

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤 の設計

所属 国立医薬品食品衛生研究所
研究者 伊豆津 健一

要旨

タンパク質など生体高分子の有効活用に向けて、高度な安定性を持つ凍結乾燥製剤の製剤設計法を検討した。凍結による構成成分の相分離が分子間相互作用を左右する主因であり、その制御が安定性向上に有用なことを明らかにした。

1. 研究目的

遺伝子組替えタンパク質など各種生体高分子医薬品は活発な研究開発が行われており、その有効活用には化学的・物理的安定性の確保が課題となる。長期保存に適した用時溶解型のタンパク質凍結乾燥製剤には、凍結乾燥による高次構造変化や保存中の化学反応抑制のため糖類、高分子、界面活性剤などが安定化の目的で添加されており、製剤開発には生理活性を指標とした試行錯誤による添加剤選択から、安定化メカニズムに基づく合理的な設計への変化が求められている。

凍結乾燥製剤の構成成分であるタンパク質と添加剤は凍結により氷晶間に濃縮される。Sucrose など代表的な添加剤の安定化作用は、タンパク質との水素結合による凍結・凍結乾燥時の高次構造の維持、およびアモルファス・ガラス化による保存時の分子運動と化学反応の抑制に基づくと考えられる。本研究では添加剤による安定化に必要な分子間相互作用を左右する因子として、構成成分の凍結溶液や乾燥固体中の分子レベル混合性に着目し、その把握と制御により高度な安定性を持つ凍結乾燥製剤の製剤設計法の開発を目指した。

2. 研究方法

凍結溶液と凍結乾燥固体の物性は DSC を用いた熱分析により評価した。各種添加剤の凍結溶液が固有の温度に最大凍結濃縮相ガラス転移温度 (T_g') を持つことを利用し、複数の溶質を含む凍結溶液の微分 DSC 曲線 T_g' ピーク温度及び形状より溶質混合性を判断した。凍結溶液(10 μ l)は-100°Cから5°C/min で昇温測定した。凍結乾燥品のガラス転移温度(T_g)は、試料(約 1 mg)を 0°Cから昇温測定し求めた。添加剤の結晶性は熱分析と粉末 X線回折から評価した。

凍結乾燥と保存時のタンパク質安定性は FT-IR を用いた二次構造、HPLC による分子量、酵素活性測定から評価した。凍結乾燥試料は KBr 打錠法で行い、溶液試料(20 mg/ml, pH 7.0)は CaF₂セル(光路長 6 μ m)を用いて同緩衝液との差スペクトルを解析した。アミド I 域吸収の二次微分値形状から、各タンパク質の二次構造組成と凍結乾燥の影響を検討した。

3. 研究成果

凍結溶液及び凍結乾燥固体中の構成成分の相分離

凍結溶液中の各種タンパク質(BSA, lysozyme, gelatin 等)と非イオン性高分子添加剤 (PVP, Ficoll) は組合せにより異なる混合性を示した。凍結溶液の微分 DSC 曲線では構成成分の中間にピークが現れる場合と高分子の T_g' ピークが現れる場合に分かれ、それぞれ混合濃縮と相分離状態を示すと考えられた。また混合性は buffer や塩等共存物質の存在により変化した。

タンパク質と安定化剤として頻繁に用いられる糖類の凍結溶液中の混合性は濃度比により大きな

差がみられた。Gelatin と単糖類や二糖類の混合凍結溶液の微分 DSC 曲線は、タンパク質に対する濃度費の高い領域を除いて糖類と gelatin の T_g 間を濃度比により直線的に移動し、良好な混合性を持つことが示された。

これに対し糖類の濃度比が高い領域では混合性の低下が観察された。BSA と sucrose の混合溶液の T_g ピークは sucrose 割合の増加とともにブロードとなり、濃度比 10:1 付近で sucrose の T_g と混合相の T_g の両ピークが現れた。ピークの最も高い温度を混合比に対してプロットするとこの濃度比で不連続となり、糖類相の T_g から混合相の T_g にシフトした。この結果から糖類の濃度比が高い領域では氷晶間で水和した二糖類のみからなる相とタンパク質と糖類を含む混合相に分離すると考えられた。

