

measurement of the fluorescent intensity inside cells using confocal microscopy. The intensity of the intracellular fluorescence was evaluated by image processing software (MetaMorph, Molecular Devices, CA, USA). The intensity of a single cell was mathematically determined by dividing the total intensity by the number of cells. Three independent experiments were averaged and analyzed statistically with the *t*-test.

2.8. Knockdown of ABCB1 by siRNA

Stealth RNAi oligonucleotides (Invitrogen) were used for siRNA experiments. Human ABCB1-siRNA sense, 5'-UCCCGUAGAAACC-UUACAUUUUAUGG-3', and antisense, 5'-CCAUAAAUGUAAGGUUU-CUACGGGA-3', sequences were used. For a negative control, the Stealth RNAi Low GC Negative Control Duplex (Invitrogen) was used. The Stealth RNAi oligonucleotides were transfected into HeLa cells by using Lipofectamine RNAi MAX according to the manufacturer's protocols. After two days, the cells were exposed to 50 µg/mL Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. After incubation, cells were washed with HBSS, and then incubated for another 2 h in HBSS without polymers. Cells were collected, and the intracellular polymers were quantified as described in Section 2.3.

2.9. Western blotting

Cells were washed with PBS and lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 10% glycerol; and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors, namely, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (5–20%) and transferred to a Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The blots were probed with anti-MDR (G-1) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and developed with anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK) by chemiluminescence.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties of Dox-bound micelles

The micelle carrier (Fig. 1) consisted of a block copolymer of PEG (molecular weight about 5000) and poly(aspartic acid) (polymerization degree, 30). To increase the hydrophobicity of the inner core, Dox was partially conjugated (about 45%) to the side chain of the aspartic acid. Because particle size affects the intracellular uptake of nanoparticulate formulations, we first examined the particle size of the micelles without free Dox. The Dox-bound micelles had a hydrodynamic diameter of about 42 nm at the dosed concentration of 50 µg/mL (Fig. 2a). AFM measurement of the micelles also confirmed that they were spherical with a particle size of around 40 nm (Fig. 2b). This size of micelle without free Dox is very similar to that of the micelles containing free Dox in the inner core that interacts with the conjugated Dox (Nakanishi et al., 2001), indicating that the presence of incorporated free Dox does not change the average diameter much.

Table 1
IC50 values (µg/mL).

24 h			48 h		
Dox-bound polymer	Micelle incorporating free Dox	Free Dox	Dox-bound polymer	Micelle incorporating free Dox	Free Dox
>10	0.37	0.27	>10	0.045	0.024

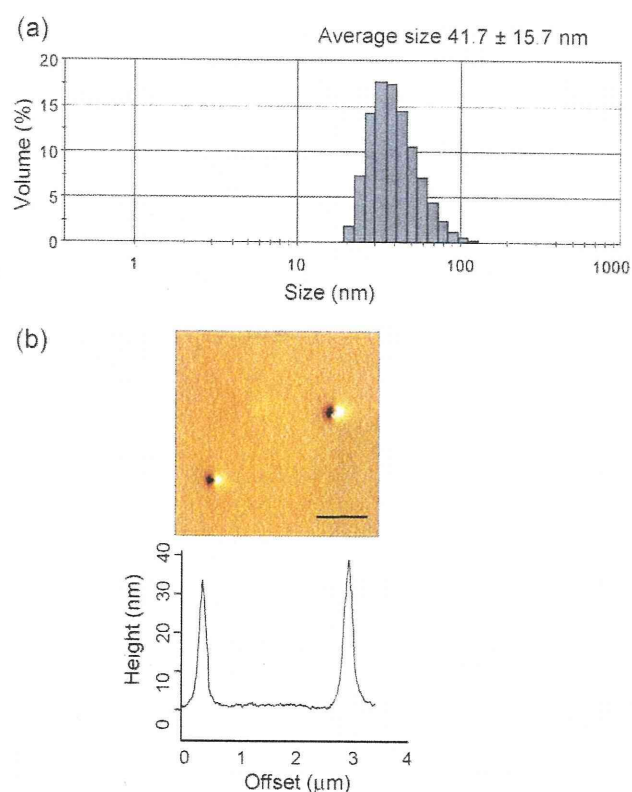


Fig. 2. Physicochemical properties of Dox-bound polymeric micelles. (a) Average size distribution of Dox-bound polymeric micelles by DLS. (b) The upper image shows an AFM image of Dox-bound polymeric micelles (bar: 1 µm) and the lower shows the cross-sectional topological profile of the image drawn in the upper panel.

3.2. In vitro cytotoxicity

We examined the *in vitro* cytotoxicity of the Dox-bound copolymers and the micelles incorporating free doxorubicin. As shown in Table 1, the cytotoxicity of doxorubicin-bound copolymers was negligible. This fact has been also reported in the previously published paper (Nakanishi et al., 2001). On the other hand, micelles incorporating free doxorubicin showed equivalent *in vitro* cytotoxic activity to free doxorubicin which is not incorporated into micelle. Therefore, in this system, the doxorubicin was conjugated to the block copolymer to increase the hydrophobicity of the inner core of the micelle so that efficient amount of free doxorubicin can be incorporated into the inner core of the micelles, and its cytotoxicity was negligible.

3.3. Intracellular uptake of Dox-bound polymers

To evaluate the intracellular uptake of Dox-bound polymers, we measured their intracellular amount by quantitating the doxorubicinone released from the intracellular polymers by acid hydrolysis treatment (Fig. 1b). Although the Dox-bound polymers contained 0.02% (w/w) free doxorubicinone as an impurity, no inherent free doxorubicinone was detected in the cells in any of the experiments in which we measured the intracellular concentration of doxorubicinone without acid hydrolysis. This result also indicates that

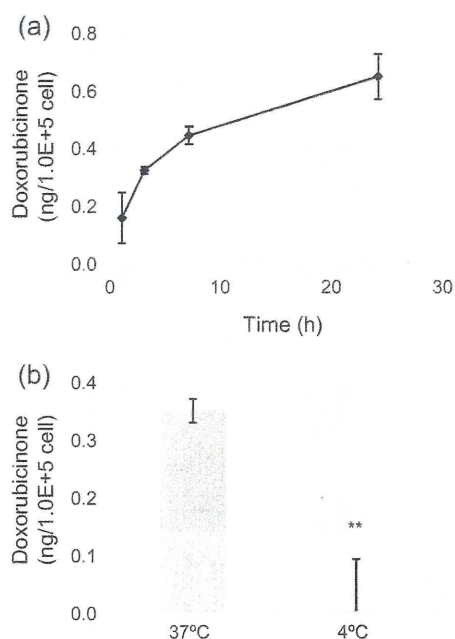


Fig. 3. Internalization of Dox-bound polymers. (a) Change in the internalized amount of Dox-bound polymers in cells as indicated by released doxorubicinone over time. HeLa cells were incubated in medium containing Dox-bound polymers for the indicated durations, followed by washes with PBS. The doxorubicinone released by acid hydrolysis was quantitated as a measure of the amount of intracellular polymers, as described in Section 2. (b) Effect of temperature on the internalization of Dox-bound polymers. HeLa cells were incubated in medium containing Dox-bound polymers at 37 °C or 4 °C for 3 h, followed by washes with PBS. The amount of intracellular polymers was quantitated by measuring the doxorubicinone released by acid hydrolysis, as described in Section 2. ** $P < 0.01$.

degradation of Dox-bound polymers that releases doxorubicinone during the experiments was negligible.

We then incubated HeLa cells in medium containing Dox-bound polymers for 1–24 h. After the incubation, the cells were washed. By determining the amounts of doxorubicinone released from Dox-bound polymers by acid hydrolysis of the cells, we were able to observe a time-dependent increase in the intracellular amount of Dox-bound polymers (Fig. 3a). Moreover, the amount of polymers in cells was significantly lower in cells incubated with the polymers at 4 °C than at 37 °C (Fig. 3b), indicating that the cells took up the polymers by endocytosis.

