

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成17（2005）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 12

米谷芳枝

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 17

IV. 研究成果の刊行物・別刷 18

別添3

厚生科学研究費補助金（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） 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

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

NMR および誘電緩和が反映する分子運動はタンパク質やDNAの安定性を支配する構造緩和の運動より有意に短い時間軸を示したが、いずれも構造緩和の分子運動と連動していることが明らかになり、構造緩和の分子運動を直接測定していないにもかかわらず、タンパク質やDNAの凝集に繋がる分子運動の変化を検出するための指標として有用であることが分かった。また、 β -ガラクトシダーゼをデキストランハイドロゲルに内包し、分子運動を抑えることによって凍結乾燥時の失活を抑制できることが明らかになった。さらに、凍結乾燥再水和法によるリポソーム調製において、リポソーム粒子径の安定性に対するショ糖の影響を各調製過程で調べた結果、ショ糖は凍結時においてリポソームの凝集を防いでおり、凍結乾燥品の再水和時におけるショ糖の添加は凝集を促進することが明らかになった。

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高い安定性を有するタンパク質およびDNA製剤として最も有望であると考えられる凍結乾燥製剤を対象とし、タンパク質やDNAの安定性を支配すると考えられる分子運動を感度よく検出するための方法を検討した。すなわち、デキストラン系の添加剤を含有する凍結乾燥製剤を用いて、誘電緩和時間に反映され

る分子運動および NMR 緩和時間に反映される分子運動の実体を、熱分析法によって測定される構造緩和の分子運動と比較して考察し、誘電緩和時間および NMR 緩和時間をタンパク質や DNA の凝集を引き起こす分子運動を検出するための指標として用いることができるかどうか、その有用性を評価した。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 分子ずつ封じ込めて分子運動性を抑制し、タンパク質の保存安定性を確保する技術を開発することを目指して、モデルタンパク質 β -ガラクトシダーゼを内包するデキストランゲルの保存安定性について基礎的な検討を行った。さらに、③安定性の高い DNA 導入剤の開発を目指して、凍結乾燥再水和法によって調製されるリポソームについて、凍結時と再水和時におけるショ糖の影響を解析するとともに、リポソームへの遺伝子導入効率や安定性に及ぼす脂質組成の影響を検討した。

B. 研究方法

タンパク質凍結乾燥製剤の安定性を支配する分子運動性の誘電緩和スペクトル法および NMR スペクトル法による測定

分子量の異なるデキストランを用いて調製した分子運動性の異なる凍結乾燥製剤について、誘電緩和時間および NMR 緩和時間の温度依存性と、ガラス転移温度(T_g)から算出した構造緩和時間の温度依存性を比較検討した。

凍結乾燥したデキストラン 40k およびデキストランの切片であるイソマルトトリオース (IMT) について、メチン炭素の回転軸系スピン-スピン緩和時間($T_{1\rho}$) から相関時間(τ_c)を計算し、その温度依存性を誘電緩和時間の温度依存性と比較した。また、誘電緩和スペクトルをデバイ緩和の成分に解析することによって、誘電緩和時間に相当する $T_{1\rho}$ の値に変換し、 $T_{1\rho}$ の実測値と比較した。さらに、DSC で製剤のガラス転移温度(T_g)を測定し、観測された T_g の値から構造緩和時間を計算し、NMR による相関時間(τ_c)および誘電緩和時間と比較した。

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

メタクリル酸(GMA)修飾デキストランとポリエチレングリコール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、あるいは過硫酸アンモニウムを添加してレドックス反応を開始させること(化学重合法)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後、活性を測定し、凍結乾燥時の β -ガラクトシダーゼの失活が、ハイドロゲルに内包することにより抑制されるかを検討した。なお、活性測定はデキストラナーゼによってデキストランを分解することによって、ゲル中の β -ガラクトシダーゼを抽出した後、行った。

凍結乾燥再水和法によるリポソーム調製と安定性および遺伝子導入率の測定

凍結乾燥再水和法によるリポソーム調製において、リポソーム粒子径の安定性に対するショ糖の影響を調べるために、リポソーム懸濁液(脂質 1.5 mg/mL 水)を薄膜法により調製し、全脂質と同質量のショ糖を加え、凍結・室温融解後の粒子径の変化を測定した。また、このリポソーム懸濁液にショ糖を加えて凍結乾燥後に水で再水和を行ったものと、リポソーム懸濁液の凍結乾燥後にショ糖水溶液で再水和を行ったものの粒子径変化を比較した。さらに、遺伝子導入効率に対する影響は、リポソーム懸濁液にプラスミド DNA とショ糖溶液を加えて凍結乾燥再水和を行い、リポソーム未封入のプラスミド DNA を PicoGreen dsDNA によって測定した。

(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安定性を支配する分子運動性を測定するための指標としての誘電緩和時間および NMR 緩和時間

デキストランおよび IMT のいずれの凍結乾燥品においても、主鎖の炭素の $T_{1\rho}$ は T_g より約 20°C 低い温度付近から温度の上昇とともに減少しはじめ、 T_g 付近では著しい減少を示した (Fig.1)。

デキストランおよびIMTの凍結乾燥品で観察された T_{1p} の極小値から推定した A を用いて(1)式に従って相関時間 τ_c を計算した(Fig.2)。 τ_c の計算値は、構造緩和時間(Adam-Gibbs-Vogel式に従って T_g から計算)より小さく、デキストランでは T_g/T が1.06付近で、またIMTでは T_g/T が0.95付近で、プロトンホッピング様プロセスの平均誘電緩和時間(τ_{DES})とほぼ同じオーダーの値を示した。 T_g/T がそれぞれ1.06および0.95より大きくなると、 T_{1p} から計算した τ_c は、 τ_{DES} のプロットから大きく外れて頭打ちになった。

$$\frac{1}{T_{1p}} = \frac{A\tau_c}{1 + 4\omega_i^2\tau_c^2} \quad (1)$$

T_{1p} から求めた τ_c が低温領域で τ_{DES} から外れる理由を明らかにするために、プロトンホッピング様プロセスを反映する誘電緩和スペクトルから測定した τ_{DES} を、それに相当する T_{1p} の値に変換し、 T_{1p} の実測値と比較した。IMT凍結乾燥品で観察された誘電損 ε'' を(2)式にしたがって3つのデバイ緩和の τ を仮定して解析し、3つの τ とそれぞれの比率 f を求めた(Fig.3)。

$$\varepsilon'' = \sum_{i=1}^3 \frac{\Delta\varepsilon_i\omega\tau_i}{1 + \omega^2\tau_i^2} \quad (2)$$

得られた3つの τ と f を用いて、(3)式に従って ^{13}C のスペクトル密度 $J(\omega)$ を計算した。

$$J(\omega) = \sum_{i=1}^3 \frac{f_i\tau_i}{1 + 4\omega^2\tau_i^2} \quad (3)$$

T_g (120℃)を挟んだ温度領域において計算した $J(\omega)$ の周波数依存性をFig.4Aに示す。また、本研究で用いた周波数である57kHzにおける $J(\omega)$ の温度依存性をFig.4Bに示す。

次に、計算された $J(\omega)$ の値および T_{1p} の極小値を用いて(4)式に従って T_{1p} を計算した(Fig.5)。デキストラン凍結乾燥品についても同様に、誘電緩和スペクトルから測定した τ_{DES} を、それに相当する T_{1p} の値に変換した(Fig.5)。

