

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790044

研究課題名（和文） 新規経口アルブミン製剤の設計と評価

研究課題名（英文） Preparation and evaluation of novel oral albumin formulation

研究代表者

岩尾 康範（IWAO YASUNORI）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30433022

研究成果の概要（和文）：

本研究は、遺伝子組換え技術及びエマルジョン技術を駆使して、“新規経口アルブミン製剤”を開発することを目的として企図された。部位特異的変異法によりアルブミン変異体を作製し、小腸上皮細胞への透過性を評価した結果、ドメインⅢのアミノ酸を変異させたものが膜透過性は高く、かつ、それを用い調製したナノ粒子においても有意な透過性の増大が認められた。したがって、本手法により小腸上皮細胞への透過性に優れたHSA変異体ナノ粒子の作製が可能になるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we aimed to develop a novel oral albumin formulation with high permeability to the intestinal membrane by using a combination of site-directed mutagenesis and emulsion method. It was found that domain III mutants showed high permeability from the MDCK cells compared with other mutants. In addition, as for the nanoparticles prepared by using the multiple mutated albumins, the nanoparticles showed a good permeability compared with control. These results indicate the feasibility of preparation of recombinant albumin nanoparticles with high permeability to the intestinal membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012 年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：製剤学

## 1. 研究開始当初の背景

アルブミン製剤は出血性や外傷性ショック時の循環血漿量の是正、また熱傷やネフローゼ症候群などのアルブミン漏失亢進に伴う補充など、種々の疾患時に汎用されており、近代医療にとって欠かせない医薬品とな

っている。これらの疾患はいずれも緊急性を要するため、実際の臨床の現場においては注射剤として静脈内投与が行われる。一方、慢性的なアルブミン合成能低下を引き起こす肝硬変などにおいてもアルブミンの補充を目的に、アルブミン製剤の静脈内投与が行わ

れているが、患者の QOL や医療コスト削減のためには、注射回数の低減や非注射化が極めて重要であり、経口アルブミン製剤の開発が切望されている。しかしながら、アルブミンを含め、ペプチド、核酸、タンパク質などのバイオ薬物は、一般にその安定性の低さや粘膜透過性の低さが問題となり、経口製剤への応用は極めて難しいと考えられている。近年では、オリゴアルギニンをはじめとしたアルギニンや疎水性アミノ酸残基ペプチド (cell-penetrating peptide (CPP) と呼ばれる) をバイオ薬物と共有結合することで、様々な物質の細胞内への導入を可能にすることが報告されているが、共有結合による薬物の解離が難しく薬物自身の生物活性の低下を引き起こすなど、依然として課題が残る。

## 2. 研究の目的

アルブミンの体内動態は、特異的なアミノ酸残基や部位が大きく影響を及ぼすことが考えられており、遺伝子組換え技術を駆使することで求める体内挙動を示すアルブミン変異体を意のままに作製できると思われる。このことは、消化管上皮細胞における膜透過性に関しても同様であり、膜透過性亢進に関与するアミノ酸残基の詳細を明らかにし、その部位にアルギニンや疎水性アミノ酸残基を導入することができれば、吸収促進 CPP ペプチドなどを利用せずともアルブミンの吸収を上昇させることが可能となる。すなわち本研究は、遺伝子組換え技術を基に、消化管上皮細胞における膜透過性に優れたアルブミン変異体を作製し、さらに消化酵素によるアルブミンの加水分解を抑制するため、粒子径 300 nm 以下のアルブミン変異体—ナノスフェアを調製する。調製したナノスフェアの膜透過性、放出特性、構造・体内動態特性や変異原性の有無を調べ、新規経口アルブミン製剤としての可能性を追求する。

## 3. 研究の方法

### 1. アルブミン 変異体の調製と小腸上皮細胞における膜透過実験

*Yeast-E. coli* のシャトルベクター-pPIC9 上で AOX1 のプロモーター下流にシグナル配列とポリ A 配列を含む HSACDNA を挿入した。これを発現ベクターとし、QuikChange® XL site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE) を用いて部位特異的に変異させた後、このベクターで *Pichia pastoris* (GS115 株) を形質転換し、BMMY 培地培養後、培地上清より 60% 硫酸分画により濃縮を行い、Blue Sepharose CL-6B を用い、アルブミン変異体を精製した。アルブミン変異体[約 40 種]の小腸上皮細胞における膜透過実験を行うために、イヌ腎

