リポソーム製剤の研究開発における薬物放出評価法

山本 栄一[†]*In Vitro* Release Method for Liposome Drug ProductsEiichi Yamamoto[†]

Analytical Research, Pharmaceutical Science & Technology Unit, Medicine Development Center,
Eisai Co., Ltd.; Tokodai 5-1-3, Tsukuba, Ibaraki 300-2635, Japan.

(Received August 6, 2018)

Over the past few decades, liposome drug delivery systems (liposome DDS) have attracted much attention as the most advanced DDS. Efficacy and toxicity profiles of liposomes are based on their characteristic pharmacokinetics, drug release, and disposition after administration. Many attempts have been made to develop these systems especially as liposomal anti-cancer drugs. In the development of liposome DDS, identification of critical quality attributes and establishment of a control strategy to ensure consistent drug product quality are crucial. Among the quality attributes, particle size, drug encapsulation, and drug release from liposomes would affect their *in vivo* pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Thus these features need to be evaluated with appropriate analytical methods to confirm the quality and performance of the drug products. This article focuses on drug release from liposomes and reviews the effects of physicochemical properties of loaded drugs on release, simulation of drug release from liposomes, and design of a simulated body fluid for drug release assay of drug products.

Key words—drug release; drug product; liposome drug delivery system; release mechanism; quality control

1. はじめに

リポソームドラッグデリバリーシステム [リポソーム drug delivery system (DDS)] 製剤研究は、四半世紀の間に 18 品のリポソーム医薬品を創出してきた。リポソーム製剤は、投与後の体内動態や薬物放出に基づいて、コンベンショナルな溶液製剤とは異なる効果を発揮することから、今日、新規医薬品の創出を企図した創薬モダリティの 1 つとして期待されている。

リポソーム製剤投与後の薬物体内動態に影響する製剤の品質特性として、リポソームの粒子径、薬物の封入率及び放出性などを挙げることができる。それゆえ、リポソーム製剤の研究開発においては、こ

れらの特性を適切な分析法により評価し、製剤の一貫した高い品質とその性能を実証する必要がある。¹⁻³⁾

本誌上シンポジウムでは、低分子薬物を封入したリポソームの薬物放出に焦点を当て、*in vitro* 放出評価法、放出性に影響を及ぼす要因、放出性シミュレーション及び放出性評価用擬似媒体設計の事例を紹介する。

2. *In vitro* 放出性評価法

リポソーム製剤が一貫した生体内安定性及び有効成分の放出特性を有していることを保証するためには、生理的条件を適切に反映した試験液中でリポソームからの有効成分の *in vitro* 放出特性を評価する必要がある。

In vitro 放出性は、通常、放出性評価用試験液にリポソーム分散液を添加し、一定温度でインキュベートした際の薬物放出率を時間に対してプロットすることにより評価される。

リポソーム製剤の *in vitro* 放出試験性評価法として様々な方法が報告されているが、医薬品開発を目的とした場合には、主に試料採取・分離法である遠

エーザイ株式会社メディシン開発センター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分析研究部 (〒300-2635 茨城県つくば市東光台 5-1-3)

現所属：[†]国立医薬品食品衛生研究所薬品部第二室 (〒210-9501 川崎市川崎区殿町 3-25-26)

e-mail: eyamamoto@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第 138 年会シンポジウム S59 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Graphical Illustration of the Process of Centrifugation Method, Dialysis and Reverse Dialysis Methods

心分離法と透析膜分離法 [(1) Dialysis 法及び(2) Reversed dialysis 法] (Fig. 1) が用いられる。手法の詳細については、いくつかの総説⁴⁻⁶⁾があるので、そちらを参照されたい。

