

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
研究者 阿曾幸男

分担研究者

国立医薬品食品衛生研究所薬品部 吉岡澄江

要旨

非ウイルス性の遺伝子ベクターとして注目されている DNA-カチオン性脂質複合体について、その凍結乾燥製剤の安定性に関する基礎的な知見を得ることを目的とし、そのモデルであるカチオン性リボソーム凍結乾燥製剤の保存安定性を明らかにし、安定性を支配する因子について考察した。

1. 研究目的

本研究はウイルスを用いずに遺伝子を標的細胞内に導入する手法として注目され、臨床試験等も行われている DNA-カチオン性脂質複合体製剤について、製剤を構成する分子の分子運動性に基づいて、製剤の保存安定性を評価する手法を開発し、製剤の実用化に向けた基盤的な知見を得ることを目的とする。ヒトの全遺伝子配列が解読され、遺伝子の機能や疾病との関連が明らかにされつつあり、それらの成果に基づいた新たな疾病治療法が試みられている。たとえば、血管壁増殖遺伝子の発現を制御する遺伝子部位に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを投与し、血管壁の増殖を抑制させることにより、心筋梗塞治療時の心血管バイパスの再狭窄を抑制する試みや、血管新生に関連する遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を投与し、動脈硬化を起こしている部位に新たな血管を生じさせ、血流障害を改善する試みが行われている。今後、DNA を有効成分とするさまざまな形の医薬品製剤が市販されるものと予想される。そのなかでもウイルスを用いない DNA-カチオン性脂質複合体は安全性の面でウイルスベクターに比べ優れており、また、非ウイルスベクターであるカチオン性高分子などに比べ、遺伝子導入効率が高いことから、最も有望視されているものであるが、これらの医薬品製剤における保存時の DNA-カチオン性脂質複合体の化学的あるいは物理的な安定性に関する知見は断片的なものに限られている。DNA を有効成分とする医薬品製剤が市販されるのに備え、DNA 医薬品の保存安定性に関する包括的な研究およびその研究を遂行する上で不可欠な DNA 医薬品の安定性評価法の開発は急を要することである。本年度は、DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の安定性に関する基礎的な知見を得ることを目的として、そのモデルとしてカチオン性脂質リボソームについて、粒子径の変化を指標として保存安定性を明らかにし、保存安定性を支配する因子について考察する。そのために、以下の検討を行った。

- ①カチオン性リボソームの粒子径測定法の確立。
- ②熱力学的に安定なリボソーム脂質の組成の決定。
- ③カチオン性リボソームの凍結乾燥条件と再分散後のリボソーム粒子径との関係の解明。
- ④凍結乾燥製剤について保存安定性試験を行い粒子径の経時的な変化および安定性を支配する製剤の物理的因子の解明。

2. 研究方法

2.1 塩基性リボソームの調製

N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP) 250mg とコレステロール 125 または 50mg をクロロホルムに溶解し、窒素気流によりクロロホルムを留去した。さらに、1時間減圧にし、残留するクロロホルムを除いた。水 50ml を加え、50℃で 10 分間加温し、脂質を分散させた。孔径 0.6 μ m および 0.2 μ m のポリカーボネート製メンブランフィルターでろ過することにより、粒子径約 200nm のリボソームの溶液を得た。

2.2 塩基性リボソームの凍結乾燥

凍結乾燥製剤の添加剤として、ショ糖、トレハロース、デキストラン、ポリヒドロキシエチルアス

パラギン(PHEA)、ショ糖-デキストラン混合物(2:1 および 1:1)を用いた。10w/v%の添加剤溶液と等量のリポソーム溶液を混合し、その溶液 500 μ l をポリプロピレン製のチューブに入れ、液体窒素に入れて急速に凍結するか、あるいは凍結乾燥機の棚で-10 $^{\circ}$ C/h の速度で冷却し、凍結した。凍結した試料は約 5 Pa の減圧下、棚温度を-40 $^{\circ}$ C で 12 時間、-20 $^{\circ}$ C で 8 時間、0 $^{\circ}$ C で 3 時間、20 $^{\circ}$ C で 3 時間保持し、乾燥を行った。リポソーム凍結乾燥製剤は 25 $^{\circ}$ C、23%RH で 1 日保存して水分量を調整した後、40 あるいは 50 $^{\circ}$ C に保存し、再分散後リポソーム粒子径を測定するとともに、示差走査熱量計(DSC)により製剤の物理化学的特性の変化を明らかにした。

