

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合
研究事業

タンパク質製剤および非ウイルス性遺伝子導入製剤
の分子運動性に基づく安定性試験法の確立

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成19（2007）年4月

目次

I. 総括研究報告書

タンパク質製剤および非ウイルス性遺伝子導入製剤の分子運動性に基づく安定性試験法の確立

II. 分担研究報告書

凍結乾燥・再水和調製法による遺伝子封入りポソーム製剤の安定性の評価に関する研究 22

米谷芳枝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 34

タンパク質製剤および非ウイルス性遺伝子導入製剤の分子運動性に基づく安定性試験法の 確立

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

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の保存中の安定性を著しく改善するショ糖の作用は、タンパク質の局所的分子運動性を抑制する作用に起因することを明らかにした。また、ゲル製剤においてもタンパク質の局所的分子運動性を抑制することがゲルに内包したタンパク質の安定化につながる可能性が明らかになった。凍結乾燥再水和法で調製した遺伝子導入製剤は、凍結時に添加する糖の種類によって製剤の分散性および遺伝子導入効率が異なり、ショ糖ではDNAとの局所の相互作用により、50℃で50日間の保存においても、用時調製とほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示すことを明らかにした。

分担研究者

米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所教授

協力研究者

阿曾幸男 国立衛研 薬品部主任研究官

A. 研究目的

タンパク質やDNAを医薬品として応用するための開発研究が精力的に進められているが、いかに優れた特色をもつ医薬品といえども、医療への適用時までには一定の品質を保持しているという安定性の保証なくしては実用化され得ない。タンパク質やDNAは、熱力学的に不安定で凝集等の物性変化を起こしやすいために、低温で行われる長期保存試験以外には、その安定性を的確に評価する方法がない。本研究では、応用の現実味が増している非ウイルス性遺伝子導入製剤としてのリポソーム製剤や、ポストゲノム時代に入り重要性を増すタンパク質等を対象とした凍結乾燥製剤について、分子レベルで効率的に安定性を評価する方法を確立することを目的とする。

医薬品製剤の品質の物理的および化学的経時変化に密接に関連した製剤の分子運動性を測定し、それに基づいて製剤の安定性を予測し、製剤の有効期間を決定することの可能性が、我々をはじめとするいくつかの研究グループの最近の研究によって拓かれつつあり、超効率

的な安定性試験法としての発展が期待されている。すなわち、膨大な時間と資源を費やす実証的な保存安定性試験に代わる超効率的な安定性試験法として、分子運動性を指標にすることによって製剤の安定性を予測する方法が有望になった。このことを踏まえ本研究では、タンパク質製剤および非ウイルス性遺伝子導入製剤の安定性評価法として、分子運動性の解析に基づく方法を確立するための研究を展開する。同時に、安定性を支配するタンパク質やDNAの分子運動性を制御することにより、高い安定性を有するタンパク質製剤および非ウイルス性遺伝子導入製剤の開発を目指す。

本年度は、①タンパク質凍結乾燥製剤の品質保証において普遍的な問題となっているタンパク質の凝集現象について、製剤の保存安定性と分子運動性との関連を明らかにし、分子運動性を指標とするタンパク質凍結乾燥製剤の安定性評価法の確立のために必要な検討を行った。すなわち、 β -ガラクトシダーゼをモデルタンパク質とし、ショ糖等の糖類を添加剤として調製した凍結乾燥製剤について、凍結乾燥過程におけ

るタンパク質の構造変化および製剤の分子運動性のそれぞれが保存安定性に与える影響を比較した。さらに、タンパク質の凝集速度に関連する分子運動性として、製剤のガラス転移温度(T_g)で表されるグローバルな分子運動性および NMR 緩和時間で表されるタンパク質分子のローカルな運動性を比較し、製剤の安定化に有効な分子運動の制御法を考察した。また、②ゲルの網目によって形成されるナノキャビティの中にタンパク質を1分子ずつ封じ込めることによるタンパク質の安定化のメカニズムを明らかにすることを目的とし、デキストランゲルマイクロスフェアについてゲルおよび内包モデルタンパク質 β -ガラクトシダーゼの分子運動性の測定を行った。さらに、③本年度は安定性の高い DNA 導入製剤の開発を目指して、これまでに決定したりポソームの組成、リポソームと DNA の混合比、 T_g の異なる糖を添加剤として用い、凍結乾燥再水和法によってプラスミド DNA 封入りポソーム製剤を調製し、温度における安定性をその物理化学的性質（分散性、サイズ）と遺伝子発現効率から検討した。

B. 研究方法

タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

ショ糖、トレハロースあるいはスタチオースを添加剤として用いて、タンパク質と添加剤の比率の異なる β -ガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤を調製した。製剤を 12% 相対湿度(RH)および種々の温度条件に保存した後、 β -ガラクトシダーゼの凝集量を HP-SEC で測定した。

凍結乾燥製剤の水分吸着を真空水分吸脱着測定装置で、また、 T_g を温度変調 DSC で測定した。さらに、固体 FT-IR を用いて 1580~1720 cm^{-1} の領域で二次微分スペクトルを測定した。

凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の回転系スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)を固体 NMR で測定した。

タンパク質封入ナノキャビティを有するハイドロゲルの調製と安定性の測定

β -ガラクトシダーゼとメタクリル酸(GMA)を修飾したデキストラン水溶液とポリエチレンゲ

リコール水溶液からエマルジョンを調製し、 γ 線を照射することによって、ハイドロゲルマイクロスフェアを調製した。得られたハイドロゲルを凍結乾燥した。ゲルの分子運動性の測定は示差走査熱量測定(DSC)により、内包モデルタンパク質である β -ガラクトシダーゼの分子運動性の測定はタンパクのカルボニル炭素の $T_{1\rho}$ 測定により行った。

遺伝子封入りポソームの溶解性

DC-Chol:DOPE(モル比 3:2, 1:2)からなる正電荷リポソームは薄膜法によって調製した。

凍結乾燥再水和法による遺伝子封入りポソーム製剤は、リポソーム懸濁液に、正電荷リポソームと DNA の (+/-) の荷電が 2:1, 16:1 になるようにプラスミド DNA を添加した後、その懸濁液に質量比で全脂質:添加剤 1:5 になるように、ショ糖、イソマルトースあるいはイソマルトリオースを加えた。この懸濁液を1チューブあたりの全脂質量が約 1 mg になるように分注し、液体窒素で急速凍結した後、凍結乾燥した。これらの凍結乾燥製剤を -20°C 、 25°C 、 40°C 、 50°C で 50 日間保存した。

得られた凍結乾燥製剤を各 100 μL 、100 μL 、800 μL と合計 1 mL の水で vortex をかけながら再水和し、リポソーム製剤の分散性と粒子サイズを測定した。

遺伝子封入りポソームの遺伝子封入率および遺伝子導入率の測定

遺伝子封入率は、再水和したりポソーム懸濁液を 45,000 xg で超遠心し、上清中のプラスミド DNA をリポソームに未封入として、PicoGreen dsDNA 法によって測定した。

遺伝子としては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA、細胞は HeLa 細胞を用いた。遺伝子導入率は、再水和した遺伝子封入りポソーム製剤懸濁液を1ウエルあたり 2 μg DNA となるように添加して、3時間無血清培地で、その後 21時間 10%FBS 含有培地でインキュベーション

