

201034063A

厚生労働科学研究費補助金

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、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術
の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成23（2011）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

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、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術
の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成23（2011）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の

高感度安定性評価技術の確立に関する研究 --- 1

阿曾幸男

II. 分担研究報告

プラスミドDNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率 ----- 17

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 ----- 29

タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術の確立に関する研究

研究代表者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

モデルタンパク質としてインスリンを用い、スクロースなどの5種類の糖類を添加剤として用いた凍結乾燥製剤について40℃、50℃および60℃における保存安定性を検討した結果、糖の安定化効果は凍結乾燥する前の溶液のpHや保存温度に依存することが明らかになった。また、安全性は高いが遺伝子導入効率が低いことが問題となっている遺伝子導入用リポソーム製剤の遺伝子導入効率を改善するためにPEG修飾によるリポソームの表面改質を検討した。蛍光物質を用いた蛍光測定と誘電緩和時間測定から、PEG修飾リポソームの表面状態は水和し、PEG脂質を用いて表面修飾したリポソームとプラスミドDNAとの複合体になると脱水和する傾向がみられた。誘電緩和時間は、リポソームおよびそのリポプレックスの水和状態の新たなパラメーターとなることが示唆された。

研究分担者

米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所教授
協力研究者
宮崎玉樹 国立衛研 薬品部主任研究官

A. 研究目的

ヒト型抗体医薬に代表されるように、近年のバイオテクノロジーの発展はタンパク質や核酸などの高分子医薬を製剤化し、医療の現場で用いようとする流れを加速している。高分子医薬は熱力学的に不安定であり、製剤化やその後の保存中に温度や湿度などの環境要因の影響を受け薬理効果を失いやすい。このような高分子医薬を医療の場で活用するためには高度な製剤学的工夫による安定化を施す必要がある。製剤学的工夫による安定化効果を確認し、その最適化を行えるように、短時間で高分子医薬製剤の安定性を評価できる評価法の開発が不可欠である。最近、中性子散乱によって測定される比較的スケールの小さなローカルな運動性と安定性との関連を示唆する報告がなされているが、本研究は中性子散乱のような特殊な装置によらず、ローカルな運動性の指標であるβ緩和時間の測定法を開発し、β緩和時間に基づいた高分子医薬製剤の安定性評価法を

開発することを目的とする。また、タンパク質のローカルな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の開発につながる。さらに、プラスミドDNAとの複合体(リポプレックス)形成能を有し、遺伝子導入用ベクターとして用いられている正電荷リポソームについて、PEG修飾によりリポソームの表面改質を行い、リポソーム表面の水和状態と細胞内への取り込みとの関連を明らかにし、導入効率の高い遺伝子導入ベクターの設計を行う。

本年度はタンパク質の凍結乾燥製剤については、インスリンをモデルタンパクとして用い、スクロース、トレハロース、スタキオース、デキストランを添加剤として用いた凍結乾燥製剤の保存安定性を検討し、糖の安定化効果が凍結乾燥に用いた溶液のpHや保存温度の影響を明らかにした。また、遺伝子導入リポソーム製剤については、リポソームの表面水和の研究に最もよく用いられるPEG脂質で修飾したリポソームおよびその

リポプレックスの表面の水和状態に焦点をあて、蛍光標識による GP (generalized polarization) 測定と水の誘電緩和時間測定の二つの方法から検討を行った。その結果、遺伝子導入用リポソームベクターの開発の上で新しい知見が得られ、これらの物性を測定することによってリポソームとプラスミド DNA (pDNA) の最適混合比の予測が可能であることを示す知見が得られた。

B. 研究方法

(1) 凍結乾燥製剤中のインスリンの分子運動性と安定性との関連

凍結乾燥製剤の調製

ヒト型インスリン (ヒューマリン注、イーライリリー) を透析により精製し、pH を 4 または 7 に調整した。遠心濃縮によりインスリン濃度を 4 mg/mL に調整し、インスリンと添加剤の比率が 1:1.5 になるようにスクロース、トレハロース、スタキオースあるいはデキストランを加え、0.2mL ずつ小分けし凍結乾燥した。

安定性試験

25°C、相対湿度 12% の条件で 1 日保存し、水分含量を調整した凍結乾燥製剤を、25、40、50、60°C に保存した。保存試料に残存するインスリンを以下の条件に従い、液体クロマトグラフィーにより定量した。

液体クロマトグラフィーの条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：280nm)

カラム：イナートシル WP-300 (C8、4.6mm × 250mm)

カラム温度：35°C

移動相：移動相 A：0.01M 硫酸アンモニウム水溶液 (硫酸を用いて pH2.2 に調整)

移動相 B：0.07% トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液

移動相の組成

注入後の時間 (分)	移動相 A 液 (vol%)	移動相 B (vol%)
0~1	72.5	27.5
1~11	72.5→70.0	27.5→30.0
11~16	70.0→65.0	30.0→35.0
16~19	65.0	35.0
19~20	65.0→72.5	35.0→27.5

流量：毎分 1.6mL

(2) パルス磁場勾配 NMR による水の拡散係数の測定

高分子や糖の水溶液中の水分子の拡散係数はパルス NMR (プロトンの共鳴周波数：25MHz、NM-25、日本電子データム) を用い、30°C で測定した。磁場勾配強度は 20 ガウス/cm を用いた。誘電緩和時間の測定はデジタイジングオシロスコープ (54120B 型、アジレント) を用い、時間領域反射法により測定した。

(3) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

リポプレックスの調製

カチオン性脂質としては、二級のアミノ基と末端にヒドロキシル基を有し、コレステロールと結合した OH-Chol と四級のアミノ基 DOTAP を、中性のヘルパー脂質として DOPE を、PEG 脂質として分子量 2000 を用いた (Fig. 1)。脂質濃度 4.5mM で OH-Chol / DOPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:0.2、脂質濃度 5.6mg/mL)、OH-Chol / DOPE / DSPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:x:0.2 - x、脂質濃度 5.6mg/mL)、DOTAP / DOPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:0.2、脂質濃度 7.0mg/mL) の 3 種類のリポソームを薄膜法にて調製し、超音波を照射して粒子径を約 160nm にした。

pDNA としては、プラスミド DNA pCMV-luc を用いた。カチオン性リポソームと DNA の (+/-) 荷電比は、3/1、5/1 として室温で 5 分間インキ

ュベーションをしてリポプレックスを調製した。20 μ Lのリポプレックスを超純水、またはPBS 2mLで希釈し、希釈直後および希釈30分後にGP値の測定を行った。

