

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

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 ライフサイクルにわたって医薬品の品質を維持・改良するには科学的体系的なアプローチで開発研究を実施し、品質管理戦略を確立することが求められており、特に機能性製剤に関してはそのための品質特性の評価手法、製造プロセスの解析手法の確立が急務である。ナノ DDS 製剤等の機能性製剤の品質管理戦略を確立に必要な品質・工程評価手法の開発を目的として研究を実施し、蛍光標識法などの分光学的技術を用いた先端的評価手法が、機能性製剤の重要品質特性や製造工程の評価に有効であることを示した。

研究組織

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所
奥田晴宏；加藤くみ子；四方田千佳子；柴田寛子；阿曾幸男；宮崎玉樹；香取典子；小出達夫；坂本知昭
- (2) 東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之
- (3) 東京工業大学資源化学研究所 西山伸宏
- (4) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (5) 東邦大学薬学部 寺田勝英
- (6) 帝京大学薬学部 丸山一雄
- (7) 日本化薬株式会社 中西健
- (8) 興和株式会社 小崎雅人
- (9) アステラス製薬株式会社
山梨繁行；三村尚志；瀧本直人
- (10) 東和薬品株式会社 立木秀尚
- (11) ニプロパッチ株式会社 山内仁史
- (12) 富士フィルム株式会社 大野誠
- (13) 塩野義製薬株式会社
村主教行；古家喜弘；日裏深雪
- (14)
- (15) 第一三共株式会社 脇山尚樹
- (16) 武田薬品工業株式会社
池田幸弘；小澤昭夫；廣島高志；手島浩一郎
- (17) 株式会社パウレック 高嶋武志
- (18) 参天製薬株式会社
西岡和幸；池井辰夫
- (19) 日揮株式会社
河合正雄；木村格

- (20) 田辺三菱製薬株式会社

田邊良輔；夜久晃治

A. 研究目的

医薬品製剤開発および品質管理は、21 世紀になってから大きな変革を迎えた。経験に基づき工程を設計し、工程管理値と規格を定めて規制当局に登録する従来の方法論では、医薬品製剤の品質を市販後も長期間にわたって維持、改良することができないことが指摘され、それに代わって、開発段階からリスクマネジメント手法を用いて、リスクを特定し、特定されたリスクについて集中的に資源を投入し、科学的体系的な開発研究を実施し、品質管理戦略を確立必要性が強く強調されている。ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）においても「クイリティバイデザイン（QbD）：科学的体系的アプローチによる製剤および製造工程の開発」が品質関連トピックとして議論され、Q8-Q11 ガイドラインが完成した。日米欧の規制当局及び産業界は QbD による製剤開発の実施に向けて努力を傾注しているところである。

特に、機能性医薬品の品質を確実に保証するには、最終製品の品質試験のみでは不十分で、科学的体系的な医薬品開発を実施し、総合的な品質管理戦略を確立することが必須であるが、そのためには、①医薬品の有効性及び安全性に直結する重要品質特性（CQA）を解析する手法および② 製造プロセスを解析する手法を開発す

ることが必須である。

本研究ではナノ DDS 製剤を初めとして先端の技術を応用して製造される医薬品の品質管理戦略を確立するために必要な品質特性評価手法および製造工程評価手法を開発・確立することを目的とする。その成果は、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。

本研究計画は4分担研究課題から構成される。第一課題は、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、リアルタイムな製剤開発や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。

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。分担課題責任者は製薬業界あるいはアカデミアの研究者・技術者と分担研究班を組織し、班会議を開催、試料・技術の交換および意見交換を実施し、研究を遂行した。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，西岡，古家，日裏，手島，廣島，池井，小澤，河合，木村，田邊，夜久）

第一課題は、1) 高分子ミセル製剤：シスプラチン内包ミセルに関してミセル内核の α -ヘリックス形成とミセルの *in vitro* 製剤特性及び体内動態や薬理活性の関連性について解析した。2) リポソーム製剤：各種脂質組成からなるリポソームを作製し、ヒト血清との相互作用や補体系への影響について精査した。3) 薬物トランスポーター：数理モデルを構築し、受容体占有率をシミュレーションするとともに、ヒト MCT9 の細胞内・組織局在や、*in vitro* 輸送実験を行った。4) QbD アプローチ：PLGA ナノ粒子製剤について目標製品品質プロファイル(QTPP)の設定、CQA の提案、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。さらに、重要工程パラメータ(CPP)について中心複合法に

よる最適化を行い、デザインスペースを構築した。

第二課題は、1) 溶出試験法：フロースルーセル(FTC)法を用いて、経時的な模擬消化管液の適用、口腔内崩壊(OD)錠の水あり/なし投与時の胃内環境を模した試験条件、長期放出型マイクロスフェア製剤に対する放出試験条件について検討した。2) 局所皮膚適用製剤：標準製剤とジェネリック(GE)製剤について、ラットおよびブタを用いた同等性(BE)試験の予測法を検討した。3) リポソーム製剤の特性：様々なサイズの標準粒子を用い動的光散乱法の解析方法の精度を調査した。蒸発光散乱法を用い脂質成分の分析方法を検討した。GMP を想定してアクティブターゲティング型リポソーム製剤の工程法を検討した。

第三課題は、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、コクリスタル製剤について、これらの製剤の品質管理を可能にする製剤の品質特性評価法の確立をめざして研究を行った。

第四課題は、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分析評価手法について検討を行った。

倫理面の配慮

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

本研究結果を研究課題別に示す。

第一課題 1) 高分子ミセル製剤：高分子ミセルの内核の α -ヘリックス形成が *in vitro* での薬物放出、安定性、さらには *in vivo* における血中滞留性改善、固形がんへの集積と抗腫瘍効果に重要であることを明らかとした。蛍光標識ミセルを創製し、高分子ミセルの細胞内動態可視化法を構築した。2) リポソーム製剤：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た。3) 薬物トランスポーター：*in vitro* 試験に基づいた受容体占有率の推定法を構築した。MCT9 過剰発現細胞の利用により、MCT9 の組織及び細胞内分布解析、機能解析手法を構

築した。4) QbD アプローチ：PLGA ナノ粒子製剤について、CQA と CPP の相関を明らかにし、要因図及び分散分析を用いたリスク評価を行うとともに、中心複合法による最適化を行い、得られた結果を基に応答曲面法により視覚化しデザインスペースを構築した。

第二課題 1) 溶出試験法：難水溶性製剤に一连の模擬消化管液を使うことで製剤特性に応じた溶出挙動が得られた。OD 錠では直径 12 mm の FTC 使用時には直径 22.6 mm よりも速い溶出速度を示した。長期放出型マイクロスフェア製剤の放出試験では他法よりもフロースルーセル (FTC) 法にフレキシビリティがあった。2) 局所皮膚適用製剤：ラット/ブタ薬物放出率において GE 製剤は低値を示したが、ブタ角質中薬物量 (DPK) 試験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。3) リポソーム製剤の特性：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く精度が高いことが分かった。リポソーム構成脂質だけでなくリン脂質加水分解産物も同時に分離可能な方法を構築した。また、種々工程法を検討し、連続限外ろ過によりワンステップで未封入薬物や修飾分子を除去できることを示した。

第三課題 1) 非晶質製剤：ラマンスペクトル、IR スペクトル、TSDC、DSC、NMR の測定により、非晶質製剤の溶出性に影響すると考えられる薬物の分子状態、局所分子運動性、高分子添加剤-薬物の相互作用の評価法を確立できた。また、非晶質製剤の結晶化は表面を高分子で被覆することや無機ナノ粒子添加剤であるアエロジルを添加することにより抑制できた。2) コクリスタル製剤：溶解熱測定により得られる溶解度パラメーターが、コクリスタル及びその非晶質複合体の物理的安定性 (結晶化) 及び化学的安定性 (類縁物質の生成) と関連することが分かった。

第四課題 1) 製剤特性を評価する先端的手法の検討：フロースルーセル法オープンシステム及び過飽和・析出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物性評価及び打錠特性への影響評価、光励起非破壊検査法による製剤内異物検査及び糖衣コーティングの評価、近赤外イメージングを用いた製剤均一性評価等が重要品質特性の評価手法として有用であることを示した。2) 工程管理の先端的手法の検討：テラヘルツ分光法による錠剤コーティング工程のリアルタイムモニタリング、近赤外分光法による連続製造工程のモニタリング、内部蛍光検出法による製

造工程及び製造環境の微粒子・バイオパーティクル等のモニタリング、超臨界クロマトグラフィー法による光学純度の超高速モニタリング技術等が、製造工程をモニタリング及びコントロールする技術として有用であることを示した。

D. 考察

第一課題では、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、体内動態評価法構築による生体側因子に関する研究や製剤機能と品質特性との関係に関する研究を行い、さらにナノ DDS 製剤を対象とした QbD アプローチの実例を示すことができた。これらの成果は、ナノ DDS 製剤の開発・評価ガイドライン作成に資するデータとなるとともに、ナノ DDS 製剤の合理的品質管理システムの構築に役立つと期待される。

第二課題では、機能性製剤を対象に FTC 法における溶出・放出挙動に影響する重要因子の特定や、局所性パップ剤のラットを用いたヒト BE 試験の予測法の有用性を示すと共に、リポソーム製剤の工程法・特性評価における課題や評価方法を提案した。溶出試験法の検討では FTC 法について基礎的な検討を積み重ねており、各製剤の特性を捉えうる溶出曲線が得られることのほか、試験液の線流速の差が溶出挙動に影響を与えることを示した。また、長期放出型マイクロスフェア製剤の放出試験では方法により放出挙動に差異が生じていたことから、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。これらの成果は、機能性製剤の適切な生物薬学的評価法の確立と効率的な製剤設計、さらには開発・評価ガイドライン作成に繋がるものと期待される。

第三課題では、超難溶性薬物の溶出特性を改善するうえで重要と考えられる品質特性の評価法を確立することができた。これらの評価法はより良い製剤特性を有する非晶質、コクリスタル製剤の開発に結びつくものと考えられる。

