

201433009A (1/4)

厚生労働科学研究委託費

創薬基盤推進研究事業

医薬品等の品質・安全性確保のための
評価法の戦略的開発

平成26年度 委託業務成果報告書 (第1分冊)

医薬品品質管理手法の高度化に対応した医薬品製剤の評価技術の開発

(H26 - 創薬 - 一般 - 009)

受託者 (研究代表者) 合田 幸広

平成27 (2015) 年3月

本報告書は、厚生労働省の創薬基盤推進研究事業による委託業務として、合田 幸広が実施した平成26年度「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I 総括研究報告書

医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発
合田 幸広

.....1

II 分担研究報告書

成果発表会開催等の成果活用

高柳 輝夫

.....65

1. 医薬品品質管理手法の高度化に対応した医薬品製剤の評価技術の開発（Iグループ）

リポソーム製剤の薬効・安全性に関わる品質特性評価研究

加藤 くみ子

.....67

医薬品・製剤添加物の体内動態支配要因の解析

楠原 洋之

.....71

ポリマー精密設計に基づくナノ医薬品の機能最適化

西山 伸宏

.....75

ナノ化技術を用いたタンパク製剤の効率的な封入方法とその評価法に
関する研究

小崎 雅人

.....81

先端的分析評価法を用いた製剤開発及び製造工程管理に関する研究

香取 典子

.....89

原薬及び製品の品質に影響する物性評価法の開発

寺田 勝英

.....101

難水溶性薬物製剤の製剤特性評価技術の開発

阿曾 幸男

.....107

難溶性薬物の過飽和溶解と安定化メカニズムの評価

森部 久仁人

.....125

共非晶質医薬品の構造安定性に及ぼす物理化学的因子に関する研究

村主 教行

.....133

非晶質製剤の安定性評価技術の開発

大原 求

.....139

コアモルファス製剤の保存安定性と製剤の熱力学的パラメーターの研究

池田 幸弘

.....147

生体内環境を反映した製剤機能の評価法と製剤技術に関する研究	
伊豆津 健一153
製剤の微小構造評価法と機能特性に関する研究	
米持 悦生163
リポソーム製剤の機能評価法に関する研究	
吉田 英人169
リムルス試験による樹状細胞等を用いたエンドトキシン測定法の検証に関する研究	
菊池 裕173
エンドトキシン測定法に用いるヒト iPS 細胞由来樹状細胞の樹立に関する研究	
遊佐 精一177
オゾン過酸化水素混合ガス滅菌法とエンドトキシン等発熱性物質不活化に関する研究	
山村 隼志181
ヒト iPS 細胞由来樹状細胞の解析とエンドトキシン測定法への適用に関する研究	
辻 勉187
III 研究成果の刊行に関する一覧表191

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

研究代表者 合田幸広（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長）

研究要旨 品質や安全性が確保された新規な医薬品をいち早く創出するためには、医薬品のライフサイクルを見据え、それぞれの医薬品の特性や機能に応じて、科学的体系的な考え方にに基づき、医薬品の品質・安全性を評価するシステムを戦略的に構築する必要がある。特に革新的医薬品は高度に複雑な品質特性や製造プロセスを有することから、先端的分析手法を評価・標準化し、品質保証システムに導入することが希求されている。本研究は、大きく4グループ（Ⅰ 医薬品製剤、Ⅱ 先端的バイオ医薬品、Ⅲ 核酸医薬品、Ⅳ 天然物医薬品）に分かれ、各グループが、各分野で医薬品創出の隘路となっている品質・安全性評価のための基礎的データを収集し、最新の科学的知見を取り入れた、品質・安全性確保のための評価法について、日本の承認審査のシステムをよく理解した上で、戦略的に開発するものである。本研究は、承認申請等において要求される技術要件や評価法の検討を行っている国立衛研の研究者と、製品開発に豊富な経験を有する企業の研究開発技術者、技術要件を支える基盤的研究を行っているアカデミアの研究者が互いに協力し合い実施するところに、最大の特色がある。

本年度のグループ毎の進捗状況は以下の通りである。

Ⅰ 医薬品品質管理手法の高度化に対応した医薬品製剤の評価技術の開発

先端的 DDS 製剤の製剤機能評価研究では、低分子薬物、siRNA、タンパク質を内包した高分子ミセルやリポソームについて、キャリア成分の組成や化学構造の検討を行うとともに、疾患モデル動物や細胞株による薬理活性に関わる製剤特性（有効成分の内包、標的性等）について評価手法を検討中である。また、薬物トランスポーター等の医薬品の製剤機能に重要な生体内因子について機能評価系を検討中である。なお、本研究で得られた知見も参考として、リポソーム製剤に関するガイドライン原案及び siRNA 搭載ナノ製剤に関するレフレクションペーパー原案が作成されつつある。

また、先端的分析評価法を用いた製剤開発及び製造工程管理に関する研究では、以下の検討を行った。弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の評価系を、溶出試験装置を用いて構築した。溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的として、動的散乱法を用いた粒度分布測定装置の有用性を評価した。塩化合物の固有溶解度および pKa より脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の改良を行い、判定精度をより高めた。近赤外イメージングシステムにより製剤均一性の評価を行った。テラヘルツ分光法により OD 錠の吸湿の影響について評価を行った。さらに、製造工程を管理する先端的手法について以下の検討を行った。連続製造において、リスクアセスメントにより製剤品質に影響を与える重要品質特性を特定した。また近赤外分光法を用いた連続製造のリアルタイムモニタリングについて、適切な測定部を試作、測定を行い、測定方法に関

する幾つかの知見を得た。テラヘルツ帯受信機を用いたコーティング工程のリアルタイムモニタリングの可能性を示した。

難水溶性薬物製剤の製剤特性の評価技術の開発では、難水溶性薬物製剤として注目を集めている非晶質化製剤、コアモルファス製剤の構造安定性に及ぼす物理化学的因子として、混合エンタルピーが重要な役割を果たしていることが判明した。また、非晶質化製剤からの薬物の溶解速度は薬物と高分子との相溶性に大きく依存することが明らかとなった。これらの因子は、今後安定で優れた溶出特性を有する難水溶性薬物製剤設計に役立つことになる。

生体内環境を反映した製剤機能の評価法と製剤技術に関する研究では、医薬品の投与経路における生体内環境を反映した製剤の *in vitro* 機能特性評価法の構築を目的に、消化管内、血管内および呼吸器系をモデルとしたシステムについて検討した。放出制御形製剤の評価に有用とされるフロースルー型溶出試験装置について、研究室間の共同試験を行い、セル内外における温度差により生じる試験液流の乱れの抑制が、評価に重要なことを明らかにした。医薬品の消化管内における吸収モデルとして、膜成分を含む懸濁液を用いた簡易型の 2 画分システムの活用について検討した。リポ化製剤からの薬物放出 *in vivo* 評価に血漿を活用し、主薬の pKa の影響が大きいことを明らかにした。

iPS 細胞等由来樹状細胞を用いたエンドトキシン等発熱性物質検出法の開発では、当初の予定どおり、単球活性化試験法 (MAT) に適切な樹状細胞を得るために、ヒト末梢血より単球を単離し、*in vitro* で樹状細胞を製造した。また、エンドトキシン等発熱性物質の不活性化法として、乾燥状態のエンドトキシンにオゾン過酸化水素混合ガスを暴露する添加回収実験を行い、その有用性を確認した。