し、ルシフェラーゼ発現量をピカジーンを用いて測定した。

遺伝子導入リポソーム製剤の細胞毒性

遺伝子発現時の HeLa 細胞のタンパク質濃度測定から評価した。

(倫理面への配慮)

本研究では、広く用いられている培養細胞のみを用い、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

ショ糖、トレハロースあるいはスタチオースを添加剤として含有する β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は、保存中に凝集することが HP-SEC によって観察された。Fig.1 にトレハロースを含有する製剤で得られた SEC の例を示す。凝集の初期のタイムコースは Fig.2 に示すように、いずれの製剤も一次速度式で表すことができた。凝集速度は添加剤に大きく依存し、 T_g 以下の温度領域ではショ糖<トレハロース<スタチオースの順に大きくなり、 T_g 以上の温度領域ではトレハロース<スタチオースの順に大きくなった。ここで、ショ糖は T_g 以上では保存中に結晶化するため、凝集速度を測定できなかった。

見かけの 1 次速度定数から算出した t_{90} (凝集が 10% 進行するのに要する時間) は、Fig.3 に示すように、 T_g 以下の 50℃ においても、また T_g 以上の 80℃ においても添加剤の比率とともに増大し、添加剤比率に対して log-linear の依存性を示した。添加剤比率依存性の勾配が大きいことから、添加剤による β -ガラクトシダーゼ安定化効果は添加剤によるタンパク質希釈効果だけでは説明できないことが分かった。

ショ糖、トレハロースおよびスタチオースの添加剤間で観察された β -ガラクトシダーゼ凝集速度の差異を引き起こす要因の一つとして、凍結乾燥過程においてタンパク質が受ける構造 (conformation) 変化の度合いが添加剤によって異なり、その結果、保存中の凝集速度に差異が

生じることが考えられる。Fig.4 に示すように、凍結乾燥後の未凝集体量は、ショ糖やトレハロースよりもスタチオースにおいて最も小さく、スタチオースでは凍結乾燥過程における凝集が最も著しいことが分かった。しかし、凍結乾燥過程における β -ガラクトシダーゼの構造変化を FT-IR によって検討した結果、Fig.5 に示すように、添加剤比率 0~0.5 の領域で測定した FT-IR の二次微分曲線は添加剤間で有意な差がみられず、タンパク質が凍結乾燥過程において受ける二次構造変化の度合いには有意な差がないと考えられた。

ショ糖、トレハロースおよびスタチオースの添加剤間でみられた β -ガラクトシダーゼ凝集速度の差異を引き起こす要因の一つとして、凍結乾燥製剤の分子運動性の差異が考えられる。タンパク質の凝集は分子間反応であるので、製剤の T_g で表されるようなグローバルな分子運動性が凝集速度に大きな影響を与え、グローバルな分子運動性の増大とともに凝集が促進されると通常考えられている。しかし、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の T_g は、Fig.6 に示すようにショ糖<トレハロース<スタチオースの順に高くなり、グローバルな分子運動性はショ糖>トレハロース>スタチオースの順に低くなるのに対して、 β -ガラクトシダーゼの凝集速度はショ糖<トレハロース<スタチオースの順に速くなることが分かり、予想に反してグローバルな分子運動性は凝集速度の主要な決定要因ではないことが明らかになった。さらに、いずれの製剤も添加剤比率が 0 から 0.3 付近まで上昇すると、 T_g は著しく低下するにもかかわらず (Fig.6)、凝集速度は小さくなる (t_{90} は大きくなる、Fig.3) ことから、グローバルな分子運動性は凝集速度の主要な決定要因ではないことが確認された。

T_g で表されるグローバルな分子運動性よりも短い時間軸をもつローカルな分子運動性が β -ガラクトシダーゼの凝集速度とより密接に関連し、ショ糖、トレハロースおよびスタチオース間の凝集速度の差異を引き起こす可能性を考察するために、凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素のスピン-格子緩和時間を測定し、ローカルな分子運動性の影響を検討した。カルボニル炭素のスピン-格子緩和は、Fig.7 に示

すように、ショ糖、トレハロースおよびスタチオースのいずれの添加によっても遅延されたが、遅延の度合はショ糖が最も大きかった。非線形回帰によって算出した $T_{1\rho}$ の添加剤比率依存性を Fig.8 に示す。ショ糖製剤の $T_{1\rho}$ は添加剤比率の上昇とともに著しく長くなったが、スタチオース製剤の $T_{1\rho}$ は、0.09 の添加剤比率では変化せず、それより高い添加剤比率においてもショ糖製剤より短い $T_{1\rho}$ を示した。トレハロース製剤はショ糖製剤とスタチオース製剤の中間の $T_{1\rho}$ を示した。これらの結果から、 β -ガラクトシダーゼのローカルな分子運動性は、ショ糖によって最も強く抑制されることが分かった。添加剤が β -ガラクトシダーゼのローカルな分子運動性を抑制する度合は、凝集速度を減少させる度合と密接に関連することから、ローカルな分子運動性が凝集速度の主要な決定要因ではあることが示唆された。Fig.3 に示した t_{90} の添加剤依存性の勾配が大きく、添加剤の希釈効果だけではその依存性を説明できないが、添加剤のローカルな分子運動性の抑制作用が主要な役割を果たすと考えることによって説明することができる。すなわち、ショ糖は β -ガラクトシダーゼのローカルな分子運動性を最も強く抑制し、その結果、凝集を抑制することができると考えられる。

以上のように、 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の安定性を決定する主要な要因はタンパク質のローカルな運動性であることが明らかになった。

ナノキャビティによる封入タンパク質の安定化と分子運動性の関係

前年までの検討の結果、 β -ガラクトシダーゼの活性はデキストランを添加剤として用いた場合、凍結乾燥や保存によって失われるのに対し、ゲルマイクロスフェア中では活性が保持され、安定化されることが明らかになった。そのメカニズムを明らかにするために、ゲルマイクロスフェアのグローバルな運動性の指標である T_g の測定し、ゲルマイクロスフェアのグローバルな運動性に及ぼすゲル化の影響を調べたところ、75%RH で水分含量を調整したデキストランの T_g は Fig.9 に示すように、ゲル化することにより上昇し、GMA 修飾率が高くゲルの架橋が密な

デキストランほど T_g は高かった。ゲル化によってグローバルな運動性が抑制されることが明らかとなった。

ゲル化はゲルマトリックスのグローバルな運動性を抑制するのに加え、 β -ガラクトシダーゼのローカルな運動性も抑制することが ^{13}C -NMR 緩和時間の測定から明らかになった。Fig.10 は 75%RH で水分含量を調整したゲルマイクロスフェア中の β -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の緩和過程を示す。ゲル化することによってカルボニル炭素の緩和過程が遅くなっていることがわかる。緩和過程が遅いほど、運動性が低いことを意味し、カルボニル炭素は主にタンパク質の主鎖に存在することから、 β -ガラクトシダーゼの主鎖の動きがゲル化によって抑制されていることを示す。ゲル化による運動性の抑制は乾燥状態のゲルマイクロスフェアにおいても観測された。

以上の結果はゲル化による β -ガラクトシダーゼの安定化機構として、ゲルマトリックスのグローバルな運動性や β -ガラクトシダーゼ分子のローカルな運動性の抑制が重要であることを示唆するものと考えられる。

