

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～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 吉岡澄江

平成19（2007）年4月

## 目次

### I. 総合研究報告書

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 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 29

III. 研究成果の刊行物・別刷 32

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、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。インスリン凍結乾燥製剤の安定性は、インスリン分子の $\beta$ 緩和に相当する運動を抑制し、 $\beta$ 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。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の保存中の安定性を著しく改善するショ糖の作用は、タンパク質の局所的分子運動性を抑制する作用に起因することを明らかになった。

$\beta$ -ガラクトシダーゼをデキストランゲルや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1分子ずつ封じ込めることによって、凍結乾燥時およびその後の失活を抑制できることが明らかになった。また、ゲル製剤においてもタンパク質の局所的分子運動性を抑制することがゲルに内包したタンパク質の安定化につながる可能性が明らかになった。

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。凍結乾燥再水和法で調製した遺伝子導入製剤は、凍結時に添加する糖の種類によって製剤の分散性および遺伝子導入効率が異なり、ショ糖添加製剤ではDNAとの局所の相互作用により、50℃で50日間の保存においても、用時調製とほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示すことを明らかになった。

## 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した。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した。

研究は下記の3つのアプローチで行った。①高い安定性を有するタンパク質製剤として最も有望であると考えられる凍結乾燥製剤について、タンパク質の安定性と分子運動性の関係を明らかにし、分子運動性に基づく安定性評価法を開発した。まず、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として、誘電緩和時間および NMR 緩和時間を指標とする方法の有用性を評価した。さらにインスリン凍結乾燥製剤を用いて、分子運動性がタンパク質の安定性に及ぼす影響を分解反応の活性化エネルギーの影響と比較し、それぞれの相対的寄与率を定量的に解析するとともに、タンパク質分子の運動性を抑制し、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。さらに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤を用いて、タンパク質の凝集速度に関連する分子運動性として、製剤のガラス転移温度( $T_g$ )で表されるグローバルな分子運動性および NMR 緩和時間で表されるタンパク質分子のローカルな運動性を比較し、製剤の安定化に有効な分子運動の制御法を検討した。

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、 $\beta$ -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。さらにゲル化によるタンパク質の安定化のメカニズムをゲルおよび内包モデルタンパク質  $\beta$ -ガラクトシダーゼの分子運動性の観点から考察した。

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されるプラスミド DNA 封入リポソーム製剤について、リポソームの組成、リポソームと DNA の混合比、および凍結時に添加する  $T_g$  の異なる糖の種類が、リポソームへの遺伝子封入率、DNA 封入リポソーム製剤の分散性、細胞への遺伝子導入効率に及ぼす影響を検討した。さらにプラスミド DNA 封入リポソーム製剤の熱による安定性をその物理化学的性質(分散性、サイズ)と遺伝子発現効率から検討した。

## B. 研究方法

### タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性に基づく安定性評価法および製剤の安定化法の開発

#### 1) 誘電緩和時間および NMR 緩和時間を指標とする分子運動性の測定法の評価

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( $\tau_c$ )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( $\tau_c$ )および誘電緩和時間と比較した。

#### 2) 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の評価

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 H<sub>2</sub>O 飽和溶液:6%相対湿度(RH); LiCl H<sub>2</sub>O:12%RH; 酢酸カリウム:23%RH; MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O:33%RH; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2H<sub>2</sub>O:43%RH; NaBr 2H<sub>2</sub>O: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<sub>g</sub> を温度変調 DSC で測定した。

### 3)タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

ショ糖、トレハロースあるいはスタチオースを添加剤として用いて、タンパク質と添加剤の比率の異なる β-ガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤を調製した。製剤を 12%相対湿度(RH)および種々の温度条件に保存した後、β-ガラクトシダーゼの凝集量を HP-SEC で測定した。

凍結乾燥製剤の水分吸着を真空水分吸脱着測定装置で、また、T<sub>g</sub> を温度変調 DSC で測定した。さらに、固体 FT-IR を用いて 1580~1720cm<sup>-1</sup> の領域で二次微分スペクトルを測定した。

凍結乾燥製剤中の β-ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の回転系スピン-格子緩和時間(T<sub>1ρ</sub>)を固体 NMR 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

メタクリル酸(GMA)を修飾したデキストランあるいは PVA と β-ガラクトシダーゼの水溶液をポリエチレングリコール水溶液に添加することにより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、β-ガラクトシダーゼを内包する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、凍結乾燥時およびその後の保存中の β-ガラクトシダーゼの失活が、ゲルに内包することにより抑制されるかを検討した。また、示差走査熱量測定(DSC)およびタンパクのカルボニル炭素の T<sub>1ρ</sub>測定により、ゲルの分子運動性や β-ガラクトシダーゼの分子運動性に及ぼすゲル化の影響を検討した。

### 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。

3 種類の組成の異なるリポソーム DC-Chol DOPE(モル比 1:0, 3:2, 1:2)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リポソーム製剤は、リポソーム懸濁液(DC-Chol:DOPE モル比 3:2, 1:2)に、正電荷リポソームと DNA の (+/-) の荷電が 2:1, 16:1 になるようにプラスミド DNA を添加した後、その懸濁液に質量比で全脂質:添加剤 1:5 になるように、ショ糖、イソマルトースあるいはイソマルトトリオースを加えた。この懸濁液を 1 チューブあたりの全脂質量が約 1 mg になるように分注し、液体窒素で急速凍結した後、凍結乾燥した。これらの凍結乾燥製剤を -20℃、25℃、40℃、50℃で 50 日間保存した。得られた凍結乾燥製剤を各 100 μL, 100 μL, 800 μL と合計 1 mL の水で vortex をかけながら再水和し、リポソーム製剤の分散性と粒子サイズを測定した。

