

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成16（2004）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	15
村勢則郎	
2. 分子運動性に基づくりボソーム製剤の安定性評価	20
米谷芳枝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	28

厚生科学研究費補助金（医薬品等医療技術等リスク評価研究事業）
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

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

タンパク質凍結乾燥製剤の品質変化を引き起こす分子再配列の運動は、添加剤がグルコースの場合には誘電緩和スペクトル法で観察することができたが、グルコースオリゴマーやデキストランを添加剤とする製剤では、0.01Hz～100kHzの周波数領域では観察できないほどに速度が遅いことが分かった。それらの製剤では、分子再配列の運動ではなく、プロトンホッピング様の分子運動が誘電緩和スペクトル法で観察されたが、この運動は分子再配列の運動と連動しているため、その誘電緩和時間を測定することによって分子再配列運動の変化を観察できることが明らかになった。また、高分子-水系における水分子の拡散運動性は、マクロには高分子網目構造の存在に大きく依存することが明らかになった。さらに、脂溶性の高いレチノイン酸を含有したリポソーム製剤の保存安定性および血中での安定性が、リポソームの組成としてステロールグルコシドを添加することによって著しく改善できることが明らかになり、その安定化のメカニズムとしてリポソーム膜内でのステロールグルコシドとレチノイン酸の相互作用およびリポソームの表面に存在する糖鎖によるタンパク質の吸着の低下が示唆された。

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様々な運動を示しており、製剤が保存中に示す物理的および化学的な品質変化はその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品質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った。

前年度は①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がKWW関数によって解析できることを明らかにした。得られたパラメータから、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})を計算した結果、 t_{90} の温度依存性は、固体NMRで測定されるガラス転移開始温度(T_m)付近において大きく変化し、タンパク質の失活および凝集の速度が製剤の分子運動性の上昇と密接に関連して速くなることを確認した。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高分子-水系の凍結挙動を二次元X線回折-DSC同時測定によって解析した結果、凍結した架橋デキストランゲルでは、架橋密度の低いゲルほど高分子鎖にそって小さなサイズの氷晶が形成されやすいことを明らかにした。さらに、③静脈内投与可能な粒子径をもち、DNAを高い効率で封入できるリポソーム製剤について、凍結乾燥・再水和による調

製法の最適条件を検討するとともに、粒子径等の物性の安定性を評価した結果、全脂質量に対して同質量のショ糖を添加することによって、粒子径 $0.4\mu\text{m}$ 、封入率 60%以上の DNA 封入リポソーム凍結乾燥製剤が調製できること、また、その物性は 4°C で 1 ヶ月以上の保存においても安定であることを明らかにした。

本年度は、①タンパク質凍結乾燥製剤の安定性を正確に精度よく予測するための分子運動性の直接的な指標を見出すことを目的として、誘電緩和スペクトル法によって製剤の分子運動を測定し、第 1 年度に NMR で測定された分子運動と比較することによって、製剤の品質変化を引き起こす分子運動の実体の解明を行った。また、②高分子網目構造による水分子拡散運動の抑制について知見を得ることを目的として、吸水・保水性菌体外多糖の不凍水量と拡散運動性との関係を検討した。さらに、③脂溶性が高くリポソーム化が困難とされている薬物を高い封入率で含有する安定性の高いリポソーム製剤を調製する方法を開発することを目的として、リポソームの組成に糖脂質であるステロールグルコシドを用いる方法を、急性前骨髄性白血病や皮膚の扁平上皮細胞癌の治療に有効であることが知られているレチノイン酸をモデル薬物として検討した。

B. 研究方法

誘電緩和スペクトル法によるタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性の測定

異なる分子運動性を示す凍結乾燥製剤のモデルとして、分子量の異なるデキストランの凍結乾燥品を用いて、誘電緩和スペクトル法で分子運動を観察した。デキストラン 40k およびデキストラン 1k、さらにデキストランの構成単位であるグルコースおよびその 3 量体であるイソマルトトリオースのそれぞれの 2.5% 溶液を凍結乾燥し

(Freezevac C-1、東西通商)、 $0.01\text{Hz}\sim 100\text{kHz}$ の周波数領域で誘電緩和スペクトルを測定した (TA)。測定した温度領域は $-20^\circ\text{C}\sim 200^\circ\text{C}$ であり、各試料のガラス転移温度 (T_g) の前後の温度で測定した。

高分子・水系における水分子の拡散運動の解析

IM244 株より抽出し精製した吸水・保水性菌体外多糖 (NY-AC) について、2-8% の多糖濃度の試料

の DSC を測定した (パーキンエルマー社製 Pyris 1、冷却速度: $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 、昇温速度 $5^\circ\text{C}/\text{min}$)。キサンタンガム、グリシンベタインおよび L-リシンについても同様に測定した。

レチノイン酸含有リポソーム製剤の調製

ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) $60\mu\text{mol}$ 、大豆から抽出されたステロールグルコシド (SG) $10\mu\text{mol}$ 、レチノイン酸 (ATRA) $1\sim 10\mu\text{mol}$ 、コレステロール (Ch) $30\mu\text{mol}$ を用いて、逆相蒸発法によって SG-リポソームを調製した。非 SG-リポソームは $60\mu\text{mol}$ DPPC、 $1\sim 10\mu\text{mol}$ ATRA、 $40\mu\text{mol}$ Ch から逆相蒸発法をによって調製した。

リポソームの粒子径を動的レーザー光散乱計によって、またレチノイン酸のリポソームへの封入率は、HPLC によって測定した。

リポソーム製剤の安定性の評価は、2.9mol% ATRA 封入 SG-リポソームを 4°C と 25°C の遮光下と非遮光下で保存後、ゲルろ過をして、リポソーム分画とフリー ATRA 分画の ATRA を HPLC で定量することによって行った。また、80% のラット血清存在下での各 ATRA 封入 SG-リポソームの安定性は、カルセインを封入した ATRA・SG-リポソームを調製して、 37°C で 2 時間インキュベーションしたときの放出されたカルセインの蛍光を定量して評価した。

さらに、抗腫瘍効果を SPF の雌性 6 マウスを用いて検討した。治療は、癌を接種して 8 日目に 2.9mol% ATRA 封入 SG-リポソームを 0.585mg ATRA /kg で静脈内投与した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた動物は、実験用マウスのみであり、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

タンパク質凍結乾燥製剤の品質変化を引き起こす分子運動の実体

1) 誘電緩和スペクトルで測定される分子運動

凍結乾燥したデキストラン 40k の誘電緩和スペクトルは、試料をテフロンシートでカバーした状態では Fig.1(A) に示すように、1Hz で 130°C 付近に $\tan\delta$ (誘電分散に対する誘電吸収の比) のピークをもつ緩和を示したが、テフロンシートのな

い状態では Fig.1(B)に示すように、 $\tan\delta$ の上昇のみがみられ、ピークは観察されなかった。デキストランの β 緩和は1kHzで27°C付近にピークを示すことが、フィルム状に成形した40kより大きい分子量をもつ試料で報告されているので

(Montes等)、40kのデキストランでは、27°Cより低い温度にピークがあると思われる。従って、1kHzで200°C以上にピークをもつ緩和は、 β 緩和より遅い分子運動に起因すると考えられる。スペクトルを拡大した図 (Fig.1の右図)では、ピークは低温側で-20°Cまで観察されないものの、 β 緩和に由来する緩和を示唆する強度変化が見られた。

凍結乾燥したデキストラン1k、イソマルトトリオースおよびグルコースは、Fig.2に示すように、1kHzでそれぞれ、170°C、140°Cおよび100°C付近にピークをもつ緩和を示した。これらの緩和は、デキストラン40kと同様に、テフロンシートのない状態では $\tan\delta$ が増大しつづけ、ピークは観察されなかった。これは、電荷の移動が不均一なときに観察される Maxwell Wagner 過程と同様に、テフロンシートによって電極への電荷の移動が阻止されたために観察されたと考えられる。したがって、Fig.2(A)に示すテフロンシートのある状態で測定された $\tan\delta$ のピークは、Smith等によってマンニトールで観察されているイオンの拡散運動やタンパク質で観察されているプロトンホッピングと同様の分子運動 (プロトンホッピング様の分子運動) を反映しており、その緩和時間はその平均の速度を表すと考えられる。デキストラン40k、デキストラン1kおよびイソマルトトリオースで観察されたプロトンホッピング様分子運動に起因する誘電緩和スペクトルは、Fig.3に示すように、緩和吸収をピークにおける緩和吸収で規格化し、ピークにおける周波数で規格化した周波数に対してプロットすると、 T_g 前後の温度領域でほぼ一定の形のスペクトルを示した。イソマルトトリオースはばらつきの大きいスペクトルを示した。