II 先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発

バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究では、O-結合型糖鎖試験法の標準化を目的に、非還元アルカリ β -脱離法の最適化を行った。また、バイオ医薬品の不純物評価に関する研究では、光遮蔽法を含む 6 種類の凝集体評価法について、粒子径標準粒子を試料とした分析能の比較を行い、各評価法の特徴を明らかにするとともに、バイオ医薬品注射剤の不溶性微粒子試験法に関し、試験の低容量化に必要な課題を明らかにした。

新たな生産基材により生産されるバイオ医薬品の品質安全性評価に関する研究では、新たな生産基材トランスジェニック (Tg) カイコの品質要件を明らかにするため、カイコ繭タンパク質を定量するための ELISA を構築し、トランスジェニック (Tg) カイコ由来バイオ医薬品の不純物評価法としての有用性を明らかにした。また、Tg カイコ卵巣及び精巣の採取・凍結・再移植技術を開発し、Tg バンク凍結保存の運用試験を開始した。

液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) によるバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発では、抗体医薬品を対象とした血中濃度薬物分析において、前処理等の違いが分析法バリデーション結果に及ぼす影響を多機関共同研究により検証した。

リガンド結合法によるバイオ医薬品の免疫原性評価法の開発と標準化では、免 LOCI 法あるいは

ECL 法を用いた抗薬物抗体分析において、共存薬物による妨害の回避のために有用な前処理方法を見出した。また、WHO が主催する抗薬物抗体国際標準品の共同検定に参加した。

バイオ医薬品の安全性の分析・評価法研究では、医薬品副作用データベースに登録された抗体医薬品に関する有害事象を解析し、インフリキシマブでは 30 代または乾癬、セツキシマブ及びリツキシマブでは 60 代以上が infusion reaction のリスク因子である等の可能性を見出した。

新規ウイルス安全性評価技術の開発では、CHO 細胞が産生する内在性レトロウイルス様粒子の遺伝子が ChERV-050801 であることを明らかにした。Q-PCR を用いたウイルス試験において、残存するウイルスゲノム断片を nuclease で分解することによって、ウイルス感染価との相関性を確保できることを明らかにした。

III 核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発

核酸医薬品のオフターゲット効果評価法開発においては、近年開発が進んでいる「スプライシング制御型アンチセンス」のオフターゲット効果について「スプライシングの変化を検出するポテンシャルを有する“高密度エクソンアレイ”が安全性評価の標準法に成り得るか」を検証した。さらにこの過程で、「スプライシング制御型アンチセンスとどの程度の相補性を有する RNA のスプライシングが影響を受けるのか」についても検証を行った。この結果、高密度エクソンアレイによりスプライシング制御型アンチセンスによるオフターゲット効果を感度よく検出できることを明らかにした。また、「スプライシング制御型アンチセンスにより影響を受ける RNA の配列条件」を明らかにし、この条件がアンチセンスの塩基長によって変化することを示した。

核酸医薬品の自然免疫活性化評価法に関しては、「市販の Toll-like 受容体導入細胞がスプライシング制御型アンチセンスの自然免疫活性能を評価できるか」について検証を行った。具体的には、近年アンチセンス医薬品の塩基長が短くなっていることを考慮し、短い塩基長（14-18 塩基長）で Toll-like 受容体を活性化するポジティブコントロールのオリゴ配列を決定した。さらに、高機能性を付与する人工核酸を当該配列に導入することで、スプライシング制御型アンチセンスとして機能するオリゴ核酸をデザインし、これらのオリゴ核酸の自然免疫能を Toll-like 受容体導入細胞を用いて解析した。

IV 天然物医薬品の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

センブリやケイヒ等の単味製剤として利用されてきた生薬に関して、煎出液と生薬エキスの同等性を評価する手法について検討し、近々に医薬食品局審査管理課より発出予定の「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」の原案を策定した。西洋ハーブである赤ブドウ葉について、一般用医薬品及び健康食品として流通する製品について LC-MS による成分比較を行った。葉類生薬ハッカ等については、国内市場品を広く収集して成分分析を行った。国内市場に局方不適合種の流通が明らかとなったボウフウについては、遺伝子情報を利用した純度試験法案を作成した。テンナンショウの掌葉半夏に対する純度試験法案の作成も並行して進めている。また、ジンギョウの基原鑑別法を開発するため、中国各所で採集したサンプルを対象に遺伝子解析を行った。マオウエキスの疼痛抑制作用を有意に示す画分について、カラムクロマトグラフィーによる分画・精製を行い、

現段階で3成分を単離した。マオウ含有漢方処方品質評価手法の確立を目指し、マオウの疼痛抑制作用について薬理的な検討を行った結果、受容体型陽イオンチャンネルTRPV1を脱感作させることで鎮痛作用を発現させることが明らかとなった。さらに、TRPV1活性を指標としたショウキョウ、カンキョウの品質評価を行った。

