

20130703/A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12(ADP)リポソーム：
臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

人工血小板／H12(ADP)リポソーム：
臨床研究への移行を目指した品質管理と薬物試験

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 半田 誠
慶應義塾大学医学部 輸血・細胞療法センター 教授

平成26(2014)年3月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を
目指した品質管理と薬物試験
(H24-創薬総合-一般-008)

平成25年度
総括・分担研究報告書

平成26年3月

・・・・・・・・・・・・・・・・ 研究組織 ・・・・・・・・・・・・・・・・

(研究代表者)

半田誠 慶應義塾大学医学部 教授

(研究分担者)

武岡真司 早稲田大学理工学術院 教授

池田康夫 早稲田大学理工学術院 教授

木下学 防衛医科大学校 准教授

丸山徹 熊本大学薬学部 教授

鈴木英紀 日本医科大学 准教授

鎌田徹治 慶應義塾大学医学部 講師

目 次

人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を目指した
品質管理と薬物試験

平成25年度研究報告

I. 総括研究報告書

半田 誠 ----- 1

II. 分担研究報告

1. H12-(ADP)リポソームの品質管理体制の確立

武岡 真司 ----- 11

2. 第2世代H12-(ADP)リポソームの *in vivo* 止血能評価

池田 康夫 ----- 17

3. 大量出血合併急性血小板減少家兎モデルにおけるH12(ADP)リポソームの投与効果
—臓器出血後のH12(ADP)リポソーム事後投与の救命効果とfibrinogen補充の影響—

木下 学 ----- 24

4. H12(ADP)リポソームの体内動態の解析に関する検討

丸山 徹 ----- 46

5. H12-(ADP)小胞体の安全性評価：血栓誘発性の検討/DICラットモデルでの検討

半田 誠 ----- 55

6. 超微細形態解析—ウサギ肝出血時に投与した人工血小板リポソーム分布の電顕的
検討—

鈴木 英紀 ----- 59

7. α IIb β 3 インテグリンとH12担持リポソームの結合解析—表面プラズモン共鳴法
による無細胞測定系の検討—

鎌田 徹治 ----- 64

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 75

IV. 研究成果の刊行物・別冊

I . 総括研究報告

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業)

人工血小板/H12(ADP)リポソーム：臨床研究への移行を目指した
品質管理と薬物試験

総括研究報告書

研究代表者 半田 誠 (慶應義塾大学医学部 教授)

研究要旨

【研究目的】 人工血小板/H12(ADP)リポソーム (LP) の臨床研究への移行を目標として、本試験物の製造・品質管理体制を確立し、薬物試験 (薬理試験、薬物動態試験、毒物試験) について非臨床データの集積を行う。

【研究方法】 LP の品質評価について、比濁法によるエンドトキシン試験を行い、大型エクストルーダー及びクロスフローろ過を用いて製造工程のスケールアップを検討、また、保存安定性試験を継続した。致死性の臓器損傷ウサギモデルを用いて大量輸血に伴う急性血小板減少症への適応をフィブリノゲン製剤併用プロトコルで評価し、同時に、止血部位への LP の集積を、超薄切片法により形態観察した。健常およびブスルファン惹起血小板減少ラットを用いて、反復投与による ABC 現象を検討した。血栓症誘発・促進作用を LPS 惹起 DIC ラットモデルで評価した。無細胞系の性能評価法について、LP と α IIb β 3 の結合を表面プラズモン共鳴法で検討した。

【研究結果・考察】 エンドトキシン測定法を確立し、製造物が薬局方の基準を満たすことが確認された。現行の 10 倍程度 (100mg から 1g レベル) の製造工程スケールアップが可能であることが明らかとなった。LPS 分散液の 4℃、1 年間の保存安定性が認められた。止血能は改善したにもかかわらず、LP の救命効果はフィブリノゲンの併用で改善しなかった。肝臓止血部位で LP の集積が確認できた。薬物惹起血小板減少モデルでは ABC 現象は確認できなかった。血栓優位型 DIC モデルで LP による有意な血栓症誘発・促進作用は認めなかった。結合能測定は成功せず、チップ表面に固定化した精製 α IIb β 3 の質が課題となった。

【結論】 LP の臨床研究への移行を目標として、当初の計画通り順調に、製造・品質管理体制の確立へのステップが達成され、非臨床データが集積された。

(研究分担者)

武岡真司	早稲田大学理工学術院	教授
池田康夫	早稲田大学理工学術院	教授
木下学	防衛医科大学校	准教授
丸山徹	熊本大学薬学部	教授
鈴木英紀	日本医科大学	准教授
鎌田徹治	慶應義塾大学医学部	講師

