

製剤の品質特性評価及び体内動態に関する研究、第二課題は、機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究、第三課題は、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、第四課題は、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

4つの分担研究課題は、それぞれ国衛研研究者が分担研究課題責任者を務めた。下記に各分担研究班の構成を示す

第一課題：加藤くみ子（構成員 楠原、西山、中西、小崎）

第二課題：四方田千佳子（構成員 柴田、丸山、山梨、立木、山内、大野）

第三課題：阿曾幸男（構成員 宮崎、瀧本、山本、村主、三村、脇山、池田）、

第四課題：香取典子（構成員 小出、坂本、寺田、高嶋、日裏、廣島、池井、木村、夜久）

(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：

構成アミノ酸の光学活性が異なる PEG-ポリグルタミン酸から調製した 3 種類のシスプラチン (CDDP) 内包ミセル (CDDP/m) に関して、担がんマウスを用いた体内動態と抗腫瘍効果の検証を行った。これによって、ミセルを構成するブロック共重合体の化学構造とナノ DDS としての機能の相関（構造-機能相関）を考察した。

細胞内動態を解析するために、蛍光を有する 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、NMR によるポリマーの構造解析を行った。siRNA による特定のタンパク質発現抑制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：

脂質薄膜法を用いて、種々の組成からなるリポソームを作製した。これらをヒト血清と混合し、生成した補体成分である C3b の分解産物 iC3b 量を ELISA により測定し、補体活性化能と品質特性との関連性を調べた。

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、HEK293T 細胞を用いてヒト MCT9 の安定発現系および内因性 MCT9 を siRNA によりノックダウンさせた評価系を構築し、in vitro 輸送実験を行った。免疫染色により細胞内局在、正常組織における膜局在を明らかにした。

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。また、得られた CPP を用いて中心複合法により系の拡張を行い、応答局面法によりデザインスペースを構築した。

(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) 法溶出試験装置における崩壊型錠剤および口腔内崩壊錠の溶出挙動について、3 種類のセルの比較検討とガラスビーズ直径の影響を評価した。さらに、水あり/なし服用を想定した溶出試験データより IVIVC の手法で生物学的同等性 (BE) 試験結果の予測を試みた。また持続型 PLGA マイクロスフェア製剤について FTC 法をはじめ種々の放出試験法を比較検討し、

サルを用いた in vivo 評価を実施した。

2-2) 局所皮膚適用製剤の評価方法：

ヒト BE 試験結果を予測可能な in vivo 同等性評価法の確立を目的に、ラットを用いて製剤中薬物含量変化から算出した放出率、テープストリッピング法による角質中薬物量、microdialysis 法を用いた皮膚中薬物濃度および血漿中薬物濃度を測定した。

2-3) リポソーム製剤の特性と評価方法：

脂質濃度が数mM～20mMと希薄な溶液を濃縮などの前処理を行うことなく、ありのままの状態で感度の異なる示差走査熱量計(DSC)により膜物性の評価を試みた。構成脂質を定量するために、UPLC-Corona 検出器を用い検出条件(移動相組成、検出器設定など)の最適化を行った。試験条件(試験液の種類や pH)と調製方法(硫酸アンモニウムの pH と濃度)の変動が in vitro 薬物放出性に与える影響を評価した。

(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に関する研究：

①新たな非晶質体として注目を集めているコアモルファスについて、コアモルファス形成の評価法やコアモルファス化による溶出性改善や物理的安定性改善に影響を及ぼすと考えられる分子間相互作用や各種分子運動性を評価する手法について検討した。②固体分散体を用いた非晶質製剤の高湿度条件下における物理的安定性に及ぼす軽質無水ケイ酸(アエロジル 200、表面特性が異なるアエロジル R805)の影響を評価した。非晶質薬物の表面における結晶化に及ぼす高分子の影響について検討した。

3-2) 過飽和溶液状態の評価法に関する研究：

過飽和溶液形成及びその安定化に寄与する過飽和溶液の構造を明らかにするために、High-resolution magic-angle-spinning (HRMAS) NMR 測定による非晶質製剤の過飽和状態の評価法について検討した。過飽和溶液中における薬物と高分子間の分子間相互作用を 2 次元 ^1H - ^1H nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) 法により評価した。過飽和溶液の構造と過飽和溶液中における薬物結晶化抑制機構の関連を検討し、薬物結晶化抑制機構と薬物膜透過性との関連について考察を行った。

(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 CQA 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よる CQA 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 CQA を把握する評価技術として、過飽和・析出挙動評価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、粉体の摩擦帯電量測定による粉体付着性評価、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糖衣錠の皮膜厚さの評価、近赤外イメージング法による製剤均一性評価及び赤外、レーザ分光による造粒物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、CQA をコントロールする分析評価手法として、近赤外分光法による連続プロセスのモニタリング、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

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(L-グルタミン酸)およびポリ(D-グルタミン酸)を構成鎖とするブロック共重合体は、 α -helix を形成することによって安定な CDDP 内包ミセルを形成し、(高次構造を形成しないミセルと比較して)優れた血中滞留性、肝臓・脾臓への集積性の抑制、固形がんへの集積性の向上を示すことが確認された。さらに、ミセル内核におけるポリ(グルタミン酸)鎖の高次構造形成によって抗腫瘍効果も著しく増強されることが明らかとなった。

また、高分子ミセルの生体内動態可視化を目的とした蛍光標識ミセルの創製では、NMR により

Nile-Red ポリマー, DBD-ED ポリマーの構造を解析した. ポリマーの細胞内輸送と細胞外排出について 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おける補体活性化を調べた結果, カチオン性リポソームにおいて iC3b の生成が大きかった.

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. マウス in vivo 試験を行い, その脳内動態を考慮することで, 臨床データを説明することができた. 一方, 過剰発現細胞やノックダウン細胞を用いた in vitro 試験により MCT9 が有機カチオントランスポーターであることを明らかにした.

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. さらに, 上記 CPP の 3 因子に加え, 2 因子間の交互作用で薬物濃度に対して比較的高い効果が確認された添加速度について, 中心複合法による系の拡張を行った. また, 中心複合法により得られた結果を基に応答局面法により視覚化しデザインスペースを構築した.

(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:

錠剤用セルおよび顆粒用セルでの溶出挙動は, セル間のばらつきが比較的少なく, 類似した溶出挙動を得られたものの, 散剤用セルでは非常にバラつきが大きくなり, 直径 0.5~1.5 mm のガラスビーズでは直径が小さいほど溶出速度が速くなった. 試験液(pH1.2)量が 200 および 50 mL の FTC 法溶出試験結果に基づく生物学的同等性試験の

予測値は, 試験液量 900 mL のパドル法溶出試験よりも実測値との乖離が小さかった. 持続型 PLGA マイクロスフェア製剤について, サルを用いた in vivo 試験では 0 次の薬物放出挙動を示し, 種々の in vitro 評価法を検討した結果, 同様の 0 次の放出挙動を得ること出来た. In vitro の放出試験においては, 温度及び試験液に対する薬物溶解度の変化により薬物放出挙動が変化した.

2-2)局所皮膚適用製剤の評価方法:

ヘアレスラット腹部に, ロキソプロフェン-Na(LX-Na)貼付剤を投与したところ, 薬物放出率, 角質中薬物量および血漿中薬物濃度において, 標準製剤とジェネリック製剤間で有意な違いを示さず, 同程度の値を示した. これに対し, 皮膚中薬物濃度は, 標準製剤に比してジェネリック製剤で高く推移する傾向を認めた.

2-3) リポソーム製剤の特性と評価方法:

一般的な感度 (1.0 μ W) の示差走査熱量計 (DSC) に対して検出感度が 0.2 μ W, 0.015 μ W とあわせて 3 種の異なる感度の装置で測定を行ったところ, 検出感度に応じて DSC サーモグラムの吸熱ピークの形状が変化することがわかった. HPLC-ELSD 検出器では PEG 脂質のピークがブロードになり定量が困難であったのに対し, UPLC-Corona 検出器では PEG 脂質のシャープなピークが得られた. 試験液の pH や試験温度が薬物放出性に大きく影響すること, 低 pH かつ相転移温度付近まで加熱した条件において, 濃度の異なる硫酸アンモニウムで調製したリポソームの放出プロファイルを識別できることが分かった.

(3) 超難溶性薬物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に関する研究:

①コアモルファスに関して:

コアモルファスは薬物と低分子薬物あるいは低分子添加剤との複合体非晶質である. 優れた溶出性を保ちつつ, 物理的な安定性も単体の非晶質と比較して改善される傾向がある. コアモルファスの形成性の評価法, 物理的安定性に関連する製剤特性評価法, 溶出性に関連する製剤特性評価法について検討した. コアモルファスの形成性を評価する手法として DSC による結晶化傾向の評価が有用であることが分かった. 冷却中に結晶化する薬物(Class I 薬物)(3 種類)と種々の薬物(6 種類)のモル比 1:1 の混合物を融解後, 冷却中に結晶化

が起こる組み合わせはコアモルファスを形成しないこと、熔融後冷却中に結晶化が起こらない組み合わせはコアモルファスを形成し、コアモルファスとして安定に存在できることが分かった。本手法により新規のコアモルファス7種類を得ることができた。ナプロキセン-インドメタシンコアモルファスについて Raman スペクトルによる評価の結果、phenyl ring の相互作用が示唆され、FT-IR による評価の結果、ナプロキセン-インドメタシンの間に新たにカルボン酸ダイマーの形成が示された。

インドメタシンとシメチジシンからなる新規コアモルファスは様々なモル比で単体の各非晶質よりも高い T_g を有するコアモルファスを形成することが明らかとなった。形成されたコアモルファスの T_g は組成によって異なり、モル比 3:1 付近で最大値を示したことから、この組成で最も効率的に分子間相互作用を形成していると推察された。インドメタシンとフェロジピンからなる新規のコアモルファスは、単体の各非晶質と同程度の T_g を有するにも関わらず、優れた物理的安定性を示した。各種分子運動性を評価したところ、 $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間(T_1)によって評価可能な局所の分子運動性及び表面の分子運動性の低下が、コアモルファス形成による物理的安定性の改善に寄与している可能性が示唆された。

