

200940007B

厚生労働科学研究費補助金

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

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の
確立に関する研究

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成22(2010)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

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

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の
確立に関する研究

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成22（2010）年 4月

目 次

I. 総合研究報告

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の確立に関する研究 --- 1
阿曾幸男

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 36

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 44

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）
総合研究報告書

タンパク質及び核酸含有製剤の高感度安定性評価法の確立に関する研究

主任研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室室長

タンパク質カルボニル炭素やDNAのデオキシリボース炭素のNMR緩和時間や、タンパク質の分解に伴う極微弱な熱をマイクロ熱量測定によって検出することによって、タンパク質凍結乾燥製剤や遺伝子導入リポソーム製剤などの保存安定性を高感度に評価することが明らかになった。カチオン性脂質の化学構造や、リポソームの水和状態などが遺伝子導入効率や細胞内取り込みに大きな影響を与えることを明らかにし、遺伝子導入効率が高く、保存安定性に優れた非ウイルス性遺伝子導入製剤の設計において重要な知見を得ることができた。

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

宮崎玉樹 国立衛研 薬品部主任研究官

A. 研究目的

近年、熱力学的に不安定なタンパク質や核酸などの高分子医薬に対し、高度な製剤学的工夫を施すことにより安定化を行い製剤化する試みが多数行われている。不安定な高分子医薬を医療の場で活用するためには、有効期間の間、その品質が保持されていることが不可欠であり、特に、高度な安定化を行った製剤は、安定性が製剤ロットによって変動する恐れがあり、製剤間の安定性の差を感度良く検出し、安定性試験を行ったロットと同等の安定性を有することを保証する必要がある。近年、我々や米国の研究グループの研究によって、高分子医薬品の安定性と製剤の分子運動性が密接に関連することが明らかになり、製剤の分子運動性に基づいて医薬品の安定性を予測できる可能性が示されつつある。また、保存安定性を支配する分子運動として、構造緩和を引き起こすスケールの大きな運動(分子の並進運動や分子全体の回転運動)に加え、それよりスケールの小さな運動の重要性が指摘されている。

本研究においては、タンパク質や核酸などの高分子医薬の製剤化法としてfirst choiceされる凍結乾燥製剤を安定化製剤のモデルとし、固体高分解能NMRや誘電緩和スペクトルなどを用い、分解に必要な分子運動性を高感度に検出すること、および、医薬品の分解にともなうナノワットレベルの極微小な熱を検出することによって、保存安定性と関連する医薬品の物理化学的な特性を明らかにし、安定性を予測する手法の開発を行う。また、遺伝子導入効率が高く、保存安定性に優れた非ウイルス性遺伝子導入製剤の製剤設計を行ない、得られた製剤に本研究で開発された安定性評価法を適用し、その有用性を確認することも目的とする。

B. 研究方法

(1)タンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性を決める分子運動性とその制御

スクロース、トレハロースあるいはスタキオース、イソマルトース、ヒドロキシエチルスターチ(HES)、デキストランを添加剤として用いて、 β -ガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤(タン

パク質：添加剤=2:1)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、活性を測定した。凝集量は HP-SEC により、活性は 2-ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシドを基質とし用い、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スピン格子緩和時($T_{1\rho}$)および回転系スピン-格子緩和時間($T_{1\rho}$)を固体 NMR で測定した。製剤の T_g は温度変調 DSC で測定した。

(2)等温マイクロ熱量測定および熱刺激脱分極電流測定法によるタンパク質凍結乾燥製剤の安定性予測

製剤の発生する熱を等温マイクロ熱量計を用い 20、25、40°C で測定した。

熱刺激脱分極電流測定は TS-POLOR 型の装置(リガク)を用い、分極を温度 60°C または 80°C、電圧は 10V で行った。-100°C から 5°C/min で昇温し、脱分極電流を測定した。

(3)遺伝子導入製剤の遺伝子導入効率に及ぼす因子の解明

(3)-1 ナノ粒子/DNA および遺伝子導入リポソーム製剤の遺伝子導入効率に対する糖の影響

ナノ粒子による遺伝子導入実験

OH-Chol 脂質と Tween80 からなるナノ粒子を修正エタノール注入法で調製した。糖としては、2 糖類のマルトース、トレハロース、ラクトース、スクロース、セルビオースを用いた。細胞は PC-3、SKBr-3、L1210 を用いた。DNA としては、分泌性ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA pCMV-Gluc を用いた。ナノ粒子と DNA の(+/-)荷電比は 3/1 として 0 ~ 50mM NaCl 水溶液中で複合体 (ナノ粒子/DNA) を調製した。このナノ粒子/DNA を 50mM NaCl 水溶液を用いたときは 125 mM、その他のときは 150 mM の各糖を添加した培地で 3 時間インキュベーションし、その後培地を糖無添加の培地に変えて、さらに 48 時間 10%FBS 含有培地でインキュベーションして、その後分泌されたルシフェラーゼ発現量をピカジーンを用いて測定した。

凍結乾燥再水和法調製リポソーム製剤による遺伝子導入実験

MHAPC と DOPE 脂質がモル比で 1:1 のリポソーム (MHAPC-Lip)、または、MHAPC と DOPE とバイオ界面活性剤 MEL-A がモル比で 1:1:0.5 のリポソーム (MEL-A-MHAPC-Lip)を薄膜法で調製し、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA pCMV-luc を用いて、(+/-)荷電比 3/1 の複合体を調製した。この懸濁液に全脂質の 5 倍質量のスクロース、またはマルトースを添加した懸濁液 (A)、その凍結乾燥製剤 (B) およびそれを再水和した懸濁液 (C) を用いて、A549 細胞、またはマウスに気管内投与をして遺伝子導入効率を調べた。なお、(C)は 1.55 mg 粉末を 60 μ l 水で再水和した(333 ng DNA/ml)。凍結乾燥再水和前リポソームのサイズは、約 200 nm であり、凍結乾燥再水和後は約 1-5 μ m であった。

遺伝子導入効率は、A、C 懸濁液を 1 ウェルあたり 2 μ g DNA となるように添加して、24 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測定した。B では、3.1 mg (40 μ g DNA 含有)の凍結乾燥製剤をマウスの気管に内径 5 μ m の注射針の注射筒を用いて肺に投与した。

遺伝子導入ナノ粒子製剤の細胞毒性

遺伝子発現時の各細胞に対する毒性は、WST8 測定から評価した。

(3)-2 DNA の分子運動性に及ぼす糖の影響

サケ由来の DNA をモデルとし、スクロース、イソマルトース、イソマルトトリオースを添加し、凍結乾燥した。凍結乾燥製剤中の DNA のデオキシリボース炭素について、実験室系および回転系スピン-格子緩和時間(T_1 および $T_{1\rho}$)を ^{13}C -NMR で測定した。