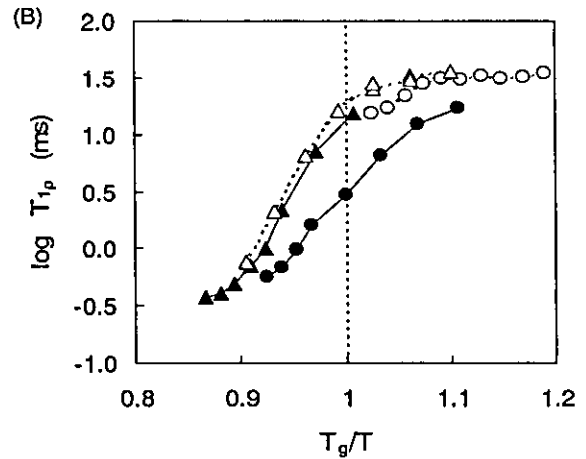
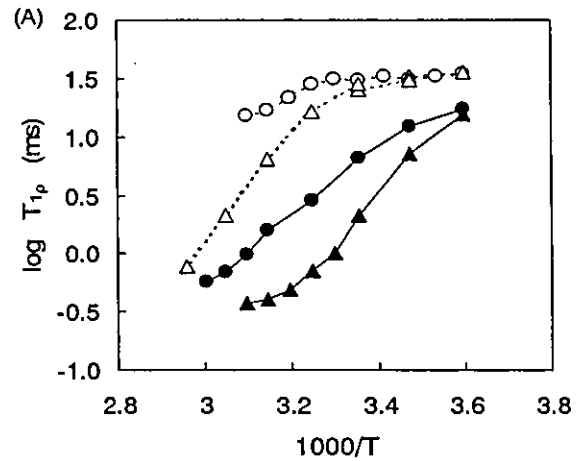


Fig.1. T_{1p} of freeze-dried IMT equilibrated at 43%RH (Δ) and 60%RH (\blacktriangle) and T_{1p} of freeze-dried dextran 40k at 60%RH (\circ) and 75%RH (\bullet), plotted against $1000/T$ (A) and T_g/T (B).

IMT およびデキストランについて実測された T_{1p} は、それぞれ T_g/T が0.95 および1.06 付近で誘電緩和スペクトルから計算した T_{1p} の値とほぼ一致したが、 T_g/T が大きくなると、誘電緩和スペクトルからの計算値から外れ、10msのオーダーで頭打ちになった。この頭打ちは、運動性の低下に伴って T_{1p} に対するスピン-スピン相互作用の影響が大きくなり、 T_{1p} が運動性よりも静的要因によって支配されるためであると考えられる。

IMT およびデキストラン凍結乾燥品の分子運動性は、 T_g よりかなり低い温度では T_{1p} には反映されないほど非常に遅いため、 T_{1p} の実測値は誘電緩和スペクトルからの T_{1p} の計算値から大

大きく外れるが、 T_g 付近では両者がほぼ一致することから、NMR 緩和時間に反映される分子運動は、誘電緩和時間に反映される分子運動と同じオーダーの時間軸をもつことが分かった。

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = AJ(\omega) = \frac{1 + 4\omega^2\tau_c^2}{T_{1\rho(\min)}\tau_c} J(\omega) \quad (4)$$

ここで、

$$\omega^2\tau_c^2 = 0.5$$

τ_c および τ_{DES} に反映される分子運動は、熱分析で測定される構造緩和の分子運動より有意に短い時間軸を示したが、いずれも、構造緩和時間と同様に、 T_g 付近で勾配が大きく変化する温度依存性を示した。これらの結果は、 τ_c および τ_{DES} に反映される分子運動が、構造緩和の分子運動と連動していることを示唆していると考えられる。 τ_c および τ_{DES} のいずれも、構造緩和の分子運動を直接測定していないにもかかわらず、構造緩和の分子運動と連動しているために、構造緩和の分子運動の変化を検出できることが分かった。

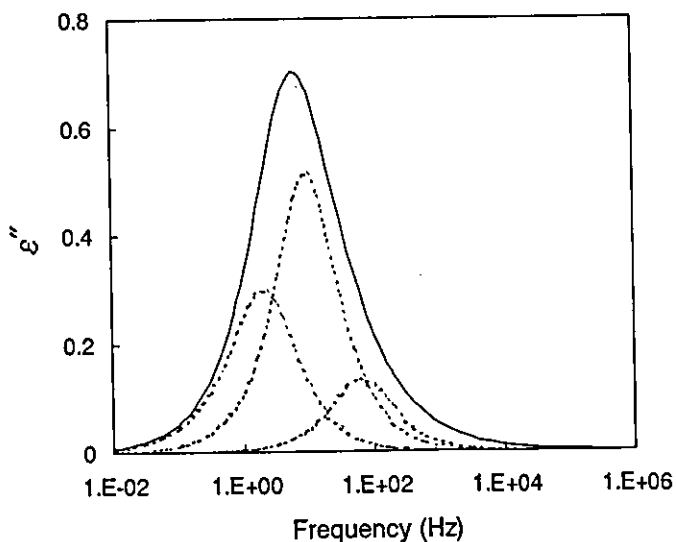


Fig.3. Dielectric relaxation spectrum of freeze-dried IMT at 120°C (solid line). Dashed lines represent three components of the Debye relaxation used for the transformation of τ_{DES} to $T_{1\rho}$.

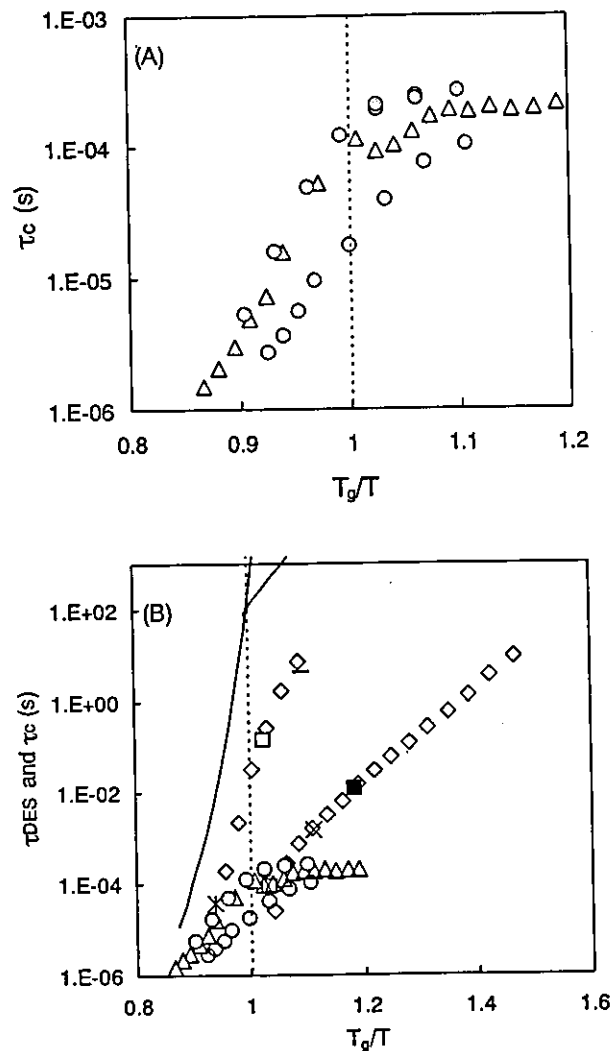


Fig.2. (A) τ_c for the methine carbon of dextran 40k at 60%RH (Δ), dextran 40k at 75%RH (\circ), IMT at 43%RH (\bullet) and IMT at 60%RH (\blacktriangle) calculated from the observed value of $T_{1\rho}$. (B) Comparison of the τ_c of methine carbon with the τ_{DES} of the proton-hopping like process for dextran 40k (\diamond) and IMT (\blacklozenge) determined with dry samples at various temperatures, as well as τ_{DES} determined for dextran 40k at 25°C and 43%RH (\blacksquare), 60%RH (\times), 75%RH ($+$) and τ_{DES} determined for IMT at 25°C and 23%RH ($-$), 43%RH (\blacksquare), 60%RH ($*$). The relaxation time of molecular rearrangement motion determined calorimetrically (solid line) is also shown.