遺伝子導入リポソーム製剤の安定性に及ぼす糖添加剤の影響

前年度の実験結果から、リポソーム組成としては、高い遺伝子発現を示した DC-Chol と DOPE のモル比 3:2、1:2 の2種類を、粒子径の小さいリポソームを調製するために糖の添加量は、全脂質の5倍量添加することにした。

DNA はリポソームに対して (+/-) 荷電比が 2:1、16:1 となるように添加し、さらに3種類の糖を添加して凍結乾燥再水和法によって DNA 封入リポソーム製剤を調製した (Table 1)。

凍結乾燥製剤の安定性は -20°C (コントロール)、 25°C 、 40°C 、 50°C で50日間保存して調べた。再水和後のリポソーム懸濁液の分散性を検討した結果、DC-Chol/DOPE (1:2) リポソームは DC-Chol/DOPE (3:2) に比べて、分散性が低下し、特にイソマルトトリオースを添加した製剤で不均一な分散が観察された (Table 2)。これは

リポソームの正電荷に対する DNA の荷電比が 2 であるので、DC-Chol/DOPE (1:2)では全脂質あたりの DNA 量が多くなり、DNA が凝集し不安定になったと考えられる。

ガラス転移温度(T_g)はショ糖では 80°C、イソマルトースでは 105°C、イソマルトトリオースでは 130°Cであり、 T_g が高い糖を添加すると保存温度が T_g 以下の温度では、製剤はガラス状態でありリポソームは安定に存在すると考えられるが、分散性は T_g の高いイソマルトトリオースで低下する結果となった。

添加した糖による遺伝子封入率への影響を検討した結果、どの製剤も保存温度によらず遺伝子の封入効率は 100%近い値を示した。これはリポソーム懸濁液では、遺伝子が正電荷のリポソームに封入および吸着していることを示唆した。

リポソームの脂質組成と、リポソームと DNA の (+/-)荷電比の遺伝子導入効率に対する影響を検討した。その結果、コントロールである -20°C で最も高い遺伝子発現効率を示す脂質組成は、DC-Chol:DOPE=1:2 で、(+/-)荷電比は 2:1 であった。また、(+/-)荷電比 16:1 では、DC-Chol:DOPE = 1:2 のリポソームが DC-Chol:DOPE=3:2 より、高い遺伝子導入効率を示した(Fig. 11)。しかし、このとき糖の種類の影響はほとんどないことが明らかになった。

糖の製剤の保存安定性への影響を遺伝子導入効率で調べた。温度による遺伝子発現効率の低下では、イソマルトトリオース < イソマルトース < ショ糖の順に少なくなった(Fig.12)。また、コントロールである -20°C での保存製剤に対する比で比較すると、DC-Chol/DOPE (1:2)リポソームでショ糖添加である C-1 製剤では、50°C で 50 日間保存においてもほとんど遺伝子の導入効率が変わらないことから、安定な製剤であることが明らかになった(Fig.12)。

この遺伝子封入リポソーム製剤は、50°C で 50 日間保存したときで、市販品のリポフェクタミン 2000 の 1/7 の遺伝子導入効率を示した。なお、

同じ脂質組成と荷電比のリポソームと遺伝子との用時調製製剤では遺伝子導入効率はリポフェクタミン 2000 の 1/3 であった。

遺伝子発現時の細胞のタンパク質量から細胞毒性を評価すると、すべての遺伝子導入製剤で導入したタンパク質濃度は、市販のリポフェクタミン 2000 より高く、細胞毒性は低いことが明らかになった(Fig.13)。

Fig.12 に示すように、温度による遺伝子発現効率の安定性はイソマルトトリオース < イソマルトース < ショ糖の順であった。保存安定性に及ぼす添加剤の影響を製剤の物性の違いから考察する。凍結乾燥製剤は T_g が高いほど安定であると考えられている。また、プラスミド DNA-リポソーム複合体の DNA 導入効率は複合体の粒子径の影響を受けることが知られている。はじめに、製剤の T_g や複合体の粒子径とプラスミド DNA 導入効率の保存安定性の関連について考察する。

Fig.14 にプラスミド DNA-リポソーム凍結乾燥製剤の T_g を示す。いずれの添加剤においても添加剤のみの凍結乾燥品に比べリポソームを含有すると T_g が数°C 低下し、リポソームと DNA を含有する製剤ではさらに大きな T_g の低下が観測された。リポソームと DNA を含有する製剤の T_g はショ糖 < イソマルトース < イソマルトトリオースの順であり、製剤マトリックスのグローバルな運動性はショ糖を添加した製剤が最も高く、遺伝子導入効率の保存安定性は製剤マトリックスのグローバルな運動性と直接には関連しないことが明らかになった。

リポソーム-プラスミド複合体凍結乾燥製剤を再水和して得られたリポソームの粒子径に及ぼす保存の影響を Fig.15 に示す。いずれの添加剤を用いた製剤においても、粒子径の変化は小さかった。 T_g の低いショ糖を添加剤として用いた場合、保存温度が高いほど粒子径が大きくなる傾向が見られた。製剤の T_g より低い温度で保存したために、保存温度による粒子サイズの変化が見られ

なかったものと考えられ、リポソームの粒子サイズの保存安定性は製剤マトリックスの T_g すなわちグローバルな運動性の影響を大きく受けると考えられる。イソマルトース、イソマルトトリオースを添加剤として用いた製剤においてはリポソームの粒子サイズが変化しないにも関わらず、温度による遺伝子導入効率の低下が見られたことから、遺伝子導入効率の保存安定性はリポソーム粒子径の変化と関連しないことが示された。したがって、製剤の T_g や複合体の粒子サイズ以外の因子が遺伝子導入効率の安定性を支配していると考えられる。

誘電緩和測定によって、ショ糖、イソマルトース、イソマルトトリオースのローカルな運動性を測定した。Fig.16 に 1Hz から 1kHz の周波数で測定したショ糖の誘電損の温度変化を示す。1Hz で測定すると -20℃ 付近に誘電損の極大が見られた。極大の温度は周波数が高いほど高温にシフトしたことから、観測された誘電損の極大は β 緩和に基づくものと考えられる。Fig.17 に 10Hz の周波数で測定した誘電損の温度変化に及ぼす添加剤の影響を示す。誘電損の極大の温度はイソマルトトリオース < イソマルトース < ショ糖の順であり、 T_g の順序とは逆であった。これは、同じ温度で比較したとき、ローカルな分子運動性はショ糖が最も低いことを意味する。リポソームと DNA を含有する製剤においては、電気伝導度に基づくシグナルが、 β 緩和に基づく誘電損の極大とオーバーラップするため、誘電損の極大を明瞭に観測することができなかったが、 β 緩和に基づくショルダの温度は添加剤単独の系と同じ順であり、DNA-リポソーム複合体製剤のローカルな運動性もショ糖を添加剤として用いた製剤が最も低いことが示唆された。この結果は、遺伝子導入効率の保存安定性に関連する因子として、ローカルな分子運動の重要性を示唆するものと考えられる。

