

20030616

厚生労働省科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小谷 均

平成 16 (2004) 年 3 月

# 目 次

## I 総括研究報告書

- ハイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発に関する研究・・・1  
小谷 均（シェノミティア株式会社）

## II 分担研究報告書

- 1 ハイオナノ粒子生産技術の開発、マスターセルバンクの作成および検査・・・7  
中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広（シェノミティア株式会社）
- 2 ハイオナノ粒子の精製技術開発と安全性向上に関する研究・・・17  
中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広（シェノミティア株式会社）
- 3 抗癌剤封入ヘクターによる癌治療技術の開発・・・23  
中島俊洋、福村正之（シェノミティア株式会社）
- 4 ヘクターの修飾による標的化技術の開発・・・37  
金田安史（大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学・教授）

## III 研究成果の刊行に関する一覧表・・・41

## IV 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総括研究報告書

## 「バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発」

主任研究者 小谷均 （ジェノメディア株式会社）

研究要旨 本研究では、純国産技術であるハイオナノ粒子を、汎用性の高い医用材料として実用化するために大阪大学とアノエス MG が産学共同で開発研究を行い、生体高分子を主成分とする先端医薬品を安全かつ高効率に生体臓器へ導入するための医用材料とする。具体的には生産技術 生体高分子封入技術 標的化技術 製剤技術（安全性 安定性向上のための技術開発）という5項目の技術開発を行なうが、平成15年度は、平成14年度に行った生産技術、封入技術の開発成果をもとにして、更に継続してそれらの技術向」を目指すと共に、実用化に向けて、医薬品製造用の材料であるマスター細胞バンク、マスターHVJ バンクの作製 安全性に関する基礎データ取得、抗癌剤の封入と癌に対する薬効検討、標的化技術の開発を行った。

### A 研究目的

現在 他の先進国と同様に日本においても高齢化に伴う医療費の増加が社会問題となりつつある。特に成人病に対しては、有効性の高い治療薬が少ないことから、それらの予防と治療を有効に行うための画期的な先端治療技術や先端医薬品の開発が切望されている。

現在の創薬の主流となっている戦略は、数100万種類(外資系巨大製薬企業)の低分子有機化合物ライブラリーを、ロボットを使用した超高速スクリーニング(Ultra High Throughput Screening UHTS)により処理して医薬品のノズルとなる化合物を同定するというもので、化合物の種類数に依存するため膨大なコストと労力が必要となり、低コストで医薬品を開発するのは困難になっている。また、数10万種類の化合物ライブラリーしか所有しない国内の製薬企業は数100万種類のライブラリーを所有する海外の大手製

薬会社(メカファーマ)に対抗して優位性を持つ医薬品を継続的に開発する事は困難な状況である。

従来遺伝子、核酸、蛋白質などの生体高分子は、細胞への吸収効率か低く治療用分子として開発するのは困難とされていた。しかし、本研究開発により高効率に生体臓器や細胞に導入できるようになれば 有機化合物に依存した医薬品とは異なる新しいタイプの医薬品開発か出来るようになり、既存の医薬品では治療か困難であった成人病に対して有効性の高い医薬品の開発か可能になると考えられる。そのためには、機能性生体高分子を生体内の疾患組織や疾患臓器へ効率よく導入するための高性能なヘクター技術の開発か必要不可欠である。また 国内における医薬品開発コストを軽減するためには国産技術によるヘクターの開発か必要である。

ジェノメディアが、大阪大学と産学共同で開発

中のハイオナノ粒子は、ポストゲノム時代に急速にニーズが高まっている、生体高分子を高効率に生体組織へ導入するためのヘクターとして、簡便性、導入効率、安全性のいずれの面においても優れたテリハリーシステムとなることか期待されている。本技術か実用化されれば、機能性生体高分子を医薬品として開発する事か容易になり、21世紀の新規医療技術として注目されている遺伝子医療や再生医療に使用する先端医薬品の実用化か飛躍的に早まり、ポストゲノム時代の新規医薬品の開発分野で日本かリード出来る。これにより 国産の先端医薬品開発か活性化されれば急速な増加傾向にある成人病治療の医療費削減に貢献出来るかと期待される。また、先端医薬品開発分野で、国産技術の実用化のためのハイオヘンチャーの起業と育成か促進されれば、従来は大手製薬企業ではリスクか高いために難しかった先端医薬品の開発を、ヘンチャー企業へとリスク分散して共同開発を行なう事により、国産の先端医薬品開発の活性化か期待できる。

そこで、本研究では数年以内に臨床応用を行なうための技術を確認するため、製造技術、封入技術 標的化技術の開発を行ない、安全性の向上、汎用性の拡大、臓器特異性の確立を実現すると共に 安全性、有効性に関する研究も行う。

## B 研究方法

### (1) 医薬品製造用ハングの作製

ハイオ医薬材料用のヘクター粒子製造には、使用する材料についても医薬品製造用として安全性か保証されている必要がある。そこで、医薬品製造用に使用するヒト培養細胞株に関

しては、病原性ウイルスなどの混入か無い事か確認された細胞ストックを用いて、臨床用ヘクターを製造するためのヒト培養細胞ハング(マスターセルハング MCB)を作製して、目的の医薬品製造用の基準に準拠しているかを検討した。また、ヘクター産生に使用するHVJについても、細胞と同様に医薬品製造用のハングを作製する必要かあるため、クローニング後に種ウイルスのノートストックを作製して病原性ウイルスなどの混入を検討した。

### (2) 生体高分子封入技術の開発ーヒト培養癌細胞および担癌マウスに対する抗癌剤テリハリーシステムの有効性評価

昨年度の研究で、マウスの大腸癌細胞を用いた研究により、ヘクターへ抗癌剤を封入する事で、標的細胞に対する増殖抑制効果か大幅に向上することを明らかにした。そこで本年は、ヒト由来の癌細胞を含む種々の癌細胞に対しても、同様の増殖抑制効果か認められるかについて検討を行った。ヒト食道癌細胞と脳腫瘍細胞を使用して 2種の抗がん剤(フレオマイノン、ペプレオマイノン)をヘクターへ封入後に、それぞれの培養癌細胞に対して反応させた後に培地交換を行ない 増殖抑制効果を WST アッセイ法により検討した。また、実際に生体内の癌に対しても増殖抑制効果か認められるかについて、生体内に移植した癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した。材料としてはマウス大腸癌細胞(CT 26)を用い、マウス皮下に移植 生着させて一定のサイズになるまで腫瘍を増殖させた後に、腫

