薬部では国内で用いられていた COVID-19 診断用 NAT 検査薬の信頼性を確認することを目的に、コピー数を規定した同一の試料 (SARS-CoV-2 ゲノム RNA 及び模擬ウイルス) を用いて、一斉性能評価試験を実施した。本発表では、一斉性能評価試験の概要をお話するとともに、核酸増幅反応液中の夾雑物の影響に関する検討等についても紹介したい。

【COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験】

2020 年初頭の COVID-19 パンデミック発生初期には、新型コロナウイルス感染の有無を判断するための NAT 検査薬が緊急開発され、開発開始から 2~6 ヶ月間という短期間のうちに、数十の COVID-19 診断用 NAT 検査薬の使用が認められた。一般に感染症診断薬の審査においては、対象ウイルス核酸を正しく検出する能力 (分析性能) ならびに感染者を正しく特定する能力 (臨床性能) について試験データを示す必要があるが、早期に開発された COVID-19 診断用 NAT 検査薬に関しては、分析性能について詳細な試験計画や結果の提示が要求されなかった。また、臨床性能については、通常は 150 以上の臨床検体を用いた試験が求められるところ、25 の臨床検体 (陽性 10 検体及び陰性 15 検体) を用いた評価結果に

【図表1】 緊急開発されたNAT検査薬の一斉性能評価試験の概要



基づいて使用の可否が判断され、多くは研究用試薬（薬事未承認）という位置づけで使用が許可された。以上のように十分に性能が確認されたわけではない状況であったため、遺伝子医薬部では、早期に使用許可を受けた NAT 検査薬の性能を検証するため、統一した標準試料（ウイルス RNA 及び模擬ウイルス）を用いて一斉性能評価試験を実施することとした（図表 1）¹⁾。

ウイルス RNA を用いた試験では、遺伝子医薬部に設置されている核酸増幅装置に適用可能な 9 品目について評価した。その結果、対象 9 品目はいずれも、50 コピー/反応以上のウイルス RNA を 100% の確率で陽性と判定した。ただし、1 品目においては、検査に使用する測定装置、測定プレートの組み合わせによってはウイルス RNA を含まない陰性コントロールを一定の確率で陽性と判定してしまう現象、すなわち「偽陽性」が生じることを発見し

【図表2】 ウイルスRNAを用いた核酸増幅検査薬の一斉試験の結果

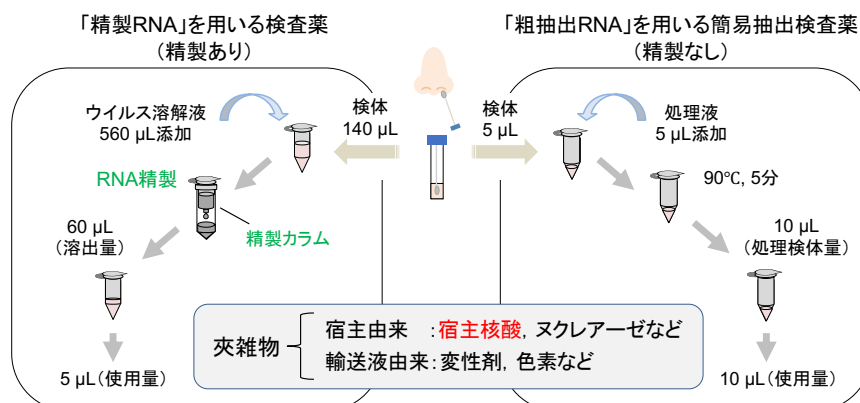
開発企業名 (五十音順)	500 コピー	200 コピー	50 コピー	20 コピー	5 コピー	0 コピー
MBL (医学生物学研究所)	100%	100%	100%	100%	83%	0%
シスメックス	100%	100%	100%	92%	67%	0%
島津製作所	100%	100%	100%	100%	100%	0%
タカラバイオ	100%	100%	100%	100%	67%	0%
ダナフォーム	100%	100%	100%	50%	33%	33%
東洋紡	100%	100%	100%	83%	75%	0%
富士フイルム 和光純薬	100%	100%	100%	100%	92%	0%
プロメガ	100%	100%	100%	100%	67%	0%
ライフテクノロジーズ ジャパン	100%	100%	100%	83%	0%	0%

