

## 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  
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.

### 分担研究者

- (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 宮崎玉樹
- (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 立木秀尚
- (14) ニプロパッチ 山内仁史
- (15) 富士フィルム 大野誠
- (15) 国立医薬品食品衛生研究所 加藤くみ子
- (16) 東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之
- (17) 東京大学大学院医学系研究科 西山伸宏
- (18) エーザイ株式会社 石原比呂之
- (19) 日本化薬株式会社 中西健
- (20) 国立医薬品食品衛生研究所 香取典子
- (21) 国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫
- (22) 国立医薬品食品衛生研究所 坂本知昭
- (23) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (24) 参天製薬(株) 西岡和幸
- (25) 塩野義製薬(株) 古家喜弘
- (26) 武田薬品工業(株) 小澤昭夫
- (27) 田辺三菱製薬(株) 田邊良輔
- (28) 日揮(株) 河合正雄
- (29) (株) パウレック 高嶋武志
- (30) 東邦大学 薬学部 寺田勝英

### 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：非晶質製剤の安定性と関連する分子運動性を評価する方法を検討した。ニフェジピン、フェノバルビタール、インドメタシン、ケトコナゾール等をモデル薬物とした固体分散体を調製し、動的粘弾性測定により非晶質薬物のスケールの大きな分子運動性の評価法を、インバースガスクロマトグラフィー(IGC)により、非晶質製剤の表面における分子運動性の評価法を検討した。また、ラマン分光法により、固体分散体表面における結晶化速度の評価を検討した。

1-2) ナノ微粒子製剤：ナノ微粒子製剤の過飽和溶液における製剤特性を解析することを目的として、噴霧乾燥法により調製したカルバマゼピン(CBZ)の固体分散体を水に分散して得られる過飽和溶液について、Caco-2 単層膜及び透析膜を用いて、薬物膜透過性を明らかにした。また、緩和時間測定を含む  $^1\text{H-NMR}$  測定により、過飽和溶液中の CBZ の構造及び分子状態を評価する方法を開発し、薬物の分子状態が薬物の膜透過性を支配する因子として重要であることを明らかにした。さらに、湿式粉碎機ビーズミルを用いた難溶性薬物のナノ(サブミクロン)領域への粉碎を実施し、ナノ粒子化及び分散安定性に及ぼす水溶性高分子の影響を検討した。

1-3) Cocrystal 製剤：難溶性化合物のモデルとしてミコナゾールを用い、共結晶を調製した。溶解度相図を用いて、原薬の物性改善に重要な役割を果たすと考えられる分子間相互作用メカニズムを評価する手法を開発した。ミコナゾールの各結晶の原薬および予備製剤での安定性試験を行い、各結晶の安定性を評価した。

### (2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究

2-1) 溶出試験法の検討：フロースルーセル(FTC)法で溶出試験液を経時的に変更する操作を試み、

腸溶性製剤および徐放製剤の溶出性を検討した。また、腸溶性製剤については、種々の溶出試験装置(回転バスケット法、パドル法、レシプロケーティングシリンダー法及び FTC 法)と溶出試験操作(単一溶液法、液置換法、アルカリ添加法)について比較検証した。また、FTC 法溶出試験装置(CE7Smart)のポンプについて、各流速における真度を測定した。

2-2) 製剤設計と *in vitro/in vivo* 評価：塩基性難溶性のモデル化合物を用いて、有機酸による吸収改善効果の評価、酸添加製剤の *in vitro* 評価系の問題点抽出を行った。新規 IVIVC 構築式において予測値と実測値が大きく乖離した 2 製剤に生理学的吸収モデルの適用を試みた。

2-3) 局所皮膚適用製剤の評価方法：3 種類のリドカインテープ(標準製剤、後発品 2 製剤 GE-A, GE-B)に対して、ラットを用いた 4 種混合試験、ブタを用いた薬物放出率および角質中薬物量の評価を行った。

2-4) リポソーム製剤の特性と評価方法：調製工程のパラメータを変更してリポソームを調製し、ネガティブ染色法により作成したサンプルについて透過型電子顕微鏡(TEM)で形態観察を行った。抗癌剤や  $^{10}\text{B}$  化合物を封入したトランスフェリン修飾リポソームを調製し、機能評価を行った。また、血清由来のタンパク質 13 種類について、表面プラズモン共鳴を用いてリポソームとの相互作用解析を行った。

### (3) ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関わる製剤特性研究

3-1) 画期的ナノ粒子製剤の物性と動態・薬効解析：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ニウム白金(II)錯体 DACHPtCl(NO<sub>3</sub>)水溶液を反応させることにより、DACHPt 内包ミセル(DACHPt/m)を調製した。DACHPt/m の *in vitro* 細胞毒性、マウスを用いた血中滞留性、皮下移植モデルに対する *in vivo* 制がん活性評価について解析した。

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 DBD-ED, Nile-Red 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。DBD-ED, Nile-Red を結合させたブロック共重合体による混合ミセルの形成・崩壊と蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)の関係について解析した。さらに HeLa

細胞に投与後、共焦点顕微鏡により観察した。また、蛍光標識ナノ粒子と PEG 鎖を表面修飾したナノ粒子を調製し in vivo イメージング装置により体内分布を観察した。

3-2) ナノ粒子製剤の薬物放出特性評価法の確立: ドキソルビシン封入 PEG 化リポソームを調製し、リポソーム内及びフリーのドキソルビシン濃度をカラムスイッチングシステムを搭載した HPLC システムにより測定し、マウス血漿中での in vitro 放出性、尾静脈投与後のマウス血中濃度推移を解析した。また、マウス腫瘍皮下移植モデルを用いた in vivo 抗腫瘍効果を測定した。

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、脳脊髄液を採取し薬物濃度を定量した。また野生型マウス及び Oat3(-/-)マウスの生体試料(血漿・脳脊髄液)についてメタボローム解析を行った。

#### (4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

製剤開発時に必要な製剤の重要品質特性を評価する方法及び製造工程中でリアルタイムあるいは超高速に重要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、確立するため、製品設計段階及び実製造プロセスにおける評価に関する課題についてスクリーニングを行ない、有用性が高いと思われる以下の分析評価手法について検討を行った。

製造プロセスの理解を進めて重要品質特性を把握する評価技術として、ステーションナリーバスケット法による溶出性評価、分散安定性分析法による水性懸濁性点眼剤の再分散性の評価、摩擦帯電量測定法による打錠障害の予測、光励起非破壊検査法及び超音波非接触測定法による製剤内異物及び欠陥の評価、TOF-SIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry;飛行時間型二次イオン質量分析法)によるステアリン酸マグネシウムの分布の解析について検討を行った。また、製造工程をリアルタイムあるいは超高速にモニタリングし、重要品質特性をコントロールする分析評価手法として、PAS (Photo Acoustic Spectroscopy;赤外光音響分光法)によるガス分析、テラヘルツ分光法による錠剤コーティングの評価、超臨界クロマトグラフィーを用いた UHPLC 法による光学純度のリアルタイム解析、内部蛍光検出法による製造環境のモニタリングについて

検討を行った。

(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

超難溶性薬物の溶出特性を改善する方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、これらの製剤の品質管理を可能に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: 非晶質製剤の安定性に影響を及ぼすと考えられる分子運動性の評価法について検討を行った。ガラス転移温度( $T_g$ )の異なる数種の薬物について、それぞれの薬物の  $T_g$  付近の温度で測定した貯蔵弾性率( $G'$ )と損失弾性率( $G''$ )の周波数依存性を測定した。 $G'$  の対数値は低周波領域においては周波数に対して直線的に増加するが、 $G''$  の極大値が観測される周波数より高い周波数においては頭打ちとなった。 $G'$  および  $G''$  の周波数依存性のデータを Cole-Davidson 式にフィットし、せん断緩和時間  $\tau$  とその分布を表す  $\alpha$  を算出した。測定温度が異なるにもかかわらず、何れの薬物のせん断緩和時間も同様の値(2-3 秒)であった。従って、観測された緩和はガラス転移に関連するスケールの大きな分子運動によって引き起こされたものと考えられる。せん断緩和時間は  $T_g$  以上の温度領域において、ガラス転移を引き起こすスケールの大きな分子運動の評価に有用であることが分かった。また、非晶質ケトコナゾール及びケトコナゾール-PVP K30 固体分散体(96:4)につき、IGC を用いて  $40^\circ\text{C}$  ( $T_g - 5^\circ\text{C}$ ) におけるウンデカンの  $V_{\max}$  の経時変化を測定し、KWW 式にあてはめて、緩和時間 ( $\tau$ )、分布パラメーター ( $\beta$ ) ならびに分子運動性の指標である  $\tau^\beta$  を見積もった。薬物単独の  $\tau^\beta$  の値に比べ固体分散体の  $\tau^\beta$  の値は 10 倍程度大きいことから、薬物単独に比べ固体分散体の表面の分子運動性は低いことが明らかとなり、非晶質ケトコナゾールの結晶化のしやすさと関連することが示された。さらに、ラマン分光光度測定により、非晶質固体分散体の結晶化度を測定した。粉末 X 線回折測定に比べラマン分光光度測定は直線性がよく、結晶化度を精密に評価できた。測定深度を制御するこ

とにより試料表面近傍の結晶化度の測定が可能であることが分かった。面分析の結果から、固体分散体中の結晶/非晶質の分布の観測が可能であり、非晶質固体分散体の表面における結晶化過程の評価に有用であることが分かった。

1-2) ナノ微粒子製剤：CBZ と HPMC-AS の固体分散体を溶解して得られた過飽和溶液の<sup>1</sup>H-NMR 測定を行ったところ、CBZ/HPMC-AS 過飽和溶液中の CBZ のケミカルシフト値は重水を用いて調製したリン酸緩衝液中の値と同じであり、過飽和溶液中の CBZ は緩衝液中と同様の化学的環境にあると考えられた。また、CBZ のシグナルの線幅が著しく増大し、過飽和溶液中では CBZ の運動性が抑制されていることが示され、CBZ は過飽和溶液中で自己会合していると考えられる。一方、poloxamer を添加して可溶化した溶液中の CBZ のケミカルシフト値は高磁場シフトし、シグナルの線幅も先鋭化された。CBZ はリン酸緩衝液中にくらべ疎水性の環境にあり、運動性が高いことが示され、CBZ は poloxamer の疎水性コアに封入されていることを示唆するものと考えられる。このような CBZ の分子状態の違いが Caco-2 単層膜に対する透過性の違いを引き起こしたものと考えられ、<sup>1</sup>H-NMR による薬物の分子状態の評価の重要性が示された。また、難溶性薬物（プロブコール、ダナゾール、イトラコナゾール）のナノ粒子化及び分散安定性に及ぼす水溶性高分子の影響を評価した結果、水溶性高分子は、①立体障害により粉碎工程中及び保存中の分散安定性を向上させ、②粉碎工程中の結晶の成長を抑制することが示唆された。

1-3) Cocrystal 製剤：難溶性化合物のモデルとしてミコナゾールを用い、塩及び共結晶形成の検討を行った。単結晶構造解析からミコナゾールマレイン酸の複合体はイオン結合により塩を形成しているのに対し、ミコナゾールとフマル酸及びコハク酸との複合体は水素結合により共結晶を形成していることが明らかとなった。安定性試験の結果、ミコナゾールマレイン酸塩およびミコナゾールとフマル酸との共結晶は製剤中で酸付加体を生成するが、コハク酸との共結晶は溶解性及び安定性に優れることが分かった。この結晶間の安定性の差は溶解度相図を用いた分子間相互作用メカニズムを解析することによって説明できた。溶解度相図による評価は cocrystal 製剤の製剤特性を解析する上で有用であることが分かった。

