

寄稿論文

日本精化の高純度リン脂質と Presome[®] シリーズを用いた リポソーム液の調製

日本精化株式会社 精密化学品事業本部 リピッド事業部
富田 康治, 前田 典之, 松本 正樹

Abstract

最初のリポソーム製剤であるAmBisome[®]が米国で承認されてから30年以上が経過し、その間様々なリポソーム製剤、リピッドナノパーティクル製剤が承認された。これら製剤の多くに日本精化のリン脂質、コレステロール、また当社独自製法のPresome[®]が使用されている。本稿では当社が供給する高純度リン脂質、高純度コレステロールのご紹介とともに、Presome使用のメリットおよび使用方法につき述べる。

Keyword: リン脂質, Presome, リポソーム, LNP, ドラッグデリバリーシステム, 製剤化技術

■はじめに

リポソーム製剤やLNP(リピッドナノパーティクル)製剤の原料となるリン脂質は生体膜の主要構成成分であり、高い生体親和性をもつため、医薬品への応用が比較的容易に行える。リン脂質の物性を利用して調製されるリポソーム製剤は、治療効果を高める、副作用を軽減する、患者の負担を小さくする事で患者のQOL(生活の質)を改善する事を目的とし、ナノサイズのマイクロカプセルとしてリポソーム内に薬剤を封入し患部へ届ける、いわゆるドラッグデリバリーシステム(DDS)への利用を目的として盛んに研究され、今では多くのリポソーム製剤が承認され、現場の医療に貢献している。また最近ではファイザー社やモデルナ社のCOVID-19ワクチンの承認により、mRNAを主薬としたLNP製剤も改めて注目されている。これらの開発の歴史や有用性については多くの成書があるのでそちらを参照いただきたい。

世界中の製薬企業は、安全性や体内動態がわかっている既承認薬について、剤型変更や投与経路変更によって新たな薬効を見だし、別の疾患に対する薬として創薬する手法としてドラッグリポジショニングに盛んに取り組んでいる。既に臨床試験が終わっている原薬は安全性や毒性が検証済みであり、基礎研究や非臨床試験を省略または簡略化できる事で医薬品開発コストを大きく削減できる。また新薬開発の領域として、いまだ満たされていない医療ニーズ、つまり、いまだ有効な治療方法がない疾患に応え、希少疾患と呼ばれる難病を治療する、いわゆるアンメットメディカルニーズへの取り組みが非常に盛んに行われている。このドラッグリポジショニングとアンメットメディカルニーズへの取り組みで、各製薬企業では既存薬のリポソーム製剤化研究やLNPのプラットフォームを活用する動きが活発化してきている。

このリポソーム製剤とLNP製剤に共通して使用される素材として、日本精化が製造販売する医薬用の高純度リン脂質と高純度コレステロールがある。水中で容易に形成される脂質二重膜であるリポソームの中には低分子から高分子まで封入することができ、薬剤のカプセルとしてはきわめて理想的なものといえる。LNPはsiRNAが体内に投与された後でヌクレアーゼ等の酵素による分解から守ることと、低分子医薬品と比較し分子量が大きく負電荷を多く有するsiRNAをナノ粒子で包むことで疎水性の細胞膜を透過させやすくし、細胞質内への移行を促進できることから、注目されている。

