

表 5 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

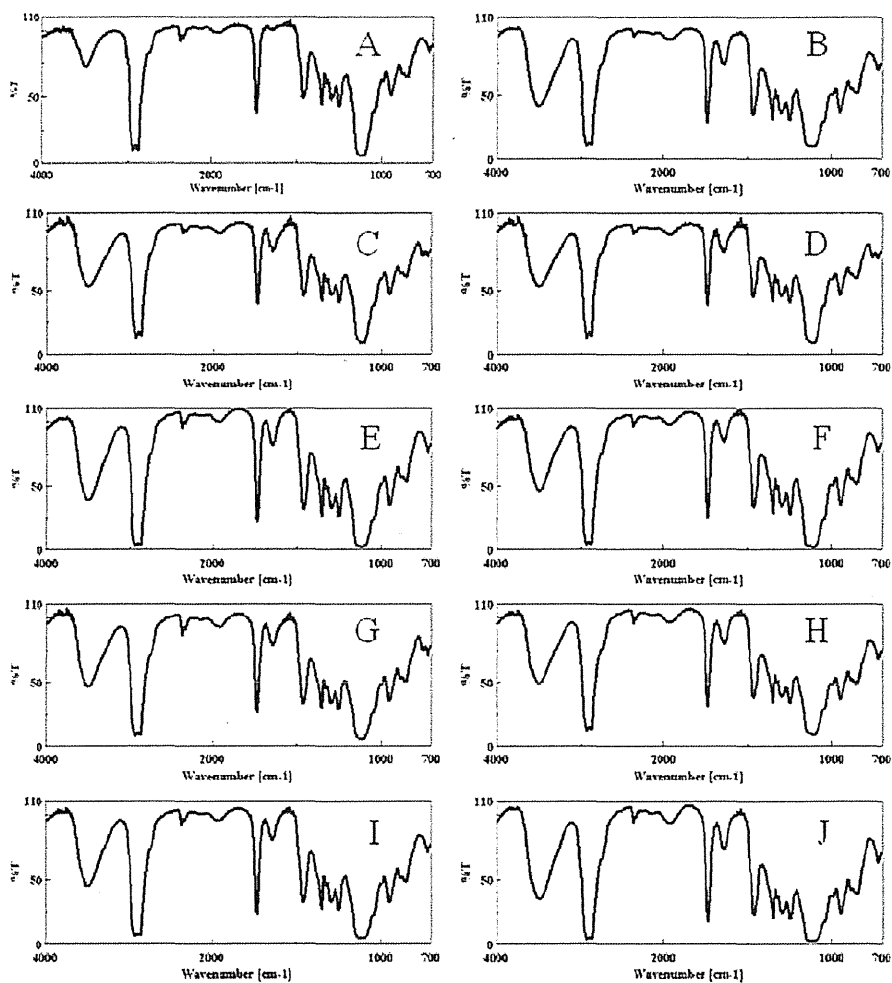


図 10 PS80 試薬の赤外吸収スペクトル

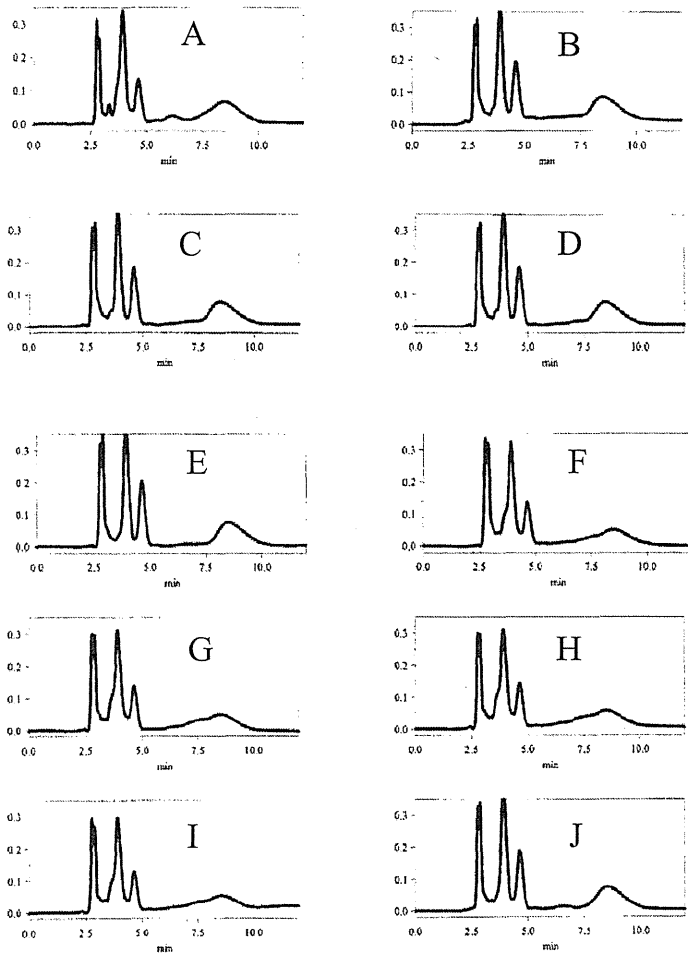


図 11 PS80 試薬のクロマトグラム

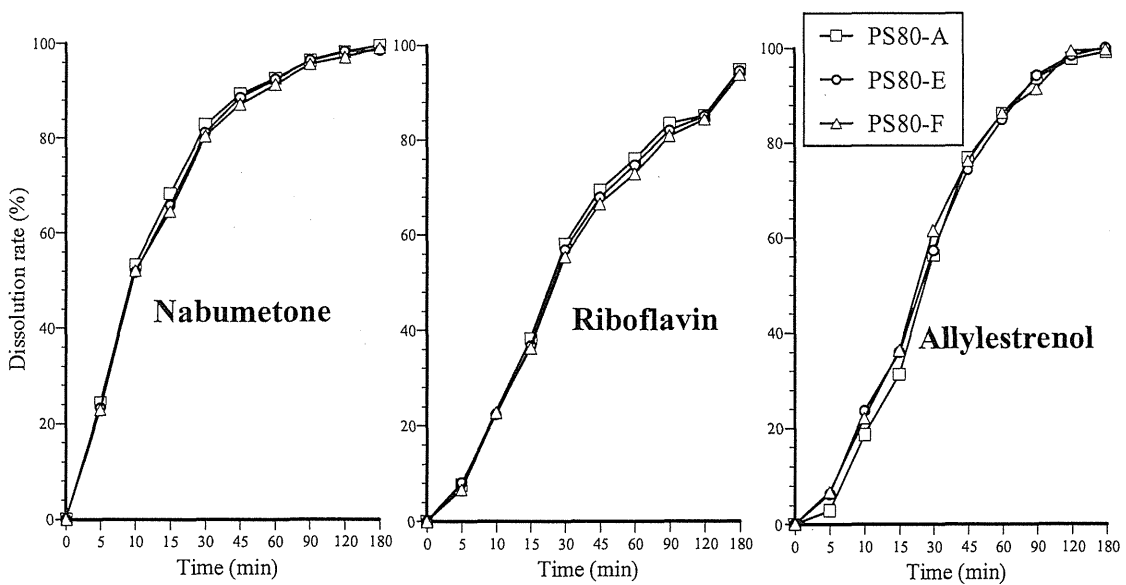


図 12 PS80 試薬の溶出挙動に及ぼす影響

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

分担総合研究報告書

脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究

研究分担者 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 脂質分散系製剤のうちマイクロエマルジョンやリポソーム製剤, その他, マイクロスフェア製剤について製剤特性の評価や in vitro 試験方法の検討を行った. シクロスポリンのマイクロエマルジョン経口製剤については, 先発品と後発品とで粒子径など物理化学的性質を評価し, 後発品は先発品よりも各種溶液に懸濁した際の粒子径が大きくなる傾向が認められたが, ラット経口投与後の AUC や Cmax に有意な差は認められず, 先発品と全く同じ粒子径でなくても 100nm 程度で均一に分散されていれば, 体内動態が大きく異なる可能性は低いことが示唆された. リポソーム製剤については, FDA のガイダンスに例示された in vitro 薬物漏出性の試験条件をもとに, 薬物放出挙動に影響する要因を検証し, 37°Cではヒト血漿 50%溶液や各種緩衝液中で観察される薬物放出率が非常に低いこと, 温度上昇に伴う薬物放出率の増加は pH が低いほど明確であること, 超音波照射によって速やかな薬物放出が観察できることが判明した. マイクロスフェア製剤については, in vitro 薬物放出試験の構築を目的に, 試験液や試験方法を比較検討した. 生理的環境に近い緩衝液であればヒト in vivo 累積 AUC 率と関連した放出挙動が得られること, 45°Cにおいて”試料と分離方式”と”連続フロー方式”とでほぼ同じ放出挙動が観察されたものの, pH や塩濃度が放出挙動に与える影響を明確にした. さらに調査研究として, FDA のリポソーム製剤に関する2つのガイドライン, EMA のリポソーム製剤に関するリフレクションペーパーの内容をまとめた.

A. 研究目的

リポソームやリピッドマイクロスフェア, マイクロエマルジョンなど脂質分散系製剤の開発が活発に進められ, 既にいくつかの製剤が承認されている. このような特殊な製剤の場合, 生物学的同等性の評価は製剤の特性を十分に考慮して行われるべきである. 我が国の現行の生物学的同等性試験ガイドラインはほぼ全ての製剤を網羅しているものの, 特殊な製剤に関しては議論の余地があると思われる. 例えば, 非経口製剤の項では, 製剤の特性に応じた適当な溶出(放出)試験又はそれに代わる物理化学的試験を行う, とあるが, 詳細な試験内容・条件など実際に試験を行う上で参考になる情報は提示されていない. また, リポソーム製剤などのように体内動態や組織分布が複雑な注射剤の場合, 同じ血中濃度推移を示したとしても治療効果と関連しない可能性が考えられる. 特殊な製剤の同等性に対する考え方はFDAやEMAな

どで少しずつ提案されており, 我が国でも何かしらの対応が必要である.