凍結乾燥したグルコースは、Fig.2において、プロトンホッピング様分子運動に起因する緩和よりも低温側(約50°C)にテフロンシートの影響を受けない緩和が見られた。この緩和は、0.01Hz~100kHzの周波数領域では、 T_g より高い温度領域でのみ観察することができ、また、Fig.4に示

すようにプロトンホッピング様分子運動に起因する緩和より大きい分布を示すことから、 α 緩和、すなわち製剤の品質変化を引き起こすと考えられる分子再配列の運動に由来すると考えられる。Parkerらは1kHzで70°Cに α 緩和を観察しており、ピーク温度の差は乾燥状態の違いに帰することができる範囲内であることから、Fig.2の緩和が α 緩和に由来することが支持される。グルコース凍結乾燥品におけるプロトンホッピング様分子運動は、Fig.2において α 緩和より高温側にみられ、また、Fig.4では緩和の裾野だけが低周波領域にみられる。したがって、グルコースにおけるプロトンホッピング様分子運動は、 α 緩和より遅い運動であることが分かった。

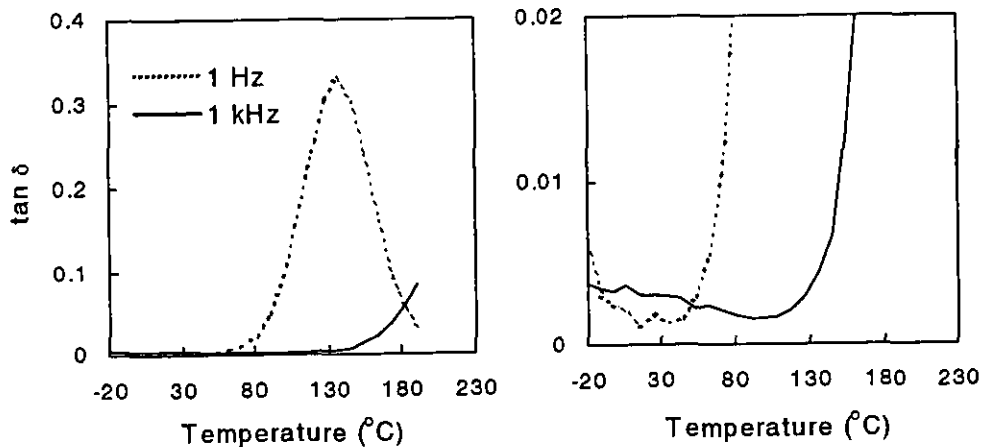
2) 誘電緩和時間の温度依存性

デキストラン40k、デキストラン1kおよびイソマルトトリオースの凍結乾燥品で観察されたプロトンホッピング様分子運動およびグルコース凍結乾燥品で観察された α 緩和の誘電緩和時間は、Fig.5(A)のような温度依存性を示した。分子再配列の運動の緩和時間は、 T_g 以上の温度領域では Vogel-Tamman-Fulcher 式 (VTF 式)、 T_g 以下の温度領域では Adam-Gibbs-Vogel 式 (AGV 式) に従って製剤の T_g から計算することができる。デキストラン40k、デキストラン1k、イソマルトトリオースおよびグルコース凍結乾燥品のそれぞれの T_g から計算した分子再配列の緩和時間を Fig.5(A)に線で示す ($m=70$ を仮定)。分子再配列の緩和時間は分子量が低下するに従って小さくなり、運動性が上昇するのが分かる。

グルコースの α 緩和に帰属させた誘電緩和時間は、 $m=70$ を仮定して計算した分子再配列の緩和時間とほぼ一致した。ここで、 m の値は実測されていないので、 T_g より高い温度領域における分子再配列の緩和時間の計算値は概算値にすぎないが、誘電緩和時間の実測値を T_g に外挿した値がほぼ100sのオーダーになることから、Fig.4に示すグルコースの誘電緩和は α 緩和、すなわち分子再配列の運動を反映していることが確認された。

デキストラン40k、デキストラン1kおよびイソマルトトリオースでみられたプロトンホッピング様分子運動の T_g 以下の温度領域における誘電緩和時間は、AGV式で計算された分子再配列運

(A) Samples with teflon sheet



(B) Samples without teflon sheet

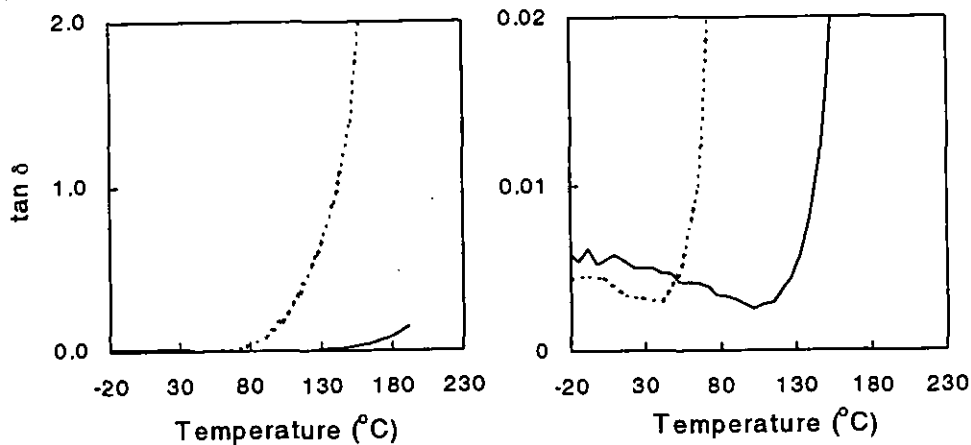


Fig.1. Dielectric relaxation spectra of lyophilized dextran 40k measured with (A) and without (B) Teflon sheet at 1 Hz (broken line) and 1 kHz (solid line).

動の緩和時間 (m の値によって影響されない) より短く、プロトンホッピング様分子運動が分子再配列の運動より速いことが分かった。Fig.5(B)に示すように、これらの緩和時間を T_g で規格化した温度に対してプロットすることによって分子量の違いによる T_g の差異の影響を削除しても、分子量が大きくなるにしたがって誘電緩和時間は小さくなり、分子再配列運動の緩和時間との差が大きくなった。すなわち、 T_g における誘電緩和時間は、分子量が大きくなるにしたがって小さくなった。この結果から、プロトンホッピング様分子運動の速度が T_g 以外の要因によっても影響されることが明らかになった。プロトンホッピング様分子運動のように電荷が移動する運動の速度は、分子間の移動の方が分子内の移動より遅いと考えられることから、分子量が小さくなるにした

がって分子間の移動の比率が高くなり、電荷移動の平均の速度は遅くなると考えられる。したがって、分子量が小さいものほど T_g が低く運動性は高いが、 T_g の影響を差し引くと、誘電緩和時間は相対的に大きくなると考えられる。

Fig.5(B)には、水分を吸着したデキストラン40k およびイソマルトトリオースの凍結乾燥品の誘電緩和時間も示すが、いずれも乾燥状態のプロットと一致し、水分吸着が誘電緩和時間に及ぼす影響は、水分吸着による T_g の低下によって説明することができた。この結果から、水分は T_g の低下をとおしてのみ凍結乾燥製剤の運動性に影響を与えることが分かった。

Fig.5(B)に示されるように、プロトンホッピング様分子運動の誘電緩和時間の温度依存性は、低温領域から T_g に近づくとその勾配が大きくなり、

緩和時間は温度変化によって大きく変化した。この T_g 付近における温度依存性の変化は、製剤の品質変化を引き起こす分子再配列の運動の緩和時間 (Fig.5 の線) の温度依存性と同様であり、プロトンホッピング様分子運動が分子再配列の運動と連動していることが示唆される。すなわち、 T_g 付近で分子再配列運動の温度依存性が変化すると、それと連動したプロトンホッピング様分子運動の温度依存性も変化する。その結果、誘電緩和時間を指標としてプロトンホッピング様分子運動の変化を観察することによって、分子再配列の運動の変化を観察することができると考えられる。

高分子-水系における水分子の拡散運動の解析

NY-AC 水溶液の不凍水量は、Fig.6 に示すように、高濃度 (6%以上) ではキサントガムより多いが、6%以下ではキサントガムより少なかった。これは NY-AC が吸水してゲル化膨潤するためと考えられる。両者の水分吸着等温線を比較すると、水和水量は保水性の高い NY-AC の方がキサントガムよりも全相対湿度領域で多くなった (Fig.7)。

グリシンペタインは、Fig.8 に示すように、冷却過程では共晶 (氷とグリシンペタインの結晶) の析出による発熱ピークは観測されなかったが、昇温過程で発熱ピークが観測され、結晶が析出することがわかった。グリシンペタイン-水系の状態図を Fig.9 に示す。