第四課題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。これらの新しい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

分光学的技術を初めとする各種の分析評価手法が、ナノ DDS 製剤に代表される機能性製剤の重要品質特性あるいは製造工程の評価に有効であることを示すことができた。例えば、FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）現象を利用した高分子ミセルなど蛍光標識手法がナノ医薬品の特性解析に有効であること、テラヘルツ分光や近赤外分光、ラマン分光、TSDC、DSC、NMR が固形製剤の重要品質特性の解析に有効でことなどが明らかとなった。機能性製剤の生物学的評価法を検討し、

固形製剤にとっても最も重要な CQA である溶出性の評価手法として、FTC 法の基礎情報を集積し、難水溶性製剤や OD 錠、長期放出型マイクロスフェア製剤の特性評価における有用性を示した。さらにヒト BE 試験の予測における、ブタ角質中薬物量を評価することの有用性を示した。GMP 製法に有効な工程法を提案するとともに、リポソーム製剤の粒子径や脂質成分を適切に評価可能な方法を調査した

高機能製剤の重要品質特性の評価には生体内の挙動を正確に反映するモデルシステムの構築あるいは生体内挙動そのものを評価するシステムの構築が必須であり、本研究課題全体を通じて、flow-through cell 法を初めとする溶出モデルシステム、体内動態モデルの構築およびその評価手法（FRET 等）を確立することができた。

これらの研究結果は、機能性製剤の開発・評価ガイドラインの基礎的知見を与えた。

F. 研究発表

論文発表 16

1. Sakai-Kato, K., et al., Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components, *Biomaterials* 35, 1347-1358 2014
2. Un, K., Sakai-Kato, K. et al., Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes, *Biomaterials*, 33, 8131-8141, 2012
3. 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
4. Ueda K., Yamamoto K., et al., Mechanistic Differences in Permeation Behavior of Supersaturated and Solubilized Solutions of Carbamazepine

Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Measurements. *Molecular Pharmaceutics*. 9, 3023-33 2012.

5. Koide T., et al., 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
6. Sakamoto T., et al., Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging, *J Pharm Biomed Anal.* 74, 14-21 2013
7. Sakamoto T., et al., Coating and density distribution analysis of commercial ciprofloxacin hydrochloride monohydrate tablets by terahertz pulsed spectroscopy and imaging, *J Pharm Innov.* 7, 87-93 2012
8. 香取典子、薬局方の試験規格を PAT、RTRT へ適用する場合の諸問題- PAT における製剤均一性試験法の判定基準について、*Pharm Tech Japan* 29(1) 7-10 (2013)
9. 小出達夫、香取典子他、PAT による医薬品品質管理の課題と展望、*Pharm Tech Japan* 28(4) 7-10 (2012)
10. 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, 丸山一雄他, *Progress in Drug Delivery System*, 20, 103-108, 2011.
11. Shibata H, Yomota C., et al., 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.
12. Shibata H, Yomota C., et al., Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 60(8) 967-75, 2012;
13. Shibata H., Yomota C., et al.,

Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions. Biol. Pharm. Bull. 35(11):2081-72 2012.

14. Shibata H., Yomota C., et al., 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. 14(2), 811-17 2013
15. Sonoda S., Maruyama K, et al., Novel diagnostics and therapeutics with ultrasound technologies and nanotechnologies. Yakugaku Zasshi, 133, 1269-1276 2013.
16. Hagisawa K, Maruyama K., et al., Thrombus-targeted perfluorocarbon-containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis: in vitro and in vivo study. J. Thromb. Haemost., 11, 1565-1573 2013.

学会発表 25

(下記に主な国際学会における発表を記載)

- ・ Sakamoto T., et al., Analysis of hydration and dehydration on xanthine related compounds during pharmaceutical granulation process using terahertz spectroscopy, 38th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz waves, Mainz, Germany (2013.9)
- ・ Sakamoto T., et al., Vibrational spectral analysis of pharmaceutical ingredients during a tableting process by cross-sectional use of near-, mid-, and far-infrared/terahertz electro-magnetic waves for process understanding, 7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Kobe (2013.8)
- ・ Sakamoto T., et al., Application of terahertz/far-infrared spectroscopic analysis of an active pharmaceutical ingredient (API) and other medical additives for a pharmaceutical process analytical technology (PPAT), International Workshop on Optical

Terahertz Science and Technology 2013, Kyoto (2013.4)

- ・ Sakamoto T., et al., Vibrational spectroscopic analysis of pseudo-polymorphism conversion of theophylline during a tableting process, Philadelphia, PA, USA (2013.3)
- ・ Sakamoto T., et al., Understanding of pseudo-polymorphism conversion mechanism of theophylline under a wet granulation process using terahertz spectroscopy, International Symposium on Frontiers in Terahertz Technology, Nara (2012.11)
- ・ Sakamoto T., et al., Vibrational spectroscopic analysis of theophylline in a pharmaceutical granulation process using near-, mid- and far-infrared/terahertz spectroscopy, 37th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves, Wollongong, NW, Australia (2012.9)
- ・ T. Koide, et al., Analyzing the quality of solid dosage forms by using pharmaceutical imaging techniques, FIP World Congress 2013 (2013.9 Dublin, Ireland)
- ・ Miyazaki T., Aso Y et al., Effects of PVP and HPMC on the dynamic viscoelastic properties of amorphous nifedipine. AAPS, Chicago, (2012.10)
- ・ Miyazaki T., Aso Y., Y. et al., Inhibition of surface crystallization of amorphous nifedipine by coating with PVP and HPMC. AAPS, San Antonio, (2013.11)
- ・ Shibata H., Yomota C., et al., Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions. AAPS, Chicago (2012.10)

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

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

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、成分解析、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、単味生薬製剤の同等性確保ガイドライン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 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) (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
- (8) 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
- (9) 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
- (10) 東京大学大学院薬学系研究科教授 関水 和久
- (11) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 袴塚高志
- (12) 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
- (13) 興和株式会社医薬事業部薬粧開発部 小泉裕久
- (14) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課 浅羽祐介
- (15) 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
- (16) 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, 日向野太郎
- (17) 慶應義塾大学薬学部教授 木内文之
- (18) 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
- (19) 大正製薬株式会社製薬技術研究所 照井祐一
- (20) 北里大学東洋医学総合研究所所長 花輪壽彦
- (21) 松山大学薬学部医療薬学科教授 天倉吉章
- (22) 常磐植物化学研究所 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。

本研究計画は3分担研究課題から構成される。第一課題は、生薬の標準化と品質評価手法に関する研究、第二課題は、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、第三課題は、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である。

B. 研究方法

本研究は、生薬、西洋ハーブ、漢方処方の3分野を対象としている。生薬分野では、生薬の基原

の鑑別法の開発を実施するとともに、メタボローム分析等を実施し、基原と成分の関係を明らかにした。使用した生薬及び植物体の入手先は、特に記述したもの以外は、毎年度の報告書に記載している。また、単味生薬について、エビデンスに関する調査研究を実施し文献情報集を作成し、さらに、生薬製剤承認基準案検討班会議を7回開催した。特に、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、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、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。西洋ハーブでは、新規医薬品の作出に貢献するため、基原の鑑別法を確立するとともに、標準化をはかる目的で、プロファイル分析等を実施した。漢方処方では、抗腫瘍活性を持つ麻黄湯、および構成生薬である麻黄をモデル医薬品とし、生体由来の医薬品あるいはバイオ医薬品の評価法やガイドラインを参考に、標準化法の確立をはかった。〈倫理面の配慮〉

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、実施中の麻黄エキス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・考察

〈生薬の標準化と品質評価手法に関する研究〉
天南星の掌葉半夏に対する純度試験法について妥当性確認試験を実施した。不適合品混入疑似試料7検体を含む11検体を各機関に送付し、プロトコルに従い、試験を実施した結果、適正な結果を得られた機関は4機関に留まった。また、その他の問題として、過去のPCR産物のコンタミネーションが原因と思われる試験不能が3機関で起きた。電気泳動時のPCR産物の環境中への拡散防止策の構築が課題となった。

酸棗仁、晋耆、灯心草、半夏の理化学試験法を検討し、各生薬の指標成分候補として、frangulofolin, oleanolic acid, 9-O-methyl coumestrol, luteolin 3',5-dimethyletherを同定した。また半夏と天南星を区別可能なスポットを見出した。また、晋耆について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。抽出溶媒としてD₂Oが適切であった。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。イソフラボン類では、データ上では検出されたが、解析に影響を与えなかった。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。

キナのアルカロイド及び紫根の色素成分の定量法を確立した。また、紫根については、市場品に適用し、今後の規格設定の一助となる結果を得た。

甘草の基原植物鑑別法として、日局収載種の*G. uralensis*, *G. glabra*と局外種の*G. inflata*について、3種および3種間の種間雑種を区別出来る可能性がある遺伝子領域を見出した。

DNAの抽出・調製が困難な試料(熟地黄及びリュウコツ)からの、遺伝子の調製、増幅法について検討し、前者については、ある程度増幅が可能な条件が得られた。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。

地黄の薬効評価のためのカイコを用いる簡便な実験プロトコルを作成した。本試験法で様々なロットのジオウの高血糖カイコに対する血糖降下活性を測定、ロットによって活性が異なる事が判明した。

党参の基原と品質について検討した。*Codonopsis*属2種1変種の核rDNAのITS領域における遺伝子多型を明らかにし、各分類群を鑑別するマーカー配列を見出した。さらに、各分類群の成分的な特徴を明らかにする目的で成分分析を行った。*C. pilosula* 及び *C. pilosula* var. *modesta*の根の主な成分はcodonopyrrolidium Bであり、同種に由来する市場品も同様であった。一方、*C. tangshen*の根はtangshenoside I及びcodonopyrrolidium Aの含量が他種に比べて有意に高く、この特徴は野生品で明らかであった。従来、品質評価の指標成分とされたLobetyolinは2種1変種に共通して含まれていたが、党参市場品で含量が低く、生薬の保存状態の影響が考えられた。

