

**Supplementary Table S8.**

Entry	ID	Sequence	$T_m$ (°C)
1	+114-1_9/9	CCT CTG GGC	87.0 ± 2.2
2	+114-1_7/9_2	CCT CTG gGc	83.1 ± 2.7
3	+114-1_4/9	cCt CtG gGc	66.7 ± 0.4
4	+115-1_8/8	CCT CTG GG	76.3 ± 1.5
5	+115-1_6/8	CCT CTg Gg	72.1 ± 0.4
6	+115-1_4/8	cCt CtG gG	61.0 ± 1.6
7	+116-1_7/7	CCT CTG G	72.8 ± 1.4
8	+116-1_5/7	CCT CtG g	57.7 ± 2.3
9	+116-1_3/7	cCt CtG g	47.9 ± 0.7
10	+117-1_6/6	CCT CTG	53.4 ± 2.8
11	+117-1_4/6	CCT cTg	45.2 ± 2.3
12	+117-1_3/6	cCt CtG	37.1 ± 2.1

**Supplementary Table S9.**

Entry	ID	Sequence
1	+110-1_6/13	cCt CtG gGc TcC t
2	+110-1_G117A	cCt Ct <u>A</u> gGc TcC t
3	+110-1_G117C	cCt Ct <u>C</u> gGc TcC t
4	+110-1_G117T	cCt Ct <u>T</u> gGc TcC t
5	+110-1_G115C/G117C	cCt Ct <u>C</u> g <u>C</u> c TcC t
6	+110-1_G115C/g116c/G117C	cCt Ct <u>C</u> <u>c</u> Cc TcC t
7	+114-1_7/9_2	CCT CTG gGc
8	+114-1_T118A	CCT C <u>A</u> G gGc
9	+114-1_T118C	CCT C <u>C</u> G gGc
10	+114-1_T118G	CCT C <u>G</u> G gGc
11	+114-1_G117C/C119G	CCT <u>G</u> T <u>C</u> gGc
12	+114-1_G117C/T118C/C119G	CCT <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> gGc

**Supplementary Table S10.**

Gene		Sequence	Size (bp)
Dystrophin reporter minigene	For. primer:	AACGGTACCAACGCTGCTGTTCTTTTCA	587 (Exon 58 inclusion)
	Rev. primer:	CTTGGAGCCGTACTGGA ACT	466 (Exon 58 skipping)
DMD	For. primer:	AAACAATGGCAAGACCTCCA	
	Rev. primer:	CTGGACAGACGTGGAAAGAAA	
	Nested For. primer:	GTCTCTCAACATTAGGTCCCATT	575 (Exon 58 inclusion)
	Nested Rev. primer:	CTCCTCGAAGTGCCTTGACT	454 (Exon 58 skipping)
GAPDH	For. primer:	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
	Rev. primer:	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

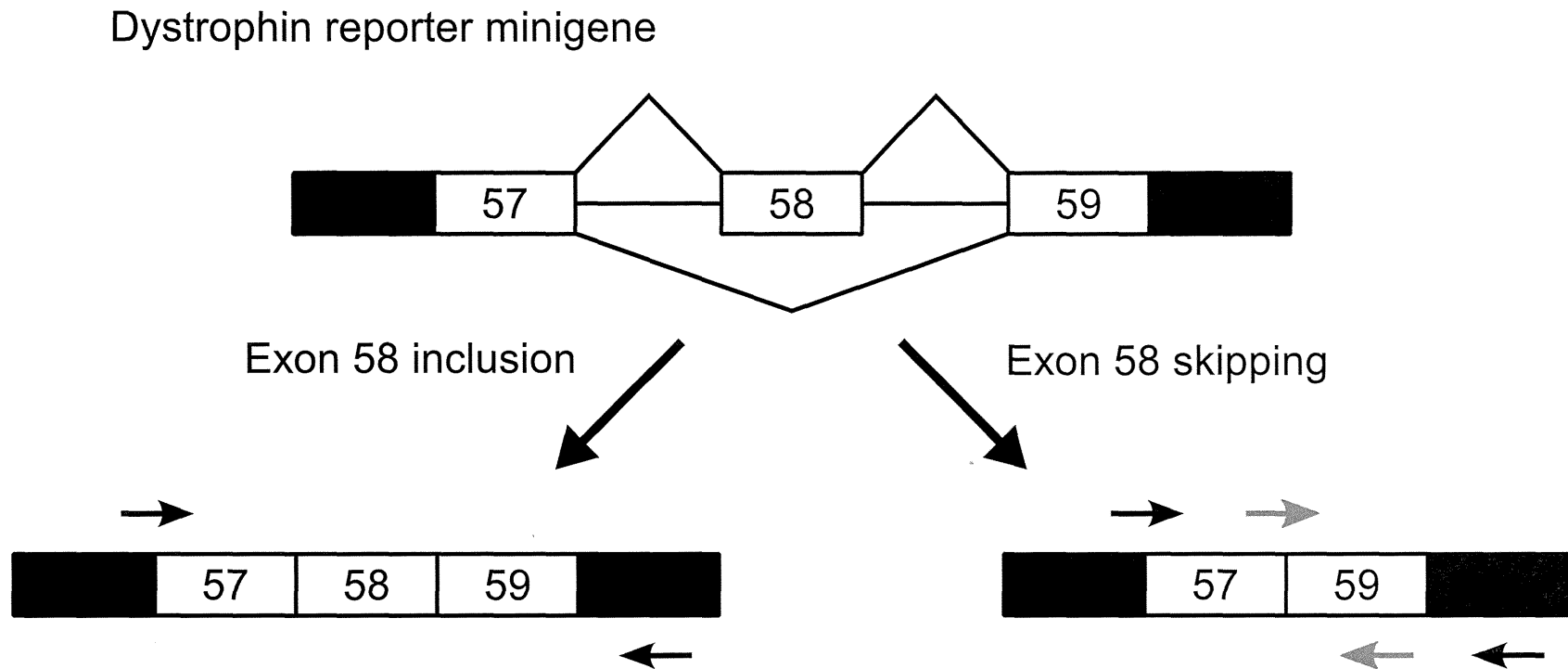
**Supplementary Table S11.**

Gene		Sequence	Size (bp)
DMD	For. primer:	GATGTACATAGGAGCTGCCTC	70 (Exon 57/59 junction)
	Rev. primer:	TCAGCCTGCTTTCGTAGA	(Exon 59)
GAPDH	For. primer:	GGTCACCAGGGCTGCTTTT	85
	Rev. primer:	GTAAACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG	

