

201427034A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等規制調和・評価研究事業

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 奥田 晴宏

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等規制調和・評価研究事業

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 奥田 晴宏

平成 27 (2015) 年 3 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研究	
	奥田 晴宏	
II.	分担研究報告	
	1. ナノ DDS 製剤	13
	加藤 くみ子	
	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	27
	石井 明子	
	3. 核酸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	41
	井上 貴雄	
	4. タンパク質性医薬品・核酸医薬品の安定性に関する研究	119
	阿曾 幸男	
	5. 遺伝子治療用医薬品の評価に関するレギュラトリーサイエンス研究	125
	内田 恵理子	
	6. 血糖降下薬の臨床評価に関するレギュラトリーサイエンス研究	139
	野村 由美子	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	181
IV.	研究成果の刊行物・別刷	185

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
総括研究報告書

－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：奥田 晴宏（国立医薬品食品衛生研究所 副所長）
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 第二室長）
井上 貴雄（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第二室長）
阿曾 幸男（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第二室長）
内田 恵理子（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 第一室長）
野村 由美子（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部長）
研究協力者：各分担研究報告書に記載した。

研究要旨

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。3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

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*における相互作用の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。今年度は、核酸（siRNA）等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価手法の開発を行った。また、昨年度リポソームを対象に最適化した血液適合性試験、つまり溶血性試験、及び血液凝固試験を種々の物理的・化学的特性を有するリポソームに適用し、物理的・化学的特性と血液適合性との関連性について明らかとした。一方、国際的な動向を踏まえナノ医薬品の分類等を考察するとともに、国際的なナノ医薬品の個別製品に対する規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価に関する文書化に着手した。

(2) 改変タンパク質製剤の評価に関するRS研究

改変抗体やFc融合タンパク質等の改変タンパク質製剤の開発環境整備を目的に、改変タンパク質製剤の開発初期からヒト初回投与試験（FIH）までの非臨床試験段階における留意事項の整理、及び、関連する評価法の開発とその有用性評価を行っている。本年度は、SPR法を用いた結合親和性評価法により、Fcγ受容体結合性の種差を明らかにして、抗体等改変タンパク質製剤のFIH安全性確保に必要なヒトへの外挿性に関する留意事項を考察した。また、新規改変タンパク質製剤の候補となるLactoferrin-Fc融合タンパク質（LF-Fc）をモデルとして、これまでに構築したFcγ受容体結合性／活性化能評価系の有用性を明らかに

した。さらに、これまでの調査ならびに研究を総括して、改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項をまとめた。

(3) 核酸医薬品の評価に関するRS研究

本研究では、国内外においてガイドラインが存在しない核酸医薬品について、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を行う。核酸医薬品は化学合成医薬品であるが、低分子医薬品やバイオ医薬品をベースとした規制では対応できない核酸医薬品に特有の性質がある。その重要課題の1つとされるのが、RNAを標的とする核酸医薬品（アンチセンス、siRNA等）による「ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果」の発現であり、その評価法の確立や判断基準の設定が課題となっている。本研究では、全身投与性の核酸医薬品として初めて上市されたKynamroに代表される「Gapmer型アンチセンス」を対象とし、オフターゲット効果の評価に関する包括的な解析を行った。その結果、13、15、18塩基長のGapmer型アンチセンスのいずれにおいても、明確なオフターゲット効果が観察され、相補性が高いほど発現抑制を受ける遺伝子の割合が大きいこと等が判明した。

(4) タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

タンパク質性医薬品の品質確保のためには品質変化と関連する有効成分、添加剤の因子を明らかにし、その因子を評価し、コントロールする手法を開発することが不可欠である。特に、保存中の品質変化を短期間に評価できる標準的な評価法があれば、安定な処方探索のための期間が短縮され、開発を促進するものと考えられる。本研究においては抗体医薬の市販製剤について、安定性評価法としての標準化を目的とし、近年タンパク質の安定性との関連が示唆される β 緩和時間等の分子内の局所的な運動性やタンパク質の分解に伴う微少な熱を指標とする安定性評価の可能性について検討した。 ^{13}C -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。また、分解に伴う熱を等温マイクロ熱量計で観測でき、熱の大きさと分解速度が関連することが示された。

(5) 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

遺伝子治療用医薬品（遺伝子治療用製品）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、今年度は次世代シークエンサーを用いたレトロウイルスベクターの品質評価について検討した。その結果、一過性発現で製造するベクターはロット間で大きく品質が異なる可能性が示されたが、プラスミドの純度が品質に影響する可能性について今後検討が必要であることが明らかとなった。レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターのようにトランスフェクション法により製造するベクターでは、品質評価としての塩基配列解析の重要性が示唆された。さらに、遺伝子治療用製品の開発途中での製法変更や設計変更時の考え方、特に旧製法や旧ベクターで得られた非臨床試験データの利用可能性に関する考え方をまとめた。これを基にリフレクションペーパーの作成を開始した。

(6) 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

日本発の新薬の開発を効率的・効果的に行うためには、レギュラトリーサイエンスに基

づき承認申請に当たって考慮すべき要件や基準を明確化することが必要である。血糖降下薬について、既存の臨床評価ガイドラインでは言及されていない新規のインスリン製剤の臨床評価方法等について検討し、今後の臨床開発や承認審査に資するガイドライン改訂案を策定した。

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、開発～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さらに本年度は特に血糖降下薬をとりあげ、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

(1) ナノDDS製剤の評価法

(1-1) 核酸（siRNA）等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価法の開発

異なる蛍光特性を有する色素でそれぞれ標識したリポソームとsiRNAを混合し、複合体を形成した。マクロファージ細胞であるMD細胞、及びヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に複合体を添加し、5-6時間後に共焦点顕微鏡（Nikon、A1）で細胞内局在を観察した。

(1-2) ナノDDS製剤の血液適合性に関する研究

昨年度最適化した溶血試験法を用いて、種々の脂質組成を有するリポソーム製剤に適用した。また、血液凝固時間（PT時間）の測定法を、種々の脂質組成を有するリポソームに適用した。さらに、科学的な論文を中心に血小板凝固試験に関して調査した。

(2) ナノ医薬品の分類に関する調査研究

欧州医薬品庁（EMA）や米国食品医薬品局（Food and Drug Administration: FDA）から発出されているガイドライン等や科学的な論文を中心に、ナノ医薬品の分類に関する動向を調査した。

(3) リポソーム製剤の評価に関する研究

品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性試験の評価に当たっての留意点および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって

確認しておくべき事項の文書化に着手した。

(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。

B-2 改変タンパク質性製剤の評価に関するRS研究

(1) SPR法を用いたFcγR結合に関する種差の解析

センサーチップにヒト、マウス、またはカニクイザルFcγ受容体細胞外ドメインの組換えタンパク質を捕捉し、各種抗体医薬品類をアナライトとして添加して、結合親和性を解析した。

(2) Fc受容体結合性・活性化能評価系の有用性評価：LF-Fcの特性解析への応用

CHO細胞で発現したLF-Fc及びヒンジ領域欠損LF-Fcについて、SPR法により、Fcγ受容体結合性を解析した。また、Fcγ受容体発現レポーター細胞を用いて、LF-FcのFcγ受容体活性化能を測定した。

(3) 改変タンパク質製剤開発における留意事項

高濃度溶液製剤が求められる近年の抗体医薬品の開発動向を踏まえ、抗体等改変タンパク質製剤の分子設計において求められる要件を考察した。また、「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」を参照し、改変タンパク質製剤に特有の留意事項をまとめた。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面での配慮を要する試薬等は用いていない。

B-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

本研究で行った研究は以下の4点である。それぞれ研究方法の概略を記載する。

(1) *in silico*解析 (オフターゲット候補遺伝子の抽出および整理)

ライフサイエンス統合データベースセンター・内藤雄樹氏の御協力のもと、10-30塩基長程度の短いオ

リゴ核酸の相同性検索に適したGGRNAおよびGGGenomeの検索システムを用いて、Gapmer型アンチセンスと相補結合するヒトmRNA (=オフターゲット候補遺伝子) の抽出を行った。この際、アンチセンスとの相補結合部位にミスマッチやインサーション、あるいはデリーションを有するヒトmRNAについても漏れなく抽出し、結合様式を指標に整理を行った。なお、GGRNAおよびGGGenomeを用いた検索に関しては、一般に公開されている検索条件ではオフターゲット候補遺伝子を幅広く抽出することが困難と考えられたため、内藤氏の協力のもと、本研究独自に検索システムを改良し、可能な限り相補性の条件を緩めて検索を行った。

(2) ヒト培養細胞を用いた*in vitro*解析 (オフターゲット効果が引き起こされる配列条件の検証：マイクロアレイ解析)

Gapmer型アンチセンスは標的RNAと相補的に結合し、標的RNA鎖を切断することで有効性を発揮する。本解析では、「Gapmer型アンチセンスとどの程度の相補性を有するmRNAが分解されるか」について検証するため、eGFP mRNAを標的とするアンチセンスとeGFP発現ヒト細胞を用いて、ヒト細胞に内在的に発現する遺伝子への影響を検討した。まず、eGFP mRNAに対して考えられる全ての仮想アンチセンス (13、15、18塩基長) を設計し、*in silico*解析によってアンチセンスと相補性を有するヒト遺伝子 (=オフターゲット候補遺伝子) の数を調べた。この中から、オフターゲット候補遺伝子数が多いアンチセンスを約38本抽出・合成した後、eGFP発現ヒト細胞を用いた*in vitro*解析により、eGFP mRNAを効率よく分解するアンチセンスを5本選別した。次に、これらの抗eGFPアンチセンスをそれぞれeGFP発現ヒト細胞に導入し、内在的に発現するヒト遺伝子の発現変動をマイクロアレイにより網羅的に解析した。得られた遺伝子発現のデータは、「①*in silico*解析」で抽出・分類したオフターゲット候補遺伝子のグループ毎に発現変動を統計解析し、相補性の程度と発現変化の関連を検証した。

(3) *in vitro*試験と*in vivo*試験の相関性に関する検証 (マウス肝培養細胞とマウス肝臓におけるオフター

ゲット効果の比較)

ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果はゲノム配列がヒトと異なる動物では評価できないため、ヒト細胞を用いた試験が必要である。培養細胞を用いた評価系を構築する前提として、細胞系の試験で個体のオフターゲット効果を予測できることを実験的に示しておくことが望ましい。そこで、マウス由来培養細胞とマウス個体と同じGapmer型アンチセンスを導入し、細胞と個体における遺伝子発現の変化を比較した。具体的には、既報論文から、マウス個体において標的mRNAを効率よく分解するGapmer型アンチセンスを選択・合成し、当該アンチセンスがマウス肝培養細胞においても有効であることを確認した。次に、当該アンチセンスをマウス肝培養細胞およびマウスに導入し、肝細胞および肝臓から得たRNAでマイクロアレイ解析を行った。

(4)ヒト肝細胞キメラマウスを用いたオフターゲット効果の検証

近年、細胞／組織の一部がヒト由来の細胞に置き換わった「ヒト化動物」の研究が進んでいるが、中でも肝臓がヒト肝細胞に置き換わった「ヒト肝細胞キメラマウス」については安定提供されるまでに技術進展しており、医薬品評価系としてのポテンシャルも報告されている。一方、全身投与されるアンチセンス医薬品は肝臓に集積・機能することが知られており、実際、現在開発されているGapmer型アンチセンスの多くは肝臓を標的とするものである。上述のように、オフターゲット効果は動物では評価できないが、ヒト肝細胞キメラマウスを用いれば、アンチセンス医薬品のオフターゲット効果を個体で評価できる可能性がある。そこで、「(2)ヒト培養細胞を用いた*in vitro*解析」で選別したGapmer型アンチセンスをヒト化肝臓マウスに投与し、マイクロアレイを用いてオフターゲット効果を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した「ヒト肝細胞キメラマウス」の作成の際に用いた「ヒト肝細胞」については、インフォームド・コンセントが得られた市販のヒト凍結肝細胞を利用した。動物実験においては、国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施

に関する規定に従った。

B-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

4種の抗体医薬の市販製剤(ヒュミラ皮下注40mgシリンジ0.8mL(アダリムマブ)、ランマーク皮下注120mg(1.7mL×バイアル、デノスマブ)、アクテムラ点滴静注用400mg(トシズマブ)、レミケード点滴静注用100mg(インフリキマブ))について¹³C-NMR緩和時間を測定するとともに、タンパク質の分解に伴う微少な熱を等温マイクロ熱量計を用いて測定した。さらに、保存した試料について、サイズ排除クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーにより分解物を定量し、分解物の量をもとに製剤間の保存安定性の差を評価し、保存安定性と¹³C-NMR緩和時間やタンパク質の分解に伴う微少な熱との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面での配慮を要する試薬等はない。

B-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

(1)次世代シーケンサーを用いたレトロウイルスベクターの品質評価

gp91phox遺伝子発現レトロウイルスベクターとして、stable cell lineの培養上清及びパッケージング細胞にエンベローププラスミドとベクタープラスミドを一過性にトランスフェクションした培養上清の2種類の方法で産生した。これら2種類のベクターから核酸を調製し、キャピラリーシーケンサーABI 3500xl Genetic Analyzerと次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000を用いて塩基配列解析を行った。