*Gentiana*属生薬「竜胆」と「秦艽」の基原に関す

る研究を実施した。*Gentiana*属11種の内*G. straminea*, *G. crassicaulis*及び不明種を除く8種は、GenBankに登録されている塩基配列とほぼ一致した。*G. straminea*では挿入がない配列を、同種の配列と判断した。*G. crassicaulis*ではGenBankに登録されている配列が誤りであると判断した。同属植物は容易に交配が起こるものと考えられ、今回採集した*G. crassicaulis*も別の植物種と交配しており、この別種の配列がGenBankに誤って登録されたものと考察した。この植物が何であるかを解明するためには、再調査が必要であろう。不明種は*G. crassicaulis*とほぼ同じ地域に生育しており、塩基配列ではともに挿入が認められたが、6箇所の塩基が異なった。また、不明種は*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*G. straminea*の配列は、不明種の配列とほぼ一致する。不明種は*G. tibetica*であろうと考察しているが、分布域が一致せず、今後さらなる検討が必要である。本研究により、*G. scabra*と*G. manshurica*以外は各種に特徴的な配列が明らかになったことから、今後、市場品の同定は容易になるものと考えられる。

＜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＞

西洋ハーブの品質評価に関する研究：遺伝子解析の結果、植物粉末の配合が謳われているブラックコホシュ健康食品10製品のうち、ブラックコホシュの基原植物である*Cimicifuga racemosa* L. の遺伝子配列が検出されたのは5製品であり、残りの5製品からは同属の*C. dahurica* L. が検出された。成分分析の結果、医薬品の成分プロファイルは互いに酷似し、天然物由来製品として十分に許容できる範囲であった。他方チェストツリー製品では、遺伝子解析の結果、植物粉末の配合が謳われるチェストツリー健康食品8製品はすべて正しい基原植物である*Vitex agnus-castus* L. に由来することが分かった。成分分析の結果、基本的なピークプロファイルは共通するものの、各ピークの含量比は製品毎に多様であることが分かった。従って、本品の場合には、種内変異が蓄積しやすい植物であると考えられるため、栽培条件の制御など生産段階での管理により品質を一定に保つことが重要性であると考えられた。また、同属植物の*V. rotundifolia* L. に由来する生薬マンケイシとチェストツリー製品の成分比較を行ったところ、両者のピークプロファイルはよく似ていたが、その中からそれぞれに特徴的なピークを見出すことができた。

ブラックコホシュ、チェストツリー以外に、さらに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原生薬を計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。

生薬製剤の標準化に関する研究：これまでの報告書を基に、局方手引きの効能読み替え、新規効能追加、新規生薬収載案について検討した結果、一般用医薬品として適切な効能効果を支持する文献は29報見出され、その内訳はメタアナリシス1報、RCT25報、RCT以外のCT3報であった。さらに、一般用医薬品としてわかりにくい効能効果のものを、わかりやすい効能効果に読替える案をまとめた。例えば、オウバクの「胃部・腹部膨満感」は「胃部・腹部膨満感（おなかが張った感じ）へ、カンゾウの「咽喉痛」は「咽喉痛（のどの痛み）」への読み替えが提案された。また、局方手引きが単味生薬の煎液に関する基準であるのに対し、現代の生薬製剤メーカーが求めるものはエキス製剤に関する基準であることから、昭和60年5月31日発出の厚生省薬務局薬審第120号通知「医療用漢方製剤の取扱いについて」を参考にしながら、煎剤とエキス剤をブリッジングするためのガイドライン案を考案した。さらに、検討班で分担してカンゾウ、ジュウヤク、コウジン、コウカ、サフラン、ボウイ、オウレン、オウバク、キササゲ、ケイヒ及びリュウタンの11種類の生薬について個別に本案について実証試験を行い、その結果に従い適切な修正を加えた後に、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完成させた。

＜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＞

麻黄エキスより細胞運動能抑制活性を指標に、活性成分を分画した結果、既知化合物9種、新規化合物1種を単離同定した。新規化合物はherbacetin 7-O-neohesperidosideであり、本物質は、弱いながらも抑制活性を有することが明らかとなった。さらに、そのアグリコンであるherbacetinの薬理活性を評価した結果、強い細胞運動能抑制活性を有することを見出した。ついで、herbacetinの薬理的評価を実施したとこ

ろ、①MET, FLT3, TrkA, Aurora kinase A, Aurora kinase B 等のキナーゼ活性を阻害すること、②Aurora kinase B の活性を阻害し、ヒト肝臓がん由来 HuH-7 細胞の細胞周期を G2-M 期で停止させること、③HuH-7 細胞の MET 及び下流の Akt のリン酸化を抑制し、アポトーシスを引き起こさせること、⑤ヒト肝臓がん由来細胞を移植したモデルマウスにおいて、腫瘍の増殖を抑制することが明らかになった。本研究により、麻黄の抗腫瘍・転移抑制作用の活性成分のひとつは、herbacetin であることを見出し、その薬理学的作用を裏付けることができた。一方、麻黄の抗腫瘍・転移抑制作用には、herbacetin 以外にも複数の化合物が関与することが示唆され、引き続き解析を進めることが課題となった。本研究の成果を総合的に考察した結果、生薬等の天然物は、複数の成分が薬効に関与しているケースが少なくないものと予想され、薬効の標準化を化合物のみで実施することは限界があることが示唆され、適切な活性試験を設定することが極めて有用であると考えられた。

なお、本研究では、麻黄の主生理活性成分である ephedrine アルカロイド類には、抗腫瘍・転移抑制作用活性が存在しないことが明らかになっており、麻黄より、これらの成分を除いたエキス(去エキス)においても、活性が維持されることが判明している。さらに、去エキスでは、麻黄の活性として知られている疼痛抑制活性もあることが判明した。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、ephedrine 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

生薬関係では、生薬の標準化のため、複数の生薬で指標成分等を同定した。これらの結果は、局外生規改訂で新規確認試験法の採用等に反映された。また、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。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。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。さらに、局方手引きの効能効果の読替え案について議論し、わかりやすい効能効果に読替えた案としてまとめることができた。また、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、従前の研究成果を利用して赤ブドウ葉が製品化(アンチスタックス)されたほか、今回新たに、チェストベリー乾燥エキス(プレフェルミン)について、承認が了承された。また、漢方処方関係では、麻黄湯をモデル処方として、抗腫瘍活性、転移抑制活性を評価、同活性成分の一つとして麻黄より herbacetin を同定。同化合物は、複数のキナーゼを阻害、ヒト肝臓がん由来 HuH-7 細胞での検討から、aurora kinase B 阻害及び Met のシグナル阻害し、細胞周期を停止させアポトーシスを誘導することで、腫瘍増殖を抑制させる。これら知見を元に、3 件の特許出願を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表 原著論文 10 総説 1

- 1) Fukahori, M. et al., Quality evaluation of medicinal products and health foods containing Chaste Berry (*Vitex agnus-castus*) in Japanese, European and American markets. *Chem. Pharm. Bull.*, submitted.
- 2) Masada-Atsumi, S. et al., 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. et al., 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., et al., 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. et al., 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. et al., 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. et al., Studies on the identification test for Hedysarii Radix. Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science, **44**: 672-678 (2013).
 - 8) Amakura, Y. et al., Characterization of Phenolic Constituents from Ephedra Herb Extract. Molecules, **18**: 5326-5334 (2013).
 - 9) Takeda, A. et al., Studies on the identification test for JUNCII HERBA. Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science, **43**: 1116-1120 (2012).
 - 10) Kakigi, Y. et al., Comprehensive analysis of flavonols in Ginkgo biloba products using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-violet detection and time-of-flight mass spectrometry. Biosci. Biotech. Biochem. **76**: 1003-1007 (2012).
 - 11) 丸山卓郎他, 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 23 件
- 1) 白石真純他, 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, 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) 竹田文信他, 日本生薬学会第59回年会, 2012 年9月, 木更津.
 - 4) 若菜大悟他, 日本生薬学会第59 回年会, 2012 年9月, 木更津.
 - 5) 渥美さやか他. 日本生薬学会第59回年会, 2012年9月, 木更津.
 - 6) 日向須美子他, 2012 年 10 月, 横浜.
 - 7) 若菜大悟他, 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, 第27回健康食品フォーラム, 2012年10月, 東京.
 - 9) 日向須美子他, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.
 - 10) 天倉吉章他, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜.
 - 11) 日向須美子他, 日本薬剤学会第28年会, 2013 年5月, 名古屋.
 - 12) 合田幸広, 日本薬剤学会第28年会, 2013年5 月, 名古屋
 - 13) Hyuga, S. et al., 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.
 - 14) 日向昌司他, 第30回和漢医薬学会, 2013年8 月, 金沢.
 - 15) 日向須美子他, 第30回和漢医薬学会, 2013年8 月, 金沢.
 - 16) 何敬愉他, 第30回和漢医薬学会, 2013年8月, 金沢.
 - 17) Hyuga, S. et al., 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月, 横浜.
 - 18) 渥美さやか他, 日本食品化学学会第19回総会・学術大会, 2013年8月, 名古屋.
 - 19) 何敬愉他, 日本生薬学会第60回年会, 2013年9 月, 北海道当別.
 - 20) 吳曉婷他, 日本薬学会第134年会, 2014年3月, 熊本.
 - 21) 好村守生他, 日本薬学会第134年会, 2014年3 月, 熊本.
 - 22) 日向須美子他, 日本薬学会第134年会, 2014 年3月, 熊本.
 - 23) 大嶋直浩他, 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 2012-258719 (2012 年 11 月 27 日) 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 2013-240718 (2013 年 11 月 21 日) 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
 - 3) 出願番号: 特願 2013-240823 (2013 年 11 月 21 日) 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