## SUPPLEMENTARY REFERENCES

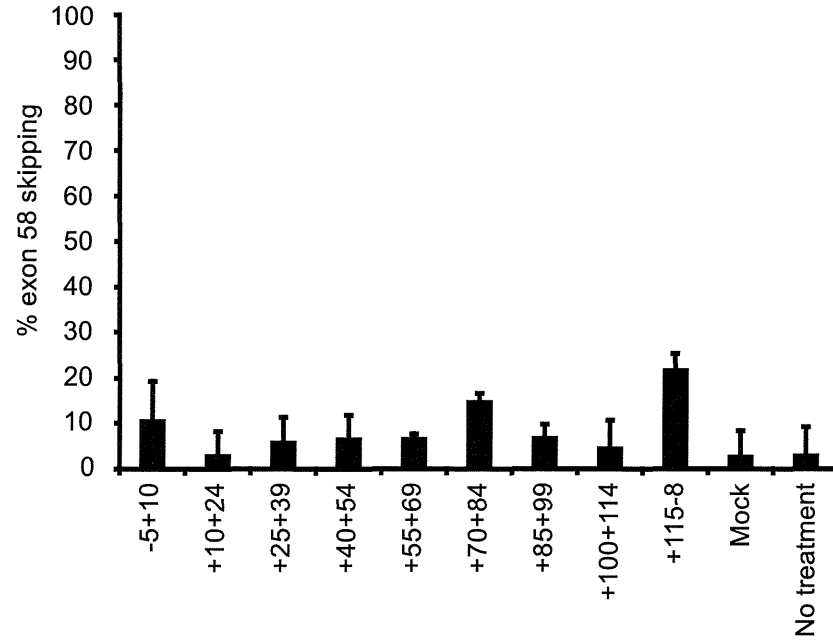
61. Kawakami, J., Tanaka, Y. and Kishimoto, K. (2009) Accurate curve fitting procedure for UV melting analysis of highly thermostable RNA hairpins. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 227-228.