(3)-3 プラスミド DNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

カチオン性コレステロール誘導体(CCDs)合成

4 種類の生体分解性カチオン性コレステロール誘導体(CCDs)を合成した(Fig. 1)。これらは、塩基性を示すアミノ基が第一、第二、第三

級アミノ基かの違いがあり、また、末端の水酸基の有無、コレステロールとの結合がカーバメイト結合かとアミド結合 (OH·Chol) かが異なっている。

リポソーム製剤による遺伝子導入実験

各 CCD 脂質と DOPE (モル比で 1:1) からなるリポソームを修正エタノール注入法で調製した。または、MHAPC と DOPE と MEL-A、Tween 80 がモル比で 1:1:0.5 のリポソームを同様に調製した。DNA としては、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA pCMV-luc を用いた。カチオン性リポソームと DNA の (+/-) 荷電比は 3/1、5/1 として水中で複合体 (リポソーム/DNA、リポプレックス) を調製した。これらを A549 細胞、または、マウスの気管に内径 5 μm の注射針の注射筒を用いて肺に投与した。遺伝子導入効率率は、1 ウェルあたり 2 μg DNA となるようにリポプレックスを添加して、24 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。

リポプレックスの細胞内取り込み

A549 細胞にローダンミンでラベルしたリポプレックスを添加して、PBS 中で 2 時間インキュベーションをし、フローサイトメーターで取り込みを評価した。

リポソームとリポプレックスの物性測定

リポソームとリポプレックスのサイズと表面電位は、電気泳動光散乱光度計 (ELS-Z2、大塚電子株) を用いて測定した。DNA と各リポソームとの相互作用を DNA の円二色性 CD 測定で調べた。リポプレックスの表面の pH は 4-heptadesyl-7-hydroxycoumarin (HC) を添加したリポソームを用いて、Em300-400 nm、Ex450nm、25°C での蛍光を測定して求めた。リポプレックスの表面の水和状態は 6-dodecanoyl-2-demethylaminonaphthalene (laurdan) を添加したリポソームを用いて、25°C で Ex340nm おける Em440 と 490 nm での蛍光強度の差から GP (generalized polarization) 値を求めた。

$$GP(\text{Ex}_{340}) = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

誘電緩和測定は、25°C 行った。

(倫理面への配慮)

用いた培養細胞は広く用いられているものであり、倫理面の問題はないと判断した。マウスを用いた実験については、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験をおこなった。

C. 研究結果

(1) タンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性を決める分子運動性とその制御

スクロース、トレハロースあるいはスタキオースを添加剤として含有する β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は、Fig. 2 に示すようにいずれの製剤も保存中に一次速度式に従う β -ガラクトシダーゼの凝集を示した。凝集が 10% 進行するのに要する時間 (t_{90}) の温度依存性を Fig. 3 に示す。 T_g における t_{90} はスタキオース < トレハロース < スクロースの順に大きくなり、凝集速度は添加剤に大きく依存した。また、 T_g 以上の温度領域における t_{90} の温度依存性の傾きは T_g 以下にくらべ大きく、分子運動性が凝集速度に寄与することが示唆される。Fig. 4 に β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の T_g とガラクトシダーゼのカルボニル炭素の $T_{1\rho}$ を示す。 T_g は構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動 (分子の並進や回転運動など) の指標であり、 T_g が高い製剤ほど、ある温度における構造緩和を引き起こす分子運動性が低いことを意味する。それに対し $T_{1\rho}$ は構造緩和よりもスケールの小さな分子運動の指標であり、 $T_{1\rho}$ が大きいほどその分子運動性が低いことを意味する。凍結乾燥製剤の T_g はスクロース < トレハロース < スタキオースの順に高くなり、構造緩和を引き起こす分子運動性はスクロース > トレハロース > スタキオースの順に低くなることが示された。凍結乾燥製剤の $T_{1\rho}$ はスタキオース < トレハロース < スクロースの順に大きく、 $T_{1\rho}$ に反映されるスケールの小さな運動性はスタキオース > トレハロース > スクロースの順に小さくなることが示された。したがって、凝集速度は T_g で表される構造緩和を引き起こす分子運動性よりも、 $T_{1\rho}$ に反映される

スケールの小さな運動性と密接に関連していることが示唆される。

保存安定性と NMR 緩和時間で表される分子運動性の関連をさらに検討するため、スクロース、トレハロース、スタキオース、イソマルトース、デキストラン、HES を添加剤として用いた凍結乾燥製剤について酵素活性の変化をもとに保存安定性を検討するとともに、保存実験を行った温度において、タンパク質カルボニル炭素の NMR 緩和時間の測定を行った。Fig.5 に 40°C における β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の失活のタイムコースを示す。スクロース、トレハロース、イソマルトースは失活が遅く、300 日保存後も、90%以上の活性が残存していた。スタキオースを添加した製剤は 240 日保存により、活性が保存前の約 90%に減少した。一方、デキストランや HES を添加した製剤においては初期に速やかな失活がみられ、それに引き続いてゆるやかな活性の減少が観測された。添加剤によって β -ガラクトシダーゼの失活速度に大きな差がみられた。スクロース、トレハロース、イソマルトース、スタキオースを添加剤として用いた凍結乾燥製剤中の β -ガラクトシダーゼの失活速度は一次速度式に従い速度定数を算出した。得られた速度定数を Fig.6 に示す。デキストランと HES を添加した凍結乾燥製剤において観測された初期の速やかな失活は凍結乾燥によってダメージを受けた β -ガラクトシダーゼの失活によるものと考えられることから、これらの凍結乾燥製剤の失活のタイムコースは 2 つの指数関数の和によって表されると仮定し、フィッティングを行った。Fig.6 には後半の緩やかな失活の速度定数を示す。添加剤によって β -GA の安定性は大きく異なることが分かった。

β -ガラクトシダ凍結乾燥製剤の ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、50-100 ppm 付近に糖の炭素に由来する大きなピークが観測され、

$$P = 177.8 \frac{\Delta H_r(\infty)}{\tau_0} \left(1 + \frac{\beta t}{\tau_1} \right) \left(1 + \frac{t}{\tau_1} \right)^{\beta-2} \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau_0} \right) \left(1 + \frac{t}{\tau_1} \right)^{\beta-1} \right] + P_k \quad (1)$$

175ppm 付近に β -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素のシグナルが観測された。タンパク質

のカルボニル炭素について Torchia のパルスシークエンスを用い、 T_1 を測定した。40°C と 50°C の 2 つの温度で測定した β -ガラクトシダーゼの失活速度と β -ガラクトシダーゼカルボニル炭素の T_1 との関係を Fig.7 に示す。ここで、 T_1 は温度が高いほど短いことから、”Slow motional regime” における値と考えられ、 T_1 が短いほどカルボニル炭素の分子運動性が高いことを示す。 T_1 が大きくカルボニル炭素の分子運動性が低いと考えられる凍結乾燥製剤ほど、 β -GA の失活速度が小さく安定であることが明らかになった。また、異なる温度で測定した失活速度と T_1 のプロットが 1 つの曲線上に集まった。これは、 T_1 で表される分子運動性と失活速度が関連することを支持するデータであると考えられる。

