

とが望ましい。

**Q24**

α-グルコシダーゼ阻害薬のような「2型糖尿病における食後血糖の改善」の効能を有する薬剤であっても、本ガイドラインに従って、同様の評価が必要となるのか。

**A24**

経口血糖降下薬の一つとして、同様に扱われる。

**Q25**

本ガイドラインを受け、既承認薬の添付文書への記載方針は変わるのか、既承認薬へのガイドラインの適用を確認したい。

**A25**

既承認の経口血糖降下薬について、一律に添付文書の記載を改める予定はない。なお、併用効能が承認されていない組み合わせについて新たに併用療法長期投与試験を実施し、効能・効果の一部変更承認申請を行うことは可能であるが、個別の事例については、機構に相談されたい。

その他

**Q26**

インスリン製剤の臨床評価においては、注射剤を念頭に記載されていると考えられる。注射剤以外の製剤の開発において留意する点はあるか。

**A26**

本ガイドラインのインスリン製剤の臨床評価においては、注射剤を念頭に記載している。吸入剤等の注射剤以外の製剤の開発においては、本ガイドラインに記載の試験に加え、適用部位の安全性などの試験が必要となる。

必要とされる具体的な試験内容については、各製剤により異なる可能性があることから、個別に機構に相談することが望ましい。

**Q27**

本ガイドラインは○年○月○日から適用されるが、それまでの間は、「経口血糖降下薬の臨床評価方法に関するガイドライン」が適用されることを確認したい。

**A27**

本ガイドラインの適用前は、「経口血糖降下薬の臨床評価方法に関するガイドライン」及び「経口血糖降下薬の臨床評価方法に関するガイドラインに関する質疑応答集（Q&A）」が適用される。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
石井明子, 川崎ナナ	第13章第2節 バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の品質関連規制と対応の留意点		動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術	技術情報協会	東京	2014	523-531

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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
Tada M, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Kawasaki N	Development of a cell-based assay measuring the activation of FcγRIIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies	PLOS ONE	9(4)	e95787	2014
Shimo, T., Tachibana, K., Saito, K., Yoshida, T., Tomita, E., Waki, R., Yamamoto, T., Doi, T., Inoue, T., Kawakami, J., Obika, S.	Design and evaluation of locked nucleic acid-based splice-switching oligonucleotides in vitro.	Nucleic Acids Research	42(12)	8174-8187	2014
加藤くみ子	ナノメディシンに関するレギュラトリーサイエンスの動向	BIO Clinica	29	1170-1174	2014
原島秀吉、秋田英万、加藤くみ子、石井武彦、松村保広、片岡一則	ナノテクノロジーを基盤とした医薬品のレギュラトリーサイエンス研究への取り組み	Drug Delivery System	29	217-225	2014
加藤くみ子	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：作成の経緯と概要	Pharm Tech Japan	30	1011-1015	2014
加藤くみ子	ナノ医薬品の評価に関する本邦および欧米の規制動向について	製剤機械技術学会誌	23	24-30	2014
加藤くみ子	ナノ医薬品の機能と実用化に向けた課題	Pharm Tech Japan	30	425-428	2014
井上貴雄	核酸医薬品開発の動向	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	45(4)	288-298	2014
井上貴雄	核酸医薬品開発の現状	PHARMSTAGE	14(3)	1-3	2014
井上貴雄, 吉田徳幸	核酸医薬品の実用化促進に向けた取り組み	国立医薬品食品衛生研究所報告	132	13-15	2014

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ドンス.	公衆衛生	78	125-129	2014
山口照英 内田恵理子	遺伝子治療の開発に関する我が国の規制と海外動向	Pharma Medica			印刷中
内田恵理子 五十嵐友香 佐藤陽治	遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究	衛研報告	132	10-12	2014

第5章 第1節 製品領域ごとに見る関連規制と対応の留意点

[2] バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の  
品質関連規制と対応の留意点

石井 明子

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第2室 室長 博士(薬学)

川崎 ナナ

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長 薬学博士

(株)技術情報協会

2014年4月発刊

「最新動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術」抜刷

## 第1節 [2] バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の品質関連規制と対応の留意点

はじめに

組換えタンパク質を有効成分とするバイオ医薬品は、目的物質の遺伝子を導入した細胞の培養により製造されるもので、これまでにエリスロポエチン、インターフェロン、抗体医薬品等、医療上重要な多くの製品が上市されている。バイオ医薬品の品質管理では、その複雑な品質特性と有効性・安全性の関連を理解し、原材料管理、工程パラメータ管理、工程内管理試験、規格及び試験方法等からなる品質管理戦略を適切に構築することが肝要である。バイオ医薬品の製造に用いられる細胞は、細胞基材と呼ばれ、原材料の一つに位置付けられる。細胞基材の特性や培養工程パラメータは、生産される組換えタンパク質の翻訳後修飾や不純物プロファイル等に影響するため、それらの管理は、最終製品の品質の確保において重要な要素となる。本節では、バイオ医薬品製造に用いられる細胞基材、バイオ医薬品の品質関連規制、及び、バイオ医薬品の品質管理における細胞培養関連の留意事項について概説する。

### 1. バイオ医薬品の製造に用いられる細胞基材

バイオ医薬品の製造工程は、目的物質の遺伝子を導入した細胞から、医薬品製造に適したクローンを選択、増幅して作製したセル・バンクから始まる。種培養～拡大培養、生産培養、培養上清の回収、精製、製剤化が、バイオ医薬品製造の主なステップである（図1）。

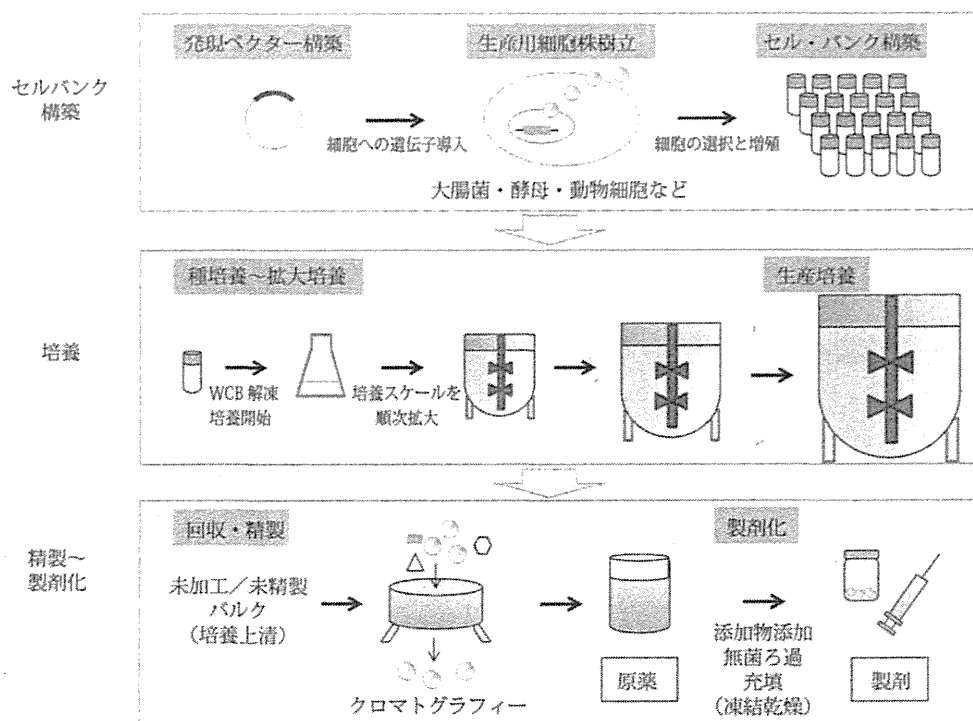


図1 バイオ医薬品の製造工程概略

バイオ医薬品の製造には、これまで、動物細胞、大腸菌、酵母の他、昆虫細胞、植物細胞等が用いられている。日本で現在市販されているバイオ医薬品の製造に用いられている細胞の内訳を図2に示した<sup>1)</sup>。動物細胞を用いて製造される品目が半数以上である。動物細胞は、糖タンパク質の製造に適用可能なことが特徴で、近年、開発品目の増加が著しい抗体医薬品等の製造に用いられている。動物細胞の内訳では、CHO細胞が最も多く、全体の約3分の2を占めている。

