

主に粒子径 234nm の位置に約 40% 形成され、2 時間で全てが粒子径 188nm の位置に転換された。ヒト化モノクローナル抗体製剤においては、2 時間で粒子径 434nm と 2723nm の位置に凝集体それぞれ 16.9% と 4.8% 形成された。3 時間では粒子径 560nm の位置に 64.2% 凝集体が形成され、5 時間では全てが粒子径 879nm の位置に転換された。

### (3) 振とうが凝集体の形成に及ぼす作用

市販ヒト IgG においてポリプレenchューブにおいて 320rpm では凝集体は形成されなかったが、640rpm では粒子径 126nm の位置に 15.3% 形成された。一方、ガラスバイアルでは 640rpm で全てが粒子径 165nm の位置に転換された (図 3)。ヒト化モノクローナル抗体製剤においては、ポリプロピレンチューブでは、3 時間で粒子径 2099nm の位置に凝集体が 6.1% 形成され、その後 9 時間まで増加は見られなかった。一方、ガラスバイアルでは、3 時間で粒子径 377nm の位置に凝集体が 19.9% 形成され、6 時間では同様な位置で 43.1% に増加した。9 時間では単量体が 94.4% 消失し、粒子径 658.8nm 及び 2772nm の位置にそれぞれ、86.5% 及び 7.8% 凝集体が形成された。

### (4) 凍結融解が凝集体の形成に及ぼす作用

市販ヒト IgG において、5 回の凍結融解により粒子径 81.4nm の位置に凝集体が 20.3% 形成され、6 回でほぼ同様な位置で 33.7% 形成された。ヒト化モノクローナル抗体製剤においては、4 回の凍結融解において粒子径 608nm と 1882nm に凝集体がそれぞれ 3.9% と 9.8% 形成された。凝集体の粒子径及びその割合は 8 回でもほとんど変わらなかった。以上の結果から、光散乱法により、種々の

物理ストレスにより生じた凝集体の粒子径とその相対量 (粒子径が大きいほど感度が高くなるため実際の量とは異なる) を評価可能であった。

## 3.2. 酸変性構造体の特異的検出法の開発

### (1) 酸変性構造体検出システムの作成

タイプ II ペプチドは、正常なヒト IgG にはほとんど結合特性を示さず、酸性処理によって生じる酸変性構造体に極めて高い特異的結合を示すことから、酸変性構造体の存在を高い感度で特異的に検出することができる。酸変性構造体は、一旦、センサーチップに結合すると、容易に解離しないことから、アミノ PEG4 化タイプ I 及び II ペプチドを、CM5 センサーチップ上に固定して、抗体溶液をインジェクトし、再生条件は、0.1% SDS で行うことにした。

### (2) 抗体の酸性条件ストレスによるタイプ I, II ペプチド固定化センサーチップ応答の変化

酸性条件処理後の抗体の応答を解析したところ、タイプ II ペプチドに対する応答は、酸処理後約 2 時間後から見られ、酸変性構造体の生成が進んでいることが分かった (図 4B 及び C)。タイプ I ペプチドに対する反応性は、処理後 1 時間で約 8 倍にも上昇していた (図 4A 及び C)。タイプ II によって認識される酸変性構造体が生成する以前に、別の反応が起こっていることが示唆された。

### (3) フィルターろ過後の酸性処理抗体溶液の応答の変化

酸性処理後の抗体溶液を 0.22 $\mu$ m のフィルターに通し、凝集物を除去した場合、残存の 280nm の吸光度は、酸性処理時間に依存して (3 時間で半分) に低下した。一方、ペプチド固定化センサー

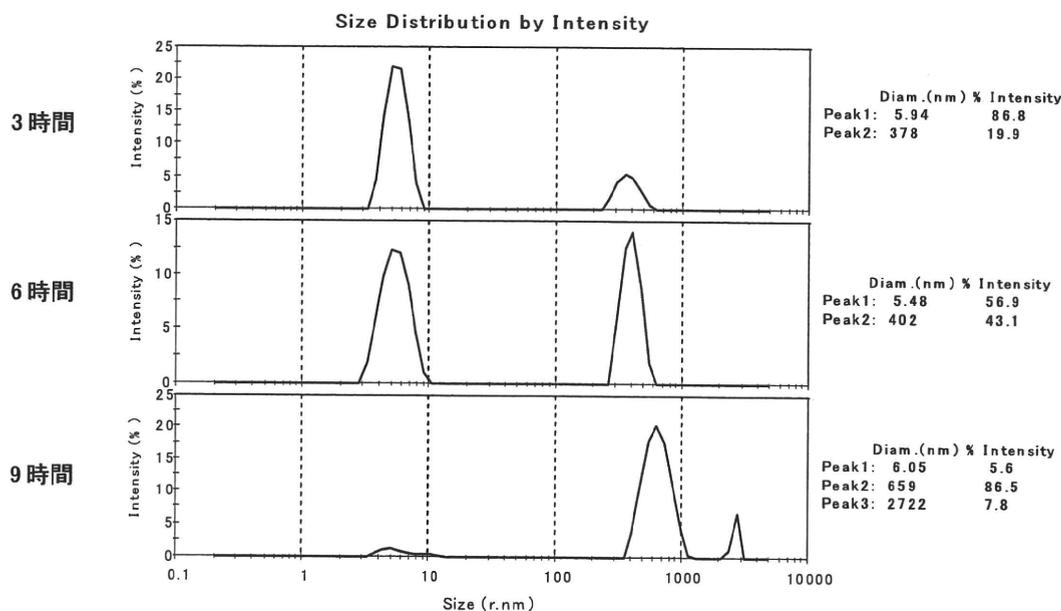


図3. ヒト化モノクローナル抗体製剤において振とうが凝集体の形成に及ぼす影響 (ガラス容器)

チップに対する応答は、ほとんど変化しなかった。  
 (4) 界面活性剤 (Tween20) の酸性処理抗体溶液の  
 応答への影響

オリゴマーの形成を阻害する Tween を添加しない場合の応答変化を検討したところ、タイプ I ペプチドに対する酸性処理抗体の反応は、約 1.3 倍に上昇した。一方、タイプ II ペプチドに対する反応は、2.3 倍にまで上昇した。以上のことは、結合応答の増大には、オリゴマー形成が関与し、タイプ II ペプチドが認識する分子種の方が、オリゴマー形成反応がより良く深く関わっていることを示している。

(5) 酸性処理抗体溶液のサイズ排除、イオン交換クロマトによる分析

酸処理したサンプルを、サイズ排除クロマトグラフィーで分析したところ、時間依存的に、モノマー-IgG のピークの急速な減少が見られ、約 1 時間の処理で 10% にまで、2 時間後にはほぼ消失した。同じサンプルをタイプ I, II のペプチドに対する SPR の応答によって解析したところ、酸性処理 2 時間以降も継続的な増加がみられた。このことは、少なくとも酸性処理 2 時間以降のタイプ I, II のペプチドに対する SPR の反応の増強には、単量体の IgG は関係せず、形成されたオリゴマーと関連した現象であることが考えられた。同じ酸処理サンプルを陰イオン交換クロマトグラフィーで分

析したところ、サイズ排除クロマトと同様に、モノマー-IgG のピークの急速な減少が見られ、オリゴマーに由来するピークの観察はできなかった。なお、同じ酸処理のサンプルでも、その後の中和と希釈処理によって、残存率が異なることを確認した。

#### D. 考察

##### 1. 糖鎖分析/糖鎖プロファイリングの共同研究

標準的糖鎖試験の策定を目的に、2AB 誘導体化順相 HPLC を用いた糖鎖分析/プロファイリング法について、抗体医薬品を対象とした標準的糖鎖分析/プロファイリング共同研究手順を作成し、糖鎖試験法としての妥当性を検証した。2AB 誘導体化法として、還元剤として毒性の高いシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いた方法が広く用いられている。日本薬局方ではシアン化合物は原則として使用しないよう求められていることから、より安全な 2-ピコリンボランを用いた方法を使用した。

クロマトグラム上のピークは、機関 A にてエキソグリコシダーゼ感受性と質量分析により帰属した。帰属結果は、マウスミエローマ細胞 (SP2/0) で産生される抗体に結合している糖鎖は、 $\alpha$ Gal 構造を含むこと、結合するシアル酸はほとんどが NeuGc であることが知られていることと一致して

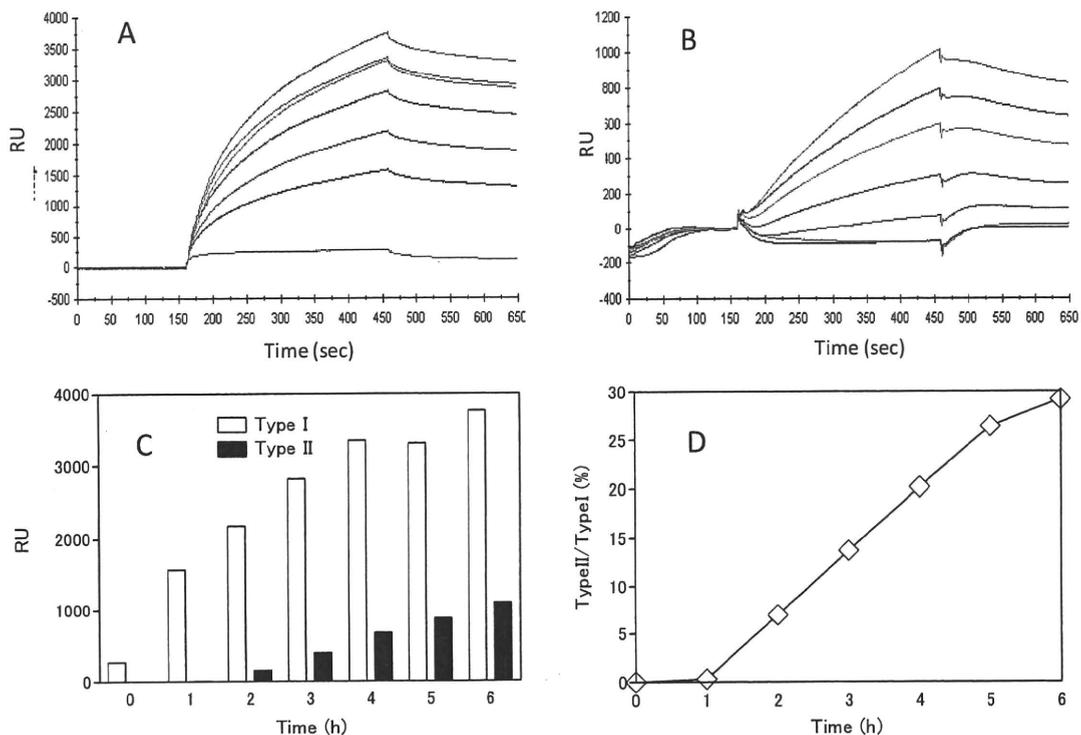


図4. ペプチド固定化センサーチップにおける酸性処理したヒト抗体の応答変化 (A) タイプ I, (B) タイプ II, (C) インジェクション後30秒と300秒のRUの差 (D) タイプ I ペプチドセンサーチップに対する反応に対するタイプ II ペプチドセンサーチップの反応 (%)

いた。抗体の糖鎖プロファイルとして、主要糖鎖だけでなく、微量糖鎖、特に非ヒト型構造を含む糖鎖がどの程度含まれているのかが評価できることが重要であることから、FG0, FG1, FG2等の主要糖鎖、M5、並びに $\alpha$ GalやNeuGcを含む微量糖鎖ピーク等15個について、糖鎖プロファイルを、GOFに対するピーク高さの比より評価した。

多機関共同研究において、いずれの機関においても、繰り返し注入による分析の再現性を確認した。糖鎖プロファイリング結果を比較したところ、HPLCシステムに問題のあった1機関を除き同様な結果が得られていた。15ピークのピーク高さ比の室内及び室間再現精度は、一部のピークを除き、それぞれ約5%及び20%以内であり、本糖鎖分析／プロファイリング法の実行可能性が確認された。室間再現精度が室内再現精度と比べて大きくなった原因として、機関間でクロマトグラムの分解能に差があったことが考えられた。