イトラコナゾールとコクリスタルを形成するフマル酸あるいは酒石酸との組み合わせから調製したコアモルファスについて、固体 NMR およびラマン分光測定による分子間相互作用の形成を確認した。フマル酸とのコアモルファス内においてコクリスタルと同様の相互作用を形成していた。一方、酒石酸とのコアモルファスについて明確な相互作用は確認されなかった。分子間相互作用の形成が確認されたイトラコナゾールとフマル酸のコアモルファスは酒石酸とのコアモルファスに比べイトラコナゾールが速やかに溶出し、その濃度が維持されることが判った。コアモルファスからの溶出性に分子間相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

②固体分散体に関して：

2 つのグレードの軽質無水ケイ酸(アエロジル 200 およびアエロジル R805(アエロジル 200 のシラノール基部分をオクチルシラン化したもの))を添加することにより、トログリタゾンとポリビニ

ルピロリドンからなる固体分散体の高湿度条件下における物理的安定性が向上することを明らかにした。吸湿した水分子の固体分散体内挙動がアエロジルによって制御されることによって安定化されると推察された。疎水性の表面特性を有するアエロジル R805 を添加した固体分散体からのトログリタゾン溶出はアエロジル 200 を添加した固体分散体より遅いことから上に述べた安定化メカニズムが支持されるものと考えられる。

非晶質ニフェジピンの表面における結晶化は高分子で被覆することにより抑制された。同一濃度の高分子溶液を用いて被覆処理を行ったところ、残存量が多い高分子ほど結晶化抑制効果が大きいことが分かった。高分子残存量は高分子水溶液の粘度とは関連が見られず、ニフェジピンと高分子との相互作用の差が高分子残量に関係するものと考えられる。

3-2) 過飽和溶液状態の評価法に関する研究：

MAS 条件下の 2 次元 $^1\text{H-}^1\text{H}$ NOESY NMR 測定によるメフェナム酸(MFA)/オイドラギット EPO(EPO)過飽和溶液のキャラクターゼーションの結果、MFA の 2 つの芳香環は、EPO の主鎖と疎水相互作用を形成し、MFA のカルボキシル基は EPO 側鎖のアミノアルキル基と親水性相互作用(水素結合あるいはイオン結合を形成)することが分かった。MFA の結晶化は EPO との親水性及び疎水性相互作用により抑制されており、これが過飽和溶液の長期安定性に寄与することが分かった。フェニトイン(DPH)及びその誘導体を用いた結晶化抑制試験により、HPMC は DPH の NH 基を介さない非特異的な相互作用により DPH の結晶化を抑制したのに対し、PVP は DPH の NH 基と水素結合あるいは静電的相互作用等の特異的相互作用により DPH 結晶化を抑制したと推察された。また、特異的相互作用により DPH の結晶化を抑制した PVP は DPH の Caco-2 膜透過を抑制することが示された。

(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。腸における弱塩基性薬物の過飽和・析出挙動を評価するシステムを溶出試験のパドル法と組み合わせて構築し、既に体内動態が報告されているジピリタゾール等のモデル化合物の評価を行い、本システムが有用であること

を示した。結晶多形や塩、医薬品添加物などの粉体の摩擦帯電量の測定を行い、摩擦帯電量が粉体付着性評価の指標との一つとなり、混合性との関連があ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について、小角 X 線、原子間力顕微鏡、染色による顕微鏡観察により検討した結果、イオン性高分子を添加すると薬物粒子との電氣的相互作用によりこれらが緩凝集体を形成し再分散性を大幅に改善することを明らかとした。製剤中における弱塩基性化合物の脱塩・フリー化は、化合物の固有溶解度値、酸乖離定数、カウンターイオン種が脱塩の有無を決定する重要因子であることを明らかとした。糖衣錠の糖衣部と錠剤内部の熱拡散率の差が大きいことから、光励起非破壊検査法を用いて、糖衣錠の皮膜厚さの測定が非破壊で可能であることを明らかとした。混合条件の異なるモデル錠剤を近赤外イメージングシステムにより評価を行い製剤の均一性評価が可能であることを明らかとした。赤外、レーザ分光法による判別分析評価が造粒物評価に有用であることを示した。

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。近赤外分光法により連続プロセスのモニタリングを行い、センサー設置位置、混合終点の評価、検量線の精度の向上等が今後の実用化の課題となることを明らかとした。細菌ディテクタを用いた内部蛍光検出法について、物質の発する蛍光特性の違いによる蛍光出力値の違いを測定するように機器を改良することにより、製造現場で発生するアルミ片やポリエステルなどの非生物粒子とバイオパーティクルの識別性を高め、製造環境の変化を連続してタイムリーに計測できることを示した。

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 CQA 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。

内核において α -helix を形成する高分子ミセルは、前年度まで 37℃、生理食塩水中で高い安定性を示すことが確認されていたが、本年度の研究によって、固形がんに対する集積性・選択性を飛躍的に高め、優れた治療効果を示すことが明らかになった。このシスプラチン内包ミセルは、現在、第 3 相治験が進められ早期実用化が期待されている。このように、ミセル内核への高次構造の導入は、内包薬剤の徐放化、ミセルの安定化、体内動態の改善に極めて有用であると考えられる。

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により、ミセルの細胞内動態に関わる内因性タンパク質を明らかとした。送達、標的性を指向した DDS 製剤では、有効成分の放出場所を解析することは薬効への影響を考察する上で重要であるとともに、細胞からのポリマーの排出機構に関する知識の蓄積は細胞内への蓄積など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補体活性化が主要要因の一つであることが知られており、本研究のようにリポソーム製剤の品質特性と補体活性化との関連性に関する情報を蓄積することは、リポソーム製剤の製剤設計において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・ノックダウン細胞を用いた *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、ならびにその膜局在から細胞内への取り込みに働くことが示唆された。Verapamil や TEA 等を利用することで、脳・腎臓への薬物移行における MCT9 の寄与率が評価できるものと期待される。

さらに本研究では、開発初期における PLGA ナノ粒子製剤の QbD アプローチの実例を示すことができた。今回の様に開発初期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は重要である。これにより、生産スケール時の QbD アプローチも容易となる。製品品質を製造工程で造り込むことにより、より安定した品質の医薬品が供給できるようになるであろう。

う。

(2) 機能性製剤の生物薬剤学的評価法に関する研究

FTC 法溶出試験装置において溶出挙動に影響する因子の特定を試みた。錠剤用セルおよび顆粒用セルでは、崩壊した製剤がセル内に均一に分散可能であり、セル間のばらつきが抑えられたと推察された。一方、散剤用セルでは、セル内に重しとして入れた網がセル内の水流や顆粒の分散性に影響したと考えられ、結果としてセル間のばらつきにつながったと推察された。IVIVC の検討で使用了薬物は、比較的溶解度が低く、体内動態が溶出挙動に依存しており、パドル法溶出試験装置に比べて物理的な影響が少ない FTC 法で、より生体内に近い溶出挙動を示したと推測できた。また、持続型 PLGA マイクロスフェア製剤においても種々の因子について評価した結果、温度及び試験液に対する薬物の溶解度、溶液中での薬物の安定性が最もクリティカルであり、長期放出試験においては試験液が置換される系が望ましいと考えられた。

局所皮膚適用製剤やリポソーム製剤などの特殊な非経口製剤について、製剤機能や品質を評価するのに適切な方法の検討を行った。局所皮膚適用製剤については、ヒトにおいて BE が証明されている LX-Na 貼付剤のラット *in vivo* 試験において皮膚中薬物量は他の試験項目と異なる結果を示した。通常、製剤から放出された薬物は、角質から皮内へ拡散し、血中へ移行するため、皮内濃度だけが異なる傾向を示すとは考え難く、測定している皮膚の深度の違いが原因と考えられた。リポソーム製剤の熱測定においては、感度が 0.2mW 以下では検出ピークがブロードで小さいのに対し、感度が 0.015μW と高くなるとシャープになることから、相転移温度以外にもピーク形状などからのドメイン解析が可能になることが示唆された。リポソーム構成脂質の定量法において、より微細な充填剤を含むカラムによりピークがシャープで高段数になったことに加え、ELSD よりも Corona 検出器は約 10 倍感度が高いことから、検出が困難であった PEG 脂質を定量可能になったと考えられた。また、透析膜を使った溶解性などの評価から、*in vitro* 薬物放出性において認められた pH 依存性には、封入された薬物の各 pH の試

験液に対する溶解性が大きく寄与していることが示唆された。

(3) 超難溶性製剤の物理薬剤学的評価法研究

3-1) 非晶質製剤の物性評価法に関する研究：

①非晶質薬物と低分子化合物の複合体非晶質であるコアモルファスの形成には水素結合や疎水結合など分子間相互作用が重要であり、相互作用の評価に FT-IR、固体 NMR、ラマン分光測定が有用であることが明らかになった。今後、コアモルファス形成を予測可能な薬物の物理化学的特性値を明らかにすることが必要と考える。コアモルファスの機能面については、溶出性においても相互作用の違いによって溶出速度や濃度に差が見られ、相互作用を利用し、安定で溶出性という機能にも優れた非晶質形態としてコアモルファスが活用可能である可能性が明らかとなった。コアモルファスの物理的な安定性は¹H-NMR 緩和時間(T₁)によって評価可能な局所の分子運動性及び表面の分子運動性の低下が関連している可能性が示唆された。

