

パ腫細胞に対する BAFF の作用の分子機構を明らかにするとともに、臨床症例での病態における BAFF の意義について明らかにし、新規治療法等の臨床への応用について検討を進める。また、ヒト由来細胞株で産生された組み替え型 BAFF の調整を進め、天然型 BAFF と反応する抗体の作製を目指す。

DAP の作用機構については、T 細胞のネガティブセレクションにより誘導されるアポトーシスには FADD と caspase-8 が必ずしも必要とされないことが明らかにされていることから、DAP3 が FADD と caspase-8 の活性化を伴わないアポトーシスシグナル伝達経路にも関与している可能性が考えられる。DAP3 に結合する DELE の作用機構については、アミノ酸配列の解析により、その N 末端にはタンパク質の不安定化に関わる PEST 配列が存在することが明らかになっていることから、ユビキチン-プロテアソーム経路を介したタンパク質レベルでの発現制御が DELE の機能制御に重要な働きをしていると考え、現在解析を進めている。

CAIA マウスを用いた解析により、関節リウマチの病態に線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージが  $\alpha 9$  インテグリン依存的な刺激による炎症性サイトカイン/ケモカインの産生に関わる可能性が示され、実際のリウマチ患者においても  $\alpha 9$  インテグリンの機能を阻害する事によりその治療が可能である事が示唆される。異なる関節炎モデルである

CIA モデルにおいても、 $\alpha 9$  インテグリンおよびそのリガンドであるオステオポンチンおよびテナーシン C との相互作用により自己免疫疾患に重要な役割を果たす Th17 細胞の分化、増殖を惹起している事、抗  $\alpha 9$  インテグリン抗体 55A2C 投与が Th17 細胞の分化を阻害し、その結果関節炎を抑制していることが明らかになった。本研究で作製した抗ヒト  $\alpha 9$  インテグリンモノクローナル抗体は関節リウマチ治療への応用が期待される。

## E. 結論

BAFF、DAP3 のアポトーシス制御機構における機能や、間接リウマチモデルにおけるオステオポンチンおよびその受容体である  $\alpha 9$  インテグリンの機能的役割について解析を行った。今後、さらにそれぞれの解析を継続するとともに、B 細胞異常によって起こる自己免疫疾患や、B 細胞性腫瘍における、それぞれの役割とその相互関係について、検討を進めて行く。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N. Differential effects of BAFF on B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol.* 2010 Jun;91(5):808-19.

2) 恩田恵子, 清河信敬. BAFF による B 細胞の生存維持の分子機構. (総説) 臨床免疫・アレルギー科

- 2010 July;54(1):14-18.
- 3) K. Ito, S. Kon, Y. Nakayama, D. Kurotaki, Y. Saito, M. Kanayama, C. Kimura, H. Diao, J. Morimoto, Y. Matsui, T. Uede : The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol.* 28:11-19, 2009.
- 4) T. Haga, J. Suzuki, H. Kosuge, M. Ogawa, H. Saiki, G. Haraguchi, Y. Maejima, M. Isobe, T. Uede : Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking T cell activation through 4-1BB pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 46:719-727, 2009.
- 5) M. Kanayama, D. Kurotaki, J. Morimoto, T. Asano, Y. Matusi, Y. Nakayama, Y. Saito, K. Ito, C. Kimura, N. Iwasaki, K. Suzuki, T. Harada, H.M. Li, J. Uehara, T. Miyazaki, A. Minami, S. Kon, T. Uede : Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 182:8015-8025, 2009.
- 6) P.H. Anborgh, S.M. Wilson, A.B. Tuck, E. Winquist, N. Schmidt, R. Hart, S. Kon, M. Maeda, T. Uede, L.W. Stitt, A.F. Chambers : AF : New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer: clinical validation and comparison of multiple ELISAs. *Clin Chem.* 55:895-903, 2009.
- 7) Y. Maeno, M. Shinzato, S. Nagashima, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, T. Uede, K. Taniguchi : Effect of osteopontin on diarrhea duration and innate immunity in suckling mice infected with a murine rotavirus. *Viral Immunol.* 22:139-144, 2009.
- 8) A. Takahashi, M. Kurokawa, S. Konno, K. Ito, S. Kon, S. Ashino, T. Nishimura, T. Uede, N. Hizawa, S.K. Huang, M. Nishimura : Osteopontin is involved in migration of eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy.* 39:1152-1159, 2009.
- 9) Y. Matsui, N. Iwasaki, S. Kon, D. Takahashi, J. Morimoto, Y. Matsui, D.T. Denhardt, S. Rittling, A. Minami, T. Uede : Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. *Arthritis and Rheumatism.* 60:2362-2371, 2009.
- 10) D. Takahashi, N. Iwasaki, S. Kon, Y. Matsui, T. Majima, A. Minami, T. Uede : Down-regulation of cathepsin K in synovium leads to progression of osteoarthritis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 60:2372-2380, 2009.
- 11) M. Kurokawa, S. Konno, A. Takahashi, B. Plunkett, S.R. Rittling, Y. Matsui, S. Kon, J. Morimoto, T. Uede, S. Matsukura, F. Kokubu, M. Adachi, M. Nishimura, S.K. Huang : Regulatory role of DC-derived osteopontin in systemic allergen sensitization. *Eur J Immunol.* 39:3323-3330, 2009.
- 12) N. Fujita, S. Fujita, Y. Okada, K. Fujita, A. Kitano, O. Yamanaka, T. Miyamoto, S. Kon, T. Uede, S.R. Rittling, D.T. Denhardt, S. Saika : Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking osteopontin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:790-794, 2010.
- 13) D. Iwata, M. Kitamura, N. Kitaichi, Y. Saito, S. Kon, K. Namba, J. Morimoto, A. Ebihara, H. Kitamei, K. Yoshida, S. Ishida, S. Ohno, T. Uede, K. Ono, K. Iwabuchi : Prevention of experimental uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. *Exp Eye Res.* 90:41-48, 2010.
- 14) A.M. Seier, A.C. Renkl, G.S. Chulz, T. Uebele, T. Ahrens, A. Sindrilaru, S. Iben, L. Liaw, S. Kon, T. Uede, J.M. Weiss : Antigen-specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis. *Am J Pathol.*

176:246-258,2010.

15) Y. Nakayama, S. Kon, D. Kurotaki, J. Morimoto, Y. Matsui, T. Uede: Blockade of interaction of alpha9 integrin with its ligands hinders the formation of granulation in cutaneous wound healing. *Lab Invest* 90:881-894, 2010.

16) J. Morimoto, S. Kon, Y. Matsui, T. Uede: Osteopontin; as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Drug targets*. 11:494-505, 2010.

17) Matsuda M, Suizu F, Hirata N, Miyazaki T, Obuse C, Noguchi M. Characterization of the interaction of Influenza virus NS1 with Akt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010 395(3):312-7

18) Harada T, Iwai A, Miyazaki T. Identification of DELE, a novel DAP3-binding protein which is crucial for death receptor-mediated apoptosis induction. *Apoptosis.*, 2010 Oct;15(10):1247-55.

19) Iwai A, Shiozaki T, Kawai T, Akira S, Kawaoka Y, Takada A, Kida H, Miyazaki T. Influenza A virus polymerase inhibits type I interferon induction by binding to interferon  $\beta$  promoter stimulator 1. *J Biol Chem.*, 2010 Oct 15; 285(42):32064-74

20) Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, Kameyama T, Kitatsuji C, Kashigi F, Goto S, Kameoka S, Fujikura D, Yamada T, Mizutani T, Kazumata M, Sato M, Tanaka J, Asaka M, Ohba Y, Miyazaki T, Imamura M, Takaoka A. ZAPS is a potent stimulator of RIG-I-mediated signaling for antiviral response. *Nature Immunology*, 2011 Jan;12(1):37-44.

21) Shiozaki T, Iwai A, Kawaoka Y, Takada A, Kida H, Miyazaki T. Requirement of Siva-1 for replication of influenza A virus through the apoptosis induction. *J Gen Virol*. 2011 Feb;92(Pt 2):315-25.

22) Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, Sasaki J,

Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y, Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. *PLoS ONE* PLoS One. 2011 Jan 20;6(1):e16324.

## 2. 学会発表

1) 恩田恵子, 玉一博之, 山田浩之, 斎藤洋平, 鈴木恭子, 藤村純也, 斎藤正博, 清水俊明, 清河信敬. 小児 B 細胞性腫瘍における BAFF 受容体の発現と BAFF の作用第 113 回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 4 月 23 日-25 日, 2010.

2) 飯島一智, 藤本純一郎, 中川温子, 清河信敬. Analysis on molecules characteristically expressed in childhood mature B-cell lymphoma/leukemia. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日-24 日, 2010.

3) 清河信敬, 飯島一智. Differential effects of BAFF on B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 9 月 22 日-24 日, 2010.