瘍内に抗癌剤を封入したヘクターを単回投与して腫瘍の増殖に対する効果について腫瘍径を指標として検討した。

(3) 生体高分子封入技術の開発—ヘクター—を利用した癌免疫反応誘導の評価

空ヘクター粒子には細胞性免疫を高める作用を持つインターフェロン $\gamma$ を誘導する活性があることから、抗癌剤を封入したヘクター粒子を投与することで癌に対する免疫が誘導されるかを検討した。担癌マウスに対して抗癌剤を封入したヘクター粒子を単回或いは連続投与を行い、抗腫瘍効果が増強されるかを、腫瘍径を指標に評価を行なった。また、ヘクターを投与した後にどのような免疫細胞が癌組織内へ浸潤しているかを検討するために、癌組織の凍結切片の免疫染色を行なった。更に誘導された癌免疫の継続性を確認するために、抗癌剤を封入したヘクター粒子により癌の萎縮や消失が認められたマウスに対して癌細胞の再移植を行ない、移植した癌細胞の生着や増殖が阻害されるかを検討した。

(4) ハイオナノ粒子の精製技術開発—空ヘクター粒子の安全性確認

臨床応用のためには、投与に用いるヘクター粒子の安全性が保証される必要がある。本ヘクター粒子中には種々の分子を封入して治療に使用するため、先ず封入物質を含まない空ヘクター粒子自身の安全性に関する検討を行った。現在、食道癌を対象とした臨床応用を想定しているため、投与経路として静脈内、

肺（経鼻）、皮内投与を行い、種々の用量の空ヘクター粒子をマウスへ投与して、その影響について検討した。

(5) ヘクターの修飾による標的化技術の開発

ハイオナノ粒子である HVJ-E ヘクター 10,000 HAU 分を 200 マイクログラムのリポーター遺伝子発現用プラスミド（pCMV Luciferase）、或いは 400 マイクログラムの FITC 標識したテコイオリコ核酸混合して粒子内に封入した。標的化には粒子表面の電荷を調節するために 硫酸プロタミン（1000 HAU のヘクター粒子あたり 500 マイクログラムを使用）と混合後、1000 HAU 分のヘクター粒子をマウスの尾静脈より注入した。

遺伝子発現検討の場合は、24 時間後に、各臓器におけるルンフェラーゼ遺伝子の発現を酵素活性を測定することで評価した。

また、核酸医薬のデリバリーの場合には、投与後 2 時間で肺を摘出してその凍結切片を作成して蛍光顕微鏡で観察することで評価を行なった。

## C 研究結果と考察

(1) ハイオナノ粒子生産技術の開発—医薬品製造用バンクの作製

平成 14 年度は、医薬品レベルのヘクター製造に使用するヒト培養細胞株の調製に関して、細胞ストックを作製し、無菌性、病原性ウイ

ルス混入の検査を行なった事を報告した。本年は 作成した細胞ストックから実製造用に使用する 250 ハイアルのマスター細胞バンク (MCB) を GMP 体制下で調製して、同様に無菌性、病原性ウイルス混入の検査を行なった。その結果、現在までに作製した MCB を融解して起眠した場合に医薬品製造に使用するために十分な生存率が得られる事などが確認されており、医用レベルの材料を実製造できる状況となった。一方、医薬品製造用の HVJ の整備についても、細胞と同様にクローニク後にストックを作製した上で 無菌性、病原性ウイルス混入の検査を行ない、マスターHVJ バンク(MVB)の調製準備中である。また 並行して臨床用に必要な医用材料レベルのヘクター製造設備 製造体性の設備も進めており、平成 16 年度中に実際に医薬品を製造できる体制(GMP 体制)下で運用を開始していく予定である。

## (2) 生体高分子封入技術の開発ーヘクターを利用した抗癌剤デリバリーシステムの開発

ヒト食道癌細胞及び脳腫瘍細胞をそれぞれ3種類使用して増殖抑制効果を検討したところ、いずれの細胞に対しても効果が認められる事が明らかとなった。また、その効果はヘクターを使用しない場合の抗癌剤の作用と比較して300倍程度である事が明らかとなった。そこで、実際の癌に対しても同様の治療効果が認められるかについて 4 体内に移植した癌細胞に対する増殖抑制効果を検討した結果、抗癌剤を封入したヘク

ターを投与した場合には腫瘍の萎縮や消失が認められ、その効果はヘクターへ封入しない場合の100倍程度である事が明らかとなった。以上の結果から、ヘクターへの封入により抗癌剤の増殖抑制効果か、培養癌細胞だけでなく体内へ生着した腫瘍に対しても大幅に向上する事が明らかとなった。

## (3) 生体高分子封入技術の開発ーヘクターを利用した癌免疫反応の誘導

担癌マウスに対して、抗癌剤を封入したヘクター粒子を単回投与するだけで腫瘍の消失が認められた事から、抗癌剤を封入したヘクター粒子を投与することで、癌細胞に対する増殖抑制効果だけでなく 癌免疫が誘導される事が示唆された。そこで 抗癌剤を封入したヘクター粒子を利用した癌免疫療法が可能であるかを検討したところ、連続投与では、単回投与と比較して癌の萎縮や消失などの抗腫瘍効果が増強される事が明らかとなった。また、癌免疫の誘導を確認するために、癌の萎縮や消失が認められたマウスに対して癌細胞の再移植を行なったところ、移植した癌細胞の生着や増殖が阻害される事が明らかとなった。以上の結果から、抗癌剤を封入したヘクター粒子の投与により、癌細胞の増殖抑制だけでなく、癌免疫を誘導出来る事が示唆された。

## (4) ハイオナノ粒子精製技術の開発ー空ヘクター粒子の安全性確認

封入物質を含まない空ヘクター粒子自身の安全性に関するデータを取得するために、種々の用量の空ヘクター粒子をマウスの静脈内・鼻腔内、皮内へ投与して、その影響について検討した。その結果、皮内投与においては最高用量においても局所的な影響のみであったか、その他の経路については高用量群において浴血などの影響が認められた。今後は、抗癌剤を封入したヘクター粒子を用いて、GLP 体制下で更に詳細な安全性に関する検討を行ない、臨床応用開始のための申請書作成を開始する。

