

201105009A

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

革新的医薬品の開発環境整備に向けた
レギュラトリーサイエンス研究
(H23- 特別 - 指定 -017)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹

平成 24 (2012) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

革新的医薬品の開発環境整備に向けた
レギュラトリーサイエンス研究
(H23-特別-指定-017)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹

平成 24 (2012) 年 4 月

目次

I.	総括研究報告	1
	革新的医薬品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究	
	川西 徹	
II.	分担研究報告	
	1. DDS製剤の評価	15
	加藤 くみ子	
	2. 有効性・安全性バイオマーカーの確立	25
	斎藤 嘉朗	
	3. ヒト特異的有害反応の評価系構築に向けた研究	33
	関野 祐子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働科学特別研究事業)
総括研究報告書

革新的医薬品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究

主任研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

我が国は医薬品・医療機器開発の基盤となる基礎的な科学水準は高く、医薬品・医療機器シーズも数多く発見されているにもかかわらず、医療への実用化が欧米に比べると遅いことが問題となっている。その主要な原因の一つとして、医薬品・医療機器の規制環境の整備の遅れを指摘する声は強く、我が国の科学技術政策課題の中の最重要課題として、「医薬品・医療機器の評価に関わるレギュラトリーサイエンス研究の強化」があげられているところである。また医薬品・医療機器は国民の健康に直結する工業製品であると同時に、医薬品・医療機器産業は知識集約型産業であり、成熟社会を迎えつつある我が国における 21 世紀の産業基盤として期待されている。

このような背景の中、国立医薬品食品衛生研究所では、平成 24 年度から以下のような先端的医薬品・医療機器の評価技術開発研究への重点的な取り組みを開始する：（１）先端的医薬品・医療機器の臨床試験の実施にあたっての条件（品質および安全性の確認）の明確化とその手法の開発；（２）先端的医薬品・医療機器候補について、医療における有用性・安全性を確認、確保するための評価法の開発、及びその標準化；（３）先端的医薬品・医療機器を承認申請するにあたって考慮すべき要件の明確化、及び基準の作成。

本研究は上記研究を本格的に実施する前段階として、（１）革新的医薬品の医療への応用を迅速に進める上で整備が必要と考えられる規制ガイドラインや評価法についてまとめるとともに、（２）特に我が国で開発が進んでいる DDS 製剤の評価基準および評価法の開発・標準化研究として、①薬物キャリアの細胞内取り込みおよび細胞内移行評価法を検討し、蛍光標識リポソームを用いた細胞内動態試験法を確立し、②高分子ミセル製剤の評価にあたって考慮すべきポイントをまとめた；（３）医薬品の有効性・安全性評価に用いられるバイオマーカーの評価・確立のための研究として、①ゲノム DNA 試料に関する検討を行い、保管、調製等の取扱条件を確立し、②血液試料中の生体内内在性代謝物の網羅的解析を行い、血漿と血清間、男女間、およびヒトとラット間での内在性脂質代謝物レベルでの違いを明らかにした、；（４）iPS 細胞を用いた医薬品によるヒト特異的有害反応の評価のための研究として、①ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の評価、②ヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の評価 を実施した。

本研究成果は、平成 24 年度から我が国における革新的医薬品開発を推進する上で必要な規制ガイドライン策定研究を成功させる上で、その基礎となるものである。

分担研究者	
加藤くみ子	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長
斎藤嘉朗	国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長
関野祐子	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長
研究協力者	
運 敬太	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
片岡一則	東京大学大学院
原島秀吉	北海道大学大学院薬学系研究 科 教授
松村保広	国立ガンセンター東病院
西山伸宏	東京大学
黒瀬光一	国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長
前川京子	国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長
佐藤 薫	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
諫田泰成	国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

A. 研究目的

我が国における医薬品開発環境の問題として、医薬品に関する基礎研究レベルは高く医薬品のシーズは数多く発見されているにもかかわらず、それにみあった日本発の新薬の開発例は少なく、また医薬品の実用化のスピードが欧米に比べて遅く、いわゆるドラッグラグが問題となっている。このような我が国における医薬品の製品化のスピードの遅さの主要な原因の一つとして、承認・審査の過程のシステム整備が不十分であることが指摘されている。

この状況を打破すべく、日本発の新薬の開発を効率的・効果的に行うためのレギュラトリーサイエンスを充実・強化し、医薬品の評価、根拠に基づいた審査指針や基準策定等の作成の推進が、“科学技術基本計画、科学技術アクションプラン・資源配分方針”あるいは“医療イノベーション

の目指す方向性（医療イノベーション推進室）”において我が国の科学技術政策の最重要課題の一つにあげられている。

この施策を実現するため、国立医薬品食品研究所では、平成24年度から以下の革新的医薬品の評価技術開発研究への取り組みを予定している：1)革新的医薬品の臨床試験の実施にあたっての条件（品質および安全性の確認）の明確化とその手法の開発；2)革新的医薬品候補について、医療における有用性を確認、確保するための評価法の開発、及びその標準化；3)革新的医薬品を承認申請するにあたって考慮すべき要件の明確化、及び基準の作成

本研究は平成24年度からの本格的な取り組みを前に、(1)革新的医薬品の医療への応用を迅速に進める上で必要と考えられる規制ガイドラインや評価法は具体的に何であるのか明確にするための調査；(2-1)我が国で開発が進んでいるDDS製剤の評価基準および評価法の開発・標準化研究；(2-2)有効性・安全性評価に用いられるバイオマーカーの評価・確立のための研究；(2-3)iPS細胞を用いたヒト特異的な有害反応評価系の研究を実施した。

B. 研究方法

B-1. 革新的医薬品の評価に関して必要な研究に関する調査研究

内外で行われている医薬品の開発や承認申請に関わる議論、関連規制ガイドラインの整備状況をもとに、我が国で世界に先駆けた革新的医薬品開発を行うための環境整備として、レギュラトリーサイエンス研究の立場から必要な研究について考察した。

B-2. DDS製剤の評価

B-2-1 薬物キャリアの細胞内取り込みおよび細胞内移行評価法の研究：

(1-1)リポソーム調製

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)及びCholesterol (Chol)を物質量比で1:1で混合し、さらに蛍光標識脂質をNBD結合DOPC又はCholを5%含有させた後

(DOPC:chol:NBD-labeled DOPC (45:50:5 at a molar ratio)), 脂質薄膜法を用いてリポソームを作製。粒子径及びゼータ電位は Zetasizer Nano(Malvern 社製)で測定。

(1-2) 共焦点レーザー顕微鏡観察

ヒト癌由来 HeLa 細胞, またはヒト結腸癌由来 HT-29 細胞株を 35mm PLL-coat dish に 5×10^4 cells/dish で播種, 一定期間培養後に蛍光標識脂質を含有したリポソームを添加し, 細胞小器官特異的な染色が可能な試薬 CellLight を用い, 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss LSM 510, Carl Zeiss 社)を用いて観察。また, 後期エンドソームマーカーには Alexa-transferrin (ex.594nm, em.617nm)を使用。

(1-3) リポソーム構成成分の細胞内存在量評価

HeLa 細胞又は HT-29 細胞に蛍光標識リポソームを添加して一定期間培養後, トリプシン処理によって細胞を剥離, 細胞溶解バッファーによる細胞破壊後, 遠心分離, 上清中の蛍光強度を蛍光分光光度計 (HitachiF-7000) により測定 (細胞タンパク質量により補正)。

