

20132804/A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

革新的医薬品の開発環境整備を目指した
レギュラトリーサイエンス研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹

平成 26(2014)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

革新的医薬品の開発環境整備を目指した
レギュラトリーサイエンス研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹

平成 26 (2014) 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を目指したレギュラトリーサイエンス(RS)研究 川西 徹	
II.	分担研究報告	
	1. ナノ DDS 製剤の評価に関する RS 研究	9
	加藤 くみ子	
	2. 改変タンパク質製剤（改変型抗体医薬）の評価に関する RS 研究	19
	石井 明子	
	3. 核酸医薬品の評価に関する RS 研究	35
	井上 貴雄	
	4. タンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性の評価に関するRS研究	55
	阿曾 幸男	
	5. 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究	59
	内田 恵理子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	77
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

革新的医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究

研究代表者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 所長

我が国で臨床応用が試みられつつある革新的医薬品製剤を中心に、以下の研究を行った：①医療応用を迅速に進める上で必要な規制ガイドライン案や評価法をリスト化する；②キーとなると考えられる評価手法を開発・標準化する；③必要に応じて規制ガイドライン等の作成，評価法策定を行う。

2年目の成果は以下の通りである。

(1) ナノ DDS 製剤の評価に関する RS 研究：

①ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤の *in vivo* におけるタンパク質，細胞との相互作用に関する評価法について調査，考察し，「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー」の解説論文に反映した；②評価手法の中でも，ナノ DDS 製剤と血中タンパク質との相互作用は，生体内安定性，有効成分の放出性，輸注反応など，ナノ DDS 製剤の臨床上的有効性及び安全性に影響する重要なファクターであるので，有効性と安全性確保の観点より，その評価手法として，ナノ DDS 製剤の血液適合性試験（補体系活性化試験），赤血球との相互作用（溶血性試験），及び血漿成分への影響（血液凝固試験）について，リポソーム製剤を対象に最適化，確立した。

(2) 高度改変タンパク質製剤の評価に関する RS 研究：

改変タンパク質製剤では，作用の種特異性が高く，非臨床試験結果に基づくヒトでの安全性予測が困難な場合が少なくない。そこで非臨床試験から臨床試験への安全かつ迅速な移行のための環境整備のための研究を行った。本年度は，①改変型医薬品の分子設計について，薬理作用・体内動態・免疫原性・製剤化・製造工程を考慮して，留意すべき事項をまとめた；②Fcγ受容体結合親和性プロファイリングに適した表面プラズモン共鳴（SPR）解析法を構築するとともに，改変型抗体医薬品の非臨床評価において課題となるFcγ受容体結合親和性の種差を解析した。

(3) 核酸医薬品の評価に関する RS 研究：

核酸医薬品の安全性確保において，オフターゲット効果（標的 mRNA と類似した配列を持つ遺伝子の発現が抑制される現象）の発現は最も懸念される点であり，特に「相補的結合依存的なオフターゲット効果」の発現評価法の確立や判断基準の設定が喫緊の課題となっている。そこで本年度は，①複数のタイプが存在するアンチセンス医薬品について調査研究を行い，それぞれのアンチセンス医薬品に対してオフターゲット効果の評価法を検討，提案した；②さらに，Kynamro®の上市で注目を集めている Gapmer 型アンチセンスに関して，マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の誘導を検証した。

(4) タンパク質性医薬品等の安定性評価に関する RS 研究：

タンパク質医薬品は保存により様々な品質変化を引き起こすことが知られており，保存中の品質変化を

短期間に評価できる方法は初期臨床段階での品質確保や製剤処方最適化に有用であり、革新的タンパク質医薬の開発を促進するものと考えられる。本研究においてはタンパク質の動的揺らぎを指標とした短期間での安定性評価法の開発・標準化を目指す。本年度はタンパク質性医薬品の安定性に影響を及ぼすと考えられる有効成分分子の高次構造の揺らぎを評価する手法（タンパク質のβ緩和時間等を指標にした）として、¹³C-NMR 緩和時間の可能性について引き続き検討し、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の¹³C-NMR 緩和時間によって評価できる可能性を示唆する結果を得た。

(5) 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究：

①染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの要因とリスク低減化のために考慮すべき事項、非臨床で実施すべき染色体への組込試験や挿入変異のリスク評価法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした； ②一方、遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した； ③また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。

研究分担者

- 加藤くみ子 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部第四室 室長
- 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第二室 室長
- 井上貴雄 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部第五室室長
- 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部第二室 室長
- 内田恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部第一室室長

研究協力者

- 吉澤靖貴 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部
- 桜井真理 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部
- 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第三室 室長
- 鈴木琢雄 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 主任研究官
- 五十嵐友香 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部協力研究員

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・医療機器に関する基礎研究レベルは高く、医薬品・医療機器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・新医療機器の開発例は少なく、また医薬品・医療機器の実用化のスピードが欧米に比べ遅く、いわゆるドラッグラグあるいはデバイス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・医療機器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・医療機器等の開発を効率的・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・医療機器の評価、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にあげられている。

以上の国の施策を実現するため、本研究では革新的医薬品開発に向けた規制環境整備のためのレギュラトリーサイエンス研究として、我が国で臨床応用が試みられているナノ DDS 医薬品、改

変タンパク質性医薬品(抗体医薬), 核酸医薬品, 遺伝子治療用医薬品をとりあげ, 以下の取り組みを開始した:

- 1) 革新的医薬品のヒト初回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, 現在まで我が国における医薬品の規制に関わる技術的なガイドラインや評価法の作成, あるいはその国際調和に関わってきた国立医薬品食品衛生研究所の医薬品関連部門の研究員によって構成され, 臨床応用に至る過程でキーとなる評価法等の開発・標準化研究を実施する。これらの研究成果は, 規制当局である厚生労働省および審査担当の医薬品医療機器総合機構との連携の中で, 医薬品の規制にダイレクトに反映されることが大きな特徴である。

B. 研究方法

B-1 ナノ DDS 製剤の評価に関する RS 研究:

ナノ DDS 製剤の *in vivo* におけるタンパク質, 細胞との相互作用に関する評価手法に関しては, 科学的な論文を中心に調査した。また, EMA や FDA から発出されているガイドライン等を参考に, タンパク質, 細胞との相互作用が有効性や安全性に与える影響について考察した。

中性リポソームおよびカチオン性リポソームについて, 補体活性化測定, 溶血性試験, 血液凝固試験の最適化を行った。

B-2 改変タンパク質性製剤の評価に関する RS 研究:

バイオ医薬品の製造と開発に関する考え方として, ICH Q11ガイドラインに記載されている目標製品品質プロファイルや重要品質特性の考え方, ならびに, 改変型抗体に関する学術文献をもとに, 改変型抗体医薬品製剤の分子設計において求められる

要件を考察した。SPR解析にはBiacore T200 (GEヘルスケア)を使用した。アミンカップリングによりセンサーチップCM5に抗His抗体 (GEヘルスケア)を固定化した。His-tag付加されたFcγR細胞外ドメインの組換えタンパク質 (Sino Biologicals)をキャプチャーし, アナライトとして各種の抗体医薬品を用いて結合親和性の解析を行った。

B-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究:

核酸医薬品の開発状況を, 文献および国内外の学術集会等で調査して「アンチセンス医薬品の開発動向と機能的分類」に関してまとめた。さらに, 現在, 最も進んだ開発段階にあるGapmer型アンチセンスを対象にオフターゲット効果を解析した。具体的には, GFPを安定発現するヒト細胞 (HEK293細胞) に対して, GFPに対するアンチセンスを添加し, 抗GFPアンチセンスと相補的に結合しうるヒト内在性遺伝子がどのように発現変化するかを, マイクロアレイおよび定量PCRにより解析した。

B-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究:

¹³C-NMR 緩和時間の市販製剤中のタンパク質の局所的な運動性の評価への適用性については, ヒュミラ皮下注(アダリムマブ), アクテムラ注(トシズマブ), レミケード注用(インフリキマブ)を用いて検討した。レミケード注用は凍結乾燥品であり, 5%溶液になるよう水を加え溶解したものについて測定した。緩和時間はInversion-recovery法によって20°Cにおいて測定した。変性温度はマイクロ熱量計 (TAM III, TA Instruments) を用い, 毎時 1°Cの昇温速度で測定した。

B-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関する RS 研究:

染色体組込型ベクター製品の開発動向は関連する論文や書籍, 学会等の情報を基に検討した。リスク評価については, EMAのガイダンス及び関連する論文を中心に検討した。Gp91phox 遺伝子を発現するレトロウイルスベクター産生細胞(パッケージング細胞)の培養上清からウイルスRNAを抽出, デジタルPCRを用いてウイルス

コピー数を測定した。レトロウィルスベクターで K562 細胞を感染させ、細胞への感染率を感染力価として算出するとともに、残存率を算出した。

(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

我が国の産学において医薬品開発が活発であり、ヒト初回臨床試験が間近、あるいは臨床試験が行われつつある革新的医薬品として、(1)ナノ DDS 製剤、(2)改変型抗体医薬品、(3)核酸医薬品、(4)遺伝子治療用医薬品 をとりあげ、これら医薬品のヒト初回臨床試験、さらには承認申請に至るまでに配慮すべき要件、特に品質、安全性評価の要件を明らかにするため、以下の RS 研究を行った。

C-1 ナノ DDS 製剤の評価に関する RS 研究：

(1) ナノ DDS 製剤の *in vivo* におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する主な評価法としては、

- ① 直接、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法 としては a) タンパク結合率、血球分配率 (*in vivo* 試験) ; b) 血液適合性試験 (*in vitro* 試験) ; c) ゲル電気泳動と質量

分析法 (*in vitro* 試験) ;

- ② 間接的に、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法 としては a) 動的光散乱 (*in vitro* 試験); b) 静的光散乱 (*in vitro* 試験); c) 蛍光色素標識化 (*in vitro, in vivo* 試験); d) 同位体標識化(主として *in vivo* 試験)

があり、それぞれの試験法についてその利点、欠点等を含めてまとめ、昨年度作成した、“ブロック共重合体ミセル医薬品に関する MHLW-EMA 国際共同リフレクション・ペーパー”の解説文とした。

(2) ナノ DDS 製剤の臨床前での安全性について留意すべきポイントとして、血液適合性に着目した。血液適合性試験は本邦では医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスに掲載されているが、ナノ DDS 製剤の試験への適用で問題が発生することが少なくない。そこでリポソーム製剤の試験が可能となるように (1)補体系活性化測定法、(2)溶血性試験法、(3)血液凝固試験法 について最適化を行い、試験法を確立した。

C-2 改変タンパク質製剤 (改変型抗体医薬品) の評価に関する RS 研究：

(1) IgG の各領域の構造および機能についてまとめるとともに、改変型抗体医薬品を分子設計するにあたって考慮すべき要件をまとめ、選択されたリード抗体を至適化するには、(1)有効性・安全性に関連する薬理作用、薬物動態、免疫原性; (2) 製剤化に関連する溶解性、安定性; さらに (3) 製造工程 を考慮して、構造の至適化が必要であることを明らかにした。次に有効性・安全性の観点からは、薬理作用、薬物動態、免疫原性の観点で分子設計にあたって配慮すべきポイントをまとめた。製剤化の観点からは、溶解性、安定性、製造工程の観点で、分子設計にあたって配慮すべきポイントをまとめた。

(2) 次に抗体医薬品の抗体依存性細胞傷害作用による抗腫瘍作用という薬理作用発現を期待する一方で、インフュージョン反応の発現等の有害反応にもつながる可能性のある抗体医薬の Fc 領域と Fcγ 受容体の結合性を評価する上で重要な、Fcγ 受容体結合に関する種差の検討を SPR 解析により行った。その結果、ヒト Fcγ 受容体とマ

ウス Fc γ 受容体では、ヒト IgG₁ 由来 Fc を持つ抗体の結合親和性に相違が認められたが、ヒト Fc γ 受容体とカニクイザル Fc γ 受容体に対する抗体の結合性には、大きな違いはないことを明らかにした。

C-3 核酸医薬品の評価に関する RS 研究：

(1) アンチセンス医薬品の機能的分類を理解する上で必須である、修飾型核酸およびアンチセンス医薬品それぞれの開発状況を調査し、今後開発が活発化されるアンチセンス医薬品の特徴をまとめた。

(2) 次にその中で最も開発段階が進んでいるアンチセンス医薬品である Gapmer 型アンチセンスは、オフターゲット効果の発現が検証されておらず、どれくらいの相補性を持つ mRNA が影響を受けるのか不明である。そこで Gapmer 型アンチセンスをヒト細胞に添加し、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果の発現を網羅的に検証した。その結果、以下の点が明らかになった。

- ・完全相補する標的外遺伝子は、その 60%以上が 50%未満まで発現抑制される。
- ・1 塩基ミスマッチを持つ遺伝子であっても、40%程度の遺伝子は 50%未満まで発現抑制される。
- ・2 塩基ミスマッチを持つ遺伝子でも、50%未満まで発現抑制されるケースがある。ただし、その発現確率は小さいと見積もられる。