②固体分散体内に添加したアエロジルは水分子の挙動を制御することによって、高湿度条件下における物理的安定性を向上させることを明らかにした。本技術は、吸湿した水分子が結晶化のトリガーとなる化合物の場合には、水和に限らず物理的安定性の向上が期待できるものであった。

3-2) 過飽和溶液状態の評価法に関する研究：

HR MAS NMR 測定は過飽和溶液のキャラクターゼーションに有用であり、得られた知見は、固体分散体からの過飽和溶液形成メカニズム解明に向けた一助になると期待される。また、各ポリマー溶液からの DPH の Caco-2 膜透過実験により、ポリマーによる薬物結晶化抑制機構の違いが、薬物膜透過性に大きく影響することが示された。この知見は、効果的な固体分散体制剤の処方設計の一助になると期待される。

(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、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、内部蛍光検出法、過飽和・析出挙動評価システムについては測定感度やシステムの改善・最適化を行うことにより、より実用性の高い評価手法とし

での開発を行い、成果を上げた。また、粉体の摩擦帯電量の測定、弱塩基性化合物塩の脱塩・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製剤均一性評価、赤外、レーザー分光法による造粒物の判別分析評価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 シリーズ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) 画期的ナノ 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、以下の結論を得た。

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* での有効成分の体内分布、安定性、薬効との関連性を明らかにすることができた。また、ブロック共重合体の蛍光標識手法や siRNA を利用した分子生物学的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。

1-2) リポソーム製剤の補体活性化における品質特性の影響について精査した。

1-3) 薬物の中枢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注目し、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

有機カチオントランスポーターである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、リスク評価を行った。また、中心複合法により得られた結果を基に応答局面法により視覚化しデザインスペースを構築し、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) 機能性製剤の評価法を検討し、以下の結論を得た。

2-1) FTC 法溶出試験装置において、分散が非常に早い崩壊型錠剤の評価は、錠剤用セルおよび顆粒用セルの両方を適用できること、溶出挙動はガラスビーズの直径に大きく影響されること、溶出試験液量の変更は、溶解性が低い医薬品の BE 試験結果の予測での有用性が期待できることを示した。さらに持続型 PLGA マイクロスフェア製剤の *in vitro* 放出試験において FTC 法はフレキシビリティに富んでおり、クリティカルファクタを考慮した放出試験法を設定出来る可能性を示した。

2-2) ラットを使って薬物放出率、角質中薬物量、皮膚中薬物濃度および血漿中薬物濃度を同時に測定することで、精度良く局所皮膚適用製剤の BE を評価できる可能性が示唆された。

2-3) 脂質濃度が数 mM と希薄な溶液の膜構造をありのままの状態で測定する手段として高感度示差走査熱量計が有用であることがわかった。

UPLC-Corona 検出器を使用することで、検出が困難であった PEG 脂質を定量可能になり、リポソーム製剤の構成脂質を one step かつ短時間で定量可能になった。*In vitro* 薬物放出性に大きく影響する要因(試験条件や調製方法)を精査することで、調製方法の変動を検出可能な試験条件を提案できた。

(3) 超難溶性薬物の溶出性改善法として注目されている非晶質製剤の可溶化に係る物性評価法を検討し、以下の結論を得た。

3-1) 低分子薬物同士で形成されるコアモルファスについては、その形成や溶出性に分子間相互作用が重要な働きをしていること、分子間相互作用の評価に FT-IR、固体 NMR、ラマン分光測定が有用であることを明らかにした。コアモルファスの物理的安定性と関連する局所の分子運動性や表面の分子運動性の低下が影響していることが示唆された。これらの分子運動性の評価法として

¹H-NMR 緩和時間及びインバースガスクロマトグラフィーが有用であることを明らかにした。トログリタゾンとポリビニルピロリドンからなる非晶質固体分散体に添加したアエロジルは水分子の挙動を制御することによって、高湿度条件下における非晶質固体分散体の物理的安定性を向上させることが分かった。高分子で被覆することによる非晶質ニフェジピン表面における結晶化の抑制効果は、残存量が多い高分子ほど大きいことが分かった。

3-2) 過飽和溶液の評価法に関しては、HRMAS NMR 測定が過飽和溶液中の MFA と EPO の分子間相互作用の評価に有用であることを明らかにした。また、DPH 過飽和溶液の Caco-2 細胞透過改善メカニズムを解明した。

(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 CQA 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、以下の結論を得た。即ち、内部蛍光検出法による製造環境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。また過飽和・析出挙動評価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、粉体の摩擦帯電量測定法による混合性評価、光励起非破壊検査法による糖衣錠皮膜評価、近赤外イメージングの製剤均一性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) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhaara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H., “Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components ” *Biomaterials* 35, 1347-1358 (2014).

2) Sonoda S, Yamashita T, Suzuki R, Maruyama K, Sakamoto T.: Novel diagnostics and therapeutics with ultrasound technologies and nanotechnologies. *Yakugaku Zasshi*, 133: 1269-1276 (2013).

3) Hagiawa K, Nishioka T, Suzuki R, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Nishida Y, Iida K, Luo H, Siegel RJ.:

Thrombus-targeted perfluorocarbon-containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic

thrombolysis: in vitro and in vivo study. *J. Thromb. Haemost.*, 11: 1565-1573 (2013).

4) Shibata H, Yomota C, Okuda H. : Simultaneous determination of polyethylene glycol-conjugated liposome components by using reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV and evaporative light scattering detection. *AAPS PharmSciTech*. 2013 Jun;14(2):811-7.

5) Ueda, K., Higashi, K., Yamamoto, K., Moribe, K. Inhibitory effect of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug recrystallization from a supersaturated solution assessed using nuclear magnetic resonance measurements. *Mol. Pharm.* 2013, 10 (10), 3801-3811.

6) Higashi, K., Yamamoto, K., Pandey, K. M., Mroue, H. K., Moribe, K., Yamamoto, K., Ramamoorthy, A. Insights into atomic-level interaction between mefenamic acid and Eudragit EPO in a supersaturated solution by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy. *Mol. Pharm.* 2014, 11, 351-357.

7) T. Nakahashi, T. Matsumoto, N. Wakiyama, K. Moribe, K. Yamamoto; The role of light anhydrous silicic acid on physical stability of troglitazone solid dispersion under humidified conditions, In-print, *Advanced Powder Technology* (2013).

2. 学会発表

1) Kayoko Kanamitsu, Hiroyuki Kusuhaara, Tetsuya Suhara, Yuichi Sugiyama. Prediction receptor occupancy of dopamine D2 antagonist in the brain based on the systemic exposure and in vitro binding assay. 日本薬物動態学会 第 28 回年会, 平成 23 年 10 月 9-11 日, 東京

2) 楠原洋之, “医薬品の体内動態特性を決定する生体膜輸送機構の解明”, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 平成 23 年 10 月 26 日, 東京

3) 小林和正, 野崎翔吾, 杉山雄一, 楠原洋之 “Monocarboxylate transporter9 (MCT9)/ SLC16A9 のは乳類発現細胞における機能解析”, 第 29 回日本 DDS 学会学術集会平成 24 年 7 月 4 日日京都

4) 加藤くみ子「DDS 製剤キャリアの動態とトランスポーター」第 29 回日本 DDS 学会学術集会 2013 年 7 月 5 日 (京都)

5) 小田雄介, 鈴木 亮, 小俣大樹, 澤口能一, 宇留賀仁史, 関むつみ, 根岸洋一, 川上茂, 樋

- 口ゆり子, 橋田充, 丸山一雄, バブルリポソームの安定性におよぼす脂質組成の影響, 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 京都, 2013 年 7 月 4-5 日
- 6) Daiki Omata, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Yoshikazu Sawaguchi, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama, Targeted gene delivery in liver by bubble liposomes and ultrasound, CRS Annual Meeting 2013, Honolulu, 2013 年 7 月 21-24 日
- 7) 石川 舞, 小田雄介, 宇留賀仁史, 鬼塚沙也加, 鈴木 亮, 小俣大樹, 関むつみ, 直井智幸, 澤口能一, 根岸洋一, 丸山一雄, 構成脂質の異なるバブルリポソームを用いた超音波遺伝子導入特性の評価, 遺伝子・デリバリー研究会第 13 回シンポジウム, 東京, 2013 年 5 月 11 日
- 8) Hiroko Shibata, Ken-ichi Izutsu, Chikako Yomota, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda: Separation and quantification of polyethylene glycol-conjugated liposome components by reversed-phase HPLC analysis with UV and evaporative light scattering detection. AAPS (2013.11)
- 9) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 奥田晴宏 「高分子で被覆した非晶質ニフェジピン固体表面の結晶化抑制」日本薬剤学会第 28 年会, 名古屋市, 2013 年 5 月
- 10) T. Miyazaki, Y. Aso, H. Okuda, Inhibition of surface crystallization of amorphous nifedipine by coating with PVP and HPMC. AAPS, San Antonio, 2013 年 11 月
- 11) 大塚直哉, 植田圭祐, 清水梢, 片川和明, 熊本卓哉, 東頭二郎, 森部久仁一, 山本恵司 第 30 回 製剤と粒子設計シンポジウム, 岐阜, 2013 年 10 月
- 12) 植田圭祐, 東頭二郎, 森部久仁一, 山本恵司 第 30 回 製剤と粒子設計シンポジウム, 岐阜, 2013 年 10 月
- 13) 小出達夫, 香取典子, 奥田晴宏 近赤外イメージングによる製剤の混合均一性評価における医薬品原料の粒子径の影響についての検討 日本薬剤学会 第 28 年会 (2013.5 名古屋)
- 14) 小出達夫 イメージング技術を用いた造粒顆粒及び製剤評価 日本薬剤学会 第 4 回経口吸収フォーカスグループ第 4 回合宿討論会 (2013.8 京都)
- 15) K. Moriguchi Strategic Approaches to Enhance Bioequivalence of FDC to Mono Tablets by Dissolution Techniques. 55th Annual International Industrial Pharmaceutical Research & Development Conference (2013.6 Madison, WI, USA)
- 16) T. Koide, N. Katori, T. Fukami, Y. Yamamoto, H. Okuda, Analyzing the quality of solid dosage forms by using pharmaceutical imaging techniques. FIP World Congress 2013 (2013.9 Dublin, Ireland)
- 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 薬品部
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、キナーゼ阻害作用、疼痛抑制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。

