

20110203AB

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、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術の確立に関する研究

平成22年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成24（2012）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術の確立に関する研究

平成22年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 阿曾 幸男

平成24（2012）年 4月

目 次

I. 総合研究報告

タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の

高感度安定性評価技術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----- 15

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 21

## タンパク質、核酸等の高分子医薬製剤の高感度安定性評価技術の確立に関する研究

研究代表者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

モデルタンパク質としてインスリンおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼを用い、スクロースなどの5種類の糖類を添加剤として用いた凍結乾燥製剤の保存安定性を検討した。インスリンにおいては、糖の安定化効果は凍結乾燥する前の溶液のpHや保存温度に依存することが明らかになった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤については、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度は構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動よりも、NMR緩和時間によって表されるスケールの小さな分子運動がより密接に関連することが示された。スケールの小さな分子運動性を指標とする安定性予測の可能性が示唆された。また、安全性は高いが遺伝子導入効率が低いことが問題となっている遺伝子導入用リポソーム製剤の遺伝子導入効率を改善するためにPEG修飾によるリポソームの表面改質を検討した。蛍光物質を用いた蛍光測定と誘電緩和時間測定から、PEG修飾リポソームの表面状態は水和し、PEG脂質を用いて表面修飾したリポソームとプラスミドDNAとの複合体になると脱水和する傾向がみられた。PEGの表面水和状態がリポプレックスの細胞内取り込みに影響することが明らかとなった。PEG修飾リポソーム表面でのPEGのマッシュルーム・ブラシ分布状態もGP測定と水の誘電緩和測定によって、推定できることが示唆された。

## 研究分担者

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

ヒト型抗体医薬に代表されるように、近年のバイオテクノロジーの発展はタンパク質や核酸などの高分子医薬を製剤化し、医療の現場で用いようとする流れを加速している。高分子医薬は熱力学的に不安定であり、製剤化やその後の保存中に温度や湿度などの環境要因の影響を受け薬理効果を失いやすい。このような高分子医薬を医療の場で活用するためには高度な製剤学的工夫による安定化を施す必要がある。製剤学的工夫による安定化効果を確認し、その最適化を行えるよう

に、短期間で高分子医薬製剤の安定性を評価できる評価法の開発が不可欠である。最近、中性子散乱によって測定される比較的スケールの小さなローカルな運動性と安定性との関連を示唆する報告がなされているが、本研究は中性子散乱のような特殊な装置によらず、ローカルな運動性の指標である $\beta$ 緩和時間の測定法を開発し、 $\beta$ 緩和時間に基づいた高分子医薬製剤の安定性評価法を開発することを目的とする。また、タンパク質のローカルな分子運動性を制御することにより、高い安定性を有するタンパク質製剤の開発につながる。さらに、プラスミドDNAとの複合体（リポプレックス）形成能を有し、遺伝子導入用ベクターとして用いられている正電荷リポソームについて、PEG修飾によりリポソームの表面改質を行い、リポソーム表面の水和状態と細胞内への取り

込みとの関連を明らかにし、導入効率の高い遺伝子導入ベクターの設計を行う。

タンパク質の凍結乾燥製剤については、インスリンおよびβガラクトシダーゼをモデルタンパクとして用い、インスリンについてはスクロース、トレハロース、スタキオース、デキストランを添加剤として用いた凍結乾燥製剤の保存安定性を検討し、糖の安定化効果が凍結乾燥に用いた溶液のpHや保存温度の影響を明らかにした。βガラクトシダーゼについては、保存安定性と<sup>13</sup>C-NMR緩和時間によって表される分子運動性との関連を明らかにした。また、遺伝子導入リポソーム製剤については、リポソームの表面水和の研究に最もよく用いられるPEG脂質で修飾したリポソームおよびそのリポプレックスの表面の水和状態に焦点をあて、蛍光標識によるGP(generalized polarization)測定と水の誘電緩和時間測定の二つの方法から検討を行った。その結果、遺伝子導入リポソームベクターの開発の上で新しい知見が得られ、これらの物性を測定することによってリポソームとプラスミドDNA(pDNA)の最適混合比の予測が可能であることを示す知見が得られた。

