

リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の
分離定量法の開発とその応用に関する研究

大西 直角

目次

緒論	1
第1章 カラムスイッチングHPLCシステムを用いたリポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の分離定量法の開発	4
第1節 緒言	4
第2節 カラムスイッチングHPLCシステムを用いたリポソーム封入および未封入DXRの分離定量法の開発	6
第1項 DXR封入りポソームの特性評価	9
第2項 リポソーム封入および未封入DXRの分離条件の選択	9
第3項 リポソーム封入DXRの抽出条件の選択	13
第4項 リポソーム封入および未封入DXRの分析手順の設定	14
第3節 カラムスイッチングHPLCシステムを用いたリポソーム封入および未封入DXRの分離定量法の分析法バリデーション	15
第1項 特異性	15
第2項 併行精度	15
第3項 直線性	16
第4項 真度(回収率)	17
第5項 室内再現精度	17
第6項 定量限界および検出限界	18
第7項 遠心分離法によって得た薬物封入率との比較	19
第4節 SBMおよびE7107封入りポソームへの応用	20
第5節 小活	26
第2章 カラムスイッチングHPLCシステムを用いたリポソーム製剤のIN VITRO薬物放出試験法の開発	27
第1節 緒言	27
第2節 カラムスイッチングHPLCシステムを用いたDXR封入りポソームのIN VITRO薬物放出試験法の開発	27
第1項 DXR封入りポソームの特性評価	30
第2項 DXRの溶解性	30
第3項 カラムスイッチングHPLCシステムによるDXR封入りポソームのin vitro薬物放出試験法の妥当性検証	30
第3節 透析法によるDXR封入りポソームのIN VITRO薬物放出特性の評価	31
第4節 カラムスイッチングHPLCシステムによるDXR封入りポソームのIN VITRO薬物放出特性の評価	35

第5節	SBM封入りポソームへの応用	37
第6節	薬物封入特性評価法への応用	39
第7節	小活	40
第3章	カラムスイッチングHPLCシステムを用いたリポソーム製剤の特性評価	42
第1節	緒言	42
第2節	INS封入りポソームの封入状態の評価	42
第3節	小活	48
第4章	総括および考察	49
実験の部		51
略語表		58
謝辞		60
引用文献		61

緒論

創薬の難易度がますます高まるなか、医薬品の適応・剤形拡大を通じ、薬物の有用性を最大化し、患者とその家族および医療従事者の潜在的な要求に応えることは、製薬企業の使命のひとつであり、また、超高齢化社会における健康寿命向上への貢献においても、極めて重要である。その一環として、多種多様な機能を有する医薬品製剤が開発され、設計・製造技術は発展・成熟してきた [1,2,3,4,5]。一方で、さらに有効性と安全性を高めて、迅速開発・安定供給を可能にするには、それらを詳細かつ簡便に評価する分析技術の開発は必要不可欠である [6]。

バイオアベイラビリティ向上およびターゲティングを目的とした薬物送達キャリアーが多く開発され、リポソームやリピッドエマルジョン、生分解性高分子からなるナノ粒子などがその代表例である。粒子径を数百nmに調整したものは、正常組織に比べて血管透過性が著しく亢進している腫瘍組織に血管から流出しやすく、さらに、腫瘍組織ではリンパ系が発達していないために、異物として排除されず蓄積するといった特徴 (Enhanced Permeability and Retention effect: EPR効果)を持つ。そしてこれらは、バイオテクノロジーの進歩に伴い登場してきた、抗体医薬品、生理活性ペプチド、プラスミドDNAやsiRNAなどの核酸医薬品の薬物送達キャリアーとしても注目されている [7,8,9,10,11]。これらのうち、リポソームは、主成分がリン脂質やコレステロールからなる二重膜で形成される閉鎖小胞で、水溶性および脂溶性薬物のどちらも封入できる生体適合性に優れた薬物送達キャリアーである。脂質組成、荷電状態、粒子径、表面特性などを容易に変化・修飾させることができ、その体内動態を制御することができる。なかでも、リポソーム表面をポリエチレングリコール (PEG)で修飾したPEG化リポソームの注射剤は、細網内皮系のマクロファージによる捕食を回避することができ、血中滞留性が向上する [12,13,14,15,16]。その結果、抗腫瘍薬の受動的ターゲティングを目的としたキャリアーとして利用される。さらに、リポソームを注射のほか、経口、経肺、経皮、点眼など様々な投与経路で利用するための研究が盛んに行われている [17,18,19,20,21]。しかしながら、未だにリポソームを薬物送達キャリアーとして利用した医薬品は、Ambisome[®]、Doxil[®]、Visudyne[®]などに限られているのも現状である。

リポソームに封入された薬物は、標的部位に送達された後、放出され、あるいは、標的組織・細胞に取り込まれ、効果を発揮すると期待される一方で、封入されていない薬物は標的部位に送達されないばかりか、ときに副作用の原因となる。つまり、リポソーム内に封入された薬物量と封入されていない薬物量の比 (薬物封入率)やその放出挙動などは、その有効性と安全性に影響を与える一次品質であり、各極のレギュレーション上も、その管理は要求される場所である [22,23,24,25,26]。しかしながら、標準的な評価方法は存在せず、遠心分離 [27,28]や透析 [29,30]によって、封入薬物と未封入薬物を分離後、それぞれ、あるいは、その一方を、HPLCなどを用いて評価することが一般的となっている。遠心分離法においては、試料によってはリポソームと外水相の密度差がなく、分離困難になるものや、ときに、リポソーム

に封入されず表面に吸着して存在する薬物が、リポソームとともに沈殿あるいは浮遊し、あたかも封入薬物として評価されてしまうことがある。透析法においては、透析膜の分画分子量の適切な選択が必要となるうえ、試料が希釈されることは避けられず、感度の低下を招く。そして、透析膜への薬物の吸着が懸念されたり、透析が平衡に達するまでに長い時間を要したりする場合も少なくなく、不安定な薬物の場合は、正確な評価結果が得られないことがある。いずれの方法も、評価に比較的大量の試料を必要とすることも課題である。これらの理由から、遠心分離や透析による封入薬物と未封入薬物の分離定量法の確立と実際の評価操作は煩雑となり、多大な労力とコストおよび時間を要しているのが現状である。その一方で、製剤処方最適化研究においても、薬物封入率および放出特性の評価は重要で、評価法の精度、正確性、感度のほか、迅速性の向上が強く要求されている。

著者は、カラムスイッチング HPLC システムを用いて、リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の分離と評価を一体化したうえで、自動化することにより、煩雑な前処理を必要としない簡便で迅速なリポソーム封入薬物および未封入薬物の分離定量法を構築することとした。遠心分離や透析は、HPLC システムに組み込むことができない。そこで、リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物はそれぞれ、物理化学的な存在状態が異なっていることに着目し、その特性の差を利用して分離できる固相抽出 (Solid phase extraction: SPE)カラムと操作条件を網羅的に検索した。リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物量の比を変化させることなく分離できる操作条件を開発した後、さらに、両者を適切に評価できる操作条件をカラムスイッチング HPLC システムに組み込むことで、リポソームの試料溶液を注入するだけで、リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物を自動的に分離定量する方法を開発した。

第 1 章では、ドキシソルビシン (DXR)封入リポソームをモデルとして、カラムスイッチング HPLC システムを用いてリポソーム封入 DXR と未封入 DXR の分離定量法を開発後、分析法バリデーションを実施し、薬物封入率測定法としての妥当性を検証した。さらに、同一の開発手順で、サルブタモール (SBM)封入リポソームおよび E7107 封入リポソームについても、薬物封入率測定法を開発した。次に、第 2 章では、第 1 章で開発したカラムスイッチング HPLC システムによるリポソーム封入 DXR と未封入 DXR の分離定量法を基礎として、DXR 封入リポソームの *in vitro* 薬物放出試験法を設定し、それによって得た結果と、一般的に行われている透析膜による *in vitro* 薬物放出試験法によって得た結果を比較し、考察した。同様に、SBM 封入リポソームについても結果の比較および考察を加えることにより、開発したカラムスイッチング HPLC システムによるリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法の有用性について考察した。最後に、第 3 章では、開発したカラムスイッチング HPLC システムなどを用いて、脂質薄膜をインスリン (INS)溶液で水和することで調製した INS 封入リポソーム中の INS の封入状態を評価・考察することで、本法の有用性を考察した。

なお、本論文はすでに受理された下記の論文を総括したものである。

- 1) Rapid determination of the encapsulation efficiency of a liposome formulation using column-switching HPLC.

N. Ohnishi, E. Yamamoto, H. Tomida, K. Hyodo, H. Ishihara, H. Kikuchi, K. Tahara, H. Takeuchi.

Int. J. Pharm. 441 (2013) 67-74.

- 2) Characterization of a doxorubicin liposome formulation by a novel in vitro release test methodology using column-switching high-performance liquid chromatography.

N. Ohnishi, H. Tomida, Y. Ito, K. Tahara, H. Takeuchi.

Chem. Pharm. Bull. 62 (6) (2014) 538–544.

- 3) Characterization of insulin-loaded liposome using column-switching HPLC.

N. Ohnishi, S. Tanaka, K. Tahara, H. Takeuchi.

Int. J. Pharm. 479 (2015) 302-305.

第1章 カラムスイッチング HPLC システムを用いたリポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の分離定量法の開発

第1節 緒言

リポソーム製剤中の封入薬物は、標的部位に送達された後、効果を発揮することが期待される。封入されていない薬物が製剤中に存在すると、標的部位に送達されないばかりか、ときに副作用の原因となる。つまり、封入薬物量と未封入薬物量の比(薬物封入率)は、その有効性と安全性に影響を与える一次品質である。

封入薬物と未封入薬物は一般的に、遠心分離や透析によって、それらが存在する環境の密度や粒子サイズの差を利用して分離されるが、それらの分離操作は煩雑なうえ、比較的大量の試料を必要とする。さらに、遠心分離法では、試料によっては、リポソームと外水相に密度差がなく、分離困難となるものや、ときに、リポソームに封入されず表面に吸着して存在する薬物が、リポソームに付着したままで、未封入薬物として分離されず、あたかも封入薬物として評価されてしまうことがある。透析法では、試料が希釈されることが避けられず、感度の低下を招く。そして、透析膜への薬物の吸着が懸念されたり、透析が平衡に達するまでに長い時間を要したりする場合も少なくなく、不安定な薬物の場合は、正確な評価結果が得られないことがある。

DXR 封入リポソームをモデルとして、カラムスイッチング HPLC システムを用いてリポソーム封入 DXR と未封入 DXR の分離定量法を開発後、分析法バリデーションを実施し、薬物封入率測定法としての妥当性を検証した。さらに、同一の開発手順で、SBM 封入リポソームおよび E7107 封入リポソームについても、薬物封入率測定法を開発した。DXR、SBM、および、E7107 の化学構造をそれぞれ、Figure 1-1、Figure 1-2、および、Figure 1-3 に示す。

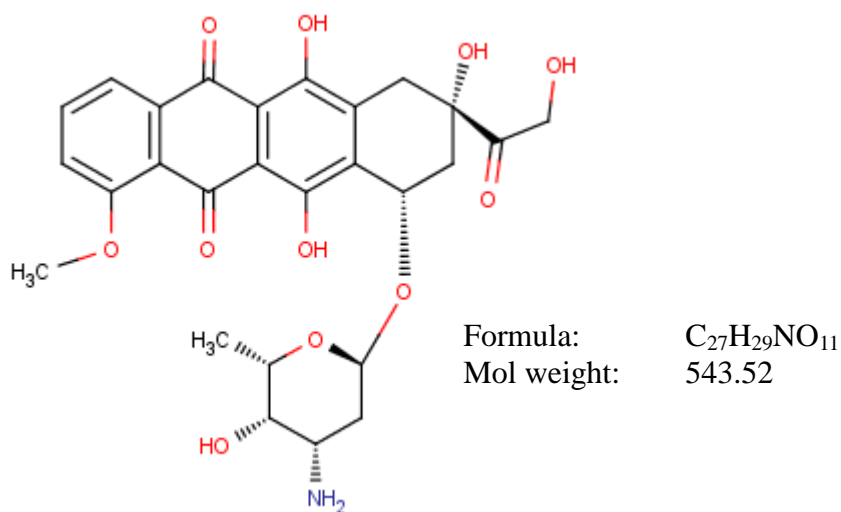


Figure 1-1. Chemical structure of doxorubicin (DXR).

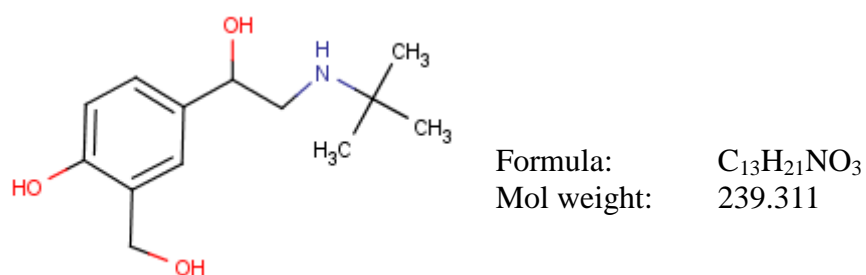


Figure 1-2. Chemical structure of salbutamol (SBM).

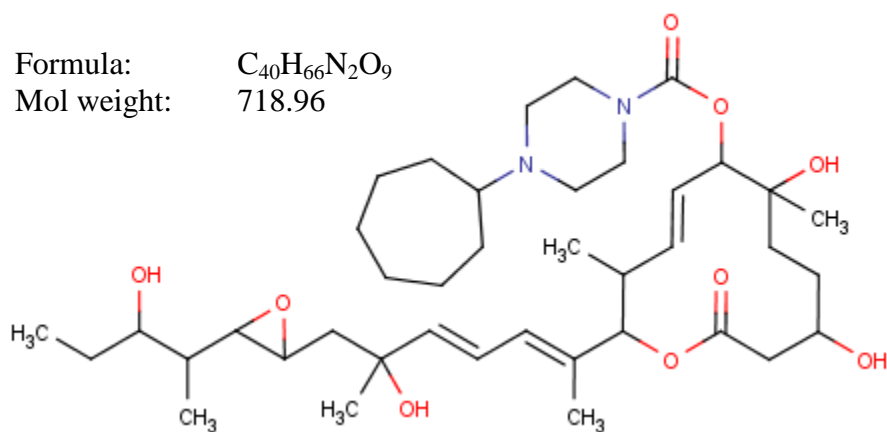


Figure 1-3. Chemical structure of E7107.

第2節 カラムスイッチング HPLC システムを用いたリポソーム封入および未封入 DXR の分離定量法の開発

リポソームに封入された薬物と未封入の薬物を分離定量するために、Figure 1-4 に示すような 2 つの 6 方バルブを備えたカラムスイッチング HPLC システムを構築した。分析手順を要約すると、(a) 分離カラムで、封入薬物と未封入薬物を分離して、抽出カラムで封入薬物をリポソーム内からすべて抽出する。その後、6 方バルブを切り替え、(b) 未封入薬物の分析、および、(c) 封入薬物の分析を連続的に行うものである。

本法において、封入薬物と未封入薬物の分離は、分離カラムの固定相との相互作用の差によることから、リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の比率を変えことなく分離を達成するためには、薬物およびリポソームの組成に応じて、分離カラムおよび移動相を適切に選択する必要がある。また、リポソームに封入された薬物は、そのままでは、HPLC システムの検出器として汎用される UV などでは正確に定量することが困難なため、すべての封入薬物をリポソームから抽出する手順の構築も必要である。Table 1-1 に示す組成の DXR 封入リポソームをモデルとして用い、構築したカラムスイッチング HPLC システムの操作条件の最適化を行った。

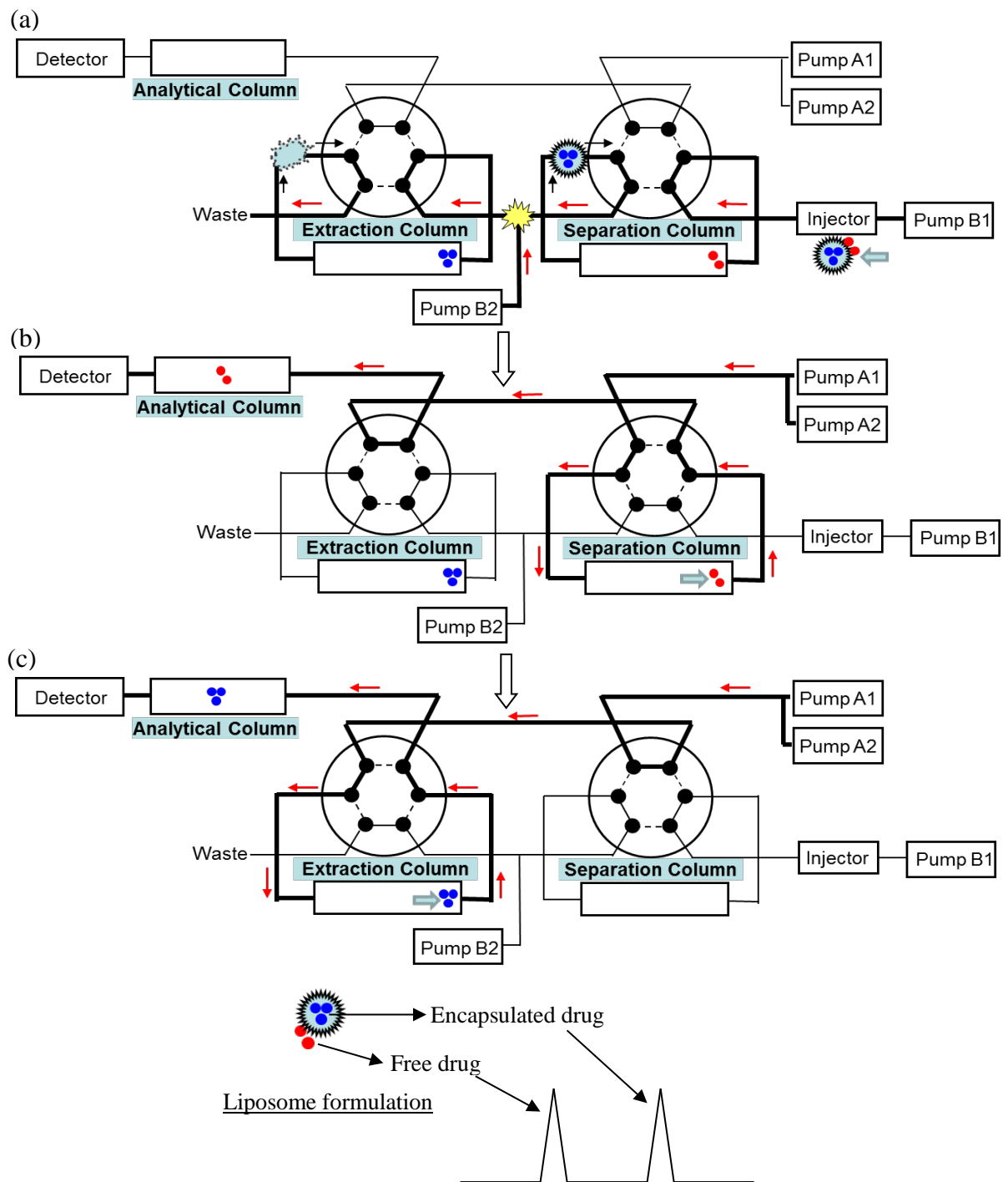


Figure 1-4. Schematic diagram of the column-switching HPLC system; (a) Separation of free and encapsulated drug and extraction of encapsulated drug from the inner phase of liposome, (b) Analysis of free drug, (c) Analysis of encapsulated drug.