B-2-2 高分子ミセル製剤の評価法に関する研究:

品質特性, 製造工程管理, 薬物動態, 作用メカニズム, 非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法, さらに初回ヒト試験に先だてて確認しておくべき事項をまとめた。

また, 欧州医薬品庁を訪問し, ナノテクノロジーを応用した医薬品(ナノメディシン, ナノ医薬品)の規制に関わる議論を行った。

B-3. 有効性・安全性バイオマーカーの確立

B-3-1 ゲノム DNA に関する検討

(1-1) 全血保存条件

DNA 抽出のための全血は, 採血後 2 時間以内に凍結, -80°C 保存した 5 人の健康人末梢血を使用。凍結状態で納入後, 直ちに, -80°C 保管。保存状態の影響の検討のため, 融解後, 次の 6 条件で全血を保管: 1) 0 時間; 2) $4^{\circ}\text{C} \cdot 4$ 時間; 3) $4^{\circ}\text{C} \cdot 24$ 時間; 4) $25^{\circ}\text{C} \cdot 4$ 時間; 5) $25^{\circ}\text{C} \cdot 24$ 時間; 6) 凍結融解の 5 回繰り返し (-80°C にて 10 分凍結後, 25°C 水浴中で融解)。全血は 6 条件の実施後, 直ちに下記に示す (A) あるいは

(B) 法により DNA 抽出作業を開始。

(1-2) ゲノム DNA の抽出方法

(A) 液層分離法: Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を使用。まず, 全血に細胞溶解液を添加, 遠心操作により核のみを沈殿・分離。核溶解液を加え, 核を完全に溶解させた後, 蛋白沈殿溶液を加え, 遠心操作により蛋白質を沈殿させ, 上清の DNA 溶液にイソプロパノールを加え, DNA を沈殿。70%エタノールで DNA を洗浄後, DNA 用バッファー (Tris-EDTA, pH 7.5) に溶解。

(B) シリカ膜スピンカラム法: NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) を使用。全血をプロテアーゼ K にて処理, シリカ膜スピンカラムに添加後, 遠心操作によりシリカ膜に DNA を吸着させ, 2 回の洗浄・遠心操作後, DNA 溶出バッファー (Tris-HCl, pH 8.5) にて溶出。

(1-3) ゲノム DNA の保存条件の検討

(A) 法で抽出した DNA に対して, 0 回, 10 回, 20 回の凍結融解を (-80°C にて 10 分凍結後, 25°C 水浴中で融解) 実施し保存条件を検討。

(1-4) 品質評価

上記条件にて調製したゲノム DNA に対して Affymetrix 社の DNA マイクロアレイである GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array (25 万種の遺伝子多型 (SNPs) を測定) を用いてタイピングを実施し, アレイ当たりの (サンプル毎の) コールレート (タイピング成功率) を指標としてバイオマーカー探索用試料としての品質評価を実施。SNP タイピングは各ゲノム DNA 250 ng を用いて, Affymetrix 社の推奨マニュアルに従い, 実施。Dynamic Model (DM) アルゴリズムを用いて 93% 以上のコールレートが得られることを確認後, Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier (BRLMM) アルゴリズムを用いて genotyping コーリングを実施。95% 以上のコールレートが得られた場合, 品質基準を満たすものと判定。また, BRLMM を用いて算出したコールレートに対する各条件群 ($n=5$) 間の平均値の差の有無は paired two tailed t-test により検定し, 検定の多重性補正は, Bonferroni 法により行った。

B-3-2 血液中の内在性代謝物に関する検討

(2-1) 血液の採取と血漿・血清の調製

Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 週齢 (計 5 匹) の血漿及び血清を、コージンバイオ (株) より購入。ラットは同社にて普通食 (オリエンタル酵母 EF) により 7 日間の馴化期間を経て、16 時間の絶食後、エーテル麻酔下で開腹し、前腸間膜動脈より無菌採血。同一個体より EDTA・2Na を抗凝固剤として用いる条件及び、凝固剤を用いない条件の 2 通りで採血を行い、それぞれ血漿及び血清を常法に従い分取。血漿・血清ともに採血後 2 時間以内に分取し、直ちに -80°C に保存。

ヒトの血漿及び血清は東京未来スタイル (株) を介して ProMedDx 社より購入。食事制限を行っていない白人の健常ボランティア男性 5 名 (年齢 27-33 歳, 中央値 30 歳), 女性 5 名 (年齢 26-33 歳, 中央値 32 歳) より、EDTA・2K 採血及び凝固剤を用いない条件下で上腕部の静脈より採血を行い、常法に従い、同一個人より血漿・血清を採血した。血漿・血清ともに採血後 2 時間以内に分取し、直ちに -80°C に保存。

(2-2) メタボローム測定

ラット及びヒト血清・血漿から、内部標準物質 (IS) 存在下、中性条件での Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出し、下層 (有機層) 及び上層 (水層) を分取。リン脂質・トリアシルグリセロール等の脂溶性の高い代謝物を含む下層は、超高性能液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOFMS, 超高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC, 飛行時間型質量分析計は Waters 社 LCT Premier XE) を用いて、脂質代謝物 (リン脂質, リゾリン脂質, スフィンゴミエリン, セラミド, ジアシルグリセロール, トリアシルグリセロール) を網羅的に相対定量。酸化脂肪酸 (oxFA) を含む上層は、さらに Oasis HLB Vac RC cartridge (Waters 社) を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。これら試料について超高速液体クロマトグラフ-三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計 (UPLC-MS/MS, 高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC, 三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計は AB SCIEX 社 QTRAP5500) を用いたネガティ

ブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定。

(2-3) データ解析

UPLC-TOFMS により得られたデータは、2DICAL (三井情報株式会社) を用いてピークを抽出し、内部標準物質 (IS) により補正を行った全ピークの height 値を用いて主成分分析 (PCA) を行い、群内サンプルばらつき、及び群間の類縁性の評価を実施。また、2 群間の直交 PCA 判別分析 (OPLS-DA) により、種々の条件下で変化が認められるピークにつき、代謝物の同定を行った後、対応のある Student's t-test (血漿と血清間の比較) または、Mann-Whitney U-test (男女または種間の比較) 等による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定。

UPLC-MS/MS より得られたデータは、MultiQuant ソフトウェア (AB SCIEX 社) を用いて各代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により抽出操作の補正を行い、補正後の全ピークにつき、その面積値を用いて PCA 解析を行った。さらに、各ピークにつき、対応のある Student's t-test (血漿と血清間の比較) または、Mann-Whitney U-test (男女または種間の比較) 等による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定。

B-4. ヒト特異的有害反応評価系

B-4-1 心筋細胞

(1) ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学で山中 4 因子のレトロウイルスを用いて樹立) は理化学研究所バイオリソースセンターより購入 (#HPS0063)。未分化 iPS 細胞は、マイトマイシン C 処理済の SNL76/7 細胞 (European Collection of Cell Cultures) をフィーダー細胞として用い、増殖培地 (bFGF を添加した霊長類 ES 細胞用培地 (リプロセル, #RCHEMD001)) で培養。

(2) ヒト iPS 細胞の未分化マーカーの発現

ヒト iPS 細胞の未分化状態は、細胞を 4%PFA で固定後、未分化マーカー Nanog および Oct3/4 に対する抗体で免疫蛍光染色により解析。

(3) ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導

ヒト iPS 細胞のコロニーを CTK 溶液 (0.1mg/ml collagenase IV, 0.25 % trypsin, 0.1 mM CaCl₂, 20 % Knockout Serum Replacement) で 5 分間処理後, スクレーパーで物理的に剥がし, 小さな塊を作成. 超低接着ディッシュに移して増殖培地を用いて 4 日間培養し, EB を形成. さらに 3 週間, 分化培地 (20%FBS を含む α MEM) で浮遊培養を行い, 拍動 EB を得た.