## B. 研究方法

### (1) 凍結乾燥製剤中のインスリンおよびβガラクトシダーゼの分子運動性と安定性との関連 インスリン凍結乾燥製剤の調製および安定性試験

ヒト型インスリン(ヒューマリン注、イーライリリー)を透析により精製し、pHを4または7に調整した。遠心濃縮によりインスリン濃度を4 mg/mLに調整し、インスリンと添加剤の比率が1:1.5になるようにスクロース、トレハロース、スタキオースあるいはデキストランを加え、0.2mLずつ小分けし凍結乾燥した。得られた製剤を25℃、相対湿度12%の条件で1日保存し、水分含量を調整した凍結乾燥製剤を、25、40、50、

60℃に保存した。保存試料に残存するインスリンを以下の条件に従い、液体クロマトグラフィーにより定量した。

液体クロマトグラフィーの条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：280nm)

カラム：イナートシル WP-300 (C8、4.6mm ×250mm)

カラム温度：35℃

移動相：移動相A：0.01M 硫酸アンモニウム水溶液(硫酸を用いてpH2.2に調整)

移動相B：0.07%トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液

移動相の組成

注入後の時間 (分)	移動相 A 液 (vol%)	移動相 B (vol%)
0~1	72.5	27.5
1~11	72.5→70.0	27.5→30.0
11~16	70.0→65.0	30.0→35.0
16~19	65.0	35.0
19~20	65.0→72.5	35.0→27.5

流量：毎分 1.6mL

### βガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の調製および安定性試験

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用いて、βガラクトシダーゼの凍結乾燥製剤(タンパク質：糖=2:1)を調製した。製剤を25℃、12%相対湿度(RH)に1日保存して水分含量を調整した後、および種々の温度条件に保存した後、25、40、50℃に保存した。製剤中に残存するβガラクトシダーゼの活性を2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを基質として用いて測定した。

等温マイクロ熱量計を用い、20、25、40℃において、製剤が発生する熱を測定した。また、製剤のT<sub>g</sub>を温度変調型DSCで測定した。

25℃、11%相対湿度に1日保存することにより水分含量を調整した凍結乾燥製剤について、

$^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR により、25、40、50°Cにおける $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素のスピン-格子緩和時間( $T_1$ )の測定を行った。

## (2) パルス磁場勾配NMRによる水の拡散係数の測定

高分子や糖の水溶液中の水分子の拡散係数はパルス NMR (プロトンの共鳴周波数: 25MHz、NM-25、日本電子データム) を用い、30°Cで測定した。磁場勾配強度は 20 ガウス/cm を用いた。誘電緩和時間の測定はデジタイジングオシロスコープ (54120B 型、アジレント) を用い、時間領域反射法により測定した。

## (3) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

### リポプレックスの調製

カチオン性脂質としては、二級のアミノ基と末端にヒドロキシル基を有し、コレステロールと結合した OH-Chol と四級のアミノ基 DOTAP を、中性のヘルパー脂質として DOPE を、PEG 脂質として分子量 2000 を用いた。脂質濃度 4.5mM で OH-Chol / DOPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:0.2、脂質濃度 5.6mg/mL)、OH-Chol / DOPE / DSPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:x:0.2 · x、脂質濃度 5.6mg/mL)、DOTAP / DOPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:0.2、脂質濃度 7.0mg/mL) の 3 種類のリポソームを薄膜法にて調製し、超音波を照射して粒子径を約 160nm にした。pDNA としては、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 として室温で 5 分間インキュベーションをしてリポプレックスを調製した。20 $\mu\text{L}$  のリポプレックスを超純水、または PBS 2mL で希釈し、希釈直後および希釈 30 分後に GP 値の測定を行った。

また、OH-Chol / DOPE / DSPE / DSPE-PEG (モル比 1:1:x:0.2 · x)、DOTAP/Chol

= 1/1, または 2/1 (モル比) に PEG-DSPE 及び DSPE を同様に添加した 3 種類のリポソームを薄膜法にて調製し、超音波を照射して粒子径を約 120nm にした。プラスミド DNA としては、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 として室温で 5 分間インキュベーションをしてリポプレックスを調製した。