L-リシンは Fig.10 に示すように、どのような冷却・昇温条件でも析出せず、溶液は凍結濃縮するとガラス化した。濃度が薄くなるとガラス転移温度が急激に上昇したことから (Fig.11)、濃厚溶液では溶液全体がガラス化するのに対し、希薄水溶液では凍結濃縮されて、ガラス化する溶液の濃度が実質的に上昇すると考えられる。Fig.12 に示すように、グリシンペタインはグルコースより水和量が多いことがわかった。

レチノイン酸含有リボソーム製剤の安定化

Fig.13a に示す化学構造をもつ SG を加えて調製した SG-リボソームは、Fig.13b に示すような構造を有すると考えられる。

ATRA (Fig.13c) は疎水性薬物であるので、リボソームの脂質膜に封入されると考えられるが、そ

の封入率は Table 1 に示すように、調製時の ATRA 濃度が 2.9mol% では、SG-リボソームと非 SG-リボソームでそれぞれ 56.7% と 64.2% と封入率に大きな違いは見られなかったが、非 SG-リボソームでは封入率のばらつきが大きく、ATRA を封入すると不安定になることが示唆された。浅井らは、約 5mol% より過剰な ATRA は、リボソームから分離してエマルジョンを作ると報告しているが、Table 1 に示す粒子径の測定結果からは 1 つのピークが観察されるのみであった。これらの結果から、SG が ATRA と相互作用をしてリボソーム膜内で安定化していることが示唆された。

2.9mol% ATRA 封入 SG-リボソームの 4°C と 25°C での遮光下と非遮光下で 20 日間保存後の ATRA の安定性を調べた結果、Fig.14 に示すように、粒子径には大きな変化はなかったが、Fig.15 に示すように、25°C で非遮光下では両リボソームとも不安定で、6 日間でそれぞれ約 7% と 20% ATRA が残存した。25°C で遮光下では SG-リボソームは、非 SG-リボソームより安定であった。4°C で遮光下では非 SG-リボソームは不安定であったが、2.9mol% SG-リボソームは安定で、24 日後で 83.1% の ATRA が残存した。

80% のラット血清存在下での SG-リボソームの安定性は、Fig.16 に示すように、カルセイン封入 ATRA・SG-リボソームを、37°C で 2 時間インキュベーションしたとき、9.1mol% ATRA を除き、カルセインの放出は少なく安定であった。一方、カルセイン封入 ATRA・非 SG-リボソームは、カルセインを放出して不安定であった。

ATRA・SG-リボソームの担癌マウスにおける抗腫瘍効果は、Table 2 に示すように、平均生存日数が 18.2 日であり、SG 非含有リボソーム (14.1 日) より高く、また、平均体重の減少は観察されなかった。これらの結果から、ATRA はリボソーム調製時に超音波や有機溶媒に触れるが、抗腫瘍効果の生理活性を保持していることが明らかになった。

D. 考察

タンパク質凍結乾燥製剤の品質変化を引き起こす分子運動の実体

デキストランを添加剤として用いた凍結乾燥製剤が示す分子運動の中で、プロトンホッピング

様の分子運動が誘電緩和スペクトルに反映され、誘電緩和時間を指標として分子運動の速度を測定できることが明らかになった。プロトンホッピング様分子運動のメカニズムの詳細は不明であるが、Maxwell Wagner 過程と同様の挙動を示すことから、マンニトールなどで観察されている電荷の移動をともなう運動（電荷の拡散運動）であることは確実であると考えられる。プロトンホッピング様の分子運動の緩和時間は製剤の品質変化を引き起こす分子再配列の運動の緩和時間と同様に、 T_g 付近で温度依存性が変化したことから、分子再配列の運動と連動した運動であると考えられ、その誘電緩和時間は分子再配列運動の変化を観察する指標として有用であると考えられる。前期までの本研究において、製剤の品質変化を引き起こす分子再配列運動の変化は、NMR 緩和時間からも観察できることが明らかになっているが、今後、誘電緩和時間と NMR 緩和時間で測定される分子運動の比較をすることによって、タンパク質凍結乾燥製剤の品質変化を引き起こす分子運動の実体に関するさらに詳細な情報が得られると思われる。

高分子-水系における水分子の拡散運動の解析

NY-ACの不凍水量が高濃度ではキサントガムより多いのに、低濃度ではキサントガムより少なかったのは、水和してゲル化膨潤した結果、水は高分子間に分子集合の形で存在するようになり、孤立した水分子として高分子網目構造内に閉じ込められなくなる結果を反映しているものと考えられる。

生物の凍結・乾燥耐性に関与する適合溶質として知られるグリシンベタインやL-リシンは分子内に正負のイオンを併せ持つ双性イオンであるために、水を添加したときにNaClのように解離できずに、水を引き寄せる性質や潮解性を示し、不凍水量が多くなっていると考えられる。

レチノイン酸含有リポソーム製剤の安定化

リポソームの組成にSGを用いることにより、レチノイン酸含有のリポソームを安定化できることが明らかになったが、その安定化作用はリポソーム膜内でのSGとレチノイン酸の相互作用に起因すると思われる。また、血清中でもリポソームの凝集等が抑制され安定性が改善されるこ

とが分かったが、リポソームの表面に存在する糖鎖がタンパク質等の吸着を低下させるためであると考えられる。

E. 結論

タンパク質凍結乾燥製剤の品質変化を引き起こす分子再配列の運動は、添加剤がグルコースの場合には誘電緩和スペクトル法で観察することができたが、グルコースオリゴマーやデキストランを添加剤とする製剤では、0.01Hz~100kHzの周波数領域では観察できないほどに速度が遅いことが分かった。それらの製剤では、分子再配列の運動ではなく、プロトンホッピング様の分子運動が誘電緩和スペクトル法で観察された。プロトンホッピング様の運動は分子再配列の運動と連動しているため、その誘電緩和時間を測定することによって分子再配列運動の変化を観察できることが明らかになった。

また、水分子の拡散運動性は、マクロには高分子網目構造の存在に大きく依存することが明らかになった。また、ミクロな分子レベルでは、溶液の粘度が重要であり、ガラス転移及びガラス転移曲線の測定が有益な情報をもたらすことも明らかになった。

さらに、ジバルミトイルフォスファチジルコリンリポソームにSGを添加することによって、レチノイン酸の封入率の高いリポソームを調製することができた。SGの添加は、レチノイン酸の安定性を高めるばかりでなく、血中におけるリポソームの凝集等を抑制して安定化することが明らかになり、静脈内投与可能なリポソーム製剤として適用できる可能性が示された。

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.*, 93, 384-391 (2004).
- 2) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Molecular