2.3 粘度測定

リポソーム凍結乾燥製剤を水に再分散させ、Cone 粘度計を用いて、その溶液の粘度を 25 $^{\circ}$ C で測定した。直径 40mm、1.59 $^{\circ}$ の Cone を用いた。Shear rate を 1~500 rad/s の範囲で変化させ、shear stress との間に直線関係が見られる範囲のデータを用いて粘度を算出した。

2.4 リポソーム粒子径測定法

カチオン性リポソームの凍結乾燥製剤を水 500 μ L に再分散し、動的光散乱法によって粒子径を測定した。測定は 25 $^{\circ}$ C で行い、粘度の値は上に述べた方法で実測した値を用いた。

3. 研究成果

3.1 動的光散乱法に基づくカチオン性リポソームの粒子径の測定値に及ぼす測定条件の影響

カチオン性脂質-DNA 複合体の粒子径を正確に再現性よく測定するために、動的光散乱法に基づいて測定される粒子径が測定条件によってどのような影響を受けるかを検討し、測定条件の最適化を行った。本測定法では粒子の濃度によって粒子径の測定値が影響を受けないことを前提として、散乱強度を毎秒 10000 カウントになるようにフィルターの透過率を調整して測定する。塩基性リポソームの系においてもこの前提が成り立つかどうかを確認するため、種々のリポソーム濃度で粒子径の測定を行った。7mg/ml の脂質濃度のリポソームを水で希釈して粒子径を測定したところ、Fig. 1 に示すように 0.7~7 mg/ml の濃度範囲において塩基性リポソームの粒子径は脂質濃度に依存せず、200nm の値が得られた。したがって、この濃度範囲においては、他の分散系と同様に散乱強度を毎秒 10000 カウントになるように調整することによって、リポソームの粒子径が正確に測定できるものと考えられる。

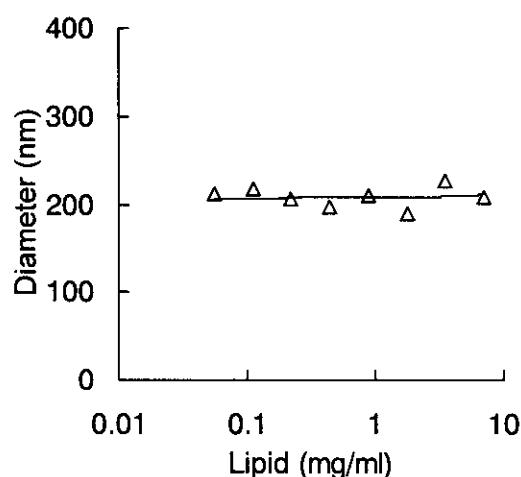


Fig. 1 Diameter of cationic liposome dispersed in water at various lipid concentration

次に、塩基性リポソームの粒子径の測定値に及ぼす添加剤の影響を検討した。粒子径 200nm の塩基性リポソームを種々の添加剤水溶液に分散させると Table 1 に示すように、デキストラン水溶液の場合およそ 500nm、sucrose や PHEA 水溶液の場合はおよそ 300nm の値が得られた。動的光散乱法は散乱光の揺らぎのデータから粒子の拡散係数を算出し、拡散係数を Einstein-Stokes 式に従い、粒子径に変換する。従って、粒子を分散させる溶媒の粘度やその温度の影響を受ける。溶液の粘度を考

Table 1 Diameter of cationic liposome in various excipient solutions

Excipient (5w/v%)	Viscosity (cP)	Liposome diameter (nm)	
		Without correction	With correction
Water	0.89	202	
Sucrose	1.2	270	198
Dextran (40k)	2.2	494	195
PHEA	1.3	284	192

Measurement was carried out at 25 $^{\circ}$ C

慮して粒子径を測定すると、いずれの場合も水に分散させた場合と同様の 200nm の値が得られたことから、添加剤の水溶液に分散することによってリポソームが凝集し、大きな粒子になったのではなく、溶液の粘度が上昇したことによって大きな値が得られたものと思われる。したがって、動的光散乱法によって粒子径を測定する際にはリポソームを分散させる溶液の粘度を実測し、補正する必要があることが示された。