リポソームとリポプレックスの物性測定

リポソームとリポプレックスのサイズと表面電位は、電気泳動光散乱光度計(ELS-Z2、大塚電子(株))を用いて、表面の水和状態は蛍光物質6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene(laurdan)を0.2mol%総脂質に対して添加したリポソームを用いて、25 $^{\circ}$ CでEx340nmおけるEm440と490nmでの蛍光強度の差からGP(generalized polarization)値を求めて評価した。

$$GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

誘電率と誘電緩和は、デジタイジングオシロスコープ(54120B型、アジレント製)によって、25 $^{\circ}$ C水中で総脂質濃度11.2mg/mLのリポソームを用いて行った。コントロールとしてpDNA水溶液の測定を行い、リポプレックスの測定値から差し引いた。

(倫理面への配慮)

本研究において行った実験は化学実験であり、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

(1)凍結乾燥製剤中のインスリンの分子運動性と安定性との関連

弱酸性のpH領域においてインスリンはA鎖21のアスパラギンにおいて酸無水物中間体を生成し、酸無水物中間体が水と反応することによりデスアミド体となり、もう一分子のインスリンのA鎖またはB鎖のアミノ基と反応することにより2量体を生成することが知られている。これらの分解反応は酸無水物中間体が生成する段階が律速段階であるとされている。Fig. 2に60 $^{\circ}$ Cで保存した凍結乾燥製剤(pH4.0)中のイン

スリンの代表的なクロマトグラムを示す。保存により、インスリンのピークが減少し、インスリンのピークの後にデスアミド体と思われる小さなピークが溶出した。また、インスリンの前に複数の小さなピークが観測された。その生成量は添加剤の影響を受け、スクロース、トレハロースを添加した製剤においてはインスリン単独やデキストランを添加した製剤より生成量が多かった。一方、pH7.0の溶液から凍結乾燥した製剤においてはインスリンのピークの前に溶出する分解物のピークは60 $^{\circ}$ C保存によりほとんど増加しなかった(Fig.3)。これらの結果はインスリンの凍結乾燥製剤中の分解が複数の経路で進行し、それらの速度は添加剤やpHの影響を大きく受けることを示す。

Fig.4に60 $^{\circ}$ Cに保存した凍結乾燥製剤(pH4.0)中のインスリンの分解のタイムコースを示す。凍結乾燥製剤中におけるインスリンの分解はクロマトグラムの結果から示されるように複雑であるが、未変化のインスリンの残存量のタイムコースは1次反応速度式に従ってフィッティングできた。フィッティングにより見かけの分解速度定数を見積もった結果をFig.5、6に示す。Fig.5に示すpH4.0の溶液から凍結乾燥した製剤中のインスリンの分解は50 $^{\circ}$ Cおよび60 $^{\circ}$ Cにおいてはスタキオースを添加した製剤が最も安定であり、スクロースを添加した製剤においては不安定化するように見える。しかし、40 $^{\circ}$ Cにおいてはスクロースもスタキオースと同程度の安定化効果を示すことが明らかになった。一方、pH7.0の水溶液から凍結乾燥した製剤中のインスリンの分解はFig. 6に示すように、60 $^{\circ}$ Cの保存条件においてスクロースが最も安定であった。スクロースの安定化効果は温度やpHの影響を大きく受けた。

(2)パルス磁場勾配NMRによる水の拡散係数の測定

高分子添加剤や糖と水分子との相互作用を明らかにすることを目的とし、水の拡散係数に及ぼす高分子添加剤の影響を検討した。水の拡散係数の測定は Fig.7 に示すパルス磁場勾配スピネコー法によって行った。本方法によって得られる信号強度 I は 1 式によって表され、磁場勾配パルスの持続時間 δ を変化させてシグナルを測定することにより、拡散係数 D を算出することができる。

$$I = I_0 \exp\{-\gamma^2 D \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3}) G^2\} \quad (1)$$

ここで、 γ は磁気回転比、 δ は磁場勾配パルスの持続時間、 Δ は拡散時間、 G は磁場勾配の強さを表す。

Fig.8 に 20%PVP 水溶液について得られた磁場勾配パルスの持続時間 δ とシグナル強度の関係を示す。使用した装置は共鳴周波数が 25MHz のパルス NMR であるため、水と PVP のプロトンのシグナルが含まれている。水と PVP の拡散係数は異なるので、厳密には 1 式が適用できないが、図に示すようにフィッティングが良いことから 20%の濃度においては水分子の拡散係数測定に対する高分子プロトンの寄与は無視できると考えられる。Fig. 9 に種々の高分子や糖の水溶液について測定した拡散係数と誘電緩和時間を示す。誘電緩和時間は水分子が 1 ラジアン回転するのに要する平均の時間であり、誘電緩和時間が大きいほど水分子の平均の運動性が小さく、高分子と相互作用している水分子が多いことを示す。また、拡散係数が小さいほど水分子の平均の運動性が小さく、高分子と相互作用している水分子が多いことを示すと考えられる。Fig. 9 に示すように誘電緩和時間が小さい水溶液ほど拡散係数が大きい傾向がみられることから、パルス磁場勾配 NMR によって測定される拡散係数が水分子の運動性の指標となり、高分子添加剤や糖と水分子の相互作用の評価に適用できることが示唆された。

(3) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

リポソームの PEG 脂質による表面修飾と表面電位、水和状態との関係を調べた。

各リポソームにおいては、PEG 修飾率が高くなると表面電位は低下する傾向が見られた。

蛍光標識したリポソームの蛍光強度から導き出される GP 値は水和状態の指標とされており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。PEG 脂質で 1~10%修飾した OH-Chol リポソームにおいては、1%と 5%で GP 値が低下した(Fig. 10 A, B)。DOTAP / DOPE / DSPE-PEG リポソームでは、GP 値が OH-Chol リポソームより全体に低くなった(Fig. 10 C)。これは、DOTAP / DOPE のリポソームの 4 級アミンが水和しやすいためと考えられる。

OH-Chol リポソームの GP 値を超純水と PBS 中で測定したとき、PBS 中の方が水中より GP 値は高くなった。これは PBS 中に含まれるイオンが正電荷脂質に対して脱水和作用を引き起こしたためと考えられる (Fig. 11)。

次に、このリポソームおよびリポプレックスの GP 測定を行った (Fig. 12)。リポプレックスは荷電比 $+/- = 3/1$ となるように調製した。PEG 未修飾では DNA との混合直後に凝集が観察されたため、調製できた 1.0%、1.5%、5%PEG 修飾のリポプレックスにおいて GP 値の測定を行った。リポソームとリポプレックスの GP 値を比較すると、リポプレックスの GP 値のほうが高くなり、脱水和することがわかった。

このリポソームおよびリポプレックスの誘電緩和時間測定を行ったところ、PEG 修飾リポソームとリポプレックスにおいては、PEG 修飾量が増加するとともに緩和時間の減少が見られ、脱水和する傾向が観察された (Fig. 13)。これは、Fig. 12 より PBS 中で測定した GP 値から、5%PEG 修飾リポプレックスは脱水和しているという結果と一致した。