通常、含量の比較の際には、ピーク面積を用いるが、今回用いた抗体の微量糖鎖の不均一性は非常に複雑であったことから、ピーク高さによる評価を行った。バイオ医薬品に結合した糖鎖不均一性は複雑であり、全ての糖鎖をピークとして分離するのは困難な場合が多い。そのような場合、適宜、ピーク面積とピーク高さのどちらでも評価しやすい方を選択して良いといえる。実際の試験においては、試料調製を含む分析操作に問題がないことを確認するための試料も必要と考えられることから、糖タンパク質標準物質の分析結果と比較することが無難と思われる。

来年度は、逆相HPLC、UHPLC並びにキャピラリー電気泳動を用いた試験法について共同研究を実施し、最終年度は日局糖鎖試験法原案としてまとめる予定である。

## 2. SPR法による抗体医薬品のFcRn結合性試験法

機関Bでは機関AよりRSDが大きかったこと、機関Cではセンサーグラムのフィッティングが不良であったことから、標準的試験法とするには改善が必要であると考えられた。また、共同検定実施の過程で、データの自動解析を行う場合の留意点も見出された。

### 1) 機関Bにおける試験結果に基づく考察

本研究ではBiacore 3000を用いて適切な固定化量を250-500 RUと設定したが、Biacore T200を使用した機関BでのRSDが比較的大きな値となった。Biacore T200はBiacore 3000よりも感度が向上しており、推奨されるリガンド固定化量が低い。このため、至適固定化量がBiacore 3000とは異なる可能性が考えられる。機関A-2及びBの結果か

ら、機種によらず良好な結果を得るためには、固定化量の上限を300 RU程度に見直す必要があると考えられた。

### 2) 機関Cにおける試験結果に基づく考察

機関Cで低濃度アナライトのセンサーグラムのフィッティングが不良となる原因について、機関A及び機関Cの実験手技の違いを含めて検討した。ボルテックスミキサーを用いてアナライトの希釈を行った場合に低濃度アナライトのセンサーグラムが不良となることが分かり、アナライト希釈の際の攪拌方法の違いが測定結果に影響している可能性が示唆された。

### 3) データの自動解析における留意点

Biacore T200のようにデータの自動解析が行われるシステムでは、結合開始及び解離開始のポイントでスパイク状のノイズが観察される場合に、マニュアル操作によりノイズ部分を解析対象から除くことによってフィッティングが改善されることが分かった。また、初期設定のまま解析を行うと良好なフィッティングが得られない場合はbivalent analyteモデルにおけるkd1の初期値を、0.001から実際の数値に近い0.1に変更することにより、フィッティングが改善されることが明らかになった。

今回の知見を基に、来年度は、試験結果に及ぼす各種操作・データ解析法について検討し、最終的には抗体医薬品の結合活性試験法案としてまとめる予定である。

## 3. 凝集体の評価技術に関する研究

### 3.1. 光散乱法

光散乱法を用いた凝集体の測定により、物理的ストレスより生じる様々な大きさの凝集体を検出できることが明らかになった。特に生成された凝集体は、一部の場合を除いて、粒子径が約100nm以上であることは注目すべき点と思われる。通常、凝集体測定に用いるサイズ排除クロマトグラフィーでは、排除限界が粒子径約30nmであり、それ以上大きな凝集体は分離できないからである。タンパク質医薬品の二量体の凝集体は通常免疫原性を起こさないが、それ以上の粒子径では大きさに依存して免疫原性が高くなることが知られている。従って、最大粒子径5 $\mu$ mまでの広い範囲で凝集体を測定可能な光散乱法は、特に抗体医薬品のような分子量の大きな医薬品から生成される凝集体の粒子径を免疫原性との関連の可能性を考慮に入れて評価できるため有用な測定法である。

凝集体の形成されやすさは各抗体により異なり、特定の抗体で得られた結果は他の抗体に外挿できないことが示唆された。浸とうによるストレスで

は、ポリプレenchューブに比べガラスバイアルのほうが形成された凝集体の相対量は顕著に高い。凝集体の形成は容器との疎水的な相互作用により促進されることから、疎水性の高いガラスバイアルではより凝集体の形成が促進されたものと考えられる。

### 3.2. 酸変性構造体の特異的検出法の開発

酸性処理によって生じる IgG 抗体の凝集の原因となる分子種の検出や特定を試みた。タイプ II ペプチドが認識する酸変性構造体と呼んでいる分子種は、フィルターでろ過されるような大きな凝集体ではないが、単量体として存在しておらず、オリゴマー構造をしていることが示唆された。予想外なことに、酸処理によってタイプ I ペプチドとの反応性の急速な増大が見られ、その増加幅は、4 時間の酸処理によって元のレスポンスの 10 倍を超えていた。酸処理抗体の反応が、タイプ II ペプチドとのレスポンスより早い段階で出ていることから、酸性処理によって起こる凝集へ続く反応の早期のステップを検出していることが示唆される。酸処理によって生じるオリゴマー分子種は、フィルターでも除去されず、一方、イオン交換やサイズ排除クロマトでも検出できない。我々は、タイプ II ペプチドとタイプ I ペプチドの結合反応を組み合わせることでこの分子種の検出を可能にした。

### E. 結論

抗体医薬品の製法開発、品質・安全性確保のための共通基盤技術として、①標準的糖鎖試験法、②結合活性測定法、③凝集体評価法の開発を行った。

① 2AB 誘導体化順相 HPLC による糖鎖プロファイリング法の実行可能性を多機関共同研究により検証し、いずれの機関も概ね 15 個のピークを分離できること、また、ピーク高さ比の室内再現精度は、概ね 5% 以下、また、室外再現精度は、一部分離の不十分なピークを除き、20% 以内であることを確認した。本分析法は抗体医薬品の糖鎖試験法として適用可能であり、今後、その他の分析法についても標準化を実施し、日局糖鎖試験法原案としてまとめる予定である。

② SPR 法を用いた結合親和性測定法を検討し、標準的試験法とするための課題として、リガンド固定化量上限の見直しやアナライト希釈方法の検討の必要性が示唆された。今後、標準的試験法作成に向けて、試験結果に及ぼす各種操作・データ解析法等について検討する予定である。

③ 光散乱法によって、最大約 3000nm までの様々な粒子径の凝集体を測定できることを確認し

た。今後、光散乱法について、抗体医薬品における凝集体の工程内管理試験、製剤化および貯蔵を含めた最終産物の評価試験としての適用可能性を評価していく。また、ヒト IgG 特異的結合ペプチド、タイプ I、タイプ II ペプチドを固定化した SPR センサーチップにより、抗体の酸変性の初期過程にイオン交換やサイズ排除クロマトでは分離できない特殊なオリゴマー分子種を検出可能とした。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ: 遊離糖鎖の LC/MS. 試料分析講座.. 印刷中
- 2) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田 稔, 川西 徹, 山口照英, 川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn. 日薬理誌, 136, 280-284 (2010)
- 3) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英, 治療用タンパク質の免疫原性 その 2 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス Vol, 41, No.5 390-400 (2010)
- 4) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英, 治療用タンパク質の免疫原性 その 3 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス Vol, 41, No.9 726-735 (2010)
- 5) Maeda E, Urakami K, Shimura K, Kinoshita M, Kakehi K. Charge heterogeneity of a therapeutic monoclonal antibody conjugated with a cytotoxic antitumor antibiotic, calicheamicin. J Chromatogr A. 1217(45):7164-7171
- 6) Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K. Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. Anal Chem. 2010 82(17):7436-7443.
- 7) Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K. Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Biomed Chromatogr. 2010
- 8) Wada Y, et al. Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. Mol Cell Proteomics. 2010 9(4):719-727.
- 9) Hiratsuka T, Matsuzaki S, Miyata S, Kinoshita M, Kakehi K, Nishida S, Katayama T, Tohyama M. Yokukansan inhibits neuronal death during ER

stress by regulating the unfolded protein response. PLoS One. 2010 5(10):e13280

- 10) Takada H, Nishida A, Domaie M, Kita A, Yamano Y, Uchida A, Ishiwata S, Fang Y, Zhou X, Masuko T, Kinoshita M, Kakehi K, Sugiura R. The cell surface protein gene ecm33+ is a target of the two transcription factors Atf1 and Mbx1 and negatively regulates Pmk1 MAPK cell integrity signaling in fission yeast. Mol Biol Cell. 2010 21(4):674-685.
- 11) Yang, J., Yoshida, R., Kariya, Y., Zhang, X., Hashiguchi, S., Nakashima, T., Suda, Y., Takada, A., Ito, Y.\*, and Sugimura, K., Characterization of human single-chain antibodies against highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: mimotope and neutralizing activity, Journal of biochemistry, 148, 507-515 (2010)
- 12) 橋口 周平, 伊東祐二, 田中孝一, 松木園美穂, 村岡賢, 杉村和久, フェージディスプレイ Beyond antibody:~抗体様分子による分子標的~, 生化学, 82, 710-726 (2010)

## 2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ: 抗体医薬品の品質・安全性評価の新潮流. 日本学術会議シンポジウムバイオ医薬品の新たな潮流. (2011, 1, 21) 東京
- 2) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 中澤志織: 創薬におけるグライコミクスアプローチ. 創薬を加速する次世代プロテオミクスの多面的アプローチ. 日本薬学会第 131 年会 (2011, 3, 28-31) 静岡
- 3) 小林 哲, 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 川崎ナナ: 表面プラズモン共鳴法を用いた抗体医薬品と新生児型 Fc 受容体 (FcRn) との結合親和性試験法の策定について. 日本薬学会第 131 年会 (2011, 3, 28-31) 静岡
- 4) 原園 景, 橋井 則貴, 川崎 ナナ: 抗体医薬品の糖鎖プロファイリング法としての 2-アミノベンズアミド誘導体化及び順相 HPLC 蛍光検出法の検討. 日本薬学会第 131 年会 (2011, 3, 28-31) 静岡
- 5) Shingo Niimi, Japanese Perspective on Impurities and Identification of Monoclonal Antibody Products, USP Sponsered Workshop at the 2010 AAPS-PSWC Meeting Impurities, Adulteration and the Changing Role of USP in Global Drug Quality (2010. 11) (New Orleans)
- 6) B. K. Kor, M. Matsumoto, M. Kinoshita, K. Kakehi, T. Hayakawa, Permethylation of 2-AA labeled N-glycans and its application to HPLC-MS analysis. The 25th International Carbohydrate Symposium (2010, 8) 千葉
- 7) 仲西暁良, 佐藤葵, 木下充弘, 森山博由, 早川堯夫, 掛樋一晃, キャピラリー電気泳動を用いる糖鎖を指標とする細胞評価法 - 再生医療実用化に向けた基礎検討 - 第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (2010,11) 岐阜
- 8) 仲西暁良, 佐藤葵, 木下充弘, 早川堯夫, 掛樋一晃, 糖鎖を指標とする細胞の個性解析 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010, 12) 兵庫
- 9) Ito Y, Selections of cell-specific antibodies and Ig-specific peptides by phage display: their potentials for clinical and industrial uses. 2010 KSBB (Korean Society for Biotechnology and Bopscience) Spring Meeting and International Symposium, April 16, 2010, Seoul, Korea.
- 10) 畠中 孝彰, 梶 幸也香, 坂元 孝太郎, 有馬 一成, 伊東 祐二, IgG 特異的結合ペプチドを用いたヒト血清からの抗体精製法の検討 第 10 回日本蛋白質科学会 (2010, 6) 札幌
- 11) 畠中孝彰, 梶幸也香, 有馬一成, 伊東祐二, IgG 結合ペプチドによる抗体精製システムの構築の試み 日本生化学会九州支部例会 (2010, 5) 鹿児島
- 12) 塚本翔悟, 畠中孝彰, 有馬一成, 伊東祐二, 高機能性低分子化抗体の単離を目指した T7 フェージによる抗体ライブラリの構築 日本生化学会九州支部例会 (2010, 5) 鹿児島
- 13) 畠中孝彰, 梶幸也香, 杉田良平, 塚本翔悟, 有馬一成, 伊東祐二, BIAcore T100 による T7 フェージ上に提示された特異ペプチドとヒト抗体との相互作用解析 BIA Symposium 2010 (2010, 7) 東京