Table 1-1. Formulations of DXR liposomes and the physicochemical properties.

Components	Formulation						
	A	B	C	D	E	Doxil	
DXR hydrochloride (mg/mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	
Phospholipid	HSPC (mg/mL)	9.6	9.6	–	7.6	–	9.6
	DSPC (mg/mL)	–	–	9.6	–	–	–
	EPC (mg/mL)	–	–	–	2.0	9.6	–
	Cholesterol (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
	MPEG2000-DSPE (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	–	–	3.2
	DSPE-020CN (mg/mL)	–	–	–	3.2	3.2	–
Inner phase	Ammonium sulfate (mM)	250	–	250	250	250	250
	HP- β -CyD (mM)	–	250	–	–	–	–
	Citric acid/sodium citrate	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
	pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Outer phase	Histidine (mM)	10	10	–	10	10	10
	Sucrose (mg/mL)	9	9	–	9	9	9
	Ammonium sulfate (mM)	–	–	250	–	–	–
	Citric acid/sodium citrate	–	–	q.s.	–	–	–
	pH	7.5	7.5	5.5	7.5	7.5	7.5
Mean diameter \pm SD (nm) in water	109.5 \pm 22.0	106.5 \pm 31.5	112.1 \pm 23.1	115.4 \pm 33.8	99.5 \pm 20.0	82.4 \pm 16.4	
Zeta potential \pm SD (mV) in PBS	-7.5 \pm 5.4	-2.6 \pm 3.2	-5.7 \pm 5.3	-5.6 \pm 1.3	-5.2 \pm 1.6	-7.9 \pm 4.2	

第1項 DXR 封入リポソームの特性評価

Table 1-1 にモデルとして用いた DXR 封入リポソームの組成、粒子径、および、ゼータ電位を示す。DXR 封入リポソーム A~E は、脂質薄膜を水和することであらかじめ調製したリポソームと、DXR 溶液を混合することによるリモートローティング法により調製した。

脂質組成は、リポソームの柔軟性を決定する重要な要素である。例えば、HSPC や DSPC のような長鎖アシル基をもつ飽和リン脂質は、柔軟性に欠けた不透過性のリポソーム二重膜を形成する。反対に、EPC や SPC などの天然由来の不飽和リン脂質は、透過性が高い、比較的不安定なリポソーム二重膜を形成する。また、コレステロールは、リン脂質二重膜を安定化する。つまり、Table 1-1 に示した DXR 封入リポソーム A~E は、それらの粒子径を 100 nm 程度に統一する一方で、リン脂質二重膜の柔軟性と透過性に多様性を持つように調製した。また、リポソーム A は、Doxil を模擬して調製した。

第2項 リポソーム封入および未封入 DXR の分離条件の選択

構築したカラムスイッチング HPLC システム (Figure 1-4) の分離カラムとして、Table 1-2 に示すさまざまな SPE カラムを用い、Doxil を注入したときに見積もられる未封入 DXR の量 (%) を評価した。結果を Figure 1-5 に示す。なお、試料溶液は、Doxil を水で 10 倍希釈して用いた。

比較的疎水性の高い C4、C8、および、C18 カラムを用いたとき、未封入 DXR の量は、約 95% 以上と見積もられた。これは、カラム固定相との相互作用により、リポソームに封入された DXR も意図せず抽出されたことを示唆した。一方、比較的疎水性の低い Diol、PVA、PHM、および、MC カラムを用いたとき、未封入 DXR の量は約 1% 以下と見積もられ、リポソームに封入された DXR とカラム固定相との相互作用が最小化され、封入 DXR と未封入 DXR の分離に適していると考えられた。

さらに、封入 DXR と未封入 DXR の分離における移動相の影響を調査するために、分離カラムとして、Diol あるいは C18 カラムを用い、さまざまな移動相によって Doxil の試料溶液を注入したときに見積もられる未封入 DXR の量 (%) を評価した。結果を Figure 1-6 に示す。なお、試料溶液は、Doxil を水で 10 倍希釈して用いた。

分離カラムとして、Diol カラム (Figure 1-6 (a))、移動相として、水、0.1% SDS、0.1% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 、0.1% Na_2HPO_4 、10% ACN、および、10% MeOH を用いた場合、未封入 DXR の量は約 1% 以下と見積もられた。逆に、移動相として、0.1% TFA、0.1% HClO_4 (70%)、0.1% CH_3COOH 、0.1% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、および、0.1% NaCl を用いた場合、未封入 DXR の量は約 5%~90% 以上と見積もられ、リ

ポソーム内部からの意図しない封入DXRの抽出が観察された。また、分離カラムとして、C18 カラムを用いた場合 (Figure 1-6 (b))、0.1% SDS以外のすべての移動相で、未封入DXRの量は約 90%以上と見積もられ、リポソーム内部からの意図しない封入DXRの抽出が観察された。0.1% SDSを用いたときに見積もられた未封入DXRの量 (4.5%)が、他と比べて極端に低かった詳細な原因は不明であるものの、これらの結果は、リポソーム表面とカラム固定相との疎水的相互作用によってリポソームが崩壊した後、カラム固定相上に封入DXRが抽出されることを示唆した。

封入薬物と未封入薬物の分離過程においては、リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の比率を変えることなく、未封入薬物が効果的に分離カラム固定相に保持される一方で、リポソーム表面と分離カラムの固定相との相互作用は最小化されるべきである。これまでの結果を勘案し、開発するカラムスイッチング HPLC システム (Figure 1-4)の分離過程においては、分離カラム、および、移動相としてそれぞれ、Diol カラム、および、水を選択することとした。加えて、リポソームの剛性を高め、リポソーム内部からの意図しない封入 DXR の漏出を避けるため、分離カラムの温度を低温の 10 °C に設定した。

Table 1-2. Information for the SPE columns used for column screening for separation and extraction.

ID	Brand name (Supplier)	Size			Base	Functional group
		Column (I.D.×L, mm)	Particle (μm)	Pore (nm)		
Diol	Inertsil Diol (GL Science)	4.6 × 10	5	10	Silica	Diol
PVA	MSpak GF4A (Shodex)	4.6 × 10	9	40		Polyvinyl alcohol
PHM	SB400G-4A (Shodex)	4.6 × 10	7	–		Polyhydroxymethacrylate
MC	Shim-pack MAYI-ODS (Shimadzu GLC)	4.6 × 10	50	13	Silica	Methylcellulose
C4	YMC-Pack Pro C4 (YMC)	4.0 × 23	5	12	Silica	Butyl
C8	YMC-Pack Pro C8 (YMC)	4.0 × 23	5	12	Silica	Octyl
C18	YMC-Pack Pro C18 (YMC)	4.0 × 23	5	12	Silica	Octa decyl

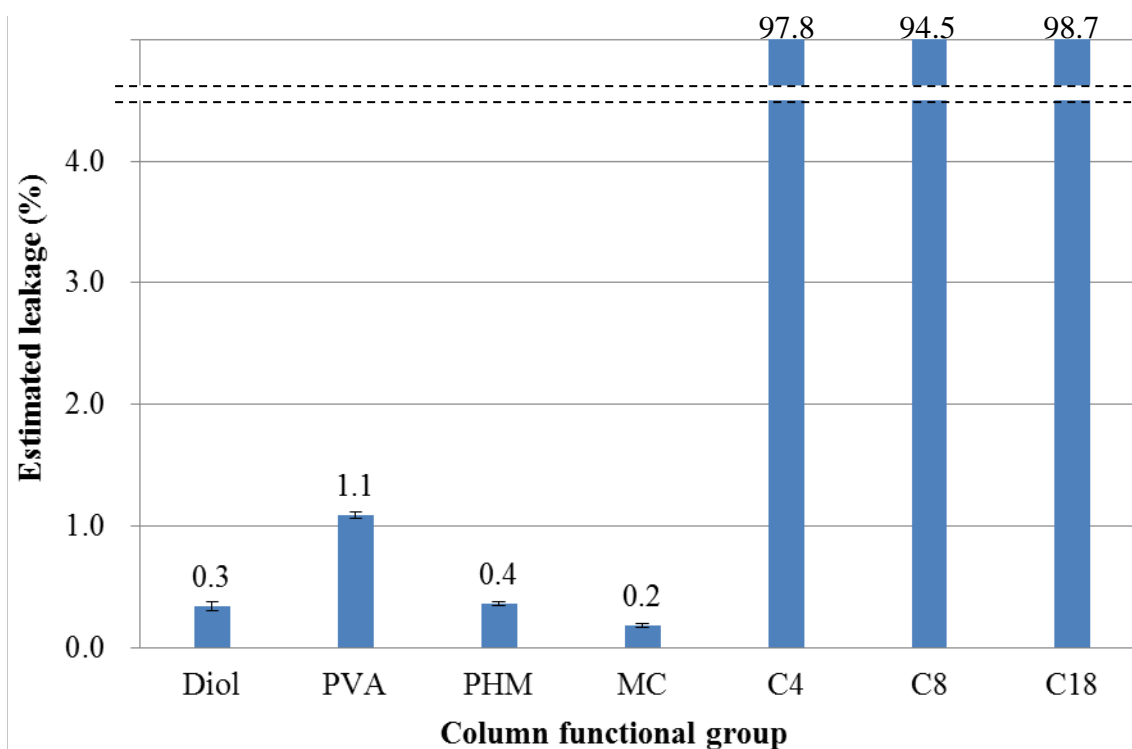


Figure 1-5. DXR leakage from Doxil estimated using various SPE columns for separation of free and encapsulated DXR. A sample suspension of Doxil was injected into the column-switching HPLC system (Figure 1-4) equipped with various SPE columns as the separation column and C18 SPE column as the extraction column. Water and a mixture of ACN, water, and $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (800:200:1, v/v/w) were used as the injection mobile phase and the extraction mobile phase, respectively. Results are means \pm SD of three experiments.

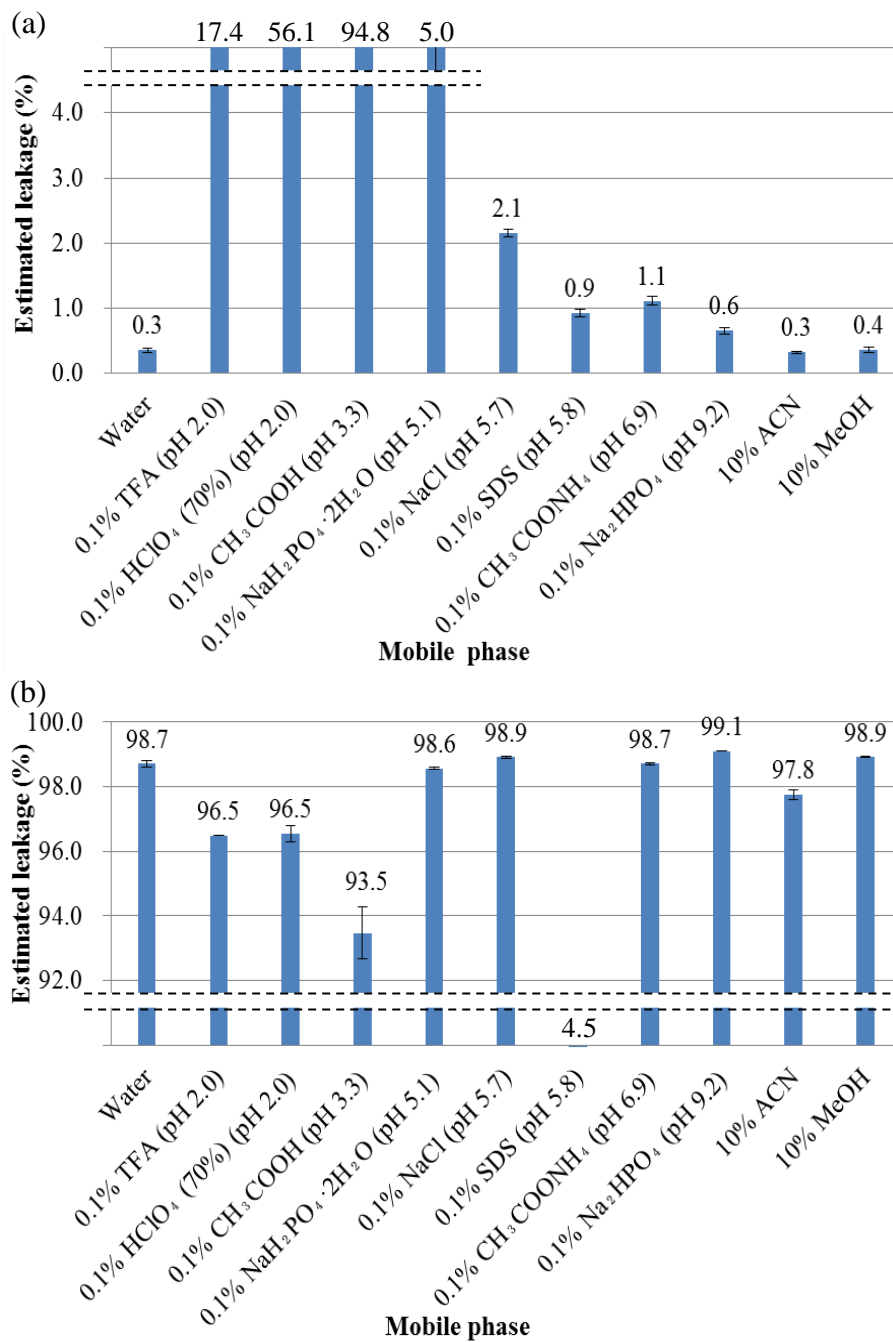


Figure 1-6. DXR leakage from Doxil estimated using various mobile phases for separation of free and encapsulated DXR. A sample suspension of Doxil was injected using various mobile phases into the column-switching HPLC system (Figure 1-4) equipped with (a) Diol SPE column or (b) C18 SPE column as the separation column and C18 SPE column as the extraction column. Results are means \pm SD of three experiments.

第3項 リポソーム封入 DXR の抽出条件の選択

第2節 第2項の結果から、リポソーム表面とカラム固定相との疎水的相互作用により、リポソームを崩壊させた後、リポソーム封入薬物をカラム固定相上に抽出可能であることが示唆された。

構築したカラムスイッチング HPLC システム (Figure 1-4)においては、抽出カラムの固定相との疎水的相互作用により、分離カラムを通過したリポソーム封入 DXR を、抽出カラム上に全量抽出することを試みた。Figure 1-5 および Figure 1-6 の結果を勘案し、抽出カラムとして C18 カラムを選択したうえで、ポンプ B2 を用いて有機溶媒 (アセトニトリル/水/酢酸アンモニウム混液, 800:200:1, v/v/w) を導入することで、リポソーム表面と、抽出カラムの固定相との疎水的相互作用を増加させ、抽出カラム上にリポソーム封入 DXR を抽出する方法を設定した。さらに、リポソームの剛性を弱め、リポソーム内部からの封入 DXR の抽出を効果的にするため、抽出カラムの温度を、DXR 封入リポソームの相転移温度以上である 55 °C に設定した。開発するカラムスイッチング HPLC システムの分離過程および抽出過程の概念図を Figure 1-7 に示す。

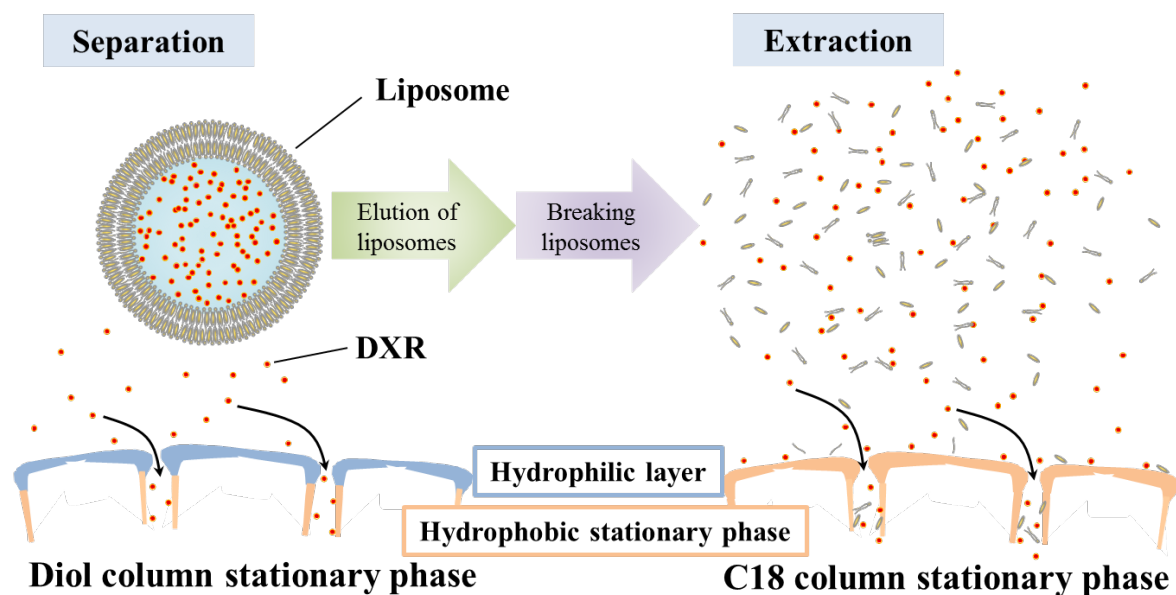


Figure 1-7. Schematic explanation of separation and extraction processes in the developed column switching HPLC system.

第4項 リポソーム封入および未封入 DXR の分析手順の設定

未封入 DXR および封入 DXR をそれぞれ、分離カラムおよび抽出カラムの固定相上に抽出した後、カラムスイッチング HPLC システム (Figure 1-4) に装備した 6 方バルブを切り替え、それぞれを順次、分析カラムに導入し、カラムヘッドで濃縮した後、グラジエント分析を行った。DXR の検出は、極大吸収波長である 235 nm で行った。

これまでの検討結果に基づき設定したカラムスイッチング HPLC システムによる DXR 封入リポソーム製剤の分析条件を Table 1-3 に示す。また、本法に従い、DXR 封入リポソーム A を分析した際の代表的クロマトグラムを Figure 1-8 に示す。未封入 DXR および封入 DXR を良好に分離定量できることが示唆された。

Table 1-3. The optimized analytical conditions of the column-switching HPLC system for DXR liposome.

