



Title	脂質ナノ粒子の品質管理に関する国内外の規制と今後の展望
Author(s)	竹田, 寛
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13335号
Issue Date	2018-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13335
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90661
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroshi_Takeda.pdf



博士学位論文

脂質ナノ粒子の品質管理に関する国内外の規制と今後の展望

北海道大学大学院生命科学院

生命医薬科学コース 薬剤分子設計学研究室

竹田 寛

目次

1. 研究背景と本研究の目的.....	6
1.1 脂質ナノ粒子の医薬品への応用の現状.....	6
1.2 脂質ナノ粒子を医薬品として開発するための薬事規制.....	8
1.3 脂質ナノ粒子の大規模製造における課題.....	10
1.4 研究の目的・方法.....	12
2. 脂質ナノ粒子の国内外ガイドライン等及び既承認品目に関する調査.....	14
2.1 国内外のガイドライン、ガイダンス、コンセプトペーパー等に関する調査.....	14
2.2 ブロック共重合体ミセルに関する日欧共同のリフレクションペーパーに関する調査.....	18
2.3 既承認の脂質ナノ粒子を用いた医薬品に関する調査.....	21
2.3.1 国内で承認されている医薬品に関する調査.....	21
2.3.2 米国で承認されている医薬品に関する調査.....	24
2.3.3 欧州で承認されている医薬品に関する調査.....	26
2.4 2章のまとめ.....	27
3. 古典的な脂質ナノ粒子の特性解析及び規格設定において必要な事項、検討すべき事項.....	29
3.1 脂質ナノ粒子に関する一般的内容.....	29
3.2 注射剤に関する内容.....	36
3.3 吸入剤に関する内容.....	37
3.4 外用剤に関する内容.....	38
3.5 3章のまとめ.....	38
4. 革新的な脂質ナノ粒子の特性解析及び規格設定において必要な事項、検討すべき事項.....	39
4.1 人工の脂質様分子が添加された粒子で考慮すべき事項.....	39
4.2 表面修飾された粒子で考慮すべき事項.....	41
4.3 高分子化合物（核酸、抗原など）が封入された粒子で考慮すべき事項.....	43
4.4 異なる機能をもった膜が重層化された粒子で考慮すべき事項.....	44
4.5 有効成分以外の粒子構成成分の管理について.....	45
4.6 4章のまとめ.....	46
5. 流路製造装置を用いた脂質ナノ粒子の連続生産に関する検討.....	47
5.1 流路製造装置の医薬品製造への応用.....	47
5.2 連続生産技術の脂質ナノ粒子への応用（QbDアプローチに基づく検討）.....	48
5.2.1 検討対象の粒子、製造装置.....	48
5.2.2 目標製品品質プロファイル（QTPP）の設定.....	49
5.2.3 CQA の特定.....	49
5.2.4 潜在的な重要工程パラメータ（CPP）.....	50
5.2.5 製造実験と CPP の特定.....	51
5.3 QbDアプローチに基づく CL4H6-LNP の製造実験に関する考察.....	59
5.3.1 流路製造装置を用いた脂質ナノ粒子の製造に関する考察.....	59

5.3.2 粒度分布の管理に用いる変数に関する考察	60
5.4 5章のまとめ	61
6. 結語	63
実験項	64

[略語等一覧]

略語	英語	日本語
CL4H6-LNP	—	CL4H6 を用いた脂質ナノ粒子
CPP	Critical Process Parameter	重要工程パラメータ
CQA	Critical Quality Attribute	重要品質特性
DDS	Drug Delivery System	—
DEPC	1,2-Dierucoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	ジエルコイルホスファチジルコリン
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	ジミリストイルホスファチジルコリン
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoglycerol	ジミリストイルホスファチジルグリセロール
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	ジオレイルホスファチジルコリン
DPPA	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphate	ジパルミトイル- <i>sn</i> -グリセロール-3-ホスファート
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	ジパルミトイルホスファチジルコリン
DPPE	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine	ジパルミトイル- <i>sn</i> -グリセロール-3-ホスホエタノールアミン
DPPG	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoglycerol	ジパルミトイルホスファチジルグリセロール
DSPC	1,2-Dipstearoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholine	ジステアロイルホスファチジルコリン
DSPG	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoglycerol	ジステアロイルホスファチジルグリセロール
D10、D50、D90	—	10%累積粒子径、50%累積粒子径、90%累積粒子径
EPR	Enhanced Permeability and Retention	—
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamine	<i>N</i> -アセチルガラクトサミン
GMP	Good Manufacturing Practice	—
GQP	Good Quality Practice	—
HSPC	Hydrogenated Soybean L- α -Phosphatidylcholine	水素添加大豆ホスファチジルコリン
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
LNP	Lipid Nano Particle	脂質ナノ粒子
MEND	Multifunctional Envelope-type Nano Device	多機能性エンベロープ型ナノ構造体
MPEG-DMG	1,2-Dimyristoyl- <i>rac</i> -Glycero-3-Methyl Polyoxyethylene 2000	<i>N</i> -(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジミリストイルグリセロール
MPEG-DSPE	<i>N</i> -(Carbonyl-Methoxypolyethylene Glycol 2000)-1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamine	<i>N</i> -(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジステアロイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスホエタノールアミン
PAT	Process Analytical Technologies	プロセス解析工学
PEG	Polyethylene Glycol	ポリエチレングリコール
pKa	—	酸解離定数
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構
QbD	Quality by Design	クオリティ・バイ・デザイン
QTPP	Quality Target Product Profile	目標製品品質プロファイル
SMN2	<i>Survival Motor Neuron 2</i>	—

略語	英語	日本語
siRNA	Short Interference RNA	—
SNALP	Stable Nucleic Acid-Lipid Particles	—
TNS	6- <i>p</i> -Toluidino-2-naphthalenesulfonic acid	6- <i>p</i> -トルイジノ-2-ナフトレンスルホン酸

1. 研究背景と本研究の目的

1.1 脂質ナノ粒子の医薬品への応用の現状

脂質ナノ粒子は、リン脂質等による脂質膜により構成された、ナノメートルスケールの Drug Delivery System（以下、「DDS」）である。

代表的な脂質ナノ粒子として、リポソームが挙げられる。リポソームは、リン脂質等の両親媒性分子による二重膜からなる小胞であり、医薬品の有効成分を脂質二重膜の内相又は膜中に封入することにより製造される。本邦では、リポソーム医薬品として、2018年5月現在、表1に示す3種の医薬品が承認されている^{1,2,3)}。アムビゾーム及びビスダインは、天然のリン脂質からなるリポソーム中に有効成分を封入したのみの、比較的単純な構造のリポソームであり、毒性の強い有効成分が高濃度で循環血中に放出されないよう制御すること等を目的としてリポソーム化されている。一方ドキシルは、毒性の強い有効成分が血中で放出されないよう制御するとともに、適切な粒子径に調製することで、Enhanced Permeability and Retention（以下、「EPR」）効果により、がん組織への選択的な集積を実現している。また、表面をポリエチレングリコール（以下、「PEG」）鎖で修飾することにより、血中での安定性を改善している。これらの医薬品は、いずれも化学合成された低分子を有効成分としている。このように、既存のリポソーム製剤は、循環血中で薬物のリザーバーとしての機能を果たすものや、がん組織のように血管透過性が高上した組織への選択的な薬物送達を可能とするものが主であったが、それ以外の組織に選択的に薬物を送達することは困難であった。

表1 本邦で既承認のリポソーム医薬品

ブランド名	有効成分名	リポソームの構成成分	効能・効果	承認年月
アムビゾーム	アムホテリシン B	HSPC、DSPG、コレステロール、トコフェロール	1. 真菌感染症 2. 真菌感染が疑われる発熱性好中球減少症 3. リーシュマニア症	2006年4月
ドキシル	ドキシソルピシン塩酸塩	HSPC、MPEG-DSPE、コレステロール	1. がん化学療法後に増悪した卵巣癌 2. エイズ関連カポジ肉腫	2007年1月
ビスダイン	ベルテポルフィン	エッグホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルコリン	中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性症	2003年10月

DSPG：ジステアロイルホスファチジルグリセロール

HSPC：水素添加大豆ホスファチジルコリン

MPEG-DSPE：N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン

- 1) アムビゾーム点滴静注用 50 mg インタビューフォーム
(https://ds-pharma.jp/product/ambisome/pdf/ambisome_inj_interv.pdf)
- 2) ドキシル注 20 mg インタビューフォーム
(http://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/800155_4235402A1025_1_001_1F)
- 3) ビスダイン静注用 15 mg インタビューフォーム
(https://drs-net.novartis.co.jp/SysSiteAssets/common/pdf/vis/if/if_vis.pdf)

ところで近年、低分子医薬品では治療が困難であった疾患に対し、核酸医薬品等の中分子医薬品の開発が盛んに行われている。スピラザ（有効成分名：ヌシネルセンナトリウム、SMN2（Survival Motor Neuron 2）遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、細胞質内又は核内でタンパク質等の転写・翻訳に影響することで薬理作用を発揮する。このような特性を有する核酸医薬品は、遺伝子異常により生体内で特定のタンパク質が発現しない、又は十分に機能しない状態にある先天性の遺伝子疾患に対して、新たな治療法を提供することが期待されている。核酸医薬品は細胞質内又は核内が作用点となるため、薬理作用を発揮するためには細胞膜及び/又は核膜を通過する必要がある。しかしながら、以下のような問題点が存在することから、核酸医薬品を単独でヒトに投与した場合には、十分な組織中濃度が得られにくいという問題があった。

- 1本鎖又は2本鎖の核酸を細胞外から細胞内に輸送する輸送体等は存在せず、また、核酸は分子全体が負電荷を帯びているため受動拡散による細胞内移行も期待できないことから、もっぱらエンドサイトーシスにより取り込まれること。
- 核酸医薬品を投与した場合、天然の核酸であれば速やかに血中及び組織中のヌクレアーゼにより分解されてしまう。また、非天然の核酸であれば、短時間で腎から排泄されてしまう。このため、エンドサイトーシスを効率的に促進する上で、血中又は組織中の核酸濃度を長期間高値に維持することが困難であること。

このため、これまでに開発されてきた核酸を単独でヒトに投与するタイプの医薬品は、表2のとおり、特殊な投与経路又は対象疾患の病態により、一定の細胞内取込みが期待できる疾患に限定されていた。

表2 現在国内外で開発又は承認されている、主な核酸を単独でヒトに投与する医薬品

ブランド名	有効成分名	効能・効果	薬物動態学的特徴
スピラザ（日米欧）	ヌシネルセンナトリウム	脊髄性筋萎縮症	髄腔内に本剤を投与することで、長期的に髄液中本薬濃度が高濃度に保たれた結果、エンドサイトーシスにより神経細胞の細胞質内に移行し、作用を発揮するアンチセンスオリゴヌクレオチド
Exondys 51（米）	Eteplirsen	エクソン51のスキッピングにより効果が期待できる遺伝子変異を有するDuchenne型筋ジストロフィーの治療	Duchenne型筋ジストロフィー患者では筋膜の透過性が向上しているため、静脈内大量投与により筋細胞内に移行し、作用を発揮するアンチセンスオリゴヌクレオチド
-	NS-065/NCNP-01	エクソン53のスキッピングにより効果が期待できる遺伝子変異を有するDuchenne型筋ジストロフィーの治療	
-	DS-5141	エクソン45のスキッピングにより効果が期待できる遺伝子変異を有するDuchenne型筋ジストロフィーの治療	
マクジェン	ベガブタニブナトリウム	中心窩下脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性症	作用部位である硝子体内に直接投与され、循環血中の標的タンパク質に結合、機能阻害するアプタマー。

このような背景を踏まえ、核酸の体内動態の改善を目的として、種々の DDS 技術の核酸医薬品への導入が進められている。Alnylam 社がトランスサイレチン型家族性アミロイドーシス患者を対象として開発中のパチシランナトリウム⁴⁾は、short interference RNA (以下、「siRNA」)を封入した脂質ナノ粒子であり、トランスサイレチンの産生を担う肝等の体細胞に siRNA を効率的に導入できるとされている。同じく Alnylam 社がポルフィリン症患者を対象として開発中の Givosiran 等では、肝に薬物を送達するため、N-acetylgalactosamine (以下、「GalNAc」)による人工核酸分子の修飾が行われている⁵⁾。この他にも、アデノ随伴ウイルスにより有効成分であるベクターを体細胞に導入する遺伝子治療用製品 (Glybera) が、家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症患者を対象として欧州で承認されていた⁶⁾。GalNAc による修飾は、肝を標的とした核酸の送達にしか用いることができないという制約がある。また、アデノ随伴ウイルスをキャリアとする場合、封入可能な核酸は原則としてアデノ随伴ウイルスのゲノムに組み込むことが可能なものに限られるため、siRNA やアンチセンスオリゴヌクレオチドを封入することは技術的に困難であった。これに対し脂質ナノ粒子は、封入する有効成分や標的組織・細胞に対する制約が少ないことから、核酸医薬品のキャリアとして注目されている。

脂質ナノ粒子については近年、天然のリン脂質、コレステロール等からなる単純なりポソームに機能性分子を加えることで、特定の組織への集積性を向上させる技術、細胞内導入効率を格段に上昇させる技術の研究が盛んに行われている。Alnylam 社は、MC3 等のカチオン性脂質様分子を添加することで、核酸の細胞内導入効率を大きく向上させた、Stable Nucleic Acid-Lipid Particles (以下、「SNALP」)と呼ばれる DDS を開発した⁷⁾。また、著者の所属する研究室では、YSK05、CL4H6 等のカチオン性脂質様分子を添加することで核酸の細胞内導入効率を向上させるとともに、表面をリガンド等で修飾した、多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (Multifunctional Envelope-type Nano Device、以下、「MEND」)と呼ばれる DDS の研究開発が行われている⁸⁾。

1.2 脂質ナノ粒子を医薬品として開発するための薬事規制

医薬品の開発においては、過去に蓄積された多くの開発品目に関する知識と経験に基づき、検討すべき事項、実施すべき試験等がガイドライン、ガイダンス等として取りまとめられている。世界的には、医薬品規制調和国際会議 (International Council for Harmonisation of Technical

4) Orphanet J Rare Dis 2015; 10: 109

5) Mol Ther Nucleic Acids 2017; 6: 116-32

6) http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002145/WC500135476.pdf (2017年10月、特許切れを理由に販売が終了された)

7) Gene Ther 2006; 13(7): 583-4、Nat Biotechnol 2005;23(8): 1002-7

8) 薬学雑誌 2007; 127 (10): 1655-72、薬学雑誌 2008; 128(2): 219-32

Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、以下、「ICH」) ガイドラインが具体的な薬事規制の根幹をなしており、医薬品の品質管理に関し表 3 のガイドラインが作成され、通知されている。また、日本、米国及び欧州の薬局方では、製剤の剤形ごとに満たすべき品質基準が定められている。その他、「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」(平成 17 年 2 月 10 日付 薬食審査発第 0210001 号) 等の種々の国内通知により本邦での薬事規制は形成されており、医薬品開発に際し検討すべき事項を明確化することにより、医薬品開発の促進に寄与している。

表 3 医薬品の品質管理に関連する ICH ガイドライン

Q1A(R2)	安定性試験ガイドライン
Q1B	新原薬及び新製剤の光安定性試験ガイドライン
Q1C	新投与経路医薬品等の安定性試験成績の取扱いに関するガイドライン
Q1D	原薬及び製剤の安定性試験へのブラケットティング法及びマトリキシング法の適用
Q1E	安定性データの評価に関するガイドライン
Q2A	分析バリデーションに関するテキスト(実施項目)
Q2B	分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)
Q3A(R2)	新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン
Q3B(R2)	新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン
Q3C(R5)	医薬品の残留溶媒ガイドライン
Q3D	医薬品の元素不純物ガイドライン
Q4B	薬局方テキストを ICH 地域において相互利用するための評価及び勧告
Q5A(R1)	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
Q5B	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
Q5C	生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安定性試験
Q5D	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
Q5E	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う同等性/同質性評価
Q6A	新医薬品の規格及び試験方法の設定
Q6B	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の設定
Q7	原薬 GMP のガイドライン
Q8(R2)	製剤開発に関するガイドライン
Q9	品質リスクマネジメントに関するガイドライン
Q10	医薬品品質システムに関するガイドライン
Q11	原薬の開発と製造(化学薬品及び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
M4	新医薬品の製造販売の承認申請に際し承認申請書に添付すべき資料の作成要領について
M7	「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性(変異原性)不純物の評価及び管理」ガイドライン

1.1 項で述べたとおり、脂質ナノ粒子を用いた医薬品は、近年急速な発展が認められている一方で、ICH ガイドライン及び国内ガイドラインはリポソーム等の脂質ナノ粒子をカバーしていない。また、脂質ナノ粒子は主に低分子化合物により構成されるが、DDS としてのシステム全体は低分子化合物の集合体であり、①品質特性値はロット内の全システムで単一ではなく一定の幅の分布を有すること、②集合体全体の詳細な特性値を現在の分析技術によりすべて分析することはできないこと等の他の医薬品にはない特徴を有する。したがって、既存のガイドラインの考え方を脂質ナノ粒子にそのまま当てはめることが適切ではない点、困難

な点、不足する点があると考えられる。

米国及び欧州では、2018年1月現在、リポソーム等の脂質ナノ粒子の品質管理に関連して表4のようなガイダンス、リフレクションペーパー等が発出されている。このうち、研究に着手した2013年時点で発出されていたものは、米国におけるリポソーム医薬品開発に関するドラフトガイダンス(①)及びドキシル後発品開発のためのドラフトガイダンス(②)、欧州におけるリポソーム後発品開発のためのリフレクションペーパー(⑥)及び表面修飾を行う場合の一般的な留意事項に関するリフレクションペーパー(⑦)のみであった。①については、古典的なリポソームを主眼としていたこと、②については、ドキシル後発品の開発に特化した内容であったこと、⑥及び⑦については考え方の概要のみが記載されており詳細かつ明確な方針が示されていないリフレクションペーパーであり、世界的にみても、SNALP、MEND等の革新的な脂質ナノ粒子に対する薬事規制が十分に明確化されているとはいえない状況であった。

表4 米国及び欧州における脂質ナノ粒子の品質管理に関連する主なガイダンス等(2018年1月現在)

米国	Draft Guidance for Industry “Liposome Drug Products” ①	初版：2002年 改訂第1版：2015年
	Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride ②	初版：2010年 改訂第1版：2014年 改訂第2版：2017年
	Draft Guidance on Amphotericin B ③	初版：2014 改訂第1版：2016年
	Draft Guidance on Daunorubicin Citrate ④	2014年
	Draft Guidance on Verteporfin ⑤	2014年
欧州	Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product ⑥	2013年
	Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products ⑦	2013年

以上を踏まえ著者は、本邦におけるリポソーム等の脂質ナノ粒子に関する薬事規制を整理・検討するとともに、革新的なSNALP、MEND等の開発に際し考慮すべき点を世界に先駆けて提言・明確化する国内ガイドラインを策定することを第一の課題として、本研究に着手した。

1.3 脂質ナノ粒子の大規模製造における課題

脂質ナノ粒子の製造においては、工程のスケール依存性(製造スケールの変動により品質への影響を生じる現象)が課題とされてきた⁹⁾。既存の多くのリポソーム医薬品の製造は、あらかじめ形成したリポソームに、①有効成分の脂溶性を利用して二重膜中に薬物を分布させる方法(アムビゾーム点滴静注用50mg等)、②塩濃度勾配又はpH勾配を利用して薬物を充填する方法(ドキシル注20mg等)により行われてきた。一方、SNALP、MEND等の機能性脂質ナノ粒子の製造(特に、核酸を封入する場合)では、脂質ナノ粒子を構築した後にpH勾

9) Draft Guidance for Industry “Liposome Drug Products”. FDA CDER, 2015

配等を利用して薬物を封入することが困難であること等を理由として、エタノール注入法により薬物封入と同時に粒子形成が行われることが一般的である。研究室における小スケールでの調製では、Vortex Mixer を用いた振とう操作により製造を行うことが一般的であるが、操作者の技量に依存する部分が大きく、再現性の観点では課題があった。また、非臨床試験・臨床試験の実施を見据えた場合、段階的に製造スケールを増大させる必要があるが、医薬品製造で一般的に用いられる攪拌翼付き反応装置では、低分子医薬品の場合でさえスケール依存性が認められる場合が多く、脂質ナノ粒子の実用化において大きな障壁となっていた⁹⁾。

一方で最近、医薬品の製造において連続生産技術の開発・導入が盛んに行われている¹⁰⁾。連続生産技術は、他の製造業ではすでに一般的に普及しており、長期間にわたって単一の製品を連続生産することで、効率的な大量生産が可能となる。医薬品の製造においては、高価な製品の少量・多品種製造が求められること、製品品質について特に厳密な管理が求められること、逸脱発生時の廃棄・回収のリスクを最小化できること等の背景もあり、バッチ式の製造が長らく行われてきたが、最近のプロセス解析工学（以下、「PAT」）の発展と、Quality by Design（以下、「QbD」）による工程設計の普及・深化に伴い、工程を高精度でモニタリングしながら小規模な製造設備を長時間運転して医薬品の商用生産を行う技術が注目されている。