# Supplementary Fig. 1

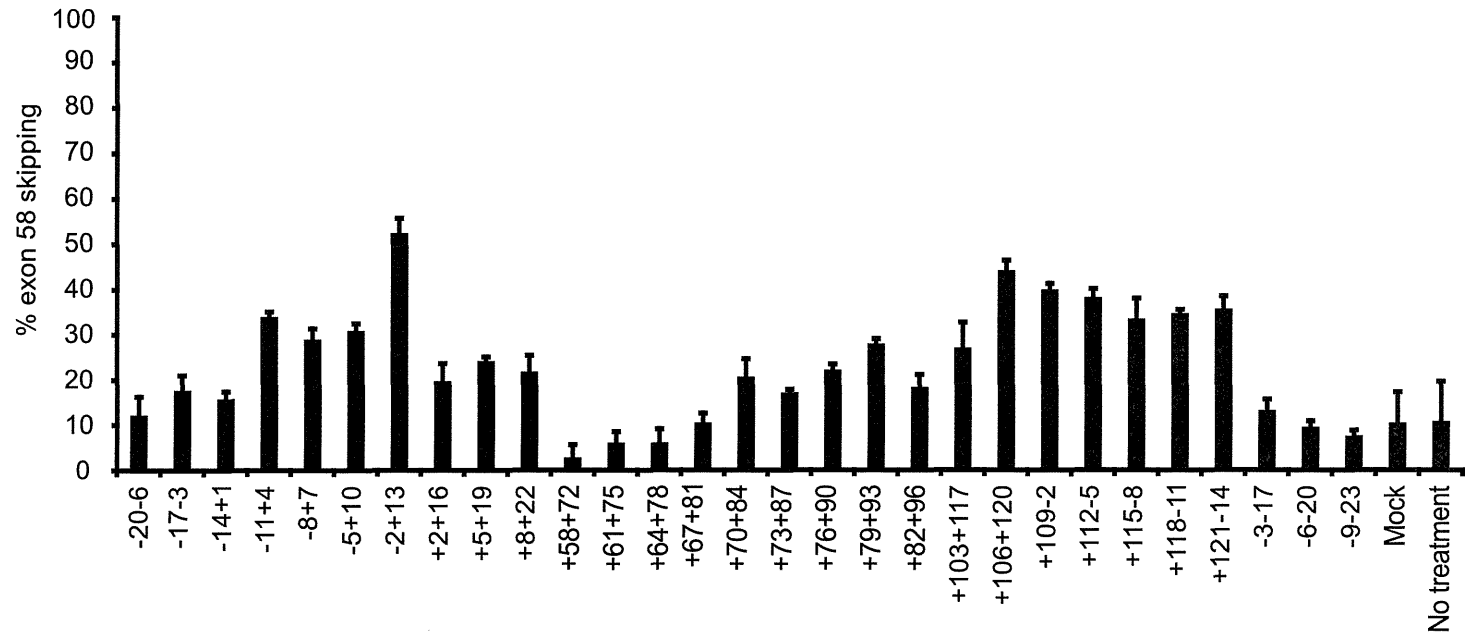


## Supplementary Fig. 2

**A**

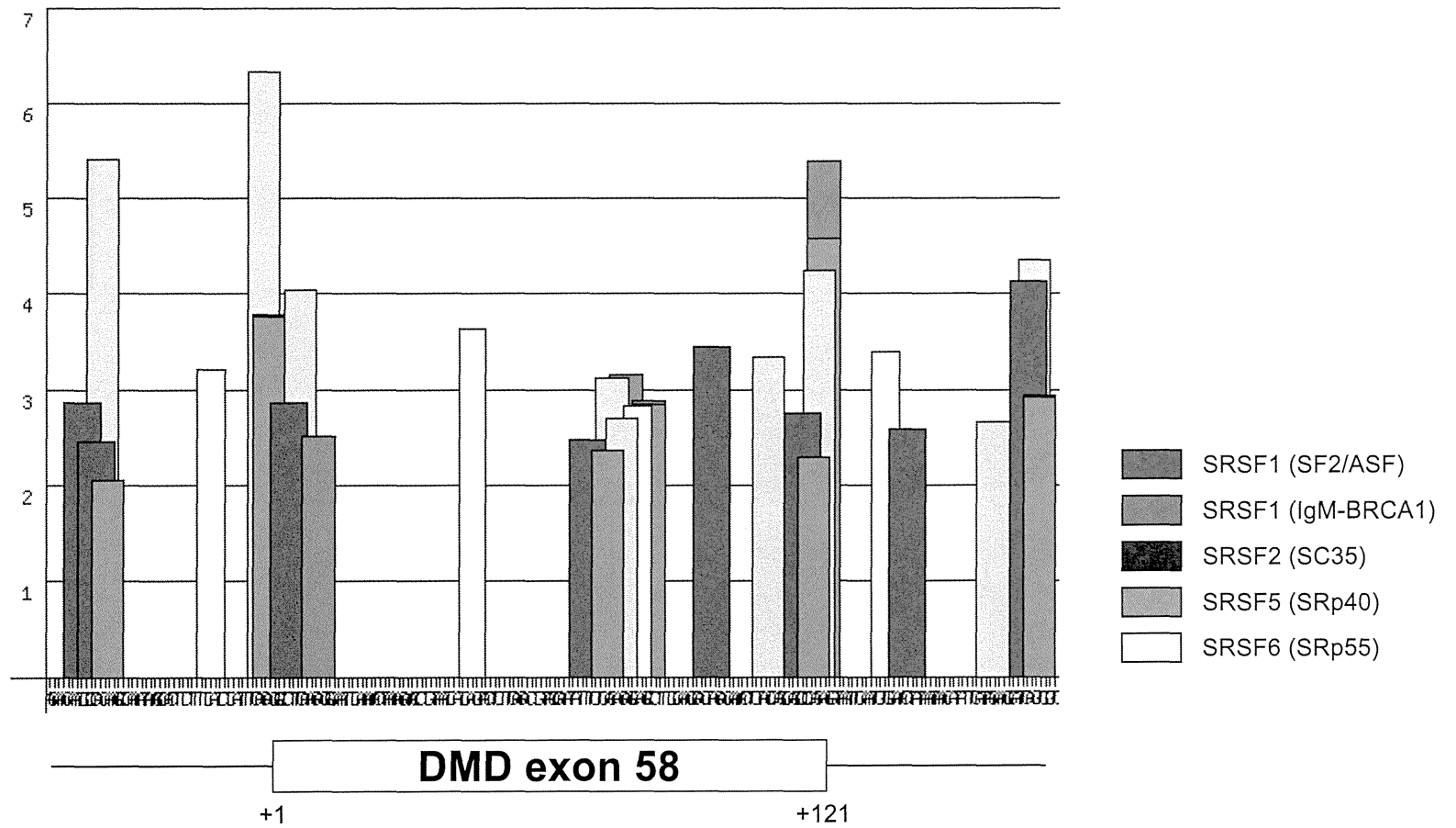


**B**



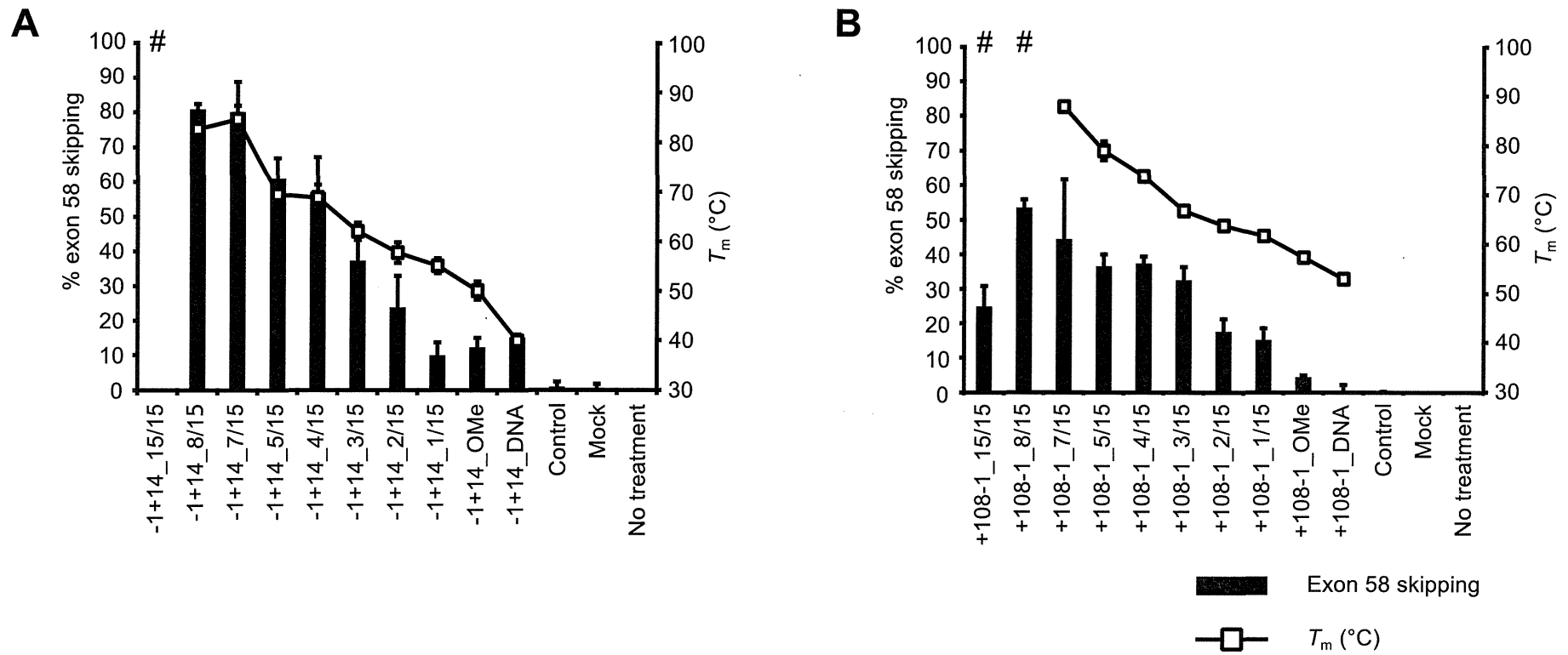
### Supplementary Fig. 3

— 268 —

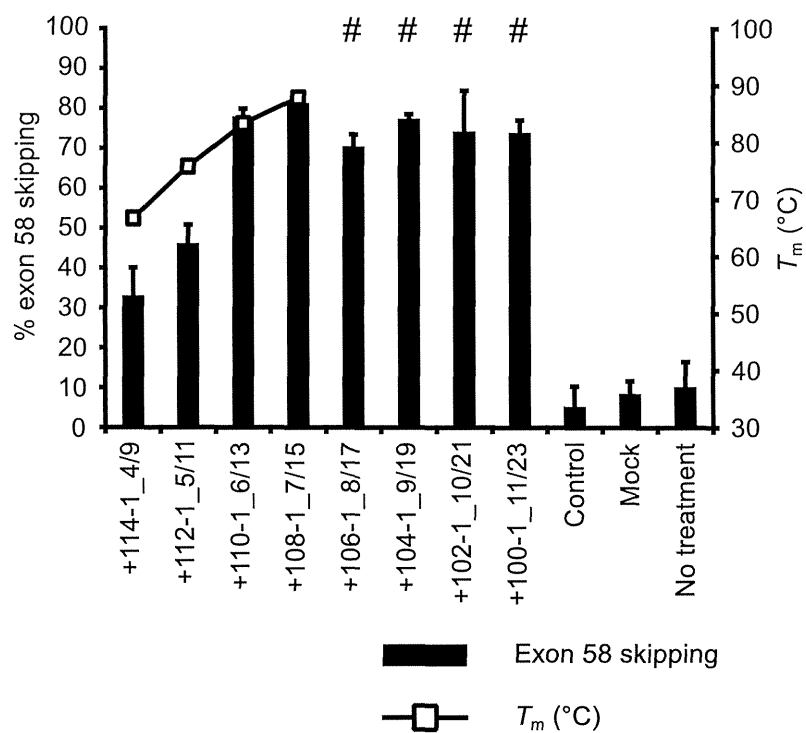




### Supplementary Fig. 4

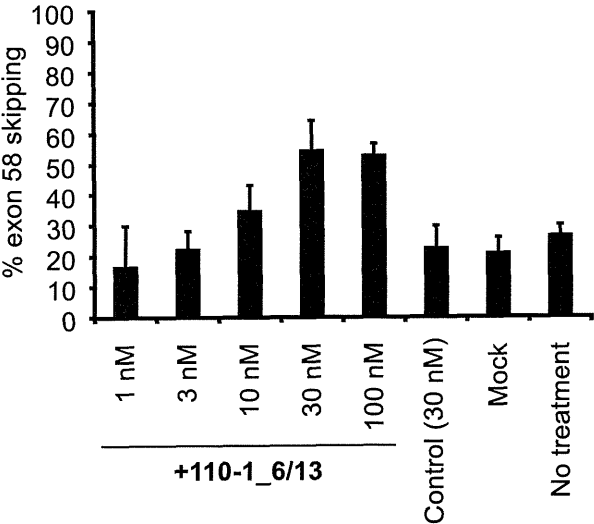


## Supplementary Fig. 5

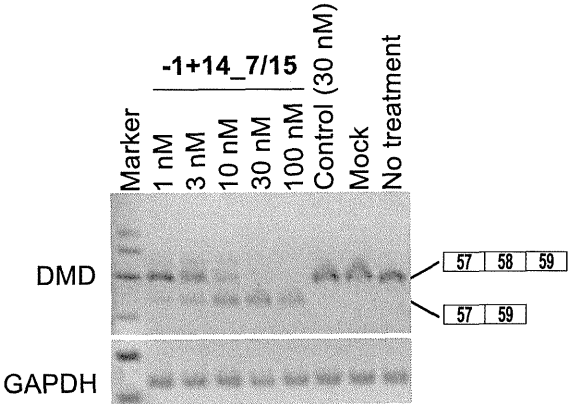


# Supplementary Fig. 6

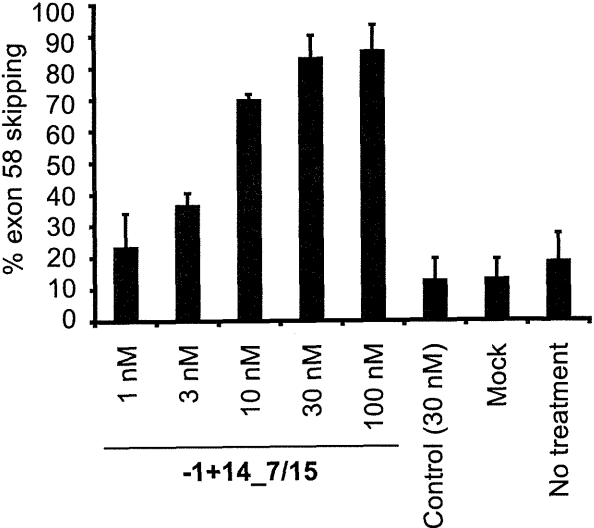
**A**



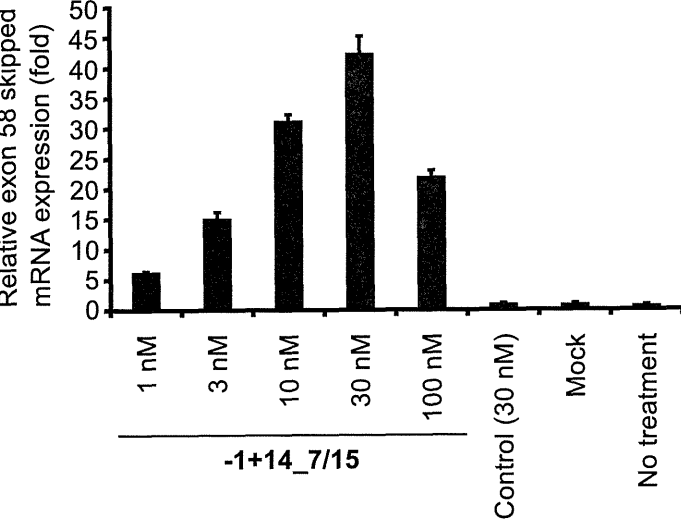
**B**



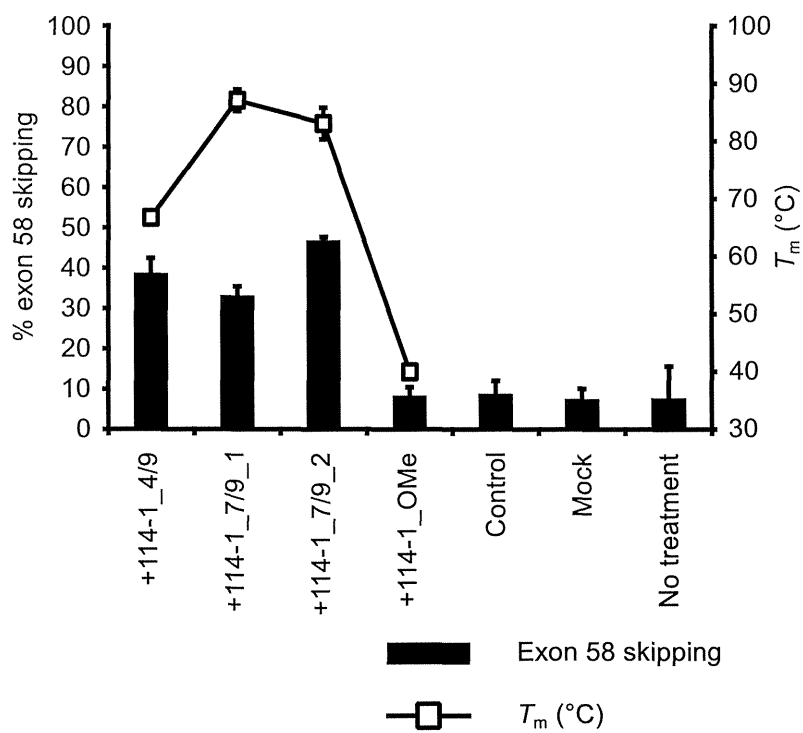