研究分担者

I グループ

加藤 くみ子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部室長

楠原 洋之 東京大学大学院薬学系研究科 教授

西山 伸宏 東京工業大学資源化学研究所 資源化学研究所高分子材料部門 教授

小崎 雅人 興和株式会社富士研究所主任研究員

香取 典子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部室長

寺田 勝英 東邦大学薬学部 教授

阿曾 幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部室長

森部 久仁一 千葉大学大学院薬学研究院製剤工学 教授

村主 教行 塩野義製薬株式会社 CMC 開発研究所 製剤研究センター主席研究員

大原 求 第一三共株式会社 製薬技術本部分析評価研究所 所長

池田 幸弘 武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 主席研究員

伊豆津 健一 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部室長

米持 悦生 星薬科大学医薬品化学研究所 教授

吉田 英人 キューピー株式会社研究開発本部 技術研究所 機能素材研究部チームリーダー

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生

微生物部室長

遊佐 精一 テラ株式会社 執行役員, 研究開発部部長

山村 隼志 株式会社 IHI 生物・化学プロセスグループ課長代理

辻 勉 星薬科大学 教授

II グループ

川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部室長

石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部室長

山口 秀人 アステラス製薬株式会社バイオ技術研究所プロセス第二研究室主管研究員

中家 修一 株式会社島津製作所主任

奥村 渉 株式会社住化分析センターファーマ大阪事業所

鳥巢 哲生 武田薬品工業株式会社 CMC 研究センター光バイオ技術室

古賀 淳一 第一三共株式会社 執行役員研究開発本部バイオ統括部長

寺島 勇 中外製薬株式会社 CMC 開発部グループマネージャー

水野 保子 株式会社東レリサーチセンター 医薬信頼性保証室マスター

横山 毅 一般社団法人日本血液製剤機構 研究開発本部中央研究所蛋白精製研究室 主査

富田 正浩 株式会社免疫生物研究所 藤岡研究所 執行役員 部長

大庭 澄明 持田製薬株式会社製剤研究所 副部長

内山 進 株式会社ユー・メディコ 取締役

秦 信子 株式会社 Ig-M 神戸本社研究室研究開発部マネージャー

菊池 慶実 味の素株式会社バイオ・ファイン研究所 Corynex グループ長

南出 善幸 株式会社島津テクノリサーチ 医薬ライフサイエンス事業部 部長

中村 隆広 株式会社新日本科学安全性研究所 研究統括部 部長

井上 則子 株式会社 JCL バイオアッセイ 常務取締役研究部長

橋本 勉 株式会社 LSI メディエンス 創薬支援事業本部 グループリーダー

豊島 聰 武蔵野大学薬学部 特任教授

瀬筒 秀樹 独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット長

伊藤 孝司 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

武田 茂樹 群馬大学大学院理工学府分子科学部門 教授

遊佐 敬介 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 室長

坂井 薫 一般社団法人日本血液製剤機構研究開発本部 中央研究所感染性病原体研究室室長

IIIグループ

井上 貴雄 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部室長

飯村 信 第一三共株式会社研究開発本部 ・ バイオ統括部・バイオ研究企画 G 主査

高垣 和史 日本新薬株式会社 創薬研究所・東部創薬研究所・リーダー

山本 誠司 扶桑薬品工業株式会社研究開発センター・バイオテク研究部門・主任研究員

IVグループ

袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部部長

木内 文之 慶應義塾大学薬学部天然医薬資源学講座 教授

伊藤 美千穂 京都大学大学院薬学研究科 准教授

丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部室長

小松 かつ子 富山大学和漢医薬学総合研究所 教授

花輪 壽彦 北里大学東洋医学総合研究所 所長

天倉 吉章 松山大学薬学部 教授

高柳 輝夫 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 理事長

A. 研究目的

品質確保は、医薬品の有効性と安全性保証の基本である。従って、医薬品では、そのライフサイクルの様々な段階で品質確保のための厳しい規制が実施されている。他方このような規制は、医薬品開発における隘路の一つとなっている。

例えば、製薬企業は、最終製品において一定の品質規格を満たすだけでなく、あらかじめ規制当局から承認された製造工程パラメータを用いて製造しなければならない。他方、ミセル製剤やナノ粒子製剤に代表される新規機能性製剤や、バイオ医薬品等の分野では製造技術革新が著しく、科学的体系的な考えの下で、製造工程パラメータについて弾力的に運用することが求められている。そのためには、製品とプロセスを詳細に分析し、プロセスの修正が製品品質に悪影響を及ぼさないことを保証する手法を確立することが必要である。

また、バイオ医薬品では、生体を合成系に利用すること、有効成分がタンパク質であること等に起因する品質確保の為の課題が多く存在する。特に先端的な製品では構造等が複雑化し、従来からある品質・安全性評価法では対応出来ないことが多い。また、現在開発が進んでいる核酸医薬品では、標的としない遺伝子の発現を制御してしまうオフターゲット効果の評価法や判断基準が未整備で、これらも開発の隘路となっている。さらに天然物医薬品では、多成分系のため、製造工程管理はもとより素材や最終製品において成分全体をとらえ品質管理を行うことが期待され、新たな品質評価手法の確立が求められている。

医薬品は規制下に生産されるため、新規な医薬品の創出を効率的に推進するためには、生産段階まで見据えて、長期にわたる医薬品のそれぞれの開発段階において、配慮すべき技術要件を明確にする必要がある。さらに承認審査時等に利用される品質評価法や品質確保のための具体的な基準等、新規医薬品の特性に応じた、品質確保手法の確立が必要となる。

本研究は、前述した新規医薬品開発時の様々な課題を克服し、医薬品の開発推進と承認審査の迅速化を目的としたもので、承認申請等において要求される技術要件や評価法の検討を行っている国研の研究者と、製品開発経験の豊富な企業研究者、技術要件の基盤的研究を行う大学の研究者が共同研究体制を組み、標準となる技術要件を明らかにする基礎データを収集すると共に、最新の科学的知見を取り入れた、品質・安全性確保の為の評価法について、日本の承認審査システムをよく理解した上で、戦略的に開発するものである。

B. 研究方法

B-1 医薬品品質管理手法の高度化に対応した

医薬品製剤の評価技術の開発(Iグループ)

B-1.1. 先端的 DDS 製剤の製剤機能評価手法研究

リガンド分子搭載ナノ医薬品の合成スキームの検討: Acetal-PEG-poly(L-lysine) (Acetal-PEG-PLys) を合成し, Acetal-PEG-PLys の側鎖に TFA-NH-PEG-COOH を反応させ, 側鎖に PEG スペーサーを介して 1 級アミノ基を有するプラットフォームポリマーを合成した。さらに Fmoc-MAP(8)-Cys(Acm)- β Ala-Wang Resin に Boc-PEG-NHS を反応させ, ヨウ素による Acm 基の脱保護, トリフルオロ酢酸による Boc 基の脱保護と樹脂からの切り出しを行うことにより, デンドリマーを基本骨格とする合成リガンドプラットフォームを合成した。

タンパク質医薬品のナノ粒子構造体への効率的な封入方法の検討: 現在まで上市されたタンパク質製剤の精査を行い, ナノ粒子製剤とすることによる意義を整理した。Polyethylene glycol - poly Aspartic acid ブロック共重合体 (PEG-P(Asp)) および Polyethylene glycol - poly Glutamic acid ブロック共重合体 (PEG-P(Glu)) を合成し, モデルタンパク質と混合することによりナノ粒子形成の確認を行った。ナノ粒子の評価としては, 平均粒子径および多分散度 (PDI) を ZETA SIZER NANO ZS (Malvern) により測定した。

リポソーム製剤の有効性に関わる品質特性に関する研究: Bangham 法 (薄膜法) を用いて, 種々の脂質組成からなるリポソームを作製した。リモートローディング法によりドキシソルビシンを内包し, 内包率を測定した。リポソームの粒子径とゼータ電位を測定した。

薬物トランスポーターの機能解析: OATP1B1 ならびに NTCP を安定発現する HEK293 細胞を用いて, 常法に従い in vitro 阻害試験をおこなうとともに

に、HepG2 細胞を宿主細胞とした、発現系を構築した。

B-1. 2. 先端的分析評価法を用いた製剤開発及び製造工程管理に関する研究

溶解型製剤の可溶/析出評価法の効率化・迅速化を目的とした動的散乱法を用いた粒度分布評価：配合変化により析出し白濁することが明らかになっているモデル化合物を対象とし、目視での評価では捉えきれないナノレベルでの現象を動的散乱法により評価を行った。

弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の溶出試験評価系の構築：本研究では、弱塩基性化合物である化合物 A の即放性錠剤を使用し、弱塩基性化合物における食事の影響を評価可能な In vitro の評価系を、溶出試験装置を用いて構築した。