医薬品製造における連続生産技術では、製造スケールに対するフレキシビリティの観点が特に注目されている。医薬品製造においては、非臨床試験に用いられる検体から一定の品質管理が求められ、臨床試験に用いる治験薬製造においては治験薬 GMP¹¹⁾に基づき製造工程のベリフィケーション等が求められる。さらに、承認申請の段階で GMP 省令¹²⁾に基づき、原則として商業用スケールでの製造工程のバリデーションの実施が求められる。第Ⅰ相試験に用いる治験薬と第Ⅲ相試験に用いる治験薬の製造スケールが 100 倍以上異なること、第Ⅲ相試験に用いる治験薬の製造スケールと商業生産の製造スケールが 10 倍以上異なることも珍しくないため、各製造スケールにおける検討を個別に行う必要が生じ、生産性の低下につながっていた。また、スケール変更時に最終製品の品質への影響が認められ、工程の再設計が必要となることもしばしばあった。ここに連続生産技術を導入すると、治験薬製造の段階から商業用製造まで一貫して同一の製造設備を用い、運転時間を延長することのみによって容易に製造スケールの変更が可能となることから、医薬品の製造工程の確立作業における生産性

10) JPMA NEWS LETTER 2016 No. 173 (http://www.jpma.or.jp/about/issue/gratis/newsletter/archive_after2014/73t6.pdf)
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価事業 医薬品の新規開発と製造変更における品質管理手法に関する研究 「連続生産に関する Points to Consider」 文書 (http://www.nihs.go.jp/drug/section3/AMED_CM_PIC.pdf)

11) 「治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬 GMP）について」（平成 20 年 7 月 9 日付薬食発第 0709002 号）

12) 「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」（平成 16 年 12 月 24 日付厚生労働省令第 179 号）

の大幅な向上が期待できる。

上記の連続生産の特徴は、脂質ナノ粒子の製造においても有用であり、運転時間の変更により自在に製造スケールの変更が可能となるため、製造スケール、製造設備等の変更に伴い品質特性が変化するリスクを最小化することが可能となる。したがって、脂質ナノ粒子を医薬品として実用化する上で、連続生産技術を導入することは極めて重要と考えられる。

しかしながら、連続生産技術に関する薬事規制は十分に整備されているとはいいがたく、国内では日本医療研究開発機構による医薬品等規制調和・評価事業において **Points to Consider**¹⁰⁾が取りまとめられ、この内容を踏まえてドラフトガイダンス¹³⁾が公表されたのみである。また、既承認の医薬品では、経口固形製剤において連続生産が導入された製剤が一部承認されているものの、より複雑かつ精密な制御が必要となる脂質ナノ粒子を用いた医薬品の製造において承認された品目、製造条件について詳細な検討を行った公表事例はなかった。

以上を踏まえ、革新的な SNALP、MEND 等の脂質ナノ粒子の実用化に向けて、連続生産技術を脂質ナノ粒子の製造に導入するための基礎的な検討を QbD の手法を用い、医薬品の承認申請に係る添付資料に準ずる記載形式で検討結果を例示することで、当該技術の普及・発展に寄与できるものと考えられる。さらに、当該検討は、将来的に策定が期待される脂質ナノ粒子の製造への連続生産技術の応用に関するガイダンス等の基盤となることが期待される。

1.4 研究の目的・方法

本研究では、まず、1.2 項に記載した背景及び第一の課題を踏まえ、医薬品開発の早期段階から検討が必要となる特性解析及び規格設定において必要となる項目、検討すべき項目を提言することを目的として、調査研究を行うこととした。調査研究では、①米国及び欧州で発出されている主なガイダンス、リフレクションペーパー等（表 4）並びに②脂質ナノ粒子と同様に低分子化合物の集合体である、ブロック共重合体ミセルに関する日欧共同のリフレクションペーパー¹⁴⁾において推奨されている規格項目及び特性解析項目を調査した上で、③日米欧で承認されている脂質ナノ粒子医薬品の審査報告書に基づき、実際に測定等されている規格項目及び特性解析項目を調査した（2 章）。また、当該調査結果を踏まえて、規格設定及び特性解析において必要となる項目、検討すべき項目を抽出することとした。この検討においては、本研究室で開発中の MEND を用いた研究結果も考慮して行うこととした。なお、当該調査研究では、DDS における複雑性、求められる機能等が大きく異なることから、(i) 古典

13) 医薬品の連続生産を導入する際の考え方について（暫定案）
(<https://www.pmda.go.jp/files/000223711.pdf>)

14) 「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表等について」（平成 26 年 1 月 10 日付 薬食審査発 0110 第 1 号）

的な脂質ナノ粒子（血液中で薬物のリザーバーとして機能することを期待して開発される脂質ナノ粒子；3章）と、(ii) 革新的な脂質ナノ粒子（表面修飾や人工脂質の添加により、特定の組織への集積性と細胞内導入効率の向上が図られた脂質ナノ粒子；4章）に分けて、検討を行うこととした。

次に、1.3 項に記載した背景及び第二の課題を踏まえ、本研究室で現在研究を行っている CL4H6 を用いた脂質ナノ粒子（以下、「CL4H6-LNP」）を用いて、流路製造装置（マイクロミキサー）による製造実験を行うこととした。本検討は、革新的な SNALP、MEND 等の脂質ナノ粒子の実用化に向けて、連続生産技術を導入するために必要と考えられる基礎的な検討を QbD の手法を用いて行うこととし、医薬品の承認申請に係る添付資料に準ずる記載形式で検討結果をまとめることとした（5章）。

なお、本研究は、厚生労働省による「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」において、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency、以下、「PMDA」）の職員である著者が本研究室に所属して行ったものであり、本研究で得られた知見の一部は「リポソーム製剤の化学、製造、及び品質管理に関する素案」（脂質ナノ粒子 WG（北海道大学大学院薬学研究院）、2015年3月、<http://www.pmda.go.jp/files/000208789.pdf>）作成において活用されている。また、当該文書は、「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」として最終化され、厚生労働省 医薬・生活衛生局 審査管理課より通知されている（平成28年3月28日付 薬生審査発 0328 第19号）。

2. 脂質ナノ粒子の国内外ガイドライン等及び既承認品目に関する調査

2.1 国内外のガイドライン、ガイダンス、コンセプトペーパー等に関する調査

国内外の薬局方及び ICH-Q6A ガイドライン（表 3）では、一般的な医薬品の規格設定に際し特に考慮すべき点が剤形ごとに取りまとめられている。本邦では、薬局方には先発医薬品・後発医薬品を問わず検討が必要な規格項目が示されており、ICH-Q6A ガイドラインには主に先発医薬品の規格項目として検討が必要な内容が記載されている。

他方、リポソーム又は脂質ナノ粒子について取り扱った公表文献のうち、2013 年に掲載されたものについて調査¹⁵⁾を行ったところ、脂質ナノ粒子の投与経路として一般的と考えられる注射剤（静脈内投与等）のほか、経皮吸収¹⁶⁾又は経肺吸収¹⁷⁾を期待した製剤の開発も行われていた。

日本薬局方（第十七改正第一追補）及び ICH-Q6A ガイドラインにおいて、注射剤、外用剤、吸入液剤に対し規格設定すべきとされている項目は表 5 のとおりであった。なお、ICH-Q6A ガイドラインにおいては、「新原薬あるいは新製剤の開発段階で蓄積された経験とデータは、規格を設定するための基礎とすべきものである。これらに基づいて、ある種の試験を削除したり、別の試験に代えたりすることが可能である。」とされており、規格試験として測定するだけでなく、工程内試験としての測定や代替試験法の設定等、柔軟な対応が許容されている。

表 5 日本薬局方及び ICH-Q6A ガイドラインにおいて規格設定すべきとされている項目

	注射剤	外用剤	吸入液剤
性状	2（大きさ、剤形、色など）	2（大きさ、剤形、色など）	2（大きさ、剤形、色など）
含量/定量法	2	2	2
確認試験	2（原薬を特異的に確認できる方法とすべき）	2（原薬を特異的に確認できる方法とすべき）	2（原薬を特異的に確認できる方法とすべき）
純度試験	2（有機・無機不純物（分解生成物）及び残留溶媒）	2（有機・無機不純物（分解生成物）及び残留溶媒）	2（有機・無機不純物（分解生成物）及び残留溶媒）
製剤均一性	1、2	1（外用液剤）	-
採取容量試験	1	-	-
pH	2	-	-
無菌性	1、2	-	-
エンドトキシン/発熱性物質	1（皮内・皮下・筋肉内投与にのみ用いる製剤は除く）、2	-	-
不溶性異物	1	-	-

15) データベースとして PubMed を用いて、以下の検索式で 2014 年 2 月 25 日に検索を行った。

・ ((liposome human drug) AND ("2013/1/1"[Date - Publication] : "2013/12/31"[Date - Publication]))

検索の結果、422 報が該当し、このうち電子ジャーナル契約等の観点で所属研究室での入手が容易であった 287 報（68.2%）を対象に調査を行った。

287 報から、日本語・英語以外の言語で記載されていた 9 報、リポソーム又は脂質ナノ粒子を取り扱っていなかった 23 報、調査時点で電子版を閲覧できなかった 73 報、書籍 1 報、総説 33 報を除外した結果、個別具体的なシーズたるリポソーム又は脂質ナノ粒子を取り扱った公表文献は 148 報であった。

なお、リポソーム又は脂質ナノ粒子の特性解析に関する記載があった文献は 82/148 報（55.4%）であった。

16) Int J Nanomedicine 2013; 8: 2677-88

17) Ther Deliv 2013; 4(8): 1047-72、J Pharm Sci 2013; 102(4): 1281-9

	注射剤	外用剤	吸入液剤
不溶性微粒子	1、2	-	-
水分含量	2（非水性の注射剤及び注射剤調製用の粉末製剤）	-	-
抗菌性保存剤含量	2（添加する場合）	-	-
抗酸化保存剤含量	2（添加する場合）	-	-
容器からの溶出物	1（注射剤用ガラス容器試験法、プラスチック製医薬品容器試験法、輸液用ゴム栓試験法に適合）、2	-	-
投与システムの機能性試験	2（プレフィルドシリンジ製剤等の場合）	-	-
浸透圧	2（等張性の製剤の場合）	-	-
粒子径分布（粒度）	2（懸濁剤）	-	-
再分散性	2（保存中に粒子が沈殿する懸濁剤の場合）	-	-
再調製時間	2（乾燥粉末製剤の場合）	-	-

1: 日本薬局方で必要とされている項目

2: ICH-Q6A ガイドラインで設定すべきとされている項目（製剤特有の項目は、注射剤のみ記載されている）

また、米国及び欧州で発出されている主なガイダンス、リフレクションペーパー等（表 4）のうち、脂質ナノ粒子一般について取り扱ったものにおいて、設定すべきとされている規格項目及び検討すべきとされている特性解析項目は表 6 のとおりであった。

表 6 米国及び欧州で発出されている脂質ナノ粒子一般について取り扱ったガイダンス等

	米国リポソームドラフトガイダンス (①)		欧州リポソーム後 発品リフレクシ ョンペーパー (⑥)	欧州 表面修飾に関 するリフレクシ ョンペーパー (⑦)
	2002 年版	2015 年版		
脂質ナノ粒子の成分等	◎（脂質の構成）、 ○（脂質成分の有効成分に対するモル比、各構成成分の質量パーセント）	○（脂質成分の有効成分に対するモル比、各構成成分の質量パーセント）	○（脂質成分の有効成分に対する比）	-
モルフォロジー	○（ラメラ数を含む）	○（ラメラ数を含む）	○	-
リポソームの構造、完全性	-	○	-	-
内相の特性	○（内相の容積）	-	△（内相の pH ; pH 勾配法により封入するリポソームの場合）	-
有効成分のリポソーム中での状態	-	-	△（ドキシソルビシンのように有効成分が析出する場合）	-
有効成分のリポソーム中での分布	-	-	△	-
相転移温度	○	○	△（相転移温度と相転移のエンタルピー）	-
表面の特性	-	○	○（表面の PEG の位置）	○ ^{a)}
電荷	○（正味電荷）	-	△（表面電位）	-
粒子径/粒度分布	○	◎	○	-
光散乱係数	○	-	-	-

	米国リポソームドラフトガイダンス (①)		欧州リポソーム後 発品リフレクショ ンペーパー (⑥)	欧州 表面修飾に関 するリフレクショ ンペーパー (⑦)
	2002 年版	2015 年版		
粘度	-	○	-	-
分光学的なデータ	○	○ (例: ³¹ P-NMR)	-	-
浸透圧	○	◎	-	-
封入率	◎ (封入分子と遊離 分子の定量)	◎ (封入分子と遊離 分子の定量)	○ (封入分子と遊離 分子の定量)	-
有効期間内の有効成分の 漏出速度	-	○	-	-
含量	◎ (封入分子と遊離 分子の定量)	◎ (総量)	-	-
<i>In vitro</i> 放出 (buffer)	◎	◎	○	-
<i>In vitro</i> 放出 (血漿等)	-	-	△ (血漿中でのリポ ソームの完全性)	-
純度	◎ (脂質分解物)	◎ (脂質分解物、有 効成分分解物、残留 溶媒)	○ (凝集体)	-
物理的な安定性	-	◎	-	-
無菌	-	◎	-	-
エンドトキシン	-	◎	-	-
塩濃度を変化させたとき のリポソームの完全性の 変化	-	○ (放出、封入率、 粒度)	-	-
有効成分、脂質、機能的 分子の製剤中での安定性	-	-	○	-

○: 特性解析項目として測定すべきとされている項目

◎: 規格に設定すべきとされている項目

△: 特殊な場合に特性解析項目として測定すべきとされている項目

a) 物理化学的な特性、表面修飾の不均一性が有効性・安全性に及ぼす影響、リガンドの配置・配座、修飾の安定性 (保存時、投与時)、脱離した修飾分子が与える影響

また、米国で発出されている、個別の後発品開発のためのドラフトガイダンス (表 4 の②～⑤、最新の版) において、測定すべきとされている特性解析項目は表 7 のとおりであった。

表 7 米国で発出されている個別の後発品開発のためのドラフトガイダンス

	ドキシソルビシン 塩酸塩製剤 (②)	アムホテリシン B 製剤 (③)	ダウノルビシン クエン酸塩製剤 (④)	ベルテポルフィン 製剤 (⑤)
脂質ナノ粒子の成分	○ (脂質の量、脂 質と薬物の比率を 含む)	○	○ (脂質の量、脂質と 薬物の比率を含む)	○ (脂質の量、ベル テポルフィンの 位置異性体の比 率、脂質と薬物の 比率を含む)
封入率	○ (封入分子と遊 離分子の定量)	○ (封入分子と遊 離分子の定量)	○ (封入分子と遊離分 子の定量)	○ (封入分子と遊 離分子の定量)
内水相の状態	○ (塩濃度、容 積、pH、硫酸イオ ン及びアンモニウ ムイオン濃度)	-	○ (内相と全体のク エン酸濃度、容積、 pH、スクロース濃 度)	-
ヒスチジン濃度	○	-	-	-
スクロース濃度	○	-	○	-
ラクトース濃度	-	-	-	○
有効成分のリポソ ーム中での状態	○ (析出している こと)	-	○ (析出していないこ と)	-
モルフォロジー	○ (ラメラ数を含 む)	○ (ラメラ数を含 む)	○ (ラメラ数を含む)	○ (ラメラ数を含 む)

	ドキシソルピシン 塩酸塩製剤 (②)	アムホテリシン B 製剤 (③)	ダウノルピシン クエン酸塩製剤 (④)	ベルテポルフィン 製剤 (⑤)
相転移プロファイル	○ (脂質単独、リポソーム構成後)	○	○ (脂質単独、リポソーム構成後)	○ (脂質単独、リポソーム化した後の凍結乾燥後)
粒子径/粒度分布	○ (D50、「(D90-D10) /D50」)	○ (D50、「(D90-D10) /D50」)	○ (D50、「(D90-D10) /D50」)	○
PEG 層厚	○	-	-	-
表面電位	○	○	○	○
<i>In vitro</i> 放出	○ (血中で漏出しないこと、弱酸性条件下で薬物を放出すること、過酷条件下での完全性、リポソーム内のゲル相からの薬物放出)	○ (漏出速度)	○ (血中で漏出しないこと、弱酸性条件下で薬物を放出すること、過酷条件下での完全性、リポソーム内のゲル相からの薬物放出)	○ (血中でベルテポルフィンが速やかに放出されること)

○: 特性解析項目として測定すべきとされている項目

後発品開発のためのドラフトガイダンスを俯瞰すると、以下の内容が背景にあるものと考えられる。

- ドキシソルピシン塩酸塩製剤及びダウノルピシンクエン酸塩製剤は、①強毒性の有効成分を封入していること、②封入には濃度勾配法を用いていること、③循環血中では薬物を放出せず、pH が低下する標的組織近傍のみで薬物を放出すること等の特徴を有しており、ドキシソルピシン塩酸塩製剤については脂質ナノ粒子表面が PEG で修飾されている。一方でアムホテリシン B 製剤は、①脂溶性及び毒性の高い有効成分を脂質二重膜中に溶解させていること、②循環血中で有効成分を緩徐に放出することが特徴であり、ベルテポルフィン製剤は①脂溶性及び毒性の高い有効成分を脂質二重膜中に溶解させることに加え、②血中でベルテポルフィンを速やかに放出することが特徴である。
- ドラフトガイダンスが作成されている 4 種の医薬品のいずれにおいても測定すべきとされている特性解析項目は以下のようになっており、いずれも一般的なリポソーム/脂質ナノ粒子において重要な特性であると考えられる。
 - 脂質ナノ粒子の成分 (脂質の量、脂質と薬物の比率を含む)、添加剤濃度
 - 封入率 (封入分子と遊離分子の定量)
 - モルフォロジー、ラメラ数
 - 脂質単独及びリポソーム構成後の相転移プロファイル (相転移温度等)
 - 粒子径/粒度分布:

なお、ベルテポルフィン製剤においては、投与後速やかに有効成分が放出されることから、有効性及び安全性に重大な影響を及ぼすおそれはないが、リポソームの投与時の安全性及び安定性等に影響する可能性があることから、測定すべきとされていた。

- ・ 表面電位
- ・ *In vitro* 溶出性：

製剤に期待される放出特性を踏まえて、必要な条件が設定されていた。循環血中での薬物放出を期待していないドキシソルビシン塩酸塩製剤及びダウノルビシンクエン酸塩製剤では循環血中で放出せず、弱酸性条件下で薬物を放出することの確認が求められていたのに対し、アムホテリシン B 製剤及びベルテポルフィン製剤では循環血中で有効成分を定められた速度で放出することの確認が求められていた。
- ・ 一方で、ドキシソルビシン塩酸塩製剤及びダウノルビシンクエン酸塩製剤のみで、以下の特性解析項目の測定が求められていた。
 - ・ 内水相の状態（容積、pH、内水相の溶媒特性（塩濃度など））：

両製剤は、生体内/細胞内の特定の部位のみで薬物を適切な速度で放出することを期待される放出制御型製剤である。したがって、溶出特性の管理が品質管理上極めて重要になると考えられる。ドキシソルビシン塩酸塩製剤はアンモニウムイオン濃度勾配法、ダウノルビシンクエン酸塩製剤は pH 勾配法によりリポソーム中に有効成分が封入され、逆反応により有効成分が放出されるため、これらの特性は放出速度に影響するものと考えられる。
 - ・ 有効成分のリポソーム中での状態：

ドキシソルビシン塩酸塩製剤ではリポソーム中で有効成分の多くが析出し、固体として存在しているのに対し、ダウノルビシンクエン酸塩製剤ではほとんどが溶解して存在しているとドラフトガイダンス中に記載されていた。固体が内水相に溶解した後、内水相からリポソーム外に移行する過程と、直接内水相からリポソーム外に移行する過程では、放出速度や律速段階が異なる可能性があることから、特性解析項目として重要視されているものと考えられる。
 - ・ PEG 層厚：

PEG による表面修飾が行われているドキシソルビシン塩酸塩製剤のみで設定されている。PEG 層は、リポソームが生体内の網内系や免疫細胞に捕捉されるのを抑制し、循環血中の滞留時間を延長させると考えられている。PEG による修飾の程度等が異なった場合、生体内半減期が変動するおそれがあることから、特性解析項目として重要視されているものと考えられる。

2.2 ブロック共重合体ミセルに関する日欧共同のリフレクションペーパーに関する調査

ブロック共重合体ミセルは、低分子化合物の複合体として複雑かつ巨大な構造物を形成している点で脂質ナノ粒子と類似している。本研究に着手した 2013 年より後、2014 年にプロ

ック共重合体ミセルに関する日欧共同のリフレクションペーパー¹⁴⁾が作成され、発出されたことから、欧州のリポソーム後発品のためのリフレクションペーパー（表4の⑥）と比較検討を行った（表8）。

表8 欧州におけるリポソーム後発品及びブロック共重合体ミセルのためのリフレクションペーパーの比較

	日欧共同ブロック共重合体ミセル リフレクションペーパー	欧州リポソーム後発品 リフレクションペーパー (⑥)
脂質ナノ粒子の成分等	◎（共重合体ミセルの定量又は有効成分との重量比）	○（脂質成分の有効成分に対する比）
化学構造	○	-
確認試験	◎（有効成分と共重合体ミセルを確認できるもの）	-
モルフォロジー	○	○
有効成分の状態	○（有効成分の物理的状态）	△（有効成分のリポソーム中での状態；ドキシソルピシンのように有効成分が析出する場合）
有効成分の分布	○（表面に結合した有効成分の画分）	△（有効成分のリポソーム中での分布）
会合数	○	-
内相の特性	-	△（内相のpH；pH 勾配法により封入するリポソームの場合）
相転移温度	-	△（相転移温度と相転移のエンタルピー）
表面の特性	○（リガンド等）	○（表面のPEGの位置）
電荷	○（ゼータ電位）	△（表面電荷）
粒子径/粒度分布	○	○
粘度	○	-
浸透圧	○	-
封入率	◎（封入薬物量、非封入薬物量）	○（封入分子と遊離分子の定量）
<i>In vitro</i> 放出 (buffer)	○	○
<i>In vitro</i> 放出 (血漿等)	○（血漿中及び組織中での安定性、分解）	△（血漿中でのリポソームの完全性）
純度	◎（凝集物、沈殿物、分解物を含む）	○（凝集体）
ナノ構造の濃度依存性 （臨界ミセル濃度など）	○	-
有効成分、脂質、機能性分子の製剤中での安定性	-	○
力価	◎（有効成分が生物薬品である場合）	-