D. 考察

(1) 凍結乾燥製剤中のインスリンの分子運動性と安定性との関連

種々の糖を添加剤として用いたインスリンの凍結乾燥製剤について、インスリンの残存量の時間変化から分解速度を見積もったところ、糖の安定化効果は保存温度や凍結乾燥前の水溶液の pH の影響を受けることが明らかになった。今後、インスリンのカルボニル炭素の緩和時間と分解速度との間の関連を明らかにし、緩和時間に基づく安定性予測の可能性を検討する。

(2) パルス磁場勾配 NMR による水の拡散係数の測定

パルス磁場勾配 NMR によって得られた水分子の拡散係数と誘電緩和時間の間には関連がみられた。これらの測定原理の異なる運動性パラメータを相補的に使用することにより、高分子添加剤や糖と水分子との相互作用をより詳細に解析できるようになると考えられる。今後、水分子の拡散係数に及ぼす濃度、温度の影響を検討し、有用性を明らかにする。

(3) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

遺伝子導入用リポソームベクターでは、一般にカチオン性脂質が用いられている。アニオン性の pDNA とリポプレックスを作り、なおかつアニオン性電荷をもつ細胞と相互作用させるために、カチオン性リポソームと pDNA の (+/-) 荷電比を調整してカチオン性に行っている。従って、このカチオン性脂質のリポプレックスにおいては、pDNA とリポソーム脂質膜との強い静電的相互作用により、サイズや表面状態が変化することが知られている。そのため、これまでにはリポプレックスの表面状態は表面電位で評価されてきた。ここでは表面の水和状態を新たな方法で測定することにより、細胞内取り込みに最適なカチオン性リポソームと pDNA の混合比を決定できる可能性を検討した。

まず、カチオン性脂質としては、生体分解性が

高く、pDNA と適度に相互作用をする脂質として、コレステロール誘導体 (OH-Chol) を選択した。リポソームの表面電位は、PEG 脂質の添加によって低下する傾向を示した。これは、OH-Chol の二級アミノ基の解離状態が PEG によって遮蔽されるためと推察された。また、GP 値からみたりポソームの水和状態は、PEG 修飾の増加によって水和する傾向を示し、リポプレックスでは脱水する傾向を示した。

誘電緩和時間測定からも、PEG 修飾リポソームにおいて、PEG 修飾が増加すると水和し、そのリポプレックスにおいては脱水する傾向がみられた。GP 値は蛍光物質の分布するカチオン性脂質の極性基近傍の水和状態を反映している。誘電緩和時間は溶液中の水分子の平均の動きを反映しており、カチオン性脂質の極性基に水和した水分子と PEG 鎖に水和した水分子も緩和時間の増加に寄与していると推察される。したがって、リポソーム全体の水和状態を反映すると考えられる。

E. 結論

(1) 凍結乾燥製剤中のインスリンの安定性に及ぼす糖の影響は凍結乾燥前の水溶液の pH や保存温度に大きく依存し、pH4.0 の水溶液から凍結乾燥した場合、50°C、60°C 保存においては検討した糖の中でスタキオースが最も大きな安定化効果を示し、スクロースは安定化効果を示さなかった。40°C 保存ではスクロースとスタキオースは同程度の安定化効果を示した。一方、pH7.0 の水溶液から凍結乾燥した場合、60°C 保存において、スクロースが最もインスリンを安定化した。

(2) 糖や高分子医薬品添加剤の水溶液についてパルス磁場勾配 NMR によって測定した水分子の拡散係数は誘電緩和時間と関連することが明らかになった。

(3) 誘電緩和時間は、PEG 修飾リポソームとリポソーム/pDNA 複合体のカチオン性の極性基と PEG 鎖長の全体の水和状態を示すパラメーター

となることが示唆された。この測定法は、PEG修飾リポソームの表面水和状態の解明に有用となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshioka S., Forney K. M., Aso Y., Pikal M. J.: Effect of Sugars on the Molecular Motion of Freeze-dried Protein Formulations Reflected by NMR Relaxation Times. *Pharm. Res.*, accepted.
- 2) Miyazaki T., Aso Y., Kawanishi T.: Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of amorphous solids with and without polymers. *J. Pharm. Sci.*, accepted.
- 3) Miyazaki T., Aso Y., Yoshioka S., Kawanishi T.: Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP. *Int. J. Pharm.*, **407**, 111-118(2011).
- 4) Yoshioka, S., Aso Y.: Molecular Mobility of Freeze-Dried Formulation as Determined by NMR Relaxation times, and Its Effects on Storage Stability. Chap.13. In *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 3rd Ed., Rey, L., May, J.C., Eds. Informa Healthcare, London, pp. 354-371. (2010).
- 5) Wang, B., Cicerone, M. T., Aso, Y., Pikal, M. J.: The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.*, **99**, 683-700 (2010).
- 6) K. Kawano, Y. Maitani, Tumor permeability of nanocarriers observed by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *Yakugaku Zasshi*, **130**(12), 1679-1685 (2010).
- 7) K. Shiraishi, K. Kawano, Y. Maitani, Yokoyama M. Polyion complex micelle MRI contrast agents from poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine) block copolymers having Gd-DOTA: preparations and their control of T₁-relaxivities and blood circulation characteristics. *J Control Release*, **148**, 160-167 (2010).
- 8) Y. Hattori, N. Kanamoto, K. Kawano, H. Iwakura, M. Sone, M. Miura, A. Yasoda, N. Tamura, H. Arai, T. Akamizu, K. Nakao, Y. Maitani, Molecular characterization of tumors from a transgenic mice adrenal tumor model: Comparison with human pheochromocytoma, *International Journal of Oncology*, **37**:695-705 (2010).
- 9) Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Minowa, T. Sugino, Y. Shimojo, Y. Maitani, Enhanced Antitumor Efficacy of Folate-linked Liposomal Doxorubicin with TGF- β Type I Receptor Inhibitor, *Cancer Science*, **101**, 2207-2213 (2010).
- 10) A. Hioki, A. Wakasugi, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani, Development of an In Vitro Drug Release Assay of PEGylated Liposome Using Bovine Serum Albumin and High Temperature, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1466-1470 (2010).
- 11) Y. Maitani, Lipoplex formation using liposomes prepared by ethanol injection. *Methods Mol Biol.*, **605**, 393-403 (2010).
- 12) Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga, Y. Maitani, Increase of therapeutic effect by treating nasopharyngeal tumor with combination of HER-2 siRNA and paclitaxel, *International Journal of Oncology*, **36**: 1039-1046 (2010).
- 13) K. Koga, Y. Hattori, M. Komori, R. Narishima, M. Yamasaki, M. Hakoshima, T. Fukui, Y. Maitani, Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis, *Cancer Science*, **101**: 941-947 (2010).
- 14) H. Ma, K. Shiraishi, T. Minowa, K. Kawano, M. Yokoyama, Y. Hattori, Y. Maitani, Accelerated blood clearance was not induced for a gadolinium-containing PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle in mice, *Pharm. Res.*, **27**, 296-302 (2010).