T_g の知見から、遺伝子導入効率の保存安定性と関連する因子として、DNA-リポソーム複合体と

添加剤の相互作用が示唆された。Fig.15 に示すように、ショ糖製剤の T_g は DNA-リポソーム複合体が共存すると 20℃ 以上低下したが、イソマルトース製剤の T_g の低下は約 10℃ であり、ショ糖製剤に比べ小さかった。これはイソマルトースに比べ、ショ糖の水素結合が DNA-リポソーム複合体によって強く阻害されていること、すなわち、ショ糖と DNA-リポソーム複合体がより強く相互作用することを示唆し、相互作用の強いショ糖を添加した製剤が保存安定性優れていると考えられる。

D. 考察

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度を決定する主要な要因はタンパク質のローカルな運動性であることが明らかになり、ショ糖のようにタンパク質のローカルな運動性を強く抑制できる添加剤を用いることによって、製剤の安定性を著しく改善できることが分かるなど、安定性に優れたタンパク質凍結乾燥製剤の開発に大いに役立つ知見を得ることができた。今後は、炭素以外の NMR や広範囲の周波数にわたる誘電緩和法などを活用して、ローカルな運動性をさらに部位特異的に測定することが必要であると考えられる。

また、デキストランを架橋したゲル製剤においてもタンパク質の安定性とタンパク質分子の運動性に関連することを示唆する知見が得られた。今後、他の高分子ゲルにおいても検討することにより、分子運動性抑制によるタンパク質の安定化の普遍性を明らかにする必要があると考える。

さらに、本研究から、糖は再水和後のリポソームの分散性と、製剤の温度安定性に大きな影響を与えることが明らかになった。一方、糖は遺伝子導入効率には影響せず、リポソームの脂質組成と荷電比が寄与することが明らかとなった。

これまでは、糖はリポソームの凍結時に作用して、再水和後のリポソームの粒子径は、ショ糖添加では小さくなることが報告されているが、本研究では糖の種類によらず、脂質組成と荷電比の影響が大きくなった。

遺伝子封入りポソーム (DC-Chol:DOPE=1:2、(+/-)荷電比=2:1) でショ糖を添加した製剤が、高い遺伝子導入効率を示した。この結果から、ショ糖は T_g がこの糖の中では最も低いことから、糖は、自分自身がガラス状態となり、リポソーム脂質膜が安定化するというマクロなりポソームの安定性に寄与しているのではなく、DNA との局所な水素結合等の相互作用によって DNA の安定性に寄与している可能性が示唆された。FT-IR などにより、添加剤との相互作用を詳細に検討する必要があると考える。

現段階ではリポソームの外側に静電的に吸着した DNA と、リポソーム内の DNA とを完全に分離定量できないので、糖がリポソーム内への遺伝子の封入に影響し、リポソーム内遺伝子が製剤の安定性に寄与しているかが明確ではない。しかし、この場合も糖が脂質に一時的な不安定化に作用したことが DNA の安定性に間接的に寄与した可能性を示している。

E. 結論

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度を決定する主要な要因はタンパク質のローカルな運動性であり、ショ糖のようにタンパク質のローカルな運動性を強く抑制できる添加剤を用いることによって、製剤の安定性を著しく改善できることが明らかになった。

また、ゲル製剤においてもタンパク質のローカルな運動性を抑制することがゲルに内包したタンパク質の安定化につながる可能性が明らかになった。

さらに、ショ糖を用いて凍結乾燥した遺伝子封入りポソーム (DC-Chol/DOPE=1/2) 製剤は高い DNA 活性を保持しており、50°C で 50 日間保存しても、用時調製リポソームベクターとほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示し、遺伝子導入用製剤として有用性が高いことを明らかにした。 T_g の低いショ糖を用いた製剤が最も安定であったことから、DNA 封入りポソーム製剤の安定性と関連する因子として、 T_g を指標とするグローバルな運動性よりも、スケールの小さな運動性や添加剤と DNA-リポソーム複合体との相互作用が重要であ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) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, T. Kawanishi, Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature. *Int. J. Pharm.* (2006) Accepted.
- 2) S. Yoshioka, Y. Aso, Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability during Storage of Amorphous Pharmaceuticals *J. Pharm. Sci.*, (2006) Accepted.
- 3) S. Yoshioka, T. Miyazaki, Y. Aso, Degradation Rate of Lyophilized Insulin, Exhibiting an Apparent Arrhenius Behavior around Glass Transition Temperature Regardless of Significant Contribution of Molecular Mobility. *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 2684-2691.
- 4) S. Yoshioka, T. Miyazaki, Y. Aso. β -relaxation of insulin molecule in lyophilized formulations containing trehalose or dextran as a determinant of chemical reactivity. *Pharm. Res.*, (2006) 23, 961-966.
- 5) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, Physical Stability of amorphous acetanilide derivatives improved by polymer excipients. *Chem. Pharm. Bull.*, (2006) 54, 1207-1210.
- 6) S. Yoshioka, Y. Aso, T. Miyazaki, Negligible contribution of molecular mobility to the degradation rate of insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone). *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 939-943.
- 7) Y. Aso, S. Yoshioka, Molecular Mobility of Nifedipine-PVP and Phenobarbital-PVP Solid Dispersions as Measured by ^{13}C -NMR Spin-Lattice Relaxation Time. *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 318-325.
- 8) M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani. Combination of non-viral connexin 43

- gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *International Journal of Oncology*, 30:225-231 (2007).
- 9) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of stability in vitro and in vivo, *Int. J. Pharm.*, 308:183-189(2006).
- 10) L. Feng, X. R. Qi, X. J. Zhou, Y. Maitani, S. C. Wang, Y. Jiang, T. Nagai, Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres, *J Control Release*. 112(1):35-42, (2006).
- 11) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine linked PEG-lipids: effect of oligo-arginine length. *Int. J. Pharm.* 316(1-2): 109-116 (2006).
- 12) Y. Hiruta, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Obata, Y. Maitani, Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin, *J Control Release.*, 113: 146-154 (2006).
- 13) K. Kawano, M. Watanabe, T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles, *J Control Release.*, 112: 329-332 (2006).
- 14) T. Yoshitomi, S. Yabuki, H. Kawakami, R. Sato, K. Toma, M. Furuhashi and Y. Maitani, The structure of artificial lipids possessing oligo(ethylene glycol) and their behavior in water. *Colloids and Surfaces A.*, 284-285: 276-283, (2006).
- 15) S. Igarashi, Y. Hattori and Y. Maitani, Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic, *J Control Release*. 112: 362-368 (2006).
- 16) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine -modified liposomes and the effect of oligoarginine length, *Bioconjugate Chemistry.*, 17: 935-942 (2006).
- 17) Y. Hattori and Y. Maitani, Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer. *Cancer Science*. 97: 787-798 (2006).
- 18) K. Hayashi, JB Lee, Y. Maitani, N. Toyooka, H. Nemoto, T. Hayashi, The role of a HSV thymidine kinase stimulating substance, scopoladulciol, in improving the efficacy of cancer gene therapy. *J Gene Med*. 8(8):1056-67 (2006).
- 19) Y. Maitani, S. Yano, Y. Hattori, M. Furuhashi, Y. Hayashi, Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system. *J Liposome Res*. 16:359-342 (2006).