○：特性解析項目として測定すべきとされている項目

◎：規格に設定すべきとされている項目

△：特殊な場合に特性解析項目として測定すべきとされている項目

リポソーム後発品のためのリフレクションペーパーには規格項目に関する記載がないのに対し、ブロック共重合体ミセルのためのリフレクションペーパーでは規格項目に関する記載がある他、両リフレクションペーパーには記載の深度、実際的な記載（確認試験、純度試験、浸透圧等への言及）の有無に違いが認められる。また、両リフレクションペーパーには、以下のような違いが認められる。

- ・ ブロック共重合体ミセルのためのリフレクションペーパーのみで測定すべきとされている項目
- ・ 会合数：

リポソームでは、製造条件により一定の分布を有する会合数及び粒子径の粒子が得られるのに対し、ブロック共重合体ミセルでは一般的には用いるユニマーの特性に応じて会合数が定まることから、設定されているものと考えられる。

- 粘度：

リポソーム後発品のためのリフレクションペーパーに記載がない理由は明確ではないが、米国のリポソームのためのドラフトガイダンス（2015年版）においては測定すべき特性解析項目として挙げられていること（表6）、相転移温度等の脂質特性の差異により粘度は異なると考えられることから、脂質ナノ粒子においても一定の重要性を有するものと考えられる。
- ナノ構造の濃度依存性（臨界ミセル濃度など）：

リフレクションペーパー中でも、「このパラメータが低値すぎて、現在の分析技術を用いて測定できない場合があることに留意すべきである。」とされている。生体内で想定される程度の希釈条件下でも粒子が安定に存在できることは *in vitro* 放出特性として別途評価可能であることから、重要性は必ずしも高くないのではないかと考えられる。
- リポソーム後発品のためのリフレクションペーパーのみで測定すべきとされている項目
 - 内相の pH：

ブロック共重合体ミセルでは、ユニマーに有効成分を共有結合により結合した上で会合、又は親水性相互作用等によりミセル中に封入する方法がとられており、粒子形成後に事後的に有効成分を封入する製法は取られないこと、リポソームほど大きな内水相を有していないことから、差異が生じたものと考えられる。
 - 相転移温度：

脂質膜を有するリポソームに特有の特性であることが理由と考えられる。
 - 有効成分、脂質、機能性分子の製剤中での安定性：

リポソームに用いられる脂質分子、機能性分子は分子内に二重結合を有しているもの、アンモニウム塩を形成しているものが含まれており、酸化、酸による異性化を受けるリスク、分解するリスクを有することから、特記されているものと考えられる。なお、ブロック共重合体ミセルにおいても、用いるユニマーの特性によってはその変性・分解を考慮すべきものがあると考えられる。

2.3 既承認の脂質ナノ粒子を用いた医薬品に関する調査

国内外で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品¹⁸⁾は、2018年1月現在、表9のとおりである。これらの品目について、日本、米国及び欧州で公開されている審査情報（審査報告書、資料概要等）に基づき、設定された規格項目及び測定された特性解析項目を調査した。なお、地域ごとに公開されている審査情報には差異があること、日米欧で設定された規格が異なる場合もあることから、調査結果は地域ごとに提示する。

表9 国内外で承認されているリポソーム医薬品（2018年1月現在）

ブランド名	有効成分名	リポソームの構成成分	承認地域
Abelcet	アムホテリシンB	DMPC、DMPG	米*
アムビゾーム /AmBisome	アムホテリシンB	HSPC、DSPG、コレステロール、トコフェロール	日/米
Amphotec /Amphocil	アムホテリシンB	コレステロール流酸エステルとの複合体	米*
DaunoXome	ダウノルビシン クエン酸塩	DSPC、コレステロール	米
Definity	オクタフルオロプロパン	DPPA、DPPC、DPPE	米
DepoCyt /DepoCyte	シタラビン	トリオレイン、DOPC、DPPG、コレステロール	米/欧
DepoDur /DepoMorphine	モルヒネ硫酸塩	トリオレイン、トリカプリリン、DOPC、DPPG、コレステロール	米/英
ドキシル /Doxil/Caelyx	ドキシソルビシン塩酸塩	HSPC、MPEG-DSPE、コレステロール	日/米/欧
Exparel	ブピバカイン	DPPG、DEPC、トリカプリリン、コレステロール	米
Marqibo	ピンクリスチン硫酸塩	スフィンゴミエリン、コレステロール	米
Mepact	Mifamurtide	1-パルミトイル-2-オレイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスホコリン、ジオレイル- <i>sn</i> -グリセロ-3-ホスホ-L-セリン	欧
Myocet	ドキシソルビシン塩酸塩	ホスファチジルコリン、コレステロール	欧
Onivyde	イリノテカン塩酸塩	DSPC、MPEG-DSPE、コレステロール	米/欧
ビスダイン /Visudyne	バルテポルフィン	エッグホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジルコリン	日/米/欧
Vyxeos	ダウノルビシン クエン酸塩/シタラビン	DSPC、DSPG、コレステロール、グルコン酸銅、トリエタノールアミン	米

* 販売されていない

DEPC：ジェルコイルホスファチジルコリン、DMPC：ジミリストイルホスファチジルコリン、DMPG：ジミリストイルホスファチジルグリセロール、DOPC：ジオレイルホスファチジルコリン、DPPA：ジパルミトイル-*sn*-グリセロール-3-ホスファート、DPPC：ジパルミトイルホスファチジルコリン、DPPE：ジパルミトイル-*sn*-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン、DPPG：ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、DSPC：ジステロイルホスファチジルコリン、DSPG：ジステアロイルホスファチジルグリセロール、HSPC：水素添加大豆ホスファチジルコリン、MPEG-DSPE：N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000)-1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン

2.3.1 国内で承認されている医薬品に関する調査

国内で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品について、公表されている審査報告書に記載されていた規格項目は表10のとおりであった。なお、本邦の審査報告書には、測定された特性解析項目について網羅的な記載はないため、記載を省略した。

18) アジュバントとしてリポソームが添加されているワクチンは、調査対象に含めなかった。

表 10 国内で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品に設定されていた規格項目

		アムビゾーム (2006年)	ドキシル (2006年)	ビスダイン (2003年)
性状		◎ (外観)	◎	-
確認試験	有効成分	◎	◎	-
	その他の脂質ナノ粒子 構成成分	-	◎	-
pH		◎	◎	◎
純度試験	類縁物質	◎	◎	◎
	残留溶媒	-	◎	△ ^{b)}
	X	-	◎ (2項目)	-
水分		◎	◎	◎
浸透圧		-	◎	△ ^{b)}
製剤均一性		◎	◎	◎
不溶性微粒子		-	-	◎
発熱性物質		◎	◎	◎
無菌		◎	◎	◎
粒子径		◎	◎	△ ^{b)}
封入率		-	◎	-
抗酸化剤含量		-	-	△ ^{b)}
有効成分の異性体比		-	-	△ ^{b)}
含量/定量法		◎	◎	◎
その他マスキングされている情報		B量 ^{a)} 、X	X (2項目)	-

◎: 規格項目として記載されていたもの

X: マスキングされている箇所

a) 「本剤と X をインキュベートし、X B の量を測定することにより、本剤の X を評価するために設定された試験」であると補足されていた。また、用時調整が必要なアムビゾームにおいて、調整法が変動することで変動する特性である旨が記載されていた。

b) 検討した上で、規格に含めなかった項目として記載されていた。

また、アムビゾームの審査報告書の〈機構における審査の概略〉において、特性解析及び規格設定に関連して、以下の内容が記載されていた。

- 有効成分の封入率の恒常性を担保する方策について：

申請者は当初、「リポソーム封入率」の測定を企図したものの正確な測定が困難であったことから、代替試験法として「B量」試験を設定し、管理している旨が説明され、PMDA に了承されていた。
- 「リポソームのバースト（リポソームの内側が外側に対して高張となった場合に、リポソーム内へ水が流入することによって、リポソームが膨張し、浸透圧に耐えきれなくなったときに起こる浸透圧崩壊）」のリスクについて：

申請者は、①有効成分が脂質二重膜中に保持されていること、②有効成分により脂質二重膜に細孔が形成されていると推測されるため、内相と外相で大きな浸透圧差を生じることはないと考えることから、バーストが生じる可能性は極めて低いと説明していた。この点について PMDA は、製剤から有効成分が放出されるメカニズムが確定されていないことから、上記の説明を「了承しかねる」と判断し、「有効成分の放出機序を含め、製剤特性について更なる基礎的な検討」が引き続き必要であると評価していた。

この評価については、現在の審査の水準であれば、非臨床試験、臨床試験においてバーストを疑わせる事象が認められていなかった場合、それら品質以外のデータも含めてリスク評価を行い、最終的な評価・判断がなされるものと考えられる。

表 10 に記載した 3 品目の承認審査時には、本邦では脂質ナノ粒子の品質管理に関するガイドライン等は示されていなかったため、医薬品一般を対象とした薬局方、既存のガイドライン等に示された考え方（表 5）に基づき審査が行われたものと考えられる。しかしながら、以下の点で既存のガイドライン等に示された考え方に必ずしも整合しない点が認められ、一部については不整合の理由が明確ではなかった。

- ビスダインの審査報告書には、確認試験に関する記載がない。国内外の薬事規制は、偽薬・不適正医薬品の市場からの排除を目的として発展してきた経緯もあり、日米欧の規制当局ではすべての医薬品に対し、確認試験の規格項目への設定が強く要求されている。製剤化後の測定が困難であったこと等の理由により、工程内試験として管理されている可能性は想定されるが、審査報告書では言及されておらず、規格試験として確認試験に関する記述がない理由・背景は公開情報からは明確にならなかった。
- アムビゾーム及びドキシルの審査報告書には、不溶性微粒子試験に関する記載がない。また、いずれの製剤の審査報告書にも、不溶性異物試験に関する記載がない。
- 不溶性微粒子試験は、10 μm 以上の外来性の微粒子を測定する試験法であり、日本薬局方では、リポソーム製剤のように第 1 法（光遮蔽粒子係数法）で試験できない場合には第 2 法（顕微鏡粒子係数法）を用いて試験を実施することとされている。アムビゾーム及びドキシルはいずれも 100 nm 前後のリポソームであり、不溶性微粒子としてはカウントされないことから、不溶性微粒子試験は実施可能であり、適切に製造されている場合には日米欧の薬局方が求める水準に適合するものと考えられる。本邦でも、ほとんどすべての注射剤において規格設定が要求される項目であり、規格試験として不溶性微粒子試験に関する記述がない理由・背景は公開情報からは明確にならなかった。
- 不溶性異物試験は、欧米では設定されない場合があるが、本邦では日本薬局方の規定に基づき規格項目としての設定が要求されている。規格試験として不溶性異物試験に関する記述がない理由・背景は公開情報からは明確にならなかった。
- ビスダインの審査報告書には、封入率に関する記載がない（アムビゾームについては上記のとおり）。ビスダインは、極めて難溶性の有効成分の可溶化剤としてリポソームを用いていること、投与後速やかに有効成分がリポソームから放出されること（2.1 参照）等の背景を踏まえて規格設定されなかった可能性は想定されるが、詳細な議論内容等は公開情報からは明確にならなかった。なお、米国で発出されている後発品開発のための

ドラフトガイダンスでは、封入率の測定が求められている（表 7、⑤）。

2.3.2 米国で承認されている医薬品に関する調査

米国で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品について、公表されている審査報告書に記載されていた規格項目及び特性解析項目は表 11 のとおりであった。なお、Abelcet、AmBisome、Amphotec/Amphocil、DaunoXome、Doxil については、品質に関する審査報告書が公表されていなかったことから、調査の対象外とした。また、Definity（2001 年）、Depocyt（1999 年）、Visudyne（1999 年）については審査報告書の作成・公表時期が古く、規格項目に関する記載が公表されていなかったことから、表 11 には含めなかった。

表 11 米国で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品の規格項目及び特性解析項目

		DepoDur (2004 年)	Exparel (2011 年)	Marqibo ^{a)} (2012 年)	Onivyde ^{b)} (2015 年)
性状		-	-	◎、◎*	◎**
モルフォロジー		○（多重層リポソーム）	○（多重層リポソーム）	○	○（一重層リポソーム）
脂質構成		-	◎（コレステロール量）	◎*（スフィンゴミエリン量、コレステロール量、脂質比）	○（有効成分と脂質の重量比）
薬物の封入状態		-	-	-	○（ゲル化又は析出）
確認試験	有効成分	-	◎	◎	-
	脂質	-	-	◎*	-
pH		▲	◎	◎、◎*	◎**
純度試験	不純物/分解物	○	◎	◎	-
	脂質分解物	-	-	◎*	-
	Leachables/Extractables	-	-	-	◎**
浸透圧		-	◎	◎、◎*	◎**
製剤均一性		-	◎	-	-
不溶性微粒子		-	◎	◎、◎*	◎**
エンドトキシン		○	◎	◎、◎*	◎**
無菌		-	◎	◎*	◎**
粒子径	平均粒子径	○	◎	◎、◎*	○、◎**
	粒度分布	▲	-	◎、◎*	◎**
表面電位		○	-	-	-
封入率		▲（遊離体の量）	◎（遊離体の量）	○/◎（遊離体の量）	-
In vitro 放出		▲	◎	○	◎**
含量		▲	◎	◎	◎**
その他マスキングされている情報		▲（2 項目）	◎（2 又は 3 項目）	◎*（残留している何か）	-

◎：規格項目として記載されていたもの

○：特性解析項目として記載されていたもの

▲：安定性試験において測定項目とされていたもの

a) 用時調製を行うキット製剤であり、ビンクリスチン含有リポソームの規格項目とされたものには◎、未封入のリポソーム溶液の規格項目とされたものには◎*を記載した。

b) 規格項目に関する記載がなく、重要品質特性（CQA）が記載されていたことから、挙げられていたものに◎**を記載した。

また、審査報告書における議論として、特性解析及び規格設定について以下の内容が記載

されていた。

- DepoDur
 - ・ 粒度分布が *in vitro* 及び *in vivo* の放出特性に与える影響について検討されていなかったが、ロット間で粒度分布にほとんど変動が認められなかったことから、追加検討は不要と判断されていた。なお、当該議論に付随して工程内規格を追加設定するよう指摘されていた。
 - ・ *in vitro* 放出試験が 4 日で実施されているのに対し、ヒトに投与した場合には 24～48 時間で薬物が放出されていることから、放出時間に乖離があるとして、*in vitro* 放出試験の試験条件及び判定基準について議論されていた。試験条件については変更不要と判断されたが、判定基準については変更が求められた。
- Onivyde
 - ・ *in vitro* 放出試験とヒト生体内での薬物放出の相関性の観点から *in vitro* 放出試験の条件について議論されており、判定基準の変更が求められた。

表 11 に記載した 4 品目の承認審査時には、米国ではリポソーム医薬品に関するドラフトガイダンスが発出されており、当該ガイダンス（表 6）及び ICH-Q6A ガイドライン（表 5）に示された考え方にに基づき審査が行われたものと考えられる。しかしながら、以下の点で既存のガイドライン等に示された考え方に必ずしも整合しない点が認められ、一部についてはその理由が明確ではなかった。

- DepoDur では脂質の構成に関する検討が行われていない。同様の徐放化機構を有する Exparel においても、コレステロール量のみが測定対象とされ、その他の脂質については評価対象とされていないことから、製剤特性や変動リスクを考慮した上で特性解析不要と判断された可能性は否定できないが、その背景は公開情報からは明確にはなかった。
- Exparel では粒度分布が規格設定されていない。広く利用されている粒子径測定装置（脂質ナノ粒子でよく用いられる、動的光散乱計を含む）では、粒度分布に関する情報も得られるため、平均粒子径のみを規格に含めた背景は明確ではない。
- Onivyde は、MPEG-DSPE を含むリポソームであり（表 9）、表面が PEG 修飾されている旨が欧州の審査報告書にも記載されているが、表面修飾に関する特性が重要品質特性（Critical Quality Attribute、以下、「CQA」）¹⁹⁾に含まれていなかった。Onivyde と同様に PEG 修飾されたドキシルの後発品開発のためのドラフトガイダンスでは、PEG 層厚の測定が求められており（表 7、②）、CQA ではないと判断された理由は明確にはなら

19) 要求される製品品質を保証するため、適切な限度内、範囲内、分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質（ICH-Q8 ガイドライン）

なかった。

- DepoDur 以外の品目で、表面電位に関する検討が行われていなかった。少なくとも現時点では、脂質ナノ粒子の電荷に関する情報は薬物動態に影響する重要な特性と考えられており、2013 年に掲載されたリポソーム又は脂質ナノ粒子について取り扱った公表文献¹⁵⁾でも約 50%でゼータ電位等の測定が行われていた。なお、米国のリポソーム医薬品に関するドラフトガイダンスでは、2002 年版には記載のあった電荷に関する内容が 2015 年版では削除されていることから、2002 年版の公表以降、設定の要否について何らかの議論があった可能性が考えられる。

2.3.3 欧州で承認されている医薬品に関する調査

欧州で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品について、公表されている審査報告書に記載されていた規格項目は表 12 のとおりであった。なお、欧州では経肺吸収を期待したりリポソーム製剤であり、臨床データが不足していると判断されたために承認は適切ではないと判断された Arikayce の Withdrawal assessment report が公表されており、規格項目については「accepted」と評価されていたことから、表 12 に含めた。また、Caelyx (2004 年)、DepocYTE (2005 年) については審査報告書の作成・公表時期が古く、規格項目に関する記載が公表されていなかったことから、表 12 には含めなかった。

表 12 欧州で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品の規格項目

	Arikayce ^{a)} (2016 年)	Mepact (2008 年)	Myocet ^{b)} (2002 年)	Onivyde (2016 年)	Visudune ^{c)} (2003 年)
性状	-	◎ (外観)	◎	◎	-
リポソームを構成する添加剤濃度	◎	-	-	-	-
有効成分と脂質の比 (計算値)	-	-	-	◎	-
脂質の比 (計算値)	-	-	-	◎	-
確認試験	有効成分	◎	◎	-	◎
	脂質	-	◎	-	◎
複屈折	-	◎	-	-	-
pH	-	◎	◎	◎	-
純度試験	分解物	◎	◎	-	◎
	脂質分解物	◎	-	-	◎
	残留溶媒	◎	◎	-	◎
	残留トリメチルアミン	-	-	-	◎
浸透圧	-	-	-	◎	◎
水分	-	◎	-	-	-
製剤均一性	◎	-	-	-	◎
送達量均一性	◎	-	-	-	-
平均充填量	-	◎	-	-	-
採取容量	-	-	-	◎	-
不溶性微粒子	-	◎	-	◎	-
エンドトキシン	-	◎	-	◎	-
無菌	-	◎	-	◎	-
粒子径	平均粒子径	◎	◎	◎	-
	粒度分布	-	◎	-	◎

	Arikayce ^{a)} (2016年)	Mepact (2008年)	Myocet ^{b)} (2002年)	Onivyde (2016年)	Visudune ^{c)} (2003年)
空気力学的粒度とその分布 (製剤中、噴霧後)	◎	-	-	-	-
ゼータ電位	-	-	-	◎	-
封入率	◎	-	◎	◎	-
<i>In vitro</i> 放出	◎	-	-	◎	-
保存剤含量	-	-	-	-	◎
含量	◎	◎	◎	◎	◎
活性	-	◎	-	-	-
噴霧される薬物量	◎	-	-	-	-

◎: 規格項目として記載されていたもの

a) Withdrawal assessment report が公表されている。

b) 無菌試験等、静注製剤で必須の項目が設定されていないため、すべての規格項目が審査報告書に記載されているわけではないと考えられる。

c) 列挙された規格項目に「等」が付されており、この他にも設定された項目が存在するものと考えられる。

Mepact では封入率が規格項目に含まれてないが、審査報告書には有効成分 (Mifamurtide) がリポソーム中で安定に存在し、遊離しないことが確認されたと記載されており、この特性のために封入率が規格項目に含まれなかったものと考えられる。

欧州では、リポソーム後発品開発のためのリフレクションペーパーが 2013 年に公表されており、特性解析項目として検討すべき事項が挙げられている。Arikayce 及び Onivyde については、当該文書も参考に審査が行われたものと考えられる。

- Arikayce では「リポソームを構成する添加剤濃度」、Onivyde では「有効成分と脂質の比 (計算値)」及び「脂質の比 (計算値)」が規格として設定されており、両者は本質的には同等の管理内容と考えられる。なお、Onivyde の規格について、何を測定し、なぜ「計算値」である旨が明示されているのかについては明確ではなかった。
- Arikayce では、ゼータ電位又は電荷が規格に含まれていなかった。当該製剤は吸入剤であり、注射用剤とは異なる考え方で審査された可能性、空気力学的粒度等と組み合わせる粒子特性を管理する管理戦略を採用した可能性は否定できないが、不要と判断された理由は明確ではなかった。

2.4 2章のまとめ

以上、①米国及び欧州で発出されている主なガイダンス、リフレクションペーパー等 (表 4) 並びに②脂質ナノ粒子と同様に低分子化合物の集合体である、ブロック共重合体ミセルに関する日欧共同のリフレクションペーパーにおいて推奨されている規格項目及び特性解析項目、③日米欧で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品で測定されている規格項目及び特性解析項目並びにそれに関する議論内容に対する調査を行った。