いずれの手法においても、その分析評価はリポソーム製剤を添加した試験液のインキュベーション、試料の採取、前処理、分析及び解析の手順からなる。遠心分離法では、採取した試験液試料を超遠心分離することでリポソームを沈降させ、薬物が溶解している上澄み液を採取する。この上澄み液及び遠心分離前の試料中に含まれる薬物を定量し、薬物放出率を算出する。透析法には、1) 製剤試料を含む透析チューブを試験液中に配置し、透析チューブの外側の試験液を採取する Dialysis 法と 2) 製剤試料を添加した試験液中にブランクの透析チューブを配し、チューブ内側の試験液を採取する Reversed dialysis 法がある。これらの透析法では、採取された試験液試料中にはリポソームは含まれず、薬物とリポソームの分離が達成されるため前処理は不要となる。また、前者の Dialysis 法は、U.S. Pharmacopeia (USP) apparatus 4 を用いるフロースルーセル法と組み合わせる⁷⁾ことで操作の一部を自動化することができる。

リポソームの薬物放出性評価法の開発にあたり、いくつかの留意点がある。リポソームは様々な方法により調製できるものの、いかなる方法を採用してもリポソームの粒子径には分布がある。よって、遠心分離法では、その遠心分離操作にて、粒子径の小さなリポソームをも沈降させる適切な遠心分離条件を選択する必要がある。一方、透析法では、粒子径

が数十から数百ナノメートルのリポソーム粒子を透過させることなく、薬物のみを透過させることができる透析膜を選択することが重要となる。また、低分子の薬物であっても膜透過に時間を要するため、実際の薬物放出と得られる薬物放出プロファイルにタイムラグが生じる。^{8,9)} このタイムラグを考慮して解析する方法も報告されているが、¹⁰⁾ 薬物放出プロファイルを適切に評価できる複数の試料採取時点を選択することが重要である。加えて、薬物の器具等への吸着^{11,12)}にも注意が必要である。顕著な吸着が認められる場合には、吸着抑制¹²⁾等の対策が必要となる。

放出された薬物の定量には、通常、分離分析法である HPLC が採用される。HPLC 分析条件は、薬物の特性や試料中の薬物濃度を鑑みて適切な検出器を選択し設定する。特異性、感度、真度、精度に加え堅牢性を確保することが重要である。

HPLC 分析に先立つ試料の前処理として遠心分離法を採用するとき、一連の操作は時間を要し、ときにはエラーの発生を招く。また、試料中に極微細なリポソームが含まれ、超遠心分離では薬物とリポソームの分離が難しい場合もある。このような課題の解決を目的として、近年、超遠心分離時の試料中の粒子の沈降速度から粒子径や放出率を求める方法¹³⁾やリポソームの外相に薬物の安定同位体を添加し、LC/MS で評価する新たな評価法¹⁴⁾が報告されている。また、筆者らはリポソームと薬物の大きさや物理化学的性質の差異を利用してこれらを分離する nanoparticle exclusion chromatography (nPEC) を開発した。^{15,16)} 本法では、リポソーム試料を

nPEC カラムに直接注入するだけで、試料中の非封入型薬物をリポソームから分離・定量することができることから、試料の前処理を不要とする簡便・迅速な評価法の開発が可能となる。今後も新たな放出性評価法や分析法が考案されるであろうが、目的に応じた適切な方法を選択し、その妥当性を確認することが重要である。

製剤の開発過程において、製剤の処方や製法等を変更する際には、その変更が品質や性能に影響しないことを実証すべく製剤の同等性が評価される。同等性評価における *in vitro* 放出プロファイルの比較においては、経口固形製剤の溶出試験等と同様に similarity factor (f_2) が有用である。¹⁷⁾

3. *In vitro* 放出性に影響を及ぼす要因

リポソームからの薬物放出速度はリポソームの粒子径に依存することが報告されているが、¹⁸⁾ 一般にリポソーム製剤の粒子径は制御されていることから、*in vitro* 薬物放出に影響を及ぼす主たる因子は、試験液の組成や温度などの外部要因、リポソーム粒子の組成（膜及び内水相液）、並びにリポソームに封入又は担持される薬物の物理化学的特性となる。