遺伝子封入率は、再水和したリポソーム懸濁液を 45,000 xg で超遠心し、上清中のプラスミド DNA をリポソームに未封入として、PicoGreen dsDNA 法によって測定した。遺伝子としては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA、

細胞は HeLa 細胞を用いた。遺伝子導入率は、再水和した遺伝子封入りポソーム製剤懸濁液を 1 ウエルあたり 2  $\mu\text{g}$  DNA となるように添加して、3 時間無血清培地で、その後 2 1 時間 10%FBS 含有培地でインキュベーションし、ルシフェラーゼ発現量をピカジーンを用いて測定した。

遺伝子導入リポソーム製剤の細胞毒性は遺伝子発現時の HeLa 細胞のタンパク質濃度測定から評価した。

(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分子運動性に基づく安定性評価法および製剤の安定化法の開発

##### 1) 誘電緩和時間および NMR 緩和時間を指標とする分子運動性の測定法の評価

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  $T_{1\rho}$  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  $\tau_c$  を計算した (Fig.2)。 $\tau_c$  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 ( $\tau_{DES}$ ) 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、 $T_{1\rho}$  から計算した  $\tau_c$  は、 $\tau_{DES}$  のプロットから大きく外れて頭打ちになった。

$$\frac{1}{T_{1\rho}} = \frac{A\tau_c}{1 + 4\omega_1^2\tau_c^2} \quad (1)$$

$T_{1\rho}$  から求めた  $\tau_c$  が低温領域で  $\tau_{DES}$  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  $\tau_{DES}$  を、それに相当する  $T_{1\rho}$  の値に変換し、 $T_{1\rho}$  の実測値と比較した。IMT 凍結乾燥品で観察された誘電損  $\epsilon''$  を (2) 式にしたがって 3 つのデバイ緩和の  $\tau$  を仮定して解析し、3 つの  $\tau$  とそれぞれの比率  $f$  を求めた (Fig.3)。

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

得られた 3 つの  $\tau$  と  $f$  を用いて、(3) 式に従って  $^{13}\text{C}$  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°C) 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  $T_{1\rho}$  の極小値を用いて (4) 式に従って  $T_{1\rho}$  を計算した (Fig.5)。

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

デキストラン凍結乾燥品についても同様に、誘

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

電緩和スペクトルから測定した  $\tau_{DES}$  を、それに相当する  $T_{1\rho}$  の値に変換した (Fig.5)。

ここで、

IMT およびデキストランについて実測された  $T_{1\rho}$  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  $T_{1\rho}$  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  $T_{1\rho}$  に対するスピン-スピン相互作用の影響が大きくなり、 $T_{1\rho}$  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

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。

$\tau_c$  および  $\tau_{DES}$  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、 $\tau_c$  および  $\tau_{DES}$  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。 $\tau_c$  および  $\tau_{DES}$  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。

## 2) 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の評価

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  $t_{90}$  (インスリンの分解が 10% 進行するのに要する時間) を Fig.6 および Fig.7 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.8、Fig.9 および Fig.10 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.6 および Fig.7 に示した  $t_{90}$  の温度依存性に基いて、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  $\tau$  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  $\tau$  で表すことによって Modified Collins-Kimball 式(5 式)を導入した。

$$k_{obs} = k_{act} \left( \frac{\alpha T \left( \frac{1}{\tau} \right)^\xi}{k_{act} + \alpha T \left( \frac{1}{\tau} \right)^\xi} \right) \quad (5)$$

ここで、 $\xi$  は  $\tau$  と拡散係数間のデカップリングの度合を表す定数、 $\alpha$  は  $\tau$  と  $k_{obs}$  間のカップリングの度合を表す定数である。インスリンの分解が拡散過程を含むと仮定して、Fig.6 および Fig.7 に示した  $t_{90}$  の温度依存性を 5 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、5 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.11 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.12 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  $t_{90}$ に比べて著しく長かった。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  $\beta$ 緩和であることが示唆された。

### 3)タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度を決める分子運動性とその制御

ショ糖、トレハロースあるいはスタチオースを添加剤として含有する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は、保存中に凝集することが HP-SEC によって観察された。Fig.13 にトレハ

ロースを含有する製剤で得られた SEC の例を示す。凝集の初期のタイムコースは Fig.14 に示すように、いずれの製剤も一次速度式で表すことができた。凝集速度は添加剤に大きく依存し、 $T_g$ 以下の温度領域ではショ糖 < トレハロース < スタチオースの順に大きくなり、 $T_g$ 以上の温度領域ではトレハロース < スタチオースの順に大きくなった。ここで、ショ糖は  $T_g$ 以上では保存中に結晶化するため、凝集速度を測定できなかった。

見かけの 1 次速度定数から算出した  $t_{90}$  (凝集が 10% 進行するのに要する時間) は、Fig.15 に示すように、 $T_g$ 以下の 50°C においても、また  $T_g$ 以上の 80°C においても添加剤の比率とともに増大し、添加剤比率に対して log-linear の依存性を示した。添加剤比率依存性の勾配が大きいことから、添加剤による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ安定化効果は添加剤によるタンパク質希釈効果だけでは説明できないことが分かった。

