

たい。国内企業の話題としては、日東電工/Quark社が開発するND-L02-s0201(標的:HSP47, 適応:肝硬変)が挙げられ、海外でPhase 1試験が開始されている。siRNA医薬品の臨床試験は、国内企業としては初めての例である。ND-L02-s0201では、肝臓における活性化星細胞に取りこませることを目的として、ビタミンAが結合したリポソーム製剤を用いている。siRNA医薬品の開発状況に関しては文献20, 21も合わせて参照されたい。

5.3 miRNAに関連する核酸医薬品

非コードRNAの一つであるmiRNAは20数塩基の短い一本鎖RNAで、主にmRNAの3'非翻訳領域に結合することで、mRNAの機能を阻害する。miRNAも1993年に線虫を用いた研究から発見され^{22, 23}、2001年になってヒトも含めた多くの生物種でmiRNAが存在することが示された²⁴。miRNAの生成機構/作用機構はsiRNAのパスウェイと類似している。すなわち、ゲノムDNAから転写されてヘアピン構造をとったpri-miRNAは、二段階の切断を受けてsiRNAと同じ二本鎖RNAとなる。その後、siRNAと同様にRISC複合体に取りこまれた後、相補鎖であるパッセンジャー鎖が除かれて、一本鎖ガイド鎖(=miRNA)がRISC複合体に残る。この複合体がガイド鎖に相補的なmRNAを認識し、mRNAの翻訳抑制あるいは分解を引き起こす。siRNAとの違いや詳細な分子機構はここでは割愛し、miRNAが標的mRNAの機能を抑制することを強調しておく。

miRNAに関連する核酸医薬品は「miRNAの発現異常によって引き起こされる病態を、miRNAの量を正常化することによって治療する」というコンセプトで創製される。まず、miRNAの発現が減少した病態については、miRNAを補充する試みが行われる。miRNAとは上述の生成経路の最後に生じる一本鎖RNAを指すが、miRNAが機能を獲得するためには相補結合した二本鎖の状態では二本鎖RNAの状態では細胞内に導入することとなる。このようにmiRNAを補充する目的で使われる二本鎖RNAは“miRNA mimic”とも呼ばれ、二本鎖RNAであるため体内への導入にはキャリアが必要である。一般に癌においてはmiRNAの発現が減少していることから、miRNA mimicは癌への適応が特に期待されている。現時点では非臨床試験の段階であり、開発している企業としてはMirna社が挙げられる。

miRNAの発現が亢進した病態では、miRNAの量を減少させる方法論が必要である。miRNAは短いRNAであることから、ほぼ同じ長さのsiRNAによってmiRNAを

認識し、分解することは事実上不可能である。そこで、miRNAの機能を抑制する手法として、miRNAと相補的に結合するアンチセンスが用いられる。miRNA阻害型アンチセンスは、miRNAと標的mRNAの結合をブロックするものであり、アンチセンス医薬品の分類としては「立体障害」となる(Table 3)。miRNA阻害型アンチセンスの開発を行っているのは、アンチセンス医薬品開発の代表格ISIS社とsiRNA医薬品開発の代表格Alnylam社が合同で設立したRegulus社、並びにSantaris社、Miragen社がある。

現在、miRNA阻害型アンチセンスで臨床試験段階にあるのは、Santaris社が開発しているMiravirsenである。Miravirsenは架橋型核酸LNAを含むアンチセンスであり、皮下注射に投与された後、肝臓で機能する。Miravirsenの標的であるmiR-122は肝臓特異的に発現するmiRNAで、miR-122がC型肝炎ウイルスのRNAに結合することがウイルス増殖に必須である。皮下投与されたMiravirsenは肝細胞内でmiR-122をトラップするため、C型肝炎ウイルスの増殖が抑制される。MiravirsenはPhase 2で良好な結果が得られており、Phase 3に入るところである。miRNAに関連する核酸医薬品に関しては文献25, 26, 27も合わせて参照して頂きたい。

5.4 デコイ

デコイ核酸医薬品は「転写因子が結合するDNA領域の塩基配列」を人工的に合成した二本鎖のDNAである。デコイを細胞内に導入すると、標的の転写因子に「おとり(=デコイ)」として結合し、この結果、本来のプロモーターDNA領域と転写因子の結合が阻害される。したがって、デコイはアプタマーと同様に蛋白質の標的とする核酸医薬品である。一般に転写因子はある特定の現象に関わる遺伝子群を同時に発現制御することから、転写因子を標的とした医薬品は効果的に有効性を発揮する可能性を秘めている。

デコイ核酸医薬品の開発はアンジェスMGにおいて進められており、炎症に関連する遺伝子群を制御する転写因子NF κ B(Nuclear Factor-kappa B)を標的としたデコイの臨床研究が進められている。NF κ Bが関与する病態は、アトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患、血管再狭窄、関節症など多岐に渡っており、NF κ Bデコイの応用範囲は広いと期待される。本開発については、文献28, 29に詳しいので、そちらを参照して頂きたい。

デコイ核酸医薬品としては、もう一つAdynxx社が開発するAYX1がある。AYX1はearly growth response protein 1(EGR1)と呼ばれる転写因子と結合し、その機能を阻害する。EGR1は神経可塑性に関与することが知られており、EGR1の阻害により痛みの伝達が遮断される。

現在、手術時に単回投与し、手術後の痛みを低減するという目的で臨床試験が行われている。2013年の時点でPhase 2が終了し、良好な結果が得られている。

5.5 アプタマー

アプタマーは一本鎖 RNA 又は DNA で構成され、その立体構造により標的蛋白質と結合して機能を阻害する核酸医薬品である。試験管内人工進化法 (SELEX 法) によって取得される。アプタマーの利点としては、標的蛋白質への結合性/特異性が高い、免疫原性が低い、化学合成可能で製造、保存が容易であることなどが挙げられる。アプタマーは細胞外で蛋白質と結合して機能を発揮するため、原理的に抗体医薬品と競合する。現在、アプタマーの臨床開発品数は10程度であり、Phase 3の段階にあるものが2品目ある。アプタマーの具体的な開発品目に関しては、文献30, 31に詳細に記載されているのでここでは割愛し、ここではアプタマー開発のトピックとして、REG1を紹介する。