3.4. Intracellular distribution of Dox-bound polymers

The intracellular distribution of Dox-bound polymers was studied by confocal microscopy using the inherent fluorescence of the Dox covalently bound to the block copolymers. The Dox-bound polymers were localized in the perinuclear regions but not in the nucleus (Fig. 4a). This was different from the localization of free Dox which was distributed in the nucleus after 1 h (Fig. 4b), as reported previously (Beyer et al., 2001). This distribution will explain the fact that *in vitro* cytotoxicity of Dox-bound polymers was negligible (Table 1). To confirm that the Dox was not released from block copolymers as doxorubicinone (Fig. 1b) during the incubation time of the experiment, Dox-bound polymers were incubated in cell culture medium for 1 h at 37 °C, and then removed by centrifugal filtration using a Microcon YM-3 tube (Millipore, MA, USA). The resultant filtrate was added to the cell culture medium. Confocal microscopy showed no fluorescence within the cells (Fig. 4c). Furthermore, when HeLa cells were cultured in cell culture medium containing 20 ng/mL free doxorubicinone, which corresponds to 0.02% (w/w) of Dox-bound polymers, for 24 h, fluorescence was negligible within the cells (Fig. 4d). These results show that the fluorescence

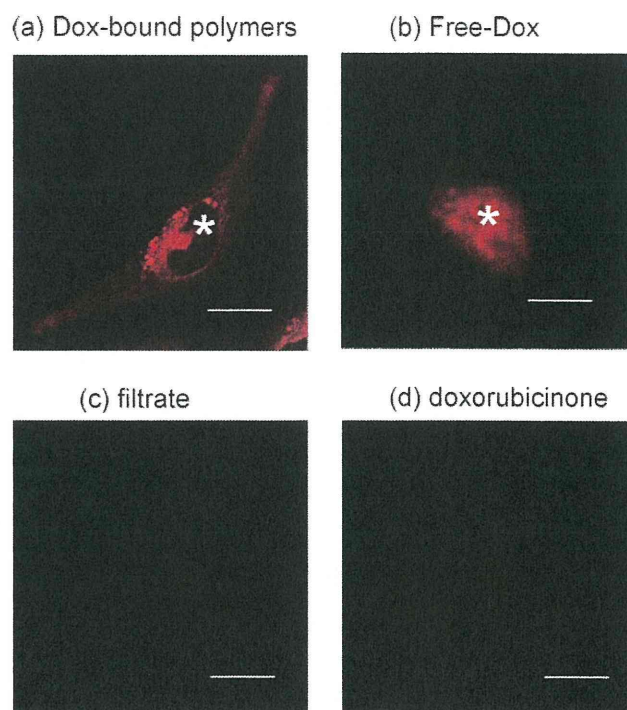


Fig. 4. Intracellular distribution of (a) DOX-bound polymers in HeLa cells exposed to 50 $\mu\text{g/mL}$ Dox-bound polymers and (b) free DOX in cells exposed to 5 $\mu\text{g/mL}$ free Dox for 1 h. Intracellular distribution of DOX-bound polymers in HeLa cells (c) cultured for 24 h in medium containing the filtrate of medium that was preincubated with Dox-bound polymers, and (d) cultured with 20 ng/mL free doxorubicinone for 24 h. Bars: 10 μm . Asterisk indicates the nucleus.

seen within the cells after Dox-bound polymer incubation is caused by the uptake of polymers and not by free doxorubicinone or Dox.

We next examined the intracellular localization of Dox-bound polymers by colocalization studies using fluorescent organelle markers. The fluorescence derived from Dox-bound polymers coincided well with the specific staining of the ER by ER-Tracker in double-labeling experiments (Fig. 5a). High-resolution images showed that both staining procedures clearly stained membranous structures (Fig. 5b).

Because the Golgi apparatus is also located in the perinuclear area and is involved in the intracellular transport of various molecules, we investigated the localization of the polymers by transfecting cells with an expression construct containing ECFP fused to a Golgi-specific protein. As shown in Fig. 5c, the distribution of polymers in the Golgi was negligible. We also confirmed that treatment of cells with Lipofectamine treatment did not affect the distribution of polymers (data not shown).

To what, then, can this particularly strong staining of the perinuclear areas be attributed? The perinuclear area is known to be the microtubule-organizing center (MTOC), an area in eukaryotic cells from which microtubules emerge and where endosomes and other endocytotic vesicles cluster (Matteoni and Kreis, 1987). In fact, a fluorescent staining image showed that the vesicles containing Dox-bound polymers in the perinuclear area (Fig. 6a, yellow arrows) coincided with the MTOC, as marked by Alexa-transferrin, an endocytic marker (Fig. 6a, white arrows). Some of the vesicles containing polymers were also stained by LysoTracker, a dye that specifically stains lysosomes (Fig. 6b). These results show that the polymers are internalized by endocytosis and transported to endosomal/lysosomal compartments. Duncan and colleagues, examined the localization of polymers by using Oregon Green as a fluorescent tag and found that three water-soluble polymeric carriers, *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, Dextran, and PEG, localized to late

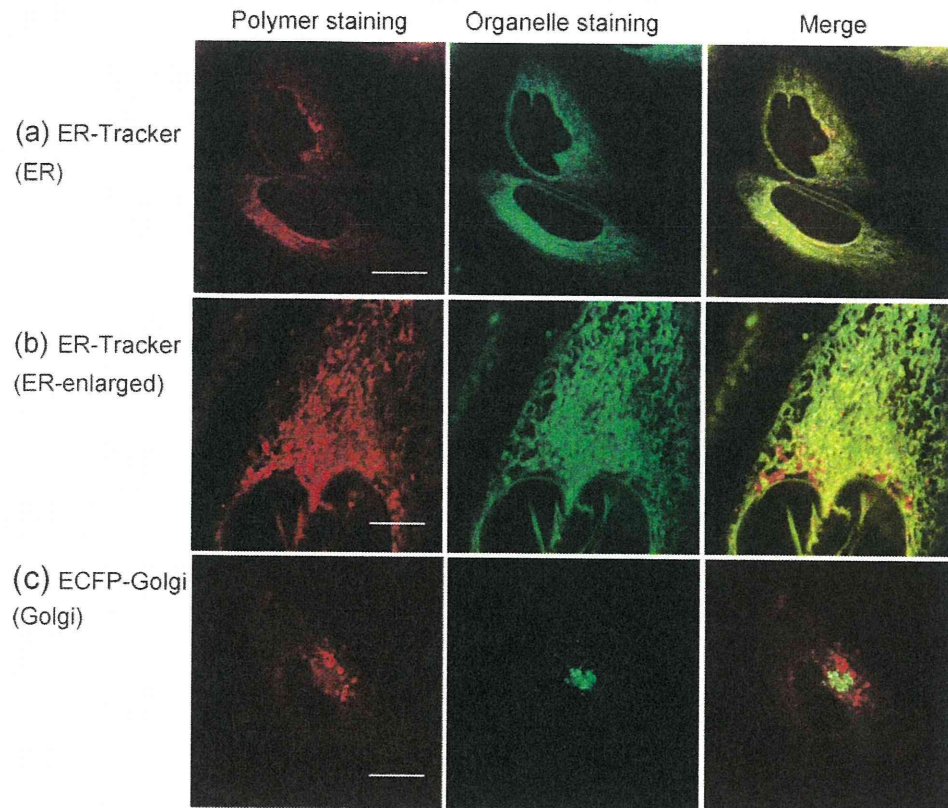


Fig. 5. Localization of Dox-bound polymers in cells co-stained with organelle-specific markers. Left, images of stained Dox-bound polymers; middle, organelle-specific fluorescent staining images; right, merged images of the left and middle images. Localization experiments using, (a and b) ER-Tracker for ER, (c) ECFP-Golgi for Golgi. Bars: 10 μm for (a) and (c). Bars: 5 μm for (b).

endosomal compartments (including lysosomes) (Richardson et al., 2008), findings consistent with our results. The perinuclear localization of the polymers is a great advantage of this system with regard to the incorporation of a nuclear-targeted drug or gene.

Most nanomaterials have been shown to exploit more than one pathway to gain cellular entry, and the pathway exploited can determine the intracellular fate (Sahay et al., 2010a). After internalization into HeLa cells, the Dox-bound polymers might

be delivered to the ER directly from endosomes; in the case of cholesterol, there is some evidence for a direct pathway from endosomes to the ER (Ioannou, 2001; Mineo and Anderson, 2001). Or the polymers might be delivered to the ER directly, bypassing the endosomes/lysosomes, as do unimers of the amphiphilic triblock copolymer of poly(ethylene oxide), poly(propylene oxide), and Pluronic P85 (Sahay et al., 2010b). Simian virus 40 is known to enter the cytosol *via* the ER, suggesting that polymers distributed

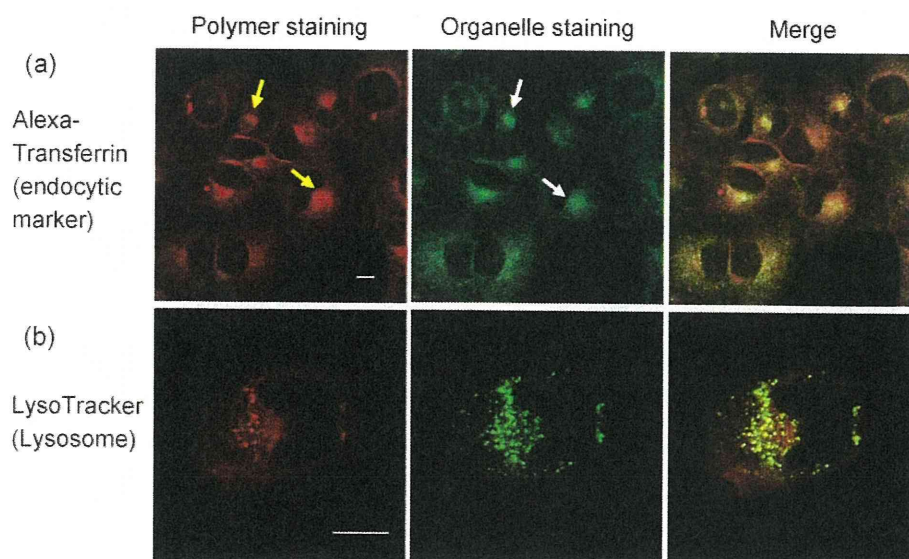


Fig. 6. Fluorescent staining images of Dox-bound polymers in cells co-stained with organelle-specific fluorescent staining images; right, merged images of the left and middle images. Localization experiments using, (a) Alexa-transferrin, an endocytic compartment marker, and (b) LysoTracker, which is specific for lysosomes. Bars: 10 μm . Yellow and white arrows in (a) indicate the MTOC area.

