

製剤総則の改正概要およびその影響

を合理的かつ適切に分類、定義し、品質を保証するために必要な試験法、貯法等を示す」に立ち返り、全面改正を行うこととし、2004年3月に改正作業を開始、7年の歳月をかけて改正に至った。

このたびの改正にあたっては、医薬品の規格基準書である薬局方の製剤総則の趣旨に照らし、以下の基本方針を立てた。

- ①臨床で汎用されている製剤の収載：日局15までの製剤総則の枠組みでは記載が困難であったため、臨床現場で汎用されている製剤でも、収載されていない剤形も少なくなかった。例えば口腔内崩壊錠、経口ゼリー剤、舌下錠、吸入剤、テープ剤等があげられる。
- ②剤形の適切な分類と定義：品質管理の要件を明確化する上で適切な枠組みを提供するように剤形を分類するとともに、それぞれを適切かつ簡潔に定義する。ただし規制への悪影響を抑えるため、収載剤形の定義は妥当なものについては極力日局15製剤総則の定義を踏襲する。ただし、散剤、顆粒剤、軟膏剤等については、合理性や国際的整合性に配慮し定義の変更を行った。
- ③製剤の機能の確保に必要な試験内容の充実：各製剤が有すべき製剤特性および確認するための試験を明確化する。
- ④製剤試験(および貯法)記載の整備：各製剤の品質確保に必要な試験内容を整備するとともに、容器・包装および貯法についても記載整備を行う。
- ⑤国際調和への配慮：現在医薬品製剤の開発、製造、流通の国際化は著しい。国際間で製剤の規制上の取り扱いが異なると、医薬品の品質管理に混乱を招くので、国際的整合性への配慮は必須である。

### 3 剤形の分類の考え方

剤形の分類方法は多種多様である。例えば形状からみると、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤等に分類、製法から錠剤は素錠、糖衣錠等に分類できる。製剤機能である放出性から即放錠、腸溶錠、徐放錠等に、崩壊・分散性からは口腔内崩壊錠、発泡錠、分散錠等に分類できる。このように個々の剤形を取り上げてみると、形状、機能特性の組み合わせでさまざまな分類が可能である。

日局16製剤総則では、剤形をまず投与経路および適用部位の別で大分類し、さらに剤形の形状、機能、特性から分類する方法を採用した。すなわち、投与経路や適用

表1 投与経路および適用部位による製剤分類と品質管理の留意点

製剤の投与経路および適用部位	品質管理上重要な品質特性
経口投与する製剤	消化管内での溶出性または崩壊性
口腔内に適用する製剤	口腔内での溶出性または崩壊性
注射により投与する製剤	無菌、異物、微粒子、発熱性物質
透析に用いる製剤	微生物汚染
気管支・肺に適用する製剤	粒子径、微生物汚染
目に投与する製剤	無菌、異物
耳に投与する製剤	微生物汚染
鼻に適用する製剤	噴霧量
直腸に適用する製剤	直腸内での溶融、溶解、分散
臍に適用する製剤	臍内での溶融、溶解、分散
皮膚などに適用する製剤	皮膚吸収、刺激性
生薬関連製剤	生薬成分の特殊性

部位から剤形を分類してみると、臨床で使用されている製剤の全体像の把握が容易になるばかりでなく、品質管理上留意すべき点においても共通点が多く、品質管理に必要な要件をまとめる上でも適切な分類法と考えられた(表1)。この投与経路および適用部位による分類は、現在同様に改正を検討中である米国薬局方の剤形分類の考え方や、現在の欧州薬局方の分類方法とも共通するところである<sup>2,3)</sup>。次いで大分類した剤形について、さらに形状等から主要な剤形を中分類し規定した。例えば、経口投与する剤形については錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤など主要な剤形への分類、あるいは含嗽剤や点鼻剤のような特殊な用途による剤形グループへの分類を行った。さらにおのおのの中分類で規定された剤形について、必要に応じて特徴のある剤形を規定して小分類した。例えば、錠剤では口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠など特別の機能を有する剤形への分類、経口液剤ではエリキシル剤、懸濁剤、乳剤のように特定の処方・製法による製剤グループへの分類である。

図1に日局16製剤総則で取り上げた剤形を、日局15製剤総則と比較して示した。なお大中小三段の分類とは別に、剤形の中には、製造方法や形態をもとにさらに分類されたものもあり、例えば錠剤の場合は素錠、フィルムコーティング錠など製法による分類、注射剤では凍結乾燥注射剤、粉末注射剤、充てん済みシリンジ剤、カートリッジ剤等への分類が行われているものもある。表記方法としては、中分類された剤形の中にさらに分類される剤形がある場合、「～及び～が含まれる」と表現した。また、例えばカプセル剤などのように硬カプセル剤と軟カプセル剤から成る場合は、「～及び～がある」と表現した。

日局16製剤名

注) 大分類:ゴシック体, 中分類:普通, 小分類:斜体, 黄色の背景色:新規収載の剤形

1. 経口投与する製剤

- 1.1. 錠剤
  - 1.1.1. 口腔内崩壊錠
  - 1.1.2. チュアブル錠
  - 1.1.3. 発泡錠
  - 1.1.4. 分散錠
  - 1.1.5. 溶解錠
- 1.2. カプセル剤
- 1.3. 顆粒剤
  - 1.3.1. 発泡顆粒剤
- 1.4. 散剤
- 1.5. 経口液剤
  - 1.5.1. エリキシル剤
  - 1.5.2. 懸濁剤
  - 1.5.3. 乳剤
  - 1.5.4. リモナーデ剤
- 1.6. シロップ剤
  - 1.6.1. シロップ用剤
- 1.7. 経口ゼリー剤

2. 口腔内に適用する製剤

- 2.1. 口腔用錠剤
  - 2.1.1. トローチ剤
  - 2.1.2. 舌下錠
  - 2.1.3. バックル錠
  - 2.1.4. 付着錠
  - 2.1.5. ゴム剤
- 2.2. 口腔用スプレー剤
- 2.3. 口腔用半固形剤
- 2.4. 含嗽剤

3. 注射により投与する製剤

- 3.1. 注射剤
  - 3.1.1. 輸液剤
  - 3.1.2. 埋め込み注射剤
  - 3.1.3. 持続性注射剤

4. 透析に用いる製剤

- 4.1. 透析用剤
  - 4.1.1. 腹膜透析用剤
  - 4.1.2. 血液透析用剤

5. 気管支・肺に適用する製剤

- 5.1. 吸入剤
  - 5.1.1. 吸入粉末剤
  - 5.1.2. 吸入液剤
  - 5.1.3. 吸入エアゾール剤

6. 目に投与する製剤

- 6.1. 点眼剤
- 6.2. 眼軟膏剤

7. 耳に投与する製剤

- 7.1. 点耳剤

8. 鼻に適用する製剤

- 8.1. 点鼻剤
  - 8.1.1. 点鼻粉末剤
  - 8.1.2. 点鼻液剤

9. 直腸に適用する製剤

- 9.1. 坐剤
- 9.2. 直腸用半固形剤
- 9.3. 注射剤

10. 腔に適用する製剤

- 10.1. 腔錠
- 10.2. 腔用坐剤

11. 皮膚などに適用する製剤

- 11.1. 外用固形剤
  - 11.1.1. 外用散剤
- 11.2. 外用液剤
  - 11.2.1. リニメント剤
  - 11.2.2. ローション剤
- 11.3. スプレー剤
  - 11.3.1. 外用エアゾール剤
  - 11.3.2. ボンプスプレー剤
- 11.4. 軟膏剤
- 11.5. クリーム剤
- 11.6. ゲル剤
- 11.7. 貼付剤
  - 11.7.1. テープ剤
  - 11.7.2. パップ剤

[3] 生薬関連製剤各条

- 1. エキス剤
- 2. 丸剤
- 3. 酒精剤
- 4. 浸剤・煎剤
- 5. 茶剤
- 6. チンキ剤
- 7. 芳香水剤
- 8. 流エキス剤

日局15製剤名

- 1. エアゾール剤
- 2. 液剤
- 3. エキス剤
- 4. エリキシル剤
- 5. カプセル剤
- 6. 顆粒剤
- 7. 丸剤
- 8. 眼軟膏剤
- 9. 経皮吸収型製剤
- 10. 懸濁剤・乳剤
- 11. 坐剤
- 12. 散剤
- 13. 酒精剤
- 14. 錠剤
- 15. シロップ剤
- 16. 浸剤・煎剤
- 17. 注射剤
- 18. 貼付剤
- 19. チンキ剤
- 20. 点眼剤
- 21. トローチ剤
- 22. 軟膏剤
- 23. パップ剤
- 24. 芳香剤
- 25. リニメント剤
- 26. リモナーデ剤
- 27. 流エキス剤
- 28. ローション剤

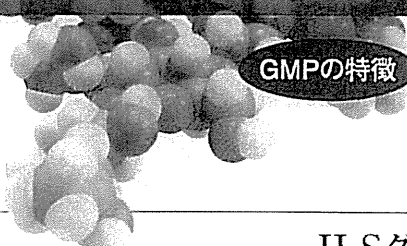
図1 日局16製剤総則において製剤各条にあげた剤形, および日局15収載の剤形  
大分類の剤形はゴシック体, 中分類の剤形は普通文字で, 小分類の剤形は斜体文字で記している。また黄色の背景色の剤形は日局16で新規に収載された剤形を表す。

GMP対応ペプチド合成受託



ペプチドが医薬品の新たな未来を切り開く

ILSグループがペプチド性医薬品を研究段階から実生産までトータルでサポート!



GMPの特徴

- g~kgまで幅広く対応
- 液相法、固相法、ハイブリッド
- Boc法、Fmoc法等の多彩な合成法に対応可能



AMERICAN PEPTIDE COMPANY  
Total Peptide Management™

American Peptide Company, Inc.(APC)は  
ILS株式会社100%出資の子会社で、GMP  
対応ペプチドの製造をしています。

ILSグループのGMP対応ペプチド

Generic医薬品原薬やお客様の開発されている新有効成分医薬品  
原薬等、日米欧のお客様のご要望に応じたGMP対応ペプチドを数多  
く製造しています。

また、約20年にわたるペプチド性医薬品の開発と製造販売実績から  
得られた知識・ノウハウをもとに、お客様のニーズに合ったサービスをご  
提供いたします。

- エルカトニン
- β-Amyloid(1-42)
- サケカルシトニン
- Exendin(9-39)
- グルカゴン
- プセリリン酢酸塩
- フェルチレリン酢酸塩

※その他、がんワクチン用ペプチド等の臨床研究用・臨床  
開発用ペプチドについても多数受託経験がございます。

ILS株式会社  
http://www.ils.co.jp

〒302-0104 茨城県守谷市久保ヶ丘一丁目2番地1  
ペプチドホットライン: 0297-45-6761 FAX: 0297-45-6353 Email: apc-japan@ils.co.jp

## 4 改正製剤総則の構成

日局15までは、まず「1. 製剤通則」として製剤全般の共通事項が記載され、2. 以下にアイウエオ順に剤形名およびその説明が列記されていた。日局16では日局15同様に〔1〕として「製剤通則」をまとめたが、〔2〕は「製剤各条」とし、大分類、中分類、小分類からなる剤形分類に従って剤形を列記する構成とした。各剤形についてはまず剤形の定義、次に製法、さらに品質管理上当該製剤が有すべき製剤特性および試験、次に容器・包装および貯法について必要に応じて記した。なお、主として生薬を原料とする製剤剤形である生薬関連製剤は、〔3〕生薬関連製剤各条としてまとめて記載した。

剤形の記載順序は、汎用性、重要性、性状、用途を基準に優先順位をつけた。すなわち、大分類では、経口投与製剤＞注射剤＞…＞皮膚適用製剤の順、中分類では、固形剤＞液剤＞半固形剤＞…＞用途別の順、小分類では、口腔内崩壊錠＞チュアブル錠＞発泡錠＞分散錠＞溶解錠の順である。各製剤の試験法の順は原則として日局一般試験法の記載順位に従った。

