

20050113A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成18（2006）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評価法に関する研究 12

米谷芳江

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 20

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

インスリン凍結乾燥製剤の安定性は、インスリン分子の β 緩和に相当する運動を抑制し、 β 緩和が分解速度の律速段階となるような添加剤を加えることによって、著しく改善されることが明らかになった。また、 β -ガラクトシダーゼはPVA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安定化でき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導入製剤は、凍結時に添加する糖の種類によってリポソーム製剤の分散性および遺伝子導入効率が異なり、isomaltotriose や isomaltose によって安定性の高いリポソームが調製できることが明らかとなった。

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前年度の研究によって誘電緩和時間およびNMR緩和時間で測定される分子運動性が安定性と密接に関連することが明らかになったタンパク質凍結乾燥製剤について、さらに分子運動性を指標とするタンパク質凍結乾燥製剤の安定性評価法の確立のために必要な基盤を築くべく検討を加えた。すなわち、安定性の決定要因としての分子運動性の重要度を、もう一つの決定要因である分解反応の活性化エネルギー

ギーの重要度と比較して、安定性に対するそれぞれの相対的寄与率を定量的に解析した。同時に、タンパク質分子の分子運動性を抑制し、製剤の安定性を改善することができる添加剤の特性を、タンパク質との相互作用能力の観点から検討し、安定性に優れたタンパク質凍結乾燥製剤の開発のための合理的な処方設計を検討した。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やポリビニルアルコール(PVA)ゲルについて保存安定性を検討した。さらに、③安定性の高いDNA導入製剤の開発を目指して、凍結乾燥再水和法によって調製したDNA封入りリポソームについて、リポソームの組成、リポソームとDNAの比、および凍結時に添加する糖の種類によるリポソームへの遺伝子封入率と、DNA封入りリポソーム製剤の分散性、細胞への遺伝子導入効率への影響を検討した。

B. 研究方法

タンパク質凍結乾燥製剤の安定性の決定要因としての分子運動性の重要度

インスリン凍結乾燥製剤は、ポリビニルピロリドン 10k(PVP)、デキストラン 40k、トレハロースおよび poly(hydroxyethyl)aspartamide(PHEA)の各添加剤と human insulin の pH4.0 水溶液から凍結乾燥して調製した。製剤を一定の温湿度条件下 (LiBr H₂O 飽和溶液:6% 相対湿度(RH); LiCl H₂O:12%RH; 酢酸カリウム:23%RH; MgCl₂ 6H₂O:33%RH; K₂CO₃ 2H₂O:43%RH; NaBr 2H₂O:60%RH)に保存した後、インスリンの分解量を HPLC で、インスリンの二量体生成量を HP-SEC で測定した。凍結乾燥製剤の T_g を温度変調 DSC で測定した。

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

β-ガラクトシダーゼとメタクリル酸(GMA)を修飾したデキストランあるいは PVA 水溶液とポリエチレングリコール水溶液からエマルジョン

を調製し、γ線を照射することによって、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。50℃あるいは60℃、75%RHに保存後、活性を測定し、保存時の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。

遺伝子封入りリポソームの遺伝子封入率および遺伝子導入率の測定

3種類の組成の異なるリポソームを用いて、リポソームとDNAの比を変えた複合体を調製し、遺伝子導入効率の最適な脂質組成と、リポソームとDNAの比を検討した。

凍結乾燥再水和法による遺伝子封入りリポソーム製剤は、DC-Chol:DOPE(モル比3:2、1:2)からなるリポソーム懸濁液に、リポソームのプラス荷電とDNAのマイナス荷電が2:1になるようにプラスミドDNAを添加した後、その溶液にSucrose、IsomaltoseあるいはIsomaltotrioseを加え(全脂質:添加剤1:5)、液体窒素で急速凍結した後、凍結乾燥した。得られた凍結乾燥製剤を再水和し、リポソーム製剤の分散性を調べた。また、Hela細胞におけるルシフェラーゼ発現量から、遺伝子導入効率を測定するとともに、PicoGreen dsDNA法によってリポソームに封入されたプラスミドDNAを測定した。さらに、凍結乾燥製剤のT_gおよび水分吸着等温線を測定するとともに、再水和して得られたリポソームの粒子径を動的光散乱法により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、広く用いられている培養細胞のみを用い、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の決定要因としての分子運動性の重要度

PVP、デキストラン、トレハロースおよび PHEA を添加剤として調製したいずれの凍結乾燥製剤においても、HPLC で測定したインスリン量の減少のタイムコースは初期段階では1次速度式にフィットした。1次速度定数から算出した t₉₀ (インスリンの分解が10%進行するのに

要する時間) を Fig.1 および Fig.2 に、それぞれ T_g で規格化した温度に対してプロットした。

HP-SEC で測定した二量体生成の初期のタイムコースも同様に 1 次速度式にフィットし、1 次速度定数から t_{90} を算出することができた。インスリンは酸性溶液中で、あるいは酸性溶液から凍結乾燥した状態では、cyclic anhydride intermediate 形成を介して脱アミド体および二量体を生成することが知られているが、PVP、デキストラン、トレハロースおよび PHEA のいずれの製剤においても同様に、律速段階である cyclic anhydride intermediate 形成を経て、脱アミド体および二量体を生成することが確認された。Fig.3、Fig.4 および Fig.5 に示すように、12%RH ではいずれの製剤においてもインスリン分解速度 (中間体生成速度) は二量体生成速度よりも有意に速い (t_{90} が小さい) ことから、cyclic anhydride intermediate から二量体ばかりでなく脱アミド体も生成されることが分かった。湿度が高くなると、分解速度と二量体生成速度の差が小さくなり、脱アミド反応の比率が低くなることが明らかになった。

Fig.1 および Fig.2 に示した t_{90} の温度依存性に基づいて、インスリン分解速度の決定要因としての分子運動性の重要度を解析した。二分子反応のように反応種の拡散速度が反応速度を支配する反応では、見かけの速度定数 k_{obs} は Collins-Kimball 式にしたがって、拡散速度によって決定される速度と、活性化エネルギーによって決定される速度定数 k_{act} の関数として表すことができる。我々は、この Collins-Kimball 式中の拡散速度によって決定される速度が構造緩和時間 τ と逆比例すると仮定して、拡散速度によって決定される速度を τ で表すことによって Modified Collins-Kimball 式(1 式)を導入した。

$$k_{obs} = k_{act} \left(\frac{\alpha T \left(\frac{1}{\tau} \right)^\xi}{k_{act} + \alpha T \left(\frac{1}{\tau} \right)^\xi} \right) \quad (1)$$

