

# Technical Report

## FFF-C8030を用いた薬剤内包／非内包リポソームの比較測定

Comparative measurement of drug-encapsulated/non-encapsulated liposomes using FFF-C8030

日光 政隆<sup>1</sup>、青木 健吾<sup>1</sup>、中村 文子<sup>2</sup>、加藤 晴久<sup>2</sup>

### Abstract:

遠心フィールドフローフラクショネーション（遠心FFF）ユニットFFF-C8030を用いて薬剤を内包するリポソームと非内包リポソームを比較測定しました。遠心FFFは試料の質量に応じた分離ができ、FFF-C8030は最大発生遠心力が高いため、リポソームのような軽い粒子も分析できます。測定の結果、保持時間と粒子径の関係を比較することで、リポソーム中の薬剤濃度を推定できる可能性があることが分かりました。

**Keywords:** Field-Flow Fractionation、Centrifugal Field-Flow Fractionation、Sedimentation Field-Flow Fractionation、遠心フィールドフローフラクショネーション、遠心FFF、FFF-C8030、DDS、LNP、リポソーム

## 1. 背景

核酸医薬・mRNA医薬品が期待される薬効を得るには、塩基配列設計の最適化に加え、「投与後に体内で分解を受けることなく、ターゲットとする臓器に届ける」ためのドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System：DDS）が重要です。国内ではDDSとしてリポソームを用いた医薬品が早期に上市され、厚労省はリポソーム開発関連ガイドライン<sup>1)</sup>を2016年に発出しています。このガイドラインでは、リポソーム製剤において特に考慮すべき品質特性として、粒度分布や有効成分の封入率などが挙げられています。

リポソームは、生体膜を構成する成分と同じリン脂質から形成される脂質二重膜からなる小胞で、その内部に水溶性薬物、脂溶性薬物、高分子といった幅広い薬物を封入でき、さらにはその粒子径を制御することで、体内の特定部位のみに吸収されるようにすることが可能です。

本稿では、遠心フィールドフローフラクショネーション（遠心FFF、CF3）を用いて、市販されているクロドロン酸内包リポソームの分級分析を行った事例をご紹介します。

## 2. 遠心FFF

島津製遠心FFFシステムの外観をFig.1に、遠心FFFシステムの模式図をFig.2に示します。同システムは、遠心力を発生させる遠心FFFユニット、送液ポンプ、試料注入装置、検出器で構成されます。分析において、試料はポンプで送液されるキャリア液に注入され、次いで遠心FFFユニット（FFF-C8030）の内部に導入されます。FFF-C8030では、円環上のチャンネルが高速で回転しており、そこで生じる遠心力により試料が分級されます。FFF-C8030は最大発生遠心力が15,900 ×gと大きいため、従来では困難だった小さくて軽い粒子を分析できます。遠心FFFの詳細については、Technical Report C190-0526および、Technical Report C190-0539をご参照ください。



Fig. 1 遠心FFFシステムの外観

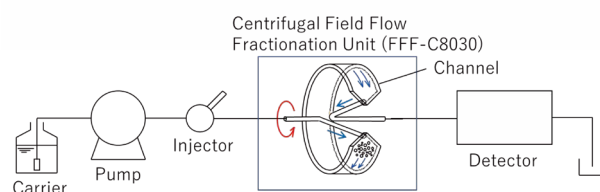


Fig. 2 遠心FFFシステムの模式図

## 3. 薬剤内包／非内包リポソームの測定

遠心FFFでは遠心力を利用するため、試料粒子の質量に応じて保持時間が変化します。リポソームが内包している薬剤の濃度が異なれば、同じ粒子径であってもリポソームの質量に差があると考えられます。すなわち、遠心FFFの保持時間の差からリポソーム中の薬剤濃度を推定できると期待されます。

そこで、遠心FFFで薬剤を内包しているリポソームと非内包のリポソームの保持時間の差を確認するために、市販のクロドロン酸内包リポソーム（以下、内包リポソーム）と非内包のリポソーム（以下、非内包リポソーム）をFFF-C8030システムを用いて分析しました。検出器には多角度光散乱検出器（MALS）を使用しました。測定したリポソームの平均粒子径カタログ値は250～350 nm（平均半径125～175 nm）です。測定条件をTable 1に示します。