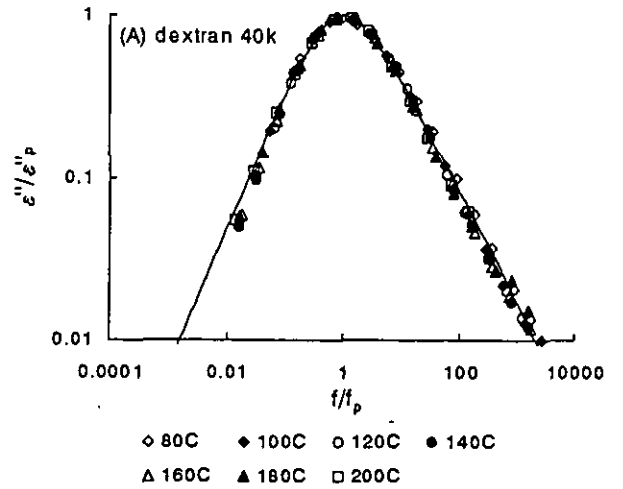
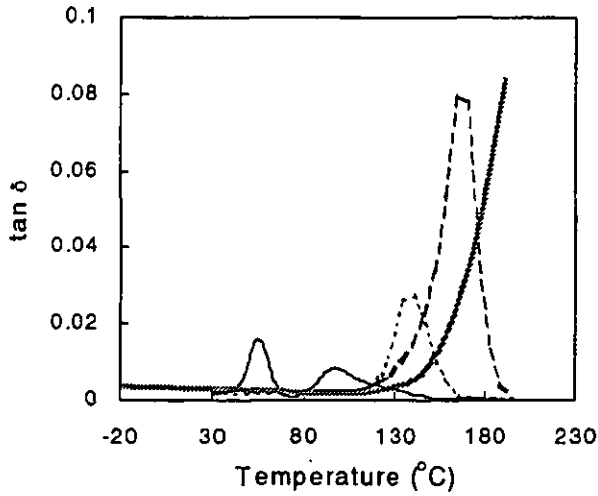
- mobility of lyophilized poly(vinylpyrrolidone) and methylcellulose as determined by the laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times of ^1H and ^{13}C , *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 1289-1292 (2003)
- 3) S. Yoshioka, S. Tajima, Y. Aso, S. Kojima, Inactivation and aggregation of β -galactosidase in lyophilized formulation described by Kohlrausch-Williams-Watts stretched exponential function, *Pharm. Res.*, 20, 1655-1660 (2003)
 - 4) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamics simulation, *Pharm. Res.*, 20, 873-878 (2003)
 - 5) 村勢則郎：高分子ゲルピースの凍結と乾燥，低温生物工学会誌，Vol.49， No.1， 63-67(2003).
 - 6) N. Murase: Vitriified water in frozen polymer gels, Proceeding of International Congress of Refrigeration, ICR0377 (2003).
 - 7) 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).
 - 8) K. Shimizu, K. Tamagawa, N. Takahashi, K. Takayama, and Y. Maitani, Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid - loaded liposomes contained sterylglucoside mixture, *Int. J. Pharm.*, 258(1-2) 45-53 (2003).
 - 9) K. G. Lau, S. Chopra and Y. Maitani, Entrapment of bleomycin in ultra-deformable liposomes, *S.T.P. Pharm.* 13(1) 241-245 (2003).
 - 10) X. Qi, M. H. Liu, H. Y. Liu, Y. Maitani, and T. Nagai, Topical econazole delivery using liposomal gel, *S.T.P. Pharm.* 13(4) 241-245 (2003).
 - 11) N. Takahashi, K. Tamagawa, K. Shimizu, T. Fukui, and Y. Maitani, Effects on M5076-hepatic metastasis of retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, fenretinide entrapped in SG-liposomes, *Biol Pharm Bull.* 26(7)1060-3 (2003).
2. 学会発表
- 1) 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、日本薬学会第124年会 (2004. 3)
 - 2) 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、日本薬学会第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、日本薬学会第124年会 (2004. 4)
 - 4) 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体は何か、第42回NMR討論会 (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) Yoshioka, S., Aso, Y., and Kojima, S.: Temperature dependence of bimolecular reaction rates in lyophilized formulations described by the Adam-Gibbs-Vogel equation, American Association of Pharmaceutical Scientists, 2003 Annual Meeting (2003.10)
 - 7) Miyazaki, T., Yoshioka, S., Aso, Y., and Kojima, S.: Effect of polymer excipients on physical stability of amorphous acetaminophen, American Association of Pharmaceutical Scientists, 2003 Annual Meeting (2003.10)
 - 8) 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)

- 9) 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)
- 10) 村勢則郎、志村康孝、山崎研人、類家正稔：糖水溶液を添加した高分子ゲルビーズの膨潤過程の追跡、第49回低温生物工学会年会 (2003).
- 11) 村勢則郎：低温生物物理化学と食品冷凍技術、日本冷凍空調学会 (2003)
- 12) N. Murase: Vitriified water in frozen polymer gels, 21st IIR International Congress of Refrigeration, ICR0377 (2003)
- 13) 田村麻衣、永井恒司、米谷芳枝、エタノール注入法による微粒子製剤の特性、日本薬学会122年会 (2003. 3)
- 14) Y. Maitani, S. Yano, and K. Hayashi, Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA and entrapping DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system in vitro and in vivo: Proceedinga of 6th international conference of Liposome Advances, p.109, London, UK, (2003.12)

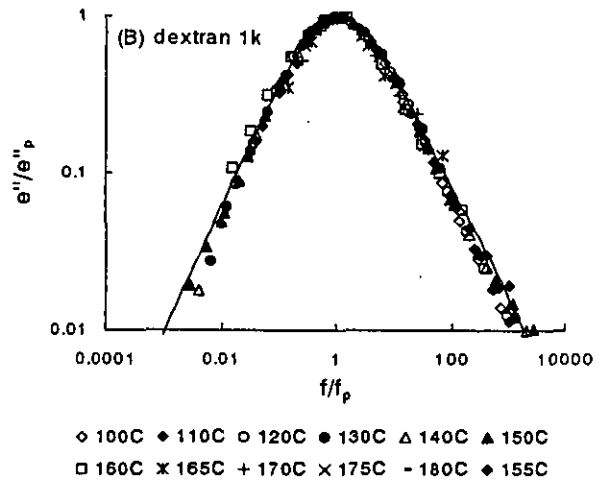
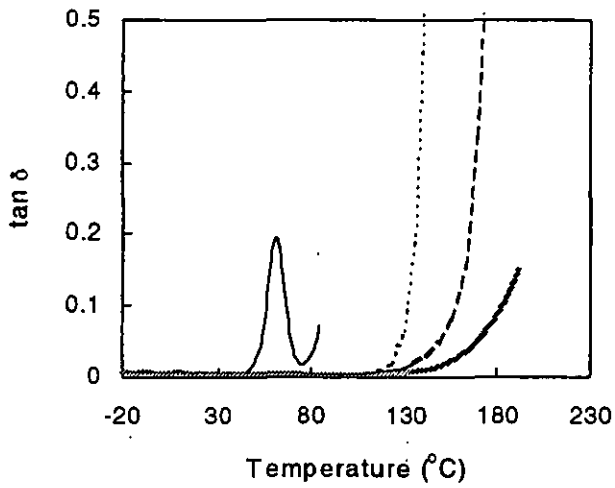
H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

(A) Samples with teflon sheet



(B) Samples without teflon sheet



— glucose IMT
 - - - - dextran 1k - · - · - dextran 40k

Fig.2. Dielectric relaxation spectra of freeze-dried glucose, IMT, dextran 1k and dextran 40k measured with (A) and without (B) Teflon sheet at 1 kHz.

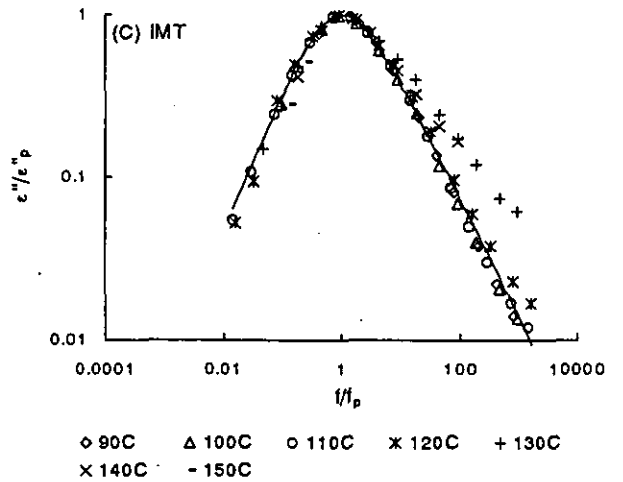


Fig.3. Normalized plot of the Maxwell Wagner spectra for freeze-dried dextran 40k (A), dextran 1k (B) and IMT (C)

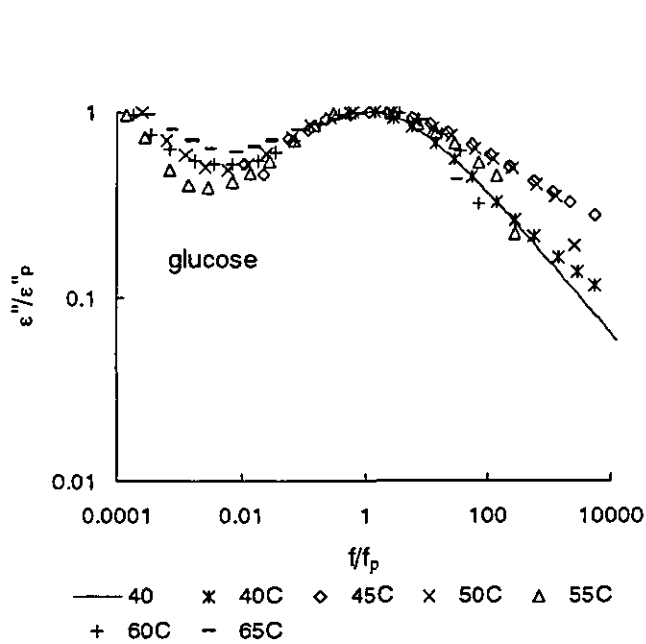


Fig.4. Normalized plot of the α -relaxation spectra for freeze-dried glucose.

