

図2 ヒトFcRn (α鎖) のアミノ酸配列 (a) および細胞外領域の立体構造 (b)

IgGの高次構造上CH2領域とCH3領域の間に位置するLeu253, His310, His435が関与し, IgGのHis残基とFcRnの酸性アミノ酸残基の静電的相互作用がpH依存性の結合に寄与しているとされている(18). IgG結合に関与するFcRn上のアミノ酸残基は, FcRn α2ドメインのGlu115, Glu116, Asp130, Trp131, Leu135とされている(19)が, この部位のアミノ酸配列には種による相違がみられ, FcRnとIgGの結合に種差があることの一因と考えられている(18). 現在では, マウスIgG1およびIgG2aはヒトFcRnに結合しないことが明らかにされており(20), ヒトに投与されたマウス抗体が短半減期であることの科学的根拠となっている.

FcRnにはIgGの他にアルブミンもpH依存的に結合する(21). FcRnにおけるアルブミン結合部位はHis166であり, IgG結合部位とは異なっているため, IgGとアルブミンは拮抗することなくFcRnに結合する(22). ヒトにおけるアルブミンの半減期は約20日であり, IgGと同様である(22).

FcRnの膜貫通領域直下の2つのArg残基はカルモジュリンの結合に関わっており, カルモジュリンとの結合がFcRnタンパク質の半減期やIgGの輸送効率に関与していることが報告されている(23). また, ヒトを含む多くの種で保存されているTrp309, Leu320, Leu321がadaptor protein AP-2との結合およびFcRnのエンドサイトーシスに関与することが報告されている(18).

3. 生体各組織におけるFcRnの役割

FcRnは新生児期のみならず成体においても種々の組織に発現していることが明らかにされており(21), IgGの分解抑制による血中濃度維持, および細胞内経路を介したIgGの輸送により, IgGによる生体防御機構に関与していると考えられる.

1) IgG血中濃度維持

FcRnは, 主として細胞内に局在している(24).

FcRnは細胞内に取り込まれたIgGとエンドソーム内で結合して, IgGがリソソームに輸送されて分解されるのを抑制し, IgGを細胞外にリサイクルすることによってIgGの血中濃度を維持していると考えられている(21)(図3a). IgG血中濃度維持には血管内皮細胞および血球系細胞に発現しているFcRnが関与していることが, 組織特異的ノックアウトマウスを用いた実験等により示されている(25, 26). IgGの細胞への取り込みはピノサイトーシスによるとされているが(21), *in vitro* 実験ではFcRn発現量とIgG取り込み量が相関するという報告(27)がある他, Na⁺/H⁺交換輸送体の活性が高い上皮細胞やがん細胞あるいは炎症部位などでは細胞表面の微小環境の酸性化により細胞表面でのIgGとFcRnの結合が可能になり, FcRnがIgG取り込みに関与している可能性も考えられている(18).

2) IgG輸送

FcRnは上皮細胞等においてトランスサイトーシスによりIgGを輸送する(図3b). 多量体免疫グロブリン受容体pIgRによる二量体IgAの輸送が基底膜側から管腔側への単方向であるのと対照的に, FcRnは双方向性にIgGを輸送し得ることが報告されている(16, 28). 各組織でのFcRnの役割については未解明の点が多いが, 齧歯類の新生児小腸における乳汁中IgGの吸収の他, ヒト, サル, およびウサギの胎盤における母親由来IgGの胎児への輸送, 成体の小腸におけるIgGの管腔側への分泌と基底膜側への抗原の取り込み, および抗原提示細胞への輸送(29), 腎糸球体基底膜からのIgG除去(30)等にFcRnが関与しているとされている. また, 好中球における抗体結合細菌の貪食(31)や, 抗原提示細胞での抗原抗体複合体の取り込みと抗原提示にもFcRnが関わっている(32).

4. 抗体医薬品の体内動態とFcRn

1) 抗体医薬品の血中半減期とFcRn

図1に抗体医薬品のヒトにおける血中半減期を示し

た(6). マウス抗体の血中半減期が短いこと, また, 表に記載したキメラ型, ヒト化, ヒト抗体およびFc融合タンパク質は全てヒトIgG1由来のFc領域を持つが, その血中半減期は製品により異なっていることが分かる. 一般に, バイオ医薬品の血中半減期制御には, 分子量や等電点, 受容体結合性など多くの要素が関わっている. 我々は, 抗体医薬品の血中半減期とFcRn結合親和性の関連を明らかにする目的で, 11種類の代表的な既承認抗体医薬品について, 表面プラズモン共鳴法を用いてヒトFcRnとの結合親和性を解析した. その結果, ヒトIgG1由来Fc領域を持つ抗体医薬品のFcRn結合親和性は製品により異なっており, 特にFc融合タンパク質ではFcRn結合親和性が低いことが明らかになった. また, 一部の抗体を除いて, FcRn結合親和性とヒトでの血中半減期(文献値)に相関が認められ, FcRn結合親和性が血中半減期制御に関わる重要な要素の1つであることが示された(33).

さらに, 評価に用いた抗体医薬品の中には, アロタ

イブの違いによりFc領域のアミノ酸2残基の配列が異なる製品があることや, Fc領域に結合している糖鎖の構造も製品により異なっていると考えられることから, これらの限定的な差がFcRn結合親和性に影響している可能性を考え, パパイン消化によりFc領域をFab領域あるいは受容体領域から分離してFcRnとの結合親和性を測定した. 興味深いことに, FcRn結合親和性が相対的に低い抗体医薬品のFcRn結合親和性は, パパイン消化により上昇し, FcRnに高親和性を示す抗体医薬品と同程度になることが明らかになった(図4). すなわち, アロタイプや糖鎖構造の相違がFcRn結合親和性に影響しているのではなく, Fab領域あるいは受容体領域の構造がFc領域内のFcRn結合部位の高次構造に影響する結果, 各抗体医薬品が固有のFcRn結合親和性を有していることが示唆された(33).

2) 抗体医薬品の生体内分布とFcRn

3.の2)で述べたように, FcRnを介した生体局所でのIgG動態制御に関する知見が集積され, IgGを介し

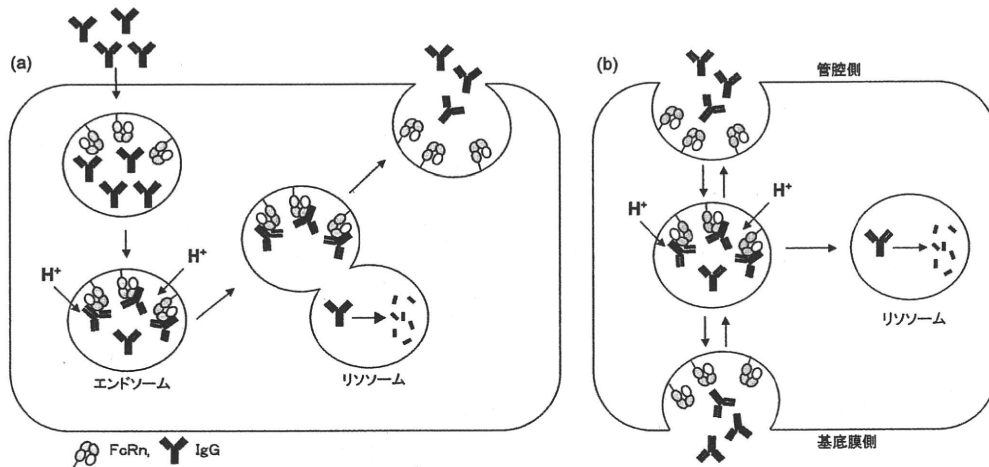


図3 FcRnを介したIgGのリサイクリング(a)およびトランスサイトーシス(b)

(a) リサイクリング: 血管内皮細胞等に発現しているFcRnはIgG分解抑制を担っている. ピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれたIgGは, H⁺の流入により酸性化したエンドソーム内でFcRnに結合する. FcRnに結合しなかったIgGはリソソームで分解されるが, FcRnと結合したIgGは分解を免れ, 細胞外に輸送されてFcRnから解離することにより, リサイクルされる. (文献21より改変)
 (b) トランスサイトーシス: 小腸上皮細胞等に発現しているFcRnは細胞内経路を介したIgG輸送を担っている.

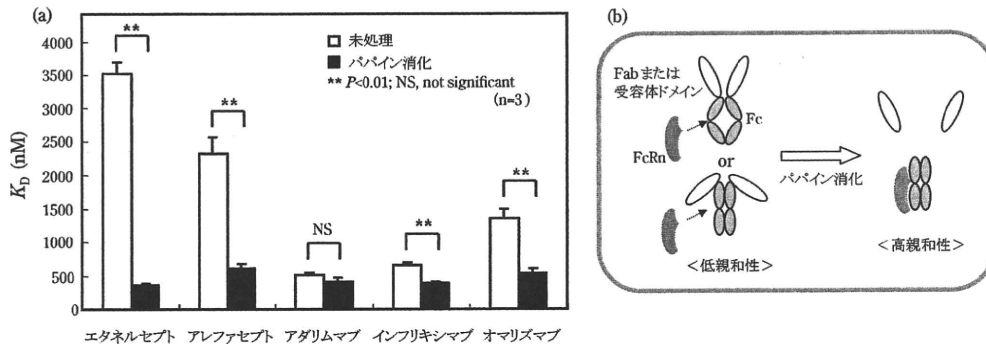


図4 抗体医薬品のFcRn結合親和性のパパイン消化による変化(a)およびデータから想定されるモデル(b)

(a) Suzuki T, et al. (文献33より一部改変)

た免疫応答における FcRn の役割が解明されつつある。投与された抗体医薬品も生体内 IgG と同様の機構により局所で輸送されると考えられるが、血中から組織への抗体医薬品の移行は主として対流や拡散等の受動的な機構によるものと考えられており(34)、抗体医薬品の生体内分布と FcRn の関連に関する知見は限られている。しかし、FcRn を介した抗体の胎盤通過が抗体医薬品の安全性を考える上で重要であるという点は明確であり(35)、ヒトでは胎盤に FcRn が発現する妊娠第 3 期以降には母親に投与された抗体医薬品が胎児に移行する可能性が高い。また、非臨床生殖発生毒性試験の実施に際しては、試験に用いる動物の FcRn と被験薬の結合親和性や、動物における IgG 母子免疫の機構を十分に考慮する必要がある。この他、アルツハイマー病治療薬として開発が進められている抗 β アミロイド抗体の作用機構についてはまだ一定の見解が得られていないが、FcRn の関与を示唆する報告もあり(36)、抗体医薬品の生体内分布と FcRn の関連の解明は今後の課題である。

5. FcRn との結合性を利用したバイオ医薬品の開発動向

現在までに、FcRn との結合親和性を上昇させ、血中半減期の延長と有効性の向上を目的とした改変型抗体(37)の開発が進められている他、ホルモンやサイトカイン、酵素などを Fc 領域と融合させることにより血中半減期を延長することが試みられている(38)。また、エリスロポエチンあるいは卵胞刺激ホルモンを Fc 領域と融合させたタンパク質では、FcRn を介した肺上皮細胞におけるトランスサイトシスを利用し、経肺的に投与する試みが報告されている(39, 40)。FcRn はアルブミンの半減期制御にも関わっているが、Fc 融合タンパク質の場合と同様、有効成分となるタンパク質をアルブミン融合タンパク質(41)あるいはアルブミン結合性タンパク質(42)に改変することにより、血中半減期の延長を図っている例もある。

一方、FcRn を介したリサイクリングには、結合の pH 依存性が保たれていることが重要であるため、pH 非依存的に FcRn と結合する改変型抗体は FcRn の阻害薬として作用する。このような抗体は内因性抗体のクリアランスを亢進させるため、自己免疫疾患治療に有用である可能性が考えられており(43)、今後、FcRn 阻害薬が自己免疫疾患治療薬として開発される可能性もある(44)。ヒト血漿由来 IgG を大量に静注する免疫グロブリン製剤の有効性メカニズムにも FcRn の飽和による内因性自己抗体のクリアランス亢進が関わっている可能性が考えられている(45)。