(他 18 演題)

## 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

表1. 各機関にて抗体制剤を分析して得られた糖鎖プロファイル

Lab.	Peak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	Average	2.80	8.62	0.88	100.00	14.47	11.08	112.63	33.23	3.48	44.30	2.45	5.25	0.99	2.10	0.58
	SD <sub>ave</sub>	0.02	0.05	0.04		0.11	0.10	0.67	0.14	0.08	0.41	0.06	0.09	0.05	0.05	0.05
B	Average	3.15	8.80	2.14	100.00	16.60	10.88	109.44	39.42	3.36	42.96	2.49	5.29	0.94	2.08	0.50
	SD <sub>ave</sub>	0.14	0.13	0.86		1.05	0.06	1.07	5.26	0.08	0.43	0.13	0.15	0.03	0.08	0.03
C	Average	3.06	8.67	0.86	100.00	14.70	10.80	110.32	31.87	3.25	42.75	2.45	5.25	1.01	2.00	0.54
	SD <sub>ave</sub>	0.09	0.12	0.06		0.37	0.10	0.36	0.34	0.02	0.22	0.05	0.03	0.06	0.04	0.02
D <sup>a</sup>	Average	2.98	8.59	-	100.00	19.72	10.89	113.72	38.99	3.04	46.07	2.22	5.27	0.77	2.00	0.57
	SD <sub>ave</sub>	0.18	0.58	-		2.84	0.58	5.24	3.47	0.17	1.43	0.13	0.46	0.06	0.17	0.08
E	Average	3.23	8.91	0.93	100.00	15.52	10.84	107.63	30.91	3.07	40.70	2.20	4.80	0.86	1.84	0.47
	SD <sub>ave</sub>	0.13	0.16	0.10		0.44	0.18	0.55	0.66	0.04	0.34	0.10	0.03	0.03	0.05	0.03
F	Average	2.92	8.67	0.88	100.00	13.62	10.60	109.36	30.97	2.96	42.36	2.39	5.09	0.91	1.94	0.52
	SD <sub>ave</sub>	0.06	0.13	0.05		0.40	0.09	0.97	0.43	0.12	1.04	0.05	0.25	0.06	0.16	0.06
G <sup>b</sup>	Average	3.90	12.88	-	100.00	13.80	9.28	84.32	27.65	2.68	37.93	2.13	5.11	1.12	2.09	0.52
	SD <sub>ave</sub>	0.11	1.42	-		0.77	0.24	2.15	1.63	0.09	1.16	0.11	0.18	0.10	0.12	0.05
H	Average	3.10	8.79	1.79	100.00	16.60	10.90	111.59	34.41	3.30	44.67	2.41	5.38	0.80	2.13	0.52
	SD <sub>ave</sub>	0.13	0.50	0.19		0.37	0.19	1.13	0.62	0.12	0.76	0.10	0.23	0.09	0.09	0.03
I	Average	2.70	8.55	1.02	100.00	13.91	10.78	109.95	32.68	3.15	42.97	2.47	5.29	0.94	2.02	0.53
	SD <sub>ave</sub>	0.03	0.10	0.09		0.08	0.05	0.80	0.14	0.10	0.37	0.04	0.04	0.03	0.03	0.01
J <sup>c</sup>	Average <sub>total</sub>	2.99	8.70	1.21	100.00	15.64	10.85	110.58	34.06	3.20	43.35	2.39	5.20	0.90	2.01	0.53
	SD <sub>I</sub>	0.05	0.05	0.09		0.58	0.01	2.86	1.79	0.05	0.30	0.11	0.20	0.09	0.02	0.02
	SD <sub>R</sub>	0.27	0.43	0.63		3.11	0.57	7.98	6.49	0.49	4.97	0.44	0.52	0.36	0.39	0.13
J <sup>c</sup> (height)	Average	2.94	8.61	0.89	100.00	14.58	10.78	111.79	32.44	3.16	45.72	1.90	4.62	0.84	2.08	0.44
	SD <sub>ave</sub>	0.08	0.19	0.06		0.26	0.09	1.04	0.29	0.02	0.44	0.02	0.07	0.05	0.04	0.04
J <sup>c</sup> (area)	Average	3.19	8.79	0.97	100.00	14.82	11.63	114.44	33.57	3.96	50.99	3.45	6.58	1.11	2.23	0.52
	SD <sub>ave</sub>	0.16	0.33	0.15		0.10	0.19	0.22	0.09	0.10	0.37	0.06	0.05	0.02	0.03	0.02

Average<sub>total</sub>: average of all measurements from all labs except G; SD<sub>ave</sub>: SD of all measurements in each lab; SD<sub>I</sub>: intermediate precision; SD<sub>R</sub>: reproducibility

<sup>a</sup>他の機関よりグラジエント時間が5分間長い。

<sup>b</sup>機関Gのデータは、プロファイルに差が認められたことから統計処理から除外した。

<sup>c</sup>UPLCを用いた。

## 天然物医薬品の評価手法と標準化に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部  
研究者 合田 幸広

研究要旨 標準化を指向した品質評価法として、遺伝子鑑別、<sup>1</sup>H-NMR メタボローム解析、LC/MS プロファイル分析、NO 産生抑制、細胞運動能抑制、Tyr リン酸化の変動等各種試験法を検討、天然物医薬品に対する試験法の適性を評価すると共に、単味生薬製剤の承認基準案作成に着手した。

### 分担研究者

- (1) (株) ツムラ生薬研究部生薬研究課 近藤健児
- (2) 三栄源エフ・エフ・アイ(株)品質保証部検査課 中川 誠
- (3) 日本粉末薬品株式会社八尾工場 横倉胤夫
- (4) (株) 栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (5) (株) ウチダ和漢薬研究開発部 川崎武志
- (6) (株) 島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部バイオ臨床ビジネスユニット 白崎良成
- (7) 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野教授 水上 元
- (8) 富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野教授 小松かつ子
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 袴塚高志
- (10) エスエス製薬株式会社成田研究所・製剤開発研究部分析研究課 廣田浩之
- (11) アサヒフードアンドヘルスケア株式会社学術技術部 松本一浩
- (12) 興和株式会社医薬事業部薬粧開発部 小泉裕久
- (13) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課 木村博明
- (14) ゼリア新薬工業株式会社中央研究所コンシューマヘルスケア研究部 小林正治郎
- (15) 大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所分析研究室 日向野太郎
- (16) 慶應義塾大学薬学部教授 木内文之
- (17) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官 日向昌司
- (18) 大正製薬株式会社医薬事業グループ医薬化学研究所 濱口卓也
- (19) 北里大学東洋医学総合研究所所長 花輪壽彦

### A. 研究目的

天然物医薬品は、合成品と違い、医薬品としての規格化・標準化が困難で、現代科学の水準に照

らして、再現性の良い医療を行い、医薬品として新効能等を取得する為の品質規格条件が明確ではない。本研究では、産官学の研究者が共同で、現代科学の水準に基づき、分子生物学、植物化学、分析化学的な手法を組み合わせながら、生薬、西洋ハーブ、漢方処方等の天然物医薬品について、標準化を指向した品質評価手法の確立をはかることを目的とする。

### B. 研究方法

〈生薬の品質評価手法と標準化に関する研究〉

#### B-1. 党参

党参はキキョウ科の *Codonopsis pilosula*, *C. pilosula* var. *modesta*, *C. tangshen* などの根に由来する生薬である。天然物医薬品の品質確保の基本は、正しい基原の原材料を使用することであることから、本研究では、*Codonopsis* 属植物の遺伝子多型に基づく同定法を開発する。実験材料としては、中国で収集、確保した *C. tangshen* 52 検体、*C. pilosula* 39 検体、*C. pilosula* var. *modesta* 12 検体、*Codonopsis* sp. 4 検体及び、生薬党参 43 市場品 77 検体を用いた。各検体の葉または根から全 DNA を抽出し、これを鋳型にして核 ITS 領域を PCR 法で増幅した。

#### B-2. 半夏及び天南星

半夏及び天南星は、共にサトイモ科 (Araceae) 植物を基原とし、半夏は、カラスビシャク *Pinellia ternata*、天南星は、マイヅルテンナンショウ *Arisaema heterophyllum*, *A. erubescens*, *A. pedatisecta* (Syn.: *Pinellia pedatisecta*) 及び *A. amurense* のコルク層を除いた塊茎であると、日本薬局方及び日本薬局方外生薬規格においてそれぞれ規定されている。しかしながら、両者の中には、外観及び性状が類似するものがある上、特徴的な成分が乏しいことから、形態及び理化学試験による鑑別が難しく、しばしば誤用される。このため、日本薬局方では、半夏の *Arisaema* 属植物に対する純度試験として鏡検による粘液道の確認を規定しているが、通例、半夏は、加工

調製の過程において周皮が除かれるため、粘液道の確認は、事実上困難である。このため、顕微鏡観察に代わる両者の区別方法の確立が望まれている。このような背景から、両者の成分化学的特徴による判別を目標として、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析による簡便な確認試験法及び品質評価法の検討を行った。実験材料としては、市場に流通品及び、分担研究者の所属する企業より入手した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルのデータ処理は Alice2 for Metabolome (JEOL) を用い、10~0.01ppm の範囲において、0.01ppm ごとの積分値を計測した。この時、0.01~0.01 ppm の範囲を d<sub>4</sub>-TMS のピークとし、その積分値を 100 とした。多変量解析は、Pirouette (Infometrix) を用いて計算した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータの主成分分析 (Principle Component Analysis; PCA) は、各ケミカルシフトを独立変数、積分値を従属変数とし、前処理として平均化処理を行った。また、Partial Least Square (PLS) 回帰分析では、PCA に用いた <sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータを説明変数、各試料の trnL-F IGS 配列の相同性を目的変数とした。さらに、使用した半夏及び天南星の基原植物の確認として、葉緑体 DNA trn L-F IGS 領域利用した塩基配列解析を行った。

### B-3. 晋者

シンギはマメ科 *Hedysarum polybotrys* の乾燥した根であり、中国薬典には収載されているが、日本では、自主規格しかなく、品質確保のための特異性の高い試験法が設定されていない。本研究では、類似生薬であるオウギを対照とし、オウギとシンギを明確に区別できる確認試験法の設定を目指す。試料は、分担研究者が所属する生薬メーカーの協力のもと、広く中国及び日本市場品を入手した。

### B-4. 朮類生薬の抗炎症作用

本研究に先立つ研究課題において、リボゾーム遺伝子の ITS 領域の塩基配列に基づく朮類生薬の DNA 鑑別法が開発された。この方法では、蒼朮と白朮の鑑別のみならず、その基原種の同定が可能である。本年度の研究では、DNA 鑑別法を利用して基原種のレベルまで同定した蒼朮と白朮の複数のロットの検体を用いることにより、両者の薬理作用に違いがあるかどうかを検討した。指標とするアッセイ系としては、LPS 刺激によるマウスのマクロファージ様細胞 (RAW264 細胞) の NO 産生に対する抑制をみる *in vitro* assay 系 (抗炎症作用) を用いた。さらに、各生薬の精油画分の TLC パターンを比較することにより、NO 産生抑制活性を担う成分の推定を試みた。実験材料として、蒼朮は 55 検体、白朮は 45 検体を入手して使用し