(2)遺伝子治療用製品の製法変更及び設計変更時の考え方について

遺伝子治療用製品の開発途中での設計変更時の考え方に関するEMAのリフレクションペーパー(Reflection paper on design modifications of gene therapy medicinal products during development)及び関連する論文等をもとに検討した。

(倫理面への配慮)

ウイルスベクターを用いた実験は、成育医療研究センター及び国立医薬品食品衛生研究所の遺伝子組換え実験安全管理規則に基づき適正な審査により承認されたもので、規則を遵守して適切に実施された。

B-6 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

糖尿病治療薬に関して、既存の臨床評価ガイドラインには言及されていない新規のインスリン製剤を開発する際の臨床評価方法を検討するとともに、インスリン製剤を除く新規の血糖降下薬と既承認のインスリン製剤を併用した場合の臨床評価方法等を検討した。

(1)インスリン製剤の臨床評価方法

これまで言及されてこなかった新規のインスリン製剤を開発する際の臨床試験について、海外のガイドライン並びにこれまで承認された製剤の申請データパッケージ及び審査情報をもとに、必要な試験の種類や、試験ごとの目的、対象、評価項目、試験期間、試験方法、観察項目、評価法等について整理した。

(2)インスリン製剤併用時の臨床評価方法

インスリン以外の血糖降下薬と既承認のインスリン製剤を長期間併用した場合の安全性及び有効性を評価するための臨床試験について、インスリン製剤の特徴を踏まえ、目的、対象、評価項目、試験期間、用法・用量、試験症例数、観察項効能・効果の記載等について整理した。

(3)その他

糖尿病にかかる最新の治療ガイドライン、パブリックコメント等を参照し、記載内容を更新した。また、これらの評価方法にかかる考え方について日本糖尿病学会年次学術集会においてシンポジウムを開催するとともに、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構新薬審査第一部において専門協議を開催し、専門家と意見交換を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、承認審査情報の整理等を中心に行っており、人権擁護上の配慮や動物愛護等に配慮が必要な事項はない。

C. 結果

C-1 ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

(1)ナノDDS製剤の評価法

リポソーム、及びsiRNAを異なる蛍光特性を持つ色素でそれぞれ標識後、複合体を形成し、2種類の細胞に添加後、共焦点顕微鏡で観察することにより、siRNA、脂質、及び両者の複合体の局在を観察することが可能となった。

前年度確立した溶血性試験、及び血液凝固試験について、様々な脂質組成を有するリポソーム製剤に応用し、リポソームの物理的・化学的特性と血液適合性との関連性について明らかとした。

(2)ナノ医薬品の分類

ナノ医薬品を、製剤側の特性を利用した機能、及び生体側の特性を利用した機能により分類を試みた。さらに、ナノ医薬品の分類に関する国際的な動向を調査した。

(3)リポソーム製剤の評価

国際的な個別ナノDDS製剤の規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価にあたっての留意点及び評価手法の文書化に着手した。品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性評価の節は、申請時に必要なデータセットを想定して作成することとする。一方、First in humanの節は、ヒトに初めて投与するまでに確認しておくべき品質、非臨床データは何か、またヒト初回投与量設定において考慮すべき点に関して記述することとした。

C-2 改変タンパク質性製剤の評価に関するRS研究

(1)FcγR結合に関する種差の解析

糖鎖構造あるいはサブクラスの異なる抗体について、ヒト、カニクイザル、マウスのFcγ受容体との結合親和性を比較したところ、糖鎖改変によりFcγRIIIa結合親和性を上昇させた改変IgG1抗体モガムリズマブでは、ヒトと同様サルFcγRIIIaについても結合親和性の上昇が観察されたものの、マウスFcγRIIIは応答せず、FcγRIVにおいて、結合親和性の上昇が認められた。IgG2抗体パニツムマブでは、ヒトFcγRIIbよりサルFcγRIIbへの結合性が特に高く、顕

著な種差が認められた。IgG4抗体ナタリズマブでは、サル、及び、マウスFc γ 受容体各サブクラスへの結合性がヒトに比べて低かったが、特にFc γ RI結合性の相違が大きく、種差が認められた。

(2)Fc受容体結合性・活性化能評価系の有用性評価：LF-Fcの特性解析への応用

新規改変タンパク質製剤のモデルとして、LF-Fc、及び、ヒンジ欠損LF-Fcの特性解析を行った。ヒンジ領域欠損LF-Fcは、免疫活性化による有害反応の回避と血中安定性の向上を目的に改変されている。ヒンジ領域欠損LF-FcのFc γ R結合性は、LF-Fcより低く、Fc γ RI結合性は検出されたが、Fc γ RIIIa、IIIaとの結合は検出されなかった。また、LF-Fc単独によるFc γ RIIIa活性化が認められたのに対して、ヒンジ欠損LF-FcではFc γ RIIIa活性化が認められなかった。血中濃度維持に関与するFcRnとの結合性は、ヒンジ領域の有無で大きな相違はなかった。

(3)改変タンパク質製剤開発における留意事項

改変型抗体やFc融合タンパク質等の改変タンパク質製剤では、近年、皮下投与製剤が増えている。改変タンパク質の分子設計においては、標的部分子との結合性のみでなく、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)製造工程を考慮した構造の最適化が必要と考えられた。また、FIHガイドランスにおいてリスク要因とされている標的分子(作用部位)の特性や、モデル動物の妥当性を検証する際、改変抗体医薬品製剤に共通の課題として、Fc受容体との結合性/活性化能の種差とヒトへの外挿性を考慮する必要がある、ヒト初回投与試験投与量の設定には、推定最小薬理作用量(MABEL)の利用を考慮することが必要と考えられる。

C-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

本研究において以下の点を明らかにした。

- ・13、15、18塩基長のGapmer型アンチセンスのいずれにおいても、明確なオフターゲット効果が観察され、相補性が高いほど発現抑制を受ける遺伝子の割合が大きかった。
- ・Gapmer型アンチセンスの塩基長が長くなるほど、

ミスマッチの影響は小さくなり、多くのミスマッチが入っても発現抑制される確率が高くなる傾向にあった。しかし、塩基長が長くなると相補結合する遺伝子の数が著しく少なくなるため、結果的には、短い塩基長のアンチセンスほどオフターゲット効果が起こる遺伝子の数が増えることが示唆された。