以上の解析結果から、13 塩基長の Gapmer 型アンチセンスの場合、少なくとも 1 塩基ミスマッチを有する遺伝子までは、オフターゲット候補遺伝子として *in silico* 解析でピックアップする必要があり、発現抑制の程度をヒト細胞で解析するのが適当と考えられた。13 塩基長のアンチセンスでは 1 塩基ミスマッチを持つ mRNA は理論的には 52 個存在しており、定量 PCR 等で個別に解析するよりも、マイクロアレイを用いた網羅的解析の方が効率がよいと考えられた(効率のみならず、2 塩基ミスマッチを持つ mRNA の挙動も同時に解析できる利点がある)。

C-4 タンパク質性医薬品および核酸医薬品の安定性評価に関する RS 研究：

いくつかの抗体医薬の市販製剤とそれを透析することにより溶液の塩濃度を変化させた試料について、初年度確率したタンパク質カルボニル炭素の ¹³C-NMR 緩和時間を測定し、安定性との関連について検討した。その結果、緩和時間が大きく分子運動性が大きいと考えられる試料ほど、変性温度が低く不安定であることが示され、タンパク質の安定性がカルボニル炭素の ¹³C-NMR 緩和時間によって評価できる可能性を示唆するものとする。

C-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関する RS 研究：

(1) 遺伝子治療用医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究の一環として、染色体組込型ベクターの開発動向と安全性評価について検討した。染色体組込型ベクターの安全性上の最重要課題は挿入変異によるがん化のリスクであり、リスクの要因とリスク低減化のために考慮すべき事項、非臨床で実施すべき染色体への組込み試験や挿入変異のリスク評価法、臨床試験でのモニタリング法についての課題を明らかにした。

(2) 遺伝子治療用ベクターの品質評価法として、ウイルスベクターの重要品質特性である比活性の評価について検討し、デジタル PCR を用いたウイルスゲノム定量法の有用性を示した。また、レトロウイルスベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子導入における細胞の品質・安全性評価の一環として、ウイルスベクターの細胞外での残存性を検討し、感染条件によっては理論値よりも多くのベクターが遺伝子導入細胞懸濁液に残存する可能性を示した。遺伝子導入細胞へのカルタヘナ第一種使用等の適用に際しては、多面的な検討によりその適否を判断する必要があると考えられる。

D. 研究により得られた成果の今後の活用

今年度、各課題について得られた成果は下記の通りに活用される。

(1) ナノ DDS 製剤の評価： 本研究でまとめ

たナノ DDS 製剤のタンパク質や細胞との相互作用の試験法に関する情報は、昨年度作成した“ブロック共重合体ミセル製剤の MHLW-EMA 国際共同リフレクションペーパー”の技術的解説文として利用されることになる。また、リポソーム製剤の試験法として最適化された血液適合性試験は、今後その他のナノ DDS 製剤の安全性試験法に応用されることが予想される。

- (2) 改変タンパク質製剤（改変型抗体医薬品）の評価： 改変型抗体医薬品を分子設計する際に配慮すべきポイントが整理され、今後の抗体医薬品の的確な設計に生かされる。また Fcγ 受容体の結合活性の種差に関する結果は、マウスやサルを用いた試験結果をヒトに外挿する際に極めて有用な情報となる。
- (3) 核酸医薬品の評価： 世界的にみても規制方針が確立していない“アンチセンス核酸医薬品の開発にあたって配慮すべきポイント”をまとめる上での基礎資料が得られるとともに、それらポイントの中で安全性評価における最重要課題である“オフターゲット効果評価法”を提案する上でキーとなるデータが得られた。
- (4) タンパク質の安定性の評価： ¹³C-NMR 緩和時間は製剤中のタンパク質の保存安定性の評価に有用であることが示唆された。今後 NMR 緩和時間と保存安定性との関連が明らかにし、実時間で保存に比べ、短時間で安定性評価が可能な評価法の開発に結びつける予定である。
- (5) 遺伝子治療用医薬品の評価： 本研究の成果は、現在実施している遺伝子治療関連指針の見直しや今後作成を予定している遺伝子治療の個別課題に対するリフレクションペーパーの作成、さらに遺伝子治療の審査等に活用する予定である。

以上、最終年度、各課題の目的を達成する上で有用かつ重要なデータおよび資料が得られた。

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. 論文発表

- 1) Sakamoto, T. Fujimaki, Y., Takada, Y., Aida, K., Terahara, T., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging. *J Pharm Biomed Anal* 74, 14-21 (2013)
- 2) Koide, T., Nagato, T., Kanou, Y., Matsui, K., Natsuyama, S., Kawanishi, T.: Detection of component segregation in granules manufactured by high shear granulation, *Int J Pharm* 441, 135-145 (2013)
- 3) Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Randolph, T. W., Impact of heat treatment on miscibility of proteins and disaccharides in frozen solutions., *Eur J Pharm Biopharm.* 85, 177-183 (2013)
- 4) Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H.: Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids, *Biochim Biophys Acta* 1840, 1171-1180 (2014)
- 5) Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y.: Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the intracellular fate of encapsulated doxorubicin, *Mol Pharmaceutics* 11, 160-167 (2014)
- 6) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusahara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H.: Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their

- components, *Biomaterials*. **35**, 1347-1358 (2014)
- 7) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Yamaguchi, T., Okuda, H., Kawanishi, T.: High performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* **5**, 5899-5902 (2013)
 - 8) 川西徹: 革新的医薬品の開発環境整備を目指したレギュラトリーサイエンス研究, 衛研報 **131**, 2-6 (2013)
 - 9) 川西徹, 清原孝雄, 檜山行雄, 津田重城: 今後の日本薬局方の新しい流れ, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **44** 790-801. (2013)
 - 10) 加藤くみ子, 中西健, 小崎雅人, 松田嘉弘, 平野舞, 花田博幸, 久田茂, 小野寺博志, 西山伸宏, 原島秀吉, 松村保広, 片岡一則, 奥田晴宏, 川西徹: ブロック共重合体ミセル医薬品の評価. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **44**, 968-975 (2013)
 - 11) 加藤くみ子: DDS製剤開発の活性化と実現に向けた取り組みについて 薬剤学 **73**, 187-188 (2013)
 - 12) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ: 抗体医薬の分子設計 薬剤学 **74**, 1-8 (2014)
 - 13) 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: 第4章 ヒト初回投与量設定方法 第2節 バイオ医薬品, 新薬開発にむけた臨床試験 (第I~III相臨床試験) での適切な投与量設定と有効性/安全性評価, pp72-86 サイエンス&テクノロジー出版, 東京 (2013)
 - 14) 井上貴雄: 抗体医薬の動向 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス **45** (in press)
 - 15) 阿曾幸男: 医薬品の発がん性不純物の評価と管理に関するガイダンス 公衆衛生 **72**, 125-129 (2014)
 - 16) 内田恵理子: 遺伝子治療薬, バイオ医薬品 西島正弘, 川崎ナナ編, pp235-244, 化学同人, 京都(2013)