研究組織

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 合田幸広
- (2) (株)ツムラ生薬研究部生薬品質グループ 中井洋一郎
- (3) 三栄源エフ・エフ・アイ(株)品質保証部検査課 中川 誠
- (4) 日本粉末薬品株式会社八尾工場 横倉胤夫
- (5) (株)栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (6) (株)ウチダ和漢薬研究開発部 川崎武志
- (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 関水和本久
- (10) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 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 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 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
- (21) 常磐植物化学研究所(株) 山下忠俊

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、カイコ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. 妥当性確認試験

平成 24 年 10 月 30 日付け薬食審査発 1030 第 1 号により、日本薬局方外生薬規格 2012 (局外生規 2012) が発出された。その中で、テンナンショウは、マイヅルテンナンショウ *Arisaema heterophyllum* Blume, *Arisaema erubescens* schott, *Arisaema amurense* Maximowicz 又は、その他同属の近縁植物のコルク層を除いた塊茎と規定されている。これにより、局外生規 1989 において、テンナンショウの基原植物として規定されていた *Arisaema pedatisecta* Schott (Syn: *Pinellia pedatisecta*) が、偽品として除かれた。しかしながら、正品と *A. pedatisecta* は、全形生薬では、鑑別は難しくないものの、刻みや粉末状態では、鑑別は困難である。また、特徴的な成分に乏しいことから、理化学試験による鑑別法の設定も難しい。このため、本研究班では、遺伝子情報を利用するテンナンショウの掌葉半夏 (*A. pedatisecta*) に対する純度試験法として、multiplex ARMS 法による試験法の開発を行ってきた。今年度は、昨年度までに開発した試験法の妥当性確認試験として、共通のプロトコールに基づき、8 機関により共通未知試料を同時期に分析し、その精度及び頑健性の確認を行った。

実験材料としては、各委託元企業より提供を受けたテンナンショウ及び掌葉半夏の試料、各 30 検体について、定量 PCR を行い、その結果に基づき、それぞれ 3 検体ずつを用いて疑似混合試料 11 検体を調製し、共同試験における未知検体とした。なお、共同試験では、各試料から調製した DNA 溶液を検体として送付した。

検出された DNA 断片のパターンから、下記の判定基準に従い、各検体の適否を判定した。

1. PCR 反応におけるブランク反応液に、プライマーダイマーを除くバンドを検出しない。もし、バンドが検出される場合は、PCR 溶液の調製の際に、外因性の DNA が混入したと判断し、PCR からやり直す。
 2. DNA 試料溶液を加えた反応液において、約 150 bp のバンドが確認されない場合、DNA の抽出が失敗したものとして判定不能とする。
 3. DNA 試料溶液を加えた反応液において、プライマーダイマーの他、約 150 bp のバンドのみを認める時、*P. pedatisecta* の混入はないものと判断し、適合とする。
 4. DNA 試料溶液を加えた反応液において、プライマーダイマーの他、約 150 及び 65 bp のバンドを認める時、*P. pedatisecta* が混入している疑いがあると判断し、再度 PCR を行う。
- 4-1. 再試験において、約 150 bp のバンドのみ

を認める場合 (約 65 bp のバンドが認められない場合)、試験は適合とする。

4-2. 再試験において、約 150 及び 65 bp のバンドを認める場合、不適合とする。

B-2. リュウタン及びジンギョウ

リンドウ科 *Gentiana* 属植物に由来する生薬には「竜胆」と「秦艽」があり、前者は慢性胃炎や尿道炎などに、後者は関節リウマチや四肢の麻痺などに応用される。「竜胆」は、『第 16 改正日本薬局方』に *Gentiana scabra* Bunge, *G. manshurica* Kitag., *G. triflora* Pall. の根及び根茎が規定され、また『中華人民共和国薬典』ではこれら 3 種に *G. rigescens* Franch. ex Hemsl. が加えられている。一方、「秦艽」は、『日本薬局方外生薬規格 2012』及び『中華人民共和国薬典』に *G. macrophylla* Pall., *G. straminea* Maxim., *G. crassicaulis* Duthic ex Burk. 又は *G. dahurica* Fisch. の根が記載されている。しかし、両生薬、とくに「秦艽」については中国及び日本市場品の基原種について客観的に同定されていない。そこで、両生薬の標準化を行う目的で、中国の東北 3 省、内蒙古自治区、雲南省、甘粛省及び四川省で現地調査を行い、収集した *Gentiana* 属植物について核 rDNA の ITS 領域の遺伝子多型を検討した。

実験材料は以下の通りである。主として中国で収集した *Gentiana* 属 12 種 2 変種 [Pneumonanthe 節: *G. scabra* 8 検体, *G. scabra* var. *buergeri* 3 検体 (ササリンドウ系), *G. manshurica* 3 検体, *G. triflora* 27 検体, *G. triflora* var. *japonica* 3 検体 (日本園芸品エゾリンドウ系); Monopodiae 節: *G. rigescens* 4 検体; Cruciate 節: *G. macrophylla* 11 検体, *G. officinalis* (= *G. gannanensis*) 11 検体, *G. dahurica* 7 検体, *G. decumbens* 3 検体 (モンゴル国), *G. straminea* 6 検体, *G. siphonantha* 2 検体, *Gentiana* sp. (*G. tibetica*?) 13 検体, *G. crassicaulis* 5 検体]。括弧内に特に記載のない植物種は中国採集品。竜胆 5 市場品各 3 検体及び秦艽 2 市場品各 3 検体。

B-3. リュウコツ

竜骨は大型哺乳動物の化石化した骨を基原とする生薬である。その基原動物種の実態は明確でない。近年、化石からの DNA の抽出が可能な場合もあることが明らかにされ、化石 DNA の調製を目的とするキットも商品化されて市販されている。竜骨から DNA を調製し、特定の遺伝子配列を PCR 増幅できれば、その配列から基原動物種の同定を比較的容易に行えるものと考えられる。多様な生物を簡便に区別するための世界規模の遺伝子データベースの構築が国際バーコード (international Barcode of Life; iBOL) 計画として推進されている。動物ではミトコ

ンドリアゲノムに存在する *cytochrome oxidase 1* (*co1*) や *cytochrom b* (*cytb*) が対象遺伝子として採用され、これらについては配列情報の蓄積が進んでいる。本研究では、竜骨の基原動物種を遺伝子レベルで鑑別する方法を確立することを目的として、竜骨から PCR の鋳型となりうる DNA の調製を試みた。

竜骨は生薬として市販されているものを用いた(日本薬局方規格品；大晃生薬から購入)。鹿茸は名古屋市立大学所属標本を用いた。動物の肉類は、名古屋市内の商店で購入した。

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℃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、ウチダ和漢薬市販品及び、医薬基盤研薬用植物資源研究センターが、国内生薬の多様性を検討するため国内市場で入手した試料を用いた。

〈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、負イオンモードで測定した。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、ピークの検出を行った後、SIMCA-P+ Ver. 12.0.1 (Umetrics)を用いて主成分分析を行った。データ処理上の都合により、チェストツリー原生薬、医薬品、健康食品、マンケイシのグループごとに主成分分析を行い、データが外れる傾向にある試料は排除した上で、グループ間の主成分分析を行った。

B-6. 生薬製剤承認基準案の検討

国立医薬品食品衛生研究所生薬部を事務局とし、4 回、生薬製剤承認基準案検討班会議を開催した。検討班では、局方手引きに記載されている

効能効果のうち、一般用医薬品としてわかりにくいものについて、「新・一般用漢方処方の手引き(じほう)」及び厚生労働省医薬食品局安全対策課の指定研究「一般用医薬品における、化学合成品等のリスク区分の見直しと漢方製剤の安全性に関する研究」における「効能効果の表現がセルフメディケーションにふさわしくない一般用医薬品の取り扱いについての検討」の研究結果等を参考として、局方手引きの効能効果読替え(案)の作成をおこなった。さらに、第十六改正日本薬局方及び医薬品製造販売指針 2012 等の記載事項を参考に、単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン(案)を作成した。煎剤とエキスの同等性確保の方法としては、昭和 60 年 5 月 31 日薬審 2 第 120 号「標準湯剤との比較試験に関する資料」を参考とした。また、指標成分の確認試験及び定量法は、生薬毎に状況が異なることから、検討班で分担して個別に条件を考案した。

〈育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方の品質評価に関する研究〉

B-7. 縮合型タンニン簡易部分構造解析法の検討

各種天然物抽出エキスについて分画を行い、縮合型タンニン画分につき、5% *p*-bromobenzylmercaptan, 3.3% HCl-MeOH 溶液を用いたチオール分解の後、マスマスペクトル (ESI) の測定を行った。また、分解反応液について、MCI gel CHP-20P, Sephadex LH-20 等の各種カラムクロマトグラフィーによる分離、精製を行った。

B-8. Gossypetin キナーゼ阻害作用プロファイル

MET, FLT3, Aurora kinase A, Aurora kinase B, TrkA について、各キナーゼドメインの組換えタンパク質と合成基質ペプチドを用いたキナーゼ阻害アッセイを行い、基質ペプチドと生成したリン酸化ペプチド量を Lab Chip 3000 (Caliper Lifesciences)で測定した。

B-9. Herbacetin の急性骨髄性白血病細胞増殖抑制作用

FLT3 が恒常的に活性化しているヒト急性骨髄性白血病細胞由来 MV4-11 細胞を 10%血清添加培地で懸濁、播種し、herbacetin を最終濃度 0~40 $\mu\text{g/mL}$ となるように添加し、3 日間培養した後、WST アッセイで生細胞数を定量した。