おわりに

バイオ医薬品の開発には、生命科学の進歩による新たな知見の蓄積と、医薬品製造技術の進展が関わっており、抗体医薬品は両者が相乗的に作用して発展を続ける好例と言える。ペプチドおよびタンパク質医薬品では、体内動態の改善が開発の鍵となっている例が少なくないが、IgG の Fc 領域やアルブミンは、種々の生理活性タンパク質に血中安定性を付与し得るドメインとして今後も活用されると予想される。FcRn を含め、タンパク質医薬品の体内動態制御に関わる分子的基盤の解明が進み、新薬の分子設計や関連する医薬品の有効性・安全性確保に寄与することが期待される。

謝辞：本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、ならびに厚生労働科学研究費補助金により行われたものである。

文 献

- 1) Isenberg DA. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:229.
- 2) 川西 徹. *日薬理誌*. 2008;131:102-108.
- 3) Köhler G, et al. *Nature*. 1975;256:495-497.
- 4) 野口浩. *医学のあゆみ*. 1993;167:457-462.
- 5) Morell A, et al. *J Clin Invest*. 1970;49:673-680.
- 6) Lobo ED, et al. *J Pharm Sci*. 2004;93:2645-2668.
- 7) Morrison SL, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:6851-6855.
- 8) Jones PT, et al. *Nature*. 1986;321:522-525.
- 9) Brambell FW, et al. *Nature*. 1964;203:1352-1354.
- 10) Junghans RP. *Immunol Res*. 1997;16:29-57.
- 11) Simister NE, et al. *Nature*. 1989;337:184-187.
- 12) Ghetie V, et al. *Eur J Immunol*. 1996;26:690-696.
- 13) Israel EJ, et al. *Immunology*. 1996;89:573-578.
- 14) Junghans RP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5512-5516.
- 15) Roopenian DC, et al. *J Immunol*. 2003;170:3528-3533.
- 16) Claypool SM, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:28038-28050.
- 17) Praetor A, et al. *J Cell Sci*. 2002;115:2389-2397.
- 18) Ward ES, et al. *Adv Immunol*. 2009;103:77-115.
- 19) Andersen JT, et al. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24:318-332.
- 20) Andersen JT, et al. *J Biol Chem*. 2010;285:4826-4836.
- 21) Roopenian DC, et al. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:715-725.
- 22) Anderson CL, et al. *Trends Immunol*. 2006;27:343-348.
- 23) Dickinson BL, et al. *Mol Biol Cell*. 2008;19:414-423.
- 24) Lencer WI, et al. *Trends Cell Biol*. 2005;15:5-9.
- 25) Akilesh S, et al. *J Immunol*. 2007;179:4580-588.
- 26) Montoyo HP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:2788-2793.
- 27) Goebel NA, et al. *Mol Biol Cell*. 2008;19:5490-5505.
- 28) McCarthy KM, et al. *J Cell Sci*. 2000;113(Pt 7):1277-1285.
- 29) Yoshida M, et al. *J Clin Invest*. 2006;116:2142-2151.
- 30) Akilesh S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:967-972.
- 31) Vidarsson G, et al. *Blood*. 2006;108:3573-3579.
- 32) Qiao SW, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:9337-9342.
- 33) Suzuki T, et al. *J Immunol*. 2010;184:1968-1976.
- 34) Tabrizi M, et al. *Aaps J*. 2009;12:33-43.
- 35) Pentz N, et al. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009;86:328-344.
- 36) Deane R, et al. *J Neurosci*. 2005;25:11495-11503.
- 37) Zalevsky J, et al. *Nat Biotechnol*. 2010;28:157-159.
- 38) Jazayeri JA, et al. *BioDrugs*. 2008;22:11-26.
- 39) Bitonti AJ, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9763-9768.
- 40) Low SC, et al. *Hum Reprod*. 2005;20:1805-1813.
- 41) Subramanian GM, et al. *Nat Biotechnol*. 2007;25:1411-1419.
- 42) Dennis MS, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:35035-35043.
- 43) Vaccaro C, et al. *Nat Biotechnol*. 2005;23:1283-1288.
- 44) Sesarman A, et al. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:2533-2550.
- 45) Akilesh S, et al. *J Clin Invest*. 2004;113:1328-1333.

バイオ医薬品開発における潮流と規制

Recent Progress in Biomedical Research & Development
(Trends and Regulations)

第6回
最終回

バイオ治験薬の品質・安全性確保

Approaches for ensuring quality and safety of
biological investigational medicinal products

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

石井明子, 川崎ナナ

AKIKO ISHII, NANA KAWASAKI

National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals

はじめに

新薬開発が容易ではない状況を打破するべく提示されたFDAのクリティカルパスから6年、医薬品開発推進の動きは国内外で続いている。わが国でも、治験環境の充実を目的として、全国治験活性化3カ年計画、新たな治験活性化5カ年計画に続き、平成23年度には早期臨床試験の強化やグローバル臨床研究拠点の整備を含む「ポスト治験活性化5カ年計画」が公表される予定である¹⁾。また、有効な新薬を海外に遅れることなく審査承認できるよう、医薬品の開発時期を海外と同調させるための有力な手段である国際共同治験の推進を目的として、「国際共同治験に関する基本的考え方」が平成19年に通知として発出されている。

新薬の治験ではヒトに対する有効性・安全性が未知の薬物が投与されるため、実施に際して最も配慮すべき点は被験者の安全確保である。また、新薬開発を適切に進めていくためには、治験環境の整備に加えて、治験薬の品質保証に基づく治験データの信頼性確保が欠かせない。バイオ医薬品には、作用の種特異性が高く非臨床試験による安全性評価が難しいケースが少なくないこと、目的物質の構造に不均一性が存在し製造方法が品質に大きく影響することなど、化学合成医薬品とは異なる特徴がある。有用なバイオ医薬品を迅速に開発していくためには、

これらの特徴を考慮しつつ、安全かつ効率的に治験を進める努力が必要である。本稿では、治験に用いられる被験薬としてのバイオ医薬品(組換えタンパク質医薬品)候補薬物をバイオ治験薬と称し、知識管理、科学的理解、ならびにリスクマネジメントをベースとする近年の医薬品の製法開発・品質管理の潮流を踏まえて、バイオ治験薬の品質・安全性確保について考察する。なお、本稿の内容は公的に入手可能な資料と国立医薬品食品衛生研究所における業務を通じて学んだことから考察した筆者の私見である。

1. バイオ治験薬の品質・安全性確保の考え方

医薬品とは、治験を通じて有効性・安全性が確認され、確認された有効性・安全性を裏付ける物質特性として一定の品質を備えたものである。これに対して治験薬は、ヒトに対する有効性・安全性が未知であり、有効性・安全性を裏付ける品質特性やそれを作り出す製造工程も確定していない。有効性・安全性が未検証である治験薬の投与には本質的にリスクが潜在するため、治験薬の有効性・安全性確保のためには、それまでに得られた実証データや既存の知識をもとに当該治験薬の特徴を十分に理解してリスク要因を明らかにし、リスクを低減する方策を考えることが重要である。その上で、残存するリスク

表1 治験薬GMP(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)

第1 総則
1. 目的
1.1 治験薬の品質を保証することで、不良な治験薬から被験者を保護すること
1.2 治験薬のロット内及びロット間の均質性を保証することで、臨床試験の信頼性を確保すること
1.3 治験薬が開発候補として絞り込まれた段階においては、当該治験薬と市販後製品の一貫性を、治験薬の製造方法及び試験方法が確立した段階においては、当該治験薬と市販後製品の同等性を保証することで、市販後製品の有効性及び安全性並びに臨床試験の適切性を確保すること

表2 治験薬GMPに掲げられた目的に対応して、バイオ治験薬の品質・安全性確保に求められる要件

1.1 治験薬の特性を十分に理解して想定されるリスク要因を明らかにして、リスクの低減化を図ると共に、適切な工程管理・品質試験を設定すること
1.2 頑健性の高い製造方法を構築し、治験薬ロットの品質試験により品質の一定性を確認すること (製造工程管理手法が確立されていない開発初期では、品質試験の重要性が高い)
1.3 製法変更時の同等性/同質性評価を適切に実施しながら開発を進めること

については、被験者への危害が生じないよう十分な対策を講じるべきである。

わが国には、バイオ治験薬の品質・安全性に特化したガイドラインはないが、治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP)(平成20年7月9日 薬食発第0709002号)が定められており、治験薬の品質管理に関して、医薬品開発をめぐる近年の動向を踏まえた規制当局の考え方を知らる上で、大変参考になる事項が書かれている。治験薬GMPの冒頭に掲げられている3つの「目的」(表1)は、WHO-GMP/ヒト用治験薬ガイドラインの一般原則を原型とし²⁾、治験薬の製造管理、品質管理を通じて目指すべき方向が明確に示されたものである。したがって、この「目的」を達成する方法を考えることが、ヒト初回投与試験から第Ⅲ相臨床試験を通じて、治験薬の品質・安全性確保に求められる要件を考える切り口の1つになると考えられる(表2)。

表3～5に治験および治験薬に関する規制環境整備の国際的動向を記載した。わが国の特徴は、治験届出制により治験が行われていること、治験薬の品質・安全性に特化したガイドラインが定められていないこと、ならびに、医薬品GMPとは独立して、早期探索的段階から第Ⅲ相まで治験の段階に応じた治験薬の品質保証を可能とする治験薬GMPが定められている点である。旧治験薬GMP(平成9年3月31日 薬発第480号)の改正により現

表3 治験および治験薬に関する規制環境整備の国際的動向

	日本	米国	EU
治験の実施許可	治験届出制	治験申請制	治験申請制(2004年より)
バイオ治験薬の品質安全性に関するガイドライン	無	有(表4参照)	有(表4参照)
治験薬のGMP ²⁾	治験薬GMPによる規制	医薬品GMPによる規制(21CFR 210&211) 治験薬のGMPに関するガイダンス(表5参照)	医薬品GMPによる規制(Directive 2003/94/EC) 治験薬のGMPに関する補遺(表5参照)

表4 欧米におけるバイオ治験薬の品質安全性に関するガイドライン

	[米国]
1995年	Guidance for Industry: Content and Format of Investigational New Drug Applications (INDs) for Phase 1 Studies of Drugs, Including Well-Characterized, Therapeutic, Biotechnology-derived Products 第1相臨床試験に用いられる治験薬の申請に関するガイダンス
2006年	Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies 探索的臨床試験に関するガイダンス(CMCに関する記載を含む)
	[EU]
2007年	Guideline on Strategies to Identify and Mitigate Risks for First-in-Human Clinical Trials with Investigational Medicinal Products EMEA/CHMP/SWP/28367/07 ヒト初回投与臨床試験におけるリスクの同定と低減に関するガイドライン
2008年	Guideline on Virus Safety Evaluation of Biotechnological Investigational Medicinal Products EMEA/CHMP/BWP/398498/2005 バイオ治験薬のウイルス安全性に関するガイドライン
2010年	Guideline on the Requirement for Quality Documentation concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials (Draft) EMA/CHMP/BWP/534898/2008 バイオ治験薬の品質関連の記載事項に関するガイドライン案

在の治験薬GMPが策定された際、目的1.3(表2)に対応して、ベリフィケーションやクオリフィケーションの概念が取り入れられたことによって、治験の進展に応じた合理的な管理が認められることとなった。

GMPでは、あらかじめ規定された手順に従って製造工程が管理・記録され、品質規格に定められた適否の判

表5 欧米における治験薬のGMPに関するガイドライン

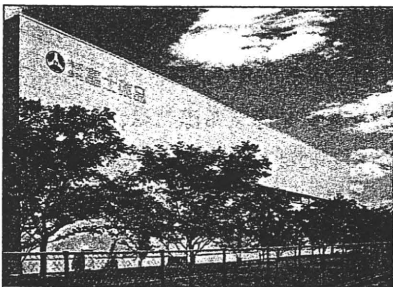
[米国] Guidance for industry : CGMP for phase 1 investigational drugs Guideline on the preparation of investigational new drug products (human and animal) 第II相, 第III相試験に用いられる治験薬は後者のガイドラインの適用を受ける
[EU] Good Manufacturing practices Annex 13 Manufacturing of investigational medicinal products

定基準を満たす製品が得られたことを確認・記録することをもって、品質が保証されたと判断される。しかし、どのような工程管理を行い品質試験を設定すれば製品の有効性・安全性を担保できるのか。これには画一的な答えはなく、製品の特性や開発段階に応じたケースバイケースの対応が必要である。一般に、第III相試験までには製造方法および品質試験をほぼ確定することが求められるが、製造工程や品質特性への理解が十分でない開発初期には、どこまで特性解析を行い、どのように品質管理を行うべきか、また非臨床試験系の妥当性をどのように評価し、臨床試験に入るべきであろうか。

治験薬GMPに掲げられた3つの目的を達成するためのアプローチを考えると、科学とリスクマネジメントに基づくライフサイクル全期間に適用可能な医薬品の品

質管理の戦略が述べられたICH Qトリオ(Q8, Q9, Q10)ガイドラインの考え方が参考になる。すなわち、治験薬の品質確保を1つのリスクマネジメントプロセスと考え、既存の知識と当該治験薬に関して得られている実験データをもとに治験薬の被験者への安全性に関するリスクアセスメントを行い、そのリスクを低減するための特性解析、品質試験の設定、製法開発、工程管理の設定をリスクコントロールと位置づける。治験薬の品質に関する情報を治験担当医師と共有することがリスクコミュニケーションであり、治験結果の次のステップへの反映がリスクレビューに相当すると考えることも可能ではないだろうか。

有効な品質リスクマネジメントのアプローチは、開発および製造中に潜在する品質問題を特定し、コントロールする予防的な手段を提供し、より高品質の医薬品を患者に提供することを可能とする。製品ライフサイクルの初期にあたる治験薬の品質管理は、リスクマネジメントを基本とし、目的とする製品品質プロファイル(QTPP: quality target product profile)の構築を目指した製造品質設計を行うことにより、治験の各段階で得られている知識レベルに応じた管理戦略の妥当性を説明することが可能と考えられる。知識管理と科学的理解に基



最新の製造設備で

開発から製造まで

注射剤のことなら富士薬品におまかせ下さい!!