2. 学会発表 講演

- 1) 加藤くみ子 「ブロック共重合体ミセル医薬品に関する欧州医薬品庁 (EMA)との共同文書作成」第10回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム 2014年1月16日(東京)
- 2) 加藤くみ子「リポソーム製剤の評価手法について」ナノ製剤技術研究会 2013年10月4日 (京都)
- 3) 加藤くみ子「DDS 製剤キャリアの動態とトランスポーター」第29回日本 DDS 学会学術集会 2013年7月5日 (京都)
- 4) 加藤くみ子「ナノテクノロジーの医薬品開発への応用」 第50回薬剤学懇談会研究討論会 2013年6月28日 (札幌)
- 5) Kumiko Sakai-Kato "Current Initiatives relevant to Nanomedicines in Japan" The European Summit for clinical nanomedicines 2013 2013年6月25日 (Basel)
- 6) 石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 次世代抗体医薬品の非臨床評価 日本薬学会第134年会シンポジウム 2014年3月 熊本
- 7) 井上貴雄:「核酸医薬開発の動向と課題」, 医薬基盤研究所講演会 (2013.12) (大阪)
- 8) 井上貴雄:「核酸医薬品の現状と課題(総論)」, ライフサイエンス技術部会 材料分科会講演会 (核酸医薬研究の最前線①~有機合成からのアプローチ~) (2013.11) (東京)
- 9) 井上貴雄:「核酸医薬品開発の動向と課題」, 第144回ヒューマンサイエンス エキスパート研修会 (核酸医薬品開発を巡る国際的展望と期待 -核酸医薬は新薬開発の突破口となるか-) (2013.10) (東京)

学会発表

- 1) 加藤くみ子, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏, 合田幸広 リポソーム及び内包薬物の細胞内動態に関する研究 第22回日本バイオイメージング学会学術集会, 東京 (2013.9.15)
- 2) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏: リポソーム

に内封されたドキシソルピシンの細胞内動態に及ぼすリポソーム構成脂質の影響, 第 29 回日本 DDS 学会, 京都, 2013 年 7 月

- 3) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏: リポソーム中のポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質の細胞内動態特性評価, 日本薬剤学会第 28 会, 名古屋, 2013 年 5 月
- 4) 加藤くみ子, 日高征幸, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏 “シリカ粒子, 酸化チタンの物理的・化学的特性と *in vitro* 腸管吸収モデルによる細胞透過性との関連性について” 日本薬剤学会第 28 年会 平成 25 年 5 月 25 日
- 5) 吉田徳幸, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治, 井上貴雄: 「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」, 日本薬学会第 134 年会 (2014. 3) (熊本)
- 6) 吉田徳幸, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治, 井上貴雄: 「核酸医薬品のオフターゲット効果に関する基盤研究」, 第 11 回アンチセンスシンポジウム (2013. 11) (徳島)
- 7) Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Eriko Uchida, Kiyomi Sasaki, Satoshi Obika, Yoji Sato: 「In Silico Analysis of Off-target Effects of Oligonucleotide Therapeutics」, 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (2013.10) (Naples)
- 8) 吉田徳幸, 井上貴雄, 内田恵理子, 小比賀聡, 佐藤陽治: 「オフターゲット効果の安全性評価法の確立に向けた基盤研究」, 第 5 回日本 RNAi 研究会 (2013. 8) (広島)
- 9) 井上貴雄: 「核酸医薬品開発の現状と課題およびガイドライン策定に向けた取り組み」, ヒューマンサイエンス振興財団 規制動向調査 WG 会議 (2013. 7) (東京)

2. 実用新案登録

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

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
ナノDDS製剤

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

ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤の *in vivo* におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する評価法について調査、考察し、「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー」の解説論文に反映した。さらに、評価手法の中でも、ナノ DDS 製剤と血中タンパク質との相互作用は、生体内安定性、有効成分の放出性、輸注反応など、ナノ DDS 製剤の臨床上的有効性及び安全性に影響する重要なファクターである。そこで、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として、ナノ DDS 製剤の血液適合性試験、つまり補体系活性化試験、赤血球との相互作用（溶血性試験）、及び血漿成分への影響（血液凝固試験）について、リポソーム製剤を対象に最適化し、確立した。

研究協力者

吉澤靖貴

桜井真理

A. 研究目的

標的指向性の向上により標的部位に医薬品を選択的に送達することで、副作用の低減、有効性の向上をコンセプトとした画期的医薬品の開発が進展している。脂質、合成高分子等の自己組織化を有効成分の内包、放出制御に利用する微細加工技術（ナノテクノロジー）はその代表例である。様々な素材を用いた原薬や製剤の開発は、高機能化・複雑化しており、2010年以降、ナノテクノロジーに関連した規制の適応範囲や製品毎の評価に関する規制文書が欧米規制当局を中心に発出されている。我が国においてもナノテクノロジーを応用した高機能なナノ DDS 製剤開発が急速に進展している状況下、規制の適応範囲や評価法の

妥当性を検証する、あるいは裏打ちするための研究が必要である。

最先端のバイオテクノロジーやナノテクノロジーを用い、様々な素材を利用した複雑な構造を有するナノ DDS 製剤においては、これらの新素材が生体に投与された際に、血液成分や細胞など生体を構成する要素に接触する。このようなタンパク質や細胞との相互作用は、細網内皮系による取り込み、血中滞留性、ミセルの構造安定性（つまり有効成分の放出性）、標的細胞への取り込みなど、ナノ DDS 製剤の有効性や安全性に影響し得るため、*in vitro*、*in vivo* におけるタンパク質や細胞との相互作用評価は、重要品質特性の特定、ナノ DDS 製剤の薬物動態や薬理作用、安全性を

考察する上で重要である (図 1)。そこで本年度は、ブロック共重合体ミセルやリポソーム製剤等の静脈注射ナノ DDS 製剤について in vivo におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する評価法について調査、考察した。