#### (5) ハイオナノ粒子の修飾による標的化技術の開発

ハイオナノ粒子の標的化技術としては、硫酸プロタミンによる表面電荷の調節、カチオン性・アニオン性ポリマーによる修飾、脂質を介したペプチドや PEG など修飾分子の埋め込み、HVJ の膜蛋白質 (F 蛋白質、HN 蛋白質) と一本鎖抗体蛋白やリカントペプチドとのキメラ化を検討しているが、本年度の研究により表面電荷の調節により、遺伝子や核酸医薬を封入したヘクター粒子肺組織へ選択的に標的化できることを明らかにした。現在血流から脳組織や肝臓の实质細胞へ標的化する技術についても検討を進めており、来年度の研究では、それらの技術を利用して網内系組織以外の臓器に対する標的化技術も開発する予定である。

## D 結論

本年度の研究により、ヘクターの臨床応用に必要な基礎データと安全性・品質の高い製造用材料を得る事が出来た。今後は、臨床応用開始のための申請に必要なデータを取得するための研究・開発を中心にプロジェクトを進める予定である。来年度は、本プロジェクトで確立した製造技術により前臨床研究を行なうために必要となるヘクターの大量製造を行ない、臨床応用に向けて安全性に関する研究と、薬効・薬理に関する研究、免疫賦活化のメカニズムに関する研究を中心に癌免疫作用に関する検討を集中して行うことで、痛免疫療法に対する適用範囲の拡大を目指す。更に、標的化技術の開発についても並行して進めることで、プロジェクト終了後速やかに臨床応用を開始することを目指す。

## E 健康危険情報

特になし。HVJ をアルキル化剤であるヘータプロピオラクトンで不活性化して作成した第一世代の HVJ エンベロープヘクターでも感染性は認められず、安全性が高いことが明らかになった。

## F 研究発表

### 1 論文発表

Kotani, H, Nakajima, T, Lai, S, Morishita, R, Kaneda, Y (2003), Innovating Novel Vectors for Cardiovascular Disease. Current Gene Ther in press

## 2 学会発表

Nakajima T, Fukumura M, Miyaji K, Yoshida K, Kaneda Y, Kotani H Development of an Innovative Non-Viral Vector for Cardiovascular Disease 6<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2003年6月6日, Washington,DC

## G 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1 特許取得

現在1件出願準備中

### 2 実用新案登録



厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発  
「バイオナノ粒子生産技術の開発、マスターセルバンクの作成および検査」

分担研究者 中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広（ジェノメディア株式会社）

- (1) 研究要旨 ハイオナノ粒子を医用材料として臨床応用するためには、この粒子の恒常性と安全性を維持することを要求される。バイオナノ粒子の生産基準は細胞由来の生物起源医薬品の品質基準に該当すると考えられるためにウイルスや細菌などの外来性因子の汚染の可能性を否定し、細胞の性質を正しく把握し一定に維持しなければならない。本研究では生物薬品（ハイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞において日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）の三極の合意事項に基づいて示された標準的方法をもとにして、製造用細胞のハンク化（マスターセルハンク作成）および微生物による汚染否定試験を実施した。

## B 研究目的

細胞培養技術を用いて作製されたハイオナノ粒子を実際にヒトの治療に臨床応用するためには、医用材料レベルの恒常性と安全性が確保されている必要がある。厚生省医薬安全局審査管理課による医薬審第873号 平成12年7月14日に記載されているように、恒常性を確保するためには、細胞のハンク化するかわち もともと 個の細胞を選択し（クローニング） 特性解析された同 の出発素材、すなわちセル・ハンクを増やして均一の細胞のハンク（製造用のストック）を作成して、全製造ロットに使用することか必要であること。製造業者は 何らかの形でセル・ハンクを調製し、セル・ハンクの作成について実施した作業の内容を記録することか義務付けられていること。加えて、医用材料レベルの安全

性を保証するためにこの細胞ハンクに対して適切な試験を実施しウイルスや細菌 真菌（カビ）等による汚染のないことを保証する責任があることを明記している。今回のマスターセルハンク（MCB と略す）の作成および検査は昨年度に実施した製造用細胞の分離（クローニング作業）を基にして行ったものであり、細胞培養により製造される医薬品の最も重要な製造原料の つとみなされ、かつ生産されるハイオナノ粒子の性質を最も大きく左右すると考えられるマスターセル（出発点の細胞）の確保と保証をすることを目的としている。

## C 研究方法

- (1) ーント細胞（マスター細胞の候補となる種細胞）の選択から今年度の成果までの経過

昨年度の研究では 800 個以上の細胞クロー

ーン(一個の細胞から増やした均一の細胞集団)を各々独立に培養を行い、増殖性能とバイオナノ粒子の生産能力を比較しながら約6ヶ月かけてシード細胞の候補を3つに絞り込んだ。3つのシード細胞はこのあとマスターセルバンクを作成するのに最低限必要と考えられる試験(バクテリアやその他のウイルスの汚染否定 表参照)を専門の機関で実施して、いずれも問題ないことが明らかとなりこれら3つをシード細胞として確立した。

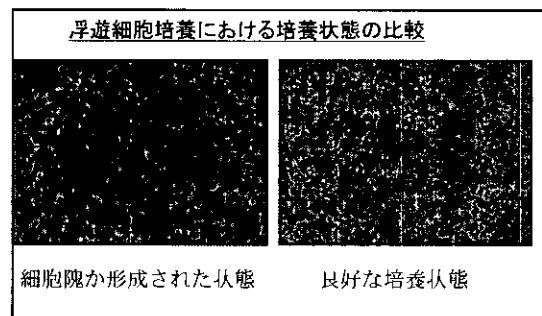
今年度はこの3つの細胞からの更なる絞込みからマスターセルバンクの作成および安全性の試験までを実施した。以下の(2)項以降に一つの細胞クローンへの絞込みについて報告する。

## (2) 培養の容易さの比較 培養継続中における細胞塊の形成

動物細胞培養においては実験スケールの培養(小スケール)から製造スケールへの拡大では特に細胞の状態を一定に保つことに留意しなければならない。これには本来細胞が持つ扱いやすさに加え培養液との相性などが重要な因子となる。これまでの研究では異なる培養液を用いて結果的に若干性質の異なる3つのシード細胞 A,B と C を得て、維持培養を繰り返してきたが培養を継続するにつれ細胞 C と専用の培養液の組み合わせは A,B に比べ培養条件の管理がデリケートであることが明らかとなってきた。細胞培養を継続していくためには、新しいフラスコへ植え継ぐ操作が必須であるがこの際に細胞の密度を厳しく管理しておかないと容易に細胞塊が生成し、著

しく細胞の生存率が低下してしまう場合があることが判明した。また、スケールアップした場合にはバイオリクターへ種細胞を植え込む作業があり、細胞へのダメージもある程度想定しなければならない。