Medical Innovator
一人ひとりの健康を守るために、
新たな未来に向けた挑戦を続けてまいります

注射剤(液剤・凍結乾燥製剤)
医薬品・治験薬

受託製造

- 小量スケールから実生産規模大量スケールまで対応可能
- 治験薬製造 EU-GMPに対応!
- 製剤設計から安定性試験受託

医薬品製造業・無菌医薬品区分



お問い合わせは…



株式会社 富士薬品
富山第二工場

〒939-2721 富山県富山市婦中町板倉750番地
TEL: 076-465-3242 FAX: 076-465-5450
E-mail: jyutaku-info@fujiyakuhin.co.jp

DM資料請求カードNo.79

PHARM TECH JAPAN ● Vol.26 No.11(2010) 71(2099)

づくリスクマネジメントの重要性を踏まえ、バイオ治験薬の安全性に関する既存の情報を概説した上で、ヒト初回投与試験実施に際して求められる要件、および、市販製剤の製法確立・品質確保に向けて治験段階で検討していくべき事項を以下に考察する。

2. バイオ治験薬の安全性に関する 概論

バイオ治験薬の安全性を考える上では、知識管理の1つとして、既承認バイオ医薬品あるいはバイオ治験薬に関して蓄積されてきた知見を整理し、リスク要因を考慮することが有用である。バイオ治験薬の安全性は、初回臨床試験で被験者全員が多臓器不全に陥った抗CD28アゴニスト抗体TGN1412³⁾の事故から得られた教訓なしに語ることはできないが、欧州医薬品庁(EMA)からは、TGN1412事故の原因検証とその後の議論を元に、初回臨床試験のためのリスク同定とリスク低減のためのガイドライン“Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products”が公表されており、バイオ治験薬の安全性を考える上で参考となる内容が書かれている。リスク要因として、作用機構、標的分子の性質、動物モデルの妥当性、の3点が重要であるとするこのガイドラインの記載を参考に、バイオ治験薬の安全性について、リスク要因として考慮すべき事項を以下に列挙する。各項目について、リスクが高いという知見がある場合、または、その内容が不明確な場合、有害作用が生じる可能性が懸念されるため、リスクを低減する対策が必要である。

(1) 作用機構および標的分子の性質

化学合成医薬品では、標的外分子への作用や毒性のある代謝物への変換等によるoff-target効果が原因となって有害作用が生じるケースも比較的多いが、バイオ医薬品ではそのような例は稀であり、有効成分の過剰な薬理作用、すなわちon-targetな作用が有害作用の原因となるケースが多い。したがって、治験薬の有効性の根拠となる作用機構と用量反応性を十分に理解することが重要である。TGN1412により生じたサイトカイン放出症候群は過剰な薬理作用が原因であったケースと言えるであろう。その他に、t-PAによる出血傾向やインスリンによる低血糖等がこれにあたる。有害作用の出現頻度や出

現までの投与期間を考えると治験では検出されない可能性があるが、免疫抑制作用を持つバイオ治験薬では、腫瘍形成や日和見感染の懸念がある。欧米で承認されていた抗CD11抗体efalizumabは、市販後にJCウイルスの再活性化により生じる進行性多巣性白質脳症を生じたことから、販売が中止された。

また、有効成分が複数の薬理作用を持つ場合、目的外の作用が生じ有害作用が生じる可能性がある。インターフェロンによる発熱等がその例である。細胞増殖因子としての作用を合わせ持つバイオ医薬品では、腫瘍形成のリスクが懸念される。

既承認のバイオ医薬品にはない新規な作用機構を持つバイオ治験薬では、非臨床試験結果からは予測が困難な有害作用が生じる可能性も否定できない。

有効成分の作用機構に関連して、標的分子の組織分布や機能等の性質もリスク要因として重要である。例えば、標的分子が標的組織外にも存在する場合、有害作用が生じることがある。抗EGFR抗体では、ざ瘡様皮疹や皮膚の乾燥等の皮膚症状が高頻度に生じることが知られているが、これは正常皮膚組織に存在するEGFRが標的となる結果とされる。CD28のように生理的なフィードバック機能を超えて標的分子を介した反応が進展する可能性がある場合は、注意が必要である。また、標的分子が複数の生理活性を持つ場合、目的外の作用が生じる可能性がある。抗TNF α 抗体による結核再燃(TNF α の肉芽形成阻害作用の抑制による)がその例である。

作用機構に関連したリスクを考える際には、関連する作用機構を持つ薬物がヒトに投与された過去の例や、薬理作用を介した重篤な毒性発現のリスクを模倣しうる動物モデル(トランスジェニック動物、ノックインあるいはノックアウト動物などを含む)での実験結果を参照することも有用である。

投与量設定により回避することが難しい有害作用については、有害作用の出現が懸念されることを踏まえた観察と迅速な処置のための備えが、リスクへの対応として必要と考えられる。

(2) 有効成分の構造

バイオ医薬品の多くは糖鎖を持つ糖タンパク質であるが、動物細胞で生産された糖タンパク質の糖鎖には、Gal(α 1-3)GalあるいはNeuGcといった非ヒト型糖鎖が付加される可能性がある。非ヒト型糖鎖が問題となった例は多くはないが、Gal(α 1-3)Galを含有する糖鎖をFab

領域に持つ抗体医薬品では、Gal(α 1-3)Galに対するIgE抗体を保有する患者で過敏症反応が生じた例が報告されている⁹⁾。治験薬が糖タンパク質である場合は、非ヒト型糖鎖の有無について調べ、安全性への影響を考慮しておく必要がある。

また、非臨床試験では評価ができないが、有効成分の構造によっては、ヒトに対する免疫原性が高い場合がある。血小板増加作用を持つトロンボポエチンの部分配列を持つPEG化MGDFの開発は、治験段階で中和抗体産生による重篤な血小板減少症が生じ、中止されている⁹⁾。生体内生理活性タンパク質と同じあるいは類似の構造を持つバイオ医薬品に対して中和抗体が産生されると、内在性の生理活性タンパク質の作用をも抑制する結果、重篤な有害作用を生じる可能性があるため注意が必要である。

(3) 不純物の種類と残存量, 免疫原性

バイオ医薬品の原薬あるいは製剤に残存する不純物としては、製造工程由来不純物および目的物質由来不純物があり、それらが治験薬の安全性に影響する可能性を考慮すべきである。製造工程由来不純物としては、宿主細胞由来タンパク質や宿主細胞由来DNA、エンドトキシン(大腸菌を宿主とする場合)、培地成分、精製用カラムからの浸出物等がある。宿主細胞由来タンパク質の残存量が高い場合に免疫原性が増し、抗体出現率が高くなる⁹⁾ことが知られている。成長ホルモン後続品の開発においては、宿主細胞由来タンパク質の残存量が多い製剤を用いた治験で抗体産生率が高く、製法改良後の製剤では抗体産生率が低下したことが報告されている⁹⁾。大腸菌を宿主とする場合、DNAの非メチル化CpG配列やエンドトキシンがアジュバントとして作用し、抗体産生を亢進させる可能性も考えられる。また、エリスロポエチン製剤では、ラバーストッパーからの浸出物が抗体産生を増強していた可能性が指摘されている⁹⁾。ヒトに対する免疫原性は非臨床試験では評価ができないため、臨床試験において評価すべき項目の1つである。抗体産生による有害作用が生じないかについても注意が必要である。免疫原性は投与経路によっても異なり、皮下投与では静脈内投与に比較して、抗体産生が起こる可能性が高い。目的物質由来不純物に関しては、擬似抗原として免疫原性増強に関わる可能性が考えられる。不純物に対する免疫応答がインフュージョン反応につながる可能性もある。また、目的物質が酵素前駆体である場合に、すでに活性化されている分子種は目的物質由来不純物であり、その含

量は限度値を定めて管理する必要がある。

(4) 混入汚染物質

動物あるいはヒト細胞を生産基材とするバイオ医薬品では、細胞基材に存在する可能性のある内在性ウイルスや非内在性ウイルス、あるいは培養中に混入・増殖する可能性が懸念される外来性ウイルス等の感染性物質が製品に混入し、感染症が伝播する可能性が否定できない。バイオ医薬品生産に用いられている多くの細胞で、レトロウイルスあるいはレトロウイルス様粒子が存在することが知られている。これまでにバイオ医薬品でウイルス感染事故が起こった例は報告されていない⁹⁾が、動物あるいはヒト細胞を生産基材とする場合には、感染性物質混入のリスクを考え、ウイルスの混入否定試験を実施するとともに、ウイルス除去不活化の対策を講じることが必須である。

(5) 細胞の使用経験

バイオ医薬品製造には、大腸菌、酵母の他、CHO細胞やSP2/0細胞、NS0細胞等の動物細胞がよく用いられている。生産性の向上やコストダウンを目的に新たな細胞基材の開発が進んでいるが、使用経験の少ない細胞を用いる場合、内在性ウイルスに関する安全性や翻訳後修飾の点で未知の要素があることを念頭におくべきである。

(6) 非臨床試験の妥当性

バイオ医薬品の作用は標的特異性が高いため、標的分子の構造がヒトと動物で異なる場合は動物を用いた有効性・安全性の評価が困難である。そのため、非臨床試験では適切な動物種の選択が重要であり、標的分子、標的分子の構造上のホモロジー、分布、情報伝達経路、薬理効果の性質を考慮して、利用可能な動物種を見極める必要がある。反応性がない、あるいは反応性がヒトと異なる動物を用いた試験では、ヒトで予想される薬理作用を検出することができない、薬物動態および薬力学の解析結果の誤った解釈につながる、毒性作用を見出すことができないといったリスクがある。治験薬の薬理作用および毒性作用の評価を通じて、利用可能な動物種/モデルの妥当性が疑わしいと考えられた場合は、非臨床結果から予測されない問題が生じるリスクが増すと考えるべきである。バイオ医薬品の非臨床試験については、ICH S6ガイドラインとその補遺が参考になる。

動物モデルの妥当性を示すためには、下記のような点

についてヒトとの比較を行うことが考えられる。

▶ 標的分子の発現, 分布, 一次構造

▶ 薬力学

・ 結合と占有率, 細胞のシグナル伝達を含めた機能発現の結果

・ 他の機能ドメインがある場合には, 動物におけるそのドメインの機能に関するデータ

▶ 代謝および排泄等の薬物動態

▶ ヒトと動物の組織を用いた交差反応試験(例: モノクローナル抗体)