REG1は二つのオリゴ核酸 Pegnivacogin と Anivamersen で構成されるアプタマー医薬品で、Regado社で開発が進められている。Pegnivacoginは血液凝固因子の一つである第IXa因子を標的とするRNAアプタマーであり、第IXa因子を阻害することにより血液凝固を抑制する。一方、AnivamersenはPegnivacoginと相補的に結合するRNA鎖であり、Pegnivacoginの立体構造を変化させることができる。興味深いことに、PegnivacoginはPEG化により血中半減期が24時間以上になるように設計されており、一方で、AnivamersenはPEG化されておらず、半減期は5分未満となっている。すなわち、通常はPegnivacoginを投与することで血液凝固を抑制し、効果が強すぎた場合に半減期の短いAnivamersenを投与することで“解毒”することが可能となっている。

このようなオリゴ核酸にしかできない発想は、抗体医薬品との差別化という意味で重要であり、今後も新しいアイデアが生まれてくることを期待したい。なお、REG1はPhase 2で良好な結果が得られ、現在、Phase 3に入っている。

5.6 CpG オリゴ

CpG オリゴはここまで述べてきた核酸医薬品において副作用と懸念される点を、主作用として利用した医薬品である。すなわち、オリゴ核酸がToll様受容体を介して引き起こす自然免疫系の活性化を、免疫賦活化作用という有効性として捉えた医薬品である。CpG オリゴはワクチンを投与する際の核酸アジュバントとして利用されるケースが多く、一本鎖DNAを認識するToll様受容体9を介し

て作用する。具体的な開発品目に関しては、文献32～34を参照して頂きたい。

6. 最後に

以上、核酸医薬品の基本的性質と開発動向について述べた。今後の課題としては、デリバリー技術のさらなる進展(肝臓以外の臓器への送達、細胞内取り込み効率の向上、投与量の低減)、並びに合成コストの低減が挙げられる。これらの課題に取り組むことが重要であるが、一方で、現在の技術でも核酸医薬品の上市可能なレベルに達しており、まずは、治療可能な疾患を対象にして成功例を出していくことが重要である。

核酸医薬品の規制面については、現状ではケーススタディが少なく、世界的に整備されていない状況であるが、国内においても核酸医薬品のレギュラトリーサイエンスを議論する動きが生まれている。今後、医薬品開発とレギュラトリーサイエンス研究の両輪で前進し、日本発の核酸医薬品が早期に誕生することを期待したい。

謝 辞

本稿を執筆するにあたり、当研究室の吉田徳幸博士、佐々木澄美博士には調査研究やFigure作成等で御協力頂きました。また、核酸医薬品開発に関わる多くの方から御助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) 鈴木和博, 「核酸医薬」 バイオ医薬品. 西島正弘, 川崎ナヲ編. 化学同人. 2013, p.226-234.
- 2) 山口照英, 内田恵理子. 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保, 世界への薬事申請書の書き方成功へのバイブル. 佐藤章弘 企画編集. 技術情報協会. 2012.
- 3) Aoki, Y.; Nagata, T.; Yokota, T.; Nakamura, A.; Wood, M.J.; Partridge, T.; Takeda, S. Highly efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin- α 2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. *Hum Mol Genet.* 2013, 22 (24), p.4914-28. doi: 10.1093/hmg/ddt341. Epub 2013 Jul 23.
- 4) 西川元也. 核酸医薬開発の鍵を握る薬物送達システム (DDS). 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2012. 43 (9), p.778-785.
- 5) 和田猛. 核酸医薬品に求められるもの. 医薬ジャーナル. 48 (1), p.61-63.
- 6) 小比賀聡. 糖部架橋型核酸の医薬への応用. 医薬ジャーナル. 2012, 48 (1), p.65-69.
- 7) Obika, S., et al. Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneturidine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3'-endo sugar pucker. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, p.8735-8738.
- 8) 平尾一郎. 新規機能性核酸の創製へのチャレンジ. 医学の歩み. 2011, 238 (5), p.566-572.
- 9) シード・プランニング社. 2012年版 世界の核酸医薬品開発の現状と将来展望.

