

図7 カイコの卵巣凍結および精子凍結によるバンク化

試験	マスター・トランスジェニック・バンク (凍結保存された精子・卵巣)	ワーキング・トランスジェニック・バンク (冷蔵保存された卵)	医薬品製造に用いる世代数上限より後世代の個体
特性解析試験	・導入遺伝子を持つ個体の作出率 ・保存アンブル間差	・導入遺伝子を持つ個体の作出率	
純度試験	・導入遺伝子を持たない細胞の混入比率 ・微生物汚染の有無	・導入遺伝子を持たない卵の混入比率 ・微生物汚染の有無	
安定性試験	・保存可能期間の検討(導入遺伝子を持つ個体作出率による評価)	・保存可能期間の検討(導入遺伝子を持つ個体作出率による評価)	
作出された個体の試験	・導入遺伝子(ORF)の配列、コピー数、組込み部位 ・組換えタンパク質発現量 ・成育特性 ・上記に関する個体差	・導入遺伝子(ORF)の配列、コピー数、組込み部位 ・組換えタンパク質発現量 ・成育特性 ・上記に関する個体差	・組換えタンパク質発現量 ・成育特性 ・上記に関する個体差

表3 Tgカイコバンクの試験

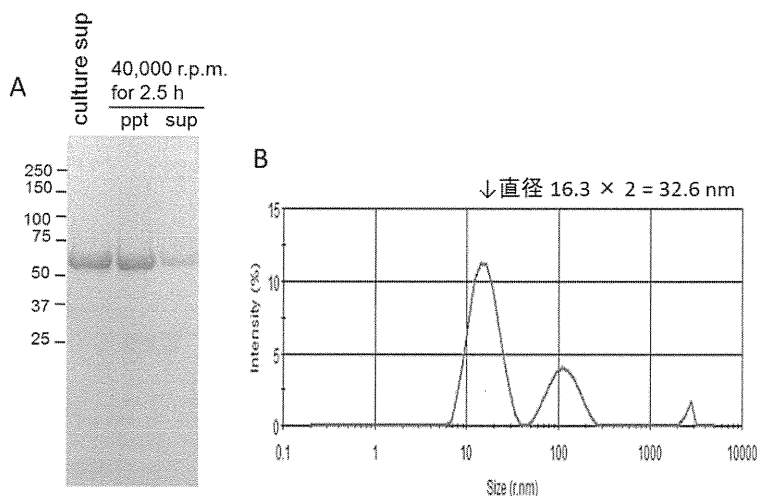


図8 ウイルス様粒子 HEV-VLP の調製(A)と精製した VLP の静的光散乱法による粒子径の測定(B)

ヒト血清添加濃度(%)	抗mAb抗体添加濃度 (ng/mL)	シグナル	抗mAb抗体算出濃度 (ng/mL)	真度	S/N比
0	9500	428139	10407	109.5	2489
	3800	153577	4137	108.9	893
	1520	39582	1271	83.6	230
	608	17144	603	99.2	100
	243.2	6941	259	105.5	40
	97.28	2510	102	104.9	15
	38.912	1078	41	105.4	6
0	172				
0.1	9500	31172	10222	107.6	174
	3800	9192	3671	96.6	51
	1520	2962	1421	93.5	17
	608	1141	602	99.0	6
	243.2	541	267	109.8	3
	97.28	310	110	113.1	2
	38.912	221	38	97.1	1
0	179				
1	9500	16999	9888	104.1	96
	3800	5064	3677	96.8	29
	1520	1905	1460	96.1	11
	608	825	627	103.1	5
	243.2	414	261	107.3	2
	97.28	261	94	97.0	1
	38.912	213	36	93.0	1
0	177				
10	9500	10072	9836	103.5	61
	3800	3349	3718	97.8	20
	1520	1216	1451	95.5	7
	608	590	619	101.8	4
	243.2	323	264	108.6	2
	97.28	225	103	105.9	1
	38.912	187	37	95.9	1
0	164				

表4 ヒト血清無添加及び添加における抗 mAb 抗体のシグナル

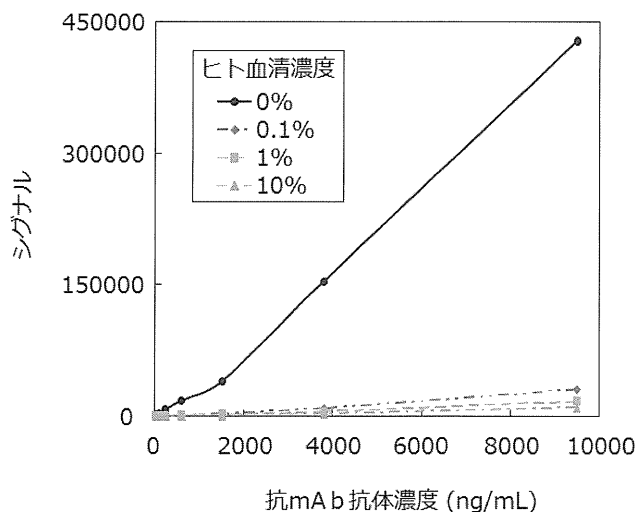


図9 抗 mAb 抗体の検量線

製剤特性評価及び製造工程管理に基づく機能性製剤等の 総合品質管理戦略確立に関する先端的評価科学研究

国立医薬品食品衛生研究所
奥田晴宏

研究要旨 QbD 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) ナノ粒子 DDS 製剤, (2)機能性製剤, (3) 超難溶性薬物製剤等について製剤特性評価法の開発を行い, また, (4)これらの製剤の製造工程をリアルタイム, 超高速に管理する製造工程管理手法を検討した.

研究分担者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 加藤くみ子
- (2) 東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之
- (3) 東京大学大学院医学系研究科 西山伸宏
- (4) 日本化薬株式会社 中西健
- (5) 興和株式会社 小崎雅人
- (6) 国立医薬品食品衛生研究所 四方田千佳子
- (7) 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) アステラス製薬株式会社 山梨繁行
- (12) 東和薬品株式会社 立木秀尚
- (13) ニプロパッチ株式会社 山内仁史
- (14) 富士フィルム株式会社 大野誠
- (15) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (16) 国立医薬品食品衛生研究所 宮崎玉樹
- (17) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (18) 塩野義製薬株式会社 村主教行
- (19) アステラス製薬株式会社 三村尚志
- (20) 第一三共株式会社 脇山尚樹
- (21) 武田薬品工業株式会社 池田幸弘
- (22) 国立医薬品食品衛生研究所 香取典子
- (23) 東邦大学 薬学部 寺田勝英
- (24) 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) 株式会社パウレック 高嶋武志
- (24) 参天製薬株式会社 西岡和幸
- (25) 塩野義製薬株式会社 古家喜弘
- (26) 武田薬品工業株式会社 小澤昭夫
- (27) 武田薬品工業株式会社 手島浩一郎
- (28) 日揮株式会社 河合正雄
- (29) 日揮株式会社 木村格
- (30) 田辺三菱製薬株式会社 田邊良輔

A. 研究目的

最新の医薬品開発では、医薬品のライフサイクルを通じて品質確保を図るために、品質・安全性・有効性に関連する目標製品品質プロファイル (QTPP) を設定し、そのプロファイルを満足する重要品質特性 (CQA) となりうる特性 (potential CQA) を選択し、その特性を体系的・科学的に研究し、CQA を最終的に特定する。その上で、最終製品の品質試験 (スペック) および製造工程管理を組み合わせる品質管理戦略を立案し、製品品質の恒常性が確保される。さらに製造工程を管理するためには、プロセス解析工学 (PAT) の手法を取り入れ、リアルタイムに工程をモニターすることによりより頑健かつ科学的な製造工程管理を実現することが望まれている。このような科学的・体系的な取り組みは QbD アプローチとも呼ばれ、ICH でも推奨されている。

ミセル製剤やナノ粒子製剤に代表される機能性製剤は製剤特性や製造方法が複雑・高度化しており、QbD アプローチで取り組むには下記の様な課題が存在する。① 設定される QTPP の評価法の開発、② CQA が QTPP に及ぼす作用機序の解明、③ 機能性製剤の品質特性の解析手法 ④ CQA と製造工程の機能的関連を解析するリアルタイム測定技術などである。

本研究計画は上記の研究課題に対応し、4 分担研究課題から構成される。第一は、ナノ DDS 製剤の品質特性評価及び体内動態に関する研究、第二は、機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究、第三は、ナノレベルの物性制御を活用して製剤化した非晶質製剤等の超難溶性薬物の物理薬剤学的評価法に関する研究、第四はリアルタイムな製造工程管理に適用可能な先端的分析技

術の開発に関する研究である。

本研究は、我が国の医薬品品質分野ガイドラインの作成に多年関与してきた国立試験研究機関の研究者、製薬企業等の研究開発技術者、および主に医薬品製剤学分野を研究対象としているアカデミアの研究者が共同して実施する。

その研究成果は、科学的体系的取組みによる医薬品開発の促進を通じて、我が国の医薬品品質確保に貢献する。さらに、機能性製剤の開発時あるいは承認申請に必要なとされる開発・評価ガイドラインを作成する上での基礎的知見を与えることが期待される。

B. 研究方法

(1) ナノ DDS 製剤の製剤特性評価研究

1-1) 高分子ミセル製剤の製剤機能と品質特性との関係に関する研究、及び体内動態評価法

ポリエチレングリコール (PEG) と構成アミノ酸の光学活性が異なるポリグルタミン酸からなるブロック共重合体にシスプラチン (CDDP) 水溶液を反応させることにより、3種類の CDDP 内包ミセル (CDDP/m) を調製した。CDDP/m の内核を構成するポリグルタミン酸の高次構造、及び製剤特性 (in vitro の放出性及び安定性) について解析した。

細胞内動態を解析するために、蛍光を有する Bodipy-TR, Nile-Red, DBD-ED 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導入したミセルを調製し蛍光特性について調べた。また、Nile-Red ポリマー、DBD-ED ポリマーからなる FRET ミセルを調製し細胞内取り込み後のミセル崩壊について追跡した。さらに siRNA によりブロック共重合体の細胞内動態に関わる内因性タンパク質を解析した。

1-2) リポソーム製剤の安全性に関わる品質特性

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) または 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) と Cholesterol (Chol) を物質量比で 1:1 で混合し、脂質薄膜法を用いて、それぞれ中性リポソームまたはカチオン性リポソームを作製した。これらをヒト血清と混合し、リポソームに結合した血清タンパク質のみを SDS-PAGE により分離後、nano-LC MS/MS により同定した。

