

厚生科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

分子運動性パラメータの活用による次世代医薬品の
安定性評価法の開発研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成14（2002）年4月

目次

I. 総括研究報告書

分子運動性パラメータの活用による次世代医薬品の安定性評価法の開発研究	1
------------------------------------	---

II. 分担研究報告書

1. 溶液の凍結過程における分子運動性の解析	8
------------------------	---

村勢則郎

2. 分子運動性に基づくりポソーム製剤の安定性評価	
---------------------------	--

米谷芳枝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	14
-----------------	----

分子運動性パラメータの活用による次世代医薬品の安定性評価法の開発研究

主任研究者 吉岡澄江 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室室長

デキストラン等の高分子添加剤を用いたタンパク質凍結乾燥製剤について、その安定性とより密接に相関し、正確な安定性評価に活用できる分子運動性のパラメータの探索を行った結果、NMR 緩和測定によって得られる実験系スピン-格子緩和時間(T_1)および回転軸系スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)が、それぞれ時間軸の異なる運動を反映し、凍結乾燥製剤の分子運動性の指標として活用できることが明らかになった。さらに、架橋デキストランゲルの凍結状態をラマン分光法および二次元X線回折-DSC 同時測定により検討した結果、昇温結晶化する水は低温でガラス状態にあること、ゲル中にはガラス化している水の他にサイズの小さな氷晶が比較的多数形成されていることが示され、高分子ゲル中の水は、架橋密度、網目構造に依存して分子の拡散運動が束縛され、凍結時に様々なサイズ・形状の氷晶を形成することが明らかになった。また、次世代医薬品と考えられるリポソーム製剤の調製法として、凍結乾燥・再水和法によって、薬物封入率が高く、粒子径の小さいリポソームを調製するための調製条件を検討した結果、凍結時にショ糖を脂質に対して重量比で 8:1 加えること、再水和時においては少量の水を連続的に添加すること、ピラルピシンの封入にはリポソーム脂質成分としてオレイン酸を添加することが必要であることが明らかになった。

分担研究者

村勢則郎 東京電機大学 理工学部教授

米谷芳枝 星薬科大学 薬剤学教室 助教授

A. 研究目的

医薬品製剤は分子レベルでは様々な運動性をもっており、製剤が保存中に示す物理的および化学的な経時変化は分子運動性によって支配されている。たとえ固形製剤においても、水分子をはじめとして経時変化を誘起するのに十分な運動性を有する分子が存在し、その運動性が製剤の有効期間を決定していると考えられる。現在、製剤の有効期間は、製剤を一定条件に長期にわたって保存する実証的な保存試験によってかなりの労力と資源を消費して設定されているが、物理的・化学的品質変化の本質を支配する分子運動性を指標として有効期間を推定することができれば有効期間の設定において大幅な効率化・省力化が可能になる。本研究は、ポストゲノム時代に臨んで重要性を増すタンパク質等を対象とした凍結乾燥製剤やリポソーム製剤の安定性評価に備え、製剤中の分子の運動性を測定する方法を体系化し、製剤の品質変化と分子運動性の関係を明らかにすることにより、保存安定性試験のみに依存することなく、製剤を構成する分子の運動性に基づいて有効期間を推定するための基礎研究を行う。

本年度は、①デキストラン等の高分子添加剤を用

いたタンパク質凍結乾燥製剤について、その安定性と密接に相関し、安定性評価に活用できる分子運動性のパラメータの探索を行うことを目的とし、NMR 緩和測定によって得られる実験系スピン-格子緩和時間(T_1)および回転軸系スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)がそれぞれ製剤中のどのようなスケールの分子運動性を反映するのかを明らかにするための研究を行った。また、②凍結乾燥製剤の物理的状態を明らかにする目的で、架橋デキストランゲルの凍結状態における水分子の運動性をラマン分光法および二次元X線回折 DSC 同時測定によって解析した。さらに、③凍結乾燥製剤と並んで次世代医薬品と考えられるリポソーム製剤の分子運動性と安定性の関係を明らかにする目的で、まず、リポソーム製剤を凍結乾燥品として保存できる利点がある凍結乾燥・再水和 (dehydration-rehydration vesicle、DRV) 法によって、薬物封入率が高く、粒子径の小さいリポソームを調製するための調製条件を調べ、特に再水和時においてリポソームの粒子径を支配する膜の分子運動性に及ぼす糖類の影響について検討した。

B. 研究方法

タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性の測定

牛血清γグロブリン(BGG)をモデルタンパク質とする凍結乾燥製剤は、デキストラン(40k)およびBGGを重量比50:1で重水に溶解した溶液を凍結乾燥して調製した(Freezevac C-1、東西通商)。製剤を一定相対湿度下(12%~86%RH)に保存し、水分含量を調整した。製剤中のプロトンの T_1 および $T_{1\rho}$ をパルスNMR(MU-25、日本電子)を用いて測定した(温度領域:低水分含量の試料は -100°C ~ 170°C 、高水分含量の試料は 5°C ~ 85°C)。 T_1 の測定はInversion-recovery法で行った。シグナルの減衰は、測定した全温度および湿度領域においてmono-exponential式で表すことができ、最小二乗法によって T_1 を求めた。

$T_{1\rho}$ は10ガウスのスピンロッキング磁場を照射して測定した(温度領域:低水分含量の試料は -100°C ~ 170°C 、高水分含量の試料は 5°C ~ 85°C)。乾燥状態および12%RHおよび60%RHにおける緩和は、全温度領域でmono-exponential式で表すことができた。一方、高湿度条件下(12%RHおよび60%RH)では、高温領域でbi-exponential式で表される緩和を示した(75%RHでは 75°C 以上、86%RHでは 55°C 以上)。この場合、低温側の $T_{1\rho}$ の値との比較はbi-exponential式へのフィッティングで得られる小さい方の値を用いた。

また、固体高分解能 ^{13}C -NMR(Varian)を用いてデキストランのメチン炭素の T_1 および $T_{1\rho}$ を70ppmのピークの減衰に基づいて測定した(温度領域: 5°C ~ 65°C 、湿度:60、75および86%RH)。 T_1 の測定にはTorchiaのパルス系列を用い、 $T_{1\rho}$ の測定には54ガウスのスピンロッキング磁場を用いた。緩和はすべての条件でmono-exponential式で表すことができた。

架橋デキストランゲルの凍結状態における水分子の運動性の測定

試料として昇温結晶化の観測されているセファデックスG25ゲルの他に、G100、G10ゲル(架橋デキストラン; Amersham Pharmacia Biotech社; 架橋密度:G10>G25>G100)を使用した。乾燥したセファデックスビーズに蒸留水を添加して含水率50wt%に調整した。

ラマンスペクトル測定では、外径が $10 \times 6.5 \times 10$ mmの石英製キュベットに試料を入れて栓をし、微小冷却ユニット(MMR Technologies, Inc., USA)

を使用して室温から約 $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で -40°C まで冷却し、その後設定温度までヒーターで加熱して、ラマンスペクトルをRaman 960 (Thermo Nicolet, Inc., USA)を用いて測定した。

二次元X線回折-DSC同時測定は、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所の放射光共同利用施設(BL-18C)を使用し、X線回折-CCD検出法で測定を行った。(X線: 0.07nm , ビームサイズ: 100 ミクロン、 20keV 使用; 検出器:HiPic C4880, 浜松ホトニクス株式会社製; DSC:メトラ.社FP99使用) 測定は約 $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で -40°C まで冷却し、その後 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で昇温した。X線回折像は1分ごとにCCDカメラで取り込み、その後FIT2Dのソフトを使用して出力した。

DRV法による薬物封入リポソーム製剤の調製

リポソームはDRV法により調製した。成分としては、精製卵黄レシチン(EPC):コレステロール(Ch): β -sitosterol glucoside(Sit-G):オレイン酸(OA)=7:3:2:0~1(モル比)を用いて、水和法によって多重層リポソームを作り、これを超音波処理して小さな一枚膜リポソームにした。これに各種の糖とピラルピシン(THP)を総脂質に対して種々の比で加えて凍結乾燥し、得られた粉末に水を添加して再水和し、THP封入リポソームにした。リポソームの粒子径は、電気泳動光散乱光度計により測定した。薬物封入率は、超遠心分離($100\,000 \times g$, 60分、 4°C)により、リポソームと未封入の薬物を分離し、蛍光光度計(ex: 482nm , em: 550nm)により未封入の薬物濃度を測定し、リポソーム中の薬物濃度を1式より算出した。

Entrapment efficiency (%)

$$=(C_{\text{total}} - C_{\text{supernatant}})/C_{\text{total}} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 C_{total} は添加した総薬物濃度、 $C_{\text{supernatant}}$ はリポソーム中の未封入の薬物濃度を示す。

