



WP2608: 脂質ナノ粒子およびリポソームの FFF-MALS-DLS による性状解析

Christoph Johann, Ph.D., Wyatt Technology

日本語訳：昭光サイエンス株式会社

はじめに

脂質ナノ粒子（LNP）およびリポソームは、それぞれ内部構造の異なる脂質ベースの薬剤キャリアーです。リポソームはリン脂質膜が水溶性の内部の空洞を取り囲む、天然の細胞壁の合成類似物となっています。LNP にはナノエマルジョン、ミセル、固体脂質ナノ粒子（SLN）が含まれます。リポソームと LNP は、構成成分、構造、形態を制御でき、これらの性質をそれぞれ特定の薬学的応用に応じるようデザインすることにより、ドラッグデリバリーシステムに広く利用されています。

薬学上、迅速かつ効果的な製品開発および規制当局の認可のためには、粒子を包括的に性状解析することが求められています。評価すべき基礎的な性質は、サイズ分布とゼータ電位です。さらに、粒子の内部構造、薬剤の取り込みモード、薬剤の取り込み能力および薬剤放出の速度論に関する知識はドラッグデリバリーシステムの開発を成功させる鍵となる重要な因子です。

粒子の解析方法

ナノ粒子の粒子径測定には動的光散乱（DLS）、電子顕微鏡（EM）、ナノ粒子トラッキング解析（NTA）など種々の方法が用いられます。

- バッチ DLS 粒度分布測定法は、迅速で簡便な測定法で、粒度分布の全体像を測定するのに優れますが、半定量的で、分解能が低く、また結果が大粒子側に偏りやすくなる欠点があります。
- EM は粒子径と構造を高分解能で、真の定量的な分布を与えますが、試料の十分な前処理が必要で、かつ粒度分布の全体像を捉えることは困難で、数百～数千個の粒子しか測定できないという欠点があります。

- NTA は一部の小粒子の個数分布を測定できますが、粒度分布の分解能は中程度で、測定可能な粒子径範囲も限られています。また結果が大粒子側に偏る傾向もあります。

FFF-MALS-DLS は詳細かつ正確で定量的な粒度分布を測定可能な、非常に汎用性の高い技術です。他の手法と異なり、大きさの異なる粒子が混在した試料でも正確な粒度分布測定が行えます。FFF-MALS-DLS はサイズごとに粒子を分離するフィールドフローフラクショネーション（FFF）と、粒子径と粒子の構造を決定するオンライン多角度光散乱と動的光散乱（MALS、DLS）を組み合わせたものです。さらに UV/VIS、蛍光、RI のような検出器を付加することで、ドラッグデリバリーシステムを担うナノ粒子の解析にさらなる機能性を持つ強力な分析システムになります。



FFF-MALS-DLS とは

FFF-MALS-DLS システムは次の 2 つのシステム構成で成り立っています:

1. **分離部:** Eclipse™ FFF 機器と、送液ポンプ、脱気装置、オートサンプラーなどの標準的な HPLC 機器。
2. **解析用検出器部:** WyattQELS™ オンライン DLS モジュールを内蔵した DAWN®多角度光散乱 (MALS) 検出器、および追加の HPLC UV または蛍光検出器。MALS は根自乗平均 (rms) 半径 R_g (回転半径) を決定し、DLS は流体力学的半径 R_h を決定します。さらに、 R_h は FFF の任意の検出器からのピークを用いて保持時間からも見積もることができます。

Eclipse については <https://www.shoko-sc.co.jp/products/equipment/fff/index.html> を、多角度光散乱検出器 DAWN については https://www.shoko-sc.co.jp/products/equipment/light_scattering/dawn/index.html をご覧ください。

ケーススタディー #1: 固体脂質ナノ粒子およびナノ構造を持つ脂質キャリア

固体マトリックスを持つ脂質ナノ粒子は完全に生体適合性があり、FDA 認可の脂質と安定剤から成ります。これは取り込まれた薬剤を過酷な条件下 (例えば口腔摂取) で保護し、脂質の構成成分は