た（図表 2：赤枠）。この点については、厚生労働省（医療機器審査管理課、結核感染症課）に直ちに報告し、ダナフォーム社に迅速な対応を促したことで、検査現場における偽陽性拡大防止に貢献した。また、模擬ウイルスを用いた試験では、専用測定装置を用いる検査薬も含めた 30 品目（2020 年 7 月末時点）を評価するため、遺伝子医薬部にて調製した模擬ウイルス試料を濃度非開示で開発企業に配布し、その解析結果を取りまとめた。その結果、すべての検査薬が 4300 コピー/mL 以上の濃度試料（約 50 コピー/反応に相当）について 100% の確率で陽性と判定した。一方で、低濃度の試料については検査薬によって差がみられ、検査薬ごとに反応系に持ち込める検体量（ウイルス量）の違いが影響したと考えられた。本試験で評価した検査薬の構成や仕様等については別途、調査研究として公表している²⁾。

【反応系に含まれる宿主由来核酸がウイルス核酸の検出に及ぼす影響に関する検討】

上記の一斉性能評価試験においては、夾雑物を含まない評価試料を用いたが、実際の検査に用いる臨床検体中には宿主由来の核酸をはじめとする多種の夾雑物が含まれている。現

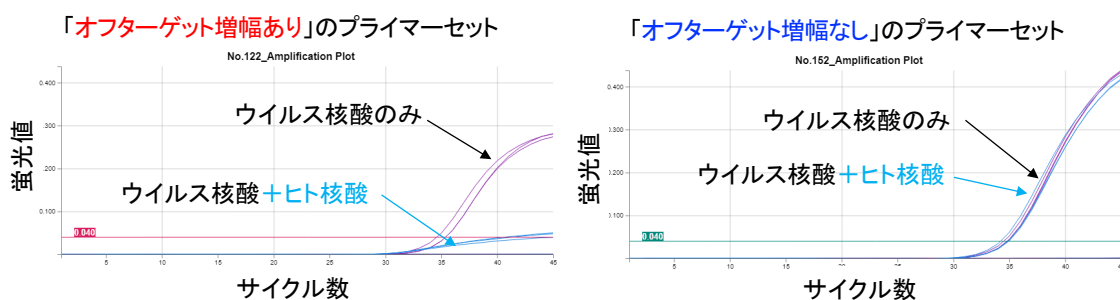
【図表3】 検体からのRNA精製ステップの有無とその特徴



在使用されている COVID-19 診断用 NAT 検査薬は、大きく RNA 精製を必要とする検査薬と精製不要の簡易抽出検査薬に分けられるが、検体中に混入する宿主由来の核酸（ヒト核酸）については RNA 精製を行う場合でもウイルス RNA と同様にカラムに吸着するため除くことができない（図表 3：赤字）。こうした検体中に混入するヒト核酸は、理論的にはウイルス検出プライマーによりオフターゲット増幅を引き起こすと考えられるものの、プライマーの結合位置や相補性の違いなどから、ヒト核酸の影響は限定的と考えられており、実際、既存の性能評価ガイダンスにヒト核酸の混入の影響について具体的な言及はない。

以上を踏まえ、本研究では反応系に含まれるヒト核酸がウイルス核酸の検出に及ぼす影響について解析を行った。具体的には、風邪コロナウイルスの核酸を対象に、プライマーが備えるべき基本要件（至適 Tm 値、GC 含有率など）を満たす約 300 のプライマーセットを設計し、オフターゲット増幅の発生頻度及び検出感度への影響を検討した。その結果、ヒト核酸存在下においては 15% のプライマーセットで実際にオフターゲット増幅が起こることを見出した。また、オフターゲット増幅が起こるプライマーセットについては、目的ウイルス核酸の検出感度が大きく低下し、一方で、オフターゲット増幅を起こさないプライマーセットはヒト核酸の影響をほとんど受けないことがわかった（図表 4）。

【図表4】 オフターゲット増幅プライマーのウイルス核酸検出感度評価



以上の結果から、一般的に我々が設計・使用しているプライマーでは、比較的高頻度に宿主核酸を非特異的に増幅する反応が起こっており、そのようなプライマーセットではウイルス核酸の検出感度が低下していると考えられた。この偽陰性につながる現象については、夾雑物を含まない試験系では予め評価することができず、また、臨床検体を用いた試験でも、ヒト核酸の混入量が個人や採取方法によりばらつくため、十分な評価ができない可能性がある。ヒト核酸を意図的に混入させた試料を用いた試験を実施することにより、現状では見逃されているリスクのあるオフターゲット増幅及び感度低下を特定することが可能となり、より検出感度が高い検査薬の開発につながると考えられる。

