

平成15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

目 次

第3分野

課題番号

| | | |
|----------------------|--|-------------|
| 20030917A KH31028 | 非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価 | 吉岡澄江 …… 1 |
| 918A KH31029 | ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発 | 能美健彦 …… 10 |
| 919A KH31030 | バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発 | 川崎ナナ …… 18 |
| 920A KH31031 | 医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究 | 棚元憲一 …… 27 |
| 921A KH31032 | 動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究 | 大野泰雄 …… 33 |
| 922A KH31033 | 医薬品開発と再生医学への応用を目指した細胞成熟制御法の開発 | 藤本純一郎 …… 43 |
| 923A KH31034 | 創薬における毒性回避のための戦略：cDNAマイクロアレイ解析による関連分子の探索と毒作用予見技術の確立 | 井上 達 …… 48 |
| 924A KH31035 | 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究 | 合田幸広 …… 58 |
| 925A KH31036 | 医薬品の適性使用に向けたヒト薬物代謝特性の解析・予測支援システムの構築とハイスループット試験系についての研究 | 頭金正博 …… 67 |
| 926A KH31037 | 多剤併用療法に則した新しい迅速結核菌薬剤感受性試験法の開発 | 山崎利雄 …… 74 |
| 927A KH31038 | 食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立 | 山本茂貴 …… 83 |
| 928A KH32081 | 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 | 阿曾幸男 …… 90 |

第4分野

| | | |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|
| 929A KH41039 | ボツリヌスA～F型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立 | 小熊恵二 …… 97 |
| 930A KH41040 | 小児先天異常症の原因遺伝子の解明と治療法の開発に関する研究 | 奥山虎之 …… 101 |
| 931A KH42074 | 熱帯病に対するオーファンドラッグ開発研究 | 名和行文 …… 105 |
| 932A KH42075 | 新生児臨床試験組織の育成と新生児用医薬品開発の科学性・倫理性に関する研究 | 山崎俊夫 …… 115 |

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ポ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。

A. 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、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。平成 13 年度および 14 年度には、カチオン性脂質リポソームの粒子径を指標として DNA-カチオン性脂質複合体の凍結乾燥製剤の安定性評価を行った。その結果、ショ糖やトレハロースなど糖類やデキストラン、アスパラギン

誘導体などの水溶性高分子、ならびにショ糖とデキストランの混合物などは凍結乾燥の際に、カチオン性リポソームを安定化することが明らかになり、これらの添加剤を含有する凍結乾燥製剤の保存安定性は製剤のガラス転移温度(T_g)に大きく依存し、 T_g の高い製剤ほど安定であることがわかった。また、製剤の保存安定性はゆっくり凍結した製剤の方が安定であった。ショ糖を添加剤として用いた製剤の検討により、凍結速度による保存安定性の差は T_g には反映されなかったのに対し、動的粘弾性測定による製剤のレオロジー特性に反映されたことから、動的粘弾性測定法が DNA-カチオン性脂質複合体製剤の保存安定性評価に有用であることが示唆された。15 年度においては、動的粘弾性測定法が他の添加剤を用いた製剤に対して普遍的に適用可能かを検討すると共に、凍結濃縮相における添加剤濃度が凍結速度の影響を受けることを他の添加剤を用いた系について明らかにする。また、凍結速度により保存安定性に差が生じたメカニズムを詳細に解析するために、製剤の水分吸着挙動を検討するとともに、動的粘弾性測定法とは時間スケールが異なる NMR 緩和法によって製剤マトリックスの分子運動性を明らかにする。

B. 研究方法

B.1. カチオン性リポソームの調製

N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammonium 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°C で 10 分間加温し、脂質を分散させた。孔径 0.6 μm および 0.2 μm 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 のリポソームの

溶液を得た。DNA のモデルとして Polydeoxyadenylic acid (Poly[dA])を用い、2 U/mlの濃度になるようにリポソーム溶液に添加した。