- ・今回の解析から、各塩基長のGapmer型アンチセンスについて、相補性の程度と発現抑制される遺伝子の割合の関係が明らかになったが、発現抑制される遺伝子と発現抑制されない遺伝子を*in silico*解析から予測することは現時点では難しいことがわかった。
- ・マウス肝培養細胞とマウス肝臓のオフターゲット効果の比較から、リポフェクション法で十分量のアンチセンスを導入する培養細胞よりもマウス組織の方が発現抑制の程度が弱い傾向にあった。重要な点として、個体の組織において強く発現抑制されたオフターゲット遺伝子は、培養細胞においても強く発現抑制されており、培養細胞の試験系で個体のオフターゲット効果を高い確率で予測できることがわかった。
- ・ヒト肝細胞キメラマウスにおいてもオフターゲット効果による発現抑制が観察され、ヒトにおけるオフターゲット効果の発現を動物個体で検証できるポテンシャルが示された。ただし、今回検討を行った投与量ではアンチセンスの肝臓内への導入が十分でなかったと考えられるなど、今後精査すべき課題も明らかとなった。

C-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

(1)サイズ排除クロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィーによる分解物の検出

25°Cで3か月保存した試料のサイズ排除クロマトグラムは非常に小さいがメインピークの前にピークが観測され、分子サイズの大きな分解物が生成していることが示された。製品によって分解物の生成量に差が見られた。分子サイズが大きな分解物の生成速度は非常に小さく、正確な値を求めるためにはさ

らに長期の保存実験が必要であるが、今回得られた結果から大まかに見積ると、アクテムラ点滴静注用、レミケード点滴静注用水に溶解したもの、ランマーク皮下注、ヒュミラ皮下注の順に生成速度が大きくなる傾向が見られた。

(2) 等温マイクロ熱量計を用いた分解に伴う熱の測定

抗体医薬の分解に伴う熱(Q)は、測定開始直後に比較的大きな熱が検出された後、15日以降はほぼ一定の熱が観測された。15日以降に観測された一定の大きさの熱は100日まで測定してもほぼ一定であり、タンパク質の分解に伴う熱と考えられる。タンパク質1gあたりの熱の大きさはアクテムラ点滴静注用が約0.9 μ W、レミケード点滴静注用水を溶解したものが約1.8 μ W、ランマーク皮下注が約4.6 μ W、ヒュミラ皮下注が約5.5 μ Wであった。これは分子サイズが大きな分解物の生成速度と同じ順番であり、等温マイクロ熱量計による分解熱と保存安定性が関連することが示唆された。

(3) 抗体タンパク質の¹³C-NMR緩和時間と安定性の関係

抗体タンパク質の¹³C-NMR緩和時間は製品によって異なっており、アクテムラ点滴静注用が約3.8秒、レミケード点滴静注用水を溶解したものが3.1秒、ランマーク皮下注が2.8秒、ヒュミラ皮下注が2.7秒であった。観測された緩和時間は運動の速度との間に反比例の関係が成り立つと考えられる。緩和時間の逆数の値が大きいほど分解物生成速度が大きい傾向があることから、緩和時間はタンパク質の安定性の指標として用いることができると考えられる。

C-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

(1) 次世代シーケンサーを用いたレトロウイルスベクターの品質評価

2種類の方法で産生したベクターについて、ベクタープラスミドの配列と回収したウイルスゲノムの配列の一致率をキャピラリーシーケンサーにより検討した結果、stable cell line由来のベクターでは、目的遺伝子(gp91phox)の配列は3回とも90%以上一致したが、一過性トランスフェクションで得たベクターでは、複数回の調製で一致率が0-99%と非

常にばらついた。一度にベクターの全長が解析可能な次世代シーケンサーを用いて解析すると、stable cell line由来のベクターでは解析に十分なカバレッジが得られ、もとのベクタープラスミドとウイルスゲノムで異なる領域を容易に判定できたが、一過性のトランスフェクション法により得たベクターは、数回サンプル調製を行っても解析に耐え得るカバレッジは得られなかった。

(2) 遺伝子治療用製品の設計変更時の考え方について

遺伝子治療製品の臨床開発の途中で良く行われるベクターコンストラクトの設計変更例として、プラスミドベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、AAVベクター、遺伝子導入細胞での変更例を取り上げ、導入した変更に伴い必要となる追加の非臨床試験の範囲や設計変更前のベクターで得られた非臨床試験データの利用、追加の非臨床試験が必要とされる場合の非臨床モデルの関連性、その後の臨床試験の開始前に新旧ベクターの製品設計の違いをブリッジングさせるために必要とされる非臨床データについてなど、変更時にどの程度のデータを収集すれば良いかをまとめた。

C-6 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

(1) インスリン製剤の臨床評価方法

インスリン製剤は、単剤では超速効型、速効型、中間型、混合型、持効型に分類され、超速効型と持効型糖の異なる種類の配合剤等がある。このため、新有効成分含有医薬品の場合、混合型製剤や配合剤の場合等、開発する製剤の特徴に応じて、必要な試験を特定した。

(2) インスリン製剤併用時の臨床評価方法

医療現場では血糖降下薬とインスリン製剤が併用される場合も多く、インスリン製剤と治験薬を長期間併用した場合の安全性、有効性を確認することも必要であり、その方法を明確化することが望まれていた。投与期間はICH E1ガイドラインにおける安全性を評価するために必要な症例数及び期間を考慮し1年以上とするが、特にインスリン製剤は、血糖値に応じて用法・用量の調節がなされ、併用試験にお

いてはインスリン製剤の用法・用量変更による安全性及び有効性への影響が大きいと考えられることから、投与期間の中で被併用薬であるインスリン製剤の用法・用量を原則として一定とする二重盲検期間（通常12～24週間）を設定することが必要であることを明確にした。

(3) その他

現行ガイドラインが公布されて以降の診療ガイドライン等の改訂を踏まえ、妊娠糖尿病の定義を更新する等の改訂を行った。また、パブリックコメントに寄せられた意見、質問を踏まえ、インスリン製剤併用試験における対象患者や用量の取扱いにかかる考え方を明確化するなどの対応をした。

D. 考察

D-1 ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

核酸医薬品や抗悪性腫瘍剤等においては、標的指向性の向上により標的細胞に医薬品を送達することで、副作用を低減し、有効性を増強させた画期的医薬品の開発が期待できる。細胞、及び細胞内小器官レベルでの動態を共焦点顕微鏡により可視化する手法に着目し、リポソームを蛍光標識しその細胞内動態を追跡する手法を構築した。構成脂質と有効成分を別々に蛍光標識したリポソームを用いて、それぞれの細胞への取り込み機構や細胞内局在を追跡することで、リポソームがどのような状態で細胞内にとりこまれ、細胞内のどこで崩壊し薬物が放出されるかを考察することが可能となる。