臓尿細管上皮細胞 MDCK 細胞を用い、評価を行った。

### 2. アルブミン変異体ナノ粒子の調製と透過性評価

脱溶媒和法に従い、50-100 mg/mL のアルブミン溶液にエタノールを持続滴下することで脱溶媒和し、超高压乳化分散機 Microfluidizer® M110-E/H で処理する事で均一化を行った。その後、8% グルタルアルデヒドを加え粒子を固化することでナノ粒子を得た。また、液中乾燥法により W/O/W のアルブミン変異体—ナノスフェアを作製した。3% w/v poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)/塩化メチレン溶液中に 10% w/v アルブミン変異体を滴下し、sonicator を用いて O/W エマルションを作製した。0.5% polyvinyl alcohol/水溶液中に滴下し、W/O/W のエマルションを作製した。最後に、超遠心機を用いて、100,000 g で遠心分離することで、目的とする平均粒子径 300 nm のナノスフェアを下層に得た。その後、SEM を用いたナノスフェア表面の観察や *in vitro* 放出特性など、種々の物理化学的特性を詳細に検討した。加えて、MDCK 細胞を用い、アルブミン—ナノスフェアの実際の小腸上皮細胞への透過性を検討した。

### 3. 液中乾燥法/新規生分解性合成高分子を用いたマイクロスフェアからの薬物放出挙動解析

液中乾燥法により W/O/W のマイクロスフェアを作製した。3% w/v poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)/塩化メチレン溶液中に 10% w/v アルブミン変異体を滴下し、sonicator を用いて O/W エマルションを作製した。0.5% polyvinyl alcohol/水溶液中に滴下し、W/O/W のエマルションを作製した。最後に、超遠心機を用いて、100,000 g で遠心分離することで、目的とする平均粒子径 300 nm のナノスフェアを下層に得た。その後、SEM を用いた表面の観察や *in vitro* 放出特性など、種々の物理化学的特性を詳細に検討した。

## 4. 研究成果

### 1. 遺伝子組換え 1 残基置換アルブミン変異体の小腸上皮細胞における取り込み解析

部位特異的変異法により、薬物結合に重要なアミノ酸残基をアラニンへ 1 残基置換させた変異体を *Pichia* 酵母により作製し、小腸上皮細胞への透過性を評価した。その結果、ドメイン I と III のアミノ酸を変異させたもの (R410A など) が、若干ではあるが、膜透過性が亢進する傾向にあることが明らかとなった。

## 2. 遺伝子組換えアルブミン変異体を用いた、ナノ粒子の調製と評価

部位特異的変異法を用い作製したアルブミン変異体を用いて、脱溶媒和法に従い、ナノ粒子の調製を行った。ナノ粒子を得た。ナノ粒子の平均粒子径は約 300 nm、ゼータ電位は -5.1 mV であった。どちらも澄明な分散液として安定しており、粒子の凝集を抑制するために十分なゼータ電位の値であったことが推察された。Colon-26 細胞を用いた毒性試験の結果、両ナノ粒子自身による細胞毒性の影響は無いことが確認され、投与した際の生体への影響は極めて小さいことが示唆された。MDCK 細胞を用いた結果、HSA 変異体ナノ粒子ではコントロールと比較し、有意な透過性の増大が認められ、小腸上皮細胞への透過性に優れた HSA 変異体ナノ粒子が作製できる可能性が示唆された。今回調製したナノ粒子は比較的粒子径が大きく、透過性亢進には、その微細化が必須になるものと思われる。今回の結果を基に、統計学的手法を用いた微細化における製造条件の最適化が必要になってくるものと思われる。

## 3. 液中乾燥法/新規生分解性合成高分子を用いたマイクロスフェアからの薬物放出挙動解析

異なる分子量、分子量分布、組成を有する生分解性高分子（乳酸重合体（PLA）、乳酸-グルコール酸重合体（PLGA）、乳酸-ポリエチレングリコールブロック重合体（PLAPEG））15 種を新規に合成し、そのマイクロスフェアを調製後、薬物放出挙動の解析を行った。その結果、分子量が 100 kDa と比較的大きい PLA-3 と分子量が大きく、かつ PEG 組成比が 4% と低い PLAPEG9604 が、最も徐放性を示す優れた高分子であることが明らかとなった。現在、それら結果を基に、統計学的手法を用いて、製造条件の最適化を行っている。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 17 件のうち 10 件）

1. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Giam Chuang VT, Sato K, Otagiri M, Maruyama T. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. *Biochemical Pharmacology*, 84, 1207-1214 (2012).
2. Shiino K\*, Iwao Y\*, Fujinami Y, Itai S.