2. 学会発表

- 1) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西徹: 加水分解速度の異なる結合を介して架橋したデキストランゲルからのタンパク質の放出制御 日本薬学会第

- 131 年会(2011.3)
- 2) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西徹:非晶質ニフェジピンの核生成速度および結晶成長速度に及ぼす高分子添加剤の影響 日本薬学会第 131 年会 (2011.3)
- 3) Aso, Y., Miyazaki, T., Yoshioka, S., Kawanishi, T.: Correlation between storage stability of lyophilized beta-galactosidase and molecular mobility as determined by ^{13}C -NMR relaxation time. Pharmaceutical Sciences World 2010 Congress in Association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
- 4) Forney, K., Yoshioka, S., Aso, Y., Pikal, M.: Effect of sugars on molecular dynamics of lyophilized protein formulations, as determined by ^{13}C NMR relaxation times. Pharmaceutical Sciences World 2010 Congress in Association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
- 5) Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Different polymer content dependence between the nucleation rate and the crystal growth rate in amorphous nifedipine solid dispersions with PVP or HPMC. Pharmaceutical Sciences World 2010 Congress in Association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
- 6) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: ^{13}C -CP/MAS NMR および熱刺激電流測定による乳糖水和物粉砕品の結晶性の検討 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5)
- 7) 若杉亜以, 浅川真澄, 小木曾真樹, 清水敏美, 米谷芳枝 オーガニックナノチューブを用いた新規ドラッグデリバリーシステムの構築 SORST シンポジウム(4) (2010. 1)
- 8) 服部喜之, 金本巨哲, 川野久美, 岩倉浩, 赤水尚史, 中尾一和, 米谷芳枝 副腎腫瘍自然発症遺伝子改変マウスの DNA マイクロアレイによる遺伝子解析 第 83 回日本内分泌学会 (2010.3)
- 9) 川野久美, 服部喜之, 岩倉浩, 赤水尚史, 米谷芳枝 副腎腫瘍発症遺伝子改変マウスに対する抗癌剤微粒子製剤と分子標的薬の併用治療効果 第 83 回日本内分泌学会(2010.3)
- 10) 川野久美, 米谷芳枝 DCE-MRI を用いた TGF- β 阻害剤併用時の微粒子製剤の腫瘍移行性評価 日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 11) 泉澤友宏, 服部喜之, 戸潤一孔 米谷芳枝 プロテオグリカンを介したデカアルギニン脂質/DNA 複合体の細胞内取り込み 日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 12) 岩瀬由布子, 米谷芳枝 オクトレオチド修飾リポソーム製剤の調製と *in vitro* 評価日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 13) 若杉亜以, 浅川真澄, 小木曾真樹, 清水敏美, 米谷芳枝 オーガニックナノチューブの薬物キャリアーへの応用日本薬学会 第 130 年会 (2010.3)
- 14) 尾上裕貴, 林京子, 李貞範, 米谷芳枝, 甲斐敬, 林利光 単純ヘルペスウイルス感染症治療におけるポリエチレンイミンの特性日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 15) 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝 アンジオテンシン II による昇圧下でのリポソーム製剤の腫瘍集積性の検討日本薬学会 第 130 年会 (2010.3)
- 16) 勢子祐貴, 服部喜之, 米谷芳枝 スニチニブ封入リポソーム製剤のラット副腎髄質褐色細胞腫担癌ヌードマウスに対する評価 日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 17) 中野宏樹, 置田裕子, 石井佑太, 長岡康夫, 上里新一, 服部喜之, 米谷芳枝 新規遺伝子発現増強剤 DDTS-K-182 日本薬学会 第 130 年会 (2010.3)
- 18) Kanamoto, N., Takeuchi, Y., Hattori, Y., Yoshida, M., Kondo, E., Yamada, G., Fujii, T., Saijo, M., Nambu, T., Miura, M., Yasoda, A., Arai, H., Maitani, Y. and Nakao, K. Expression of folate receptor type α gene in thyroid papillary carcinoma 第 14 回国際内分泌学会 (2010.3)
- 19) 中村太郎, 川野久美, 白石貢一, 横山昌幸, 米谷芳枝 腫瘍ターゲティング脂質微粒子 MRI 造影剤の調製と評価 第 5 回日本分子イメージング学会(2010.5)
- 20) 白石貢一, 川野久美, 米谷芳枝, 横山昌幸 高分子ミセル MRI 造影剤と ABC 現象の検証 第 5 回日本分子イメージング学会(2010.5)
- 21) 田中拓海, 阿曾幸男, 米谷芳枝 リポソームの表面水和状態と細胞内取り込み 日本薬剤学会 第 25 年会 (2010.5)
- 22) 田中拓海, 服部喜之, 米谷芳枝 アンジオテンシン II 昇圧下における正電荷リポソームの癌遺伝子送達 第 26 回日本 DDS 学会 (2010. 6)
- 23) 加藤真子, 服部喜之, 米谷芳枝 静脈内投与したリポプレックスの腫瘍集積性に及ぼすコラゲナーゼ処理の影響 第 26 回日本 DDS 学会 (2010. 6)
- 24) 坪田結香, 川野久美, 米谷芳枝 血中滞留性リポソームの腫瘍集積性に対する VEGF 受容体

阻害剤の併用効果 第 26 回日本 DDS 学会
(2010. 6)

25) 荒金大介, 中澤裕太, 泉澤友宏, 宮下久徳,
石垣賢二, 林京子, 甲斐敬, 米谷芳枝 抗ウイル
ス剤ポリエチレンイミン(PEI)の弱毒化を目的
としたリポソーム及びキトサンの併用効果 第
26 回日本 DDS 学会 (2010. 6)

26) 白石貢一, 馬会利, 川野久美, 米谷芳枝, 横
山昌幸 高分子ミセル MRI 造影剤の頻回投与に
よる ABC 現象への影響と診断への有用性第 26
回日本 DDS 学会 (2010. 6)

27) 白石貢一, 馬会利, 川野久美, 米谷芳枝, 横
山昌幸 高分子ミセルキャリア内核の影響によ
る ABC 現象の発現と回避性 第 26 回日本 DDS
学会 (2010. 6)

28) 渡辺 和男, 金子 洵, 米谷 芳枝 葉酸修飾ポ
リ-L-リシンコートリポソームの調製と細胞へ
の取り込み評価 第 26 回日本 DDS 学会 (2010.
6)

