

厚生労働科学研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

活性蛋白の非注射型ナノDDS製剤
(課題番号：H16-トランス-007)

平成16年度～平成17年度 総合研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成18(2006)年3月

平成16年度より平成17年度までの期間、厚生労働科学研究費補助金基礎研究成果の臨床応用推進研究事業において、研究課題「活性蛋白の非注射型ナノDDS製剤（課題番号：H16-トランス-007）」について、以下に総合報告を行う。

目次

I	研究組織	1
II	補助金額	2
III	研究成果報告	3
	平成16年度	3
	平成17年度	9
IV	研究成果の観光に関する一覧表	13
V	研究成果による特許権等の 知的財産権の出願・登録状況	24
VI	健康危険情報	25

I 研究組織

主任研究者

水島 裕 （平成14年度～平成16年度）
（東京慈恵会医科大学DDS研究所・所長）

分担研究者

上野 晃憲（平成14年度～平成16年度）
（東京慈恵会医科大学客員教授・DDS研究所）

鈴木 潤（平成14年度～平成16年度）
（株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発本部・本部長）

上野 幸生（平成14年度～平成16年度）
（株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発部・主席研究員）

水島 徹（平成14年度～平成16年度）
（熊本大学医学薬学研究部・教授）

Ⅱ 補助金額（間接経費）

平成16年度	55,900,000円（5,400,000円）
平成17年度	50,940,000円（5,040,000円）
総額	106,840,000円（10,440,000円）

なお、経理事務については、東京慈恵会医科大学に委任した。

Ⅲ 研究成果

研究実施年度毎に、その成果をまとめた。

平成 16 年度

研究要旨

活性のあるたんぱく医薬としてまずインスリンを選び、ナノ製剤の作製、経皮投与による血糖降下作用、血中インスリン値および皮下組織のインスリンの免疫染色により、インスリンの経皮吸収を検討した。その結果、必ずしも十分ではないが、臨床試験にそのまま使用しうる製剤が作製することができたと思われる。

PLGAやポリスチレンの粒子を使用する方法、また経腸投与などの研究も行ったが、現在のところインスリンを金属イオン存在下で沈殿させたものを最終的には炭酸カルシウムで被覆した粒子を候補とした。この製剤の経皮投与により血糖値下降反応が認められた。また、細胞内シャペロンが非注射型ナノDDS製剤の開発に重要な役割を果たすと思われるので、たんぱく質のフォールディングについての研究を推進した。なお、本年度ではトランスレーショナル試験または臨床試験には至らなかった。

A. 研究目的

今年度の厚生労働省の大型研究費の公募テーマの一つがナノテクノロジーおよびトランスレーショナルリサーチである。これまで我々は両者のテーマについて十分な経験を積んできたが、今年度新たに発見した独特の技術により活性たんぱくをナノ粒子化して、活性タンパクの経皮・経粘膜の吸収を上昇させる技術の開発を進めている。本技術の完成により、これまでほぼ不可能であったインスリンなどの活性たんぱくの経皮吸収が可能になると思われる。IRB認可の医学的臨床研究で同様の性質をもつ低分子ミセルナノ粒子がヒト皮膚でも充分吸収をするとのデータも得ているので、ヒトへの応用も充分可能と考えている。このナノ医薬品の開発が達成されれば、2010年には患者が2億人に達すると思われる糖尿病や開発途上国でのワクチン療法への応用を望んでいる治療技術のひとつであるので、当然医療における必要性は極めて高く、日本の経済に対する波及効果も極めて大きいと思われる。なお、我々は既にい

くつかのDDS製剤を開発・実用化した経験があり、本研究で検討する医薬品と添加物の多くはすでに市販医薬品そのものと薬事法上使用認可されているものばかりで、しかもその認可用量範囲での製剤化であるので、開発が順調に進む可能性が極めて高い。本研究はインスリンのナノ粒子の作製からスタートするが、それが実用化まで最低で4～5年、長くとも7～8年であろうと考えている。