(2)等温マイクロ熱量測定および熱刺激脱分極電流測定法によるタンパク質凍結乾燥製剤の安定性予測

スクロース、トレハロースあるいはスタキオースを添加剤として含有する β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の分解速度は Fig.3 に示すようにスタキオース > トレハロース > スクロースの順に大きくなり、凝集速度は添加剤に大きく依存した。等温マイクロ熱量計を用い、タンパク質の分解に伴って発生する微小な熱を検出し、タンパク質凍結乾燥製剤の安定性予測の可能性を検討した。Fig.8 に 40°C および 20°C における β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の発生する熱の測定例を示す。Fig.8(A) に示すように試料が測定温度と平衡に達するまでの約 0.5 日間に大きな発熱が観測され、その後、構造緩和に伴い、ゆっくり減衰する発熱が 10 日間観測される。それ以降の発熱はプラトーとなり、 β -ガラクトシダーゼの分解に伴う発熱(P_k)と考えられる。Fig.8(B) は 20°C における β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の発生する熱の測定例を示す。温度が低下することにより、分解

$$\Delta H_r(\infty) = (T_g - T) \cdot \Delta C_p \quad (2)$$

速度が遅くなり、プラトーの発熱は数十 nW 程度の非常に小さな値となった。観測された Heat flow(P)の時間変化を 1 式に従いフィットし、 τ_0 、 τ_1 、 β および P_k の値を算出した。ここで、 $\Delta Hr(\infty)$ の値は T_g と熱量測定温度 T および T_g における比熱変化 ΔC_p の値を用い、2 式に従い算出した。 β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤の P_k の値は添加剤によって異なった。40°C における $1/P_k$ の値と分解速度(t_{90})を比較すると、Fig.9 に示すように、 $1/P_k$ の値はスクロース>トレハロース>スタキオースの順で小さくなり、 t_{90} と同様であった。この結果は P_k がタンパク質凍結乾燥剤の安定性の指標として用いることができることを示す。Fig.10 に P_k の温度依存性を示す。20°C から 40°C の温度範囲で観測された P_k と温度の逆数はアレニウスの関係に従い、20°C における P_k の値は 40°C における P_k の十分の一の値であった。これらの結果は P_k が分解速度と関連するパラメータであることを示唆するものと考えられる。 β -ガラクトシダーゼの分解速度の温度依存性が Fig. 10 に示す P_k の温度依存性と同じ傾きをもつと仮定し、25°C における t_{90} の値を算出したところ、スクロース、トレハロース、スタキオースを添加剤として含有する凍結乾燥剤中で β -ガラクトシダーゼが 10%凝集するのに要する時間は、それぞれ、3.2 年、2.4 年、1.6 年であった。マイクロ熱量測定によってタンパク質凍結乾燥剤の室温における安定性を短期間に評価でき、有用であることが示された。

タンパク質凍結乾燥剤ではさまざまなスケールの分子運動が起きている。安定性との関連が注目されているスケールの小さな運動を解析する上で NMR 緩和測定が有用であることを明らかにした。 ^{13}C -NMR や ^{15}N -NMR は製剤中の特定の分子の動きを観測することができ、製剤中のタンパク質の相対的な運動性の差異を明らかにする上で有用である。しかし、NMR 緩和時間から絶対的な運動の速度を見積もるためには、広範囲の温度領域における緩和時間の測定が不可欠であり、誘電緩和測定はこのような NMR 緩和測定の弱点を補うものとして有用であると考えられる。誘電緩和測定の一手法と注目されている熱刺激脱分極電流測定

によるタンパク質凍結乾燥剤の分子運動性の測定を検討した。熱刺激脱分極電流測定のもっとも基本的な測定方法である Global 法について概略を記す。温度を高めて試料の分子運動性を高め、試料に電場をかけ、電気双曲子を電場方向に配向させ分極させる。続いて、電場をかけたまま試料を十分に冷却し、分極を凍結させた後、一定速度で昇温する。温度が高くなり、分子運動が始まると、配向した電気双曲子がランダムな方向を向くため、脱分極が起こり、それに伴い 10^{-14} A 程度の非常に微弱な電流が流れる。Global 法のほかに、狭い範囲の温度で分極させる Thermal window 法などの方法もあり、スケールの異なる分子運動を選択的に検出することが可能である。Fig. 11 に β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥品の熱刺激脱分極電流の測定例を示す。100°C 付近に脱分極電流のピークが見られた。BSA やリゾチームにおいても 100°C 付近にピークが観測された。糖類を含む β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤においても脱分極電流のピークが見られた。Fig.12 にそのピーク温度を示す。糖類を含む β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥剤のピーク温度は糖単独の凍結乾燥品のピーク温度と β -ガラクトシダーゼ単独の試料のピーク温度の中間の値であった。Fig. 13 に糖類の脱分極電流のピーク温度と DSC で測定される T_g との関連を示す。 T_g の高い糖ほど脱分極電流のピーク温度が高いことから、脱分極を引き起こす動きはガラス転移(構造緩和)を引き起こす動きと関連していると思われる。乾燥状態のタンパク質は T_g における比熱変化が小さいため DSC での T_g 測定が困難であるが、熱刺激脱分極電流測定によってタンパク質の T_g が測定できる可能性が示唆された。

(3)遺伝子導入製剤の遺伝子導入効率に及ぼす因子の解明

(3)-1 ナノ粒子/DNA および遺伝子導入リポソーム製剤の遺伝子導入効率に対する糖の影響

細胞培地に各糖を添加して、ナノ粒子/DNA の遺伝子導入効率を 2 種類の細胞で調べた

(Fig.14)。どちらの細胞においても、スクロースの添加時に最も高い遺伝子発現が見られ、マルトース、トレハロース、ラクトースでは遺伝子発現の低下が見られた。このときの細胞毒性は各糖類で顕著な差が見られなかったことにより、遺伝子発現の差は細胞への導入効率の差によると推察された。

また、スクロースの添加において、複合体形成時の塩の影響を調べたところ、10~50mM NaCl でさらに発現が高くなることが明らかになった (Fig.15)。

遺伝子導入リポソーム製剤として、MHAPC-Lip、MEL-A-MHAPC-Lip/DNA 複合体について検討した。リポソーム製剤とマルトース、またはスクロースを添加した懸濁液 A、または、その凍結乾燥再水和液 C と細胞をインキュベーションした結果、MEL-A-MHAPC-Lip にスクロースを添加した系では、凍結乾燥前 A に比べて約 10 倍高い遺伝子導入効率を示した (Fig.16)。遺伝子導入用リポソームベクターでは、 T_g の低いスクロースを添加して凍結乾燥再水和時すると遺伝子導入効率が高くなり、糖はリポソームの安定性よりも DNA の局所的安定性に寄与している可能性があることを報告した。もし、糖が DNA の局所的安定性に寄与しているならば、リポソームでなく、ナノ粒子によっても同じように遺伝子導入効率が上昇するはずである。Fig.14 に示すように、ナノ粒子/DNA の遺伝子導入効率に及ぼす 5 種類の 2 糖類の影響は、リポソームの凍結乾燥再水和時と同様に、スクロースの培地への添加によって遺伝子導入効率が高くなった。この結果より、スクロースは複合体中の DNA や、複合体の分散性などに大きな影響を与えることが示唆された。また、複合体形成時の塩濃度が遺伝子導入効率に大きく寄与することも明らかとなった。スクロースは、複合体中の DNA と局所的な水素結合等の相互作用によって安定性に寄与している可能性が示唆された。

凍結乾燥製剤 B をマウスに気管内投与して、肺での遺伝子導入効率を調べたが、十分な発現はみられなかった。スクロースを添加した凍結乾燥再水和法で調製した遺伝子封入リポソーム製剤をマウスの肺に投与して遺伝子導入効率を調べた結果、十分な発現を得ることはできなかった。これはリポソームのサイズが 1 ミクロン以上の大きさになったために、粘膜透過性が低下したためと推察された。