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

DOPE : $R_1 = C18:1$ $R_2 = C18:1$

DSPE : $R_1 = C18:0$ $R_2 = C18:0$

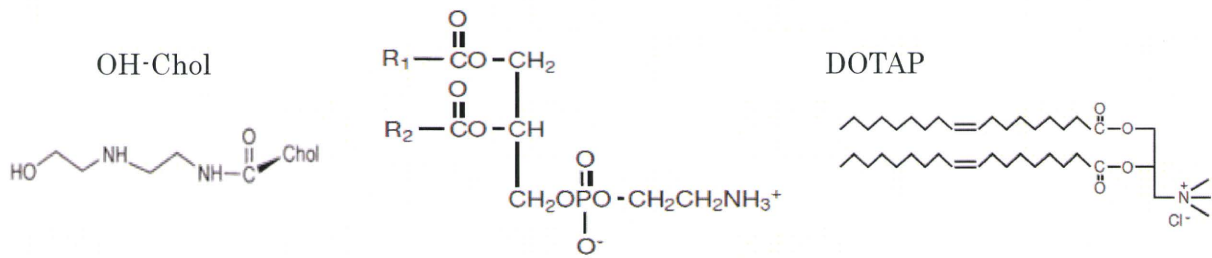


Fig. 1 Chemical structures of lipids

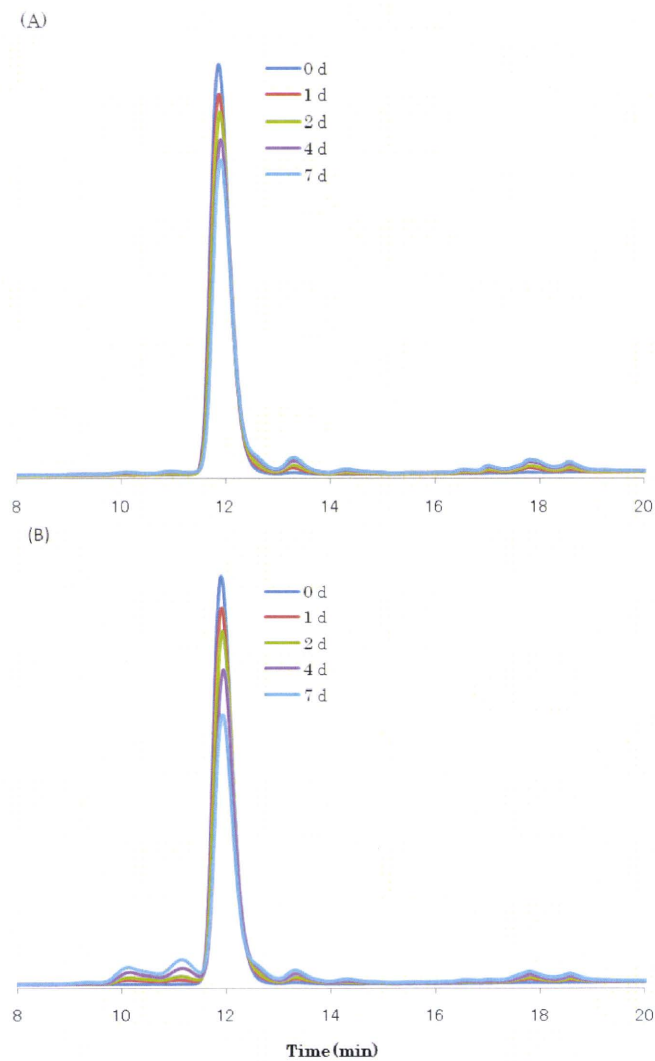


Fig.2. RP-HPLC chromatograms of insulin in lyophilized formulations (pH 4.0) after storage at 60 °C.

(A): Insulin formulation without sugar. (B): Insulin formulation with sucrose.

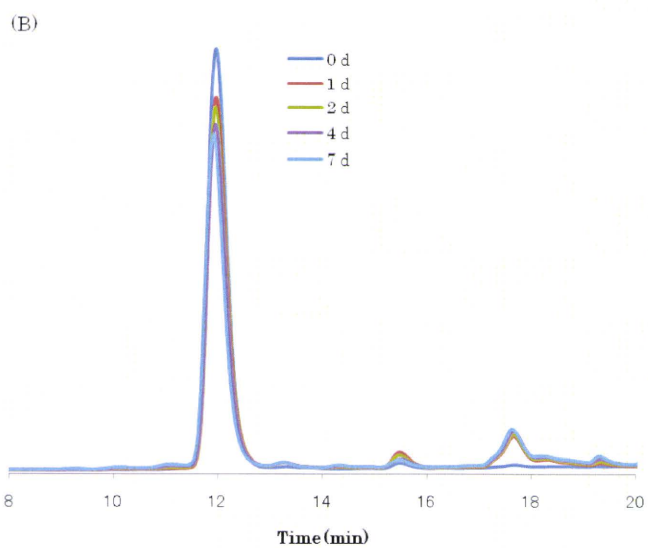
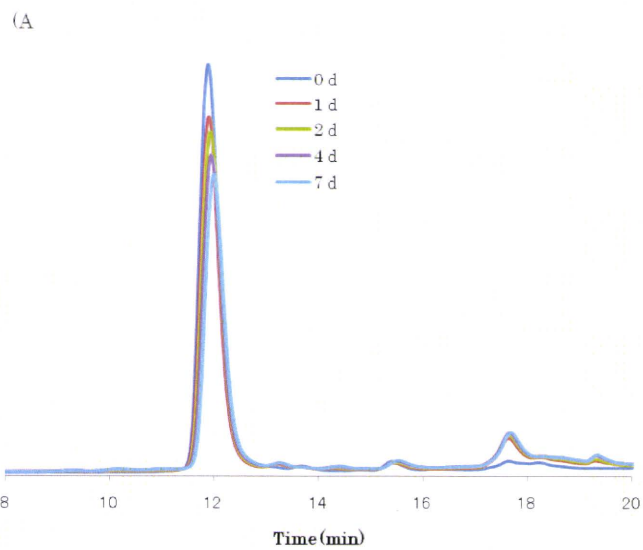


Fig.3. RP-HPLC chromatograms of insulin in lyophilized formulations (pH4.0) after storage at 60 °C.

(A): Insulin formulation without sugar. (B): Insulin formulation with sucrose.

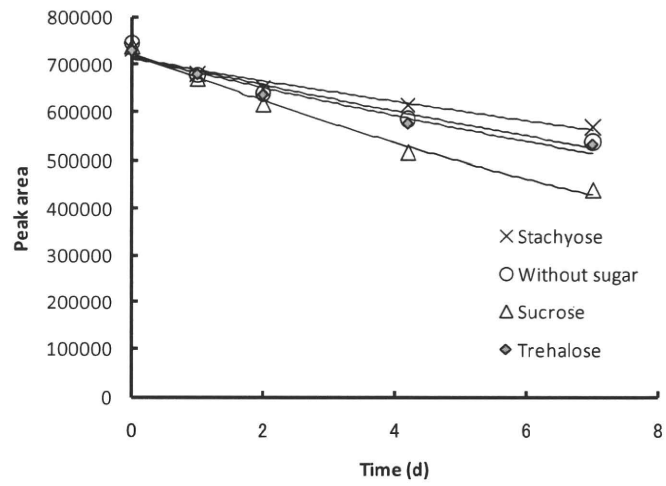


Fig.4. Degradation of insulin in lyophilized formulations (pH 4.0) with sugars at 60 °C.