(2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する

研究

機能性製剤の適切な生物薬剤学的評価法（*in vitro* 及び *in vivo* 評価法）の確立と効率的な製剤設計を目指して以下の検討を行った。

2-1) 溶出試験法の検討：FTC 法で試験液を連続的に変化させた場合の pH を測定し、10 分以内にセル中の pH が変化していることが確認された。ニフェジピン徐放製剤の溶出性を一連の消化管模擬試験液で評価し、各製剤の溶出特性を捉えうることを示した。また、FTC 法溶出試験装置のポンプについて、広い流速範囲においてキャリブレーションを行うと、日差変動が大きくなり流速調整が不正確になることが分かった。

液置換法は、試験条件のフレキシビリティに加え、製剤ロット間の識別性にも優れており、4 種のいずれの装置を用いた場合でも同等の放出挙動や識別性を示した。一方、アルカリ添加法においては添加液によりコーティング膜が破壊されてしまう懸念があり、製剤ロット間の識別性が乏しくなる可能性が示唆された。

2-2) 製剤設計と *in vitro/in vivo* 評価：溶出試験では酸添加による吸収改善効果を適切に評価できなかったが、酸溶液中の溶解度測定を用いた Dose Number の算出により、吸収改善に必要な有機酸添加量を予測可能であること、溶解度の低い化合物では溶解速度律速となり、溶解速度が吸収性に影響を及ぼしている可能性があることを示した。IVIVC 手法は有用な方法であるが、膜透過が律速の薬物や吸収部位による差が大きい薬物には適用が困難であること、吸収部位による差がある場合は生理学的吸収モデルを適用することでより良好な予測が可能であることが示された。

2-3) 皮膚適法製剤の評価方法：ラットの皮内薬物濃度および血漿中薬物濃度、薬物放出率において、GE-A は標準製剤に比して有意な低値を示した。また、角質中薬物量の経時的変化に、製剤間の有意な違いは認められなかった。一方、ブタにおける検討の結果、薬物放出率および角質中薬物量において試験製剤間の明確な違いは認められなかった。

2-4) リポソーム製剤の特性と評価方法：ネガティブ染色 TEM 法により観察したところ、僅かに変形があるものの個々の粒子の外形が確認でき、粒径は動的光散乱により求められた粒径と対応していた。調製時のパラメータを変更して調製したリポソームでは、明らかな形態の変化が観察された。

特徴的な挙動を示すタンパク質が薬物放出や酵素によるリン脂質分解に与える影響の評価を試み、ApoEがPEGリポソームからの薬物放出を促進する傾向があること、リン脂質分解に与えるアルブミンの作用はPEG修飾の有無によって異なることを明らかにした。

トランスフェリン PEG リポソームをボロン中性子捕捉療法に適用したところ、優れた血中滞留性とがん組織集積性、長い集積時間を示し、効率的に細胞内に取り込まれ、抗腫瘍効果を発揮した。

### (3) ナノ粒子DDS製剤の体内動態に関わる製剤特性研究

画期的ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関わる安定性、標的性、放出性等の製剤特性、及び生体内因子に関する研究を行った。

3-1) 画期的ナノ粒子製剤の物性と動態・薬効解析：高分子ミセルの内核を構成するポリアミノ酸 P(Glu)鎖が $\alpha$ -helixを取る場合、及び random coilを取る場合では *in vitro* における細胞毒性に差異は認められなかったが、前者は後者より高い安定性と血中滞留性を示し、有意に高い制がん作用を示す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/N-Red 混合 FRET ミセルを調製した。混合ミセルの塩基処理により FRET ピークが減少したことから、ミセルの崩壊を FRET ピークで推測できる可能性が示唆された。混合ミセルを HeLa 細胞培養液中に加えたところ、細胞内への取り込み量は増加する一方、FRET に由来する蛍光強度比の経時的減少が観察され、ミセルが細胞内で崩壊している現象を捉えられる可能性が示唆された。

蛍光標識ナノ粒子(粒子径 40 nm)を調製し体内動態に与える影響を *in vivo* イメージング装置で調べた。PEG 修飾により *in vitro* 細胞内取り込み量は大幅に減少するのに対し *in vivo* での動態には変化が見られなかった。また PEG 修飾によりナノ粒子の周辺に形成される固定水層(FALT)の厚さに変化は見られなかった。

3-2) リポソーム製剤からの薬物放出性とマウス腫瘍皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果：ドキシソルビシン封入 PEG 化リポソームを調製し、マウス血漿中での *in vitro* 放出性、尾静脈投与後のマウス血中濃度推移、さらには、マウス腫瘍皮下移植モデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍効果を測定した。その結果、同一の処方のリポソーム間では、コントロール群に対する増殖抑制効果で評価される抗腫

瘍活性が増殖の遅い細胞において低く評価される傾向にあること、一方では、増殖速度の速い腫瘍モデルを用いた評価においては、いずれのリポソームにおいても良好な抗腫瘍活性が得られやすいことが示された。

3-3) 薬物トランスポーターの機能解析：遺伝子欠損マウスを用いた静脈内持続投与により、定常状態における血漿中濃度、脳・腎臓、脳脊髄液中濃度を測定し、検討した5種類の H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬のうち、cetirizine, fexofenadine について、Oat3 がこれら薬物の腎臓内動態に関与していることを示唆する結果を得た。また、野生型マウス・Oat3(-/-)マウスの血漿、脳脊髄液のメタボローム解析を実施した結果、特に血漿で顕著に蓄積する化合物を見いだした。

### (4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

製剤特性を評価する先端的手法の検討を行い、以下の成果が得られた。回転バスケットを用いてステーションナリーバスケット法による溶出性の評価を行ったところ、一部の試料を除き、ひし形バスケットを用いた場合とほぼ同等の結果が得られ、ひし形バスケットの代わりに、より汎用性の高い回転バスケットが代用できることを明らかにした。打錠障害は粉体付着性、摩擦帯電量との間に相関がみられ、摩擦帯電量が打錠障害の発生を予測する指標として利用できることを明らかにした。水性懸濁性点眼剤において、分散安定性分析法により得られる沈降層の高さと製剤の再分散性との間に相関が認められ、懸濁性製剤の処方スクリーニングにおける分散安定性分析法の有用性を明らかにした。光励起非破壊検査法及び超音波非接触測定法を用いることにより製剤内の異物の検出が可能であり、異物検査へ応用が可能であることを示した。TOF-SIMS を用いることにより、いままでの顕微分光技術では難しかった固形製剤中のステアリン酸マグネシウムの分布を解析できることを明らかにした。製剤の画像化技術の有用性を示した。

製造工程をモニタリング及びコントロールする技術について検討を行い、以下の成果が得られた。カンチレバー方式のPASを用いることにより混合ガスの赤外スペクトル測定及び定性が可能であり、揮発性化合物やガス反応のリアルタイム分析に応用できることを明らかにした。超臨界クロマトグラフィーを用いたUHPLC法を用いることにより、遅滞なく反応液の品質情報を工程にフィードバックでき、ほぼリアルタイムに反応工程

を解析・評価できる可能性を示した。テラヘルツ分光法により製造条件の異なるコーティング錠についてオフラインによる測定を行い、不良錠を検出できることを示し、コーティング工程のモニタリング技術として有用であることを示した。また細菌ディテクタを用いた内部蛍光検出法について機器の改良及び運用法を改善することにより、製造環境中の微生物汚染をより効率良くモニタリングできることを示した。

#### 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 1)非晶質製剤, 2)ナノ微粒子製剤, 3)Cocrystal 製剤について検討し、非晶質製剤に関してはその物理的安定性に大きな影響を及ぼすと考えられる分子運動性の評価法として、動的粘弾性測定法は、 $T_g$  以上の温度における分子運動性を評価する方法として有用であることを明らかにできた。また、IGC による方法は固体分散体の粒子表面の分子運動性に関する有用な情報を与えることが分かった。さらに、ラマン分光分析により固体分散体の粒子表面における結晶化度を評価することができた。今後、多く薬物についてラマン分光分析により、表面における結晶化速度を明らかにするとともに、IGC によって表面の分子運動性を明らかにすることにより、固体分散体表面の分子運動性の評価に基づく安定性予測法の可能性について検討を行う必要があると考えられる。

ナノ微粒子製剤については、 $^1\text{H-NMR}$  測定により溶液中の過飽和溶液中の薬物の分子状態を明らかにすることができた。CBZ/HMPC-AS 過飽和溶液中の CBZ の分子状態は薬物が自己会合しているのに対し、poloxamer を添加して可溶化した溶液中の CBZ は poloxamer の疎水性コアに封入されていることが明らかになった。この溶液中の分子状態の違いが Caco-2 単層膜及び透析膜を用いたときの CBZ の薬物透過性の違いと関連することから、過飽和溶液中の薬物の分子状態を評価することの重要性が示された。また、難溶性薬物のナノ粒子化や分散安定性に対する水溶性高分子の役割を明らかにできた。今後、水溶性高分子の分散安定性向上効果及び結晶成長抑制効果と高分子の物性パラメータとの関係について検討する必要があると考えられる。

Cocrystal 製剤については、ミコナゾールはフマル酸及びコハク酸と cocrystal を形成し、マレイン

酸とは塩を形成することが分かった。いずれの結晶も溶解速度が改善されたが、化学的な安定性に差が見られた。医薬品の溶解度等の物性改善を目的とする cocrystal 研究において、目的とする物性値の評価のみならず、医薬品としての製造性や流通条件・期間における品質を保証する安定性についても十分な評価を行った上で、最適な形態を選定することの重要性が示されたものと考えられる。

##### (2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究

さまざまな製剤特性の評価に有用な FTC 法について、基礎的な検討を積み重ね、生物薬剤学的な評価に役立てることを目的に、いくつかの経口製剤をモデルとして検討を行った。消化管模擬試験液を連続して用いることにより、各製剤の溶出特性を捉えうる溶出曲線を得ることを示した。他の溶出試験装置と比較したところ、FTC 法が最も試験条件の柔軟性がある優れた手法であり、製剤の機能及びその特性を適切に評価する上で非常に有用な *in vitro* 評価法であった。一方で、FCT 法溶出試験装置のポンプ流量の日差変動が問題となったが、制御ソフトの修正によって広い流速範囲での試験が可能になることを示した。

また、溶出試験では適切な評価が困難であった塩基性難溶性製剤については、*in vitro* 溶解度/溶解速度試験と *in vivo* 吸収評価を的確に組み合わせた製剤評価が、塩基性難溶性化合物の吸収改善手段の一つである酸添加製剤を速やかに開発するための有用な評価系になると期待された。さらに難溶性薬物については、*in vivo* 溶出挙動以外に胃排出、消化管移動、溶出過程、吸収部位差などの要因を組み込んだ生理学的吸収モデルを適用することで、良好な血中濃度の予測が可能であることを示した。

非経口製剤のうち局所皮膚適用製剤やリポソーム製剤など特殊な注射剤の生物薬剤学的評価法の検討を行った。皮膚適用製剤の動物での *in vivo* 同等性試験は、製剤間差を詳細に評価するにはラットにおける放出性、皮内薬物濃度、血漿中薬物濃度が有用だが、ヒト同等性試験を想定した場合には、ブタに対する DPK 試験を用いることが最も効果的と考えられた。リポソーム製剤の *in vitro* 評価法に関してはネガティブ染色 TEM 法によるリポソームの形態観察を行い、調製法の違いに起因した薬剤内包状態の違いを検出できることを示した。*In vitro* でのリポソームとタンパク質