カチオン性リポソームの粒子径に及ぼす脂質組成の影響

DOTAP を用いたカチオン性リポソームの粒子径に及ぼす補助脂質であるコレステロール含量の影響を調べた。添加剤としてショ糖およびデキストランを用いて凍結乾燥し、再分散したカチオン性リポソームの平均粒子径はいずれのコレステロール含量においても同様であったが、粒子径の分布はコレステロール含量が高いほど狭くなり、均一なりポソームが生成する傾向が見られた。したがって、重量比 2:1 の DOTAP とコレステロールから成るリポソームについて、添加剤の影響や保存安定性について検討を行った。

カチオン性リポソームの粒子径に及ぼす凍結乾燥の影響

凍結乾燥過程におけるリポソームの劣化は 1) 凍結時の氷晶形成による物理的なストレス、2) 乾燥時に水が蒸発することにより、水分子による安定化作用がなくなることなどによって引き起こされると考えられ、凍結乾燥後、水に再分散したリポソームの粒子径は凍結乾燥条件の影響を受けるとと思われる。凍結時の氷晶形成による物理的なストレスの影響を検討するため、異なるサイズの氷晶が形成されるように、液体窒素に試料を浸け、急速に凍結する方法（小さな氷晶が生成）と、試料を凍結乾燥機の棚に置き、棚を $-10^{\circ}\text{C}/\text{h}$ の速度で冷却し、試料を凍結させる方法（比較的大きな氷晶が生成）で試料を凍結し、凍結融解あるいは凍結乾燥を行い、リポソームの粒子径がどのような影響を受けるかを比較検討した。

Fig. 3 に示すように凍結した試料を 25°C の水につけ、融解した試料の粒子径は凍結方法によらず大きな差は見られなかった。また、凍結乾燥後水に再分散した試料においてもカチオン性リポソームの粒子径に差は見られなかった。しかし、生成した凍結乾燥ケーキの外観は冷却速度によって差が見られ、Fig. 4 に示すように液体窒素で急速に凍結した試料ではいずれの添加剤においてもケーキが一部収縮し、ゆっくり凍結した試料は凍結時

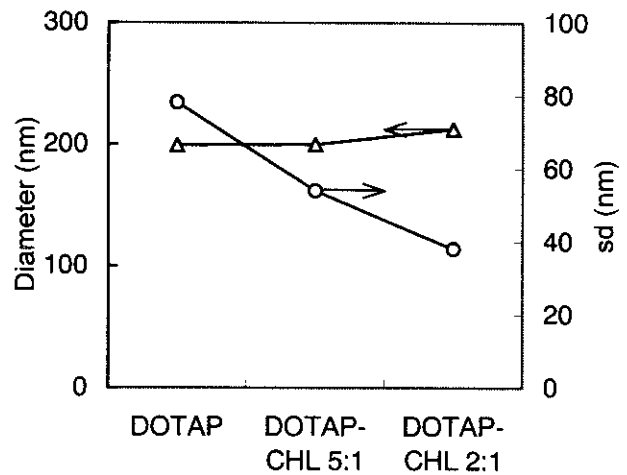


Fig. 2 Diameter and its distribution of cationic liposome.

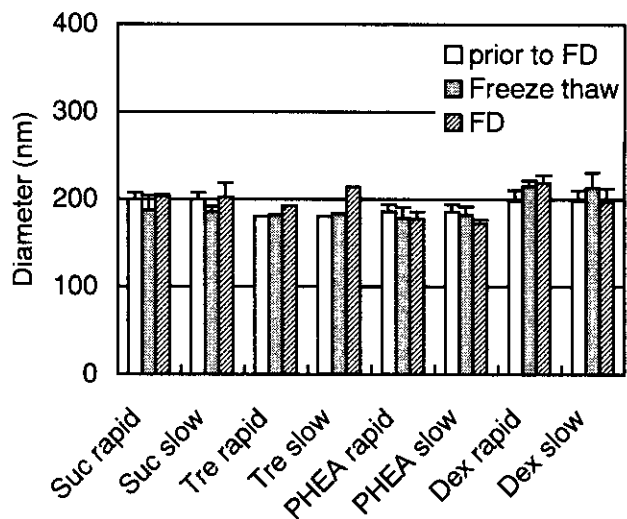


Fig. 3 Effect of cooling rate of cationic liposome solution on the diameter of liposome.