1-3) 薬物トランスポーターの機能解析

薬物の中樞神経系への暴露を決定する因子として血液脳関門透過機構に注目した。血漿中濃度の時間推移、血液脳関門透過性、脳内遊離型薬物と受容体との相互作用を組み込んだ数理モデルを

構築し、報告値・推定値を用いて、受容体占有率をシミュレーションし、報告値と比較した。また、ヒト MCT9 cDNA を HEK293 細胞に過剰発現させ、細胞内での局在を免疫染色により明らかにするとともに、in vitro 輸送実験を行った。

1-4) PLGA ナノ粒子製剤の開発における QbD アプローチ:

PLGA ナノ粒子製剤について、対象疾患と薬物の選定、QTPP の設定、CQA の提案、Fish bone 解析による要因図作成、及び実験計画法の一部実施法によるリスク評価を行った。得られた結果から、分散分析により効果が強く且つ p 値が 0.05 以下の場合に影響のある因子と判断し、重要プロセスパラメータ (CPP) とした。

(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) 法で経口固形製剤に関して、経時的な擬消化管液を用いる溶出試を試みた。また、FTC 法を用いた口腔内崩壊 (OD) 錠の水ありおよび水なし投与時の胃内環境を模した溶出試験条件の構築を試み、フロースルーセル直径と試験液量を変化させた時の影響を評価した。さらに、長期放出型マイクロスフェア製剤について種々の放出試験法の比較、並びに加速測定条件について検証した。

2-2) 局所皮膚適用製剤の評価方法: 2種類のフェルビナクパップ剤、標準製剤とヒト BE 試験 (皮膚薬物動態学的試験: DPK 試験) において同等性が証明されている GE 製剤に対して、ラット 4 種混合試験、ブタ薬物放出率および角質中薬物量評価を行った。

2-3) リポソーム製剤の特性と評価方法: 精度の良い粒子サイズ評価手法の構築を目的に、粒径既知の様々な粒子サイズの標準粒子を用い、動的光散乱法で測定した粒径とその精度を調査した。アクティブターゲティング型リポソーム製剤の GMP 製法を開発するために、オキサリプラチン (L-OHP) 封入トランスフェリン (TF) 修飾 PEG-リポソームの調製から条件を整理し、GMP に対応した工程法を検討した。また、蒸発光散乱法を使ってリポソーム製剤の脂質成分やリン脂質加水分解生成物を同時に測定可能な分析方法の構築を試みた。

(3) 超難溶性製剤の物理薬剤学的評価研究

3-1) 非晶質製剤の物性評価法の確立

内部に比べ不安定といわれる非晶質表面にお

ける結晶化速度を評価できる評価系を非晶質ニフェジピンおよび PVP または HPMC を添加した固体分散体について検討した。また、非晶質製剤の物理的安定性との関連が示唆されるラマンスペクトル, FTIR により測定される非晶質の分子状態や TSDC 及び DSC を用いて測定される非晶質化した薬物分子の局所分子運動性を評価し、物理的安定性との関係を検討した。さらに、インドメタシンとポリビニルピロリドンからなる固体分散体のマトリックス内部に、固体分散体を形成することが知られている無機ナノ粒子添加剤軽質無水ケイ酸（アエロジル）を分散させ、物理的安定性を評価した。固体分散体のバルクの物性評価を行い安定性に影響する要因の特定を試みた。

3-2) 過飽和状態の評価法の確立

詳細については不明である過飽和溶液の構造を評価することを目的とし、モデル薬物としてカルバマゼピン、フェニトイン、ポリマーとして異なるグレードの hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate (HPMC-AS)を用い、グレード違いのポリマーによる結晶化抑制作用の違いを検討し、NMR 測定により HPMC-AS 溶液の構造及び薬物-HPMC-AS 間の相互作用を評価した。

3-3) 複合体非晶質の物性評価法の確立

難溶性化合物のモデルとして経口抗真菌薬イトラコナゾールを用い、イトラコナゾールと cocrystal を形成できるカルボン酸 cocrystal former (CCF)との複合体非晶質を凍結乾燥法および粉砕法により調製し、その物理的、化学的安定性を評価した。また、溶解熱、DSC、吸湿性の測定を行い及び分子間相互作用の解析を行った。

(4) 製剤開発および製造工程管理分析手法に関する研究

製剤開発及び製造工程管理に必要な製剤の品質に影響する重要品質特性の評価手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のモニタリングが可能な工程評価手法を開発し、実用化するために、製品設計段階及び実製造プロセスにおける分析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た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、フロースルーセル法オープンシステムによる溶出性評価、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、粉体の表面自由エネルギー及び摩擦帯電量測定

による粉体付着性評価および打錠障害の予測、難溶性化合物の塩における脱塩・フリー化の挙動の検討、光励起非破壊検査法による製剤内部異物及び欠陥評価、近赤外イメージング法による製剤分析評価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、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) ナノ DDS 製剤の製剤特性評価研究

画期的ナノ DDS 製剤の体内動態に関わる安定性、放出性等の製剤機能、及び品質特性との関連性、生体内因子に関する研究、並びに安全性に関わる品質特性の研究を行った。さらにこれらを包括的・体系的に捉える QbD アプローチをナノ DDS 製剤へ適応した。

1-1) 高分子ミセル製剤の製剤機能と品質特性との関係に関する研究、及び体内動態評価法：高分子ミセルの内核を構成するポリグルタミン酸鎖の構成アミノ酸の光学活性により内核の高次構造が異なり、この差異が *in vitro* での薬物放出、安定性に影響を及ぼ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、N 末端に Bodipy-TR を結合したポリマーでミセル形成による消光が観察された。また、DBD/N-Red 混合 FRET ミセルは細胞に取り込まれた後にエンドソーム/ライソゾームで解離することが示唆された。その後の細胞外排出までのポリマーの細胞内輸送について siRNA を用いて解析した結果、脂質の輸送に関わる内因性タンパク質の関与が示唆された。

1-2) リポソーム製剤の安全性に関わる品質特性

血清と各種リポソームとの相互作用に関する評価手法を構築し、中性およびカチオン性リポソームと相互作用する血清タンパク質として、免疫グロブリン、補体成分を同定した。

1-3) 薬物トランスポーターの機能解析：

Quetiapine については、in vitro 試験に基づいて、大脳皮質ドーパミン D2 受容体占有率を推定することができた。一方、perospirone については、代謝物を考慮してなお、実測値との間に乖離が認められた。MCT9 の組織及び細胞内分布を明らかにした。MCT9 過剰発現細胞では、ニコチン受容体パーシャルアゴニストの細胞内蓄積が、mock-vector transfected 細胞に比べて有意に増加していた。

1-4) PLGA ナノ粒子製剤の開発における QbD アプローチ：

PLGA ナノ粒子製剤について、製品特性に関わる CQA と CPP の相関を明らかにするために、要因図及び分散分析を用いたリスク評価を行った結果、粒子径の CPP は PLGA 濃度及び攪拌速度、薬物内包率の CPP は良溶媒に対する貧溶媒量であることが判明した。

(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、模擬胃液としてミルクを緩衝液で倍希釈したものをを用いると、セル上部のフィルターへの吸着を起し溶出が困難であった。イトラコナゾール製剤では、製剤の特性に応じた溶出が顕著になることが示された。OD 錠において直径 12 mm のフロースルーセル使用時には、22.6 mm のものよりも速い溶出速度を示した。22.6 mm 使用時の試験液量 50, 200 および 900 mL の溶出試験では、全ての試験液でほぼ同じ溶出挙動を示した。

長期放出型マイクロスフェア製剤について振とう法と FTC 法を比較したところ、いずれの手法も十分な識別能を示したが、振とう法では 0 次の放出挙動を示したのに対し、FTC 法は 1 次の放出挙動を示した。また試験温度を上げることで in vitro 放出試験の実施期間を短縮できる可能性が示唆された。

2-2) 皮膚適法製剤の評価方法：ラットにおける薬物放出、角質中薬物量、皮内薬物濃度および血漿中薬物濃度において GE 製剤は標準製剤に比して有意な低値を示した。一方、GE 製剤のブタ薬物放出率は標準製剤より低いことが確認されたが、ブタ角質中薬物量における標準製剤と GE 製剤の差は小さく、同等性を示唆する範囲となった。

2-3) リポソーム製剤の特性と評価方法：標準粒

子を異なる 2 種類の装置で測定したところ、光子相関法の方が周波数解析法よりも実際の粒径との乖離が小さいことが分かった。しかし、粒子サイズの異なる 2 成分を混合したところ、2 成分を検出して精度よく測定することはできなかった。リポソーム調製方法について様々な条件を検討した結果、エタノール注入法のみで平均粒子径約 100 nm の均一なリポソームが得られた。さらに、連続限外ろ過によりワンステップで未反応 TF や未封入 L-OHP を完全に除去できることを示した。構成脂質の分析方法について検討し、リポソーム構成脂質だけでなくリゾリン脂質や遊離脂肪酸を同時に分離できる方法を構築した。安定性評価に適用したところ、保存温度の上昇に伴って加水分解生成物が顕著に増加することが確認された。

(3) 超難溶性薬物製剤の物理薬剤学的評価研究

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、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。

3-1) 非晶質製剤の物性評価法の確立

ニフェジピンあるいはニフェジピン-高分子混合粉末をカバーグラスにとり、熔融急冷することにより得られた非晶質試料は空気と接する表面において結晶化が進行することが偏光顕微鏡による観察から明らかになった。試料の表面を水、PVP 水溶液、HPMC 水溶液により湿潤させ、直ちに減圧乾燥した非晶質試料は高分子の種類によって結晶化速度に差がみられた。

Raman スペクトルや IR スペクトルを経時的に測定することにより、非晶質インドメタシンの構造緩和中の分子間相互作用の変化を推測することができた。インドメタシン-ナプロキセン共非晶質体の IR スペクトルの温度変化からインドメタシン-ナプロキセンカルボン酸ダイマーが 60°C においても維持されていることがわかり、共非晶質体の物理安定性と関連することが示唆された。

物理的安定性に差のあるニフェジピン-PVP K30 固体分散体 (混合比 95:5, 90:10) につき、 β -process 由来の分子運動性を TSDC により測定できた。脱分極電流ピークは、混合比 95:5, 90:10 とともに同様の形状で、ピークトップの温度も同一であり、局所分子運動性に差がないことが分かった。昇温速度を変えた DSC 測定によって検出された β -process に由来する分子運動も混合比 95:5, 90:10 の固体分散体において明確な差が認められ

ないことが示唆された。

インドメタシンに PVP を 10% または 8% 添加した固体分散体、また PVP8% 添加の固体分散体中に 2% のアエロジル A200 またはアエロジル R805 を添加した固体分散体を 40°C/75%RH に保存すると、2% のアエロジルを添加した試料は PVP10% のサンプルよりもより安定であり、疎水性のアエロジルを添加した固体分散体は親水性のアエロジル添加した固体分散体よりも安定となる傾向が認められた。