**C**



**D**

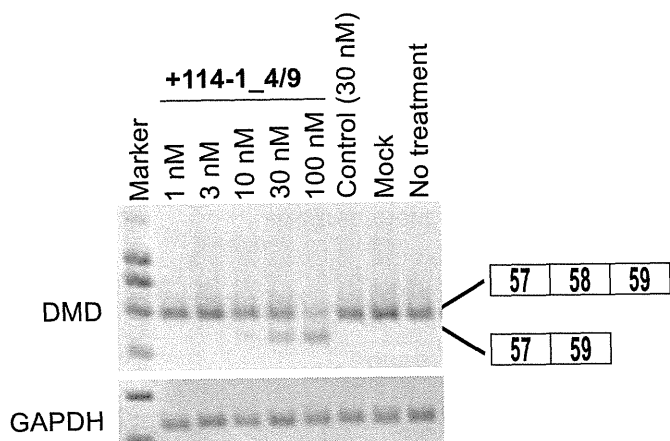


## Supplementary Fig. 7

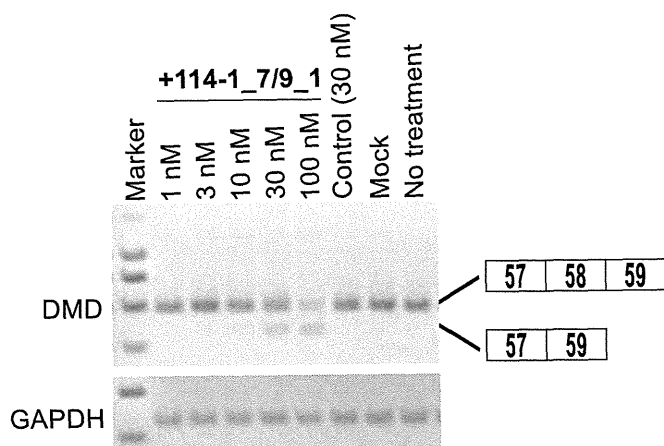


# Supplementary Fig. 8

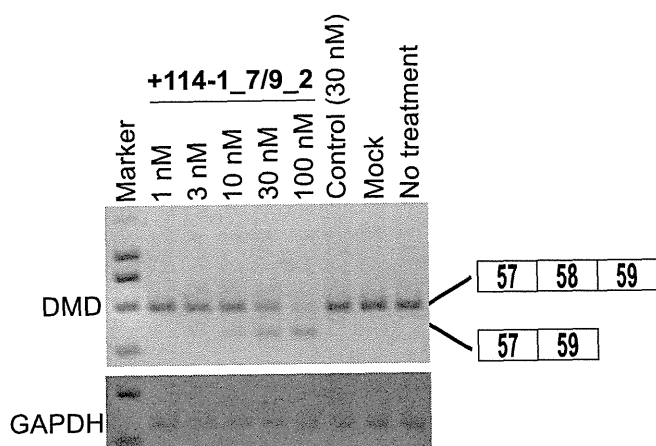
**A**



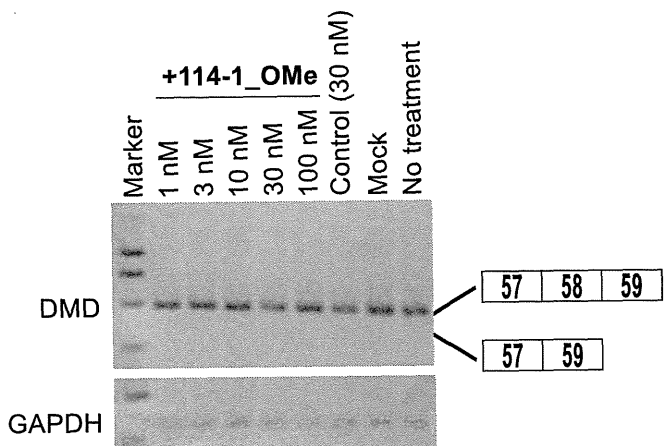
**B**



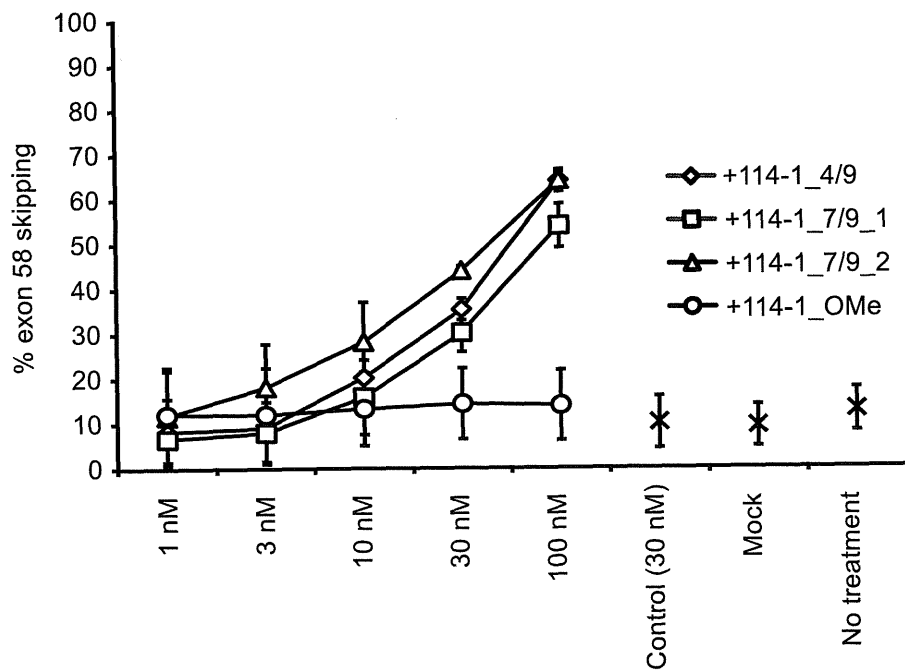
**C**



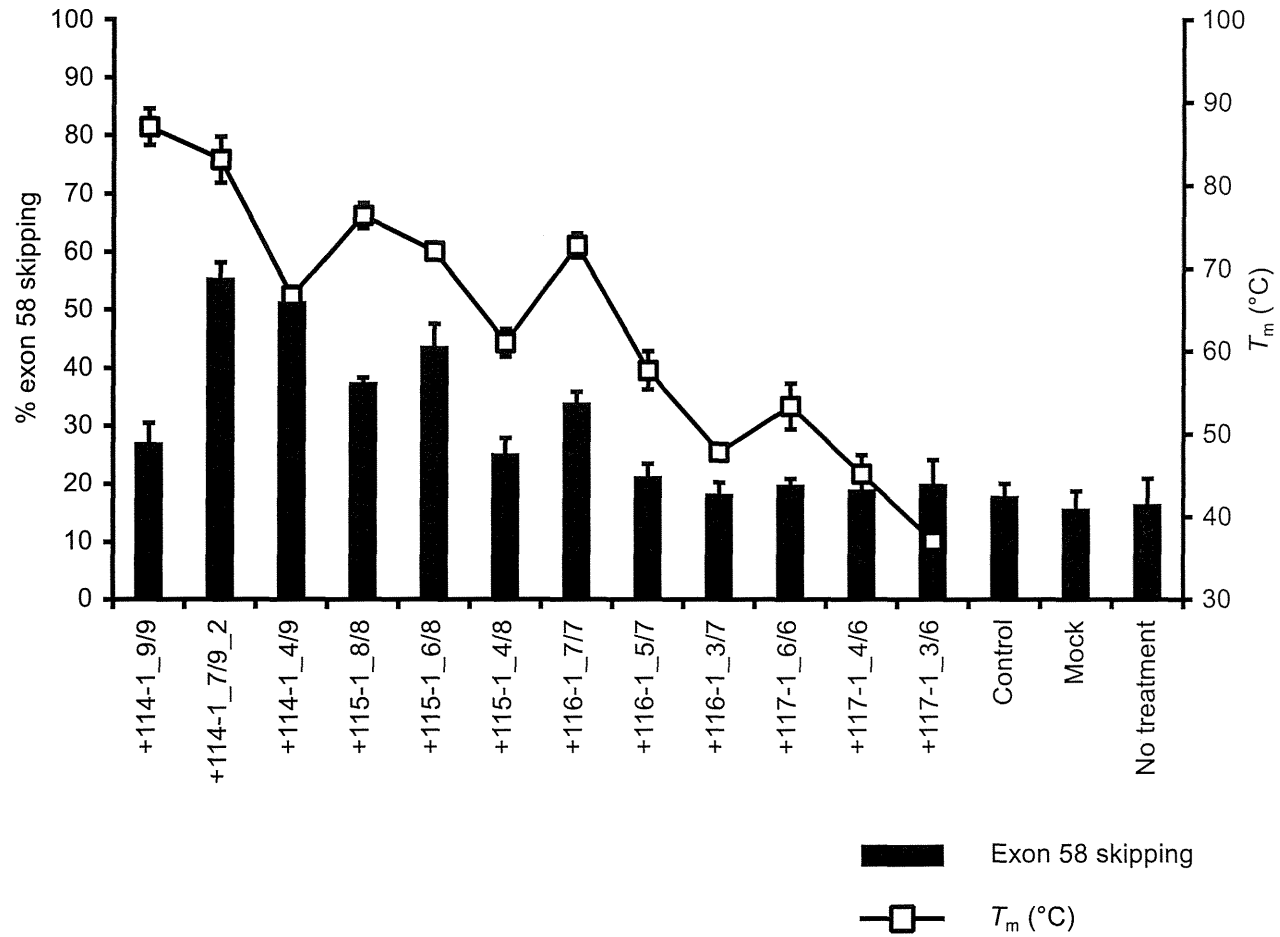
**D**



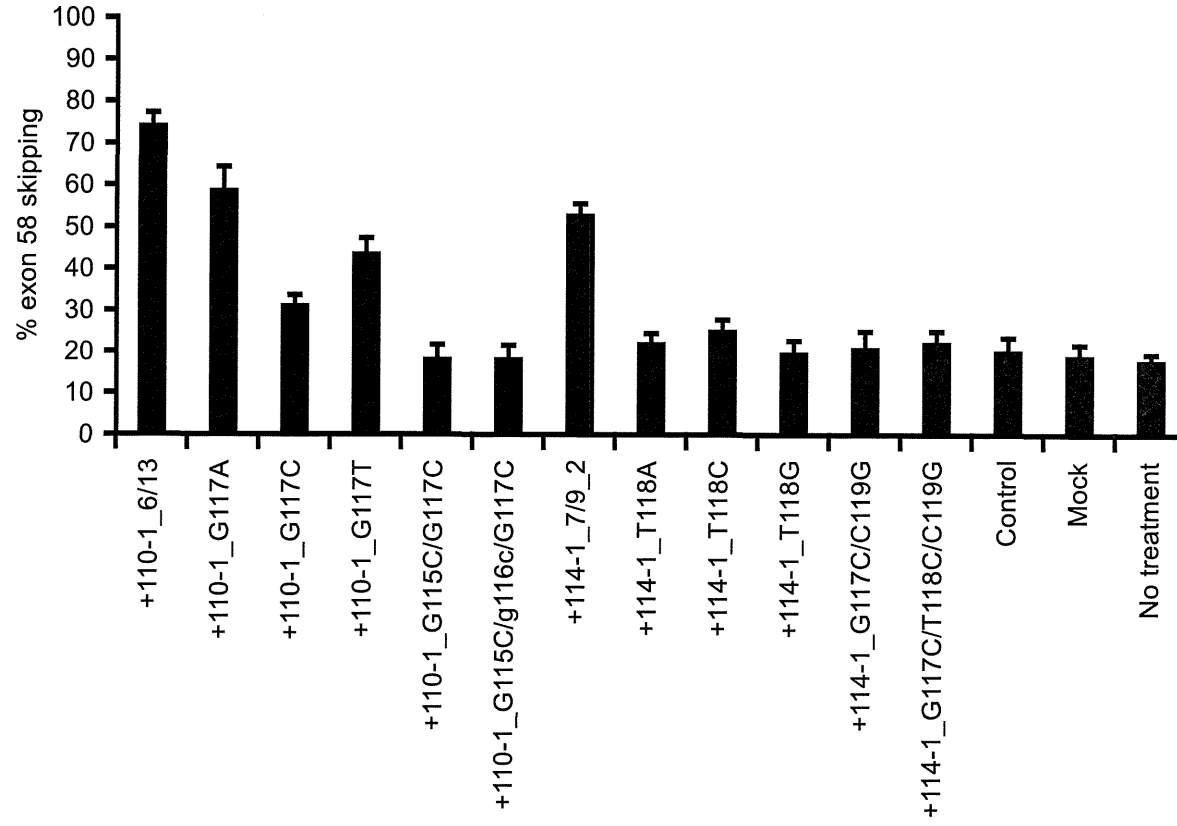
**E**



Supplementary Fig. 9

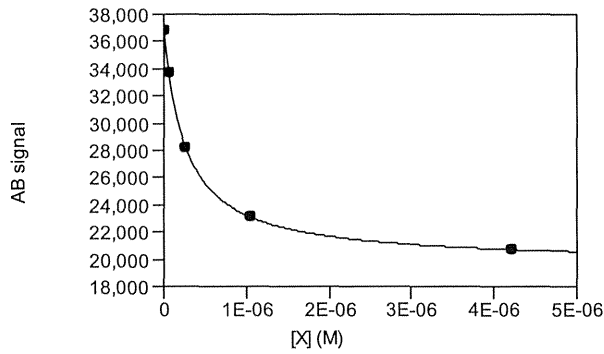


### Supplementary Fig. 10

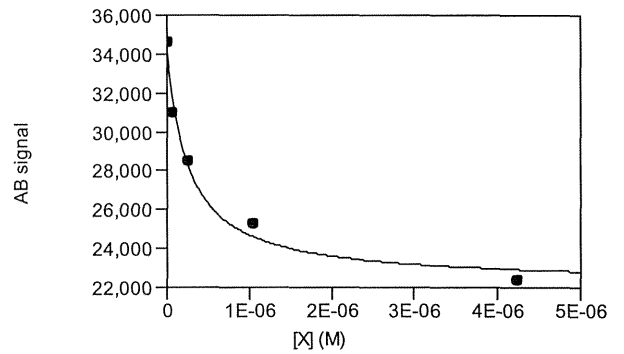