ショ糖、トレハロースおよびスタチオースの添加剤間で観察された  $\beta$ -ガラクトシダーゼ凝集速度の差異を引き起こす要因の一つとして、凍結乾燥過程においてタンパク質が受ける構造 (conformation) 変化の度合いが添加剤によって異なり、その結果、保存中の凝集速度に差異が生じることが考えられる。Fig.16 に示すように、凍結乾燥後の未凝集体量は、ショ糖やトレハロースよりもスタチオースにおいて最も小さく、スタチオースでは凍結乾燥過程における凝集が最も著しいことが分かった。しかし、凍結乾燥過程における  $\beta$ -ガラクトシダーゼの構造変化を FT-IR によって検討した結果、Fig.17 に示すように、添加剤比率 0~0.5 の領域で測定した FT-IR の二次微分曲線は添加剤間で有意な差がみられず、タンパク質が凍結乾燥過程において受ける二次構造変化の度合いには有意な差がないと考えられた。

ショ糖、トレハロースおよびスタチオースの添加剤間でみられた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ凝集速度の差異を引き起こす要因の一つとして、凍結乾燥製剤の分子運動性の差異が考えられる。タンパク質の凝集は分子間反応であるので、製剤の  $T_g$ で表されるようなグローバルな分子運動性が凝集速度に大きな影響を与え、グローバルな



分子運動性の増大とともに凝集が促進されると通常考えられている。しかし、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の  $T_g$  は、Fig.18 に示すようにシヨ糖<トレハロース<スタチオースの順に高くなり、グローバルな分子運動性はシヨ糖>トレハロース>スタチオースの順に低くなるのに対して、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの凝集速度はシヨ糖<トレハロース<スタチオースの順に速くなることが分かり、予想に反してグローバルな分子運動性は凝集速度の主要な決定要因ではないことが明らかになった。さらに、いずれの製剤も添加剤比率が0から0.3付近まで上昇すると、 $T_g$  は著しく低下するにもかかわらず(Fig.18)、凝集速度は小さくなる ( $t_{90}$  は大きくなる、Fig.15) ことから、グローバルな分子運動性は凝集速度の主要な決定要因ではないことが確認された。

$T_g$  で表されるグローバルな分子運動性よりも短い時間軸をもつローカルな分子運動性が $\beta$ -ガラクトシダーゼの凝集速度とより密接に関連し、シヨ糖、トレハロースおよびスタチオース間の凝集速度の差異を引き起こす可能性を考察するために、凍結乾燥製剤中の $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素のスピン-格子緩和時間を測定し、ローカルな分子運動性の影響を検討した。カルボニル炭素のスピン-格子緩和は、Fig.19 に示すように、シヨ糖、トレハロースおよびスタチオースのいずれの添加によっても遅延されたが、遅延の度合はシヨ糖が最も大きかった。非線形回帰によって算出した  $T_{1\rho}$  の添加剤比率依存性を Fig.20 に示す。シヨ糖製剤の  $T_{1\rho}$  は添加剤比率の上昇とともに著しく長くなったが、スタチオース製剤の  $T_{1\rho}$  は、0.09 の添加剤比率では変化せず、それより高い添加剤比率においてもシヨ糖製剤より短い  $T_{1\rho}$  を示した。トレハロース製剤はシヨ糖製剤とスタチオース製剤の中間の  $T_{1\rho}$  を示した。これらの結果から、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのローカルな分子運動性は、シヨ糖によって最も強く抑制されることが分かった。添加剤が $\beta$ -ガラクトシダーゼのローカルな分子運動性を抑制する度合は、凝集速度を減少させる度合と密接に関連することから、ローカルな分子運動性が凝集速度の主要な決定要因ではあることが示唆された。Fig.15 に示した  $t_{90}$  の添加剤依存性の勾配が大きく、添加剤の希釈効果だけで

はその依存性を説明できないが、添加剤のローカルな分子運動性の抑制作用が主要な役割を果たすと考えることによって説明することができる。すなわち、シヨ糖は $\beta$ -ガラクトシダーゼのローカルな分子運動性を最も強く抑制し、その結果、凝集を抑制することができると考えられる。

以上のように、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の安定性を決定する主要な要因はタンパク質のローカルな運動性であることが明らかになった。

#### 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.21 に $\gamma$ 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 $\beta$ -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、 $\beta$ -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、ハイドロゲルゲル化することによって、凍結乾燥中の $\beta$ -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。 $\beta$ -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、 $\beta$ -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。

Fig.22 にデキストランマイクロスフェアからの $\beta$ -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スフェアにおいては、初期に速やかな $\beta$ -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いため、マイクロスフェアの表面近傍に取り込まれた $\beta$ -

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 $\beta$ -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スフェアにおいては、24時間の放出時間内において $\beta$ -ガラクトシダーゼの放出がほとんど観測されなかった。 $\beta$ -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。

Fig.23 に $\gamma$ 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 $\beta$ -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。また、高分子としてPVAを用いゲル化することによっても、 $\beta$ -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.24 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 $\beta$ -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。ゲル化することによって、保存中の $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活を抑制できることが明らかになった。

ゲル化によって凍結乾燥時および保存中の $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活が抑制されるメカニズムを分子運動性の観点から検討した。同じ温度において比較したとき $T_g$ が高いほど構造緩和時間は大きくなり、構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動が遅い。75%RHで水分含量を調整したデキストランの $T_g$ はFig.25に示すように、ゲル化することにより上昇し、GMA修飾率が高くゲルの架橋が密なデキストランほど $T_g$ は高かった。ゲル化によって構造緩和の分子運動性が抑制されることが明らかとなった。

ゲル化は $\beta$ -ガラクトシダーゼのローカルな運動性も抑制することが $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間の測定から明らかになった。Fig.26は75%RHで水分含量を調整したゲルマイクロスフェア中の $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の回転座標系におけるスピン-格子緩和過程を示す。ゲル化

