

エジピンの緩和時間の約 1/50 の値が算出された。モル比 1:1 のコアモルファスが、25℃では非晶質ニフェジピンよりも優れた安定性を示したにも関わらず、40℃では結晶化速度が非晶質ニフェジピンとほぼ同等安定性を示したのは、この分子運動性の大幅な増大(緩和時間の減少)が原因と考えられた。

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：今回検討した物理化学的パラメーターのうち、NAP へ配合した薬物の結晶化傾向 (class I-III) はコアモルファス形成に顕著に影響を与えていることが示され、class III のコアモルファス形成には配合する薬物が class III であることが重要であることが明らかとなった。また、その他の物理化学的パラメーターの内、分子間相互作用に寄与すると考えられる topological polar surface area, polarizability や hydrogen bond (HB) acceptor 数の寄与が大きいことが分かった。NAP は HB donor を有するので配合する薬物には HB donor ではなく acceptor を含有することが重要であった、と推察できる。また、薬物の flexibility に関わる rotatable bond 数や Kier Flex の寄与も大きいことが明らかとなり、flexibility の高い薬物が co-amorphous 形成を容易にすることが示唆された。

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：調製法の違いについては、粉碎操作は、応力が与えられることで、相互作用が促進されていると考えられるが、一方、凍結乾燥では、相互作用が促進されず、得られた非晶質は相互作用が弱いために ITZ 単体への結晶化が確認された。噴霧乾燥は、凍結乾燥と同様の乾燥操作であるが、噴霧された液滴は熱および気流により、サイズが徐々に縮小し、ITZ と CCF が徐々に近接するために相互作用が可能となった

と考えられた。しかし、固体 ^{13}C -NMR 測定で確認されたように、粉碎と噴霧乾燥では相互作用が異なり、どちらが高機能、安定なコアモルファスかは今後確認していく必要があると考えられる。また、噴霧乾燥工程で 1.5%-2.0%の分解が生じていることが確認されたことから、溶媒、温度などの噴霧乾燥条件も最適化する必要がある、大量製造にはまだ課題があると示唆された。

非晶質製剤の安定性評価技術の開発：結晶性分子に対してメカニカルストレスを与えると、分子の配列が破壊され、一時的に非晶質化が生じるが、同時に分子の再配列も起こり結晶化との平衡が発生する。SMT 単独では再配列による結晶化速度が優位となって、粉碎による結晶性低下は小さかったが、不純物が存在すると、分子の再配列に障害となり、結果として結晶性低下が促進されたと考えられた。SMT の熔融急冷非晶質の結晶化速度も共存する不純物の影響を受けることが明らかとなった。

また、SMT 及び SMT に不純物を 5%混入させた結果より、非晶質中の結晶核発生または微細結晶の結晶成長に対して、不純物が抑制効果を示したと考えられた。

難溶性薬物の過飽和溶解と安定化メカニズムの解明：得られた溶出プロファイルから式 (2) に基づき、DPH 及び S100 の溶出速度を算出した。S100 の溶出速度は DPH 含量の増加に伴い徐々に低下した。これは難水溶性の DPH 含量が増加したことで、試料の疎水性が増大するためと考えられた。一方、DPH の溶出速度は DPH 含量 10%以下の DPH/S100 SPD の場合、S100 の溶出速度と等しいが、DPH 含量 25%以上の DPH/S100 SPD からの DPH の溶出速度は、S100 の溶出速度と比較して有意に低下した。GBM/S100 SPD の場合も S100 の溶出速度は GBM 含量の増加に伴い徐々に低下した。GBM

の溶出速度は GBM 含量によらず全ての GBM/S100 SPD において、S100 の溶出速度と等しくなった。このことから、いずれの GBM 含量の GBM/S100 SPD においても GBM は S100 と共に拡散層を通過してバルクへ放出されたと考察された。

また、 ^{13}C -CP/MAS NMR 測定結果より、DPH 含量 10%以下の DPH/S100 SPD では DPH が S100 マトリクス中に分子分散するのに対し、DPH 含量 25%以上の DPH/S100 SPD では DPH は S100 マトリクス中に完全には分子分散せず、一部の DPH が DPH-rich なドメインを形成することが示唆された。DPH-rich なドメイン中の DPH は溶出試験時に溶液との接触によって結晶化し、DPH の溶出速度は S100 の溶出速度と比較して低下したと考えられた。GBM/S100 SPD についても GBM 含量の変化に伴う GBM 炭素の化学シフトの変化から、GBM 含量 50%以下の GBM/S100 SPD ではほとんどの GBM が S100 と分子レベルで相互作用形成するのに対し、GBM 含量 75%以上の GBM/S100 SPD では、GBM が S100 マトリクス中に分子分散するには過剰であり、一部の GBM が GBM-rich なドメインを形成すると推察された。しかし、SPD 中で GBM-rich なドメインに存在する GBM は溶出試験時にも非晶質状態を維持することができるため、低 GBM 含量の場合と同様に GBM が S100 の溶出に伴って溶出したと考察された。固体分散体制剤の設計において薬物の溶出性制御は重要な課題であり、本研究で得られた知見は、ポリマー選択や薬物/ポリマー配合比の設定などの処方検討の際に極めて有力な指針となる。今後、他の薬物/ポリマー固体分散体についても同様の検討を行うことで、固体分散体からの薬物溶出メカニズムの更なる解明が期待される。

D-1.4. 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

フロースルー法の溶出試験装置を用いた 3 機関でのサリチル酸錠の溶出プロファイル比較において、研究機関 2 の溶出率が高くなった原因として、試験液流を整えるためにセル下部に充填されたガラスビーズの粒子サイズが機関間で異なり、水流に影響を与えた可能性が示唆された。試験機関 2 では、他機関に比べて粒子サイズの幅が狭く（均一性が高く）真球度が高いとされるガラスビーズを用いていた。また、粒子径が小さいほど溶出率が高くなるという報告があることから、フロースルーセル内の試験液の流れ（流速や動きなど）の流体力学的な解析による解明と、試験条件の改善が期待される。

Pluronic は透析モジュール内で主薬分子を吸着またはミセルとして保持し、試験液からの移行を可能にしたと考えられる。この結果から、高分子界面活性剤と透析膜の活用により、試験液相と可溶化・吸着相の 2 相系分画を比較的容易に利用できることが示された。一方で、インキュベーション中の膜破損や移行速度の低さ、および Pluronic 溶液の膜吸収モデルとしての妥当性など、難溶性医薬品の移行モデルとしての活用への課題が示された。

吸入流量の増加に伴う FPD の増加は、吸入流量が増大することで、粒子にかかる力が増大し、より小さな粒子へと解砕されるとともに、添加剤である乳糖水和物からの主薬の剥離が起りやすくなったためと考えられた。吸入剤粒子の評価時の流量測定値に与える影響が分級装置により異なった原因として、ACI は NGI と比較してウォールロスが高いこと、捕集カーブの重複が大きいこと、また対数換算した際の各ステージのカットオフ径の間隔が一定でないこと等が考えられた。

リポソーム作製時に用いる PGA の分子量と濃度

がドキシソルピシン放出性の変動要因となること、および内水相に高分子量あるいは高濃度のPGAを用いることにより、安定にドキシソルピシンを内包したりポソームが調製できることが明らかとなった。またリポソーム内でのドキシソルピシン保持は、放出量の変化を介して、細胞増殖阻害作用に影響を与えることが、LLC細胞を用いた評価で認められた。

生体内の環境を反映したりポ化製剤の放出挙動を評価する上で、試験系に持ち込む脂肪粒子(脂質)量の調整と、混合直後の薬物放出測定的重要性が示唆された。また、卵黄レシチンで乳化されたりポ化製剤は、可溶化した薬物を速やかに血中へ放出する可溶化製剤としての機能と、徐放性を有するDDS製剤としての機能の両方を持つと考えられた。