平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月

研究要旨 副作用リスクの予測と安全性評価に関して、非臨床開発過程においては、ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の分化およびその評価、医薬品のインビトロアレルゲン性予測系の開発、臨床開発過程においては、安全性バイオマーカーの探索・同定と診断法の開発、の研究をそれぞれ行い、成果が得られた。

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 丹羽卓朗
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

非臨床・臨床それぞれの開発過程を通じて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。具体的な項目としては、必要性和参加企業のニーズを踏まえ、次に示す項目とした。

(1) 非臨床開発過程

(1-1) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の作製およびその評価：医薬品の副作用発現に影響する小腸・肝臓を連関させた薬物動態予測系を構築するために、ヒト iPS 細胞を腸管上皮細胞および成熟した肝細胞に分化誘導すること及びその評価を目的とした。

(1-2) 医薬品のインビトロアレルゲン性予測系の開発：アレルゲン性は、動物試験での予測が難しく、未だ確立された試験法は無い。そこで、培養細胞を用いたアレルゲン性の簡便な検出系の構築をめざした。

(2) 臨床開発過程

(2-1) 安全性バイオマーカーの探索

(2-1-1) 創薬における安全性バイオマーカーは、副作用の回避や早期発見、毒性メカニズムの解析につながる情報として重要である。薬物解毒において重要な役割を果たすグルタチオン S-転移酵素 (GST) に関して、肝障害バイオマーカーの探索として、Gstm1-(M1), Gstt1-(T1)および Gstm1-Gstt1-(M1T1) 欠損マウスと野生型(WT)マウスの胆汁を採取し、LC/MS 法(ESI-pos) によるメタボロミクス解析を実施した。

(2-1-2) 内因性化合物を用いて、薬物代謝酵素・トランスポーターを介した薬物間相互作用を定量的に評価する方法論を開発することを目的とした。

(2-2) 安全性バイオマーカー診断法の開発：医薬品による副作用の発現と関連のある遺伝子の多型に関し、簡便・安価で迅速なタイピング系を開発するとともに、副作用発症患者の検体(血液及び患者臨床情報)を収集し、発症と関連するバイオマーカー(遺伝子多型等)の同定を目的とした。

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・成熟肝細胞の作製およびその評価(名市大、田辺三菱製薬、横浜薬科大、九州大、国立衛研)：国立成育医療研究センター研究所にて樹立されたヒト iPS 細胞株

(Windy) を用い、腸管上皮細胞および肝細胞への分化を行った。腸管上皮細胞への分化では低分子化合物を用いて、肝細胞への分化ではある一定時期に血清および低分子化合物を含む変法 L-15 培地を用いて、これらの分化誘導に対する効果を検討した。一方、分化誘導後、経時的に細胞より抽出した RNA をプローブとし、Human whole genome ver.2.0(4X44K) (Agilent 社)を用いて網羅的に遺伝子発現プロファイルを収集し、IPA (interactive pathway analysis) システム等によって解析した。また、ヒト iPS 細胞より腸管上皮細胞様細胞に分化誘

導を行ない、リアルタイム RT-PCR 法により、15 種類の機能性 UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 分子種の mRNA 発現解析を行った。

(1-2) 医薬品のインビトロアレルギー性予測系の開発 (Meiji Seika ファルマ, 国立衛研) : 全身投与医薬品のアレルギー性評価に, in vitro 皮膚感作性試験法である h-CLAT (human Cell Line Activation Test) の適用の可能性を検討した。ヒトでのアレルギー性副作用報告のある薬物を単球由来の THP-1 細胞に曝露し, 感作性マーカー分子である CD54 と CD86 の発現量をもとに薬物のアレルギー性の検討を行った。また, 300 万件を超える診療報酬明細書 (レセプト) データから導き出したアレルギー性副作用の発生頻度情報を基に, 低頻度医薬品について h-CLAT 法を評価した。また, CD54, CD86 以外のアレルギー性マーカー分子についても検討を行った。

(2) 臨床開発過程

(2-1) 安全性バイオマーカー (BM) の探索 (第一三共, 東京大, 理研)

(2-1-1) 4 群の各 6 例の試料に関して LC/MS で測定したデータを SIEVE でアライメント実施後, Simca-P を用いて WT に対する KO 群での変動因子を抽出した。

(2-1-2) 合成抗菌薬 DX-619 による肝 CYP3A4 の Mechanism-based inhibition (MBI) を評価するため, 血漿中コルチゾールならびに尿中 6 β -ヒドロキシコルチゾール排泄量を測定し, 見かけの生成クリアランスを算出した。血漿中 6 β -ヒドロキシコルチゾール, および非結合形薬物分率を測定し, 腎クリアランスを算出した。腎薬物トランスポーター発現系を用いて in vitro 試験を実施した。プロベネシド (OAT 阻害剤), ピリメタミン (MATE 阻害剤) を投与された健康人被験者の血漿・尿中の 6 β -ヒドロキシコルチゾールを定量した。

(2-2) 安全性バイオマーカー診断法の開発 (国立衛研, プレシジョン, 積水メディカル) : 日本人においてカルバマゼピン誘発性の SJS/TEN 発症に関連する HLA-A*31:01 と連鎖不平衡を示すサロゲートマーカー多型に関し, PCR-RFLP 法により迅速タイピング系を構築した。また, 薬物性肝障害, 及び分子標的治療薬による副作用を発症した患者の DNA を収集し, 発症と相関する遺伝子多型を TaqMan 法等により探索した。また, 自動化 SNPs 同定系の構築においては, ビーズアレイをキャピラリーチップの中に封入した BIST (Beads in Straw Tip) を用いた。BIST 法を用いることにより, 1 本のキャピラリーチップ内で多種 (10 の SNPs) の SNPs を同時に同定, かつチップ内で全ての反応が行えることから, 自動化が容易である。SNPs の同定には, 各遺伝子, アリルにそれぞれ特異的な Tag 配列を付与したプライマーを用いた Allele Specific Primer

Extension PCR (ASPE-PCR) 法を用いた。この PCR 産物を, ビーズ上の相補的なプローブと反応させ SNPs の同定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究には, 市販の或いは公的バンクより頒布されるヒト由来細胞 (より得られた DNA) を用いており, 必要に応じて「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い, 各研究実施機関で研究倫理審査委員会の承認が得られた後, 解析を行った。また, 本研究で取り扱うヒト検体については, 既に研究実施機関の倫理委員会の承認を得ており, 被験者の同意も適正に得ている。動物実験は, 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守して実験を行なわれた。以上, 倫理的な問題は無い。

C. 研究結果

(1) 非臨床開発過程

(1-1) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の作製およびその評価 : 低分子化合物を用いて分化誘導した腸管上皮細胞は, 腸管上皮マーカーの発現上昇および薬物代謝酵素活性がみとめられた。また 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ で処理することで, CYP3A4 の mRNA 発現および代謝活性の上昇もみとめられた。肝細胞へ分化した細胞は肝細胞マーカーを発現し, FBS を含んだ変法 L-15 培地を適切な時期に用いることでその発現は増加した。また, 低分子化合物および FBS 濃度を最適化することで, 肝細胞マーカーおよび薬物代謝酵素の発現は増加し, ほぼ全ての細胞がアルブミン免疫蛍光染色で陽性を示した。一方, iPS 細胞の腸上皮細胞への分化状態を把握するために, 未分化, 小腸上皮細胞, の分化段階のマーカー遺伝子に着目して網羅的遺伝子発現プロファイルを解析した結果, 分化誘導処理によって, 未分化細胞マーカー遺伝子の発現が低下し, 小腸上皮幹細胞の分化マーカーの発現が誘導され, 小腸上皮肝細胞への分化が進行していることが判明した。また, リアルタイム RT-PCR 法により腸管上皮細胞様細胞において 5 種類の UGT 分子種が発現していることを明らかにした。

(1-2) 医薬品のインビトロアレルギー性予測系の開発 : 被験物質として 26 物質を h-CLAT にて評価した。15 物質が陽性, 7 物質が陰性, 他 4 物質は不溶性などの理由で試験不成立となった。また, アレルギー性副作用の発生頻度情報を基に現在までの h-CLAT の結果を評価した。頻度情報で陽性の 8 物質のうち 7 物質が h-CLAT で陽性となり, 頻度情報で陰性 7 物質のうち 2 物質が h-CLAT 陰性となった。アレルギー性マーカーについては免疫応答に関与する 4 遺伝子について, アレルギー性物質応答性をリアルタイム RT-PCR 法で検討した結果, 感作性物質に対して IL-8 遺伝子発現が高い応答性を示し

たので、IL-8 による分泌型レポーター遺伝子アッセイ系を構築し、アレルゲン暴露による発現誘導を確認した。

(2) 臨床開発過程

(2-1) 安全性バイオマーカー (BM) の探索

(2-1-1) Score plot では KO 群と WT 群はそれぞれのクラスター形成が見られ、PC1 軸に対して左右に良好に分離した。WT と比較して M1, T1 の KO および両 KO (DKO), の 3 群共通で変動したピークが 13 本確認され、これらは全て KO 群で顕著に減少していた。

(2-1-2) DX-619 により、 6β -ヒドロキシコルチゾールのみかけの生成クリアランスならびに腎クリアランスの低下が認められた。 6β -ヒドロキシコルチゾールは尿細管分泌を受け、腎薬物トランスポーター OAT3, MATE1 および MATE2-K 基質であった。プロベネシド投与により、血漿中 6β -ヒドロキシコルチゾールは増加し、尿中排泄量は変動していないことから、腎クリアランスの低下が認められた。プリメタミン投与による影響は認められなかった。