これまでリポソーム放出性評価用の媒体には、等張化リン酸緩衝液（PBS）やヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）緩衝液など多様な試験液が用いられてきたが、塩基性薬物であるドキソルビシンを事例として、リポソームからの薬物の放出性に pH 緩衝剤の種類も影響することが報告されている。¹⁹⁾ これは試験液中の各イオンがホフマイスター効果等^{20,21)} の作用によりリポソーム膜の流動性を変化させ、²²⁾ 薬物の膜透過性を高める²³⁾ ためと考えられる。いかなるリポソーム製剤でも試験液の組成によって放出プロファイルが異なる可能性があるものの、試験液には pH 緩衝能を確保しつつ薬物に対する sink 条件を満たす生理的条件を適切に反映した媒体が選択される。

リポソーム膜の相転移温度は、その構成成分によって異なることから、試験液の温度も放出性を変化させる重要な因子となる。これはリポソームの脂質膜の流動性が温度に依存し、相転移温度で最も高くなる²⁴⁾ ためである。評価温度は、生体温度である 37°C 付近の一定温度とすることが妥当であるが、温度感応性リポソーム²⁵⁾ などのように薬物放出が温度に依存する場合、目的に応じて異なる温度を選択

することもできるであろう。加えてリポソーム製剤の中には、光、²⁶⁾ 超音波²⁷⁾ の刺激に応じて薬物を放出する処方もある。このような製剤においては、薬物放出機構に基づき、温度に加えその特徴・性能を実証できる評価条件を設定すべきである。

製剤の使用目的によっては、製剤の特性を鑑みて複数の放出試験条件を設定することもある。例えば、抗がん剤封入リポソーム製剤の場合には、血漿や腫瘍間質液中におけるリポソームからの有効成分の放出プロファイルにより製剤の特長を明示することができる。

薬物等化合物は、それぞれが特徴的な物理化学的性質（脂溶性や酸解離定数）を有し、リポソーム粒子分画中にて、他の分子との相互作用に基づいてリポソーム内水相と膜に分配し、存在状態が決定される。内水相中で対イオンと塩を形成し析出することもある。²⁸⁾ リポソーム内水相で結晶化した薬物が放出されるためには、内水相液への溶解、リポソーム膜への分配、膜透過さらに外水相液への溶解の過程を経る。よって、リポソームの内水相に封入された薬物の放出性は内水相液の組成にも依存する。さらに薬物の放出速度は薬物の存在状態、酸解離定数や脂溶性に基づき異なる。具体例として、PBS (pH 7.4) 中における脂溶性の異なる β ブロッカー群のリポソームからの放出速度は薬物の脂溶性に依存して高まることが報告されている。²⁹⁾ また、ヒト血漿 (pH 7.4) 中でのピリジン誘導体のリポソームからの *in vitro* 放出速度は、化合物の脂溶性スケール Alog P^{30} が 1.75–4.51（実測の $\log D_{pH\ 7.4}$: 2.6–3.6）の範囲で脂溶性度と高い相関を示した。³¹⁾

薬物の脂溶性が高く、薬物が内水相液にほとんど溶解せずにリポソーム膜に分配している場合、その放出は膜からリポソーム外水相への放出過程のみとなるが、筆者の経験に基づけば、リポソーム膜の親和性が高い化合物の中には、緩衝液中で化合物が放出されず、血漿タンパク質等を添加した媒体中での放出性評価が必要となった事例もある。このような薬物放出の機構は、リポソーム粒子表面へのタンパク質の吸着による膜流動性の変化、膜に担持された化合物のタンパク質との相互作用、さらにタンパク結合による見かけの溶解度の向上等によるものと考えられる。

他方、高脂溶性の抗真菌剤であるアムホテリシン

Fig. 2. Relationship between Non-ionized Ammonia Concentration and DOX Release (M) from PLD in Human Plasma in 24 h

