

て溶出試験を行い、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； 1-6) 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テープ剤粘着特性評価法を検討。

(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性製剤：ニトレンジピン、ニフェジピン、FK783 等のモデル薬物について、セルロース誘導体(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性機能を支配する普遍的な製剤物性を検討； 2-2) ナノ微粒子化を利用した可溶性製剤： ProbucoI, PVP 及び sodium dodecyl sulfate の混合粉碎により生成した probucoI ナノ微粒子について、懸濁液中の構造・分子状態を各種測定によって解析し、これらの物性がナノ微粒子の *in vivo* 吸収性等に及ぼす影響を考察； 2-3) cocrystal 化を利用した可溶性製剤：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や遠赤外吸収スペクトル測定の有用性を検討。カフェインの cocrystal と塩結晶を判別する手法としての固体 ¹⁵N-NMR スペクトル法の有用性を検討。

(3) 製剤開発および製造工程管理の方策の研究

3-1) 粒度分布測定器(Insitac)を用い、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を解析； 3-2) 粉末 X 線回折、赤外分光 IR 及び熱分析 TG により結晶多形の混合比を定量； 3-3) イメージング分析技術を用い製剤の配合変化(変色)を検討； 3-4) 収束ビーム反射測定法 FBRM を用い、固形製剤製造における造粒物の粒度分布を解析； 3-5) エネルギー分散型 X 線分析 EDAX や近赤外分光 NIR により滑沢剤ステアリン酸マグネシウム Mg-St の混合状態を分析； 3-6) NIR イメージングシステムにより固形製剤の造粒状態を解析； 3-7) 超高速クロマトグラフィー(UPLC)により合成工程の工程管理を検討； 3-8) CO₂ センサー等を用い、培養工程の直接的モニタリング法を検討。 3-9) テラヘルツ波の医薬品評価技術としての導入研究

(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. 研究結果および考察

(1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

機能性製剤の有効性、安全性に影響を及ぼす特性の解析と評価システムの構築に関する研究：

1-1) リポソーム製剤の放出性評価：ドキシソルピシン(DXR)塩酸塩の PEG 修飾リポソーム製剤(ドキシル注®20mg)の規格試験結果から、DXR 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の各因子についてクラスター解析を行い、平均粒径、リポソーム化率と放出性の間に高い相関性があることを示した。また DXR またはカルボキシフルオレセイン(CF)を封入したリポソームの薬物保持・放出性評価の方法を検討し、簡便性が求められる品質管理試験向けには界面活性剤の添加が有用であること、細胞培養液・培養上清の活用により *in vivo* 血中安定性と相関する放出試験を設定できる可能性を示した。

1-2) 薬物送達キャリアに関する研究： IP6 を用いたリポソームへの制癌剤(イリノテカン)封入法では、高い封入効率と血中滞留性および肝臓、脾臓での集積が観察され、さらに担癌マウスに対しイリノテカンと IP6 の相加あるいは相乗的な作用を示唆する腫瘍増殖抑制効果が得られた。また、γ-PGA NP は抗原提示細胞へ取込まれ、CTL 活性を誘導することを見出すとともにその機構を解明、腫瘍に対して予防的増殖抑制効果と治療的転移抑制効果を示し、ガンワクチンキャリアとして利用できることを明らかにした。

1-3) DDS 製剤の非臨床と臨床評価：シスプラチンおよび SN-38 内包高分子ミセルについてトランスレーショナル研究を行い、ミセル化による水溶性や動態変化が腎毒性の軽減や投与方法の多様化に有効であることを明らかにするとともに、前臨床のデータを分析し臨床プロトコルに反映させ、臨床治験を安全に行うことができた。

1-4) 口腔内崩壊錠の崩壊性の評価：ヒトの口腔内構造を模して開発された試験器を用いて、14 種の市販口腔内崩壊錠の崩壊時間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)と比較した。局方試験法では評価が困難な保存による特性変化(吸湿性の低下、機械強度の増大等)も認識可能であった。

1-5) 持続性製剤等の機能評価と特性解析：MRI 装置を用いた持続性ゲルマトリックス製剤の溶出過程の測定法は、非破壊かつリアルタイムで水分浸透やゲル層浸食の画像化が可能であり、製剤機能特性の評価法として有用であった。

1-6) 外用剤・経皮吸収製剤の製剤研究：タック性

測定装置を用いたツロブテロール貼付剤の粘着特性の評価結果は、官能試験およびヘアレスマウス皮膚試験と一致し、製剤化に有用な粘着力および剥離エネルギー値の数値化も可能であった。

(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されている非晶質化製剤、ナノ微粒化製剤、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て研究した。

2-1) 非晶質化を利用した可溶化製剤：非晶質化により可溶化された製剤では、分子運動性に加え、薬物と高分子の相互作用が溶出特性の改善や改善された溶出性の安定性を支配する重要な因子の1つであった。また、固体 NMR 法によって得られる薬物のケミカルシフトや緩和時間は薬物と添加剤の相互作用の評価や非晶質製剤の保存安定性を評価する上で有用な指標であり、これらのパラメータを指標として、薬物-添加剤相互作用を強めるように製剤の調製条件を最適化することが可能であった。最適化条件で調製された非晶質製剤は保存中に非晶質から結晶への変化が起こらず、溶出特性の変化が起こらない品質特性に優れた製剤であった。また、非晶質製剤では、製剤を構成する粒子表面は内部に比べ結晶化が速やかに起こり不安定であった。表面における結晶化を直接的に観測できる原子間力顕微鏡や、非晶質製剤の表面の分子運動性を選択的に測定できるインバースガスクロマトグラフィーは非晶質製剤の表面と内部の安定性の差を評価する上で有用であった。

2-2) ナノ微粒化を利用した可溶化製剤：Probuco/PVP の2成分系混合粉碎に比べ、第3の成分である界面活性剤を加えることにより、水に懸濁後もナノ微粒状態が保たれる安定なナノ微粒製剤を調製できた。¹³C 固体 NMR の測定により、ナノ微粒子の probucon と PVP との相互作用、界面活性剤と PVP との相互作用が検出され、ナノ微粒子形成にはこれら分子間の相互作用が重要な因子であることを明らかにした。このようにして得られた probucon ナノ微粒子製剤は薬物単独に比べ大幅な *in vivo* 吸収性の改善がみられた。この *in vivo* 吸収性の改善は添加剤として用いた PVP の分子量が小さいほど顕著であった。このような *in vivo* 吸収性の違いは、ナノ微粒子に吸着している PVP-界面活性剤複合体の構造・分子状態の違いが関連していることが示唆された。

2-3) Cocrystal 化を利用した可溶化製剤：テラヘル

ズスペクトル測定と遠赤外吸収スペクトルの併用により広い振動数領域でのスペクトル測定が可能となり、cocrystal 形成に重要な役割を果たす分子間相互作用の評価に有用であった。また、カフェインの種々の cocrystal 及び塩結晶について ¹⁵N-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った。シフトの値と N-H 間の結合距離とは相関し、化学シフトの値から cocrystal と塩結晶の判別が可能であり、cocrystal の最適化に有用な情報を与えることが分かった。

(3) 製剤開発および製造工程管理の研究

機能性製剤等の製剤設計や製剤開発および製造工程管理を行う上で必要な製剤および工程評価手法を検討した。

3-1)懸濁性点眼剤製造時の主薬分散工程において、適切な条件設定（加圧分散し気泡を抑制、測定濃度範囲に希釈可能な自動希釈システムの使用等）により、実製造ラインでレーザー回折法によるリアルタイム粒度分布計測・管理が可能となった。

3-2)製剤中に存在する5%以下の原薬結晶の混在の定量はIRやTGでは困難であったが、粉末X線回折では結晶混在比3~7%の定量が可能であることを確認した。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）であった。

3-3)特性X線法による元素マッピング及びX線CT、RIイメージング技術を用い錠剤の配合変化（変色）を分析したところ、リン酸ナトリウムの偏析が検出され、これが糖類と反応し、変色の原因となったと考えられた。

3-4) FBRM を用いることにより、レーザー回折では不可能な流動層造粒工程中の微粉の挙動を捉えることができた。

3-5)錠剤硬度が混合時間の増加に伴い低下する傾向をEDAXにより検討し、造粒主薬粒子の表面のステアリン酸マグネシウムが混合により分散、展延して粒子間に滑沢効果が働いたためと考えられた。

3-6)高速攪拌造粒のモデル実験を行い、NIRイメージングシステムを用いてその造粒状態を分析した。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。

3-7)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ィールの変化を、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。

3-8)培養工程において、NIR を利用した菌体濃度センサーを用いることにより菌体濃度測定を可能にした。

3-9)パルス分光技術の特徴とテラヘルツ電磁波領域の特性の組み合わせによって、完全非破壊で錠剤のコーティングの厚みや内部密度の分布を調べることが可能であった。

D. 結論

1. 機能性製剤の製剤機能評価法研究： リポソーム製剤の *in vitro* 放出性評価は、さらに生体内環境等を考慮した評価法へと発展させたい。IP6 を用いたリポソーム薬物封入体およびタンパク質内包 γ -PGA-NP は優れた薬物キャリア候補である。口腔内崩壊錠の崩壊性試験法、貼付剤の粘着力試験法はユニークであり広く利用できるものである。

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： 本研究成果は、超難溶性製剤の製剤設計およびその評価に利用できるものである。

3. 製剤開発および製造工程管理の研究： 本研究で検討した製剤特性および製造工程評価法は、いずれもが製造工程のリアルタイムモニタリングに適用可能であり、製剤開発・製造の現場での本格的な適用が期待される。

E. 研究発表(英文誌発表 65 報のうち 41 報を記載)

- 1) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Significance of Local Mobility in Aggregation of \square -Galactosidase Lyophilized with Trehalose, Sucrose or Stachyose, *Pharm Res.*, **24**, 1660-1667 (2007)
- 2) Miyazaki, T., Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.: Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature, *Int J Pharm*, **336**, 191-195 (2007)
- 3) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T., Tanaka, K., Kitamura, S., Takakura, A., Hayashi, T., Muranushi, N.: Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers as measured by $^1\text{H-NMR}$ spin-lattice relaxation, *Chem Pharm Bull.*, **55**, 1227-1231 (2007)
- 4) K.Izutsu, C.Yomota, N.Aoyagi. Inhibition of mannitol crystallization in frozen solutions by sodium phosphates and citrates. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**: 565-570 (2007)
- 5) Yoshioka, S., Aso, Y.: Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability During Storage of Amorphous Pharmaceuticals. *J. Pharm.*

Sci., (2007) **96**, 960-981.