前年度最適化した*in vitro*試験法を用いて、製剤の品質特性と*in vitro*での血液適合性との相関に関するデータを蓄積した。今後は、さらに詳細な検討を行うとともに、*in vitro*での血液適合性と*in vivo*での安全性との関連性について情報を蓄積していきたい。

ナノ医薬品の特性は、ナノメートルのサイズによりもたらされるため、欧米では少なくとも1つ以上のナノメートルサイズの構成要素を有していることが、ナノ医薬品の作業定義、またはナノテクノロジーを応用した製品であるかどうかの判断基準の一つとして用いられている。複数のナノメートルサイズの構成要素を有しているナノ医薬品では、その適切

な品質特性評価のために、各要素を分離して評価することも今後は必要になってくるかもしれない。原理の異なる複数の分析手法の組み合わせによる品質特性評価が重要になってくるであろう。

リポソーム製剤の評価については、ブロック共重合体ミセル医薬品とは異なる特性に留意しつつ、海外より発出されているナノDDS製剤関連の文書を参考にし、文書化・国際的な発信を目指したい。

D-2 改変タンパク質性製剤の評価に関するRS研究

抗体等タンパク質製剤の非臨床試験では、標的分子結合性の種差が課題となるが、改変抗体では、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性や、infusion reaction等の有害反応に関わるFcγ受容体等との結合性に関しても、ヒトへの外挿性を考慮する必要がある。SPR法を用いたFcγ受容体結合性解析法や、Fcγ受容体発現レポーター細胞を用いたFcγ受容体活性化能解析法は、抗体、Fc融合タンパク質の改変タンパク質製剤の評価手法として有用と考えられた。近年、Fc改変タンパク質製剤の開発が増えていることから、これらの評価法を活用し、非臨床試験の段階でヒトでの作用を適切に予測することが、FIH安全性確保に役立つと考えられる。

D-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

Gapmer型アンチセンスを開発するにあたり、ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の観点から留意すべき点を考察する。

・本研究の成果は、オフターゲット候補遺伝子を抽出する際に「どの程度の相補性を持つ遺伝子までピックアップすれば良いか」を判断するための1つの科学的根拠を提示している。注意すべき点として、今回の解析は「オフターゲット効果が起こりやすい条件」で検証を行っている点が挙げられる。本研究の結果を参考にしながらも、①ヒトにおいて実際に有効性を発揮する濃度は今回の解析より低いと推定されること、また、②相補性が低いオフターゲット候補遺伝子は統計的には変動する可能性があるが、変動する確率は極めて小

さいこと、などを考慮して、オフターゲット候補遺伝子を抽出するための検索条件を考察することが望ましいと思われる。

- *in silico*解析では発現抑制される遺伝子を予測することができないため、オフターゲット候補遺伝子が実際に発現抑制されるか否かを、ヒト細胞を用いて検証する必要があると考える。その際、発現抑制される遺伝子が数十から数百に及ぶ可能性が考えられるため、マイクロアレイのような網羅的な手法を用いるのが現実的と考えられる。
- ヒト細胞を用いた検証は実際に発現抑制される遺伝子を特定できる点で有用であるが、当該細胞に発現していない遺伝子に関しては検証ができないという欠点がある。この点は*in silico*解析と合わせて解析することで互いの弱点を補う必要がある。今回の解析から、完全相補あるいは1塩基ミスマッチのような相補性が高い遺伝子に関しては、高い確率でオフターゲット効果が誘導されることが明らかになった。すなわち、相補性が高い遺伝子に限定すると予測性は高いと考えてよい。*In vitro*試験に用いたヒト細胞に発現していない遺伝子であっても、アンチセンスと相補性が高い遺伝子については、オフターゲット効果が起こるという前提に立ち、安全性担保の観点から当該遺伝子の機能を考察する必要がある。

D-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

本年度の検討により、タンパク質の分子サイズの大きな分解物の生成速度と等温マイクロ熱量計による分解熱やタンパク質のカルボニル炭素の¹³C-NMR緩和時間との間に関連があることを示唆する結果が得られた。今回使用した¹³Cの共鳴周波数100MHzの装置を用いた場合、¹³C-NMR緩和時間は数日の測定時間を要する。また、十分なs/n比を得るためにはさらに長い測定時間が必要となる。等温マイクロ熱量計による分解熱の測定には定常状態になるまでに1ヶ月を要することから、測定時間の観点からは¹³C-NMR緩和時間が有利であると考えられる。しかし、¹³C-NMR緩和時間と分子運動性の関係は運動の速度

によって比例関係が成り立つ場合と反比例の関係が成り立つ場合があり、緩和時間の温度依存性を検討することなどによりタンパク質の運動性と緩和時間の関係を詳細に検討する必要があると考えられる。

NMR緩和時間や分解に伴う微少な熱が保存安定性と関連することが示唆されたことから、実時間で保存に比べ、短時間で安定性評価が可能になり、革新的なタンパク質医薬の実用化促進につながるものと考えられる。

D-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

一過性発現で製造するベクターはロット間で大きく品質が異なる可能性が示されたが、プラスミドの純度が品質に影響する可能性について今後検討が必要である。レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターのようにトランスフェクション法により製造するベクターでは、品質評価としての塩基配列解析の重要性が示唆された。また、次世代シーケンサーはベクターの全塩基配列を一度に解析可能であり、今後のデータの蓄積により、ベクターで変異が起こりやすいホットスポットなどが明らかになることが期待される。一方、遺伝子治療製品の設計変更時の考え方については、設計のそれぞれの改良に関し、製品について既に確立されている有効性や安全性プロファイルへの影響や患者への潜在的リスクを評価することの必要性が示唆された。さらに、遺伝子治療ベクターの製法の大きな変更を実施する場合の新旧製品の品質の同等性評価と、その評価結果に基づく非臨床試験の追加の必要性について考察した。遺伝子治療ベクターは非常に複雑な構造をしており、従来のバイオ医薬品の製法変更における品質の同等性で新旧製品の安全性等とつなぐことが困難な場合が多く、品質の同等性の実証をどの程度実施可能か、また得られたデータから旧製品でのデータをどの程度読み込むことが可能か基礎的検討を行った。

D-6 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

現行の「経口血糖降下薬の臨床評価方法に関するガイドライン」(以下、旧ガイドラインという)は平

成22年7月に通知されているが、インスリン製剤は対象とされていなかった。一方、医療現場では、効果発現のタイミングが異なる様々な種類のインスリン製剤やこれらの配合剤が開発、使用されており、開発に当たっての留意点を示すガイドラインの策定が求められていた。