の相互作用様式や膜安定性、PLA2 によるリン脂質分解に与える影響は、タンパク質の種類によって異なることが分かった。また、アクティブターゲット型リポソームの設計に必要な条件として、1) 十分量の標的分子が細胞表面に発現、2) 血中滞留性に影響しないリガンドの選別や設計、3) 細胞内への移行性の考慮、4) 治療上有効な薬物量の送達かつ適切時間維持、が考えられた。

### (3) ナノ粒子DDS製剤の体内動態に関わる製剤特性研究

本研究では、昨年度の結果を踏まえ、ナノ粒子DDS製剤である高分子ミセル製剤、リポソーム製剤に関し、体内動態に関わる安定性、標的性、放出性等の製剤特性を評価する手法の開発、さらに体内動態や薬効に影響を及ぼす製剤側・生体側の因子に関する研究を行った。

高分子ミセルの内核を構成する高分子鎖の高次構造を制御することによって、内核に $\alpha$ -helix構造を有するDACHPt/mはrandom coil構造を有するDACHPt/mより、有意に高い制がん活性を示すことが明らかになった。前者は後者より高い安定性と血中滞留性を示したことから、EPR効果によるより高い腫瘍集積性を示す可能性がある。また、前者はより小さいサイズを有することによって優れた腫瘍集積性及び浸透性を示す可能性がある。今後、腫瘍集積性及び浸透性を検討予定である。

一方、DBDとN-Redを蛍光団としてポリマーを調製した結果FRET現象が観察されたことにより、両者がミセルを形成し、さらに混合ミセルを塩基処理したところ、FRETピークが減少したことから、ミセルの崩壊をFRETピークで推測できる可能性が示唆された。本手法によりポリマーの存在状態、経時的なミセル崩壊等、より詳細な細胞内動態に関する情報が得られると期待される。

また、生体内におけるナノ粒子DDS製剤の薬物放出特性(放出速度及び放出量)は主要な製剤特性である。昨年度開発したカラムスイッチングを搭載したHPLCシステムにより内包ドキシソルピシンの放出速度とマウス腫瘍皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果について比較検討した結果、放出速度と腫瘍の増殖速度の組み合わせによって薬効が変動し、処方検討における薬物放出性評価方法と腫瘍モデルの選択の重要性が示唆された。

さらに本研究では、医薬品や製剤添加物の体内動態を左右する生体側因子に着目し、その中心

的な役割を果たしている薬物トランスポーターの機能解析を行った。遺伝子欠損マウスを用いることにより、薬物トランスポーターOat3は、腎臓内薬物動態に関与する重要なトランスポーターであることが示された。またOat3機能を反映したバイオマーカー探索手法としてメタボローム解析の有用性が示された。

### (4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

本年度は、昨年度において成果を上げた評価手法について、PAS、TOF-SIMS、光励起非破壊検査法及び超音波非接触測定法では、評価を適用する製剤等の範囲を拡大することを検討し、また内部蛍光検出法やステーションナリーバスケット法については測定感度や試験の煩雑さ等の問題について改善を行うことを検討して、より実用性の高い評価手法の開発を行った。さらに超臨界クロマトグラフィー、摩擦帯電量測定法や分散安定性分析法など新しい技術の導入についても検討を行い、一定の成果を上げることができた。そして本研究において検討された評価手法により製剤の物理的および化学的情報を収集でき、そのため製剤設計及び製造プロセスの理解が進み、より科学的な製剤開発が行えることが示された。また本研究で検討を行ったモニタリング技術は、製造工程における重要品質特性を把握する技術として有用であるばかりでなく、開発段階における条件検討などの際にも有用な情報を迅速に提供でき、製造プロセスの理解及び開発を迅速に進めることができると考えられた。これらの技術は今後、製剤設計や製造に実用化され、安定した品質の医薬品製造に貢献すると考えられた。

本研究で取り上げた手法は国際的なガイドラインであるICH Q8の目指す高度な品質管理を可能にする分析技術と考えられ、本研究の成果を用いることで、信頼度の高い医薬品製剤設計、製造工程管理が可能であることが証明され、新薬申請の審査の効率化が図れるものと考えられる。またこれらの方法が日局試験法に採用される際には本研究の内容は有用なデータとして貢献すると考えられる。

## E. 結論

超難溶性薬物製剤、機能性製剤、ナノ粒子DDS製剤等の製剤特性評価法ならびに製造工程評価手法の開発、確立に向けて、

(1) 超難溶性薬物の可溶化法として注目されている以下の製剤における可溶化に関係する物性

評価法を検討し、

1-1) 動的粘弾性測定および IGC によって、非晶質医薬品のスケールの大きな分子運動性や表面における分子運動性の評価法を確立し、非晶質製剤の結晶化のしやすさとの関連を示唆する知見を得た。ラマン分光分析によって非晶質固体分散体表面の結晶化度の評価法を確立した；

1-2)  $^1\text{H-NMR}$  測定によって CBZ/HPMC-AS 固体分散体を水に分散して得られた過飽和溶液中の CBZ の分子状態を評価できた。薬物の分子状態の違いによって膜透過速度に差が生ずることを明らかにした。また、難溶性薬物をより微小なナノ粒子とするためには、ぬれ性改善に必要な最少量の界面活性剤の存在が必要であることを明らかにし、ナノ粒子の分散安定性向上には水溶性高分子が必要であることを明らかにした；

1-3) 難水溶性のミコナゾールはフマル酸及びコハク酸と cocystal を形成し、フマル酸との cocystal は製剤中で不安定であるが、コハク酸との cocystal は溶解速度の改善のみならず、優れた安定性を示した。この結晶間の安定性の差を解析できることから、溶解度相図による評価は cocystal 製剤の製剤特性を解析する上で有用であることが分かった。

(2) 機能性製剤の生物学的評価法を検討し、

2-1) FTC 法で徐放性製剤の溶出性を検討し、一連の消化管模擬試験液を用いることの有用性を示した。腸溶性製剤の最適な *in vitro* 溶出試験法を構築することを目的とし、種々の溶出試験装置について比較検証した結果、液置換法が識別性に優れていた。また、ポンプ流速のキャリブレーションと日差変動を検証した；

2-2) 塩基性難溶性のモデル化合物を用いて酸添加製剤の吸収に及ぼす要因を明確にし、製剤開発における吸収改善スキームを提案した；

2-3) *in vivo* 同等性評価法を検討し、ラット薬物放出率、皮膚中薬物濃度および血漿中薬物濃度により同等性の評価は可能であるが、角質中薬物量の評価はブタで行うことが望ましいと考えられた；

2-4) リポソーム製剤の粒子外形や薬剤内包状態を調べるための可視化技術の構築を試み、TEM による形態観察を行うことで調製条件と形態との関係性を示した。リポソーム/タンパク質相互作用解析を行い、タンパク質の種類によってリポソームに対する相互作用様式が大きく異なることを示した。さらに、トランスフェリン PEG リポソームの適用例など蓄積された情報を基にアクティ

ブターゲティング型リポソーム製剤の設計に関する条件を整理した。

(3) 画期的ナノ粒子 DDS 製剤の体内動態に関する製剤側、生体側の機能評価法を検討し、

3-1) マウス腫瘍皮下移植モデルを用い高分子ミセルの内核を構成する高分子鎖の高次構造と血中滞留性や *in vivo* での薬効との関連性を明らかにすることができた。また、FRET 現象を利用した高分子ミセルを調製しミセルの細胞内動態に関するより詳細な評価の可能性が示された。In vivo イメージング装置による動態解析法について検討した；

3-2) リポソーム内包薬物の放出速度と腫瘍の増殖速度の組み合わせによって薬効が変動し、処方検討における薬物放出性評価方法と腫瘍モデルの選択の重要性が示唆された；

3-3) 遺伝子欠損マウスを用いることにより Oat3 が  $\text{H}_1$  受容体拮抗薬の腎臓内薬物動態に関与する重要なトランスポーターであることが示された。また Oat3 機能を反映したバイオマーカー探索手法としてメタボローム解析の有用性が示された。

(4) 医薬品の製剤開発時及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及びモニタリングが可能な分析評価手法の開発研究を行い、テラヘルツ分光法による錠剤コーティング、内部蛍光検出法による製造環境、PAS によるガス分析及び UHPLC による原薬合成工程のリアルタイム評価が有用であることを示した。またステーションナリーバスケット法による溶出評価、分散安定性分析法による懸濁性製剤の再分散性の評価、摩擦帯電量測定法による打錠障害、光励起非破壊検査法及び超音波非接触測定法による異物検査、TOF-SIMS のステアリン酸マグネシウムの評価への応用について有用性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 誌上発表

- 1) Tamaki Miyazaki, Yukio Aso, Toru Kawanishi: Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of amorphous solids with and without polymers. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4413-4420 (2011).
- 2) S. Yoshioka, K.M. Forney, Y. Aso, M.J. Pikal: Effect of sugars on the molecular motion of freeze-dried protein formulations reflected by NMR relaxation times. *Pharm. Res.* **28**, 3237-3247 (2011).



