

挙げたもの以外の西洋ハーブについても良好な研究成果が得られているが、承認申請との関係において現時点では公開できないため、次年度以降に報告する予定である。

〈新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究〉

PCR-RFLP による朮類生薬の鑑別を利用した改定純度試験法案を作成し、妥当性確認試験を行った結果、同試験法案は、現行のものに比べ、操作が簡便かつ、頑健性の高い優れた方法であることが示された。

また、今年度、新たに検討を行った党参については、湖北省に自生する *C. pilosula* と *C. tanshen* の核 ITS 領域の塩基配列を明らかにするとともに、日本に流通する党参市場品の基原種を調査した。その結果、貴州省産のものは湖北省産 *C. pilosula* の配列に一致したが、甘粛省産のものは異なっていた。党参の主要な基原種であり、各地で栽培される *C. pilosula* は、ITS 領域の遺伝子型に地域特異性がある可能性が考えられた。湖北省神農架周辺では *C. tanshen* が栽培されていた。ただし、純系の *C. tanshen* ではなく、別種 (*C. henyi* と考えられる) との交配によりできた植物が多く、中には別種も含まれていた。この状況は、湖北省の党参市場品にも反映されていた。

車前子については、リボゾーム遺伝子の ITS 領域の塩基配列をマーカーとする遺伝子鑑別法が、基原同定法として有用であることが示された。また、種子の 100 粒重と TLC プロファイルが、車前子の表現型による鑑別マーカーとして有用である可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表等

- 1) Uchiyama, N., Kim, I. H., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Konishi, T., Goda, Y., HPLC separation of naringin, neohesperidin and their C-2 epimers in commercial samples and herbal medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**, 864-869 (2008).
- 2) Maruyama T., Kamakura H., Miyai M., Komatsu K., Kawasaki T., Fujita M., Shimada H., Yamamoto Y., Shibata T., Goda Y., Authentication of the traditional medicinal plant, *Eleutherococcus senticosus* by DNA and chemical analyses, *Planta Med.*, **74**, 787-789 (2008).
- 3) Hakamatsuka, T., Safety assurance of

health foods, *Bunseki*, **2009**, 149-150.

### 2. 学会発表

- 1) 大沼美貴、小林 進、末永恵美、丸山卓郎、袴塚高志、合田幸広、菱田敦之、木内文之、西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (4) ブラックコホシユの遺伝子鑑別法について、日本食品化学学会第 14 回総会・学術大会、平成 20 年 5 月、西宮
- 2) 朱姝、大家真由子、田中謙、白焱晶、小松かつ子、丸山卓郎、合田幸広、川崎武志、藤田正雄：刺五加の基原と品質に関する研究 (3) 一中国東北地方における遺伝的・成分的多様性、日本生薬学会第 55 回年会、2008 年 9 月、長崎
- 3) 丸山卓郎、近藤健児、四柳雄一、山本豊、川崎武志、司馬真央、寺坂和祥、山根真由、Shu ZHU、坂田こずえ、藤田正雄、亀山浩、西村直行、小松かつ子、水上元、合田幸広、「遺伝子情報を利用する生薬の純度試験」の改定に向けた妥当性確認試験について、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都
- 4) 末永恵美、丸山卓郎、袴塚高志、飯田修、合田幸広、西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (6) *Vitex* 属植物における ITS 遺伝子領域の個体内変異、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月、京都
- 5) 大沼美貴、小林 進、末永恵美、丸山卓郎、袴塚高志、合田幸広、菱田敦之、木内文之、西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (5) ブラックコホシユ市場品の品質評価、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月、京都
- 6) 柿木康宏、袴塚高志、鴨脚毅、望月直樹、合田幸広、LC/CAD を用いたイチョウ葉エキス中のテルペンラクトン類分析、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月、京都
- 7) 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (7) チェストツリー製品の崩壊性について、日本食品化学学会第 15 回総会・学術大会、平成 21 年 5 月、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

H. 知的財産権の出願登録状況  
特になし

## 先端技術を応用した製剤の品質確保と評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部  
研究者 川西 徹

### 研究要旨

機能性製剤の品質確保の方策の策定にむけて、(1)リボソーム製剤、ナノ粒子製剤、難溶性製剤等の製剤機能評価法；(2)超難溶性薬物の可溶化法として注目されている非晶質化製剤、ナノ微粒子化製剤、Cocrystal 製剤における可溶化等に関する物性評価法；(3)医薬品製造工程のオンラインリアルタイムモニタリングへの応用を視野にいたした分析法に関する研究を行った。

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 四方田千佳子
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 伊豆津健一
- (3) 星薬科大学薬学部 米谷芳枝
- (4) 国立がんセンター 松村保広
- (5) 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作
- (6) アステラス製薬 北村 智
- (7) 大鵬薬品 馬場一彦
- (8) ニプロパッチ 山内仁史
- (9) ヤンセンファーマ 中島辰巳
- (10) 富山産業 中川知秀
- (11) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (12) 国立医薬品食品衛生研究所 宮崎玉樹
- (13) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (14) 塩野義製薬 村主教行
- (15) 第一三共製薬 中上博秋
- (16) 中外製薬 小川 裕
- (17) 武田薬品 池田幸弘
- (18) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (19) 東邦大学薬学部 寺田勝英
- (20) 国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫
- (21) ファイザー 山田清孝
- (22) パウレック 高嶋武志
- (23) 参天製薬 木村章男
- (24) 塩野義製薬 片岡隆博
- (25) 武田薬品工業 松永浩和
- (26) 日揮 渡辺恵市郎
- (27) 田辺三菱製薬 土屋 亨

### A. 研究目的

ゲノム創薬時代を迎え、標的分子へ強力に作用する薬物の分子設計あるいは分子選別が可能になり

つつある現在、製剤に機能を持たせ、生体内での放出性、標的性、体内動態、あるいは生体内安定性等を変えることにより、生体内での作用を空間的、時間的に調節し、有効性、安全性を高める製剤技術が注目されている。このような製剤レベルの医薬品開発手法は、ゲノム創薬により極めて強力な医薬品シーズが発見されたにもかかわらず、通常の投与方法では有害作用がみられて医薬品として使用しにくい場合、あるいは難溶性で通常の製剤としてはヒトに投与しがたい場合、さらには既存の医薬品資源についても、新たな有用性を創り出す技術として、重要性が増している。このような機能性製剤は、DDS製剤あるいはリボソーム製剤など既に開発の歴史が刻まれているが、近年バイオテクノロジー、あるいはナノテクノロジーなどの周辺技術の進展を背景に、さらに研究・開発が活発化し、画期的医薬品として既に市販された製品も出現している。

しかしながら、このような機能性製剤については、最新の材料科学、高分子化学、タンパク質化学、微細加工技術等が結集されて開発・製造されることもあり、製品としての品質確保の方策についての規準は明確にされていない。本研究は、このような機能性製剤の品質確保の方策を策定するための基礎データを得ることを目的に実施する。

研究は以下の三つの方向からの検討から構成される。第一はいくつかの機能性製剤について、製剤機能の評価法開発を行う。第二は非晶質化法、ナノレベル微粒子化法あるいは可溶化剤適用によって製造した超難溶性製剤の製剤機能解析法開発および品質確保の方策の検討である。第三はこれら機能性製剤の製剤開発および製法工程管理の方策の策定である。



## B. 研究方法

### (1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

1-1) 薬物封入リポソーム製剤の製剤特性の評価：リポソームにフィチン酸（イノシトール6リン酸：IP6）を用いたキレート法によりイリノテカンを封入し、封入効率と血中滞留性および担ガンマウスにおける抗腫瘍効果を検討した；

1-2) 多変量解析によるリポソーム製剤の評価：ドキシソルピシン塩酸塩のポリエチレングリコール修飾リポソーム製剤（ドキシル注<sup>®</sup>20mg）についてドキシソルピシン含量、類縁物質、リソフォスファチジルコリン量、濁度、pH、放出性、リポソーム化率及び平均粒子径を因子として多変量解析（クラスター分析）を行った；

1-3) リポソーム製剤からの医薬品放出性の検討：ドキシソルピシン(DXR)またはカルポキシフルオレセイン(CF)を封入したリポソームを調製し、試験液への界面活性剤および細胞培養液・上清の影響を検討した；

1-4) タンパク質キャリアーとしての $\gamma$ -PGA（ポリ $\gamma$ -グルタミン酸）ナノ粒子の有用性評価：溶液混和によりタンパク質を内包した $\gamma$ -PGA ナノ粒子(NP)を作製した。また FITC 標識オプアルブミン FITC-OVA を内包した $\gamma$ -PGA NP をマウスに投与、腫瘍の生着率等を検討した；

1-5) ミセル体を中心とした DDS 製剤の非臨床と臨床評価：開発段階にあるミセル製剤につき薬理、抗腫瘍効果、毒性のプロファイルを基礎と臨床の両面から検討した；

1-6) 難溶性薬物の経口固形製剤の溶出性評価：消化管モデル液（SSIF）等を調製し、イプリフラボン錠とフェニトインとフェノバルビタールの複合錠、イトラコナゾールカプセルについて、溶出試験を実施した；

1-7) 口腔内崩壊錠の評価手法：舌表面を模した多孔板と上顎の役目を果たす重りおよび水分供給機構を持つ装置を用い、ボグリボース口腔内崩壊錠について崩壊性等を検討した；

1-8) 持続性製剤等の機能評価と特性解析：フローセル法を用いた溶出試験を行うとともに、錠剤中への試験液の浸透及び錠剤のゲル化過程について Magnetic Resonance Imaging (MRI) 装置を用いて評価した；

1-9) 外用剤・経皮吸収製剤の粘着特性評価法：ツロプテロール貼付剤について、タック性測定装置と引張り試験機を用いた測定と簡易的な官能試験により粘着特性の評価を行った。

### (2) 超難溶性薬物の製剤機能解析法研究および品質確保の方策の検討

2-1) 非晶質化を利用した可溶化製剤：ニトレンジピン、ニフェジピン、FK783、トログリタゾン、ニルバジピンなどの広範なモデル薬物について、セルロース誘導體(HPMC、HPMCP、HPMC AS)やポリビニルピロリドン(PVP)などを添加した非晶質固体分散体を溶融法、混合粉碎法、スプレードライ法によって調製し、薬物の非晶質状態の安定性や可溶化機能を支配する普遍的な製剤物性を検討した；

2-2) ナノ微粒子化を利用した可溶化製剤：Probuco<sup>®</sup>、PVP 及び sodium dodecyl sulfate (SDS) 重量比 1/3/1 の 3 成分混合粉碎により生成した probuco<sup>®</sup> ナノ微粒子について、懸濁液中の構造・分子状態を ESEM、ゼータ電位、溶液 NMR 及び液中 AFM 測定によって評価し、これらの物性がナノ微粒子の in vivo 吸収性に及ぼす影響を考察した；