- 6) T. Hamaguchi, Y. Matsumura, et al., A. Pharmacokinetic Study Paclitaxel-incorporating Nanoparticle Formulation. *Brit J Cancer.*, **97**: 170-176, 2007.
- 7) Y. Matsumura, Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting.*, **15**(7-8) :507-517, 2007.
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) T. Yoshikawa, N. Okada, A. Oda, K. Matsuo, K. Matsuo, Y. Mukai, Y. Yoshioka, T. Akagi, M. Akashi, S. Nakagawa, Development of amphiphilic γ -PGA-nanoparticle based tumor-vaccine: Potential of the nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier. *Biochem Biophys Res Commun.*, **366**, 408-413 (2008)
- 11) 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)
- 12) Y. Matsumura, Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Jpn J Clin Oncol* 2008; **38**:793-802.
- 13) Y. Matsumura, Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**:899-914.
- 14) 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.
- 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) M. Sumitomo, Y. Matsumura, et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res.*, **122** : 2148-2153, 2008.
- 18) K. Moribe, C. Wanawongthai, J. Shudo, K. Higashi, K. Yamamoto : Morphology and Surface States of Colloidal Probucol Nanoparticles Evaluated by Atomic Force Microscopy, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**(6),

- 878-880 (2008)
- 19) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of ¹⁹F-NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions, *Chem Pharm Bull.*, **57**, 61-64 (2009)
 - 20) 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)
 - 21) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of ¹⁹F-NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions, *Chem Pharm Bull.*, **57**, 61-64 (2009)
 - 22) Sakamoto, T., Matsubara, T., Sasakura, D., Takada, Y., Fujimaki, Y., Aida, K., Miura, T., Terahara, T., Higo, N., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Chemical mapping of tulobuterol in transdermal tapes using microscopic laser Raman spectroscopy, *Pharmazie*, **64**, 166-174 (2009)
 - 23) Izutsu, K., Hiyama, Y., Yomota, C., Kawanishi, T.: Near-infrared analysis of hydrogen-bonding in glass- and rubber-state amorphous saccharide solids, *AAPS PharmSciTech*, **10**, 524-529 (2009)
 - 24) Shibata, H., Saito, H., Yomota, C., Kawanishi, T.: Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: alteration in the number of large particles in infusion solutions, *Int J Pharm*, **378**, 167-176 (2009)
 - 25) Sakamoto, T., Portieri, A., Taday, P. F., Takada, Y., Sasakura, D., Aida, K., Matsubara, T., Miura, T., Terahara, T., Arnone, D. D., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging, *Pharmazie*, **64**, 361-365 (2009)
 - 26) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts, *Chem Pharm Bull.*, **57**, 1231-1236 (2009)
 - 27) C.K. Brown, L. Buhse, H. Friedel, S. Keitel, J. Kraemer, M. Morris, M. Stickelmeyer, C. Yomota and V. P. Shah, FIP Position Paper on Qualification of Paddle and Basket Dissolution Apparatus, *AAPS Pharm Sci Tech.* **10**:924-927 (2009)
 - 28) 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*, **136**, 30-37 (2009)
 - 29) J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, Y. Matsumura. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int. J. Cancer.*, **124**, 2505-2511(2009)
 - 30) Y. Matsumura, K. Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci.*, **100**, 572-579 (2009)
 - 31) Y. Saito, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, Y. Matsumura. Antitumour activity of NK012, SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, in Hypovascular Orthotopic Pancreatic Tumour. *Eur. J. Cancer*, **46**, 650-658(2009)
 - 32) W. Limwikrant, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe: Characterization of ofloxacin-oxalic acid complex by PXRD, NMR, and THz spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **382**, 50-55 (2009).
 - 33) T. Sakamoto, K. Mizukai, T. Kawanishi, Y. Hiyama, Real-time Analysis for quality control of a Reaction Process using Ultra-high Performance Liquid Chromatography Reduction of phenyl ketone to phenyl alcohol, *J Pharm Innov*, **4**, 115-120 (2009)
 - 34) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, **389**, 107-113, (2010)
 - 35) Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR, *J.Immunol.*, **184**, 1968-76 (2010)
 - 36) J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, T. Sugino, Y. Matsumura. Antitumor Effect of NK012, SN-38 Incorporating Polymeric Micelle on U87MG Orthotopic Glioblastoma in Mice Compared with Irinotecan in Combination with Bevacizumab. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 521-9(2010)
 - 37) H. Shibata, C. Saito, C. Yomota, T. Kawanishi, Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie* (in press)
 - 38) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids. *J. Pharm. Sci.* (in press)
 - 39) T. Tajiri, S. Morita, R. Sakamoto, M. Suzuki, S. Yamanashi, Y. Ozaki and S. Kitamura Investigation of Drug Release Mechanisms of Hydrogel Matrix Tablets Using Flow-Through Cell Dissolution Coupled with Magnetic Resonance Imaging. *Int. J. Pharm.*, (in press).
 - 40) H. Kenmotsu, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, A. Takahashi, T. Nagano, K. Goto, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer*, (in press).
 - 41) T. Nagano, M. Yasunaga, K. Goto, H. Kenmotsu, Y. Koga, J. Kuroda, Y. Nishimura, T. Sugino, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura. Synergistic Antitumor Activity of the SN-38-Incorporating Polymeric Micelles NK012 with S-1 in a Mouse Model of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer*, (in press).

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；(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) 埼玉第一製薬 山内仁史
- (9) 富山産業 中川知秀
- (10) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (11) 国立医薬品食品衛生研究所 宮崎玉樹
- (12) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (13) 塩野義製薬 村主教行
- (14) 第一製薬 中上博秋
- (15) 中外製薬 小川 裕
- (16) 武田薬品 池田幸弘
- (17) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (18) 東邦大学薬学部 寺田勝英
- (19) 国立医薬品食品衛生研究所 坂本知昭
- (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 小澤昭夫
- (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製剤あるいはリポ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) リポソーム製剤からの医薬品放出性の検討：ドキシソルビシン(DXR)またはカルボキシフルオレセイン(CF)を封入したリポソームを調製し、試験液に界面活性剤あるいは細胞培養液・上清を添加した場合の放出への影響を検討した；

1-2) 薬物封入リポソーム製剤の製剤特性の評価：オクトレオチド(Oct)で表面修飾した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、物性測定するとともに甲状腺腫様ガン（MTC）由来細胞への作用を検討した；

1-3) 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： 溶液混和により抗原タンパク質を内包した γ -PGA ナノ粒子(NP)を作製し、抗原タンパク質の細胞への取り込み等を検討した；

1-4) ミセル体を中心とした DDS 製剤の非臨床と臨床評価： 開発段階のミセル製剤につき組織集積と抗腫瘍作用を非臨床試験によって検討した；

1-5) 難溶性薬物の経口固形製剤の溶出性評価： 食前、食後における人工腸液 FaSSIF および FeSSIF 等を調製し、イトラコナゾール錠およびカプセルについて、溶出試験を実施した；

1-6) 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、各種市販口腔内崩壊錠について崩壊性等を検討した；

1-7) 持続性製剤等の機能評価と特性解析: 持続性ゲルマトリックス製剤について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；

1-8) 外用剤・経皮吸収製剤の粘着特性評価法： 市販の医療用テープ剤について、タック性測定装置と皮膚への貼りつきの強さ(剥離力)を官能試験により評価した。

(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、セルロース誘導体(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、混練溶融法(HME 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。今年度は添加剤との2成分混合系や実生産に使用可能な装置を用いて製造された固体分散体など実製剤に近い系について検討を行うとともに、物理的安定性の予測法の検討を行った；

2-2) ナノ微粒子化を利用した可溶化製剤： フェニトイン(DPH)と2種類のフェニトイン誘導体(MDPH: DPHのモノメチル化体, DMDPH: DPHのジメチル化体)について PVP および SDS との3成分混合粉碎によりナノ粒子を調製し、薬物の構造の違いが薬物の微粒子化及び微粒子の安定性に与える影響について検討した；

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¹⁵N-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

医薬品製造工程のプロセス理解、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への応用を視野にいたした分析法に関する以下の研究を行った：