B. 研究方法

まず、ナノ粒子作製方法の検討であるが、インスリンを脂溶化するための金属としては亜鉛、鉄、銅などを検討した。つぎに疎水基と陰イオン基を有する有機化合物の種類を検討した。種々の理由から、ミリスチン酸、オレイン酸、ラウリル酸およびそれぞれのナトリウムへ、またインスリン亜鉛と有機化合物を溶解させるためにはアセトン、エチルアルコールなどを検討した。さらに界面活性剤の種類を検討、さらに作製された一次ナノ粒子のカルボキシル基に、カルシウムイオンと炭酸イオンを付けるわけであるが、その量比の検討などを行った。そしてそれを一次、二次、三次のインスリン粒子と名づけた。それぞれの製剤につき、粒子径、含まれているインスリン量を測定した。

また、インスリンの経皮吸収試験であるが、作製された粒子をワセリン、グリセリンなどと混合し、マウスおよびラットの脱毛した背部に塗布し、血中グルコース値とインスリン値を測定した。また、インスリンの免疫染色法としてはインスリン塗布後、マウスの皮膚を採取し、切片を作成した後、二抗体免疫染色法で検討した。

C. 研究成果

インスリンを水に対して不溶化する際にはカルシウム、鉄、銅、亜鉛のイオンを混和することにより行なったが、最も適していると思われたのは亜鉛イオンであり、ほとんどが沈降して均一な懸濁液が作製できた。検討内容とその結果を記載する。最初に生理活性たんぱく質またはペプチドを水不溶体とする。この水不溶体とする手段として最も好ましいものは、生理活性たんぱく質またはペプチドと沈澱物を形成する2価または3価の金属イオンを使用することであった。そのような2価または3価の金属イオンとしては、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、酢酸亜鉛などの亜鉛塩、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウムなどのカルシウム塩、塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩、塩化銅、硫酸銅などの銅塩で検討を行った。どのイオンにおいても沈殿形成は認められたが、なかで

も亜鉛イオンを用いたときが好ましい結果であった。

疎水基と、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などの陰イオン残基を併せもつ化合物を配合する必要がある。1次粒子作製時に検討した疎水基と陰イオン基の両者を有する有機化合物としては、様々な有機化合物について調べたが、最終的にはミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、とパルミチン酸を中心に検討した。今年度の成果としてのインスリンについては、ミリスチン酸が適当であると判断できる結果を得た。更に、陰イオン基としては、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などいくつもの陰イオン残基を有する化合物で検討した。その結果、どの陰イオン基をもつ化合物でも1次粒子の作製は可能であるという結果であった。

界面活性剤の検討の結果としては、特にTwee n 8 0が最も適しているとの結果であり、それによって作製することとした。作製されたナノ粒子にカルシウムイオン、炭酸イオンを順次結合させていくわけであるが、種々検討した結果、塩化カルシウムと炭酸ナトリウムがよいとの結果であり、それを用いたカルシウムイオンに対する炭酸イオンの比はモル比で1 : 0. 0 5程度であればかなり良い粒子となるとの結果であった。

作製したインスリンナノ粒子の粒径はその条件により種々のものが得られた。小さなものは10～20 nm、通常は100～300 nm、大きなときは500 nmになるが、PK、PD試験ではかなり類似の成績が得られた。以下述べる動物実験の成績は、ミリスチン酸かミリスチン酸ナトリウムを用いたものである。インスリンナノ粒子のPK・PDを行なった。正常マウス 糖尿病マウスに三次ナノ粒子を中心に、50, 100, 200 μ gの投与で比較し、また種々の粒径のナノ粒子を各種正常、および糖尿病マウス・ラットで検討したところ、ばらつきはあるが類似の成績が得られた。表にしてまとめているが、正常マウスのd d Yと、糖尿病モデルマウスのd B / d Bおよびk k A yの3系統のマウスで、現インスリン製剤と本研究で作製したナノ粒子製剤との比較実験を行なった。現インスリン製剤は3から5 μ g / h e a dを背部皮内投与し、本研究のインスリンは200 μ g / h e a dの用量をグリセリンを基材とした製剤として背部皮膚に塗布した。その結果を表として示した。d d Yマウスにおいて、血糖降下作用が示された。また、糖尿病モデルマウス（d B / d Bおよびk k A yの両者共）でも血糖降下作用が認められた。これらのマウスにおける血糖降下作用は、モノマーのインスリンでの結果と比較して d B / d Bで55倍、 k k A yで57倍 であった。ナノ粒子化したインスリンにおいてはどのマウスにおいてもAUCは約20であり、現使用製剤のモノマーインスリンではどのマウスにおいても約25程度であった。この結果からは、本研究の製剤が遜色ない薬理作用を発揮できることを示している。適用したインスリン