D-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：末梢血単核球より誘導された樹状細胞は、Th1型免疫誘導できる成熟樹状細胞であることが示された。ヒトは遺伝的背景が異なり同じ培養法でも特徴の異なる樹状細胞が得られる可能性があり、引き続き異なるヒト健常人ボランティアより樹状細胞を誘導する予定である。また、ヒト末梢血単核球よりiPS細胞の樹立を進めており、今回得られた樹状細胞と同等性を示す細胞の誘導法の確立を行う。

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：今回使用した3種類の細胞間の比較では、新鮮血単球が最もLPSに対する反応性が高く、高レベルのTNF- α 及びIL-6の放出を認めた。しかし、凍結単球ではその反応性が極めて低いものであった。個人差も考えられるが、凍結融解の影響や細胞保存の温度

管理も重要であることが示唆された。

新鮮血単球由来マクロファージに及ぼす血清の影響を検討したところ、ウシ胎児血清存在下では、TNF- α の放出が10-40倍程度高くなることが分かった。この原因としてはLPSの受容体への結合を補助するCD14の供給によるものと考えられ、本研究で用いた成熟樹状細胞はCD14陰性であることが低反応性の原因であることが考えられる。従って、CD14を補填する処理を施すことにより、反応性が高められる可能性が考えられる。

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：単球活性化試験法では、エンドトキシン標準品及び*E. coli*由来LPSの双方でIL-1 β の産生が確認できたが、それらはMATキットで想定されている活性より低かった。凍結ヒト単球は欧州で健常人から採血された後、数時間以内に凍結されて-80°C以下で保存されている。単球の保存温度が-80°Cでは長期間安定しているが、-70°Cでは2週間で失活するとされており、欧州から日本へ輸送する行程や保存時に温度変化によって活性の低下が生じたとも推定される。凍結保存や輸送時の温度管理が重要であることが示唆された。

エンドトキシンによる刺激では、ヒト樹状細胞のIL-1 β 産生は認められなかった。本年度の研究では樹状細胞誘導法を確立することを目的として調製された誘導された成熟樹状細胞を用いており、膜結合型CD14の発現が極めて低かった。樹状細胞活性化試験の確立にはCD14の発現が重要と推定され、本研究に用いた成熟樹状細胞ではなく、未成熟樹状細胞や樹状細胞前駆細胞を用いることが必要と考えられた。

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：乾燥下でのエンドトキシンの不活化法には乾熱処理(250°C、

2時間)があり、ガラスや金属を処理して6log以上減少させるが、250°Cの乾熱処理には耐性がなない生体由来高分子やプラスチックを用いた医療器具等には適用できない。常温乾燥下での不活化法は、 γ 線及び電子線照射並びに酸化エチレンガス、高圧蒸気、過酸化水素プラズマ及び過酸化水素/過酢酸ガスプラズマ暴露の減少数は1log以下で、処理を繰返しても減少数は更新されなかった。一方、オゾン過酸化水素混合ガス暴露では、30°Cで2log以上の、50°Cで3log以上の減少数を示した。生体由来高分子やプラスチックを用いた医療器具等には50°Cで安定なものも多く、本研究で開発したオゾン過酸化水素混合ガス暴露によるエンドトキシン不活化法は有用性が高い。乾熱処理以外で3log以上不活化する方法はないことから、新規性と効果があると判断した(除染装置および除染方法、特許出願済)。今後は暴露条件(ガス濃度、混合比、温度、湿度等)を最適化すると共に、不活化で生じる新たな物質の発熱性を、先の樹状細胞活性化試験法での評価を検討する。

D-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)

D-2.1. バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究

D-2.1.1. O-結合型糖鎖試験法の標準化

O-結合型糖鎖の解析において、適切な遊離方法がないことが、大きな課題となっている。近年、ピーリング反応を抑制したO-結合型糖鎖遊離法についていくつか報告がなされている。アルカリとしてアンモニアを用いて糖鎖の還元末端をグリコシルアミンとしておく方法、EDTA処理やTFA処理などによりカチオンを除去する方法、遊離と同時にPMP誘導体化する方法などである。そこで、

O-結合型糖鎖の標準的な糖鎖試験法を作成すべく、モデル試料を用いて分析方法の最適化を行ったところ、アルカリとしてカルバミン酸アンモニウムを用いた方法で、良好にピーリング反応を抑えることができた。その他の方法に関しては更なる検討が必要であるとともに、ピーリング反応などの副生成物をどの様に扱うのかについて議論が必要である。

なお、ピーリング反応による分解が生じていても、ペプチドマップ法と組み合わせることで、確度の高い糖鎖の付加部位、及び構造の推定が可能であった。

D-2.1.2. 凝集体評価法の開発と標準化

D-2.1.2.1. 凝集体評価法の分析能の比較

光遮蔽法(L0)は、注射剤の不溶性異物試験において、粒子径10 μ m以上の微粒子の評価に使用されている。本研究により、10 μ mだけでなく5 μ mのポリスチレン粒子も感度良く測定できることが確認された。2 μ mの粒子については、今回の試料が本分析には粒子数が多すぎたため、より低濃度での検討が必要である。

フローイメージング法(FI)では、10、5及び2 μ mの粒子について感度よく、また、広い濃度範囲で測定が可能であった。1 μ mのシリカ粒子では、計数率が低く、適切な評価ができないことが確認された。

レーザー回折法(LD)では、2 μ m以上の粒子ではL0及びFIと較べて著しく感度が低く、この粒子径の粒子は、粒子を個数として計測する手法がよいと考えられた。1 μ mのシリカ粒子については、今回検討した3つの定量法のなかで唯一良好な測定結果が得られた。500及び900nmの粒子では、1.0 μ g/mL以上の濃度で定量することができ、この範囲の粒子の定量法の一つとして有用であることが確認された。

動的光散乱法 (DLS) では、60 nm から 500 nm の粒子について、感度良く (0.25~0.5 μ g/mL 程度) 粒子を検出でき、20%以内の誤差で粒子径を得ることができた。粒子径の大きな粒子については、得られる粒子径の変動が大きいことに注意が必要である。タンパク質製剤中の凝集体の評価、品質試験にどの様に利用できるかについては今後検討が必要である。

ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) 及び共振式質量測定法 (RMM) については、新しい分析法でありデータが少ないことから、バイオ医薬品凝集体分析法としての特徴を明らかにすることが、今後の課題である。

D-2.1.2.2. 不溶性微粒子試験低容量化の検討

注射剤の不溶性微粒子試験法として、光遮蔽粒子計測法 (LO) は国際調和された試験法である。現在 25 mL 以下の注射剤においては、10 本以上の内容物を集めて試験することとなっている。USP において、2014 年 8 月に <787> Subvisible Particulate Matter in Protein Injections が制定され、タンパク質の注射剤において、低容量 (0.2 mL 以上) での LO 測定が認められ、容器毎に評価できることになった。低容量での試験が可能となるならば、必要な試料量の削減だけでなく、容器毎の評価となるため、不適切な検体をより検出しやすくなるかもしれない。

今回の検討結果では、低容量化した分析においても、良好な直線性が確認できた。測定精度の若干の低下が認められたものの、それほど大きくはなく (相対標準偏差で 2 倍程度)、また、測定条件を低容量測定に適したものとすることで改善される可能性がある。今後、精度についてより多くのデータを集めるとともに、実試料のばらつきについてもデータを収集する予定である。また、

タンパク質製剤中の凝集体は、屈折率の関係で LO では検出しにくい可能性がある点や試料の希釈の是非についても議論していく必要がある。

D-2.1.2.3. 過酷試験試料における不溶性微粒子数

抗体溶液製剤において、不溶性微粒子数と可溶性会合体含量の間に相関は認められなかった。一部の粒子径の評価だけでは、凝集体全体を評価はできないことが示された。

D-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

D-2.2.1 抗カイク菌由来タンパク質測定系の構築

8M 尿素にて抽出した菌タンパクをウサギに免疫することにより作製したポリクローナル抗体は、ウエスタンブロットによる評価により、メジャーなタンパク質であるセリシンだけでなく、マイナーな菌タンパク質群にも反応することが確認された。ただし、15kDa 以下の低分子のタンパク質には反応性が見られなかったことから、この分子サイズの HCP の検出が重要になる場合には、他の方法を用いた測定系を開発する必要がある。また、組換えタンパク質の精製後に残存する HCP の検出性についても、より詳細な解析が必要であろう。

