

整えるべく、スキップ試験の適用、中止、再開の原則を定めた。また、スキップ試験にはいくつかの方式があることを示すとともに、含量均一性試験などへの具体的適用法ならびに基準を定めた（厚生科学研究／医薬安全総合研究事業）。

#### 4. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

ミレニアムプロジェクトにおいて、患者から採取した血液中の薬物およびその代謝物の濃度を測定するため、塩酸イリノテカン、タキサン系抗ガン剤、テガフルンについて、その代謝経路を調査して、生体試料中の分析法を確立し、そのバリデーションを行った。また、ヒト肝ミクロゾームによって、塩酸イリノテカンから新規代謝物が生成することを確認した（薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業）。

#### 5. 医薬品の物理・化学的安定性に関する研究

高分解能<sup>13</sup>C固体NMRおよび<sup>1</sup>HパルスNMRを用いて、デキストランなどの高分子を添加剤としたタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性を測定した結果、カーボンおよびプロトンの回転系におけるスピンスピン緩和時間 $T_{1\rho}$ が、スピンスピン緩和時間 $T_1$ に比較して、運動性の変化をより感度よく測定でき、タンパク質の安定性とより密接に関係することが明らかになり、安定性評価の指標として非常に有用であることが分かった（厚生科学研究／医薬安全総合研究事業）。

ポリビニルピロリドンなどの高分子添加剤と非晶質ニフェジピンの固体分散体について測定した誘電緩和時間およびガラス転移点 $T_g$ の昇温速度依存性に基づく構造緩和時間は、ニフェジピンの結晶化速度と同様の温度依存性を示すことが明らかになり、保存時における結晶化速度を緩和時間に基づいて予測できる可能性が示唆された（官民共同プロジェクト研究／創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

イソプロピルアクリルアミドから $\gamma$ 線照射によって調製した刺激応答性ハイドロゲルは、重合開始剤を用いる従来法に比較して、より均一なゲルネットワークを有し、その結果、徐放化された薬物放出特性を示すことが明らかになった（国立機関原子力試験研究費）。

医薬品添加剤として用いられる高分子の凍結溶液中での相分離について、その機構とタンパク質などの高分子医薬品の構造に対する影響を検討した。

#### 6. 麻薬および依存性薬物に関する研究

ジヒドロコデイン、アセトアミノフェン、ペンタゾシンなど薬物中毒の頻度の高い薬物をそれぞれラットに投与し、毛髪から投与薬物及び代謝物を確認した。ジヒドロコデイン、アセトアミノフェンによる薬物中毒のヒト毛髪からも、使用薬物とその代謝物を検出し、毛髪によるそれらの薬物中毒診断の有効性を示した。また、ダンシル誘導体化法を用いる生体試料中のフェンフルラミンおよびフェンテルミンのHPLCによる高感度分析法を開発した。

向精神薬( $\alpha$ -methyltryptamine,  $\gamma$ -butyrolactone お

よび zolpidem) について、呈色反応、赤外吸収スペクトル分析、薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーならびにガスクロマトグラフ／質量分析を行い、これらの測定結果に基づいて分析マニュアルを作成した（医薬局監視指導・麻薬対策課委託研究費）。

5種類のアヘンアルカロイド、メコニン、ならびにモルヒネの主代謝物であるモルヒネ-3-および-6-グルクロン酸抱合体について、尿中からの抽出法を検討し、これらの尿中薬物のLC/APCI-MSを用いた同時定量分析法を確立した。さらに、ラットを用いてアヘン気化成分の吸入実験を行い、尿中への各薬物の排泄パターンを検討した結果、メコニンがアヘン喫煙者の尿中薬物分析をする際の薬物マーカーとなる可能性が示唆された（厚生科学研究／医薬安全総合研究事業）。

## 生 物 薬 品 部

部 長 早 川 堯 夫

### 概 要

ゲノム解読が一段落し、ポストゲノムの中心課題であるゲノム機能解析研究、そしてゲノム創薬、ゲノム医療という目標に向かう大きなうねりが始まった。こうした中から多くの新規合成医薬品、タンパク質性医薬品、遺伝子治療薬、細胞・組織利用医薬品等の開発が期待されている。こうした研究の渦中にあることや、その動向に絶えず触角を研ぎすましていることは、生物薬品の特性、品質、安全性、有効性等の評価の一端を担う業務を行う上で不可欠な活動である。