- 3) 宮崎玉樹, 阿曾幸男: 熱分析による非晶質医薬品の結晶化の評価. 熱測定, **38**, 125-131 (2011).
- 4) Shunichirou Tsutsumi, Motoo Iida, Norio Tada, Takashi Kojima, Yukihiko Ikeda, Toshiya Moriwaki, Kenjirou Higashi, Kunikazu Moribe, Keiji Yamamoto: Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. *Int. J. Pharm.*, **421**, 230-236 (2011)
- 5) Kazuo Maruyama: Intracellular targeting delivery of liposomal drugs for tumor delivery based on EPR effects, *Advanced Drug Delivery Rev.*, **63**, 161-169, 2011
- 6) 柴田寛子, 四方田千佳子: 米国 FDA のドキソルビン封入 PEG リポソームに対する生物学的同等性試験ガイドライン (案) について. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**(11), 990-998 (2011)
- 7) S. Herlambang, M. Kumagai, S. Horie, S. Fukushima, M. Oba, T. Nomoto, K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama, K. Kataoka: Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy. *J. Control. Release*, **155** (3), 449-457 (2011).
- 8) E. Yamamoto, K. Hyodo, N. Ohnishi, T. Suzuki, H. Ishihara, and H. Kikuchi: Direct, simultaneous measurement of liposome-encapsulated and released drugs in plasma by on-line SPE-SPE-HPLC. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3620-3625 (2011)
- 9) Sakai-Kato, K., Nanjo K., Kawanishi T., and Okuda H.: Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites. *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 391-396 (2012)
- 10) Sakai-Kato, K., Ishikura, K., Oshima, Y., Tada, M., Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Yamaguchi, T., Nishiyama, N., Kataoka, K., Kawanishi, T., Okuda H.: Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers, *Int. J. Pharm.*, **423**, 401-409 (2012)
- 11) Sakai-Kato K, Ota S, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Kawanishi T.: Size separation and size determination of liposomes. *J. Sep. Sci.* **20**, 2861-2865, (2011).
- 12) Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.: Size separation of colloiddally dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 5520-5526 (2011).
- 13) 加藤くみ子: DDS 製剤評価の動向と今後の課題. *HUMAN SCIENCE*, **23**, 28-31 (2012).
- 14) 加藤くみ子: ナノメディシンに関する最近の動向. *ファルマシア*, **47**, 329-333 (2011).
- 15) Y. Yamamoto, T. Fukami, T. Koide, T. Suzuki, Y. Hiyama, K. Tomono: Pharmaceutical evaluation of steroidal ointments by ATR-IR chemical imaging: Distribution of active and inactive pharmaceutical ingredients. *Int. J. Pharm.* **426** 54-60 (2012).
2. 学会発表
- 1) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西徹: 等温マイクロ熱量計による非晶質ニフェジピン粉砕物の物理的安定性の評価. 日本薬剤学会第 26 年会(2011.5).
- 2) Yukio Aso, Tamaki Miyazaki, and Toru Kawanishi: Crystallinity of ground lactose hydrate determined by <sup>13</sup>C-NMR. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting and Exposition (2011.10).
- 3) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 奥田晴宏: <sup>13</sup>C-固体高分解能 NMR による市販製剤中のジヒドロピリジン系医薬品の存在状態の検討. 日本薬学会第 132 年会(2012.3).
- 4) 植田圭祐, Waree Limwikrant, 東頭二郎, 関根秀一, 森部久仁一, 堀江利治, 山本恵司: 第 28 回製剤と粒子設計シンポジウム, 大阪, 2011 年 10 月
- 5) 田尻智計, 坂本良作, 山梨繁行, 北村智: 腸溶性製剤の最適な in vitro 溶出試験法の検討 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 6) 柴田寛子, 川西徹, 四方田千佳子: ドキソルビン封入リポソームの in vitro 薬物放出における pH, 温度, 超音波の影響. 日本薬剤学会第 26 年会 (2011.5)
- 7) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Effect of pH, temperature, and ultrasound on drug-release from doxorubicin-encapsulated liposome. AAPS (2011.10)
- 8) 柴田寛子, 四方田千佳子, 川西徹: 逆相 HPLC-蒸発光散乱検出器を用いたリポソーム製剤中の脂質成分定量法の検討 日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 9) 兵頭健治, 山本栄一, 大西直角, 鈴木卓也, 石原比呂之, 菊池寛, 浅川直樹: 日本薬剤学会第

- 26 年会, 東京, 2011 年 5 月
- 10) 山本栄一, 大西直角, 鈴木卓也, 兵頭健治, 石原比呂之, 菊池寛, 浅川直樹: 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011 年 5 月
- 11) 山本栄一, 大西直角, 鈴木卓也, 兵頭健治, 石原比呂之, 菊池寛, 浅川直樹: 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2011 年 6 月
- 12) Eiichi Yamamoto: The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery System, Hawaii, USA. 2011 年 12 月
- 13) 加藤くみ子: ナノ DDS 製剤開発に関する動向と評価手法研究. 日本薬学会第 132 年会 札幌, 2012 年 3 月 29 日
- 14) 加藤くみ子: 東京ナノテクノロジーを応用した製剤開発に関する動向. 第 20 回 固形製剤処方研究会 シンポジウム, 東京, 2011 年 11 月 29 日
- 15) 加藤くみ子, 石倉恵子, 水端美保, 西山伸宏, 片岡一則, 川西徹: ドキソルビシン結合高分子ミセルの細胞内動態に関する評価研究. 第 27 回日本 DDS 学会学術集会, 東京, 2011 年 6 月 9 日
- 16) 加藤くみ子, 水端美保, 大島裕希, 兵頭健治, 石原比呂之, 菊池寛, 川西徹: ナノメディシンのサイズ・表面物性評価法の検討. 日本薬剤学会第 26 年会, 東京, 2011 年 5 月 31 日.
- 17) T. Sakamoto, K. Nakayama, D. Sasakura, T. Kawanishi, Y. Hiyama: Vibrational Spectroscopic analysis of pharmaceuticals and tablet process understanding using near-, mid-, and far-infrared / terahertz spectroscopy. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (2011. 5 Kyoto)
- 18) T. Sakamoto, K. Nakayama, A. Portieri, D. Arnone, D. Sasakura, P. Taday, A. Zeitler, T. Kawanishi, Y. Hiyama: Time-course analysis of tablet film-coating using terahertz pulsed imaging. 36th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (2011. 10 TX, USA)
- 19) T. Koide, N. Sanada, M. Tozu, N. Katori, T. Kawanishi, Y. Hiyama: Study on Evaluation of solid dosage forms using TOF-SIMS chemical mapping and NIR chemical imaging techniques. 2011 AAPS Annual Meeting and Exposition (2011.10 Washington DC, USA)
- 20) 藤沼健太, 米持悦生, 吉橋泰生, 寺田勝英: 処方粉体の打錠用杵への付着性と相互作用パラメータの検討. 第 28 回製剤と粒子設計シンポジウム (2011.10 大阪)
- 22) 坂本知昭: 医薬品製造工程管理ツールとしての SFC への期待. SFC 研究会 (2012.2 東京)
- 23) 小出達夫, 眞田則明, 戸津美矢子, 川西徹, 檜山行雄: 飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いた固形製剤におけるステアリン酸マグネシウム分布の解析. 日本薬学会 132 年会 (2012.3 札幌)
- 24) 坂本知昭, 長門琢也, 細野哲矢, Axel Zeitler, 香取典子, 奥田晴宏: テラヘルツパルスイメージングによるコーティング欠陥の検出. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3 札幌)
- 25) 坂本知昭, 渡邊英俊, 香取典子, 奥田晴宏: ハイスループット ODS カラムを用いたプロプラノロールのワンポットーツーステップ合成工程のリアルタイム解析. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3 札幌)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 統合型毒性試験系による安全性評価手法構築に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部  
研究者 山田 雅巳  
研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨 F344 系 *gpt delta* ラットと他の試験の統合を検討した。遺伝毒性試験としての新規 Pig-a アッセイプロトコルの確定および技術共有が完了した。代替試験法として小核試験の可視化、Ames 試験における新手法の改良、umu 試験の改良等を検討した。

### 研究分担者

- (1) 大阪府立大学 杉本憲治
- (2) カントリービレッジネオエクスパート(株) 藤居 互
- (3) (株)蛋白精製工業 平田大介
- (4) (財)食品薬品安全センター 須井 哉
- (5) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (6) 帝人ファーマ(株) 木本崇文
- (7) 第一三共(株) 伊東 悟
- (8) 田辺三菱製薬(株) 宇野芳文・武藤重治
- (9) 科研製薬(株) 真田尚和
- (10) 中外製薬(株) 三島雅之・竹入 章
- (11) 日本エス・エル・シー(株) 高木久宜
- (12) 国立医薬品食品衛生研究所 石井雄二
- (13) 国立医薬品食品衛生研究所 増村健一

### A. 研究目的

化学物質の安全性評価は実験動物を用いる毒性試験の結果に基づいて実施されてきた。近年、動物愛護に対する関心の高まりを受けその観点に基づいて、動物実験に関する 3R (削減-Reduction-、改善-Refinement-、代替-Replacement-)を考慮したガイドラインの策定が国際的な流れとして求められている。マルチエンドポイントを組み込んだ統合型遺伝毒性試験系の確立は、医薬品を含む化学物質全般のヒト健康影響を評価している厚生労働行政にとっては喫緊の課題と考える。

本研究課題は 3 つのグループ (G)、*in vivo* 試験法 G、Pig-a アッセイ G、代替試験法 G、に分けて実施することにした。

1. トランスジェニック (Tg) 動物を用いる遺伝毒性試験は臓器特異的な評価が可能な *in vivo* 突然変異検出系であり、その有用性が注目されている。*in vivo* 試験法 G は、国立衛研の能美らが HS 重点研究の中で開発した遺伝毒性

検出用 *gpt delta* Tg マウスおよびラットを用いる遺伝毒性試験にマルチエンドポイントで試験を組み込むことを検討する。

(増村) 改良型 *gpt-delta* マウス (Pol  $\kappa$  KI *gpt delta*) における *in vivo* 変異原性の基礎データを得るとともに、高感度試験系としての有用性を検討する。*gpt delta* マウスについても加齢による変異蓄積への影響を検討するため 2 年間の飼育実験の結果を解析した。

(三島・竹入) Pol  $\kappa$  ノックイン *gpt delta* マウスより樹立した胚線維芽細胞 (MEF) の遺伝毒性評価系としての可能性を検討する。マイトマイシン C (MMC) で処理し DNA 二本鎖切断 (DSB) の誘発と修復における Pol  $\kappa$  の関与を調べ、既知変異原物質である benzo[a]pyrene (B[a]P), benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE) で細胞を処置し、リン酸化 H2AX ( $\gamma$ H2AX) を指標として DNA 損傷の検出を検討した。合わせ Pol  $\kappa$  欠損の効果も調べた。

(高木) 現在メインで使用されている F344 系 *gpt delta* に対して一般毒性試験に準じた背景データ作成を行い、統合型遺伝毒性試験系として有用なモデル動物であることを証明する。一方で、WistarHannover 系 *gpt delta* ラットの開発を進める。

(藤居) F344 系統 *gpt delta* ラットによる遺伝毒性評価系に統合する評価系として末梢血小核試験を選択し、ラット既知発がん物質である B[a]P を用いて、Tg 突然変異試験と末梢血小核試験の異なるエンドポイントに対する検出力を検証する。

(石井) ①発がん性試験と同一条件で試験を実施できる F344 系 *gpt delta* ラットを用いて、一般毒性 *in vivo* 変異原性ならびに発がん性の同時評価の可能性を検討する。タモキシフェン

(TAM) 及びペンタクロロフェノール (PCP) を単独又は併用投与した *gpt delta* ラットの肝臓について、病理組織学的検索、肝細胞前がん病変の指標である glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の定量解析ならびに *gpt* 及び Spi<sup>-</sup> 変異頻度解析を実施する。②F344 *gpt delta* ラットの104週間の飼育を終了し、剖検観察後、主要臓器について重量を測定する。

2. Pig-a 遺伝子突然変異を利用した *in vivo* 突然変異試験法 (以後、Pig-a アッセイ) は、末梢血を用いて遺伝子突然変異誘発性を評価できる方法であることから、動物愛護(3R)を考慮して従来の遺伝毒性試験あるいは反復投与毒性試験に組み込むことが出来る点で有用性が期待されている。本研究では、参加する共同研究機関 (国立衛研、田辺三菱製薬、第一三共、科研製薬、帝人ファーマ) にて Pig-a アッセイの技術共有化を実施し、代表的な遺伝毒性物質を用いて Pig-a アッセイの施設間差検証を行った。

3. 代替試験法は動物を用いない 3R の目的に合致し、特にスクリーニングの段階で有用であるため、より精度の高い結果を出せる試験が求められている。そこで代替試験法 G は文字通り Replacement を目的にそれぞれ次のような試験法を検討する。

(山田) 作出した pol  $\kappa$  ノックイン (pol  $\kappa$  KI) *gpt delta* マウスから MEF を樹立し、ベンツピレンを用いて曝露実験を行った。pol  $\kappa$  野生型および pol  $\kappa$  KI 細胞株の突然変異誘発能に関する基礎データを得るとともに、*in vitro* 変異原性試験系としての有用性を検討した。

(杉本) ライブセルイメージングによる解析方法を利用し *in vivo* 小核試験の代替法を確立する。小核形成のパターンへの薬剤濃度依存性の関与をマイトマイシン C (MMC) を用いて調べた。

