

ナノメディシンの物性評価と レギュラトリーサイエンス：高分子ミセルの例から

北九州市立大学 国際環境工学部*

櫻井和朗*

Characterization of nanomedicine in terms of regulatory science perspective

Liposomes and polymeric micelles containing a biologically active compound or polymers bearing pro-drug at their side chains can be categorized into “nanomedicines”. The size of the nanomedicines is in the range of 1 -100 nm and the size is essential to induce biological efficacy such as biodistribution. Characterizing their accurate structures and properties, which is required by FDA, is important in terms of CMC. We presume that light or X-ray static scattering combined with a fractionation tool by use of gel or filed flow meet such demand.

生理活性物質を内包したリポソームや高分子ミセルなどの DDS 製剤は、ナノメディシンに分類できる。ナノメディシンは従来の低分子医薬に比べてはるかに大きく数十から数百ナノメートルである。ナノメディシンではその大きさに起因するさまざまな生体反応が現れる。したがってナノメディシンの構造や物性を正確に測定することは、レギュラトリーサイエンスの観点からも重要である。従来、使われてきた動的散乱法は不正確であり、FDA が要求する統計的で絶対的な値を簡便に測定できる方法が求められている。筆者らは、光や X 線による静的散乱法とゲルや流動場による分画法を用いた装置が、この要求を満たすと考えている。本稿では、筆者らの最近の例を用いて静的散乱法の有用性を示す。

Kazuo Sakurai*

Keywords: DDS, nanomedicine, regulatory science, CMC, scattering

1. ナノメディシンとレギュラトリーサイエンス

生理活性物質を内包したリポソームや高分子ミセルなどの DDS 製剤は、ナノメディシンに分類できる。ナノメディシンの定義であるが、レギュラトリーサイエンスの観点からは、2017年に FDA から製薬メーカー向けの規則案の説明として、“Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials”¹⁾ が出された。これらの資料によると、大きさが1~100 nm の範囲に入っている、そのサイズに起因した生理的な効果を示す材料は、すべてナノテクノロジーを利用した薬剤で

ありメディシンに入るとしている¹⁾。カーボンナノチューブのようにその大きさや形に起因する毒性を示すことがあり、FDA は注意を喚起している。図1は、D’Mello らの論文に報告されている FDA でのナノメディシンの承認件数の経年推移である²⁾。2005年から2015年までで倍増しており、近年はそれ以上にナノメディシンの承認件数が増加している。承認されたナノメディシンの粒子径の大きさは10~300 nm が圧倒的に多い。これは、腎排泄を抑えるため10 nm 以上、脾臓などのマクロファージや肝臓のクッパー細胞などに捕捉されないために、200 nm 程度以下である必要があることによる。ナノメディシンを開発し製造する CMC (Chemistry, Manufacturing and Controls) には、製剤の「同等性」をどの物性で保証するかという課題が常につきまとう。無論、審査段階によっ

* Department of Chemistry and Biochemistry,
University of Kitakyushu
〒808-0135 北九州市若松区ひびきの1-1
1-1 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Fukuoka 808-0135, Japan

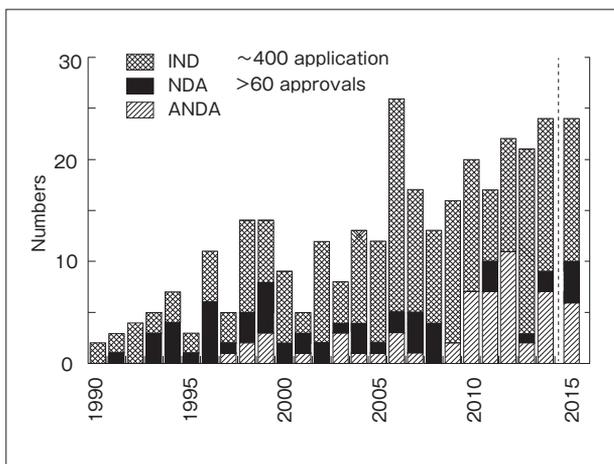


図1 アメリカFDAへのナノメディシンの申請件数の推移

IND: Investigational New Drug Application (臨床試験前に行う新薬の安全性に関する審査)、NDA: New Drug Application (アメリカ国内で新薬市場販売許可を得るためにFDAに提出する最終書類、薬剤開発過程で得た情報の集大成で、前臨床、臨床データを含むことはもちろん、薬物自体の化学的、薬理学的性格、安定性から副作用まですべての情報を含む)、ANDA: Abbreviated New Drug Application (後発薬を販売するために提出する承認申請)。