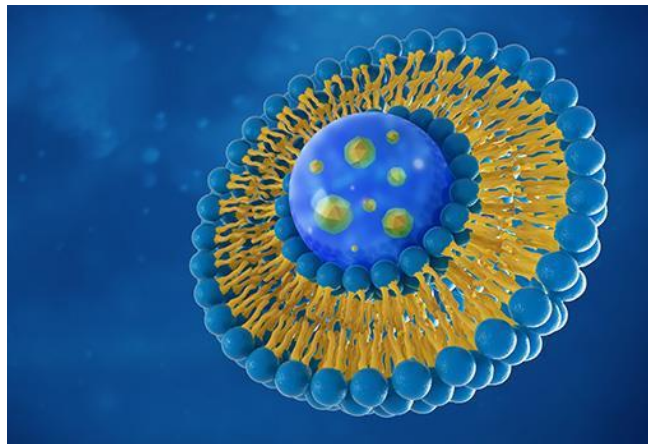


図 1 リポソームおよび脂質ナノ粒子製剤は、標的を定めて効果的な送達を可能にします。ここに示したリポソームはコアに薬剤ペイロードを包み込んだものですが、膜層に組み込んだり、粒子の表面に付着したりできます。

薬剤の取り込みと放出に最適になるように調製されます。

固体脂質ナノ粒子 (SLN) の短所は挿入できる薬剤の量が制限されていることで、これは脂質コアの結晶構造の結果です。この制限を克服するために、さらに多くの薬剤を挿入するのに適したナノ構造脂質キャリア (NLC) が開発されました。

NLC 開発の初期の段階では、固体 SLN やナノ構造 NLC の形態は知られていませんでした。粒子中で液相と固相がどのように配置されているか、また、粒子が球形なのか、他の形状をとっているかも明らかではありませんでした。これらの性質を知ることが薬剤挿入と放出制御を最大化するために重要になります。

これらの疑問を明らかにする研究³において、3つの異なる LNP を比較しました: 球状の液滴を持つことが知られているナノエマルジョン、固体 SLN、および液体と固体の脂質の混合物を含む NLC です。これらの試料を FFF-MALS、EM、バッチ DLS によって解析しました。

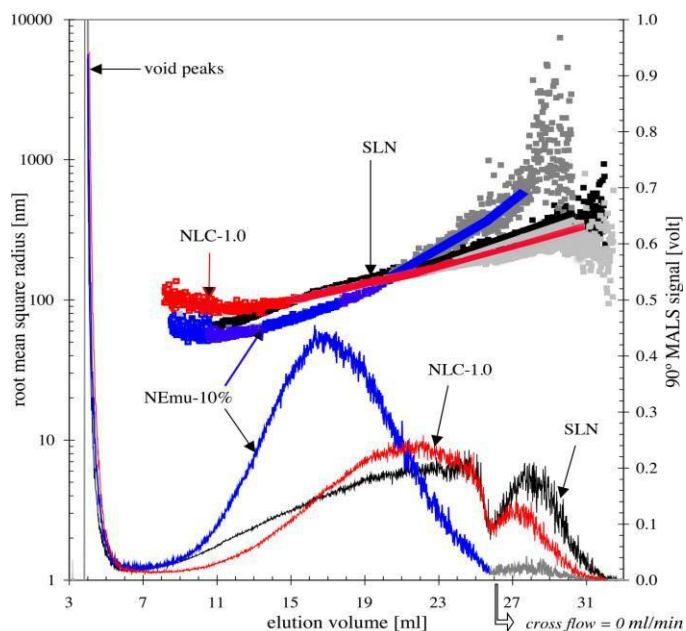


図 2 ナノエマルジョン (NEmu-10%, 青)、SLN (黒) および NLC (赤) の AF4-MALS フラクログラム。90°の LS 信号を MALS から計算した RMS 半径と重ねて描いてあります。ナノエマルジョンの半径は他の 2 つの試料と比べて溶出体積が 11、20mL 小さく、SLN と NLC がより細長い構造を持っていることを示しています (文献 3 の図を改変)。