することによってカルボニル炭素の緩和過程が遅くなっていることがわかる。緩和過程が遅いほど、運動性が低いことを意味し、カルボニル炭素は主にタンパク質の主鎖に存在することから、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの主鎖の動きがゲル化によって抑制されていることを示す。ゲル化による運動性の抑制は乾燥状態のゲルマイクロスフェアにおいても観測された。

以上の結果はゲル化による $\beta$ -ガラクトシダーゼの安定化機構として、ゲルマトリックスのグローバルな運動性や $\beta$ -ガラクトシダーゼ分子のローカルな運動性の抑制が重要であることを示唆するものと考えられる。

#### 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.27)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.28)、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.29)。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、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、薬物封入り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。

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.30)、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.31)。

リポソーム組成として、高い遺伝子発現を示した DC-Chol と DOPE のモル比 3:2、1:2 の 2 種類を、DNA はリポソームに対して (+/-) 荷電比が 2:1、16:1 となるように添加し、さらに 3 種類の糖を添加して凍結乾燥再水和法によって DNA 封入りリポソーム製剤を調製した (Table 1)。粒子径の

小さいリポソームを調製するために糖の添加量は、全脂質の 5 倍量添加することにした。

凍結乾燥製剤の安定性は  $-20^{\circ}\text{C}$  (コントロール)、 $25^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$ 、 $50^{\circ}\text{C}$  で 50 日間保存して調べた。再水和後のリポソーム懸濁液の分散性を検討した結果、DC-Chol/DOPE (1:2) リポソームは DC-Chol/DOPE (3:2) に比べて、分散性が低下し、特にイソマルトトリオースを添加した製剤で不均一な分散が観察された (Table 2)。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 (1:2) では全脂質あたりの DNA 量が多くなり、DNA が凝集し不安定になったと考えられる。

ガラス転移温度 ( $T_g$ ) はショ糖では  $80^{\circ}\text{C}$ 、イソマルトースでは  $105^{\circ}\text{C}$ 、イソマルトトリオースでは  $130^{\circ}\text{C}$  であり、 $T_g$  が高い糖を添加すると保存温度が  $T_g$  以下の温度では、製剤はガラス状態でありリポソームは安定に存在すると考えられるが、分散性は  $T_g$  の高いイソマルトトリオースで低下する結果となった。

添加した糖による遺伝子封入率への影響を検討した結果、どの製剤も保存温度によらず遺伝子の封入効率は 100% 近い値を示した。これはリポソーム懸濁液では、遺伝子が正電荷のリポソームに封入および吸着していることを示唆した。

リポソームの脂質組成と、リポソームと DNA の (+/-) 荷電比の遺伝子導入効率に対する影響を検討した。その結果、コントロールである  $-20^{\circ}\text{C}$  で最も高い遺伝子発現効率を示す脂質組成は、DC-Chol:DOPE = 1:2 で、(+/-) 荷電比は 2:1 であった。また、(+/-) 荷電比 16:1 では、DC-Chol:DOPE = 1:2 のリポソームが DC-Chol:DOPE = 3:2 より、高い遺伝子導入効率を示した (Fig.32)。しかし、このとき糖の種類の影響はほとんどないことが明らかになった。

糖の製剤の保存安定性への影響を遺伝子導入効率で調べた。温度による遺伝子発現効率の低下では、イソマルトトリオース < イソマルトース < ショ糖の順に少なくなった (Fig.33)。また、コ

ントロールである  $-20^{\circ}\text{C}$  での保存製剤に対する比で比較すると、DC-Chol/DOPE (1:2) リポソームでショ糖添加である C-1 製剤では、 $50^{\circ}\text{C}$  で 50 日間保存においてもほとんど遺伝子の導入効率が変わらないことから、安定な製剤であることが明らかになった (Fig.33)。

この遺伝子封入りリポソーム製剤は、 $50^{\circ}\text{C}$  で 50 日間保存したときで、市販品のリポフェクタミン 2000 の 1/7 の遺伝子導入効率を示した。なお、同じ脂質組成と荷電比のリポソームと遺伝子との用時調製製剤では遺伝子導入効率はリポフェクタミン 2000 の 1/3 であった。

遺伝子発現時の細胞のタンパク質量から細胞毒性を評価すると、すべての遺伝子導入製剤で導入したタンパク質濃度は、市販のリポフェクタミン 2000 より高く、細胞毒性は低いことが明らかになった (Fig.34)。

Fig.33 に示すように、温度による遺伝子発現効率の安定性はイソマルトトリオース < イソマルトース < ショ糖の順であった。保存安定性に及ぼす添加剤の影響を製剤の物性の違いから考察する。凍結乾燥製剤は  $T_g$  が高いほど安定であると考えられている。また、プラスミド DNA-リポソーム複合体の DNA 導入効率は複合体の粒子径の影響を受けることが知られている。はじめに、製剤の  $T_g$  や複合体の粒子径とプラスミド DNA 導入効率の保存安定性の関連について考察する。

Fig.35 にプラスミド DNA-リポソーム凍結乾燥製剤の  $T_g$  を示す。いずれの添加剤においても添加剤のみの凍結乾燥品に比べリポソームを含有すると  $T_g$  が数  $^{\circ}\text{C}$  低下し、リポソームと DNA を含有する製剤ではさらに大きな  $T_g$  の低下が観測された。リポソームと DNA を含有する製剤の  $T_g$  はショ糖 < イソマルトース < イソマルトトリオースの順であり、製剤マトリックスのグローバルな運動性はショ糖を添加した製剤が最も高く、遺伝子導入効率の保存安定性は製剤マトリックスのグローバルな運動性と直接には関連しないことが明らかになった。