てその程度は異なるが、毒性や薬効を調べた試験ロットと実際に製造する製剤ロットが同じであることをどの物性や構造をもとにして保証していくか、ナノスケールがもたらす特異的な特性と薬理活性をどの物性で評価して製品として制御していくかなど。これらの課題は、低分子医薬と比較してナノメディシンでは極めて難しい問題となる。また、ナノメディシンの粒子全体を原薬(API: active pharmaceutical ingredient)と扱うのか、最終の製剤(Drug product)として扱うのかで分析の方法が異なってくるが、低分子の製剤と異なり、ナノメディシンの中にはどのように考えてよいのか判然としないものもある³⁾。かつては、粒子の大きさの指標となる極限粘度を測定するだけでよい時代があったが、最近の規制当局からの文書^{4,5)}を読むと、会合数や大きさ、それらの分布などを測定する必要がある。また、どの物性や大きさが生理活性と結びついているかを明らかにする必要がある。安全を保証する科学であるレギュラトリーサイエンスがリスクマネジメントの考えに基づく限り、特性と結びついている物性を最新の測定技術で明らかにする要求は当然である。

2. 分画法と組み合わせた静的散乱法

溶液散乱の静的散乱測定では、散乱光強度 $I(q)$ を散乱角 θ 、もしくは $q=(2\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ で定義される散乱ベクトルの絶対値の関数として測定する(図2A)。ここで λ は光の波長である。粒子間の干渉が無視できる程度の希薄溶液からの光散乱やX線小角散乱の強度 $I(q)$ は、以下の式で重量平均分子量 M_w と関係づけることができる^{6,7)}。

$$I(q) = N(\rho V)^2 S(q) = \frac{M_w}{N_A} c(\rho v)^2 S(q) \quad (1)$$

ここで N 、 V 、 ρ 、 $S(q)$ 、 N_A 、 c 、 v は、それぞれ単位体積中の散乱体の数、1つの散乱体の体積、散乱体の平均電子密度、形状因子、アボガドロ数、重量濃度、比容である。 $S(q)$ は角度零で1となるように規格化されている。小さな q における $S(q)$ の漸近挙動から回転半径 $\langle S^2 \rangle$ (教科書によっては R_g と表記するときもある)が求まり、大きな q の $S(q)$ から散乱体の内部構造に関する情報が得られる。光散乱では、 ρv の積が溶質の屈折率増分として独立に決定できるため M_w が正確に求められるが、 $S(q)$ からは粒子の大きさの指標である $\langle S^2 \rangle$ が求められるのみである。一方、X線小角散乱では、 ρ に関して仮定が必要であるため M_w の決定にやや不確かさが残るが、 $S(q)$ からは原子レベルに至るまでの内部構造に関する情報が得られる。2つの方法ではこのようにそれぞれ短長所があり、双方を相互補完的に組み合わせることで、より正確な分子描像が得られる。ここで強調しておきたいのは、DDSや製剤の業界で広く使われている動的散乱においては、流体力学的半径(R_h)を求めるためにはさまざまな仮定が必要であり、粒子の形状が球体でない場合や多分散などの場合はその仮定が不適切なことがある。一方、静的散乱測定では、分子量と回転半径を求めるためにはモデルや仮定がまったく不必要である。その意味で、これらの値は絶対値といえる。