(7) 使用される治験薬の適格性

医薬品開発の際には, 開発の進展に伴い, 製造方法の変更がしばしば行われる。バイオ治験薬の製法変更前後での品質の同等性/同質性については, ICH Q5Eガイドラインに従って評価を行う必要があるが, 非臨床試験からヒト初回投与試験に移行する際に, 製法変更が行われ, 製品の品質に違いが生じた場合, 特に安全性に関して, 臨床上, 悪影響がないことを十分に検証しなければならない。複雑な分子の場合は特に, 製法変更により, 恐らく特性解析では検出されないものの生物学的性質や臨床効果に影響し得るような微細な変化が有効成分に生じる可能性があるため, 注意が必要である。このような懸念が生じることを避けるため, 初期の臨床試験に用いられる治験薬は, 非臨床試験に用いられた治験薬と同じ製造方法のものにすべきである。治験薬の適格性を評価するために用いられる試験法の妥当性にも注意が必要である。

3. ヒト初回投与試験の実施に際して バイオ治験薬に求められる要件

バイオ治験薬の安全性に関して考慮すべき事項を踏まえ, これら既存の知識から考えられるリスクを低減するため, ヒト初回投与試験の実施に際して最低限必要と考えられる要件として, 次のようなものが考えられる。被験者の健康被害に直接つながるリスクを避けることが第一であり, 微生物の混入否定が求められる。また, アレルギー反応の原因となる可能性や, 有効成分の免疫原性を増強する可能性がある宿主細胞由来タンパク質等, 製造工程由来不純物の含量が一定レベル以下であることを確認する必要がある。製造工程に添加される原料で, 安全性への影響が懸念されるものがある場合は, その除去

状況の確認も必要である。さらに, 特性解析や非臨床試験結果等から設定された投与量が適切であり, 設定どおりの量(力価)が投与されることを担保する必要がある。

(1) 微生物の混入否定

① ウイルス安全性の確保

動物あるいはヒト細胞を生産宿主とする場合, ICH Q5Aガイドラインに準じたウイルス安全性確保のための対応が必須である。Q5Aではセル・バンクおよび未加工/未精製バルクにおけるウイルス試験, ならびに, 精製工程に関するウイルスクリアランス工程評価試験が求められているが, ヒト初回投与試験前においても必須と考えられるのは, マスター・セル・バンクおよび未加工/未精製バルクのウイルス試験であろう。マスター・セル・バンクに関しては, レトロウイルス試験(感染性試験, 電子顕微鏡観察, 逆転写酵素活性等), *in vitro*試験, *in vivo*試験, 抗体産生試験等が必要である。未加工/未精製バルクに関しては, *in vitro*スクリーニング試験やNAT法等の試験を用いる。

② マイコプラズマ否定試験

マスター・セル・バンクを対象としたマイコプラズマ否定試験が必要である。日本薬局方参考情報20(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験)が参考になる。

(2) 製造工程由来不純物の残存量評価

① 宿主細胞由来タンパク質

宿主細胞由来タンパク質(HCP: Host cell protein)は安全性に影響する可能性のある製造工程由来不純物であるため, 治験に使用される製剤ロットあるいはその工程中間体での含量を測定する。通例, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)が用いられるが, 使用する抗HCP抗体について, 残存する可能性のあるHCPの種類と検出可能なHCPの種類に関する検討によりその適格性を評価しておくことが望ましい。許容されるHCP残存量に関する明確な基準はないが, 既承認バイオ医薬品に含まれる残存量を参考に1日投与量あたりのHCP量の基準を考えることも可能と考えられる。酵母を宿主とする場合は, アレルギー反応が生じた例も知られており, 宿主細胞に応じた検討が必要と考えられる。

②宿主細胞由来DNA

宿主細胞由来DNAは、宿主細胞が大腸菌の場合は免疫応答を惹起し、安全性に影響する可能性も否定できない。その他の場合も精製度の目安として、治験に使用される製剤ロットあるいはその工程中間体での含量を測定する必要があると考えられる。サザンハイブリダイゼーションや定量的PCRが用いられるが、使用するプローブやプライマーの妥当性を検証しておくべきである。DNAの混入量に関しては、投与量あたり10ngを上限とするという考え方がWHOから示されている⁹⁾。

(3)投与量の適切性の評価

治験薬が目的とする生物活性を有することを確認し、生物学的性質の特性解析や非臨床試験結果をもとに算出された投与量が適切に投与されることを担保する必要がある。そのため、信頼性のある力価測定法を確立して、治験に使用される製剤ロットに設定どおりの力価の治験薬が含まれていることを示す必要がある。力価測定法は、有効性と関連のある作用機構を反映したものであることが望ましい。力価は標準物質との効力比をもとに算出されるため、標準物質の設定も必要である。投与量が重量表示される場合でも、力価は測定し、比活性を確認する。

<ヒト初回投与量の設定>

初回投与量の設定はヒト初回投与試験の被験者の安全確保において、重要な要素である。用量設定には利用可能なすべての情報を考慮し、ケースバイケースの原則に基づいて行わなければならない。一般には、最も感受性の高い適切な動物種を用いて実施された非臨床安全性試験により求められた最大無作用量No Observed Adverse Effect Level(NOAEL)を、allometric factorまたは薬物動態学的解析に基づいて補正したものが、最も重要な情報となる。適切な投与量は、分子の特性や臨床試験のデザインに応じて、適切なsafety factorを用いてさらに補正することにより算出される。

2. バイオ治験薬の安全性に関する概論(1)~(7)についてリスク要因があると考えられた治験薬では、用量設定のためにその他の方法を考慮すべきであり、MABEL(Minimal Anticipated Biological Effect Level: 推定最小薬理作用量)を用いる方法が推奨される。MABELは、ヒトで最小限度の生物学的影響が得られると予測される用量である。MABELの算出には、以下のような薬物動態/薬力学(PK/PD)データから利用可能なすべての*in vitro*および*in vivo*の情報を利用することができる。

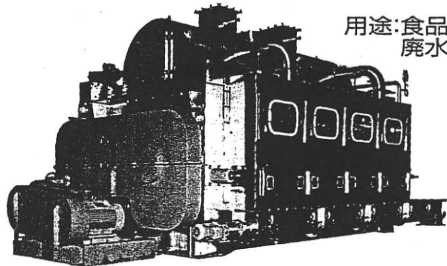
KATSURAGI

乾燥 冷却 濃縮
蒸発 真空 廃水処理

ドラムドライヤ
(常圧式)

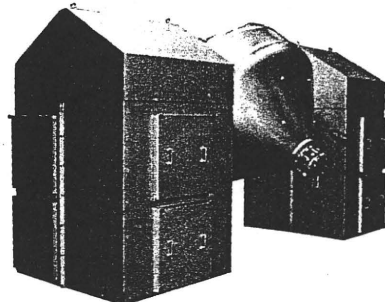
液状、スラリー状の原料を
1パスで濃縮乾燥

用途:食品、化学品、
廃水処理



ダブルコーン
ドライヤ

高真空、低温乾燥、GMP対応



▶テスト機を完備しております。お気軽にご相談下さい。◀

カツラギ工業株式会社
ホームページ <http://www.katsuragi.co.jp/>

本社 〒557-0063 大阪市西成区南津守5丁目4番6号
TEL (06) 6659-2432 (代) FAX (06) 6658-3789

DM資料請求カードNo.60

- i) ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における *in vitro*での標的分子との結合および占有率
- ii) ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における *in vitro*での用量反応曲線と、適切な動物種における *in vivo*での用量反応
- iii) 適切な動物種への薬理量の投与

ヒトで有害反応が生じる可能性をさらに限定するため、MABELからのヒト初回投与量算出には、safety factorが適用される場合もある。その際には、有効成分の新規性、生物活性、作用機構、種特異性の程度、用量反応曲線の形、MABEL算出の不確かさなどのリスク要因を考慮する。用いたsafety factorの妥当性を示す必要がある。使用した方法(例：NOAEL, MABEL)により算出されたヒト初回投与量が異なる場合は、正当性が示されない限り、最も低い用量を用いることが妥当と考えられる。

(4) 注射剤の製剤試験の実施

治験に用いられる製剤ロットに関して、一般的に注射剤に求められる試験が必要である。いずれも日本薬局方一般試験法を用いることができる。エンドトキシン試験(日本薬局方一般試験法<4.01>)、無菌試験法(日本薬局方一般試験法<4.06>)が必須である他、局方注射剤に求められている注射剤の不溶性異物検査(日本薬局方一般試験法<6.06>)、注射剤の不溶性微粒子試験(日本薬局方一般試験法<6.07>)に適合することは基本的な要件である。

4. 臨床試験開始から承認申請へ： 開発の進展に応じた治験薬の製造 と品質評価

治験薬の製造と品質評価には、開発段階に応じた対応が必要である。開発初期では製造工程に関する検討や理解が十分でなく、製造工程管理による品質の一定性確保が十分でないと考えられることから、治験薬の品質の確認のため、また治験薬の品質の一貫性を示すために、治験に使用されるロットの品質評価が特に重要である(図1)。製造されたロット数が限られている場合などでは品質試験(規格及び試験方法)を設定することができず、特性解析結果を確認しておくに留まる可能性もあるが、特性解析は、製品の特性に関する理解を深めるためのみならず、製法変更が行われた際に、変更前後での同等性/同質性

評価を適切に実施するためにも必要であるので、構造および物理的・化学的性質の解析も可能な限り開発初期から実施するべきである。一般に、第Ⅲ相試験の開始前までには承認時の製造方法と品質試験が定められている必要がある。

治験薬を評価する段階は、市販製剤の製造工程管理、品質管理を検討する段階でもある。重要品質特性(CQA: critical quality attribute)の確定を進め、工程管理に役立てることが有用であろう。原薬および製剤のCQAは、目標製品品質プロファイルやこれまでに得られた知識に基づいて得られ、製品および工程開発の指針として利用される。バイオ医薬品原薬のCQAに関する考え方を図2に示した。想定されるCQAは、バイオ医薬品の品質特性に関する従来の知識から考えることができるが、有効性・安全性に関連する生物活性、製造工程の影響を受けやすい構造および物理的・化学的性質、生物活性に影響する構造および物理的・化学的性質が、製品ごとに明らかにすべきCQAであると考えられる。

(1) 特性解析

① 構造解析・構造確認

目的とする構造のタンパク質が得られていることを確認するため、アミノ酸配列を解析する。LC/MSを用いたペプチドマッピングが有用である。ペプチドマッピングは確認試験にも応用が可能であるため、開発初期であっても実施することが望ましい。分子内にCys残基を含む場合は、スルフヒドリル基およびジスルフィド結合を解析する。大腸菌のインクルージョンボディに目的タンパク質を発現させ、還元、再酸化のステップが含まれる製品では特に、目的とする位置にジスルフィド結合が存在することを確認する必要がある。目的物質が糖タンパク質である場合は、糖組成・糖鎖構造を明らかにする。糖鎖が有効成分の体内動態や生物活性に影響すると考えられる場合は、開発初期からロットごとのデータを蓄積し、製法と糖鎖構造、動態あるいは活性との関連を明らかにしていくことが管理戦略構築のためにも有用である。

② 物理的・化学的性質

分子量・分子サイズ、アイソフォームパターン、電気泳動パターン、液体クロマトグラフィーパターン、および、分光学的性質(紫外可視吸収スペクトル、円偏光二色性、核磁気共鳴)等を必要に応じて解析する。製造工程による変動が大きい品質特性や、生物活性との関連の