# Supplementary Fig. 11

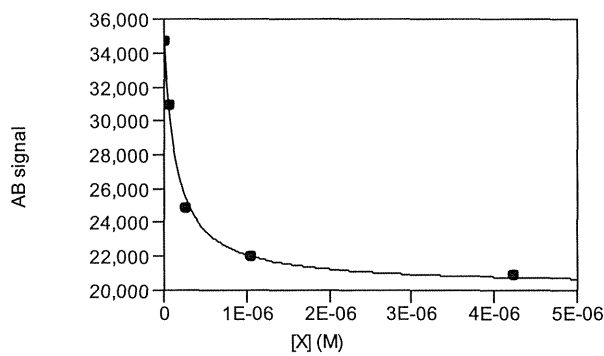
**A** Labeled A strand: +100-1\_11/23  
Competitor X strand: +102-1\_10/21



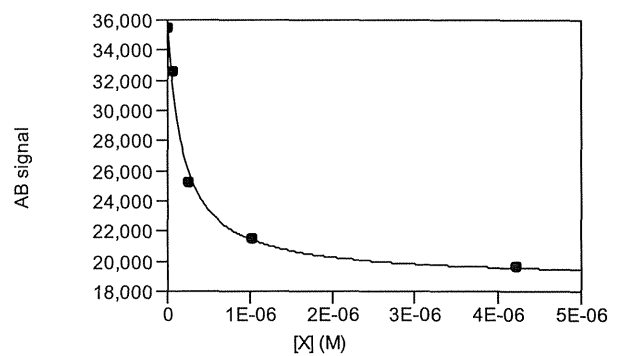
**B** Labeled A strand: +100-1\_11/23  
Competitor X strand: +104-1\_9/19



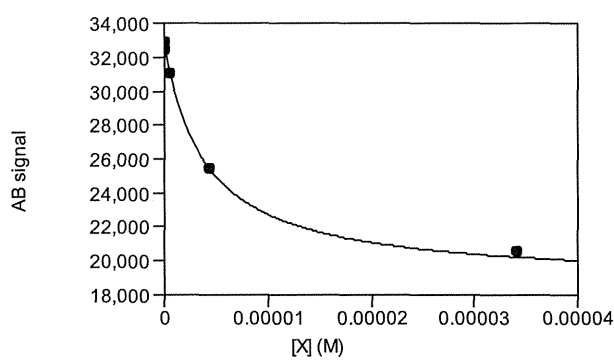
**C** Labeled A strand: +104-1\_9/19  
Competitor X strand: +106-1\_8/17



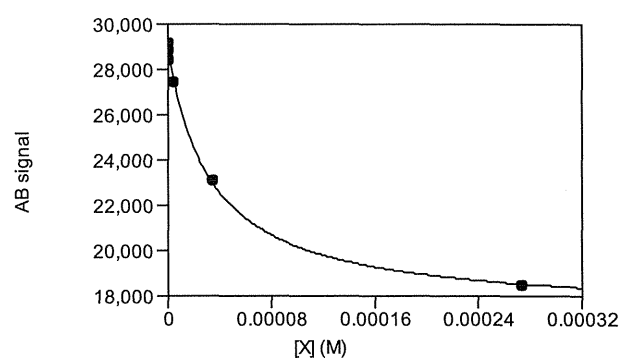
**D** Labeled A strand: +106-1\_8/17  
Competitor X strand: +108-1\_7/15



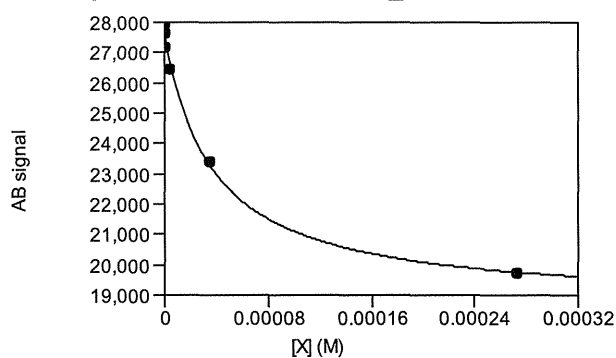