Detection:	UV (Detection wavelength: 235 nm)					
Separation column:	Inertsil WP300 Diol (10 mm × 4.0 mm I.D., 5 μm) (10 °C)					
Extraction column:	YMC-Pack Pro C18 (23 mm × 4.0 mm I.D., 3 μm) (55 °C)					
Analytical column:	YMC-Pack Pro C18 (75 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm) (Ambient)					
Mobile phase						
Pump A1 and B1:	Water					
Pump A2 and B2:	A mixture of acetonitrile, water and ammonium acetate (800:200:1, v/v/w)					
Flow rate						
Total of pump A1 and A2:	1 mL/min					
Total of pump B1 and B2:	1 mL/min					
Sample concentration:	0.2 mg/mL as DXR hydrochloride					
Injection volume:	5 μL					
Program:	Linear gradient and valve position as shown below					
Time	Mobile phase (%)				Valve position	Purpose
	Pump A1	Pump A2	Pump B1	Pump B2		
0.00					Figure 1-4 (a)	Separation
2.00	80	20				
4.00						
9.00	0	100			Figure 1-4 (b)	Analysis for free DXR
12.00			80	20		
12.01						
14.00	80	20			Figure 1-4 (c)	Analysis for encapsulated DXR
16.00						
21.00	0	100				
24.00						

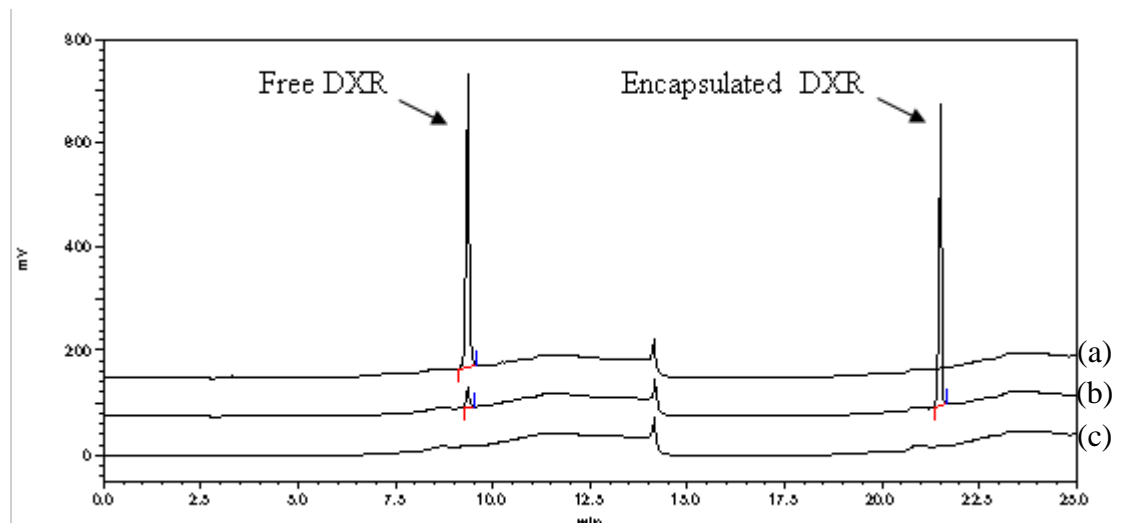


Figure 1-8. Representative chromatograms for DXR liposome formulation; (a) DXR solution (0.2 mg/mL), (b) sample suspension of DXR liposome A (0.2 mg/mL), (c) sample suspension of liposome A without DXR (blank).

第3節 カラムスイッチング HPLC システムを用いたリポソーム封入および未封入 DXR の分離定量法の分析法バリデーション

開発したカラムスイッチングHPLCによるリポソーム封入DXRと未封入DXRの分離定量法 (Table 1-3)の、薬物封入率測定法としての妥当性を検証するため、ICH Q2 (R1) [31]に従って分析法バリデーションを実施した。バリデーション項目は、特異性、併行精度、直線性、真度 (回収率)、室内再現性、定量限界、および、検出限界であった。あわせて、従来から一般的に用いられている遠心分離法によって得た薬物封入率との一致性についても検証した。Table 1-1 に示すDXR封入リポソームAをバリデーション対象試料として用いた。

第1項 特異性

特異性は、クロマトグラム上のピーク分離によって評価した。Figure 1-8 に示すように、DXR 封入リポソーム A 中の封入 DXR および未封入 DXR は良好に分離され、かつ、封入 DXR および未封入 DXR の溶出位置に測定上の妨害がなかったことから、本法の特異性に問題を認めなかった。

第2項 併行精度

DXR 封入リポソーム A を連続 6 回分析し、得られた封入 DXR および未封入 DXR のピーク面積を用い、Equation 1 に従って薬物封入率を算出した。得られた薬物封入率の平均値、標準偏差、相対標準偏差、および、標準偏差の 95%信頼区間はそれぞれ、94.2%、0.44%、0.47%、および、0.27%~0.46%であった。また、得られた封入 DXR および未封入 DXR ピークの保持時間の相対標準偏差はそれぞれ、0.01%および 0.04%であり、かつ、本分析法バリデーションを通じ

て、ピーク形状や保持時間の顕著な変化は観察されず、本法の併行精度に問題を認めなかった。

Equation 1

$$EE = \frac{E_{\text{drug}}}{T_{\text{drug}}} \times 100 = \left(1 - \frac{F_{\text{drug}}}{T_{\text{drug}}}\right) \times 100 = \left(1 - \frac{F_{\text{drug}}}{F_{\text{drug}} + E_{\text{drug}}}\right) \times 100$$

where,

EE: Encapsulation efficiency (%)

E_{drug} : Encapsulated drug in liposome formulation

T_{drug} : Total amount of drug

F_{drug} : Free (unloaded) drug in liposome formulation

第3項 直線性

直線性は、合計 4 つの回帰直線を作成し、それぞれの傾きを比較することにより評価した。DXR 封入リポソーム A 中の封入 DXR あるいは未封入 DXR それぞれについて、0.002~0.04 mg/mL (低濃度)、あるいは、0.1~0.3 mg/mL (高濃度)の範囲で、濃度に対するピーク面積の回帰直線を作成した。なお、封入 DXR に対する回帰直線の作成にあたっては、リポソーム内に封入仕切れていない DXR が分離カラム上で分離されることを避けるために、カラムスイッチング HPLC システムから分離カラムを取り除いたうえで、試料溶液を注入した。また、未封入 DXR に対する回帰直線の作成にあたっては、リポソームを含まない DXR 溶液を試料溶液として用いた。

得られたそれぞれの回帰直線の傾き、Y 切片、および、相関係数を Table 1-4 に示す。すべての回帰直線の相関係数は 0.999 以上であり、それぞれの残差プロットに系統的な偏りは認められなかった。封入 DXR の高濃度領域における回帰直線の傾きに対するそれぞれの回帰直線の傾きの比は、0.9~1.0 であった。これらの結果は、DXR 封入リポソームの薬物封入率を見積もるうえで、0.002~0.3 mg/mL の濃度範囲で本法の直線性に問題ないことを示した。

Table 1-4. Formulae of regression lines for free and encapsulated DXR in DXR liposome A ($Y = aX + b$); peak area (Y) was plotted against concentration (X).

Subjected DXR	Range (mg/mL)	Slope (a)	Y intercept (b)	Correlation coefficient (r)	Slope ratio*	
Free	Low	0.002 – 0.04	11370	-16.30	0.9993	0.9
	High	0.1 – 0.3	12580	-132.8	0.9998	1.0
Encapsulated	Low	0.002 – 0.04	11800	-5.816	0.9999	0.9
	High	0.1 – 0.3	12830	-278.7	0.9995	-

*Slope/slope for encapsulated DXR (high)

第4項 真度 (回収率)

真度 (回収率)は、DXR 封入リポソーム A の試料溶液 (0.1、0.2、および、0.3 mg/mL)から得た封入 DXR および未封入 DXR の合計ピーク面積を、対応する DXR 溶液から得た DXR のピーク面積と比較することにより評価した。結果を Table 1-5 に示す。得られた回収率は、検証した濃度水準において、99.8%～100.0%となり、良好であった。このことは、開発したカラムスイッチング HPLC システムに DXR 特異的な吸着がないこと、および、設定した抽出操作により封入 DXR を完全に抽出 (回収)できることを示した。本法の真度 (回収率)に問題を認めなかった。

Table 1-5. Recovery of DXR from DXR liposome A.

DXR in liposome sample suspension (mg/mL)	0.1	0.2	0.3
Recovery (%) (average, n=3)	99.8	100.0	99.8
RSD (%)	1.7	0.3	1.1
95% confidence interval (%)	95.7 – 103.9	99.3 – 100.6	96.9 – 102.7
		99.1 – 100.7	

第5項 室内再現精度

DXR 封入リポソーム A について、2人の試験者 (A あるいは B)が、2ロットの分離カラム (Inertsil WP300 Diol ; ロット α あるいは β)、および、2ロットの抽出カラム (YMC-Pack Pro C18 ; ロット X あるいは Y)を用いて、6日間にわたり分析 (繰り返し 3 回)し、封入 DXR および未封入 DXR のピーク面積を得て、Equation 1 に従い薬物封入率を算出した。得られた薬物封入率の一元配置による分散分析を行った結果を Table 1-6 に示す。得られた薬物封入率の平均値、室内再現精度の標準偏差、および、その 95%信頼区間はそれぞれ、96.6%、0.46%、および、0.31%～0.94%であった。本法の室内再現精度に問題を認めなかった。

Table 1-6. Intermediate precision for encapsulation efficiency (EE) of DXR liposome A.

Day (Entry)	1	2	3	4	5	6	
Operator	A	B	A	B	B	A	
Separation column	α	α	β	β	α	β	
Extraction column	X	Y	X	Y	X	Y	
EE (%)	n=1	96.7	97.1	95.8	96.1	96.7	96.9
	n=2	97.2	96.9	96.3	96.0	96.9	96.9
	n=3	97.0	96.2	96.1	96.0	96.9	96.8
Average (%)	96.6						
	Repeatability			Intermediate Precision			
SD (%)	0.25			0.46			
95% confidence interval of SD (%)	0.18 – 0.41			0.31 – 0.94			
RSD (%)	0.26			0.48			

第 6 項 定量限界および検出限界

定量限界および検出限界は、ピークの S/N 比をそれぞれ、10 あるいは 3 に外挿することで見積もることが一般的であるが、本法の場合、グラジエント分析によるベースラインドリフトの影響を無視できないため、定量限界については、所望濃度の DXR 溶液から得たピーク面積の再現性、検出限界については、所望濃度の DXR 溶液から得たピークを目視確認することにより検証した。

定量限界を検証するため、1 $\mu\text{g/mL}$ の DXR 溶液を連続 6 回分析し、得られた未封入 DXR のピーク面積の相対標準偏差を求めたところ、7.6%であった。定量限界付近で未封入 DXR ピークの評価を行う場合、DXR 封入リポソーム製剤の薬物封入率は 95%以上と見込まれる。その場合の評価にあたっては、未封入 DXR のピークは封入 DXR のピークに比べてはるかに小さく、薬物封入率の算出において、そのばらつき (相対標準偏差: 7.6%)は無視できると考えられることから、検証した 1 $\mu\text{g/mL}$ は、本法の定量限界として許容できると判断した。

検出限界を検証するため、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の DXR 溶液を分析した。得られたクロマトグラムを Figure 1-9 に示す。未封入 DXR のピークを目視で確認できたことから、検証した 0.1 $\mu\text{g/mL}$ は、本法の検出限界として許容できると判断した。

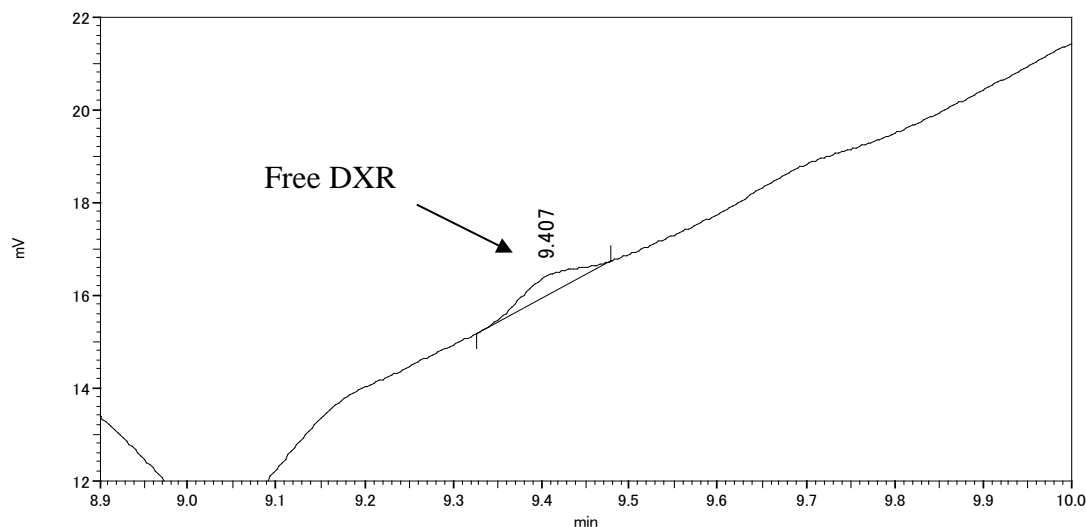


Figure 1-9. Chromatogram for confirmation of detection limit; free DXR solution (0.1 µg/mL).

第7項 遠心分離法によって得た薬物封入率との比較

開発したカラムスイッチング HPLC 法により得た薬物封入率と、従来から一般的に用いられている遠心分離法によって得た薬物封入率の一致性について検証した。Table 1-1 に示す DXR 封入リポソームを試料として用いた。両法で得た薬物封入率を Table 1-7 に示す。DXR 封入リポソーム C の薬物封入率は 50% 程度となり、他の DXR 封入リポソームのそれより低かった。これは、リポソーム内水相と外水相の pH に差がなく、リポソームの薬物封入能力が低かったことが原因と考えられた。しかしながら、いずれの DXR 封入リポソームについても、カラムスイッチング HPLC 法および遠心分離法の両法で得た薬物封入率に有意差 ($P=0.05$) はなく、良好に一致した。また、両法から得た結果のばらつきについても有意差 ($P=0.05$) はなかった。この結果は、開発したカラムスイッチング HPLC 法が、遠心分離法の代替法に成り得ることを示唆した。

Table 1-7. Comparison of encapsulation efficiencies (EE) of DXR liposomes obtained by the developed column-switching HPLC and ultracentrifugation.

Method	EE ± SD (%)					
	A	B	C	D	E	Doxil [®]
Ultracentrifugation	93.0 ± 0.25	87.5 ± 1.06	50.5 ± 2.04	95.2 ± 0.19	97.6 ± 0.32	98.6 ± 0.40
Column-switching HPLC	93.6 ± 0.14	86.5 ± 1.53	50.2 ± 0.49	94.3 ± 0.54	97.4 ± 0.06	97.7 ± 0.49

第4節 SBMおよびE7107封入リポソームへの応用

前節までに、DXR封入リポソームのカラムスイッチングHPLCシステムによる薬物封入率測定法を開発した。同一の開発手順で、SBM封入リポソームおよびE7107封入リポソームについても、カラムスイッチングHPLCシステムによる薬物封入率測定法を開発した。Table 1-8およびTable 1-9に示す組成のSBM封入リポソームおよびE7107封入リポソームについて、分析条件を最適化した。検討の結果、SBM封入リポソームおよびE7107封入リポソームに対して設定したカラムスイッチングHPLCシステムの分析条件をTable 1-10およびTable 1-11に、設定した条件で分析した際の代表的クロマトグラムをFigure 1-10およびFigure 1-11に示す。SBM封入リポソーム中の封入SBMおよび未封入SBM、および、E7107封入リポソーム中の封入E7107および未封入E7107を良好に分離できることが確認された。

Table 1-8. Formulations of SBM liposomes and their physicochemical properties.

Components	Formulation						
	F	G	H	I	J	K	
Salbutamol hemisulfate (mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Phospholipid	HSPC (mg/mL)	9.6	9.6	9.6	9.6	8.0	–
	EPC (mg/mL)	–	–	–	–	–	7.9
	Cholesterol (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	3.2	0.5	0.5
	MPEG2000-DSPE (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	3.2	–	–
Inner phase	Ammonium sulfate (mM)	250	300	–	–	120	120
	HP- β -CyD (mM)	–	–	–	250	–	–
	Sodium citrate (mM)	–	–	300	–	–	–
	Citric acid/Sodium citrate	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	–	–
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.4	5.4	
Outer phase	Phosphate buffered saline						
	NaCl (mg/mL)			8.00			
	Na ₂ HPO ₄ (mg/mL)			1.44			
	KH ₂ PO ₄ (mg/mL)			0.24			
pH			7.4				
Mean diameter \pm SD (nm) in water	118.6 \pm 20.2	164.3 \pm 57.0	169.3 \pm 50.4	103.7 \pm 30.1	140.1 \pm 42.7	123.7 \pm 23.5	
Zeta potential \pm SD (mV) in PBS	-33.6 \pm 0.72	-33.6 \pm 1.8	-32.2 \pm 2.6	-30.3 \pm 1.5	-22.2 \pm 2.3	-21.0 \pm 2.0	

Table 1-9. Formulations of E7107 liposomes and their physicochemical properties.

Components	Formulation					
	L	M	N	O	P	
E7107 (mg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Phospholipid	HSPC (mg/mL)	9.6	9.6	–	7.6	–
	DSPC (mg/mL)	–	–	9.6	–	–
	EPC (mg/mL)	–	–	–	2.0	9.6
	Cholesterol (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
	MPEG2000-DSPE (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	–	–
	DSPE-020CN (mg/mL)	–	–	–	3.2	3.2
Inner phase	Ammonium sulfate (mM)	250	–	250	250	250
	HP- β -CyD (mM)	–	250	–	–	–
	Citric acid/Sodium citrate	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
	pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Outer phase	L-histidine (mM)	10	10	–	10	10
	Sucrose (mg/mL)	9	9	–	9	9
	Ammonium sulfate (mM)	–	–	250	–	–
	pH	7.5	7.5	5.5	7.5	7.5
Mean diameter \pm SD (nm) in water	121.8 \pm 28.4	107.0 \pm 34.8	108.7 \pm 23.8	112.6 \pm 21.3	129.7 \pm 33.3	
Zeta potential \pm SD (mV) in PBS	-24.9 \pm 1.5	-12.9 \pm 3.0	-9.2 \pm 1.7	-15.0 \pm 3.7	-14.4 \pm 2.2	

Table 1-10. The optimized analytical conditions of the column-switching HPLC system for SBM liposome.