3-1) 粉末 X 線回折測定により原薬・製剤中における原薬の結晶多形混在比率評価法の確立；

3-2) テラヘルツ波の医薬品評価技術としての導入研究；

3-3) エネルギー分散型 X 線分析を用いた固形製剤の混合及び打錠状態の分析評価；

3-4) 分光顕微技術（近赤外及び赤外 ATR イメージング、ラマンマッピング手法）を用いた造粒顆粒の評価；

3-5) 製剤内表面のイメージング技術の製剤分析への応用；

3-6) ラマン分光分析法による原薬製造の反応リアルタイムモニタリングと品質コントロール；

3-7) バイオ医薬品製造における PAT に関する研究

3-8) フィルムコーティング工程への近赤外モニタリング検討；

3-9) 熱浸透率センサーによるステアリン酸マグネシウムの滑沢効果の研究；

3-10) 超高速液体クロマトグラフィー技術の光学純度リアルタイム解析への応用研究

(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) 封入薬物と脂質組成の異なる2種類のリポソームに対して、各種塩・糖・バッファー類の薬物放出性に与える影響を評価したところ、Tris-HCl等の特定の塩・糖・バッファー類によって薬物放出が促進されることが示唆され、リポソームの薬物放出性に関する基礎情報を集積できた。また、昨年度報告した培養液中における沈殿物生成について原因解明を試み、凝集物は2価イオン存在下でリポソームとヘパリンが結合して形成されたものであり、PEG修飾によってその結合が阻害されること、凝集物形成によって未修飾リポソームのマクロファージへの取り込みが促進されることが判明した。

1-2) 製剤の腫瘍送達性の向上による甲状腺髄様ガン(MTC)薬物療法の有効性向上と副作用軽減を目的として、MTC腫瘍細胞に高発現しているソマトスタチン受容体(SSTR)の特異的リガンドであるオクトレオチド(Oct)で表面を修飾したイリノテカン封入リポソームを調製した。このOct修飾製剤は受容体を介してMTC腫瘍細胞内に選択的に取り込まれることを明らかにし、MTCの薬物治療効果を向上させる可能性を示唆した。

1-3) 抗原タンパク質を内包するフェニルアラニンエチルエステル導入両親媒化ポリγ-グルタミン酸(γ-PGA)ナノ粒子は、マウス骨髄由来樹状細胞を用いた実験から、エンドサイトーシスによって抗原提示細胞(APC)に効率よく取り込まれ、内包した抗原をMHC class I/II両分子を介した抗原提示経路に送達することを明らかにした。また細胞内に取り込まれた粒子から抗原タンパク質が徐々に放出され、細胞質に移行することを確認した。

1-4) モデル動物を用いてイリノテカンの活性代謝物であるSN-38内包ミセル(NK-0120)の組織集積と抗腫瘍作用を検討した。ミセル内包化により静脈投与が可能となり、腫瘍組織の血管透過性亢進に基づく腫瘍部位への特異的な分布や、集積されたミセルからの長時間放出を示唆する高い抗腫瘍効果がみられた。また同ミセル製剤は臨床開発が先行するCPT-11製剤に比べ多くの検討項目で優れた特性を示した。これらの非臨床情報を臨床治験を勧めるプロトコールに反映させた。

1-5) 人工消化管モデル試験液が、より生理学的な

状況に近づけるように改訂されたのを受け、従来の人工消化管モデル試験液と比較検討した。報告ではセレコキシブのようなある程度の溶解性を有する医薬品では、食後のモデル試験液(FeSSIF)におけるタウロコール酸やレシチンの濃度の低下の影響はほとんど無いと報告されているが、中性付近で溶解度の低いイトラコナゾールでは、その製剤特性が大きく影響し、製剤によって溶出率への影響が異なることを示した。また、薬物動態シミュレーションソフトGastro Plusを用いて、難溶性薬物の血中濃度予測への適用を試み、一定の予測が可能であることを示した。

1-6) 口腔内崩壊錠の崩壊試験を目的にヒト口腔内構造を模して開発した試験器を用いた崩壊試験では、14種の口腔内崩壊錠のほとんどで官能試験の文献値と相関する結果が得られ、評価法としての有用性が示された。局方試験装置では錠剤に荷重をかけた条件でこれに近似した結果を示すことから、口腔内残留感の原因となる崩壊凝集粒の除去過程など崩壊機構の反映が、官能試験と高い相関を示す原因と考えられた。

1-7) 試験液を軽水から重水に換えることにより持続性ゲルマトリックス製剤の試験液浸透過程と形態変化の同時モニタリングが可能となり、親水性高分子基剤に分散させた非晶質薬物の再結晶化がゲル中での遅い試験液置換による過飽和状態に起因することを明らかにした。

1-8) 外用剤・経皮吸収製剤の粘着特性(肌への貼付きは良好かつ粘着面同士が貼り付いても剥しやす)を客観的に評価する目的で開発したタック性測定装置を用い、ツロブテロール製剤の粘着力を測定するとともに、皮膚への貼り付きの強さ(剥離力)を官能試験にて評価した。官能試験で得られた剥離力の順位性は動物皮膚を用いた試験と良好な一致が見られたが、タック性測定装置による評価を進めるには、被着材料などの選択が重要であることが示された。

(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。①前年度までの検討によって明らかになった非晶質状態の安定性を支配する製剤物性の普遍性を確認することを目的として、実際の製剤に近い系での検討を行うとともに、②本製剤の品質確保を可能にする非晶質状態から結晶への変化速度の予測法の開発を検討した。

①非晶質製剤の安定性を支配する製剤物性の普遍性の検討

ニフェジピン-HPMCAS 固体分散体は相溶性のよい溶媒を用いてスプレードライすることにより、保存安定性に優れた非晶質固体分散体が得られることを昨年度までの検討によって明らかにした。実際の医薬品に近い実験系として、固体分散体と添加剤（D-マンニトール、コーンスターチ、無水乳糖、含水二酸化ケイ素、結晶セルロース）との2成分混合系について検討したところ、コーンスターチのように水分を多く持つ添加剤を配合した場合には、コーンスターチに含まれる自由水が結晶化を促進して製剤の溶出性が大きく低下することを確認した。しかし適切に乾燥処理をすれば、このような混合末でも溶出性を維持できることがわかった。また、乾燥処理した低水分検体を評価した結果、固体分散体調製時の調製溶媒の違いが製剤の安定性に影響していることを確認することができた。

実生産に適用可能な混錬溶融法(HME 法)や連続式の混合粉碎法によって得られた非晶質固体分散体について、製造パラメータと保存安定性の関係を検討した。連続式の混合粉碎機を用いて調製した固体分散体中のトログリタゾンの短距離秩序の変化を固体 NMR によって検出できた。この固体 NMR パラメータを用いることによって、連続式の混合粉碎機を用いて調製した固体分散体の物理的安定性を予測することができた。固体分散体調製法として、スプレードライ法と混錬溶融法（HME 法）について比較し、それぞれの制御因子が溶出性に及ぼす影響を確認した結果、スプレードライ法では粒径および粒子形状等のマクロな影響ではなく、薬物-高分子間の相互作用の違いによるミクロな影響が大きいのに対し、HME 法では、粒子の性状(主に硬さ)の違いが溶出プロファイルに影響を及ぼすことを明らかにした。

②非晶質製剤の結晶化速度予測法の検討

固体分散体の物理的安定性を短い時間で予測するために、高温、高湿度条件で保存されるが、実際に非晶質製剤が保存される室温条件での安定性

評価方法として、固体分散体にその薬物結晶を添加することにより結晶核生成期間を短縮し、再結晶化速度を促進させる物理的安定性の評価手法（Seeding approach）を検討した。ニルバジピンと HPMC の比率を変えて調製した非晶質固体分散体（薬物/HPMC = 1/0, 1/0.02, 1/0.04, 1/0.06, 1/0.1, 1/0.2, 1/1, 1/3, 1/5）にニルバジピン重量に対して 10%の結晶を添加し、25℃、60%相対湿度で保存した。HPMC の比率が小さい固体分散体においては約 1 カ月の保存により、結晶化速度を求めることができた。この速度と HPMC 濃度の関係から HPMC 含量が高い固体分散体について結晶化速度を予測したところ、25℃2 年保存したサンプルの実測値とほぼ一致していたことから、Seeding approach はプラクティカルな安定性予測法として有用であることがわかった。

昨年度までの検討により FK783 の非晶質固体分散体の表面における結晶成長速度は内部より速やかに起こることを明らかにした。インバース・ガスクロマトグラフィー（IGC）により、難溶性薬物のモデル化合物 FK783 と PVP、並びに TC-5R で調製した固体分散体の表面自由エネルギーを測定したところ、表面自由エネルギーが一定となるまでの時間は TC-5R を添加した固体分散体に比べ PVP を添加した固体分散体の方が速く、再結晶化のし易さとの間に相関のあることが示唆された。IGC は非晶質表面の再結晶化を評価する手法として有用であることがわかった。

結晶化速度は分子運動性と熱力学的な因子すなわち結晶化することによりエネルギー的に得をする結晶化の駆動力(ΔG_v)とエネルギー的に損をする核-非晶質間の界面自由エネルギー(σ)の影響を受ける。核生成速度や結晶成長速度に差があるニフェジピン、ニトレンジピン、ニルバジピンの 3 種類のジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬について検討したところ、 ΔG_v はニフェジピンが最も大きく、結晶化速度と関連することが分かった。

2-2) ナノ微粒子化を利用した可溶化製剤

医薬品、水溶性高分子及び界面活性剤による 3 成分混合粉碎（GM）により調製した医薬品のナノ微粒子のサイズ、懸濁液中での安定性に及ぼす医薬品の構造との相関関係を明らかにすることを目的として、フェニトイン(DPH)と 2 種類のフェニトイン誘導體（MDPH：DPH のモノメチル化体、DMDPH：DPH のジメチル化体）について PVP および SDS との GM によりナノ粒子形成を検討した。いずれの DPH 誘導體も 3 成分 GM を行うことによ