- 10) HS 財団規制動向調査ワーキンググループ. HS 財団平成 25 年度規制動向調査報告書「核酸医薬品の開発と規制の動向」. 2014 年 3 月.
- 11) 李知子, 松尾雅文. Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエクソンススキッピング誘導治療. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5), p.536-541.
- 12) Sivanesan, S.; Howell, M.D.; Didonato, C.J.; Singh, R.N. Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy. *Transl Neurosci*. 2013, 4 (1). doi: 10.2478/s13380-013-0109-2
- 13) Osman, E.Y.; Yen, P.F.; Lorson, C.L. Bifunctional RNAs targeting the intronic splicing silencer N1 increase SMN levels and reduce disease severity in an animal model of spinal muscular atrophy. *Mol Ther*. 2012, 20 (1), p.119-26. doi: 10.1038/mt.2011.232.
- 14) Guo, S.; Kempfues, K.J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995, 81 (4), p.611-20. PMID: 7758115.
- 15) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998, 391 (6669), p.806-11. PMID: 9486653.
- 16) Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411 (6836), p.494-8. PMID: 11373684.
- 17) Kleinman, M.E.; Yamada, K.; Takeda, A.; Chandrasekaran, V.; Nozaki, M.; Baffi, J.Z.; Albuquerque, R.J.; Yamasaki, S.; Itaya, M.; Pan, Y.; Appukuttan, B.; Gibbs, D.; Yang, Z.; Karikó, K.; Ambati, B.K.; Wilgus, T.A.; DiPietro, L.A.; Sakurai, E.; Zhang, K.; Smith, J.R.; Taylor, E.W.; Ambati, J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*. 2008, 452 (7187), p.591-7. doi: 10.1038/nature06765.
- 18) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R.K.; Racie, T.; Rajeev, K.G.; Röhl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliensky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.P. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004, 432 (7014), p.173-8.
- 19) Zimmermann, T.S.; Lee, A.C.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Bumcrot, D.; Fedoruk, M.N.; Harborth, J.; Heyes, J.A.; Jeffs, L.B.; John, M.; Judge, A.D.; Lam, K.; McClintock, K.; Nechev, L.V.; Palmer, L.R.; Racie, T.; Röhl, I.; Seiffert, S.; Shanmugam, S.; Sood, V.; Soutschek, J.; Toudjarska, I.; Wheat, A.J.; Yaworski, E.; Zedalis, W.; Koteliensky, V.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.P.; MacLachlan, I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature*. 2006, 441 (7089), p.111-114. Epub 2006 Mar 26.
- 20) 福永淳一, 神津知子. RNAi 創薬と国内外の開発状況. バイオインダストリー. 2012, 29 (7), p.10-14.
- 21) 宮岸真. 核酸医薬 種類と DDS. *Pharma Tech Japan*. 2013, 29 (6), p.115-123.
- 22) Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, 75 (5), p.843-854.
- 23) Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993, 75 (5), p.855-862.
- 24) Lagos-Quintana, M.I.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001, 294 (5543), p.853-858.
- 25) 鹿島理沙, 羽田明子. miRNA 研究最前線. *ファルマシア*, 2013, 49 (6), p.524-528.
- 26) 山田陽史, 吉田哲郎. miRNA 医薬開発の現状と展望. 遺伝医学 MOOK. 2012, 23, p.208-213.
- 27) 尾崎充彦, 落谷孝広. micro 医薬によるがん治療への展開. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5), p.524-528.
- 28) 三宅 隆, 森下竜一. デコイ核酸医薬を用いる血管疾患治療薬の開発. *医薬ジャーナル*. 2012, 48 (1). p.119-123.
- 29) 玉井克人. NF κ B デコイ DNA 軟膏によるアトピー性皮膚炎の治療. *医薬ジャーナル*. 2012, 48 (1), p.125-128.
- 30) 石黒亮. アプタマー創薬と国内外の開発状況. *バイオインダストリー*. 2012, 29 (7), p.4-9.
- 31) 藤原将寿. アプタマー医薬. 医学のあゆみ. 2011, 238 (5) p.507-513.
- 32) Hancock, R.E.; Nijnik, A.; Philpott, D.J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012, 10 (4) p.243-254.
- 33) Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Eggermont, A.; Fridman, W.H.; Galon, J.; Sautès-Fridman, C.; Tartour, E.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2012, 1 (5), p.699-716.
- 34) Bode, C.; Zhao, G.; Steinhagen, F.; Kinjo, T.; Klinman, D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert.Rev.Vaccines*. 2011, 10 (4), p.499-511.

核酸医薬品の実用化促進に向けた取り組み

井上貴雄[#], 吉田徳幸

Study toward practical use of oligonucleotide therapeutics

Takao Inoue[#], Tokuyuki Yoshida

Over the past decade, oligonucleotide-based therapeutics such as antisense oligonucleotides and small interfering RNAs (siRNAs) have been developed extensively. For example, mipomersen (Kynamro™; ISIS Pharmaceuticals), which is a second-generation antisense oligonucleotide administered by subcutaneous injection, has recently been approved by the FDA for the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia. On the other hands, methods for the evaluation of quality, efficacy and safety of oligonucleotide therapeutics have not been fully discussed. Furthermore, the regulatory guidance specific for oligonucleotide therapeutics has not been established yet. Under these circumstances, we started to collaborate with Osaka University and PMDA to discuss regulatory science focused on oligonucleotide therapeutics. Through the collaboration, we would like to propose the possible design of quality evaluation and preclinical safety evaluation of oligonucleotide therapeutics.

Keywords: Oligonucleotide Therapeutics, antisense, regulatory science

1. はじめに

アンチセンス, siRNA, アプタマーに代表される核酸医薬品は, これまで“Undruggable”とされてきた分子を標的にすることが可能であることから, 抗体医薬品に続く次世代医薬品として注目を集めている. 本邦でも第4期科学技術基本計画(平成23年8月19日閣議決定)において革新的治療方法の確立を目指した研究開発推進が謳われる中, 核酸医薬品が明記されるなど, その期待は高まっている. また, ごく最近, 厚生労働省から発表された「先駆けパッケージ戦略」においても, 実用化促進すべき革新的医薬品として核酸医薬品が挙げられている. 核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で, 低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる. また, その物質的性質, 機能的性質から, ひとつのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規の核酸医薬品が誕生すると考えられており, 開発期間の面からも注目される.

核酸医薬に関する最近のトピックスとしては, 2013年に全身投与が可能な核酸医薬品としてKynamro®(一般名: Mipomersen)が世界で初めて上市されたことが挙げられる. Kynamro®はApoB-100のmRNAをターゲットとする家族性高コレステロール血症治療薬であり, キャリア無しで皮下投与された後, 肝臓で有効性を発揮する. これまで核酸医薬品は体内における易分解性の問題から局所投与しかできなかったが, 修飾核酸技術の進歩等によりこの問題が打破され, 適用範囲が大きく広がっている.

以上のように, 核酸医薬は有効性の観点からは上市可能な状況となっているが, 一方で, 先端医薬品であるが故に品質・安全性の評価手法が確立されていないという問題がある. また, 核酸医薬品に特化したガイダンスも整備されていない. 核酸医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究の推進とガイダンスの策定が喫緊の課題である.

