

氏名	よこ 横	た 田	ひろ 博	ゆき 之
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)			
学位記番号	論 農 博 第 2334 号			
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日			
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当			
学位論文題目	Quality evaluation of recombinant DNA-derived pharmaceutical proteins (組換え DNA 技術を応用したタンパク質医薬品の品質評価方法に関する研究)			
論文調査委員	(主 査) 教 授 佐々木隆造	教 授 井上國世	教 授 伏木 亨	

論 文 内 容 の 要 旨

組換え DNA 技術の発展により従来入手が困難であったヒト型のサイトカイン・酵素などを医薬品として利用できるようになったが、それらを製品化するためには品質評価方法の開発が不可欠である。本研究は遺伝子組換えヒトインターロイキン 11 (recombinant human interleukin-11, 以下 rhIL-11) 及び遺伝子組換えヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (pamiteplase) の品質評価方法について検討した結果について報告したものであり、その成果は以下のように要約される。第一章では、rhIL-11のエンドトキシン測定について述べている。医薬品の *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL, カプトガニ血球抽出物) 試験を行う際に偽陰性を防止するために義務づけられているエンドトキシン添加回収試験において、塩基性タンパク質が試料である場合には、エンドトキシン添加回収率の著しい低下が認められることが報告されている。従来回収率低下の原因は明らかではなかったが、強塩基性タンパク質である rhIL-11のエンドトキシン添加回収試験における回収率の低下の原因を検討し、rhIL-11存在下でエンドトキシンがガラスチューブに吸着することがエンドトキシン回収率低下の主原因であることを明らかとした。

第二章では、rhIL-11の簡便で高精度の *in vitro* bioassay を開発した。96穴マイクロプレートを用い、rhIL-11濃度依存的に増殖するマウス形質細胞種細胞株 T10細胞に段階希釈した rhIL-11の試料及び力価標準品を加え、37°C でインキュベートした後、テトラゾリウム塩 WST-1 を加え、ミトコンドリア脱水素酵素により生成したホルマザン色素をマイクロプレーダーにより測定する方法を設定した。さらに医薬品の品質試験としての *in vitro* bioassay で非常に重要となる分析精度を向上させるための検討を実施し、標準品と試料の96穴プレート上の配置が分析精度に影響することを見いだした。

第三章では、pamiteplase の糖組成分析法について述べている。組織プラスミノゲン活性化因子の糖鎖は、その血中半減期に大きな影響を与えることが知られており、糖鎖を評価することは、製品の品質評価において非常に重要である。分析の妨害となる安定化剤 (ショ糖) を効率よく除去し、さらに高価な専用装置を用いることなく精度良く糖組成を測定できる方法を開発した。

第四章では、rhIL-11のメチオニン酸化体の分離・定量法を開発した。rhIL-11のタンパク質表面に位置してレセプターとの結合に関与する Met⁵⁸ は特に酸化を受けやすく、その酸化により生物活性が失われることから、rhIL-11の品質評価において正確に Met⁵⁸ 酸化体含量を測定することは重要である。Met⁵⁸ 酸化体は rhIL-11 (分子量19,047) にわずか一個の酸素原子が結合したものであるが、0.1% / min の非常に緩やかなアセトニトリル勾配を用いた逆相液体クロマトグラフ法により rhIL-11と Met⁵⁸ 酸化体を良好に分離することに成功した。また本測定方法を用い、rhIL-11をモデルとしてプラスチックチューブがタンパク質の酸化に及ぼす影響について検討し、ポリプロピレンチューブが酸化を生じさせる可能性があること、及びポリプロピレンチューブ保管の際には遮光に注意が必要であることを明らかにした。

第五章では、SDS-PAGE において銀染色等の高感度染色法を用いた場合に検出される偽バンド (artificial bands) の低減方法について検討した。偽バンドの原因物質はヒト皮膚ケラチンであることが報告されており、従来偽バンドは試料や電気泳動に使用する緩衝液の汚染によると考えられていたが、ゲルに由来する偽バンドが存在することを明らかとし、その

対応策として、各ウエルに2-メルカプトエタノールを含む緩衝液をアプライして5分間静置し、さらに通常とは逆方向の電気泳動を5分間行った後、アプライした緩衝液を除去するゲル前処理方法を設定し、偽バンドを大きく低減させることができた。分子量マーカーの電気泳動パターンから判断して、本処理は電気泳動パターンに影響を与えず、偽バンドを低減する現実的な方法であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

組換えDNA技術を応用したタンパク質医薬品は、今日医薬品の中で重要な位置を占めるまでに至っており、それらのタンパク質を医薬品として製品化するために、その品質を評価するための品質評価方法の開発が不可欠である。しかしながら、タンパク質は従来の低分子化合物医薬品と大きく性質が異なるため、従来とは異なる品質評価方法を開発する必要がある。本研究では、血小板形成促進活性を持つ遺伝子組換えヒトインターロイキン11 (rhIL-11) 及び線維素溶解を促進する遺伝子組換えヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (pamiteplase) を題材としてその課題に取り組んだものである。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 医薬品中のエンドトキシンを可能なかぎり除去することが重要であり、そのためには開発を目的とする医薬品中のエンドトキシンの定量法の開発が必要である。rhIL-11のエンドトキシン添加回収率低下の原因について検討し、rhIL-11存在下でエンドトキシンがガラスに吸着することを見だし、従来原因が明らかではなかった塩基性タンパク質医薬品のエンドトキシン添加回収率低下の主要原因がエンドトキシンのガラスへの吸着であることを提唱した。
2. rhIL-11の簡便で高精度の *in vitro* bioassay を開発した。さらに標準品と試料の96穴プレート上の配置が分析精度に影響することを見だし、汎用性のある *in vitro* bioassay の分析精度向上策を提唱した。
3. pamiteplase の糖組成分析方法について検討し、汎用装置を用いて精度良く糖組成を測定する方法を開発した。
4. rhIL-11のMet⁵⁸酸化体含量の測定方法を開発した。さらにポリプロピレンチューブがタンパク質の酸化を生じさせる可能性があること、及び露光したポリプロピレンチューブでは酸化が促進されることを明らかにした。
5. SDS-PAGEにおいて銀染色等の高感度染色法を用いた場合に検出される偽バンド (artifactual bands) の低減方法について検討し、ゲルに由来する偽バンドが存在することを明らかとし、有効な偽バンド低減策を見いだした。

以上のように、本論文は、組換えDNA技術を応用したタンパク質医薬品の品質評価方法の検討において様々な工夫・改良を行い、医薬品の品質評価にとどまらず、タンパク質研究一般にも有用な知見を明らかにしたものであり、応用生命科学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年9月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。