リポソーム-プラスミド複合体凍結乾燥製剤を再水和して得られたリポソームの粒子径に及ぼす保存の影響を Fig.36 に示す。いずれの添加剤を用いた製剤においても、粒子径の変化は小さかった。 $T_g$  の低いショ糖を添加剤として用いた場合、保存温度が高いほど粒子径が大きくなる傾向が見られた。製剤の  $T_g$  より低い温度で保存したために、保存温度による粒子サイズの変化が見られなかったものと考えられ、リポソームの粒子サイズの保存安定性は製剤マトリックスの  $T_g$  すなわちグローバルな運動性の影響を大きく受けると考えられる。イソマルトース、イソマルトトリオースを添加剤として用いた製剤においてはリポソームの粒子サイズが変化しないにも関わらず、温度による遺伝子導入効率の低下が見られたことから、遺伝子導入効率の保存安定性はリポソーム粒子径の変化と関連しないことが示された。したがって、製剤の  $T_g$  や複合体の粒子サイズ以外の因子が遺伝子導入効率の安定性を支配していると考えられる。

誘電緩和測定によって、ショ糖、イソマルトース、イソマルトトリオースのローカルな運動性を測定した。Fig.37 に 1Hz から 1kHz の周波数で測定したショ糖の誘電損の温度変化を示す。1Hz で測定すると  $-20^{\circ}\text{C}$  付近に誘電損の極大が見られた。極大の温度は周波数が高いほど高温にシフトしたことから、観測された誘電損の極大は  $\beta$  緩和に基づくものと考えられる。Fig.38 に 10Hz の周波数で測定した誘電損の温度変化に及ぼす添加剤の影響を示す。誘電損の極大の温度はイソマルトトリオース < イソマルトース < ショ糖の順であり、 $T_g$  の順序とは逆であった。これは、同じ温度で比較したとき、ローカルな分子運動性はショ糖が最も低いことを意味する。リポソームと DNA を含有する製剤においては、電気伝導度に基づくシグナルが、 $\beta$  緩和に基づく誘電損の極大とオーバーラップするため、誘電損の極大を明瞭に観測することができなかったが、 $\beta$  緩和に基づくショルダの温度は添加剤単独の系と同じ順

であり、DNA-リポソーム複合体製剤のローカルな運動性もショ糖を添加剤として用いた製剤が最も低いことが示唆された。この結果は、遺伝子導入効率の保存安定性に関連する因子として、ローカルな分子運動の重要性を示唆するものと考えられる。

$T_g$ の知見から、遺伝子導入効率の保存安定性と関連する因子として、DNA-リポソーム複合体と添加剤の相互作用が示唆された。Fig.15に示すように、ショ糖製剤の $T_g$ はDNA-リポソーム複合体が共存すると $20^{\circ}\text{C}$ 以上低下したが、イソマルトース製剤の $T_g$ の低下は約 $10^{\circ}\text{C}$ であり、ショ糖製剤に比べ小さかった。これはイソマルトースに比べ、ショ糖の水素結合がDNA-リポソーム複合体によって強く阻害されていること、すなわち、ショ糖とDNA-リポソーム複合体がより強く相互作用することを示唆し、相互作用の強いショ糖を添加した製剤が保存安定性優れていると考えられる。

#### D. 考察

①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。

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 $\beta$ 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。

$\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度

を決定する主要な要因はタンパク質のローカルな運動性であることが明らかになり、ショ糖のようにタンパク質のローカルな運動性を強く抑制できる添加剤を用いることによって、製剤の安定性を著しく改善できることが分かるなど、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。今後は、炭素以外のNMRや広範囲の周波数にわたる誘電緩和法などを活用して、ローカルな運動性をさらに部位特異的に測定することが必要であると考えられる。

②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、 $\beta$ -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。

③さらに、糖は再水和後のリポソームの分散性と、製剤の温度安定性に大きな影響を与えることが明らかになった。一方、糖は遺伝子導入効率には影響せず、リポソームの脂質組成と荷電比が寄与することが明らかとなった。

これまでは、糖はリポソームの凍結時に作用して、再水和後のリポソームの粒子径は、ショ糖添加では小さくなることが報告されているが、本研究では糖の種類によらず、脂質組成と荷電比の影響が大きくなった。

遺伝子封入りリポソーム(DC-Chol:DOPE=1:2、(+/-)荷電比=2:1)でショ糖を添加した製剤が、高い遺伝子導入効率を示した。この結果から、ショ糖は $T_g$ がこの糖の中では最も低いことから、糖は、自分自身がガラス状態となり、リポソーム脂質膜が安定化するというマクロなりリポソームの安定性に寄与しているのではなく、DNAとの局所な水素結合等の相互作用によってDNAの安定性に寄与している可能性が示唆された。FT-IRなどにより、添加剤との相互作用を詳細に検討する必要があると考える。

現段階ではリポソームの外側に静電的に吸着したDNAと、リポソーム内のDNAとを完全に分離定量できないので、糖がリポソーム内への遺伝子の封入に影響し、リポソーム内遺伝子が製剤の安定性に寄与しているかが明確ではない。

しかし、この場合も糖が脂質に一時的な不安定化に作用したことが DNA の安定性に間接的に寄与した可能性を示している。

## E. 結論

①NMR 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、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  $\beta$  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。さらに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の凝集速度を決定する主要な要因はタンパク質のローカルな運動性であり、ショ糖のようにタンパク質のローカルな運動性を強く抑制できる添加剤を用いることによって、製剤の安定性を著しく改善できることが明らかになった。

② $\beta$ -ガラクトシダーゼをデキストランゲルや PVA ゲルに内包することにより凍結乾燥時およびその後の保存中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。ゲル製剤においてもタンパク質のローカルな運動性を抑制することがゲルに内包したタンパク質の安定化につながる可能性が明らかになった。