## 5 製剤通則

製剤通則は製剤全般に共通する事項を記載するものであるが、日局15の7項から日局16では11項となった。以下に項別に追加的な説明を加える。

### ①製剤通則(3)

臨床で汎用される製剤は製剤各条に収載すべく製剤通則を改正した。とはいえ、剤形には多種多様なものがあり、製剤各条にあげたもの以外を日局製剤と認めないということではない。この点を明らかにするため、「製剤各条には一般に使用されている剤形を示したが、それら以外にも適切なものであれば日局の剤形とすることができる。例えば、投与経路と製剤各条の剤形を組み合わせで新たな剤形とすることができる」とした。なお各条の剤形名は複数の投与経路に使用される剤形の場合、主たる投与経路の剤形名には投与経路を付していない。例えば、内用カプセル剤、内用散剤についてはいずれもカプセル剤、散剤を剤形名としている。

### ②製剤通則(4)

製剤各条では剤形に応じて一般試験法の設定あるいは「適切な～性」という表現で各製剤が有すべき製剤特性を規定した。「適切な～性」を確認するための試験については本来局方の中で一般試験法として設定されることが望ましいが、製品ごとに個別な対応が必要な製剤特性、あるいは一般試験法を設定するには時期尚早な製剤特性、さらには製品によっては製造工程において担保が可能と考えられる特性もある。このような場合は製剤各条では「本剤は、適切な～特性を有する」という表現にとどめた。

### ③製剤通則(8)

非無菌製剤であっても、微生物による汚染や増殖を避けて、製剤を製造、保管することは重要であり、必要に応じて微生物限度試験法を適用すべきである。個々の製剤に関する微生物限度試験法設定の必要性については、微生物に汚染されるリスクの程度、微生物汚染の人体に与える影響の両面を考慮して判断する。例えば、微生物の汚染や繁殖が起こりにくく、人体への影響が少ないと考えられる経口固形製剤では、原材料や製造時の微生物管理が適切に行われている限り、微生物限度試験は一般に不要だろう。一方、微生物汚染されるリスクが高い液剤、微生物汚染による人体への影響が大きい吸入剤は微生物限度試験法の適用を検討する必要がある。ただし、個別の製剤への微生物限度試験法の適用については、スキップ試験とすることも含めて、効率的、効果的な微生物管理の方策を立てればよい。

### ④製剤通則(9)

製剤均一性試験法のうちの含量均一性試験および溶出試験法については、生薬成分は適用除外とすることを記した。この規定は従来別途当局からの通知で示されていたが、日局16では製剤通則に書き込んだ。一方、一般用医薬品に関するこれら試験の適用除外については、日局15同様に通知で示した<sup>1)</sup>。

### ⑤製剤通則(10)

「製剤の容器・包装は、製剤の品質確保とともに、適正な使用および投与時の安全確保に適したものとす」とした。日局15までは各剤形の各条に一律の容器や貯法が記されてきた。しかし製剤の安定性は処方や製法が違えば異なるので、剤形ごとの一律の規定は合理的ではない。したがって、日局16では各条の貯法の記載は「通例、

「容器とする」とした上、例えば「製品の品質に湿気が影響を与える場合は、防湿性の容器を用いる」のように容器の選択の条件を具体的に示すこととした。

## 6 製剤各条

製剤各条には、各剤形の定義、次に製法、さらに有すべき製剤特性および品質管理のための試験、次に容器・包装および貯法について記した。各剤形の記載については、日局15の記載内容については妥当なものは極力それらを踏襲した。各条に記された試験および容器・包装に関する記述は基本的な要求事項であり、また、製法は一般的な製法を示したものである。添加剤についての記述は最小限のものである。したがって、個別の製剤においてはそれ以外の要求事項もあり得るし、また製法が製剤総則の製法と異なることも十分にあり得る。

### (1) 剤形の定義の変更

日局16における製剤総則改正では、医薬品規制上への影響を最小限とするため、剤形の定義については極力日局15製剤総則を踏襲した。しかし、品質管理上の合理性、国際的整合性等の面から、定義を変更したものがある。特に以下の2つについては規制への影響が大きいと考えられるので解説する。

### ① 散剤と顆粒剤

散剤と顆粒剤については日局15までは、「製剤の粒度の試験法」による一律の粒度規定により分類、定義されてきた。この分類は日局独自のものであり、欧米では製剤粒子の結合状態の強弱によって散剤、顆粒剤の分類が行われている。日局15製剤総則の粒度による分類法は、散剤と顆粒剤を明瞭に区別できるという利点を有するものの、造粒された顆粒でも粒径が小さいものは散剤に分類されてきた。経口投与製剤では、吸収速度に直結する溶出性が品質管理上重要であるが、非造粒の散剤では粒径が溶出性と密接に関係するのに対して、造粒製剤では崩壊過程が溶出の律速段階となる場合もある。したがって、品質管理の観点では、一律の粒度規定で散剤と顆粒剤を区別する合理性はない。むしろ造粒工程の有無による分類が品質管理上では合理的と考えられ、日局16では製造工程における造粒の有無で、散剤と顆粒剤を分類することとした(図2)。

また、細粒剤は日局15では比較的大きな粒径にそろった散剤という位置づけの、欧米にはない剤形であった。これら細粒剤は造粒工程を経て製造されており、日局16では、散剤、顆粒剤の定義の変更に伴い、日局15細粒に規定されたのと同様の粒度規定を満たす(ただし、日局16細粒剤は日局15細粒に比較して粒度の下限は緩い)顆粒剤として分類することとした(図3)。

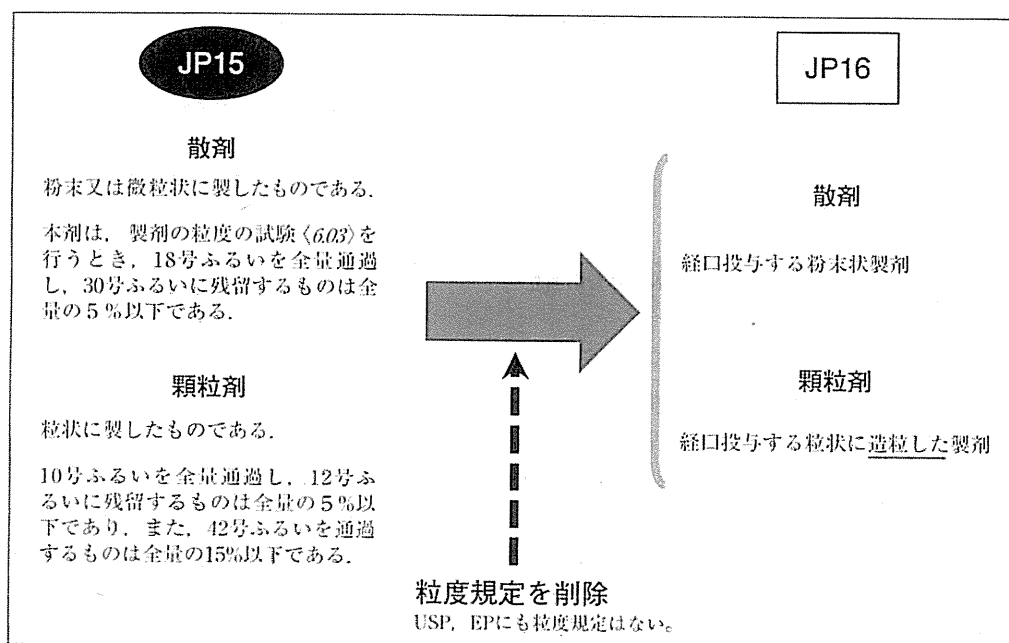


図2 日局15と日局16製剤総則における散剤、顆粒剤の定義

日局15では散剤、顆粒剤は粒度によって一律に分類されていた。一方日局16では造粒工程の有無で分類される。

製剤総則の改正概要およびその影響

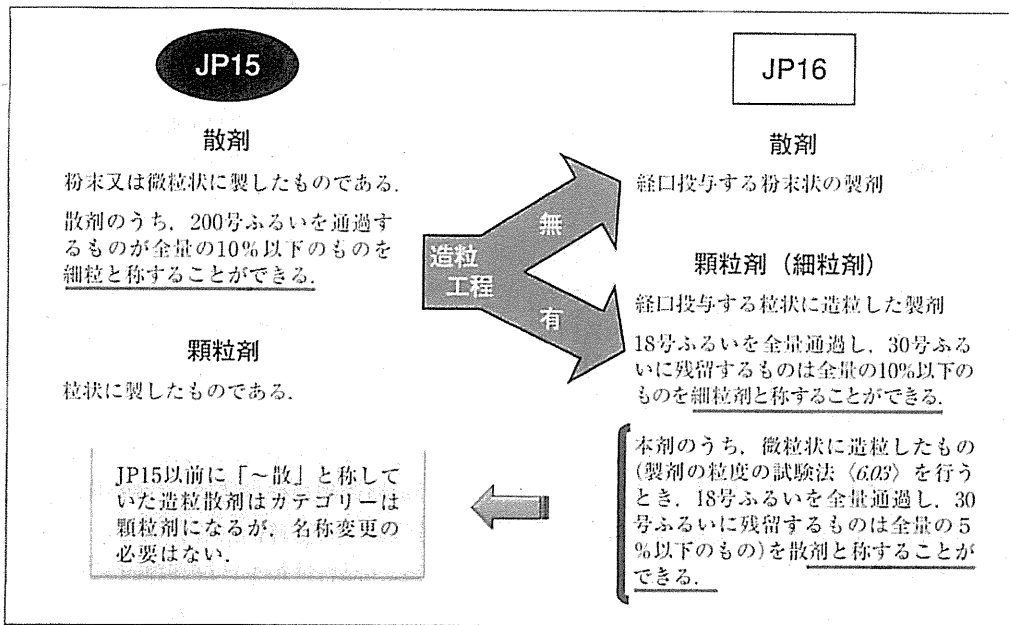


図3 日局15と日局16製剤総則における細粒剤の定義  
細粒は日局15では散剤に分類されていたが、造粒工程を経て製造されるので、日局16では顆粒剤に分類される。

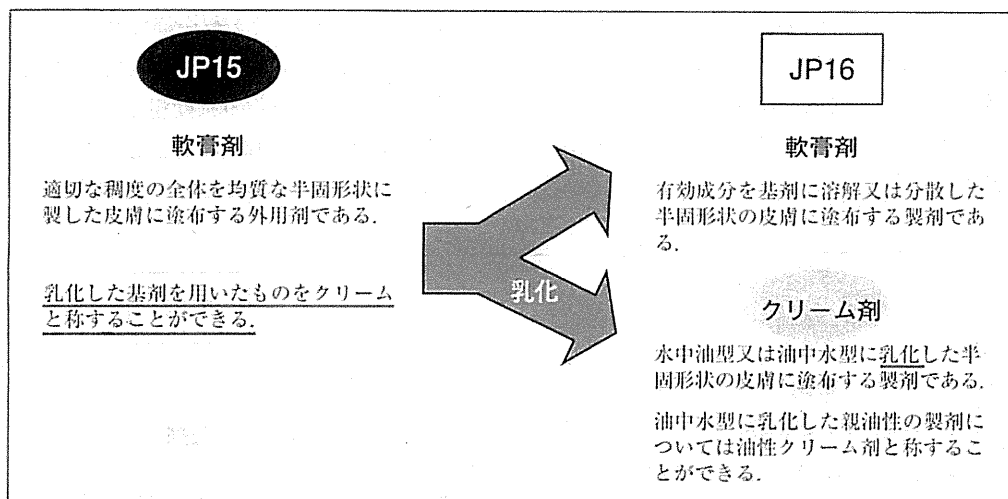


図4 日局16における軟膏剤のクリーム剤からの独立

以上の定義の変更により、日局15では散剤に分類された粒径が小さい造粒製剤は日局16では「細粒剤」あるいは「顆粒剤」に分類されることになり、販売名の変更が必要となる。しかし、名称の変更は長年医療現場へ浸透してきた製品においては、販売面への影響や安全性等のモニタリングに影響を及ぼすことから、顆粒剤の項(6)に「本剤のうち、微粒状に造粒したものを散剤と称することができる」を追記することとした。ただし、この項の追加は、既存の製品について当面名称変更の措置をとらなくてよいこととすることが意図であり、今後、新た