ここで、 ξ は τ と拡散係数間のデカップリングの割合を表す定数、 α は τ と k_{obs} 間のカップリングの割合を表す定数である。インスリンの分解

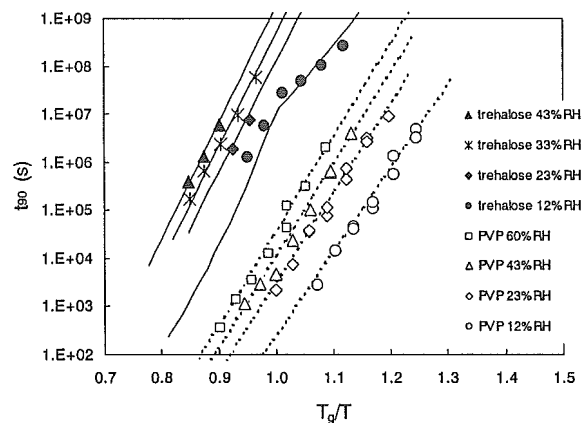


Fig.1. Temperature dependence of t_{90} for trehalose and PVP formulations

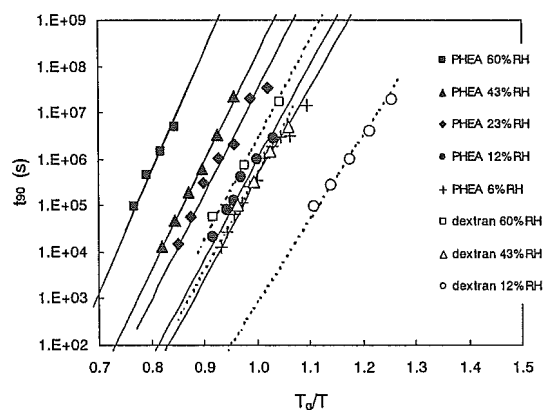


Fig.2. Temperature dependence of t_{90} for PHEA and dextran formulations

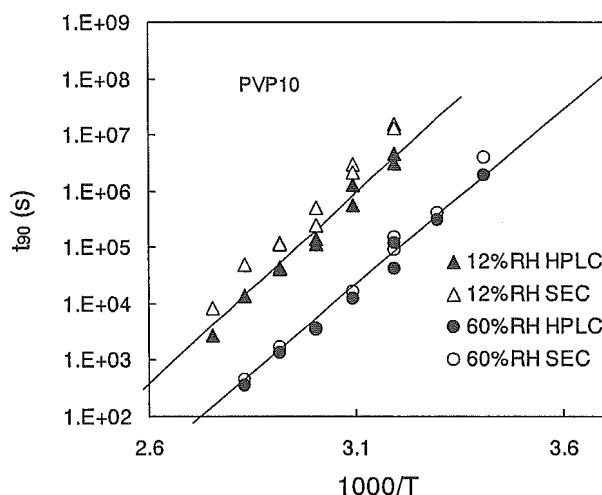


Fig.3. t_{90} for PVP formulation determined by HPLC and SEC

が拡散過程を含むと仮定して、Fig.1およびFig.2に示した t_{90} の温度依存性を1式にしたがって非線形回帰分析（実線および点線で示す）することによって、 k_{obs}/k_{act} 、すなわち分子運動性の低下が分解速度を低下させる度合を表す指標を計算した。

PVP 製剤およびデキストラン製剤の t_{90} は、いずれの湿度条件においても、 T_g 周辺で温度依存性の勾配変化を示さず、1式への曲線回帰分析の結果、 T_g における k_{obs}/k_{act} は1と推定された。さらに、 T_g における t_{90} は、湿度（すなわち製剤の T_g ）によって大きく異なった。これらの結果から、PVP 製剤およびデキストラン製剤中のインスリンの分解速度は分子運動性に依存せず、活性化エネルギーによって決定されることが明らかになった。

一方、トレハロース製剤では、低湿度条件（12%RH）において、 t_{90} の温度依存性の勾配が T_g 付近で変化した。 k_{obs}/k_{act} の値は、Fig.6に示すように、 T_g に相当する温度で最小になった。12%RH では T_g における k_{obs}/k_{act} は0.05と著しく小さい値を示した。 k_{obs}/k_{act} は湿度の上昇とともに増大し、23%RH、33%RH および 43%RH では、それぞれ0.91、0.98、0.99であった。これらの結果から、トレハロース製剤中のインスリンの分解速度は、湿度が高い条件下では主に活性化エネルギーに支配されるが、湿度が減少するにしたがって分子運動性に大きく影響されるようになることが明らかになった。

PHEA 製剤中のインスリンの分解速度は、トレハロース製剤と同様に、低湿度条件下において分子運動性に依存した。 k_{obs}/k_{act} の温度依存性をFig.7に示す。 T_g における k_{obs}/k_{act} は、6%RH および 12%RH では、それぞれ0.6 および 0.8であり、それ以上の湿度条件下では1であった。これらの結果から、トレハロース製剤中のインスリンの分解速度は、低湿度下においてインスリン製剤ほど顕著ではないが、分子運動性に依存することが明らかになった。

トレハロース製剤および PHEA 製剤の 12% RH における t_{90} は、同一温度の PVP 製剤およびデキストラン製剤の t_{90} に比べて著しく短かった。これは、トレハロース製剤および PHEA 製剤では分子運動性が低いために分解速度が減少する

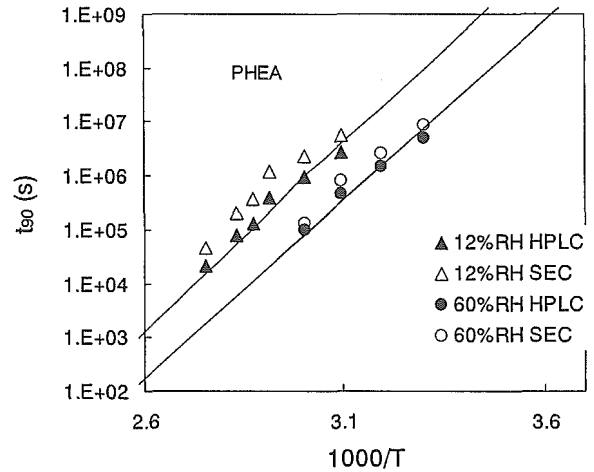


Fig.4. t_{90} for PHEA formulation determined by HPLC and SEC

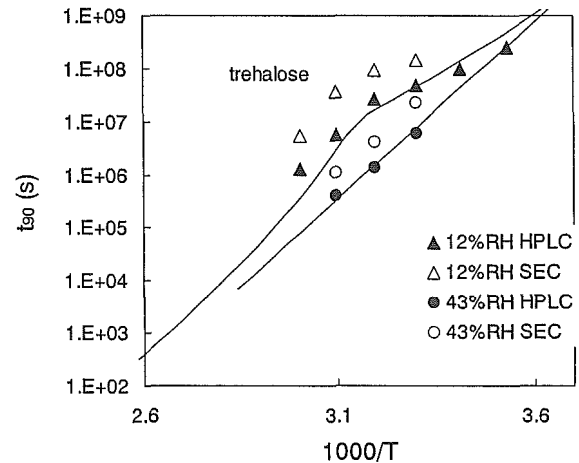


Fig.5. t_{90} for trehalose formulation determined by HPLC and SEC

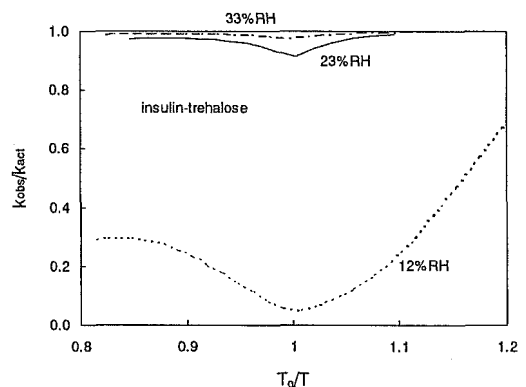


Fig.6. Degree of reduction in k_{obs} caused by reduced molecular mobility for trehalose formulation

ためであると考えられる。ここで、トレハロース製剤および PHEA 製剤は PVP 製剤およびデキストラン製剤に比べて、 T_g が低く、マトリックスの分子運動性が高いことが分かり、分解に関わる分子運動はマトリックスの運動性ではなく、インスリン分子の β 緩和であることが示唆された。

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安定性

Fig. 8 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保存の影響を示す。50°C 75%RH に 5 日間保存すると、ゲル化していない凍結乾燥品は 80%まで活性が低下したのに対し、ゲル化したマイクロスフェア製剤では活性が保持されていた。前年度の検討により、デキストランをゲル化すると凍結乾燥時の β -ガラクトシダーゼの失活を抑制できることを明らかにしたが、ゲル化したデキストランは凍結乾燥後の保存中においても β -ガラクトシダーゼを安定化できることが明らかとなった。また、高分子として PVA を用いゲル化することによっても、 β -ガラクトシダーゼの保存安定性が改善されることが明らかになった。Fig. 9 に示すようにゲル化していない PVA とともに凍結乾燥した β -ガラクトシダーゼは 60°C、75%RH で保存すると 1 日以内に活性を失うが、ゲル化した PVA 中では 5 日保存しても約 20%しか失活せず、PVA ゲルもタンパク質の安定化に利用できることが示された。今後、個々のタンパク質の物理化学的特性に適した水溶性高分子を選択できるように、デキストランや PVA 以外にハイドロゲルマイクロスフェア化が可能な水溶性高分子を探索ことがタンパク質の効率的な安定化につながるものとする。