③凍結乾燥再水和調製法による DNA 封入りポソームは、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。ショ糖を用いて凍結乾燥した遺伝子封入りポソーム(DC-Chol/DOPE=1/2)製剤は高い DNA 活性を保持しており、50℃で 50 日間保存しても、用時調製リポソームベクターとほぼ同等の高い遺伝子導入効率を示し、遺伝子導入用製剤として有用性が高いことを明らかにした。 $T_g$ の低いショ糖を用いた製剤が最も安定であったことから、DNA 封入りポソーム製剤の安定性と関連する因子として、 $T_g$ を指標とする構造緩和の分子運動よりも、ローカルな運動性や添加剤と DNA-リポソーム複合体との相互作用が重要であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, T. Kawanishi, Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelatd to the glass transition temperature. *Int. J. Pharm.* (2006) Accepted.
- 2) S.Yoshioka, Y.Aso, Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability during Storage of Amorphous Pharmaceuticals *J. Pharm. Sci.*, (2006) Accepted.
- 3) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso, Degradation Rate of Lyophilized Insulin, Exhibiting an Apparent Arrhenius Behavior around Glass Transition Temperature Regardless of Significant Contribution of Molecular Mobility. *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 2684-2691.
- 4) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso.  $\beta$ -relaxation of insulin molecule in lyophilized formulations containing trehalose or dextran as a determinant of chemical reactivity. *Pharm. Res.*, (2006) 23, 961-966.
- 5) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, Physical Stability of amorphous acetanilide derivatives imporoved by polymer excipients. *Chem. Pharm. Bull.*, (2006) 54, 1207-1210.
- 6) S.Yoshioka, Y.Aso, T. Miyazaki, Negligible contribution of molecular mobility to the degradation rate of insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone). *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 939-943.
- 7) Y. Aso, S. Yoshioka, Molecular Mobility of Nifedipine-PVP and Phenobarbital-PVP Solid

- Dispersions as Measured by  $^{13}\text{C}$ -NMR Spin-Lattice Relaxation Time. *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 318-325.
- 8) M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani. Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *International Journal of Oncology*, 30:225-231 (2007).
  - 9) M. Watanabe, K. Kawano, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Preparation of camptothecin-loaded polymeric micelles and evaluation of stability in vitro and in vivo, *Int. J. Pharm.*, 308:183-189 (2006).
  - 10) L. Feng, X. R. Qi, X. J. Zhou, Y. Maitani, S. C. Wang, Y. Jiang, T. Nagai, Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres, *J Control Release*. 112(1):35-42, (2006).
  - 11) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Design, synthesis and gene delivery efficiency of novel oligo-arginine linked PEG-lipids: effect of oligo-arginine length. *Int. J. Pharm.* 316(1-2): 109-116 (2006).
  - 12) Y. Hiruta, Y. Hattori, K. Kawano, Y. Obata, Y. Maitani, Novel ultra-deformable vesicles entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin, *J Control Release.*, 113: 146-1542 (2006).
  - 13) K. Kawano, M. Watanabe, T. Yamamoto, M. Yokoyama, P. Opanasopit, T. Okano, Y. Maitani, Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles, *J Control Release.*, 112: 329-332 (2006).
  - 14) T. Yoshitomi, S. Yabuki, H. Kawakami, R. Sato, K. Toma, M. Furuhashi and Y. Maitani, The structure of artificial lipids possessing oligo(ethylene glycol) and their behavior in water. *Colloids and Surfaces A.*, 284-285: 276-283, (2006).
  - 15) S. Igarashi, Y. Hattori and Y. Maitani, Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic, *J Control Release*. 112: 362-368 (2006).
  - 16) M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine -modified liposomes and the effect of oligoarginine length, *Bioconjugate Chemistry.*, 17: 935-942 (2006).
  - 17) Y. Hattori and Y. Maitani, Two-step transcriptional amplification-lipid-based nanoparticles using PSMA or midkine promoter for suicide gene therapy in prostate cancer. *Cancer Science*. 97: 787-798 (2006).
  - 18) K. Hayashi, JB Lee, Y. Maitani, N. Toyooka, H. Nemoto, T. Hayashi, The role of a HSV thymidine kinase stimulating substance, scopadulciol, in improving the efficacy of cancer gene therapy. *J Gene Med*. 8(8):1056-67 (2006).
  - 19) Y. Maitani, S. Yano, Y. Hattori, M. Furuhashi, Y. Hayashi, Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system. *J Liposome Res*. 16:359-342 (2006).
  - 20) S. Yoshioka, Y. Aso, Comparison of the glass transition temperature and fragility parameter of isomaltol-oligomer predicted by molecular dynamics simulations with those measured by differential scanning calorimetry. *Chem. Pharm. Bull.* 53:1443-1445 (2005).
  - 21) 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)
  - 22) Y. Aso, S. Yoshioka, Effect of Freezing Rate on Physical Stability of Lyophilized Cationic Liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 301-304 (2005).
  - 23) 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).
  - 24) 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).
  - 25) 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).
  - 26) 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).
  - 27) 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).
  - 28) 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).
- 29) Y. Hattori, and Y. Maitani, Folate-linked lipid-based nanoparticle for targeted gene delivery, *Current Drug Delivery*, 2:243-252, (2005).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) Y. Maitani, K. Nakamura, K. Kawano. Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 6, 81-93 (2005).
- 33) 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).
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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).
- 37) 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).
- 38) 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).
- 39) 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).
- 40) 米谷芳枝, 機能性脂質マイクロエマルジョンと DDS, *医薬ジャーナル Medical Front Line*, 40, 37-43 (2004).
- 41) 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).
- 42) 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).
- 43) 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、川西 徹: 固体分散体中のアスピリンの拡散速度と化学反応性に関する分子動力的検討. 日本薬学会第127年会 (2007. 3)
- 2) 阿曾幸男, 吉岡澄江、川西 徹:  $^{13}\text{C}$ -NMR緩和時間によるデキストランゲル中の $\beta$ ガラクトシダーゼの分子運動性の測定. 日本薬学会第127年会 (2007. 3)
- 3) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y.: Relationship between storage stability and  $\beta$ -relaxation for lyophilized insulin and  $\beta$ -galactosidase formulations, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2006.11)
- 4) Aso, Y., Miyazaki, T., Yoshioka, S.: Determination of molecular mobility of phenobarbital in solid dispersions with PVP and HPMC by  $^{13}\text{C}$ -NMR relaxation measurement in relation to phenobarbital crystallization, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2006.11)
- 3) Yoshioka, S., Aso, Y.: The relative contribution of molecular mobility and chemical activation barrier to the chemical reactivity of lyophilized insulin formulations,