が吸収されているか否かについて、マウスの採血を行ってインスリンの血中濃度を測定し、AUCとして換算した。血糖降下作用が認められた際の本製剤を経皮適用した動物の血中インスリン値は、現行製剤のモノマーインスリンの皮下投与と比較して、110倍であった。表の下段に示したように、ナノ粒子化した本製剤によると考えられるインスリン濃度の測定がなされた。

D. 考察

今年度については、主にインスリンの注射によらない投与方法に適する製剤を作製するために、ナノ粒子化する方法について研究を行なった。インスリンは現社会において急増している糖尿病患者にとって必要不可欠なものであるが、現製剤は自己による皮下注射による治療が主に行われており、患者にとって非常に苦痛でありまた毎日（1回ないし2回）の投与義務があつて精神的にまた社会生活を営む上で、いろいろと不便な点が多いことは明らかである。もし、注射ではなく皮膚への塗布が可能になるとか、服薬が可能となれば、患者にとってのQOLが飛躍的に改善されるであろうことは容易に想像できる。また、徐放性を持たせることもできれば、1日に何回も投与することなくなることも可能になると思われる。

東京慈恵会医科大学DDS研究所においては、これまでにターゲット能を持った徐放性ナノ粒子製剤、たんぱく質医薬の徐放製剤、炭酸カルシウムのナノ粒子などを開発してきた。これらの製剤は、静脈内投与、皮下投与、経皮投与などで適用可能である。そこで、この技術を応用して幅広いたんぱく質医薬、特にインスリンの経皮吸収製剤の開発を目指した。ナノ粒子化することによって皮膚のバリアーを通過することができる可能性を考えた。インスリンをまず不溶化して有機溶剤と混和してから、水中に滴下して作製するナノ粒子の作製方法から検討を開始した。不溶化する方法については、これまでにG-CSFで経験をつんできているのでそれを参考に検討した。2価または3価の金属イオンについて、相当広範囲に検討した結果、やはり亜鉛イオンが最適であった。また、粒子として作製したあとの製剤化を考慮すると、その粒子が付着しあったり凝集することがあると、見かけの粒子径が大きくなり経皮吸収されない可能性が考えられたので、均一なナノ粒子とするために、粒子作製時に添加する化合物について様々な検討を行った。その結果として、インスリン製剤作製にはミリスチン酸を存在させること、また界面活性剤としてTweenを用いることを見出した。それでもなお、作製した粒子の物理的および化学的安定性を増すために、カルシウムイオンに炭酸イオンを用いて結果的には炭酸カルシウムのシェルとすることを考えた。この炭酸カルシウムでの被覆を行なわないイ

ンスリン粒子を皮膚に適用しても、その吸収は極端に悪いものであった（データは未発表）。一方、炭酸カルシウム被覆の本研究で作製したインスリンナノ粒子は、結果で示したように、経皮吸収され血中のインスリン濃度が上昇し、かつ血糖値の下降作用が認められる。したがって、この製剤が経皮吸収されるのには炭酸カルシウムでできた粒子であることが重要な要因となっている可能性がある。我々がこれまでに別の化合物に対して作製した炭酸カルシウムナノ粒子が、経皮投与で薬理学的効果を示しているという事実と矛盾しないと考えている。

この血糖値の下降作用は正常マウスばかりでなく、糖尿病の病態モデルマウスのd B/d Bマウスでもk k A yマウスでも認められたことから、糖尿病治療に用いることが可能であると思われる。事実、この製剤を皮膚に塗布したとき皮膚の角質層にインスリンが染色されることから、この製剤が経皮吸収されていることが証明されている。また、適用数時間後においてもその角質層で検出できることから、炭酸カルシウムのナノ粒子として長時間にわたって徐放している可能性も考えられる。このことは、経皮適用した動物実験での血糖値下降が1時間目から徐々に現れ始め実験を行なった6時間後でもなお継続していたという結果と一致している。なお、現インスリン製剤を皮下投与すると、投与30分後に降下は最大となり、3時間後には相当の効果の減弱が生じると対照的である。

