

表1 日本薬局方による規格試験の結果

Quality Standards	Fats and Fatty Oils Test		
	Acid Value	Saponification Value	Iodine Value
	Not more than 2.0	45-55	19-24
A	0.38±0.01	50.0±0.6	22.8±0.1
B	0.69±0.01	50.3±0.4	20.3±0.2
C	0.83±0.02	53.0±0.6	20.0±0.1
D	0.62±0.01	53.3±0.1	20.1±0.1
E	0.74±0.01	48.0±0.9	21.3±0.3
F	1.88±0.01	50.9±0.7	21.6±0.5
G	1.30±0.02	49.2±0.9	22.2±0.2
H	1.26±0.01	50.5±0.4	21.8±0.4
I	1.41±0.02	46.5±1.2	21.8±0.1
J	1.70±0.02	45.9±0.6	23.0±0.4

Mean±SD, N=3

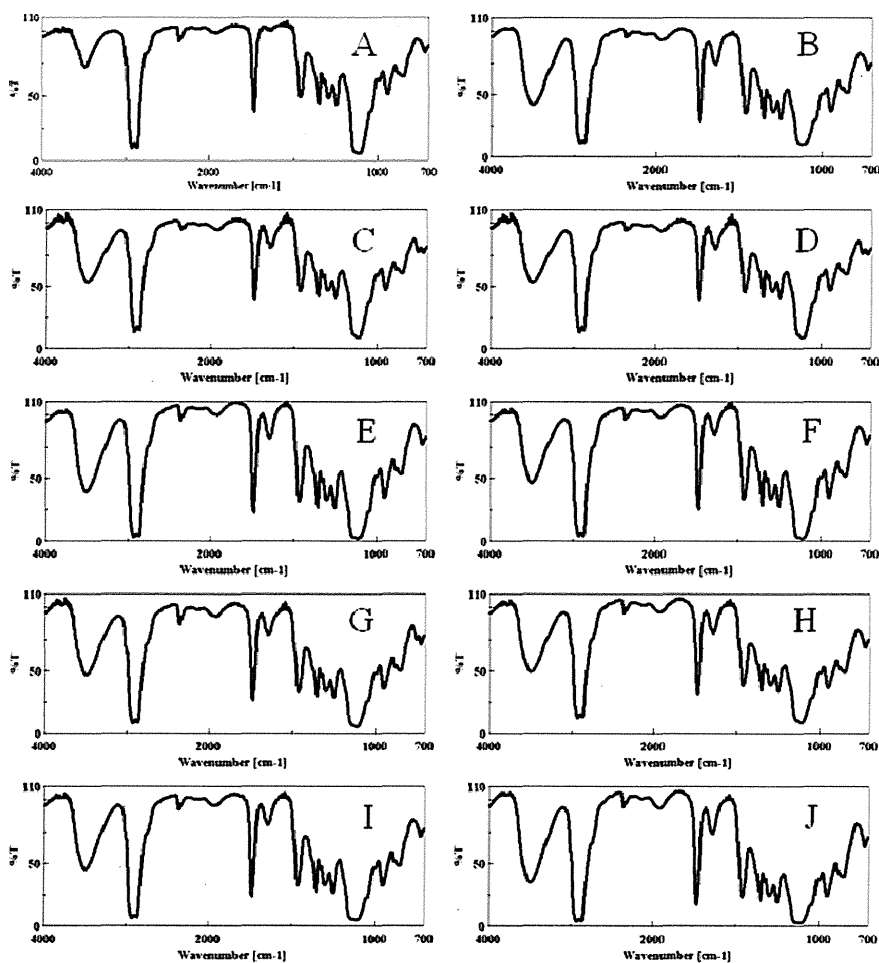


図4 PS80試薬の赤外吸収スペクトル

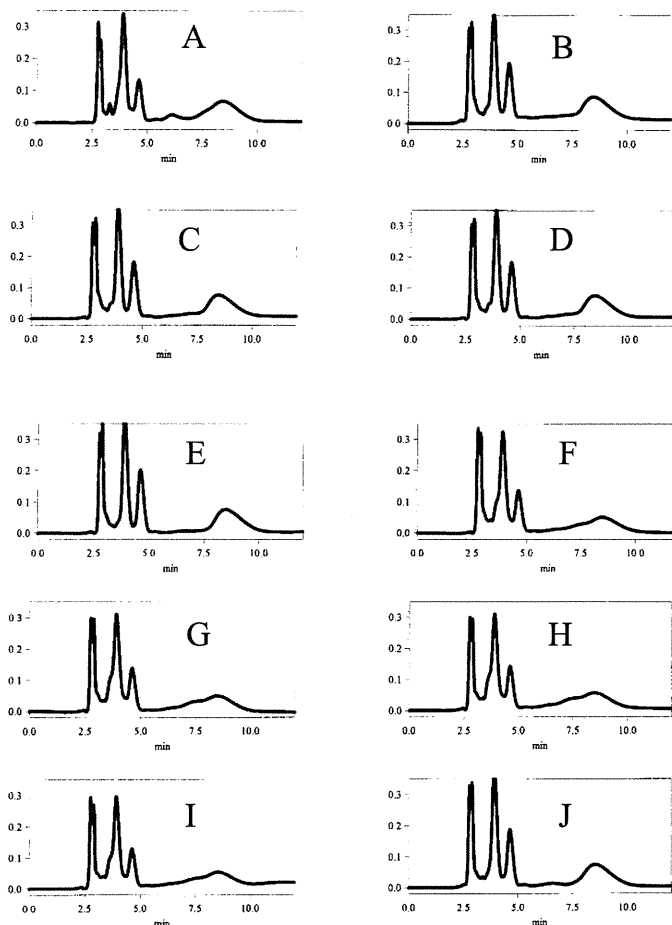


図5 PS80試薬のクロマトグラム

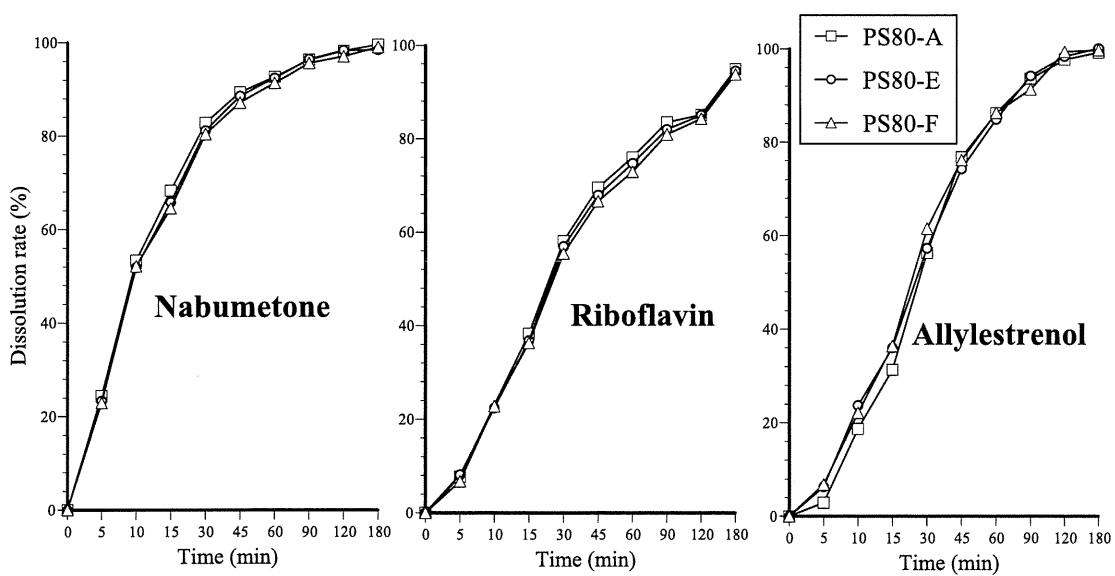


図6 PS80試薬の溶出挙動に及ぼす影響

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

-マイクロスフェア製剤の薬物放出性に関する検討-

研究分担者 柴田 寛子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 市販マイクロスフェア製剤(リスパダールコンスタ)を対象に、試験液組成等の薬物放出挙動に与える影響を評価するとともに、2 種類の方法、“試料と分離方式”と“連続フロー方式”を用いて、薬物放出性の評価を試みた。種々の試験液で 37°Cにおける薬物放出挙動を評価したところ、生理的環境に近い PBS もしくは HBS を用いることで、ヒトにおける in vivo 累積 AUC 率と関連した放出挙動が得られることが確認できた。45°Cにおける薬物放出挙動を2種類の方法で比較したところ、何れの方法においても同じ放出挙動が認められた。また、“連続フロー方式”ではセル間の放出挙動に差異が認められたが、12 mm の通常セルから散剤・顆粒剤用セルに変更することで、セル間の差異は解消されることが分かった。

A. 研究目的

マイクロスフェア製剤はポリマーからなる粒子径が数〜数十 μm 程度の球状の製剤で、乳酸・グリコール酸共重合(PLGA)で構成されるものが多い。主に加水分解によってポリマーが生分解されることで薬物が放出される。ポリマーの生体内分解速度は PLGA のモノマー組成比や分子量に大きく影響されることから、放出速度を任意に設定可能であり、2 週間に1回から12 週間に1回の製剤など、様々な製剤が開発されている。従って、マイクロスフェア製剤において薬物放出特性は最も重要な製剤機能の一つであり、同等の製剤機能や品質を保証するための放出試験法の設定が望まれている。