抗菌タンパク質 IgG を利用して構築したサンドイッチ ELISA では、0.39ng/mL から 25.0ng/mL の範囲での定量性が確認された。また、検出限界は、0.16ng/mL と算出された。バイオ医薬品に残存する HCP は、通例、100ppm 以下とされていることから、想定される目的タンパク質濃度の試料に残存する HCP 定量に適用できると考えられた。

D-2.2.2. カイク菌由来タンパク質測定系の構築

Tg バンクとして、精子の凍結保存は実績があり、既に確立された技術である。しかしながら、精子

(精液)の採取には、多くのオス個体数が必要であり、手間と時間を要するため、卵巣と同様に、精巣凍結保存と精巣移植によって系統復帰と自然交配が可能になることが望ましい。凍結した精巣移植に関しても、卵巣移植と同様にカイコで可能であることが示唆されたため、Tgバンクとして精巣の利用も検討しておく必要があると思われる。

D-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

バリデーションを実施した結果、一部の機関は、既存ガイドライン (LBA ガイドライン) の真度 ($\pm 20\%$) 及び精度 (20%以下) の基準を満たしていた。その他の機関では、一部のバリデーション項目が既存のガイドラインの基準を満たさなかったが、今後、さらに測定方法の最適化を進めることで、既存ガイドラインで求められる信頼性の基準を満たすことが可能になるものと思われる。

内標準物質としての使用を目的に作製したSIL-Fabは、非標識の培地にて分泌させた場合と同様の収量が得られた。非標識の培地にて分泌させた際には、物理的・化学的性質、及び免疫化学的性質に関しては正常なFab分子が分泌されていたことを確認している。

D-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

全4機関で測定を行った抗B-mAb抗体については、LOCI法、ECL法ともに、設定された酸解離によりDrug toleranceを改善することができた。機関Aと機関Bの検討結果から、Drug toleranceの改善に影響すると考えられたパラメータは、酸解離の時間であり、短い方がDrug tolerance改善効果が高かった。これは、酸解離時間が長くなると、ADAが失活するためと考えられたが、40分間酸解離させた機関Dで、酸解離の効果が最大であったので、プロトコールによって、時間の影響

に違いがあると考えられる。

4機関全てで、ADA濃度が低いほど改善効果が大きくなっており、ADA濃度が低く、薬物が残存することが想定される実試料において、Drug tolerance改善のための前処理が有用であると考えられた。

今回、検討した酸解離法は、抗B-mAb抗体の測定においては、LOCI法、ECL法どちらにも有用なDrug tolerance改善法であることが示唆された。また、他の抗mAb抗体で検討した結果も、ほぼ同等であり、有用性が確認できた。抗EPO抗体BM802では、改善効果がみられなかったが、抗EPOポリクローナル抗体LS-C11323の結果(機関A)で、酸解離でDrug toleranceが改善していることから、モノクローナル抗体であるBM802が特に酸に弱い特性を持っていたためと考えられる。ヒト生体内のADAの特性については、十分な知見がなく、ポリクローナル抗体であれば、一般に改善効果があるのかは、さらに検討の余地がある。

機関Dで実施した平衡移動法は、抗B-mAb抗体のDrug toleranceを大きく改善できた。酸処理によるADAの変性の可能性がある場合、酸解離法に代わる有用な方法である。ただし、長時間のインキュベーションによって、薬物非共存下でのレスポンスが低下すること、測定に時間がかかるという問題がある。

以上、今回検討した2つの分析法、2つの前処理による5測定法を比較すると、機関Dの酸解離処理を含むECL法が、Drug tolerance改善効果が最大であった。また、レスポンスも他の2機関のECL法より、かなり大きかった。プロトコールを比較すると、機関Cと機関Dの酸解離法は、酸解離時間以外は類似しているため、測定条件の詳細な比較を行って、Drug tolerance改善法の標準化を進める予定である。

D-2.5. バイオ医薬品の安全性の分析・評価法研究

セツキシマブ等の infusion reaction 報告症例における抗ヒスタミン剤の併用割合が、全有害事象報告症例で見た時よりも高かったことについては、抗ヒスタミン剤の併用がリスク因子である可能性もあったが、これはむしろ、リスクの高い患者で積極的に抗ヒスタミン剤が使われていると見るのが妥当であろう。

D-2.6. 新規ウイルス安全性評価技術の開発

D-2.6.1. バイオ医薬品製造細胞が産生するウイルス様粒子

CHO 細胞から放出されるレトロウイルス様粒子には、感染性が認められず、危険視されてはいない。しかし、レトロウイルスは極めて柔軟性に富んだウイルスであるため、例えば CHO 細胞に外来性レトロウイルスが感染した場合、組換えなどによってヒト細胞に感染性をもつ新たな組換えウイルスが出現することも十分考えられる。内在性レトロウイルスの遺伝子が明らかになれば、このような潜在的な危険性を評価することができるようになる。また遺伝子が明らかになったことによって簡便なウイルス様粒子のコピー数の測定が定量 PCR によって容易になると考えられる。

D-2.6.2. Q-PCR によるウイルスクリアランス試験

ウイルス粒子中ゲノムを分解せずに、遊離ゲノムのみを選択的に分解できる Micrococcal Nuclease 処理条件を見出し、Q-PCR を用いたウイルス粒子数測定における遊離ゲノムやその断片の影響を最小化することができた。その結果、静置したる過前の対照試料でも試料中ウイルスの感染価の低下が認められ、感染価による評価では、ウイルス除去膜による B19 ウイルス除去率の評価が困難であった条件においても、Nuclease+条件

での Q-PCR を用いることで、全てのウイルス粒子を選択的に測定できるものと考えられた。また、本法を用いることにより、ウイルス除去膜工程のろ過後液で、検出限界未満にまで B19 ゲノムが除去されたことを示すことができた。以上より、適切なプライマーを設定した Q-PCR は、Nuclease+ 条件で B19 のウイルス除去膜での除去率を適正に評価でき、ウイルス安全性評価の面からも有用な手法であることが示された。

D-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)

D-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

D-3.1.1. オフターゲット候補エクソンの抽出

今回の解析において、RD細胞に発現するエクソンの数は「356,345」であり、このうち、我々がオフターゲット候補エクソンとして抽出したエクソンの割合は、「inc 2」+「inc 3」+「inc 4」+「inc 5」+「inc 6」= (50 + 654 + 8958 + 43349 + 80956) = 「133,967」である。これはRD細胞に発現するエクソンの37.6%に当たる。データには示さないが、18塩基長の場合、今回のように6つの不適合性 (inc 6) までを許容して検索を行うと、エクソン総数の3分の1程度のオフターゲット候補エクソンが抽出される。これを7つの不適合性 (inc 7) まで拡大すると、どのエクソンにもヒットしてしまうほど特異性が低くなり、*in silico*解析の目的が失われる。すなわち、18塩基長のアンチセンスの場合、オフターゲット候補エクソンの抽出は、上記の観点から「inc 6」まで行えば十分と考えられる。

