

厚生労働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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成15（2003）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	13
------------------------	----

村勢則郎

2. 分子運動性に基づくリポソーム製剤の安定性評価	19
---------------------------	----

米谷芳枝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	26
-----------------	----

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

ポリビニルアルコールおよびメチルセルロースを添加剤として用いた凍結乾燥製剤における β -ガラクトシダーゼの凝集および失活を KWW 関数を用いて解析した結果、パラメータ τ および β から計算した t_{90} の温度依存性は、NMR 緩和時間から測定した分子運動性が大きく変化する温度である T_{mc} 付近において、勾配が大きく変化することが分かり、分子運動性の変化に伴ってタンパク質の失活および凝集の挙動が大きく変化す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二次元X線回折-DSC 同時測定を用いて詳細に検討した結果、G25 ゲルではサイズの小さな氷晶が比較的多数形成されるのに対して、架橋密度の高いG10ゲル中には大きなサイズの氷晶が形成されやすく、架橋密度の低いG100ゲル中には高分子鎖にそって氷晶が成長しやすいことが明らかになった。また、凍結乾燥・再水和調製法において、全脂質量に対するショ糖の添加量を最適化し、脂質の分子運動性を制御することによって、高いDNA封入率と静脈内投与可能な粒子径のリポソーム製剤を調製できること、さらに粒子径等の物性が安定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 医薬品化学研究所 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。

前年度は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、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を明らかにした。また、②凍結乾燥製剤の製造における重要な工程である凍結過程において、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を明らかにした。さらに、③DNA をリポソームに効率的に封入する方法として有望と考えられる凍結乾燥・再水和法(DRV法)について、抗癌剤ピラルピシンをモデル薬物として、封入率が高く、粒子径の小さいリポソーム調製法の最適条件を明らかにした。

本年度は、前年度の成果に基づき、①高分子添加剤含有のタンパク質凍結乾燥製剤について、タンパク質の保存安定性と分子運動性との関係をさらに詳細に検討する目的で、ポリビニルアルコール(PVA)およびメチルセルロース(MC)を添加剤とした凍結乾燥製剤中におけるモデルタンパク質、 β -ガ

ラクトシダーゼの変性および凝集を速度論的に解析し、その温度依存性を検討した。また、②凍結乾燥製剤の物理的状態に大きな影響を与えることになる高分子・水系の凍結挙動をさらに詳細に解析するために、二次元のX線回折-DSC同時測定によって、凍結時に形成される氷晶の形状および水分子の運動性を解析した。さらに、③DNAを高い効率で封入し、静脈内投与可能な粒子径のリボソーム製剤の調製法を検討するとともに、粒子径等の安定性を評価した。

B. 研究方法

β-ガラクトシダーゼの失活および凝集の測定

β-ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は、PVAあるいはMCの2.5%溶液に重量比1/50のタンパク質を溶解し、凍結乾燥して調製した(Freezevac C-1、東西通商)。一定相対湿度下(6%~43%RH)に保存して水分含量を調整した製剤を一定温度条件下(10~70°C)に保存し、経時的に活性を2-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideを基質として測定した。

同時に、サイズ排除クロマトグラフィーによってタンパク質の凝集量を測定した。Fig.1にクロマトグラム代表例を示す。未変性体のサイズに相当するタンパク質量(変性体量も含む)をピーク高さに基づいて算出し、凝集したタンパク質量を求めた。

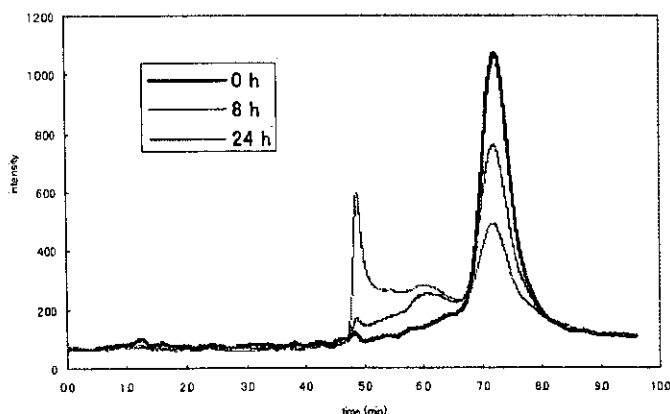


Fig.1. Typical size exclusion chromatograms of lyophilized β-GA formulation containing PVA stored at 60°C and 23%RH.

二次元X線回折-DSC同時測定による高分子・水系の凍結挙動の解析

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。

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。

DRV法によるDNA封入リボソーム製剤の調製と物性評価

リボソームはDRV法で調製した。精製卵黄レシチン(PC):dioleoyl phosphatidylethanolamine(DOPE):1,2-dioleoyl-3-(trimethylammonium) propane chloride (DOTAP):β-sitosterol glucoside (Sit-G):レチノイン酸(RA)=32:16:8:0~6:0~4(モル比)(Table 1)を用いて、水和法によって多重層リボソームを作り、超音波処理して小さな一枚膜リボソームを調製した。これに各種類の糖と、ルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA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、DNA封入リボソームにした。

リボソームの粒子径および表面電位は、電気泳動光散乱光度計(大塚電子(株))により測定した。DNA封入率は、DNAを³⁵Sでラベル化し、超遠心分離(100000×g、60分、4°C)により、リボソームと未封入のDNAを分離し、上清のラベル体のラジオ活性を測定し、リボソーム中のDNA濃度を以下の式より算出した。

Entrapment efficiency (%)

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

ここで、C_{total}は添加した総DNA濃度、C_{supernatant}はリボソームへの未封入のDNA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。培養細胞としては、ヒト肝細胞HepG2細胞を用いた。

Table 1. Liposome formulations for entrapment of 200 µg plasmid DNA

Formula	Liposome	PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA (µmol)
1	Control	32:16:8:0:0
2	Sit-G	32:16:8:6:0
3	Sit-G/RA	32:16:8:6:4

C. 研究結果

タンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性と分子運動性

1) β-ガラクトシダーゼの凝集

PVA を添加剤とした製剤中の β-ガラクトシダーゼは、Fig.2 に示すように、保存によって経時的に凝集を示した。凝集のデータを

Kohlrausch-Williams-Watts Stretched

Exponential Function (KWW 関数、1 式) で解析し、平均凝集時間 τ および凝集時間の分布を表す β を求めた。Fig.3 に示すように、凝集のタイムコースを τ で規格化した時間に対してプロットすると、6%RH(相対湿度)/10-70°C および 23%RH/10-40°C の条件下では、タンパク質の凝集は直線となり、 β が 1 の一次式で表されることが分かった。それに対して、23%RH/50-70°C では β が 1 より小さい非線形曲線になり、これらの条件では 1 次式から外れることが示唆された。

$$\phi(t) = \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_{KWW}} \right)^{\beta_{KWW}} \right] \quad (1)$$

MC を添加剤とした製剤中のタンパク質の凝集 (Fig.4 および 5) は、 τ で規格化した時間に対してプロットすると、12%RH(相対湿度)/20-30°C では直線を示したが、12%RH/40-70°C および 43%RH/20-70°C では β が 1 より小さい非線形曲線を示した。