4) 飯島一智, 恩田恵子, 中川温子, 藤本純一郎, 清河信敬. 小児成熟 B 細胞性リンパ腫/白血病に特徴的に発現する遺伝子の解析. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010. 5) 恩田恵子, 山田浩之, 斎藤正博, 飯島一智, 清河信敬. BAFF は B 前駆細胞性 ALL の増殖を亢進するがアポトーシスは抑制しない. 第 72 回日本血液学会学術集会, 横浜, 9 月 24 日-26 日, 2010.

6) 飯島一智, 山田浩之, 中川温子, 藤本純一郎, 清河信敬. バーキットリンパ腫特異的分子の発現・機能解析. 第 52 回日本小児血液学会学術総会・第 26 回日本小児がん学会学術集会, 大阪, 12 月 17 日-19 日, 2010.

7) 黒滝大翼, 森本純子, 上出利光: 組織固着マクロファージサブセットによる T 細胞免疫応答制御機構の解明. 第 98 回日本病理学会総会 (京都) 5 月 1 日

-3 日, 2009.

8) 金山剛士、黒滝大翼、森本純子、上出利光:  $\alpha 9$  インテグリンは関節炎の発症に重要な微小環境を構成する。第 98 回日本病理学会総会(京都) 5月1日-3日, 2009.

9) Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede: The role of osteopontin in the cardiovascular diseases. 第 61 回日本細胞生物学会 Workshop (名古屋) 6月2日-4日, 2009.

10) Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Toshimitsu Uede: Regulation of T cell responses by a distinct subset of resident splenic macrophages. マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム(金沢), 7月2-3日, 2009.

11) 伊藤甲雄、黒滝大翼、松井裕、森本純子、上出利光: 実験的自己免疫性脳脊髄炎における  $\alpha 9$  インテグリンの機能解析。第 20 回生体防御学会学術集会(東京), 7月25-26日, 2009.

12) 松井雄一郎、岩崎倫政、三浪明男、今重之、上出利光: Osteopontin による変形性関節症の発症及び進行抑制効果。第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

13) 松井裕、池末昌弘、森本純子、小嶋哲人、上出利光: 心筋梗塞における Syndecan-4 の機能解析。第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

14) 森本純子、佐藤佳代子、伊藤甲雄、中山洋佑、松井裕、喜田宏、宮崎忠昭、上出利光: インフルエンザ A ウイルス感染防御免疫応答における Opn の機能解析。第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

15) Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Bae Kyeonghwa, Toshimitsu Uede: Regulation of T cell responses by a novel subset of resident splenic macrophages. 第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

16) 今野哲、黒川真嗣、高橋歩、松井裕、上出利光、足立満、西村正治、Shau-Ku

Huang: アレルゲン全身感作に及ぼすオステオポンチン(OPN)の影響。第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

17) 木田真紀、岡田由香、藤田織人、北野愛、雑賀司珠也、上出利光: オステオポンチンの欠如は皮膚創傷治癒を遅延する。第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

18) Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Tsuyoshi Asano, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede: Synovial fibroblasts and macrophages differentially contributes to the development of autoimmune arthritis via  $\alpha 9$  integrin. 第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

19) Kazuya Iwabuchi, Daiju Iwata, Mizuki Kitamura, Yoshinari Saito, Shigeyuki Kon, Junko Morimoto, Shigeaki Ohno, Susumu Ishida, Toshimitsu Uede, Kazunori Onoe: Administration of Osteopontin small interfering RNA ameliorates experimental autoimmune uveoretinitis model in mice. 第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

20) 藤田織人、岡田由香、上出利光、今重之、Susan R. Rittling, David T. Denhardt, 松岡雅人、緒方奈保子、雑賀司珠也: 絡膜血管新生におけるオステオポンチンの役割。第 9 回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.

21) 浅野毅、岩崎倫政、今重之、金山剛士、鈴木孝治、三浪三千男、三浪明男、上出利光: 関節リウマチにおける  $\alpha 9$  インテグリン-リガンド間相互作用の解析。第 24 回日本整形外科学会基礎学術総会(横浜), 11月5-6日, 2009.

22) Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Koyu Ito, Masashi Kanayama, Toshimitsu Uede: Regulation of T Cell Responses by a Distinct Subset of Resident Splenic Macrophages. 日本免疫学会総会(大阪), 12月2-4日, 2009.

- 23) Tsuyoshi Asano, Norimasa Iwasaki, Masashi Kanayama, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : The interaction of  $\alpha 9$  integrin and its ligands contributes to the development of Rheumatoid Arthritis. 第39回日本免疫学会学術集会 (大阪), 12月2-4日, 2009.
- 24) Junko Morimoto, Kayoko Sato, Hiroshi Kida, Tadaaki Miyazaki, Toshimitsu Uede : Osteopontin deficiency promotes secondary immune response to influenza A virus infection, possibly by regulating the maintenance of virus-specific memory CD8+ T cells. 第39回日本免疫学会学術集会 (大阪), 12月2-4日, 2009.
- 25) Yutaka Matsui, Masahiro Ikesue, Daichi Ohta, Keiko Danzaki, Tetsuhito Kojima, Toshimitsu Uede : Syndecan-4 protects from cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. 第32回日本分子生物学会 (横浜), 12月9日-12日, 2009.
- 26) Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Tsuyoshi Asano, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : Synovial fibroblasts and macrophages differentially contribute to the development of autoimmune arthritis via  $\alpha 9$  integrin. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 12月2-4日, 2009.
- 27) Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Tsuyoshi Asano, Yutaka Matsui, Yosuke Nakayama, Yoshinari Saito, Koyu Ito, Chiemi Kimura, Norimasa Iwasaki, Koji Suzuki, Tanenobu Harada, Hong Mei Li, Jun Uehara, Tadaaki Miyazaki, Akio Minami, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Uede : Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 12月2-4日, 2009.
- 28) Koyu Ito, Daisuke Kurotaki, Yutaka Matsui, Junko Morimoto, Toshimitsu Uede : Alpha9 integrin is involved in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating inflammatory cell migration from draining lymph node to central nervous systems. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 12月2-4日, 2009.
- 29) Keiko Danzaki, Yutaka Matsui, Yoichiro Iwakura, Toshimitsu Uede : Interleukin-17 deficiency accelerates atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. 第32回日本分子生物学会年会 (横浜), 12月9日-12日, 2009.
- 30) 池末昌弘、松井裕、檀崎敬子、太田大地、小嶋哲人、上出利光 : 新生内膜形成と動脈硬化におけるシンデカン-4の機能. 第32回日本分子生物学会 (横浜), 12月9日-12日, 2009.
- 31) 太田大地、池末昌弘、松井裕、上出利光 : The functional significance of interactions between ADAM15 and integrins in the invasion of breast cancer cells. 第32回日本分子生物学会 (横浜), 12月9日-12日, 2009.
- 32) 藤倉大輔、上出利光、宮崎忠昭 : Functional role of CLIPR-59 in TNF mediated pro-apoptotic signal. 第32回日本分子生物学会 (横浜), 12月9日-12日, 2009.
- 33) Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Kyeonghwa Bae, Toshimitsu Uede : Regulation of T Cell Responses by a Distinct Subset of Resident Splenic Macrophages. 1st International Conference on Immune Tolerance, (Boston, MA), 10月25-27日, 2009.
- 34) 上出利光 : 「組織微小環境の内的調節因子、オステオポンチンの病態病理学」第99回日本病理学会、宿題報告、京王プラザホテル (東京,) 4月27-29日, 2010.
- 35) 上出利光 : The aberrant interaction of matricellular proteins and integrins in pathological foci leads to inflammatory tissue damage. Invited speaker. FASEB

summer research conference (Steamboat Springs, CO, USA), 8月1-6日、2010.

36) 上出利光 : Matricellular proteins and their integrin receptors-new drug targets for inflammatory disorders and cancers. Novo Nordisk Symposium, China, Beijing, 11月4日、2010.

37) K. Ito, D. Kurotaki, Y. Matsui, M. Kanayama, J. Morimoto, T. Uede: Alpha9 integrin is involved in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cell migration from lymph node. 14th International Congress of Immunology (Kobe), 8月22-27日、2010.

38) Suzuki, Yoshimitsu; Nohmi, Takao; Fukada, Kazutake; Kondoh, Masatoshi; Miyazaki, Tadaaki; Cheng, Lei; Maeyama, Kazutaka; Okada, Shigeru; Shimada, Takashi, The therapeutic effects of Enterococcus faecalis FK-23 on allergic disorder and viral, International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics - IPC2010.

39) Tadaaki Miyazaki, Pathogenicity of Influenza A Viruses and Development of the Drugs for Influenza, The 15th International Congress of Oriental Medicine 2010/04/19

40) 深田一剛, 近藤正敏, 鈴木義充, 嶋田貴志, 宮崎忠昭, Enterococcus faecalis FK-23 の可溶性成分によるインフルエンザ予防のメカニズム, 日本乳酸菌学会 2010年度大会 仙台 2010.7.26・27.