B.2. カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の調製

凍結乾燥製剤の添加剤として、ショ糖、トレハロース、デキストランおよびショ糖-デキストラン混合物(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24時間、-20 $^{\circ}$ Cで16時間、0 $^{\circ}$ Cで6時間、20 $^{\circ}$ Cで6時間保持し、乾燥を行った。

B.3. 添加剤-カチオン性リポソーム水溶液の凍結濃縮相におけるガラス転移温度の測定

ショ糖、トレハロース、デキストランあるいはショ糖-デキストラン混合物(1:1)とカチオン性リポソームの水溶液約5 μ L をサンプルパンにはかり採り、示差走査熱量計(DSC)の中で、0.2 $^{\circ}$ C/minの速度で-50 $^{\circ}$ Cまで冷却するか、液体窒素に入れて急冷した後、-50 $^{\circ}$ Cから1 $^{\circ}$ C/minの速度で昇温し、凍結濃縮相のガラス転移温度(T_g')を測定した(温度変調幅： ± 0.5 $^{\circ}$ C、温度変調周期：100秒)。

B.4. カチオン性リポソーム製剤のレオロジー特性の解析

コントロールドストレステオメーター(AR-1000型、TA Instrument)を用いて、ショ糖、トレハロース、デキストランあるいはショ糖-デキストラン混合物(1:1)を添加剤として含有するカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤について動的粘弾性率の測定を行った。凍結乾燥ケーキを厚さ420~440 μ mに圧縮し試料とした。4cmの平行プレートを用い、一定の大きさ(40 Pa)の振動ストレスを試料に加え、振動周波数0.1 rad/sで、貯蔵弾性率および損失弾性率の温度変化を測定した。

B.5. カチオン性リポソーム製剤のNMR緩和測定に基づく分子運動性の解析

ショ糖、トレハロースあるいはデキストランを添加剤として含有するカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤について、 1 H-NMRのスピン-格子緩和時間を測定した。

B.6. カチオン性リポソーム製剤の水分吸着速度の解析

水分吸着測定装置(GM-300型、VTI Corp.)を用いて、ショ糖、トレハロース、デキストランあるいはショ糖-デキストラン混合物(1:1)を添加剤として含有するカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤について10%相対湿度(RH)における水分吸着量を経時的に測定した。測定を開始する前に試料を真空下、25 $^{\circ}$ Cで5時間乾燥した。

(倫理面への配慮) ヒトならびに動物を用いた実験は行わなかったため、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

C.1. カチオン性リポソームの溶液の凍結濃縮相のガラス転移に及ぼす凍結速度の影響

凍結速度によって製剤の外観や保存安定性に差が生ずる理由を明らかにすることを目的として、リポソームと添加剤を含む水溶液の温度変調型DSCの測定を行った。Fig. 1にカチオン性リポソームを含有するトレハロース水溶液のサーモグラムを代表例を示す。Total heat flowでは-32 $^{\circ}$ C付近に凍結濃縮相におけるガラス転移による比熱の変化とエンタルピー緩和に基づく吸熱過程がオーバーラップして観測されるため、ガラス転移温度を正確に決めることができない。Total heat flowを温度変調に対して可逆的に追従するReversing heat flowと不可逆

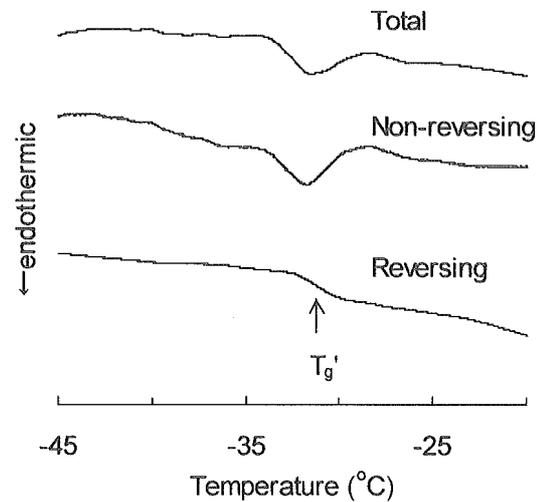


Fig. 1 Typical thermograms of cationic liposome solution containing 5% trehalose.