**E** Labeled A strand: +108-1\_7/15  
Competitor X strand: +110-1\_6/13



**F** Labeled A strand: +110-1\_6/13  
Competitor X strand: +112-1\_5/11



**G** Labeled A strand: +112-1\_5/11  
Competitor X strand: +114-1\_4/9





## 7 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

かとう  
■ 加藤 くみ子

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部



加藤 くみ子  
1995年 東京大学薬学部 卒業  
1997年 東京大学大学院 薬学系研究科  
修士課程修了, 三共株式会社研究員,  
学術振興会特別研究員(PD),  
武蔵野大学助手, 助教を経て,  
2008年 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部  
室長, 博士(薬学)(東京大学)  
現在の研究: DDS 製剤の品質評価研究

Key words : ナノメディシン, レギュラトリーサイエンス,  
リボソーム, ブロック共重合体ミセル

### Abstract

昨今, 先端的医薬品・医療機器・再生医療等製品の開発・実用化促進のためにレギュラトリーサイエンスが推進されている。先端的技術の医薬品開発への応用としてナノテクノロジー応用医薬品(ナノメディシン)が挙げられる。近年では, より一層高機能化した製品の開発が行われているが, その実用化のためには品質, 有効性, 安全性を適切に評価するための新たな評価法の開発に資する科学研究が不可欠である。本稿では, 国内外におけるナノメディシンのレギュラトリーサイエンスの動向について概説する。

### はじめに

我が国において「レギュラトリーサイエンス」の概念は, 内山充国立医薬品食品衛生研究所元所長(当時 国立衛生試験所副所長)により, 「科学技術の進歩を, 真に人と社会に役立つ, 最も望ましい姿に調整(レギュレート)するための, 評価・判断の科学」であるとして提唱された<sup>1)</sup>。昨今では, 先端的医薬品・医療機器・再生医療等製品の開発・実用化促進のためにレギュラトリーサイエンス推進が政府の政策に取り入れられるとともに, 法制化された。