41) 近藤正敏, 嶋田貴志, 宮崎忠昭, Enterococcus faecalis FK-23 によるインフルエンザの予防効果- FK-23 の投与経路によるその効果の相違 -, 日本乳酸菌学会 2010年度大会 仙台 2010.7.26・27.

42) 上原純, 宮崎忠昭, DAP3 と LKB1 による anoikis 誘導機構, 第33回日本分子生物学会神戸ポートアイランド 2010.12.7・10

43) 村松大輔, 数馬田美香, 内山博文,

青木志保, 原田種展, 二川安弘, 中山洋佑, 宮崎忠昭, 黒酵母菌 Aureobasidium pullulans 由来βグルカンのインフルエンザウイルス感染防御効果について, 日本薬学会第131年会 静岡 2011.3.28・31.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

1) 北大番号 : P2009-014 (新規出願)

発明名称 : Death ligand / Death receptor システム阻害による病態制御薬 宮崎忠昭

JSTと共同出願予定

2) 北大番号 : P2009-046 (新規出願)

発明名称 : ウイルスの感染を抑制する物質のスクリーニング方法およびウイルス感染抑制剤

※代表発明者 : 大場先生で受付しています。 宮崎忠昭

3) 北大番号 : P2009-108 (新規出願)

発明名称 : インフルエンザウイルス感染症の治療剤

北大持分を譲渡しアウレオ単独名義で出願済 (10/8)。 宮崎忠昭

4) 北大番号 : P2009-108 (国内優先出願)

発明名称 : インフルエンザウイルス感染症の治療剤

上記の10/8出願を基礎とする国内優先出願を予定。 宮崎忠昭

5) 北大番号 : (提出中)

発明名称 : 新規なN結合型シアロ糖鎖配糖体の製造方法

国立大学法人静岡大学農学部と共同出願中 宮崎忠昭

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 治療遺伝子発現用レトロウイルスベクターを用いた 遺伝子導入細胞による難治性疾患の治療実施のための 支援体制の構築

所 属 国立成育医療研究センター研究所

研究者 小野寺 雅史

**研究要旨** 難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療の実施に向け、1) 臨床研究で使用される造血幹細胞のソースの評価、2) 患者染色体への治療ベクター挿入部同定法の確立、3) マウスモデルを用いた慢性肉芽腫症遺伝子治療の有効性の評価、4) 当研究センターにおける遺伝子治療臨床研究の実施体制の強化、5) GMP 準拠ウイルス上精の製造に関する準備などを行った。これら研究を進めることで、我が国の遺伝子治療臨床研究の実施を包括的支援していただけるものと思われる。

### 研究分担者

- (1) 峰野 純一 (タカラバイオ株式会社)
- (2) 大津 真 (東京大学医科学研究所)
- (3) 河合 利尚 (国立成育医療研究センター)

### A. 研究目的

現在、欧米を中心に原発性免疫不全症等、小児難治性疾患に対する造血幹細胞遺伝子治療が広く行われ、造血幹細胞移植の適応とならない患者に対して根治療法と呼べるほどの治療成績を上げている。一方、我が国の現状を鑑みたとき、ウイルスベクターの開発など遺伝子治療の基礎的研究に関しては優れた技術を有するものの、これら技術を臨床の場で応用する橋渡し機関が欠如しているため、遺伝子治療臨床研究の実施が遅々として進まず、欧米のそれに比して大きな遅れをとっている。そこで、本研究では、小児難治性疾患に対する我が国独自の遺伝子治療臨床研究推進のため、GMP 準拠ウイルス上精の製造、効率的な造血幹細胞への遺伝子導入法や遺伝子治療臨床研究の安全性や有効性を評価する系の確立ならびに実際の遺伝子治療を行う際に必要となる実施体制の整備などを行い、包括的に造血幹細胞遺伝子治療を支援する体制を構築していく。

### B. 研究方法

#### 1. 造血幹細胞の未熟性に関する研究

造血幹細胞遺伝子治療で使用される至適造血幹細胞のソースを決定するため、Lonza 社より入手した臍帯血由来、骨髄由来、G-CSF 刺激末梢由来 CD34 陽性細胞を、長期間ヒト造血幹細胞を維持できる免疫不全マウス NOD/SCID x IL-2Rg<sup>null</sup> (NOG)マウスに移植し、その後のマウス体内におけるヒト造血細胞の数を算定した。

#### 2. ベクター挿入部位同定のに関する研究

実際に造血幹細胞遺伝子治療を受けた患者検

体を用いて治療ベクターの挿入部位同定を行った。方法は、患者検体(骨髄、末梢血)よりゲノム DNA を抽出し、物理的に断片化後、アダプターライゲーション、nested PCR を行い、得られた PCR 産物を Genome Sequencer FLX System を用いて網羅的にシーケンスを行った。

#### 3. モデルマウスを用いた研究

慢性肉芽腫症のモデルマウスとして gp91<sup>phox</sup> 遺伝子欠損マウスの骨髄より lineage 陰性、c-KIT 陽性、Sca-1 陽性細胞 (KSL 細胞) を FACS にて採取し、無血清培地にサイトカンを追加して、gp91<sup>phox</sup> 遺伝子発現ウイルスを感染させる。その後、蛍光色素マーカーにて導入細胞のみを採取し、それら細胞をマウスに移植する。

#### 4. 当センターの実施体制の整備

実際の遺伝子治療を行う細胞調製室の整備、専従研究者の育成及び病院内の遺伝子治療実施に関する連携を強化した。

#### 5. 臨床用ウイルス製造に関する準備

現在、成育医療研究センターでは、米国国立衛生研究所 (NIH) の Malech 博士と共同で慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞遺伝子治療を計画しているが、そこで用意されているウイルス上清には限度があり、多くの患者対象とするためには新たなウイルス上清を製造しなければならない。このため、同一ウイルスの Master Cell Bank (MCB) を Malech 博士より入手し、タカラバイオ社において臨床用ウイルス上清製造のための working cell bank (WCB) を作製する準備を進めている。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究に向けた研究においては、

「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成16年2月19日)に従って準備し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成14年3月27日、平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正)に基づいて行った。実施計画書作成に必要な前臨床研究の一部では、臍帯血等の造血幹細胞を利用しているが、それら一連の研究は施設内の倫理委員会の承認を受けている。動物実験に関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「動物愛護管理法の一部を改正する法律」「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守して行う。また、挿入部位同定に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき行い、得られたデータの管理に関しては、連結可能匿名化にて、個人情報保護法を遵守して行った。

### C. 研究結果

#### 1. 造血幹細胞の未熟性の関する研究

移植後6ヶ月目にマウス骨髄を採取し、ヒト造血細胞の割合を算定したところ、臍帯血由来、骨髄由来、G-CSF刺激末梢由来CD34陽性細胞のCD34陽性細胞の順でキメリズムが高かった。また、各々のCD34陽性細胞は骨髄球系やリンパ球系(T細胞、B細胞)へと分化したことから、分化傾向に偏りはなく、得られたキメリズムの違いは各CD34陽性細胞中に存在している未熟細胞の割合の違いによるものと推測できた。

#### 2. ベクター挿入部位同定の関する研究

複数のPCR primerを設計し、得られるバンドがスメア状になるprimer setを決定した。それらバンドをゲルから回収し、各シーケンスデータをクラスタリングして、各クラスタリングのリード数の上位10位もしくは1.0%以上のリード数が得られたものを抽出した。

#### 3. モデルマウスを用いた研究

遺伝子導入効率は40~70%であり、蛍光色素を指標に導入細胞のみを採取して一定の放射線照射したマウスに移植した。その結果、これら細胞はすべての骨髄球系、リンパ球系に分化し、長期にわたる骨髄再構築能を示した。また、骨髄再構築のための最低の放射線照射量は400cGyであった。また、活性酸素産生量は必ずしも蛍光色素の蛍光強度と相関せず、蛍光色素陽性細胞においても活性酸素を産生しない細胞群が存在した。

#### 4. 当センターの実施体制の整備

・細胞調製室の整備: 8m x 6mの実験室内に、細胞調整室、一次ガウンニング室と前室、器財保管のための準備室を設置した。また、資料や細胞を保管する保管室も用意した。

・専従研究者の育成: 遺伝子治療実施に向け、専従研究者やその研究補助員とともに免疫学的検査法(FACS、ELISA、免疫グロブリン産生、TRECなど)を導入した。

・病院内の体制整備: 各診療科医師、看護部、薬剤部などのco-medicalと頻りに遺伝子治療に関する話し合いを行い、遺伝子治療が遅滞なく進むような体制強化を行った。