凍結乾燥再水和法によって調製した遺伝子導入リポソーム製剤の遺伝子封入率と遺伝子導入効率 (1)

組成の異なる 3 種のリポソームを用いて、リポソームと DNA の比を変えた複合体を調製し、遺伝子導入効率の最適な脂質組成と、リポソームと DNA の比を検討した結果、リポソームの組成とし

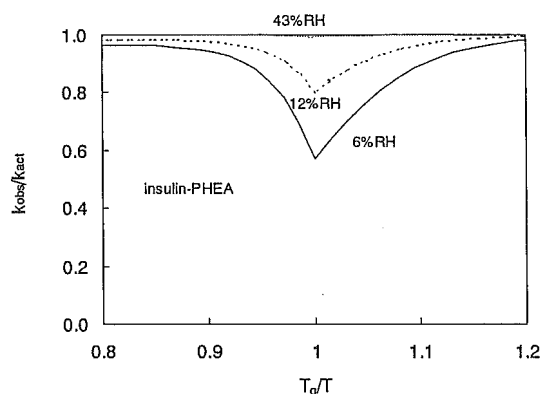


Fig.7. Degree of reduction in k_{obs} caused by reduced molecular mobility for PHEA formulation

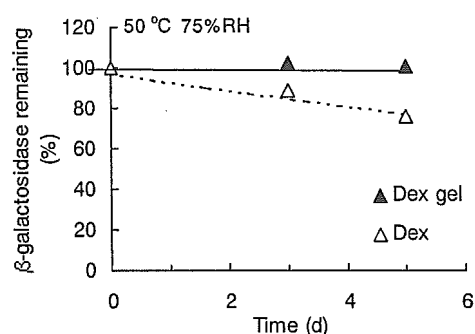


Fig. 8 Effect of storage on β -galactosidase activity in dextran gel

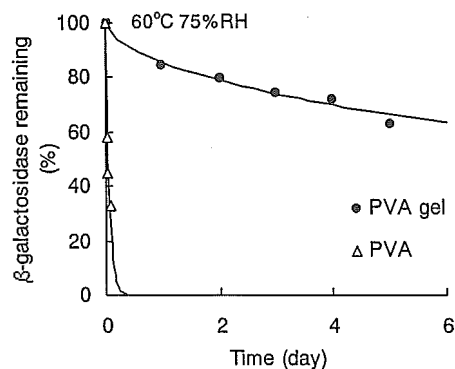


Fig. 9 Effect of storage on β -galactosidase activity in PVA gel

ては、正電荷脂質 DC-Chol とヘルパー脂質 DOPE のモル比 3:2、1:2 (Fig. 10)、リポソームと DNA の比は、リポソームのプラス荷電と DNA のマイナス荷電 (+/-) 2:1 のとき、最も遺伝子導入効率が高いことが明らかになった (Fig. 11)。

これらの 2 種の組成と荷電比を用い、3 種類の糖を添加して凍結乾燥再水和法によって調製

した DNA 封入りリポソーム製剤について、再水和後のリポソーム懸濁液の分散性、遺伝子封入率と、細胞への遺伝子導入効率を検討した結果、リポソームと DNA の荷電比(+/-)が 2:1 おけるリポソームの組成では、DC-Chol/DOPE (モル比 3:2)リポソームは DC-Chol/DOPE (1:2) に比べて、分散性が低下した (Table 1)。これはリポソームの正電荷に対する DNA の荷電比が 2 であるため、DC-Chol/DOPE (モル比 3:2)では、DNA 量が多くなり、リポソーム膜に吸着しにくくなり、凝集し不安定になったことが示唆された。

添加した糖の種類による遺伝子封入率の影響を検討した結果、凍結乾燥前のリポソームと DNA 混合懸濁液では、遺伝子封入率は、isomaltose > isomaltotriose > sucrose の順に高く、凍結乾燥製剤では、isomaltose > sucrose > isomaltotriose の順に高くなった (Fig. 12)。凍結乾燥前の懸濁液では、遺伝子が正電荷のリポソームに吸着していると考えられ、凍結乾燥製剤では遺伝子のリポソームへの吸着と封入があると推察される。

遺伝子導入効率では、リポソームと DNA 混合懸濁液では、isomaltotriose > isomaltose > sucrose の順に高く、凍結乾燥製剤では、糖の種類による差はなかった (Fig. 13)。また、凍結乾燥製剤は凍結乾燥前の混合懸濁液とほぼ同じ遺伝子導入率を示した。

これまでのリポソーム懸濁液と DNA の凍結乾燥製剤では、DNA の活性、すなわち、遺伝子導入効率が低下することが知られており、そのため、凍結乾燥したりポソームに必要時に DNA を添加し、再水和して、遺伝子導入製剤としてきた。

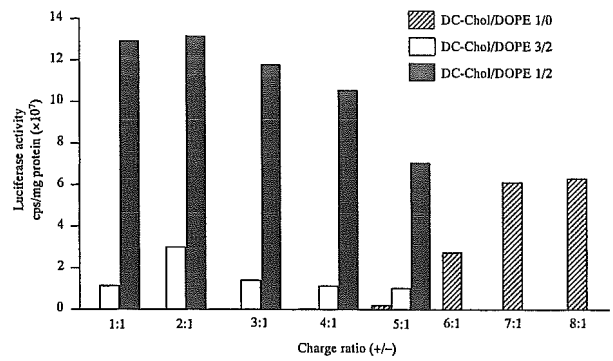


Fig. 10. (+/-) 荷電比を変えた時のリポソーム/DNA 複合体ベクターによる遺伝子導入効率

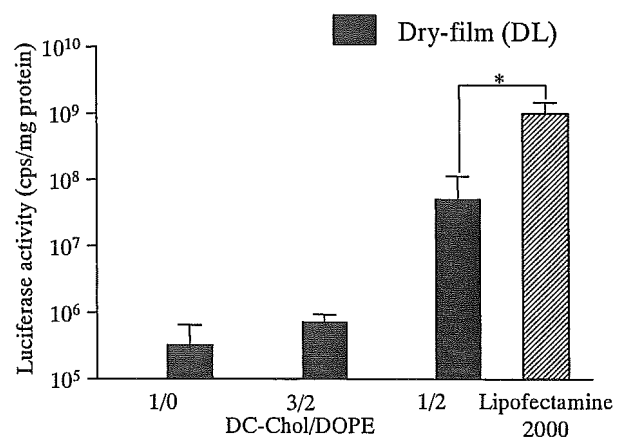


Fig. 11. 最適混合荷電比 (+/-) でのリポソーム/DNA 複合体ベクターによる遺伝子導入効率

この結果より、糖を用いて凍結乾燥した遺伝子封入りリポソーム製剤では封入された DNA は活性を保持していると推察される。特に isomaltotriose や isomaltose では、その効果が高いことが示唆された。

Table 1 プラスミド DNA-塩基性リポソーム製剤の組成

Formulation	DC-Chol : DOPE	Lipid (μg/tube)	Total Lipid (μg/tube)	DNA (μg/tube)	Excipient (μg/tube)
B-1	3:2	624	949	200	Sucrose 4725
B-2	3:2	624	949	200	Isomaltose 4725
B-3	3:2	624	949	200	Isomaltotriose 4725
C-1	1:2	316	1181	100	Sucrose 5900
C-2	1:2	316	1181	100	Isomaltose 5900
C-3	1:2	316	1181	100	Isomaltotriose 5900