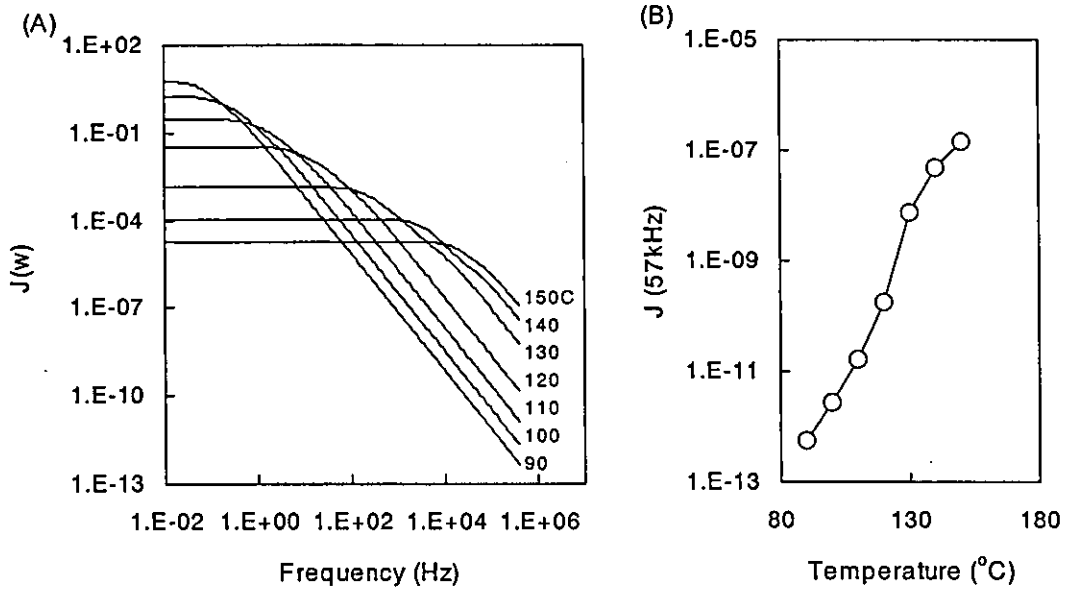


Fig.4. Spectral density calculated from dielectric relaxation spectrum of freeze-dried IMT as a function of frequency (A) and at 57 kHz as a function of temperature (B).

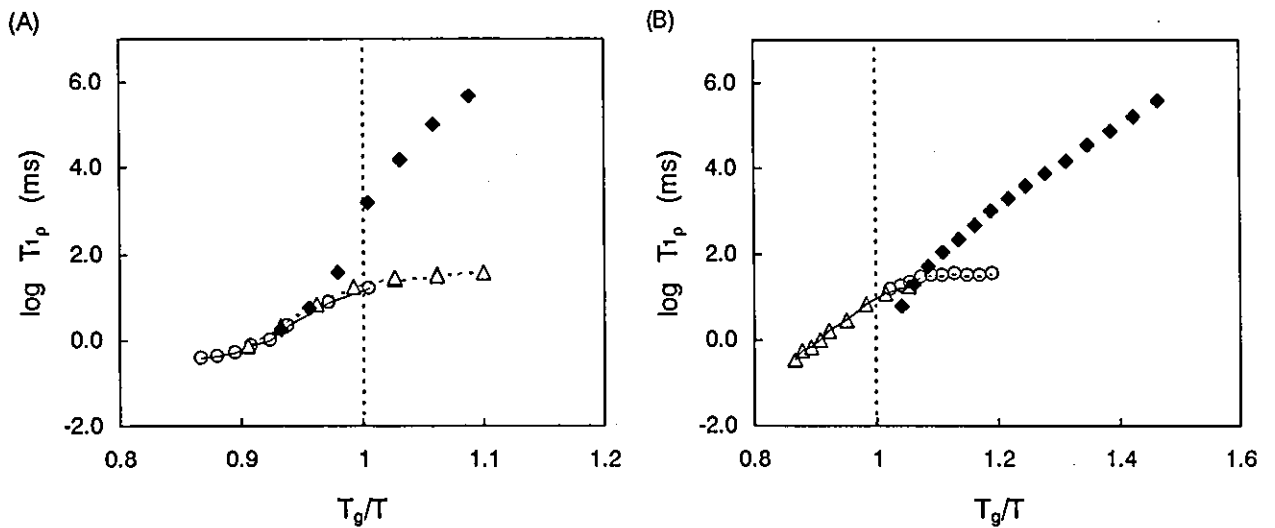


Fig.5. T_{1p} observed at 43%RH (Δ) and 60%RH (\circ) for freeze-dried IMT (A) and that at 60%RH (\circ) and 75%RH (Δ) for freeze-dried dextran 40k (B), compared with T_{1p} estimated based on the spectral density calculated from dielectric spectrum (\blacklozenge).

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安定性

Fig. 6 に γ 線照射によりハイドロゲル化したデキストランマイクロスフェア中の β -ガラクトシダーゼ活性に及ぼす凍結乾燥の影響を示す。

比較のためにゲル化せずに凍結乾燥した結果も示す。ゲル化せずに凍結乾燥すると、 β -ガラクトシダーゼの活性は 50%程度に減少した。それに対し、4%あるいは6%の GMA を修飾したデキストランを用いてハイドロゲル化したマイク

ロスフェアにおいては、凍結乾燥後も 90~80% のガラクトシダーゼ活性が残存していた。また、データは示さないが、過硫酸アンモニウムのレドックス反応によってハイドロゲル化したマイクロロスフェアにおいても、同様に活性が保持されていた。したがって、ハイドロゲル化することによって、凍結乾燥中の β -ガラクトシダーゼの失活が抑制されることが明らかになった。 β -ガラクトシダーゼの残存活性は GMA 修飾率の高いゲルが低い傾向を示した。これは、GMA 修飾率が高いほど、ゲルの網目が密に形成されるため、デキストラナーゼによるデキストランの分解効率が悪く、 β -ガラクトシダーゼの抽出が完全に行われなかったためと思われる。 β -ガラクトシダーゼの抽出法の最適化が必要であると考えられる。

Fig. 7 にデキストランマイクロロスフェアからの β -ガラクトシダーゼの放出曲線の代表例を示す。4%の GMA を修飾したデキストランを用いてハイドロゲル化したマイクロロスフェアにおいては、初期に速やかな β -ガラクトシダーゼの放出が観測され、その後、ゆっくりとした放出が観測された。ゲルの網目のサイズが大きいため、マイクロロスフェアの表面近傍に取り込まれた β -ガラクトシダーゼが速やかに放出した後、中心部分に取り込まれた β -ガラクトシダーゼがゆっくりと放出したものと考えられる。それに対して、6%の GMA を修飾したデキストランを用いてハイドロゲル化したマイクロロスフェアにおいては、24 時間の放出時間内において β -ガラクトシダーゼの放出がほとんど観測されなかった。 β -ガラクトシダーゼがハイドロゲルの網目の中に均一に取り込まれていることが示唆された。

凍結乾燥再水和法によって調製されるリポソームの遺伝子導入効率および安定性

凍結乾燥再水和法(Fig.8)によって調製されるリポソームの粒子径に及ぼすショ糖の影響を検討した結果、ショ糖を凍結時に添加した場合は小さくなり(Fig.9)、再水和時に添加した場合は逆に大きくなり凝集することが明らかになった(Fig.10)。また、凍結乾燥再水和法によってリポソームが再構成される可能性を調べるために、リポソーム懸濁液ではなく、脂質エタノー