#### 5. 臨床用ウイルス製造に関する準備

現在、Malech博士とMCBの譲渡に関する話し合いを進めており、入手次第、臨床用ウイルス上清製造に向けたWCBの作製を開始する。

### D. 考察

#### 1. 造血幹細胞の未熟性の関する研究

移植後6ヶ月の段階でヒト造血細胞のキメリズムは臍帯血由来、骨髄由来、G-CSF刺激末梢由来CD34陽性細胞の順で高かった。このことは臍帯血に最もヒト造血能を再構築できる未熟細胞が存在することを示唆している。ただ、実際、遺伝子治療臨床研究において、臍帯血由来CD34陽性細胞を利用する場合は、胎児診断など予め疾患が同定された場合に限り、臍帯血由来CD34陽性細胞を使用する機会は少ない。一方、末梢血由来CD34陽性細胞は一度の大量の細胞を調製でき、また、骨髄再構築能が比較的早いことから利用する臨床研究も増えている。ただ、今回の結果からその未熟性に関しては骨髄由来CD34陽性細胞より劣ると思われ、使用に関してより慎重な適応基準が必要になってくると思われる。

#### 2. ベクター挿入部位同定の関する研究

すべての検体において挿入部を解析することができた。この結果は、以前行ったLAM-PCRの結果と一致し、今回の網羅的挿入部位解析が十分に信頼のおけるものであることが示された。さらに、LAM-PCRで得られなかった挿入部位も同定できたことから、ある程度、頻度の低いものを増幅可能であることが示唆された。

#### 3. モデルマウスを用いた研究

gp91<sup>phox</sup>遺伝子欠損マウスにおけるgp91<sup>phox</sup>遺伝子発現細胞の生着に最低でも400cGyの放射線照射量が必要であったことから、gp91<sup>phox</sup>遺伝子発現は造血幹細胞の増殖に正の効果(growth advantage)を与えていないことが示唆された。また、導入遺伝子の発現と機能修復の関係が必ずしもリニアではなく、遺伝子導入された全ての細胞において機能修復が得られるようベクターを構築することが望ましいことが示唆された。

#### 4. 当センターの実施体制の整備

当研究センターで計画している慢性肉芽症に対する遺伝子治療臨床研究は平成23年2月24日



付けで当研究センターの遺伝子治療臨床研究審査委員会にて承認され、現在、厚生労働省・科学審議会への提出に向けての準備が進められている。この審議会にて審議され、最終的に厚生労働大臣の承認を得ることで、遺伝子治療臨床研究が実施されることになるが、その実施にあたっては、当研究センター全体の支援が必須であり、また、その体制整備は急務である。よって、これら当センターの実施体制の整備を早急に進めなければならない。

#### 5. 臨床用ウイルス製造に関する準備

今回の WBC の作製により多くの患者がこの造血幹細胞遺伝子治療の対象となり得、また、ここから得られる知見は他の遺伝子治療 (ADA 欠損症やウイスコット・アルドリッチ症候群) に対する臨床用ウイルス上清製造にも役立つ。

#### E. 結論

- 1) NOG マウスを用いた移植研究で、臍帯血由来、骨髄由来、G-CSF 刺激末梢由来 CD34 陽性細胞の順でその未熟性は高いと思われた。
- 2) pyrosequencing の原理を応用した高速ソーケンシングによる遺伝子導入部位の網羅的解析法は、以前より行われていた LAM-PCR 法で得られた結果を再現し、さらにはより頻度の低いバンドも増幅できることが示唆された。
- 3) gp91<sup>phox</sup> 遺伝子は造血幹細胞の増殖に正の影響を与えていないこと。また、遺伝子の機能には一定の閾値があることが示された。
- 4) 遺伝子治療臨床研究で使用される細胞調整室の準備、遺伝子治療専属スタッフへの指導及び病院関係者との連携を深めた。
- 5) 臨床用ウイルス製造のための WCB 作製の準備を開始した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tozuka Y, Kumon M, Wada E, Onodera M, Mochizuki H, Wada K: Material obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem Int* 57: 235-247, 2010.
- 2) Hirata Y Hamanaka S, Onodera M: Transactivation of the dopamine receptor 3 gene by a single provirus integration results in development of B cell lymphoma in transgenic mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells.

*Blood* 115: 3930-3938, 2010.

- 3) Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, Watanabe T, Mori H, Onodera M, Mochizuki H, Hattori N, Urabe T: Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 299-310, 2010.
  - 4) Takayama, N., Otsu, M et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 207, 2817-2830 (2010).
  - 5) Ogawa, S., Otsu, M et al. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res* 16, 3825-3831 (2010).
  - 6) Ogawa, S., Otsu, M et al. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle* 9(2010).
  - 7) Kaneko, S., Otsu, M & Nakauchi, H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol* 17, 271-275 (2010).
  - 8) Hayashi, Y., Otsu, M et al. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5, e14099 (2010)
  - 9) Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M. Osteomyelitis due to trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection*. 2011.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 小野寺雅史 遺伝子治療における我が国と欧米の違い 第1回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム (特別講演), 東京, 2011.1.26
  - 2) Otsu, M., et al. Update of Stem Cell Gene Therapy

#### Clinical Trial for ADA-Deficiency in Japan

The 13th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy. 2010, Washington DC.

- 3) Otsu, M., et al. Update on a Japanese clinical trial of Stem Cell Gene Therapy for ADA-Deficiency. The 17th Annual Congress of the European Society of Gene Therapy. 2010, Milan.
- 4) Suzuki, S., Otsu, M., Nakauchi, H. Irradiated bone marrow environment impairs hematopoietic stem cells by exposure to tumor necrosis factor. The 52nd ASH Annual Meeting, 2010, Orland.
- 5) Otsu, M., et al. Stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficiency: a report of six-year outcomes in 2 treated patients. The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
- 6) Okabe, M., Otsu, M., et al. Characterization of iPS cells generated from murine hematopoietic cells. The 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
- 7) Lai, CY., Otsu, M. et al. Role of CXCR4 Signaling in Hematopoietic Stem Cell Repopulation. The 17th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, 2010, Utsunomiya, Japan
- 8) 村山静子、田村英一郎、河合利尚、井田博幸. 非感染性腸炎を合併した慢性肉芽腫症の検討. 第42回小児感染症学会. 2010
- 9) 明城和子、藤本慎一郎、河合利尚. 慢性腸炎からマクロファージ活性化症候群を合併した慢性肉芽腫症の1例. 第42回小児感染症学会. 2010.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 効果的な酵素補充療法を可能にするライソゾーム病の 新たな診療体制の確立

所 属 (独)国立成育医療研究センター  
臨床検査部

研究代表者 奥山 虎之

### 研究要旨

酵素補充療法が使用可能となり、ライソゾーム病の治療の可能性は飛躍的に進歩した。しかし、同治療法には、1. 中枢神経症状に対して効果が期待できない、2. 病態が進んだ患者の治療効果が乏しい、3. 莫大な医療費がかかる、なども問題も認識されるに至っている。本研究では、これらの諸問題を解決するために、1. 中枢神経に到達する小分子による治療法であるケミカルシャペロン療法を開発する、2. 新生児スクリーニング法を開発する、3. 無血清培地を利用した低コストの酵素産生系の有用性を確立する、ことを同時に進める。今年度、ケミカルシャペロン法については、そのスクリーニング方法を確立した。早期診断のためのスクリーニング法として、乾燥ろ紙血検体を用いたタンデム質量分析装置による検出法の検討を始めた。また、無血清培地で産生した酵素製剤の有用性をムコ多糖症モデルマウスを利用して検証した。

### 研究分担者

- (1) 鳥取大学生命機能研究支援センター 難波 栄二  
(2) 日本ケミカルリサーチ株式会社 森本 秀人

### A. 研究目的

酵素補充療法が可能なライソゾーム病であるムコ多糖症Ⅱ型とポンペ病を対象として、

- (1) 中枢神経病変に対する治療法の開発  
(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立  
(3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化、の3点を目的に研究を進める。

現在、6疾患（ゴーシェ病、ポンペ病、ファブリ

一病、ムコ多糖症I, II, VI型）で酵素補充療法が使用可能であり、相当数の患者が酵素補充療法の恩恵に与っているが、臨床経験の蓄積は以下の新たな問題を浮き彫りにしている。

- (1) 高分子である酵素は、血液脳関門を通過できないことから、精神発達遅滞や退行に対する効果が期待できない。  
(2) ムコ多糖症の骨病変やポンペ病の心筋障害等には、病変が進展する以前から酵素補充を開始しないと効果がない。  
(3) 疾患の認知度が高まるにつれてライソゾーム病と診断される患者は着実に増えているため、年間数千万円におよぶ高額医療の妥当性が問われ始めている。

## B. 研究方法

(1) 中枢神経病変に対する治療法の開発  
有効なケミカルシヤペロンを検出するため、はじめにIDS結合化合物の探索を行った。ヒトIDS酵素蛋白質の立体構造解析は、サルファテースファミリー蛋白質で立体構造が報告されているヒトARSA (Arylsulfatase A) とヒトARSB (Arylsulfatase B) の構造を元に行った。IDS結合化合物のインシリコスクリーニングは、榊原らにより開発された統計的識別モデル(SVM)を用いた結合予測手法 (Nagamine and Sakakibara, 2007) により行った。FDA認可薬ライブラリーはEnzo Life Sciencesより購入し、用いた。IDS活性測定は4-MU人工基質を用い、行った。

