

CERI NEWS

No.99 2025 April

CONTENTS

● 巻頭言

新たな創薬モダリティ：核酸医薬

大阪大学大学院薬学研究科 教授 小比賀 聡

● 技術紹介

陰イオン交換クロマトグラフィーによる siRNA 医薬品の分析

● 業務紹介

① 核酸医薬品の安全性評価

～核酸医薬品のオフターゲット作用の評価に適したマイクロアレイの検討～

② HPLC による分析メソッド開発支援と分取・精製

③ 抽出物・浸出物（E&L）試験

● 本機構の活動から

令和 7 年度 CERI 公募型研究助成採用テーマ

令和 7 年度 CERI 賞表彰報告

・日本ゴム協会 CERI 最優秀発表論文賞

・日本ゴム協会 CERI 若手奨励賞

● お知らせ

令和 7 年度 CERI 寄付講座 開講案内

国際医薬品開発展（CPHI Japan 2025）出展

第 12 回化粧品産業技術展（CITE Japan 2025）出展

第 30 回化学物質評価研究機構研究発表会開催案内

● 編集後記

新たな創薬モダリティ：核酸医薬

大阪大学大学院

薬学研究科

教授 小比賀 聡



近年、新たな創薬モダリティとして核酸医薬が注目されている。比較的短い鎖長（十数塩基から数十塩基）の化学合成された核酸分子を医薬品として利用しようというもので、従来の低分子医薬や抗体医薬とは異なり、細胞内の RNA に直接作用し遺伝子発現を制御するという新たな作用機序を有する点が核酸医薬の大きな特徴である。そのため、核酸医薬はまだ治療法が見出されていない希少疾患や難治性疾患に対する新たな治療法として期待され、世界中で活発な研究開発が繰り広げられている。2025 年 1 月末時点において世界で 23 品目の核酸医薬が承認されており、我が国でも筋ジストロフィー治療薬 viltolarsen（2020 年）や高コレステロール治療薬 inclisiran（2023 年）、遺伝性 ATTR アミロイドーシス治療薬 vutrisiran（2023 年）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）治療薬 tofersen（2024 年）など 8 品目が既に承認されている。これら以外にも多くの臨床試験が進められており、今後も医療応用がますます広がるものと期待されている。

核酸医薬には様々な種類が存在する。一本鎖核酸であるアンチセンス核酸は、疾病の原因となる遺伝子の mRNA や pre-mRNA に配列特異的に結合することで、翻訳過程の阻害やスプライシング過程の制御が可能となる。また、二本鎖 RNA からなる siRNA は RISC と呼ばれる RNA-タンパク質複合体を介して標的の mRNA を切断し翻訳過程を阻害する。核酸で作られた抗体様分子である核酸アプタマーは、その立体構造により標的タンパク質を厳密に認識することで薬効を発揮する。このように、核酸医薬の種類・作用メカニズムは多岐にわたるが、天然の DNA や RNA からなるオリゴヌクレオチドは生体内で十分な安定性を持たないため、いずれの核酸医薬においても天然の DNA や RNA をそのまま医薬品として利用することは難しく、化学修飾を施した人工核酸の利用が不可欠とされている。

医薬品開発において、品質評価や安全性評価が重要であることは言うまでもないが、核酸医薬においてもそれは同じである。従来の低分子医薬品の分子量が数百程度であるのに対して、核酸医薬の分子量は数千から 2 万程度と大きい。前述の通り核酸医薬は、ヌクレオチドと呼ばれるユニットが十数塩基から数十塩基連なった構造をしており、このヌクレオチドユニットを化学反応により繋いでいくことで製造されるが、その製造過程ではどうしてもヌクレオチドユニットが一つや二つ欠損したものも含まれてくる。こうした短鎖不純物は目的とする核酸医薬と物性が似通っているため、液体クロマトグラフィーでの分離や分析を妨げる要因になっている。また、用いる化学修飾によっては、核酸医薬自身がジアステレオマー混合物となってしまうため、核酸医薬の分離・分析を一層困難なものにしている。核酸医薬の品質を担保するためには、こうした構造上の特徴を十分に理解した上で新たな分離・分析法を生み出していく必要がある。

核酸医薬の安全性評価においては、オフターゲット解析が重要となる。アンチセンス核酸や siRNA では標的とする RNA の発現抑制により薬効を発揮するが、標的ではない類似の RNA 配列に対しても作用してしまうことが想定される。これがオフターゲット効果であり、アンチセンス核酸や siRNA の副作用の原因の一つになり得る。そのため核酸医薬の開発段階では、オフターゲット効果

を最小限にとどめるべく、*in silico* 解析やヒト細胞を用いたマイクロアレイ解析、RNA シーケンス解析などが実施されている。

CERI では、核酸医薬の品質評価やオフターゲット解析に関する最先端の技術開発が進められており、我が国の核酸医薬開発を推進する大きな原動力となっている。希少疾患や難治性疾患に苦しむ患者さんに一日も早く有効で安全な核酸医薬が届けられるよう、今後も CERI の活躍に期待したい。

技術紹介

陰イオン交換クロマトグラフィーによる siRNA 医薬品の分析

日田事業所 騰川 博之

1. はじめに

核酸医薬はオリゴ核酸を有効成分とした医薬品で、これまで難治とされてきた疾患の新たな治療薬として注目を集めています。その中でも近年 siRNA 医薬品の開発が活発であり、2018 年以降に 6 品目が承認されています¹⁾。siRNA 医薬品は約 20 塩基長のセンス鎖とアンチセンス鎖からなる 2 本鎖核酸であり、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) にアンチセンス鎖のみが取り込まれ複合体を形成し、標的 mRNA を取り込み切断することで標的とするタンパク質の発現を抑制することができます。siRNA 医薬品中には過剰な 1 本鎖、不完全長の 2 本鎖等多数の不純物が混在しています (図 1)。また生体内で分解されやすい siRNA 医薬品の安定性を向上させるために導入されたホスホロチオアート (PS) 修飾ではリン原子が不斉点となり、*n* か所導入した場合 2^n の特性の異なるジアステレオマーの混合物となるため、品質を担保するためにその分布を評価することが重要です (図 2)。そこで、高い分離能を有し、オリゴ核酸の立体構造を維持したまま分析するのに適している陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) に着目し、siRNA 医薬品に含まれる不純物及び PS 修飾に由来するジアステレオマーの分離への応用を検討しました。

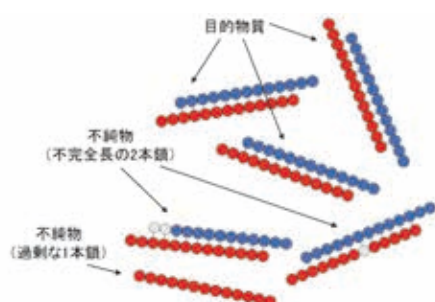


図1 siRNA 医薬品に含まれる不純物

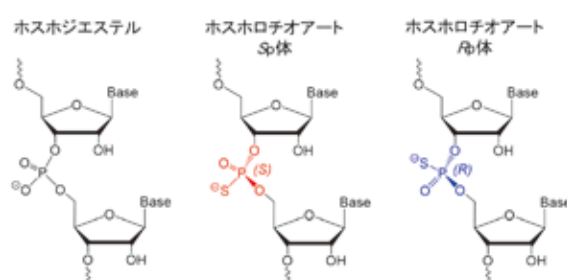


図2 ホスホロチオアート修飾によるジアステレオマー

2. 結果及び考察

2.1 siRNA 医薬品に含まれる不純物の分離

承認されている siRNA 医薬品である Lumasiran の天然型の配列をモデル siRNA (RNA1) として分析条件を検討しました。カラム温度を 30℃～60℃に変化させて RNA1 を分析したところ、30℃～50℃ではシャープなピーク形状を示しましたが、60℃まで上げるとブロードなピーク形状となりました。

た（図3）。これは、カラム温度が高温となることで Watson-Crick 塩基対の水素結合が解離し不安定な状態となったためと考えられます。さらに、移動相の pH を 9.0 と 7.0 で比較したところ、pH 7.0 の移動相では 2 本鎖とアンチセンス鎖の溶出時間が近く、siRNA 中に過剰な 1 本鎖が存在していても分離及び検出の難しさが示唆されましたが、pH 9.0 では 2 本鎖に対して 1 本鎖が大幅に遅く溶出したことから、siRNA 中に過剰な 1 本鎖が存在していた場合に十分に分離及び検出可能であると考えられました（図4）。これは、G (guanosine) 及び U (uridine)（いずれも $pK_a = 9.2^{2)}$ ）が pH 9.0