(3)-2 DNA の分子運動性に及ぼす糖の影響

スクロースを添加した遺伝子導入リポソーム凍結乾燥製剤はイソマルトースやイソマルトトリオースを添加した製剤くらべ保存安定性に優れ、50℃、50 日保存後も遺伝子導入活性を有する。保存安定性に及ぼす糖の影響を DNA の運動性の観点から考察するために、サケ由来の DNA をモデルとして用い、 ^{13}C -NMR 緩和時間の測定を行った。DNA の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig.17 に示す。15ppm 付近に見られるシグナルはチミンのメチル基炭素、40ppm 付近のシグナルはデオキシリボースの CH_2 炭素、60 から 90ppm に見られるシグナルはデオキシリボースの酸素が結合した炭素、110ppm より低磁場に見られるシグナルは塩基の炭素のシグナルと考えられる。添加剤として用いる糖の炭素のシグナルは 60 から 100ppm に現れるので、糖と重ならない 40ppm 付近のシグナルを DNA の運動性の測定に用いた。

Fig.18 にデオキシリボース炭素のスピンの緩和過程のタイムコースを示す。上の図は MHz オーダーの運動性を反映する実験室座標系におけるスピン-格子緩和過程、下の図は数十 kHz オーダーの運動性を反映する回転座標系におけるスピン-格子緩和過程を示す。ばらつきが大きいものの、どちらの緩和過程の場合も DNA 単独にくらべ糖を添加した場合、緩和が遅くなり、運動性が低下していることが明らかとなった。

Fig.19 に DNA のデオキシリボース炭素の T_1 、 $T_{1\rho}$ に及ぼす糖の影響を示す。DNA 単独にくらべ糖が存在すると T_1 、 $T_{1\rho}$ は増大し、その順序はスクロース>イソマルトース>イソマル

トトリオースの順であった。遺伝子導入効率の保存安定性の最も良かったスクロース製剤が DNA の局所的な運動性は最も小さいことから、保存安定性と DNA の局所的な運動性に関連があると考えられる。

(3)-3 プラスミド DNA/リポソームの表面状態と遺伝子発現効率

遺伝子導入用リポソームベクターでは、カチオン性脂質が用いられている。これはアニオン性の DNA と複合体リポプレックスを作り、なおかつアニオン性電荷をもつ細胞との相互作用をさせるために、カチオン性リポソームと DNA の(+/-)荷電比を調整してカチオン性になるようにしている。従って、このカチオン性脂質の設計は遺伝子導入の鍵となる。そこで、遺伝子導入用リポソームベクターの遺伝子導入効率を改善するために、新規なカチオン性コレステロール誘導体(CCDs)を合成した。これらを用いて調製したリポソームベクターの *in vitro* とマウスの経肺投与における遺伝子導入効率を明らかにし、肺への遺伝子送達用非ウイルスベクターへの有用性を検討した。また、リポプレックスになったとき、DNA とリポソーム脂質膜との強い分子的相互作用により、サイズや表面状態が変化することが知られている。そのため、これまでリポプレックスの表面状態は表面電位の測定で評価されてきたが、ここでは新たに表面の水和状態と pH が細胞取り込みや遺伝子導入効率の指標にならないかを検討した。また、バイオ界面活性剤である mannosylerythritol (MEL-A)や Tween 80 を用い(Fig. 1)、リポソーム表面の改質を行い、遺伝子導入効率と細胞への取り込みに対する影響について検討し、リポソームの表面の水和状態や pH と遺伝子導入効率との関連を明らかにした。

新規の CCDs からなるリポソームベクターを用いて *in vitro* と、マウスの肺に遺伝子投与後の導入効率とその化学構造の関連性について検討した。*in vitro* での DNA 導入効率を調べた結

果、CCDs のアミノ基の末端に水酸基がない誘導体からなるリポソームが高い発現効率を示した。続いてマウスの経肺投与による遺伝子導入についても検討した結果、*in vitro* と異なり、水酸基をもつ第三級アミン誘導体 (MHAPC) が導入に有効であった(Fig. 20)。*in vivo* では水酸基をもつ第三級アミンをもつ MHAPC が導入に有効であったことから、肺粘膜上では第三級アミンによるプラスミド DNA との強い結合が DNA の安定性に必要と考えられた。

次に遺伝子導入効率を改善するために、非イオン性界面活性剤によるリポソームの表面修飾を検討した。MHAPC リポソームに MEL-A、または Tween 80 で修飾したベクターにおいて、MEL-A は *in vitro* と *in vivo* でともに発現を上昇したが、Tween 80 はいずれにおいても上昇しなかった(Fig. 20,21)。MEL-A リポソームベクターは、Tween 80 リポソームベクターに比べ、*in vitro* では細胞内に取り込まれた後 DNA を早く放出し、*in vivo* ではマウスの肺粘膜上にリポプレックスを長く保持することが確認された。

さらに、MEL-A のリポソームに対する影響をリポプレックス表面の物理化学的性質に基づいて検討した。これまでリポプレックスの表面電位が細胞との相互作用の指標として用いられてきたが、表面の水和状態や pH について検討した。HC の解離状態からリポソーム表面の pH を、laurdan の GP 値から水和状態を算出した(Fig. 22)。なお、GP 値が高いとき、水和されていることを示す。その結果、MEL-A はリポプレックスの表面電位に影響しないが、Tween 80 は有意に低下させることが明らかになった(Fig. 23)。また、Tween 80 は MEL-A よりリポプレックスの GP 値を減少させたので表面を水和させることも明らかになった(Fig. 24)。なお、このとき各リポソームと DNA の相互作用は CD 測定からはほぼ変わらず、また、表面の pH には大きな違いはみられなかった(Fig. 25,26)。これらのリポプレックスでは、MEL-A は細胞内取り込みが変わらず、Tween 80 では減少させた (Fig. 27)。

遺伝子導入効率を改善するために非イオン性界面活性剤によるリポソームの表面修飾を検討した。蛍光標識したリポソームの蛍光強度から導き出される GP 値は水和状態の指標といわれており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。OH-Chol リポソームに MEL-A、または Tween 80 で修飾したベクターにおいては、Tween 80 は MEL-A よりリポプレックスの GP 値を減少させたので表面を水和させることが明らかになった (Fig. 28)。

リポソーム表面の水和状態を水の誘電緩和測定によって検討した。リポソームの濃度がどの程度で測定できるかを検討した。リポソーム懸濁液 (総脂質量約 6 mg/mL) を超遠心 (452000 x g、30min、4°C) により 5 倍に濃縮した総脂質量約 30mg/mL のリポソームと、それを希釈した 15, 10 mg/mL のリポソーム懸濁液の誘電緩和測定を行った (Fig. 29)。総脂質量約 10mg/mL のリポソームでも測定できることが明らかになったため、超遠心による濃縮ではなく、リポソームをこの濃度で調製することにした。

このリポソームおよびリポプレックスの誘電緩和測定を行った (Fig.30)。GP 値と同様に MEL-A を添加したものは添加しないものよりも脱水和状態にあり、一方で Tween 80 を添加したものは水和状態にあるという傾向が確認された。このリポソームのゼータ電位を測定したところ、Fig. 31 のようになった。