- Amorph 2006 - Molecular Basis of Stability in Pharmaceutical and Food Glasses (2006.7)
- 4) 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)  
講演ハイライト「タンパク質医薬品の品質変化は分子の動きで予測できる」 p. 35.
  - 5) 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 $\beta$ -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)
  - 6) 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)
  - 7) 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 $^{13}\text{C}$  NMRで測定した $\beta$ 緩和速度との関係. 日本薬学会第21年会 (2006. 3)
  - 8) 阿曾幸男, 吉岡澄江:  $^{13}\text{C}$ -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. 日本薬学会第21年会 (2006. 3)
  - 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ソルピシン封入り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, カンプトテシン封入り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12年会 (2006. 3)
  - 18) Y. Hattori and Y. Maitani, Tumor-specific two-step transcriptional amplification for non-viral suicide gene therapy of prostate cancer, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery, (2006. 7)
  - 19) M. Furuhata, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori and Y. Maitani, Intracellular delivery of plasmid DNA using oligoarginine modified micelles and liposomes, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery, (2006. 7)
  - 20) 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ベクターによる遺伝子導入 第22回日本DDS学会 (2006.7)
  - 21) 羽山明宏, 山本竜広, 横山昌幸, 川野久美, 米谷芳枝 カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾方法の検討 第22回日本DDS学会 (2006. 7)
  - 22) 服部喜之, 米谷芳枝2段階遺伝子転写増幅法による脂質微粒子遺伝子ベクターを用いた前立腺癌特異的自殺遺伝子治療の評価, 日本癌学会 第65回総会 (2006. 9)
  - 23) M. Furuhata, H. Kawakami, K. Toma, Y. Yamada, Y. Hattori and Y. Maitani, Oligoarginine modified liposome and micelle vector complex with plasmid DNA for gene delivery, Membrane-permeable peptides: Chemistry, biology and therapeutic applications, A Satellite Meeting of International Conference of 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting, (2006.11)
  - 24) 羽山明宏, 山本竜広, 横山昌幸, 川野久美, 米谷芳枝 カンプトテシン封入高分子ミセルへの新規葉酸修飾法の検討とin vivo評価 日本薬学会第127年会 (2007. 3)
  - 25) 山田敦史, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝ドキソルピシン封入葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果におけるPEG脂質の影響 日本薬学会第127年会 (2007. 3)
  - 26) 吉澤隆, 服部喜之, 米谷芳枝 葉酸受容体選択性siRNA遺伝子ベクターの開発 日本薬学会第127年会 (2007. 3)
  - 27) 藤田堯志, 古幡昌彦, 服部喜之, 川上宏子, 戸潤一孔, 米谷芳枝 In vivo用オリゴアルギニン脂質ベクターの開発 日本薬学会第127年会 (2007. 3)
  - 28) 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)
  - 29) Aso, Y., Yoshioka, S. Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers in solid dispersions, as determined by  $^1\text{H-NMR}$

- spin-lattice relaxation measurements, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2005.11)
- 30) 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)
- 31) Masahiko Furuhashi, 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)
- 32) 吉岡 澄江、阿曾 幸男. 凍結乾燥製剤のSub-Tg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)
- 33) 阿曾幸男、吉岡澄江 デキストラングルに内包した $\beta$ -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)
- 34) 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)
- 35) 阿曾 幸男、吉岡 澄江.  $^{13}\text{C}$ -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)
- 36) 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)
- 37) 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)
- 38) Aso, Y., Yoshioka, S. Molecular mobility of solid dispersions of nifedipine-PVP as measured by  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2004 Annual Meeting (2004.11)
- 39) Yoshioka, S., Can molecular dynamics simulation predict the glass transition temperature of freeze-dried formulations? Pharmaceutical Sciences World Congress (2004. 6)
- 40) 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)
- 41) 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)
- 42) 梶原栄一、米谷芳枝 ガンシクロビル封入りポソーム製剤の調製. 日本薬学会第125年会 (2005. 3)
- 43) 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)
- 44) 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)
- 45) 蛭田有香、服部喜之、米谷芳枝. 皮膚癌治療用ブ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)
- 46) 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)
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) Yoshiyuki Hattori and Yoshie Maitani, Novel folate-linked nanoparticles for DNA transfection into human prostate cancer and oral cancer cells, 9th Liposome Research Days Conference, May 11-15, 2004, Hsinchu, Taiwan.
- 52) 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.