塩化合物の C_0 および pK_a より脱塩・フリー化の有無を予測できる脱塩判定式の作成：固体中での脱塩・フリー化における湿度の影響を調査すると共に、溶解度に関する 2 種の式より脱塩境界式を算出し、原薬の C_0 と pK_a より製剤中での脱塩リスクを判定できる脱塩判定図を作成した。原薬は、固有溶解度（分子型の溶解度）が数 $\mu\text{g/mL}$ 程度の弱塩基性化合物の塩 15 種（塩化合物 a~o）をモデル化合物として使用した。添加剤は、一般的な製剤で使用される添加剤の中から 12 種を選択した。

連続製造工程におけるリスクアセスメント及び PAT ツールを用いた連続製造工程のリアルタイムモニタリング：水分量のモニタリングについては、近赤外分光技術を用い、結合液供給速度を変化させた場合の湿潤粉体の水分値を計測した。連続造粒は連続混合造粒機（CTS-MiGRA ㈱パウレック）を用いた。連続混合造粒機の出口に専用シュートを試作して、近赤外分析装置（㈱ビートセン

シング社製 BeatSensor GP2）の測定プローブを取り付けた。また、排出口から定期的な湿潤顆粒のサンプリングを行い、オフラインにより水分値測定を行った。水分計はザルトリウス社製 MA150 を用い、水分測定条件は 80°C 、15min で行った。粒子径モニタリングは、連続造粒機の出口配管にバッチプロセスで用いる粒度分布測定装置を接続し、結合液供給速度をパラメータとした。結合液はヒドロキシプロピルセルロース水溶液とした。粒度分布測定装置は排出口の真下に設置した。粒度分布測定装置には Particle-Viewer（㈱パウレック製）を用いた。

テラヘルツ波等振動分光を用いた口腔内崩壊錠の品質特性評価：テラヘルツ分光器はアドバンテスト社製 TAS-7500 を用い、測定条件について、周波数分解能は 7.5 GHz (0.007 THz)、測定範囲は 0~5 THz、積算回数は 16384 回（推奨値：自動設定）に設定した。リファレンスは空気とし、リファレンス測定時に試料室への乾燥空気のパーセントは継続して行った。ロラタジン OD 錠をアルミシートから取り出した後、直ちに TAS-7500 の試料室内に設置した。試料測定時は乾燥空気のパーセントを停止し、測定を開始した。

テラヘルツ発振器は量子カスケードレーザー（Easy QCL, Longwave 社製）を用い、検知器（受信機）として低周波・高感度テラヘルツカメラ（日本電気製）を設置した。量子カスケードレーザーより発振したテラヘルツ波をバンドパスフィルターにて 2 THz 付近の周波数帯を選別した。試料に照射したテラヘルツ波の反射波または透過波を低波数・高感度テラヘルツカメラを用いて検知した。透過スペクトルの計測は、空気（照明のみ）をリファレンスとして用い、試料から得たテラヘルツイメージにおける 40 pixel x 40 pixel (15 mm^2) の信号値総和を求め、リファレンスにおける

同エリアの信号値総和との比から透過率を算出した。

B-1.3. 難水溶性薬物製剤の製剤特性の評価技術の開発

コアモルファスの形成を予測する評価手法の確立：14種の薬物をモデル化合物として、コアモルファスの形成を試み、形成性及び物理的安定性に寄与する因子について調査を行った。また、製剤応用に向けた物性評価として、吸湿性の評価を行った。さらに、ニフェジピン(対象薬物)と水溶性ビタミンのニコチン酸アミド(コフォーマー)からなるコアモルファスについて、コアモルファスの保存安定性と分子運動性の関係について検討した。

コアモルファス医薬品の構造安定性に及ぼす物理化学的因子に関する研究：モデル薬物として8種の非ステロイド性抗炎症薬を用い、コアモルファス形成に寄与する薬物の物理化学的因子に関して研究を行った。示差走査熱量計(DSC)を用いて熔融-冷却-再熔融処理を施した際の結晶化傾向を評価した。そこで結晶化傾向が高いと判断した薬物を選定し、他の薬物とモル比1:1で物理混合した試料をDSC測定した。この際の結晶化傾向の変化からコアモルファス化の評価を行った。得られたコアモルファス化傾向と成分の物理化学的パラメーターについて partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) で解析を行い、コアモルファス形成に寄与する物理化学的因子を調べた。

コアモルファス製剤の保存安定性と製剤の熱力学的パラメーターの研究：コクリスタルと同様に相互作用を有する複数成分からなる原薬形態である複合体非晶質、コアモルファスについて、その安定性評価及び分子間相互作用の熱的解析を行った。難溶性化合物のモデルとしては経口抗

真菌薬 itraconazole(ITZ)を用い、ITZとcocrystalを形成できるカルボン酸cocrystal former(CCF)とのコアモルファスを対象とし、商用製造に用いられる製剤技術であるスプレードライヤーを用いて調製する検討を行い、調製されたコアモルファスの分光学的評価および安定性評価を実施した。調製法によるコアモルファスの物性特性の違いを考察した。

非晶質製剤の安定性評価技術の開発：非晶質原薬の固体物性、物理的安定性に対する微量の構造類似不純物の影響を評価し、そのメカニズムを考察することを目的とし、構造が類似する一連の化合物群が入手可能なサルファ剤系化合物(合成抗菌薬)及びメフェナム酸を代表とするフェナム酸系化合物(非ステロイド系抗炎症薬)をモデル化合物として、人為的に構造類似化合物を不純物として混入させた試料を用いて、不純物が物性に与える影響を評価した。

難溶性薬物の過飽和溶解と安定化メカニズムの解明：固体分散体制剤を設計する際には、長期的な非晶質安定性の確保や水分散後の高い薬物濃度の達成等に加えて、薬物溶出性も担保されなければならない。非晶質固体分散体からの薬物の微視的な溶出挙動を理解する目的で、薬物/Eudragit® S100(S100)固体分散体を噴霧乾燥法により調製し、UV検出器と蒸発光散乱検出器(ELSD: evaporative light scattering detector)を併用することにより、非晶質固体分散体からの薬物及びポリマーの溶出速度を同時に評価した。モデル薬物としてはBCS class-IIに分類されるフェニトイン(DPH: diphenylhydantoin)及びグリベンクラミド(GBM)を用いた。また、薬物溶出速度に及ぼす固体分散体の分子状態の影響を評価する目的で、固体NMR測定を用いた物性評価を行い、薬物溶出速度との関連性について検討し

た。

B-1.4. 生体内環境を反映した製剤機能の評価法と製剤技術に関する研究

フロースルーセル法溶出試験装置として、検討に参加した3研究機関で SOTAX 社製の CE7smart を使用し、モデル製剤として USP サリチル酸錠 300mg とイノベロン錠を用いた評価を行った。USP サリチル酸錠 300mg の試験には 22.6mm セルを用い、リン酸緩衝液を試験液として、流速は 16mL/min、試験温度は 37°Cで行い、規定尾測定時間に分取測定した。ルフィナミド錠 200mg の試験方法は、USP37NF32 に記載されているルフィナミド錠の溶出試験に従って実施した。なお今回の検討ではフロースルーセルを通過した試験液は全量回収し、その一部を HPLC で分析した。