表1. 承認済ナノ医療製剤

| 商品名 (上市年,国) | 薬剤 | 開発・ 販売会社 | 脂質組成 | 適応疾患 |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|---|-------------------|
| AmBisome® (’90, US) | Amphotericin B | Gilead | HSPC/DSPG/Cholesterol | 抗真菌症 |
| Doxil®/Caelyx® (’95, US/’96, EU) | Doxorubicin | ALZA | HSPC/Cholesterol/MPEG-DSPE | 卵巣がんなど |
| DaunoXome® (’95, US) | Daunorubicin | Gilead | DSPC/Cholesterol | カボジ肉腫 |
| Visudyne® (’00, US) | Verteporfin | QLT | DMPC/EPG | 加齢黄斑, 変性症 |
| EXPAREL® (’12, US) | Bupivacaine | Pacira | DEPC/DPPG/Cholesterol/ Tricaprylin | 術後疼痛抑制 |
| ONIVYDE® (’15, US) | Irinotecan | Merrimack | DSPC/Cholesterol/MPEG-DSPE | 膵臓がん |
| VYXEOS® (’17, US/’18, EU) | Daunorubicin and Cytarabine | Celator/ Jazz Pharma | DSPC/Cholesterol/DSPG | 急性骨髄性, 白血病 |
| ARIKAYCE® (’18, US) | Amikacin | INSMED | DPPC/Cholesterol | 緑膿菌感染症 |
| ONPATRO® (’18, US/’18, EU) | siRNA | Alnylam | DSPC/Cholesterol/DMG-PEG/ DLin-MC3-DMA | hATTRアミロイ ドーシス |
| Comirnaty® (’20, Worldwide) | mRNA | Pfizer/ BioNtech | DSPC/Cholesterol/PEG脂質/カチ オニックリピッド | 新型コロナワク チン |
| mRNA-1273 (’20, Worldwide) | mRNA | Moderna | DSPC/Cholesterol/PEG脂質/カチ オニックリピッド | 新型コロナワク チン |

■高純度リン脂質とナノ医療製剤への産業利用

2018年4月のFDAリポソーム製剤ガイダンス(Liposome Drug Products, Guidance for Industry)の発効によって、ホスファチジルコリン(PC)中にエステル結合している脂肪酸の純度を管理すべきことが規定された。たとえば様々な医薬品に使用されているHSPC(水素添加大豆レシチン)の構成脂肪酸はステアリン酸とパルミチン酸がモル比約8:1の割合で結合している状態である。HSPCは天然物由来のリン脂質であることから、この脂肪酸の割合は大豆の由来、産地、精製法、またロットによっても変動する可能性が高い。またEPC(卵黄レシチン)も同様であり、卵黄はニワトリの卵から得られるが、このニワトリの餌や飼育環境によってEPCの脂肪酸純度が変わる事は当社でもデータを取得し把握している。ロットによって脂肪酸の比率が異なるということは化学的に見れば複数の化合物の混合物となり、脂肪酸純度の変動するということは、複数の化合物の混合比が変化する。疎水性を担う脂肪酸の割合が変動すれば、これを用いたリポソームの性能にも影響が出る

可能性がある。

FDAガイドラインに記載されているように脂肪酸純度を制御する事は、大豆やニワトリまで遡って管理する必要があるため困難である。従って、リポソームやLNP製剤の設計段階でこれらの脂肪酸純度の変化をカバーする試験データを取得し、製剤承認後も、原料の脂肪酸純度をロットごとにチェックし、規格外の物は除外して製造に用いる必要がある。このFDAのガイドライン発効を受け、その後、製剤検討ではジェネリック医薬品開発を除いて天然由来のレシチンを使う事が徐々に少なくなり、代わりに脂肪酸がそろったレシチン=高純度リン脂質が使用されてきている。一般的には99%以上といった高純度に精製された脂肪酸を用いて高純度リン脂質が製造されている。恒常的に安定したリポソーム性能を求めるとであれば、高純度リン脂質は非常に有効である。日本精化は、脂肪酸純度を揃えた高純度リン脂質シリーズを既に1990年代初頭から開始し、今では年間で商業的に数トン以上を生産している。Gilead社のアムビゾーム®等を始め、様々な製剤に活用されている。

高純度リン脂質を医薬品用原料として製造する為には、100 kg単位での製造を安定に行う為の様々な生産技術が求められる。特に高純度リン脂質を製造するためには純度99.0%以上といった高純度脂肪酸を用いなければならないが、高純度脂肪酸が市場から直接大量に直接入手できるケースは稀であり、多くは自社で精製を行ってから用いることが多い。ただし、脂肪酸の純度を上げることは一般的に容易ではなく、不純物として微量に含まれている炭素数が少し違う脂肪酸、例えばパルミチン酸の中に微量含まれるステアリン酸を分離精製するためには高い技術力が必要である。