2-3) cocrystal 化を利用した可溶化製剤：薬物とカウンター分子間の相互作用の測定法として、テラヘルツスペクトル測定に加え、遠赤外吸収スペクトル測定の有用性を検討した。また、カフェインの cocrystal と塩結晶を判別する手法としての固体<sup>15</sup>N-NMR スペクトル法の有用性を検討した。

### (3) 製剤開発および製造工程管理の方策の研究

医薬品製造工程のオンラインリアルタイム分析への応用を視野にいれて、下記の研究を実施した：

3-1) リアルタイム計測対応の粒度分布測定器 (Insitac) を用いた懸濁性点眼剤における主薬懸濁粒子の粒子径や粒度分布解析；

3-2) 粉末 X 線回折、赤外分光 IR 及び熱分析 TG による結晶多形の混合比の定量；

3-3) イメージング分析技術を用いた製剤の配合変化（変色）の検討；

3-4) CO<sub>2</sub> センサーを用いた培養工程の直接的モニタリング法の検討；

3-5) 収束ビーム反射測定法 FBRM を用いた固形製剤製造における造粒物の粒度分布解析；

3-6) エネルギー分散型 X 線分析 EDAX や NIR による滑沢剤ステアリン酸マグネシウム Mg-St の混合状態の分析

3-7) 近赤外イメージングシステムによる固形製剤の造粒状態の解析；

3-8) 超高速クロマトグラフィー(UPLC)による合成工程の工程管理

(倫理面への配慮)



動物実験については、各研究機関の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施するものであり、倫理審査の承認を得ている。

## C. 研究結果

### (1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

#### 1-1) 薬物封入リボソーム製剤の製剤特性の評価

ガン化学療法に求められる抗ガン剤の徐放化と、血中薬物濃度の維持を目的として、リボソームにフィチン酸（イノシトール6リン酸: IP6）を用いたキレート法によりイリノテカンを封入し、封入効率と血中滞留性および担ガンマウスにおける抗腫瘍効果を検討した。IP6を用いたリボソームでは、同じキレート法（CuSO<sub>4</sub>）を封入に使用したリボソームと同様に、薬物組成比の高い条件においても70%以上の封入効率が示された。またマウス尾静脈内投与後24時間にわたり、水溶液や封入にpH勾配法(クエン酸)を用いたリボソームに比べ高い血中滞留性と血液、肝臓、脾臓での集積が観察され、リボソーム内でのIP6あるいはCuとイリノテカンとの強い相互作用の寄与が示唆された。また、Colon26細胞担癌マウスを用いて大腸癌に対する抗腫瘍効果を評価したところ、IP6を用いたイリノテカン封入リボソームで、他試料に比べ有意に高い腫瘍増殖抑制効果が得られ、イリノテカンとIP6の抗腫瘍効果が相加あるいは相乗的に作用する事が示唆された。

#### 1-2) リボソーム製剤の評価

優れた腫瘍抑制効果を有するが、心毒性など重篤な副作用を持つドキシソルピシン塩酸塩の腫瘍への送達効率向上目的で開発されたPEG修飾リボソーム製剤について、規格試験結果（10ロット）のクラスター解析から最短距離法による樹形図( dendrogram)を作製し、項目の関係を考察した。

その結果、リボソーム製剤の試験項目中で含量、類縁物質、濁度及びpHの群と、放出性、平均粒径及びリボソーム化率の群でそれぞれ高い類似性を示すことが明らかとなった。また放出性に対して試験液中に含まれる塩化アンモニウムやL-ヒスチジンなどの濃度は明確な影響を与えず、製剤の用法に従い5%ブドウ糖液にて希釈後のリボソーム化率は、冷所及び室温で4日間安定であった。

#### 1-3) リボソーム製剤からの医薬品放出性の検討

放出性および病変部位・組織での挙動に対応した *in vitro* 評価基準設定への活用を目的として、ド

キシソルピシン(DXR)またはカルボキシフルオレセイン(CF)を封入したリボソームを調製し、試験液への界面活性剤および細胞培養液・上清の影響について検討した。ケノデオキシコール酸(CDC)やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、Tween X-100など界面活性剤を用いた放出試験は測定に必要な時間や簡便性に優れ、脂質組成の識別性が示唆される一方で、脂質組成を変更(コレステロール添加など)またはPEG修飾したリボソームからの薬剤放出性は *in vivo* 血中安定性と相関せず、活用はルーチンでの品質管理向けが中心になると考えられた。次に生理的環境に近い条件で薬剤放出性を評価する目的で、各種の細胞培養液・培養上清を用いてDXR封入リボソームからのDXR放出率を測定したところ、HUVECの培養液を使った場合、*in vivo* 血中安定性と相関のある放出試験を設定できる可能性が示された。PEG未修飾リボソームではヘパリンなど一部の培養液成分による凝集生成が示唆され、薬剤放出性との関係を明確にする必要性が認められた。

#### 1-4) タンパク質キャリアーとしてのポリγ-グルタミン酸(γ-PGA)ナノ粒子の有用性評価

ガンワクチンキャリアーとしての活用を目的に、タンパク質を内包する両親媒性γ-PGA微粒子の調製法と免疫学的な特性を検討した。天然物由来γ-PGAのカルボキシル基にフェニルアラニンエチルエステルを導入・調製した両親媒性γ-PGAはタンパク質溶液との混合により容易かつタンパク質の活性を失うことなくナノ粒子を形成し、また2.5%のグルコースを添加することで凝集すること無く、しかも内封タンパク質の漏出を伴うことなく凍結乾燥できることが明らかとなった。また、あらかじめOVA免疫を施したC57BL/6マウスを用いた腫瘍生着拒絶実験および細胞傷害試験から、腫瘍抗原タンパク質を内包した本ナノ粒子は、腫瘍抗原タンパク質に特異的なCTL活性を効率よく誘導することができ、その結果、腫瘍に対する優れた予防的増殖抑制効果と治療的転移抑制効果を達成できることを明らかにした。

#### 1-5) ミセル体を中心としたDDS製剤の非臨床と臨床評価

DDS製剤の非臨床と臨床情報を包括的に解析し、臨床応用を進めるためのトランスレーショナル研究として、シスプラチン内包ミセル(NC-6004)およびSN-38内包ミセル(NK012)について、薬理、抗腫瘍効果、毒性プロファイルなど基礎と臨床の両面から検討した。NC-6004ミセル製剤の臨床第1相



治験では腎毒性の軽減が証明され、外来治療の可能性が示唆された。CDDP で有名な毒性である、嘔気、嘔吐は軽度であった。しかしプラチナアレルギーと考えられる過敏症反応の頻度が高く、今後の臨床展開において、この過敏症の克服が本ミセル製剤の臨床展開における最重要課題と考えられた。イリノテカンの活性体であり水溶性の低い SN-38 は、ミセル内包化により静脈での直接投与が可能となり、前臨床および臨床第一相試験において有用性が示唆された。

DDS 製剤、特にミセル体につき、前臨床のデータを正確に分析することにより、臨床プロトコルに反映させ、実際の臨床治験も安全に行うことができた。また DDS 製剤化された親化合物の臨床動向の考察は、DDS 製剤の臨床試験の展開にとって貴重な情報を与え、前臨床試験および早期臨床試験においても非常に効率化できることが明らかとなった。

#### 1-6) 難溶性薬物の経口固形製剤の溶出性評価

界面活性剤や、SSIF 等を用いた溶出試験を比較検討し、より適切な難溶製剤の溶出試験の設定法を模索し、活用を目指すこととした。はじめに有害試薬であるジクロロメタンを使用しない SSIF の調製法を検討したところ、ジクロロメタンを使用することなく、タウロコール酸ナトリウムと精製卵黄レシチンを濃厚溶液として混合後、所定濃度に希釈することにより、ジクロロメタンを使用した場合と同様の物性と溶出性が得られる試験液を調製できることを示した。この方法により、SSIF をより容易に使用可能となった。

イトラコナゾールカプセルは、生物学的同等性が担保されて承認されているものであるが、用いる溶出試験液によって溶出挙動に差が存在し、特に 1%ポリソルベート溶液中で製剤間の溶出挙動に大きな差がみいだされた。

#### 1-7) 口腔内崩壊錠の評価手法

口腔内崩壊錠 (Orally Disintegrating Tablet, ODT) の崩壊時間の適切な評価法設定を目的に開発したヒトの口腔内を模した構造の試験器について検討した。医療用ボグリボース口腔内崩壊錠をモデル製剤として、製品および高温高湿の過激条件下で保存した製剤について、口腔内崩壊試験器を用いて崩壊時間の平均および相対標準偏差ならびに苛酷試験前後の崩壊時間変化率を求め、薬局方の崩壊試験法 (第 1 法) による結果と比較した。8 銘柄中 6 銘柄で過酷試験による崩壊時間の有意な変化 (加速または抑制) がみられたが、本試験法によ

り得られた崩壊時間の変化率は 6 銘柄において局方試験法と高い相関を示したのに対し、2 銘柄ではより大きな変動がみられ、本試験器は吸湿性の低下、機械強度の増大など、吸水崩壊以外の崩壊特性の変化も認識することが示唆された。

#### 1-8) 持続性製剤等の機能評価と特性解析

親水性高分子基材を用いた持続性ゲルマトリックス製剤の機能・特性の適切な評価手法の確立を目的として実験を行った。ゲルマトリックス基材として各種分子量のポリエチレンオキサ이드 (PEO) 及びポリエチレングリコール (PEG) を、薬物としてアセトアミノフェンを用いたモデル製剤についてフロースルーセルを用いた溶出試験を実施するとともに、MRI (スピンエコー法) を用いた溶出試験過程の測定結果を  $^1\text{H-NMR}$  緩和時間 ( $T1/T2$ ) に基づき溶液部分、ゲル部分、未浸透固体部分に区分し画像化した。ゲルマトリックス製剤の溶出制御機構は大きく二つに分けられ、基剤の分子量が低い製剤からの薬物溶出は比較的速いゲル層の浸食速度に大きく依存するのに対し、高分子量の基剤を主とする製剤では、基剤の浸食とともに溶出がゲル層からの拡散速度の影響を受ける事が示唆された。

以上、フロースルーセル法と MRI 装置を併用した溶出試験中の製剤状態の非破壊かつリアルタイム測定・観察は、親水性高分子基材を用いた持続性ゲルマトリックス製剤の機能及び特性を評価する手法として有用であることが明らかとなった。