1 島津製作所 分析計測事業部

2 産業技術総合研究所 計量標準総合センター

Table 1 測定条件

System	: Nexera™ lite
Centrifugal field-flow fractionation unit	: FFF-C8030
Mobile phase	: 67 mmol/L Phosphate buffer (pH 7.2), 160-14481, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Japan
Flow rate	: 1 mL/min
Injection vol.	: 10 $\mu$ L
Initial rotation speed	: 12000 rpm (15,900 $\times$ g)
Period of constant field (T1)	: 10 min
Decay constant (-Ta)	: 40 min
Relaxation time (Trelax)	: 2.5 min
Detection	: Multi angle light scattering (DAWN HELEOS II, Wyatt Technology Corp.)

Table 2 分画液の密度測定結果

分析試料	密度 (g/cm <sup>3</sup> )
内包リボソーム	1.025
非内包リボソーム	1.011

Fig.3およびTable 2に示す結果より、遠心FFFではリボソームの密度差に応じて分離がなされ、保持時間と粒子径の関係からリボソーム中の薬剤濃度を推定できる可能性があると考えられます。

## 5. まとめ

遠心FFFを使って薬剤内包/非内包リボソームを比較測定しました。保持時間と粒子径の関係を比較することで、リボソーム中の薬剤濃度を推定できる可能性があることが分かりました。

また、キャリア液と分析試料の密度差に応じて試料に働く遠心力は変化します。そのため、試料の密度や粒子サイズを考慮してキャリア液の密度を調整することで、分級の最適化を行える可能性があります。

粒子と分離流路表面の相互作用など、その他の要因が影響する可能性も考えられるため、各要因の影響を評価していく必要はありますが、遠心FFFはリボソーム試料に対する分析手法として期待されます。

### 参考文献

- 1) リボソーム製剤の開発に関するガイドライン（平成28年3月28日付 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長通知（薬生審査発0328第19号））

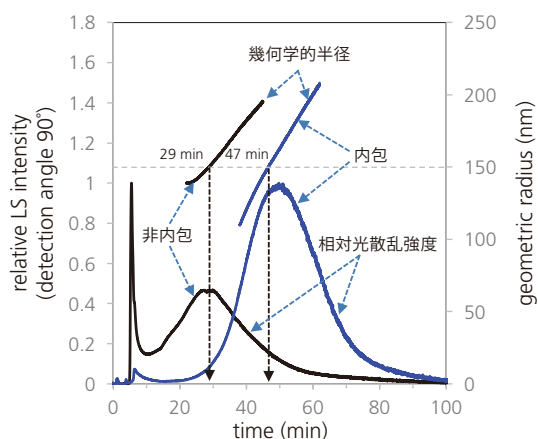


Fig. 3 内包/非内包リボソームの分析結果

Fig.3に内包および非内包リボソームをMALSで測定した相対光散乱強度（検出角度90°）と幾何学的半径を示します。光散乱強度の結果からは、非内包リボソームの方が内包リボソームよりも保持時間が早いことがわかりました。幾何学的半径の溶出曲線からも、サイズの同じ粒子であれば、非内包リボソームの方が早く溶出することがわかりました。例えば、幾何学的半径150 nmのリボソームが溶出している時間は、内包リボソームで47分、非内包リボソームで29分でした。

## 4. 粒子密度の測定

この保持時間の差が粒子の質量（密度）に由来するものか調べるため、実際に内包/非内包リボソーム粒子の密度を測定しました。

まず、遠心FFFで分級した試料を分画採取し、サイズの揃ったリボソーム試料を用意しました。次に、この試料中に含まれるリボソーム粒子の質量を共振質量測定法により測定し、動的光散乱法（DLS）によって測定した粒子径から体積を求めて、粒子密度を算出しました（Table 2）。測定の結果、非内包リボソームより内包リボソームの方が密度が大きいことがわかりました。

Nexera は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所**  
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2023年3月  
© Shimadzu Corporation, 2023