タンパク質の凝集について得られた τ と β の値を Table 2 に示す。PVA 製剤では、NMR の緩和時間を指標として測定される分子運動性が大きく変化する温度 (T_{mc}) は、23%RH では 35°C、6%RH では 70°C 以上であったが、温度が上昇して T_{mc} を超えると β が 1 から減少した。それに対して、MC 製剤では、 T_{mc} は、43%RH では 55°C、12%RH では 70°C 以上であったが、12%RH/20-30°C の条件を除いて、 T_{mc} より低い温度でも β は 1 より小さい値を

示した。43%RH では、さらに T_{mc} 付近で β が大きく減少した。

2) β-ガラクトシダーゼの失活

PVA 製剤および MC 製剤中の β-ガラクトシダーゼの失活を、 τ で規格化した時間の関数として、それぞれ Fig.6 および Fig.7 に示す。PVA 製剤では、6%RH および 23%RH におけるすべての温度で β は 1 となったが、MC 製剤では、43%RH/60-70°C で非直線の失活がみられた。Table 3 に示すように、タンパク質の失活について算出した β は、MC 製剤では T_{mc} を超えると β が著しく減少したが、PVA 製剤では、 T_{mc} 以上でも β は 1 で変化しなかった。

3) β-ガラクトシダーゼの凝集および失活の温度依存性

タンパク質が 10%凝集あるいは失活するのに要する時間 t_{90} を τ および β を用いて 2 式にしたがって計算した結果、Fig.8 および Fig.9 に示す温度依存性をもつことが分かった。PVA 製剤中のタンパク質失活の t_{90} は 6% および 23%RH のいずれにおいても直線的な温度依存性を示したが、タンパク質凝集の t_{90} は 6%RH では直線であったが、23%RH では T_{mc} 付近で温度依存性の勾配が変化した。

一方、MC 製剤におけるタンパク質の凝集および失活の t_{90} は 12%RH では直線的な温度依存性を示したが、43%RH では T_{mc} を超えると温度依存性は直線性から外れた。

$$t_{90} = \tau \exp \left(\frac{\ln(-\ln 0.9)}{\beta_{KWW}} \right) \quad (2)$$

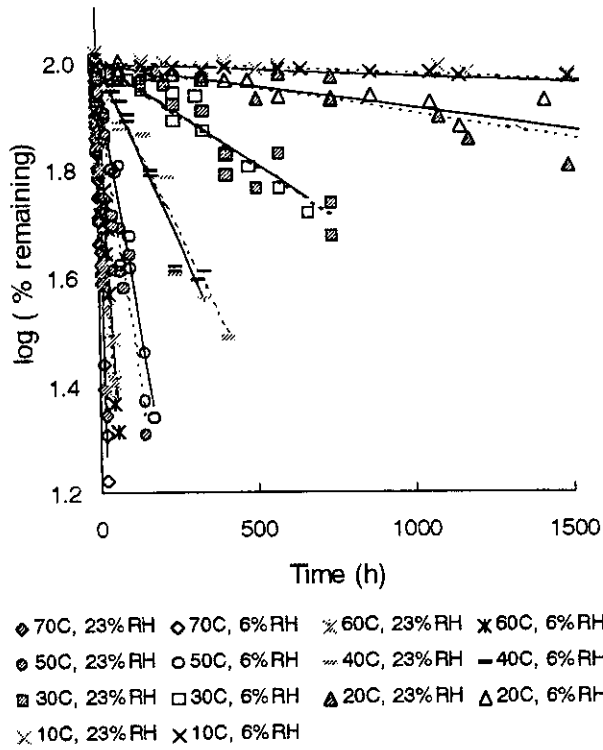


Fig.2. Protein aggregation in lyophilized β -GA formulation containing PVA as a function of time.

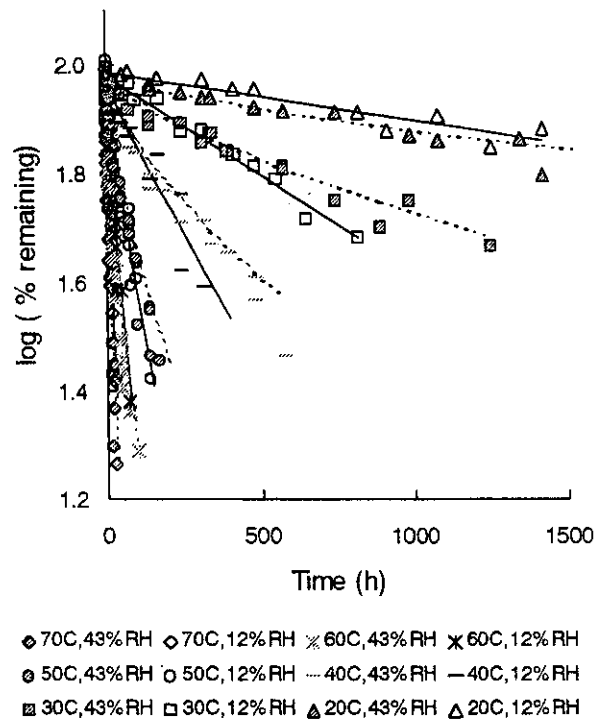


Fig.4. Protein aggregation in lyophilized β -GA formulation containing MC as a function of time.

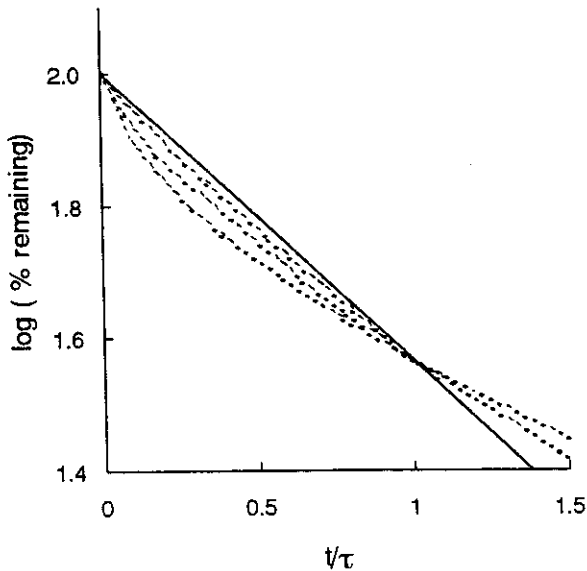


Fig.3. Regression curves for protein aggregation in lyophilized β -GA formulation containing PVA as a function of the time scaled to τ .