後述するように、動物細胞を用いる場合、大腸菌や酵母等の微生物では必要とされないウイルス安全性確保の対策が必要となる点に注意が必要である。

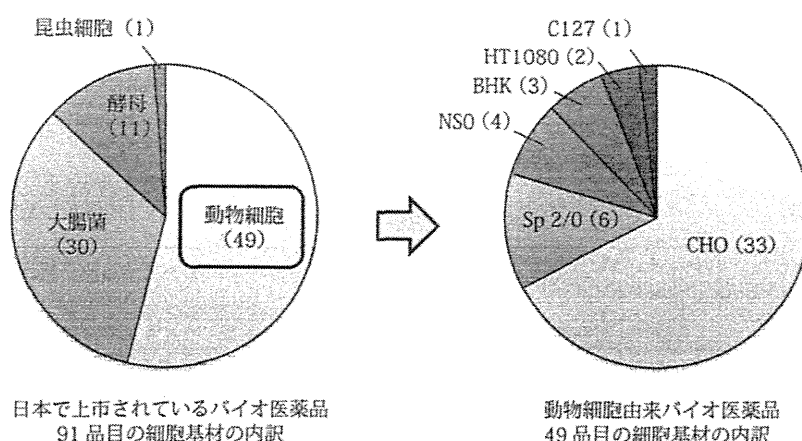


図2 バイオ医薬品の製造に用いられている細胞基材

## 2. バイオ医薬品の品質関連規制

### 2.1 バイオ医薬品の品質管理に関するガイドライン

バイオ医薬品の品質関連の規制文書として、表1に示すようなガイドライン類が整備されている<sup>2)</sup>。平成17年までに整備されたICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）ガイドラインQ5シリーズ、及び、Q6Bにおいて、バイオ医薬品に特化した品質管理の考え方が示されている。その後策定されたQ8～Q11ガイドラインでは、リスクマネジメントの考え方を取り入れた品質管理戦略の構築を含む考え方が述べられており、原材料、原薬、製剤を評価対象とした各論であるQ5シリーズ及びQ6Bをベースに、Q8～Q11を参照することで、品質特性と有効性・安全性を科学的に関連付けた合理的な品質管理戦略の構築が可能となる。また、日本独自の指針として、感染性物質の混入回避のために、生物由来原料基準が定められている。その他、プロセスバリデーション、GMP、承認申請書の記載に関しても、参考となるガイドライン類が策定されている。これらの他に、我が国に流通する医薬品の品質に関する規範書である日本薬局方には、バイオ医薬品の品質評価に用いられる試験法のいくつかについて、基本的な考え方や留意事項がまとめられており、特性解析の実施や、規格及び試験方法の設定の際には、有用な参考資料となる。

### 2.2 バイオ医薬品の品質管理

医薬品の品質管理の目的は、医薬品の品質特性を一定の範囲内に保つことにより、開発過程で確認された有効性・安全性を、市販後も継続して保証することにある。図3に示すように、品質管理戦略の構築においては、製造された原薬及び製剤について、特性解析を実施して品質特性を明らかにすること、特性解析結果、及び、非臨床・臨床試験結果や文献情報等の知見をもとに、有効性・安全性を担保するために優先的に管理すべき品質特性（重要品質特性）を選択し、その管理目標を設定すること、さらに、重要品質特性の管理戦略を構築すること、が中心的課題となる。品質管理戦略は、通例、原材料管理、工程パラメータ管理、プロセス評価、工程内管理試験、原薬／製剤の規格及び試験方法等から構成される。

表1 バイオ医薬品の品質管理に関する主なガイドライン類

分類		ガイドライン・通知・事務連絡		
特性解析, 品質管理		ICH Q6B	平成13年5月1日 医薬審発第571号	生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法
原材料	遺伝子発現構成体	ICH Q5B	平成10年1月6日 医薬審第3号	組換えDNA技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について
	セル・バンク	ICH Q5D	平成12年7月14日 医薬審第873号	生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来, 調製及び特性解析について
	生物由来原料		平成15年5月20日 厚生労働省告示第210号	生物由来原料基準
			平成21年3月27日 厚生労働省審査管理課事務連絡	生物由来原料基準の規定を満たさないマスター・セル・バンク又はマスターシードを使用した医薬品等の取扱いについて
		平成21年3月27日 厚生労働省審査管理課事務連絡	生物由来原料基準に規定する原材料の取扱いについて	
原材料・工程管理	ウイルス安全性	ICH Q5A	平成12年2月22日 医薬審第329号	ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について
製法変更	同等性/同質性評価	ICH Q5E	平成17年4月26日 薬食審査発第0426001号	生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の製造工程の変更にもなる同等性/同質性評価について
製法開発	原薬の製造と開発	ICH Q11	平成23年6月28日 厚生労働省医薬食品局審査管理課	原薬の開発と製造(化学薬品とバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)ガイドライン(案)
	製剤開発	ICH Q8	平成22年6月28日 薬食審査発第0628第1号	製剤開発に関するガイドラインの改定について
品質管理システム	品質リスクマネジメント	ICH Q9	平成18年9月1日 薬食審査発第0901004号 薬食監麻発第0901005号	品質リスクマネジメントに関するガイドライン
	品質システム	ICH Q10	平成22年2月19日 薬食審発第0219第1号 薬食監麻発第0219第1号	医薬品品質システムに関するガイドラインについて
プロセス・バリデーション	バリデーション基準		平成17年3月30日 薬食監麻発第0330001号	薬事法及び採血及び供血あつせん業取締法の一部を改正する法律の施行に伴う医薬品, 医療機器等の製造管理及び品質管理(GMP/QMS)に係る省令及び告示の制定及び改廃について
GMP	原薬のGMP	ICH Q7	平成13年11月2日 医薬発第1200号	原薬のGMPガイドラインについて
承認申請書	承認申請書における製造工程の記載		平成17年2月19日 薬食審査発第0210001号	改正薬事法に基づく医薬品等の製造販売承認申請書記載事項に関する指針について
承認申請添付資料	CTDにおける製造工程の記載	ICH M4Q	平成15年7月1日	医薬品の承認申請のための国際共通化資料 コモン・テクニカル・ドキュメント CTD - 品質に関する文書の作成要領に関するガイドライン
特性解析規格及び試験方法			平成23年3月24日 厚生労働省告示第65号	第十六改正日本薬局方
			平成26年2月28日 厚生労働省告示第47号	第十六改正日本薬局方第二追補

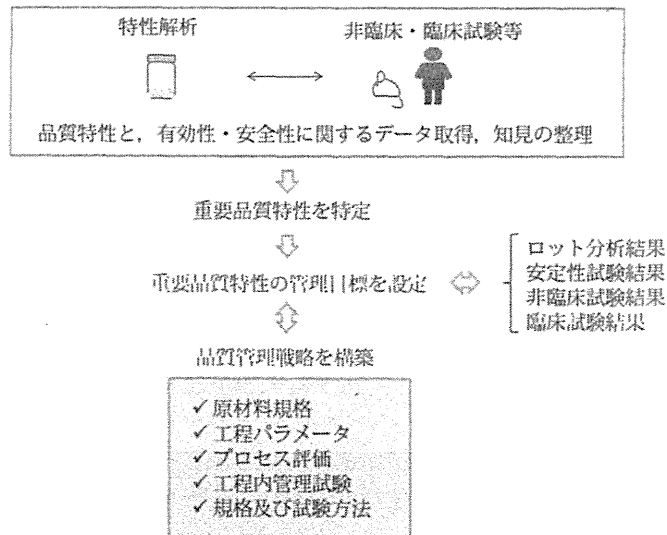


図3 バイオ医薬品の品質管理戦略構築の流れ



## 2.2.1 特性解析

バイオ医薬品の開発過程では、製造された原薬あるいは製剤について、構造、物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質、純度及び不純物に関する広範囲かつ詳細な特性解析を行い、その特性を明らかにする。表2に、バイオ医薬品の品質特性として代表的なものを示した。品質特性は、原薬/製剤に含まれる目的物質の分子変化体や、それらの物理的・化学的性質、あるいは、存在が想定される不純物等として表される。

表2 バイオ医薬品原薬の品質特性の例

有効成分関連	製造工程由来不純物 混入汚染物質関連
アミノ酸配列 (N/C 末など) ジスルフィド結合 高次構造 糖鎖 糖鎖 脱アミド体 酸化 糖化 凝集体 断片	宿主細胞由来タンパク質 宿主細胞由来 DNA 培地成分 緩衝液成分 カラム樹脂 (protein A など) 試薬 エンドトキシン 微生物 ウイルス

## 2.2.2 重要品質特性の特定と許容範囲設定

特性解析により明らかになった各品質特性について、非臨床・臨床試験で得られたデータや、関連する製品の情報等をもとに、有効性・安全性との関連付けを行う。その際、各品質特性について、生物活性、薬物動態、薬理作用、抗薬物抗体産生、有害事象発生等への影響と、その不確かさを考慮したリスク分析が有用である<sup>3)</sup>。リスク分析結果に基づき、優先的に管理すべき重要品質特性を特定する。重要品質特性が特定されれば、ロット分析結果、安定性試験結果、非臨床・臨床試験結果をもとに、有効性・安全性を担保できる範囲として、各々の重要品質特性の管理の目標を設定する。