これまでに提案された、マイクロスフェア製剤からの薬物放出性評価の方法として、単純に試験液にマイクロスフェアを分散させて経時的に試験液を回収し薬物濃度を測定する“試料と分離方式”や、マイクロスフェアを入れた透析膜を試験液に浸す“膜拡散方式”、マイクロスフェアをセルやカラムに入れ、そこにポンプを使って試験液を送液する“連続フロー方式”などが挙げられる。開発した製剤の特性評価に主眼が置かれた報告が多く、複数の方法を直接比較した

報告は少ない。

そこで本研究では、市販マイクロスフェア製剤、リスパダールコンスタ(リスペリドンのマイクロスフェア製剤)を対象に、試験液組成等の薬物放出挙動に与える影響を評価するとともに、“試料と分離方式”と“連続フロー方式”による薬物放出性の評価を試み、各方式の比較を行った。なお、“膜拡散方式”は、マイクロスフェアからの薬物放出ではなく薬物の膜拡散だけを測定してしまう可能性があるため、本検討では“試料と分離方式”と“連続フロー方式”を行うこととした。

B. 研究方法

(1) 試験液の調製

リン酸緩衝液については、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 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。各 pH の 0.2 mol/L リン酸緩衝液 25 mL と 0.5M 塩化ナトリウム溶液 0-150 mL (PBS は 150 mL) に水を加えて 500 mL とし、試験液とした。HBS については、pH 7.5 に調整した 0.2 mol/L HEPES 緩衝液 25 mL と 0.5M 塩化ナトリウム溶液 150 mL に水を加えて 500

mLとし、試験溶液とした。生理食塩水は1Lの水に塩化ナトリウム9 gを溶解して試験液とした。炭酸水素ナトリウム緩衝液については、0.2 mol/L 炭酸ナトリウム溶液と0.2 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液を混合してpH 10.5に調整した溶液を25 mLと、0.5M 塩化ナトリウム溶液150 mLに水を加えて500 mLとし、試験溶液とした。各試験液に適宜ポリソルベート20を添加し、さらに防腐剤としてアジ化ナトリウムを0.01%となるよう添加したものを試験に用いた。なお、試験開始前に、試験液は15分超音波照射し、45°Cで2時間加温することで脱気した。

(2)“試料と分離方式”による薬物放出性の評価
リスパダールコンスタを50mLおよび250 mLのサンプル瓶に5 mg および20 mg 量り入れ、各試験液を50 mLおよび200 mL 入れ、各温度に設定した恒温槽に置いた(図 1a)。各時間に恒温槽からサンプル瓶を取り出し、静かに瓶を回して攪拌し10分静置した後、試験液を1 mLもしくは4mL 採取し、0.2 μm フィルターを通した液をHPLC用のバイアルに入れ、分析に用いた。試験液を採取後、試験温度に温めておいた試験液1 mL および4 mLをサンプル瓶に加え、恒温槽に戻した。試験終了までこれを繰り返した。

(3)HPLCによるリスペリドン濃度の定量
分析装置はHPLCシステム(L-700, 日立ハイテック)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(Inertsile-ODS3 4.0 × 100 mm, 5 μm)を用い、カラムオープンは40°Cとした。65 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液/アセトニトリル(7:3)を移動相とし、流速は1.0 mL/minで分析を行った。分析試料20 μLを注入し、UV検出器(275 nm)でリスペリドンのピークを検出した。なお、EPより購入したリスペリドン標準品18 mgを100 mLのHBSで溶解したものをストック溶液とし(4°Cで保存)、ストック溶液をHBSで希釈した溶液(36 μg/mLから2倍希釈で5点)を使って検量線を作成した。

(4)“連続フロー方式”による薬物放出性の評価
フローズルーセル法溶出試験装置はSOTAX社のCE7Smartを用いた。装置構成は、本体、ポンプ、UV検出器、メディアリザーバーとし、クローズドシステムとして使用した(図 1b)。UV検出器で試験液とリスペリ

ドンの標準液を測定後、システム全体を水で十分に洗浄後、水を抜き、脱気した試験液に置換した。試験液の流速は8 ml/minとした。直径12 mmのセルの場合、直径約1 mmのガラスビーズと量り取った製剤20 mgを3回に分けて交互に入れ軽く混ぜた後、0.7μmと2.7μmのガラスフィルターを取り付けた。散剤・顆粒剤用のセルの場合、製剤はガラスビーズと混ぜることなく、ドーム型のメッシュの下にセットした。なお、製剤とガラスビーズをセルに入れる前に、セルを徐電装置に当てておいた。設定したメソッドをスタートし、ガイドに従ってセルを入れたジャケットを装置本体にセット後、試験液がセルの中に入ったと同時にUV検出器の測定もスタートさせた。

C. 研究結果

試験液組成の放出挙動に与える影響

“試料と分離方式”により、代表的な生理的緩衝液であるPBSとHBS、その他、生理食塩水と精製水における薬物放出挙動を37°Cで観察した(図 2)。リスパダールコンスタには専用懸濁液が付属されており、その懸濁液にはポリソルベート20が1%含まれていることから、ポリソルベート20の薬物放出挙動に与える影響も評価した。ポリソルベート20を添加すると放出が速くなる傾向が認められたが、濃度を0.01%、0.1%と高くしても明確な差は認められなかった。

PBSポリソルベート20添加の場合、主な放出が始まるまでラグタイムがおおよそ25日あり、薬物放出相の後、40日後には放出率は90%以上となった。PBSの方が少し速いが、PBSとHBSはよく似た放出挙動を示した。生理食塩水の場合、PBSやHBSとラグタイムは同じ25日くらいであるが、放出相における放出速度が遅く、40日経っても放出率は80%に満たなかった。精製水の場合、他の試験液とは全く異なる放出挙動が認められ、ラグタイムは殆ど無く、試験開始から徐々に薬物放出率が上昇し、25日過ぎには100%に達した。

このような放出挙動の差には試験液の浸透圧やpHが影響しているものと考えられる。そこで浸透圧(塩濃度)とpHの異なる緩衝液で薬物放出挙動を観

察した(図 3). リン酸緩衝液(pH 7.5)の塩化ナトリウム濃度を0から150 mMまで比較したところ、塩化ナトリウム濃度 100 mM ではラグタイムがおよそ 25 日とPBS(塩化ナトリウム濃度 150 mM)と同様の放出挙動が認められたが、それ以下では濃度が低いほどラグタイムが短く、初期の段階から明確な薬物が観察された。pHの影響を評価するため、pH5.5 および 7.5 のリン酸緩衝液と pH 10.5 の炭酸緩衝液を比較したところ、pH が低いほど薬物放出が速くなる傾向が認められた。

ヒトにおける血漿中リスペリドンの in vivo 累積AUC率を図4に示す。投与初期での薬物放出量は少なく、およそ24日のラグタイムの後、主な薬物放出が始まり、40日後には80%以上の累積AUC率が認められている。上記の37°Cにおけるポリソルベート20添加PBSおよびHBSで観察されたin vitro 累積放出率は(図2a,b), in vivo 累積AUC率とある程度相関していると言える。今回は、他の報告でも多く用いられているリン酸緩衝液を使って、各方法を比較することにした。

“試料と分離方式”における放出挙動

マイクロスフェア製剤の37°Cにおける薬物放出は非常に緩やかであるため、その試験期間は数カ月を要する。マイクロスフェア製剤については試験温度を上昇させることで薬物放出速度が速くなることが明らかにされており、試験期間を短くし、効率的に放出挙動を評価する目的で、試験温度を上げた加速放出試験法が提案されている(ref)。リスパダールコンスタについては、45°Cでの加速放出試験が提案されており(ref)、PMDAのHP上で公開されている審査結果報告書からも、規格試験において45°Cでの放出試験が実施されたものと推測される。そこで、ポリソルベート20 0.01% 添加PBSにおいて37°Cと45°Cにおけるin vitro 薬物放出挙動を評価した。

37°Cではラグタイム約25日、50%放出点は約31日(30.61日)だったのに対し、45°Cではラグタイム約5日、50%放出点は約6日(5.66日)と、試験温度を45°Cに上げることで、薬物放出速度がおよそ5倍速くなることが確かめられた(図5)。さらに、37°Cと45°Cで放出プロファイルが同じであることから、温度を上げ

ても同じメカニズムで薬物が放出されているものと考えられ、45°Cにおける放出性評価は、品質や製剤特性を評価するのに適した試験条件であると言える。そこで“連続フロー方式”による放出性評価の検討は45°Cで行った。

“連続フロー方式”による放出性評価の検討

“連続フロー方式”による放出性評価はフローセル法溶出試験装置を用いて行った。フローセル法ではセルの中でガラスビーズとマイクロスフェア製剤を混合することで、製剤の凝集を起こすことなく、適切に放出性を評価することができると思われる。そこでまずは通常の錠剤などに使われる直径12mmのセルにリスパダールコンスタをガラスビーズと混合して入れて放出挙動を観察した。流路をUV検出器につなぎ、放出挙動をリアルタイムでモニターした結果を図6に示した。試験液は“試料と分離方式”と同じポリソルベート20 0.01% 添加PBSを使用した。各セルの値を平均したグラフを見ると、“試料と分離方式”で観察された放出挙動と殆ど同じであり、50%放出点も5.51日であることから、試験方法の違いによる放出挙動の差は無いものと考えられた。しかし、各セルの値を見ると、セル間で放出挙動に明らかな差が認められ、製剤とガラスビーズを混合する操作による差が疑われた。