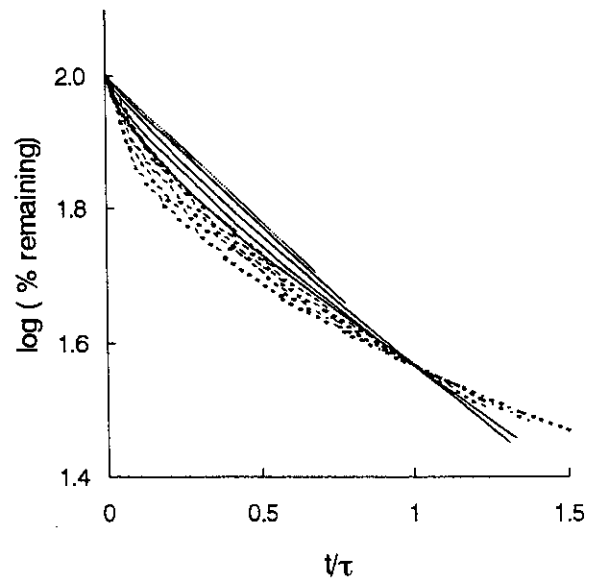


Fig.5. Regression curves for protein aggregation in lyophilized β -GA formulation containing MC as a function of the time scaled to τ .

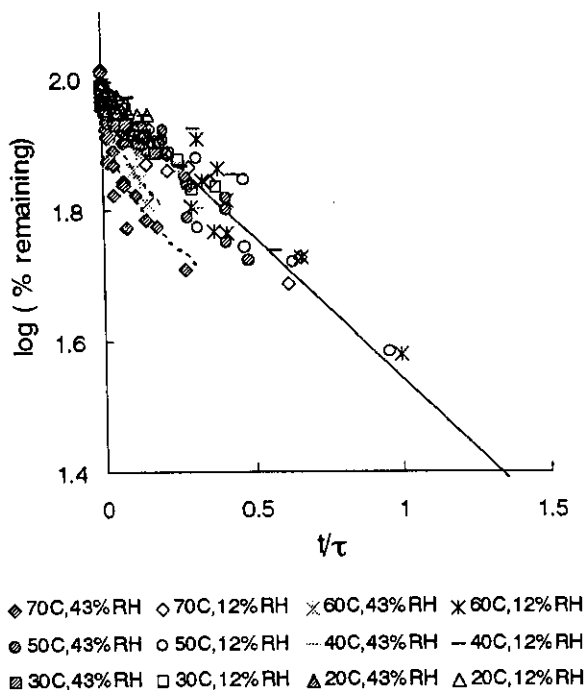


Fig. 6. Regression curves for inactivation of β -GA in lyophilized formulation containing PVA as a function of the time scaled to τ .

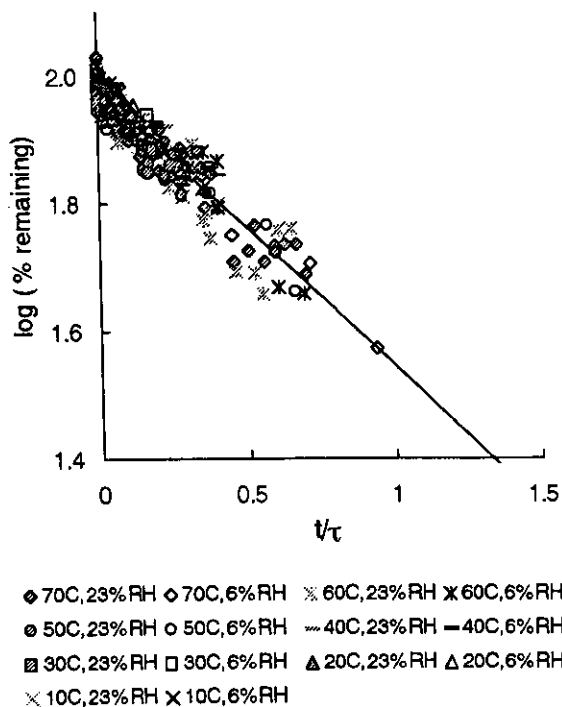


Fig. 7. Regression curves for inactivation of β -GA in lyophilized formulation containing MC as a function of the time scaled to τ .

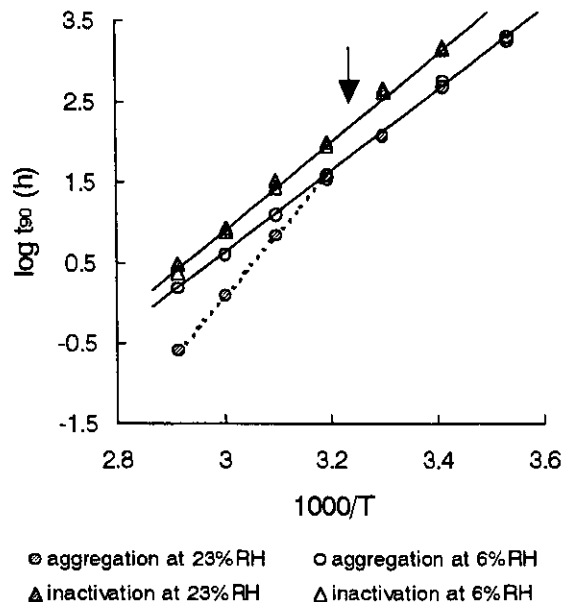
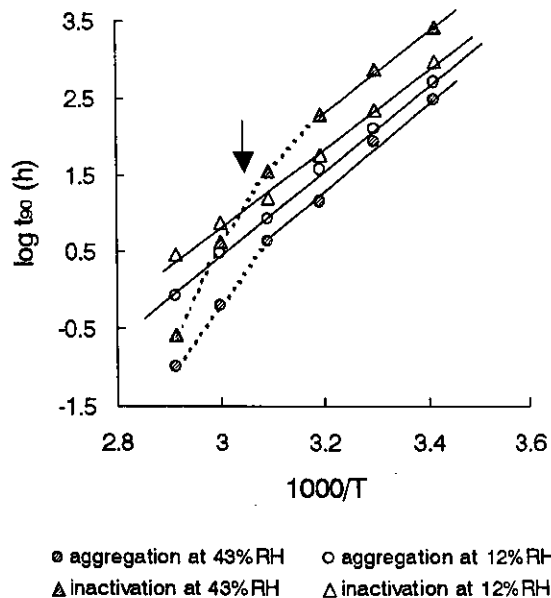


Fig. 8. The time required for 10% aggregation or inactivation (t_{90}) in lyophilized formulation containing PVA.



Arrow indicates critical mobility temperature (T_{mc}) as determined by NMR-relaxation.

Fig. 9. The time required for 10% aggregation or inactivation (t_{90}) in lyophilized formulation containing MC.

Arrow indicates critical mobility temperature (T_{mc}) as determined by NMR-relaxation.