その結果、ガイダンス、リフレクションペーパー等については、一部記載 (記載の改訂を含む) の理由・背景が明確ではない点が認められたが、欧米で推奨されている主要な規格項

目及び特性解析項目の多くは共通していた。米国の後発品開発に関するドラフトガイダンスでは、品目の特性に応じた特性解析項目の測定が推奨されていた。日米欧の既承認医薬品については、承認の時期や品目の特性に応じて規格項目及び特性解析項目が設定されていたが、欧米におけるガイダンス、リフレクションペーパー等で推奨されている規格項目及び特性解析項目が測定されていない品目も認められた。

3. 古典的な脂質ナノ粒子の特性解析及び規格設定において必要な事項、検討すべき事項

本章では、2章の調査結果、考察内容を踏まえて、古典的な脂質ナノ粒子の特性解析及び規格設定において必要な事項、検討すべき事項について考察する。なお、本章で議論する「古典的な脂質ナノ粒子」とは、主として天然に存在する脂質を用いて製造されるリポソームで、主に低分子化合物を有効成分として含有し、表面修飾が行われていないものとし、脂質ナノ粒子に関する一般的内容について記載した後、投与経路特異的な内容について記載する。

3.1 脂質ナノ粒子に関する一般的内容

3.1.1 性状

ICH-Q6A ガイドラインでは、大きさ、剤形、色などの目視検査の内容を設定すべき項目として挙げている。もっとも簡便に、当該医薬品であることを確認可能な項目であり、ほとんどすべての医薬品において設定されていることから、脂質ナノ粒子においても規格項目に含める必要があると考えられる。

3.1.2 確認試験

脂質ナノ粒子以外の多くの医薬品では、確認試験として、製剤中に「有効成分が含有されていること」を確認するための試験の設定が求められている。試験方法については、ICH-Q6A ガイドラインでは特異性の高い方法（低分子医薬品の場合は、赤外吸収スペクトル法等）が望ましいとされており、その考え方は脂質ナノ粒子にも当てはめられる。

脂質ナノ粒子では、有効成分に加えて、脂質等の構成成分が適切な量添加され、適切に集合体を形成していることが、医薬品の有効性及び安全性を担保する上で重要である。したがって、脂質ナノ粒子の構成成分が製剤中に含有されていることは、確認試験において確認すべき事項と考えられる。

なお、欧米で発出されている主なガイダンス等（表4）では、脂質の構成比を規格項目（米国リポソームドラフトガイダンス（①）2002年版）又は特性解析項目（欧州リポソーム後発品リフレクションペーパー（⑥））に含めるべきとされているほか、有効成分と脂質の比が特性解析項目として検討すべき項目に挙げられている。脂質ナノ粒子を用いた医薬品において、「脂質ナノ粒子」自体が期待した性能を発揮すること及びその品質の恒常性が担保されることは重要であることから、本邦においても特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認する必要があると考えられる。脂質の構成比又は有効成分と脂質の比の変動が「脂質ナノ粒子」自体の性能に大きく影響する場合には、関連する項目を規格項目にも含める必要がある。

3.1.3 脂質ナノ粒子の特性

3.1.3.1 粒子径/粒度分布

脂質ナノ粒子の粒子径は、個々の粒子の薬物放出特性、生体内での安定性（網内系での取込み等）に強く影響することから、規格項目に設定した上で厳密な管理が必要である。米国及び欧州で発出されている主なガイダンス等（表 4）では粒子径/粒度分布をそれぞれ規格項目及び特性解析項目として測定することを推奨しており（表 6、表 7）、欧米における既承認医薬品においても特性解析項目として測定されている（表 11、表 12）。

粒子径は、平均粒子径（又はメジアン径）だけでなく、粒度分布も含めて規格設定し、管理する必要がある。粒度分布のばらつきが大きいロットでは、粗大粒子や微細粒子が含まれる量が相対的に多くなる。粗大粒子や微細粒子で生体内での挙動（安定性、薬物動態）が変化した場合、有効性及び安全性に影響を与えるリスクがある。

本邦ではこれまで、10%累積粒子径、90%累積粒子径（D10、D90）を用いて粒度分布を評価してきたが、米国の後発品開発のためのドラフトガイダンスでは、「(D90-D10) /D50」により算出される指標を用いて類似性を判定している。本研究で実施した流路製造装置を用いた検討の結果、①D10、D50、D90 は変動しても、「(D90-D10) /D50」は変動しないケースが認められたこと、②「(D90-D10) /D50」の変動が認められた場合、測定結果の解釈のためにはD10、D50、D90 に立ち戻る必要があることを考慮すると、粒度分布の日常管理のためには従来どおり D10、D50、D90 を用いることが現時点では望ましいと考えられた（5.3.2 項参照）。なお、いずれを指標として用いる場合であっても、製剤設計、ロット間の変動も考慮しつつ、有効性及び安全性が異なる（可能性のある）医薬品を排除可能な規格が設定される必要がある。

粗大粒子の発生に特に着目して管理する場合、光散乱を用いた粒度測定法（レーザー回折法、動的光散乱法等）では粗大粒子に起因する散乱光がより強く観測されるため、体積粒子径ではなく散乱光により管理を行うことも有用と考えられる。

なお本邦では、粒度分布の真度はこれまで必ずしも重要視されてこなかった。これは、同一の測定機器を用いて品質が一貫していることを確認することで品質管理としては必要条件を充足する場合がほとんどであったことが背景としてあった。しかしながら、体内動態を考慮して粒子径等の特性が設計される脂質ナノ粒子の品質管理においては、規格値の上限/下限の設定、製造方法変更時に脂質ナノ粒子の粒度分布が変動した場合の影響評価を行う上で、十分な真度で粒度分布が測定されていることは有用と考えられる。

3.1.3.2 モルフォロジー

脂質ナノ粒子は、調製法や調製時の条件によって、一重層リポソーム、多重相リポソーム等種々の形態をとることがあるため、粒子構成成分が適切に集合体を形成しているか否かに

ついて確認することは重要である。欧米で発出されている主なガイダンス等（表 4）ではモルフォロジー（ラメラ数等）を特性解析項目として測定することを推奨しており（表 6、表 7）、米国における既承認医薬品においても特性解析項目として測定されている（表 11）。モルフォロジーが変化した場合、脂質ナノ粒子からの薬物放出特性に影響がでる可能性がある。

モルフォロジーの確認方法は、現時点では電子顕微鏡等による観察となるため、日常管理で確認を行うことは現実的ではないが、本邦でも特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認する必要がある。日常管理については、他の試験方法（封入率、*in vitro* 放出試験等）を組み合わせることで間接的に保証する考え方も有用となる。

3.1.3.3 脂質ナノ粒子の脂質膜に関する特性

3.1.3.3.1 ゼータ電位

脂質ナノ粒子の多くはその表面に電荷を有しており、その電荷が生体内での安定性（網内系での取込み等）、組織分布、細胞内取込みに影響すると考えられている。このため、脂質ナノ粒子の表面電荷を管理することは重要とされ、米国及び欧州で発出されている主なガイダンス等（表 6、表 7）でも、特性解析項目として測定が推奨されている。しかしながら、脂質ナノ粒子の表面には水和層があるため、現在の分析技術では粒子表面の電荷を正確に測定することができない。このため、水和層の表面の電位（ゼータ電位）を表面電荷の代替として測定することにより、粒子特性を把握することが現在では一般的になっている。

ゼータ電位は、製造工程における粒子形成の完全性を確認する上で、粒子径と並び簡便に測定可能な方法であり、ヒトの薬物動態への影響を反映する項目であることから、規格設定して管理する必要がある。

測定には、現在は電気泳動光散乱法（レーザードップラー法）が多く用いられているが、測定に使用する溶媒の種類、塩濃度、pH、電気伝導度等により測定結果が影響を受けるため、試験液調整は厳密に行う必要がある。

3.1.3.3.2 相転移温度/相転移プロファイル

脂質膜は、低温では比較的 rigid な構造を有するが、相転移温度を超えて加温することで流動性、透過性が増すことが知られている。相転移温度は、脂質の混合比による影響を受けるため、相転移温度を測定することで、脂質ナノ粒子表面の脂質相が均質に形成されているかを判断することができる（均質なほど、シャープなピークが認められる）。脂質膜の特性は、一般的には製剤特性に直結する重要な項目であると考えられるため、米国及び欧州で発出されている主なガイダンス等（表 6、表 7）と同様、特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。

コレステロールの添加により脂質の流動性が上がり、明確な相転移温度を示さなくなるが、このような場合においても相転移プロファイルの差異は脂質相形成の変動/不均一性が原因

である可能性が高いため、積極的に測定すべきと考えられる。

なお、2.2 項に記載のとおり、相転移温度の違いによって脂質ナノ粒子溶液の粘度が異なる場合には、粘度によりモニタリングすることも可能かもしれない。

3.1.3.4 脂質ナノ粒子の内相に関する特性

米国のリポソームのためのドラフトガイダンス及び一部の後発品開発のためのドラフトガイダンスでは、内相の容積の測定が求められているが、内相の容積は現在の分析技術で正確に測定することはできないこと、本質的に粒子径/粒度分布と対応すると考えられることから、粒子径/粒度分布と併せて測定する意義は高くないものと考えられる。

内相の pH、特定の塩濃度は、別途調製した脂質ナノ粒子に対し pH 勾配法や濃度勾配法により有効成分を封入する場合に特に重要となる。内相での薬物の封入状態（3.1.3.4 参照）にも影響する場合があるため、pH 勾配法、濃度勾配法等により有効成分を封入する脂質ナノ粒子では、特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認することが望ましい。測定する場合には、現在の分析技術では脂質ナノ粒子の形成後に内相の特性を正確に測定することは困難であることから、予めインジケータを添加して脂質ナノ粒子の形成を行うことにより、確認する方法が現実的には採りうる。評価に際しては、インジケータの添加により脂質ナノ粒子の品質特性及び製造工程に大きな影響が生じていないことが前提となる。

3.1.3.5 封入有効成分の粒子内での分布

アムホテリシン B 等の比較的脂溶性の高い有効成分を封入する場合には、一部の有効成分が内水相中ではなく脂質膜中に分布することがある。脂質膜中に分布した有効成分は、内水相中に分布するものと比較して脂質ナノ粒子から容易に放出されるため、*in vitro* 放出特性を保証するためには、封入薬物の粒子内での分布の一貫性が担保されるように管理すべきである。有効成分の脂質ナノ粒子中での分布は、欧州のリポソーム後発品に関するリフレクションペーパーにおいても特性解析項目として検討すべきとされている（表 6）。本邦でも、脂質膜中への分布が否定できない製剤の場合は特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。

なお、測定は電子顕微鏡を用いることで可能と考えられる。

3.1.3.6 封入有効成分の状態（結晶化、ゲル化の有無等）

pH 勾配法、濃度勾配法等により有効成分を封入する脂質ナノ粒子では、内水相中での有効成分の捕捉によって薬物封入が行われるため、有効成分が内水相中でゲル化、又は結晶化して析出する場合がある（それぞれ、Onivyde 及びドキシル）。一方で、固体の析出が認められない場合もある（ダウノルビシンクエン酸塩）。固体の析出の有無及び析出の様相は脂質ナノ粒子からの薬物放出特性に影響すると考えられることから、pH 勾配法、濃度勾配法等により

有効成分を封入する脂質ナノ粒子、内水相中で有効成分の析出が懸念される脂質ナノ粒子では封入有効成分の状態を特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。封入有効成分の状態は、欧州のリポソーム後発品に関するリフレクションペーパーにおいても特性解析項目として検討すべきとされている（表 6）。

3.1.4 pH

注射剤であるか否かにかかわらず、外水相の pH が変動した場合には脂質ナノ粒子の変性、有効成分の漏出、長期保存時の安定性への影響が懸念されることから、製剤の pH については管理する必要がある。影響の大きさを考慮すると規格項目に含めて管理することが適切と考えられるが、製剤製造工程において pH 調製工程が含まれ、長期保存試験において pH に変動が認められない場合には、特性解析項目に設定した上で、日常管理は製剤製造工程での工程管理として管理する方策も採りうると考えられる。

3.1.5 純度試験

米国及び欧州で発出されている主なガイダンス等（表 6、表 7）においても、脂質ナノ粒子の不純物管理に対するアプローチについては、詳細な記載がなかった。

製剤中に存在する不純物は、大別して①製造工程、出発物質等に由来して製剤中に残留する不純物、副生成物、②製剤の分解により生じる分解物、③製剤の保存中に、主にプラスチック製容器から溶出する溶出物に分類される。製剤ごとに不純物プロファイル（認められる不純物の種類と量）は少なくとも特性解析項目として特定した上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。

①については、主に残留する原材料（封入されなかった有効成分、粒子形成に用いられなかった脂質等）及び原材料に由来する不純物、製造工程で使用される有機溶媒、無機不純物、その他の試薬、不完全な脂質ナノ粒子等が想定される。

- 残留する原材料（封入されなかった有効成分、粒子形成に用いられなかった脂質等）及び原材料に由来する不純物、その他の試薬等：

安全性に影響する可能性があることから、主な不純物の量は規格項目として設定することを考慮すべきである。なお、透析による低分子不純物の除去工程が含まれる場合で、工程能力及び製造工程の頑健性にに基づき低分子不純物の残留リスクが十分に低いことが担保されている場合には、規格設定を不要と判断することは可能と考えられる。封入されなかった有効成分については、封入率（3.1.7 項）も参照のこと。

- 残留溶媒、無機不純物：

安全性に影響する可能性があることから、ICH-Q3C ガイドライン又は ICH-Q3D ガイドラインも参考に、規格項目として設定することを考慮すべきである（検討の結果、工程能力及び製造工程の頑健性にに基づき残留リスクが十分に低いことが担保されている

場合には、規格設定を不要と判断することは可能と考えられる)。

- 不完全な脂質ナノ粒子：

脂質ナノ粒子は、現在の技術ではロット内で単一の特性を有するように製造することができないため、特性値に一定のばらつきを有する粒子群となる。このため、製剤の有効性及び安全性に影響する可能性がある一部の粒子は不純物として取り扱うことを考慮すべきである(検討の上、工程能力及び製造工程の頑健性に基づき残留リスクが十分に低いことが担保されている場合には、規格設定を不要と判断することは可能と考えられる)。現在の分析技術では日常的な測定が困難な粒子については、製造工程での管理を含めた適切な管理戦略を策定し、ロット間で大きな変動が生じないように管理する必要がある。例としては、次のような粒子が挙げられる。

- 凝集体
- 脂質膜の組成や有効成分の封入状態、有効成分の分布が異なるために、放出特性が大きく異なる粒子
- 粒子径が大きい又は小さいため、生体内での薬物動態が異なる可能性がある粒子(粒子径/粒度分布として管理することも可能)

なお、脂質ナノ粒子は、バイオ医薬品と同様に一定の不均一性を有すると考えられることから、ICH-Q6B ガイドラインに示された考え方を取り入れ、生物活性、有効性及び安全性の観点から目的物質に匹敵する性質を持つ粒子については「目的物質関連物質」として扱い、不純物に含めないことも可能と考えられる。

②については、主に脂質ナノ粒子の変性により生じる凝集物/沈殿、有効成分の漏出・分解や脂質の変性等により機能を喪失した粒子等が想定される。安定性試験においてこれらの生成が認められた場合には、規格項目として設定すべきと考えられる。現在の分析技術では日常的な測定が困難な粒子については、間接的に測定可能な代替試験法を設定すべきである。上記と同様、一部の粒子を「目的物質関連物質」として扱い、不純物に含めないことも可能と考えられる。

- 脂質ナノ粒子の変性により生じる凝集物/沈殿：

凝集物は生体内での薬物動態が異なる可能性があるほか、一般的に抗原性が高くなるとされているため、不純物として管理すべきと考えられる。粒子径/粒度分布測定法(動的光散乱法など)や不溶性微粒子試験等により測定可能と考えられる。

- 有効成分の漏出・分解や脂質の変性等により機能を喪失した粒子：

有効性及び安全性に影響すると考えられるため、不純物として管理すべきと考えられる。有効成分の漏出については封入率(3.1.7 項)により、有効成分や脂質の分解については HPLC 法、*in vitro* 放出特性等により測定可能と考えられるが、困難な場合は生物

活性試験や非臨床試験による評価も考慮すべきである。

③については、近年管理の必要性が指摘されている不純物であり、Onivyde でも特性解析項目として設定されている。プレフィルドシリンジを用いる場合を含めて、プラスチック製容器に保存する場合、プラスチック製品を製造に用いる場合にはリスク評価を行い、必要に応じて規格に設定すべきである。バイオ医薬品と同様、反応性の溶出物が認められる場合には、溶出物単体だけでなく、製剤成分と溶出物の反応生成物にも注意が必要である。

3.1.6 *in vitro* 放出試験

古典的な脂質ナノ粒子は、現時点では主に①難溶性の有効成分を封入し、静注可能とするための粒子（ビスダイン等）、②毒性の強い有効成分を封入し、循環血中で徐々に薬物を放出する粒子（アムビゾーム等）、③腫瘍組織（pH が低い）等の特定の条件下で薬物を放出する粒子（ドキシル等）に大別される。いずれの場合も、血液中及び生体内（吸入剤、外用剤の場合はそれぞれの投与部位、作用部位等）において企図した薬物放出特性が達成されていること、脂質ナノ粒子が想定した状態で安定に存在し、想定以上の有効成分の放出が認められないことを、種々の条件の *in vitro* 放出試験により確認することが重要である。

in vitro 放出試験の試験条件は、ヒトで放出特性の変動を検出可能なものとする必要がある。必ずしもヒト血液等を用いる必要はないが、試験条件の設定に際してはヒト血液中及び/又は標的組織での放出特性との関連性は十分に確認される必要がある。非ヒト血液を用いる場合にも、血液中でリポソーム周辺に結合・付着するタンパク質には種差があると考えられていることから、注意が必要である。

その上で、①及び②の場合については、脂質ナノ粒子が期待通りに形成されており、期待する放出特性を有することを確認する必要があることから、放出試験を規格項目に設定する必要がある。放出試験では、放出プロファイルを評価することが重要であるため、複数時点（少なくとも初期、中期、後期の3～4点）で放出率の測定を行い、判定する必要がある。なお、①の場合で、投与後速やかな有効成分の放出が認められる場合においても、粒子形成が適切に行われたことを確認することは脂質ナノ粒子では重要と考えられるため、原則として省略することはできないと考えられる。

③の場合については、脂質ナノ粒子が期待通りに形成されており、循環血中で有効成分が放出されないこと及び特定の条件下で有効成分が放出されることを確認する必要がある。したがって、複数条件の放出試験を規格項目として設定し、放出プロファイルを評価すべきである。

3.1.7 封入率

脂質ナノ粒子を用いた医薬品では、有効成分を単独で投与した場合と比較して薬物動態、有効性及び安全性が改善されることが期待されているため、投与製剤中の有効成分のうち十

分量が脂質ナノ粒子に封入されている必要がある。米国及び欧州で発出されている主なガイドダンス等では封入率、又は「封入分子と遊離分子の定量」を規格項目又は特性解析項目として測定することを推奨しており（表 6、表 7）、米国及び欧州における既承認医薬品においてもほとんどの医薬品で規格項目として測定されている（表 11、表 12）。したがって、本邦でも規格項目に設定する必要がある。

なお、難溶性の有効成分を脂質ナノ粒子に封入した場合で、有効成分がその脂溶性によって脂質相内に限局して分布しており、熱力学的に安定な平衡状態にある場合等、封入率を測定する意義が乏しいと考えられる場合には、特性解析項目として測定することも可能と考えられる。

3.1.8 含量/定量法

製剤中に含まれるすべての有効成分量として、規格項目に設定すべきと考える。

3.2 注射剤に関する内容

日本薬局方（第十七改正第一追補）及び ICH-Q6A ガイドラインの記載（表 5）並びに欧米における既承認医薬品の規格項目（表 11、表 12）を踏まえると、3.1 項の内容に加えて、以下については原則として規格項目に含めるべきと考えられる。また、凍結乾燥注射剤等、用時調製を行う製剤の場合には、製剤だけでなく、調製後の薬液の特性解析も実施する必要がある。

- 製剤均一性
- 採取容量：
 - 従来注射剤と同様、製剤設計（注射剤の過量充填量）と製造工程に基づき担保できる場合には、測定不要となる場合があると考えられる。
- 無菌
- エンドトキシン/発熱性物質：
 - 一部のリポソーム製剤では、エンドトキシン試験に用いられるライセート試薬と脂質が交差反応を起こすことが知られている²⁰⁾。したがって、エンドトキシン試験を適切に実施できない場合には、発熱性物質試験として実施すべきと考えられる。
- 不溶性異物
- 不溶性微粒子
- 水分（凍結乾燥注射剤の場合）
- 保存剤（抗酸化剤、抗菌剤）含量（添加する場合）

20) Nanomedicine (London) 2010; 5: 555-62

- 浸透圧（等張性の製剤の場合）

3.3 吸入剤に関する内容

吸入剤については、日本薬局方（第十七改正第一追補）及び ICH-Q6A ガイドラインには考慮すべき規格項目又は特性解析項目について具体的な記載がほとんどない（表 5）。

一方で本邦では、吸入剤の特性解析に関連する文書として、「吸入粉末剤の後発医薬品の生物学的同等性評価に関する基本的考え方について」（平成 28 年 3 月 11 日付 事務連絡）が公表されており、製剤学的同等性試験として薬物送達量、微粒子量（1 吸入あたり肺内に到達すると想定される 5 μm 以下の空気力学的粒子径を有する薬物量）、空気力学的サイズによる粒子の分画に基づく評価が推奨されている。