散剤・顆粒剤用のセルは、フィルター/メッシュで仕切られた空間に製剤を入れ、さらに製剤の上にドーム型の網を置くことで製剤が固まることなく試験液中に均一に分散するよう設計されている(図7c)。ガラスビーズと混合しなくても適切に評価できるものと考え、散剤・顆粒剤用のセルを使って放出挙動の評価を試みた。その結果、グラフが水平方向にスライドしたような現象が見られものの、50%放出点は通常セルを使った場合と殆ど同じ5.52日であり、各セルをモニターした値を見ると、全てのセルで同じ放出挙動が得られることが判明した(図7)。

D. 考察

試験液組成等の薬物放出挙動に与える影響を評価した。ポリソルベート20の放出挙動に与える影響については、ポリソルベート20を添加した群では製剤の顕著な凝集が観察されなかったことから、ポリソ

ルベート 20 は薬物の溶解性に影響するのではなく、製剤の分散性を良くすることで、薬物放出を促すものと考えられた。図 3 において塩濃度が低いほど薬物放出の開始が速くなる現象が認められたが、これは浸透圧が低いために製剤の水吸着/膨潤が進み、薬物の拡散が促進されたものと推測される。精製水において試験開始から薬物放出が認められたのは(図 2c), 浸透圧が低いことが影響しているものと考えられた。また pH は低いほど主な薬物放出の開始点が速くなる傾向が認められたが、pH が低いほど封入薬物であるリスペリドンの溶解度は高いことが知られており、各 pH における溶解度の差が影響したものと考えられる。浸透圧や pH が薬物放出性に影響を与える機序を明らかにするには、リスペリドンの溶解度や試験中の pH 変化、マイクロスフェアからの薬物放出メカニズムなどを調査する必要があり、今後の課題である。

同じ試験液を使って”試料と分離方式”と”連続フロー方式”を比較したところ、両者に明確な差は認められなかった。しかしながら今回の検討では、”試料と分離方式”は試料を静置した状態のみで実施し、”連続フロー方式”は一定の流速(8ml/min)でしか放出性を評価していない。従って、”試料と分離方式”では攪拌した状態や、”連続フロー方式”ではもっと遅い/速い流速における薬物放出性の評価など、製剤に与える水力学的影響も今後検討する必要がある。

”連続フロー方式”の検討では、散剤・顆粒剤用のセルを使うことでセル間の放出挙動の差が解消されることを示したが、グラフが水平方向にスライドしたような現象が見られた。リスパダールコンスタからの薬物放出性については温度の影響が大きいことが知られており、データには示していないが、”試料と分離方式”について 1.0℃異なる温度で試験したところ、50%放出点が 1.5 日遅くなることを確認している。そこで、試験時と同じ状態で各セルの中の温度を測定したところ、放出開始が遅いセルでは温度が低い傾向が認められた。設定温度 ± 0.5 には入っているものの、温度の影響が大きい製剤については、より精密な温度制御が可能な装置を使用するほうが望ましいと考えられた。

E. 結論

リスパダールコンスタを対象に試験液組成の薬物放出性に与える影響を検討し、生理的環境に近い浸透圧と pH の緩衝液であれば、in vivo における薬物放出とある程度相関した in vitro 薬物放出挙動を観察できることを確認した。同じ温度・試験液であれば2種類の方法、”試料と分離方式”と”連続フロー方式”で放出挙動に明確な差は無いことを示した。ただし、”連続フロー方式”ではセルの選択や温度制御に注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H. : Alterations in the Detergent-Induced Membrane Permeability and Solubilization of Saturated Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes: Effects of Poly(ethylene glycol)-Conjugated Lipid. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2012;60(9):1105-11.

2) Shibata H, Saito H, Kawanishi T, Okuda H, Yomota C. : Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2012;60(8):967-75.

3) Shibata H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H. : Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions. Biol Pharm Bull 2012;35(11):2081-72.

2. 学会発表

1) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Haruhiro Okuda: Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions

AAPS (2012.10)

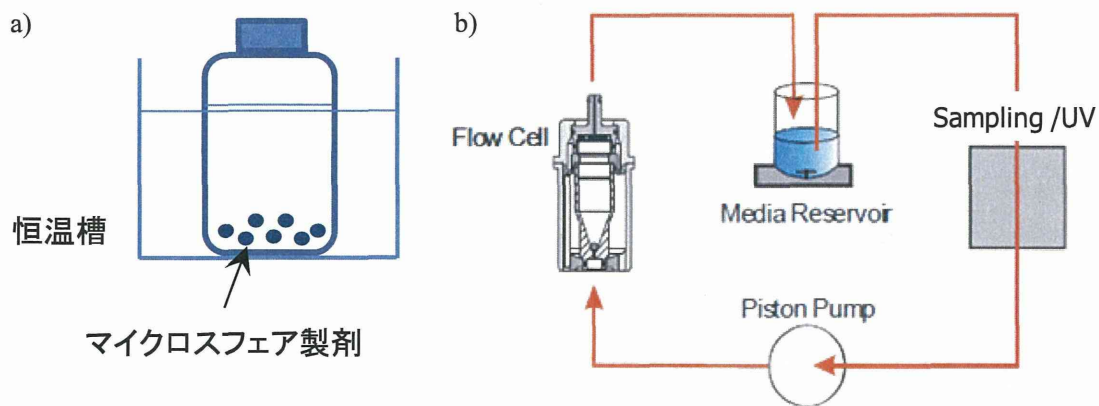


図1 試料と分離方式(a)と連続フロー方式(b)の概略図

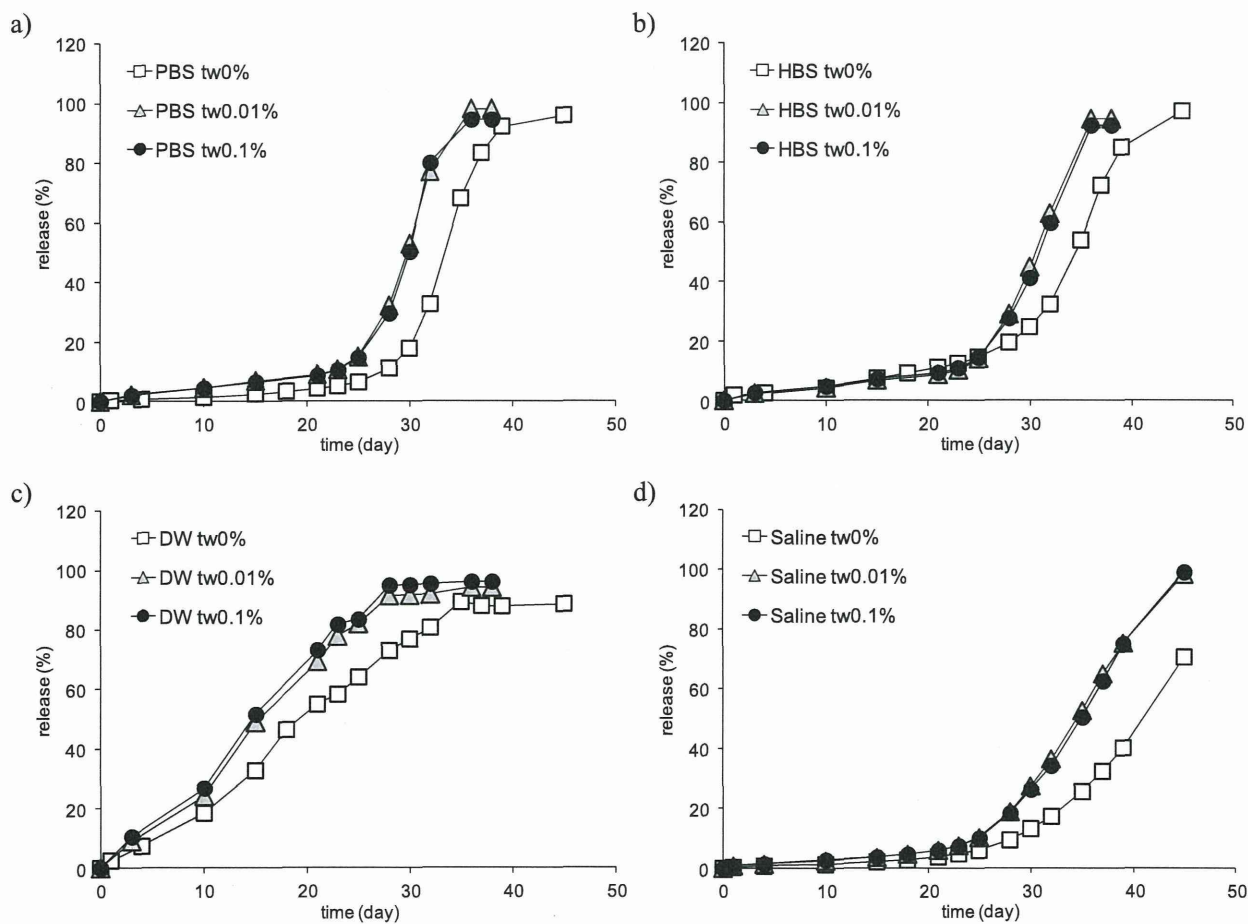


図2 試験液の種類と界面活性剤の影響

PBS (a), HBS (b), 蒸留水 (c), および生理食塩水(d) に, それぞれ tween 20 を 0, 0.01% および 0.1% 添加した溶液を試験液とし, 37°C における *in vitro* 薬物放出挙動を観察した。