## 2.2.3 品質管理戦略の構築

品質管理戦略は、重要品質特性が許容範囲に収まるよう、原材料の管理、工程パラメータ、プロセス評価、工程内管理試験、規格及び試験方法等を組み合わせて構築する。工程ごとに重要品質特性への影響、逸脱の頻度・検出性を考慮して管理方法を選択し、組み合わせる手法が有用である。品質管理戦略構築の際には、重要品質特性に影響する原材料特性、工程パラメータ等を明らかにし、それらの許容範囲を設定する。工程内管理試験は、培養上清や中間体等を対象に実施される試験であり、主として、原薬での試験より上流での管理が合理的である品質特性の管理に用いられる。工程内管理試験を実施することにより、製造工程の途中の段階で、製品の品質特性が目標とする管理の範囲内にあることを確認することができる。規格及び試験方法は、原薬及び製剤を対象に、重要品質特性が許容範囲内にあることを直接確認するもので、品質管理戦略の要である。規格及び試験方法は、出荷判定にも用いられる。

品質管理戦略として、一つの品質特性について、上記の管理手法のうち、複数のものが設定されることが多く、例えば、重要品質特性とされた糖鎖構造を、原材料の管理、工程パラメータの管理、並びに、規格及び試験方法により管理する、という戦略が考えられる。

設定された管理戦略の妥当性及び工程の再現性は、プロセスバリデーションにより確認する。プロセスバリデーションでは、原則3ロットの実生産スケールでの製造を行い、設定された稼働条件で、製造工程の各パラメータ、工程内管理試験結果、及び、製造された原薬及び製剤の特性が、予め設定された範囲に入ることを確認する。

## 3. バイオ医薬品の品質管理における細胞培養関連の留意事項

バイオ医薬品の品質管理において、細胞基材及び培養工程に関連して、特に留意すべきポイントを表3にまとめた。これらは、2.2.3で述べた品質管理戦略の要素のうち、原材料の管理、工程パラメータ管理、工程内管理試験に相当する。

表3 バイオ医薬品の製造工程における細胞培養関連の留意事項

<p><u>原材料管理</u></p> <p>遺伝子発現構成体</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 構築過程, 塩基配列, 細胞構築の履歴の保存</li> </ul> <p>セルバンク</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ MCB, WCB の構築</li> <li>✓ 特性解析試験, 純度試験 (ウイルス試験を含む), 安定性評価</li> <li>✓ 医薬品生産に用いることのできる世代数の規定</li> <li>✓ 更新方法及び更新時の基準の設定</li> </ul> <p>培地・培地添加物</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 市販品であっても受け入れ基準を設定し, 原材料特性の一定性を確保</li> </ul> <p>生物由来原料基準への適合性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 細胞, 培地添加物等</li> </ul> <p><u>工程パラメータ</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 重要工程パラメータの特定と範囲設定</li> </ul> <p><u>工程内管理試験</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 必要に応じ, 生産されるタンパク質の特性に関する試験, ウイルス試験等の設定</li> </ul> <p><u>ウイルス安全性</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ セルバンクのウイルス試験</li> <li>✓ 未加工/未精製バルクのウイルス試験</li> <li>✓ 細胞以外の生物由来原料の管理</li> </ul> <p><u>製法変更時の対応</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 同等性/同質性評価</li> </ul>
--

### 3.1 原材料の管理

バイオ医薬品製造の原材料には、培養工程で用いる細胞（遺伝子発現構成体が導入されたもの）、培地、培地添加物、精製・加工工程で用いる試薬類、カラム樹脂、水等がある。原材料の特性は、最終製品の品質特性に影響するため、原材料特性と製品の品質特性の関連を明らかにし、原材料に関しても、適切な基準を設定して管理する必要がある。

#### 3.1.1 遺伝子発現構成体

組換えタンパク質をコードする配列を含むベクターは、遺伝子発現構成体とよばれる。遺伝子発現構成体の特性は、目的物質の構造や発現量に影響するため、細胞基材の構築に用いられる遺伝子発現構成体は、構築過程、及び、全塩基配列が明らかなものでなければならない。遺伝子導入に始まる細胞基材の構築過程を含めて、情報を適切に整理、保管しておく。

#### 3.1.2 セル・バンク

細胞基材の特性は、目的物質の翻訳後修飾構造や不純物プロファイルに影響するため、バイオ医薬品の品質の恒常性確保のためには、各製造バッチで同じ細胞基材を用いることが望ましい。そのため、目標とする組換えタンパク質の生産に適した細胞株として樹立された細胞基材をセル・バンク・システムにより管理し、開発段階から市販後まで、常に単一の細胞プールに由来する細胞から製造工程を開始する。通例、セル・バンクとして、マスター・セル・バンク (MCB)、及び、ワーキング・セル・バンク (WCB) の2種類が作製される。

##### (1) セル・バンクの評価・管理

作製された MCB, WCB については、特性解析試験、及び、純度試験により、その特性を明らかにし、医薬品製造に適した細胞であることを確認する (表 4)<sup>4)</sup>。特性解析試験では、宿主細胞の確認、遺伝子発現構成体が導入され、目

的物質が発現していることの確認、ならびに、細胞に保持されている遺伝子発現構成体の配列やコピー数の解析等を行う。純度試験では、微生物学的純度、及び、他の細胞の混入に関して試験を行い、ヒト・動物細胞では、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス安全性試験（後述）等を実施する。

また、生産に使用可能な *in vitro* 細胞齢を規定し、*in vitro* 細胞齢の上限を超えて培養した細胞（CAL：cells at the limit of *in vitro* cell age used for production）についても同様の試験を行い、各バッチの培養期間を通じた細胞基材の安定性を確認する。バンクの凍結保存中の安定性についても評価が必要であるが、保存期間が長期にわたるため、予め保存期間を設定することは現実的でない。定期的にバンクの一部を解凍して予め設定された基準に適合することを評価し、継続して保存・使用が可能であることを確認していく。

## (2) セル・バンクの更新

MCB、WCB の使用予定に応じて、更新方法、及び、更新時の規格を設定する。通例、WCB の更新は MCB から行われる。MCB は更新予定がないとされる場合もある。医薬品の供給が途絶えることがないように、不測の事態に備えて、バンクは複数の施設に分割して保存する。

表4 セル・バンクの評価・管理（主な試験項目の例）

	遺伝子発現構成体	特性解析試験	純度試験	保存中の安定性、及び培養期間中の安定性
MCB	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 目的タンパク質をコードする部分の塩基配列</li> <li>&gt; 遺伝子発現構成体のコピー数、挿入と欠失、組込み部位の数</li> <li>&gt; プラスミド保持率（染色体外発現の場合）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 目的タンパク質の発現</li> <li>&gt; アイソザイム解析等による由来する種の確認</li> <li>&gt; 選択培地での増殖</li> <li>&gt; 生存率</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 細菌・真菌の否定試験</li> <li>&gt; マイコプラズマ否定試験</li> <li>&gt; 内在性及び非内在性のウイルスに関する試験</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 保存期間</li> </ul>
WCB	—	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 細菌・真菌の否定試験</li> <li>&gt; マイコプラズマ否定試験</li> <li>&gt; 外来性ウイルスに関する試験</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 保存期間</li> <li>&gt; 目的タンパク質発現の安定性</li> </ul>
CAL	> MCB と同じ内容の試験	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 内在性及び外来性ウイルスに関する試験</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; 目的タンパク質発現の安定性</li> </ul>

### 3.1.3 培地、及び、培地添加物

培地や培地添加物は、細胞の増殖や産生される組換えタンパク質の特性に影響する。市販品を使用する場合でも、受け入れ基準等を設定して管理し、原材料特性が一定に保たれるよう、留意する。

### 3.1.4 生物由来原料基準への適合性

ウイルス等のヒト感染性物質の混入を回避するため、バイオ医薬品の製造に用いる生物由来原料は、生物由来原料基準に適合したものをを用いる。生物由来原料に該当するものとして、細胞、培地成分、培地添加物等が考えられる。

生物由来原料基準では、細胞の入手方法について明らかにすること、細胞株や培養終了後の細胞についてウイルス試験を行うこと等が求められている。細胞以外の生物由来原料についても、健康な動物に由来するものであること、製造工程で真菌・細菌・ウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと等が必要とされている。また、各原材料については、品質及び安全性の確保に必要な情報が確認できるよう、原材料の作製の記録やロット番号を保存することが求められている。ウシ由来の原材料については、伝達性海綿状脳症伝播の回避のため、使用可能な原産国が限定されている。

生物由来原料基準に適合しない原材料は、薬事食品衛生審議会における個別製品毎のリスク評価等を経て、承認書に記載した上で使用可能な場合があるが、製品の添付文書での情報提供が必要となる。血清については、マスター・セル・バンク樹立の際にのみ用いられた場合は、一定の要件が満たされれば、添付文書への記載は求められない。

最近では、無血清培養によるバイオ医薬品製造が一般的になっており、製造工程で血清を用いるケースは減っている。細胞以外に生物由来原料を使わない製造方法を確立することは、製品への感染性物質混入の危険を低減することのみならず、品質管理の合理化にもつながると考えられる。

### 3.2 工程パラメータ管理

細胞培養工程において管理すべき工程パラメータの例として、温度、培地添加物濃度、溶存酸素濃度、溶存二酸化炭素濃度、pH、攪拌速度、細胞密度、生存率、培養時間等があげられる。培養工程のパラメータと品質特性や工程特性との関連については、培地成分濃度と糖鎖付加パターン、溶存酸素濃度と糖鎖付加の割合、剪断応力あるいは溶存二酸化炭素濃度と目的物質発現量の関連等、多数の例が報告されており、培養工程のパラメータは、種々の品質特性に影響する重要な要素である<sup>5)</sup>。