現在までの実験結果では、効果をみとめるものの、投与量が皮下投与に比べてかなり大量でなければ同等の効果が得られていない。これは現在の作製方法でのインスリンの粒子内への封入率の問題であろう。これを改善することが今後重要な研究すべき事項である。

さて、本年は1年目であり、今後の方針を決めなければならない。今後の方針として考えられるのは、ラットでは効果があるが、他の動物で調べる。現在の製剤で、ヒトで検討してみる。現在の製剤を改良する。全く別のナノ粒子を用いる、の4つであろう。教科書的、文献的にマウス、ラットの皮膚とヒトで、薬物が吸収しやすい皮膚の薄い場所の組織像を比べてみると、構造的にそれほど差異は見られないので私どもは②の現在の製剤でヒトで検討してみる、を進めておきながら他の3つを平行検討するのがよいのではないかと考えている。この程度の吸収であれば臨床試験上まったく危険はなく、また2型の糖尿病の初期からも使えるという医学上の著しいメリットがあるため、倫理委員会を通して臨床試験をすることは医学的・倫理的に正しいと考えている。

現在の製剤をヒトに用いるとして、可能かどうか、また採算が合うかを検討してみると次のようになる。特に2型の糖尿病患者の基礎分泌の補填には一日10～15単位で十分である。本経皮製剤が8時間もつとして、1回3～5単

位、皮下注射の30倍必要として1回100～150単位、mgとすれば5mg以上、近いうちインスリンがバイオで1g2万円で作製できるとして、1回の経皮投与量が100円少し、つまり製剤として500円のを1日3回投与することで十分であり、採算も合い、医療経済上も間違いなくプラスになるものと思われる。

E. 結論

本研究では、たんぱく質医薬の製剤を作製することが主な目標である。今年度の研究として、インスリンを取り上げ、亜鉛、ミリスチン酸を混合し、アセトンに溶かし水中で懸濁する方法により、ナノ粒子製剤の作製を試みた。その結果として、粒子内にインスリンを取り込ませた製剤の作製に成功した。この製剤の作製方法の概念については、条件検討を広範囲に行った。しかしながら、粒子径を自在にコントロールするところまでには至っていないこと、封入率がそれほど高くないことなど、まだ改善しなければならない点が残っているのも事実である。しかしながら、作製したインスリン・ナノ粒子を動物に投与した場合、たとえ皮膚への塗布によっても血糖値の下降ならびに血中インスリン濃度の上昇が確認された。この結果は、この製剤作製法が根本的に用いることができないというのではなく、粒子内への封入率さえ上昇すれば臨床的に使用可能であることを示唆しているものと思われる。

得られた結合体自体が目的とするナノ粒子そのものであり、驚くべきことに、このナノ粒子を経皮、経粘膜投与した場合に、当該ナノ粒子がキャリアーとして作用し、そこに含有された生理活性たんぱく質またはペプチドを良好に生体内吸収させるものであり、その生体内吸収性は高く、注射投与に代わり得るものとなる。

実験モデルとして使用したポリスチレン粒子の研究結果からは、今後さらに確認を行なう必要があると思われるが、経腸吸収用製剤の作製できる可能性が示唆された。

しかし、最も大切な血糖降下作用が未だ十分ではないとしても、このままの製剤でもヒトに応用することは可能であり、来年度は臨床試験を行う予定である。それとともに本製剤の改良か、全く別のナノ粒子を作るなどの研究も進めたいと思っている。

平成 17 年度

研究要旨

作製条件の検討結果にしたがって作成したインスリンを含むナノ粒子（ナノインスリン）は、均一な粒子であって、封入されたインスリンに変性は認められない。マウス背部皮膚に塗布した実験では、血中インスリン濃度の上昇と血糖値の持続的な下降が観察された。ボランティアの前腕内側に塗布したとき、有意な血糖値低下を認めなかった。