(須井) Ames 試験を、より少量の被験物質で短期間に実施できる FAT に、感受性、利便性の面から改良を加える。

(平田) Ames 試験の欠点を補う遺伝毒性試験法として開発された umu 試験で、ラット glutathione *S*-transferase (GST) を発現できるようにした株を採用し、ジハロアルカンに対して特異的に感受性を高める。検出効率を上げる目的で5種類の Lysis buffer で細胞を破碎し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を比較する。

## B. 研究方法

《*in vivo* 試験法 G》

(増村) Pol  $\kappa$  KI *gpt delta* Tg マウスの自然突

然変異については、雄12週齢及び、雌雄52週齢の Pol  $\kappa$  KI および Pol  $\kappa$  WT マウスの肝臓および精巣からゲノム DNA を抽出し、*gpt* アッセイにより点突然変異体頻度、Spi<sup>-</sup> アッセイにより欠失変異体頻度を測定した。得られた変異体のシーケンス解析を行い変異部位を決定した。4、26、52、78 および 104 週齢の雄 *gpt delta* マウスについても、主要臓器を採材して凍結保存した。肝臓と精巣について *gpt* アッセイによって点突然変異頻度を、Spi<sup>-</sup> アッセイによって欠失変異体頻度を測定した。

(三島・竹入) Pol  $\kappa$  KI *gpt delta* MEF を用いた遺伝毒性試験の検討

*gpt delta* pol  $\kappa$  KI マウス (mutant pol  $\kappa$  homo/ $\lambda$  EG10 homo) および *gpt delta* マウス (野生型 pol  $\kappa$  homo/ $\lambda$  EG10 homo) より調製した MEF (それぞれ pol  $\kappa$  KI MEF および pol  $\kappa$  野生型 MEF) を用いた。MEF を約1週間培養し、96 well プレートへ播種した翌日、MMC を 2  $\mu$ g/mL を最高用量として公比2で11段階の用量で24時間、また B[a]P、BPDE をそれぞれ 50  $\mu$ g/mL、2  $\mu$ mol/L を最高用量として、以下公比2、11段階の用量で処理した。処理時間は BPDE は24時間、B[a]P はラット肝 S9mix 存在下で4時間とした。DNA 損傷は、細胞を  $\gamma$ H2AX (Ser139) の発現を抗体により蛍光染色し、細胞あたりの蛍光強度を ArrayScan HCS Reader (Thermo) で測定して調べた。

(高木) F344 系 *gpt delta* ラットの背景データ作成について、13週飼育実験には、6週齢の F344 系 *gpt delta* ラットおよび対照群として F344 系ラットを雌雄各20匹、計80匹を用いた。飼料は 5002 Certified Rodent Diet を、飲水は塩素消毒した井戸水をそれぞれ自由摂取させた。体重は週1回測定した。一般状態および死亡動物の有無は毎日観察し、試験開始13週後に全生存動物を安楽死させ試験を終了した。体重、臓器重量の測定、血液学的検査および血液化学的検査を行った。各器官を採取しホルマリン固定を行った。定法に従いヘマトキシレン・エオジン (H. E.) 染色切片を作製し、病理組織学的検索を実施した。26、52 週間飼育試験については、6週齢の F344 系 *gpt delta* と対照群雌雄各40匹について12時間明暗サイクルで飼育した。試験開始26週、52週後に、それぞれ各群20匹、計80匹ずつ安楽死させた。各種臓器の重量測定およびホルマリン固定し、さらに、病理組織学的検索を実施した。統計学的処理方法としては、2群間の等分散について分散比の F 検定を行い、

等分散であれば Student の *t* 検定、非等分散であれば Aspin-Welch の *t* 検定を、有意水準を 5% で実施した。

(藤居)F344 系 *gpt* delta ラットを用いた B[a]P の Tg 突然変異試験および末梢血小核試験について、6 週齢の F344 系統 *gpt* delta 雄性ラットを用いた。飼料 (CE-2) および水道水は自由に摂取させた。被験物質として B[a]P を、陽性対照として *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を、ラット体重 1 kg あたり 5 ml の投与溶液を用時調製し、1 群あたり 6 匹のラットに 1 日 1 回、28 日間 (day1-28) の強制経口投与を行った。B[a]P はオリーブ油を溶媒とし、0 (陰性対照)、62.5、125 mg/kg の投与量となるように調製した。ENU (陽性対照) は PBS (pH6.0) を溶媒とし、10 mg/kg の投与量となるように調製した。末梢血の採取は、全例について投与前日 (day0) および day4, 15, 29 に実施した。Day4 以降の採血は、前日の投与から 24 時間後に実施した。末梢血小核試験は、day-1, 3, 14 および day28 に採取した末梢血中の小核を含む網状赤血球 (MN-RET) を、*In vivo* Rat MicroFlow PLUS Kit を用い、フローサイトメーターを使用して測定した。1 検体あたり 2 万個の RET (網状赤血球) を計測して MN-RET の出現頻度を算出した。投与最終日より 3 日後に、麻酔下で腹大動脈より採血した後、臓器を摘出し重量を測定した。採取した組織は -80°C で凍結保存し、血液については、血液学的検査および血液生化学的検査を実施した。末梢血小核試験、*gpt* アッセイ (点突然変異検出)、Spi-アッセイ (欠失突然変異検出) は定法に従った。

(石井) F344 系 *gpt* delta ラットを用いた TAM の 13 週間反復投与試験

①6 週齢の雌性 F344 *gpt* delta ラット 40 匹を各群 10 匹ずつ、対照群、TAM および PCP 単独投与群、TAM と PCP 併用投与群の計 4 群に配した。TAM 及び PCP をそれぞれ 500 ppm 及び 200 ppm の濃度で 13 週間単独又は併用投与した。動物は剖検日前日より一晩絶食させ、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検した。各臓器は肉眼的に観察後摘出し、臓器重量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査および病理組織学的検索を行った。肝臓の GST-P 陽性肝細胞巢の量的解析およびコメットアッセイを実施した。肝臓の一部は *gpt* アッセイおよび Spi-アッセイ用の試料として凍結保存した。肝臓については、GST-P 免疫染色を施し、GST-P 陽性肝細胞巢の定量的解析を実施した。外側左葉の一

部は *gpt* 及び Spi- assay 用のサンプルとして液体窒素により凍結後、-80°C で保存した (ここまでは昨年度実施)。血液生化学的検査は、SRL 社 (東京) に委託し、点突然変異及び欠失突然変異を *gpt* アッセイ及び Spi-アッセイにより調べた。②6 週齢の雌雄 F344 系 *gpt* delta ラット各 75 匹および対照群として野生型の雌雄 F344 ラット各 75 匹を CRF-1 固形基礎飼料と水道水で飼育したものについて自然発生腫瘍の検索をした。一般状態の観察を連日実施し、体重は開始から 13 週目までは毎週 1 回、14 週目以降からは毎月 1 回測定した。各臓器は肉眼的に観察後摘出し、主要臓器の重量を測定した。その他の臓器も含め、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を施し、病理組織学的検索を行った。

《*Pig-a* アッセイ G》(本間、木本、伊東、宇野・武藤、真田)

*Pig-a* は GPI アンカー合成に必須の遺伝子であり、X 染色体上に位置している。*Pig-a* 遺伝子上に変異が生じると、GPI アンカーが合成されなくなり、その結果細胞表面上に GPI アンカータンパクが発現しなくなる。*Pig-a* アッセイはこの原理を利用し、GPI アンカータンパク (赤血球では CD59) を認識する蛍光標識抗体で末梢血赤血球を処理した後、フローサイトメーターを用いて *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性、GPI アンカーが発現していない細胞) の出現頻度を評価する系である。

#### 1) *Pig-a* アッセイの技術共有化

末梢血全赤血球を用いた *Pig-a* アッセイ (RBC *Pig-a* アッセイ) 及び網状赤血球 (RET) に特化した *Pig-a* アッセイ (PIGRET 法) の 2 つを共同研究機関で技術共有するため、開発元である帝人ファーマで詳細な測定プロトコールを作成し、技術共有化を進めた。

#### 2) 遺伝毒性物質投与ラットを用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証

初期試験として、帝人ファーマにおいて SD ラット (雄、7 週齢) に ENU を 0, 10, 40 mg/kg、または Dimethyl benzantracene (DMBA) を 0, 20, 40 及び 60 mg/kg、または 4-Nitroquinoline-1-Oxide (4-NQO) を 0, 25, 50 及び 100 mg/kg で投与した。投与後 4 週目まで定期的に採血した末梢血サンプルを用いて RBC *Pig-a* アッセイ及び一部の機関で PIGRET 法を実施し、*Pig-a* 変異頻度を測定した。また、末梢血サンプルの一部を国立衛研に送付し、採

血翌日の末梢血サンプルを用いた RBC *Pig-a* アッセイを国立衛研で実施した。投与 2 日目にも採血を行い、末梢血サンプルを用いた小核誘発性を任意で評価した。

#### 《代替試験法 G》

(山田) ①変異型 *pol κ* をホモで持つ *pol κ* KI *gpt delta* マウス(16-20 週齢)を交配させ、13.5 日胚より *pol κ* KI *gpt delta* MEF を樹立した。セミコンフルエントになるまで 1~3 日程度培養した後、細胞を -80°C で凍結保存した。樹立した MEF については、由来する胎児組織からゲノム DNA を抽出し、PCR によって遺伝子型が *pol κ* KI ホモ体であることを確認した。また、野生型 *pol κ* を持つ *gpt delta* マウスからも同様に MEF を樹立した。②本研究ではベンツピレン代謝活性化体のベンツピレンジオールエポキシド (BPDE) を使用した。96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  個の MEF 細胞をまき、5 時間後に 10 nM, 50 nM, 100 nM の BPDE, および溶媒 (DMSO) のみを添加し、37°C・5%CO<sub>2</sub> 条件下で 19 時間曝露させた。曝露終了後に培地を交換し、MTS assay によって細胞の生存率を測定した。各細胞株で一用量あたり 3 ウェル使用した。さらに、細胞毒性が認められた BPDE 50 nM の用量で各細胞株を処理し、回収した細胞からゲノム DNA を抽出して *gpt* アッセイによって点突然変異体頻度を測定した。

(杉本) ライブセルイメージング装置には、電動式 XY ステージに対応した器械を用いた。ステージトップインキュベーター内に水補給装置を設置し、光源にはハロゲンランプを、細胞の観察には 40 倍の対物レンズを、画像の取得には超高感度の EM-CCD カメラを用いた。可視化細胞には、m5S (mCherry-H3A14-6) (マウス胎児線維芽細胞株 (m5S) 由来のトランスジェニック蛍光細胞) を使用した。染色体数は 41 本で、パッセージ 6 までは蛍光が失われず、また細胞の 7 割以上がこの染色体数を維持することを確認した。細胞は 15%FBS 添加の D-MEM 培地にて、炭酸ガスインキュベーター内で一晚培養後に、水で希釈した MMC を加え (終濃度 150, 300, 450 nM) 4 時間処理した。培地交換の際に薬物を除去し、ライブセルイメージング装置で、6 分間隔で 65 時間継続してタイムラプス観察を行った。小核の形成頻度は、一定時間後の取得画像中に見いだされる小核を持つ細胞の割合とした。

(須井) 菌株には Ames 試験菌株 TA100 株および TA98 株を用いた。FAT の実験方法は、384 ウェルプレートを用いた Sui ら (2009) の方法 (改良法