重要品質特性を一定の範囲に保つために優先管理すべき工程パラメータ（重要工程パラメータ）の特定には、重大性、頻度、検出性を考慮したスコア付の手法を用いることができる。各パラメータの許容範囲は、それまでの製造実績や一つの工程パラメータを変動させた一変量実験、あるいは、複数の工程パラメータを変動させた多変量実験の結果に基づいて設定する。複数のパラメータの相互の関係が品質特性に影響する場合、工程パラメータの許容範囲は、複数の工程パラメータの組合せからなるデザインスペースとして設定する。

### 3.3 工程内管理試験の設定

工程内管理試験は、培養上清や中間体等を対象に実施される。工程内管理試験を実施することにより、製造工程の途中の段階で、製品の品質特性が目標とする管理の範囲内にあることを確認することができる。細胞培養工程で行われる工程内管理試験の例として、生産培養終了後の培養上清（未加工/未精製バルク）のウイルス試験があげられる。生産される組換えタンパク質の特性に関する試験等も、必要に応じ、設定される。工程内管理試験として設定されない場合でも、適宜、モニタリングを実施することが工程の恒常性を確認するために有用である。

### 3.4 ウイルス安全性

バイオ医薬品では、これまでにウイルス汚染による健康被害の報告はないが、動物細胞はヒト感染性ウイルスの宿主になり得ること、培養工程で原材料等からウイルスが混入し、増幅される可能性も想定されることから、製造工程への感染性因子混入は避けなければならない。培養工程でウイルス混入事故が生じると、製造の停止、原因の究明、除染等に、多大な時間と労力が費やされるばかりでなく、医薬品の供給停止にもつながる。過去に、ウイルス汚染事故が何件か起きており、製品の供給停止に至った例もあることから<sup>6)</sup>、ウイルス安全性の確保は、製品の安全性確保と安定供給の両側面から重要である。

ウイルス安全性確保の対策は、主として、①セル・バンクのウイルス試験、②未加工/未精製バルクのウイルス試験、③精製工程のウイルス不活化/除去能の評価、からなる。①セル・バンクのウイルス試験では、評価対象となるウイルス、及び、試験方法、試験すべき細胞、試験検体について、表5に示す内容が推奨されている。②未加工/未精製バルクのウイルス試験では、表5の試験法のうち、*in vitro*試験が主に用いられる。③は、培養工程で万が一ウイルスの混入があった場合でも、最終製品にウイルスが混入しないよう、モデルウイルス等を用いて、精製工程のウイルス除去

表5 ウイルス試験の概要

評価対象	試験方法	試験すべき細胞	試験検体
レトロウイルス 及び 内在性ウイルス	感染性試験	MCB, CAL	細胞を含まない培養上清
	電子顕微鏡観察	MCB, CAL	生細胞/ 細胞を含まない培養上清
	逆転写酵素活性	MCB <sup>a</sup> , CAL <sup>a</sup>	細胞を含まない培養上清
	細胞種特異ウイルス試験	MCB <sup>b</sup> , CAL <sup>b</sup>	
非内在性ウイルス 及び 外来性ウイルス	<i>In vitro</i> 試験	MCB, CAL	溶解処理後の細胞/培養液
	<i>In vivo</i> 試験	MCB, CAL	溶解処理後の細胞/培養液
	抗体産生試験	MCB <sup>c</sup>	溶解処理後の細胞/培養液
	細胞種特異的ウイルス試験	MCB <sup>b</sup>	

a：レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要

b：細胞株の起源・由来から存在が予測されるウイルスを検出するための試験を適宜実施

c：げっ歯類由来の細胞について試験法が確立されている

CHO, C127, BHK 細胞等では、内在性レトロウイルス様粒子の存在が知られている。  
(ウイルス汚染に起因する安全上の問題は報告されていない。)

不活化能を定量的に評価しておくものである。詳細については、ICH Q5A ガイドラインに記されており、生物由来原料基準におけるウイルス試験に関する要求事項もこれに合致している。

セル・バンク以外の原材料についても、ウイルス安全性が確保されたものを用いる必要があることは言うまでもない。過去に海外で起こった培養工程のウイルス汚染事故では、血清等の生物由来原料が汚染源であったとされており<sup>6)</sup>、ウイルス安全性確保には、その他の原材料の管理も重要である。

### 3.5 製造方法の変更前後での同等性/同質性評価

上記のような留意事項を踏まえて、品質管理戦略が構築されるが、バイオ医薬品の開発過程や市販後には、新技術の導入や製造規模の拡大のため、製造に用いる原材料や工程パラメータが変更されることがある。バイオ医薬品の品質は製造工程の影響を受けるため、それまでに実施した有効性・安全性の評価結果が、製法変更後も引き続き有効であることを示すために、ICH Q5E ガイドラインに従い、製法変更前後の製品について同等性/同質性評価を行う必要がある。

同等性/同質性とは、必ずしも変更前後の製品の品質特性が全く同じであることを意味するものではなく、変更前後の製品の類似性が高いこと、ならびに、品質特性に何らかの差異があったとしても、既存の知識から最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないであろうことが十分に保証できることを意味する。ICH Q5E では、いくつかのケースに分けて同等性/同質性評価における対応が示されている（図4）。品質の比較試験により、製法変更前後での同等性/同質性が担保されない場合、開発ステージに応じて、非臨床試験や臨床試験の実施が必要となることもある。製法変更前後で同等性/同質性が確保されないと判断された場合、変更後の製法を採用しないか、新有効成分含有医薬品として製法変更後の製品で全ての試験をやり直すかのいずれかとなる。製造方法の変更には、慎重な対応が必要である。

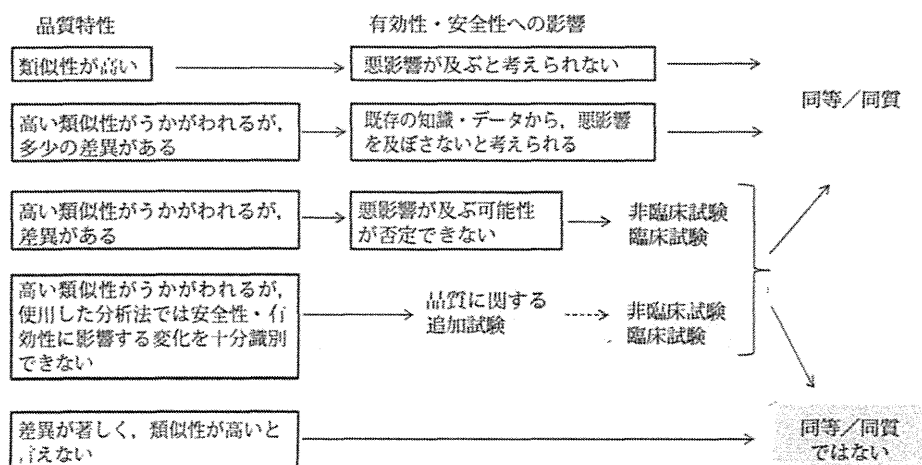


図4 バイオ医薬品の製造工程の変更にともなう同等性/同質性評価

おわりに

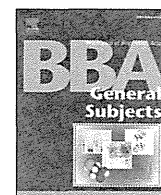
細胞基材及び培養工程を中心に、バイオ医薬品の品質管理について概説した。医薬品の製造工程には、要求される品質を満たす製品を、医薬品のライフサイクル全体にわたって恒常的に作り出す能力が求められる。細胞培養の工程は、品質特性を創り出す工程であり、重要品質特性への影響も大きい。有効性・安全性との関連を考慮し、適切な製法開発と管理戦略の構築が行われることが望まれる。

### 文 献

- 1) 我が国で承認されたバイオ医薬品：国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 HP

[http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved\\_biologicals.html](http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html)

- 2) 石井明子, 多田稔, 川崎ナナ, バイオ医薬品の製造工程管理 Pharm Tech Japan, 28 (8), 59-70 (2012)
- 3) 川崎ナナ, 石井明子, 奥田晴宏, バイオ医薬品のクオリティーバイデザイン Pharm Tech Japan, 28 (12) : 107-117 (2012)
- 4) 石井明子, 多田稔, 川崎ナナ, バイオ医薬品の生産用基材 Pharm Tech Japan, 28 (7), 67-76 (2012)
- 5) Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production, MAbs, 2 (5), 466-79 (2010)
- 6) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴, バイオ医薬品の外来性感染性物質について Pharm Tech Japan, 28 (5), 65-70 (2012)



# Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids



Kumiko Sakai-Kato <sup>a,\*</sup>, Masayuki Hidaka <sup>a</sup>, Keita Un <sup>a</sup>, Toru Kawanishi <sup>b</sup>, Haruhiro Okuda <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 11 July 2013

Received in revised form 10 December 2013

Accepted 13 December 2013

Available online 19 December 2013

### Keywords:

Nanomaterial

Silica particle

In vitro model

Simulated gastrointestinal fluid

## ABSTRACT

**Background:** Amorphous silica particles with the primary dimensions of a few tens of nm, have been widely applied as additives in various fields including medicine and food. Especially, they have been widely applied in powders for making tablets and to coat tablets. However, their behavior and biological effects in the gastrointestinal tracts associated with oral administration remains unknown.

