

博 士 論 文

疾患細胞指向性リポソームによる 治療薬の開発に関する研究

平成 27 年度

崇城大学 大学院工学研究科
応用生命科学専攻 博士課程
医用生体工学講座

1419D03

山 崎 周 一

目 次

第 1 章 緒論	- 1
第 2 章 ハイブリッドリポソームの膜物性	- 12
2-1 序	- 12
2-2 実験	- 13
2-2-1 試料	- 13
2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	- 14
2-2-3 動的光散乱法による膜直径の測定	- 15
2-3 結果と考察	- 16
2-3-1 ハイブリッドリポソームの膜物性	- 16
2-4 総括	- 21
第 3 章 ハイブリッドリポソームのヒト乳がん細胞皮下移植 モデルマウスに対する治療効果	- 22
3-1 序	- 22
3-2 実験	- 23
3-2-1 試料	- 23
3-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	- 23
3-2-3 使用細胞	- 23
3-2-4 使用動物	- 23
3-2-5 飼育条件	- 23
3-2-6 ヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスの作製法	- 24
3-2-7 ヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験	- 25
3-2-8 CD34 免疫染色による皮下腫瘍組織切片観察	- 25
3-3 結果と考察	- 26
3-3-1 ハイブリッドリポソームのヒト乳がん細胞皮下移植 モデルマウスに対する治療効果	- 26
3-3-2 CD34 免疫染色による血管新生抑制効果	- 34
3-4 総括	- 38

第 4 章 ハイブリッドリポソームの血管新生抑制メカニズム	- 39
4-1 序	- 39
4-2 実験	- 40
4-2-1 試料	- 40
4-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	- 40
4-2-3 使用細胞	- 40
4-2-4 細胞毒性試験	- 40
4-2-5 管腔形成抑制試験	- 41
4-2-6 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 産生抑制試験	- 42
4-3 結果と考察	- 44
4-3-1 ハイブリッドリポソームの管腔形成抑制効果	- 44
4-3-2 ハイブリッドリポソームの VEGF 産生抑制効果	- 50
4-4 総括	- 52
第 5 章 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスに対する ハイブリッドリポソームの治療効果	- 53
5-1 序	- 53
5-2 実験	- 54
5-2-1 試料	- 54
5-2-2 ハイブリッドリポソームの調製	- 54
5-2-3 使用動物	- 54
5-2-4 飼育条件	- 54
5-2-5 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスの作製法	- 54
5-2-6 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスに対する治療実験	- 55
5-2-7 スコア法による評価	- 56
5-2-8 HE 染色による組織切片観察	- 57
5-2-9 サフラニン O 染色による組織切片観察	- 57
5-2-10 免疫染色による組織切片観察	- 58

5-3	結果と考察	- 59
5-3-1	コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスの作製	- 59
5-3-2	コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスに対する治療効果	- 61
5-3-3	ハイブリッドリポソームの関節リウマチ治療メカニズム	- 68
5-4	総括	- 75
第 6 章	ハイブリッドリポソームを上市する際の戦略的考察	- 76
6-1	序	- 76
6-2	新薬事業における業界環境調査	- 77
6-2-1	業界環境調査における前提条件・制約条件	- 77
6-2-2	業界外部環境調査	- 78
6-2-3	内部環境調査	- 80
6-2-4	外部要因と内部要因の統合	- 80
6-2-5	イノベーション指向の戦略調査	- 82
6-3	結果と考察	- 85
6-3-1	新薬事業 環境調査結果	- 85
6-3-2	新薬事業 戦略論	- 88
6-4	総括	- 91
第 7 章	総論	- 93
	参考文献	- 99

第1章 緒論

人類の歴史は「疾病との戦い」の歴史であり、「医療の進化」の歴史である。有史以前から人類は様々な疾病を患い、そしてその一部を克服し、このことが医療の進化をもたらして来た。しかし医療の発達した現在においても鎮静化した疾病はあるものの、まだまだ人類を脅かす疾病も多く存在している。その中でも「がん」のように元は自己の正常な細胞が何らかの影響により遺伝子変異が起きることでがん腫瘍となるものや、自己免疫が何らかの原因でそのバランスが大きく狂い自己を攻撃し続けることで発症する「関節リウマチ」がある。これらの疾病は、元は自己細胞・自己免疫であるため薬剤等による差別化攻撃が難しい場合や単純には効果の出ない場合が多い。またがん細胞に至っては、自己免疫から逃れる手段や自己免疫を味方につける手段さえ内在していると思われる。人それぞれ性格が異なるようにこれらの疾病もバラエティに富んでいて、複雑な多様化の進化を果したものであると考えられる。

「がん」は死を誘導する遺伝子変異による疾病であり、日本においてはがん死亡者数およびがん罹患者数は増加の傾向にある。1975年では、総人口およそ1億1千百万人に対して、がん死亡者数およそ13.6万人、がん罹患者数およそ20.6万人であった。これと比較して2011年では、総人口およそ1億2千6百万人に対して、がん死亡者数およそ35.7万人、がん罹患者数およそ85.1万人であり、36年間でがん死亡者数約2.6倍、がん罹患者数約4.1倍となった^{1,2)}。

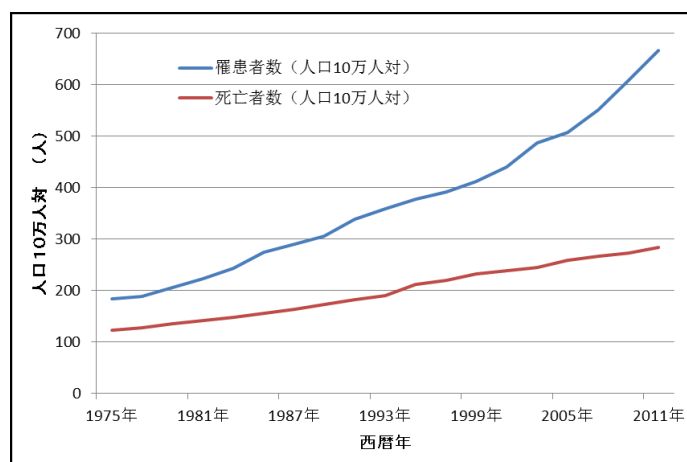


Fig. 1-1 日本におけるがん死亡者数・がん罹患者数推移²⁾

がん死亡者数・がん罹患患者数推移を Fig. 1-1 に示す。今後、日本の総人口はゆるやかな減少傾向に向かう。これと対比して がん死亡者数および がん罹患患者数はしばらくの期間は増加する見込みである。従って、人口 10 万人に対するがん死亡者数および がん罹患患者数は増え続けることになると思われる。

がんの治療法は、手術・放射線・薬物療法が 3 大療法である。手術・放射線療法は局所制御に優れているものの、がん細胞が体中に散らばっている場合は効果が得難い。薬物療法は薬剤に耐性となった細胞が残ることにより、薬剤の効果が持続しないという欠点がある。いずれの治療法にしても副作用の影響は重大であり、十分に考慮していかなければならない課題である。

がん細胞は自己の正常細胞の遺伝子が何らかの影響で変異を起こし、不死化や無秩序な増殖性を有する がん細胞となるが、このがん細胞の生物学的特徴をまとめると Table 1-1 のようになる。このなかで ①無秩序な増殖性 ③血管新生に関しては、現在抗がん薬・抗血管新生薬がある。②増殖抑制からの回避 ⑦遺伝子の不安定性と遺伝子変異 ⑩アポトーシス（細胞死）への抵抗性 のいずれにも関与しているものに p53 がん抑制遺伝子の異常がある。⑥不死化にはテロメラーゼ酵素が関与している。⑧免疫細胞の攻撃からの回避には免疫チェックポイントタンパクが関与している³⁾。

Table 1-1 がんの生物学的特徴とその原因³⁾

	がんの生物学的特徴	原 因
①	無秩序な増殖性	増殖因子と受容体シグナル伝達
②	増殖抑制からの回避	p53, RB などのがん抑制遺伝子異常
③	血管新生	VEGF, PDGF などの血管新生因子
④	浸潤や転移	TGF- β と EMTメタロプロテアーゼ腫瘍間質反応
⑤	がんを進行させる炎症	細菌感染とウイルス感染、NF- κ B 活性化
⑥	不死化	テロメラーゼ
⑦	遺伝子の不安定性と遺伝子変異	p53 と 遺伝子修復酵素の異常 ヒストンタンパクの異常
⑧	免疫細胞の攻撃からの回避	制御性T細胞と骨髄由来免疫制御マクロファージ 免疫チェックポイントタンパク
⑨	細胞エネルギー代謝の異常	解糖系の異常亢進とミトコンドリア機能異常
⑩	アポトーシスへの抵抗性	p53 異常、アポトーシス系の異常

このように がん細胞が正常細胞と異なる特徴としては、無制限な増殖能を有すること、その背景としてアポトーシスや増殖抑制のシグナルを受けにくいこと、エネルギー代謝が異常であること、周囲の組織を破壊しながら浸潤あるいは血管やリンパ管を介して転移を起こすこと、免疫細胞からの攻撃を回避する能力を持つこと、などが挙げられる。従って、がん細胞は強力な生存力を身に付けた細胞であると言わざるを得ない。

血管新生とは、既存の血管を基盤として新しく血管網を形成する生理的現象のことである。ヒト成体においては、創傷治癒の過程や子宮内膜等以外では通常あまり発現しない。一般的には、血管新生は がん腫瘍、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、心筋梗塞等における虚血改善等の疾病に発現するとされている。

がん細胞は正常細胞と比較して、細胞エネルギー代謝異常のため多くの酸素や栄養素を必要とする。そのため血管新生現象が発現しなければ、がん腫瘍は 2～3 ミリの大きさが限界と言われている。がん腫瘍は 2～3 ミリの大きさでは、十分な低酸素状態である。がん細胞内に存在する転写因子の低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor、HIF)-1 α は、通常タンパク質分解酵素プロテアソームにより分解され細胞核内に入ることはない。しかし低酸素状態で HIF-1 α は細胞核内に移行し、低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor、HIF)-1 β と結合することで目的遺伝子の転写を促進する。(Fig.1-2) このとき産生されるタンパク質の 1 つが血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) -A である^{4,5)}。新生血管形成には、この VEGF システムが中心的役割を果たすことが明らかになってきた⁶⁻⁸⁾。

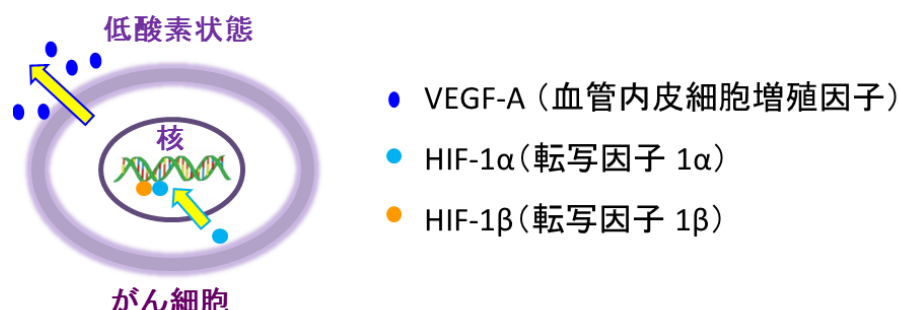


Fig. 1-2 がん細胞における VEGF-A 産生に関する HIF-1 の関与

血管新生現象の概要を Fig. 1-3 に示す。VEGF-A は血管内皮細胞に存在するレセプターである血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR-2）に結合して、血管内皮細胞を活性化させる。活性化した血管内皮細胞はタンパク質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP：Matrix Metalloproteinase）を分泌して基底膜を分解し、血管内皮細胞の増殖と遊走を促進する。このようにして がん腫瘍に新生血管が伸び、酸素・栄養素の供給が継続していく。

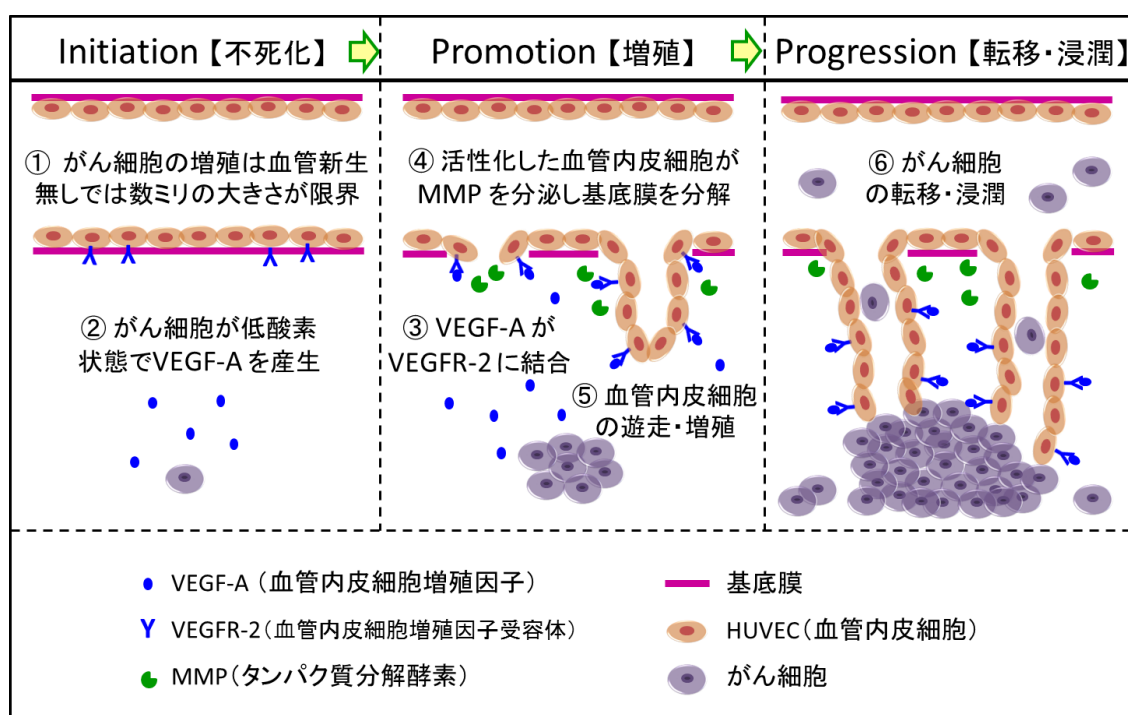


Fig. 1-3 がん腫瘍における血管新生現象の概要

がん腫瘍における血管新生現象を抑制することは、がん細胞の増殖を抑制する働きとなる。がん自体の治療法としては抗がん薬を含めた 3 大療法が基盤となるが、この血管新生現象を抑制することが可能な薬剤が開発されれば、現在の がん治療法に大きく補完すると考えられる。抗がん薬とマッチングした抗血管新生薬の開発が期待される場所である。加えてこれらの薬剤は、患者様の QOL (Quality of Life) を十分に維持するため、副作用の少ない薬剤として研究・開発すべきと考える。

関節リウマチ（Rheumatoid Arthritis：RA）は膠原病の1つであり、臨床的にはリウマチ性疾患、病因論的には自己免疫疾患、病理学的には結合組織疾患を併せ持つ疾患である⁹⁾。また、RAは自己免疫異常に伴い関節滑膜を炎症の主体とする慢性の多関節炎とこれによる骨・関節破壊を特徴とする疾患である（Fig.1-4）。罹患者数は人口のおよそ1%におよび、発症年齢は若年から高齢者まで幅広く、中でも30～50歳代の働き盛りに多く¹⁰⁾（Fig.1-5）、女性は男性に比べ約2～3倍発症し易いことが知られている。骨・関節破壊は放置すると進行して関節の構造が破壊され、その機能を失うことから著しい日常生活の制限がもたらされる。以前は、関節破壊は疾病期間が長くなるとともに次第に進行すると考えられていたが、1989年に発症後2年以内に急速に関節破壊が進行することが明らかとなった¹¹⁾（Fig.1-6）。その後、これまでの抗リウマチ薬と比較して骨・関節破壊を抑える効果の強いメトトレキサート（MTX）が登場した。関節リウマチと診断された患者様は、副作用の心配からMTXが使用できない場合を除けば、原則的にMTXで治療を開始することがグローバルにおける標準的な治療ガイドラインとなっている。

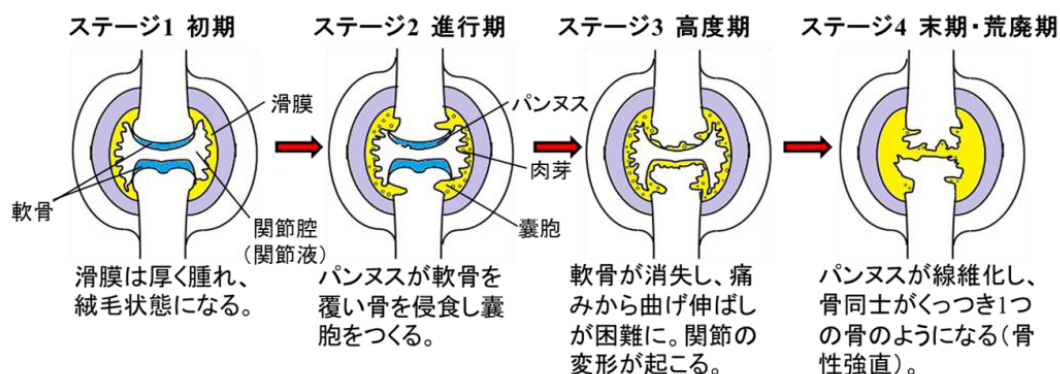


Fig. 1-4 関節リウマチの進行（ステージ1～ステージ4）

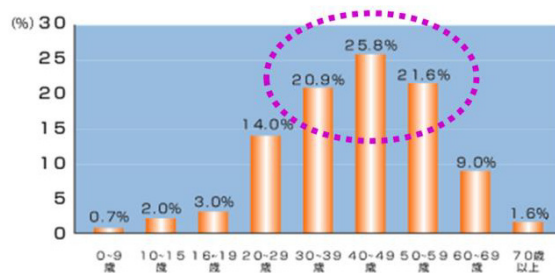


Fig. 1-5 発症年齢分布¹⁰⁾

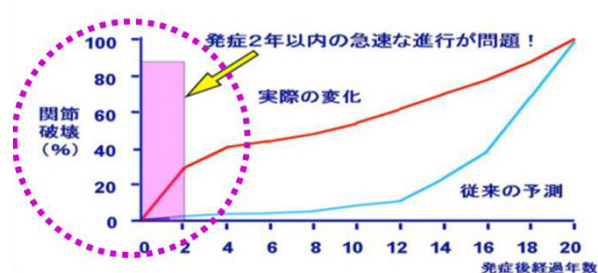


Fig. 1-6 発症から関節破壊に至る期間¹¹⁾

RA の 4 大治療法は、薬物療法、外科的療法、リハビリ療法、基礎療法（教育）である。薬物療法は臨床薬を用いて治療する方法である。外科的療法^{12,13)}は炎症の主座である関節滑膜を除去する滑膜切除手術、破壊が進行した関節の機能を再建する人工関節置換手術、固定した方が良い関節の固定手術に分けられる。リハビリ療法は痛みや腫れを軽くする物理療法、筋力をつけ関節を動かす能力を保持・改善する運動療法、関節の機能を改善し日常生活の動作を良く出来るようにする作業療法、不安定な関節を安定させ変形を予防する装具療法がある。基礎療法は患者様自身が毎日の暮らしの中で留意点をしっかり守り生活をしていく療法のことで、具体的には RA に関する正しい知識を得る、適度な運動と安静の維持、規則正しく栄養バランスの良い食事、冷えや湿気への対策などが指導・教育されている。そしてこれらの 4 大療法を用いて患者様にマッチングした治療法を、医師・看護師・薬剤師・栄養士・理学療法士・ソーシャルワーカー・患者様家族・患者様それぞれの立場から連携確立していくことが重要な時代となって来ている。

RA の薬物療法は、RA と診断されたら MTX を服用することからスタートする。RA 治療ガイドライン¹⁴⁾は Phase I・Phase II・Phase III から構成され、これを用いて最長 2 年以内に患者様に最適な治療方針を決定する¹⁵⁾(Fig.1-7)。

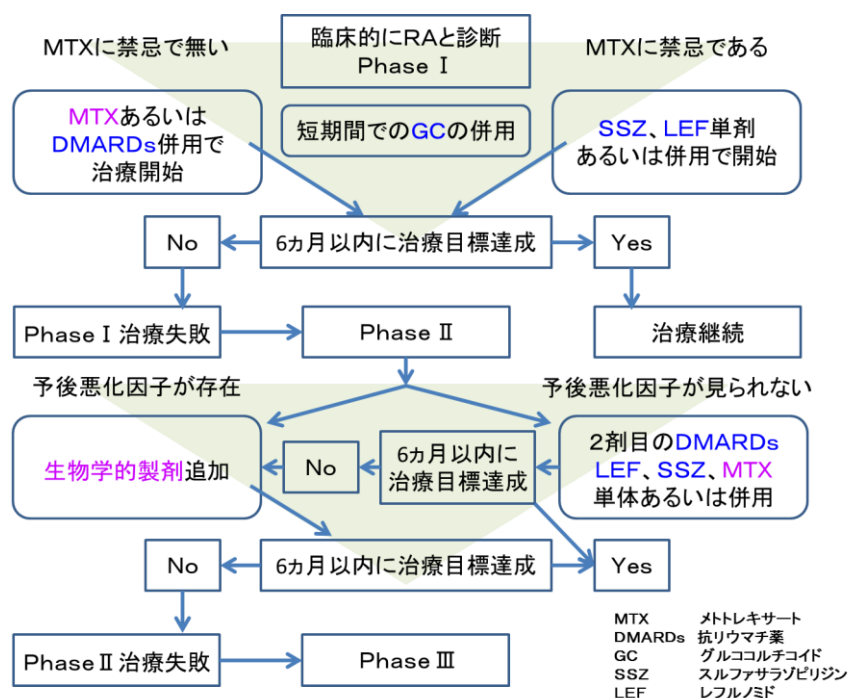


Fig. 1-7 RA 治療ガイドライン（2002）抜粋

Phase I ではMTX、DMARDs(疾患修飾性抗リウマチ薬)、Phase II 以降MTX、DMARDsに加えて生物学的製剤が追加される。RA 薬物療法には、これらの臨床薬の他にNSAIDs(非ステロイド剤)、ステロイド剤のいわゆる抗炎症効果や疼痛を鎮静化する効果のある薬物が使用されている¹⁶⁾。RA 治療では、これらの薬剤の併用が今のところ必要となっている(Table 1-2)。薬効および副作用は個人差があるため、色々な薬剤を試しながら服用していくことが現状である。しかしながら、反応主座である RA 関節滑膜部位に特異的に融合・蓄積するような抗リウマチ薬があれば、少ない薬物量で効果を期待することができ、加えて副作用も顕著に少なくなるものと考えられる。最近MTXをDDS(Drug Delivery System)に封入することにより、効率的薬効および副作用低減を目指した研究報告¹⁷⁾があるが、大きな効果は得られていない。

Table 1-2 関節リウマチに使用される臨床薬の種類¹⁸⁾

非ステロイド剤 (NSAIDs)	ステロイド剤	抗リウマチ薬 (DMARDs)	生物学的製剤
アセトアミノフェン (カロナール)	デキサメタゾン (デカドロン)	レフルノミド (アラバ) DNA合成阻害	エタネルセプト (エンブレル) TNF-α阻害薬
エトドラク (ハイベン)	メチルプレドニゾ ロン (メドロール)	メトトレキサート (リウマトレックス) 葉酸活性阻害薬	アバタセプト (オレンシア) T細胞作用抑制
セレコキシブ (セレコックス)	ベタメタゾン (リンデロン)	タクロリムス (プロGRAF) T細胞の作用抑制	トリシズマブ (アクテムラ) IL-6 阻害薬
ロキソプロフェンNa (ロキソニン)	トリアムシノロン アセトニド (ケナコルト)	スルファサラゾピリジン (アザルフィジンEN) 炎症メディエータの抑制	インフリキシマブ (レミケード) TNF-α阻害薬
ジクロフェナクNa (ボルタレン)	プレドニゾロン (プレドニン)	ブシラミン (リマチル) T細胞増殖抑制等	アダリムマブ (ヒュミラ) TNF-α阻害薬

()は商品名、青色は作用分類

RA の発症メカニズムは全貌が解明されていないが、遺伝的・環境的要因を背景として自己の抗原に対する免疫反応が始まり、更に何らかの要因が引き金となって関節滑膜における炎症が生じる。これにより RA 最大の特徴である滑膜線維芽細胞の活性化と増殖が進行し、軟骨・骨の破壊が引き起こされる。また、滑膜線維芽細胞の異常増殖と滑膜局所における自己免疫応答性の関与が明らかにされている¹⁹⁾。環境的要因としては、ウイルス感染や喫煙などがあげられる。遺伝的要因としては、主要組織適応遺伝子複合体 (major histocompatibility complex ; MHC、ヒトでは human leukocyte antigen ; HLA) の遺伝子多型が知られている。

自己抗原は単一のものではなく、関節組織に発現するさまざまなタンパク質が抗原として関与することが考えられ、Ⅱ型コラーゲン、qp39、IgG、フィブリノーゲン、ケラチンなどのシトルリン化タンパク質が報告されている²⁰⁾。このような自己抗原を取り込んだ抗原提示細胞はリンパ節に移動して T 細胞に抗原を提示する。抗原提示を受けた T 細胞は B 細胞を活性化し、その抗原を発現する関節部位へ遊走する。B 細胞の活性化により産生される自己抗体は免疫複合体を形成し、滑膜組織において血管炎を引き起こすとともに抗原発現細胞に結合する。このようにして形成された自己免疫異常を背景に何らかの引き金を契機として非特異的な関節炎が引き起こされた場合に滑膜炎が持続し、RA に特徴的な臨床徴候を呈していく病態が想定されている²¹⁾。RA 発症メカニズムと時間経過を Fig.1-8 に示す。また RA の発症メカニズムに関して、近年 RA の自己抗原の 1 つが特定され臨床データと結び付けた報告²²⁾ がなされている。今後、RA 発症メカニズムの全貌解明が期待される。

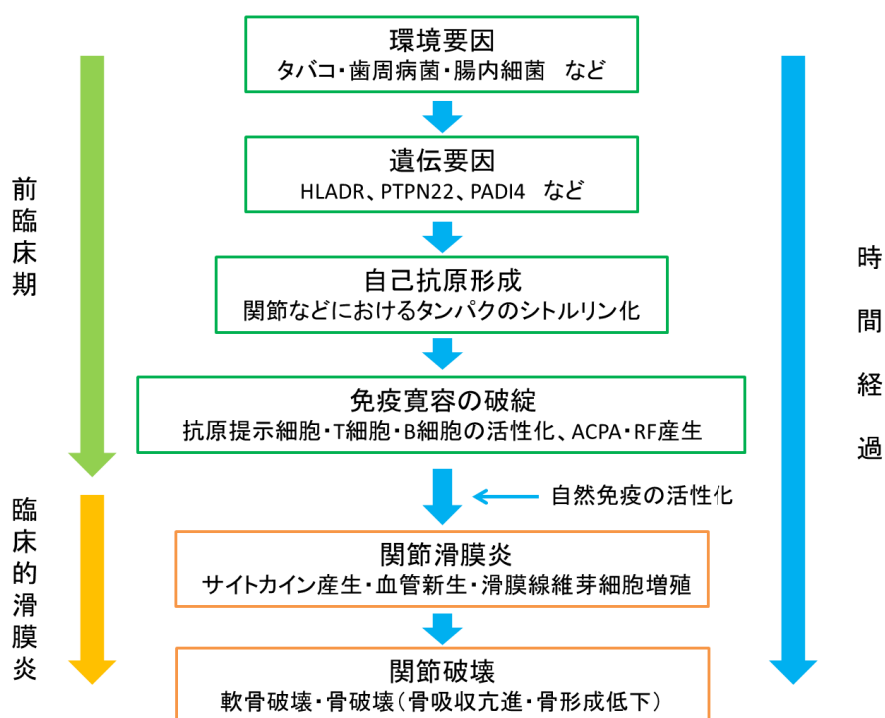


Fig. 1-8 関節リウマチの発症メカニズムと時間経過²¹⁾

関節滑膜組織において滑膜線維芽細胞やマクロファージなどから産生されるさまざまな炎症性サイトカインは、RAの病態で重要な役割を担っている。その中でも腫瘍壊死因子（TNF- α ）とインターロイキン-6（IL-6）はその阻害がRA治療として有効であることから、RAの病態に特に大きく関与している。TNF- α はRAの病態に関与するさまざまな細胞に作用し、更なるサイトカインやケモカインの産生を促進して炎症性サイトカインカスケードを呈する（Fig.1-9）。また血管内皮細胞に対して接着因子の発現を亢進させ、血管新生を促進することにより滑膜組織への炎症細胞浸潤を促進させる。そして、滑膜線維芽細胞からのプロテアーゼ産生や破骨細胞の分化・骨吸収能を亢進させることで骨・軟骨破壊を引き起こす。またIL-6は、抗体産生を促進させる働きを持つ²¹⁾。

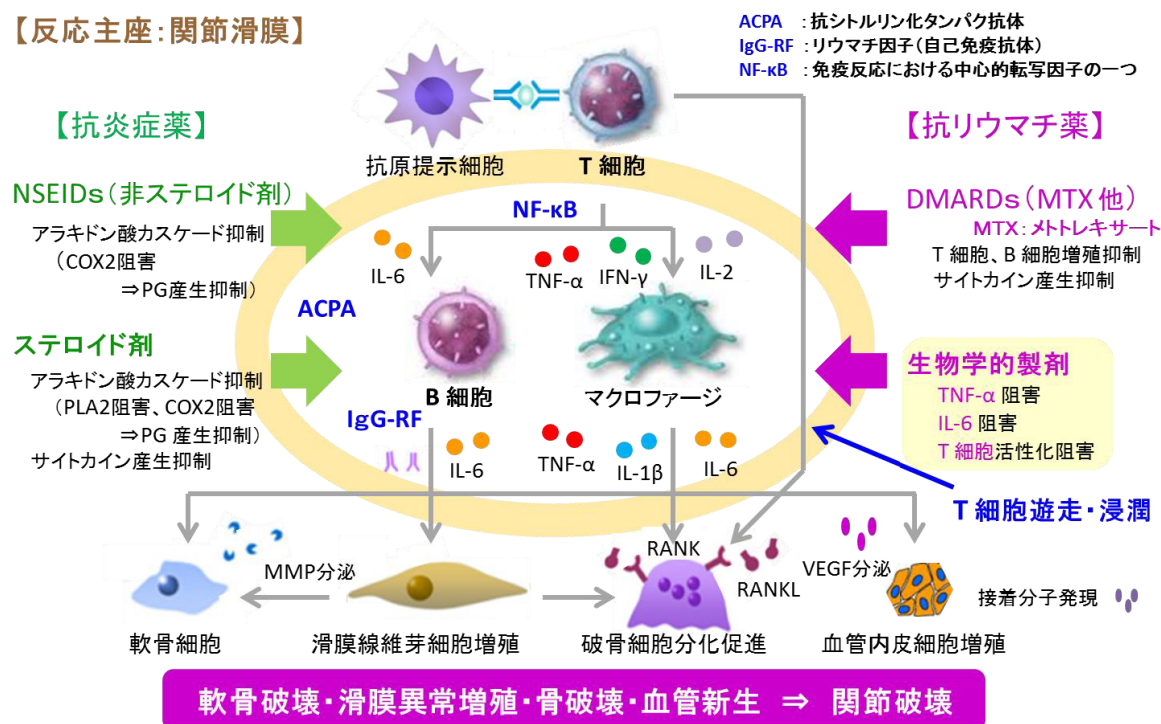


Fig. 1-9 RAにおける炎症性サイトカインカスケード関連図^{15, 21, 23)}

RA治療における生物学的製剤はその効果が期待されていたが、患者様の中には大きな効果があり寛解に近づくことができる場合もあるが、効果が弱い場合や副作用が大きく治療に適さない場合もあることが分かってきた。また生物学的製剤の薬価は高く、そのことが原因で治療に使用できない患者様も存在する。

炎症性サイトカインの中でも $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 を阻害する生物学的製剤は注目されている。これらの生物学的製剤とは別のメカニズムによるアプローチにより、副作用が少なく炎症性サイトカインカスケードを顕著に抑制する抗リウマチ薬の開発を期待したいところである。

上岡らが開発したハイブリッドリポソーム (HL) ^{24, 25)} は、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射することで容易に得られる。従来のリポソーム調製法のように有機溶媒を用いないことから有機溶媒の混入がなく安全性が高く、素材および組成比の選択により形態、膜サイズ、相転移温度、膜流動性のコントロールが可能であり ²⁶⁻³⁰⁾、細網内皮系 (RES : Reticuloendothelial Systems) への捕獲回避が可能な、生体適合性に優れた医用素材である。

HL は薬物送達システム (DDS : Drug Delivery System) として用いることができる ³¹⁻³³⁾。しかし、HL 単体で がん細胞に対する抗腫瘍効果 ³⁴⁻³⁸⁾ が見出された。HL は がん細胞に特異的に融合・蓄積し ^{39, 40)} アポトーシスを誘導する ⁴¹⁻⁴⁸⁾ ことが明らかとなっている。また、HL のヒト前骨髄性白血病 (HL-60) 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムの全容 ⁴⁴⁾ が明らかとなっている。

担がんモデル動物において HL 単体による治療効果 ⁴⁹⁻⁵⁵⁾、肝転移抑制効果 ⁵⁶⁾ が報告されている。正常動物においては、長期間反復投与毒性試験 ⁵⁷⁾、体内動態試験 ⁵⁸⁾ により高い安全性が確認されている。また、生命倫理委員会承認後の臨床試験において、再発悪性リンパ腫の患者様に対する延命効果および固形リンパ腫の顕著な縮小効果 ⁵⁹⁾ が明らかとなっている。

HL の誘導体であるカチオン性 HL に関しては、ヒト腎がん (OS-RC-2) 細胞に対するアポトーシス誘導 ⁶⁰⁾ および腎がんモデルマウスに対する治療効果 ⁶¹⁾ が報告されている。更に、エイズウイルス感染細胞の増殖抑制効果 ⁶²⁾、RA モデルマウスに対する治療効果 ⁶³⁾ 等、がん領域のみならず多方面へ HL の研究領域は広がりを見せている。このように正常細胞と比べて膜流動性の大きな がん細胞や異常細胞などに特異的に融合・蓄積する HL は、副作用のない新しいタイプの治療薬剤としての可能性を秘めており、各臨床分野への創薬および医療応用が期待されている。

本研究は、HL を用いた「疾患細胞指向性リポソームによる治療薬の開発に関する研究」についてまとめたものである。ヒト乳がんの治療に関して、モデル動物に対する治療効果および治療メカニズムについて検討した。つぎに RA の治療に関して、モデル動物に対する治療効果および治療メカニズムについて検討した。

本論文は、次の各章から構成されている。第 2 章は HL の膜物性について述べた。第 3 章は HL のヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果について述べ、第 4 章は HL の血管新生抑制メカニズムについて述べた。第 5 章は コラーゲン誘発 RA モデルマウスに対する HL の治療効果について述べた。第 6 章は HL を上市する際の戦略的考察について述べた。第 7 章は 本研究の総論である。

第2章 ハイブリッドリポソームの膜物性

2-1 序

生体の基本的構成要素である細胞は、細胞膜により細胞外部環境と区別されている。細胞膜は単に細胞外部環境から細胞内部を護るための仕切り機能だけではなく、イオンポンプやイオンチャネルによる選択的透過性、受容体を介する情報伝達などの重要な機能をもっている。細胞膜は脂質二重層と呼ばれる構造であり、その主要構成成分であるリン脂質は一方の端が親水性であり他方が炭化水素からなる疎水性である。そのため極性をもつ体液中では疎水性部分を内側に、親水性部分を外側になるような二重の膜を形成する。

リポソームとは細胞膜と同様の脂質二重膜構造をもち、細胞膜の構成成分であるリン脂質より人工的に調製される複合体である。1964年に英国の物理学者 A. Bangham らが発見した⁶⁴⁾。彼らは卵黄から抽出して精製したリン脂質を水に分散させたところ小胞体 (vesicle) ができることを確認し、脂質と細胞体を意味する lipo と soma を組み合わせてリポソーム (liposome) と名付けた。リポソームはリン脂質を水相に分散させた時にでき、内部に薬剤を封入することで特定の臓器部位に薬剤を送ることが可能となる。このような理由によりリポソームは薬物送達システム (Drug Delivery System : DDS) キャリアーとして広く使用されており⁶⁵⁻⁶⁸⁾、薬剤の治療効果を高めるだけでなく副作用の軽減も期待することができる。

リポソームを DDS として投与した場合、免疫系が多く存在する肝臓、脾臓、肺の細網内皮系 (Reticular Endothelial System : RES) による捕獲⁶⁹⁾を回避することで血中滞留性が上昇し、標的部位へのターゲティング性が高まる。血中半減期を比較的長くするために RES による捕獲を回避させるには、リポソームの膜直径が約 100nm 以下であることが重要となる⁷⁰⁾。

本章では、リン脂質 (DMPC) とミセル分子 ($C_{12}(EO)_n$: $n=23,25$) を素材として調製した HL-n の 25℃保存における膜物性について検討した。

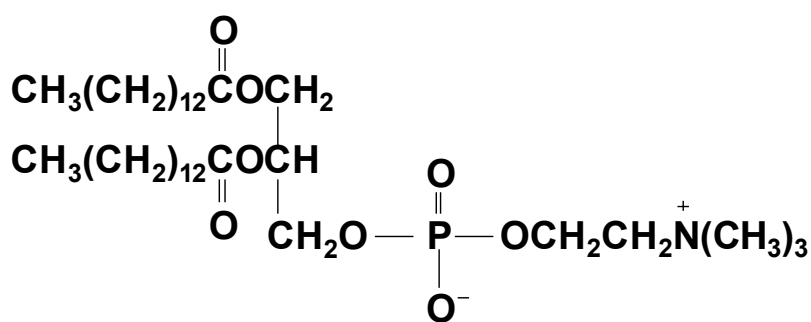
2-2 実験

2-2-1 試料

〈 リン脂質 〉

L- α -Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) は、市販品 (COATSOME MC-4040、MW=677.9、相転移温度：23°C、purity>99%、日油株式会社) をそのまま使用した。

以下に構造式を示す。

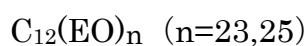
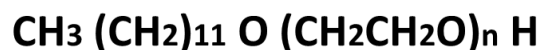


DMPC

〈 ミセル界面活性剤 〉

Poly (oxyethylene(n) lauryl ether (C₁₂(EO)_n) (n=23,25) は市販品を使用した。C₁₂(EO)₂₃ (Brij35、MW=1199.5、シグマアドリッチ株式会社) はエーテル再結晶したものを使用した。C₁₂(EO)₂₅ (NIKKOL BL-25、MW=1287.6、日光ケミカルズ株式会社) はそのまま使用した。

以下に構造を示す。



2-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

リン脂質 (DMPC) および界面活性剤 ($C_{12}(EO)_n$) ($n=23,25$) を精秤し、5% ブドウ糖溶液 (大塚製薬株式会社) 中でバス型超音波照射器 (VS-N300, VELVO-CLEAR: 300W) を用いて窒素雰囲気下で超音波照射処理 (45℃, 1ml/min) を行い、均一な溶液が得られたことを確認後、滅菌済みメンブランフィルター (孔径 0.20 μ m、セルロースアセテート材質; 13CP020AS, ADVANTEC) で濾過滅菌してサンプル溶液とした。サンプル溶液の保存は 25℃で行った (Fig. 2-1)。

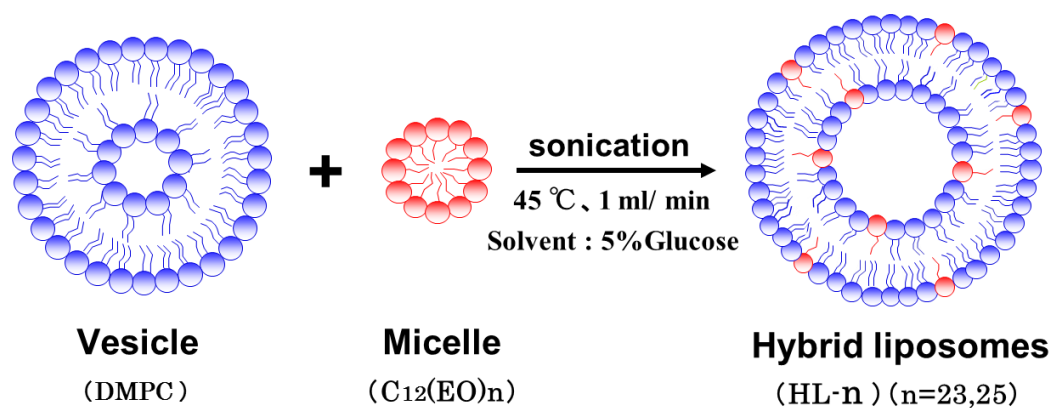


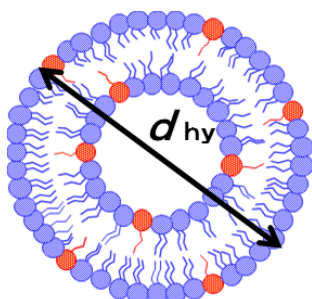
Fig. 2-1 Schematic representation of hybrid liposomes.

2-2-3 動的光散乱法による膜直径の測定

懸濁溶液あるいは溶液中に分散した微粒子は、その粒子の周りにある水（溶媒）分子とぶつかり合いブラウン運動をしている。その動きは粒子の直径が小さいほど周りの溶媒分子との衝突により動かされる運動量が大きくなり早く動く。粒子の直径が大きくなると衝突による影響が受けにくくなるので運動量も小さくなりゆっくりと動く。

動的光散乱法は、ブラウン運動をしている粒子にレーザー光を照射して粒子からの散乱光を検出・分析する方法である。粒子からの散乱光には、粒子それぞれのブラウン運動の速度に対応した揺らぎが観測され、時間的に変動する位相（時間変動位相）を含んでいる。散乱光の時間変動位相は、入射光の位相とのずれ又は入射光の中心周波数からのずれとみなすことができる。測定を続けることで粒子の不規則な運動は、光学位相差又はスペクトル周波数差の分布として求めることができる。この結果から粒子の拡散係数が得られ、この拡散係数とその他の測定データから Stokes-Einstein の理論を用いて粒子の直径を決定することができる。

ハイブリッドリポソームの膜直径（ d_{hy} : hydrodynamic diameter）は、光散乱光度計（ELSZ-0、大塚電子株式会社）を用い、動的光散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 633nm の発振線を出力 10mW で用い、散乱角 90°C で測定を行った。得られた拡散係数（ D ）を（2-1）式（Stokes-Einstein の式）に代入し、膜の直径（ d_{hy} ）を求めた。



$$d_{hy} = \kappa T / 3 \pi \eta D \quad (2-1)$$

κ : Boltzmann 定数

T : 絶対温度

η : 溶媒の粘度

2-3 結果と考察

2-3-1 ハイブリッドリポソームの膜物性

臨床応用を目的とし、調製溶媒に 5%ブドウ糖溶液を用いて調製したリン脂質 (DMPC) と PEG 系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_n$; $n=23,25$) からなる 95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_n$ ハイブリッドリポソーム (HL- n ; $n=23,25$) の膜安定性について検討した。試料溶液の保存・測定は室温 (25℃) で行った。

DMPC、HL-25 膜直径の経時変化結果を Fig. 2-2 および Table 2-1 に示す。HL-25 の膜直径は調製後約 70nm で、その後 7 日目まで約 70nm から約 120nm の間で増大と減少を繰り返した。14 日目には約 20nm まで減少し、1 ヶ月以上安定な膜直径を維持した。DMPC は調製後約 190nm でその後減少し、14 日目まで約 120nm から約 190nm の間で推移していたが 21 日目に沈殿した。

HL-23 膜直径の経時変化を Fig. 2-3 および Table 2-2 に示す。HL-23 の膜直径は調製後約 80nm で 7 日目まで約 100nm と増大したが、その後徐々に減少し約 25nm で長期間安定した。

以上の結果から、HL- n ($n=23,25$) は約 100nm 以下で安定した膜を形成することが明らかとなった。このことから HL- n ($n=23,25$) は、臨床応用において静脈内投与の際に細網内皮系 (RES) への捕獲を回避できることが可能な大きさであり血中滞留性が高いことが示唆された。更に、室温保存で長期間安定であるため、保存および輸送においても有用な医薬品として期待することができる。

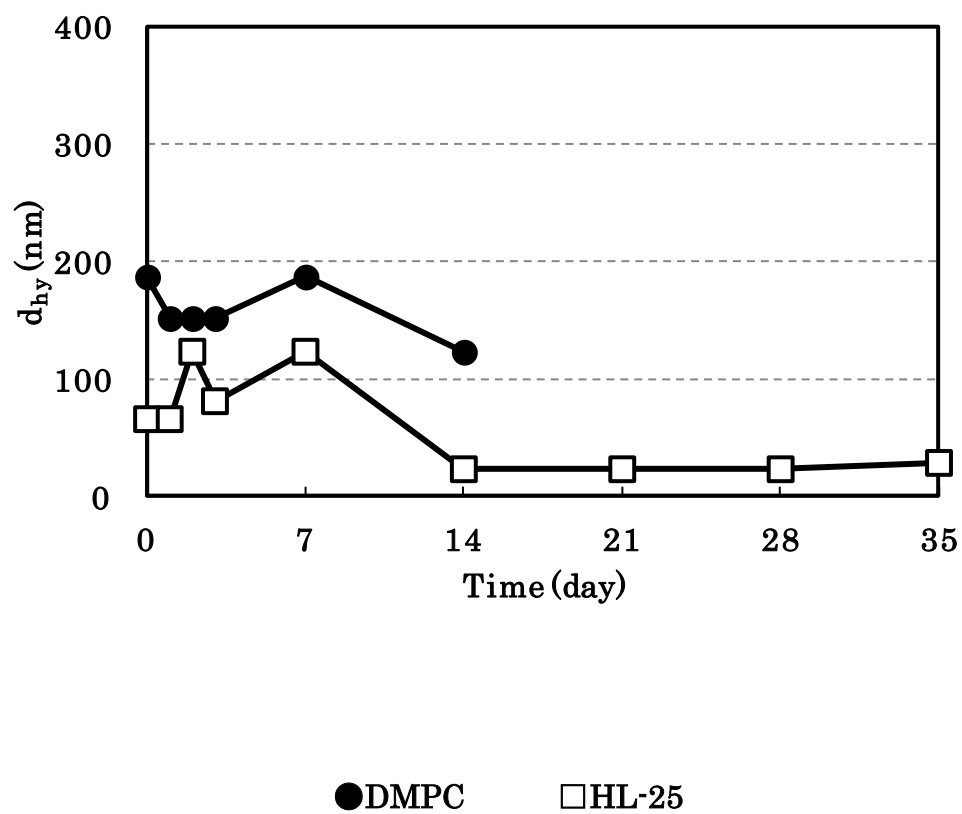


Fig. 2-2 Time courses of d_{hy} change for HL-25 in 5% glucose solution at 25°C.
 ([DMPC]= 3.0×10^{-2} M, $[C_{12}(EO)_{25}] = 1.58 \times 10^{-3}$ M)

Table 2-1 Time courses of d_{hy} change for HL-25 in 5% glucose solution at 25°C.

Sample	d_{hy} (nm)				
	0	1day	2days	3days	7days
DMPC	187.4(d)	152.0(d)	152.0(d)	152.0(d)	187.4(d)
HL-25	65.8(s)	65.8(t)	123.3(s)	81.1(s)	123.3(s)

Sample	d_{hy} (nm)			
	14days	21days	28days	35days
DMPC	123.3(d)	↓		
HL-25	23.1(s)	23.1(d)	23.1(s)	28.5(s)

s : single peak, d : double peaks, t : triple peaks

↓ : precipitation

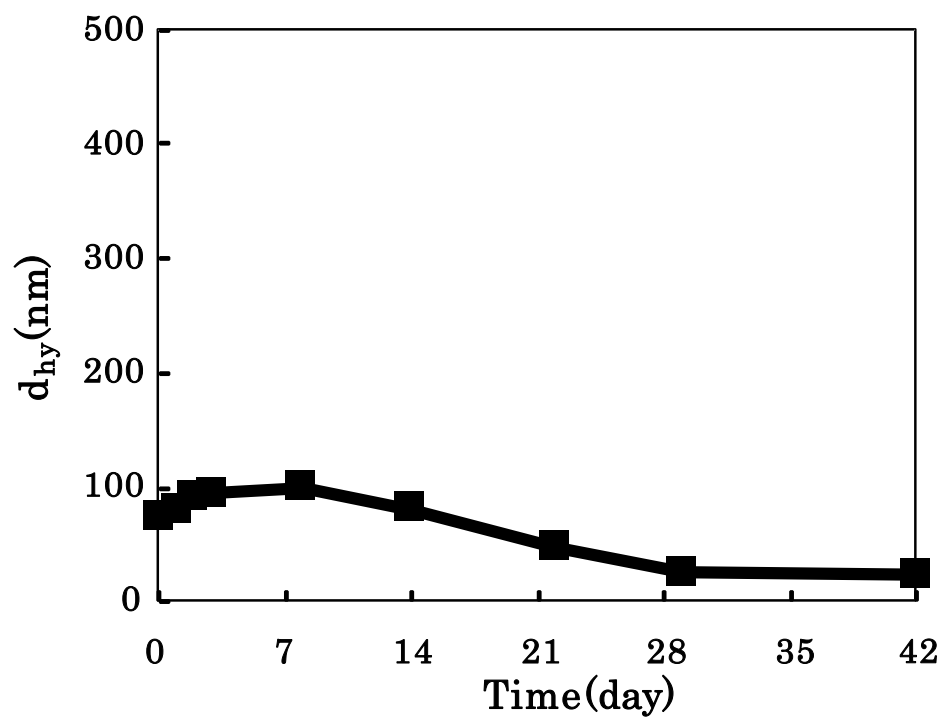


Fig. 2-3 Time courses of d_{hy} change for HL-23 composed of 95mol%DMPC and 5mol% $C_{12}(EO)_{23}$ in 5% glucose solution at 25°C.
 $[DMPC]=2.0 \times 10^{-2}M$, $[C_{12}(EO)_{23}]=1.05 \times 10^{-3}M$

Table 2-2 Time courses of d_{hy} change for HL-23 composed of 95mol%DMPC

Sample	$d_{hy}(nm)$				
	0	1day	2days	3days	8days
HL-23	74.9(s)	80.0(s)	92.4(s)	94.8(s)	100.1(d)
	65.8	81.1	152.0	100.0	152
and 5mol% $C_{12}(EO)_{23}$ in 5% glucose solution at 25°C.					
Sample	$d_{hy}(nm)$				[DMPC]= $2.0 \times 10^{-2}M$, [$C_{12}(EO)_{23}$]= $1.05 \times 10^{-3}M$
	14days	22day	29days	42days	
HL-23	81.5(s)	47.1(s)	25.3(s)	23.0(s)	
	53.4	43.3	23.1	23.1	

s : single peak, d : double peak, t : triple peak

2-4 総括

本章では、臨床応用を目的とした 95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_n$ ハイブリッドリポソーム (HL- n : $n=23,25$) の室温 (25°C) 保存・測定における膜物性について検討したところ、以下のような興味深い知見が得られた。

1. HL-23 は調製後に膜直径の増大がみられた。その後 徐々に減少し 100nm 以下で 1 ヶ月以上安定した膜を形成した。
2. HL-25 は調製後から 7 日目まで、膜直径が約 70nm から約 120nm の間で推移した。その後 約 20nm まで減少して 1 ヶ月以上安定した膜を形成した。
3. DMPC の膜直径は、調製後から 14 日目まで約 120nm から約 190nm の間で推移したが、21 日目に沈殿しているのが確認された。

HL- n ($n=23,25$) の膜直径は 100nm 以下であり、静脈投与を行う際に細網内皮系 (RES) の捕獲から回避可能であることが明らかとなった。また、室温において長期間安定であることから、保存・輸送等においても有用な医薬品として期待することができる。

以上の結果より、HL は臨床応用可能な医療素材であると考えられる。

第3章 ハイブリッドリポソームのヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウス に対する治療効果

3-1 序

動物実験は主に医学の発展のため、一部には公衆衛生に貢献するため必要なものとしてやむを得ず実施するもので、1964年に採択されその後必要に応じて修正されて来た「ヘルシンキ宣言」にその主旨が示されている。これに準じて各研究機関は研究活動を行い、倫理審査委員会を自主的に設置している。

実験動物とは、試験・実験・研究・教育・生物学的製剤の製造・その他科学上の使用のため、合目的に繁殖・生産した動物を指す。遺伝要因は動物実験の成績に大きく影響するため、再現性を高めるために実験動物には高い遺伝子構成の同一性が求められる。実験動物種としては、マウス・ラット・モルモット・スナネズミ・ハムスター・フェレット・ウサギ・イヌ・ミニブタなどがある。これらの実験動物では遺伝学的な統御がなされており、均質な遺伝的要件を備えていることから動物実験に必要な再現性あるいは精度をある程度担保している。特に代表的なマウス・ラットでは、現在数多くの系統が存在している。

マウスは、一般的には給餌面・飼育面・取扱い面で有利であり、遺伝的コントロールされた系統が多く樹立していること等で、多くの動物実験に利用されている。ヌードマウス⁷¹⁾はT細胞が欠損した免疫不全マウスであり、ヒトがん細胞を移植しても拒絶されることがない。また体毛が無いことから、皮下移植した腫瘍の観察が容易である。

本章では、ヌードマウスを用いた95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_5$ ハイブリッドリポソーム(HL-25)のヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果を検討した。更に、CD34免疫染色を用いて血管新生抑制効果を検証した。

3-2 実験

3-2-1 試料

リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_{25}$) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

3-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソーム (HL-25) は、2-2-2 と同様のものを使用した。

3-2-3 使用細胞

ヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞は、国立研究開発法人理化学研究所より入手したものを使用した。培養培地として Leibovitz's L-15 Medium (ATCC : American Type Culture Collection) +10% fetal bovine serum (FBS, ATCC) を用いて、37°C、湿度 95%、CO₂ 濃度 5% の条件で培養を行った。

3-2-4 使用動物

実験に使用する動物はヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu、雌性、5 週齢、日本クレア株式会社) を用い、3 日間馴化した後に使用した。

3-2-5 飼育条件

ヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu) は、恒温恒湿環境下 (室温 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$) で飼育した。水および餌はオートクレーブにより滅菌したものを自由に摂取させた。

3-2-6 ヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスの作製法

動物実験は、“崇城大学における動物実験に関する指針” および関連法令を順守し、崇城大学動物実験倫理委員会の承認後に実施した。MDA-MB-453 細胞を PBS(-) : マトリゲル=1:9 の混合液に懸濁し、懸濁液 0.1ml を 500 万 cells/body となるようにマウスの後背部皮下に接種し移植した。使用したマウスは 9 匹である。これによりヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスを作製した (Fig. 3-1)。

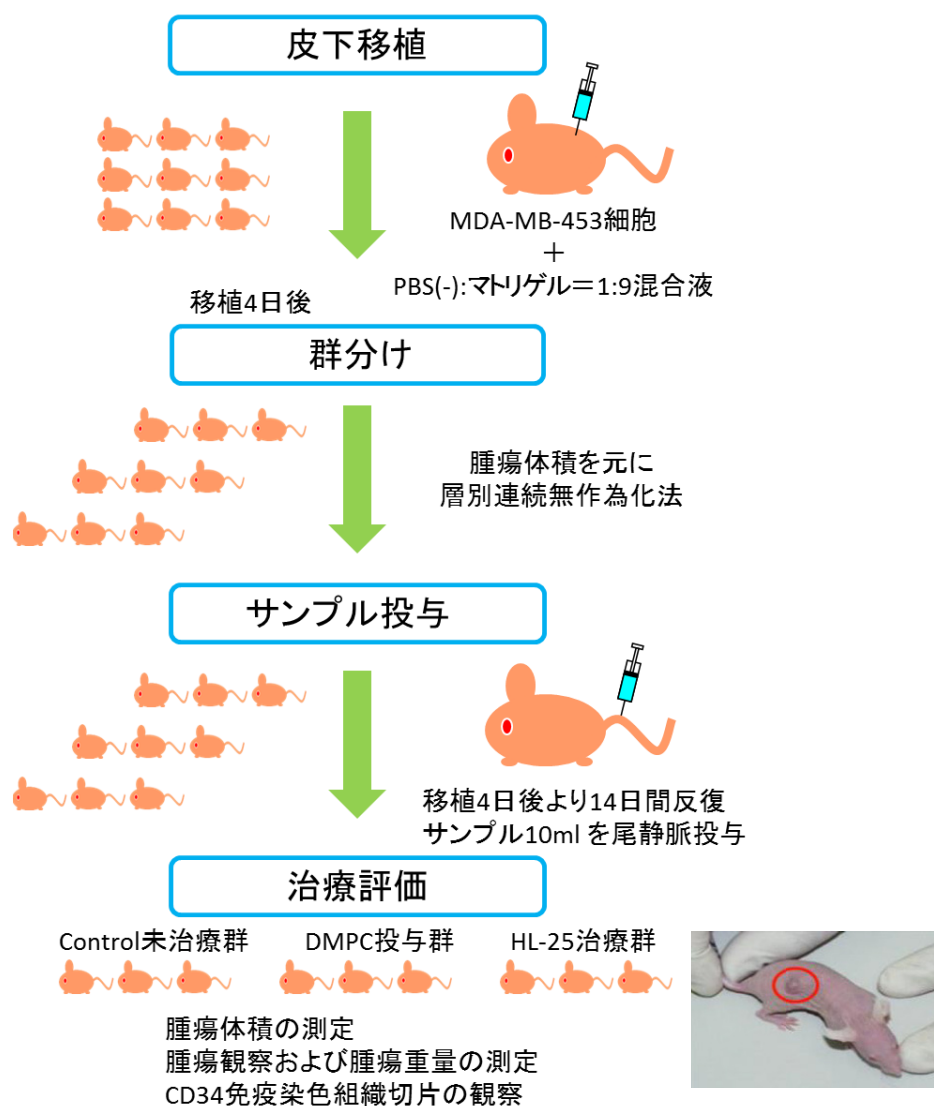


Fig. 3-1 モデルマウス作製・評価の流れ

3-2-7 ヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験

皮下移植 4 日後に腫瘍の大きさを測定し、腫瘍体積を元に層別連続無作為化法により Control 未治療群、DMPC 投与群、HL-25 治療群の 5 群に分けた。群分け後サンプルを尾静脈から 10mg/kg 投与し、1 日 1 回、14 日間投与を行った。

投与終了翌日に麻酔下で解剖し、腫瘍の観察および腫瘍重量の測定を行った。投与期間中の腫瘍体積は (3-1) 式に基づき算出した。

$$\text{腫瘍体積(mm}^3\text{)} = \text{長径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times \text{短径(mm)} \times 0.5 \quad (3-1)$$

3-2-8 CD34 免疫染色による皮下腫瘍組織切片観察

CD31 および CD34 は毛細血管内皮細胞に発現するタンパク質である。従って、免疫染色を用いて腫瘍の新生血管を検出することが可能である。

組織切片の血管内皮細胞の染色は、パラフィン包埋組織切片をコントラストよく染色できる CD34 抗体を用いて免疫染色した (Fig. 3-2)。解剖で取り出した腫瘍を株式会社バイオ病理研究所に委託し、組織切片化、染色を行った。腫瘍切片の顕微鏡観察を行い、腫瘍内部の血管新生抑制について検討した。観察後に各切片からランダムに 5 か所を撮影し、画像解析ソフト「ImageJ」⁷²⁾ を用いて CD34 陽性領域の定量化を行った。

CD34免疫染色組織切片の染色手順

- 1 脱パラフィン → アルコール → DW
- 2 PBS洗浄
- 3 オートクレーブによる賦活化 120°C10分
- 4 PBS洗浄
- 5 1%過酸化水素 / メタノール
- 6 PBS洗浄
- 7 スキムミルクにて非特異反応のブロック
- 8 一次抗体: Rat monoclonal [MEC14.7] to CD34
4°C/Over Night 100倍希釈 【Gene Tex: GTX28158】
- 9 PBS洗浄
- 10 ヒトスフィン シンプルステイン マウスMAX-PO(Rat)
- 11 PBS洗浄
- 12 DABで発色 → DWでストップ
- 13 核染 (マイヤーのヘマトキシリン) → 水洗
→ アルコール脱水 → キシレン透徹

Fig. 3-2 CD34 免疫染色の手順

3-3 結果と考察

3-3-1 ハイブリッドリポソームのヒト乳がん細胞皮下移植モデルマウス に対する治療効果

95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$ ハイブリッドリポソーム(HL-25)の *in vivo* における血管新生抑制効果を検討するため、ヌードマウスを用いてヒト乳がん(MDA-MB-453)細胞皮下移植モデルマウスに対する治療実験を実施した。

投与期間中の体重測定結果を Fig. 3-3 および Table 3-1 に示す。群間による体重の有意差は見られず、DMPC および HL-25 のマウスに対する毒性は認められなかった。

投与期間中の腫瘍体積測定結果を Fig. 3-4 および Table 3-2 に示す。投与終了翌日の平均腫瘍体積は、Control 未治療群 435.03mm³、DMPC 投与群 516.14 mm³、HL-25 治療群 191.94mm³ (抑制率約 65%, $p<0.05$) となり、Control 未治療群および DMPC 投与群と比較して HL-25 治療群は顕著な腫瘍増殖抑制効果が見られた。

投与終了翌日に解剖して腫瘍を観察した結果を Fig. 3-5 に示す。Control 未治療群および DMPC 投与群において腫瘍表面に新生血管が多く見られたのに対して、HL-25 治療群ではほとんど見られなかった。

腫瘍重量の測定結果を Fig. 3-6 および Table 3-3 に示す。Control 未治療群および DMPC 投与群と比較して HL-25 治療群は顕著に腫瘍重量が小さく、腫瘍増殖抑制効果が見られた。

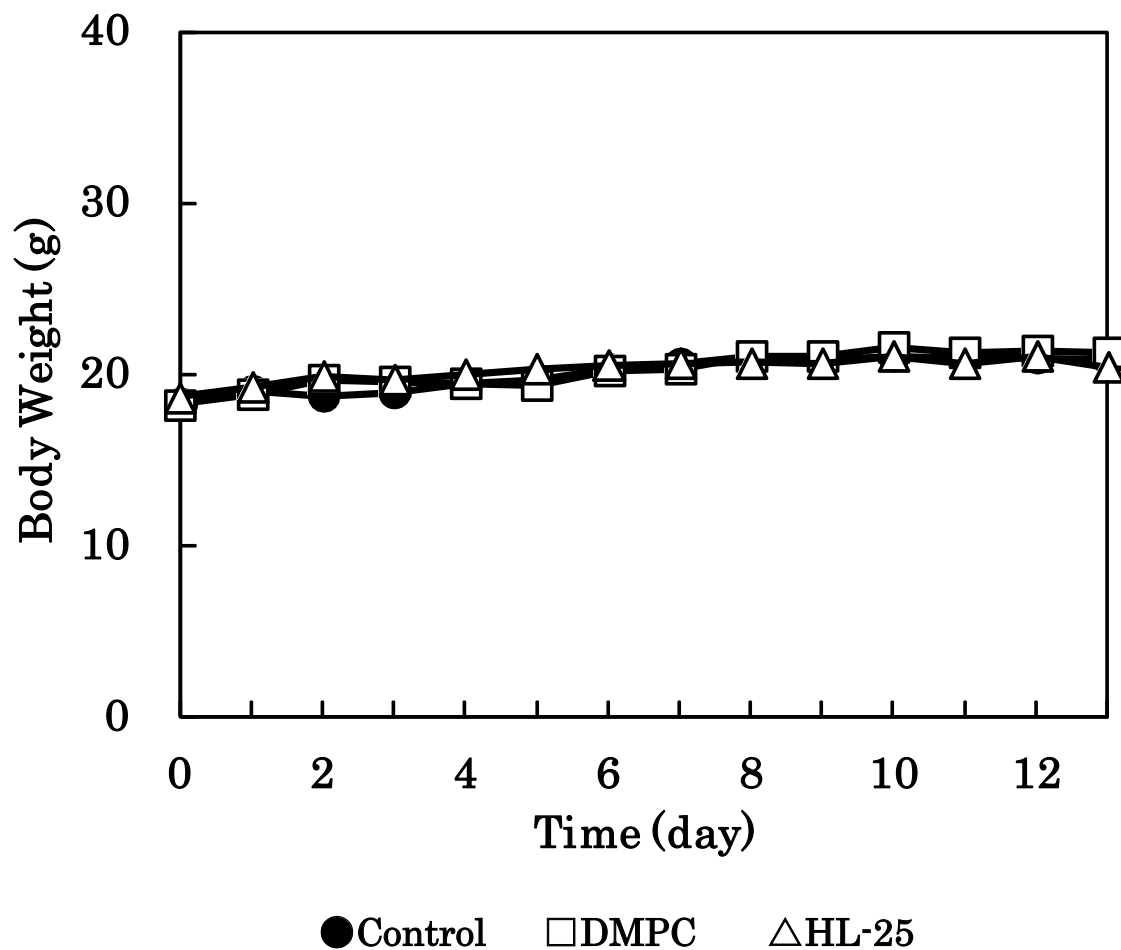


Fig. 3-3 Body weight change in xenograft model mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

Animal: BALB/c AJcl-nu/nu

Table 3-1 Body weight change in xenograft model mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

Sample	Dose (mg/kg)	Body weight (g) on day				
		0	1day	2days	3days	4days
Control (5%Glucose solution)	—	18.25	19.00	18.73	18.88	19.45
		±0.88	±1.01	±0.89	±0.85	±1.10
DMPC	DMPC 203	18.22	18.83	19.65	19.53	19.43
		±1.34	±1.11	±1.08	±1.13	±1.10
HL-25	DMPC 203 C ₁₂ (EO) ₂₅ 17.5	18.63	19.23	19.86	19.64	19.99
		±0.93	±0.80	±0.49	±0.61	±0.74

Sample	Dose (mg/kg)	Body weight (g) on day				
		5days	6days	7days	8days	9days
Control (5%Glucose solution)	—	19.67	20.26	20.59	21.06	20.85
		±1.17	±1.41	±1.37	±0.68	±0.95
DMPC	DMPC 203	19.38	20.20	20.25	21.04	21.01
		±1.15	±1.02	±0.91	±0.81	±0.80
HL-25	DMPC 203 C ₁₂ (EO) ₂₅ 17.5	20.33	20.46	20.57	20.66	20.58
		±0.60	±0.75	±0.81	±0.93	±0.61

Sample	Dose (mg/kg)	Body weight (g) on day			
		10days	11days	12days	13days
Control (5%Glucose solution)	—	21.05	20.96	20.94	20.83
		±0.69	±0.57	±0.41	±0.67
DMPC	DMPC 203	21.56	21.25	21.35	21.22
		±0.78	±0.75	±0.72	±0.88
HL-25	DMPC 203 C ₁₂ (EO) ₂₅ 17.5	21.07	20.57	21.07	20.41
		±0.80	±0.82	±0.80	±0.82

Values represent mean±S.D.
Animal: BALB/c AJcl-nu/nu

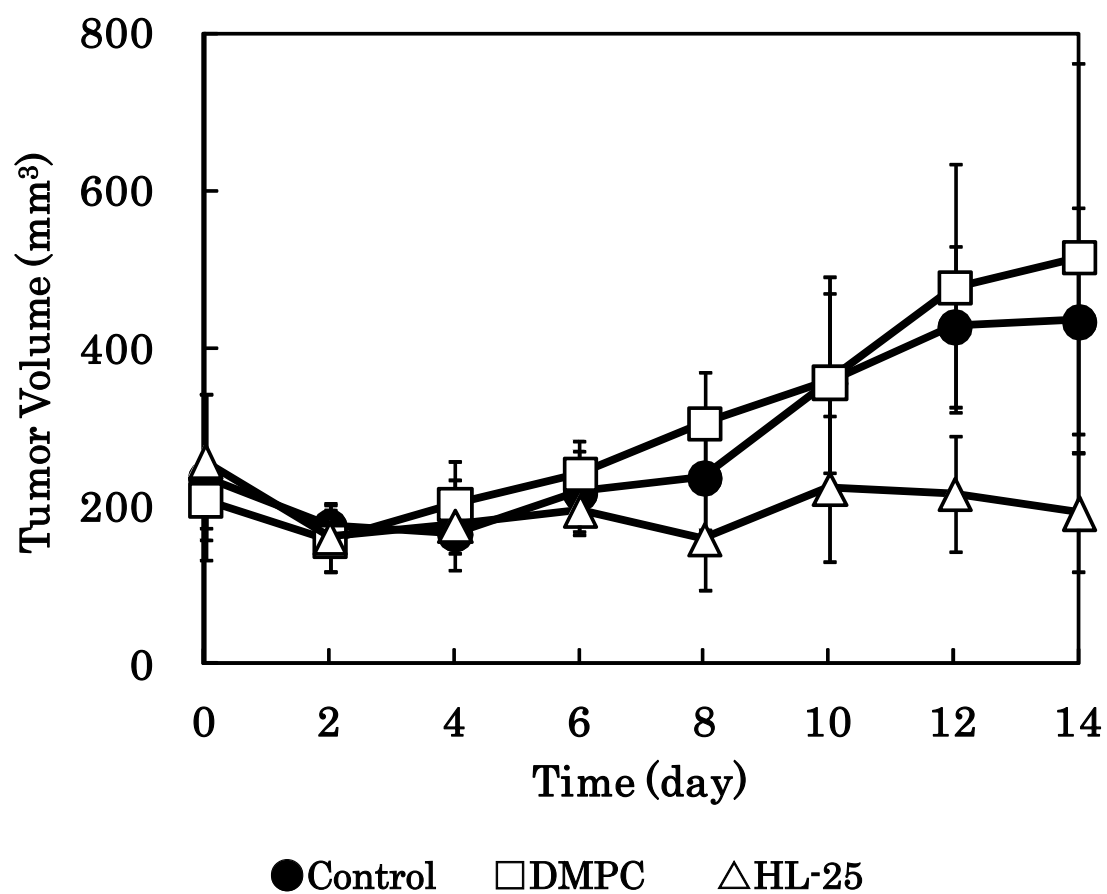


Fig. 3-4 Tumor volume change in xenograft model mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.
Animal: BALB/c A/Jcl-nu/nu

Table 3-2 Tumor volume change in xenograft model mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

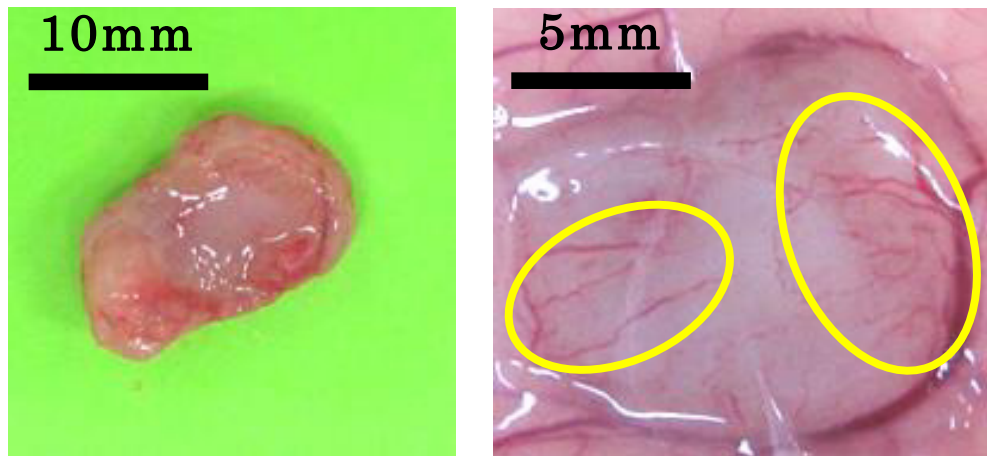
Sample	Dose (mg/kg)	Tumor volume (mm ³) on day				
		0	2days	4days	6days	8days
Control (5%Glucose solution)	—	236.94 ±105.11	175.01 ±26.59	165.66 ±24.77	217.54 ±54.08	236.47 ±64.54
DMPC	DMPC	208.70	156.80	203.68	241.30	305.65
	203	±49.36	±39.27	±55.49	±42.24	±64.13
HL-25	DMPC	257.96	161.27	176.36	195.77	158.54
	$\frac{203}{C_{12}(EO)_{25}}$ 17.5	±83.90	±42.84	±57.80	±28.08	±63.94

Sample	Dose (mg/kg)	Tumor volume (mm ³) on day		
		10days	12days	14days
Control (5%Glucose solution)	—	356.67 ±113.49	428.29 ±100.76	435.03 ±142.77
DMPC	DMPC	358.29	477.94	516.14
	203	±133.49	±157.29	±246.82
HL-25	DMPC	223.16	215.69	191.94
	$\frac{203}{C_{12}(EO)_{25}}$ 17.5	±92.03	±73.75	±75.83

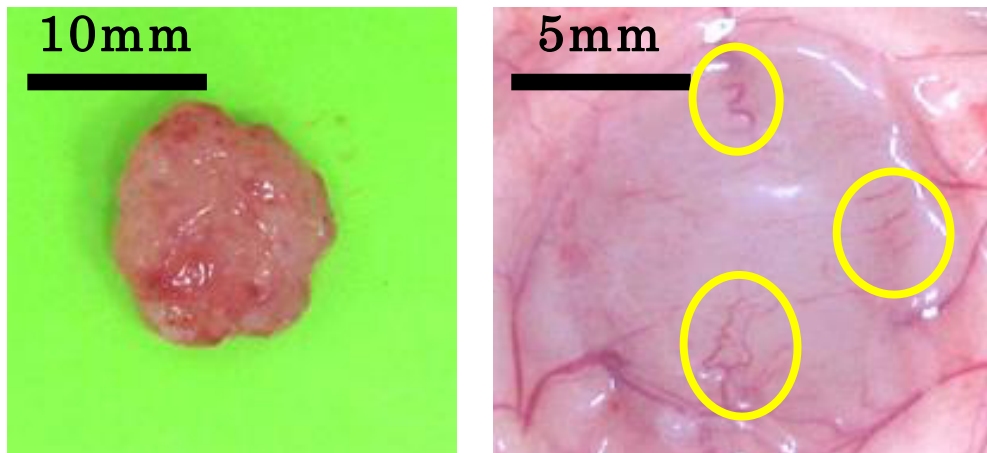
Values represent mean±S.D.

Animal: BALB/c AJcl-nu/nu

Control



DMPC



HL-25

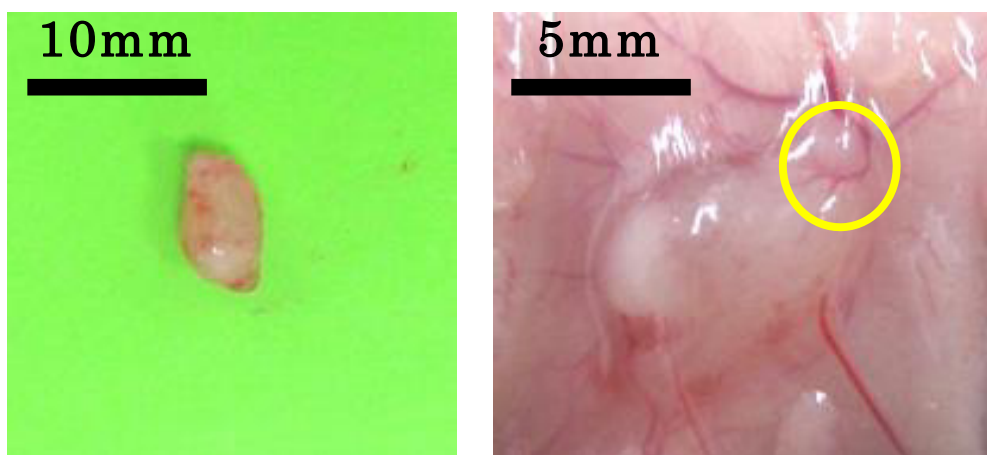


Fig. 3-5 Photographs of tumor in mice after the subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

Circle: angiogenesis

Animal: BALB/c AJcl-nu/nu

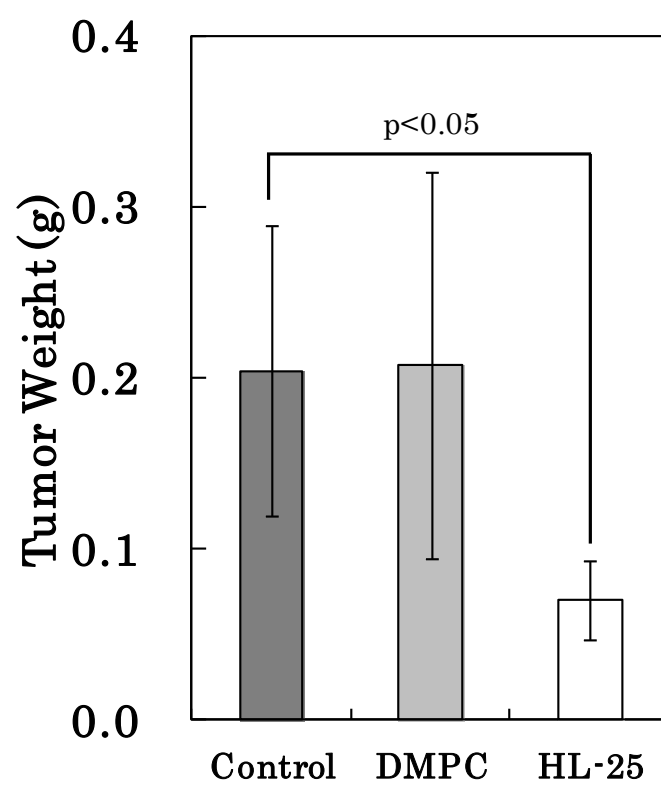


Fig. 3-6 Tumor weight of mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

Table 3-3 Tumor weight of mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

Sample	Dose (mg/kg)	Tumor weight (g)
Control (5%Glucose solution)	—	0.20 ±0.08
DMPC	DMPC 203	0.21 ±0.11
HL-25	DMPC 203 C ₁₂ (EO) ₂₅ 17.5	0.07 ±0.02

Values represent mean±S.D.

Animal: BALB/c AJcl-nu/nu

3-3-2 CD34 免疫染色による血管新生抑制効果

腫瘍内部の血管新生を観察するため、血管内皮細胞を CD34 免疫染色した腫瘍切片を作製した。観察結果および画像処理ソフトで定量化した結果を Fig. 3-7、管腔面積を定量化したグラフを Fig. 3-8、Table 3-4 に示す。Control 未治療群および DMPC 投与群と比較して、HL-25 治療群では CD34 陽性領域が小さくなる傾向が見られた。

以上の結果から、MDA-MB-453 細胞皮下移植モデルマウスに対して、HL-25 は、血管新生抑制を伴う腫瘍増殖抑制効果を示すことが示唆された。

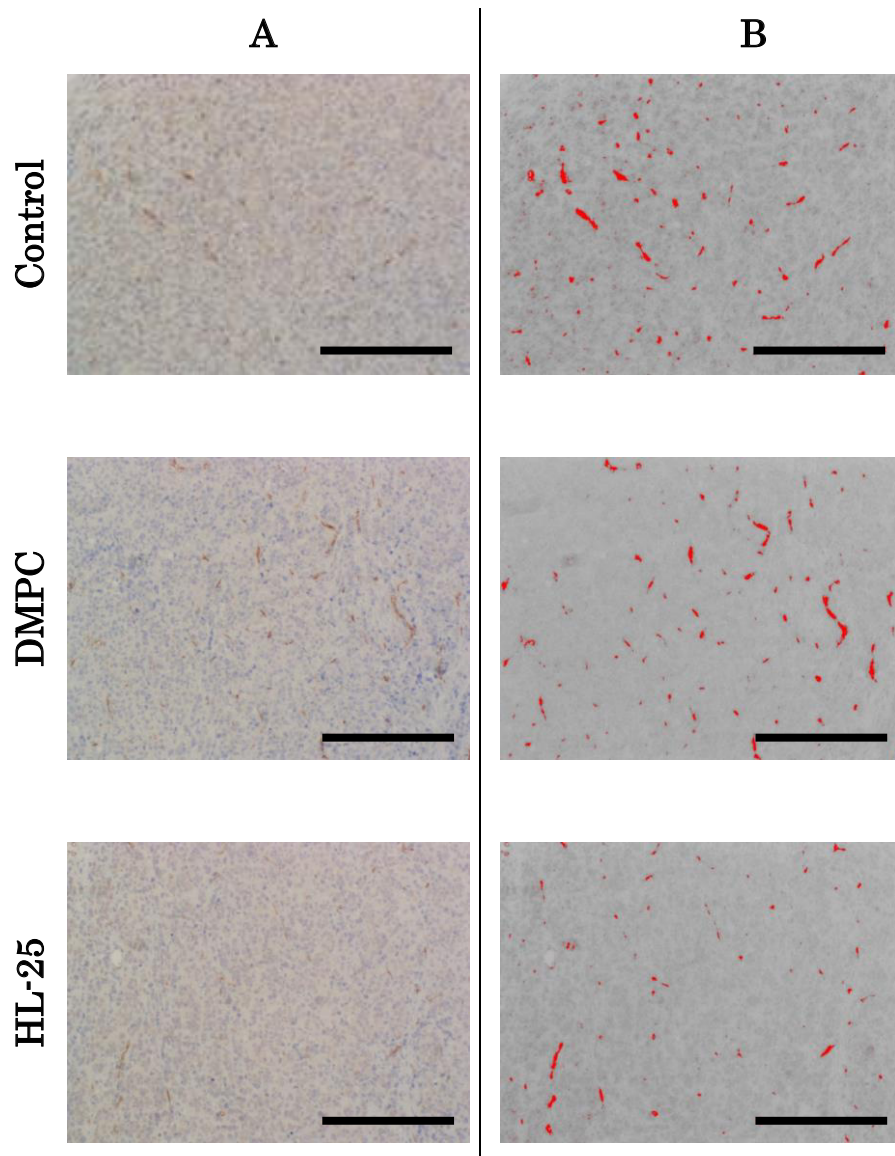


Fig. 3-7 (A) CD34 immunostaining of tumor tissue of mice after subcutaneous inoculation of MDA-MB-453 cells.

(B) Detection of CD34 positive area using “ImageJ” software.

Scale bar: 10mm

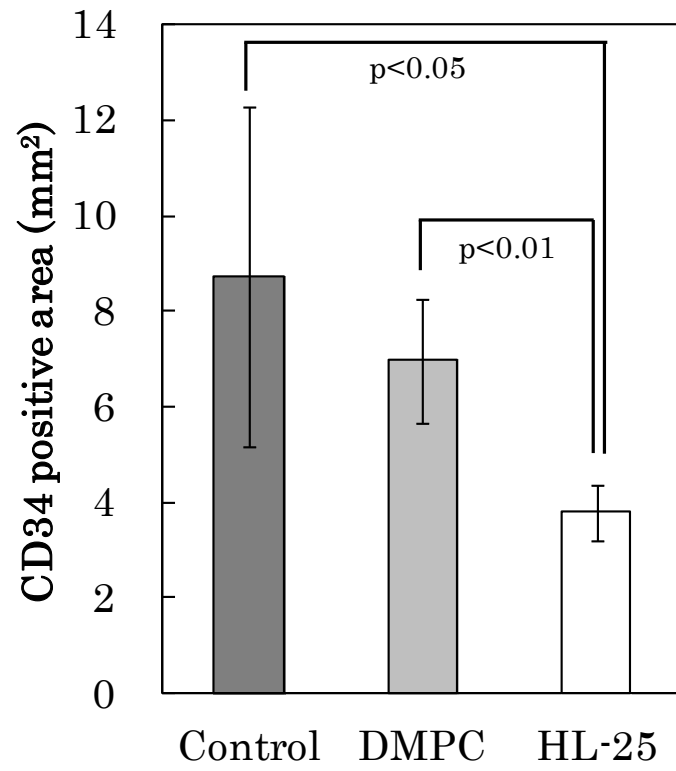


Fig. 3-8 Detection of CD34 positive area using “ImageJ” software.

Table 3-4. Detection of CD34 positive area using “ImageJ” software.

Sample	Dose (mg/kg)	CD34 positive area (mm ²)
Control (5%Glucose solution)	—	8.73 ±3.55
DMPC	DMPC 203	6.97 ±1.29
HL-25	DMPC 203 <hr/> C ₁₂ (EO) ₂₅ 17.5	3.79 ±0.59

Values represent mean±S.D.

3-4 総括

本章では、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$ ハイブリッドリポソーム (HL-25) のヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果、血管新生抑制効果を検討した。ヌードマウスに MDA-MB-453 細胞を皮下移植して治療実験を実施し、腫瘍組織切片に対しては CD34 免疫染色を用いた血管新生抑制実験を行った。その結果、以下の様な興味深い知見が得られた。

1. 投与期間中、Control 未治療群および DMPC 投与群の腫瘍体積は継続的に増大した。これに対して HL-25 治療群の腫瘍体積は、ほぼ一定の大きさで推移した。投与最終日には Control 未治療群の平均腫瘍体積が 435.03mm^3 、DMPC 投与群の平均腫瘍体積が 516.14mm^3 であったのに対し、HL-25 治療群の平均腫瘍体積は 191.94mm^3 となり抑制率は約 65%であった。
2. 投与終了後の腫瘍観察により、Control 未治療群および DMPC 投与群では腫瘍表面の新生血管が多数見られたが HL-25 治療群ではほとんど見られず、血管新生抑制効果が示唆された。
3. 投与終了後の腫瘍重量により、Control 未治療群および DMPC 投与群と比較して HL-25 治療群は顕著に腫瘍重量が小さく、腫瘍増殖抑制効果が明らかとなった。
4. CD34 免疫染色を用いた腫瘍組織切片の観察により、Control 未治療群および DMPC 投与群と比較して HL-25 治療群は CD34 陽性領域の減少が見られた。また画像処理ソフトを使用しても、同様の結果が得られた。

以上の結果から、HL-25 は MDA-MB-453 細胞皮下移植モデルマウスに対して血管新生抑制を伴う抗腫瘍効果を持つことが示唆された。通常では、血管新生抑制薬は他の抗がん薬と併用されるため、その副作用が問題となる。しかし HL-25 は副作用が無く、血管新生抑制薬と抗がん薬 双方の効果があり、新しいタイプのがん治療薬として期待することができる。

第4章 ハイブリッドリポソームの血管新生抑制メカニズム

4-1 序

医薬品開発は、化合物の探索・基礎実験、非臨床試験（GLP : Good Laboratory Practice）、臨床試験・治験（GCP : Good Clinical Practice）を経て、厚生労働省の承認申請へと進んでいく。日本では非臨床試験と臨床試験を合わせると、6～12年程度の期間が必要となる。基礎実験および非臨床試験では、細胞実験（*in vitro*）や動物実験（*in vivo*）を実施する。医薬品はその後も医薬品製造管理（GMP : Good Manufacturing Practice）、医薬品品質管理（GQP : Good Quality Practice）、医薬品販売後の安全管理（GVP : Good Vigilance Practice）等、これらの基準に準じて厳格な管理がなされている。

細胞実験はこのプロセスの一部である。実験手順およびその結果は、正しく評価されなければならない。さもなければ、後々の影響が計り知れないものとなる。始めの一步は、目的とともに倫理観を持つべき一步となる。

第3章では、実験動物に対する治療効果およびCD34免疫染色を用いた血管新生抑制効果を検証した。その結果、HL-25単体は抗腫瘍効果および血管新生抑制効果を有することが明らかとなった。血管新生抑制現象が早期に起きると、がん細胞に抗がん薬の送達が困難な状態となり抗腫瘍効果が低下する。血管新生抑制現象が遅過ぎると、がん細胞が増殖していく恐れがある。HL-25単体でモデル動物に対する顕著な治療効果が得られたのは、抗腫瘍現象と血管新生抑制現象がバランスの取れた状態で進行した結果と思われる。

本章では、血管内皮細胞（HUVEC）を用いて *in vivo* における 95mol% DMPC/5mol% C₁₂(EO)₂₅ ハイブリッドリポソーム（HL-25）の血管新生抑制メカニズムについて検討した。HUVECの生存に影響を与えないHL-25の濃度範囲において、管腔形成の影響および血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の産生抑制について検討した。

4-2 実験

4-2-1 試料

リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_{25}$) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

4-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソーム (HL-25) は、2-2-2 と同様のものを使用した。

4-2-3 使用細胞

細胞毒性試験は正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を使用し、培養には増殖添加剤を加えた基礎培地 HuMedia-EB2 を使用した。継代用試薬としてトリプシン/EDTA 溶液、トリプシン中和液、HEPES 緩衝液を使用し、37℃、湿度 95%、CO₂ 濃度 5%の条件で培養を行った。

管腔形成抑制試験は、HUVEC と皮膚繊維芽細胞(NHDF)の 2 種類の細胞を使用し、これらの細胞が血管新生キットの 24well プレート上に共培養された状態のもので行った。HUVEC は細胞毒性試験に用いた細胞と同様のものである。HUVEC と NHDF は血管新生専用培地に血管新生促進因子である VEGF-A を添加した培地で培養した。なお、細胞および培養に必要な試薬は全て倉敷紡績株式会社より入手したものを使用した。

4-2-4 細胞毒性試験

HL の細胞毒性試験は、酵素活性測定法である WST-1 assay 法⁷³⁾により実施した (Fig. 4-1)。HUVEC を 5 万 cells/ml となるように調製し、96well プレートに播種した。24 時間前培養を行った後サンプルを添加した。48 時間後に WST-1 を添加し、呈色後 波長 450nm における WST-1 formazan の吸光度を分

光光度計により測定した。生存率は 5% グルコース溶液を添加した場合の吸光度 (A_{Control}) とサンプルを添加した場合の吸光度 (A_{Mean}) の比より算出した。

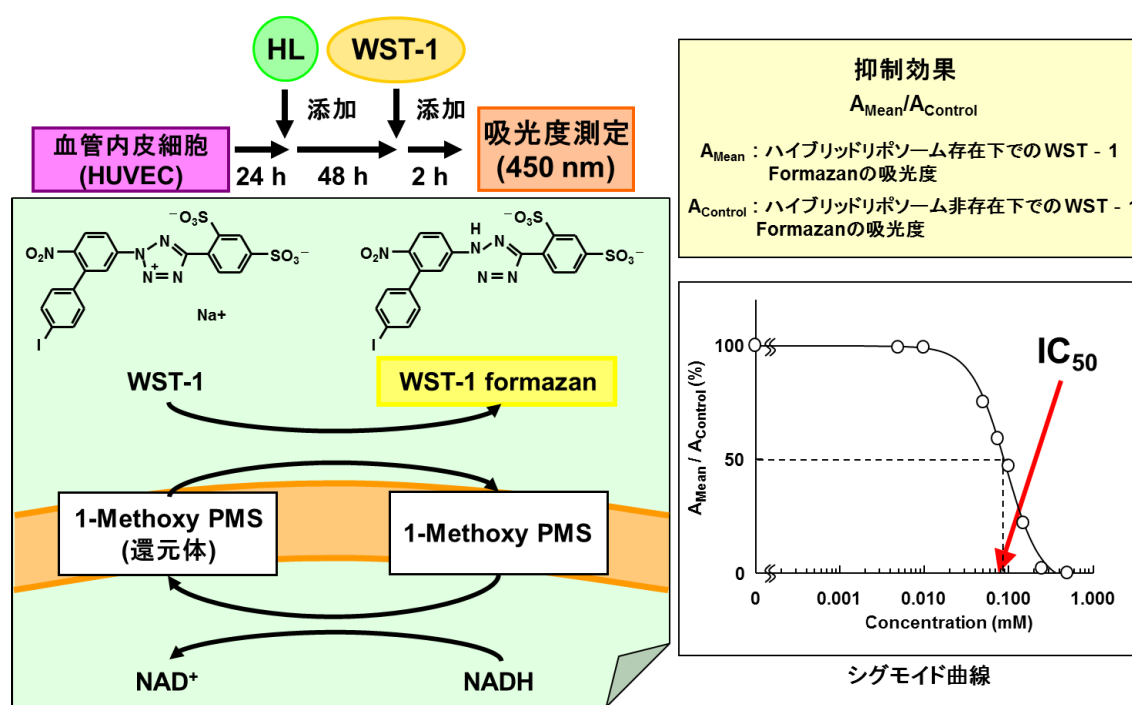
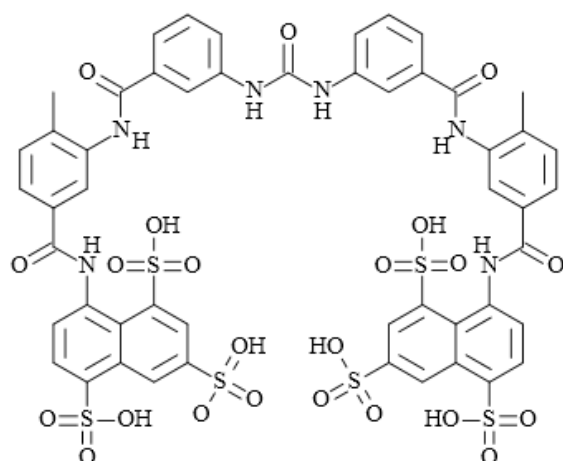


Fig. 4-1 WST-1 assay 法

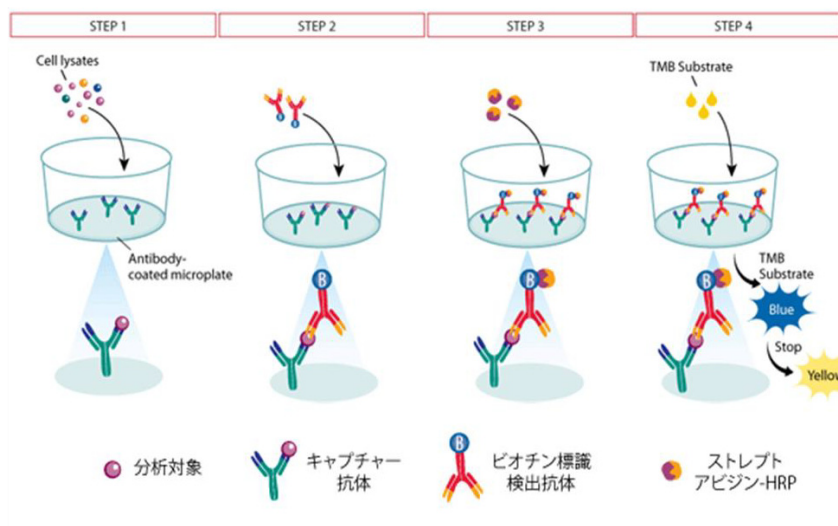
4-2-5 管腔形成抑制試験

培養 1, 4, 7, 9 日目に VEGF とサンプルを添加した専用培地で培地交換した。抑制効果の判定のため、HL-25 の溶媒である 5% グルコース溶液のみを添加した Control および管腔形成抑制効果を持つ Suramin (0.05mM) を設定した (Fig. 4-2)。なお、Suramin の血管新生抑制作用は、血管内皮細胞表面にある受容体に作用し増殖因子の結合の阻害によると考えられている⁷⁴⁾。

顕微鏡にて画像の撮影を行い、撮影した画像を元に画像処理ソフト「ImageJ」を用いて CD31 陽性領域の定量化を行った。画像は各 5 枚(Control のみ細胞の剥離により観察に適している部分が小さく 3 枚) ずつ解析し、平均値をグラフ化した。



VEGF産生抑制試験方法



MDA-MB-453細胞を
 5.0×10^4 cells/mlで播種
 HL添加

5日間培養

染色

吸光度の測定

Fig. 4-3 ELISA 法の概要

4-3 結果と考察

4-3-1 ハイブリッドリポソームの管腔形成抑制効果

HL を血管内皮細胞に添加する際の適切な濃度域を求めるため、HL の血管内皮細胞に対する細胞毒性試験を実施した。結果を Fig. 4-4 に示す。また、細胞毒性試験の結果から得られた増殖抑制濃度を Table 4-1 に示す。図中に示している濃度は培地中の最終濃度である。

DMPC の増殖抑制濃度に関しては、生存率が 50%を下回らなかったため算出できなかった。1500 μ M や 3000 μ M の高濃度の well を顕微鏡観察したところ、沈殿が生じているのが観察された。

HL-25 は最終濃度が 200 μ M 以下であれば、血管内皮細胞の増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。この結果を元にして管腔形成抑制試験を実施した。血管新生キットを用いて管腔形成を観察した結果を Fig. 4-5 に示す。画像中で黒く見えている部分が CD31 免疫染色によって染色された血管内皮細胞である。画像の観察から、Control および DMPC と比較して、HL-25 を添加したものでは管腔の長さ、管腔の数が少なくなっており、HUVEC の管腔形成抑制が観察された。

画像処理ソフト「ImageJ」を用いて CD31 陽性領域を赤色で示した画像を Fig. 4-6 に、管腔領域を定量化した結果を Fig. 4-7、Table 4-2 に示す。画像の観察結果と同様、Control および DMPC と比較して HL-25 を添加したものでは管腔面積が顕著に小さくなった。培地中の HL-25 の濃度が HUVEC の IC₅₀ 相当の濃度の時でも管腔形成を有意に抑制しているため、HL-25 が HUVEC の生存に影響を与えない濃度における管腔形成抑制効果が示唆された。

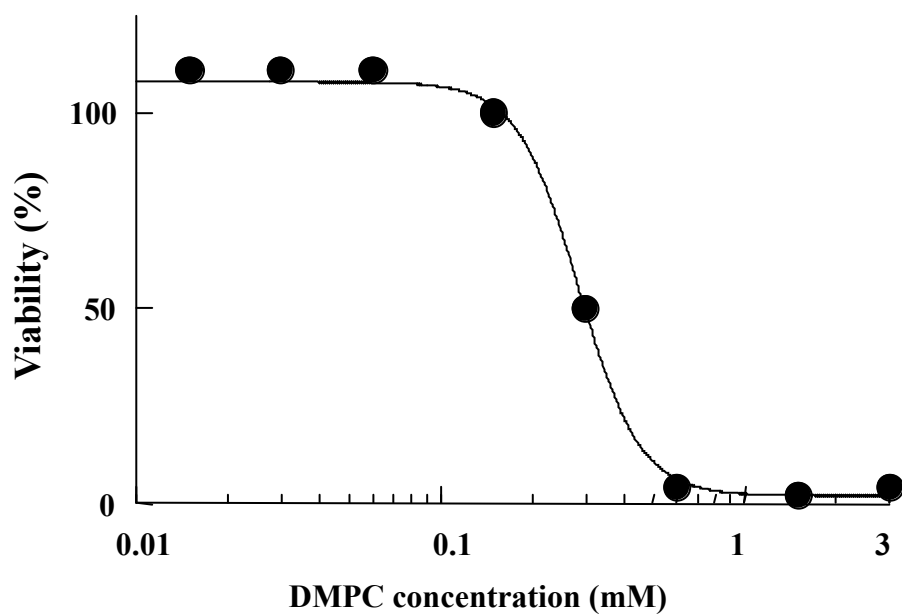


Fig. 4-4 Cytotoxic activity after addition of HL-25 in HUVECs.

Table 4-1 5~50% Inhibitory concentration ($IC_5 \sim IC_{50}$) of HL on the growth of HUVECs.

IC_5	IC_{10}	IC_{20}	IC_{50}
160 μ M	180 μ M	200 μ M	270 μ M

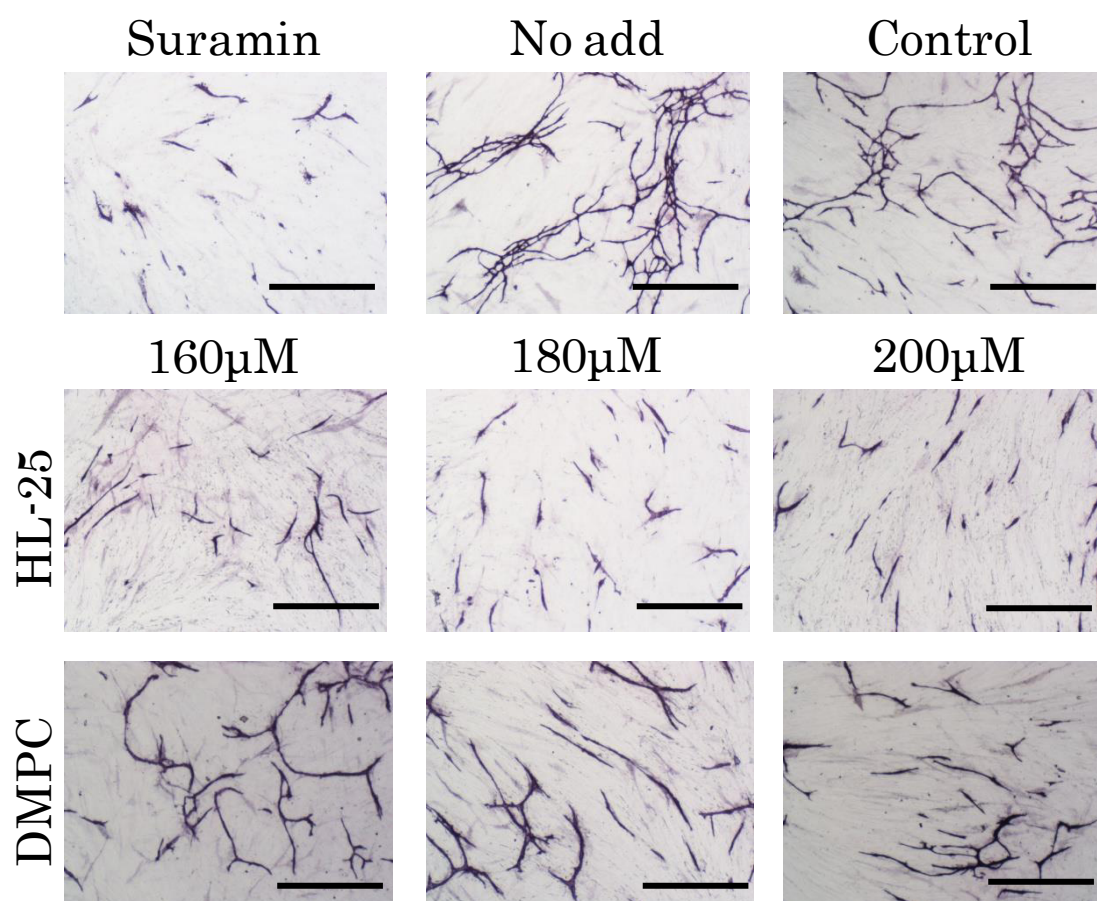


Fig. 4-5 Inhibitory effect of HL-25 on the tube formation of HUVECs.
Scale bar: 10mm

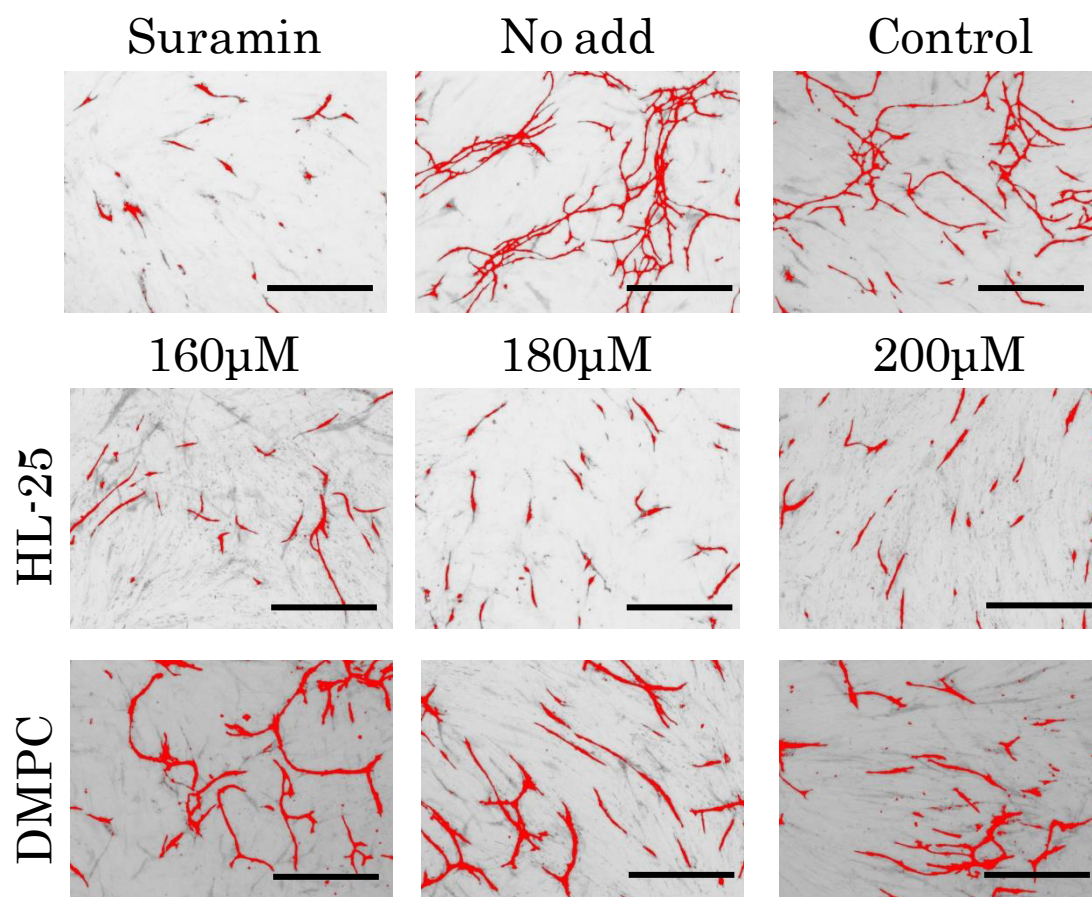


Fig. 4-6 Detection of CD31 positive area using ImageJ software.

Scale bar: 10mm

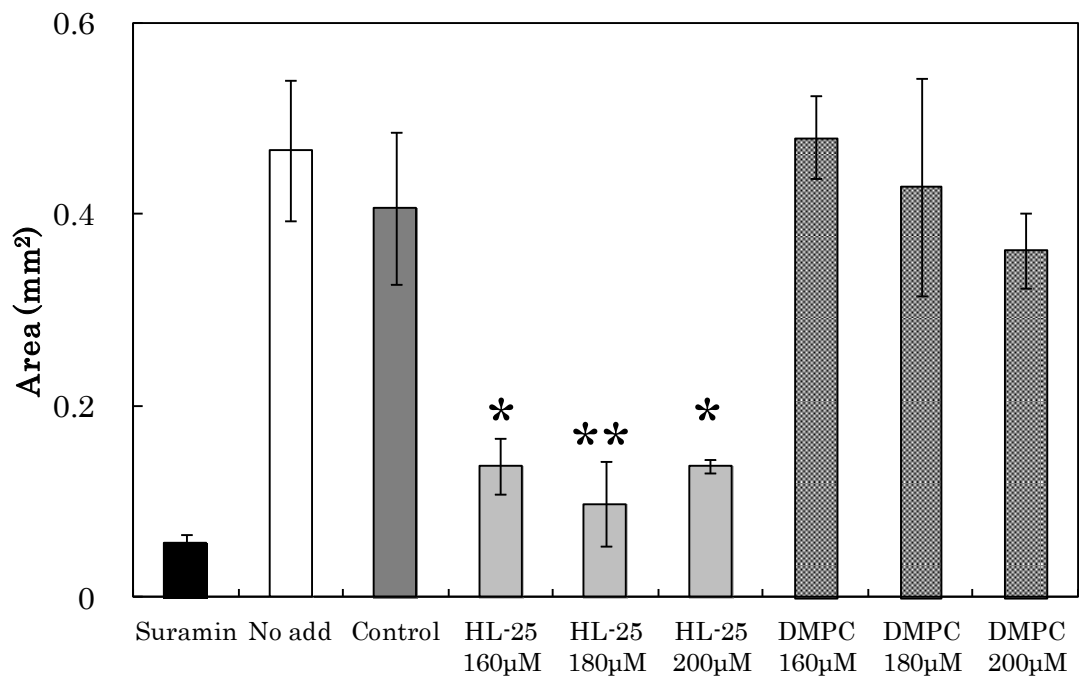


Fig. 4-7 Quantification of CD31 positive area using ImageJ software.

* $p < 0.05$ vs. a control group. ** $p < 0.01$ vs. a control group.

Table 4-2 Detection of CD31 positive area using “ImageJ” software.

Sample	Final concentration [μM]	CD31 positive area (mm ²)
Suramin	1000	0.056±0.010
No add	—	0.467±0.073
Control	—	0.406±0.079
HL-25	160	0.136±0.029
	180	0.097±0.045
	200	0.137±0.007
DMPC	160	0.481±0.044
	180	0.429±0.114
	200	0.362±0.040

Values represent mean±S.D.

4-3-2 ハイブリッドリポソームの VEGF 産生抑制効果

各 HL 濃度における VEGF 濃度を Fig. 4-8、Table 4-3 に示す。HL-25 を添加したものは、グルコースを添加した Control (HL-25 濃度 $0\ \mu\text{M}$) と比較して、HL 濃度依存的に VEGF の濃度が減少していることが明らかとなった。このことから HL-25 は、ヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞に対して VEGF 産生を抑制している可能性が示された。

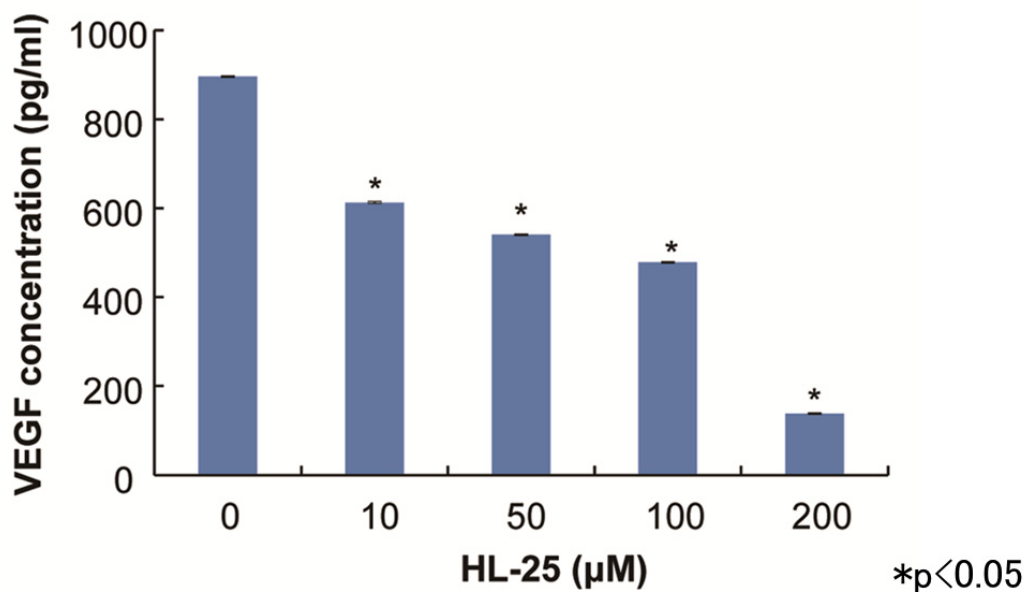


Fig. 4-8 HL-25 による VEGF 産生抑制効果

Table 4-3 Concentration of VEGF in MDA-MB-453 cells treated with HL-25 using ELISA.

Sample	DMPC concentration [μ M]	VEGF concentration [pg/ml]
Control	—	896 \pm 0.19
HL-25	10	613 \pm 0.18
	50	540 \pm 0.2
	100	478 \pm 0.12
	200	138 \pm 0.07

Values represent mean \pm S.D.

4-4 総括

本章では、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{25}$ ハイブリッドリポソーム (HL-25) の血管新生抑制メカニズムについて検討した。血管内皮細胞 (HUVEC) に対する HL-25 の細胞毒性試験および HUVEC の管腔形成抑制試験を実施した。管腔形成抑制効果では、血管新生キットを使用した。その結果、以下の様な興味深い知見が得られた。

1. 細胞毒性試験の結果より、HL-25 の培地中濃度が 200 μ M 以下であれば、HUVEC の増殖にほとんど影響を及ぼさないことが分かった。
2. HL-25 の培地中濃度が 160~200 μ M の低濃度域において HUVEC の管腔形成を顕著に抑制することが明らかとなった。
3. HL-25 は、濃度依存的に血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生を抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、HL-25 は HUVEC の生存に影響を与えない濃度において管腔形成を抑制することが明らかとなった。また、そのメカニズムの 1 つとして、HL-25 は MDA-MB-453 細胞における VEGF の産生を抑制していることが明らかとなった。今後、HL-25 で処理したがん細胞における HUVEC の遊走阻害効果等を検討することにより、血管新生阻害メカニズムの解明が期待される。

第5章 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスに対するハイブリッド リポソームの治療効果

5-1 序

関節リウマチ (RA : Rheumatoid Arthritis) は原因不明の自己免疫疾患のひとつで、現在も根本的治療法が見出されていない難治性疾患である。RA を研究する上で必要なものに動物実験があり、種々の動物モデルが開発されてきた⁶²⁾。RA では結合組織成分のコラーゲンに対する自己免疫反応に関わる症例が多数あることに基づいて、1977 年 Trentham らはウシⅡ型コラーゲン (ⅡC) をラットに免疫することにより RA によく似た多発性関節炎の誘導に成功した⁶³⁾。その後 1980 年に Courtenary らによって、マウスを用いたコラーゲン誘発 RA (CIA : Collagen Induced Arthritis) モデルマウスが作製された。マウスは免疫遺伝学的によく解析されていて、評価精度も向上する。CIA モデルマウスは RA の病態に近いモデルとして、病態の解析および薬効の評価等によく利用されている⁶⁴⁾。

RA における関節滑膜を反応主座とする種々の反応には、次のようなものがある。まず滑膜線維芽細胞の異常な増殖と活性化であり、活性化した滑膜線維芽細胞は炎症メディエーターの刺激により更なる炎症性サイトカインの産生を引き起こす。それと同時に、活性化した滑膜線維芽細胞は破骨細胞分化に必須であるサイトカインの receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) を大量産生し、破骨細胞を分化させ骨破壊を引き起こす。また Matrix metalloproteinase (MMP) を産生し軟骨破壊を引き起こす。関節滑膜では、炎症性サイトカインの産生が異常化して更なる炎症性サイトカインを大量に継続して産生する炎症性サイトカインカスケードの状態となっている。RA では炎症性サイトカインの中でも特に、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、インターロイキン-6 (IL-6) が重要である。

本章では、CIA モデルマウスに対する 95mol%DMPC/5mol%C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッドリポソーム (HL-23) の治療効果を検討した。関節部位の組織構造は組織染色を用いて、炎症性サイトカインは免疫染色を用いて、それぞれの評価を行った。

5-2 実験

5-2-1 試料

リン脂質 (DMPC) および PEG 系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_{23}$) は、2-2-1 と同様のものを使用した。

5-2-2 ハイブリッドリポソームの調製

ハイブリッドリポソーム (HL-23) は、2-2-2 と同様のものを使用した。

5-2-3 使用動物

実験用動物は、DBA マウス (DBA/1J Sea、雌性、5 週齢、九動株式会社) を使用した。

5-2-4 飼育条件

マウスは、恒温恒湿環境下 (室温 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$) で飼育した。水および餌は自由に摂取させた。

5-2-5 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスの作製法

DBA マウス (DBA/1J Sea, 5 週齢, 九動株式会社) を用い、初回免疫として 1mg/ml ウシⅡ型コラーゲン (Ⅱ C, Chondrex) および完全フロントアジュバント (FCA, テクノケミカル株式会社) の等量混合液 0.1ml をマウスの尾根部皮下に注射した。初回免疫当日から 21 日後、追加免疫としてウシⅡ型コラーゲンおよび不完全フロントアジュバント (FIA, テクノケミカル株式会社) の等量混合液 0.1ml を初回免疫同様にマウスの尾根部皮下に注射し、関節リウマチモデルマウスである CIA (Collagen Induced Arthritis) モデルマウスを作製した (Fig. 5-1)。

5-2-6 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスに対する治療実験

DBA マウス (DBA/1J Sea、雌性、5 週齢、九動株式会社) を使用して CIA モデルマウスを作製した。初回免疫当日の体重をもとに層別連続無作為化法により Control (5% glucose) 群および HL-23 治療群の二つに群分けを行った。追加免疫後からサンプルを 1 日 1 回 (10ml/kg、Dose for DMPC : 136mg/kg) 腹腔内に 2 週間反復投与を行い、その後 1 日おきに 80 日間投与した。投与期間中は毎日、一般状態の観察および体重測定を行った。治療効果については、目視観察およびスコア法により評価した (Fig. 5-2)。



Fig. 5-1 CIA モデルマウス作製法および治療実験の流れ

5-2-7 スコア法による評価

CIA モデルマウスの手および足の腫れは、スコア法のカウント方法⁶⁵⁾を参考に実施した。手および足の指については発赤と膨張があれば0.1とした。手首については、手首関節部のくびれがなくなったときを0.5、それよりもさらに凸に飛び出したときを1.0とした。足首については、アキレス腱のまわりの窪みが見えなくなったときを0.5、それよりもさらに凸に飛び出したときを1.0とした。スコア法のカウント方法を Fig. 5-2 に示す。

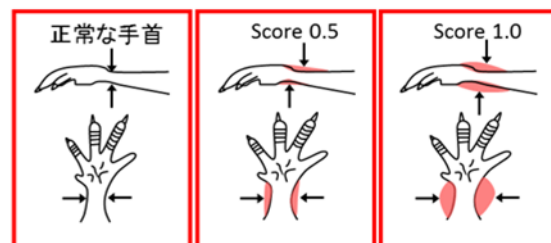
【手指、足指】

発赤と膨張があれば0.1とした。



【手首】

手首関節部のくびれがなくなった0.5、それよりも凸に飛び出した時1.0とした。



【足首】

アキレス腱付着部が鈍角になりアキレス腱のまわりのくぼみが見えなくなった時0.5、さらに凸に飛び出した時1.0とした。

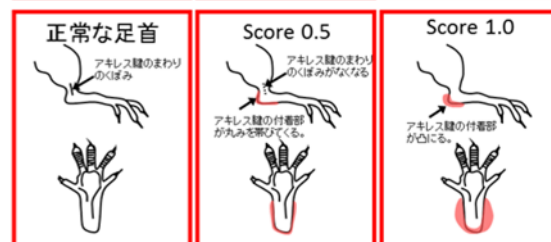
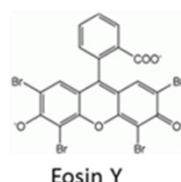
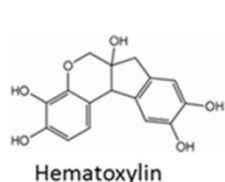


Fig. 5-2 スコア法のカウント方法

5-2-8 HE 染色による組織切片観察

DBA マウス (DBA/1J Sea、雌性、5 週齢、九動株式会社) を使用して CIA モデルマウスを作製した。初回免疫当日の体重をもとに層別連続無作為化法により Control (5% glucose) 群および HL-23 治療群の二つに群分けを行った。追加免疫後からサンプルを 1 日 1 回 (10ml/kg、Dose for DMPC : 136mg/kg) 腹腔内に 2 週間反復投与を行い、その後 1 日おきに 80 日間投与した。投与終了後、解剖して指のサンプルを採取し、ホルマリンで固定した。HE 染色組織切片の作製は株式会社バイオ病理研究所に委託し、Nikon DS カメラコントロールユニットを用いて切片観察を行った。

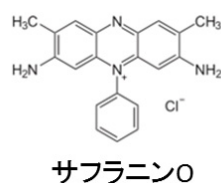
HE 染色は単に組織の形態を観察する目的で、細胞核・細胞質等を染色する方法である。関節の構造破壊状態を観察する目的で実施した。



5-2-9 サフラニン O 染色による組織切片観察

DBA マウス (DBA/1J Sea、雌性、5 週齢、九動株式会社) を使用して CIA モデルマウスを作製した。初回免疫当日の体重をもとに層別連続無作為化法により Control (5% glucose) 群および HL-23 治療群の二つに群分けを行った。追加免疫後からサンプルを 1 日 1 回 (10ml/kg、Dose for DMPC : 136mg/kg) 腹腔内に 2 週間反復投与を行い、その後 1 日おきに 80 日間投与した。投与終了後、解剖して指のサンプルを採取し、ホルマリンで固定した。サフラニン O 染色組織切片の作製は株式会社バイオ病理研究所に委託し、Nikon DS カメラコントロールユニットを用いて切片観察を行った。

サフラニン O 染色は、関節軟骨部位を赤く染める。軟骨の破壊状態を観察する目的で実施した。



5-2-10 免疫染色による組織切片観察

DBA マウス (DBA/1J Sea、雌性、5 週齢、九動株式会社) を使用して CIA モデルマウスを作製した。初回免疫当日の体重をもとに層別連続無作為化法により Control (5% glucose) 群および HL-23 治療群の二つに群分けを行った。追加免疫後からサンプルを 1 日 1 回 (10ml/kg、Dose for DMPC : 136mg/kg) 腹腔内に 2 週間反復投与を行い、その後 1 日おきに 80 日間投与した。投与終了後、解剖して指のサンプルを採取し、ホルマリンで固定した。免疫染色組織切片の作製は株式会社バイオ病理研究所に委託し、Nikon DS カメラコントロールユニットを用いて切片観察を行った。なお免疫染色には、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の 3 種類で治療評価を行った。

免疫染色は、抗体を用いて実験サンプル中の抗原を検出し発色反応で可視化する方法で、抗原抗体反応を応用したものである。概念図を Fig. 5-3 に示す。

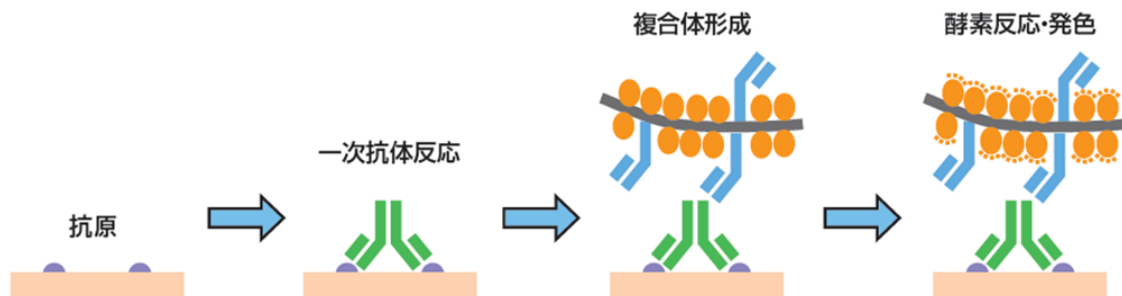


Fig. 5-3 免疫染色の概念図

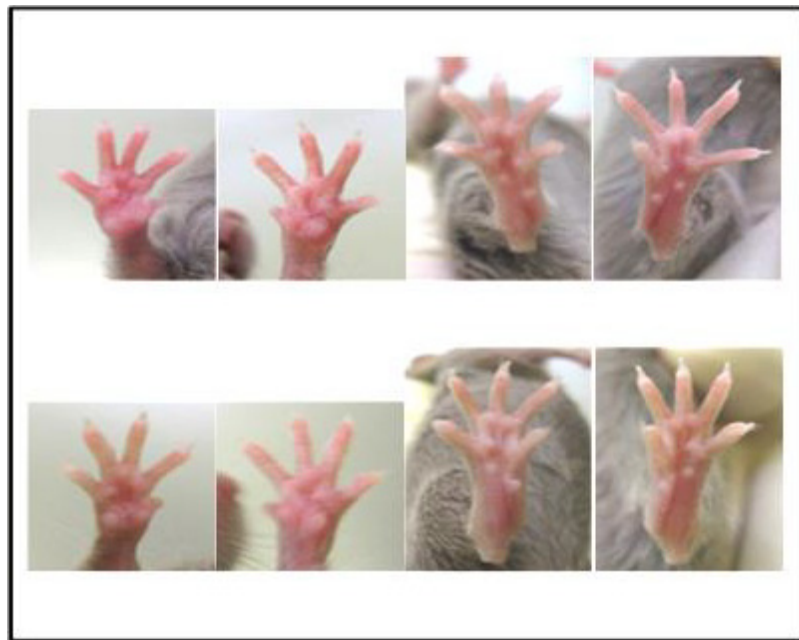
5-3 結果と考察

5-3-1 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスの作製

ハイブリッドリポソーム HL-23 の RA 治療効果を検討するため、DBA マウスを使用して関節リウマチモデルマウス（CIA モデルマウス）を作製した。

Fig. 5-4 に免疫投与前と初回免疫投与後 5 週目における DBA マウスの足の画像写真を示す。初回免疫後 5 週目における DBA マウスの写真から明らかなように、足の指関節の腫れが観察された。

この結果より、比較的短期間で CIA モデルマウスの作製に成功した。



5weeks after

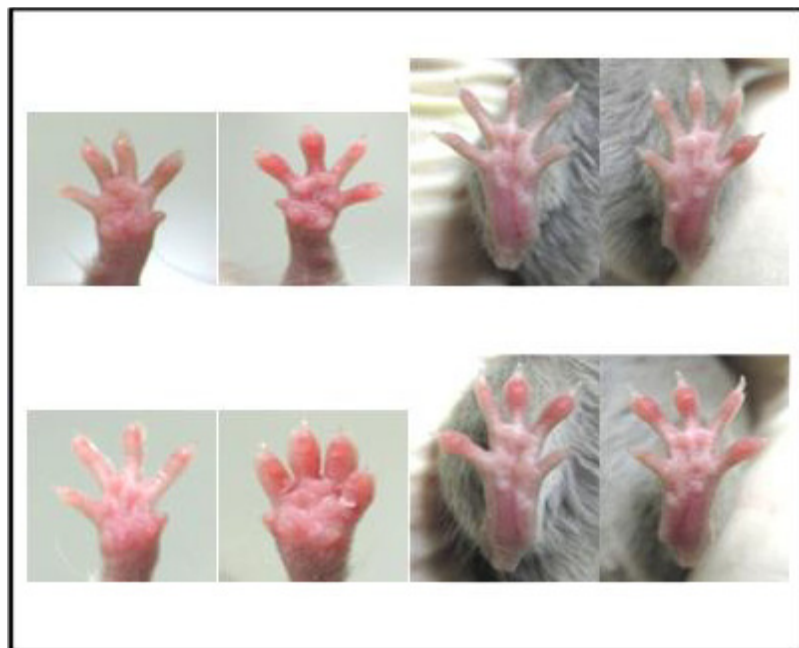


Fig. 5-4 Photographs of foot pad of DBA mice after the first immunity.

5-3-2 コラーゲン誘発関節リウマチモデルマウスに対する治療効果

関節リウマチに対する 95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッドリポソーム (HL-23) の治療効果を検討するために、CIA モデルマウスを使用した治療実験を行った。

追加免疫後の体重測定の結果を Table 5-1~5-3 に示す。また、Control 未治療群と HL-23 治療群の体重変化のグラフを Fig. 5-5 に示す。グラフからわかるように、Control 未治療群と HL-23 治療群には大きな体重の差はみられなかった。

次に、CIA マウスの Control 未治療群と HL-23 治療群の追加免疫投与前と追加免疫投与後 10 週目における足の画像写真を Fig. 5-6 に示す。HL-23 治療群と比較して、Control 未治療群は足の腫れが確認された。また、追加免疫後の CIA マウスの足のスコア推移グラフを Fig. 5-7 に示す。Control 未治療群と比較して、HL-23 治療群は顕著なスコアの減少が見られ、統計的有意差 ($p<0.05$) が確認された。

以上の結果から、CIA モデルマウスに対する HL-23 の治療効果が明らかとなった。

Table 5-1 Body weight change for CIA model mice treated with HL-23.

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		1day	2days	3days	4days	5days	6days	7days
Control	—	19.7 ± 0.9	19.5 ± 1.0	19.9 ± 1.3	19.4 ± 1.2	19.4 ± 1.2	20.4 ± 1.2	19.1 ± 0.9
HL-23	DMPC							
	136	19.5	18.9	19.3	19.2	19.4	19.8	19.0
	C ₁₂ (EO) ₂₃	± 0.9	± 1.0	± 0.9	± 0.9	± 0.8	± 0.9	± 0.8
	11.7							

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		8days	9days	10days	11days	12days	13days	14days
Control	—	19.1 ± 0.8	19.7 ± 0.8	19.9 ± 0.7	19.3 ± 0.8	19.7 ± 0.9	19.5 ± 1.0	19.5 ± 1.0
HL-23	DMPC							
	136	19.2	20.1	20.1	19.5	19.8	19.9	20.2
	C ₁₂ (EO) ₂₃	± 0.9	± 0.9	± 1.0	± 0.9	± 1.0	± 0.9	± 0.9
	11.7							

Values represent mean \pm S.D.

Table 5-2 Body weight change for CIA model mice treated with HL-23.

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		15days	18days	20days	21days	25days	27days	29days
Control	—	19.2 ±1.0	20.3 ±0.9	20.2 ±0.7	20.7 ±1.0	20.9 ±1.0	21.1 ±1.1	20.8 ±0.8
DMPC								
HL-23	136	19.9	20.4	20.4	20.4	21.2	21.3	21.3
	C ₁₂ (EO) ₂₃	±1.0	±0.8	±1.2	±1.0	±0.8	±0.6	±0.6
	11.7							

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		32days	34days	36days	39days	41days	43days	48days
Control	—	21.0 ±1.0	21.1 ±0.9	21.4 ±1.0	20.9 ±0.5	20.4 ±1.0	21.4 ±1.1	22.3 ±0.8
DMPC								
HL-23	136	20.8	21.1	22.4	22.3	22.0	22.2	22.7
	C ₁₂ (EO) ₂₃	±1.0	±0.9	±0.8	±0.7	±0.6	±0.6	±1.2
	11.7							

Values represent mean±S.D.

Table 5-3 Body weight change for CIA model mice treated with HL-23.

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		50days	53days	55days	57days	60days	62days	64days
Control	—	22.0 ±1.1	22.4 ±1.4	22.6 ±1.1	23.3 ±1.1	22.8 ±0.7	22.3 ±0.8	22.3 ±0.6
HL-23	DMPC							
	136	22.7	22.5	23.5	23.3	23.2	23.2	23.2
	C ₁₂ (EO) ₂₃	±1.2	±0.8	±1.0	±0.6	±0.9	±1.1	±1.3
	11.7							

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		67days	69days	71days	74days	76days	78days	81days
Control	—	22.9 ±1.0	22.9 ±0.9	22.5 ±0.7	23.1 ±0.8	23.7 ±0.5	23.4 ±0.6	22.9 ±0.6
HL-23	DMPC							
	136	23.2	23.7	24.3	24.2	23.7	23.6	24.1
	C ₁₂ (EO) ₂₃	±1.0	±1.2	±0.8	±0.8	±1.3	±1.4	±1.4
	11.7							

	Dose (mg/kg)	Body Weight (g) on day						
		84days	85days	88days	90days	92days	95days	97days
Control	—	23.2 ±0.9	23.4 ±0.9	22.7 ±0.9	23.7 ±0.8	23.2 ±0.7	23.9 ±0.7	23.4 ±0.9
HL-23	DMPC							
	136	24.6	24.6	24.4	24.8	24.2	24.7	25.0
	C ₁₂ (EO) ₂₃	±1.0	±0.8	±0.8	±1.2	±1.1	±0.8	±0.7
	11.7							

Values represent mean±S.D.

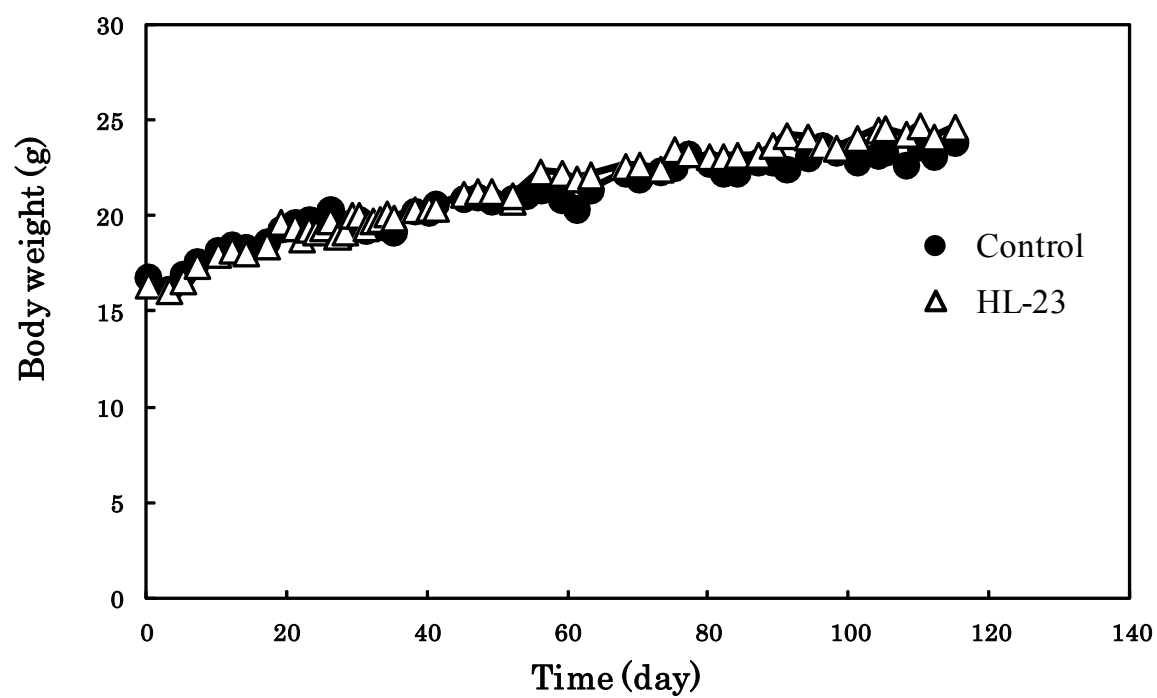


Fig. 5-5 Body weight change for CIA model mice treated with HL-23.

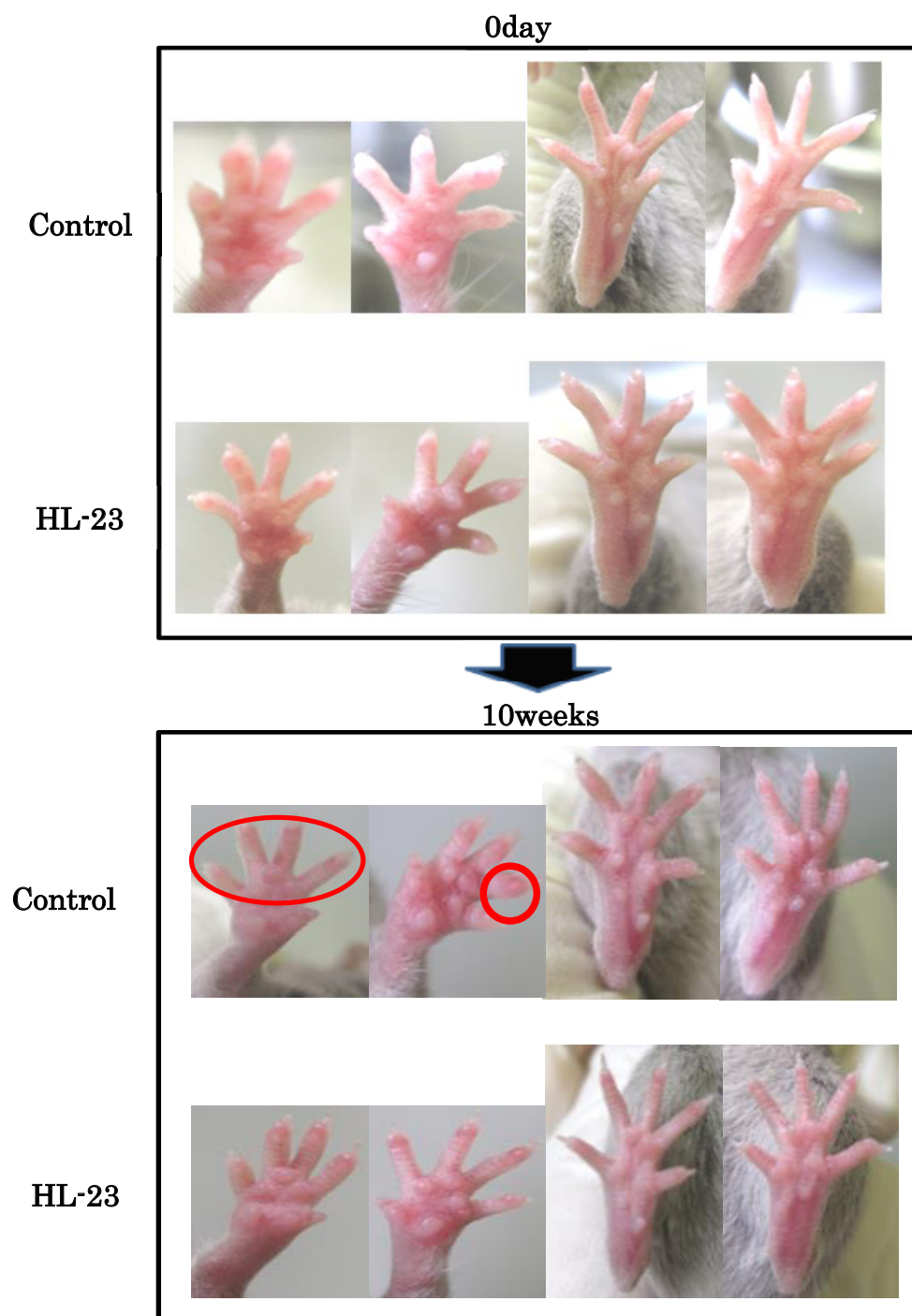


Fig. 5-6 Therapeutic effects of HL-23 for CIA model mice with rheumatoid arthritis.

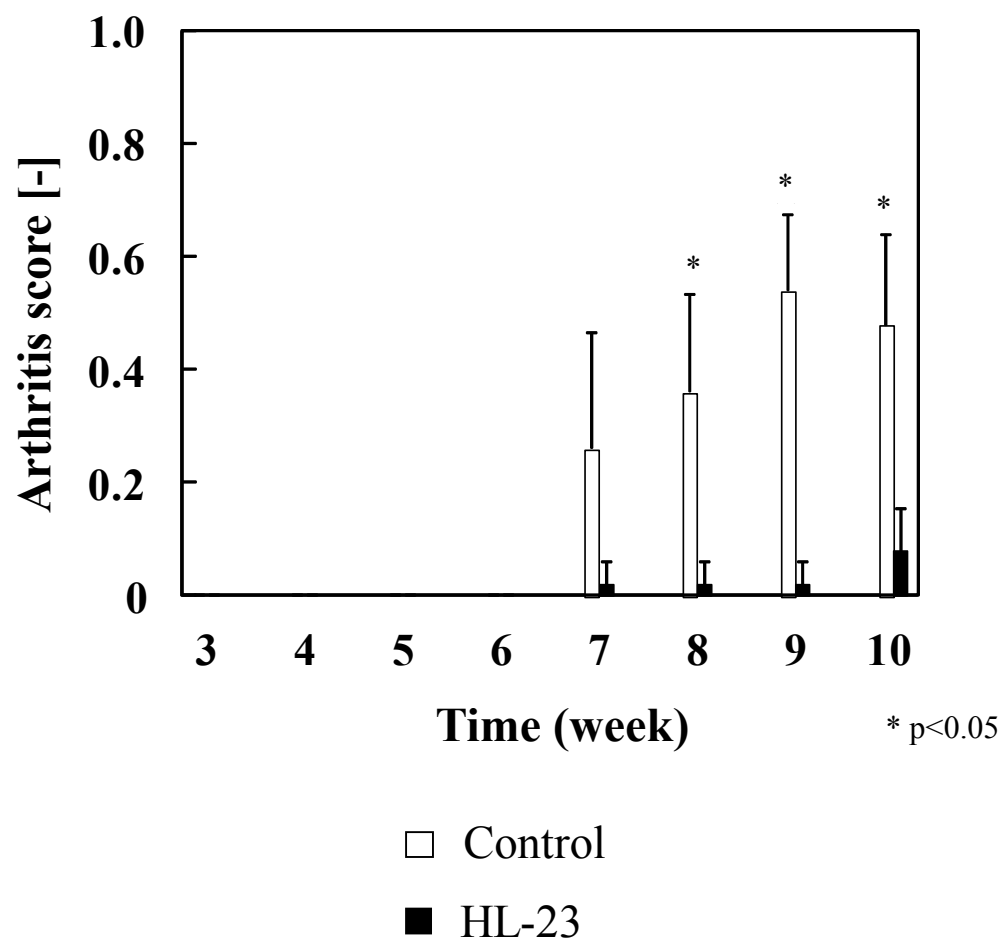


Fig. 5-7 Arthritis score of CIA model mice treated with HL-23.
Data represent mean \pm S.D.

5-3-3 ハイブリッドリポソームの関節リウマチ治療メカニズム

以上の結果から、HL-23 は CIA モデルマウスに対しての治療効果が明らかとなった。次に、組織染色および免疫染色を用いて、治療部位の組織構造の観察および炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6) の観察を行った。尚、CIA モデルマウス手指関節部位切片の作製は株式会社バイオ病理研究所に委託したが、切片の位置は Fig.5-8 に示した。

CIA モデルマウス手指関節部位切片の HE 染色画像を Fig.5-9 に示す。HL-23 治療群は Normal 群と同様に正常な関節組織を維持しているが、Control 未治療群では関節腔がつぶれ関節組織の破壊が見られた。この結果から HL-23 は CIA モデルマウスに対し、関節の骨破壊を抑制することが明らかとなった。

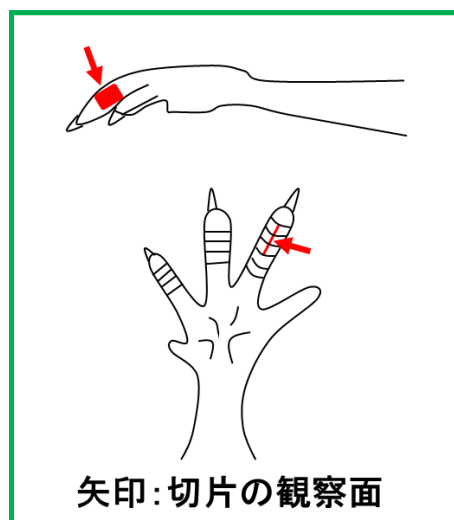
CIA モデルマウス手指関節部位切片のサフラニン O 染色画像を Fig.5-10 に示す。HL-23 治療群は Normal 群と同様に正常な関節組織および軟骨組織を維持しているが、Control 未治療群では軟骨組織の破壊が見られた。この結果から HL-23 は CIA モデルマウスに対し、関節の軟骨破壊を抑制することが明らかとなった。

CIA モデルマウス手指関節部位切片の IL-1 β 免疫染色の結果を Fig.5-11 に示す。HL-23 治療群は Normal 群と同様に IL-1 β 陽性細胞は見られなかったが、Control 未治療群では多数の IL-1 β 陽性細胞が見られた。この結果から HL-23 は CIA モデルマウスに対して、顕著な IL-1 β の産生抑制効果を示すことが明らかとなった。

CIA モデルマウス手指関節部位切片の TNF- α 免疫染色の結果を Fig.5-12 に示す。HL-23 治療群は Normal 群と同様に TNF- α 陽性細胞は見られなかったが、Control 未治療群では多数の TNF- α 陽性細胞が見られた。この結果から HL-23 は CIA モデルマウスに対して、顕著な TNF- α の産生抑制効果を示すことが明らかとなった。

CIA モデルマウス手指関節部位切片の IL-6 免疫染色の結果を Fig.5-13 に示す。HL-23 治療群は Normal 群と同様に IL-6 陽性細胞は見られなかったが、Control 未治療群では多数の IL-6 陽性細胞が見られた。この結果から HL-23 は CIA モデルマウスに対して、顕著な IL-6 の産生抑制効果を示すことが明らかとなった。

HE・サフラニンO 組織染色
IL-1 β ・TNF- α 免疫染色



IL-6 免疫染色

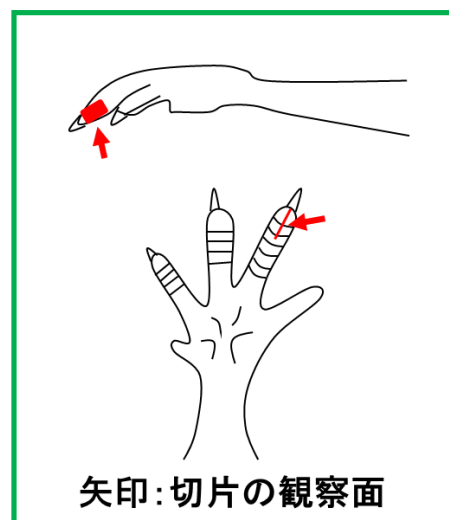
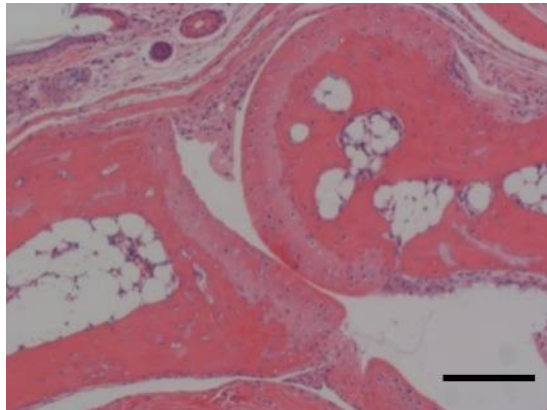
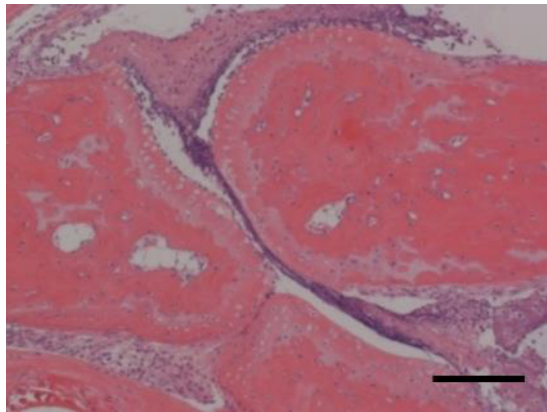


Fig. 5-8 CIA モデルマウスの組織切片作製における手指関節部位の位置

Normal



Control

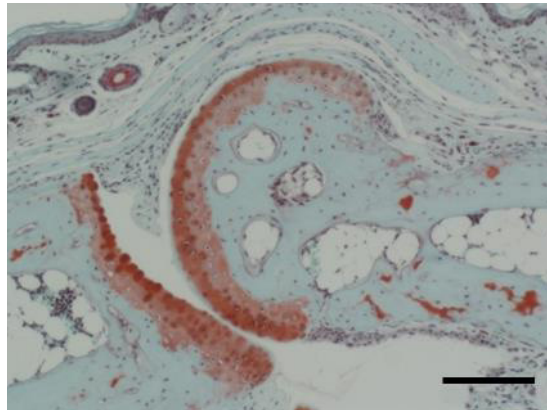


HL-23

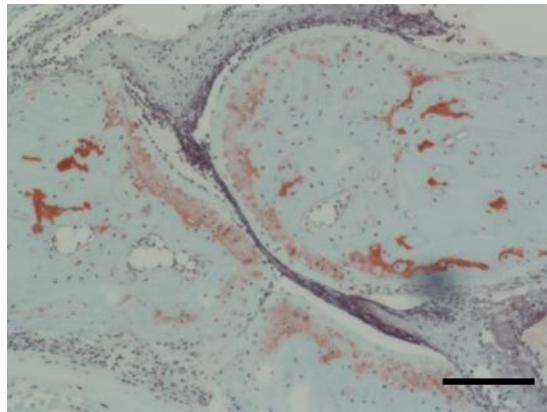


Fig. 5-9 Therapeutic effects of HL-23 for CIA mouse models with rheumatoid arthritis on the basis of HE staining of tissue sections in finger. Dose for DMPC; 136 mg/ kg. Scale bar : 100 μ m.

Normal



Control



HL-23

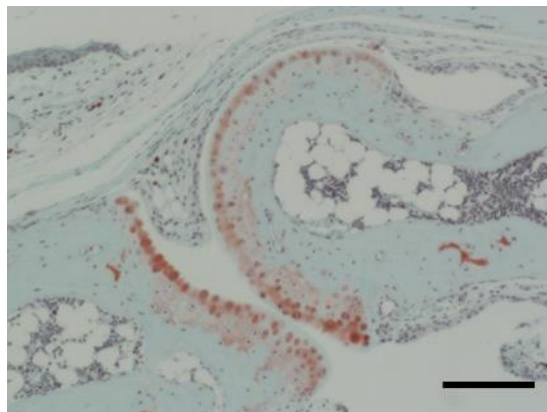
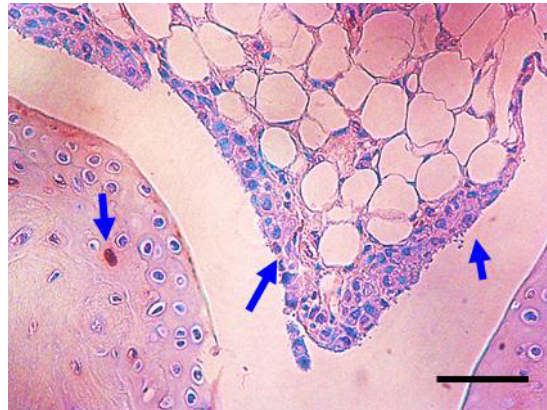
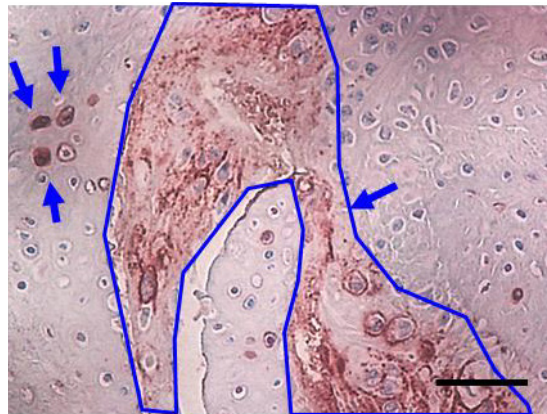


Fig. 5-10 Therapeutic effects of HL-23 for CIA mouse models with rheumatoid arthritis on the basis of safranin staining of tissue sections in finger. Dose for DMPC; 136 mg/ kg. Scale bar : 100 μ m.

Normal



Control



HL-23

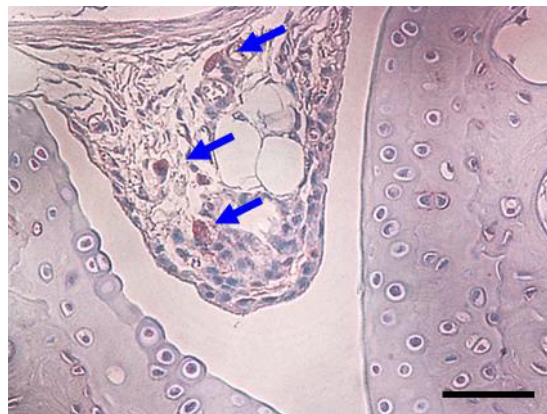
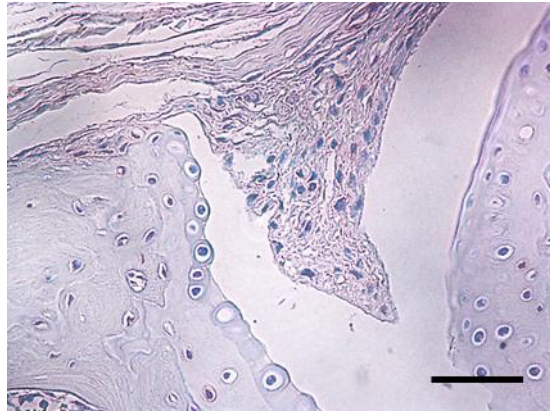
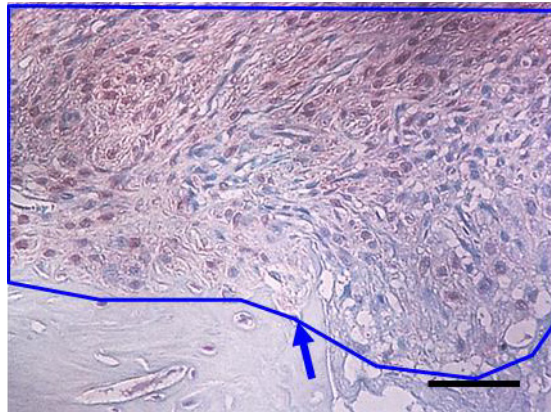


Fig. 5-11 Therapeutic effects of HL for CIA mouse models with rheumatoid arthritis in tissue sections in finger using immunostaining of IL-1 β . Dose for DMPC ; 136 mg/ kg. Arrows indicate IL-1 β positive cells. Scale bar : 50 μ m.

Normal



Control



HL-23

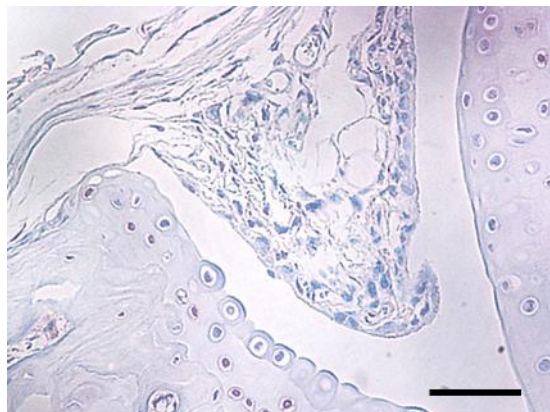
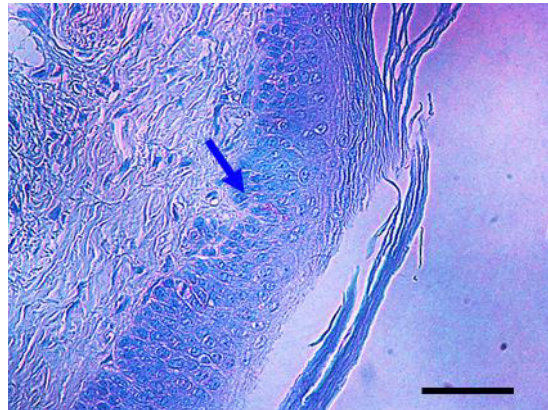
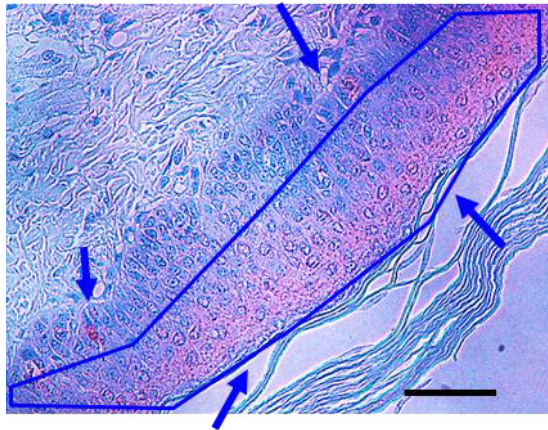


Fig. 5-12 Therapeutic effects of HL for CIA mouse models with rheumatoid arthritis in tissue sections in finger using immunostaining of $\text{TNF-}\alpha$. Dose for DMPC ; 136 mg/ kg. Arrows indicate $\text{TNF-}\alpha$ positive cells. Scale bar : 50 μ m.

Normal



Control



HL-23

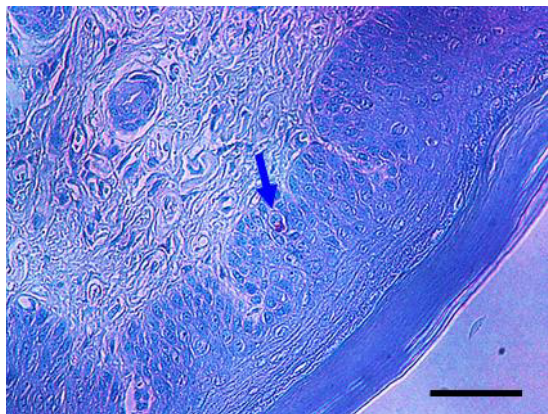


Fig. 5-13 Therapeutic effects of HL for CIA mouse models with rheumatoid arthritis in tissue sections in finger using immunostaining of IL-6. Dose for DMPC ; 136 mg/ kg. Arrows indicate IL-6 positive cells. Scale bar : 50 μ m.

5-4 総括

本章では、95mol%DMPC/5mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッドリポソーム (HL-23) の関節リウマチモデルマウスに対する治療効果を検討するため、DBA マウスを使用した CIA モデルマウスの作製、治療実験、および組織切片の観察を行ったところ、以下のような興味深い知見が得られた。

1. 関節リウマチモデルマウス作製において、初回免疫後 5 週間で手足の指関節の腫れが確認され、比較的短期間で CIA モデルマウスを作製することが可能となった。
2. HL-23 は CIA モデルマウスに対する治療実験において、腫脹等の抑制効果がみられ顕著な治療効果が得られた。
3. HL-23 は CIA モデルマウスに対して、組織染色を用いた切片観察において、関節構造および骨・軟骨破壊の顕著な抑制効果が得られた。
4. HL-23 は CIA モデルマウスに対して、免疫染色を用いた切片観察において、炎症性サイトカイン ($IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$) の顕著な産生抑制が明らかとなった。

以上の結果から、比較的短期間で治療実験に使用可能な関節リウマチモデルマウス (CIA モデルマウス) の作製が可能となった。また、HL-23 は CIA モデルマウスに対する関節の骨・軟骨破壊抑制を伴う腫脹等の治療効果がみられた。これらの効果は、炎症性サイトカイン ($IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$) の産生抑制効果に基づくもので、関節リウマチ治療に対する有用性を得ることができた。

第6章 ハイブリッドリポソームを上市する際の戦略的考察

6-1 序

第2章から第5章まではハイブリッドリポソーム（HL）のヒト乳がんおよび関節リウマチモデル動物に対する治療効果を中心に述べてきた。結果から HL は、副作用が少なく患者様の QOL（Quality of Life）を維持しながら薬物治療を行う「抗がん薬・抗リウマチ薬」として期待できることが示唆された。

医療の現場は、高度な専門知識と経験を有する医師・看護師・医療スタッフ等が中心となり構成されている。また、薬事法等の法規制が大変厳しい業界である。難治性疾患に対する治療は、決定的標準治療がほとんど存在しないなか、医師らは知識と経験を基に相互依存・経路依存（一般的標準治療、学会を介した治療情報伝達、製薬メーカーからの情報、厚生労働省からの通達等）を重視して治療方針を決定しているようである。

一方、新薬（新製品・新商品）を上市する場合や新規事業を立ち上げる場合には、その業界環境や市場の調査・分析が必要となる。調査・分析方法としては、一般的に業界外部環境調査・内部環境調査などがあり、それぞれにいくつかのフレームワークが存在し客観的かつ網羅的に分析することができる。これらのフレームワークを活用して、HL を新薬として上市する際の方向性、連携先、戦略等についてまとめることが可能である。また業界環境調査および事業戦略とは別に、HL による新薬創製に関する技術評価・市場評価⁷⁹⁾を実施し、これらの結果を良く理解した上で新薬の試作導入をすることが定石である。

本章では、HL を「抗がん薬・抗リウマチ薬」として上市する際の事業戦略論について検討した。

6-2 新薬事業における業界環境調査

6-2-1 業界環境調査における前提条件・制約条件

業界環境調査を実施するにあたり、現在実体のない事業組織を仮に設定する必要がある。仮設定の当該事業組織は、事業リスクを少なく経営の安全性を高める意味で少人数組織員（2～3人）の「大学発ベンチャー会社」とした。大学発ベンチャー会社では新薬の研究・開発・応用を主業務とし、モノづくりおよび販売等を補完する製薬メーカーと戦略的提携（連携）⁸⁰⁾を設定した。資本提携や出資を伴わない業務提携範囲の連携である。連携先製薬メーカーは、新薬の製造・販売・プロモーションを主業務と設定した。これらを前提条件とした。

新薬開発期間は、臨床試験等の法規制に従い上市するまで5～10年程度かかるため、新薬開発に関する資金は基本的に連携する製薬メーカーあるいは公的補助金等を使用する設定にした。大学発ベンチャー会社の組織員は新薬が上市されるまで、研究に携わっている大学教授等から構成されるものとし無給とした。これらを制約条件とした。前提条件・制約条件を Fig. 6-1 に示す。

テーマ	新薬（抗がん薬・抗リウマチ薬）の上市
前提条件	<ul style="list-style-type: none">・ 新薬事業組織は大学発ベンチャー会社（研究・開発・応用）・ 製薬メーカーと連携（製造・販売・プロモーション）・ 基本特許を取得している
制約条件	<ul style="list-style-type: none">・ 大学発ベンチャー会社組織員は新薬上市まで無給・ 研究資金は連携する製薬メーカーもしくは公的補助金で賄う

Fig. 6-1 業界環境調査における前提条件・制約条件

6-2-2 業界外部環境調査

企業を取り巻く業界環境を業界外部環境と言い、業界外部環境を分析するフレームワークは数種類ある。ここでは、テーマ・前提条件・制約条件を考慮して以下の3つのフレームワークを活用して調査を行った。

【PEST 分析：業界マクロ環境分析】

PEST 分析⁸¹⁾は、政治的環境（Political）・経済的環境（Economic）・社会的環境（Sociological）・技術的環境（Technological）の4つの側面から業界マクロ環境を分析するフレームワークである。例えば政治的環境は法規制の形で現れ、関連する業界に直接的な影響を与える。ビジネスのルールが変わるとその影響はシェアや収益等に直接関係し、ビジネスの成果を決定づける重要な要因の1つとなる⁸²⁾。PEST 分析では、政治的環境・経済的環境・社会的環境・技術的環境を合わせて時代の潮流を読むことが重要なポイントとなる。Fig. 6-2 に PEST フレームワークを示す。

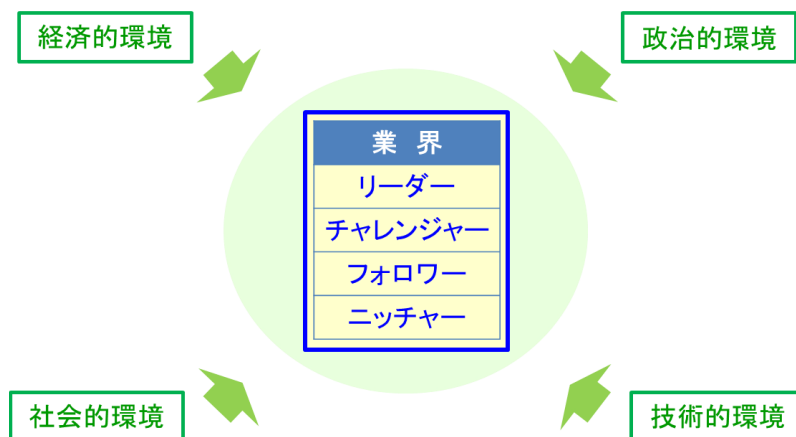


Fig. 6-2 PEST フレームワーク

【5つの競争要因（5F：5 Forces）分析：業界マイクロ環境分析】

5Fとは、業界競合他社・新規参入者・供給者・購入者・代替品の5つの力のことである。5Fフレームワーク^{81,83)}は、業界構造における力関係を表わすと同時に、業界におけるライバルは既存の同業他社だけではないことが分かる。新規参入者は海外企業・大企業・異業種企業に注意する必要がある。また、代替品は真のニーズに注意する必要がある。Fig.6-3に5Fフレームワークを示す。

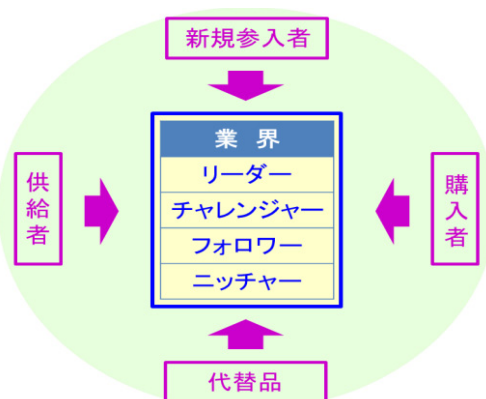


Fig. 6-3 5F フレームワーク

【4つの競争地位モデル分析：業界マイクロ環境分析】

4つの競争地位モデル分析^{81,84)}は、業界内の競合他社に絞って分析するフレームワークである。業界内の事業者を、リーダー・チャレンジャー・フォロワー・ニッチャーの4つにモデル化したものであり、競争地位ごとの基本的戦略の定石をTable 6-1に示す。

Table 6-1 4つの競争地位モデルに対応する基本戦略

競争地位	定義	基本戦略
リーダー	業界におけるトップ企業	市場拡大、模倣
チャレンジャー	リーダーの地位を狙う2番手企業群	異質競争
フォロワー	リーダーの動きに追随する下位企業群	競争回避
ニッチャー	業界他社と棲み分けて特殊な市場を狙う企業群	集中特化

6-2-3 内部環境調査

前提条件である「大学発ベンチャー会社」の内部環境を調査する際、テーマ・前提条件・制約条件を考慮して次のフレームワークを使用した。

【7S モデル分析】

仮設定である大学発ベンチャー会社事業組織の内部環境調査は、7S モデル分析⁸¹⁾ で実施した。7つの視点で組織を分析することで、自社と業界他社の比較を含めて自社組織を客観的に見ることができる。Table 6-2 に 7S フレームワークの要点を示す。

Table 6-2 7S フレームワークの要点

項目	内容	例	区分
Shared Value	共通の価値観	顧客第一主義	ソフト 4S
Style	経営スタイル	官僚制	ソフト 4S
Staff	人材	高度な専門職	ソフト 4S
Skill	スキル・ノウハウ	知財	ソフト 4S
Strategy	戦略	中期経営計画	ハード 3S
Structure	組織構造	組織図	ハード 3S
System	システム・制度	評価精度	ハード 3S

6-2-4 外部要因と内部要因の統合

業界外部環境調査および内部環境調査から抽出した外部要因・内部要因を統合するには、以下のフレームワークを使用した。

【3C 分析】

3C 分析⁸¹⁾ とは、自社・顧客・競合の 3 つの視点で業界環境を分析するフレームワークで、外部要因（顧客・競合）と内部要因（自社）の両面分析である。3C フレームワークを Fig. 6-4 に示す。

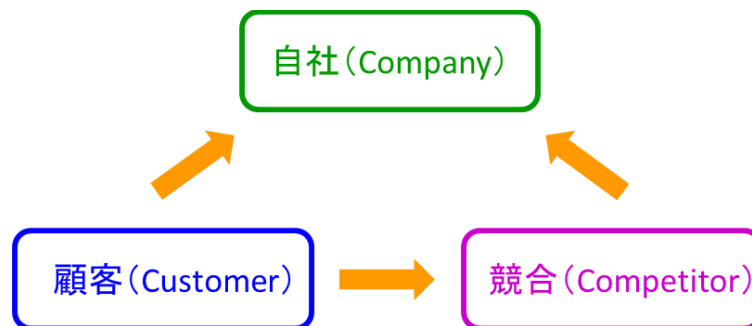


Fig. 6-4 3C フレームワーク

【SWOT 分析】

SWOT 分析^{83,85)}とは、自社の強みと弱み、外部環境の機会と脅威の4項目で分析するフレームワークである。自社の内部要因をプラス面とマイナス面に区分し、外部要因をプラス面とマイナス面に区分して分析をする。また、SWOTの発展形として、機会・脅威の各項目と強み・弱みの各項目をクロスさせて、その4つのセルごとに戦略の方向性を考えるクロスSWOT分析⁸¹⁾がある。Fig. 6-5にSWOTフレームワークを示す。

SWOT	プラス	マイナス
内部要因	<u>S</u> 強み (Strength)	<u>W</u> 弱み (Weakness)
外部要因	<u>O</u> 機会 (Opportunity)	<u>T</u> 脅威 (Threat)

Fig. 6-5 SWOT フレームワーク

6-2-5 イノベーション指向の戦略調査

イノベーション（技術革新）⁸⁶⁾とは経済発展の原動力となるもので、下記の5項目を指すのが経営学における意味するところである。

- ①新製品の開発 ②新生産方法の確立 ③新市場の開拓
- ④原材料や半製品の新しい供給源の獲得 ⑤新組織の構築

イノベーションはプロセスであり①～⑤の単発活動だけでなく相互にあるいは連鎖的活動も含め、経済的発展（経済的な成功）につながる一連の活動のことを言う。狭い意味での技術革新ではなく、必ず経済的な成功の位置づけを伴うものと定義されている。また、イノベーションのためには製品システム⁸⁷⁾という概念が重要である。製品システムは、技術システム・アプリケーションシステム・ビジネスシステムから成り（Fig. 6-6）、結果的に「売れるモノづくり・儲かるモノづくり」をサポートする基本概念となる。

新薬の上市においてイノベーションを目指すため、活用できる手法から以下の3つについて検討した。

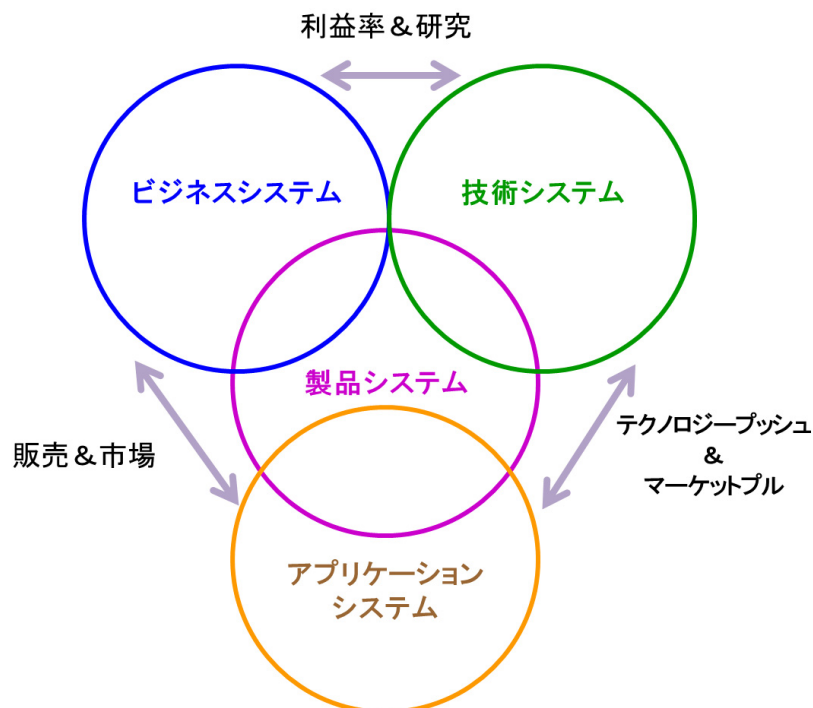


Fig. 6-6 製品システムのリンク図

【シナリオプランニング法】

シナリオプランニング法⁸⁸⁾とは、問題の複雑性や不確実性が高まるなか長期的な視点から未来を可視化し、戦略や計画を立て実現するプロセスをシナリオとして描く手法である。問題や課題を明確にし、それに対するキーファクターを数多く選出し、ドライビングフォースを決定する。このドライビングフォースの中から未来への影響度の大きい2項目程度を抽出し、シナリオロジックを選定する。このシナリオに肉付けし、先行指標の選定をする。Fig. 6-7にシナリオプランニング法フレームワークを示す。

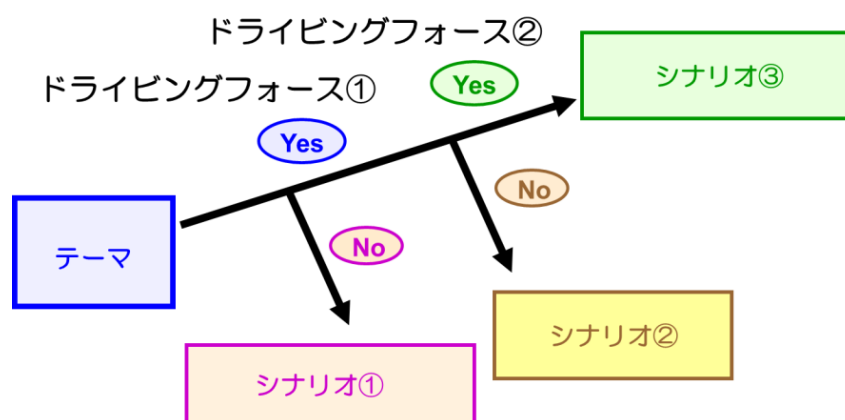


Fig. 6-7 シナリオプランニング・フレームワーク

【リードユーザー法】

リードユーザー法⁸⁹⁾とは、リードユーザーを製品の開発過程に積極的に取り込み、高い製品開発成果の実現を目指すアプローチのことである。メーカーがリードユーザーの特徴を持つユーザーを探索し、そのユーザーが直面する問題や解決方法を参考にしながら製品開発を行う方法である。またリードユーザーとは、重要な市場動向に関して大多数のユーザーに先行し自らのニーズを充足させる解決策を実行しているという特徴をもっている。そしてリードユーザーは、これらリードユーザーの特徴をもっているユーザーのうちイノベーションに結び付くユーザーのことである。リードユーザーの特徴をもっていてもイノ

ベーションに結び付かない自己満足的な製品を開発するユーザーは、いわゆる「おたく」的存在でありリードユーザーとは言わない。またリードユーザーの存在領域は、先進類似分野の最先端やターゲット市場の最先端にあるといわれている。製品需要曲線におけるリードユーザーの存在領域を Fig. 6-8 に示す。

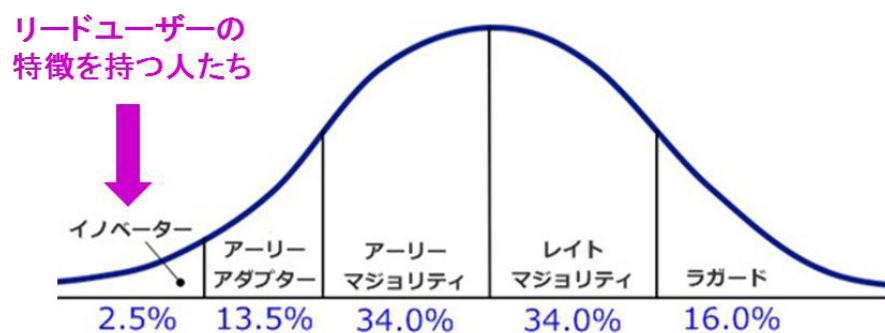


Fig. 6-8 製品需要曲線におけるリードユーザーの存在領域

【オープンイノベーション】

オープンイノベーション⁹⁰⁾とは、企業内部と外部のアイデアを組み合わせることで、革新的で新しい価値を創り出すことを目的とした考え方である。最大のメリットは、自社単独で進めていた研究開発を迅速かつ効率的に実施できることであり、自社の努力では解決できない課題に対しても社外からのアイデアで解決策を見出すことが可能である。技術や製品の多様化が進む現代において、イノベーションを起こす重要な手法の1つと考えられている。

6-3 結果と考察

6-3-1 新薬事業 環境調査結果

設定した前提条件・制約条件を考慮した上で、大学発ベンチャー会社が新薬事業において新薬上市する場合の業界環境調査結果を以下にまとめた。

業界外部環境調査結果を Fig. 6-9 に示す。この図は、PEST フレームワーク、5つの競争要因（5F）フレームワーク、4つの競争地位フレームワークで実施した分析をまとめたものである。PRST 分析からは、社会福祉費の増大、薬事法等法規制が厳しい、大企業による網羅的新薬開発、これらのことに気を付けなければならないことが示唆された。5F 分析からは、医療の経路依存性が大きいこと、他の治療法の進展に注意が必要なことから、医療の現場では標準治療法や知識と経験の範囲で治療方針が決定されることが推定された。4つの競争地位モデルからは、連携先企業のタイプを想定することが可能である。この場合、前提条件・制約条件から業界リーダーもしくはチャレンジャーが適していると考えられる。

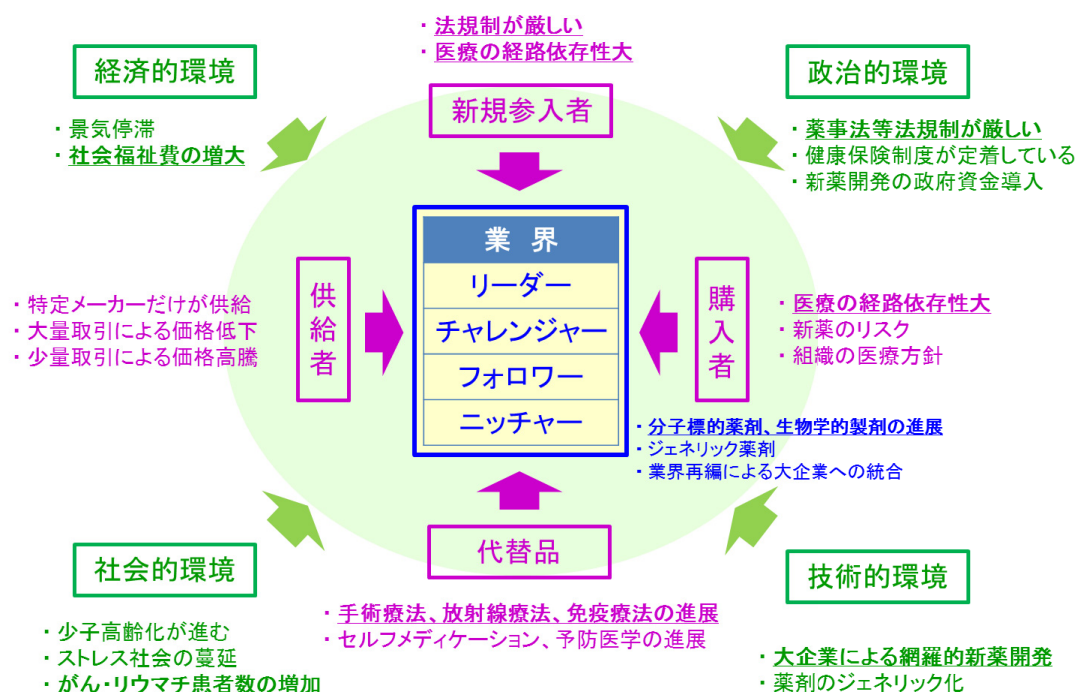


Fig. 6-9 業界外部環境調査結果（PEST、5F、4つの競争地位）

内部環境調査結果を Fig. 6-10 に示す。この図は 7S フレームワークで行った分析をまとめたものである。7S 分析からは、共通の価値観として患者様とその家族のために真剣、戦略として大学シーズと市場ニーズの組合せ、経営スタイルとしてコンプライアンス重視でありながらあらゆるシーンでチャレンジ志向、人材として他社との連携型人材、スキル・ノウハウとしてコミュニケーションスキル、組織構造としてミッション重視のスタッフ制、などこれらの要素を有する組織造りおよび人材確保・育成が必要ということが示唆された。

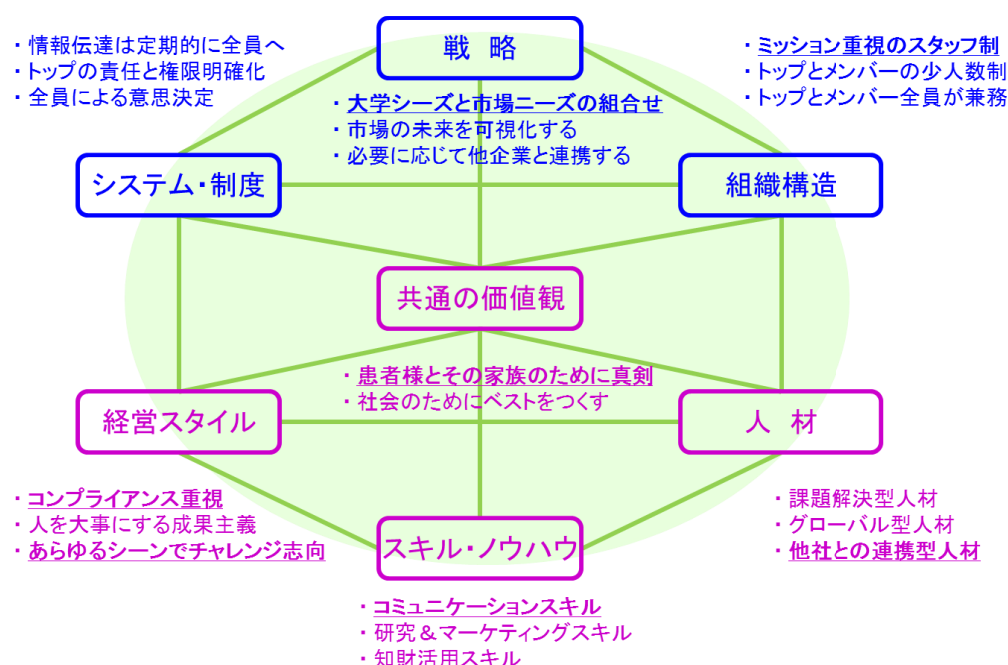


Fig. 6-10 内部環境調査結果（7S）

内部要因と外部要因の統合においては、3C フレームワークの結果を Fig. 6-11 に示す。3C 分析からは、自社が経路依存性の大きく新薬開発競争が激しい業界へ新規参入をする際、連携先となる製薬メーカーが決め手になることが示されている。連携先製薬メーカーの業界内における力、知識と経験、などが自社とマッチングするパートナーを選定する必要がある。

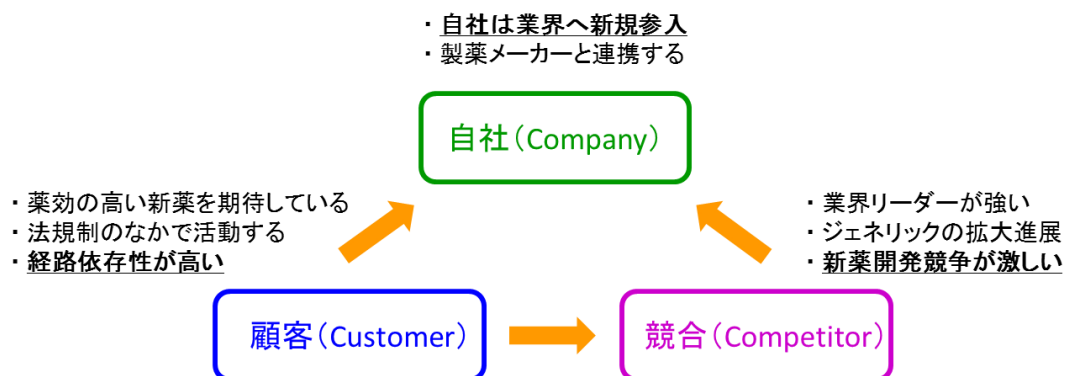


Fig. 6-11 内部・外部要因統合 (3C)

内部要因と外部要因の統合において、クロス SWOT フレームワークの結果を Fig. 6-12 に示す。クロス SWOT 分析からは、HL 単体で上市を目指す、HL 封入体で上市を目指す、特許を戦略的に取得整備^{91,92)} し特許群使用権を貸与する、現在の特許使用権を貸与する、などが示された。

クロスSWOT	強み (Strength)	弱み (Weakness)
機会 (Opportunity) <ul style="list-style-type: none"> ・ がん、リウマチの罹患者数が増加している。 ・ 副作用の少ない「抗がん薬・抗リウマチ薬」が存在しない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 開発新薬に基本特許がある。 ・ 開発新薬は既存の薬剤を封入できる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 会社として組織・機能が充分でない。 ・ 製薬他社と連携もしくは知財移転の方法しかない。
脅威 (Threat) <ul style="list-style-type: none"> ・ 薬事法が厳しく臨床試験をクリアするか不確実である。 ・ 新薬開発を大手製薬メーカーが進めている。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 既存薬剤を封入した HL封入体で上市を目指す。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 特許使用権を貸与する。

HL単体は、「抗がん薬・抗リウマチ薬」に適用する。
HL封入体は、「抗リウマチ薬」に適用する。

Fig. 6-12 内部・外部要因統合 (クロス SWOT)

6-3-2 新薬事業 戦略論

ここまで業界環境調査結果を述べてきた。本研究の新薬は上市する目的であるが、イノベーションも目指している。そこでイノベーション指向の戦略論でいくつかの調査結果をまとめた。

シナリオプランニング法を使用した「がん薬物療法」の未来を可視化した図を Fig.6-13 に示す。がん薬物治療は、今後進展すると思われる分子標的薬剤あるいは代替療法（免疫療法・手術療法・放射線療法）の進展によりその主療法は変化するものと考えられる。世の中の変化に応じて想定したシナリオを 3 つ作成した。どの世の中になっても、フレームワークで考えた実施項目の中から実行することができるので、少なくとも他社に比較して迅速な実行および方向変換が可能となる。シナリオ②を基本シナリオとして選定した。

HL を抗がん薬として上市するには臨床試験の壁が大きく、新規参入の会社では実績や資金も無く、大変難しい課題である。連携先製薬会社に恵まれれば進展する可能性はあるが、それでも医師は患者様に対するリスクを最小限にするため薬として登録したものを使用する立場であり、HL の新薬リスクを医師が理解し臨床試験で採用することは簡単ではない。従って、HL の抗がん薬としての臨床試験は、抗リウマチ薬の上市後に実施することを考えた。

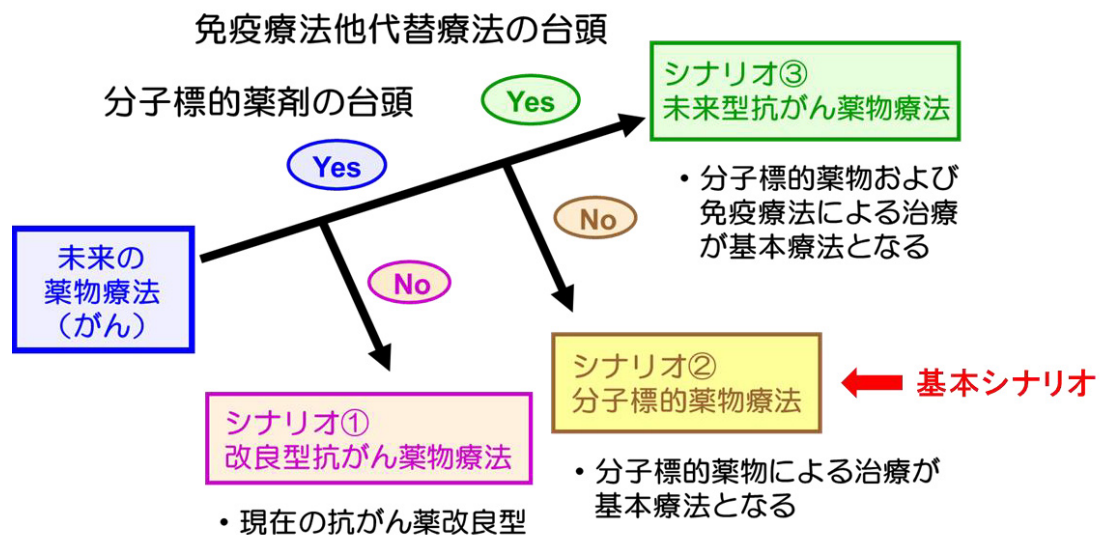


Fig. 6-13 シナリオプランニング（抗がん薬）

シナリオプランニング法を使用した「関節リウマチ薬物療法」の未来を可視化した図を Fig.6-14 に示す。関節リウマチ薬物治療は、薬効の大きな副作用の少ない画期的な新薬が期待されている。また、グローバルな治療ガイドラインの刷新も期待される。そこでこれらの進展次第で次の世の中が変わることを想定してシナリオを作成した。シナリオ②を基本シナリオとして選定した。

抗リウマチ薬は現在、メトトレキサート (MTX) ・生物学的製剤が主流となっている。これらの薬剤は患者様の差異により効果もバラツキがあり、副作用も重大な問題となっている。MTX を封入した HL は患部に融合するため、少ない薬剂量で HL と MTX の相乗効果が期待でき、副作用も少なくなるものと考えられる。また新規参入会社としては、連携先製薬メーカーの知識・経験だけではなく、業界内でシェアをもっている既存の抗リウマチ薬および治療ガイドライン等が活用できることが大きなメリットとなる。

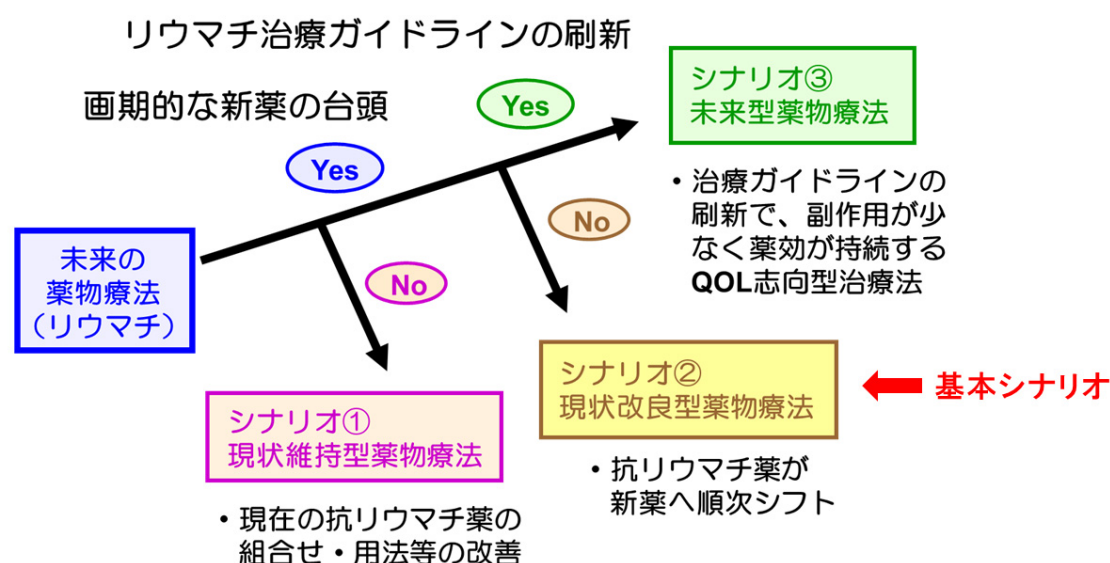


Fig. 6-14 シナリオプランニング (抗リウマチ薬)

リードユーザー法から新薬事業を考察した。リードユーザーの特定は難しいが、大学発ベンチャー会社の戦略である「大学シーズと市場ニーズの組合せ」を自ら追及することで、自らがリードユーザーの特徴を呈していくと考える。その後、周辺分野における最先端の研究者・技術者の中からリードユーザーを見つける能力が備わるものと思われる。これに至るまでには時間がかかるので、

事業立上げ時は連携先の製薬メーカーにリードユーザーの特徴をもつ研究者がいるかどうか重要なポイントになる。そして、リードユーザーの特徴をもつ研究者を真のリードユーザーに育てることが重要な要件となる。

イノベーションにおけるオープンイノベーションは、今後益々重要な手法になってくると思われる。特にコモディティ商品などで素材に知財があり、それを応用する場合には適切な方法である。法規制が厳しく経路依存性の大きな新薬事業においては、オープンイノベーションが最適か疑問は残るが、HLを素材と考え色々な医療分野への応用開発を想定することでオープンイノベーションのスタイルが見えてくるものと思われる。少なくとも、市場シェアを確保し HL を市場に多く送り出すには、妥当な方法の 1 つということができる。

6-4 総括

本章では、ハイブリッドリポソーム (HL) を「抗がん薬・抗リウマチ薬」として上市する際の事業戦略論について検討したところ、以下のような有効性のある戦略論的知見が得られた。

1. 前提条件は、事業組織は大学発ベンチャー会社（研究・開発・応用）とし、HL の基本特許を所有している。
2. 制約条件は、大学発ベンチャー会社組織員（HL 研究に携わる教授 2~3 名）は新薬上市するまでは無給とし、その期間における研究資金は連携する製薬メーカー（製造・販売・プロモーション）もしくは公的補助金で賄う。
3. 事業戦略は、
 - ① 特許使用权の貸与ビジネスをする。【抗がん薬・抗リウマチ薬】
 - ・ 事業そのものに参加しない方針
 - ② MTX 封入 HL および HL 単体で上市を目指す、適切な製薬メーカーと連携する。【抗リウマチ薬】
 - ・ HL 封入体は、既存の製薬メーカーと既存のリウマチ治療ガイドラインを最大限に活用して新規参入をする方針
 - ・ HL 封入体の上市後に、HL 単体を導入する方針
 - ③ 抗リウマチ薬の上市後、HL の臨床試験完了を目指す。【抗がん薬】
 - ・ HL に対する医師の信頼を抗リウマチ薬上市により担保する方針

HL を新薬事業で上市する際の事業戦略として参考になると考える。これらのまとめを Fig. 6-15、Fig. 6-16 に示す。また、新薬事業を展開する前には、ファイナンス計画を盛り込んだビジネスプラン^{93,94)} の策定が必要である。

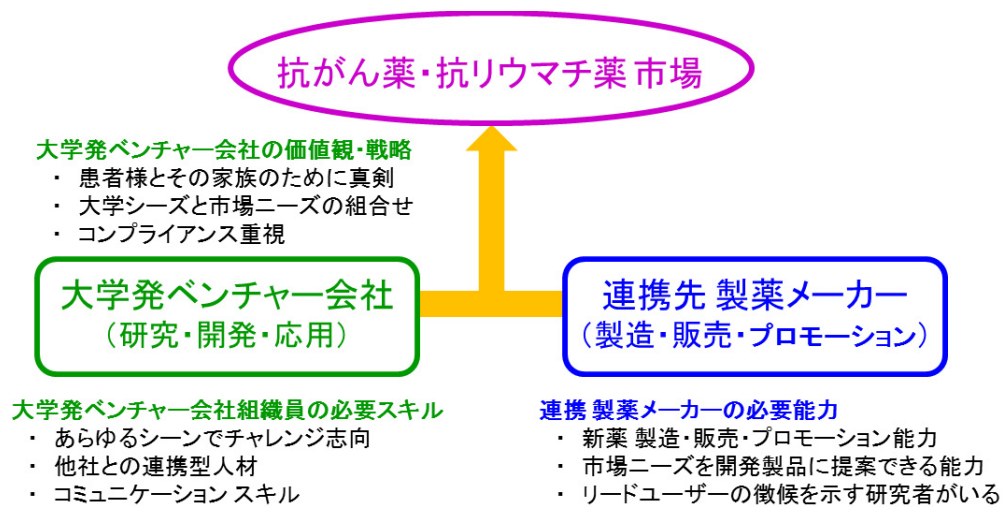


Fig. 6-15 新薬ビジネスのための連携体と役割

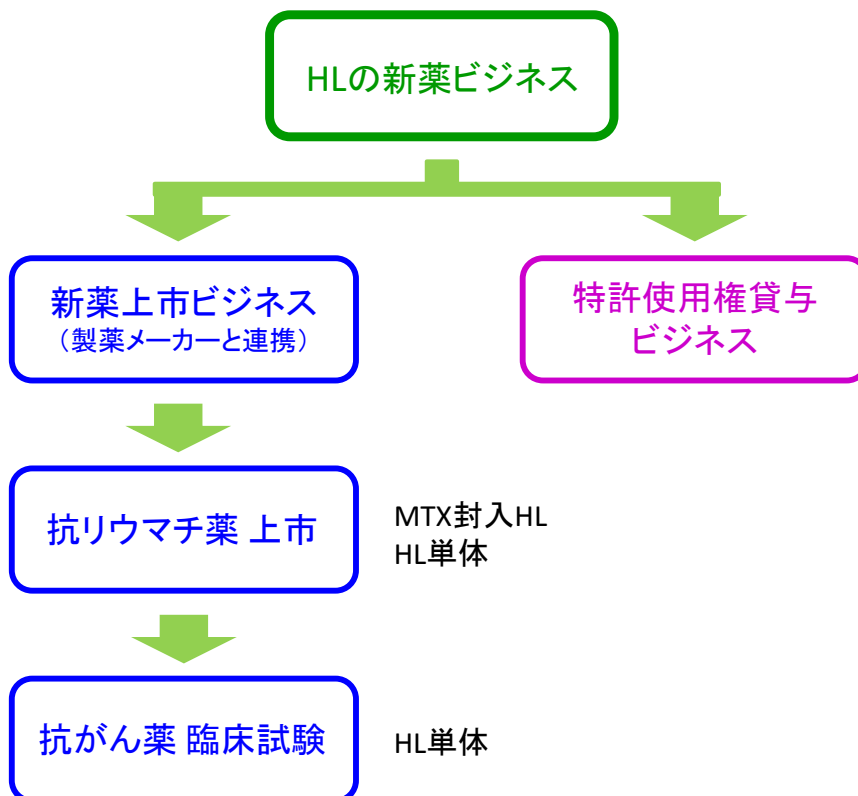


Fig. 6-16 新薬ビジネスの方向性

第7章 総論

日本における社会保障給付費は年々増加の傾向にあり、2014 年では総額 115 兆円を超えている。内訳として 1 番目に大きいのが国民年金給付費の 56 兆円で、次いで医療給付費 37 兆円となりこれは国民の窓口負担分を合わせた国民医療費として 43 兆円となる。他は、福祉その他である。国民医療費のうち 65 歳以上が 57%を占め、一人当たりの年間医療費は 65 歳以上 72 万円、64 歳以下 18 万円と偏りが大きくなっている⁹⁵⁾。社会保障給付費の推移を Fig.7-1 に示す。

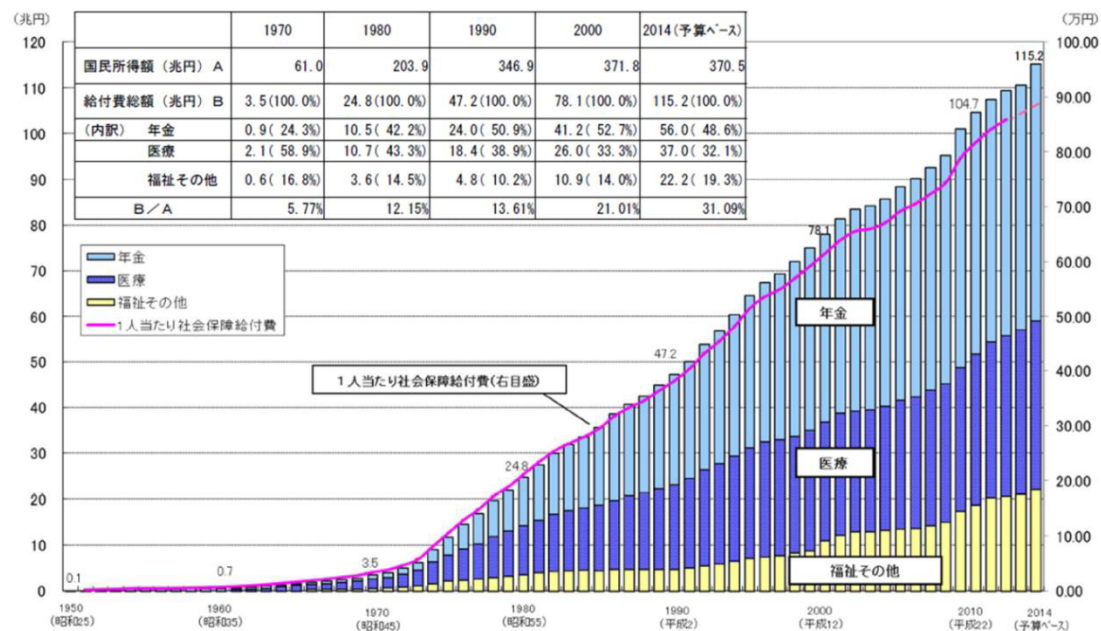


Fig. 7-1 日本における社会保障給付費の推移⁹⁵⁾

Table 7-1 医薬品の有効率⁹⁶⁾

医療分野では、一般的な診療情報に基づき病名が確定するとその病名に応じた標準薬が提供されるが、患者様個々の体質等により薬剤が有効の場合もあれば無効の場合、あるいは副作用が出現することもある。従って医薬品有効率の問題があり、有

疾患分野	薬剤の有効率 (%)
がん	25
アルツハイマー	30
C型肝炎	47
骨粗鬆症	48
関節リウマチ	50
偏頭痛(急性)	52
糖尿病	57
喘息	60
不整脈	60
統合失調症	60
うつ病	62

効率として「がん 25%、アルツハイマー30%、関節リウマチ 50%」となっている^{96, 97)} (Table 7-1)。このことより、主な疾患分野だけでも年間 1 兆円以上の薬剤が効果の無いものと推定されている。この問題に対して、副作用が少なく薬効の安定した薬剤開発は、社会保障給付費の医療給付費において無駄な費用の削減につながる。

がん治療の分野においては、分子標的薬物療法が近い将来その効果を期待されている。現在、世界では 41 種類程度の分子標的薬剤が認可されており、その内 29 剤が低分子薬剤、11 剤が抗体医薬となっている³⁾ (Fig. 7-2)。日本でも大手製薬会社が分子標的薬剤の開発中であり、数年後には臨床応用可能になってくると思われる。分子標的抗がん剤は患者様の個別化医療の面からも優れた薬剤と考えられ、今後期待したいところである。しかし分子標的薬剤開発の研究は進んではいるものの、安全性評価や副作用に関する臨床データの蓄積はこれからである。また、がん細胞膜のすべての標識に対する分子標的薬剤を開発するには、莫大な時間と資金がかかる。分子標的薬剤はその有効性、利便性、安全性、コスト、副作用等、いくつかの視点でその開発領域に限界が出るものと思われる。従って、がん細胞膜の特定の標識に対する分子標的薬剤の開発は実行されるものの、すべての がん細胞に対する分子標的薬剤の開発は困難と思われる。

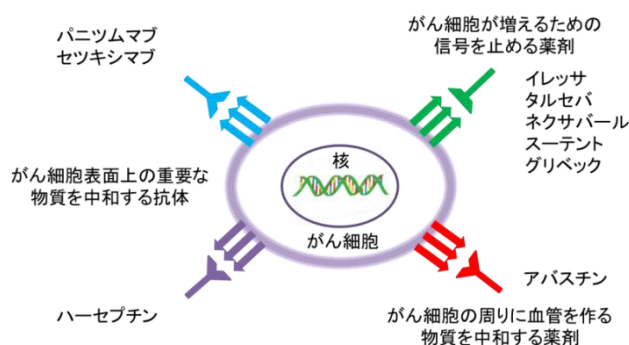


Fig. 7-2 分子標的薬剤の概念図³⁾

HL のような がん細胞に特異的に融合・蓄積しアポトーシスを誘導する薬剤は、分子標的薬剤を補完する薬剤としても最適であると考えられる。特に、HL

の血管新生抑制効果を伴う制がん効果に関しては、HL 単体で優れた効果を発揮することが期待できる。

関節リウマチ（RA）治療分野では、4 大治療法（薬物療法、外科的療法、リハビリ療法、基礎療法）があり、その中で薬物療法が主体となっている。前出のグローバルにおける標準的な治療ガイドラインでは、RA と診断されたらメトトレキサート（MTX）を服用することから薬物治療がスタートすることになっている。副作用で使用できない患者様あるいは著しく薬効の無い患者様を除いて、過半数を超える RA 患者様が MTX を服用していることになる。HL は単体で RA 治療に応用することも可能であるが、既存の RA 主薬 MTX の補完薬剤、あるいは生物学的製剤の代替薬剤としての可能性は十分に高いと考えられる。医療の現場は経路依存性が強いため、HL を RA 治療薬として上市する場合、このような方向性も考慮して検討をしていく必要があると考えている。

治療応用	HL形態イメージ	市場参入への評価
HL単体 (抗がん薬)		医療現場は経路依存性の大きな市場であり、そのままでの参入は容易ではない。 抗リウマチ薬上市後に臨床試験完了を目指す。
HL単体 (抗リウマチ薬) MTX・他 代替		MTX・他と競合する戦略である。 HLに実績が無いため、市場参入は困難と思われる。
HL封入体 (抗リウマチ薬) MTX 補完		MTXと連携する戦略である。 MTXの実績を活用し、更にその使用量と副作用を軽減できる可能性がある。

MTX・他: 他とは生物学的製剤

Fig. 7-3 HL の市場参入形態

HL を「抗がん薬・抗リウマチ薬」の新薬として上市する場合、本来 HL 単体で上市を目指すものであるが薬事法等法規制が厳しく経路依存性の高い市場のため、既存の薬剤および治療ガイドラインを活用するのが安全策と思われる。抗リウマチ薬の分野において MTX 封入 HL で上市を果し、その後 HL 単体を市場に導入する。抗がん薬の分野では、抗リウマチ薬（HL 封入体）を上市する

ことで医師の信頼を担保することができ、臨床試験への協力が得られるものとする (Fig. 7-3)。

ハイブリッドリポソーム (HL) ^{24,25)} は、緩衝溶液中で超音波を照射することで得られ、有機溶媒の混入がなく、膜直径や相転移温度のコントロール可能な生体適合性に優れた医療用素材である。HL は がん細胞に特異的に融合・蓄積し ^{39,40)} アポトーシスを誘導する ⁴¹⁻⁴⁸⁾。アポトーシス誘導経路は、Fas またはミトコンドリアヘシグナル伝達し、カスパーを活性化し、DNA を断片化することが解明されている ⁴⁴⁾。また HL は、担がんモデル動物に対する治療効果 ⁴⁹⁻⁵⁵⁾ および肝転移抑制効果 ⁵⁶⁾ が、正常動物に対する長期間反復投与毒性試験 ⁵⁷⁾ および体内動態試験 ⁵⁸⁾ において安全性が報告されている。更に HL は 生命倫理委員会承認後の臨床試験において、再発悪性リンパ腫の患者様に対する延命効果および固形リンパ腫の顕著な縮小効果が明らかとなっている ⁵⁹⁾。

本研究は、副作用が少なく、患者様の QOL を維持しながら薬物療法を行う「抗がん薬」・「抗リウマチ薬」の臨床薬開発を目指している。抗がん薬に関しては、HL-25 のヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果および血管新生抑制メカニズムを検討した。また抗リウマチ薬に関しては、HL-23 のコラーゲン誘発関節リウマチモデルマウス (CIA モデルマウス) に対する治療効果および免疫染色を用いた炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α 、IL-6) の産生抑制効果を検討した。以下、各章ごとに得られた興味ある研究成果についてまとめた。

第 2 章では、HL-23 および HL-25 の膜物性について検討した。HL-23 は調製後 膜直径の増大が見られたが、その後縮小し室温において 100nm 以下で 1 ヶ月以上安定した膜を形成した。HL-25 は調製後から 7 日目まで、膜直径が約 70nm から約 120nm の間で推移した。その後 約 20nm まで減少し室温において 1 ヶ月以上安定した膜を形成した。従って HL-23 および HL-25 は、細網内皮系 (RES) 捕獲回避可能な膜直径を有し、室温において長期間安定することが明らかとなった。

第 3 章では、HL-25 のヒト乳がん (MDA-MB-453) 細胞皮下移植モデルマウスに対する治療効果を検討した。投与期間中、Control 未治療群および DMPC 投与群は腫瘍体積が継続的に増大したのに対し、HL-25 治療群では腫瘍はほぼ一定の大きさで推移した。投与最終日には、Control 未治療群の平均腫瘍体積が

435mm³、DMPC 投与群の平均腫瘍体積が 516mm³に対し、HL-25 治療群の平均腫瘍体積は 191mm³となり、抑制率は約 65%となった。投与終了後の腫瘍表面観察においては、Control 未治療群・DMPC 投与群の腫瘍表面には新生血管が多数見られたが、HL-25 治療群の腫瘍表面には新生血管はほとんど見られなかった。腫瘍重量においても、Control 未治療群・DMPC 投与群と比較して、HL-25 治療群は腫瘍重量が顕著に小さい結果が得られた。また、CD34 免疫染色による腫瘍組織の切片観察より、Control 未治療群・DMPC 投与群と比較して HL-25 治療群で CD34 陽性領域の減少が見られた。従って HL-25 は、ヒト乳がん（MDA-MB-453）細胞皮下移植モデルマウスに対して、腫瘍の表面および内部で血管新生抑制効果を伴う抗腫瘍効果を持つことが示唆された。

第 4 章では、HL-25 の血管新生抑制メカニズムについて検討した。血管内皮細胞（HUVEC）に対する HL-25 の細胞毒性試験、血管新生キットを用いた HUVEC の管腔形成抑制試験、MDA-MB-453 細胞の血管内皮細胞増殖因子（VEGF）産生抑制試験を行った。HL-25 は HUVEC の増殖に影響を与えない 160~200 μ M の低濃度域において、管腔形成を顕著に抑制し、MDA-MB-453 細胞の VEGF 産生を HL-25 濃度依存的に抑制することが明らかとなった。従って HL-25 の血管新生抑制効果は、VEGF 産生抑制によることが示唆された。

第 5 章では、HL-23 の CIA モデルマウスに対する治療効果、免疫染色を用いた炎症性サイトカインの産生抑制効果を検討した。関節リウマチモデルマウス作製において、比較的短時間で CIA モデルマウスを作製することが可能となった。HL-23 は CIA モデルマウスに対し、スコア法を用いた顕著な治療効果が得られた。HL-23 は CIA モデルマウスに対し、組織染色を用いた関節の骨・軟骨破壊の顕著な抑制効果が得られた。HL-23 は CIA モデルマウスに対し、免疫染色を用いた炎症性サイトカインの顕著な産生抑制効果が得られた。従って HL-23 は、CIA モデルマウスに対して、関節の骨・軟骨破壊抑制効果および炎症性サイトカイン産生抑制効果を有する顕著な治療効果が明らかとなった。

第 6 章では、HL を上市する際の戦略的考察を検討した。事業体は大学発ベンチャー会社とし、HL の基本特許を所有していて、製薬メーカーと連携することを前提条件とした。抗リウマチ薬では、MTX 封入 HL で臨床試験を目指し上市することが可能性の大きな戦略であることが示唆された。その後、HL 単体で上市することが示された。抗がん薬では、抗リウマチ薬として HL を上市するこ

とで HL に対する医師の信頼が担保されるため、抗がん薬臨床試験に採用される可能性が高くなることが示された。

以上の結果から、HL-25 のヒト乳がん (MDA-MB-45) 細胞皮下移植モデルマウスに対する顕著な治療効果には、血管新生抑制効果が働いていることが示唆された。HL-25 の血管新生抑制メカニズムの全貌は解明されていないが、VEGF の産生を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。今後、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor : HIF-1 α 、HIF-1 β) の関与を検討することにより、メカニズム全貌の解明を進めて行きたい。HL-23 の CIA モデルマウスに対する顕著な治療効果には、関節骨・軟骨破壊抑制効果および炎症性サイトカイン産生抑制効果が働いていることが明らかとなった。更に HL-23 の治療メカニズム全貌解明を進めて行きたい。また、メトトレキサート (MTX) を封入した HL-23 による RA 治療効果の検討も合わせて進めて行きたい。今後は、これまでの研究成果を基に、副作用がなく、患者様の QOL を維持しながら薬物療法において効果のある臨床薬開発へ発展することが期待される。

参考文献

- 1) がんの統計編集委員会編,「がんの統計 '14」,(公財)がん研究振興財団 (2014).
- 2) 国立がん研究センターがん情報サービス編,「がん登録・統計」(2015).
- 3) 森崎 隆 著,「がん治療革命—未来への提言—」,現代書林, 46 (2014).
- 4) 高倉伸幸 編,「わかる実験医学シリーズ 基礎から応用までの血管新生がわかる」,羊土社 (2004).
- 5) 高井義美, 秋山徹編,「がん細胞の生物学 がん研究のいま 2」,東京大学出版 (2006).
- 6) N. Ferrara, T. D. Smyth, *Endocrine Rev.*, **18**, 4 (1997).
- 7) M. Shibuya, N. Ito, L. C. Welsh, *Curr Top Microbio. Immunol.*, **237**, 59 (1999).
- 8) K. Alitalo, P. Carmeliet, *Cancer Cell.*, **1**, 219 (2002).
- 9) 岡庭豊, “病気がみえる Vol.6 免疫・膠原病・感染症”, 医療情報科学研究所 (2009).
- 10) (公社)日本リウマチ友の会 編,「2000 年リウマチ白書」, 障害者団体定期刊行物協会 (2000).
- 11) H.A.Fuchs, et al., *Journal of Rheumatology*, **16**, 585 (1989).
- 12) 龍順之助, 関節リウマチの手術療法の進歩, 総合臨床, **57**, 2087 (2008).
- 13) 龍順之助, 渡辺昌彦, 穂坂邦大, 関節リウマチ手術療法の適応と見極め, 現代医用, **36**, 151 (2004).
- 14) J.S.Smolen, et al., *Annals of Rheumatic Diseases*, **73**, 492 (2014).
- 15) (公社)日本リウマチ友の会 編,「流(ながれ)」, 障害者団体定期刊行物協会, **308**, 18 (2014).
- 16) 尾崎承一, 関節リウマチ 正しい治療がわかる本, 研友企画出版, 52 (2008).
- 17) N. Zhahg, P. R. Wardwell, R. A. Bader, *Pharm. Res.*, **31**, 2326 (2014).
- 18) (公社)日本リウマチ友の会 編,「流(ながれ)No.304 リウマチ手帳」, 障害者団体定期刊行物協会, 4-9 (2014).
- 19) 住田孝之, “膠原病・リウマチを科学する 初学者から専門家まで”, 診断と治療社 (2005).
- 20) I. B. McInnes, G. Schett, *N Engl J Med*, **365**, 2205 (2011).
- 21) 美研クリエイティブセンター編,「骨研究最前線」, (株)エヌ・ティー・エス, 73 (2013).
- 22) Y. Ito, S. Sakaguchi, et al., *Science*, **346**, 363 (2014).

- 23) 医療法人社団 それいゆ会 こだま病院 H.P. (最終アクセス日 : 2015.11.16.)
[http://www.soreiyu.net/hospital/hospital_department/rheumatic-2.html.]
- 24) R. Ueoka, R.A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Strauss, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 25) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R.A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 26) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797 (1990).
- 27) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Dozono, Y. Yano, M. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219 (1990).
- 28) R. Ueoka, E. Yamada, O. Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597 (1991).
- 29) K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **60**, 3342, (1995).
- 30) 今村主税, 金納明宏, 光岡ちほみ, 北島俊一, 井上秀顕, 岩原正宜, 松本陽子, 上岡龍一, *薬学雑誌*, **116**, 942 (1996).
- 31) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986 (1996).
- 32) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekura, M. Iio, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640 (1988).
- 33) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hirano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213 (1993).
- 34) R. Ueoka, Y. Matsumoto, *Bio Industry.*, **10**, 221 (1993).
- 35) Y. Matsumoto, C. Imamura, T. Ito, C. Taniguchi, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1456 (1995).
- 36) Y. Matsumoto, T. Kato, S. Iseki, H. Suzuki, K. Nakano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937 (1999).
- 37) 松本陽子, 加藤俊博, 井関伸至, 鈴木仁士, 中野浩司, 上岡龍一, *薬学雑誌*, **119**, 280 (1999).
- 38) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 380 (2006).
- 39) K. Nakano, Y. Iwamoto, W. Yakata, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251 (2002).
- 40) Y. Komizu, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131 (2006).

- 41) C.Imamura, Y. Kemura, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1119 (1997).
- 42) Y. Matsumoto, T. Kato, Y. Kemura, M. Tsuchiya, M. Yamamoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **28**, 53 (1999).
- 43) Y. Iwamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **292**, 231 (2005).
- 44) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Matsushita, R. Ueoka, *Int. J. Cancer.*, **115**, 377 (2005).
- 45) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 46) H. Ichihara, Y. Matsuoka, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **30**, 2011 (2010).
- 47) 行原真美子, 古水雄志, 田上 修, 松下 琢, 松本陽子, 上岡龍一, *薬学雑誌*, **130**, 1581 (2010).
- 48) Y. Komizu, S. Nakata, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *ACS med. Chem. Lett.*, **2**, 275 (2011).
- 49) A. Kanno, R. Kodama, Y. Terada, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Drug Delivery System*, **13**, 101 (1998).
- 50) A. Kanno, Y. Terada, K. Tsuzaki, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Drug Delivery System*, **14**, 37 (1999).
- 51) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013 (1999).
- 52) R. Ueoka, Y. Matsumoto, A. Kanno, K. Tsuzaki, H. Ichihara, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1262 (2000).
- 53) S. Shimoda, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **372**, 162 (2009).
- 54) H. Ichihara, K. Funamoto, T. Matsushita, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **394**, 174 (2010).
- 55) H. Ichihara, J. Ueno, M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **406**, 173 (2011).
- 56) 根岸由香, 吉沢譲治, 山崎洋次, 松本陽子, 上岡龍一, *日本小児外科学会雑誌*, **41**, 930 (2005).

- 57) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167 (2006).
- 58) 市原英明, 永見英明, 山本圭一, 松本陽子, 上岡龍一, *薬学雑誌*, **123**, 25 (2003).
- 59) H. Ichihara, H. Nagami, T. Kiyokawa, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **28**, 1187 (2008).
- 60) M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1816 (2008).
- 61) M. Umebayashi, T. Makizono, H. Ichihara, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Anticancer Res.*, **30**, 327 (2010).
- 62) R. Ueoka, Y. Komizu, Y. Matsumoto, Yu Zhong, R. Tanaka, N. Yamamoto, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 4578 (2008).
- 63) H. Ichihara, M. Hino, T. Makizono, M. Umebayashi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 207 (2011).
- 64) A. D. Bangham, M. N. Sandish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
- 65) J. R. Graybill, P. C. Craven, R. L. Taylor, D. M. Williams, W. E. Magee, *J. Infect. Dis.*, **145**, 748 (1982).
- 66) A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, M. Francis, H. Anthony, B. Yechezkel, *Cancer Res.*, **54**, 987 (1994).
- 67) D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos, *Science*, **267**, 1275 (1995).
- 68) V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 145 (2005).
- 69) N. Oku, Y. Tokudome, H. Tsukada, S. Okada, *Biochim. Biophys. Acta*, **1238**, 86 (1995).
- 70) R. S. Bresalier, *Gut and Liver*, **2**, 69 (2009).
- 71) G. C. Bosma, R. P. Custer, M. J. Bosma, *Nature*, **301**, 527 (1983).
- 72) A. Amine, S. Rivera, P. Opolon, M. Dekkal, D.S. Biard, H. Bonamar, F. Louache, M. McKay, J. Bourhis, E. Deutsch, M.C. Vozenin-Brotons, *PLOS ONE*, **4**, 5018 (2009).
- 73) M. Ishiyama, M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118 (1993).
- 74) J. Waltenberger, U. Mayr, H. Frank, V. Hombach, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **28**, 1523 (1996).
- 75) 中釜齊, 北田一博, 城石俊彦, “マウス・ラットなるほど Q&A”, 羊土社, 17 (2007).
- 76) D. E. Trentham, A. S. Townes, A. H. Kang, *J. Exp. Med.*, **146**, 857 (1977).

- 77) 安倍千之, 澤井高志, “関節炎モデル”, 日本医学館 (2000).
- 78) H. Yoshitomi, N. Sakaguchi, K. Kobayashi, Gordon D. Brown, T. Tagami, T. Sakihama, K. Hirota, S. Tanaka, T. Nomura, I. Miki, S. Gordon, S. Akira, T. Nakamura, S. Sakaguchi, *J. Exp. Med.*, **201**, 949 (2005).
- 79) J. テサー, S. ゴーシュ, S. W. アンダーソン, T. ブラモルスキー, “戦略的技術マネジメント”, 日本評論社 (2007).
- 80) J. B. バーニー, “企業戦略論 (下) 【競争優位の構築と持続】”, ダイヤモンド社 (2010).
- 81) 手塚貞治, “戦略フレームワークの思考法”, 日本実業出版社 (2010).
- 82) B. J. ネイルバブ, A. M. ブランデンバーガー, “コーペティション経営”, 日本経済新聞社 (1997).
- 83) J. B. バーニー, “企業戦略論 (上) 【競争優位の構築と持続】”, ダイヤモンド社 (2010).
- 84) 沼上 幹, “マーケティング戦略”, 有斐閣アルマ (2010).
- 85) 大江 建, “なぜ新規事業は成功しないのか”, 日本経済新聞出版社 (2008).
- 86) J. ティッド, J. ベサント, K. パビット, “イノベーションの経営学”, NTT 出版 (2008).
- 87) F. ベッツ, “戦略技術管理論”, 文理閣 (2005).
- 88) P. シュワルツ, “シナリオ・プランニングの技法”, 東洋経済新聞社 (2000).
- 89) E. V. ヒッペル, “民主化するイノベーションの時代”, ファーストプレス (2005).
- 90) 星野達也, “オープン・イノベーションの教科書”, ダイヤモンド社 (2015).
- 91) 経済産業省 特許庁, “事業戦略と知的財産マネジメント”, 工業所有権情報・研修館 (2010).
- 92) 野崎篤志, “特許情報分析とパテントマップ作成入門”, 発明協会 (2011).
- 93) グロービス経営大学院, “【新版】グロービス MBA ビジネスプラン”, ダイヤモンド社 (2010).
- 94) 廣畑伸雄, 向山尚志, 山本豪紀, “財務会計演習 第 2 版”, EME パブリッシング (2008).
- 95) 厚生労働省 H.P., 「社会保障制度改革の全体像」(最終アクセス日: 2015.11.16.)
[http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/hokabunya/shakaihoshou/dl/260328_01.pdf]

- 96) 南雲明, リサーチペーパー「薬物治療における個別化医療の現状と展望・基礎研究の進展が医薬品開発に与えるインパクト」, 医薬政策研究所, **56**, 5 (2013).
- 97) 富士経済 編, 2014 医療用医薬品データブック, 富士経済, (2014).

謝 辞

本論文は、崇城大学大学院工学研究科応用生命科学専攻において、松本陽子教授のご指導のもと博士課程 2 年間に行った研究をまとめたものである。

本研究を遂行する上で、終始ご指導・ご鞭撻を賜りました松本陽子教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重なご教示・ご助言を賜りました上岡龍一名誉教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で、適切なご指導・ご意見を賜りました松下琢教授、市原英明准教授に感謝致します。

本論文の執筆にあたり、貴重なご意見を賜りました寺本祐司教授に感謝致します。

実験を行う上で、多大な貢献をいただきました学生諸氏に感謝致します。特に菊本ありささん、高木麻里さん、中島裕美さんに感謝致します。

本研究を行うにあたり、ご理解ご支援を頂きました 熊本防錆工業株式会社 代表取締役 前田真弘社長に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり、終始温かい支援を頂いたリウマチ患者の妻に感謝します。