FAT) によった。TA100 株では、前培養後の菌液の希釈率を通常どおりの 1 倍に加えて、4 倍、1/2 倍 1/4 倍の合計 4 段階とした。TA98 株でも 4 段階の菌液を用意した。被験物質による処理 (プレインキュベーション、PI) には 24 ウェルプレートを用い、37°C、170 rpm で 90 分間振盪した。24 ウェルプレートの使用ウェル数は、菌量 (4 倍) では 4 ウェル/用量、それ以外の菌量では 3 ウェル/用量とした。S9 mix 中の S9 濃度は 10%とした。被験物質は、S9 mix 非存在下で AF-2 と 4NQO、S9 mix 存在で 2-2AA と B[a]P を用いた。PI 後は、24 ウェルプレートの各ウェルにインジケータ培地を 2.5 mL 加えて処理液を調製した。24 ウェルプレートの 1 ウェル中の処理液を、384 ウェルプレートに分注した (60 μL/ウェル×48 ウェル、合計 3 枚)。分注後、384 ウェルプレートをチャック付ビニール袋に入れ、37°C で 3 日間静置培養した。FAT の判定は、復帰突然変異が生じたウェルでは菌が増殖して pH が下がることにより、発色試薬の bromocresol purple が紫色から黄色に変色する原理を用い、目視により行う。2 年めは、菌株にアミノ酸非要求性になった TA100 および TA98 株を用いた。0.1 mol/L リン酸緩衝液 0.5 mL に各希釈菌液 0.1 mL および NB トップアガー 2 mL を加えて攪拌したのち、最少グルコース寒天平板培地上へ上層した (2 枚/希釈菌液)。最少グルコース寒天平板培地を 37°C で 2 日間静置培養し、生成したコロニー数を計測して各希釈菌液中の生菌数の濃度 (個/mL) を求めた。また、生菌数の濃度から、384 ウェルマイクロプレートあるいは、96 ウェルマイクロプレートの 1 ウェル中に含まれる菌数を求めた。プレインキュベーション (PI) の条件は、24 ウェルマイクロプレートを 37°C、170 rpm で 90 分間回転の振盪培養とした。静置培養の条件は、分注後、384 ウェルマイクロプレートあるいは 96 穴ウェルマイクロプレートをチャック付ビニール袋に入れ、37°C で 3 日間とした。復帰突然変異菌を含むウェル中では菌が増殖して pH が下がることにより、発色試薬の bromocresol purple が紫色から黄色に変色する。黄変ウェル数の計測は、目視により行った。

(平田) 使用菌株 *S. typhimurium* NM5004 株は、大阪府公衆衛生研究所 (現 中国科学院生態環境研究中心) の小田美光博士より譲渡された。この菌株には glutathione *S*-transferase (GST) を発現するプラスミドが導入されている。任意に選択した 10 個のコロニーから 1,3-ジクロロアセトンに対して最も感度のよい株を選んだ。キットに添付する菌量を決定するため、1,2-dibromoethane (和光

純薬) など 5 種類の被験物質の最小検出濃度を調べた。次に、 $\beta$ -gal 活性を効率よく検出するため、次の 5 種類の細胞を破碎する Lysis buffer について効果を比較した。発色基質クロロフェノールレッド- $\beta$ -D-ガラクトピラノシドを 0.1M phosphate buffer (pH7.0) で希釈し、4.0mg/ml に調製した。各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加して軽く振とうし、37°C、15 分間発色させた後、1 M NaCO<sub>3</sub> を 100  $\mu$ l ずつ添加して反応を停止後、O. D.<sub>570</sub> を計測した。

### C. 研究結果

#### 《in vivo 試験法 G》

(増村) *Pol  $\kappa$  KI gpt delta* マウスの自然突然変異頻度の検討については、雄 12 週齢において、点突然変異頻度が肝臓と比較して精巣で有意に低い値を示した。両臓器において *Pol  $\kappa$  KI* と *Pol  $\kappa$  WT* の間に点突然変異頻度および変異タイプの違いは認められなかった。*Spi*<sup>-</sup>欠失変異体頻度は精巣と肝臓で差はみられなかった。肝臓、精巣ともに *Pol  $\kappa$  KI* では *Pol  $\kappa$  WT* と比較して欠失変異頻度が約 2 割高かった。*Pol  $\kappa$  KI* では 1 塩基欠失の頻度が *Pol  $\kappa$  WT* と比較して若干高かったが有意な差は認められなかった。52 週齢マウスの肝臓における点突然変異体頻度が、雌雄とも *Pol  $\kappa$  KI* では *Pol  $\kappa$  WT* に対して約 7-8 倍の有意な増加がみられたが雌雄の差はなかった。雄の精巣においては *Pol  $\kappa$  KI* では有意差はないものの野生型に対して増加傾向 (約 2 倍) が観察された。② *gpt delta* マウスを通常飼料 CRF-1 で飼育し、4、26、52 および 78 週齢の肝臓と精巣について *gpt* アッセイを行い、点突然変異頻度を測定した。肝臓の点突然変異頻度は 4 週齢に対して 26 週齢では 1.5 倍、52 週齢では 2.2 倍、78 週齢では 3.4 倍と加齢に伴う増加が認められた。一方、精巣では加齢による変異頻度の有意な増加は認められなかった。肝臓、精巣ともに G:C→A:T トランジションおよび欠失が主な変異タイプであった。

(三島・竹入) *Pol  $\kappa$  KI MEF* および *Pol  $\kappa$  WT MEF* いずれにおいても、MMC および、B[a]P, BPDE 処理により  $\gamma$ H2AX による蛍光強度が増加した。*Pol  $\kappa$  WT MEF* では処置後 5 日目までに徐々に蛍光強度が減少した。一方、*Pol  $\kappa$  KI MEF* では 5 日後においても蛍光強度は高い値を維持した。蛍光強度はいずれの化合物においても、*pol  $\kappa$  野生型 MEF* と比較して、*pol  $\kappa$  KI MEF* で高い値が得られた。特に B[a]P では *pol  $\kappa$  KI* と *pol  $\kappa$  野生型* との差が顕著であった。*Pol  $\kappa$  KI MEF* および *pol  $\kappa$  野生型 MEF* において、DNA 損傷の

検出が可能であった。

(高木) F344 系 *gpt delta* ラットの背景データ作成については、13 週までは全群に死亡動物は見られなかった。52 週の試験期間を通じ、雄のみ Tg 群で有意に高い推移が認められた。血液学的検査、血液化学的検査、器官重量のほか病理組織学的検査を行った。雄において、肝臓の小肉芽腫、心臓の線維化、骨髄の萎縮等が観察された。雌においては、肝臓の小肉芽腫、心臓の線維化、骨髄の萎縮等のほか、子宮の囊胞状過形成が観察された。

(藤居) F344 系 *gpt delta* Tg ラットを用いた B[a]P の Tg 突然変異試験は、体重、臓器重量ともに、B[a]P 投与群においても、陽性対照群 (ENU 投与) においても、増加が抑制されていた。B[a]P 投与群において、血液中の赤血球、白血球、血小板、ヘモグロビン、ヘマトクリット値は用量依存的な低値が、血清中の総タンパク、総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸の低下、A/G 比、総ビリルビン、BUN、クレアチニン、無機リン、マグネシウム、ナトリウムについては顕著な高値が認められた。ENU 投与群においても投与初期より体重増加抑制が認められた。臓器重量においては、測定対象とした全ての臓器で顕著な低下が認められた。末梢血小核試験の結果は、B[a]P 投与群においては day4 より用量依存的な網状赤血球 (MN-RET) の増加が認められ、経時的に出現頻度が上昇する傾向が認められた。ENU 投与群は、day3 から顕著な MN-RET の増加が認められ、day28 で最も高値に検出された。また、投与最終日より 3 日後に採材した骨髄および大腸について点突然変異頻度を測定した。骨髄における *gpt* 変異体頻度、*Spi*<sup>-</sup>変異体頻度ともに、B[a]P 投与群で増加が認められたのに対して、ENU 投与では *gpt* 変異体頻度のみの増加であった。大腸については、B[a]P 62.5 mg/kg 投与群で 4 倍、125 mg/kg 投与群で 10 倍、ENU 投与群で 59 倍の *gpt* 変異体頻度の上昇が認められた。

(石井) ① F344 系 *gpt delta* ラットを用いた TAM の 13 週間反復投与試験は TAM および TAM+PCP 群で投与開始 1 週目から著しい体重増加抑制が認められ、有意な低値となった。1 日当たりの平均摂餌量は対照群に比べ TAM および TAM+PCP 群で低値を示し、1 日当たりの TAM 摂取量は TAM および TAM+PCP 群で差は認められなかった。肝臓について病理組織学的検索を実施した結果、TAM 群では全例で小葉辺縁部の肝細胞肥大と局所の肝細胞変性・壊死像が認められた。TAM+PCP

群においても同様の病変が認められたものの、その頻度に差は認められなかった。また PCP 群においては小葉辺縁部の肝細胞肥大のみが認められた。TAM 群では肝 GST-P 陽性細胞巢の数ならびに面積は有意に上昇した。TAM+PCP 群においても対照群に比べ有意な上昇が認められたものの、TAM 群との間に差は認められなかった。肝臓におけるコメントアッセイの結果、対照群と比較していずれの指標も群間に有意な変化は認められなかった。*gpt* 変異頻度は、TAM 群では肝臓において対照群の約 30 倍、*red/gam* 変異頻度は約 17 倍の有意に増加した。また、TAM+PCP 群においても対照群に比べ有意な増加が認められたものの、TAM 群との間に差は認められなかった。② *gpt delta* ラット試験期間中の途中死亡数は 84 週目以降増加したが、生存率については雌雄ともに遺伝子型間で差は認められなかった。最終体重は雄性 *gpt delta* ラットで有意な低値が認められた。解剖時の剖検所見では、雌雄のラットに脾臓及び肝臓の腫大、下垂体腫大、腎臓の腫大、乳腺を含む皮下腫瘍及び精巣腫大が認められ、雄性ラットでは腎臓及び精巣の腫大が、雌性ラットでは下垂体腫大及び乳腺を含む皮下腫瘍が高頻度に認められたが、何れの発生頻度にも遺伝子型間に差は認められなかった。

《*Pig-a* アッセイ G》(本間、木本、伊東、宇野・武藤、真田)

#### 1) *Pig-a* アッセイの技術共有化

帝人ファーマで RBC *Pig-a* アッセイ及び PIGRET 法の詳細な測定プロトコールを作成し、各研究機関に送付した。帝人ファーマで採血したサンプルを各機関へ送付し、各機関で RBC *Pig-a* アッセイを実施して技術共有化を検討した。その結果、いずれの機関でも陰性対照群に対し ENU 40 mg/kg での明確な *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が認められた。また、初回測定結果では各機関で陰性対照群の値にバラつきが認められたが、測定機器における *Pig-a* 変異細胞を検出する領域の設定を各機関で一律 (補正サンプルが 99.0% 囲まれる範囲) となるように工夫して再解析したところ、各機関とも目標値 ( $10 \times 10^{-6}$  以下) が達成できた。

2) 各種化合物を用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証各機関の RBC *Pig-a* アッセイの結果を比較したところ、いずれの化合物も投与用量に応じた *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が投与後 2 週目以降より認められた。また、各機関で採取した末梢血サンプルを国立衛研に送