Detection:	UV (Detection wavelength: 225 nm)
Separation column:	MAYI-ODS (G) (10 mm × 4.6 mm I.D., 50 μm) (10 °C)
Extraction column:	YMC-Pack Pro C18 (23 mm × 4.0 mm I.D., 3 μm) (55 °C)
Analytical column:	YMC-Pack Pro C18 (75 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm) (Ambient)
Mobile phase	
Pump A1 and B1:	Water
Pump A2 and B2:	A mixture of acetonitrile, water and ammonium acetate (800:200:1, v/v/w)
Flow rate	
Total of pump A1 and A2:	1 mL/min
Total of pump B1 and B2:	1 mL/min
Sample concentration:	0.2 mg/mL as salbutamol hemisulfate
Injection volume:	10 μL
Program:	Linear gradient and valve position as shown below

Time	Mobile phase (%)				Valve position	Purpose
	Pump A1	Pump A2	Pump B1	Pump B2		
0.00					Figure 1-4 (a)	Separation
2.00	95	5				
4.00						
9.00	0	100			Figure 1-4 (b)	Analysis for free salbutamol
12.00			95	5		
12.01						
14.00	95	5				
16.00					Figure 1-4 (c)	Analysis for encapsulated salbutamol
21.00	0	100				
24.00						

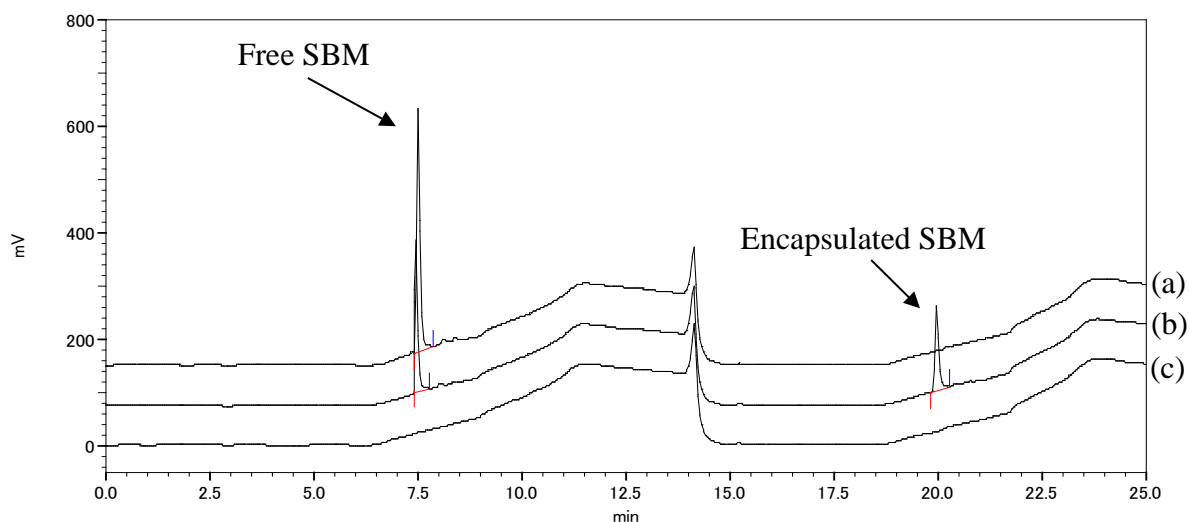


Figure 1-10. Representative chromatograms of SBM liposome obtained by the optimized column-switching HPLC method; (a) SBM solution (0.2 mg/mL), (b) sample suspension of SBM liposome E (0.2 mg/mL), (c) sample suspension of SBM liposome E without salbutamol (blank).

Table 1-11. The optimized analytical conditions of the column-switching HPLC system for E7107 liposome.

Detection:	UV (Detection wavelength: 241 nm)
Separation column:	Inertsil WP300 Diol (10 mm × 4.0 mm I.D., 5 μm) (10 °C)
Extraction column:	YMC-Pack Pro C18 (23 mm × 4.0 mm I.D., 3 μm) (55 °C)
Analytical column:	YMC-Pack Pro C18 (75 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm) (Ambient)
Mobile phase	
Pump A1 and B1:	Water
Pump A2 and B2:	A mixture of acetonitrile, water and ammonium acetate (800:200:1, v/v/w)
Flow rate	
Total of pump A1 and A2:	1 mL/min
Total of pump B1 and B2:	1 mL/min
Sample concentration:	0.1 mg/mL as E7107
Injection volume:	10 μL
Program:	Linear gradient and valve position as shown below

Time	Mobile phase (%)				Valve position	Purpose
	Pump A1	Pump A2	Pump B1	Pump B2		
0.00					Figure 1-4 (a)	Separation
2.00	80	20				
4.00						
9.00	0	100			Figure 1-4 (b)	Analysis for free E7107
12.00			80	20		
12.01						
14.00	80	20				
16.00						
21.00	0	100			Figure 1-4 (c)	Analysis for encapsulated E7107
24.00						

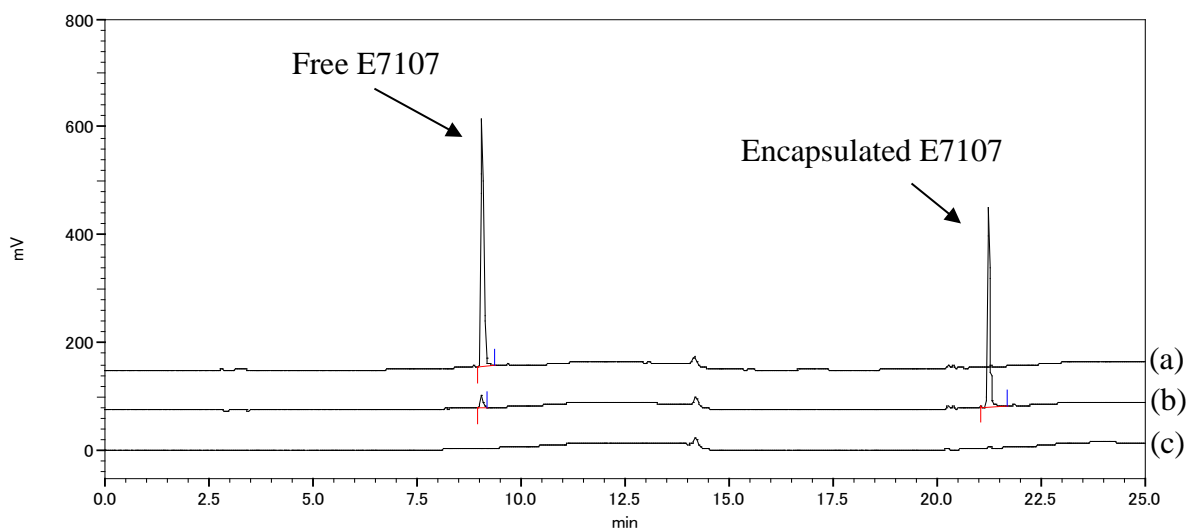


Figure 1-11. Representative chromatograms of E7107 liposome obtained by the optimized column-switching HPLC method; (a) E7107 solution (0.1 mg/mL), (b) sample suspension of E7107 liposome J (0.1 mg/mL), (c) sample suspension of E7107 liposome J without E7107 (blank).

続いて、開発したカラムスイッチング HPLC 法により得た薬物封入率と遠心分離法によって得た薬物封入率の一致性について検証した。Table 1-8 および Table 1-9 に示した SBM 封入リポソームおよび E7107 封入リポソームを試料として用いた。両法で得た薬物封入率を Table 1-12 および Table 1-13 に示す。いずれの SBM 封入リポソームおよび E7107 封入リポソームについても、カラムスイッチング HPLC 法および遠心分離法の両法で得た薬物封入率に有意差 ($P=0.05$) はなく、良好に一致した。また、両法から得た結果のばらつきについても有意差 ($P=0.05$) はなかった。この結果は、開発したカラムスイッチング HPLC 法が、遠心分離法の代替法に成り得ることを示唆するとともに、他の薬物を封入したリポソーム製剤についても、本章で行ったような一定の分析条件の最適化検討により、カラムスイッチング HPLC システムによる薬物封入率測定法を開発することができる可能性を示唆した。

Table 1-12. Comparison of encapsulation efficiencies (EE) of SBM liposomes obtained by the developed column-switching HPLC and ultracentrifugation.

Method	EE \pm SD (%)					
	F	G	H	I	J	K
Ultracentrifugation	26.1 \pm 0.67	36.2 \pm 0.83	16.3 \pm 0.43	34.4 \pm 0.38	38.4 \pm 0.47	29.6 \pm 0.48
Column-switching HPLC	23.9 \pm 0.14	34.8 \pm 0.61	16.0 \pm 0.50	32.0 \pm 1.47	37.4 \pm 0.57	30.7 \pm 0.90

Table 1-13. Comparison of encapsulation efficiencies (EE) of E7107 liposomes obtained by the developed column-switching HPLC and ultracentrifugation.

Method	EE \pm SD (%)				
	L	M	N	O	P
Ultracentrifugation	94.8 \pm 0.05	94.3 \pm 0.51	36.4 \pm 1.61	94.5 \pm 0.23	95.5 \pm 1.22
Column-switching HPLC	95.3 \pm 0.26	94.9 \pm 0.23	40.2 \pm 0.40	95.6 \pm 0.10	94.7 \pm 0.57

第5節 小活

DXR 封入リポソームをモデル製剤として、カラムスイッチング HPLC システムを用いてリポソーム製剤の封入薬物と未封入薬物の分離定量法を開発した。その後、分析法バリデーションを実施することで、リポソーム製剤の薬物封入率測定法としての妥当性を確認した。また、SBM および E7107 封入リポソームについても応用可能であることを確認した。本法の開発において以下の知見を得た。

- 1) SPE カラムおよび移動相などの分離条件を最適化することにより、リポソーム未封入薬物をカラム固定相に抽出する一方、封入薬物をカラム固定相と相互作用させることなく溶出させることができ、両者を適切に分離できることが判明した(分離過程)。
- 2) 疎水的相互作用により、リポソームを崩壊させた後、封入薬物をカラム固定相に完全抽出できることが判明した(抽出過程)。
- 3) 上記の分離および抽出過程を、Figure 1-4 に示すようなカラムスイッチング HPLC システムで連続させ、薬物の分析過程と組み合わせることで、リポソーム製剤の封入薬物と未封入薬物の分離定量法を確立でき、薬物封入率測定法として応用可能であった。

以上より、構築したカラムスイッチング HPLC システムは、一般的に用いられている遠心分離による薬物封入率測定法の代替法となり、大量の試料や煩雑な前処理操作を必要としない、試料溶液を注入するだけのリポソーム製剤の薬物封入率測定法を提供できることが示された。本法の迅速性、簡便性を勘案すると、市販後の品質管理法に加え、開発段階におけるリポソーム製剤の処方および製法開発のための評価法としても有用であると考えられる。

第2章 カラムスイッチング HPLC システムを用いたリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法の開発

第1節 緒言

リポソーム製剤中の封入薬物は、標的部位に送達された後、放出されて初めてその効果を発揮すると期待される。血中等に投与され、目的部位に到達するまでに内封した薬物が放出されてしまえば、期待した効果が減少することに繋がる。そればかりか、放出された薬物による副作用も懸念される。従って、リポソーム製剤の開発においては、リポソーム製剤からの薬物放出特性を様々な条件で詳細かつ正確に評価し、把握、管理することは、有効性および安全性確保の観点から極めて重要である。

リポソーム製剤の薬物放出特性の評価は、リポソーム製剤を各種溶媒に分散し、攪拌した後、規定時間でサンプリングを行い、封入薬物と放出 (未封入)薬物を遠心分離で分離して評価したり、各種溶媒に浸した透析膜の内側あるいは外側にリポソーム製剤を分散させ、攪拌した後、分離された放出 (未封入)薬物を評価したりする方法が一般的である。しかし、サンプリング後の遠心分離による分離は、操作が煩雑となるうえ、比較的大量の試料を必要とする。さらに、分離操作中に薬物の放出が進行したり、薬物が不安定であったりする場合は、正確にその放出特性を評価することができないことがある。透析膜による薬物放出特性の評価においては、透析膜の薬物透過速度は、透析膜内外の薬物濃度差であったり、薬物分子量と透析膜の分画分子量 (Molecular weight cut off: MWCO) の関係に強く依存したりする結果、リポソームからの薬物放出特性ではなく、薬物の透析膜透過特性を評価してしまう懸念がある。特に、リポソームからの放出が速い場合は、その懸念が強くなる。

第1章で開発したカラムスイッチング HPLC システムを基礎として、リポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法を開発した。モデル製剤として、DXR 封入リポソームを用い、開発したカラムスイッチング HPLC システムによる薬物放出試験法によって得た結果と従来から一般的に用いられている透析膜による薬物放出試験法によって得た結果を比較し、本法の優位性を考察した。さらに、SBM 封入リポソームについても、両薬物放出試験法によって得た結果の差を考察した。また、開発したカラムスイッチング HPLC システムをリポソーム製剤の薬物封入特性評価法として応用することにより、DXR 封入リポソームの薬物封入特性も評価した。

第2節 カラムスイッチング HPLC システムを用いた DXR 封入リポソームの *in vitro* 薬物放出試験法の開発

開発したリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法は、第1章で開発したカラムスイッチング HPLC システムによるリポソーム封入薬物と未封入薬物の分離定量法 (Figure 1-4) を基礎としている。本法および透析膜による薬物放出試験法の概要

を Figure 2-12 に示す。開発したカラムスイッチング HPLC システムによる *in vitro* 薬物放出試験法において、リポソーム製剤は各種溶媒に分散、攪拌された後、規定時間でカラムスイッチング HPLC システムに直接注入され、封入薬物と放出(未封入)薬物が分離される。その比率から、薬物放出率を算出する。

検討には、Table 2-14 に示す組成の DXR 封入リポソームをモデルとして用いた。HSPC ストックリポソームは、薬物封入特性の評価法への応用検討に使用した。

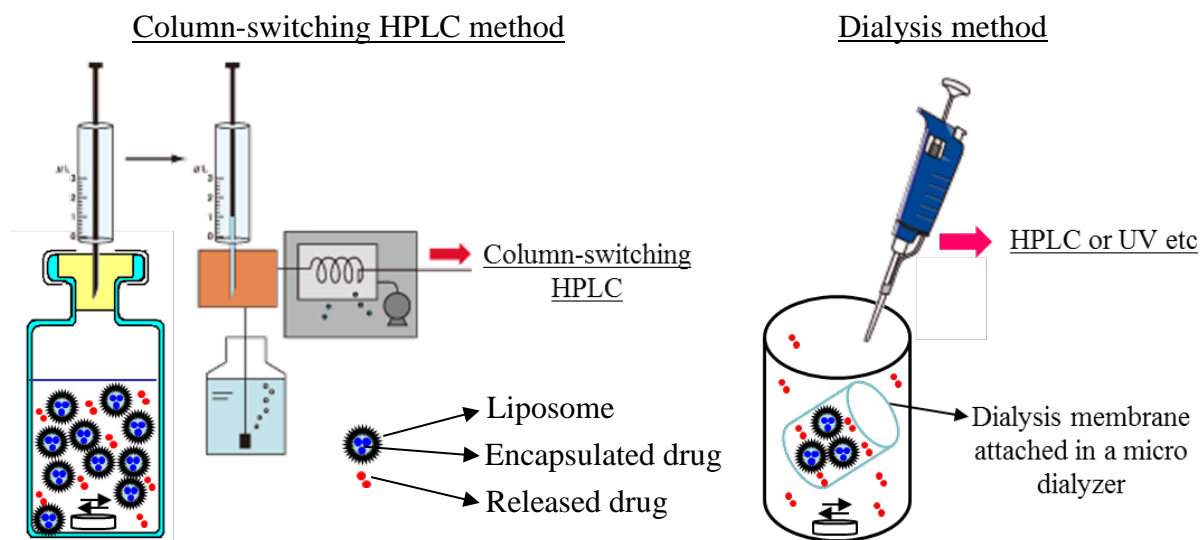


Figure 2-12. Schematic overviews of the developed *in vitro* drug release test methodology by the column-switching HPLC and a conventional *in vitro* drug release test methodology by dialysis.

Table 2-14. Formulations of DXR liposomes and their physicochemical properties.

Components	Formulation				
	EPC	EPC+HSPC	Doxil [®]	HSPC stock liposome	
Doxorubicin HCl (mg/mL)	2.0	2.0	2.0	-	
Phospholipid	HSPC (mg/mL)	-	7.6	24	
	EPC (mg/mL)	9.6	2.0	-	
	Cholesterol (mg/mL)	3.2	3.2	3.2	8
	MPEG2000-DSPE (mg/mL)	-	-	3.2	8
	DSPE-020CN (mg/mL)	3.2	3.2	-	-
Inner phase	Ammonium sulfate (mM)	250	250	250	
	Citric acid/Sodium citrate	q.s.	q.s.	q.s.	
	pH	5.5	5.5	5.5	
Outer phase	Histidine (mM)	10	10	10	
	Sucrose (mg/mL)	9	9	9	
	pH	7.5	7.5	7.5	
Encapsulation efficiency ± SD (%)		97.4 ± 0.06	94.3 ± 0.54	97.7 ± 0.49	-
Mean diameter (nm) (polydispersity index)	in 0.1 mol/L HCl	98.4 (0.077)	104.6 (0.066)	83.4 (0.116)	-
	in PBS	137.7 (0.272)	138.9 (0.253)	136.6 (0.267)	-
Zeta potential ± SD (mV) in PBS		-5.2 ± 1.6	-5.6 ± 1.3	-7.9 ± 4.2	-

第1項 DXR 封入リポソームの特性評価

Table 2-14 にモデルとして用いた DXR 封入リポソームの組成、第1章で開発したカラムスイッチング HPLC 法で測定した薬物封入率、粒子径、およびゼータ電位を示す。DXR 封入リポソーム EPC および EPC+HSPC は、脂質薄膜を水和することであらかじめ調製したリポソームと、DXR 溶液を混合することによるリモートローディング法で DXR を封入し、調製した。

リン脂質組成は、第1章でモデルとして使用した DXR 封入リポソームと同様に、リン脂質二重膜の柔軟性と透過性に多様性を持たせ、その薬物放出特性が違いを持つように選択した。いずれのリポソームも薬物封入率が 90% 以上で、薬物放出特性評価法の開発に用いる試料として適切であった。粒子径は、0.1 mol/L 塩酸中で測定した場合、100 nm 前後であったが、PBS 中で測定した場合、わずかに大きくなった。これは、DXR がリン酸イオン (PO_4^{3-}) と複合体を形成したことによると考えられた [32,33]。DXR 封入リポソームを PBS 中に高濃度で分散させた際に、粘性の高い分散体に変化したことも、それを支持した。ゼータ電位は、いずれの試料も PBS 中で負電荷を示した。

第2項 DXR の溶解性

37 °C における DXR の 0.1 mol/L 塩酸中および PBS 中での溶解度を調査したところ、DXR 塩酸塩として、0.1 mol/L 塩酸中で、20 mg/mL 以上、PBS 中で、17.3 mg/mL (繰り返し 3 回の平均値) であった。つまり、後述する透析法およびカラムスイッチング HPLC システムによる DXR 封入リポソームの *in vitro* 薬物放出特性の評価においては、いずれもシンク条件を満たしていることが確認された。

第3項 カラムスイッチング HPLC システムによる DXR 封入リポソームの *in vitro* 薬物放出試験法の妥当性検証

本法の基礎となるカラムスイッチング HPLC システムによるリポソーム封入 DXR と未封入 DXR の分離定量法 (Table 1-3) は、第1章において、その妥当性が確認されているが、対象となる DXR 封入リポソーム EPC および EPC+HSPC のリン脂質組成は、測定法の妥当性の検証に使用した試料 (Table 1-1; DXR 封入リポソーム A) の組成と異なるため、リン脂質組成の差が影響を与える可能性が最も高い評価項目である真度 (回収率) について、追加検証した。真度 (回収率) は、DXR 封入リポソーム EPC あるいは EPC+HSPC の試料溶液 (0.2 mg/mL) から得た封入 DXR および未封入 DXR の合計ピーク面積を、対応する DXR 溶液から得た DXR のピーク面積と比較することにより評価した。回収率の結果 (平均 ± 標準偏差, n=3) は、DXR 封入リポソーム EPC の場合、100.2% ± 1.5%、EPC+HSPC の場合、101.2% ± 2.0% であった。この結果は、開発したカラムスイッチング HPLC システムに DXR の特異的吸着がないこと、および、設定し

た抽出操作により、対象となる DXR 封入リポソーム EPC および EPC+HSPC から封入 DXR を完全に抽出 (回収) できることを示した。

第 3 節 透析法による DXR 封入リポソームの *in vitro* 薬物放出特性の評価

DXR 封入リポソーム EPC、EPC+HSPC、および、Doxil の *in vitro* 薬物放出特性を、透析法 (透析膜: CelluSep F1; MWCO: 3.5 kDa、温度: 37 °C、回転子回転速度: 350 rpm) により、0.1 mol/L 塩酸中および PBS 中で評価した。また、DXR の透析膜透過速度を見積もるため、DXR 溶液 (2 mg/mL) についても、同様に評価した。得られた結果を Figure 2-13 に示す。