に申請される造粒製剤の場合は、顆粒剤または細粒剤と称すべきと考える。

②軟膏剤とクリーム剤

日局15では軟膏剤は「通例、適切な稠度の全体を均質な半固形状に製した、皮膚に塗布する外用剤」と定義され、クリーム剤は軟膏剤の一部として「軟膏剤のうち、通例、乳化した基剤を用いたものをクリーム剤と称することができる」と定義されてきた。しかし、臨床上では軟膏剤とクリーム剤とはしばしば使い分けが必要であり、

この点に関連して調剤指針<sup>6)</sup>では「軟膏に含まれる商品名から基剤を判断すると誤解を生じたり、あるいは基剤を想定できない場合があり注意が必要」とある。また「局所皮膚適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドライン」<sup>7)</sup>などにおいても異なる製剤として扱われ、規制上でも扱いは異なる。そこで日局16では水中油型または油中水型に乳化した半固形状の皮膚に塗布する製剤をクリーム剤とし、軟膏剤とは独立した剤形とした。すなわち、軟膏剤は「皮膚に塗布する、有効成分を基剤に溶解又は分散させた半固形の製剤である」とし、クリーム剤は「皮膚に塗布する、水中油型又は油中水型に乳化した半固形の製剤である」とした(図4)。またクリーム剤の中で水中油型または油中水型クリーム剤は、通常、水性または油性クリーム剤と呼ばれることが多いが、両者を名称で簡単に区別するため、油性クリーム剤にのみ“油性クリーム”を称することができることとした。

なお、局方各条取載のうちで、乳化している軟膏剤である「親水軟膏」は「親水クリーム」、「吸水軟膏」は「吸水クリーム」と名称が変更されたが、「親水軟膏」および「吸水軟膏」の名称も別名として残すこととした。

## (2) その他

### ① 経口ゼリー剤とゲル状の経口液剤

ゼリーは弾性のある一様な分散体で、水分を多く含むものであるが、容器から取り出した時にその形が保たれているものをいう。一方、経口液剤にも高分子増粘剤が添加されるゲル状の製剤があるが、流動性が高く、取り出されると形状は保たれない。そこで両者を流動性の有無で区別し、経口ゼリー剤は「流動性のない成形したゲル状の製剤」、ゲル状の経口液剤は「液状又は流動性のある粘稠なゲル状の製剤」と規定した。経口ゼリー剤は溶出試験法に適合するか、または適切な崩壊性を有することが求められるが、ゲル状の経口液剤には求められない。

### ② 経皮吸収型製剤

経皮吸収型製剤は、日局15で1つの剤形として追加されたが、有効成分を全身循環血流に送達することを目的とした皮膚適用製剤の総称であることから、1つの剤形として分類することは適当ではないと判断した。そこで日局16では、独立した剤形からは除外し、II. 皮膚などに適用する製剤として、項(1)にその定義を記載するとともに、その放出速度について「経皮吸収型製剤からの

有効成分の放出速度は、通例、適切に調節される」と言及した。

### ③ 生薬関連製剤

丸剤、酒精剤、芳香水剤は既存製品のほとんどが生薬を有効成分として含有する剤形であるので生薬関連製剤に分類することとした。また、現在でも使用されているということを理由に茶剤を復活させた。

## 7 製剤総則改正後の課題

このたびの日局16製剤総則改正は極めて大きな改正であり、医療用医薬品、一般用医薬品、生薬含有製剤、院内製剤等の幅広い医薬品を対象としているため、製薬企業、医療関係者、教育機関、関連研究機関等へ、改正内容について十分に周知を図ることが重要と考えている。

また、製剤総則改正作業が日局16告示の直前にまで及んだため、各条製剤の記載の整備を徹底する必要がある。例えば、日局16の各条に取載された細粒剤には粒度規定が残されているが、細粒剤の粒度は製造工程管理等で担保されていれば、必ずしも最終製品の規格試験として実施する必要はないとの考えにより、追補時に細粒剤の粒度規定を各条から削除する予定である。

さらに、製剤総則で「適切な～性を有する」とした製剤特性を確認するための試験については、局方一般試験法とすることが可能なものから整備することが必要と考えている。中でも吸入剤における有効成分微粒子の空気力学的評価の試験法は、現局方国際調和で調和課題として取り上げられており、国際調和を待って近々に局方取載が可能になると考えられる。また欧米の局方に既取載の試験については、妥当なものから順次日局へ一般試験法としての取載を図っていききたい(図5)。

製剤技術の進歩は絶え間なく続いており、将来にわたっての課題として、今後も医療現場に導入され標準的に用いられるようになった新規製剤については、速やかに製剤各条へ取載していくことが重要である。

## おわりに

日局16では製剤総則が全面改正された。この改正では、臨床で汎用されている製剤をほぼ網羅するとともに、投与部位および適用部位から大分類し、さらに剤形の形状や特性等によりさらに細分類した。この改正により、臨



製剤総則の改正概要およびその影響

床で汎用されている医薬品製剤の全体像の把握が容易になるとともに、さらに、各製剤について品質管理に必要な

- ▶ 崩壊性、溶出性：  
口腔内崩壊錠、口腔用錠剤
- ▶ 噴霧量の均一性<sup>1)</sup>：  
口腔用スプレー剤、吸入粉末剤、吸入エアゾール剤、点鼻剤、スプレー剤
- ▶ 空気力学的に適切な粒子径<sup>2)</sup>：  
吸入粉末剤、吸入エアゾール剤
- ▶ 放出性：  
(1) 埋め込み注射剤、持続性注射剤（放出特性<sup>3)</sup>）；  
(2) 坐剤、陰錠、陰用坐剤、貼付剤<sup>4)</sup>（放出性<sup>5)</sup>）；  
(3) 経皮吸収型製剤<sup>6)</sup>（放出速度）
- ▶ 粘性：  
口腔用半固形剤、眼軟膏剤、直腸用半固形剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤
- ▶ 粘着性：  
貼付剤

図5 製剤各条において「本剤は、適切な～特性を有する」とされた製剤特性のリスト

- 1) 欧米の薬局方に収載されており、一般試験法の目録への導入が容易と考えられる製剤特性
  - 2) 局方国際調和対象として国際調和が進んでおり、比較的早い段階で一般試験法の設定が可能と思われる製剤特性
- \* 目録16製剤総則では放出性を示す用語として、持続性注射剤のように放出を調節した剤形には「放出特性」を、坐剤のように調節していない剤形には「放出性」を使用している

な基本的な要件(製剤試験、容器・包装、貯法等)を整備したことにより、医薬品製剤の品質管理に関わる基本事項を確認することが可能となり、品質管理の教育用資料にもなると考える。

ただし、このたびの製剤総則改正の何よりのメリットは、今後臨床現場に応用される新しいタイプの製剤の局方収載を容易にする、柔軟性のあるフレームワークが完成したことにあると考えている。

■謝辞

本稿は日本薬局方原案審議委員会製剤委員会の前座長青柳伸男博士をはじめとした委員の皆様、事務局の皆様、コメントをお寄せいただいた皆様との長年にわたる議論をもとに書かれたものであり、すべての関係者に心から感謝の意を表します。

■参考文献

- 1) 青柳伸男：日本薬局方製剤総則：全面改正の考え方、医薬品研究、39、741-759(2008)
- 2) <1151> Pharmaceutical Dosage Forms, *Pharmacopieal Forum*, 35, 1260-1310(2009)
- 3) DOSAGE FORMS, *European Pharmacopoeia* 6.0, 715-753(2008)
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長「第十六改正日本薬局方における製剤総則等の改正に伴う医薬品製造販売承認申請等の取扱いについて」(平成23年3月30日薬食審査発0330第7号)
- 5) 日本薬剤師会編：第十二改訂調剤指針増補版、薬事日報(2008)
- 6) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長「局所皮膚適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドライン」(平成15年7月7日薬食審査発第0707001号)



# FUSION 湿式酸化方式オフライン TOC Analyzer

注射用水・精製水・常水・洗浄バリデーション



**最新の技術・最高の選択**

湿式酸化/NDIR方式を測定原理とするFUSION 全有機炭素分析計は、特に低濃度TOCを高精度に分析するために開発されたラボ用TOC分析計です。

- 低濃度分析における信頼性
- マルチポイント校正機能
- 自動ブランク取得機能
- 優先サンプル割り込み機能
- 窒素ガスリーク検知機能

登場

オンライン型TOC計

ACCURA-HS



最新分析アルゴリズムを搭載

- USP/EP/JP3局対応
- 特殊加工UV酸化チャンバの採用
- 高出力UVランプの採用
- 酸素キャリアガスを使用しない
- 簡便操作・メンテナンスフリー



株式会社 ティ・アンド・シー・テクニカル

〒120-0036 東京都足立区千住40番12号 プラティネールビル2F  
TEL. 03-3870-7101 FAX. 03-3870-7102

<http://www.tactec.co.jp>



# 第十六改正日本薬局方の

## 主な改正点

KAWANISHI Toru  
川西 徹\*

### はじめに

日本薬局方は薬事法によって「医療上重要と認められている医薬品の性状および品質などを定めた国定の医薬品規格基準集」と位置づけられる、法律に準じる基準書である。薬事法によって少なくとも10年に一度は全面改正することが求められており、第九改正（昭和51年）以降は5年ごとに全面改正が行われている（さらに第十二改正からは全面改正の間に2度の追補が発行されている）。その第十六改正日本薬局方（日局16）が2011年3月24日に告示された。日局16では医薬品を巡る環境の変化を反映した広範な改正が行われたが、本稿では日局16の主要な改正点を解説する。

### 日局16の作成基本方針

日局16に向けた改正作業を行うにあたり、平成18年7月に薬事・食品衛生審議会から厚生労働大臣あてに「第十六改正日本薬局方作成基本方針」が答申されている<sup>1)</sup>。この方針は、①保健医療上重要な医薬品の全面取載、②最新の学問・技術の導入による質的向上、③国際化の推進、④必要に応じた速やかな部分改正および行政による円滑な運用、⑤日本薬局方の改正過程の透明性の確保および日本薬局方の普及、の5つの柱からなる。

### 日局16の主な改正点

上記の基本方針に則り、日本薬局方を構成する通則、総則、一般試験法、医薬品各条、参考情報など

**Key words** 医薬品／公定書／品質管理／製剤

\* 国立医薬品食品衛生研究所副所長

について、数多くの改正が行われた。これらの改正の詳細については、別の総説、解説<sup>2,3)</sup>を参照いただくとして、本稿では特に日局16を特徴づける以下の改正点を取り上げる。

#### (1) 製剤総則の全面改正

##### 1) 製剤総則の改正理由

日本薬局方の製剤総則は医療現場で汎用される製剤を分類、定義し、それぞれについて製法、品質を保証するために必要な品質試験、品質を保持するための容器・包装、貯法などを示したものであるが、局方収載医薬品製剤にとどまらず、我が国で販売される医薬品製剤の基本的な品質要件となるものでもある。日本薬局方において製剤およびその関連品質管理事項を独立した製剤総則としてまとめ、主要な剤形を50音順に記載し、それぞれの定義、製法などを記した局方製剤総則のスタイルが完成したのは日局7（1961年施行）であるが、以後日局15までこのスタイルは引き継がれており、追加や部分的な改正を除いて、50年近くにわたって基本的な構成は変わっていない。そのため、(1) 臨床現場で汎用されている製剤で取載されていないものが少なくない、(2) 分類、定義が適切でない製剤がある、(3) 各製剤の品質管理に必要な試験などの記載が不十分などの問題が生じていた。そこで7年の検討期間をかけて日局16の告示にあわせて大改正した。