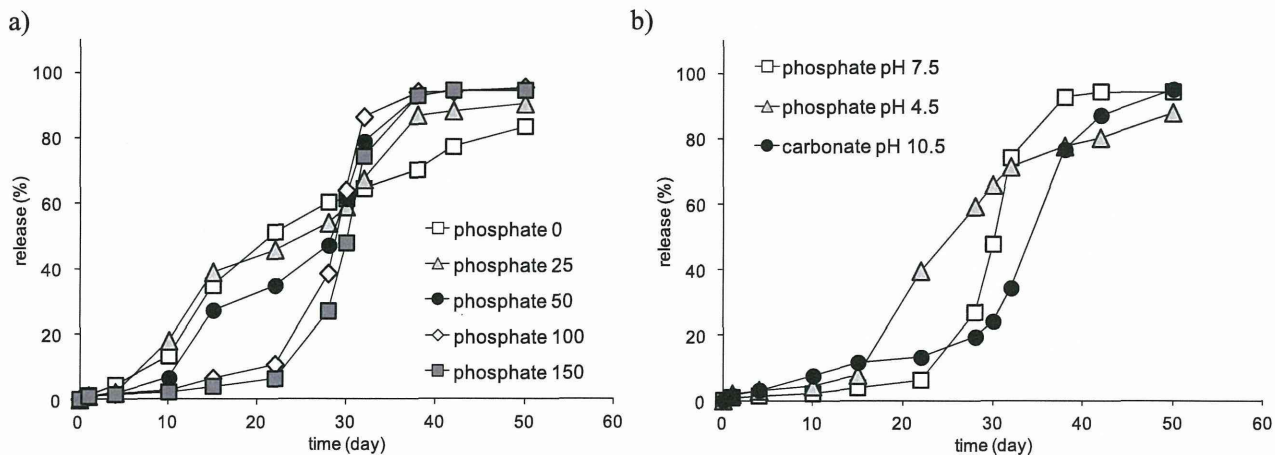


図3 緩衝液中の塩濃度(a)とpH(b)の影響

(a)ではリン酸緩衝液(pH 7.5)に塩化ナトリウムを0-150 mMとなるよう添加した溶液を試験液とし, (b)ではpH 4.5 および pH 7.5 に調整したリン酸緩衝液(塩化ナトリウム 150mM), pH 10.5 に調整した炭酸水素ナトリウム緩衝液(塩化ナトリウム 150mM)を試験液とし, 37°Cにおける in vitro 薬物放出挙動を観察した。

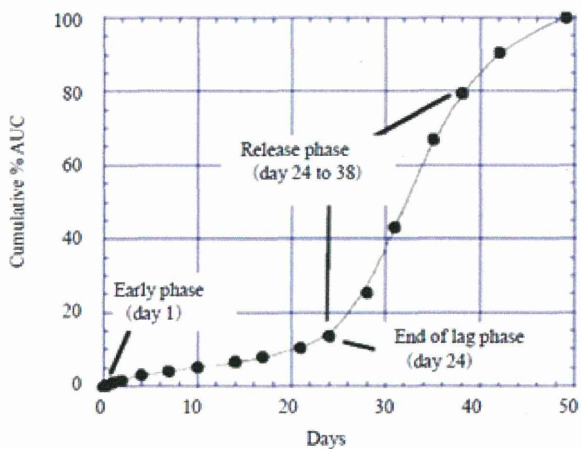


図4 海外 RIS-INT-54 試験(市販予定製剤 50 mg)における血漿中リスペリドン(平均値)の in vivo 累積 AUC 率

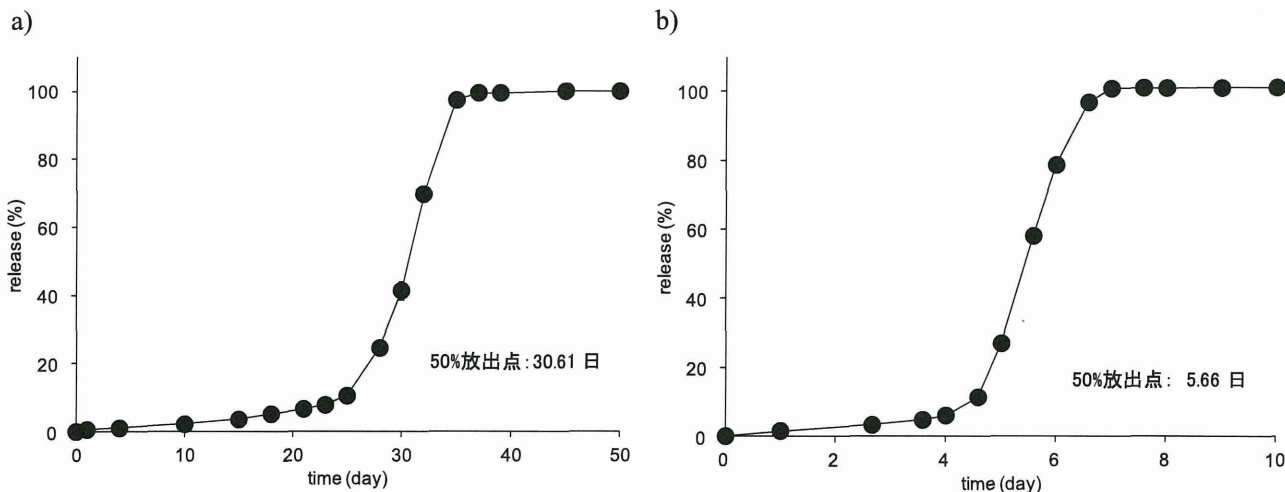


図5 “試料と分離方式”による in vitro 薬物放出性の評価 (n=6)

37°C(a)と45°C(b)における放出挙動を観察した。データは平均値±標準偏差を示している。

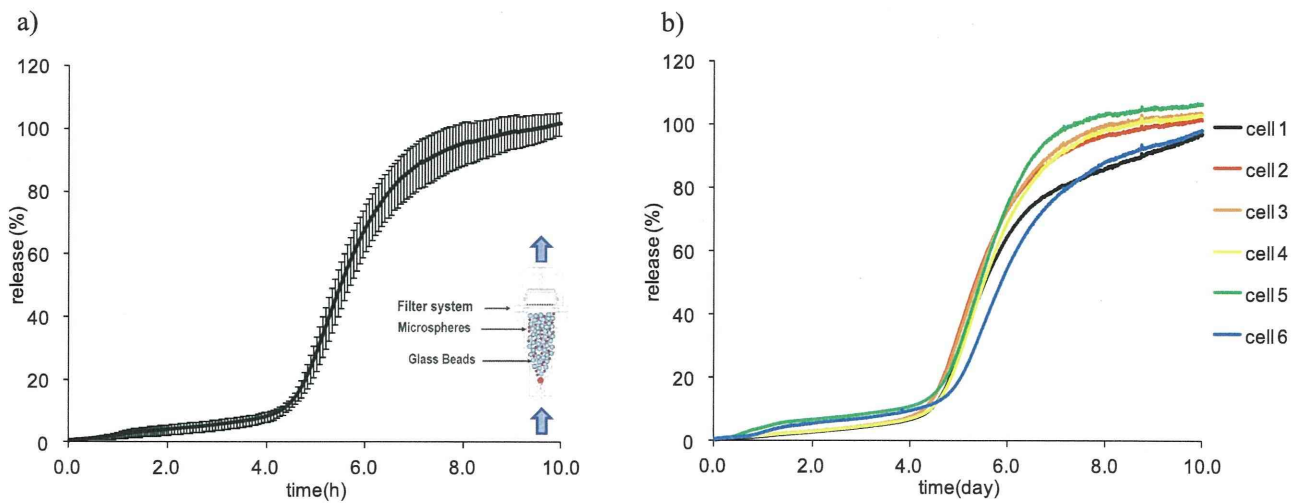


図6 “連続フロー方式”による in vitro 薬物放出性の評価 (n=6)
 12 mm の通常セルに製剤をガラスビーズと混和して入れ、45°Cにおける放出挙動を観察した。
 (a)は平均値±標準偏差を示し、(b)は各セルの値を示している。

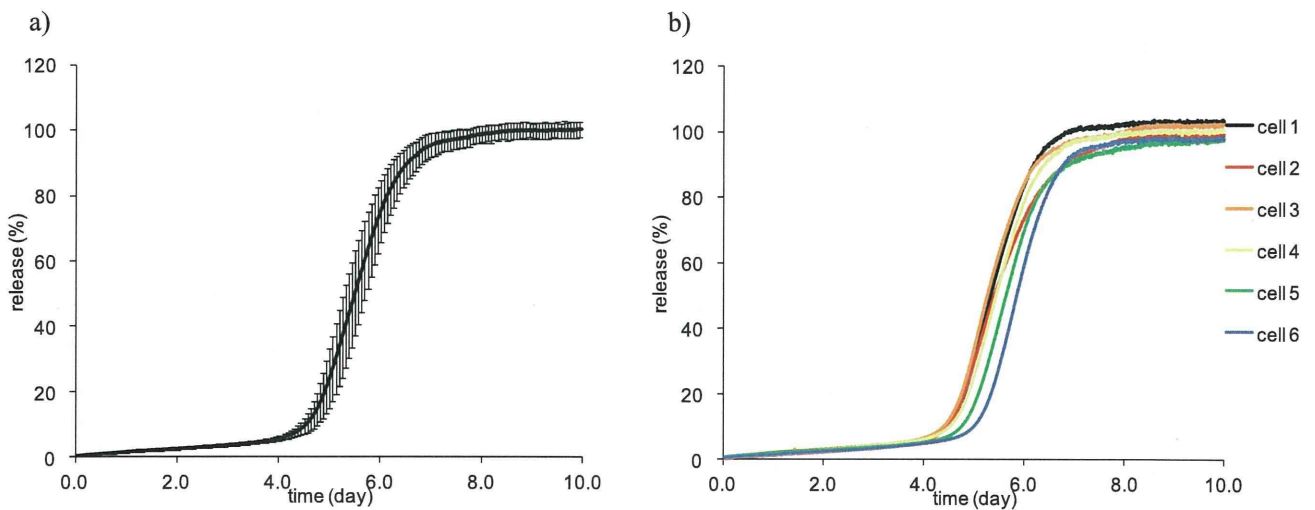
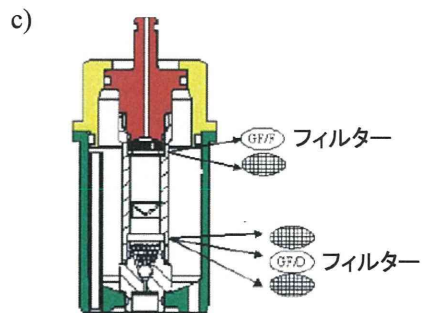