また、欧州で品質に関する審査が行われ、規格項目については「accepted」と判断された Arikayce で設定されていた規格項目を踏まえると、3.1 項の内容に加えて、以下の項目については規格項目又は特性解析項目に含めるべきと考えられる。吸入剤の場合、噴霧後の外水相の量が少なくなる、脂質ナノ粒子に物理的な力が加わること等を踏まえ、噴霧前の製剤特性に加えて噴霧後の製剤特性についても十分な検討が必要であり、必要に応じて両者を規格項目に含めることが適切と考えられる。

- 薬物送達量、送達量均一性：

吸収部位又は作用部位に到達すると想定される薬物量は、有効性及び安全性に直接影響する重要な項目であり、規格項目に設定する必要がある。また、Arikayce と同様に、送達量均一性についても、規格項目に設定して管理すべきである。

- 微粒子量（気管で吸収される、又は作用する製剤の場合）：

吸入により肺まで到達する粒子の量は安全性に影響する可能性があるため、少なくとも特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。空気力学的粒度として十分な管理が困難な場合には、別途規格項目に設定して管理する必要がある。

- 空気力学的粒度とその分布：

吸入時の個々の粒子の挙動に重大な影響を与えることから、空気力学的粒度の管理は粒子径と同様に重要であり、製剤中の特性だけでなく噴霧後の粒子特性についても規格項目に設定して管理する必要がある。微細粒子・粗大粒子は吸収部位又は作用部位に到達できないと考えられるため、平均径/メジアン径だけでなく粒度分布を管理することが重要である。なお、空気力学的粒度とその分布を規格項目に含める場合の粒子径/粒度分布の規格設定の要否については、安定性、有効性及び安全性に及ぼす粒子径/粒度分布の影響、変動リスク等を踏まえて慎重に検討する必要がある。

- 噴霧される薬物量：

吸収部位又は作用部位に到達すると想定される薬物量は、有効性及び安全性に直接影響する重要な項目であること、Arikayce においても規格項目に含まれていることから、原則として、規格項目に設定して管理する必要がある。なお、噴霧される薬物量は噴霧器の性能も反映するパラメータであると考えられることから、噴霧器の性能が適切に担保されている場合には、規格設定が不要と判断できる場合があると考えられる。

3.4 外用剤に関する内容

外用剤については、日本薬局方（第十七改正第一追補）及び ICH-Q6A ガイドラインには考慮すべき規格項目又は特性解析項目について具体的な記載がほとんどない（表 5）。また、現時点では個別具体的な開発候補品目の品質に関する知見もほとんど得られていない。外用剤には、これまでもエマルジョン製剤等が存在しているが、特に留意すべき特性解析項目、規格項目は存在しないことから、3.1 項の内容に加えて、脂質ナノ粒子とすることにより特に留意が必要な点はないものと考えられる。

3.5 3章のまとめ

以上の検討及び考察の結果、古典的な脂質ナノ粒子の規格項目及び特性解析項目としては、表 13 の項目を検討すべきと考えられた。

表 13 古典的な脂質ナノ粒子の規格項目及び特性解析項目として検討すべき事項

規格項目	性状、確認試験（有効成分及び脂質ナノ粒子の構成成分の確認）、粒子径/粒度分布、ゼータ電位、pH、純度試験、 <i>in vitro</i> 放出試験、封入率、含量/定量法 〔注射剤〕 製剤均一性、採取容量、無菌、エンドトキシン/発熱性物質、不溶性異物、不溶性微粒子、水分、保存剤含量、浸透圧 〔吸入剤〕 薬物送達量、送達量均一性、空気力学的粒度とその分布、噴霧される薬物量
特性解析項目	脂質の構成比、有効成分/脂質比、モルフォロジー、相転移温度/相転移プロファイル、脂質ナノ粒子の内相に関する特性（pH、塩濃度等）、封入有効成分の粒子内での分布、封入有効成分の状態（結晶化、ゲル化の有無等） 〔吸入剤〕 微粒子量

なお、表 13 に示した項目は、現在までに得られた知見に基づくものである。今後開発される脂質ナノ粒子において、その特性を考慮した場合に測定の必要性が低いと考えられる特性解析項目/規格項目については、品目ごとに柔軟で、科学的に妥当な対応がなされることが期待される。

4. 革新的な脂質ナノ粒子の特性解析及び規格設定において必要な事項、検討すべき事項

古典的な脂質ナノ粒子と比較して、SNALP、MEND 等の革新的な脂質ナノ粒子は、表 14 の点から特徴づけられる。

表 14 古典的脂質ナノ粒子と革新的脂質ナノ粒子の特徴の比較

	古典的な脂質ナノ粒子	革新的な脂質ナノ粒子
粒子を構成する脂質等	主に天然に存在する脂質、コレステロールなど	左記に加え、細胞内導入効率の向上等を期待して添加される人工の脂質様分子が含まれる。
表面修飾の有無	修飾されていない。	PEG の他、標的組織への集積性を得るためのリガンド、抗体で修飾されている。
封入される有効成分	主に溶解性、毒性に問題のある低分子化合物	生体内安定性や細胞内導入効率に問題のある高分子化合物（核酸、抗原など）
高度な機能性	主に薬物を放出するカプセルとしての機能	細胞内導入効率を高めた粒子中に、別の細胞内器官（核、ミトコンドリア等）への標的機能を有する粒子を封入

脂質ナノ粒子全般において必要と考えられる特性解析項目及び規格項目については 3 章に記載したとおりであり、その内容の多くは革新的な脂質ナノ粒子においても適応可能と考えられる。本章では、革新的な脂質ナノ粒子において特に考慮すべき内容、古典的な脂質ナノ粒子とは異なる考え方をすべき点を記載する。

4.1 人工の脂質様分子が添加された粒子で考慮すべき事項

SNALP 及び MEND では、MC3²¹⁾、YSK05 等のカチオン性の脂質様分子が添加されている。添加の目的は、脂質ナノ粒子がエンドサイトーシスにより細胞に取り込まれた後の、エンドソーム脱出効率の向上である。カチオン性脂質様分子が適切に配置され、機能しなかった場合には、有効成分量に対して期待する生物活性が得られないと想定される。

人工の脂質様分子を添加する場合、当該分子がヒトの脂肪を構成する脂質二重膜に取り込まれ、長期間貯留・蓄積した場合、細胞機能への影響が懸念されることから、一定の生分解性を有する分子を設計・選択する必要がある。その上で、長期投与が想定される脂質ナノ粒子では、人工の脂質様分子が貯留・蓄積した場合のリスク及び長期投与時の安全性について、非臨床試験・臨床試験で慎重に検討する必要がある。

カチオン性脂質様分子を添加する場合には、規格項目又は特性解析項目として、以下の点を特に考慮すべきと考えられる。

- 脂質ナノ粒子を構成する脂質の構成比：

脂質ナノ粒子の表面に、カチオン性脂質様分子が分布していることが重要である。核酸を封入する場合（4.3 参照）には、一定量のカチオン性脂質様分子が核酸とともに凝

21) Angew Chem Int Ed 2012; 51(34): 8529-33

集体を形成し、粒子内に分布することが確認されているため、特に注意が必要である。特性解析項目には含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。

測定方法は現時点では確立されていないが、電子顕微鏡を用いた元素分析により測定できる場合がある。

- カチオン性脂質様分子の分解/変性物：

カチオン性脂質様分子が分解又は変性した場合、脂質ナノ粒子の機能は低下し、最終的には発揮されなくなる可能性が高い。したがって、製剤中に存在するカチオン性脂質様分子の分解/変性プロファイルについて検討を行うべきである。その上で、カチオン性脂質様分子の分解/変性の進展に伴って生物活性が低下する可能性が示唆された場合には、分解/変性物量（純度試験）又は生物活性試験を規格項目に含めることを考慮すべきである。

- 脂質ナノ粒子の酸解離定数（以下、「pKa」）

カチオン性脂質様分子は、水素イオンによってカチオン化されて機能を発揮する。このため、脂質ナノ粒子表面に分布したカチオン性脂質様分子の状態を確認する上で、粒子の pKa を測定することは有用であり、特性解析項目には含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。なお、測定は TNS assay²²⁾等を用いることで可能と考えられる。

- カチオン性脂質様分子の分解/変性又は脱落により機能が低下した粒子：

カチオン性脂質様分子の分解/変性又は脱落により、不純物（又は目的物質関連物質）として取り扱うべき粒子が生成する可能性がある。なお、この特性については、カチオン性脂質様分子の分解/変性物、遊離カチオン性脂質様分子の量、脂質ナノ粒子の pKa 等をモニタリングすることで把握可能と考えられるため、ほとんどの場合特性解析項目に含める必要はないと考えられる。

- 生物活性：

現在の分析技術では物理的・化学的特性に差異が認められない場合であっても、脂質ナノ粒子のように複雑性が高く分析が困難な医薬品では、製造方法変更時等にロット間で生物活性が大幅に低下してしまう場合がある。製剤を用いて、エンドソーム脱出効率を評価可能な生物活性試験系を樹立しておくことが望ましいと考えられる。

22) (6-*p*-Toluidino-2-naphthalenesulfonic acid (TNS)) と呼ばれる蛍光プローブを添加して、脂質膜表面のカチオン性を評価する測定法。TNS は水和されている状態ではほとんど蛍光を発しないが、カチオン性を帯びた粒子表面と相互作用し、脂質膜中に取り込まれることで蛍光を発するようになる (Langmuir 2011; 27: 1907-14)。

また、カチオン性脂質様分子以外の人工脂質等を添加する粒子の場合でも、カチオン性脂質様分子を添加する場合と同様の考え方にに基づき、以下の点について検討することで、規格項目又は特性解析項目に含めるべき項目を抽出することは可能と考えられる。

- 人工脂質様分子の粒子上・粒子中の分布に関する特性
- 人工脂質様分子の機能に関する特性
- 生物活性

4.2 表面修飾された粒子で考慮すべき事項

PEG により表面修飾された脂質ナノ粒子としてドキシル、Onivyde が承認されている。また、PEG による修飾については、米国及び欧州で発出されている主なガイダンス等（表 6、表 7）においても言及されている。

PEG による表面修飾は、脂質ナノ粒子が生体内の網内系や免疫細胞に捕捉されるのを抑制し、循環血中の滞留時間を延長させると考えられている。一方で、脂質ナノ粒子をがん組織等の血管透過性が高上した組織に送達する場合、EPR 効果を得るためには PEG が粒子表面から脱落している必要がある。したがって、脂質ナノ粒子の設計段階では、期待する PEG 修飾の程度の経時推移を定めた上で、設計通りの粒子が得られたことを確認することが望ましいと考えられる。

米国のリポソームドラフトガイダンスには表面修飾に関連する詳細な記載はないが、ドキシソルビシン塩酸塩製剤の後発品開発のためのドラフトガイダンスでは、PEG 層厚が測定すべき項目とされている（表 7）。また、欧州のリポソーム後発品のためのリフレクションペーパー及び表面修飾に関するリフレクションペーパーでは、修飾分子の物理化学的な特性、表面修飾の不均一性が有効性・安全性に及ぼす影響、リガンドの配置・配座、修飾の安定性（保存時、投与時）、脱離した修飾分子が与える影響について、特性解析項目に含めるべきとされている（表 6）。

一方で、SNALP 及び MEND では PEG に加えて、高次構造に起因した機能を発揮するリガンド、ポリペプチド等による表面修飾が行われる。リガンド、ポリペプチド等が分解/変性した場合には、有効性に影響を生じる可能性がある。したがって、PEG 及び/又はリガンド、ポリペプチド等による表面修飾を行う場合には、規格項目又は特性解析項目として、以下の点を特に考慮すべきと考えられる。

- PEG 層厚（PEG による表面修飾を行う場合）：

上記のとおり、脂質ナノ粒子の薬物動態に影響することがしられており、ドキシルの後発品開発のためのドラフトガイダンスでも測定すべき項目とされている（表 7）ことから、特性解析項目には含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきで

ある。また、長期保存時に PEG 化脂質の脱落等により表面修飾分子数の減少が認められる場合には、規格項目に含める必要がある。

- 修飾分子の物理的・化学的特性、生物学的特性：

バイオ医薬品（ICH-Q5 ガイドライン）に準じて、物理的・化学的特性、生物学的特性に関する特性解析を行う必要がある。

- 修飾分子の分布・配置：

脂質ナノ粒子が期待した機能を発揮するためには、修飾分子が粒子表面に適切な数、配置されなければならない。著者の所属研究室では、製造方法の変更に伴い脂質二重膜の内水相側に修飾分子が多く分布したことに起因して、生物活性の低下が認められた事例があったことから、品質管理上重要な特性である。少なくとも特性解析項目には含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。

- 修飾分子の分解/変性：

修飾分子が分解又は変性した場合、脂質ナノ粒子の機能は低下し、最終的には発揮されなくなる可能性が高い。したがって、製剤中に存在する修飾分子の分解/変性プロファイルについては検討を行うべきである。その上で、修飾分子の分解/変性の進展に伴って生物活性が低下する懸念がある場合には、修飾分子の分解/変性物量を規格項目（生物活性試験等）に設定すべきである。

- 脂質ナノ粒子から遊離した修飾分子：

特定の受容体等を認識して結合する修飾分子の場合、標的となる受容体上で脂質ナノ粒子本体と競合が発生し、脂質ナノ粒子の生物活性が低下する可能性がある。したがって、遊離した修飾分子については、不純物として取り扱うことが適切である。その上で、遊離量の増加に伴って生物活性が低下する可能性が示唆された場合には、修飾分子の量を規格項目（生物活性試験等）に含めるべきである。

- 修飾分子の分解/変性又は脱落により機能が低下した粒子：

修飾分子の分解/変性又は脱落が認められる場合には、機能性が低下した粒子が生成する可能性がある。修飾分子の分解/変性又は脱落と生物活性との関連性について検討し、不純物（又は目的物質関連物質）として取り扱う必要がないか明確化すべきである。その上で、生物活性の低下が認められる場合には、当該粒子の生成を確認可能な試験方法を設定し、規格項目（純度試験、生物活性試験等）に含めるべきである。

なお、修飾分子の分解/変性又は脱落を測定する場合、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて脂質ナノ粒子から遊離した PEG 化脂質を除去した上で、脂質ナノ粒子の構成成分について質量分析を行うことで、脂質膜の主たる構成成分である特定の脂質に対する配合比として測定することができる。また、生物活性試験の利活用も有用である。

- 生物活性：

高次構造に起因した機能を発揮するリガンド、ポリペプチド等による表面修飾を行う場合、現在の分析技術でその機能の完全性を確認することには限界がある。バイオ医薬品と同様に、修飾分子の生物活性を評価可能な試験系を樹立しておくべきと考えられる。リガンド、ポリペプチド等による表面修飾とは特徴が大きく異なる修飾を行う場合、以下の点について検討することで、特性解析項目又は規格項目に含めるべき項目を抽出することは可能と考えられる。

- 修飾分子の物理的・化学的特性、生物学的特性
- 修飾分子の分布に関する特性
- 修飾分子の機能に関する特性
- 脂質ナノ粒子の生物活性

4.3 高分子化合物（核酸、抗原など）が封入された粒子で考慮すべき事項

SNALP、MEND では、核酸や抗原などの高分子化合物の封入が行われている。封入される核酸についても、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA のような比較的小さな核酸から、プラスミド DNA のような大きな核酸まで、多様性に富んでいる。

核酸などの高分子化合物を封入する場合、巨大な高分子化合物をそのまま粒子内に封入することは困難である。このため、高分子化合物に疎水性のコアを形成させた上で、そのコアを中心に脂質ナノ粒子形成を行う製造方法が現在は一般的である。例えば、核酸であれば、カチオン性の化合物（SNALP 及び MEND では、カチオン性脂質様分子が代替している）を添加することにより疎水性のコアを形成したのち、粒子形成が行われると考えられている。また、著者の所属研究室では、BCG 抗原を有機溶媒で処理することで疎水性コアを形成させ、脂質ナノ粒子に封入することに成功している。

このような特徴を踏まえると、核酸、抗原等を封入する場合には、規格項目又は特性解析項目として、以下の点を特に考慮すべきと考えられる。

- モルフォロジー：

核酸医薬品を封入する脂質ナノ粒子では、静電的相互作用により凝集した核酸医薬品からなる核の周りに脂質が分子間相互作用により集まり、一重の脂質層を形成していると考えられている。したがって、脂質ナノ粒子のモルフォロジーについては、形成される脂質層の数だけでなく、脂質層が脂質二重膜であるのか、一重の脂質層であるのかについても確認すべきと考えられる。

- 疎水性コアの特性：

有効成分が封入されていない粒子の発生リスク、及び長期保存時の封入成分の分解/

変性プロファイルについて理解することは重要と考えられることから、疎水性のコアを形成する化合物の種類と会合数については、特性解析項目には含めた上で、製造方法変更時等には影響の有無を確認すべきである。電子顕微鏡等を用いることにより評価可能と考えられる。

1つの脂質ナノ粒子中に封入されている核酸、抗原等の概数を、粒子数、薬液中の有効成分量、封入率等から計算して把握しておくことは、脂質ナノ粒子の生物活性を保證する観点からも重要と考えられる。肝細胞において遺伝子発現を抑制可能な siRNA 数は 400~500/cell であるとの報告²³⁾もあり、1粒子中に封入される核酸の数が少ない粒子では生物活性が低下すると考えられる。

- 有効成分が封入されていない粒子：

疎水性のコアを形成したのち、それを核とした粒子形成が行われる場合であっても、用いる脂質の特性と粒子形成条件によっては、脂質のみが会合し、有効成分が封入されていない粒子が形成される可能性が想定される。これらの粒子は、有効成分が封入された脂質ナノ粒子とタンパク結合、受容体上での結合、細胞内取込み等の過程において競合する可能性があることから、製造原理上、有効成分が封入されていない粒子の生成の可能性がある場合には、不純物として取り扱うべきである。原則として、関連する測定値を規格項目に設定する必要があると考えられるが、製造工程の頑健性等から管理可能である場合には、特性解析項目に含めた上で、製造方法変更時等に影響の有無を確認すべきである。

有効成分の封入の有無によって粒子密度は大きく異なることから、スクロース密度勾配遠心等により分離し、評価することは可能ではないかと考えられるが、分析が困難な場合には、生物活性に影響が生じていないことを確認すべきである。

- 生物活性：

封入された有効成分の分解/変性の有無について、まずは HPLC 等により分離・定量することが適切と考えられる。しかしながら、封入されたりポソーム中から高分子化合物を取り出す処理において有効成分の分解/変性が生じる場合には、有効成分の分解/変性を正確に把握することが困難となる。このような場合は、生物活性を規格項目に設定すべきと考えられる。

4.4 異なる機能をもった膜が重層化された粒子で考慮すべき事項

核やミトコンドリア等の細胞内小器官の一部は、それぞれ独立した核膜、脂質二重膜に覆

23) Silence 2010; 1: 16

われており、膜の透過性が輸送体等によりコントロールされているため、核やミトコンドリア等での作用を期待する有効成分の作用を効率よく発揮させるためには、当該細胞内小器官まで有効成分を輸送し、膜内に有効成分を導入することが必要となる。

著者の所属研究室では、特定の組織・細胞への集積性及び細胞内導入効率の向上を期待した脂質ナノ粒子中に、さらに細胞内小器官への輸送と導入を行うための脂質ナノ粒子を封入した粒子（KALA-MEND²⁴、MITO-Porter²⁵）の開発が進められている。

このような脂質ナノ粒子では、外側の粒子により内側の粒子へのアクセスが制限されるため、外側の粒子を除去しない限り内側の粒子の詳細な特性解析が困難と考えられる。しかしながら、完成した脂質ナノ粒子の外側の粒子のみを選択的に除去することは、技術的に困難である。このような粒子は、内側の粒子を形成した後、外側の粒子形成を段階的に行うことで製造されていることから、内側の粒子形成後に内側の粒子に関する規格試験、特性解析を実施する必要があると考えられる。

その上で、外側の粒子形成工程が内側の粒子の特性に影響する（例：リガンドを変性させる、内側の粒子を崩壊させる等）可能性は否定できないことから、最終的な脂質ナノ粒子の性能については、生物活性を規格項目に設定して、評価すべきと考えられる。

4.5 有効成分以外の粒子構成成分の管理について

欧米では、医薬品に用いられる添加剤（有効成分以外の成分）は、規格項目だけでなく供給業者、グレード等が承認事項とされ、変更の際に薬事手続きが必要な場合がある。これに対し本邦では、添加剤に対する管理は規格設定のみが求められており、供給業者、グレード（日本薬局方に規定するよう定められているものは除く）等については製造販売業者がGMP/GQP上で管理するものとされ、承認事項には含まれてこなかった。また、添加剤の製造方法については、添加剤供給業者の多くが「厳密な」GMPには対応していないこと等の背景もあり、国内外ともに承認事項に含まれていない。

しかしながら、革新的な脂質ナノ粒子には、有効成分以外にも、脂質ナノ粒子の有効性及び安全性に強く影響を及ぼす機能性分子、修飾分子等が添加されている。これらの脂質ナノ粒子構成成分に求められる品質管理は、従来の医薬品添加剤に求められる品質管理水準とは一線を画するものであり、「送達剤」として、品質確保のために必要な管理を行うべきである。

修飾分子として、バイオテクノロジーを応用して産生される抗体、タンパク質等の全部又は一部を用いる場合には、セルバンクの管理、培養時の外来性微生物の混入等の製造工程管理、特性解析をバイオ医薬品（ICH-Q5ガイドライン）に準じる水準で行うべきである。また、