以下に細胞塊が生成した例として2つの異なる培養液で独立に50日間培養を続けるうちに生じた細胞の位相差顕微鏡写真を図に示す。左が細胞塊が形成されてしまった状態で数個から数十個の細胞が一まとまりの塊を作っている、右が良好な細胞状態で一個一個がばらばらにほぐれた状態である。一旦、左の状態になってしまうとこの後細胞は死滅に向かい培養の継続がてきなくなってしまう。医療用ベクターを安定して製造するという点から考えてCの細胞と培養液の組み合わせはマスターセルバンク作成の候補から除外するのが望ましいと判断した。

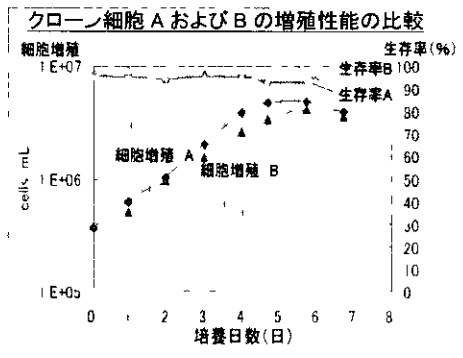
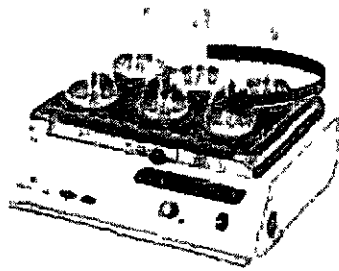


## (3) 細胞の増殖性の比較

次に、バイオナノ粒子の製造を行う培養を効率よく行うことを考えて、細胞の最終到達密度(栄養原を十分与え増殖するに任せたときの細胞数のピーク)と高密度培養での生存率を調べ、高密度培養が可能であるかを簡便な方法で確認した。125mLの浮遊培養専用フラスコにクローン A,B を各々植え込み、旋回培

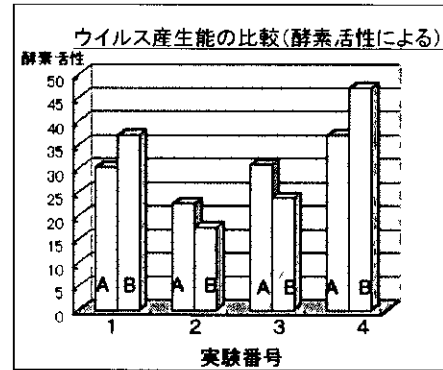
養を行った。以下のグラフに示すとおり両者は1mLあたり $4 \times 10^6$ の6乗個を超える密度まで容易に到達し、生存率も80-90%を維持した。溶存酸素濃度や培養液のpH制御ができない培養フラスコによる培養でも十分な高密度化が可能であり、今後バイオリクターを用いてスケールアップするためにも十分な性能を有した細胞であることが明らかとなった。

浮遊培養用フラスコによる検討(巡回培養)

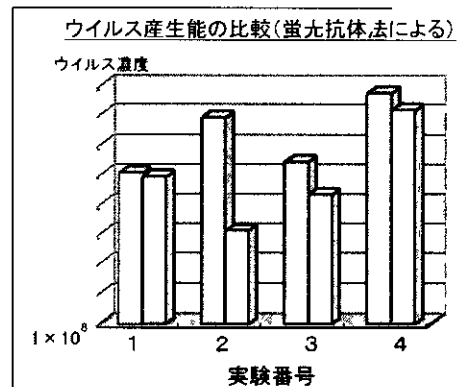


(4) バイオナノ粒子原材料(センダイウイルス)の生産能の比較

1LスケールのバイオリクターによってAおよびBの細胞を培養しセンダイウイルスを感染させてウイルス回収の量を比較した。生産量の評価はウイルスの表面に存在する酵素(ノイラミナーゼ)活性で評価した。



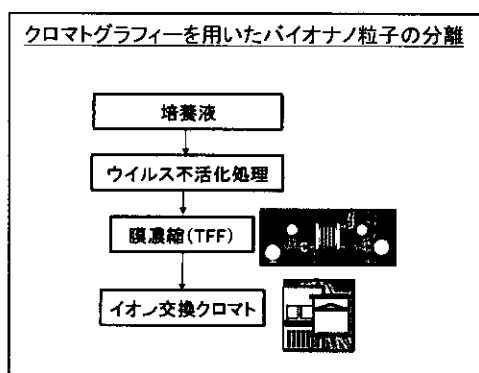
縦軸が酵素活性(培養液中のウイルス濃度)で2組の棒グラフの左がクローンA、右がクローンBを示し4回の実験の結果を比較した。酵素活性による比較ではAとBの両者にほとんど差が見られなかった。さらにウイルスの性能を評価するのに使用される培養細胞に対する感染性の試験(蛍光抗体法)での比較を試みた。ウイルスを産生させた培養液を回収し、別の培養プレート上で培養したBHK細胞(ウイルスの代表的な宿主 ハムスター由来培養細胞)に感染させて蛍光を発する抗体を用いて細胞のウイルス感染を検出した。縦軸がウイルス感染細胞数(培養液中のウイルス濃度)で2組の棒グラフの左がクローンA、右がクローンBを示し4回の実験の結果を示す。



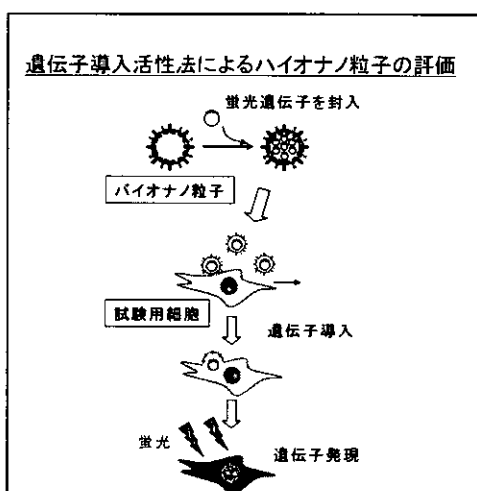
産生されたセンダイウイルスの感染性も両細胞でほとんど差が見られず、量に加え質的にも

同等の性能の細胞であると判定した。

最後にバイオナノ粒子のヘクターとしての性能を比較した。このためには回収したウイルス培養液にまず化学処理を行ってウイルスを不活性化し、次にイオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー法でバイオナノ粒子を分離純化した。