図7 散剤・顆粒剤用セルを使った“連続フロー方式”による in vitro 薬物放出性の評価 (n=6)
 散剤・顆粒剤用セルに製剤を入れ、45°Cにおける放出挙動を観察した。(a)は平均値±標準偏差を示し、
 (b)は各セルの値、(c)は散剤・顆粒剤用セルの模式図を示している。



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

リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討

ーリポソーム脂質二重膜の相転移挙動評価ー

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)

リポソーム製剤の薬物放出性を制御する因子の一つとして、脂質二重膜の相転移挙動の評価法の検討を行った。ドキシソルビシン封入リポソーム (DOXIL) と同じく水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC) からなるリポソーム二重膜の相転移挙動に及ぼすコレステロールの影響を、示差走査熱量測定 (DSC) と環境感受性蛍光プローブ prodan を用いた蛍光スペクトル測定により調査した。両測定結果から HSPC-コレステロール混合二重膜の相図を作成したところ、コレステロールモル分率 (X_{ch}) > 0.02 での前転移の消失, $X_{ch} = 0.07$ における調和融点の存在, X_{ch} が 0.4 以上での単一秩序液体相 (L_o 相) の出現などが示された。これら変化点の組成は六方格子モデルに基づくコレステロール分子の規則的分布とよく一致し、DSC 測定と併せて環境感受性蛍光プローブ測定の脂質二重膜相転移評価法としての有用性が示された。さらに、PEG 修飾 HSPC-コレステロール混合二分子膜についての蛍光プローブ測定から、表面 PEG 鎖と脂質膜との疎水的相互作用 (PEG 鎖の脂質膜内部への侵入) の可能性が示唆された。

A. 研究目的

リポソーム脂質二重膜の相転移温度及び相状態は、リポソーム製剤の粒子安定性や薬物放出性を規定する物理化学的特性の一つとして重要である。特に、リポソームに内封された薬剤の保持と放出のバランスは、脂質二重膜の相状態によって決定されると考えられている¹⁾。本研究では、脂質二重膜の相転移挙動の検出方法として、従来の示差走査熱量測定 (DSC) に加えて、新たに環境感受性蛍光プローブ prodan を用いた蛍光スペクトル測定法の有用性を検討した。また、両測定結果からリン脂質-コレステロール混合二重膜系の相図を作成し、リポソーム二重膜中でのコレステロールの分布挙動について考察した。さらに、環境感受性蛍光プローブ測定法を、PEG 修飾リポソーム脂質二重膜の評価にも適用を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬

リポソーム構成脂質として、日油株式会社から供与された水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soybean phosphatidylcholine : HSPC) とコレステロール (Sigma-Aldrich 社) 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であ

る DSPE-PEG2000 (日油株式会社) を用いた。環境感受性蛍光プローブ prodan と laurdan は Invitrogen から購入した。

2. リポソームの調製

DSC 測定に用いた HSPC あるいは HSPC/cholesterol 多重層ベシクル (MLV) は以下に示すパンガム法によって調製した。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 10 mM 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。この MLV 分散液を DSC 測定に使用した。Prodan 蛍光スペクトル測定には, エタノール溶媒中に溶解させた prodan を脂質とともに混和し (lipid:prodan=500:1 モル比), 上記の方法で MLV を作製した後, MLV 分散液を Mini-Extruder (Avanti Polar Lipid 社) を用いて 200 nm のポリカーボネートフィルターに十数回通過させたリポソームを用いた。PEG 修飾リポソームについては, メタノール:クロロホルム (1:2 v/v) に溶解させた PEG 脂質を脂質と共に混和し, 上記の方法で PEG リポソームを作製した。リポソーム脂質二重膜のコレステロールモル分率 (X_{ch}) は, $m_{ch}/(m_{ch}+m_{HSPC})$ (m_{ch} :コレステロールモル量, m_{HSPC} :HSPC モル量) と表される。リン脂質の定量は Bartlett 法²⁾により行った。

3. 環境感受性蛍光プローブを用いた蛍光スペクトル測定

Prodan 標識したリポソームを脂質濃度が 1 mM (prodan=2 μ M) になるように調整し, 励起波長 361 nm, 測定波長 380~600 nm の範囲でスペクトル測定を行った。測定には F-4500 形分光蛍光光度計 (日立ハイテック) を用い, 30~70°C の温度範囲で行った。Laurdan については, 脂質濃度を 500 μ M (laurdan=1 μ M) に調整したりポソームを用い, 励起波長 350 nm, 測定波長 370~600 nm で蛍光観察を行った。また, 膜環境の指標となる Generalized Polarization (GP) 値は以下の式より算出した。

$$GP = \frac{I_{440nm} - I_{490nm}}{I_{440nm} + I_{490nm}}$$

I_{440nm} と I_{490nm} はそれぞれ 440nm と 490nm におけるプローブ蛍光強度である。

4. 示差走査熱量測定 (DSC)

DSC 測定には MicroCal 社 MCS DSC を用いた。測定条件は昇温速度 45°C/h, 開始温度 20°C, 終了温度 80°C とし, 脂質濃度 2 mM の MLV 分散液を用いて測定した。得られたデータは MicroCal ORIGIN を用いて解析した。

C. 研究結果

1. 環境感受性蛍光プローブによる脂質二重膜相転移挙動の評価

1-1. HSPC 二重膜の相転移に伴う prodan 蛍光スペクトル変化

HSPC リポソームについて、温度変化に対する prodan 蛍光スペクトルの挙動を図 1 に示す。それぞれのスペクトルは単一の極大波長を有し、それらの極大波長は温度上昇に伴い 440 nm 付近（ゲル状態を反映）から 490 nm 付近（液晶状態を反映）へとシフトすることが確認された。蛍光発光スペクトルの極大波長は溶媒の誘電率と強い相関があり、このスペクトル変化は、励起状態で生じた大きな双極子モーメントを安定化させるような溶媒分子の再配向運動（溶媒緩和または双極子緩和）によって説明される³⁾。図 1 のスペクトルから、温度上昇に伴う蛍光極大波長の変化を表したのが図 2 である。ホスファチジルコリン (PC) 分子によって形成される二重膜の相状態は、温度上昇に伴い、疎水鎖が全てトランス型かつ膜面に対しておよそ 30° 傾いたラメラゲル ($L_{\beta'}$) 相から、 $L_{\beta'}$ 相の親水部のパッキングが変化し波型になったリップルゲル ($P_{\beta'}$) 相を経て、疎水鎖が融解し流動性が増加した液晶 (L_{α}) 相へと変化する。この際、 $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ への相転移を前転移 (pretransition)、 $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ への転移を主転移 (main transition) とよぶ⁴⁾。図 2 より、prodan 蛍光極大波長は、45~47°C 付近で 440 nm から 470 nm へ、50~53°C 付近で 470 nm から 490 nm へと、二つの温度領域で急激な変化が観察された。このような変化は prodan 分子の脂質二重膜中での垂直分布の変化によるものと考えられ⁵⁾、それぞれの温度領域での脂質二重膜の相転移（前転移と主転移）に伴う prodan 分子周辺の局所的な極性変化を反映していると考えられた。

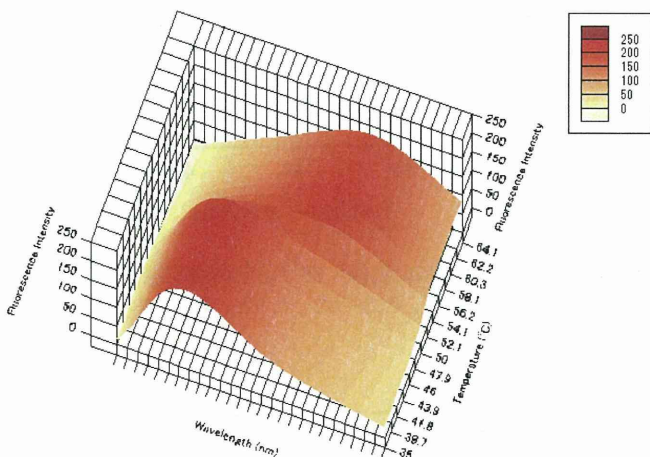


図 1. HSPC リポソーム中の prodan 蛍光スペクトルの温度変化

1-2. HSPC-コレステロール混合二重膜での prodan 蛍光スペクトル挙動

図 3 には、コレステロール分率を変化させた HSPC リポソームにおける prodan 蛍光極大波長の温度依存性を示した。コレステロールを含有するリポソームでは prodan 蛍光極大波長の二段階変化が見られず、前転移は不明瞭であった。これは、 $X_{ch}=0.05$ 以下の範囲で前転移が消失していること