た。これらの生薬はまず PCR-RFLP 法を用いて *Atrachylodes lancea*, *A. chinensis* および白朮を鑑別し、さらに白朮については増幅産物の塩基配列を解読して *A. japonica*, *A. ovata* の鑑別を実施した。

### <西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究>

#### B-5. 西洋ハーブの品質評価

ブラックコホッシュの安定性試験では、一般用医薬品として欧州に流通する製品を現地の薬局で購入して検体とした。また、LC/MS によるプロファイル分析は、我が国で健康食品として流通する 2 製品 (A 及び B) をインターネット経由で購入して検体とした。曝光条件での安定性試験は、総照射量 60 万、120 万及び 180 万 Lux·hrs で行った。高温条件での安定性試験は、60℃で 1 週間及び 3 週間とした。試料は HPLC 分析に供し、クロマトグラフ全体のプロファイル、及びトリテルペン配糖体である 27-Deoxyactein 含量を指標に安定性を評価した。LC/MS によるプロファイル分析では、Shimadzu UFLC を接続した ThermoFisher Scientific LTTQ Orbitrap XL を用い、ESI でイオン化を行った。

#### B-6. 生薬製剤承認基準案の検討

OTC 医薬品協会の生薬製品委員会と薬制委員会の協力のもと、国立衛研において検討班会議を 3 回開催した。生薬製剤承認基準案を作成するにあたり、基準案検討の優先対象とすべき生薬を選抜し、それぞれの承認基準案策定の難易度を推定し、また、承認基準案の根拠となるエビデンスについて、検討班会議参画者で分担して、文献を検索を行い、データベースの作成を試みた。文献検索には SciFinder, J Dream II, 医中誌 web ver. 4 及び Pub Med を主に利用した。

### <抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究>

抗腫瘍活性を持つ麻黄湯、および構成生薬である麻黄をモデル医薬品とし、生体由来の医薬品あるいはバイオ医薬品の評価法やガイドラインを参考に、以下の評価法について具体的に検討した。

#### B-7. 生物学的評価法の検討

細胞増殖の測定: ヒト肝癌由来株 HuH7 細胞を用いて HGF あるいは EGF とともに各種濃度で麻黄を添加し、3 日間培養した後、MTT を用いて細胞数を測定した。

MET のチロシンリン酸化量の解析: MDA-MB-231 細胞に 50 ng/ml HGF とサンプルを含有した DMEM 培地を添加して 5 分間インキュベートした後、細胞溶解液で溶解、抗 MET 抗体で免疫沈降し、抗チロシンリ

ン酸化抗体を用いてウェスタンブロットで検出した。

キナーゼ阻害活性の測定：96種の組換えキナーゼによる合成ペプチド基質のリン酸化活性をLabChip3000で測定した。この各反応系に各種濃度の麻黄エキスを添加し、阻害活性を測定した。

抗体アレイによるリン酸化チロシンの測定：100  $\mu\text{g/ml}$  麻黄を添加培養したHuH7細胞の可溶画分をビオチン化し、リン酸化チロシン検出用抗体アレイに添加した。抗体アレイへの結合分子をCy3-ストレプトアビジンでラベルした後、Array Scannerを用いて解析した。

#### B-8. 物理化学的評価法の検討

バニリン-塩酸法：試験溶液に4%バニリン-メタノール、さらに濃塩酸を加え、遮光下、20°C、15分間インキュベートした後、500 nmの吸光度を測定した。

運動能の測定：MDA-MB-231細胞を各エキス含有DMEM培地に懸濁し、トランスウエルに添加し、24時間培養した。下部ウエルに移動した細胞数を位相差顕微鏡下でカウントして運動能とした。

(倫理面の配慮)

本研究で用いているヒト癌由来細胞株HuH7細胞およびMDA-MB-231細胞は、研究用に頒布されている細胞株で、倫理的な問題は無い。また、その他のヒト由来材料や実験動物を用いた実験は実施していない。

### C. 研究結果

#### <生薬の品質評価手法と標準化に関する研究>

##### C-1. 党参

3年間(2008年~2010年)に採集した*Codonopsis*属植物107検体のITS領域の解析の結果、*C. pilosula*には11タイプの塩基配列が見出され、その内検体数が多かった主たるタイプは4タイプであった。*C. pilosula* var. *modesta*には7タイプの塩基配列が見出され、5検体がGenBankに登録されている塩基配列(Acces. No. EF190461)をもつタイプPM-0であった。*C. tangshen*には10タイプの塩基配列が見出されたが、主なタイプは3種であった。上記の遺伝子型を示した*Codonopsis*属植物と採集地との関係をまとめると、重慶市及び湖北省採集品(62検体)のほとんどが、*C. tangshen*であった。*C. pilosula*(5検体)及び*Codonopsis* sp. (2検体)は少数で、すべて栽培品であった。

甘粛省採集品では、文県の野生品のみが*C. pilosula* var. *modesta*で、栽培品ではこれに*C. pilosula*が混ざる(1栽培地)か、またはすべて*C. pilosula*(1栽培地)であった。文県以外の甘

粛省採集品はほとんど*C. pilosula*であり、*Codonopsis* sp.が2検体見られた。

*Codonopsis* sp.とは、花の形状や子房半下位の特徴は*C. pilosula*と類似していたが、葉の形状は*C. tangshen*に類似していた植物である。

栽培地では、通常、同種でも数種類の遺伝子型が見られ、別種の混在も確認された。

党参市場品34品より各2検体ずつITS領域を解析したところ、2検体ともに同じ種に由来する市場品は21市場品であったが、同じ遺伝子型を示すものは僅かに5市場品であった。湖北省または重慶市産の党参で、同省または同市で購入したものはほとんど*C. tangshen*由来で、*C. pilosula*の混入もあった。甘粛省産の党参では、文県で購入した「紋党参」、成都市場及び南昌市場の党参に*C. pilosula* var. *modesta*の純系であるタイプPM-0が認められた。ただし、紋党参と称する別の市場品の2検体は、タイプPM-IIIとタイプT-1であった。タイプT-1は*C. tangshen*に特徴的な遺伝子型であり、本市場品は*C. pilosula* var. *modesta*と*C. tangshen*がともに存在する栽培地から生産されたものである可能性が考えられる。甘粛省産党参で、「条党」と称されるものでは、龍西産は*C. pilosula*系統のタイプP-IIであったが、岷県産は別種の純系タイプであった。PM-0とS-0であった。また、「白条党」は*C. pilosula*系統のタイプP-Vと種名不明のタイプ(RC-6)であった。このものは、122番目の塩基がT、441番目の塩基がCであり、純系と考えられたことからタイプQ-0とした。

一般に、条党(白条党)は*C. pilosula*の根、紋党参(紋党)は*C. pilosula* var. *modesta*の根であるとされているが、それらの基原については、検体毎にあたる必要がある。

山西省産党参及び山西省市場品は、*C. pilosula*系統のタイプP-0、P-1、P-IVが主であった。

全77検体(43市場品)では*C. pilosula*由来の市場品が多く、その内訳は、タイプP-1(12検体)、P-0(8検体)、P-IV(8検体)、P-II(6検体)、P-V(5検体)、P-III(3検体)などであったが、*C. pilosula* var. *modesta*由来のタイプPM-0が8検体、*C. tangshen*由来のタイプT-IIIが5検体認められた。

##### C-2. 半夏及び天南星

抽出溶媒を確認するため、 $\text{CDCl}_3$ 、 $\text{CD}_3\text{OD}$ 、 $\text{D}_2\text{O}$ を用いて抽出を行い、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した結果、 $\text{D}_2\text{O}$ 抽出時のみPCA解析可能なピークが得られた。ただし、一部のピークにおいて、試料間における化学シフトのずれが観測されたが、 $\text{D}_2\text{O}$

を利用したリン酸緩衝液を抽出溶媒とすることで解消された。次いで試料濃度を検討し、濃度と積分値の直線性を確認した。その結果、100 mg/mL で抽出時の積分値が 0.06 以上のバケツ積分値を示す範囲に関しては R<sup>2</sup> 値が 0.9 以上を示す割合が 8 割以上となり、良い直線性を示す事が分かった。そこで、各試料溶液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルをデータ処理した後、PCA により解析した。その結果、全試料は、大きく 3 つのグループに分類された。また、半夏と天南星を区別して観察した場合、半夏、天南星ともに 2 グループに分類でき、半夏の 1 グループと天南星の 1 グループは、部分的に重複していた。この時の各主成分軸の寄与率は第一主成分が 46.1 %、第二主成分が 20.6 % を示し、累積寄与率は 66.7 % だった。続いて、loading plot を詳細に観察した所、一部グループで 1.34ppm のダブルットシグナルが PCA score plot の解析結果に強い影響を与えていることが分かった。このシグナルは各種二次元 NMR スペクトルから乳酸と推定された。乳酸が多く含まれるサンプル群は輸送・保存の過程において発酵を受けている可能性があるため、この一群を除外し再解析を行った。その結果、半夏の群、A 社天南星から成る群、B 社天南星の群に分類できた。この時の loading plot から、糖由来のピークと考えられる 3.0-4.5ppm、5.24ppm および 5.42ppm の各シグナルは、第一主成分を正の方向に増加させ、一方、高磁場領域に存在する、有機酸及びアミノ酸等に由来すると推定される各ピークは、第二主成分を正の方向に増加させている事が分かった。

PCA の結果、半夏と天南星のそれぞれ 1 群ずつには分類できず、天南星が 2 グループに分類された。この違いは基原植物や産地、加工調製法などの違いに起因すると考えられたため、次に、葉緑体 DNA trn L-F IGS 領域の塩基配列解析を行い、基原植物の確認を行った。その結果、A 社の天南星は *P. pedatisecta*、B 社及び I 社のものは *Arisaema* については、各社製品から代表個体、1 検体を DNA 配列解析した結果、いずれの検体もデータベース上の *P. ternata* の配列と一致した。また、これらの DNA 配列について、近隣接合法により分子系統樹を作成した。その際、アウトグループとして *Pinellia* 属及び *Arisaema* 属植物と同じサトイモ科 *Aroideae* 亜科に属する *Ambrosina bassii* の配列を用いた。*P. pedatisecta* (*Arisaematis* type 5) と *P. ternata* (AF469023) が、同じクラスターを形成し、また、*Arisaema* spp. (*Arisaematis* types 1-4) もまた、

別の単一クラスターを形成し、属レベルで、形態学的な分類と一致する分離パターンを示した。

上記 DNA 配列解析の結果から、PCA により 2 グループに分類された天南星は、基原植物の違いを示していることが確認された。従って、成分組成と DNA 配列に相関があるのではと推定し、塩基配列相同性を目的変数とした PLS 判別モデルの構築を試みた。相同性を計算する上で基準とする配列は、分子系統樹において端に位置するものを選ぶと直線的に相同性が求められると考え、A 社天南星 (*Arisaematis* type 5) の DNA 配列を基準とし、この配列との相同性を目的変数とした。全試料について <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、PLS 回帰計算を行った。この時、前処理として平均化処理を行い、さらに回帰直線の質を向上させるため、直交シグナル補正 (OSC: Orthogonal Signal Correction) を用い、相関のない変数を除去した。最適ファクター数はクロスバリデーションを利用して検証を行い、8 と決定した。この時、重決定係数 (R<sup>2</sup>) は 0.9990 であり、非常に良い直線性が得られた。次に、判別モデルの予測性能を確認するため test set, training set を設定し PLS 回帰直線を作成し、test set の予測を試みたところ、良好な結果が得られた。

### C-3. 晋耆

実験材料とした 31 個体について外観 (形状) と鏡検による鑑別を試みた結果、シュウ酸カルシウムの結晶細胞列を確認することで 29 個体については、*Hedysarum* 属植物を基原とするものと考えられた。また残り 2 個体は、*Astragalus* 属植物を基原とするものと考えられたが、詳細については、TLC や HPLC による成分組成の比較、含有成分の確認等が必要であることが判明した。そこで TLC 試験法について検討した結果、以下の方法で、オウギと鑑別できることが判明した。