水溶液からの光散乱測定の最大の実験的障害は、測定対象より大きなゴミである。式(1)が示すように、 $I(q)$ は散乱体の体積の2乗に比例する。大きな

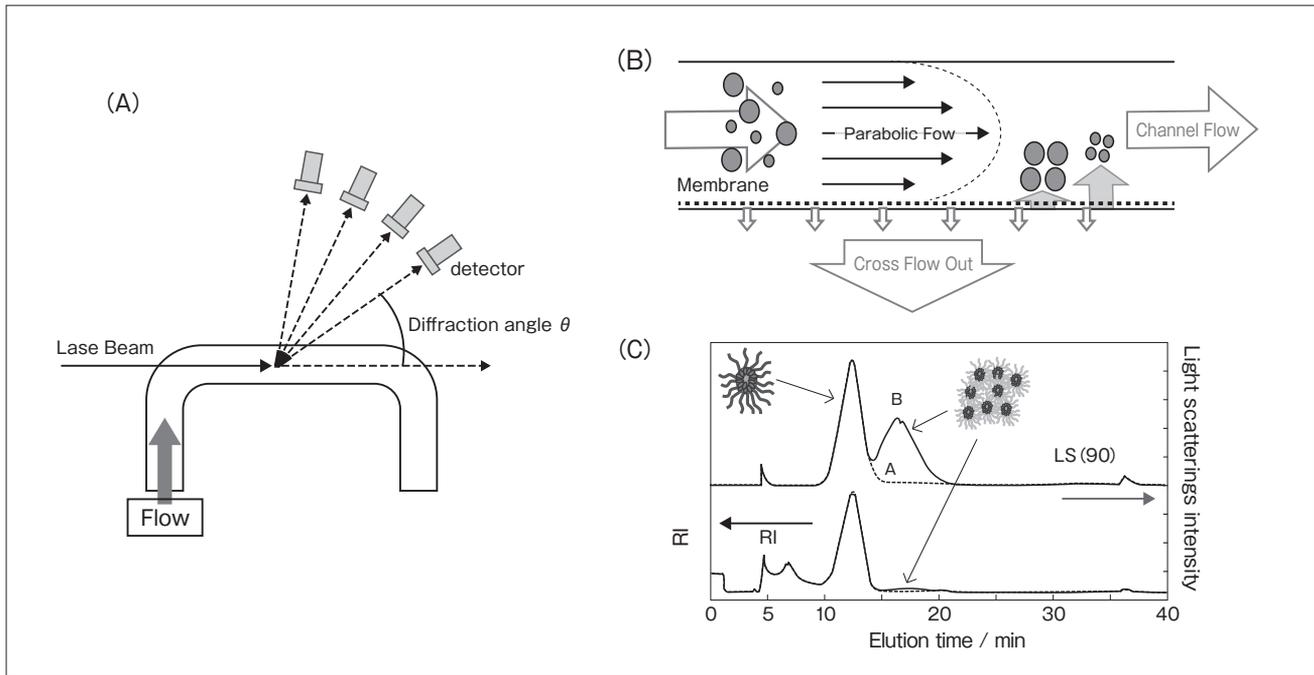


図2 分画装置と組み合わせた静的光散乱の測定原理とその結果の1例

- A: 流動場分画法(FFF)やゲルクロマトグラフ法(GPC)の流出液が流れる流路にレーザー光を入射して、その散乱光を散乱角 θ の関数として測定する静的光散乱。
- B: FFFによる粒子の分画。細い流路に2つの流れ(流路に沿った流れChannel Flowと、下の半透膜を介して垂直に流れるCross Flow)で粒子を大きさによって分ける。大きな粒子はCross Flowによって半透膜に押し付けられるが、小さな粒子は拡散によって上に浮き、それをChannel Flowが押し流す。したがって、大きな粒子から先に流出する。
- C: FFFで測定した高分子ミセルの例。同じ試料を異なるミセル調製法(A: 超音波分散法、B: 透析膜法)でミセルを作成したところ、2次凝集体の量に差が出た。光散乱で2次凝集体を観測するとクロマトの面積比で同程度となるが、屈折率(RI)で観測すると2次凝集体の濃度はたかだか2%程度である。

ゴミがある場合はそれからの散乱が強く、溶質からの散乱強度が観測できないときがある。試料溶液の遠心処理やクリーンルーム内での作業など、正確なデータを得るためには煩雑な操作が必要である。近年、ゲルクロマトグラフ法(GPC)や流動場分画法(FFF)で溶質を流体力学的な大きさで分けた後に、光散乱光度計で連続的に溶離液を測定する装置が利用できる。この装置を使うと厄介な光学精製の問題を解決できる。しかし、低分子ミセルや高分子会合体などは、GPCのゲルカラムによって構造が破壊されるか吸着して溶離してこないため、GPCには向かないとされてきた。高分子ミセルがDDS粒子として研究され始めて長い間、ミセルの会合数が容易に決定できないのはこれらの理由による。一方、FFFでは分離に流動場を使っているためこの吸着の問題を回避できる。図2Bと図2Cに、FFFの原理と高分子ミセルを分画したときのデータを示す。FFFでは、さまざまな粒径サイズをもつ集合体を一箇所に集めた(フォーカス)後に、Cross