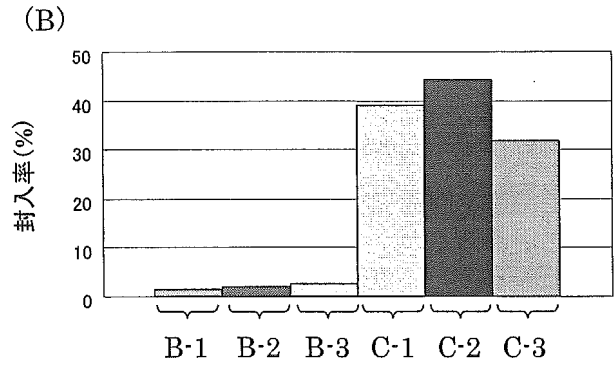
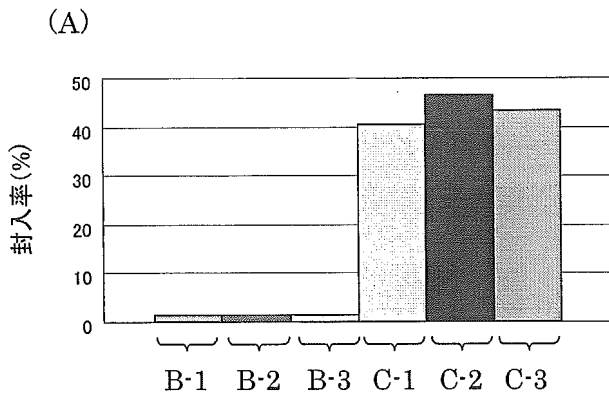


Fig. 12. 凍結乾燥前(A)と凍結乾燥後(B)の遺伝子封入率

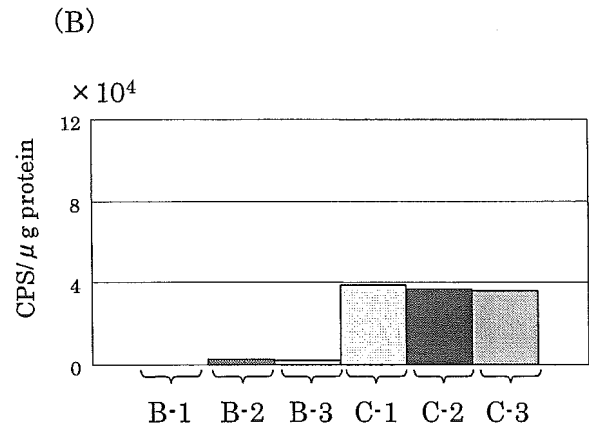
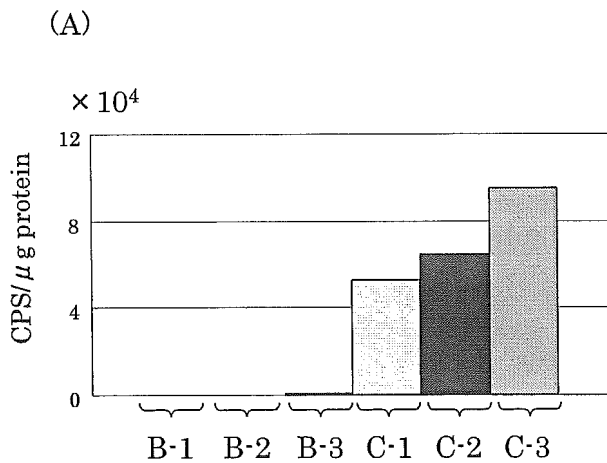


Fig. 13. 凍結乾燥前(A)と凍結乾燥後(B)の遺伝子導入効率

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(2)

Fig.12 および 13 に示すように、凍結乾燥再水和により得られたリポソーム中のプラスミド DNA の封入率や遺伝子導入効率は添加剤によって差が見られたが、その理由をリポソームの粒子径や製剤の T_g および水分吸着等温線に及ぼす添加剤の影響から考察した。いずれの添加剤を含有する場合においても調製直後のリポソームの粒子径は 200~300nm であったが、Fig.14 に示すようにプラスミド DNA を添加することにより 200~300nm の大きさのリポソームのほかに、リポソームと DNA の複合体と考えられる約 600~1400nm の粒子が検出された。また、いずれの添加剤を用いた凍結乾燥製剤においても、再水和し

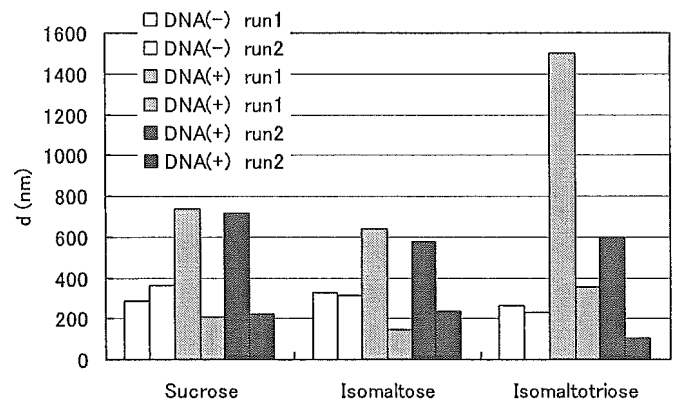


Fig. 14. Effect excipient on the diameter of cationic liposomes prior to freeze-drying

て得られた溶液には主に 200~300nm と約 1000nm のリポソームが検出された(Fig. 15)。このように、リポソームの粒子径は添加剤の影響をほとんど受けなかったことから、添加剤によるプラスミド DNA の安定化作用の差は粒子径と関連しないことが示された。

検討したリポソーム凍結乾燥製剤は DSC 測定によってガラス転移が観測されたことから非晶質であることが明らかになった。凍結乾燥製剤の T_g は Table 2 に示すように Isomaltotriose を含有する製剤が最も高かった。また、いずれの添加剤においてもリポソームのみを含有する製剤に比べ、リポソームと DNA を含有する製剤の T_g が低く、低下の度合は Sucrose、Isomaltose、Isomaltotriose の順で大きくなった。また、Isomaltose や Isomaltotriose を添加剤として用いた場合、DNA を含有ことによってガラス転移の温度範囲が広がった。

水分吸着等温線の結果も Sucrose 製剤と Isomaltose および Isomaltotriose 製剤の間に差があることが示された。Fig. 16 に示すように Isomaltose および Isomaltotriose 製剤ではリポソームと DNA を含有する時の水分吸着量がリポソームのみを含有する場合より低下する傾向が見られたのに対し、Sucrose 製剤においては Sucrose の結晶化が起こらない 60%RH 以下の相対湿度では DNA を含有しても水分吸着量に大きな差は見られなかった。水分吸着量の低下はリポソームと DNA との相互作用によって水とリポソームあるいは水と DNA との相互作用が競合的に阻害された結果と考えられ、3 製剤のうち、水分吸着量の低下が最も大きい Isomaltotriose 製剤はリポソームと DNA との相互作用が最も強く起きていると期待される。

以上の結果から、リポソームに取り込まれたプラスミド DNA の活性が Isomaltotriose 製剤において最もよく保持されるのは、Isomaltotriose が 3 種の添加剤のうち最も高い T_g を有するため、凍結乾燥中の製剤のガラス状態を安定化し、DNA の失活を抑制するからと考えられる。また、水分吸着実験から Isomaltotriose 製剤においてリポソームと DNA が最も強く相互作用していることが示唆されたが、これも DNA の安定化に寄与すると思われる。

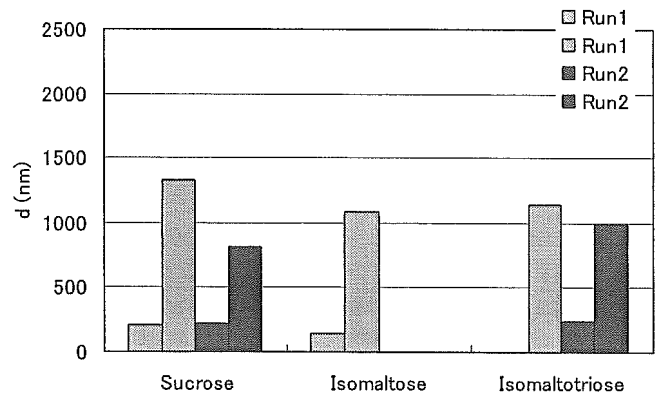


Fig. 15. Effect of excipient on the diameter of cationic liposome after rehydration of lyophilized formulation.