【参考文献】

- 1) 築茂由則, 井上貴雄. 新型コロナウイルス感染症診断用核酸検査薬の信頼性確保に向けた取り組み. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 53(2), p116-120. (2022)
- 2) 築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 山本真梨子, 野口耕司, 鈴木孝昌, 本間正充, 合田幸広, 井上貴雄. 早期に使用許可を受けた COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の構成に関する調査と考察. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 54(2), p148-161. (2023)

MEMO

A series of horizontal dotted lines for writing.

抗体医薬品による Fcγ 受容体を介した生物活性評価法の開発

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・主任研究官
青山道彦

【はじめに】

抗体医薬品を含めたバイオ医薬品は遺伝子組換え技術や細胞培養技術等のバイオテクノロジーを応用して製造される医薬品であり、低分子医薬品と異なり、分子量が大きく、構造が複雑であることから、様々な分子種を含む不均一な分子の集合体として存在する。翻訳後修飾（糖鎖構造、酸化など）や凝集/分解などによって引き起こされるバイオ医薬品の不均一性は有効性・安全性に影響するため、各々の分子種がどのような生物活性を有するかを評価する必要がある。本講演では、抗体医薬品の様々な品質特性が有効性・安全性に及ぼす影響に関して、抗体医薬品の薬理作用に関連する抗体受容体である Fcγ 受容体 (FcγR) に焦点を絞り、我々が作製した生物活性評価系とそれを用いた特性解析の結果を紹介する。

【抗体による FcγR を介した細胞活性化評価系の構築】

抗体は 2 本の H 鎖と 2 本の L 鎖によって構成される分子量約 150,000 の糖タンパク質である。抗体医薬品の薬理作用の発揮において、Fab 領域による抗原への特異的な結合が重要であることは言うまでもないが、細胞傷害活性を薬理作用とする抗体医薬品においては Fc 領域を介したエフェクター活性が重要であることが知られている。なかでも、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性においては、免疫細胞に発現する FcγR の抗体 Fc 領域への結合が活性発現のトリガーとなっている。さらに、抗体医薬品の安全性確保における問題点として、意図せぬ免疫系の活性化に伴う有害作用の発現があげられるが、このような抗体医薬品の有害作用発現においても、抗体の Fc 領域とそれを認識する FcγR の結合に伴う免疫細胞の活性化が深く関連することが知られている。従って、抗体医薬品の品質・安全性評価においては、FcγR を介した薬理作用と有害作用の両面を考慮した検討が重要である。

哺乳動物においては構造の異なる様々な FcγR が存在し (図 1A)、免疫細胞毎に特徴的な発現分布を示すが、その構造や発現パターンは動物種 (ヒト、ヒト以外の霊長類、マウス等の齧歯類) 間で大きく異なることから、従来の実験動物を用いた非臨床試験では、抗体医薬品によるヒト FcγR を介した有害作用発現を評価することは困難である。そのため、抗体医薬品による FcγR を介した免疫細胞活性化評価においてはヒト末梢血単核球等の初代培養細胞が用いられることが一般的であるが、細胞調製の煩雑さやドナー間差の影響、再現性の低さ等の課題を有している。そこで、我々はヒトで発現する 4 種類の活性型 FcγR (FcγRI、FcγRIIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIb) と 1 種類の抑制型 FcγRIIb に関して、薬理活性に影響することが報告されている遺伝子多型を含めて、レポーター細胞株を構築した (図 1B, C)。構築したレポーター細胞株は抗体による FcγR 活性化を FcγR 毎に迅速かつ簡便に評価可能であり、FcγR に対する抗体の結合活性の違いを反映することを明らかとした¹⁻³。