**Methods:** Amorphous silica particles with diameters of 50, 100, and 200 nm were incubated in the fasted-state and fed-state simulated gastric and intestinal fluids. The sizes, intracellular transport into Caco-2 cells (model cells for intestinal absorption), the Caco-2 monolayer membrane permeability, and the cytotoxicity against Caco-2 cells were then evaluated for the silica particles.

**Results:** Silica particles agglomerated in fed-state simultaneous intestinal fluids. The agglomeration and increased particles size inhibited the particles' absorption into the Caco-2 cells or particles' transport through the Caco-2 cells. The in vitro cytotoxicity of silica particles was not observed when the average size was larger than 100 nm, independent of the fluid and the concentration.

**Conclusion:** Our study indicated the effect of diet on the agglomeration of silica particles. The sizes of silica particles affected the particles' absorption into or transport through the Caco-2 cells, and cytotoxicity in vitro, depending on the various biological fluids.

**General significance:** The findings obtained from our study may offer valuable information to evaluate the behavior of silica particles in the gastrointestinal tracts or safety of medicines or foods containing these materials as additives.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nanomaterials are materials that have at least one dimension in the nanoscale range (approximately 1 nm to 100 nm). Recently, nanomaterials have been applied in various fields, including medicine, cosmetics, and foods, because nanomaterials may have physical, chemical, or biological properties that are different from those of their bulk. While nanotechnology can exploit the improved and often novel properties of materials, there have been publications about concerns regarding the safety to humans and potential environmental impact of such materials [1–4].

In the medical field, nanomaterials have been used as drug carriers for drug delivery systems (DDS) [5–8].

**Abbreviations:** DDS, drug delivery system; PDI, polydispersity index; TEM, transmission electron microscopy; FaSSGF, fasted-state simulated gastric fluids; FeSSGF, fed-state simulated gastric fluids; FaSSIF, fasted-state simulated intestinal fluids; FeSSIF, fed-state simulated intestinal fluids; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, Phosphate buffer saline; HBSS, Hanks' balanced salt solution; FBS, fetal bovine serum; TEER, transepithelial electrical resistance

\* Corresponding author. Tel./fax: +81 3 3700 9662.

E-mail address: [kumikato@nihs.go.jp](mailto:kumikato@nihs.go.jp) (K. Sakai-Kato).

Amorphous silica particles have been widely applied as additives for various purposes, for example, to improve the flowability used in powders for making tablets; they have also been applied as additives to coat tablets, to improve their hardness. In solid oral dosage form, silicates are often used as glidants. Glidants are substances that improve the flowability of cohesive powders and granules. Silicates are well suited for that purpose, because of their small particle size and large specific surface area. One of the most frequently used glidants is colloidal silica (e.g., Aerosil 200), which exhibits very small particle sizes in the nanometer range, and a large specific surface area of approximately 200 m<sup>2</sup>/g [9]. Although the primary dimensions of these particles are a few tens of nm, they form aggregates of a few hundred nm. These novel materials have been the focus of medical developments in a number of areas, and many researchers have investigated their use not only as additives in tablets, but also as novel carriers for poorly-water-soluble drugs [10–12].

Amorphous silica particles have also been used in other fields, where they are applied directly to the human body as ingredients in cosmetics and toothpaste, or even as powdered food ingredients to prevent caking [13,14].

However, when amorphous silica particles were swabbed on skin, it was reported that the nano-sized materials penetrated through the skin, became distributed in the body, and induced unexpected toxicity [2]. It has been reported that the toxicity derived from amorphous silica particles depends on the particle size and the surface properties [15,16].

Generally, tablets are taken via oral administration. Using this administration route, the particles contained in the tablets do not remain at specific sites for a long period. However, if the particles are absorbed from the intestine and enter the blood circulation, it is important to consider whether the phenomena that occur when the drugs are administered intravenously would also occur in this case. In addition, no studies have been performed to investigate the toxicity associated with the oral administration of amorphous silica particles as additives in oral solid dosage forms; the evaluation of the physicochemical properties, intestinal permeability properties, and intestinal cell toxicity resulting from the oral administration of nano- or submicron-size amorphous silica particles is therefore essential to ensure the safety of solid oral dosage forms containing these materials.

In the present study, we evaluated the size, the absorption from the intestine, and the cytotoxicity using *in vitro* models of amorphous silica particles after oral administration. In particular, we investigated the effects of the size of the particles and the composition of the intestinal tract fluid on the intestinal permeability properties and the intestinal cell toxicity. In this study, we used amorphous silica particles with diameters of 50, 100, and 200 nm. In the oral administration of medicines, the physiological conditions in the intestinal tract are dramatically different in the fasted state and the fed state. It is known that these differences affect the absorption of drugs from the gastrointestinal tract. This study therefore investigated the changes in the size of amorphous silica particles in the fasted-state and fed-state simulated gastric and intestinal fluids.

As an *in vitro* model for intestinal absorption, we used the Caco-2 cell. Caco-2 cells grown as a monolayer become differentiated and polarized such that their morphological and functional phenotype resembles that of the enterocytes that line the small intestine [17,18]. Caco-2 cells express tight junctions, microvilli, and numerous enzymes and transporters that are characteristic of such enterocytes. The Caco-2 monolayer is widely used throughout the pharmaceutical industry as an *in vitro* model of the human small intestinal mucosa to predict the absorption of orally administered drugs. The correlation between the *in vitro* apparent permeability across Caco-2 monolayers and the *in vivo* fraction absorbed is well established [19]. Caco-2 cells have in fact been used as a model to investigate the possible harmful effect of silica nanoparticles in the gastrointestinal tract [20]. Furthermore, Caco-2 monolayers have been used to evaluate the intracellular uptake of nanosized-drug delivery systems [21,22].

In this study, the intracellular transport into Caco-2 cells, the Caco-2 monolayer membrane permeability, and the cytotoxicity against Caco-2 cells were then evaluated for the amorphous silica particles, in the fasted-state and fed-state simulated gastric and intestinal fluids.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Silica particles

Suspensions of fluorescently labeled amorphous silica particles (nominal diameters as stated by suppliers: 50 nm, SP-50; 100 nm, SP-100; and 200 nm, SP-200) were obtained from Micromod Partikeltechnologie (Rostock, Germany). These were amorphous silica particles [16]. Silica suspensions were shaded and stored at 4 °C and diluted in various fluids before each experiment. The suspensions were sonicated for 10 min, and then vortexed for 1 min immediately prior to use. The silica particles were suspended in various fluids, and then incubated at 37 °C for 1 h before the measurements were performed. The mean particle size, the polydispersity index (PDI), and the  $\zeta$ -potentials of the silica particles were measured using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), with a concentration of 0.1 mg/mL in water (Table 1). The water used

**Table 1**

The mean particle size, the polydispersity index (PDI), and the  $\zeta$ -potentials of the silica particles used in this study.

Sample	Particle size (nm)	PDI	$\zeta$ -Potential
Silica			
SP-50	47.5 ± 4.0	0.14 ± 0.053	−43.2 ± 2.0
SP-100	99.0 ± 3.2	0.03 ± 0.030	−53.8 ± 1.4
SP-200	176 ± 6.4	0.16 ± 0.024	−51.8 ± 1.4

Samples were dissolved in MilliQ water with a concentration of 0.1 mg/mL. Each value represents the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

in this study was purified using Milli-Q system (Millipore, Tokyo, Japan). Fig. 1 shows transmission electron microscopy (TEM) images of the silica particles used in this study. The images were obtained using an H-9000 UHR instrument (Hitachi, Tokyo, Japan).

### 2.2. Cell culture

Caco-2 cells—human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)—were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Brooklyn, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Nishirei Biosciences, Tokyo, Japan), 100 U/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies). Cells were grown in a humidified incubator at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, and the culture medium was changed every other day.

### 2.3. Composition of simulated gastric and intestinal fluids

The fasted-state simulated gastric fluids (FaSSGF) and the fed-state simulated gastric fluids (FeSSGF) were prepared according to a previous report [23]. The fasted-state simulated intestinal fluids (FaSSIF) and the fed-state simulated intestinal fluids (FeSSIF) were prepared according to the manufacturer's instructions (Celeste Co., Tokyo, Japan). An Ubbelohde-type viscometer was used for the viscosity measurements. The detailed components of each fluid are shown in Table 2.