Preparation and evaluation of granules with pH-dependent release by melt granulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 431, 70-77 (2012) (\*: Equal contribution).

3. Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*, 64, 450-454 (2012).
4. Otsuka T\*, Iwao Y\*, Miyagishima A, Itai S. Application of principal component analysis enables to effectively find important physical variables for optimization of fluid bed granulator conditions *International Journal of Pharmaceutics*, 409, 81-88 (2011) (\*: Equal contribution).
5. Uchimoto T\*, Iwao Y\*, Takahashi K, Tanaka S, Agata Y, Iwamura T, Miyagishima A, Itai S. A comparative study of glycerin fatty acid ester and magnesium stearate on the dissolution of acetaminophen tablets using the analysis of available surface area. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78, 492-498 (2011) (\*: Equal contribution).
6. Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Repeated injection of high doses of hemoglobin encapsulated liposomes (hemoglobin-vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metabolism and Disposition*, 39, 484-489 (2011).
7. Umeki N, Sato T, Harada M, Takeda J, Saito S, Iwao Y, Itai S. Preparation and evaluation of biodegradable films containing the potent osteogenic compound BFB0261 for localized delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, 10-18 (2011).
8. Shiino K\*, Iwao Y\*, Miyagishima A, Itai S. Optimization of a novel wax matrix system using aminoalkyl methacrylate copolymer E and ethylcellulose to suppress the bitter taste of acetaminophen. *International Journal of Pharmaceutics*, 395, 71-77 (2010) (\*: Equal contribution)
9. Miyamoto Y\*, Iwao Y\*, Tasaki Y, Sato K, Ishima Y, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. *FEBS*

Letter, 584, 2816-2820 (2010) (\*: Equal contribution)

10. Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Maeda H, Nakajou K, **Iwao Y**, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M, Otagiri M. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics. *Journal of Control Release*, 145, 9-16 (2010)

[学会発表] (計 69 件のうち 10 件)

1. **岩尾康範**, 木村晋一郎, 石田将之, 宮城島惇夫, 板井茂. 遠心転動造粒法における微小球形粒子の製造に関する研究 (I) ~乳糖/デンプン混合粉体の製造条件の最適化~. 日本薬学会第 25 年会. 徳島. 05/14. 2010
2. 石田武浩, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂. 炎症性腸疾患治療を目的とした新規ワックスマトリックス製剤の設計と評価. 第 21 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 23 年度日本薬学会東海支部例会 (愛知) 2011 年 11 月 23 日.
3. 石田将之, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂. "薬物高含有微小球形粒子の製造と評価—遠心転動造粒装置における製造条件の最適化" 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 30 日.
4. 内本武亮, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂. "攪拌溶解造粒法を用いた微小球形粒子の調製" 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 31 日.
5. 山田尚樹, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂. "薬物高含有微小球形粒子の製造と評価—遠心転動造粒装置における製造条件の最適化" 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 31 日.
6. 舟越由香, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂. "凍結乾燥脂質ナノ粒子製剤の物性と動態特性に関する研究" 日本薬学会第 132 年会 (札幌) 2012 年 3 月 31 日.
7. 山田尚樹, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂. "多機能型遠心転動造粒装置を用いた微粒子コーティングプロセスの比較検討" 日本薬学会第 27 年会 (神戸) 2012 年 5 月 24 日.
8. **岩尾康範**, 柿沼稔, 野口修治, 板井茂. "界面活性剤の安定性が薬物の溶出性に及ぼす影響" 日本薬学会第 27 年会 (神戸) 2012 年 5 月 26 日.
9. 佐野秀祐, **岩尾康範**, 野口修治, 板井茂, 木村進. "マイクロウェーブによる膨化現象を利用した口腔内崩壊錠の調製と評価" 第 21 回 DDS カンファレンス (静岡) 2012 年 9 月 1 日.
10. **岩尾康範**. "加熱溶解造粒法を用いた新

規製剤開発とその評価" 創剤カンファレンス静岡 (静岡), 2012 年 12 月 14 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: クラリスロマイシンの徐放性医薬製剤  
発明者: 板井茂, 野口修治, **岩尾康範**, 藤木定弘

権利者: 静岡県立大学

種類:

番号: 2012-073119

出願年月日: 20120731

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~pharmeng/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩尾 康範 (IWAO YASUNORI)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号: 30433022

(2) 研究分担者

なし