■高純度コレステロール

コレステロールは不飽和脂質膜では脂質分子の相互作用を強め、膜透過性と流動性を減少させる（fluidizing効果）。一方、飽和脂質に加えると相転移が消失し、ゲル相の温度でも流動性を有する膜になる（condensing効果）。コレステロールが存在すると、相転移での劇的な流動性変化が消失するため、結果として相転移温度以上では流動性の減少が、相転移温度以下では流動性の増加が観察される。このような性質はリン脂質に対し、30モル%以上コレステロールが加わった時に顕著になる。そのため、リポソーム製剤やLNP製剤には、高純度リン脂質とともにコレステロールが用いられることが多い。コレステロールは天然由来原料を精製して製造するケースが多いが、天然原料にはラトステロール、デスモステロール、ジヒドロコレステロールなどの類縁物質を不純物として含み、これらの化学構造が類似しているため単純に精製を繰り返すだけでは高純度を達成しにくい。日本精化では自社技術を利用し、注射剤用グレードとして高純度コレステロール（商品名:コレステロールHP）の製造及び販売を行っている。日本精化が製造するコレステロールの純度は99.0%以上であり、これらは多くの上市リポソーム医薬品に使用されている。

■リポソーム製剤の研究開発

リン脂質を水溶液中に懸濁させると、脂質二重膜を形成して内部に水相を有する閉鎖小胞となる。この閉鎖小胞がリポソームであり、内部に様々な活性物質を取り込むことができる。研究段階においては、数mL程度のリポソーム液を調製する方法としてバンガム法があり、また他にもいくつかの手法が成書で説明されており、その多くは簡便なものとなっている。研究初期段階ではこれでも問題ないが、製剤開発の進捗とともに1 Lや10 L等のパイロットスケールでリポソーム液を実際に製造するとなった場合、バンガム法ではスケールアップが困難な場合がほとんどである。その結果、実験室で少量調製を行っていた手法とは別のリポソーム調製法に変更しなければならない場合が多い。リポソーム液の製造方法が変われば製剤性能の再現性に欠ける等

の不具合を生じる可能性もある。またどの手法を選択する場合でも、リポソーム調製で最も重要なことは原料のリン脂質やコレステロールを分子レベルで均一に混合し、水和しなければならない点である。この点が不十分であると疎水性であるコレステロール同士が凝集し、うまくリポソーム膜に入らずに析出してしまふ。また、例えば原料が分子レベルまで混合できた場合でもその混合物が塊や固体のような水和しにくい形態であれば、水和工程を今まで以上に強化する必要がある、そのため新たに設備投資が必要となる場合も考えられる。有機溶媒を用いてリポソーム液を調製する手法も多く存在するが、その場合は製剤中に残留する有機溶媒の除去方法の確立と除去レベルの管理という新たな作業が発生することになる。

■リポソームを簡単に調製できる脂質混合物 “Presome”

Presomeは日本精化の独自技術で製造した脂質混合物であり、リポソーム製造の複雑な操作を大幅に省くことが可能である。有機溶媒を使わず水溶液を加え軽く攪拌するだけで、粒子径1 μm程度のMLV(多重層膜)リポソーム液を得ることができる。この後、必要に応じて目的の粒子径までサイジングすることで要望するリポソームを得ることが可能である(図1)。Presomeは単に脂質粉末を混合したのもでも、脂質混合溶液から溶媒を除去したのもでもなく、リポソーム調製用に特別な工程を経た分子レベルの脂質混合物で、リポソーム製造工程の簡略化、大量製造、高濃度液の調製に最適である。下記にPresomeを使用するメリットを列挙する。

- リポソーム液製造の複雑な操作を大幅に省略
- 大量製造(最大20 kg/ロット)、高濃度液の調製
- 有機溶媒を使用せずにリポソーム液を調製
- ご希望の脂質組成でPresomeを製造
- 脂溶性の物質を含めたPresomeも調製(不可の場合有り)
- 原料の脂質に日本精化の高純度リン脂質、高純度コレステロール、機能性リン脂質等を利用可能
- 一貫した品質管理/GMP管理