り、水に分散することで、平均粒子径約 150nm のナノ微粒子が形成されることを明らかにした。しかし、GM 懸濁液の安定性は DPH>MDPH>DMDPH の順であった。IR, ¹³C-固体 NMR の結果から、固体状態で形成される 3 成分間の相互作用は DPH>MDPH>DMDPH の順であった。以上の結果から、相互作用の違いがナノ微粒子形成あるいはナノ微粒子の安定性に寄与していると推察された。

2-3) Cocrystal 化を利用した可溶性製剤

Cocrystal の結晶化スクリーニングにおいて、カウンター分子種および晶析溶媒の多様性を確保すると共に、化合物-cocrystal former-溶媒の 3 成分系での相図を考慮して晶析条件を設定することが重要であることを明らかにした。また、オフロキサシンはジカルボン酸類と混合粉碎することにより、モル比 1:2 の複合体を形成するが、テラヘルツ分光法により、複合体形成に伴う分子状態の変化を検出できた。さらに得られた結晶が塩か cocrystal かを判定するには ¹⁵N-NMR が有用であることを示した。

(3) 製剤開発および製造工程管理の研究

3-1) 原薬中に存在する可能性のある 2 種類の水和物結晶形の割合を変えて混合し、粉末 X 線回折測定を用いて検量線を作成し、この検量線を用いて原薬中および製剤中におけるモデル化合物の結晶形比率を定量的に評価できる手法を確立した。原薬単独および 50% の模擬製剤について経時的な結晶形変化を追跡した結果、3 水和物結晶から 1 水和物結晶の変化では、保湿性のある賦形剤が結晶形変化速度をやや低下させる傾向にあり、賦形剤が共存すると、結晶形変化速度に影響する可能性が示唆され、製剤中での原薬の結晶形を定量的に評価する必要性を示す重要な知見であると考えられた。今回の測定手法は、1 検体あたりの測定時間が約 5 分間と短く、多検体の測定にも適用できるため、安定性試験や配合性スクリーニング等に有効と考えられた。

3-2) テラヘルツパルス波を用いた試料表面及び内部の物理的な情報をイメージとして視覚的に表すことで品質の評価を試みた結果を基に、製造管理技術としての適用性を検討した。パルス分光技術の特徴とテラヘルツ電磁波領域の特性の組み合わせによって、完全非破壊で錠剤のコーティングの厚みや内部密度の分布を調べることが可能であった。

3-3) エネルギー分散型 X 線分光法 (EDAX) や NIR を用いた分析評価によって Mg-St (ステアリン酸マ

グネシウム) の混合挙動が錠剤硬度に及ぼす影響を調べた。EDAX による主薬粒子表面の分析で、Mg-St 凝集物の分散と主薬粒子表面への付着が混合初期に起こり、表面での展延と分散がその後の混合で促進されることを視覚的、数値的に直接確認することができた。この Mg-St 混合状態の変化は錠剤表面の分析でも検出することが可能であった。また、Mg-St の滑沢効果は、Mg-St の分散や展延に起因しており、混合粉末の嵩密度の上昇、および打錠時の粉末充填深さの低下が起こり、打錠後の錠剤硬度の低下が発生していた。錠剤表面を広い範囲で行なったマクロな条件での分析に加えて、粒子の表面のミクロな条件での分析を行なうことや、近赤外など他の分析手法での分析結果と併せて議論するなど、多角的に議論することによって、その特性や影響を評価することが可能であった。

3-4) 近赤外及び赤外 ATR イメージング、ラマンマッピング手法を用いて造粒顆粒の同じ箇所を測定し、主薬及び添加剤等の分布状態を評価、比較したところ、同じような成分分布を示す傾向は見られたが、ラマンマッピング及び赤外 ATR イメージング手法を用いた場合は近赤外と比べ微細な分布が明確に確認できた。この結果の差は、近赤外よりも赤外 ATR スペクトルやラマンマッピングの方が成分の同定が容易なこと、そして最小測定範囲がより小さくなったことが要因と考えられた。

3-5) 医薬品錠剤の室温保管でまれに斑点状の着色が発生するが、その発生原因やメカニズムが不明であるため、その原因究明を実施した。EPMA 法による錠剤表面の元素マッピング、FT-IR 法によるイメージング、X 線 CT 分析を行った結果、変色部及びその周辺にリン酸ナトリウム塩が分布しており、変色がリン酸ナトリウム塩と処方的大部分を占める糖類の反応によって起こっていると推測された。配合変化試験及び NMR による検証を行った結果、変色部では糖の反応の 1 つであるカラメル化反応が起こっていることが示唆された。

3-6) 医薬品の原薬製造法開発における PAT 技術の利用として、ラマン分光分析法を取り上げ、光延反応における不安定中間体を含む各成分のモニタリングを検討し、反応最適化ツールとしての有用性の確認を行った。その結果、モデル基質を用いたリアルタイムモニタリングでは、原料、不安定中間体、及び生成物の経時的変化が検出できた。またこの不安定中間体の挙動を解析することで、反応機構に関する知見が得られ、モニタリングが

反応の化学的理解にも繋がるということが認められた。開発品を用いた検討では、スペクトルの波形解析を行うことで、原料、不安定中間体、生成物に加えて、副生成物のモニタリングが可能となり、ラマン分光分析が、製造法開発段階での品質コントロールにおける評価データの一つとなり得ることが示唆された。

3-7) 細胞培養医薬品の製造におけるPATについて検討した。(1)全細胞濃度計：酵母をモデルとした培養における計測能の評価検討を実施した結果、使用した全細胞濃度計は、培養工程に十分適用できることが示された。更に全細胞濃度計による模擬抗体液の乳白濁化現象についてのモニタリング実験により、精製工程・製剤工程における直接モニタリング適用の可能性も考えられた；(2)溶存CO₂濃度計：酵母をモデルとした培養における計測能の評価検討を実施したが、センサーによって異なる結果となることが判明した；(3)NIR：抗体を含むタンパク質生成物のin-lineモニタリング機器としての適用報告が複数あるものの、多成分系となる培地や培養液それぞれの成分の校正に多くの労力と時間が掛かること、また、抗体医薬品原薬製造工程では濃度が希薄なため、スペクトルの変化が微小であり、適用に課題が残った。

3-8) 錠剤コーティング操作において近赤外分析装置によるコーティング皮膜量、水分、錠剤重量についてリアルタイムモニタリングの可能性を検討した。オフライン測定、接触方式インライン測定、非接触方式インライン測定の結果より、水分・皮膜量（錠剤重量）を近赤外測定によって非接触で測定できる可能性が示唆された。皮膜量に関しては、近赤外線測定できる基剤であれば、非接触で測定できると思われるが、水分測定では、吸水性の高い錠剤では結果が異なる可能性があるため、注意が必要と考えられた。錠剤コーティング装置中の近赤外分析装置の取付位置について議論になったが、ドラム背面にガラス窓を設置し、ガラス窓越しに非接触方式によるモニタリングの可能性検討を実施した結果、測定可能性を示すデータが得られた。

3-9) ステアリン酸マグネシウムは、打錠特性、錠剤物性に大きく影響することが経験的に知られているので、製剤添加剤との混合性のオンラインモニタリングへの熱浸透率測定への適用、及び混合後の圧縮成形性、崩壊性、溶解性とステアリン酸マグネシウムの物性の関係性について検討を行った。その結果、今回検討した種々のステアリン酸マグ

ネシウム試料は、ロットにより白糖デンプン顆粒との混合性に違いがあることが確認された。さらに、白糖デンプン顆粒と各ロットのステアリン酸マグネシウムの混合速度の違いは、これまで経験的に知られていた粒子径のみならず、水和数、ステアリン酸含量、結晶化度についても影響を受けることが明らかとなった。

3-10) 超高速液体クロマトグラフィー技術の光学純度リアルタイム解析への適用性の検討を行った。その結果、高速分析対応のキラルカラム技術の現状もあり溶出には7分の時間が必要であり、劇的な迅速化は達成できなかった。しかし、不斉合成工程における光学純度の管理や開発段階における条件検討時に有用なクロマトグラフィー情報を提供できるものと考えられた。

D. 考察

(1) 機能性製剤の製剤機能評価法研究

薬物封入リポ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、各種塩・糖・バッファー類の薬物放出性に与える影響を調べ、Tris-HClによる放出促進を見いだした。*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。

各種の人工腸液を用いて超難溶性のイトラコナゾール製剤の溶出試験条件を検討したが、人工腸液を全ての製剤に同じように適用することは困難であること、またさらなる可溶化能の付与が必要であることが示唆された。一方薬物動態シミュレーションソフトをイトラコナゾールカプセルのデータに応用したところ、血中濃度推移の予測が可能であると思われ、難溶性薬物の製剤設計等への応用が期待される。

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、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たが、実際の医薬品に近い実験系である添加剤との 2 成分混合系や実生産に適用できる装置を用いて製造した非晶質固体分散体についても、薬物-添加剤相互作用の影響を強く受けることが確認された。また、IGC が薬物の表面における結晶化速度を評価できることが示唆された。