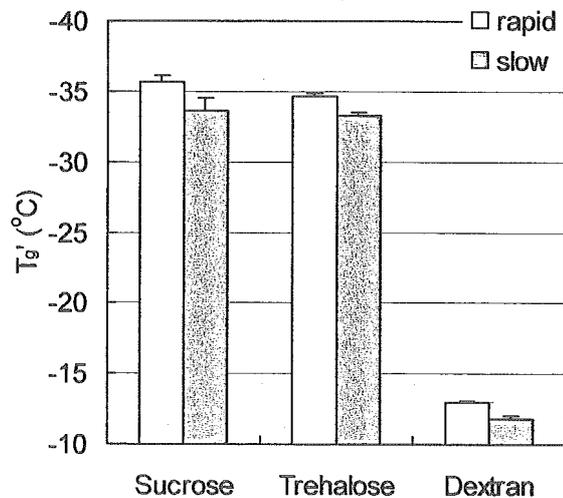


Fig. 2 T_g' of cationic liposome solution containing various excipients.

的な Non-reversing heat flow に分離することにより、温度変調に対して可逆的に追従するガラス転移による比熱の変化を明瞭に観測することができ、正確な T_g' の値を得ることができた。

Fig. 2 にリポソームと添加剤を含む水溶液の T_g' の値を、また、Fig. 3 に T_g' における比熱の変化を、昨年度シヨ糖について得られた結果と共に示す。何れの添加剤においてもゆっくり凍結した場合の方が T_g' の値は約 $1\sim 2^\circ\text{C}$ 高く、また、 T_g' における比熱の変化も大きかった。これらの結果は昨年度、シヨ糖とリポソームを含む水溶液について得られた結果と同様の結果であった。ゆっくり凍結したほうが大きな氷晶が生成し、凍結濃縮相における添加剤濃度が高くなるという現象が普遍的なものであることが明らかになった。

C.2 カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤のレオロジー特性の解析

平成 14 年度にシヨ糖を用いて調製したカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤について検討した結果、凍結方法による保存安定性の差が製剤のレオロジー特性に基づく分子運動性の違いによって説明することができた。すなわち、ゆっくり凍結した製剤は保存安定性がよく、また、レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性は小さいことが示された。動的粘弾性率に基づく製剤マトリックスの運動性が凍結乾燥製剤の保存安定性を評価する上で有用な指標となることが示唆された。他の添加剤を用いた製剤についても、このような凍結速度による運動性の差が観察されるかを検討し、動的粘弾性率に基づく製剤マトリックスの運動性が保存安定性の指標として普遍的に適用できるかを検討した。本方法は一定の周波数で振動する応力を試料に与え、試料の歪を測定するものであり、応力と歪の関係から、貯蔵弾性率(G')および損失弾性率(G'')が得られる。Fig. 4 に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 G' および G'' の周波数依存性の代表例を示す。 G' は周波数が高くなるにつれ、大きくなった。これは、シヨ糖含有製剤が低い周波数の応力に対しては粘性体としての性質を示し、高い周波数の応力に対しては弾性体(固体)としての性質を示すことを表している。粘性体から弾性体へ変化する周波数で G'' が極大となり、この周波数の逆数が運動性の指標である緩和時間となる。Fig. 5 に乾燥状態のシヨ糖およびトレハロース含有リポソーム製剤について測定した緩和時間の温度依存性を示す。同じ温度で比較した時、何れの添加剤においてもゆっくり凍結して調製した製剤の方が緩和時間が大きく、運動性が低いことが明らかとなった。動的粘弾性率に基づく製剤マトリックスの運動性が保存安定性の指標として普遍的に適用できることが明らかになった。