このような背景のもと, 本研究では特殊な製剤(マイクロエマルジョン, リポソーム, マイクロスフェア製剤)を対象に, 類似性が求められ得る製剤特性の評価方法の検討や, 製剤特性と体内動態との関連性を検証した. さらに諸外国における特殊な製剤の生物学的同等性に対する考え方を把握するため, 特にリポソーム製剤に関するガイドラインをまとめた.

B. 研究方法

B-1 マイクロエマルジョン製剤の物理化学的性質と体内動態の評価

シクロスポリンの油性製剤(先発品 A), シクロスポリンのマイクロスフェア製剤(先発品 B), 先発品 B の後発品 4 製品(C-F)を試験製剤とした. 各製剤を水, 溶出試験溶液や人工腸液に分散し, その溶液の濁度と

粒子径を測定した。さらに水に分散した溶液をラットに経口投与後、経時的に採血し、血中濃度を測定した。体内動態パラメーター、AUC、C_{max} 及び T_{max} は WinNonlin (version 5.2, Pharsight Corporation, USA)を用いて計算した。

B-2 リポソーム製剤の in vitro 薬物放出性評価

FDA のガイドラインに提示された in vitro 漏出性試験条件例を参考に、ドキシソルビシン(DXR)封入 PEG リポソームの DOXIL について、試験液の種類や pH、希釈率、試験温度や超音波の薬物放出挙動に与える影響を評価した。各試験液に DOXIL を分散した試験溶液を各温度の恒温槽でインキュベートし、Sephadex G-25 カラムで分取したリポソーム分画について、DXR 濃度を HPLC で測定した。0 時間の試験溶液中の DXR 濃度をコントロール(100%)として放出率を算出した。

B-3 マイクロスフェア製剤の in vitro 薬物放出性評価
リスペリドンの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種類の試験方法、“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。“連続フロー方式”には UV 検出器を接続した7連のフロースルーセル法溶出試験装置を使用した。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、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。

B-4 FDA および EMA のリポソーム製剤に関するガイドライン

FDA のガイドラインとして、主に”ドキシソルビシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス (Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride)“(2010 年)(添付資料1)、その他”リポソーム製剤:化学、製造及び品質管理;ヒト薬物動態と生物学的利用能;表示文書(案)(Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation)”(2002 年)(添付資料2)、及び、このガイドラインに寄せられ

たパブリックコメントを調査対象とした。EMA のガイドラインとして、“先発リポソーム製剤を基準に開発された静脈注射用リポソーム製剤の提出データに関するリフレクションペーパー(案)(Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product Draft)”を調査対象とした。