Table 2 T_g of cationic liposome-plasmid DNA formulations

	T_g ($^{\circ}\text{C}$)	
	+Liposome	+Liposome+DNA
Sucrose	72.8	70.3
Isomaltose	96.3	83.9
Isomaltotriose	123.4	99.0

D. 考察

インスリン凍結乾燥製剤の安定性は処方する添加剤によって大きく変化し、インスリンの分子運動を抑制する作用を有する添加剤が安定化に有用であることが明らかになり、安定性に優れたタンパク質凍結乾燥製剤の開発に大いに役立つ知見を得ることができた。安定性に直接関わる分子運動として β 緩和を示唆する結果が得られたが、今後 NMR 等によって分子運動の実体を確認し、安定化メカニズムを詳細に解明することが必要であると考えられる。

また、タンパク質のハイドロゲル製剤についても、タンパク質分子の運動性を抑制することによって安定性を改善できることが示された。今後、 β -ガラクトシダーゼ以外のタンパク質について検討することにより、ゲル化によるタンパク質の安定化の普遍性を検討する必要があると考える。

さらに、凍結乾燥再水和調製法による DNA 封入リポソームについては、各糖の遺伝子封入率、遺伝子導入効率に対する影響を脂質と DNA の荷電比を変えて検討する必要がある。また、凍

結乾燥製剤の温度における安定性も調べる必要がある。

E. 結論

インスリン凍結乾燥製剤の安定性は、トレハロースあるいはPHEAを添加剤として加えることによって著しく改善された。これらの添加剤は製剤マトリックスの分子運動性は高めるが、インスリン分子の β 緩和に相当する分子運動を抑制するため、インスリン分子の運動が分解速度の律速段階になり、分解速度が低下することが明らかになった。それに対してPVPおよびデキストランはインスリン分子の分子運動を抑制できないため、分解速度の決定要因は分子運動ではなく、反応の活性化エネルギーになることが明らかになった。

また、 β -ガラクトシダーゼはPVA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、保存時の失活を抑制できることが明らかになった。

さらに、添加剤としてisomaltotrioseやisomaltoseを用い、凍結乾燥再水和調製法によって調製したDNA封入りリポソームは、sucroseと同様の遺伝子導入活性を有することが明らかとなり、これらの糖がsucroseより高い T_g を有することから活性維持効果が高いことが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso. β -relaxation of insulin molecule in lyophilized formulations containing trehalose or dextran as a determinant of chemical reactivity. *Pharm. Res.* Accepted (2006).
- 2) Y. Aso, S. Yoshioka, Molecular Mobility of Nifedipine-PVP and Phenobarbital-PVP Solid Dispersions as Measured by ^{13}C -NMR Spin-Lattice Relaxation Time. *J.Pharm.Sci.*, 95: 318-325 (2006).

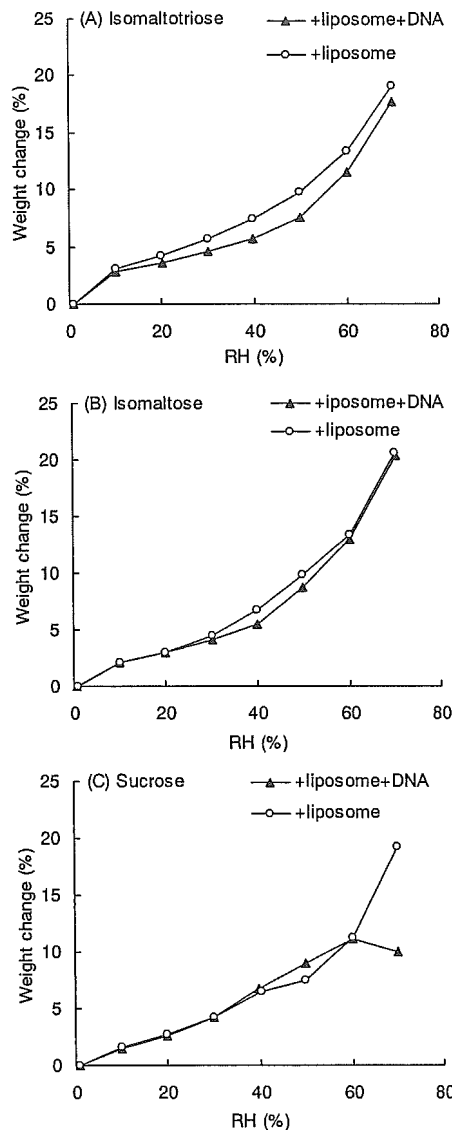


Fig. 16. Water sorption isotherms of cationic liposome-plasmid formulations

- 3) S.Yoshioka, Y.Aso, T. Miyazaki, Negligible contribution of molecular mobility to the degradation rate of insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone). *J. Pharm. Sci.*, 95: 939-943 (2006)..
- 4) S.Yoshioka, Y.Aso, Comparison of the glass transition temperature and fragility parameter of isomalto-oligomer predicted by molecular dynamics simulations with those measured by differential scanning calorimetry. *Chem. Pharm. Bull.* 53:1443-1445 (2005).
- 5) S.Yoshioka, Y.Aso, A quantitative assessment of the significance of molecular mobility as a determinant for the stability

- of lyophilized insulin formulations. *Pharm. Res.* 22: 1358-1364 (2005)
- 6) Y. Aso, S. Yoshioka, Effect of Freezing Rate on Physical Stability of Lyophilized Cationic Liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 301-304 (2005).
 - 7) 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).
 - 8) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. *Int. J. Pharm.*, 308(1-2):183-189, (2006).
 - 9) W.X. Ding, X.R. Qi, P. Li, Y. Maitani, T. Nagai, Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *Int. J. Pharm.*, 300(1-2):38-47, (2005).
 - 10) P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano, Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Control. Release*, 104(2):313-21, (2005).
 - 11) Y. Hattori, H. Kubo, K. Higashiyama and Y. Maitani, Folate-linked nanoparticles formed with DNA complexes in sodium chloride solution enhance transfection efficiency, *J. Biomedical Nanotechnology*, 1(2):176-184, (2005).
 - 12) K. G. Lau, Y. Hattori, S. Chopra, E. A. O'Toole, A. Storey, T. Nagai and Y. Maitani, Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: In vitro stability and toxicity on human cutaneous keratinocyte cell lines, *Int. J. Pharm.*, 300:4-12, (2005).
 - 13) Y. Hattori, and Y. Maitani, Folate-linked nanoparticle-mediated suicide gene therapy in human prostate cancer and nasopharyngeal cancer with herpes simplex virus thymidine kinase, *Cancer Gene Therapy*, 12: 796-809, (2005).
 - 14) Y. Hattori, and Y. Maitani, Folate-linked lipid-based nanoparticle for targeted gene delivery, *Current Drug Delivery*, 2:243-252, (2005).
 - 15) J. Shi, W. Yan, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai, Characteristics and biodistribution of soybean sterylglucoside and polyethylene glycol modified cationic liposomes and their complexes with antisense oligodeoxynucleotide for hepatitis B virus therapy, *Drug Delivery*, 12(6):349-356, (2005).
 - 16) T. Shiokawa, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Ohguchi, H. Kawakami, K. Toma, and Y. Maitani, Effect of the Polyethylene Glycol linker Chain Length of Folate-linked Microemulsions Loading Aclacinomycin A on Targeting Ability and Antitumor Effect in vitro and in vivo, *Clinical Cancer Res*, 11(5):2018-25 (2005).
 - 17) Y. Maitani, K. Nakamura, K. Kawano. Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 6, 81-93 (2005).
 - 18) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori and Y. Maitani, Design, Synthesis and Gene Delivery Efficiencies of Novel oligo-Arginine Linked PEG-Lipid: Effect of Oligo-Arginine Length, *Peptide Science* 2004, 241-242, (2005).
2. 学会発表
- 1) 吉岡 澄江、宮崎 玉樹、阿曾 幸男、ポリビニルピロリドンおよびポリアミノ酸等の高分子含有凍結乾燥製剤におけるインスリンの化学的分解速度の決定要因としての分子運動性の重要度、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
 - 2) 阿曾幸男、吉岡澄江、ポリビニルアルコールゲ

