

薬 学 研 究 科

平 成 26 年 度

(論文提出による博士論文)

岩 塚 欣 也

学位論文審査結果の報告書

氏 名 岩 塚 欣 也

生 年 月 日 昭和・平成59年12月2日

本 籍 (国籍) 日本

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 第 1 2 4 号

学位授与の条件 学位規程第5条2項該当
(博士の学位)

論 文 題 目

糖鎖分析を基盤とした眼組織試料の分析研究

審 査 委 員

(主 査) 鈴 木 茂 生



(副主査) 岩 城 正 宏



(副主査) 川 崎 直 人



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

点眼剤は角結膜上に薬液を滴下して結膜嚢内に貯留させ、角膜組織、結膜組織、あるいは角膜を介して前房内に薬液が浸潤して効果を発揮する。点眼剤は眼局所で作用するため全身投与に比べて副作用が少ない。一方で、点眼剤は眼に直接投与するため、薬剤の眼に対する刺激性の評価は重要な試験項目の一つである。一般的に眼刺激性試験は1944年にFDAの毒性学者であったジョン・ドレイズとジェイコブ・スピネスによって考案されたドレイズ試験が用いられている。ドレイズ試験はウサギの眼に被験物質を投与し、角膜、虹彩及び結膜の状態変化をスコア化して評価する試験法である。ドレイズ試験は実験動物に対して局所的な苦痛を与える試験法であり、近年の動物愛護の観点から様々な代替法が研究されている。ドレイズ試験の代替法となるin vitro試験法として、角膜培養細胞を用いる眼刺激性試験の開発が検討されてきた。しかしながら、in vivoの評価と一致しない例も散見される。その理由として、涙液成分の有無、大気への暴露などの違いの他、細胞表層を構成するタンパク質や脂質の違い、細胞外マトリックス構造の違いなどが考えられるが、in vitro試験とin vivo試験の結果の相違をこのような観点から議論した例は見当たらない。

眼科領域で用いられる薬剤の殆どは水溶液としてプラスチック容器に充填され、同一の容器から患者の手で頻回投与される。点眼剤の使用時に患者が、誤って点眼容器のノズル部分をまぶたに接触させ、眼の分泌物（眼脂）が点眼容器中に逆流し、眼脂等が使用中の薬剤に混入する事例もあり、他の製剤剤形に比べ汚染しやすい。特に、点眼剤使用時の眼脂混入に起因した消費者からの報告は年々増加している。2000年3月8日付医薬発第237号「医薬品等の回収について」が医薬安全局長名で通知され、無菌製剤については製造工程中に外来性異物及び生体由来異物が混入した場合は製品を回収することが明記されている。従って眼脂は生体由来異物に該当し、その混入が点眼剤の開封後であるかどうか回収対象の判断を大きく左右することになる。このことから点眼剤メーカーは点眼剤に混入した眼脂を同定するための確認試験を実施する必要がある、通常角膜からの脱落細胞を、ギムザ染色法により染色して観察することで眼脂を同定している。しかし、染色法は検出感度が低いことから眼脂を特定できない例もあり、顕微FT-IRやニンヒドリン試液によるタンパク確認等の複数の試験を実施しているのが現状である。しかしながら、いずれの方法も感度が低いうえ特異性が低いため、点眼剤に混入した異物を特定できる試験項目ならびに試験法が求められる。以上のような背景から、申請者は点眼剤の開発と品質確保に資する研究を目指し、複合糖質糖鎖を指標とする眼組織および眼由来細胞試料の分析研究を行った。

第一章では、眼刺激性試験として使用されているドレイズ試験のin vitro代替法試験に用いられている培養ウサギ角膜上皮細胞のStatens Seruminstitut rabbit cornea (SIRC)細胞と生体ウサギの眼球から採取したウサギ角膜上皮細胞中に存在するN-結合型糖鎖及びGAGを比較分析した。眼刺激性試験のような眼表面の変化を観察するin vivo試験の代替法として培養細胞を用いる場合、培養細胞の細胞表層は生体ウサギ由来の角膜上皮を可能な限り模倣している事が望ましい。糖鎖を指標としてSIRC細胞及びウサギ角膜上皮細胞の比較分析を実施した結果、N-結合型糖鎖においては、ウサギ角膜上皮細胞ではマンノースを8残基有するハイマンノース型糖鎖が全糖鎖の10.9%を占める主要な糖鎖であったのに対し、SIRC細胞では還元末端にフコースを1残基有し、シアル酸を持たない複合型2本鎖糖鎖が全糖鎖の11.4%を占める主要な糖鎖であった。GAGについては、ウサギ角膜上皮細胞ではヒアルロン酸のみが観察されたのに対して、SIRC細胞ではヒアルロン酸の他、硫酸基の結合位置が異なる数種類のコンドロイチン硫酸も観察され、ウサギ角膜上皮細胞とその培養細胞であるSIRC細胞の糖鎖プロファイルは異なることを示した。糖鎖プロファイルのこのような違いは、様々な細胞環境の違いを反映していると考えられ、眼刺激性試験においても物理化学的特性の大きく異なる物質を試験する場合においては留意すべき項目となると考えられる。

第二章では点眼剤中に混入した眼脂を同定するために、N-acetylneuraminic acid (NeuAc)を指標とする方法を開発した。眼脂には結膜の杯細胞から分泌されるムチンが豊富に含まれており、ムチン中のNeuAcを眼脂同定の指標として用いることができると考えられる。すなわち、酸加水分解により糖タンパク質試料からNeuAcを遊離し、さらにNeuAcを蛍光標識して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析する方法と液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC/MS) で遊離したNeuAcを直接分析する方法を検討した。ブタ胃ムチン中のNeuAcをHPLC及びLC/MSで分析した結果、それぞれ $2.9 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ 及び $1.8 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ であり、何れの分析法でも感度良く糖タンパク質試料中のNeuAcを分析できることがわかった。そして、異物混入品として返品された9本の点眼剤を検体として用いて、眼脂の同定法として一般的に用いられているギムザ染色法と今回開発したLC/MS法による眼脂の同定を比較した。その結果、ギムザ染色法では9検体中6検体で染色が確認され、LC/MS法では9検体中8検体でNeuAcが検出された。ギムザ染色法で眼脂を同定できなかった3検体についてはLC/MS法で同定することができた。また、逆にLC/MS法で眼脂を同定できなかった1検体はギムザ染色法で同定することができた。NeuAcを指標としたLC/MS法は新たな眼脂同定法として適用できること、さらにギムザ染色法などの既存の方法と組み合わせて用いることで、眼脂の混入を高い精度で確認できることがわかった。

第三章では、生体試料中に存在する糖タンパク質由来の遊離糖鎖の分析に関する研究を行った。生体中においてN-結合型及びO-結合型糖鎖はコアタンパク質に結合した形で存在するが、ある種の癌細胞では糖タンパク質由来の遊離糖鎖が大量に細胞内に観察される例もある。これらの遊離糖鎖は小胞体ストレスによるタンパク質フォールディング不全の結果生じた糖鎖やリソソーム酵素の異常・欠損により細胞内に蓄積した結果、存在していると考えられている。さらに、細胞内に蓄積した遊離糖鎖は、細胞外に滲出することも考えられるが、組織や血清中における遊離糖鎖の存在が明らかにされた例はない。ドライアイの発症原因のひとつとして酸化ストレスの関与が考えられており、細胞へのストレスにより漏出した遊離糖鎖が血清や涙液などに存在している可能性も考えられ、遊離糖鎖の存在に関する知見は興味深い。著者は眼組織を含め様々な生体試料の糖鎖分析を行い、血清中にN-結合型及びO-結合型糖鎖が存在することを発見した。ヒト血清試料中の遊離糖鎖を詳細に解析すると、観察される殆どの遊離糖鎖はシアル酸を有する複合型糖鎖であり、フコース残基を持たないジシアロ二本鎖糖鎖が全遊離糖鎖の62%を占める主要な糖鎖であった。また、興味深い事に、微量ではあるがムチン型糖タンパク質由来と考えられる糖鎖も観察され、個体の違いに関わらず、全ての血清試料中に観察された。これらの結果から、観察された遊離糖鎖は何らかの器官の細胞由来ではなく、血清中の糖タンパク質由来である可能性が高いと考えられた。

本研究により、1) 眼組織とその培養細胞の発現糖鎖プロファイルは著しく異なる、2) 点眼剤へ混入した眼脂の同定法としてLC/MSを用いるNeuAcを指標とする分析法が有用である、3) 血清中には遊離糖鎖が存在し、その遊離糖鎖が糖タンパク質糖鎖由来であることを明らかにした。

近年、有機合成により製造される低分子化合物だけでなく、動物細胞培養により生産される、ペプチドやタンパク質を有効成分とする点眼剤や眼内注射剤の開発が進んでいる。タンパク質を有効成分とする薬剤については、有機合成化合物と異なる物理化学的性質を持つため、各種生物学的試験においてin vivoとin vitro試験における相違点にも留意が必要であり、また医薬品製剤の安定性などにおいても独自の視点での評価が必要になると考えられる。このような背景を踏まえて、本研究で得られた知見が点眼剤の各種評価試験の精度を担保し、新しい点眼剤の研究開発に繋がることで、より良い医薬品が患者へと届けられることに寄与するものと期待される。

論文審査結果の要旨

眼は外界の情報のうち光に関する情報を脳に伝える視覚器官であり、その表面はまぶた及び涙液層によって保護されている。さらに、涙液中に分泌されるムチン型糖タンパク質中のO-結合型糖鎖が動物レクチンタンパク質の1つであるガレクチン-3との相互作用を介して眼表面のバリアとして働き、細菌接着の防止、境界潤滑の増加、上皮防御機能の維持に関与している。さらに、ドライアイ、上方輪部角結膜炎、翼状片、眼酒さ等の疾患において、眼表面のO-結合型糖鎖の修飾異常が報告されている。著者らのグループはこれまでにコンタクトレンズ装着者では、涙液中のシアル酸量が非装着者に比べて有意に低下していることを見出し、シアル酸量の低下は涙液中ムチンの減少に起因することを明らかにしている。

点眼剤は角結膜上に薬液を滴下して結膜嚢内に貯留させ、角膜組織、結膜組織、あるいは角膜を介して前房内に薬液が浸潤して効果を発揮する。点眼剤は眼局所で作用するために副作用が少ないが、その一方で、点眼剤は眼に直接投与するため、薬剤の眼に対する刺激性の評価は重要な試験項目の一つである。一般的に眼刺激性試験は1944年にFDAの毒性学者であったジョン・ドレイズとジェイコブ・スピネスによって考案されたドレイズ試験が用いられている。ドレイズ試験はウサギの眼に被験物質を投与し、角膜、虹彩及び結膜の状態変化をスコア化して評価する試験法である。ドレイズ試験は実験動物に対して局所的な苦痛を与える試験法であり、近年の動物愛護の観点から様々な代替法が研究され、角膜培養細胞を用いる眼刺激性試験の開発が検討されてきたが、真に代替法となり得るかについては議論の余地がある。in vitro法とin vivoの相違を糖鎖の観点から議論した例は見当たらない。

そこで申請者らは、第一章として、眼刺激性試験として使用されているドレイズ試験のin vitro代替法試験に用いられている培養ウサギ角膜上皮細胞のStatens Seruminstitut rabbit cornea (SIRC)細胞と生体ウサギの眼球から採取したウサギ角膜上皮細胞中に存在するN-結合型糖鎖及びグリコサミノグリカン(GAG)を比較分析した。その結果、N-結合型糖鎖においては、ウサギ角膜上皮細胞ではマンノースを8残基有するハイマンノース型糖鎖が全糖鎖の10.9%を占める主要な糖鎖であったのに対し、SIRC細胞では還元末端にフコースを1残基有し、シアル酸を持たない複合型2本鎖糖鎖が全糖鎖の11.4%を占める主要な糖鎖であるなど差違が顕著であった。GAGについては、ウサギ角膜上皮細胞ではヒアルロン酸のみが観察されたのに対して、SIRC細胞ではヒアルロン酸の他、硫酸基の結合位置が異なる数種類のコンドロイチン硫酸も観察され、ウサギ角膜上皮細胞とその培養細胞であるSIRC細胞の糖鎖プロファイルは異なることを示した。糖鎖プロファイルのこのような違いは、様々な細胞環境の違いを反映していると考えられ、眼刺激性試験においても物理化学的特性の大きく異なる物質を試験する場合においては留意すべきであることを見いだした。

ところで、点眼剤の異物混入の原因としては、製造時による混入するケースと点眼剤の使用時に患者が誤って点眼容器のノズル部分をまぶたに接触させ、眼の分泌物(眼脂)が点眼容器中に逆流し汚染するケースが考えられるが、そのほとんどが後者であり、メーカーにはこれらを明確に区別することが求められる。そこで第二章では、点眼剤中に混入した眼脂を同定するために、N-acetylneuraminic acid (NeuAc)を指標とする方法を開発し、一般的にしようされているギムザ染色法との相関を調査した。これは眼脂に豊富に含まれるムチン中のシアル酸を眼脂同定の指標とするものである。NeuAcの同定には加水分解物を蛍光標識して高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法と液体クロマトグラフィー-質量分析(LC/MS)で遊離したNeuAcを直接分析する方法を用いて、それぞれ比較した。LC/MS法は定量性では劣るものの、感度が高く、操作が簡便であった。異物混入品と

して返品され、眼脂による汚染が予想される9本の点眼剤を検体として用いて、ギムザ染色法とLC/MS法による眼脂の同定を比較した。その結果、LC/MS法ではギムザ染色法を上回る検体数で陽性が得られた。したがって、NeuAcを指標としたLC/MS法は新たな眼脂同定法として有用であることを見いだした。

さらに、第三章では、上記研究を通して培った糖鎖解析技術を駆使し、血清に存在する遊離糖鎖の存在を見だし、その構造について詳細に解析した結果、N-結合型糖鎖やO-結合型に加え、一部は還元末端のN-アセチルグルコサミンが遊離した糖鎖の存在を見いだした。細胞内に遊離糖鎖が存在することは知られており、これらが細胞外に滲出することも考えられるが、組織や血清中における遊離糖鎖の存在が明らかにされた例はなく、病態等との関連に興味を持たれる内容である。以上より、これら一連の研究の研究目的とそのアプローチ、結果および考察は非常に明快適切である。

平成26年7月19日の公聴会においては、前半2章に関する口頭発表を行った。発表内容に関する質疑応答では一部、困惑する場面も見られたが、応答の内容は、発表内容および周辺知識を含め的確に対応できており、概ね良好であった。

各種生物学的試験においてin vivoとin vitro試験における相違点にも留意が必要である。また、品質管理において様々な視点からの検討が必要である。本研究で得られた知見が点眼剤の各種評価試験の精度を担保し、新しい点眼剤の研究開発にも繋がるものである。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として十分値のあるものと認める。