### 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、表面の水和状態は蛍光物質 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (laurdan) を 0.2mol% 総脂質に対して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) 値を求めて評価した。

$$GP = (I_{440} \cdot I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$$

誘電率と誘電緩和は、デジタイジングオシロスコープ (54120B 型、アジレント製) によって、25°C の水中で行った。コントロールとして pDNA 水溶液の測定を行い、リポプレックスの測定値から差し引いた。

### 細胞内取り込みと遺伝子発現

FITC 標識した pDNA (FITC-pDNA) を用いてリポプレックスを調製し、A549 細胞ではリポプレックス投与後 PBS 中で 2 時間、Colon26 (C26) 細胞では、血清含有培地で 3 時間インキュベーションし、フローサイトメーターで測定した。遺伝子発現は、各細胞と 24 時間インキュベーション後、遺伝子発現量を測定した。なお、コントロールとして市販品の Lipofectamine 2000 (LA) を用いた。

### (倫理面への配慮)

本研究において行った実験は化学実験および

培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題はないと判断した。

## C. 研究結果

### (1)凍結乾燥製剤中のインスリンおよびβガラクトシダーゼの分子運動性と安定性との関連

弱酸性の pH 領域においてインスリンは A 鎖 21 のアスパラギンにおいて酸無水物中間体を生成し、酸無水物中間体が水と反応することによりデスアミド体となり、もう一分子のインスリンの A 鎖または B 鎖のアミノ基と反応することにより 2 量体を生成することが知られている。これらの分解反応は酸無水物中間体が生成する段階が律速段階であるとされている。60℃に保存した凍結乾燥製剤(pH4.0)中のインスリンは保存により、未変化のインスリンのピークが減少し、インスリンのピークの後にデスアミド体と思われる小さなピークが溶出した。また、インスリンの前に複数の小さなピークが観測された。その生成量は添加剤の影響を受け、スクロース、トレハロースを添加した製剤においてはインスリン単独やデキストランを添加した製剤より生成量が多かった。一方、pH7.0 の溶液から凍結乾燥した製剤においてはインスリンのピークの前に溶出する分解物のピークは 60℃保存によりほとんど増加しなかった。これらの結果はインスリンの凍結乾燥製剤中の分解が複数の経路で進行し、それらの速度は添加剤や pH の影響を大きく受けることを示す。

凍結乾燥製剤中におけるインスリンの分解は複雑であるが、60℃に保存した凍結乾燥製剤(pH4.0)中の未変化のインスリンの残存量のタイムコースは 1 次反応速度式にフィッティングできた。フィッティングにより見かけの分解速度定数を見積もった結果、pH4.0 の溶液から凍結乾燥した製剤中のインスリンの分解は 50℃および 60℃においてはスタキオースを添加した製剤が最も安定であり、スクロースを添加した製

剤は添加剤を加えずに凍結乾燥したインスリンより不安定であった。しかし、40℃においてはスクロースもスタキオースと同程度の安定化効果を示すことが明らかになった。一方、pH7.0 の水溶液から凍結乾燥した製剤中のインスリンの分解は 60℃の保存条件においてスクロースが最も安定であった。スクロースの安定化効果は温度や pH の影響を大きく受けた。

スクロース、トレハロース、イソマルトース、スタキオース、デキストランあるいは HES を添加剤として用いた凍結乾燥品中の β-ガラクトシダーゼの安定性を活性変化に基づいて明らかにした。スクロースを添加剤として用いた凍結乾燥品中の 25℃における β-ガラクトシダーゼの失活は 455 日保存後もほとんど見られず、安定であった。50℃、40℃における失活のタイムコースは 1 次反応速度式 (=指数関数)によって記述できた。トレハロース、スタキオース、イソマルトースを添加剤として用いた凍結乾燥品中の β-ガラクトシダーゼの失活も 1 次反応速度式に従った。一方、デキストランおよび HES を添加剤として用いた凍結乾燥製剤においては、検討した全ての温度において 2 相性の失活のタイムコースが観測された。失活のタイムコースは 2 つの指数関数の和にフィットできた。2 相性のタイムコースが観測される理由の詳細は不明であるが、凍結乾燥によって活性低下を引き起こさない程度に β-ガラクトシダーゼの構造に変化が起こり、そのような構造の変化した β-ガラクトシダーゼは、保存中の失活を引き起こしやすく、それが保存初期の速やかな活性の消失を引き起こすものと考えられる。検討した添加剤の中で、スクロースが最も安定であり、トレハロース、イソマルトース、スタキオース、デキストラン、HES の順に速度定数が大きく、不安定であった。