ミレニアムプロジェクトにおけるヒトゲノム・再生医療事業の一環として、次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究及び細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する基盤研究が開始され、順調な展開をみせている。前者の研究成果に関連して、標的細胞指向性や目的遺伝子発現調節機構を備えたベクターを迅速、簡便に構築できるという遺伝子導入技術が当部で開発されつつあることは、次世代遺伝子治療薬創製のためのバックボーンの提供ということにとどまらず、遺伝子改変細胞や遺伝子改変動物等の評価系の開発、さらには遺伝子関連の各種基礎研究やゲノム機能解析の推進に強力なツールを提供するものとして注目できる。また、細胞・組織加工医薬品等に関する研究において、ウイルス安全性面からは、各種ウイルス検出法の高感度化に資する技術開発が進展しつつある。

一方、糖タンパク質の解析に関して、迅速・簡便化、高精度化、高感度化した手法の開発が着々と進展しつつある。これは、糖タンパク質性医薬品の特性・品質評価法としての応用のみならず、細胞・組織加工医薬品等における有効成分として分泌される糖タンパク質の解析、あるいはプロテオーム

研究にきわめて有用な手段を提供するという点で意義深いと考えられる。

国際調和関係では、ICHのCTD-Qに関する国際調和文書の作成に向け全面協力をした。また、ICHの生物薬品の特性解析、品質確保及び規格及び試験方法に関する国際調和ガイドラインの考え方及び内容をわが国で定着させるための活動にも注力した。さらに、遺伝子治療薬、細胞治療薬、トランスジェニック動物由来医薬品等の新たなバイオ医薬品の品質、安全性確保等に関する国際動向に関して調査研究し、わが国の施策を国際的に調和のとれたものとする作業を進めた。細胞・組織利用医薬品等については、わが国の指針を整備する上での中心として貢献した。その他、最近、欧米を中心にホットな話題となっている生物薬品の同等性/同質性評価 (comparability) に関して検討を進め、本課題に対して科学的にどのようにアプローチするかに関する考え方を提示した。これは、ICH6に向け新たなトピックスとなる。薬局方の国際調和は、一般試験法関係でそれぞれ調和活動に参画したが、特に各種電気泳動法の調和に関して着実な進展がみられた。

最近、タンパク質性医薬品の新薬申請の数が増加しつつあり、特別審査や専門協議などに従事する時間も自ずと増加した。今後、ポストゲノムでの成果が反映されるようになれば、さらに飛躍的な増加が予測される。

人事面では、重点支援協力研究員として派遣されていた日向須美子氏が平成12年10月1日付けでヒューマンサイエンス振興財団ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業の流動研究員として採用された。伊藤さつき氏が平成12年10月1日付けで重点支援協力研究員として派遣され、平成13年4月1日付けでヒューマンサイエンス振興財団ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業の支援研究員として採用された。ヒューマンサイエンス振興財団よりヒトゲノム・再生医療等研究事業の研究支援者として瓶子宣子氏が平成12年5月1日付けで採用され、平成13年3月31日付けで退所された。平成13年3月31日付けで非常勤職員の村井淳氏が退所された。重点支援研究員として派遣されていた柴山理恵氏及び細野哲司氏が平成13年4月1日付けで非常勤職員に採用された。

海外出張は以下のとおりであった。早川部長：ミレニアム世界薬学大会に出席・講演（米国：平成12年4月16日～平成12年4月22日）、生物薬品2000年会議に出席・講演（米国：平成12年6月3日～平成12年6月11日）、欧州におけるバイオテクノロジー応用医薬品等の品質・安全性の確保方策について最近の動向を調査研究（ベルギー・フランス：平成12年7月15日～平成12年7月26日）、第3回IBC国際会議に出席・講演（米国：平成12年9月16日～平成12年9月23日）、第5回日米EU医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議（ICH5）に出席・講演（米国：平成12年11月5日～平成12年11月13日）；山口室長：第3回IBC国際会