さらに、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として欧米で議論が活発となっている、ナノ DDS 製剤の血液適合性試験、つまり補体系活性化試験、赤血球との相互作用 (溶血性試験)、及び血漿成分への影響 (血液凝固試験) に着目し、リポソーム製剤を対象に最適化し、確立した。

B. 研究方法

(1) ナノ DDS 製剤の in vivo におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する評価法に関する調査研究

評価手法に関しては、科学的な論文を中心に調査した。また、EMA や FDA から発出されているガイドライン等を参考に、タンパク質、細胞との相互作用が有効性や安全性に与える影響について考察した。

(2) ナノ DDS 製剤の血液適合性に関する研究

(2-1) リポソームの調製

実験で用いる中性リポソームは、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) 及び Cholesterol (Chol) を物質量比で 1:1 で混合し、脂質薄膜法を用いて作製した。カチオン性リポソームは 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) 及び Chol を物質量比で 1:1 で混合し、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。

(2-2) 補体活性化測定

MicroVue iC3b ELISA kit, SC5b-9 ELISA kit, ヒト血清, HAGG (Heat Aggregated Gamma Globin), ZymosanA は QUIDEL 社製を用いた。

ヒト血清と脂質濃度 10mg/mL に希釈したリポソームを 1 : 1 の割合 (7 μ L : 7 μ L) でヒト血清と混合させ、37°C の湯浴に 15min インキュベートした。インキュベート後のサンプルを 10mM EDTA を添加した ELISA キット付属の Specimen Diluent で適宜希釈をし、生成した補体活性化産物 iC3b または, SC5-9 の生成量を ELISA メーカー提供のプロトコールに従い測定した。プレートリーダー (Abs450nm を使用) は BioRad 社製を用いた。

(2-3) 溶血性試験法

ウサギ脱繊維血はコージンバイオ社製を、ヘモグロビン B-テストワコーは和光純薬社製を、ネガティブコントロールのポリエチレングリコール (平均分子量 8,000Da) は Sigma 社製を用いた。

ウサギ脱繊維血に PBS を加え 800 \times g で遠心分離し赤血球を洗浄した。これを溶血が見られなくなるまで繰り返した後、上清をブランク用に回収し、沈殿した赤血球はヘモグロビン B-テストワコーによりヘモグロビン量を定量した。ヘモグロビン量が 10mg/mL になるよう PBS で希釈し、回収した上清も PBS で同倍希釈した。各種コントロール用試薬およびリポソームサンプルを 2, 0.4, 0.08mg/mL の 3 濃度になるように PBS で希釈し、1.5mL チューブに希釈した各コントロール用試薬、およびリポソームサンプルを 10 μ L ずつ入れた。この上から、ヘモグロビン量を調製した脱繊維血および上清を各 90 μ L 添加した。37°C の湯浴で 4 時間インキュベート後、サンプルを 800 \times g で 5min 遠心分離し、ヘモグロビンが流出した上清を PBS で適宜希釈し、吸光度をプレートリーダーにより測定した (Abs570nm)。

(2-4) 血液凝固試験法

血液凝固試験用標準ヒト血漿, PT 測定試薬「デイドイノピン」, 及び APTT 測定試薬「アクチン FSL」はシスメックス社製を用いた。

血液凝固試験用標準ヒト血漿を超純水 1mL で溶解した。希釈したヒト血漿を、リポソーム、ポジティブコントロールである抗凝固剤 (EDTA/PBS) , 及びコントロール(ベースライン)である PBS と、それぞれ 162 μ L:8 μ L の比率となるように混合し 37 $^{\circ}$ C で 30min インキュベートした。凝固時間 (PT 時間及び APTT 時間) は凝固計 CA-50 (シスメックス社製) の操作マニュアルに従って測定した。

(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、領布品であるため、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) ナノ DDS 製剤の in vivo におけるタンパク質、細胞との相互作用に関する評価法に関する調査研究

ナノ DDS 製剤の体内動態や薬効、及び安全性に影響を及ぼす生体内のタンパク質や細胞との相互作用は、多くの場合、ナノ DDS 製剤の表面で起こる。重量当たりの表面積は粒子径が小さくなると急激に増大するため、バルク固体と比べ、その相互作用の頻度も増大すると考えられる。し

たがって、ナノ医薬品を設計する際は、安定性に優れ、生体内に投与後はより好ましい薬物動態特性、薬効、及び安全性を示すよう、ナノ医薬品の表面物性の制御が重要になる。具体的には、キャリア組成を工夫する、PEG など親水性ポリマーで表面を被覆する、等の製剤設計により

- ① 血漿タンパク質との非特異的相互作用の制御、細網内皮系による認識・クリアランスの回避 \Rightarrow ナノ医薬品の血中滞留性の向上
- ② 血液適合性(溶血性、凝固系、補体系等への影響)の向上、免疫原性の抑制
- ③ 標的細胞内への取り込み促進等の効果が期待される。

本研究では、ナノ DDS 製剤の生体内タンパク質、細胞との相互作用の具体的評価法を科学論文より調査した。直接的な相互作用の評価手法と間接的な相互作用の評価手法に便宜上分類し、以下に調査結果を記す。ただし、これらは事例であり、他にも適切な評価手法があるかもしれない。

① 直接、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法

- a) タンパク結合率、血球分配率(in vitro 試験) : 低分子化学合成品では、薬物代謝評価のために一般的に行われている試験である。ナノ DDS 製剤またはそのキャリア成分と血液タンパク質との結合型、非結合型の分離(ゲル濾過法や平衡透析法などによる)が困難である場合や、キャリア成分の全血中濃度、血漿中濃度測定が困難である場合も想定される。しかし、低分子化学合成品で汎用されている手法等を利用し、ナノ DDS 製剤のタンパク質結合率や血球分配率を求めることが可能であれば測定を行うことが好ましいと考える。
- b) 血液適合性試験 (in vitro) : 溶血性試験(赤血球との相互作用)や、血液凝固(血漿成分への影響)、補体系への影響を調べる試験等がある。
- c) ゲル電気泳動と質量分析法 (in vitro) : ナノ DDS 製剤と相互作用するタンパク質を同定するための手法として有効である。