試料粉末 1 g をとり、メタノール 20 mL を加えて 10 分間還流抽出する。冷後、ろ過し、ろ液を濃縮乾固する。これに水 20 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を加えて分配した後、ジエチルエーテル層をとり、水浴上で蒸発乾固する。これにメタノール 1 mL を加えて溶かし、試料溶液とする。試料溶液 20  $\mu$ L をシリカゲル薄層板にスポットし、ヘキサン/2-ブタノン/ギ酸混液 (60:40:1) で 10 cm 展開する。薄層板を風乾した後、紫外線 (主波長 254 nm 又は 365 nm) を照射して検出した後、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧し、105°C で 3 分間加熱して検出する。

本試験法では、バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧、加熱後、オウギで Rf 値 0.33 に特徴的

な赤色スポットが検出される一方、シンギからはこれに対応するスポットは認められなかった。他方、噴霧用バニリン・硫酸・エタノール試液を噴霧、加熱後、Rf 値 0.41 の特徴的な赤色スポットは、シンギのみに出現した。そこで、後者のスポットについて、単離構造決定を行ったところ、プレオカルパンである Medicarpin であることが明らかになった。

#### C-4. 朮類生薬の抗炎症作用

蒼朮 55 検体について、PCR-RFLP 法によって基原の鑑別を実施し、交雑種を排除した。次いで、入手した朮類生薬のうち蒼朮 41 検体 (*A. lancea* 16 検体, *A. chinensis* 25 検体) および白朮 44 検体 (*A. ovata* 9 検体, *A. japonica* 34 検体) からメタノールエキスを調製し、NO 産生抑制作用 (抗炎症作用) を RAW264.7 細胞を用いて検討した。添加濃度を 250 µg/mL とし、各生薬の NO 産生抑制活性を調べたところ、蒼朮、白朮ともに検体によってその効果は大きなバラツキを示したが、阻害率の平均値は蒼朮が  $47 \pm 22\%$ 、白朮が  $47 \pm 20\%$  と全く差が無かった。次に、このデータを基原種別にして比較したところ、蒼朮では *A. lancea* を基原とするものが  $42 \pm 27\%$ 、*A. chinensis* を基原とするものでは  $49 \pm 19\%$  であり、基原種による差は認められなかった。一方、白朮では *A. japonica* を基原とする和朮は  $54 \pm 16\%$ 、*A. ovata* を基原とする唐朮は  $21 \pm 9\%$  となり、唐朮の NO 産生抑制活性は蒼朮、和朮に比較して有意に低いことが明らかになった。蒼朮のうち *A. lancea* を基原とすることが確認された 16 検体について、日本薬局方の方法に準拠して精油成分の TLC 分析を実施し、そのパターンと NO 産生の抑制作用を比較した。その結果、NO 産生抑制作用の強さは、おおむねヘキササン抽出物中のヒネソールおよび  $\beta$ -オイデスモノールに相当するスポットの大きさと相関し、これらの精油成分の作用によるものであることが示唆された。

<西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究>

#### C-5. 西洋ハーブの品質評価

ブラックコホッシュ曝光条件では、総照射量 180 万 Lux·hrs 条件でもクロマトグラフ全体のプロファイル及び 27-Deoxyactein 含量に変化は確認されなかった。一方、高温条件では、60°C 3 週間において 27-Deoxyactein 含量が初期値に対して約 10% 低下していた。ついで、LC/MS によるプロファイル分析を行った。本年度は、LC/MS 分析で得られるクロマトグラフピークを多変量解析するための予備実験として、2 種の製品について

ピークプロファイルを比較し、可能な限りピークの同定を行った。製品 A では、約 150 成分が観測された。得られたマススペクトルの精密質量情報から組成推定を行ったが、欧州薬局方において指標成分に規定されているトリテルペン配糖体 27-Deoxyactein は検出されなかった。一方、製品 B についても同様な解析作業を行ったところ、約 70 成分が観測され得られたマススペクトルの精密質量情報による組成推定から、27-Deoxyactein 及び Cimigenoside 等の 7 つの既知なブラックコホッシュ特徴的成分を検出された。また約 50 成分について、上記の既知成分の組成から、水素付加、水付加、糖導入等の有機化学的に無理の無い変換で説明できる成分であった。製品 A 及び B から検出されたピークを、LC の保持時間、MS のプリカーサー質量及びプロダクトイオン質量を基に比較検討したところ、共通するものは 45 成分であった。

ブラックコホッシュ以外に、3 品目の西洋ハーブについて良好な研究成果を得ているが、承認申請との関係において現時点では公表ができない。そのうち 1 ハーブでは、欧州で一般用医薬品として流通する製品の原料エキス 15 ロットについて TLC 及び HPLC による成分プロファイル分析を行い、高度に一定品質が確保されていることを確認し、2 番目のハーブでは、同様に欧州で一般用医薬品として流通している製品 6 ロットに対して、ガスクロマトグラフィー分析を行い、指標成分 10 成分が欧州薬局方の規格範囲内であることを確認した。さらに、3 品目目では、これまでの研究で構築された PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法を、欧州より導入を考えている西洋ハーブの原材料植物に適用し、正しい基原植物であることを確認している。

#### C-6. 生薬製剤承認基準案の検討

検討班での議論に基づき、文献収集は班員各自がデータベースにアクセスして行うこととし、有効性及び安全性のエビデンスとして有用な臨床試験及び薬理実験に関する文献を優先的に集め、品質規格の参考エビデンスとして成分研究及び分析研究も収集することとした。英語及び日本語で記載された文献のみを扱い、その他の言語による論文は書誌情報のみを得た。報告書式は統一し、一般的情報としてデータベース通し番号、生薬別通し番号、文献タイトル (原文および和文)、著者、筆頭著者、筆頭著者所属、雑誌情報、記載言語、研究種別 (臨床試験、薬理実験、成分研究及び分析研究)、要旨、特記事項・備考を集め、それぞれの研究種別に特化した欄には、例えば臨床

研究であれば、エビデンスレベル、対象人種、評価項目、薬効分類、評価検体、方法、結果、特記事項・備考を記載するための枠組みを作成して共有した。

探索対象の生薬はいずれも公定書収載品目であり、このうち局方手引き収載の生薬として、ウワウルシ、キササゲ、ケイヒ、コウカ、コウジン、サンキライ及びボウイが選択され、局方手引き未収載であるが個別の承認前例がある生薬として、オウギ、オンジ及びシンイ、そして、局方手引き未収載で個別の承認前例も無いアセンヤクが選択された。調査の結果、安全性及び有効性に関する根拠の蓄積具合が生薬毎に大きく異なることが明らかとなった。なお、収集したエビデンスデータに若干の追加・修正を加えた後、平成 23 年度にデータ冊子を作成する予定である。

〈抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究〉

#### C-7. 生物学的評価法の具体的検討

予備的検討が完了していた、細胞運動、細胞増殖、MET のリン酸化については、評価法としての検討を実施した。また、特性解析として、リン酸化に着目した解析を行った。

##### C-7.1 細胞の運動能抑制を指標とした評価法

ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞の運動能は、HGF の添加濃度依存的に誘導され、この運動能は麻黄湯によって抑制された。また、この抑制活性は構成生薬である麻黄によるものであることが明らかとなった。活性は麻黄の添加濃度依存的に有意に低下し、 $IC_{50}$  は 23  $\mu\text{g/ml}$  程度であった。確認試験として応用可能であると考えられた。留意点として、細胞毒性によるシュードポジティブの有無の確認が考えられた。

##### C-7.2 細胞の増殖抑制を指標とした評価法

麻黄による細胞増殖抑制活性を測定するために、20 ng/ml HGF あるいは 20 ng/ml EGF とともに各種濃度で麻黄を添加しアッセイを行った結果、いずれも濃度依存的に細胞増殖を抑制することが明らかとなった。また、 $IC_{50}$  を算は、HGF で 70  $\mu\text{g/ml}$ 、EGF で 130  $\mu\text{g/ml}$  であり確認試験、あるいは力価試験として応用可能であると考えられた。

##### C-7.3 MET のチロシンリン酸化抑制を指標とした評価法

MDA-MB-231 細胞は、50 ng/ml HGF と 5 分間インキュベーションすると MET がリン酸化されるが、10-40  $\mu\text{g/ml}$  の麻黄エキスを添加すると、いずれの濃度でも MET のリン酸化は完全に抑制された。検出はウェスタンブロット法を用いたが、定量性

に欠けるが特異性が高いことから、確認試験に適していると考えられた。

##### C-7.4 キナーゼ活性を指標とした特性解析

麻黄 (0.05, 0.5, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いて、96 種のキナーゼに対する阻害効果を解析した結果、特異性は高くなく、多種類のキナーゼの阻害活性が確認された。その中でも高感受性のキナーゼとしては、脳特異的キナーゼ BRSK1/2 が最も高く、オーロラキナーゼの AurA/B、MAPK 系のキナーゼ群であった。一方、PKC $\tau$  を除く全ての PKC に対しては活性化作用を示し、Fyn, Lyn, Lck といったチロシンキナーゼ群に対しては全く影響を与えないことが明らかとなった。特性解析として有用であるが、インビトロ試験であるため、検証が課題となった。

##### C-7.5 リン酸化チロシンを指標とした特性解析

細胞増殖因子のレセプターやその下流のシグナルに關与する分子のチロシンのリン酸化部位 228 か所を検出する抗体アレイを用いて麻黄の添加によるリン酸化の変動を解析した結果、すでにリン酸化が抑制されることが明らかとなっていた MET を含め、KIT, PDGFR, FGFR, TIE2, FLT3, EGFR などのチロシンのリン酸化も抑制されることが明らかとなった。リン酸化の特性解析として有用であるが、評価法の設定に向け、検証が課題となった。

#### C-8. 物理化学的評価法の具体的検討

麻黄に含まれるプロアントシアニジンが、抗腫瘍活性を担っている可能性に着目し、プロアントシアニジン類のうちダイマーであるプロシアニジン A2 およびプロシアニジン B2 を用いて、HGF により誘導される癌細胞の運動抑制効果を解析した結果、いずれも癌細胞の運動能を有意に低下させた。プロアントシアニジン類は麻黄と同様に運動能を抑制する活性があることが示唆され、麻黄中の活性成分のひとつはプロアントシアニジン類である可能性がある。そこで、バニリン-塩酸法を用いて麻黄中のプロアントシアニジン類の定量を行った結果、約 11%であることが明らかとなった。

#### D. 考察

〈生薬の品質評価手法と標準化に関する研究〉

##### D-1. 党参

*Codonopsis* 属 2 種 1 変種で見出された塩基配列を整理すると、分類に重要な塩基として、122 番目、226 番目、441 番目、489 番目の塩基が見出された。*C. pilosula* の遺伝子型を考えると、同種でみられた 6 種のタイプ P-0, P-I, P-II, P-III,

P-IV, P-V の成因は、純系のタイプ P-0 と、122 番目が T かつ 226 番目が T であるタイプ S-0、または 122 番目が T かつ 441 番目が C であるタイプ Q-0 とが交雑して生じた可能性が高い。さらに、489 番目が Y であるタイプでは *C. tangshen* との交雑も考えられた。*C. pilosula* var. *modesta* は多くがタイプ PM-0 であったが、稀にタイプ S-0、Q-0 または *C. tangshen* のタイプ T-I が関与したと考えられる 226 番目、441 番目または 489 番目の塩基が Y に置換したタイプも認められた。*C. tangshen* はタイプ T-I, T-II, T-III がほぼ同程度認められた。これらは、上記 4 箇所の塩基配列が TCTC であったが、134 番目の塩基のみが異なっていた。タイプ T-III は R (G/A) であったことから、タイプ T-I と T-II の交雑によって生じたものと考えられた。なお、タイプ T-1' は 489 番目の塩基が Y であり、*C. tangshen* と *C. pilosula* の交雑によって生じたものと考えられ、この植物の形態がどちらの種に類似するかによって、*C. tangshen* と、*C. pilosula* と同定されたものと考えられた。