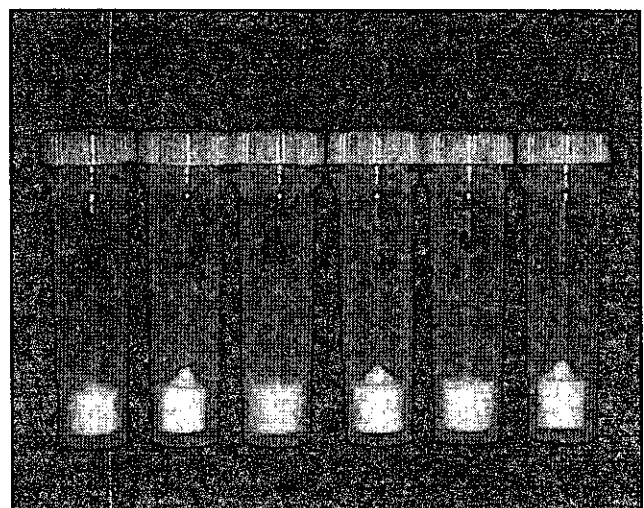


Fig. 4 Effect of cooling rate of cationic liposome solution on the shape of freeze-dried cake.

の形状が保存されたケーキが得られた。

カチオン性リポソームの粒子径に及ぼす添加剤の影響

添加剤を加えずに凍結乾燥し、水に再分散すると、カチオン性リポソームの粒子径は乾燥前に200nmであったものが600nmに増大した。これは乾燥によって脂質同士が融合するためと考えられる。ショ糖、トレハロースなどの糖やデキストラン、PHEA等の水溶性高分子、ショ糖とデキストランの混合物を添加剤として用いると、再分散後のカチオン性リポソームの粒子サイズは凍結乾燥前とほとんど変わらず、今回検討した添加剤は凍結乾燥時にカチオン性リポソームに対して安定化作用を持つことが明らかになった。

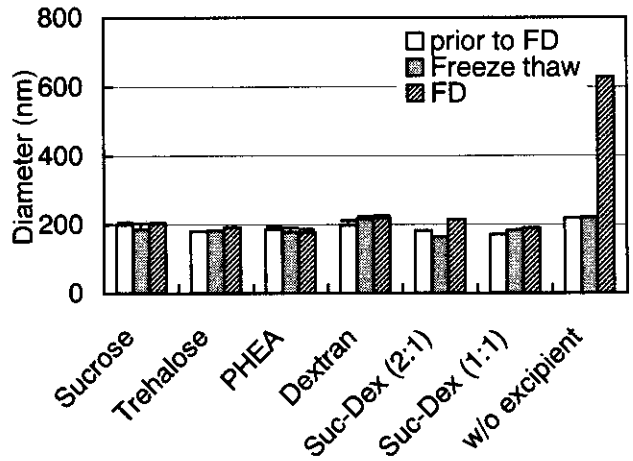


Fig. 5 Diameter of cationic liposome lyophilized with various excipients.

3.3 カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の保存安定性の検討

25°C、23%RHの条件で1日保存して水分含量を調整したカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤を40°Cあるいは50°Cに保存したところ、ショ糖を添加剤として用いた製剤ではFig. 6に示すように粒子径が200nmから400nmに増加した。増加の速度は温度が高いほど速やかであった。トレハロース、PHEAを添加剤として用いた製剤においても保存により粒子径が増加したが、ショ糖に比べ増加の度合いは小さかった(Fig. 7および8)。また、Fig. 7に示すようにショ糖にデキストランを添加するとデキストランの添加量が高いほど、保存によるリポソーム粒子径の増加が抑制される傾向が見られた。デキストランを添加剤として用いた製剤においては40°C、20日あるいは50°C、7日の保存によって粒子径に変化は見られず、安定であった。

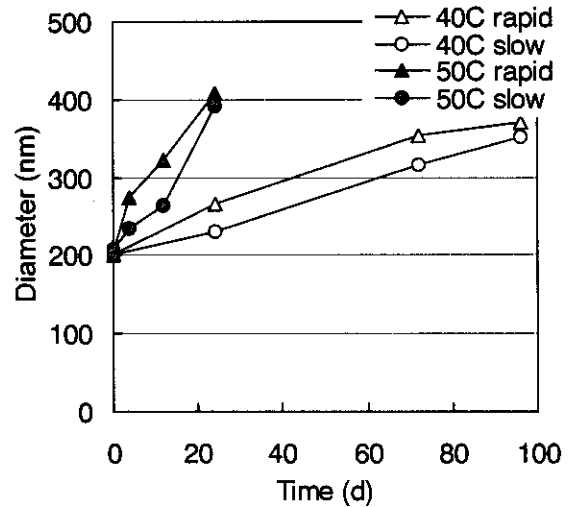


Fig. 6 Diameter of cationic liposome lyophilized with sucrose. Storage temperature: 40°C open symbols; 50°C closed symbols.