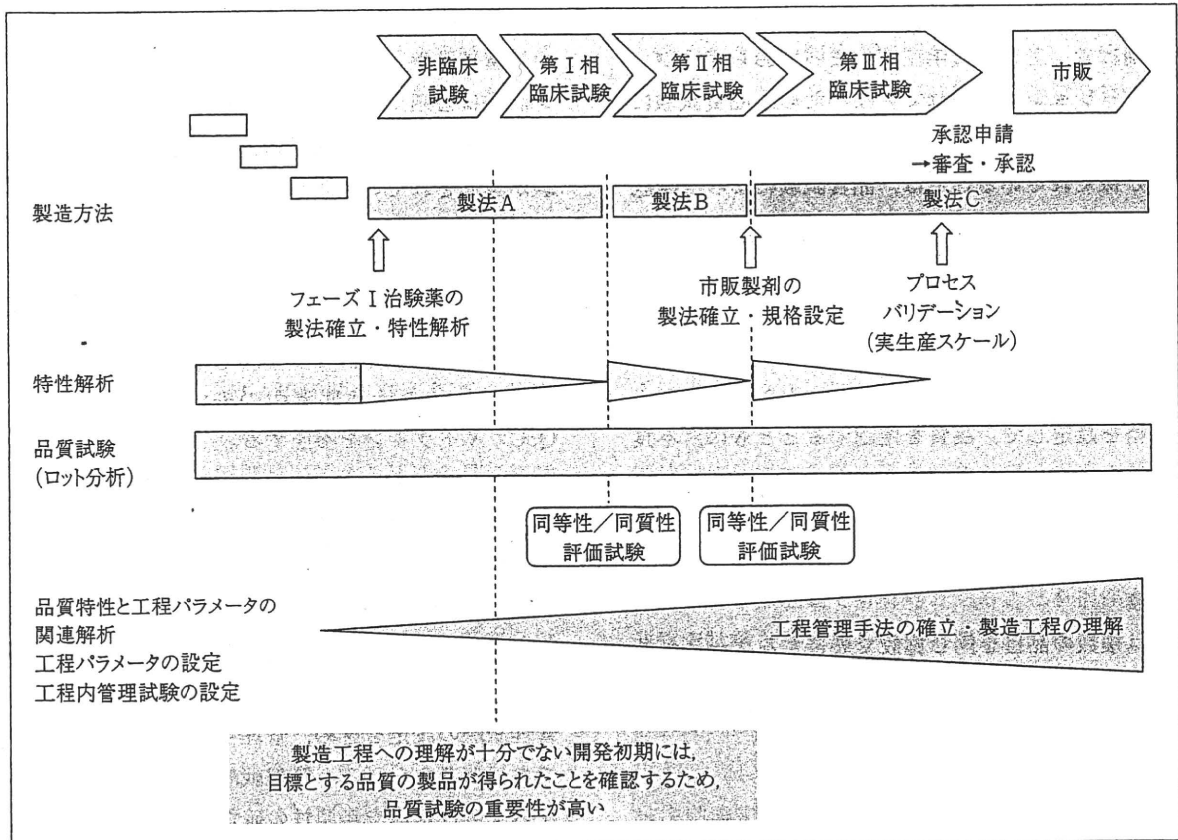


図1 バイオ治験薬の製造方法および品質試験法の開発

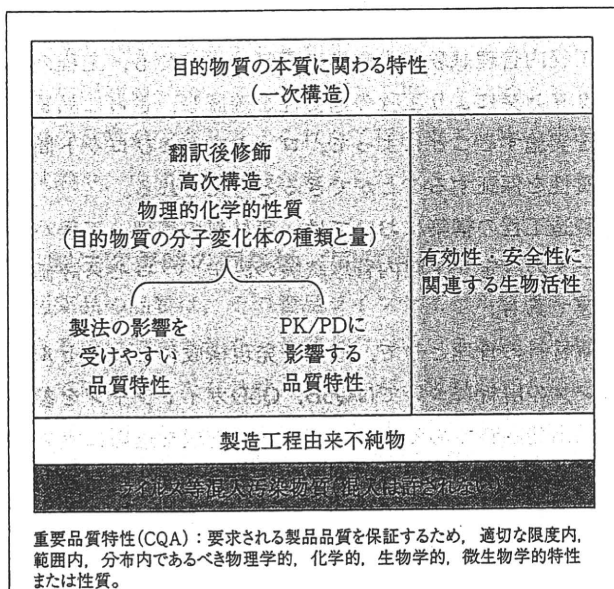


図2 バイオ医薬品原薬の重要品質特性

ある品質特性は、CQAであると考えられる。

③生物学的性質

生物活性の定性的、定量的評価は、作用機構の解析や臨床投与量の検討のために重要である。定性的評価とし

ては、特異的な標的および標的外分子に対して生じる医薬品の作用の性質(影響の及ぶ範囲、増幅性、持続性、可逆性)、さらにその下流の反応機構が含まれる。

定量的評価としては、用量反応曲線のタイプと傾き、すなわち、考えられる濃度の範囲で直線性が成り立つか、あるいは、非直線性か(最大効果でプラトーとなる、濃度変化以上に反応の変化が大きいのU型、ベル型)、といった特徴が重要である。

④不純物

製造工程由来不純物として、宿主細胞由来タンパク質、DNA、培地成分、クロマトグラフィー用樹脂からの浸出物などの残存量を評価する。宿主細胞由来タンパク質は、製品の免疫原性に影響するため、十分に低減化されていることを評価する必要がある。

目的物質由来不純物としては、切断体、脱アミド体、異性体、ジスルフィド結合ミスマッチ体、酸化体、凝集体等がある。脱アミド体は活性に影響がない場合もあり、その場合は目的物質関連物質である。

(2) 品質試験(規格及び試験方法)

開発初期には、工程管理手法が定まっておらず、プロセスバリデーションも行われていないため、品質試験による品質の確認が重要である。ロット内およびロット間の均質性が保たれていることは、品質試験によって確認することができる。承認申請時の規格及び試験方法は、ロット分析結果、安定性試験結果、非臨床試験および臨床試験のデータ等を考慮して設定する必要があるが、治験段階ではこれらのデータがそろっていない。したがって、その時点までに得られているデータから妥当と考えられる規格を設定して、品質を確認するとともに、不良ロットの検出に努めるべきである。

①原薬の品質試験

・確認試験

治験薬は複数の品目を同じ施設で製造するケースが多いと考えられるため、確認試験の実施が推奨される。ペプチドマッピングが望ましい。

・純度試験

安全性に影響すると考えられる不純物(宿主細胞由来タンパク質等)については、開発初期であっても規格を設定する必要がある。製造工程の中間体を試料とするほうが妥当なケースもあり、その場合は工程内管理試験として設定する。凝集体は抗体産生を誘導する可能性があるため、限度値を定めて含量を管理すべきである。

・糖鎖試験

特性解析において、糖鎖構造が体内動態や生物活性に影響するという知見が得られている場合は特に、糖鎖試験を設定する必要がある。

・力価試験

定められた量の治験薬を確実に投与するためには、製品の力価を測定する方法の妥当性が問われる。測定系が適格でない場合や、測定系の信頼性が十分検証されていない場合は、非臨床試験で用いられた用量が正確でなく、安全な用量に関して誤った解釈がなされてしまう可能性がある。また、力価の測定には、開発の早い段階から標準物質を整備することが重要である。

②製剤の品質試験

・無菌性試験

バイオ治験薬はほとんどが注射剤であるので、開発初期においても無菌性試験は必須である。

・エンドトキシン試験

無菌性試験と同様、開発初期においてもエンドトキシン試験は必須である。大腸菌を宿主とする製品で、工程内管理試験あるいは原薬の試験としてエンドトキシン試験が実施されている場合でも、製剤中のエンドトキシン残存量の測定が必要である。

③安定性試験

規格及び試験方法として設定された試験法を用い、実保存条件での治験期間中の安定性を担保する。ICH Q5Cガイドラインを参照する。

(3) 製法開発、工程管理手法の構築

医薬品の品質は、製品になってから検証するものではなく、製品設計によって製品に組み込まれていることが望ましい。品質特性(特にCQA)と製造工程の関連を解析して工程の理解を深め、重要工程パラメータや工程内管理試験の設定を含め、管理手法を確立することが有用であると考えられる。管理戦略の構築においては、ウイルス安全性確保や無菌性の確保といった被験者の健康被害防止に直接つながる事項を最優先としつつ、宿主細胞由来タンパク質等の不純物の低減を図ることが合理的である。

工程内管理試験が未整備の段階であっても、工程のモニタリングにより工程の適切性を確認し、さらに品質試験を実施することによって、ロット内およびロット間の均質性を保証することができると考えられる。

製造工程の構築においては、原材料の管理、工程パラメータの設定、工程内管理試験の設定、プロセス評価が必要である。

原材料の管理として、遺伝子発現構成体およびセル・バンクの解析についてはQ5B、Q5Dガイドラインを参照し、出発原料であるセル・バンクの管理を適切に実施する。培養に用いる細胞の世代数については、開発初期には規定されていなくても差し支えないであろう。動物細胞あるいはヒト細胞を細胞基材とする場合は、治験開始前にセル・バンクのウイルス試験が必須である。精製工程に関するウイルスクリアランス工程評価試験も実施すべきであるが、セル・バンクのウイルス試験のほうが重要度は高いと考えられる。ウイルス安全性評価はQ5Aガイドラインに従って実施する。ヒトあるいは動物細胞を用いて製造されるバイオ治験薬の安全性確保において、ウイルス安全性評価が必須である一方で、製造工程の検

討を伴う初期の治験段階では、実施施設に制約があり実施に困難を伴うウイルスクリアランス工程評価試験を繰り返すことは必ずしも合理的でなく、安全確保と効率を見据えた適切な判断が必要である。バイオ治験薬のウイルス安全性について、2008年にEMAからガイドライン“Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products”が公表されている。このガイドラインでは、治験薬の特性を踏まえたウイルス安全性確保に関する考え方が述べられており、製造用細胞の特性と履歴、製造用細胞の特性解析の程度、製造工程におけるヒトや動物由来原料の使用状況、ウイルス迷入の可能性、製造用細胞に関する製造企業の経験、ウイルス除去工程に関する製造企業の経験、文献情報等を考慮して、治験の段階に応じた合理的な試験実施が可能であることが書かれている。

また、わが国では、生物由来原料基準により医薬品に使用される原料または材料に求められる要件が定められている。感染性物質混入のリスク低減のため、生物由来原料基準への適合性は事前に確認しておく必要がある。

工程パラメータの設定はCQAへの影響を中心に検討を行い、CQAに影響する工程パラメータを同定し、適切な範囲を検討する。開発初期では特に、立証された許容範囲として、各パラメータの許容範囲を独立して検討することでよいと考えられる。

工程内管理試験としては、原薬を用いた試験より工程内での試験が妥当と考えられた工程由来不純物の残存量の試験や、中間体の試験が考えられる。

(4) 製法変更時の同等性／同質性確保

医薬品の品質は、その製品ライフサイクルを通して維持あるいは改善されなければならない。これは、治験によって確認された有効性・安全性が市販製剤でも継続して担保されるために必須の要件である。しかし、治験段階では、開発の進展に伴い、スケールアップを含め種々の製法変更が実施されるため、品質に影響が生じる可能性がある。より高発現の細胞株を製造に用いるため、セル・バンクの変更が行われることもしばしばである。そのため、有効性・安全性に悪影響がないことを見極めながら、製法の改良を進めていく必要がある。

治験薬GMPでは、その目的1.3に関連して、「一貫性(consistency)」とは治験薬と市販後製品の共通点ならびに相違点およびその因果関係が明確にされていることであり、「同等性(equivalency)」とは治験薬と市販後製

品が品質、安全性および有効性について科学的に有意差が認められず、同等と判断しうること、と定義されている。バイオ医薬品では、目的物質の品質特性を高次構造や不均一性を含めて完全に解析することが困難であり、製法変更前後で品質が完全に同一であるとは判断できないため、同等性(equivalency)ではなく、ICH Q5Eガイドラインに従い、同等性／同質性(comparability)を評価する。

製造方法や試験方法を変更した場合は、その変更に伴う一連の文書を適切に保管してトレーサビリティを保つ必要がある。また、ロットごとに、変更の際の比較評価試験に使用する量を勘案した上で、適切な量を参考品として保管しておく。

先に述べたとおり、非臨床安全性試験の結果が臨床試験に用いる治験薬でも有効であることを担保するために、非臨床試験と初回あるいは初期臨床試験は同じ製法のロットを用いることが望ましい。

5. 治験をめぐる今後の展望と バイオ治験薬の品質・安全性確保

治験に関する今後の動向として、探索的臨床試験の増加や、国際共同治験の増加が想定される。探索的臨床試験は開発候補薬物の絞り込みにも有用であると期待されており、平成22年に発出されたICH M3ガイドラインR2「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」において早期探索臨床試験の項が設けられ、わが国においても「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス(薬食審査発第0603001号 平成20年6月3日)」が発出される等、関連したガイドラインの整備も進んでいる。