党参市場品のみに見出された 9 タイプの遺伝子型については、上記で述べた 4 箇所の塩基配列の原則からは同定できなかつたものである。34 市場品では各 2 検体について遺伝子解析を行ったが、同じ遺伝子型を示すものは少数であり、同種の別タイプの遺伝子型や、さらには別種の遺伝子型を示した。この原因として、湖北省、重慶市及び甘粛省の栽培地においても、栽培植物は同型のものが少なく、遺伝子多型が見られていたことから、それが市場品に反映された結果であろう。また、別種遺伝子の組み合わせから、栽培地では *Codonopsis* 属植物 2 種 1 変種間で交雑が行われている可能性が考えられた。また、植物を栽培するための種子の段階で、様々なものが混在した可能性も考えられる。

#### D-2. 半夏及び天南星

今回、半夏および天南星の <sup>1</sup>H-NMR データを利用したメタボローム解析による判別を試みた。

抽出溶媒の検討においては、比較した 3 溶媒の中で、D<sub>2</sub>O を用いた場合が最も多くの成分情報が得られることが明らかとなった。漢方処方の中には、湯剤であることを考えると、D<sub>2</sub>O エキスで良好なプロファイリング分析が出来たことは、生薬及び漢方処方の標準化を目指す上で、より実践的であり、好ましい結果であると思われる。続いて行った PCA では、半夏の中に、乳酸を多量に含む試料群が見出された。乳酸生成の経路としては、嫌氣的発酵や付着菌によるものが先ず疑われる

ため、真空包装の是非や保管方法のあり方等について、検討が必要であり得る。乳酸を多く含むサンプルを除いた試料群による PCA では、3 つの群が観測され、DNA 配列の解析結果からこれらのグループ分離は、基原植物の違いを反映していることが明らかになった。天南星の基原植物としては、*Arisaema* 属植物 3 種と、*Pinellia pedatisecta* が局外生規で規定されているが、*Pinellia pedatisecta* を基原とする天南星は、*Arisaema* 属植物を基原とするものと、少なくとも今回の評価系において、明確に異なるプロファイルを示す事が明らかになった。局外生規は現在、改訂作業が始められており、今回の結果を契機に、*P. pedatisecta* を天南星の基原植物とすることの是非について議論を進めるべきである。

次に、基原植物の違いを基にした PLS 回帰モデルを作成し、半夏と天南星の判別が可能か確認した。今回作成した回帰直線モデルは、重決定係数 (R<sup>2</sup>) 0.9990 と非常に良い直線性が得られ、*Arisaema* 属植物基原の天南星、半夏、および *P. pedatisecta* 基原の天南星をそれぞれ、良好に区別可能であった。また、その予測性能を確認するため、数サンプルを test set として除外し、その他の試料を training set とし PLS 回帰直線を作成し、test set の予測を行った。その結果、良好な結果が得られたため、予測性能も十分であると言える。

今回の結果から、成分情報の多変量解析が生薬の品質の同等性評価の有力な手段となり得ると考えられた。今後は、LC-MS など、NMR とは別の成分情報にも範囲を広げ検討を行うとともに、同等性評価のための指標成分の同定を目指した研究を指向すべきと思われる。

#### D-3. 晋耆

今回試験に使用したサンプルは、いずれも中国において主要な産地の生薬を使用しており、品質も安定し日本の流通においても中心を占めている。今後は産出量の少ない他のマイナーな産地の生薬についても同様の結果が得られるか、更に広範な検討が必要と考えられる。

#### D-4. 朮類生薬の抗炎症作用

本研究では、研究班によって開発された DNA 鑑別法を用いて、基原種のレベルまで同定された蒼朮と白朮を用い、またできるだけ多数の検体について活性を測定することにより、蒼朮と白朮の薬理作用の違いにアプローチすることとした。マクロファージ由来の細胞株の LPS 処理による NO 産生の誘導に対する抑制作用を蒼朮、白朮のメタノールエキスをを用いて比較した。蒼朮と白朮間で比

較したときには両者の作用の強さに差はなかったが、基原種ごとに比較したときは、唐白朮(*A. ovata*)は和白朮、蒼朮と比較して有意に低い活性を示した。これらの生薬にはマクロファージ様細胞の NO 産生を抑制する活性(抗炎症活性)化合物(群)が含有されており、その含量は *A. ovata* では他と比べて低いことを示唆している。さらに、半定量的分析より、これらの活性は精油成分であるヒネソールおよび $\beta$ -オイデスマールに起因しているものと考えられた。

<西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究>

#### D-5. 西洋ハーブの品質評価

これまでの検討において、医薬品あるいは健康食品として流通するブラックコホシユ製品について崩壊試験を行ったところ、健康食品の中には日本薬局方で規定される時間内に水中で全く崩壊しないものが観察された。一方、医薬品はすべて規定時間内に崩壊した。今回、医薬品として流通するブラックコホシユ製品について曝光条件及び高温条件での安定性試験を行ったところ、総照射量 180 万 Lux $\cdot$ hrs の曝光条件には安定であったが、60 $^{\circ}$ C 3 週間の高温条件ではわずかに成分の減少が観察された。今後、健康食品として流通するブラックコホシユ製品に関しても、その安定性について検討する必要がある。また、将来的に医薬品及び健康食品として流通するブラックコホシユ製品を一斉に LC/MS 解析し、そのクロマトをもとに変数解析を行い、製品の品質評価への適用を検討する予定であるが、その予備実験を兼ねてブラックコホシユ製品 2 品目について LC/MS による精密なプロファイル分析を行ったところ、欧州薬局方において指標成分に規定されているトリテルペン配糖体 27-Deoxyactein が一方の製品には検出されなかった。約 70 本観測されたクロマトピークのうち、45 本までが共通であることは近縁植物の誤用と推測された。今後、多くのブラックコホシユ製品を LC/MS 解析に供し、ブラックコホシユ製品としてのバラつきを可視化すると共に、基原の異なる植物に由来する製品と識別する方法として展開したいと考えている。

#### D-6. 生薬製剤承認基準案の検討

生薬製剤承認基準の作成を将来的な目標として、承認基準案に記載すべき生薬のリストアップを試みた。天然物由来の生薬は、季節や土地による成分の量的質的なバラつき、濃度の低い化合物が大量に含有されることによる定量分析の難しさ、等を勘案する必要がある、またそれぞれの生薬において事情が異なるため、どのようにして、

そしてどこまで標準化できるか一律の方策を設定し得ない。このため、それぞれの生薬の状況を把握するところから開始せざるを得ず、有効性及び安全性を保証する臨床試験あるいは薬理研究の文献、及び品質保証を容易にする成分研究及び分析研究に関する文献について個別に検討することにした。予想通り、生薬によってエビデンスの蓄積具合は異なり、しかも一様に決定的なエビデンスを欠くため、生薬製剤承認基準としてどのレベルまで要求できるか生薬毎に見極めることが重要となり、個々の生薬の状況に即した承認審査ガイドラインを作成する必要があると思われる。

<抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究>

#### D-7. 生物学的評価法の具体的検討

##### D-7.1 細胞の応答能を指標とした評価法

細胞運動、細胞増殖、いずれも試験法として有用であると考えられた。今後、ロット分析や活性分画の解析を踏まえ、設定を判断する必要がある。

##### D-7.2 網羅的手法を用いた特性解析

多成分系の作用機構を探ることは容易でない。他方、近年確立されつつある様々な網羅的な解析手法は、その結果だけですべてを解明することは望めないが、詳細に解析すべき候補分子を客観的に炙り出すことが出来る優れた方法であることが確認できた。次年度は、本年度得られた結果を踏まえ、個別の検証を実施する予定である。

#### D-8. 物理化学的評価法

これまで、麻黄の薬理効果はエフェドリンなどのアルカロイドの作用が重要であると考えられており、事実、日本薬局方における麻黄の規格ではエフェドリン類を 0.7%以上含有することとされている。本研究では、麻黄にプロアントシアニジンが 11%含まれていることが明らかになった。今後、麻黄のプロアントシアニン類の構造と生理活性を明らかにし、プロアントシアニジン含量と生物学的評価法の結果の相関について慎重に解析する必要がある。

#### E. 結論

<生薬の品質評価手法と標準化に関する研究>

##### E-1. 党参

3 年間で収集した植物材料 107 検体、生薬材料 77 検体について、ITS 領域の塩基配列を検討した結果、*C. pilosula*, *C. pilosula* var. *modesta* 及び *C. tangshen* の分類では、上流から、122 番目、226 番目、441 番目、489 番目の塩基に着目す

ればよいことが分かった。 *C. pilosula* では、純系のタイプ P-0 のほか、他系統との交雑によると考えられる P-I, II, III, IV が多く認められた。さらに *C. tangshen* との交雑を示唆されるタイプもあった。 *C. pilosula* var. *modesta* では純系のタイプ PM-0 が主流であった。 *C. tangshen* には 134 番目の塩基が異なる純系のタイプ T-I と T-II が存在し、それらの交雑に由来すると考えられる T-III を含めてこれら 3 タイプが流通していた。市場品の遺伝子型は均一のものが少なく、栽培地における栽培植物の遺伝子多型を反映する結果であった。

#### E-2. 半夏及び天南星

成分情報のオミクス解析による生薬の品質評価及び標準化を検討するため、半夏及び天南星の D<sub>2</sub>O エキスについて、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析を行うとともに、DNA 配列解析による基原植物の鑑別を行った。DNA 配列の相同性を目的変数とし、OSC フィルタリングを適用した PLS 回帰分析を行った結果、重決定係数 (R<sup>2</sup>) 0.9990 という非常に良い直線性を示す回帰直線が得られた。また、今回 <sup>1</sup>H-NMR データを利用した回帰直線から、半夏及び天南星の基原植物が予測できたことから化学成分的観点からの半夏と天南星の判別は可能だと考えられる。

#### E-3. 普耆

日本薬局方では、オウギの純度試験 (1) としてシンギが含まれる *Hedysarum* 属植物を鏡検により区別する方法が規定されている。即ち、生薬の縦切片を鏡検し、繊維束の外辺にシュウ酸 Ca の単晶を含む結晶細胞列を認めないことを確認する。本研究で設定した確認試験法は、オウギに含まれずシンギに含まれる成分として既に報告されている Medicarpin を指標とした簡便な方法であり、シンギの確認試験法として有用であるだけでなく、オウギの純度試験として鏡検による判定を補完する手段になり得る。

#### E-4. 朮類生薬の抗炎症作用

基原種同定された試料エキスを調製、マクロファージ由来細胞株の LPS 処理による NO 産生誘導に対する抑制作用を調べた結果、唐白朮は和白朮、蒼朮と比較して有意に低い活性を示した。本結果と蒼朮試料の TLC 分析結果を比較した結果、蒼朮の NO 産生抑制作用は、精油成分であるヒネソールおよび β-オイゲノールに起因していることが示唆された。

<西洋ハーブの品質評価と天然物医薬品の標準化に関する研究>

#### E-5. 西洋ハーブの品質評価

今回、医薬品として流通するブラックコホシユについて安定性試験を行ったところ、概ね良好な状況であった。一方、ブラックコホシユ健康食品の LC/MS によるプロファイル分析から、近縁植物の誤用を推測させる結果を得た。