(2-2) 安全性バイオマーカー診断法の開発

HLA-A*31:01 と連鎖不平衡を示す rs1633021 ($r^2=0.7355$, $D'=0.9204$) 及び rsXXXXXXX ($r^2=1.0$, $D'=1.0$) のタイピング系を構築し、SJS/TEN 発症患者検体を用いて、HLA-A*31:01 との連鎖不平衡を確認した。胆汁うっ滞型の薬物性肝障害、及びメシル酸イマチニブによる好中球減少・皮疹と関連する候補遺伝子多型を同定した。また、HLA-A*31:01 と絶対連鎖不平衡にあると推定される 2 種の遺伝子に対して、ASPE-Primer の設計を行った。これらの Primer を用いて BIST 法による SNPs のタイピングを行った結果、既知の SNPs 情報と一致した結果が得られ、2 箇所の SNPs を同時に同定することが可能な系が構築できた。また、反応工程の自動化を可能にした。

D. 考察

(1) 非臨床開発過程

(1-1) ヒト iPS 細胞を用いた小腸上皮・成熟肝細胞の作製およびその評価：本研究で用いた低分子化合物は、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化促進もしくは機能獲得に有用であることが明らかとなった。また肝細胞への分化においては、FBS および低分子化合物を適切な時期に適切な組成で用いることで分化を促進または純度を向上させることが示唆された。一方、網羅的遺伝子発現プロファイル解析により分化誘導を行った細胞は、未分化状態から分化状態に移行しており、また、一定の割合で小腸上皮細胞が分化していると考えられた。UGT 以外に分化細胞マーカー遺伝子も未分化 iPS 細胞 Dotcom 株と比較して発現量が高くなったことから、分化誘導により得られた細胞は腸管上皮細胞の特徴を反映し、また、分化誘導も生体の発生に倣って

段階的に進んでいる可能性が示された。

(1-2) 医薬品のインビトロアレルゲン性予測系の開発：アレルゲン性の検出が h-CLAT によって可能であることが明らかになったが、判定のカットオフ値や評価濃度の設定範囲を全身投与医薬品用に最適化する必要があると考えられる。また、アレルゲン性マーカーとして IL-8 の有用性が示されたが、ベクターに導入する IL-8 転写調節領域のさらなる検討が必要である。

(2) 臨床開発過程

(2-1) 安全性バイオマーカー (BM) の探索

(2-1-1) 3 群共通で変動したピークは WT に対していずれも顕著に減少しており、M1 と T1 の KO により先の代謝が亢進されたと考えられる。一方で、DKO と T1 および M1 と T1 共通ではこれらの変動ピークは主として WT に対して顕著に増加しており、代謝がブロックされ蓄積した結果と考えられた。

(2-1-2) In vitro 試験から予測されたとおり、DX-619 により、肝 CYP3A4 障害が生じているものと考えられる。 6β -ヒドロキシコルチゾールは OAT3 基質となることから、その腎クリアランスは OAT3 機能を反映したバイオマーカーとして有用である。しかし、MATE のプローブとしては、利用できない。

(2-2) 安全性バイオマーカー診断法の開発

HLA-A*31:01 と絶対連鎖不平衡にある遺伝子多型の、安価で迅速なタイピング系は、日本人におけるカルバマゼピンによる SJS/TEN 発症の回避に有用な方法の一つとして期待される。薬物性肝障害発症と関連する遺伝子多型の探索においては、今後さらに検体数をふやした解析が必要である。

E. 結論

1) 非臨床開発過程

低分子化合物の活用や培地の最適化により、ヒト iPS 細胞から薬物動態学的機能を有する腸管上皮細胞分化誘導法の確立と高純度な肝細胞を得ることに成功した。また、iPS 細胞から目的細胞への分化誘導を DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により評価可能であることを明らかにした。また、最適化の必要性があるが h-CLAT およびレポーターアッセイ系を用いた医薬品のインビトロアレルゲン性予測系を開発した。

(2) 臨床開発過程

(2-1) 安全性バイオマーカーの探索

安全性バイオマーカー候補として、GST ノックアウト状態の違いにより、WT と異なる変動様式を示す内因性代謝物をメタボロミクス解析によって検出した。また、プローブ薬を投与しなくても、肝 CYP3A4 および腎 OAT3 が介在する薬物間相互作用を検出することが可能となった。

(2-2) 安全性バイオマーカー診断法の開発

医薬品による副作用の発現と関連する遺伝子の多

型に関し、迅速タイピング系を開発した。副作用発症患者の検体を収集し、一部の副作用に関しては、発症と相関する遺伝子多型を見出した。また、自動化された同時多項目遺伝子解析手法の開発に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Imamura Y, Tsuruya Y, Damme K, Heer D, Kumagai Y, Maeda K, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Izumi T, Sugiyama Y, Kusuhara H. 6 β -hydroxycortisol is an Endogenous Probe for Evaluation of Drug-drug Interaction Involving a Multispecific Renal Organic Anion Transporter, OAT3/SLC22A8, in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos*, in press
2. Kusuhara H, Yoshida K and Sugiyama Y. In vivo characterization of interactions on transporters. In: *Transporters in Drug Development* (ed. By Yuichi Sugiyama and Bente Steffansen), pp23-36, Springer, New York, 2013
3. Imamura Y, Murayama N, Okudaira N, Kurihara A, Inoue K, Yuasa H, Izumi T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effect of the Fluoroquinolone Antibacterial Agent DX-619 on the Apparent Formation and Renal Clearances of 6 β -Hydroxycortisol, an Endogenous Probe for CYP3A4 Inhibition, in Healthy Subjects. *Pharm Res*. 30(2):447-57 (2013)
4. Kusuhara H, Miura M, Yasui-Furukori N, Yoshida K, Akamine Y, Yokochi M, Fukizawa S, Ikejiri K, Kanamitsu K, Uno T and Sugiyama Y Effect of Coadministration of Single and Multiple Doses of Rifampicin on the Pharmacokinetics of Fexofenadine Enantiomers in Healthy Subjects. *Drug Metab Dispos*, 41(1):206-13 (2013).
5. Imai S, Kikuchi R, Kusuhara H and Sugiyama Y DNA Methylation and Histone Modification Profiles of Mouse Organic Anion Transporting Polypeptides. *Drug Metab Dispos*, 41(1):72-8 (2013)
6. Ito S, Kusuhara H, Kumagai Y, Moriyama Y, Inoue K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Tanabe K, Yuasa H and Sugiyama Y N-Methylnicotinamide Is an Endogenous Probe for Evaluation of Drug-Drug Interactions Involving Multidrug and Toxin Extrusions (MATE1 and MATE2-K). *Clin Pharmacol Ther* 92:635-641, 2012.
7. Yoshida K, Maeda K and Sugiyama Y Hepatic and Intestinal Drug Transporters: Prediction of Pharmacokinetic Effects Caused by Drug-Drug Interactions and Genetic Polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53:581-612 (2013)
8. 打田光宏, 土屋 敏行, 宇梶 真帆, 斎藤 嘉朗, 黒瀬 光一: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) を用いた医薬品のアレルゲン性評価. *Immuno Tox Letter*. Vol. 17, No. 2 (通巻 34 号), 5-6, 2012
9. Kurose K, Koizumi T, Nishikawa J, Maekawa K, Saito Y. :Quality requirements for genomic DNA preparations and storage conditions for a high-density oligonucleotide microarray. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (10), 1846-1848, 2012
10. Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S: An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, in press.
11. Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T: Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 29, 44-51 (2014).
12. Sasaki T, Takahashi S, Numata Y, Narita M, Tanaka Y, Kumagai T, Kondo Y, Matsunaga T, Ohmori S, Nagata K: Hepatocyte nuclear factor 6 activates the transcription of CYP3A4 in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 28, 250-259 (2013).
13. Nakamura K, Matsuzawa N, Ohmori S, Ando Y, Yamazaki H, Matsunaga T: Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 28, 38-43 (2013).
14. Matsunaga T, Maruyama M, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y, Ohmori S: Mechanisms of CYP3A induction by glucocorticoids in human fetal liver cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 653-657 (2012).
15. Tsuchiya H, Matsunaga T, Aikawa K, Kamada N, Nakamura K, Ichikawa H, Sasaki K, Ohmori S: Evaluation of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells for detection of CYP1A inducers. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 598-604 (2012).
16. Takezawa T, Matsunaga T, Aikawa K, Nakamura K, Ohmori S: Lower expression of HNF4 α and PGC1 α might impair rifampicin-mediated CYP3A4 induction under conditions where PXR overexpressed in human fetal liver cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 430-438 (2012).
17. Suzuki E, Matsunaga T, Aonuma A, Sasaki T, Nagata K, Ohmori S: Effects of hypoxia-inducible factor-1 α chemical stabilizer, CoCl₂ and hypoxia on gene expression of CYP3As in human fetal liver cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27, 398-404 (2012).
18. 岩尾岳洋, 松永民秀: 薬物動態研究におけるヒト多能性幹細胞の活用. *薬剤学*, 72 (2), 88-94 (2012).
19. 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の自動化に対応する全自動遺伝子解析装置の開発, *細胞* Vol 45 (3), 152-156, 2013
20. Hanioka N, Iwabu H, Hanafusa H, Nakada S, Narimatsu S. Expression and inducibility of UDP-glucuronosyltransferase 1As in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012;110(3):253-258.
21. Hanioka N, Tanaka S, Moriguchi Y, Narimatsu S. Stereoselective glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. *Pharmacology* 2012;90(3-4):117-124.
22. Hanioka N, Nonaka Y, Saito K, Kataoka H, Narimatsu S. Effect of aflatoxin B1 on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in