膜透過後の薬物保持モデルとして、polyvinylpyrrolidone (PVP 29k) または Pluronic F-127 の 10%(w/w) 溶液を内包した再生セルロースチューブと透析カセット (3500MWC0) を用いた。検討対象の薬品 (カルバマゼピン、プロプラノロール) を薬局方の溶出試験第 2 液 (900mL, 37°C) に溶解させた後に、溶出試験装置 (パドル法) のベッセルに移し、透析カセットを入れた後、各時間に試験液を手動でサンプリングし、薬物濃度の変化を UV で評価した。

吸入剤の空気力学的特性評価には、薬物の分粒に用いる多段インパクターとしてアンダーセンカスケードインパクター (ACI) と次世代インパクター (NGI) を使用し、数種の吸入流量で薬剤を捕集、回収後、HPLC を用いて測定した。また各条件でのカットオフ径は、EP・USP に記載の方法に従い算出した。粒子の空気力学的粒度分布として、最上段から最下段の各ステージにおける薬物回収量より得られた、カットオフ径-累積質量曲線を元に、5 μm 以下の微粒子量 (FPD)、空気力学

的中位径 (MMAD)、および幾何標準偏差 (GSD) を算出した。最終的に、NGI で得られた結果と ACI で得られた結果を比較し考察した。

リポソーム製剤の微小構造と機能特性に関する検討には、水素添加大豆レシチン (HSPC)、コレステロール、ポリエチレングリコール (分子量 2000) 結合ジステアロイルフォスファチジルコリンを重量比 3:1:1 で含み、内水相として 0.65 M トリエタノールアミン (TEA) と平均分子量 4,800, 9,800, 20,500 の PGA 溶液 (1-4 mg/mL) を含むリポソームを薄膜法で調製した。超音波照射により粒子径を約 100 nm に調整した後、60°C で 10 分間インキュベートによりドキシソルビシンをリポソームに内封した。薬物封入率は、セファデックス G-50 カラムを用いた分離により算出した。また封入安定性は PBS を用いた透析により評価した。薬効の評価は、Lewis 肺がん細胞 (LLC 細胞) に薬物封入リポソームを添加し、48 時間後の細胞生存率について WST-8 試薬を用いて測定した。

リポ化製剤の調整は、一般的な脂肪乳剤の処方を基準とし、臨床での投与濃度を参考にアムホテリシン、シクロスポリン等のモデル薬物を配合して調製した。リポ化製剤からの薬物放出量評価を目的とした実験では、各種リポ化製剤とヒト血漿を 1:1 の比率にて混和した後に 37°C に保ち、経時的にサンプリングを行った。サンプリングした試料は速やかにゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行い、脂肪粒子と放出した薬物および血漿タンパク質の分離を行った。さらに分取した脂肪粒子を HPLC によって分析し、薬物放出量を評価した。放出性に対する血漿量の影響検討を目的とした実験では、各種リポ化製剤とヒト血漿を 1:1~1:9 の比率にて混和した後にサンプリングを行ない、前述のものと同じ方法で評価した。

B-1.5. iPS 細胞等由来樹状細胞を用いたエン

ドトキシン等発熱性物質検出法の開発研究

iPS 細胞等由来樹状細胞を用いたエンドトキシン等発熱性物質検出法の開発：健常人ボランティアより成分採血装置を使用し、末梢血4リットルから末梢血単核球を回収した。付着法にて単球を分離し、GM-CSF 及び IL-4 を含む培地で5日間培養して未成熟樹状細胞を誘導した。未成熟樹状細胞をピシバニール (OK432) 及びプロスタグランジン E2 (PGE2) を含む培地で24時間培養して成熟樹状細胞を誘導した。細胞培養上清を ELISA で、細胞表面表現系を FACS で解析した。

ヒト iPS 細胞由来樹状細胞の解析とエンドトキシン測定法への適用に関する研究：凍結ヒト単球、ヒト新鮮末梢血単球、単離した単球を M-CSF 存在下で7-8日間培養して得られる単球由来マクロファージ及び成熟樹状細胞を用いた。これらの細胞を 96 ウェル培養プレートに播種し、ウシ胎児血清存在下または非存在下で *Escherichia coli* ATCC 23501 由来 LPS とともに 37°C で3時間培養した後、遠心分離により培養上清を得た。得られた細胞培養上清を回収し、TNF- α 及び IL-6 を ELISA にて定量した。

リムルス試験による樹状細胞等を用いたエンドトキシン測定法の検証に関する研究：*E. coli* 由来 LPS は、第十六改正日本薬局方第一追補エンドトキシン試験法に準拠したマイクロプレートカイネティック比色法によるリムルス試験で測定し、エンドトキシンユニット (EU) を算出した。

オゾン過酸化水素混合ガスを用いたエンドトキシン等発熱物質不活化法の開発：乾熱処理して脱エンドトキシン処理した 6 mm 角のガラス板を担体として、*E. coli* ATCC 23501 由来エンドトキシンを塗布後に乾燥させたものを試料 (Endotoxin Indicator, EI) とし、試験に用いた。EI を約 30 L の SUS 製容器に入れ、オゾンガ

ス及び過酸化水素ガスを導入し、所定の時間暴露した。終了後に EI からエンドトキシンを脱エンドトキシン水で回収し、リムルス試験で残存活性を測定した。

B-2 先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発 (II グループ)

B-2.1. バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究

B-2.1.1.0-結合型糖鎖試験法の標準化

試料としてFc融合タンパク質(アバタセプト)、及び、ウシフェツインを用いた。

(1) 非還元的アルカリ β -脱離

4mg/mL のタンパク質溶液にカルバミン酸アンモニウム溶液を混合し、60°C で20時間インキュベートした。精製水を添加し、60°C で減圧にて遠心乾固した。本操作をさらに1回繰り返した。150mmol/L 酢酸水溶液を添加して60°C で減圧にて遠心乾固を2回繰り返した。水に溶解し、遊離糖鎖を含む溶液全量を BlotGlyco 法のプロトコールに従って2AB誘導体化し、70% アセトニトリルを加えて試料溶液とした。10 μ L を HILIC/FL により分析した。

(2) 還元的アルカリ β -脱離

糖タンパク質試料に1M水素化ホウ素ナトリウムを含む0.05Mの水酸化ナトリウム溶液を加えてよく攪拌した後、40, 60, 80°Cにて、30分間~7時間反応させた。反応後、氷冷した酢酸(3滴)を加えて中和し、水を加え、活性化した強陽イオン交換樹脂に通した。この液を減圧にて遠心乾固した。メタノールを加えて攪拌し減圧にて遠心乾固を3回繰り返してボランを除去した後、0.1%トリフルオロ酢酸に溶解させ、分析試料とした。0.5 μ L を MALDI-TOF MS により分析した。