#### E-6. 生薬製剤の承認基準案の検討

生薬製剤承認基準案策定の基盤整備として、単味生薬としての承認が望まれる 11 の生薬について、その有効性及び安全性を保証するエビデンスの収集を行った。漢方処方と異なり、エビデンスは一様に弱いものであったが、それを認識した上で、それぞれの生薬について個別の対応が必要と思われる。今年度の検討過程を俯瞰して、今後の検討班の基本方針は以下のものであるべきと思われる。現代の生活環境、社会構造、疾病構造を鑑みて、「局方手引きの生薬関連部分」の見直しを行ない、生薬製剤承認審査基準の原案を策定する。また、具体的な手順は下の通りである。1. 局方手引き既収載生薬 (35 生薬) の記載事項 (用法および用量、効能又は効果、備考) の見直し 2. 局方手引き既収載生薬における新規効能効果の検討 3. 局方手引きへの新規収載候補生薬の検討 <抗腫瘍活性を持つ天然物医薬品の評価手法に関する研究>

#### E-7. 生物学的評価法

抗腫瘍活性を有する麻黄を使用し、評価手法として、各種試験法について検討した。その結果、細胞運動能抑制および MET のチロシンリン酸化抑制を指標とした評価法は、確認試験法として、細胞増殖抑制を指標とした評価法は、確認試験法および力価試験法として有用であるものと考えられた。また、網羅的試験法は、特性解析としては有用であり、多成分系である天然物医薬品の評価法を客観的に設定する糸口を与えるものと考えられるが、引き続いての検討が必要であることが明らかとなった。

#### E-8. 物理化学的試験法

今回新たに、生物学的評価法だけではなく、物理化学的評価法も合わせて検討した結果、これまで麻黄の成分として注目されていなかったプロアントシアニジンが、活性成分である可能性が示唆された。引き続き、各種縮合型タンニン類等について、活性を検討していく必要があろう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表等

- 1) Kakigi Y., Mochizuki N., Icho T., Hakamatsuka T., Goda Y., Analysis of Terpene

- Lactones in a Ginkgo Leaf Extract by High-Performance Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 590-594 (2010).
- 2) 丸山卓郎, 近藤健児, 四柳雄一, 山本豊, 川崎武志, 司馬真央, 寺坂和祥, 山根真由, Shu Zhu, 坂田こずえ, 藤田正雄, 穂山浩, 西村直行, 小松かつ子, 水上元, 合田幸広, PCR-RFLP 法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験に対する妥当性確認試験, *生薬学雑誌*, **64**, 96-101 (2010).
  - 3) Kakigi Y., Hakamatsuka T., Goda Y., Takeshi Icho T., Mochizuki, N., Investigation of Biologically Active Components in Ginkgo Leaf Products on the Japanese Market, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, accepted.
  - 4) Bai, Y., Zhu, S., Maruyama, T., Shibata, T., Kawasaki, T., Goda, Y., Komatsu, K., "Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast trnK intron sequence." *Food Chemistry*, submitted.
2. 学会発表等
    - 1) 袴塚高志, 高橋敏, 寺崎さち子, 横田洋一, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (8) イチョウ葉製品の崩壊性について, 日本食品化学学会第 16 回総会・学術大会, 2010 年 6 月, 大阪.
    - 2) 柿木康宏, 鴨脚毅, 袴塚高志, 合田幸広, 望月直樹, イチョウ葉エキス中のフラボノイド類の網羅的分析, 日本食品化学学会第 16 回総会・学術大会, 2010 年 6 月, 大阪.
    - 3) 合田幸広, 般用医薬品承認審査合理化等検討会 (中間報告) への対応研究, 日本 OTC 医薬品協会生薬製品委員会講演会, 2010 年 6 月, 東京.
    - 4) 島戸陽太, 牧野利明, 水上元, 白朮と蒼朮の薬能の違いに関する研究-RAW264 細胞を用いた抗炎症作用の比較-, 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島.
    - 5) 何敬愉, 朱姝, 小松かつ子, 合田幸広, 党参の基原と品質に関する研究 (2) Codonopsis 属植物及び党参の ITS 領域の塩基配列について, 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島.
  - 6) 若菜大悟, 丸山卓郎, 山本豊, 合田幸広, メタボローム解析による半夏, 天南星の判別, 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島.
  - 7) 袴塚高志, 西洋ハーブの品質評価, 第 18 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 平成 22 年 11 月, 東京.
  - 8) 丸山卓郎, 半夏の基原-DNA 解析及び天南星との鑑別について, 第 26 回生薬に関する懇談会, 2010 年 12 月, 東京.
  - 9) 合田幸広, 般用医薬品承認審査合理化等検討会 (中間報告) への対応研究, 大阪家庭薬協会講演会, 2011 年 1 月, 大阪.
  - 10) 日向須美子, 日向昌司, 白石真澄, 花輪壽彦, HGF により誘導される乳癌細胞の運動能及び c-Met のチロシンリン酸化の麻黄湯による抑制, 日本薬学会第 131 年会, 平成 23 年 3 月, 静岡.
  - 11) 白石真澄, 日向須美子, 日向昌司, 花輪俊彦, ヒト乳癌細胞の c-Met 遺伝子発現に対する麻黄湯および麻黄の効果, 日本薬学会第 131 年会, 平成 23 年 3 月, 静岡.
  - 12) 袴塚高志, 遠藤明仁, 勢ノ康代, 合田幸広, 森田英利, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (9) ヒト腸内乳酸菌の遺伝子発現に及ぼすブラックコホシ健康食品の影響, 日本薬学会第 131 年会, 平成 23 年 3 月, 静岡.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
- 国際特許出願  
 国際出願番号: PCT/JP2010/055622  
 発明者: 花輪壽彦, 日向須美子, 日向昌司.  
 発明名称: 麻黄を成分とする MET 阻害剤.

## アデノウイルスベクターを駆使した薬物誘発性肝障害 モデル動物の開発

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所  
幹細胞制御プロジェクト  
研究者 水口 裕之

ラット肝癌由来細胞を利用した各種 *in vitro* 実験系において、本研究計画の妥当性ならびに有用性を証明した。また、本事業成功の鍵を握るアデノウイルスベクターの改良を行い、目的とする新規 Ad ベクターの開発に成功した。

### 研究分担者

- (1) 金沢大学医薬保健研究域薬学系 横井毅
- (2) 大阪大学大学院薬学研究科 形山和史
- (3) 小野薬品工業株式会社 松村直哉

### A. 研究目的

本研究では、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた遺伝子発現制御系を駆使して、薬物誘発性肝障害予測を可能にする簡便なモデル動物作成法の開発を行う。具体的には、(1) *in vivo* 肝臓で簡便かつ効率良く候補遺伝子の発現抑制 (ノックダウン) を達成するための RNA 干渉 (RNAi) 誘導 Ad ベクターを開発し、(2) ヒトと齧歯類の肝薬物代謝活性の種差 (ヒト << 齧歯類) をなくすために、関連酵素の高効率ノックダウンあるいは強制発現が可能な Ad ベクターを開発する。これにより、ヒトと同程度の解毒能を有するげっ歯類を簡便に作成することが可能となれば、ヒト肝における代謝的活性化による毒性発現を実験動物で再現することが可能となり、新薬開発のスピード化ならびにコスト削減につながる事が期待される。

### B. 研究方法

#### B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクタープラスミドの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。Fig. 1. (A) に示すシャトルプラスミド (pHM15-hU6/hH1 と pHM5-hU6/hH1) を作製し、目的の shRNA をコードするオリゴ DNA 配列を挿入、作製した shRNA 発現シャトルプラスミドを適切な

制限酵素で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド (pAdHM41-E3 (+)) とライゲーションを行うことにより Ad ベクタープラスミドを得た。作製した Ad ベクタープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (Qiagen) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、各 Ad ベクターを得た。常法により Ad ベクターの増殖、精製を行い、精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。また、Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech) を用いて生物学的タイターを測定した。

#### B-2. 細胞培養

ヒト肺癌由来細胞株である A549 細胞および Luciferase を恒常的に発現させた A549 細胞 (A549-Luc) は DMEM (10%FCS、抗生物質含有) を用いて、ヒト子宮頸癌由来細胞株である HeLa 細胞および GFP を恒常的に発現させた HeLa 細胞 (HeLa-GFP) は MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM (MEM; 10%FCS、抗生物質含有) を用いて 37℃、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

#### B-3. 標的遺伝子の発現抑制効果の評価

GFP 遺伝子：GFP を恒常的に発現する HeLa-GFP 細胞を 12 穴プレートに、 $3 \times 10^4$  cells/1.5ml/well で播種し、翌日に各種 GFP に対する shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターを 1000 VP/cell で 37℃、1.5 時間作用させた。ウイルス作用 72 時間後、細胞を回収し、フローサイトメーター (LSR II) を用いて蛍光を測定した。

Firefly Luciferase 遺伝子：Luciferase を恒常的に発現する A549-Luc 細胞を 96 穴 black プレートに、 $5 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ l/well で播種し、翌日に各種 Luciferase に対する shRNA 発現カセ

ットを搭載した Ad ベクターを 1000 VP/cell で 37°C、1.5 時間作用させた。ウイルス作用 72 時間後、Pica Gene LT 2.0 (東洋インキ) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

c-Myc および p53 遺伝子:A549-Luc 細胞を 12 穴プレートに、 $1.5 \times 10^4$  cells/1.5ml/well で播種し、翌日に各種 Ad ベクターを 3000 VP/cell で 37°C、1.5 時間作用させた。72 時間培養後、細胞を回収し、cell lysis buffer に懸濁、15000 rpm で 15 分遠心後、上清を回収した。溶解液のタンパク質濃度を Bio-Rad protein assay kit を用いて測定後、常法に従い、Western Blott 法にて両タンパクの発現量を評価した。

#### B-4. VA-RNAs 欠損 Ad ベクタープラスミドの構築

VA-RNAs コード領域を欠損させた Ad ベクターは、E1 欠損領域に外来遺伝子を挿入できるベクタープラスミド pAdHM4 を元に、VA-RNA I 及び VA-RNA II 遺伝子の内部プロモーター領域の一部を欠損させた VA-RNAs コード配列を含む配列及び VA-RNAs コード配列の近傍で線状化した pAdHM4 をエレクトロポレーションによって大腸菌 BJ5183 株 (Qbiogene 社) に共導入し、相同組換えを生じさせることで VA-RNAs 欠損 Ad ベクタープラスミド pAdHM4 $\Delta$ VR を得た。なお、本研究では、作製した各ベクターに蛍光タンパク質である GFP の発現カセットを搭載し、Ad ベクターの産生、増幅、および遺伝子導入用ベクターとしての能力を評価できるように設計した。

#### B-5. VA-RNA I 発現細胞の作製

テトラサイクリン依存性ヒト H1 プロモーターの制御下で VA-RNA I を発現するカセットを含む VA-RNA I 発現制御用レンチウイルスベクター (LV-H1tet0-VRI-ERP) を作製し、HEK293 細胞に導入し、ドキシサイクリン (doxycycline, DOX) にて VA-RNA I を発現誘導可能な細胞を作製した。作製した細胞を VA293 細胞と呼ぶこととした。

#### B-6. VA-RNAs および GFP 遺伝子の発現確認

VA-RNAs は、常法に従いノザンプロット法により確認した。GFP の発現は、蛍光顕微鏡下での観察、あるいはフローサイトメトリーにより解析した。

#### B-7. Ad $\Delta$ VR ベクター増幅の確認

増幅した Ad $\Delta$ VR ベクターの VA-RNAs をコードする DNA 配列の近傍を PCR 法により増幅した。その増幅産物を制限酵素 RsrII により処理し、Ad $\Delta$ VR ベクターと FG-Ad ベクターを確認した。Ad

$\Delta$ VR ベクターは、Figure 1-B に示すように VA-RNA II 遺伝子内の制限酵素 RsrII の認識部位の一部を欠損しているため、理論上、制限酵素 RsrII では消化されない。増幅された各ベクターについて、2%アガロースゲルにより電気泳動を行った。