リポソームからの DXR の放出速度は、0.1 mol/L 塩酸中および PBS 中のいずれにおいても、EPC > EPC+HSPC > Doxil と見積もられた。これは、DXR 封入リポソームのリン脂質二重膜の柔軟性と透過性を反映した結果であった。また、0.1 mol/L 塩酸中における DXR の放出速度は、PBS 中のそれよりも速かった。しかしながら、DXR 溶液でさえも、透析膜を介した DXR の漏出が、0.1 mol/L 塩酸中で完了、あるいは、PBS 中で頭打ちに達するまでに約 6 時間を要した。薬物の透析は、透析膜内外の溶液中の薬物濃度に依存し、温度、粘度、および、分散媒の攪拌強度にも影響を受ける。PBS 中では、DXR が粘性の高い分散体に変化したことを考慮すると、PBS 中で観察された DXR の不完全な放出は、0.1 mol/L 塩酸中に比べて低い PBS 中の溶解度だけに依存するのではなく、PBS 中での低い流動性 (不十分な攪拌強度) によっても引き起こされた可能性があると考えられた。そこで、攪拌強度の影響を調査するため、回転子の回転速度を 200、350、あるいは、800 rpm に変更し、DXR 溶液を用いて、透析膜を通した DXR の漏出特性を PBS 中で評価した。結果を Figure 2-14 に示す。回転子の回転速度を 800 rpm とした場合でも、PBS 中においては、DXR の完全漏出は達成されなかった。200 rpm の場合では、他と比べて、DXR の漏出速度がわずかに遅くなる傾向があったものの、350 rpm の場合と 800 rpm の場合の間に、DXR の漏出プロファイル上の顕著な差は認められなかった。一方、800 rpm の場合には、わずかながら DXR の漏出プロファイルのばらつきが大きくなった。これは、激しい攪拌によって発生した気泡が原因となって生じたと考えられた。それゆえ、Figure 2-13 の薬物放出プロファイル取得のために選択した 350 rpm の回転速度は、本透析法で達成できる最適な攪拌条件であったと考えられた。

これらの結果を勘案すると、本透析法においては、最大 6 時間程度の DXR の透析膜透過遅延が存在することから、本透析法によって得たリポソームからの DXR 放出プロファイルは、リポソームからの DXR の放出と、DXR の透析膜透過の二段階で構成されると考えられた。つまり、透析法だけで、リポソーム製剤の薬物放出特性を完全に評価・理解することは困難であることが示唆された。特に、リポソームからの薬物放出が極めて速い場合は、薬物の透析膜透過が律速となり、その放出プロファイルは、薬物の透析膜透過プロファイルそのものになってしまう

可能性が高くなる。したがって、透析法でリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法を確立する際は、リポソーム封入薬物と放出 (未封入) 薬物を適切に分離する一方で、放出薬物の透析膜の透過速度を最大化するべきである。薬物の透析膜透過速度は、薬物の分子サイズと相関があり、一般的に、薬物の分子量に逆比例する。分子サイズが透析膜の MWCO に近づくとつれ、透析膜の薬物透過は部分的あるいは完全に制限される。つまり、透析膜の MWCO も重要な選択因子である。DXR の透析膜透過に与える MWCO の影響を調査するため、透析膜として、CelluSep F1 (MWCO: 3.5 kDa)、および、F2 (MWCO: 12–14 kDa) を用いて、DXR 溶液および Doxil からの DXR の放出特性を評価した。結果を Figure 2-15 に示す。0.1 mol/L 塩酸中においては (Figure 2-15 (a))、透析膜の MWCO に関係なく、DXR 溶液でさえも、透析膜を介した DXR の完全漏出までに約 6 時間を要した。一方、Doxil からの DXR の放出も、透析膜の MWCO に関係なく、24 時間後においても 5% 以下であった。PBS 中においては (Figure 2-15 (b))、24 時間後までの DXR 溶液からの透析膜を介した DXR の漏出特性に、わずかな差が認められたものの、透析膜の MWCO に関係なく、DXR の漏出が頭打ちになるまでには、0.1 mol/L 塩酸中の場合と同様に、約 6 時間を要した。PBS 中での Doxil からの DXR の放出特性も、0.1 mol/L 塩酸中の場合と同様に、透析膜の MWCO に関係なく、24 時間後においても 5% 以下であった。結果として、Figure 2-13 の薬物放出プロファイル取得のために選択した透析膜の MWCO (3.5 kDa) は、本透析法において、適切な範囲内であったと考えられた。

これまでの検討結果を考慮して、評価に用いた透析によるリポソーム製剤の薬物放出特性評価法は、達成できる範囲で適切な条件であったと判断した。

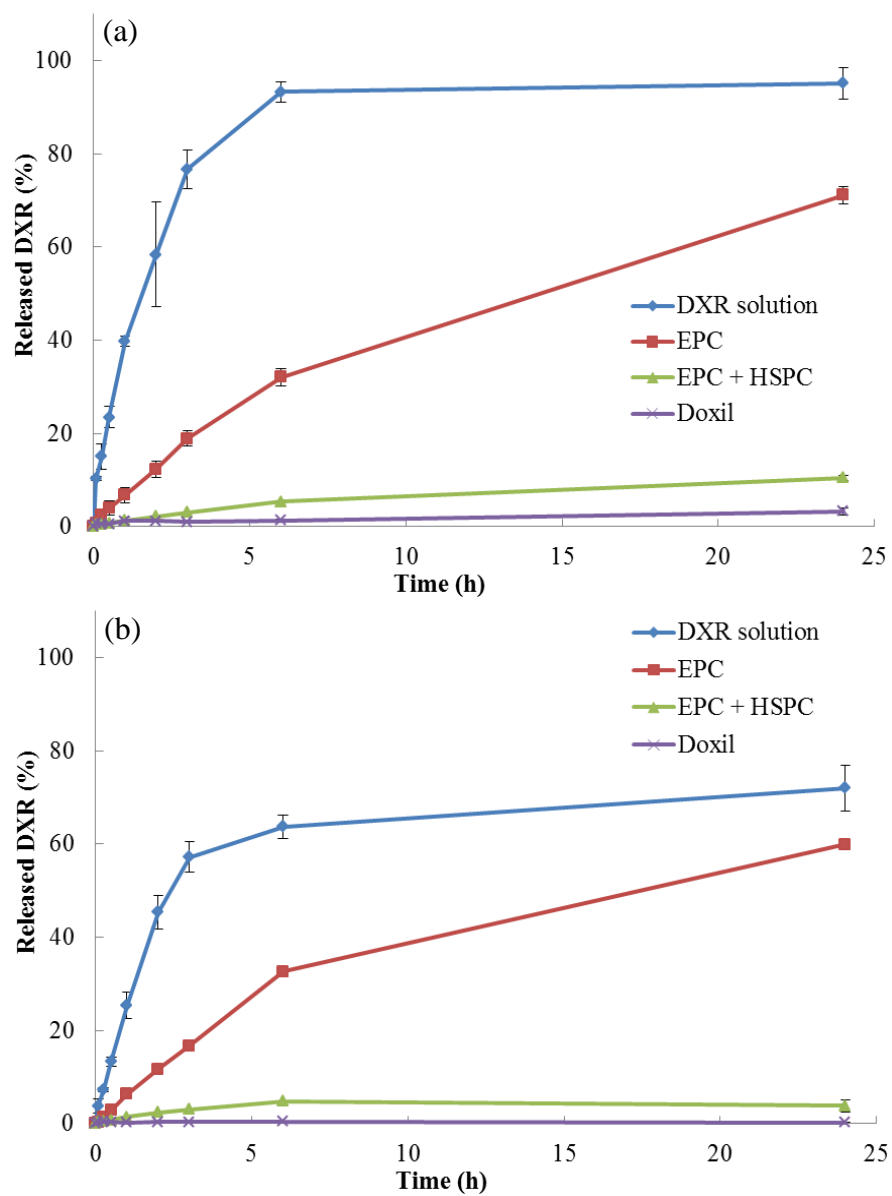


Figure 2-13. The in vitro drug release profiles of the DXR liposomes by dialysis in (a) 0.1 mol/L HCl and (b) PBS (pH 7.4). CelluSep F1 (MWCO: 3.5 kDa) was used as the dialysis membrane. Data are represented as mean \pm S.D. of three experiments.

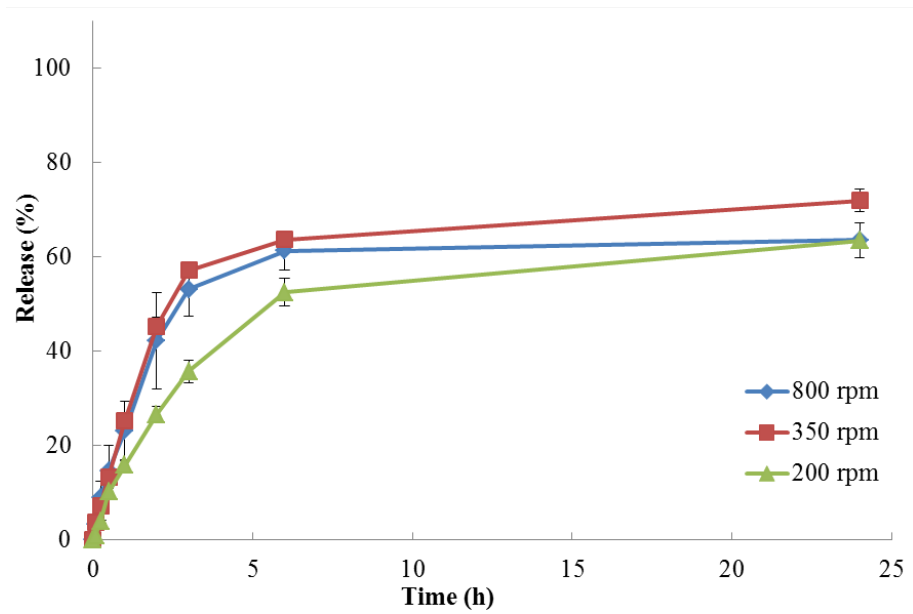


Figure 2-14. Influence of agitation speed on the in vitro drug release profiles of DXR solution in PBS (pH 7.4) by dialysis. CelluSep F1 (MWCO: 3.5 kDa) was used as the dialysis membrane. Data are represented as mean \pm S.D. of three experiments.

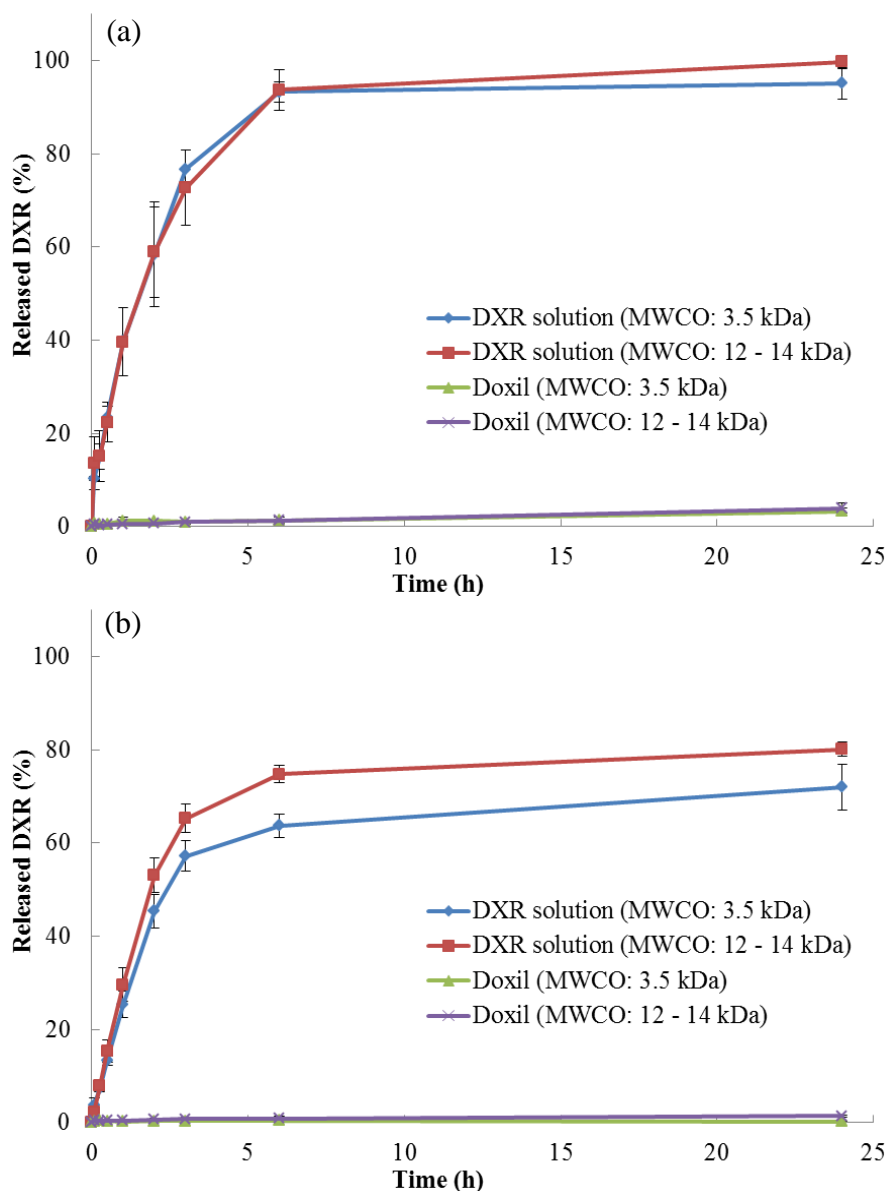


Figure 2-15. Influence of MWCO on the in vitro drug release profiles by dialysis (a) in 0.1 mol/L HCl and (b) in PBS (pH 7.4). Data are represented as mean \pm S.D. of three experiments.

第4節 カラムスイッチング HPLC システムによる DXR 封入リポソームの in vitro 薬物放出特性の評価

開発したカラムスイッチング HPLC 法により、0.1 mol/L 塩酸中および PBS 中における、DXR 封入リポソーム EPC、EPC+HSPC、および、Doxil の in vitro 薬物放出特性を評価した。得られた結果を Figure 2-16 に示す。

いずれのリポソームも、DXR を素早く放出し、5 分以内には、ほぼ頭打ちに達

した。DXR の放出の程度は、DXR 封入リポソームのリン脂質二重膜の柔軟性と透過性を反映し、0.1 mol/L 塩酸中および PBS 中のいずれにおいても、EPC > EPC+HSPC > Doxil となった。また、0.1 mol/L 塩酸中における DXR の放出の程度は、PBS 中よりも大きくなった。これらは、透析法によって得た関係性と同じであった。

カラムスイッチング HPLC 法により得たリポソームからの DXR の放出特性の関係性は、透析法により得た関係性と一致したものの、両法によって得た DXR 放出プロファイルそのものの違いは明らかであった。カラムスイッチング HPLC 法によって得たリポソームからの DXR の放出特性は、0.1 mol/L 塩酸中および PBS 中のいずれにおいても、放出速度そのものには、顕著な差を認めなかったものの (5 分以内に頭打ち)、その DXR の放出の程度には、明らかな違いがあった。カラムスイッチング HPLC 法には、リポソームからの DXR の放出以外に律速となる過程が存在しないことから、これらの結果は、DXR 封入リポソームの新たな *in vitro* 薬物放出プロファイルを明らかにしたと考えられた。つまり、透析法によって観察されたリポソームからの DXR の放出特性の差は、分散媒の pH に起因した DXR の放出平衡の差によって引き起こされた可能性があると考えられた。

また、カラムスイッチング法と透析法で得た 24 時間後の DXR 放出率には、顕著な差が認められた。これは、透析法における透析膜の薬物透過可能面積 (0.8 cm^2) が限られていたことや、十分な攪拌強度が透析膜内にまで伝わりにくかったことで、DXR および分散媒の透析膜を通じる十分な拡散が達成できなかったことが原因であると考えられたが、これらは、透析法の本質的な課題のひとつである。

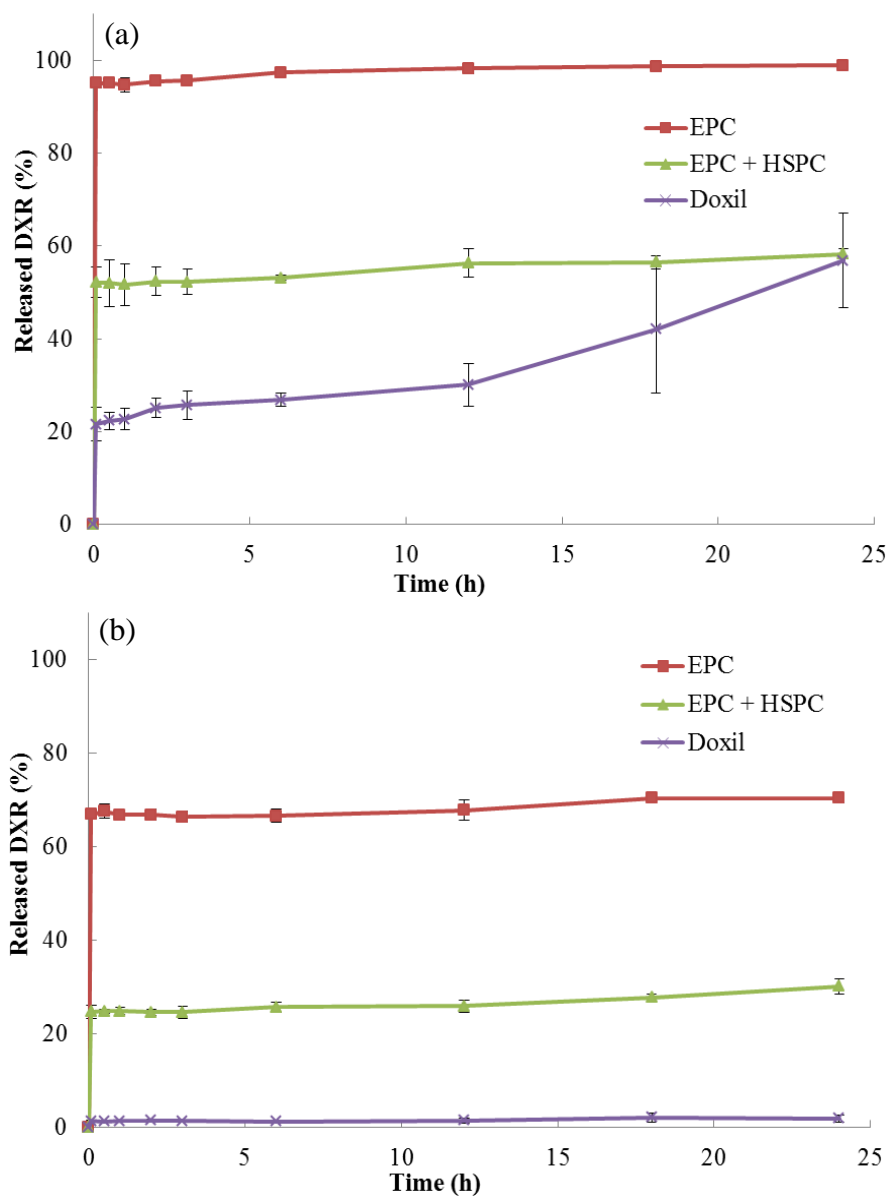


Figure 2-16. The in vitro release profiles of the DXR liposome obtained by the column-switching HPLC in (a) 0.1 mol/L HCl and (b) PBS (pH 7.4). Data are represented as mean \pm S.D. of three experiments.