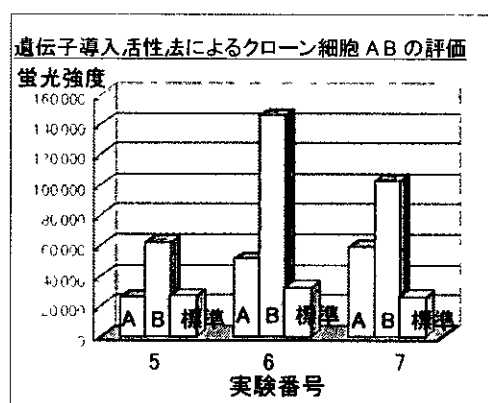


ヘクターとしての性能評価をするためにはホタルの蛍光遺伝子プラスミドをヘクターの中へ封入して培養細胞へ取り込ませた結果、細胞が蛍光を発する強度を比較する方法（遺伝子導入活性法）を用いた。



グラフの縦軸は蛍光強度を示し、各実験の3本の棒グラフは左からクローン細胞 A、クローン細胞 B、標準試料(実験間のばらつきを

確認するため)である。これまで2つの評価ではほぼ同等であった2つの細胞は実験番号5-7の繰り返し実験により、遺伝子の導入の性能に差が見られクローン細胞 B から得たバイオナノ粒子がより高い効果を示すことがわかった。この結果をからクローン細胞 B をバイオナノ粒子製造のためのマスター細胞として用いることとした。



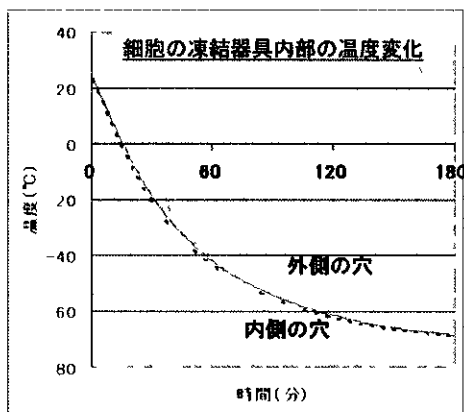
#### (5) 細胞バンク作成に先立つ細胞保存方法の検討

細胞バンクを作る際には一度に多量のバイアルを凍結保存する必要があるの、これまで実験室で行っていた小型の細胞保存用の凍結器具を使用することができない。GMP 製造(医薬品製造の基準に従った作業)では一般にプログラムフリーザー(大量のバイアルを一度に温度制御しながら液体窒素で凍らせる機械)が使用されるため、凍結作業での一分間の温度低下と温度保持のための入力プログラムを事前に決定しておかなければならない。そこで実験用凍結器具に温度センサーを取り付けて、実験器具内部の温度変化を確認してプログラムを作成し、さらにこの凍結プ

プログラムを用いて保存された細胞が正常に融解し再生(起眠)するかを比較した。

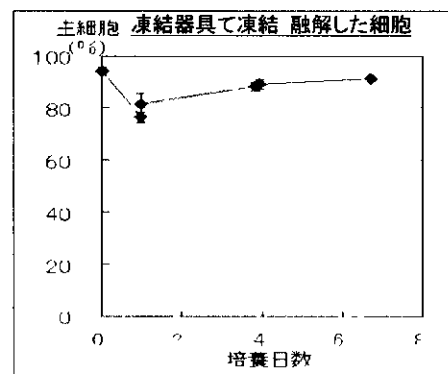


凍結用器具の内部はバイヤルを入れる穴が同心円状に2列に並んでいるので、内側と外側の各々の穴1つずつに温度センサーをセットして温度のデータを取得した。以下のグラフに示すように25°Cから-20°Cまでの温度変化は1分あたり平均-1.5°C、-20°Cから-40°Cまでの平均は-0.8°Cであった。これまで同器具においては常に一定の凍結結果(融解後の生存率が一定)を得てきたが、予想通り器具内の異なる場所での温度変化に差は見られなかった。

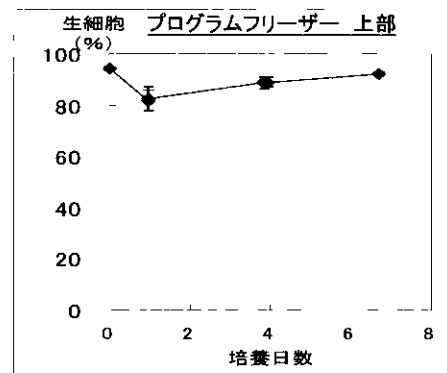


このデータを基に凍結用プログラムを検査してプログラムフリーザーを用いてテスト凍結を行った。念のためフリーザー庫内の上部と下部に各々細胞の入ったバイヤルを入れて凍結を行った。以下に凍結 融解後の細胞培養のデータを示す。

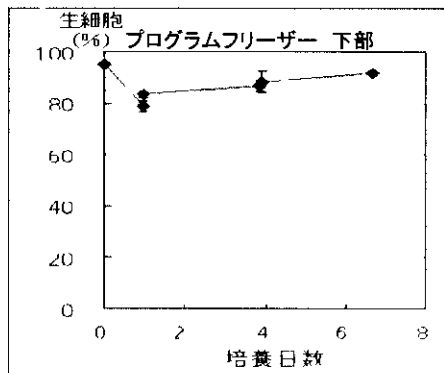
縦軸に細胞の生存率(培養液中における生細胞の比率)、横軸に培養日数を示す。グラフが不連続となっている部分はフラスコからフラスコへの植え継ぎの操作を行ったポイントである。「凍結器具を用いた細胞の生存率」は融解翌日に75%を維持しておりこの後の培養においては徐々に90%まで回復し良好な細胞保存の状態と判定できる。



これに対しプログラムフリーザーを用いて凍結を行った結果を次に示す。



プログラムフリーザーを用いた場合でも一日目で80%の生存率、培養を継続して90%まで回復する傾向がみられた。この傾向はプログラムフリーザーの下部で凍結したバイヤルでも全く同等であった(次のグラフに示す)。



ここで設定した凍結プログラムはこの細胞のバンクを作成するのに十分なものであることがわかった。

(6) マスターセルバンク(MCB)の委託の準備(作業標準の作成)

MCB の製造作業は医薬品の製造を念頭に置いた厳格な管理が要求される。このためには作業方法や実施記録について事前に文書を作成し、委託側の担当者が内容をチェックするのに加え、この文書に対して実施責任者が承認をする必要がある。今回の委託ではまず最初に作業方法のチェックを行い、各作業項目の細部については受託機関の既存の(医薬品製造についての基準に準じた)手順書をもとに、今回のクローン細胞 B に最適な方法へと変更を加えた。この細胞は浮遊細胞であり、かつ無血清培養液を用いるために過去に多くあった壁着性の血清培養に比べると十分な注意をしながら培養を行うことが肝要である。さらに、海外の製造機関では特に手順を詳細に規定しておくことが作業中のトラブルを未然に防ぐことにつながるため文書の確認は入念に実施した。