リポソームの表面状態の遺伝子導入効率と細胞への取り込みに対する影響について検討したところ、リポソーム表面の改質に用いた MEL-A は *in vitro* と *in vivo* でともに発現を上昇したが、Tween 80 はいずれにおいても上昇しなかった。リポプレックスの表面電位においては、MEL-A は変化しないが Tween 80 は有意に低下させ、また、リポプレックスの表面の水和状態においては、Tween 80 は MEL-A より水和させることが明らかになった。したがって、リポプレックスの高いカチオン性の表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係すると推察された。さらに、MEL-A リポソームベ

クターは、Tween 80 リポソームベクターに比べ、*in vitro* では細胞に取り込まれた後 DNA を早く放出したことより、MEL-A は Tween 80 リポソームベクターと異なる細胞取り込み機構を誘導する可能性が示唆された。

D. 考察

(1)タンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性を決める分子運動性とその制御

種々の糖を添加剤として用いた β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について、タンパク質カルボニル炭素の緩和時間と失活速度の間には関連がみられた。緩和時間に基づく安定性予測の可能性が示唆された。しかし、保存安定性の時間スケールは月~年の時間スケールであるのに対し、 T_1 は非常に短い時間スケールで起こる分子運動によって支配される。中性子散乱測定によって測定される MHz オーダーの分子運動性が保存安定性と関連するとの報告もあることから、これは失活速度と T_1 の関連を否定するものではないと考えられる。スケールの小さな分子運動とタンパク質の保存安定性の関連性を説明する理論の構築が必要であると考えられる。

(2)等温マイクロ熱量測定および熱刺激脱分極電流測定法によるタンパク質凍結乾燥製剤の安定性予測

スクロース、トレハロース、スタキオースを添加した β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の安定性はスクロース > トレハロース > スタキオースの順であり、添加剤の影響を受けた。これらの凍結乾燥製剤について、40~20°C においてマイクロ熱量計によって測定した分解熱 (P_k) は、安定性の良いスクロース製剤が最も小さく、スクロース < トレハロース < スタキオースの順であり、添加剤の違いによる安定性の差と関連した。また、 P_k の温度依存性と分解速度の温度依存性が同じであると仮定し、25°C における β -ガラクトシダーゼの残存率が 90% になる時間を計算することができた。これらの結果は凍結乾燥製剤の安定性予測法として、マイクロ熱量測定が有用であることを示すものであるが、さらに、

β -ガラクトシダーゼ以外のタンパク質製剤についても検討を行い、その普遍性を明らかにする必要があると考える。

β -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤は 60~80 付近に脱分極電流のピークが観測された。ガラス転移温度が高い試料ほどピーク温度が高いことから、脱分極電流として観測される双曲線の運動は、ガラス転移を起こす動きと関連すると考えられる。DSC では測定が難しいタンパク質の Tg 測定に有用であることが示された。今後、Global 法に加え、Thermal window 法による検討を行い、脱分極を引き起こす運動の実態を明らかにするとともに、安定性との関連が注目されるスケールの小さな運動を検出できる測定条件を明らかにする必要があると考えられる。

(3) 遺伝子導入製剤の遺伝子導入効率および細胞内取り込みに及ぼす因子の解明

遺伝子導入効率や細胞内取り込みに及ぼす種々の因子を明らかにすることができた。脂質の化学構造に因子としては、水酸基をもつ第三級アミン誘導体 (MHAPC) が有用であることが明らかになった。遺伝子導入用リポソームベクターやナノ粒子/DNA 製剤の遺伝子導入効率や細胞内取り込みに及ぼす糖類などの添加剤の影響は DNA の局所の安定性に寄与している可能性があることが明らかになった。遺伝子導入用リポソームベクターの表面物性として、従来から報告されている表面電位の他に、水和状態の違いも遺伝子導入効率や細胞内取り込みに影響を及ぼすことを明らかにした。これらの知見は遺伝子導入効率が高く、保存安定性に優れた非ウイルス性遺伝子導入製剤の製剤設計を行なう上で、有用な知見と考えられる。

E. 結論

(1) タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度は構造緩和時間で表されるスケールの大きな分子運動性よりも、タンパク質のカルボニル炭素の NMR

緩和時間に反映されるスケールの小さな運動性と密接に関連していることが明らかになった。

(2) 等温マイクロ熱量測定は不安定な高分子医薬品製剤の保存安定性を高感度に評価できる有用な手法であることが明らかになった。

(3) 遺伝子導入ナノ粒子製剤やリポソーム製剤の *in vitro* における遺伝子導入効率は糖の影響を受け、スクロースが最も効率が高いことが明らかとなった。

(4) 遺伝子導入用リポソーム製剤の *in vivo* での活性発現には、リポソーム/DNA 複合体のサイズの制御が重要であることが明らかとなった。

(5) DNA の運動性を抑制する効果の大きい糖を添加した遺伝子導入リポソーム製剤は保存安定性に優れていることが明らかになった。

(6) 等遺伝子導入用リポソーム製剤には、リポソーム/DNA 複合体の高いカチオン性の表面電位と水和状態が、細胞内取り込みに関係すると推察された。今後のリポソームベクターの遺伝子導入効率を予見するうえでの 1 つのマーカーとして、リポソームの表面水和状態を使用できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bingquan Wang, Marcus T. Cicerone, Yukio Aso, Michael J. Pikal : The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.* (2010) **99**, 683-700.
- 2) 阿曾幸男, 吉岡澄江: 非晶質の緩和と結晶化, 難水溶性薬物の物性評価と製剤設計の新展開, シーエムシ出版, 224-235 (2010).
- 3) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of ^{19}F -NMR for

- assessing the molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions. *Chem. Pharm. Bull.*, (2009) **57**, 61-64.
- 4) Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T.: Wide-Ranging Molecular Mobilities of Water in Active Pharmaceutical Ingredient (API) Hydrates as Determined by NMR Relaxation Times. *J Pharm. Sci.*, (2008) **97**, 4258-4268.
- 5) Maitani Y., Aso Y., Yamada A., Yoshioka S.: Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency. *Int. J. Pharm.*, (2008) in press.
- 6) 吉岡澄江、阿曾幸男、川西徹:平成 18 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告書－水分吸着曲線の解析による局方収載添加剤の吸湿性に関する研究－医薬品研究, (2008) **39**, 51-56.
- 7) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Significance of Local Mobility in Aggregation of β -Galactosidase Lyophilized with Trehalose, Sucrose or Stachyose. *Pharm. Res.*, (2007) **24**, 1660-1667.
- 8) 吉岡澄江、阿曾幸男、川西徹:平成 17 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告書－水分吸着曲線の解析による局方収載添加剤の吸湿性に関する研究－ 医薬品研究, (2007) **38**, 228-234.
- 9) Yoshioka S., Aso Y.: Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability During Storage of Amorphous Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, (2007) **96**, 960-981.
- 10) Miyazaki T., Yoshioka S., Aso, Y., Kawanishi T.: Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature. *Int. J. Pharm.*, (2007) **336**, 191-195.
- 11) Aso Y., Yoshioka S., Miyazaki T., Kawanishi T., Tanaka K., Kitamura S., Takakura A., Hayashi T., Muranushi N.: Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers as measured by $^1\text{H-NMR}$ spin-lattice relaxation. *Chem. Pharm. Bull.*, (2007) **55**, 1227-1231.
- 12) Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga and Y. Maitani, Increase of therapeutic effect by treating nasopharyngeal tumor with combination of HER-2 siRNA and paclitaxel, *International Journal of Oncology*, in press.
- 13) K. Koga, Y. Hattori, M. Komori, R. Narishima, M. Yamasaki, M. Hakoshima, T. Fukui and Y. Maitani, Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis, *Cancer Science*, in press.
- 14) K. Goto, Y. Chiba, K. Matsusue, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, S. Kimura, M. Misawa, The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res.*, in press.
- 15) H. Ma, K. Shiraishi, T. Minowa, K. Kawano, M. Yokoyama, Y. Hattori, Y. Maitani, Accelerated blood clearance was not induced for a gadolinium-containing PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle in mice, *Pharm Res*, in press.
- 16) T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, M. Yokoyama, Y. Maitani, Increase in tumour permeability following TGF- β type I receptor inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI. *British*