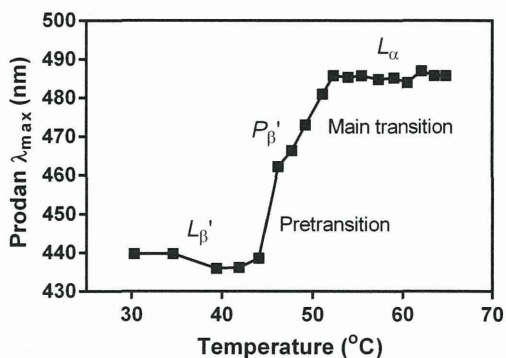


図 2. Prodan 蛍光極大波長の温度依存性

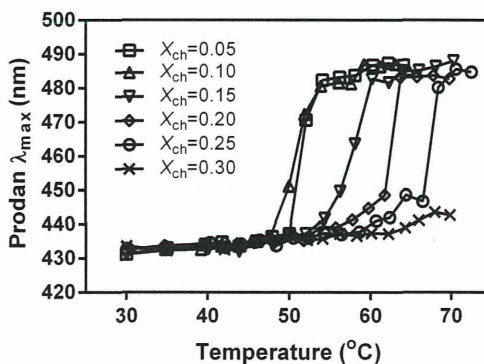


図 3. 種々のコレステロール分率における prodan 蛍光極大波長の温度依存性

を示す。また、コレステロール分率の増加に伴い、蛍光極大波長の増加は緩やかになり、 $X_{ch}=0.25$ では、蛍光極大波長が増加し始めてから 490 nm 付近でプラトーに到達するのに 20 °C 以上の温度上昇が必要であった。 $\lambda_{max}=440$ nm と 490 nm がそれぞれゲル相及び液晶相に対応していることから、この温度範囲における相状態はゲル相と液晶相の二相共存状態であると考えられた。

2. HSPC-コレステロール混合二重膜の DSC 測定

図 4 には、HSPC-コレステロール混合二重膜の DSC 測定結果を示した (図 4B は前転移部分のみを拡大したものである)。これより、コレステロールを含まない HSPC リポソームでは 47.8°C と 53.6°C をそれぞれピークとする前転移と主転移が観察され、prodan 蛍光極大波長の温度変化領域と一致した (図 2)。また、コレステロール分率の増加に伴い主転移の吸熱ピークが小さくブロードになり、 $X_{ch}=0.4$ では吸熱ピークが全く観察されなくなった (図 4A)。また図 4B より、 $X_{ch}=0.03$ において前転移が完全に消失していることが確認された。

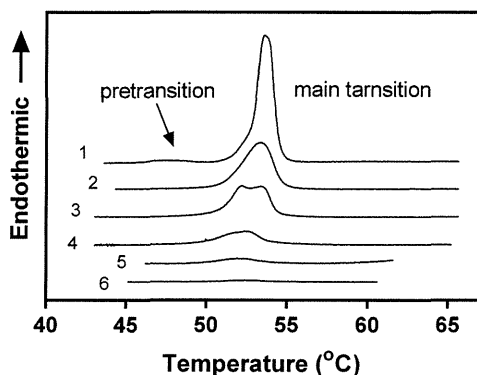


図 4A. コレステロール分率による DSC 曲線の変化
 $X_{ch}=0$ (1), 0.05 (2), 0.1 (3), 0.25 (4), 0.35 (5),
0.4 (6)

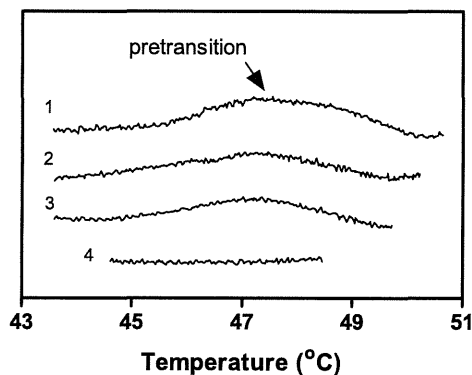


図 4B. DSC 曲線における前転移の拡大図
 $X_{ch}=0$ (1), 0.01 (2), 0.02 (3), 0.03 (4)

図 5 には、DSC 測定より得られた相転移エンタルピー変化 (ΔH) のコレステロール分率依存性を示した。 $X_{ch}>0.02$ における前転移エンタルピーの消失は、脂質膜に微量に含まれるコレステロールによって $L_{\beta'}$ / $P_{\beta'}$ 間の相転移である前転移が消失することを示している。コレステロールを含まない純粋なリン脂質二重膜でのゲル状態 ($L_{\beta'}$, $P_{\beta'}$) ではリン脂質分子が約 30° 傾いた状態で配列しているのに対し、コレステロールが挿入されるとリン脂質分子の再配向が起り、膜表面に対して垂直に並んだゲル状態 (L_{β}) へと変化することが知られている⁵⁾。すなわち、コレステロールの挿入によって $L_{\beta'}$ 相が L_{β} 相に変化し、 X_{ch} が 0.03 では $L_{\beta'}$ 相が消失し全て L_{β} 相として存在していると考えられる。一方、主転移においても X_{ch} の増加に伴って

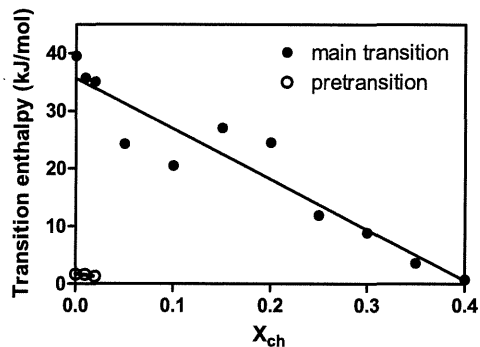


図 5. 相転移エンタルピーとコレステロール分率との関係

ΔH 値は減少し、 $X_{ch}=0.4$ 付近ではほぼ0となった。リン脂質二重膜の主転移における熱力学的な量変化には、リン脂質アシル鎖のトランス-ゴーシュ構造変換が大きく寄与しており、 X_{ch} の増加に伴う主転移エンタルピーの減少は、脂質膜へのコレステロール挿入が相転移に伴うリン脂質アシル鎖の構造変換を制限している結果と考えられる。さらに、 X_{ch} が0.4以上での主転移エンタルピーの消失は、全てのHSPC分子のアシル鎖構造変換が制限を受け、秩序液体相 (L_o)として存在していることを示唆する。

3. HSPC-コレステロール混合二重膜の相図作成

HSPC-コレステロール混合二重膜の相挙動を俯瞰的に示すために、prodanによる蛍光測定とDSC測定の結果を併せた相図を作成した(図6)。DSCはリン脂質炭化水素鎖の構造変化(アシル鎖融解)に敏感である一方、prodanは二重膜の親水性頭部の環境を反映している。相図作成においては、DSC測定によって得られた相転移温度(図6の○)とprodanの蛍光極大波長が490nm付近(液晶状態に相当)に到達した時の温度(図6の●)を用いている。このとき、両温度間の領域は、液晶相とゲル相が共存している相状態に相当する。ゲル状態として存在する二重膜は、温度上昇によってまずアシル鎖の融解が起こり、さらに温度が上がることでprodanが存在する膜の親水性頭部まで影響を及ぼし、その後完全な液晶相へ移行すると考えられる。ここで、液晶相はコレステロールを含む膜において一般に用いられている非秩序液体相 (L_d)、ゲル相は秩序固体相 (S_o)と同義である。またDSC測定結果から、 $X_{ch}>0.4$ においては秩序液体 (L_o)相が単一相として出現する。

今回得られた相図では $X_{ch}=0.07$ 付近で調和融点を確認されたが、調和融点を有する一般的な固液相平衡においては、構成二成分間で新たに安定な化合物を生成することが知られている。すなわち、コレステロール分子がいくつかのHSPC分子と相互作用して新たな化学種を形成することを意味しており、実際、膜内におけるコレステロールの局在を観察する蛍光プローブを用いることで、コレステロール分布が特定の分率において不連続に変化することが確認されている^{7,8)}。これは、HSPC分子とコレステロール分子が特定の組成において相互作用し規則的分布をとることを示唆し、膜自由エネルギーという観点からも、脂質分子が規則的に配置されることでより安定な状態が得られると考えられている⁹⁾。

そこで、この規則的配置を理論的に考察するために六方格子モデルを導入し、ゲル状態での相構造をより詳細に検討した(図7)⁹⁾。脂質二重膜表面が全て L_β (1:48) ユニットで構成される時、コレステロール1分子とそれを取り囲む48個のHSPC分子の構造は図7(a)に示すようになり、このときのコレステロール分率0.02は前転移消失が起きる組成に類似している(図4B)。すなわち、 $X_{ch}=0.02$ 付近では図7(a)のようにすべての脂質分子が L_β 相として存在するため、これ以上のコレステロール組成では前転移が消失したと考えられる。また、 $X_{ch}=0.07$ 付近における調和融点の存在は、図7(b)に示すように全て L_β (1:12) ユニットの構成しているときの組成 ($X_{ch}=0.077$) とよく一致する。