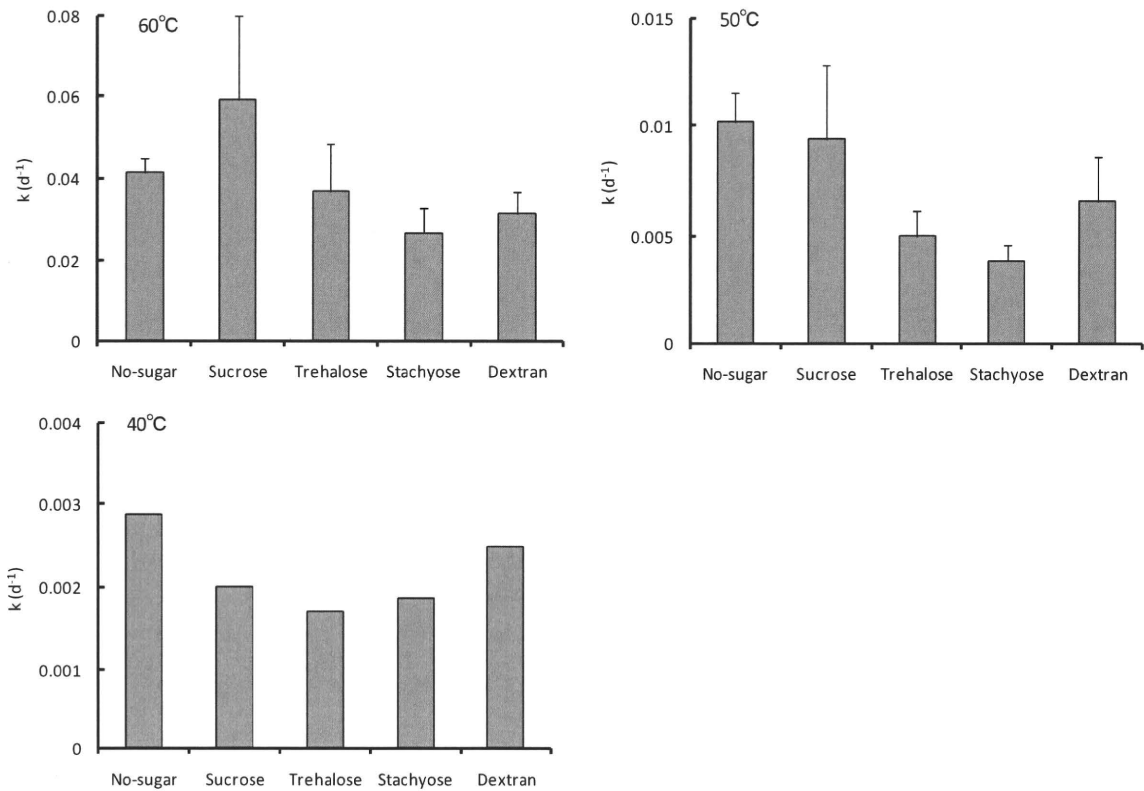


Fig.5. Effect of excipients on the degradation rate of insulin in lyophilized formulations (pH 4.0).

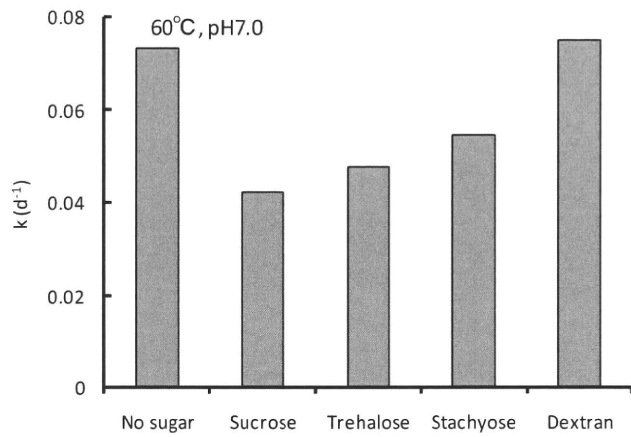


Fig.6. Effect of excipients on the degradation rate of insulin in lyophilized formulations (pH 7.0).

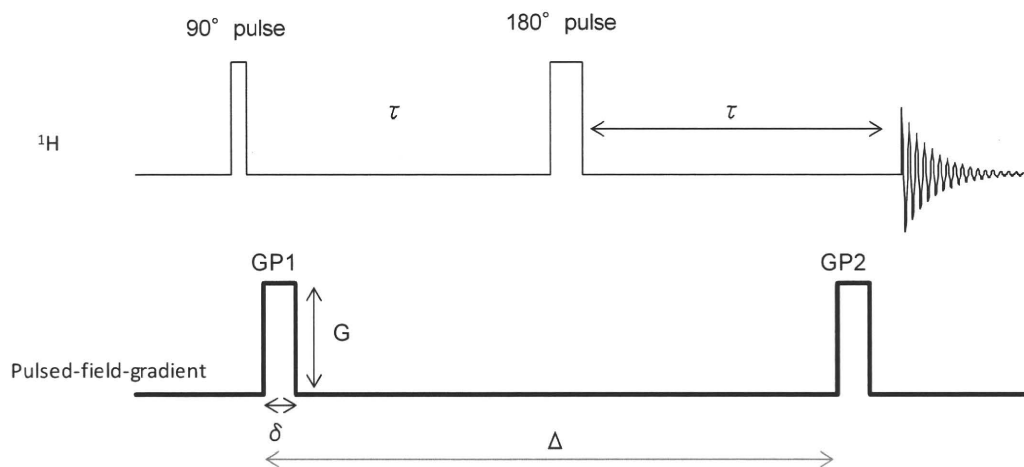


Fig.7. Pulse sequence for diffusion measurements.