(3) 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP) 誘

導体化

糖タンパク質試料に、0.5M PMP を含む 25% アンモニア水を加えてよく攪拌した後、50°Cで 15 時間反応させ、減圧にて遠心乾固した。水を加えて減圧にて遠心乾固を 2 回繰り返した後、1%酢酸溶液とクロロホルムを加えて強く攪拌し、クロロホルム層を除く操作を計 4 回繰り返した。水層を減圧にて遠心乾燥し、水 1mL に再溶解し、C18 固相抽出カートリッジで精製した。

B-2.1.2. 凝集体評価法の開発と標準化

凝集体評価法の分析能の比較：標準粒子希釈液の調製は、以下の方法によった。Thermo Fisher Scientific 社より、NICB トレーサブル粒子径標準粒子 60 nm, 220 nm, 500 nm, 2 μ m, 5 μ m 及び 10 μ m (ポリスチレン) 並びに 1 μ m (シリコン) を購入した。標準粒子は 0.2 μ m のフィルターを通したミリ Q 水を用いて希釈し、ポリスチレン粒子は 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%, 0.00005% 及び 0.000025% の溶液、シリカ粒子は、0.002%, 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001% 及び 0.00005% の溶液を調製した。希釈液は分注し、共同研究参加機関へ室温にて配布した。濃度範囲が測定に適さない場合は適宜希釈液を調製することとした。粒子径標準粒子の希釈液は、よく混合し、適切な方法で脱気した後、分析に供することとした。測定する標準粒子の粒子径は、各装置の測定可能な粒子径をもとに決定した。

標準粒子の分析は以下の方法によった。(1) 光遮蔽：KL-04A (リオン) 及び 8000A+3000A (HIACH) を用いた。日局 <6.07> 注射剤の不溶性微粒子試験法に従い、5mL ずつ 4 画分採取し、粒子径分布を計測した。最初の画分の計測値は棄却し、残りの計測値から平均粒子数を計算した。(2) フローイメージング：DPA-4200 及び PA-4100 (Brightwell), MFI5200 (Protein Simple), Flow

CAM (Fluid imaging technologies) 及び FPIA-3000S (Marvern) を用いた。(3) レーザー回折：Aggregates Sizer (島津製作所) を用い、1mm 光路長セルを用いて測定した。(4) 動的光散乱：UPA-UT (日機装), ゼータサイザーナノ ZS (Marvern) 及び ELSZ (大塚電子) を用いた。(5) ナノトラッキング：Nanosight NS500 (Marvern) を用いた。(6) 共振型質量測定：アルキメデス (Malvern) を用いた。

不溶性微粒子試験の低容量化の検討：標準粒子試料を 0.2, 0.5 または 1 mL ずつ 4 画分採取し、日局 <6.07> 注射剤の不溶性微粒子試験法 (LO) に準じて試験を行い、3 画分の計測値を得た。

過酷試験試料における不溶性微粒子数：抗体溶液製剤 (mAb A) 4 ロットについて、それぞれ 40°C で 4 週間保管し、不溶性微粒子試験法にて不溶性微粒子数を測定した。

B-2.1.3. バイオ医薬品品質試験のシステム適合性

共同研究参加機関を対象に、バイオ医薬品品質試験に関して、適切と考えられるシステム適合性に関するアンケート調査を行った。

B-2.2. 新たな生産基材により生産されるバイオ医薬品の品質安全性評価に関する研究

B-2.2.1. カイコ繭由来タンパク質量法の構築

カイコ繭より 8M 尿素にて抽出したタンパク質を免疫原として家兎に免疫し、採取した抗血清から Protein A カラムにより IgG 画分を精製した。得られた IgG から、Fab', 及び、Fab'-HRP を調製した。抗繭タンパク質 IgG 画分をマイクロプレートに固相化し、Fab'-HRP を検出用試薬として用いる ELISA 系を構築した。作製したカイコ繭由来タンパク質 ELISA にて、Tg カイコ繭から抽出・精製した組換えタンパク質 A の各精製工程における溶液中の残存 HCP を測定した。

B-2.2.2. Tg カイコ由来タンパク質の試験的製造，発現系改良，及びバンク化技術の開発

カテプシン A，リソソーム病治療用酵素 X，食欲抑制ペプチド活性型ネスファチン，ガン抗原 MAGE-A4，p53，WT-1，TNFR-Fc，ネコインターフェロン等をモデルタンパク質として，Tg カイコでの発現系を構築し，発現量増加，発現安定性，個体選別法，バンク化等，組換えタンパク質の製造と品質評価・管理手法の検討を行った。

Tg バンクの作製・管理手法では，ニュートラルレッドを含む人工色素を用いて卵巣を染色する方法により卵巣採取の効率化を図った。また，紐体と共に卵巣を採取し，再移植の際にレシピエントの紐体と絡めることで，移植後の産卵効率の向上を図った。今年度からは大型液体窒素タンクを用いた Tg バンクの本格的な運用試験を開始した。

B-2.3. LC/MS によるバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発

B-2.3.1 試薬類

共同研究では，共通した抗体医薬品（ヒト IgG1），マウス血清（6 種類），TPCK 処理トリプシン，及び内標準物質（SIL-IS）を使用した。

B-2.3.2. 共同研究内容

抗体添加マウス血清を試料として，各機関で前処理及び液体クロマトグラフィー／質量分析（LC/MS）による測定方法の最適化，ならびに，「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」に従ったバリデーションを行った。

B-2.3.3. 安定同位体標識 Fab 発現系の作製

ある抗体医薬品の Fab 領域をモデルとし，安定同位体標識 Fab（SIL-Fab）発現系を構築した。

B-2.4. リガンド結合法によるバイオ医薬品の免疫原性評価法の開発と標準化

B-2.4.1. 試料及び抗薬物抗体分析法

モデル ADA として，ヒト血清に抗 B-mAb ポリク

ローナル抗体，抗 EPO モノクローナル抗体 BM802，あるいは，抗 EPO ポリクローナル抗体 LS-C11323 を添加した試料を 4 機関で共通に用いた。

共通試料 3 種および個別試料を用いた ADA 分析法を各機関で構築した。用いられた分析法は，LOCI（luminescent oxygen channeling assay）法（AlphaLISA）が 1 機関，及び，ECL（electrochemiluminescence）法が 3 機関であった。また，Drug tolerance 改善のための試料の前処理法や反応条件を検討し，薬物共存下での ADA 分析を実施した。ADA 濃度は，各機関での予備検討の結果をもとに高濃度（H），中濃度（M），低濃度（L）の 3 種類とし，統一した条件を設定し，抗 B-mAb 抗体では，5，0.5，0.05 $\mu\text{g/ml}$ ，抗 EPO 抗体では，0.5，0.25，0.05 $\mu\text{g/ml}$ を基準とした。

カットポイント（CP）は，個別別ブランク血清を用いた CP 設定は行わずに，陰性対照（n=6）の平均値に 1.329* を乗じて求めた仮カットポイント（仮 CP）を使用した。（*：背景値（個別別ブランク血清）の相対標準偏差を 20% と仮定し，t 分布表の母集団無限大における臨界値を用いた 95% 信頼区間上限値として設定した。）