A. 研究目的

人工血液の開発は、医療の高度化と患者の高齢化に伴う需要の増加および少子化による献血人口の減少に対応した血液製剤の安定供給の確保等に関する法律（血液法）に基づき、官民学が取り組むべき重要な課題とされてきた。とりわけ、保存期間が短く、厳密な保存条件を要し、緊急使用が困難なヒト血小板（献血・院内製剤や iPS 細胞由来血小板）に代わる人工物の開発は、欧米においても精力的に行われてきたが、未だに実用化はされていない。我々は、H9 年度より現在まで、厚生労働科学研究費の助成及び大学・企業の連携プログラムの協力を得て人工血小板の開発研究を継続し、多くの候補ナノ粒子の中から絞り込まれた H12(ADP) リポソームが、その効力と安全性の面からの前臨床評価により、創薬化が十分可能であると判断するに至った。

本微粒子は、粒子径が 250nm でポリエチレングリコール鎖による表面修飾により十分な血中滞留性と体内排泄性を備え、かつ認識分子としてヒトフィブリノゲンペプチド (H12) を表面に担持させることで止血局所（活性化血小板）特異性を有し、内包化したアデノシン 2 リン酸 (ADP) を血小板凝集依存性に止血局所で放出すること、が特徴である (Okamura Y, et al: J Thromb Haemost 7:470, 2009). 実際、3 つの異なった機能を有する有機分子 (脂質類、合成ペプチド H12、リボヌクレオチド ADP) で構成された今迄に世界に類を見ない独創的な薬剤であり、かつ本来の人工血液の趣旨に即して生体材料を一切用いないことが特長である (基礎特許：薬物運搬体)。

当該 3 カ年研究 (今回は 2 年目) では、担当者との直接接触を介した民間企業との、あるいは大型開発研究費による公的機関との連携を模索しながら、外傷等による大量出血での使用を対象とした臨床研究への移行を目的として、本試験物の品質管理と薬物試験 (薬理試験、薬物動態試験、毒物試験) について非臨床試験データの集積を行い、その適格性を検証する。

B. 研究方法

1. H12 (ADP) リポソームの製造および品質管理の確立 (武岡、池田)

大学施設におけるラボスケールでの製造環境のもとで、1) 日本薬局方に基づいた比濁法 (トキシノメータ) によるエンドトキシン試験を、標準標品による検量線を用いて施行するとともに、細菌培養試験を行い、製造環境を評価した。2) 現行のゲルろ過に代わり負荷量スケールアップが可能なクロスフローろ過法を用いて、未内包 ADP の除去効果を測定するとともに、現行 (20 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder; Nothern Lipid Inc.) よりも大型のエクストルーダー (100 mL LIPEX™) による粒子径制御効率を、昨年度設定した暫定的な品質標準仕様表に照らして評価した。3) リポソーム分散液の冷蔵保存安定性を 1 年間まで標準仕様表に照らして評価した。4) 陰性荷電脂質である DHSG の含量を 5 倍に増やし、*in vitro* での人工血小板活性を増強させた第 2 世代 H12 (ADP) リポソームの *in vivo* 効果及び保存安定性を検討した。

2. 薬効薬理試験及び形態的観察 (木下、鈴木)

前年度までに確立した出血性ショックによる致死性の大量出血/輸血に合併する希釈性血小板減少症 (5 万/ μ l $>$) ウサギモデル (Nishikawa K et al: J Thromb Haemost 10: 2137, 2012) を用いて、臨床試験プロトコルを作成する上での情報を得るため、実臨床で効果が期待されているフィブリノゲン製剤 (Haemocompletan、CSL ベーリング、70mg/kg ポーラス投与) の同時投与による H12 (ADP) リポソーム (20 mg/kg) の止血や救命効果の改善を検討した。

3. 薬物動態試験 (丸山)

健常ラット及び既報 (Okamura Y, et al: J Thromb Haemost 7:470, 2009) にしたがって作成したブスルファン惹起血小板減少ラットに、H12 (ADP) リポソーム (10 mg/kg) を投与し、14 日まで経時的に、ラット血漿中のリポソーム結合性 IgG 及び IgM を、リポソーム固相化プレートを用いて測定した。脂質コレステロール及び包含 ADP をそれぞれ ^3H と ^{14}C で標識したリポソームを初回投与後 5 日目に追加投与し、その体内動態を測定して、ABC 現象 (Accelerated Blood Clearance Phenomenon) を評価した。

4. 安全薬理試験 (半田)

前年度に引き続き、血栓症の誘発・促進作用を評価するために、エンドトキシン: LPS (E. coli 055:B5、Sigma、30 mg/kg) を 4 時間持続注入して作製した DIC ラットモデル (血栓優位型) を用い、超高用量 (80 mg/kg) のリポソームを

投与して、陰性対照と比較して、アンチトロンビンや D-ダイマー等の血液凝固パラメータ及び肝・腎臓障害マーカー (ALT とクレアチニン) の変動を測定した。

5. 無細胞系による機能評価系の確立 (鎌田)