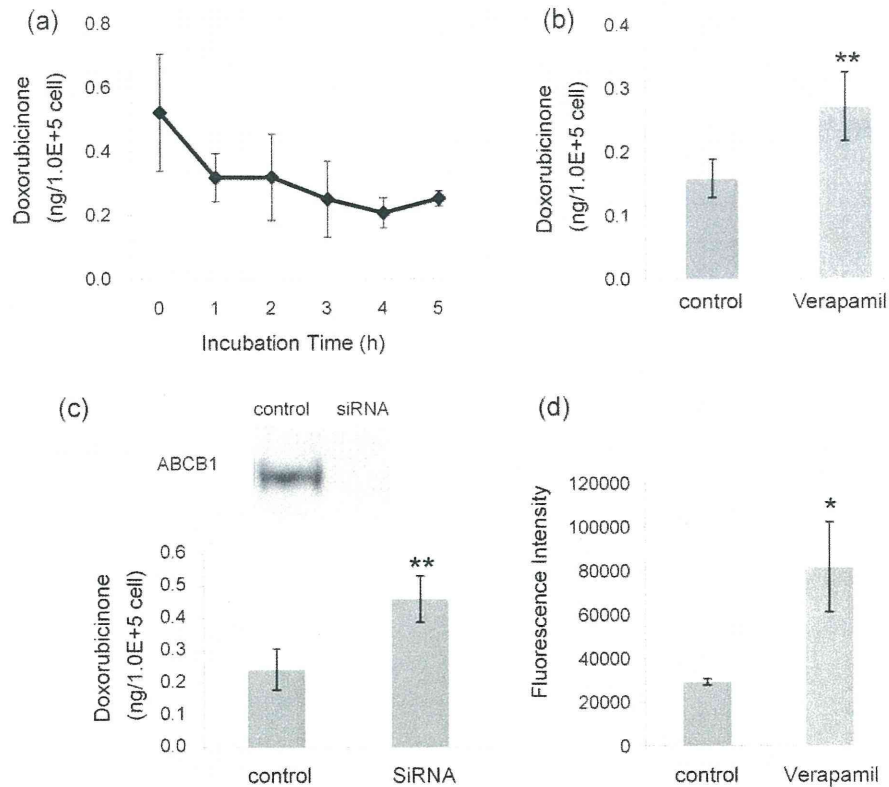


Fig. 7. Efflux of Dox-bound polymers. (a) Time-dependent change in intracellular Dox-bound polymers as indicated by released doxorubicinone. After incubation in medium with Dox-bound polymers, HeLa cells were washed and incubated with HBSS at 37 °C for the indicated durations. The doxorubicinone released by acid hydrolysis was quantitated as the amount of intracellular polymers as described in Section 2. (b) Effect of ABCB1 transporter on the efflux of Dox-bound polymers. HeLa cells were exposed to 50 µg/mL Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. Cells were washed with 50 µg/mL verapamil or 0.1% dimethyl sulfoxide as a control. Then, the cells were incubated for another 2 h in HBSS containing the same concentration of each reagent. The amount of intracellular polymers was quantitated as the amount of doxorubicinone released by acid hydrolysis, as described in Section 2. ** $P < 0.01$. (c) Effect of the knockdown of ABCB1 transporter expression by siRNA on the efflux of Dox-bound polymers. Expression of ABCB1 in cell extracts was analyzed by immunoblot analysis (top). After 2 days of siRNA transfection, the cells were exposed to 50 µg/mL of Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. After incubation, the cells were washed with HBSS and then incubated for another 2 h in HBSS without polymer. The amount of intracellular polymers was quantitated as the amount of doxorubicinone released by acid hydrolysis, as described in Section 2 (bottom). ** $P < 0.01$. (d) Effect of ABCB1 transporter on the efflux of DBD-labeled polymers. HeLa cells were exposed to 50 µg/mL DBD-labeled polymers in culture medium for 24 h. Cells were washed with 50 µg/mL verapamil or 0.1% dimethyl sulfoxide as a control. Then, the cells were incubated for another 2 h in HBSS containing the same concentration of each reagent. The fluorescence intensity in a single cell was calculated as described in Section 2. * $P < 0.05$.

in the ER might similarly gain access to the cytosol (Damm et al., 2005). The characteristic distribution pattern of the polymers did not change much with increasing incubation times from 0.5 to 24 h (data not shown). Although it is not clear whether the polymers maintain their structure as globular micelles or exist as unimers after internalization into a cell, increasing the dosed polymer concentration to 1 mg/mL did not change the staining pattern (data not shown). Recently, we showed PEG and poly(glutamic acid) block copolymer micelles incorporating dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) selectively dissociate within late endosomes (Murakami et al., 2011), suggesting that the Dox-bound polymers might also dissociate.

3.5. Efflux of Dox-bound polymers from HeLa cells to medium

As described in Section 3.2, the amount of intracellular Dox-bound polymers increased with time when cells were continuously exposed to Dox-bound polymers (Fig. 3a). In contrast, the amount of Dox-bound polymers gradually decreased after the Dox-bound polymers were removed from the medium (Fig. 7a). Interestingly, this decrease in the intracellular amount of Dox-bound polymers was abolished in the presence of verapamil, an inhibitor of ABCB1 (ATP-binding cassette protein B1) transporter (Fig. 7b). The ABCB1 transporter, which is also known as multidrug resistance 1 (MDR-1) or P-glycoprotein, is a member of the ABC-type transporter family and an efflux pump for various drugs. To further investigate the

role of this transporter in the efflux of Dox-bound polymers from cells to medium, small interference RNAs (siRNAs) were used to target ABCB1 RNA in HeLa cells. Two days after transfection of synthetic siRNA, Western blot analysis showed that levels of ABCB1 protein expression in siRNA-transfected HeLa cells were drastically decreased (Fig. 7c), and the efflux of Dox-bound polymers from these cells was also significantly inhibited (Fig. 7c). The efflux of DBD-labeled polymers was also inhibited by ABCB1 transporter inhibitor, when intracellular fluorescence intensity of DBD-labeled polymers was measured (Fig. 7d). These results suggest that ABCB1 transporter is a key regulator of the clearance of Dox-bound polymers from HeLa cells.

It is reported that drug-binding site of ABCB1 transporter is located at a drug binding pocket that is formed by transmembrane segments and allow access of molecules directly from the membranes (Aller et al., 2009; Loo et al., 2003a,b). Furthermore, it is also known that subdomains of the ER form close contact with plasma membrane and some proteins may regulate the formation of direct membrane contacts that facilitate sterol exchange between the ER and plasma membrane (Ikonen, 2008).

Therefore, it is probable that a part of Dox-bound polymers localized in ER are transported to plasma membrane and then recognized at the drug binding site in the transmembrane segments of ABCB1 transporter.

In general, the ABCB1 transporter has very broad substrate specificity: recent studies have shown that it mediates the efflux

of a relatively large peptide, amyloid β peptide (molecular weight, 4.5 kDa), across the blood–brain barrier into the bloodstream (Cirrito et al., 2005; Kuhnke et al., 2007; Lam et al., 2001). To the best of our knowledge, the ABCB1 transporter has not been reported before to be involved in the clearance of block copolymers from cells. Because ABCB1 transporter is expressed primarily in certain normal cell types in the liver, kidney, and jejunum (Thiebaut et al., 1987), the role of ABCB1 transporter as excretion pump of Dox-bound polymer and the effect of ABCB1 transporter on the polymer blood level are probably significant from a safety perspective.