### 2.4. Stability of fluorescence labeling

Fluorescently labeled silica particles were diluted to 1 mg/mL in various types of fluids (MilliQ water, D-MEM, PBS, FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF, FeSSGF, 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid, and lysis buffer (1.0% Triton X-100 in HBSS)) and incubated at 37 °C for 6 h. After incubation, the particles were centrifuged (20,000 g, 30 min) and the precipitated silica particles were resuspended with the same volumes of fresh fluids as those before centrifugation. The fluorescent intensities of the suspension before and after centrifugation were measured at an excitation wavelength of 542 nm and an emission wavelength of 602 nm in a fluorescence spectrophotometer (F-7000; Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan). The percentage of the fluorescent dye retained in the silica particles after 6-h incubation was expressed as follows:

$$A/B \times 100(\%),$$

where A represents the fluorescence intensity of the silica particles resuspended with fresh fluid after centrifugation, and B represents the fluorescence intensity of the silica suspension before centrifugation.

### 2.5. Intracellular uptake study

Fluorescently labeled silica particles were used in this study to evaluate the intracellular uptake of silica particles. Caco-2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were plated in a 6-well plate in medium containing 10% FBS and 100 U/ml penicillin/streptomycin. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in various types of fluids (D-MEM, PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and then incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. In addition, to mimic the



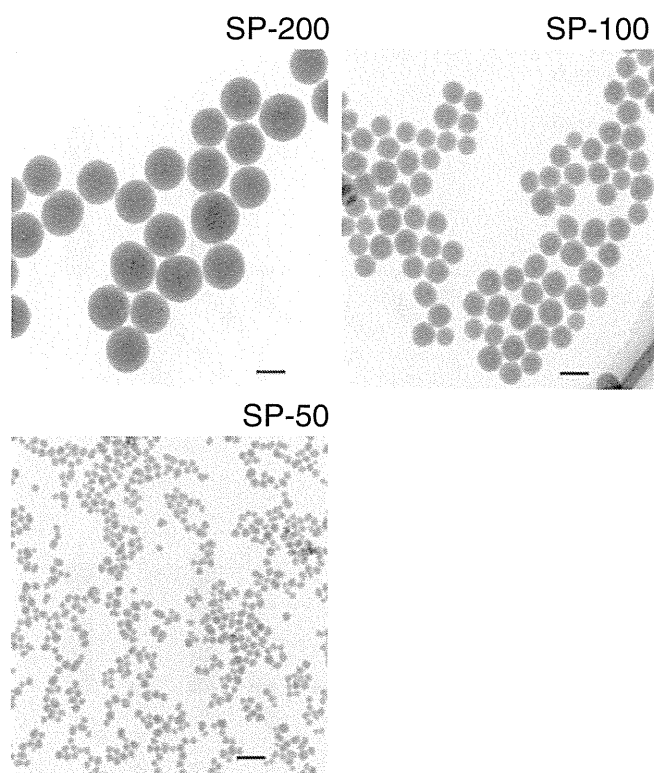


Fig. 1. TEM images of silica particles used in this study. The scale bar represents 100 nm.

gastric and intestinal conditions (indicated as “FaSSGF → FaSSIF” and “FeSSGF → FeSSIF”), fluorescently labeled silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, and incubated at 37 °C for 1 h. Subsequently, the diluted silica particles were further diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in FaSSIF or FeSSIF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. The diluted and incubated fluorescently labeled silica particles were added to the cells, which were pre-incubated for 96 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). After incubation for 2 h in the silica particle-containing fluid, the cells were washed, and the incubation medium was replaced with Hanks' balanced salt solution (HBSS). The cells were then trypsinized with 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (Life Technologies), washed with HBSS three times, and suspended in lysis buffer (1.0% Triton X-100 in HBSS). The cell suspension was shaken, centrifuged at 15,000 ×g and 4 °C for 10 min, and the fluorescence intensity of the resulting supernatant was measured at an excitation wavelength of 542 nm and an emission wavelength of 602 nm in a fluorescence spectrophotometer (F-7000). The fluorescence intensity was expressed as incorporated particle mass per unit protein content of cells. The protein concentration was determined using a protein assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Tokyo, Japan).

**Table 2**  
Composition of FaSSGF, FeSSGF, FaSSIF, and FeSSIF.

	FaSSGE	FeSSGF	FaSSIF	FeSSIF
Sodium taurocholate (μM)	80	–	3	15
Sodium acetate (mM)	–	29.75	–	–
Sodium chloride (mM)	34.2	237.02	105.4	203.1
Sodium hydroxide (mM)	–	–	10.5	101
Sodium dihydrogen-orthophosphate (mM)	–	–	28.7	–
Acetic acid (mM)	–	17.12	–	144.17
Lecithin (μM)	20	–	0.75	3.75
Pepsin (mg/mL)	0.1	–	–	–
pH	1.6	5	6.5	5.0
Osmolality (mOsm/kg)	120.7 ± 2.5	400	270 ± 10	635 ± 10

## 2.6. Confocal microscopy study

To observe the intracellular uptake of the fluorescently labeled silica particles, Caco-2 cells ( $5.0 \times 10^4$ ) were plated in 35 mm glass-bottom dishes coated with poly-L-lysine (Matsunami Glass, Osaka, Japan) in medium containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in various types of fluids (PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and then incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. After the cells were pre-incubated for 48 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the diluted and incubated fluorescently labeled silica particles were added to the cells. After incubation for 2 h in the silica particle-containing fluid (37 °C or 4 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the cells were washed and kept in HBSS for imaging using confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510, Oberkochen, Germany). To observe co-localization, endosomes and lysosomes of cells were labeled with AlexaFluor-488-conjugated transferrin (Life Technologies) and LysoTracker Green DND-26 (Life Technologies), respectively, in accordance with the manufacturer's instructions. Data were collected using dedicated software supplied by the manufacturers, and exported in tagged image file format.

## 2.7. Transcellular transport study

Caco-2 cells were suspended in a serum-free medium consisting of D-MEM and Mito + Serum Extender (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and seeded on 24-well size BD Falcon cell culture inserts (BD Biosciences) at  $2 \times 10^5$  cells/well [24]. In experiments that required the use of differentiation medium, the seeding medium was replaced with optimized differentiation medium 48 h after cell seeding; the medium was replaced every 24 h thereafter. The transepithelial electrical resistance (TEER) was also measured using a Millicell-ERS resistance system (Millipore, Billerica, MA, USA) every 24 h, and the wells with TEER values of over 200 Ω cm<sup>2</sup> were used as Caco-2 cell monolayers. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 1 mg/mL in various types of fluids (PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and then incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. In addition, to mimic the gastric and intestinal conditions (indicated as “FaSSGF → FaSSIF” and “FeSSGF → FeSSIF”), fluorescently labeled silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, and incubated at 37 °C for 1 h. The diluted silica particles were subsequently further diluted to a concentration of 1 mg/mL in FaSSIF or FeSSIF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. The diluted and incubated fluorescently labeled silica particles were added to the apical side of the Caco-2 cell monolayers. Phosphate buffer saline (PBS) was added to the basal side at the same time. Samples (fluorescently labeled silica particles) were drawn out of the basal side at 15 min intervals. An equal volume of PBS was added to the basal side immediately after each sampling. The TEER was simultaneously determined using a Millicell-ERS resistance system.

## 2.8. Cytotoxicity study

The cytotoxicity of the silica particles was assessed using a WST-8 assay (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). Caco-2 cells ( $1 \times 10^5$ ) were plated in 96-well plate in medium containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. Silica particles were diluted to concentrations of 0.1, 1, or 10 mg/mL in various types of fluids (D-MEM, PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. In addition, to mimic the gastric and intestinal conditions (indicated as “FaSSGF → FaSSIF” and “FeSSGF → FeSSIF”), silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, and incubated at 37 °C for 1 h. The diluted silica particles were subsequently further diluted to concentrations of 0.1 or 1 mg/mL in FaSSIF or FeSSIF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. After the cells were pre-incubated for 72 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the diluted and subsequently incubated particles were added to the cells. After

incubation for 6 h, the cells were washed, the fluid was replaced with fresh culture medium without silica particles, and an additional 0, 6, 24, or 48 h of incubation was applied. Cell counting kit-8 solutions were then added to each well, and the cells were incubated for 2 h. After incubation, absorbance values at 450 nm were measured using a microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and the results were expressed as viability (%).

### 2.9. Statistical analyses

The results are presented here as the mean  $\pm$  S.D., calculated from more than three experiments. An analysis of variance (ANOVA) was used to test the statistical significance of the differences between groups. Multiple comparisons between control and test groups were performed using Dunnett's test.