Table 2. τ and β obtained for β -GA aggregation by curve-fitting to the KWW equation

temperature (°C)	PVA				MC			
	6%RH		23%RH		12%RH		43%RH	
	τ (h)	β	τ	β	τ	β	τ	β
10	1.87x10 ⁴	1	1.74x10 ⁴	1	-	-	-	-
20	5.29x10 ³	1	4.56x10 ³	1	4.89x10 ³	1	7.92x10 ³	0.68
30	1.13x10 ³	1	1.11x10 ³	1	1.20x10 ³	1	2.13x10 ³	0.69
40	3.23x10 ²	1	3.56x10 ²	1	4.02x10 ²	0.954	5.83x10 ²	0.62
50	1.15x10 ²	1	89.2	0.875	1.10x10 ²	0.873	1.37x10 ²	0.65
60	38.7	1	27.9	0.724	54.2	0.779	39.4	0.54
70	13.9	1	10.3	0.607	21.4	0.699	10.4	0.48

Table 3. τ and β obtained for β -GA inactivation by curve-fitting to the KWW equation

temperature (°C)	PVA				MC			
	6%RH		23%RH		12%RH		43%RH	
	τ (h)	β	τ	β	τ	β	τ	β
20	1.41x10 ⁴	1	1.36x10 ⁴	1	9.13x10 ³	1	2.49x10 ⁴	1
30	4.43x10 ³	1	4.01x10 ³	1	2.15x10 ³	1	6.97x10 ³	1
40	8.40x10 ²	1	9.48x10 ²	1	5.50x10 ²	1	1.82x10 ³	1
50	2.55x10 ²	1	3.12x10 ²	1	1.51x10 ²	1	3.47x10 ²	1
60	79.5	1	74.5	1	72.5	1	2.05x10 ²	0.579
70	22.4	1	28.7	1	27.6	1	56.0	0.419

高分子・水系の凍結挙動と水分子の運動性

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、回折強度の比較的均一な連続したリングが観測された。昇温DSC曲線の吸熱方向への移行に対応してリング状の回折強度は弱まり不均一化し、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。Fig.10に示すように、昇温結晶化による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ゲルではスポット状の回折像のみが観測された。G100ゲルではスポット状の回折像は観測されないが、連続したリングの一部が途切れた回折像が観測された(Fig.11)。

DRV法によるDNA封入リポソーム製剤の物性と安定性

添加する糖の検討として、コントロールリポソーム(PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA=32:16:8:0:0)、Sit-Gリポソーム(PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA=32:16:8:6:0)、Sit-G/RAリポソーム(PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA=32:16:8:6:4)にグルコース、乳糖、シヨ糖を総脂質と同質量だけ添加したときのリポソームの粒子径とDNA封入率を測定した。その結果、リポソームの粒子径は、凍結乾燥・再水和前は50nm位であるが、再水和後は大きくなり、凍結時にシヨ糖を添加したとき最も大きくなるということが明らかとなった。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。シヨ糖の添加量を総脂質に対して0.25から1.20まで変化させたとき、0.7から1.2位で、粒子径が155nmとほぼ一定になることから、シヨ糖の添加量は総脂質と同質量が最適と考えた(Table 4)。次にSit-G/RAリポソームでシヨ糖の添加量をかえたときのリポソームの粒子径とDNA封入率を測定したところ、シヨ糖の添加量が増加したときにリポソ-

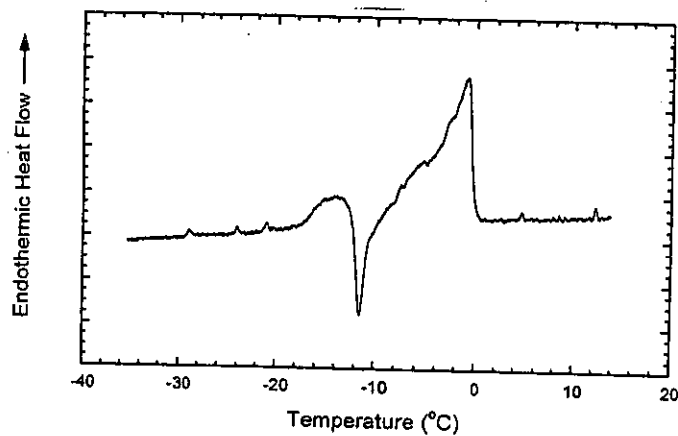
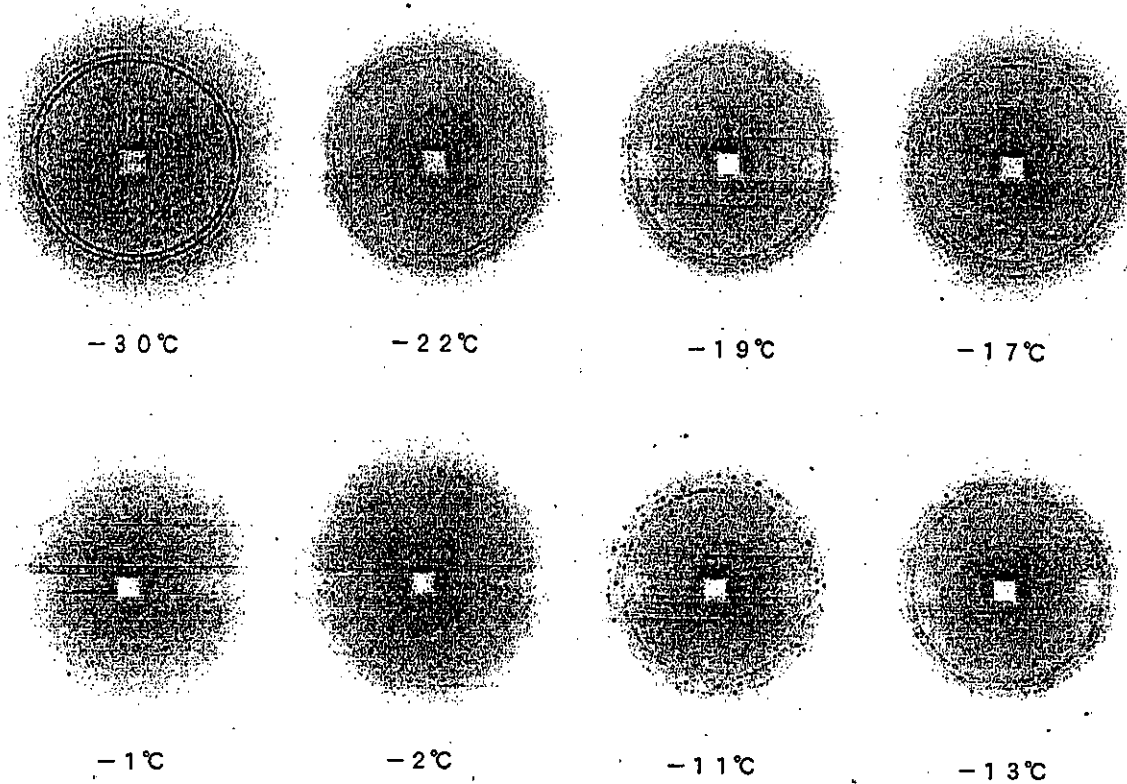


Fig. 10.