C.3 $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間によるカチオン性リポソーム凍結

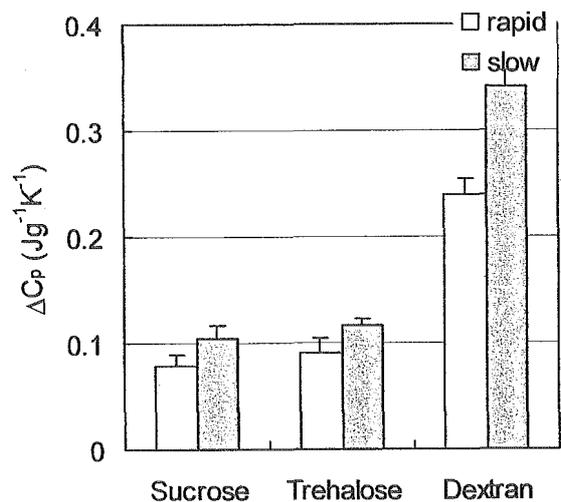


Fig. 3 Change in the heat capacity at T_g' of cationic liposome solution containing various excipients.

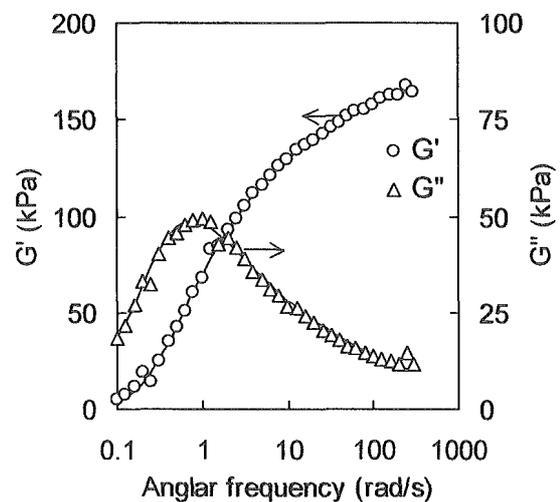


Fig. 4 Dynamic shear modulus (G' , G'') of cationic liposome-sucrose formulation. dry, 74°C .

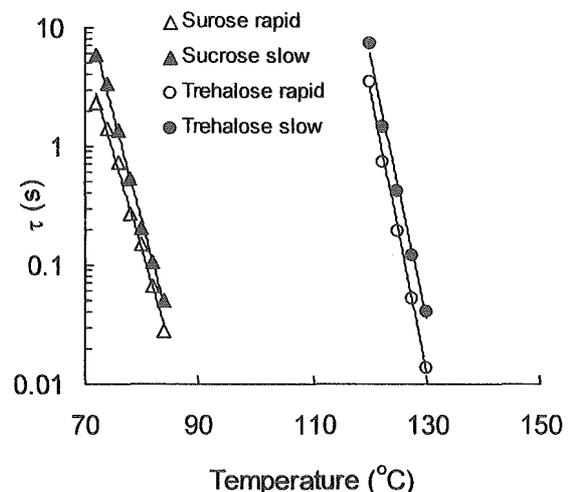


Fig. 5 τ of cationic liposome formulations.

乾燥製剤のLocalな運動性の解析

動的粘弾性率の測定は製剤マトリックスの比較的遅い動きを感度よく反映すると考えられる。それに対して、NMR緩和時間は製剤マトリックスの局所的な比較的速い動きを反映する。Table 1はショ糖、トレハロース、デキストランを添加剤として用いたリポソーム凍結乾燥製剤のスピン-格子緩和時間(T_1)および回転系におけるスピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)を示す。何れの添加剤を用いた製剤においても凍結速度が違っても T_1 および $T_{1\rho}$ の値はほぼ同様の値が得られ、製剤マトリックスの局所的な運動性は凍結速度の影響を受けないことが明らかとなった。製剤の T_g が凍結速度の影響を受けなかったことに対応する結果と考えられ、微視的な(分子レベルでみた)製剤マトリックスの構造に差が無いことが示唆される。