- Journal of Cancer*, 101(11), 1884-1890 (2009).
- 17) Y. Maitani and Y. Hattori, Oligoarginine-PEG-lipid particles for gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(10):1065-1077 (2009).
 - 18) Y. Ishii, Y. Hattori, T. Yamada, S. Uesato, Y. Maitani, Y. Nagaoka, Histone Deacetylase Inhibitor Prodrugs in Nanoparticle Vector Enhanced Gene Expression In Human Cancer Cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4603-4610 (2009).
 - 19) Shiraishi K, Kawano K, Minowa T, Maitani Y, Yokoyama M. Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. *J Control Release*, 136(1):14-20 (2009).
 - 20) Y. Chiba, S. Onoda, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, and M. Misawa. Upregulation of ADAM8 in the Airways of Mice with Allergic Bronchial Asthma. *Lung*, 187:179-185 (2009).
 - 21) Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani, Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors, *J. Control. Release*, 136:30-37 (2009).
 - 22) Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani, The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice, *Biol. Pharm. Bull.* 32(4): 755-759 (2009).
 - 23) M. Furuhata, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG, *Int J Pharm.* 37(1-2):40-46 (2009).
 - 24) Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, *Nanotechnology*, 20(5):55106.
 - 25) W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung, *Biol. Pharm. Bull.* 32(2):311-315 (2009).
 - 26) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani, Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone, *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 98-104 (2009).
 - 27) W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80, *Chem. Pharm. Bull.* 57(2), 138-143 (2009).
 - 28) T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes, *Int J Pharm.* 368, 186-192 (2009).
 - 29) . Hattori and Y. Maitani. Folate-linked lipid-based nanoparticle gene delivery to the tumor, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Edited by H. S. Nalwa, American Scientific Publishers, in press.
 - 30) H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T.

- Nagai. Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*. 84A(3):598-606 (2008)
- 31) A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J Nanosci Nanotechnol.*, 8:3085-3090 (2008)
- 33) N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T. Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba. p-dodecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor efficacy in vitro and in vivo against human prostate cancer and mechanism of action. *Int J Cancer*. 122(3):689-98 (2008)
- 34) W. Ding, Y. Hattori, K. Higashiyama, Y. Maitani. Hydroxyethylated cationic cholesterol derivatives in liposome vectors promote gene expression in the lung. *Int. J. Pharm.*, 354(1-2):196-203 (2008)
- 35) M. Furuhata, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani. Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency, *J Nanosci Nanotechnol.*, 8 (5), 2308-315 (2008)
- 36) Y. Maitani, Y. Aso, A. Yamada, S. Yoshioka. Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome /DNA complexes with high transfection efficiency, *Int. J. Pharm.*, 356:69-75 (2008)
- 37) K. Niikura, Y. Kobayashi, D. Okutsu, M. Furuya, K. Kawano, Y. Maitani, T. Suzuki, M. Narita. Implication of spinal protein kinase C γ isoform in activation of the mouse brain by intrathecal injection of the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate using functional magnetic resonance imaging analysis. *Neurosci Lett.*, 433(1):6-10 (2008)
- 38) H.L. Ma, Y.F. Xu, X.R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int J Pharm.* 354(1-2):217-26 (2008)
- 39) Y. Maitani, S. Katayama, K. Kawano, A. Hayama, K. Toma, Artificial Lipids Stabilized Camptothecin Incorporated into Liposomes *Biol. Pharm. Bull.*, 31(5), 990-993, (2008)
- 40) M. Watanabe, K. Kawano, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin, *J. Control. Release*, 127 231-238 (2008)
- 41) T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, High gene delivery in tumor by intratumoral injection of tetraarginine-PEG lipid-coated protamine/DNA, *J. Control. Release*, 129(2)124-127 (2008)
- 42) Y. Ohguchi, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani, Selective delivery of folate-PEG-linked nanoemulsion-loaded aclinomycin A to KB nasopharyngeal cells and xenograft: Effect of chain length and amount of folate-PEG linker, *J. Drug Targeting*, 16(9), 660-667 (2008)
- 43) A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Honda, Y. Hattori, Y. Maitani, Design of folate-linked liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice, *Clinical Cancer Res*, 14 (24) 8161-8168(2008)
- 44) T. Yoshizawa, Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga and Y. Maitani, Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 718-725 (2008)
- 45) Y. Hattori, T. Yoshizawa, K. Koga, Y. Maitani, NaCl induced high cationic hydroxyethylated cholesterol-based

- nanoparticle-mediated synthetic siRNA transfer into prostate carcinoma PC-3 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 31. 2294-2301 (2008)
- 46) T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani, Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes, *Int J Pharm.* 368, 186-192 (2009)
- 47) W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung, *Biol. Pharm. Bull.* 32(2):311-315 (2009)
- 48) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani, Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone, *Molecular Pharmaceutics*, 6(1), 98-104 (2009).
- 49) W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani, Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80, *Chem. Pharm. Bull.* 57(2), 138-143 (2009)
- 50) Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani, Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors, *J. Control. Release*, in press.
- 51)
- 51) A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, (2007) 8 (5), 1-6.
- 52) M. Furuhata, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani. Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, (2008) 8 (6), 1-8 .
- 53) N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T. Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba. p-Dodecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor efficacy in vitro and in vivo against human prostate cancer and mechanism of action. *Int. J. Cancer*, (2008) 122, 689-698.
- 54) H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T. Nagai. Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2007) 84, 598-606.
- 55) W. Ding, Y. Hattori, Y. Maitani. Hydroxyethylated cationic cholesterol derivatives in liposome vectors promote gene expression in the lung. *Int. J. Pharm.*, accepted.
- 56) M. Fukushima, Y. Hattori, H. Tsukada, K. Koga, E. Kajiwara, K. Kawano, T. Kobayashi, K. Kamata, Y. Maitani. Adiponectin gene therapy of streptozotocin-induced diabetic mice using hydrodynamic injection. *J. Gene Med.*, 9: 976-985 (2007).
- 57) Y. Hattori, Y. Maitani. Low-molecular-weight polyethylenimine enhanced gene transfer by cationic cholesterol-based nanoparticle vector, *Biol. Pharm. Bull.*, 30(9) 1773-1778 (2007).
- 58) Y. Maitani, S. Igarashi, M. Sato, Y. Hattori. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression, *Int. J. Pharm.*, 342: 33-39 (2007).
- 59) Y. Hattori, W. Ding, Y. Maitani. Highly efficient cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated gene transfer in vivo and in vitro in prostate carcinoma PC-3 cells, *J. Control. Release*, 120: 122-130 (2007).
- 60) E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M.

- Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitani. Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy, *J. Control. Release*, 120: 104-110 (2007).
- 61) Y. Hattori, M. Fukushima and Y. Maitani. Non-viral delivery of connexin 43 gene with histone deacetylase inhibitor to human nasopharyngeal tumor cells enhances gene expression and inhibits in vivo tumor growth, *Int. J. Oncol.*, 30: 1427-1439 (2007).
- 62) Y. Zhang, X.R. Qi, Y. Gao, L. Wei. Y. Maitani, T. Nagai. Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect. *J. Control. Release*, 117: 281-290 (2007).
- 63) Y. Hattori and Y. Maitani, DNA/lipid complex incorporated with fibronectin to cell adhesion enhances transfection efficiency in prostate cancer cells and xenografts. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 603-607 (2007).
- 64) 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).
2. 学会発表
- 1) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: 原子間力顕微鏡を用いた非晶質ニフェジピン表面の結晶化観察, 日本薬剤学会第 24 年会 (2009. 5)
- 2) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 熱刺激電流測定法による数種のセファロsporin系抗生物質の水分子の運動性の測定日本薬剤学会第 24 年会 (2009. 5)
- 3) Yukio Aso, Tsuyoshi Ohta, Tamaki Miyazaki and Toru Kawanishi: Stabilization and controlled release of β -galactosidase in cross-linked hydrophilic polymers prepared by γ -irradiation, Controlled Release Society Annual Meeting (2009. 7)
- 4) Miyazaki T., Aso, Y., Kawanishi T.: Crystallization rate of nifedipine at the surface of the amorphous solids determined by atomic force microscopy. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2009.11).
- 5) Aso Y., Miyazaki T., Yoshioka S., Kawanishi T.: Temperature dependence of β -relaxation time of flufenamic acid in solid dispersions determined from ^{19}F -NMR relaxation time. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2009.11).
- 6) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: 結晶化の駆動力および結晶-非晶質界面自由エネルギーから予測されるニフェジピン類薬物の核生成速度, 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3).
- 7) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: 加水分解速度の異なる結合を介して架橋したデキストランゲルからの β -ガラクトシダーゼの放出制御, 日本薬学会第 130 年会 (2010. 3)
- 8) 阿曾幸男, 太田 鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹: γ 線照射を利用して調製したデキストラナーゼ含有デキストランゲルからのタンパク質の放出制御. 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3).
- 9) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: ニトレンジピンエナンチオマーとキラル高分子からなる非晶質固体分散体を用いた薬物-添加剤間相互作用の評価. 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3).
- 10) 阿曾幸男: 高分子医薬品製剤の保存安定性と NMR 緩和. よこはま NMR 構造生物学研究会第 36 回ワークショップ「生体系固体 NMR の基礎から応用への展開」(2009. 3).
- 11) Miyazaki T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi T.: Different crystallization rates of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with chiral excipients. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2008.11).
- 12) Aso, Y., Miyazaki T., Yoshioka, S., Kawanishi T.: Molecular mobility of flufenamic acid in solid dispersions as

- determined by ^{19}F -NMR relaxation time. American Association of Pharmaceutical Scientists. Annual Meeting (2008.11).
- 13) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 川西 徹: ^{13}C 標識ニトレンジピン光学異性体の分子運動性に及ぼす高分子添加剤の影響, 第 47 回 NMR 討論会 (2008.9).
- 14) 吉岡澄江, 阿曾幸男, 大迫 勉, 川西 徹: NMR 緩和時間に反映される医薬品水和物中の水分子の運動性. 日本薬学会第 128 年会 (2008. 3).
- 15) 阿曾幸男, 吉岡澄江、川西 徹: デキストラン生成過程における β -ガラクトシダーゼおよびインスリンの活性に及ぼす γ 線照射の影響とデキストランによる失活抑制作用. 日本薬学会第 128 年会 (2008. 3).
- 16) Yoshioka, S., Miyazaki T., Aso, Y., Kawanishi T.: Significance of Local and Global Mobility in Aggregation of Lyophilized- β -Galactosidase. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2007.11).
- 17) Aso, Y., Miyazaki T., Yoshioka, S., Kawanishi T.: A comparison of the physical stability of amorphous nitrendipine and its enantiomer, American Association of Pharmaceutical Scientists. Annual Meeting (2007.11).
- 18) 阿曾幸男, 吉岡澄江, 川西 徹: ^{19}F -NMR による非晶質フルフェナム酸の結晶化過程の解析, 第 46 回 NMR 討論会 (2007.9).
- 19) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 川西 徹: タンパク質凍結乾燥製剤の凝集速度に及ぼす局所的分子運動性の影響. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007.5).
- 20) 阿曾幸男、吉岡澄江、宮崎玉樹、川西 徹: 非晶質ジヒドロピリジン系薬物の物理的安定性と α および β 緩和時間で表される分子運動性との関係. 日本薬剤学会第 22 年会 (2007.5).
- 21) 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).
- 22) 阿曾幸男, 吉岡澄江、川西 徹: ^{13}C -NMR 緩和時間によるデキストラングル中の β 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).
- 23) 古賀公子, 服部喜之, 米谷芳枝: 悪性内分泌腫瘍における RET 標的 siRNA とイリノテカンの併用治療 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 24) 林京子, 米谷芳枝 甲斐敬, 林利光: ポリエチレンイミンの性器ヘルペス治療効果 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 25) 服部喜之, 古賀公子, 泉澤友宏, 山崎正博, 成島遼太, 福井哲也, 米谷芳枝: ハイドロダイナミクス法により遺伝子導入したマウスにおける mRNA 発現体内分布と発現タンパク質活性 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 26) 谷口幸寛, 川野久美, 米谷芳枝: 葉酸修飾抗癌剤封入微粒子製剤の血管新生阻害剤併用による抗腫瘍効果の増強 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 27) 下條裕樹, 渡辺和男, 梅田勲, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝: Layer-by-Layer 法を用いた高分子電解質修飾リポソーム製剤の調製と評価 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 28) 箕輪卓也, 川野久美, 栗林秀人, 白石貢一, 服部喜之, 横山昌幸, 米谷芳枝: Gd 封入リポソーム造影剤を用いた DCE-MRI による TGF- β 阻害剤の評価 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 29) 丁武孝, 服部喜之, 米谷芳枝: 遺伝子導入用葉酸修飾ナノプレックスの開発 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 30) 箱島基貴, 服部喜之, 米谷芳枝: ヒト咽頭上皮癌における Her-2 siRNA とパクリタキセルの併用治療の検討 日本薬学会第 129 年会 (2009. 3)
- 31) 川野久美, 服部喜之, 横山昌幸, 岩倉浩, 赤水尚史, 米谷芳枝: 副腎腫瘍発症遺伝子改変マウスの MRI による腫瘍増殖評価 第 4 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (2009.5)