製剤を構成する分子は様々なスケールの分子運動を行っている。構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動性の指標として、エンタ

ルピー緩和時間を等温マイクロ熱量測定により算出した。また、スケールの小さな分子運動性の指標として、タンパク質カルボニル炭素のスピル格子緩和時間( $T_1$ )を測定した。

等温マイクロ熱量によって観測される $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の Heat Flow は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数日にわたり観測された。それ以降の発熱はほぼプラトーとなった。プラトーになった発熱は $\beta$ -ガラクトシダーゼの分解に伴う発熱( $P_k$ )と考えられる。観測された Heat flow( $P$ )の時間変化を 1 式に従いフィットし、 $\tau_0$ 、 $\tau_1$ 、 $\beta$ および  $P_k$  の値を推定した。ここで、 $\Delta H_r(\infty)$ 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  $\Delta C_p$  の値を用い、2 式に従い算出した。分子運動性の指標である  $\tau_D^\beta$  の

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

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

$$\tau_D^\beta = \left(\tau_0^{1/\beta}\right) \left(\tau_1^{\beta-1/\beta}\right) \quad (3)$$

値は 3 式に従い計算した。 $\tau_D^\beta$  および  $P_k$  の推定値を Table 1 に示す。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の  $\tau_D^\beta$  の値はスクロースを添加した製剤が最も小さく、イソマルトース、トレハロース、スタキオースの順に大きかった。なお、デキストラン、HES 製剤は糖類に比べ  $T_g$  が高く、エンタルピー緩和速度が遅いことから、等温マイクロ熱量測定によるエンタルピー緩和時間の測定は困難であった。乾燥状態の $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤の緩和時間はスクロース<トレハロース<スタキオースの順であり、水分を調整した試料と同じであった。 $\tau_D^\beta$  の値が小さいほど分子運動性が大きいことを意味し、失活速度定数の最も小さかったスクロース製剤が最もエンタルピー緩和を引き起こす分子運動性が高かった。従って、エンタルピー緩和時間 ( $=\tau_D^\beta$ ) を指標とする分子運動性は失活を引き起こす運

Table 1  $T_g$ , change in the heat capacity at  $T_g$  ( $\Delta C_p$ ), relaxation time ( $\tau_D^\beta$ ),  $P_k$  and water content of lyophilized  $\beta$ -galactosidase containing various excipients

Excipient	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta C_p$ ( $\text{Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ )	$\tau_D^\beta$ (hr) at 40 $^{\circ}\text{C}$	$P_k$ ( $\mu\text{W}$ ) at 40 $^{\circ}\text{C}$	Water content (%)
Sucrose	46.3 $\pm$ 0.2 <sup>a)</sup>	0.41 $\pm$ 0.02 <sup>a)</sup>	20, 25	0.024, 0.021	2.8 $\pm$ 0.2 <sup>a)</sup>
Trehalose	60.7 $\pm$ 0.7 <sup>a)</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>a)</sup>	49, 50	0.038, 0.038	3.0 $\pm$ 0.3 <sup>a)</sup>
Stachyose	69.5 $\pm$ 1.2 <sup>a)</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>a)</sup>	59, 46	0.054, 0.055	3.1 $\pm$ 0.3 <sup>a)</sup>
Isomaltose	54.2 $\pm$ 0.9 <sup>a)</sup>	0.33 $\pm$ 0.12 <sup>a)</sup>	33, 24	0.051, 0.050	2.8 $\pm$ 0.3 <sup>a)</sup>
HES	185	0.18	ND	ND	3.2 $\pm$ 0.4 <sup>a)</sup>
デキストラン	189	0.21	ND	ND	3.7 $\pm$ 0.4 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>: average  $\pm$  standard deviation (n=3).