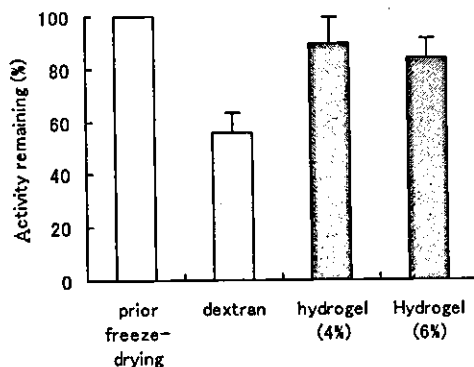


Fig.6. Effects of freeze-drying on β -galactosidase activity

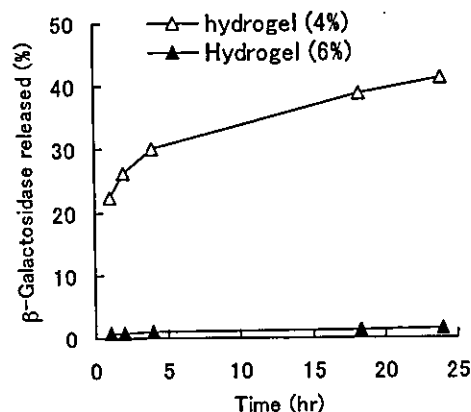


Fig.7. Release profiles of β -galactosidase from dextran hydrogel microspheres

ル溶液から直接、凍結乾燥再水和した結果、この方法においてもリポソームが調製されることが明らかになった。さらに、この場合においても、脂質溶液にショ糖を添加したほうがリポソームの粒子径は小さくなることが示された。また、リポソームへの遺伝子導入効率や安定性に及ぼす脂質組成の影響を検討した結果、リポソーム膜の表面電荷の影響が大きいことが示唆された。

これまでは、リポソーム懸濁液の凍結時に糖を添加して再水和するとリポソーム粒子径は大きくなり、封入された薬物は保持されていると考えられてきた。しかし、薬物を空リポソームとともに凍結乾燥後、再水和すると薬物が封入され、リポソームの粒子径が大きくなることは、一時的にリポソームの流動性が上昇し薬物の透過性が上昇するか、リポソームの融合が起

きているかが考えられる。また、リポソームの凍結乾燥後において走査電顕でのリポソームの観察結果から、リポソームのベシクル状態は観察されなかった。従って、凍結によって破壊さ

れたリポソームの膜構造は、再水和時に再構築が起きており、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察される。すなわち、糖は膜を安定化するのではなく、膜を一時的に

<凍結乾燥再水和法 Dehydration Rehydration Vesicle (DRV法)>

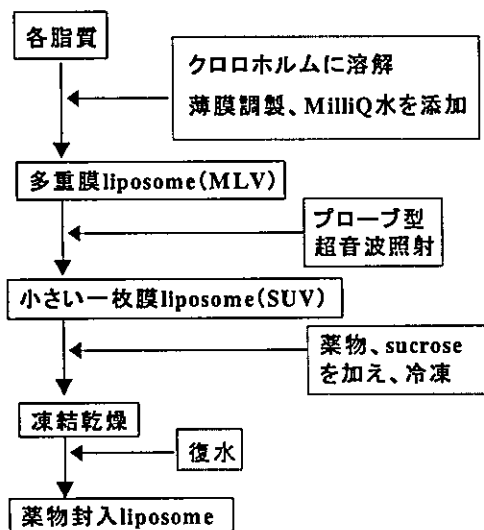
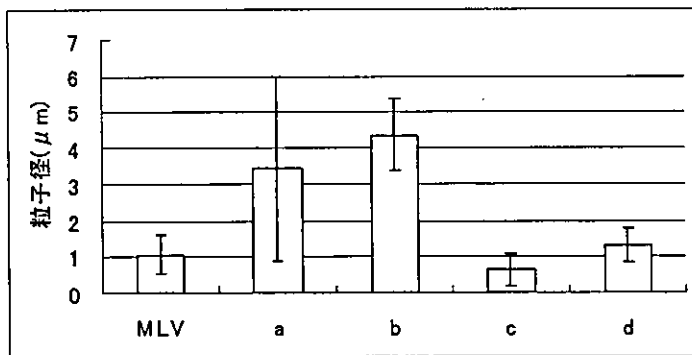


図2 凍結過程におけるシヨ糖の役割



- a) MLV 急速凍結 室温融解
- b) MLV 凍結 室温融解
- c) MLV + シヨ糖 急速凍結 室温融解
- d) MLV + シヨ糖 凍結 室温融解

乱しているのではないかと推察された。リン脂質の分子運動性は、水の分子運動性が変化する凍結、乾燥、再水和時に大きく影響され、凍結時にトリハロースなどの糖を入れると、糖がガラス状態となり、脂質膜が安定化されることが報告されている。しかし、凍結・乾燥では、リポソーム膜中のリン脂質の分子運動性は未だ明らかになっておらず、薬物封入リポソームを凍結乾燥するとリポソームの形態のまま、すなわち、薬物をリポソーム内に保持した状態で凍結乾燥されたという報告もある。一方、凍結乾燥した空リポソームの粉末に薬物溶液を入れると封入されることも報告されている。このように、凍結・乾燥では、どの過程でショ糖がどのような作用をしているかが明らかでなかった。本研究から、ショ糖には脂質間の相互作用を弱め、リポソーム膜の凝集抑制作用があり、その作用が強く働くのは凍結時であると考えられた。また、脂質溶液の凍結乾燥においてもリポソームが調製されることから、凍結乾燥再水和法において、再水和時にリポソームは形成され、この時に薬物がリポソーム内に封入されることが示

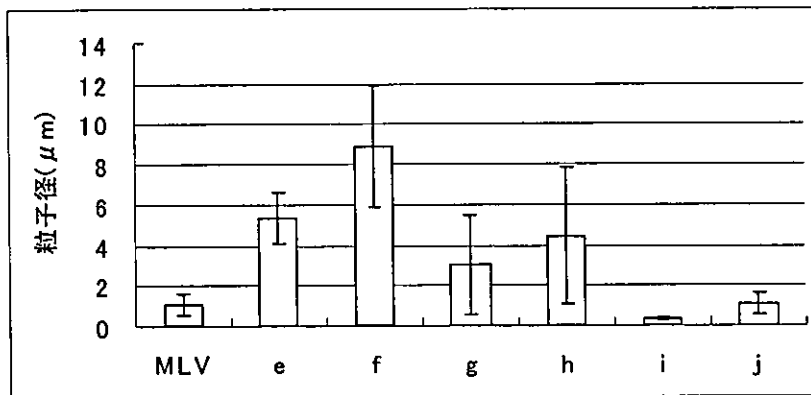
唆された。

D. 考察

タンパク質や DNA の凍結乾燥製剤の安定性を支配する分子運動を検出する方法として、誘電緩和スペクトル法および NMR スペクトル法が有用であることが明らかになった。これらの方法を用いてタンパク質や DNA を有効成分とする医薬品の安定性を適切に効率的に評価することが可能になり、これらの医薬品を一定の品質を有する製剤として広く医療の場に安定に供給することが可能になると考えられる。

また、タンパク質や DNA のハイドロゲルやリポソーム製剤について、タンパク質や DNA 分子の運動性を抑制することによって、タンパク質や DNA の安定性を改善できることを示唆する基礎的知見を得ることができた。このように安定性に密接に関連した分子運動を制御することによってタンパク質や DNA の安定化を図る手法が確立されれば、従来、医薬品として実用化できなかった多くの優れた特性を有する高分子薬物の製剤開発にも繋がるものと考えられる。