(●) PLD (DOX concentration: 200 $\mu\text{g/mL}$) in ammonium acetate spiked plasma (90% plasma, total ammonia concentration: 286 μM , 5 mM and 50 mM, pH 7.4) and (○) PLD (DOX concentration: 200 $\mu\text{g/mL}$) in plasma (90% plasma, total ammonia concentration: 286 μM , pH 7.94, 8.34 and 8.76). (■) PLD (DOX concentration: 100 $\mu\text{g/mL}$) in 5.0 mM ammonium acetate spiked plasma (95% plasma, pH 6.6, 7.0, 7.4 and 7.8).³⁷⁾

Fig. 3. Time Course of *in Vitro* Doxorubicin (DOX) Release from Pegylated Liposomal DOX (PLD) in (○) Human Plasma (pH 7.4) and (●) Simulated Tumor Interstitial Fluid (human plasma containing 5 mM total ammonia at pH 7.0)³⁷⁾

Bを膜に担持したリポソーム製剤（アムビゾーム[®]）は血漿中であってもアムホテリシンBをほとんど放出しないものの、³²⁾ 本製剤を真菌細胞に添加し細胞培養すると、リポソームが真菌細胞壁に結合した後、リポソームが崩壊し、抗真菌作用を発揮する。³³⁾ このような製剤では先述のような放出された薬物を定量する手法で薬物放出性を評価することは困難であるものの、他のリポソーム製剤と同様に薬物放出性の評価が求められる。³⁴⁾ リポソーム中の薬物が効果を発揮するためには、薬物がリポソームから放出される必要があることを考え合わせると、アムホテリシンBリポソームのような製剤の場合には、*in vitro* 薬理活性の評価が放出性評価の代替となり得るかもしれない。

4. 薬物放出シミュレーションと放出性評価用擬似腫瘍間質液

近年、リポソームに封入された塩基性薬物がリポソーム外水相に含まれるアンモニア等の膜透過性塩基により放出される機構³⁵⁾に基づいて、その放出速度が評価・解析されてきている。^{36,37)}

表面をポリエチレングリコール（polyethylene glycol; PEG）で修飾したステルスリポソーム（PEG化リポソーム）を静脈内投与すると、リポソームは血中に滞留することで、³⁸⁾ Enhanced per-

meability and retention 効果³⁹⁾により腫瘍組織に集積する。そして腫瘍間質液中のアンモニアの濃度が高まっていることから、^{40,41)} リポソームから塩基性薬物が放出されると考えられる。⁴²⁾ これらの知見に基づくと、塩基性の抗がん剤を封入したリポソームは目的に合致した優れた特徴を有すると言える。

しかしながら、腫瘍間質液中でのリポソームの薬物放出速度は不明であった。そこで筆者らは、PEG化リポソームであってもその表面と血漿タンパク質が相互作用すること、⁴³⁾ ドキソルビシン封入リポソームのヒト血漿での放出性評価がドラフトガイドランスに例示されていること⁴⁴⁾を踏まえ、ヒト血漿中でのPEG化リポソームからのドキソルビシンの放出性への血漿pH及び血漿中アンモニア濃度の効果を評価した。そして、ドキソルビシンの薬物放出速度をHenderson-Hasselbalchの式を用いて化学量論的に解析した。さらに、腫瘍間質液中でのリポソームの薬物放出性をシミュレートするとともに薬物放出性評価用の擬似腫瘍間質液を設計した。³⁷⁾ 本検討にて、ヒト血漿中のアンモニア1分子により、リポソーム中のドキソルビシン10分子が放出されることが明らかとなった（Fig. 2）。また、ヒト血漿（pH 7.4）中及び擬似腫瘍間質液（5.0 mM アンモニアを含む pH 7.0 のヒト血漿）中でのリポソームからのドキソルビシンの放出速度を評価した結果、擬似腫瘍間質液中での放出速度が血漿中に比し

て15倍以上高まっていることが示された (Fig. 3).

