

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790046

研究課題名（和文） 誘電泳動法による高機能性製剤の評価技術の開発

研究課題名（英文） Studies on evaluating quality of highly-functional pharmaceuticals using dielectrophoresis

研究代表者 加藤 くみ子 (SAKAI-KATO KUMIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・室長

研究者番号：10398091

研究成果の概要（和文）：

本研究は、誘電泳動法を利用しナノ粒子製剤に含有される薬物量によりナノ粒子を分離及び精製する手法を開発することを目的とした。交流電圧を印加し誘電泳動の誘起条件を変化させるところ薬物の有無でキャリアの電極への集積速度が異なることが明らかとなり、誘電泳動現象によりキャリアに内包される薬物量の違いにより、ナノ粒子製剤を分離できる可能性が示唆された。さらに本現象をクロマトグラフィー法へ適用するためにモノリス型カラムによるナノ粒子製剤の分離を行った。

研究成果の概要（英文）：It was found that the dielectrophoresis induced by alternating voltage could differentiate the accumulation rates of nano-meter sized drug carriers depending on the existence of the incorporated drugs. We also tried to analyze the nano-meter sized drug carriers using monolithic capillary column in order to apply the dielectrophoresis to chromatography.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	0	2,100,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医薬品評価科学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ナノ DDS 製剤、誘電泳動、モノリス型カラム、分析化学

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノメートルサイズの薬物キャリアに薬物を内包し、生体内安定性、放出性、標的指向性、体内動態等を調節することにより、生体内での作用を空間的、時間的に調節し、有効性、安全性を高める製剤技術の重要性が増している。このような高機能性製剤については、近年バイオテクノロジー、あるいはナ

ノテクノロジーなどの周辺技術の進展を背景に、研究・開発が活発化され、臨床試験実施中の製剤も相当数にのぼる。しかしながら、これら高機能性製剤については、製品としての品質基準は明確にされていない。

1つ1つのナノ粒子 DDS 製剤の中に有効性を有する薬物が均一に含有されていることが必要となるが、これを評価する手法は存

在しておらず、すべてに均一に含有されているという前提で、動物試験等の前臨床試験、および臨床試験が実施されているのが現状である。誘電泳動法はナノ粒子の分析法に適していることに加え、その分離機構には粒子全体の誘電率が影響するため、中性粒子でも分極すれば分離可能となり、適用範囲が広い(図1)。高分子ミセルの表面はPEGなど中性分子で覆われていることが多いため、高分子ミセルをその薬物量により分離する手法には誘電泳動法が適していると考え、本研究課題の着想に至った。

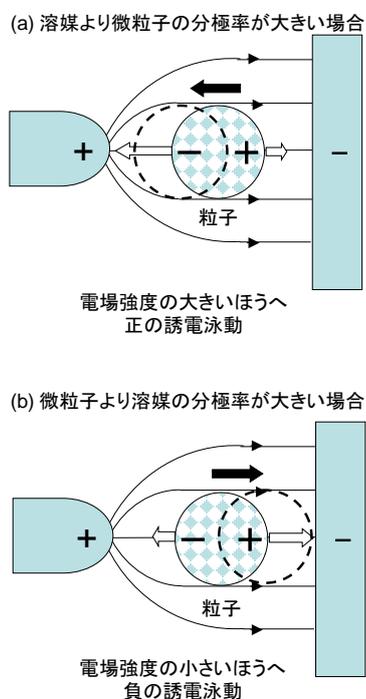


図1 誘電泳動の原理

2. 研究の目的

誘電泳動法を利用し、ナノ粒子 DDS 製剤に含有される薬物量によりナノ粒子を分離及び精製する手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) ナノ粒子製剤に含有される薬物量によ

りナノ粒子を分離する手法

分極率の大きい抗がん剤ドキシソルビシンを内包した高分子ミセルとリポソームを作製した。薬物キャリアに薬物を含む水溶液を加えて薬物を内包させた後、透析等により、薬物を内包したキャリアと内包されなかった薬物を分離した。ナノ粒子製剤は動的光散乱計を用いて粒子径の均一性を確認した。

交流電圧を引加し、キャリアのみ、または薬物を内包させた試料を電極へ集積させ、その速度を求めた。

2) モノリス型カラムを用いたナノ粒子の分離法

カラムには長さ 500mm, 内径 0.2 mm のキャピラリーモノリス型カラムを、移動相には 10mM リン酸緩衝液とメタノールの混液を用いた。

4. 研究成果

1) ナノ粒子製剤に含有される薬物量によりナノ粒子を分離する手法

誘電泳動現象では、塩濃度が大きいと誘電率が増大し測定に大きな影響を及ぼすため、リポソームおよび高分子ミセルにつき、キャリアのみと薬物を内包させたものをそれぞれ超純水で希釈し塩濃度を下げたのち、測定試料とした。交流電圧を印加し誘電泳動を誘起させる際に、周波数および印加時間を変化させたところ、一定の条件において、キャリアのみと薬物を内包したキャリアとで電極への集積速度が異なることが明らかとなった。この結果より、誘電泳動現象によりナノメートルサイズのキャリアに内包される薬物量の違いにより、ナノ粒子製剤を分離できる可能性が示唆された。