(7) MCB の委託の準備(製造施設の査察)

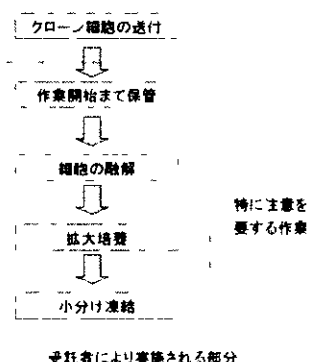
今回のように医薬品の製造に相当するレベルの製造(GMP 製造)の委託を行う際は、通常委託側が受託者における作業が適切に実施されることを確認するために事前に受託者に対し査察を実施することが多い。MCB は製造の上で最も重要な製造原料にあたるため現地での査察を実施した。査察は製造作業にかかわる機器の管理が適切であるか、それを証明する文書があるかといった点や作業所の衛生管理や作業員の服装等が適正かといった点に加え、作業の管理体制 責任の所在が明確であることを文書で規定しているかといったことに注目して実施した。

管理体制や管理文書の整備といった点では GMP 製造をこれまで手がけてきた会社であるため十分整えられており問題は見られなかった。製造施設についても適正に管理されているということを確認できた。しかしながら今回の作業を実施するに当たり一部の機械が不十分であることが明らかとなったため、受託側が至急現地で機器の調達を手配して作業開始までに調整と必要な管理文書の作成を行うこととなった。

(8) MCB の委託の準備(技術移管)

細胞バンク作成の作業は日本から凍結保存細胞バイアルを受託機関に送り、それを融解して拡大培養して十分な量の細胞を得た後に行われる。(下図参照)受託側の GMP 施設には実作業中に委託者の入室を許可していないため、注意を要する部分は作業期間前に実地で作業担当者同士で刷り合わせと技術移管を行うことが望ましい。

### マスターセルバンクの作成手順

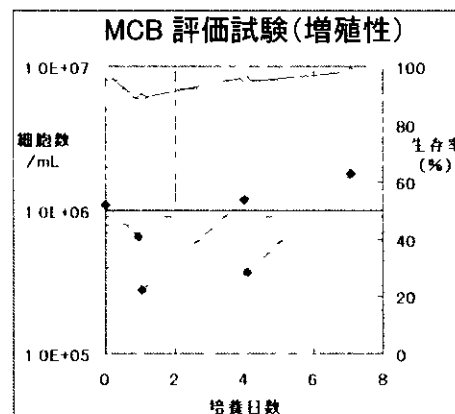


そこで査察に加えて、製造本作業の期間を避けて製造現場において実施することとした。現地作業との技術移管のために同系列の細胞を準備し培養作業を行った。その結果注意を要する作業についても十分な技術移管ができた。

#### (9) MCB(マスターセルバンク)の作成

MCB 作成のための細胞の融解作業は受託機関により平成 15 年 10 月 22 日に行われ、その後の拡大培養も順調に実施された。6 回の植え継ぎの後に増殖した細胞を 11 月 10 日に回収し凍結用培養液への置換とバイアルへの小分け作業とプログラムフリーザーを用いた凍結も問題なく行われた。作成された MCB の本数は 250 本でありこの委託における最終的な評価点である融解後の細胞培養試験を行った。規定は解凍直後の生存率が 70%、 $7 \times 10^5$  個の細胞数に満たない場合は即時、再度融解からやり直すことを定めたがこの基準をクリアしさらに増殖確認の試験を行った。以下のグラフは白抜き(右軸)が生存率を示しており解凍直後(0日)は98%の生存率を示した、細胞の回収は黒四角(左軸)に示すとおり $1 \times 10^6$  個の回収であ

った。さらに4日目から7日目の間の細胞の増殖性(倍加時間)を計算したところ 315 時間で基準の 40 時間を上回る増殖速度であり事前に設定しておいた評価の基準に満たすバンクが作成されたことを確認した。



#### (10) MCB の品質検査(安全性の試験)

先にも述べたように医用材料レベルの安全性を保証するためにこの細胞バンクに対して適切な試験を実施してウイルスや細菌 真菌(カビ)等による汚染のないことを保証しなければならない。無菌性以外の試験項目の選定は出発時の細胞の起源(どの生物由来であるか)バンクを作成するまでに用いた培養液の組成(動物由来の成分が含まれていた場合その内容)、どのような管理状態で培養をされてきたかという記録をもとに十分な検討をしなければならない。通常の細胞培養ではウシ由来の血清を必ず培養液に使用した履歴があるはずで、ウシに関するウイルスに対しての試験はすでにシート細胞(マスター細胞の候補)の段階で陰性であることを確認した。シート細胞試験以降の培養では切動物由来の成分を加えていないため今回の MCB の品質試験の項目には加えな

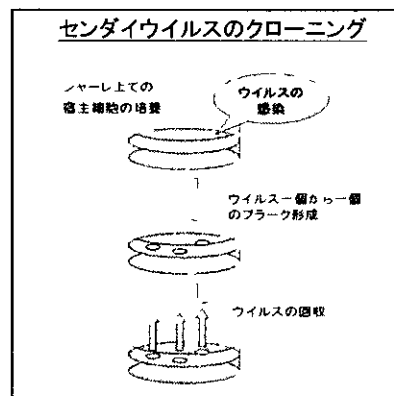
かった。無菌性の試験とマイコプラズマ（生物学的に細菌に分類され、ウイルス並みに小さいありふれた病原体）試験は MCB 作成の間に適切に無菌作業が行われたことを試験結果から確認することかてきる。その他はこの細胞の起源かヒトの組織であることからヒトに感染するウイルスに関する試験を中心に選択した。試験方法のプレートは米国の規制当局の基準に従った発育鶏卵を用いたウイルス汚染の否定試験や欧州の規制当局の基準に準拠した試験などを含めて、すべて GLP（適性検査基準 検査を実施する上で信頼性を確保するために導入されたシステム）基準に準拠した高い信頼性の委託試験を行った。今回、MCB に対して選択した試験項目は合計 20 種類にも及ぶか、細胞培養で得られたハイオナノ粒子を医療材料に使用するためには GLP 組織で実施された試験による十分な安全性の保証が不可欠であると考えられる。