(4) 活動電位の測定

拍動 EB をトリプシン処理して細胞を単離後, マトリゲルでコートしたディッシュで培養, 再び拍動を開始した細胞の活動電位を測定.

B-4-2 神経細胞

京大が樹立したヒト iPS 細胞株 201B7, および慶應大学より 201B7 由来 neurosphere の供与をうけ使用. basic fibroblast growth factor (bFGF) (peprotech), epidermal growth factor (EGF) (peprotech), human leukemia inhibitory factor (LIF) (millipore) を添加した neurosphere 培地を用いて 12 日間浮遊培養後, TripLE Select (invitrogen) により single cell にした後, 100000 cells / 500 \square / well の割合でポリオルニチン/フィブロネクチンコートした 8 well スライドチャンバー (nunc) に播種し, さらに B27 supplement (gibco) 含有分化誘導培地に交換.

(1) ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本のカルシウムイメージング: 上記分化誘導条件で 30, 40 日間培養後, 各種刺激に対するカルシウム応答を fura2-AM カルシウムイメージング法を用いて AQUACOSMOS / RATIO システムで測定.

(2) ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の免疫組織化学的検討: 上記分化誘導条件で 40 日間培養後, Tuj1, glial fibrillary acidic protein (GFAP), Nestin, MAP2, PSD95, synapsin1 の発現を免疫組織化学的に検討.

(倫理面への配慮)

本研究の一部は市販のヒト試料 (血液, 血漿, 血清及び血液より抽出したゲノム DNA) を使用する研究であるため, 機関研究倫理審査委員会に

申請し, 承認を得た上で研究を遂行した. また研究の一部では慶應大学よりヒト iPS 細胞由来 neurosphere 等を受け入れるため, 慶應大学と MTA を取り交わした. 遺伝子組み換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)及びこれに基づく当研究所の規則に従い, 研究内容につき各研究機関の承認を得て遂行した. さらに動物実験に関しては, 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し, 動物実験委員会に研究計画を申請し, 承認を得た後に行うと共に, 動物愛護の精神に則って, 実験を遂行した.

C. 研究結果及び考察

C-1. 日本発の革新的医薬品の開発にむけた環境整備のためのレギュラトリーサイエンス研究について

C-1-1. レギュラトリーサイエンス研究の必要性 —世界に先駆けた日本での革新的医薬品開発を促進させるための環境整備—

総合科学技術会議における第4期科学技術基本計画, あるいは医療イノベーション会議からの文書等の中で, 我が国において革新的医薬品・医療機器開発を促進する上でのレギュラトリーサイエンスの充実・強化が最重要課題としてあげられている. これらライフイノベーションあるいは医療イノベーションが対象とする革新的医薬品としては, 再生医療関連製品あるいは医療機器の他, さらに核酸医薬品, ペプチド性医薬品, あるいは高度改変タンパク質性医薬品, さらには先端的な製剤技術を利用したナノDDS製剤などもその対象になろう. そこで, 今後開発が活発化されることが見込まれる核酸医薬品, ペプチド性医薬品, 高度改変タンパク質性医薬品, あるいはナノDDS製剤について, 我が国での開発環境整備のためのレギュラトリーサイエンス研究の課題について考察する.

現在まで以上あげたような新しいタイプの医薬品の多くは米国あるいは欧州のアカデミア, あるいはバイオベンチャーがシーズを発見し, それ

を欧米の製薬企業が医薬品として開発、規制当局に臨床試験の申請を行い、試験を実施、臨床有効性、安全性を確認して承認、市販されるケースが多い。このような場合、米国 FDA は開発企業からの相談を早期から受け、臨床試験についても IND 申請制度のもとで開発企業と密接な情報交換をおこなっているようである。さらに申請が近づくと、新しいタイプの医薬品開発に関するガイダンス、あるいはガイダンスまでにいたらない内容のものは”Point-to-Consider”として、「開発および承認申請に際して考慮すべきポイント」を開発者に対してドラフトとして作成、その間公聴会等を行ってさらに意見交換を継続し、承認に先立って FDA の考えを公表することが多い。このような文書は、場合によってはドラフトのまま終わることもあるが、このような文書を作成することは製品の開発者と規制当局との対立しがちなポイントの透明性をもった整理に役立ち、開発のスピードアップに結びついており、多くの革新的医薬品の開発、承認、実用化において米国が先行する大きな理由となっている。一方、欧州においても近年は EMA も積極的に革新的医薬品の規制関連文書の整備を行っており、最近ではガイドラインという名称ではなく、まずは形式および内容において柔軟な「開発にあたって考慮すべきポイント」を Reflection paper としてまとめ、そのさらに規制ガイダンスとして進化させるという方式をとっており、欧州における革新的医薬品開発の活発化に結びついている。一方我が国においては、物質的な意味での新しいタイプの革新的医薬品を世界に先駆けて我が国で承認した例は極めて少なく、欧米で既承認の医薬品が日本に申請されるタイミングになると欧米における規制ガイドライン等を参考にして規制の方針を議論、場合によって厚労省の通知としてガイドライン化することが行われてきた。

しかしライフイノベーション、あるいは医療イノベーションに示された世界に先駆けた日本での革新的医薬品開発という国の施策を成功させるためには、まずは日本での開発が円滑に行える環境の整備が必要であり、規制の立場からみると、米国 FDA や EMA が行っているような、早期の規制関連文書の作成を通じた「開発者が開発にあ

たって考慮すべきポイント」の整理が必要になってくる。また、従来我が国で公表されている医薬品規制関係の文書は、一部の ICH 調和文書を除いて、内容的には医薬品承認申請準備段階以降を扱った物といえる。しかし、臨床試験を含めて世界に先駆けて日本での医薬品開発を活発化するためには、開発過程の課題を対象とした規制文書が必要となる。特に我が国では「ヒト初回臨床試験」が行いにくい、という問題を解決するには、革新的医薬品に関して「ヒト初回臨床試験を実施可能な条件」についての合意形成が重要になるものと思われる。

C-1-2. 核酸医薬品、ペプチド性医薬品、高度改変タンパク質性医薬品、ナノ DDS 製剤の品質、非臨床評価に係わるレギュラトリーサイエンス研究について

以下、具体的に、核酸医薬品、ペプチド性医薬品、高度改変タンパク質性医薬品、ナノ DDS 製剤について、これらの医薬品を適用対象としている品質、非臨床安全性評価に関するガイダンスを整理するとともに、今後必要とされるガイダンスについて考察する。我が国において新有効成分医薬品の承認申請において参照すべき規制文書としては、現在では ICH 国際調和ガイドライン群が第一にあげられる。品質面では化学合成医薬品については、ICH-Q6A が規格および試験法の設定、ICH-Q3 シリーズが不純物（残留溶媒を含む）評価、ICH-Q1 シリーズが安定性評価、ICH-Q4B が主要な品質一般試験法、ICH-Q2 が分析法バリデーションを扱い、原薬 GMP を扱った ICH-Q7 を含めて、開発時あるいは承認申請に当たって必要な品質面の要件の基準が示されている。ただし、これら化学合成医薬品品質ガイダンスの適用対象をみると、ICH-Q6A では小分子量化学合成ペプチドは適用可能とされているが、高分子量のペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドは適用対象から外されている。またペプチド、オリゴヌクレオチドは ICH-Q3 シリーズの適用対象から外されている。このことは、核酸医薬品やペプチド性医薬品の多くは、化学合成で製造されるものが多いとはいえ、既に準備されている化学合成医薬品ガイドラインとは別途の配慮が必要とみ