Taken together, the findings presented here suggest that Dox-bound polymers are incorporated by endocytosis. Some of the incorporated polymers are transferred to the endosome/lysosome system, and the rest may bypass the endosomal system. Then, the polymers are likely delivered to other compartments, including ER and the plasma membrane. The excretion of excess polymers from the cells is mediated by the ABCB1 transporter. Although in this system, the conjugated Dox was not designed to be released from the polymers, our results concerning intracellular trafficking and clearance of polymers would be very useful to design the carrier system where bound drugs are released from the carrier for pharmacological activity.

4. Conclusion

We investigated the intracellular trafficking of Dox-bound polymers. The polymers are internalized into cells by endocytosis, then transported to endosomal/lysosomal compartments, followed by partial distribution to the ER, or transported directly to the ER. The active excretion of the polymers from the cells may be mediated by the ABCB1 transporter. It is surprising that cells utilize their endogenous transport system for intracellular trafficking of this artificial drug carrier. Our results potentially can contribute not only to the discussion of safety issues of polymeric therapeutics but also the development of a DDS strategy utilizing or targeting this endogenous pathway more effectively.

Acknowledgements

The authors are grateful for support from Research on Publicly Essential Drugs and Medical Devices (Japan Health Sciences Foundation), a Health Labor Sciences Research Grant, and the Global COE Program for the Center for Medical System Innovation, MEXT, KAKENHI (21790046), and Nippon Kayaku Co. Ltd. We thank Mr. R. Nakamura (Nikon Corp.) for technical assistance.

References

- Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A., 1999. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 16, 3–27.
- Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L., Chang, G., 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323, 1718–1722.
- Bae, Y., Kataoka, K., 2009. Intelligent polymeric micelles from functional poly (ethylene glycol)-poly (amino acid) block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 768–784.
- Beyer, U., Rothern-Rutishauser, B., Unger, C., Wunderli-Allenspach, H., Kratz, F., 2001. Differences in the intracellular distribution of acid-sensitive doxorubicin-protein conjugates in comparison to free and liposomal formulated doxorubicin as shown by confocal microscopy. *Pharm. Res.* 18, 29–38.
- Cirrito, J.R., Deane, R., Fagan, A.M., Spinner, M.L., Parsadanian, M., Finn, M.B., Jiang, H., Prior, J.L., Sagare, A., Bales, K.R., Paul, S.M., Zlokovic, B.V., Pivnicka-Worms, D., Holtzman, D.M., 2005. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 115, 3285–3290.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., Helenius, A., 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* 168, 477–488.
- Davis, B.M., Humeau, L., Slepishkin, V., Binder, G., Korshalla, L., Ni, Y., Ogunjimi, E.O., Chang, L.F., Lu, X., Dropulic, B., 2004. ABC transporter inhibitors that are substrates enhance lentiviral vector transduction into primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 104, 364–373.
- Ferrari, M., 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* 5, 161–171.
- Hamaguchi, T., Kato, K., Yasui, H., Morizane, C., Ikeda, M., Ueno, H., Muro, K., Yamada, Y., Okusaka, T., Shirao, K., Shimada, Y., Nakahama, H., Matsumura, Y., 2007. A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. *Br. J. Cancer* 97, 170–176.
- Hopkins, A.L., Groom, C.R., 2002. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 727–730.
- Hughes, B., 2009. Gearing up for follow-on biologics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 181.
- Ikonen, E., 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 125–138.
- Illum, L., Davis, S.S., Müller, R.H., Mak, E., West, P., 1987. The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a blockcopolymer-polyamine 908. *Life Sci.* 40, 367–374.
- Ioannou, Y.A., 2001. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 657–668.
- Kataoka, K., Kwon, G.S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., 1993. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J. Control. Rel.* 24, 119–132.
- Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y., 2001. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 113–131.
- Kolwankar, D., Glover, D.D., Ware, J.A., Tracy, T.S., 2005. Expression and function of ABCB1 and ABCG2 in human placental tissue. *Drug Metab. Dispos.* 33, 524–529.
- Kuhnke, D., Jedlitschky, G., Grube, M., Krohn, M., Jucker, M., Mosyagin, I., Cascorbi, I., Walker, L.C., Kroemer, H.K., Warzok, R.W., Vogelgesang, S., 2007. MDR1-P-glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer's amyloid- β peptides – implications for the mechanisms of A β clearance at the blood–brain barrier. *Brain Pathol.* 17, 347–353.
- Kuroda, J., Kuratsu, J., Yasunaga, M., Koga, Y., Saito, Y., Matsumura, Y., 2009. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int. J. Cancer* 124, 2505–2511.
- Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.-M., Sharom, F.J., Reiner, P.B., 2001. β -Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J. Neurochem.* 76, 1121–1128.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., Kwon, G.S., 2002. Poly(ethylene oxide)-block-poly (L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 169–190.
- Lee, S.M., Kim, J.S., 2005. Intracellular trafficking of transferrin-conjugated liposome/DNA complexes by confocal microscopy. *Arch. Pharm. Res.* 28, 93–99.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M., 2003a. Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 13603–13606.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M., 2003b. Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *J. Biol. Chem.* 278, 50136–50141.
- Manunta, M., Izzo, L., Duncan, R., Jones, A.T., 2007. Establishment of subcellular fractionation techniques to monitor the intracellular fate of polymer therapeutics. II. Identification of endosomal and lysosomal compartments in HepG2 cells combining single-step subcellular fractionation with fluorescent imaging. *J. Drug Target.* 15, 37–50.
- Matsumura, Y., Maeda, H., 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46, 6387–6392.
- Matsumura, Y., Hamaguchi, T., Ura, T., Muro, K., Yamada, Y., Shimada, Y., Shirao, K., Okusaka, T., Ueno, H., Ikeda, M., Watanabe, N., 2004. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *Br. J. Cancer* 91, 1775–1781.
- Matteoni, R., Kreis, T.E., 1987. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* 105, 1253–1265.
- Mineo, C., Anderson, R.G., 2001. Potocytosis. Robert Feulgen lecture. *Histochem. Cell Biol.* 116, 109–118.
- Murakami, M., Cabral, H., Matsumoto, Y., Wu, S., Kano, M.R., Yamori, T., Nishiyama, N., Kataoka, K., 2011. Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Sci. Transl. Med.* 3, 64ra2.
- Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K., 2001. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J. Control. Rel.* 74, 295–302.
- Nishiyama, N., Kataoka, K., 2006. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. Ther.* 112, 630–648.
- O'Brien, M.E.R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P., Orlandi, F., Mellars, L., Alland, L., Tendler, C., 2004. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 15, 440–449.
- Olson, R.D., Mushlin, P.S., Brenner, D.E., Fleischer, S., Cusack, B.J., Chang, B.K., Boucek Jr., R.J., 1988. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 3585–3589.

- Rejman, J., Bragonzi, A., Conese, M., 2005. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.* 12, 468–474.
- Richardson, S.C., Wallom, K.L., Ferguson, E.L., Deacon, S.P., Davies, M.W., Powell, A.J., Piper, R.C., Duncan, R., 2008. The use of fluorescence microscopy to define polymer localisation to the late endocytic compartments in cells that are targets for drug delivery. *J. Control. Rel.* 127, 1–11.
- Sahay, G., Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2008. Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug. Chem.* 19, 2023–2029.
- Sahay, G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V., 2010a. Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Rel.* 145, 182–195.
- Sahay, G., Gautam, V., Luxenhofer, R., Kabanov, A.V., 2010b. The utilization of pathogen-like cellular trafficking by single chain block copolymer. *Biomaterials* 31, 1757–1764.
- Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T., 2010. Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 878, 1466–1470.
- Savić, R., Luo, L., Eisenberg, A., Maysinger, D., 2003. Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles. *Science* 300, 615–618.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7735–7738.
- Torchilin, V.P., 2002. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 235–252.
- Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., Gao, Z., Papahadjopoulos-Sternberg, B., 2003. Immunomicelles: targeted pharmaceutical carriers for poorly soluble drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6039–6044.
- Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K., Kataoka, K., 1999. Selective delivery of adriamycin to a solid tumor using a polymeric micelle carrier system. *J. Drug Target.* 7, 171–186.

日本薬局方の今とこれから

川西 徹
Toru KAWANISHI
国立医薬品食品衛生研究所副所長

1 はじめに

日本薬局方(日局)の歴史を振り返ると、1886年に初版が発布されているが、明治政府がその制定を決定し発行の準備を開始したのは1880年である。この年は日本薬学会が誕生した年でもあり、日局の誕生にかかわられた先達の多くは同時に日本薬学会の誕生にもかかわっておられる。このように日局はその誕生から日本薬学会と関連が深い。以来130有余年、医薬品を巡る環境の変化に対応しつつ、共に歴史を積み重ねている。本稿では、日局の現在についてまとめるとともに、日局周辺の状況の変化、さらには日局の今後を考えてみたい。

2 日局とは?