Flowを加える。粒径の大きいものは自己拡散速度が小さく、小さな試料の自己拡散速度が大きい特性を利用して、Cross Flowで粒度分布を縦方向に作成する。この粒度分布に中央部分の流速が速いChannel Flowで中央部の粒子から流し出す。流れ出した溶液からの光散乱と屈折率、UV吸収を測定する。図2Cは、高分子ミセルのFFFのクロマトグラムの例である。上段は光散乱90度の強度であり、下段は屈折率から換算した濃度である。光散乱の17分あたりに幅広の流出が観測されるが、屈折率(RI)では検出されない。このピークはミセルの2次凝集体と思われる。2次凝集体のピークは透析法で作成した試料には存在するが、超音波で作成した試料では極めて少ない。まったく同じ材料からでもこのようにミセル作成方法によって2次凝集体の量が異なる。近い将来は、このFFFやGPCを放射光X線と組み合わせて、分画された各フラクションからの散乱測定を行うことが可能となると思われる。最近、分画法と組み合わせた静的光散乱と動的光散乱

で求めたさまざまなナノメディシンの粒径分布を比較した研究例があるので、詳細は文献⁸⁾を参考にしてほしい。

3. 高分子ミセル

筆者らは横山・白石らと共同で、DDSに使われる高分子ミセルの典型的な例である図3の下段に示したポリエチレングリコール(PEG)を親水鎖、ベンジルエステル化アスパラギン酸を疎水鎖にもつブロック共重合体を作る系に関して検討してきた^{9~14)}。系統的に各ブロック鎖の重合度、疎水鎖のベンジル化率を変化させた30種類近い試料を合成し、FFFと組み合わせた静的な光散乱法から高分子ミセルの分子量を求めた。あらかじめ調べておいたブロック共重合体の分子量で割ることで、ミセルの会合数(N_{agg})を求めた。 N_{agg} を決定する最も大きな因子を検討したところ、疎水鎖のベンジル化率であることが判明した。すなわち、疎水鎖の疎水性を

わずかに変化させることで凝集力が変化し会合数が変わることがわかった。高分子の物理によると、疎水鎖の分子量が大きくなると会合数が増加すると予測されるが、図3に示してあるようにその影響はベンジル化率に比べてはるかに小さい。会合数はミセルの体積と比例関係にあり、会合数が1000倍になるとミセルの半径は10倍になる。Cabralら¹⁵⁾によると、がんの種類によっては高分子ミセルの半径が30と100nmで集積度合いが大きく異なる。もしこのような微妙な大きさに薬剤の動態を制御しようとする、ベンジル化率85%あたりはほんのわずかな差でミセルの大きさが異なり、最終製剤の大きさの制御が難しくなると考えられる。

SAXS(X線小角散乱法)ではさらに詳細な構造解析が可能となる。疎水鎖の重合度が同じでベンジル化率が異なる(上から77、81、89%)の3試料について、散乱強度を q に対してプロットした(図4)。これらの散乱プロファイルは以下の3つの典型的な球状ミセルの特徴をもつ。①散乱強度が $q \rightarrow 0$ で一