なされていることの反映である。また ICH-S シリーズとして整備されている非臨床ガイドライン群は、上記医薬品や製剤の非臨床評価においても基本となるものの、必ずしも当てはまらない部分も少なくない。一方核酸医薬品やペプチド性医薬品の有効成分は比較的分子量が大きく、物質的にも生体成分と共通しており、タンパク質性医薬品を中心とした生物薬品のガイドラインをベースにするという考えもあるかもしれない。しかし、生物薬品の品質ガイドラインである ICH-Q5 シリーズおよび ICH-Q6B でも、合成ペプチド及びポリペプチドや DNA を成分とする医薬品は適用対象から外されている。このように化学合成された分子量が比較的大きい核酸医薬品、あるいはペプチド性医薬品を適用対象とした品質面での規制ガイドラインはなく、規制に当たっては個別の製品ごとの判断にゆだねられている状況にある。特に核酸医薬品については承認された製品はまだ少なく、世界を見渡しても品質評価にあたっての基本的要件をまとめた文書はみあたらない。したがって、これら先端的医薬品の開発環境を整備するという意味からも、これら医薬品の品質評価、非臨床安全性評価の要件の整理をレギュラトリーサイエンスの課題として取り上げる意義は大きい。即ちこれらの医薬品の開発経験者と規制関係者が開発段階から情報交換を行い、開発に際して考慮が必要な要件を随時まとめてゆくことは、これら医薬品の臨床応用を早期に実現する上でも大きな推進力となる。

ペプチド性医薬品の品質評価は、(1) 有効成分の生物作用がアミノ酸一次構造で一義的に決定されるのか、あるいはタンパク質性医薬品と同様に生物作用が異なるような複数の高次構造を持ちうるのか、(2) 生体内で特別な生物作用を発現するような構造の有無、(3) 有効成分および不純物の生物作用の種特異性の有無、および動物を用いた非臨床試験のヒト作用の予測性の有無、(4) 免疫原性の有無、等の特性の違いによって、整理されると思われる。

一方核酸医薬品 (=オリゴヌクレオチド医薬品) の品質評価においては、アンチセンス、リポザイム、デコイ、siRNA、アプタマー等、その作用メカニズムに応じた配慮が品質評価においても必

要になると思われる。それぞれの製品群において製造工程中で生成する可能性のある構造物の整理、さらにその中で特異な生物作用を持つ可能性のある不純物の可能性への配慮、特にアプタマーなど高い標的特異性をもたせた医薬品については、ヒト型タンパク質性医薬品同様にヒト細胞系を用いた生物学的特性解析が品質評価においても重要になるかもしれない。また核酸医薬品の多くは、臨床応用に際しては DDS 製剤化が必要となり、DDS 製剤としての品質評価も必要となる。

高度改変タンパク質性医薬品 (生体由来タンパク質に限りなく近い製品として開発した旧来の組換え医薬品ではなく、積極的に構造を改変して生体由来のタンパク質と異なる生物学的特性をもたせた医薬品) の品質評価の場合は、ICH-Q5A, Q5B, Q5C, Q5D, Q5E および Q6B, 安全性評価では ICH-S6 はそのまま有用なガイダンスとなりえる。しかし品質評価においても安全性評価においても、付加的に配慮すべきポイントは少ない。さらにヒト特異的な生物作用をもつ製品について、非臨床試験での評価法について、試験法についてより具体的な整理が必要になることが予想される。

ナノ DDS 製剤の場合は、どのような課題があるだろうか？ これら製剤については、今後材料面でも新しい製品が出現することが予想され、ケースバリエーションの対応が望まれる。とはいえ、これらの製剤の多くは、有効成分の生体内動態 (細胞内の微細動態を含めて) を調節することにより、有効性に選択性を持たせるとともに、毒性を抑えるために設計されたものである。したがって、論点は生体内動態の評価が最も重要で、品質的には生体内動態に関わる製剤特性の特定、さらには当該製剤特性の評価法、および製造方法と製剤特性との関係の解析にあらう。また有効性、安全性との観点からは、生体内動態と有効性、安全性との関係の解析技術がレギュラトリーサイエンス研究の課題として浮かび上がるものと思われる。

ヒト初回試験に先立って考慮すべきポイントについては、既存の医薬品については ICH-M4 ガイダンスで整理された上、我が国でも「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」(厚生労働省医薬品食品

局審査管理課長，薬食審発 0402 第 1 号，平成 24 年 4 月 2 日）が発出され，整備が進んだ。後者の通知はタンパク質性医薬品については，新しいタイプまでも考慮したものとなっているものの，カバー可能な範囲は，基本的には既存のタイプの医薬品といえ，今後開発が行われる核酸医薬品，ペプチド性医薬品，ナノ DDS 製剤等においては，それぞれの特性に応じた追加的な配慮が必要であり，今後の研究が望まれる。

C-2. DDS製剤の評価法に関する研究

世界的に最先端の研究が進んでいる日本発の DDS 製剤を実用化するために，以下に記す研究を実施した。

C-2-1. 薬物キャリアの細胞内取り込みおよび細胞内移行評価法の研究：

共焦点顕微鏡を用いてリポソーム及びリポソーム構成成分の細胞内動態を測定するために，リポソームの主要な構成成分であるリン脂質とコレステロールをそれぞれ脂質の蛍光色素として汎用されている NBD 標識した。この蛍光標識リン脂質あるいは蛍光標識コレステロールを用いて粒子径及びゼータ電位を測定した結果，上記組成のリポソームは，全て粒子径約 110nm，表面電荷は 0mV となっていた。また PDI は全て約 0.06 であり，比較的粒径分布の小さい製剤が調製できていると考えられた。

次に作製したリポソームを用い HeLa 細胞へのリポソーム取込一定時間後のリポソーム構成成分の細胞内局在の評価手法について検討した。蛍光標識脂質による試験条件の予備的検討（蛍光スペクトルの安定性，あるいは取り込み条件等）に続き，NBD でリン脂質あるいはコレステロールをそれぞれ標識したリポソーム 2 種を別々に細胞内に取り込ませ，取込 24 時間後の細胞内局在を HeLa 細胞を用いて評価した。その結果，蛍光標識脂質は初期/後期エンドソームマーカーである Alexa-transferin との共局在が認められ，リン脂質及びコレステロールがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが示唆された。さらに，各種エンドサイトーシス等阻害剤を用いて阻害実験を行い，今回用いたリポソームにおいては，クラスリン介在性エンドサイトーシ

スを介して細胞内に取り込まれることが示された。同様にコレステロールもクラスリン介在性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれていたことから，本実験条件ではリポソームの球形構造を維持した状態で細胞内に取り込まれていると考えられた。