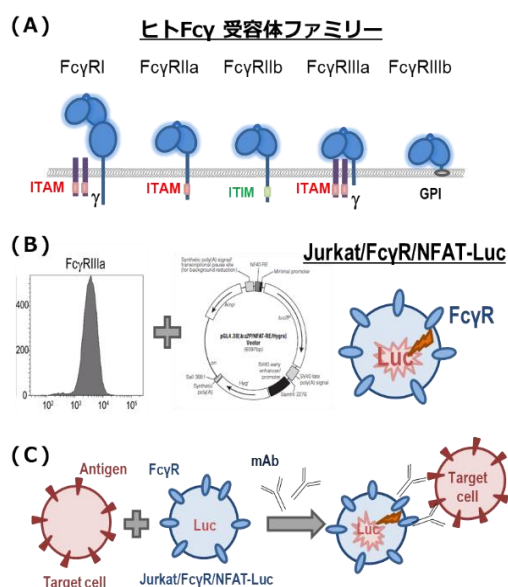


図1 (A) ヒト Fcγ 受容体ファミリーの構造, (B) FcγR レポーター細胞株の構築, (C) レポーター細胞を用いたアッセイ系

以後、作成した FcγR レポーター細胞株を用い、抗体医薬品の特性と有効性・安全性に関連する *in vitro* 評価の結果を発表する。

【糖鎖構造などが異なる抗体のエフェクター活性の評価】

抗体の Fc 領域を介したエフェクター活性は抗体 Fc 領域の Asn-297 に結合する N 結合型糖鎖が非常に重要な役割を果たすことが知られている。特に、コアフコースの有無は FcγRIIIa を介した ADCC 活性に大きな影響があることが明らかとなっている。しかしながら、抗体の N 結合型糖鎖は非常に複雑かつ多様な構造を持っており、個々の糖鎖構造が FcγR を介した生物活性に及ぼす影響に関する理解は十分でない。そこで、我々は酵素反応により均一な糖鎖構造を有する抗体を作成し、糖鎖構造の違い、特に末端ガラクトースの数や結合位置が抗体の ADCC 活性に及ぼす影響を評価した (図 2)。その結果、N 結合型糖鎖に最大 2 個結合する末端ガラクトースに関して、ガラクトースが結合していない抗体 (G0F) と比べ、ガラクトースを 2 個結合した糖鎖 (G2F) を有する抗体が高い FcγRIIIa 活性を示した。また、興味深いことに末端ガラクトースが 1 個結合した糖鎖 (G1F) は α 1-3 結合、α 1-6 結合と結合部位の異なる構造異性体を有しているが、α 1-3 結合糖鎖 (G1bF) は G0F と同等の FcγRIIIa 活性を示したのに対し、α 1-6 結合糖鎖 (G1aF) は G2F と同等の FcγRIIIa 活性を示した。

以上の結果から、先行研究において末端ガラクトース量の増加により FcγRIIIa 活性が増強する可能性が指摘されていたが、α 1-6 末端にガラクトースが結合することが FcγRIIIa 活性の増強に重要であることが示された⁴。また、以上の結果から、我々の樹立した FcγR レポーター細胞株は、糖鎖構造やアミノ酸改変によって変化する抗体医薬品の Fc 領域を介したエフェクター活性の違いを評価可能であることが示された。