##### 2) 日局16製剤総則の構成および製剤の分類

日局15では、まず「1. 製剤通則」として製剤全般の共通事項が記載され、「2.」以下に50音順に剤形名およびその説明が列記されていた。日局16では日局15同様に「製剤通則」を〔1〕としてまとめたが、さらに〔2〕は「製剤各条」とし、大分類、中分類、小分類からなる剤形分類にしたがって剤形を列記する構成とした。

日局16製剤総則の最大の特徴はこの分類法にある。剤形をまず投与経路および適用部位別で大分類し、さらに剤形の形状、機能、特性から分類する方



日局16 製剤総則剤形名リスト

大分類：大型，中分類：普通，小分類：イタリック，灰色の背景色：新規取載の剤形

[2] 製剤各条

1. 経口投与する製剤

- 1.1. 錠剤
  - 1.1.1. *口腔内崩壊錠*
  - 1.1.2. *チュアブル錠*
  - 1.1.3. *発泡錠*
  - 1.1.4. *分散錠*
  - 1.1.5. *溶解錠*
- 1.2. カプセル剤
- 1.3. 顆粒剤
  - 1.3.1. *発泡顆粒剤*
- 1.4. 散剤
- 1.5. 経口服液剤
  - 1.5.1. *エリキシル剤*
  - 1.5.2. *懸濁剤*
  - 1.5.3. *乳剤*
  - 1.5.4. *リモナーデ剤*
- 1.6. シロップ剤
  - 1.6.1. *シロップ用剤*
- 1.7. 経口ゼリー剤

2. 口腔内に適用する製剤

- 2.1. 口腔用錠剤
  - 2.1.1. *トローチ剤*
  - 2.1.2. *舌下錠*
  - 2.1.3. *バツカル錠*
  - 2.1.4. *付着錠*
  - 2.1.5. *ガム剤*
- 2.2. 口腔用スプレー剤
- 2.3. 口腔用半固形剤
- 2.4. 含嗽剤

3. 注射により投与する製剤

- 3.1. 注射剤
  - 3.1.1. *輸液剤*
  - 3.1.2. *埋め込み注射剤*
  - 3.1.3. *持続性注射剤*

4. 透析に用いる製剤

- 4.1. 透析用剤
  - 4.1.1. *腹膜透析用剤*
  - 4.1.2. *血液透析用剤*

5. 気管支・肺に適用する製剤

- 5.1. 吸入剤
  - 5.1.1. *吸入粉末剤*
  - 5.1.2. *吸入液剤*
  - 5.1.3. *吸入エアゾール剤*

6. 目に投与する製剤

- 6.1. 点眼剤
- 6.2. 眼軟膏剤

7. 耳に投与する製剤

- 7.1. 点耳剤

8. 鼻に適用する製剤

- 8.1. 点鼻剤
  - 8.1.1. *点鼻粉末剤*
  - 8.1.2. *点鼻液剤*

9. 直腸に適用する製剤

- 9.1. 坐剤
- 9.2. *直腸用半固形剤*
- 9.3. *注腸剤*

10. 腔に適用する製剤

- 10.1. *腔錠*
- 10.2. *腔用坐剤*

11. 皮膚などに適用する製剤

- 11.1. 外用固形剤
  - 11.1.1. *外用散剤*
- 11.2. 外用液剤
  - 11.2.1. *リニメント剤*
  - 11.2.2. *ローション剤*
- 11.3. スプレー剤
  - 11.3.1. *外用エアゾール剤*
  - 11.3.2. *ポンプスプレー剤*
- 11.4. 軟膏剤
- 11.5. クリーム剤
- 11.6. ゲル剤
- 11.7. 貼付剤
  - 11.7.1. *テープ剤*
  - 11.7.2. *パップ剤*

[3] 生薬関連製剤各条

- 1. エキス剤
- 2. 丸剤
- 3. 酒精剤
- 4. 浸剤・煎剤
- 5. 茶剤
- 6. チンキ剤
- 7. 芳香水剤
- 8. 流エキス剤

日局15 製剤総則剤形名リスト

- |           |            |           |            |
|-----------|------------|-----------|------------|
| 1. エアゾール剤 | 8. 眼軟膏剤    | 15. シロップ剤 | 22. 軟膏剤    |
| 2. 液剤     | 9. 経皮吸収製剤  | 16. 浸剤・煎剤 | 23. パップ剤   |
| 3. エキス剤   | 10. 懸濁剤・乳剤 | 17. 注射剤   | 24. 芳香剤    |
| 4. エリキシル剤 | 11. 坐剤     | 18. 貼付剤   | 25. リニメント剤 |
| 5. カプセル剤  | 12. 散剤     | 19. チンキ剤  | 26. リモナーゼ剤 |
| 6. 顆粒剤    | 13. 酒精剤    | 20. 点眼剤   | 27. 流エキス剤  |
| 7. 丸剤     | 14. 錠剤     | 21. トローチ剤 | 28. ローション剤 |

図1 日局15および日局16製剤総則への製剤取載リスト

法を採用した。投与経路や適用部位により剤形を分類してみると、臨床で使用されている製剤の全体像を把握しやすくなるだけでなく、品質管理上の留意点にも共通点が多いため、規格基準書である日本薬局方として品質管理に必要な要件をまとめる上でも適切な分類法といえる。次いで大分類した剤形について、さらに形状などから主要な剤形を中分類し規定した。例えば経口投与する剤形については錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの主要な剤形に分類、あるいは別に大分類した製剤では含嗽剤や点鼻剤のような用途による剤形グループへの分類を行った。さらに中分類で規定された各々の剤形について、必要に応じて特徴のある剤形を規定して小分類した。例えば錠剤では口腔内崩壊錠、チュアブル錠、発泡錠などの特別な機能を有する剤形に分類し、経口液剤ではエリキシル剤、懸濁剤、乳剤のように特定の処方・製法による製剤グループに分類した。分類した剤形の記載順序は、汎用性、重要性、性状、用途を基準に優先順位をつけ、優先順位がつけられないものについては50音順とした。すなわち、大分類では、経口投与製剤>注射剤>一>皮膚適用製剤の順、中分類では、固形剤>液剤>半固形剤>一>用途別の順、小分類では口腔内崩壊錠>チュアブル錠>発泡錠>分散錠の順である。図1に日局16製剤総則で取り上げた剤形リストを、日局15製剤総則と比較して示した。

製剤各条にあげた剤形については、まず剤形の定義、次に製法、さらに品質管理上において当該製剤が有すべき製剤特性およびその試験、次に容器・包装および貯法について記した。剤形の定義は妥当なものについては極力日局15製剤総則の定義を踏襲したが、散剤、顆粒剤、軟膏剤などについては、合理性や国際的整合性に配慮し定義の変更を行った。

なお、主として生薬を原料とする製剤剤形である生薬関連製剤は、〔2〕製剤各条の後に、〔3〕生薬関連製剤各条としてまとめて記載した。

### 3) 剤形の定義の変更

日局15では、散剤と顆粒剤はそれぞれ「粉末又は微粒状に製したもの」および「粒状に製したもの」と定義し、製剤の粒度の試験に用いるふるいの目の大きさの違いにより、一律に分類していた。しかし、この分類および定義は製剤粒子の結合状態の強弱によって分類する欧米薬局方の定義と異なる。そこで、日局16では、造粒の有無で区別をすることとし、顆粒剤は「経口投与する粒状に造粒した製剤」、散剤は「経口投与する粉末状の製剤」とした。また、従来散剤に含まれるとされていた剤形である細粒についても、造粒されているという調査結果から、顆粒剤の一部に分類することとした（詳細は他の解説<sup>4)</sup>を参照）。

また、日局15ではクリーム剤は、「軟膏剤のうち通例、乳化した基剤を用いたものをクリーム剤と称することができる」と定義され、軟膏剤の一部とされてきたが、臨床ではしばしば使い分けが必要であり、日局16ではクリーム剤は軟膏剤から独立した剤形とした。

## (2) 水各条に関する改正

### 1) 製薬用水の分類の見直し

日局15では「常水」、「精製水」、「滅菌精製水」、および「注射用水」の4種類の製薬用水（＝医薬品の製造に使用される水）が、医薬品各条に規定されていた。しかし、「精製水」および「注射用水」は製薬用水製造システムで製造され配管を通じて医薬品の製造設備に供給されるバルク状態の水（バルク水）と、これを容器に充填し製品として市場に流通する容器入りのもの（容器入りの水）とを、同一規格としてきた。このため、規格は複雑で、品質管理の上で必要な要件もわかりにくいものとなっていた。そこで、日局16では「精製水」は、バルク水を現行の各条名のまま「精製水」とし、容器に充填された製品は「精製水（容器入り）」とし、それぞれに必要な規格設定を行った（図2）。また、注射用水についても同様に対応した。滅菌精製水は、実態調査結果よりバルク水の設定はせず「滅菌精製水（容器入り）」とした。なお、表示への対応として、精製水（容器入り）、注射用水（容器入り）については、本質欄に「ただし、（容器入り）を省略して表示することができる」と記載するとともに、「滅菌精製水（容器入り）」は別名として「滅菌精製水」を用いることができるように手当した。

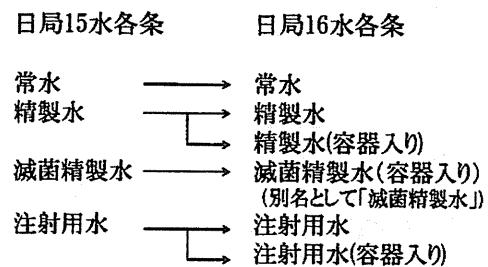


図2 日局15および日局16の水各条の関係

### 2) 製薬用水の各条の純度試験内容の見直し

精製水および注射用水の純度試験の規格について導電率および有機体炭素（TOC）により規定できないか検討を行った。その結果、バルク水については導電率 $2.1\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ （25℃）以下、TOC 0.50mg/L以下を限度値として設定することにより、それぞれ無機塩類および有機不純物を管理することが可能であることがわかり、日局15の無機塩類や過マンガン酸カリウム還元性物質試験をこの2項目に置き換えた。

各容器入りの水については、無機塩類は導電率が $5\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (25℃)以下(内容量が10mLを超える製品)、または $25\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (25℃)以下(内容量が10mL以下の製品)を採用することにより管理可能と判断した。一方、ゴム栓付きポリエチレン容器入りの場合などは、TOCは高値を示すことがあり、TOCを指標とした有機不純物の管理は困難であると結論し、容器入りの水の純度試験は、導電率と過マンガン酸カリウム還元性物質の試験とした。

### 3) 水各条の改正に伴う通則の改正および参考情報への手当

通則20の医薬品の試験に用いる水の定義を改正し、「医薬品等の試験に用いる水は、別に規定するもののほか、精製水とする」を「医薬品等の試験に用いる水は、試験を妨害する物質を含まないなど、試験を行うのに適した水とする」とした。これは「精製水」とすると、GMP管理の下で製造され医薬品製造に用いられる水をさすことになり、医薬品製造用の水の製造設備を持たない機関などでの運用が困難であることに対する対応である。ただし、参考情報「医薬品等の試験に用いる水」を新規収載し、その中で「精製水」、「精製水(容器入り)」などは医薬品などの試験に用いることが可であることを解説した。また、参考情報「製薬用水の品質管理」を整備・充実させた。

### (3) 生薬などの医薬品各条の成分含量測定法の項の改正

生薬などの医薬品各条について、「成分含量測定法」の項名を「定量法」に改め、あわせて成分の含量規定の項の記載を整備するとともに、関連する試薬・試液の名称および規格を整備した。(医薬品各条29項目、試薬・試液30項目の改正)

#### (4) 試薬・試液の名称改正

日局15において、塩またはエステルである原薬の医薬品名称を変更した。それにあわせ医薬品各条の試験に原薬を試薬として用いている場合には、その試薬名称も変更する必要があったが、作業量が膨大であったため変更を見送ってきた。そこで日局16では、以下の改正方針で、その対応を行った。