2. 学会発表

- 1) 吉岡澄江、阿曾幸男、川西 徹: 固体分散体中のアスピリンの拡散速度と化学反応性に関する分子動学的検討. 日本薬学会第 127 年会 (2007. 3)
- 2) 阿曾幸男, 吉岡澄江、川西 徹:¹³C-NMR 緩和時間によるデキストランゲル中のβガラクトシダーゼの分子運動性の測定. 日本薬学会第 127 年会 (2007. 3)
- 3) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y.: Relationship between storage stability and β-relaxation for lyophilized insulin and β-galactosidase formulations, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2006.11)
- 4) Aso, Y., Miyazaki, T., Yoshioka, S.: Determination of molecular mobility of

- phenobarbital in solid dispersions with PVP and HPMC by ^{13}C -NMR relaxation measurement in relation to phenobarbital crystallization, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2006.11)
- 5) Yoshioka, S., Aso, Y.: The relative contribution of molecular mobility and chemical activation barrier to the chemical reactivity of lyophilized insulin formulations, Amorph 2006 - Molecular Basis of Stability in Pharmaceutical and Food Glasses (2006.7)
 - 6) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男: ポリビニルピロリドンおよびポリアミノ酸等の高分子含有凍結乾燥製剤におけるインスリンの化学的分解速度の決定要因としての分子運動性の重要度. 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
講演ハイライト「タンパク質医薬品の品質変化は分子の動きで予測できる」 p.35.
 - 7) 阿曾幸男, 吉岡澄江: ポリビニルアルコールゲルに内包した β -ガラクトシダーゼの活性に及ぼす保存の影響. 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 8) 宮崎 玉樹, 吉岡 澄江, 阿曾 幸男: ニフェジピン類薬物の結晶化速度と分子運動性についての検討. 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 9) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男: 糖類および水溶性高分子含有凍結乾燥製剤中のインスリンの分解速度と固体 ^{13}C NMR で測定した β 緩和速度との関係. 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 - 10) 阿曾幸男, 吉岡澄江: ^{13}C -NMR による ニフェジピン-およびフェノバルビタール-HPMC 固体分散体の分子運動性の測定. 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 - 11) 梶原栄一、福島正義、川野久美、服部喜之、林京子、米谷芳枝 ガンシクロピル封入血中滞留性リポソーム製剤の調製と評価、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 - 12) 大口 裕規乃、米谷 芳枝、アクラシノマイシン A 封入葉酸修飾マイクロエマルジョンの in vivo 及び in vitro における癌ターゲティング能の評価、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 - 13) 福島正義、服部喜之、米谷芳枝、前立腺癌に対するドセタキセル併用コネキシン 43 遺伝子治療の検討、 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
 - 14) 服部喜之、米谷芳枝、葉酸修飾脂質微粒子ベクターの遺伝子導入効率における塩濃度の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 15) 川野 久美、米谷 芳枝、腫瘍選択的葉酸修飾ドキシルビシン封入りリポソームの設計と評価、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 16) 片山明香、川野久美、戸潤一孔、米谷芳枝、カンプトテシン封入りリポソーム製剤における安息香酸誘導体の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 17) 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝、オリゴアルギニン修飾リポソームベクターの開発 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 18) 山田敦史、川野久美、米谷芳枝、葉酸修飾リポソームによる細胞内薬物送達におけるポリエチレングリコール脂質の影響、 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 19) 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝、PEG 修飾脂質微粒子 siRNA ベクターの開発 日本薬学会第 12 年会 (2006. 3)
 - 20) Y. Hattori and Y. Maitani, Tumor-specific two-step transcriptional amplification for non-viral suicide gene therapy of prostate cancer, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery, (2006. 7)
 - 21) M. Furuhata, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori and Y. Maitani, Intracellular delivery of plasmid-DNA using oligoarginine modified micelles and liposomes, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery, (2006. 7)
 - 22) 古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝 オリゴアルギニン修飾ベクターによる遺伝

- 子導入 第 22 回日本 DDS 学会 (2006.7)
- 23) 羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝 カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾方法の検討 第 22 回日本 DDS 学会 (2006.7)
- 24) 服部 喜之、米谷 芳枝 2 段階遺伝子転写増幅法による脂質微粒子遺伝子ベクターを用いた前立腺癌特異的自殺遺伝子治療の評価, 日本癌学会 第 65 回総会 (2006.9)
- 25) M. Furuhata, H. Kawakami, K. Toma, Y. Yamada, Y. Hattori and Y. Maitani, Oligoarginine modified liposome and micelle vector complex with plasmid DNA for gene delivery, Membrane-permeable peptides: Chemistry, biology and therapeutic applications, A Satellite Meeting of International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting, (2006.11)
- 26) 羽山明宏、山本竜広、横山昌幸、川野久美、米谷芳枝 カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討と in vivo 評価 日本薬学会 第 127 年会(2007.3)
- 27) 山田敦史、川野久美、服部喜之、米谷芳枝ドキシソルピシン封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果における PEG 脂質の影響日本薬学会第 127 年会 (2007.3)
- 28) 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝 葉酸受容体選択性 siRNA 遺伝子ベクターの開発 日本薬学会第 127 年会(2007.3)
- 29) 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝 In vivo 用オリゴアルギニン脂質ベクターの開発 日本薬学会第 127 年会 (2007.3)

3. その他
なし

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

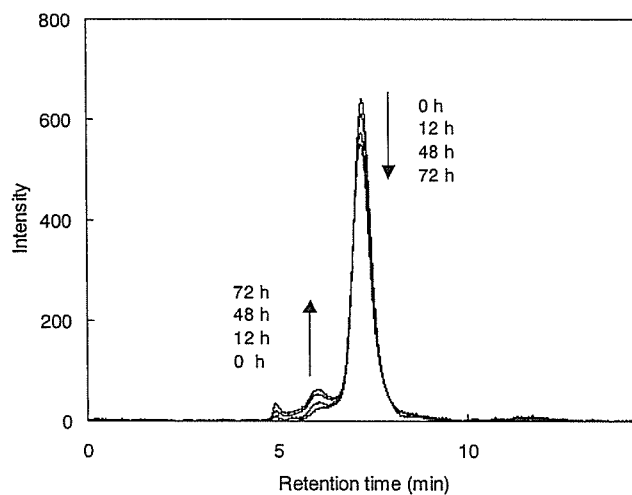


Fig.1. Size-exclusion chromatograms of β -GA lyophilized with trehalose after various periods of storage at 80°C and 12 %RH. The weight fraction of trehalose : 0.5.

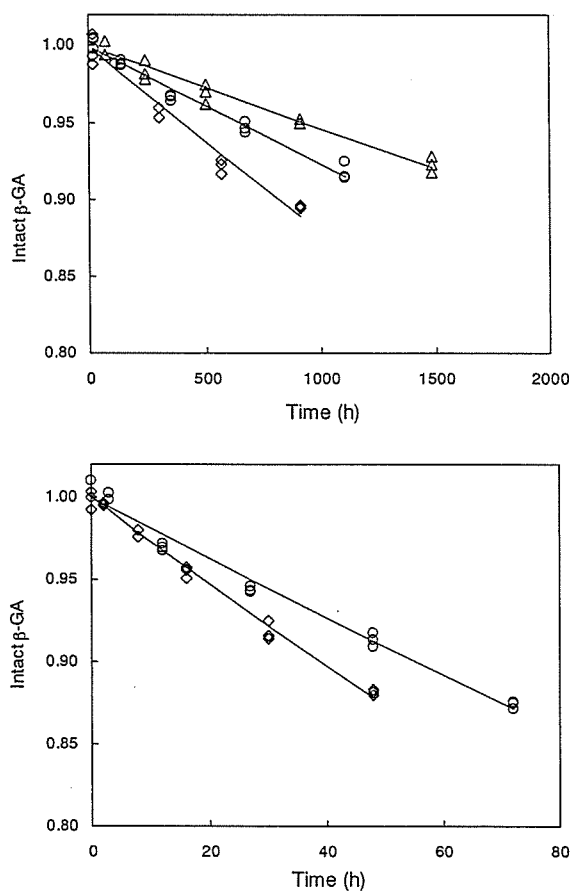


Fig.2. Time courses of aggregation of β -GA lyophilized with sucrose (Δ), trehalose (\circ) or stachyose (\diamond).
 (A) aggregation at 50°C and excipient fraction of 0.33.
 (B) aggregation at 80°C and excipient fraction of 0.5.