B-10. Herbacetin の NGF-TrkA シグナル及び神経突起伸張抑制作用

NGF-TrkA シグナルの解析：PC12 細胞を 0~20 $\mu\text{g/mL}$ herbacetin 及び 100ng/mL NGF 添加無血清培地で 30 分間インキュベート、PBS で洗浄した後、タンパク質抽出用細胞溶解液で細胞を溶解した。

細胞溶解液につき SDS-PAGE を行い、抗リン酸化 TrkA 抗体、抗 TrkA 抗体及び抗 GAPDH 抗体を用いたウエスタンブロッティングで検出した。神経突起伸長の解析:PC12 細胞を I 型コラーゲンコーティング 24 穴プレートに播種、0~10 μ g/mL herbacetin 及び 100ng/mL NGF 添加した 1%ウマ血清-0.5%ウシ胎児血清添加培地で 48 時間インキュベートした。NGF によって誘導された神経突起の伸長は、位相差顕微鏡下で 1 視野あたり 100 個以上の細胞を画像解析ソフト (Image J) で解析し、6 視野の平均値を求めた。

B-11. Herbacetin ホルマリン誘導疼痛抑制効作用
50, 100, 150mg/kg 及びコントロールとして溶媒をマウス (n=8) の腹腔内に投与、90 分後に 2.5%ホルマリン溶液 20 μ L を左後肢足裏皮下に投与した。ホルマリン投与後、足を舐める、噛むなどの疼痛関連行動を経時的に測定した。

B-12. アルカロイド除去エキスの調製

麻黄の熱水抽出エキスから特許手法 (出願中のため、具体的な記載は省略) により、アルカロイド除去エキスを調製。本エキスにより、次の毒性試験及び、安全性確認のための臨床研究を行っている、

B-13. アルカロイド除去エキスの毒性試験

ヒトの 50 倍量のアルカロイド除去エキスを ICR マウス (雄 5 匹、雌 5 匹) に 2 週間反復投与した後、イソフルラン麻酔下で解剖し、腹部大動脈あるいは大静脈より血液を採取するとともに、各臓器を回収し、重量を測定した。採取した血液から血清を調製し、肝機能検査 (ALB, AST, ALT, ALP, LDH, LAP, γ -GT, T-BIL) を実施した。統計解析は 1way-ANOVA 解析後、Dunnett's test 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し、倫理審査の承認を得ている。また、実施中の安全性のための臨床研究では、十分に討議し、研究目的を含め、研究内容の倫理的および科学的な妥当性について、適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で、人権保護を含めたインフォームドコンセントの下、被験者に不利益が伴わないよう配慮して行っている。また、臨床研究として登録している。

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. 妥当性確認試験

各疑似混合試料より調製した DNA を鋳型に用

い、共同試験と同一のプロトコールにより、PCR を行った結果、良好な結果が得られ、本試料は、試験法の妥当性確認のための共同試験に用いる試料として適当であることが確認された。次いで共同試験を実施した。その結果、試験結果は、全て正しい結果を導いた機関が、4 機関、一部の検体に不正解が含まれていた機関が 1 機関、ネガティブコントロールにバンドを検出し、試験を中止した機関が 3 機関であった。

C-2. リュウタン及びジンギョウ

竜胆 (Pneumonanthe 節及び Monopodiae 節) : Pneumonanthe 節 3 種 2 変種及び Monopodiae 節 1 種の ITS1, 5.8S 及び ITS2 領域の塩基配列はそれぞれ 231 bp, 163 bp 及び 229 bp 又は 230 bp であり、上流から 72 番目の塩基が adenine (A) であることにより、この位置の塩基が cytosine (C) である Cruciata 節植物と区別された。また、Pneumonanthe 節 3 種 2 変種は 41 番目、209 番目及び 588 番目の塩基が A, guanine (G), A であることで他の 2 節から分けられた。Pneumonanthe 節の *G. scabra* 7 検体及び *G. manshurica* 1 検体は GenBank に登録されている 2 種の塩基配列と完全に一致し、かつ 2 種は相同の塩基配列を示した。*G. scabra* var. *buergeri* に由来する園芸品 2 検体も母種と相同の配列であった。これら 2 種 1 変種の同定には、100 番目、160 番目、445 番目、586 番目、604 番目の塩基が重要であった。*G. triflora* 27 検体はすべて同一の配列を示し、GenBank に登録されている同種の配列とは 563 番目に塩基の欠失があることのみ異なった。*G. scabra* とは 9 箇所の塩基で違いが認められた。*G. scabra* と同定した 1 検体は、これらの内 8 箇所がヘテロ型の塩基であり、*G. triflora* との自然交配が示唆された。*G. triflora* var. *japonica* に由来する園芸品は、母種と 3 箇所の塩基が異なった。これら 1 種 1 変種の同定には、48 番目、580 番目、618 番目の塩基が重要であった。Monopodiae 節の *G. rigescens* は、GenBank に登録されている同種の配列と 428 番目の塩基が異なり、他の 2 節の植物とは 25 箇所塩基の違いが認められた。4 検体の中には他種との交配が示唆される配列のものが認められた。

生薬「竜胆」の産地が東北 3 省である日本市場品 1 点及び中国市場品 3 点は *G. scabra* 又は *G. manshurica* と同じ塩基配列を示した。これらの市場品が栽培品であるならば、*G. scabra* である可能性が高い。雲南省市場品 1 点は *G. rigescens* と同定できたが、3 検体の配列からは他種との交配が示唆されるものであった。

秦艽 (Cruciata 節) : Cruciata 節 8 種の ITS1,

5. 8S 及び ITS2 領域の塩基配列はそれぞれ 231 bp 又は 234bp, 163 bp 及び 228 bp 又は 229 bp であった。 *G. macrophylla* の塩基配列は種内で安定し、11 検体すべてが GenBank に登録されている同種の配列と完全に一致し、上流から 195 番目と 564 番目の塩基に特徴があった。本種以外の Cruciata 節植物は、若干の種内多型が認められるものの、各種に特徴的な配列が認められた。 *G. officinalis* 11 検体の内 7 検体の塩基配列は、 *G. macrophylla* に類似して 195 番目と 564 番目の塩基が A と Thymine (T) であることが共通したが、551 番目の塩基が T であることにより *G. macrophylla* と区別された。7 検体の内 1 検体は GenBank に登録されている同種の配列と一致した。一方、11 検体の内 4 検体は、 *G. dahurica* との違いが認められる 7 箇所ではヘテロ型の塩基を示し、それらの種類から *G. dahurica* と交配している可能性が示唆された。 *G. dahurica* 7 検体の内、甘肅省産の 2 検体は GenBank に登録されている同種の配列と完全に一致し、また他の同省産 2 検体も同様の配列で、25 番目、226 番目、228 番目の塩基が G, T, T であることに特徴があった。一方、内蒙古産の 3 検体は 10 数箇所ではヘテロ塩基が認められるかまたはダイレクトシーケンスでは解析が困難であった。そこでこれらについてクローニング法を行った結果、3 検体それぞれ 10 クロンのうち約半数が *G. dahurica* と相同の塩基配列を示し、一方残りのクローンは 24 番目、98 番目、114 番目、147 番目、206 番目、239 番目、378 番目、423 番目、435 番目、487 番目の塩基に特徴のある配列を示した。したがって、これら 3 検体は *G. dahurica* と、上記の位置の塩基が A, A, G, T, A, A, T, C, A, A の配列を有する別種が交配している可能性が示唆された。なお、239 番目と 378 番目の塩基は 5. 8S 領域であった。 *G. straminea* に関して GenBank には 4 種類の塩基配列が登録されており、これらは 4 箇所の塩基配列 (42 番目、116 番目、184 番目、226 番目) と 1 箇所の挿入 (3 bp, 118-120 番目) により 2 大別された。本研究で検討した 6 検体はすべて挿入がない配列とほぼ一致した。この配列は *G. dahurica* に類似するが、25 番目の塩基が C であることにより *G. dahurica* と区別された。

G. siphonantha の配列は GenBank に登録されている同種 DQ497573 の配列とほぼ一致した。本種の配列は *G. straminea* の配列と類似していることから、これら 2 種は区別できなかった。

Gentiana sp. 3 検体は、GenBank に登録されている *G. straminea* の配列の内 118-120 番目に 3 bp の挿入がある配列に類似し、2 検体 (GSG124, 140)

では *G. straminea* の DQ497574 の配列と相同であった。また GenBank に登録されている *G. tibetica* の配列とも類似していた。

G. crassicaulis 5 検体ではダイレクトシーケンスによる解析が困難であったためクローニング法を行った。その結果、5 検体は共通して、8 ~13 クロンのうち大半は 116 番目が T で 118-120 番目に 3 bp の挿入がある配列を示した。頻度が最も高かった配列はさらに、413 番目 C, 423 番目 C, 548 番目 T, 551 番目 A, 586 番目 T の配列を示し、これと *Gentiana* sp. の GSG124, 140 の配列を比較すると、6 箇所 (184 番目、413 番目、423 番目、548 番目、551 番目、586 番目) の塩基に違いが認められた。一方、残りのクローンの配列から、5 検体は共通して 3 bp の挿入がなく、29 番目 G, 42 番目 C, 116 番目 C, 195 番目 G, 413 番目 C, 423 番目 C, 564 番目欠失、587 番目 T の配列をもつ別種の関与が示唆された。GenBank に登録されている *G. crassicaulis* の配列がこの別種の配列と類似したが、564 番目は A, 607 番目は T である点で異なった。したがって、5 検体は上記の特徴を有する 2 種が交配したものであると推定した。