標準的なバッチ DLS 測定は低分解能の技術であり、大きさや構造に関しては詳細を明らかにできません。しかし、DLS ではマイクロエマルジョンに比べて SLN や NLC がより高い多分散度を持つことを示し、不均一性を示唆しています。これは FFF-MALS と EM の結果からも明らかになりました。

FFF-MALS はバッチ DLS よりも試料のより詳細な情報を明らかにします。図 2 の例ではメインのフラクトグラムにおいて、SLN と NLC が特定の溶出時間においてナノエマルジョンに比べて高い R_g 値を持つことを明らかにしています。FFF における保持時間は流体力学的半径に直接関係しているため、両タイプの脂質粒子は球状ではなく、若干長い形をしていると結論付けられます。これらの結果は、EM の画像が液滴がついた針状および回転楕円体の混合物であるという結果からも確認できました。つまり、これらの方法の組み合わせは、双方の情報を補完することができ、粒子の形態の理解を深めることができるツールであることを証明できました。

ケーススタディー#2：脂質ベースナノ粒子の前臨床解析

最近の文献によれば⁴、医薬ナノ粒子の安全性と有効性の評価のキーとなる要素は粒子サイズ分布と安定性です。著者たちは要旨で次のように述べています：「粒子の平均サイズとサイズ分布の測定は挑戦的な仕事で、独立な複数の高分解能のサイズ測定技術、特に複雑な生物学的媒体中での測定の組み合わせが必要です。残念なことに、その制限にもかかわらず、…バッチモードの動的光散乱 (DLS) が未だにナノ医療分野での粒子サイズ分布を測定する唯一の方法になっていることがしばしばです。…AF4-MALS-DLS は脂質ベースのナノ粒子の前臨床解析に強力な方法です。」

この文献では、DLS、AF4-MALS-DLS、TEM による解析データを比較することによってこの結論を支持しています。そこでは 3 つの異なる Lipidots™ 製剤を用意し、新たに調製された試料、3 か月および 6 か月保存した試料、および血清とインキュベートした試料のサイズ分布を測定しています。図 3 は、フラクトグラムと MALS から求めた RMS 半径を、

新鮮な脂質ナノ粒子の結果と、4°C で 6 か月保存した試料の結果とを比較したものです。

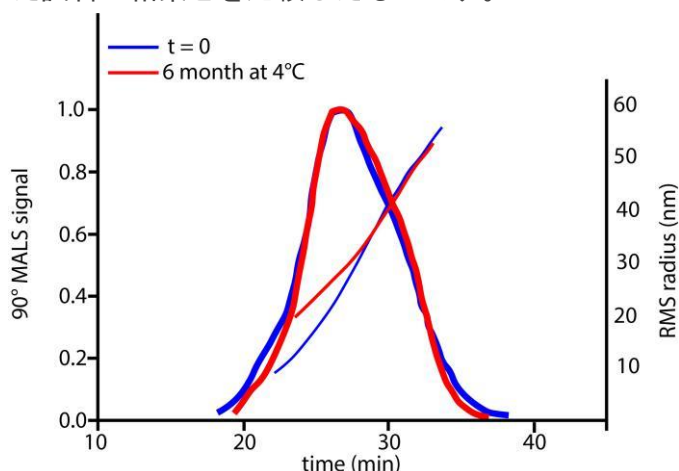


図 3 脂質、レシチン、および色素溶液の混合物を有効成分として調製した Lipimage815™ の AF4-MALS フラクトグラム。重ね書きは $t = 0$ および 6 か月保存後の試料を比較しており、溶出時間 23-30 分の間で RMS 半径が増加していることを示しています (文献 4 の図を改変)。