ナノ微粒子化による可溶化製剤については、DPH 誘導体/PVP/SDS3 成分 GM について検討した結果、薬物の化学構造の違いによらず平均粒子径約 150nm のナノ微粒子が形成されたが、GM 懸濁液の安定性は、DPH>MDPH>DMDPH の順であった。固体状態で形成される 3 成分間の相互作用の違いがナノ微粒子形成あるいはナノ微粒子の安定性に寄与していると推察された。化学構造とナノ微粒子の懸濁液における安定性との関連について懸濁液中での薬物の物性評価を含め更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、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、IGC 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確認された。

(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 線を応用した画像化技術やラマン、赤外及び赤外 ATR、近赤外、テラヘルツを利用した顕微分光若しくはイメージング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有用であることが示され、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把握することが可能で、原因分析、製剤の開発や製造工程の管理手法への応用が十分期待できると考えられた。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としてラマンや近赤外分光装置、X 線回折、熱浸透率センサーや UHPLC などが有用であることも示された。これらのモニタリング技術は工程管理手法として有用であるばかりでなく、開発段階における品質に関する有用な情報を短時間に得ることを可能にすると考えられた。

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、ステアリン酸マグネシウムの純度、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が得られた。この結果は、ステアリン酸マグネシウムの製造現場での受け入れ試験に、これまで管理されていなかったステアリン酸マグネシウムの物理化学的性質、特に、水和物の結晶形、結晶化度を考慮する必要性を示唆している。

バイオ医薬品 QbD は、2009 年 10 月に欧米製薬企業で構成する CMC Biotech Working Group から、抗体医薬開発のケーススタディー (A-Mab: a Case Study in Bioprocess Development) が公開され、QbD による開発例が生まれる契機となると考えられる。本研究の成果はバイオ医薬品 QbD における PAT に貢献できると考える。

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) PEG 修飾リポソーム製剤の *in vitro* 放出性に与える溶液中の塩・糖・バッファー類の影響を調べた；
 - 1-2) Oct を表面修飾したイリノテカン封入リポソーム製剤は甲状腺腫瘍ガンの薬物治療に有用な特性を示すことを確認した；
 - 1-3) フェニアラニンエチルエステル導入両親媒化 γ -PGA ナノ粒子はワクチンキャリアーとして優れた特性を示すことを明らかにした；
 - 1-4) SN38 内包ミセルについて、前臨床試験により抗ガン剤として優れた特性を示すことを明らかにした；
 - 1-5) 各種人工消化管モデル試験液を用いて難溶性薬物であるイトラコナゾールの錠剤およびカプセルの溶出性を検討した；
 - 1-6) 口腔内崩壊試験器を崩壊試験を市販口腔内崩壊錠で行い、官能試験と相関する結果を得た；
 - 1-7) フロースルーセル法と MRI 装置を併用した溶出試験により親水性高分子基材を用いた持続性製剤からの非晶質薬剤の放出過程を解析した；
 - 1-8) 外用剤・経皮吸収製剤の粘着特性評価のための開発したタック性測定装置による評価結果と官能試験との評価結果を比較検討した。
- (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実際の医薬品に近い実験系において示した IGC は非晶質表面の再結晶化を評価する手法として有用であることがわかった。また、常温、低湿度での固体分散体の安定性評価法として Seeding approach が有用であることが示唆された；
 - 2-2) ナノ粒子化製剤について、医薬品の構造の違いによってナノ微粒子のサイズ、懸濁液中での安定性に差が生ずるのは固体状態における医薬品、水溶性高分子、界面活性剤の3者間の相互作用の違いが寄与してい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) 粉末 X 線回折測定により、原薬・製剤中の原薬の結晶形比率を水和物結晶形のモデル化合物について定量的に評価できる手法を確立した；
- 3-2) テラヘルツ波を用いることにより、完全非破壊での錠剤のコーティングの厚みや内部密度の分布を調べることが可能であった；
- 3-3) EDAX による分析で、Mg-St 凝集物の分散と主薬粒子表面への付着を視覚的、数値的に確認することができた；
- 3-4) ラマンマッピング及び赤外 ATR イメージング手法を用いた造粒顆粒分析は近赤外イメージングと比べ微細な分析が可能であった；
- 3-5) 元素マッピング、FT-IR ケミカルイメージング、XCT などのイメージング技術は、着色現象の原因推定を迅速に行うことが可能な有益な手法であった；
- 3-6) 原薬製造（製造法開発）における反応最適化のためのモニタリングツールとしてのリアルタイムラマン分析の有用性が認められた；
- 3-7) 全細胞濃度計は細胞濃度及び抗体医薬の白濁化現象のモニタリングに応用可能であることが示唆された；
- 3-8) 錠剤コーティング操作において近赤外分析装置によるコーティング皮膜量、水分、錠剤重量についてリアルタイムモニタリングの可能性が示唆された；
- 3-9) ステアリン酸マグネシウムの混合のオンラインモニタリングへの熱浸透率測定の実用が可能であった；
- 3-10) 超高速液体クロマトグラフィーによる光学純度リアルタイム解析実現の可能性を示した。

F. 研究発表

1. 誌上発表 (43 報のうち 29 報を選択)

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) Hikaru Tanaka, Iyuki Namekata, Hideaki Nouchi, Koki Shigenobu, Toru Kawanishi, and Akira Takahara, New Aspects for the Treatment of Cardiac Diseases Based on the Diversity of Functional

- Controls on Cardiac Muscles: Diversity in the Excitation–Contraction Mechanisms of the Heart, *J. Pharmacol.Sci.*, **109**, 327-333 (2009)
- 4) Iyuki Namekata, Yayoi Tsuneoka, Akira Takahara, Hideaki Shimada, Takahiko Sugimoto, Kiyoshi Takeda, Midori Nagaharu, Koki Shigenobu, Toru Kawanishi, Hikaru Tanaka: Involvement of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the automaticity of guinea-pig pulmonary vein myocardium as revealed by SEA0400, *J. Pharmacol.Sci.*, **110**, 111-116 (2009)
 - 5) Sakamoto, T., Matsubara, T., Sasakura, D., Takada, Y., Fujimaki, Y., Aida, K., Miura, T., Terahara, T., Higo, N., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Chemical mapping of tulobuterol in transdermal tapes using microscopic laser Raman spectroscopy, *Pharmazie*, **64**, 166-174 (2009)
 - 6) Izutsu, K., Hiyama, Y., Yomota, C., Kawanishi, T.: Near-infrared analysis of hydrogen-bonding in glass- and rubber-state amorphous saccharide solids, *AAPS PharmSciTech*, **10**, 524-529 (2009)
 - 7) Shibata, H., Saito, H., Yomota, C., Kawanishi, T.: Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: alteration in the number of large particles in infusion solutions, *Int J Pharm*, **378**, 167-176 (2009)
 - 8) Sakamoto, T., Portieri, A., Taday, P. F., Takada, Y., Sasakura, D., Aida, K., Matsubara, T., Miura, T., Terahara, T., Arnone, D. D., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging, *Pharmazie*, **64**, 361-365 (2009)
 - 9) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts, *Chem Pharm Bull*, **57**, 1231-1236 (2009)
 - 10) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, **389**, 107-113, (2010)
 - 11) Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR, *J Immunol.*, **184**, 1968-76 (2010)
 - 12) H.Shibata, C.Saito, C.Yomota, T.Kawanishi, Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie* (in press)
 - 13) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids. *J. Pharm. Sci.* (in press)
 - 14) C.K. Brown, L. Buhse, H. Friedel, S. Keitel, J. Kraemer, M. Morris, M. Stickelmeyer, C. Yomota and V. P. Shah, FIP Position Paper on Qualification of Paddle and Basket Dissolution Apparatus, *AAPS Pharm Sci Tech*. **10**:924-927 (2009)
 - 15) T. Tajiri, S. Morita, R. Sakamoto, M. Suzuki, S. Yamanashi, Y. Ozaki and S. Kitamura Investigation of Drug Release Mechanisms of Hydrogel Matrix Tablets Using Flow-Through Cell Dissolution Coupled with Magnetic Resonance Imaging. *Int. J. Pharm.*, (in press).
 - 16) 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*, **136**, 30-37 (2009)
 - 17) 松尾圭祐、吉川友章、岡田直貴、中川晋作、 γ -PGA ナノ粒子を応用したがんワクチン療法の開発. *Drug Delivery System*, **23**, 130-137, (2008)
 - 18) 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)
 - 19) J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, Y. Matsumura. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int. J. Cancer.* **124**, 2505-2511(2009)
 - 20) Y. Matsumura, K. Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci.*, **100**, 572-579, 2009.
 - 21) J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, T. Sugino, Y. Matsumura. Antitumor Effect of NK012, SN-38 Incorporating Polymeric Micelle on U87MG Orthotopic Glioblastoma in Mice Compared with Irinotecan in Combination with Bevacizumab. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 521-9(2010)
 - 22) Y. Saito, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, Y. Matsumura. Antitumor activity of NK012, SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, in Hypovascular Orthotopic Pancreatic Tumour. *Eur. J. Cancer*, **46**, 650-658(2009)
 - 23) H. Kenmotsu, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, A. Takahashi, T. Nagano, K. Goto, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer*, (in press).
 - 24) T. Nagano, M. Yasunaga, K. Goto, H. Kenmotsu, Y. Koga, J. Kuroda, Y. Nishimura, T. Sugino, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura. Synergistic Antitumor Activity of the SN-38-Incorporating Polymeric Micelles NK012 with S-1 in a Mouse Model of

Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Cancer*, (in press).