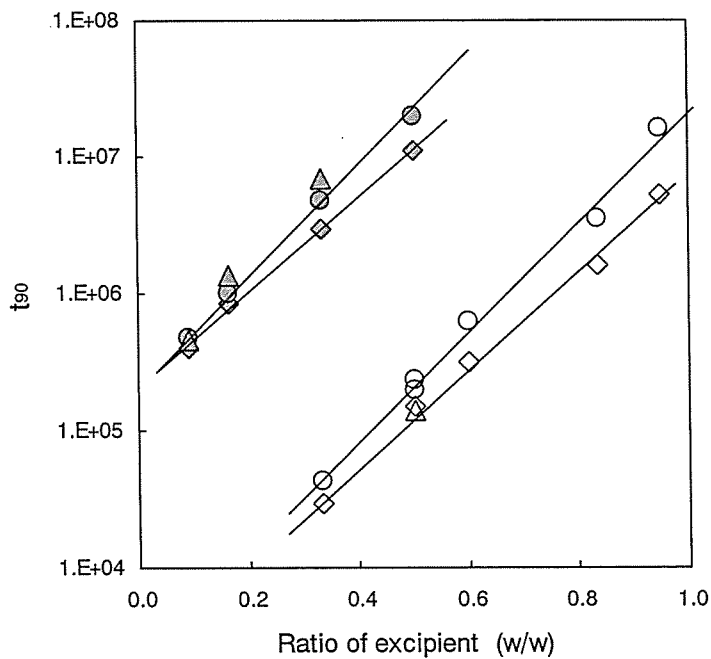


Fig.3. Dependence of t_{90} on the weight fraction of excipient.

The value of t_{90} was determined at 80°C and 12 %RH for trehalose (○) and stachyose (◇), and at 50°C and 12 %RH for trehalose (●), sucrose (▲) and stachyose (◆).

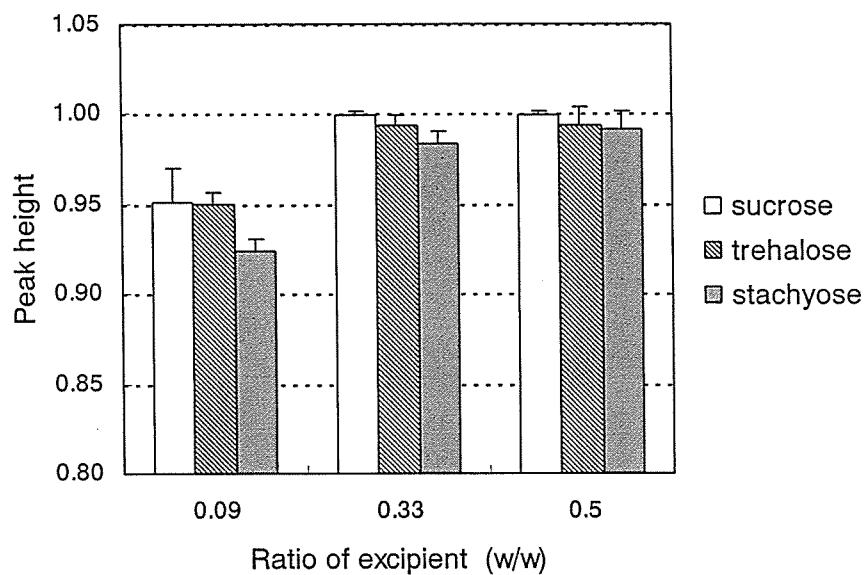


Fig.4. Effect of excipient fraction on aggregation of β -GA lyophilized with sucrose, trehalose or stachyose during freeze-drying process. Bars represent standard deviation ($n=3$).

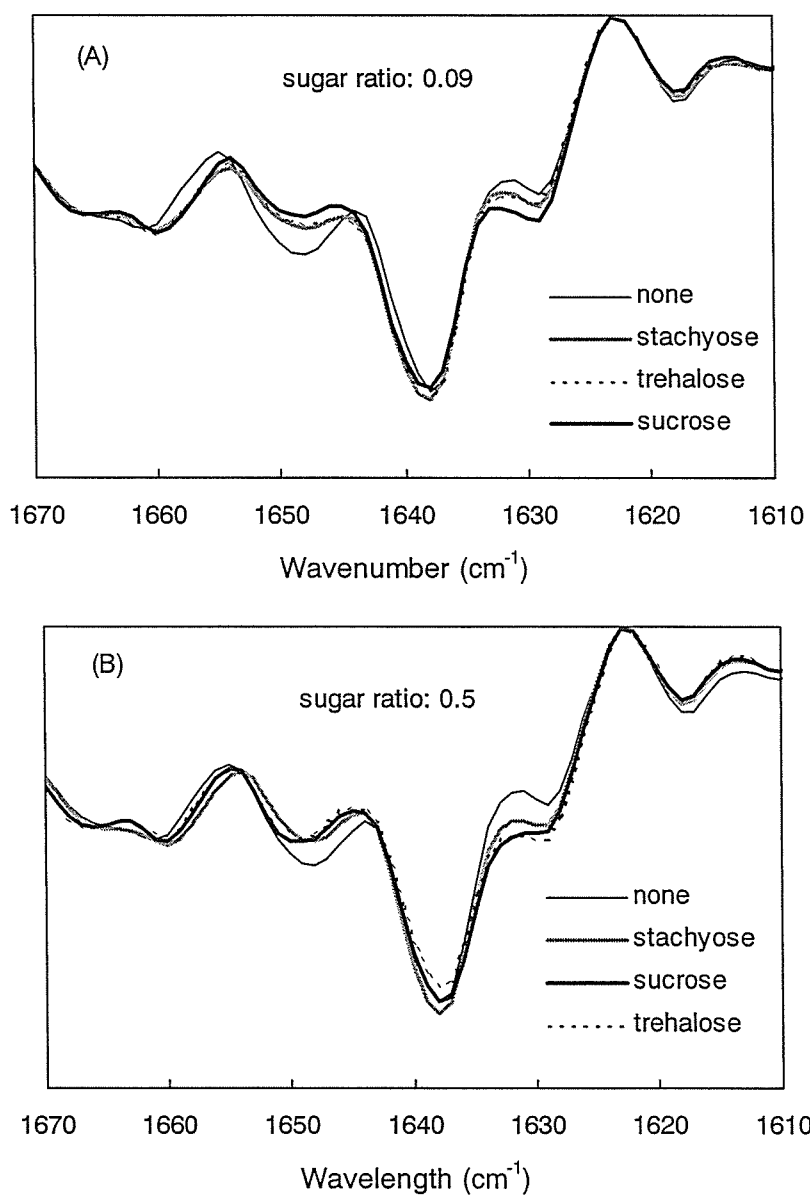


Fig.5. Second derivative FT-IR spectra for β -GA lyophilized with sucrose, trehalose or stachyose of 0.09 (A) and 0.5 fractions (B).