2. 研究目標

日本の核酸化学技術は世界でもトップレベルにあり, 特に大阪大学薬学研究所の小比賀聡教授らが世界に先駆けて開発した「架橋型人工核酸」は核酸医薬の分野において特筆すべき成果である. 小比賀教授のグループでは,

[#] To whom correspondence should be addressed:

Takao Inoue; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel/Fax: +81-3-3700-9217; E-mail: takao@nihs.go.jp

この架橋型人工核酸を用いたアンチセンス医薬品の開発を精力的に進めており、上述のKynamro®よりも低用量で、かつ有効性が高いアンチセンス候補品の創製に成功している。現在、高コレステロール血症の原因遺伝子の一つであるPCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) 等を標的としたアンチセンスについて候補物質を得ており、今後、非臨床安全性試験ならびに臨床開発に進む予定である。以上の背景のもと、大阪大学薬学研究科が「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」に採択され、核酸医薬品に関するレギュラトリーサイエンス研究を推進しているところである。本事業の研究目標は、①高コレステロール血症を標的とした核酸医薬候補品(抗PCSK9アンチセンス)の臨床開発、②核酸医薬品のガイダンスの基盤となるコンセプトペーパーの作成、③核酸医薬品の品質や安全性を適正に予測/評価/判断するためのレギュラトリーサイエンス研究の推進、④核酸医薬品ならびにレギュラトリーサイエンスに精通した優秀な人材の育成、である。

3. 連携体制

本事業を推進している研究機関、メンバー、研究内容を以下に記載する(敬称略/順不同)。なお、ガイダンス策定の土台となるコンセプトペーパーの作成については、以下に示す全メンバーが議論に参加しており、大阪大学薬学研究科が中心となり、草案を執筆している。

①大阪大学薬学研究科 (以下、阪大薬)

メンバー：堤康央、小比賀聡、小林直之、橘敬祐、藤坂朱紀、辻野博之、吉田徳幸、伊藤浩介、山本剛史、藤尾慈、櫻井文教、吉岡靖雄、中山博之、宇野公之、土井健史(上記15名のうち5名は、本研究事業を中心的に進め

るメンバーとして本予算枠で事業に参画)

研究内容：研究の統括、抗PCSK9アンチセンスの開発、コンセプトペーパーの作成、核酸医薬品の品質確保に関する基盤研究

②国立循環器病研究センター研究所 (以下、国循)

メンバー：斯波真理子、山本晴子

研究内容：抗PCSK9アンチセンスの安全性と有効性に関する研究

③国立医薬品食品衛生研究所 (以下、NIHS)

メンバー：井上貴雄

研究内容：核酸医薬品の安全性評価に関する調査および基盤研究

④医薬品医療機器総合機構 (以下、PMDA)

メンバー：山田雅信、笹木修、高木和則

研究内容：ガイダンス作成に向けた基盤構築に関する調査研究、コンセプトペーパーの内容に関する議論

⑤ジーンデザイン、塩野義製薬

メンバー：非公開

研究内容：核酸医薬品の原料製造や原薬製造法に関連する情報提供および非臨床安全性評価に関する検討(ジーンデザインは国内で唯一GMPに準拠した核酸医薬製造施設を持つ企業)

人材交流の体制に関しては概略を図1にまとめた。阪大薬の吉田徳幸特任助教が協力研究員としてNIHSに向向し、核酸医薬品のオフターゲット効果に関する研究を実施している。一方、井上貴雄は阪大薬の招聘准教授(附属創薬センター 創薬臨床研究推進ユニット 核酸医薬評価科学プロジェクト)に着任しており、月1回阪大薬を訪問し、本事業に関する会議および個別研究のディスカッションに参画している。阪大薬とPMDAの人材交流に

人材交流の体制

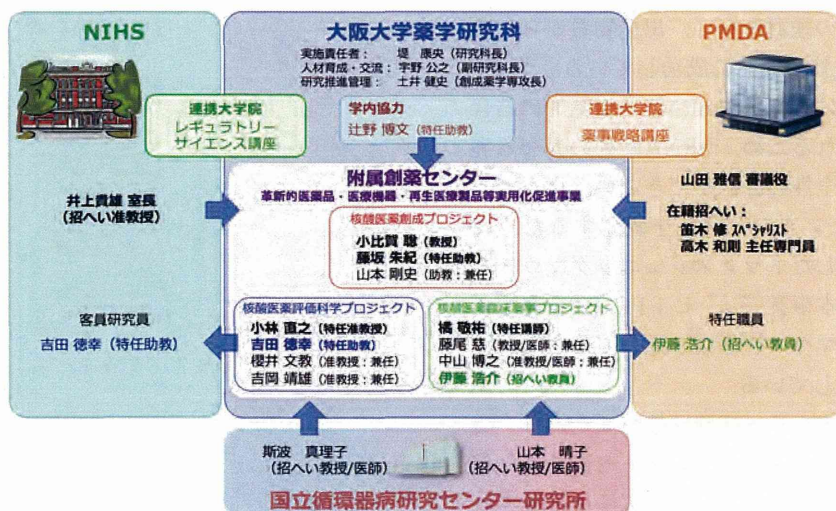


図1 人材交流の体制

関しては、薬事行政に習熟した人材を育成するため、阪大薬の伊藤浩介招聘教員が特任職員としてPMDAに向向している。PMDAでは薬事行政の実務に携わると共に、核酸医薬品の専門家としてPMDA内の核酸医薬品に関連する議論に参画している。一方、阪大薬はPMDAの山田雅信審議役、笹木修スペシャリスト、高木和則主任専門員を在籍招聘として招き、本事業で作成している核酸医薬品に関するコンセプトペーパーの内容／方向性について、定期的に意見の交換を行っている。国循からは斯波真理子特任部長と山本晴子部長を阪大薬の招聘教授に迎え、核酸医薬品の塩基配列の最適化、薬効評価、毒性評価を実施している。

阪大薬の人材交流に関連する取り組みとして特筆すべきは、阪大薬がNIHS およびPMDAと大学院の連携協定を結んでいる点であり、それぞれ「レギュラトリーサイエンス講座」および「薬事戦略講座」が組織化されている。レギュラトリーサイエンス講座には、医薬品（機能性製剤学分野、バイオ医薬学分野、核酸医薬学分野、薬食衛生微生物学分野、医薬等安全性学分野）のみならず、再生医療等製品（遺伝子細胞医薬学分野）、食品（食品安全学分野）、医療機器（医療機器安全学分野）の各分野が設置されており、阪大薬がNIHSとの人材交流を通じ、幅広い分野でレギュラトリーサイエンスを強化する姿勢が伺える。

研究内容

公開可能な研究内容として、平成25年度報告書に記載した研究成果を一部改訂して記載する。

①抗PCSK9アンチセンスの評価に関する試験研究の成果

本研究事業で開発を行う抗PCSK9アンチセンスでは、小比賀教授が独自に創製した修飾型核酸「AmNA」が用いられる。AmNAの効率的な合成経路を確立するため、有機合成に関する種々の検討を行い、出発物質から12段階でAmNAを合成する技術開発に成功している。