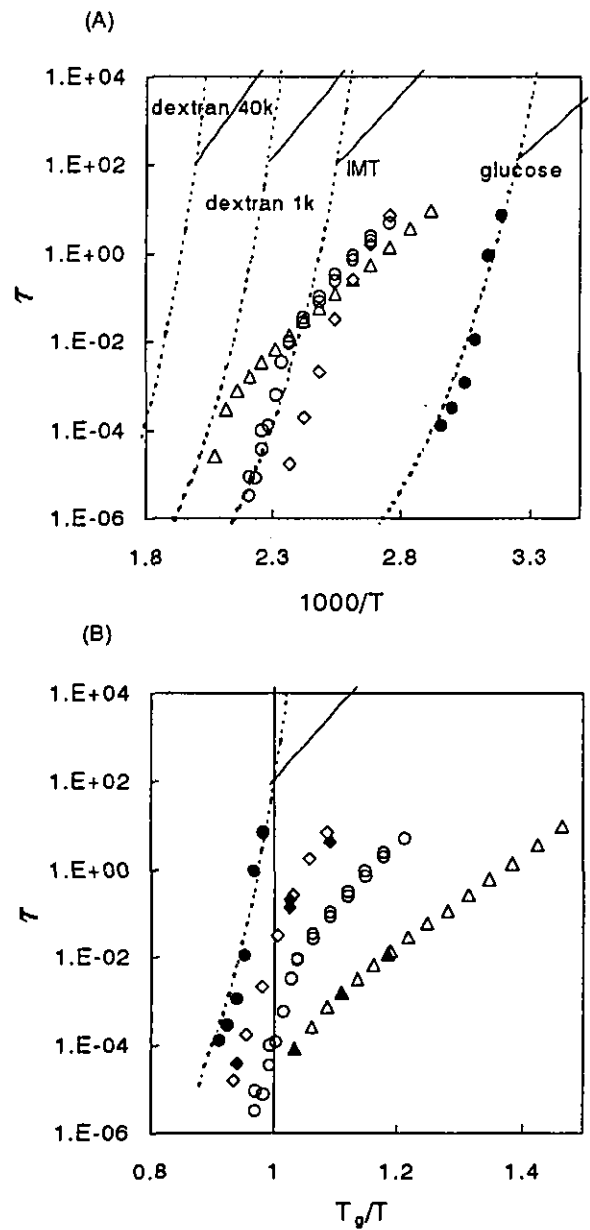


Fig.5. Relaxation time of the Maxwell Wagner-like process for freeze-dried dextran 40k (Δ), dextran 1k (\circ) and IMT (\diamond), and that of the α -relaxation for freeze-dried glucose (\bullet). Δ \circ \diamond \bullet : determined with dry samples at various temperatures. \blacktriangle \blacklozenge : determined with samples containing various water contents at 25°C.

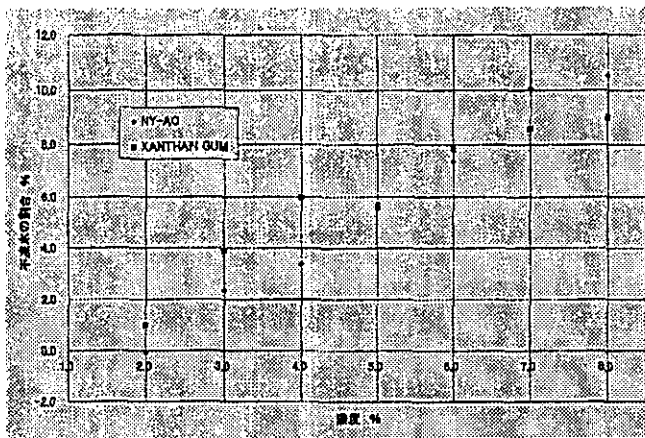


Fig.6 Amount of unfrozen water of NYAC and xanthan gum.

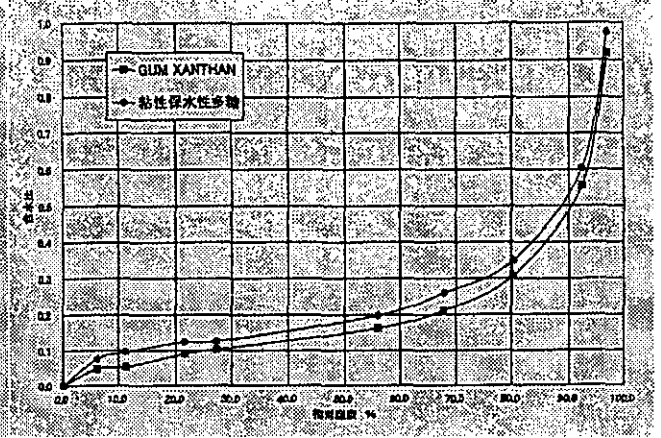


Fig.7 Water adsorption isotherm of NY-AC and xanthan gum. (30°C)

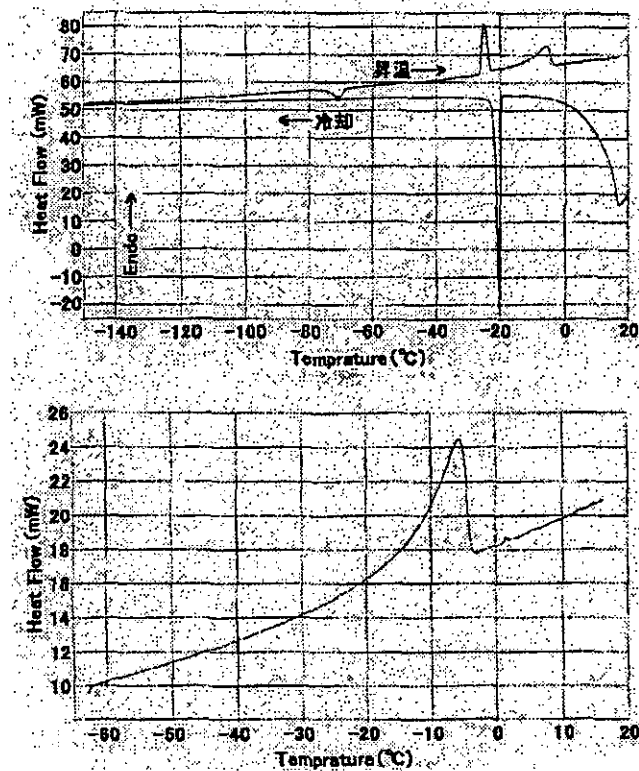


Fig.8 DSC traces observed with aqueous glycine betaine solution. (upper: heating and cooling traces when cooled to -150°C lower: heating trace after cooling to -60°C)

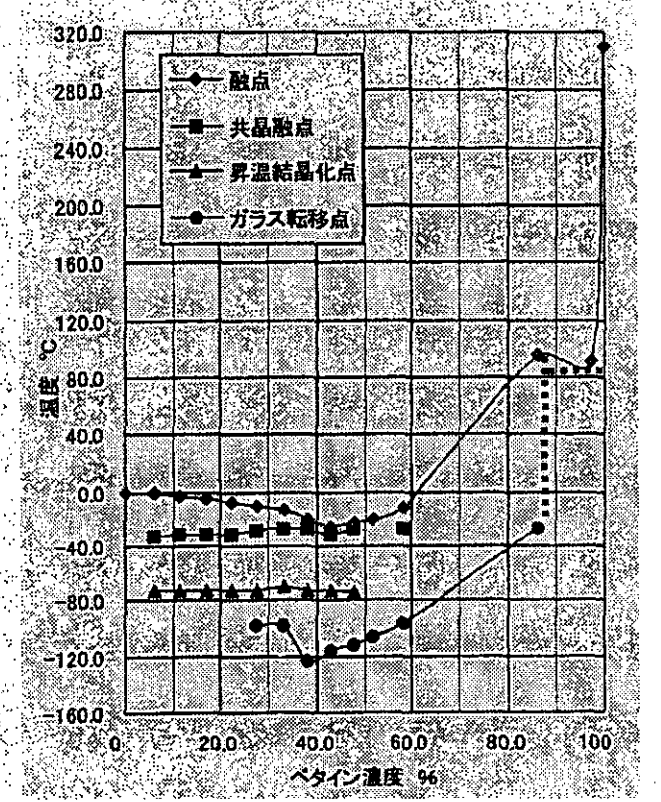


Fig.9 Solid-liquid state diagram of glycine betaine-water system.