② 間接的に、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法

- a) 動的光散乱(in vitro): タンパク質との相互作用によるサイズの変化を追跡し、ナノ DDS 製剤の構造安定性を知ることができる。ただし、血液など多成分のタンパク質が混在する溶液中では一般的に適さない。
- b) 静的光散乱(in vitro): 散乱光の角度分布を測定することによって、粒子の大きさ、分子量、粒子の形状、粒子間相互作用などについて情報を得ることが可能であるため、ナノ DDS 製剤の構造安定性を知ることができる。
- c) 蛍光色素標識化(in vitro, in vivo): キャリア成分や有効成分を蛍光標識化し、消光現象や蛍光共鳴エネルギー移動現象を利用することにより、タンパク質や細胞との相互作用によるナノ DDS 製剤の構造安定性を知ることができる。ただし、蛍光色素による標識の安定性に留意する必要がある。
- d) 同位体標識化(主として in vivo): キャリア成分や有効成分を標識化し、その動態を追跡することにより、タンパク質や細胞との相互作用による動態への影響を考察することが可能となる。ただし、ナノ DDS 製剤の構造安定性に関する情報を得る手法としては一般的には適さない。

さらに、血中における遊離有効成分濃度と有効成分の総濃度、また組織あるいは臓器中における有効成分の総濃度に基づき、in vivo でのナノ DDS 製剤の挙動を考察することも生体でのタンパク質や細胞との相互作用を間接的に評価する上で有効であると考えられる。in vitro における薬物放出試験も in vivo の安定性を評価する上で重要な情報を与える。血漿を用いるのが、最も in vivo を反映した試験法と言えるが、血漿中で測定できない場合は、アルブミンを含有した緩衝液など適切な「関連媒体」を用いることが必要であろう。

ナノ DDS 製剤の細胞、タンパク質との相互作用の重要性については、特に安全性の観点から欧

米規制当局の文書にも言及されている。例えば、EMA のリポソーム製剤に関するリフレクションペーパーでは、リポソーム製剤の補体活性化の測定について言及されている¹⁾。すでに臨床応用されているリポソーム製剤²⁾や鉄ナノ粒子製剤³⁾では、安全性に関わる課題として、インフュージョンリアクション（輸注反応）がしばしば問題となることがある。一般にインフュージョンリアクションとは、薬剤投与中又は投与開始後 24 時間以内に発現する紅潮、息切れ、顔のむくみ、頭痛、悪寒、血圧低下などの症状の総称である。24 時間以降、または 2 回目の投与以降に発現することもある。インフュージョンリアクションが生じるメカニズムについてはまだ十分に分かっていないが、リポソーム製剤においては、補体成分の活性化が主要誘因であることが示唆されており²⁾、補体活性化により生成した補体分解産物による肥満細胞や好塩基球の脱顆粒や血管透過性の亢進、平滑筋収縮などがアレルギー様症状を引き起こし、補体活性化の程度が大きいほど偽アレルギー反応のリスクが高まると考えられている。Szebeni らは、これを、C-activation-related pseudoallergy (CARPA) と呼ばれる反応であるとしている⁴⁾。欧州では、補体成分の活性化を誘起しやすいリポソーム製剤の物理的・化学的特性に関する研究が進んでいる。これまで報告されている要因を表 1 にまとめた。EMA のリフレクションペーパーには、有害事象の可能性の程度を評価するために in vitro と in vivo の試験、例えば、補体（あるいはマクロファージや好塩基球）の活性化測定や、ブタなど感度の高い動物モデルを用い投与後の肺動脈圧の上昇をモニターする手法等を、必要に応じて考慮すべきである、との記載がある。¹⁾

一方、FDA のリポソームに関するドラフトガイドラインには、「リポソームと血清タンパク質及びリポタンパク質の相互作用は、リポソーム製剤に使用する脂質の種類に依存するため、原薬及びリポソーム製剤のタンパク結合率（リポタンパク

質を含む)の測定や主要結合タンパク質の同定を行うこと」との記載がある⁵⁾。ナノ医薬品の in vivo 安定性は、リポタンパク質をはじめ血中タンパク質との相互作用により影響を受ける可能性がある。リポソーム製剤などのキャリア型ナノ医薬品から有効成分が早期放出された結果として投与量が予定以上に放出された場合、そのような相互作用は安全上の意味合いを有する。

このように、製剤設計の早期段階からナノ医薬品の細胞やタンパク質との相互作用に関する情報を得て、これをコントロールするための表面物性の制御が重要な課題となる。

2013年にEMAより、ナノ医薬品の表面被覆に関するリフレクションペーパーが発出された⁶⁾。本文書は、非経口投与型のナノ医薬品の開発にあたり、ナノ医薬品の表面被覆について留意すべき点に焦点をあてた文書である。製剤の体内分布、細胞内動態への影響から、

① ナノ医薬品表面へのPEG等による被覆の均一性や被覆の安定性

② 受容体のリガンドや抗体などナノ医薬品に標的性を付与するための表面修飾分子の配向性が、有効性や安全性の観点から特に重要な特性であるとしている。具体的な製剤特性評価における留意点としては、上記①に関連して、組成を含む被覆素材の解析、被覆素材を結合するリンカー部分の化学の明確化、被覆の安定性(保存時の安定性及び使用時の安定性)を指摘している。また、上記②に関連して、ナノ医薬品の表面に存在する表面修飾分子の配向性やコンフォーメーションに留意すべきことが記されている。本リフレクションペーパーは、表面被覆のみに焦点を当てた文書であり、ナノ医薬品の開発において表面物性の重要性が窺い知れる。

本年発出された「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー」⁷⁾にも、ブロック共重合体ミセル製剤の薬物動態学的特性は、プロ

ック共重合体ミセルと血漿、血清タンパク質又は血液細胞との相互作用により変化し得ること、また、ナノ DDS 製剤の体内分布、安定性及び安全性に影響する可能性があることが知られているため、静脈内に投与したブロック共重合体ミセルのタンパク質及び細胞との相互作用について考察することが重要であることが記載された。さらに、本研究で調査した具体的な相互作用に関する評価手法を、本リフレクションペーパーの解説論文に反映した⁸⁾。

(2)ナノ DDS 製剤の血液適合性に関する研究

本研究では、ナノ DDS 製剤の臨床上で安全性において留意すべき事項として、血液適合性に着目した。血液適合性(Hemocompatibility)試験は医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスに掲載されており、製品に生体に接触する部分が存在する場合、血中の細胞やタンパク質にさらされることにより生じる有害作用についての非臨床試験の一つである⁹⁾。血液適合性試験は、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の5つの試験項目に分類される。血液学的項目では主に赤血球や白血球との相互作用を評価し、代表的な標準評価項目として全血算と溶血が挙げられている。また、補体系に関する標準的な試験項目としては、可溶性の補体分解産物(C3a, C5a, SC5b-9など)の一つ又は複数をを用いた補体活性の評価が記載されている。