- HepG2 cells. *Chemosphere* 2012;89(5):526-529.
23. Nagaoka K, Hanioka N, Ikushiro S, Yamano S, Narimatsu S. The effects of N-glycosylation on the glucuronidation of zidovudine and morphine by UGT2B7 expressed in HEK293 cells. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012;27(4):388-397.
 24. Hanioka N, Takahara Y, Takahara Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Narimatsu S. Hydrolysis of di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in human liver microsomes. *Chemosphere* 2012;89(9):1112-1117
 25. Mayumi K, Hanioka N, Masuda K, Koeda A, Naito S, Miyata A, Narimatsu S. Characterization of marmoset CYP2B6: cDNA cloning, protein expression and enzymatic functions. *Biochem Pharmacol* 2013 85(8):1182-1194.
 26. Miyake Y, Mayumi K, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Narimatsu S, Hanioka N. cDNA cloning and functional analysis of minipig uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1. *Biol Pharm Bull* 2013;36(3):452-461.
 27. Kokawa Y, Kishi N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Narimatsu S, Hanioka N. Effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A8 polymorphism on raloxifene glucuronidation. *Eur J Pharm Sci* 2013;49(2):199-205.
 28. Yamamoto K, Mukai M, Nagaoka K, Hayashi K, Hichiya H, Okada K, Murata M, Shigeyama M, Narimatsu S, Hanioka N. Functional characterization of cynomolgus monkey UDP-glucuronosyltransferase 1A9. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, in press.
 29. Takahara Y, Kinashi Y, Takahara Y, Hichiya H, Okada K, Murata M, Shigeyama M, Hanioka N. Butylbenzyl phthalate hydrolysis in liver microsomes of humans, monkeys, dogs, rats and mice. *Biol Pharm Bull*, in press.
 30. Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M and Saito Y: Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet*. 27:447-450 (2012).
 31. 斎藤嘉朗, 前川京子, 鹿庭なほ子, 日本人を対象にしたゲノム・メタボローム解析によるバイオマーカー探索, *ファームステージ* 6: 1-4, (2012)
 32. 須藤チエ, 前川京子, 瀬川勝智, 花谷忠昭, 佐井君江, 斎藤嘉朗: 医薬品重篤副作用報告からみる薬物性肝障害の最近の動向. *国立医薬品食品衛生研究所報告* 133 :66-70(2012).
 33. Maekawa K, Futagami T, Kusunoki Y, Matsuzaki Y, Takikawa H: Identification of a novel HLA-B allele HLA-B*07:185 in a Japanese individual. *Tissue Antigens*, In press.
 34. 前川京子, 斎藤嘉朗, 薬物性肝障害の遺伝的素因, *医学のあゆみ* 248: 11-18 (2014)
 35. 斎藤嘉朗, 佐井君江, 鹿庭なほ子, 田島陽子, 石川将己, 最上(西巻)知子, 前川京子: バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けて. *薬学雑誌*, 133: 1373- 1379, 2013 .
 36. 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の普及に向けた全自動遺伝子検査装置の開発, *BIO Clinica Vol 28 (9)*, 69-73, 2013
 37. 宮下雪子, 上田哲也: 核酸検査の普及に向けた全自動遺伝子検査装置の開発, *細胞 Vol 45 (11)*, 537-541, 2013
 38. 宮下雪子, 上田哲也: タンパク質自動解析用ツールの開発, *酵素工学ニュース* 70 号, 26-30, 2013 年
- 2.学会発表
1. 打田光宏, 土屋敏行, 宇梶真帆, 斎藤嘉朗, 黒瀬光一: Human Cell Line Activation Test (h-CLAT) を用いた医薬品のアレルゲン性評価. 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会 (2012 年 9 月, 東京)
 2. 小玉菜央, 岩尾岳洋, 壁谷知樹, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 中村克徳, 松永民秀: 複数の低分子化合物はヒト iPS 細胞から機能性を持った小腸上皮細胞様細胞への分化効率を改善する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 (神戸).
 3. 岩尾岳洋, 近藤祐樹, 小玉菜央, 中村克徳, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 黒瀬光一, 松永民秀: 低分子化合物はヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化を促進する. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013 年 10 月 (東京).
 4. 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 荻原留理, 佐々木崇光, 永田 清, 黒瀬光一, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 山折大, 大森 栄, 中村克徳, 松永民秀: ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞の薬物動態学的機能. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013 年 10 月 (東京).
 5. 荻原留理, 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 山折大, 大森 栄, 中村克徳, 松永民秀: 低分子化合物組み合わせによるヒト iPS 細胞から胚体内胚葉への分化. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10 (東京).
 6. 松永民秀, 近藤祐樹, 荻原留理, 岩尾岳洋, 永田清, 黒瀬光一, 堀川隆司, 丹羽卓朗, 山折大, 大森 栄, 中村克徳: ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた薬物代謝酵素誘導評価. *フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー*, 2013.9 (福岡).
 7. 吉橋幸美, 近藤祐樹, 三森佳代, 荻原留理, 岩尾岳洋, 金濱吉範, 牧与志幸, 松永民秀: ヒト人工多能性幹細胞の肝細胞への分化における変法 L-15 培地及び血清の効果. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 (福岡).
 8. 岩尾岳洋, 中村克徳, 永田 清, 松永民秀: ペプチド輸送機能を有するヒト iPS 細胞由来腸管細胞の作製. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 2012.11.
 9. 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 吉橋幸美, 三森佳代, 杉山留理, 佐々木崇光, 永田 清, 黒瀬光一, 丹羽卓朗, 山折大, 大森 栄, 中村克徳, 松永民秀: 低分子化合物はヒト人工多能性幹細胞から肝細胞への分化を促進する. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 2012 年 11 月 (千葉).
 10. Iwao T, Nagata K, Matsunaga T: Differentiation into functional enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 19th Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 12th European Regional

- International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) Meeting, Jun. 2012 (Noordwijk aan Zee, The Netherlands).
11. 三宅祐加, 真弓慶, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: ミニブタ UGT1A1 の cDNA クローニング及び酵素機能. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山, 2012 年 5 月.
 12. 畠山和久, 花房弘之, 松永民秀, 黒瀬光一, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞における UDP-グルクロン酸転移酵素の発現解析. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山, 2012 年 5 月 18-19 日.
 13. 古川由貴, 岸直樹, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: 変異型 UGT1A8 酵素の機能: 7-ヒドロキシ-4-トリフルオロメチルクマリンを基質に用いた解析. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 岡山, 2012 年 5 月 18-19 日.
 14. 山本康平, 向井麻莉菜, 岸直樹, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 神野透人, 成松鎮雄: ヒト及びカニクイザル UDP-グルクロン酸転移酵素 1A9 の酵素機能比較第. 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 松江, 2012 年 11 月 10-11 日.
 15. 高原有香, 高原佑輔, 埴岡伸光, 成松鎮雄: フタル酸ジエステル類の代謝に関与する加水分解酵素の種差. 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 松江, 2012 年 11 月 10-11 日.
 16. 伊豆野祥太郎, 埴岡伸光, 綾野賢, 江尻洋子, 内藤真策, 成松鎮雄: Expression profiling of UDP-glucuronosyltransferases in HepG2 and MCF-7 cells cultured on micro-space plates. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉, 2012 年 11 月 20-22 日.
 17. 古川由貴, 岸直樹, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: Effect of UDP-glucuronosyltransferase 1A8 polymorphism on raloxifene glucuronidation. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉, 2012 年 11 月 20-22 日.
 18. 三宅祐加, 真弓慶, 神野透人, 香川(田中)聡子, 埴岡伸光, 成松鎮雄: cDNA cloning and functional characterization of miniature pig UDP-glucuronosyltransferase 1A1. 日本薬物動態学会第 27 回年会, 千葉, 2012 年 11 月 20-22 日.
 19. 畠山和久, 埴岡伸光, 黒瀬光一, 松永民秀, 成松鎮雄: ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞様細胞における UDP-グルクロン酸転移酵素の発現解析. 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月.
 20. 鬼無悠, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 神野透人, 成松鎮雄: フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの抱合反応に関与するヒト UDP-グルクロン酸転移酵素分子種. フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 福岡, 2013 年 9 月 13-14 日.
 21. 高須賀茜, 須野学, 伊藤雄大, 埴岡伸光: ヒト及びラット UGT1A8 を用いたミコフェノール酸グルクロン酸抱合反応の速度論的解析. 日本薬学会第 133 年会, 熊本 (熊本大学), 2014 年 3 月.
 22. 前川京子, 西川潤, 鹿庭なほ子, 杉山永見子, 小泉朋子, 黒瀬光一, 頭金正博, 斎藤嘉朗: 日本人におけるアロプリノール誘因性重症薬疹発症の危険因子 HLA-B*58:01 のサロゲートマーカー多型を対象としたタイピング系の構築, 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7) (仙台)
 23. 斎藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 杉山永見子, 黒瀬光一, 前川京子: 臨床的に重要な副作用のゲノム解析に関する取り組みの現況と今後のメタボロミクス解析の必要性等について. 第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7) (仙台)
 24. 楠原洋之 薬物トランスポーターによる細胞内からの排出輸送過程にお薬物相互作用の評価, 第 40 回 日本毒性学会学術年会, 千葉, 2013.6.17-19
 25. 楠原洋之 薬物トランスポーターの発現・機能変動に伴い血漿中濃度・尿中排泄が変動する代謝物の探索, 第 86 回日本生化学会大会, 東京, 2013.9.11~13
 26. 楠原洋之 薬物動態における薬物トランスポーターのインパクト, 第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 仙台, 2013.11.23~24
 27. 楠原洋之, 薬物トランスポーターの生理学的基質の探索, 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014.3
- G. 知的所有権の所得状況
1. 特許
 - 1.発明の名称: 人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法 (PCT 出願予定)
発明者: 松永民秀, 岩尾岳洋
特許出願人: 公立大学法人 名古屋市立大学
 - 2.発明の名称: 人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法
発明者: 松永民秀, 岩尾岳洋, 近藤祐樹, 吉橋幸美, 宮田直樹, 鈴木孝禎
国際出願番号: PCT/JP2013/065298
国際出願日: 2013 年 6 月 1 日
公開日: 2013 年 12 月 12 日
特許出願人: 公立大学法人 名古屋市立大学
 - 3.発明の名称: 人工多能性幹細胞を腸管上皮細胞へ分化誘導する方法
発明者: 松永民秀, 岩尾岳洋
出願番号: 特願 2013-036434
出願日: 2013 年 2 月 26 日
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学
 - 4.発明の名称: 人工多能性幹細胞を肝細胞へ分化誘導する方法
発明者: 松永民秀, 岩尾岳洋, 近藤祐樹, 吉橋幸美
出願番号: 特願 2012-131240, 2012-247010
出願日: 2012 年 6 月 8 日, 2012 年 11 月 9 日
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学
 2. 実用新案登録 該当無し
 3. その他 該当無し