3-2) 過飽和状態の評価法の確立

サクシニル基の割合が少ない HF グレードの HPMC-AS は LF グレードの HPMC-AS に比べ、過飽和状態のカルバマゼピンの結晶化を抑制する効果大きいことが分かった。HF グレードの HPMC-AS の結晶化抑制作用が一定になる濃度は薬物によって異なること、高分子の NMR スペクトルが薬物の存在の影響を受けないことから、薬物により高分子の構造が変化しないことが示唆された。NOEZY 測定の結果、結晶化抑制効果の大きいカルバマゼピン/HF 溶液ではカルバマゼピンと HF 間の cross peak が観察され、具体的な部位は特定できないが、溶液中でカルバマゼピンと HF 間に相互作用が存在していることが明らかとなった。

3-3) 複合体非晶質の物性評価法の確立

凍結乾燥および粉砕により調製したイトラコナゾールとカルボン酸 cocrystal former (CCF, フマル酸, コハク酸 L-酒石酸, 安息香酸, マレイン酸) との複合体非晶質の物理的安定性は CCF によって異なること、また、粉砕により調製した複合体非晶質は凍結乾燥によって得られたものより安定であることが分かった。化学的安定性(=類縁物質の生成)も調製方法や CCF によって異なった。分子間相互作用を熱的に解析したところ、物理的、化学的安定性が良いフマル酸との組み合わせは、相互作用により非晶質としても結晶としても熱力学的に安定化されていることが判った。また、非晶質のガラス転移点のシフトにより非晶質状態での分子間相互作用の検出でき、相互作用の量論比も導くことができた。

(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。難溶性の酸性化合物の In-vivo を反映した溶出試験条件の設定を、フロースルーセル法オープンシステムで検討したところ Acid stage 及び Buffer stage の連続操作を行うこ

とで、In-vivo を反映した溶出試験が確立できた。粉体の付着性と、粉体の表面自由エネルギー及び摩擦帯電量との間に相関がみられ、これらが打錠における粉体付着性評価の指標となることを明らかとした。分散安定性分析法を用いた高分子の添加による懸濁性点眼剤の再分散性の改善評価について検討した結果、非イオン性高分子を添加した場合は沈降容積、イオン性高分子の場合は沈降速度が再分散性改善の指標になることを明らかとした。pKa 値および固有溶解度値が類似した弱塩基性化合物の塩酸塩のうち、水中で容易に脱塩・フリー化した塩酸塩は、6 種の添加剤との混合により脱塩・フリー化し、水中における脱塩・フリー化と添加剤との混合による脱塩・フリー化の相関性を明らかとした。光励起非破壊検査は錠剤に内在する樹脂など金属以外の異物探査にも適用可能であること、錠剤と異物の熱伝導率の差が大きい方が探査しやすいことを示し、また、内在欠陥や糖衣の皮膜厚さの測定にも応用できる可能性を見いだした。近赤外イメージングによる製剤の測定において、空間分解能や打錠の際における粒子の充填状況が測定、解析に影響することを示し、その原因となる原料粒子の大きさを考慮してデータ解析を行う必要があることを明らかとした。

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。アセトナフトンからアセチルナフトールへの還元反応を対象に超臨界クロマトグラフィー法による光学純度の経時解析を行ったところ、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た。薄い被膜厚みの測定が可能なテラヘルツ分析装置を用いて錠剤コーティングの評価を行ったところ、30 μ m 前後のコーティング被膜から相関性のある検量線の作製が可能であることが示された。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、清掃・消毒及び室内除染の効果および巻き締め工程における製造環境を、微粒子数とバイオパーティクル数から評価することができ、環境の変化を連続してタイムリーに計測可能であることが示された。

D. 考察

(1) ナノ DDS 製剤の製剤特性評価研究

ナノ DDS 製剤の品質特性解析技術開発の進展や、体内動態と品質特性の関係さらには医薬品としての有効性・安全性との関係に関する知識の蓄積により、体内動態に重要な影響を及ぼす製剤の

重要品質特性が特定できるようになれば、その成果は製品としての品質基準の明確化、さらには開発コスト・開発期間の削減につながると考えられる。そこで本研究では、ナノ DDS 製剤である高分子ミセル製剤、リポソーム製剤、及び PLGA ナノ粒子製剤に関し、製剤機能と品質特性との関係に関する研究、及び体内動態に関わる評価法の開発と生体側因子に関する研究を行った。さらにナノ DDS 製剤を対象としたより進んだ体系的品質管理手法として QbD アプローチの実践に着手した。

高分子ミセルの内核を構成する高分子鎖の高次構造を解析することにより、内核での α -helix 形成がポリマーの臨界会合濃度を低下させミセル状態が熱力学的に安定になったことが示唆された。内核の高次構造がシスプラチンの徐放とミセル構造の安定性に大きく寄与することが示唆され、今後、体内動態や抗腫瘍効果への影響を検討予定である。

一方、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、N 末端に Bodipy-TR を結合したポリマーは感度及び選択性の面で優れたツールとなりうることが明らかとなった。DBD と N-Red を蛍光団としてポリマーを調製した FRET ミセル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可能性が示された。送達、標的性を指向した DDS 製剤では、有効成分の放出速度、放出場所を解析することは薬効や安全性への影響を考察する上で重要である。

リポソーム製剤の過敏症反応に関する研究においては本年度血清タンパク質と各種リポソームとの相互作用に関する評価手法を構築した。補体活性化に着目しリポソーム製剤の品質特性に関する情報を蓄積することは今後の製剤開発に有益であると考えられる。

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手法を検討した。D2 受容体拮抗薬について受容体占有率に基づいた脳実質への濃縮率の評価手法を構築するとともに、MCT9 過剰発現細胞を用いた細胞内局在、*in vitro* 輸送実験により MCT9 が有機カチオントランスポーターであることが示唆された。一方、有効成分のみではなくキャリア成分であるブロック共重合体の体内動態にもトランスポーターが関与することを明らかとした。

さらに本研究では、比較的初期の検討における

PLGA ナノ粒子製剤開発の QbD アプローチの実例を示すことができた。今後 CPP と設定した因子について中心複合法による最適化、応答局面法による視覚化によりデザインスペースの構築を目指す予定である。今回の様に基礎の段階で幅広く検討を行い品質特性と工程パラメータの理解を深めておくことで、生産スケール時の QbD アプローチを行う場合までに因子を絞り込むことも可能となり、最終的にはコストの抑制、また申請へのスピードアップにつながることが期待できる。

(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や長期放出型マイクロスフェア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。セルの直径による溶出挙動の違いは、セル内での試験液の線流速の差が考えられた。主薬が試験液に十分溶解する条件では、試験液量の変更は溶出挙動に大きな影響を与えないと思われた。長期放出型マイクロスフェア製剤においては、試験方法により薬物放出挙動に差異が生じていたことから、適切な *in vitro* 評価系を構築するためにはその重要因子を事前に特定することが重要であると考えられた。

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。局所皮膚適用製剤については、GE 製剤剥離時に薬物を高濃度含有する上部角質を多く剥離したことが、GE 製剤の見かけ上の薬物放出率を低くした一因となっている可能性があり、製剤剥離時に除去される皮膚角質量の差異についても考慮する必要があると考えられた。リポソーム製剤の *in vitro* 評価法に関しては、粒子径測定法の検討を行い、動的光散乱法は有効な方法であるが、粒径分布が異なる粒子が存在する場合には別の測定法を併行して行い、測定値の妥当性を示す必要があると考えられた。調製方法については、NHS 活性化エステル PEG を使った TF 修飾率は従来法よりも工程が少ない上に高い TF 修飾率を示したが、時間経過と共に活性化エステルが加水分解されたため、TF 修飾反応開始までの過程を迅速に行う必要があることが示された。構成脂質の測定方法について、コレステロールに関しては ELSD よりも UV 検出器の方が検量線の直線性や回収率が優れ

ており、その原因としては移動相中の酢酸アンモニウムの影響が考えられた。

(3) 超難溶性製剤の物理薬剤学的評価法研究

超難溶性薬物の製剤化法として注目を集めている非晶質製剤、Cocrystal 製剤について検討し、非晶質製剤に関しては

カバーガラス上で熔融急冷して得られた非晶質ニフェジピンは表面の結晶化速度の評価系として有用であることを明らかにした。今後、高分子添加剤の影響を結晶化の核生成過程と結晶成長過程に分離して詳細に解析する必要があると考える。IR ならびに Raman スペクトルは構造緩和中における相互作用の変化の解析に有用であることが分かった。TSDC 及び DSC を用いてニフェジピン-PVP K30 固体分散体中の薬物の局所運動性を評価できた。薬物の局所分子運動性は固体分散体の物理的安定性との相関が低く、今後、固体分散体の物理的安定性に影響を与える因子として、試料表面の物性（表面における分子運動性等）について検討する必要があると考える。PVP の固体分散体の内部に無機ナノ粒子添加剤であるアエロジルを分散させることにより、物理的安定性を向上する可能性があることを見出した。今後、アエロジル安定化のメカニズムについて詳細に検討する必要があると考える。

過飽和状態の評価法については、NOEZY 測定における薬物-高分子間の cross peak の有無が HPMC-AS のグレードによるカルバマゼピンの過飽和状態からの結晶化抑制効果の差と関連した。NOEZY 測定は過飽和溶液中の薬物-高分子間相互作用の評価に有用であることが分かった。

Cocrystal 製剤については、イトラコナゾールと cocrystal を形成できるカウンター分子との複合体非晶質の安定性、相互作用を明らかにした。溶解熱に基づき分子間相互作用の解析を行ったところ、分子間相互作用による熱力学的な安定化と複合体非晶質の物理的、化学的安定性と関連することが明らかとなった。今後も、分子間相互作用の解析を進めると共に応用例を拡大し、難溶性医薬品へと適用する必要があると考えられる。

(4) 製剤開発および製造工程管理手法研究

本年度は、これまでの研究で成果を上げた評価手法について、分散安定性分析法、光励起非破壊検査法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、またテラヘルツ法、超臨界クロマトグラフィー法、内部蛍光検出法、フロースル

セル法については測定感度やシステムの改善を行うことにより、より実用性の高い評価手法としての開発を行い、成果を上げた。また、粉体の表面自由エネルギー及び摩擦帯電量の測定、塩酸塩の脱塩・フリー化の挙動、懸濁性点眼剤の再分散性、近赤外イメージングによる原料粒子径の影響について検討を行い、製剤処方に起因する製剤設計や製造工程の不具合の影響について理解を深め、評価手法を開発する取り組みも行っている。また内部蛍光検出法、近赤外イメージング法など評価手法自体の理解を進め、運用法を改善することにより評価法としての実用性を上げることも行った。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、これらの技術は今後、製剤設計や製造、品質管理に実用化され、安定した品質の医薬品製造に貢献すると考えられる。