バッチ DLS では両試料は同一であるように見えました。FFF-MALS の結果は初期の溶出時間において R_g が増加していることが明らかであり、より長い粒子形状が形成されていることを示しています。FFF-MALS によるこれらの微妙な違いの測定はバッチ DLS だけでは検出不能で、薬剤ナノキャリアシステムの製品開発に少なからぬ影響を与える可能性があります。

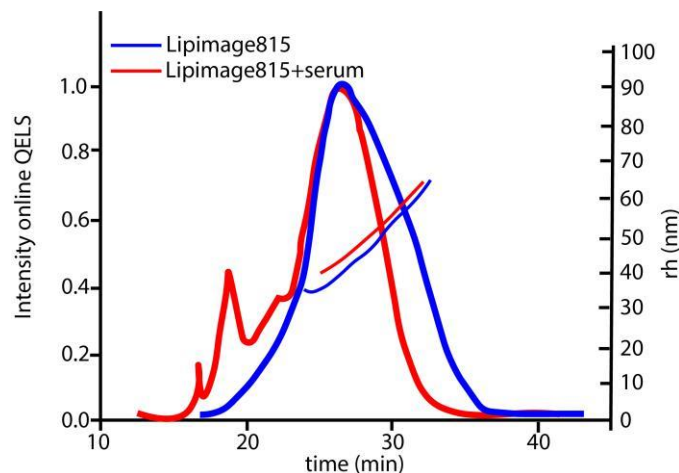


図 4 血清とインキュベートした脂質ナノ粒子と元の脂質ナノ粒子を比較した AF4-DLS (QELS) フラクトグラム。元の試料と比べて、血清とインキュベートしたものはピーク幅が狭くなっています。このような微妙な変化は DLS または NTA では検出できません (文献 4 から改変)。

薬剤が静脈注射を目的として調製されている場合、重要な考慮点は脂質ナノ粒子と血清との相互作用です。生体マトリックスは解析をさらに困難にします。バッチ DLS もナノ粒子トラッキング解析 (NTA) も有用な結果を与えることができません⁴。しかし、FFF によって脂質ナノ粒子を他の成分から分離でき、図 4 に示すように、オンライン光散乱によって効果的な解析が可能になります。

ケーススタディー #3: リポソームからの薬剤の受け渡し

リポソームは薬剤分子や RNA ベースの治療薬のデリバリーのキャリアーとして一般的に用いられています。薬剤はリポソームのコアに含まれるか、脂質二重層に組み込まれるか、外表面に付着します。リポソームによる調製の目的は、患者の特定の部位に薬剤を届けて放出することです。

非経口で与える場合、薬剤とリポソームは異なるクリアランス動態をとり、リポソーム自体が血流から除去される前に薬剤が早期喪失してしまう恐れがあります。脂溶性および両親媒性の薬剤は、リポソームからリポ蛋白質、血球の細胞膜または血清アルブミンのような豊富な蛋白質に再配分される可能性があります。

予測モデル

体外での薬剤損失の程度を予測するための試験は、例えば、薬剤を運ぶドナーリポソームと大きな多層小胞のようなアクセプター脂質粒子などの試験があります。薬剤送達の程度や動態の解析では、ドナー粒子とアクセプター粒子を分離して定量化する必要があります。この薬剤送達モデルの解釈は効率的なリポソームベースのドラッグデリバリー製剤の開発に重要です。伝統的には、これは卓上遠心分離機と放射性標識によって行われてきました。

FFF-MALS を用いることにより、ラベルなしで正確かつ簡便な予測が可能となりました⁵。ドナーリポソームは、アクセプターとして機能する、より大きい多層小胞から、FFF によってベースライン分離され、狭いサイズ分布のピークとして溶出されます。UV 吸収または蛍光で検出可能な色素分子は、ドナーからアクセプターに転送されるモデル薬剤として機能します。