D-3.1.2. オフターゲット効果の影響を受け

る遺伝子の配列条件

次に、「inc 2」から「inc 6」に分類したオフターゲット効果エクソンが実際に影響を受けるか否かについて考察する。まず、50%未満に発現抑制された割合について、U検定で有意差検定を行うと、「inc 2」から「inc 6」のいずれのグループにおいても、「SS018-2と相補性のないエクソン群 (Other) と比べて、有意に50%未満に抑制される」という結果が得られる (有意水準5%)。すなわち、「inc 5」や「inc 6」が50%未満に抑制される割合は「Other」と同程度であるが (それぞれ0.10%, 0.11%, 0.09%), 統計的には有意差があるという判定となる。次に、「50%未満に発現抑制されたエクソンの割合」ではなく、発現抑制の程度で考えると、「inc 2」, 「inc 3」は「other」に比べて明確に影響を受けているが、「inc 4」, 「inc 5」, 「inc 6」への影響は「inc 2」, 「inc 3」に比べると極めて小さい。以上を考え合わせると、18塩基長のスプライシング制御型アンチセンスでは、①「inc 6」までのオフターゲット候補遺伝子を抽出しておき、その発現変動を培養細胞で検証することが有効であると考えられる。②抽出したエクソンの中で、実際にオフターゲット効果の影響を受ける可能性があるのは、「inc 3」までのエクソンと考えられる。ヒト培養細胞に発現していないエクソン (遺伝子) については、実際にオフターゲット効果の影響を受けるか否かの検証することができないが、そのような場合には「inc 3」までのエクソンがオフターゲット効果の影響を受けうるという前提で考察する必要があると思われる。

以上の考察は、「ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果が極めて起こりやすい条件 (アンチセンス濃度 = $ED_{50} \times 10$)」で検証を行った結果に基づくものである。エクソンスキップ

療法に用いられる際のアンチセンスの有効濃度は、 ED_{50} の1~数倍程度であると見積もられることを加味すると、ヒト組織で実際に起こるオフターゲット効果は今回の解析結果よりも弱いと推測され、安全性評価の対象として「inc 3」までのエクソンを考慮することで安全性を担保できると思われる。この点を実験的に示すため、アンチセンス濃度を減少させた際のオフターゲット候補エクソンの発現変動について、引き続き解析を進める。核酸医薬の開発現場においても、アンチセンスの有効濃度を考慮して、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験 (アレイ解析) をデザインすることが望ましいと考えられる。

D-3.1.3. 発現抑制を受けるオフターゲット候補エクソンの割合

本研究では、スプライシング制御型アンチセンスについてオフターゲット効果の検証を行っているが、50%未満まで発現抑制の影響を受けるエクソンの割合は、相補性が高くても10%程度である。これは、RNAを分解するタイプのGapmer型アンチセンスと比較すると遙かに小さい (厚生労働科学研究 医薬品等規制調和・評価研究事業「革新的医薬品の研究環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究」26年度報告書参照)。この要因としては、Gapmer型アンチセンスはRNA鎖のどの部分に結合しても切断するポテンシャルがあるが、スプライシング制御型アンチセンスについては、スプライシング因子が結合する部位 (Exonic splicing enhancer: ESEに相当) に結合しないとエクソンスキップを誘導しないというメカニズムの違いが考えられる。スプライシング制御型アンチセンスは完全相補してもスプライシングに影響しない確率の方が高いので、この観点からも培養細胞を用いた検証が重要であると考えられる。

D-3. 1. 4. 発現抑制の程度と安全性の関連

mRNA を切断・分解する核酸医薬の場合、「オフターゲット効果が生じている」と判断する基準に関しては、「ヒト培養細胞に対し、核酸医薬品を添加していない条件（あるいはコントロールのオリゴ核酸を添加した条件）と比較して、標的遺伝子以外の遺伝子の発現が 50%未満まで低下した場合」と考えるのが適当と思われる。これは、①遺伝子改変技術により作製された遺伝子ヘテロ欠損マウスは、ほとんどの場合、表現型を示さないこと、②ヒトの機能欠損型変異による遺伝性疾患に関しても、多くの場合、ヘテロ欠損では異常が現れないこと（ヘテロ欠損で異常が現れたとしても忍容性が高いと考えられること）による。すなわち、遺伝子発現が 50%程度保たれていれば機能的に大きな異常を伴わないという遺伝学的な知見に基づき、「50%未満まで低下した場合」と規定するのが妥当と考えられる。以上は、一般論から導いた線引きであるので、遺伝子によっては当該遺伝子に特有の性質を加味して安全性を判断すべきと考えられる。

この議論を踏まえて、スプライシング制御型アンチセンスについてオフターゲット効果の線引きを考えると、オフターゲット候補エクソンの発現が 50%未満になると正常遺伝子の発現も 50%未満になるため、正常機能が維持できなくなると解釈できる。従って、線引きは「オフターゲット候補エクソンの発現が 50%未満」と考えるのが妥当であろう。以上は、アンチセンスがオフターゲット遺伝子に対して機能欠失型の影響を与える場合、すなわち、エクソンスキップによりオフターゲット遺伝子のタンパクの読み枠がずれ、遺伝子機能が失われることを前提とした議論である。一方で、エクソンスキップが起こっても読み枠がずれずに、途中のアミノ酸は欠失するものの、C 末

端までタンパクが翻訳されるケースが想定される（確率 3 分の 1 で起こり得る）。このケースは、内在には発現していないタンパクが新たに現れるため、当該変異タンパクの存在が与える影響を考察する必要がある。例えば、オフターゲット遺伝子の遺伝子産物が細胞内でタンパク複合体を形成するための足場タンパクとして機能する場合、部分的に欠失した変異タンパクがドミナントネガティブ体として作用し、タンパク複合体の機能を阻害する恐れがある。この場合は、オフターゲットエクソンの発現抑制の程度では線引きができないため、変異タンパクが実際に安定に生じるのか、有害作用を及ぼしうるのか等、ケースバイケースで安全性の観点から総合的に考察する必要がある。

D-3. 1. 5. 評価系

本研究では高密度エクソンアレイを用いて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を検証した。この結果、高密度エクソンアレイで一定の評価ができることが明らかになったが、ジストロフィン遺伝子の発現が検出できなかったことに代表されるように、プローブと RNA のハイブリダイゼーションを利用した検出法には限界があると推定される（この点は高密度エクソンアレイに限定された問題ではなく、アレイ解析に共通した“検出系の限界”と捉えるべきであろう）。これを補うために、オフターゲット効果が起こる可能性が高いと考えられる遺伝子については、PCR をベースとした評価系を組み合わせることが有効である。また、将来的には RNA の配列をダイレクトに読む次世代シーケンス解析（RNA-seq）も評価法の候補と考えられる。今後、これらの手法と高密度エクソンアレイによる解析を比較し、その整合性を検証しておくことも重要と考える。

D-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

D-3.2.1. 修飾型核酸の導入と TLR9 活性化能減弱の関連

これまで、CpG ODN の TLR9 を介した自然免疫系の活性化は、オリゴ核酸の塩基部分に修飾を施すことにより回避できることが知られている。例えば、Uhlmann らは、①シトシン (C) の 5 位をメチル化すること、②シトシン (C) の 5 位の置換基の種類を変化することで TLR9 の活性が減弱することを報告している (Uhlmann et al., ChmMedChem, 1, 1007, 2006)。一方、これまで糖部を修飾した核酸の TLR9 への影響についてほとんど検討されていなかった。今回の結果から、オリゴ核酸に糖部修飾型核酸を導入することで、TLR9 活性化能が減弱する傾向にあることが初めて示された。LNA に関しては、糖部が架橋されているだけでなく、シトシン (C) の 5 位がメチル化されているため、糖部架橋のみの影響については、今後塩基部修飾と糖部修飾を分けて検討する必要がある。一方、2' -OMe は塩基部に修飾が入っていないため、純粋に糖部修飾の影響のみで TLR9 活性を減弱していると考えられる。糖部 2 位の修飾により、オリゴ核酸自身の立体構造の変化やオリゴ核酸と TLR9 の作用面の変化が減弱の原因として考えられる。今回、2' -OMe 搭載オリゴ核酸に関しては、導入の様式によって TLR9 活性の減弱の程度に差が認められた。この点については、18c オリゴに含まれる CpG ジヌクレオチドのシトシン (C) とグアニン (G) のどちらに 2' -OMe が導入されるか、が TLR9 活性化への影響が異なる要因と考えている。糖部修飾型核酸の導入様式と TLR9 活性化能の変化について法則性を見出すことができれば、TLR9 を介する有害作用のリスクを回避する手法の一助となると期待される。