近年のバイオ医薬品の開発においては、天然型タンパク質の一部の構造改変、複数のタンパク質の機能ドメインの融合、化成品との共有結合等により、非天然型の構造を持つ製品を開発するケースが増加している。このような場合に、目的に適う優れた特性を示す候補品の見極めに、探索的臨床試験が有用な可能性も考えられる。早期探索的臨床試験では、その後の治験薬との一貫性は重要視されないと考えられるが、リスク要因を考慮し初回投与量の適切な算出に資する体内動態に関する情報の取得、作用機構の解明と力価測定法の確立が重要であると考えられる。

一方、国際共同治験は、ドラッグラグが社会的に問題

視されていること、現状では海外メーカーが先導的に開発を進めているバイオ医薬品が多いことから、今後増加することが予想される。これまでにバイオ医薬品で国際共同治験が実施された例として、トラスツマブの乳がんに対する術後補助化学療法との併用追加の例がある⁹⁾。

国際共同治験を計画する場合の基本的な留意事項は、「国際共同治験に関する基本的考え方」に述べられているように、

- ・ 民族的要因が治験薬の有効性及び安全性に及ぼす影響
- ・ 国際共同治験のデザイン
- ・ 主要評価項目に関する参加地域間差
- ・ 有害事象の収集方法及び評価方法

である。

化学合成医薬品に関しては、安全性に影響する民族的要因として、薬物代謝酵素の活性低下・消失を伴う遺伝子多型の出現頻度が日本人と他人種で異なる例が報告されている¹⁰⁾。バイオ医薬品に関しても、有効性及び安全性に関わる因子の遺伝子多型などの人種あるいは民族的要因に関する検討を進め、わが国におけるバイオ医薬品開発のための治験を安全に実施するために考慮すべき点について明らかにしていくことも必要であると考えられる。

おわりに

現在、世界の医薬品市場におけるバイオ医薬品の割合は2割程度であるが、その市場成長率は医薬品市場全体の2倍であり、年率2桁の伸びを示している¹¹⁾。バイオ医薬品は、先端技術応用医薬品として生命科学の研究成果を社会に還元し、国民の健康・安心に貢献する重要な役割を担っている。わが国では治験の空洞化が言われて久しいが、治験環境の充実に加えて、治験薬の品質・安全性確保の合理的な方策確立により治験が安全かつ効率的に実施され、有用なバイオ医薬品が迅速に創出されることが期待される。本稿が、バイオ治験薬の品質・安全性確保に関する議論の端緒となれば幸いである。

参考文献

- 1) 「新成長戦略」について、平成22年6月18日、閣議決定 [cited; Available from: <http://www.kantei.go.jp/jp/sinseichou/sinseiryaku/sinseichou01.pdf>]
- 2) 古田土真一：第2章 治験薬のGMPの医薬品GMPとの相違および三極の相違、治験薬GMPハンドブック、じほう(2009)
- 3) 山口照英, 石井明子：次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について—TGN1412事故が医薬品開発に与えたインパクト、谷本学校「毒性質問箱」, 10, 1-33(2007)
- 4) Chung, C. H., Mirakhor, B., Chan, E., Le, Q. T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B. A., Satinover, S. M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R. J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D. J., Platts-Mills, T. A.: Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. *N Engl J Med.* 358: 1109-1117(2008)
- 5) Li, J., Yang, C., Xia, Y., Bertino, A., Glaspy, J., Roberts, M., Kuter, D. J.: Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood.* 98: 3241-3248(2001)
- 6) EMA. Omnitrope; Scientific discussion. 2006 [cited; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000607/WC500043692.pdf]
- 7) Boven, K., Stryker, S., Knight, J., Thomas, A., van Regenmortel, M., Kemeny, D. M., Power, D., Rossert, J., Casadevall, N.: The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int.* 67: 2346-2353(2005)
- 8) Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J.: WHO Study Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007. *Biologicals.* 36: 203-211(2008)
- 9) 荒戸照世：第12章 バイオ医薬品(タンパク質性医薬品)の臨床試験における留意点、先端バイオ医薬品の評価技術、シーエムシー(2010)
- 10) Saito, Y., Maekawa, K., Ozawa, S., Sawada, J.: Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in east asians and their comparison with other ethnic populations. *Curr Pharmacogenomics.* 5: 49-78(2007)
- 11) 八木 崇：バイオ医薬品開発における潮流と規制 第1回 バイオ医薬品を取り巻く環境、PHARM TECH JAPAN, 26(4): 37-44(2010)

Spheroid Formation and Expression of Liver-Specific Functions of Human Hepatocellular Carcinoma-Derived FLC-4 Cells Cultured in Lactose–Silk Fibroin Conjugate Sponges

Yohko Gotoh,^{*,†} Yasuyuki Ishizuka,[‡] Tomokazu Matsuura,[§] and Shingo Niimi[⊥]

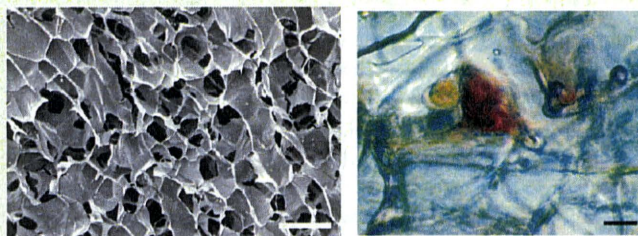
[†]Silk-Materials Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

[‡]Applied Cell Biotechnologies, Inc., 1-1-48 Suehirocho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

[§]Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

[⊥]Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

ABSTRACT: This study presents a hepatic tissue engineering application of three-dimensional (3D) porous sponges composed of lactose–silk fibroin (SF) conjugates (Lac–CY–SF) bearing β -galactose residues, hepatocyte-specific ligands. Lac–CY–SF sponges were prepared by freeze-drying, followed by immersion in a series of methanol aqueous solutions. Lac–CY–SF sponges showed heterogeneous pore structure with round pores about 100 μm in diameter and elongated pores 250–450 μm in length and 100–150 μm in breadth. To employ a 3D Lac–CY–SF culture system, human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells were seeded in Lac–CY–SF sponges and cultured up to 3 weeks. FLC-4 cell culture in collagen and SF sponges was also performed for comparison with the cell response to Lac–CY–SF sponges. Within 5 days of culture, FLC-4 cells cultured in Lac–CY–SF sponges, as well as the cells cultured in collagen sponges, formed multicellular spheroids with diameters from 30 to 100 μm more efficiently than did the cells cultured in SF sponges. After 3 weeks of culture, WST-1 viability assay revealed that shrinkage suppression of Lac–CY–SF sponges enabled the maintenance of viable FLC-4 cells for a long time, while the shrinkage and disintegration of collagen sponges prevented the maintenance of the cells. FLC-4 cells cultured in Lac–CY–SF sponges exhibited greater elevation of albumin secretion and sustained a higher albumin level compared with the cells cultured in collagen and SF sponges during the 3 week cultivation period. FLC-4 cells cultured in Lac–CY–SF sponges for 3 weeks expressed genes related to liver-specific functions such as transferrin and HNF-4 α . On the other hand, the cells cultured in collagen and SF sponges for 3 weeks did not express these genes. These results indicated the very promising properties of Lac–CY–SF sponges as a scaffold for long-term culture of functional FLC-4 cells to study drug toxicity and hepatocyte metabolism in humans and develop a bioartificial liver model.



INTRODUCTION

Silk fibroin (SF) is a natural fibrous protein created by the *Bombyx mori* silkworm. SF fibers have been used as a textile material for thousands of years and as a surgical suture thread for several decades. In recent years, it has been found that an aqueous SF solution prepared by dissolving SF fibers in highly concentrated salt solutions can be easily reformed into films, fibers, gels, and sponges.^{1–3} The utility of the regenerated SF has been expanded to biomaterials for cell culture and tissue engineering due to its versatile processability, mechanical properties, and biocompatibility.^{1–3} Previous studies focused on two-dimensional (2D) SF films as a scaffold for cell culture.^{1,2} Recently, porous SF sponges have been exploited as three-dimensional (3D) scaffolds for bone and cartilage regeneration using osteoblasts⁴ and chondrocytes,⁵ respectively. Kaplan et al. have reported novel applications in stem-cell-based tissue engineering using 3D porous SF sponges and

human mesenchymal stem cells derived from bone marrow^{3,6–8} or adipose tissue.^{8,9} Nonwoven microfibrillar SF nets have also been developed by Unger et al. as 3D scaffolds for supporting endothelial cells.^{10,11} Such 3D scaffolds with highly porous structure are designed by mimicking the structure and morphological features of native extracellular matrix (ECM), which provides mechanical support and regulates cell adhesion, proliferation, and differentiation.^{12,13} Artificial 3D scaffolds can principally replace physical functions of the native ECM, for example, organizing cells into a 3D-architecture, providing mechanical integrity to the new tissue, and providing a space for the diffusion of nutrients and metabolites to and from the cells.^{12,13}

Received: December 10, 2010

Revised: February 15, 2011

It is well established that scaffold topography controls hepatocyte shape which dictates hepatocellular function.^{14–17} Functions of monolayer hepatocytes in 2D culture rapidly decrease within a few days.¹⁷ The function of hepatocytes can be improved by their culture in 3D systems, such as packed-bed bioreactors,^{17,18} porous polymer foams,^{16,17,19} and sponges,²⁰ since 3D culture conditions more closely resemble the normal tissue environment than 2D culture conditions. Funatsu et al. reported that primary rat hepatocytes cultured in the pores of polyurethane foam formed spherical multicellular aggregates (spheroids) and the spheroids maintained liver-specific functions such as albumin secretion, urea synthesis, and drug metabolism for at least 2 weeks.^{17,19} Cohen et al. also demonstrated that hepatocyte spheroids formed in porous alginate sponges exhibited improved liver-specific functions and prolonged differentiated state compared with hepatocytes grown as a monolayer on collagen-coated dishes.²⁰ Therefore, research in the field of hepatic tissue engineering has included the development of a method for the effective formation of hepatocyte spheroids. For these reasons, many researchers have focused on topographic design of 3D scaffolds for the spheroid formation of hepatocytes.

In addition to the scaffold topography, ligand–receptor interaction between β -galactose residues introduced chemically into scaffold materials and asialoglycoprotein receptors on the surfaces of hepatocytes has been shown to influence cellular behavior and functions.^{21–26} Galactose-carrying polystyrene^{21,22} and galactosylated alginate^{21,23} developed by Akaike et al. have been shown to induce selective adhesion of hepatocytes, formation of hepatocyte spheroids, and functional maintenance of the spheroids. Thus, galactosylated scaffolds have been proposed as alternatives for optimal hepatocyte functions and stable immobilization of hepatocyte spheroids.²¹ Moreover, galactosylated nanofiber mesh²⁴ and galactosylated gelatin sponges²⁵ have been recently prepared based on the link between topographic and biochemical design.

We have developed galactosylated SF (Lac–CY–SF) as a scaffold for hepatocyte culture via covalent conjugation of SF and lactose bearing β -galactose residues using cyanuric chloride (CY) as a coupling reagent.²⁷ Our results have demonstrated that rat primary hepatocytes attached well onto dishes coated with Lac–CY–SF conjugates²⁷ and formed spheroids on the conjugate-coated dishes.²⁸ In this study, we further prepared 3D porous Lac–CY–SF scaffolds, that is, Lac–CY–SF sponges, by freeze-drying and immersion in a series of methanol aqueous solutions to provide a suitable environment enabling the maintenance of hepatic spheroids and expression of liver functions *in vitro*. To employ the 3D Lac–CY–SF culture system, FLC-4 cells, one of the liver cell lines derived from Japanese hepatocellular carcinoma patients and named FLC (functional liver cells),^{29–33} were selected and cultured in Lac–CY–SF sponges. Owing to the scarcity of human tissue and rapid declination of differentiated functions of primary human hepatocytes during culture, human liver-derived cell lines have been developed as alternatives to primary human hepatocytes.^{34,35} Since the FLC lines such as FLC-4, FLC-5, and FLC-7 highly preserve many functions of normal human hepatocytes such as protein synthesis and drug metabolism in long-term cultures, they have been regarded as a component of a bioartificial liver model using a radial flow bioreactor^{31–33} and used as a simulation model for analysis of drug metabolism in human liver.^{31,32} The FLC-4 cells cultured in Lac–CY–SF sponges were subjected to morphological and functional examinations and compared with cells cultured in SF and collagen sponges.