- 32) 勢子祐貴, 川野久美, 服部喜之, 米谷芳枝 :
PC-12 細胞担癌ヌードマウスに対するリポソーム製剤の抗腫瘍効果の評価 日本薬剤学会 第 24 年会 (2009.5)
- 33) 若杉亜以, 浅川真澄, 清水敏美, 米谷芳枝 :
ドキシソルビシン-オーガニックナノチューブ複合体の調製と評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 34) 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝 : アンジオテンシン II を用いた昇圧療法によるドキシソルビシン封入りリポソーム製剤の担がんマウスの体内分布の評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 35) 馬会利, 白石貢一, 箕輪卓也, 川野久美, 横山昌幸, 服部喜之, 米谷芳枝 : Accelerated Blood Clearance Phenomenon was not Induced by Repeated Injections of Gadolinium-containing Polymeric Micelle 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 36) 米谷芳枝 : リポソーム化造影剤を用いた DCE-MRI による TGF- β 阻害剤の評価 第 25 回日本 DDS 学会 (2009.7)
- 37) Y. Maitani : Liposomal Drug Delivery System for HSV-tk Suicide Gene Therapy BIT's 2nd Annual World Summit of Antivirals (WSA-2009)(2009.7, 中国)
- 38) Ai Wakasugi, Masumi Asakawa, Masaki Kogiso, Toshimi Shimizu and Yoshie Maitani: Development of organic nanotube entrapped anticancer drug 17th International Symposium on Microencapsulation (2009. 9 名古屋)
- 39) K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani: In vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone with higher membrane fluidity 17th International Symposium on Microencapsulation (2009. 9 名古屋)
- 40) Y. Hattori, N. Kanamoto, K. Kawano, H. Iwakura, T. Akamizu, K. Nakao and Y. Maitani: Molecular characterizations of tumors from human pheochromocytoma and adrenal neuroblastoma-model transgenic mice 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009.10)
- 41) 箕輪卓也, 川野久美, 白石貢一, 横山昌幸, 米谷芳枝, Gd 封入りリポソーム製剤の MRI による腫瘍集積性の評価、フィジカル・ファーマフォーラム、2008.3.24-25
- 42) 下條裕樹、渡辺和男、箕輪潤一、梅田 勲、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、Layer-by-Layer 法を用いた表面修飾リポソーム製剤の放出性評価、フィジカル・ファーマフォーラム、2008.3.24-25
- 43) 萩原彩子、服部喜之、丁武孝、米谷芳枝、正電荷コレステロール誘導体を用いた siRNA 送達用脂質ナノ粒子の開発、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 44) 施力、服部喜之、丁武孝、古賀公子、箱島基貴、川野久美、米谷芳枝、フィチン酸を用いたイリノテカン封入りリポソーム製剤の調製と抗腫瘍効果の評価、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 45) 古賀公子、服部喜之、米谷芳枝、悪性内分泌腫瘍における RET 標的 siRNA と抗癌剤の併用治療、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 46) 日置敦子、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、血中滞留性リポソーム製剤の in vitro 放出性、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 47) 小野瀬絵里、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、葉酸修飾リポソームの抗腫瘍効果における脂質膜組成の影響、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 48) 古幡昌彦、川上宏子、戸潤一孔、米谷芳枝、オリゴアルギニン PEG 修飾リポソームによる細胞内取り込み経路および遺伝子発現、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 49) 下條裕樹、渡辺和男、箕輪潤一、梅田勲、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、Layer-by-Layer 法を用いた表面修飾リポソーム製剤の調製と評価、日本薬学会 第 128 年会、2008.3.26-28
- 50) 小林昇平、古幡昌彦、R. Danev、永山國昭、戸潤一孔、服部喜之、米谷芳枝、原口徳子、オリゴアルギニン脂質/DNA 複合体の細胞内動態、遺伝子・デリバリー研究会 第 8 回シンポジウム、2008.5.9
- 51) 古賀公子、服部喜之、福島正義、米谷芳枝、ハイドロダイナミクス法を用いたアディポネクチン遺伝子による糖尿病遺伝子治療、日本薬剤学会 第 23 年会、2008. 5.20-22

- 52) 箕輪卓也、川野久美、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝、Gd 封入りポソームの DCE-MRI による腫瘍血管透過性の評価、第 3 回日本分子イメージング学会学術大会、2008.5.22-23
- 53) 丁武孝、服部喜之、米谷芳枝、MEL-A modified MHAPC-liposomes for gene delivery in vitro and in the lung、第 10 回応用薬理シンポジウム、2008.6.7-8
- 54) 谷口幸寛、川野久美、米谷芳枝、葉酸と PEG 修飾のデザインによるドキソルビシン封入りポソーム製剤の抗腫瘍効果の評価、第 24 回日本 DDS 学会、2008. 6. 29-30
- 55) Xian Rong Qi , Yuan Li, Yoshie Maitani, Tsuneji Nagai, PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, 第 24 回日本 DDS 学会、2008. 6. 29-30
- 56) 箕輪卓也、川野久美、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝、Gd 封入りポソーム製剤の MRI による腫瘍集積性の評価、第 24 回日本 DDS 学会、2008. 6. 29-30
- 57) 箱島 基貴、服部 喜之、米谷 芳枝、Her-2 発現腫瘍に対する Her-2 標的 siRNA と抗癌剤との併用治療の検討、第 24 回日本 DDS 学会、2008. 6. 29-30
- 58) Y. Hattori and Y. Maitani, Cationic Hydroxyethylated Cholesterol-based Nanoparticle-Mediated Synthetic siRNA Transfer into Prostate Carcinoma PC-3 Cells, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 59) Y. Taniguchi, K. Kawano, Y. Maitani, Targeting effect of folate-linked liposomal doxorubicin was improved by TGF- β inhibitor, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 60) K. Koga, Y. Hattori, Y. Maitani, RET-targeted siRNA Inhibits the Growth in Medullary Thyroid Carcinoma TT Cells and the Xenografts, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 61) 丁武孝、泉澤友宏、服部喜之、米谷芳枝、MEL-A and Tween 80 modified cationic liposomes for gene transfection in vitro and in the lung, 11th LIPOSOME RESEARCH DAYS CONFERENCE, 2008.7.19-22
- 62) Y. Maitani, A. Yamada, Y. Taniguchi, K. Kawano, Y. Hattori, Design of folate linked-liposomal doxorubicin to its antitumor effect in mice, Ehrlich II, 2nd World Conference on Magic Bullets, 2008.10.3-5
- 63) Y. Maitani, Liposomal Drug Delivery : An Update, 22nd Federation of Asian Pharmaceutical Association Congress, 2008. 11.7-10
- 64) 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、2007.3.28-30
- 65) 山田敦史、川野久美、服部喜之、米谷芳枝、ドキソルビ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、2007.3.28-30
- 66) 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、2007.3.28-30
- 67) 藤田堯志、古幡昌彦、服部喜之、川上宏子、戸澗一孔、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、2007.3.28-30
- 68) 服部喜之、丁武孝、米谷芳枝、正電荷コレステロールナノ粒子を用いた前立腺癌への遺伝子導入、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 69) 古幡昌彦、川上宏子、戸澗一孔、服部喜之、米谷芳枝、オリゴアルギニンミセル/DNA 複合体の構造と遺伝子導入効率、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 70) 丁武孝、服部喜之、東山公男、米谷芳枝、Cationic Cholesterol Derivatives for Gene Delivery into the Lung、日本薬剤学会第 22 年会、2007.5.21-23
- 71) 施力、服部喜之、川野久美、米谷芳枝、CPT-11 封入 PEG 修飾リポソームとカルボキシエステルゼの腫瘍内補充による SN38 濃度の変化、日本薬剤学会第 22 年会、