D-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)

D-4.1. 単味生薬製剤の品質確保に関する研究

単味生薬製剤における煎出剤とエキス製剤の同等性を担保するブリッジングについて実証し、局方手引きに記載されているほとんどの生薬における具体例 (案) を提示した。特に定量法においては、多くの生薬エキスで少なくとも 2 成分を指標とできることを示した。しかし、本検討班における実証的検討は少数の試料を対象にしたものであり、バリデーションも行っていないため、あくまでも具体例を提示した暫定案との位置付けである。本提案を参考として、実用に耐える確認試験及び定量法を確立することが望まれる。

また、これまでの研究会議で作成した単味生薬製剤承認基準原案及び同等性ガイドラインについては、平成 26 年 9 月 1 日～10 月 3 日にパブリックコメントを募集した平成 26 年度中には通知として発出される予定である。

D-4.2. 西洋ハーブの品質確保に関する研究

LC/MS 分析データに基づくチェストツリーとマンケイシの成分比較により、マンケイシに特異的な成分を見出し、単離と構造決定を行い、3-*O*-*trans*-feruloyl tormentic acid と同定した。本化合物の *Vitex* 属からの単離報告は始めてである。

近年、高性能な機器分析により得られた膨大なデータの網羅的解析を行うメタボロミクス研究が急速な発展を遂げており、天然物医薬品のレギュラトリーサイエンス分野においても、薬用植物や生薬の品質管理・評価への活用が検討されつつある。本研究では、同一原料に由来する一般用医薬品と健康食品との品質の違いを評価する上で、メタボローム解析の有用性を検討するため、赤ブ

ドウ葉エキス含有製品 3 製品を対象として LC/MS 分析データを用いたメタボローム解析を行った。医薬品と健康食品との判別分析の結果、医薬品に特徴的な成分としてオリゴ糖、健康食品に特徴的な成分として配糖体を見出すことができた。

健康食品の製品間およびロット間の成分比較では、製品間でピーク強度比 100 倍以上、ロット間でもピーク強度比 20 倍以上の成分を見出し、品質にばらつきが大きいことが示唆された。以上の結果より、メタボローム解析によって、同一の原料由来で添加剤の異なる 3 製品を明確に分類できることが示された。さらに、医薬品および健康食品のロット間の成分比較では、健康食品の成分のばらつきが大きいことが示され、メタボローム解析は天然物由来の医薬品および健康食品の品質評価に有用であることが示唆された。

D-4. 3. 標準煎剤とエキスとの同等性確保研究

煎液とエキスの同等性を担保する指標の一つとしてスウェルチアマリンを用い、日局に規定されている方法を準用することによって比較が可能であることを示した。また、第二の定量成分としてセンブリに含まれていることが報告されており、比較的超波長に吸収極大を持つゲンチオピクロシドを選定し、HPLC を用いた定量法を設定した。文献に報告されているゲンチオピクロシドの含量を表 1 に示す。スウェルチアマリンの含量は日局に 2.0% 以上と規定されており、ゲンチオピクロシドとスウェルチアマリンの含量にはかなり差があるが、ゲンチオピクロシドの吸収極大に合わせた 247 nm で検出する定量条件を用いることにより、スウェルチアマリンとゲンチオピクロシドのピーク面積がほぼ同程度の範囲に収まることから、両者を同時に定量することが可能である。しかし、定量の正確性の観点から、スウェルチアマリンについては検出感度の高い 238 nm で

検出する方法を用いるのが適切である。

D-4. 4. 国内流通の薬類生薬ハッカに関する調査

ヨーロッパの *M. arvensis* は染色体数が $2n=72$ であるが、日本や中国、インドなどアジア圏で *M. arvensis* とされる植物は染色体数が $2n=96$ である。日本で生薬ハッカの基原とされる植物 (var. *piprascens*) も $2n=96$ である。同一種内に染色体数が異なる変種が含まれるということは考えにくく、ヨーロッパとアジア圏の *M. arvensis* はそれぞれ別種であると考えられるべきであろう。

ハッカは生薬としての利用のみならず、ハッカ油、さらにはハッカ油から精製したメントールという形で食品や化粧品、また医薬品にも世界中で多く利用されている。ヨーロッパ薬局方 “Mint oil, partly dementholised”, また米国薬局方 herbal drugs “Dementholised Mint Oil” の項の記述においては、基原の植物種は *M. canadensis* L. になっている。エルメントールやハッカ油を製造している会社にインタビューした結果では、これらの dementholised mint oils の基原植物は日本薬局方のハッカの基原と同じものであるということであった。このような事情を鑑みると、正しいハッカの基原植物を確保するため、また欧米薬局方との調和をも考慮すると、日本薬局方で表記されるハッカの基原の学名は *M. canadensis* L. としたほうがよいのではないだろうか。この点に関しては、ヨーロッパと北米とで *M. canadensis* L. として取り扱っている植物と日本薬局方ハッカの基原植物が確かに同一のものであることを確認する必要がある。

D-4. 5. マオウエキスの成分プロファイル分析

エフェドラアルカロイド除去マオウと、各種アッセイに供してきたマオウエキスが異なる来歴であるため、これまでその同等性について問題と

されていたが、今回 LC/MS による詳細な解析により、その同等性が証明されたため、今後の展開が開かれてきたものと思われる。

D-4.6. マオウエキスの薬理学的解析

マオウエキスが TRPV1 を介した Ca^{2+} 濃度流入作用惹起、及び Paw licking 試験によるインビボ疼痛誘発の作用を示した。アルカロイド除去画分を作製する意義を間接的に示す格好のデータとなる。

D-4.7. ゲノム解析による原料生薬の品質評価

ボウフウ市場品の中に、華山前胡を基原とするものが、含まれる場合があることが明らかになった。華山前胡は、河南省西部、陝西省南西部に分布し、かつては、“同州防風”として当地で使用されていたことが、本草考証により推定されている（同州は、現在の陝西省渭南市一帯の旧地名）他、陝西省では、ボウフウの代用品として使用されていることが、Flora of China に記述されている。このため、委託元企業が、陝西省及び周辺域を産地とするボウフウ類生薬を収集した。これらの試料について、核 rDNA ITS 領域の塩基配列解析を行った結果、約半数の試料が華山前胡を基原とするものであった（これらの試料は、本研究用に収集したものであり、市場には流通していない）。現在、ボウフウの国内市場品は、内蒙古や黒龍江省産が中心であるが、今後の資源調達環境の変化により、陝西省周辺域を産地とするものを取り扱う場合には、注意が必要である。

ジンギョウについては、GenBank に登録された配列の植物材料について、基原同定に問題点が観察された。今回、*G. dendrologi* である植物が誤って *G. straminea* と同定されている可能性があることがわかった。したがって、『局外生規 2012』に規定されている 4 種以外の根も「秦艽」と称して日本市場に流通している可能性が十分に考え

られる。

D-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の LC-HRMS 分析を行い、その結果を説明変数として TRPV1 賦活活性を予測するモデル式の構築を行った。成分分析結果を多変量解析に供するために、データマトリクスに変換する際、各検体のクロマトグラムをアライメントする必要がある。今回、専用のソフトウェアを使用し、アライメント結果が不十分な箇所は、目視で確認を行い修正したが、その際、reference とした検体に、対象とするピークが存在しない場合があり、そのようなケースでは、目視での修正が困難であった。このような状況を避ける手段として、LC-HRMS 分析のデータの取得の際に、全検体のエキスを混合した試料を調製し、その分析結果を reference として使用することが望ましいと考えられた。

主成分分析では、3 種のピークピッキング条件を使用し、その結果を比較したが、抽出するピーク数が増大するに従い、第二主成分までの累積寄与率が減少し、主成分に無相関のデータの割合が増えていると考えられた。スコアプロットからは、抽出ピーク数が増えるに従い、ショウキョウとカンキョウの区分が明確になり、より総合的な解析が出来ていると考えられる。ピークピッキング条件の最適化のためには、今回のショウキョウとカンキョウの様に、明確に区分されるアウトグループを設けておき、主成分分析により、それらを区別可能なピーク数を指標にすることが、有用な手段であると考えられる。