薬局方とは「医療上重要と認められる医薬品の性状および品質などを定めた“医薬品の規格基準書”」である。世界を見渡すと、薬局方は各国単位あるいは各地域単位で発行されており、ほとんどの薬局方は公定書(=政府が法律に基づいて規格・基準を定めて公布する文書)である。日局の場合、薬事法第41条で「厚生労働大臣は、医薬品の性状及び品質の適正を図るため、薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、日本薬局方を定め、これを公示する」と位置付けられており、法律ではないが、薬事法との連動によって法律に準じる機能を有する。また、我が国における「医薬品」は薬事法第2条で規定されているが、その第1項は「日本薬局方に収められているもの」とされており、さらに薬事法第56条では「販売し、授与し、又は販売若しくは授与の目的で製造し、輸入し、貯蔵し、若しくは陳列してはならない(医薬品)」の第1項として、「日本薬局方に収められている医薬品であって、その性状又は品質が日本薬局方で定める基準に適合しないもの」となっている。したがって日局で定める規格・基準に適合しないものの流通等は、すなわち薬事法違反の対象となる。

日局は通則(日局の記載、解釈、運用全般にわたる原則)、総則(生薬総則、製剤総則)、一般試験法(共通性の高い試験方法)、医薬品各条(収載医薬品毎の規格および試験方法)、参照スペクトル、その他(参考情報等)からなるが、単に日局収載医薬品ばかりでなく、新薬や後発品を含めた医療用医薬品はもちろん、一般用医薬品さらには薬局製剤に至るまで、我が国の医薬品の品質管理において参照すべき品質規範書と位置付けられる。このように日局は、製薬企業や規制当局にとって極めて重要なものである。また薬局が調剤業務を行う場合にも、局方試験法は重要である。さらに我が国では、薬学教育の場で薬局方は医薬品の品質試験法を学ぶテキストとして長年使用されてきた。

3 日本薬局方の今

1. 日局の改正

日局を所管するのは厚生労働省医薬食品局であるが、現在日局改正案作成の審議は医薬品医療機器総合機構(PMDA)に設置されている日本薬局方原案審議委員会が行っている(事務局は規格基準

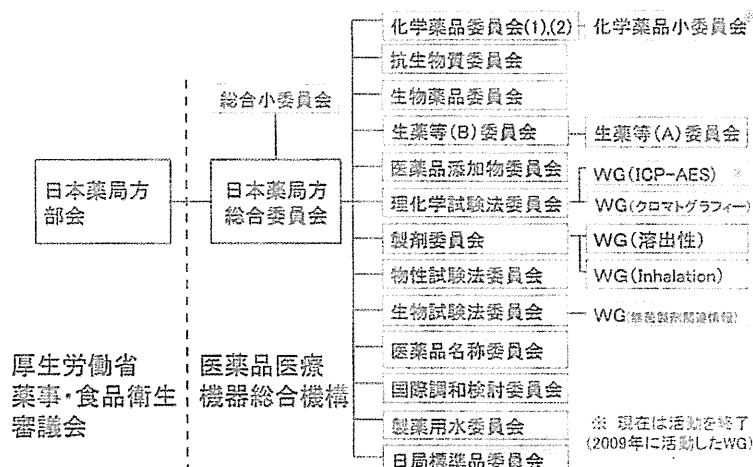


図1 日本薬局方改正の審議体制

部医薬品基準課)。原案審議委員会は図1に示す構成となっているが、これらの委員会には延べ400人余の産官学の専門家が参画している。原案審議委員会で作成された改正原案は、薬事・食品衛生審議会に報告され、日本薬局方部会での審議を経て改正案として承認される。この間PMDAから1回以上、厚生労働省から1回の意見公募が行われる。

日局の改正については、薬事法第41条第二項により少なくとも10年に1度は全面改正するとされているが、第9改正(1976年)以降は5年ごとに全面改正が行われている(さらに第12改正からは全面改正の間に2度の追補が発行されている)。その第16改正日本薬局方(日局16)が、2011年3月24日に告示されたところである。

2. 日局16

日局16では医薬品を巡る環境の変化を反映した広範な改正が行われたが、主要な改正点は次の通りである：①製剤総則の大改正、②水各条に関する改正、③生薬等の医薬品各条の成分含量測定法の項の改正、④試薬・試液の名称改正、⑤JIS廃止試薬の規格案の作成、⑥医薬品各条の含量規格値の改正、⑦溶出性の項の記載整備。また、医薬品各条への新規収載品目数は106(化学薬品87、抗生物質3、添加物1、生薬3)にのぼり、改正された各条330(削除数15)を含み、収載品目数は1,764となった。これらの改正の詳細については、別の総説、解説¹⁾を参照いただくとして、以下、上記の主要改正点のうち、影響が最も大きいと思われる①について解説する。

日局製剤総則は医療現場で汎用される製剤を分類、定義し、それぞれについて製法、品質を保証するために必要な品質試験、品質を保持するための容器・包装、貯法等を示したものである。日局において製剤およびその関連品質管理事項を独立した製剤総則としてまとめ、主要な剤形を50音順に記載、それぞれ定義、製法等を記した局方製剤総則のスタイルが完成したのは日局7(1961年施行)であるが、以後50年近くにわたって基本的な構成は変わっていなかった。そのため、(1)臨床現場で汎用されているにもかかわらず収載されていない製剤が少なくない(例：輸液剤、透析溶剤、点耳剤、点鼻剤、舌下錠等)、(2)分類、定義が適切でない製剤がある(例：液剤の定義＝「液状の内用剤又は外用剤で、製剤総則中の他の製剤各条に該当しないもの」)、(3)各製剤の品質管理に必要な試験等の記載が不十分、等の問題が生じていた。そこで7年の検討期間をかけて、日局16の告示にあわせて大改正した。

日局15では、まず「1. 製剤通則」として製剤全般の共通事項が記載され、「2.」以下に50音順

に剤形名およびその説明が列記されていた。日局 16 では日局 15 同様に「製剤通則」を〔1〕としてまとめているが、さらに〔2〕は「製剤各条」とし、大分類、中分類、小分類からなる剤形分類にしたがって剤形を列記する構成とした。日局 16 製剤総則の最大の特徴は、この分類法にある。剤形をまず投与経路および適用部位の別で大分類し、さらに剤形の形状、機能、特性から分類する方法を採用している。投与経路や適用部位により剤形を分類してみると、臨床で使用されている製剤の全体像を把握しやすくなるだけでなく、品質管理上の留意点にも共通点が多いため、品質規範書である日局として品質管理に必要な要件をまとめる上でも適切な分類法といえる。

次いで、大分類した剤形を形状等から中分類し規定した(例；経口投与する剤形では錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤など主要な剤形への分類)。さらに中分類で規定された各々の剤形について、必要に応じて特徴のある剤形を規定して小分類した(例；錠剤では口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠など特別の機能を有する剤形)。分類した剤形の記載順序は、汎用性、重要性、性状、用途を基準に優先順位を付け、優先順位が付けられないものについては 50 音順とした。なお、主として生薬を原料とする製剤剤形である生薬関連製剤は、〔2〕製剤各条の後に、〔3〕生薬関連製剤各条としてまとめて記載した。

製剤各条に挙げた剤形については、まず剤形の定義、次に製法、さらに品質管理上当該製剤が有すべき製剤特性およびその試験、次に容器・包装および貯法について記した。剤形の定義は妥当なものについては極力日局 15 製剤総則の定義を踏襲したが、散剤、顆粒剤、軟膏剤等については、合理性や国際的整合性に配慮し定義の変更を行った(詳細は別の総説³⁾を参照)。

4 日本薬局方を巡る問題とこれから

1. 異図的混入物質に対する日局の対応

近年、医薬品の原材料の調達、製造、流通の国際化が著しい。このような環境の変化の中、従来では考えられなかった医薬品への異図的な混入物質による健康被害が起こっている。最も有名な事例は、グリセリンへのジエチレングリコール(DEG)の混入である。新聞でも大きく報道されたが、中国で製造された DEG にグリセリンのラベルが貼られ、スペインを経てパナマに輸入され、風邪薬用シロップの原料として使われたために多数の幼児が死亡した。⁴⁾ 同様の DEG 混入は西アジア、アフリカでも頻繁に起こっており、米国 FDA は米国薬局方 USP に対して、グリセリンの確認試験として DEG の混入否定試験を追加するよう強く要請した。同様な事件はヘパリン製剤でも起こり、過硫酸化コンドロイチン硫酸(OSCS)が混入された中国産ヘパリンを使用して製造されたヘパリン製剤によって、多数の患者にアレルギー反応などによる重篤な副作用が米国およびドイツで起こった。⁵⁾ この事件への対応についても、FDA は USP に対してヘパリンの確認試験として OSCS の混入否定試験を追加するように強く要請し、USP はこれらの要請に応じた。