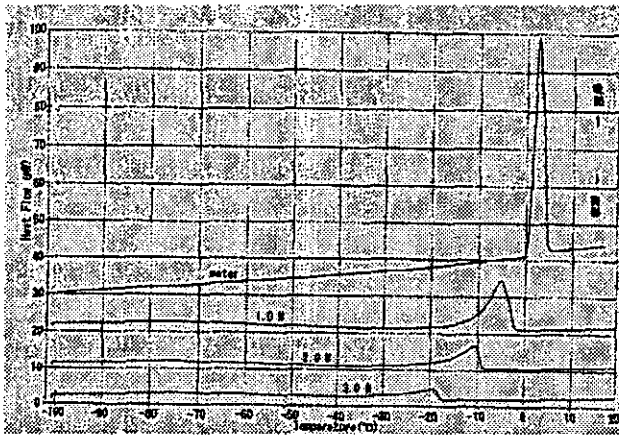


Fig.10 DSC heating traces observed with aqueous L-lysine solutions.

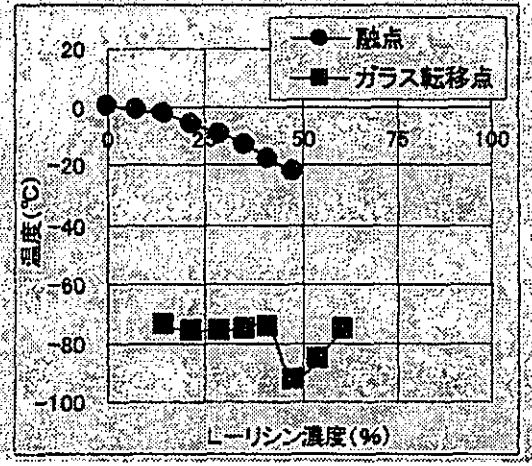


Fig.11 Solid-liquid state diagram of L-lysine-water system.

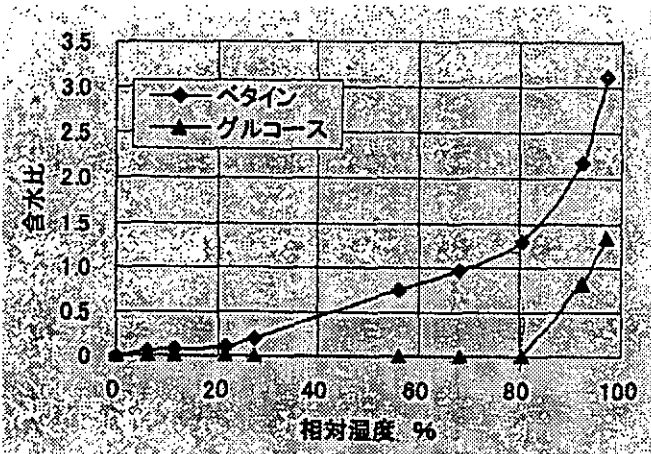


Fig.12 Water adsorption isotherms of glycine betaine and glucose. (30 °C)

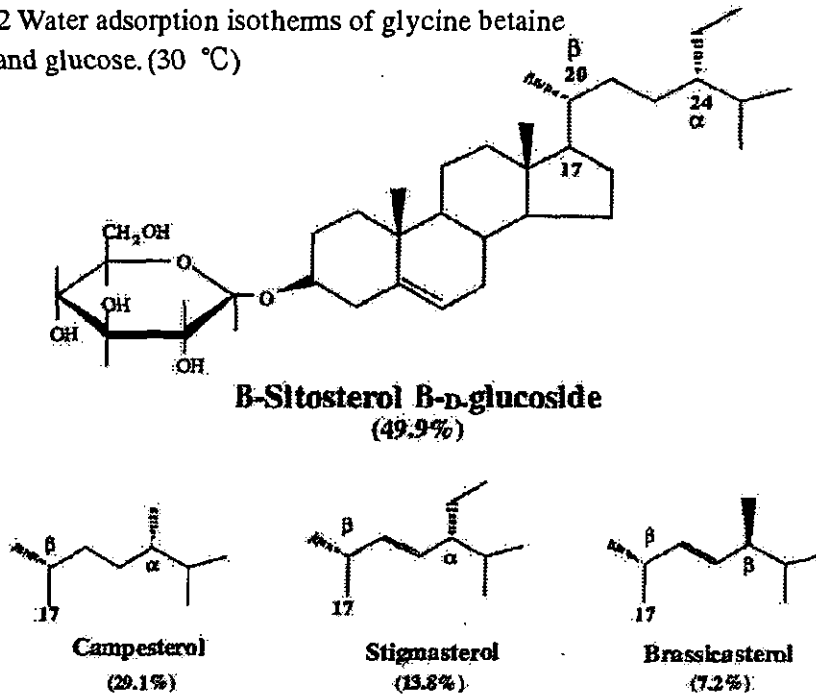


Fig. 13a Chemical structure of the soybean-derived sterylglucoside mixture (SG). The numbers in parentheses represent the mixture ratio in SG.

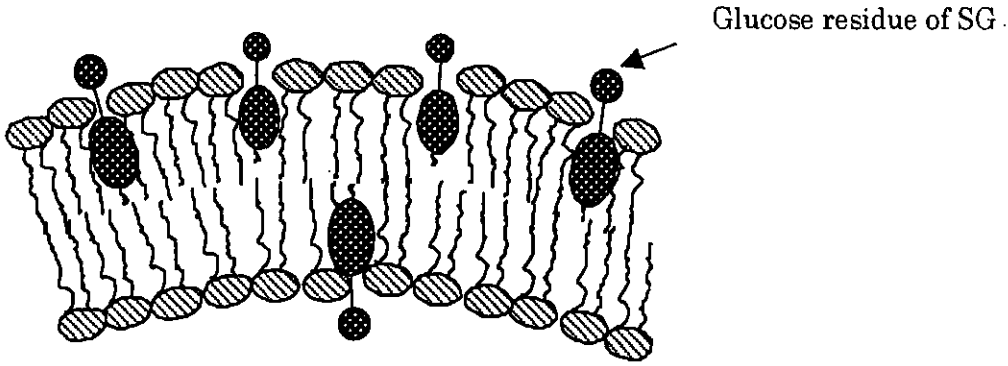


Fig.13b Schematic representation of molecular interaction between DPPC and SG in liposomes

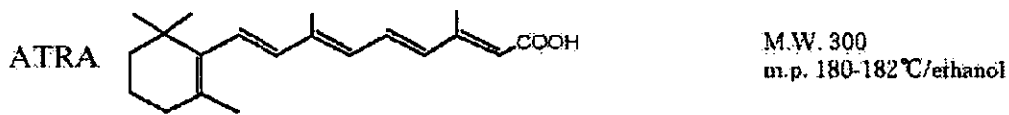


Fig. 13c Chemical structure of retinoic acid (ATRA)

Table 1
Effects of ATRA/lipid (mol%) on entrapment efficiency and particle size of SG and non-SG liposomes after gel filtration^a

Liposomes	ATRA/lipid (mol%)	ATRA (μ M)	Entrapment efficiency (%)	Mean particle size
SG liposomes	0	—	—	162.1 \pm 1.7
	1	23.7 \pm 4.2	84.5 \pm 15.2	171.6 \pm 6.3
	2.9	47.3 \pm 19.4	56.7 \pm 23.3	174.3 \pm 4.7
	4.8	52.8 \pm 26.7	38.0 \pm 19.2	157.8 \pm 2.0
	9.1	125.0 \pm 19.4	45.0 \pm 0.7	167.4 \pm 5.3
Non-SG liposomes	0	—	—	172.6 \pm 1.9
	1	23.8 \pm 19.2	103.6 \pm 69.0	155.4 \pm 3.7
	2.9	53.5 \pm 25.1	64.2 \pm 30.1	175.6 \pm 4.7
	4.8	110.6 \pm 49.7	79.6 \pm 35.8	182.8 \pm 11.0
	9.1	140.0 \pm 66.9	50.4 \pm 24.1	191.3 \pm 6.7

^a Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

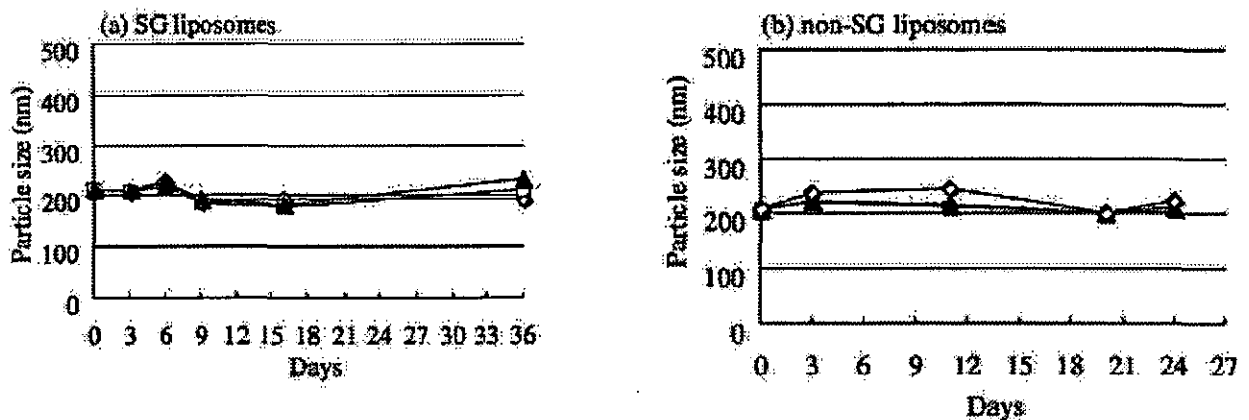


Fig.14 Change of mean diameter of liposomes prepared with 2.9 mol% ATRA at 4 and 25 °C as a function of time. (\diamond) 25 °C (open), (\square) 25 °C (close), (\blacktriangle) 4 °C.