凍結乾燥前、後および再水和後の粒子の状態は、走査電子顕微鏡(日本電子、JEOL JSM-5600LV)によって観察した。

C. 研究結果

タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性

1) プロトンおよびメチン炭素の T_1 によって測定されるデキストランの分子運動性

デキストランを添加剤として用いたタンパク質凍結乾燥製剤についてパルスNMRで測定した ^1H の T_1 は、Fig.1Aに示すような温度依存性を示した。

T_1 はいずれの湿度においても温度上昇とともに減少し、この温度領域が分子運動性の増大とともに T_1 が減少する slow motional regime であることが分かった。湿度が上昇するにしたがって分子運動性の増大が観察された。

固体高分解能 ^{13}C -NMR で測定されたデキストランメチン炭素の T_1 を Fig.1B に示す。 ^{13}C の T_1 は ^1H の T_1 と同様にすべての湿度領域において温度の上昇にしたがって低下した。

2) プロトンおよびメチン炭素の $T_{1\rho}$ によって測定されるデキストランの分子運動性

^1H および ^{13}C の $T_{1\rho}$ をそれぞれ Fig.2A および Fig.2B に示す。 ^1H の $T_{1\rho}$ は12%RHでは温度による有意な変化はみられなかったが、その他の湿度条件下では T_1 よりも温度による変化が大きかった(T_1 の変化は約0.6オーダーであるのに対して、 $T_{1\rho}$ の変化は約1.8オーダー)。比較的高い湿度では ^1H の $T_{1\rho}$ は極小値を示し、その極小値が見られる温度は湿度の上昇とともに低下し、高温側は分子運動性の増大とともに $T_{1\rho}$ が増大する fast motional regime であることが分かった。

^{13}C の $T_{1\rho}$ も ^1H の $T_{1\rho}$ と同様に、温度による変化が T_1 より大きいことが分かった。86%RHでは極小値が見られたが、緩和時間の測定が65°C以下に限られているため、60%RHおよび75%RHでは極小値を観察することはできなかった。

比較的低い湿度において、広範囲の温度領域で測定した ^1H の $T_{1\rho}$ を Fig.3 に示す。60%RHでは、Fig.2A に示した高温領域における $T_{1\rho}$ の大きな変化の他に、低い温度領域においても、約-60°C付近に極小値をもつ $T_{1\rho}$ の小さな変化も観察された。この低温領域における小さな変化は、乾燥状態および12%RHにおいても観察され、湿度の低下とともに極小値は高温側へ移動した。

凍結挙動からみた水分子の運動性

架橋デキストランゲルのラマン測定の結果を Fig.4 に示す。波数 3400cm^{-1} 付近の散乱ピークはOHの伸縮振動によるものである。G25ゲルにおいて、-24°Cで得られたスペクトルは室温(27°C)で得られた液体の水のスペクトルに非常に近い。DSCで昇温過程における発熱ピークが観測されたあとの-11°Cでは、 3400cm^{-1} 付近の散乱ピークが低波数側にシフトしブロード化している。これは水の生成によるもので、発熱ピークが昇温結晶化によるものであることがラマン分光法でも確認された。G100ゲルのスペクトルがそのことを裏付ける。すなわち、

凍結して-40°Cになると、 3400cm^{-1} 付近の散乱強度ピークはやはり低波数側にシフトしブロード化しているが、G100ゲルは昇温結晶化を示さず、冷却すると単純に氷晶を形成することが知られている。以上より、凍結したG25ゲル中において、氷晶を形成していない水、すなわち、ガラス化した水の存在が確認された。

二次元X線回折-DSC同時測定では、六方晶水の(100)、(002)、(101)面からの反射に対応する回折像が3本の同心円(リング)状に観測された。凍結したG25ゲルでは回折強度の均一な連続したリングが観測されたが、昇温と共にリング状の回折強度は不均一化し、同じリング上にスポットが不連続に配列した回折像を示すようになった。昇温DSC曲線の発熱ピークに対応して、スポットの強度が増大し、数も増加した。凍結したG10やG100ゲルでは連続したリングは観測されなかった。

DRV法による薬物封入リポソーム製剤の分子運動性と安定性

添加する糖の検討として、リポソーム(EPC:Ch:Sit-G:OA=7:3:2:0)とOAを添加したリポソーム(EPC:Ch:Sit-G:OA=7:3:2:1)にグルコース、乳糖、ショ糖を総脂質と同重量だけ添加したときのリポソームのサイズと薬物封入率を測定した。リポソームのサイズは、凍結乾燥・再水和前は80nm位であるが、凍結時にショ糖を添加したとき最も小さく、薬物封入率は20%位と低いことが明らかとなった(Table 1)。一方、OA添加リポソームでは、薬物封入率は80%位と上昇するが粒子サイズは約 $1\mu\text{m}$ と大きくなることがわかった。これらの結果より、糖としてはショ糖を使用することにした。次に、リポソーム(EPC:Ch:Sit-G:OA=7:3:2:1)においてショ糖の最適添加量を調べた結果、添加量が多くなるほどリポソームのサイズは小さくなった。総脂質の8倍重量のショ糖を添加したとき、リポソームのサイズは約300nmと小さく、薬物封入率も80%位を維持することが明らかとなった(Table 2)。さらに、再水和状態において凍結乾燥粉末に添加する水の量を決定するために、添加水量を変えて再水和した。その結果、水の添加量が多いほど再水和後のリポソームのサイズは大きくなり、薬物封入率が低くなった。

再水和後の粒子径は300-500nmであったが、さらに超音波照射処理によって粒子径200nm以下の小さなリポソームとなり、薬物封入率は約80%と高い値を維持していた(Table 3)。

各操作過程におけるリポソーム膜状態を走査電顕で調べたところ、凍結乾燥後には、リポソームの

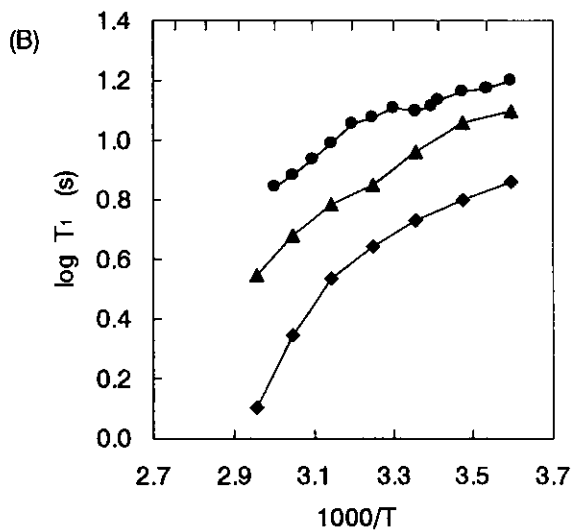
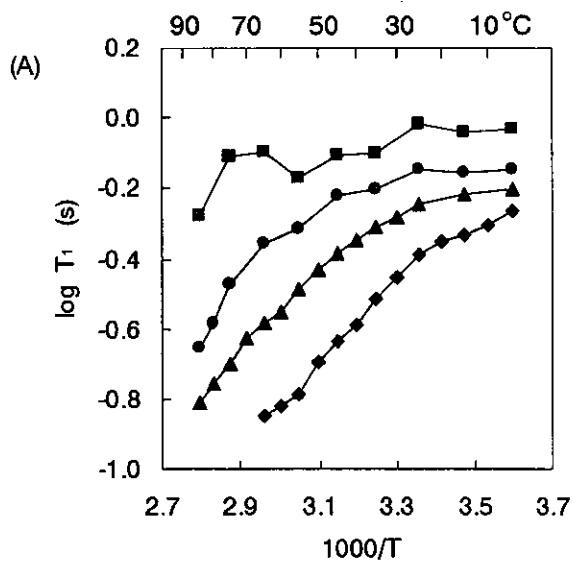


Fig. 1. Spin-lattice relaxation time in the laboratory frame (T_1) of proton (A) and methin carbon (B) of dextran in lyophilized BGG formulation as a function of temperature.

Humidity: 12(■), 60(●), 75(▲) and 86%RH(◆).

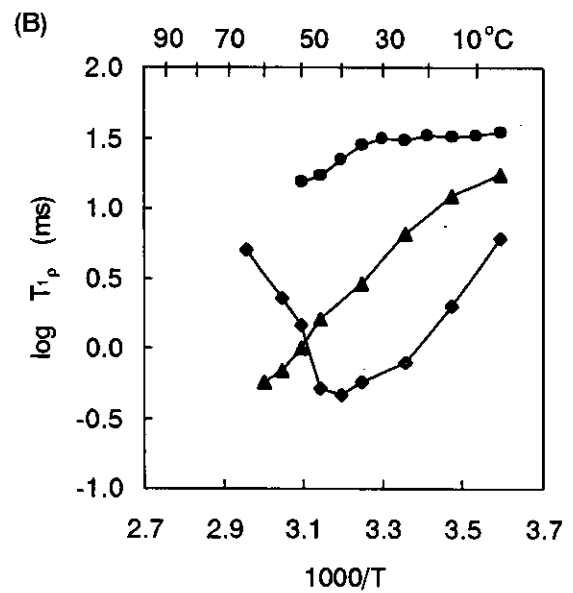
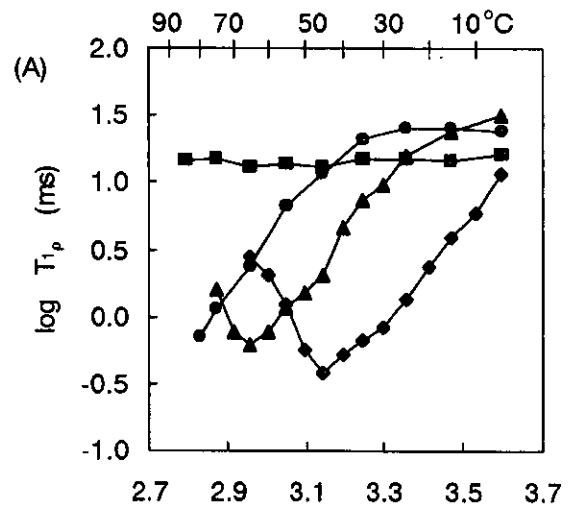


Fig. 2. Spin-lattice relaxation time in the rotating frame ($T_{1\rho}$) of proton (A) and methin carbon (B) of dextran in lyophilized BGG formulation as a function of temperature. Humidity: 60(●), 75(▲) and 86%RH(◆).