#### 1-9) 外用剤・経皮吸収製剤の製剤化研究

主薬の経皮吸収を目的とした貼付剤であるテープ剤について、タック性測定装置を用いた粘着特性 (肌への粘着性および粘着面同士の自着性) 評価法を検討し、官能試験の結果と比較した。タック性測定装置のパネ板選択など試験条件を医療用テープ剤の評価に向けて最適化したところ、市販製剤の自着性について得られた粘着力および剥離エネルギー値は官能試験の順位と一致した。また皮膚との粘着性についてヘアレスマウス皮膚を用いた試験では、離速度が順位変動の要因となることが示された。

### (2) 難溶性薬物の製剤機能解析法および品質確保の方策の研究

超難溶性薬物の可溶化法として注目を集めている非晶質化製剤、ナノ微粒子化製剤、Cocrystal 製剤について、これらの製剤の可溶化機能を支配する製剤の物性評価法の確立をめざした研究を行っ



た。

## 2-1) 非晶質化を利用した可溶化製剤

非晶質製剤は結晶状態では難溶性の薬物を非晶質化し、高いエネルギー状態にすることにより可溶化するものである。可溶化機能を発揮するためには非晶質状態が安定に維持されていることが不可欠である。従って非晶質状態の安定性を支配する製剤物性を明らかにし、それらを制御することによってはじめて本製剤の品質確保が可能になる。そこで、安定な非晶質状態の形成に重要な役割を果たすと考えられる①薬物-添加剤相互作用と②薬物の表面の物性に着目し、それらの評価手法を検討した。また、スプレードライ法により調製した非晶質化製剤について、製造パラメータを制御することにより、薬物-添加剤相互作用が制御できることを明らかにし、品質確保につながる知見を得た。

①薬物-添加剤相互作用：HPMC や HPMCP を添加した固体分散体中におけるニトレンジピンの非晶質状態の安定性を検討したところ、(-)-ニトレンジピンに比べ(+)-ニトレンジピンの核生成速度が小さく安定であった。ジヒドロピリジン環炭素の分子運動性を NMR 緩和時間で測定したところ、セルロース誘導体との相互作用によって(+)-体の運動性が(-)体より大きく低下していることがわかった。ニトレンジピンの非晶質状態の安定性の差は(-)体に比べ(+)-体がセルロース誘導体と強く相互作用するためと考えられる。また、HPMC および PVP を添加した固体分散体におけるトログリタゾンの非晶質状態の安定性は添加剤によって差が見られた。<sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N-固体高分解能 NMR の測定により、HPMC は PVP とは異なる様式でトログリタゾンと相互作用していることがわかった。相互作用の様式の違いを考慮して、NMR スペクトルのデータを Partial Least Squares 回帰分析 (PLS 法) により多変量解析を行ったところ、固体 NMR スペクトルと安定性との間に相関性がみられ、HPMC、PVP 何れを添加した場合も同様の回帰線によって関連付けられた。以上の結果から、固体高分解能 NMR は薬物-添加剤相互作用を評価する手法として有用であることが明らかになった。

次にスプレードライ法により調製した非晶質化製剤の薬物-添加剤相互作用を固体 NMR により評価した。HPMC AS を添加剤として加えたニフェジピンの非晶質化製剤において、HPMC AS の分子鎖が縮まる acetone/ethanol (10:90)を調製溶媒に使うより、分子鎖が広がる acetone/acetic acid (90:10)を

用いた方が、ニフェジピンと HPMCAS が強く相互作用していることがニフェジピンの NMR 緩和時間の測定によって明らかになった。薬物-添加剤相互作用が強い製剤は 60℃で1 ヶ月間保存しても溶出速度に変化が見られず、非晶質状態の安定性が良いことが明らかになった。また、HPMC を添加剤として加えたニバルジピンの非晶質化製剤において、キャリアガスの流量が低いほどニバルジピンと HPMC の相互作用が強くなることが明らかになり、また少ないキャリアガス流量で乾燥した試料の方が最大溶出率と4 時間後溶出率が高く、優れた可溶化能を示した。

②薬物の表面物性：非晶質の薬物が結晶状態にもどる過程は、薬物粒子の内部より表面で速やかに起こり、表面が内部に比べ不安定であることがいくつかの薬物で知られている。非晶質 FK783 の非晶質状態の安定性も内部にくらべ表面が不安定であることが、昨年度の検討によって明らかになった。本年度は内部と表面の安定性の差を引き起こす物性を検討した。表面自由エネルギー(分子が粒子の内部に存在するときに比べ、粒子表面に存在するときにエネルギー的に不安定になる度合い)は結晶状態の FK783 に比べ非晶質状態の FK783 が大きく、結晶状態の方がエネルギー的に有利であることが示された。また、インバースガスクロマトグラフィーにより、FK738 単独あるいはその 30%PVP 固体分散体について表面の分子運動性を明らかにすることができた。内部に比べ表面は約 10 倍運動性が高いことがわかった。表面が内部に比べエネルギー的に不安定であることおよび運動性が高いことが表面が不安定であることの原因と考えられた。

薬物-添加剤相互作用の制御および表面自由エネルギーや表面の分子運動性の制御が非晶質化を利用した可溶化製剤の品質確保に重要であることが示唆された。

## 2-2) ナノ微粒化を利用した可溶化製剤

懸濁液中のナノ微粒子の構造・分子状態を評価し、これらの物性と *in vivo* 吸収性との関連を検討した。ProbucoI, PVP 及び sodium dodecyl sulfate (SDS) 重量比 1/3/1 の 3 成分混合粉砕により生成した probucoI ナノ微粒子の粒子径は、PVP12 を用いると 20nm であるが、保存により粒子径が約 130nm に増大した。PVPK17 を用いた場合、ナノ微粒子の粒子径は 90nm であり、保存による粒子径の変化はほとんど認められなかった。PVPK17 の系の *in vivo* 吸収性は PVPK12 の系に比べ低かった。



ESEM, ゼータ電位, 溶液 NMR 及び液中 AFM 測定の結果, PVPK17 を用いた場合, SDS との間でベンダント型の複合体が形成され, この複合体が微粒子表面に層構造を形成するが, PVPK12 を用いた場合, PVP の分子量が小さいため, K17 の場合のようなネックレス構造をとることができず, 層構造は形成されないと考えられた. ナノ微粒子の表面構造の違いが微粒子の安定性や *in vivo* 吸収性に影響していると考えられた.

### 2-3) Cocrystal 化を利用した可溶性製剤

Cocrystal 形成に重要な役割を果たす薬物-カウナー分子間の相互作用の評価法としてテラヘルツスペクトル法に加え, 遠赤外吸収スペクトル法の有用性を明らかにした. エテンザミド-チオ尿素複合体について検討したところ, テラヘルツスペクトル法ではうまく測定ができない周波数領域 (3THz~) において複合体形成に伴うスペクトルの変化が確認できた. テラヘルツスペクトル法と遠赤外吸収スペクトル法を併用することにより広い振動数領域でのスペクトル測定が可能になった. また, カフェインの種々の cocrystal 及び塩結晶について,  $^{15}\text{N}$ -固体高分解能 NMR スペクトルを測定したところ, カフェインの N1 窒素原子の化学シフトが高磁場シフトすることが明らかになり, cocrystal は 13~27 ppm シフトするのに対し, 塩結晶では 59~67 ppm の大きなシフトが見られた. シフトの値と N-H 間の結合距離とは相関し, 固体  $^{15}\text{N}$ -NMR スペクトルが cocrystal と塩結晶の判別に有用であることが明らかになった.

### (3) 製剤開発および製造工程管理の研究

医薬品製造工程のオンラインモニタリングへの応用を視野にいれて, 分析方法の検討を行い, 以下の結果を得た.

3-1) 懸濁性点眼剤製造時の主薬分散工程におけるリアルタイム粒度分布計測・管理の可能性を Insittec を用いて評価した結果, リアルタイム測定による課題 (分散時の気泡が及ぼす測定結果への影響や高濃度薬液に対する測定精度及び希釈手法) を事前に確認し, 適切な方法・条件 (気泡を抑制する為, 加圧分散を行い, 高濃度薬液の場合は, 瞬時に測定濃度範囲に希釈可能な自動希釈システムを用いる等) で測定することによって, 実製造ラインでリアルタイム粒度分布計測が可能であることが示唆された.

3-2) 粉末 X 線回折, IR 及び TG を用い, モデル化合物の II 型結晶中の I 型結晶の混在比の定量法を

検討した. IR 及び TG では, 5%以下の低濃度における II 型結晶中の I 型結晶の比率の定量は困難であったが, 粉末 X 線回折では II 型結晶中の I 型結晶混在比 3~7%の定量性があることを確認した (計算上の定量限界は 6.5%). モデル化合物については, 粉末 X 線回折が有効であったが, 化合物によっては, IR や TG (又は DSC) の方が有効である可能性が考えられた. 以上のように, 粉末 X 線回折, IR 及び TG のいずれかの手法を用いることにより, 例外を除き, 原薬製造最終工程の管理を目的とした結晶多形混在の定量が可能 (5%程度以上) な方法をみいだした.

3-3) X 線マイクロアナライザー-EPMA 法による元素マッピング, あるいは FT-IR 法による特定した波長でのイメージング分析により, モデル製剤の錠剤表面の変色部にリン酸ナトリウム塩が局在していることが分かり, その分布状態を確認することができた. また, X 線 CT により, リン酸ナトリウム塩の錠剤内部での分布状態を確認することができた. イメージング分析結果と配合変化試験を組み合わせることで, 錠剤着色の原因が糖とリン酸ナトリウム塩との反応に起因することが判明し, アルドール縮合反応が起こっていることが示唆された. イメージング分析により, 従来困難であった固形製剤表面や内部における処方成分の分布や状態を比較的容易に視覚化することが可能となり, 原因分析の他にも, 今後は製剤開発や製造工程管理手法への応用も考えられる.

3-4)  $\text{CO}_2$  濃度センサーを用いた培養工程の直接的モニタリング法を酵母の培養をモデルとして検討した. その結果, センサーによって異なる結果となることが判明した. 溶存  $\text{CO}_2$  濃度を制御する際, 消泡剤の添加が外乱となることが予測されるが, その程度については更なる実験データが必要であると考えられた.