図3 凍結乾燥と再水和過程におけるショ糖の役割



- | | | |
|--------------|--------|--------|
| e) MLV | 急速凍結乾燥 | ショ糖再水和 |
| f) MLV | 凍結乾燥 | ショ糖再水和 |
| g) MLV | 急速凍結乾燥 | 水再水和 |
| h) MLV | 凍結乾燥 | 水再水和 |
| i) MLV + ショ糖 | 急速凍結乾燥 | 水再水和 |
| j) MLV + ショ糖 | 凍結乾燥 | 水再水和 |

E. 結論

NMR および誘電緩和が反映する分子運動はタンパク質や DNA の安定性を支配する構造緩和の分子運動より有意に短い時間軸を示したが、いずれも構造緩和の分子運動と連動していることが明らかになり、構造緩和の分子運動を直接測定していないにもかかわらず、タンパク質や DNA の凝集に繋がる分子運動の変化を検出することができ、安定性評価の指標として有用であることが分かった。

また、 β -ガラクトシダーゼをデキストランハイドロゲルに内包することにより凍結乾燥時の失活を抑制できることが示され、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って、タンパク質の安定化が可能であることが明らかになった。

さらに、凍結乾燥再水和調製法による DNA 封入リポソームは、凍結乾燥によってリポソーム自体の粒子径の変化や、DNA の構造変化による凝集性に大きな影響を受けることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Yoshioka, Y. Aso, Glass Transition-Related Changes in Molecular Mobility below Glass Transition Temperature of Freeze-dried Formulations, as Measured by Dielectric Spectroscopy and Solid State NMR. *J. Pharm. Sci.*, 94, 275-287 (2005).
- 2) Y. Aso, S. Yoshioka, Effect of Freezing Rate on Physical Stability of Lyophilized Cationic Liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 301-307 (2005).
- 3) T. Miyazaki, Y. Aso, S. Yoshioka, S. Kojima. Ability of polyvinylpyrrolidone and polyacrylic acid to inhibit the crystallization of amorphous acetaminophen. *J. Pharm. Sci.*, 93: 2710-2717 (2004)
- 4) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima. Temperature- and glass transition temperature-dependence of bimolecular reaction rates in lyophilized formulations described by Adam-Gibbs-Vogel equation, *J. Pharm. Sci.*, 93, 1062-1069 (2004)
- 5) Y. Aso, S. Yoshioka, 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).
- 6) Yoshie Maitani, Koji Nakamura, and Kumi Kawano, Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery, *Current Pharmaceutical Biotechnology* in press.
- 7) C. Xiao, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai, Sustained-release of cisplatin from multivesicular liposomes: potentiation of antitumour efficacy against S180 murine carcinoma, *J. Pharm. Sci.*, 93(7) 1718-24 (2004).
- 8) T. Nagamoto, Y. Hattori, K. Takayama, and Y. Maitani, Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery, *Pharm. Res.*, 21 (4): 671-674 (2004).
- 9) Y. Hattori and Y. Maitani, Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer, *J. Contr. Release*, 79(1-3):147-55 (2004).
- 10) 米谷芳枝, 機能性脂質マイクロエマルションと DDS, *医薬ジャーナル Medical Front Line*, 40, 37-43 (2004).
- 11) T. Fan, K. Takayama, Y. Hattori, and Y. Maitani, Formulation Optimization of Paclitaxel Carried by Pegylated Emulsions Based on Artificial Neural Network, *Pharm. Res.*, 21(9) 1694-1699 (2004).

- 12) M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, and K. Kawano, Polymer design and incorporation method for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin, *J. Drug Targeting*, 12(6) 373-84 (2004).
- 13) P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano, Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting, *Pharm. Res.*, 21(11) 2003-2010 (2004).
2. 学会発表
- 1) 吉岡 澄江、阿曾 幸男 凍結乾燥製剤の Sub-T_g 領域における分子運動性の変化に対する NMR および誘電緩和の検出力の比較 日本薬学会第 125 年会 (2005. 3)
- 2) 阿曾幸男、吉岡澄江 デキストランゲルに内包した β -ガラクトシダーゼの活性に及ぼす凍結乾燥および保存の影響 日本薬学会第 125 年会 (2005. 3)
- 3) 吉岡 澄江、阿曾 幸男 インスリン凍結乾燥製剤の安定性に対する分子運動性および熱力学的ファクターの相対的寄与率の解析 日本薬剤学会第 20 年会 (2005. 3)
- 4) 阿曾 幸男、吉岡 澄江 13C-NMR 緩和時間測定に基づくニフェジピンおよびフェノバルビタールと PVP の相互作用の検討 日本薬剤学会第 20 年会 (2005. 3)
- 5) 宮崎 玉樹、吉岡 澄江、阿曾 幸男 非晶質アセトアニリド誘導体の結晶化に及ぼす薬物-高分子間相互作用の影響 日本薬剤学会第 20 年会 (2005. 3)
- 6) Yoshioka, S., Aso, Y. Effect of molecular mobility as indicated by glass transition temperature on insulin degradation in lyophilized formulations. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2004 Annual Meeting (2004.11)
- 7) Aso, Y., Yoshioka, S. Molecular mobility of solid dispersions of nifedipine-PVP as measured by 13C-CP/MAS NMR. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2004 Annual Meeting (2004.11)
- 8) Yoshioka, S., Can molecular dynamics simulation predict the glass transition temperature of freeze-dried formulations? Pharmaceutical Sciences World Congress (2004.6)
- 9) 服部喜之、米谷芳枝 葉酸修飾脂質微粒子遺伝子ベクターによる扁平上皮癌細胞自殺 遺伝子治療の評価 日本薬学会第 125 年会(2005.3)
- 10) 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癌ターゲティング能と抗腫瘍効果 日本薬学会第 125 年会(2005.3)
- 11) 梶原栄一、米谷芳枝 ガンシクロビル封入リポソーム製剤の調製 日本薬学会第 125 年会(2005.3)
- 12) 福島正義、服部喜之、米谷芳枝 前立腺癌に対するコネキシン遺伝子治療とドセタキセルの併用治療の検討 日本薬学会第 125 年会(2005.3)
- 13) 服部喜之、米谷芳枝 扁平上皮癌細胞における葉酸修飾脂質微粒子ベクターの遺伝子送達能の評価、第 20 回日本 DDS 学会(2004.7)
- 14) 蛭田有香、服部喜之、米谷芳枝 皮膚癌治療用プレオマイシン封入変形性リポソーム経皮吸収製剤の開発 第 20 回日本 DDS 学会(2004.7)
- 15) 川野久美、高山幸三、米谷芳枝 コハク酸トコフェロールを用いたドキシソルピシン封入血中滞留性リポソーム製剤の ANN による処方検討 第 20 回日本 DDS 学会(2004.7)
- 16) Yoshie Maitani, Saki Igarashi, Kyoko

Hayashi and Yoshiyuki Hattori
Liposome complexed DNA and entrapping
DNA as gene delivery: Suicide gene therapy
using herpes simplex virus thymidine kinase.
The 2nd Japan-Korea Joint symposium on
Drug Delivery and Therapy, Kyoto, Japan,
May29, 2004.

17) Yoshie Maitani, Takahiro Nagamoto,
Yoshiyuki Hattori, Kozo Takayama Novel
chitosan particles and chitosan-coated
emulsions inducing immune response via
intranasal vaccine delivery. Pharmaceutical
Sciences World congress, Kyoto, Japan,
May29-June 3, 2004.

18) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P.
Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani
Evaluation of camptothecin-loaded poly
(ethylene glycol)-poly (aspartate ester)
copolymers as prolonged circulation time in
vivo. Pharmaceutical Sciences World
congress, Kyoto, Japan, May29-June 3, 2004.

19) P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe,
K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano Polymeric
micelles as carriers for camptothecin:
influence of alkyl core, chain length and drug
content on incorporation and drug release.
Pharmaceutical Sciences World congress,
Kyoto, Japan, May29-June 3, 2004.