ND: not determined.

Water content of samples were adjusted by storing at 25 $^{\circ}\text{C}$  and 12%RH for 1d.

動とは異なると考えられる。

12%RH で水分含量を調整した試料の 40°Cにおける  $P_k$  の値は Table 1 に示すようにスクロース<イソマルトース<トレハロース<スタキオースであり、失活速度定数と同じ順番であった。 $P_k$  は  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活に伴う発熱を表すものであるから、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ 1 分子当たりの失活に伴う発熱の大きさが共存する添加剤によって影響を受けないと仮定すれば、 $P_k$  は失活速度定数に比例すると期待できる。 $P_k$  と失活速度定数の関係はほぼ原点を通る直線によって表すことができ、 $P_k$  の値によって  $\beta$ -ガラクトシダーゼの安定性が予測できることを示唆するものと考えられる。乾燥状態の試料の  $P_k$  の値はスクロース、トレハロース、スタキオース何れの場合も、12%RH で水分を調整した試料の値より大きかった。この結果は水分を調整した  $\beta$ -ガラクトシダーゼに比べ乾燥状態の  $\beta$ -ガラクトシダーゼが不安定であると考えられることができる。しかし、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ 1 分子当たり失活に伴う発熱の大きさが水分の影響を受ける可能性も排除できない。等温マイクロ熱量測定により  $P_k$  を適切に推定するためには、Heat flow の観測値に対するエンタルピー緩和に伴う発熱の寄与が小さくなるようにできるだけ長時間測定する必要がある。今回のデータは測定時間が十分でなく、エンタルピー緩和による熱と分解熱をうまく分離されていない可能性も否定できない。本研究においては 12%RH に保存して水分含量を調整して安定性試験を行ったため、乾燥状態における安定性試験は行っていない。今後、乾燥状態における安定性試験をおこない、 $P_k$  による安定性予測の Feasibility の確認が必要であると考えられる。

$\beta$ -ガラクトシダーゼの Local な運動性の指標として、 $\beta$ -ガラクトシダーゼカルボニル炭素の  $T_1$  を測定した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの複数のカルボニル炭素の平均の緩和時間である。広い温度範囲における緩和時間の測定を行い、緩和時間の

極小値を見出すことができれば、分子運動性の直接的な指標である  $\tau_c$  (分子が 1 ラジアン回転するのに要する時間) を算出できる。しかし、本研究では測定温度範囲が狭く、極小値が見いだされなかったため、 $T_1$  と  $\beta$ -ガラクトシダーゼの保存安定性との見かけの相関を議論するにとどめる。種々の添加剤を用いて調製した凍結乾燥製剤中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の  $T_1$  の値は温度が高いほど短い。この結果は緩和時間が 1 つの相関時間によって記述されると仮定するならば、slow motional regime であることを示し、 $T_1$  が大きいほど Local な分子運動性が低いことを表す。 $T_1$  と失活速度定数の関連を検討した。デキストランや HES を添加剤として用いた製剤においては 2 相性の失活のタイムコースが得られ、2 つの速度定数が推定された。遅い失活の失活速度定数を用いた。異なる温度における測定結果であるにもかかわらず、失活速度定数の対数と  $T_1$  の間には直線関係があるように見える。ただし、スクロースやトレハロースを添加した凍結乾燥品中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの 25°C における失活速度は他のデータから外れているが、これらの凍結乾燥品においてはほとんど失活しておらず速度定数が正確に推定されないためと考えられる。あるいは、これらの凍結乾燥品においては緩和時間が 100 秒近いので、スピン-格子緩和に対して分子運動以外のメカニズムによる寄与があるためと考えられる。失活速度定数の対数と  $T_1$  の間に直線関係が見られたことはタンパクカルボニル炭素の  $T_1$  に基づいて安定性が予測できることを示唆すると思われる。また、 $T_1$  の値をもとに適切な添加剤の選択が可能であると考えられる。