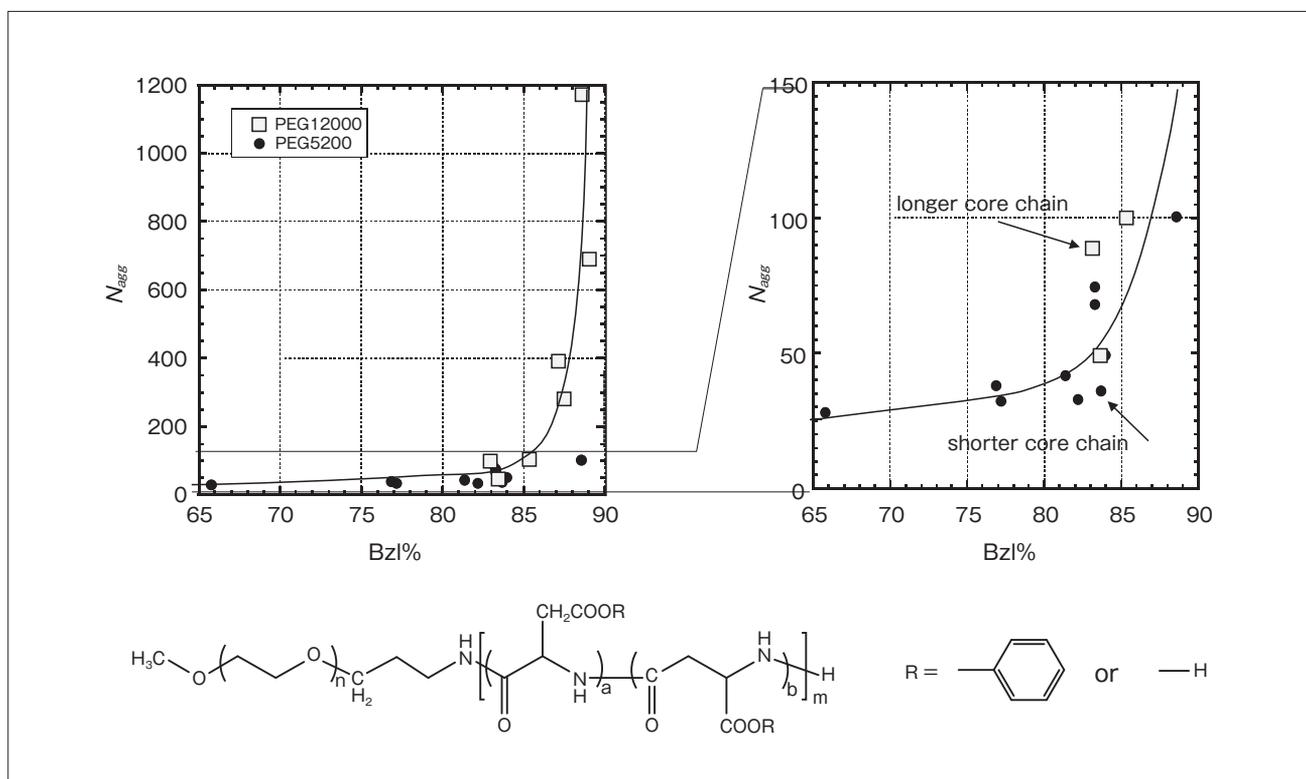


図3 会合数のベンジル化率(Bzl%)の依存性

左図の低い会合性の部分を拡大したのが右図。同じベンジル化率で比較をすると内殻鎖の長い高分子鎖が大きな会数を示す。ポリエチレングリコール・ベンジルエステル化アスパラギン酸からなる高分子ミセルの会合数(N_{agg})を静的光散乱から求め、疎水鎖のベンジル化率でプロットした。疎水鎖の重合度による会合数の変化はわずかである。下は用いた高分子の化学構造。

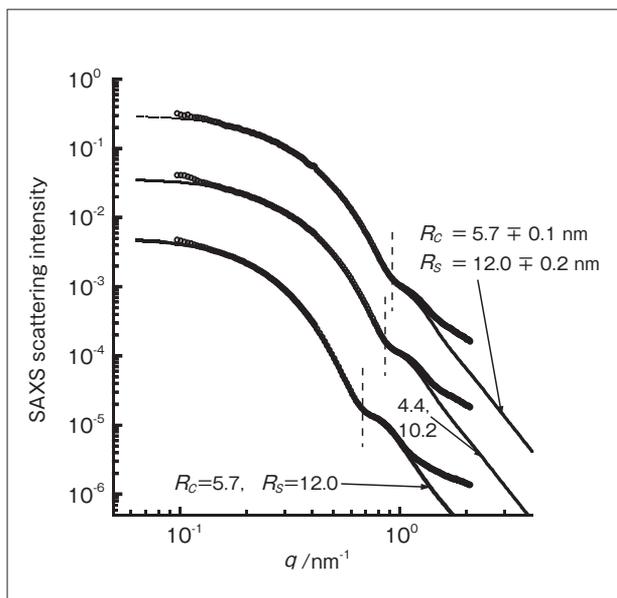


図4 ポリエチレングリコール・ベンジルエステル化アスパラギン酸からなる高分子ミセルのX線小角散乱(SAXS)の測定例とコア・シェルモデルから計算した理論値の比較
試料は同じ疎水鎖の長さでベンジル化率が異なる。散乱強度は比較のために縦軸に平行移動させてある。