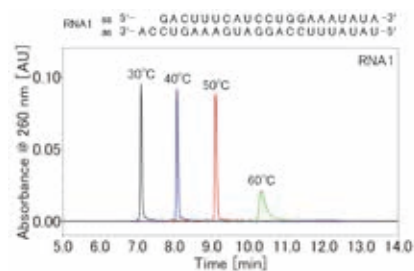


図3 カラム温度の検討

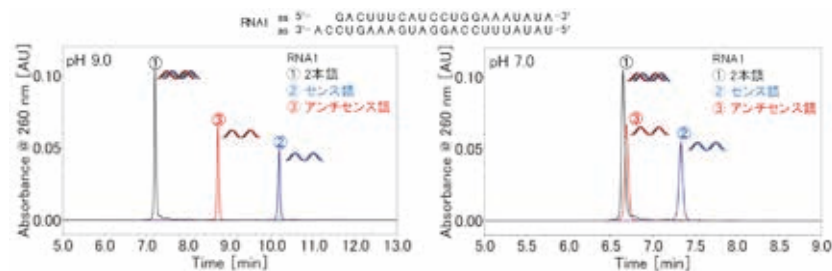


図4 移動相の pH の検討

の移動相では互変異性により僅かに負電荷を有し、1 本鎖においては塩基対を形成せず核酸塩基が露出していることから、カラム官能基と相互作用が生じ保持が強くなったためと考えられます。以上の結果から、カラム温度 30℃、pH 9.0 の条件が最適であると判断しました。最適化した分析条件を表1に示します。

表1 分析条件 1

カラム	DNAPac PA200 RS (4 μ m), 4.6×250 mm
移動相A	20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
移動相B	1.25 mol/L NaClを含む移動相A
グラジエント	30 - 70% 移動相B (0 - 15 min)
流速	0.8 mL/min
カラム温度	30℃

最適化した分析条件において、RNA1 に加えて RNA2 及び RNA3（それぞれ承認されている siRNA 医薬品である Inclisiran 及び Givosiran の天然型の配列）の 3 種のモデル siRNA を用いて、目的物質である 2 本鎖と 1 本鎖（センス鎖及びアンチセンス鎖）の分離について検討しました。その結果、いずれのモデル siRNA においても、2 本鎖と各 1 本鎖が異なる保持時間で溶出したことから、siRNA 医薬品中に過剰な 1 本鎖が含まれる場合に目的物質と良好に分離できました（図5）。続いて、3 種のモデル siRNA のセンス鎖又はアンチセンス鎖の 5' 末端の 1 塩基を欠損した不完全長の 2 本鎖（n-1）を用意し、目的物質との分離を検討しました。不完全長の 2 本鎖は目的物質と構造が類似しているため、分離が困難と考えられていますが、いずれにおいてもおおむね良好に分離可能でした（図6）。

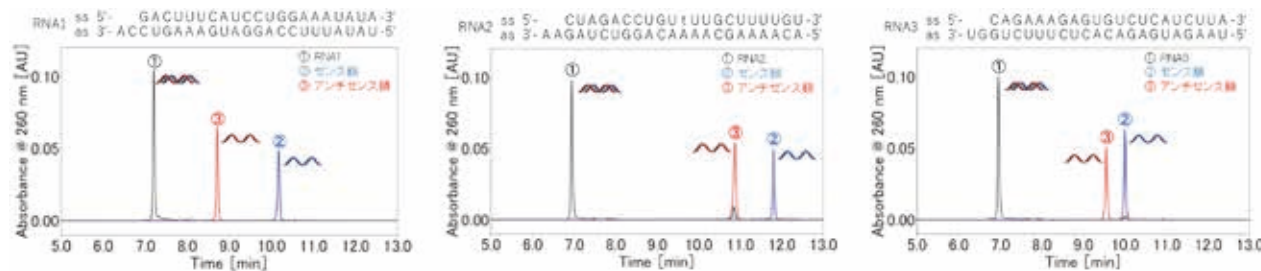


図5 目的物質（2本鎖）とセンス鎖及びアンチセンス鎖の分離

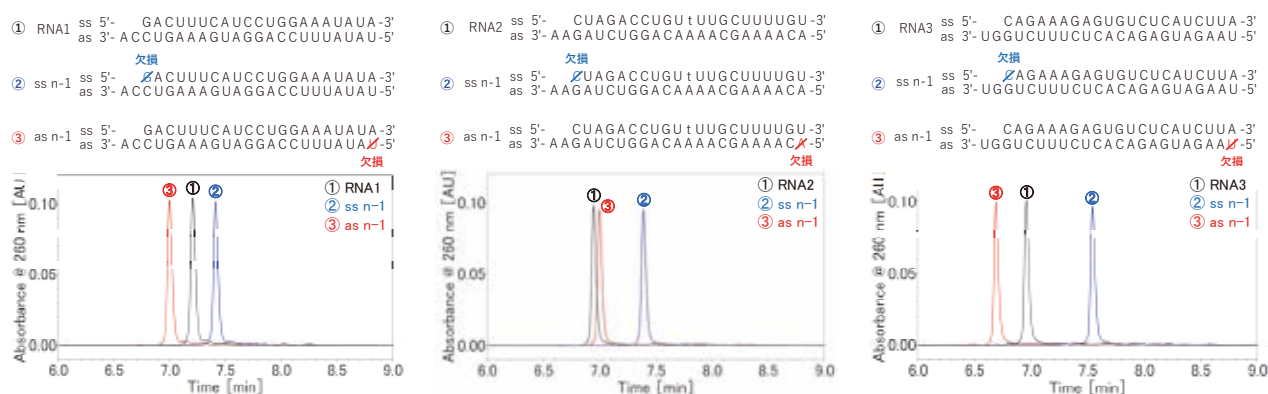


図6 目的物質（2本鎖）と末端1塩基を欠損した不完全の2本鎖の分離

この保持機構を解明するため種々の検討を実施した結果、2本鎖を形成した状態よりもフレキシブルな1本鎖やオーバーハング（siRNAの末端にある2本鎖を形成していない1本鎖の状態の部分）の方がカラムの第4級アンモニウム基の正電荷とリン酸の負電荷のアクセシビリティが高く保持が強いこと、アルカリ性の移動相においては塩基欠損により露出したオーバーハングに位置するG及びUにおいて互変異性により生じた負電荷が保持に強く関与することが明らかとなりました³⁾（図7）。

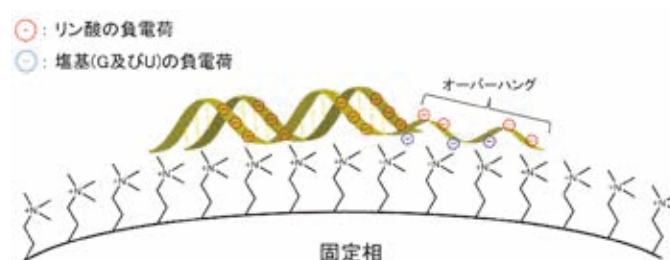


図7 オーバーハングを有する2本鎖RNAの保持機構

2.2 PS修飾を有するsiRNA医薬品のジステレオマーの分離

2.1 から AEX が siRNA の僅かな構造の差異を認識し分離するのに適していることが明らかとなったため、PS修飾を有する siRNA のジステレオマーの分離への適用を検討しました。承認されている siRNA 医薬品であり、配列の末端に合計6か所の PS 修飾を有する Lumasiran の配列をモデルとし、2'位の化学修飾及び GalNAc リガンドを持たず、PS修飾を2、4又は6か所所有する配列を用いました。分析条件を表2に示します。まず、2か所の PS 修飾を有する7種の配列について1本鎖の状態と2本鎖を形成した状態でのジステレオマーの分離を比較したところ、1本鎖の状態よりも2本鎖の状態の方が4つのジステレオマーが良好に分離する傾向を示しました（図8）。さらに、4か所の PS 修飾を有する siRNA のジステレオマーの分離を検証したところ、1つの配列において16の全てのジステレオマーのピークトップが検出され、6か所の PS 修飾を有する siRNA のジステレオマーの分離を検証したところ、64のジステレオマーのうち半数近い約30のピークトップを検出しました（図9）。