A. 目的

これまで開発してきた技術を応用して活性をもつ蛋白質をナノ粒子化することにより、経皮・経粘膜の吸収を飛躍的に上昇させる技術の開発を試みる。本年度については、動物での実験結果を踏まえて、ヒトでの検証を行うことを目的とした。なお、詳細な内容については分担研究者の報告に記載したので、本総括報告においては簡潔に記載するに留める。

B. 研究方法

1. 蛋白質のフォールディングを調節して製剤を作製することの利点などについて基礎的な情報を集積した。
2. 昨年度の本研究によって得られたナノ粒子の作製条件に基づいて、インスリンと亜鉛、ミリスチン酸、Tween80、炭酸カルシウムを用いることによりナノインスリン粒子の作製を行った。このナノインスリン粒子の物理的な性質について調べた。
3. ナノインスリン粒子に封入したインスリンに変性などが生じていないかを検討した。
4. 動物実験を行って、ナノインスリンの有効性や安全性について調べた。正常マウスと糖尿病モデルマウスを用いて、比較した。
5. ボランティアを募り、ヒトにこのナノインスリン粒子を適用し、その安全

性と有効性について調べた。

C. 研究成果

1. 本年度は、蛋白医薬そのものではなく N S I D s の場合で検討をおこなった。誘導される分子シャペロンの種類ならびにその性質について検索を行い、この分子シャペロンが蛋白のフォールディングと関係があることを示唆する結果を得た。
2. 作製条件を決定して、ナノインスリン粒子の作製を行った。粒子径測定器を用いてナノインスリン粒子の径の測定とそのばらつきを調べたが、平均して約 200 から 300 nm の粒子径であった。そのばらつきはおおきいものではなかった。また、電子顕微鏡による観察においても、均一な粒子であることが証明され、おおきな凝集塊は見受けられていない。
3. 高速液体クロマトグラフィー (H P L C) を用いて、ナノインスリンに封入したインスリンを分析したところ、モノマーインスリンと同一の保持時間に単一のピークが認められた。また、ナノインスリン粒子から放出させたインスリンを抗体を用いた E L I S A で測定したところ、十分な量の検出が可能であった。
4. 動物実験として、正常動物として d d Y マウス、糖尿病モデルマウスとして d B / d B マウスと k k A y マウスの合計 3 系統のマウスを用いて、ナノインスリンを背部皮膚に塗布したところ、血中インスリン濃度の上昇と血糖値の有意な低下を認めた。この血糖値低下はナノインスリン粒子の塗布後 6 時間後においても認められた。一方、モノマーインスリンの皮下投与では 6 時間後にはコントロールと同値に戻っていた。また、このナノインスリン粒子の皮膚への塗布によっては、塗布部位に特に変化は認めなかった。
5. 健常ボランティア 2 名 (男性、71 歳と 64 歳) の前腕内側にナノインスリンを塗布して、時間を追って血糖値を測定した。塗布後 5 時間まで測定を行ったが、インスリンを投与していないコントロールの時間経過と比較して有意な低下は認められていない。

D. 考察

蛋白医薬（インスリン）をナノ粒子化することに成功し、現段階では均一な粒子（ナノインスリン）が作製可能となっている。蛋白のフォールディングを調節出来るようになれば、さらに効率の良い粒子作製が可能になると考えられる。本年度行ったマウスの皮膚へのナノインスリン塗布の実験においては、インスリンの吸収と血糖値低下が観察されたが、ヒトにおいては観察されていない。皮膚構造の違いによるかもしれないが、さらに粒子作製の検討を行う必要があるかもしれない。しかし、この大きさのナノインスリンを別の部位の皮膚に適用して検討することも必要かもしれない。また、別の投与経路（例えば、経肺投与など）での可能性について検討する価値はあると思われる。