G. decumbens 3 検体は、GenBank に登録されている同種の配列とわずかに異なったが、71 番目 C と 573 番目 A は共通した。

秦艽市場品については、中国市場の内蒙古産秦艽は *G. dahurica* の配列と完全に一致もしくはほぼ一致し、同種であると同定できた。一方、日本市場の四川省産秦艽ではヘテロ塩基が認められたためクローニング法を行った。その結果、116 番目が T で 118-120 番目に 3 bp の挿入がある配列を示すクローンと、116 番目が C で挿入がない配列を示すクローンが半々であるかもしくは後者がやや多かった。前者では、今回研究材料とした *G. crassicaulis* の特徴であった 548 番目 T, 551 番目 A の配列が見られ、一方後者の中には GenBank に登録されている *G. crassicaulis* の配列と相同なものが認められた。したがって、この秦艽市場品は上記 2 種が交配したものであると推定した。

C-3. リュウコツ

骨や歯のような硬組織から DNA を抽出するためには、リン酸カルシウムや炭酸カルシウムを溶出させて組織を軟化する脱灰処理を行う必要がある。最近では、脱灰処理とその後の DNA 調製を組み合わせたキットも販売されている。これらの方法を用いて、竜骨からの DNA 抽出を試みた。

竜骨中の DNA 存在量は微量であり、また流通過程中にヒトなどの DNA により汚染されている可能

性も高い。そこで、抽出にあたっては竜骨の切断生薬を DNA Away 溶液に浸漬後、超純水製造装置から直接採取した水で洗浄し、さらに ethanol で洗浄後に、注意して乾燥したものを用いた。また、脱灰以降の操作を試料を加えずに並行して実施した抽出液を作成し、操作過程での DNA の汚染が起こっていないことを確認した。また、ポジティブコントロールとして鹿茸からの DNA 抽出を行ったが、操作はまったく別の場所で行い、クロスコンタミネーションがないように注意した。チューブ類、チップ類は DNA-free grade の個包装されたものを用い、ピペッターは操作ごとに DNA Away 溶液処理を行った。

鹿茸からは、脱灰処理キット (TBONE EX Kit) と DNA 抽出キット (QIAamp DNA Blood Mini Kit) を組み合わせる方法で DNA を抽出し、抽出液を鋳型としてプライマーセット B で PCR を行うことにより、約 130 塩基からなる増幅産物を得ることが出来た。これに対して、竜骨からは上記の方法では全く増幅産物が得られなかったため、化石 DNA の抽出用に構成されたキット (GENECLEAN Kit For Ancient DNA) を用いて抽出を試みた。このキットでは、脱灰処理液として guanidine thiocyanate を含む試液 A と EDTA を含む試液 B が用意されているので、両者を使用してみた。その結果、脱灰処理液として試液 B を用いた場合には増幅産物は全く得られなかったが、試液 A を用いた場合には、プライマーセット B を用いて PCR 増幅を 2 回繰り返すことにより、増幅産物を検出できた。

増幅産物が検出できた竜骨由来の PCR 溶液を exonuclease と alkali phosphatase の混合液 (Exo-SAP-It) で処理し、シーケンスの解読を行った。その結果、予想通り 134 塩基からなる配列が解読できた。この配列をもとに BLAST アルゴリズムを用いて DNA データベースから類似の配列を検索したところ、エゾシカ *Cervus hortulorum* (97%)、ニホンジカ *C. nippon* (95%)、アカシカ *C. elaphus* (94%) と非常に高い similarity を示した。

C-4. 高血糖モデルカイクによる薬効評価

本研究では、ジオウの有効成分がポリガラクトースであるという結果に基づいて、迅速簡便なジオウ中の有効成分の調製法の確立を試みた。ポリガラクトースは、その化学的性状から、熱水抽出が可能であり、エタノール沈殿によりグルコース等の単糖を容易に分画可能である。6 つのロットのジオウの抽出画分について、高血糖カイクに注射し、6 時間後にカイクの血液を回収し、フェノール硫酸法により血糖値を測定した。以前の方法

で高血糖カイクに対して血糖降下活性のあったジオウ及び NIB-0155、NIB-0021 から得られた抽出画分の投与により高血糖カイクの血糖値は、生理食塩水投与群と比べて統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) の低下を示した。一方、NIB-0045、NIB-0071、NIB-0126 から得られた抽出画分の投与では高血糖カイクの血糖値の低下は、生理食塩水投与群に比べて統計学的な有意の差を示さなかった ($p < 0.05$)。

〈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

チェストツリー乾燥エキスを含む医薬品とマンケイシ製品について主成分分析を行った結果、チェストツリー医薬品に特徴的な成分を 3 つ、マンケイシに特徴的な成分を 3 つ、選出することができた。主成分分析から得られたチェストツリー医薬品に特徴的なピークのうち、 m/z 423 イオンは $[M+HCOO]^-$ イオンであると推測され、 $[M-H]^-$ イオンの成分分子の組成式は、 $C_{22}H_{34}O_5$ と推定された。 m/z 439 のイオンも $[M+HCOO]^-$ であると推測され、 $[M-H]^-$ は m/z 393 であり、この成分分子の組成は、 $C_{21}H_{34}O_6$ と推定された。 m/z 747 のイオンは、2 量体のイオンであることが推測され、 $[M-H]^-$ は m/z 373 であり、この成分分子の組成式は、 $C_{19}H_{18}O_8$ と推定された。

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。

C-6. 生薬製剤承認基準案の検討

主に煎剤あるいは末での服用が規定されている「局方手引き」の収載単味生薬を、エキス製剤として承認申請する際のブリッジングガイドライン「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)の基本方針について議論した。エキス製剤の品質を確保する方法の基本方針としては、エキス希釈率を変化させて指標成分の含量を一定に保つ欧州式の方法ではなく、漢方における標準湯剤とエキスの同等性を担保することにより品質を確保する方法(昭和 60 年 5 月 31 日薬審 2 第 120 号「標準湯剤との比較試験に関する資料」)を参考とすることとなった。また、局方手引きの効能効果の読替え案について議論し、一般用医薬品としてわかりにくい効能効果のものを、「新・一般用漢方処方の手引き」や厚生労働省医薬食品局安全対策課の指定研究班の研究結果等を参考に、わかりやすい効能効果に読替えたものを案としてまとめた。

〈育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方の品質評価に関する研究〉

C-7. 縮合型タンニン簡易部分構造解析法の検討

反応溶液の MS を測定した結果、臭素化合物に特徴的な相対強度 1:1 の同位体イオンピークが複数観察され、それらは他のピークと明瞭に区別することができた。また、観察されたピークが分解物由来であることを確認する目的で分解反応液の精査を行い、得られた化合物について NMR 等による構造解析を行った結果、catechin 類の 4 位と *p*-bromo- benzylmercaptan が結合した化合物が確認された。本研究で縮合型タンニンの部分構造を簡易に分析する手法が確立された。

C-8. Herbacetin の急性骨髄性白血病細胞増殖抑制作用

MV4-11 細胞の細胞数は、添加濃度に依存して減少しており、IC₅₀ 値は、17.7 μ M であった。高濃度処理条件においては、細胞の形態が異常なものも観察され、細胞増殖が阻害されるとともに、アポトーシスが誘導されていることが示唆された。

Gossypetin キナーゼ阻害作用プロファイル

herbacetin の標的キナーゼである MET, FLT3, Aurora kinase A, Aurora kinase B, TrkA について IC₅₀ 値を算出した結果、gossypetin も同程度に阻害活性を有することが明らかになった。

C-9. Herbacetin の NGF-TrkA シグナル及び神経突起伸張抑制作用

NGF によって誘導される TrkA のチロシンリン酸化は、herbacetin の添加濃度依存的に抑制された。NGF を添加しなかった PC12 細胞は、神経突起を伸張しなかったが、NGF を添加した PC12 細胞は、全体の約 30% の細胞が神経突起を伸長し、神経突起の平均長は、37 μ m であった。一方、herbacetin の添加によって、神経突起の長さ及び神経突起を有する細胞の割合が有意に減少した。

C-10. Herbacetin ホルマリン誘導疼痛抑制効作用

第 1 相反応は、投与群で抑制傾向を示したが、コントロール投与群との有意差はなかった。一方、第 2 相反応は、投与量に依存した抑制傾向を示し、100~150mg/kg では、コントロール投与群に対して有意に疼痛行動が抑制された。

C-11. アルカロイド除去エキスの調製

原料の麻黄と作製したアルカロイド除去エキスについて、エフェドリンとプソイドエフェドリン含量を測定した結果、原料麻黄では、約 1.5~3% であったが、処理後は 0.05ppm 未満で、高度に除去されていることが確認された。また、3D-HPLC, LC-MS により麻黄エキスと除去エキスの組成成分を比較した結果、除去エキスにおいてはアルカロイドのピークが消失したが、他の成分パターンは麻黄エキスとほぼ同様であった。

C-12. アルカロイド除去エキスの毒性試験

コントロール(滅菌水)、麻黄エキス、アルカロイド除去エキスについて、ヒトの標準的投与量の 50 倍量をマウス(一群、雄 5 匹、雌 5 匹)に対し 2 週間反復投与した結果、すべての個体において、投与期間中に死亡した個体や動物倫理上問題となる衰弱動物は出ず、外観の異常も観察されなかった。また、2 週間反復投与終了の翌日において、体重や臓器重量には影響がなく、目視で確認できる各臓器の異常も観察されなかった。さらに、すべての検査項目(血清中の ALB, AST, ALT, ALP, LDH, LAP, γ -GT, T-BIL)において、用いたマウス(ICR)の基準値内であり、1way-ANOVA 解析/Dunnett's test による統計解析の結果についても、コントロール群と麻黄エキス、アルカロイド除去エキスの間に有意差はなかった。