C. 研究結果

C-1 マイクロエマルジョン製剤の物理化学的性質と体内動態の評価

各製剤のカプセル内容物1カプセル分を 10mL の蒸留水、溶出試験第1液、2液で懸濁したところ、先発品 B と後発品 E は透明に近い水溶液となったが、後発品 C・D・F は濁りが認められ、油性製剤である先発品 A とは状態が異なるものの、後発品 F は白く、後発品 C と D は青白く濁った。人工腸液 FeSSIF で懸濁したところ、後発品全て白濁したのに対し、先発品 B はほぼ透明であった(図1)。次に粒子径を評価したところ、蒸留水中の平均粒子径は、先発品 B 26.4 nm に対し、後発品 4 製剤は C 74.8, D 64.5, E 39.7, F 79.2 nm と大きい傾向が見られた。また、人工腸液 FeSSIF に懸濁した後発品 4 製剤の平均粒子径(5倍・25倍希釈)は 100~200 nm と顕著に大きくなり、見た目の結果とおよそ相関していた。

ラットを使って経口投与後の CsA と代謝物(AM1, AM9, AM1c)の体内動態パラメーターを比較した(表1)。先発品 B は先発品 A と比較して、CsA と代謝物の T_{max} は顕著に早くなり、C_{max} 及び AUC が有意に高くなることが確認できた。後発品も有意な差はないものの、先発品 A よりも C_{max} や AUC が高くなる傾向が認められた。後発品の CsA の T_{max} は先発品 B よりも明らかに遅くなっていたが、C_{max} と AUC に関しては先発品 B と後発品 4 製剤との間で有意な差は認められなかった。また、代謝物の C_{max} や AUC についても先発品 B と後発品 4 製剤との間で明確な差は認められなかった。

C-2 リポソーム製剤の in vitro 薬物放出性評価

ヒト血漿 50%溶液に DOXIL を分散させ、37℃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。37℃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。

温度上昇の DXR 放出性に与える影響を評価したところ、各緩衝液 pH 5.5 中では速い DXR 放出が観察され、43, 47, 52, 57℃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 2)。一方、pH 6.5 や 7.5 では 57℃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。

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。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。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。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。

C-3 マイクロスフェア製剤の in vitro 薬物放出性評価

”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、生理食塩水と蒸留水における薬物放出挙動を 37℃で観察した。リスパダールコンスタには専用懸濁用液が付属されており、その懸濁溶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。その結果、PBS もしくは HBS ポリソルベート 20 添加でヒト in vivo 累積 AUC 率とある程度相関した放出プロファイルが得られた。また、塩濃度や pH の異なる緩衝液を使った検討から、塩濃度が低いほど、pH が低いほど、薬物放出の開始が速くなる傾向が認められた。なお、ポリソルベート添加によって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。

さらに試験温度を 45℃に上げて観察したところ、37℃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℃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℃に

上げることで、薬物放出速度がおおよそ 5 倍速くなることが確かめられた。37℃と 45℃で放出プロファイルが同じであることから、温度を上げて同じメカニズムで薬物が放出されていると考えられた。そこで、”連続フロー方式”による放出性評価の検討は 45℃で試みた。

”連続フロー方式”で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。その結果、”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 (図 3)。しかし、各セルの値を見ると、セル間で放出挙動に差が認められ、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。そこで、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るものの、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 4)。

C-4 FDA および EMA のリポソーム製剤に関するガイドライン

FDA の“ドキシソルピシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス”において、生物学的同等性を証明するために推奨されているのは、臨床試験と In vitro 試験の 2 試験である。その他、溶出試験は適切な方法を設定して、12 製剤で試験を行い、標準製剤と試験製剤を比較する。さらに、試験製剤は、標準製剤と医薬品組成が同じであること、同じ封入方法で製造されていること、様々なリポソーム特性 (リポソームの組成、薬物封入状態、内部環境、リポソームの形態・ラメラ数、脂質二重膜の相転移、粒子径分布、リポソーム表面の PEG、表面電位・電荷、in vitro 漏出率) が同等であることが求められている。臨床試験では、卵巣がん患者を対象に、血中の遊離ドキシソルピシンとリポソーム封入ドキシソルピシンの濃度を測定し、それぞれの AUC と Cmax について 90%信頼区間法で生物学的同等性を判定する。In vitro 試験では 3 ロットの粒子径分布を

測定し、 $D50$ 値とスパン = $(D90-D10)/D50$, または多分散指数について 95%信頼区間にもとづいて母集団生物学的同等性の判定を行う。

EMA のリフレクションペーパーでは、“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ことから、通常の生物学的同等性試験では検出できない有効性・安全性の大幅な変化が起きる可能性があるため、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徹底的な薬物動態や組織分布の特性解析が重要である”, という考え方が根幹となっている。製剤品質の項には、記載すべき品質特性や製剤コンパラビリティの立証に求められることが記載され、質的・量的な組成が同一もしくは厳密に一致していること、品質が同等/同質であることを高い水準で証明するために広範囲にわたる最先端の特性解析を行うことが求められている。非臨床試験に関しては、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が、リポソーム製剤の複雑さによっては非臨床試験を削減でき、どの試験を免除可能であるかはケースバイケースである、と記載されている。臨床試験に関しては、リポソームに封入された薬物のクリアランスは、キャリアそのもののクリアランス、薬物の放出速度、遊離した薬物のクリアランスと代謝速度に依存する、という科学的根拠に基づいて提案がなされている。血中の遊離薬物および封入薬物濃度の両方を測定し、 AUC や C_{max} だけでなく分布や排泄特性についても、90%信頼区間の比が 80-125%の範囲に入ること、類似性を証明することが求められている。その他、代謝産物の測定も求められる。さらに、製剤の複雑さによっては有効性評価が求められ、製剤の定性的組成に差異がある場合は治療学的同等性試験の追加実施が求められる。

D. 考察

D-1 マイクロエマルジョン製剤の物理化学的性質と体内動態の評価

粒子径が1~10 μm の油性製剤である先発品 A よりも、粒子径が 100 nm 程度にコントロールされている先発品 B や後発品4製剤の AUC や C_{max} は明らか