カチオン性リポソームの凍結乾燥製剤についてDSCを測定した結果、何れの添加剤を用いた製剤においてもガラス転移が観測され、非晶質であった。ガラ

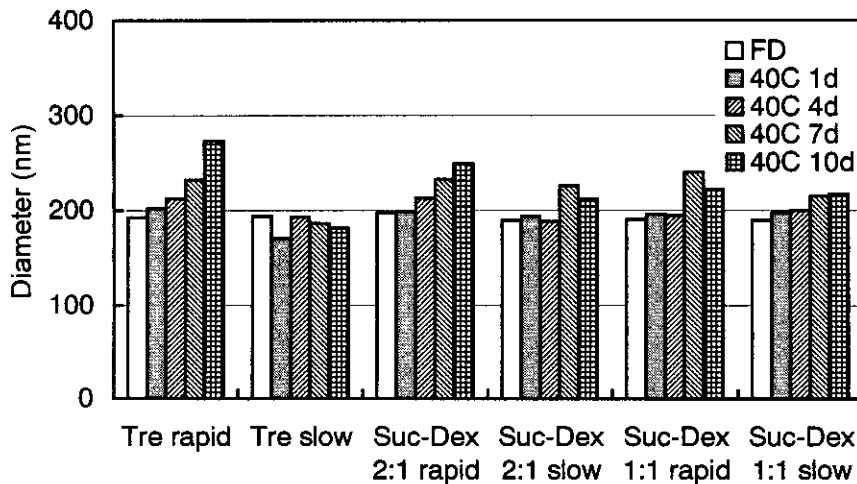


Fig. 7 Diameter of cationic liposome lyophilized with trehalose or sucrose-dextran.

ス転移温度(T_g)は Table 2 に示すようにデキストランを用いた製剤が最も高く、シヨ糖を用いた製剤の T_g は最も低かった。カチオン性リポソーム製剤の保存による粒子径の変化の度合いは T_g の高い製剤ほど小さく、保存安定性と T_g すなわちマトリックスの運動性との間に関連があることが示された。また、シヨ糖製剤では 80°C 付近にシヨ糖の結晶化による発熱ピークが観測され、この結晶化ピークは 50°C で 4 時間保存した試料では保存前と同様であったが、24 時間保存した試料では観測されず、50°C での保存中にシヨ糖が結晶化したことが明らかとなった。したがって、シヨ糖を添加剤として用いたカチオン性リポソーム製剤の場合はマトリックスの運動性が高いことに加え、結晶化によりシヨ糖とリポソームが相互作用することができなくなり、シヨ糖による安定化作用が失われたことによって、他の添加剤にくらべ保存による粒子径の増加の度合いが大きかったものと思われる。

デキストランを用いた製剤を除き、検討した何れの製剤においても、液体窒素を用いて急速に凍結した試料に比べ、-10°C/h の冷却速度でゆっくり凍結した試料の方が保存による粒子径の増加が小さく、安定な傾向が見られた。DSC による検討の結果、冷却速度によって製剤の T_g に差は見られず、凍結速度の違いによって安定性に差が見られた理由は不明であるが、この結果は安定な製剤を得るためには凍結速度を含め凍結乾燥の操作条件の最適化が必要であることを示すものと考えられる。

4. 考 察

本年度、カチオン性リポソームの凍結乾燥製剤について行った基礎的検討により、DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の保存安定性を考察する上で、有用な知見を得ることができた。リポソームの粒子径の保存による増加の度合いが製剤の T_g すなわち運動性と関連することが示され、 T_g の高い添加剤とともに凍結乾燥することにより安定な製剤が作成できることが示唆された。我々は既に、非晶質薬物の結晶化速度が運動性に基いて予測できることを示唆する知見を得ている。カチオンリポソームの粒子径に関しても非晶質医薬品の結晶化と同様な取り扱いによって、安定性予測が可能であることを明らかにすることは今後検討すべき研究課題と考える。そのためには凍結乾燥製剤の分子運動性を明らかにするとともに、リポソームの粒子径の変化を速度論的に取り扱う方法論を確立する必要があると考えられる。また、本年度の研究成果により、凍結乾燥時の凍結速度によってカチオン性リポソームの粒子径や製剤の T_g に差は見られなかったものの、凍結乾燥製剤のケーキの外観が異なり、カチオン性リポソームの粒子径の保存による増加の度合いにも差があることが明らかになった。その詳細なメカニズムについては不明であり、さらに検討すべき課題と考える。