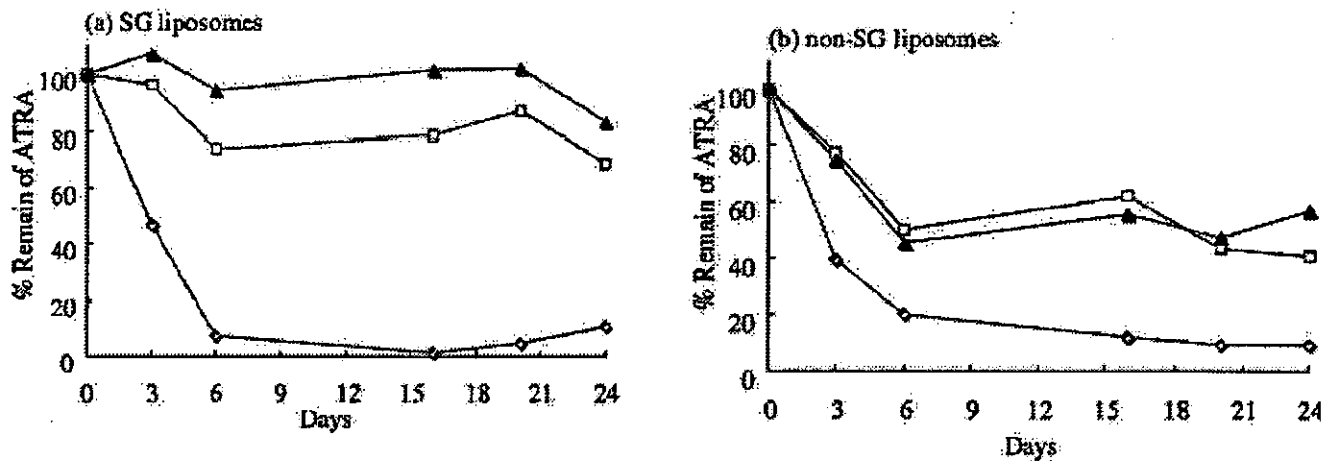


Fig.15 . Percentage of remaining ATRA in liposomes prepared with 2.9 mol% ATRA composed of SG liposomes (a) and non-SG liposomes (b). (\diamond) 25°C (open), (\square) 25°C (close), (\blacktriangle) 4°C.

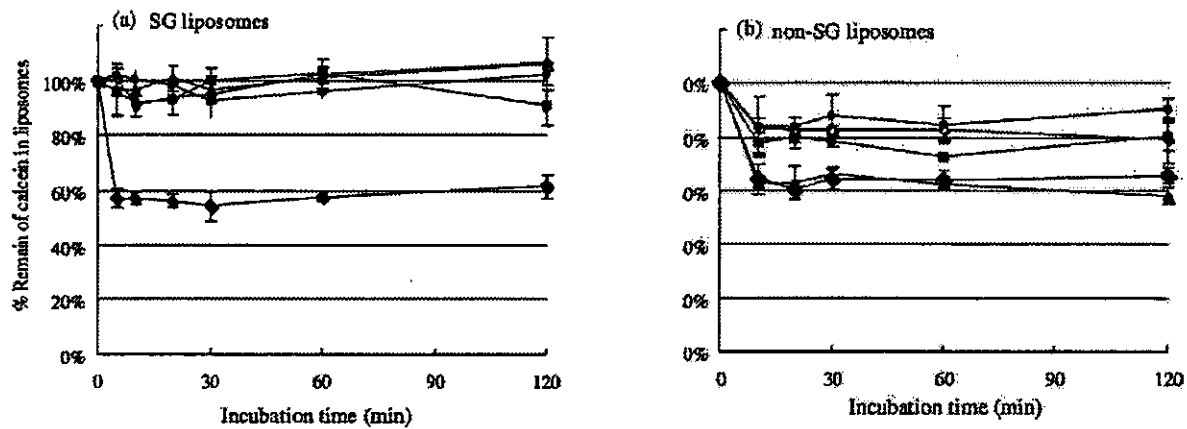


Fig.16 Time-course of calcin release from liposomes in 30% rat serum. ATRA in the lipid mixture was 0% (\diamond), 1.0% (\blacksquare), 2.0% (\blacktriangle), 4.8% (\bullet), 9.1% (\blacklozenge). Each value represents mean \pm S.D. ($n=3$).

Table 2
Effect of ATRA-loaded SG liposomes on hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma

Preparation	Dose (mg/kg)	Survival time (days)			ILS (%) ^a	Mean body weight change (%) ^b (S.D.)
		15 days	Mean (S.D.)	Median		
Saline		0/9	14.1 (0.9)	15		6.9 (5.8)
SG liposomes	0.585	7/9	18.2 (2.7) ^c	18	20.0	7.9 (2.1)

^a Percentage increase in life span: $[(T/C - 1) \times 100]$ (%), where T and C represent the median survival time (days) of the treated and control animals, respectively.

^b Average and standard deviation of body weight change from 0 to 13.

^c $P < 0.01$ compared to value for saline group.

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業) 2003 年度
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

高分子網目構造による水分子拡散運動の制限について知見を得ることを目的に、吸水・保水性菌体外多糖 NY-AC(IM244 株より抽出精製)の不凍水量を DSC を用いて測定し、保水性を持たない多糖キサンタンガムと比較した。NY-AC 水溶液の不凍水量は、高濃度(6%以上)ではキサンタンガムより多いが、低濃度ではキサンタンガムより少なくなった。これは NY-AC が吸水してゲル化膨潤した結果と解釈できる。水分吸着等温線を作成して比較すると、水和水量は保水性の高い NY-AC の方が多かった。これまでの研究結果と同様に、ゲル化膨潤により凍結挙動、すなわち、水分子の拡散挙動は変化することがわかった。

また、凍結濃縮時における水溶液からの溶質の析出しやすさを明らかにする目的で、いずれも双性イオンであるグリシンベタイン、L-リシンの凍結融解過程を DSC を用いて調べた。グリシンベタインは冷却過程では析出しないが、昇温過程で析出する。L-リシンは冷却過程でも昇温過程でも析出せず、凍結濃縮の結果、ガラス化する。水分吸着等温線から、双性イオンは水分吸着量の多いことが明らかとなった。水和力の強いことが水の拡散を抑え、不凍水量を多くしていると理解することができる。

水系において、水分子の拡散運動性は高分子網目構造の存在、溶液の粘度に依存するガラス転移の影響を受ける。水分吸着等温線から水和特性についても知見が得られた。

A. 研究目的

水分子拡散運動は高分子網目構造の存在によって制限され、凍結現象に反映されると考えられる。このようなゲル中の水の運動性の解析及びキャラクタリゼーションを目的に、微生物菌体外に産生される保水性粘性多糖(NY-AC)・水系の凍結挙動をDSC(示差走査熱量測定)で解析することにより、不凍水量を算出し、水分吸着等温線を作成して水和特性を明らかにする。

また、生物の凍結・乾燥耐性に関与する双性イオンとして知られるグリシンベタイン、

L-リシン・水系の凍結挙動を調べ、凍結濃縮時におけるこれらの溶質の析出しやすさ、ガラス化、水和特性について検討することを目的としている。

B. 研究方法

試料:吸水・保水性菌体外多糖 NY-AC は IM244 株より抽出し精製したものを使用した。吸水倍率は 170 ~ 200 であることが知られている。また、比較のため、同じ多糖のキサンタンガムも使用した。グリシンベタイン、L-リシンは購入したものをそのまま使用した。

試料調製:濃度の異なった試料をメスフラスコを用いて調製した。また、飽和塩の入ったデシケータを用いて相対湿度を調整し、その中に乾燥試料を入れて保存し(30°C、2週間以上)、低含水率試料を調製した。