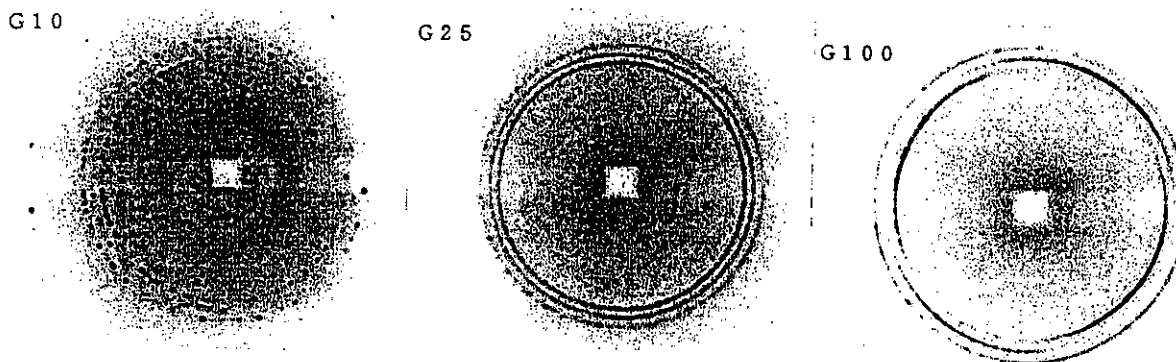


Fig. 11

Table 4. Effect of increasing sucrose:lipid weight ratio on the size of empty Sit-G-liposomes (n=3)

Sucrose/lipid (mg/mg)	Diameter (nm) average \pm SD
0.25	309.8 \pm 13.6
0.70	155.4 \pm 11.2
1.20	155.2 \pm 1.3

Table 5. Effect of increasing sucrose:lipid weight ratio on size (n=3) and entrapment efficiency of Sit-G/RA liposomes (n=2)

Sucrose/lipid (mg/mg)	Entrapment efficiency (%)	Diameter (nm) average \pm SD
0	89.5	704.0 \pm 176.8
1	65.9	185.8 \pm 45.5
2	36.1	151.7 \pm 7.1

Table 6. Characterization of Sit-G and Sit-G/RA-liposomes prepared with a sucrose:lipid weight ratio of 1 (n=3)

Liposomes	Entrapment efficiency (%)	Diameter (nm) average \pm SD	Zeta-potential (mV)
Control	97.3	194.1 \pm 3.5	51.7 \pm 0.8
Sit-G	91.4	243.8 \pm 35.7	44.6 \pm 3.4
Sit-G/RA	65.9	185.8 \pm 45.5	29.1 \pm 0.3

ムの粒子径は 151nm 位に小さくなり、DNA 封入率も 36%位に低下した (Table 5)。これは、Sit-G/RA リポソームは RA によって表面の正電荷が低下したために、負電荷の DNA が封入されにくくなったと推察された。

コントロール、Sit-G、Sit-G/RA リポソームにおいて、ショ糖の添加量を総脂質と同質量添加したときのリポソームの粒子径と DNA 封入率を測定したところ、3種類のリポソームにおいて粒子径が 250nm 位で、DNA 封入率も 65%以上の製剤が調製できることが明らかになった (Table 6)。

さらに、凍結後の水の蒸発速度が遅いほど、また、

再水和状態において凍結乾燥粉末に添加する水の量が多いほど、再水和後のリポソームの粒子径は大きくなり、薬物封入率は低くなることが明らかになった。

DNA がリポソームの内水相に保持されているかを調べるためにコントロール、Sit-G、Sit-G/RA リポソームにおいて、空のリポソームと DNA 封入リポソームの表面電位を比べたところ、封入前はそれぞれ 54.1mV、43.6mV、30mV、封入後は、51.7mV、44.6 mV、29.1. mV とほとんど変化がなかった。

リポソーム製剤中の DNA 活性を確認するために、培養細胞とインキュベーションして遺伝子導入し、

ルシフェラーゼ遺伝子の発現を調べたところ、発現が見られた。

また、DNA リボソーム凍結乾燥製剤を1ヶ月以上4℃で保存したところ、再水和後のリボソームの粒子径は小さく、安定であることが明らかとなった。しかし、再水和後のリボソーム懸濁液状態では、1週間で粒子径が変化し、凝集が観察された。

D. 考察

タンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性と分子運動性

PVA 製剤中のタンパク質の失活は T_{mc} 以上の温度領域においても1次式で表すことができたが、タンパク質の凝集は T_{mc} 以下の領域でのみ1次式で表すことができた。これらの結果から、 T_{mc} 以下でガラス状態のPVA 製剤では、タンパク質は1次式にしたがって変性タンパク質に変化し、その変性体がさらに凝集すると考えられる。温度の上昇に伴ってガラス転移が始まり、部分的に運動性が高まったPVA分子が T_{mc} 付近で現われはじめると、タンパク質分子の拡散速度の平均値が上昇し、速度の分布も大きくなり、その結果、 T_{mc} 以上の温度ではタンパク質の凝集の β が減少すると考えられる。

PVA 製剤中のタンパク質の凝集の β とは異なり、失活の β は T_{mc} 付近で部分的に運動性が高まったPVA分子が現われはじめても変化しなかったことから、失活は分子間の衝突が関与する凝集に比べて、ガラス転移による分子運動性の変化には影響されないことが示唆された。

MC 製剤はPVA 製剤とは大きく異なるタンパク質の失活および凝集を示した。 T_{mc} 以上の温度では失活も1次式から外れ、ガラス転移によって運動性が増大するとその影響を受けることが分かった。これは、PVAがタンパク質と相互作用して運動性の上昇による失活を抑制するのに対して、MCはそのような安定化作用を示さないためと考えられる。

さらに、PVA 製剤中の凝集は T_{mc} 以上の温度でのみ1次式から外れたのに対して、MC 製剤では T_{mc} 以下の温度でも1次式から外れた。これは、凍結乾燥課程におけるストレスによってタンパク質の構造が様々な程度に変形したためと考えられる。すなわち、凍結乾燥課程で変形の程度が異なるタンパク質が生成され、それぞれが異なる凝集時間で凝集するために、 T_{mc} 以下の温度でも凝集時間に分布が生じ、 β は1より小さくなったと考えられる。

1式にしたがってタンパク質の凝集および失活について算出した τ の値は、失活あるいは凝集時間の

分布を表す β の値に関わらず37%失活あるいは凝集するのに要する時間に相当する。それに対して、3式によって計算される τ_r は、異なる τ と β の値をもつ非晶質の緩和挙動を比較するために利用されており、異なる τ と β の値をもつタンパク質の失活および凝集挙動を比較するための指標としても有用なパラメータであると考えられる。しかし、 τ_r は β が減少するにしたがって、より多くのタンパク質が失活あるいは凝集する時間を表すので、 β が小さい場合には、タンパク質のほとんどが失活あるいは凝集する時間を表すことになる。また、 β が温度変化に伴って急激に変化する場合には、温度の上昇によって τ_r が増大するという異常な温度依存性を示すことになり、医薬品の安定性の指標としてはふさわしくないと考えられる。

2式にしたがって τ と β から計算される t_{90} はタンパク質製剤の安定性評価においては τ_r より有用であると考えられる。PVA 製剤中のタンパク質の凝集の t_{90} およびMC 製剤中の凝集と失活の t_{90} は T_{mc} 付近で勾配が変化する温度依存性を示した(Fig.8 および Fig.9)。これは、 T_{mc} 付近で分子運動性に変化し、それに伴って β が急激に変化したためと考えられる。

一方、 T_{mc} 以下におけるMC 製剤中の凝集で観察された β の緩やかな減少は、 t_{90} の温度依存性を変化させなかった。直線的な温度依存性がみられたことから、 β が温度によって変化しても急激に変化しない限り、高温で得られた値を外挿することによって t_{90} を予測できることが示唆された。