20) Yoshiyuki Hattori and Yoshie Maitani,
Novel folate-linked nanoparticles for DNA
transfection into human prostate cancer and
oral cancer cells, 9th Liposome Reseach Days
Conference, May 11-15, 2004, Hsinchu,
Taiwan.

21) Yoshiyuki Hattori, Takahiro Nagamoto and
Yoshie Maitani, Induction of immune
response via intranasal vaccine delivery by
novel chitosan particles and chitosan-coated
emulsions, 9th Liposome Reseach Days

Conference, May 11-15, 2004, Hsinchu,
Taiwan.

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

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合 研究事業)
(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リポソーム製剤の安定性の評価に関する研究

(分担)研究者 米谷芳枝 星薬科大学医薬品化学研究所

リポソームの凍結乾燥・再水和 (dehydration-rehydration vesicle、DRV) 調製法では、リポソーム懸濁液に薬物とショ糖を入れて、凍結乾燥するとサイズの小さい薬物封入リポソームが調製できる。しかし、この調製法における薬物封入機構やショ糖の役割は明らかになっていない。これまでの研究から、リポソーム懸濁液の凍結乾燥品では走査電子顕微鏡によってリポソームが観察されなかったことから、リポソーム懸濁液は一度凍結乾燥によってリポソーム構造が壊され、再水和時に再構成されるのではないかと推察された。本研究では、リポソームの各調製過程である凍結、再水和(再構成)時においてショ糖を添加し、リポソームのサイズの変化とカルセイン封入率を測定することによって、薬物封入機構とショ糖の役割を明らかにすることを目的とした。リポソームの各調製過程におけるショ糖添加の影響を調べた結果、ショ糖は凍結時においてリポソームの凝集を防いで安定性を高め、凍結乾燥品の再水和時におけるショ糖の添加は凝集を促進することが明らかになった。また、脂質溶液の凍結乾燥によってもリポソームが調製されることから、リポソーム懸濁液は凍結乾燥によってリポソーム構造が壊され、再水和時に再構成される可能性も明らかにした。

A. 研究目的

これまでは遺伝子治療用遺伝子導入リポソームベクターは、リポソームと DNA を混合して複合体にする方法が用いられている。この方法では複合体が時間とともに凝集して粒子径が大きくなるため、使用する直前に混合する。また、このベクターを遺伝子治療に用いると複合体では DNA は血中で直ちに DNA 分解酵素によって分解される。これらの点から DNA を封入したリポソーム凍結乾燥製剤は、体内において安定な理想的な DNA 製剤といえる。しかし、これまでは凍結乾燥・再水和 (dehydration-rehydration vesicle、DRV) 法で DNA 封入リポソーム製剤を調製すると、調製後の粒子径が約 $0.6 \mu\text{m}$ と大きく、静脈内投与に用いることは不可能であった。しかし、DRV法でショ糖を用いて調製すると静脈内投与可能な粒子

径の DNA 封入リポソームになることを報告してきた。

このように、凍結乾燥再水和法では、リポソーム懸濁液に薬物とショ糖を入れて、凍結乾燥するとサイズの小さい薬物封入リポソームになるが、この薬物封入機構やショ糖の役割は明らかにされてない(図1)。これまでの研究から、リポソーム懸濁液の凍結乾燥品では走査電子顕微鏡によってリポソームが観察されなかったことから、リポソーム懸濁液は一度凍結乾燥によって壊され、再水和時に再構成されるのではないかと推察された。本研究では、リポソームの各調製過程である凍結、再水和(再構成)時においてショ糖を添加し、リポソームのサイズの変化とカルセイン封入率を測定することによって、薬物封入機構とショ糖の役割を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

脂質は精製卵黄レシチン (EPC):

コレステロール(Chol)=2:1 (mol 比)を用いた。

実験1: リポソーム懸濁液(脂質 1.5 mg/mL水, A)を薄膜法により調製し、全脂質と同質量のショ糖を加え、凍結・室温融解し、粒子径の変化を調べた。次に、上記の A にショ糖を加えて凍結乾燥後に水で再水和を行ったものと、A の凍結乾燥後にショ糖水溶液で再水和を行ったものの粒子径変化を比較した。

実験2: 脂質エタノール溶液(脂質 1.5 mg/mL)にショ糖水溶液(0.75 mg/mL)を全脂質とショ糖の質量が同じになるように加え、凍結乾燥・再水和を行った。カルセインを封入するため、① 20 mM カルセイン水溶液 1 mL にショ糖 0.75 mg を溶かした液を加えた後凍結乾燥し、1/10PBS で再水和する方法と、②ショ糖水溶液(0.75 mg/mL)を加え凍結乾燥した後、20 mM カルセイン水溶液で再水和する方法を行った。これらの調製後、粒子径を測定し、カルセイン封入率を求め、共焦点顕微鏡によりリポソームの存在を観察した。

実験3: リポソームへの遺伝子導入率の測定 遺伝子導入効率に対する影響は、リポソーム懸濁液にプラスミド DNA とショ糖溶液を加えて凍結乾燥再水和を行い、リポソーム未封入のプラスミド DNA を PicoGreen dsDNA によって測定した。

リポソームの粒子径および表面電位は、電気泳動光散乱光度計(大塚電子(株))により測定した。封入率は、カルセイン封入リポソーム 100 μ L をゲルろ過し、リポソーム分画と遊離物分画に含まれるカルセインの蛍光強度 ($E_x = 485$ nm/ $E_m = 535$ nm) から以下の式を用いて算出した。リポソーム分画 100 μ L に 0.5% Triton 溶液を 100 μ L 加え、リポソームを破壊し、定量用のサンプルとした。

$$\text{封入率(\%)} = \text{Cf/Ct} \times 100$$

なお、Cf はリポソーム分画中のカルセインの蛍光強度、Ct は全体のカルセインの蛍光強度を示す。凍結乾燥前、後および再水和後の粒子の状態

は、走査電子顕微鏡(日本電子、JEOL JSM-5600LV)によって観察した。

培養細胞としては、ヒト肝細胞 HepG2 細胞を用いた。

C. 研究結果

リポソームの各調製での凍結、再水和時ににおけるショ糖の役割:

実験1の結果より、ショ糖を加えなかった試料では大きいサイズのリポソームになったのに対し、凍結前にショ糖を加えた試料では元のリポソームに比べ同等、もしくは小さいサイズのリポソームになった。しかし、再水和時にショ糖を加えた試料では、大きいサイズのリポソームになった。このことから、ショ糖にはリポソームの凝集抑制作用があり、その作用が働くのは凍結時であると考えられた(図2、図3)。

実験2より、脂質溶液にショ糖水を加え凍結乾燥再水和する方法においても、ショ糖はリポソーム懸濁液の時と同様に、形成したリポソームのサイズを小さくした。

薬物封入機構:

実験2の結果より、試料①、②は共に、粒子径が薄膜法によるリポソームに比べ同等もしくは小さいサイズとなり、共焦点顕微鏡によりカルセインを封入したリポソームであることが確認された。カルセインの封入率は約 0.1 %であった。このことから、脂質溶液にショ糖水を加え凍結乾燥再水和することによってリポソームを形成できることが確認された。また、この調製法においてもショ糖の添加によってリポソームの粒子径が小さくなった。

D. 考察

これまででは、リポソーム懸濁液の凍結時に糖を添加して再水和するとリポソーム粒子径は大きくなり、封入された薬物は保持されていると考えられてきた。しかし、薬物を空リポソームとともに凍結乾燥後、再水和すると薬物が封入され、リポソームの粒子径が