3-5) 流動層造粒乾燥工程における粒度分布の直接モニタリングへの FBRM の応用を検討した. FBRM により粒子のレーザー遮断長さを測定することで, 粒子長さ別に粒子個数の変化を捉えることが可能であり, 数秒のデータ取得時間でレーザー回折では不可能な微粉の挙動を捉えることができるため, リアルタイム測定に適していることが明らかとなった. また高濃度での測定も可能であり, プローブ先端で測定するために, プローブを突き出さずに装置壁面への設置が可能であった. 測定焦点をさらに前方へ延長することができればガラス越しでの非接触測定も期待され, 活性値の高い薬物取



扱いにおいてサンプリングを避けたい製造工程分析技術としても期待される。このように、FBRMは医薬品製造における造粒、粒子コーティング、粉砕などの各単位操作において、粒子の個数分布のモニタリングに応用可能であると考えられる。

3-6) NIR および EDAX を用いて Mg-St の混合挙動が錠剤硬度におよぼす影響について調べた。Mg-St の混合条件の異なる造粒主薬粒子の表面観察や、錠剤を作製して評価したところ、Mg-St 凝集物の分散と主薬粒子の表面への付着が混合初期(1~5分)に起こり、主薬粒子の表面での展延と分散がその後の混合で促進されることが EDAX による主薬粒子の表面分析で確認できた。この Mg-St の混合状態の変化は、EDAX による錠剤表面の分析でも検出することができ、マッピング画像の解析により混合状態の変化を観察することが可能であった。錠剤硬度が混合時間の増加に伴い低下する傾向を示すのは、混合により Mg-St が分散と展延して粒子間に滑沢効果が働くためと考えられた。以上、EDAX は固形製剤の有用な分析ツールになると考えられた。

3-7) 近赤外イメージングシステムを用いた医薬品品質評価を目的として、高速攪拌造粒のモデル実験を行い、その造粒メカニズムについて検討した。その結果、造粒することにより含量の不均一は伴わないが、顆粒中での成分の偏析が生じることが明らかとなった。この偏析は適切な造粒終点付近となる品質管理上重要なポイントで現れ、これを目安にした品質管理が可能であると考えられた。

3-8) 合成反応における重要な工程パラメータを変化させた場合に生じる生成物の収量や不純物プロファイルの変化を、UPLC による短いサンプリング間隔の測定でリアルタイムに解析できることを確認した。これらの結果から、合成工程におけるより強固な品質保証体制を構築するためのアプローチとして、UHPLC が大きく貢献できることが示唆された。

## D. 考察

### (1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

薬物封入リボソーム製剤からの主剤の *in vitro* 放出性は、これら製剤の開発に必須の評価指標であるばかりでなく、市販後の製造ロットの製品の一定性評価という視点でも、適切な評価系の設定が望まれる。本研究では、昨年度に続いて界面活性剤あるいは細胞培養上清液の利用を検討し、

DXR 封入リボソームからの DXR 放出率を測定したところ、HUVEC の培養上清液を使った場合、*in vivo* 血中安定性と相関のある放出試験を設定できる可能性が示された。しかし、条件によって矛盾する結果も得られており、*in vivo* に対応した評価系の設定までには、さらに詳細かつ多面的な検討が必要であろう。

難溶性製剤のイトラコナゾールカプセルは用いる溶出試験液によって溶出挙動に差が存在し、特に 1%ポリソルベート溶液中で製剤間の溶出挙動に大きな差がみられた。これらの差が臨床効果にどの程度反映される可能性があるのか、あるいは妥当な溶出試験条件について考察するには、さらに検討する必要がある。

口腔内崩壊試験機あるいはタック測定装置は、それぞれ口腔内崩壊錠および外用剤・経皮吸収製剤の製剤特性の評価にきわめて有用であることが示されており、今後製剤試験に広く活用されることが期待される。

### (2) 超難溶性薬物の製剤機能解析法研究および品質確保の方策の検討

本研究によって、難溶性薬物の可溶化法として注目を集めている方法を用いた非晶質化製剤、ナノ微粒子化製剤、cocrystal 製剤について、安定性の高い可溶化機能を有する製剤の設計とその評価法に関する重要な知見を得ることができた。

非晶質化法による可溶化製剤においては、薬物および添加剤が異なり、調製法も異なる様々な固体分散体において、薬物の非晶質状態の安定性や可溶化機能が薬物-添加剤相互作用の影響を強く受けることが示され、薬物-添加剤相互作用を制御することが、非晶質化製剤の品質を確保する上で重要であると考えられる。また、薬物の表面における分子運動性が内部に比べ大きく、その高い分子運動性が非晶質状態の安定性に関連することが示唆され、今後、ナノレベルでの製剤物性の評価も必要であると考えられる。

ナノ微粒子化法による可溶化製剤においては、PVP の分子量によって、微粒子表面の構造が影響を受け、*in vivo* 吸収性に差がでることが明らかになった。薬物吸収メカニズムを明らかにするために、溶液状態でのナノ微粒子製剤物性をさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

Cocrystal 法を利用した可溶化製剤に関しては、固体 NMR 測定により薬物-カウンター分子間の相互作用に関して有益な情報が得られた。今後、種々



の化合物について検討することにより、一般化できるか否かについて検討するとともに、他の分析法（テラヘルツ分光法、溶解熱測定）により、Cocrystal の特性を多面的に評価し、安定性をはじめとする developability や機能性評価について研究を進める必要があると考えられる。

可溶化製剤の物性評価法に関して、固体 NMR 法は非晶質化製剤、ナノ微粒子化製剤、cocrystal 製剤の何れにおいても、薬物-添加剤相互作用を解析する上で、強力なツールであることが明らかになった。また、テラヘルツ分光法、インバースガスクロマトグラフィーなどが固体状態における可溶化製剤の物性評価を行う上で有用であることがわかった。

### (3) 製剤開発および製造工程管理の方策の研究

製剤開発の指針として出された ICHQ8 ガイドラインでは製造プロセスを理解する重要性が指摘されており、製剤開発時に得られた情報や製造経験で得られた知識がデザインスペース、規格、および生産管理に役立つことが記述されている。そのため、製造プロセスの理解を進める技術及び製造工程をモニタリングし、コントロールする技術が必要とされている。本研究において、特性 X 線やエネルギー分散型 X 線分析、X 線 CT などの X 線を応用した技術や赤外、近赤外を利用した顕微分光システムは品質を左右する要因を把握するプロセス理解のツールとして非常に有用であることが示され、また、製造工程をモニタリング及びコントロールする技術 (PAT) として FBRM、レーザー回折器などの粒子測定システム、近赤外分光器、UHPLC などが有用であることも示された。

また、製剤開発や医薬品製造、品質管理において医薬品原料の品質管理も重要であり、本研究では製剤開発や製造工程において重要因子となりうる原薬の結晶多形や添加剤であるステアリン酸マグネシウムについて検討を行った。ステアリン酸マグネシウムについては、品質に大きく影響することが経験的に知られているにも関わらず科学的な検討が十分に行なわれておらず、品質の不具合がおこる大きな原因のひとつであるが、本研究において、これまで経験的に知られていた粒子径のみならず、Mg-St の純度、結晶性などが影響し、さらにこれらの品質がメーカーやロット間に大きな差があるという貴重なデータを提供した。

## E. 結論

機能性製剤の品質確保の方策の策定にむけて、

(1) リポソーム製剤、ナノ粒子製剤、難溶性製剤等の製剤機能評価法を検討し、

1-1) IP6 を用いてイリノテカンを封入したリポソーム製剤は製剤特性に優れ、またマウスで優れた抗腫瘍効果を示すことを明らかにした；

1-2) リポソーム製剤の因子に関するクラスター分析により、放出性とリポソーム化率および平均粒子系が高い類似性を示すことを示した；

1-3) PEG 修飾リポソーム製剤の *in vitro* 放出性評価系として界面活性剤や細胞培養上清の利用の可能性を示した；

1-4) 両親媒化  $\gamma$ -PGA はタンパク質の内包化が容易であり、凍結乾燥が可能、さらに優れたガンワクチンキャリアーであることを示した；

1-5) ミセル内包化による抗ガン剤について早期臨床試験のために前臨床データが有用であることを示した；

1-6) 難溶性経口固形製剤の溶出性試験における消化管内モデル液の調整法を改良するとともに、イトラコナゾールカプセルの溶出性を検討した；

1-7) 口腔内崩壊試験器は吸水崩壊以外の崩壊特性の変化も認識できることをみいだした；

1-8) フロースルーセル法と MRI 装置を併用した溶出試験は親水性高分子基材を用いた持続性製剤の機能評価に有用であることを示した；

1-9) 引張り試験器が外用剤・経皮吸収製剤の粘着特性評価に有用なことを明らかにした。

(2) 超難溶性薬物の可溶化法として注目されている以下の製剤における可溶化に関係する物性評価法を検討し、

2-1) 非晶質化製剤について、様々な固体分散体の非晶質状態の安定性や可溶化機能が薬物-添加剤相互作用や製剤表面の分子運動性の影響を強く受けることを示した。製造パラメータを変化させることにより、薬物-添加剤相互作用の強さを制御できることを示した；

2-2) ナノ粒子化製剤について、液中 AFM 法などの検討により、微粒子表面の構造が PVP の分子量によって異なり、その違いが *in vivo* 吸収性に影響することを明らかにした；

2-3) Cocrystal の物性研究において、遠赤外線分光法、テラヘルツ分光法、固体 NMR 測定により薬物とカウンター分子間の相互作用に関して有益な情報の得られることを明らかにした。



(3) 医薬品製造工程の理解及びそれに基づくオンラインリアルタイムモニタリングを視野にいれた分析法に関する研究を行い、

- 3-1) オンラインレーザー回折器を用いて、懸濁性点眼剤における主薬懸濁粒子の粒度分布のリアルタイムモニタリングに成功した；
- 3-2) 粉末 X 線回折による、結晶多形混在比率 5% 付近の定量性を確認することができた；
- 3-3) 各種イメージング分析技術を用いて、製剤の配合変化による変色の解析に成功した；
- 3-4) 溶存 CO<sub>2</sub> 濃度センサーを利用した酵母培養のモニタリング法を検討した；
- 3-5) FBRM を用いて、造粒工程における粒度分布のリアルタイムモニタリングに成功した；
- 3-6) エネルギー分散型 X 線分析の元素マッピングによってステアリン酸マグネシウム混合時間による錠剤硬度の低下の原因の解析に成功した；
- 3-7) 造粒することにより造粒終点付近で顆粒中で偏析が生じることを明らかとした；
- 3-8) 超高速液体クロマトグラフィーによる合成工程のリアルタイム分析実現の可能性を示した。