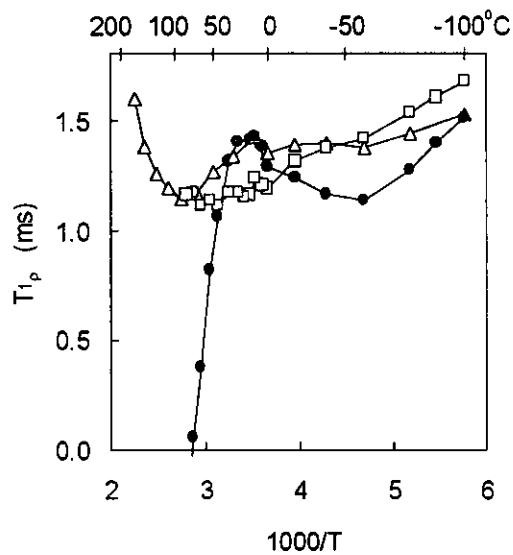


Fig. 3. $T_{1\rho}$ of dextran proton in lyophilized BGG formulation as a function of temperature.

Humidity: dry(Δ), 12(\square) and 60%RH(\bullet).

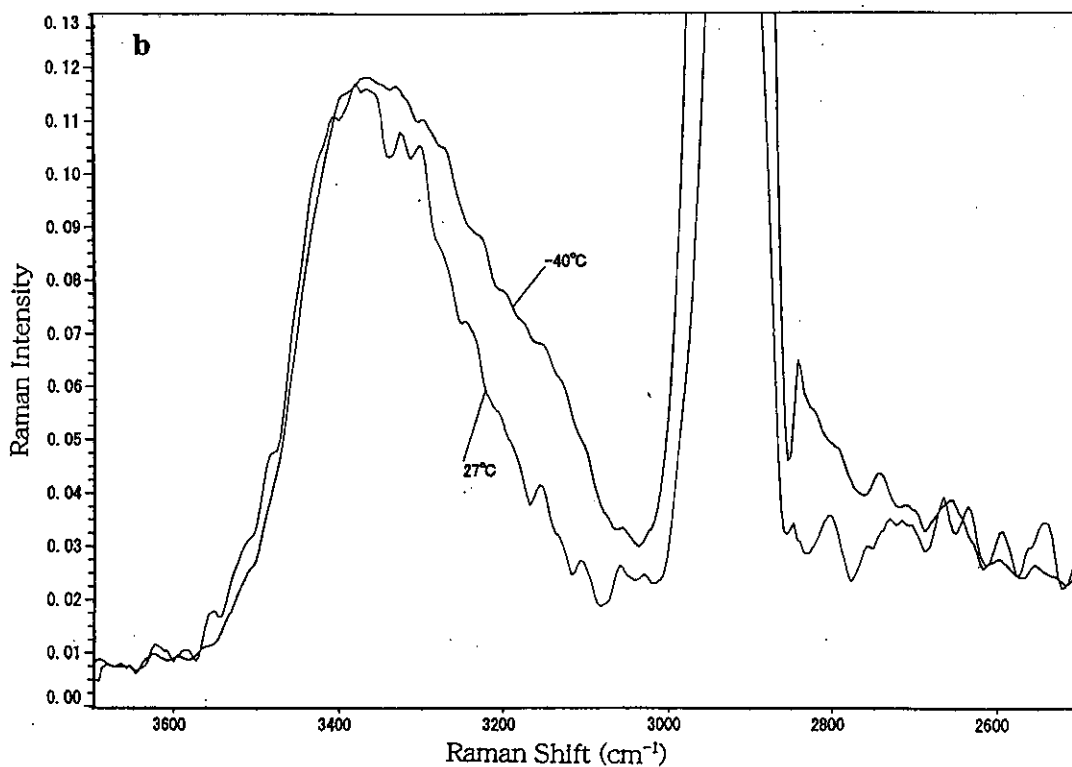
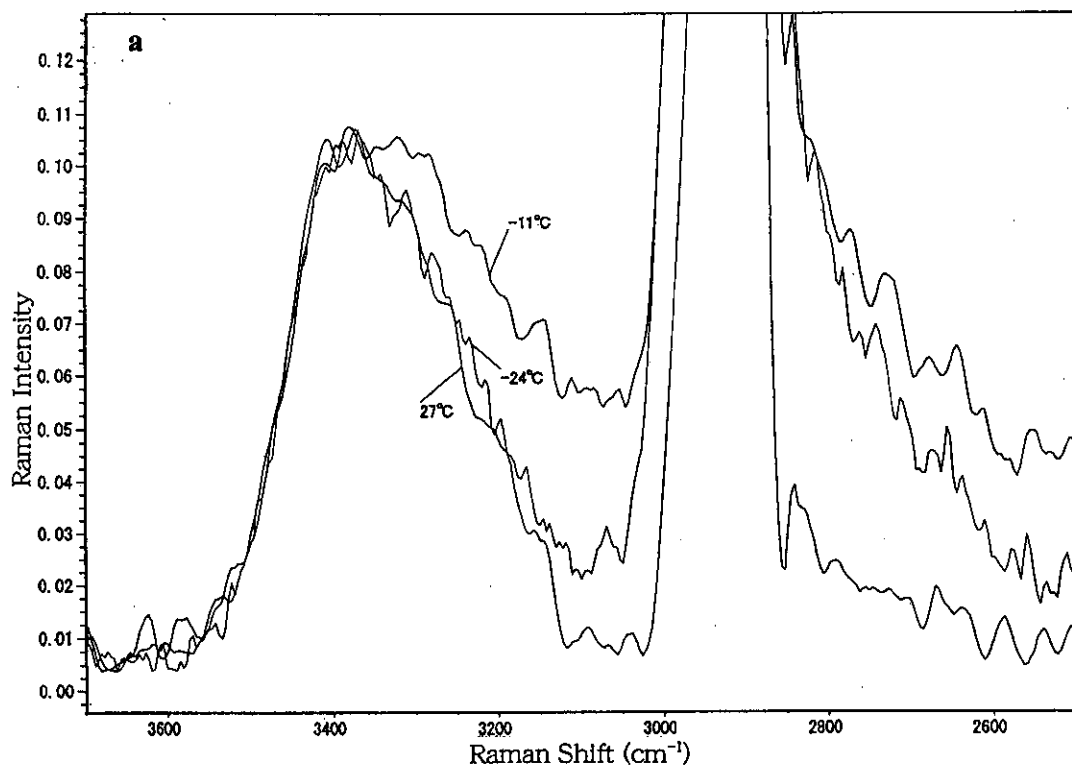


Figure 4a Raman spectra of OH stretching band observed with a Sephadex G25 gel during rewarming ; **b** Raman spectra of OH stretching band observed with a Sephadex G100 gel.

Table 1 The effect of sugar on the average particle size and entrapment efficiency of SL-THP at sugar/lipid=1 (w/w).

EPC : Ch : Sit-G : OA (molar ratio)	Sugar	Average particle size (nm)	Entrapment efficiency (%)
7 : 3 : 2 : 0	Without sugar	1317.1	31.2
	Glucose	187.3	26.8
	Lactose	389.5	30.7
	Sucrose	147.2	34.9
7:3:2:1	Without sugar	1244.7	80.0
	Glucose	675.5	87.3
	Lactose	1245.4	78.6
	Sucrose	780.4	71.5

Table 2 The effect of sucrose ratio to lipid on the average particle size and entrapment efficiency of THP.

EPC : Ch : Sit-G : OA (molar ratio)	Sucrose/ Lipid (w/w)	Average particle size (nm)	Entrapment efficiency (%)
7:3:2:1	0	979.0 ± 129.6	81.0 ± 6.0
	2	423.7 ± 35.8	82.4 ± 10.7
	5	412.4 ± 1.5	82.6 ± 4.9
	8	341.0 ± 41.1	80.7 ± 11.3

Table 3 The average particle size and entrapment efficiency of liposomes after sonication.