大きくなることは、一時的にリポソームの流動性が上昇し薬物の透過性が上昇するか、リポソームの融合が起きているかが考えられる。また、リポソームの凍結乾燥後において走査電顕でのリポソームの観察結果から、リポソームのベシクル状態は観察されなかった。従って、凍結によって破壊されたリポソームの膜構造は、再水和時に再構築が起きており、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察される。すなわち、糖は膜を安定化するのではなく、膜を一時的に乱しているのではないかと推察された。リン脂質の分子運動性は、水の分子運動性が変化する凍結、乾燥、再水和時に大きく影響され、凍結時にトリハロースなどの糖を入れると、糖がガラス状態となり、脂質膜が安定化されることが報告されている。しかし、凍結・乾燥では、リポソーム膜中のリン脂質の分子運動性は未だ明らかになっておらず、薬物封入リポソームを凍結乾燥するとリポソームの形態のまま、すなわち、薬物をリポソーム内に保持した状態で凍結乾燥されたという報告もある。一方、凍結乾燥した空リポソームの粉末に薬物溶液を入れると封入されることも報告されている。このように、凍結・乾燥では、どの過程でショ糖がどのような作用をしているかが明らかでなかった。本研究から、ショ糖には脂質間の相互作用を弱め、リポソーム膜の凝集抑制作用があり、その作用が強く働くのは凍結時であると考えられた。また、脂質溶液の凍結乾燥においてもリポソームが調製されることから、凍結乾燥再水和法において、再水和時にリポソームは形成され、この時に薬物がリポソーム内に封入されると考えられた。

E 結論

リポソームの各調製過程におけるショ糖の影響を調べた結果、ショ糖は凍結時においてリポソームの凝集を防いで安定性を高め、凍結乾燥品の再水和時におけるショ糖の添加は凝集を促進することが明らかになった。また、脂質溶液の凍結乾燥によってもリポソームが調製されることから、リポソーム懸濁液

は凍結乾燥によってリポソーム構造が壊され、再水和時に再構成される可能性も明らかになった。今後は、この調製法におけるショ糖が、DNAとリポソームの安定性にどのように寄与しているかを、デキストラン等の高分子のこれまでに確立された分子運動性の評価法で分析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

C. Xiao, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai, Sustained-release of cisplatin from multivesicular liposomes: potentiation of antitumour efficacy against S180 murine carcinoma, *J. Pharm. Sci.*, 93(7) 1718-24 (2004).

T. Nagamoto, Y. Hattori, K. Takayama, and Y. Maitani, Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery, *Pharm. Res.*, 21 (4): 671-674 (2004).

Y. Hattori and Y. Maitani, Enhanced *in vitro* DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer, *J. Contr. Release*, 79(1-3):147-55 (2004).

T. Fan, K. Takayama, Y. Hattori, and Y. Maitani, Formulation Optimization of Paclitaxel Carried by Pegylated Emulsions Based on Artificial Neural Network, *Pharm. Res.*, 21(9) 1694-1699 (2004).

2. 学会発表

五十嵐 早貴、服部 喜之、北本 大、米谷 芳枝
SG および MEL 含有リポソームによる導入遺伝子の細胞内移行量と発現、第 125 年会 (2004. 3)

渡邊 正人、米谷 芳枝、カンプトテシン封入血中滞留性リポソーム製剤の調製とその評価、第 125 年会 (2004. 3)

服部 喜之、米谷 芳枝

扁平上皮癌細胞における薬酸修飾脂質微粒子ベクターの遺伝子送達能の評価、第 20 回日本 DDS 学会 (2004. 7)

蛭田 有香、服部 喜之、米谷 芳枝
 皮膚癌治療用プレオマイシン封入変形性リポソーム
 経皮吸収剤の開発、第 20 回日本 DDS 学会
 (2004. 7)

川野 久美、高山 幸三、米谷 芳枝、コハク酸トコ
 フェロールを用いたドキシソルピシン封入血中滞留性
 リポソーム製剤のANNによる処方検討
 第20回日本DDS学会(2004. 7)

服部 喜之、米谷 芳枝、葉酸修飾脂質微粒子遺

伝子ベクターによる扁平上皮癌細胞自殺遺伝子治
 療の評価、日本薬学会第 125 年会 (2005. 3)

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癌ターゲットイ
 ング能と抗腫瘍効果、日本薬学会第 125 年会
 (2005.3)

梶原 栄一、米谷 芳枝、ガンシクロビル封入リポソ
 ーム製剤の調製、日本薬学会第125年会(2005. 3)

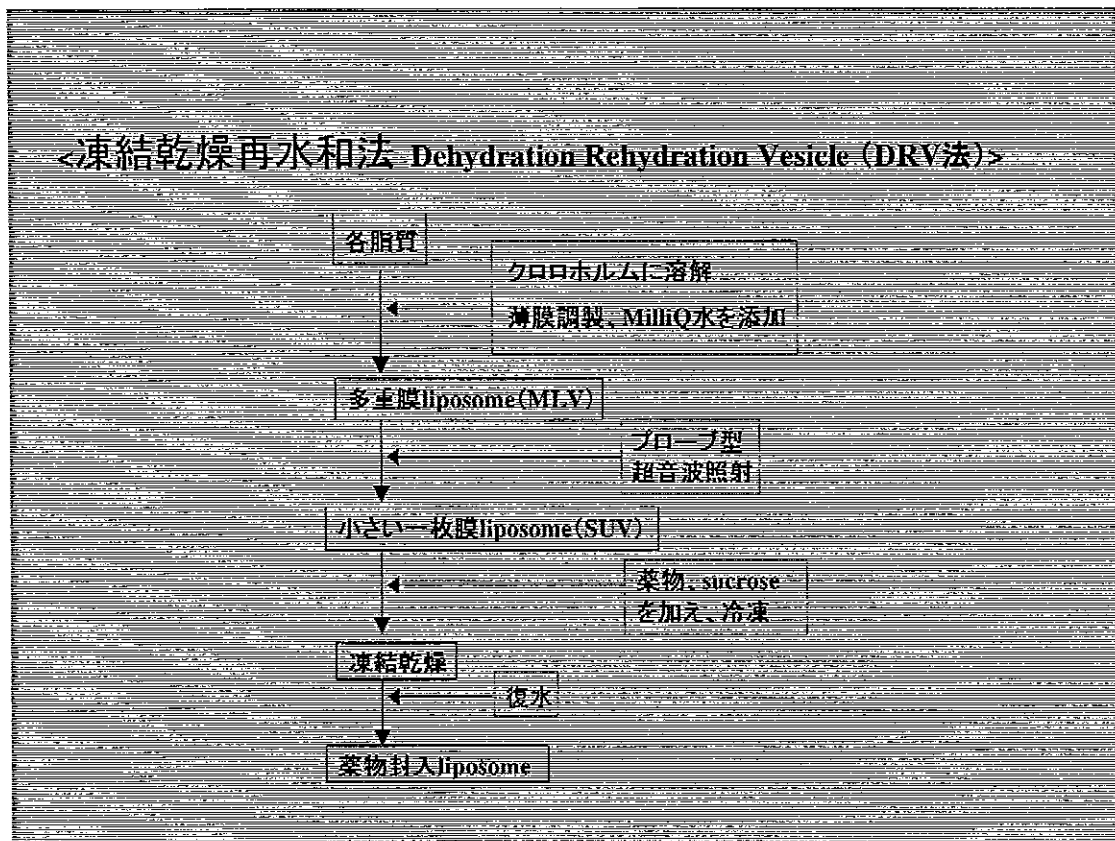
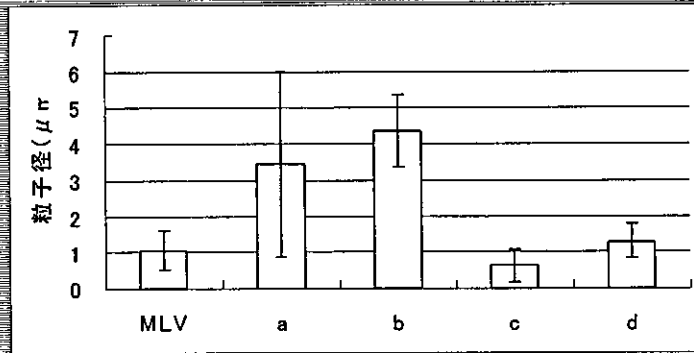