## F. 研究発表

### 1. 誌上発表

- 1) Yoshioka, S., Aso, Y., Osako, T., Kawanishi, T.: Wide-ranging molecular mobilities of water in active pharmaceutical ingredient (API) hydrates as determined by NMR relaxation times, *J Pharm Sci.*, **97**,4258-4268 (2008)
- 2) Namekata, I., Fujiki, S., Kawakami, Y., Moriwaki, R., Takeda, K., Kawanishi, T., Takahara, A., Shigenobu, K., Tanaka, H.: Intracellular mechanisms and receptor types for endothelin-1-induced positive and negative inotropy in mouse ventricular myocardium, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **376**, 385-95 (2008)
- 3) Iida-Tanaka N, Namekata I, Tamura M, Kawamata Y, Kawanishi T, Tanaka H.: Membrane-labeled MDCK cells and confocal microscopy for the analyses of cellular volume and morphology, *Biol Pharm Bull.* 2008 Apr;31(4):731-4 (2008)
- 4) Suzuki, T., Tamehiro, N., Sato, Y., Kobayashi, T., Ishii-Watabe, A., Shinozaki, Y., Nishimaki-Mogami, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Inoue, K., Ohno, Y., Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression, *J Pharmacol Sci.*, **107**, 285-94 (2008)
- 5) 川西徹：抗体医薬の現状と展望，日薬理誌，**131**，

- 102-108 (2008)
- 6) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Freeze-drying of proteins in glass solids formed by basic amino acids and dicarboxylic acids, *Chem Pharm Bull*, **57**, 43-48 (2009)
- 7) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of (19)F-NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions, *Chem Pharm Bull.*, **57**, 61-64 (2009)
- 8) S. Kadoya, K. Izutsu, E. Yonemochi, K. Terada, C. Yomota, T. Kawanishi, Glass-state amorphous salt solids formed by freeze-drying of amines and hydroxy carboxylic acids: effect of hydrogen-bonding and electrostatic interactions. *Chem. Pharm. Bul.*, **56**: 821-826 (2008)
- 9) J. I. Kuroda, J. I. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, Y. Saito, Y. Matsumura, Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer* 2008.(in press)
- 10) Y. Matsumura, Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Jpn J Clin Oncol* 2008; **38**:793-802.
- 11) Y. Matsumura, Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**:899-914.
- 12) T. E. Nakajima, K. Yanagihara, M. Takigahira, et al., Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res* 2008; **68**:9318-22.
- 13) T. E. Nakajima, M. Yasunaga, Y. Kano, et al., Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 2008; **122**:2148-53.
- 14) K. Sai, Y. Saito, M. Itoda, et al., Genetic variations and haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; **23**:139-47.
- 15) Y. Saito, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, Y. Matsumura, Enhanced distribution of NK012, a polymeric micelle-encapsulated SN-38, and sustained release of SN-38 within tumors can beat a hypovascular tumor. *Cancer Sci* 2008; **99**:1258-64.
- 16) M. Sumitomo, F. Koizumi, T. Asano, et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelle, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res* 2008; **68**:1631-5.
- 17) R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Negishi, et al., Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *J Control Release*



- 2008; **125**:137-44.
- 18) Y. Watanabe, A. Aoi, S. Horie, et al., Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci* 2008; 99:2525-31.
  - 19) 中川晋作, ワクチンキャリアーとしてのポリγ-グルタミン酸ナノ粒子の有効性と安全性. *薬学雑誌*, 128, 1559-1565, 2008.
  - 20) Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani, Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors, *J. Control. Release*, in press.
  - 21) A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Honda, Y. Hattori, Y. Maitani, Design of folate-linked liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice, *Clinical Cancer Res*, **14** (24) 8161-8168(2008)
  - 22) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani, Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone, *Molecular Pharmaceutics*, **6**(1), 98-104 (2009).
  - 23) M. Watanabe, K. Kawano, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin, *J. Control. Release*, **127** 231-238 (2008)
  - 24) Y. Ohguchi, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani, Selective delivery of folate-PEG-linked nanoemulsion-loaded aclacinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: Effect of chain length and amount of folate-PEG linker, *J. Drug Targeting*, **16**(9), 660-667 (2008)
  - 25) K. Moribe, C. Wanawongthai, J. Shudo, K. Higashi, K. Yamamoto : Morphology and Surface States of Colloidal Probuocol Nanoparticles Evaluated by Atomic Force Microscopy, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**(6), 878-880 (2008)
2. 学会発表
- 1) K. Izutsu, C. Yomota, T. Kawanishi, Effect of fluidity and raft-forming lipid components on the drug permeability of phosphatidylcholine- based vesicle barrier, 4th LogP Symposium on PhysChem and ADMET Profiling in Drug Research (2009.2)
  - 2) C. Yomota, H. Hotate, H. Shibata, T. Kawanishi, Proposal of a rapid and simple preparation of the simulated intestinal fluid (FeSSIF), American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2008.11)
  - 3) H. Shibata, C. Yomota, T. Kawanishi, In vitro analysis of drug release from long-circulating liposome-encapsulated doxorubicin. FIP 2008 (2008.9)
  - 4) 阿曾幸男, 太田 綱, 宮崎玉樹, 川西 徹: γ線照射を利用して調製したデキストラナーゼ含有デキストランゲルからのタンパク質の放出制御, 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3).
  - 5) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: ニトレンジピンエナンチオマーとキラル高分子からなる非晶質固体分散体を用いた薬物-添加剤間相互作用の評価. 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3).
  - 6) 阿曾幸男, 高分子医薬品製剤の保存安定性と NMR 緩和, よこはま NMR 構造生物学研究会第 36 回ワークショップ「生体系固体 NMR の基礎から応用への展開」(2009. 3)
  - 7) Miyazaki T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi T.: Different crystallization rates of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with chiral excipients. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2008.11).
  - 8) Aso, Y., Miyazaki T., Yoshioka, S., Kawanishi T.: Molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions as determined by <sup>19</sup>F-NMR relaxation time. American Association of Pharmaceutical Scientists. Annual Meeting (2008.11).
  - 9) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西 徹: <sup>13</sup>C 標識ニトレンジピン光学異性体の分子運動性に及ぼす高分子添加剤の影響, 第 47 回 NMR 討論会 (2008.9).
  - 10) 小出達夫, 長門琢也, 松井航, 夏山晋, 檜山行雄: NIR イメージングシステムを用いた固形製剤の造粒状態の分析及び溶出性の予測, 日本薬剤学会第 23 年会 (2008.5 札幌)
  - 11) T. Koide, T. Nagato, K. Matsui, S. Natsuyama, T. Kawanishi, Y. Hiyama, : Study on the observation of the degree of granulation and prediction of the dissolution by NIR(Near Infrared) chemical imaging system, 2008 AAPS Annual meeting and Exposition (2008.11 Atlanta GA. USA)
  - 12) 小出達夫, 川西徹, 檜山行雄: 近赤外イメージングと顕微ラマンシステムを用いた医薬品評価に関する研究, 日本薬学会第 129 年会 (2009.3 京都)
  - 13) 坂本知昭, 周 利, 檜山行雄: 超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) による合成工程のリアルタイム解析, 日本薬学会第 129 年会, 京都, (2009.3 京都)
  - 14) 河野勇人, 吉橋泰生, 米持悦生, 寺田勝英 : ステアリン酸マグネシウムの混合による表面物性への影響, 第 25 回製剤と粒子設計シンポジウム, (2008.11 大津)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



## 代替毒性試験法の評価と開発に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
研究者 能美 健彦

研究要旨 ヒト細胞、ヒト由来の代謝酵素遺伝子を用いて in vitro 遺伝毒性試験系のヒト化を進めた。gpt delta トランスジェニックラット、マウス遺伝毒性試験とラット小核試験のバリデーションを進め、代替毒性試験法の基盤的研究を推進した。

### 分担研究者

- (1) 近畿大学大学院 小田美光
- (2) サントリー株式会社 藤居 互
- (3) 蛋白精製工業 平田 大介
- (4) 食品薬品安全センター秦野研究所 須井哉
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (6) 第一三共株式会社 高崎 涉
- (7) 大鵬薬品工業株式会社 岡 宏明
- (8) 中外製薬株式会社 三島雅之
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所 西川秋佳
- (10) 明治製菓株式会社 林 宏行
- (11) 和研製薬株式会社 真田尚和

### A. 研究目的

動物愛護に対する関心の高まりを受けて、動物実験を出来る限り in vitro 試験（培養細胞）で代替(Replacement)し、実験動物を用いる場合には、使用する頭数の削減(Reduction)、また一匹あたりの動物からより多くの有用情報を得るなどの工夫(Refinement)を行うことが、安全性評価の分野において強く求められている。すでに EU（欧州共同体）は、化粧品の安全性評価に関して 2009 年から実験動物を使ったデータを基本的に受け入れないことを表明しており、医薬品の安全性評価に関しても、上記の 3R(Reduction, Refinement, Replacement)を念頭に、安全性評価に関わる試験方法を再吟

味することが緊急の課題である。

遺伝毒性試験は、化学物質のゲノムに対する変異作用（突然変異および染色体異常誘発性）を評価する試験法であり、その結果は発がん性と相関する。これはがんの誘発が、遺伝子突然変異や染色体異常に基づくためである。現在の評価法によれば、ある化学物質に発がん性があり、その発がん作用が当該物質の遺伝毒性に基づく場合には、その物質の発がん作用には閾値がないものとされ、NOAEL（無毒性量）は設定されない。したがって医薬品等の候補化合物に遺伝毒性が認められた場合には、開発が中止される例が少なくない。

医薬品の遺伝毒性評価には、一般に(1)微生物(2)哺乳類細胞(3)マウス（小核試験）を用いることが ICH ガイドラインで求められている。しかし哺乳類細胞を用いる試験については、動物に対し発がん性を示さないにもかかわらず陽性となる物質（偽陽性）が少なくないことから試験細胞株の遺伝的改良が望まれている。また小核試験においては、血液系の細胞に対する遺伝毒性のみが評価の対象となるため、多臓器において遺伝毒性を評価する試験、例えばトランスジェニック遺伝毒性試験法の確立が望まれている。特に発がん試験で汎用される F344 ラットを基にした試験系の確立が期待されている。微生物遺伝毒性試験については、より少



量の試料で試験結果を得ることのできるハイ  
スループット化が求められている。

本研究では、ヒト薬物代謝酵素遺伝子を導入  
した遺伝毒性試験用のサルモネラ株、哺乳類細  
胞株の樹立、遺伝的に改良したヒト細胞株の作  
出を通して、動物実験を代替しうる *in vitro*  
試験系の確立を目指す。また変異検出用のレポ  
ーター遺伝子を導入した F344 *gpt delta* トラン  
スジェニックラット遺伝毒性試験系を確立する  
ことにより、発がんの標的臓器で遺伝毒性を検  
出することを可能にする。これにより、発がん  
試験に用いられる動物数を削減できる可能性が  
高まる。さらに DNA 損傷部位の乗り越え DNA 合  
成（トランスレージョン DNA 合成、TLS）に関わ  
る DNA ポリメラーゼ  $\kappa$  (Pol  $\kappa$ ) の活性を特異的  
に不活化したノックイン(KI)マウスとヒト細胞  
株を作出し、その評価を行う。Pol  $\kappa$  KI マウス  
およびヒト細胞株は、多環芳香族炭化水素系の  
遺伝毒性物質に対して、高い感受性を示すこと  
が期待される。これらの研究の実施により、医  
薬品の遺伝毒性、発がん性評価における 3R が前  
進し、動物数を削減しつつ安全な医薬品を社会  
に供給することが可能となる（図 1）。