EPC : Ch : Sit-G : OA (molar ratio)	Particle size (nm)	Entrapment efficiency (%)
7:3:2:1	197.8	84.6
7:5:1	168.6	82.7

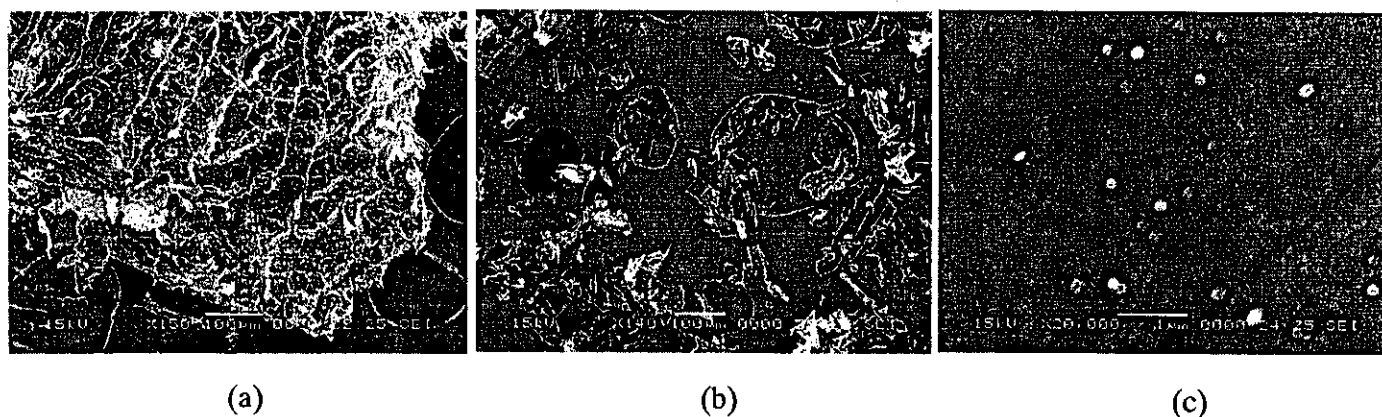


Fig. 1 Scanning electronic micrograph of EPC:Ch:Sit-G:OA=7:3:2:1 (molar ratio). (a) Freeze-dried liposomes without sucrose. (b) Freeze-dried liposomes with sucrose. (c) Rehydrated liposomes freeze-dried with sucrose.

ベシクル状態は観察されず、再水和後にはベシクル状態が観察された (Fig. 5)。

D. 考察

タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性

凍結乾燥製剤中のデキストラン分子は、メチレン基の局所的な動きから、複数のグルコース単位が関与する協動的なグローバルな動きまで、種々のスケールの運動を持つと考えられる。本研究では、プロトンおよびメチン炭素の T_1 および $T_{1\rho}$ によってデキストランの分子運動性を測定した。凍結乾燥製剤は重水を用いて調製したので、化学交換を起こさないプロトン、すなわち、グルコース単位中の 5 個のメチンプロトンと 2 個のメチレンプロトンの T_1 および $T_{1\rho}$ が測定されたことになる。

60%RH において広範囲の温度領域で観察された ^1H の温度依存性 (Fig.3) から、プロトンは少なくとも 2 種類の相関時間の異なる動き、すなわち、高温領域において $T_{1\rho}$ の大きな変化をもたらす動きと、低温領域において $T_{1\rho}$ の小さな変化をもたらす動きを持つと考えられる。後者の動きは、乾燥状態ではより高い温度で見られた。slow motional regime における緩和時間が単一の相関時間 τ_c で表すことができると仮定すると、温度が約 90°C から 10°C へ低下するときに見られる $T_{1\rho}$ の上昇はさらに低温領域へと継続すると予想される。しかし、 $T_{1\rho}$ の温度依存性は約 10°C において不連続となったことから、さらに、より小さな τ_c をもつより速い動きが存在することが示唆され、凍結乾燥製剤中のデキストランは少なくとも 3 個の τ_c で表される分子の動きを示すと考えられる。

60%RH におけるデキストラン分子の動きを Fig.6A に示す 3 個の異なる τ_c を仮定して、 T_1 および $T_{1\rho}$ の実測値に基づいて解析した。ここで、それぞれの動きに対するエネルギー障壁に相当する活性化エネルギーは、8.0 (τ_{c1})、2.5 (τ_{c2}) および 1.0 kcal/mol (τ_{c3}) と仮定した。また、前指数因子はそれぞれ、 2×10^{-10} (τ_{c1})、 5×10^{-9} (τ_{c2}) および 9×10^{-13} s (τ_{c3}) と仮定した。Fig.6A で仮定したそれぞれの τ_c の値から 2 式にしたがって計算した T_1 の値を Fig.6B に示す。

$$1/T_1 = (9/8) \gamma^4 (h/2\pi)^2 [4\tau_c / 15r^6 (1 + \omega_0^2 \tau_c^2) + 16\tau_c / 15r^6 (1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2)] \quad (2)$$

γ : ^1H の磁気回転比、

h : プランク定数

ω_0 : ^1H の共鳴周波数、

r : H-H 間距離 (1.8Å)

一方、 $T_{1\rho}$ はそれぞれの τ_c の値から 3 式にしたがって計算し、その結果を Fig.6C に示す。

$$1/T_{1\rho} = A \tau_c / (1 + 4 \omega_1^2 \tau_c^2) \quad (3)$$

ここで、 A は実測された $T_{1\rho}$ の極小値を用いて $\omega_1 \tau_c = 0.5$ と仮定して計算した定数であり、温度に依存しないと仮定した。最も大きな τ_c (τ_{c1}) の A は Fig.2A に示す 75%RH における $T_{1\rho}$ の極小値を用いて計算し、 τ_{c2} の A は Fig.3 に示す $T_{1\rho}$ の極小値を用いて計算した。 τ_{c1} 、 τ_{c2} および τ_{c3} で表される動きが緩和過程に等価に寄与する場合には、緩和速度 (T_1 および $T_{1\rho}$ の逆数) はそれぞれの τ_c による緩和速度の合計として計算できる。60%RH において観察された T_1 および $T_{1\rho}$ は、 τ_{c1} 、 τ_{c2} および τ_{c3} から計算した値 (Fig.7A および B のライン) にほぼ一致した。Fig.7 の結果から、 T_1 は τ_{c2} および τ_{c3} の動きを反映するのに対して、 $T_{1\rho}$ は τ_{c1} および τ_{c2} の動きを反映することが示唆される。

Fig.7 に示すように、 $1000/T$ が 3 より小さい温度領域では T_1 および $T_{1\rho}$ の実測値は計算値から外れた。 T_1 および $T_{1\rho}$ はいずれも、温度が T_{mc} (^1H のスピン-スピン緩和においてロレンツ型緩和が現れ始める限界温度) を超えて上昇すると急激に減少した。 T_{mc} 付近の温度領域では、 $T_{1\rho}$ は τ_{c1} をもつ最も遅い動きを反映するのに対して、 T_1 は τ_{c2} をもつ中間の速さの動きを反映すると考えられる。 T_{mc} 付近で T_1 および $T_{1\rho}$ の温度依存性に不連続点が見られるのは、 T_{mc} を超えて温度が上昇すると、 τ_{c1} および τ_{c2} で表される分子運動が急激に高まるためであると考えられる。

60% および 75%RH における T_1 および $T_{1\rho}$ を T_{mc} で規格化した温度の逆数でプロットすると、Fig.8 に示すように、異なる湿度で温度依存性は重なり、傾きは T_{mc} を超えると大きくなった。これらの結果から、 T_{mc} を超えて温度が上昇すると、 τ_{c1} および τ_{c2} で表される分子運動が急激に高まるという結論が支持される。

Fig.7 に示すように、 -20°C ($1000/T=4$) 付近で観察される T_1 および $T_{1\rho}$ は、 τ_{c2} で表される分子運動を反映する。この動きは次のような理由によってデキストラン分子のメチレンプロトンによると考えられる。まず、 T_1 の実測値は、1 式の r にメチレン基におけるプロトン間の距離に相当する 1.8Å を代