D. 考察

〈生薬の標準化と品質評価手法に関する研究〉

D-1. 妥当性確認試験

今回の共同試験では、全ての検体で正しい結果を導いた機関が、半数の 4 機関に留まった。残りの半数の内、3 機関が、ネガティブコントロールにおける増幅バンドの出現による、試験中止という結果であった。この内、2 機関は、1 度目の PCR においては、ネガティブコントロールにバンドを認めていないことから、2 度目以降の PCR におけるコンタミネーションの原因は、1 度目の PCR の際に生じた増幅産物が、環境中に飛散したことによるものと推察される。遺伝子情報を利用した公的検査において先行している、遺伝子組み換え食品の検査でも、この点は大きな課題となっており、その防止策が、(独)農林水産消費技術センター(現、農林水産消費安全技術センター)作成の JAS 分析試験ハンドブック、遺伝子組み換え食品検査・分析マニュアル、コンタミネーション防止編に、まとめられている。要点としては、過去の PCR 産物の物理的封じ込めが重要であり、特に、PCR 産物が開放系に曝される電気泳動における作業環境、使用済み器具類の廃棄環境の整備や実験室のレイアウトの工夫が指摘されている。

一方で、我々は、これまでも、同様の共同試験を 2 度、行っているが、このような事態は、発生していない。今回と、以前 2 回の試験との違いは、今回の PCR が、multiplex PCR である点と、検出感度を確保するために、サイクル数が大きい点である。上記のどちらか、あるいは、両方の要因により、今回の試験法案は、これまでに比べ、より厳密な PCR 産物の物理的封じ込めが求められるものであると考えられる。

上記の考察を踏まえ、遺伝子情報を利用する生薬の純度試験法の今後については、2 度手間にな

るものの、multiplex PCR を断念し、不純物特異的 PCR と陽性対照 PCR とを分けて行う、上記のマニュアルを周知し、PCR 産物の物理的封じ込めを徹底する等の方策をとった上で、さらに、検討を進めるべきと考えられた。

D-2. リュウタン及びジンギョウ

Gentiana 属植物 11 種の内、*G. straminea*, *G. crassicaulis* 及び *Gentiana* sp. (学名未定) を除く 8 種は、GenBank に登録されている塩基配列と一致するかもしくはほぼ一致した。*G. straminea* では *G. dahurica* に類似し 3 bp の挿入がない配列を、同種の配列と判断した。*G. crassicaulis* では、GenBank に登録されている同種の配列が誤りであり、3 bp の挿入がありかつ 413 番目 C, 548 番目 T, 551 番目 A の特徴を有する配列が同種のものであると考察した。同属植物は容易に交配が起こるものと考えられ、事実今回採集した *G. crassicaulis* も別の種と交配していた。この別種の配列は GenBank に登録されたものと類似した。四川省産秦艽でも同様の 2 種の存在が考えられ、こちらでは DQ398636~DQ398638 の配列と完全に一致するクローンが存在した。*G. crassicaulis* に関係する 2 種類の配列の内、どちらが本来の *G. crassicaulis* の配列かを明らかにするために、まず DQ398636~DQ398638 の配列を報告した中国科学院華南植物園のグループが管理しているハーバリウムを訪問する予定である。

この報告で *Gentiana* sp. とした植物は、*G. crassicaulis* と同一地域に生育しており、ともに 3 bp の挿入が認められた。*Gentiana* sp. は *G. straminea* と誤って同定されたものと考えられ、GenBank に登録されている DQ497574 の配列は *Gentiana* sp. に一致またはほぼ一致した。採集した植物では数個の花冠が頂部に集まり、また花冠内部に緑色の斑点がないことから、明らかに *G. straminea* ではない。現段階では *G. tibetica* であろうと考察しているが、分布域が一致せず、植物分類学的にさらなる検討が必要である。

ITS 領域の配列は *Gentiana* 属植物の分類に有用な知見を与えたが、*G. scabra* と *G. manshurica*, *G. straminea* と *G. siphonantha* はそれぞれ区別ができず、別の領域の検討も必要である。また、*Gentiana* 属植物では自然交配が起こり易いことから、ITS 領域を解析する場合にはクローニング法による解析も行う必要がある。

秦艽では、*G. straminea*, *G. crassicaulis* 及び *G. tibetica* が植物分類学的に正しく同定されているかが問題になる。中国の栽培地では秦艽として *G. officinalis*, *G. officinalis* と *G. dahurica* との交配種及び *Gentiana* sp. が栽培さ

れており、これらは明らかに局外生規 2012 と異なる種である。今後、秦艽の主流品が野生品から栽培品に変わることを想定すると、標準化のための早急な対処が必要である。また、原植物が異なることによる品質低下が懸念されることから、今後、各種の成分比較も行う予定である。

D-3. リュウコツ

竜骨は、日本薬局方では大型哺乳動物の化石化した骨と規定されているが、その実態は明らかでない。動物の骨を地中に数十年間埋めただけのものも流通しているとされている。形態学的方法や化学的方法でその基原動物種を明らかにすることは非常に困難である。分子進化学の進歩と並行して、化石からの DNA の抽出がしばしば報告され、最近では化石用の DNA 抽出キットも市販されるに到っている。竜骨から PCR の増幅の鋳型となりうる DNA を調製できれば、特定の遺伝子領域を増幅して塩基配列を解読することによって容易に基原種の同定ができるものと考えられる。

本年度の研究においては、このような観点から竜骨からの DNA 抽出法を確立し、配列情報が蓄積しているミトコンドリアゲノムの cytochrome b 遺伝子内の短い領域を増幅することを試みた。現在までの検討で、化石 DNA 用抽出キットを用いることにより、cytochrome b 遺伝子の約 130 塩基の長さからなる領域を増幅し、塩基配列の解読を行った。しかしながら、化石 DNA の抽出にあたっては、環境中の DNA の汚染が常に問題になる。本研究においても、そのような汚染の可能性がまだ、排除できていない。今後なお、慎重な検討を行っていく必要がある。

D-4. 高血糖モデルカイコによる薬効評価

生薬の品質管理において、動物個体に対する薬効の評価が理想であるが、マウスやラットなどの哺乳動物は高価であり、しかも動物愛護の観点からの問題があるため、汎用的な評価系にはできない。カイコは、安価で特別な飼育スペースが必要ないので、多くのサンプルのロットチェックが必要な品質管理のための *in vivo* 評価モデルとしては有用である。

哺乳動物を用いた実験は、国際原則である 3R、すなわち Replacement (代替法の開発)、Reduction (動物数の削減)、Refinement (動物の苦痛の削減) に従って実験を行わなければならない (Russell *et al.*, 1959)。カイコを代替動物として利用することは、3R の中の Relative Replacement の考えと合致する。カイコを用いた評価系は、医薬品の開発や品質管理において倫理的な観点から問題となる哺乳動物を用いた動物実験の制限下で有用な代替実験系となり得る。

＜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

チェストツリー医薬品とマンケイシの比較では、主成分分析により、チェストツリー医薬品に特徴的な成分を3つ、マンケイシに特徴的な成分を3つ、選出することができた。今後、これらのピークの構造推定を進めるとともに、試料数の増加や判別分析による特徴的なピークの検出も検討することが必要と考えられた。

D-6. 生薬製剤承認基準案の検討

局方手引きでは、収載生薬について主に煎剤あるいは末での服用が規定されているため、局方手引き収載生薬をエキス製剤として承認申請する際のブリッジングガイドラインである「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」（案）を作成した。煎剤とエキス剤のブリッジングは生薬毎に状況は異なるが十分実用に耐えるガイドライン案が仕上がり、局方手引き改訂のための準備は整ったものと思われる。

＜育薬を指向し生物学的特性解析を基盤とした漢方処方の品質評価に関する研究＞

D-7. 麻黄の抗腫瘍活性及び疼痛抑制活性

麻黄成分である herbacetin は、FLT3 キナーゼの阻害作用を有し、ヒト急性骨髄性白血病細胞の増殖を抑制したことから、FLT3 が恒常的に活性化している急性骨髄性白血病細胞の増殖抑制剤としての応用が期待された。同様に、関連化合物である gossypetin についても、herbacetin の標的キナーゼを阻害する作用を有することも判明した。さらに herbacetin は、NGF-TrkA シグナルを抑制することで、神経突起の伸長を抑制する作用を有することが明らかとなり、NGF-TrkA シグナルが関与する慢性疼痛など、に対しても鎮痛作用を有するものと期待された。そこで、herbacetin についてホルマリン誘導疼痛抑制効作用について検討した。ホルマリン試験において、第1相反応（0～5 分間）は、知覚神経終末に対するホルマリンの直接刺激による疼痛を反映し、第2相反応（15～45 分間）は、ホルマリンによる組織侵害で生じた炎症による疼痛を反映する。モルヒネのような中枢性鎮痛薬は、両方反応を抑制し、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）は、第2相反応のみを抑制する。Herbacetin は、第1相目の反応については抑制傾向を示したが有意差はなく、第2相反応を有意に抑制したことから、NSAIDs とは機構が異なるが、末梢性の作用することで鎮痛作用を示すことが示唆された。

これまでの検討から、麻黄アルカロイドには、

抗腫瘍・転移抑制作用が無いことが判明しており、麻黄より、アルカロイドを除いたエキスにおいても、活性が維持されることが判明した。本研究の最終目的は育薬で、麻黄含有漢方処方において、これまでにない効能を検討し、標準化のための活性評価系を確立することであるが、臨床学的な立場で考えると、抗腫瘍・転移抑制作用や、疼痛抑制作用を考えた場合には、アルカロイド類は不要な副作用を引き起こす成分と考えられた。従って、育薬の観点から、去エキスについて標準化をはかる方向で研究を展開させることになった。そのためには、まず、去エキスについての安全性を確認する必要があると急遽考えられたため、そのための動物による安全性試験及び、臨床研究を実施することとなった。安全性のための臨床研究は、平成 26 年 3 月末には終了することになっているが、本報告書の段階では、結果がまだ出ておらず、記述することができない。

E. 結論

遺伝子情報に基づく天南星の掌葉半夏に対する純度試験法を確立し、妥当性確認試験を実施した結果、より高いレベルのコンタミネーション防止策、具体的には、より厳密な PCR 産物の物理的封じ込めが重要であることが判明した。また竜胆と秦艽、党参等の結果は、今後これらの生薬の公的規格化に反映される。さらに、局方手引きの効能効果の読替え案についてまとめ、煎剤とエキス製剤のギャップを埋めるための「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」（案）を作成した。西洋ハーブ関係では、本研究成果を反映して承認申請が行われ、チェストベリー乾燥エキスについて承認が了承された。漢方処方関係では、漢方処方の新規効能効果を踏まえた試験法について検討し、アルカロイド除去麻黄エキスを利用した漢方処方に育薬の可能性が高いことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文等発表

- 1) 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. *Chem. Pharm. Bull.*, accepted (2014).
- 2) Masada-Atsumi, S., Kumeta, Y., Takahashi, Y., Hakamatsuka, T. and Goda, Y.: Evaluation of the botanical origin of black cohosh products by genetical and chemical analysis *Biol. Pharm. Bull.*, 62(3): in press (2014).