### (2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立

新生児ろ紙血を3 mm大に打ち抜き1枚を検体とした。これをMicrocon Ultracel YM-10のフィルター上に入れ、1 %BSA溶液 100  $\mu$ lを加えて25  $^{\circ}$ C、2 時間で抽出した。さらに8000 rpm、15分間の条件で遠心しコレクションチューブを新規のものに交換した。コンドロシンの50  $\mu$ g/ml水溶液10  $\mu$ lと50 mmol/l Tris-HCl緩衝液(pH7) 20  $\mu$ l、さらにケラターゼII、ヘパリチナーゼ、コンドロイチナーゼBを各1 mU/30  $\mu$ lとなるようあらかじめ調整した酵素混合水溶液 30  $\mu$ lをフィルター上に添加した。約10秒間ボルテックミキサーにより混合した後に37  $^{\circ}$ Cで12.5 時間加温した。これを16000 rpm、15分間の条件で遠心し得られたろ過液をオートサンプラー用注入バイアルへ移し、検体とした。

LC/MS/MS装置として質量分析計にはAPI 4000を使用した。また高速液体クロマトグラフィー装置としてHP1100 systemを、オートサンプラーとしてHTC PALを使用した。カラムは Hypercarb

2.0 mm i. d.  $\times$  100 mm、5  $\mu$ mを使用した。イオン化法はTurbo ionspray法、検出モードはMultiple reaction monitoring (MRM) negative modeとした。KS、HS、DSを酵素分解して得られる二糖、それぞれの質量/イオン比 (m/z) (断片化前/断片化後) と断片化のエネルギー (CID) であるが、KSをケラターゼIIで分解すると、Gal  $\beta$ 1<sup>4</sup>GlcNAc(6S) (MSD) とGal(6S)  $\beta$ 1<sup>4</sup>GlcNAc(6S) (DSD) の二種類の二糖が得られ、これらのm/zは 462.1/97.0 (CID: -80 eV) と同じであることから、今回併せてKSとして測定した。HSをヘパリチナーゼで分解すると、 $\Delta$ DiHS-OS [378.1/174.9 (-22eV)] と  $\Delta$ DiHS-NS [416.0/137.9 (-34 eV)]、 $\Delta$ DiHS-6S [458.2/97.1 (-52 eV)] の3種類の二糖が得られた。またDSをコンドロイチナーゼBで分解すると、二糖である  $\Delta$ DiDS-4Sが得られるが、 $\Delta$ DiHS-6Sと  $\Delta$ DiDS-4Sは同位体であり、m/zとCIDが同じで、ピークは分離出来ない。人体からは  $\Delta$ DiHS-6Sがほとんど産生されない為、本検討では  $\Delta$ DiHS-6Sで検量線を作成し、ろ紙血検体から得られたピークをDS由来の  $\Delta$ DiDS-4Sとして測定した。

### (3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化、

本薬効評価には、既に日本ケミカルリサーチ(株)で確立済みであったIDS産生細胞並びに同細胞の無血清培養技術により製造した遺伝子組換えヒトIDSを用いた。ムコ多糖症II型のモデル動物であるIDS KOマウスを用いて、精製されたIDSの薬効を評価した。IDS KOマウスでは、尿及び全身の組織中にGAGの蓄積が認められ、GAGの減少効果を指標としたIDSの薬効評価のための有用なモデルである。

IDSを0.5 mg/kg、1.0 mg/kg及び2.0 mg/kgの用量で、15~19週齢のIDS KOマウスへ週1回24週

間反復尾静脈内投与した（1群4匹）。投与媒体を週1回24週間反復投与したIDS KOマウスを病態対照群、またIDS KOマウスと同腹仔の野生型マウス（雄）を正常対照群として設定した。初回投与前及び初回投与から4、8、16、24週後に採尿し、尿中GAG濃度を定量した。また、最終投与から1週間後に肝臓、心臓、腎臓、脾臓、肺、脳、大腿筋及び舌を採取した。採取した組織は液体窒素で凍結した後、凍結乾燥した。凍結乾燥した組織を裁切した後、トリス塩酸緩衝液中でアクチナーゼE（科研製薬株式会社）によりタンパク質を分解し、組織中に含まれるGAGを可溶化した。反応液の上清を回収し、上清中に含まれるGAG濃度を定量した。尿中及び組織中GAGの定量はAlcian Blueによる比色定量法で行った。尿中のGAG濃度は尿中クレアチニン量で、組織中GAG濃度は、組織乾燥重量で補正した。なお、尿中クレアチニン量は生化学自動分析装置（ベックマン・コールター・バイオメディカル株式会社）を使用しクレアチナーゼ・F-DAOS法にて測定した。

### C. 研究結果

（1）中枢神経病変に対する治療法の開発  
FDA認可薬ライブラリー（640化合物）から、SVMを用いたインシリコ解析によりヒトIDS酵素に結合する化合物を探索した結果、9個の候補化合物を同定した。

（2）乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立

新生児ろ紙血のGAGをAPI4000で測定した結果、 $\Delta$ DiHS-0Sの平均は $87.57 \pm 28.53$  ng/ml、 $\Delta$ DiHS-6Sの平均は $205.58 \pm 73.76$  ng/ml、KSの平均は $357.07 \pm 102.96$  ng/mlとなった。出生時体重別では値に大きな違いはなかった。 $\Delta$ DiHS-NSについては、今回、十分な感度が得られないものが多

かった。これに先立ち予備実験を行っていたが、予備実験の段階では $\Delta$ DiHS-NSのピークも得られ、各二糖の相関としては、HSの $\Delta$ DiHS-0Sと同じくHS由来の $\Delta$ DiHS-NSは良好に相関し（ $R=0.79$ ）、 $\Delta$ DiHS-0SとDSを反映する $\Delta$ DiHS-6Sは弱い相関（ $R=0.56$ ）、KSと他の二糖の相関は弱かった（ $R=0.11 \sim 0.2$ ）であった。

（3）精製されたIDSをIDS KOマウスへ0.5 mg/kg、1.0 mg/kg及び2.0 mg/kgの用量で、週1回24週間反復尾静脈内投与した。その結果、尿中GAG濃度は、初回測定時点の投与4週から顕著に減少し、投与期間中、野生型群の尿中GAGレベルに近い濃度で推移した。組織中のGAG濃度は、脳以外の組織において、顕著に減少し、いずれの投与群においても病態対照群と比較して有意なGAG濃度の減少効果が認められた。

### D. 考察

IDSケミカルシャペロンの開発を目的とし、候補化合物の探索を行った。また今回は、早期の臨床応用を目指し、FDA認可薬ライブラリーの中から候補化合物の探索を行い、9個の候補化合物を同定した。予備的な結果では、9個のうち8個の化合物について10-80  $\mu$ M濃度で正常酵素に対する阻害活性を認めていない。今後は、この化合物についてより詳細な解析を行い、その結果を予測手法にフィードバックさせ、再度インシリコ解析を行う。また、他の化合物ライブラリーを用い、同様の手法によりケミカルシャペロンの探索を行う。

新生児から得られたろ紙微量血液検体からGAGの測定が可能であり、結果の分布より正常範囲を決めることが可能であった。正常新生児ろ紙血サンプルを増やすことにより正確な正常値範囲を決めることにより、ムコ多糖症患者を本検査法で診断することが可能となる。今後はムコ多糖症患者のろ紙血検体を用いて、正

常群との結果との比較を行う。本法による簡便で迅速な診断法を開発し普及させれば、ムコ多糖症の早期発見のみならず、その後の治療効果判定などにも使用できる可能性がある

無血清培養にて製造した遺伝子組換えヒトIDSを、ムコ多糖症II型のモデルマウスであるIDS K0マウスへ0.5 mg/kg、1.0 mg/kg及び2.0 mg/kgの用量で週1回24週間反復尾静脈内投与したところ、全ての用量において、尿中及び組織中GAG濃度の顕著な減少効果が認められた。

#### E. 結論

ケミカルシャペロンの候補分子が9種類示された。また、ろ紙血サンプルを用いたムコ多糖症の診断法の有用性と無血清培地を用いた酵素製剤の有用性を示唆する成績を得た。次年度以降、さらに研究を進める基盤が確立した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  2. 学会発表
- 該当なし

#### G知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 医薬品製剤及び製造工程の科学的開発戦略を実現 させるための製剤評価及び製造工程評価法の開発研究

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 科学的体系的アプローチによる医薬品製剤開発の実現に不可欠な製剤特性を解析するための適切な評価法が定まっていない (1)超難溶性薬物製剤, (2)機能性製剤, (3)ナノ粒子 DDS 製剤等について製剤特性評価法の開発を行い, また, (4)これらの製剤の製造工程をリアルタイム, 超高速に管理する製造工程管理手法を検討した。