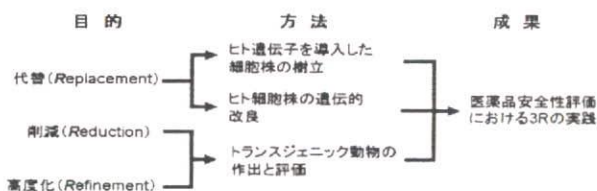


図 1 遺伝毒性分野における代替試験法開発の指針

今年度は、(1)ヒト薬物代謝酵素を導入した微  
生物株を用いる遺伝毒性試験法のキット化とハ  
イ・スループット化を進め、(2)ヒト CYP 遺伝子  
を発現するヒト細胞株の感受性の検討、酵素誘  
導をかけたラット由来の S9 (肝ホモジェネート  
の 9,000 x g 上清) と非誘導 S9 の比較、(3)F344  
*gpt delta* トランスジェニックラットのバリデー  
ションを進めた。また Pol  $\kappa$  KI マウスと *gpt*  
*delta* マウスの交配を行った。

## B. 研究方法

### B-1 微生物を用いた高感度・迅速な遺伝毒性ハ イスループット試験の構築研究

*Salmonella typhimurium* (以下サルモネラと  
略) OY1002/1A2 (ヒト CYP1A2 と NADPH-CYP 還元  
酵素及びサルモネラのアセチル転移酵素 (NAT)  
高産生株) の一夜培養液を 1  $\mu$ g/mL  
tetracycline を含む L-broth あるいは TGlyT 培  
地 (1% Bactrotrytone、0.5% NaCl、0.2%  
glycerol (v/v)) で 50 倍希釈し、その菌液を 37°C  
で培養し、その後、1 mM IPTG、0.5 mM  $\delta$   
aminolevulinic acid、250  $\mu$ L/L trace element、  
を加え代謝酵素を発現させた。被験物質は  
2-aminoanthracene (2-AA)、  
2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]  
quinoline (MeIQ)、2-amino-6-methyldipyrido  
[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1) 及び  
2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline  
(IQ) である。被験物質で処理した後、菌液 10  
 $\mu$ L に Z 緩衝液 90  $\mu$ L、PopCulture Reagent  
(Novagen) 5  $\mu$ L を加え、室温で 10 分放置した。  
Chlorophenolred- $\beta$ -D-galactopyranoside  
(CPRG) を加え  $\beta$ -D-galactosidase 活性を測定  
した。蛍光基質としては、4-MUG (Wako)、  
Tokyogreen (第一化学)、発光基質としては  $\beta$ -  
Glo<sup>R</sup> assay system (Promega)、 $\beta$ -  
galactosidase chemiluminescent substrate  
を用い CPRG と比較した (小田)。

### B-2 ヒト型高感度 umu テスト株のバリデー ション

サルモネラ OY1002/1A2、OY1002/1A1、OY1002  
/1B1、OY1002/3A4 (ヒト CYP1A2、1A1、1B1、3A  
4 と NADPH-CYP 還元酵素及びサルモネラの NAT  
高産生株) の一夜培養液を、TGlyT で 50 倍希釈  
し 37°C で 1 時間培養した後に、IPTG、 $\delta$  aminol  
evulinic acid、trace element を加え、その菌  
液を 37°C で 3 時間培養した。96 穴マイクロタイ



タープレートに被験物質溶液 4 $\mu$ L および培養後の菌液 96 $\mu$ L を加え、37°Cで3時間振とう培養(1,400 rpm)した。その後、CPRG を発色基質に $\beta$ -D-galactosidase 活性を比較した。用いた化合物は2-AA、Glu-P-1、IQ、2-aminofluorene (2-AF)、benzo[a]pyrene(BP)、MeIQ、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)、3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2)である(藤居)。

### B-3 ヒト型高感度 umu テスト株のキット化

試験菌株にはサルモネラ OY1002/1A2 株を用いた。一夜培養液を TGyT 培地で希釈した後、37°Cで培養し、遠心して集めた菌体を凍結乾燥した。凍結乾燥菌株に11 mLのTGyT培地を加え、37°Cで1、2ないし3時間培養した。その後、IPTG、 $\delta$  aminolevulinic acid、trace elementを加えて合計4時間培養し、umu試験に供した。試験化合物としてはIQ、MeIQを用いた(平田)。

### B-4 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実用化

9種類の抗菌剤(streptomycin sulfate (SM); erythromycin (EM); vancomycin hydrochloride (VM); nalidixic acid (NA); norfloxacin (NFX); ofloxacin (OFX); ciprofloxacin (CFX); lomefloxacin hydrochloride (LFX); amphotericin B (AT))の変異原性を、通常のAmes法と改良法FAT(Fluctuation Ames Test)で試験し、その感度を比較した。菌株としては、TA100、TA98、TA102、大腸菌DNAポリメラーゼIV(DinB)を発現するYG5161株(TA1535/pYG768)を用いた(須井)。

### B-5 DNAポリメラーゼ遺伝子の改変による代替毒性試験法の改良に関する研究

ヒトDNAポリメラーゼ $\kappa$ (Pol $\kappa$ )の活性中心部に存在する198番目のアスパラギン酸(198D)と199番目のグルタミン酸(199E)をアラ

ニンに置換したヒトNalm-6 KI細胞と、活性中心が存在するエクソン6を欠失させたノックアウト(KO)細胞の増殖速度、細胞周期、薬剤(hydroxyurea(HU)、BP+S9)に対する致死感受性を野性型株と比較した(能美)。

### B-6 ヒト型遺伝毒性試験のリスクアセスメントへの応用

ヒトリンパ芽球細胞株TK6、AHH-1と、トランシジェニックヒト細胞h2E1v2、MCL-5を用いて、acrylamide(AA)、glycidamide(GA)の遺伝毒性を検討した。陽性対照としては、CYP2E1で代謝活性化されるdimethylnitrosamine(DMN)を用いた。h2E1v2はCYP2E1を、MCL-5は5つの代謝酵素(CYP1A2、CYP2A3、CYP3A4、CYP2E1、mEpoxide hydrolase)を高発現する。細胞を1%のAAあるいはGAに24時間連続曝露した。処理終了後、正常培地で48時間培養し小核標本を作製した。また処理終了3日目に、細胞を3 $\mu$ g/mLトリフルオロチミジン(TFT)を含む培養液にはん種し、14日目に突然変異コロニー(TFT耐性コロニー)の数を計数し、TK遺伝子突然変異率を算出した。さらにAAによる主たるDNAアダクトであるN7-GA-GuaをLC/MS/MSにより測定した(本間)。

### B-7 ヒト型遺伝毒性試験における遺伝子多型を考慮したリスクアセスメント

Phenobarbitalおよび5,6-benzoflavoneを投与した7週齢の雄性Sprague-Dawley(SD)ラットの肝臓から調製したS9(誘導S9)および無処置の同齢雄性SDラット肝から調製したS9(非誘導S9)を用い、8種類の化合物(BP、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine hydrochloride(PhIP)、coumarin(COU)、cyclophosphamide(CPA)、diclofenac(DF)、piroxicam(PX)、lansoprazole(LAN)、chlorpheniramine(Chl))の遺伝毒性を、チャイニーズハムスターCHL/IU細胞を用いるinvitro小核試験で検討した。また酵素活性と蛋白質発



現量を誘導 S9 と非誘導 S9 で比較した (高崎)。

#### B-8 ヒト培養細胞と齧歯類培養細胞の遺伝毒性試験における感受性の差の検討

Methotrexate と gemcitabine のヒト細胞 WTK-1 と マウスリンフォーマ L5178Ytk+/- (MOLY) に対する遺伝毒性を *in vitro* 小核試験、*Tk* 遺伝子突然変異試験により検索した (岡)。

#### B-9 遺伝子改変哺乳類細胞を用いた遺伝毒性スクリーニング法の開発

Pol  $\kappa$  の 198D と 199E をともにアラニンに置換した KI マウスを遺伝毒性試験用の *gpt delta* トランスジェニックマウスと交配した。*gpt delta* ホモの個体については、後代検定と *gpt delta* 遺伝子の FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 解析にてホモとヘテロの判別を実施した (三島)。

#### B-10 *gpt delta* マウスを用いた環境化学物質の発がん機序解明へのアプローチ

6 週齢の雌性 F344 *gpt delta* トランスジェニックラットに tocotrienol (2%、4%) あるいは陽性対照として diethylnitrosamine (DEN、20 mg/kg、週 1 回 x 13 回腹腔投与) を投与し、肝臓の *gpt* 突然変異体頻度 (MF) を測定した (西川)。

#### B-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

雌性 F344 *gpt delta* トランスジェニックラットに tamoxifen citrate を 250ppm あるいは 500ppm の用量で 13 週間混餌投与した。投与終了後に、血液学的検査、血液生化学検査及び剖検を行い、肝、腎、卵巣及び子宮について採材及び病理組織学的検査を行った。また 20mg/kg あるいは 40mg/kg の用量で 3 週間反復経口投与を行い、10 週間の休薬の後に採材 (肝、腎) した。Tamoxifen の構造類似体である toremifen

citrate について、40 mg/kg 投与群を設定し、3 週間反復経口投与後、10 週間の休薬を経て採材 (肝、腎) を行った。*gpt* アッセイ及び Spi<sup>-</sup> アッセイにより、tamoxifen 及び toremifen 投与群の肝における MF を算出した (林)。

#### B-12 フローサイトメトリーによる *in vivo* 小核試験のバリデーション

7 週齢の雄性 Crl:CD (SD) ラットに cyclophosphamide (CP、10 mg/kg、経口単回)、mitomycin C (MMC、2 mg/kg、腹腔単回)、colchicine (COL、0.25、0.5、1 mg/kg、腹腔単回)、vinblastine (VIN、0.25、0.5、1.0、2 mg/kg、腹腔単回) 投与した。それぞれの化合物は 2 日間連続で投与を行い、24、48 及び 72 時間後に、尾静脈より血液採取し、超低温メタノールで固定し、MicroFlow<sup>PLUS</sup> Kit の方法に従い、抗 CD71 抗体及び抗 CD61 抗体、propidium iodide (PI) と反応させた。フローサイトメーターを用いて、FITC 標識抗 CD71 抗体、PE 標識抗 CD61 抗体及び PI で標識した細胞を検出した。1 サンプルにつき CD71 陽性幼若赤血球 20,000 個をカウントし、その中で % MN-RET を算出した。顕微鏡を用いて小核を検索した際には、生理食塩水あるいは CP を投与した 24 時間後に 5  $\mu$ L の尾静脈血を採取し、acridine orange で染色し、蛍光顕微鏡で 1 サンプルあたり 8000 個の幼若赤血球をカウントして % MN-RET を算出した。