インスリン製剤の開発に当たって、確認すべき点や留意すべき点をまとめた。特に、インスリン製剤は、目標とされた血糖値に達成するように投与量を調節しつつ使用されることから、臨床試験においても、推奨される用法で、目標とされた血糖値に達成するように予め投与量の調節基準を設定し、その基準に基づき用量調節する（Treat-to-target試験）とともに、アナログ製剤の留意点についても明確化した。

経口血糖降下薬とインスリン製剤の併用について、被併用薬であるインスリン製剤の用法／用量を原則として一定とする二重盲検期間（通常12～24週間）を設け、その後はインスリン製剤の用量調節を可能とする試験デザインを提示した。

策定したガイドライン案については、パブリックコメントを募集し、パブリックコメントに寄せられた意見、質問を踏まえ、インスリン製剤併用試験における対象患者や用量の取扱いにかかる考え方を明確化するなどの対応をした。

今後、所要の手続きを経て改訂案が通知されることにより、広く新薬の開発や承認審査時の評価に資することが期待される。

E. 結語

平成26年度も政府は、一層の革新的医薬品の創製に向けてレギュラトリーサイエンス研究体制の整備を強化している。例えば、健康・医療戦略推進法では「国は、医療分野の研究開発の成果の実用化に際し、その品質、有効性及び安全性を科学的知見に基づき適正かつ迅速に予測、評価及び判断することに関する科学の振興に必要な体制の整備、人材の確保、養成及び資質の向上その他の施策を講ずるものとする（第十三条第二項）」としてRS研究の推進を掲げている。さらに日本再興戦略（平成26年6月24日閣議決定）においても革新的な医薬品・医療機器の研

究開発、再生医療等の先端医療研究の推進が挙げられ、引き続き健康・医療戦略（平成26年7月22日閣議決定）においても研究開発におけるレギュラトリーサイエンスを普及・充実させることが決定している。さらに医療分野研究開発推進計画（平成26年7月22日健康医療戦略推進本部）では、「日本が世界に先駆けて開発する核酸医薬の副作用評価法に関する研究の開発が取り上げられているところである。

本研究班は上記のような要請にこたえ、下記に列挙する成果を挙げる事が出来た。

E-1 ナノDDS製剤の評価に関するRS研究

核酸（siRNA）を搭載したナノ医薬品の細胞内動態評価法を構築した。ナノDDS製剤の血液適合性試験、溶血性試験及び血液凝固試験を用い、物理的・化学的特性の異なる様々なリポソーム製剤の血液適合性と物理的・化学的特性との関連性について考察した。ナノ医薬品の分類に関して考察、及び国際的な動向を調査するとともに、国際的な個別ナノDDS製剤の規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価にあたっての留意点及び評価手法の文書化に着手した。

E-2 改変タンパク質性製剤の評価に関するRS研究

SPR法を用いた結合親和性評価により、Fc γ 受容体結合性の種差を明らかにし、抗体等改変タンパク質製剤の薬理作用の外挿性には、Fc γ 受容体結合性を考慮すべきであることを明らかにした。

改変タンパク質製剤の候補となるLF-Fcの特性解析により、これまでに構築したFc受容体との結合性、及び、Fc γ 受容体活性化能の評価系の有用性を明らかにした。

改変タンパク質製剤の分子設計から非臨床評価までの留意事項を明らかにした。

E-3 核酸医薬品の評価に関するRS研究

本研究では、Gapmer型アンチセンスのオフターゲット効果を考察するために必要な実験的データを包括的に示した。ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット効果の発現は科学的な因果関係が極めて

明確であるため、適切な評価を行えば、オフターゲット効果による有害作用の発現は確実に食い止めることができると考えられる。まずは、適切な*in silico*解析と*in vitro*解析を組み合わせることで、「ヒトにおいてオフターゲット効果が起こる可能性が高い遺伝子」を知ることが重要である。その上で当該遺伝子の機能、発現時期、発現部位等を総合的に勘案し、当該遺伝子の抑制による有害作用の発現の可能性を考察し、安全性試験の必要性を判断すべきであろう。

E-4 タンパク質性医薬品等の安定性に関するRS研究

タンパク質の高次構造の揺らぎを¹³C-NMRによって評価する方法について市販モノクロナル抗体製剤を用いて検討した。動的な揺らぎの指標である¹³C-NMR緩和時間はサイズ排除クロマトグラフィーで検出される大きなサイズの分解物の生成速度と関連することが示唆され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。また、分解に伴う熱を等温マイクロ熱量計で観測でき、熱の大きさと分解速度が関連することが示された。

E-5 遺伝子治療用医薬品の評価に関するRS研究

stable cell lineにより製造したベクターは品質が一定で次世代シーケンサーによる全塩基配列解析が可能であり、配列に変異が生じた場合でも検出可能

であるが、一過性のトランスフェクションで製造したベクターは品質がロットにより大きく異なり、塩基配列解析の重要性が示唆された。また、遺伝子治療用製品の開発途中での製法変更や設計変更時の考え方をまとめた。これを基に、遺伝子治療製品の製法変更や設計変更時の考え方、特に旧製法や旧ベクターで得られた非臨床試験データの利用可能性に関するリフレクションペーパーを作成する予定である。

E-6 血糖降下薬の臨床評価に関するRS研究

日本発の新薬の開発を効率的・効果的に行うための取り組みの一環として、血糖降下薬について、既存の臨床評価ガイドラインでは言及されていない新規のインスリン製剤の臨床評価方法や経口血糖降下薬とインスリン製剤の併用時の臨床評価方法等について検討し、今後の臨床開発や承認審査に資するガイドライン改訂案を策定した。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

各分担研究報告書に記載した。

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）
分担研究報告書

－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

ナノ医薬品と生体タンパク質・細胞との相互作用は、生体内安定性・生体内分布、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。本年度は、核酸（siRNA）等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価手法を構築した。前年度確立したナノDDS製剤の血液適合性試験のうち、溶血性試験及び血液凝固試験について、様々な脂質組成を有するリポソーム製剤に応用し、物理的・化学的特性と血液適合性との関連性について明らかとした。国際的な動向を踏まえナノ医薬品の分類等を考察するとともに、国際的な個別ナノ製剤の規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価に関する文書化を開始した。これまでにナノ医薬品に関して得られた知見に対する情報提供を目的に、ナノ医薬品に関するホームページを整備・充実させた。

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、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。そこで本年度は、核酸（siRNA）等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価手法を構築した。また、昨年度リポソームを対象に最適化した、ナノDDS製剤の血液適合性試験、つまり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、種々の物理的・化学的特性を有するリポソームを用いて測定し、物理的・化学的特性と血液適合性との関連性について明らかとした。一方、国際的な動向を踏まえナノ医薬品の分類等に関して考察するとともに、国際的なナノ医薬品の個別製品に対する規制文書を参考に、リポソーム製剤の評価に関する文書化に着手した。得られた知見に対する情報提供を目的に、ナノ医薬品に関するホームページを整備した。