#### B-8. 細胞培養および薬物処置

293細胞は10% FBSとNEAAを含むDMEMを用いて 10 cmプレートで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後  $1 \times$  PBS溶液4 mLをプレートに加え、培地を5 mL 入れておいた50 mLのファルコンチューブにプレートより剥離した細胞を移し、4,000 rpm、4°Cで5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してプレートにまき、5% CO<sub>2</sub>存在下37°Cで培養した。H4IIE細胞は10% FBSを含む $\alpha$ -MEMを用いて10 cmプレートで培養した。継代時、培地をアスピレート除去した後トリプシン-EDTA溶液4 mLをプレートに加え37°Cで2分間インキュベートした。培地を5 mL入れておいた50 mLのファルコンチューブにプレートより剥離した細胞を移し、4,000 rpm、4°Cで5分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してプレートにまき、5% CO<sub>2</sub>存在下37°Cで培養した。細胞障害性の検討においては、DMSO溶液とした薬物を5% FBS含有細胞培養液で希釈した。各濃度のDMSO濃度は0.1-0.4%の範囲内で統一した。

#### B-9. テストステロン 6 $\beta$ 水酸化酵素活性の測定

Yamazaki と Shimada の方法に従い測定した (Yamazaki and Shimada, 1997) 。Ad ベクター感染させた細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下培養した。24、48、72 時間後、培養液をアスピレーターで吸引し、100  $\mu$ M テストステロンを含む培地 1 mL を加えた。1 時間後に培地を採取して生成した 6 $\beta$  水酸化テストステロンを以下の方法により測定した。採取した培地 500  $\mu$ L にジクロロメタン 4 mL、精製水 500  $\mu$ L、内部標準物質として 100  $\mu$ M のコルチコステロン 20  $\mu$ L を加えて激しく攪拌した。2,500 rpm で 10 分間遠心分離後、ジクロロメタン層を別の試験管に移し、窒素気流下乾固させた。溶液全てを乾固させた後、試験管に 200  $\mu$ L の 45% メタノールを加え、1 分間ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、2,000 rpm で 5 分間遠心分離し、40  $\mu$ L を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には、ポンプ (日立 L-2130)、オートサンプラー (日立 L-2200)、カラムオーブン (日本分光 CO-965)、UV 検出器 (日立 L-2400) を用いて、溶離液を 240 nm でモニター

した。カラムはMightsyl RP-18 GP-150-4-65  $\mu$ M (関東化学) を用いた。移動相は50% MeOH/10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を使用し、流速は1.0 mL/min、カラム温度は35°Cとした。

#### B-10. GSH含量の測定

Tietzeの方法を用い一部改良して、以下の方法でGSH含量を測定した(Tietze, 1969)。細胞液40  $\mu$ Lに5% メタリン酸溶液20  $\mu$ Lを加え、10分間水中放置した。Stock bufferを180  $\mu$ L加え、15,000 rpm、4°Cにて10分間遠心分離し上清を得た。検量線は200  $\mu$ M GSHを0.5% スルホサリチル酸100  $\mu$ Lを用いて、100、50、25、12.5、6.25、3.13および1.56  $\mu$ Mとなるよう希釈して使用した。96ウェルプレートにおいて、各ウェルに0.3 mM  $\beta$ -NADPH溶液140  $\mu$ Lと4.8 mM DTNB溶液を25  $\mu$ L加え、5分間室温で反応させた後、検量線溶液と上記操作で得られた細胞溶液の上清を20  $\mu$ Lずつ加えた。Glutathione Reductase (4 Units/mL) 25  $\mu$ Lを加え、5分後405 nmの吸光度をBiotrakII plate readerを用いて測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、各分担研究者が所属する研究施設の各種委員会の承認を得た上で実施している。なお本研究においては、公知の細胞株以外のヒト由来の試料は使用していない。

### C. 研究結果

#### C-1. 新規 Ad 発現ベクターの in vitro および in vivo 動態学的評価

ヒト CYP3A4 発現 Ad ベクター AdCYP3A4、ラットのグルタチオン合成酵素 (GCSH) を RNA 干渉 (RNAi: RNA interference) によりノックダウンする為の short hairpin RNA を発現する Ad ベクター AdGCSH-shRNA を作製した。作製したベクターをラット肝癌由来 H4IIE 細胞に同時感染させ、細胞内における CYP3A4 発現およびグルタチオン (Glutathione-SH: GSH) 含量の減少が認められる実験条件の探索を行った。

各ウイルスベクター作用時の影響を、テストステロン 6 $\beta$  水酸化酵素活性、GCSH mRNA、および GSH 含量を測定することにより評価した。(1) AdCYP3A4 作用させた場合、期待どおり CYP3A4 酵

素活性が上昇し、その上昇はベクター濃度依存的であった。しかしながら、高濃度のベクター処置あるいは長時間処置では逆に CYP3A4 活性が減少したことから、高濃度の Ad ベクターは細胞毒性を誘発してしまうことが示唆された。(2) AdCYP3A4 と AdGCSH-shRNA の同時感染による影響を検討するため、H4IIE 細胞に AdCYP3A4 またはコントロールベクターとして使用した AdGFP、および AdGCSH-shRNA を同時感染させた。その結果、Ad 感染3日目の AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群および AdGFP/AdGCSH-shRNA 群において、Ad ベクターを作用させていない Control 群に対し各々67%、58% の GCSH mRNA の有意な減少が認められた。また AdCYP3A4 単独感染と Control 群の間において GCSH mRNA 量の有意な差は認められなかった。

(3) Control 群における細胞内 GSH 含量は  $81 \pm 2.1$  nmol/mg であったが、感染3日目の AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群および AdGFP/AdGCSH-shRNA 群では、Control に対し各々46%、42%の有意な減少が認められた。以上の結果より、CYP3A4 の発現が上昇し、かつ GSH 含量が低下した目的の細胞を得ることができた。

さらに薬物による細胞障害性への影響を検討した。CYP3A4 発現上昇 GSH 含量減少状態となっていることを確認した AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 共感染 H4IIE 細胞を使用し、肝障害誘発の報告がある薬物の細胞障害性について、MTT アッセイおよびクリスタルパイオレット染色により検討した。その結果、重篤な肝障害を惹起するとして販売中止となった経口抗糖尿病薬であるトログリタゾン処置では25、50  $\mu$ M AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群の細胞障害性が AdGFP 群、AdCYP3A4 群、AdGFP/AdGCSH-shRNA 群に対し有意に増強された (Figure 1)。また、フルタミド処置では20、50  $\mu$ Mにおいて、アセトアミノフェン処置では10、20 mMにおいて、細胞障害性の亢進が認められた。一方、肝毒性が比較的低いロジグリタゾン処置においては AdCYP3A4/AdGCSH-shRNA 群における細胞障害性増強は認められなかった。以上の結果は、より高感度に薬の細胞障害性を検出する事ができ、今後の in vitro 試験系の発展と医薬品開発への貢献が期待される細胞試験系を作出できたことを示している。

#### C-2. ShRNA 発現 Ad ベクターの機能評価

これまでに報告されている shRNA 発現 Ad ベクターは、単一の Ad ベクターにひとつの shRNA 発現カセットを搭載している。その際、RNAi 誘導

能の高いターゲット配列が同定されている場合には問題ないが、RNAi 誘導能の低いターゲット配列しか明らかになっていない場合や、発現量の多い遺伝子を抑制したい場合、あるいは複数の遺伝子を同時に抑制したい場合には多量の Ad ベクターを作用させる必要があるため、Ad ベクターによる細胞毒性や免疫反応の誘導など、副作用を引き起こす危険性が懸念される。そこで、複数の shRNA 発現カセットを搭載可能な Ad ベクターシステムを構築することにより、単一 Ad ベクター当たりの RNAi 誘導能を向上させ、前述の問題点を克服する新規 Ad ベクターの開発を試みた。

shRNA 発現カセットを 4 単位搭載可能な Ad ベクターを作製した (Figure 2, A)。その機能を、Green Fluorescent Protein (GFP) または Luciferase に対する shRNA 発現カセットを 4 単位搭載した Ad ベクター、あるいは Luciferase/GFP/p53/c-Myc の 4 種類の遺伝子に対する shRNA 発現カセットを各 1 単位搭載した Ad ベクターを作製し、それらによる RNAi 誘導能を評価した。その結果、shRNA 発現カセットを 4 単位搭載した Ad ベクターが効果的に RNAi を誘導していることが確認できた (Figure 2, B and C)。また、4 種類の遺伝子に対する shRNA 発現カセットを各 1 単位ずつ搭載した Ad ベクター作用群では、それぞれのターゲット遺伝子に対する発現抑制効果が観察された。しかしながら、その抑制効果は 1 種類の遺伝子に対する shRNA 発現カセットを搭載した Ad ベクターと比較してわずかに弱いものであったため、改善の余地があると考えられた。

### C-3. ShRNA 発現アデノウイルスベクターの作成

RNAi を誘導する場合、shRNA 発現 Ad ベクターの利用を選択することが可能である。しかしながら、cDNA を導入して遺伝子発現させる場合の Ad ベクターの高い遺伝子発現効率を考慮に入れると、その shRNA 発現 Ad ベクターにより誘導される RNAi 効果は予想されたほど高くないことが経験的に知られている。近年、野生型 Ad ゲノムにコードされる virus associated RNAs (VA-RNAs; VA-RNA I と VA-RNA II) が pre-miRNA や shRNA 前駆体の核外輸送を担う exportin5 と競合することや、Dicer に結合することでその機能を阻害し、結果として miRNA の成熟や shRNA の機能発現過程を阻害することが報告された。また、VA-RNAs が Ad ベクターにも存在し、標的細胞内で VA-RNA が速やかに発現することが明らかとなっている。

そこで本研究では、VA-RNAs を欠損させた Ad ベクターの作製を試みた。本ベクターが作製できれば、shRNA の成熟が VA-RNAs により抑制されることのない、つまり“目的遺伝子のノックダウン効果が高い” shRNA 発現 Ad ベクター開発へと繋がることを期待される。

VA-RNAs をコードする遺伝子配列を欠損させた Ad ベクター作製用プラスミド pAdHM4 $\Delta$ VR-CMVGFP を構築した。常法に従いウイルスゲノム末端に存在する制限酵素 PacI で切断して線状化し、トランスフェクション試薬 SuperFect™ (Qiagen 社) を用いて HEK293 細胞へトランスフェクションした。対照として、従来型 (FG: first generation) の Ad ベクタープラスミド (FG-Ad ベクタープラスミド) pAdHM4-CMVGFP を同手法によりトランスフェクションした。しかしながら通常 Ad の増幅に用いられる HEK293 細胞では、VA-RNAs を欠損した Ad ベクター (Ad $\Delta$ VR ベクター) が増幅しないことが明らかとなった。

次に、VA-RNA I をドキシサイクリン (Dox) 添加時に発現する VR293 細胞を作製し (Figure 3, A)、Ad $\Delta$ VR ベクターの産生を試みた。Ad $\Delta$ VR ベクタープラスミドを常法に従い VR293 細胞にトランスフェクションした後に Dox を添加することで VA-RNA I の発現を誘導したところ、細胞内で Ad $\Delta$ VR ベクターが増幅することが確認された (Figure 3, B)。また、作製したベクターに搭載した外来遺伝子 (GFP) の発現量を比較することで遺伝子導入ベクターとしての能力を比較したところ、Ad $\Delta$ VR ベクターが FG-Ad ベクターと同等の遺伝子導入効率を示すことが確認された (Figure 4)。

### D. 考察

当該事業年度は、ヒト CYP3A4 の強制発現と齧歯類 (ラット) GCSh のノックダウンが肝毒性評価系の改善に繋がるか否かを検討した。その結果、計画した研究戦略が本事業目的である薬物誘発性肝障害モデル動物開発に適していることを明らかとした。また、本事業成功の鍵を握る新規 Ad ベクターについて、Ad ベクターによる RNAi 誘導の効果増強を達成する新規ベクターの開発を行った。異なる二つの戦略から Ad ベクターの改良を試みた結果、共に良好な結果を得ることに成功した。次年度以降、各研究結果を融合することでさらなる改良を行い、本事業の成功を目指す。