高分子-水系の凍結挙動と水分子の運動性

凍結したG25ゲルで観測された回折強度の均一な連続したリングは、粉末状結晶に特徴的なもので、サイズの小さな氷晶の形成によるものとみなすことができる。氷晶サイズは μm オーダーと見積られた。

昇温と共に -20°C 付近から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、サイズの小さな氷晶の融解と再結晶による小さな氷晶の成長が同時に進行したためと考えることができる。再結晶では熱の出入りが相殺されるはずであるので、スポットの出現と対応してDSC曲線が吸熱方向へ移行する結果は、小さな氷晶の融解の方が再結晶より顕著であることを反映していると解釈できる。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。G25ゲル中では、凍結時の網目構造の急激な変化により水分子の拡散運動が妨げられ、水は網目構造内にトラップされ

てサイズの小さな氷晶を形成しやすいものと解釈できる。同様な理由でガラス化しやすいことも理解できる。DSC測定によりガラス転移点は明らかになっていないが、回折像の微妙な変化から、 -20°C 付近から水分子の運動は開始していることは明らかであり、ガラス転移点は少なくともこの温度より低温にあると考えられる。

G10ゲルではスポット状の回折像が観測された。このことはサイズの大きな氷晶が形成されることを意味している。架橋密度が高いために凍結時に高分子網目構造が変形しにくく、網目構造によって水分子の拡散運動が妨げられにくいために、氷晶の成長を可能にしている結果と考えられる。

凍結状態のG100ゲルでは、連続したリングの一部が途切れた回折パターンが観測された。この結果は高分子鎖に沿って氷晶が形成されやすいことを反映していると理解される。

高分子網目構造の存在は水分子の拡散運動に影響を及ぼすと考えられ、それが凍結挙動に反映し、DSC測定による凍結融解パターンの相違をもたらすと解釈される。しかしながら、DSCを用いた凍結過程の解析は、ガラス転移点や吸・発熱の検出に基づいた、熱力学的なマクロな現象の解析にとどまっていた。一次元X線回折の測定結果から得られる情報も凍結・融解現象の範囲にとどまっていた。本研究で行った二次元X線回折により、氷晶のサイズ、形状など、構造的な側面に言及することができるようになった。また、二次元X線回折パターンの温度変化から、水分子運動の開始温度をある程度把握することができるようになった。凍結挙動の解析において、二次元X線回折測定の重要性が明らかになったといえる。

DRV法によるDNA封入リポソーム製剤の物性と安定性

これまで、リポソームの凍結乾燥・再水和後の粒子径は糖を添加すると変わらず、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、リポソームの粒子径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昇し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。昨年度の研究では、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ので、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。すなわち、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。

リン脂質の分子運動性は、水の分子運動性が変化する凍結、乾燥、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。しかし、凍結・乾燥では、リポソーム膜中のリン脂質の分子運動性は未だ明らかになっておらず、薬物封入リポソームを凍結乾燥するとリポソームの形態のまま、すなわち、薬物をリポソーム内に保持した状態で凍結乾燥されたという報告もある。一方、凍結乾燥した空リポソームの粉末に薬物溶液を入れると封入されることも報告されている。このように、凍結・乾燥では、どの過程でショ糖がどのような作用をしているかが明らかになっていない。

凍結速度と乾燥過程での水の蒸発速度が遅いと、また、再水和過程で水の量が多いと粒子径が大きくなることが明らかになった。

また、糖の量を増加するとリポソームの粒子径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。

DNAがリポソームの内水相に保持されているかについて、空のリポソームとDNA封入後のリポソームで表面電位を比べたところ、封入前と封入後ではほとんど変化がなく、DNAのリポソーム表面への電気的な吸着の可能性は低いことが示唆された。また、製剤中のDNAは、培養細胞でルシフェラーゼ遺伝子の発現が観察され、遺伝子導入後まで保持されていることが確認された。

DNA封入リポソーム凍結乾燥製剤は安定であるが、再水和後のリポソーム懸濁液状態では、粒子径が変化し、凝集することが明らかとなった。

すなわち、凍結・乾燥・再水和では、凍結時にリポソーム内部に氷晶ができ、脂質二重膜が破壊し、再水和時に凍結後の融解時のように脂質間の疎水的相互作用によってリポソームが再構成され、そのときに高濃度(0.5M)のショ糖存在下では、脂質間の相互作用を弱め、リポソーム膜を安定し、凝集を防

止するが、低濃度では逆に膜構造を乱すことが明らかになった。

E. 結論

PVA および MC を添加剤として用いた凍結乾燥製剤における β -ガラクトシダーゼの凝集および失活は KWW 関数によって解析することができた。得られたパラメータ τ および β から計算した t_{90} は、NMR 緩和時間から測定した分子運動性が大きく変化する温度である T_{mc} 付近において、勾配が大きく変化する温度依存性を示し、タンパク質の失活および凝集の挙動が分子運動性によって支配されることが明らかになった。

また、凍結した架橋デキストラン (Sephadex) ゲルの二次元 X 線回折-DSC 同時測定により、昇温結晶化の観測される G25 ゲルでは、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わかった。G25 より架橋密度の高い G10 ゲル中には G25 ゲルより大きなサイズの氷晶が形成されやすく、G25 より架橋密度の低い G100 ゲル中には高分子鎖にそって氷晶が成長しやすいことが明らかになり、二次元 X 線回折によって氷晶のサイズに言及できる有益な知見が得られた。

さらに、ショ糖の添加量を全脂質量に対して同質量にすると、 $0.4\mu\text{m}$ の粒子径で DNA の封入率が 60% 以上の DNA 封入りポソーム凍結乾燥製剤が調製できること、また、この製剤の安定性は高いことが明らかとなった。脂質の分子運動性に対する糖の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、その比が低いと逆に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

- 1) Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Molecular mobility-based prediction of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital in PVP solid dispersions. J. Pharm. Sci., submitted.
- 2) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamics simulation, Pharm. Res., accepted (2003)
- 3) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Different

molecular motions in lyophilized protein formulations as determined by laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times. J. Pharm. Sci., 91, 2203-2210 (2002).

- 4) Y. Aso, S. Yoshioka, J. Zhang and G. Zograf, Effect of water on the molecular mobility of sucrose and PVP in a lyophilized formulation as measured by ^{13}C -NMR relaxation time. Chem. Pharm. Bull., 50, 822-826 (2002).
- 5) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima and Nicholas F. Cappuccino, A comparison of the analysis of covariance (ANCOVA) and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products. Chem. Pharm. Bull., 50, 881-883 (2002).
- 6) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄、凍結乾燥製剤の安定性に及ぼす水の影響、低温生物工学会誌、48, 42-46 (2002).
- 7) 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 "Amorphous Food and Pharmaceutical Systems", Edited by H. Levine, Roy. Soc. Chem, 339-346, (2002).
- 8) N. Murase, S. Abe, H. Takahashi, C. Katagiri and T. Kikegawa: Ice crystallisation in polymer gels studied by the XRD-DSC simultaneous measurement, Proceeding of IIR International Conference of "Cryopreservation and safe keeping of tissues", in press. (IIR: International Institute of Refrigeration)
- 9) 村勢則郎、安部 悟、高橋 浩、片桐千帆、亀掛川卓美: 高分子ゲル中における氷晶形成の二次元 XRD-DSC 同時測定、低温生物工学会誌、48(2)、印刷中。
- 10) K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai and Y. Maitani, Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles, Int. J. Pharm., 252(1-2) 73-9 (2003).
- 11) K. Nakamura, Y. Maitani and K. Takayama, Regional intestinal absorption of FITC-dextran 4,400 with nanoparticles based on $[\beta]$ -sitosterol $[\beta]$ -D-glucoside in rats, J. Pharm. Sci., 92(2) 311-8 (2003).