E. 結論

昨年度までの条件検討の成果に基づいて、均一なナノインスリン粒子が作製された。マウスを用いた動物実験においてこのナノインスリン粒子の経皮吸収を示唆する結果が得られ、また血中血糖値低下という作用の確認がなされた。平成 18 年度に予定していたヒトでの試験を本格的に始める前に、ボランティアを募ってプレリミナリーに試みることができた。ヒトの前腕からの吸収が低いために、血糖値降下までの観察はなされなかった。

以上の研究成果を総合的に見てみると、本年度の研究は実施計画に従って順調に進捗したと思われる。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
水島 裕	抗加齢医療とは	日本医事新報	4236	1-11	2005
水島 裕	アンチエイジング医療と再生医療はじめに	医学のあゆみ	214	127-129	2005
水島 裕	炎症性・免疫疾患に対するステロイド療法のこつ	ステロイドの使い方こつと落とし穴 (中山書店)		112-113	2006
水島 裕、桧垣 恵	D D S 研究のあゆみとわが国の貢献	<i>Pharm. Tech. Japan</i>	21(12)	1945-1948	2005
Higaki M., Kameyama M., Udagawa M., Asano S., Yamaguchi Y., Igarashi R., and Mizushima Y.	Transdermal delivery of CaCO ₃ -nanoparticles containing insulin	<i>In submission</i>			
Mizushima Y., Ikoma T., Tanaka J., Hishi K., Ishihara T., Ogawa Y. and Ueno A.	Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs	<i>Control. Release</i>	(In press)		2006
Ishihara T., Izumo N., Higaki M., Shimada E., Hagi T., Mine L., Ogawa Y., and Mizushima	Role of Zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its	<i>J. Control. Release</i>	105	68-76	2005

Y.	release profile				
Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., and Mizushima Y.	Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticle for a new delivery system.	<i>J. Control. Release,</i>	103	93-98,	2005.
Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect	<i>Cancer Res</i>	65	1868- 1876	2005
Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.	Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	50	1641- 1646	2005

Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., and <u>Mizushima, T.</u>	Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	50	1927- 1937	2005
Sone, M., Hayashi, H., Yamamoto, H., Hoshino, T., <u>Mizushima, T.</u> , and Nakashima, T.	Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation.	<i>Hearing Research</i>	204	140-1 46	2005
Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Nanba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S. and <u>Mizushima, T.</u>	Involvement of intracellular Ca^{2+} levels in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis.	<i>J. Biol. Chem</i>	280	31059 -3106 7	2005

Ushijima, H., Tanaka, K., Takeda, M., Katsu, T., Mima, S. and <u>Mizushima, T.</u>	Geranylgeranylacetone protects membranes against non-steroidal anti-inflammatory drugs.	<i>Mol. Pharmacol.</i>	68	1156-1161	2005
Tsutsumi, S., Namba, T., Tanaka, K., Ishihara, T., Arai, Y., Aburaya, M., Suzuki, K., Hoshino, T. and <u>Mizushima, T.</u>	Celecoxib up-regulate endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced apoptosis in human gastric cells.	<i>Oncogene</i>	in press.		2005
上野晃憲、水島裕	医療におけるナノテクノロジー	Annual Review 呼吸器 2005		58-63	2004
T. Ishihara, N. Izumo, M. Higaki, E. Shimada, T. Hagi, L. Mine, Y. Ogawa, and Y. Mizushima	Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile	Journal of Controlled Release			in press
石原 務、出雲夫、水島裕	ナノ微粒子製剤の開発とそのDDSへの応用	Pharm Tech Japan	20(13)	2621-2627	2004

石原務、出雲信夫、檜垣恵、水島裕	新しく開発中の薬剤① ーナノステロイドー	炎症と免疫	13(2)	143-1 47	2005
Ueno Y. Futagawa H. Takagi Y. Ueno A. Mizushima Y.	Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for new delivery system	J. Controlled Release			In press
Mizushima Y. Ikoma T. Obata A. Futagawa H. Shimada E. Ishihara T. Ogawa Y. Tanaka J.	Injectable porous hydroxylapatite microparticles for the delivery of protein and lipophilic drugs	J. Controlled Release			In press
Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions.	<i>Biochem.</i> <i>Pharmacol.</i>	67	575-5 85	2004
Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs.	<i>Dig. Dis.</i> <i>Sci.</i>	49	210-2 17	2004