- 3) He, J. Y., Zhu, S., Komatsu, K., Goda, Y. and Cai, S. Q.: Genetic polymorphism of medicinally used *Codonopsis* species in internal transcribed spacer sequence of nuclear ribosomal DNA and its application to authenticate *Codonopsis Radix*. *J. Nat. Med.*, **68**: 112-124 (2014).
- 4) He, J. Y., Zhu, S., Goda, Y., Cai, S. Q. and Komatsu, K.: Quality evaluation of medicinally-used *Codonopsis* species and *Codonopsis Radix* based on the contents of pyrrolidine alkaloids, phenylpropanoids and polyacetylenes. *J. Nat. Med.*, on line available 10.1007/s11418-013-0801-0
- 5) Masada-Atsumi, S., Onuma, M., Suenaga, E., Maruyama, T., Hishida, A., Kiuchi, F., Kobayashi, S., Goda, Y. and Hakamatsuka, T.: Genome-based authentication of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*; Ranunculaceae) supplements available in the Japanese markets. *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **20**: 178-188 (2013).
- 6) Hyuga, S., Hyuga, M., Yoshimura, M., Amakura, Y., Goda, Y. and Hanawa, T.: Herbacetin, a constituent in *Ephedrae herba*, suppresses the HGF-induced motility of human breast cancer MDA-MB-231 cells by inhibiting c-Met and Akt phosphorylation. *Planta Medica*, **79**: 1525-1530 (2013).
- 7) 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.: Studies on the identification test for *Hedysarii Radix*. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **44**: 672-678 (2013).
- 8) 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*, **18**: 5326-5334 (2013).
- 9) 丸山卓郎, 河野徳昭, 小松かつ子, 遺伝子解析技術を用いた薬用植物基原種の鑑別, 特産種苗 **16**, 70-76 (2013).
2. 学会発表等
 - 1) 日向須美子他, がん転移抑制効果を有する漢方薬の基礎研究から導き出された活性成分のユニークな薬理作用と臨床応用への可能性, 日本薬剤学会第28年会, 2013年5月, 名古屋.
 - 2) 合田幸広 多成分系としての生薬・漢方製剤の特徴と課題 日本薬剤学会第28年会, 2013年5月, 名古屋
 - 3) Hyuga, S. et al., Herbacetin, a biologically active constituent in *Ephedrae herba*, suppresses the HGF-induced motility of human breast cancer cells through inhibition of c-Met phosphorylation, The 64th annual meeting of the Japan Society for Oriental Medicine, 3rd Academic Meeting of Global Research Network for Traditional Medicine (GRNTM) 2013年5月, 鹿児島.
 - 4) 日向昌司他, 麻黄の活性成分・Herbacetin のマルチキナーゼ阻害作用, 第30回和漢医薬学会, 2013年8月, 金沢.
 - 5) 日向須美子他, 麻黄の活性成分・Herbacetin によるがん細胞の運動能, 増殖, 及び腫瘍増殖の抑制, 第30回和漢医薬学会, 2013年8月, 金沢.
 - 6) 何敬愉他, Chemical evaluation on *Codonopsis Radix* (1) - Development of HPLC-DAD method for analysis of polyacetylenes, phenylpropanoids and pyrrolidine alkaloids in medicinally-used *Codonopsis* species. 第30回和漢医薬学会, 2013年8月, 金沢.
 - 7) 渥美さやか他, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (12) チェストツリー市場品の品質評価, 日本食品化学学会第19回総会・学術大会, 2013年8月, 名古屋.
 - 8) 何敬愉他, Quality evaluation of medicinally used *Codonopsis* species and *Codonopsis Radix* based on the contents of pyrrolidine alkaloids, phenylpropanoid and polyacetylenes. 日本生薬学会第60回年会, 2013年9月, 北海道当別.
 - 9) Hyuga, S. et al., Herbacetin in *Ephedra Herb* suppresses motility and growth of cancer cells through inhibition of Met and Aurora kinase B 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月, 横浜.
 - 10) 呉曉婷他, *Gentiana*属生薬の基原と品質に関する研究 (2) —*Gentiana*属4種及び竜胆のITS配列について. 日本薬学会第134年会, 2014年3月, 熊本.
 - 11) 好村守生他, 縮合型タンニンの簡易部分構造解析法の検討, 日本薬学会第134年会, 2014年3月, 熊本.
 - 12) 日向須美子他, HerbacetinによるMet及びAurora kinase Bのキナーゼ活性阻害を介した抗腫瘍効果, 日本薬学会第134年会, 2014年3月, 熊本.
 - 13) 大嶋直浩他, ミャンマー産サンソウニン (酸棗仁) の特異的成分の同定について, 日本薬学会第134年会, 2014年3月, 熊本.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
 - 1) 出願番号: 特願 2013-240718 (2013年11月21日) 出願人: 国立衛研所長・北里研究所, 発明者: 花輪壽彦, 日向須美子, 合田幸広, 日向昌司, 天倉吉章, 好村守生.
 - 2) 出願番号: 特願 2013-240823 (2013年11月21日) 出願人: 国立衛研所長・北里研究所・常磐植物化学研究所, 発明者: 花輪壽彦, 日向須美子, 合田幸広, 日向昌司, 天倉吉章, 好村守生, 山下忠俊.

ヒトにおける安全性確保のための、非臨床・臨床開発における 評価・予測系の開発

国立医薬品食品衛生研究所

医薬安全科学部

黒瀬 光一

研究要旨：副作用リスクの予測と安全性評価に関して次の項目に関して研究を行い、成果を得た。(1) 医薬品のインビトロアレルギー性予測系の開発、(2) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮細胞の分化およびその評価、(3) 安全性バイオマーカーの探索・同定と診断法の開発

研究組織

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
黒瀬光一
前川京子
- 2) 積水メディカル(株) つくば研究所
森 篤雄
- 3) 田辺三菱製薬(株) 薬物動態研究所
堀川隆司
- 4) 東京大学大学院 薬学系研究科
楠原洋之
- 5) 理化学研究所
杉山雄一
- 6) 横浜薬科大学 公衆衛生学研究室
埴岡伸光
- 7) 九州大学大学院 農学研究院
田代康介
- 8) Meiji Seika ファルマ(株) 医薬研究所
土屋敏行
- 9) 第一三共(株) 薬物動態研究所
渡邊伸明
- 10) 名古屋市立大学大学院 薬学研究科
松永民秀
- 11) プレシジョン・システム・サイエンス(株)
上田哲也

A. 研究目的

医薬品開発過程の早期にヒトにおける安全性評価を適切に行うことができれば、開発候補薬の効率的で確かな絞り込みや安全性確保のための対策が創薬のより早い段階において可能となり、開発期間や開発費の削減、さらには、より安全な医薬品供給の促進が期待される。そこで、本研究では、参加企業のニーズと医薬品開発上の必要性を踏まえ、非臨床・臨床それぞれの開発過程において近々に対処すべき課題に関する研究を行い、両過程を通した副作用リスクの予測と安全性評価系の開発をめざすことを目的とした。今年度は、非臨床開発過程では、ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮細胞の作製およびその評価、および医薬品のインビトロアレルギー性予測系の開発を、臨床開発過程においては、安全性バイオマーカー (BM) の探索・同定と診断法の開発

を目的とした。

B. 研究方法

1) 非臨床開発過程

1-1) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮細胞の分化およびその評価。

ヒト iPS 細胞は国立成育医療研究センター研究所において樹立されたヒト iPS 細胞株 (Windy) を用いた。まず、activin A 含む培地で 3 日間、fibroblast growth factor 2 を含む培地で 4 日間培養した。その後、Y-27632 を 10 μM となるよう添加し、37°C で 60 日間処理した後、細胞を Accutase で剥離し、あらかじめ、ヒト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した GFR Matrigel でコーティングした細胞培養用 24 ウェルプレートに播種した (Y-27632 は播種後 24 時間培地に添加した)。細胞播種後、epidermal growth factor を含む培地で 19 日間培養した。分化誘導終了後、細胞を回収し、各マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。なお、低分子化合物 (A-Q) はある期間に複数添加して分化誘導を行った。薬物代謝酵素誘導実験では、1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ を 10 nM となるよう添加し、細胞回収前に 48 時間処理した。Sucrase-isomaltase の免疫蛍光染色は、分化誘導終了後、細胞を固定し、膜透過処理およびブロッキングを行った。その後、一次抗体および二次抗体で処理し、核染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。ペプチドの取り込み実験では、25 μM β -Ala-Lys-AMCA (蛍光ラベルされたジペプチド) を CO₂ インキュベーター中 37°C で 4 時間処理