先端的技術を医薬品開発に応用する試みとしてナノテクノロジー応用医薬品(本稿では, ナノメディシンと称する)が挙げられる。リボソーム製剤や鉄ナノ粒子製剤, ナノ結晶製剤など, すでに世界的規模で臨床応用されている製品も存在する<sup>2)</sup>。

ナノテクノロジーを医薬品開発に応用する目的は様々であるが, いずれもサイズに起因する特異な特性(例えば, 結晶表面積の増大による溶出速度の増大, 膜透過性の改善など)を利用したものである。近年では, さらに標的指向性を向上させるための修飾や, 治療と診断など複数の機能を集積化した製品の開発が盛んに行われている。これらの実用化のためには品質・有効性・安全性を適切に評価する必要があるが, ナノメディシンは最新の材料科学, 高分子化学, バイオテクノロジー, タンパク質化学, 微細加工技術等が結集されて開発・製造されているため, 新たな評価法の開発に資する科学研究が不可欠である。この科学研究を通して, 開発に際して考慮が必要な要件をまとめる, さらに機能評価法を開発・標準化し, 評価法ガイドライン案等を作成することが重要であり, 先端的医薬品の臨床応用を早期に実現する上で大きな推進

*The trend of regulatory science of nanomedicines* : Kumiko Sakai-Kato  
Division of Drugs, National Institute of Health Sciences

力になると考えられる。本稿では、ナノメディシンのレギュラトリーサイエンスに関する国際的な動向について紹介したい。

## 1. 米 国

米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: 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<sup>3)</sup>。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)<sup>4)</sup>”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 100 nm)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  $\mu\text{m}$  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同時に、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 100 nm”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。従つて、これらの状況を考慮し、FDAが規制権限を持つあ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 100 nm”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(表1)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”<sup>5)</sup>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、ドキシソルピシン塩酸塩含有PEG

表1 ナノメディシン関連の規制文書

年	機関	対象製剤	文書
2002	FDA	リポソーム	Draft Guidance, Liposome Drug Products-Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation
2006	EMA	ナノメディシン一般	Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use
2010	FDA	リポソーム	Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride
2011	EMA	鉄ナノ粒子	Reflection paper on non-clinical studies for generic nanoparticle iron medicinal product applications
2013	EMA	リポソーム	Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product
2013	EMA	ナノメディシン一般	Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products
2013	EMA	鉄ナノ粒子	Draft reflection paper on the data requirements for intravenous iron-based nano-colloidal products developed with reference to an innovator medicinal product
2013	FDA	鉄ナノ粒子	Draft Guidance on Iron Sucrose
2014	MHLW/EMA	ブロック共重合体ミセル	Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products
2014	FDA	ナノメディシン一般	Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology

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”<sup>6)</sup>が発出されている。後者については製剤組成、ドキ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（遊離のドキソルビシンと内包されたドキソルビシンの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”<sup>7)</sup>が発出されている。

## 2. 欧州

欧州医薬品庁（EMA）におけるナノメディシン

に関するレギュラトリーサイエンス活動の一環として、2010年9月にEMA主催によるナノメディシンに関する国際ワークショップが開催された。本ワークショップには欧州各国の他、米国、カナダ、日本、オーストラリアなど27カ国から産官学、さらに患者団体の代表等が出席し、1) 現在までにどのようなナノメディシンが実用化されてきたか、また開発中であるか、2) 医薬品への実用化に向け取り組まれている先端技術、3) ナノメディシンの品質特性評価、非臨床評価、リスク管理（ヒト及び環境へのリスク評価）、4) ナノメディシンを用いることによる患者の利益と利益享受のための課題、など広範な内容が議論された。<sup>8)</sup>

さらに、2011年以降は、リポソーム、鉄ナノ粒子、ブロック共重合体ミセル医薬品、ナノメディシンの表面被覆に関するリフレクションペーパーが作成され、このうちブロック共重合体ミセル医薬品に関するリフレクションペーパーは厚生労働省と共同で作成さ

表2 日本で認可された主なナノメディシン\*

分類	商品名	薬効分類名	販売開始年
リポソーム製剤	ビスダイン <sup>®</sup>	加齢黄斑変性症治療剤	2004年
	アムピゾーム <sup>®</sup>	ポリエンマクロライド系抗真菌性抗生物質製剤	2006年
	ドキシル <sup>®</sup>	抗悪性腫瘍剤	2007年
鉄ナノ粒子製剤	リゾピスト <sup>®</sup>	MRI用肝臓造影剤	2002年
	フェジン <sup>®</sup>	鉄欠乏性貧血治療剤	2007年**
ナノ結晶製剤	イメンド <sup>®</sup>	選択的NK <sub>1</sub> 受容体拮抗型制吐剤	2009年
	ゼブリオン <sup>®</sup>	持続性抗精神病剤	2013年
その他のナノ医薬品	アブラキサン <sup>®</sup>	抗悪性腫瘍剤	2010年

\*現時点でナノメディシンの定義は存在しないが、サブミクロン以下のナノメートルサイズの構成要素を含む医薬品を記した。

\*\*フェジン静注40mgとしての販売開始年。

れた<sup>9)</sup>。EMAにおいて公表されているリフレクションペーパーとは、特に新しい分野で経験が限られている領域やトピックスに関する技術の現状を整理し、開発者との間で共有化を図る目的で作成される文書である。将来、ガイドラインその他の関連文書が作成される際にはその参考となりうるものである(EMA「Procedure for European Union Guidelines and Related Documents within the Pharmaceutical Legislative Framework」)。

一方、第一世代のナノメディシンとして臨床応用されているリポソームや鉄ナノ粒子製剤には既に特許切れの製品も存在し、先発品を参照として開発されたナノメディシン(EMAは、これらを“ナノシミラー”と称している<sup>9)</sup>)の規制当局への申請も行われているため、リポソーム製剤と鉄ナノ粒子製剤に関するリフレクションペーパーは、それぞれのナノシミラーを開発する際の留意点を記した文書となっている。リポソーム製剤では、

その体内分布(biodistribution)及び有効成分の体内での放出速度と放出量が、薬効や安全性に影響を及ぼす重要な因子である。先発医薬品と全く同じではなく、類似の製品を作る場合は、製品の複雑さにより一部省略も可能であると考えられるが、追加的な比較試験(PK試験、組織分布、薬理学的な試験、製品によっては毒性試験)が臨床的な生物学的同等性試験の前に必要になるであろうことが記されている<sup>9)</sup>。

### 3. 日本

日本で認可されている主なナノメディシンの製品例を表にした(表2)。これらに加え、日本発のナノメディシンとして注目されている開発中の製品にブロック共重合体ミセル製剤がある<sup>10)</sup>。ブロック共重合体ミセル医薬品のように先端的技術を用いた医薬品開発が国際的に急速に展開している中、品質・有効性・