議に出席（米国：平成12年9月16日～平成12年9月23日）；川西室長：トランスジェニック動物/クローン動物を利用して製造した医薬品の安全性評価に関する調査（米国・英国：平成12年11月30日～平成12年12月10日）；内田室長：第4次韓国食品医薬品安全庁国際シンポジウムに出席・講演（韓国：平成12年9月4日～9月7日）；水口研究員：第3回アメリカ遺伝子治療学会に出席・講演（米国：平成12年5月31日～6月7日）

#### 業務成績

1. 特別審査 12件
2. その他

第14改正日本薬局方作成作業に伴う業務、中央薬事審議会（薬事・食品衛生審議会）各種調査会・部会・専門協議、日本薬局方外医薬品成分規格検討委員会、原体・添加物小委員会（いずれも医薬安全局審査管理課）、科学技術会議政策委員会/革新技術審査委員会、各種国際協力事業などに協力した。

#### 研究業績

1. 生物薬品の特性と品質評価技術に関する研究

i) LC/MSは、産生細胞の異なる3種類のエリスロポエチンの糖鎖構造及び分布の違いを明確にできることから、糖タンパク質性医薬品の特性解析法、糖鎖部分の恒常性評価法、及び同等性/同質性評価法として有用であることが確認された（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

ii) エリスロポエチンの糖鎖の一部が硫酸化されていることを見出した。また、エキソグリコンダーゼ消化法、及びNMRによって、硫酸基は非還元末端側のGlcNAc-7の6位カーボンの水酸基に結合していることが明らかになった（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

iii) フォリスタチン(FS)の糖鎖部分の機能を解析するための糖鎖構造の改変を目的として、FS産生CHO細胞にN結合糖鎖のcore mannoseへGlcNAcを転移しbisecting構造を形成させる酵素であるGnT-III遺伝子を導入し、糖鎖にbisecting GlcNAcが付加したFSを得ることができた（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

iv) ガングリオシドGD1aは、マウスのHGF受容体c-METだけではなくヒトのc-METのチロシンリン酸化も抑制することを見出した。c-METを過剰発現している癌細胞はHGFにより転移能が亢進することから、このような癌細胞に対して、GD1aは転移抑制剤と成り得ることが示唆された（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

v) バイオテクノロジー応用医薬品の生物活性評価法の開発の一環として、DMSO処理したHL-60細胞の増殖性を指標として、IL-3、GM-CSF及びIL-6の生物活性を測定する方法を確立した。

vi) 細胞・組織利用医薬品の品質・安全性評価技術開発の一環として、①ウイルス検出法の高感度化を目的としたウイルス濃縮法に関する検討を行い、ポリエチレンイミン磁気

ビーズ等を用いた方法が極めて有用であることを見出した。

②Gバンド解析, Competitive Genome-hybridization解析, マルチカラーFISHを適切に組み合わせることにより, 染色体転座などの細胞特性変化を的確に解析できる手法を確立した。

③細胞由来タンパク質プロファイル迅速・高感度解析法の一環として, 2次元電気泳動での特定タンパク質の帰属決定法を確立した。また, 細胞由来タンパク質のモデルとしてトロンボモジュリン及びフォリスタチンを用い, ミクロLC/MSによるペプチド及び糖ペプチドマッピング, 並びにLC/MS/MSのprecursor-ion scanによる糖ペプチドマッピングを行い, これらの手法が, 微量タンパク質の一次構造, 修飾アミノ酸, 糖鎖結合位置, 糖鎖構造, 及び部位特異的糖鎖の不均一性の解析に応用できること, したがって細胞・組織加工医薬品等の有効成分として分泌されるタンパク質の特性解析法として有用であることを明らかにした。

④組織・細胞加工医薬品等から分泌される目的タンパク質の生体内発現量や体内動態に関する新規評価法の開発研究を開始し, FlAsH (4', 5'-bis (1, 3, 2-dithio- arsolan-2-yl) fluorescein)を用いた血液中の目的タンパク質の簡便な定量的蛍光標識法を開発した。