本研究で取り上げた手法は製剤開発及び品質管理におけるガイドラインである ICH Q トリオが目指す高度な品質管理を可能にする分析評価手法である。これらの分析技術によりこれまで評価が難しかった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及び製造工程、品質管理が行えることから、新薬審査及び日局試験法収載など厚生行政への貢献が期待される。

E. 結論

(1) 画期的な DDS 製剤の体内動態に着目し製剤側、生体側の機能評価法、及び両者の関連性、さらに体系的な QbD アプローチを検討し、

1-1) 高分子ミセルの内核を構成する高分子鎖の高次構造と *in vitro* での有効成分の放出性、安定性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など蛍光標識手法がミセルの細胞内動態に関するより詳細な評価に有用であることが示された。さらに、細胞内に存在する内在性タンパク質がポリマーの動態に関与していることが明らかとなった。;

1-2) リポソームと血清タンパク質との相互作用におけるリポソーム製剤の品質特性の影響について評価法を構築した。

1-3) 薬物の中樞神経系への暴露を決定する要因として、血液脳関門透過機構に着目し、D2 受容体拮抗薬について、受容体占有率に基づいた脳実質への濃縮率の評価手法を構築した他、MCT9 が血液脳関門に発現し、カチオン性薬物の輸送活性

を示すことを明らかにした。

1-4) PLGA ナノ粒子製剤の製品特性に関わる CQA と CPP の相関を明らかにするために、要因図及び分散分析を用いたリスク評価を行い、ナノ DDS 製剤開発における QbD アプローチの適応可能性を明示した。

(2) 機能性製剤の生物学的評価法を検討し、

2-1) FTC 法での消化管模擬試験液を用いることの困難さと有用性を示した。また、OD 錠の FTC 法溶出試験ではセル直径の影響が大きく、主薬が十分溶解する条件では試験液量は溶出挙動に大きな影響を与えないことを示した。長期放出型マイクロスフェア製剤の *in vitro* 放出試験系については、FTC 法を用いた手法が他法よりフレキシビリティがあり、汎用性に富むことを示した。

2-2) 正常皮膚に適用される薬剤においてヒト生物学的同等性 (DPK 試験) を予測するためには、ブタでの角質中薬物量の評価 (ブタ DPK 試験) を行うことが最も効果的であることが推察された。

2-3) リポソーム製剤の評価方法

粒径測定法については、粒径既知の単分散粒子を用いた検討から、動的光散乱法では周波数解析法よりも光子相関法の精度が高いことを示した。リポソームの調製方法について、NHS 活性化エステル PEG を使った TF 修飾法、エタノール注入法および限外ろ過法を組み合わせることで、簡便かつ迅速に TF 修飾 PEG リポソームの調製が可能となることを示した。リポソーム構成脂質の測定方法について、簡便な逆相 HPLC-UV/ELSD 分析方法を構築し、加熱処理した製剤中のリン脂質分解生成物の定量などに応用可能であることを示した。

(3) 超難溶性薬物の溶出性改善法として注目されている以下の製剤における可溶化に関する物性評価法を検討し、

3-1) 表面における結晶化速度を評価できる評価系を確立し、表面における結晶化速度に及ぼす高分子被覆の影響を明らかにできた。

非晶質薬物の分子状態の評価を行う際に Raman スペクトルや IR スペクトル等の分光法で継時的に評価することが有用であることが明らかとなった。

TSDC 及び DSC を用いることで、固体分散体中の薬物の局所分子運動性を評価できることが示唆された。今回検討したニフェジピン-PVP K30 固体分散体については、局所分子運動性と物理的安定性との相関が低いことが示された。

無機ナノ粒子添加剤であるアエロジルを PVP

の固体分散体の内部に分散させることにより、物理的安定性を向上しうる可能性があることが見出された。;

3-2) HPMC-AS HF グレードの CBZ 結晶化抑制作用は LF グレードより強かった。NMR 測定の結果から、濃度依存的な HF の構造変化は観察されなかった。NOESY 測定の結果から、CBZ と HPMCAS 間の相互作用の違いが両グレードを用いた際の CBZ 結晶化抑制作用の違いに反映したと推察された。;

3-3) Cocrystal を形成する難溶性薬物分子と CCF の組み合わせによる複合体非晶質は、ITZ をモデル化合物とした系において、非晶質の物理的安定性を向上させた。また、化学的安定性について CCF との相互作用の違いを利用し安定なものを得ることも可能であった。熱的評価を行うことによって非晶質状態での分子間相互作用を捉えることが可能となり、非晶質が結晶せず安定に維持される系では、相互作用により非晶質が熱力学的に安定化されていることが明らかとなった。

(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及び超臨界クロマトグラフィー法による光学純度の経時解析リアルタイム評価が有用であることを示した。またフロースルーセル法オープンシステムによる溶出評価、分散安定性分析法による懸濁性製剤の再分散性の評価、粉体の表面自由エネルギー及び摩擦帯電量測定法による打錠障害、光励起非破壊検査法による異物検査、近赤外イメージングの製剤分析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) 加藤くみ子 “医薬品添加物の細胞内動態とトランスポーター” *Drug Delivery System* 27(5) 389-398, 2012

2) Un, K., Sakai-Kato, K., Oshima, Y., Kawanishi, T., Okuda H., “Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes”, *Biomaterials*, 33, 8131-8141, 2012

3) Computed tomography imaging of transferrin targeting liposomes encapsulating both boron and iodine contrast agents by convection enhanced

delivery to F98 rat glioma for boron neutron capture therapy. S. Miyata, S. Kawabata, R. Hiramatsu, A. Doi, N. Ikeda, T. Yamashita, T. Kuroiwa, S. Kasaoka, K. Maruyama, S. Miyatake. *Neurosurgery*. 68. 1380-1387. 2011

4) リポソームと遺伝子発現タグを利用したがん細胞に対する新規アクティブターゲティングシステムの開発 (The liposome-based targeting system by the combination of tag ligand and genetically expressed tag protein) 佐藤紗也佳, 真柴拓哉, 本田亜紀, Citterio Daniel, 小田雄介, 鈴木 亮, 丸山一雄, 鈴木孝治 *Progress in Drug Delivery System*, 20, 103-108, 2011.

5) Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H. : Alterations in the Detergent-Induced Membrane Permeability and Solubilization of Saturated Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes: Effects of Poly(ethylene glycol)-Conjugated Lipid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2012;60(9):1105-11.

6) Shibata H, Saito H, Kawanishi T, Okuda H, Yomota C. : Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2012;60(8):967-75.

7) Shibata H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H. : Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions. *Biol Pharm Bull* 2012;35(11):2081-72.

8) Keisuke Ueda, Kenjirou Higashi, Waree Limwikrant, Shuichi Sekine, Toshiharu Horie, Keiji Yamamoto, and Kunikazu Moribe. Mechanistic Differences in Permeation Behavior of Supersaturated and Solubilized Solutions of Carbamazepine Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Measurements. *Molecular Pharmaceutics*. 9(11):3023-33 (2012).

9) Tatsuo Koide, Takuya Nagato, Yoshiyuki Kanou, Kou Matsui, Susumu Natsuyama, Toru Kawanishi, Yukio Hiyama

Detection of component segregation in granules manufactured by high shear granulation with over-granulation conditions using near-infrared chemical imaging

Int. J. Pharm. 441 135-145 (2013)

2. 学会発表

1) 西山伸宏, "光線力学治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 第 51 回生体医工学会 オーガナイズドセッション 「物理的作用を活用した高

機能ドラッグデリバリーシステム」, 福岡国際会議場, 福岡市 2012 年 5 月 11 日(依頼講演)

2) 西山伸宏, "がんの診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", 第 7 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, アクトシティ浜松, 浜松市 2012 年 5 月 24 日(招待講演)

3) 西山伸宏, 片岡一則 "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", 日本薬剤学会 第 27 年会, 神戸国際会議場, 神戸 2012 年 5 月 26 日(招待講演)

4) N. Nishiyama, K. Kataoka, "Design of polymeric micelles for targeting intractable cancers", 第 71 回日本癌学会学術総会ロイトン札幌, 札幌 2012 年 9 月 20 日(一般講演)

5) 西山伸宏, "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", 創剤フォーラム第 18 回シンポジウム, タワーホール船堀, 江戸川区 2012 年 9 月 28 日(招待講演)

6) 西山伸宏, "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", ナノメディシンフォーラム, 東京慈恵会医科大学, 港区 2012 年 10 月 19 日(招待講演)

7) 加藤くみ子, 運 敬太, 川西 徹, 奥田晴宏 "リポソームの細胞内動態評価" 第 21 回日本バイオイメージング学会 平成 24 年 8 月 27 日 京都

8) 運敬太, 加藤くみ子, 川西 徹, 奥田晴宏 "リポソーム構成成分の細胞内動態特性評価" 日本薬剤学会第 27 年会平成 24 年 5 月 26 日 神戸

9) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Haruhiro Okuda: Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions. *AAPS (2012.10)*

10) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 奥田晴宏 「非晶質ニフェジピンの粘弾性に及ぼす高分子添加剤の影響」日本薬剤学会第 27 年会, 神戸市, 2012 年 5 月

11) T. Miyazaki, Y. Aso, H. Okuda, Effects of PVP and HPMC on the dynamic viscoelastic properties of amorphous nifedipine. *AAPS, Chicago*, 2012 年 10 月

12) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 奥田晴宏 「¹³C-固体 NMR による非晶質ニフェジピンの結晶化および結晶転移の検討」日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月

13) 植田圭祐, 東頭二郎, 森部久仁一, 山本恵司, 第 29 回製剤と粒子設計シンポジウム, 豊橋, 2012 年 10 月

14) 瀬尾淳紀, 東頭二郎, 森部久仁一, 山本恵司,

第 29 回製剤と粒子設計シンポジウム, 豊橋, 2012
年 10 月

15) 藤沼健太, 米持悦生, 吉橋泰生, 寺田勝英,
森山広志, 松山達

表面自由エネルギーと帯電特性評価による医薬
品の凝集性, 付着性の評価

第 50 回粉体に関する討論会 (2012.10 京都)

16) 小出達夫, 香取典子, 深水啓朗, 山本佳久,
奥田晴宏

近赤外ケミカルイメージングによる製剤評価～
原料の粒子径が測定に与える影響についての検
討

第 28 回近赤外フォーラム (2013.3 那覇)