細胞内小器官として脂質の輸送に関わる小胞体とゴルジ体に着目してリポソームの細胞内局在について検討した。リポソームの細胞内局在を調べるために，小胞体，及びゴルジ体を NBD とは異なる蛍光特性を有する色素で特異的に標識することとした。検討の結果，リポソームは細胞内に取り込まれた後，リン脂質は小胞体及びゴルジ体に集積する一方，コレステロールは小胞体のみを集積することが示され，両成分の細胞内局在が異なることが示された。この結果はエンドソーム/ライソソーム到達後の過程でリポソームの球形構造が崩壊し，内包薬物が放出されるとともにリポソームの各構成成分が異なる機構で細胞内輸送されることを示唆している。

C-2-2. 高分子ミセル製剤の評価法に関する研究：

ブロック共重合体ミセル製剤の評価にあたっての留意点および評価試験法に関する事項をまとめた。品質特性，製造工程管理における項目は，物理化学的特性に関する理化学試験について重要度や製品特異的な特性等の観点で分類し記載した。非臨床試験の薬物動態試験においては血中薬物濃度や組織や臓器への分布に関する評価についてまとめた。FIH（ヒト初回投与）試験では，ヒトに投与する前に行っておくべき非臨床試験，ヒト初回投与量の決定において考慮すべき点，FIH 試験で使用する治験薬の品質に関する考慮点をまとめた。また，欧州医薬品庁を訪問し，担当者とナノメディシンの評価に関する議論を行った。（詳細は加藤くみ子分担報告書を参照）

C-3. 医薬品の有効性・安全性バイオマーカーの評価に関する研究

本邦で整備すべきバイオマーカー関連のガイドラインとして，バイオマーカーの探索・検証に関するものがある。この策定のためには，対象と

する測定用試料の必要要件やマーカー選択において考慮すべき要件を明らかにする必要がある。このため本研究では、以下の検討を行った。

C-3-1. ゲノム DNA 試料に関する検討：

DNA マイクロアレイ法によるゲノムバイオマーカーの探索に供する全血の保管条件、DNA の抽出・保管条件の検討を行った。BRLMM を用いて算出したコールレートについて以下の全ての検体・条件で 95%以上(範囲は 98.77~99.78%)を示し、品質に悪影響が生じたものはなかった。即ち全血の保管に関しては 25°C・24 時間の保管、全血凍結融解では 5 回まで、DNA の抽出方法に関しては、液層分離法、シリカ膜カラム法いずれでも同程度の高品質 DNA を抽出することが可能であった。DNA の凍結融解は少なくとも 20 回まで品質に影響を及ぼさないことが判明した。このことから、抽出法に関しては、より簡便なシリカ膜カラム法で十分であり、保管要件に関しては、通常の作業工程に則っていれば、高密度 DNA マイクロアレイを用いたゲノムバイオマーカー探索・検証のための DNA の品質は十分に確保されると考えられた。

C-3-2. 血液試料に関する検討：

メタボローム用試料(血液)に関し、ラットおよびヒト試料を対象に UPLC-TOFM および UPLC-MS/MS を用いてメタボローム解析を行い、以下のようにラットでは血漿と血清間で、ヒトでは男女間で、異なるレベルを示す内在性代謝物があることを明らかにした。

ラットの血漿と血清間で 36:5ePE (もしくは 36:4pPE, グリセロール骨格の 1 位の結合が e はエーテル型, p はプラズマローゲン型で、両者は精密質量が等しく区別できない)が血漿と比較して血清で 2.1 倍増加する代謝物であることを同定した。その他、ラットにおいて血漿より血清中のレベルが高い代謝物として、32:0PC (1.9 倍), 18:0LPC (1.3 倍), 38:5ePE (もしくは 38:4pPE, 1.8 倍), 38:6ePE (もしくは 38:5pPE, 1.8 倍) が同定された。さらに脂肪酸代謝物に関しては、22 種の代謝物レベルが、血漿と比較して血清中で有意 ($p < 0.01$) に増加した(顕著な増加が認められた代謝物としては Thromboxane B2

(TXB2, 1,297 倍), 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE, 1,138 倍), 12-hydroxyheptatrienoic acid (12-HHT, 1,102 倍), Prostagrinsin D2 (PGD2, 113 倍), Arachidonic acid (AA, 3.7 倍) 等)。この差については、血清では、血液凝固に伴うアラキドンカスケードの進行に伴い、数種のエイコサノイドの濃度が血漿中とは異なるためと考えられた。

一方、男性と比較して女性で有意 ($p < 0.01$) にレベルが低い代謝物として 11,12-dihydroxy-eicosatrienoic acid (11,12-DiHETrE, 0.57 倍, 女性/男性) 及び 14,15-dihydroxy-eicosatrienoic acid (14,15-DiHETrE, 0.57 倍) が同定され、また血清でも、11,12-DiHETrE (0.51 倍, $p = 0.009$) 及び 14,15-DiHETrE (0.56 倍, $p = 0.02$) は女性のレベルが男性よりも低かった。

さらに、ヒトとラット間で、数種のリン脂質・脂肪酸代謝物レベルに相違が認められることが明らかとなった。即ち顕著な差 ($p < 0.01$) があるリン脂質代謝物として、20:4Lysophosphatidylcholine (20:4LPC), 34:1 Phosphatidylcholine (34:1PC), 34:1 Sphingomyelin (34:1SM) があり、雄性ラットと比較してヒト男性で有意に高く、逆に、40:6 PC, 20:4 LysoPC のレベルはラットの方がヒトと比較して有意に高かった。一方、血漿中の脂肪酸代謝物に関して、ラットと比較してヒト男性で有意にレベルが高いものは見いだせなかった。逆に、ヒト男性で有意にレベルが低い脂肪酸代謝物として、19 種が同定された。顕著にレベルが異なるものとして、AA (0.21 倍, ヒト男性血漿/ラット血漿), Eicosapentaenoic acid (EPA, 0.22 倍), Docosahexaenoic acid (DHA, 0.13 倍), 5-Hydroxy-eicosapentaenoic acid (5-HEPE, 0.08 倍), 8-HEPE (0.17 倍), 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid (5,6-EET, 0.18 倍) 等が挙げられた ($p < 0.01$)。

これらの結果は、概して血漿と血清間、男女間、種間で、脂質代謝物に関しては同様のレベルであるものの、一部にはレベルが大きく異なる分子もあることを示したものである。探索したバイオマーカーが、これらの分子に該当する場合には、試料選択や外挿において注意を要することが示唆された。

C-4. ヒト特異的有害反応の評価系構築に向けた研究：

C-4-1. ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞の評価・標準化：

ヒト iPS 細胞株 201B7 について未分化状態にあることを確認するために、幹細胞マーカーの発現を免疫染色およびフローサイトメーターによって検討した。その結果、未分化マーカーである Nanog および Oct3/4 が発現していることを確認し、さらに、細胞膜マーカーである Tra-1 についても発現を確認した。次に、EB 形成による分化誘導法により心筋への分化誘導を行ったところ、3 週間の浮遊培養により拍動 EB が得られ、その割合は約 10%であった。さらに、得られた拍動 EB から拍動する細胞を単離・培養し、心筋マーカー分子の発現を検討したところ、 α アクチニンやトロポニンが陽性であった。従って、拍動能とともに心筋マーカー分子の発現から、得られた分化細胞が心筋であることが示唆された。