24) Biomaterials 2009; 30(15): 2940-9

25) Biomaterials 2012; 33(5): 1589-95

化学合成により製造される人工脂質様分子についても、分子内の二重結合の位置や配座等、脂質ナノ粒子の有効性及び安全性に影響を与える重要な品質特性を特定し、管理戦略を定める必要があり、エンドプロダクトに対する規格試験の実施のみで品質を保証することが困難な場合には、製造工程の概略及び工程内管理を承認事項に含めることも考慮すべきである。

4.6 4章のまとめ

以上の検討及び考察の結果、革新的な脂質ナノ粒子の規格項目及び特性解析項目としては、表 15 の項目を検討すべきと考えられた。また、革新的な脂質ナノ粒子では、その高度な機能性を製剤に対する規格試験/特性解析のみによって保証することは困難な場合があることから、ICH-Q8～Q11 ガイドラインに示された考え方を積極的に導入し、QbD に基づく工程設計とリスクマネジメントを行うことで、品質を保証することが重要と考えられる。

表 15 革新的な脂質ナノ粒子の規格項目及び特性解析項目として検討すべき事項

人工の脂質様分子が添加された粒子	人工脂質様分子の粒子上・粒子中の分布に関する特性、人工脂質様分子の機能に関する特性、生物活性 〔カチオン性脂質様分子を添加する場合〕 脂質の構成比、カチオン性脂質様分子の分解/変性物量、pKa、生物活性、(必要に応じて)カチオン性脂質様分子の分解/変性又は脱落により機能が低下した粒子
表面修飾された粒子	修飾分子の物理的・化学的特性及び生物学的特性、修飾分子の分布に関する特性、修飾分子の機能に関する特性、生物活性 〔PEG、リガンド、ポリペプチド等による表面修飾を行う場合〕 PEG 層厚、修飾分子の物理的・化学的特性及び生物学的特性 (バイオ医薬品 (ICH-Q5 ガイドライン) に準じて)、修飾分子の分布・配置、修飾分子の分解/変性、脂質ナノ粒子から遊離した修飾分子量、生物活性、(必要に応じて)修飾分子の分解/変性又は脱落により機能が低下した粒子
高分子化合物 (核酸、抗原など) が封入された粒子	モルフォロジー、疎水性コアの特性、生物活性、(必要に応じて)有効成分が封入されていない粒子
異なる機能を持った膜が重層化された粒子	生物活性 ※ 最終製品に対する規格試験に基づき品質管理を行うことには限界があることから、内側の粒子形成後に内側の粒子に関する規格試験、特性解析を実施する必要がある。

なお、表 15 に示した項目は、現在までに得られた知見に基づくものであり、今後開発される品目において、その特性を踏まえると一部の規格項目及び特性解析項目の測定の必要性が低いと考えられる場合には、品目ごとに柔軟で、科学的に妥当な対応がなされることが期待される。

5. 流路製造装置を用いた脂質ナノ粒子の連続生産に関する検討

5.1 流路製造装置の医薬品製造への応用

流路製造装置は、低分子化合物の化学合成の分野において長く研究が行われてきた。研究は当初、①高濃度の基質溶液を短時間的に反応させることで、溶媒使用量や加熱に必要なエネルギーを低減すること（グリーン・ケミストリー）、②有限な資源である金属触媒を固定化・再利用すること等を目的として行われていた²⁶⁾。一方近年では、製造スケールに対するフレキシビリティの観点から特に注目され（1.3 参照）、米国を中心に医薬品製造への導入が盛んに研究されている²⁷⁾。

低分子化合物の流路製造では、低分子化合物の化学合成において一般的に影響を生じる溶媒系、濃度、反応温度、試薬のモル比等に加えて、特に以下の点が、反応の収率や副反応の進行に影響を与えると考えられている。

- 混合チャンバーの大きさ、チャンバーへの進入角度など。Micro reactor（プレートに溝を掘って基質溶液を流し、反応させるもの）の場合は、流路のプレートの形状。
- 混合効率、混合時にかかる物理的なエネルギーが変動する。また、流路製造の場合、高温・高濃度条件下で短時間的に反応が進行するものが一般的であるため、適切な混合状態が早期に得られる条件を設定する必要がある。
- 流量
 - 混合効率、混合時にかかる物理的なエネルギー、混合チャンバーへの滞留時間（触媒反応の場合は、反応時間）が変動する。
- （カラム型の反応装置の場合）カラムへの滞留時間
 - 反応時間に影響を与える。

以上の点を踏まえると、流路製造装置を用いた工程設計に特有の問題として、①混合条件、及び②反応時間に影響を与える工程パラメータをどのように特定し、管理するかが重要と考えられる。

流路製造装置を用いた連続生産の導入のためには、QbD アプローチによる製造工程に対する理解と、適切な工程設計、PAT を用いた工程のモニタリングが必須である。しかしながら、脂質ナノ粒子の連続製造に用いる流路製造装置（マイクロミキサー）については、実際の医薬品製造に向けた具体的な検討内容は公表されておらず、研究者が脂質ナノ粒子の実用化を目指す上で足かせとなっていると考えられた。

そこで、本章では、モデルとなる脂質ナノ粒子を用いて、実際に QbD アプローチによる製

26) Chem Eur J 2008; 14: 7450-9、Nature 2015; 520: 329-32

27) <http://www.ifpac.com/cortona/Cortona10-Presentations/Caine.pdf>

<http://pqri.org/wp-content/uploads/2017/02/1-API-CM-PCCollins.pdf>

造工程の検討を行った。

5.2 連続生産技術の脂質ナノ粒子への応用 (QbD アプローチに基づく検討)

5.2.1 検討対象の粒子、製造装置

製造条件の検討を行うにあたり、以下の観点から検討対象の粒子を選定し、表 16 の粒子を用いて検討を行うこととした。

- 革新的な脂質ナノ粒子 (4 章参照) であること。
- 市販のキット等を用いることで、簡便に特性解析、生物活性測定を行えること。
- 連続生産への応用が検討されており、スケールアップが可能な流路製造装置を用いて安定した製造が可能であること。

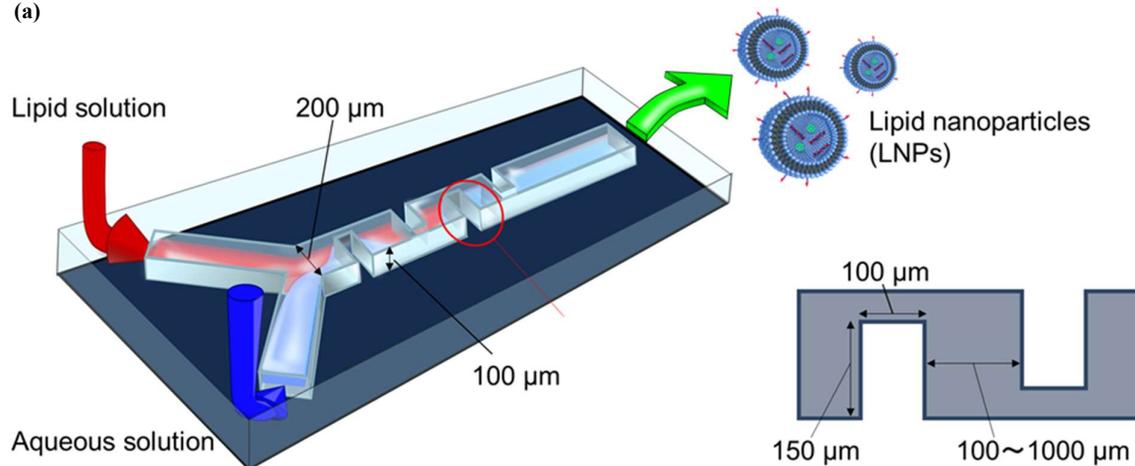
表 16 検討対象の粒子

粒子の種類	CL4H6-LNP
粒子の機能性	・ 肝臓の類洞を透過し、肝細胞に集積する。 ・ pH 応答性のカチオン性脂質様分子を含み、エンドソーム脱出及び細胞内導入効率が改善されている。 ・ PEG により表面修飾されており、循環血中での安定性が改善されている。 ・ siRNA が封入されている。
粒子の標的、作用	肝細胞において、凝固第Ⅶ因子の生成を抑制する。
粒子の組成	CL4H6/コレステロール/MPEG-DMG ^{a)} (60/40/0.75 mol%)

a) *N*-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジミリストイルグリセロール

なお、著者の所属研究室では、北海道大学大学院 工学研究院 生物機能高分子部門 分子機能化学分野 生物計測化学研究室と流路製造装置について共同研究を行っており、本研究では図 1²⁸⁾のような流路製造装置 (特願 2017-080118) を用いて検討を行った。

(a)



28) ACS Omega 2018; 3: 5044-51

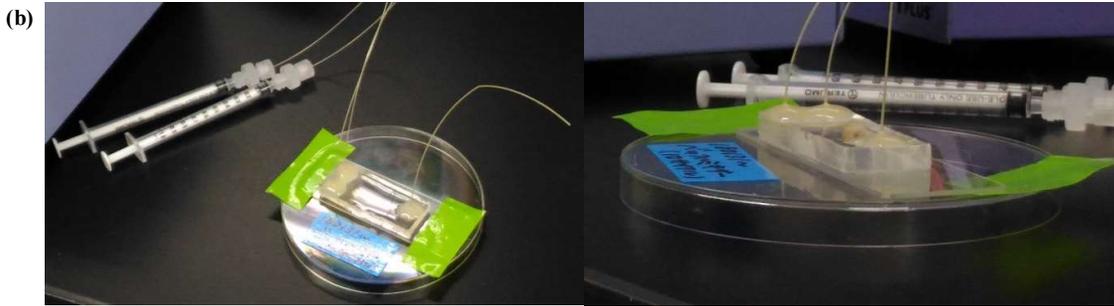


図1 流路製造装置（マイクロミキサー）
 (a) 装置の模式図と寸法、(b) 装置の写真（上から及び横から）

5.2.2 目標製品品質プロファイル（QTPP）の設定

検討対象の粒子（以下、「本 LNP」）は、肝細胞を標的とする脂質ナノ粒子であり、表 16 のような機能性を有する。したがって、目標製品品質プロファイル（Quality Target Product Profile、以下、「QTPP」）²⁹⁾として、以下の点が挙げられる。

- (1) 脂質ナノ粒子として、必要な品質が確保されていること（3章参照）
- (2) 必要量の siRNA をロット内/ロット間で均質に含有すること（4章参照）
- (3) 不純物量が一定に管理されていること
- (4) 静脈内投与可能であること
- (5) 静脈内で安定に存在できること（4章参照）
- (6) 肝に選択的に集積すること
- (7) 肝細胞に効率的に取り込まれ、内包物を細胞質内に移行させられること（4章参照）
- (8) 細胞質内で、内包物たる siRNA が機能すること

なお、実際に医薬品として開発される脂質ナノ粒子の場合には「国内市場において流通可能な十分な安定性を有すること」等も QTPP に挙げられるものと考えられる。

5.2.3 CQA の特定

5.2.2 項に挙げた QTPP を恒常的に担保する上で、表 17 の点が重要品質特性（CQA）¹⁹⁾として挙げられる。

表 17 本 LNP の CQA

QTPP	CQA
(1) 脂質ナノ粒子として、必要な品質が確保されていること	<p>[LNP 全般 (3章)] 性状、確認試験（有効成分及び脂質ナノ粒子の構成成分の確認）、粒子径/粒度分布、ゼータ電位、pH、純度試験（封入率、リボソームを構成していない低分子化合物、元素不純物、残留溶媒、変異原性不純物等）、<i>in vitro</i> 放出試験、封入率、含量</p> <p>[siRNA 封入 (4章)] モルフォロジー、疎水性コアの特性、純度試験（有効成分が封入され</p>

29) 製剤の安全性及び有効性を考慮した場合に要求される品質を保証するために達成されるべき、製剤の期待される品質特性の要約（ICH-Q8 ガイドライン）

QTPP	CQA
	ていない粒子)、生物活性
(2) 必要量の siRNA をロット内/ロット間で均質に含有すること	製剤均一性、偏析 (=時間と品質特性の関連性)
(3) 不純物量が一定に管理されていること	純度試験 (封入率、リボソームを構成していない低分子化合物、元素不純物、残留溶媒、変異原性不純物等)、偏析 (=時間と品質特性の関連性)
(4) 静脈内投与可能であること	製剤均一性、採取容量、無菌、エンドトキシン、不溶性異物、不溶性微粒子
(5) 静脈内で安定に存在できること	PEG 層厚、純度試験 (脂質ナノ粒子から遊離した PEG 量)、 <i>in vitro</i> 放出試験、静脈内で PEG 修飾が一定時間保持されること
(6) 肝に選択的に集積すること	粒子径/粒度分布、ゼータ電位
(7) 肝細胞に効率的に取り込まれ、内包物を細胞質内に移行させられること	脂質の構成比、純度試験 (CL4H6 の分解/変性物量、CL4H6 の分解/変性又は脱落により機能が低下した粒子)、pKa、生物活性
(8) 細胞質内で、内包物たる siRNA が機能すること	封入率、含量/定量法

なお、本 LNP は siRNA により形成された疎水性のコアの周辺を脂質 1 重膜が取り囲んで形成されていることから、「CL4H6、PEG の分布・配置」について、CQA に含める必要はないと判断した。また、本検討では本 LNP に関する潜在的な CQA をすべて列挙したが、今後、流路製造装置 (マイクロミキサー) を用いた多様な脂質ナノ粒子の製造実績が集積した場合、又は非臨床・臨床試験の結果から、一部の特性が脂質ナノ粒子の機能、薬物動態、有効性及び安全性に影響しないことが確認できている場合には、すべてを CQA として挙げる必要はないものと考えられる。

5.2.4 潜在的な重要工程パラメータ (CPP)

脂質ナノ粒子の製造に流路製造装置 (マイクロミキサー) を用いる場合には、一般的な低分子化合物 (5.1 項参照) での知見も踏まえると、品質に影響を与えうる潜在的な重要工程パラメータ (Critical Process Parameter、以下、「CPP」)³⁰⁾として、以下の点が挙げられる。通常の医薬品開発においては、①同様の製造方法による製造工程から経験的に得られた工程に対する知識や、②医薬品シーズとして確立される前に得られた製造に関する知識等から、各パラメータがいずれの CQA にどの程度影響するかを予め検討・考察した上で、影響する可能性がある工程パラメータを挙げることとなるが、流路製造装置 (マイクロミキサー) を用いて多様な脂質ナノ粒子を製造した経験はないことから、本検討では、流路製造装置 (マイクロミキサー) で変動しうる製造工程パラメータを CQA に紐づけることなく挙げた。

- 混合チャンバーの大きさ、チャンバーへの進入角度などのマイクロミキサーの形状
 - 混合条件に影響を与える因子であり、実際の医薬品開発で大規模製造を行う場合には最適化が行われる。混合効率に大きな影響を与えることが知られており、粒子形

30) 工程パラメータのうち、その変動が重要品質特性に影響を及ぼすもの、したがって、その工程で要求される品質が得られることを保証するためにモニタリングや管理を要するもの (ICH-Q8 ガイドライン)

成過程に重要な影響を与える可能性がある。

- ・ 流路製造装置(マイクロミキサー)の場合、繰り返し使用による装置の劣化により、流路の形状がわずかに変動する可能性が想定される。実際に、医薬品開発において大規模製造を行う場合には、装置の洗浄バリデーション、繰り返し使用可能回数についても検討を行う必要があり、装置を「単回使用」として管理することも一案と考えられる。
- ・ 流量/流速
- ・ 油相と水相の混合比
 - ・ いずれも、粒子の形成・成長速度に影響を与える可能性がある。本研究室での他の脂質ナノ粒子の製造実験から、粒子径/粒度分布に影響する場合が多いことが確認されている。
- ・ 温度
 - ・ 粒子の形成・成長速度に影響を与える可能性がある。
- ・ 水相(酢酸緩衝液)の塩濃度、pH
 - ・ 本 LNP は pH 応答性脂質様分子により脂質膜が構成されること、siRNA による疎水性コアと脂質分子の疎水的相互作用により粒子形成が行われると想定されることから、塩濃度や pH は粒子の形成・成長速度に影響を与える可能性がある。

5.2.5 製造実験と CPP の特定

5.2.4 項に記載した潜在的な CPP が本 LNP の品質に与える影響について検討するため、表 18 のような製造実験を行った。siRNA 溶液中の NaCl 濃度については、内水相を等張にすることを目的として設定した。

本検討における標準的な製造条件(表 18 中の太字で記載した条件)は、これまでの脂質ナノ粒子の製造経験及び条件最適化に関する検討結果に基づき設定した。製造条件の検討範囲については、これまでの検討は最適条件の設定に主眼を置いており、不適合境界(Edge of Failure)³¹⁾に関する検討は行っていなかったことから、通常想定される変動の範囲を超えて設定した。製造実験は、4 つの変数のうち 1 つを変動させ、他の 3 つの製造条件は標準的な製造条件とした。なお、実際の医薬品製造では、通常想定される各製造パラメータの変動の範囲を十分にカバーするように製造パラメータの範囲を設定することで十分であり、不適合境界を探索するために極端な製造条件をすべての製造パラメータに設定することは必須ではない。

31) 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 原薬の開発・製造情報に関する研究 ―Quality by Design の方法論による原薬研究開発― (<http://www.nihs.go.jp/drug/section3/H23OkudaRRep.pdf>)

表 18 製造実験の製造条件

<製造方法の概略> siRNA のリン酸緩衝液溶液と、脂質 (CL4H6/コレステロール/MPEG-DMG ^{a)} (60/40/0.75 mol%) のエタノール溶液を、流路製造装置 (マイクロミキサー) を用いて室温で混合した。得られた粒子を回収し、外水相を 20 mM MES 緩衝液 (pH6.0) として、4°C で 2 時間以上透析して精製した。	
流路製造装置 (マイクロミキサー) の流速 (mL/min)	0.25、0.50、1.0、 1.5 、2.0
[設定根拠] 上限 (2.0) は、流路製造装置 (マイクロミキサー) の強度上の制限に基づき設定。 下限 (0.25) は、用いるシリンジポンプの精度 (±1%) を十分に超える値として、不適合境界を探索するために設定。	
混合比 (siRNA 溶液/脂質溶液)	1.5、2.0、 3.0 、5.0、9.0
[設定根拠] 用いるシリンジポンプの精度 (±1%) を十分に超える値として、不適合境界を探索するために設定。	
siRNA 溶液の pH	3.0、3.5、 4.0 、5.0、6.0
[設定根拠] 酢酸緩衝液の干渉能を考慮すると、pH0.5 を超える変動は考え難い。これを十分に超える値として、不適合境界を探索するために設定。	
siRNA 溶液中の NaCl 濃度 (mM)	0 、50、100、150、250
[設定根拠] 調製時の変動はわずかと想定されることから、生理食塩水中の NaCl 濃度 (154 mM) を中心に、不適合境界を探索するために設定。	

太字：標準的な操作条件

a) N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジミリストイルグリセロール

「混合チャンバーの大きさ、チャンバーへの進入角度などのマイクロミキサーの形状」については、同一の流路製造装置 (マイクロミキサー) を用いて脂質ナノ粒子の製造実験を行っていることから、本検討では変動要因には含めないこととした。また、温度についても、現在は室温で調製を行っていること、流路製造装置 (マイクロミキサー) を恒温に維持するための装置が本研究室にはなかったことから、本検討では検討対象としなかった。

製造条件の変動による品質への影響については、以下の測定項目により検討した。本 LNP については、表 17 のとおり多くの CQA が特定されているが、脂質ナノ粒子の形成工程に着目し、影響が生じた場合に最も鋭敏に変動を観察できる項目を選んで検討することとした。

- 粒度分布 (Z-Ave³²⁾、個数平均径³³⁾、D10、D50、D90³⁴⁾)
- PDI³⁵⁾
- ゼータ電位
- siRNA 封入率
- pKa
- 生物活性 (凝固第VII因子の血中濃度)

32) 動的光散乱計 (ゼータサイザー) で算出される粒子径に関連するパラメータ。粒度分布のピークが 1 つであると仮定し、算出されたキュムラント径 (ISO13321 part 8)。