17) 坂本知昭, 渡邊英俊, 香取典子, 岩崎裕子,
高柳雅治, 堀江真之介, 奥田晴宏

UHPLC および次世代 SFC UPC2 を用いたケト
ンからアルコールへの不斉合成工程における光
学純度のリアルタイム解析

日本薬学会第 133 年会 (2013.3 横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

育薬を指向した天然物医薬品の標準化と品質評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
合田 幸広

研究要旨 育薬の観点から、生薬、西洋ハーブ、漢方処方等天然物医薬品の標準化・品質評価手法として、遺伝子鑑別、メタボローム解析、細胞運動能抑制、キナーゼ阻害作用等各種試験法を検討、評価すると共に、単味生薬製剤の承認基準案につき検討を行った。

研究分担者

- (1) (株)ツムラ生薬研究部生薬品質グループ 中井洋一郎
- (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バイオ臨床ビジネスユニット 二宮健二
- (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) 東京大学大学院薬学系研究科教授 関水和田久
- (10) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 袴塚高志
- (11) アサヒフードアンドヘルスケア株式会社学術部 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 浅羽祐介
- (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 平山千穂
- (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) 大正製薬株式会社製薬技術研究所 照井祐一
- (19) 北里大学東洋医学総合研究所所長 花輪壽彦
- (20) 松山大学薬学部医療薬学科教授 天倉吉章

A. 研究目的

天然物医薬品としては、生薬、西洋ハーブ等からなる生薬製剤や漢方製剤がある。これら製剤は、

主に伝統的な使用知見を基に、一定の効能効果が認められ医薬品として承認を受けている。しかし、疾病構造の変化している現代社会では、従来の効能効果に加え、国民の健康維持のために、伝統的な医療では考えられなかった新規効能、例えば、抗腫瘍、抗アレルギー、認知機能維持・改善といった効能効果を持つ医薬品の承認が重要と考えられる。事実、厚生労働省一般用医薬品承認審査合理化等検討会の中間報告では、疾病構造の変化に対応した漢方薬・生薬の活用が提言・具体的な方策として挙げられ、生薬製剤の評価(承認審査)について、一般用医薬品の範囲拡大のためにも具備すべき特性を考慮した基準等を策定すべきと提言している。しかし具体的な基準作成は全く行われておらず、これら製剤につき、育薬の観点から新規効能効果を取得しようとする場合、多くの医薬品メーカーはその開発を躊躇せざるを得ない状態と言える。

本研究では、官民共同型研究の利点を最大限に生かし、行政研究機関、企業側研究者、アカデミックサイトが共同で、現代科学の水準に基づき、各種分析化学、分子生物学、植物化学、天然物化学、生化学的な手法を組み合わせながら、生薬、西洋ハーブ、漢方処方の3分野毎に、具体的な品目を念頭におき、育薬の視点から標準化と品質評価法の確立を目指す。生薬では、標準化の基礎となる基原の鑑別法の確立が重要となる、さらに、従前の研究から、メタボロームの解析による品質評価法が確立されつつあり、さらに基原植物毎の薬効差との関係につき具体的な検討をはかる。また単味生薬につき、新規効能の取得を目指し、局方生薬承認基準の改正案について検討する。さらに標準化法確立の一環として、カイクをモデル動物とした生薬の有効性評価系について検討する。西洋ハーブでは、これまで対象とした品目につき引き続き新規承認を目指す研究を実施するとともに、育薬を指向し、局外規等で既に承認がある西洋ハーブを選択、調査と標準化試験法の確立を組み合わせた研究を実施する。漢方処方では、麻

黄湯を選択し、新規効能である抗腫瘍効果を評価する試験法の確立と活性成分の解明を目指す。

B. 研究方法

〈生薬の標準化と品質評価手法に関する研究〉

B-1. 地黄

アカヤジオウ (*Rhemannia glutinosa* var. *purpurea*), カイケイジオウ (*R. glutinosa*) は、武田薬品京都薬草園から分与され、本学薬用植物園で栽培されているもの、および養命酒製造株式会社薬草園由来のものを用いた。市場品の地黄は、医薬基盤研究所薬用資源研究センターおよび本研究班の生薬メーカーのものを用いた。

B-2. 党参

Codonopsis 属植物 56 検体、党参 55 市場品 71 検体は、昨年度「天然物医薬品の評価手法と標準化に関する研究：KHB1008」で報告した物を用いた。これらの基原種と ITS 塩基配列のタイプは、既に報告している。分析の標準化合物 Codonopyrrodium B (1), Codonopyrrodium A (2), Tangshenoside I (3), Cordifolioidyne B (4), Lobetyolinin (5), Lobetyolin (6), Lobetyol (7) は、*C. tangshen* の根を基原とする党参から、単離構造決定したものを使用した。

B-3. 晋耆

本研究班の生薬メーカーから入手した全 29 検体の内、核 DNA の LEAFY 遺伝子の 2nd intron の遺伝子型が、AA 型のもの 4 個体、BB 型 4 個体、CC 及び F2F2 型、各 1 個体、AB 型 3 個体の計 13 個体を用いた。また、アミノ酸分析には、栃本天海堂の市販品を使用した。

NMR 測定用生薬の抽出溶媒は重水溶液に 3-trimethylsilyl- 2, 2, 3, 3-*d*₄-propionic acid Na salt を 0.01 % 添加したものをを用いた。各試料の粉末 10 mg に抽出溶媒 1 mL を加え、5 Hz, 30 分振とう抽出を行った後、1000 x g で 10 分間遠心分離を行い、得られた上清を試験溶液として用いた。NMR スペクトルの測定には JEOL ECA-600 型核磁気共鳴装置を用いた。¹H-NMR スペクトルは non spin 系で x offset = 5 ppm, x sweep = 30 ppm の範囲を測定した。積算回数は 64 回とした。この時、relaxation time は 5 s とした。また、溶媒ピークを消去するため、4.62 ppm に 60 dB での照射を行った。全測定は、人為的操作誤差の有無を確認するため、n=2 で行った。¹H-NMR スペクトルのデータ処理は Alice2 for Metabolome (JEOL) を用い、10~-0.01 ppm の範囲において、0.05 ppm ごとの積分値を計測した。この時、0.01~-0.01 ppm の範囲を *d*₄-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。¹H-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、パレートスケール処理を行った。

B-4. 高血糖モデルカイコによる薬効評価

カイコの受精卵(交雑種ふ・よう x つくば・ね)は愛媛養蚕株式会社から購入した。孵化した幼虫は室温で人工飼料シルクメイト 2S(日本農産工業株式会社)を与えて 5 令幼虫まで育てた。飼育容器は卵から 2 令幼虫までを角型 2 号シャーレ(栄研器材)、それ以降をディスポーザブルのプラスチック製フードパック(フードパック FD 大深, 中央化学株式会社)を用いた。飼育温度は 27°C とした。特に記載がない限り、実験には 4 齢眠以後絶食させた 5 令 1 日目の幼虫を用いた。地黄は、ウチダ和漢薬 (Lot. SU312910) を使用した。

〈育薬を指向した西洋ハーブの品質評価と生薬製剤の標準化に関する研究〉

B-5. チェストツリーを材料とした西洋ハーブの品質評価

一般用医薬品として欧州に流通するチェストツリー製品は現地の薬局で販売されていた 8 種類を入手した。日本国内で健康食品として流通するチェストツリー製品はインターネット経由で 10 種類を購入した。日本薬局方外生薬規格マンケイシは、国内の主要な生薬メーカー 3 社より 5 製品を購入した。LC-MS/MS 分析は、Shimadzu Prominence UFLC/LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific) を使用した。測定データは、差異解析ソフトウェア SIEVE 2.0.1 (ThermoFisher Scientific) で処理し、ピークの検出とアライメントを行った後、多変量解析に供した。チェストツリー製品およびマンケイシに含まれる成分の主成分分析並びに判別分析には、多変量解析ソフトウェア SIMCA-P+ Ver. 12.0.1 (Umetrics) を用いた。

B-6. 生薬製剤承認基準案の検討

平成 22~23 年度における「天然物医薬品の評価手法と標準化に関する研究：KHB1008」の報告書別冊「単味生薬の有効性及び安全性を保証するエビデンスに関する文献情報 (I) (II)」の調査結果から、どの効能をどのように読み替えるか、(どの生薬の) どの効能を新規に追加するか担当生薬について取捨選択し、それらを支持するエビデンス (文献) に関する情報を報告書別冊から抜き出した。抜き出した文献は、①臨床研究 [RCT (ランダム化比較試験), RCT 以外の CT (臨床試験) (無作為、非対照など), 調査研究, 症例報告] であること、②単味製剤 (あるいは単味エキス)

に関する研究であること、の2つを満たすものを「コアエビデンス」、それ以外を「サポートエビデンス」とした。次に、これらの論文のうち、班会議において、新規効能として提案可能なものを支持するコアエビデンス論文をピックアップし、論文内容を精査した。

<育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方品質評価に関する研究>

B-7. 麻黄エキスの成分検討

麻黄エキスを水に溶解し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分画した。各分画物を濃縮し、分画濃縮物を得た。これらの分画濃縮物より、各種クロマトグラフィーを繰り返し、10種の化合物と、縮合型タンニンオリゴマー画分を得た。

B-8. キナーゼ阻害アッセイ

組換えキナーゼによる合成ペプチド基質のリン酸化反応を Lab Chip 3000 を用いて測定し、統計解析ソフトウェア (GraphPad Prism 5) を用いた4パラメーターロジスティック曲線の近似式から IC₅₀ 値を算出した。

B-9. 細胞運動抑制アッセイ

MET 陽性のヒト乳癌由来 MDA-MB-231 細胞を用い、50 ng/mL HGF により誘導されるトランスウェルの移動細胞数を位相差顕微鏡下で計数し、バックグラウンド (HGF 無添加) での細胞移動数を差し引きした後、HGF 添加での実質移動細胞数に対する比率細胞運動の抑制率を求めた。

B-10. 細胞増殖抑制アッセイ

10%血清添加培地に懸濁した HuH-7 細胞を 48 ウェルプレートに播種し、24 時間培養した。0-40 μg/mL Herbacetin 添加培地で 3 日間培養した後、WST アッセイで生細胞数を定量した。

B-11. Aurora kinase B の発現及び基質の Histone-H3 のリン酸化の検出

0-20 μg/mL Herbacetin 及び 10%血清添加培地で 6 時間培養した HuH-7 細胞をタンパク質抽出用細胞溶解液で溶解し、抗リン酸化 Histone-H3 抗体、抗 Aurora kinase B 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。