2) モノリス型カラムを用いたナノ粒子の分離法

マイクロメートルサイズの貫通孔を有し、試料であるナノ粒子製剤の詰まりを防ぐことも可能なモノリス型カラムによるナノ粒子製剤の分析法を開発した。粒子充填型カラムと比較し空隙率が高いため、ナノ粒子がカラム内に詰まることもなく、カラム負荷圧が低く、カラム長の増加による分離性能の向上が期待できた。シリカナノ粒子、リポソームを試料として分析条件を検討したところ、カラムには中性親水性基であるアミド基で表面修飾したシリカ系モノリス型カラムが良好なピーク性能を可能とした。これは、イオン交換型相互作用に基づく試料の吸着を抑えることが可能であったためと推察され、リポソーム製剤など生体由来物質を主成分とするナノ粒子分析へ応用可能であると考えられる。移動相には pH7 のリン酸緩衝液とメタノールの混液が適していた (図2)。また、カラムのスケールアップによる分取・精製も可能であると考えられる。今後、誘電泳動現象をクロマトグラフィー法へ適用することにより、汎用性の高いナノ粒子製剤の解析・分離手法を確立できると考えられる。

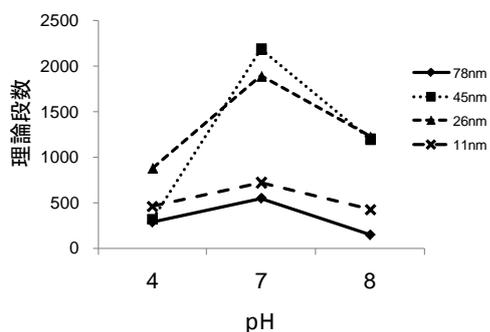


図2 ピーク性能に及ぼす移動相 pH の影響
試料: 11, 26, 45, 78 nm のシリカナノ粒子

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Sakai-Kato, K., Hasegawa, T., Takaoka, A., Kato, M., Toyooka, T., Utsunomiya-Tate, N., Kawanishi, T. “Controlled structure and properties of silicate nanoparticle networks for incorporation of biosystem components” *Nanotechnology* 22, 205702 (2011). 査読有。
- (2) 加藤くみ子 “ナノテクノロジーを応用した製剤に関する評価とその課題” 薬剤学、**71**, 114-117 (2011) 査読無。
- (3) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T. “Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography” *J. Chromatogr. B* **878**, 1466-1470, (2010). 査読有。
- (4) Sakai-Kato, K. “Development of high-performance analytical methods using biomolecules encapsulated in silicate nanomaterials.” *Chromatography* 31, 17-22, (2010). 査読有。
- (5) 加藤くみ子 “高機能性DDS製剤の品質特性評価研究” *PharmStage* vol 9 No.9 1-2 (2009). 査読無。
- (6) Sakai-Kato, K., Ishikura, K. “Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology.” *Analytical Sciences* **25**, 969-984, (2009). 査読有。

[学会発表] (計 9 件) (うち招待講演計 3 件)

- (1) 加藤くみ子, 水端美保, 大島裕希, 川西徹 “製剤に用いられるシリカナノ粒子の物性評価に関する研究” 日本薬学会第

- 131 年会、(静岡) (平成 23 年 3 月 29 日)
- (2) 加藤くみ子, 齋藤栄子, 竹内豊英, 川西徹 “モノリス型キャピラリーカラムを用いたナノ粒子のサイズ分離手法の開発”
第 21 回 クロマトグラフィー科学会議 (西宮) (平成 22 年 10 月 23 日)
- (3) Sakai-Kato, K., Kawanishi, T., “Current initiatives in Japan for nanomedicines”, First international workshop on nanomedicines, European Medicines Agency, London (招待講演 3 September 2010)
- (4) 加藤くみ子, 齋藤栄子, 石倉恵子, 川西徹, “ナノ粒子製剤のサイズ特性評価に関する検討”
第 26 回日本 DDS 学会学術集会 (大阪) (平成 22 年 6 月 17 日)
- (5) 加藤くみ子, 石倉恵子, 鈴木琢雄, 多田稔, 石井明子, 山口照英, 川西徹 “ナノ粒子 DDS 製剤の細胞内動態評価に関する基礎的研究” 日本薬剤学会第 25 回年会 (徳島) (平成 22 年 5 月 14 日)
- (6) 加藤くみ子, 齋藤栄子, 石倉恵子, 川西徹 “超高速 LC を用いたドキシソルピシン内包 DDS 製剤の体内動態評価に向けた研究”
第 130 回日本薬学会年会 (岡山) (平成 22 年 3 月 29 日)
- (7) 加藤くみ子 “生体物質の機能解析と高性能分離分析法への応用” 第 20 回クロマトグラフィー科学会議 (東京) (招待講演 平成 21 年 11 月 12 日)
- (8) 加藤くみ子, 石倉恵子, 鈴木琢雄, 石井明子, 山口照英, 川西徹 “ナノ粒子 DDS 製剤の細胞内動態可視化に関する基礎的研究” 第 18 回日本バイオイメージング学会学術集会 (岡山) (平成 21 年 9 月 3 日)
- (9) 加藤くみ子 “高機能性製剤の品質評価法

の開発” 第 22 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(岐阜) (招待講演、平成 21 年 7 月 16 日)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nihs.go.jp/drug/DrugDiv-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 くみ子 (SAKAI-KATO KUMIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・
室長

研究者番号：10398091