に大きかったことから、シクロスポリンのマイクロエマルジョン製剤において粒子径は重要な要因の一つであることが確かめられた。しかし、先発品 B と後発品において、粒子径が小さいほど AUC が大きくなるというような相関性は認められなかった。従って、今回評価したシクロスポリンのマイクロエマルジョン製剤に関しては、生物学的同等性試験における粒子径評価の利用には少し制限があると考えられた。

D-2 リポソーム製剤の in vitro 薬物放出性評価

生体関連性のある条件(37 $^{\circ}\text{C}$ ヒト血漿 50%中 24 時間、及び 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。pH は低いほど、温度は高いほど DXR が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。さらに、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、各条件が脂質二重膜の完全性や薬物封入状態を評価可能かどうか検討する必要がある。

D-3 マイクロスフェア製剤の in vitro 薬物放出性評価
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。また、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。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の影響も今後検討する必要がある。また、“連続フロー方式”では、セルの選択や温度制御を十分考慮する必要がある。

D-4 FDA および EMA のリポソーム製剤に関するガイドライン

FDAが提示した”ドキソルビシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス“とEMAのリフレクションペーパーで共通して試験製剤に求められているのは、先発リポソーム製剤と同一(もしくは厳密に一致した)組成で構成され、物理化学的特性における類似性を示し、ヒトにおける封入薬物と遊離薬物の体内動態の類似性を証明すること、である。上記要求事項は、先発リポソーム製剤と同等・同質であることを示すために、多くの研究開発者が科学的に必要であると判断する可能性が高いものと考えられる。一方で異なる点としては、EMAのリフレクションペーパーでは非臨床試験や、臨床試験における有効性評価が求められる場合があることである。これは対象製剤が複雑な場合や、製剤間に定性的組成の差がある場合に対応するための措置だと考えられる。今後、FDAやEMAのガイダンスを参考に、我が国で先発製剤を基準に開発されたリポソーム製剤に対してどのような方策が適切であるか、実験的検討も含めて、引き続き検討する必要がある。

E. 結論

マイクロエマルジョン製剤については、先発品と後発品とで見た目や粒子径に明らかな違いがあるものの、ヒトでの同等性に加えて、少なくとも今回のラットにおける体内動態試験の結果は後発品の非同等性を示すものではないことを明らかとした。リポソーム製剤については、試験液のpHや温度、超音波照射が大きく薬物放出挙動に影響するなど、in vitro評価法を設定する上で有用な基礎情報を収益した。さらにマイクロスフェア製剤については、試験液組成の薬物放出挙動に与える影響を評価するとともに、in vitroで薬物放出性を評価する試験方法として、フローセル法溶出試験装置の有効性と課題を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 柴田寛子, 四方田千佳子: 米国FDAのドキソルビシン封入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) 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.

3) 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.

4) 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) 柴田寛子, 齋藤はる奈, 川西徹, 四方田千佳子 シクロスポリンカプセルの先発品と後発品における物理化学的性質と体内動態の比較評価 日本薬剤学会第25年会 (2010.5)

2) 柴田寛子, 四方田千佳子, 川西徹 細胞培養液中におけるリポソーム製剤の凝集物形成に関する検討 日本薬学会第131年会 (2011.3)

3) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Basic examination for in vitro release test of drug-encapsulated liposome. Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)

4) 柴田寛子, 川西徹, 四方田千佳子 ドキソルビ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)

5) 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)

6) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru

Kawanishi: Effect of pH, temperature, and ultrasound on drug-release from doxorubicin-encapsulated liposome

AAPS (2011.10)

7) 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)

8) 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)

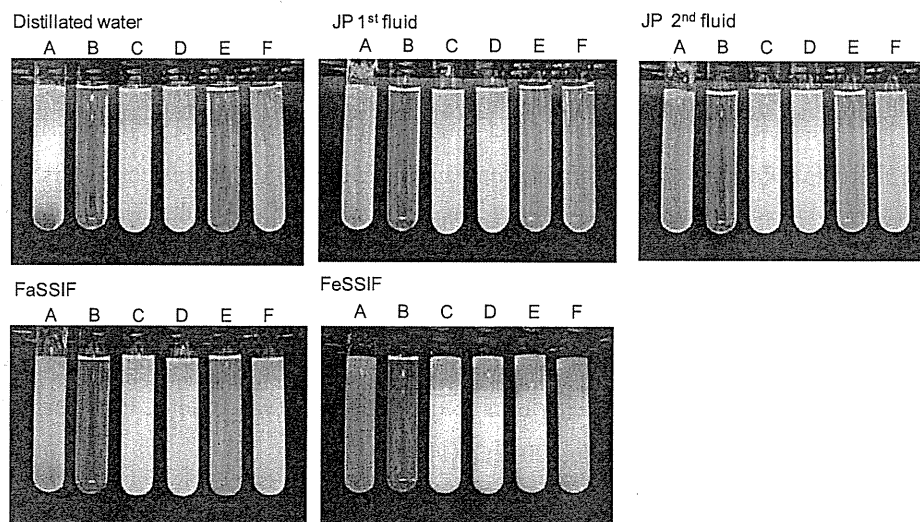


図1 マイクロエマルジョン製剤の見た目の評価

a) カプセル内容物, b)カプセル内容物を懸濁した後の溶液

表1 ラット経口投与後におけるCsAの体内動態パラメーター

	Product A	Product B	Product C	Product D	Product E	Product F
CsA						
Tmax (hr)	7.00±2.14	1.10±0.21 ^a	2.30±0.44 ^{a,b}	2.90±0.87 ^b	2.70±0.89 ^b	2.85±1.01 ^{a,b}
Cmax (ng/mL)	474±60	671±95 ^a	559±74	611±197	565±69	615±107
AUC (hr*ng/mL)	5839±371	7194±507 ^a	6625±541	7454±2185	7105±721	7653±1502
AM1						
Tmax (hr)	7.00±2.14	3.15±1.55 ^a	2.70±0.30 ^a	3.80±0.97	2.70±0.89	3.17±0.79 ^a
Cmax (ng/mL)	106±45	164±21 ^a	127±18	161±42	135±35	164±19 ^a
AUC (hr*ng/mL)	1033±112	1675±99 ^a	1188±101 ^b	1798±472	1509±170 ^a	1743±212 ^a
AM9						
Tmax (hr)	7.00±2.14	3.10±1.55 ^a	3.00±0.84	4.80±0.73	3.00±0.84	4.30±1.49
Cmax (ng/mL)	30±4	52±8 ^a	44±6 ^a	50±13	47±5 ^a	48±6 ^a
AUC (hr*ng/mL)	278±27	519±56 ^a	414±26 ^a	604±142 ^a	566±30 ^a	607±107 ^a
AM1c						
Tmax (hr)	4.10±1.99	1.35±0.18 ^a	2.90±0.81 ^b	3.40±0.68 ^b	1.80±0.34	2.85±0.81 ^b
Cmax (ng/mL)	29±7	46±8 ^a	33±4	45±17	39±6	50±9 ^a
AUC (hr*ng/mL)	197±38	336±36 ^a	261±42	401±100	290±34	478±100 ^a

Each value represents the mean ± S.E. (n = 5).