B-12. 細胞周期の解析

HuH-7 細胞を 2 日間培養し、EDTA で解離させた後、ヨウ化プロピジウムで染色し、フローサイトメーターで細胞あたりの DNA 量を測定した。

B-13. HGF-MET シグナルの検出

血清飢餓処理した HuH-7 細胞を、0-5 μg/mL Herbacetin 及び 20 ng/mL HGF 添加培地で 10 分間インキュベートし、タンパク質抽出用細胞溶解液で溶解し、抗リン酸化 MET 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体を用いたウエスタンブ

ロットで検出した。

B-14. アポトーシスの解析

HuH-7 細胞を、0-20 μg/mL Herbacetin 及び 10%血清添加培地で 18 時間培養した後、細胞を溶解し、細胞死検出キットを用いてアポトーシス細胞を検出した。

B-15. HuH-7 細胞移植ヌードマウスの腫瘍増殖に対する Herbacetin の効果の解析

Balb/c ヌードマウスに HuH-7 細胞を皮下移植し、1 週間後、腫瘍形成を確認し、コントロール群とヘルバセチン投与群 (各 6 匹) について、1 日 1 回、コントロール群は滅菌水を経口投与し、ヘルバセチン投与群は、35 mg/kg の Herbacetin を経口投与した。経時的に腫瘍サイズとマウスの体重を測定し、20 日目にマウスを過麻酔下に屠殺して、腫瘍を回収した。

(倫理面への配慮)

本研究には、ヒト由来の試料は用いておらず、倫理上、特に問題となる事象はないと考える。

C. 研究結果

<生薬の標準化と品質評価手法に関する研究>

C-1. 地黄

国内各所より入手したアカヤジオウ、カイケイジオウの各 2 系統について、EXPA 遺伝子のエキソン 2 とエキソン 3 の塩基配列を比較した。エキソン 3 では分析した検体のすべてで塩基配列が一致したのに対して、エキソン 2 では 5' -end から 158 番目の塩基が、アカヤジオウでは T であるのに対してカイケイジオウでは C であった。この置換は Ile (ATT) → Ile (ATC) に対応する同義的な置換であった。そこで、このサイトを鑑別サイトとして生薬の DNA 鑑別を検討した。その結果、32 検体中、PCR 増幅できた 22 検体ですべてが、カイケイジオウタイプであることが判明した。

C-2. 党参

Codonopsis 属植物の根及び党参市場品の原植物を正確に同定した上で、同属 2 種 1 変種の成分的差異を論じた報告はないことから、今回、生物活性の報告がある 7 成分を単離、同定し、分類群間の差異を検討した。

基原種、ITS 配列のタイプまたは産地が異なる *Codonopsis* 属植物の根 (一部党参市場品) について HPLC 分析を行った結果、成分含量に個体差は認められるが、着目した 7 成分が同属 2 種 1 変種の主な成分であることが判明した。ただし、湖北省の神農架及び五峰に産する野生の *C. tangshen* には、さらに多様な成分が含まれていることがわかった。また、種の違いによる成分的な特徴を見出せたが、ITS 領域の塩基配列タイプによる違い

や産地による違いは明瞭でなかった。また、甘肅省文県で収集した *C. pilosula* var. *modesta* の 3 検体では、アルカロイド 1 の含量が高いことが判明した。ついで、党参市場品について分析を行ったところ、*C. tangshen* を基原とする検体は、たとえ *C. pilosula* または *C. pilosula* var. *modesta* と同一の市場品内にあっても、3 または 4 が高含量を示した。香港市場品の 1 検体は ITS 領域の塩基配列から *C. tangshen* であろうと推定したが、化合物 3 の含量が高く、本推定を裏付けた。また他の検体でも、遺伝子型と成分定量パターンが植物材料から得られた結果とほぼ一致した。採取品、市場品を合わせて解析した結果、*C. pilosula* と *C. pilosula* var. *modesta* の主要な成分は Codonopyrrolidinium B であり、*C. tangshen* の特徴的な成分は 3 及び 2 と推定された。主成分分析の結果もこれを裏付けていた。*C. pilosula* var. *modesta* は、母種と成分的に区別できなかった。

C-3. 晋耆

検討の結果、抽出溶媒は D₂O が最適と考えられ、選択した。また、ダイナミックレンジについて検討した結果、使用する試料の量は、10 mg とした。

各試料溶液の ¹H-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、第一主成分（寄与率 57.6%）及び第二主成分（寄与率 14.1%）により、大きく 4 つのグループに分類された。次に、各主成分に寄与の大きい成分を推定するため、次に因子負荷量の解析を行った。その結果、第一主成分で、正の方向に寄与しているピーク群には、5.4 ppm 付近のアノマープロトンと推定されるピーク及び 3.5-4.0 ppm 付近の多数のピークが見られ、糖に由来していると考えられた。従って、第一主成分軸方向の広がりには、主に糖の含有量に依存していると考えられた。一方、第二主成分で、正の方向に寄与しているピーク群には、2.9-3.6 ppm 付近及び 1.7-2.2 ppm 付近の化学シフトを持つピークが多数認められ、シロギの含有成分から考え、これらのピークは、アミノ酸に由来すると推定された。そこで水性メタノールエキスを調製、誘導体化を行った上で、LC-MS によるアミノ酸分析を行い、成分分析の結果と NMR のシグナル両方を考え合わせると arginine, asparagine の関与が高いものと判明、さらに、GABA 及び proline 関与の可能性も考えられた。

また、主グループと異なるプロファイルを示したグループは、いずれも asparagine 含量が高い傾向があった。その要因が、生育環境、加工調製法、遺伝的形質の違いにあるのか、別の要因にあ

るかは不明であるが、本生薬の特徴的な成分パターンの一つであると考えられる。

C-4. 高血糖モデルカイコによる薬効評価

これまでの結果から、ジオウを 5 段階のステップで処理したジオウ粗抽出画分に高血糖カイコの血糖降下活性があることを見出している。しかし、5 段階の処理を経る方法は、再現性や簡便さの観点からの問題が生じる。そこで、ジオウの品質管理の標準化のために、有効成分を含む、簡便なジオウ粗抽出画分を得る方法に開発を行った。文献調査の結果を元に、活性成分をポリガラクトースと推定し検討した結果、新たに、熱水抽出とエタノール沈殿という 2 段階のステップで活性が、再現性良く確認出来ることが判った。次に、カイコを用いた生薬の品質管理の適応拡大を目指して、高血糖カイコに対して治療効果を示すジオウ以外の生薬の探索を行った。当研究室に保管されていた生薬のエキス粉末の投与により高血糖カイコの血糖値が低下するか検討した。その結果、カロコン、カンゾウ、ニンジン、バクモンドウ、コウジン、トウキ、オウレンのエキスの投与により、高血糖カイコの血糖値が低下した。よって、これらの生薬は、カイコの血糖値を低下させる有効成分を含んでいることが示唆された。

〈育薬を指向した西洋ハーブの品質評価と生薬製剤の標準化に関する研究〉

C-5. 西洋ハーブの品質評価

チェストツリー製品のうち植物粉末を含む 8 製品について、花芽形成に関与する *FLORICAULA/LEAFY* (*FLO/LFY*) 遺伝子の第二イントロン領域約 1.3 kbp の塩基配列を解読し、原料植物の同定を行った。その結果、8 製品全てが正しい基原種である *V. agnus-castus* に由来しており、同属異種植物の混入は認められなかった。

日本薬局方外生薬規格 2012 では、生薬マンケイシを「ハマゴウ *Vitex rotundifolia* Linné filius 又はミツバハマゴウ *Vitex trifolia* Linné (*Verbenaceae*) の果実」と規定している。次に、日本に流通するマンケイシ 5 製品について、チェストツリー製品と同様に *LFY* 遺伝子の塩基配列を解読して基原植物を同定した結果、4 製品が *V. rotundifolia* に由来し、1 製品は *V. rotundifolia* と *V. trifolia* の混合品であることが明らかになった。

チェストツリー医薬品について、LC-MS 分析の positive mode のクロマトグラムではピークが全体的に小さいものの、casticin をはじめ、良好な分離パターンを得ることができた。一方、negative mode では 1 つの検体を除いて有効なピークがほとんど得られなかった。さらに、チェス

トツリー乾燥エキスを含む医薬品8製品と健康食品4製品の positive mode における LC-MS 測定結果について、主成分分析を行ったところ、3つのクラスターが形成された。それぞれのクラスターを形成する要因となったピークを検出し、個別の MS スペクトル分析を行ったところ、これらは主に界面活性剤であることが推定され、TIC クロマトグラムの差異解析では植物由来成分よりも界面活性剤など添加剤の与える影響が大きいことが示唆された。

DNA 塩基配列の解析結果に従って、*V. agnus-castus* に由来すると確定したチェストツリー健康食品8製品と、*V. rotundifolia* に由来する生薬マンケイシ4製品について、添加剤由来と考えられるピークを除去した上で、成分レベルでの判別分析を行った。S プロットの解析から、*V. agnus-castus* に特異的な成分を5つ検出した。このうち1成分は、チェストツリー医薬品と健康食品に存在し、マンケイシには全く含まれていなかったことから、*V. agnus-castus* の純度試験のマーカ化合物として利用できる可能性が期待された。一方、*V. rotundifolia* に特異的な成分として2つ検出し、そのうちの1つは保持時間と精密質量が標品と一致したことから、casticin であると考えられた。

なお、チェストツリー以外に、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詳細の公表を見送る。そのうち1つについては、海外で医薬品として流通する製品の生薬を計12種入手し、乾燥減量、灰分及び酸不溶性灰分が欧州薬局方の規格に適合することを確認した。しかし、TLC 及び LC による分析において、近縁種の混入を示す結果が得られた。2つ目の西洋ハーブも欧州で一般用医薬品として流通している品目であり、原料エキス7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た。3つ目は、欧州で一般用医薬品として流通する製品について、抗酸化能を評価し、その主成分群と抗酸化能に相関を見出した。

C-6. 生薬製剤承認基準案の検討

報告書別冊「単味生薬の有効性及び安全性を保證するエビデンスに関する文献情報 (I) (II)」を基に、効能読み替え、新規効能追加、新規生薬収載案を提示し、それらを支持するエビデンス (文献) に関する情報を抜き出した。抜き出した文献をについて、①臨床研究[RCT (ランダム化比較試験), RCT 以外の CT (臨床試験) (無作為, 非対照など), 調査研究, 症例報告]であること、②

単味製剤 (あるいは単味エキス) に関する研究であること、の2つを満たすものを「コアエビデンス」、それ以外を「サポートエビデンス」とした。

コアエビデンスとして報告されたのは、ボウイ:1報, サフラン:6報, ケイヒ:13報, コウカ:1報, オウバク:1報, ソウハクヒ (桑の葉):4報, コウジン:2報 (以上新規効能追加案), オンジ:2報 (新規生薬追加案) 計30報であった。