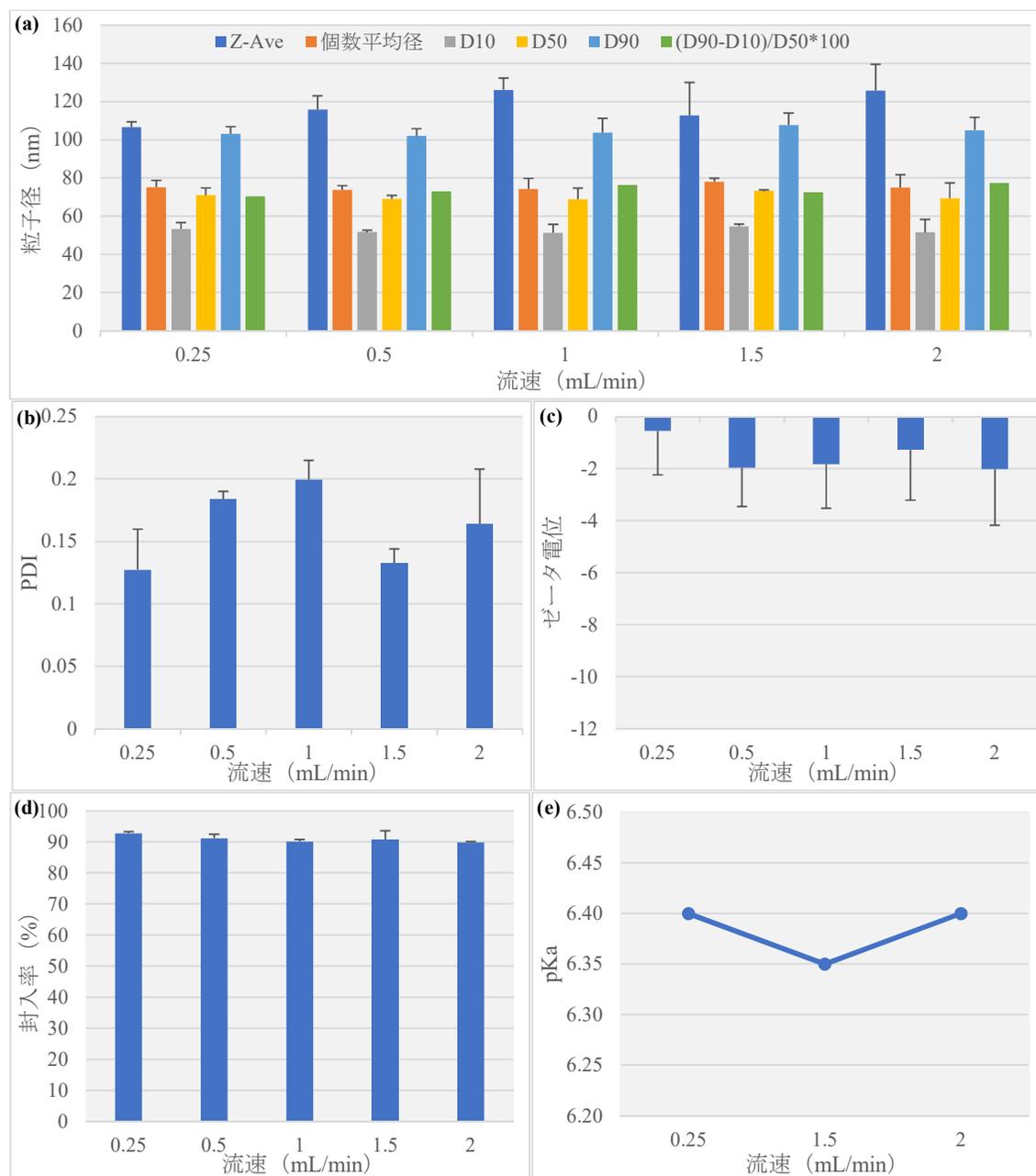
33) 個数分布に基づく粒度分布における平均径

34) 個数分布に基づく粒度分布における 10 パーセンタイル値、50 パーセンタイル値 (モード径)、90 パーセンタイル値

35) 動的光散乱計 (ゼータサイザー) で算出される多分散指数 (分布のばらつきに関連するパラメータ、0 に近いほど均質)

5.2.5.1 流路製造装置（マイクロミキサー）の流量の影響

流路製造装置（マイクロミキサー）の流速を変動させた結果は図 2 のとおりであった。脂質ナノ粒子の pKa や生物活性への影響は認められなかった。その他の品質特性についても、不適合境界は認められなかった。



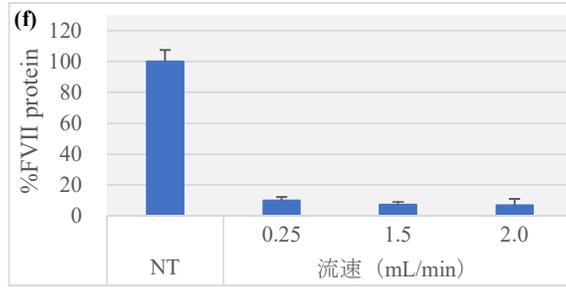


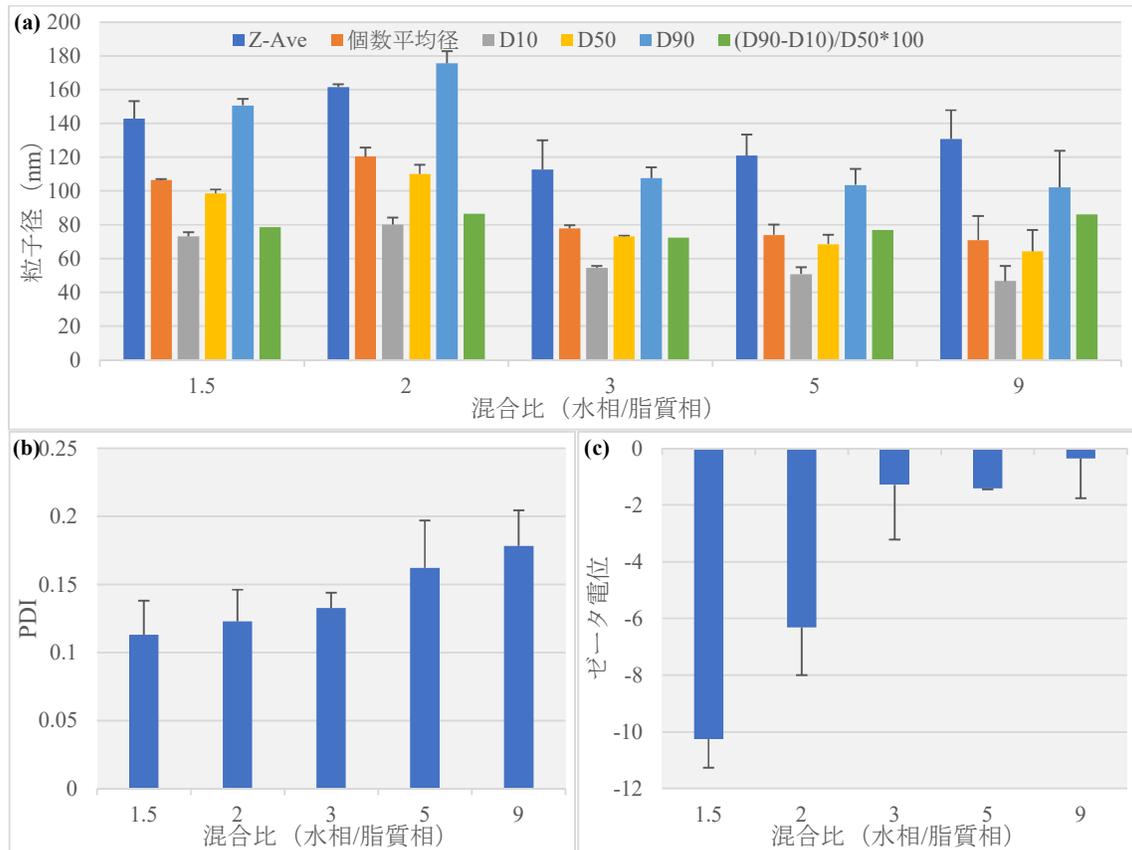
図2 流速を変動させた場合の品質への影響 (平均値±標準偏差, n=3 (pKa は n=2))

(a) 粒子径/粒度分布に対する影響、(b) PDI に対する影響、(c) ゼータ電位に対する影響、(d) 封入率に対する影響、(e) pKa に対する影響、(f) 生物活性 (凝固第VII因子の血中濃度) に対する影響

以上の検討結果及び製造効率を考慮し、流速については標準的な操作条件を 1.5 mL/min と設定することに大きな問題はないと考えられた。また、検討を行った範囲内 (0.25~2.0 mL/min) であれば、変動による品質への大きな影響は認められないものと考えられた。

5.2.5.2 混合比 (siRNA 溶液/脂質溶液) の影響

siRNA 溶液 (水相) と脂質溶液 (脂質相) の流路製造装置 (マイクロミキサー) での混合比を変動させた結果は図 3 のとおりであった。混合比が 2.0 以下で粒子径の増大 (D50 として 98.6~110 nm)、ゼータ電位の低下、封入率の低下が認められ、1.5 では生物活性の低下が認められた。



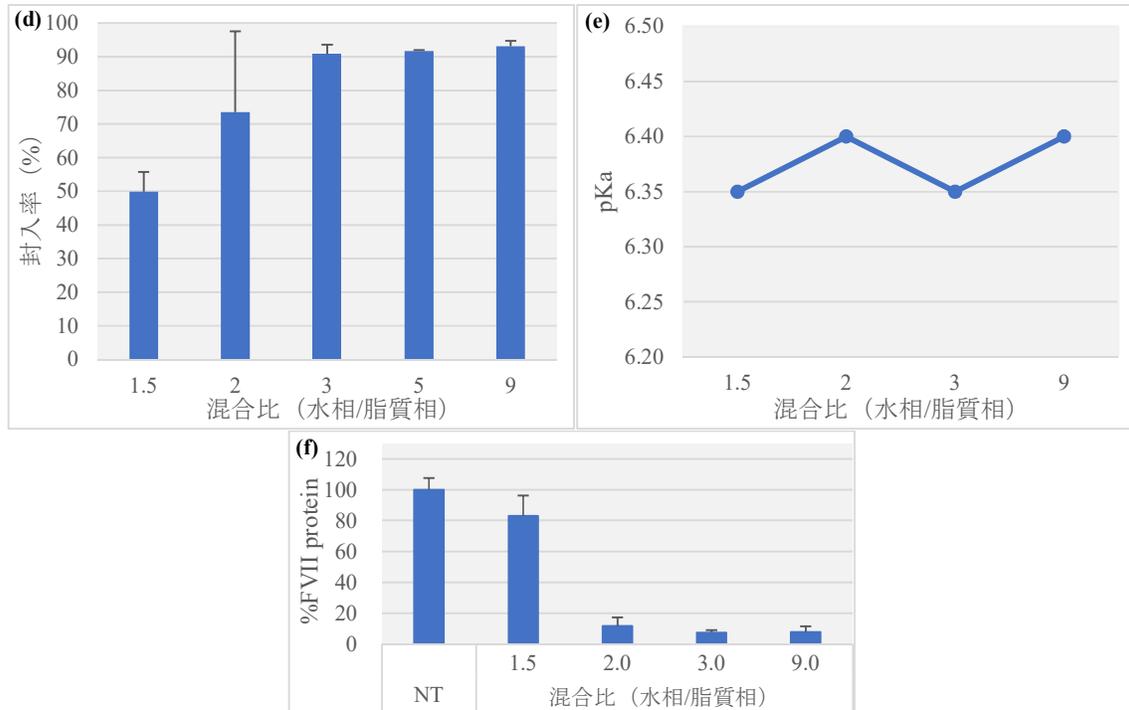


図3 混合比を変動させた場合の品質への影響 (平均値±標準偏差、n=3 (pKa は n=2))

(a) 粒子径/粒度分布に対する影響、(b) PDI に対する影響、(c) ゼータ電位に対する影響、(d) 封入率に対する影響、(e) pKa に対する影響、(f) 生物活性 (凝固第VII因子の血中濃度) に対する影響

したがって、混合比 (水相/脂質相) については、3.0 以上 9.0 以下で製造することが適切と考えられた。当初の想定どおりに標準的な操作条件を 3.0 (表 18) とした場合、製造時の変動により混合比がわずかに低下した場合、本 LNP の品質に影響を与える可能性があることから、より高い値に設定することが適切と考えられた。

また、混合比を 2.0 とした場合、封入率が 75% を下回って低下したのに対し、生物活性にはほとんど影響が認められなかったことから、生物活性試験における検出感度が十分ではない可能性が示唆された。今後追加検討を行う場合には、封入率の低下に伴って予想される生物活性への影響を感度よく検出可能な投与量を設定すること適切と考えられた。

5.2.5.3 siRNA 溶液の pH の影響

siRNA 溶液の pH を変動させた結果は図 4 のとおりであった。pH 6.0 で粒子径の増大 (D50 として 367 nm)、ゼータ電位の低下、封入率の低下が認められ、生物活性の低下も認められた。5.2.5.2 の混合比 2.0 の結果とは異なり、生物活性の十分な低下が認められた理由について、本検討では粒子径の大幅な増大が認められたことが影響した可能性が想定された。また、pH 3.5 では、ゼータ電位がほぼ中性となったが、繰り返し測定時の個々値は -2.23、-0.37 及び 2.69 であり、他の製造条件では認められない大きな陽性の測定値が得られたことによる影響と考えられた。このような外れ値が得られた理由については明確ではないが、他の 2 測定については pH 3~5 の製造条件で得られたゼータ電位の個々値の範囲内であったこと、pH 3.0

ではゼータ電位への影響は認められていないことから、偶発的な結果と考えられる。

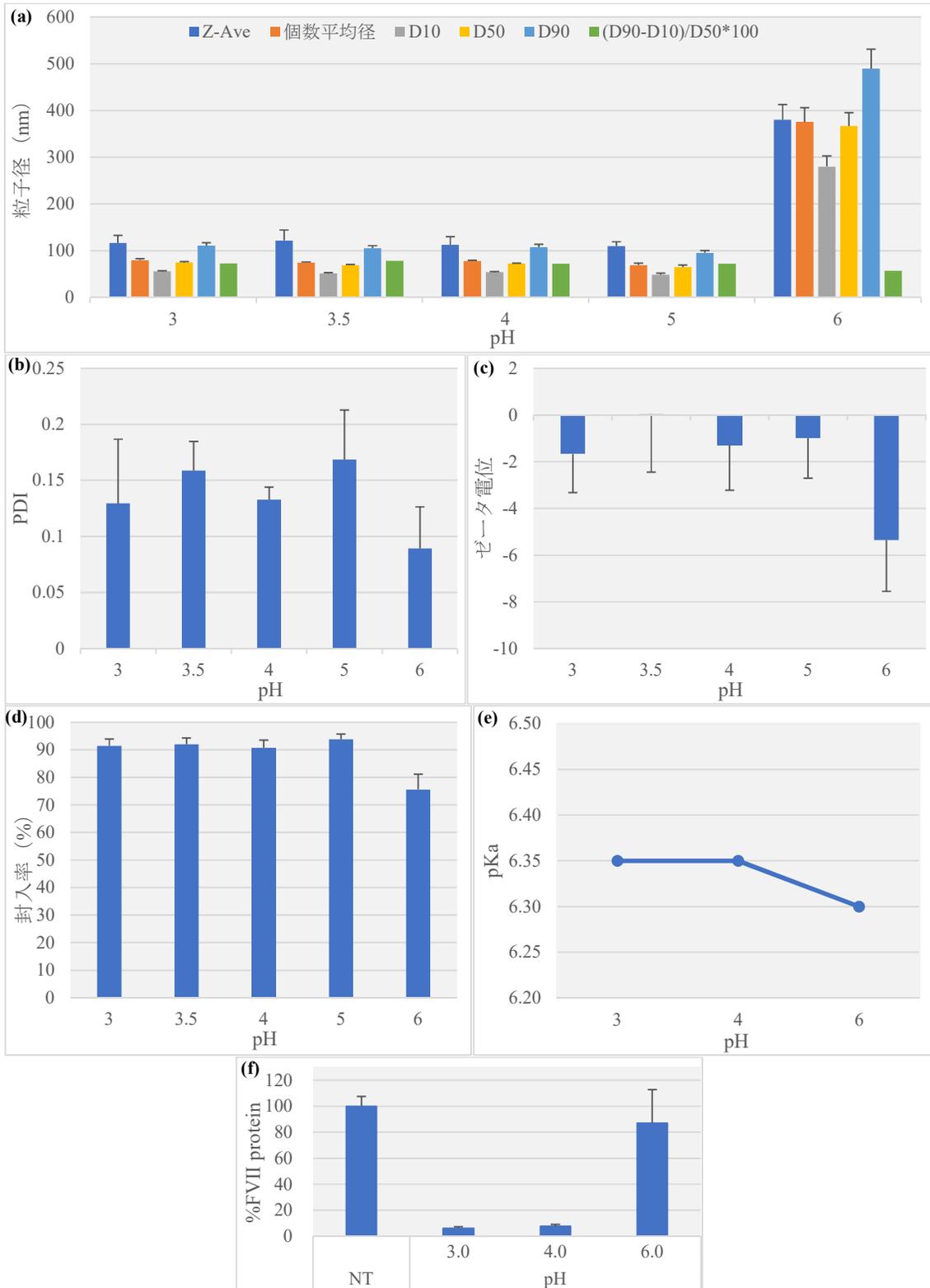
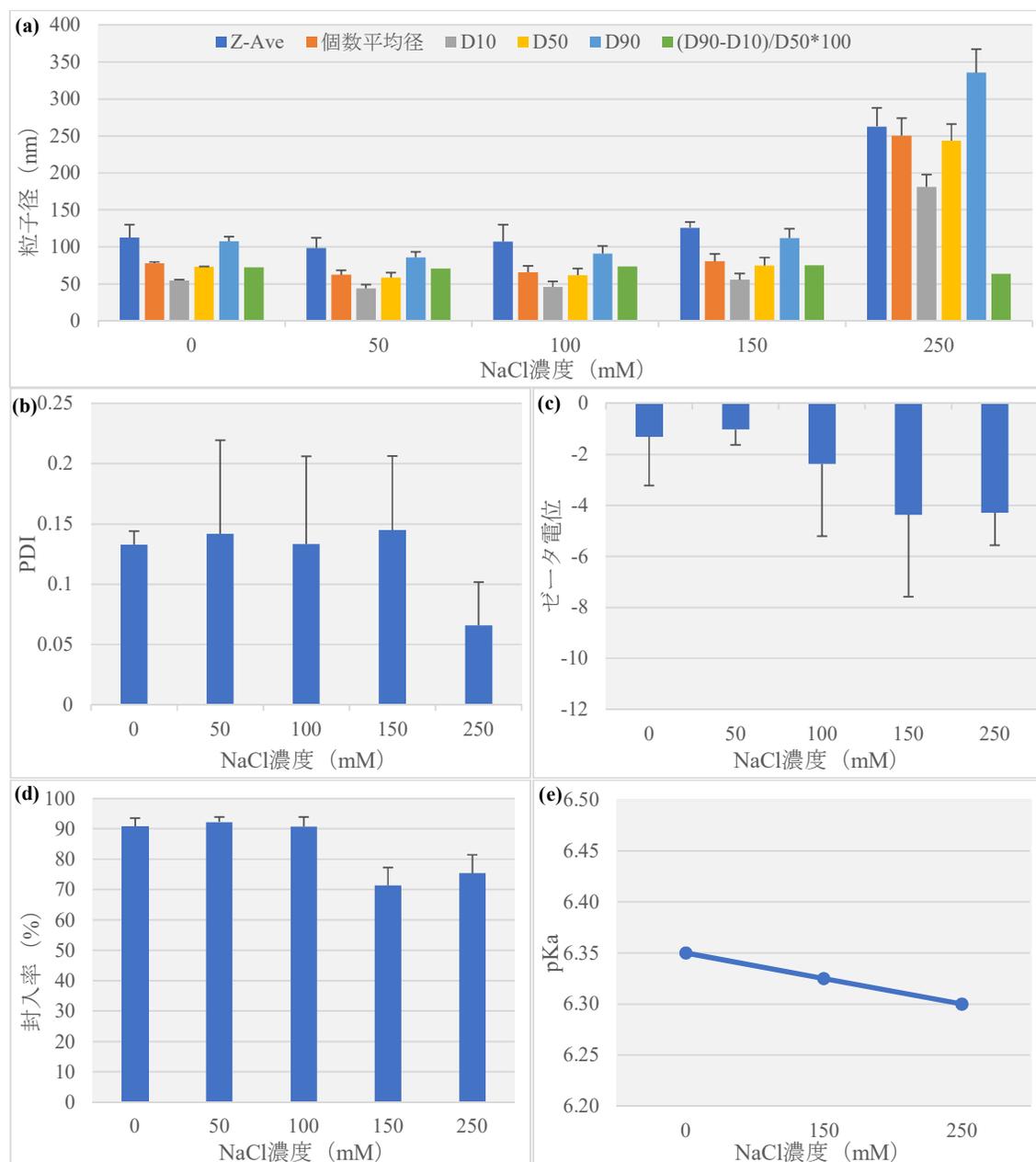


図4 siRNA 溶液の pH を変動させた場合の品質への影響 (平均値±標準偏差、n=3 (pKa は n=2))
 (a) 粒子径/粒度分布に対する影響、(b) PDI に対する影響、(c) ゼータ電位に対する影響、
 (d) 封入率に対する影響、(e) pKa に対する影響、(f) 生物活性 (凝固第VII因子の血中濃度) に対する影響

以上より、検討を行った製造条件の範囲では、siRNA 溶液の pH は 3.0~5.0 の範囲で製造することが適切と考えられた。

5.2.5.4 siRNA 溶液の塩濃度の影響

siRNA 溶液の塩濃度を、NaCl を添加して変動させた結果は図 5 のとおりであった。150 mM 以上の条件でゼータ電位及び封入率の低下が認められ、生物活性の低下も認められた。一方で粒子径については、150 mM では大きな影響が認められなかったが、250 mM では粒子径の増大が認められた。



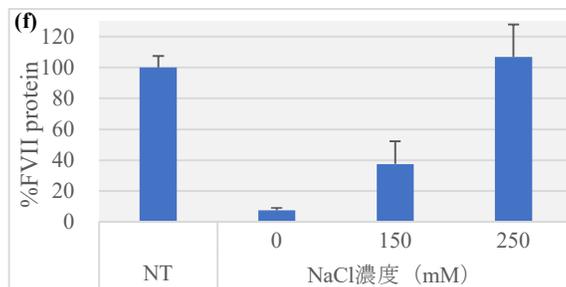


図5 NaClを用いてsiRNA溶液の塩濃度を変動させた場合の品質への影響
(平均値±標準偏差, n=3 (pKaはn=2))

(a) 粒子径/粒度分布に対する影響、(b) PDIに対する影響、(c) ゼータ電位に対する影響、
(d) 封入率に対する影響、(e) pKaに対する影響、(f) 生物活性(凝固第VII因子の血中濃度)に対する影響