共存薬物濃度の範囲は，レスポンスが仮 CP をまたぐように設定し，共存薬物濃度は，抗 B-mAb 抗体分析系では，0.0001~100 $\mu\text{g/ml}$ ，抗 EPO 抗体分析系では，0.001~10 $\mu\text{g/ml}$ を基準範囲とした。

B-2.4.2. 抗 EPO 抗体国際標準品の共同検定参加

WHO より配布された抗 EPO ヒトモノクローナル抗体 10 種類について，SPR 法，及び，LOCI 法により，レスポンスがカットポイント以上，及び，カットポイント以下となる境界の希釈倍数を測定した。

B-2.5. バイオ医薬品の安全性の分析・評価法

研究

PMDA が公開している医薬品副作用データベース (JADER) を用いて、医薬品一般名にマブ (抗体医薬品のステム) あるいはセプト (受容体のステム)、副作用名に infusion または心不全・穿孔を入力して症例を検索した。投与開始日と有害事象の初回発現日が記載されているものを解析症例として、これらより発現時期を算出した。発現時期の有意差判定は SPSS 14.0 の Mann-Whitney 検定を行い、箱ひげ図も参照した。また、infusion reaction については JADER の全報告数 225,722 件を母集団として、シグナル検出指標の Reporting Odds Ratio (ROR) を算出した。ROR の計算には、独自に構築した有害事象解析システムを使用した。

B-2.6. 新規ウイルス安全性評価技術の開発

B-2.6.1. CHO 細胞内在性レトロウイルス遺伝子の解析

公開データベースから、チャイニーズハムスターのトランスクリプトームデータ、及び、CHO 細胞のゲノムデータをダウンロードした。レトロウイルス gag 遺伝子由来 150nt 配列を query として、CHO 細胞のトランスクリプトームデータベースから、gag の ORF が保存されている内在性レトロウイルス gag 遺伝子の候補を検索した。得られた配列をもとに、チャイニーズハムスターゲノムに対して BLAST を用いた検索を行い、CHO 細胞内在性レトロウイルスをコードする遺伝子を同定した。

B-2.6.2. Q-PCR によるウイルスクリアランス試験

B19 ウイルス粒子は、B19 陽性血漿の超遠心分離による沈殿をフィブリノゲン製剤の工程中間品 (ウイルス除去膜工程前液) で再懸濁して調製した。B19 遊離ゲノムは B19 陽性血漿から抽出し調製した。B19 ビリオン又は遊離ゲノムに対し 50~0.08 U/mL の DNase I 又は 10~0.016 U/mL の

Micrococcal Nuclease を 10~60 分間反応させた。反応停止後ゲノム抽出を行い、TaqMan PCR による増幅サイズ 988 bp の Q-PCR (以下 988 bp Q-PCR) により B19 ゲノムを定量した。

B-3核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発 (Ⅲグループ)

B-3.1. スプライシング制御型アンチセンスのハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果に関する研究

本年度は、近年特に開発が進んでいるスプライシング制御型アンチセンスに焦点を絞り、解析を行った。スプライシング制御型アンチセンスとは、「pre-mRNA に相補的に結合し、スプライシングに関与するタンパク質群 (スプライシング因子) の pre-mRNA への結合を阻害することによってスプライシングを変化させるオリゴ核酸」である。これにより、標的エクソンを成熟 mRNA からスプライスアウト (エクソンスキップ) し、コドンの読み枠を正常化することで機能を保持したタンパク質を発現させる。スプライシング制御型アンチセンスのデザインとしては、2014 年に小比賀聡教授が報告した「架橋型核酸 LNA を含むスプライシング制御型アンチセンスに関する論文 (Simo et al., *Nucleic Acids Research*, 42, 8174-8187, 2014)」の知見を基に“架橋型核酸 LNA と DNA が交互に配置されたアンチセンス (LNA/DNA アンチセンス)”を採用し、ジストロフィン遺伝子・エクソン 58 を標的にすることにした。アンチセンスの配列については、①強いオンターゲット効果を持ち、かつ、②できるだけ多くのヒト遺伝子と相補結合するという指標で選別した。具体的には以下の条件でスクリーニングを行った。

B-3.1.1. オンターゲット効果の強度によるアンチセンスの絞り込み

(*in vitro* 解析 : 140 配列 → 32 配列)

- 18 塩基長の LNA/DNA アンチセンス
- ジストロフィン遺伝子エクソン 58 に対して考えられるすべての相補配列 (140 本)
- ヒト横紋筋肉腫由来 RD 細胞で評価
- アンチセンス最終濃度 100nM を Lipofection 法で導入
- エクソン 58 がスキップした mRNA とスキップしていない mRNA を RT-PCR で判別し、スキップ活性を定量化

B-3.1.2. オフターゲット候補遺伝子数によるアンチセンスの絞り込み

(*in silico* 解析 : 32 配列 → 3 配列)

ライフサイエンス統合データベースセンター内藤雄樹氏の協力のもと、内藤氏が開発した検索システム (GGRNA および GGGenome) を用いて *in silico* 解析を行った (日本新薬グループが担当)。オンターゲット効果の強度で選択した 32 本のアンチセンス配列について、ヒト遺伝子を対象とした *in silico* 解析を行い、相補箇所が多い 3 本のアンチセンスを抽出した。

B-3.1.3. オンターゲット効果の確認, ED₅₀ の算定

以降の高密度エクソンアレイ解析に用いるアンチセンス濃度を設定するため、上記の解析から抽出したアンチセンスについて、ED₅₀ 値を決定した (第一三共グループが担当)。

B-3.1.4. オフターゲット効果の評価方法

スプライシング制御型アンチセンスのオフターゲット効果の評価するには、標的外遺伝子のスプライシングの変化を検出する必要がある。スプライシングの変化は、「成熟 mRNA において各エクソンが存在するか否か (スプライスアウトされるか、スプライスインされるか)」を検出することにより評価できると考えられる。そこで我々は各エクソンの存在量を検出するために、エクソン

毎にプローブが設定された高密度エクソンアレイ [Affymetrix 社 GeneChip® Human Transcriptome Array2.0 (HTA2.0)] を評価法の第一選択として採用した。

B-3.1.5. オフターゲット候補エクソンの抽出および分類

ヒト転写産物データベース (NCBI : Refseq60) を対象とした *in silico* 解析により、オフターゲット効果の解析に用いるスプライシング制御型アンチセンスと相補性を有するエクソン (= オフターゲット候補エクソン) を検索、同定した。この際、GGGenome を独自に改変したプログラムを用い、アンチセンスとエクソン間に「ミスマッチ」、「インサクション」、あるいは「デリーション」が入ることを許容して抽出した。抽出したオフターゲット候補エクソンは、上記の 3 つの不適合性パラメータの総和で分類した (例 : ミスマッチとインサクションがそれぞれ 1 箇所あった場合は、「不適合性 2」のエクソンとして分類)。