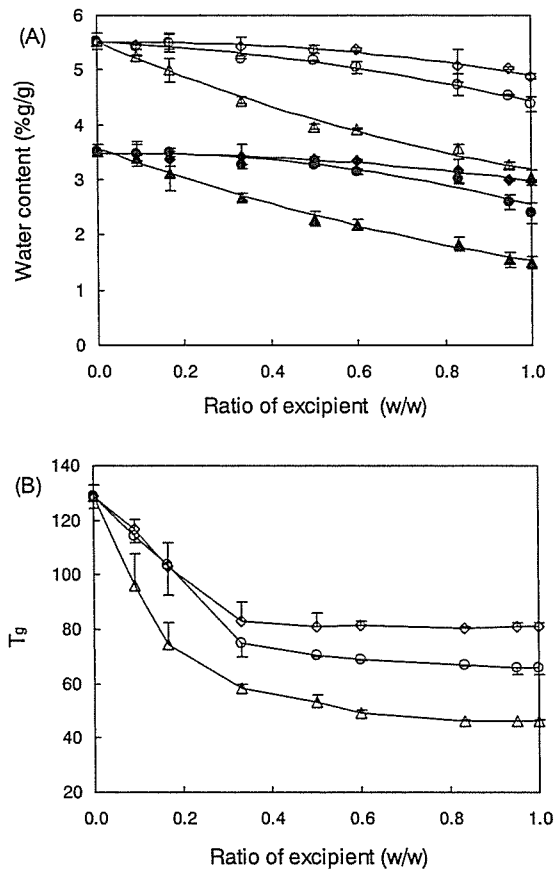


Fig.6. Water content (A) and T_g (B) of lyophilized β -GA formulations containing trehalose (○●), sucrose (△▲), or stachyose (◇◆) as a function of the weight fraction of excipient. (A) closed symbols: 10 %RH; open symbols: 20 %RH. 25°C. (B) 12 %RH. sd (n=3).

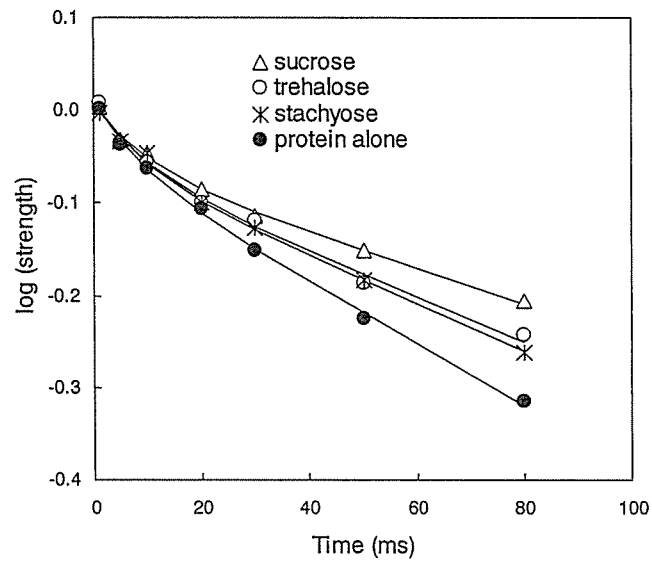


Fig.7. Time course of spin-lattice relaxation at 25°C and 12 %RH for carbonyl carbon of β -GA lyophilized with sucrose, trehalose or stachyose. The weight fraction of excipient : 0.5.

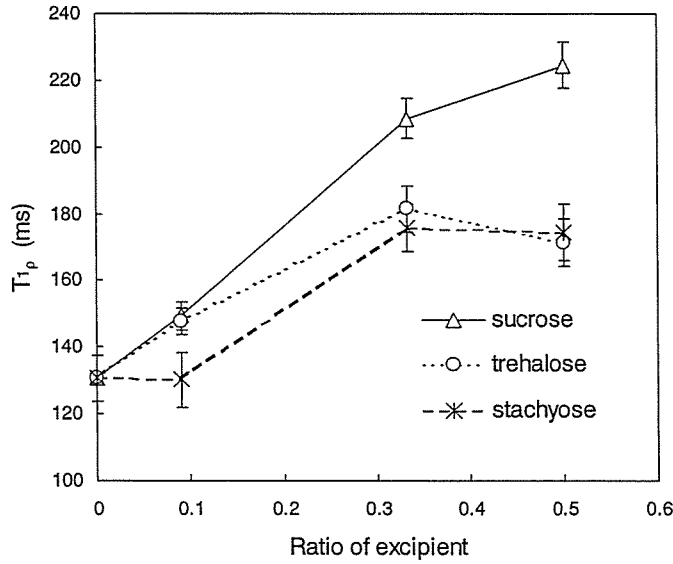


Fig. 8. Effect of weight fraction of excipient on T_{1p} of carbonyl carbon at 25°C and 12 %RH for β -GA lyophilized with sucrose, trehalose or stachyose.

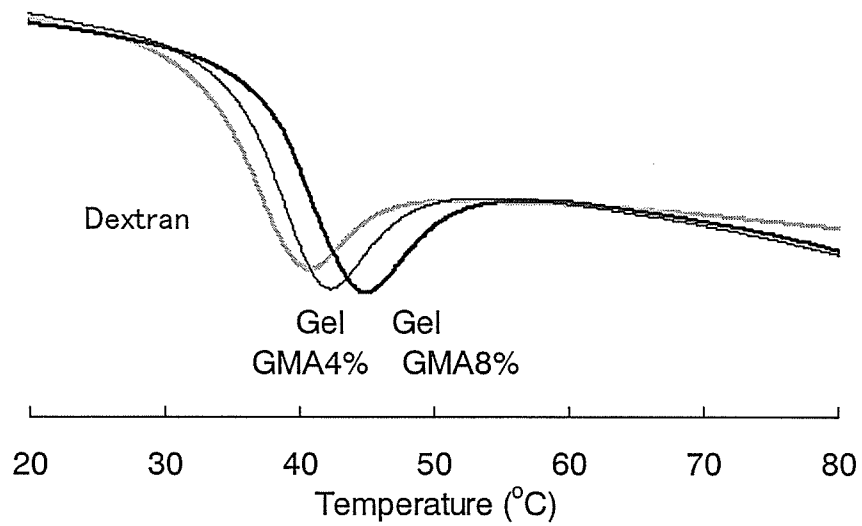


Fig. 9. Effect of cross-linking on T_g of dextran. Water content of the sample was adjusted by storing at 25 °C and 75%RH for 1 day.