各コアエビデンスの精査の方法としては、RCT 論文として具備すべき要件をまとめた「CONSORT Statement」及び、薬用ハーブ製品の RCT 論文作成のために開発された「ハーブ介入の CONSORT」を基に作成したチェックリストに記入することにより行った。

<育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方品質評価に関する研究>

C-7. 麻黄エキスの成分

これまでの研究から、漢方処方麻黄湯の抗腫瘍活性、転移抑制活性の原因生薬は、麻黄であり、麻黄の成分と知られている ephedrine 類は、これらの活性を持たないことが明らかになっている。そこで本研究では、ephedrine 類以外の成分が活性本体であると考え、麻黄熱水抽出物 (麻黄エキス) の成分分析を行うこととした。その結果、麻黄エキスの酢酸エチルおよび n-ブタノール分画物から、既知化合物9種 (*trans*-cinnamic acid, syringin, catechin, epicatechin, symplocoside, pollentitin B, herbacetin 7-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-glucoside 7-*O*-rhamnoside, isovitexin 2''-*O*-rhamnoside) とともに、文献未記載の化合物の計10種の化合物を単離した。NMR 等の各種機器分析データに基づき、本化合物について構造解析した結果、herbacetin 7-*O*-neohesperidoside と構造決定した。

C-8. 溶媒分配画分細胞運動抑制作用

麻黄の水抽出エキスを各種溶媒で分配して得られた4画分について、細胞運動抑制作用を評価した結果、n-ブタノール画分に、最も強い抑制活性が見出された。また、やや劣るものの、水画分にも抑制活性が観察された。

C-9. n-ブタノール画分に含まれる成分の細胞運動抑制作用の評価

n-ブタノール画分から分離同定された、化合物のうち、構造が特徴的な化合物とその関連化合物、活性に関する知見から関与が予想される化合物について、細胞運動抑制作用を評価した結果、含有化合物として、herbacetin-7-*O*-glucoside に、弱い抑制活性が見出された。そこで、アグリコンである herbacetin について細胞運動能抑アッセイを実施した結果、強い抑制活性が観察された。

従って, herbacetin は, 麻黄の活性成分のひとつであると考えられた.

C-10. 水画分の分離分画の細胞運動抑制作用

水抽出画分を Diaion HP-20 カラムで 7 分画に分離し, 細胞運動抑制作用を評価した結果, 分画 5 に強い抑制活性が観察された. この分画を Sephadex LH-20 カラムで 12 分画に分離し, 細胞運動抑制作用を評価した結果, 分画 12 に強い抑制活性が観察された. 現在, この分画に含まれる化合物につき, 構造推定を進めている.

以上の評価結果を総合的に判断すると, 麻黄の抗腫瘍活性には複数の化合物が関与していることが示唆され, 有効性を担保するためには, 物質だけでなく, 適切な活性測定法を設定すべきであると考えられる.

C-11. herbacetin のキナーゼ阻害

herbacetin について, キナーゼ阻害プロファイリングを実施した結果, 阻害活性が予想されていた MET に加え, FLT3, TrkA, Aurora kinase A, Aurora kinase B に対する阻害活性が示唆されたため, これらのキナーゼに対する阻害活性を詳細に検討した結果, MET, FLT3, TrkA, Aurora kinase A, Aurora kinase B において, それぞれ herbacetin の添加濃度依存的な活性阻害が観察され, IC₅₀ 値を算出した結果, それぞれ 2 μM, 38 nM, 189 nM, 355 nM, 405 nM であった.

C-12. HuH-7 細胞増殖に対する herbacetin の効果

Aurora kinase B 陽性である HuH-7 細胞を用い, Aurora kinase B の発現量とその基質である Histone-H3 のリン酸化に対する herbacetin の抑制効果を解析した結果, herbacetin の添加濃度依存的に Histone-H3 のリン酸化は抑制されたが, Aurora kinase B の発現量は変化しなかった. また, HuH-7 細胞の細胞周期に対する herbacetin の効果を解析した結果, herbacetin の添加濃度依存的に G2-M 期の細胞が増加した. 以上の結果から, herbacetin は, Aurora kinase B の活性を阻害し, HuH-7 細胞の細胞周期を G2-M 期で停止させる作用を有することが明らかになった.

C-13. HuH-7 細胞の HGF-MET シグナルに対する herbacetin の効果

MET 陽性である HuH-7 細胞を用い, herbacetin の HGF-MET シグナルに対する効果を調べた結果, HGF 刺激による MET のリン酸化は, herbacetin の添加濃度依存的に抑制された. また, Akt のリン酸化は, herbacetin の添加濃度依存的に抑制されたが, ERK のリン酸化は, HGF 刺激後もほとんど生じておらず, herbacetin の添加による影響もほとんど観察されなかった. 以上の結果から, herbacetin は HuH-7 細胞の MET 及び下流の Akt

のリン酸化を抑制することが明らかになった.

C-14. HuH-7 細胞のアポトーシスに対する herbacetin の効果

HuH-7 細胞を用い, herbacetin のアポトーシスの誘導作用を解析した結果, herbacetin の添加濃度依存的にアポトーシス細胞の割合が有意に増加していることが明らかとなり, Herbacetin は, HuH-7 細胞の HGF-MET シグナルを抑制することにより, アポトーシスを誘導する作用を有するものと考えられた.

C-15. HuH-7 細胞移植ヌードマウスの腫瘍増殖に対する herbacetin の効果

腫瘍増殖に対する herbacetin の効果を解析した. 腫瘍重量は, herbacetin 投与群はコントロール群と比較して有意に低下していたが, マウスの体重は実験期間を通して, コントロール群及び herbacetin 投与群で有意差はなかった. 以上の結果から, herbacetin は, ヌードマウスにおける腫瘍増殖を抑制することが明らかになった.

D. 考察

<生薬の標準化と品質評価手法に関する研究>

D-1. 地黄

trnK 領域を対象とするこれまでの研究では, nested-PCR を行うことが必要であった. また, trnK 遺伝子は葉緑体ゲノム上に存在しているため個体内に極めて多数のコピーが存在している. そこで, 核ゲノム遺伝子でコピー数の多くないものとして EXPA 遺伝子を対象とし 1 回の PCR で増幅できるよう短い領域を増幅かつ直接シーケンスが可能のようにシーケンス反作用のプライマーサイトを forward primer の 5' -側側に付加したところ, 良好な結果が得られた. 解析できたすべての鑑別サイトの塩基はすべて C であり, アカヤジオウタイプである T を示すものはなかった. この結果は, trnK 遺伝子を用いた昨年度の検討結果と一致した. 鑑別の基礎となる基原植物の数が少ないために, 種内での変異の有無が明らかでない. 従って, 今後より多数の系統の植物サンプルについての検討が必要である.

D-2. 党参

甘粛省文県で収集した *C. pilosula* var. *modesta* は, 母種と成分的に区変種の 3 検体で化合物 1 の含量が高かった. *C. pilosula* var. *modesta* 由来の党参は「紋党参」とも称され品質が良いとされるが, この根拠となる成分が化合物 1 であるか否かは, さらに検体を増やして検討しなければ結論が出ない. また, 今回の研究では, サポニン成分や糖質については検討しておらず, これらの成分も品質に関与しているとも考えら

れ、今後の検討課題である。甘肅省での調査では、*C. pilosula* または *C. pilosula* var. *modesta* の栽培年数を聞くことができた。年数がわかっている検体の成分含量を比較したが、3年間栽培したものが、1年間の栽培品より含量が高いという結果は得られなかった。これについては、栽培研究が必要であろう。化合物3及び2の含量が高いという *C. tangshen* の特徴は野生品で顕著であったが、栽培品ではそれがわかり難くなる傾向があった。栽培により、種苗が劣化している可能性が考えられた。以上、今回の成分研究の結果、*C. pilosula* (変種を含む) と *C. tangshen* の成分的な差異が明らかになったことから、今後、成分組成からも両種を鑑別することが可能である。

D-3. 晋耆

今回、シングルの ¹H-NMR データを利用したメタボローム解析による品質評価を試みた。

抽出溶媒の検討においては、比較した3溶媒の中で、CD₃OD 及び D₂O 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。漢方処方の方多くは、湯剤であることを考えると、D₂O 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。

PCA では、第一主成分は、主に糖の含量を捉えていた。一方、第二主成分は、アミノ酸類、特に、arginine 及び asparagine の量を捉えていた。さらに、入手時期の比較から生薬の経時変化として、両アミノ酸が減少することが明らかになった。他方、糖類の含量は、経時変化に無関係であった。

二次代謝物であるイソフラボン類では、¹H-NMR スペクトルデータ上では検出されたが、今回の解析では、品質評価の対象物質としては認められなかった。糖やアミノ酸類に比較して含量が低いことが要因である可能性もあるため、データの预处理として対数処理を行う、あるいは、芳香族プロトンのみを解析対象とするなど、別の解析手法も検討の余地がある。LEAFY 領域の遺伝子型と成分パターンの相関では、入手年の新しいものに限って着目すると、BB 型の遺伝子型を持つ3検体が、糖含量が高い傾向が認められたが、検体数が少ないため、この点については、検体数を増やし、更に検討が必要である。

D-4. 高血糖モデルカイコによる薬効評価

本研究で、カイコの治療活性を指標としたジオウの品質管理のための簡便な検定方法の確立、及びジオウ以外のいくつかの生薬の薬効をカイコで評価できることを示した。品質管理で重要なことは、再現性よく、安価でかつ簡便であることで

ある。カイコを用いることにより、安価で少ない量で個体に対する薬効の有無を評価することが可能となる。

ジオウ以外の生薬でいくつか高血糖カイコの血糖値を低下させる活性を有するものが得られた。カロコン、カンゾウ、ニンジンについては、有意に血糖値が低下した。その他のバクモンドウ、コウジン、トウキ、オウレンなどについては、再現性も含めて、より多くの個体のカイコを用いて、有意差検定ができる条件で再検討することが今後、必要である。また、トウキはたくさん投与するとカイコが弱る。その他の生薬でも、投与量が多すぎると、血糖値が高くなってしまいうこともある。よって、検定に使う適切な濃度も明らかにする必要があるのである。これらの生薬の有効成分を知ることは、TLC や HPLC など他の方法への応用も考えると重要な課題である。