B. 研究方法

(1) 核酸 (siRNA) 等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価法の開発

リポソームは、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) 及び Chol、蛍光標識した NBD-DOTAP を物質量比で 49.5 : 50 : 0.5 mol で混合し、脂質薄膜法¹⁾ 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。

siRNA のモデルとして、サイトカイン産生を誘起することが報告されている、 β -ガラクトシダーゼに対する siRNA (β -gal 728、ジーンデザイン株式会社合成) を用いた²⁾。

5'-CUACACAAAUCAGCGAUUUtt-3'

5'-AAAUCGCGUAUUUGUGUAGtt-3'

細胞には、マクロファージ細胞である MD 細胞 (ATCC) および、ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC (Lonza) を用いた。ガラスボトムディッシュ (Matsunami glass) に細胞を播種し (MD cells : 50000 cells/2mL/well for 72 hr incubation)、CO₂ インキュベータ内で培養した。N/P 比で 1、2 となるように liposome と siRNA を混合後 30 分間室温で静置し、liposome-siRNA 複合体を opti-MEM 存在下で添加 (5 μ g as liposomes/mL/well)、5-6 時間 CO₂ インキュベータ内で培養した。観察前にヘキスト (0.1 μ g/mL) で 15 分間染色した。共焦点顕微鏡 (Nikon, A1) で細胞内の局在を観察した。

(2) ナノ DDS 製剤の血液適合性に関する研究

(2-1) 溶血性試験

実験で用いるリポソームは、表 1 に示す組成の脂質を、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。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、0.4mg/mL の 2 濃度になるよう 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 5 min 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)。

(2-2) 血液凝固試験

血液凝固試験用標準ヒト血漿、PT 測定試薬「デイドイノビン」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 1 mL 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 の比率となるよう混合し 37 $^{\circ}$ C で 30min インキュベートした。凝固時間 (PT 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。

(2-3) 血小板凝固試験に関わる評価法の調査研究

科学的な論文を中心に血小板凝固試験に関して調査した。

(2-4) ナノ医薬品の分類に関する調査研究

ナノ医薬品の分類に関して考察するとともに、欧州医薬品庁 (EMA) や米国食品医薬品局 (FDA) から発出されているガイドライン等や科学的な論文を中心に、ナノ医薬品の分類に関する国際動向を調査した。

(3) リポソーム製剤の評価に関する研究 :

品質特性、製造工程管理、薬物動態、作用メカニズム、非臨床安全性試験の評価に当たっての留意点

および評価試験法、さらに初回ヒト試験に先だって確認しておくべき事項の骨子をまとめた。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 核酸 (siRNA) 等を搭載したナノDDS製剤の細胞内動態評価法の開発

リポソーム、及びsiRNAの両局在を調べるために異なる蛍光特性を有する色素でそれぞれを標識することとした。リポソームはNBDで標識したDOTAPをモル比で0.5%加えることで蛍光標識化を行った。一方、siRNAは5′末端にssH amino linkerを介してAlexa594を修飾したものをを用いた。[キャリア中のカチオン性基の総数 (N)] / [核酸中のリン酸基の総数 (P)] として定義されるN/P比が1及び2となるように混合したりポソーム・siRNA複合体(以降、複合体と称する)を、MD細胞、及びHUVEC細胞に添加し、細胞内への局在について今回新たに立ち上げた共焦点顕微鏡システムにより調べた。

N/P比1では、粒子径115nm (PDI=0.228)、ゼータ電位-27.4mVであったのに対し、N/P比2では粒子径105nm (PDI=0.197)、ゼータ電位61.0mVであった。このようにN/P比の違いにより粒子径に大きな違いはなかったが、ゼータ電位が大きく異なっていた。

このゼータ電位の差は、細胞内への複合体の細胞内取り込みにも大きく影響を与え、S/P比1では、いずれの細胞においても、細胞内への取り込み量は少なく、微小な蛍光が観察されるのみであったが、S/N比2では、HUVEC細胞内の蛍光量が増加しており、より多くの複合体が取り込まれていることが明らかとなった。これは、正電荷を帯びた複合体と負電荷を帯びた細胞膜との相互作用によるものと考えられる。一方、MD細胞では、S/N比2においても細胞内への取り込みはS/N比1と変わりなく、細胞種の違いにより取り込みが大きく異なることが明らかとなった。さらに、図1に示す通り、細胞内で観察された蛍光は、siRNAに由来する赤い色素とリポソームに由来する緑の色素、両者が重ね合わさった黄色の色素の3種が観察され、リポソームと複合体しているsiRNA、及びリポソームから遊離しているsiRNAが存在していることが明らかとなった。

(2) ナノDDS製剤の血液適合性に関する研究

本研究では、昨年度確立した上記手法のうち、溶血性試験法、及び血液凝固試験法について、リポソーム製剤の物理的・化学的特性と血液適合性との関連性について明らかとした。

(2-1) 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³⁾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。

図2に示す通り、脂質濃度の高い方が、溶血性が高かった。また汎用されているドキシルと比べ、リポソーム#1、2、3、6、8で溶血性が高い結果が得られた。特に、カチオン性の脂質からなるリポソーム#6で非常に高い溶血性が観察されたが、PEG修飾をすることで、低減されることが明らかとなった。カチオン性脂質とマイナスの電荷を帯びている脂質との相互作用の結果溶血性にも影響を及ぼすことが報告されており⁴⁾、本事件でも確認され、

本試験法の妥当性が示された。

(2-2) 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となりうる。本血液凝固試験法は、ナノDDS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。

本研究では、評価項目として汎用されるAP時間を測定することとした。図3に示した通り、いずれの組成においても、また、いずれの脂質濃度においてもAP時間への影響は見られなかった。今後は、同様に様々な脂質組成を有するリポソームにおいてAPTT時間を測定し、さらに詳細に血液凝固作用への影響を精査したい。

(2-3) 血小板凝集に関する調査

血小板凝集への影響もいくつかのナノマテリアルにおいて観察されている(表2)。血液凝集は血液凝固カスケードの一部の現象としてとらえられることができるであろう。ナノマテリアルをキャリアとして医薬品開発が進んでいる、siRNA自身も血小板凝集抑制作用が報告されている⁵⁾。血小板凝集試験法は表3に示す通り複数報告されている。表3にし複数存在する。複雑なカスケードを経て、*in vivo*での血液凝固という症状が生じると考えられるため、(2-2)で述べた試験法も含めたいずれの試験で疑わしい結果を得た場合は、*in vivo*での慎重な精査を要することが重要であろう⁶⁾。