E. 結論

E-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)

E-1.1. 先端的 DDS 製剤の製剤機能評価手法

研究

本年度は、先端的 DDS 製剤のキャリア成分組成や化学構造の検討を行うとともに、機能評価法を検討し、1) 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。2) ポリイオンコンプレックスがタンパク製剤のナノ粒子化に非常に有効であり、堅牢な調製方法を与える可能性が示唆された。3) リポソームへのドキシソルビシン内包率を評価する手法を構築し、脂質組成の内包率への影響を精査した。4) HepG2 細胞を宿主細胞としたトランスポータ発現系を構築し、B 型肝炎由来ペプチドと薬物トランスポーターとの相互作用の可能性を示した。

E-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

動的散乱法により、目視では確認できない析出した粒子を捉えることができ、水性点眼液の析出評価法として動的散乱法が有用であることを見出すことができた。

飽和・析出を生じる弱塩基性化合物製剤の食事の影響を評価するために、パドル法及びポンプを組み合わせて構築した評価システムは、弱塩基性薬物の食事の影響を評価するために有用なツールであると考えられた。

原薬の C_0 、 pK_a 及び対イオン種から成る脱塩判定図を考案した。これにより、製剤中における原薬の脱塩・フリー化を理論的に予測することが可能となった。

また製造工程を管理する先端的手法として、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造粒工程のリアルタイムモニタリングについて検討を行い、以下の結果が得られた。

連続造粒工程の p-CMA として粒度分布、密度、

水分を抽出し、それらに影響を与える p-CPP の抽出を行った。

連続造粒プロセスにおいて、近赤外分光法により造粒物の水分含量モニタリングを行ったところ、造粒物中の水分量の変化を捉えることができた。粒子径モニタリングについてはまだ十分な結果が得られず、代表的なサンプリングをできるような工夫が必要であることが明らかとなった。

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では、ロラタジン OD 錠の吸湿性評価に同分光法が適用可能であることが示された。また、テラヘルツ波受信機（カメラ）によりロラタジン OD 錠のイメージング画像が得られ、今後、吸湿変化（分布）の観察などテラヘルツリアルタイムイメージング解析技術を用いた品質特性評価手法の開発が可能であることが示された。

E-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には混合の自由エネルギーの小さい組み合わせが有利であり、コアモルファス化に用いる化合物の結晶化傾向が低く、TPSA、polarizability や Kier Flex 等の分子の Flexibility が高いものが望ましいことが明らかとなった。

Amorphous 状態で吸湿性の低い薬物同士の組み合わせにおいては、吸湿性の低いコアモルファスが得られることが明らかとなった。

ニコチン酸アミドとのコアモルファス化により、非晶質ニフェジピンの物理的な保存安定性が向上した。コアモルファスの結晶化速度には、非晶質マトリックスの分子運動性が大きく影響していることが分かった。

治験薬および製品の製造に使用される製剤技術であるスプレードライヤーを用いてコアモル

ファスを調製することが可能であることが示された。コアモルファスの製造性、開発可能性が高められ、新たな物性改善アプローチとしての feasibility を提示するものである。

5. スルファメタジンは構造類似の不純物の混入により粉碎による非晶質化傾向が増大すること、また、その程度が不純物の種類により差があることが分かった。不純物の混入により熔融急冷により調製した非晶質スルファメタジンの結晶化も抑制されることが示された。

HPLC の検出器に UV 及び ELSD を併用することで、噴霧乾燥により調製された DPH/S100 固体分散体及び GBM/S100 固体分散体からの薬物及び S100 の溶出速度を同時に評価可能であった。本手法を用いることにより、固体分散体の溶解時に薬物が非晶質状態を維持する場合は、薬物がポリマーの溶出に伴って溶出し、溶出速度が改善されることを見出した。また、緩和時間測定を含めた固体 NMR 測定により、固体分散体中における薬物とポリマーの分子レベルの混和性が薬物の溶出性に強く影響することを明らかとした。

E-1. 4. 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

FTC 法溶出試験装置は比較的精度良く測定でき、機関差・装置間差も小さいことが分かった。ただし、試験製剤によってはガラスビーズの違いなど FTC 法特有の要因が試験結果に影響する可能性があり、今後も変動要因に関して検討する必要がある。難溶性医薬品の溶解性と膜吸収のモデルとして、透析膜を用いた試験液と高分子界面活性剤溶液による 2 相系分画の有用性が示唆された。吸入剤の評価では、吸入流量が高い試験条件で、空気力学的粒子径の測定値に装置間の差が認められた。

リポソーム製剤の微小構造と機能特性に関す

る検討から、負電荷高分子である PGA を用いることで、抗がん薬ドキソルビシンをリポソームに安定に保持できることを明らかにした。生体内の環境を反映したりポ化製剤の放出挙動を確認する上で、試験系に持ち込む脂肪粒子(脂質)量の調整と、混合直後の薬物放出を観測することが重要だと考えられる。また、卵黄レシチンで乳化されたりポ化製剤では、対象薬物により血中での速やかに放出が進む場合と、徐放機能を示す場合がある事が示された。

E-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

ヒト単核球から樹状細胞を分化誘導し、ELISA 及び FACS で性状を解析したところ、細胞表面表現型及び産生するサイトカインは成熟樹状細胞の特徴を示した。末梢血単核球から再現性のある *Ex vivo* 樹状細胞培養法を確立した。

各種細胞に対する LPS の反応性を検討したところ、凍結ヒト単球及びヒト末梢血由来樹状細胞は、いずれも著しく低い反応性であった。LPS に対する反応性の高い新鮮末梢血単球由来のマクロファージを用いて血清の影響を検討した結果、ウシ胎児血清の存在下で強い TNF- α の放出が認められ、血清成分が反応を増強している可能性が示された。従って、樹状細胞を用いる場合にも、血清成分等の補助因子の役割や細胞の凍結融解及び温度管理の影響を検討する必要性が示された。

エンドトキシンで凍結ヒト単球を刺激して IL-1 β の産生は確認できたが、それらの反応性は用いた濃度から想定される活性より低く、凍結保存後の温度管理の重要性が示唆された。一方、成熟樹状細胞では、エンドトキシン刺激による IL-1 β 産生は認められなかった。ヒト末梢血から iPS 細胞を樹立して分化誘導された樹状細胞の利用には、未成熟樹状細胞や樹状細胞前駆細胞等で膜

結合型 CD14 の確認が必要なことが示唆された。

常温乾燥下でエンドトキシンを不活化できる手法として、オゾン過酸化水素混合ガス暴露の適用可能性について検討した結果、50° Cでは3log以上の不活化が確認され、有効性が示唆された。

E-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)

E-2.1. バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究

(1) カルバミン酸アンモニウムを用いたアルカリb-脱離によるO-結合型糖鎖遊離方法を最適化した。

(2) 凝集体評価法としての利用が考えられている光遮蔽法、フローイメージング法、レーザー回折法、動的光散乱法、ナノトラッキング解析法、及び、共振型質量測定法に関して、標準粒子を用いた分析能の比較を行い、これらの分析法を適用可能な粒子径・濃度を確認した。

(3) タンパク質注射剤の不溶性微粒子試験の低容量化の課題として、低容量測定に適した測定条件の設定、精度に関するデータの取得、実製剤での微粒子含量に関するデータの収集が必要であることを明らかにした。また、苛酷試験試料において、不溶性微粒子数と可溶性会合体含量に相関がないことを見出した。

E-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

Tg カイコ由来バイオ医薬品の製造工程由来不純物評価法として、カイコ繭由来タンパク質測定用のELISAを構築し、その有用性を示した。また、Tg カイコのバンク化による管理手法確立に必要な組織採取・凍結・再移植技術の開発を進めた。

