

血液脳関門生体模倣システム (BBB-MPS) の開発と社会実装・行政受容を目指す研究

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・薬理部

○最上 (重本) 由香里

【緒言】

新たなモダリティ医薬品の台頭、動物実験 3R の推進、創薬プロセスの効率化など、医薬品開発を取り巻く環境は刻々と変化しており、非臨床評価も変化に対応していく必要がある。ヒト細胞を搭載した生体模倣システム (Microphysiological System; MPS) は、変化していく医薬品開発環境に対応する創薬ツールとして世界中で開発が進んでいる。欧米では、MPS サプライヤー企業の創立、製薬会社の MPS デバイス社内検討が進められ、行政的受容の議論も開始されている。本邦においても、2017 年に産官学が連携した AMED-MPS プロジェクトが立ち上がり、肝臓・小腸・腎臓・血液脳関門 (Blood Brain Barrier; BBB) を対象臓器とした MPS 開発研究および標準化に向けた議論が進んでいる。また、今年度より MPS 技術の社会的、行政的受容を目的とした AMED-MPS-レギュラトリーサイエンスプロジェクトがスタートした。講演者は九州大学薬学部薬理学講座にて博士号を取得後、薬理部第 1 室で、中枢神経系における医薬品や化学物質等の有効性・安全性を評価する研究に従事してきた。また、上述の AMED-MPS プロジェクトに参画し、研究活動を行っている。

脳の血管は BBB のバリア機能によって、末梢の血液と脳の組織液の物質の交換を制限している。BBB のバリア機能は、脳内の環境を維持することに役立っているが、一方で多くの薬剤が血液から脳へ移行することを妨げるため、中枢神経医薬品の上市の低確率、中枢性副作用予測の困難さの一因となっている。BBB は、血管を形成する内皮細胞同士がタイトジャンクションタンパク質によって強固に密着し、様々なトランスポーターを介して、栄養素などを取り込む一方で、有害物質を血管側へ排出している。血管の周辺はペリサイトとアストロサイトのエンドフィートで覆われており、ニューロバスキュラ-ユニットとよばれる複合的な組織を形成している。予測性の高い中枢神経系評価を行うために、ヒト BBB の複雑な構造と機能を再現した MPS の開発が期待されている。

本発表では、我々が取り組む BBB-MPS を事例として、レギュラトリーサイエンス、およびアンメットニーズに応える新たな創薬ツールの開発研究アプローチを紹介する。また、本研究のバックグラウンドとなる研究として、講演者が取り組んできた、『ラット BBB-MPS を用いたミクログリアの BBB 機能制御メカニズムの解析』についても報告する。

【ラット BBB-MPS を用いたミクログリアの BBB 機能制御メカニズムの解析 ～BBB-MPS の有効性の紹介～】

脳の免疫担当細胞であるミクログリアは多彩な生理的機能により中枢神経系の恒常性を維持している¹。脳梗塞、てんかん、アルツハイマー、多発性硬化症など、多くの中枢神経疾患において、ミクログリアの活性化と BBB の破綻が生じ、症状が悪化することが報告されているが、BBB の破綻に対するミクログリアの直接の関与については不明であった。講演者はファーマコセル社で製品化されている静置型二次元 (2D) -BBB-MPS (トランズウェルプレートのトランズウェルの内部を血管側、外部を脳側に見立て、血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトの 3 種の細胞で構成されたモデル) を用いた研究により、本モデルの脳側に活性化したミクログリアを共培養すると脳側のサイトカイン・ケモカイン濃度が増大し、BBB バリア機能が崩壊することを示した。また、ミクログリアによるサイトカイン・ケモカイン濃度の増大はアストロサイトとの相互作用によって生じていることを明らかにした^{2, 3}。本研究により、2D-BBB-MPS にミクログリアを搭載することで、脳の炎症性変化も検証可能となり、生体反応をより再現したモデルになる可能性を示した。

また、BBB 形成・成熟過程に及ぼすミクログリアの役割について解析を行った。BBB の形成時期や形成メカニズムはほとんど明らかになっていない。講演者は、2D-BBB-MPS のバリア形成過程にミクログリアを共培養して解析を行い、ミクログリアが血管周辺のサイトカイン・ケモカイン濃度を調節することに