(2-4) ナノ医薬品の分類等に関する調査研究

(2-4-1) ナノ医薬品の機能による分類

図4には、主として製剤側の特性を利用した機能と、主として生体側の特性を利用した機能により、便宜上、ナノ医薬品を分類してまとめた。ただし、これらはナノ医薬品に特徴的な機能の事例であること、また、多くのナノ医薬品では製剤側の因子と生体側の因子が相互に関連し機能している点にも留意する必要がある。

ナノテクノロジーを用いて形成されるナノメート

ルサイズの物質(ナノマテリアル)は、バルク部分が減少し、界面が増すことで、個々の原子・分子・バルク物質が有する化学的・物理的特性とは区別し得る特異な性質を示す。このナノマテリアルに特有の優れた性質を医薬品に応用した事例として、例えば、酸化鉄をナノメートルサイズの粒子にすることで磁性が変化し常磁性が現れる性質を利用したSPIO (superparamagnetic iron oxide: 超常磁性酸化鉄)があり、MRI造影剤として臨床応用されている。また、ナノマテリアルは単位質量あたりの表面積が増大するため、難溶性薬物をナノ結晶化することで溶解性や溶出性が増大し、バイオアベイラビリティの増大が期待される事例も製剤側に起因する機能として挙げられるだろう。

一方、生体側の特性を利用するために製剤を適切なナノメートルサイズに設計した製剤もある。一例としては、生体における毛細血管の細胞間隙構造の特性をナノ医薬品の体内分布制御に利用するもので、EPR (Enhanced permeability and retention) 効果⁷⁾を利用した静脈注射用ナノ医薬品(抗癌剤を内包したリポソーム製剤など)が挙げられるだろう。また、有効成分をキャリアに内包することで血中タンパク質の非特異的結合や酵素による分解を回避し、有効成分の安定性の向上が期待される。事例としては、核酸医薬品やペプチド・タンパク質性医薬品など不安定な薬物を内包したナノ医薬品の研究開発が挙げられる。ペプチド・タンパク質性医薬品では、患者の利便性やコンプライアンスの向上という点から経口投与が望まれるが、消化酵素やタンパク分解酵素による分解を受けやすく、また消化管粘膜透過性が低いことから、近年ナノメートルサイズのキャリアに内包した製剤の研究開発が盛んに行われている⁸⁾。その他、エンドサイトーシス等の機構によりナノ粒子の細胞内取り込みが促進される事象を利用した製剤の研究開発も進められており、核酸医薬品のような細胞内取り込みに工夫を要する医薬品の研究開発においては、今後重要な機能となるであろう。表4には、これらの機能を意図して製剤化された製品のうち我が国で臨床応用されているものを記す。

ナノ医薬品の作業定義や、ナノ医薬品を開発する

際に考慮すべき事項について、開発が盛んな欧米で改定作業が進んでいる。今後、我が国における規制方針を定める際の参考にするため、以下に調査内容を記す。

(2-4-2) FDAの状況

FDAにおいては、2006年にナノテクノロジー・タスクフォースが組織された。本タスクフォースは、ナノスケールのマテリアルを用いた革新的で安全性・有効性に優れた製品を継続して開発できるような規制の枠組みを策定するためのレギュラトリーサイエンスを推進している⁹⁾。2014年6月には、“Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology (FDAが規制権限を持つ製品にナノテクノロジーが応用されているかどうかの検討)⁵⁾”に関するガイダンスを发出している。本ガイダンスは、医薬品、医療機器、化粧品、食品など、FDAが規制する製品がナノマテリアルを含んでいるかどうか、またはナノテクノロジーを応用しているかどうかを検討する際のFDAの現在の考えを示したものであり、規制目的の定義を定めたものではないとしている。FDAが規制する製品がナノマテリアルを含んでいるかどうか、またはナノテクノロジーを応用しているかどうかについて検討する際の考慮点は以下の通りである、としている。

1. あるマテリアルまたは最終製品の少なくとも一次元の外寸法、または内部もしくは表面構造が、ナノスケールの範囲(約1 nmから100nm)となるように加工されたものであるかどうか。

さらに

2. 例え寸法がナノスケールの範囲外(ただし1 μmまで)であったとしても、あるマテリアルまたは最終製品が、その寸法に起因する物理的・化学的特性または生物学的影響を含む特性または現象を示すように加工されたものであるかどうか。

上記2つの考慮点は、市販前審査を必要とする製品においてはFDAがこれらの考慮点を当該製品に適用するかどうか判断する機会を与えるとともに、市

販前承認を必要としない製品にあつては開発者が上記2点を十分に考慮すべきである、としている。“約1 nmから100nm”というサイズは、欧州委員会、カナダ厚生省、国際標準化機構(ISO)、経済協力開発機構(OECD)のナノテクノロジーに関するワーキングパーティー、米国規格協会等により発表された定義、作業定義、または説明で使用されている。従って、これらの状況を考慮し、FDAが規制権限を持つ製品がナノマテリアルを含んでいるかどうか、またはナノテクノロジーが応用されているかどうか、を検討する最初のスクリーニングツールとして“約1 nmから100nm”というスケールが適用されるべきであるとしている。これらナノスケールに起因した特性又は現象のうち医薬品に関連したものとして、生物学的利用能の増加、投与量低減、または医薬品薬効の向上、有害性低減などが挙げられている。

医薬品に関する規制文書としては、上記ナノテクノロジー・タスクフォースが組織される以前に、リポソーム製剤に関するガイダンス案“Guidance for industry; liposome drug products”¹¹⁾が2002年に发出されている。このガイダンスはCMC(Chemistry, manufacturing and control)関連項目、ヒトでの薬物動態・バイオアベイラビリティに関する項目、及び表示方法に関する項目から構成されている。また、2010年には、ドキシソルビシン塩酸塩含有PEG修飾リポソーム製剤の後発品開発における生物学的同等性評価ガイダンス案“Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride”¹²⁾が发出されている。後者については製剤組成、ドキシソルビシンのリポソームへの内包方法、物理的・化学的特性が同等であることを前提とした、非常に限定された製剤についての生物学的同等性を対象とした文書となっている。生物学的同等性試験として、卵巣がん患者を対象とした臨床試験(遊離のドキシソルビシンと内包されたドキシソルビシンのAUCとCmax)、及び*in vitro*試験として粒子径分布測定が記載されている。さらに2013年には含糖鉄製剤の後発品開発における生物学的同等性評価ガイダンス案“Draft Guidance on Iron Sucrose”¹³⁾が发出されている。