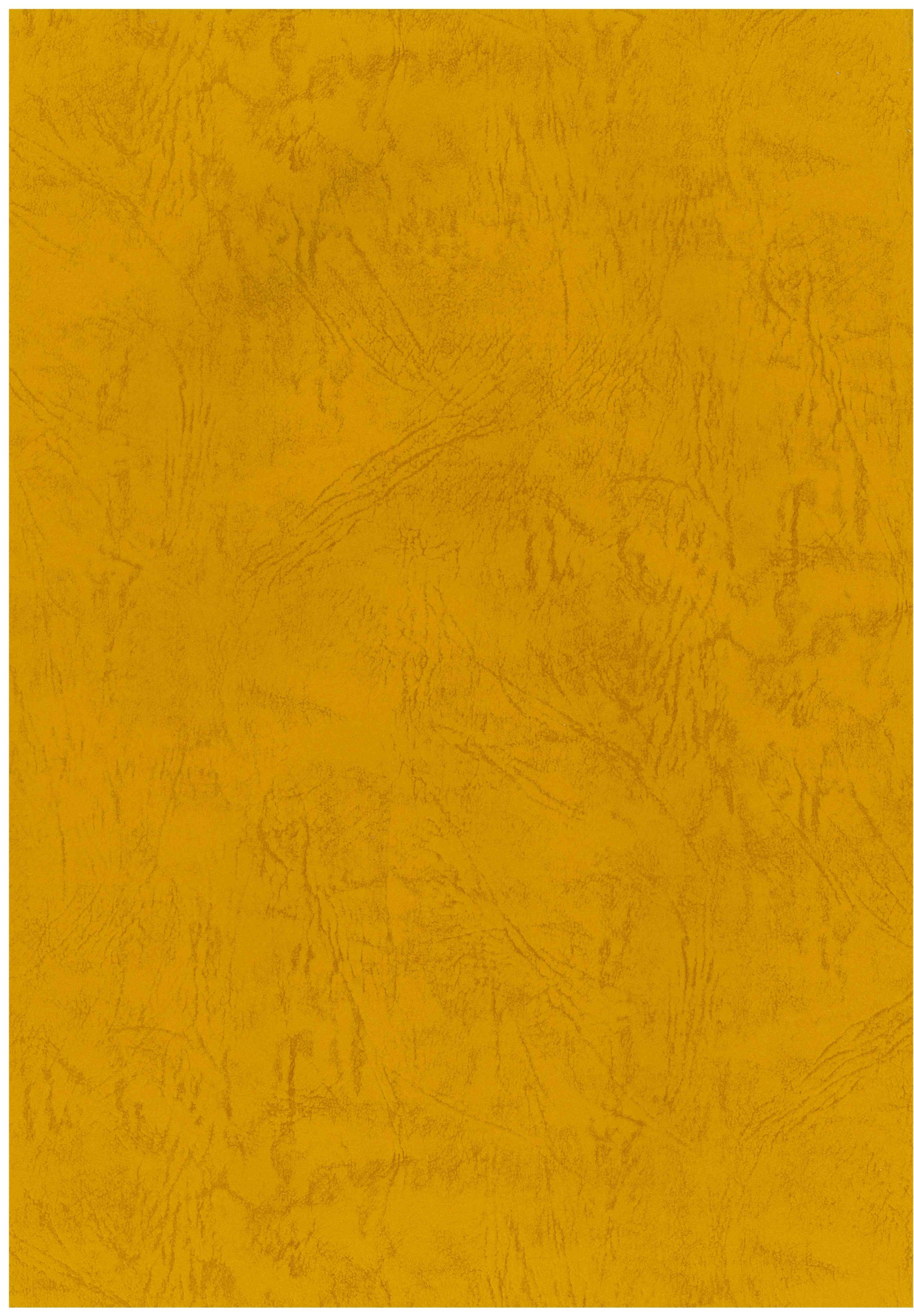
アンチセンス医薬品は、ヒトのmRNAと相補的に結合するようにデザインされるため、mRNA配列の異なる実験動物では有効性や安全性の評価ができない。従って、個体においてアンチセンスの有効性を確認するためには、ヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成する必要がある。本事業では、ヒトPCSK9を発現するトランスジェニックマウスの作成を進めており、現在、F0ヘテロマウスを樹立している。

核酸医薬品を構成するオリゴ核酸は核酸同士がリン酸ジエステルで結合しているが、ヌクレアーゼ耐性等を付与するためにリン酸部の酸素原子が硫黄原子に置換されている（S化）。これにより、リン原子に不斉点が発生す

るため、オリゴ核酸は立体異性体が混合したラセミ体となる。核酸医薬品の品質管理に関する研究として、立体異性体の生成比を変動させる要因を探索している。

②ガイダンス策定の基盤となるコンセプトペーパーの作成

ガイダンス策定の基盤となるコンセプトペーパーとして、「核酸医薬品の品質管理に関するコンセプト」と「核酸医薬品の非臨床安全性試験に関するコンセプト」を作成した。今後、PMDA、NIHS、製薬企業、製造企業等に意見聴取した上で、改訂を行う。非臨床安全性評価に関しては、抗PCSK9アンチセンスをモデルに試験の実施方針を立案した。今年度より、非臨床安全性試験を開始する。



2014 33009A (4/4)

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4分冊)