よって BBB の発達を促進していることを明らかにした³。さらに、発達期のラットを用いてラットの BBB 形成時期を特定し、その時期の脳血管近傍ミクログリアが BBB 形成・成熟に重要な役割を果たしているという知見を得ている。講演者は、BBB-MPS を用いることで、in vivo の反応予測性が高まり、ミクログリアの新たな生理機能を解明出来ること、また同時に、ミクログリアを搭載することによって BBB-MPS の評価予測性が向上する可能性を示した。

【BBB-MPS の開発と標準化に向けた取り組み】

BBB-MPS を用いた評価結果を医薬品開発に用いるためには、“BBB らしさ”を比較する世界共通基準を定める必要がある。そこで産官学で協議を行い、必要最小限の BBB 機能ベンチマーク項目を提言した。東京薬科大学の降幡知巳研究室が開発したヒト由来不死化脳血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを本課題における基準細胞とし、2D-BBB-MPS を作製してベンチマーク項目を測定した。その結果、提言したベンチマークを用いることで、2D-BBB-MPS の性能を評価できること、当該 BBB-MPS で推奨される試験系を明確化できることを示した⁴。また、より生体模倣性の高い BBB-MPS として、三次元チューブネットワーク BBB デバイス (3D-BBB) を大阪大学の松崎典弥研究室と共同開発した。3D-BBB は、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトで構成され、脳毛細血管自己形成型のチューブネットワーク構造を有する。我々は、この 3D-BBB がベンチマーク項目を満たすこと⁵、さらにトランスフェリン受容体を介したトランスサイトーシス (RMT) を再現していることを実証し^{6,7}、本モデルが、高分子医薬品の中枢移行性を評価可能なユーザーニーズの高いモデルになる可能性を示した。また、ラットの BBB 発達過程と比較し、BBB 成熟過程の指標を見出し、3D-BBB 成熟段階を示唆するデータを取得した。以上のように我々は、MPS 技術開発研究において、先端技術の開発と同時に、評価系の生体模倣性の検証と、評価系の頑健性向上に取り組んでいる。これらの科学的エビデンスが社会実装を促進することで、的確な行政受容につながることを期待される。

【まとめ】

MPS は多くの要素技術の複合体であることから、様々な技術要件の検討を行い再現性がとれるようにプロトコルを最適化する必要がある。信頼性のあるデータの蓄積と、MPS の有用性を証明することによって、医薬品評価試験での実用化を目指していきたい。

1. **最上(重本) 由香里**、佐藤 薫 (2017) ミクログリアの中枢神経系発達調節機能とその創薬・治療への応用可能性 日本薬理学雑誌 150 (6) 268.
2. **Shigemoto-Mogami Y**, Hoshikawa K, Sato K, (2018) Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model. *Front Cell Neurosci.* 12 494.
3. **最上(重本) 由香里**、佐藤 薫 (2021) サイトカイン・ケモカインを介したミクログリアの中枢神経系発達調節機能 YAKUGAKU ZASSHI 141 (3) 359.
4. Nakayama-Kitamura K, **Shigemoto-Mogami Y**, Toyota Y, Mihara I, Moriguchi H, Naraoka J, Furihata T, Ishida S, Sato K, Development of human blood-brain barrier / Micro Physiological System -Comparison between facilities by evaluation parameters- Regen Ther. in revision.
5. Figarol A, Naka Y, **Shigemoto-Mogami Y**, Furihata T, Sato K, Matsusaki M, (2020) *In Vitro* self-organized three-dimensional model of the blood-brain barrier microvasculature. *Biomed Mater.* doi:10.1088/1748-605X/aba5f1.
6. Piantino M, Louis F, **Shigemoto-Mogami Y**, Kitamura K, Sato K, Furihata T, Yamaguchi T, Kawabata K, Yamamoto S, Iwasaki S, Hirabayashi H, Matsusaki M, (2022) Brain Microvascular Endothelial Cells Derived from Human induced Pluripotent Stem Cells as in vitro model for assessing BBB Receptor-Mediated Transcytosis. *Mater Today Bio.* 14, 100232.
7. Piantino M, Kang DH, Furihata T, Nakatani N, Kitamura K, **Shigemoto-Mogami Y**, Sato K, Matsusaki M. (2022) Development of a three-dimensional blood-brain barrier network with opening capillary structures for drug transport screening assays. *Mater Today Bio.* 15, 100324.

MEMO

A series of horizontal dotted lines for writing.