Trehalose や melibiose 溶液に対する gelatin や lactoglobulin の添加では、混合比 10:1 程度まで糖類の T_g ピーク形状が変化せず、この領域で糖類とタンパク質が分離して凍結濃縮される可能性を示した。同溶液のタンパク質比を上げると凍結溶液は混合相の T_g を示すことから、観察された相分離は凍結前の溶液中でのタンパク質沈殿とは異なると考えられた。

各種タンパク質と糖類の凍結溶液中における混合性を T_g ピーク温度の濃度依存性等から比較した結果、gelatin と混合性の高い順に二糖類では sucrose > maltose > trehalose > melibiose、単糖類では glucose > fructose > galactose となり、水和半径等との関係が想定された。また sucrose や trehalose との混合性が高い順に、lysozyme > ovalbumin, BSA > lactoglobulin, gelatin となった。

凍結溶液中の添加剤間の混合性

各種水溶性高分子はしばしば、二糖類を主な安定化剤とするタンパク質凍結乾燥製剤の高温安定性向上や乾燥時間短縮の目的で用いられる。Sucrose と dextran の凍結溶液中の混合性は sucrose と gelatin の組合せと同様に初期濃度比に依存し、大部分の濃度比では混合状態であったが、濃度比 10:1 付近では微分 DSC 曲線に sucrose 相と混合相の T_g ピークが現れ、両相への分離が示された。一方 sucrose とオリゴ糖(maltopentaose)の組合せでは、混合比に依存して T_g が直線的に移動し、広い範囲での混合凍結濃縮を示した。二糖類と高分子添加剤間の相分離はすでに報告した高分子添加剤間の相分離とともに、凍結乾燥品の物性や安定化作用がばらつく原因になると考えられた。

構成成分の混合性と安定化作用

FT-IR を用いた各種タンパク質の二次構造検討から、添加剤とタンパク質の混合性が凍結乾燥時の安定化に重要であることが示された。BSA の例では 1656 cm^{-1} に現れる α -ヘリックスのピークが凍結乾燥により縮小し、高次構造の乱れを示した。凍結溶液中でタンパク質とアモルファス混合相を形成する sucrose は BSA の α -ヘリックス構造を維持したが、凍結により相分離・結晶化する mannitol