リポソームと活性化血小板上の α IIb β 3 インテグリンとの結合を、表面プラズモン共鳴法 (Biacore 2000 を使用) を用いて検討した。安定発現培養細胞より GRGDS ペプチド・アフィニティ精製した活性型 α IIb β 3 をセンサーチップ表面に固相化した。

C. 研究結果及び考察

1. H12 (ADP) リポソームの製造および品質管理の確立 (武岡、池田)

1) エンドトキシン試験法の確立及び無菌環境の評価 (H25 武岡分担研究報告) : 界面活性剤 $C_{12}E_{10}$ 溶液の存在下で、リポソーム試験物のエンドトキシン試験の妥当性が確認された (Fig 2)。培地コロニー法により、製造工程の無菌環境が確認できた (Fig 3)。2) 製造工程のスケールアップ (武岡) : 現行の小型容量 (20ml) エクストルーダー及びゲルろ過による未内包 ADP 除去法から大型 (100ml) エクストルーダー及びクロスフローろ過法へ移行することで、製造工程のスケールアップ (現行の 10 倍程度 : 100mg より 1g オーダー) が可能となった (Fig 4-6)。3) 保存安定性 (武岡) : サンプル数は十分ではないが、4°C、1 年間以上の保存安定性が確認された (Table 1)。4) 第 2 世代人工血小板の *in vivo* 性能評価 (H25 池田分担研究報告) : ブスルファン惹起血小板減少ラットの延長した出血時間の短縮効果は、現試験物に比して、第 2 世代人工血小板が同等以上の血小板代替性能を有することが分かった (Fig 4)。冷蔵で 1 ヶ月間の保存安定性が認められた (Fig 1)。以上のことから、ラボスケールでの試験物製造及び品質管理体制の確立への行程が順調に進められたと結論できた。

2. 薬効薬理試験及び形態的観察 (木下、鈴木)

当該試験物の想定している適応は、外傷や手術に伴う大量出血・大量輸血に合併する急性血小板減少である。既に我々は、血液希釈による急性血小板減少症ウサギモデルにおいて、肝臓損傷による致死的出血性ショックに対応して、H12 (ADP) リポソームが血小板輸血に匹敵する救命効果を来すことを明らかにしてきた (Hagisawa K, et al : 論文投稿中)。しかしながら、その救命率 (肝臓損傷後、止血措置と平行して投与 : 事後投与) は十分とはいえなかった。実臨床においては、ダメージコントロール処置、赤血球輸血や輸液を前提として、

血小板輸血とともに、フィブリノゲンを含む凝固因子の補充が効果的であるとされている。そこで、より適切な臨床プロトコル作成を視野にいれ、フィブリノゲン製剤併用による効果を評価した (H25 木下分担研究報告)。H12(ADP)リポソーム投与群及びフィブリノゲン製剤併用群の救命率はそれぞれ 60% (6/10) と 33% (2/6) であった。一方、血小板輸血 (PRP) 群、H12(PBS)リポソーム群及びリポソーム非投与 (PPP) 群の救命率はそれぞれ、50% (5/10)、17% (1/6) 及び 10% (1/10) であった (Fig 5)。フィブリノゲン補充により測定限界以下であったフィブリノゲン濃度が改善され、Sonoclot 凝固能も大幅に回復されたにもかかわらず、その付加的効果は得られなかった (Table 2)。その原因としては、フィブリノゲン以外の凝固因子の不足や高度の貧血の存在の可能性が指摘できる。また、リポソームや血液製剤の投与量や投与スケジュール (複数回投与) の工夫も必要かもしれない。諸臓器 (肝、腎、肺) の組織学的検索では、微小血栓などの存在は認められなかった。一方、肝臓損傷部の切片の電顕的検索では、血小板凝集塊に一致して、血小板間隙にリポソームの存在を強く疑わせる無構造物が多数認められた (H25 鈴木分担研究報告、図 4、5)。生体内において当該リポソーム試験物の局所集積を示唆する初めての知見であり、コントロールを設定したより慎重な検索が今後必要である。

3. 薬物動態試験/ABC 現象 (丸山)

健常のマウスにおいては、リポソーム投与後 7 日をピークに IgM 抗体の出現をみた (H25 丸山分担研究報告、Fig 1)。一方、血小板減少動物においては、抗体の出現は大幅に抑制された (Fig 4)。未標識リポソーム投与後 5 日目に投与した標識リポソームの体内動態試験では、健常動物において、ABC 現象が観察され、肝臓でのトラップが明らかとなった (Fig 2、3)。一方、血小板減少動物においては、ABC 現象は認められなかった (Fig 5、6)。抗がん剤 (ブスルファン) による免疫抑制効果が作用していると考えられる。複数回投与を想定する場合は、ABC 現象を考慮に入れる必要があるが、当該リポソームの適応は単回使用を前提としている。さらなる検討は必要ないかもしれない。