- (1) 次のように試薬・試液名を変更する：1) アミンの無機酸塩又は有機酸塩は「○○○\*\* \*塩」と命名する〔(例)塩酸イミプラミン→イミプラミン塩酸塩〕；2) 第四級アンモニウム塩類は、「○○○\*\* \*化物」と命名する〔(例)塩化コリン→コリン塩化物〕。
- (2) 9.41 試薬・試液の条について名称改正を行うが、旧試薬名は「…を見よ」として残すこととする。この措置によって、旧試薬名を使用することを可

- 能とし、医薬品各条内の試薬の名称は変更しない。
- (3) JIS規格を引用している試薬については、JISとの不整合箇所を整備する。
- (4) 日局品を試薬としている場合には、原則として医薬品各条名を試薬名とする。
- (5) 日局品以外を試薬とする場合には、エステルおよび水和物などの試薬の名称については原則改正の対象としないが、水和物の数が記載可能な試薬については水和物の数を記載する〔(例)塩化ストロンチウム→塩化ストロンチウム六水和物〕。

#### (5) JIS廃止試薬の規格案の作成

日本薬局方に収載されている試薬・試液では、その規格に日本工業規格(JIS規格)が引用できるものについてはJIS番号と等級(グレード)で規定していた。しかし、局方試薬・試液の中でJIS規格が廃止されるものが散見されるようになり、その対応を行った。日局16では、JIS規格が廃止されたものについて、局方に設定の必要のない(=日局での用途が不明、あるいは流通の実態がない)もの4項目(過塩素酸カリウム、酢酸ウラニル二水和物、*o*-ニトロフェノール、マグネソン)を削除するとともに、41項目については具体的な規格・試験方法を設定した。なお、三酸化ナトリウムビスマスの確認試験で用いられている硝酸マンガ(II)六水和物[K8568, 特級]を追加した。

#### (6) 溶出性の項の記載整備

溶出性試験は経口製剤について溶出試験規格に適合しているかどうかを判定するために行う医薬品品質管理試験の一つであるが、日本薬局方では「併せて著しい生物学的非同等性を防ぐことを目的としている」と位置づけている。このような溶出試験の重要性から、日局16では、新規収載品では規格設定の妥当性を確認し、日局15収載品で溶出規格が設定されていない製剤についてはそれらをリストアップし、溶出規格を設定する必要のない品目の確認を含めて、医薬品各条の溶出性の項を記載整備した。従来から日局に収載されていて溶出性の規格が設定されていなかった製剤については、4液性(pH1.2, pH4.0, pH6.8, 水)の試験液における溶出プロファイルの試験結果に基づいて溶出規格を設定した。新収載品目では、日本薬局方外医薬品規格(局外規)第三部<sup>5)</sup>収載品目あるいは承認申請書に溶出性の規格がある製剤の場合はそれらを基本とし、試験条件が適切でないと思われる場合は、必要に応じて可能な範囲で修正して設定した。

#### (7) 医薬品各条への収載品目数

新規収載品目は図3に示す通りであるが合計106品目にのぼった。また、改正した品目は330、削除数

は15であり、各条収載品目の合計数は1,764となった。

化学薬品	87
抗生物質	3
生物薬品	0
添加物	1 (トレハロース水和物)
生薬	15
合計	106

図3 日局16医薬品各条新規収載品目の分類

## おわりに

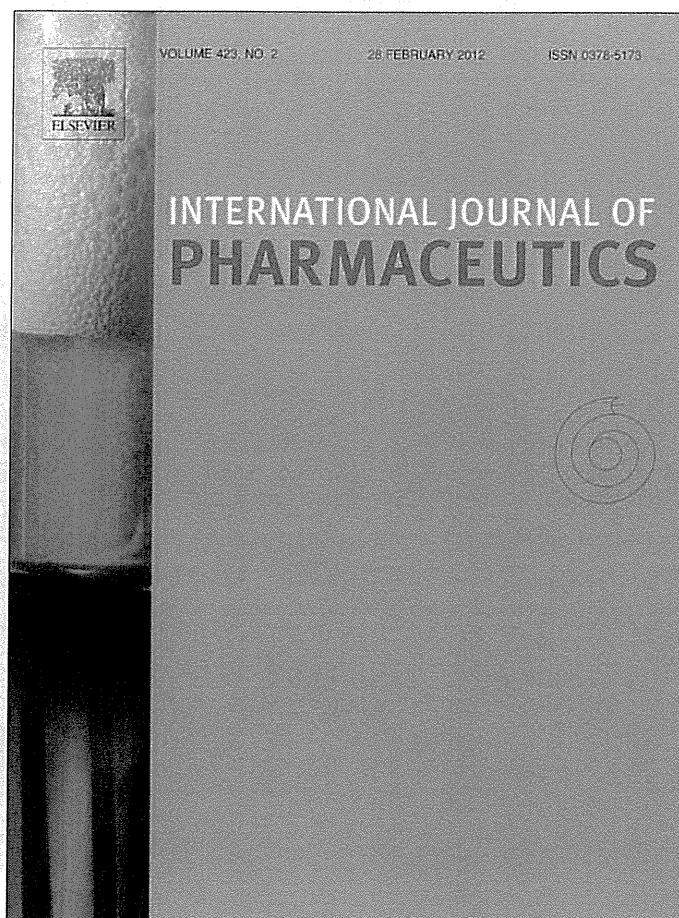
日本薬局方は医療、製薬企業、薬事行政、薬学研究、薬学教育などに携わる多くの薬剤師の皆様に、それぞれの場で活用していただく公共のものである。その改正は関係者の皆様の知識と経験およびご意見をもとに行われる作業である。現在、改正関係の情報は医薬品医療機器総合機構日本薬局方HP ([http://](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou.html)

[www.pmda.go.jp/kyokuhou.html](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou.html)) に随時公開されている。皆様には、日局16を実務などにおいてご活用いただくとともに、日本薬局方が我が国における適正な医薬品品質規範書であり続けるために、日本薬局方の今後の改正についてご意見をお寄せいただければ幸いである。

## 文献

- 1) 第十六改正日本薬局方作成基本方針 (平成18年8月3日厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡) ([http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/pdf/bulldata/H180803\\_0000000\\_01.pdf](http://www.pmda.go.jp/kyokuhou/pdf/bulldata/H180803_0000000_01.pdf))
- 2) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編：日本薬局方技術情報2011 (JPTI2011), じほう (2011)
- 3) 特集第十六改正日本薬局方改正点, 薬局, 16 (No.6) (2011)
- 4) 川西徹：製剤総則の改正概要およびその影響 *Pharm Tech JAPAN*, 27, 15-22 (2011)
- 5) 厚生省医薬安全局長：日本薬局方外医薬品規格第三部の総説について (平成11年3月23日医薬発第343号) (<http://www.jp-orangebook.gr.jp/>)

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.

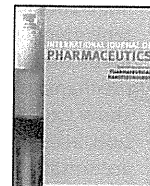


This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Pharmaceutical nanotechnology

## Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers

Kumiko Sakai-Kato<sup>a,\*</sup>, Keiko Ishikura<sup>a</sup>, Yuki Oshima<sup>a</sup>, Minoru Tada<sup>b</sup>, Takuo Suzuki<sup>b</sup>, Akiko Ishii-Watabe<sup>b</sup>, Teruhide Yamaguchi<sup>c</sup>, Nobuhiro Nishiyama<sup>d</sup>, Kazunori Kataoka<sup>d,e</sup>, Toru Kawanishi<sup>c</sup>, Haruhiro Okuda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>c</sup> National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>d</sup> Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>e</sup> Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 July 2011

Received in revised form

16 November 2011

Accepted 15 December 2011

Available online 23 December 2011

## Keywords:

Doxorubicin-bound block copolymers

Intracellular trafficking

Confocal microscopy

Transporter

Endocytosis

## ABSTRACT

New technologies are needed to deliver medicines safely and effectively. Polymeric nanoparticulate carriers are one such technology under investigation. We examined the intracellular trafficking of doxorubicin-bound block copolymers quantitatively and by imaging doxorubicin-derived fluorescence using confocal microscopy. The polymers were internalized by endocytosis and distributed in endosomal/lysosomal compartments and the endoplasmic reticulum; unlike free doxorubicin, the polymers were not found in the nucleus. Moreover, the ATP-binding cassette protein B1 (ABCB1) transporter may be involved in the efflux of the polymer from cells. This drug delivery system is attractive because the endogenous transport system is used for the uptake and delivery of the artificial drug carrier to the target as well as for its efflux from cells to medium. Our results show that a drug delivery system strategy targeting this endogenous transport pathway may be useful for affecting specific molecular targets.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Recently, genomic drug discovery techniques, organic synthesis, and screening technologies have been used to develop molecularly targeted medicines, some of which are already being used clinically (Hopkins and Groom, 2002; Hughes, 2009). However, these new technologies do not necessarily lead to the introduction of new treatments because even when promising compounds are discovered by genomic drug discovery techniques, they often have harmful properties or are difficult to deliver to the target because they are relatively insoluble (Hopkins and Groom, 2002; Lipinski

et al., 2001). New formulation technologies are being developed to enhance the effectiveness and safety of pharmaceutical products by focusing on improving the release, targeting, and stability of drugs within the body, so that the location and timing of their action in the living body can be controlled.

Nanotechnological advances have contributed to the development of new drug delivery system (DDS) products such as polymeric micelles and liposomes that range in size from several tens of nanometers to 100 nm (Ferrari, 2005). Some of these DDS products are already being marketed as innovative medical treatments (O'Brien et al., 2004), and the number being used in clinical trials has risen impressively in recent years (Hamaguchi et al., 2007; Kuroda et al., 2009; Matsumura et al., 2004). These nanoparticulates possess several unique advantages for drug delivery, including high drug-loading capacity, controlled drug release, and small size, which allows the drug to accumulate in pathological tissues such as tumors, which have increased vascular permeability (Nishiyama and Kataoka, 2006).

Polymeric micelles have received considerable attention recently as promising macromolecular carrier systems (Allen et al., 1999; Kataoka et al., 1993, 2001; Lavasanifar et al., 2002; Torchilin, 2002; Torchilin et al., 2003). Polymeric micelles are amphipathic systems in which a hydrophobic core is covered with an outer

**Abbreviations:** DDS, drug delivery system; PEG, polyethyleneglycol; RES, reticuloendothelial system; EPR, enhanced permeability and retention; Dox, doxorubicin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; DLS, dynamic light scattering; AFM, atomic force microscopy; HBSS, Hank's balanced salt solution; ER, endoplasmic reticulum; ECFP, enhanced cyan fluorescent protein; Alexa-transferrin, Alexa Fluor 488 conjugate of transferrin; MTOC, microtubule-organizing center; ABCB1, ATP-binding cassette protein B1; MDR1, multidrug resistance 1; (PBS), phosphate-buffered saline; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; SDS, sodium dodecyl sulfate; PVDF, polyvinylidene fluoride.

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9662; fax: +81 3 3700 9662.

E-mail address: [kumikato@nihs.go.jp](mailto:kumikato@nihs.go.jp) (K. Sakai-Kato).



shell consisting of hydrophilic macromolecules such as polyethylene glycol (PEG) chains. Polymeric micelles can both encapsulate medicine of high density and evade the foreign body recognition mechanism within the reticuloendothelial system (RES), and they show excellent retention in the blood (Illum et al., 1987). In addition, accurate size control of the nanoparticulates enables them to accumulate in cancerous tissue, owing to the increased permeability of tumor vessels due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect (Matsumura and Maeda, 1986).