- ルに内包した β -ガラクトシダーゼの活性に及ぼす保存の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 3) 宮崎 玉樹、吉岡 澄江、阿曾 幸男、ニフェジピン類薬物の結晶化速度と分子運動性についての検討日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 4) 吉岡 澄江、宮崎 玉樹、阿曾 幸男、糖類および水溶性高分子含有凍結乾燥製剤中のインスリンの分解速度と固体 ^{13}C NMR で測定した β 緩和速度との関係、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 5) 阿曾 幸男、吉岡 澄江、 ^{13}C -NMR による ニフェジピン-およびフェノバルビタール-HPMC 固体分散体の分子運動性の測定、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 6) Yoshioka, S., Aso, Y. Relative contributions of molecular mobility and chemical activation barrier to the degradation rate of lyophilized insulin, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2005.11)
- 7) Aso, Y., Yoshioka, S. Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers in solid dispersions, as determined by ^1H -NMR spin-lattice relaxation measurements, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2005.11)
- 8) Miyazaki, T., Yoshioka, S., Aso, Y. Effect of drug-polymer interaction on crystallization of amorphous acetanilide derivatives in the solid dispersions, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2005.11)
- 9) 梶原栄一、福島正義、川野久美、服部喜之、林京子、米谷芳枝 ガンシクロビル封入血中滞留性リポソーム製剤の調製と評価、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 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 in vivo 及び in vitro における癌ターゲティング能の評価、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 11) 福島正義、服部喜之、米谷芳枝、前立腺癌に対するドセタキセル併用コネキシン 43 遺伝子治療の検討、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 12) 服部喜之、米谷芳枝、葉酸修飾脂質微粒子ベクターの遺伝子導入効率における塩濃度の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 13) 川野 久美、米谷 芳枝、腫瘍選択的葉酸修飾ドキシルビシン封入リポソームの設計と評価、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 14) 片山明香、川野久美、戸潤一孔、米谷芳枝、カンプトテンシン封入リポソーム製剤における安息香酸誘導体の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 15) 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝、オリゴアルギニン修飾リポソームベクターの開発 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 16) 山田敦史、川野久美、米谷芳枝、葉酸修飾リポソームによる細胞内薬物送達におけるポリエチレングリコール脂質の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 17) 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝、PEG 修飾脂質微粒子 siRNA ベクターの開発 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 18) Masahiko Furuhata, Yoshiyuki Hattori, Hiroko Kawakami, Kazunori Toma, Yoshie Maitani: Mechanism of the cellular uptake of oligo-arginine-PEG-lipid vector in gene delivery, 第 78 回日本生化学会 (2005.10)
- 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

凍結乾燥再水和法による非ウイルス性遺伝子導入製剤の封入率と安定性

分担研究者 米谷芳枝 星薬科大学 医薬品化学研究所 教授

これまでのリポソームとDNA混合懸濁液や、DNA封入リポソーム凍結乾燥製剤では、DNAの活性低下、すなわち、遺伝子導入効率の低下や凝集が問題となっており、そのためリポソーム懸濁液や凍結乾燥製剤に必要時にDNAを添加し、再水和して、遺伝子導入製剤としてきた。凍結乾燥再水和法で調製したDNA導入製剤は、凍結時に添加する糖の種類によってリポソーム製剤の分散性および遺伝子導入効率が異なり、isomaltotriose や isomaltose では、DNAの活性維持効果が高いことが示唆された。

A. 研究目的

現在、遺伝子導入用リポソームベクターはリポソーム懸濁液で、遺伝子との複合体を用時調製して用いられており、遺伝子封入製剤は未だ市販されていない。これは、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く、遺伝子製剤の安定性等に問題があるためである。使用の簡便性や品質管理、大量生産などから、安定性の高い遺伝子封入製剤が望まれる。

凍結乾燥では、トリハロースを代表とする糖類がリポソームの内外液に存在すると、凍結乾燥製剤の安定性を維持することが知られている。一方、薬物のリポソームへの封入法である凍結乾燥再水和法では、少量の糖類を外液に添加するとリポソーム膜が乱され、サイズの小さい薬物封入リポソームが調製できることが報告されている。

そこで、本研究では、各種糖を用いてリポソームに凍結乾燥再水和法で遺伝子を封入した製剤を調製し、製剤中のプラスミドDNAの安定性を評価する方法を確立することを目的とする。

また、安定性を支配するDNAの分子運動性を糖によって制御することにより、高い安定性を有する非ウイルス性遺伝子導入製剤の開発を目指す。

本年度は安定性の高いDNA導入製剤の開発を目指して、リポソームの組成、リポソームと

DNAの混合比、ガラス転移温度(T_g)の異なる糖を添加剤として用い、凍結乾燥再水和法によってプラスミドDNA封入リポソームを調製し、その物理化学的性質(分散性、サイズ)、遺伝子封入率と遺伝子発現効率など凍結乾燥製剤の物性への影響を検討した。

B. 研究方法

遺伝子/リポソーム複合体の最適混合荷電比と遺伝子導入率の測定

正電荷脂質DC-Cholとヘルパー脂質であるDOPEのモル比1:0、3:2、1:2の3種類の組成の異なるリポソームを用いて、リポソームとDNAの比を変えた複合体を調製し、遺伝子導入効率の最適な脂質組成と、リポソームとDNAの比を検討した。リポソームのプラス荷電とDNAのマイナス荷電は、1:1から8:1まで調べた。

遺伝子封入リポソームの遺伝子封入率および遺伝子導入率の測定

凍結乾燥再水和法による遺伝子封入リポソーム製剤は、DC-Chol:DOPE(モル比3:2、1:2)からなるリポソーム懸濁液に、(+/-)の荷電が2:1になるようにプラスミドDNAを添加した後、その溶液にSucrose、IsomaltoseあるいはIsomaltotrioseの水溶液を加え(全脂質:添加剤1:5)、液体窒素で急速凍結した後、凍結乾燥した。

得られた凍結乾燥製剤を再水和し、リポソーム製

剤の分散性を調べた。また、Hela細胞におけるルシフェラーゼ発現量から、遺伝子導入効率を測定するとともに、PicoGreen dsDNA法によってリポソームに封入されたプラスミドDNAを測定した。

C. 研究結果

遺伝子/リポソーム複合体の最適混合荷電比と遺伝子導入率

粒子径 約200 nmのDC-CholとDOPE のモル比1:0、3:2、1:2の3種類のリポソームを用いて、リポソームとDNAの荷電比を変えた複合体を調製し、遺伝子導入効率の最適な脂質組成と、リポソームとDNAの比を検討した。その結果、最も高い遺伝子発現効率を示す(+/−)荷電比は、DC-Chol:DOPE=1:0のリポソームでは8:1であり、DC-Chol:DOPE=3:2、1:2のリポソームでは、ともに2:1であった。また、DC-Chol:DOPE=1:0のリポソームでは、細胞毒性が見られたため、DC-Chol:DOPE=3:2、1:2をリポソーム組成とした(Fig. 1)。

凍結乾燥再水和法によって調製した遺伝子導入リポソーム製剤の遺伝子封入率と遺伝子導入効率

これら2種類の組成と最適荷電比(+/−)2:1を用いて、3種類の糖を脂質の5倍質量添加して凍結乾燥再水和法によってDNA封入リポソーム製剤を調製した(Table 1)。再水和後のリポソーム懸濁液の分散性、遺伝子封入率と、細胞への遺伝子導入効率を検討した結果 DC-Chol/DOPE (3:2)リポソームは DC-Chol/DOPE (1:2) に比べて、分散性が低下した。これはリポソームの正電荷に対する DNA の荷電比が2であるので、DC-Chol/DOPE (3:2)では、正電荷が多いためにDNA量が多くなり、DNAが凝集し不安定になったことが示唆された。