^a P < 0.05 compared to Product A.

^b P < 0.05 compared to Product B.

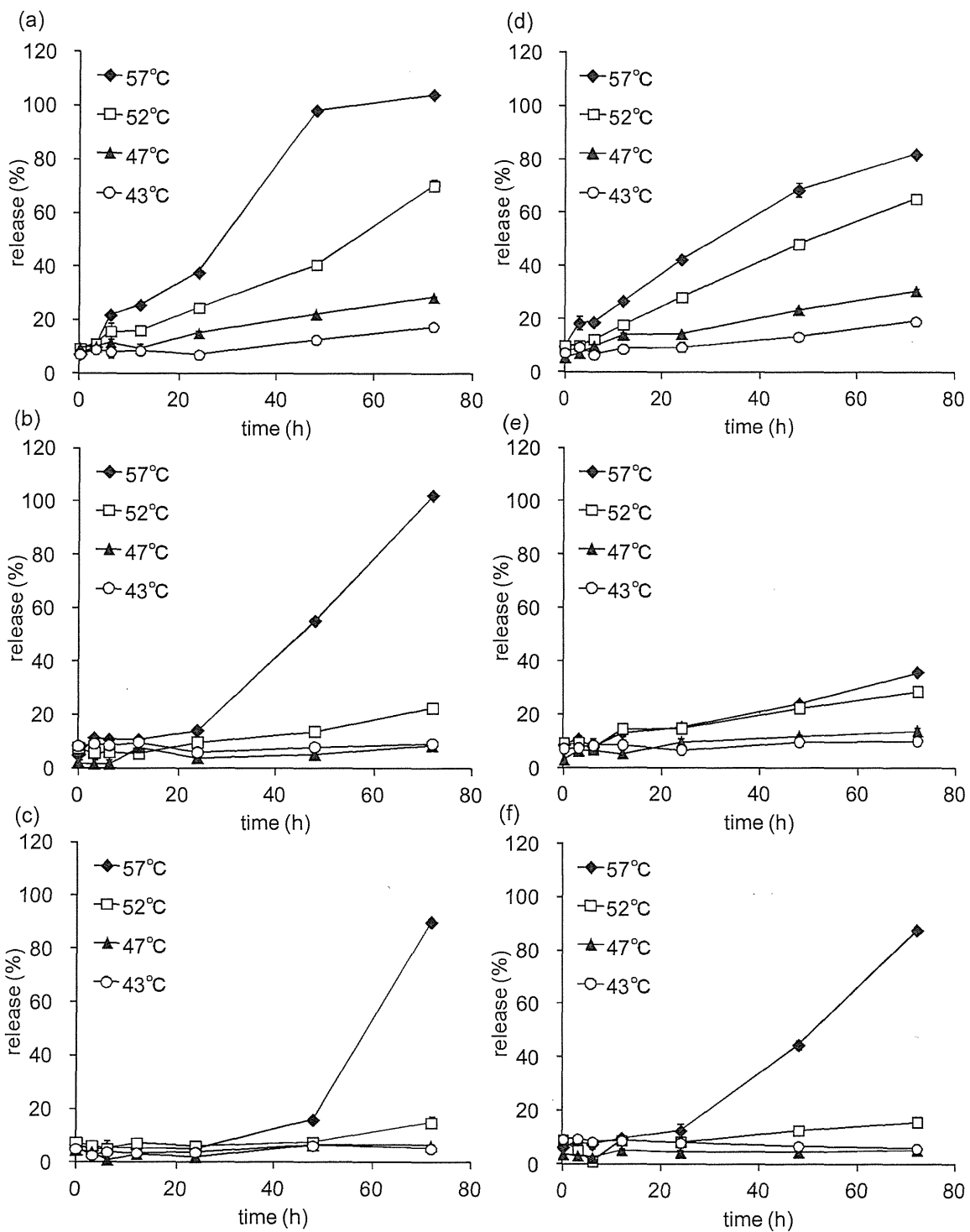


図2 温度と pH の DXR 放出挙動におよぼす影響

(a) PBS pH 5.5, (b) pH 6.5, (c) pH 7.5, (d) McIlvaine pH 5.5, (e) pH 6.5, (f) pH 7.5

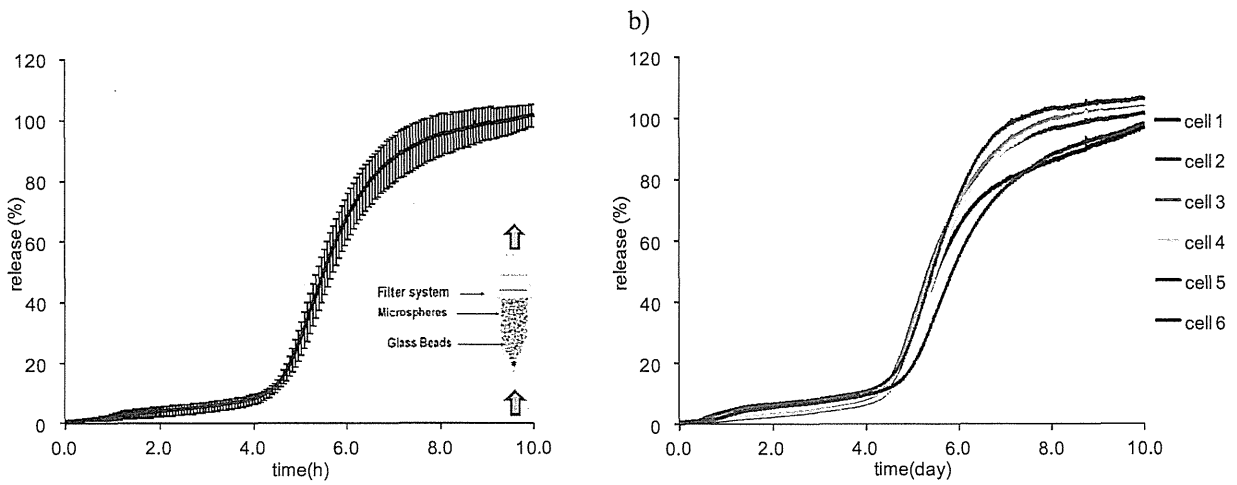


図3 “連続フロー方式”による in vitro 薬物放出性の評価 (n=6)
 12 mm の通常セルに製剤をガラスビーズと混和して入れ、45℃における放出挙動を観察した。
 (a)は平均値±標準偏差を示し、(b)は各セルの値を示している。