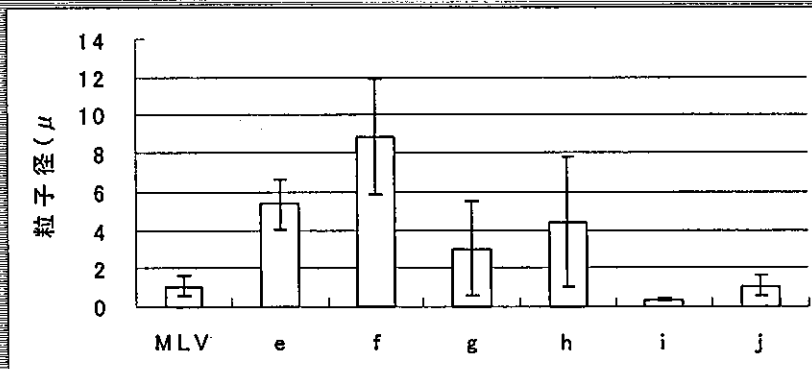
図 1

図2 凍結過程におけるショ糖の役割



- a) MLV 急速凍結 室温融解
- b) MLV 凍結 室温融解
- c) MLV + ショ糖 急速凍結 室温融解
- d) MLV + ショ糖 凍結 室温融解

図3 凍結乾燥と再水和過程におけるショ糖の役割



- e) MLV 急速凍結乾燥 ショ糖再水和
- f) MLV 凍結乾燥 ショ糖再水和
- g) MLV 急速凍結乾燥 水再水和
- h) MLV 凍結乾燥 水再水和
- i) MLV + ショ糖 急速凍結乾燥 水再水和
- j) MLV + ショ糖 凍結乾燥 水再水和

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1) S. Yoshioka, Y. Aso,	Glass Transition -Related Changes in Molecular Mobility below Glass Transition Temperature of Freeze-dried Formulations, as Measured by Dielectric Spectroscopy and Solid State NMR.	J. Pharm. Sci.,	94,	275-287	(2005)
2) Y. Aso, S. Yoshioka,	Effect of Freezing Rate on Physical Stability of Lyophilized Cationic Liposomes.	Chem. Pharm. Bull.,	53,	301-307	(2005)
3) T. Miyazaki, Y. Aso, S. Yoshioka, S. Kojima.	Ability of polyvinylpyrrolidone and polyacrylic acid to inhibit the crystallization of amorphous acetaminophen.	J. Pharm. Sci.,	93:	2710-2717	(2004)
4) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima.	Temperature- and glass transition temperature-dependence of bimolecular reaction rates in lyophilized formulations described by Adam-Gibbs-Vogel equation,	J. Pharm. Sci.,	93,	1062-1069	(2004)
5) Y. Aso, S. Yoshioka, 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).
6) Yoshie Maitani, Koji Nakamura, and Kumi Kawano,	Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery,	Current Pharmaceutical Biotechnology,	6,	81-93	(2005)
7) C. Xiao, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai,	Sustained-release of cisplatin from multivesicular liposomes: potentiation of antitumour efficacy against S180 murine carcinoma,	J. Pharm. Sci.,	93(7)	1718-24	(2004).
8) T. Nagamoto, Y. Hattori, K. Takayama, and Y. Maitani,	Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery,	Pharm. Res.,	21 (4):	671-674	(2004).
9) Y. Hattori and Y. Maitani,	Enhanced in vitro DNA transfection efficiency by novel folate-linked nanoparticles in human prostate cancer and oral cancer,	J. Contr. Release,	79,	173-183	(2004).
10) 米谷芳枝,	機能性脂質マイクロエマルションとDDS,	医薬ジャーナルMedical Front Line,	40,	37-43	(2004).
11) T. Fan, K. Takayama, Y. Hattori, and Y. Maitani,	Formulation Optimization of Paclitaxel Carried by Pegylated Emulsions Based on Artificial Neural Network,	Pharm. Res.,	21,	1692-1697	(2004).
12) M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, and K. Kawano,	Polymer design and incorporation method for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin,	J. Drug Targeting,	12(6)	373-84	(2004).
13) P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano,	Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting,	Pharm. Res.,	21,	2001-2008	(2004).

Glass Transition-Related Changes in Molecular Mobility below Glass Transition Temperature of Freeze-Dried Formulations, as Measured by Dielectric Spectroscopy and Solid State Nuclear Magnetic Resonance

SUMIE YOSHIOKA, YUKIO ASO

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Received 27 April 2004; revised 7 September 2004; accepted 14 September 2004

Published online 29 November 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.20244

ABSTRACT: The purpose of this study was to explore why changes in the molecular mobility associated with glass transition, the timescale of which is on the order of 100 s, can be detected by measuring the nuclear magnetic resonance relaxation times that reflect molecular motions on the order of 10 kHz and 1 MHz. The molecular motions in freeze-dried dextran 40k, dextran 1k, isomaltotriose (IMT), and α -glucose comprising a common unit but with different glass transition temperatures, were investigated by dielectric spectroscopy (DES) in the frequency range of 0.01 Hz to 100 kHz and in the temperature range of -20° to 200°C , in order to compare with the molecular motions reflected in nuclear magnetic resonance relaxation times. The α -relaxation process for freeze-dried α -glucose was visualized by DES, whereas those for freeze-dried dextran 40k, dextran 1k, and IMT were too slow to be visualized by DES. The latter freeze-dried cakes exhibited quasi-dc polarization because of proton-hopping-like motion rather than α -relaxation process. The correlation time (τ_c) for the backbone carbon of dextran 40k and IMT, calculated from the measured value of spin-lattice relaxation time in the rotating frame, was found to be close to the relaxation time of proton-hopping-like motion determined by DES (τ_{DES}) at temperatures around glass transition temperature. The timescales of molecular motions reflected in the τ_c and τ_{DES} were significantly smaller than that of motions leading to molecular rearrangement (molecular rearrangement motions), which correspond to α -relaxation. However, the shapes of temperature dependence for the τ_c and τ_{DES} were similar to that of the calorimetrically determined relaxation time of molecular rearrangement motions. Results suggest that the molecular motions reflected in the τ_c and τ_{DES} are linked to molecular rearrangement motions, such that enhancement of molecular rearrangement motions enhances the molecular motions reflected in the τ_c and τ_{DES} . Thus, the τ_{DES} and τ_c can reflect changes in molecular mobility leading to unwanted changes in amorphous formulations, and are thought to be a useful measure for evaluating the stability of formulations. © 2004 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 94:275–287, 2005

Keywords: dielectric spectroscopy; solid state NMR; freeze-drying; relaxation time

INTRODUCTION

Amorphous pharmaceuticals, as opposed to crystals, reveal various modes of rotational and

diffusive motions leading to molecular rearrangement that may bring about unwanted changes in the system. These motions leading to molecular rearrangement (hereafter referred to as molecular rearrangement motions) exhibit an average relaxation time on the order of 100 s at the calorimetric glass transition temperature (T_g). Furthermore, the average relaxation time

Correspondence to: Sumie Yoshioka (Telephone: 81-3-3700-8547; Fax: 81-3-3707-6950; E-mail: yoshioka@nihs.go.jp)

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 94, 275–287 (2005)
© 2004 Wiley-Liss, Inc. and the American Pharmacists Association