この保持機構を解明するため種々の検討を実施した結果、ジステレオマーのうち2本鎖を形成した状態において負電荷を有する硫黄原子が内側を向いている Rp 体よりも外側を向いている Sp 体の方が保持が強いことが示され、カラムの第4級アンモニウム基の正電荷と負電荷を有する PS 結合の

表2 分析条件2

カラム	DNAPac PA200 RS (4 μm), 4.6×250 mm
移動相A	20 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0)
移動相B	1.25 mol/L NaClを含む移動相A
グラジエント	42 - 62% 移動相B (0 - 20 min)
流速	0.8 mL/min
カラム温度	30℃

硫黄原子とのアクセシビリティの差によって R_p 体と S_p 体が分離していることが示唆されました⁴⁾ (図10)。

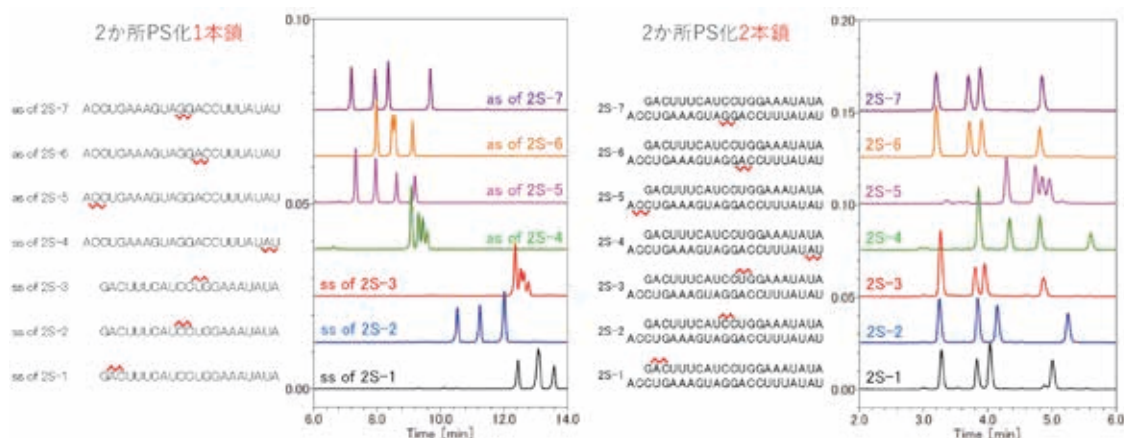


図8 2か所のホスホロチオアート修飾を有する配列の1本鎖及び2本鎖の状態でのジアステレオマーの分離

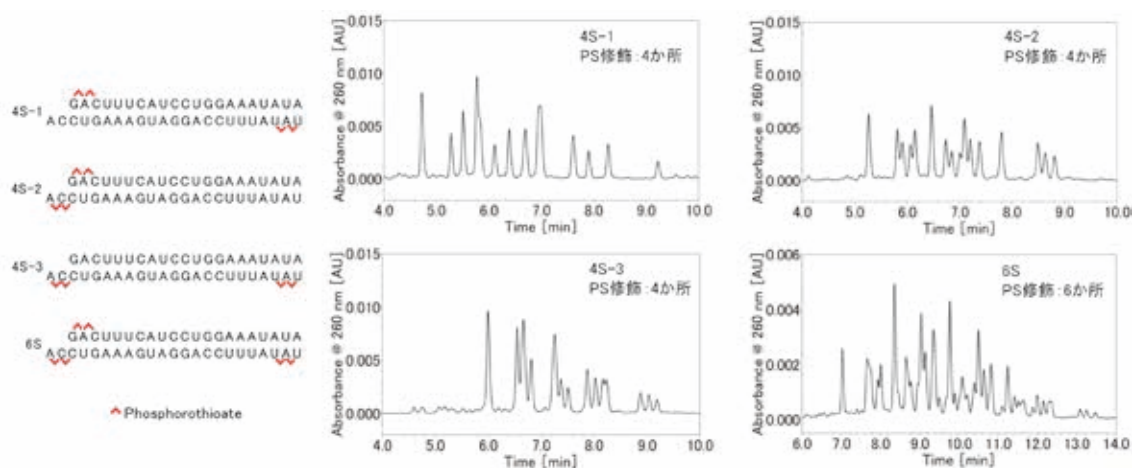


図9 4又は6か所のPS修飾を有する siRNA のジアステレオマーの分離

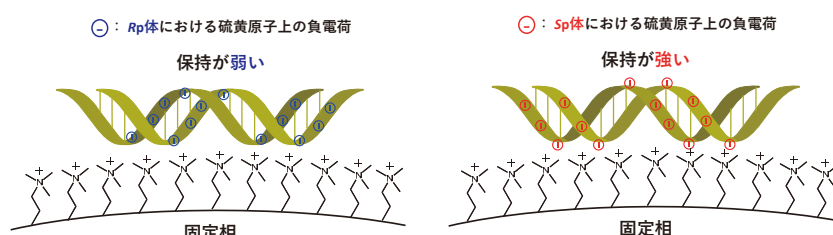


図10 ホスホロチオアート修飾のジアステレオマーの分離機構

3. おわりに

AEX が siRNA 医薬品に含まれる種々の不純物及び PS 修飾に由来するジアステレオマーの分離に有用であることが示され、またその保持・分離機構の一端を明らかにしました。このように CERI では HPLC、LC-MS、キャピラリー電気泳動等の分析機器、ELISA、セルベースアッセイ等を用いた核酸医薬品、mRNA 医薬品等の分析方法の開発及び品質試験を実施していますので、お困りの点がありましたらお気軽にお問い合わせください。

本研究は AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：大阪大学・小比賀聡教授）の成果です。

参考文献

- 1) 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部. 日米欧のいずれかで承認された核酸医薬品. <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf>(accessed 2025-1-10).
- 2) Pallavi Thaplyal; Philip C Bevilacqua. Experimental Approaches for Measuring pKa's in RNA and DNA. *Methods Enzymol.* 2014, 549, 189-219.
- 3) Hiroyuki Togawa. et al. Retention behavior of short double-stranded oligonucleotide and its potential impurities by anion-exchange chromatography under non-denaturing conditions. *J. Chromatogr. A.* 2023, 1691, 463808.
- 4) Hiroyuki Togawa. et al. Separation of the diastereomers of phosphorothioated siRNAs by anion-exchange chromatography under non-denaturing conditions. *J. Chromatogr. A.* 2024, 1721, 464847.

業務紹介

核酸医薬品の安全性評価 ～核酸医薬品のオフターゲット作用の評価に適したマイクロアレイの検討～

安全性評価技術研究所 石田和也

1. はじめに

近年、開発が盛んになっている核酸医薬品は、従来の低分子医薬品、抗体医薬品とは作用のメカニズムが異なり、こうした医薬品では標的にできないリボ核酸（RNA）も標的とすることが可能です。そのため、従来の医薬品では治療が困難であった遺伝性疾患、難治性疾患等の疾病に対する新たな医薬品として期待されています。一方、医薬品には本来の標的以外の意図しないメカニズムによる作用の可能性があります。核酸医薬品の場合、核酸特有のハイブリダイゼーション依存的オフターゲット作用（以降、オフターゲット作用という）の可能性もあり、それら进行评估することが求められています¹⁾。オフターゲット作用は、*in silico* 解析により核酸医薬品の相補配列を有する遺伝子を探索し、核酸医薬品をばく露したヒト細胞における遺伝子発現変動解析（*in vitro* 解析）に基づき評価できます²⁾。核酸の性質から、核酸医薬品は相補配列間で部分的に塩基違い、挿入、欠失等がある遺伝子にも結合する性質があり、核酸医薬品の配列長によって結合しうる遺伝子の数は非常に多くなります。そのため、原薬のオフターゲット作用の評価において遺伝子発現マイクロアレイ（以下、マイクロアレイという）等の網羅的遺伝子発現変動解析を用いることは非常に有用です。本稿では、核酸医薬品の中でも、mRNA 又は mRNA 前駆体を標的として結合し、これらを切断することで遺伝子の発現を抑制するアンチセンスオリゴ核酸（ASO）をモデル核酸として、本機構が実施しているオフターゲット作用の評価に使用する遺伝子発現解析用のマイクロアレイの性能確認を行った結果を紹介します。

2. オフターゲット作用の評価の概要

オフターゲット作用の評価では、ASO が結合し得る遺伝子（以下、オフターゲット候補遺伝子という）を特定するために、まず、ヒトの mRNA 又は mRNA 前駆体の配列情報を用いた *in silico* 解析を行います。次に、オフターゲット候補遺伝子の発現が核酸医薬品により実際に影響を受けるか確認するため *in vitro* 解析でヒト細胞に ASO をばく露し、オフターゲット候補遺伝子の発現抑制を評価します。そして、発現抑制を受けたオフターゲット候補遺伝子について有害影響によるリスク評価を行うこととされています²⁾。