- 25) Bingquan Wang, Marcus T. Cicerone, Yukio Aso, Michael J. Pikal : The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.* **99**, 683-700 (2010).
- 26) W. Limwikrant, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe: Characterization of ofloxacin-oxalic acid complex by PXRD, NMR, and THz spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **382**, 50-55 (2009).
- 27) 阿曾幸男, 吉岡澄江: 非晶質の緩和と結晶化, 難水溶性薬物の物性評価と製剤設計の新展開, シーエムシ出版, 224-235 (2010).
- 28) 小出達夫: 顕微イメージング技術を用いた製剤開発および製造工程管理手法, *ファルマシア* **45** (4) 343-347 (2009)
- 29) T. Sakamoto, K. Mizukai, T. Kawanishi, Y. Hiyama, Real-time Analysis for quality control of a Reaction Process using Ultra-high Performance Liquid Chromatography Reduction of phenyl ketone to phenyl alcohol, *J Pharm Innov*, **4**, 115-120 (2009)

2. 学会発表

- 1) 柴田寛子, 齋藤はる奈, 四方田千佳子, 川西徹リポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験に関する基礎的検討 日本薬剤学会第 24 年会 (2009.5)
- 2) 柴田寛子, 齋藤はる奈, 四方田千佳子, 川西徹薬物封入リポソームの *in vitro* 薬物放出試験に関する基礎的検討 日本薬学会第 130 年会 (2010.3)
- 3) K. Izutsu, C. Yomota, T. Kawanishi, Effect of lateral membrane inhomogeneity on permeability of pharmaceuticals through vesicle-loaded barrier, 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (2010.3)
- 4) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: 原子間力顕微鏡を用いた非晶質ニフェジピン表面の結晶化観察, 日本薬剤学会第 24 年会 (2009. 5)
- 5) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 熱刺激電流測定法による数種のセファロsporin系抗生物質の水分子の運動性の測定 日本薬剤学会第 24 年会 (2009. 5)
- 6) Yukio Aso, Tsuyoshi Ohta, Tamaki Miyazaki and Toru Kawanishi: Stabilization and controlled release of β -galactosidase in cross-linked hydrophilic polymers prepared by γ -irradiation, Controlled Release Society Annual Meeting (2009. 7)
- 47) Miyazaki T., Aso, Y., Kawanishi T.: Crystallization rate of nifedipine at the surface of the amorphous solids determined by atomic force microscopy. AA PS Annual Meeting (2009.11).
- 8) Aso Y., Miyazaki T., Yoshioka S., Kawanishi T.: Temperature dependence of β -relaxation time of flufenamic acid in solid dispersions determined from

^{19}F -NMR relaxation time. AAPS Annual Meeting (2009.11).

- 9) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: 結晶化の駆動力および結晶-非晶質界面自由エネルギーから予測されるニフェジピン類薬物の核生成速度, 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3).
- 10) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 加水分解速度の異なる結合を介して架橋したデキストランゲルからの β -ガラクトシダーゼの放出制御, 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3)
- 11) 森部 久仁一, 荻野 亜希子, 東 顕二郎, 山本 恵司: 日本薬剤学会第 24 年会, 静岡, 2009 年 5 月
- 12) Kunikazu Moribe, Akiko Ogino, Kenjiro Higashi, Keiji Yamamoto : Asian Federation for Pharmaceutical Sciences, Kyoto, (2009. 10)
- 13) Wree Limwikrant, 東 顕二郎, 森部 久仁一, 山本 恵司: 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3, 岡山)
- 14) Y. Kojima, R. Kinoshita, K. Daidoji, R. Takano, T. Ohta, K. Shiraki, H. Maeda, Y. Ogawa, AAPS Annual Meeting (2009.11).
- 15) K. Shiraki, S. Higo, Y. Kojima, T. Ohta, Y. Ogawa, AAPS Annual Meeting (2009.11).
- 16) 小出達夫, 長門琢也, 松井航, 夏山晋, 川西徹, 檜山行雄: 近赤外イメージングシステムを用いた医薬品製造における造粒メカニズムの解明, 第 25 回近赤外フォーラム (2009.5 名古屋)
- 17) 小出達夫, 長門琢也, 松井航, 加納良幸, 夏山晋, 川西徹, 檜山行雄: NIR イメージングシステムを用いた顆粒中の偏析の観察と造粒メカニズムの考察, 日本薬剤学会第 24 年会 (2009.5 静岡)
- 18) 河野勇人, 吉橋泰生, 米持悦生, 寺田勝英: 表面自由エネルギーと熱浸透率を指標とした白糖デンプンとステアリン酸マグネシウムの混合速度の評価, 第 2 回標準処方研究フォーラム (2009.10 名古屋)
- 19) T. Koide, T. Nagato, S. Natsuyama, A. Ohnishi, T. Kawanishi, Y. Hiyama,: Observation of segregation in the granules made by high shear granulation using NIR and ATR-IR imaging techniques 7th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (2010.3 Valetta. Malta)
- 20) 小出達夫, 大西晃宏, 長門琢也, 夏山晋, 川西徹, 檜山行雄: 近赤外及び赤外 ATR イメージングシステムを用いた医薬品品質評価に関する研究, 日本薬学会第 130 年会 (2010.3 岡山)

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
研究期間 平成19年4月～平成22年3月

研究要旨 (1)ヒト薬物代謝酵素を発現する微生物株を用いた遺伝毒性試験のハイ・スループット化とキット化(2)遺伝的に改良したヒト細胞株の樹立と評価(3) *gpt delta* トランスジェニックラット、マウス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・ビジネス・システム(株) 藤居 互
- (3) (株)蛋白精製工業 持田 弘、平田大介
- (4) (財)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)安全性研究所 高崎 渉・伊東 悟
- (7) 大鵬薬品工業(株)徳島研究所 岡 宏明
- (8) 中外製薬(株)富士御殿場研究所 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)医薬研究所 林 宏行・川村祐司
- (11) 科研製薬(株)総合研究所 真田尚和

A. 研究目的

医薬品に関して 3R(Reduction, Refinement, Replacement)を念頭に、安全性評価に関わる試験法を再吟味することが喫緊の課題である。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。だが、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。哺乳類細胞を用いる試験については、非発がん物質を陽性と判定する場合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、小核試験では血液系の細胞に対する遺伝毒性のみが評価されるため、生殖細胞を含む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開発が望まれている。特に発がん試験で汎用されるF344ラットを基に、一般毒性試験との統合、小核試験を含む複数の遺伝毒性試験を同一個体で実施することが、望まれている。

上記の目的を達成するため、本研究班では、班全体を3つのグループに分け、(1)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の樹立と、試験系のハイ・スループット化およびキット化、(2)遺伝的に改良したヒト細胞株の作出およびその評価、(3)遺伝毒性試験用のトランスジェニックラット、マウスのバリデーションを進めてきた。具体的には、(1)に関し、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(umu試験)のキット化とハイ・スループット化を進め(小田、藤居、平田)、フラクチュエーションAmes試験(FAT)の最適条件を検討した(須井)。(2)に関して、特定のヒト薬物代謝酵素を高発現するヒト細胞、DNA損傷の乗り越えに関わるDNAポリメラーゼ κ (*pol* κ)遺伝子のノックイン(KI)およびノックアウト(KO)細胞株の作出とその評価(能美、本間、岡)、ヒト肝ミクロゾームにおける薬物代謝酵素の一塩基多型(SNP)解析結果と小核誘発性の相関の検討(高崎・伊東)。(3)に関して、発がんの標的臓器における遺伝毒性を検出できるF344 *gpt delta* トランスジェニックラットのバリデーション(西川、林)、*Pol* κ KIマウスの樹立およびバリデーションおよび小核試験・コメット試験の組合せを検討した(三島、真田)。

B. 研究方法

B-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

umu試験菌株である *Salmonella typhimurium* (以下サルモネラと略)TA1535株を基に、ヒト薬物代謝酵素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)を高産生す

る株 OY1002/1A2 を樹立した。また TA1535NR/1, 8-DNP 株に各 CYP 分子種と NADPH-P450 還元酵素遺伝子を発現させ OY1022/1A1、OY1022/1A2、OY1022/1B1 および OY1022/3A4 を樹立した。これらの株を用い改良マイクロプレート法と試験管法（従来からの umu 試験）を比較した。試験管法では、OD₆₀₀0.3 の培養液 1ml と被験物質調製液 10 μl を試験管で 2 時間培養し、濁度を A₆₀₀ で測定した後、従来の方法で β-ガラクトシダーゼ活性を算出した。改良マイクロプレート法では、菌液を TGlyT 培地で 50 倍希釈し、37℃ で 3 時間振盪培養した後、1mM IPTG、0.5 mM δ-aminolevulinic acid、250 μL/L trace elements を添加し、更に 37℃ で 1 時間振盪培養した。96 穴マイクロプレートに被験物質調製液 4 μl と上記の菌液 96 μl を加え、3 時間振盪培養し、菌液の濁度 (595 nm) を測定した。別のプレートで菌液 10 μl と Z-緩衝液 90 μL、PopCulture Reagent 5 μl を攪拌後、室温で 10 分放置した。発色基質として CPRG 溶液を 10 μl 加え、37℃、8-10 分間静置後、1M 炭酸ナトリウムを 100 μl で反応を停止し、吸光度 (570 nm) を測定した。試験に用いた化合物は、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)、2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)、3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2)、3,6-Dinitrobenzo[e]pyrene (DNB[e]P) である (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 および対照株 OY1002/pCW を用い、上記の小田の結果を追試するとともに、他の化合物を用いて、改良マイクロプレート法と試験管法を比較した。試験に用いた化合物は 2-AA、Glu-P-1、2-AF、IQ、MeIQ、benzo[a]pyrene (B[a]P)、Trp-P-2、2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)、2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2)、3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)