C.4. カチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の水分吸収速度に及ぼす凍結速度の影響

25°C、10%RHに保存した時のリポソーム製剤の水分含量が平衡に達するまでの時間を測定したところ、Fig. 6

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ relaxation time of cationic liposome formulations

| Excipient | | T_1 (s) | $T_{1\rho}$ (ms) |
|-----------|-------|-----------|------------------|
| Sucrose | slow | 0.29 | 4.0 |
| | rapid | 0.28 | 4.0 |
| Trehalose | slow | 0.28 | 4.4 |
| | rapid | 0.30 | 4.6 |
| Dextran | slow | 0.43 | 10.2 |
| | rapid | 0.44 | 10.7 |

に示すように、急速に凍結した製剤はゆっくり凍結した製剤に比べ、水分含量が平衡に到達する時間が短いことが、何れの添加剤を用いた製剤においても明らかになった。凍結乾燥製剤のような非晶質マトリックスの水分吸収は、まず、マトリックス表面に水分子が吸着し、その水分子がマトリックス内部に拡散していくことによって進行すると考えられる。急速に凍結した場合、ゆっくり凍結した時に比べ小さな氷晶が形成されるため、凍結乾

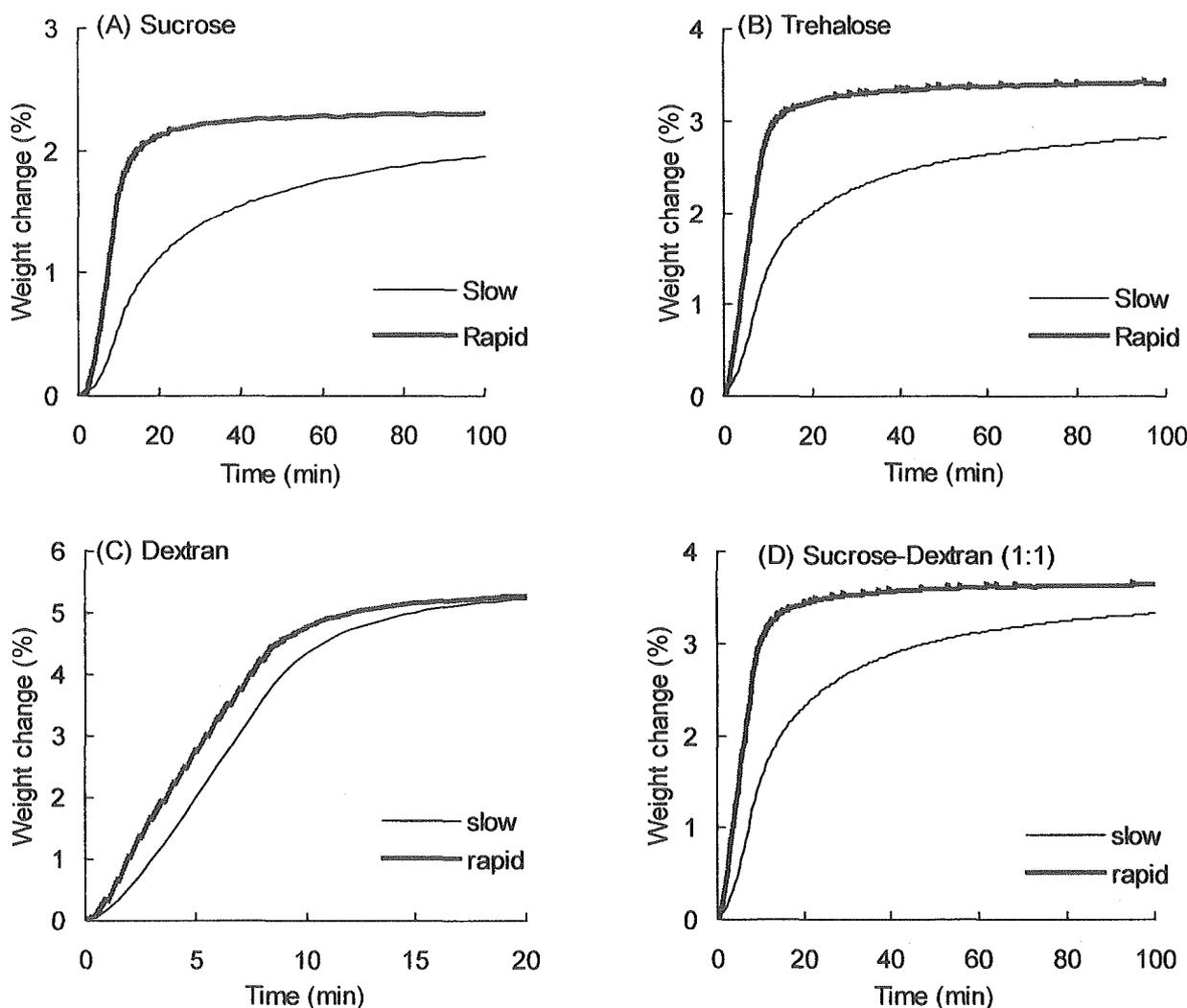


Fig. 6 Weight change of cationic liposome stored at 25°C and 10%RH.

燥によって得られたマトリックスは、よりポーラスなものが得られると考えられる。すなわち、マトリックスの体積に対してマトリックスの表面積がより大きいものが得られるために、平衡に達する時間が短くなると考えられる。これは凍結乾燥製剤マトリックスのメソスコピックな構造が凍結速度によって異なることを示唆するものであり、構造の違いが動的粘弾性率からみた分子運動性の差をもたらしたものと思われる。