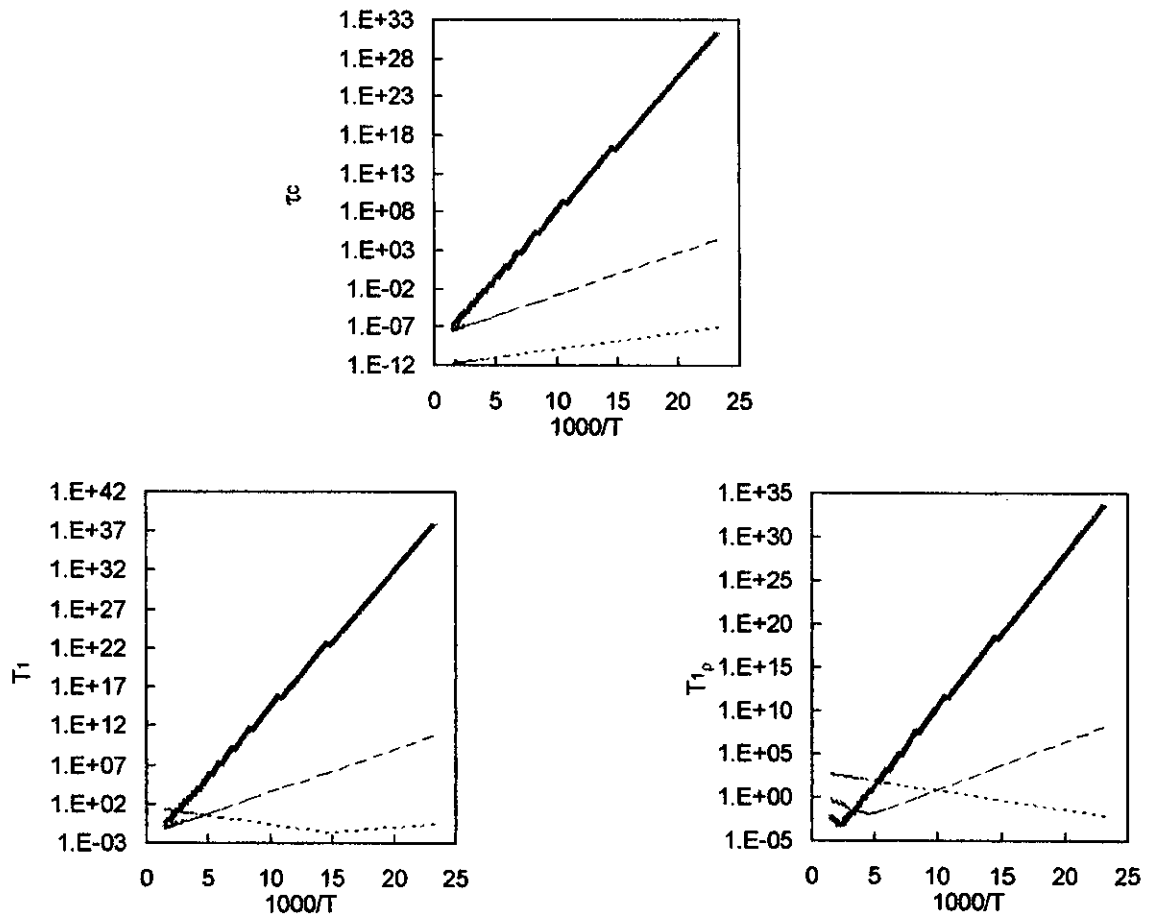


Fig. 6. Three correlation times used for explaining the temperature dependence of T_1 and T_{1p} observed at 60%RH (A), as well as T_1 (B) and T_{1p} (C) calculated from each correlation time.

τ_{c1} : - - - τ_{c2} : τ_{c3}

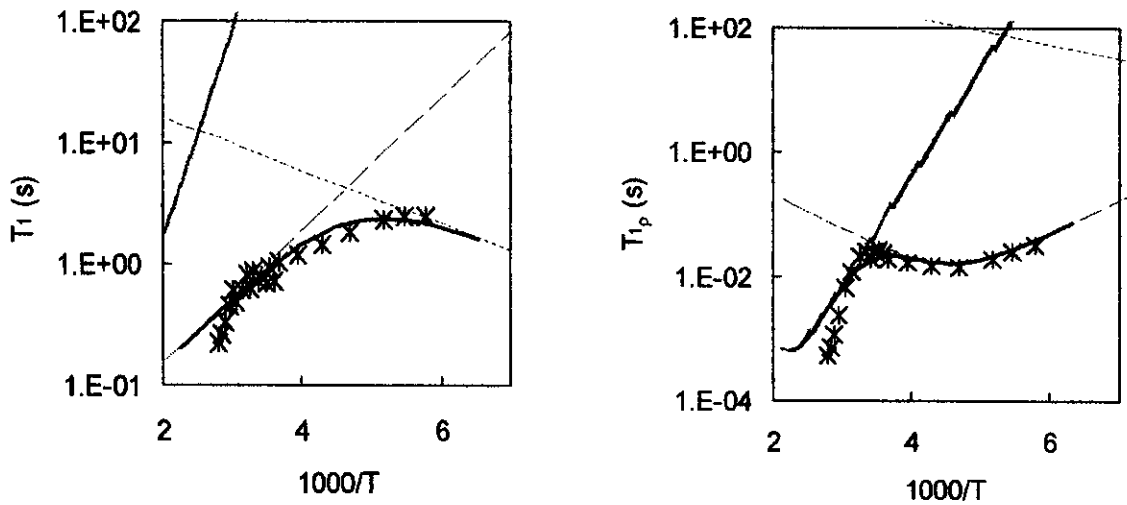


Fig. 7. Temperature dependence of T_1 (A) and T_{1p} (B) observed at 60%RH

— T_1 and T_{1p} calculated from three correlation times
 - - - T_1 and T_{1p} calculated from τ_{c1}
 T_1 and T_{1p} calculated from τ_{c2}
 - . - . T_1 and T_{1p} calculated from τ_{c3}

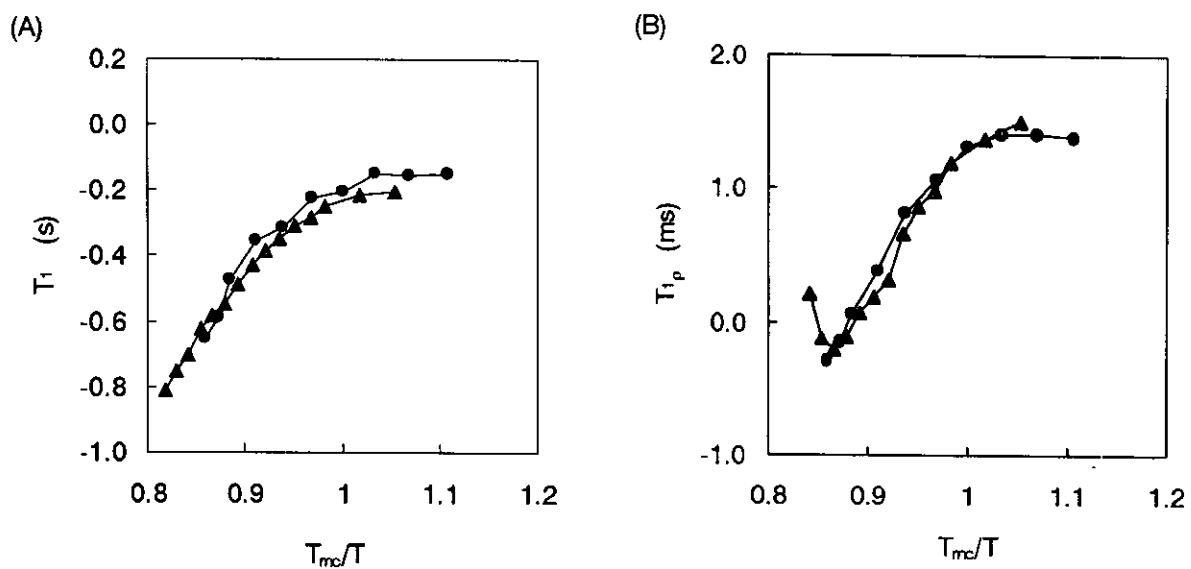


Fig. 8. Temperature dependence of T_1 (A) and T_{1p} (B) observed at 60(●) and 75%RH (▲) plotted against the reciprocal of temperature normalized by T_{mc} .

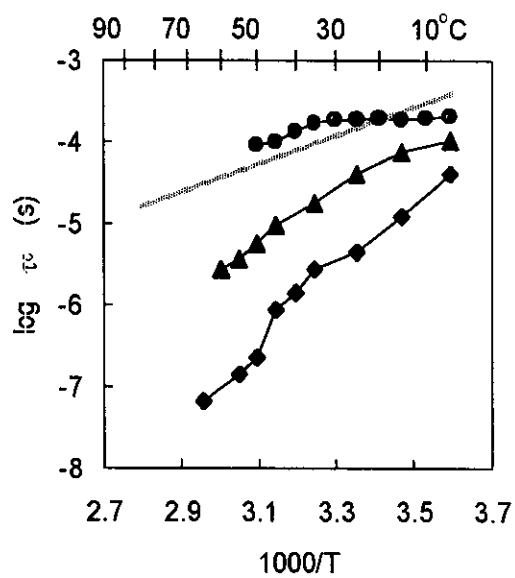


Fig. 9. t_c calculated from T_{1r} of dextran methin carbon at : 60(●), 75(▲) and 86%RH(◆). Line represents t_{c1} calculated from T_{1r} of dextran proton at 60%RH.