These studies can contribute to improving scaffold designs in hepatic tissue engineering.

■ MATERIALS AND METHODS

Materials. Lactose monohydrate and cyanuric chloride (CY) were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). All the other chemicals used for glycoconjugation of SF and preparation of SF-derived sponges were commercial reagent-grade products. Sterile cross-linked collagen type I sponges for 3D culture (15 mm in diameter and 3 mm in thickness) were commercially supplied by Nitta Gelatin Inc. (Osaka, Japan) and used as a control to evaluate FLC-4 cell responses to SF-based biomaterials. The cross-linkage of collagen sponges was performed by both ultraviolet irradiation and dehydration by heating to reduce the rate of biodegradation.

Preparation of Lac–CY–SF and SF Aqueous Solutions. An aqueous solution of SF was prepared from *Bombyx mori* silkworm cocoons in a similar manner to that described previously.³⁶ Briefly, the cocoons were degummed with boiling 0.5% (w/v) Na₂CO₃ solution for 30 min and rinsed with hot water. The purified SF fiber was dissolved in 9 M LiBr aqueous solution at 60 °C over 30 min. Then, the dissolved solution was dialyzed against distilled water to obtain 1–2% (w/v) SF solution.

As shown in Figure 1, Lac–CY–SF conjugates were synthesized by the chemical modification of amino acid residues in SF with lactose using CY as a coupling reagent according to our previous procedure.^{27,28} Based on our previous studies on the modification of SF with CY-activated poly(ethylene glycol)³⁶ or CY-activated chitooligosaccharide,³⁷ it was considered that lysine and tyrosine residues of SF reacted with CY-activated lactose.^{27,28} In brief, 60 mg of CY in 3 mL of 1,4-dioxane was slowly added to a solution of 116 mg of lactose monohydrate in 9 mL of distilled water at 4 °C while the pH of the mixture was adjusted to about 9 with 20% (w/v) Na₂CO₃ solution. The reaction mixture was stirred at 4 °C and pH 9 by adding 20% (w/v) Na₂CO₃ solution for 2 h to prepare CY-activated lactose. Subsequently, 6.9 mL of 1.75% (w/v) SF aqueous solution containing 121 mg of SF was added to the CY-activated lactose solution. The mixture was then incubated at a pH of about 9 and 37 °C for 3 h in order to make lysine and tyrosine residues of SF react with CY-activated lactose. Since the reaction between SF and CY-activated lactose was accompanied by the hydrolysis of an excess of CY-activated lactose, Na₂CO₃ solution was added to the reaction mixture to keep the pH value of the mixture at about 9. The mixture was neutralized with 1 N HCl solution to stop the reaction. The resulting product was purified by dialysis against distilled water, followed by concentration using ultrafiltration to obtain about 2% (w/v) solution containing 144 mg of Lac–CY–SF conjugates.

Preparation of Lac–CY–SF and SF Sponges. An aliquot (0.5 mL) of 1% (w/v) solutions of Lac–CY–SF and SF was poured into a polypropylene container (15 mm in inner diameter and 53 mm in height) and then frozen at –20 °C overnight. The frozen materials were lyophilized for 5–6 h in an EYELA FD-5N freeze-dryer (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) to obtain a spongy porous matrix (15 mm in diameter and 3 mm in thickness). Since the resulting sponges were water-soluble, they were immersed in a series of methanol aqueous solutions and distilled water to induce crystallization and water-insolubility.³⁸ The resulting Lac–CY–SF sponges were successively immersed and allowed to stand for more than 8 h in 10% (v/v) H₂O–90% (v/v) methanol solution, 30% (v/v) H₂O–70% (v/v) methanol solution, 50% (v/v) H₂O–50% (v/v) methanol solution, 70% (v/v) H₂O–30% (v/v) methanol solution, and distilled water at room temperature. SF sponges were successively immersed and allowed to stand in 10% (v/v) H₂O–90% (v/v) methanol solution, 50% (v/v) H₂O–50% (v/v) methanol solution, and distilled water. The size of the sponges was almost unchanged during the immersion. After the immersion, water-insoluble sponges were obtained. The insoluble

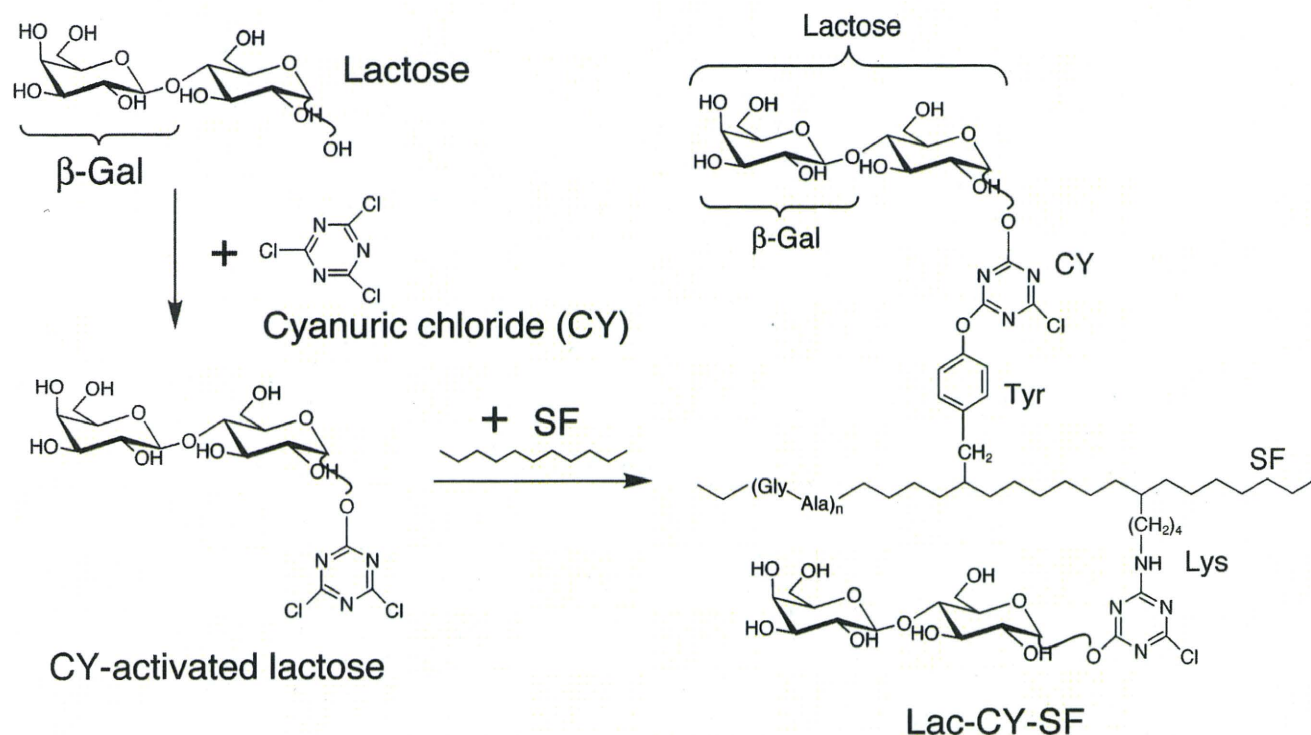


Figure 1. Preparation of lactose–silk fibroin conjugates (Lac–CY–SF) prepared using cyanuric chloride (CY) as a coupling reagent.

sponges were sterilized by immersion in 70% (v/v) ethanol aqueous solution and stored in the same alcoholic solution until use.

Observation of Sponge Samples by Scanning Electron Microscopy (SEM). Surface structures and pore size of sponge samples were observed using a scanning electron microscope (SEM, JMS-6460 LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) under an accelerating voltage of 5 kV. Prior to imaging, the freeze-dried SF-derived sponges and collagen sponges were mounted on aluminum stubs with double-sided sticky carbon tape and spattered with osmium tetroxide using a NL-OPC80A osmium plasma coater (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Culture of FLC-4 Cells in Sponge Samples. The FLC-4 cell line (former name, JHH-4) derived from hepatocellular carcinoma of a 51-yr-old Japanese male patient was established by Nagamori et al. in 1983.^{29,30,32,33} The cell line was routinely cultured in a 75 cm² cell culture flask with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Biowest, Nuaille, France), 100 units/mL penicillin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), and 0.25 µg/mL fungizone (Gibco Industries, Inc., Langley, OK) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. The cells were passaged using 0.25% trypsin–0.02% EDTA solution (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO).

SF-derived sponges stored in the alcoholic solution were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) three times and then soaked overnight at 4 °C in the DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics prior to cell inoculation. Control collagen sponges were also prewetted overnight at 4 °C in the same culture medium. Each prewetted sponge was placed in a well of a 6-well tissue culture plate. For biochemical analysis, except for the study on mRNA expression, FLC-4 cells were seeded onto the top surface of the sponges at a concentration of 1×10^4 cells/sponge with 0.1 mL of the serum-supplemented medium, and cultured for 30 min in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. Following cell seeding, 3 mL of the culture medium was added to each cell seeding well and the cell-seeded sponges were further incubated to promote cell attachment. After 3 days of culture, each sponge was

transferred into a new 24-well tissue culture plate to remove nonadherent cells and 1 mL of the culture medium was added to each well. The medium was replaced with the fresh medium every 3–4 days (twice per week) thereafter.

Morphological Observation of FLC-4 Cells. The morphologies of viable cells cultured for 5 days or 24 days in sponge samples were visualized using 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride (neutral red).³⁹ Neutral red is taken up by viable cells and stored in the lysosomes.³⁹ After the cultivation, 100 µL of 3.3 mg/mL neutral red in Dulbecco's phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was added to each well, and the cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 3 h. Then, the medium was aspirated from all wells. The cell–sponge constructs were washed with PBS and fixed with 10% (w/v) formaldehyde in PBS for 1 h. They were washed 3 times with PBS and visualized under phase-contrast microscope (Olympus CK40-32PH).

Macroscopic Observation of Cell–Sponge Constructs. The cell–sponge constructs stained with neutral red and fixed with formaldehyde for microscopic examination were also used for macroscopic observation. Macroscopic findings on cell–sponge constructs were recorded with a digital camera (Sony Cyber-shot DSC-T30).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Determination of Albumin. After 7, 14, or 21 days of culture, seeded sponges were incubated in 1 mL of fresh medium for 24 h. An aliquot (0.1 mL) of the medium was withdrawn from each well for analysis. The amount of albumin secreted into the medium for 24 h was quantified by the indirect sandwich ELISA technique using a primary capture antibody and a secondary detection antibody linked to horseradish peroxidase. A human albumin ELISA quantitation kit (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX) was used according to the manufacturer's protocol. A standard curve was made using purified human albumin (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX).