D. 考察

前年度までの検討の結果、ショ糖を添加剤として用いたリポソーム製剤において、急速に凍結して製剤に比べゆっくり凍結した製剤の方が保存安定性に優れていることが明らかになり、保存安定性は動的粘弾性率からみた分子運動性と関連していることが示された。また、凍結速度の影響は、ゆっくり凍結した方が大きな氷晶が生成し、凍結濃縮相におけるショ糖濃度が高いことと関連していることが示唆された。本年度、動的粘弾性率からみた分子運動性や凍結濃縮相における添加剤濃度が凍結速度の影響を受けるかを他の添加剤を用いて検討した結果、その普遍性を明らかにすることができた。また、NMR緩和時間測定の結果から、製剤マトリックスを構成する分子の局所的な運動性に差が無いことが明らかになり、微視的な(分子レベルでみた)製剤マトリックスの構造に差が無いことが示唆された。さらに、リポソーム製剤の水分含量が平衡に達する時間は凍結速度の影響を受け、急速に凍結した製剤の方が平衡に達する時間が短く、製剤マトリックスのメソスコピックな構造が凍結速度によって異なることを示唆する知見が得られ、その違いが動的粘弾性率からみた分子運動性や保存安定性が凍結速度により異なるという現象を引き起こしていると考えられる。凍結速度により保存安定性に差が生じたメカニズムに関する知見が得られたものとする。

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、リポソームの粒子径の安定性ととともに、DNAの保存安定性を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。今後、DNAのモデルであるPoly[dA]やモデルプラスミドについて分子量やスーパーコイル構造の含量など指標にして保存安定性を明らかにすることが検討すべき課題と考える。

E. 結論

- (1) カチオン性リポソームと添加剤の水溶液をゆっくり凍結したほうが大きな氷晶が生成し、凍結濃縮相における添加剤濃度が高くなることがショ糖以外の添加剤においても確認され、普遍的な現象であることがわかった。
- (2) 動的粘弾性率測定に基づく製剤マトリックスの運動性が凍結乾燥製剤の保存安定性の評価に普遍的に適用できる指標であることが明らかとなった。
- (3) NMR緩和時間測定に基づいて製剤マトリックスの局