ヘリウム不足に対応した室内空気試験業務

国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

○大嶋 直浩

【緒言】

ヘリウム不足が深刻化している。ヘリウムは日本で産出されないため、その全量を主に米国やカタール等からの輸入で賄っている。しかし、定期的な修理トラブル・港湾ストライキや中東での政情不安により、その供給は極めて不安定である。2022年ではコロナ禍による物流停滞、ロシアのウクライナ侵攻による経済制裁の影響、大型ヘリウム精製施設のプラント火災などでヘリウムの供給不足に拍車がかかった。さらに歴史的な円安による購買力低下でヘリウムの調達が困難となり所内のヘリウム供給も滞った。他方、ヘリウムはガスクロマトグラフ(GC)のキャリアーガスのみならず、超電導マグネット、半導体、量子コンピュータ及び原子炉等の冷却剤並びにロケット発射の推進剤など極めて重要な分野で旺盛な需要があり、ヘリウムがもつ不活性や不燃性を期待して今後も使用量が増加することが予想される。このような状況から短期的にヘリウム不足が解消されたとしても、自国でヘリウムが産出されない限り常にヘリウム不足の憂き目にあう。

シックハウス症候群は、室内空気質の汚染により誘発される健康障害の総称であり、住宅の気密化、ライフスタイルの多様化及び家庭用品の変遷等により質的・量的に絶えず変化する。室内空気質の汚染は建築物等から放散される化学物質が主因であり、これらの不必要なばく露を低減させ、それらが健康影響の危惧を起こすことなく安全かつ適正に使用されることを目的に、室内濃度指針値(以下、指針値)が策定されている。指針値は、関係者が室内空気汚染の低減策を講じる上で参考となる値であり、それ自体に法的な拘束力は持たないものの、建築物衛生法、住宅品質確保法、学校環境衛生基準及び業界の自主基準等に幅広く参照されている。指針値と突合するための測定データは、信頼性や妥当性が検証された標準的測定方法で精確に測定されることが求められており、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC/MS)の使用が規定されている。しかしながら、そのキャリアーガスはヘリウムに限定されており、昨今のヘリウム需給逼迫に対応するためその代替ガスを用いた検証が急務となっている。

本発表では、室内空気中化学物質の GC/MS 分析にヘリウム代替キャリアーガスとして安定的に供給可能な水素及び窒素への適用性を検証し、標準的測定方法の改定に資するデータを取得したため¹⁾、その詳細について紹介する。

【方法】

測定対象化合物を指針値が設定された物質(以下、指針値設定物質)を対象とした。即ち、

揮発性有機化合物(VOC)であるトルエン、エチルベンゼン、キシレン、スチレン、パラジクロロベンゼン及びテトラデカン、並びに準揮発性有機化合物(SVOC)であるフタル酸ジ-*n*-ブチル (DnBP)及びフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)である。GC/MS 装置は主にアジレント・テクノロジー社製 GCMS-5977B を使用し、機種間差の評価では島津製作所製 GCMS-QP2020 の分析データと比較した。水素発生装置は Airtech 社製の NM Plus 160 Hydrogen Generator を使用した。GCMS-5977B の分析条件を表 1, 表 2 に記す。

表 1. VOC の測定条件

Carrier gases	He	H ₂	N ₂
Sampling conditions			
Expected air volume	144 L (0.1 L/min, 24 h)		
Expected extraction volume	1 mL		
Analytical conditions			
Column	Rtx®-1 (0.32 mm × 60 m, 1 µm)	Rxi®-1MS (0.25 mm × 60 m, 1 µm)	
Time	45 min	52.5 min	105 min
Gradient mode	40°C → (5°C/min) → 250°C	40°C → (4°C/min) → 250°C	40°C → (2°C/min) → 250°C
Inlet temperature	280°C		
Source temperature	230°C		
Quad temperature	150°C		
Linear velocity (cm/sec)	36.5	36.5	18.9
flow (mL/min)	2	0.92	0.5
Inlet pressure (kPa)	12.3	5.4	6
Split ratio	20:1		10:1
Acquisition type	SIM / Scan		
Range (m/z)	35 – 450		
Injection volume	1.0 µL		