E-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

マウス血清中の抗体医薬品を対象として、LC/MSによる血中濃度測定の前処理方法を最適化した。一部の機関では、既存ガイドラインの真度

及び精度の基準に準拠した分析を実施可能であることが実証された。安定同位体標識 Fab を作製した。

E-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

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。

E-2.5. バイオ医薬品の安全性の分析・評価法研究

抗体医薬品の有害反応の初回発現時期や粗オッズ比の計算から、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が示唆された。

E-2.6. 新規ウイルス安全性評価技術の開発

CHO細胞の内在性レトロウイルス様粒子の遺伝子を特定した。またQ-PCRを用いたウイルス除去率の測定において、Nucleaseによる前処理が有用であることを見出した。

E-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)

E-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

「ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果」については、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、オフターゲット効果のリスクのある遺伝子を抽出するための「相補性の基準」を初めて示した。

E-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

一方、「自然免疫活性化」に関しては、近年修飾型核酸の開発進展から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（18塩基長）でTLRを活性化するポジティブコントロールのオリゴ核酸配列を決定した。また、高機能性を付与する修飾型核酸を当該配列に導入して、TLR9活性化能を調べたところ、今回解析した修飾型核酸の多くについて、TLR9活性化能を顕著に抑制する効果があることを見出した。

E-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)

単味生薬製剤に関して、目標であった「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」及び単味生薬製剤承認基準の発出が近いことは画期的である。本ガイドラインは、本研究事業の前身である政策創薬マッチング研究事業「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」から官民共同研究として進めてきた活動であり、今後、生薬・生薬製剤の分野が活性化され、新しい効能効果や新しい生薬を積極的に追加収載する流れが定着するものと考えられる。

西洋ハーブ医薬品も同様にヒューマンサイエンス財団の官民共同研究の中で、西洋ハーブを日本で一般用医薬品として流通させるために、どのように欧州での臨床試験とブリッジングを掛けるか、また、エビデンスを持つ製剤と日本国内で販売する製剤との同等性をいかにして証明するか、検討してきたものである。西洋ハーブは多くが我が国で健康食品として流通しており、たとえ、同じ基原種の医薬品が販売されても、相変わらず健康食品として流通し続けることが予測され、引き続きその品質確保に留意するべきと思われる。今回、LC/MS分析データに基づく赤ブドウ葉エキス含有製品の製品間およびロット間の成分比較により、それぞれの製品に特徴的に配合された添

加剤を正しく検出するとともに、健康食品のロット間の品質のばらつきについて有用な知見を得た。LC/MS分析データを用いたメタボローム解析は、天然物を原料とする医薬品および健康食品の品質評価に有用であると考えられる。

一方、ハッカについては、日本薬局方のハッカの基原植物名変更を迫る重い結論となった。来年度に継続する本研究でさらなる確証が得られた場合、学会、論文誌等での公表と同時に、日本薬局方原案審議委員会に提案を上げることになり、日本の天然物医薬品の品質確保に貢献する重要な成果になり得ると思われる。

エフェドラアルカロイド除去マオウと、各種アッセイに供してきたマオウエキスの同等性について証明されたことは非常に重要であり、今後、薬理学的研究や臨床研究において、エフェドラアルカロイド除去マオウを積極的に使用できるものと思われる。

ボウフウ及びジンギョウを取り上げてゲノム解析による原料生薬の品質評価について検討を進めたが、両者とも複数の基原種から構成される生薬だけに扱いは容易ではなく、また、時代の変遷とともに、分布や流通経路等が変わる天然資源の難しさが明らかとなった。今後も調査研究を進め、正しい基原の生薬の流通を支援する方策を提言することを目指すべき題材と思われる。

F. 健康危機情報

JADERを用いた粗オッズ比の計算等から、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、トラスツズマブでは男性または胃癌、トシリズマブでは10代以下がinfusion reactionのリスク因子である可能性が示唆された。

Infusion reaction報告症例における抗ヒスタミン剤の併用割合は、全有害事象報告症例で見た

時よりも高かった。

トラスズマブ及びベバシズマブでは女性または乳癌，トシリズマブ及びエタネルセプトでは60代以上，インフリキシマブではベーチェット症候群が心不全のリスク因子である可能性が示唆され，ベバシズマブでは遠隔転移を伴う結腸癌・直腸癌，インフリキシマブでは男性またはクローン病，リツキシマブでは60代以上またはびまん性大細胞型リンパ腫が穿孔のリスク因子である可能性も示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表等

Iグループ

- 1) Ueda, K., Higashi, K., Yamamoto, K., Moribe, K.: The effect of HPMCAS functional groups on drug crystallization from the supersaturated state and dissolution improvement. *International Journal of Pharmaceutics*, **464** (1-2): 205-213 (2014)
- 2) Moribe, K., Makishima, T., Higashi, K., Nan L., Limwikrant, W., Ding, W., Masuda, M., Shimizu, T., Yamamoto, K.: Encapsulation of poorly water-soluble drugs into organic nanotubes for improving drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics*, **469**: 190-196 (2014)
- 3) Ueda, K., Higashi, K., Kataoka, M., Yamashita, S., Yamamoto, K., Moribe, K.: Inhibition mechanism of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug crystallization in gastrointestinal fluid and drug permeability from a supersaturated solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62**: 293-300 (2014)
- 4) Izutsu, K., Yonemochi, E., Yomota, C., Goda, Y., Okuda, H., Studying the Morphology of Lyophilized Protein Solids using X-Ray Micro CT: Effect of Post-freeze Annealing and Controlled Nucleation. *AAPS PharmSciTech*, **15**: 1181-1188 (2014)
- 5) Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Yamaki, T., Ohdate, R., Yu, Z., Yonemochi, E., Terada, K. Effects of Formulation and Process Factors on the Crystal Structure of Freeze-dried Myo-Inositol, *J. Pharm. Sci.*, **103**: 2347-2355 (2014)
- 6) 吉田寛幸, 伊豆津健一, 柴田寛子, 桑名明美, 合田幸広, リザーバー式吸入粉末剤における振とう操作と薬物放出量に関する検討: *医療薬学*, **41**: 50-55 (2015)
- 7) 柴田寛子, 伊豆津健一: 直腸投与製剤の種類と用途, *薬局*, **65**: 2365-2369 (2014)
- 8) 吉田寛幸: 経肺吸収製剤の評価法に係る規制の現状について: *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **45**: 891-897 (2014)
- 9) Hattori, Y., Nakamura, A., Arai, S., Nishigaki, M., Ohkura, H., Kawano, K., Maitani, Y., Yonemochi, E.: In vivo siRNA delivery system for targeting to the liver by poly-L-glutamic acid-coated lipoplex. *Results in Pharma Sciences*, **4**:1-7 (2014)
- 10) Hattori, Y., Arai, S., Okamoto, R., Hamada, M., Kawano, K., Yonemochi, E.: Sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA could effectively deliver siRNA to the liver. *Int. J. Pharm.*, **476**: 289-298 (2014)
- 11) 香取典子, 坂本知昭, 小出達夫: 日本薬局方における品質試験と製造工程管理: プロセス解析工学 (PAT) と新たな品質パラダイム, *レギュラトリーサイエンス学会誌*, **4**(2):177-187 (2014)
- 12) Yen HC, Cabral H, Mi P, Toh K, Matsumoto