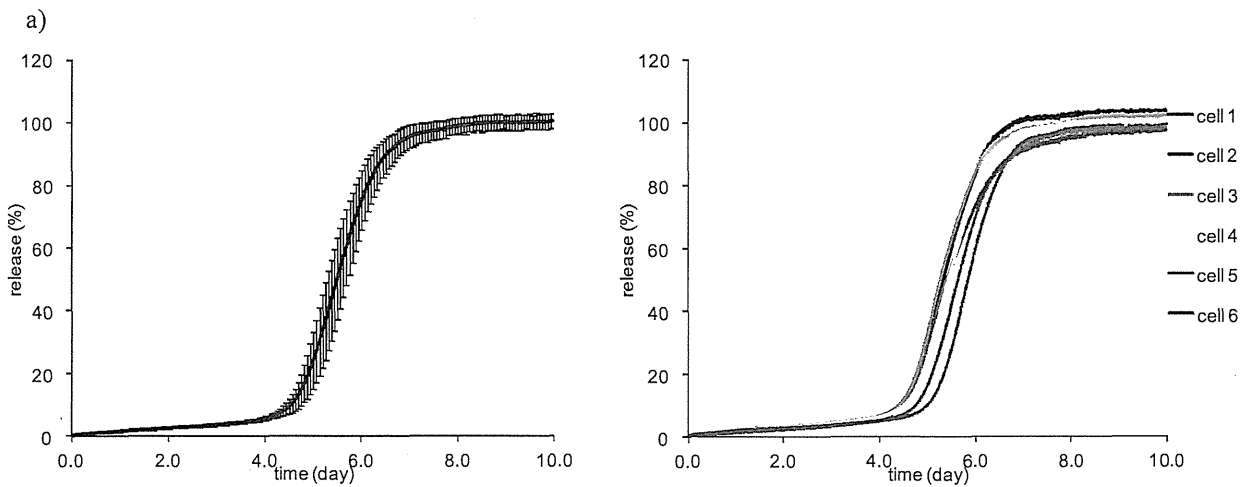
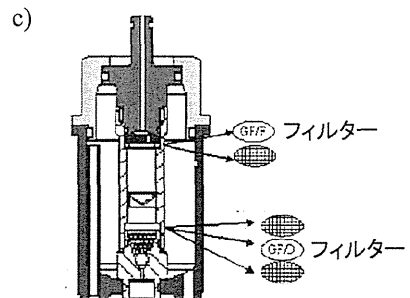


図4 散剤・顆粒剤用セルを使った“連続フロー方式”による in vitro 薬物放出性の評価 (n=6)
 散剤・顆粒剤用セルに製剤を入れ、45℃における放出挙動を観察した。(a)は平均値±標準偏差を示し、(b)は各セルの値、(c)は散剤・顆粒剤用セルの模式図を示している。



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）
分担総合研究報告書

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

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、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、蛍光標識 PEG リン脂質を用いた PEG リン脂質のリポソーム膜内外層間の分布、リポソーム膜表面での PEG 被覆率などに関する蛍光分光学的評価を行った。これらの結果より、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、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 とリポソーム調製後に PEG リン脂質を加える post-insertion 法でほぼ同じであることが示され、PEG 修飾リポソームの表面物性は、修飾法の違いに関わらず 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。

さらに、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すると共に、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。

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。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¹⁻²⁾。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、蛍光標識 PEG リン脂質を利用した PEG リン脂質の表面被覆率などに関する蛍光分光学的評価を行った。

さらに、リポソーム製剤の粒子安定性や薬物放出性を規定する脂質二重膜の相状態に着目し³⁾、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。そして、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。

B. 研究方法

1. 試薬

リポソーム構成脂質としては, distearoylphosphatidylcholine (DSPC) と distearoylphosphatidylglycerol (DSPG) と水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soybean phosphatidylcholine : HSPC) 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 脂質の蛍光標識には NHS-Fluorescein (Thermo SCIENTIFIC 社) と NBD succinimidyl ester (Invitrogen) 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

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. これを 60°C 付近に保ったまま, 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 に加熱しながらボルテックスを 60 分間行うことで作製した. 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), 上記の方法でリポソームを作製した. DSC 測定には, ボルテックス後に形成されている MLV を使用した. 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⁴⁾により行った.

3. リポソームの粒子径及びゼータ電位の測定

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

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

から説明される⁵⁾. 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

$$\kappa = \sqrt{\frac{2000N_A e^2 I}{\varepsilon_r \varepsilon_0 k T}} \quad (2)$$

の関係にあり, NaCl のような 1 : 1 電解質の場合, 25 °C では

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

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

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

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 (FALT) を求めることができる⁶⁾. なお, 式(3)の κ の算出には, Tris の pKa (8.08) から解離型として存在する Tris の割合を求めることで緩衝液 (pH=7.4) 中の 10 mM Tris の寄与を考慮した.

4. PEG リン脂質末端の fluorescein あるいは NBD 蛍光標識

PEG 鎖末端がアミンで活性化された DSPE-PEG2000-NH₂ を 50 mM 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 (DMSO) 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. ゲルろ過クロマトグラフィー

Fluorescein 標識 PEG リン脂質を 1 % の割合で混合した DSPE-PEG2000 を用いてリポソームの PEG 修飾を行った後, Sepharose CL-6B カラム (直径 1 cm × 長さ 40 cm) を用いたゲルろ過によりリポソーム膜に挿入された PEG リン脂質と未挿入の PEG リン脂質の分布を求めた. ゲルろ過は, 流速 1 mL/min, フラクシオン体積 0.75 mL, 溶離液は 10 mM Tris-HCl buffer を用いて行った. 各フラクションの fluorescein 蛍光は励起波長 490 nm, 蛍光波長 535 nm で測定した.