今後はこのような知見を基に、擬似体液中でのリポソームからの薬物の *in vitro* 放出性が評価され、それぞれの製剤や薬物の物理化学的特性に基づく特徴付け、製剤の同等性評価を含む比較評価さらに *in vitro-in vivo* 相関の解析につながることを期待される。

5. おわりに

リポソームの薬物放出性は製剤の特性及び品質評価のみならず、投与後の効果及び安全性を見積もる重要な指標となる。それゆえ、薬物放出性はリポソーム医薬品の研究開発において、粒子径、薬物含量や封入率等と並んで必須の評価項目である。

今日、ガイドライン等で放出性評価媒体の例示はあるものの、リポソーム製剤の放出性を評価する標準的な条件や手法は定まっていない。今後、リポソーム医薬品数の増加や関連する知見の集積を経て標準法が開発され、リポソーム製剤の効率的な研究開発そして有用な製品の創出に結実することが期待される。

謝 辞 本研究に際し、有益なご助言とご協力を頂きましたエーザイ株式会社 兵頭健治博士、鈴木卓也修士、石原比呂之博士、菊池 寛博士、櫛田郁雄博士、浅川直樹博士 (現 島津製作所)、東京大学大学院薬学系研究科 加藤 大博士 (現 昭和大学薬学部) に深謝いたします。

利益相反 山本栄一は本総説の執筆・投稿時にエーザイ株式会社の社員であった。

REFERENCES

- 1) European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), "Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product," 2013.
- 2) Ministry of Health Labour and Welfare, "Guideline for the Development of Liposome Drug Products," 2016.
- 3) U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), "Guidance for Industry: Liposome Drug Products, Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation," 2018.
- 4) Shen J., Burgess D., *Drug Deliv. Transl. Res.*, **3**, 409–415 (2013).
- 5) D'Souza S., *Adv. Pharm.*, 304757 (2014).
- 6) Solomon D., Gupta N., Mulla N. S., Shukla S., Guerrero Y. A., Gupta V., *AAPS J.*, **19**, 1669–1681 (2017).
- 7) Bhardwaj U., Burgess D. J., *Int. J. Pharm.*, **388**, 287–294 (2010).
- 8) Zambito Y., Pedreschi E., Di Colo G., *Int. J. Pharm.*, **434**, 28–34 (2012).
- 9) Modi S., Anderson B. D., *Mol. Pharm.*, **10**, 3076–3089 (2013).
- 10) Schwarzl R., Du F., Haag R., Netz R. R., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **116**, 131–137 (2017).
- 11) Chao Y., Liang Y., Fang G., He H., Yao Q., Xu H., Chen Y., Tang X., *Pharm. Res.*, **34**, 610–618 (2017).
- 12) Yuan W., Kuai R., Dai Z., Yuan Y., Zheng N., Jiang W., Noble C., Hayes M., Szoka F. C., Schwendeman A., *AAPS J.*, **19**, 150–160 (2017).
- 13) Mehn D., Iavicoli P., Cabaleiro N., Borgos S. E., Caputo F., Geiss O., Calzolari L., Rossi F., Gilliland D., *Int. J. Pharm.*, **523**, 320–326 (2017).
- 14) Skoczen S., McNeil S. E., Stern S. T., *J. Control. Release*, **220**, 169–174 (2015).
- 15) Kimoto A., Watanabe A., Yamamoto E., Higashi T., Kato M., *Chem. Pharm. Bull.*, **65**, 945–949 (2017).
- 16) Yamamoto E., Miyazaki S., Aoyama C., Kato M., *Int. J. Pharm.*, **536**, 21–28 (2018).
- 17) Clark B. C., Dickinson P. A., Pyrah I. T., "Injectable Dispersed System: Formulation, Processing, and Performance, *In vitro/in vivo* release from injectable dispersed systems," ed. by Burgess D. J., Taylor & Francis, Boca Raton, 2005, pp. 125–157.
- 18) Yamauchi M., Tsutsumi K., Abe M., Uosaki Y., Nakakura M., Aoki N., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 963–966 (2007).
- 19) Shibata H., Izutsu K., Yomota C., Okuda H., Goda Y., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **41**, 1376–1386 (2015).