4. 安全薬理試験 (半田)

血栓症状を前景とするエンドトキシン誘発性ラット DIC モデルにおいて、H12-(ADP)リポソーム及び対照であるリポソームと生理食塩水の投与による影響を比較した。LPS の 4 時間持続投与によって、PAI-1 濃度の著明な増加が誘発され、血小板やフィブリノゲンは減少し、その他のマーカーは DIC を示唆する変

動をきたした。一方、血栓症による肝臓及び腎臓の障害が出現し、少なくとも 24 時間後まで持続した。いずれのマーカにおいても、またいずれの時点においても、その変動は、3 群間で有意な差 (t 検定) は認めなかった (H25 半田分担報告、Fig 2)。当該リポソームの血栓誘発・増強作用は少なくとも 80 mg/kg までの投与量の範囲内では起こらない可能性が示唆された。なお、昨年度は出血優位型 DIC モデルで投与後 30 分に一過性の D ダイマー上昇を認めた。今回のモデルでも、投与後 30 分のマーカ測定を行う必要があるかもしれない。

5. 無細胞系による機能評価系の確立 (鎌田)

リポソーム試験物の品質評価に性能試験は必須である。リポソームが α IIb β 3 との結合を介した活性血小板への補助作用を評価するシステムとして、表面プラズモン共鳴法が最適であることが、今までの検討で明らかとなった。しかしながら、今回の検討で、安定発現細胞よりアフィニティ精製した活性型変異 α IIb β 3 の質的問題で、センサー表面へのリポソーム結合は測定できなかった。固相化した複合体の精製条件 (EDTA や低 PH) による変性の可能性が強く疑われた (H25 鎌田分担研究報告、図 10、11)。測定法の確立には精製条件の検討が必須である。

D. 結論

3 年後の臨床研究への移行を目標として、ラボスケールにて、品質保証、製造体制の確立へのステップを順調に踏み、H12 (ADP) リポソームの人工血小板としての適格性を示唆する非臨床試験データが集積できた。薬効薬理試験ではより効果的な投与プロトコルが設定の必要性が明らかとなった。薬物動態試験では ABC 現象を考慮する必要性が明らかとなった。安全薬理試験で危惧される血栓症誘発・促進作用は認めなかった。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

(1) Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda

Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model. *J Pharm Sci.* (2013) 102(10):3852-9.

(2) Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T. Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposomes coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute. *Drug Metab Dispos.* (2013) 41(8):1584-91.

(3) Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, Ikeda Y, Aiso S: Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha V \beta 3$ integrin. *PLoS One.* (2013) 8(6):e66096.

(総説)

(1) 半田 誠 : 人工血小板開発の現状と今後の展望. 日病薬誌. (2013) 49(9):949-53.

(2) 木下 学: 人工血液 : 人工血小板の臨床応用. *A Net.* (2013) 18:14-7.

(3) 西川可穂子、萩沢康介、柳川鍊平、土井麻実、鈴木英紀、齋藤大蔵、阪本敏久、武岡真司、半田誠、木下 学 : 人工血小板 H12(ADP) リポソームを用いた急性血小板減少病態への止血・救命対策. *人工血液* (2013) 21: 60-7.

2. 学会発表

(1) Tan S, Arai M, Watanabe N, Handa M, Ikeda Y and Takeoka S "Inhibitory Study on the binding of high anionic liposomes to activated platelet membrane" International Symposium on Integration of Chemistry and Bioscience (January 2014., Tokyo)

(2) 岡村 陽介, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠 「人工血小板 : H12-(ADP) リポソームの設計」, 第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013. 12., 奈良)

(3) 藤山 敦史, 土井 麻実, 池田 康夫, 武岡 真司 「血小板代替物 H12-(ADP) リポソームの物理化学的評価法の確立」、第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013. 12., 奈良)