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

(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. グループ総括研究報告書 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 袴塚 高志	1
II. 分担研究報告書 単味生薬製剤及び西洋ハーブの品質・安全性確保に資する評価法開発	
1. 単味生薬製剤及び西洋ハーブの品質・安全性確保に資する評価手法に関する研究 単味生薬製剤の品質確保に資する評価手法に関する研究 袴塚 高志	11
マンケイシの指標成分探索 袴塚 高志	141
赤ブドウ葉エキス含有製品の成分比較 袴塚 高志	151
2. 単味生薬製剤の理化学的品質評価法の開発 標準煎剤とエキスとの同等性確保に資する指標の検討（センブリ） 木内 文之	163
3. 葉類生薬の成分化学的品質評価法に関する研究 葉類生薬の成分化学的品質評価法に関する研究 伊藤 美千穂	171
漢方製剤の薬効を担保する品質評価手法等に関する研究	
4. 漢方製剤の品質確保に資する化学的評価技術の開発 マオウエキスの成分プロファイル分析 天倉 吉章	177
5. 新規漢方製剤の品質評価手法に関する研究 麻黄の鎮痛作用の薬理学的特性解析 花輪 壽彦	185
原料生薬の品質確保に資する評価法の開発	
6. 成分及びゲノム解析による原料生薬の品質評価法の開発 ボウフウ類生薬の基原種鑑別及び ARMS 法による純度試験法について 丸山 卓郎	193
TRP チャネル賦活活性を指標としたショウキョウ, カンキョウの成分解析について 丸山 卓郎	205
7. 原料生薬のゲノム解析による基原評価法の開発 ジンギョウ（秦艽）の基原植物について 小松 かつ子	217
III. 学会等発表実績（4）	225

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

研究分担者 袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

我が国で古くより医薬品として使用されてきた漢方製剤や単味生薬は、現代においても国民の疾病予防及び健康維持などに貢献しているが、近年の人口分布の高齢化や、生活習慣病、精神・神経疾患の増加など疾病構造の変化に対応して、新規処方、新規生薬及び新規効能効果の実用化が期待されている。また、欧州において医薬品として汎用されている生薬製剤（西洋ハーブ）を、我が国における新規の一般用医薬品（ダイレクトOTC）として導入する動きもますます活発化しつつある。

一方、品質や安全性が確保された新規な医薬品を創出するためには、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。本研究では、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、分析化学、分子生物学、天然物化学及び植物学を組み合わせ、多成分系である天然物医薬品の特質を勘案した品質・安全性の評価法を開発する。

「局方医薬品承認申請の手引き」に記載されている生薬を単味エキス製剤として承認申請する際に必要となる資料等について、単味生薬製剤承認基準原案及び「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）としてまとめた。さらに、「局方医薬品承認申請の手引き」記載生薬のエキスに関して、各種公定書及び文献を調査したのち、単味生薬の煎剤および定量法の指標成分を選定し、その可用性を実証的に検討し、暫定案として示した。これらは、単味生薬エキスに由来するエキス製剤の開発における規格設定に有益な情報となり得るものと思われる。

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った。その結果、マンケイシの指標成分として 3-*O*-*trans*-feruloyl tormentic acid を同定した。本化合物は、*Vitex* 属からは初の単離報告例となる。

赤ブドウ葉エキスを原料とする医薬品 1 製品 2 ロットおよび健康食品 2 製品 3 ロットを対象として、LC/MS 分析とメタボローム解析を行った。主成分分析の結果、スコアプロット上で製品およびロットごとに明確なグループが形成され、それぞれに特徴的に配合された添加剤を正しく見出すことができた。さらに、健康食品のロット間ではピーク

強度が 20 倍以上異なる成分が見いだされ、医薬品に比べてロットによる品質のばらつきが大きいことが示唆された。これらの結果より、LC/MS 分析データを用いたメタボローム解析は、西洋ハーブ由来の医薬品および健康食品の品質評価法として有用であることが示唆された。

単味生薬の標準煎剤とエキスとの同等性を担保するための具体的な評価指標を、センブリについて検討した。確認試験については、日本薬局方に規定されているセンブリの確認試験をそのまま適用することが可能であった。定量成分としては日本薬局方に規定のあるスウェルチアマリンの他に、センブリの成分として報告があり、定量が可能と考えられるゲンチオピクロシドを選定し、各成分についての定量法を作成した。ここで設定した試験法は、センブリエキスの品質管理に活用されることが期待される。

生薬として用いられるハッカについて、日本国内で流通するものをひろく収集し、その基原や性状等について検討した。また、文献調査により、基原の植物種について検討した。近年は灰分の値が基準を超えるサンプルが多くなったという現状の原因を追究したところ、異种植物のもと思われる長毛がハッカ植物体に多数付着していることを発見した。

我々は、マオウ（麻黄）エキスからエフェドリンアルカロイドを除去した EFM (ephedrine alkaloids free Mao extract, 特許 2013-240823) の製造法を構築している。本研究では、マオウエキス及び EFM の成分プロファイルを明らかにするとともに、EFM で消失もしくは減少した成分を同定することにした。その結果、消失若しくは減少した成分は、エフェドリンアルカロイドの他に 6-methoxykynurenic acid, 6-hydroxykynurenic acid 及びケイヒ酸であることが明らかになった。

漢方製剤の新規効能効果を踏まえた品質評価手法の開発を目指し、薬理学的特性解析法として、疼痛関連受容体 TRPV1 発現細胞を用いたインビトロアッセイ及び疼痛モデルマウスを用いたインビボアッセイを検討した。

陝西省周辺域を産地とするボウフウ類生薬を収集し、遺伝子解析により基原種鑑別を行った結果、約半数の検体で、華山前胡を基原とするものが見出された。このため、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の設定を検討した結果、DNA 調製の簡便性、基原種鑑別の特異性、検出感度に優れた試験条件の設定をすることが出来た。

メタボローム解析を利用した生薬の品質評価法を検討するため、ショウキョウ及びカンキョウエキスの LC-HRMS 分析を行い、得られた成分情報について、主成分分析を行うと共に、成分データを説明変数に用い、TRP チャネルの賦活活性を目的変数として、PLS 分析を行い、活性予測モデル式の構築を行った。その結果、多変量解析に供する LC-HRMS 分析データの取得の仕方について、いくつかの課題を見出したが、薬理試験の精度を考慮すると、十分な予測性能を有するモデル式が構築出来、本手法が、生薬の品質評価の手段として有用であると考えられた。今後、検体数を増やし、モデル式の精度を検証する必要がある。