添加した糖の種類による遺伝子封入率への影響を検討した結果、凍結乾燥前のリポソームとDNA混合懸濁液では、isomaltose > isomaltotriose > sucrose の順に高く、凍結乾燥製剤では、isomaltose > sucrose > isomaltotriose の順に高くなった(Fig. 3)。凍結乾燥前の懸濁液では、遺伝子が正電荷のリポソームに吸着していると考えられる。

遺伝子導入効率では、リポソームとDNA混合懸濁液では、isomaltotriose > isomaltose > sucrose の順に高く、凍結乾燥製剤では糖の種類による差はなく(Fig. 4)。また、凍結乾燥前の混合懸濁液とほぼ同じ遺伝子導入率を示した。

D. 考察

DNAを空リポソームとともに凍結乾燥後、再水和するとDNA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膜の流動性が上昇しDNAの透過性が上昇するか、リポソームの融合が起きていると考えられる。また、凍結によって破壊されたりリポソームの膜構造は再水和時に再構築が起き、そのとき水とともにDNAがリポソーム内に進入する可能性もある。すなわち、糖は脂質膜の安定化作用と、一時的な不安定化作用があると推察される。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。昨年度の研究から、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ことが明らかになっている。isomaltose などでは脂質膜に対してどのような作用があるかをショ糖と比較する必要がある。

今後、凍結乾燥再水和調製法によるDNA封入リポソームについては、脂質とDNAの荷電比(+/−)を2:1から変えて、各糖の遺伝子封入率、遺伝子導入効率に対する影響を検討する必要がある。また、DNA封入凍結乾燥製剤の温度における安定性も調べる必要がある。

E. 結論

これまでのリポソームとDNA混合懸濁液や、DNA凍結乾燥製剤は、DNAの活性低下、すなわち、遺伝子導入効率の低下や凝集が問題となっており、そのためリポソーム懸濁液や凍結乾燥製剤に必要時にDNAを添加し、再水和して、遺伝子導入製剤としてきた。本研究の結果より、糖を用いて凍結乾燥した遺伝子封入リポソーム製剤は封入されたDNAは活性を保持しており、特にisomaltotriose や isomaltose には、活性維

持効果が高いことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability. *Int. J. Pharm.*, 308(1-2):183-189, (2006).
2. W.X. Ding, X.R. Qi, P. Li, Y. Maitani, T. Nagai, Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *Int. J. Pharm.*, 300(1-2):38-47, (2005).
3. P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano, Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Control. Release*, 104(2):313-21, (2005).
4. Y. Hattori, H. Kubo, K. Higashiyama and Y. Maitani, Folate-linked nanoparticles formed with DNA complexes in sodium chloride solution enhance transfection efficiency, *J. Biomedical Nanotechnology*, 1(2):176-184, (2005).
5. K. G. Lau, Y. Hattori, S. Chopra, E. A. O'Toole, A. Storey, T. Nagai and Y. Maitani, Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: In vitro stability and toxicity on human cutaneous keratinocyte cell lines, *Int. J. Pharm.*, 300:4-12, (2005).
6. Y. Hattori, and Y. Maitani, Folate-linked nanoparticle-mediated suicide gene therapy in human prostate cancer and nasopharyngeal cancer with herpes simplex virus thymidine kinase, *Cancer Gene Therapy*, 12: 796-809, (2005).
7. Y. Hattori, and Y. Maitani, Folate-linked lipid-based nanoparticle for targeted gene delivery, *Current Drug Delivery*, 2:243-252, (2005).
8. J. Shi, W. Yan, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai, Characteristics and biodistribution of soybean sterylglucoside and polyethylene glycol modified cationic liposomes and their complexes with antisense oligodeoxynucleotide for hepatitis B virus therapy, *Drug Delivery*, 12(6):349-356, (2005).
9. T. Shiokawa, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Ohguchi, H. Kawakami, K. Toma, and Y. Maitani, Effect of the Polyethylene Glycol linker Chain Length of Folate-linked Microemulsions Loading Aclacinomycin A on Targeting Ability and Antitumor Effect in vitro and in vivo, *Clinical Cancer Res*, 11(5):2018-25 (2005).
10. Y. Maitani, K. Nakamura, K. Kawano. Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 6, 81-93 (2005).
11. M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori and Y. Maitani, Design, Synthesis and Gene Delivery Efficiencies of Novel oligo-Arginine Linked PEG-Lipid: Effect of Oligo-Arginine Length, *Peptide Science* 2004, 241-242, (2005).

2. 学会発表

- 1) 梶原栄一、福島正義、川野久美、服部喜之、林京子、米谷芳枝、ガンシクロビル封入血中滞留性リポソーム製剤の調製と評価、日本薬剤学

会第 21 年会 (2006. 3)

- 2) 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ションの *in vivo* 及び *in vitro* における癌ターゲッティング能の評価、日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 3) 福島正義、服部喜之、米谷芳枝、前立腺癌に対するドセタキセル併用コネキシン43遺伝子治療の検討、日本薬剤学会第21年会 (2006. 3)
- 4) 服部喜之、米谷芳枝、葉酸修飾脂質微粒子ベクターの遺伝子導入効率における塩濃度の影響、日本薬学会第126年会 (2006. 3)
- 5) 川野 久美、米谷 芳枝、腫瘍選択的葉酸修飾ドキソルピシン封入リポソームの設計と評価、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 6) 片山明香、川野久美、戸潤一孔、米谷芳枝、カンプトテシン封入リポソーム製剤における安息香酸誘導体の影響、日本薬学会第126年会 (2006. 3)
- 7) 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝、オリゴアルギニン修飾リポソームベクターの開発 日本薬学会第126年会 (2006. 3)
- 8) 山田敦史、川野久美、米谷芳枝、葉酸修飾リポソームによる細胞内薬物送達におけるポリエチレングリコール脂質の影響、日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 9) 吉澤隆、服部喜之、米谷芳枝、PEG 修飾脂質微粒子 siRNA ベクターの開発 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 10) Masahiko Furuhata, Yoshiyuki Hattori, Hiroko Kawakami, Kazunori Toma, Yoshie Maitani: Mechanism of the cellular uptake of oligo-arginine-PEG-lipid vector in gene delivery, 第 78 回日本生化学会(2005.10)