である (藤居)。

B-3 ヒト型高感度 umu テスト株のキット化

サルモネラ OY1002/1A1、OY1002/1A2、OY1002/1B1、OY1002/3A4 の 4 株について 4NQO、methyl methanesulfonate (MMS) を用いて凍結乾燥条件および、アッセイ方法を検討した (持田)。続いて、サルモネラ OY1002/1A2 株について、IQ、MeIQ を用いてアッセイの培養時間を検討し、最終年度は、初年度に用いた 4 株について、濃縮率を含む凍結保存条件を検討し、さらに 9 種類の被験物質、IQ、Trp-P-1、Trp-P-2、MeIQx、MeIQ、Glu-P-1、2-AF、B[a]P、2-AA を用いて umu 試験のキット化を検討した (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

Ames 試験が陽性で、TA100、TA98 を用いた改良法 FAT (液体法) で陰性となる NTP (National Toxicology Program) 選定化合物 13 種について、大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV を発現する YG5161 株 (TA1535/pYG768) における試験を実施した。さらに 9 種類の抗菌剤の変異原性を、通常の Ames 法と改良法 FAT で比較した。最終年度は、Ames 試験で陽性、FAT (液体法) で陰性を示した 5 種類の NTP 選定化合物について、TA100、TA98 で Ames 試験および FAT (寒天法) を行った (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

Pol κ 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 KO 細胞の樹立を目的に、ターゲティングベクターをエレクトロポレーション法にて Nalm-6 細胞に導入し、薬剤耐性をマーカーに遺伝子導入株を選別した。増殖速度、細胞周期、被験物質 (hydroxyurea (HU)、B[a]P + S9、過酸化水素 (H₂O₂)) に対する致死感受性および HPRT 突然変異誘発頻度 (MF) を野生型株と比較した (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

発がん物質 2,4-diaminotoluene (2,4-DAT) と非発がん性の構造類似体

2,6-diaminotoluene (2,6-DAT) のヒト細胞 TK6 に対する遺伝毒性を、ラットおよびヒト S9 の存在下、*in vitro* 小核試験、TK 遺伝子突然変異試験により検索した。ヒトリンパ芽球細胞株 TK6、AHH-1 と、ヒト代謝酵素を高発現するトランスジェニックヒト細胞 h2E1v2、MCL-5 を、1% の acrylamide (AA) と glycidamide (GA) で 24 時間処理して TK 遺伝子突然変異試験を実施した。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。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 (Quattro Ultima Pt; Waters-Micromass 社製) で測定した(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

6 種類の自社化合物について、チャイニーズハムスター CHO/IU 細胞(肺組織由来)を用いた *in vitro* 小核試験と染色体異常試験の結果を比較した。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 ラット肝臓から調製した S9 (非誘導 S9) を用い、8 種類の化合物 (B[a]P、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、CHL/IU 細胞を用いた *in vitro* 小核試験で検討した(高崎)。さらに、ヒト肝臓サンプルから DNA を抽出し、ABI の TaqMan probe セットを用いて PCR 法による遺伝子多型解析を CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 の各変異アレルについて実施した。ヒト肝臓マイクロゾームについて、CYP の指標になる化合物に対する活性を測定した(伊東)。

B-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

代謝拮抗剤 (methotrexate (MTZ) 及び、6-mercaptopurine (6-MP)) について、マウスリンフォーマ L5178Ytk+/- (MOLY)、ヒト B リンパ球由来の TK6、WTK-1 細胞を用いて *in vitro* 小核試験を行った。MeIQx のヒト細胞 WTK-1 に対する遺伝毒性を、ラットおよびヒト S9 の存在下、*in vitro* 小核試験および TK 遺伝子突然変異試験により調べた。さらに、MTX と gemcitabine (GEM) のヒト WTK-1 とマウスリンフォーマ 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。GEM、doxorubicin 塩酸塩 (DXR)、camptothecin (CPT) の遺伝毒性を WTK-1 および MOLY 細胞でマイクロプレート法 TK アッセイにより調べた(岡)。

B-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 κ の 198D と 199E をともにアラニンに置換した KI マウスを作製するため、C57BL/6 の ES 細胞にターゲティングベクターを導入し目的遺伝子の相同組換え体を得た。それを用いて、キメラマウスを得た。キメラマウスを C57BL/6N と交配して KI ヘテロマウスを得、それら同士を交配することで KI ホモマウスを得た。さらに、この KI ホモ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、*gpt delta pol κ* KI マウスを樹立した。樹立したマウスと対照群の *gpt delta* マウスにマイトマイシン C (MMC) を 1 mg/kg/day の用量で 5 日間反復腹腔内投与した。MMC 投与群については、小核試験、6-TG アッセイと Spi アッセイを実施した。変異スペクトラムも解析した(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

初年度は、6 週齢の雄性 F344 *gpt delta* トランスジェニックラットに 2,4-DAT (500 ppm、250 ppm、125 ppm) あるいは 2,6-DAT (500 ppm) を 13 週間混餌投与し、臓器ごとの変異原性を調べた。tocotrienol (TTE; 2%、4%) あるいは陽性対照として diethylnitrosamine (DEN) を 20 mg/kg、週 1 回 x 13 回腹腔内投与し、肝臓の *gpt MF* を測定した。体重、臓器重量、肝 DNA 中の 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) レベル、*gpt MF* ならびに変異コロニーのスペクトラム解析、GST-P 陽性肝細胞巣等を解析した(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 (TMX; 250、500 ppm) を 13 週間混餌投与し、血液学的検査、血液生化学検査及び剖検を行って、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 TMX を 20 mg/kg あるいは 40 mg/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。TMX の構造類似体で

ある toremifene citrate (TRM) については 40 mg/kg を 3 週間反復経口投与し、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⁻アッセイを実施した。TMX を 3 週間反復経口投与した群の肝臓サンプルから得られた Spi 変異体の全てについて、PCR とシークエンス反応により欠失部位を特定した（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 F344 ラットに cyclophosphamide (CP, 10 mg/kg、経口)、MMC (2 mg/kg、腹腔)、colcemide (COL, 8 mg/kg、3 日間反復経口) を投与した。骨髓細胞小核試験は、幼若赤血球 2000 個中の小核を有する細胞の頻度 (% MN-RET) を算出した。末梢血小核試験は、フローサイトメーターを用いて標識細胞を検出した。7 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラットに CP (10 mg/kg、経口単回)、MMC (2 mg/kg、腹腔単回)、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、上記と同様に骨髓細胞小核試験および末梢血小核試験を実施した。8 週齢の雄性 CrI:CD(SD) ラットに対して、CP (経口)、COL (腹腔内)、vinblastine (VIN: 腹腔内) を単回投与し、上記と同様に骨髓細胞小核試験および末梢血小核試験を実施した。さらに、蛍光顕微鏡下で、各群 100 個の細胞についてコメントアッセイも実施した（真田）。

（倫理面への配慮）全ての動物実験は、各施設における「動物実験管理に関する指針」従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。マウス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

改良マイクロプレート法の試験条件を検討し、菌体破壊の際に 0.1% SDS の代わりに PopCulture5~10 μL を用いると、発色時間が 10-15 分に短縮できることを明らかにした。TGlyT 培地の方が L-broth よりも IQ、Glu-P-1、MeIQ および 2-AA による *umuC* 遺伝子誘導能が強かった。前培養菌液の希釈倍率は、100 倍よりも 50 倍の方が、活性がやや高くなった。OY1002/1A2 株を用いて IQ、MeIQ、Glu-P-1、及

び Trp-P-2 による *umuC* 遺伝子誘導を指標に、発色基質を検討したが、CPRG よりも感度を上げる物質はなかった。DNB[e]P (3 nM) に対する感受性は、CYP3A4、CYP1A2、CYP1A1 を発現する株が CYP1B1 を発現する株や対照株よりも高く、DNB[e]P の代謝活性化には CYP3A4、CYP1A2、CYP1A1 の関与が示唆された（小田）。

C-2 ヒト型高感度 *umu* テスト株のバリデーション

試験した全ての被験物質について、IPTG、 δ -aminolevulinic acid、trace elements を培養開始後 1 時間目に添加すると、*umuC* 遺伝子の発現がより強く誘導された。また培養の際に用いる平底と深型のプレートによる差異は認められなかった。マイクロプレート法と試験管法で感度を比較し、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。感度について、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低く、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かった。さらに、代謝活性化されて遺伝毒性を示す 20 物質を評価した結果、試験管法と改良マイクロプレート法における *umuC* 遺伝子誘導活性はいずれも同等の傾向を示した。Glu-P-1、IQ、MeIQ、MeIQx、2-AF、2-AA については、OY1002/1A2 が高い感受性を示した（藤居）。

C-3 ヒト型高感度 *umu* テスト株のキット化

凍結乾燥した菌を復水させ *umu* 試験に用いたが、1 時間培養した後であれば、4 菌株 (OY1002/1A1、/1A2、/1B1、/3A4) とも、試験に用いることができた（持田）。凍結乾燥した菌を TGlyT 培地で復水させた後の本培養、すなわち酵素発現の時間は 2 時間が最適だった。保存用培地による最適な菌の濃縮率は 12.5% であった。IQ を含む 9 種類の被験物質について *umu* 試験を実施した。B[a]P および Trp-P-2 では 4 種類の菌株全てにおいて発色を示さなかった。IQ ではすべての菌において、Trp-P-1 では OY1002/1A1 および OY1002/1A2 において、2-AF、2-AA、Glu-P-1、MeIQ、MeIQx は OY1002/1A2 において、コントロールの 2 倍以上の発色が観察された（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