3. オフターゲット作用の評価に使用するマイクロアレイの選択

上述したように、オフターゲット作用の評価では、マイクロアレイをはじめとした網羅的遺伝子発現変動解析が非常に有用です。マイクロアレイは複数のメーカーから販売されており、それぞれの特徴があります。ASO のオフターゲット作用の評価においてはオフターゲット候補遺伝子がマイクロアレイに搭載されていること、使用するヒト細胞においてオフターゲット候補遺伝子が発現していること（検出できること）、更にはその測定結果の定量性が重要です。これらのことを念頭に、本機構では世界的にユーザー数が多い 2 社のマイクロアレイの性能を比較し、Agilent 社のヒト遺伝子発現マイクロアレイを ASO のオフターゲット作用の評価に使用しています。Agilent 社のマイクロアレイは、遺伝子の 3' 非翻訳領域（3'UTR）近傍に 60 塩基からなるプローブが遺伝子ごとに設計されており、このプローブ長はもう 1 社（B 社）のマイクロアレイと比べて長く、より特異性の高い検出が可能である点が大きな特徴です。また、タンパク質をコードしている既知の 19,824 遺伝子のうち、Agilent 社のマイクロアレイでは約 19,000 遺伝子が搭載されており、B 社（約 17,500 遺伝子）のマイクロアレイよりも多くの遺伝子が評価可能です。

モデル ASO について一般に検索漏れがないとされる塩基配列検索ツール GGGenome を用いた *in silico* 解析を行うとともに、モデル ASO 又は媒体対照をヒト細胞（Huh-7 細胞）へばく露し、それぞれの RNA をサンプルとして Agilent 社と B 社のマイクロアレイにおける評価可能な遺伝子数、ダイナミックレンジ及び発現変動したオフターゲット候補遺伝子数を比較しました。その結果、Agilent 社のマイクロアレイは B 社と比較して、検出されるシグナルのダイナミックレンジが広いだけでなく、検出された遺伝子数も多いことが確認されました（表 1）。*in silico* 解析による塩基違い、挿入又は欠失がなくモデル ASO と完全に相補結合するオフターゲット候補遺伝子の数、このうち媒体対照群で発現（検出）していた遺伝子数及びモデル ASO により発現抑制（< 0.5 倍）されたオフターゲット候補遺伝子数を表 2 に示します。今回の比較では、Agilent 社のマイクロアレイは B 社と比べモデル ASO により発現抑制されたオフターゲット候補遺伝子をより多く評価することが可能でした（表 2）。

表 1 マイクロアレイの搭載遺伝子数、検出遺伝子数及びダイナミックレンジの比較

	Agilent 社	B 社
搭載遺伝子数	約 19,000 遺伝子	約 17,500 遺伝子
検出遺伝子数	約 14,000 遺伝子	約 11,000 遺伝子
ダイナミックレンジ	約 5 桁	約 4 桁

表2 モデル ASO を使用したオフターゲット候補遺伝子数と
発現抑制されたオフターゲット候補遺伝子数の比較

<i>in silico</i> 解析による オフターゲット候補遺伝子数		143 遺伝子
媒体対照群における 発現（検出）遺伝子数	Agilent 社	95 遺伝子
	B 社	76 遺伝子
モデル ASO により発現抑制された オフターゲット候補遺伝子数	Agilent 社	75 遺伝子
	B 社	51 遺伝子

また、Agilent 社のマイクロアレイで発現抑制をとらえた 75 遺伝子は B 社で検出された 51 遺伝子を全て包含していました。このことから、Agilent 社マイクロアレイの方がモデル ASO のオフターゲット作用による遺伝子の発現抑制をより多く検出できることが示されました。さらに、Agilent 社のマイクロアレイで捉えていたオフターゲット候補遺伝子の発現抑制（＜0.5 倍）を確認するために、マイクロアレイ解析で使用した RNA サンプルを使用して、一般に定量精度が高いとされている定量的 PCR（qPCR）を実施し、Agilent 社のマイクロアレイによる発現比と比較しました。具体的には、Agilent 社と B 社で差のあった発現抑制された遺伝子（24 遺伝子）のうち、B 社マイクロアレイの発現比との比較が可能であった 19 遺伝子を対象としました。その結果、19 遺伝子のうち 18 遺伝子は qPCR でも 0.5 倍以下に発現抑制していたことが確認できました。残りの 1 遺伝子については、Agilent 社マイクロアレイで約 0.2 倍、qPCR で約 0.7 倍であり、qPCR では 0.5 倍以下の発現抑制は見られない結果となりました。この 1 遺伝子について、詳細に公共データベースを確認すると、同じ遺伝子であっても塩基配列が異なる複数のバリエーションがあることが報告されています。そのため、Agilent 社のマイクロアレイと qPCR で発現比の乖離は、それぞれ異なるバリエーションを測定していた可能性が考えられました。

以上の結果から、本機構では Agilent 社のマイクロアレイがより多くの遺伝子を搭載・評価可能であり、かつ発現抑制される遺伝子について高い定量性で評価できることを確認した上で、核酸医薬品のオフターゲット作用の評価に使用しています。また、Agilent 社のマイクロアレイは評価したい遺伝子が搭載されていない場合、比較的容易にプローブを個別に設計し、マイクロアレイに搭載させることが可能であるため、評価したい核酸医薬品に合わせた試験が可能になっています。

4. おわりに

今回、核酸医薬品のオフターゲット作用の評価で使用するマイクロアレイに注目し、性能確認の結果を紹介しました。本機構では核酸医薬品のオフターゲット作用の評価について、*in silico* 解析や、細胞実験を含めた *in vitro* 解析の評価実績が多数ありますので、まずは是非ご相談ください。

本研究は AMED 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「核酸医薬品の製造・精製・分析基盤技術の開発」プロジェクト（代表：大阪大学・小比賀聡教授）の成果です。

また、本研究の実施に当たりモデル核酸の設計、解析等に関して、国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部の井上貴雄先生、吉田徳幸先生及び内田安則先生から多くのご支援・ご助言をいただきましたことに、深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドラインについて. 薬生薬審発 0330 第1号, 令和2年3月30日.
- 2) Tokuyuki Yoshida. et al. Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. Genes Cells. 2019, 24(12), 827-835.

HPLC による分析メソッド開発支援と分取・精製

東京事業所クロマト技術部 緒方 伸也

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は試料中の目的成分をピークとして分離できることから定性及び定量に優れており、分析化学において中心的な手法として用いられます。特に、疎水性相互作用を利用した逆相 HPLC は汎用性が高く、環境試料、工業製品、医薬品の成分分析等、様々な分野で使用されています。HPLC において最も重要なことは分離です。しかし、目的とする分離を達成するためには様々なパラメータを検討する必要があります。分離技術の根幹であるカラムは、C18 カラムだけでも多数のブランドが存在し、これらのブランド、カラムの内径、長さ、充填剤の粒子径等によっても分離特性が異なります。さらに、溶離液の種類、組成、グラジエントプロファイル、流量、温度等の複雑なパラメータを検討することで、最適な分析メソッドが開発されます。このため HPLC の知識と経験に基づく効率的なスクリーニングは、メソッド開発への近道となります。クロマト技術部は、手間のかかる HPLC 分析メソッドを開発する支援業務を開始しました。クロマト技術部門では、カラム製造やユーザーサポートにより培った豊富な知識と経験があります。これに自動分析ソフトウェアを搭載した HPLC を組み合わせることで、より短期間で高精度な分析メソッドを開発可能です。また、既存分析メソッドの改善と分取サイズへのスケールアップにも対応可能です。HPLC による分取・精製では、試料負荷と分離が最大限になるように分取 LC 用の分析メソッドを開発します。L-column シリーズの分取カラムは高負荷、高分離を実現します。また、カラムの製造及び開発で培った精製技術により、高純度の精製品を提供します。本稿では、HPLC 分析メソッド開発支援と分取から高分解能質量分析計 (Q-ToF-MS) による構造推定のモデルケースを紹介します。