6. NBD 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 Na₂S₂O₄ 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.

7. 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 μM) になるように調整し, 励起波長 361 nm, 測定波長 380~600 nm, 30~70°C の温度範囲でスペクトル測定を行った. Laurdan については, 脂質濃度を 500 μM (laurdan=1 μM) に調整したリポソームを用い, 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 laurdan 蛍光強度である.

8. 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. PEG リポソームの固定水和層の厚さ (FALT) の測定

ゼータ電位測定結果にグイ-チャップマン理論⁵⁾を適用することで, PEG 修飾リポソームの FALT を求めた. 図 1 に未修飾 (plain) 及び 3.6 mol% の DSPE-PEG2000 を post-insertion 法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 1.4nm から 3.8nm に増加していることが示された.

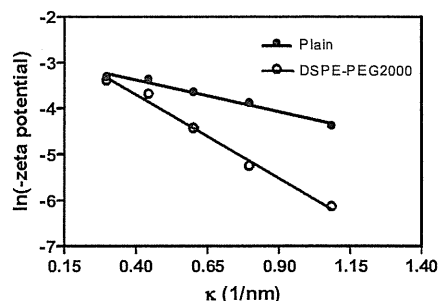


図 1. ゼータ電位とデバイパラメータ κ との関係

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, リポソーム中のリン脂質を rhodamine で, PEG リン脂質を 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 2). 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.

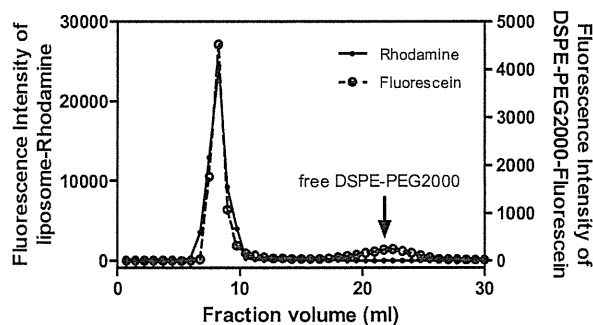


図 2. 蛍光標識 PEG リポソームの Sepharose CL-6B ゲルろ過プロファイル

3. NBD 消光を利用した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脂質及び PEG リン脂質の分布を測定した。NBD 基で標識した PEG リン脂質修飾リポソームに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加し、リポソーム膜内外層における PEG リン脂質の分布を求めた。図 3 には、pre-mixed 法及び post-insertion 法でそれぞれ調製した PEG リポソームの消光実験結果を示した。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。

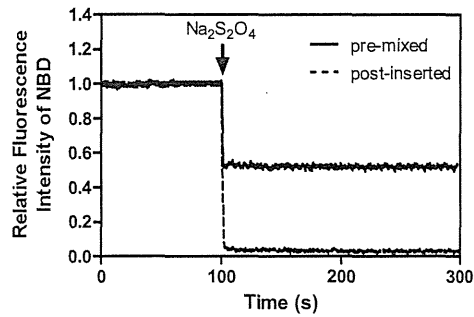


図 3. リポソーム膜外層に存在する NBD 標識 PEG リン脂質の蛍光消光挙動

4. 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 法とで比較したところ (図 4)、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らかとなった。

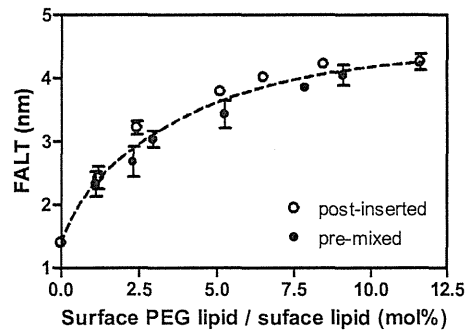


図 4. リポソーム表面 PEG 脂質濃度と FALT との関係

5. 環境感受性蛍光プローブによる HSPC-コレステロール混合二重膜の相転移挙動の評価

次に、環境感受性蛍光プローブである prodan を用いた脂質二重膜のゲル-液晶相転移挙動の観察を行った。HSPC リポソームについて prodan 蛍光スペクトルの温度変化挙動を図 5 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⁷⁾。図 5 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 6 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_β') 相から、 L_β' 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_β') 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⁸⁾。図 6 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⁹⁾, 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。

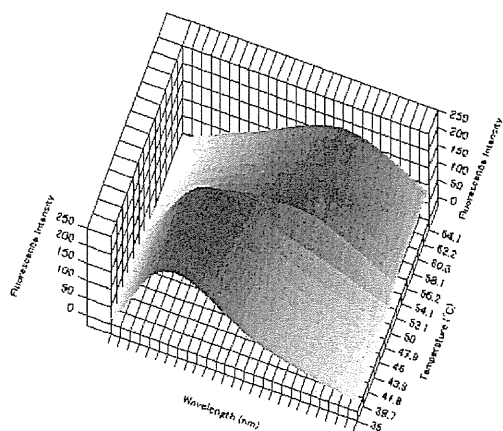


図 5. HSPC リポソーム中での prodan 蛍光スペクトルの温度変化

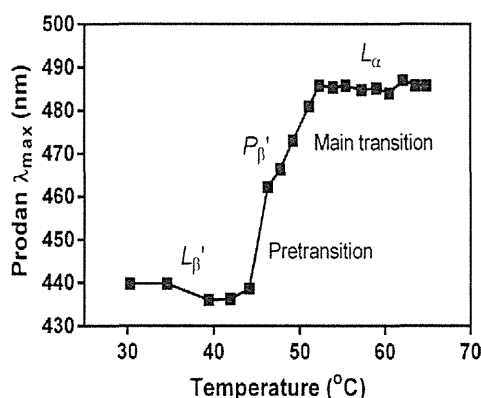


図 6. Prodan 蛍光極大波長の温度依存性

6. HSPC-コレステロール混合二重膜の DSC 測定

図 7 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。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 6)。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 7)。

図 8 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こり, 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⁹⁾。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 ΔH 値は減少し, $x_{ch}=0.4$ 付近でほぼ 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。