本研究では、ナノ DDS 製剤で重要と思われる以下の3つの項目について、リポソーム製剤を対象として評価手法を確立した。

(2-1) 補体系活性化測定法

リポソーム製剤を対象として、補体系活性化測定法を検討した。図2に補体系活性化メカニズムを示す。補体の主な成分はC1~C9で表され、C1は3つのフラグメント(C1q, C1r, C1s)、その他は補体系が活性化される過程で2つ以上のフラグメントになるものがある(C3a, C3bなど)。補体

活性化の経路として、3種類(古典経路, 第2(副)経路, レクチン経路)が知られており、いずれの経路もC3がC3aとC3bに分解される。更に、C3bはC5のC5aとC5bの分解に寄与し、最終的にC5b6789(C5b-9)が生成される。最終産物であるC5b-9は膜傷害(溶血や細胞傷害)作用を有することが知られている⁹⁾。医療機器のガイドラインには「生理作用や検出が容易なことから、可溶性のフラグメント(C3a, C5a, SC5b-9など)の一つ又は複数を用いて補体活性の評価が行われている」との記載がある⁹⁾。そこで、医療機器の血液適合性試験において測定例として例示されている補体活性化産物(C3a, C5a)についてELISA法で測定することとしたが、C3a及びよりC5aは不安定であり、ヒト血清中濃度を測定することができなかった。そこで、SC5b-9、及びより定量的な測定が可能であるとの報告¹⁰⁾を参考にC3bの分解物であるiC3bをELISA法で測定することとした。補体活性化産物を測定するに当たり、検体であるリポソーム製剤と混合するヒト血漿は、できるだけ新鮮であることが求められる¹⁰⁾。しかし、製剤設計の段階で本法を用いるためには、新鮮なヒト血清を毎回得ることは難しい場合があることから、市販の補体活性化産物測定用のコントロール血清を用いることとした。また、ポジティブコントロールとしては、HAGG(Heat Aggregated Gamma Globin)、ZymosanAを用い、いずれの補体活性化産物においてもコントロール血清との混合により、iC3b, SC5b-9の増加を検出することができ、検量線は良好な直線性を得た。またpositive control(HAGG)を用いたiC3bとSC5b-9測定の日内再現性はそれぞれ、RSD=9.77, 3.73%以下(n=3)であった。

(2-2) 溶血性試験法

血液溶血性試験には、第1法: 溶血によるヘモグロビンの吸収極大波長(540 or 576nm)にて定量する方法、第2法: ヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンに変換しその吸光度から溶出率を算

出する方法の2法が報告されている⁹⁾が、シアン化合物の不必要な使用を避ける目的から、第1法を用い、リポソーム製剤において最適化することとした。

ポジティブコントロールとして、一般的に用いられているTriton-X(final conc 1%)を用い、この溶血率を100%とすることとした。カチオン性の物質は溶血性を有することが知られているが、今回いずれの濃度でも中性リポソームであるDOPCリポソームよりカチオン性リポソームDOTAPで溶血率が大きい結果となり、本法の妥当性を示している。その結果を、図3に示す。繰り返し再現性はいずれのリポソームも0.2mg/mLの際に、0.94%以下と良好であった。測定濃度により溶血率は異なるため、実際の投与量等を考慮し、複数濃度で測定する必要があるであろう。また、インキュベーション時間によっても溶血率は異なるため、時間依存性を確認することも重要である。1点でおこなう場合は4時間とした⁹⁾。

(2-3) 血液凝固試験法

ナノDDS製剤が血液凝固因子と相互作用することにより血液凝固システムに影響を及ぼすことは安全性の面で懸念事項である。本血液凝固試験法は、ナノ粒子製剤が血漿の凝集時間に与える影響を評価する方法である。

血液凝固、すなわち凝固反応は数多くの因子が関与する複雑な過程を経るが、凝固には図4に示すように主に3つの経路が関与している。つまり①内因性のもの(接触活性化経路としても知られており、表面への損傷により活性化される)、②外因性のもの(組織因子経路としても知られている)、③最終共通経路: それぞれの経路はそれに特化した方法によって評価する。活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)試験は内因性経路の評価に用いる。プロトロンビン時間(PT)試験は外因性経路の計測に用いる。トロンビン時間(TT)は最終共通経路の機能性の指標となる。いずれの経路も多

くの凝固因子が関与し、いくつかは経路で共通して機能している。血液凝固試験法の原理は、加温下血漿に検体を加え凝固計により凝固時間を測定し、主として凝固時間の延長を測定することで、血漿成分中の凝固因子と検体との相互作用を調べる手法である。本研究では、評価項目として汎用される AP,APTT 時間を測定することとした。

凝固計による凝固時間測定前の試料調製法については、米国 Nanotechnology Characterization Laboratory(NCL)より提案されている手法である“Coagulation Assays”¹¹⁾を参考にプロトコールを作成した。PBS をコントロール (ベースライン)、凝固阻害剤として知られている EDTA をポジティブコントロールとし、凝固時間を測定し試験法の妥当性を評価した。AP 時間の PBS, EDTA(1mg/mL)の RSD は 2.88, 0.38% (n=3) と繰り返し再現性は良好であった。また APTT 時間の PBS, EDTA の RSD は 0.50, 0.32% (n=3) と繰り返し再現性は良好であった。DOPC リポソーム製剤では、コントロールである PBS と同等の値を示した。実際の投与量等を考慮し、実試料の凝固時間を複数濃度で測定し、PBS 及び EDTA の凝固時間と比較し、血液凝固への影響を判断することとした。

D. 考察

DDS 製剤の開発においては、最先端のバイオテクノロジーやナノテクノロジーを用い、様々な素材を利用した複雑な構造を有する医薬品の開発が進められている。また、医療デバイスとの融合製品の開発も活発である。これらの新素材が生体に投与された際に、血液成分や細胞など生体を構成する要素に直接接触して利用されるため、生体反応、特に免疫学的反応に関わる評価が安全性の観点からも重要であろう。静脈血中にナノ DDS 製剤が投与された際の赤血球や補体成分との相互作用評価の必要性については受け入れられつつあり、また製剤の特性によっては血液凝固への