2. 塩基性医薬品の HPLC 分析メソッド開発

構造が類似した5種の塩基性医薬品(図1)の分析メソッド開発を行いました。まず、最適な溶離液とカラムを選定するためのスカウティングを実施しました。使用する溶離液は、水系にはリン酸緩衝液及び酢酸アンモニウム溶液、有機溶媒系にはアセトニトリル及びメタノールを選択しました。カラムは L-column2 ODS 及び L-column3 C18 を使用しました。スカウティングは自動分析ソフトウェアを用いてグラジエント条件を自動検討し、それぞれの組合せでピーク形状と分離度を評価項目とし総合的に判断した結果、リン酸緩衝液及びアセトニトリルの溶離液と L-column2 ODS の組合せを選択しました(図2左)。次に溶離条件の最適化を行いました。今回はスカウティングの結果を参考に、温度及び有機溶媒比率について網羅的に測定を行いました。温度は 25℃ から 55℃ まで 5℃ ずつ変更し、初期の有機溶媒組成を 25% から 35%

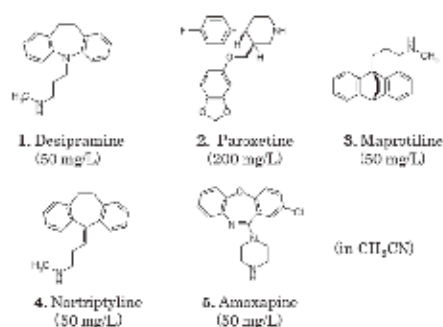


図1 塩基性医薬品5種の構造式

図2左) 次に溶離条件の最適化を行いました。今回はスカウティングの結果を参考に、温度及び有機溶媒比率について網羅的に測定を行いました。温度は 25℃ から 55℃ まで 5℃ ずつ変更し、初期の有機溶媒組成を 25% から 35%

まで2%ずつ変更して最適化を行いました。このとき、成分①及び②の温度及び有機溶媒比率をデザインスペースにより視覚化しました（図2中央）。最終条件（表1）は、分離度が1.5以上であり、かつ分析時間も考慮して温度及び有機溶媒比率を最適化しました（図2右）。

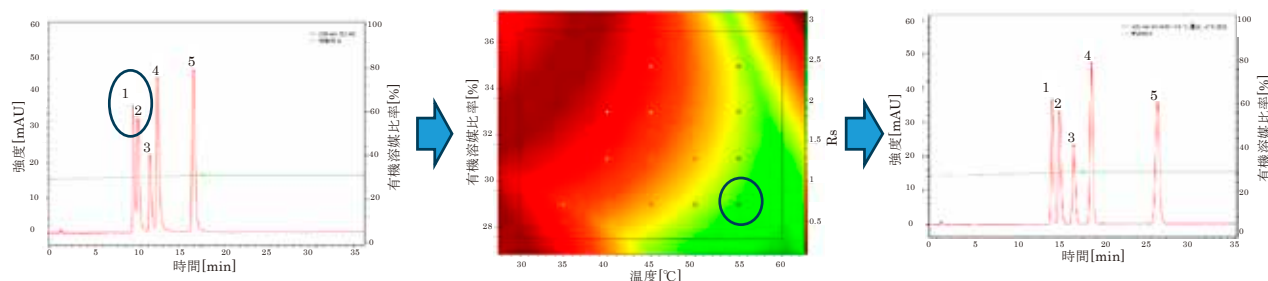


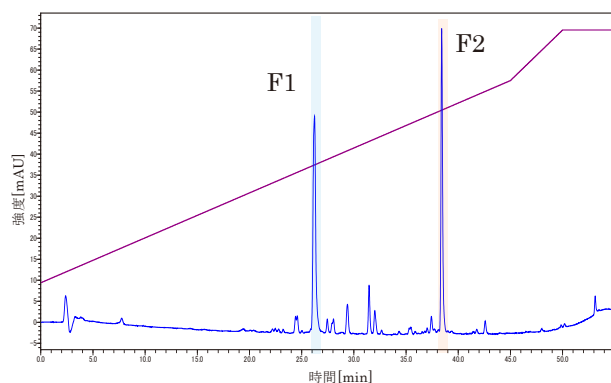
図2 スカウティング結果（左）、デザインスペース（中央）及び最適化クロマトグラム（右）

表1 最適化した分析条件

カラム	L-column2 ODS , 5 μ m 4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm L. Cat. No. 722070
溶離液	A: アセトニトリル, B: 25 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) A/B, 27/73-29/71-29/71 (0-20.1-40.0 min)
温度	55°C
注入量	1 μ L
検出	UV 220 nm
試料	塩基性医薬品 5 種

3. EPA 代謝物の分離条件探索及び構造推定

分取 LC による高精度な分離は、不純物、分解物の構造推定にも有効です。エイコサペンタエン酸 (EPA) は、生理活性をもつロイトコリエン、レゾルビン、プロスタグランジン等の代謝物があります。EPA を肥満細胞で培養し、培養上清を溶媒抽出して得た EPA 代謝物を試料としました。分取 LC により得られたフラクション F1 と F2 についてそれぞれ解析を行いました。



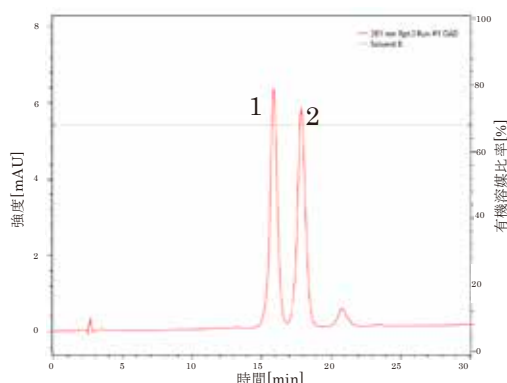
【分取 LC 条件】

カラム: **L-column2 ODS**, 5 μ m
 サイズ: 20 mm I.D. $\times$ 250 mm L. Cat. No. 742120
 溶離液: A: アセトニトリル, B: 0.1% ぎ酸溶液
 A/B, 20/80-80/20-95/5-95/5 (0-45-50-55 min)
 温度: Room temperature
 注入量: 2000 μ L
 検出: UV 254 nm
 試料: 肥満細胞培養上清(EPA 代謝物)

図3 分取 LC のクロマトグラム（エイコサペンタエン酸代謝物）

3.1 フラクション F1 の分離及び構造推定

F1 を LC/MS で定性分析した結果、 m/z 333 のイオンが観測されました。また、他の代謝物よりもピーク幅が広いため、ロイトコリエン B₅ (LTB₅)、その異性体等の混合物と考えられます。そこで F1 について分離条件を検討しました。アセトニトリルでは分離できませんでしたが、メタノールを使用すると分離することができました (図 4 上)。また、それぞれのピークについて MS/MS スペクトルを取得したところ (図 4 下)、ピーク 1 はレゾルビン E₄ (RvE₄)、ピーク 2 は LTB₅ と推定できました。



【分析条件】

カラム: **L-column2 ODS**, 5 μ m
サイズ: 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm L. Cat. No. 722080
溶離液: A: メタノール, B: 0.1% ぎ酸溶液
A/B, 68/32
温度 : 25°C
注入量: 10 μ L
検出 : UV 281 nm
試料 : 肥満細胞培養上清(EPA 代謝物)のフラクション F1

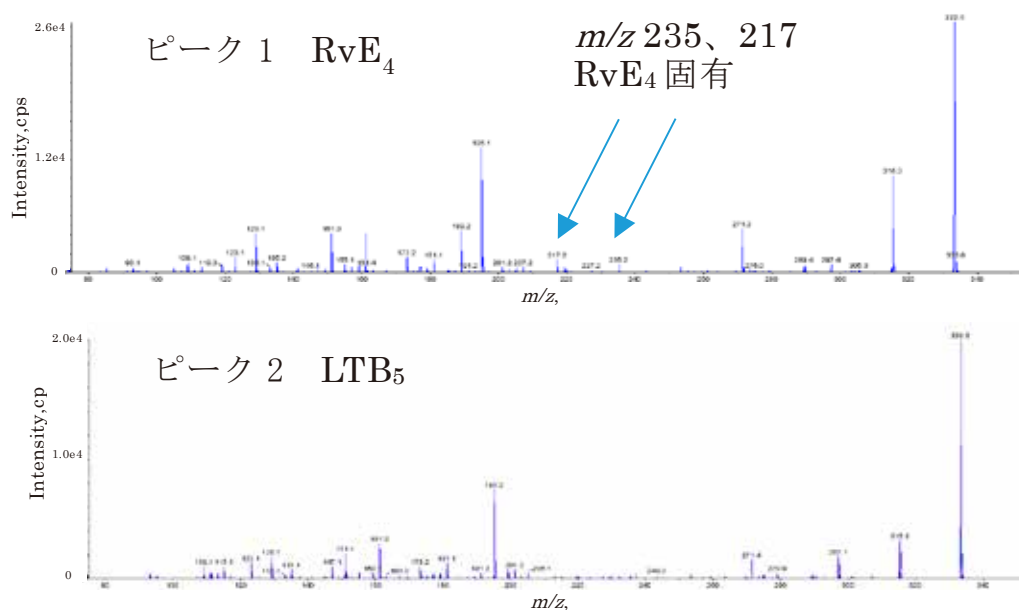


図 4 フラクション F1 のクロマトグラム及び分析条件 (上)、
ピーク 1 及びピーク 2 の MS/MS スペクトル (下)