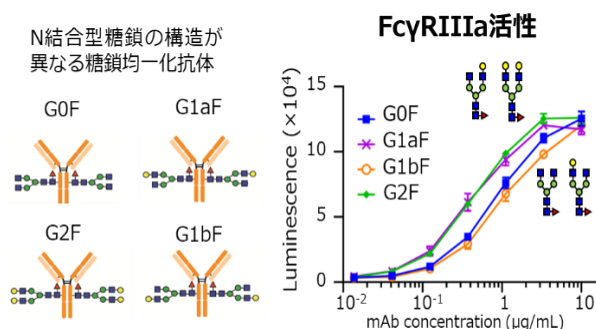


図2 糖鎖構造の異なる抗体のFcγR活性評価

【抗体薬物複合体の凝集に伴うオフターゲット毒性の評価】

抗体に抗がん剤などを搭載した抗体薬物複合体 (antibody-drug conjugate; ADC) は、抗体の機能により標的細胞特異的に搭載した低分子化合物を送達可能であることから開発が進められている。一方で、ADC においてはオフターゲット毒性が課題とされており、標的抗原を発現しない細胞 (非標的細胞)・組織への移行経路やそれに関わる品質特性の理解が必要とされている。想定される様々な経路の一つとして、FcγR を介した取込が挙げられているものの、FcγR を介した取込を否定する報告もあるなど、その寄与は明らかとなっていない。そこで、樹立した FcγR 発現レポーター細胞株を用い、FcγR を介した ADC の非標的細胞への取込の評価を試みた。FcγR レポーター細胞株に ADC を作用させた結果、ADC 単独では FcγR の活性化及び FcγR 依存的な細胞内取込が認められないことが明らかとなった。バイオ医薬品は一般に凝集することで免疫応答のトリガーとなることが知られていることから、生物薬品部ではこれまでに様々な抗体凝集体による免疫細胞活性化に関する研究を実施しており、抗体凝集体が FcγR を介して免疫細胞を活性化し得ることを明らかとしてきた^{5,6}。また、ADC はその疎水性の向上に伴い、凝集体形成が促進されることが知られている。そこで、強制的に凝集させた ADC 凝集体を用い、ADC の凝集が FcγR 依存的な非標的細胞内取込に影響するか、評価した。その結果、ADC 凝集体は FcγR レポーター細胞株で凝集に伴う細胞傷害性の増強が認められ、細胞傷害性の増強と FcγR レポ

ーター活性が相関することが明らかとなった (図 3)。以上の結果から、ADC のオフターゲット毒性発現において、FcγR は重要な役割を果たしており、ADC 凝集体などの FcγR 活性化能を有する多量体は FcγR 依存的な細胞内取込により、非標的細胞に取り込まれることが示唆された⁷⁾。また、我々の樹立したレポーター細胞株は FcγR の活性化や活性化に伴う FcγR 依存的な細胞内取込を評価可能であることが示された。抗体医薬品による FcγR の意図せぬ活性化は、ADC 凝集体におけるオフターゲット毒性の発現に限らず、抗体医薬品の免疫原性、サイトカイン放出症候群などの有害作用の発現にもつながり得ることから、我々のレポーター細胞株は抗体医薬品の安全性評価においても有用であると考えられる。

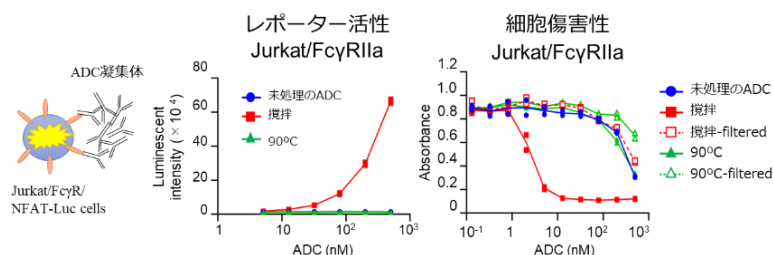


図3 ADC凝集体によるFcγR活性化とFcγR発現細胞における細胞傷害性

以上、我々が作製した FcγR レポーター細胞株は、抗体医薬品による種々の FcγR を介したエフェクター活性や有害作用発現を簡便に評価可能であることが示された。

【終わりに】

近年、抗体医薬品は従来の IgG 抗体とは構造や作用機序の異なる次世代型抗体医薬品の台頭など、モダリティの多様化が進み、それに伴い、評価すべき品質特性や生物活性も多様化が進みつつある。我々も従来の IgG 抗体のみならず、本発表で触れた抗体薬物複合体に加え、バイスペシフィック抗体、IgA 抗体などの新規モダリティの品質特性解析に向けた研究に取り組んでいる。今後はこれらの新規モダリティの品質特性が有効性・安全性に及ぼす影響の評価やそれらを簡便に評価可能な生物活性評価系の構築に取り組むことで、多様化するバイオ医薬品の有効性・安全性の担保に貢献していきたい。

【文献】

- 1) Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N. *PLoS One*. 2014 Apr 21;9(4):e95787.
- 2) Aoyama M, Tada M, Ishii-Watabe A. *Methods Mol Biol*. 2019;1904:423-429.
- 3) Aoyama M, Tada M, Ishii-Watabe A. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Jun 11;608:149-155.
- 4) Aoyama M^{*}, Hashii N^{*} et al. *mAbs*. 2019 Jul;11(5):826-836. (*equally contributed in this work)
- 5) Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A. *MAbs*. 2018 Apr;10(3):370-379.
- 6) Tada M, Aoyama M, Ishii-Watabe A. *J Pharm Sci*. 2020 Jan;109(1):576-583
- 7) Aoyama M, Tada M et al. *Pharm Res*. 2022, Jan;39(1):89-103.