続いて、拍動 EB から単離した心筋細胞について、活動電位の測定を行ったところ、様々な活動電位のパターンが得られるとともに、静止膜電位は全般的に浅い傾向にあることが明らかになった。さらに、拍動しない細胞に心筋が含まれる可能性があるのか確認するために、電気刺激を行って活動電位の測定を行った。その結果、非拍動細胞にもペーシングで活動電位の発生が認められるとともに、Ba を用いた IK1 チャネルの抑制により活動電位時間の延長が認められたことから、IK1 チャネルが機能的であり心筋であることが裏付けられた。従って非拍動細胞にも心筋細胞が含まれることが示唆された。

以上のように、非拍動細胞にも電気刺激で活動電位が認められることから、拍動能だけでは分化細胞の評価法として不十分であることが示唆された。

分化誘導法は EB 形成法と EB を介さない単層分化誘導法の 2 通りが報告されている (Burridge et al. Cell Stem Cell. 10:16-28 (2012))。今回は特別な試薬を必要とせず誰にでも追試可能なプロトコルを検証し、拍動する EB が得られた。しかしながら、この方法で作製した心筋細胞の静

止膜電位が浅く成熟が不十分な可能性があることから、さらに分化誘導法の検討を行う必要がある。また、EB による心筋分化誘導では薬剤性 QT 延長に寄与する K チャネル (IKr) の機能が弱いことが報告されており (第 2 回安全性薬理学会)、このことは薬剤による QT 延長の検出系として、かならずしも適切な分化細胞が得られていない可能性を示唆している。ヒト iPS 由来心筋細胞を用いて QT 延長を評価系するためには、均一で成熟した心筋細胞の作成技術の一段の進展が必要不可欠であり、継続的な検討が必要である。

C-4-2. ヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の評価・標準化：

(1) ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本のカルシウムイメージング

201B7 由来神経細胞標本の分化誘導 28 日目における位相差顕微鏡像では細胞体から長い突起を二本のばした bipolar type の神経細胞様細胞が多数見受けられた。これらの細胞について fura2-AM カルシウムイメージング法を用いて各種リガンドへのカルシウム応答性の検出を行った。201B7 由来神経細胞標本においては、分化誘導 30 日目に ATP 反応性の細胞が現れ、分化誘導 40 日目に、L-Glu 反応性の細胞が現れることが明らかとなった。これは P2 受容体 \rightarrow L-Glu 受容体の順に神経細胞標本が受容体を発現していることを示している。それぞれの観察時点における P2 受容体および L-Glu 受容体のサブタイプについては、現在、mRNA レベル、タンパク質レベルでの網羅的解析を行っているところである。また preliminary な実験としてマウス ES 細胞からの神経細胞分化誘導についてもカルシウムイメージング法を用いて検討している。マウス ES 細胞において、ATP, L-Glu の順序で反応性を獲得することを確認している。従って、今回検討に用いた 201B7 由来神経細胞標本は正常な分化誘導過程をたどっている可能性が高い。

(2) ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の免疫組織化学的検討

201B7 由来神経細胞標本がシナプス形成に至っているのかどうか検討するため、分化誘導 40

日目に免疫組織化学的検討を行った。前シナプス部位マーカーとして神経伝達物質の放出に関わる SNARE タンパク質の一つである synapsin1、後シナプス部位マーカーとして NMDA 受容体の裏打ちタンパク質の一つである PSD95 を選択した。また、樹状突起を可視化するため、樹状突起マーカーである MAP2 についても染色した。その結果 PSD95 の発現は非常に低く、synapsin1 との共局在は観察されなかった。機能的なシナプスが成熟している場合は synapsin1 と PSD95 の共局在が観察されるはずであり、201B7 由来神経細胞標本は機能的シナプス成熟には至っていないことが推察された。

以上のように、201B7 由来神経細胞標本は、培養系の安定性が不十分であること、培養が安定した場合でも、P2 受容体および L-Glu 受容体の発現には至るが、シナプス成熟には至らないことが示された。今後、その他のヒト iPS 細胞株由来の神経細胞標本を用いて株間比較を行い、より生体内神経細胞機能を忠実に再現する標本の探索、さらに、神経細胞標本を用いたヒト特異的有害反応評価系の構築を行う予定である。

D. 研究により得られた成果の今後の活用

本研究成果について、下記のような展望のもとに引き続き研究を進展させる。

D-1. DDS 製剤の評価法に関する研究：

リポソーム製剤の細胞内動態評価法に関しては、特に核酸やタンパク質等を内包したリポソーム製剤の薬理活性や安全性を評価するための標準的 in vitro 解析手法に発展させる。また、高分子ミセル製剤の開発、評価にあたって考慮すべき点のまとめについては、今後さらに精査し全体的な整合性に注意し文書化を目指すとともに、海外より発出されているナノメディシン関連の文書を参考にしつつ国際的な発信も視野に入れる。

D-2. 医薬品の有効性・安全性バイオマーカーの評価に関する研究：

本研究により得られた遺伝子多型測定のためのゲノム DNA 試料に関する品質要件、並びに生

体内代謝物マーカーの選択において考慮すべき血液試料の種類、男女、およびヒト・ラットの種間での相違に関する知見は、非臨床・臨床試験段階におけるバイオマーカー探索および選択において考慮すべき重要な点を明らかにしたものである。さらに研究を進める必要があるものの、これらは、今後、本邦で整備すべき「バイオマーカー探索・検証に関するガイドライン」等の策定において、その基礎となる知見である。

D-3. ヒト特異的有害反応の評価系構築に向けた研究：

市販の分化心筋細胞を利用して細胞をシート状に培養し、心電図 QT 間隔に対応する電気活動を解析することにより、催不整脈や QT 延長の予測試験への利用を試みる。ヒト抗不整脈作用の予測試験の標準化のために、E-4031 を陽性対照、アスピリンを陰性対照とする。市販のヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いて、ATP 刺激、グルタミン酸刺激に対する細胞内カルシウム測定と免疫組織染色により、シナプス形成過程を評価する。今後、医薬品の有効性と安全性を評価する試験系としての有用性を評価する。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1.論文および総説

- 1) 川西徹 医薬品の品質を巡る話題 —化学合成医薬品に関わるレギュラトリーサイエンス—
レギュラトリーサイエンス誌 2, 67-73 (2012)
- 2) Sakai-Kato K, Nanjo K, Kawanishi T, Okuda H Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites *Chem Pharm Bull.* 2012, 60, 391-396.
- 3) Sakai-Kato K, Ishikura K, Oshima Y, Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A, Yamaguchi T, Nishiyama N, Kataoka K, Kawanishi T, Okuda H Evaluation of intracellular

- trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers *Int J Pharm.* 2012, 423, 401-409.
- 4) 加藤くみ子 “DDS製剤評価の動向と今後の課題” HUMAN SCIENCE 2012 23 (1) 28-31
 - 5) Kurose K, Hiratsuka K, Ishiwata K, Nishikawa J, Nonen S, Azuma J, Kato M, Wakeno M, Okugawa G, Kinoshita T, Kurosawa T, Hasegawa R, Saito Y.: Genome-wide association study of SSRI/SNRI-induced sexual dysfunction in a Japanese cohort with major depression. *Psychiatry Res.* (in press).
 - 6) Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y.: Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet.* (in press).
 - 7) 有田誠, 斎藤嘉朗, 田口良, 西島正弘: メタボローム新技術が切り拓くこれからの脂質バイオロジー研究. *実験医学* 30: 446-454 (2012).
 - 8) Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa, K., Sekino, Y., Ohwada, T., Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without Interaction with estrogen receptors. *ACS Chem Neurosci* 3, 105-113 (C.A.), 2012
 - 9) Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S., Koizumi, S., Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* (in press)
 - 10) Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y., Koizumi, S., In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties. *Plos ONE* (in press)
- ## 2. 学会発表
- (1) 加藤くみ子 “ナノ DDS 製剤開発に関する動向と評価手法研究” 日本薬学会第 132 年会 札幌, 2012 年 3 月 29 日
 - (2) 運敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏 “リポソーム製剤の P-糖タンパク質(P-gp)を介した膜透過特性評価” 日本薬学会第 132 年会 札幌, 2012 年 3 月 31 日
 - (3) 佐藤 薫 iPS 細胞由来ニューロンの薬理学的プロファイリング 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」(2012.2) (東京)
 - (4) 佐藤 薫, 最上由香里, 関野祐子 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第 132 回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たなストラテジー」(2012.3) (札幌)
 - (5) 高橋華奈子, 最上(重本)由香里, 岡田洋平, 大津香苗, 福角勇人, 正札智子, 金村米博, 岡野栄之, 関野祐子, 佐藤 薫 ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成 日本薬学会第 132 回年会(2012.3) (札幌)
 - (6) 最上(重本)由香里, 藤森康希, 五十嵐良明, 広瀬明彦, 関野祐子, 佐藤 薫 カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響 日本薬学会第 132 回年会(2012.3) (札幌)
 - (7) 片山敦子, 門馬彰彦, 大友ゆき, 今井美鈴, 秋友孝文, 守口 徹, 関野祐子, 佐藤 薫 胎

生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索 日本薬学会第 132 回年会(2012.3) (札幌)

- (8) 藤森康希, 高木淳平, 佐藤 薫, 鈴木岳志 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会(2012.3) (京都)
- (9) 佐藤 薫, 栗脇淳一, 高橋華奈子, 斉藤善郎, 岡淳一郎, 尾谷優子, 沙宇, 中澤憲一, 関野祐子, 大和田智彦 エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見 第 85 回日本薬理学会年会(2012.3) (京都)

関連公開シンポジウム

- 1. 厚生労働省公開シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」
2012.2.25

G. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（特別研究事業）

分担研究報告書

革新的医薬品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究

DDS製剤の評価

研究分担者 加藤くみ子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長

研究要旨 リポソーム及び構成成分の細胞内取り込み、細胞内移行をマイクロプレートリーダーや共焦点顕微鏡を用いて解析する手法を確立した。本手法は、内包薬物の細胞内放出を制御する製剤の開発、及び薬理作用や安全性に影響を及ぼす品質特性の評価に応用可能であると期待される。世界的にみて我が国の開発が先行している高分子ミセル製剤に関して、品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項のまとめに着手した。

研究協力者

薬物キャリアの細胞内取り込み及び細胞内移行評価法の研究

運敬太

高分子ミセル製剤の評価法に関する研究

片岡 一則（東京大学） 原島 秀吉（北海道大学） 松村保広（国立がん研究センター）

西山 伸宏（東京大学）

A. 研究目的

核酸医薬品や抗悪性腫瘍剤等においては、標的指向性の向上により標的細胞に医薬品を送達することで、副作用を低減し、有効性を増強させた画期的医薬品の開発が期待できる。世界的に最先端の研究が進んでいる日本発の DDS 製剤を実用化するために、以下に記す研究を遂行する。

(1) 薬物キャリアの細胞内取り込みおよび細胞内移行評価法の研究：キャリアに内包された薬物の標的細胞内での動態を明らかにするために、キャリアに着目しその細胞内への取り込み、細胞内移行を解析する方法を検討する。

(2) 高分子ミセル製剤の評価法に関する研究：世界的にみて我が国で開発が先行している高分

子ミセル製剤に関して、品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項をまとめる。

B. 研究方法

(1) 薬物キャリアの細胞内取り込みおよび細胞内移行評価法の研究：

(1-1) リポソーム調製

実験で用いるリポソームは、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) 及び Cholesterol (Chol) を物質量比で 1:1 で混合し、さらに蛍光標識脂質を NBD 結合 DOPC 又は Chol

を 5%含有させた後 (DOPC:chol:NBD-labeled DOPC (45:50:5 at a molar ratio)), 脂質薄膜法を用いて作製した。リポソームの粒子径及びゼータ電位は Zetasizer Nano(Malvern 社製)で測定した。

(1-2) 共焦点レーザー顕微鏡観察

対象細胞としてヒト癌由来の細胞株である HeLa 細胞, またはヒト結腸癌由来 HT-29 細胞株を用いた。35mm PLL-coat dish に 5×10^4 cells/dish で細胞を播種した。培地には 10 % FBS 入り DMEM 培地を用い 37°C, 5 % CO₂ 下で培養した。一定期間後に蛍光標識脂質を含有したリポソームを添加した。その後, 小胞体, ゴルジ体を細胞小器官特異的な染色を行うことが可能な試薬 CellLight (ex.550nm, em.580nm, Life Technologies 社)の推奨プロトコールに従い標識し, 共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss LSM 510, Carl Zeiss 社)を用いて観察した。また, 後期エンドソームマーカーには Alexa-transferrin (ex.594nm, em.617nm)を用いた。

(1-2)リポソーム構成成分の細胞内存在量評価

HeLa 又は HT-29 細胞を 6 穴細胞培養プレートに播種し, 蛍光標識リポソームを添加して一定期間培養した。その後, トリプシン処理によって細胞を剥離し, 細胞溶解バッファーによる細胞破壊後, 遠心分離し, 上清中の蛍光強度を蛍光分光光度計 (HitachiF-7000) により測定し (ex.474nm, em.533nm), 細胞タンパク質量により補正した。

(2)高分子ミセル製剤の評価法に関する研究:

品質特性, 製造工程管理, 薬物動態, 作用メカニズム, 非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法, さらに初回ヒト試験に先だつて確認しておくべき事項をまとめた。

また, 欧州医薬品庁を訪問し, ナノテクノロジーを応用した医薬品(ナノメディシン, ナノ医薬品)の規制に関わる議論を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来培養細胞は, 研究用の市販品, 頒布品であるため, 倫理的に問題となるような事項はないと考えられるが, 常に倫理問題を意識しながら研究を遂行し, 将来必要が生じた場合には速やかに当研究所研究倫理委員会に申請して, その審査を受けるものとする。遺伝子組み換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)及びこれに基づく当研究所の規則に従い, 研究内容につき各研究機関の承認を得て遂行する。さらに動物実験に関しては, 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守し, 動物実験委員会に研究計画を申請し, 承認を得た後に行うと共に, 動物愛護の精神に則って, 実験を遂行する。

C. 研究結果

(1) 薬物キャリアの細胞内取り込みおよび細胞内移行評価法の研究:

本研究では, 共焦点顕微鏡を用いてリポソーム及びリポソーム構成成分の細胞内動態を測定するために, リポソームの主要な構成成分であるリン脂質とコレステロールをそれぞれ脂質の蛍光色素として汎用されている NBD 標識することとした。この蛍光標識リン脂質あるいは蛍光標識コレステロールを用いて粒子径及びゼータ電位を測定した結果, 本研究で用いる上記組成のリポソームは, 全て粒子径約 110nm, 表面電荷は 0mV となっていた(表 1)。また, PDI は全て約 0.06 であり, 比較的粒径分布の小さい製剤が調製できていると考えられる。