3.2 フラクション F2 の精密質量による構造推定

F2 について Q-ToF-MS を用いて精密質量による構造推定を行いました。Q-ToF-MS では得られた m/z から分子式を推定することができます。F2 では MS スキャンで得られた m/z から C₂₀H₃₀O₃ と推定できました (図 5 左)。EPA 代謝物ではヒドロキシエイコサペンタエン酸 (HEPE) が考えられます。次に MS/MS スキャンよりフラグメントイオンを確認したところ (図 5 右)、5-HEPE で確認されるスペクトルが得られました。これにより F2 で単離した成分は 5-HEPE と推定できました。フラクションを脱水、乾固、溶媒置換し NMR で測定することで更なる構造解明も可能です。

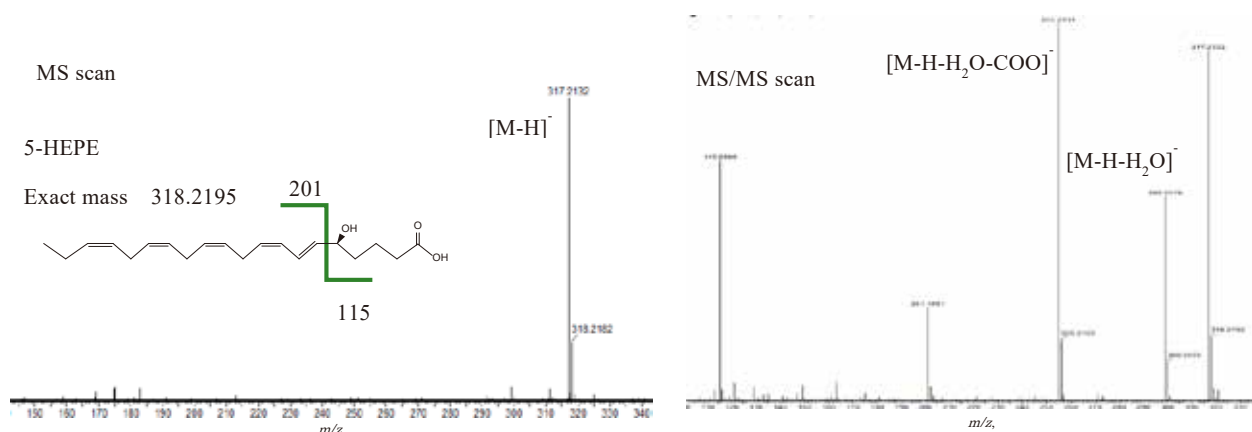


図5 Q-Tof-MSによるF2のMSスペクトル（左）、MS/MSスペクトル（右）

4. おわりに

本機構は短納期かつ高精度な新規分析メソッドの開発及び既存分析メソッドの改善を提供します。メソッド開発後も検討で得られた経験をもとに分析メソッドの移行までをサポートします。

HPLCによる分取・精製では、高純度な精製品の提供だけでなく、精製品の評価についてもサポートします。例えば、精製品のMS、NMR、FT-IR等による構造推定、定量NMRによる純度測定及び推定構造を用いた毒性評価を実施することができます。これらは、製剤、原薬等の化学合成品不純物の構造推定、標準品の作成及び天然物抽出液から有効成分の分取に適用できます。分取・精製に関する様々なご要望に対応しますので、まずはご相談ください。

抽出物・浸出物（E&L）試験

東京事業所高分子技術部 三輪怜史

1. はじめに

医薬品容器等の医療機器にも用いられるプラスチック、エラストマー等の高分子材料は、主成分のポリマー以外にオリゴマー、複数の添加剤が含まれています。これらの低分子量化合物が製剤へ浸出し、体内に取り込まれることで、製剤の治療効果に影響を及ぼしたり、毒性を発現したりするリスクが懸念されています。医療機器の安全性評価の一環として、以前から海外では欧米を中心に承認申請用資料として製剤、医療機器との接触を介してヒト体内へ投与される化学物質に関する評価結果の提出が求められていました。日本国内でも令和2年1月6日通知「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方についての改正について」（薬生機審発0106第1号）により、必要に応じて化学的情報の収集が求められることになりました。

化学的情報を収集するためには医療機器の材質、組成等の他、抽出物（Extractables）及び浸出物（Leachables）を評価するための試験が必要となります。E&L試験は、各国の規制、業界標準として表1に示すガイドラインが存在します。

表1 E&L 試験のガイドラインの例

ガイドライン	標題
ISO 10993-18	Biological evaluation of medical devices – Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process
USP <1663>	Assessment of Extractables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems
BioPhorum (団体)	Extractables testing of polymeric single-use components used in biopharmaceutical manufacturing
ICH Q3E (策定中)	Guideline for Extractables and Leachables

ISO 10993-18、USP <1663> は、試験を設計するための指針が記載されていますが、具体的な抽出法、分析手順は規定されていません。したがって、E&L 試験はこれらのガイドラインを参照しながら、医療機器から移行する有害性物質を見逃さない試験法を開発、実施し、毒性学的情報の見地から安全性を証明するデータを取得する必要があります。

2. E&L 試験の進め方

E&L 試験は多くの場合、図1のワークフローに従って実施されます。事前に得た医療機器の材質、後工程の情報に基づき試験計画を設計して、抽出物試験を実施します。その後は抽出物の濃度とその毒性に基づき、必要に応じて浸出物試験を実施する手順です。浸出物試験は製品に共存する薬剤成分が分析を妨害する、保存期間が長期にわたる等の理由により、実環境での実施が困難な場合があります。その際は、擬似環境、加速条件での浸出物試験の方法を設計することも必要です。

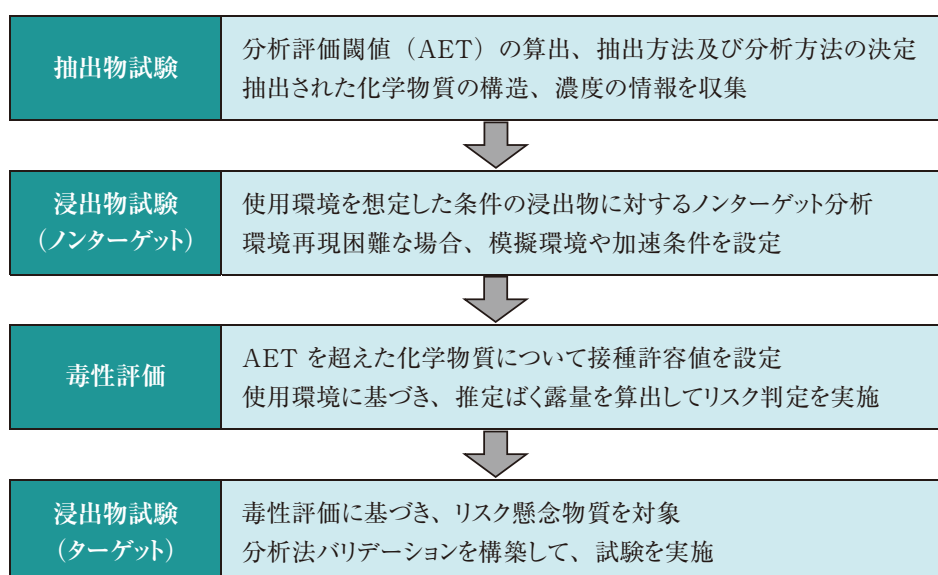


図1 E&L 試験のワークフロー

3. 試験法

材料自体の不純物、添加剤、製造過程における移行物及び劣化物、また製品に貼付されたラベルの粘着剤及びインク等が意図せず混入することを踏まえ、抽出物を網羅的に把握するための複数の抽出