幼若期特異的な生理・薬理学研究から小児用医薬品の拡充に向けて

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長
川岸 裕幸

【緒言】

“子どもは小さな大人ではない”という概念は、医療の現場においても重要である。現在の小児疾患に対する内科的治療の多くは、成人用医薬品の適用外使用により行われている。しかしながら上記の言葉の通り、小児と成人では体の大きさだけでなく、各器官の発育や成熟に差があり、薬の吸収や代謝、排泄などが大きく異なる。さらに、薬の主なターゲットとなるタンパク質分子についても、その発現や性質が小児と成人で異なることが多い。そのため、有効かつ安全な小児用医薬品を開発するためには、小児の特性を理解することが重要である。本講演では、これまでに研究してきた幼若期特異的な心臓生理作用について紹介する。さらに、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CM) を用いた医薬品評価に関する取り組みに加え、小児用医薬品の拡充に向けた今後の展望について述べる。

【幼若期特異的な心臓生理作用を利用した小児心不全治療薬の開発】

小児心不全は、本邦における小児の重要な死因のひとつであり、特に新生児・乳児期の心不全は、急速に重篤となりやすいことが知られている。主な病因のひとつとして、拡張型心筋症 (DCM) がある。一般的に予後が悪く、根治療法は心移植しかないが、小児心移植は依然としてドナー不足など障害が多い。安全な移植待機期間を確保するために、有効かつ安全な治療薬が求められる。近年、イブブラジン (HCN チャンネル阻害薬) や ARNI (アンジオテンシン受容体・ネプリライシン阻害薬の合剤) が小児心不全治療薬として米国で承認されたものの、その数は十分ではない。

アンジオテンシン AT_1 受容体 (AT_1R) は、G タンパク質経路と β アレスチン経路を介して細胞機能を調節している。2017 年、前所属の信州大学医学部分子薬理学教室で、心筋細胞の AT_1R/β アレスチン 2 経路を活性化すると、収縮に重要な L 型 Ca^{2+} チャンネル (LTCC) の活性が増強されることが発見された¹。興味深いことに、この作用は新生児マウスの幼若な心筋細胞でのみ見られ、性成熟期 (8 週齢) 以降のマウスの細胞では確認されなかった。したがって、心筋細胞の AT_1R/β アレスチン経路の活性化は、幼若期特異的な強心作用を誘導することが推察された。

そこで、新生児期および性成熟期のマウスに、G タンパク質経路を抑制しつつ β アレスチン経路を選択的に活性化する「 β アレスチンバイアス AT_1R アゴニスト (BBA)」を皮下注射し、心エコーを行った。その結果、新生児マウスに BBA を投与することで有意な強心作用が確認された。新生児マウスでの強心作用は BBA 投与後 8 時間持続した一方、性成熟マウスでは BBA による強心作用は認められなかった。また、他の強心薬で見られる心拍数や酸素消費量の増大などの副作用は誘導されなかった。BBA による強心作用は、hiPSC-CM でも確認され、ヒトにおいても保存されている薬理作用であることが示唆された² (図 1)。さらに、離乳期までに過半数が死亡する小児 DCM モデルマウスにおいて、BBA を継続投与することでその生存率が有意に改善することを見出した (未発表データ)。すなわち、BBA は小児特異的な副作用の少ない強心薬としてはたらくことが期待され、小児心不全の重要な治療薬候補となることが示された。

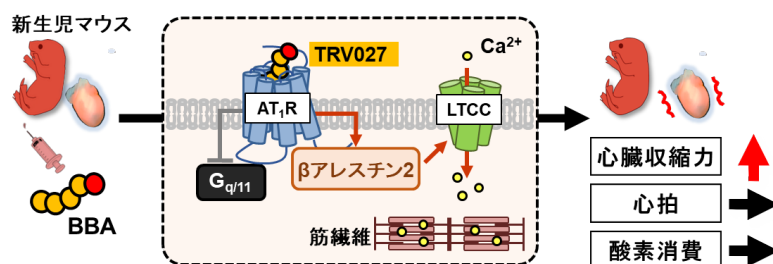


図1 心筋細胞 AT_1R/β アレスチン経路を介した幼若期特異的な強心作用

【ヒト iPS 細胞由来心筋細胞による医薬品の安全性評価】

2023年4月に薬理部の第三室長に赴任後、ヒト iPS 細胞分化細胞を用いた医薬品評価法の構築に取り組んでいる。近年、対がん療法の技術的進歩により、多くのがんサバイバーが存在する。それに伴い、抗がん剤治療による不整脈や心収縮不全などの心毒性の発生が深刻な問題となっている。そのため、非臨床試験において、医薬品の心毒性リスクを評価することが重要である。これまで薬理部では、hiPSC-CMを用いた催不整脈リスク評価法に関する国際検証試験に参加し、ICH S7B ガイドラインに関する Q&A に貢献してきた。現在は、日米欧 20 か所の大学、研究機関、企業により、医薬品の慢性曝露による心毒性評価の国際検証試験が進行中である。抗がん剤を含めた医薬品の影響について、hiPSC-CM による催不整脈性や細胞毒性、収縮不全などの評価を実施し、得られた大規模データの解析を行っている。