(4) 土井 麻実, 木下 学, 萩沢 康介, 西川可穂子, 柳川 鍊平, 半田 誠, 池

- 田 康夫, 武岡 真司「人工血小板 H12-(ADP)リポソームの止血能評価(臓器損傷後投与による検討)」, 第20回日本血液代替物学会年次大会 (2013.12, 奈良)
- (5) 藤山敦史, 土井麻実, 池田康夫, 武岡真司, 「人工血小板の品質評価に関する検討」, 第20回日本血液代替物学会年次大会(2013.12., 奈良).
- (6) Hagiwara K, Kinoshita M, Nishikawa K, Nishida Y. Treatment with Fibrinogen γ -chain Peptide-coated, Adenosine Diphosphate-encapsulated Liposomes as An Infusible Haemostatic Agent for Dilutional Coagulopathy. American Heart Association 2013. Resuscitation Science Symposium, (Young Investigator Award 受賞) Dallas final program p153 2013; 128: A357
- (7) 木下 学、萩沢康介、西川可穂子、柳川錬平、小野 聡、齋藤大蔵、高瀬凡平、酒井宏水、半田誠、武岡真司、関 修司: 人工赤血球や人工血小板などの血液代替物の開発とその将来展望. 第114回日本外科学会定期学術集会 (パネルディスカッション1-3) 2014, 京都. (日本外科学会雑誌, p168: 115, 2014)
- (8) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、土井麻実、武岡真司、齋藤大蔵、関 修司、西田育弘、半田 誠: 大量出血後の血小板減少状態下での肝外傷出血に対する H12(ADP)リポソーム投与の止血救命効果. 日本血栓止血学会第85回学術集会、山形
- (9) 萩沢康介、木下 学、西川可穂子、柳川錬平、西田育弘、関 修司、齋藤大蔵: 人工血小板を用いた重症外傷での止血制御. 第90回日本生理学会 (シンポジウム3 重度外傷と免疫・生理学—基礎から臨床まで—). 2013, 東京 (J. Physiol. Sciences. 63; S27, 2013)
- (10) 橋本麻衣、大柿滋、氏平隼人、田口和明、渡邊博志、藤山淳史、土井麻美、池田康夫、武岡真司、半田誠、小田切優樹、丸山徹、健常及び病態時における血小板代替物H12(ADP)リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響 第20回日本血液代替物学会年次大会 2013/12/6-7
- (11) 鈴木英紀、諸根信弘、武岡真司、池田康夫、半田誠: ヒト血小板と人工血小板 (H12-(ADP)リポソーム)の相互作用の形態解析. 第35回日本血栓止血学会学術集会. 2013.5.30-6.1, 山形市.

G. 知的財産権の出願・登録状況

登録 US Patent No. 7, 887, 837 “DRUG DELIVERY MATERIAL”

Ⅱ. 分担研究報告

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金
(創薬基盤推進研究事業: 政策創薬総合研究事業)
分担研究報告書

H12-(ADP)リポソームの品質管理体制の確立

分担研究者 武岡 真司 (早稲田大学 理工学術院, 教授)
研究協力者 土井 麻実 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
藤山 敦史 (早稲田大学大学院 先進理工学研究科)
大植 愛子 (早稲田大学 先進理工学部)
渡邊 麗 (早稲田大学 先進理工学部)

【研究要旨】

H12-(ADP)リポソームは、その表面にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド (H12) を結合させ、内水相に血小板凝集惹起物質である adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた血小板代替物であり、活性化血小板間を GPIIb/IIIa を介して架橋させ血小板凝集塊中で放出された ADP が血小板を活性化させて血小板凝集形成を促進する効果を有する。

本分担研究者は H12-(ADP)リポソーム試験物の製造と分担研究者への提供を担当している。本年度は、試験物の品質管理項目の拡充としてエンドトキシン試験法の確立および製造工程のスケールアップを検討した。比濁法に基づいたエンドトキシン試験法について、界面活性剤を用いた修飾を検討したところ、検量線の相関係数および添加回収率が薬局方の基準を満たしたことから、H12-(ADP)リポソームのエンドトキシン試験法を確立できた。また、クロスフロー濾過および大型エクストルージョンを利用して製造工程のスケールアップを検討し、従来法と同等の品質の H12-(ADP)リポソームを調製でき、製造工程の効率化が可能であることが示された。

A. 研究目的

リポソーム表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド (H12) を導入し、その内水相に血小板凝集惹起物質の adenosine 5'-diphosphate(ADP)を内包させた H12-(ADP)リポソームは、血小板減少病態モデル動物の出血時間を減少させることを報告してきた^{1,2)}。

分担研究者らは、H12-(ADP)リポソーム製造物の調製と分担研究者への提供を担当し

ており、平成 24 年度では試験物の製造管理項目ならびに品質管理項目を見直した。本年度 (平成 25 年度)では、品質管理項目の拡充としてエンドトキシン試験法の確立、および製造工程のスケールアップの検討を行った。また、平成 24 年度から引き続いて、リポソーム試験物の長期保存安定性試験を行った。

1) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* 7, 470-477 (2009).
2)平成 18, 19, 20 年度 政策創薬総合研究事業 研究報告書

B. 研究方法

1. エンドトキシン試験法の確立

日本薬局方に基づき濁度法によるエンドトキシン試験法を検討した。

【検量線の作成】

Control Standard Endotoxin (CSE)を注射用水で希釈して、200, 20, 2, 0.2, 0.02 EU/mLのエンドトキシン溶液を各 200 μ L 調製し、0.4 vol% の界面活性剤 C₁₂E₁₀ 溶液 800 μ L と混合した後、注射用水 3 mL を加え 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 EU/mL のエンドトキシン溶液を調製した。