薬局方国際調和の場で上記 USP の改正対応がテーマとして挙がり、日局原案審議委員会で日局の対応を検討したところ、「異図的、犯罪的に加えられる混入物質への対応は GMP レベルの問題であり、本来薬局方でカバーする問題ではない」という意見と、「公衆衛生上の薬局方の役割を考えれば、実際にリスクが想定される場合は、日局が対応することも選択肢とすべき」という意見が対立した。最終的には医薬食品局審査管理課の判断により、グリセリンとヘパリンについてはそれぞれ上記異図的混入物について純度試験を追加することで決着した。

その後米国では、同様の異図的混入物質(エチレングリコールやメラミン)の医薬品原料への混入に対する対応要請が引き続き FDA から USP になされ、薬局方のあるべき姿と国際調和の狭間の中で、日局としての対応について議論が継続している。

2. 製造工程の違いへの対応および医薬品品質管理の新しい潮流

薬局方は医薬品の規格基準書であり、一般試験法に従って医薬品各条の規格試験を行い、規格値を満足すれば、医薬品として認められる。一方で、同じ有効成分からなる原薬であっても製造方法が異なれば不純物は異なる。したがって製法が異なる医薬品について、同一の不純物規格で妥当か、という問題がある。この問題に対して欧州薬局方 EP では、純度試験として、異なる製造業者によって製造された製品に検出される不純物を網羅するという方策を採用している。ただし、日局がこの方策を採用するには、改正に係わるリソースに限界があるなかで、今後ともフォローが可能かを見極める必要がある。

今後、各条への収載が増えることが予想される組み換えタンパク質性医薬品の場合は、更に問題は複雑である。これら医薬品の場合有効成分においても分子多様性を示す製品が多く、不純物のみならず、有効成分においても同一規格での規格設定が妥当か考えなければならない製品が増える。

その他、医薬品製剤の各条への収載に際しては、現在は同一有効成分かつ同一剤形に分類される製剤については、同一規格として収載することを基本としている。しかしながら、製剤設計が異なる製剤を、同一規格でどこまで規格設定が可能か、見極める必要がある。

現在日局では、上記のように製品間で一律の規格設定が妥当ではない規格項目については、「別に規定する」として、個別の製品の具体的な規格は承認申請書に規定する方法が可能となっている。しかしこの方法を多用することは、取りも直さず日局の規格は製品品質の一定性担保に十分ではないことを示すこととなり、規格基準書としての立場を弱める可能性がある。

現在、医薬品品質管理の現場では、製品の品質の一定性を確保するための方法として、最終製品の規格試験に加え、製造工程管理を採用するケースが増えている。さらに、品質管理の新しい潮流として、ICH では quality by design (QbD) という考えが提案され、この考えに沿った品質ガイドランスの国際調和が進んでいる。この手法は科学的体系的に製造工程を設計し管理するという考えに基づくものであるが、品質管理の方法としては、最終製品の規格に代えて、製造工程中での試験あるいは製造工程の管理による製品品質の一定性の保証に重きを置くという方法である。QbD によって開発、製造されている医薬品はまだ少ないが、米国あるいは欧州の規制当局は QbD 的な医薬品開発手法を推奨しており、これらの医薬品をやがて薬局方に収載する場合に、問題が生じることが予想される。すなわち、現在の日局は最終製品の規格での品質基準が主体であり、製造工程管理を取り入れるのに十分なフレームワークとなっていない。

3. 薬局方の国際調和

1) 日米欧の国際調和活動の進捗

様々な分野で国際化が進捗しているなか、薬局方も例外ではなく、国際調和の必要性が叫ばれている。日局にとって国際調和活動は既に 20 年に及んでおり、日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) 開始とほぼ同じ時期に、薬局方検討会議 (PDG) で USP, EP と日局間の国際調和が開始されている。調和対象は、一般試験法と添加物各条である。国際調和の状況そのものは別の総説²⁾を参照いただくとして、局方国際調和関係者としては現在までに相当の成果が得られていると考えている。しかし、薬局方国際調和は遅々として進んでいないという批判も聞こえてくる。これには、以下のような事情が考えられる。

第 1 は USP, EP, 日局はそれぞれの極での立場が異なる。JP は厚生労働省が所管しており規制当局と一体であるので、国際調和決定事項は医薬品規制の現場でもそのまま採用される。一方 USP は規制当局 FDA と別組織であり、公的なものとはいえ民間団体であるため、USP で採用されても FDA がそのまま従うということではない。EP は政府系の欧州医薬品品質理事会 EDQM が

作成しているが、欧州医薬品庁 EMA とは別の組織である。このような医薬品規制上の立場、そして局方としての構成や考えの違いは、真の国際調和を困難にする要因となっている。

第2は国際調和対象の問題である。ICH での国際調和は医薬品規制の一般原則をテーマとすることが多く、各極の規制への導入にあたって調整の余地が残されている場合が多い。一方薬局方の国際調和対象は、それまで各極で医薬品の品質管理基準となっていた試験法あるいは規格そのものであり、調整の余地は小さい。したがって、調和したとされているものでも部分調和箇所が散見される。

このような事情が関係して、日米欧三極の規制当局と業界団体から構成される ICH の場で、薬局方国際調和試験法を評価し、相互受入条件を明確にする ICH-Q4B が7年前に開始され、2010年一定の成果を得たということで活動が終了された。

このように日米欧薬局方の国際調和活動は継続されているものの、薬局方全体から見れば調和部分は一部であり、現在の国際調和活動では調和達成まであまりに時間がかかりすぎるという批判もあり、薬局方の調和を目指すより規制当局の相互認証を検討すべきという声が上がっている。

2) 日米欧以外の国際交流

従来、日局にとって国際調和活動はすなわち PDG による日米欧の国際調和であった。しかし現在、世界各地の経済的なバランスは大きく変動しており、医薬品製造、医薬品流通、医薬品消費という点で東アジア、西アジア、中南米の比重が高まっている。実際 USP は世界各地に事務所を開設、薬局方本体の普及と併せて USP 標準品の普及を進めている。近年 EP もその活動を広げており、中国あるいは韓国の研究機関と MRA を結び連携を強化している。このように主要な薬局方は、国際的普及活動を積極的に開始している。日局にも新たな戦略の構築が必要となっている。

5 おわりに：21世紀の日局であるために

以上、日局の今、そしてこれから対応すべき問題についてまとめた。日局 16 を含め、日局改正関連の情報は、PMDA の日局ホームページ(<http://www.pmda.go.jp/kyokuhou.html>)に公開されている。ご存知のない方は是非とも一度訪れ、ご利用いただきたい。

日局については、アカデミアの先生方から、内容が古いという批判を頂くことが多い。日局は評価の定まった医薬品を収載し、各条の規格試験の内容も通常の製造所あるいはラボで実施可能な試験法を採用するため、一部のラボしか実施できないような先端的な内容を取り入れにくいという事情がある。また対象とする医薬品が広範囲にわたるため、改正の影響は極めて大きく、試験法や規格のアップデートにも相当の準備が必要という事情がある。しかし、医薬品を巡る環境の変化の中で必要な対応は行う必要がある。例えば日局 16 製剤総則の改正は、21世紀を見据え、新たに出現する医薬品製剤を日局に収載可能なフレームワークを作る作業と考えた。また製造工程の異なる医薬品、あるいは新しい開発手法で開発された医薬品を収載する柔軟なフレームワークを作ることは、近々の重要課題と考える。さらに医薬品の製造、流通の国際化の中で、薬局方共通の課題への対応策を日局が提案し、それを国際的にも提案していくことが重要と考えている。

21世紀の日局であるための知恵と工夫が試されている。

引用文献

- 1) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編, "日本薬局方試験法ガイド," じほう, 東京, 2011.
- 2) 川西 徹ほか, 薬局, 62, 100-144(2011).
- 3) 川西 徹, *Pharm. Tech. JAPAN*, 27, 15-22(2011).
- 4) McLean R., McDonald B., *The New York Times*, 2007年5月6日.
- 5) Kishimoto T. K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 358, 2457-2467 (2008).

シリーズ (医薬品評価をめぐる最近の話題)

医薬品の品質を巡る話題 —化学合成医薬品に係わるレギュラトリーサイエンス—

Recent Topics of Regulatory Science in the Quality Area of Chemical Drugs

川西 徹

Toru KAWANISHI

Abstract

Recent three topics in the quality area of chemical drugs are introduced as issues which should be addressed in regulatory science. First, health hazards by adulterated drugs have occurred under internationalization of drug production including supply of raw materials and drug distribution. To prevent the hazard, exhaustive impurity test using LC-MS may be useful when raw materials are selected. Second, application of science-based and risk-based modern quality management techniques to pharmaceutical production and quality assurance was proposed and the ICH guidelines for the application have been harmonized. For the implementation, the development and establishment of Process Analytical Technology by co-operation among industry, government and academia group are needed. Third, importance of regulatory science in development of innovative drugs is pointed out by the Council for Science and Technology Policy in the Cabinet Office. The point-to consider about quality aspects in the development of peptide drugs and nucleotide drugs should be made, because there is no consensus open.