入して計算した値に一致した。さらに、 T_1 の実測値は、 τ_{c2} の活性化エネルギーが2.5kcal/molであると仮定して計算した値に一致したが、この値はポリエチレン非晶質のメチレン基で報告されている値

(3.72kcal/mol)とオーダーが同じである。ここで、計算に用いた前指数因子は報告された値より大きいことから、厳密な計算には分子運動の分布を考慮しなければならないことが示唆された。

-20°Cから温度が低下すると、 T_1 の実測値は τ_{c2} で計算される値から外れ、さらに小さい相関時間(τ_{c3})を持った動きが存在することが示唆された。しかし、メチレンプロトンの動きより速い動きが何に起因するのかは明らかでない。この T_1 の実測値の外れは T_1 がこの温度領域で分子運動性と相関しないためである可能性も否定できない。

一方、温度が0°C(1000/T=3.7)から上昇すると、 T_{1p} は τ_{c1} で表される分子運動を反映し始める。この動きはメチレンプロトンの動きより相関時間が大きく、また活性化エネルギー(8.0kcal/mol)も大きいことから、デキストラン分子のメチンプロトンの動きによるものと考えられる。プロトンの T_{1p} はスピン拡散のために分子内のプロトンの平均的な動きを表すのに対して、メチン炭素の T_{1p} はメチン炭素の動きを直接反映する。メチン炭素の τ_c を T_{1p} の実測値から3式にしたがって計算した結果、Fig.9に示すように、60%RHにおけるプロトンの τ_{c1} と同じオーダーの値が得られ、 τ_{c1} がメチンプロトンに起因するという結論が支持された。

凍結挙動からみた水分子の運動性

ラマン分光法により、凍結したG25ゲル中において、ガラス化した水の存在が初めて確認された。二次元X線回折-DSC同時測定で、凍結したG25ゲルでは回折強度の均一な連続したリングが観測されたが、これはサイズの小さな氷晶による回折像と解釈することができる。昇温と共にスポットがリング上に不連続に配列した回折像を示すようになったのは、氷晶が成長したためであると考えられる。凍結状態で連続したリング状の回折像が得られたのはG25ゲルだけであったが、これはG25ゲル中でサイズの小さな氷晶ができやすいことを意味し、ガラス化しやすいことも理解できる。しかしながら、G25ゲルのDSC昇温曲線で、発熱ピークに先行して観測される吸熱方向への移行の際には、顕著な回折強度の低下は観測されなかった。したがって、吸熱方向への移行がサイズの小さな氷晶の融解と断定することはできない。リング上に配列したスポ

ットは氷の融解の進行と共に弱まり、位置を移動させたが、これは融解の進行と共に、氷あるいは氷を含んだゲルビーズ自体が移動、回転して、入射X線に対する結晶軸の角度が変動するためと考えられる。また、G25ゲルにおいてガラス転移点は明らかでないが、リング状をした回折像はかなり低温から変動しており、水分子の運動はガラス転移点より低温から開始されている可能性も考えられる。

DRV法による薬物封入りリポソーム製剤の分子運動性と安定性

リン脂質の分子運動性は、水の移動が起こる凍結乾燥と再水和時に大きく影響され、凍結時にトリハロースなどの糖を入れると、糖がガラス状態となり、脂質膜が安定化されることが報告されている。すなわち、リポソームの凍結乾燥・再水和後の粒子サイズは変わらず、封入された薬物は保持されていると考えられている。しかし、糖と薬物をリポソームとともに凍結乾燥後、再水和すると薬物が封入され、リポソームのサイズが大きくなることは、一時的にリポソーム膜の流動性が上がり薬物の透過性が上昇するか、リポソームの融合が起きているのか、透過性の上昇とリポソームの融合が同時に起きているのか、またはリポソーム膜の再構築が行われている可能性がある。走査電顕でのリポソームの観察結果から、凍結乾燥後には、リポソームのベシクル状態は観察されず、再水和後にはベシクル状態が観察された。これらの結果から、破壊されたりリポソームの膜構造は、再水和時に再構築が起きており、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察した。糖は膜を安定化するのではなく、膜を一時的に乱しているのではないかと推察される。

糖の量を上げるとリポソームの粒子形が小さくなることから、凍結乾燥後糖が膜近傍に存在し、脂質同士の凝集を制御している可能性が示唆された。糖の脂質への分子運動性に対する影響は糖と脂質との比によって異なり、その比が高いとリポソームの脂質膜を安定化し、その比が低いと膜の透過性を高めることが示唆された。

OAの量を上げるとリポソームの粒子形が大きくなるのは、薬物がリポソーム表面に吸着するためと推察された。リポソーム中のOAを増加すると、リポソームの表面電位が負になることから、OAのカルボン酸基が外水相に出ており、正電荷のTHPが電気的に吸着していると推察した。

E. 結論

デキストラン等の高分子添加剤を用いたタンパク質凍結乾燥製剤について、その安定性と密接に相關し、正確な安定性評価に活用できる分子運動性のパラメータの探索を行った。その結果、NMR 緩和測定によって得られる T_1 および $T_{1\rho}$ が、それぞれ時間軸の異なる運動を反映し、凍結乾燥製剤の分子運動性の指標として活用できることが明らかになった。すなわち、凍結乾燥製剤中のデキストランは、60%RH で -100°C から 0°C の温度領域では相関時間が 10^{-7} から 10^{-6} s オーダーのメチレンの動きを示し、それが T_1 および $T_{1\rho}$ に反映される。温度が 0°C から上昇すると、メチレンの動きは引き続き T_1 に反映されるが、運動性が高まるため $T_{1\rho}$ には反映されなくなる。そこで $T_{1\rho}$ にはメチレンではなくメチンの動きが反映され始める。湿度が減少すると $T_{1\rho}$ は高い温度でメチンの動きを反映し始め、乾燥状態ではメチンの動きは 170°C まで温度が高くなっても見られない。また、パルス NMR によってプロトンの $T_{1\rho}$ として測定されるメチンの運動性は、固体高分解能 ^{13}C -NMR によってメチン炭素の $T_{1\rho}$ として測定される運動性とほとんど一致した。温度が T_{mc} を超えると、メチレンとメチンのいずれも急激に動きが高まり、 T_1 および $T_{1\rho}$ が急激に低下することが明らかになった。

また、凍結した架橋高分子-水系で観測される昇温結晶化のメカニズムと、昇温結晶化に先行して DSC 昇温曲線が吸熱方向へ移行する原因を明らかにする目的で、凍結状態のラマンスペクトル測定、二次元 X 線回折-DSC 同時測定を試みた結果、ラマン分光法により、凍結したゲル中においてガラス状態の水の存在を検出することができた。二次元 X 線回折-DSC 同時測定では、ガラス化しやすいゲルにおいて、サイズの小さな氷晶ができやすいことを確認した。高分子ゲル中の水は、架橋密度、網目構造に依存して分子の拡散運動が束縛され、凍結時に様々なサイズ・形状の氷晶を形成することが明確になった。

さらに、次世代医薬品と考えられるリポソーム製剤の調製法として、卵黄レシチンおよびコレステロール等から調製したリポソームに、薬物と糖を添加し凍結乾燥した後、再水和する方法が薬物封入率の高いリポソームを得られる有用な方法であることが明らかになった。薬物封入率が高く、粒子径の小さいリポソーム製剤を調製するためには、凍結時にシヨ糖を脂質に対して重量比で 8:1 加えること、再水和時には少量の水を連続的に添加すること、ピラルピシンの封入にはリポソーム脂質成分としてオレイン酸を添加することが必要であるこ

とが明らかになった。リポソームの膜構造は凍結乾燥によって破壊され、再水和時に再構築が起きて、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察した。糖の脂質への分子運動性に対する影響は糖と脂質との比によって異なり、その比が高いとリポソームの脂質膜を安定化し、その比が低いと膜の透過性を高めることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

S.Yoshioka, Y.Aso, S.Kojima, Usefulness of the Kohlrausch-Williams-Watts Stretched Exponential Function to Describe Protein Aggregation in Lyophilized Formulations and the Temperature Dependence Near the Glass Transition Temperature, *Pharm. Res.*, 18, 256-260 (2001)

Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Feasibility of using isothermal microcalorimetry to evaluate the physical stability of amorphous nifedipine and phenobarbital, *Thermochimica Acta*, 380, 199-204 (2001)

Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Explanation of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital from their molecular mobility as measured by ^{13}C nuclear magnetic resonance relaxation time and the relaxation time obtained from the heating rate dependence of the glass transition temperature, *J. Pharm.Sci.*, 90, 798-806 (2001)

N. Murase, M. Ruike, N. Matsunaga, M. Hayakawa, Y. Kaneko and Y.Ono: Spider silk has an ice nucleation activity., *Naturwissenschaften*, 88, 117-118 (2001).

K. Kajiwara, A. Motegi and N. Murase: *Cryo-Letters*, 22, 311-320(2001).

村勢則郎：凍結高分子ゲル中の水の物理状態、*冷凍* 77 (891) , 44 . 48 (2001).

Wang J., Y. Maitani, K. Takayama and T. Nagai, In vivo evaluation of doxorubicin carried with long circulating and remote loading proliposome: *Int. J. Pharm.*, 203 (1-2) 61-69 (2000). Erratum, *Int. J. Pharm.*, 219 (1-2) 183-184 (2001).