【溶液 X の調製】

注射用水 45 μ L に 20mg/mL の H12-(ADP) リポソーム分散液 5 μ L に 200 μ L の C₁₂E₁₀ を加えて、42°C で 2 分間攪拌して可溶化して溶液 X を調製した。

【A 液の調製】

注射用水 900 μ L に 100 μ L の溶液 X を加え 42°C で 2 分間攪拌した。この溶液を 100 μ L とり、注射用水 900 μ L と混合して攪拌して溶液 A を調製した。

【B 液の調製】

注射用水 606 μ L に溶液 X 125 μ L と 25 EU/mL に調整した CSE 溶液 49 μ L を加え 42°C で 2 分間攪拌した。この溶液を 100 μ L とり、注射用水 1500 μ L と混合した(溶液 B、添加エンドトキシン終濃度: 0.098 EU/mL)。

【測定】

溶液 A と溶液 B、10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 EU/mL に調整したエンドトキシン溶液のそれぞれ 200 μ L ずつを LAL 試薬と混合し、トキシノメーター ET-2000 で濁度を測定した (n=2)。

【解析】

10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 EU/mL のエンドトキ

シン溶液における比濁時間 T_g 値から log (log T_g)を算出した。エンドトキシン濃度の対数を横軸、log (log T_g)を縦軸として、各エンドトキシン溶液についてグラフ上にプロットし、これら 5 つのプロットについて近似直線を描き、R² 値が 0.980 以上であることを確認した。次に、溶液 A と溶液 B における T_g 値から log (log T_g)を算出し、近似直線式からエンドトキシン値を求めた。この時、以下の式により添加回収率を算出し、リポソーム試験物のエンドトキシン試験の妥当性を検証した。

$$\text{添加回収率} = \frac{[\text{Endotoxin}]_{\text{溶液B}} - [\text{Endotoxin}]_{\text{溶液A}}}{0.098} \times 100$$

2. 微生物限度試験法の検討

粉末培地 20 g に MilliQ 500 mL を加え、攪拌し 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌した。その後、 ϕ 10 mm の培養皿 10 枚に分注し、0.2 mg/mL の H12-(ADP)リポソーム 50 μ L を塗布し、38°C で 5 日間培養し、コロニー数を計測した。

3. 調製工程のスケールアップの検討

3.1. クロスフロー濾過法による外水相 ADP の除去

クロスフロー濾過装置 (Vivaflow200、sartorius 社製) を **Figure 1** のように組み立て、①に H12-(ADP)リポソーム 27 mL を加え、60 分間クロスフロー濾過を行った。この操作では約 90 秒ごとに濾過を一時停止し、排出された濾液と等量の DPBS を①に加え、繰り返し濾過を行うことでサンプル量が常に一定となるようにした。クロスフロー濾過終了後、限外濾過チューブを用いてリポソーム 400 μ L を遠心 (20,000 g, 10

min, 4°C)し、その濾液の ADP 濃度を HPLC (Column; TSKGelODS-100 V Phase; phosphoric acid /methanol = 97/3 (v/v) (TEA 30 mM))で定量し、クロスフロー濾過後の外水相 ADP 濃度を測定した。

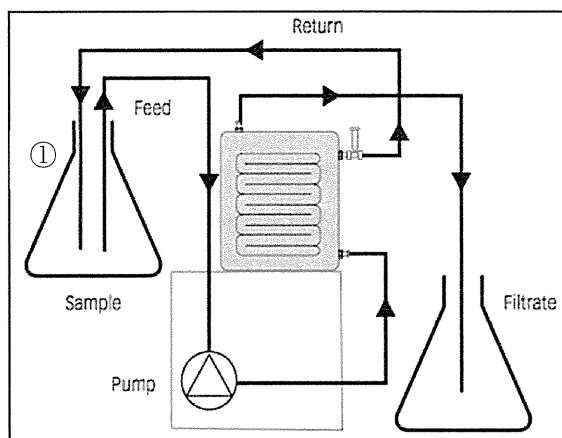


Figure 1 Scheme of Vivaflow 200.

3.2. 大型エクストルーダーを用いた粒子径制御方法の検討

H12-(ADP)リポソームの調製ではエクストルージョン法($\phi 0.45 \mu\text{m} \times 2$, $\phi 0.22 \mu\text{m} \times 3$, $\phi 0.2 \mu\text{m} \times 1$)により粒子径制御を行ってきた。本年度では、従来用いてきた小型エクストルーダー(20 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder; Nothern Lipid Inc.)と大型エクストルーダー(100 mL LIPEX™ Thermobarrel Extruder; Nothern Lipid Inc.)の処理効率を比較するため、圧力を一定にし($\phi 0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでは 1 MPa, $\phi 0.22 \mu\text{m}$, $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターでは 2 MPa)、全量が出切るまでの時間を計測した。