付し、翌日国立衛研で測定した結果と、各機関での結果を比較したところ、反応性に差がなかった。PIGRET 法について、帝人ファーマによるデモンストレーションを行った後、一部の参加機関では施設間差検証の際に PIGRET 法を実施した。その結果は、いずれも投与後 1 週目以降より、投与用量に応じた *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が認められた。さらに、RBC *Pig-a* アッセイと PIGRET の反応性の比較したところ、PIGRET で投与後 1 週目より明確な *Pig-a* 変異細胞 (CD59 陰性細胞) 数の増加が認められた。DMBA 投与の結果は、RBC *Pig-a* アッセイでは投与後 4 週目に向かって DMBA 投与群の反応が増加するのに対し、PIGRET では投与後 1 または 2 週目で最大値を示し、投与後 4 週目では低下する傾向が認められた。4-NQO 投与の結果も、PIGRET の感度が高かった。

3) 他の試験との併用の検討について、① *gpt-delta* Tg マウスを用いた *Pig-a* アッセイで、陰性対照群 (ENU 0 mg/kg) に対し ENU 40 mg/kg で *Pig-a* 変異頻度の明らかな増加。投与後 7 週時点においても *Pig-a* 変異頻度の増加が明確に維持された。② *in vivo* 末梢血小核評価との組合せの検討は、10 mg/kg 以上の ENU の投与により、投与 2 日目に用量の増加に伴って小核を有する RET の頻度が増加した。

《代替試験法 G》

(山田) ① *pol κ* KI *gpt delta* マウスについては、二腹よりそれぞれ 8 個の胚由来の MEF を樹立し凍結保存した。*pol κ* 野生型 *gpt delta* マウスについては、一腹より 5 個の胚由来の MEF を樹立した。② *pol κ* 野生型および *pol κ* KI *gpt delta* MEF 細胞株を BPDE で処理し、生存率の測定 (MTS assay) を行ったところ、それぞれ系統由来の異なる 3 種の細胞株いずれも、用量依存的に生存率が低下した。50 nM および 100 nM では *pol κ* KI の方が BPDE に対する感受性が高く、*pol κ* 野生型に比較して生存率が低かったが、その差は 10% 程度とわずかであり、全体の傾向として *pol κ* KI と *pol κ* 野生型は同様の生存率の変化を示した。

さらに、生存率が 20~30% 低下した 50 nM BPDE の条件で細胞を処理し、回収した細胞からゲノム DNA を抽出してレポーター遺伝子を回収し、*gpt* 遺伝子に生じた突然変異の頻度を測定した。MEF からのレポーター遺伝子の回収効率 (パッケージング効率) は全体に低くばらつきが大きかった。溶媒処理群の MEF 細胞における



*gpt* 点突然変異体頻度は、*pol κ* KI において 10 倍以上の有意な増加がみられた(*pol κ* 野生型は 3 系統、*pol κ* KI は 2 系統由来の平均値)。50 nM BPDE 処理群における *gpt* 点突然変異体頻度は、*pol κ* KI が野生型の約 2 倍であった。

(杉本) 核・染色体を可視化した近 2 倍体の核型を示すマウス胎児線維芽細胞株 (m5S) が分裂する様子をライブセルイメージングの手法を用いて解析した。複数の視野の画像を取得することにより、一度の観察において 100 個程度の細胞を観察することが、また、超高感度のカメラを用いることで、65 時間にも及ぶタイムラプス観察を行うことがそれぞれ可能となり、一つの細胞について連続して最長 5 回の細胞分裂をする様子を捉えることができた。MMC (150, 300, 450 nM)、4 時間処理後の細胞分裂時の小核形成をライブセルイメージング観察したところ、300nM で処理した場合、48 時間後の小核形成率は 11% で、低濃度の MMC (50 nM、100 nM) で処理した場合、コントロールと比較して細胞の増殖に影響なく、処理時間に応じて小核の形成頻度が増加した。小核形成の過程は、100nM では大部分が (17/24) 1 回目の細胞分裂時に小核を形成したが、50nM では半数以上 (8/12) が 2 回目以降の分裂になってはじめて小核を形成した。「トランスジェニック蛍光細胞」ライブ観察による小核の割合は、通常培養条件下、汎用される CHL/IU 細胞での発生頻度と同程度であった。

(須井)PI 時間の検討結果:AF-2、4NQO とともに、2 菌株で 90 分 (通常条件) のとき、0.1 倍において最低用量から明瞭な陽性結果が得られた。また、PI 時間の増加に伴って陽性反応の減少が認められた。4NQO は TA98 株で 0.1 倍において生育阻害が認められたが、PI 時間の違いによる差はなかった。2AA は、2 菌株で 90 分では、1 倍 (通常条件) において最も強い陽性反応を示し、PI 時間の増加に伴って陽性反応の減少が認められた。B[a]P は 2 菌株で 90 分では 0.5 倍において最も強い陽性反応が認められ、PI 時間の増加に伴って陽性反応の減少が認められた。次に 384 ウェルマイクロプレートを使用した結果、TA100 の、S9 mix 非存在下、存在下では、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルはそれぞれ、59 個/ウェル、50 個/ウェルであった。TA98 の、S9 mix 非存在下では、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルは 829 個/ウェルであったが、S9 mix 存在下では、復帰変異菌数が 18 個以上/ウェルで、黄変ウェル出現率が 100%# で

あった。また、96 ウェルマイクロプレートを使用した結果は、TA100 の、S9 mix 非存在下、存在下では、復帰変異菌数が 14 個以上/ウェルおよび、12 個以上/ウェルで、ともに黄変ウェル出現率が 100%# であった。TA98 (S9 mix 非存在下) では、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルは 1658 個/ウェル、復帰変異菌数が 315 個以下/ウェルで、黄変ウェル出現率は 0% であった。TA98 (S9 mix 存在下) では、復帰変異菌数が 37 個以上/ウェルで、黄変ウェル出現率が 100%# であった。#黄変ウェル出現率が 100% の場合、黄変ウェル出現頻度 (%) が 100% となる最少の復帰変異菌数/ウェルは算出できない。

(平田) *umu* 試験において、最も活性の高いコロニーを選択するため、1,3-dichloroacetone を被験物質として *umu* 試験を実施し、10 コロニーの中から最も活性が高いものを選んだ。それを用いてキットに供する菌液量の検討を行った。50ml 遠沈管で菌液を遠心して菌体を回収し、凍結保存用の培養液に置換した。その際に添加する保存培地の添加量を調整し、濃縮率 20%、30%、40%、50% について現行のキットの試験手順で試験した結果、40% がもっともよい結果だった。次に、検出効率を上げる目的で 5 種類の Lysis buffer で細胞を破碎したが、Bugbuster® 以外では  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出されなかった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が確認された Bugbuster® については、通常 10% 希釈よりも 25% 希釈で発色強度が高かった。pKJB7/1A1 と pKJB7/1A2 を導入した株を、代謝活性化を必要とする変異原物質 IQ および、直接変異原である 4-NQO で処理し、Bugbuster® で溶菌させて *umu* 試験を実施した結果、IQ は pKJB7/1A2 の菌の方が  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が高かった。

#### D. 考察

##### 《*in vivo* 試験法 G》

(増村) ①加齢が自然突然変異に与える影響を 4~102 週齢の雄 *gpt delta* マウスを用いて検討した。肝臓では *gpt* 点突然変異頻度が加齢とともに 78 週齢まで有意に増加したが、精巣では 4~78 週齢の突然変異頻度に有意な差は認められなかった。点突然変異の加齢に伴う蓄積には臓器特異性があることが示唆された。加えて、精巣で点突然変異の蓄積が見られなかったことは、精巣では外因性および内因性変異原への曝露レベルが低いことや、生殖組織では何らかの防御・修復機能が働き変異の誘発、蓄積が起こ

りにくいことが可能性が原因として考えられた。2年を超える老齢時にはそれまでの加齢に伴う変異蓄積とは異なる老化現象を反映した変異が誘発されている可能性が示唆される結果を得た。②TLS型DNAポリメラーゼはDNA損傷部位でのDNA合成を担っており、その不活化は誘発される突然変異のタイプや頻度に影響を及ぼす可能性がある。52週齢の*Polκ*KIマウスの自然突然変異頻度は、雄雌ともに*Polκ*KIが*Polκ*WTよりも高い値を示した。*Polκ*不活化による感受性の増加の程度は臓器により異なっていた（肝臓は高く、精巣は低い）。自然突然変異の原因として、食餌由来の外因性変異原や、呼吸に伴う酸化的DNA損傷等の内因性変異原の関与が考えられる。以上より、*Polκ*KIマウスでは低用量の変異原の長期曝露の影響を高感度に検出できる可能性が示唆された。*Polκ*ノックアウト *gpt* deltaマウスでは他のDNAポリメラーゼが代替的にTLSに働いている可能性を排除できない。本研究で用いた*Polκ* KIマウスは、不活化した*Polκ*がタンパクとして存在しているため、*Polκ*の影響をより詳細に解析することが可能と考えられる。ノックアウトマウスで野生型と比べて変異頻度の増加がみられたのは40週齢を超えた時点であることから、*Polκ* KIマウスにおいて加齢とともに蓄積する突然変異への影響を検討することが必要と考える。

（三島・竹入）これまでの*Polκ* KIマウスを用いた研究結果（三島ら）から、*Polκ*はGpGに形成されたintrastrand cross-linkにおけるTLSにおいてfidelityの高いDNA複製に関与することが示唆されている。さらに*Polκ* WTマウスにおいてMMC投与によって誘発される大きな欠失変異が*Polκ* KIマウスでは誘発されなくなったことから、三島らは*Polκ*がDSB修復機構の一つであるnon-homologous end-joining (NHEJ)に関与するという仮説を提唱した。MEFを用いた今回の結果は、*Polκ* KI MEFではMMCによって誘発されるDSBの修復が*Polκ* WT MEFと比較して遅延することを示唆しており、仮説を支持する結果と言える。B[a]Pは肝代謝酵素によりBPDEをはじめとした活性代謝物となり、これがグアニンの2位に付加体を形成する。*polκ*はこの付加体におけるTLSに関与することが示唆されている。H2AXのリン酸化はDNA二本鎖切断を含むDNA損傷や、DNA複製フォークの持続的な阻害によって誘発されることが知られている。今回の結果から、MEFを用いた $\gamma$ H2AX評価系が、これらの化合物によるDNA損傷を検

出可能であることが示された。また、*polκ*はこれらの化合物のDNA付加体部位でのTLSに関与し、DNA複製フォークの停止およびこれに続くDNA二本鎖切断の誘発を防いでいることが示唆された。つまり、*polκ* KI MEFを用いることでDNA損傷の検出感度が増加する可能性が示された。

（高木）確認された体重の変動は、各種データに基づき総合的に判断した結果、ロット差によるものであると推察した。絶対器官重量、血液学的検査結果および血液化学的検査において、雌雄共に散見された有意な変動は、相対重量や週齢間での相関性が確認されないことから、偶発的な変動であると判断した。病理組織学的検査では、雌雄共F344/Nラットの長期飼育で発生することが知られている所見がF344系 *gpt*-deltaラットにおいても確認された。以上より、F344系 *gpt*-deltaラットはバックグラウンドであるF344/Nラットと同等の性質を持ち合わせていると考えられる。