抄 録

化学合成医薬品の品質分野において、レギュラトリーサイエンスとしての研究や議論が必要と思われる三つの話題をとりあげた。第一は医薬品製造・流通の国際化を背景に発生した、有害物質によって異図的に汚染された医薬品による健康被害である。医薬品製造原料を選択する際に、液体クロマト質量分析法によって網羅的に不純物を試験すれば、このような健康被害を未然に防ぐことができよう。第二は科学的かつリスク分析に基づいた開発手法を医薬品製造および品質管理に応用しようという提案がされ、この考えに基づいたICH品質ガイドラインの国際調和が進んでいることである。この手法を実現、普及させるには、産官学共同でプロセス解析法の開発および確立を図る必要がある。第三は総合科学技術会議によって指摘されたように、先端的医薬品開発におけるレギュラトリーサイエンスの役割の重要性である。主たる対象は再生医療製品等であるものの、化学合成医薬品類でも、ペプチド性医薬品や核酸医薬品等では、開発にあたって品質面について考慮すべき要件をまとめることは、これら医薬品の開発促進に結びつくと思われる。

Key words: quality, adulteration, QbD, peptide drug, DNA drug

1. はじめに

医薬品・医療機器を主なスコープとしたレギュラトリーサイエンス学会が設立され、活発な活動が開始された。医薬品のレギュラトリーサイエンスにかかわる産官学の意見交換の場としては、医薬品品質分野においては国内で既に医薬品品質フォーラム¹⁾、バイオロジクスフォーラム²⁾、あるいは日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会³⁾等の活動が行われており、既に8年が経過している。本稿ではこれらの活動経験をもとに、特に化学合成医薬品の品質を対象としたレギュラトリーサイエンス関連の最近のトピック、およびその課題を、オムニバスとしてまとめる。

2. 医薬品の品質とは

レギュラトリーサイエンス学会は広く医薬品の規制に係わる評価を対象とした学会であるが、学会員の皆様には、医薬品の「品質」に馴染みが薄い方もおられると思われる。そこで蛇足となるかもしれないが、「医薬品の品質とは何か？」から本稿を始めたい。

医薬品の評価の三つの要素として、有効性、安全性、品質という表現がしばしば使われる。この中で、有効性は「医薬品の効きめ」、安全性は「医薬品の有害（望まれない）作用」と表現できる。一方「医薬品の品質」はどのように表現できるか？ 工業製品の「品質」といえば、一般には「提供される製品やサービスについて、買い手側である顧客（消費者）が求める特性との合致度（合致度が高ければ品質が高いといわれる）（2011年10月29日ウィキペディア）」というように受け取られているものと思われる。この理解では、有効性、安全性も品質に含まれることとなり、また一般の方々には、「医薬品の品質」といえば、有効性や安全性をも含む概念と受け取られている方が多いと思われる。しかし、医薬品の規制においては、「医薬品の品質」という言葉はより限定された意味で使われている。即ち「物質としての医

薬品」である。

我が国では新有効成分医薬品を市販しようとする場合、申請者は規制当局に製造販売承認申請を行って審査をうける。その際、通常以下のような内容からなる申請資料およびデータを提出する。

- ① 医薬品の開発の経過（起源又は発見の経緯及び外国における使用状況）
- ② 物質としての医薬品（製造方法、物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料）
- ③ 医薬品の安定性（安定性に関する資料）
- ④ 医薬品の作用（動物や細胞等への薬理作用に関する資料）
- ⑤ 医薬品の毒性（非臨床試験での安全性に関する資料）
- ⑥ 医薬品の体内動態（吸収分布代謝排泄に関する資料）
- ⑦ 医薬品の有効性・安全性（臨床試験における治療効果、有害作用に関する資料）
- ⑧ その他

以上の中で、「品質」は②と③である。この中味をさらに分けると以下のようにまとめられる

- (ア) 医薬品の製造方法（医薬品原料および製造工程の管理方法を含む）
- (イ) 医薬品の構造および理化学的特性（タンパク質性医薬品のような生物医薬品の場合は生物学的特性も含む）
- (ウ) 医薬品の規格および試験法（医薬品が一定であることを確認するための試験セットおよび判定基準）
- (エ) 医薬品の安定性（医薬品が安定であることの確認 → 規格および保存条件の設定）

このような医薬品の「品質」部分を、米国食品医薬品庁FDAでは“CMC”と称するが、これは“Chemistry, Manufacture, Control（化学、製造、管理）”の略である。

では「医薬品の品質」の重要性は何か？ 新薬の場合、承認申請時では上記のように、非臨床試験による薬理試験、安全性（毒性）データ、臨床

試験による有効性、安全性を示すデータを提出、審査をうけ承認される。しかし、実際の医薬品には有効成分以外に不純物が含まれるが、製造企業が異なれば通常は製造方法に違いがあり、有効成分は同一でも含まれる不純物は異なる。さらに、ヒトに投与するにあたっては、有効成分は製剤化され、医薬品製剤として投与される。例えば、経口固形製剤では消化管で有効成分が溶出し、血液中に吸収され、作用部位に到達して作用を発現する。溶出率や溶出速度が異なれば作用も異なる。したがって、同じ有効成分からなる医薬品でも、製造メーカーが異なると有効性、安全性も異なる可能性があり、また同じメーカーでも製造方法が変動すると、製造ロット間で有効性、安全性が変わることがある。しかし、一度承認された医薬品は、製造方法に大きな変更がある場合を除いて、非臨床試験、あるいは臨床試験による有効性、安全性試験を繰り返すことはなく（新薬は承認後の再審査期間中、市販後調査を課せられるが、これは厳重な比較試験ではない）、医薬品の一定性は品質面での管理（製造原料、製造工程の管理、および製品規格試験からなる）によって担保される。したがって、医薬品の製造方法、および品質管理は、医薬品の有効性、安全性を保証するように設定されている必要があり、品質部分は申請者と規制当局との約定ともいえる承認事項をまとめた文書である製造販売承認申請書の中核をなす。

このように医薬品の「品質」は、物質としての医薬品を対象としたものであるが、その目的は医薬品の有効性、安全性の確保にあるといえる。

3. 医薬品の製造・流通の国際化への対応

3-1. 医薬品原料への異図的な有害物質混入事件

現在我々の身の回りを見渡すと国際化の波は著しいものがある。身の回りの品々の生産地をみると、東アジア、東南アジア、西アジア、南米、中米、東欧を含めて様々である。医薬品の場合、服装品や電化製品ほどではないが、様々な国々で製造された製品が流通するようになっている。さら

に製造原料の供給国をたどるとその範囲は一段と広がり、供給先を突き止めることが困難ともいえる状況になりつつある。

このような医薬品の製造・流通の国際化の中、ここ数年でヒトの健康に直接係わる医薬品にとって由々しき事件が発生している。その一つは医薬品添加物グリセリンへのジエチレングリコール DEG の異図的な混入による健康被害である。最も有名な事件として、中国で製造された工業用 DEG にグリセリンのラベルが貼られ、スペインの商社をへてパナマに輸入され、これを原料として製造されたシロップ風邪薬によって、多数の小児が死亡したことが国際的に報道された⁴⁾。DEG 混入は最近では日本で報道されることは少ないが、同様な事件は今でも西アジアやアフリカで繰り返し起こっている。続いて国際的に有名な事件は、抗凝固ヘパリン製剤の原料ヘパリンへの過硫酸化コンドロイチン硫酸 OSCS の異図的な混入事件である。これも中国産ヘパリン原料への混入が原因であることが明らかとなっているが、米国を中心にアレルギー反応によって多数の健康被害が生じた⁵⁾。医薬品の国際的流通が欧米ほど活発ではない日本では、幸いにも健康被害事件とはなっていないものの、日本でも OSCS が混入したヘパリン原料が見つかった。このように悪質な有害物質混入原料が、国際的な流通ルートの中で巡り巡って、地球の裏側で健康被害を起こすという事件が立て続けに起こり、米国 FDA や欧州医薬品規制当局、あるいは WHO 等は警戒を強めている。特に FDA は医薬品原料へのエチレングリコール、メラミン混入等にも注意を向けている。

3-2. 異図的な混入物質に対するレギュラトリーサイエンスの対応

現在、このような健康被害を未然に防ぐためには、どのような医薬品品質管理体制を敷くべきか、議論が行われている。米国 FDA や欧州議会は、緊急な措置としてそれぞれの域の薬局方に対応を求め、その結果、日本薬局方を含め、各域の