所的な運動性を検討したところ、凍結速度の影響を受けないことが明らかとなり、微視的な(分子レベルでみた)製剤マトリックスの構造に差が無いことが示唆された。

- (4) 凍結方法によって、凍結乾燥品の水分含量が平衡に達する時間に差があることがわかり、凍結乾燥製剤マトリックスのメソスコピックな構造が凍結速度によって異なることが示唆された。

F. 研究発表

1. 誌上発表
 - 1) 阿曾幸男, 生分解性高分子ハイドロゲルの調製と薬物放出特性, ファームテックジャパン (2004) 20 (523-531).
 - 2) Y. Aso, S. Yoshioka, S. Kojima, Molecular mobility-based estimation of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital in PVP solid dispersions. *J. Pharm. Sci.*, (2004) 92, (384-391).
 - 3) S. Yoshioka, Y. Aso, Shigeo Kojima, Molecular mobility of lyophilized poly(vinylpyrrolidone) and methyl cellulose as determined by the laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation time of ^1H and ^{13}C . *Chem. Phar. Bull.* (2003)
 - 4) S. Yoshioka, S. Tajima, Y. Aso, Shigeo Kojima, Inactivation and aggregation of β -galactosidase in lyophilized formulation described by Kohlraush-Williams-Watts Stretched exponential function. *Pharm. Res.*, (2003) 20, (1655-1660).
 - 5) S. Yoshioka, Y. Aso, Shigeo Kojima, Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamic simulation. *Pharm. Res.*, (2003) 20, (873-878).
 - 6) 吉岡澄江、阿曾幸男：“固体医薬品の物性評価、第6節 緩和測定”、寺田勝英、山本恵司、米持悦生編、じほう、東京(2003) pp.141~169.
2. 学会発表
 - 1) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄、カチオン性リポソームを含有するショ糖凍結乾燥製剤の動的粘弾性の解析. 日本薬学会 124 年会 (2004.. 3).
 - 2) 吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄、イソマルトオリゴ糖を含有する凍結乾燥製剤の分子運動の誘電緩和による測定. 日本薬学会 124 年会 (2004. 3).
 - 3) 宮崎玉樹、吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄、非晶質アセトアミノフェンの結晶化に及ぼす高分子添加剤と湿度の影響. 日本薬学会 124 年会 (2004.. 3).
 - 4) 阿曾幸男、たん白質医薬製剤の放出性制御と安定性. 創剤フォーラム, 若手研究会 (2003. 11).
 - 5) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄、 ^1H および ^{13}C -NMR スピン-格子緩和時間に基づく非晶質医薬品に対する PVP の安定化機構の解析. 第 42 回 NMR 討論会

(2003.11)

- 6) 吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄, ^{13}C の T_1 および $T_{1\rho}$ に反映される凍結乾燥製剤の分子運動の実態は何か. 第42回 NMR 討論会 (2003. 11)
- 7) S. Yoshioka, Y. Aso, Shigeo Kojima, Temperature dependence of bimolecular reaction rates in lyophilized formulations described Adam-Gibbs-Vogel equation. American Association of Pharmaceutical Sciences. (2003. 10)
- 8) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, Shigeo Kojima Effect of polymer excipients on physical stability of amorphous acetaminophen. American Association of Pharmaceutical Sciences. (2003. 10).
- 9) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄、PVP との固体分散体におけるニフェジピンの結晶化速度の Adam-Gibbs-Vogel 式に基づく解析. 日本薬剤学会第18年会 (2003.4).
- 10) 吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄、グルコース含有凍結乾燥製剤のガラス転移温度の分子動力学法による推定. 日本薬剤学会第18年会 (2003.4).

G. 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15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16年9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