主転移温度以下では4種類の二相共存状態が確認されるが(図6中の③, ④, ⑥, ⑨)、二相共

存状態の二重膜はコレステロールリッチな領域とコレステロールプアな領域が相分離した状態で構成されていると考えられる。例えば $X_{ch}=0.05$ の HSPC-コレステロール系二重膜では、相転移温度以下において L_β (1:48) 領域と L_β (1:12) 領域がお互い独立して存在している。

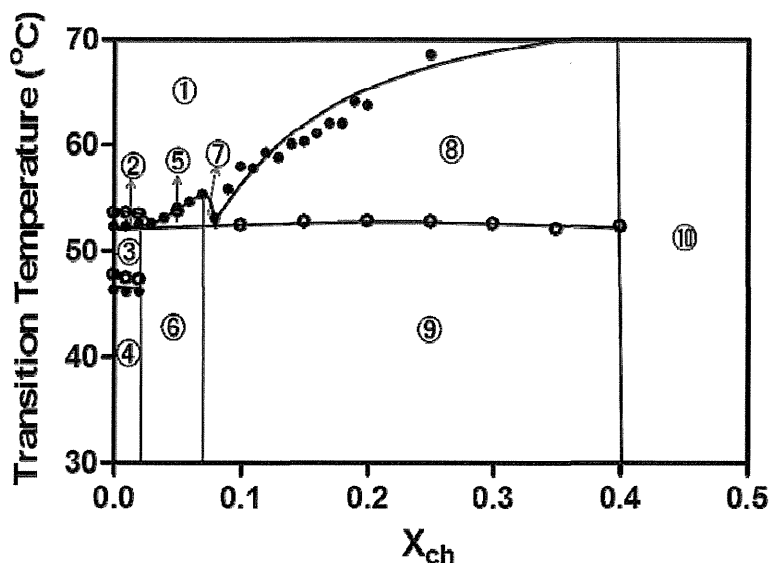


図 6. HSPC - コレステロール混合脂質二重膜の相図

●: prodan 蛍光測定による液晶相転移温度 ○: DSC 測定における相転移温度

図中の①～⑩は以下の相状態に対応する

- ① L_α ② $L_\alpha + P_\beta$ ③ L_β (1:48) + P_β ④ L_β (1:48) + L_β ⑤ $L_\alpha + L_\beta$ (1:12) ⑥ L_β (1:48) + L_β (1:12)
 ⑦ $L_\alpha + L_\beta$ (1:12) ⑧ $L_\alpha + L_o$ ⑨ L_β (1:12) + L_o ⑩ L_o

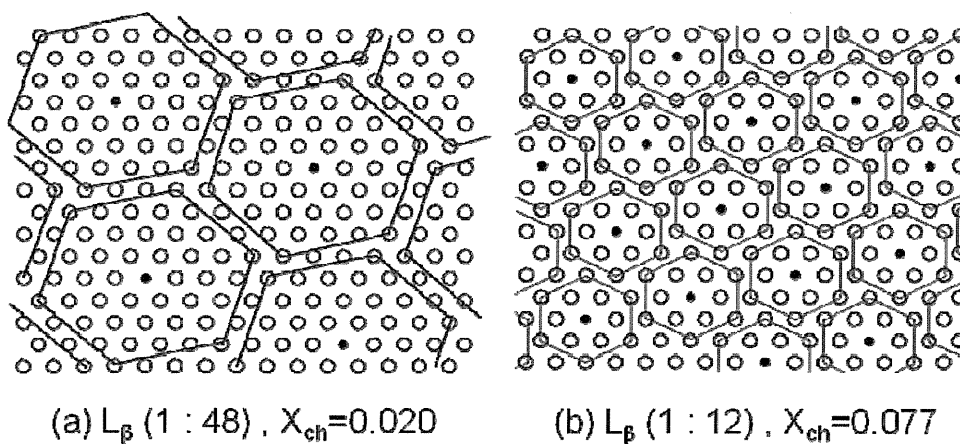


図 7. 六方格子モデルに基づく脂質二重膜中のコレステロールの規則的配置

○: HSPC 分子 ●: コレステロール分子

4. PEG 修飾による相状態及び PEG 鎖の構造変化

PEG 修飾した HSPC-コレステロールリポソーム二重膜についても prodan 蛍光測定を行ったが、PEG 鎖の有無による prodan 蛍光極大波長の温度依存性にほとんど違いが見られず、HSPC-コレステロール二重膜の相図に対して、PEG 修飾による影響はほとんどないものと考えられた。

PEG 修飾リポソームに関して、PEG 鎖の一部が液晶状態のリポソーム二重膜中に侵入しているという報告がされている¹⁰⁾。そこで、prodan の generalized polarization (GP) 値を用いて、二重膜の流動性変化の定量的評価を行った (図 8)。Doxil の場合に相当する全脂質に対して 5.6 mol% 量の PEG 修飾によって GP 値が有意に低下していることが確認され、prodan が存在する膜頭領域の流動性が増加していることが示唆された。また、GP 値の低下は相転移温度前後の両方で起こっていることから、脂質膜の相状態に関わらず膜頭領域に影響を及ぼしていると考えられた。一方、prodan よりも二重膜疎水部に位置する laurdan を用いて同様な GP 値の測定を行ったところ (図 9)、prodan と場合と異なり相転移温度以上の液晶状態のときにのみ PEG 修飾による GP 値の有意な低下が見られた。これらの結果は、液晶状態の流動的な脂質二重膜では PEG 鎖の一部が膜疎水部領域に侵入しているという報告を支持する。

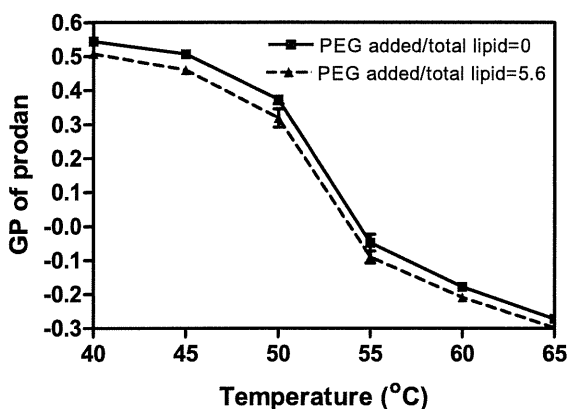


図 8. PEG 修飾リポソームにおける prodan GP 値の温度変化

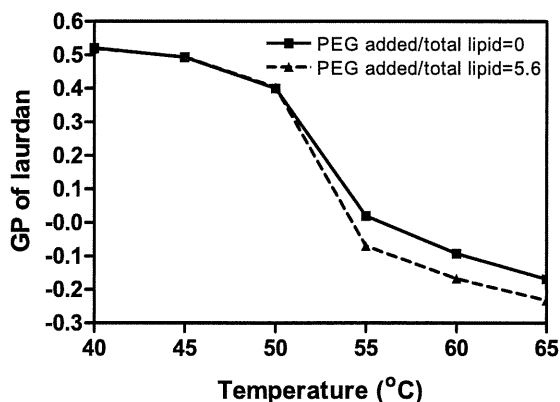


図 9. PEG 修飾リポソームにおける laurdan GP 値の温度変化

D. 考察及び結論

リポソーム脂質二重膜の相転移温度及び相状態は、リポソーム製剤の粒子安定性や薬物放出性を規定する物理化学的特性の一つとして重要である。そこで本研究では、DSC 測定に加えて環境感受性蛍光プローブである prodan の蛍光スペクトル測定を用いることで、HSPC-コレステロールリポソーム二重膜の相図を作成し、その熱的相転移挙動の俯瞰的解析を行った。

作成した相図から、 $X_{ch} > 0.02$ における前転移の消失、 $X_{ch} = 0.07$ での調和融点の存在、 $X_{ch} > 0.4$ での単一な秩序液体 (L_o) 相の存在などが示された。これら変化点の組成は六方格子モデルに基づくコレステロール分子の規則的分布とよく一致し、DSC 測定とともに環境感受性蛍光プローブ測定の脂質二重膜相転移評価法としての有用性が示された。なお、本研究での六方格子モデルではリン脂質分子組成を均一として扱っているが、実際、今回作成した相図では DPPC-

コレステロール系相図¹¹⁾に見られる 40°C 付近の相転移等は確認されず, HSPC 分子を構成している DSPC 分子と DPPC 分子は均一に混在していると考えられる。

また, PEG 修飾による脂質二重膜への影響について蛍光プローブを用いて検討したところ, 液晶状態の脂質二重膜では PEG 鎖が二重膜中へ侵入していることが示唆された。一般に, ゲル状態の場合と比較して液晶状態の二重膜では内封薬物の漏れが大きいことが知られている¹⁾。また最近の研究では, 43°C 付近でのがん温熱療法における PEG 修飾リポソームからの薬物放出量を比較すると, PEG 未修飾リポソームと比べて PEG 修飾リポソームの方が大きいことが報告されている¹³⁾。今回の蛍光プローブ測定結果と合わせて, PEG 鎖と液晶状態の脂質二重膜との疎水的相互作用によって, 温度などの外部刺激に対する PEG 修飾リポソームからの薬物放出性が変化している可能性が示唆される。

以上, 本研究で用いた環境感受性蛍光プローブ測定や DSC 測定が, 脂質二重膜の相転移挙動を評価するうえで有用であることが示された。両手法を併用することで, リポソーム二重膜の包括的な相図作成が可能であり, 温度や脂質組成の制御によるリポソーム製剤の開発やその薬物放出性などの品質管理において, 重要な指標となると考えられる。