WST-1 Cell Viability Assay. Cells grown in sponge samples were analyzed for viability using a WST-1 assay. WST-1 refers to 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt. The WST-1 assay is a colorimetric assay for the

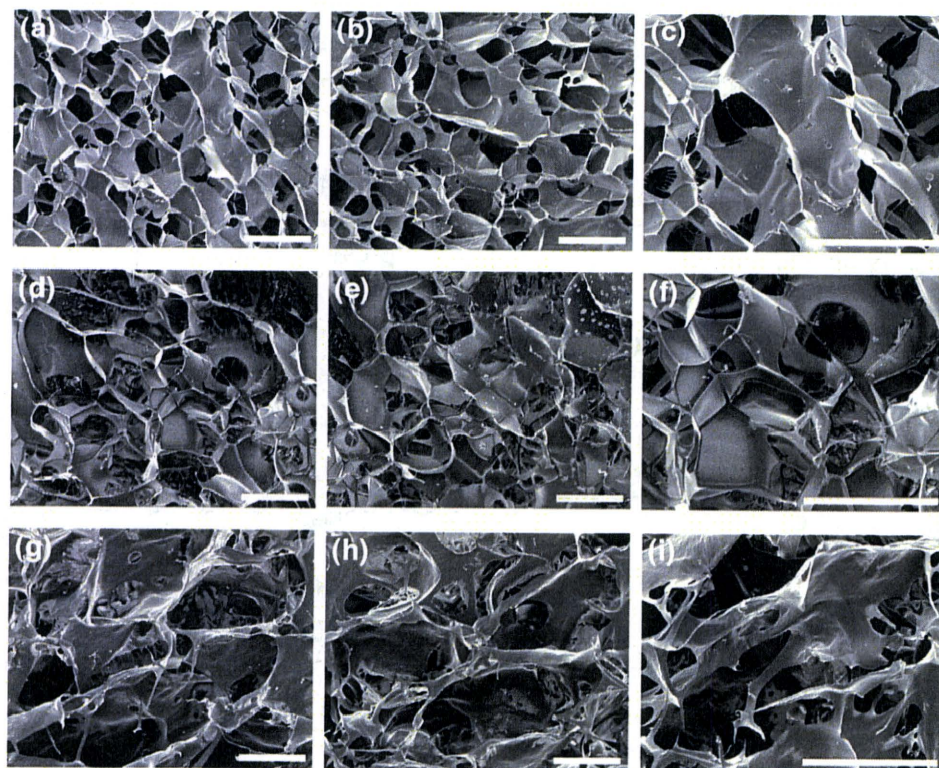


Figure 2. SEM images of Lac-CY-SF sponge (a-c), SF sponge (d-f), and collagen sponge (g-i). Scale bar indicates 200 μm .

quantification of cell viability and proliferation based on the conversion from a tetrazolium salt (WST-1) to a formazan dye by mitochondrial dehydrogenase in viable cells.^{40,41} Increased enzyme activity leads to increases in the amount of formazan product and the absorbance at 450 nm.^{40,41}

Following the collection of the culture medium for determination of albumin at day 8 or 22, the medium was changed to 1 mL of fresh medium containing 0.1 mL ready-to-use WST-1 solution along with electron coupling reagent (Premix WST-1, Takara Bio Inc., Otsu, Japan), and the sponges were further incubated at 37 °C and 5% CO₂ for an additional 2 h. Blank wells containing only culture medium and WST-1 solution were also prepared. After 2 h, 100 μL of solution from each well was transferred into a well on a 96-well plate, where the absorbance of the sample on microplate reader (EMax, Molecular Devices Co., Sunnyvale CA) was obtained at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 595 nm. The absorbance for the blank wells was subtracted from the data.

RNA Isolation and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis. For the studies on mRNA expression for transferrin and hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α in FLC-4 cells at day 21, the cells were seeded onto sponges placed in the wells of a 6-well culture plate at a concentration of 1×10^5 cells/sponge with 0.1 mL of the DMEM supplemented with 10% FBS and antibiotics. Seeded sponges were incubated for 30 min, and 3 mL of additional culture medium was added to each well. After 3 days of culture, each sponge was transferred into a new 24-well culture plate and then 1 mL of the culture medium was added to each well, followed by further incubation.

Total RNA was extracted from seeded sponges after 21 days of total cultivation using TRI Reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) according to the manufacturer's instructions based on the single step acid-phenol guanidinium extraction method developed by Chomczynski and Sacchi.⁴² Each cell-sponge construct was transferred into a 1.5 mL plastic tube and 1 mL of TRI Reagent was added. The cells grown in the sponges were lysed in TRI Reagent by repetitive pipetting. Later, 200 μL of chloroform was added to every tube. After vigorous shaking,

the tube was centrifuged at 12 000g for 15 min at 4 °C. The upper aqueous phase was transferred to a new tube, and 500 μL of isopropanol was added. The resulting mixture was stored at room temperature for 10 min and centrifuged at 12 000g for 15 min at 4 °C. The supernatant was removed, and the RNA pellet on the bottom of the tube was washed with 1 mL of 75% ethanol aqueous solution. Subsequent centrifugation was carried out at 12 000g for 15 min at 4 °C. The ethanol wash was removed, and the RNA pellet was briefly air-dried. After ethanol wash, the RNA pellet was dissolved in sterilized distilled water.

Reverse transcriptase (RT) reaction was carried out in a volume of 20 μL containing 200 ng of total RNA per sample, 50 pmol of oligo(dT)₂₀ primer, 20 nmol of dNTPs, 10 units of ReverTra Ace reverse transcriptase (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan), 10 units of RNase inhibitor, and 5 \times RT buffer (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) according to manufacturer's protocol. Synthesis of first-strand cDNA was performed at 30 °C for 10 min, 42 °C for 1 h, and 85 °C for 5 min.

Synthesized cDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using human specific primers for transferrin and HNF-4 α . The house-keeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a control. The primer sequences of HNF-4 α and GAPDH genes for PCR were obtained from published literature.^{43,44} The sequences of the HNF-4 α primers were as follows: 5'-GGGGTACCCATGGCCGAC-TACAGTG-3' and 5'-GGGGTACCGCGCTGACACCCAGGCTG-3' (predicted product size 138 bp).⁴³ The sequences of the GAPDH primers were as follows: 5'-GACAACCTTTGGTATCGTGGA-3' and 5'-TAC-CAGGAAATGAGCTTGAC-3' (predicted product size 445 bp).⁴⁴ The primer sequences of transferrin gene were designed using Primer software and the transferrin PCR product specificity was confirmed by DNA sequence analysis. The sequences of the transferrin primers were as follows: 5'-CTATGAGTATGTCACCTGCCATCCG-3' and 5'-CAG-GACTTCTTGCCCTTCAGATTG-3' (predicted product size 402 bp). The primers were synthesized and provided by Sigma Genosys (Ishikari, Japan). PCR amplification was performed in a volume of 25 μL containing 7.5 pmol of specific primers, 5 nmol of dNTPs, 0.5 units of

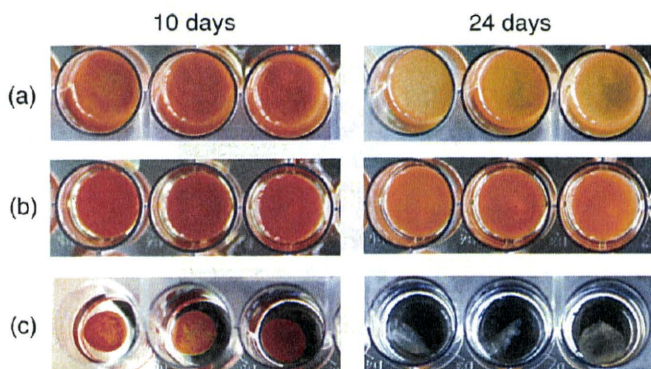


Figure 3. Macroscopic findings on the constructs of sponges (Lac-CY-SF (a); SF (b); collagen (c)) with FLC-4 cells cultured for 10 days and 24 days. Cell-sponge constructs were stained with neutral red for microscopic examination of cell morphology.

KOD-Plus- DNA polymerase (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan), 10× KOD buffer (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan), and 1 μ L of the first-strand cDNA as a template. Amplification conditions consisted of preheating at 94 °C for 2 min followed by 40 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 30 s using the GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). While the PCR products of transferrin and GAPDH were electrophoresed on a 3% agarose gel, the product of HNF-4 α was separated on 5% polyacrylamide gel. DNA fragments corresponding to transferrin, HNF-4 α , and GAPDH were visualized by staining with ethidium bromide and examination using a UV illuminator.

Statistical Analysis. Data were expressed as means \pm standard deviation (SD) from 4–6 samples. Student's *t* test was used to compare different material samples. Values with $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Morphologies of SF-Derived Sponges. SEM investigations on the top surfaces of sponge samples indicated that Lac-CY-SF and SF sponges exhibited different pore morphologies. The pores of Lac-CY-SF sponges appeared to have not only a small round shape with a diameter of about 100 μ m but also an elongated shape (Figure 2a–c). The length and breadth of the elongated pores of Lac-CY-SF sponges were 250–450 μ m and 100–150 μ m, respectively. SF sponges mainly consisted of round pores with diameters of 50–250 μ m but had a few elongated pores with a length of about 300 μ m and a breadth of about 150 μ m (Figure 2d–f). Compared with SF-derived sponges, collagen sponges displayed significantly larger pores with elongated shape (Figure 2g–i). The length and breadth of the elongated pores of collagen sponges were 400–800 μ m and about 200 μ m, respectively.

The original shape of Lac-CY-SF and SF sponges was mostly maintained after cultivation for 24 days (Figure 3a,b). Although collagen sponges were cross-linked to reduce shrinkage due to biodegradation, collagen sponges contracted as did some collagen-based materials.^{45,46} The diameter of collagen sponges decreased to about 70% of that of the original after 10 days of culture (Figure 3c). After 24 days, the shrinkage of collagen sponges was more remarkable and many collagen sponges lost their original shape (Figure 3c).

Cell Morphology. Phase contrast micrographs of FLC-4 cells cultured in sponge samples after staining with neutral red are shown in Figure 4. Within 5 days of culture, Lac-CY-SF and

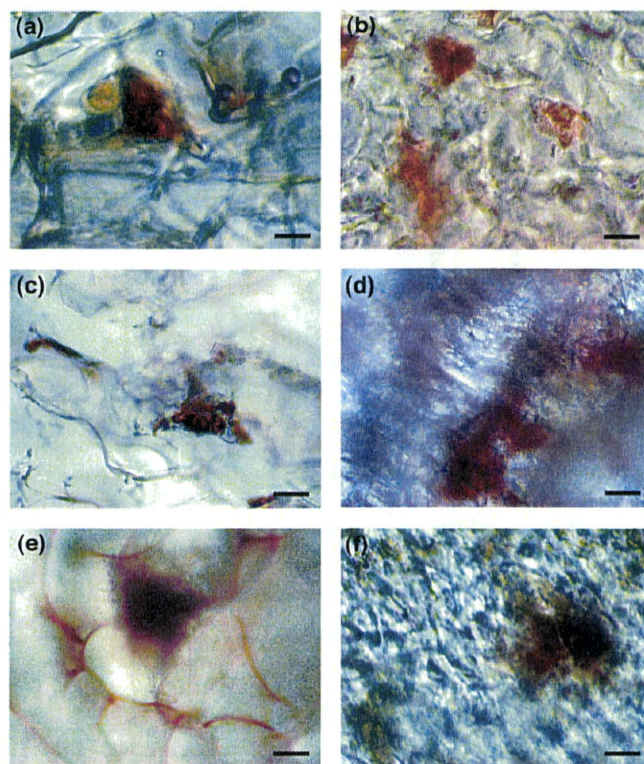


Figure 4. Phase-contrast micrographs of FLC-4 cells cultured in sponge samples. Viable cells were stained with neutral red and showed red. FLC-4 cells were cultured for 5 days in Lac-CY-SF (a) and collagen (b) sponges and for 24 days in Lac-CY-SF (c, d), SF (e), and collagen (f) sponges. Scale bar indicates 40 μ m.

collagen sponges induced the aggregation of the cells into multicellular spheroids with diameters from 30 to 100 μ m (Figure 4a,b). In SF sponges, the cell aggregates could not be observed at day 5 (data not shown). After 24 days of culture, the spheroids were still observed in Lac-CY-SF and collagen sponges (Figure 4c,d,f). The size distribution of the spheroids at day 24 was almost unchanged in both Lac-CY-SF and collagen sponges. However, small spheroids with diameters less than 40 μ m retained in collagen sponges at day 24 had a tendency to increase in the number compared with those at day 5. Only a few spheroids with a diameter of about 100 μ m were formed in SF sponges at day 24 (Figure 4e).

Cell Viability. Phase contrast images revealed that most of the aggregated FLC-4 cells were still viable (red color) after 24 days of culture in the three kinds of sponge samples. Cell viability of FLC-4 cells in each sponge at day 8 and 22 was quantitatively assessed using WST-1 assay. Figure 5 showed the absorbance of formazan dye produced by the cells in the sponges, which was proportional to the cell viability. The results of the analysis at day 8 indicated that the viability of FLC-4 cells cultured in collagen sponges was slightly higher than that in Lac-CY-SF sponges. The cell viability in SF sponges at day 8 was lowest and about half of that in Lac-CY-SF sponges at day 8. After 22 days of culture, the cell viability in Lac-CY-SF sponges was increased and significantly higher than that in collagen and SF sponges. The cell viability in collagen sponges at day 22 was the same low level as that in SF sponges at day 22. Moreover, the cell viability in collagen and SF sponges at day 22 was lower than that in collagen and SF sponges at day 8, respectively.