<育薬を指向した西洋ハーブの品質評価と生薬製剤の標準化に関する研究>

D-5. 西洋ハーブの品質評価

植物粉末を含むチェストツリー健康食品の DNA 塩基配列の解析からは、同属近縁植物の混入は認められず、チェストツリー製品は概ね正しい基原植物に由来していると考えられた。しかしながら、LC-MS による成分分析では多様なプロファイルが確認され、基原は同じでも品質が一定ではない可能性が示唆された。そこで、基原の明らかなチェストツリー健康食品と生薬マンケイシの LC-MS プロファイルについて判別分析を行い、*V. agnus-castus* と *V. rotundifolia* を判別するマーカー化合物の探索を試みた。

チェストツリー健康食品およびマンケイシの LC-MS プロファイルは全体では明確に区別でき、判別分析の結果、それぞれに特異的な成分も検出された。ほとんどの化合物は *V. agnus-castus* と *V. rotundifolia* の両方に存在したが、*V. agnus-castus* に特徴的な成分を1つ見出すことができた。

D-6. 生薬製剤承認基準案の検討

案として挙げられた効能効果の中で、一般用医薬品として適切な効能・効果を支持するコアエビデンス計30報について、精査を行った。コアエビデンスは、メタアナリシスが1報、RCTが26報(クロスオーバー試験はRCTに含む)、RCT以外のCTが3報であったが、精査の結果、RCTの中でも、特に重要な項目であるランダム化の方法(割振り順番を作成した方法)が記述されていない又は方法が完全なランダム化ではないもの(準ランダム化)や、二重盲検と明示されていないもの等、エビデンスレベルが低いと考えられる論文もあ

ることが確認された。また、日本では一般的ではない投与方法（生薬エキスの静脈注射）で行われた臨床試験論文も存在した。今後は、チェックリストの結果を基に、各論文のエビデンスレベルの高さを客観的に評価し、その評価結果を鑑みて局方手引き案作成を進める必要があると考えられた。

〈育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方品質評価に関する研究〉

D-7. 麻黄の抗腫瘍活性成分について

これまで、麻黄の有効成分としては ephedrine 類のアルカロイド成分が広く知られ、日本薬局方においても、定量指標成分は、ephedrine 類となっている。しかしながら、本研究の成果より、麻黄の抗腫瘍作用は、これらの成分ではなく、herbacetin をはじめとするポリフェノール成分に由来する可能性が高い。抗腫瘍活性に生薬の作用を絞った場合、アルカロイド画分は、副作用の原因成分となるため不要と考えられる。従って、麻黄エキス去アルカロイド分画で、活性が確認されれば、この画分を、育薬対象画分として、今後検討する必要があるものと考えられる。

多成分系からなる天然物医薬品の場合、医薬品としての標準化には、特定の活性化合物の含量のコントロールと組み合わせ、活性の標準化として、適切な生物学的な試験を設定していく必要もあるものと考えられる。麻黄由来画分の場合、標準化を考慮すれば、画分の抗腫瘍活性を担保するため、特に、適応となる癌の性質に応じた活性測定法を設定することが重要であるものと考えられる。

E. 結論

〈生薬の標準化と品質評価手法に関する研究〉

地黄の遺伝子鑑別法として、EXPA 遺伝子のエキソン 2 領域の利用を検討した結果、約 70% の試料で、nested-PCR を行うこと無く、増幅産物が得られた。解析出来た 22 検体は、いずれもカイケイジオウタイプであり、昨年度の trnK 領域による解析結果と一致した。種内変異の検討数が少ないのが、今後の課題である。

党参では、*Codonopsis* 属植物 2 種 1 変種の根と党参市場品について、アルカロイド、フェニルプロパノイド及びポリアセチレン類の 7 成分を定量した結果、*C. pilosula* (var. *modesta* を含む) の主な成分は Codonopyrrolidinium B であり、*C. tangshen* に特徴的に多い成分は Tangshenoside I 及び Codonopyrrolidinium A であることが明らかになった。

晋耆では、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、シングルの D₂O エキスについて、¹H-NMR スペクトルデータを用いたメタボローム解析を行った。その結果、同生薬の含有成分の経時変化を検出し、その主たる成分は、arginine, asparagine であることを確認した。

高血糖モデルカイコを利用したジオウの薬効評価のための簡便なプロトコールを作成した。さらにカイコで薬効を評価することができる生薬のエキスの候補を新たに複数同定した。今後、生薬の新規効能効果を評価するため、カイコをバイオモニターとして利用する手法が、有効であるかどうか引き続き検討する。

〈育薬を指向した西洋ハーブの品質評価と生薬製剤の標準化に関する研究〉

今回、チェストツリー製品の正しい原料である *V. agnus-castus* とその他の近縁植物の判別には有効なマーカー化合物の探索を目的として、チェストツリー製品および生薬マンケイシの分子遺伝学的かつ分析化学的分析を行った。今回使用したチェストツリー製品に同属他種植物の混入は認められなかったが、健康食品において正しい基原を使用することは、安全性の面からも不可欠である。従って、今後も継続して、マーカー化合物の探索をはじめ、品質規格の指標となる有用性の評価を進めていく必要があると考えられた。

また、単味生薬製剤承認基準原案の策定に向けて、一般用医薬品として適切と考えられる新規効能効果案を挙げ、それを支持するエビデンス文献を抽出し、その内容の精査を行ったところ、RCT 論文の中でも、その質（エビデンスレベル）には幅があることが確認された。これらの結果を基に、今後は各論文のエビデンスレベルの評価を行い、局方手引の改訂案の作成を進める予定である。また、それと並行して、単味生薬の煎じ薬に関する局方手引改訂版と生薬エキス・生薬製剤に関する単味生薬製剤承認基準のギャップを埋めるブリッジングガイドラインの作成も行う予定である。〈育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方品質評価に関する研究〉

漢方処方麻黄湯の構成生薬である麻黄の抗腫瘍作用は、herbacetin 配糖体を含む、複数の化合物が関与していることが明らかとなった。また、herbacetin のマルチキナーゼ阻害作用から、麻黄が MET 陽性がん、Aurora kinase 陽性がん、FLT3 陽性がん、Trk A 陽性がんに対し、抗腫瘍作用を示すことが示唆された。さらに、herbacetin は、ヒト肝臓がん細胞 HuH-7 の Aurora kinase B を阻害し、細胞周期を G2/M 期で停止させることで細胞増殖を停止させる一方、HGF-Met シグナルを阻

害し、アポトーシスを誘導することが判明した。さらにまた herbacetin は、ヌードマウスにおける HuH-7 の腫瘍増殖を抑制することが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakigi, Y., Hakamatsuka, T., Icho, T., Goda, Y., Mochizuki, N., Comprehensive analysis of flavonols in *Ginkgo biloba* products by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-violet detection and time-of-flight mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **76** (5), 1003-1007 (2012).
- 2) Takeda, A., Wakana, D., Yokokura, T., Kamiya, H., Asama, H., Kondo, S., Wada, A., Ukita, K., Wakabayashi, K., Takahashi, K., Tomitsuka, H., Sasaki, H., Kikuchi, Y., Yamamoto, Y., Shimada, Y. Goda, Y., Studies on the identification test for JUNCI HERBA. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **43**, 1116-1120 (2012).
- 3) Wakana, D., Tomizawa, Y., Maruyama, T., Kamiya, H., Kawasaki, T., Yokokura, T., Yamaji, H., Nakai, Y., Yamamoto, Y., Kondo, S., Komatsu, K. and Goda, Y., Confirmation analysis of Hedysarii Radix. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, submitted.
- 4) Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Wakana, D., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T. and Goda, Y.: Characterization of Phenolic Constituents from Ephedra Herb Extract. *Molecules*, submitted.
- 5) Fukahori, M., Kobayashi, S., Naraki, Y., Sasaki, T., Oka, H., Seki, M., Masada-Atsumi, S., Hakamatsuka, T. and Goda, Y., Quality evaluation of medicinal products and health foods containing Chaste Berry (*Vitex agnus-castus*) in Japanese, European and American markets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, submitted.

2. 学会発表等

- 1) 白石真純, 日向須美子, 日向昌司, 花輪壽彦, 五苓散及び沢瀉湯による MDR-1 高発現肝臓癌細胞 HuH-7/PTX の薬剤耐性の解除, 第 29 回和漢医薬学会学術大会, 2012 年 9 月, 東京.
- 2) 日向須美子, 漢方薬によるがんの再発・転移

防止療法をめざして～基礎研究から臨床応用へ～, 第 29 回和漢医薬学会学術大会 シンポジウム 1 「和漢医薬学とがん」2012 年 9 月, 東京.

- 3) 竹田文信, 若菜大悟, 横倉胤夫, 神谷洋, 浅間宏志, 近藤誠三, 和田篤敬, 浮田謙二, 若林健一, 高橋喜久美, 富塚弘之, 佐々木博, 菊地祐一, 山本豊, 嶋田康男, 合田幸広, トウシンソウの確認試験法について, 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月, 木更津.
- 4) 若菜大悟, 丸山卓郎, 合田幸広, 富澤裕一郎, 川崎武志, シンギの確認試験法について, 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月, 木更津.
- 5) 渥美さやか, 桑田幸恵, 高橋豊, 袴塚高志, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (11) LC-MS/MS によるブラックコホシ市場品の品質評価. 日本生薬学会第 59 回年会, 2012 年 9 月, 木更津.
- 6) 日向須美子, 白石真純, 日向昌司, 花輪壽彦, 薬剤耐性がん細胞の抗がん剤に対する感受性を回復させる漢方薬, 第 69 回日本東洋医学会関東甲信越支部学術総会, 2012 年 10 月, 横浜.
- 7) 若菜大悟, 丸山卓郎, ¹H-NMR データと遺伝子情報の多変量解析による生薬の鑑別, 第 7 回メタボロームシンポジウム, 2012 年 10 月, 鶴岡.
- 8) 合田幸広, 「健康食品」の分析から判る品質に関する課題, 第 27 回健康食品フォーラム, 2012 年 10 月, 東京. なお, 本講演は, 健康産業新聞「話題追跡」(2012 年 11 月 7 日)及び薬事日報「社福協フォーラムから」(2012 年 12 月 13 日)の両業界新聞から注目講演として, 取り上げられている.
- 9) 日向須美子, 日向昌司, 好村守生, 天倉吉章, 合田幸広, 花輪壽彦, 癌細胞の HGF-c-Met シグナルを阻害する麻黄の活性成分・Herbacetin, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.
- 10) 天倉吉章, 好村守生, 山上沙織, 吉田隆志, 日向昌司, 日向須美子, 花輪壽彦, 合田幸広, 麻黄エキスに含まれる成分研究, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称: マルチキナーゼ阻害剤, 抗癌剤, 抗転移剤, 薬剤耐性抑制剤, および疼痛抑制剤
出願番号(出願年月日): 特願 2012-258719 (2012 年 11 月 27 日),
出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財