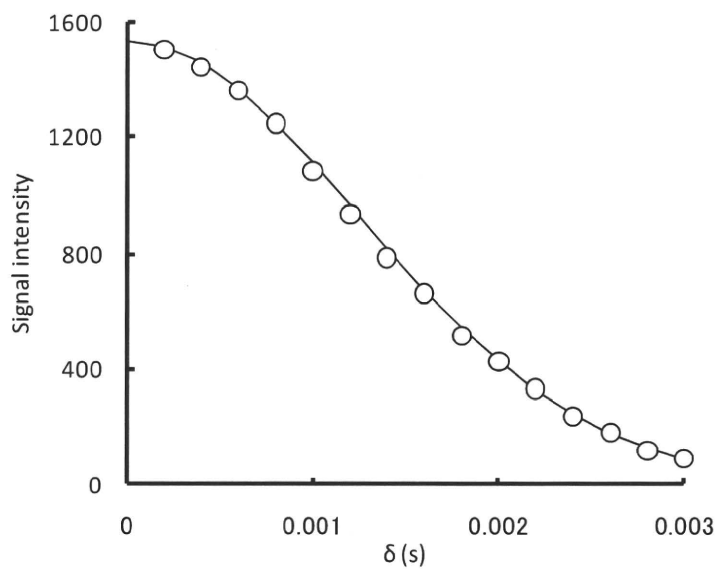


Fig.8. Signal intensity of water protons as a function of width of field-gradient pulse.

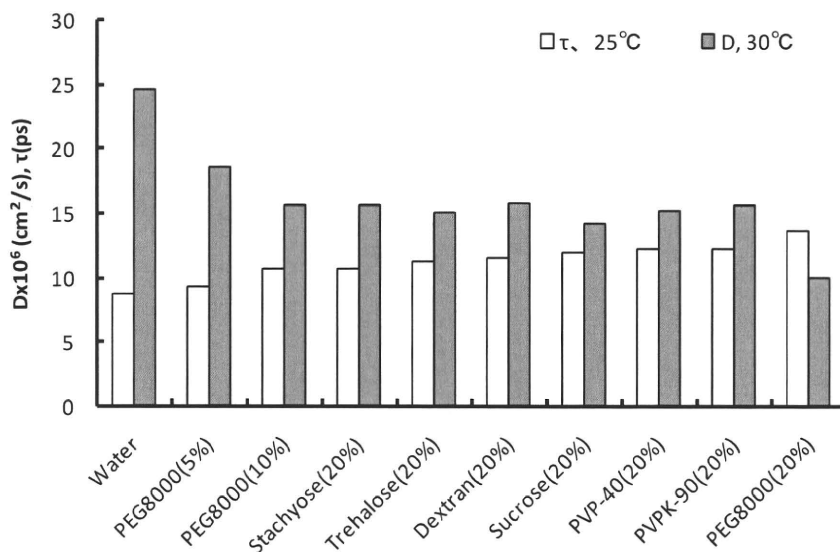
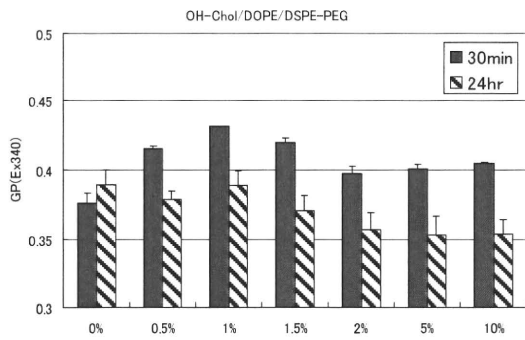
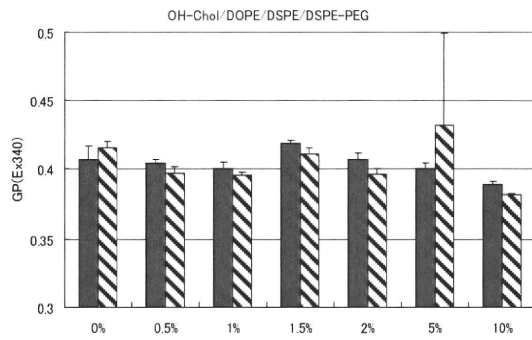


Fig.9. Comparison between diffusion coefficient (D) and relaxation time (τ) of water

A



B



C

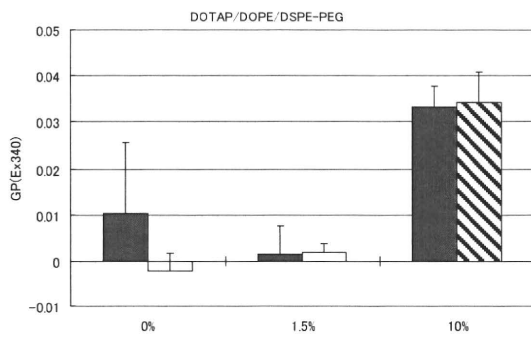


Fig. 10. The change of surface hydration of various PEGylated liposomes as monitored by laurdan generalized polarization(GP) 30 min and 24 hr after dilution with PBS

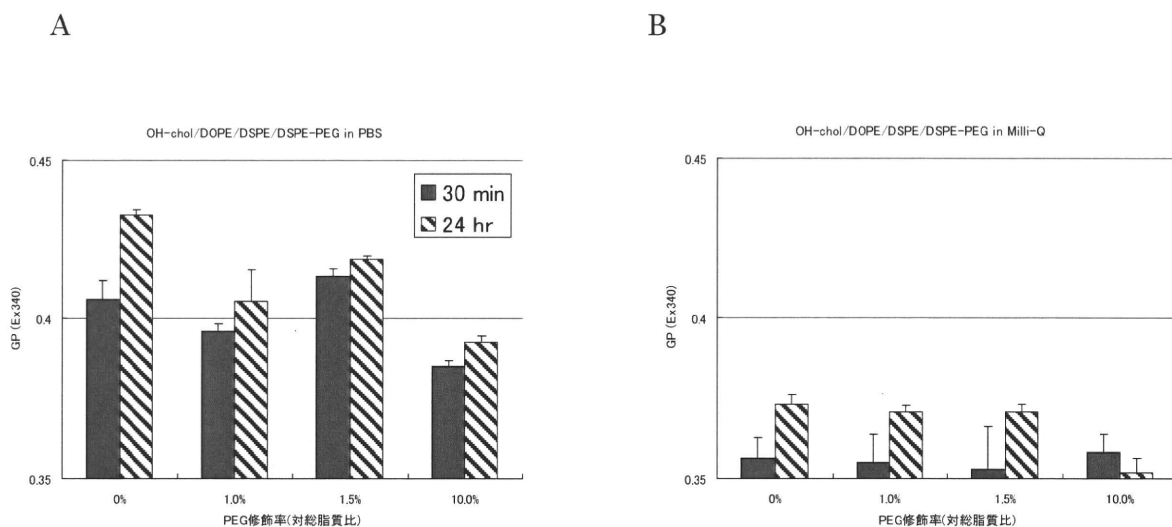


Fig. 11. The change of surface hydration of OH-Chol:DOPE:DSPE:DSPE-PEG₂₀₀₀ liposomes as monitored by laurdan generalized polarization(GP) 30 min and 24 hr after dilution with PBS (A) or Milli-Q water (B)