- 20) Sachs J. N., Woolf T. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8742–8743 (2003).
- 21) Klasczyk B., Knecht V., Lipowsky R., Dimova R., *Langmuir*, **26**, 18951–18958 (2010).
- 22) Song J., Franck J., Pincus P., Kim M. W., Han S., *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 2642–2649 (2014).
- 23) McCarley R. L., Forsythe J. C., Loew M., Mendoza M. F., Hollabaugh N. M., Winter J. E., *Langmuir*, **29**, 13991–13995 (2013).
- 24) Biltonen R. L., Lichtenberg D., *Chem. Phys. Lipids*, **64**, 129–142 (1993).
- 25) Yatvin M. B., Weinstein J. N., Dennis W. H., Blumenthal R., *Science*, **202**, 1290–1293 (1978).
- 26) Luo D., Carter K. A., Razi A., Geng J., Shao S., Giraldo D., Sunar U., Ortega J., Lovell J. F., *Biomaterials*, **75**, 193–202 (2016).
- 27) Jin Y., Liang X., An Y., Dai Z., *Bioconjug. Chem.*, **27**, 2931–2942 (2016).
- 28) Schilt Y., Berman T., Wei X., Barenholz Y., Raviv U., *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 108–119 (2016).
- 29) Betageri G. V., Parsons D. L., *Int. J. Pharm.*, **81**, 235–241 (1992).
- 30) Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J., *J. Phys. Chem. A*, **102**, 3762–3772 (1998).
- 31) Yamamoto E., Hyodo K., Suzuki T., Ishihara H., Kikuchi H., Asakawa N., Abstracts of papers, FIP Pharmaceutical Sciences World Congress/ AAPS Annual Meeting and Exposition, San Antonio, November 2013, M1429.
- 32) Kohno S., Kobayashi H., Masaoka T., Urabe A., Kanamaru A., Niki Y., Mori T., Hara K., Ikemoto H., Maniwa T., Nakajo E., Suzuki K., Yamaguchi H., *Jpn. J. Chemother.*, **61**, 347–368 (2013).
- 33) Adler-moore J. P., Proffitt R. T., *J. Liposome Res.*, **3**, 429–450 (1993).
- 34) U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Office of Generic Drugs, Draft Guidance on Amphotericin B, 2016.
- 35) Maurer N., Wong K. F., Hope M. J., Cullis P. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1374**, 9–20 (1998).
- 36) Fugit K. D., Xiang T.-X., Choi D. H., Kangarlou S., Csuhai E., Bummer P. M., Anderson B. D., *J. Control. Release*, **217**, 82–91 (2015).
- 37) Yamamoto E., Hyodo K., Suzuki T., Ishihara H., Kikuchi H., Kato M., *Pharm. Res.*, **35**, 103 (2018).
- 38) Gabizon A., Catane R., Uziely B., Kaufman B., Safra T., Cohen R., Martin F., Huang A., Barenholz Y., *Cancer Res.*, **54**, 987–992 (1994).
- 39) Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K., *J. Control. Release*, **65**, 271–284 (2000).
- 40) Eng C. H., Yu K., Lucas J., White E., Abraham R. T., *Sci. Signal.*, **3**, ra31 (2010).
- 41) Mariño G., Kroemer G., *Sci. Signal.*, **3**, pe19 (2010).
- 42) Silverman L., Barenholz Y., *Nanomedicine*, **11**, 1841–1850 (2015).
- 43) Crielgaard B. J., Yousefi A., Schillemans J. P., Vermehren C., Buyens K., Braeckmans K., Lammers T., Storm G., *J. Control. Release*, **156**, 307–314 (2011).
- 44) U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Office of Generic Drugs, Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride, 2010.