第5節 SBM 封入りポソームへの応用

前節までに、開発したカラムスイッチング HPLC システムによる in vitro 薬物放出試験法により、DXR 封入りポソームからの DXR の放出特性を評価し、透析法による結果と比較した。同様に、Table 2-15 に示す SBM 封入りポソームについても、PBS 中で、カラムスイッチング HPLC 法で SBM の放出特性を評価し、透析法による結果と比較した。結果を Figure 2-17 に示す。なお、カラムスイッチング

HPLC システムの操作条件は、Table 1-10 に示す通りであった。

カラムスイッチング HPLC 法により得たリポソームからの SBM の放出挙動は、5 分以内に約 90% に達し、その後、約 12 時間後までに完全放出された。一方、透析法による場合は、24 時間後まで徐々に SBM を放出した。評価に用いた SBM 封入リポソームの薬物封入率が 30% 程度であったことも勘案すると、これらの結果は、DXR 封入リポソームの場合と同様の考察を導き、透析膜によるリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法の場合、得られるリポソームからの薬物放出プロファイルは、リポソームからの薬物放出に続く、薬物の透析膜透過律速で形成される可能性があること、一方、カラムスイッチング HPLC 法によるリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法は、リポソームからの薬物放出以外に律速となる過程が存在しないことから、リポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出特性を詳細に評価・解明する手段となり得ることを示唆した。

Table 2-15. Formulation of SBM liposome and the physicochemical properties.

Components		Formulation
	Salbutamol hemisulfate (mg/mL)	1.0
Phospholipid	EPC (mg/mL)	7.9
	Cholesterol (mg/mL)	0.5
Inner phase	Ammonium sulfate (mM)	120
	pH	5.4
Phosphate-buffered saline (PBS)		
Outer phase	NaCl (mg/mL)	8.00
	Na ₂ HPO ₄ (mg/mL)	1.44
	KH ₂ PO ₄ (mg/mL)	0.24
	pH	7.4
Encapsulation efficiency ± SD (%)		30.7 ± 0.90
Mean diameter (nm) (polydispersity index) in water		114.0 (0.082)
Zeta potential ± SD (mV) in PBS		-21.0 ± 2.0

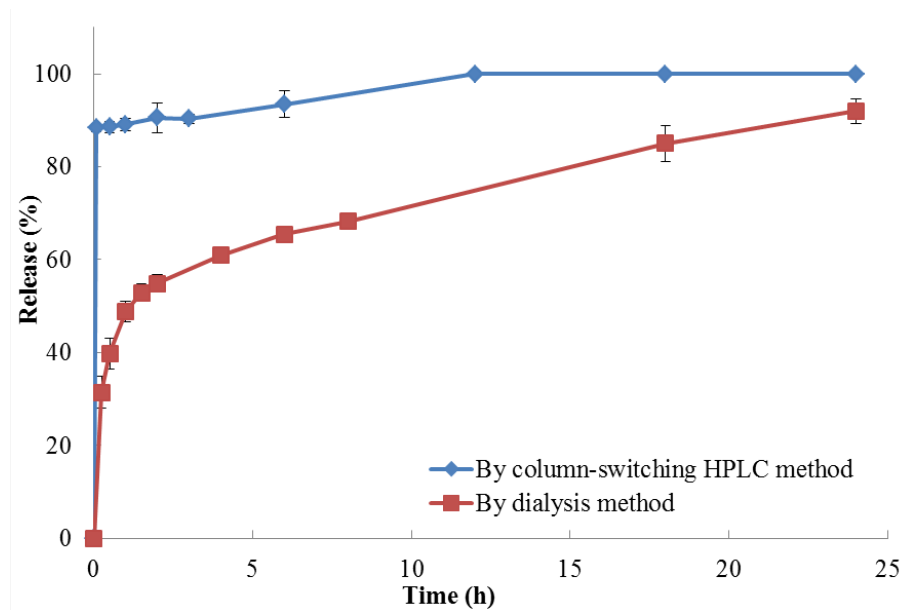


Figure 2-17. Comparison of the in vitro release profiles of a salbutamol-loaded liposome obtained by the column-switching HPLC or dialysis in PBS (pH 7.4) at 37 °C. Data are represented as mean \pm S.D. of three experiments.

第 6 節 薬物封入特性評価法への応用

開発したカラムスイッチング HPLC システムは、リポソーム製剤の in vitro 薬物放出特性の評価法として応用可能であった。さらに、本システムは、薬物封入特性の評価法としても応用可能であると考えられた。カラムスイッチング HPLC システムを用い、Table 2-14 に示す HSPC ストックリポソーム内への DXR の封入特性の温度依存性を評価した。結果を Figure 2-18 に示す。

DXR のリポソーム内への封入速度は、静置温度が高くなるほど速くなり、50 °C においては約 4 時間で完全封入された。一方で、30 °C においては 24 時間後においても完全には封入されなかった。この依存性は、リポソームを構成するリン脂質二重膜の相転移温度以上では、その柔軟性と透過性が増大されるという知見を反映していた。したがって、開発したカラムスイッチング HPLC システムは、薬物封入特性の評価法としても応用可能であり、リモートローディング法によって調製されるリポソーム製剤の処方および製法開発のための評価法として有用であると考えられた。

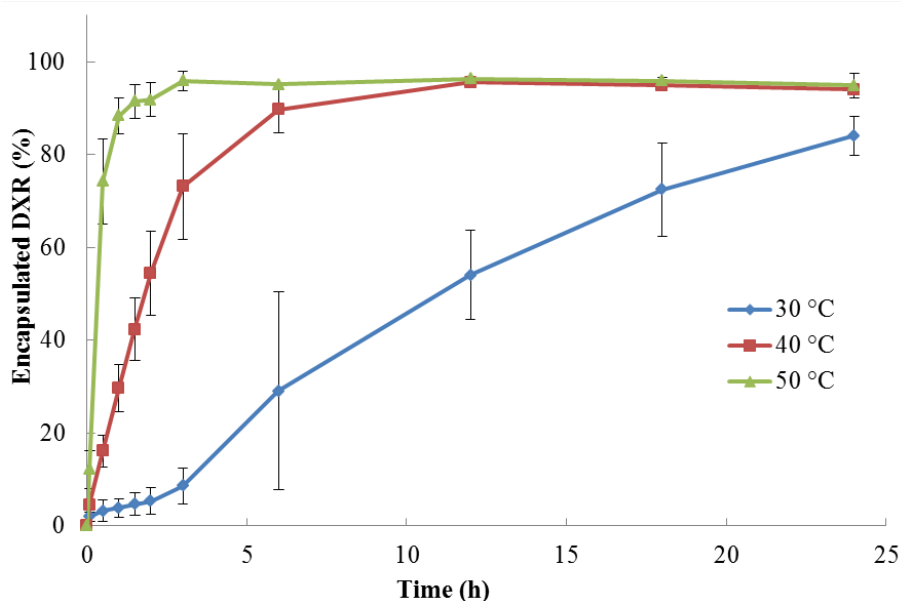


Figure 2-18. Temperature dependency of the encapsulation characteristics of DXR into the inner phase of the liposome. Data for 30 °C are the mean \pm S.D. of six experiments. Data for 40 °C and 50 °C are represented as mean \pm S.D. of three experiments.

第7節 小活

第1章で開発したカラムスイッチング HPLC システムを基礎として、リポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法を開発後、DXR および SBM 封入リポソームの薬物放出特性を評価し、透析法によって得られた結果と比較し、考察した。また、本法をリポソーム製剤の薬物封入特性評価法としても応用し、モデルリポソーム内への DXR の封入特性を評価した。本法の開発およびモデルリポソーム製剤の薬物放出・封入特性の評価から以下の知見を得た。

- 1) 透析によるリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法の場合、得られる薬物放出プロファイルは、リポソームからの薬物放出に続く、薬物の透析膜透過律速で形成される可能性がある。
- 2) 一方、カラムスイッチング HPLC システムによるリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法には、リポソームからの薬物放出以外に律速となる過程が存在しないことから、リポソーム製剤の薬物放出特性を詳細に評価・解明する手段となり得る。
- 3) また、カラムスイッチング HPLC システムによるリポソーム製剤の *in vitro* 薬物放出試験法は、試験に要求される試料が少量であり、かつ、完全に自動化することが可能であった。

以上より、本研究において構築したカラムスイッチング HPLC システムを用い

ることで、従来から一般的に用いられている透析による *in vitro* 薬物放出試験法に代わる、新規薬物放出試験法をも構築することができた。本法の正確性、迅速性、簡便性を勘案すると、市販後の品質管理法に加え、開発段階におけるリポソーム製剤の処方および製法開発のための評価法としても有用であると考えられる。

第3章 カラムスイッチング HPLC システムを用いたリポソーム製剤の特性評価

第1節 緒言

リポソーム製剤化が期待される薬物としては、すでに前章までに取り扱った低分子薬物の他、ペプチド性薬物のような高分子薬物もある。この内、INS に関しては、数十年以上前から、経口投与を目指してリポソーム製剤化が検討されている。このような高分子薬物は、封入時に一部の薬物がリポソーム表面に局在化したり、単純に吸着状態にあったりすると考えられる場合がある。リポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物を分離するには、遠心分離や透析に加え、本研究で確立したカラムスイッチング HPLC システムに組み込まれたような SPE カラムを利用する方法などがある。遠心分離法は、それぞれの薬物が存在する環境の密度差を、透析法は、粒子サイズの差を利用して、封入薬物と未封入薬物を分離する一方、SPE カラムによる分離は、固定相と薬物の相互作用の強度差を利用するため、リポソーム表面上に存在する薬物と、真にリポソーム内に封入されている薬物を分離できる可能性がある。

本章では、INS 封入リポソームをその代表として取り上げ、いくつかの条件下で調製したリポソーム製剤中の INS の封入状態を、カラムスイッチング HPLC システムにより評価した。また、従来法から用いられている遠心分離法でも評価し、得られた結果を比較することにより、リポソーム製剤中の INS の封入状態および開発したカラムスイッチング HPLC システムの有用性について考察した。

第2節 INS 封入リポソームの封入状態の評価

遠心分離法に加え、開発したカラムスイッチング HPLC 法を用いて、リポソーム製剤中の存在状態の異なる薬物を分離評価し、薬物の封入状態について考察した。Table 3-16 に示す組成の INS 封入リポソームをモデル製剤として用いた。INS 封入リポソームは、脂質薄膜を INS 溶液で水和することにより調製した。評価は、INS 封入リポソームを水あるいは 0.1% 酢酸に分散させた後、それぞれの方法で封入 INS と未封入 INS を分離定量した。加えて、リポソームと INS の単純な混合液についても、同様に評価した。両方法から見積もられた INS 封入リポソーム、および、リポソームと INS の単純混合液の薬物封入率を Table 3-17 に示す。なお、INS 封入リポソーム製剤中の封入 INS および未封入 INS の分離定量ために最適化したカラムスイッチング HPLC 条件は、Table 3-18 に示す通りであった。また、得られた代表的クロマトグラムを Figure 3-19 に示す。

水で分散した試料については、両方法から得た INS 封入リポソーム、および、リポソームと INS の単純混合液の見積もられた薬物封入率はそれぞれ、約 45%、および、約 5% となり、両方法から得た結果は良好に一致した。なお、試料の pH はいずれも 7.4 であった。一方、0.1% 酢酸で分散した試料については、INS 封入リポソーム、および、リポソームと INS の単純混合液のいずれも、遠心分離法で

得た薬物封入率がカラムスイッチング HPLC 法で得たそれよりも高く、両方法から得た結果に乖離が認められた。そして、0.1%酢酸中に分散した INS 封入リポソームの遠心分離法によって見積もられた薬物封入率は約 95%となり、薄膜水和法で薬物を封入したリポソーム製剤においては、一般的に期待できないほどの高い薬物封入率であった。なお、試料の pH はいずれも 3.3 であった。これは、カラムスイッチング HPLC 法は、INS と SPE カラムとの疎水的相互作用により、リポソーム表面に吸着した INS を未封入薬物として分離できたのに対し、遠心分離法では、リポソーム表面に吸着あるいは凝集体内部に取り込まれた INS を封入 INS とともに沈殿させた結果、封入 INS と分離できず、あたかも封入された INS と見積もったことが原因と推定された。

Table 3-16. Formulation of INS liposome.

Components		Concentration (mg/mL)
Insulin, human recombinant		2.0
Phospholipid	DPPC	58.7
	DCP	10.9
Inner phase		A mixture of PBS and 0.01 mol/L HCl (1:1, v/v)
Outer phase		

Table 3-17. Encapsulation efficiencies (EE) of INS liposome and mixture.

Dispersion media	Method	Sample	EE \pm SD (%)	
			INS liposome	Mixture of liposome and INS
in water (pH7.4)	Ultracentrifugation		43.6 \pm 0.18	4.6 \pm 0.40
	Column-switching HPLC		44.0 \pm 0.58	5.7 \pm 0.22
in 0.1% acetic acid (pH3.3)	Ultracentrifugation		94.7 \pm 0.14	56.7 \pm 0.88
	Column-switching HPLC		38.2 \pm 0.34	13.6 \pm 0.50

Table 3-18. The optimized analytical conditions of the column-switching HPLC system for INS liposome.

Detection:	UV (Detection wavelength: 230 nm)
Separation column:	MAYI-ODS (G) (10 mm × 4.6 mm I.D., 50 μm) (10 °C)
Extraction column:	YMC-Pack Pro C18 (23 mm × 4.0 mm I.D., 3 μm) (55 °C)
Analytical column:	YMC-Pack Pro C18 (75 mm × 4.6 mm I.D., 3 μm) (Ambient)
Mobile phase	
Pump A1 and B1:	Water
Pump A2 and B2:	A mixture of acetonitrile, water and perchloric acid (800:200:1, v/v/w)
Flow rate	
Total of pump A1 and A2:	1 mL/min
Total of pump B1 and B2:	1 mL/min
Sample concentration:	0.2 mg/mL as INS
Injection volume:	100 μL
Program:	Linear gradient and valve position as shown below

Time	Mobile phase (%)				Valve position	Purpose
	Pump A1	Pump A2	Pump B1	Pump B2		
0.00					Figure 1-4 (a)	Separation
2.00	80	20				
4.00						
9.00	0	100			Figure 1-4 (b)	Analysis for free (unloaded) INS
12.00			80	20		
12.01						
14.00	80	20				
16.00						
21.00	0	100			Figure 1-4 (c)	Analysis for encapsulated INS
24.00						

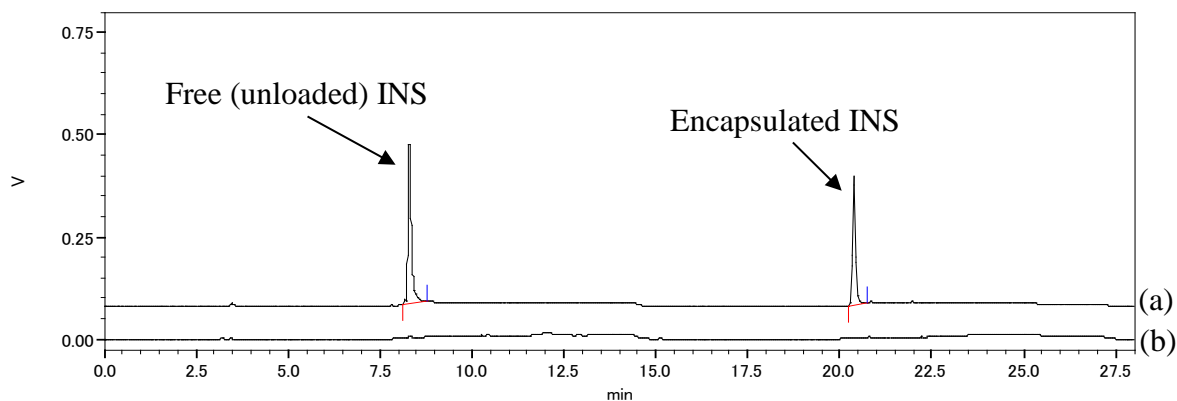


Figure 3-19. Representative chromatograms of INS liposome obtained by the optimized column-switching HPLC; (a) sample suspension of INS liposome (0.2 mg/mL diluted with water), (b) water (blank).

Table 3-19 に、INS封入リポソーム、リポソームとINSの単純混合液、および、リポソームのみ (INS未封入)の粒子径およびゼータ電位をPBS (pH7.4)中および0.1%酢酸 (pH3.3)中で評価した結果を示す。PBS中において、INS封入リポソームの粒子径は約 200 nm以下であったが、0.1%酢酸中においては、約 1000 nm以上に増大した。ゼータ電位は、PBS中において、いずれも負電荷を示したが、0.1%酢酸中においては、リポソーム単体は負電荷であったものの、INSの存在下においては、いずれの試料も正電荷を示した。これらの結果を勘案すると、酸性下において、リン脂質にDCPを含むリポソームは負電荷を維持する一方で [34,35,36]、INSは正に帯電することから、静電的相互作用によりリポソームの凝集体が形成された可能性が高い。この推定を検証するために、透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope: TEM)により、PBS中あるいは0.1%酢酸中に分散させたINS封入リポソームの形態を観察した (Figure 3-20)。PBS中に分散したINS封入リポソームは良好な分散状態であった一方 (Figure 3-20 (a))、0.1%酢酸中に分散したINS封入リポソームは凝集体となっていた (Figure 3-20 (b))。

これまでに得た粒子径、ゼータ電位、および、TEM 観察像の結果は、0.1%酢酸中に分散した INS 封入リポソームのカラムスイッチング HPLC 法および遠心分離法によって見積もられた薬物封入率の結果の乖離が、カラムスイッチング HPLC 法では、リポソーム表面に吸着した INS を未封入薬物として分離できたのに対し、遠心分離法では、リポソーム表面に吸着あるいは凝集体内部に取り込まれた INS を分離できず、あたかも封入薬物と見積もったことに起因するという推定を支持した。ここで考察した両方法による INS 封入リポソーム中の存在状態の異なる INS の分離の概念図を Figure 3-21 に示す。

開発したカラムスイッチング HPLC 法は、リポソーム製剤中の薬物を分離するために、薬物と SPE カラムの疎水的相互作用の強度差を利用しており、遠心分離や透析とは異なった分離機構を有するため、評価の目的に応じて、リポソーム製剤中の存在状態の異なる薬物を適切に分離評価する有用な手段となり、リポソーム製剤の特性評価および最適化研究に役立つものと考えられる。

Table 3-19. Particle sizes and zeta potentials of INS liposome and mixture.