Y. Maitani, S. H. Hwang, S. Tanaka, K.

Takayama and T. Nagai, Physicochemical characteristics and transfection efficiency of DNA in cationic and neutral liposomes with soybean-derived sterylglucoside into HepG2 cells: *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, 61(1), 1-10 (2001).

Y. Maitani, K. Kawano, K. Yamada, T. Nagai and K. Takayama, Efficiency of liposomes surface-modified with soybean-derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells: *J. Contr. Release*; 75(3), 381-389 (2001).

S. H. Hwang, K. Takayama and Y. Maitani, Liver-targeted gene transfer into a human hepatoblastoma cell line and in vivo by sterylglucoside-containing cationic liposomes: *Gene Therapy* 8(16), 1276-80 (2001) -

2. 学会発表

吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄：¹³C および ¹H-NMR による凍結乾燥製剤における主鎖および側鎖の運動性の解析、第 40 回 NMR 討論会 2001.11

阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄：スピン拡散測定に基づく固体分散体におけるニフェジピンと PVP の分散状態の解明、第 40 回 NMR 討論会 2001.11

S. Yoshioka : Molecular mobility of lyophilized formulations as measured by NMR and DRS, The Conference on freeze-drying of pharmaceuticals and biologicals organized by the Center for

Pharmaceutical Processing Research, reckenridge, Colorado, Aug. 2, 2001

吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄：KWW 関数を利用したタンパク質凍結乾燥製剤の凝集現象の解析、日本薬学会第 121 年会 (2001. 3)

阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄：ニフェジピン-PVP 固体分散体の構造緩和時間および誘電緩和時間の測定、日本薬学会第 121 年会 (2001. 3)

阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄：非晶質ニフェジピンおよびフェノバルビタールの結晶化速度とガラス転移温度の昇温速度依存性から算出される緩和時間との関係、日本薬剤学会第 16 年会 (2001. 3)

村勢則郎、堀江誠、小林智恵美、楊井洋子、梶原一人、渡部徳子：凍結濃縮によるデキストラン-KCl 水溶液の可逆的ゲル化、第 47 回低温生物工学会年会 (2001).

N.Murase, M. Ruike, S.Yoshioka, C.Katagiri and H.Takahashi: Glass transition and ice crystallisation of water in polymer gels studied by oscillation DSC and XRD-DSC simultaneous measurements, *The Amorphous State: A Critical Review*, , Cambridge, UK, May, 2001

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
（分担）研究報告書

製剤中の水分子の運動性の解析に関する研究

（分担） 研究者 村勢 則郎 東京電機大学理工学部教授

架橋デキストラン（Sephadex G25）ゲルの凍結状態をラマン分光法により検討した。その結果、OH伸縮振動に帰属されるバンドの散乱強度から、昇温結晶化する水は低温でガラス状態にあることが明らかになった。また、二次元X線回折—DSC同時測定の結果から、凍結状態の Sephadex G25 ゲル中には、ガラス化している水の他に、サイズの小さな水晶が比較的多数形成されていると推定された。高分子ゲル中の水は、架橋密度、網目構造に依存して分子の拡散運動が束縛され、凍結時に様々なサイズ・形状の水晶を形成することが明確になった。

A. 研究目的

DSC（示差走査熱量測定）で凍結挙動を解析することにより、高分子—水系における水分子の運動性の解析を行っている。その結果、高分子ゲルでは架橋密度に依存して、水は凍結後の昇温過程で結晶化する場があることを明らかにしてきた。昇温結晶化は、高分子網目構造内に閉じこめられ凍結時にガラス化した水に起因するものと考えられている。しかしながら、ガラス化していることの確証は得られていない。また、昇温結晶化による発熱ピークが観測される場合、これに先行してDSC昇温曲線は吸熱方向へ移行するが、その原因も未解明である。融点降下したサイズの小さな水晶の融解によるものか、ガラス転移の際のエンタルピー緩和によるものか、議論は

分かれている。そして、この原因を明らかにすることが昇温結晶化のメカニズムを解明するためには不可欠と思われる。そこで、X線回折—DSC同時測定を行って調べてきた。本年度は、凍結した高分子ゲル中の水の物理化学的状态を明らかにする目的で、ラマン分光法を用いた解析を試みた。高分子ゲルの融解過程の一次元X線回折—DSC同時測定では、融解時の反射強度が温度により大きく揺らいでおり、詳細な解析を阻んでいる。そこで、二次元のX線回折—DSC同時測定に取り組んだ。

B. 研究方法

試料：昇温結晶化の観測されているセファデックスG25ゲルの他に、G100、G10ゲル（架橋デキストラン；Amersham

Pharmacia Biotech 社；架橋密度：G10 > G25 > G100) を使用した。乾燥したセファデックスビーズに蒸留水を添加して含水率 50 wt % に調整し、試料とした。

ラマンスペクトル測定：外径が 10×6.5×10 mm の石英製キュベットに試料を入れて栓をし、微小冷却ユニット (MMR Technologies, Inc., USA) を使用して冷却した。室温から約 2°C/分 で、40°C まで冷却し、その後設定温度までヒーターで加熱した。ラマンスペクトルの測定は Raman 960 (Thermo Nicolet, Inc., USA) を用いて行った。(1064 nm YAG Laser, 450mW 使用)

二次元X線回折—DSC同時測定：高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所の放射光共同利用施設 (BL-18C) を使用し、X線回折—CCD 検出法で測定を行った。(X線：0.07nm, ビームサイズ：100 ミクロン、20 keV 使用；検出器：HiPic C4880, 浜松ホトニクス株式会社製；DSC：メトラ—社 FP99 使用) 測定は約 2°C/分 で、40°C まで冷却し、その後 1°C/分 で昇温した。X線回折像は 1 分ごとに CCD カメラで取り込み、その後 FIT2D のソフトを使用して出力した。

C. 研究結果

ラマン測定の結果を図に示す。波数 3400 cm^{-1} 付近の散乱ピークは OH の伸縮振動によるものである。G25 ゲルにおいて (図 a 参照)、24°C で得られたスペクトルは室温 (27°C) で得られた液体の水のスペ

クトルに非常に近い。DSC で昇温過程における発熱ピークが観測されたあとの、11°C では、3400 cm^{-1} 付近の散乱ピークが低波数側にシフトしブロード化している。これは氷の生成によるもので、発熱ピークが昇温結晶化によるものであることがラマン分光法でも確認された。G100 ゲルのスペクトルがそのことを裏付ける (図 b 参照)。すなわち、凍結して、40°C になると、3400 cm^{-1} 付近の散乱強度ピークはやはり低波数側にシフトしブロード化しているが、G100 ゲルは昇温結晶化を示さず、冷却すると単純に氷晶を形成することが知られている。以上より、凍結した G25 ゲル中において、氷晶を形成していない水、すなわち、ガラス化した水の存在が確認された。

二次元X線回折—DSC同時測定では、六方晶氷の (100)、(002)、(101) 面からの反射に対応する回折像が 3 本の同心円 (リング) 状に観測された。凍結した G25 ゲルでは回折強度の均一な連続したリングが観測されたが、昇温と共にリング状の回折強度は不均一化し、同じリング上にスポットが不連続に配列した回折像を示すようになった。昇温 DSC 曲線の発熱ピークに対応して、スポットの強度が増大し、数も増加した。凍結した G10 や G100 ゲルでは連続したリングは観測されなかった。

D. 考察

ラマン分光法により、凍結した G25 ゲ

ル中において、ガラス化した水の存在が初めて確認された。

二次元X線回折—DSC同時測定で、凍結したG25ゲルでは回折強度の均一な連続したリングが観測されたが、これはサイズの小さな氷晶による回折像と解釈することができる。昇温と共にスポットがリング上に不連続に配列した回折像を示すようになったのは、氷晶が成長したためであると考えることができる。凍結状態で連続したリング状の回折像が得られたのはG25ゲルだけであったが、これはG25ゲル中でサイズの小さな氷晶がしやすいことを意味し、ガラス化しやすいことも理解できる。しかしながら、G25ゲルのDSC昇温曲線で、発熱ピークに先行して観測される吸熱方向への移行の際には、顕著な回折強度の低下は観測されなかった。したがって、吸熱方向への移行がサイズの小さな氷晶の融解と断定することはできない。

リング上に配列したスポットは氷の融解の進行と共に弱まり、位置を移動させた。融解の進行と共に、氷あるいは氷を含んだゲルビーズ自体が移動、回転して、入射X線に対する結晶軸の角度が変動するためと考えられる。また、G25ゲルにおいてガラス転移点は明らかでないが、リング状をした回折像はかなり低温から変動しており、水分子の運動はガラス転移点より低温から開始されている可能性も考えられる。

E. 結論

凍結した架橋高分子—水系で観測される昇温結晶化のメカニズムと、昇温結晶化に先行してDSC昇温曲線が吸熱方向へ移行する原因を明らかにする目的で、凍結状態のラマンスペクトル測定、二次元X線回折—DSC同時測定を試みた。

ラマン分光法により、凍結したゲル中においてガラス状態の水の存在を検出することができた。

二次元X線回折—DSC同時測定では、ガラス化しやすいゲルにおいて、サイズの小さな氷晶がしやすいことを確認した。

高分子ゲル中の水は、架橋密度、網目構造に依存して分子の拡散運動が束縛され、凍結時に様々なサイズ・形状の氷晶を形成することが明確になった。

DSC昇温曲線が吸熱方向へ移行する原因は未解明であるが、より詳細な二次元X線回折—DSC同時測定により明らかにできると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- N. Murase, M. Ruike, N. Matsunaga, M. Hayakawa, Y. Kaneko and Y. Ono: Spider silk has an ice nucleation activity,, *Naturwissenschaften*, 88, 117-118 (2001).
- K. Kajiwara, A. Motegi and N. Murase: *Cryo-Letters*, 22, 311-320(2001).
- N. Murase, M. Ruike, S. Yoshioka, C. Katagiri and H. Takahashi: Glass transition and ice crystallisation of

water in polymer gels studied by oscillation DSC, XRD-DSC simultaneous measurements and Raman spectroscopy, *In*

"Progress in Amorphous Food and Pharmaceutical Systems", Edited by H Levine, Roy. Soc. Chem, *in press*.