## 3. Results

### 3.1. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the size of silica particles

The effects of various fluids on the size of the amorphous silica particles were evaluated. Following the dispersion of the silica particle samples (nominal diameters: 50 nm, SP-50; 100 nm, SP-100; and 200 nm, SP-200, as stated by the supplier) SP-50, SP-100 and SP-200 in MilliQ water, the mean particle sizes were approximately 48 nm, 99 nm, and 176 nm, respectively (Table 1), which agreed well with the nominal diameters as stated by the supplier. The  $\zeta$ -potentials of the silica particles ranged from  $-43.2$  to  $-53.8$  mV (Table 1). Then, to investigate how the state of the silica particles changed after oral administration, and during their passage through the gastrointestinal tract, the silica particles were dispersed in various types of simulated fluids. As shown in Fig. 2, when these silica particles were dispersed in fasted- and fed-state simulated gastric fluids (FaSSGF and FeSSGF) and fasted-state simulated intestinal fluids (FaSSIF), the mean particle sizes of SP-50, SP-100, and SP-200 were not affected. By contrast, when the silica particles were dispersed in fed-state simulated intestinal fluids (FeSSIF), the mean measured particle sizes of SP-50, SP-100, and SP-200 all significantly increased, to more than 1000 nm (Fig. 2). In addition, the PDI values of the silica particles dispersed in FeSSIF also increased to approximately 0.6, indicating that the SP-50, SP-100, and SP-200 particles all agglomerated in FeSSIF, regardless of the primary particle size. Then, to investigate conditions more similar to those encountered in actual oral administration before the passage through the intestinal tract, the silica particles were first diluted with simulated gastric fluids; this was then followed by dispersion in simulated intestinal fluids. As shown in Fig. 2, when the silica particles were dispersed in fasted-state simulated fluids (FaSSGF and FaSSIF), the mean particle sizes of SP-50, SP-100, and SP-200 were not affected. By contrast, when SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in fed-state simulated fluids (FeSSGF and FeSSIF), the mean measured particle sizes increased to more than 1000 nm (Fig. 2). These results suggested that silica particles—at least those used in this study—would agglomerate after postprandial oral administration.

### 3.2. Stability of fluorescent labeling of silica particles

The intracellular uptake and transcellular transport assay of silica particles depend on the accuracy of the measured fluorescence. The studies supporting stability of fluorescent labeling were performed. After incubation of fluorescently labeled silica particles in various fluids, the recovery of fluorescent dye was examined. As shown in Table 3, the fluorescent labeling of silica particles used in this study was stable in every fluid under the conditions used in this study.

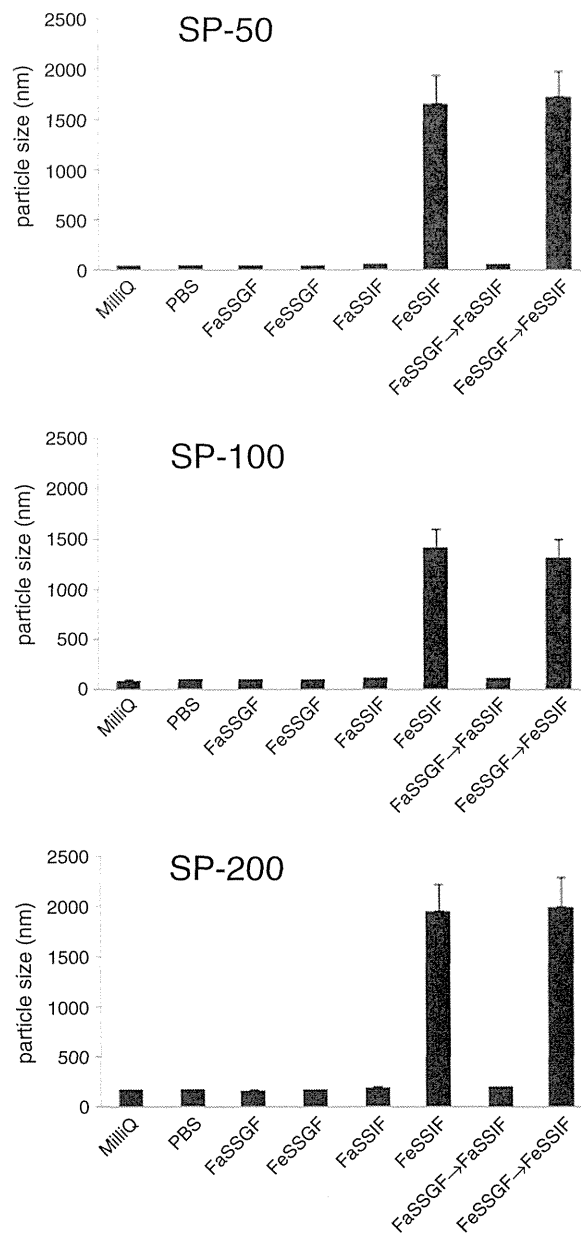


Fig. 2. Sizes of amorphous silica particles (SP-50, 100, and 200, 0.1 mg/mL) in various types of fluids. The mean particle size of the silica particles was measured using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), with a concentration of 0.1 mg/mL. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

### 3.3. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the intracellular uptake of fluorescently labeled silica particles

The effects of dispersion in simulated fluids on the intracellular uptake of silica particles were investigated using Caco-2 cells. In the preliminary experiments, we confirmed that the internalization occur linearly with times around 2 h after the addition of silica particles (Supplementary Fig. 1). Therefore, the intracellular amounts of silica particles were measured after incubation for 2 h with silica particles. Similarly, the silica particle concentrations for incubation were determined based on the linearity between silica particle masses and fluorescent intensities of internalized silica particles (Supplementary Fig. 2). As shown in Fig. 3, the intracellular amounts of SP-50, SP-100, and SP-200 dispersed in fasted-state simulated fluids (FaSSGF and FaSSIF) were almost the same as those in cultured medium (control). However, when SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in fed-state simulated

**Table 3**  
Stability of fluorescent labeling.

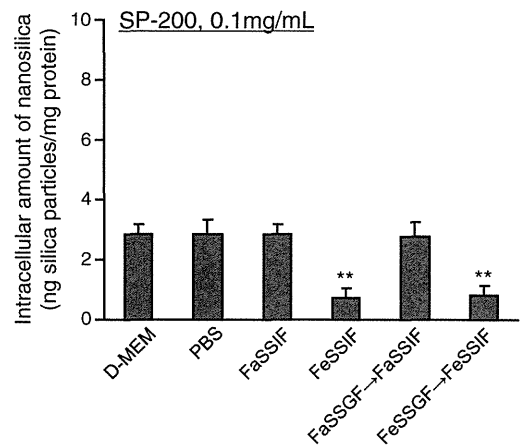
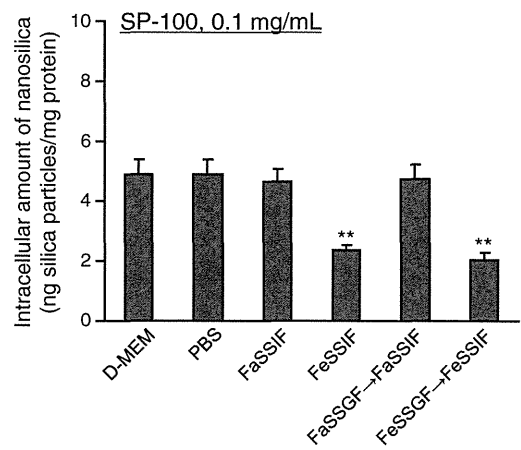
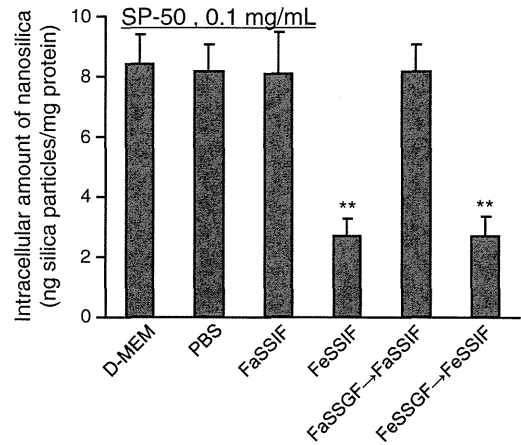
Solution	SP-50	SP-100	SP-200
	Average SD	Average SD	Average SD
MilliQ water	97.8 ± 0.62	99.8 ± 1.40	98.5 ± 4.18
PBS	98.2 ± 1.06	99.3 ± 1.05	98.9 ± 3.55
D-MEM(+)	98.8 ± 0.91	99.5 ± 1.04	98.2 ± 3.34
FaSSIF	99.1 ± 0.53	99.8 ± 1.00	98.4 ± 3.48
FeSSIF	98.4 ± 0.37	99.1 ± 0.68	98.5 ± 2.30
FaSSGF	98.4 ± 0.73	99.0 ± 0.49	98.1 ± 2.56
FeSSGF	97.6 ± 0.61	99.1 ± 0.37	98.5 ± 1.61
Trypsin	98.5 ± 5.90	98.3 ± 7.49	99.9 ± 11.2
Lysis buffer	101.5 ± 5.76	103.8 ± 6.29	99.9 ± 8.63

After incubation of fluorescent labeled silica particles in various solutions, the recovery of fluorescent dye was examined and expressed as percentage of the fluorescent intensity of the resuspended silica particles to that before centrifugation as described in "Materials and methods." Each value represents the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

intestinal fluids (FeSSIF), the measured amounts of intracellular silica particles significantly decreased (Fig. 3). This decrease in the intracellular amounts of silica particles was also observed when the silica particles were serially diluted using FeSSGF and FeSSIF (Fig. 3). We then examined the intracellular uptake of silica particles into Caco-2 cells using confocal microscopy. As shown in Fig. 4 (a), when silica particles were pre-incubated in fasted-state simulated fluids (FaSSIF), the intracellular uptake of silica particles was almost the same as that in PBS. In contrast, when silica particles were pre-incubated in fed-state simulated intestinal fluids (FeSSIF), the intracellular uptake of silica particles significantly decreased (Fig. 4 (a)). This result agreed with the quantitative values obtained using fluorescent spectroscopy described above (Fig. 3). It was also shown that silica particles pre-incubated in PBS and FaSSIF were observed to co-localize with endosomes and lysosomes after incubation for 2 h with Caco-2 cells (Fig. 4 (a)). On the other hand, the internalization of silica particles was not observed when the particles were incubated with Caco-2 cells at 4 °C (Fig. 4 (b)). These indicated that the silica particles were internalized by endocytosis, and that the silica nanoparticles are not simply adhering to the cells.