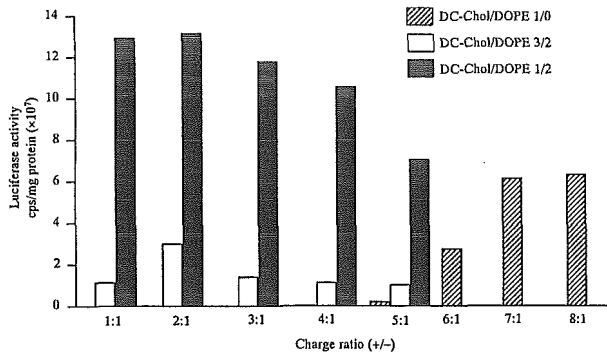


Fig. 1. (+/-) 荷電比を変えた時のリポソーム/DNA複合体ベクターによる遺伝子導入効率

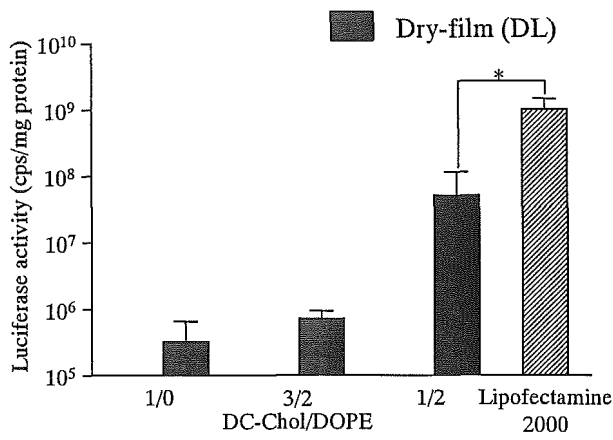


Fig. 2. 最適混合荷電比 (+/-) でのリポソーム/DNA複合体ベクターによる遺伝子導入効率

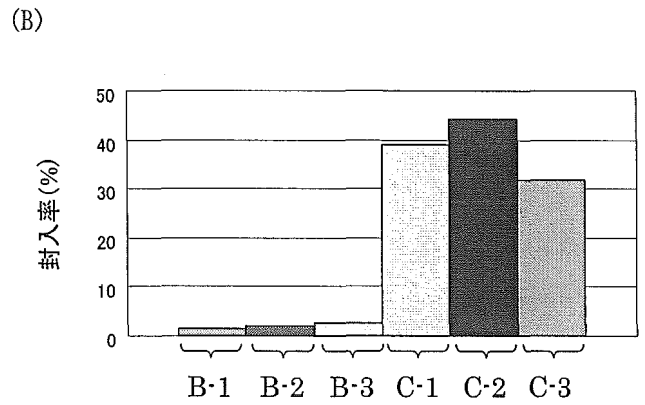
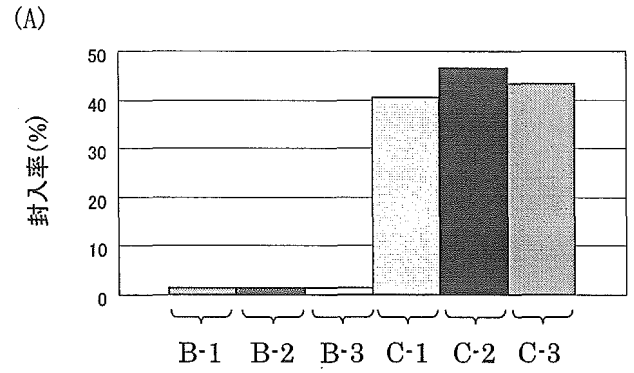
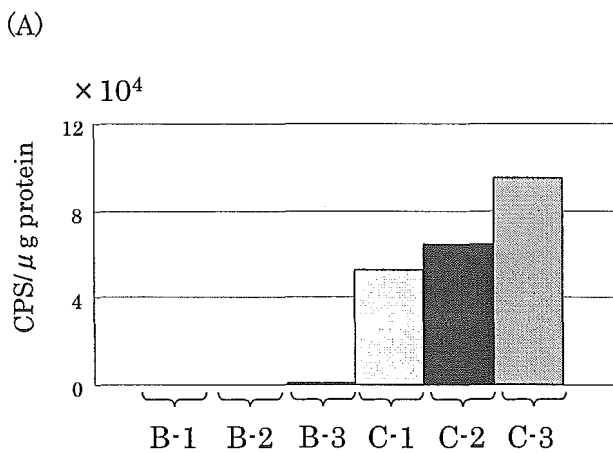


Fig. 3. 凍結乾燥前(A)と凍結乾燥後(B)の遺伝子封入率

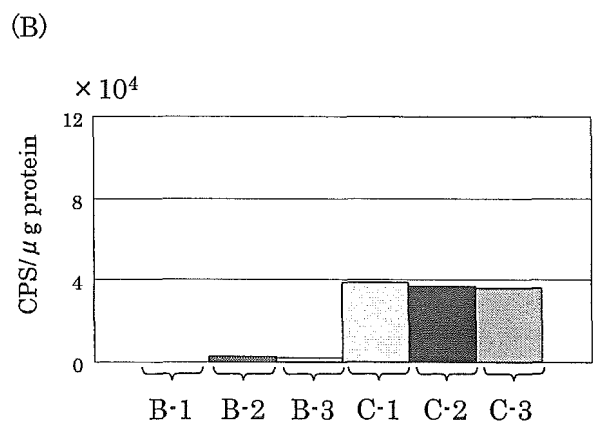


Fig. 4. 凍結乾燥前(A)と凍結乾燥後(B)の遺伝子導入効率

Table 1 プラスミドDNA-塩基性リポソーム製剤の組成						
Formulation	DC-Chol : DOPE	Lipid ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	Total Lipid ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	DNA ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	Excipient ($\mu\text{g}/\text{tube}$)	
B-1	3:2	624	949	200	Sucrose	4725
B-2	3:2	624	949	200	Isomaltose	4725
B-3	3:2	624	949	200	Isomaltotriose	4725
C-1	1:2	316	1181	100	Sucrose	5900
C-2	1:2	316	1181	100	Isomaltose	5900
C-3	1:2	316	1181	100	Isomaltotriose	5900

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, T. Miyazaki, Y.Aso.	β -relaxation of insulin molecule in lyophilized formulations containing trehalose or dextran as a determinant of chemical reactivity.	<i>Pharm. Res.</i>	Accepted	(2006).	
2) Y. Aso, S. Yoshioka,	Molecular Mobility of Nifedipine-PVP and Phenobarbital-PVP Solid Dispersions as Measured by ^{13}C -NMR Spin-Lattice Relaxation Time.	<i>J.Pharm.Sci.</i> ,	95:	318-325	(2006).
3) S.Yoshioka, Y.Aso, T. Miyazaki,	Negligible contribution of molecular mobility to the degradation rate of insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone).	<i>J. Pharm. Sci.</i> ,	95:	939-943	(2006)..
4) S.Yoshioka, Y.Aso,	Comparison of the glass transition temperature and fragility parameter of iso-malto-oligomer predicted by molecular dynamics simulations with those measured by differential scanning calorimetry.	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	53:	1443-1445	(2005).
5) S.Yoshioka, Y.Aso,	A quantitative assessment of the significance of molecular mobility as a determinant for the stability of lyophilized insulin formulations.	<i>Pharm. Res.</i>	22:	1358-1364	(2005)
6) Y. Aso, S. Yoshioka,	Effect of Freezing Rate on Physical Stability of Lyophilized Cationic Liposomes.	<i>Chem. Pharm. Bull.</i> ,	53,	301-304	(2005).
7) 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.	<i>J.Pharm. Sci.</i> ,	94:	275-287	(2005).
8) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani,	Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of their incorporation and circulation stability.	<i>Int. J. Pharm.</i> ,	308(1-2):	183-189,	(2006).
9) W.X. Ding, X.R. Qi, P. Li, Y. Maitani, T. Nagai,	Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d.	<i>Int. J. Pharm.</i> ,	300(1-2):	38-47,	(2005).
10) P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, T. Okano,	Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles.	<i>J. Control. Release</i> ,	104(2):	313-21,	(2005).
11) Y. Hattori, H. Kubo, K. Higashiyama and Y. Maitani,	Folate-linked nanoparticles formed with DNA complexes in sodium chloride solution enhance transfection efficiency,	<i>J. Biomedical Nanotechnology</i> ,	1(2):	176-184,	(2005).
12) K. G. Lau, Y. Hattori, S. Chopra, E. A. O'Toole, A. Storey, T. Nagai and Y. Maitani,	Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: In vitro stability and toxicity on human cutaneous keratinocyte cell lines,	<i>Int. J. Pharm.</i> ,	300:	4-12,	(2005).
13) Y. Hattori, and Y. Maitani,	Folate-linked nanoparticle-mediated suicide gene therapy in human prostate cancer and nasopharyngeal cancer with herpes simplex virus thymidine kinase,	<i>Cancer Gene Therapy</i> ,	12:	796-809,	(2005).
14) Y. Hattori, and Y. Maitani,	Folate-linked lipid-based nanoparticle for targeted gene delivery,	<i>Current Drug Delivery</i> ,	2:	243-252,	(2005).
15) J. Shi, W. Yan, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai,	Characteristics and biodistribution of soybean sterylglucoside and polyethylene glycol modified cationic liposomes and their complexes with antisense oligodeoxynucleotide for hepatitis B virus therapy,	<i>Drug Delivery</i> ,	12(6):	349-356,	(2005).