・村勢則郎：凍結高分子ゲル中の水の物理状態、冷凍 77 (891) , 44 - 48 (2001).

・村勢則郎、堀江誠、小林智恵美、楊井洋子、梶原一人、渡部徳子：凍結濃縮によるデキストラン- KCl 水溶液の可逆的ゲル化、低温生物工学会誌, 47(2), 印刷中.

2. 学会発表

・村勢則郎、堀江誠、小林智恵美、楊井洋子、梶原一人、渡部徳子：凍結濃縮によるデキストラン- KCl 水溶液の可逆的ゲル化、第 47 回低温生物工学会年会、要旨集, p. 21, (2001).

・ N.Murase, M. Ruike, S.Yoshioka, C.Katagiri

and H.Takahashi: Glass transition and ice crystallisation of water in polymer gels studied by oscillation DSC and XRD-DSC simultaneous measurements, *The Amorphous State: A Critical Review*, Abstract : Poster No. 13, Churchill College, Cambridge, UK, May, 2001

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合 研究事業)

(分担)研究報告書

分子運動性に基づく凍結乾燥・再水和法による薬物封入リポソーム製剤の安定性の評価に関する研究

(分担)研究者 米谷芳枝 星薬科大学医薬品化学研究所

リポソームの凍結乾燥・再水和(dehydration-rehydration vesicle, DRV)調製法は、疎水性薬物も親水性薬物も封入できる方法であり、また、リポソーム製剤を凍結乾燥品として保存できる利点がある。しかし、再水和時におけるリポソーム膜の脂質成分の分子運動性によって、粒子径が変化する欠点がある。そこで、薬物封入率が高く、粒子径の小さいリポソーム製剤を調製するためには、凍結時にショ糖を脂質に対して重量比で8:1加えること、再水和時においては少量の水を連続的に添加すること、薬物としてピラルピシン(THP)を用いたときにはリポソーム脂質成分としてオレイン酸を添加することが必要であることを明らかにした。凍結乾燥後には、リポソームのベシクル状態は観察されず、再水和後にはベシクル状態が観察された結果から、凍結乾燥によって破壊されたリポソームの膜構造は、再水和時に再構築が起きて、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察した。糖の脂質への分子運動性に対する影響は糖と脂質との比によって異なり、その比が高いとリポソームの脂質膜を安定化し、その比が低いと膜の透過性を高めることが示唆された。

A. 研究目的

リポソームの凍結乾燥・再水和(dehydration-rehydration vesicle, DRV)法は、疎水性薬物も親水性薬物も封入できる調製法であり、また、リポソーム製剤を凍結乾燥品として保存できる利点がある。しかし、再水和時にリポソーム膜の分子運動性によって粒子径が大きくなる欠点がある。そこで、薬物封入率が高く、粒子径の小さいリポソームを調製するために、凍結乾燥時と再水和時の調製条件を調べた。凍結時に添加する糖の種類とその添加量、および再水和時に添加する水量について検討し、最適条件を求めた。さらに、薬物としてピラルピシン(THP)を用いたとき、高い薬物封入率のリポソーム調製のための脂質成分も検討した。

B. 研究方法

リポソームは DRV 法により調製した。成分とし

ては、精製卵黄レシチン(EPC):コレステロール(Ch): β -sitosterol glucoside(Sit-G):オレイン酸(OA) = 7:3:2:0~1 (モル比)を用いて、水和法によって多重層リポソームを作り、これを超音波処理して小さな一枚膜リポソームにした。これに各種の糖と THP を総脂質に対して種々の比で加えて凍結乾燥し、得られた粉末に水を添加して再水和し、THP 封入リポソームにした。リポソームの粒子径は、電気泳動光散乱光度計により測定した。薬物封入率は、超遠心分離(100 000× g, 60 分, 4℃)により、リポソームと未封入の薬物を分離し、蛍光光度計(ex:482nm, em:550nm)によりリポソーム中の薬物濃度を測定し、以下の式より算出した。

Entrapment efficiency (%)

$$= (C_{\text{total}} - C_{\text{supernatant}}) / C_{\text{total}} \times 100$$

ここで、 C_{total} は添加した総薬物濃度、 $C_{\text{supernatant}}$

はリポソーム中の未封入の薬物濃度を示す。

凍結乾燥前、後および再水和後の粒子の状態は、走査電子顕微鏡(日本電子、JEOL JSM-5600LV)によって観察した。

C. 研究結果

添加する糖の検討として、リポソーム(EPC:Ch:Sit-G:OA=7:3:2:0)とOAを添加したリポソーム(EPC:Ch:Sit-G:OA = 7:3:2:1)にグルコース、乳糖、シヨ糖を総脂質と同重量だけ添加したときのリポソームのサイズと薬物封入率を測定した。リポソームのサイズは、凍結乾燥・再水和前は80 nm位であるが、凍結時にシヨ糖を添加したとき最も小さく、薬物封入率は30%位と低いことが明らかとなった(Table 1)。一方、OA添加リポソームでは、薬物封入率は80%位と上昇するが粒子サイズは約1 μ mと大きくなることがわかった。これらの結果より、糖としてはシヨ糖を使用することにした。次に、リポソーム(EPC:Ch:Sit-G:OA = 7:3:2:1)においてシヨ糖の最適添加量を調べた結果、添加量が多くなるほどリポソームのサイズは小さくなった。総脂質の8倍重量のシヨ糖を添加したとき、リポソームのサイズは約300 nmと小さく、薬物封入率も80%位を維持することが明らかとなった(Table 2)。さらに、再水和状態において凍結乾燥粉末に添加する水の量を決定するために、添加水量を変えて再水和した。その結果、水の添加量が多いほど再水和後のリポソームのサイズは大きくなり、薬物封入率が低くなった。

再水和後の粒子径は300-500 nmであったが、さらに超音波照射処理によって粒子径200 nm以下の小さなリポソームとなり、薬物封入率は約80%と高い値を維持していた(Table 3)。

各操作過程におけるリポソーム膜状態を走査電顕で調べたところ、凍結乾燥後には、リポソームのベシクル状態は観察されず、再水和後にはベシクル状態が観察された(Fig. 1)。

D. 考察

リン脂質の分子運動性は、水の移動が起こる凍結乾燥と再水和時に大きく影響され、凍結時にトリハロースなどの糖を入れると、糖がガラス状態となり、脂質膜が安定化されることが報告されている。すなわち、リポソームの凍結乾燥・再水和後の粒子サイズは変わらず、封入された薬物は保持されていると考えられている。しかし、糖と薬物をリポソームとともに凍結乾燥後、再水和すると薬物が封入され、リポソームのサイズが大きくなることは、一時的にリポソーム膜の流動性が上がり薬物の透過性が上昇するか、リポソームの融合が起きているか、透過性の上昇とリポソームの融合が同時に起きているのか、またはリポソーム膜の再構築が行われている可能性がある。走査電顕でのリポソームの観察結果から、凍結乾燥後には、リポソームのベシクル状態は観察されず、再水和後にはベシクル状態が観察された。これらの結果から、破壊されたリポソームの膜構造は、再水和時に再構築が起きており、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察した。糖は膜を安定化するのではなく、膜を一時的に乱しているのではないかと推察される。

糖の量を上げるとリポソームの粒子形が小さくなることから、凍結乾燥後糖が膜近傍に存在し、脂質同士の凝集を制御している可能性が示唆された。糖の脂質への分子運動性に対する影響は糖と脂質との比によって異なり、その比が高いとリポソームの脂質膜を安定化し、その比が低いと膜の透過性を高めることが示唆された。

OAの量を上げるとリポソームの粒子形が大きくなるのは、薬物がリポソーム表面に吸着するためと推察された。リポソーム中のOAを増加すると、リポソームの表面電位が負になることから、OAのカルボン酸基が外水相に出ており、正電荷のTHPが電氣的に吸着していると推察した。

E. 結論

薬物封入率が高く、粒子径の小さいリポソーム製剤を調製するためには、凍結時にシヨ糖を脂