安全性評価手法の新機軸：統合型毒性試験

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

山田 雅巳

平成24年4月～平成26年3月

研究要旨 *in vitro*試験法である蛍光細胞を用いる小核試験、全ゲノムの塩基配列を調べる手法等から、より多くの情報が得られることが示された。トランスジェニック動物を用いる遺伝毒性試験と一般毒性試験は統合するという結果を得た。*Pig-a*試験法は他の遺伝毒性試験結果とよい相関を示した。

研究組織

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所
山田雅巳、増村健一、石井雄二、堀端克良
- (2) 大阪府立大学 杉本憲治
- (3) サントリー・シネエクスパート㈱ 藤居 互
- (4) ㈱蛋白精製工業 平田大介
- (5) (一財)食品薬品安全センター・秦野研究所
須井 哉
- (6) 中外製薬㈱ 竹入 章
- (7) 日本エス・エル・シー㈱ 高木久宜
- (8) 帝人ファーマ㈱ 木本崇文、千蔵さつき
- (9) 第一三共㈱ 伊東 悟
- (10) 田辺三菱製薬㈱ 武藤重治
- (11) 科研製薬㈱ 真田尚和

A. 研究目的

ICHガイドラインにおいて医薬品の遺伝毒性評価の際には次の試験の組合せが標準バッテリーとされている。①微生物を用いる復帰突然変異試験②哺乳類細胞を用いる染色体異常試験③マウスを用いる小核試験。その中で①②は、動物を用いず、短時間に試験結果を得ることができる *in vitro* 試験法である。中でも、医薬品の開発初期において、少ない化合物量で多検体のスクリーニング試験を行うための微生物を用いた変異原性試験のハイスループット化、キット化等が強く望まれているが、まだルーチン化には至っていない。

一方、医薬品等化学物質の安全性評価には、これまで実験動物を多用する毒性試験が実施されてきている。その中で、従来の標準バッテリーでは評価できない多臓器での評価に関して、トランスジェニック (Tg) 動物を用いる遺伝毒性試験法が広まりつつあり、*in vivo* 遺伝子突然変異試験として、2011年に OECD ガイドライ

ンが公開された。この試験法を一般毒性試験にも応用できるように、これまでの HS 官民共同研究で F344 系統 *gpt*-delta Tg ラットが開発された (Environ Mol Mutagen, 41, 253-9, 2003)。それに加えて、新規 *in vivo* 試験法として、微量の血液サンプルで簡便に測定可能な *Pig-a* 試験法が注目されている。これまでの研究成果から改良法も検討され、国際バリデーション研究にむけての有用な知見が得られており (Environ Mol Mutagen, 52, 774-783, 2011)、今後は官民共同による標準化が求められる。

これらを踏まえ、本研究は次の三つを達成目標とする。(1) 統合型試験法として、2011年に OECD ガイドラインが公開された Tg 動物遺伝子突然変異試験を一般毒性試験へ組み込むことを視野に入れて、その科学的根拠となる基礎データの取得および、評価手法の確立、(2) 動物個体を用いない *in vitro* 代替試験法について、遺伝毒性メカニズムに基づき、小核試験の可視化、ゲノム全体の解析などを中心に新しい手法の開発、(3) 新規 *in vivo* 試験法である *Pig-a* 試験法について、民間を中心に改良法のバリデーション研究を進め、標準化を目指すと共に、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討。

B. 研究方法

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] トランスジェニック蛍光細胞を用いた小核試験代替法の確立

マウス胎児線維芽細胞株 (m5S) 由来の Tg 蛍光細胞である m5S (mCherry-H3 A14-6) を使用した。細胞の培養には 15% FBS 添加の D-MEM 培地を用い、薬物処理に際しては、あらかじめ 35 mm のガラスボトムディッシュまたは 3 ウェルプレートに

植え、炭酸ガスインキュベータ内で1晩培養したものを用いた。電動式 XY ステージを用いて多点観察することで、各ウェルあたり複数の視野の画像を取得した。連続して2回細胞分裂する細胞系統に注目し、細胞周期(=細胞分裂までに要する時間)を求めた上で、細胞周期を1.5倍に遅延する薬剤濃度(ECC_{1.5})をグラフから求めた。薬剤として、溶媒のDMSOを含め、daunorubicin、phenol、capsaicin、estragole(ES)を使用し、ECC_{1.5}の濃度で培地に加え、24時間後に新たな培地と交換することで薬物を除去した後、ガラスボトムディッシュを顕微鏡保温装置に設置し、6分間隔で65時間継続してタイムラプス観察により小核の形成頻度を測定した。

[山田] ホールゲノムシーケンシングを用いた遺伝毒性試験法の研究

Ames試験の標準株の一つである *Salmonella typhimurium* TA1535 の ϕ -メチルグアニン DNA メチル転移酵素を欠損させた株、YG7108 (アルキル化剤に特異的に高い感受性を示す)を用いて、アルキル化剤であるエチルニトロソ尿素(ENU、用量は0、50および250 $\mu\text{g}/\text{plate}$)について従来の手法でAmes試験を実施した。溶媒対照(DMSO)とENUで処理したプレートからそれぞれランダムに4個ずつ復帰変異コロニーを選び、個別に一夜培養液を用意し、ゲノムDNAを調製した(①)。TA1535を用いENU(250 $\mu\text{g}/\text{plate}$)について、従来の手法でAmes試験を実施し、最小培地に復帰変異コロニーを得た。途中、プレインキュベーション直後の混合液から1 μl 分取して 10^6 希釈し、0.1 mlをLB培地に播き37°C、一夜培養でコロニーを得た。それぞれの培地、条件ごとにランダムに選んだ3コロニーをLB培地で培養し、ゲノムDNAを調製した(②)。ホールゲノムDNAの塩基配列は、ハイ・スループットDNAシーケンサーMiSeq(Illumina, San Diego, CA)による1回のランで解析した。

[須井] 実用的ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の構築

①被験物質として、Ames試験陽性対照物質であるAF-2とBenzo[a]pyrene(B[a]P)を用いて従来用いていた菌数の1/10を処理(37°C、170 rpm、90分)した後、本培養(37°C、170 rpm、90分)を行った。Indicator mediumを添加した後、反応液を384穴マイクロプレートへ分注した。

②5種の検定菌(*S. typhimurium* TA100、

TA1535、WP2uvrA、TA98およびTA1537)から2種を選択して混合菌液を作製し、Ames試験(プレート法)を行った。

[平田] バクテリアを用いた代替毒性試験法の開発とその評価に関する研究

①CYP1A2のアミノ酸配列の中で、抗体特異性が高い部分2か所について合成ペプチドを作製し、抗原性刺激の強いキャリアタンパク質であるKeyhole Limpet Hemocyanineと、架橋剤N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimideで結合した、2種類の抗原蛋白を作製した。それらを等量子雲合して、Complete Freund's adjuvantによりエマルジョンにし、ウサギ(日本白色種)の背部に2週間隔で計6回接種して、抗ヒトCYP1A2ウサギ抗血清を得た。得られた抗血清はELISA法により力価の有無および抗原特異性の強弱を確認したのち、抗原カップリングアフィニティーカラムで精製した。抗原として、ヒト型CYP1A2を発現するプラスミドを保持する株*S. typhimurium* OY1002/1A2を培養し、1 mM IPTG、5 mM δ -アミノレブロン酸、およびトレースエレメントを添加したのち、37°Cで1時間培養後、氷冷して集菌し、リゾチーム、10% Bugbuster®溶液で溶菌後、上清を超遠心して得られたペレットを用意した。ウェスタンブロットは常法に従った。

②被験物質として、代謝活性化を経て遺伝毒性を示すことが知られるTrp-P-1、Trp-P-2、IQ、Glu-P-1、MeIQを、試験菌株として、ヒト型薬物代謝酵素を発現するようプラスミドを導入したumu試験菌株OY1002/1A2およびそれにシャペロンプラスミドを導入したOY1002/1A2/pKJE7を用いて、umu試験を実施した。同じ化合物について、TA98とTA100を用いてラットS9mix存在下でAmes試験を実施した。各試験結果から最小検出感度を算出し比較した。

(2) Tg ラット・マウスを用いた統合型毒性試験法および評価手法の確立

[石井] トランスジェニック動物を用いた一般毒性・遺伝毒性統合試験系の検討

①6週齢のF344 *gpt* delta ラット(雄)および野生型F344ラットにESを3、30及び300 mg/kg/dayの用量で4週間強制経口投与した。主要臓器を肉眼的に観察後摘出し、常法に従ってヘマトキシリンエオジン染色を施した。各臓器の残りは凍結保存後、ES特異的DNA付加体の測定及び*gpt*及びSpi⁻ assayに供した。ES特異的DNA付加体の測定は、各臓器から抽出したDNAをヌクレア

ーゼ P1 及びアルカリフォスファターゼ処理によりデオキシヌクレオシドまで分解し、ES-3'-N2-dG、ES-3'-8-dG 及び ES-3'-N6-dA 付加体を LC-MS/MS にて測定した。

②6 週齢の雌雄 F344 *gpt delta* ラット各 75 匹及び対照群としてその野生型の雌雄 F344 ラット各 75 匹を、CRF-1 固形基礎飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水で 104 週間飼育した。一般状態の観察を連日実施し、体重は開始から 13 週目までは週 1 回、14 週目以降からは月 1 回測定した。各臓器は肉眼的に観察後摘出し、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。