改良法 FAT で陽性結果が得られなかった 13 化合物について、大腸菌 DNA ポリメラーゼ IV を発現する YG5161 を用いて FAT 試験を行ったところ、2 化合物について S9 mix 存在下で陽性の結果が得られた。9 種の抗菌剤を用いる Ames 試験および改良法 FAT で、5 種のキノロン系抗菌剤が 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。streptomycin sulfate 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。最終年度に使用した 5 化合物のいずれにおいても、FAT(液体法)に比べて FAT(寒天法)の方が、Ames 試験の結果との相関性が高かった(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

ヒト Nalm-6 において Pol κ をコードする遺伝子に変異を導入した Pol κ KI ヒト細胞株を樹立した。目的とした変異(198D 199E→198A 199A)の導入と、野生型細胞と同レベルの Pol κ 蛋白質の発現を確認した。おなじく、Pol κ を欠損させた Pol κ KO 細胞も樹立し、Pol κ が発現していないことを確認した。KI 細胞と KO 細胞、野生型株で倍加時間に顕著な差は見られなかった。HU に対して、3 株(KI、KO、野生型)は 50-400 μ g の用量で生存率が約 20%に低下した。MF の増加は 3 株とも見られなかった。B[a]P に対して、3 株は S9 mix の存在下 2.4 μ g の用量でいずれも死滅した。MF は用量に応じて増加したがいずれも株間に差はなかった。H₂O₂ に対して、3 株は 30 μ M で生存率が顕著に低下した。KO 株は野生型および KI 株と比べ有意に生存率の低下が見られたが、いずれの株においても MF の増加は見られなかった(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

2,4-DAT は、S9 不在下で TK6 細胞に遺伝子突然変異を誘発した。S9 を添加すると細胞毒性はむしろ減弱した。この解毒作用にラットとヒトの間で顕著な差は観察されなかった。一方、2,6-DAT は、ラット S9 の存在下で、強い細胞毒性と遺伝子突然変異を誘発した。ラット S9 に比べヒト S9 の影響は小さく、ヒト S9 を加えると S9 非存在下と同様、弱い細胞毒性と遺伝子突然

変異の誘発が観察された。h2E1v2 細胞と親細胞である AHH-1 細胞を AA で処理したところ h2E1v2 (CYP2E1 発現細胞)と親株の AHH-1、さらに MCL-5 で、細胞毒性、遺伝毒性(遺伝子突然変異、小核)に大差は無かった。一方、DMN 処理では h2E1v2 で高い遺伝子突然変異誘発性と小核誘発性を示した。GA は、h2E1v2 と AHH-1 細胞ともに、AA に比べて低濃度で細胞毒性と遺伝毒性を示したが、その反応性には差がなかった。TK6 において AA の高濃度処理(14 mM)でわずかに、GA 処理では用量依存的に多量のアダクト(AA の 50 倍以上)の生成が観察された。h2E1v2 と AHH-1 を AA で 24 時間処理したが、2.8mM まで N7-GA-Gua のアダクトは検出されなかった。TK6 細胞を S9 存在下、および非存在下で、AA で 4 時間処理した。15 mM までの処理で、ごくわずかであるが N7-GA-Gua のアダクトは S9 の存在に有無にかかわらず生成し、その生成量には濃度依存性が認められたが、S9 の有無での差は認められなかった(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

自社化合物 6 種について CHL/IU チャイニーズハムスター細胞を用いる *in vitro* 小核試験と染色体異常試験を実施した結果、6 化合物のうち 4 化合物は両試験において陽性、2 化合物は両試験において陰性となった。従来の 6 ウェルプレート代わりにチャンバースライドを用いて行う小核試験も、染色体異常試験の代替法となりうる結果を得た。誘導 S9 の P450 含量、酵素活性は、非誘導 S9 に比べて高かった。B[a]P、PhIP、cyclophosphamide (CP) では誘導 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、ChI 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た(高崎)。ヒト肝 DNA の遺伝子多型解析をしたところ、CYP1A2*1K、*3、CYP2B6*6、*16、*26、CYP2C9*2、*3、CYP2C19*2、CYP2D6*4、*9、*10、*17、*41 のヘテロ変異アレルを持つ肝サンプル、および CYP1A2*1K、*3、CYP2B6*6、*16、*26、CYP2C19*3、CYP2D6*4、*10、*17、*41 のホモ変異アレルを持つ肝サンプルを見出した。誘導剤を投与しないラット、雌雄サルの肝 S9 および遺伝子多型をもたず、かつ酵素活性の低下が認められないヒト肝マイクロゾームを用いて *in vitro* 小核試験を実施した結果、LAN では、いずれも小核誘発性が認められたが、ラット S9 およびヒト肝マイクロゾームでの小核誘

発作用が雌雄サル S9 よりも強く出現した。一方 COU では、いずれにおいても小核誘発性が認められ、その出現率は同等であった（伊東）。

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

ラットとヒトのいずれの S9 を用いても MeIQx のヒト WTK-1 細胞に対する突然変異誘発性は低く、*in vitro* 小核試験も陰性であった。代謝拮抗剤 MTX および 6-MP に対する小核誘発の感受性は WTK1 細胞、TK6、MOLY の順であった。ヒト WTK-1 細胞は、MTX、GEM 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。WTK-1 細胞の *in vitro* での小核誘発率は、MTX 1.5 μ g/mL に対して対照群の 4 倍と、有意な増加が見られたが、MOLY 細胞では有意な増加は見られなかった。GEM 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。GEM、DXR、CPT は全ての細胞において TK assay で陽性と判断された。GEM については、MOLY 細胞が他の細胞株よりも高い用量で MF の増加を示した。DXR に対する MF の増加率は TK6 細胞が他の 2 株より低かった。CPT に対して MF の増加を示した用量は、MOLY 細胞の方が他の細胞株よりも低かった（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

初年度は、*pol* κ の 198D と 199E をいずれもアラニンに置換したヘテロ KI マウスを交配してホモ KI マウスを得た。ホモ KI マウスと *gpt* delta マウスを掛け合わせるによりダブル TG マウスを作出した。FISH 解析等により *Pol* κ KI ヘテロ/*gpt* delta ホモマウスの樹立が確認できた。*gpt* delta *pol* κ KI マウスおよび *gpt* delta マウスで、末梢血中幼若赤血球における小核出現頻は、MMC 投与により投与前と比較して有意に増加し、*gpt* delta *pol* κ KI マウスの値は、*gpt* delta マウスの値をわずかに上回った。*gpt* delta マウスの 6-TG 耐性の MF 値は、MMC 投与により対照群と比較して 1.7 倍高い値を示したが、有意差は認められなかったのに対して *gpt* delta *pol* κ KI マウスでの MF は MMC 投与により対照群と比較して 3.5 倍に有意に増加した。変異スペクトルは、*gpt* delta マウス、*gpt* delta *pol* κ KI マウスともに MMC 投与によ

り G \rightarrow T の 1 塩基置換および GpG におけるタンデム塩基置換が増加した。*gpt* delta マウスでの Spi⁻ アッセイ MF 値は MMC 投与による増加がみられなかったが、*gpt* delta *pol* κ KI マウスでの Spi⁻ アッセイ MF 値は MMC 投与により対照群の 2.4 倍に有意に増加した。変異スペクトラムは、*gpt* delta マウスでは MMC 投与により大きな欠失の変異頻度が対照群の約 3 倍に増加したのに対して、*gpt* delta *pol* κ KI マウスでは増加が認められなかった（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

F344 系の *gpt* delta ラットに 2,4-DAT、2,6-DAT を 13 週間混餌投与した。2,4-DAT の 500 ppm 投与群では第 1 週より試験終了まで有意な体重増加抑制が認められた。2,4-DAT の 500 ppm 投与群では第 8 週に体重が減少に転じたため、第 9 週より投与用量を 400 ppm に減じて試験を継続した。2,4-DAT は肝臓の *gpt* MF を増大させたが、2,6-DAT では *gpt* MF は増大しなかった。腎臓では、どちらの化合物も *gpt* MF を増大させなかった。

F344 系の *gpt* delta ラットについて、TTE 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体重増加抑制が認められた。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。TTE 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散見された。陽性対照の DEN 投与群で *gpt* MF の顕著な増加が認められたが、TTE 投与群ではいずれも対照群と比して *gpt* MF の増加は認められなかった。さらに、TTE/DEN 併用投与群では投与開始 4-13 週目に、DEN 単独群では投与開始 8、9、12 及び 13 週目に対照群と比べて有意な体重増加抑制が認められた。TTE 併用投与群にのみ肝海綿状変性を伴う GST-P 陰性の結節性肝細胞過形成病変が高頻度に認められた。DEN 単独群で対照群に比べ 8-OHdG レベルが有意に上昇したが、TTE 併用投与による影響は認められなかった。DEN 単独群では GC-TA 及び AT-TA トランスバージョン変異を伴う *gpt* MF の有意な上昇が認められたが、TTE 併用投与による影響は認められなかった。GST-P 陽性肝細胞巢の個数及び面積ならびに肝細胞 PCNA 陽性率は DEN 単独群で対照群に比べ有意に上昇し、TTE 併用投与はこれらをさらに有意に増加させた（西川）。