次に作製したリポソームを用い HeLa 細胞へのリポソーム取込一定時間後のリポソーム構成成分の細胞内局在の評価手法について検討した。まず, 脂質の蛍光標識がリポソーム作製により蛍光

色素の特性に与える影響を調べた。図1に示す通り、蛍光標識脂質を用いてリポソームを調製した場合にも、リポソーム形成前後で蛍光色素の励起・蛍光波長に大きな変化は認められなかった。

細胞内の環境は均一ではなく、細胞内小器官により pH や塩濃度が異なるため、ナノ粒子の細胞内への取り込みを定量的に評価するには、細胞内の環境変化が蛍光強度へ与える影響を検証しておく必要がある。そこで、蛍光標識脂質の pH 依存性について調べた。今回実験で用いた蛍光標識リポソームに関して、様々な pH 条件下で 37°C、24hr インキュベートした結果、蛍光強度に変化は認められなかった(図2)。また、酸性条件下(pH4.0)で長時間(72hr)インキュベートした場合にも変化は認められなかった。

さらに、蛍光標識リポソームの HeLa 細胞内への取込に関して用量・時間依存性を評価した(図3)。まず添加量については、6well plate に HeLa 細胞を 50000cells/well で播種して行った本実験条件では、終濃度 70mg 以上で飽和が認められた。本結果を踏まえ、一連の実験では終濃度 50mg を添加量とした。また、細胞内取込の時間依存性についても評価した。その結果、本実験条件下では 6hr 後までにリポソームが取り込まれ、それ以降はリポソームの細胞内取込に飽和が認められた。

以上の予備検討を踏まえ、NBD でリン脂質あるいはコレステロールをそれぞれ標識したリポソーム 2 種を別々に細胞内に取り込ませ、取込 24 時間後の細胞内局在を HeLa 細胞を用いて評価したところ、図4に示す通り、良好な染色像が観察された。

実験で用いるリポソームの細胞内取込機構について、HeLa 及び HT-29 細胞を用いて評価した。まず蛍光標識リポソームを作製し、HeLa 細胞に添加 1hr 後における細胞内局在を評価した結果、初期/後期エンドソームマーカである Alexa-transferin との共局在が認められ、リン脂質及びコレステロールがエンドサイトーシスによ

り細胞内に取り込まれることが示唆された(図4)。次に細胞内へのリポソーム取込に関与するエンドサイトーシス機構を明らかにするために、各種エンドサイトーシス等阻害剤を用いて阻害実験を行った。真核生物の細胞は、発達した細胞内膜系を利用してエンドサイトーシスと呼ばれる細胞外からの物質の取り込みを行っている。エンドサイトーシスには、1) クラスリンと呼ばれるタンパク質と小胞による受容体を介したエンドサイトーシス、2) 細胞膜上のカベオラという窪みを介して取り込まれるカベオラ依存性エンドサイトーシス、3) 低分子やイオンの取り込みである飲作用(ピノサイトーシス)があり、さらにマクロファージなどの食細胞では、4) 比較的大きな物質の取り込みであるファゴサイトーシス機構が知られている。今回、実験に供している HeLa 細胞では、ファゴサイトーシスによる取り込みは考えにくい(1)から3)の取り込み機構について調べた。その結果、今回用いているリポソームにおいては、リン脂質及びコレステロール共にクラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジン存在下で細胞内取込量が顕著に低下したことから、本リポソームはクラスリン介在性エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれることが示された(図5)。一般に、コレステロールはカベオラ介在性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが報告されている。一方、本実験では、コレステロールもクラスリン介在性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれているため、本実験条件ではリポソームの球形構造を維持した状態で細胞内に取り込まれていると考えられる。

細胞内小器官として脂質の輸送に関わる小胞体とゴルジ体に着目してリポソームの細胞内局在について検討した。リポソームの細胞内局在を調べるために、小胞体、及びゴルジ体を NBD とは異なる蛍光特性を有する色素で特異的に標識することとした。図6の緑色蛍光がリポソーム構

成分を、赤色蛍光が細胞内小器官を示す。検討の結果、リポソームは細胞内に取り込まれた後、リン脂質は小胞体及びゴルジ体へ集積した一方、コレステロールは小胞体のみへ集積することが示され、両成分の細胞内局在が異なることが示された。本知見はエンドソーム/ライソソーム到達後の過程でリポソームの球形構造が崩壊し、内包薬物が放出されるとともにリポソームの各構成成分が異なる機構で細胞内輸送されることを示唆している。

(2)高分子ミセル製剤の評価法に関する研究：

高分子ミセル製剤の開発において留意すべき点、また評価に関する文書案をまとめるにあたっての主な論点は以下のとおりであった。

2-1) 構成について：品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性の評価にあたっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項 (First in human) をまとめることとした。本案では、高分子ミセル製剤の主要な要素について開発の基本的な考え方を示すような記述とすること、本製剤に特徴的な要素、あるいは従来の医薬品にプラスアルファで考慮すべき点に焦点を当てることとし、開発のすべてを最初から記述するものではないこととした。品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性評価の節は、申請時に必要なデータセットを想定して作成することとする。一方、First in human の節は、ヒトに初めて投与するまでに確認しておくべき品質、非臨床データは何か、またヒト初回投与量設定において考慮すべき点に関して記述することとした。

2-2) 適応範囲：今回対象とする高分子ミセル製剤は、臨床応用が試みられているブロック共重合体ミセル製剤とする。現時点でも様々なタイプのブロック共重合体ミセル製剤が開発中である

ことを鑑み表現はより広範な範囲を含むこととした。また、従来型の可溶化目的のミセル製剤とは異なる点、特徴を述べることとした。具体的には、本案で取り上げるブロック共重合体ミセル製剤は安定性の向上、薬物動態の最適化、薬物放出の制御、解離速度の制御等をデザインして設計されている点を強調することとした。

2-3) 品質特性、製造工程管理：記述の方法として、ポリマーに関連する項目（ポリマーのみ、あるいは有効成分が化学的に結合したポリマー）とミセルに関する項目に整理して配慮すべき点を記載することとし、物理化学的特性に関する理化学試験については、重要度や製品特異的な特性等の観点で分類し記載することとした。

2-4) 非臨床試験について：

①薬物動態試験について：

ドキシルの製造法がステルスリポソームから硫酸アンモニウム勾配法により製造されていることからわかるように、リポソームでは薬剤を含んでいない状態でもリポソームであり、キャリアと薬剤を別々に議論することが可能である。

一方、ミセルでは個々の製品で細部は異なるものの、封入する薬剤がミセルの内核を形成する駆動力の一端を担っており、薬剤がミセル形成の駆動力になっている場合、薬剤が遊離されるにつれて内核の凝集力が低下し、ミセルが弱くなっていくことになる。多くのブロック共重合体ミセルでは生理的条件下で薬剤を徐放するような設計になっていることから、生体内に投与されたときから有効成分の遊離が始まり、ミセルの形状は刻一刻、変化している。このような性質を考慮し、in vivo での挙動を考察することが求められると考えられる。

ブロック共重合体ミセル等の DDS 製剤では、循環血中における有効成分は、単独で静脈内投与された医薬品、あるいは経口投与型の医薬品とは