[藤居] F344 系 *gpt delta* ラットを用いた突然変異試験と小核試験の統合法の検討

7 週齢の F344 系統 *gpt delta* 雄ラットに、被験物質 Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) を溶媒、オリーブ油に溶解して、0 (陰性対照)、31.25 および 62.5 mg/kg の投与量とし、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。投与前日 (day0) および day4, 15, 29 に末梢血を採取し、小核試験に供した。投与最終日の翌日および 3 日後に肝臓、大腸、骨髄を摘出し、-80℃で凍結保存した。肝臓、大腸 (結腸)、骨髄についての小核試験および骨髄と大腸の *gpt* アッセイ (点突然変異検出) を定法に従い、後日実施した。

[高木] 遺伝毒性試験用 *gpt delta* ラットの系統比較

①5 週齢雌雄の Slc:WistarHannover/Rcc-Tg(*gpt delta*) (以下 WH-TG) およびその背景系統である Slc:WistarHannover/Rcc (以下 WH-WT) を用いて 13 および 26 週間飼育試験を行った。飼料は 5002 Certified Rodent Diet (PMI Nutrition International : U.S.A.) を、飲水は塩素消毒した井戸水を自由摂取させた。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、26 週後に各群 20 匹を安楽死させた。血液学的検査、血清生化学的検査に加えて、各種臓器の重量測定およびホルマリン固定を行い、病理組織学的検索を実施した。

②SD-Tg(*gpt delta*)についても、その背景系統と共に、安全性試験に準じた 12 ヶ月飼育試験を行い背景データを得た。

[竹入] DNA ポリメラーゼ改変マウスおよび培養細胞を用いた遺伝毒性評価に関する研究

DNA ポリメラーゼ kappa ($\text{pol } \kappa$) を不活性化した *gpt delta* マウス ($\text{pol } \kappa$ KI) 及び、*gpt delta*

マウス ($\text{pol } \kappa^+$) に、クロスリンク剤である mitomycin C (MMC、用量 1 mg/kg/day) および cisplatin (CDDP 用量 3 mg/kg/day) を、1 日 1 回、5 日間反復腹腔内投与した。MMC 投与群は最終投与の 3 時間後に安楽死させ、全身諸臓器を採取し、ヒストン H2AX のリン酸化を指標に DNA 損傷を評価した。CDDP 投与群では、最終投与から 1 あるいは 4 週間の休薬後、主要臓器を採取し、*gpt* アッセイおよび Spi⁻アッセイにより遺伝毒性を評価した。MMC 投与群について、病理組織学的検索を行った。

[増村] 改良型 *gpt delta* マウスを用いた高感度試験系の検討

①*in vivo* 変異原性の基礎データを得るため、遺伝毒性試験用 *gpt delta* マウスおよび $\text{Pol } \kappa$ KI マウス (=改良型 *gpt delta* マウス) を化学物質で処理せず飼育し、*gpt delta* マウス (= $\text{Pol } \kappa^+$) は 4、26、52、78、104 週齢の雄について、 $\text{Pol } \kappa$ KI マウスは 52 週齢の雌雄について、肝臓および精巣を用いて、*gpt* アッセイにより点突然変異頻度を測定し、得られた変異体の塩基配列解析を行って突然変異を同定した。同一個体同一組織から複数の同一変異が検出された場合は、クロナル変異の可能性を除き、独立した突然変異数を計算して突然変異頻度 (*gpt* mutation frequency) を算出した。突然変異をタイプ別に集計し点突然変異スペクトルをまとめた。同じサンプルについて Spi⁻欠失変異体のシークエンス解析を行った。

②*gpt delta* マウスおよび $\text{Pol } \kappa$ KI マウスに B[*a*]P を経口投与し 8 週間後の大腸における *gpt* 点突然変異体頻度を測定した。

(3) *Pig-a* アッセイの標準化および、統合型遺伝毒性試験への組み込みの検討

◎*Pig-a* 遺伝子突然変異試験

(1) *Pig-a* アッセイ

- 血液 3 μL を 0.2 mL の PBS(-) と混和し、抗ラット CD59 抗体および抗ラット HIS49 抗体と室温で 1 時間反応させ、3000 rpm で 5 分間 (室温) 遠心分離し、上清の除去及び沈査の攪拌。Streptavidin-Allophycocyanin を含む PBS(-) 2 mL と 15 分間、室温で反応。
- 反応後、室温、3000 rpm で 5 分間、遠心分離し、上清を除去した後、PBS(-) に再懸濁したもののについて、*Pig-a* 遺伝子突然変異体頻度の解析。

(2) PIGRET

- 血液 80 μL を 100 μL の PBS(-) と混和し、3 mL の Lympholyte-Mammal を用いて白血球を分離。
- 2500 rpm で 20 分間 (室温) 遠心分離し、抗ラット CD71 抗体と 4℃で 15 分間反応させた後、

2 mL の IMag™ Buffer を加え、3000 rpm で 5 分間 (室温) 遠心。

- 上清除去後、50 μ L の PE Particles Plus-DM を加えて 4°C で 15 分間処理。
- 1 mL の IMag Buffer を加え、BD IMagnet™ を用いて 6 分間静置し、CD71 陽性赤血球を濃縮する。同様の操作を 2 分間ずつ 2 回繰り返す、200 μ L の PBS (-) を添加。
- その後、上記(1)の手法で抗ラット CD59 抗体及び抗ラット HIS49 抗体と反応させたものを解析。

(3) 解析方法

・フローサイトメーターを用いて、FITC 標識抗ラット CD59 抗体、PE 標識抗ラット CD71 抗体及び APC で標識した抗ラット HIS49 抗体と反応させた細胞を、アルゴンレーザー光 (488 nm) で励起し、それぞれ FL1 (530/30 nm), FL2 (650 nm) 及び FL4 (653/669 nm) で蛍光を測定し、解析。

(4) 評価

・全赤血球 100 万個に対する CD59 陰性赤血球数の出現頻度 (*Pig-a* Mutant Frequencies: *Pig-a* MF) を求め、媒体対照群と各用量の被験物質群との有意性について Dunnett 型の多重比較 (片側 5%) を実施。

◎反復投与毒性試験への組み込みプロトコールの検討および単回投与試験との比較

[千蔵] Cyclophosphamide (CP)

SD ラット (雄、7 週齢、N=6/group) に CP の単回経口投与 (20、50 mg/kg) もしくは、28 日間反復経口投与 (2.5、5、10 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14、28 日目に採取した血液を用いて *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により *Pig-a* MF を取得した。併せて一般状態観察し体重測定を行った。Day 29 に安楽死処置し、腹部大動脈より採取した血液を用いて臨床検査を実施した。

[伊東] Ethyl methanesulfonate (EMS)

SD ラット (雄、7 週齢、各群 5 匹) に EMS の単回経口投与 (360、720 mg/kg) もしくは反復経口投与 (25、50、100 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14 日目 (反復経口投与については 28 日目も) に尾静脈より採取した血液を用いて、*Pig-a* アッセイ (反復経口投与) および PIGRET 法 (単回経口投与) により *Pig-a* MF を取得した。

[武藤] Methyl methanesulfonate (MMS)

SD ラット (雄、6 週齢) に MMS の単回経口投与 (50、100、200 mg/kg) もしくは反復経口投与 (7.5、15、30 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14、28 日目に尾静脈より採取した血液を用いて、*Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により *Pig-a* MF を取得した。さらに、末梢血小核試験に用いた

め、上記とは別に単回投与試験、28 日間反復投与試験においてそれぞれ投与開始 2 日後、4 日後に尾静脈より採血した。

[真田] 4,4'-methylene dianiline (MDA)

SD ラット (雄、6 週齢) に MDA の単回経口投与 (各群 5 匹、13、40、120、240 mg/kg) もしくは反復経口投与 (各群 6 匹、4.4、13、40、120 mg/kg/day) を実施し、投与前および投与後 7、14、28 日目に尾静脈より採取した血液を用いて、*Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法により *Pig-a* MF を取得した。いずれの試験においても陽性対照物質として ENU を単回経口投与 (40 mg/kg) し、7、14 日後に採血し同様にアッセイに供した。

○*Pig-a* アッセイによる放射線遺伝毒性評価 [堀端]

C57BL/6 マウス (雄、8 もしくは 3 週齢、一群 5 匹) にガンマ線を、0、2、4 Gy の単回照射した群と、20 mGy/22h/day および 400 mGy/22h/day で 28 日間連続照射した群とについて、それぞれ照射前、照射後 2、4、8-10 週に尾静脈より採血を行ない *Pig-a* アッセイを実施した。陽性対照群として ENU (40 mg/kg) を単回強制経口投与した。放射線照射による造血サイクルへの影響を評価するために、抗 CD71 抗体を用いて幼若赤血球の割合を調査し、骨髄抑制をモニターした。マウスへの放射線照射は環境科学技術研究所生物影響研究部の協力を得て実施した。

◎*gpt-delta* トランスジェニックラットを用いる *Pig-a* アッセイおよび PIGRET 法 [堀端]

WistarHannover を遺伝的背景とする *gpt-delta* ラット (雄、8 週齢、一群 5 匹) に ENU (40 mg/kg) を単回強制経口投与し、投与前、投与後 1、2、4 週目に尾静脈より採血し、4 週目に臓器を採取した。末梢血サンプルを用いて PIGRET 法により幼若赤血球の、さらに、従来の *Pig-a* アッセイにより全赤血球の *Pig-a* MF をそれぞれ算出した。また、臓器 (骨髄及び肝臓) を用いて *gpt* アッセイを実施し、遺伝子変異体頻度を測定した。

(倫理面への配慮)

ヒトのサンプルを用いた実験は実施していない。動物実験は、各参加機関における動物実験委員会の承認に基づき、動物実験の適正な実施に関する規定等を遵守して実施した。

C. 研究結果

(1) *in vitro* 代替試験系を多方面から改良

[杉本] ダウノルビシンを細胞周期を停止させない濃度 (25、50、100 nM) で 24 時間処理し、薬剤を除去して 48 時間後の小核の形成頻度を