### 3.4. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the Caco-2 cell monolayer transport of silica particles

To investigate the effect of various fluids on the transcellular transport of silica particles, SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in PBS, FaSSIF, and FeSSIF, and silica particle transport studies were performed using Caco-2 cell monolayers (Fig. 5). Fig. 6 shows the time-dependent variations in the TEER and the cumulative amount of transported silica particles dispersed in various types of fluids. The TEER is well known as an indicator of the integrity, or tightness, of junctions (a tight junction is described as the closely associated area between two cells whose membranes have joined together to form a virtually impermeable barrier against various materials) [25]. As shown in Fig. 6, the TEER was hardly affected by the addition of SP-50, SP-100, or SP-200 under these experimental conditions, suggesting that the silica particles used in this study did not significantly change the structure of the tight junctions in the Caco-2 cell monolayers. From the investigation of the cumulative amounts of transported silica particles, it was clear that after 30 min, the transported amounts of SP-50 suspended in PBS and fasted-state fluid were significantly higher than those of SP-50 in fed-state fluid. The transported amounts of SP-50 dispersed in FeSSIF were significantly lower than those of SP-50 dispersed in PBS or fasted-state fluids. In the case of SP-100 and SP-200, the cumulative amount of transported silica particles was negligible until 60 min, even in the PBS and fasted-state fluids (Fig. 6).

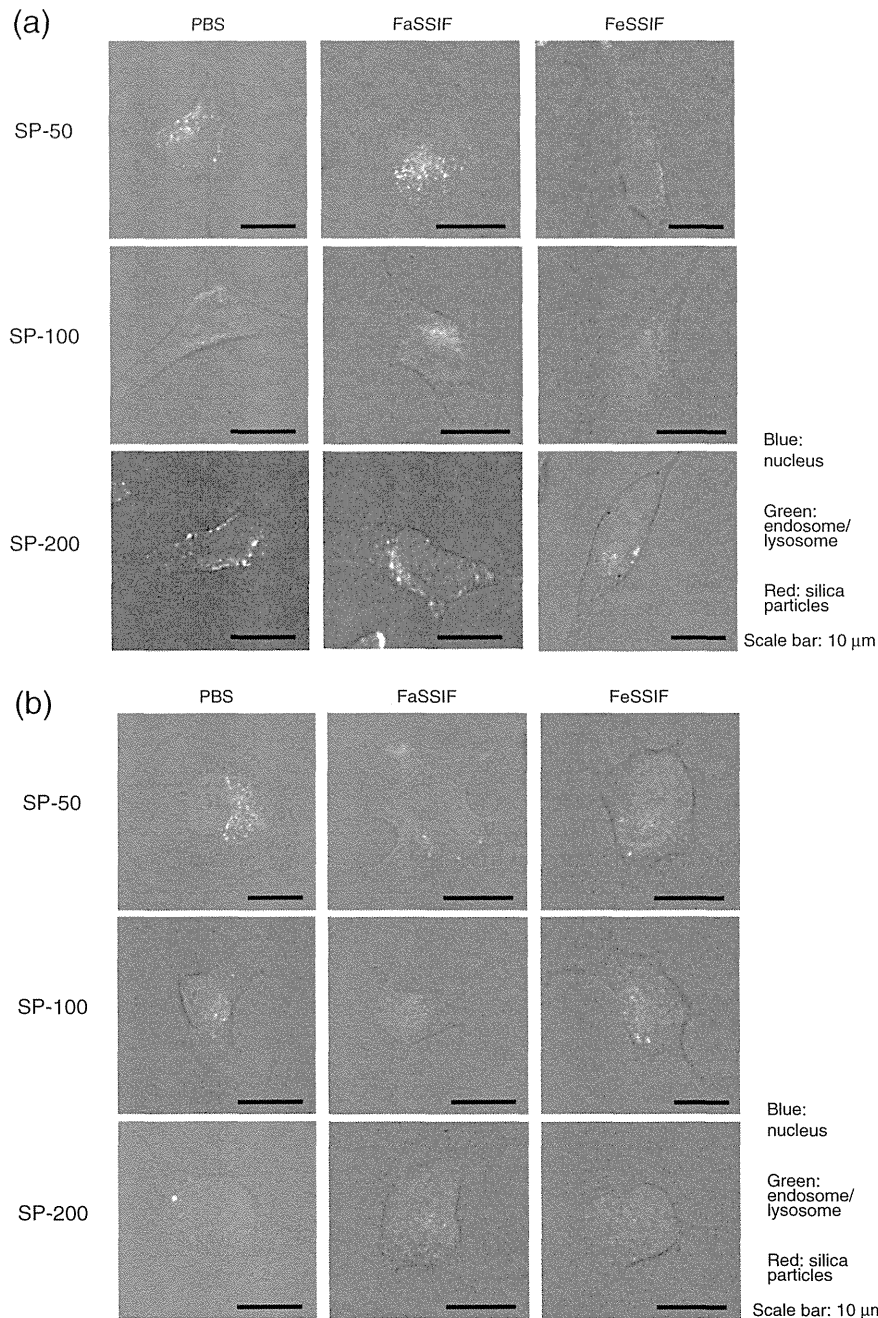


\*\* $P < 0.01$ , compared with the corresponding group of D-MEM.

**Fig. 3.** The intracellular uptake of amorphous silica particles, 2 h after their addition to Caco-2 cells. SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in various types of fluids and pre-incubated for 1 h. After incubation for 2 h in the silica particle-containing suspension, the cells were then trypsinized, washed, and lysed. The cell suspension was shaken, centrifuged, and the fluorescence intensity of the resulting supernatant was measured as described in Section 2.5. \*\* $P < 0.01$ , compared with the corresponding group of D-MEM. Each value represents the mean + S.D. ( $n = 6$ ).

### 3.5. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the cytotoxicity of silica particles

The effects of various fluids on the cytotoxicity of the silica particles were then evaluated. Silica nanoparticles (final concentration 1.0 mg/mL) were dispersed in various types of fluids and exposed to cells for



**Fig. 4.** Confocal images of the intracellular amorphous silica particles, taken 2 h after their addition to Caco-2 cells. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in various types of fluids (PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and pre-incubated for 1 h to mimic the intestinal conditions. Confocal images of the intracellular amorphous silica particles were taken 2 h after their addition to Caco-2 cells at 37 °C (a) or 4 °C (b). To observe co-localization, endosomes and lysosomes of cells were labeled with AlexaFluor-488-conjugated transferrin and LysoTracker Green DND-26, respectively. The scale bars represent 10 μm.

6 h. Up to this time point, no cytotoxicity was observed in Caco-2 cells exposed to SP-50, SP-100, or SP-200. The cultured media was then replaced with fresh medium without silica particles to eliminate any effect of the fluid itself, and the cells were incubated for another 0, 6, 24, and 48 h (Fig. 7). During this additional incubation with fresh medium, time-dependent toxicity was observed in Caco-2 cells that had been initially exposed to SP-50 dispersed in PBS or fasted-state simulated fluids. By contrast, no cytotoxicity was observed for SP-100 or SP-200 even after 48-h incubation (Fig. 7). We then investigated the concentration dependency of the silica particle toxicity on Caco-2 cells. Silica nanoparticles (final concentration 0.1, 1.0, and 10 mg/mL) were dispersed in various types of fluids and exposed to cells for 6 h. The cultured media was then replaced with fresh medium without silica particles, and the

cells were incubated for another 48 h at which time the cytotoxicity of SP-50 was considerable (Fig. 7). As shown in Fig. 8, cytotoxicity was not observed for SP-100 or SP-200 in any of the various types of fluids, even at a concentration of 10 mg/mL. By contrast, when SP-50 was dispersed in PBS or the fasted-state simulated fluids, significant cytotoxicity was detected for all concentrations of the particles, with the cytotoxicity depending on the concentration. However, when SP-50 was dispersed in FeSSIF, cytotoxicity was not observed.

#### 4. Discussion

With the increasing interest in nanotechnology, nanomaterials have been applied in various fields including medicines. Nanoparticles can