「秦艽」の基原鑑別法を開発する目的で、主に中国で収集した *Gentiana* 属 *Cruciata* 節の *G. macrophylla*, *G. straminea*, *G. crassicaulis*, *G. dahurica*, *G. officinalis*, *G. siphonantha*, *G. dendrologi*, *G. decumbens*, *G. tibetica* 及び市場流通生薬について、核 rDNA の ITS 領域の塩基配列を解析した。各種の鑑別には、上流から 25 番目, 29 番目, 42 番目, 71 番目, 116 番目, 184 番目, 195 番目, 226 番目, 228 番目, 413 番目, 423 番目, 548 番目, 551 番目, 558 番目, 564 番目, 573 番目, 587 番目及び 607 番目の塩基の種類と、1 箇所 (118 番目~120 番目) の挿入の有無が重要であることを見出した。上記のマーカー配列に基づき市場品の基原を検討した結果、内蒙古自治区産秦艽は *G. dahurica*, 青海省産秦艽は *G. crassicaulis* であると同定された。四川省産秦艽は、*G. crassicaulis* と現在不明の 1 種が交配した植物に由来することが判明した。

研究分担者

木内文之 慶應義塾大学薬学部 教授

伊藤美千穂 京都大学大学院薬学研究科
准教授

天倉吉章 松山大学薬学部 教授

花輪 壽彦 北里大学東洋医学総合研究所
所長

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

品を創出するためには、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。本研究では、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、分析化学、分子生物学、天然物化学及び植物学を組み合わせ、多成分系である天然物医薬品の特質を勘案した品質・安全性の評価法を開発する。

A. 目的

我が国で古くより医薬品として使用されてきた漢方製剤や単味生薬は、現代においても国民の疾病予防及び健康維持などに貢献しているが、近年の人口分布の高齢化や、生活習慣病、精神・神経疾患の増加など疾病構造の変化に対応して、新規処方、新規生薬及び新規効能効果の実用化が期待されている。また、欧州において医薬品として汎用されている生薬製剤（西洋ハーブ）を、我が国における新規の一般用医薬品（ダイレクト OTC）として導入する動きもますます活発化しつつある。

一方、品質や安全性が確保された新規な医薬

B. 研究方法

B-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-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-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 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-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麻黄を用い、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-6 麻黄エキスの薬理的解析

麻黄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 Ca²⁺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-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-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。

C. 結果

C-1 単味生薬製剤の品質確保に関する研究

単味生薬エキスと煎剤の同等性確保のためのブリッジングガイドライン（案）では、標準煎剤と生薬エキスの指標成分定量値の比較を少なくとも 2 成分について行い、それらの同等性を担保することとしている。昨年度に続き、さらに 14 生薬（ウワウルシ、カゴソウ、キキョウ、ケツメイシ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、サンキライ、シャゼンソウ、センナ、センブリ、ダイオウ、ニンジン、ボウイ、マクリ）について指標成分を選定したうえで確認試験と定量法について実証試験を行ったところ、いずれも概ね妥当性があるものと判断された。

C-2 西洋ハーブの品質確保に関する研究

チェストツリー及びマンケイシの果実について、LC/MS 測定とピーク抽出を行い、6,508 のピークを得た。次に、チェストツリーとマンケイシの判別分析（OPLS/O2PLS-DA）を行った結果、両者は、それぞれのグループに明瞭に区別可能であった。二群間におけるピーク強度を比較した結果、チェストツリーには全く含まれ

ず、マンケイシにのみ含まれるピーク7つのうち、天然物として不自然ではない組成式を有する化合物をマンケイシの指標成分候補として見出した。

マンケイシをクロロホルムで抽出後、Silica gel カラムクロマト、逆相カラムクロマト、及び CHP-20 を用いたカラムクロマトにより分離し、最終的には逆相 HPLC で繰り返し分離精製を行い、目的化合物を単離した。本化合物は無色非晶形物質で得られ、TOF-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMQC スペクトルの解析により、3-*O*-*trans*-feruloyl tormentic acid と同定された。

C-3 標準煎剤とエキスとの同等性確保研究

センブリを材料として選択し、各国薬局方及びそれに準ずる基準等を調査した結果、指標となりえる化合物としてスウェルチアマリンの他に、CP に規定のあるスウェロシド (sweroside) 並びにセンブリの成分として報告されているゲンチオピクロシド (gentiopicroside) が考えられた。これらのうち定量に際して妨害ピークが少ないと考えられ、より超波長側に極大吸収を持つゲンチオピクロシドを第2の指標成分とすることとした。

日局「センブリ」より煎じ液及びそのエキスを調製し、確認試験及び定量法の可用性を検証したところ、いずれも良好な結果を与え、スウェルチアマリン及びゲンチオピクロシドに関する試験項目がほぼ確立された。

C-4 国内流通の葉類生薬ハッカに関する調査

ハッカに関する文献調査の結果、最近出版された“Mint” The genus *Mentha* (Edited by Brian M. Lawrence, Taylor & Francis Group LLC, 2007) によれば、植物分類学的には、日本薬局方にハッカの基原として記載されている *Mentha arvensis* Linné var. *piperascens*

Malinvaud という学名は *M. canadensis* L. に書き換えられていることが分かった。

収集したハッカはすべて乾燥品であり、産地によって茎部分が紫色のものとうでないものがあったり、葉の厚みが異なっていたりする違いはあったが、腺鱗の様子や腺毛などについて、大きく異なるサンプルは見当たらなかった。すなわち、通常の形態観察から、基原の種が異なっていると予想されるようなサンプルはなかった。

C-5 マオウエキスの成分プロファイル分析

エフェドリンアルカロイド除去マオウ (EFM) の製造に用いた麻黄エキスと活性評価に用いた麻黄エキスを LTQ-orbitrap 型 LC/MS で分析し、これらのピークは PDA (254 nm), TIC 共によく一致したことから、各麻黄エキスは同等であることが明らかになった。また、エフェドリンアルカロイドの他に、4つのピークが EFM において消失もしくは減少していることが分かり、このうち3つは既知の 6-methoxykynurenic acid (1), 6-hydroxykynurenic acid (2) 及びケイヒ酸であった。