法と分析方法を組み合わせます。表2は抽出物の対象物と対応する代表的な分析法です。

表2 抽出物試験の分析方法例

対象物	分析方法
揮発性低分子量有機化合物	ヘッドスペースーガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC/MS) 法
揮発性有機化合物	GC/MS 法
難揮発性有機化合物	液体クロマトグラフィー / 質量分析 (LC/MS) 法
金属元素	誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法
イオン性化合物、硫黄	イオンクロマトグラフィー (IC)
水中有機化合物	全有機炭素 (TOC) 測定

有機化合物は、毒性学的懸念閾値 (TTC)、安全評価閾値 (SCT) を基に算出された AET を超える物質の把握を行います。また、潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理 (ICH M7) で示される *N*- ニトロソアミン類、アルキルアゾキシ類等の変異原性発がん物質 (cohort of concern) が含まれることが疑われる場合は、AET より低濃度の領域まで調査が必要です。

GC/MS 法、LC/MS 法で検出された物質はスペクトルライブラリ、保持時間と照合して同定します。ただし、LC/MS は普遍的なライブラリが存在しないため、独自ライブラリを準備する必要があります。ライブラリのデータ掲載量とスペクトルの精度が同定可否に大きく関わるため、CERI では一般的な化学物質のほか、ポリマー不純物、高分子用添加剤を対象とする独自ライブラリを用いています。

ライブラリにない未知化合物の構造を把握するには、一般的にはクロマトグラフィーによる分取後に核磁気共鳴、赤外分光分析等を実施する方法が考えられますが、対象となる化合物は微量である場合が多く、解析可能な感度を得るためのサンプル量確保が困難です。そこで、CERI では未知化合物が生じることを想定し、LC/MS 法には飛行時間質量分析計 (TOFMS) を用いています。測定により得られた精密質量を基に組成式推定、フラグメンテーションを解析した部分構造推測等、毒性の *in silico* 解析に必要な化合物情報の取得に努めています。推測するには原料のポリマー主鎖構造、合成時に使用される触媒及び反応経路、加工及び滅菌操作に伴う劣化反応等から発生しうる不純物を予測するため、高分子材料及び添加剤に関する知見も重要となります。

金属元素については、リスクの高い対象として医薬品の元素不純物ガイドライン (ICH Q3D) で 1 日暴露許容量 (PDE) が設定されている 24 元素について、各元素の許容限度濃度を把握できるように分析法を設定します。一般的には ICP-MS 法が適用されますが、浸出物試験において高濃度のマトリクス成分を含む製剤が対象の場合、前処理として分解処理が必要となること、スペクトル干渉を低減するためトリプル四重極を用いた ICP-MS 法を適用する等、適切に測定できる条件設定が必要です。

4. おわりに

今後、医療機器の承認に関する規制強化や、バイオ医薬品の普及に伴うシングルユース化とともに、E&L 試験の需要増加及び分析技術の高度化が求められます。CERI では長年にわたる高分子材料の分析実績に基づくポリマー、添加剤の不純物及び劣化物に関する豊富な知識と膨大なデータベースの構築、分析法のノウハウ、浸出物試験の対象物質を判断するための毒性評価、試験法のバリデーション等、E&L 試験に関する高度な技術を有し、絶えず試験法の開発を続けています。E&L 試験の実施を検討の際にはお問い合わせください。

本機構の活動から

令和 7 年度 CERI 公募型研究助成採用テーマ

本機構の研究支援事業である令和 7 年度 CERI 公募型研究助成に多数のご応募ありがとうございます。審査委員会において厳正に審査を行い、次の二題を採択しました。

☆研究者：根岸 淳（信州大学 繊維学部 准教授）

テーマ：細胞外マトリックスを有する全層角膜モデルの開発

☆研究者：守岩 友紀子（東京薬科大学 薬学部 助教）

テーマ：選択的濃縮と質量分析を基盤とする環境水中の生体リスク医薬品の高感度多成分同時分析技術の開発

令和 7 年度 CERI 賞表彰報告

本機構は、事業に関連した化学物質の評価・管理技術の分野で著しい業績を挙げた研究に対して、関連学会を通して表彰する研究表彰事業を行っています。一般社団法人日本ゴム協会の CERI 最優秀発表論文賞及び若手奨励賞について次に示す受賞者（敬称略）が表彰されました。

○一般社団法人日本ゴム協会

☆第 34 回 CERI 最優秀発表論文賞（令和 7 年 5 月）

受賞者：安藤翔太、伊藤耕三（東京大学大学院）

研究名称：末端刺激分解型ポリロタキサン添加による海洋生分解性高分子材料の強靱化とスイッチング分解

☆第 18 回 CERI 若手奨励賞（令和 7 年 5 月）

受賞者：木田拓充（滋賀県立大学）

研究名称：Rheo-Raman 分光法を用いたゴム・エラストマー材料の力学挙動解析

また、この他に、公益社団法人日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会に CERI クロマトグラフィー分析賞及び日本環境毒性学会に CERI 学会賞をそれぞれ設置いただいています。

お知らせ

令和7年度 CERI 寄付講座 開講案内

本機構は、化学物質等、製品の評価、管理技術の発展に貢献できる人材を育成することを目的に寄付講座を開設しています。令和7年度も九州大学及び東京科学大学において寄付講座を開講することを予定しています。カリキュラム等の詳細は、開催日近くになりましたら本機構ホームページ等でご案内します。ご興味のある方は是非この機会に受講ください。

☆九州大学

平成24年度から九州大学大学院工学研究院応用化学部門のご協力のもと、CERI 寄付講座を開設しています。令和7年度も「先端材料科学 ～設計、構造・物性から機能化まで～」と題して講座を開設いたします。

本講座では、九州大学大学院工学研究院応用化学部門・先導物質化学研究所の先生方を中心に、有機化学、無機化学、高分子化学等の分子材料創製や環境・材料分析等について解説し、最先端材料の基礎的な知識と技術について講義していただきます。

また、九州大学大学院工学研究院応用化学部門では、環境に調和した豊かな人間生活を実現する未来都市の創出を目的に、企業及び化学関係の研究者が広く集えるコンソーシアムを設立し、社会的に要望の高い未来化学技術の開発及び実証を行っており、この寄付講座を通してシーズの発信や情報交換等を行う予定です。

講座名：先端材料科学 ～設計、構造・物性から機能化まで～

前期：令和7年5月～令和7年6月 全14回

後期：令和7年10月～令和7年11月 全14回

講義時間：13：00～14：30、14：40～16：10（90分／回）

☆東京科学大学

平成27年度から東京科学大学（旧称 東京工業大学）物質理工学院のご協力のもと、CERI 寄付講座を開設しています。令和7年度も「ゴム・プラスチックの安全、安心 –身の回りから最新の話題まで–」と題して講座を開設いたします。

本講座では、広く社会に浸透し私たちの身の回りにある化学品を含むプラスチックやゴムとその関連製品の安全・安心を取り上げ、それらに関する情報とやさしい科学を紹介し、正しい知識を広く一般の方に紹介します。また、学生を含む専門家に対しては、最先端の安全性評価技術、劣化と寿命予測技術、耐性向上技術、更には高性能・高強度化技術・材料に関する科学を紹介し、将来の安心・安全な材料の設計の基礎を学んでいただきます。

講座名：ゴム・プラスチックの安全、安心 –身の回りから最新の話題まで–

前期：令和7年6月～令和7年8月 全14回

後期：令和7年10月～令和8年1月 全14回

講義時間：13：20～14：50、15：05～16：35（90分／回）

国際医薬品開発展（CPHI Japan 2025）出展

世界約 60 ヶ国・地域から約 3 万人の製薬業界関係者が来場する国際医薬品開発展（CPHI Japan 2025）が 4 月 9 日（水）から 4 月 11 日（金）までの 3 日間、東京ビッグサイトで開催されます。

本機構（CERI）は、創薬、開発フェーズにおける受託研究、分析及び調査・評価等を通じて医薬品開発を支援する受託研究機関（CRO）の役割を担っており、製薬企業等が製品開発から製造、販売を展開するための戦略的パートナーとして出展します。

開催期間中、CERI は出展社プレゼンテーションでの発表のほか、CERI 展示ブースにおいて、医薬品開発や各種申請を支援する受託メニューを展示し、ミニセミナーなどを実施します。