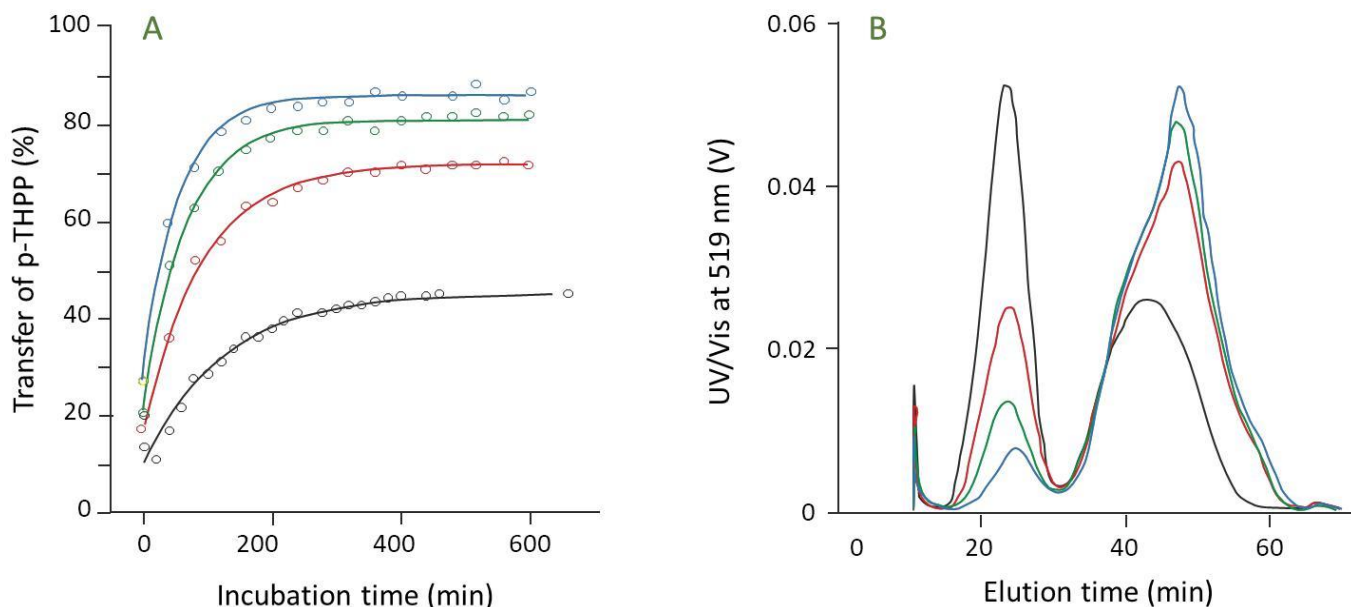


図 5 p-THPP の移動の動態に及ぼす脂質質量比の効果 (A) : ドナー-アクセプター質量比 1:0.8 (黒)、1:2.6 (赤)、1:5.4 (緑)、1:9.1 (青)。t = 0 で測定されたフラクトグラム (B)。ドナーは初期に溶出するピークで、その後にアクセプター小胞のより広いピークが続きます。ピーク面積は質量比の違いによって変化します (文献 5 から改変)。

ドナーおよびアクセプター粒子を一定時間インキュベートし、2つのピークをFFFによって分離しました。各ピーク中の色素の存在をUVまたは蛍光で定量化し、同時にサイズ分布はMALSにより確認しました。

図5にこの実験の結果を示しています。送達した薬剤の割合を、いくつかのアクセプター/ドナー脂質質量比とインキュベーション時間の関数として示しています。送達はアクセプターの質量の上昇とともに増加していることが確認できます。

遠心法に基づく方法論とは異なり、FFF法による定量化はアクセプター/ドナー比が極端な比率（典型的には血漿のみの条件）でも精確です。FFFのもうひとつの優れた点は、この方法が多く異なる薬剤モデルに適用でき、薬剤輸送の脂溶性や水溶性への依存性を調べることができることです。