⑤ヒト血液幹細胞より血管内皮細胞を誘導する系を確立した (厚生科学研究費補助金)。

vii) 医薬品の品質規格に関わる国際動向を踏まえた評価に関する研究の一環として, ①細胞・組織利用医薬品の品質や安全確保のための試験法や基準の設定, さらには規制のあり方について, 特にドナー適正を中心に国際動向について研究を行った。②遺伝子治療薬の品質, 安全性確保の基準や試験法に関する国際動向をウイルスベクターの安全性確保を中心に検討した。③製造方法が変更されたバイオテクノロジー医薬品の変更前の製品との同等性/同質性に関する評価法をわが国において確立するため, 諸外国における現状に関する調査研究を行った (厚生科学研究費補助金)。

## 2. 医薬品の有効性と安全性に関する生物化学的研究

i) 多形核白血球機能の分子機構並びに各種薬剤の有害作用発現に関する生化学的研究の一環として, 多形核白血球よりL-plastinを精製し, L-plastinが食食に関与すると報告されているコロニンと結合する可能性を見いだした。また, L-plastinの単クローン抗体の作製を行った。

ii) プラスミンにより惹起される血小板形態変化には,  $Ca^{2+}$ 依存性と非依存性の情報伝達経路が存在し, 後者ではRho-kinaseが働いていること, 両経路がcAMPに感受性であることを明らかにした (HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

## 3. 生体内活性物質の作用機序と細胞機能に関する生物化学的研究

i) GnT-III遺伝子を安定発現するK562細胞及びHepG2細胞を樹立し, アクチビン及びHGFに対する応答能を検討した結果, bisecting GlcNAcは, アクチビンに対しては抑制的, またHGFシグナルに対しては促進的に作用することが示唆さ

れた。

- ii) 細胞由来微量糖タンパク質糖鎖及び糖脂質の構造と機能の關係の解明を目的とした高感度複合糖質糖鎖構造解析法の開発を行った (科学研究費補助金)。
- iii) 食細胞活性酸素産生系の調節因子の解明とその機能分化の研究に関して, HL-60細胞の好中球分化の過程で出現するトランスフェリン陽性細胞と陰性細胞を用いた分化・増殖シグナルの解析より, 好中球分化にp70 S6キナーゼが重要な役割を担っていることを明らかにした。
- iv) カルシウム蛍光プローブの細胞内局在を利用してイノシトール三リン酸による細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオンの放出を画像解析し, 放出促進物質および放出抑制物質を検索した (HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。
- v) アデノウイルスベクターを利用してタンパク質系カルシウム蛍光プローブ Yellow-cameleonを肝細胞あるいは心筋細胞内に発現させることに成功するとともに, 汎用レーザーを用いた共焦点レーザー顕微鏡による細胞内カルシウムイオンの画像化法を確立した (HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。
- vi) Src相同ドメインを含む数種のポリペプチドと緑色蛍光タンパク質 (GFP) 類との融合タンパク質の発現プラスミドを作製・発現させ, リン酸化タンパク質を試験管レベルで蛍光変化として捕らえることが可能な蛍光性タンパク質を作製した。
- vii) グルココルチコイドによるチロシンアミノ転移酵素活性の誘導がプロテアソームの阻害剤により抑制されることを明らかにした。
- ## 4. 先端技術を利用した生体成分関連医薬品の有用性確保に関する基礎的研究
- i) トランスジェニック動物/クローン動物を利用して製造された医薬品の品質・有効性・安全性の評価法をまとめ, ガイドライン作成のための基礎資料とした (厚生科学研究費補助金)。
- ii) EBNA1とOriP配列を有したgutlessアデノウイルスベクターを作製し, 培養細胞で目的遺伝子の発現能を評価した (厚生科学研究費補助金)。
- iii) 標的細胞親和性を制御できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターシステムを開発した (厚生科学研究費補助金)。
- ## 5. 診断用医薬品に関する基礎的研究
- i) 四塩化炭素投与ラット肝疾患モデルにおいて組織プラスミノゲンアクチベーターmRNAが上昇することを明らかにした (厚生省特別研究)。
- ii) 新規グルココルチコイド受容体を結合タンパクから分離し, クロマトグラフィー上で分離させる条件について検討を行った (科学技術庁国立機関原子力試験研究費)。