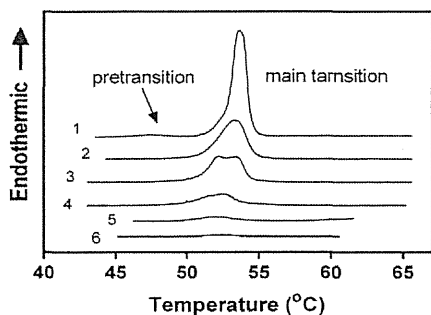


図7. コレステロール分率によるDSC曲線の変化
 $X_{ch}=0$ (1), 0.05 (2), 0.1 (3), 0.25 (4), 0.35 (5),
 0.4 (6)

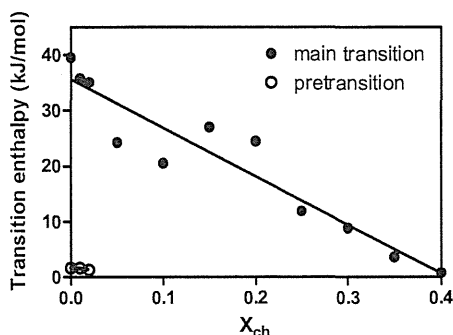


図8. 相転移エンタルピーとコレステロール分率との関係

7. 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9)。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9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9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_d)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¹⁰⁾。

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10)¹⁰⁾。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10(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8)。すなわち、 $X_{ch}=0.02$ 付近では図10(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 10 (b)に示すように全て L_{β} (1:12)ユニットを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 9 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。

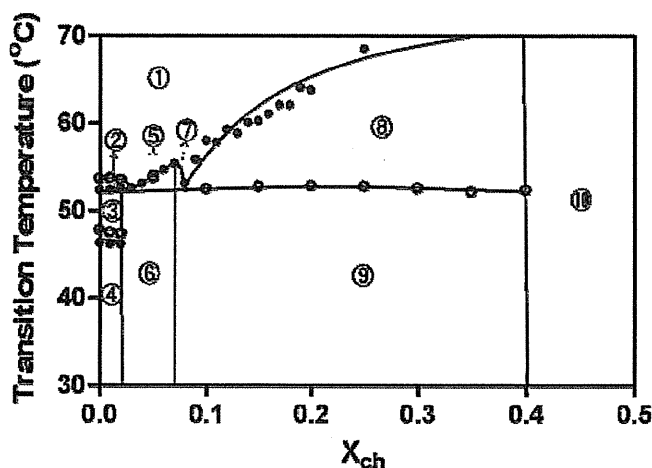


図 9. HSPC - コレステロール混合脂質二重膜の相図

●: 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_{α} + L_{β} (1:12)
 ⑥ L_{β} (1:48) + L_{β} (1:12) ⑦ L_{α} + L_{β} (1:12) ⑧ L_{α} + L_o ⑨ L_{β} (1:12) + L_o ⑩ L_o

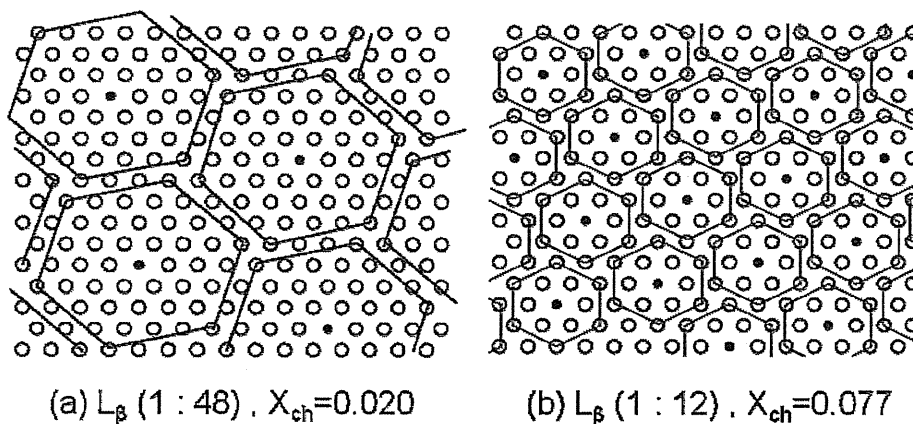


図 10. 六方格子モデルに基づく脂質二重膜中のコレステロールの規則的配置

○: HSPC 分子 ●: コレステロール分子

D. 考察及び結論

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。そこで本研究では、PEG 修飾リポソームの血中滞留性に影響を与える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 被覆率の評価を試みた。さらに、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なリポソーム脂質二重膜の相転移温度及び相状態の評価法の確立を行った。

まず、PEG 修飾法として従来から行われてきた pre-mixed 法と、近年広く用いられている post-insertion 法の両手法によって調製した PEG 修飾リポソームについて、グイ-チャップマン理論を適用して PEG 修飾リポソームの FALT を求めた。さらに蛍光標識 PEG リン脂質を用いることで、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 法でほぼ同じであることがわかり、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。

次に、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。これらの結果より、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) Iden, D. L., Allen, T. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1513, 207-216 (2001)
- 2) Moreira, J.N., Ishida, T., Gaspar, R., Allen, T. M.: *Pharm. Res.* 19, 265-269 (2002)
- 3) Ono, A., Takechi, K., Sukenari, A., Suzuki, T., Adachi, I., Ueno, M.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 97-101 (2002)

- 4) Bartlett, G.R.: *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1958)
- 5) 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
- 6) Sadzuka Y, Nakade A, HIRAMA R, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S, Sonobe T: *Int. J. Pharm.* **238**, 171-180 (2002)
- 7) Parasassi, T., Krasnowska, E.K., Bagatolli, L., Gratton, E.: *J. Fluoresc.* **8**, 365-373 (1998)
- 8) Matsuki, H., Kaneshina, S.: *Netsu Sokutei*, **33**, 74-82 (2006)
- 9) Kusube, M., Matsuki, H., Kaneshina, S.: *Colloids Surf. B*, **42**, 79-88 (2005)
- 10) Somerharju, P., Virtanen, J.A., Cheng, K.H.: *Biochim. Biophys. Acta* **1440**, 32-48 (1999)
- 11) Tamai, N., Uemura, M., Goto, M., Matsuki, H., Kaneshina, S.: *Colloids Surf. B*, **65**, 213-219 (2008)

F. 研究発表

1. 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)
- ・北山裕貴, 新村航, 四方田千佳子, 斎藤博幸: 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, 斎藤博幸: ポストインサーシ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