UVの吸光係数が低く、ドナー/アクセプター比が高い薬剤モデルでは多くの試料注入量が必要です。これらの実験にはセミ分取（SP）Eclipse FFFチャンネルを用いて成功を収めました；SPチャンネルは1100 µgの試料（典型的な分析用FFFで注入する質量の30-100倍）を注入した場合でもベースラインの分解能を保っています。

薬剤製造業へのFDAのリポソームガイドの意義

2018年4月に、FDAはリポソームを含む新しい薬剤への応用に関して重要なリポソーム製品⁶のガイド文書を出版しました。FDAはこの報告で、新しい薬剤への応用に対して期待されるデータの品質に関するレベルを引き上げました。

物理化学的性質の章では、報告すべき重要な品質について記載されています。以前は平均サイズのみを記載すればよかったのですが、今後は分布の全体の概要を記載しなければなりません。バッチDLSは平均サイズでは十分でしたが、含まれるサイズすべてにわたって信頼できる定量的な分布を記述するためには、FFFのような分離法にMALSやDLSを組み合わせなければなりません。

新しいガイドに従えば、安定性及びリポソームの形質の変化（即ち、薬剤放出、内包の効率や大きさ）も調べなければなりません。要求される検査のいくつかはFFFなしには実行するのが困難です。ここで紹介したケーススタディーは、このトピックに関してFDAの要求にどのように応えられるかを示しています。薬剤の添加、内包効率や漏失は、FFF-MALS-UVまたはFFF-MALS-蛍光による分離と解析を含むアッセイによってすべて調べることができます。追加のオフラインの解析が必要となれば、各画分は標準のHPLCフラクションコレクターで簡単に分取できます。