薬局方は純度試験等で当該異図的不純物の混入を否定する等の対応をとった。しかし、この種の混入物質に対する総合的な対策として、有機化合物医薬品原料の不純物について、網羅的な解析が可能な標準的な分離分析法の設定が重要なテーマになると思われる。分析法としては液体クロマトグラフ質量分析法 LC-MS が試験法としての網羅性、選択性という点からもっとも適していると思われる。新たに医薬品原料を調達する際は、標準的ないくつかの移動相セットで LC-MS 分析することによって、異図的な有害混入物質の混入の可能性を否定するステップを踏むことが方策としては適切と著者は考える。その際、医薬品原料群ごとの妥当な試験条件、および判定基準の設定が、レギュラトリーサイエンスの課題になると思われる。

4. 医薬品の製法開発・品質管理手法の新しい潮流とその対応

4-1. 医薬品製法開発・品質管理の新しい手法⁶⁾とは

医薬品の品質分野では、Quality by Design (QbD) アプローチという言葉に象徴される新しい医薬品製法開発・品質管理戦略が欧米から提案され、ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) においても、一大テーマとなっている。この潮流が生まれた背景は以下の通りである。

医薬品はヒトの体内に投与され健康に直接関わる製品であるため、極めて厳しい規制が行われてきた。また一度開発、承認されても、品質の向上あるいは製造コストの改善等を目指した製法変更にあたっては、規制当局による承認あるいは届出が課せられ、変更の実施までに時間、経費がかかる。そのため製造工程の変更を避ける傾向にあり、工業製品の中でも製造・品質管理は古いままであることが少なくないといわれている。一方規制側からみると、承認申請の審査ばかりでなく、製法変更に関する承認審査、さらに GMP 査察等のために大きなリソースが必要とされ、規制コストの増大を招いているといわれている。そこで、

医薬品製法開発・品質管理に新しい製造科学とリスク分析の考えを導入し、製造・品質管理を近代化しようというわけである。

この新しいアプローチでは、

- ① 医薬品製法を開発するにあたって、製剤設計を科学的に行うと同時に各種リスク分析手法を活用し、有効性、安全性に影響する製剤の品質特性パラメータを明らかにし、その許容範囲を明確にする
- ② 製造工程において、製剤の品質特性パラメータに影響する原料特性及び製造工程パラメータを特定し、品質特性パラメータと原料特性及び製造工程パラメータとの機能的関係を特定する
- ③ 以上の情報、知識をもとに医薬品製剤の適切な管理戦略を構築するという過程を踏むとされる。

この管理戦略では、最終製品の品質試験ではなく、製造工程パラメータ管理、およびプロセス解析工学 (PAT) を活用した製造工程中の試験またはリアルタイムリリース試験による管理を目指す。その際、上記②の段階で得られた情報・知識を利用して、管理値を柔軟なものとする (= デザインスペース) とともに、製品を実生産する間に得られる知識を加味して、製品ライフサイクルにわたって改善を図る。また製造工程管理が柔軟なものになった結果、規制当局の承認が必要な製法変更の機会は減り、規制コストの削減に結びつく。

4-2. QbD 的アプローチを普及させる上でのレギュラトリーサイエンスの課題

このような科学的アプローチ (= QbD アプローチ) による医薬品製法開発および品質管理手法の実現を促進する上でのレギュラトリーサイエンスの課題としては、以下のようなものが考えられる。

- (1) 重要品質特性の特定、および有効性・安全性に悪影響を及ぼさない重要品質特性の変動範囲を求めるための手法の開発、さらに関連す

る情報・知識の蓄積

製造管理に柔軟性をもたらすデザインスペースを設定するためには、重要品質特性を特定するとともに、有効性・安全性に悪影響を及ぼすことのない重要品質特性パラメータの許容幅を求める必要があるが、製品の特性上これを達成することが困難な製品群があり、QbD的手法の適用は制約される。例えば、タンパク質性バイオ医薬品の多くは、目的物質の分子多様性や、不純物のヒトにおける安全性予測の困難さ等による制約がある⁶⁾。また、小分子化学合成医薬品でも製剤に標的性を付与したDDS製剤の場合などは困難が予想される。即ち、有効性・安全性に関わる体内動態として、血中濃度を指標としたバイオアベイラビリティの評価のみでは十分ではなく、標的部位への分布を含めた生体内分布情報と品質特性との関係、および生体内分布と有効性と安全性との関係の情報が必要となる。したがって、これら製剤の場合デザインスペースの設定には困難が伴うことが予想される。

このようなバイオ医薬品やDDS製剤等における問題を克服するためには、バイオ医薬品では構造解析手法の更なる革新とともに、構造あるいは理化学的特性と生物作用の関係に関する情報の蓄積という、地道な技術的科学的情報の蓄積が必要となる。またDDS製剤のような機能性製剤においては、製剤機能に関わる製剤の理化学的特性の特定が重要であり、これらの情報の蓄積により、現状の高いハードルがやがて解消されてゆくことが期待される。

(2) 製造工程リアルタイムモニタリング手法の開発および確立

科学的アプローチを採用する効用の第一として、最終製品の出荷試験による製造管理から、工程パラメータ管理およびリアルタイムモニタリング手法を活用した製造管理を重視した、医薬品製造管理の高度化にあると考える。リアルタイムモニタリングにより製造工程中の製品の品質特性を

確認し、その結果を工程管理に反映させながら製造工程を制御することが可能になれば、高品質の製品の高効率な生産が実現し、さらにリアルタイムリリースの実現に結びつく。このような製造管理の革新を実現する上でキーとなる技術は、製造工程のリアルタイムモニタリング手法であり、今後医薬品製造管理に関わる分析技術として注力すべきポイントはこれらの手法の開発にあると考える。その例としてはイメージング手法を含めた近赤外分析法、有効成分や不純物を高速かつ定量的にモニタリングする技術として、超高压液体クロマトグラフィー (UHPLC) 等があげられる

(3) 新しい手法に関する、申請側と規制側との理解の一致

上記(1)、(2)に記したような情報・知識の蓄積、あるいは技術開発においては、製造側と規制側とが理解を一致させながら進捗させることが望ましい。その意味から、レギュラトリーサイエンスの課題とするに相応しい問題と考える。

5. 先端的医薬品の開発とレギュラトリーサイエンス

総合科学技術会議における第4期科学技術基本計画⁷⁾、あるいは医療イノベーション推進室の文書⁸⁾等の中で、我が国において先端的医薬品・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先端的医薬品としては、細胞組織加工医薬品・医療機器等のバイオテクノロジー応用製品が中心になると思われるが、核酸医薬品やペプチド性医薬品、あるいは先端的製剤技術を利用したナノ医薬品やDDS製剤などもその対象になろう。そこで、これら通常の化学合成医薬品製剤とバイオテクノロジー応用製品との中間に位置するような医薬品の品質面の課題について考察する。

我が国において新有効成分医薬品の承認申請に

において参照すべき規制文書としては、ICH 品質ガイドラインが第一にあげられる。このうち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。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、これらペプチド性医薬品あるいは核酸医薬の多くは、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。一方これらの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ペプチド性医薬品、あるいは核酸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、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おくことは、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、リボザイム、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。また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。

以上、ペプチド性医薬品と核酸医薬品の品質評価について、筆者が要点と考えている点について触れた。これらに加えて、先端的医薬品の品質評価の重要な視点としては、ヒト初回臨床試験に先立って確認しておくべき品質特性の整理が重要であり、レギュラトリーサイエンスの格好のテーマになると思われる。視点としては、①ヒト試験の安全性確保に関わる品質特性は何か、②ヒト初回臨床試験以降、承認申請に至るまでの開発過程の中で一定性の確保を図るべき品質特性は何か、の二つがあげられる。

6. おわりに

以上、化学合成医薬品を中心に、医薬品品質分野のレギュラトリーサイエンスにおける課題例をあげ、考察を加えた。本稿にあげた課題例は筆者が個人的見解として選択したものであり、これら以外にも様々な課題がある。今後これらの課題についてレギュラトリーサイエンス学会において産官学で意見交換、情報交換が行われ、医薬品の適切な規制に結びつく成果が生まれることを期待する。

文 献

- 1) <http://www.nihs.go.jp/drug/PhForum/>
- 2) http://www.nihs.go.jp/dbcb/Biologics_forum/bioforum-9.html
- 3) <http://www.nihs.go.jp/doc/rs/index.html>
- 4) McLean R, McDonald B, The New York Times, 2007年5月6日
- 5) Kishimoto TK, et al, N Engl J Med. 2008; 358: 2457-2467
- 6) 川西 徹. 製剤機械技術ハンドブック第2版. 製剤機械技術研究会編. 2010; 943-949.
- 7) 科学技術基本計画. 平成23年8月23日閣議決定.
- 8) 医療イノベーションの進め方. 平成23年10月内閣官房医療イノベーション推進室.