PresomeはSDGs(持続可能な開発目標)に合致した原材料であり、20年以上もの間に渡り上市医薬品、治験薬にも利用され、その性能が評価されている。なお上記に紹介した当社のPresomeを含め、高純度リン脂質や高純度コレステロールも東京化成の試薬として販売されているため、是非購入してお試しいただきたい。

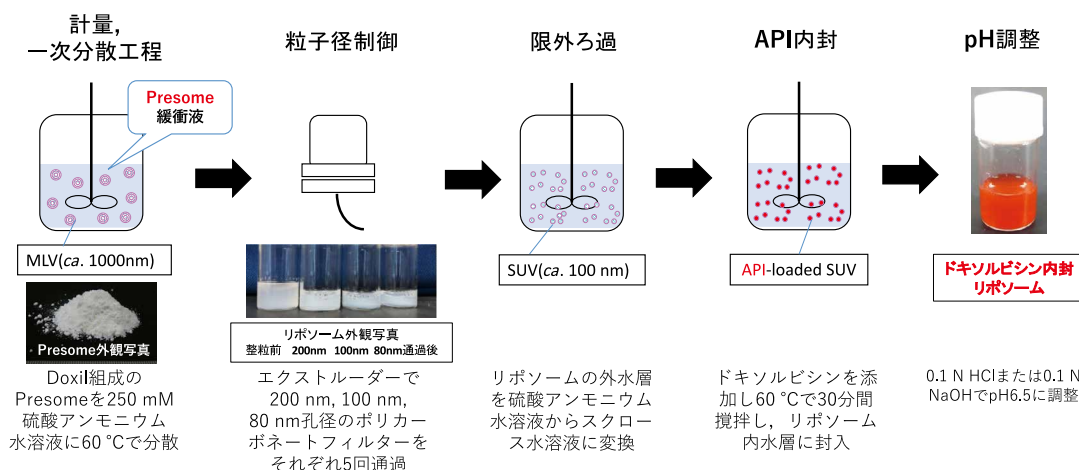


図1. Presome法によるドキシソルピシン内封リポソームの調製方法

■ Presome を用いた市販リポソームの調製

Presomeの有用性を確認するため、予め作成したPresomeを使ってすでに製剤化されているリポソーム製剤3種につき文献を参考にして調製した(1, 2, 3)。調製したそれぞれのリポソームの薬物封入率および物性データを表2に示す。

表2. Presomeを使用したリポソームの封入率および物性データ

| 製剤名 | 参考文献 | 薬物 | 薬物封入率 ¹⁾ | 脂質濃度 | 薬物濃度 | 粒子径 (PDI) |
|------------|------|---------------|---------------------|--|------------|----------------|
| DOXIL® | (1) | Doxorubicin | 100% | HSPC/Cholesterol/MPEG2000-DSPE=9.6/3.2/3.2 (mg/mL) | 2.0 mg/mL | 101 nm (0.048) |
| ONIVYDE® | (2) | Irinotecan | 99% | 未測定 | 2.3 mg/mL | 120 nm (0.091) |
| Pulmaquin® | (3) | Ciprofloxacin | 98% | HSPC/Cholesterol = 62.4/26.9 (mg/mL) | 43.7 mg/mL | 103 nm (0.038) |

1) 薬物の投与量に対するリポソームからの回収率

上記の通り、いずれの薬物もリモートローディング法を用いてリポソームに封入したが、高効率で薬物を封入することができ、脂質に関しても期待された濃度で調製することが可能であった。そのため、Presomeを使用した場合においても市販品と同等の製剤を調製可能であることが示唆された。また、上記の3製剤に加えてVYXEOS®もPresomeから調製可能であることを示唆している。