(倫理面への配慮) 全ての動物実験は、実施施設における「動物実験管理に関する指針」に従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。ヒト培養細胞ならびに微生物を用いる実験は、倫理面の問題はないものと判断した。

## C. 研究結果

### C-1 微生物を用いた高感度・迅速な遺伝毒性試験の構築研究

TGyT 培地と L-broth 培地を用いて、IQ、Glu-P-1、MeIQ および 2-AA による *umuC* 遺伝子誘導能を比較した。その結果、TGyT 培地の方が L-brot よりも *umuC* 遺伝子の発現誘導がより強く促進されることが明らかになった。前培養菌液の希釈倍率は、100 倍よりも 50 倍の方がやや高い活性を示した。OY1002/1A2 株を用いて IQ、MeIQ、Glu-P-1、及び Trp-P-2 による *umuC* 遺伝子誘導における  $\beta$ -galactosidase 基質の影響について調べた。その結果、蛍光基質 4-MUG、Tokyogreen、発光基質  $\beta$ -Galactosidase Chemiluminescent Substrate については、発色基質 CPRG とほぼ同様の活性比を示し、基質の変更による感度向上は認められなかった。 $\beta$ -Glo<sup>R</sup> Assay に関しては、ほとんど発光強度の上昇が認められなかった (小田)。

### C-2 ヒト型高感度 *umu* テスト株のバリデーション

マイクロプレート法と試験管を使う従来法で、両者の感度を比較し、Trp-P-2 以外は試験管法とマイクロプレート法で陰性、陽性の結果が一致する結果を得た。しかし、OY1002/1A1 および 1B1 についてはマイクロプレート法の検出感度は従来法より若干劣っていた。OY1002/3A4 に関しては、従来法と同等もしくはそれよりも感度が高い傾向が得られた (藤居)。

### C-3 ヒト型高感度 *umu* テスト株のキット化

凍結乾燥した菌を TGlyT 培地で復水させ、培養後、時間を変えて *umuC* 遺伝子発現量を検討した。その結果、本培養 2 時間、酵素を発現させるのに 2 時間培養した菌が、最も高い  $\beta$ -galactosidase 活性を示すことが明らかになった (平田)。

### C-4 ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の実用化

TA102 は、前培養菌液をそのまま試験菌液として使用すると、陰性対照ウェルが黄変することから、前培養菌液を遠心したのち Micro F 溶液に再懸濁し、Exposure medium と 0.04:12.63 の割合で混合することとした。9 種の抗菌剤を用いる Ames 試験および改良法 FAT を行った結果、2 試験ともに、5 種のキノロン系抗菌剤 (NA、NFX、OFX、CFX、LFX) は、TA102 株のみで陽性となった。TA100 株を用いる Ames 試験においては、全ての抗菌剤で陰性であった。一方、TA100 株 (-S9 mix) を用いる改良法 FAT においては、用量依存性を伴わない黄変ウェルの増加が 5 種の抗菌剤 (EM、VM、NA、OFX、CFX) で認められた。AT については、TA102 株 (-S9 mix) を用いる改良法 FAT でのみ陽性であった。SM を用いる Ames 試験において、TA98 株では +S9 mix でのみ弱い陽性結果が得られたが、YG5161 株では、より明瞭な陽性結果が得られた (須井)。

### C-5 DNA ポリメラーゼ遺伝子の改変による代替毒性試験法の改良に関する研究

DNA 損傷を乗り越える DNA ポリメラーゼ  $\kappa$  を不活化させたヒト NaIm-6 KI 細胞と KO 細胞の性質について野性型株と比較した。倍加時間は約 21 時間、細胞周期は S 期が 55%、G1 期が 30%、G2 期が 15% であり、三株 (KI、KO、野性型) の間に顕著な差は見られなかった。HU に対して、三株は 50-200  $\mu$ g の用量で生存率が約 20% に低下し、それ以上用量をあげても生存率は低下しなかった。BP + S9 に対して、三株は S9 mix の存在下 3  $\mu$ g の用量でいずれも死滅し、感受性の差は見られなかった (能美)。

### C-6 ヒト型遺伝毒性試験のリスクアセスメントへの応用

h2E1v2 細胞と親細胞である AHH-1 細胞を用いて AA と DMN の遺伝毒性を評価した。AA に関し



ては h2E1v2 と親株の AHH-1 で、細胞毒性、遺伝毒性（遺伝子突然変異、小核）に大きな差は無かった。一方、DMN は h2E1v2 で高い遺伝子突然変異誘発性と小核誘発性を示した。MCL-5 も AA に対して高い細胞毒性、遺伝毒性を示さなかった。h2E1v2 と AHH-1 細胞を用いて GA 遺伝毒性を評価した。両細胞とも AA に比べて低濃度で細胞毒性と、それに対応する遺伝毒性を示したが、その反応性には差がなかった。AA の高濃度処理（14mM）で TK6 に僅かなアダクトの生成が観察された。GA 処理では低用量から用量依存的な多量のアダクトの生成が観察された（本間）。

#### C-7 ヒト型遺伝毒性試験における遺伝子多型を考慮したリスクアセスメント

誘導 S9 の P450 含量、酵素活性は非誘導 S9 に比べて高い値を示した。in vitro 小核試験を実施した結果、BP、PhIP、CPA ではいずれの S9 添加時においても用量依存的な小核誘発率の増加が認められ、誘導 S9 存在下でより強い細胞毒性および小核誘発性が認められた。COU、Ch1 は誘導 S9 存在下で用量依存的な小核誘発率の増加が認められ陽性と判定され、非誘導 S9 存在下では陽性と判定できる小核誘発率の増加は認められなかった。DF、PX、LAN については、両 S9 間で細胞毒性および小核誘発性の出現状況に差は認められなかった（高崎）。

#### C-8 遺伝毒性試験に使用される細胞株の感受性に関する研究

ヒト WTK-1 細胞は、methotrexate、gemcitabine の致死作用に対して MOLY 細胞よりも高い感受性を示した。TK 遺伝子突然変異に関しても、WTK-1 細胞は MOLY 細胞と同等ないしより高い感受性を示した。in vitro 小核試験に関し、WTK-1 細胞の小核誘発率は methotrexate 1.5  $\mu$ g/mL で対照群と比較して 4 倍を示し有意な増加が見られた。しかし、MOLY 細胞では有意な増加は見られなかった。Gemcitabine に対し、

WTK-1 細胞の小核誘発率は最高で対照群の 9 倍であったが、MOLY 細胞では最高で 4.7 倍であった（岡）。

#### C-9 遺伝子導入哺乳類細胞を用いた遺伝毒性スクリーニング法の開発

Pol  $\kappa$  遺伝子に変異を持ち、かつ *gpt delta* 由来のレポーター遺伝子をホモに持つ個体を判別するため *gpt delta* ホモ候補マウスの雌 8 匹と雄 6 匹について、FISH 解析を行った。その結果、雌 2 匹と雄 4 匹の個体において 1 細胞当たり 2 個のレポーター遺伝子のシグナルを検出し、*gpt delta* ホモと判断した。同じ *gpt delta* ホモ候補マウスの中から雌 4 匹と雄 6 匹について、野生型マウスと交配し後代検定を行った。それぞれの産仔約 20 匹について PCR にて *gpt delta* 遺伝子の検出を行った結果、雌 2 匹と雄 4 匹のホモ候補個体より得られた産仔のすべてに *gpt delta* 遺伝子を検出し、*gpt delta* ホモと判断した。FISH 解析と後代検定にて等しい結果が得られ、Pol  $\kappa$  KI ヘテロ/*gpt delta* ホモマウスを樹立した（三島）。

#### C-10 *gpt delta* マウスを用いた環境化学物質の発がん機序解明へのアプローチ

体重推移は、tocotrienol 4%投与群では投与開始 3 週目より実験終了時まで、DEN 投与群では投与開始 10-12 週目に対照群と比べて有意な増加抑制が認められた。対照群と比較して最終体重は 4%投与群で有意な低値を示した。肝臓の相対重量の有意な高値が 4%投与群および DEN 投与群で認められた。病理組織学的検査の結果、tocotrienol 投与群に肝海綿状変性を伴った結節性肝細胞過形成病変が低頻度ながら散見された。陽性対照として用いた DEN 投与群で *gpt MF* の顕著な増加が認められた。一方、tocotrienol 投与群では何れも対照群と比して *gpt MF* の増加は認められなかった（西川）。

#### C-11 遺伝毒性評価用トランスジェニックラットのバリデーション

Tamoxifen の 13 週間混餌投与 (250、500 ppm) 群において、投与期間を通じて摂餌量の有意な減少がみられ、それに伴う体重の有意な減少が認められた。臓器重量測定では、子宮の絶対・相対重量の減少がみられた。病理組織学的検査では、子宮内膜の萎縮、閉鎖卵胞数の増加及び黄体数の減少がみられたが、肝臓及び腎臓に異常はみられなかった。Tamoxifen の 20 及び 40 mg/kg、3 週間経口投与群において、投与期間を通じて体重の有意な減少が認められた。Toremifen の 40 mg/kg、3 週間経口投与群において、投与期間を通じて異常はみられず、剖検においても異常はみられなかった。

Tamoxifen の 13 週間混餌群の *gpt* MF 値は、control で  $5.84 \pm 2.26$ 、250 ppm で  $77.3 \pm 22.0$ 、500 ppm で  $174.8 \pm 76.8$  であり、用量依存的かつ有意に MF が上昇した。Tamoxifen の 3 週間経口投与群の *gpt* の MF 値は、control で  $6.21 \pm 1.16$ 、20 mg/kg で  $44.7 \pm 17.3$ 、40 mg/kg で  $81.0 \pm 21.1$  であり、用量依存的かつ有意に MF が上昇した。Tamoxifen の 13 週間混餌群の *Spi*<sup>-</sup> MF 値は、control で  $1.00 \pm 1.04$ 、250 ppm で  $29.9 \pm 11.3$ 、500 ppm で  $45.1 \pm 11.1$  であり、用量依存的かつ有意に MF が上昇した。Tamoxifen の 3 週間経口投与群の *Spi*<sup>-</sup> MF 値は、control で  $2.14 \pm 2.01$ 、20 mg/kg で  $11.6 \pm 2.55$ 、40 mg/kg で  $22.4 \pm 11.4$  であり、用量依存的かつ有意に MF が上昇した。一方、toremifen の *gpt* 及び *Spi*<sup>-</sup> MF 値は、それぞれ  $5.44 \pm 1.68$  及び  $1.97 \pm 2.69$  であり、control と比較して有意な MF の上昇はみられなかった(林)。