C-6 麻黄エキスの薬理学的解析

TRPV1 を強制発現させた細胞株 mTRPV1/Flp-In293 細胞に麻黄エキスを添加後、細胞内の Ca²⁺濃度を解析した。その結果、麻黄エキスの添加濃度に依存して細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が観察された。一方、TRPV1 特異的阻害剤である BCTC (4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-*N*-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazinecarboxamid) の前処理により、麻黄エキスによる細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は抑制された。以上の結果より、麻黄は、TRPV1 を介した Ca²⁺の流入を惹起する作用を有することが明らかとなった。また、マオウエキスに対して、マウスを用いたインビボ疼痛試験のひとつである Paw licking 試験を

実施したところ、投与量依存的に疼痛行関連行動時間が増加した。また、麻黄エキスによる Paw licking 時間は、TRPV1 特異的阻害剤である BCTC の同時投与によって抑制された。以上の結果より、麻黄は感覚神経に発現している TRPV1 を介した疼痛を誘発することが明らかとなった。

次に、麻黄が TRPV1 の脱感作を介した鎮痛作用を有するのかどうかを、カプサイシンによる Paw licking 試験を用いて解析した結果、麻黄は TRPV1 の脱感作を介して鎮痛作用を発現することが示唆された。

C-7 ゲノム解析による原料生薬の品質評価

ボウフウ類生薬として入手したものについて ITS 領域の塩基配列を解析したところ、少なからぬ検体がボウフウではなく、華山前胡であった。

ボウフウの純度試験を設ける目的で、ボウフウ及び華山前胡の ITS 領域の塩基配列の多重整列解析を行い、ARMS 法のターゲットとして適切な部位を見出し、特異的なプライマーを設定した。1% 疑似混合試料あるいは 5% 疑似混合試料を含む検体でも華山前胡由来の PCR 産物を検出することが可能であり、また、陽性対象プライマーによる PCR も、特に問題が見られなかった。

ジンギョウについては、Cruciata 節 9 種の ITS1, 5.8S, 及び ITS2 領域の塩基配列を比較したところ、若干の種内多型が認められるものの、各種に特徴的な配列が認められた。

C-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のエキスについて、LC-HRMS 分析を行い、各検体から得られたデータをアライメントし、様々な条件でピーク抽出した後、主成分分析を行った。ショウキョウ由来の試料は、全て第一主成分 (Factor 1) が正、第二主成分が負の値を示し、一定の範囲内に区分された。カンキョウ由来の試料は、全

て第一主成分が、負の値を示した。従って、第一主成分の正負により、ショウキョウとカンキョウは区別された。

D. 考察

D-1 単味生薬製剤の品質確保に関する研究

本年度は昨年度に引き続き、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、局方手引きに収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、昨年度までの班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-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-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、比較的長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。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 国内流通の葉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。I-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-5 マオウエキスの成分プロファイル分析

エフェドリン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-6 麻黄エキスの薬理的解析

麻黄エキスが 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-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-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、主成分に無関連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

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ることを期待すると共に、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ことを期待する。

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。

エフェドリン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、エフェドリン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標とすべき題材と思われる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T. and Goda, Y.: Characterization of phenolic constituents from ephedra herb extract, *Polyphenols Communications* 2014, 605-606 (2014).
- 2) Fukahori, M., Kobayashi, S., Naraki, Y., Sasaki, T., Oka, H., Seki, M., Masada-Atsumi, S., Hakamatsuka, T. and Goda, Y.: Quality evaluation of medicinal products and health foods

- containing Chaste Berry (*Vitex agnus-castus*) in Japanese, European and American markets. Chem. Pharm. Bull., 62: 379-385 (2014).
- 3) He, J. Y., Zhu, S., Goda, Y., Cai, S. Q. and Komatsu, K.: Quality evaluation of medicinally-used *Codonopsis* species and *Codonopsis Radix* based on the contents of pyrrolidine alkaloids, phenylpropanoids and polyacetylenes. J. Nat. Med., 68: 326-339 (2014).
2. 学会発表等
- 1) 呉曉婷, 朱姝, 合田幸広, 小松かつ子: *Gentiana* 属生薬の基原と品質に関する研究 (3) —*Gentiana* 属 8 種及び秦艽の ITS 配列について. 日本生薬学会第 61 回年会, 2014, 9/13-14, 福岡.
- 2) 日向須美子, 日向昌司, 天倉吉章, 合田幸広, 花輪壽彦: Herbacetin の TrkA リン酸化阻害を介した神経突起伸張抑制作用及び疼痛抑制効果. 第 131 和漢医薬学会学術大会 (2014. 8. 30-31, 千葉)
- 3) Yoshiaki Amakura, Morio Yoshimura, Saori Yamakami, Takashi Yoshida, Masashi Hyuga, Sumiko Hyuga, Toshihiko Hanawa, Yukihiro Goda: Characterization of phenolic constituents from ephedra herba extract, 第 27 回国際ポリフェノール会議 (2014. 9, 愛知) .
- 4) 日向須美子, 日向昌司, 大嶋直浩, 丸山卓郎, 袴塚高志, 天倉吉章, 合田幸広, 花輪壽彦: エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFM) の薬理作用. 日本薬学会第 135 年 (2015. 3. 25-28, 神戸)
- 5) 大嶋直浩, 山下忠俊, 日向須美子, 日向昌司, 鎌倉浩之, 丸山卓郎, 袴塚高志, 天倉吉章, 花輪壽彦, 合田幸広: エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFM) の製造法及びその成分組成について. 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3. 25-28, 神戸)
- 6) 高橋純, 中森俊輔, 小林義典, 香川聡子, 神野透人, 日向昌司, 袴塚高志, 合田幸広, 日向須美子, 花輪壽彦: 麻黄の capsaicin 誘発性疼痛に関する鎮痛効果. 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3. 25-28, 神戸)
3. その他, 単行本等
- 1) 「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」平成 26 年度に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として発出予定.
- H. 知的財産権の出願, 登録状況
- 発明の名称: エフェドリン除去麻黄エキスと, その製法及び用途
- 出願番号: PCT/JP/ 2014/80605
- 出願日: 2014 年 11 月 19 日
- (基礎出願: 2013 年 11 月 21 日)
- 出願人: 株式会社常磐植物化学研究所 立崎仁・学校法人北里研究所・国立医薬品食品衛生研究所長
- 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