以上より、検討を行った製造条件の範囲では、siRNA溶液中のNaCl濃度は100mM以下で製造することが適切であり、標準的な操作条件を0mMと設定することに大きな問題はないものと考えられた。

5.2.5.5 CPPの特定

5.2.5.1~4項の検討結果から、混合比(siRNA溶液/脂質溶液)及びsiRNA溶液のpHは、標準的な製造条件の近傍に不適合限界が認められたことから、CPPとして特定し、管理する必要がある。本検討において不適合境界が確認できたことから、検討結果に基づき立証された許容境界(Proven Acceptable Range)を設定することで、リスクは管理可能と考えられる。一方で、流路製造装置(マイクロミキサー)の流速については、大きく変動した場合であっても品質への影響が認められなかったことから、CPPとして管理する必要はないと考えられる。

siRNA溶液中のNaCl濃度については、内水相に一定の浸透圧を与えること(可能であれば等張であること)が望ましいのではないかとこの観点から検討を行い、150mM以上で品質への影響が認められたため、標準的な操作条件は0mMと設定することとなった。本検討に先立ち予備的に実施した酢酸緩衝液の濃度変動に関する検討では、今回のNaCl濃度と同程度以上の濃度まで変動させた場合にも品質特性への影響が認められなかったことから、この影響は塩化物イオン濃度によるものと考えられた。したがって、siRNA溶液のイオン強度及び/又は塩濃度・種類は、siRNAとカチオン性脂質による疎水性コア形成能に影響すると考えられることから、CPPに準じて慎重な管理が必要と考えられる。

表19 特定されたCPP等

CPP等	標準的な操作条件	立証された許容限界
混合比 (siRNA 溶液/脂質溶液)	3.0 超	3.0~9.0
pH	4.0	3.0~5.0
siRNA 溶液のイオン強度及び/又は塩濃度・種類	NaCl 濃度として 0 mM	NaCl 濃度として 0~100 mM

5.3 QbD アプローチに基づく CL4H6-LNP の製造実験に関する考察

5.3.1 流路製造装置を用いた脂質ナノ粒子の製造に関する考察

流路製造装置（マイクロミキサー）を用いた脂質ナノ粒子の製造工程開発について公表されている情報はなかったが、低分子化合物の流路製造装置を用いた製造に関する研究で集積された知識、vortex mixer 等を用いて脂質ナノ粒子を製造した経験等を活用して、QbD アプローチに基づき製造実験を行うことで、CPP を特定し、不適合境界と立証された許容限界を確認できた。脂質ナノ粒子の製造では、製造条件のわずかな変動（表 18）により生成する粒子の特性に大きな影響を生じる場合があることが分かっていたが、流路製造装置（マイクロミキサー）を用いた場合にも、一部の製造パラメータのわずかな変動により品質への影響が生じる場合があることが確認された。

本 LNP の本流路製造装置（マイクロミキサー）を用いた製造実験では、混合比（siRNA 溶液/脂質溶液）並びに siRNA 溶液の pH 及び塩濃度/イオン強度の変動により多くの品質特性に影響が認められており、粒子形成が期待どおり進行しなくなった。

- 混合比（siRNA 溶液/脂質溶液）については、エタノール希釈法による脂質ナノ粒子の製造時にも認められる不具合であり、水相に対するエタノール量が相対的に増加することで、油滴からのエタノールの除去及び脂質の分散速度が低下するため、粒子形成に影響を生じている可能性がある。また、封入率と生物活性の大幅な低下が認められていることを踏まえると、エタノール分率が高くなることで、脂質の凝集能が低下し、脂質ナノ粒子そのものが不安定化している可能性も考えられる。なお、本製造実験では、用いた流路製造装置（マイクロミキサー）が高い混合効率を達成可能なため、標準的な操作条件として 3.0 と設定したが、他の流路製造装置を用いる場合には混合比を 10 以上に設定する場合もあることから、エタノール分率が高くないよう管理することは重要と考えられた。
- siRNA 溶液の pH については、カチオン性脂質のプロトン化の程度に影響するため、siRNA とカチオン性脂質による疎水性コアの形成能に影響するものと考えられる。中性付近では CL4H6 はプロトン化されていない分子が増えるため、疎水性コア形成が十分に進行せず、粒子形成が期待どおり進行しなくなったものと考えられる。
- siRNA 溶液の塩濃度/イオン強度・種類については、現時点では塩化物イオンの影響のみが確認されている（酢酸イオンでは、塩化物イオンと同程度の変動では品質への影響は認められていない）。イオン間で影響に差異が認められた理由は明確ではないが、イオンの大きさ、固さ等が影響した可能性がある。150 mM 以上では、イオン強度の上昇による脱水和・疎水性相互作用の強化、塩析に類する現象によって PEG 化脂質の凝集核への分布が増加し、上記の pH と同様に、疎水性コアの形成能に影響した結果、粒子

形成が期待どおり進行しなくなったものと考えられる。

一方で、本流路製造装置（マイクロミキサー）を用いた本 LNP の製造実験では、流速による影響が認められなかった。流速が速くなると、理論的には、水相と脂質相の混和が十分に行われなくなり、脂質粒子の形成に影響が生じると考えられるが、本流路製造装置（マイクロミキサー）は高い混合効率を達成できているため、今回の検討では混合効率は大きくは棄損されず、変動による影響が認められなかったものと考えられる。本流路製造装置（マイクロミキサー）の形状を変更する場合、混合効率が変化する可能性があることから、改めて流速等の混合効率に関連する製造パラメータの影響について検討し、混合効率が低下していないことを確認することが適切と考えられる。

なお、本流路製造装置（マイクロミキサー）より混合効率が低い別の装置を用いて製造を行う場合、混合効率が脂質粒子の形成に影響する可能性は否定できない。低分子化合物の流路製造における知見も考慮して、混合チャンバーの大きさ、チャンバーへの進入角度などのマイクロミキサーの形状が変動した場合の影響について検討することが適切と考えられる。

以上、QbD アプローチに基づき QTPP、CQA を設定した上で、脂質ナノ粒子に特徴的な品質特性に着目して CPP を特定するための製造実験を行った結果、CPP を特定することができた。事前に予想したとおり、流路製造装置（マイクロミキサー）を用いた場合でも、製造条件のわずかな変動（表 18）により得られる脂質ナノ粒子の特性に変動が認められた。なお、本検討では不純物量、製剤均一性・偏析、含量等に着目した検討は行っていないため、これらに着目した追加検討を行った場合には、CPP の追加や各 CPP の立証された許容限界の変更が生じる可能性がある。また、今回の検討結果は、本流路製造装置（マイクロミキサー）を用いて本 LNP の製造を行った場合の影響であり、用いる流路の形状や脂質の種類によって品質に影響を与える製造パラメータは異なる可能性がある点に留意する必要がある。

5.3.2 粒度分布の管理に用いる変数に関する考察

脂質ナノ粒子に限らず、低分子医薬品の管理を含めて、本邦では 10%累積粒子径、90%累積粒子径（D10、D90）を用いて粒度分布を評価・管理してきた。一方で、米国の後発品開発のためのドラフトガイダンスでは、「(D90-D10) /D50」により算出される指標を用いて類似性を判定することとしている（3.1.3.1 項）。そこで、5.2 項の製造実験の結果に基づき、「(D90-D10) /D50」の有用性について検討した。

粒度分布が変化する場合、変化の内容は大きく二つに分類される。すなわち、①粒子径の分布全体が細かい、又は粗い方にシフトした結果、D10、D50、D90 のすべてが同一方向に変動する場合と、②粒度分布の中心は大きく変動しないまま、分布のばらつきが大きくなる、又は分布の形状が変動する（例：D10 及び D90 は不変で、D50 のみがシフトする）場合とである。

① D10、D50、D90 のすべてが同一方向に変動する場合

siRNA 溶液の pH を変動させた場合 (図 4)、pH 4.0 (標準的な操作条件) と比較して pH 6.0 では Z-ave、平均粒子径、D10、D50、D90 のすべてのパラメータが大幅に増加したが、「(D90-D10) /D50」についてはほとんど変動がみられなかった。これは、粒度分布の形状と、D50 に対する相対的な分布の幅が変化しなかったことが原因と考えられる。このようなケースでは、「(D90-D10) /D50」のみを用いた場合、粒度分布の変動を検出できない可能性が高く、D50 等の他のパラメータと組み合わせて管理する必要があると考えられた。

② 分布のばらつきが大きくなる、又は分布の形状が変動する場合

CL4H6-LNP の製造実験では、「(D90-D10) /D50」の大きな変動は認められなかった。わずかな変動が認められたケースとして、混合比 (siRNA 溶液/脂質溶液) を変動させた場合 (図 3)、混合比 3.0 (検討時の標準的な操作条件) と比較して混合比 9.0 では「(D90-D10) /D50」のわずかな増加が認められた。これは、D10 及び D50 がわずかに低下したのに対し、D90 がほとんど変化しなかったことが原因であった。

このように、わずかな分布の変動を 1 値で捉えられるという点で「(D90-D10) /D50」は一定の有用性を有すると考えられるが、変動が認められた場合、計算元の各パラメータ (D10、D50、D90) に戻らないと分布がどのように変化したか確認できないことから、現時点では、算出と日常管理が必須のパラメータであるとまではいえないと考えられた。

以上より、本 LNP の製造実験結果からは、粒度分布の日常管理については、従来どおり D10、D50、D90 を中心に管理するパラメータを設定することが望ましいと考えられた。

5.4 5章のまとめ

本研究では、CL4H6-LNP をモデルとし、流路製造装置 (マイクロミキサー) を用いて脂質ナノ粒子の製造を行う場合の工程設計を、QbD アプローチを用いて行った。QTPP 及び CQA (表 17) を設定した上で、潜在的な CPP を特定した (5.2.4 項参照)。その上で製造実験を行い、CPP (混合比 (siRNA 溶液/脂質溶液)、siRNA 溶液の pH) 及び CPP に準じて慎重な管理が必要な製造パラメータ (siRNA 溶液の塩濃度/イオン強度・種類) と各製造パラメータの不適合境界を特定し、立証された許容限界を設定した。

脂質ナノ粒子の流路製造装置による製造工程に QbD アプローチを用いた事例は公開されていないことから、革新的な脂質ナノ粒子を用いた実際の検討結果を示すことで、医薬品開発の促進につながることを期待される。

また、製造実験では、低分子化合物の連続生産及び脂質ナノ粒子のこれまでの製造経験を基礎として潜在的な CPP を設定したところ、その多くで製品品質への影響が確認できた。よって、低分子化合物の連続生産及び脂質ナノ粒子のこれまでの製造経験を基礎として潜在的な CPP を特定するアプローチは、脂質ナノ粒子の流路製造装置による製造においても有用であることが示された。

6. 結語

著者は、①米国及び欧州で発出されている主なガイダンス、リフレクションペーパー等（表 4）並びに②脂質ナノ粒子と同様に低分子化合物の集合体である、ブロック共重合体ミセルに関する日欧共同のリフレクションペーパーにおいて推奨されている規格項目及び特性解析項目、③日米欧で承認されている脂質ナノ粒子を用いた医薬品で測定されている規格項目及び特性解析項目並びにそれに関する議論内容に対する調査を行った。（2 章）

上記調査内容及び著者の所属研究室で得られた知見に基づき、古典的な脂質ナノ粒子の特性解析項目及び規格項目として検討すべき項目（表 13）、革新的な脂質ナノ粒子の特性解析項目及び規格項目として検討すべき項目（表 15）について考察を行い、提言した。（3 章、4 章）

さらに、CL4H6-LNP をモデルとして、流路製造装置（マイクロミキサー）を用いて脂質ナノ粒子の製造を行う場合の工程設計を、Quality-by-Design (QbD) アプローチを用いて行った。当該検討結果に基づき、目標製品品質プロファイル (QTPP) 及び重要品質特性 (CQA) の設定事例と考え方を示した。CQA に紐づく潜在的な重要工程パラメータ (CPP) の設定と製造実験結果を踏まえ、CPP と不適合境界の特定、立証された許容限界の設定を行った。

以上

実 験 項

[第5章、図2～5]

試薬、装置等

MES 及び HEPES は同仁化学、D-PBS(-)は和光純薬、Ribogreen は Thermo Fisher scientific、コレステロール及び TritonX-100 は SIGMA-Aldrich、MPEG-DMG は日油、凝固第Ⅶ因子に対する siRNA は北海道システムサイエンスから購入したものをを用いた。CL4H6 は当研究室で合成したものをを用いた。なお、siRNA の配列は以下のとおりである。

sense: 5'-GGA UCA UCU CAA GUC UUA CTT-3'

antisense: 5'-GUA AGA CUU GAG AUG AUC CTT-3'

製造に用いた装置等のうち、流路製造装置のバッフルミキサーは北海道大学大学院 工学研究院 生物機能高分子部門 分子機能化学分野 生物計測化学研究室にて製造したものを、ガラスシリンジは HAMILTON 社の製品、シリンジ用コネクタはマイクロ化学技研社の製品、シリンジポンプは YMC 社の製品をそれぞれ用いた。透析膜は Spectrum Laboratories 社製の Spectra/Por 4 dialysis membrane を用いた。

粒子径、PDI、ゼータ電位は、Marvern instrument 社製の Zetasizer Nano ZS ZEN3600 を用いて測定した。封入率算出時及び pKa 算出時の蛍光強度測定には Enspire 2300 Multilabel Reader を用いて測定した。生物活性（凝固第Ⅶ因子の血中濃度）の測定では、Hypen BioMed 社製の Biophen FVII chromogenic assay kit で呈色した後、Enspire 2300 Multilabel Reader を用いて吸光度を測定した。

CL4H6-LNP の調製

1. siRNA 水溶液 (2 mg/mL) を 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.0~6.0) で希釈し、71.1 µg/mL に調製した (①)。なお、siRNA 濃度は混合比 (siRNA 溶液/脂質溶液) が 3.0 の場合の濃度であり、混合比の影響に関する検討 (5.2.5.2 項) では、siRNA/脂質比が変動しないよう、濃度調整を行った (例: 混合比 1.5 の場合、142.2 µg/mL)。
2. CL4H6、コレステロール、MPEG-DMG をエタノールに溶解し、それぞれ 4.8 mM、3.2 mM、0.06 mM になるよう調製した (②)。
3. ①と②をガラスシリンジに取り、シリンジポンプに装着した。さらに、バッフルミキサーとシリンジをシリンジ用コネクタを用いて接続した。
4. 各製造条件に合わせて①及び②の流量を設定し、バッフルミキサーに送液した (例: 流速 1.5 mL/min、混合比 3.0 の場合、①は 1.125 mL/min、②は 0.375 mL/min)。
5. バッフルミキサーの outlet 側から排出された CL4H6-LNP 溶液を回収した (③)。なお、送液開始後 5 秒間に得られた CL4H6-LNP 溶液は廃棄することとした。
6. ③ 500 µL を取り、外水相を D-PBS(-) 1L に置換した後、4°C で 2 時間以上かけて透析した (④)。

粒子径/粒度分布、PDI の測定

調製した④ 50 µL を測定用セルに入れ、測定した。

ゼータ電位の測定

1. 調製した④ 2 μL に、10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.40) 98 μL を加えて希釈した (⑤)。
2. 測定用セルにあらかじめ 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.40) 650 μL を入れた。セルの中央下部に⑤ 100 μL を入れ、測定した。

封入率の測定

1. 以下の試薬を調製した。
Triton(+): 10% (w/v) TritonX-100 水溶液及び Ribogreen の DMSO 溶液を適量取り、10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.40) で希釈して、それぞれ 0.2% (w/v) 及び 0.125% (v/v) 溶液とした。
Triton(-): 10% (w/v) TritonX-100 水溶液を適量取り、10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.40) で希釈して、0.2% (w/v) 溶液とした。
2. 検量線法による外部標準として、siRNA の 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.40) 溶液 (500、250、125、62.5、31.25 及び 0 ng/mL) を調製した。
3. 試料溶液として、④ 適量を 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.40) で希釈し、siRNA 濃度として約 400 ng/mL となるよう調製した。
4. 96 ウェル マイクロプレートに以下を 2 ウェルずつ充てんした。
 - ・ 試料溶液 100 μL 及び Triton(+) 100 μL : (A)
 - ・ 試料溶液 100 μL 及び Triton(-) 100 μL : (B)
 - ・ 外部標準液それぞれ 200 μL
5. このマイクロプレートを、シェーカーを用いて混合した (室温、700 rpm、30 秒)。
6. 各ウェルの蛍光強度を測定した (励起光: 500 nm、蛍光: 250 nm)。各検体の蛍光強度は各ウェルの平均値を採用し、外部標準液から得た検量線を用いて、(A) 及び (B) の siRNA 濃度を求めた。
7. 以下の計算式に基づき、封入率 (%) を算出した。
封入率 (%) = $\left[\frac{\{(A) \text{の siRNA 濃度}\} - \{(B) \text{の siRNA 濃度}\}}{\{(A) \text{の siRNA 濃度}\}} \right] \times 100$

pKa の測定

1. 以下の緩衝液を調製した。
pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5:
無水クエン酸又はクエン酸水和物、塩化ナトリウムを水に溶かし、5M NaOH 水溶液で pH を調整して、20 mM クエン酸緩衝液 (150 mM NaCl 含有) とした。得られた緩衝液は孔径 0.22 μm の滅菌ろ過フィルターを用いてろ過し、冷蔵保存した。
pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0:
リン酸一水素ナトリウム、塩化ナトリウムを水に溶かし、5M NaOH 水溶液で pH を調整して、20 mM リン酸緩衝液 (150 mM NaCl 含有) とした。得られた緩衝液は孔径 0.22 μm の滅菌ろ過フィルターを用いてろ過し、冷蔵保存した。
pH 8.5、9.0、9.5:

トリスヒドロキシメチルアミノメタン、塩化ナトリウムを水に溶かし、5M 塩酸で pH を調整して、20 mM Tris 緩衝液 (150 mM NaCl 含有) とした。得られた緩衝液は孔径 0.22 μm の滅菌ろ過フィルターを用いてろ過し、冷蔵保存した。

2. ④ 適量を取り、生理食塩水を用いて CL4H6 濃度として 0.5 mM となるよう調製した。
3. 4. 96 ウェル マイクロプレートに以下を 2 ウェルずつ充てんした。
 - ・ 2. で調製した試料溶液 12 μL
 - ・ 1. で調製した緩衝液 187.75 μL
 - ・ 0.6 M TNS 水溶液 0.25 μL
4. このマイクロプレートを、シェーカーを用いて混合した (室温、800 rpm、30 秒)。
5. 各ウェルの蛍光強度を測定した (励起光: 331 nm、蛍光: 447 nm)。各 pH の蛍光強度は各ウェルの平均値を採用した。
6. 最も蛍光強度が低かった pH の測定結果を Blank とし、各 pH の測定結果から差し引いた (0%)。最も蛍光強度が高かった pH の測定結果を 100% として、各 pH の測定結果をプロットした (縦軸: 蛍光強度 (正電荷荷電率に対応)、横軸: pH)。50% 荷電率を示す pH を pKa とした。

生物活性 (siRNA による凝固第VII因子のノックアウト活性) の測定

1. ④ 適量を取り、D-PBS(-)を用いて siRNA 濃度として 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調製した。
2. 雌性 ICR マウス (4 週齢、3 例/群) に、siRNA 濃度として 0 (D-PBS(-)) 又は 0.01 mg/kg を静脈内投与した。なお、投与液量が約 10 mL/kg となるよう、必要に応じて試料溶液を希釈した。
3. 投与 24 時間後に心から採血し、ヘパリン処理した。これを遠心し (4°C、800 \times g、5 分)、血漿を分離した。
4. Biophen FVII chromogenic assay kit を用いて凝固第VII因子活性を測定した。測定結果は 0 mg/kg 群 3 例の平均値を 100% とし、それぞれ百分率で算出した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なる御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室教授 原島秀吉先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、長時間にわたり繰り返し議論をして頂くと共に、的確かつ有益な御指導、御助言を頂きました、元 北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室准教授・秋田英万先生（現 千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室教授）、元 北海道大学大学院薬学研究院 未来創剤学研究室特任准教授・梶本和明先生（現 国立研究開発法人産業技術総合研究所 健康工学研究部門 バイオマーカー診断研究グループ主任研究員）、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室助教・中村孝司先生、元 北海道大学大学院薬学研究院未来創剤学研究室特任助教・櫻井遊先生（現 千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室特任助教）、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室助教・佐藤悠介先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室准教授・山田勇磨先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、データ取得に協力頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 薬剤分子設計学研究室・岡部奈々さん、山田小春さんに深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、流路製造装置を提供頂きました、北海道大学大学院工学研究院 生物機能高分子分野 分子機能化学分野 生物計測化学研究室教授・渡慶次学先生に深く感謝申し上げます。

本論文を審査頂き、有益なご助言を頂きました、北海道大学大学院薬学研究院 臨床病態解析学研究室教授・武田宏司先生、北海道大学大学院医学研究科 レギュラトリーサイエンス部門評価科学分野教授・荒戸照世先生に深く感謝申し上げます。

研究室を訪れるたびに温かく接し、議論させていただいた、薬剤分子設計学研究室の皆様へ感謝致します。

日々激務の中で、研究にあたる機会と時間をいただくとともに、日々議論させていただいた独立行政法人医薬品医療機器総合機構 新薬審査第三部及び規格基準部の皆様、ナノ医薬品 WG の皆様、その他関係の皆様へ感謝申し上げます。

最後に、ここまで育て、研究にあたり有形無形のサポートをしてくれた両親と家族、研究にあたる時間を与え、心の支えになってくれた妻に感謝申し上げます。

平成 30 年 7 月 竹田 寛