### 研究分担者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 官崎玉樹
- (3) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (4) 塩野義製薬 村主教行
- (5) アステラス製薬 三村尚志
- (6) 第一三共 脇山尚樹
- (7) 武田薬品工業 池田幸弘
- (8) 国立医薬品食品衛生研究所 四方田千佳子
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所 柴田寛子
- (10) 帝京大学薬学部 丸山一雄
- (11) アステラス製薬 山梨繁行
- (12) 大鵬薬品 木下真宏
- (13) 東和薬品株式会社 立木秀尚
- (14) ニプロパッチ株式会社 山内仁史
- (15) メビオフィーム 岡田一志
- (16) 国立医薬品食品衛生研究所 加藤くみ子
- (17) 東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之
- (18) 東京大学大学院医学系研究科 西山伸宏
- (19) エーザイ株式会社 石原比呂之
- (20) 日本化薬株式会社 中西健
- (21) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (22) 東邦大学薬学部 寺田勝英
- (23) 国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫
- (24) 国立医薬品食品衛生研究所 坂本知昭
- (25) パウレック 高嶋武志
- (26) 参天製薬 木村章男
- (27) 塩野義製薬 古家喜弘
- (28) 武田薬品工業 小澤昭夫
- (29) 日揮 渡辺恵市郎
- (30) 田辺三菱製薬 土屋享

### A. 研究目的

医薬品はヒトの体内に投与され健康に直接関わ

る製品であるため、極めて厳しい規制が行われてきた。また一度開発、承認されても、品質の向上あるいは製造コストの改善等を目指した製法変更にあたっては、規制当局による承認あるいは届出が課せられ、変更の実施までに時間、経費がかかる。そのため製造方法の変更を避ける傾向にあり、工業製品の中でも製造・品質管理は古いままであることが少なくない。このような背景の中、医薬品製剤開発・品質管理に製造科学と品質リスク管理の考えを導入し、製造・品質管理を近代化する必要性が叫ばれ、ICH(日米 EU 医薬品規制調和国際会議)においても、医薬品製剤および製造工程の開発における科学的体系的アプローチの構築が品質関連テーマとして取り上げられ、Q8-Q10 ガイドラインが国際調和された。

この新しいアプローチでは、(1)医薬品製剤を開発するにあたって、製剤設計を科学的に行うと同時に各種リスク分析手法を活用し、有効性、安全性に影響する製剤の品質特性パラメータを明らかにし、その許容範囲を明確にする；(2)製造工程において、製剤の品質特性パラメータに影響しうる原料特性および製造工程パラメータを特定し、品質特性パラメータと原料特性および製造工程パラメータとの機能的関係を特定する；(3)以上の情報、知識をもとに医薬品製剤の適切な管理戦略を構築する、という過程を踏むとされる。しかし、このような科学的体系的アプローチを実際の医薬品製剤において実現させてゆくための条件として、製剤特性を解析するための適切な評価法、および製造工程を解析するための適切な評価法が整備されていることが必要不可欠なものとなる。

そこで本研究では、製剤特性評価法が定まっていない(1)超難溶性薬物製剤, (2)機能性製剤, (3)ナノ粒子 DDS 製剤等について、製剤特性を評価する

方法を開発し、確立する。また、(4)製造工程中でリアルタイムあるいは超高速に製剤品質特性パラメータや製造工程パラメータの捕捉が可能な工程評価手法を開発、確立することを目的とする。

## B. 研究方法

### (1) 超難溶性製剤の物理薬剤学的評価法研究

1-1) 非晶質製剤：ニフェジピン、フェノバルビタール、フェニトインをモデル薬物とした固体分散体を調製し、固体分散体の安定性に及ぼす高分子添加剤の影響を検討し、最適な高分子添加剤の選択法を検討した。また、粒子径の異なるニフェジピン固体分散体を調製し、バルクおよび試料表面の分子運動性と物理的安定性(再結晶化のしやすさ)との関係について検討した；

1-2) ナノ微粒子製剤：モデル薬物としてカルバマゼピン(CBZ)を用いて、CBZ/HPMCAS 過飽和溶液の構造および分子状態を HPLC 測定、粒度分布測定および NMR により評価し、過飽和溶液形成および安定化メカニズムを検討した。また、ナノ粒子化手法の一つであるビーズミルを用いて難溶性薬物を湿式粉碎し、最終粒子径に及ぼす原薬物性および分散剤物性の影響を明らかにし、ナノ粒子化に最適な分散剤の物性評価法を検討した；

1-3) Cocrystal 製剤：Cocrystal 調製法の代表的な方法の一つである粉碎法は、候補化合物と個々の cocrystal former (CF) mixture を作成した後 cocrystal の形成検討を行うため、処理速度が低く、また、工数を要するという問題を抱えている。CF mixture を用いた 1 次スクリーニングを行うことにより、これらの問題を解決した効率的な cocrystal 結晶化スクリーニング系の構築検討を行った。

### (2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究

2-1) リポソーム製剤の評価法に関する研究では、抗がん剤 A を封入したアクティブターゲティング型リポソーム製剤について、脂質組成の異なる 3 種のリポソームを Extrusion 法により調製し、内封した抗がん剤 A の安定性・薬物放出性・トランスフェリン(Tf)付加状態を評価すると共に、代謝酵素など内在因子との関係も評価した。また、リポソームの血液中での血清タンパク等との相互作用を明らかにするため、ペプチド試料を nanoLC-MS で分析後タンパク質の同定を行い、さらに表面プラズモン共鳴 (SPR) による相互作用の解析を試みた。アクティブターゲティング型リポソーム製剤の設計と評価に関しては、製剤設計に必要な条件を選定

すると共に、Tf 修飾 PEG-リポソームの機能評価を試みた。

2-2) 機能性製剤の評価手法としてのフローセル法の検討では、調製したインドメタシン(IND)の MC, HPMC との固体分散体、USP 溶出試験用プレドニゾン錠、市販テオフィリン徐放錠、市販ニフェジピン CR 錠等をモデル製剤として、フローセル法の諸条件を検討した。さらに、経口剤の溶出挙動からの血中薬物濃度推移の予測を、解析ソフト IVIVC Toolkit™ for WinNonlin®により試みた。

2-3) 製剤設計とその評価として、難溶性薬物含有経口剤の設計、評価法では、塩基性薬物を取り上げ、有機酸添加などの製剤設計の有用性をビーグル犬を用いて評価した。また、外用剤・経皮吸収製剤の製剤化研究として、ケトプロフェン(KP)パップ剤をモデル薬物として、残存量試験とともに、皮内および関節内への薬物移行量を Microdialysis(MD)法により評価した。

### (3) ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関わる製剤特性研究

3-1) ナノ粒子製剤の物性・動態解析法：ポリエチレングリコール(PEG)とポリグルタミン酸からなるブロック共重合体にオキサリプラチンの活性体である 1,2-ジアミノシクロヘキサン白金(II)錯体 DACHPtCl(NO<sub>3</sub>)水溶液を反応させることにより、高分子-金属錯体形成によって形成される DACHPt 内包ミセル DACHPt/m を調製した。DACHPt/m の物性(粒径分布、安定性、薬剤放出速度)について解析した；

細胞内動態を解析するために、ミセル形成能があり、かつ蛍光を有するブロック共重合体として DBD-ED, Nile-Red, Doxorubicin を PEG とポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体に脱水縮合させたミセルを調製した。調製したミセル溶液の蛍光特性について分光蛍光光度計で測定した。また、ナノ粒子製剤の細胞内動態評価手法について検討するため、粒子径の異なる蛍光標識ポリスチレンナノ粒子、またそれぞれに PEG 鎖を表面修飾したナノ粒子を調製し HeLa 細胞に投与後、共焦点顕微鏡により観察した；

3-2) ナノ粒子製剤の薬物放出特性評価法の確立：2 機の 6 方バルブを搭載した HPLC システムを用いて、オンラインで固相抽出が可能な分析システムを構築した。ナノ粒子製剤としてドキシソルビシン封入リポソームをモデル製剤とし、製剤中および生体試料中においてリポソームに保持されている



薬物と遊離の薬物の分離定量法を確立した；

3-3) 薬物トランスポーターの機能解析：腎・脈絡叢に発現する有機アニオントランスポーター OAT3 に着目し、その遺伝子欠損マウス Oat3(-/-)マウスの脳室内に直接薬液を投与し、脳室内からの消失速度を測定した。大脳皮質に直接薬液を注入し、脳内に残存する薬物量を測定した。また、静脈中に薬物を定速静注し、定常状態で血漿、腎、脳脊髄液を採取した。薬物濃度は、LC/MS/MS を用いて定量した。

#### (4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

医薬品の製剤開発時および製造工程においてリアルタイムあるいは超高速に重要品質特性の評価およびモニタリングが可能な分析評価手法の開発研究として、以下の検討を行った。

4-1) ラマン分光分析法による不斉補助基を有する基質を用いた動的な速度分割 (Dynamic kinetic resolution) のリアルタイムモニタリングを検討し、経時変化把握ツールおよび目的物における立体選択性評価ツールとしての有用性の評価を行った；

4-2) 錠剤コーティング工程における非接触式近赤外分析装置を用いた皮膜量(錠剤重量)、および水分に関するリアルタイムモニタリングの可能性を実製造に近いスケールを用いて検討した；