B-3.1.6. 高密度エクソンアレイ解析

基本的に「1. オンターゲット効果の強度によるアンチセンスの絞り込み」で述べた手順でサンプルを調製した。試行回数は 4、アンチセンス濃度は ED₅₀ の 10 倍 ($2.76 \times 10 = 27.6$ nM) とした。高密度エクソンアレイより得られたデータの解析手順については割愛し、解析の結果得られた知見について、後に詳述する。

B-3.2. スプライシング制御型アンチセンスの自然免疫活性化に関する研究

B-3.2.1. TLR9 を活性化する「20 塩基長以下のオリゴ核酸」の探索

一般的に、TLR9 を活性化するオリゴ核酸は「CpG ジヌクレオチド」を含有することが知られており、このようなオリゴ核酸は「CpG オリゴと呼ばれている。我々は近年開発されているアンチセンス医

薬品の塩基長が短くなっていることを受け、まず、20 塩基長以下で TLR9 を活性化するオリゴ核酸を探索した。これにより、核酸医薬の開発現状に即した「TLR9 を活性化するアンチセンスのポジティブコントロール」を作製し、以降で検討する「修飾型核酸の導入による影響」を評価するための標準配列に用いることとした。具体的には代表的な CpG オリゴである ODN2006 (5' -tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3', 24 塩基長) の配列を基に、18 塩基長あるいは 15 塩基長まで短縮したオリゴ配列を設計し、Invivogen 社より販売されている「HEK-Blue hTLR9 細胞」を用いて、TLR9 活性化能を評価した。HEK-Blue hTLR9 細胞は、HEK293 細胞にヒト TLR9 遺伝子と NF- κ B 誘導性の分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子を安定的に共発現するように設計されており、TLR9 の活性化能を NF- κ B 依存的に分泌される SEAP の産生量でモニターすることが可能である。評価条件は、ODN2006 で最適化した以下の条件を用いた。

【培養系】96 穴プレート 5.0×10⁴ cells/well

【アンチセンス濃度】5 μ M

【培養時間】18 時間

B-3. 2. 2. 修飾型核酸搭載オリゴ核酸の TLR9 活性化能の評価

前節「TLR9 を活性化する 20 塩基長以下のオリゴ核酸の探索」において選別した 18 塩基長のオリゴ配列に修飾型核酸を導入することにより、スプライシング制御型アンチセンスとして機能しうる修飾型核酸搭載オリゴ核酸をデザインした。本研究では、2' -OMe (糖部の 2' 位を修飾した核酸)、LNA (糖部架橋型核酸) 等の修飾型核酸を用い、修飾型核酸の配置については、上述した小比賀らの報告をもとに“修飾型核酸と DNA が交互に配置されたオリゴ核酸”とした。

B-4 天然物医薬品の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発 (IV グループ)

B-4. 1. 単味生薬製剤の品質確保に関する研究

日本薬局方、中華人民共和国薬典 (中国薬典)、香港中薬材標準及び欧州薬局方等を参考として、単味生薬の煎剤及びエキスの同等性確保に資する確認試験及び定量法の具体例について検討した。

B-4. 2. 西洋ハーブの品質確保に関する研究

チェストツリーについては、原生薬、一般用医薬品として欧州の薬局で販売されている製品、及び、日本国内で健康食品として流通する製品を入手し、マンケイシは日本薬局方外生薬規格の製品を入手した。それぞれに LC-MS 分析を行い、互いを識別し得る指標成分について探索し、それを単離構造決定した。一方、赤ブドウ葉については、日本国内で販売されている赤ブドウ葉エキス含有製品のうち、一般用医薬品 1 製品と、健康食品 2 製品を入手して、LC-MS 分析を行い、さらに多変量解析に供した。

B-4. 3. 標準煎剤とエキスとの同等性確保研究

生薬センブリを取り上げ、日本薬局方及び中国薬典を参考として指標成分を選定し、単味生薬製剤承認基準 (案) のブリッジングガイドラインに記載されたセンブリの確認試験及び定量法の可用性を検討した。

B-4. 4. 葉類生薬ハッカに関する調査研究

ハッカに関する文献を広く収集し、特に分類に関する事項について検討した。さらに、日本国内に流通する生薬ハッカを広く収集し、実体顕微鏡にて形態を観察した。

B-4. 5. マオウエキスの成分プロファイル分析

国内の生薬メーカーより購入したマオウを用い、エフェドリンアルカロイド除去マオウエキス (EFM) を作成し、LC/MS 分析に供した。エフェド

リンと共に除去された成分を単離し、NMR や MS を用いて構造決定した。

B-4.6. マオウエキスの薬理的解析

マオウエキス原末に対して、TRPV1 を強制発現させた細胞株 mTRPV1/Flp-In293 細胞を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。また、ddY, 5 週令、雄のマウスを用い、マウス後足蹠に検体を皮内投与し、5 分間の Paw licking 時間を測定し、インビボで疼痛を評価した。

B-4.7. ゲノム解析による原料生薬の品質評価

陝西省及びその周辺域を産地とするボウフウ類生薬を入手し、植物の核 rDNA 領域の塩基配列を解析して基原種鑑別を行うとともに、ARMS 法を利用したボウフウの華山前胡に対する純度試験法について検討を行った。一方、ジンギョウについては、*Gentiana* 属 *Cruciata* 節植物を中国の内蒙古自治区、甘粛省、四川省などで収集し、さらに市場品を中国及び日本で収集して、核 rDNA の ITS 領域の遺伝子多型を検討した。

B-4.8. 多変量解析による原料生薬の品質評価

ショウキョウ及びカンキョウエキスについて TRPV1 賦活活性の強度を測定し、成分情報を説明変数に、TRPV1 賦活活性を目的変数に用いた PLS 回帰分析を行った。

〈倫理面への配慮〉遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」等に従い、所属機関における遺伝子組換え実験安全管理規則（「国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則」等）を遵守して、所属機関で定められた遺伝子組換え実験安全委員会に諮り所長等の承認を受けて実施した。

動物実験については、所属機関における動物実験の適正な実施に関する規程（「国立医薬品食品

衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程」等）を遵守し、適正な倫理委員会による審査・承認を得た上で、動物福祉および動物愛護の精神に基づいて実施した。

ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益および危険性が伴わないように配慮し、人権保護を含めたインフォームドコンセントの下に試料を採取するとともに、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・承認を得た上で実施した。なお、ヒト由来培養細胞等が、研究用の市販品、領布品である場合でも、所属機関の研究倫理規定に従い、必要に応じて所属機関の研究倫理委員会に申請して、その審査を受けた上で使用するものとした。

なお、現段階では、臨床研究を行う予定はないが、もし行う必要が生じた場合には、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実施する。

C. 結果・考察

C-1 医薬品品質管理手法の高度化に対応した 医薬品製剤の評価技術の開発(Iグループ)

C-1.1. 先端的 DDS 製剤の製剤機能評価手法研究

リガンド分子搭載ナノ医薬品の合成スキームの検討：本年度は、PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体と MAP の 8 分岐型 Lys デンドリマーを基本骨格とする 2 種類の合成リガンドプラットフォームを構築した。さらに、Lys デンドリマーにおいては、PEG 末端の 100%にモデルアミノ酸を導入することができ、65%の収率を得た。