表 2. SVOC の測定条件

Carrier gases	He	H ₂	N ₂
Sampling conditions			
Expected air volume	4,320 L (3 L/min, 24 h)		
Expected extraction volume	5 mL		
Analytical conditions			
Column	DB-1 (0.25 mm × 15 m, 0.1 µm)	DB-1MS (0.18 mm × 20 m, 0.18 µm)	
Time	30 min	18 min	35 min
Gradient mode	80°C (2 min) → (8°C/min) → 210°C (5 min) → (20°C/min) → 250°C (5 min)	80°C (1 min) → (26°C/min) → 210°C (3 min) → (40°C/min) → 250°C (8 min)	80°C (2 min) → (13°C/min) → 210°C (5 min) → (20°C/min) → 250°C (16 min)
Inlet temperature	250°C		
Source temperature	230°C		
Quad temperature	150°C		
Linear velocity (cm/sec)	67.6	57.8	28.5
flow (mL/min)	1.67	0.74	0.36
Inlet pressure (kPa)	50		
Split ratio	Splitless		
Acquisition type	SIM / Scan		
Range (m/z)	35 – 450		
Injection volume	1.0 µL		

【結果・考察】

各キャリアーガスにおける測定対象化学物質の S/N 比はヘリウムが最も高く、次いで水素、窒素と続いた。直線性を評価するため決定係数を算出した結果、いずれも良好な直線性を示し、最も感度の低かった窒素キャリアーにおいても VOC は主に 0.1~100 µg/mL、フタル酸エステルは 0.1~5 µg/mL の濃度範囲で決定係数が 0.99 以上と良好であった。

測定対象物質の定量限界値(LOQ)と各々の室内濃度指針値を比較した結果、ほとんどの化学物質で LOQ が指針値の 100 分の 1 以下であった。指針値の 100 分の 1 を若干上回ったヘリウムキャリアーのキシレン、窒素キャリアーのトルエン、キシレン及びテトラデカンについても指針値に近似した値を示したことから、これらの物質はいずれのキャリアーガスにおいても指針値の 100 分の 1 程度まで定量できることが明らかとなった。

さらに機種間差を評価するため、アジレント・テクノロジー社製の他に島津製作所製の GC/MS 装置を用いて分析データを比較した。指針値設定物質を両機器の窒素キャリアーガスで分析した結果、クロマトグラム、直線性共に良好なピークが認められ、いずれの機種も指針値の 100 分の 1 程度まで測定できたことから、これらの分析機器は指針値設定物質の標準的測定方法に適用できることが明らかとなった。

本研究では、水素をキャリアーガスとした分析結果がヘリウムと概ね同等であったことから、水素がヘリウムの代替になり得ることが示された。窒素はヘリウムに比べて明らかに感度が低く、現在の分析機器の水準ではノンターゲット分析としての使用は困難と考えられる。しかし、測定対象物質が設定されるターゲット分析では良好な直線性を示し、室内濃度指針値の 100 分の 1 程度まで定量できたことから、少なくとも指針値設定物質を対象とした分析においては窒素もヘリウムの代替キャリアーガスになり得ることが示された。

【まとめ】

本研究により、室内濃度指針値が設定された化学物質の標準的測定方法にヘリウム代替キャリアーガスとして水素及び窒素を適用できることが明らかとなった。ヘリウムに係る地政学的リスクを考慮すると、今後もヘリウム不足は慢性化・深刻化する可能性が高いため、その対策に資する研究はますます重要になるだろう。

【引用文献】

[1] Oshima N *et al.*, BPB Reports, 5, 84—87, 2022 DOI: 10.1248/bpbreports.5.4_84

Innovation of indoor air testing in helium-crisis

Naohiro OSHIMA

Department of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-44-270-6647, Fax: +81-44-270-6647, E-mail: n-oshima@nihs.go.jp

国立医薬品食品衛生研究所のRI管理について

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部

○片岡 洋平

【緒言】

国立医薬品食品衛生研究所には、放射性同位元素(RI)等を取り扱うためのRI施設が設けられており、RIを利用した実験を行うことができる共同実験施設として所内の研究者に活用されている。生化学部第一室では、このRI施設を含むRI管理を業務の一つとしており、これを目的としたRI管理室を設置している。RI管理室では施設の非密封のRI物質や密封線源による放射線照射装置、及び、放射線関連機器・設備を総合的に管理し、これらを利用した研究が円滑に推進されるよう活動を行っている。また、適切な施設の設備整備を進めると共に施設の有効利用を図り、合理的管理・運営に努めている。さらに、放射線管理に関する情報を収集し、法令を遵守して研究者が安全、かつ効率的に密封・非密封のRIを利用した実験が出来るように取り組んでいる。本発表では、当所のRI施設の紹介やRI管理の現状等について紹介する。