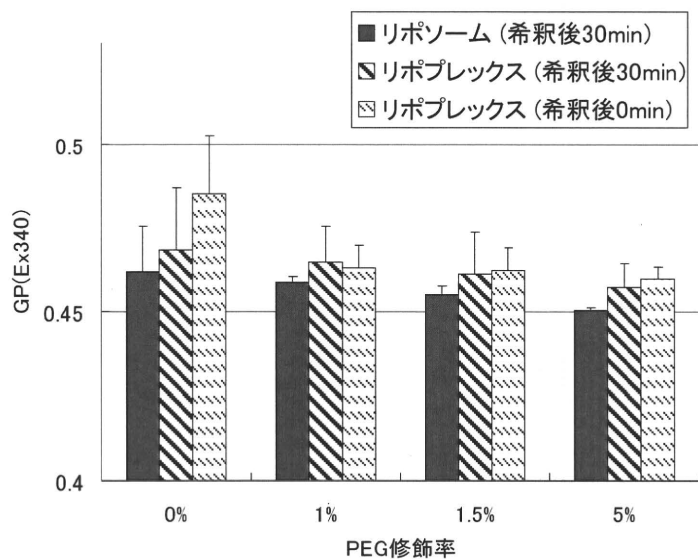


Fig. 12. The change of surface hydration of OH-Chol:DOPE:DSPE:DSPE-PEG₂₀₀₀ liposomes and their lipoplexes as monitored by laurdan generalized polarization(GP) 0 min or 30 min after dilution with PBS

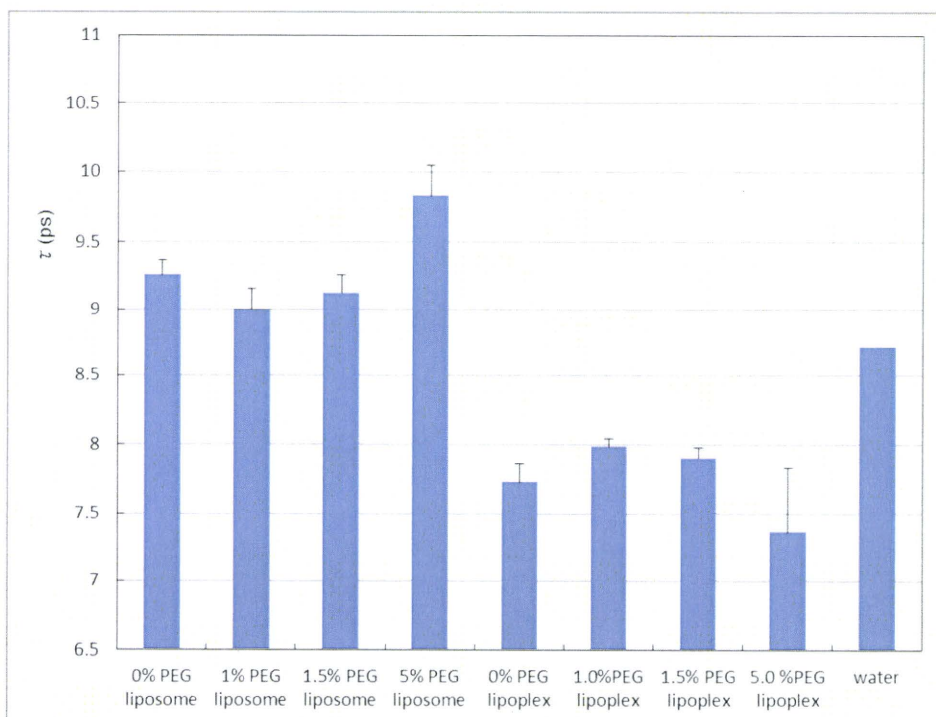


Fig. 13. Dielectric relaxation of OH-Chol:DOPE:DSPE:DSPE-PEG₂₀₀₀ liposomes and their lipoplexes in Milli-Q water

PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所 教授

現在、遺伝子導入用リポソーム製剤は、安全性は高いが遺伝子導入効率が低いのが問題となっている。遺伝子導入効率を改善するために、リポソームの表面改質が行なわれている。本研究では PEG 脂質を用いて表面修飾したリポソームとプラスミド DNA との複合体（リポプレックス）の表面水和状態を、蛍光物質を用いた蛍光測定と誘電緩和時間測定から検討した。蛍光測定と誘電緩和時間測定の結果から、PEG 修飾リポソームの表面状態は水和し、リポプレックスになると脱水和する傾向がみられた。誘電緩和時間は、リポソームおよびそのリポプレックスの水和状態の新たなパラメーターとなることが示唆された。

A. 研究目的

現在、正電荷リポソームはプラスミド DNA と複合体（リポプレックス）を調製し、遺伝子導入用ベクターとして用いられている。また、遺伝子導入効率を上げるために、リポソームの表面改質がされている。PEG 脂質でリポソームを修飾すると、未修飾のリポソームに比べて細胞内への取り込みが低下することが報告されており、これはリポソーム表面が PEG 修飾によって水和されるためと説明されている。本研究では、PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態を、蛍光物質を用いた蛍光測定と誘電緩和時間測定から検討した。

私たちはこれまでに、界面活性剤で修飾したリポソームの粒子サイズと表面電位から、そのリポプレックスの表面状態と細胞内取り込みを評価してきた。そこで、本年度はリポソームの表面水和に最もよく用いられる PEG 脂質で修飾したリポソームおよびそのリポプレックスの表面の水和状態に焦点をあて、蛍光標識による GP (generalized polarization) 測定と水の誘電緩和時間測定の二つの方法から検討を行った。これらの結果は、遺伝子導入用リポソームベクターの開発の上で新しい知見を与え、物性を測定することによってリポソームとプラスミド DNA (pDNA)

の最適混合比の予測が可能となることが期待される。

B. 研究方法

リポプレックスの調製

カチオン性脂質としては、二級のアミノ基と末端にヒドロキシル基を有し、コレステロールと結合した OH-Chol と四級のアミノ基 DOTAP を、中性のヘルパー脂質として DOPE を、PEG 脂質として分子量 2000 を用いた(Fig. 1)。脂質濃度 4.5mM で OH-Chol / DOPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:0.2、脂質濃度 5.6mg/mL)、OH-Chol / DOPE / DSPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:x:0.2 - x、脂質濃度 5.6mg/mL)、DOTAP / DOPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:0.2、脂質濃度 7.0mg/mL)の3種類のリポソームを薄膜法にて調製し、超音波を照射して粒子径を約 160nm にした。

pDNA としては、プラスミド DNA pCMV-luc を用いた。カチオン性リポソームと DNA の(+/-) 荷電比は、3/1、5/1 として室温で5分間インキュベーションをしてリポプレックスを調製した。20 μ L のリポプレックスを超純水、または PBS 2mL で希釈し、希釈直後および希釈 30 分後に GP 値の測定を行った