評価用リポソームとして、H12-(ADP)リポソームと類似の組成でH12-PEG-Glu2C18とADPを抜いたリポソーム分散液(DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE=5/4/0.9/0.03 [by mol])を用いて透過速度(mL/sec)を測定し、単位面積当たりの処理速

度 (mL/mm²/sec)を算出した。次いで、H12-(ADP)リポソーム分散液を用いて小型/大型エクストルーダーにてそれぞれ粒子径制御を行い、得られた H12-(ADP)リポソームの物性および脂質ロスを求めて比較した。

4. H12-(ADP)リポソーム分散液の保存安定性試験

H12-(ADP)リポソーム分散液(20 mg/ml)を約一年間 4°Cにて保存し、調製から約一年経過後のリポソーム試験物について、H12 担持量および ADP 漏出率の測定を行い、長期保存(冷蔵)安定性を評価した。

C. 研究結果及び考察

1. エンドトキシン試験法の確立

エンドトキシン溶液から得られた近似直線の R² 値は 0.9998 であり (Figure 2)、日本薬局方の基準 (R²>0.980)を満たした。添加回収率は 145 %であり、日本薬局方の基準値 (50~200 %)を満たした。以上より本方法は、リポソーム試験物のエンドトキシン試験が妥当であることが確認された。

また、本研究室で調製された H12-(ADP)リポソーム試験物分散液 (20 mg/mL)について、エンドトキシン濃度を測定したところ、通常のラボ環境で調製した試験物では 13.0 EU/mL であったのに対し、クリーンブース(クラス 1000)内クリーンベンチ(クラス 100)下の無菌環境で調製した試験物のエンドトキシン濃度は検出限界以下であった。

日本薬局方にしたがって、リポソーム試験物のエンドトキシン規格値を算出すると (20 mg/kg の用量でラビットの静脈投与を想定した場合)、20mg/mL 濃度の H12-(ADP)リポソームのエンドトキシン基準値は 5

EU/mL 以下と算出される。したがって、非無菌環境で調製した場合にはエンドトキシン基準値を満たさないものの、本研究レベルの無菌環境で調製されることが望ましいことが示唆された。

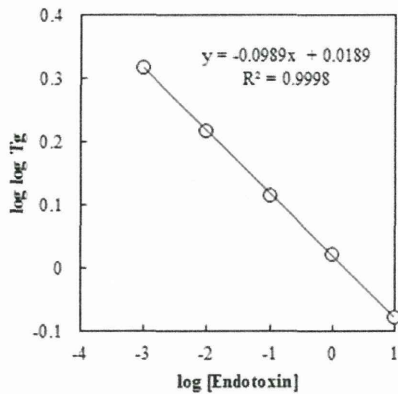


Figure 2 Calibration curve of Control Standard Endotoxin.

2. 微生物限度試験法

非無菌環境で調製された H12-(ADP)リポソーム分散液を塗布した場合のコロニー数は 92 であり (Figure 3 A)、細菌数は 1.84×10^5 /mL と算出された。他方、無菌環境で調製された H12-(ADP)リポソーム分散液を塗布した場合のコロニー数は 0 であり (Figure 3 B)、細菌数も 0 /mL であった。以上の微生物限度試験によっても、非無菌環境で調製した H12-(ADP)リポソーム分散液は、日本薬局方の定める基準 (1000 /mL) を満たさず、無菌環境で調製された H12-(ADP)リポソーム分散液は基準を満たした。

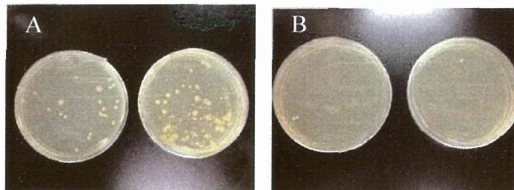


Figure 3 Bacterial colonies in H12-(ADP) liposomes. (A) Bacteria in high endotoxin sample. (B) Bacteria in low endotoxin sample.

3. 調製工程のスケールアップの検討

3.1. クロスフロー濾過法による外水相 ADP の除去

クロスフロー濾過前の外水相 ADP 濃度は 0.69 mM であったが、60 分間クロスフロー濾過後にて約 100 分の 1 の 0.88×10^{-3} mM まで減少した (Figure 4)。本研究室で調製されている H12-(ADP)リポソームの外水相 ADP 濃度の標準仕様値である 0.003 mM に達するまでに必要なクロスフロー濾過時間は本方法では 30~40 分間であることが明らかになった。

また、クロスフロー濾過による物性の変化がないことを調べるため、同ロットの H12-(ADP)リポソームを調製後、従来の精製法およびクロスフロー濾過法による精製法にて未内包 ADP を除去し、得られた試験物の物性を比較した。その結果、クロスフロー濾過法を用いた精製法は、従来の超遠心分離とゲル濾過を用いる精製法と比較して H12-(ADP)リポソームの物性に变化を与えないことが明らかとなった。クロスフロー濾過法にて製造工程をスケールアップできることが示唆された。