【RI施設の概要】

政令で定める数量以上のRIを使用する場合は密封・非密封に関わらず「放射性同位元素等の規制に関する法律」による規制を受けるため、あらかじめ国の原子力規制委員会に、使用する場所、核種、最大使用数量等について申請し、許可を得なければならない。これに基づく当所のRI施設(事業所)の区分は特定許可使用者であり、46核種の非密封RI及び2核種の密封RIの使用の許可を受けている。また、下限数量以下非密封RIを管理区域外使用場所(監視区域)で使用することが可能である。非密封RIを使用するための管理区域と監視区域及びRI管理室は管理・研究棟の1階に、密封RIを使用するための管理区域は、動物・エネルギー棟及び管理・研究棟の3階に設置されている。

当所のRI施設は、医薬品、食品、環境物質の安全性・品質に関する研究において使用されており、放射性物質の分析及び研究ツールとしての使用を目的としている。

【RI管理について】

RI施設は放射性同位元素等の規制に関する法律を遵守し、当所の放射線障害予防規程等に従い管理・運営を行なっている(図1)。日々のRI施設の安全管理は、主に放射線取扱主任者3名とRI管理室2名の担当者により行われている。

【主な管理業務の内容】

RI施設で安全に作業が行える環境であることを確認する日々の安全管理業務はもちろんのこと、主に以下の管理業務がある。①原子力規制庁への届出(必要に応じて原子力規制委員会へ変更届を起票し郵送、密封RIと非密封RIの貯蔵量等の年次報告)、②RIの管理(在庫管理、使用量の管理)、③放射線業務従事者の管理(放射線業務従事者の登録、教育訓練、健康診断、被爆管理)、④施設の管理(汚染検査、防護区域の点検、排水・排気設備の点検、放射線発生装置の点検、測定機器の校正)

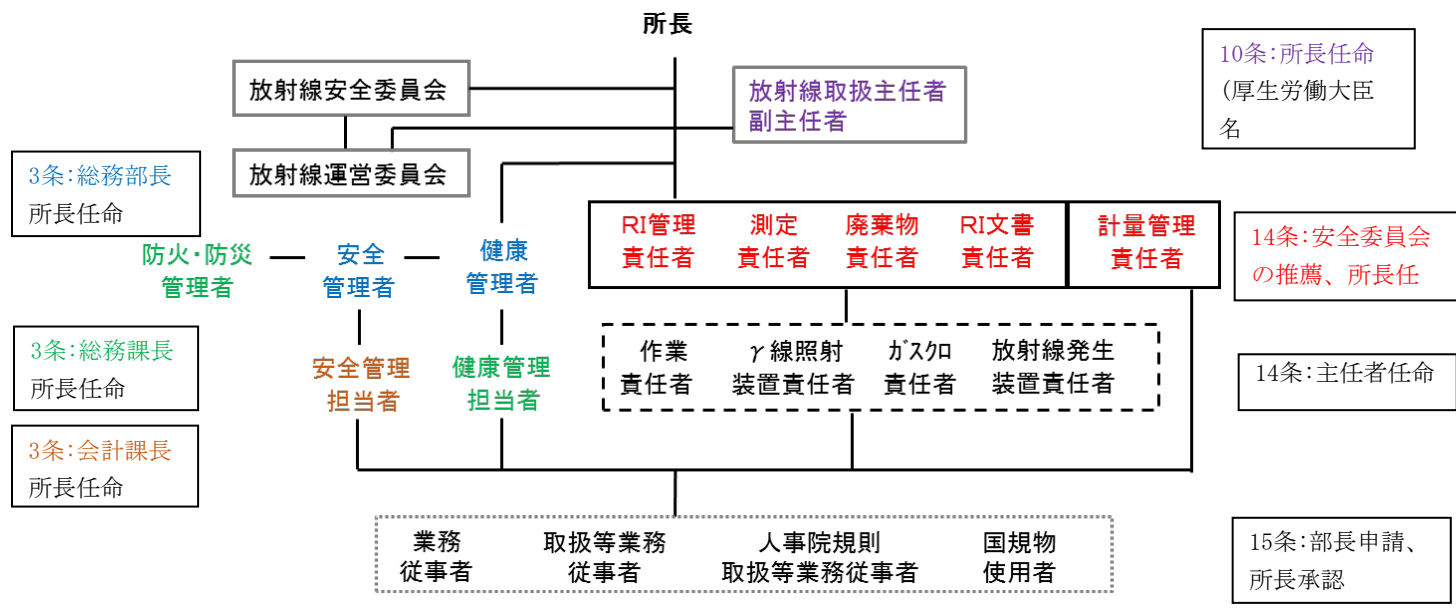


図1 放射線障害防止に関する組織

【令和4年度の主な事例】

・ RI施設の利用状況

RI施設を利用するために約90名が登録されており、このうち管理区域でRIを使用するために16名が放射線業務従事者としての登録である。その他の内訳は、ECDガスクロマトグラフ等の機器の使用や管理のための一時立入等による利用のための登録であり、これらの従事者及び利用者には年1回の教育訓練と年2回の健康診断が実施されている。