- 12) 米谷芳枝, 永井恒司, overview-脂質パーティクル製剤, Drug Delivery System, 17(4), 314-320 (2002).
2. 学会発表
- 1) 吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄, 非晶質医薬品の保存安定性を支配する分子運動性のNMR緩和による測定. 日本薬学会第124年会 (2003).
 - 2) 田島紳介、吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄、牧野公子、大島広行, インスリン凍結乾燥製剤の保存安定性及び分子間相互作用の検討. 日本薬学会第124年会 (2003).
 - 3) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄, スピナー格子緩和時間の平均化からみたニフェジピン-水溶性高分子固体分散体の分散状態, 日本薬学会第124年会 (2003).
 - 4) 阿曾幸男、小嶋茂雄, 凍結乾燥製剤中の高分子の ^1H について測定した $T1$ および $T1\rho$ の帰属と分子運動性の解析, 第41回NMR討論会 (2002).
 - 5) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄, ニフェジピンと水溶性高分子の分散状態に関する固体スピン拡散NMR解析第41回NMR討論会 (2002).
 - 6) Yoshioka, S., Tajima, S., Aso, Y., and Kojima, S, Inactivation and aggregation of b-galactosidase in lyophilized formulation analyzed by Kohlrausch-Williams-Watts Equation. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2002).
 - 7) Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Prediction of protein release rate from cross-linked biodegradable hydrogel based on gel mesh size as determined by NMR relaxation time 9th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2002)
 - 8) 吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄, タンパク質凍結乾燥製剤中のデキストランおよびPVPの誘電緩和時間およびNMR緩和時間の比較. 日本薬剤学会第17年会 (2002)
 - 9) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄, 非晶質ニフェジピンの結晶化速度および構造緩和時間に及ぼすPVPの影響, 日本薬剤学会第17年会 (2002)
 - 10) N.Murase, S.Abe, H.Takahashi, C.Katagiri and T.Kikegawa: Ice crystallisation in polymer gels studied by the XRD-DSC simultaneous measurement, Joint Meeting of the IIR with the Society for Low Temperature Biology, "Cryopreservation and safe keeping of tissues", Hradec Králové, Czech Republic, (2002)
 - 11) 村勢則郎: 高分子ゲルビーズの凍結と乾燥、第48回 低温生物工学会セミナー (2002).
 - 12) 村勢則郎、安部 悟、高橋 浩、片桐千仞、亀卦川卓美: 高分子ゲル中における氷晶形成の二次元XRD・DSC同時測定、第48回 低温生物工学会年会 (2002)
 - 13) K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai, G. Gregoriadis, Y. Maitani, Preparation and antitumor effects of pirarubicin-encapsulating liposomes for liver cancer treatment, the Controlled Release Society 29th annual meeting, (2002)
 - 14) 川野久美、高山幸三、永井恒司、米谷芳枝、DRV法によるピラルビシン封入りリポソームの調製と抗腫瘍効果の検討、第18回日本DDS学会 (2002)
 - 15) 川野久美、高山幸三、永井恒司、米谷芳枝、ピラルビシン封入肝ターゲティングリポソーム製剤の調製と評価、日本薬剤学会第17年会 (2002)
- 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

（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）ゲルの凍結状態を二次元X線回折—DSC同時測定を用いて詳細に検討した。その結果、DSC測定で昇温結晶化現象の観測される Sephadex G25 ゲルでは、凍結状態において、サイズの小さな氷晶が比較的多数形成されると推定された。G25 より架橋密度の高いG10 ゲル中にはG25 ゲルより大きなサイズの氷晶が形成されやすく、G25 より架橋密度の低いG100 ゲル中には高分子鎖にそって氷晶が成長しやすいと思われる回折パターンが観測された。高分子ゲル中では、架橋密度、網目構造に依存して水分子の拡散運動が束縛されており、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。

研究目的

DSC（示差走査熱量測定）を用いて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きた。その結果、高分子ゲルでは架橋密度に依存して、凍結後の昇温過程で氷晶形成する場合のあることが明らかになってきた。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る。そして、ガラス化していることの実証がレーザーラマン測定により得られている。昇温結晶化による発熱ピークが観測される場合、これより低温側でDSC昇温曲線は吸熱方向へ移行する。その原因は融点降下したサイズの小さな氷晶の融解によるものと思われるが、確証は得られていない。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。また、

解明を進める過程で、凍結時における高分子ゲル中の水の運動性に関し、新たな情報が得られると期待される。本研究では、凍結時に形成される氷晶の形状に関する情報をえる目的で、詳細な二次元のX線回折—DSC同時測定を行った。

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50wt%に調整し、試料とした。

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℃/分で-40℃まで冷却し、その後 1℃/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

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、回折強度の比較的均一な連続したリングが観測された。昇温DSC曲線の吸熱方向への移行に対応してリング状の回折強度は弱まり不均一化し、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。昇温結晶化による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。(図1)凍結したG10ゲルではスポット状の回折像のみが観測された。G100ゲルではスポット状の回折像は観測されないが、連続したリングの一部が途切れた回折像が観測された。(図2参照)

D. 考察

凍結したG25ゲルで観測された回折強度の均一な連続したリングは、粉末状結

晶に特徴的なもので、サイズの小さな氷晶の形成によるものとみなすことができる。氷晶サイズは μm オーダーと見積られた。昇温と共に-20℃付近から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、サイズの小さな氷晶の融解と再結晶による小さな氷晶の成長が同時に進行したためと考えることができる。再結晶では熱の出入りが相殺されるはずである。したがって、スポットの出現と対応してDSC曲線が吸熱方向へ移行する結果は、小さな氷晶の融解の方が再結晶より顕著であることを反映していると解釈できる。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。G25ゲル中では、凍結時の網目構造の急激な変化により水分子の拡散運動が妨げられ、水は網目構造内にトラップされてサイズの小さな氷晶を形成しやすいものと解釈できる。同様な理由でガラス化しやすいことも理解できる。DSC測定によりガラス転移点は明らかになっていないが、回折像の微妙な変化から、-20℃付近から水分子の運動は開始していることは明らかであり、ガラス転移点は少なくともこの温度より低温にあると考えられる。

G10ゲルではスポット状の回折像が観測された。このことはサイズの大きな氷晶が形成されることを意味している。架橋密度が高いために凍結時に高分子網目構造が変形しにくく、網目構造によって水分子の拡散運動が妨げられにくいために、氷晶の