#### C-12 フローサイトメトリーによる *in vivo* 小核試験のバリデーション

CP、MMC 及び生理食塩液を単回投与し、48 時間後の末梢血における小核出現頻度を、フローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡を用いて算出し

た。いずれの測定法においても、誘発された小核を検出することができ、算出した小核出現頻度は、それぞれの方法で類似していたが、フローサイトメトリーでの測定値は若干高い傾向を示した。COL 及び VIN の投与後 24、48 及び 72 時間における小核誘発作用を検討した。COL の 1 mg/kg を投与した群では投与後 24 時間をピークとする小核誘発頻度の増加が認められた。一方、0.5 及び 0.25 mg/kg 投与群においては、いずれの時間においても媒体対照群と同程度であった。VIN の 1 及び 0.5 mg/kg を投与した群では投与後 24 時間で小核誘発頻度の増加が認められたが、0.25 mg/kg 投与群では、媒体対照群と同程度であった(真田)。

#### D. 考察

医薬品を含む化学物質の安全性評価は、ラット、マウスを用いる毒性試験の結果に基づいて行われてきたが、近年、動物愛護に対する関心の高まりを受けて、*in vitro* (培養細胞) で動物試験を代替 (Replacement) する手法の確立が求められている。また、動物を用いる際にも、動物数の削減 (Reduction) と、同一の個体からより多くの有用情報を得ること (Refinement) が求められている。だが、動物を用いた試験結果の全てを、培養細胞で代替できるかについては不明な点も多く、医薬品の安全性を考える上で代替毒性試験法の評価が重要な課題になりつつある。また、動物数の削減、有用情報の取得を可能にするためには、新しい実験動物の作出とそのバリデーションが必要である。

本研究班では、班全体を 3 つのグループに分け、第一グループではヒト遺伝子を導入した微生物ハイ・スループット遺伝毒性試験の開発と普及をめざし (小田、藤居、平田、須井)、第二グループでは遺伝毒性試験用のヒト細胞の遺伝的改良およびヒト細胞と齧歯類細胞の感受性の比較検討を行い (能美、本間、高崎、岡)、第三グループでは *gpt delta* トランスジェニックラ



ットと小核試験のバリデーション、および Pol  $\kappa$  の活性を KI により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスの作出を進めている (三島、西川、林、真田)。

第一グループでは、各種のヒト薬物代謝酵素 CYP を発現させる umu 試験系を確立し (小田)、簡便化、キット化を進め、マイクロプレート法の有効性の確認 (藤居)、凍結乾燥菌株を用いる umu 試験の最適条件を明らかにした (平田)。umu 試験は、一日で試験を完結させることができ、データベースも比較的豊富であることから、ハイ・スループット試験として有用である。また、遺伝毒性試験の中で最も汎用されている Ames 試験のスループット性を高めた FAT 試験に TA102 株と DNA ポリメラーゼ DinB を発現する YG5161 を導入し、これらの菌株が抗菌剤の遺伝毒性を検出する上で有用であることを明らかにした (須井)。

第二グループでは、ヒト薬物代謝酵素遺伝子を発現するトランスジェニック細胞株 (h2E1V2 細胞、MCL-5 細胞) を用いて AA および GA の遺伝毒性を検索した。AA は CYP2E1 により GA に変化し、GA が遺伝毒性を示すとされている。実際 *in vivo* の試験では、AA と GA は肝臓で同程度の突然変異誘発性を示すこと、肝臓での N7-GA-Gua 等の DNA アダクト量に差は見られないことが報告されている。今回の研究で、GA は h2E1V2 細胞およびその親細胞 (AHH-1 細胞) に、強い遺伝子突然変異作用を示したが、AA は h2E1V2、MCL-5、AHH-1 いずれに対しても、ほぼ同程度の弱い遺伝毒性を示したのみであった。これらの結果から、h2E1V2 細胞、MCL-5 細胞では、AA から GA への代謝活性化が不十分であるものと結論した。ヒト型薬物代謝酵素を発現するトランスジェニック細胞は S9 の系とは異なり、細胞内での代謝と、その代謝物の影響を評価できる系として注目されているが、その特異性が高く、その利用には慎重になるべきである。また酵素誘導 S9 の問題点 (高崎)、ヒト細胞とマウス細胞の感受性につ

いても検討した (岡)。DNA 損傷の乗り越えに関わる Pol  $\kappa$  を KI および KO 法で不活化したヒト細胞株を樹立し、その化学物質に対する感受性の検索を開始した (能美)。

第三グループでは、F344 *gpt delta* トランスジェニックラットのバリデーションを進め、tamoxifen (発がん物質) が発がん標的臓器である肝臓で強い遺伝子突然変異誘発性を示したのに対し、toremifen (非発がん物質) は陰性となる結果を得た (林)。また他の遺伝毒性試験では陰性の結果を示す tocotrienol についての *in vivo* における遺伝毒性を検索し、標的臓器 (肝臓) において陰性の結果を得、tocotrienol が非遺伝毒性発がん物質であることを結論した (西川)。また、ラットを用いる小核試験の条件検討を進め、良好な結果を得た (真田)。*gpt delta* ラットを用いて、遺伝子突然変異と小核誘発を同一個体で観察できるようにすることで、動物数の削減をはかる。この他に、Pol  $\kappa$  を KI 法により不活化した *gpt delta* トランスジェニックマウスを作出した (三島)。

以上のごとく、本研究班では、各グループがそれぞれのモデル生物 (微生物、ヒト細胞、マウス・ラット) を用いながら、それぞれの試験系の有用性に検討を加え、ヒトに対するリスク評価に貢献する代替法試験を確立することをめざしている。

## E. 結論

遺伝毒性分野における代替法の確立を目的に、ヒト遺伝子を発現するハイ・スループット微生物試験系の評価を行った。また、ヒト細胞の遺伝的改良とトランスジェニックヒト細胞、酵素誘導 S9 の有用性と限界について検討した。さらに、発がんの標的臓器において遺伝毒性を検出する F344 *gpt delta* ラットと小核試験のバリデーションを進め、Pol  $\kappa$  を不活化させた *gpt delta* トランスジェニックマウスを樹立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R. S. Galhardo, R. Do, M. Yamada, E. C. Friedberg, P. J. Hastings, T. Nohmi and S. M. Rosenberg, DinB up-regulation is the sole role of the SOS response in stress-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, Genetics, in press.
- 2) A. Shibata, D. Maeda, H. Ogino, M. Tsutsumi, T. Nohmi, H. Nakagawa, T. Sugimura, H. Teraoka and M. Masutani, Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age, Mutat. Res., in press.
- 3) A. Xu, Y. Chai, T. Nohmi and T. K. Hei, Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in *gpt* delta transgenic MEF cells, Part Fibre Toxicol., 6, 3-15 (2009)
- 4) A. H. Hashimoto, K. Amanuma, K. Masumura, T. Nohmi and Y. Aoki, in vivo mutagenesis caused by diesel exhaust in the testis of *gpt* delta transgenic mice, Genes and Environ., 31, 1-8 (2009)
- 5) T. Umemura, M. Tasaki, A. Kijima, T. Okamura, T. Inoue, Y. Ishii, Y. Suzuki, N. Masui, T. Nohmi and A. Nishikawa, Possible participation of oxidative stress in causation of cell proliferation and in vivo mutagenicity in kidneys of *gpt* delta rats treated with potassium bromate, Toxicol., 257, 46-52 (2009)
- 6) K. Masumura and T. Nohmi, Spontaneous mutagenesis in rodents: spontaneous gene mutations identified by neutral reporter genes in *gpt* delta transgenic mice and rats, J. Health Sci., 55, 40-49 (2009)
- 7) 本間正充; 遺伝毒性物質に閾値はあるのか? ファルマシア 45, 143-148 (2009)
- 8) Y. Oda, T. Watanabe, Y. Terao, H. Nukaya and K. Wakabayashi, Genotoxic activation of 2-phenylbenzole-type compounds by human cytochrome P4501A1 and N-acetyltransferase expressed in *Salmonella typhimurium umu* strains, Mutat. Res., 654, 52-57 (2008)
- 9) K. Uchida, A. Furukori, Y. Shinozaki, T. Mori, D. Ogawara, S. Kanaya, T. Nohmi, H. Maki and M. Akiyama, Overproduction of *Escherichia coli* DNA polymerase DinB (Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal, Mol. Microbiol., 70, 608-622 (2008)
- 10) H. Anderson, E. Vonarx, L. Pastushok, M. Nakagawa, A. Katafuchi, P. Gruz, A. Di Rubbo, D. Grice, M. Osmond, A. Sakamoto, T. Nohmi, W. Xiao and B. Kunz, Arabidopsis thaliana Y family DNA polymerase eta catalyses translesion synthesis and interacts functionally with PCNA2, The Plant Journal, 55, 895-908 (2008)
- 11) M. Yasui, E. Suenaga, N. Koyama, C. Masutani, F. Hanaoka, P. Gruz, S. Shibutani, T. Nohmi, M. Hayashi and M. Honma, Mismatch properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases, J. Mol. Biol., 377, 1015-1023 (2008)
- 12) F. Yatagai, Y. Umebayashi, M. Honma, K. Sugawara, Y. Takayama and F. Hanaoka, Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. Mutat. Res., 638, 48-55 (2008)
- 13) F. Yatagai, M. Suzuki, N. Ishioka, H. Ohmori and M. Honma, M. Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. Radiat Environ Biophys 47, 439-44 (2008)
- 14) K. Hidaka, M. Yamada, H. Kamiya, C. Masutani, H. Harashima, F. Hanaoka and T. Nohmi, Specificity of mutations induced by incorporation of oxidized dNTPs into DNA by human DNA polymerase  $\eta$ , DNA Repair, 7, 497-506 (2008)
- 15) K. Yamauchi, S. Kakinuma, S. Sudo, S. Kito, Y. Oota, T. Nohmi, K. Masumura, M. Nishimura and Y. Shimada, Differential effects of low- and high-dose X-rays on N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutagenesis in thymocytes of B6C3F1 *gpt*-delta mice, Mutat. Res., 640: 27-37 (2008)