- Y, Liu X, Koori H, Kim A, Miyazaki K, Miura Y, Nishiyama N, Kataoka K.: Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled in vivo chemotherapy. *ACS Nano* **8**: 11591-11602 (2014)
- 13) Kim, H. J., Takemoto, H., Yi, Y., Zheng, M., Maeda, Y., Chaya, H., Hayashi, K., Mi, P., Pittella, F., Christie, R. J., Toh, K., Matsumoto, Y., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.: Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* **8**: 8979-8991 (2014)
- 14) Wu, H., Cabral, H., Toh, K., Mi, P., Chen, Y. C., Matsumoto, Y., Yamada, N., Liu, X., Kinoh, H., Miura, Y., Kano, M. R., Nishihara, H., Nishiyama, N., Kataoka, K.: Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation. *J. Control. Release* **189**: 1-10 (2014)
- 15) Uchida, H., Itaka, K., Nomoto, T., Ishii, T., Suma, T., Ikegami, M., Miyata, K., Oba, M., Nishiyama, N., Kataoka, K.: Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* **136** (35): 12396-12405 (2014)
- 16) Oe, Y., Christie, R. J., Naito, M., Low, S. A., Fukushima, S., Toh, K., Miura, Y., Matsumoto, Y., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.: Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* **35** (27): 7887-7895 (2014)
- 17) Quader, S., Cabral, H., Mochida, Y., Ishii, T., Liu, X., Toh, K., Kinoh, H., Miura, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K.: Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release*, **188**: 67-77 (2014)
- 18) Mochida, Y., Cabral, H., Miura, Y., Albertini, F., Fukushima, S., Osada, K., Nishiyama, N., Kataoka, K.: Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* **8** (7): 6724-6738 (2014)
- 19) Maeda, Y., Pittella, F., Nomoto, T., Takemoto, H., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.: Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* **35** (13): 1211-1215 (2014)
- 20) Nuhn, L., Gietzen, S., Mohr, K., Fischer, K., Toh, K., Miyata, K., Matsumoto, Y., Kataoka, K., Schmidt, M., Zentel, R.: Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum. *Biomacromolecules* **15** (4): 1526-1533 (2014)
- 21) Kim, H. J., Miyata, K., Nomoto, T., Zheng, M., Kim, A., Liu, X., Cabral, H., Christie, R. J., Nishiyama, N., Kataoka, K.: siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials*

- 35** (15): 4548-4556 (2014)
- 22) Nomoto, T., Fukushima, S., Kumagai, M., Machitani, K., Arnida, Matsumoto, Y., Oba, M., Miyata, K., Osada, K., Nishiyama, N., Kataoka, K.: Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* **5**: 3545 (2014)
- 23) Pittella, F., Cabral, H., Maeda, Y., Mi, P., Watanabe, S., Takemoto, H., Kim, H.J., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.: Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* **178**: 18-24 (2014)
- 24) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhara, 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)
- 25) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, H.: Sensitive method for measuring the concentration of doxorubicin and its metabolites in biological samples. *Chromatogr.*, **35**(suppl2): 81 (2014)
- 26) Itoh, S., Kawano, K., Takeshita, K., Maitani, Y., Tsuji, T.: Development of liposomal nanoconstructs targeting P-selectin (CD62P)-expressing cells by using a sulfated derivative of sialic acid. *Pharm. Res.*, **31**: 2868-2875 (2014).
- 27) Kamoshida, G., Ogawa, T., Oyanagi, J., Sato, H., Komiya, E., Higashi, S., Miyazaki, K., Tsuji, T.: Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). *Clin. Exp. Metastasis*, **31**: 285-291 (2014).
- 28) Kobayashi, M., Shimodaira, S., Nagai, K., Ogasawara, M., Takahashi, H., Abe, H., Tani, M., Okamoto, M., Tsujitani, S., Yusa, S., Ishidao, T., Kishimoto, J., Shibamoto, Y., Nagaya, M., Yonemitsu, Y.: Prognostic factors related to add-on dendritic cell vaccines on patients with inoperable pancreatic cancer receiving chemotherapy: a multicenter analysis. *Cancer Immunol Immunother.*, **63**: 797-806 (2014).
- 29) Koido, S., Kan, S., Yoshida, K., Yoshizaki, S., Takakura, K., Namiki, Y., Tsukinaga, S., Odahara, S., Kajihara, M., Okamoto, M., Ito, M., Yusa, S., Gong, J., Sugiyama, H., Ohkusa, T., Homma, S., Tajiri, H.: Immunogenic modulation of cholangiocarcinoma cells by chemoimmunotherapy. *Anticancer Res.*, **34**: 6353-6361 (2014).
- 30) Koido, S., Homma, S., Okamoto, M., Takakura, K., Mori, M., Yoshizaki, S., Tsukinaga, S., Odahara, S., Koyama, S., Imazu, H., Uchiyama, K., Kajihara, M., Arakawa, H., Misawa, T., Toyama, Y., Yanagisawa, S., Ikegami, M., Kan, S., Hayashi, K., Komita, H., Kamata, Y., Ito, M., Ishidao, T., Yusa, S., Shimodaira, S., Gong, J., Sugiyama, H., Ohkusa, T., Tajiri, H.: Treatment with Chemotherapy and Dendritic Cells Pulsed with Multiple Wilms' Tumor 1 (WT1)-Specific MHC Class I/II-Restricted Epitopes for Pancreatic Cancer, *Clin. Cancer Res.*, **20**: 4228-4239

(2014).

- 31) Hattori, Y., Hara, E., Shingu, Y., Minamiguchi, D., Nakamura, A., Arai, S., Ohno, H., Kawano, K., Fujii, N., Yonemochi, E.: siRNA delivery into tumor cells by cationic cholesterol derivative-based nanoparticles and liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**: 30-38 (2015).
- 32) Ahn, J., Miura, Y., Yamada, N., Chida, T., Liu, X., Kim, A., Sato, R., Tsumura, R., Koga, Y., Yasunaga, M., Nishiyama, N., Matsumura, Y., Cabral, H., Kataoka, K.: Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* **39**: 23-30 (2015)
- 33) Shibata, H., Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Goda, Y: Investigation of factors affecting in vitro doxorubicin release from PEGylated liposomal doxorubicin for the development of in vitro release testing conditions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* on line available (DOI 10.3109/03639045.2014.954582)
- ## II グループ
- 34) Hashii, N., Harazono, A., Kuribayashi, R., Takakura, D., Kawasaki, N.: Characterizations of N-glycan heterogeneities of erythropoietin products by liquid chromatography/mass spectrometry and multivariate analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **28**: 921-932 (2014).
- 35) Shimokawa, M., Kobayashi, K., Sekino, K., Toyoshima, S.: Analysis of perception gap on alliance activities between Japanese biotechnology venture companies and pharmaceutical companies. *Regulatory Science for Medical Products*, **5**(1) 13-27 (2015)
- 36) Gallat, F. X., Matsugaki, N., Coussens, N. P., Yagi, K. J., Boudes, M., Higashi, T., Tsuji, D., Tatano, Y., Suzuki, M., Mizohata, E., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Park, J., Song, C., Hatsui, T., Yabashi, M., Nango, E., Itoh, K., Coulibaly, F., Tobe, S., Ramaswamy, S., Stay, B., Iwata, S., Chavas, L. M.: In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **17**: 369-370 (2014).
- 37) 原園景, 石井明子, 川崎ナナ: 日本薬局方収載に向けて 糖鎖試験法の解説 *Pharm. Tech. Japan*, **31**(1): 81-92 (2015)
- 38) 石井明子, 川崎ナナ: 第 13 章第 2 節 バイオ医薬品 (組換えタンパク質医薬品) の品質関連規制と対応の留意点. 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, pp.523-531, 技術情報協会 東京 (2014).
- 39) 立松謙一郎: 遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産, *JATAFF ジャーナル*, **2**(7): 31-37 (2014).
- 40) 瀬筒秀樹: カイコの遺伝子組換え技術の新展開, *JATAFF ジャーナル*, **2**(7): 24-30 (2014).
- 41) 瀬筒秀樹, 立松謙一郎: 医療用有用タンパク質の生産を目指した組換えカイコの作製と展開, *生化学*, **86**(5): 553-560 (2014).
- 42) 富田正浩: 遺伝子組換えカイコ繭でのタンパク質生産, *生物試料分析* **37**, 159-168 (2014).
- 43) 川崎ナナ: 生物薬品の局方収載の現状と課題 (Current Status and Issues of Biologicals in Japanese Pharmacopoeia). *レギュラトリーサイエンス学会誌*, **4**(2): 149-154 (2014)
- 44) 川崎ナナ: バイオ後続品の品質評価の現状と課題. *医薬ジャーナル*, **50**(5) 1375-1380