成長を可能にしている結果と考えられる。

凍結状態のG100ゲルでは、連続したリングの一部が途切れた回折パターンが観測された。この結果は高分子鎖に沿って氷晶が形成されやすいことを反映していると理解される。

高分子網目構造の存在は水分子の拡散運動に影響を及ぼすと考えられ、それが凍結挙動に反映し、DSC測定による凍結融解パターンの相違をもたらすと解釈される。しかしながら、DSCを用いた凍結過程の解析は、ガラス転移点や吸・発熱の検出に基づいた、熱力学的なマクロな現象の解析にとどまっていた。一次元X線回折の測定結果から得られる情報も凍結・融解現象の範囲にとどまっていた。本研究で行った二次元X線回折により、氷晶のサイズ、形状など、構造的な側面に言及することができるようになった。また、二次元X線回折パターンの温度変化から、水分子運動の開始温度をある程度把握することができるようになった。凍結挙動の解析において、二次元X線回折測定の重要性が明らかになったといえよう。

E. 結論

凍結した架橋デキストラン (Sephadex) ゲルの二次元X線回折—DSC同時測定により、G25ゲルの昇温結晶化では、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わかった。G25より架橋密度の高いG10ゲル中にはG25

ゲルより大きなサイズの氷晶が形成されやすく、G25より架橋密度の低いG100ゲル中には高分子鎖にそって氷晶が成長しやすいと思われる回折パターンが観測された。

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ており、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。

凍結現象は水分子の運動性を反映したものであり、凍結過程の詳細な解析は医薬品の安定性に重要な情報を提供するものと考えられる。二次元X線回折により、氷晶のサイズに言及可能な非常に有益な知見が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ 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 "Amorphous Food and Pharmaceutical Systems"*, Edited by H Levine, Roy. Soc. Chem, 339-346, (2002).

・ N.Murase, S.Abe, H.Takahashi, C.Katagiri and T.Kikegawa: Ice crystallisation in polymer gels studied by the XRD-DSC simultaneous measurement, *Proceeding of IIR International Conference of "Cryopreservation and safe keeping of tissues"*, in press.

(IIR: International Institute of Refrigeration)

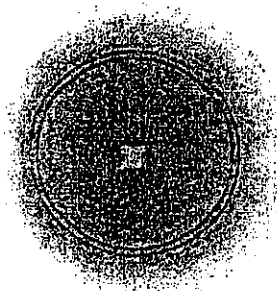
・村勢則郎、安部 悟、高橋 浩、片桐千
仞、亀卦川卓美：高分子ゲル中における氷
晶形成の二次元XRD・DSC同時測定、
低温生物工学会誌, 48(2), 印刷中.

2. 学会発表

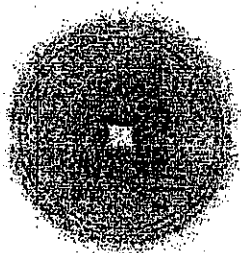
・ N.Murase, S.Abe, H.Takahashi, C.Katagiri
and T.Kikegawa: Ice crystallisation in polymer
gels studied by the XRD-DSC simultaneous
measurement, Joint Meeting of the IIR with the
Society for Low Temperature Biology,
"Cryopreservation and safe keeping of
tissues", Hradec Králové, Czech Republic, May,
2002

・ 村勢則郎：高分子ゲルビーズの凍結と
乾燥、第48回 低温生物工学会セミナー、
要旨集、p. 21 (2002).

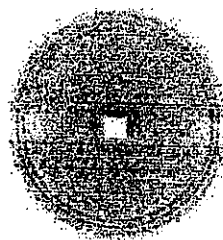
・村勢則郎、安部 悟、高橋 浩、片桐千
仞、亀卦川卓美：高分子ゲル中における氷
晶形成の二次元XRD・DSC同時測定、
第48回 低温生物工学会年会、 要旨集、
p. 27 (2002).



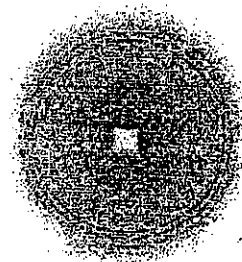
-30°C



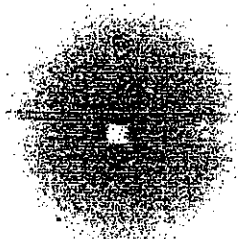
-22°C



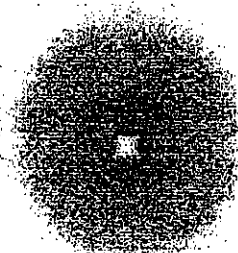
-19°C



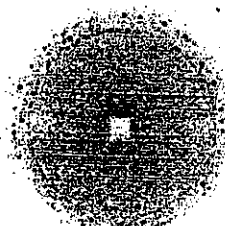
-17°C



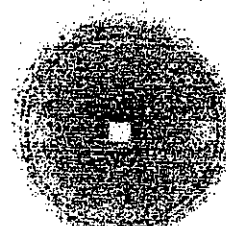
-1°C



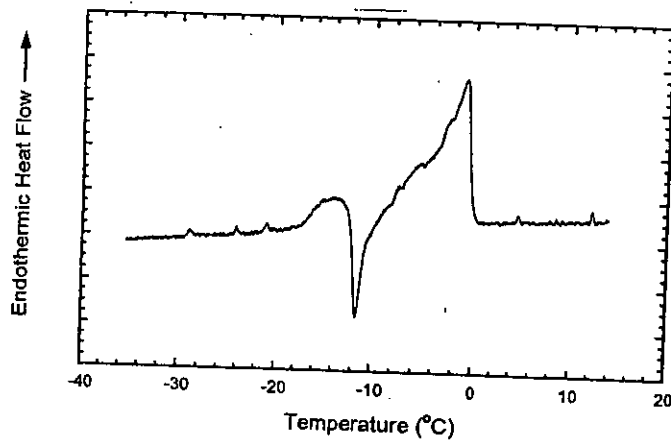
-2°C



-11°C

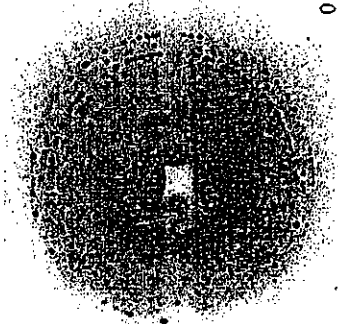


-13°C

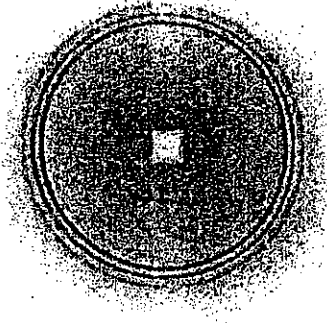


17

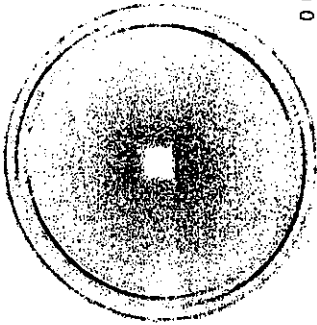
G10



G25



G100



Moss

2