Sample	INS liposome	Mixture of liposome and INS	Liposome without INS	
Mean diameter (nm) (polydispersity index)	in PBS (pH7.4)	178.4 (0.28)	161.1 (0.29)	173.3 (0.27)
	in 0.1% acetic acid (pH3.3)	1051.7 (0.26)	1530.1 (0.29)	957.4 (0.42)
Zeta potential ± SD (mV)	in PBS (pH7.4)	-20.9 ± 1.17	-26.8 ± 1.26	-33.2 ± 1.67
	in 0.1% acetic acid (pH3.3)	4.3 ± 1.58	4.7 ± 1.25	-9.5 ± 0.85

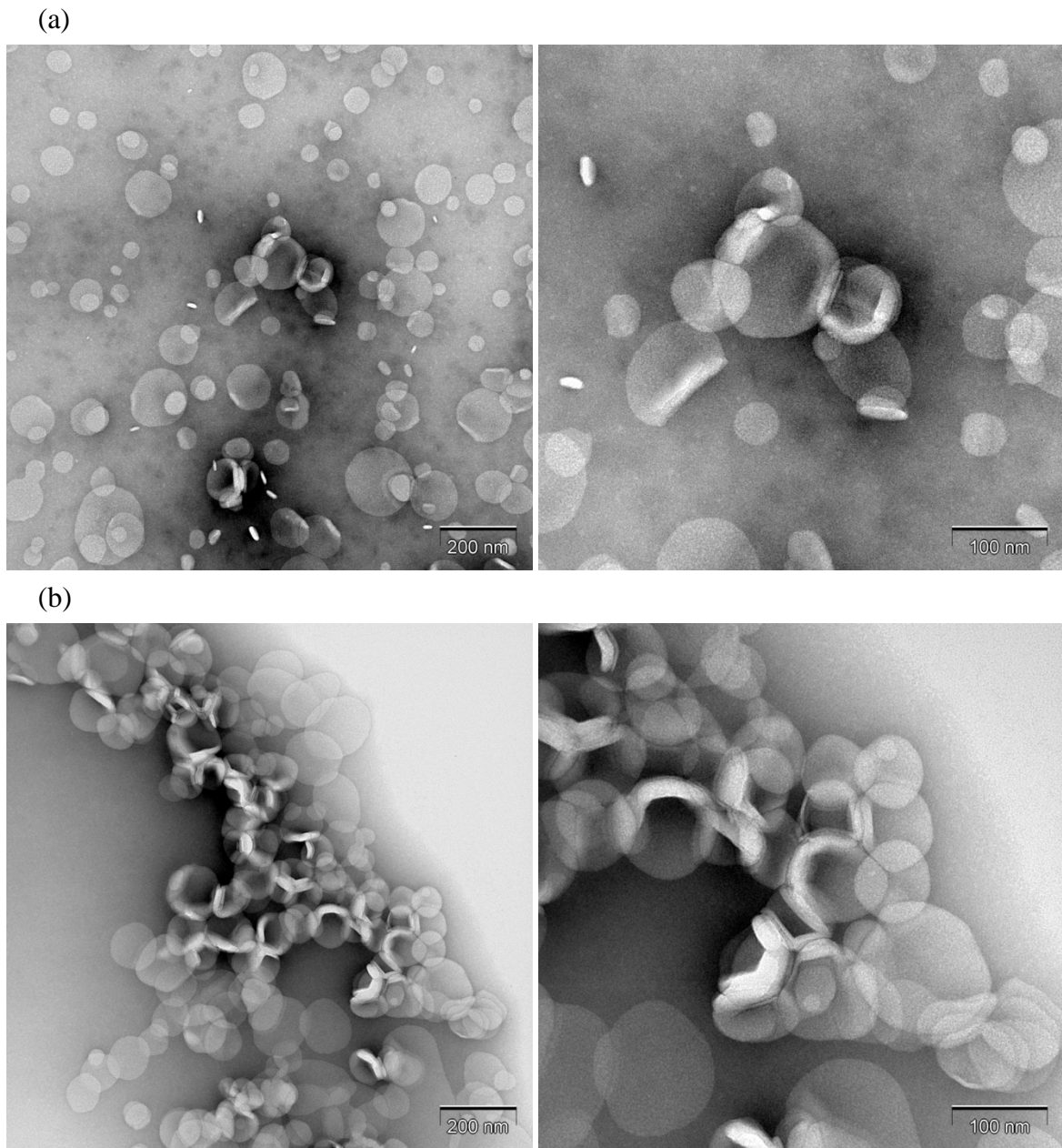


Figure 3-20. TEM images of INS liposome in (a) PBS (pH7.4) and (b) 0.1% acetic acid (pH3.3).

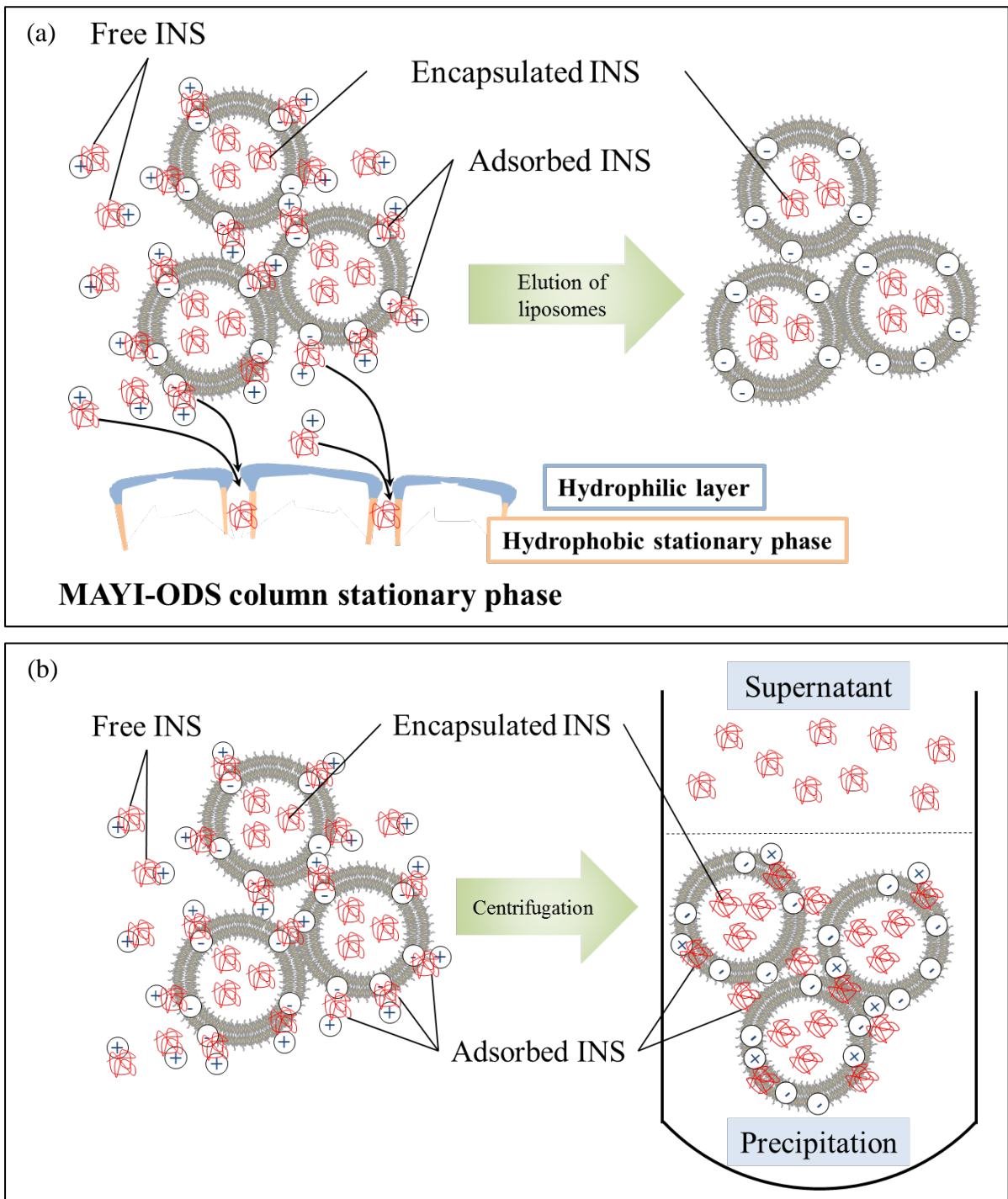


Figure 3-21. Schematic explanation for separation of encapsulated and unloaded (free) INSs in liposome formulation by (a) the developed column-switching HPLC (SPE column) and (b) centrifugation.

第3節 小活

遠心分離法および開発したカラムスイッチング HPLC 法を用いて、INS 封入リポソーム中の INS を分離評価し、その封入状態について考察することで、以下の知見を得た。

- 1) 遠心分離法で、0.1%酢酸中に分散した INS 封入リポソームを評価したところ、リポソーム表面に吸着あるいは凝集体内部に取り込まれた INS を封入 INS と分離できず、あたかも封入 INS と見積もる結果となった。
- 2) 一方、カラムスイッチング HPLC 法で、0.1%酢酸中に分散した INS 封入リポソームを評価したところ、リポソーム表面に吸着した INS を封入 INS と分離することができた。
- 3) また、カラムスイッチング HPLC 法によるリポソーム製剤の評価は、要求される試料が少量であり、かつ、完全に自動化することが可能であった。

以上より、従来から一般的に用いられている遠心分離や透析とは異なった分離機構を有するカラムスイッチング HPLC システムは、リポソーム製剤中の存在状態の異なる薬物の分離評価のための有用な手段となり、リポソーム製剤の特性評価および最適化研究に役立つものと考えられた。

第4章 総括および考察

有効性と安全性を兼ね備えた医薬品の開発の確実性を高め、さらに、その価値を最大化するには、迅速かつ最適な製剤開発および安定供給が極めて重要である。薬物キャリアを用いる DDS 製剤は、有効性、安全性を両立するための有効な手段として認識されているが、その開発には多くの課題もある。DDS 製剤のキャリアとして注目されているリポソームの場合、薬物の封入率を詳細かつ簡便に評価する分析技術は未だ確立されていない。本研究では、カラムスイッチング HPLC システムを基本手法として、リポソーム製剤を詳細かつ簡便に評価する分析技術の開発と応用研究を行い、その有用性を明らかにした。

具体的には、DXR、SBM、および、E7107 封入リポソームをモデルとし、2つの6方バルブを備えたカラムスイッチング HPLC システムを用いて、SPE カラムとの疎水的相互作用を利用したリポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の分離定量法を開発し、薬物封入率および薬物放出特性の評価法に応用した。分析法バリデーションの結果は、本法が、精度、正確性、および、感度に優れ、薬物封入率測定法として適切であることを示した。また、開発したカラムスイッチング HPLC 法は、大量の試料や煩雑な操作を必要とせず、試料溶液を注入するだけの完全に自動化された薬物封入率および薬物放出特性の評価法であった。

DXR、および、SBM 封入リポソームのカラムスイッチング HPLC 法によって得た薬物放出プロファイルと、従来から用いられている透析法によって得た薬物放出プロファイルを比較・考察したところ、透析法によって得た薬物放出プロファイルは、リポソームからの薬物放出に続く、薬物の透析膜透過律速で形成される可能性があることが示唆された。一方、カラムスイッチング HPLC 法には、リポソームからの薬物放出以外に律速となる過程が存在しないことから、リポソーム製剤本来の薬物放出特性をより詳細かつ正確に評価する手段となり得ることが示された。

また、開発したカラムスイッチング HPLC 法は、リポソーム製剤中の薬物を分離するために、薬物と SPE カラムの疎水的相互作用を利用しており、密度差を利用する遠心分離や分子サイズの差を利用する透析とは異なった分離機構を有する。遠心分離法および開発したカラムスイッチング HPLC 法を用いて、INS 封入リポソーム製剤中の INS を分離評価し、その封入状態について考察したところ、遠心分離法では、リポソーム表面に吸着した INS を封入 INS と分離することができなかったが、カラムスイッチング HPLC 法は、リポソーム表面に吸着あるいは凝集体内に取り込まれた INS を封入 INS と分離することができた。このことから、開発したカラムスイッチング HPLC 法は、リポソーム製剤中の存在状態の異なる薬物の分離評価のための有用な手段となることも明らかとなった。

以上、開発したカラムスイッチング HPLC システムによるポソーム製剤中の封入薬物と未封入薬物の分離定量法は、精度、正確性、感度のほか、迅速性および省力

性に優れ、リポソーム製剤の特性評価、最適化研究、さらには、高品質リポソーム製剤の安定供給にも役立つものと考えられる。

実験の部

第 1 章の実験

1.1 試薬および試料

ドキシソルビシン (DXR)塩酸塩は、Sicor (Milan, Italy)より購入した。サルブタモール (SBM)硫酸塩 (hemisulfate)は、東京化成工業 (Tokyo, Japan)より購入した。E7107 は、エーザイ (Tokyo, Japan)で合成したものをを用いた。水素添加大豆ホスファチジルコリン (HSPC)は、Lipoid (Steinhausen, Switzerland)より購入した。1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DSPC)は、日本精化 (Osaka, Japan)より購入した。卵ホスファチジルコリン (EPC)は、日本油脂 (Tokyo, Japan)より購入した。コレステロールは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。2 種類のN-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム、MPEG2000-DSPEおよびDSPE-020CNはそれぞれ、Corden Pharma (Liestal, Switzerland)および日本油脂から購入した。硫酸アンモニウム、スクロース、および、L-ヒスチジンは、和光純薬工業 (Osaka, Japan)より購入した。ヒドロキシ- β -シクロデキストリン (HP- β -CyD)は、Roquette (Lestrem, France)より購入した。Doxil[®]は、Janssen Pharmaceuticals (Tokyo, Japan)から購入した。

アセトニトリル (ACN)およびメタノール (MeOH)は、関東化学 (Tokyo, Japan)より購入した。トリフルオロ酢酸 (TFA)、過塩素酸 (HClO₄)、酢酸 (CH₃COOH)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (NaH₂PO₄·2H₂O)、塩化ナトリウム (NaCl)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、酢酸アンモニウム (CH₃COONH₄)、および、リン酸水素二ナトリウム (Na₂HPO₄)は、和光純薬工業 (Osaka, Japan)より購入した。その他の試薬は、特級もしくはHPLC用のものをを用いた。水は、超純水製造装置 (Milli-Q[®] TOC purification system; Millipore, Bedford, MA, USA)にて精製したものをを用いた。

1.2 DXR、SBM および E7107 封入リポソーム、および、試料溶液の調製

リポソームは薄膜法によって調製し、薬物溶液と混合して加温することによるリモートローディング法 [37,38]により、薬物を封入した。

Table 1-1、Table 1-8、あるいは、Table 1-9 に示す組成のリン脂質をメタノールとクロロホルムの混液に溶解した後、リン脂質薄膜が得られるまで減圧乾燥した。得られたリン脂質薄膜に、40 °C に保った Table 1-1、Table 1-8、あるいは、Table 1-9 に示す内水相を加えて分散させた後、粒子径を調整するために、細孔径 100 nm のポリカーボネート膜 (Nuclepore Track-Etched Polycarbonate Membrane; GE healthcare, Tokyo, Japan)に数回通した。得られたリポソームを 452,000 ×g で 60 分以上遠心分離 (CP-80WX; 日立工機, Tokyo, Japan)し、上澄液を廃棄後、リポソームの沈殿物を、Table 1-1、Table 1-8、あるいは、Table 1-9 に示す外水相に再分散し

て、リポソーム保存液とした。

別に、DXR、SBM、および、E7107 をそれぞれ、Table 1-1、Table 1-8、あるいは、Table 1-9 に示す外水相に溶解し、DXR、SBM、および、E7107 保存溶液とした。

DXR、SBM、あるいは、E7107 の濃度がそれぞれ、2.0、1.0、および、1.0 mg/mL となるように、リポソーム保存液と各薬物の保存溶液を 1:1 (v/v) の割合で混合した後、時折振り混ぜながら、60 °C に保った水浴中で 5 分間保持した。室温に冷却した後、各薬物のリポソーム製剤とした。

カラムスイッチング HPLC システムに注入するにあたっては、DXR、SBM、あるいは、E7107 封入リポソームを水で希釈し、薬物濃度をそれぞれ、0.2、0.2、および、0.1 mg/mL とした。

1.3 粒子径およびゼータ電位測定

粒子径およびゼータ電位の測定には、ELS-8000 (大塚電子, Osaka, Japan) を用いた。リポソームを水あるいは PBS に分散させ、多重散乱を避け、適切な透過率となるように試料濃度を調整した後、測定を行った。粒子径は、100 回測定の積算後、ヒストグラム解析によって算出した。ゼータ電位は、3 回測定の平均値を求めた。

1.4 カラムスイッチング HPLC システムおよび薬物封入率の測定

カラムスイッチング HPLC システムの構成は Figure 1-4 に示すとおりであった。いずれの構成装置も島津製作所製 (Kyoto, Japan) のものを使用した。

ポンプは、未封入薬物と封入薬物を分離するために移動相 B1 を送液する LC-10ADvp (Pump B1)、封入薬物を効率的に抽出するために移動相 B2 を送液する LC-10ADvp (Pump B2)、および、未封入薬物および未封入薬物をそれぞれ分析するために移動相 A1 および A2 を送液する FCV-10ALvp 低圧グラジエントユニットを備えた LC-10ADvp (Pump A1 および A2) を用いた。オートサンプラーは、SIL-10ADvp、デガッサーは、DGU-14、2 つのカラム恒温槽は、CTO-10AC、2 つの 6 方バルブは、FCV-12AH、UV 検出器は、SPD-20Avp を使い、ポンプとともに、システムコントローラー SCL-10Avp で制御した。データ処理および解析には、CLASS-VP LC-solution (ver6.12 SP5) を使用した。

封入薬物および未封入薬物の分離検討に用いた SPE カラムは、Table 1-2 に示す通りであった。一方、封入薬物および未封入薬物の分析には、YMC-Pack Pro C18 (75 mm × 4.6 mm I.D.; particle size, 3 μm; pore size, 12 nm; YMC, Kyoto, Japan) (Analytical column) を用いた。

最終的に、DXR、SBM、および、E7107 封入リポソーム製剤中の封入薬物および未封入薬物の分離評価のために最適化されたカラムスイッチング HPLC 操作条件はそれぞれ、Table 1-3、Table 1-10、および、Table 1-11 に示す通りであった。薬物封入率は、3 回測定の平均値を求めた。

1.5 遠心分離による薬物封入率の測定

カラムスイッチング HPLC に注入するにあたって調製したリポソーム分散液を 452,000 ×g で 60 分以上遠心分離 (CP-80WX) し、上澄液を得た。得られた上澄液を、HPLC (Agilent 1200 series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で分析し、対応する標準溶液 (DXR: 0.2 mg/mL、SBM: 0.2 mg/mL、あるいは、E7107: 0.1 mg/mL) から得た対象薬物のピーク面積と比較することで、上澄液の薬物濃度を算出した。その後、Equation 2 に従い、薬物封入率を求めた (3 回測定 of 平均値)。なお、HPLC 操作条件は、それぞれのリポソームに対するカラムスイッチング HPLC 操作条件における未封入薬物の分析条件と同じであった (DXR: Table 1-3、SBM: Table 1-10、あるいは、E7107: Table 1-11 参照)。

Equation 2

$$EE = \frac{T_{\text{drug}} - F_{\text{drug}}}{T_{\text{drug}}} \times 100 = \left(1 - \frac{F_{\text{drug}}}{T_{\text{drug}}}\right) \times 100$$

where,

EE: Encapsulation efficiency (%)