To maximize the efficacy and safety of DDS products, it is important to deliver these products to specific target cells and subcellular compartments. In the experiments reported here, we used confocal microscopy to study the intracellular trafficking of polymeric nanoparticulate carriers. The use of covalently bound fluorescent reagents as probes is gradually clarifying the internalization pathways and intracellular localizations of polymeric nanoparticulate carriers (Lee and Kim, 2005; Manunta et al., 2007; Murakami et al., 2011; Rejman et al., 2005; Richardson et al., 2008; Sahay et al., 2008; Savić et al., 2003). However, the excretion of the polymers from target cells after they have released the incorporated drugs has not yet been clarified in detail, although information about the clearance of carriers from cells is important from the perspective of safety. In this study, we examined the trafficking of a polymeric nanoparticulate carrier in detail, including the efflux of the polymers from cells to medium, by direct measurement of doxorubicin (Dox) covalently bound to the block copolymer. This technique avoids the necessity of considering the effects of exogenously tagged fluorescent probes on the intracellular trafficking.

Dox is one of the most effective available anticancer drugs in spite of its severe toxic effects, especially cardiotoxicity (Olson et al., 1988). As the carrier we used a PEG-poly(aspartic acid) block copolymer with covalently bound Dox (Fig. 1) (Yokoyama et al., 1999), because Dox has relevant hydrophobicity to form globular micelles by means of the hydrophobic interactions, and inherent fluorescence to investigate the intracellular trafficking of the carrier itself. Dox is partially covalently bound to the side chain of the aspartic acid (about 45% of aspartic acids), so that prepared Dox-conjugated block copolymers show good Dox entrapment efficiency possibly due to the  $\pi$ - $\pi$  interaction between conjugated and incorporated Dox molecules (Bae and Kataoka, 2009; Nakanishi et al., 2001). Therefore, in this carrier system, there are two kinds of Dox; one is Dox covalently bound to block copolymers, and the other is free Dox which is incorporated in the inner core and has a pharmacological activity by its release from the inner core. The inner core of the micelles is greatly hydrophobic owing to the conjugated Dox, while the PEG of the outer layer prevents uptake by the RES. The resulting micelle effectively accumulates in tumor tissue by the EPR effect and shows much stronger activity than free Dox (Nakanishi et al., 2001). Because the block copolymer can form globular micelles by means of hydrophobic interactions with the conjugated Dox, as shown in Section 3.1, we used a carrier without incorporated free Dox to investigate the intracellular trafficking of the carrier itself. Furthermore, by quantifying directly the amount of Dox covalently bound to the polymers, we could measure the intracellular amount of the polymers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells and micelles

HeLa cells (Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan) were kept in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen). Cells were grown in a humidified incubator at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.

Dox-bound polymeric micelles and fluorescent dye (DBD)-labeled PEG-polyaspartate block copolymers partially modified with 4-phenyl-1-butanol were synthesized by Nippon Kayaku Co. Ltd. (Tokyo, Japan) (Nakanishi et al., 2001).

### 2.2. Physicochemical data of Dox-bound micelles

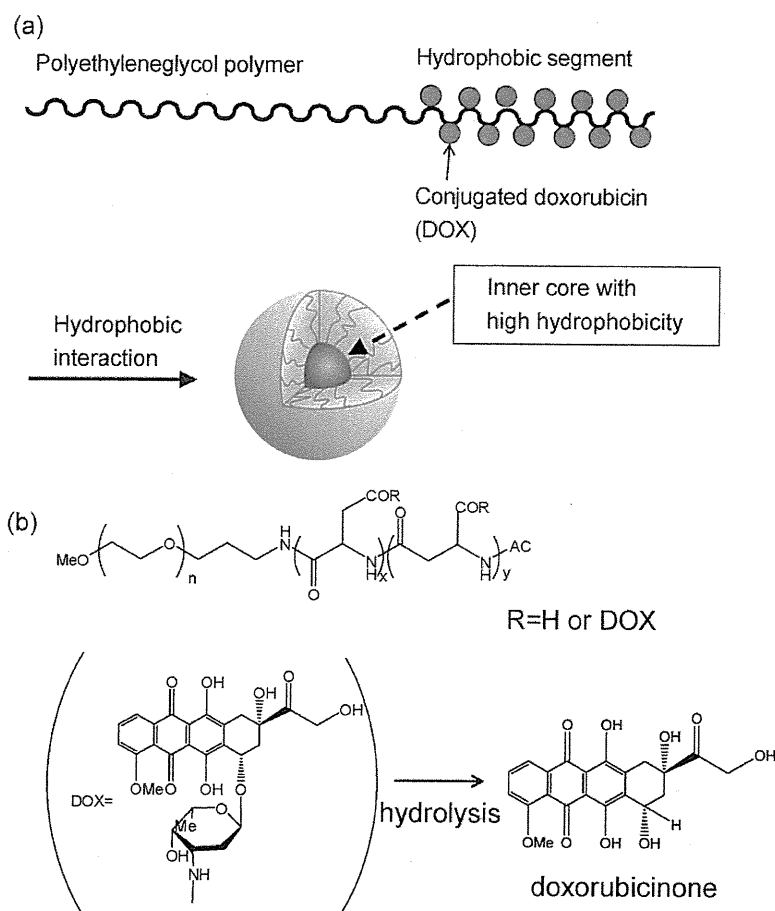
The diameters and distribution of micelles were determined by using dynamic light scattering (DLS; Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) at 25 °C. The micelles were dissolved in water and filtered through a 0.2- $\mu$ m filter before measurement. Atomic force microscopy (AFM) measurements were conducted with a NanoWizard II (JPK Instruments, Berlin, Germany) at room temperature. Images were obtained in tapping mode using a commercial microcantilever with a spring constant of 150 N/m (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). AFM images were processed with SPM image processing v. 3 software from JPK Instruments.

### 2.3. Quantitation of Dox-bound polymers in HeLa cells

The amounts of Dox-bound polymers in HeLa cells were determined by measuring the amount of doxorubicinone, which is released by acid hydrolysis of Dox-bound polymers (Fig. 1b). HeLa cells ( $1.5 \times 10^5$ ) were plated in 35-mm glass-bottom dishes coated with poly-L-lysine (Matsunami, Osaka, Japan) in DMEM containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. After incubation for two days (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the cells were exposed to 50  $\mu$ g/mL Dox-bound polymers in culture medium. After the indicated durations, the cells were washed and kept in phosphate-buffered saline (PBS) or Hank's balanced salt solution (HBSS; Invitrogen). The cells were trypsinized with 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (Invitrogen) and collected. Cells were then washed with PBS three times, and a small part of the cell suspension was used for cell counting. After centrifugation at 1000 rpm for 5 min, cell pellets were resuspended in 100  $\mu$ L PBS, and the suspension was divided into two parts (50  $\mu$ L was used with acid hydrolysis and 50  $\mu$ L without) and stored at -80 °C until analysis. After thawing, the cell suspensions were disrupted by ultrasonic liquid processor (ASTRASON 3000, Misonix, NY, USA) for 1 min. Then, 50  $\mu$ L of suspension was hydrolyzed by 0.5 N HCl at 50 °C for 15 h. After hydrolysis, samples were deproteinized with methanol, followed by centrifugation at 15,000  $\times$  g for 5 min at 4 °C. The supernatant was then neutralized with ammonium buffer, and evaporated to dryness under reduced pressure (Savant SpeedVac concentrator, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The residues were resuspended in 60% methanol, and the doxorubicinone released from the polymers by acid hydrolysis was quantified by ultra-high-performance liquid chromatography by using our previously reported method (Sakai-Kato et al., 2010) to determine the amount of intracellular Dox-bound polymers (Fig. 1b). The other 50  $\mu$ L of cell suspension was treated in the same way but without the hydrolysis step to evaluate the amount of free doxorubicinone, that is, doxorubicinone not derived from Dox-bound polymers. The results of three independent experiments were averaged and analyzed statistically by *t*-test.

### 2.4. In vitro cytotoxicity

HeLa cell lines were evaluated in the present study. The HeLa cells were maintained in monolayer cultures in DMEM containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. WST-8 Cell Counting kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) was used for cell proliferation assay. 3000 cells of HeLa cell line in 100  $\mu$ L of culture medium were plated in 96 well plates and were then incubated for 24 h at 37 °C. Serial dilutions of Dox-bound polymers, micelles incorporating free Dox or just free Dox were added, and the cells were incubated for 24



**Fig. 1.** Schematic of the structure of a Dox-bound polymeric micelle (a) and the chemical structure of the block copolymer (b). Polymer-bound Dox can be released as doxorubicinone by acid hydrolysis. The quantity of released doxorubicinone was used as a measure of the amount of intracellular polymers.

or 48 h. All data were expressed as mean  $\pm$  SD of triplicate data. The data were then plotted as a percentage of the data from the control cultures, which were treated identically to the experimental cultures, except that no drug was added.

### 2.5. Confocal analysis of live cells

The intracellular trafficking of the Dox-bound micelles in live cells was examined by confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510, Oberkochen, Germany, or Nikon A1, Tokyo, Japan). Data were collected using dedicated software supplied by the manufacturers and exported as tagged image files (TIFs). HeLa cells ( $1.5 \times 10^5$ ) were plated in 35-mm glass-bottom dishes coated with poly-L-lysine (Matsunami) in DMEM containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. After incubation for two days (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the cells were exposed to 50  $\mu$ g/mL Dox-bound polymers in culture medium. After the indicated durations, the cells were washed and kept in PBS or HBSS (Invitrogen) for imaging with the confocal microscope.

### 2.6. Labeling specific organelles in live cells

After incubation with Dox-bound polymers for 24 h, HeLa cells were washed with HBSS and labeled with organelle-specific fluorescent probes in accordance with the manufacturer's instructions. LysoTracker probe (Invitrogen) was used for labeling lysosomes, and ER-Tracker (Invitrogen) was used for labeling the endoplasmic reticulum (ER). A fluorescent Alexa Fluor 488 conjugate of

transferrin (Alexa-transferrin; Invitrogen) was used as an exogenously added endocytic marker to delineate the endocytic recycling pathway for live cell imaging.

We also used an expression construct containing enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) fused to an Golgi-targeting sequence derived from human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase as an Golgi localization marker (ECFP-Golgi). The construct was purchased from Clontech (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). Cells were grown in 35-mm glass-bottom dishes coated with poly-L-lysine and transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After overnight incubation, the cells were exposed to and allowed to internalize Dox-bound micelles for 24 h and then examined with confocal microscopy.

### 2.7. Efflux study of DOX-bound polymers or DBD-labeled polymers using the ABCB1 inhibitor verapamil

HeLa cells ( $1.5 \times 10^5$ ) were plated in 35-mm glass-bottom dishes coated with poly-L-lysine in DMEM containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. After incubation for two days (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), the cells were exposed to 50  $\mu$ g/mL Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. Cells were washed with 50  $\mu$ g/mL verapamil (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) (Davis et al., 2004; Kolwankar et al., 2005) or 0.1% dimethyl sulfoxide as a control. After washes, the cells were incubated for another 2 h in HBSS containing the same concentration of reagent. The cells were collected and processed for measurement of intracellular concentrations of Dox-bound polymers as described in Section 2.3. The efflux of DBD-labeled polymers was evaluated by

measurement of the fluorescent intensity inside cells using confocal microscopy. The intensity of the intracellular fluorescence was evaluated by image processing software (MetaMorph, Molecular Devices, CA, USA). The intensity of a single cell was mathematically determined by dividing the total intensity by the number of cells. Three independent experiments were averaged and analyzed statistically with the *t*-test.

### 2.8. Knockdown of ABCB1 by siRNA

Stealth RNAi oligonucleotides (Invitrogen) were used for siRNA experiments. Human ABCB1-siRNA sense, 5'-UCCCGUAGAAACCUUACAUUUAUGG-3', and antisense, 5'-CCAUAAAUGUAAGGUUUCUACGGGA-3', sequences were used. For a negative control, the Stealth RNAi Low GC Negative Control Duplex (Invitrogen) was used. The Stealth RNAi oligonucleotides were transfected into HeLa cells by using Lipofectamine RNAi MAX according to the manufacturer's protocols. After two days, the cells were exposed to 50 µg/mL Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. After incubation, cells were washed with HBSS, and then incubated for another 2 h in HBSS without polymers. Cells were collected, and the intracellular polymers were quantified as described in Section 2.3.