■ 終わりに

30年以上も前から世界中の研究機関によりリポソームを用いた医薬品の研究開発が盛んに行われており、最近ではコロナウイルスワクチン用途のLNP製剤にも注目が集まっている。新型コロナウイルス治療や予防等のまだ満たされていないアンメットメディカルニーズへ対応するために、既存製剤のドラッグリポジショニングによるDDS技術開発が見直され、リポソームやLNP等のナノ医療分野の研究が益々盛んに行われるようになっていく。その中で当社の高純度リン脂質や高純度コレステロールの生産量も年々増加しており、ナノ医療分野はますます発展すると考えられる。これらの原料を製造する日本精化は、研究開発機関、製薬メーカー、医療機関、医師そして患者様に安心して利用いただくため、そして安定した製剤性能を再現良く発現させられるようにするため、今後も安定した品質の製品の生産を行っていくことで、ナノ医療分野に新たな価値を提供する事が我々に課せられた使命と考えている。

日本精化は、2018年2月に創立100周年を迎えた。日本樟脳株式会社として1918年に設立された当社は、戦後の樟脳専売制度廃止という大きな試練を乗り越え、油脂事業への転換を果たした。1971年、社名現在の「日本精化株式会社」とし、ファインケミカルメーカーとして新たなスタートを切った後、今日まで、独自の化学分野を切り開くことによって業容を拡大してきた。これからも、変革し続け、持続的に成長する企業、全ての人々にとって無くてはならない存在を目指す。

Presome®は日本精化株式会社の登録商標です。また、表1.および表2.にある商品名および製剤名は、それぞれの開発・販売会社の登録商標です。

引用文献

- (1) Gregoriadis, G. (ed.). *Liposome Technology* 1984. vol. I, II, III. Boca Raton, FL: CRC Press.
- (2) C. O. Noble, M. T. Krauze, D. C. Drummond, Y. Yamashita, R. Saito, M. S. Berger, D. B. Kirpotin, K. S. Bankiewicz, J. W. Park, *Cancer Res.* 2006, 66, 2801.
- (3) D. Cipolla, H. Wu, S. Eastman, T. Redelmeier, I. Gonda, H.-K. Chan, *J. Pharm. Sci.* 2014, 103, 314.

執筆者紹介

富田 康治

2006年4月－2010年3月 京都工芸繊維大学工学部応用化学課程
 2010年4月－2012年3月 京都工芸繊維大学大学院工学部研究科生体分子工学前期博士課程
 2012年4月 日本精化株式会社入社
 現在 日本精化株式会社精密化学品事業本部リビッド事業部開発課所属

前田 典之

1994年4月－1998年3月 大阪市立大学理学部化学科
 1998年4月－2000年3月 大阪市立大学大学院理学研究科物質分子系専攻前期博士課程
 2000年4月 日本精化株式会社入社
 2002年4月－2005年3月 静岡県立大学大学院薬学研究科製薬学専攻博士後期課程
 現在 日本精化株式会社精密化学品事業本部リビッド事業部開発課長

松本 正樹

1989年4月－1993年3月 大阪市立大学工学部応用化学科
 1993年4月－1995年3月 大阪市立大学大学院工学研究科応用化学専攻前期博士課程
 1995年4月 日本精化株式会社入社
 現在 日本精化株式会社精密化学品事業本部リビッド事業部長

関連製品

| | | | |
|---|--------------|---------------|-------|
| Cholesterol (>99%) (stabilized with α -Tocopherol) | 1g 9,400円 | 5g 32,700円 | C3624 |
| DOP-DEDA | | 50mg 23,000円 | D5882 |
| Presome® ACD-1 | | 100mg 12,000円 | P2807 |
| Doxorubicin Hydrochloride | 25mg 25,000円 | 100mg 75,000円 | D4193 |
| Daunorubicin Hydrochloride | 20mg 13,200円 | 100mg 46,300円 | D4532 |
| Bupivacaine Hydrochloride | 5g 9,100円 | 25g 37,300円 | B3925 |
| Irinotecan Hydrochloride Trihydrate | | 100mg 28,200円 | I0714 |
| Cytarabine | 1g 3,400円 | 5g 11,400円 | C2035 |
| Amikacin Sulfate | 5g 5,500円 | 25g 15,300円 | A2281 |
| Ciprofloxacin | 5g 3,800円 | 25g 11,900円 | C2510 |

*これらの関連製品は試験研究用薬品(試薬)です。試験研究目的以外ではご使用いただけません。