T_{drug}: Total drug obtained from standard solution

F_{drug}: Free (unloaded) drug obtained from supernatant

第 2 章の実験

2.1 試薬および試料

第 1 章で用いた試薬のほかに、硫酸アンモニウム、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mmol/L NaCl, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 2.68 mmol/L KCl, and 1.47 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4)、および、0.1 mol/L 塩酸は、和光純薬工業より購入した。

透析膜には、CelluSep[®] F1 (MWCO: 3.5 kDa) および F3 (MWCO: 12-14 kDa) (Membrane Filtration Products, Inc.; Seguin, Texas, USA) を使用した。

2.2 DXR および SBM 封入リポソーム、および、試料溶液の調製

第 1 章と同様に、リポソームは薄膜法によって調製し、薬物溶液と混合して加温することによるリモートローディング法により、薬物を封入した。

Table 2-14 あるいは Table 2-15 に示す組成のリン脂質をメタノールとクロロホルムの混液に溶解した後、リン脂質薄膜が得られるまで減圧乾燥した。得られたリン脂質薄膜に、40 °C に保った Table 2-14 あるいは Table 2-15 に示す内水相を加えて分散させた後、粒子径を調整するために、細孔径 100 nm のポリカーボネート膜 (Nuclepore Track-Etched Polycarbonate Membrane) に数回通した。得られたリポソームを 452,000 ×g で 60 分以上遠心分離 (CP-80WX) し、上澄液を廃棄後、リポソームの沈殿物を、Table 2-14 あるいは Table 2-15 に示す外水相に再分散して、リポソーム保存液とした。

別に、DXR および SBM をそれぞれ、Table 2-14 あるいは Table 2-15 に示す外水相に溶解し、DXR および SBM 保存溶液とした。

DXR あるいは SBM 濃度がそれぞれ、2.0 および 1.0 mg/mL となるように、リポソーム保存液と各薬物の保存溶液を 1:1 (v/v) の割合で混合した後、時折振り混ぜながら、60 °C に保った水浴中で 5 分間保持した。室温に冷却した後、各薬物のリポソーム製剤とした。

2.3 リポソーム製剤の薬物封入率の測定

リポソーム製剤の薬物封入率は、第 1 章で最適化したカラムスイッチング HPLC システムにより測定した。DXR、および、SBM 封入リポソーム製剤に対するカラムスイッチング HPLC 操作条件はそれぞれ、Table 1-3、および、Table 1-10 に示す通りであった。薬物封入率は、3 回測定の平均値を求めた。

2.4 粒子径およびゼータ電位測定

第 1 章と同様に、粒子径およびゼータ電位の測定には、ELS-8000 を用いた。リポソームを 0.1 mol/L 塩酸、PBS、あるいは、水に分散させ、多重散乱を避け、適切な透過率となるように試料濃度を調整した後、測定を行った。粒子径は、100 回測定の積算後、キュムラント解析によって算出した。ゼータ電位は、3 回測定の平均値を求めた。

2.5 DXR の溶解度測定

過剰量の DXR を 0.1 mol/L 塩酸あるいは PBS に加えて、37 °C に保って約 24 時間攪拌した。その後、DXR の分散液を GL chromatodisc 4A (pore size: 0.2 μm; GL サイエンス, Tokyo, Japan) を使ってろ過し、得られたろ液を水で 1/10 に希釈後、

HPLC で分析した。標準溶液 (DXR 濃度: 0.2 mg/mL) から得た DXR のピーク面積と比較することで、溶解度を求めた。HPLC 操作条件は、DXR 封入リポソームに対するカラムスイッチング HPLC 操作条件における未封入薬物の分析条件と同じであった (Table 1-3 参照)。

2.6 透析法による in vitro 薬物放出試験

透析による in vitro 薬物放出試験法の概略図は、Figure 2-12 に示した。透析膜は、使用前に水で約 20 分間洗浄し、さらに、分散溶媒中に約 12 時間浸した後に使用した。リポソーム製剤を小型透析用容器 QuixSep[®] (Membrane Filtration Products, TX, USA) に移し、透析膜で被った後、リポソームを含んだ QuixSep を 50 mL の分散溶媒を含んだガラス容器に浸し、37 °C に保って、磁気型攪拌装置で攪拌した。リポソーム製剤の投入量は、DXR 封入リポソーム 100 µL、および、SBM 封入リポソーム 500 µL であった。QuixSep の透析可能面積は、約 0.8 cm² であった。規定時間に分散溶媒 1 mL を採取し、一部を HPLC (Agilent 1200 series) に注入した。分散溶媒中の対象薬物のピーク面積を、標準溶液 (DXR: 4 µg/mL、あるいは、SBM: 20 µg/mL) から得た対象薬物のピーク面積と比較することで、透析膜を通して漏出した薬物の濃度を算出し、Equation 3 に従い、薬物放出率を求めた (3 回測定 of 平均値)。また、HPLC 操作条件は、それぞれのリポソームに対するカラムスイッチング HPLC 操作条件における未封入薬物の分析条件と同じであった (DXR: Table 1-3、および、SBM: Table 1-10 参照)。

Equation 3

$$\text{Release (\%)} = \frac{R_{\text{drug}}}{T_{\text{drug}}} \times 100$$

where,

R_{drug}: Released (free) drug

T_{drug}: Total drug obtained from the standard solution

2.7 カラムスイッチング HPLC システムによる in vitro 薬物放出試験

カラムスイッチング HPLC システムによる in vitro 薬物放出試験法の概略図は、Figure 2-12 に示した。37 °C に保った分散溶媒を含む HPLC バイアルにリポソーム製剤を分散し、時折穏やかに攪拌しながら、規定時間に分散溶媒をオートサンプラーで採取し、カラムスイッチング HPLC システムに直接注入した。封入薬物と未封入薬物を分離定量し、Equation 4 に従い、薬物放出率を求めた (3 回測定 of 平均値)。なお、リポソームと分散溶媒の混合割合は、DXR 封入リポソーム:分散溶媒 = 1:9 (v/v)、および、SBM 封入リポソーム:分散溶媒 = 1:4 (v/v) であった。また、

カラムスイッチング HPLC システムの操作条件は、DXR、あるいは、SBM 封入りポソームそれぞれに対して最適化した操作条件を使用した (Table 1-3、あるいは、Table 1-10 参照)。

Equation 4

$$\text{Release (\%)} = \frac{R_{\text{drug}}}{T_{\text{drug}}} \times 100 = \frac{R_{\text{drug}}}{R_{\text{drug}} + E_{\text{drug}}} \times 100$$

where,

R_{drug} : Released (free) drug

T_{drug} : Total amount of drug

E_{drug} : Encapsulated drug in the liposome

第 3 章の実験

3.1 試薬および試料

第 1 章および第 2 章で用いた試薬のほかに、インスリン (INS)、ヒト、組み換え体、L- α -ホスファチジルコリン ジパルミトイル (DPPC)、および、酢酸は、和光純薬工業、リン酸ジセチル (DCP) は、Sigma-Aldrich より購入した。

3.2 INS 封入りポソームおよび試料溶液の調製

リン脂質薄膜を調製し、INS 溶液で水和することによって、リポソームの形成と同時に INS を封入した。

Table 3-16 に示す組成のリン脂質をクロロホルムに溶解した後、リン脂質薄膜が得られるまで減圧乾燥した。別に、INS を 0.01 mol/L 塩酸に溶解した後、PBS で希釈することによって、Table 3-16 に示す内外水相に溶解した INS 溶液 (2.0 mg/mL) とした。得られたリン脂質薄膜に、60 °C に保った INS 溶液を加えて分散させた後、粒子径を調整するために、細孔径 200 nm のポリカーボネート膜 (Nuclepore Track-Etched Polycarbonate Membrane) に数回通し、INS 封入りポソームとした。

また、INS 溶液 (2.0 mg/mL) と PBS でリン脂質薄膜を水和して調製した INS 未封入りポソームを 1:1 (v/v) の割合で混合し、リポソームと INS の単純混合液とした。

3.3 カラムスイッチング HPLC による薬物封入率の測定

第 1 章および第 2 章で用いたカラムスイッチング HPLC システムと同じ構成のものを用いた (Figure 1-4)。カラムスイッチング HPLC システムの操作条件は、INS 封入リポソームに対して最適化した条件を用いた (Table 3-18)。カラムスイッチング HPLC システムへの注入にあたっては、INS 封入リポソームを水あるいは 0.1%酢酸で希釈し、INS 濃度を 0.2 mg/mL とした。薬物封入率は、3 回測定の平均値を求めた。

3.4 遠心分離による薬物封入率の測定

第 1 章と同様に、カラムスイッチング HPLC に注入するにあたって調製した INS 封入リポソーム分散液を 452,000 ×g で 60 分以上遠心分離 (CP-80WX) し、上澄液を得た。得られた上澄液を HPLC (Agilent 1200 series) で分析し、対応する標準溶液 (0.2 mg/mL) から得た INS のピーク面積と比較することで、上澄液中の INS 濃度を算出した。その後、Equation 2 に従い、薬物封入率を求めた (3 回測定の平均値)。なお、HPLC 操作条件は、INS 封入リポソームに対するカラムスイッチング HPLC 操作条件における未封入 INS の分析条件と同じであった (Table 3-18)。

3.5 粒子径およびゼータ電位測定

第 1 章および第 2 章と同様に、粒子径およびゼータ電位の測定には、ELS-8000 を用いた。INS 封入リポソームを PBS あるいは 0.1%酢酸に分散させ、多重散乱を避け、適切な透過率となるように試料濃度を調整した後、測定を行った。粒子径は、100 回測定の積算後、キュムラント解析によって算出した。ゼータ電位は、3 回測定の平均値を求めた。

3.6 TEM による観察

INS 封入リポソームを PBS あるいは 0.1%酢酸に分散させた後、4 °C で 5 分間静置した。その後、INS 封入リポソーム分散液を、カーボン支持膜を張った 400 メッシュに滴下して、2%リンタングステン酸水溶液 (pH7.0) で 1 分間ネガティブ染色を行った。

透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus; 日本電子, Tokyo, Japan) を用い、試料中のリポソームについて観察した (加速電圧: 80 kV)。デジタル観察像 (2048 × 2048 pixels) は、CCD カメラ (VELETA; Olympus Soft Imaging Solutions, Munster, Germany) で撮影した。

略語表

ACN:	アセトニトリル (acetonitrile)
DCP:	リン酸ジセチル (dicetyl phosphate)
DDS:	薬物送達システム (drug delivery system)
DPPC:	L- α -ホスファチジルコリン・ジパルミトイル (L- α -phosphatidylcholine dipalmitoyl)
DSPC:	1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)
DSPE-020CN:	N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム (N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium)
DNA:	デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid)
DXR:	ドキソルビシン (doxorubicin)
EE:	封入率 (encapsulation efficiency)
EPC:	卵ホスファチジルコリン (egg phosphatidylcholine)
HP- β -CyD:	ヒドロキシ- β -シクロデキストリン (hydroxypropyl- β -cyclodextrin)
HPLC:	高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)
HSPC:	水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soy phosphatidylcholine)
INS:	インスリン (insulin)
MeOH:	メタノール (methanol)
MPEG2000-DSPE:	N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール 2000)-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム (N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium)

MWCO:	分画分子量 (molecular weight cut-off)
PBS:	リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline)
PEG:	ポリエチレングリコール (polyethylene glycol)
SBM:	サルブタモール (salbutamol)
siRNA:	低分子干渉リボ核酸 (small interfering ribonucleic acid)
SDS:	ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate)
SPC:	大豆ホスファチジルコリン (soybean phosphatidylcholine)
SPE:	固相抽出 (solid phase extraction)
TFA:	トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)
UV:	紫外吸収分光法 (ultraviolet absorption spectrophotometry)

謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました、岐阜薬科大学 製剤学研究室 竹内洋文教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、有益なご助言と懇切なるご指導を賜りました、岐阜薬科大学 製剤学研究室 田原耕平講師に深甚なる謝意を表します。研究活動にあたり便宜を図り戴いた、同研究室 小野寺理沙子助教に感謝いたします。

本研究の着想から実施にわたり、多大なる協力をいただきました、エーザイ株式会社 ファーマシューティカルサイエンス&テクノロジー機能ユニット 製剤研究戦略担当 菊池寛部長、DDS 研究グループ 石原比呂之統括課長、山本栄一博士に深謝いたします。

本研究の機会を与えていただきました、エーザイ株式会社 内藤晴夫代表執行役 CEO、ファーマシューティカルサイエンス&テクノロジー機能ユニット グローバル製剤研究担当 加藤晃良部長、製剤研究部 瀬能敬司部長、製剤分析第一グループ 長田勝信統括課長、製剤分析第二グループ 加藤隆統括課長に深謝いたします。

本研究を進めるにあたり、御協力を頂きました岐阜薬科大学製剤学研究室ならびにエーザイ株式会社ファーマシューティカルサイエンス&テクノロジー機能ユニット 製剤分析グループの皆様感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、応援してくれた、父 亮二、母 八重子に感謝いたします。また、励まし支えてくれた妻 朋子、息子 陽人、娘 海咲に感謝いたします。

引用文献

- [1] V.R. Sinha, A. Trehan, Biodegradable microspheres for parenteral delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 22 (2005) 535-602.
- [2] R. Duncan, Polymer conjugates as anticancer nanomedicines, *Nat Rev Cancert.* 6 (2006) 688-701.
- [3] L. Zhang, F.X. Gu, J.M. Chan, A.Z. Wang, R.S. Langer, O.C. Farokhzad, Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83 (5) (2008) 761-769.
- [4] D.B. Fenske, P.R. Cullis, Liposomal nanomedicines, *Expert Opin Drug Deliv.* 5 (2008) 25-44.
- [5] M. Slingerland, H-J. Guchelaar, H. Gelderblom, Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road, *Drug Discovery Today* 17 (3-4), (2012) 160-166.
- [6] A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, Analytical methods for the control of liposomal delivery systems, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 25 (2) (2006) 167-178.
- [7] M. Matsuura, Y. Yamazaki, M. Sugiyama, M. Kondo, H. Ori, M. Nango, N. Oku, Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2003) 136-143.
- [8] P.Y. Chien, J. Wang, D. Carbonaro, S. Lei, B. Miller, S. Sheikh, S.M. Ali, M.U. Ahmad, I. Ahmad. Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo, *Cancer Gene Ther.* 12 (3) (2005) 321-328.
- [9] S. Futaki, Y. Masui, I. Nakase, Y. Sugiura, T. Nakamura, K. Kogure, and H. Harashima. Unique features of a pH-sensitive fusogenic peptide that improves the transfection efficiency of cationic liposomes. *J. Gene Med.* 7 (2005) 1450-1458.
- [10] I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, High Density of Octaarginine Stimulates Macropinocytosis Leading to Efficient Intracellular Trafficking for Gene Expression *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3544-3551.
- [11] N. Yonenaga, E. Kenjo, T. Asai, A. Tsuruta, K. Shimizu, T. Dewa, M. Nango, N. Oku, RGD-based active targeting of novel polycation liposomes bearing siRNA for cancer treatment, *J. Control. Release* 160 (2) (2012) 177-181.
- [12] A.L. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin, L. Huang, Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 268 (1990) 235-238.
- [13] T. Yuda, K. Maruyama, M. Iwatsuru, Prolongation of liposome circulation time by various derivatives of polyethyleneglycols, *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996) 1347-1351.
- [14] D.W. Northfelt, B.J. Dezube, J.A. Thommes, B.J. Miller, M.A. Fischl, A. Friedman-Kien, L.D. Kaplan, C. Du Mond, R.D. Mamelok, D.H. Henry, Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: Results of a randomized phase III clinical trial, *J Clin Oncol.* 16 (1998) 2445-2451.
- [15] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review, *J. Controlled Release* 65 (1-2) (2000) 271-284.
- [16] A.A. Gabizon, Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest.* 19 (2001) 424-436.

-
- [17] K. Hironaka, Y. Inokuchi, Y. Tozuka, M. Shimazawa, H. Hara, H. Takeuchi, Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye, *J. Controlled Release* 136 (2009) 247-253.
- [18] K.M. Hosny, Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin, *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 1336-1342.
- [19] J.J. Parmar, D.J. Singh, D.D. Hegde, A.A. Lohade, P.S. Soni, A. Samad, M.D. Menon, Development and evaluation of inhalational liposomal system of budesonide for better management of asthma, *Indian J. Pharm Sci.* 72 (2010) 442-448.
- [20] S. Bai, F. Ahsan, Inhalable liposomes of low molecular weight heparin for the treatment of venous thromboembolism, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 4554-4564.
- [21] A. Schroeter, T. Engelbrecht, R.H. Neubert, A.S. Goebel, New nanosized technologies for dermal and transdermal drug delivery. A review, *Journal of biomedical nanotechnology* 6 (2010) 511-528.
- [22] ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2), Evaluation of Stability Data Q1E.
- [23] Guidance for Industry, Liposome Drug Products, Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation, (Draft Guidance), U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), August (2002).
- [24] C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang, An overview of liposome lyophilization and its future potential, *J Control. Release* 142 (2010) 299-311.
- [25] Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride, Office of Generic Drugs, February 2010.
- [26] Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product, (2013).
- [27] K. Moribe, E. Tanaka, K. Maruyama, M. Iwatsuru, Enhanced Encapsulation of Amphotericin B into Liposomes by Complex Formation with Polyethylene Glycol Derivatives, *Pharm. Res.* 15 (1998) 1737-1742.
- [28] B. Chimanuka, M. Gabriëls, M.-R. Detaevernier, J.A. Plaizier-Vercammen, Preparation of beta-artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescence parasitaemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 13-22.
- [29] L. Jia, M. Garza, H. Wong, D. Reimer, T. Redelmeier, J.B. Camden, S.D. Weitman, Pharmacokinetic comparison of intravenous carbendazim and remote loaded carbendazim liposomes in nude mice, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 65-72.
- [30] P.C. Wu, Y.H. Tsai, C.C. Liao, J.S. Chang, Y.B. Huang, The characterization and biodistribution of cefoxitin-loaded liposomes, *Int. J. Pharm.* 271 (2004) 31-39.
- [31] ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) (2005).
- [32] A. Fritze, F. Hens, A. Kimpfler, R. Schubert, R. Peschka-Suss, Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1633-1640.
- [33] D. Lasic, P. Frederik, M. Stuart, Y. Barenholz, T. McIntosh, Gelation of liposome interior A novel method for drug encapsulation, *FEBS Lett.* 312 (1992) 255-258.

-
- [34] Y. Maitani, M. Nakagaki, T. Magai, Surface potential of liposomes with entrapped insulin, *Int. J. Pharm.* 64:2-3 (1990) 89-98.
- [35] B. Biruss, C. Valenta, Comparative characterization of the physicochemical behavior and skin permeation of extruded DPPC liposomes modified by selected additives, *J. Pharm. Sci.* 96:8 (2007) 2171-2176.
- [36] A. Hasan, H. Madkor, S. Wageh, Formulation and evaluation of metformin hydrochloride-loaded niosomes as controlled release drug delivery system, *Drug Deliv.* 20:3-4 (2013) 120-126.
- [37] P. Tardi, N. Boman, P. Cullis, Liposomal Doxorubicin, *J Drug Target.* 4 (1996) 129-140.
- [38] M. Bolotin, R. Cohen, K. Bar, N. Emanuel, S. Ninio, D. Lasic, Y. Barenholz, Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandoliposomes, *J. Liposome Res.* 4 (1994) 455-479.