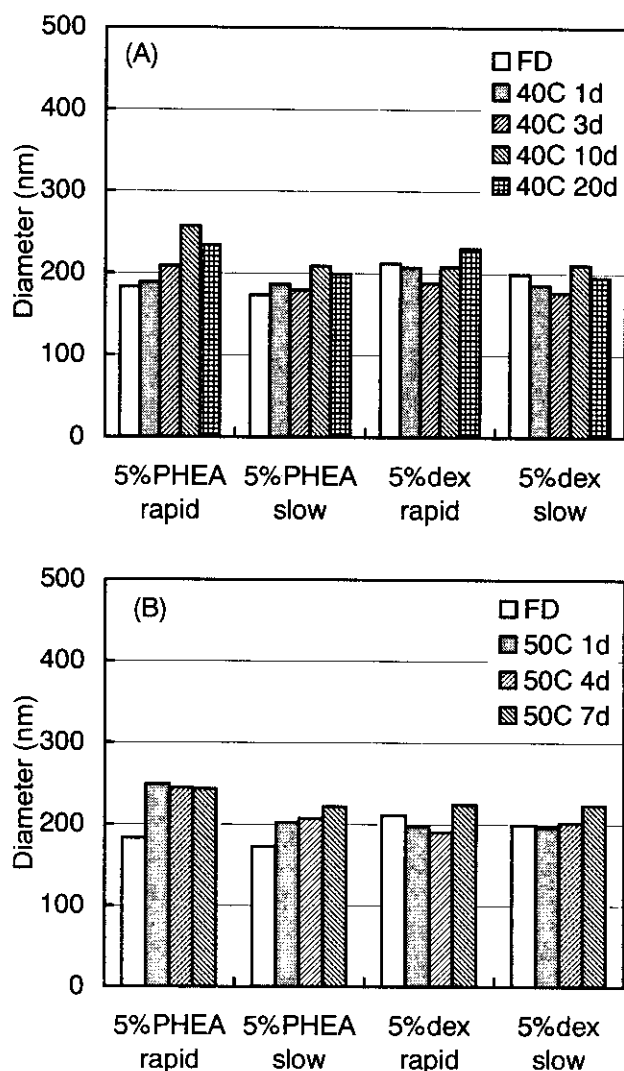


Fig. 8 Diameter of cationic liposome lyophilized with PHEA or dextran stored at 40 (A) and 50 °C (B).

Table 2 T_g of lyophilized cationic liposome formulations^{a)}

Excipient	T_g (°C)
Sucrose	35.1
Trehalose	50.2
PHEA	55.4
Dextran	112.6
Suc-Dex (2:1)	46.4
Suc-Dex (1:1)	60.4

^{a)} Water content was adjusted by storing at 25 °C and 23%RH for 1d.

5. まとめ

- (1) 凍結乾燥によるカチオン性リポソームの粒子径の増大はシヨ糖やデキストランなどの添加剤の存在によって抑制されることが示された。
- (2) T_g の低いシヨ糖を添加剤として用いた場合は保存中に粒子径の増大が見られた。一方、 T_g の高いデキストランを添加剤として用いると、粒子径が変化しない安定な製剤ができることが示された。
- (3) シヨ糖、トレハロース、シヨ糖-デキストラン混合物を添加剤として用いた製剤は、液体窒素で急速に凍結した製剤の方が粒子径の増大の速度が大きく、凍結方法によって安定性に差があることが示された。

6. 研究発表

- (1) Yukio Aso, Sumie Yoshioka , Jiang Zhang and George Zografi
Effect of water on the molecular mobility of sucrose and PVP in a colyophilized formulation as measured by ^{13}C -NMR relaxation time.
Chemical & Pharmaceutical Bulletin (2002), Accepted.
- (2) 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 NMR Relaxation Time and the Relaxation Time Obtained from the Heating Rate Dependence of T_g
Journal of Pharmaceutical Sciences, 90, 798-806 (2001).
- (3) 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).
- (4) S. Yoshioka, Y. Aso, and S. Kojima
Usefulness of Kohlraush-Williams-Watts Stretched Exponential Function to Describe Protein Aggregation in Lyophilized Formulations and Temperature Dependence Near the Glass Transition Temperature. *Pharmaceutical Research*, 18, 256-260 (2001)).

7. 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

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等開発のための評価方法の開発に関する研究

第4分野

稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

平成14年9月10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