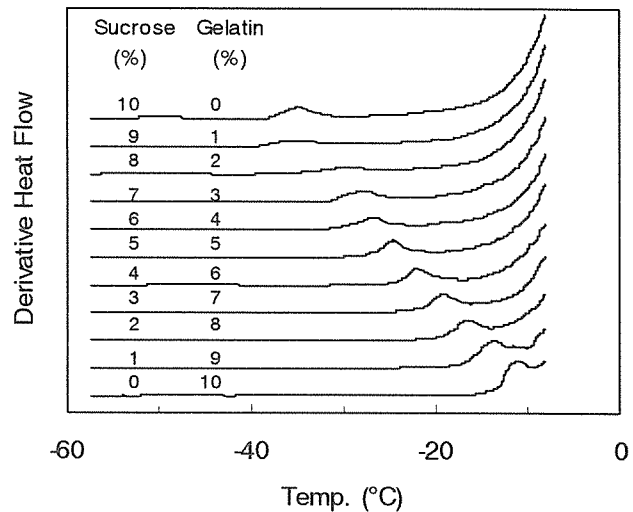


Fig. 1 Derivative thermograms of frozen solutions containing sucrose and gelatin

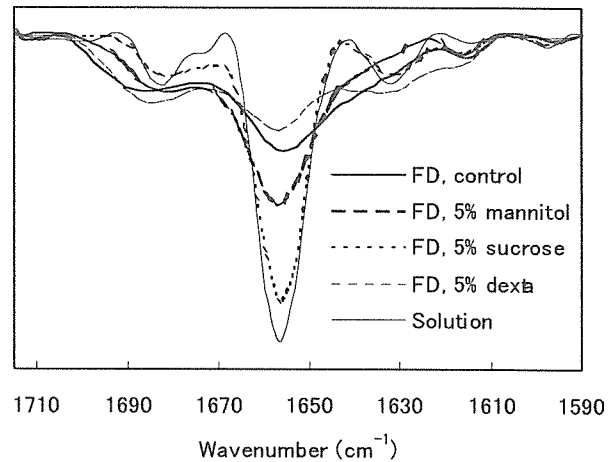


Fig. 2 Area-normalized second-derivative FT-IR spectra of freeze-dried BSA

や、相分離と立体障害によりタンパク質と十分な水素結合を形成しない dextran は安定化作用を示さなかった。またリン酸緩衝液等の添加は凍結乾燥による mannitol 結晶化とタンパク質構造変化を抑制した。同様な結果が、LDH, lactoglobulin, ovalbumin, lysozyme 等でも観察された。凍結乾燥時の構造安定化作用にはタンパク質と添加剤がアモルファス状態の混合相にあり、水素結合など十分な分子間相互作用を持つ必要があると考えられた。

凍結乾燥品の物性と分子間相互作用の制御による安定化

タンパク質凍結乾燥品の保存時の安定化を目的として、アモルファス固体のガラス転移温度上昇による分子運動と化学反応の抑制を試みた。安定化剤として Sucrose に比べ T_g の高い trehalose の利用や $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ や NaCl など塩類、dextran など水溶性高分子、albumin など生理活性の弱いタンパク質の添加は二糖類凍結乾燥品の T_g を上昇させ、高温保存に対する凍結乾燥品構造の安定性は向上した。これらの試料は 120°C で 1 日間保存した場合にも cake に外観上の変化が見られず、タンパク質の凝集は cake の崩壊した試料に比べ抑制された。しかし一部試料では、同じ糖濃度において高分子を添加することにより二次構造の乱れなど凍結乾燥時の安定化作用低下がみられた。

4. 考察

凍結溶液や乾燥固体の熱分析から、タンパク質凍結乾燥製剤の構成成分が微小領域で様々な混合性を示すことが明らかとなった。製剤のアモルファス部分における混合性はあまり考慮されてこなかったが、安定性や機能と密接に関係する製剤設計上重要な課題と考えられた。氷晶間に凍結濃縮された溶質の混合性は水性二相分離と同様に、水和した溶質分子の同種間と異種間の親和力や反発力のバランスにより決まると思われる。一般に凍結乾燥は分子運動性が著しく低くなる T_g 以下で行われるため、凍結乾燥した固体中の構成成分の混合性は凍結溶液中と等しくなると考えられた。

凍結乾燥時のタンパク質と添加剤の混合性がタンパク質高次構造安定化作用と密接に関連することが、FT-IR を用いた実験から確認された。安定化剤として二糖類とともに高分子添加剤や塩を添加すると、凍結乾燥品高温保存時の cake とタンパク質構造は安定化されたが、凍結乾燥中のタンパク質安定化作用は二糖類のみの場合に比べて低下した。これらの物質はアモルファス固体の分子運動に依存する化学反応を抑制するものの、一方で二糖類と高分子添加剤間や二糖類分子間の結合を強め、結果的に高次構造安定化に有効な二糖類とタンパク質間水素結合の不足につながると考えられた。

5. まとめ

タンパク質凍結乾燥製剤構成成分の混合性は組成により異なり、凍結乾燥や保存時の安定性に影響を与えることが明らかとなった。高温など過酷条件に対して高度な安定性を保つタンパク質凍結乾燥製剤の設計には、タンパク質と添加剤間の分子間相互作用の確保による高次構造維持と、アモルファス領域の分子運動制御による化学反応の抑制が必要であり、両者をタンパク質の構造や濃度、保存形態、使用形態等に応じて調整することが重要と考えられた。

6. 研究発表

1) Izutsu, K. & Kojima, S. Freeze-concentration separates proteins and polymer excipients into different amorphous phases. *Pharmaceutical Research* **17**, 1316-1322 (2000).

2) 伊豆津健一, 小嶋茂雄, 凍結濃縮による生体高分子の相分離と共存物質の影響, *低温生物工学会誌* **46**, 91-94 (2000).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社