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

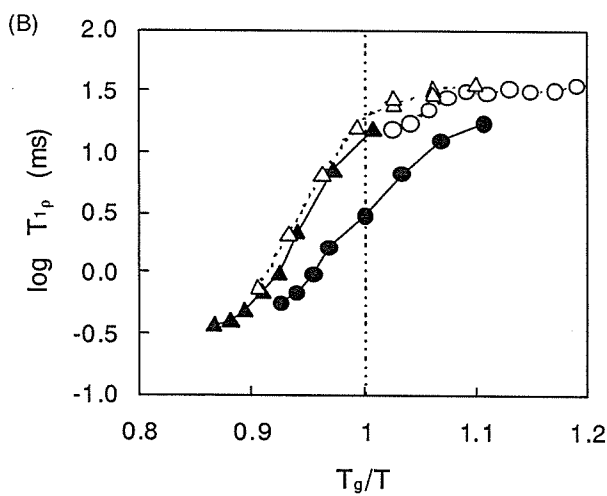
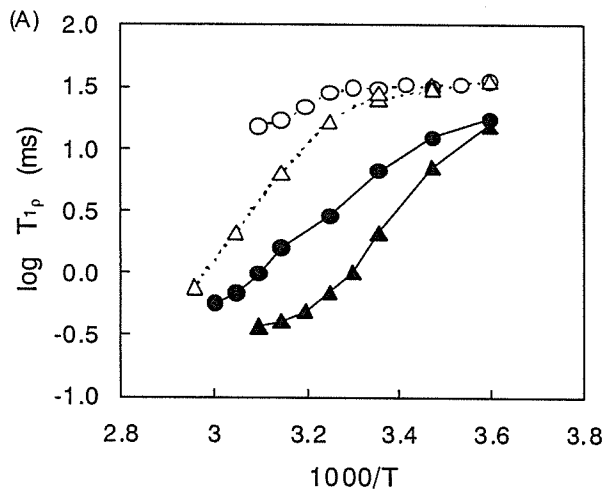


Fig.1.  $T_{1p}$  of freeze-dried IMT equilibrated at 43%RH ( $\Delta$ ) and 60%RH ( $\blacktriangle$ ) and  $T_{1p}$  of freeze-dried dextran 40k at 60%RH ( $\circ$ ) and 75%RH ( $\bullet$ ), plotted against  $1000/T$  (A) and  $T_g/T$  (B).

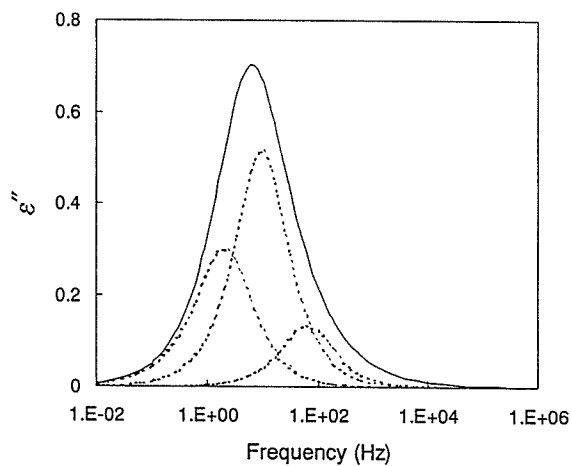


Fig.3. Dielectric relaxation spectrum of freeze-dried IMT at  $120^\circ\text{C}$  (solid line). Dashed lines represent three components of the Debye relaxation used for the transformation of  $\tau_{DES}$  to  $T_{1p}$ .

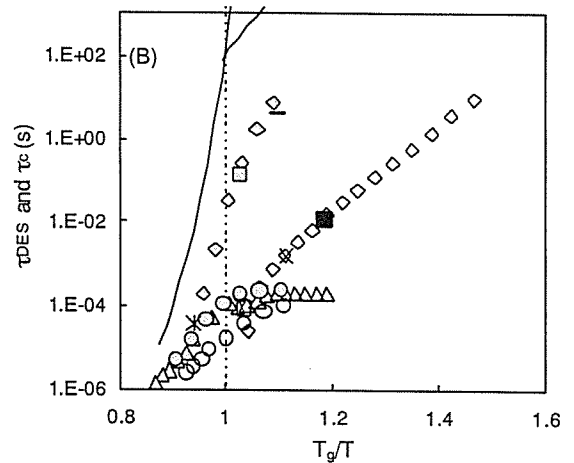
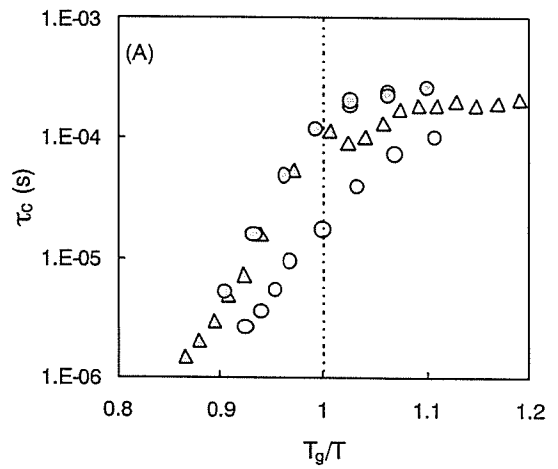


Fig.2. (A)  $\tau_c$  for the methine carbon of dextran 40k at 60%RH ( $\Delta$ ), dextran 40k at 75%RH ( $\circ$ ), IMT at 43%RH ( $\bullet$ ) and IMT at 60%RH ( $\blacktriangle$ ) calculated from the observed value of  $T_{1p}$ . (B) Comparison of the  $\tau_c$  of methine carbon with the  $\tau_{DES}$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