定値に収束する。②散乱強度が $q \sim 0.2 \sim 0.4 \text{ nm}^{-1}$ では急激な減少を見せる。③図中破線で示す肩が見られる。低 q 領域から回転半径が求められる。1番目と2番目の山の間の折れ曲がりの位置 q^* (谷の q 値) は、剛体球の半径 (R) と $Rq^* = 4.493 \dots$ の関係があり、 q^* の減少はベンジル化率の増加に伴う R の増加を意味している。2つの同心球からなるコア・シェルモデルに基づいて、最も実験値と一致する理論線(図4の細かい実線)を計算した。そのときに使った内殻と外殻の半径を、それぞれ R_c と R_s として図4に示す。理論線は実験結果をうまく説明している。また、それらの値は $\pm 2 \sim 1 \%$ 程度の優れた精度で決定できる。

4. 界面における PEG 鎖の密集度合い

SAXS と FFF/SLS を組み合わせると、会合数や内殻と外殻の半径が精密に求めることができる。これらの値をもとに高分子ミセルの PEG 鎖の密集度合いを定量的に議論することが可能となる。平らな表面上での鎖の混み具合は、溶液中で孤立している自由鎖の大きさと、平らな表面で鎖1本に配分される表面積を比較することで議論できる。「自

由鎖の断面積」を「ミセルの内殻上で配分された面積」で割った値が1以下のとき、鎖はお互いに接触しておらず孤立している。4以下ではある程度接触し鎖間の重なりが起こり始める。4~10では鎖は互いに混みあい、形状も球状から伸びた形をとる。Svaneborg らはこの考えを高分子ミセルのシェル鎖に拡張し、内殻と外殻の界面における PEG 鎖の混雑度 σ を次式で表した。

$$\sigma = \frac{N_{agg} \pi (R_{g,PEG})^2}{4 \pi (R_c + R_{g,PEG})^2} \quad (2)$$

ここで $R_{g,PEG}$ は PEG 一本鎖の溶液中での回転半径で、分子量が5000の PEG では3 nm である。この式を使って σ を正確に計算するためには、会合数 N_{agg} と内殻の半径 R_c を正確に見積もる必要がある。図3で示した PEG/アスパラギン酸の高分子ミセルに関して σ を求めると、疎水鎖のベンジル化率が高くなるにつれて1から3まで変化した。 σ が内殻と外殻の界面における PEG の混雑度を表すのに対して、水と外殻の界面での PEG の混雑度 D_{os} は以下の式で書ける。図5 A には式2と3で定義される2つの PEG 鎖の混雑度を模式的に示した。

$$D_{os} = \frac{N_{agg} \pi (R_{g,PEG})^2}{4 \pi (R_c)^2} \quad (3)$$

一方、ミセルの安定性には物理的な安定性と血中での安定性がある。物理的な安定性とは、生体内にミセルを入れたときに、浸透圧ショックやタンパク質との相互作用に対してミセルが構造を保ち得るかどうかである。横山らの研究では^{14,16)}、ミセルの物理的な安定性は、ゲルカラムにミセル溶液を通過させたときの回収率(流入時と流出時の濃度比: c_{out}/c_{in})で評価できる。筆者らは、この c_{out}/c_{in} が式2で求めた σ と極めてよい相関があることを見出した(図5 B)。大きさがほぼ同じ高分子ミセルで PEG 鎖の混雑度が異なるミセルを作成し、血中での濃度を測定した。AUC(時間曲線下面積)で高分子ミセルの血中濃度を表記して、 σ と D_{os} に対する相関を比較したところ、 D_{os} に対して最もよい相関

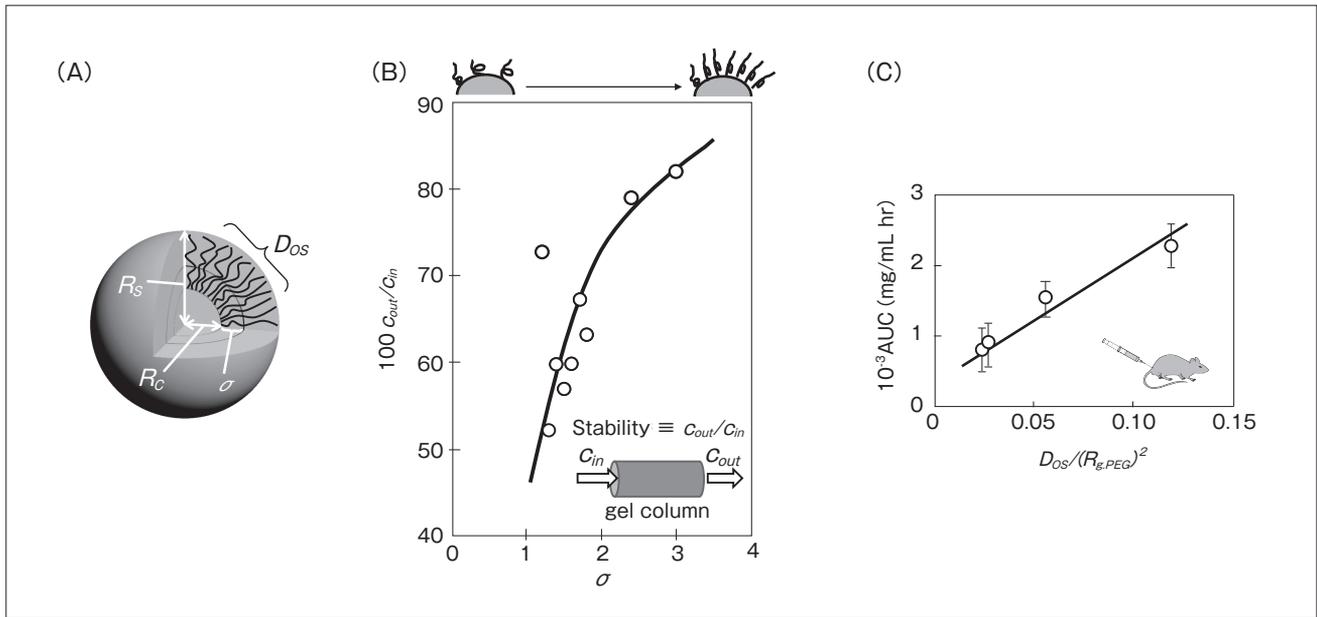


図5 高分子ミセルのPEG鎖の混雑度と安定性

A: 高分子ミセルにおける内殻と外殻の界面でのPEG鎖の混雑度 σ と溶媒と外殻最表面での混雑度 D_{os} の説明。
 B: カラム(TOSO G4000 PWXL)を通過させたときの回収率である c_{out}/c_{in} と σ の関係。
 C: 高分子ミセルを静脈注射したときのマウスの血液内の滞留性(AUC:時間曲線下面積)と D_{os} の関係。

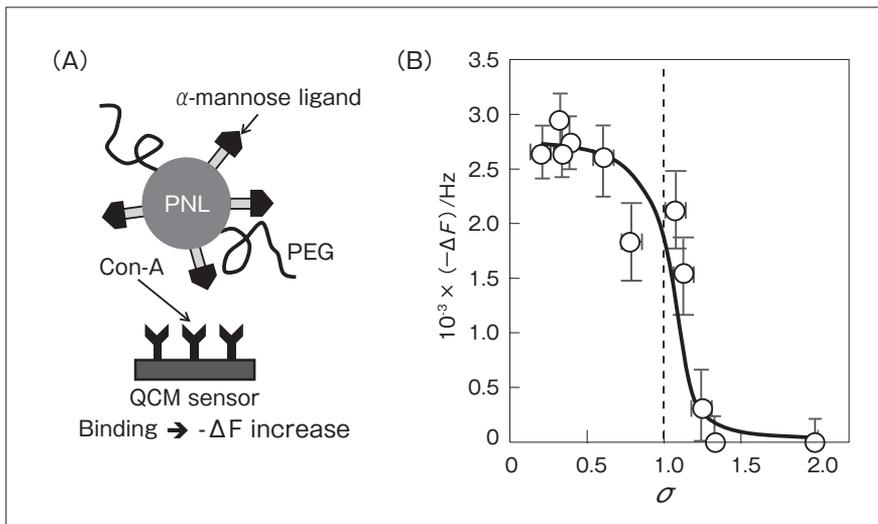


図6 ナノ粒子の表面にPEG鎖とマンノースを修飾した場合の被認識能とPEG鎖の混雑度の関係

A: 水晶振動子マイクロバランス(QCM)を用いたマンノースを修飾したナノ粒子とコンカナバリンA(Con-A)との相互作用を調べる系の模式図。
 B: QCMの振動数変化を σ に対してプロットした図。

を得た。物理的安定性、特にゲルを通過させたときの回収率で安定性を評価した場合は、内殻の疎水面を親水鎖でどれだけ覆うことができるかによって安定性が決まると考えられる。したがって、内殻と外殻の界面におけるPEGの混雑度を表す σ とよい相関があることは理解できる。また、血中での安定性は、血清タンパク質が高分子ミセルに吸着して食細

胞に取り込まれやすくなることに関係していると考えられる。したがって、溶液と外殻の界面でのPEG鎖の混雑度である D_{os} とよい相関があることも理解できる(図5C)。

PEGで覆われた高分子ミセルは、PEGのもたらすステルス効果で生体の免疫系などによるクリアランスを免れることができるが、それ自体では標的臓器への選択性はない。ミセルに標的性を与えるために抗体や特殊な化合物を付加することができる。この場合はPEG鎖との関係を十分に考える必要があ

る。ナノ粒子の表面にマンノースを修飾したPEG化粒子において、そのPEGの混雑度とマンノースの被認識能の関係を水晶振動子マイクロバランス(QCM)で調べた(図6)。マンノースの量をほぼ固定してPEGの混雑度を上げていくと、 $\sigma=1$ を境にして被認識能が下がっていくことがわかる。

5. まとめ

溶液中のナノ粒子の解析として、DLS(Dynamic Light Scattering : 動的光散乱法)が大流行している。おそらく「ボタンを押したら何も考えなくても結果が出る」簡便さがその大きな要因であろう。確かに濃度も気にしないで適当な試料溶液を穴に入れたら一瞬にして粒径と粒径の分布まで綺麗な色付きのグ

ラフで表示される簡便さは魅力である。しかし、綺麗なプロットはデータが正しいことと必ずしも同じではない。かつて研究者は中身がわからないブラックボックスが出すデータは信用しないように教育されてきた。しかし、携帯電話に代表されるように我々の身の回りにはブラックボックスがあまりに増えて、先人からの教えを忘れてしまったようだ。

文献

- 1) FDA, U.S. FDA. *Draft guidance for industry: drug products, including biological products, that contain nanomaterials*. 2017; Available from: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM588857.pdf>
- 2) D'Mello, S.R., *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **12**, 523-529 (2017)
- 3) Emily, M., *et al.*, *AAPS J.*, **20**, 92 (2018)
- 4) FDA. *Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation*. 2018; Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and>
- 5) Use, C.f.M.P.f.H., *Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products*. European Medicines Agency, London, Accessed, 2013. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-joint-ministry-health-labour-welfare/european-medicines-agency-reflection-paper-development-block-copolymer-micelle-medicinal-products_en.pdf
- 6) 柴山充弘ら, 光散乱法の基礎と応用, 講談社サイエンティフィク, 東京 (2014)
- 7) 橋本竹治, X線・光・中性子散乱の原理と応用, 講談社サイエンティフィク, 東京, (2017)
- 8) Caputo, F., *et al.*, *J. Controll. Release*, **299**, 31-43 (2019)
- 9) Akiba, I., *et al.*, *Langmuir*, **26**, 7544-7551 (2010.)
- 10) Sanada, Y., *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 8241-8250 (2012)
- 11) Sanada, Y., *et al.*, *Kobunshi Ronbunshu*, **69**, 346-357 (2012)
- 12) Sanada, Y., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 2574-2582 (2013)
- 13) Shiraishi, K., *et al.*, *J. Controll. Release*, **203**, 77-84 (2015)
- 14) Shiraishi, K., *et al.*, *J. Controll. Release*, **234**, 59-67 (2016)
- 15) Cabral, H., *et al.*, *Nat. nanotechnol.*, **6**, 815-823 (2011)
- 16) Nakanishi, T., *et al.*, *J. Controll. Release*, **74**, 295-302 (2001)