皆様のご来場を心よりお待ちしております。

【出展情報】 2025 年 4 月 9 日（水）～ 11 日（金） 10：00 ～ 17：00

東京ビッグサイト 東 4・5・6 ホール CERI 展示ブース （5M-22）

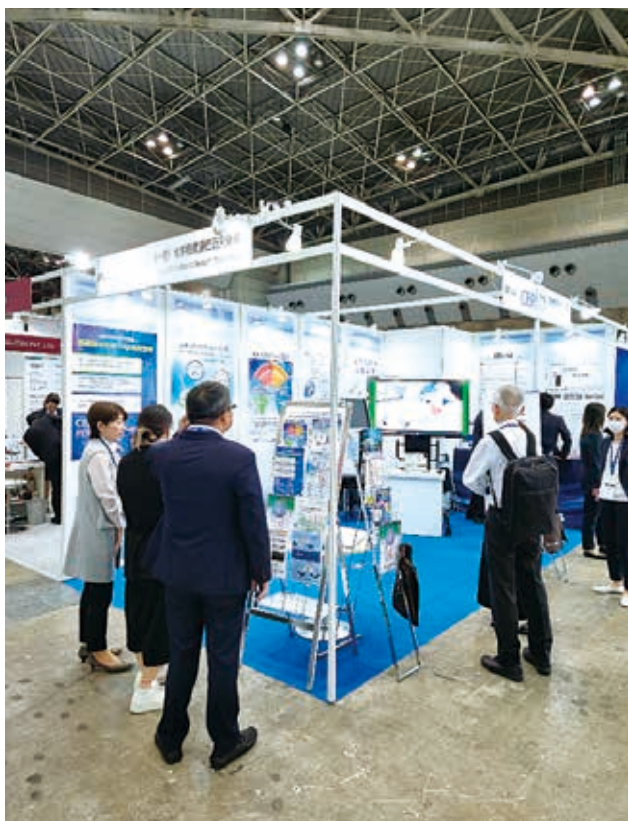
●出展社プレゼンテーション：4 月 10 日（木） 11：30 ～ 12：00 6C-08 会場

・交叉汚染防止や E & L 評価のための医薬品不純物の PDE 設定
～毒性データがない場合、PDE 値はどう決める？～

●ミニセミナー：4 月 9 日（水）～ 11 日（金） CERI 展示ブース内

タイムスケジュールは CERI ホームページトピックスでご案内します。

URL:<https://www.cerij.or.jp>



昨年（CPHI Japan 2024）の CERI 展示ブース（左）、出展社プレゼンテーション（右）の様子

第12回化粧品産業技術展（CITE JAPAN 2025）出展 ～ CERI の化粧品関連試験の紹介～



日本化粧品原料協会連合会主催の化粧品産業技術展が5月14日（水）から5月16日（金）までの3日間、パシフィコ横浜で開催されます。化粧品関連の最新の素材・技術・サービスに関連する展示と技術発表が行われ、化粧品産業に携わる方々にとって有意義な情報交換の場となっています。5月14日に開催される出展者技術発表会において、「受託分析機関 CERI：化粧品原料・素材の評価 ～化学分析・物性・安全性評価～」の発表を行います。また、展示ブースでは、受託試験に関する資料の配布のほか、製品の開発・申請等に係る各種試験のご相談も承ります。皆様のご来場をお待ちしています。なお、展示会の詳細は「CITE JAPAN 2025」のホームページをご覧ください。

【出展情報】・展示ブース番号：N9-29

・技術発表会：5月14日（水）15：30～16：00、会場 G401

（CITE JAPAN 2025）<https://www.citejapan.info/>



昨年（CITE JAPAN 2024）の CERI 展示ブース（上）、技術発表会（下）の様子

第 30 回化学物質評価研究機構研究発表会のご案内

第 30 回本機構研究発表会を次の通り開催いたします。
お忙しい折とは存じますが、是非ご参加くださいますようお願い申し上げます。

主催：一般財団法人化学物質評価研究機構
後援：経済産業省（予定）
開催日程：令和 7 年 6 月 6 日（金）14 時 00 分～18 時 30 分
開催場所：経団連会館 2 階「国際会議場」（東京都千代田区大手町 1-3-2）
参加費：無料（要旨集付）
プログラム：

14:00	開会挨拶	理事長 今田中 伸哉
14:05	基調講演	化学物質管理政策の最近の動向と今後の方向性について 経済産業省大臣官房産業保安・安全グループ化学物質管理課長 大本 治康 氏
14:35	研究発表 1	ゼブラフィッシュ胚発生毒性試験における薬物動態 ーヒト及び他の哺乳類との薬物ばく露量の比較ー 久留米事業所 縄司 奨
15:00	研究発表 2	核酸医薬品のオフターゲット効果の評価に適したマイクロアレイの検討 安全性評価技術研究所 石田 和也
15:25	研究発表 3	量子ビームを利用した小角散乱法による膨潤ゴムの架橋不均一性の評価 東京事業所高分子技術部 澤田 諭
15:50	休憩 15 分	
16:05	授与式	令和 7 年度 CERI 公募型研究助成
16:20	技術報告 1	ゴムの耐オゾン性評価方法の変更点 ー 2022 年以降の ISO 1431-1 及び JIS K 6259-1 改正を踏まえてー 高分子技術部門 岩瀬 由佳
	技術報告 2	HPLC 分析メソッド開発支援と HPLC による受託精製 クロマト技術部門 緒方 伸也
	技術報告 3	定量的構造活性相関 ((Q) SAR)、リードアクロス等による <i>in silico</i> 毒性予測 安全性評価技術研究所 林 多恵
	技術報告 4	再構築ヒト角膜様上皮モデルを用いる新規 <i>in vitro</i> 眼刺激性/損傷性試験 (OECD テストガイドライン No.492B) の紹介 化学物質安全部門 藤島 沙織
	技術報告 5	一対多型校正による JCSS 陰イオン界面活性剤標準液の開発と水道法関連分析への活用 化学標準部門 田原 佳子
	技術報告 6	製品中塩素化パラフィンの含有分析 環境技術部門 霜島 雅明
17:20	閉会	
17:30～18:30	懇親会	

※ 都合により、演題、講演者が変更になる場合があります。あらかじめご了承ください。

参加申込：研究発表会への参加については、本機構ウェブサイトトップページの Topics から専用フォームにアクセスいただき、お申し込みください。

申込締切：令和 7 年 6 月 3 日（火）

本機構ウェブサイトにおける動画配信について：

研究発表会の基調講演、研究発表及び技術報告を録画し、本機構ウェブサイトにおいて、令和 7 年 6 月 11 日（水）～令和 7 年 6 月 27 日（金）の日程で講演要旨及びプレゼンテーション動画を配信します。動画の視聴を希望される方は、本機構ウェブサイトトップページの Topics から専用フォームにアクセスいただき、お申し込みください。なお、研究発表会に参加申込みをされた方には、視聴パスワードをお知らせしますので、別途動画視聴の申込みは不要です。
動画視聴の申込締切：令和 7 年 6 月 25 日（水）

<https://www.cerij.or.jp> （本機構ウェブサイトトップページ）

各事業所連絡先

- 東京事業所
Tel:0480-37-2601 Fax:0480-37-2521
（高分子、環境、標準、クロマト、評価研）
- 名古屋事業所
Tel:052-761-1185 Fax:052-762-6055
- 大阪事業所
Tel:06-6744-2022 Fax:06-6744-2052
- 化学物質安全センター
Tel:03-5804-6134 Fax:03-5804-6140
- 久留米事業所
Tel:0942-34-1500 Fax:0942-39-6804
- 日田事業所
Tel:0973-24-7211 Fax:0973-23-9800
- 安全性評価技術研究所
Tel:03-5804-6135 Fax:03-5804-6139

編集後記

CERI NEWS 第 99 号をお届けします。巻頭言は大阪大学大学院薬学研究科の小比賀聡教授に「新たな創薬モダリティ：核酸医薬」と題し、核酸医薬の特徴、種類、問題及び今後の展望についてご紹介いただきました。本機構の開発業務にも触れていただき誠にありがとうございます。本機構は核酸医薬の分析技術、安全性試験評価技術等の研究に注力しており、研究の成果が核酸医薬分野の発展への一助となるよう、努めてまいります。

（企画部 小野澤 直樹）

CERI NEWS 発行日 令和 7 年 4 月

編集発行 一般財団法人化学物質評価研究機構 企画部
〒112-0004
東京都文京区後楽 1-4-25 日教販ビル 7F
Tel:03-5804-6132 Fax:03-5804-6139
E-Mail:cerinews@ceri.jp