現在、RI施設に保有しているRIは密封RIが2核種、非密封RIが5核種であり、令和3年度を含めてこれまでに新たな核種の受け入れによる貯蔵は1回のみで、使用による払い出しもほとんどない状況であり、貯蔵されている非密封RIの大部分が減衰による減少である。RIの使用量は、近年のRIを用いない実験手法の発展に伴い減少傾向が続いている。これまでのところ非密封RIの管理区域での使用は年に数回、短時間の実験等が行われているだけであり、その大部分が下限数量以下の監視区域における使用である。

・ 定期検査・定期確認

定期検査は、RI等の使用開始後、所定の期間ごとに放射線施設が法令に規定される技術上の基準に適合しているかについて行われ、「放射性同位元素等の規制に関する法律」に基づき、原子力規制委員会又は原子力規制委員会の登録を受けた登録検査機関が行うこととされている。当所の場合、密封線源の特定許可使用者であり、それを使用する管理区域を対象として川崎市に研究所が移転してRI施設設置に伴う施設検査の合格日から5年以内に行わなければならないため、令和4年8月末に定期検査を実施した。

定期確認は、従事者の被ばく履歴、教育訓練履歴、使用・点検記録等の帳簿を確認するものであり、RI等の管理が適切になされ、安全性が確保されているかについて「放射性同位元素等の規制に関する法律」に基づき、原子力規制委員会又は原子力規制委員会の登録を受けた登録定期確認機関が行うこととされている。当所の場合、定期検査と同様に施設検査の合格日から5年以内に行わなければならないため、定期検査と同時に実施した。

定期検査・定期確認の結果としては、大きな指摘事項もなく合格証が交付された。

・原子力規制庁の立入検査

立入検査は、「放射性同位元素等の規制に関する法律」に基づき、法令の遵守状況を確認するため、原子力規制庁により不定期に実施される。当所では非密封RIを使用する管理区域への立入検査は、川崎市に研究所が移転してから初めてであることから、帳簿、書類だけでなくその他必要な施設の検査及び関係者への質問等が詳細に行われた。

立入検査の結果としては、8月末に定期検査・定期確認を実施していたこともあり大きな指摘事項もなく終了することができた。

【今後の課題】

これまでも言われてきていることであるが、所内のRI管理を行う放射線取扱主任者の慢性的な不足がまず挙げられる。RI施設内の管理区域を使用するには所内に放射線取扱主任者が存在することが必要である。現在の放射線取扱主任者は生化学部のみで構成されていることから、学会等で放射線取扱主任者が全員不在となる可能性もあり、その場合は管理区域でRIを使用することができない。そのため、RI施設の管理体制の強化には様々な分野（部）の放射線取扱主任者から構成され、かつ十分な人数の放射線取扱主任者の確保が必要不可欠であり、長期的視野に立った管理者の育成が課題である。

また、密封RIを用いたγ線照射装置については、購入から数十年が経ち次第に機器も劣化してきており、修理部品の確保も難しくなっている。廃止を考えた場合でも機器に装備されたRIを製造国に送り返す必要があるが、現状では難しい状況であり、今後の管理について検討する必要がある。

【最後に】

厚生労働省管轄の他の研究所では、RI施設を保有しているが、その大部分が廃止されたり、そもそもRI施設を保有していないため研究が制限されており、そのためRI施設を保有している当所は、研究の自由度が比較的高くなっている。また、緊急時には厚生労働省が食品中放射性物質の規制を設けることとなっており、その科学的対応は当所の管轄となっているように、数少ない国のRI施設としてその重要度も高くなっている。このため、RI施設の継続的な運営には所内の皆様のご理解・ご協力が不可欠であり、今後、更なるご支援をお願いする次第である。これまでRI管理室では管理者の確保のために放射線取扱主任者の資格取得への奨励を行ってきたが、金銭的な補助を含めて積極的に活用していただければ幸いである。