#### (11) ウイルスのクローニング(単離)

バイオナノ粒子の生産には宿主となる細胞のほかにウイルスが重要な原料となる。本年の研究では米国の公的な細胞やウイルス等生物資源の保管機関である ATCC(American Type Culture Collection)より直接ウイルスを購入し研究に用いた。細胞やウイルスは保管機関から入手した時点では通常、遺伝的にヘテロ(異なる性質を持った集団)であり、ヘテロな集団は時間の経過に伴い徐々に集団の組成比が変化し見かけ上の性質が変ってしまう。これを防ぐために MCB の作成にお

いてはクローニング(単一の細胞から培養分離を行う操作)を実施した。ウイルスにおいても同様のことが考えられるためにクローニングを実施することとした。クローニングを行う部屋は入室・退室を管理して外部からのウイルス、特に同種のセンダイウイルスが混入する危険性を減らすこととした。また、研究に使用する安全キャビネットも実施期間についてはこの操作に専用のものとした。

ウイルスの単離には限界希釈法(ウイルス溶液を十分に希釈し 1 個のウイルスが一つの培養器に含まれるようにして培養する方法)があるが、この方法は少量のウイルスが細胞に対して強い殺傷能力を持つ場合や強力な増殖性能を持っている場合に効果的であるが、今回のバイオナノ粒子には有効ではなかった。そこで、他の一般的な手法・プラーク形成法がセンダイウイルスについても実績のある方法であることからこれを検討した。(プラーク=細胞がウイルスにより変性や死滅をした部分)



宿主細胞には MCB 作成に用いた細胞と同種のものを用い、この細胞の培養液に加える成分には極力動物由来の物質を含まな



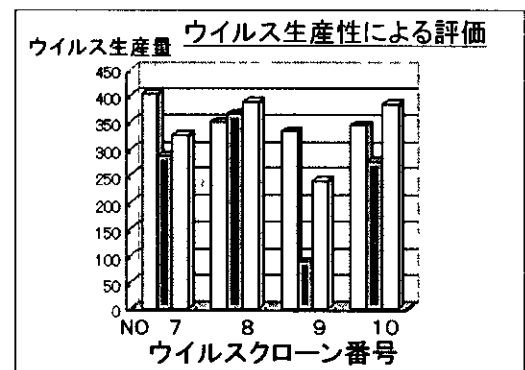
いものを選択し、動物由来の添加物についてはガンマー線を照射したものを使用するようになり心がけた。ウイルスを感染させた細胞のシャーレは 10 日目に染色液を重層して細胞を染色する。これにより細胞がウイルスにより変化した部分が白く抜けて検出でき、マイクロピペットを使用してこの部分を吸い取ることで単一のウイルスプラークを採取することができた。

センダイウイルスは通常一個の感染ウイルスから 500 個程度のウイルスが生成されるが、一個のプラークから直接宿主細胞に感染を行いウイルスを増殖させることは困難であった。そこで宿主細胞の代わりに発育鶏卵を用いてウイルスを増殖させることとした。発育鶏卵は医薬品製造のための原料のウイルス検査に用いられるほど感度の高いウイルス増殖に適した材料であることが知られている。しかしながら、一般の養鶏場から出荷される鶏卵は医療材料には不適であるため、ワクチン製造の原材料として入手できる安全な鶏卵(SPF 卵)を用いた。この鶏卵を製造するために業者は十分な空調設備と滅菌した餌を準備するのに加えて、国によって定められた各種の微生物試験やウイルス検査を親鳥に定期的実施して安全を確保している。SPF 卵で増殖させたウイルス溶液は再度プラーク形成法によるウイルス単離にかけられ、2 個のウイルスがたまたま 1 つのプラークに含まれてしまう確立を減じた。

このようにして作成した 24 個の独立のウイルスは 2 回目の単離選択の間に増殖性の点から 4 個(No 7、8、9、10)へと絞り込まれ

た。

この 4 つのウイルスクローンの比較を、培養細胞に感染させた際のウイルスの生産能で比較した。生産量の評価はセンダイウイルス表面にある糖鎖の性質を利用した赤血球凝集反応(HA)により行った。



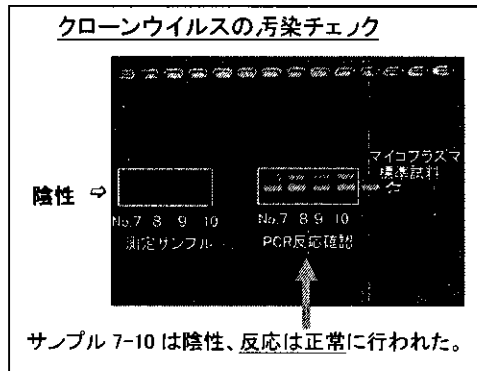
ウイルスの生産性は No 9 を除いて安定しておりこの中から変動の少ない No 8 をシートウイルス(ウイルスバンクをつくるための候補種ウイルス)に選択した。

#### (12) 分離したウイルスの微生物汚染の否定試験

このシードウイルスについても MCB を作成したときと同様に他のバクテリアやウイルスによる汚染が無いことを証明しておく必要がある。GLP 試験施設に正式に試験委託を行うのに先立って事前に自社でマイコプラズマ汚染の否定試験をして候補のウイルスが汚染されていないことを確認しておく必要があった。マイコプラズマは細菌より小さい病原微生物であるため通常の無菌フィルターを容易に透過してしまうことが知られている。

試験の方法はマイコプラズマに反応する DNA 断片を試験試料に加えた後に PCR 法で増幅を行い、電気泳動によりマイコプラズ

マに該当するDNA断片が検出されるか否かで行った。その結果は陰性でありウイルスのクローニング作業において微生物汚染の問題がなかったことがわかった。



すでに安全性に関する試験が可能な GLP 施設に対して必要な試験項目を選択して 19 の試験の委託を行っている。また、この委託試験を実施するのに先立って事前に試験に必要な測定条件と方法の検討のために加え 2つのプレスタディを委託する必要があった。

#### D 考察

本年の研究により、目的のハイオナノ粒子の製造にとって最も重要な原材料である培養細胞を供給する細胞バンクシステムを作成した。これによって、効率よくハイオナノ粒子を生産する細胞を帛に安定して供給することが可能となったのはもちろんのこと、この細胞の安全性についても細胞バンクとして満足のできる試験によって保証をすることかてきるようになった。今後ハイオナノ粒子を実用化するためには、これに加えてもうひとつの重要な原料であるセンダイウイルスの確保が必要である。これについても MCB で検討したのと同様に GLP 施設での安全性試験を実施しておくことが重要である。これについては、シートウイルス(マ