E. 参考文献

- 1) Ono, A., Takechi, K., Sukenari, A., Suzuki, T., Adachi, I., Ueno, M.: *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 97-101 (2002)
- 2) Bartlett, G.R.: *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1958)
- 3) Parasassi, T., Krasnowska, E.K., Bagatolli, L., Gratton, E.: *J. Fluoresc.* **8**, 365-373 (1998)
- 4) Matsuki, H., Kaneshina, S.: *Netsu Sokutei*, **33**, 74-82 (2006)
- 5) Kusube, M., Matsuki, H., Kaneshina, S.: *Colloids Surf. B*, **42**, 79-88 (2005)
- 6) Matsuoka, S., Kato, S., Hatta, I.: *Biophys. J.* **67**, 728-736 (1994)
- 7) Chong, P. L.-G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10069-10073 (1994)
- 8) Tang, D., Wieb van der Meer, B., Chen, S.-Y.: *Biophys. J.* **68**, 1944-1951 (1995)
- 9) Somerharju, P., Virtanen, J.A., Cheng, K.H.: *Biochim. Biophys. Acta* **1440**, 32-48 (1999)
- 10) Stepniewski, M., Pasenkiewicz-Gierula, M., Rog, T., Danne, R., Orłowski, A., Karttunen, M., Urtti, A., Yliperttula, M., Vuorimaa, E., Bunker, A.: *Langmuir* **27**, 7788-7798 (2011)
- 11) Tamai, N., Uemura, M., Goto, M., Matsuki, H., Kaneshina, S.: *Colloids Surf. B*, **65**, 213-219 (2008)
- 12) Li, L., Timo, L.M. ten Hagen, Debby, S., Tom, M. W., Gerard, C. van Rhooen, Alexander, M.M.E., Lars, H.L., Gerben, A.K.: *J. Control. Rel.* **143**, 274-279 (2010)
- 13) Jun, C., Dong, C., Jun, L., Yong, W., Jian-xin, G., Zhi-peng, C., Bao-chang, C.,

Tao, Y. : *Drug Develop. Indust. Pharm.* 39, 197-204 (2013)

F. 研究発表

1. 学会発表

北山裕貴, 新村航, 四方田千佳子, 齋藤博幸: リポソームの PEG 修飾法による表面物性の変化. 日本薬剤学会第 27 年会 (2012. 5. 24-26 神戸)

2. 論文発表

北山裕貴, 新村航, 四方田千佳子, 齋藤博幸: ポストインサージョン法によって調整した PEG 修飾リポソームの表面物性に関する研究. 膜 (MEMBRANE), 38 (1), 50-56 (2013)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュ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 24 年度 分担研究報告書

経皮吸収型製剤等の放出試験法の設定に関する研究

並びに

坐剤の放出試験法に関する基礎検討

研究分担者 四方田千佳子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第一室長

研究要旨 経皮吸収型製剤等の放出試験法の設定に関する研究 皮膚適用製剤では、水溶液に対する放出速度は、実際の適用時の皮膚表面での薬物放出とは状況が大きく異なるため、必ずしも放出性が薬物の有効性と相関すると考えられず、製剤ごとの品質の維持管理に有効な試験と位置づけられる。最終年度にあたり、皮膚適用製剤の放出試験法案を、パドルオーバーディスク法、回転シリンダー法及び拡散セル法の三測定法を取り込んだものとし、局方審議委員会へ提案し、収載へ向けた動きを開始した。

坐剤の放出試験法の設定に関する研究 昨年度、坐剤の放出試験をフロースルーセル法と回転セルを用いて検討し、試験液の温度が 36℃～38℃と変わるにつれて放出性が大きく変化する製剤があること、製剤からの薬物の放出性は DSC 測定結果とかなりの相関があることを示した。現在、坐剤の規格試験法には熔融温度試験が設定されており、日局融点測定法第 2 法で測定するとき 0～0℃で熔融すると規定されている。そこで、今年度は放出性に大きな温度変化があった製剤の融点測定を試み、融点と放出性の関係を検討し、DSC 測定の結果と比較検討した。

(1) 経皮吸収型製剤等の放出試験法の設定に関する研究

研究協力者

山内仁史、和田好夫(外用製剤協議会)

関 俊暢(城西大学薬学部)

柄本品子(総合機構一般薬審査部)

八木聡美(総合機構新薬審査第四部)

河野陽一(総合機構新薬審査第五部)

保立 仁美(国立医薬品食品衛生研究所薬品部)

A. 研究目的

経口固形製剤の溶出試験は、製剤の品質評価手法として確立され、製剤の規格試験法として、さらに生物学的同等性試験ガイドラインにおいても極めて重要な役割を果たしている。

第 16 改正日本薬局方において、製剤総則が大

改正され、皮膚適用製剤のうち全身作用性の経皮吸収製剤では放出特性を捉えるべきであると記載された。また、他方、後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン(薬食審発第 0707001 号)では、標準製剤の選定のために *in vitro* 溶出試験の適用が示されており、さらに局所皮膚適用製剤の処方変更のための生物学的同等性試験ガイドライン(薬食審発第 1101 第 1 号)では、変更水準が B 水準(処方成分内での配合量の増減による処方変更の場合で、変更した添加剤の個々の添加剤の相対的な変化率が±5%を超え±30%以内で、かつ変更した添加剤の含有率の差の絶対値の和が 30%以下である場合)では、放出試験を実施することで良いとされ、*in vitro* 試験として、パドルオーバーディスク法あるいは拡散セル法等の装置を挙げている。

最近の皮膚適用製剤の承認申請に当たっては、局所作用を意図した貼付剤においても放出性が規格試験法に設定されているため、実態を再度考慮し、局方においても貼付剤の医薬品各条では放出性を規定する方向にある。現在、第 17 改正日本薬局方に向けた医薬品各条審議では、全身作用性のツロブテロールテープ、局所作用性のフェルビナクパップ・テープにおいて、放出性を規定する予定となっている。

これらの背景から、早急に一般試験法として皮膚適用製剤の放出試験法を設定することが重要であり、USP では、<724>Drug release の中に、装置 5(パドルオーバーディスク)、装置 6(シリンダー)、EP の 2.9.4.Dissolution test for transdermal patches 中に収載されている Disk Assembly Method 及び Rotating Cylinder Method に準じてこれらの二法を採用した。さらに本年度は、外用製剤協議会のご提案に従い、縦型拡散セル法の収載を試みた。

B. 研究方法

昨年度に作成した原案を基に、産官学のご意見を求め、修正した。収載希望が示され、検討することとなった拡散セル法に関して検討した。

C. 研究結果及び考察

1. 試験法記載整備における産官学の意見

試験法記載に関しては、各試験法において、膜での使用の場合、試験法に、『疎水性、親水性の別や孔径を明記する』とあるが、透析膜のように孔径というよりは分画分子量で表記してあったり、孔径が明確でない膜も多いかと思われるので、孔径に関連した情報ということで、『孔径等』といった表現にした方が望ましいとのご意見があった。

パドルオーバーディスク法とシリンダー法で、水-アルコール混液、有機溶媒の使用に関係して、「製剤の形状に影響を及ぼさなければ、」は、形よりも性質の変化が問題であると思われるため、「製剤の性状に影響を及ぼさなければ、」もしくは「製剤の形状および性状に影響を及ぼさなければ、」とした方がよい。

製剤の固定法について、パドルオーバーディスク法とシリンダー法で表現が異なっており、「両

面テープ等の接着法で・・・に貼り付ける。」、「粘着剤あるいは両面テープで、・・・製剤を貼り付ける。」とあるので、表現を統一した方がよい。

パドルオーバーディスク法の操作の部分、気泡について、「気泡が入らないように気をつける。」は、「気泡が入らないようにする。」記載がよい。

膜の使用について、パドルオーバーディスク法では、装置のところに記載がなされ、シリンダー法では、操作のところに記載がなされているため統一するのが望ましい。

2. 判定法における記載の整備

判定法で、放出率の低い製剤で例えば規格が「10～30%」となっている場合に、0%でも「規定された範囲から表示量の 10%を超えて外れるものがない」に適合することになり、放出率が低い製剤がすべて救われることにはないかという指摘があった。再度 USP 判定基準を見直したところ、表示量 (the labeled content) の 10%ではなく、規格幅 (the average of the stated range) の平均値の 10%であることが判明した。そこで、「個々の試料からの溶出率は規定された範囲から表示量の ±10%を超えて外れるものがない」としていた部分を、「個々の試料からの溶出率は規定された範囲から規格値の ±10%を超えて外れるものがない」と改訂した。これは溶出試験の判定が表示量に対してであったことと異なっていたための混乱であった。

3. 縦型拡散セル法の試験法の提案に対する意見

製剤全体の温度コントロールがしにくい構造であるため、管理をどうするのが適当かという指摘があった。同じ縦型フランツセルを用いた膜透過性試験において、外気温の影響を受けることが経験上知られているが、放出試験に対する影響は不明であらう。室温はできるだけ一定にした法が良いかもしれないが、製剤の厚み適用法によっても差が出る可能性があるとのコメントが出された。

以上の議論を踏まえ、皮膚に適用する製剤の放出試験法(案)を作成した。

D. 結論

皮膚適用製剤の試験法案をほぼ確立し、日本薬局方原案審議委員会製剤委員会の下に設置された製