また、従来の hiPSC-CM はその表現型の未成熟性が指摘されており、一部の医薬品による心臓薬理作用を再現できていない可能性がある。そのため、遺伝子導入や培養法の改良などにより、成熟度の高い hiPSC-CM の作製法が検討されている。近年、底面にナノスケールの溝をもつ培養皿（配向性プレート）で培養することで、hiPSC-CM が配向性を獲得することが報告された。生体の心臓では心筋細胞が配向性を有することから、配向性を持つ hiPSC-CM はより成熟した表現型を示し、従来の細胞では評価が難しかった医薬品の薬理応答が向上する可能性が考えられた。そこで、hiPSC-CM を配向性プレートで培養し、収縮能、遺伝子発現、薬理応答作用への影響について検討を行った。収縮能については、高性能ビデオカメラを用いた細胞イメージングによる動きベクトル解析により、細胞収縮速度として評価した。その結果、配向性プレート培養により、hiPSC-CM は高い配向性を示し、収縮速度の有意な上昇が認められた。また、一連の収縮制御因子の遺伝子発現が上昇しており、ヒト成人心臓サンプルに類似した傾向が見られた。さらに、イソプロテレノールやジゴキシンなどの強心薬に対して、より生理的な薬理反応を示すことが判明した。以上の結果から高配向性 hiPSC-CM は、従来の細胞では検出できなかった薬剤誘発性の心収縮変化の評価に適切なツールとなることが示唆された（図2）。

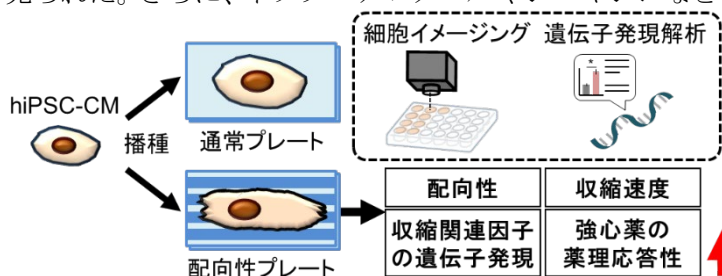


図2 配向性プレート培養によるhiPSC-CMの表現型変化

【小児用医薬品の拡充に向けた取り組み】

今後は、レギュラトリーサイエンスの立場から小児用医薬品の拡充に取り組んでいきたいと考えている。小児用医薬品の拡充は日米欧の共通の課題であり、本邦でも「経済財政運営と改革の基本方針 2023」に小児用医薬品のドラッグラグ・ドラッグロス解消の必要性が述べられている。小児用医薬品の開発停滞の原因のひとつとして、健康な小児による治験が難しく、小児集団のデータ収集に限界があることが挙げられる。その解決に向けて、治験に先立つ非臨床試験の精度を向上させ、小児の安全性と治験の質を確保することが重要である。そのためには、全身の臓器が発育・発達の上途にあり、医薬品に対する反応も変動するような小児の特性を適切に反映した評価法が求められる。これまでの基礎研究によって培った知識や技術を基に、小児用医薬品評価に資する試験法を構築し、さらにステークホルダーらと連携することで、関連ガイドラインの改定や整備を目指した研究を展開していく。

【参考文献】

1. Kashiwara T et al., Angiotensin II activates $Ca_v1.2$ Ca^{2+} channels through β -arrestin2 and casein kinase 2 in mouse immature cardiomyocytes. *J. Physiol.* 2017;595(13): 4207–25.
2. *Kashiwara T, *Kawagishi H et al., β -Arrestin-Biased AT1 Agonist TRV027 Causes a Neonatal-Specific Sustained Positive Inotropic Effect Without Increasing Heart Rate. *JACC Basic to Transl. Sci.* 2020;5(11): 1057–69. (*co-first author)