DSC 測定:NY-AC、キサンタンガムについては多糖濃度が2—8%の試料を用いた。主として冷却速度は10°C/分、昇温速度5°C/分で行った。使用した装置はパーキンエルマー社製 Pyris 1 である。

C. 研究結果

NY-AC 水溶液の不凍水量は、高濃度(6%以上)ではキサンタンガムより多いが、濃度がこれより低くなるとキサンタンガムより少なかった。これは NY-AC が吸水してゲル化膨潤する結果と解釈できる。(図1)水分吸着等温線を作成して比較すると、水和水量は保水性の高いNY-ACの方がキサンタンガムよりも全相対湿度領域で多くなった。ただし、乾燥物(NY-AC、キサンタンガム)濃度は50%以上である。(図2)

グリシンベタインの典型的な DSC 曲線を図3に示す。冷却過程では共晶(水とグリシンベタインの結晶)の析出による発熱ピークは観測されなかったが、昇温過程で発熱ピークが観測された。したがって、グリシンベタインの結晶は析出することがわかった。しかし、冷却温度が高いと析出しない。グリシンベタインの・水系の状態図を図4に示す。

L- リシンはどのような冷却・昇温条件でも析出せず、溶液は凍結濃縮の結果ガラス化

した。(図5)L- リシンの濃度が薄くなるとガラス転移温度が急激に上昇したが、濃厚溶液では溶液全体がガラス化するのに対し、希薄水溶液では凍結濃縮されガラス化する溶液の濃度が実質的に上昇するためであると説明できる。(図6)

グリシンベタインの水分吸着等温線を図7に示す。グルコースと比べて水和水量が多いことがわかる。

D. 考察

吸水・保水性菌体外多糖 NY-AC の不凍水量が高濃度ではキサンタンガムより多いのに、低濃度ではキサンタンガムより少なかったのは、NY-AC が吸水してゲル化膨潤した結果と解釈できる。すなわち、水和して膨潤した結果、水は分子集合のかたちで高分子間に存在するようになり、孤立した水分子として高分子網目構造内に閉じ込められなくなる結果を反映しているものと考えられる。

また、NY-AC の水和水量が多く膨潤性のあることから、イオン性の吸着サイトを多くもっていると考えられる。高分子網目構造の存在は水分吸着等温線において、吸着、脱着でヒステリシスをもたらすことが知られている。したがって、脱着過程の測定が水分子の運動性を検討する上で、情報を提供してくれると考えられる。(N.Murase *et al.*, *Cryoletters*, 18, 157 (1997))

生物の凍結・乾燥耐性に関与する適合溶質として知られるグリシンベタインや L-リシンは分子内に正負のイオンを併せ持つ双性

イオンである。そのために、水を添加したときに NaCl のように解離できずに、水を引き寄せる性質や潮解性を示すと考えられる。その結果、水分吸着等温線からわかるように、水和量が多くなっていると理解できる。水を放しにくい性質が水溶液から析出しづらく、不凍水量を多くし、ガラス化しやすくしていると考えられる。そして、徐冷すると凍結濃縮されてガラス化することが、ガラス転移曲線から明らかになった。

E. 結論

凍結現象は分子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。

本研究により、水分子の拡散運動性は、マクロには高分子網目構造の存在に大きく依存することが明らかになった。また、ミクロな分子レベルでは、溶液の粘度が重要であり、ガラス転移及びガラス転移曲線の測定が有益な情報をもたらすことも明らかになった。

古典的手法ではあるが、水分吸着等温線の測定、特に吸着、脱着過程のヒステリシスの観測も水分子の運動性を理解する上で重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・村勢則郎: 高分子ゲルビーズの凍結と乾燥, 低温生物工学会誌, Vol.49, No.1, 63-67(2003).
 - ・N. Murase: Vitrified water in frozen polymer gels, Proceeding of International Congress of Refrigeration, ICR0377 (2003).
 - ・村勢則郎, 志村康孝, 山崎研人, 類家正稔: 糖水溶液を添加した高分子ゲルビーズの膨潤過程の追跡, 低温生物工学会誌, Vol.49, No.2(2003), 印刷中.
 - ・村勢則郎: 低温生物物理化学と食品冷凍技術, 冷凍, 第79巻, 第916号, 印刷中.
 - ・N. Murase, S. Abe, H. Takahashi, C. Katagiri, T. Kikegawa : Two-dimensional X-ray diffraction study of ice crystallisation in polymer gels, CryoLetters, submitted.
- ## 2. 学会発表
- ・村勢則郎, 志村康孝, 山崎研人, 類家正稔: 糖水溶液を添加した高分子ゲルビーズの膨潤過程の追跡, 第49回低温生物工学会年会, 要旨集, p. 23 (2003).
 - ・村勢則郎: 低温生物物理化学と食品冷凍技術, 平成15年度日本冷凍空調学会学術講演会、特別講演(2003).
 - ・N. Murase: Vitrified water in frozen polymer gels, 21st IIR International Congress of Refrigeration, ICR0377 (2003)

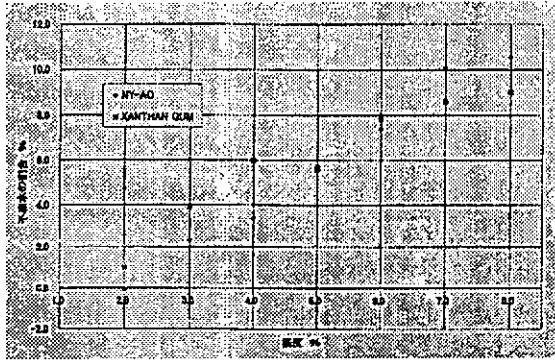


Fig.1 Amount of unfrozen water of NY-AC and xanthan gum.

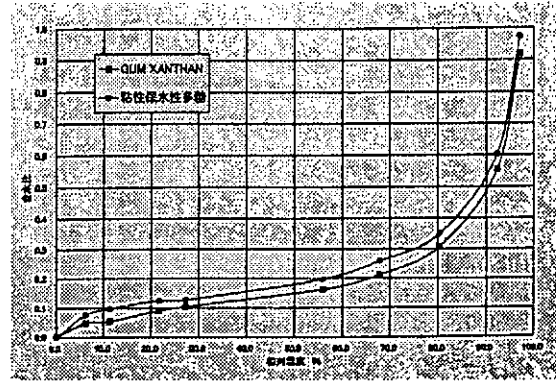


Fig.2 Water adsorption isotherm of NY-AC and xanthan gum. (30°C)

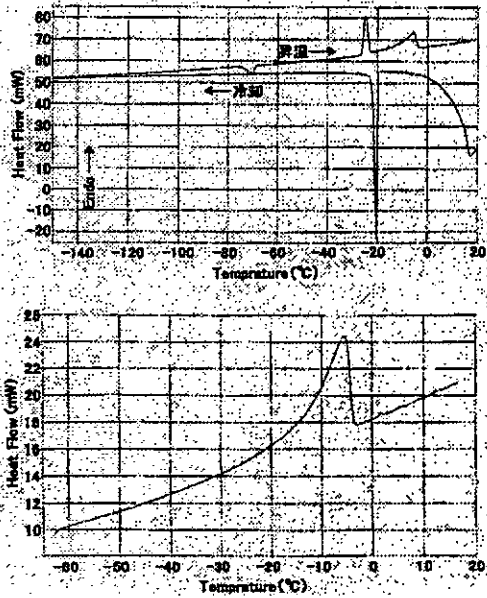


Fig.3 DSC traces observed with aqueous glycine betaine solution. (upper: heating and cooling traces when cooled to -150°C lower: heating trace after cooling to -60°C)

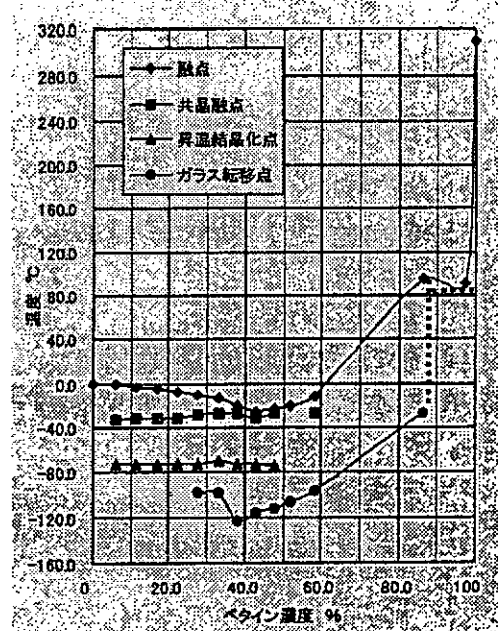


Fig.4 Solid-liquid state diagram of glycine betaine-water system.