### 2.9. Western blotting

Cells were washed with PBS and lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 10% glycerol; and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors, namely, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Samples were electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel (5–20%) and transferred to a Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The blots were probed with anti-MDR (G-1) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and developed with anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody (from sheep) (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK) by chemiluminescence.

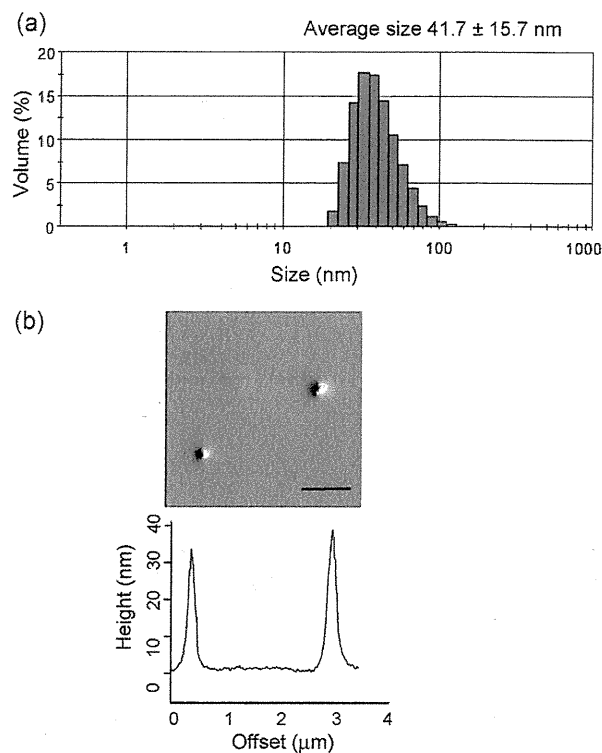
## 3. Results and discussion

### 3.1. Physicochemical properties of Dox-bound micelles

The micelle carrier (Fig. 1) consisted of a block copolymer of PEG (molecular weight about 5000) and poly(aspartic acid) (polymerization degree, 30). To increase the hydrophobicity of the inner core, Dox was partially conjugated (about 45%) to the side chain of the aspartic acid. Because particle size affects the intracellular uptake of nanoparticulate formulations, we first examined the particle size of the micelles without free Dox. The Dox-bound micelles had a hydrodynamic diameter of about 42 nm at the dosed concentration of 50 µg/mL (Fig. 2a). AFM measurement of the micelles also confirmed that they were spherical with a particle size of around 40 nm (Fig. 2b). This size of micelle without free Dox is very similar to that of the micelles containing free Dox in the inner core that interacts with the conjugated Dox (Nakanishi et al., 2001), indicating that the presence of incorporated free Dox does not change the average diameter much.

**Table 1**  
IC50 values (µg/mL).

24 h			48 h		
Dox-bound polymer	Micelle incorporating free Dox	Free Dox	Dox-bound polymer	Micelle incorporating free Dox	Free Dox
>10	0.37	0.27	>10	0.045	0.024



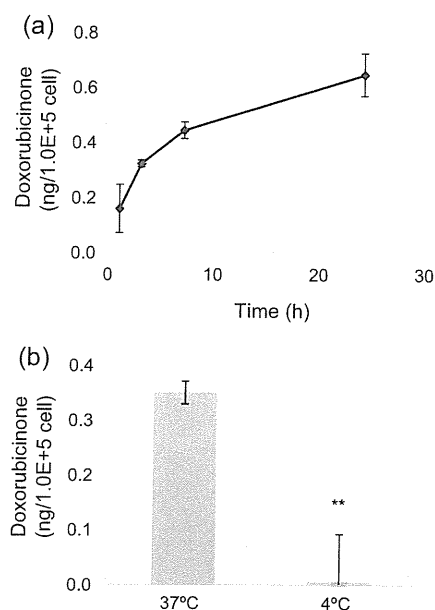
**Fig. 2.** Physicochemical properties of Dox-bound polymeric micelles. (a) Average size distribution of Dox-bound polymeric micelles by DLS. (b) The upper image shows an AFM image of Dox-bound polymeric micelles (bar: 1 µm) and the lower shows the cross-sectional topological profile of the image drawn in the upper panel.

### 3.2. *In vitro* cytotoxicity

We examined the *in vitro* cytotoxicity of the Dox-bound copolymers and the micelles incorporating free doxorubicin. As shown in Table 1, the cytotoxicity of doxorubicin-bound copolymers was negligible. This fact has been also reported in the previously published paper (Nakanishi et al., 2001). On the other hand, micelles incorporating free doxorubicin showed equivalent *in vitro* cytotoxic activity to free doxorubicin which is not incorporated into micelle. Therefore, in this system, the doxorubicin was conjugated to the block copolymer to increase the hydrophobicity of the inner core of the micelle so that efficient amount of free doxorubicin can be incorporated into the inner core of the micelles, and its cytotoxicity was negligible.

### 3.3. Intracellular uptake of Dox-bound polymers

To evaluate the intracellular uptake of Dox-bound polymers, we measured their intracellular amount by quantitating the doxorubicinone released from the intracellular polymers by acid hydrolysis treatment (Fig. 1b). Although the Dox-bound polymers contained 0.02% (w/w) free doxorubicinone as an impurity, no inherent free doxorubicinone was detected in the cells in any of the experiments in which we measured the intracellular concentration of doxorubicinone without acid hydrolysis. This result also indicates that



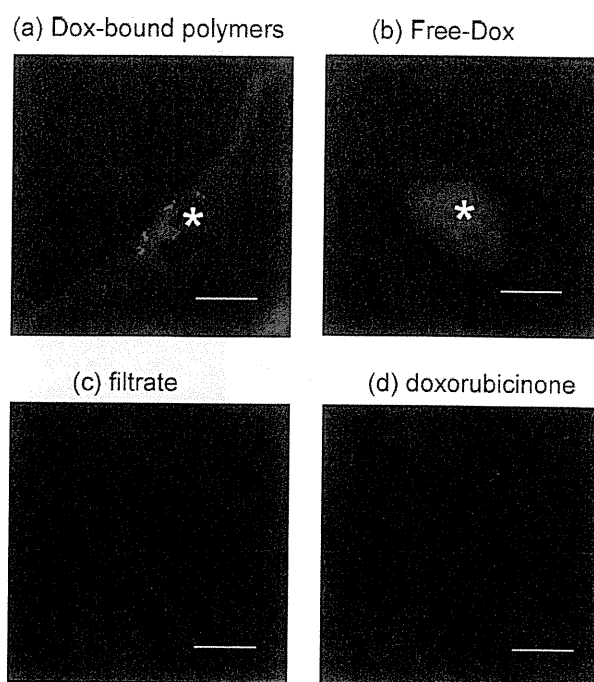
**Fig. 3.** Internalization of Dox-bound polymers. (a) Change in the internalized amount of Dox-bound polymers in cells as indicated by released doxorubicinone over time. HeLa cells were incubated in medium containing Dox-bound polymers for the indicated durations, followed by washes with PBS. The doxorubicinone released by acid hydrolysis was quantitated as a measure of the amount of intracellular polymers, as described in Section 2. (b) Effect of temperature on the internalization of Dox-bound polymers. HeLa cells were incubated in medium containing Dox-bound polymers at 37 °C or 4 °C for 3 h, followed by washes with PBS. The amount of intracellular polymers was quantitated by measuring the doxorubicinone released by acid hydrolysis, as described in Section 2. \*\* $P < 0.01$ .

degradation of Dox-bound polymers that releases doxorubicinone during the experiments was negligible.

We then incubated HeLa cells in medium containing Dox-bound polymers for 1–24 h. After the incubation, the cells were washed. By determining the amounts of doxorubicinone released from Dox-bound polymers by acid hydrolysis of the cells, we were able to observe a time-dependent increase in the intracellular amount of Dox-bound polymers (Fig. 3a). Moreover, the amount of polymers in cells was significantly lower in cells incubated with the polymers at 4 °C than at 37 °C (Fig. 3b), indicating that the cells took up the polymers by endocytosis.

#### 3.4. Intracellular distribution of Dox-bound polymers

The intracellular distribution of Dox-bound polymers was studied by confocal microscopy using the inherent fluorescence of the Dox covalently bound to the block copolymers. The Dox-bound polymers were localized in the perinuclear regions but not in the nucleus (Fig. 4a). This was different from the localization of free Dox which was distributed in the nucleus after 1 h (Fig. 4b), as reported previously (Beyer et al., 2001). This distribution will explain the fact that *in vitro* cytotoxicity of Dox-bound polymers was negligible (Table 1). To confirm that the Dox was not released from block copolymers as doxorubicinone (Fig. 1b) during the incubation time of the experiment, Dox-bound polymers were incubated in cell culture medium for 1 h at 37 °C, and then removed by centrifugal filtration using a Microcon YM-3 tube (Millipore, MA, USA). The resultant filtrate was added to the cell culture medium. Confocal microscopy showed no fluorescence within the cells (Fig. 4c). Furthermore, when HeLa cells were cultured in cell culture medium containing 20 ng/mL free doxorubicinone, which corresponds to 0.02% (w/w) of Dox-bound polymers, for 24 h, fluorescence was negligible within the cells (Fig. 4d). These results show that the fluorescence



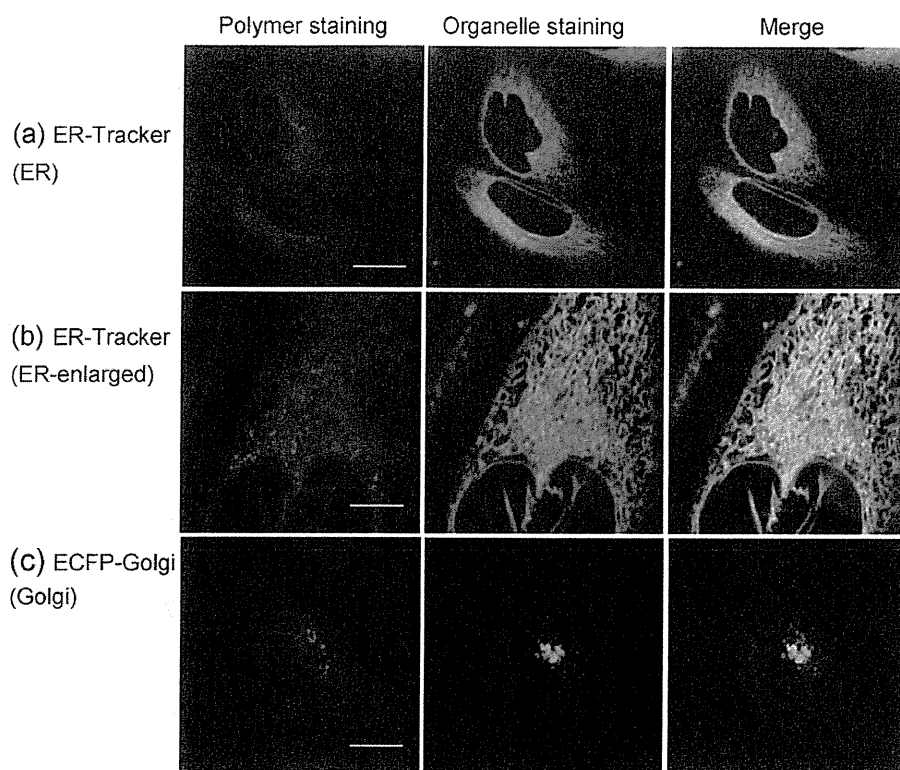
**Fig. 4.** Intracellular distribution of (a) DOX-bound polymers in HeLa cells exposed to 50 µg/mL Dox-bound polymers and (b) free DOX in cells exposed to 5 µg/mL free Dox for 1 h. Intracellular distribution of DOX-bound polymers in HeLa cells (c) cultured for 24 h in medium containing the filtrate of medium that was preincubated with Dox-bound polymers, and (d) cultured with 20 ng/mL free doxorubicinone for 24 h. Bars: 10 µm. Asterisk indicates the nucleus.

seen within the cells after Dox-bound polymer incubation is caused by the uptake of polymers and not by free doxorubicinone or Dox.

