

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 製剤の臨床上の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 ELISAKit, 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 に希釈したりポソームを 1:1 の割合(7 μ L:7 μ L)でヒト血清と混合させ、37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 °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

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、ナノ医薬品の血中滞留性の向上、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、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。

直接、細胞やタンパク質との相互作用を測定する手法

- 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理型、非結合理型の分離(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。
- 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。
- 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。

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、

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

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、ブ

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)、外因性のもの(組織因子経路としても知られている)。

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なる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シング学会学術集会, 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

表1 リポソーム製剤の補体活性化のリスクを高めることが報告されている主な要因*

- ・正あるいは負の表面電荷
- ・サイズの増加
- ・不均質性
- ・凝集体の存在
- ・リポソーム外に有効成分が存在すること (特にドキソルビシンや類似薬)
- ・高い割合 (>50%) で膜中にコレステロールが存在すること
- ・不電荷のリン脂質にPEGが結合したリポソーム
- ・リポソーム表層のポリアミノ基修飾
- ・エンドトキシンへの混入**

*参考文献2

**エンドトキシンへの混入はリポソーム自体の特性ではないが、製剤に起因する要因として記載した。

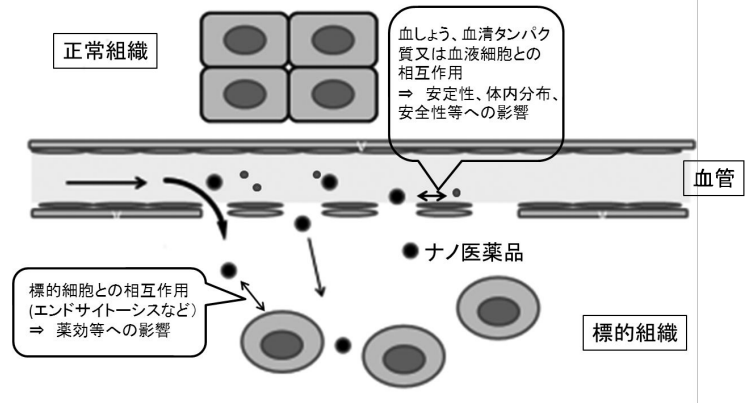


図1 ナノDDS製剤と細胞やタンパク質との相互作用に関する概念図

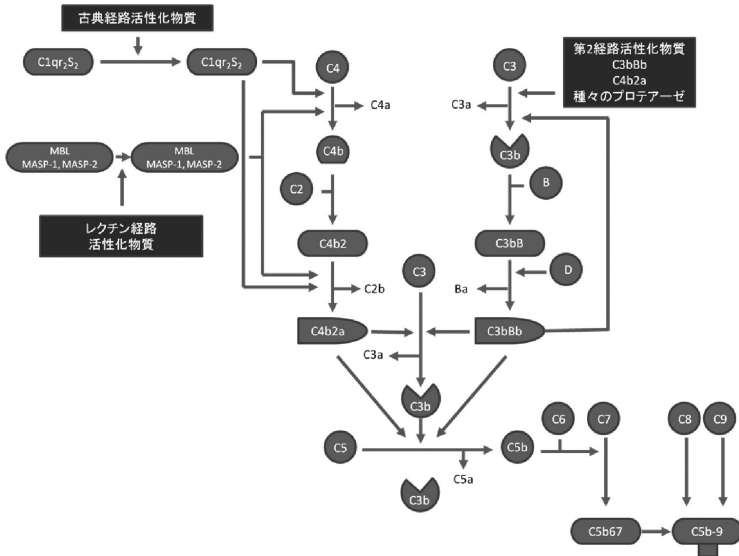


図2 補体系活性化経路の模式

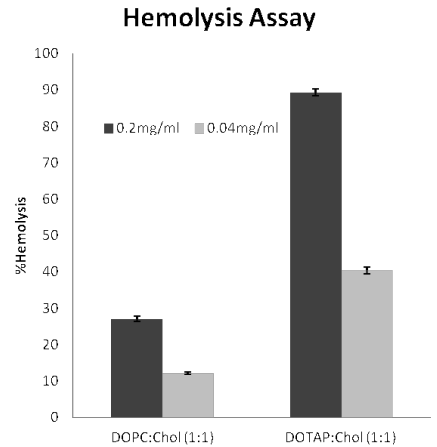


図3 中性リポソーム及びカチオン性リポソームの溶血率 (%)

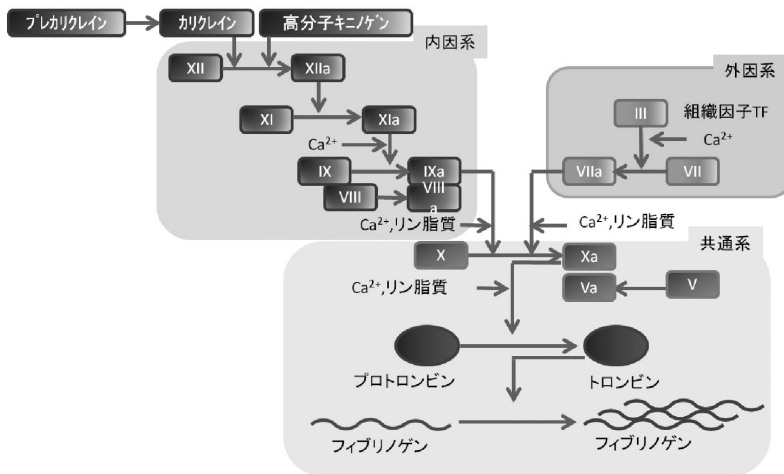


図4 血液凝固機構の模式図