

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590147

研究課題名 (和文) オンチップ細胞計測技術を用いた心毒性評価法の開発と
後発注射薬の品質試験への応用研究課題名 (英文) Study on evaluation system for drug cardiotoxicity using on-chip
cell-based analysis and quality examination of generic products of
injection

研究代表者

中嶋 幹郎 (Nakashima Mikiro)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00260737

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、注射薬の後発医薬品の安全性と毒性に関する品質試験を培養細胞や実験動物を用いて行うとともに、医薬品の心毒性をオンチップ心筋細胞集団ネットワーク計測法により評価する実験法の開発を試みた。その結果、心筋細胞集団ネットワークの拍動リズムに対する影響を観察することで、医薬品が作用するイオンチャネルの違いを区別できることを明らかにし、心毒性評価法としての本法の可能性を示した。また被験注射薬の中でその先発医薬品と比較し安全性や毒性に関する品質面において問題のある後発医薬品はなかった。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated the pharmaceutical quality and safety of generic products of injection using a cultured cell and an experimental animal, and examined the development of the method to evaluate drug cardiotoxicity by an on-chip cardiomyocyte network cell-based analysis. As a result, monitoring of effects on the beating rhythms of the network cells after treatment of agents could us estimate the ionic channel conditions, suggesting that it might be useful as a cell-based measurement system for drug cardiotoxicity. The pharmaceutical quality and safety of generic injections tested in this study were comparable to the innovator injections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：社会薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医薬品情報、安全性学、後発医薬品、品質試験、毒性試験、薬剤応答性、
セロミクス、動物実験

1. 研究開始当初の背景

我が国では、新薬（先発医薬品）と同じ薬

効成分を有する医薬品（後発医薬品）の使用
環境の整備と医療機関における利用促進が

図られている。しかし、その進捗は必ずしも順調ではない。その理由としては、後発医薬品の安全性や有効性に関する科学的情報の不足が指摘されている。後発医薬品の安全性と有効性に関しては、先発医薬品の使用実績で確認されていると仮定されるため、内服薬については生物学的同等性試験等を実施し基準をクリアすれば、後発医薬品の品質等は先発医薬品と同等であると評価され、その製造は許可される。しかし、後発医薬品の注射薬（後発注射薬）については、薬効成分が直接血管内に投与されるため、生物学的同等性試験を実施する必要はない。また先発医薬品の注射薬（先発注射薬）に対して義務づけられている7つの毒性試験を実施することも必要ないため、先発注射薬とは添加剤が異なる新規製剤ともいえる“後発注射薬”の毒性試験データは存在しない。

現在、臨床ではトルサード・ドゥ・ポワン（心臓への致死的な薬物毒性の一つ）を含む心室性頻脈発生の危険性増大が国内外において問題となっており、医薬品開発のためのICH 安全性薬理試験ガイドラインの中でも、特に医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）に関連する潜在的な催不整脈リスクに関する試験法が重要視されている。心臓は疾患に関係なく医薬品の副反応の標的となる臓器で、心臓に機能異常または病変が現れる心毒性は最も危険性の高い医薬品副作用の一つである。したがって、臨床現場からは後発注射薬の心毒性イベントの発症リスクに関する科学的情報の整備が望まれている。

一方、近年ゲノム科学の進展によって様々な生命現象が解明されてきた。しかし、ゲノミクス、プロテオミクスでは解明できない細胞レベルの解析の潜在的重要性や動物実験を代替する細胞レベルの計測技術開発の必要性が強く指摘されつつある。近年、安田らのグループ（東京医科歯科大）は、微細加工技術を用いてマイクロチップ上に構造的に1細胞単位で細胞集団ネットワークを構築し、エピジェネティックな細胞機能を計測する技術を考案した（K. Kojima et al, *J Nanobiotechnology*, 2004, 2: 9）。本計測技術は、従来無かった細胞集団ネットワークのパターン解析の重要性に基づいた新しい細胞ベースの計測技術を実現するのみならず、医薬品作用・副作用のスクリーニング法へと発展できる可能性がある。しかし、臓器組織と同様な応答を計測できる細胞ベースのオンチップ計測技術を構築するためには、通常の分散培養細胞や実験動物における薬剤応答性を検討し、得られた結果を関連づけ整合性を評価する必要があるが、そのような報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 心臓に対する副作用リスクのある先発注射薬の後発注射薬について、その安全性や毒性に関する品質情報を明らかにすること、(2) 臓器組織と同様な応答を計測できるオンチップ細胞計測技術を確立し、細胞ベースの心毒性評価法を開発すること、(3) 後発注射薬の安全性と毒性に関する品質試験へその評価法を応用することに取り組んだ。

2. 研究の方法

オンチップ細胞計測装置：XY 自動ステージ付き倒立型位相差顕微鏡（オリンパス）、ファイバーレーザー光源（シグマ光機）および顕微鏡用培養装置（東海ヒット）から構成する計測装置を用いた（図1）。



図1. オンチップ細胞計測装置

細胞ネットワーク培養チップの作製：アガロース層（5 μm ）を培養チップ基板上に塗布し、このアガロース層を集束赤外レーザー光で局所加熱することで、細胞を規則的に配置するチャンバーやチャンバー同士を結ぶトンネルを作製し、培養チップのアガロース層に3次元マイクロ構造を構築した細胞ネットワーク培養チップを作製した。

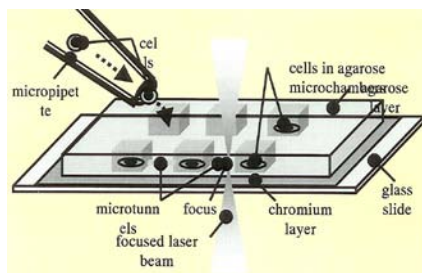


図2. 細胞ネットワーク培養チップ

オンチップ細胞計測技術を用いた心筋拍動細胞集団の拍動運動の解析：ラット新生仔の心臓を摘出し心筋細胞の初代培養を行った。その心筋細胞を培養チップのチャンバー内で一細胞培養しながら細胞同士を結合させ、段階的に細胞数を増やし、その拍動の同期現象を観察した。培養チップ上でネットワークを形成した心筋細胞集団の同期した拍動運動を撮影し、その動画データを心筋拍動計測プログラムにより数学的に解析し、オンチッ

心筋細胞集団の拍動運動を表す基礎統計データ（標本数、平均値、分散、変動係数）として算出した。

オンチップ心筋拍動細胞集団を用いた薬剤応答性試験：抗不整脈薬（リドカイン、メキシレチン、プロプラノロール、ジルチアゼム、ベラパミル、ソタロール、ニフェカラン、ジゴキシン、硫酸アトロピン）の先発注射薬を心筋拍動細胞のネットワーク培養細胞と分散培養細胞へ濃度を変えて添加し、拍動リズムの変化を測定し、拍動運動を表す基礎統計データを算出した。

培養細胞を用いた毒性試験：臨床でトルサード・ドゥ・ポワンやQT 間隔延長など心臓に対する副作用リスクのある注射薬（塩酸リトドリン、メシル酸ナファモスタット、オザグレレ、イオパミドール、シスプラチン、ドキシソルビシン、塩酸ドパミン）の先発注射薬とそれらの後発注射薬を対象とした。従来法である分散培養細胞（心筋細胞由来 H9c2、血管内皮細胞由来 b.End5、肝がん細胞由来 HepG2）を用いた WST-1 アッセイ法による細胞障害性試験を行い、細胞レベルの薬剤応答性を調べた。

実験動物を用いた毒性試験：上記の披験注射薬について亜急性毒性を観察した。マウスに投与量を変えて高用量で単回静脈内投与し、半数致死量 (LD50) を求めた。また LD50 で反復静脈内投与し死亡日数を計測するとともに血液を採取し、血清中の細胞毒性マーカー (CRP、CK、LDH) を酵素法により測定し、個体レベルの薬剤応答性を調べた。

実験動物を用いた心電図試験：マウスに上記披験注射薬を LD50 で反復静脈内投与した後、SBP2000 心電図計 (softron) を用いて心電図パラメーターを測定し、臓器レベルの薬剤応答性を調べた。

後発注射薬の純度試験：HPLC 法により上記披験注射薬の夾雑物の含有率を調べた。

オンチップ細胞計測技術を用いた心毒性の評価：オンチップ心筋拍動細胞集団を用いた薬剤応答性試験の結果を、分散培養細胞による試験結果や実験動物による心電図試験等の結果と比較し、それらの相関性を検討した。さらに披験注射薬の中で心毒性発現の可能性が示唆される後発注射薬があった場合には、心筋拍動細胞のネットワーク培養細胞を用いて薬剤応答性を調べることにした。

4. 研究成果

(1) オンチップ細胞計測技術を用いた心筋拍動細胞集団の拍動運動の解析

培養チップ上で 2~9 個のチャンバー内の心筋拍動細胞を結合させネットワークを形成した培養細胞集団の拍動が同期する現象を観察することに成功した (図 3)。

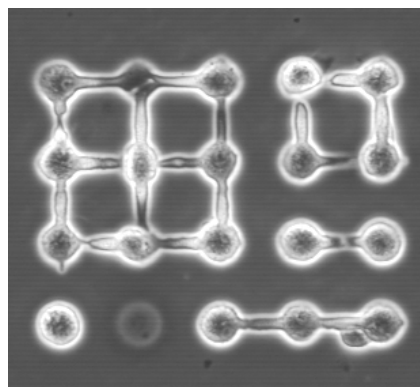


図 3. 培養チップ上の心筋拍動細胞ネットワークの拍動同期現象

心筋細胞の拍動リズムは非常に不安定で、細胞数が 2 個の同調拍動周期のばらつきは 40% 以上であったが、ネットワーク培養細胞を形成する細胞数を徐々に増加させていくと接触した心筋細胞同士の拍動リズムが安定化し、7 細胞以上のネットワーク集団では概ねその間隔が一定時間に収束し、臓器組織 (心臓) と同程度の拍動の安定性 (拍動周期の揺らぎが 10%) へ近づくことを明らかにした (図 4)。

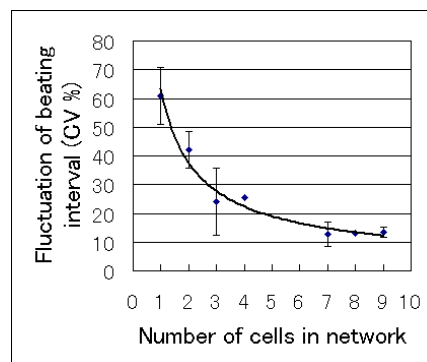


図 4. 心筋拍動細胞ネットワークを形成する細胞数と拍動周期のばらつきとの関係

また細胞数が 7 個以上のネットワーク培養細胞集団の拍動リズムの波形は、分散培養細胞で観察された拍動リズムの波形に近似していた。これらの結果から、7 細胞以上のネットワーク培養細胞集団であれば、心臓と近似した拍動パターンを再現することができるため、臓器固有の特性の変動性を計測できる可能性を示した。

(2) オンチップ心筋拍動細胞集団を用いた薬剤応答性試験

医薬品を添加していないコントロールの拍動周期を観察した場合、拍動間隔時間の平均値に対する各拍動間隔時間の比は 1 を中心とした正規分布を示した。一方、イオンチャネル遮断作用を持たないジゴキシンを低濃度 (10^{-14} M) と臨床上的有効血中濃度の 1000

倍に相当する高濃度 (10^{-6}M) で添加した場合も拍動間隔時間の比の分布パターンに変化は表れなかった。同様な実験を $10^{-14}\sim 10^{-6}\text{M}$ の濃度範囲で従来法である分散培養細胞を用いて行ったところ、ネットワーク培養細胞における変化と近似した結果が得られた (図 5)。

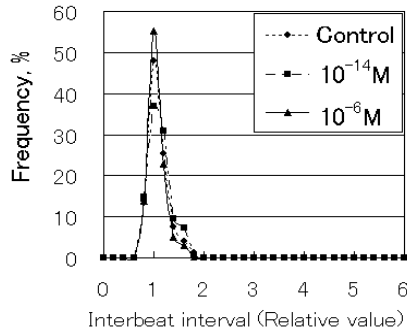


図 5. 心筋拍動細胞ネットワークの拍動間隔時間の比に対するジゴキシン添加の影響

これらの結果から、心筋細胞の拍動リズムに対する医薬品添加の影響を、ネットワーク培養細胞を用いて観察できることを明らかにした。そこで、9 種類の抗不整脈薬の先発注射薬に対するオンチップ心筋拍動細胞ネットワークの応答性を測定・解析した。その結果、医薬品を高濃度添加した場合 (高濃度暴露)、イオンチャネル遮断作用を持たない硫酸アトロピンは、ジゴキシンと同様にネットワーク細胞集団の拍動間隔時間のリズムに影響を示さなかった。一方、イオンチャネル遮断作用を持つ他の抗不整脈薬では作用するイオンチャネルの違いにより、高濃度暴露時の拍動リズムの変動の大きさが異なることを明らかにした。例えば Ca チャネル遮断作用があるジルチアゼム添加時および Na チャネル遮断作用があるプロプラノロール添加時には拍動間隔の延長を認めたが、ジルチアゼム添加時の変動の方がプロプラノロール添加時に比べて有意に大きかった (図 6)。

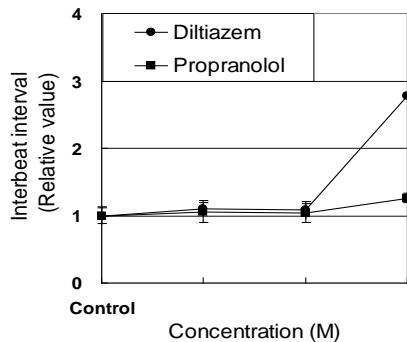


図 6. 心筋拍動細胞ネットワークの拍動間隔時間に対するジルチアゼムおよびプロプラノロール添加の影響

また、Ca チャネル遮断作用があるベラパミル添加時、Na チャネル遮断作用があるリドカインとメキシレチン添加時にも同様な結果が示された。しかし K チャネル遮断作用があるソタロールとニフェカラント添加時には拍動間隔の大きな短縮が認められた。これらの結果より、心筋細胞集団ネットワークの拍動リズムに対する影響を観察することで、医薬品が作用するイオンチャネルの違いを区別できることを明らかにし、臓器組織と同様な応答を計測できる細胞ベースの心毒性評価法としての本法の可能性を示した。

(3) 心電図を用いた薬剤応答性試験

種々の抗不整脈薬が心電図波形 (QT 間隔) に及ぼす影響について検討した。その結果、作用するイオンチャネルの違いによりマウスに異なるタイプの徐脈性不整脈が観察された。そこで、オンチップ心筋拍動細胞集団の拍動間隔変化の結果と比較することにより、個体と同様な薬剤応答性の予測の可能性について検討した。その結果、Ca チャネル遮断作用のある医薬品と K チャネル遮断作用のある医薬品は両者の間に類似性を認めたが、その他の医薬品については類似性を認めることはできなかった (表 1)。

医薬品	遮断するイオンチャネル	オンチップ細胞拍動間隔	心電図波形 QT 間隔
ジルチアゼム	Ca	大きな延長	変化なし
ベラパミル	Ca	大きな延長	変化なし
リドカイン	Na	延長	短縮
メキシレチン	Na	延長	短縮
プロプラノロール	Na	延長	延長
ソタロール	K	大きな短縮	延長
ニフェカラント	K	大きな短縮	延長
ジゴキシン	なし	変化なし	短縮
アトロピン	なし	変化なし	変化なし

表 1. 抗不整脈薬がオンチップ細胞拍動リズムと心電図波形に及ぼす影響

つまり、臓器組織と同様な応答を計測できる細胞ベースの心毒性評価法としての本法の可能性は示せたものの、実用的な計測技術として確立するには、さらに臓器固有の代謝や作用の多面性を考慮する検討を加える必要があると結論した。今後は、更にこの点に関する研究を行う必要があると考えている。

(4) 種々の後発注射薬の安全性や毒性に関する品質試験

臨床で心臓に対する副作用リスクの存在が示唆されている 7 種類の先発注射薬 (塩酸リトドリン、メシル酸ナファモスタット、オザグレル、イオパミドール、シスプラチン、ドキシソルビシン、塩酸ドパミン) の後発注射薬を対象に安全性や毒性に関する品質を検討した。特に塩酸リトドリン、メシル酸ナファモスタットおよびオザグレルの 3 種類につ

いては、国立医薬品食品衛生研究所が実施した後発注射薬の不純物に関する再評価の対象注射薬であったので、国内で市販されている全ての後発注射薬の製品について HPLC による純度試験を行い、注射薬中の夾雑物を調べた。その結果、塩酸リトドリン、メシル酸ナファモスタットおよびオザグレルの後発注射薬の約半数の製品で、先発注射薬とは異なる夾雑物が検出されたが、全ての製品において夾雑物の含有率は基準の範囲内であり純度規格に適合していた。次に従来法である分散培養細胞を用いた WST-1 アッセイ法による細胞障害性試験を行い、細胞レベルの薬剤応答性を調べた。その結果、塩酸リトドリン、メシル酸ナファモスタット、オザグレル、イオパミドール、シスプラチン、ドキソルビシンおよび塩酸ドパミンにおいて、後発注射薬の濃度-細胞生存率曲線は先発注射薬の結果と近似しており、それから算出した 50% 抑制濃度に有意な差異が認められる注射薬はなかった。図 7 には実験結果の例として、b.End5 および H9c2 細胞に塩酸リトドリンの先発注射薬と後発注射薬を添加した時の薬物濃度-細胞生存率曲線を示す。

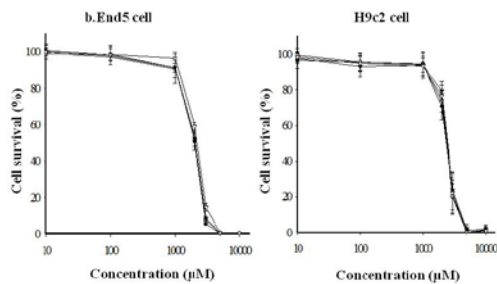


図 7. b.End5 および H9c2 細胞に塩酸リトドリンの先発注射薬と後発注射薬を添加した時の薬物濃度-細胞生存率曲線

これらの結果より、分散培養細胞における後発注射薬の薬剤応答性データに先発注射薬の結果と有意差が認められるものはなかった。次に、マウスに高用量で反復投与し亜急性毒性を観察することで、個体レベルの薬剤応答性を調べた。その結果、塩酸リトドリン、メシル酸ナファモスタット、オザグレル、イオパミドール、シスプラチン、ドキソルビシンおよび塩酸ドパミンにおいて、先発注射薬と後発注射薬間の LD50 が有意に異なる注射薬はなかった。本研究により、後発注射薬の各製品の LD50 のデータを示すことができた。また先発注射薬投与群と後発注射薬投与群のマウスの死亡日数においても差異が認められる注射薬は見当たらず、血清中の細胞毒性マーカーである CRP、CK および LDH の値や心電図波形 (QT 間隔) の値もどれも近似していた。これらの結果より、実験動物を用いた後発注射薬の個体レベルの薬剤応答性デ

ータに先発注射薬の結果と有意差が認められるものはなかった。以上の結果から、被験注射薬の中でその先発注射薬と比較し安全性や毒性に関する品質面において問題のある後発注射薬はなかった。

本研究では、後発注射薬の安全性と毒性に関する品質試験を培養細胞や実験動物を用いて行うとともに、医薬品の心毒性をオンチップ心筋細胞集団ネットワーク計測法により評価する実験法の開発を試みた。その結果、心筋細胞集団ネットワークの拍動リズムに対する影響を観察することで、医薬品が作用するイオンチャネルの違いを区別できることを明らかにし、心毒性評価法としての本法の可能性を示した。また全ての被験注射薬の安全性に関する情報を確認できた。以上の研究成果により、細胞ベースの心毒性評価法を実用的な計測技術として確立するには課題を残したが、毒性試験データが欠如している後発注射薬の安全性情報の発信に貢献できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

(1) 中嶋幹郎、大脇裕一、向江俊彦、梅野繁智、柳原克紀、河野茂、富永留美、荒木良介、寺蘭英之、北原隆志、藤秀人、佐々木均、オンチップ心筋拍動細胞ネットワークを用いた抗不整脈薬の薬物応答性の解析、長崎医学会雑誌、査読有、83、59-66 (2008)

〔学会発表〕 (計 3 件)

(1) 中嶋幹郎、荒木良介、中嶋弥穂子、中村純三、佐々木均、八坂貴宏、注射薬の後発医薬品に関する品質及び安全性の評価、第 4 回日本ジェネリック医薬品学会学術大会、2010 年 6 月 12-13 日、さいたま

(2) 荒木良介、八坂貴宏、藤井貴玄、田中栄美、向江俊彦、大脇裕一、西田孝洋、中村純三、中嶋弥穂子、中嶋幹郎、市販注射薬の先発医薬品と後発医薬品における同等性の検討 (2) : 塩酸リトドリン注射薬の品質比較、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12-13 日、福岡

(3) Ohwaki Y, Araki R, Tominaga R, Terazono H, To H, Sasaki H, Nakashima M, Effects of antiarrhythmic agents on beating rhythm of cultured cardiomyocyte networks on an agarose microchamber chip, The Second Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences, March, 16-18, Nagasaki, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 幹郎 (Nakashima Mikiro)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号：00260737

(2) 研究分担者

佐々木 均 (Sasaki Hitoshi)

長崎大学・病院・教授

研究者番号：00170689

中嶋 弥穂子 (Nakashima Mihoko)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：00301367