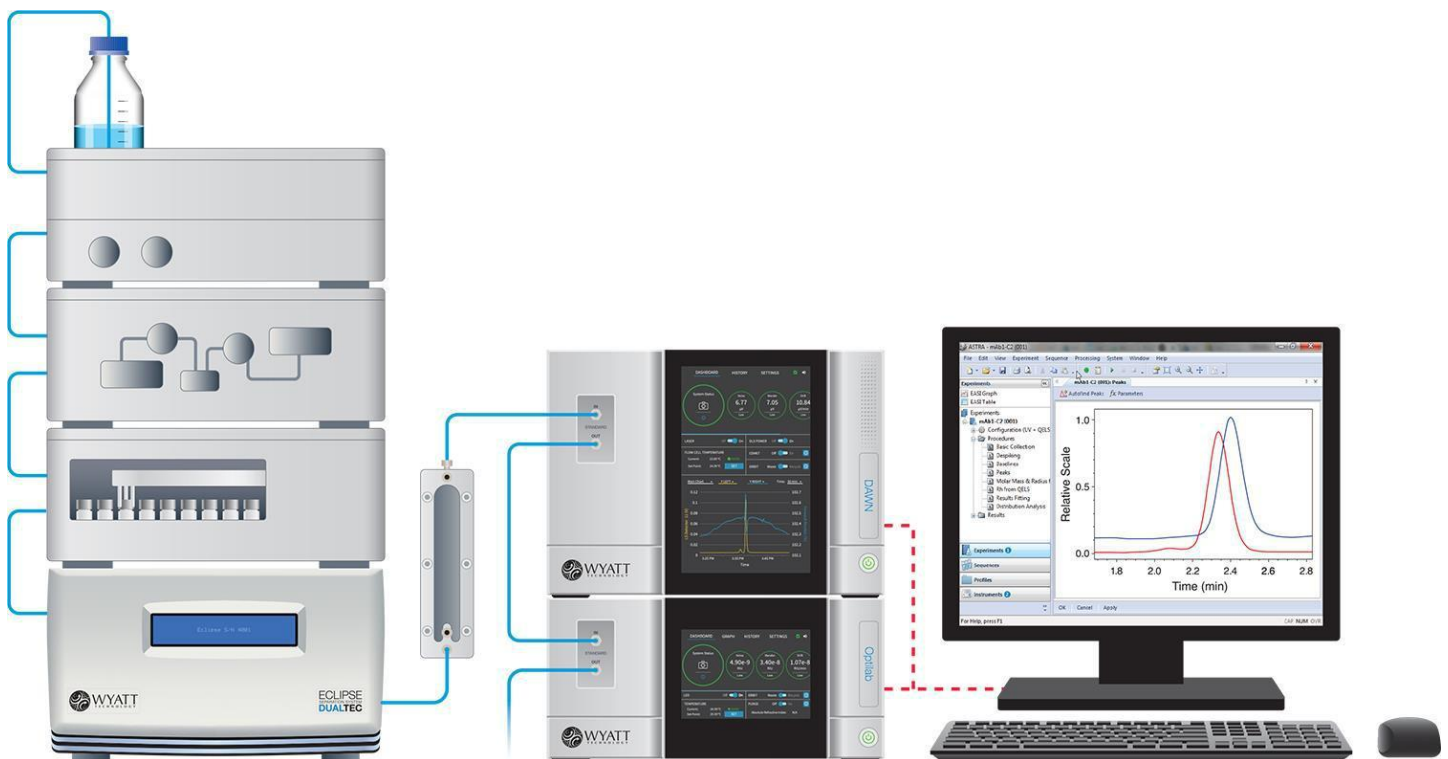
まとめ

上記のケーススタディーは、FFFを使用することにより脂質粒子を高分解能で分離できることを紹介しています。これをMALSとDLSに接続することにより自乗平均半径 R_g 及び流体力学的半径 R_h を同時に測定することで、大きさと形の分布の包括的な解析が可能になります。本研究によって、FFF-MALSによって薬剤の添加と輸送がどのように解析され、この方法が安定性の研究にどのように寄与するかを示されました。

最後に、リポソーム薬剤に関するFDAのガイドラインから見て、FFF-MALSの重要性は明らかです。FDAの要求は、薬剤のリポソームへの添加と安定性に関して、単に平均サイズやその他の詳細な研究をすることではなく、サイズ分布に関する詳細な情報を報告することです。その証拠という観点から、[Eclipse](#) FFFに続いて[WyattQELS](#)オンラインDLSモジュールを取り込んだ[DAWN](#) MALS検出器を備えたWyatt社のFFF-MALS-DLSシステムは、ドラッグデリバリーの研究開発において欠かすことのできないツールになります。

参考文献

1. <https://www.wyatt.com/files/literature/white-papers/WP2606-Exosome-characterization-by-FFF-MALS-DLS-v1.pdf>
2. S. Podzimek, Light Scattering, Size-exclusion Chromatography and Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (John Wiley & Sons; Hoboken, NJ, USA, 2012).
3. Jores, K.; Mehnert, W.; Drechsler, M.; Bunjes, H.; Johann, C.; Mäder, K.; (2004). Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. J Control Release 95(2): 217-227.
4. Caputo, F., et al. (2019). Measuring Particle Size Distribution by Asymmetric Flow Field Flow Fractionation: A Powerful Method for the Preclinical Characterization of Lipid-Based Nanoparticles. Mol Pharm 16(2): 756-767.
5. Hinna, A. H.; Huzpfeld, S.; Kuntsche, J.; Baeur-Brandl, A.; Brandl, M.; (2016). Mechanism and kinetics of the loss of poorly soluble drugs from liposomal carriers studied by a novel flow field-flow fractionation-based drug release-transfer-assay. J Control Release 232: 228-237.
6. <https://www.fda.gov/media/70837/download>



本アプリケーションノートは、Wyatt Technology Corporation が全著作権所有しています。Wyatt Technology 社による書面での事前許可なく、電子的、機械的、コピー、記録、またはいかなる手段を問わず、本アプリケーションノートの一部を複製したり、検索システムに保存したり、変換することはできません。