影響についても懸念されている¹²⁾。これらを *in vitro* で評価する試験について欧米での議論は進んでいるが、我が国では十分とは言えない。そこで、本研究では、補体系活性化試験、赤血球との相互作用 (溶血性試験)、及び血漿成分への影響 (血液凝固試験) について、リポソーム製剤を対象に最適化し、確立した。これらは、我が国における医療機器の生物学的安全性試験法ガイダンスでは、血液適合性試験とよばれる試験に該当するものである。本研究では、ポジティブコントロールや前処理法、サンプルであるリポソームの濃度依存性等を検討し最適化した。安全性に関わる *in vitro* 試験開発の目的は、開発中のナノ DDS 製剤を *in vivo* 投与した際に生じ得る急性の毒性反応を迅速に評価することである。したがって、製剤設計の早期段階からこれらの *in vitro* 評価を行うことが可能なよう、市販のコントロール血清を用いるなど、試験の利便性にも配慮し評価法を確立した。

今後は、さらに、本試験法を用いて品質特性との相関に関する知見を蓄積するとともに、*in vitro* 試験の結果と *in vivo* における安全性との相関性についてさらに調査研究を進め知見を蓄積する必要があると思われる。

E. 結論

ナノ DDS 製剤のタンパク質や細胞との相互作用は、細網内皮系による取り込み、血中滞留性、ナノ DDS 製剤の構造安定性 (つまり有効成分の放出性)、標的細胞への取り込みなど、有効性や安全性に影響するため、*in vitro*、*in vivo* におけるタンパク質や細胞との相互作用評価は、重要品質特性の特定、ナノ DDS 製剤の薬物動態や薬理作用を考察する上で重要である。本研究では、直接的、及び間接的なこれら相互作用の評価手法についてまとめた。

さらに、有効性と安全性確保の観点より、その評価手法として、ナノ DDS 製剤の血液適合性試

験, つまり補体系活性化試験, 赤血球との相互作用 (溶血性試験), 及び血漿成分への影響 (血液凝固試験) について, リポソーム製剤を対象に最適化し, 確立した.

謝辞

厚生労働省及び国立医薬品食品衛生研究所が事務局となり設置された検討会「ナノ医薬品に関する勉強会」において, ブロック共重合体ミセル医薬品評価に関し技術的な御助言を賜りました勉強会委員の先生方に深謝致します.

参考文献

- 1) Reflection paper on data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product, European Medicines Agency, 2013
 - 2) J.Szebeni, Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions, Eur. J. Nanomed. 1, 33-53, (2012)
 - 3) New recommendations to manage risk of allergic reactions with intravenous iron-containing medicines, European Medicines Agency, 2013
 - 4) J. Szebeni, Complement activation-related pseudoallergy: A new class of drug-induced acute immune toxicity, Toxicology 216, 106-121.(2005)
 - 5) Draft Guidance for Industry, Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, US Food and Drug Administration, 2002
 - 6) Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products, European Medicines Agency, 2013
 - 7) 「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパーの公開等について」平成 26 年 1 月 10 日付 薬食審査発 0110 第 1 号
 - 8) 加藤くみ子, 中西健, 小崎雅人, 松田嘉弘, 平野舞, 花田博幸, 久田茂, 小野寺博志, 西山伸宏, 原島秀吉, 松村保広, 片岡一則, 奥田晴宏, 川西徹 “ブロック共重合体ミセル医薬品の評価” 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44 (12), 968-975 (2013)
 - 9) 医療機器の製造販売承認申請等に必要生物学的安全性評価の基本的考え方について 平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号
 - 10) NCL Method ITA-5.2, Quantitative Analysis of Complement Activation, Nanotechnology Characterization Laboratory, National Cancer Institute-Frederick, 2010
 - 11) NCL Method ITA-12, Coagulation Assays, Nanotechnology Characterization Laboratory, National Cancer Institute-Frederick, 2011
 - 12) M.A., Dobrovolskaia, S.E., Mcneil, Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines, J. Control. Release 172, 456-466 (2013)
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - (1) Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H. “Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids”. Biochim Biophys Acta. 1840,1171-1180 (2014)
 - (2) Un, K., Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, Y. "Effects of liposomal phospholipids and lipid transport-related protein on the

intracellular fate of encapsulated doxorubicin"
Mol Pharm. 11, 560-567 (2014)

- (3) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H., "Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components " Biomaterials 35, 1347-1358 (2014)
- (4) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Yamaguchi, T., Okuda, H., Kawanishi, T., "High performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles." *Analytical Methods* 5, 5899-5902, 2013.
- (5) 加藤くみ子, 中西健, 小崎雅人, 松田嘉弘, 平野舞, 花田博幸, 久田茂, 小野寺博志, 西山伸宏, 原島秀吉, 松村保広, 片岡一則, 奥田晴宏, 川西徹 "ブロック共重合体ミセル医薬品の評価" 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 44 (12), 968-975 (2013)
- (6) 加藤くみ子 "DDS 製剤開発の活性化と実現に向けた取り組みについて" 薬剤学 73(3), 187-188, 2013

2. 学会発表・講演

講演

- (1) 加藤くみ子 「ブロック共重合体ミセル医薬品に関する欧州医薬品庁 (EMA)との共同文書作成」第 10 回レギュラトリーサイエンス学会シンポジウム 2014 年 1 月 16 日(東京)
- (2) 加藤くみ子「リポソーム製剤の評価手法について」ナノ製剤技術研究会 2013 年 10 月 4 日 (京都)
- (3) 加藤くみ子「DDS 製剤キャリアの動態とトランスポーター」第 29 回日本 DDS 学会学術集会 2013 年 7 月 5 日 (京都)

(4) 加藤 くみ子「ナノテクノロジーの医薬品開発への応用」 第 50 回薬剤学懇談会研究討論会 2013 年 6 月 28 日 (札幌)

(5) Kumiko Sakai-Kato "Current Initiatives relevant to Nanomedicines in Japan" The European Summit for clinical nanomedicines 2013 2013 年 6 月 25 日 (Basel)

学会発表

- (1) 加藤くみ子, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏, 合田幸広 リポソーム及び内包薬物の細胞内動態に関する研究 第 22 回日本バイオイメーキング学会学術集会, 東京 (2013.9.15)
- (2) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏 : リポソームに内封されたドキシソルビシンの細胞内動態に及ぼすリポソーム構成脂質の影響, 第 29 回日本 DDS 学会, 京都, 2013 年 7 月
- (3) 運 敬太, 加藤くみ子, 奥田晴宏 : リポソーム中のポリエチレングリコール(PEG)修飾リン脂質の細胞内動態特性評価, 日本薬剤学会第 28 会, 名古屋, 2013 年 5 月
- (4) 加藤くみ子, 日高征幸, 運敬太, 川西徹, 奥田晴宏 "シリカ粒子, 酸化チタンの物理的・化学的特性と in vitro 腸管吸収モデルによる細胞透過性との関連性について" 日本薬剤学会第 28 年会 平成 25 年 5 月 25 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし