

1. 緒言

薬物送達システムは、毒性はあるが効果が強い化合物、高親油性/難溶性化合物や、不安定な化合物の薬物送達、水溶性化合物の組織ターゲティングなど、その開発に強い関心が寄せられている。薬物送達システムの一つに、有効成分をリポソームの内水相に封入する、脂質成分へ組み込む、もしくは結合させる方法がある。リポソームは標準的には単層もしくは多重脂質二重膜で構成された小胞と記載されている。そのような多様性には、多胞体リポソーム、ポリマー修飾されたリポソームや脂質複合体などが含まれる。どの製剤においても、有効成分の一部はリポソーム外のバルク溶液中にも遊離していると考えられる。

初期の非経口リポソーム製剤は、投与後速やかに単核食細胞系によって異物認識、排除され、その後初期バーストするなど、いくつかの重要な薬物動態特性を持つことが知られていた。またリポソームの粒子径や膜流動性、表面荷電や組成といった物理化学的特性が、このような *in vivo* 挙動の決定要因であることも認識されていた。複数の製剤で、ステロール(例えばコレステロール)の添加、粒子の微細化や、共有結合されたポリマー(例えばポリエチレングリコール[PEG])による表面修飾が有効で、著しく体内動態が改善することが知られていた。

有効成分が単純な溶液中に溶解している注射剤とは異なり、リポソーム製剤には製剤特有の *in vivo* 分布特性があり、同様の血漿中濃度を示したとしても同等の治療効果とは関連しない可能性がある。新規のリポソーム製剤の安全性と有効性を確保するためには、徹底的な薬物動態や組織分布の特性解析が重要である、なぜなら、リポソーム製剤は特異的な細胞との相互作用や分布特性を示すため、製剤の違いが、通常 of 生物学的同等性試験だけでは検出できない有効性・安全性の大幅な変化を引き起こす可能性があるためである。先発品を基準に開発されたリポソーム製剤の非臨床及び臨床試験を計画する際には、先発品の開発目的と使用の根拠を考慮すべきである。

同等性/同質性の調査に用いる標準リポソーム製剤は EU 内から供給され、全ての特性解析試験において比較対象として用いることとする。

本文書では先発リポソーム製剤に対して開発されたリポソーム製剤の評価について、基本的な考え方を取り扱うが、個別の品質解析、非臨床試験・臨床試験のあり方を規定するものではない。

本文書は以下の文書と共に読むこと。

- Directive 2001/83/EC, as amended
- Part II of the Annex I of Directive 2001/83/EC, as amended
- CHMP/437/04 バイオ後続品に関するガイドライン
- Annex II to Note for Guidance on Process Validation CHMP/QWP/849/99 and EMEA/CVMP/598/99 Non Standard Processes (CPMP/QWP/2054/03)
- 有効成分としてバイオテクノロジー応用タンパク質を含むバイオ後続品に関するガイドライン

- ICH topic 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
- ICH topic S6 – バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価(CPMP/ICH/302/95)
- ICH topic E9 – 臨床試験のための統計的原則(CPMP/ICH/363/96)
- ICH topic E10 – 臨床試験における対象群の選択(CPMP/EWP /2158/99)
- 優越性と非劣性のスイッチングに関する注意点
- 生物学的利用能と生物学的同等性のガイドライン (CPMP/EWP/QWP/1401/98, rev 1 corr*)

<適用対象>

本文書は、先発リポソーム製剤に対して開発された静脈用リポソーム製剤の承認申請に向けた品質、非臨床・臨床データの収集に関して助言することを意図している。従って、本文書は以下の事項に関する決定に役立つであろう。

- 安全性と有効性を確保するため、試験製剤と標準製剤の同等性/同質性、もしくはリポソーム製剤化後の製品の同等性/同質性を立証するのに求められる製剤データ
- 前臨床と臨床試験(通常の生物学的同等性試験を含む)の必要性和、特定の試験を免除できる事例

本文書で概説する考え方は、開発途中の他の新規な「リポソームのような」製剤及び粒子状製剤に適用可能と見なされる場合もあり、静脈投与以外のルートで投与される場合も含む。

2. 議論

2.1 製剤品質

リポソーム製剤の重要品質特性は、以下に示す理由によって *in vivo* 薬物動態(PK)や薬力学(PD)特性に大きな影響を及ぼす。

- リポソームからの有効成分の放出速度は PK 及び PD に影響し、その結果、医薬品の安全性・有効性プロファイルに影響する。
- 通常、封入された有効成分は生物学的に利用不可能であり、リポソーム内に封入されている限り、代謝作用から保護されている。
- 封入された有効成分の PK は薬物キャリア(すなわちリポソーム製剤)の PK によって制御される可能性があり、薬物キャリアの PK はリポソームの物理化学的特性や封入された原薬の物理的状态によって影響および決定されている。

リポソーム製剤の複雑さ故に、製剤同等性/同質性評価の設定は、完全に非臨床及び/又は臨床データの代用とすることはできないが、非臨床及び臨床試験数の削減を正当化できるであろう。

品質特性

リポソーム製剤の品質を確保するため、評価するのに適切な物理化学的特性を規定するパラメーターを、正確に特定することが重要である。以下の一般的なパラメーターは、あらゆるタイプのリポソーム製剤を申請する際に明記する必要がある、

- ・ 脂質成分の重要事項(性状、原材料及び特性解析、製造、規格及び試験方法、安定性)
- ・ 非脂質の出発原料及び重要添加物の品質、純度及び安定性
- ・ 製造工程における重要な中間体の特定と制御
- ・ 製剤の一定性を確保するための適切な製造段階における有効成分/脂質成分比
- ・ リポソームの形態、サイズ、サイズ分布
- ・ 封入された有効成分分画(封入した量に対する遊離量)
- ・ 脂質成分の定量試験
- ・ 浸透圧
- ・ 重要な分解生成物の定量も含む(例えばリゾホスファチジルコリン、酸化/加水分解部分)、最終製品における有効成分、脂質および機能性添加物の安定性、
- ・ 使用条件下における安定性試験
- ・ 適切な試験液及び苛酷条件下におけるリポソームからの *in vitro* 薬物放出率(速度)
- ・ 再調製及び/又は院内調製のためのバリデートされた一連の作業

リポソーム製剤の特殊な機能によっては(例えば、有効成分の封入による体内分布の改良、及び安全性プロファイルの改善、PEG化によるリポソームの体内動態改良)、以下に示す追加のパラメーターも申請時には考慮すべきである。

- ・ 血漿中におけるリポソーム製剤の膜完全性の維持
- ・ 脂質二重膜の相転移温度及び/又はリポソーム“表面”電位の特性解析/規格試験
- ・ リポソーム内に封入された有効成分の物理的状態の確認(例えば、ドキシソルビシンの場合の沈殿形成)
- ・ 表面結合している薬物の分画
- ・ PEG化されたリポソーム製剤について
 - ・ 結合化学の詳細(PEG脂質)
 - ・ PEG脂質の分子量とサイズ分布
 - ・ 表面でのPEG鎖の分布
 - ・ PEG化の安定性

日常的に適用される試験のリストを設定すべきであり、上記のような製剤の特性解析に用いるパラメーターに基づいて設定すること。

以下の要件を満たすように、識別性があり、バリデートされた *in vitro* 放出試験を開発すべきである

- ・ 全身循環中及び可能であれば標的作用部位周辺(例えば作用部位での異なる pH 環境)における薬物放出を模倣したリポソームからの薬物放出を測定できること。試験液は、投与時にリポソーム製剤がされされる生理環境を反映していること。
- ・ 保存中の安定性を測定できること、またバッチ間の均一性を確保するのに十分な感度/識別性を有していること。

製剤コンパラビリティの立証

開発製品の質的・量的な組成は標準製剤と同一、もしくは厳密に一致しているべきである。

通常、先発製剤を基準にリポソーム製剤を開発した申請者は、この標準製剤の製造工程に関する情報を入手できない。従って、品質が同等/同質であることを高い保証水準で証明するため、双方の製剤を対象に、広範囲にわたる最先端の特性解析研究を並行して行うべきである。同等性/同質性試験は、「品質特性」の項で述べた試験を含み、試験及び標準製剤の品質を適切に評価するのに適切であり、特に製剤の *in vivo* 挙動と関連していることとする。同等性/同質性評価作業において特定された標準製剤との差異は、承認申請書に明記し、徹底的に評価すべきである。

通常の条件下で実施された特性解析試験に加えて、双方の製剤、すなわち開発されたリポソーム製剤と先発製剤、の苛酷試験条件下における同等性/同質性試験は、リポソーム製剤の分解産物や他の物理化学的な性能特性を調査する一つの選択肢となるであろう。

特性解析に用いる標準製剤のバッチは全てその使用期限内に分析し、分析するまで推奨保存条件下で保存すべきである。

申請製品の製剤開発

基準を満たす製品を恒常的に製造するには、各種工程管理を含め製造工程を厳密に規定し、その一定性を保つことが必要である(*)。リポソーム製剤の場合、小さな変更でも著しく性能に影響することが知られている。いかなる製造工程変更であっても、その影響を評価するための方策は、当該工程、製品、製造工程に関して製造販売業者が有する知見及び経験、開発過程で得られたデータによって異なる(*)。開発段階において製造工程を変更する場合は、同等性/同質性調査(「品質特性」参照)を行う必要がある。(※の文は Q5E に全く同じ文章があったので、まともな和訳になっております)

物理化学的試験によって製品の性能に変化が認められた際には、製造工程の変更が製品の安全性・有効性プロファイルに影響しないことを証明するために、*in vivo* 試験が必要な場合がある。

ICH 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とりあう同等性/同質性評価)の 1.4 で概説されている基本原則を考慮することが推奨される。

2.2 非臨床及び臨床要件

一般的側面

先発製剤を基準に開発されたリポソーム製剤の承認申請書は、先発製剤と比較して有効性と安全性が同等とする結論の正当性を十分に保証できるほど広範囲かつ詳細であること。一般に、同等性試験の前に実施される非臨床試験には、薬物動態、組織分布、毒性および薬力学試験における同等性/同質性評価が求められる。しかしながら、非臨床試験を削減できるかどうかは個別のリポ

ソーム製剤の複雑さに依存するであろう。従って、どの試験を免除可能であるかはケースバイケースで決定することができる。

新規リポソーム製剤の総合評価において、品質、非臨床及び臨床試験で得られた証拠全体をまとめて考慮すべきである。例えばもし、先発リポソーム製剤を基準に開発されたリポソーム製剤の非臨床試験において何かしらの差異が認められる場合は、次の臨床試験に進むよりも、検出された逸脱の考え得る原因を明確にするため、物理化学的な製剤特性の再評価が必要である。製品の類似性を示すためのデータ間の論争は、先発製剤を基準とした類似性の評価方法と矛盾し、規制当局の大きな関心となり得る(この文章がよく分かりませんでした)。

2.2.1 非臨床試験

非臨床薬物動態試験

ヒトにおけるリポソーム製剤の挙動に関しては、動物と細胞モデルでもって、いくつかの薬物動態的側面を捉えることができる。しかしながら、リポソームからの *in vivo* 薬物放出を評価する動物種やモデルは、特に標的組織への集積、薬物動態や分布などに重点を置いて、最適なものを選択する必要がある。薬物動態の類似性を主張するために、複数用量で単回および反復投与試験が求められるであろう。全身暴露に加えて、分布と排泄の類似性も示すこと。製品の毒性および/または有効性に関連する組織中の有効成分濃度を測定し、標準製剤と量的に比較する必要がある。

非臨床薬力学試験

非臨床薬力学試験は以下の項目を含むこと。

- ・ 適切なモデルを用いた複数用量での薬力学的反応評価による類似性の証明
- ・ リポソームと細胞との相互作用が毒性発現に関連する/重要である場合、リポソームと標的細胞又は他の細胞との相互作用を解析できる *in vitro* 試験

毒性試験

一般的には毒性試験は必要ないが、製剤同等性/同質性試験の結果によって、また製品の毒性の性質によっては、適切な毒性試験の実施が必要な場合もある。

2.2.2 臨床試験

【比較薬物動態試験 (同等性/同質性薬物動態試験?)】

一般的留意事項

有効成分がリポソーム製剤として投与されると、薬物動態特性の明確な変化が明らかになる、すなわち、分布容積やクリアランスが低下し、血中半減期が延長する。リポソームに封入された有効成分のクリアランスは以下の項目に依存する。

- (1) リポソームキャリアそのもののクリアランス速度
- (2) リポソームキャリアに封入された薬物の放出速度

(3) 放出された遊離薬物のクリアランスと代謝速度

毒性および有効性を評価するのに、*in vivo* で薬物が放出される速度と部位は重要なパラメーターとなる。

従って、開発したリポソーム製剤の薬物動態は常に先発リポソーム製剤と比較すべきである。通常の生物学的同等性試験が適用可能な場合もあるが、場合によっては臨機応変に追加試験を設定する必要がある。

ヒト同等性/同質性薬物動態試験では、非封入薬物とリポソームに封入された薬物による暴露の類似性だけでなく、分布と排泄特性の類似性も証明する必要がある。薬物動態試験には、生体試料（例えば全血や血漿）中の封入薬物及び遊離薬物濃度を測定するバリデーション済みの分析方法を用いることとする。

試験投与量

薬物動態挙動の用量依存性が想定されるので、使用投与量の範囲において直線性が既に証明されているか、最も検出感度の高い用量が証明され正当化されている場合を除いて、試験製剤と標準製剤の薬物動態挙動はすべての用量範囲で比較されるべきである。適用疾患によって用量が異なる場合は、直線性が証明されない限り、薬物動態試験はそれぞれの用量で実施される必要がある。

試験デザインの留意事項

製剤を健常被験者に投与できない場合、薬物動態試験は患者で実施すること。単回投与が実施できない場合（すなわち健常人において有効成分への耐性が無い場合）、患者での反復投与を実施することができる。

測定検体

バリデーション済みの生体試料分析方法は、確実に封入および非封入薬物を定量できること。有効成分はリポソームから放出されなければ代謝されないため、薬理作用に関わらず、少なくとも1つの代謝産物を定量することで放出速度を評価・比較しやすくなると思われる。代謝産物がいくつかある場合、動態に基づいて選択した代謝産物について、その妥当性を示す必要がある。一つもしくは複数の代謝産物に臨床効果のある場合、それらの動態も同様に比較されることが要求される。

測定および記録薬物動態パラメーター

理想的には、薬物動態特性の評価は、リポソームから有効成分が放出される速度を比較できるように評価すること、なぜならリポソームからの薬物放出速度が治療効果の発現および持続を規定するためである。しかしながら、AUC や C_{max} といった通常の指標は、標的組織における薬物放出速度を網羅できない場合がある。従って、放出速度及び量に加えて、分布と排泄も調査する必要がある。必要な場合には、尿中排泄速度及び量も比較すること。

長期にわたり薬物を放出するリポソームについては、クリアランス、分布容積、消失相(終末)半減期や部分 AUC (partial AUC) (例えば、0-24 時間、24-48 時間など)を詳細に測定する必要がある。これによって、リポソームの完全性や末梢組織/細網内皮系によるリポソーム取り込みといった、さらなる特性解析が可能となる。加えて、例えば、コンパートメント間クリアランスや、末梢および中央コンパートメント分布容積など、より詳細なパラメーターも考慮すること。

判定基準

封入薬物と遊離薬物の両方について類似性を証明する必要がある。一般に、C_{max}、AUC_{inf}、AUC_t の 90%信頼区間の比は 80 - 125%の範囲に入ることとなっている。追加の標準として、部分 AUC、もしくは代謝産物の判定基準が挙げられる。

有効性評価

一般に、義務付けられている臨床での薬物動態試験に加えて、有効性に関する臨床試験が求められるかどうかは、非臨床モデルや臨床薬物動態試験において、先発リポソーム製剤とそれを基準に開発されたリポソーム製剤との差異を、どれだけ感度良く検出できるか、またリポソーム製剤の複雑さに依存し、臨機応変に規定される。

定性的組成において製剤間の差異が認められる場合は、常に治療学的同等性試験の追加実施が求められる。例として、ポリマーが異なる結合方法で脂質に結合されている場合は、治療学的同等性試験が求められる場合がある。先発製剤に対してリポソーム製剤を開発する際には、製剤品質の同等性と、非臨床および臨床薬物動態試験における類似性を証明するために、出来る限りの試験を実施する必要がある。

安全性の問題

急性輸注反応はリポソーム製剤に比較的好く見られる有害事象である。しかしながら、試験製剤と先発製剤の間に定性的組成の差異(例えば異なる添加剤など)が無い限り、そのような副作用の発生頻度は同等/同質であると考えられる。動物モデルや薬物を封入していない空リポソームを使って、過敏性反応を調査することが求められる場合もある。

3. 結論

先発リポソーム製剤を基準に開発されたリポソーム製剤に関する経験は限られている。本文書では一般的な推奨事項しか提示していない可能性が高いため、リポソーム製剤の同等性/同質性を証明するのにどのようなデータが必要かという問いに関して、それぞれの製剤固有の方針を提示することを製造販売業者に求める。

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）

後発医薬品の同等性ガイドラインにおける試験条件の最適化に関する研究

平成23年度 研究分担報告書

リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討

研究分担者 齋藤博幸 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

(研究要旨)

ポリエチレングリコール（PEG）修飾リポソームの血中動態や体内分布を制御する表面物性指標の検討を目的として、表面電位測定によるリポソーム表面固定水和層の厚さの評価に加えて、PEG リン脂質のリポソーム膜内外層間の分布や表面被覆率、リポソーム膜表面でのPEG鎖コンフォメーションなどに関する蛍光分光学的評価を行った。リポソーム表面電位の指標となるゼータ電位の絶対値はPEGリン脂質添加量に依存して低下し、PEG鎖による固定水和層の形成が示唆された。この際、PEGリン脂質添加に伴う表面固定水和層の厚みの増大はリポソーム膜表面でのPEG鎖コンフォメーション変化に起因することが、蛍光標識PEGリン脂質を用いた蛍光共鳴エネルギー移動測定から示唆された。さらに、リポソーム膜内外層におけるPEGリン脂質の分布を調査したところ、リポソーム調製時にあらかじめPEGリン脂質を加えるpre-mixed法で調製したPEGリポソームでは添加したPEGリン脂質の約半分が、リポソーム調製後にPEGリン脂質を加えるpost-insertion法では90%以上が、それぞれリポソーム膜最外層に挿入されていることが示された。以上の結果をふまえて、リポソーム膜最外層におけるPEGリン脂質被覆率と固定水和層の厚みとの相関を求めたところ、pre-mixed法とpost-insertion法ではほぼ同じ相関が認められ、修飾法の違いに関わらず、PEG修飾リポソームの表面物性がPEG鎖による表面被覆率によって制御されていることが示唆された。

A. 研究目的

PEG修飾リポソームは、リポソーム製剤の血中滞留性を向上させる有効な手法として開発され、ドキシソルビシン製剤であるDoxil®を初めとしていくつかの製剤が既に実用化されている。PEG修飾リポソームの高い血中滞留性は、リポソーム表面のPEG鎖が形成する水和層やPEG鎖自身の立体障害により、オプソニンなどの血清タンパク質の結合や単核食細胞系などとの相互作用、血漿中でのリポソーム粒子間での凝集などが抑制されるためと考えられている¹⁻³⁾。リポソームのPEG修飾法としては、リポソーム調製

時にあらかじめPEGリン脂質を加える方法（pre-mixed法）が従来行われてきたが、近年、リポソーム調製後にPEGリン脂質を加えるpost-insertion法が広く利用されている⁴⁻⁵⁾。本研究では、両法で調製したPEG修飾リポソームのゼータ電位測定によるリポソーム表面固定水和層の厚さの評価に加えて、PEGリン脂質のリポソーム膜内外層間の分布や表面被覆率、リポソーム膜表面でのPEG鎖コンフォメーションなどに関する蛍光分光学的評価を行うことで、これら測定パラメータのリポソーム表面物性指標としての有用性を

検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

リポソーム構成脂質としては、distearoylphosphatidylcholine (DSPC) と distearoylphosphatidylglycerol (DSPG) は日油(株)から、cholesterolはSigma-Aldrich社から購入したものを用いた。PEG リン脂質としては、分子量 2000 の PEG 鎖が付加したリン脂質誘導体 (DSPE-PEG2000) を用い、PEG 鎖末端がアミンで活性化された DSPE-PEG2000-NH₂ は日油(株)から供与を受けた。PEG 鎖末端の蛍光標識には NHS-Fluorescein (Thermo Scientific) と NBD succinimidyl ester (Invitrogen) を用いた。

2. リポソームの調製

脂質をメタノール：クロロホルム (1 : 2 v/v) に溶解後、ロータリーエバポレーターを用いて薄膜を形成させ、一晚減圧乾燥により溶媒を除去した。薄膜に 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、約 60°C でボルテックスすることにより脂質を分散させた。これを 60°C 付近に保ったまま、Mini-Extruder (Avanti Polar Lipid 社) を用いて 200nm のポリカーボネートフィルターを十数回通過させてリポソームを調製した。Post-insertion 法による PEG 修飾リポソームは、リポソーム調製後に PEG リン脂質を加え、60°C に加温しながら 60 分間ボルテックスを行うことで作製した。リン脂質の定量は Bartlett 法⁶⁾により行った。

3. リポソーム粒子径及びゼータ電位測定

調製したリポソームの粒子径とゼータ電

位は NICOMP 社製 NICOMP 380 ZLS を用いて測定した。測定には光路長 1cm のプラスチックセルを用い、脂質濃度は 0.5 mM で行った。

リポソームのゼータ電位の絶対値は、共存する塩濃度 (イオン強度) の増大によって減少する。これは、グイ-チャップマン理論による表面電位 ψ_x と粒子表面からの距離 x との関係式

$$\phi_x \approx \phi_0 \exp(-\kappa x) \quad \dots (1)$$

から説明される⁷⁾。ここで、 ϕ_0 は $x=0$ のときの電位を表し、 κ はデバイパラメータである。 κ はイオン強度 I と

$$\kappa = \sqrt{\frac{2000 N_A e^2 I}{\epsilon_r \epsilon_0 k T}} \quad \dots (2)$$

の関係にあり、NaCl のような 1 : 1 電解質の場合、25°C では

$$\kappa = \sqrt{[\text{NaCl}] / 0.304} \quad \dots (3)$$

となる。したがって、NaCl 濃度を変えてゼータ電位 ζ ($\approx \psi_x$) を測定することで

$$\ln \zeta = \ln \phi_0 - \kappa x \quad \dots (4)$$

の関係から、粒子表面からすべり面までの距離 x 、すなわち固定水和層の厚さ (Fixed Aqueous Layer Thickness, FALT) を求めた。

4. PEG リン脂質末端の Fluorescein あるいは NBD 標識

PEG 鎖末端がアミンで活性化された DSPE-PEG2000-NH₂ を 50mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、DSPE-PEG2000-NH₂ の 10 倍量 (モル比) の NHS-Fluorescein あるいは NBD succinimidyl ester の dimethylsulfoxide 溶液を加え、一晚攪拌して反応を進行させた。未反応の NHS-Fluorescein あるいは NBD succinimidyl ester は Sephadex G-25 カラムを用いたゲルろ過により除去した。

5. NBD 蛍光消光実験

DSPE-PEG2000-NBD で標識したリポソーム溶液に水溶性の NBD 消光剤である $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加し、蛍光強度の減少率からリポソーム膜外層側に存在する PEG リン脂質の割合を求めた。

6. 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定

アクセプター分子である Rhodamine-PE を含むリポソーム膜にドナー分子である DSPE-PEG2000-NBD を post-insertion 法により挿入し、未挿入の DSPE-PEG2000-NBD は Sepharose CL-6B カラムにより除去した。この NBD-Rhodamine 二重標識 PEG 修飾リポソームについて、NBD の励起波長である 460nm で励起したときの NBD の蛍光強度の減少と Rhodamine の蛍光強度の増加から FRET を評価した。

C. 研究結果

1. Post-insertion 法による PEG 修飾リポソームの固定水和層の厚さ (FALT) の算出

Post-insertion 法によって調製した PEG 修飾リポソームのゼータ電位変化の挙動を図 1 に示す。PEG リン脂質の添加量に依存してゼータ電位の絶対値は減少し、リポソーム表面 PEG 鎖による固定水和層の形成が示唆された。そこで、グイ-チャップマン理論⁷⁾を適用して PEG 修飾リポソームの FALT を求めた。図 2 に未修飾 (plain) 及び 3.6 mol% の DSPE-PEG2000 で修飾したリポソームのゼータ電位とデバイパラメータ κ との関係を示す。この直線の傾きから、PEG 修飾によって FALT が 1.4 nm から 3.8 nm に増加していることが示された。

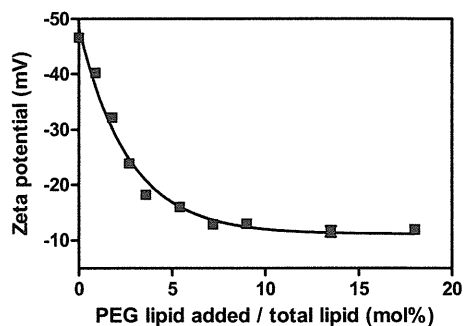


図 1. PEG リン脂質添加量に依存したゼータ電位変化

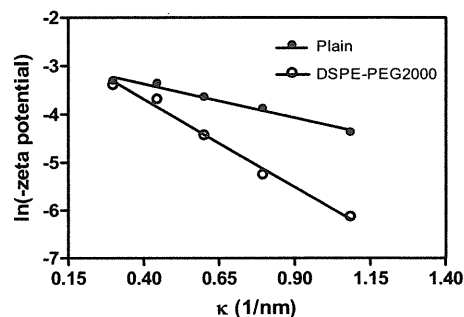


図 2. ゼータ電位とデバイパラメータ κ との関係

2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる PEG リン脂質挿入効率の測定

DSPE-PEG2000 のリポソーム膜に対する挿入効率を測定するために、リポソームリン脂質を Rhodamine-PE で、PEG リン脂質を DSPE-PEG2000-Fluorescein でそれぞれ標識し、それらの蛍光を指標に Sepharose CL-6B ゲルろ過による分離分析を行った (図 3)。Rhodamine と Fluorescein の蛍光が重なっているピークはリポソームに挿入された PEG リン脂質を、低分子量側の Fluorescein 単独のピークはリポソームに挿入されていない PEG リン脂質を表している。この 2 つのピークの曲線下面積から post-insertion 法におけるリポソーム膜への PEG リン脂質の挿入効率を求めた。さらに、調製時の温度を変えて post-insertion を行った際の挿入効率と FALT の変化を図 4 に示す。60°C 以上の温度では挿入効率及び FALT とも一定値に達してい

ることから、調製温度条件として 60°C 付近が適当と判断し、以後の post-insertion 法での調製は 60°C で行った。

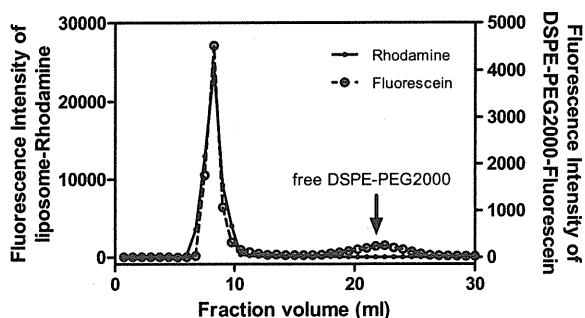


図 3. PEG リン脂質のリポソームに対する分布

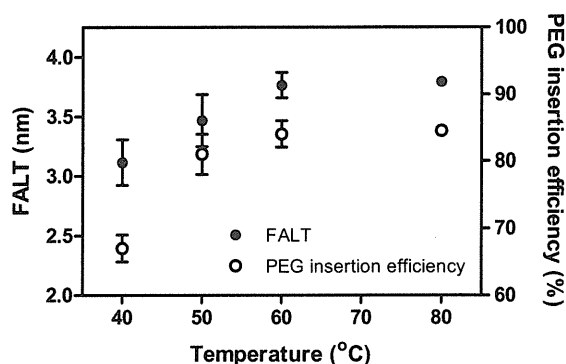


図 4. FALT と PEG リン脂質挿入効率の温度変化

3. PEG リン脂質添加量による FALT と PEG リン脂質挿入効率の変化

Post-insertion 法における PEG リン脂質の添加量と FALT 及びリポソームへの挿入効率との関係を表 1 に示した。PEG リン脂質添加量に依存して FALT が増加すること、またそれと逆相関に PEG リン脂質の挿入効率が低下することが示され、添加量として 7 mol% 程度で FALT が一定に達することが示された。

4. リポソーム膜内外層間での脂質及び PEG リン脂質の分布の測定

NBD 蛍光が亜ジチオン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) で還元されて消光する現象を利用

して、リポソーム膜内外層におけるリン脂質及び PEG リン脂質の分布を測定した。NBD 標識したリン脂質を含有するリポソームに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加すると、リポソーム膜最外層に存在する NBD 基のみが消光を受けるため、リポソーム膜最外層に存在するリン脂質の割合を求めることができる (図 5)。その結果、PEG 修飾の有無に関わらず、約半分のリン脂質がリポソーム膜外層に存在することが示され、リポソーム膜がほぼユニラメラ (単層) であることが確認された。

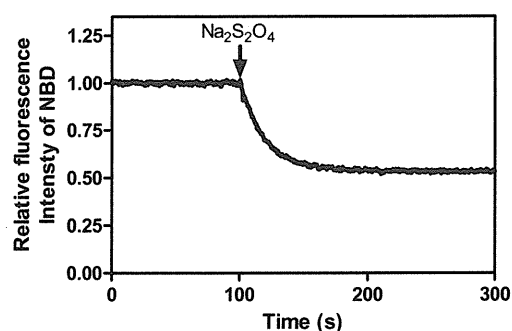


図 5. リポソーム膜外層に存在する NBD リン脂質の亜ジチオン酸ナトリウムによる蛍光消光

図 6 には、pre-mixed 法あるいは post-insertion 法で調製した PEG リポソームでの NBD 標識 PEG リン脂質の消光結果を示した。Pre-mixed 法で調製したリポソームにおいては約 50% の PEG リン脂質が、post-insertion 法では 100% に近い PEG リン脂質が、リポソーム膜外層に存在することが確認された。Post-insertion 法ではリポソーム膜調製後に PEG リン脂質を添加するため、PEG リン脂質はリポソーム膜外層にのみ存在すると考えられるが、post-insertion を行う際の温度条件によってはリポソーム膜内層側に PEG リン脂質が移行していることが確認された (図 7)。特に 80°C のような高温で post-insertion を行うと 15% 程度の PEG リ

ン脂質が内層に移行しており、高温での post-insertion には注意が必要であることが示唆された。

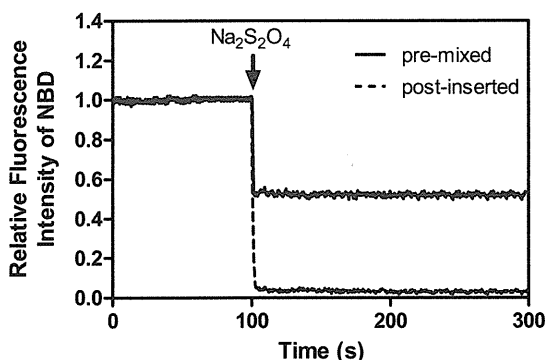


図 6. リポソーム膜最外層における NBD 標識 PEG リン脂質の蛍光消光挙動

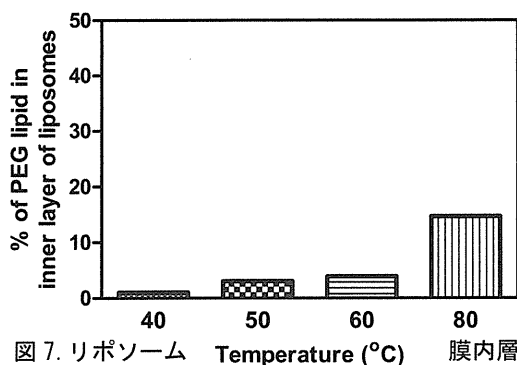


図 7. リポソーム膜内層への PEG リン脂質移行に対する調製温度の影響

5. FRET によるリポソーム膜表面 PEG 鎖のコンフォメーション変化の観測

表 1 に示した PEG リン脂質添加量の増加に伴う FALT の増大は、リポソーム膜表面での PEG 鎖コンフォメーションがマッシュルーム型からブラシ型へ変化するためと考えられている。これは、PEG リン脂質濃度の増加が PEG 鎖の三次元的な横方向への広がりを抑制し、縦方向に伸長することにより水和層が増大するためである⁸⁾。この PEG 鎖のコンフォメーション変化を検出するため、リポソーム膜中のリン脂質頭部を Rhodamine (アクセプター分子) で、DSPE-PEG2000 の末端を NBD (ド

ナー分子) で標識し、NBD から Rhodamine への FRET を観察した⁹⁾。

ドナー分子単独での蛍光強度を F_D 、アクセプター分子存在下におけるドナー分子の蛍光強度を F_{DA} とすると、励起エネルギー移動効率 E は次式で表される。

$$E = 1 - (F_{DA} / F_D) \quad \dots (5)$$

また、ドナー - アクセプター分子間距離を R 、励起エネルギー移動効率が 50% となるドナー - アクセプター分子間距離を R_0 とすると、 E は次式のように書ける。

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad \dots (6)$$

ここで、ドナーが NBD、アクセプターが Rhodamine の場合の R_0 値として 3.19 nm を用いた。

図 8 に、PEG 脂質を 1.0 mol% 添加した際の NBD と Rhodamine の蛍光スペクトルを示す。NBD の励起波長 460nm で励起すると、PEG 鎖末端の NBD 基からリポソーム膜表面の Rhodamine 基へ FRET が起こり、NBD の蛍光極大波長である 540nm 付近での蛍光強度の減少と、Rhodamine の蛍光極大波長である 580nm 付近での蛍光強度の増大が観察された。そこで、540nm 付近における蛍光強度の変化から励起エネルギー移動効率 E を、さらにその値を (6) 式に代入することでドナー - アクセプター分子間距離 R を求めた。図 9 は、PEG リ

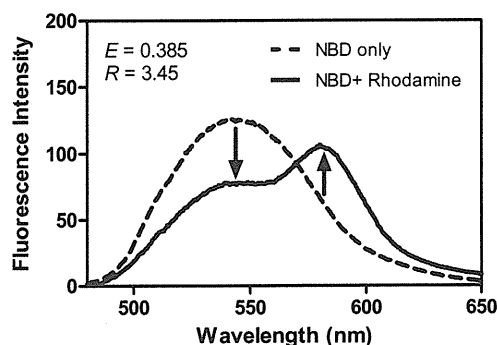


図 8. リポソーム表面での NBD-Rhodamine 間 FRET

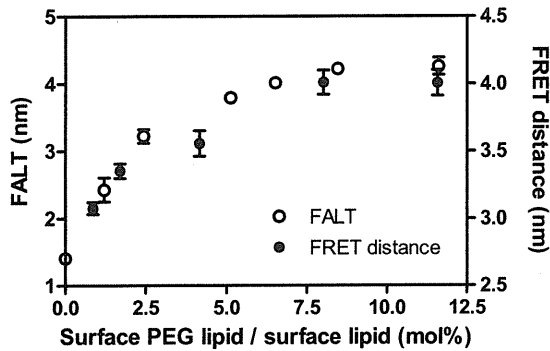


図 9. FALT と FRET 距離の変化

ン脂質の表面濃度の増加による FALT とドナー-アクセプター分子間距離の変化を示す。これより、PEG 修飾率の増加に伴う固定水和層長の増大が、リポソーム膜面から PEG 鎖末端までの平均距離の増大、すなわち PEG 鎖コンフォメーションの変化と相関していることが明らかとなった。

6. PEG リン脂質によるリポソーム表面被覆率と FALT との関係

以上の結果より、post-insertion 法及び pre-mixed 法で調製された PEG リポソームにおいて、リポソーム膜表面の PEG リン脂質による被覆率を見積もることが可能となった。そこで、リポソーム膜表面での PEG リン脂質の被覆率と FALT との相関関係を post-insertion 法と pre-mixed 法とで比較

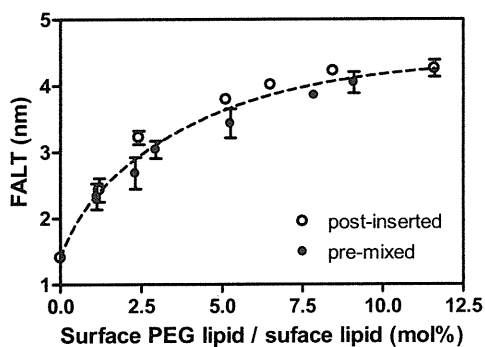


図 10. リポソーム表面 PEG 脂質濃度と FALT との関係

したところ (図 10), リポソームの PEG 修飾法に関わらず, FALT の増加は表面 PEG リン脂質濃度に依存していることが明確に示された。

D. 考察

リポソームに組み込む PEG 脂質の分子量や添加量およびアンカーとして用いる脂質の物理化学的性質の違いによって、PEG 修飾リポソームの血中滞留性が変化することが知られている。特に PEG 脂質の添加量の違いは、リポソーム膜表面での PEG 鎖コンフォメーションの違い (マッシュルーム型かブラシ型か) に影響を与え、PEG 鎖の表面密度が大きくなることで PEG 鎖がオーバーラップし、横に広がったマッシュルーム構造から縦に伸張したブラシ構造に変化すると考えられている。そこで本研究では、PEG 修飾リポソームの表面物性として表面固定水和層の厚さ (FALT) を評価するとともに、蛍光標識 PEG リン脂質を用いたリポソーム膜表面での PEG 被覆率および PEG 鎖コンフォメーション変化の評価を行った。

まず、PEG 修飾法として近年広く用いられている post-insertion 法において、PEG リン脂質添加量や調製温度による PEG 脂質挿入効率や FALT の変化を調べたところ、至適な添加量や調製温度が存在することが示された。さらに、PEG 修飾リポソームの PEG 鎖末端からリポソーム膜リン脂質頭部までの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を観測したところ、PEG リン脂質添加量の増大に伴うリポソーム表面固定水和層長の増大と膜面から PEG 鎖末端までの平均距離の増大との間により相関が認められた。これは、PEG 修飾リポソームの表面固定水和層長の増大が表面 PEG 鎖のコ

ンフォメーション変化に起因することを明確に示唆する。また、FALT と FRET 距離はともに 5~7 mol% 程度の表面 PEG リン脂質濃度で一定に達しており、このあたりで PEG 鎖がマッシュルーム構造からブラシ構造に変化していると考えられる。このとき、リポソーム膜表面脂質 14~20 分子当たり 1 分子の PEG 脂質で覆われている計算になる。

E. 結論

蛍光標識 PEG リン脂質を用いた蛍光分光測定により、pre-mixed 法と post-insertion 法における PEG リン脂質挿入効率やリポソーム膜内外層での PEG リン脂質の分布を評価することが可能となった。両法で調製した PEG 修飾リポソームの FALT の変化をリポソーム膜表面に存在する PEG 脂質濃度当たりで比較したところ、リポソーム膜最外層における PEG リン脂質被覆率と固定水和層の厚みとの相関は pre-mixed 法 と post-insertion 法でほぼ同じであり、修飾法の違いにかかわらず、PEG リポソームの表面物性が PEG 鎖の表面被覆率によって制御されていることが示された。Post-insertion 法は、添加した PEG 脂質の大部分がリポソーム膜外層に挿入され、薬物をリポソームに内封後に修飾が可能であるなど、pre-mixed 法よりも効率的な PEG 修飾法であるといえ、今後も応用が広がっていくものと思われる。

F. 参考文献

- 1) 石田竜弘, 際田弘志: 薬学雑誌, **128**, 233-243 (2008).
- 2) Dos Santos, N., Allen, C., Doppen, A. M., Anantha, M., Cox, K. A., Gallagher, R.

C., Karlsson, G., Edwards, K., Kenner, G., Samuels, L., Webb, M. S., Bally, M. B.: *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1367-77 (2007).

3) Satulovsky, J., Carignano, M. A., Szleifer, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9037-9041 (2000).

4) Iden, D. L., Allen, T. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **1513**, 207-216 (2001)

5) Moreira, J.N., Ishida, T., Gaspar, R., Allen, T. M.: *Pharm. Res.* **19**, 265-269 (2002)

6) Bartlett, G.R.: *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1958)

7) J.N. イスラエルアチヴィリ: 分子間力と表面力 第2版, 朝倉書店, 1996, p.205-276

8) Olga, G., Yechezkel, B., Aba, P.: *Chem. Phys. Lipids* **135**, 117-129 (2005)

9) Ronghua, L., Frances, J. S.: *Biochem.* **37**, 6503-6512 (1998)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

北山裕貴, 四方田千佳子, 斎藤博幸: PEG リン脂質によるリポソーム表面修飾法の最適化の検討. 第 50 回日本薬学会中国四国支部学術大会(2011.11.12-13 高松)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 PEG 脂質濃度と FALT 及び挿入効率との関係

PEG lipid added /total lipid (mol%)	0.9	1.8	3.6	5.4	7.2	9.0
FALT (nm)	2.4 ± 0.2	3.2 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1
Insertion efficiency of PEG lipid (%)	90 ± 1	88 ± 1	86 ± 1	83 ± 2	82 ± 1	77 ± 2

後発医薬品の同等性ガイドラインにおける試験条件の最適化に関する研究

脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究-2

-リポソーム製剤の薬物放出性に関する検討-

分担研究者 柴田 寛子 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨 FDA から提示されたドキシソルピシン(DXR)封入リポソーム(DOXIL)の BE 試験に関するドラフトガイドランスにおいて、同等であるべき物理化学的特性のうち、in vitro 薬物漏出性について試験条件が4つ例示されている。今年度は例示された試験条件下における DOXIL からの DXR 放出挙動に影響する要因を検証した。条件のうち生体関連性のある条件(37°Cヒト血漿 50%中 24 時間、及び 37°C pH 5.5, 6.5, 7.5 緩衝液中 24 時間)では放出率が約 10%と低いことが確かめられた。加温条件下では温度上昇に伴う明確な放出率の増加が認められ、その際の試験液の pH は 7.5 や 6.5 よりも 5.5 のほうが適切であることが示唆された。一方で、超音波照射による速やかな DXR 放出が観察され、試験液の組成や pH は超音波による DXR 放出に全く影響しないことが判明した。

A. 研究目的

リポソーム製剤の品質を確保するために評価すべき重要な製剤特性の一つとして、in vitro 薬物放出性が挙げられる。2010 年に FDA からドキシソルピシン(DXR)封入 PEG リポソーム(PLD)の生物学的同等性(BE)試験に関するドラフトガイドランスが提示された。FDA が承認している製剤のうち該当するのは DOXIL[®]のみであるため、DOXIL[®]の後発医薬品のためのガイドランスといえる。このガイドランスの中にも同等であるべき物理化学的特性に in vitro 薬物漏出(放出)性が挙げられており、試験条件が4つ例示されている。しかし、実際に試験する際には緩衝液の種類など検討すべき項目がいくつかある上、同じ条件で薬物放出挙動を評価した報告は少ない。本研究では例示された試験条件のうち、pH、温度、超音波の DXR 放出挙動に与える影響を評価すると共に、緩衝液の種類や希釈率などの影響も評価した。

B. 研究方法

(1) 試験溶液の調製

PBS については、0.5 mol/L のリン酸水素二ナトリウム①とリン酸二水素ナトリウム②を調製し、pH 5.5 は①/②=1/19、pH 6.5 は①/②= 3/7、pH 7.5 は①/②= 8/2 となるよう混合し、pH を調整後、水を加えて 0.2

mol/L とした。フィルターろ過後に高圧滅菌を行い 4°C で保存した。塩化ナトリウム 4.1g、各 pH の 0.2 mol/L リン酸緩衝液 25 mL に水を加えて 500 mL とし、試験溶液とした。McIlvaine については、0.2 mol/L リン酸水素二ナトリウム①と 0.1 mol/L クエン酸②を調製し、pH 5.5 は①/②= 58/42、pH 6.5 は①/②= 72.7/27.3、pH 7.5 は①/②= 93.65/6.35 となるよう混合し、pH を調整後、フィルターろ過を行い、試験溶液とした。

(2) 各 pH・温度における DXR 放出挙動の評価

各試験液に各希釈倍率(50、100、及び 200)となるよう DOXIL[®](#029BJD)を添加し、よく混和したものを試料溶液とした。試料溶液は経過時間に 500 μL 以上となるようエッペンチューブに3本分注した。各温度の恒温槽でインキュベートした試料溶液 500μL を生理食塩水で置換した Sephadex G-25 カラム(PD MiniTrap G-25, GE)にアプライし、生理食塩水 1 mL で溶出した分画をリポソーム分画とした。塩酸酸性イソプロパノール 1.5 mL を加え、よく混和した溶液を分析試料とし、UFLC で DXR 濃度を測定した。0 時間の試料溶液 500 μL に生理食塩水 500 μL を加え、さらに塩酸酸性イソプロパノール 1.5 mL を加えたものをコントロール(100%)とし、放出率を算出した。

(3)ヒト血漿中における DXR 放出挙動の評価
DOXIL[®] を PBS (pH 7.5) で 100 倍に希釈した溶液に同量のヒト血漿 (lot_A, lot_B) を加え、試料溶液とした。試料溶液は各経過時間に 300 μ L 以上となるようエッペンチューブに 3 本分注した。Sephacel CL-4B (GE) 5 mL を空カラム (Disposable Plastic Columns, PIERCE) に充填し、生理食塩水で置換したカラムに、37 $^{\circ}$ C の恒温槽でインキュベートした試料溶液 300 μ L をアプライし、生理食塩水 1.25 mL をアプライした後、さらに生理食塩水 1.5 mL で溶出した分画をリポソーム分画とした。上記と同様に塩酸酸性イソプロパノールを添加し、分析試料とした。

(4)超音波照射による DXR 放出挙動の評価
PBS (pH 6.5) に各希釈倍率 (50、100、及び 200) となるよう DOXIL[®] を添加し、よく混和したものを試料溶液とした。試料溶液は時点ごとに 2 mL を 15 mL チューブに 3 本分注した。恒温槽にチューブを置き、超音波ホモジナイザー (アストラソン S400) のマイクロチップをチューブの試料溶液に浸し、各条件下で超音波を照射した。各時点の試料溶液 500 μ L を生理食塩水で置換した Sephadex G-25 カラムにアプライし、上記と同様に分析試料を調製した。

(5)UFLC による DXR 濃度の定量
分析装置は UFLC システム (LC-20AD、島津製作所) を用い、文献等を参考に以下の条件で定量分析を行った。カラムは C18 カラム (Shim-pack XR-ODS 2 \times 50 mm, 2.2 μ m) を用い、カラムオープン は 40 $^{\circ}$ C とした。移動相 A : 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0)、B : 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を調製し、A/B = 4/6 の混合液を移動相とし、流速は 0.3 mL/min で分析を行った。分析試料 1 μ L を注入し、蛍光光度計 (470/590 nm) で DXR のピークを検出した。なお、アドリアシン注 10 を生理食塩水 10 mL で溶解したものをストック溶液とし (-20 $^{\circ}$ C で保存)、ストック溶液を移動相で希釈した溶液 (20 μ g/mL から 2 倍希釈で 6 点) を使った検量線を作成した。

(5)粒子径の測定
各条件でインキュベートした試料溶液 (n = 3) について、動的光散乱法 (DLS) を採用した DLS7000 (大塚

電子) で 90 度散乱測定から粒子径を算出した。キュムラント解析及びヒストグラム解析で平均粒子径及び粒子分布を算出した。

C. 研究結果

ヒト血漿中の DXR 放出挙動

FDA のガイダンスで例示されていた条件を表 1 に示す。血液循環系におけるリポソームの安定性を評価するために、ヒト血漿を使った試験条件が提案されている。ヒト血漿 50% 溶液に DOXIL を分散させ、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートしたところ、顕著な薬物放出は観察されず、48 時間インキュベートしても DXR 放出率は 10~20 % 程度であった (図 1)。なお、血漿のロット間差の有無を確認するため、2 ロットの間での放出挙動を比較したところ、両者に大きな差は認められなかった。

緩衝液中の DXR 放出挙動

37 $^{\circ}$ C における pH の異なる緩衝液中 (pH 5.5, 6.5, 7.5) の DXR 放出挙動を観察したところ、どの試験液中でも DXR 放出率は 10% 程度と低いことが判明した (図 2)。この条件は、表 1 のとおり、正常組織 (pH 7.3)、ガン細胞周辺 (pH 6.6)、ガン細胞内部 (pH 5-6) の状態を模倣するための条件である。DXR は硫酸アンモニウムによる pH 勾配を利用したリモートローディング法で封入されているため、低 pH ではある程度の DXR 放出が観察されると予想されたが、そのような傾向は全く認められなかった。

次に、各緩衝液について、温度上昇の DXR 放出性に与える影響を評価した。各緩衝液 pH 5.5 中では、McIlvaine 緩衝液より PBS で速い DXR 放出が観察され、43, 47, 52, 57 $^{\circ}$ C と温度上昇に伴い顕著に放出率が増加し、明確な温度依存性が認められた (図 3)。一方、pH 6.5 や 7.5 では 57 $^{\circ}$ C 以外放出率が低く、温度上昇との相関性は低い傾向が見られた。また、DOXIL の希釈倍率が大きいほど DXR 放出率が高くなる傾向が観察され、特に McIlvaine 緩衝液ではその傾向が強いことが判明した (図 4)。

DXR が放出される際に、リポソームそのものの状態を観察することは、放出メカニズムを考える上で重要である。そこで、上記緩衝液中のリポソームの粒子

径を経時的に測定した。その結果、顕著な DXR 放出が認められた pH5.5 の試験液でも、平均粒子径は殆ど変わらないことが判明した(図5)。ただし、散乱強度は時間が経過するにつれて低下する傾向が観察された(図6)。従って、DXR 放出は粒子径変化を伴わないが、高温で長時間インキュベートすることで、リポソームが少しずつ消失していく可能性が示唆された。

超音波照射による DXR 放出挙動

超音波強度の上昇に伴って、DXR 放出率が増加することが確認された(図7)。試験液の pH が変化しても、放出挙動には全く変化は無く、20 分以内に放出率はほぼ 100%に達した(図8)。希釈倍率は他の条件と同様に、高いほど放出率が高くなることが観察された(図9)。また、温度が低いと放出率・速度も低下することが確認された(図10)。超音波照射によって、リポソームの平均粒子径は増加し、粒子径分布が広がる傾向が認められた(図11a)。特に散乱強度は、DXR 放出率が 100%になる 20 分後であっても、ある程度の散乱強度は保たれるものの、超音波照によって速やかに低下することが判明した(図11b)。

D. 考察

pH は低いほど、温度は高いほど DXR 放出率が高く、速く放出される傾向が認められた。また pH、温度、超音波の中では DXR 放出挙動に与える影響は超音波が一番強く、超音波照射によって短時間で放出率が 100%に達することが分かった。以下、試験条件例ごとに考察する。

表1の条件例①では、48 時間インキュベートしても放出率は 10~20%と低いが、血中でリポソームが安定であることを確かめる目的で設定されており、目的には適した条件と言える。条件例②では、in vivo で腫瘍組織やガン細胞内で DXR が放出されることを in vitro で模倣することが図られているが、実際の腫瘍組織や細胞内では pH 以外に酵素などが存在するためか、37°C では pH 5.5 や 6.5 において明確な DXR 放出は認められなかった。血漿を使う他に一般的な緩衝液中で放出率を評価し、in vivo 安定性を予想することには意義があると思われるが、今回の結果からは、37°C pH 5.5 や 6.5 の条件は目的には適して

いないと思われた。

表1の条件例③の pH 6.5 では温度依存性が明確に認められなかったため、温度上昇に伴う DXR 放出速度・放出率の増加を観察するには pH 5.5 の方が適していると思われる。2種類の緩衝液を比較したところ、全体的に PBS の方が DXR 放出は速い傾向にあった。McIlvaine でも pH 5.5 であれば明確な温度依存性が観察され、試験に適用可能であるが、200 倍程度は製剤を希釈する必要があると思われる。条件例④では試験液の pH や希釈率の影響は少ないが、DXR 放出率・速度は振幅強度に大きく依存し、照射装置やプローブによって放出率 100%に達する時間など結果が異なる可能性が考えられた。

放出メカニズムに関しては、緩衝液中で加温した際のリポソームの粒子径に大きな変化は認められなかったことから、加温によって膜透過性が亢進することで、内封された DXR が徐々に放出し、pH が低い緩衝液中では DXR が分子型になり、より速やかに DXR が放出されるものと考えられる。ただし、PBS と McIlvaine とで DXR 放出挙動に違いが認められたのは、組成の違いが影響しているものと考えられるが、詳細は不明であるため、今後、DXR そのものの各緩衝液中での溶解度等も含めて詳細な検討が必要である。超音波照射による DXR 放出メカニズムについては、超音波によって一過性に膜が破壊されることで DXR が放出するものの、そのままの大きさの粒子として存在しているか、膨潤もしくは凝集した粒子として存在していると推察される。

E. 結論

各条件例でどのような DXR 放出挙動が観察されるのか確認することができた。また、温度依存的な放出率の増加を見るために用いる試験液の pH は 5.5 の方が適していることが判明した。今後は、各条件例の妥当性や適切性を評価するため、研究室で調製した PLD と DOXIL[®]を比較する必要がある。また、条件例③と④については、それぞれ脂質二重膜の完全性や薬物封入状態を評価できる条件なのか検討する必要があると考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

柴田寛子、四方田千佳子:米国 FDA のドキシソルピシン封入PEGリポソームに対する生物学的同等性試験ガイドライン(案)について、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、42(11)、990-998 (2011)

2. 学会発表

1) 柴田寛子、川西徹、四方田千佳子 ドキシソルピシン封入リポソームの in vitro 薬物放出における pH、温度、超音波の影響

日本薬剤学会第26年会 (2011.5)

2) 柴田 寛子、齋藤 はる奈、川西 徹、四方田 千佳子 : シクロスポリンマイクロエマルジョン製剤の製剤評価 : 粒子径及びラット体内動態の比較

ジェネリック医薬品学会第5回(2011.6)

3) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Effect of pH, temperature, and ultrasound on drug-release from doxorubicin-encapsulated liposome

AAPS (2011.10)

4) 柴田寛子、四方田千佳子、川西徹 逆相 HPLC-蒸発光散乱検出器を用いたリポソーム製剤中の脂質成分定量法の検討

日本薬学会第132年会(2012.3)

表1 In vitro薬物漏出条件

In vitro薬物漏出条件	試験の目的	条件設定の理由
①50%ヒト血漿中で37°C24時間	血液循環系におけるリポソームの安定性評価	血漿は最も血中の条件に近い
②pH 5.5, 6.5, 7.5緩衝液中で37°C24時間	正常組織、ガン細胞周辺、ガン細胞内部の状態を模倣する	正常組織 : pH 7.3 ; ガン組織 : pH 6.6 ; ガン細胞内部(エンドソームとリソソーム) : pH 5 - 6 (ガン細胞のエンドソームとリソソームはリポソームの取込みと薬物放出に関与していると考えられる)
③pH 6.5緩衝液中、温度範囲(43、47、52、57°C)で12時間、あるいは完全に放出するまで	脂質二重膜の完全性評価	脂質の相転移温度(T _m)は脂質二重膜の強度、硬さ、化学組成で決定される。T _m 上下における放出の温度依存性は、脂質特性の小さな差を反映する
④37°Cにおける低周波数超音波(20kHz)照射2時間、あるいは完全に放出するまで	リポソーム中に封入された薬物の状態を評価	低周波数超音波は一過性に穴のような欠陥を導入することで脂質二重膜を崩壊させ、リポソーム内部のゲルの溶解によって制御されたドキシソルピシン放出を促す

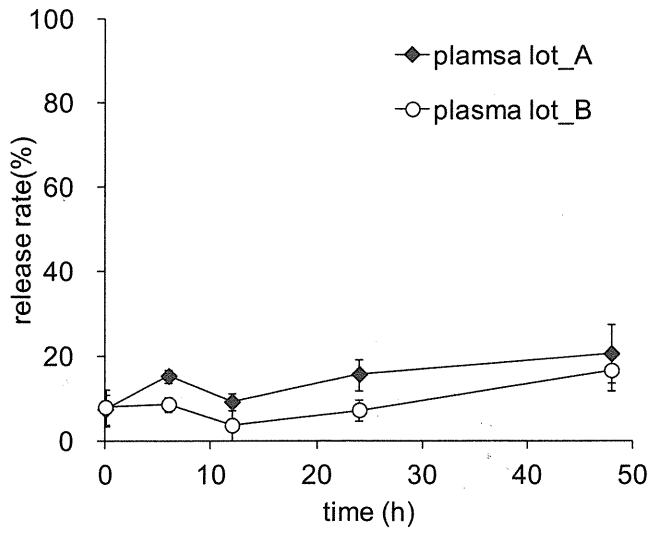


図1

ヒト血漿中で 37°C に加温した際の DXR 放出挙動

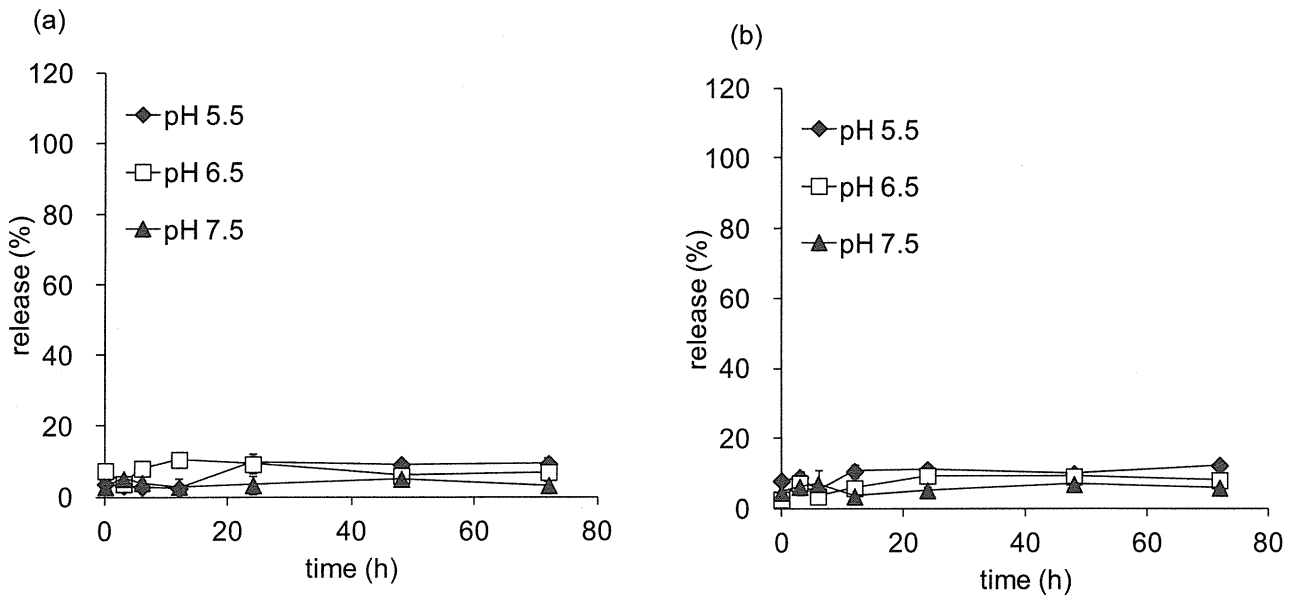


図2 37°Cにおける各緩衝液中での DXR 放出挙動

(a) PBS, (b) McIlvaine