スターウイルスの候補)に必要な試験項目の選定を済ませてすでに試験施設に委託を行った。今後の実用化のためにはこのようにして得た原材料をもとに実際に動物への適用を行い生体内での安全性について多くのデータを取得すると同時に より効果を高めるための修飾あるいは適応を進める技術開発を行う。

#### E 結論

本年度の研究で、バイオナノ粒子の製造に必要なマスター細胞バンク(MCB)を作成した。確立した技術は、今後実製造を行う場合の医薬品製造基準や、工業レベルの製造に必要なスケールアップにも耐えうる技術であり、今後得られた原材料(細胞およびウイルス)を利用してバイオナノ粒子の実際の生体内での安全性、効果の確認を繰り返して情報を得ることを行い技術開発へのフィードバックを行う。

#### F 健康危険情報

特になし。

#### G 研究発表

- 1 論文発表 なし
- 2 学会発表

Nakajima T, Fukumura M, Miyaji K, Yoshida K, Kaneda Y, Kotani H Development of an Innovative Non-Viral Vector for Cardiovascular Disease 6<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2003年6月6日, Washington,DC

- 1 特許取得  
なし
- 2 犬用新案登録

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発  
「バイオナノ粒子の精製技術開発と安全性向上に関する研究」

分担研究者 中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広（シエノメディア株式会社）

**研究要旨** ハイオナノ粒了を医用材料として臨床応用するためには、安全性が確保される品質レベルまで、不純物の除去と精製を行う必要がある。昨年度の研究により、空粒子であるハイオナノ粒子に適した精製法を確立したか、実際に臨床応用を開始するためには、実験動物による評価で安全性が保証されている必要がある。そこで、本年度の研究ではハイオナノ粒了であるヘクター一粒了を精製した後に、封入物質を含まない状態の空粒了を用いて、臨床応用の開始に必要な安全性に関する基礎データを取得した。現在のところ、食道癌や脳腫瘍など固形癌を対象とした臨床応用を想定しているため、投与経路として静脈内投与、経鼻での肺への投与、皮内投与を選択し、種々の用量の空ヘクター粒子をマウスへ投与して、その影響について検討した。

**A 研究目的**

作製されたハイオナノ粒子を実際にヒトの治療に臨床応用するためには、医用材料レベルの安全性が確保されている必要がある。通常の DDS 開発には、安全性が確保された成分のみで調製を行なうため医薬品を封入した状態で安全性の評価を行なうか、本ヘクターシステムのように生物由来の新規物質を成分とする場合には、空粒子の状態ヘクター自身の安全性に関する基礎データを取得する必要がある。

安全性のレベルを高めるためには、導入対象となる医薬品の封入前に、ヘクターそのものを十分に精製して不純物の除去効率を高める必要があり、高度な精製技術が必要となる。そこで、本年度の研究では昨年度に確立したヘクターの精製技術を更に改良して、ヒトへ

の使用が出来るレベルまで不純物を除去し出来る精製技術の確立を行う。また、最終的に、確立された技術で実際にヘクターの大量精製を行い、得られた空ヘクター粒了により実験動物を用いて安全性試験を行なって、ヒトへの臨床応用を開始するために、十分な安全性が確保されていることを確認する。

**B 研究方法**

(1) ハイオナノ粒了の調製

現在ヒト培養細胞に組換えタンパクを発現させてハイオナノ粒了を生産する技術を開発中であるか、本年度の研究では、セントアイウイルスを増殖するためにハイオリクター中でヒト培養細胞株（293細胞）を、無血清培地を用いて行遊状態で高密度培養して、

HVJ 細胞へ感染させた後に、2～4日間培養を継続してハイオナノ粒了の原料となる HVJ を産生させた。

培養上清中のウイルス粒子を完全に不活性化して、ヘクター粒子を得るために、HVJ を含む培地をアルキル化剤であるヘータフロヒオラクトンにより処理を行った。その後、混入している細胞や脂質等の残渣を除去するために ウイルスを完全に不活性化した後のサンプル液を2,000×gで20分間、4度の温度条件で遠心して、その上清を精製用原料として使用した。

混入したウイルスの不活性化処理を行った後のサンプル溶液を、原理の異なる3種類の精製用樹脂を用いて精製して、不純物の除去を行った。

得られたヘクター粒子について品質試験を行った後に、空ヘクター粒了を得るためにハノファー溶液を用いて封入操作を行った。封入操作後は、使用時までマイナス80度でサンプルを保存した。空ヘクター粒了を含むサンプルは、使用直前に融解操作を行なって、以下の安全性確認に用いた。

## (2) 皮内投与による安全性の確認

8週齢のCrJ CD-1 (ICR) 系の雄マウスを、各用量群5匹用いて、安全性に関する予備試験を行なった。試験に使用するマウスはすべて日本チャールス リハー株式会社より購入した。マウスを入荷時に外貌所見を行い、健康状態が良好であることを確認した後に7日間以上馴化を行った。馴化期間中に異常かみ

られなかった動物(30匹)を馴化最終日に無作為に5匹ずつ選抜して群分けを行って、空ヘクター粒了の投与に使用した。

群分けしたマウスを、それぞれケタミンとキノラシンを用いて混合麻酔を行い、背部皮内に一週間間隔で2回、予め設定した用量の空ヘクター粒了を投与(100マイクロリットル/部位)した。

一般症状については、投与後に1日1回以上、14日間観察して記録を保存した。体重については、投与直前と観察期間中毎日測定を行ない、各測定日ごとの体重と各測定日間の体重増加量を算出した。

投与後14日目に、マウスを塩酸ケタミン(ケタラール、三共株式会社)の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈から採血した後に、放血により安楽死させた後に、各動物について剖検を行なった。剖検により異常か認められた臓器については、10%ホルマリンで固定して保存を行なった。また、投与部位の皮膚組織は、採取後に10%ホルマリンで固定を行いパラフィン切片を作製し、HIE染色を施した後に鏡検した。

## (3) 静脈内投与による安全性確認

7週齢のCrJ CD-1 (ICR) 系の雄マウスを、各用量群5匹用いて、安全性に関する予備試験を行なった。試験に使用するマウスはすべて日本チャールス リハー株式会社より購入した。マウスを入荷時に外貌所見を行い、健康状態が良好であることを確認した後に7日間以上馴化を行った。馴化期間中に異常かみ