（藤居）今回の検討結果より、F344系 *gpt* delta Tgラットを用い、OECDガイドラインに従い、B[a]Pを28日間反復投与した動物において、骨髄、大腸における*gpt*、Spi<sup>-</sup>変異体頻度、および末梢血幼若赤血球の小核の誘発率はいずれも顕著に高く検出されたことから、本試験系は、同一個体でB[a]Pによる点突然変異、欠失変異、染色体異常を十分な感度をもって検出可能であることが明らかとなった。OECDガイドラインに則した試験スケジュール（28日間反復投与を行い、投与最終日より3日後に採材）での評価例は報告例が少なく、F344系統 *gpt* deltaラットを用いて、B[a]PおよびENUの強制経口投与によって骨髄および大腸で明瞭な陽性結果が得られたことは重要な知見である。げっ歯類を用いたB[a]Pの反復投与末梢血小核試験について、今回の評価で、投与4日目で用量依存のかつ明瞭なMN-RETの増加が示されており、少なくともF344系 *gpt* deltaラットはB[a]Pの小核発現を比較的感度良く検出可能な系であると言える。ただし、末梢血以外の組織の小核試験やコメットアッセイ等の*in vivo*遺伝毒性試験の多くの評価において、検出力のピークは最終投与後数時間~2日程度と考えられており、3日後での評価は検出力が低下することが懸念される。Tg動物を用いた突然変異試験に他の*in vivo*評価系を組み込むことは3Rの観点からも有用であるが、今後、更に統合可能な試験を拡充するにあたっては、サンプリング時期の違いによる各種

エンドポイントの検出力について検討する必要がある。

(石井) ①F344 *gpt delta* ラットを用いた統合型毒性試験法の有用性を検討するため、TAM 単独投与試験と TAM と SULT 活性の阻害剤である PCP の併用投与試験 (13 週間反復投与試験) を実施した。血清生化学的検査では、様々な項目で有意な変化が認められたものの、アルカリフォスファターゼ (ALP) の上昇を除き、特筆すべきものはなかった。TAM の発がん標的臓器である肝臓について病理組織学的検索を実施した結果、TAM 群ではすべての動物で小葉辺縁部の肝細胞肥大と軽度の肝障害が認められ、ALP の上昇はこれに起因した変化であると考えられた。ラット肝前がん病変の指標である GST-P 陽性肝細胞巢は TAM 投与群で数、面積ともに有意に上昇し、TAM のラット肝発がん性を支持する結果であった。*gpt* 及び Spi<sup>-</sup> assay による肝臓の *in vivo* 変異原性評価では点突然変異頻度を示す *gpt* MFs ならびに欠失変異頻度を示す *red/gam* MFs ともに有意な上昇が認められ、BigBlue ラットでの報告と符合した。また、TAM+PCP 群では、いずれの検索項目においても TAM 群と同様の変化が認められ、PCP 併用投与の影響は認められなかった。当時に実施したコメットアッセイは、いずれの投与群でも陰性の結果となった。コメットアッセイの基本的な実験プロトコールでは、被験物質は単回～数回の強制経口投与で行い、投与後 4 ならびに 24 時間後にアッセイを実施する。今回は混餌による反復投与であり、一般毒性試験プロトコールに準じて、剖検日前日より約 18 時間の絶食をかけている点が違う。この相違点は本実験条件下で実施するコメットアッセイの検討課題であろう。②F344 系 *gpt delta* ラットの自然発生腫瘍の検索については、雌の体重の推移および生存率の推移に遺伝子型間で差は認められず、雄では F344 *gpt delta* ラットにおいて若干の体重の低値が認められた。生存率の推移には差は認められておらず、その原因については試験終了後に実施する病理組織学的検索の結果が待たれる。

#### 《*Pig-a* アッセイ G》

##### 1) *Pig-a* アッセイの技術共有化

RBC *Pig-a* アッセイの技術共有化に関して、測定機器における *Pig-a* 変異細胞を検出する領域の設定を一律 (補正サンプルが 99.0% 囲まれる範囲) にしたところ、いずれの機関も陰性対照群の平均値が目標値 ( $10 \times 10^{-6}$  以下) を達成できた。この定義は、ラットのみならずマウス

においても適用できると考えられ、今後の国際バリデーションにも有用と考える。この共通ルールを用いることで、施設間差を小さくした。PIGRET 法の技術共有化も達成されたと考えられる。

2) (木本) 新たに確立を試みた RETs 及び BMEs の *Pig-a* アッセイは、新たな評価系として十分に期待できると考えられた。特に RETs を対象とした手法は、バックグラウンド値も低く、かつ測定母集団も変異頻度を評価するのに十分な 100 万細胞とすることができるところで、*in vivo* における遺伝子突然変異誘発性を評価するための有効な手法になると期待される。

##### 3) 各種化合物を用いた *Pig-a* アッセイの施設間差検証

各機関で遺伝毒性物質を単回投与し、*Pig-a* アッセイによる *in vivo* 突然変異誘発性を投与 4 週目まで評価した結果、いずれの機関においても投与用量に応じた *Pig-a* 変異細胞数の経時的な増加が認められた。サンプルだけを集めて衛研でまとめて実施した測定結果も含め、施設間差も同等であると考えられた。また RBC *Pig-a* アッセイと PIGRET 法では、*Pig-a* 変異細胞数が最大値を示す時期に違いが認められた。PIGRET 法において、DMBA または 4-NQO 投与後 2-4 週目で *Pig-a* 変異頻度の低下傾向が認められたのは、投与後初期に発生した赤芽球由来の *Pig-a* 変異細胞が成熟赤血球へと分化したことに関連した変化であると考えられた。PIGRET 法では RBC *Pig-a* アッセイでは検出できなかった投与用量で *Pig-a* 変異細胞数の増加を検出することができ、かつ投与後 1 週目で明らかな増加を検出することから、RBC *Pig-a* アッセイよりも短期間かつ高感度に遺伝毒性リスクを評価する手法として期待できる。

4) *Pig-a* アッセイによる遺伝毒性検出感度や、化学物質による遺伝毒性発現の特異性を明らかにするために、今後は遺伝毒性誘発機序の異なる、突然変異誘発化合物および染色体異常誘発化合物を用いて、*Pig-a* 変異組み合わせ評価の有用性を検証する必要があると考えられる。

#### 《代替試験法 G》

(山田) pol κ KI *gpt delta* マウスは安定に系統維持されており、不妊・胎生致死等は認めていない。今回樹立した MEF においても、樹立の際に目立った系統差は認められなかった。DNA 損傷部位の乗り越えに関わる TLS 型 DNA ポリメラーゼは、遺伝毒性に防御に関わる生体因子のひとつであり、損傷部位で進行を停止する複製

型 DNA ポリメラーゼに代わって損傷部位での DNA 合成を担う。このため、その不活化は誘発される突然変異の頻度やタイプに影響を及ぼす可能性がある。TLS 型 DNA ポリメラーゼの一つである Pol  $\kappa$  はマウスの精巣等において高発現が認められており、pol  $\kappa$  KI マウスから樹立した培養細胞を用いることで高感受性かつ簡便なスクリーニング系を構築できる可能性がある。

(杉本) m5S(mCherry-H3A14-6)株は、長時間のライブセルイメージングに適している。まず、ライブセルイメージング解析特有の、照射される光による毒性の問題は、超高感度のカメラを用い、励起波長として可視光を使用し、微弱な光照射条件下で実験を行うことで解消され、細胞分裂が 5 回継続して観察することができた。多点でタイムラプス観察を行うことで一度に多くの細胞を取り扱うことが可能となった。従来の処理方法(150nM)では、薬剤を除去後の 2 回目細胞分裂で小核を生じる傾向が見られたが、小核の形成頻度は低く、観察できる細胞数は限られていた。より低濃度(50-100nM)で長時間処理し、細胞周期全体を通して薬剤を処理することで、小核の形成効率が増加した。個体を用いる動物試験においては、細胞の生死というよりは、細胞の増殖の程度の微妙な差の方が、毒性としては重要なかもしれない。ライブセルイメージング技術を用いて数世代にわたり細胞を追跡し、薬剤の存在下、その細胞増殖への様子が直接モニタリングできるだろう。今後 *in vivo* 小核試験の代替法を確立できるものと期待できた。

(須井) 4 種の既知変異原物質について、菌数を変えて改良法 FAT を行った結果、回転振盪の場合、PI 時間は従来どおりの 90 分が最適条件だった。PI 後の処理液の分注操作については、96 ウェルマイクロプレート (240  $\mu$ L/ウェル $\times$ 24 ウェル、への変更で、処理ウェルにおける黄変ウェル数のばらつき減少および低用量から陽性結果が認められた。加えて、マニュアルでの分注操作に要する時間が従来に比べて半分以下となり、労力が軽減された。アミノ酸非要求性になった TA100 および TA98 を用い、菌数を変えて、静置培養には、384 ウェルマイクロプレートおよび 96 ウェルマイクロプレートを用いて改良法 FAT (S9 mix 非存在下および存在下) を実施した結果、①黄変ウェル出現のためには、1 ウェル中に複数個の復帰変異菌が必要であること、②黄変ウェル出現に必要な最少の復帰変異菌数/ウェルは、使用するマイクロウェルプレート、菌株および S9 mix の有無により異なるこ

とが分かった。

(平田) umu 試験が *S. typhimurium* NM2009 では困難であったジハロアルカンの遺伝毒性の検出が NM5004 株で可能になった。S9 非存在下で遺伝毒性を示す AF-2 を同時に測定したことで、GST 代謝活性が必要な遺伝毒性物質のみでなく、これまで NM2009 株で測定してきた物質も測定できることが予想された。今回測定した azathiopurine のような免疫抑制剤や抗がん剤にはアルキル化によって作用する薬剤が多く、これらの変異原性を測定するには NM5004 株は有効であると考えられる。umu 試験の検出効率を上げる目的で 5 種類の Lysis buffer で細胞を破碎したところ、Bugbuster<sup>®</sup>以外では  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が検出されなかった。その原因として、細胞が破碎されなかったこと、Lysis buffer 中に  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を阻害する成分が含まれていたことが考えられる。Bugbuster<sup>®</sup>については、通常の 10%希釈よりも 25%希釈で使用すると発色強度が高くなったことから、Bugbuster<sup>®</sup>については、細胞が破碎されたものの、buffer 中の成分が  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を阻害している可能性が考えられた。代謝活性化を必要とする変異原物質 IQ の場合、pKJB7/1A2 を導入した菌の方が pKJB7/1A1 を導入した菌に比して感受性が高かった。このことは、IQ を代謝活性化する分子種は 1A2 であることと矛盾がなく、この試験系が代替法として使用できることを示唆する。

## E. 結論

### 《*in vivo* 試験法 G》

52 週齢時点で Pol  $\kappa$  KI マウスが突然変異高感受性であることが示唆された。*gpt delta* マウス長期飼育した場合、肝臓では点突然変異頻度が加齢に伴い有意に増加したが、精巣では有意な増加が認められなかった(増村)。Pol  $\kappa$  KI MEF 細胞を用いた H2AX リン酸化の評価系は B[a]P、BPDE による DNA 損傷の検出が可能であり、pol  $\kappa$  KI MEF を用いることで DNA 損傷の検出感度がさらに増加する可能性が示唆された。pol  $\kappa$  が DSB 修復においても何らかの重要な役割を持つ可能性を示唆する結果も得た(三島・竹入)。F344 系 *gpt-delta* ラットと、そのバックグラウンドである F344/NS1c ラットを 1 年にわたり飼育しデータを比較した結果、F344 系 *gpt-delta* ラットは F344/NS1c と同様な背景データを有する動物として、統合型毒性試験系に供することができることが示唆された(高木)。遺伝毒性試験用