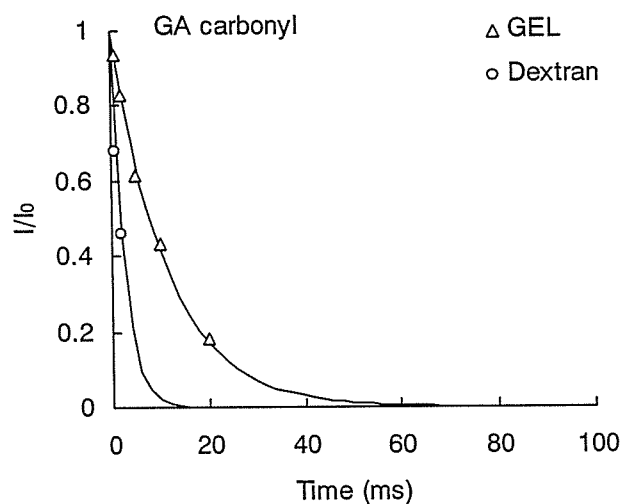


Fig. 10. Time course of spin-lattice relaxation of β -galactosidase carbonyl carbons in dextran gels and freeze-dried dextran formulation.

Water content of the sample was adjusted by storing at 25 °C and 75%RH for 1 day.

Table 1 遺伝子封入リポソーム製剤の組成

DC-Chol : DOPE(モル比)		DNA (μ g)	糖	+/-
3:2	B-1	25	Sucrose	16:1
3:2	B-2	25	Isomaltose	16:1
3:2	B-3	25	Isomaltotriose	16:1
1:2	C-1	100	Sucrose	2:1
1:2	C-2	100	Isomaltose	2:1
1:2	C-3	100	Isomaltotriose	2:1
1:2	C-4	12.5	Sucrose	16:1
1:2	C-5	12.5	Isomaltose	16:1
1:2	C-6	12.5	Isomaltotriose	16:1

Table 2 遺伝子封入リポソーム製剤の再水和後の粒子サイズ

DC-Chol : DOPE(モル比)		平均サイズ(nm) 分散 (%)		平均サイズ(nm) 分散 (%)	
3:2	B-1	179	62	1274	38
3:2	B-2	178	69	1269	31
3:2	B-3	191	70	1558	30
1:2	C-1	448	10	3495	90
1:2	C-2	364	8	3826	92
1:2	C-3	487	11	3161	88
1:2	C-4	238	30	1451	70
1:2	C-5	256	32	1591	68
1:2	C-6	205	32	1130	68

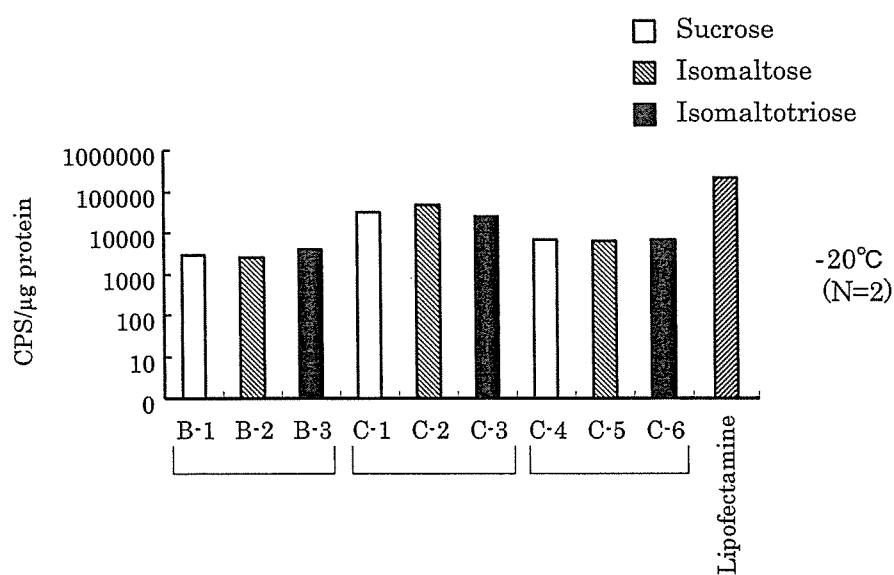


Fig.11 脂質組成比と荷電比の違いによる遺伝子導入効率

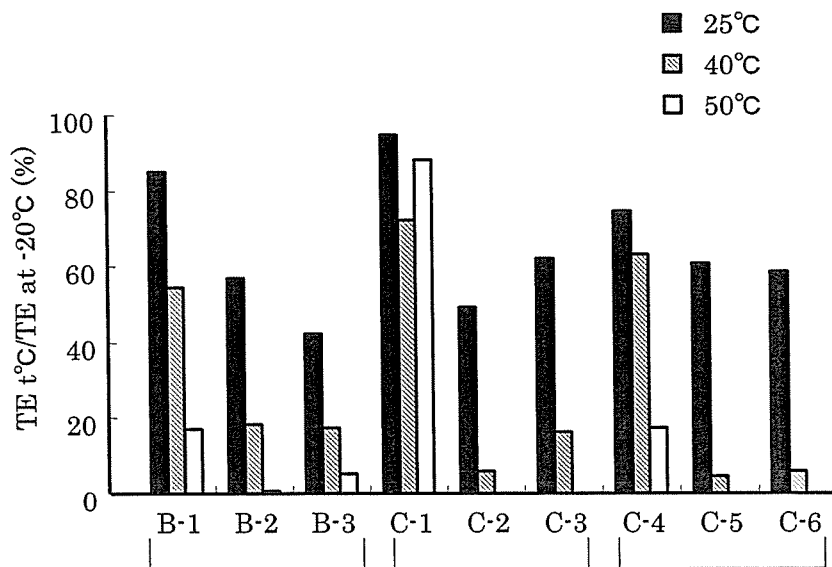


Fig.12 保存温度によるルシフェラーゼ活性低下率

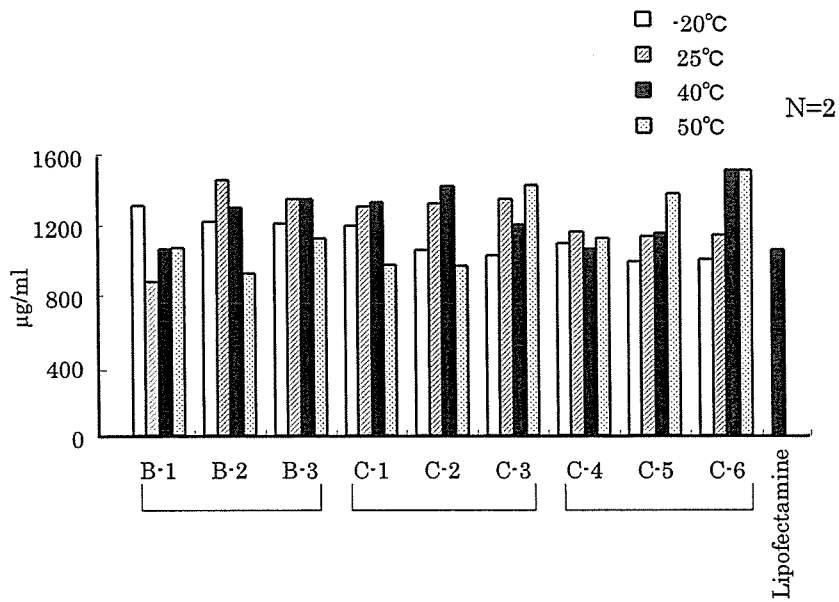


Fig.13 遺伝子導入リポソーム製剤の細胞毒性