4-3) 培養や前処理が不要で、微生物をリアルタイムに連続測定できる内部蛍光検出法について、無菌医薬品製造時の環境モニタリングへの応用を検討した；

4-4) ケン化反応による対称的ジエステルの選択的モノエステルへの合成工程における UHPLC(超高速液体クロマトグラフィー)/MS のリアルタイム解析の可能性について検討を行った；

4-5) テラヘルツパルス分光/イメージング技術による錠剤コーティング工程のオンラインリアルタイム評価を目的として、オフライン装置を用いて経時的に採取したコーティング錠を用い、錠剤表面から得られるテラヘルツパルス反射強度の分布とコーティング厚の分布を調べた；

4-6) 高感度 PAS(光音響分光法)の製剤評価への応用について検討を行った；

4-7) 高精度・識別性を有する溶出評価技術の開発を目的として、ステーションナリーバスケット法を用いた溶出挙動の異なる製剤の識別性について検討を行った；

4-8) 機械などの探傷手法である光励起非破壊検査および超音波非接触測定の製剤評価への導入を目的として、異物を内含する錠剤を作製し実際に検

査を実施し、その有効性の確認を行った；

4-9) TOF-SIMS(飛行時間型二次イオン質量分析法)の製剤評価への応用を目的として、医薬品混合物中の主薬および添加剤の分布状態の解析を TOF-SIMS を用いて行った；

4-10) スティックング、キャッピングなどの打錠障害に粉体および杵・臼の物性が及ぼす影響について検討するため、種々の粉体を種々の杵を用いて打錠し、打錠後の粉体の杵への付着現象の評価を行い、付着現象の発生要因について検討した。

(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) 超難溶性製剤の物理薬剤学的評価法研究

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、ナノ微粒化製剤、cocrystal 製剤について、その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を行った。

1-1) 非晶質製剤：非晶質ニフェジピンの結晶成長速度に及ぼす高分子添加剤の影響を検討したところ、PVP はカバーガラスで覆った試料の結晶成長抑制を大きく抑制した。HPMC の場合、ガラスで覆った試料では、結晶成長抑制効果がみられないが、試料上部が空気に暴露された系では結晶成長が抑制された。PVP と HPMC は異なるメカニズムによってニフェジピンの結晶成長を抑制していることが示された。また、種々の高分子を添加したニフェジピンやフェノバルビタール固体分散体は加湿条件(40℃/75%RH/開栓)で保存することにより、溶出率が大きく低下し、溶出中の過飽和溶解が維持できなかった。水分活性が高い試料ほど非晶質の安定性が悪く、溶出低下を認めたことから、固体分散体中の自由水が安定性に大きく影響していると考えられた。さらに、粒子径の異なるニフェジピン-PVP K30(96:4)固体分散体(粒子径：250μm 以上、75~250μm、75μm 以下)の保存安定性は粒子径が小さく表面の比率の高い試料ほど結晶化が速やかであった。エンタルピー緩和時間の分布は粒子径が小さいほど小さかった。緩和時間の分布が均一となることが、試料表面での速やかな再結晶化現象と関連しているものと推定され、表面の物理的安定性評価に役立つことが示唆される。

1-2) ナノ微粒製剤：溶媒留去法により調製した

CBZ/HMPCAS-HF 固体分散体から得られる過飽和溶液の HPLC と  $^1\text{H-NMR}$  の結果より、過飽和溶液中において CBZ および HMPCAS-HF は共に溶解状態にあることが確認された。また、 $^1\text{H-NMR}$  差 NOE 測定の結果より、CBZ と HMPCAS-HF の分子間相互作用には添加剤のアセチル基が関与していることが示唆され、アセチル基が存在しない又は割合が少ない高分子 (HPMC および HMPCAS-LF) を添加剤として用いると CBZ 過飽和溶液の形成が認められないことから添加剤のアセチル基の重要性が確認できた。また、湿式粉碎により微小な難溶性薬物粒子が生成するための分散剤 (界面活性剤) の主なファクターは①分散媒 (界面活性剤溶液および pH) への難溶性薬物の溶解度が低いことと②界面活性剤の表面自由エネルギーの極性成分 ( $\gamma_p$ ) の値が小さいことであることが明らかになった。

1-3) Cocrystal 製剤：4 つの CF を含む 5 種類の CF mixture を用いる cocrystal 結晶化の 1 次スクリーニング系を構築した。本スクリーニング系により単一の CF を用いた場合と同様に再現性良く cocrystal が形成された。今回確立した cocrystal 結晶化スクリーニング系は、例えば、カルボキシル基を synthon とする CF mixture において cocrystal が形成されれば、それに含まれていない CF であってもカルボキシル基を有すれば cocrystal を形成するポテンシャルがあると推測でき、多数の CF 候補から効率的に目的とする CF を絞り込み、選定できることが明らかになった。

## (2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究

2-1) リポソーム製剤の動向調査から、世界で上市されているリポソーム製剤は 11 品目であり、2010 年には、韓国において Belotecan のリポソーム製剤が上市された。約 50 の研究開発プロジェクトが進行中で、Phase 3 の開発研究は、いずれもアメリカで行われていた。

3 種のアクティブターゲティング型リポソームのうち、 $2\sim 8^\circ\text{C}$  3 ヶ月間の保存下、また血清中で  $37^\circ\text{C}$  2 時間でも抗がん剤 A が漏洩しなかった組成 (B) のリポソームが最も安定であった。このリポソームの  $37^\circ\text{C}$  12 時間における放出率は、pH 7 で約 10%、pH 5 で約 50% であった。リポソーム化によってヒト血清中の代謝酵素から保護され、抗がん剤 A の代謝物への変換が減少した。このリポソームは、細胞上の Tf レセプターに直接結合してクラスリン依存的な取込みとマクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれること、担がんマウ

スに対してフリー抗がん剤よりも高い腫瘍縮小効果を示すことが明らかとなった。

さらに、Tf 修飾 PEG-リポソームでは、細胞特異的に取り込まれること、PEG-リポソームと同等の血中滞留性を保持しつつ、PEG リポソームよりもがん組織中に長時間滞留することなど、アクティブターゲティング型リポソームに求められる条件を満たしていた。また、リポソームに結合する血清中タン白質の探索では、リポソームと相互作用しないとされるタン白質を除去可能な分離条件を見出し、相互作用する可能性のあるタン白質を延べ 134 個同定した。さらに、SPR 解析では、PEG 修飾および PEG 未修飾リポソームを固定したセンサーチップにアルブミンおよびフィブロネクチンを注入したところ、濃度依存的にシグナルが増加し、両リポソームとの相互作用を機械的に検出できることが確かめられた。

2-2) フロースルーセル法の試験条件の検討では、IND (インドメタシン固体分散体) では、試料量を 30 ~ 90 mg で変化させた際、試料量が増えるに従ってそれらの溶出速度は遅延し、その試料量の違いによる 6 時間後の溶出率の差は、流速 4 mL/分の場合で最大約 20%、流速 16 mL/分の場合では約 10% と流速の上昇につれて試料量の違いによる影響が小さくなった。次に、内径 12 mm の小型セルを用いて測定した IND の溶出プロファイルと比較したところ、内径 22.6 mm の大型セルを用いた場合と比べて若干溶出が遅延傾向にあった。IND に対してシンク条件にあったが、いずれの試験においても、試験開始直後の試料濃度が最も高く、流速 4 mL/分では飽和溶解度 ( $39\mu\text{g/mL}$ ) を上回る過飽和状態にあることが分かった。

プレドニゾンカリブレター錠を用いた検討から、オープンシステムのフロースルーセル法では試験液が常に廃棄されるため、途中のデータの取り方により溶出率の値が大きく変化し、データの取得間隔に留意する必要があることが明らかとなった。また、テオフィリン徐放錠による検討から、フロースルーセル法では、徐放錠を構成する顆粒の崩壊時間の差が溶出挙動に表れること、全体としての溶出曲線はパドル法と類似していることが示された。ニフェジピン CR 錠による検討から、フロースルーセル法は、攪拌力が弱いため溶出特性の錠剤間の差がパドル法よりも顕著に表れること、徐放性製剤ではデータの取得間隔はあまり問題にならなかった。また、フロースルーセル法において、保温ジャケットを用いて流路の温度制御を行

うと保温ジャケット無しの時に比べて溶出率のばらつきが小さくなる事が示された

経口固形剤の溶出試験からの血中濃度予測では、製剤 20 種類について、薬物の静脈注射時の血中薬物濃度推移をコンパートメントモデルに基づいてフィッティングした後、製剤の経口投与時の血中薬物濃度推移データを用いてデコンボリューションを行い、各薬物の吸収速度をもとめた。AUC<sub>∞</sub>および C<sub>max</sub> の値と実測値の乖離度(%)を求め、±20%の範囲を基準とし IVIVC を評価した。乖離度が両パラメータとも±20%の範囲内であったのは、20 製剤中で 10 製剤であった。2 つの独自モデル式を作成して解析したところ、20 製剤中の 15 製剤について予測値と実測値の乖離度が±20%の範囲内に収まることを示した。