We next examined the intracellular localization of Dox-bound polymers by colocalization studies using fluorescent organelle markers. The fluorescence derived from Dox-bound polymers coincided well with the specific staining of the ER by ER-Tracker in double-labeling experiments (Fig. 5a). High-resolution images showed that both staining procedures clearly stained membranous structures (Fig. 5b).

Because the Golgi apparatus is also located in the perinuclear area and is involved in the intracellular transport of various molecules, we investigated the localization of the polymers by transfecting cells with an expression construct containing ECFP fused to a Golgi-specific protein. As shown in Fig. 5c, the distribution of polymers in the Golgi was negligible. We also confirmed that treatment of cells with Lipofectamine treatment did not affect the distribution of polymers (data not shown).

To what, then, can this particularly strong staining of the perinuclear areas be attributed? The perinuclear area is known to be the microtubule-organizing center (MTOC), an area in eukaryotic cells from which microtubules emerge and where endosomes and other endocytotic vesicles cluster (Matteoni and Kreis, 1987). In fact, a fluorescent staining image showed that the vesicles containing Dox-bound polymers in the perinuclear area (Fig. 6a, yellow arrows) coincided with the MTOC, as marked by Alexa-transferrin, an endocytic marker (Fig. 6a, white arrows). Some of the vesicles containing polymers were also stained by LysoTracker, a dye that specifically stains lysosomes (Fig. 6b). These results show that the polymers are internalized by endocytosis and transported to endosomal/lysosomal compartments. Duncan and colleagues, examined the localization of polymers by using Oregon Green as a fluorescent tag and found that three water-soluble polymeric carriers, *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, Dextran, and PEG, localized to late

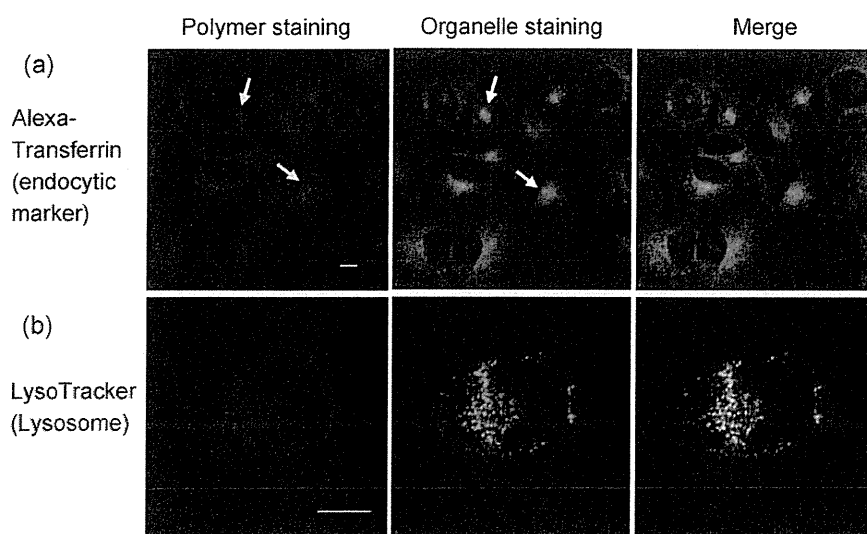


**Fig. 5.** Localization of Dox-bound polymers in cells co-stained with organelle-specific markers. Left, images of stained Dox-bound polymers; middle, organelle-specific fluorescent staining images; right, merged images of the left and middle images. Localization experiments using (a and b) ER-Tracker for ER, (c) ECFP-Golgi for Golgi. Bars: 10  $\mu\text{m}$  for (a) and (c). Bars: 5  $\mu\text{m}$  for (b).

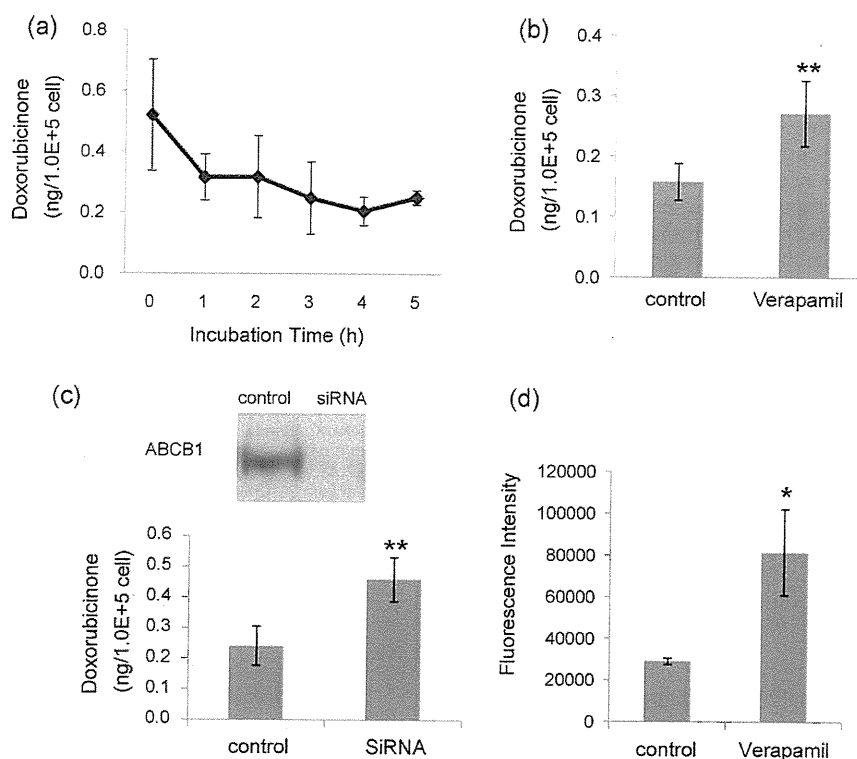
endosomal compartments (including lysosomes) (Richardson et al., 2008), findings consistent with our results. The perinuclear localization of the polymers is a great advantage of this system with regard to the incorporation of a nuclear-targeted drug or gene.

Most nanomaterials have been shown to exploit more than one pathway to gain cellular entry, and the pathway exploited can determine the intracellular fate (Sahay et al., 2010a). After internalization into HeLa cells, the Dox-bound polymers might

be delivered to the ER directly from endosomes; in the case of cholesterol, there is some evidence for a direct pathway from endosomes to the ER (Ioannou, 2001; Mineo and Anderson, 2001). Or the polymers might be delivered to the ER directly, bypassing the endosomes/lysosomes, as do unimers of the amphiphilic triblock copolymer of poly(ethylene oxide), poly(propylene oxide), and Pluronic P85 (Sahay et al., 2010b). Simian virus 40 is known to enter the cytosol *via* the ER, suggesting that polymers distributed



**Fig. 6.** Fluorescent staining images of Dox-bound polymers in cells co-stained with organelle-specific markers. Left, images of stained Dox-bound polymers; middle, organelle-specific fluorescent staining images; right, merged images of the left and middle images. Localization experiments using (a) Alexa-transferrin, an endocytic compartment marker, and (b) LysoTracker, which is specific for lysosomes. Bars: 10  $\mu\text{m}$ . Yellow and white arrows in (a) indicate the MTOC area.



**Fig. 7.** Efflux of Dox-bound polymers. (a) Time-dependent change in intracellular Dox-bound polymers as indicated by released doxorubicinone. After incubation in medium with Dox-bound polymers, HeLa cells were washed and incubated with HBSS at 37 °C for the indicated durations. The doxorubicinone released by acid hydrolysis was quantitated as the amount of intracellular polymers as described in Section 2. (b) Effect of ABCB1 transporter on the efflux of Dox-bound polymers. HeLa cells were exposed to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. Cells were washed with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verapamil or 0.1% dimethyl sulfoxide as a control. Then, the cells were incubated for another 2 h in HBSS containing the same concentration of each reagent. The amount of intracellular polymers was quantitated as the amount of doxorubicinone released by acid hydrolysis, as described in Section 2. \*\* $P < 0.01$ . (c) Effect of the knockdown of ABCB1 transporter expression by siRNA on the efflux of Dox-bound polymers. Expression of ABCB1 in cell extracts was analyzed by immunoblot analysis (top). After 2 days of siRNA transfection, the cells were exposed to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Dox-bound polymers in culture medium for 3 h. After incubation, the cells were washed with HBSS and then incubated for another 2 h in HBSS without polymer. The amount of intracellular polymers was quantitated as the amount of doxorubicinone released by acid hydrolysis, as described in Section 2 (bottom). \*\* $P < 0.01$ . (d) Effect of ABCB1 transporter on the efflux of DBD-labeled polymers. HeLa cells were exposed to 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DBD-labeled polymers in culture medium for 24 h. Cells were washed with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verapamil or 0.1% dimethyl sulfoxide as a control. Then, the cells were incubated for another 2 h in HBSS containing the same concentration of each reagent. The fluorescence intensity in a single cell was calculated as described in Section 2. \* $P < 0.05$ .

in the ER might similarly gain access to the cytosol (Damm et al., 2005). The characteristic distribution pattern of the polymers did not change much with increasing incubation times from 0.5 to 24 h (data not shown). Although it is not clear whether the polymers maintain their structure as globular micelles or exist as unimers after internalization into a cell, increasing the dosed polymer concentration to 1 mg/mL did not change the staining pattern (data not shown). Recently, we showed PEG and poly(glutamic acid) block copolymer micelles incorporating dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) selectively dissociate within late endosomes (Murakami et al., 2011), suggesting that the Dox-bound polymers might also dissociate.

### 3.5. Efflux of Dox-bound polymers from HeLa cells to medium

As described in Section 3.2, the amount of intracellular Dox-bound polymers increased with time when cells were continuously exposed to Dox-bound polymers (Fig. 3a). In contrast, the amount of Dox-bound polymers gradually decreased after the Dox-bound polymers were removed from the medium (Fig. 7a). Interestingly, this decrease in the intracellular amount of Dox-bound polymers was abolished in the presence of verapamil, an inhibitor of ABCB1 (ATP-binding cassette protein B1) transporter (Fig. 7b). The ABCB1 transporter, which is also known as multidrug resistance 1 (MDR-1) or P-glycoprotein, is a member of the ABC-type transporter family and an efflux pump for various drugs. To further investigate the

role of this transporter in the efflux of Dox-bound polymers from cells to medium, small interference RNAs (siRNAs) were used to target ABCB1 RNA in HeLa cells. Two days after transfection of synthetic siRNA, Western blot analysis showed that levels of ABCB1 protein expression in siRNA-transfected HeLa cells were drastically decreased (Fig. 7c), and the efflux of Dox-bound polymers from these cells was also significantly inhibited (Fig. 7c). The efflux of DBD-labeled polymers was also inhibited by ABCB1 transporter inhibitor, when intracellular fluorescence intensity of DBD-labeled polymers was measured (Fig. 7d). These results suggest that ABCB1 transporter is a key regulator of the clearance of Dox-bound polymers from HeLa cells.

It is reported that drug-binding site of ABCB1 transporter is located at a drug binding pocket that is formed by transmembrane segments and allow access of molecules directly from the membranes (Aller et al., 2009; Loo et al., 2003a,b). Furthermore, it is also known that subdomains of the ER form close contact with plasma membrane and some proteins may regulate the formation of direct membrane contacts that facilitate sterol exchange between the ER and plasma membrane (Ikonen, 2008).

Therefore, it is probable that a part of Dox-bound polymers localized in ER are transported to plasma membrane and then recognized at the drug binding site in the transmembrane segments of ABCB1 transporter.

In general, the ABCB1 transporter has very broad substrate specificity: recent studies have shown that it mediates the efflux