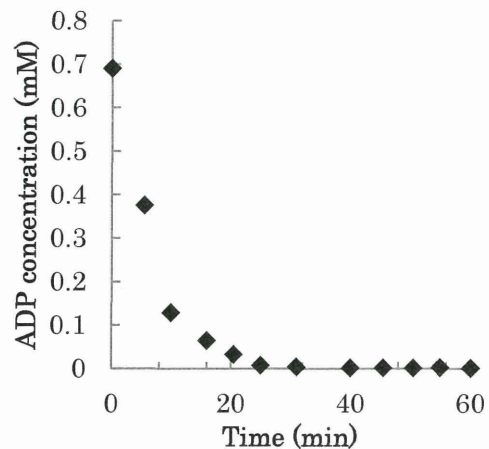


Figure 4 Change of outside ADP concentration in an H12-(ADP) liposome dispersion .

3.2. 大型エクストルーダーを用いた粒子径制御方法の検討

H12-(ADP)リポソームと類似した膜組成 (DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG-DSPE = 5/4/0.9/0.03[by mol])の評価用リポソーム試験物の透過速度 (mL/sec)と単位面積当たりの処理速度 (mL/mm²/sec)を算出した。その結果、小型エクストルーダーでは試験物 10mL で総処理時間が 3 分 26 秒、大型エクストルーダーでは試験物 20mL で 2 分 59 秒であった。両速度の比較では大型エクストルーダーの方が高くなり、粒子径制御効率が高かった (Figure 5, 6)。

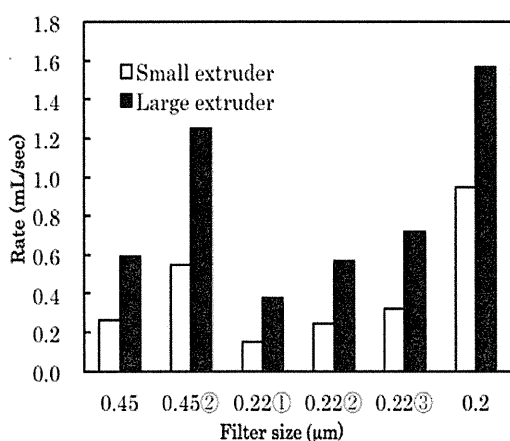


Figure 5 Effect of extruder's size on rate of extrusion.

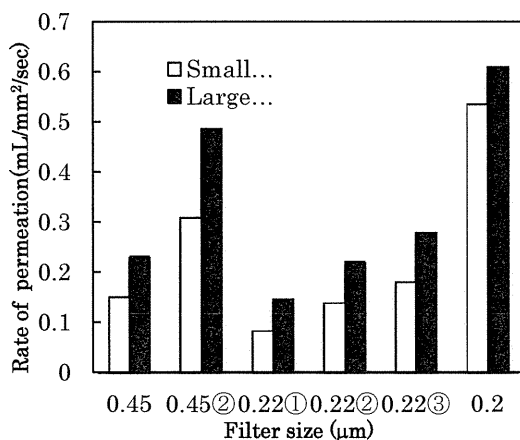


Figure 6 Effect of extruder's size on rate of permeation.

また、大型エクストルーダーにおける全フィルターでの処理時間の合計を小型エクストルーダーと比較したところ、全体の透過速度は約 2.3 倍、単位面積当たりの処理速度は約 1.6 倍となり、1 バッチ当たりの容量が 5 倍の大型エクストルーダーを用いることで粒子径制御作業全体が 11.5 倍効率化されることが示唆された。

小型/大型エクストルーダーを用いて H12-(ADP)リポソームの粒子径を制御したところ、本条件では各フィルター処理後の粒子径はほぼ等しい大きさに制御され、諸物性に違いは認められなかった。一方、脂質ロスlipid lossは小型エクストルーダーにおいてほとんど確認されなかったのに対し、大型エクストルーダーでは全脂質量の 23.5 %のロスが確認された。これはリポソーム試験物の使用量に対してフィルターの面積やエクストルーダーの容積が大きくなったため、フィルター上や内壁に残存する脂質の量が増加したためと考えられ、使用量のスケールを上げることによってロスlossは相対的に低下すると思われる。

以上の結果より大型エクストルーダーの最大容量である 100 mL 規模での H12-(ADP)リポソーム分散液の粒子径制御が可能であると思われた。

4. H12-(ADP)リポソーム分散液の保存安定性試験

H12-(ADP)リポソーム分散液を冷蔵 (4°C)で約一年間保存した。まだ十分な試験物の数で確認ができていないものの、一年経過後のリポソームの粒子径およびゼータ電位zeta potentialに大きな変化は見られなかった。また、H12 担持量および ADP 漏出率leakage rateにやや変化は