2-3)塩基性の難溶性薬物をクエン酸懸濁液として高胃内 pH のビーグル犬に経口投与したところ、薬物血漿中濃度は著しく高くなり、クエン酸の添加量に依存して血漿中濃度は高くなる傾向があり、クエン酸が吸収に影響を及ぼすことが確認された。また、酒石酸添加では、クエン酸添加よりも添加量が小さくても平均血漿中濃度が高くなり、塩体とほぼ同じ血漿中濃度プロファイルを示した。さらに、シクロデキストリン(CD)を用いて溶かした本化合物の水溶液は、BA 改善傾向と、投与量に対する AUC および C<sub>max</sub> の良好な線形性が認められ、CD 製剤開発の可能性が示された。

経皮吸収製剤の開発では、KP パップ剤の残存量試験において、ラットとブタの投与 10 時間後の残存量はそれぞれ 68.1±1.6%と 81.7±4.4%であった。MD 試験において、KP パップ投与後、薬物はラット皮内および膝関節内に急速に吸収され、2 時間でほぼプラトーとなった。これに対し、ブタ皮内および関節内への薬物移行は、ラットに比して遅く、480 分以上増加し続けることが確認された。皮膚中への移行量に関し、ラットは、8 時間までの C<sub>max</sub> がブタに比して約 9 倍高値であり、ブタとラットでは薬剤の透過量に大きな違いが確認された。同様の傾向が、血漿中薬物濃度においても認められ、体重並びに投与量を補正して算出したラットの予測 C<sub>max</sub> はブタの約 13 倍高値であった。

### (3) ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関わる製剤特性研究

新規ナノ粒子製剤の開発と、その体内動態に関わる標的性、放出性等の製剤特性、および生体内因子に関する研究を行った。

#### 3-1)ナノ粒子製剤の物性・動態解析：高分子ミセル

の内核を構成するポリアミノ酸 P(Glu)鎖の高次構造とミセルの物性について検討した。P(Glu)鎖が  $\alpha$ -helix を取る場合には粒径が 40 nm で多分散度が 0.05 以下、P(Glu)鎖が random coil を取る場合には粒径が 60nm で多分散度が 0.2 の DACHPt/m が形成されることが確認された。両者の物性の差異は薬物の放出量や安定性に影響を与えることが明らかとなった。

また、高分子ミセルの生体内動態可視化を目的とした蛍光標識ミセルの創製では、DBD の蛍光波長と Nile-Red の励起波長が接近していることから蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)が起こることが想定された。実際に DBD/Nile-Red 混合ミセルの蛍光を測定したところ、混合比を変えて調製した混合ミセルはいずれも 440nm の励起波長により 650nm の蛍光スペクトルが観察され、両者が FRET を起こすことが確認できた。

別に、粒子径や表面修飾などの異なる蛍光標識ポリスチレンナノ粒子を調製し細胞内動態に与える影響を共焦点顕微鏡で調べたところ、粒子径 40-100nm のナノ粒子と比較し 200nm では取り込み量が大きく減少していること、さらに PEG で表面を修飾すると、粒子径に関わらず取り込み量が大幅に減少することが確認された。蛍光標識体や顕微鏡の測定条件の選択により本法がナノ粒子製剤の細胞内動態を評価する手法として有用であることが示唆された。

3-2) ナノ粒子製剤の薬物放出特性評価法の確立：カラムスイッチングシステムを装備した HPLC システムを用いて、リポソームに内封された薬物(ドキシソルビシン)とリポソーム外の遊離の薬物を分離して定量することが可能な分析方法を開発した。さらに、カラムや移動相の最適化により、リポソームを含有する血漿サンプルにおいても前処理することなく血漿中の遊離ドキシソルビシンとリポソームに封入されたドキシソルビシンを分離定量することを可能にした。

3-3) 薬物トランスポーターの機能解析：Oat3(-/-)マウスでは脳内・脳脊髄液内からの消失の低下、血中からの移行性の増加が観察されたことから、Oat3 はこれら薬物の脳・脳脊髄液中からの排出に関わることが示唆された。しかし、薬物、部位により、Oat3 欠損の影響は異なり、Oat3 だけではなく、他のトランスポーターの関与も考えられた。

#### (4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

4-1) 複数の基質(アミノ酸誘導体)とベンジルアミンとの合成反応において、目的物である 2 種の立

体異性体の経時変化がラマン分光法によるリアルタイムモニタリングで検出できた。また立体選択性の評価としては、ラマンスペクトルから得られた値と、HPLCや<sup>1</sup>H-NMRより得られた値に近似性が認められ、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。

4-2) 実製造スケールに近い装置(150L)において、以前検討を行ったラボスケールの結果(7L)と同様に、経時的サンプリング(抜取り試験)で得られた実測値と近赤外分析法によるリアルタイムモニタリングから得られた予測値は高い相関性を示し、実製造のプロセス予測が可能であることを示した。

4-3) 内部蛍光検出法を用いたリアルタイム細菌デテクタ(IMD)によりバイオパーティクルを常時モニタリングすることにより、製品の微生物汚染につながる非定常状態時における製造環境の微生物汚染を把握することができた。従来、非定常状態時に製造された製品の出荷の可否は製品汚染リスクを基に判断していたが、IMDを活用した場合には得られた微生物数のデータに基づいて判断可能になることが示唆された。

4-4) UHPLC/MS技術を用いることにより、選択的モノ加水分解反応における全分析対象化合物が2分以内に分析でき、反応工程において10分間隔での工程解析が可能であった。そしてケン化反応に重要な添加塩基量と反応温度を重要工程管理パラメータとして、そのパラメータの変化に伴う反応状況の変化のリアルタイム解析を行うことが可能であった。

4-5) 65分間のコーティング工程において、工程開始後30分からオフラインによるテラヘルツ時間領域分光法で解析可能なコーティングの厚みを検出でき、コーティング工程の経時的評価を行うことが可能であった。オフラインによる対照分析の実施は、今後検討する予定であるオンライン/インラインでのリアルタイム解析に向けた基礎データとして重要な役割を持つものと考えられた。

4-6) 高感度PASはカンチレバー方式のため従来のPASと比べて感度が上昇しており、ステップスキップの採用で深さプロファイルの測定が可能であった。そのためゴムや髪の毛、液体中の組成の測定が可能であり、製剤評価への応用が可能であることが示唆された。

4-7) 溶出試験にステーションナリーバスケット法を用いることにより、粒度などの物性や製造条件が異なるため溶出挙動の異なる製剤を高精度に識別

できることが確認された。本手法は試験実施方法が煩雑であったが、バスケットおよび蓋を改良することで、より簡便で且つ迅速に試験を実施できる装置を開発した。

4-8) 光励起非破壊検査により、錠剤の内部に意図的に混入させた毛髪や小さい金属片を検出することが確認でき、錠剤の内部情報探査において全数非破壊検査の一手段となる可能性が示唆された。一方、超音波非接触測定装置は錠剤の内部の異物に反応はしたが形状までは明らかに出来なかった。内部情報探査ができる可能性があるが、錠剤外通過超音波を遮蔽するための装置が完全でないことおよび得られた情報の解釈が不十分なため、錠剤検査あるいは錠剤特性調査への適用にはさらなる検討が必要であると考えられた。

4-9) TOF-SIMSにより主薬や、従来の顕微分光手法により解析が難しかったステアリン酸マグネシウムの分布が明確に解析できたが、糖関連の添加剤はスペクトルが類似しているため、解析が困難であることが示された。そのためTOF-SIMSと従来の顕微分光手法を組み合わせて評価を行うことが有効と考えられた。

4-10) クエン酸一水和物、塩酸チアミン処方の打錠後の杵表面では粉体が凝集状態で付着し、スティッキングを誘発していることが確認された。この原因として結晶水が杵への付着性に影響していることが示唆された。一方、イブプロフェン等の処方では、顕著な付着は認められず、処方の違いにより粉体の杵への付着状態に大きな差が生じた。また、杵の金属材料の違いによるクエン酸一水和物の付着性はクロムニッケル合金が一番高くCrNiコート合金工具鋼が一番低かった。

## D. 考察

### (1) 超難溶性製剤の物理薬剤学的評価法研究

超難溶性薬物の製剤化法として注目を集めている非晶質製剤、ナノ微粒子製剤、cocrystal製剤について、製剤の設計を科学的に行うための製剤特性評価法について検討し、製剤特性を決定づける原料特性および製造工程パラメータについての知見が得られた。

非晶質製剤の結晶化速度に及ぼす粒子径の影響を検討した結果、実際の固体分散体制剤に用いられる粒子径領域において、結晶化速度に顕著な差が認められ、安定な固体分散体制剤を製造する上で、粒子径のコントロールが重要な要素となることが明らかになった。非晶質製剤の水分活性を下