## (2) パルス磁場勾配 NMR による水の拡散係数の測定

高分子添加剤や糖と水分子との相互作用を明らかにすることを目的とし、水の拡散係数に及ぼす高分子添加剤の影響を検討した。水の拡散

係数の測定はパルス磁場勾配スピネコー法によって行った。本方法によって得られる信号強度  $I$  は 4 式によって表され、磁場勾配パルスの

$$I = I_0 \exp\{-\gamma^2 D \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3}) G^2\} \quad (4)$$

持続時間  $\delta$  を変化させてシグナルを測定することにより、拡散係数  $D$  を算出することができる。ここで、 $\gamma$  は磁気回転比、 $\delta$  は磁場勾配パルスの持続時間、 $\Delta$  は拡散時間、 $G$  は磁場勾配の強さを表す。

20%PVP 水溶液について得られたプロトンのシグナル強度と磁場勾配パルスの持続時間  $\delta$  との関係を示す。観測されたシグナルは水と PVP のプロトンのシグナルが含まれている。水と PVP の拡散係数は異なるので、厳密には 1 式が適用できないが、フィッティングが良いことから 20%の濃度においては水分子の拡散係数測定に対する PVP のプロトンの寄与は無視できると考えられる。種々の高分子や糖の水溶液について測定した拡散係数と水の誘電緩和時間を比較した。誘電緩和時間は水分子が 1 ラジアン回転するのに要する平均の時間であり、誘電緩和時間が大きいほど水分子の平均の運動性が小さく、高分子と相互作用している水分子が多いことを示す。また、拡散係数が小さいほど水分子の平均の運動性が小さく、高分子と相互作用している水分子が多いことを示すと考えられる。誘電緩和時間が小さい水溶液ほど拡散係数が大きい傾向がみられることから、パルス磁場勾配 NMR によって測定される拡散係数が水分子の運動性の指標となり、高分子添加剤や糖と水分子の相互作用の評価に適用できることが示唆された。

### (3) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

リポソームの PEG 脂質による表面修飾と表面電位、水和状態との関係を調べた。

各リポソームにおいては、PEG 修飾率が高くなると表面電位は低下する傾向が見られた。

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されており、この値が高いほど脱水和状態にあるとされている。PEG 脂質で 1~10%修飾した OH-Chol リポソームにおいては、1%と 5%で GP 値が低下した。DOTAP/DOPE/DSPE-PEG リポソームでは、GP 値が OH-Chol リポソームより全体に低くなった。これは、DOTAP/DOPE のリポソームの 4 級アミンが水和しやすいためと考えられる。

OH-Chol リポソームの GP 値を超純水と PBS 中で測定したとき、PBS 中の方が水中より GP 値は高くなった。これは PBS 中に含まれるイオンが正電荷脂質に対して脱水和作用を引き起こしたためと考えられる。

次に、このリポソームおよびリポプレックスの GP 測定を行った。リポプレックスは荷電比 (+/-)=3/1 となるように調製した。PEG 未修飾では DNA との混合直後に凝集が観察されたため、調製できた 1.0%、1.5%、5%PEG 修飾のリポプレックスにおいて GP 値の測定を行った。リポソームとリポプレックスの GP 値を比較すると、リポプレックスの GP 値のほうが高くなり、脱水和することがわかった。このリポソームおよびリポプレックスの誘電緩和時間測定を行ったところ、PEG 修飾リポソームとリポプレックスにおいては、PEG 修飾量が増加するとともに緩和時間の減少が見られ、脱水和する傾向が観察された。これは、PBS 中で測定した GP 値から、5%PEG 修飾リポプレックスは脱水和しているという結果と一致した。

OH-Chol/DOPE (1/1)リポソーム及びリポプレックスでは、PEG 修飾率が 1-5%上昇しても、PBS や水中で GP 値の大きな変化はみられなかった。一方、DOTAP/Chol (1/1),(2/1)リポソーム及びリポプレックスでは(1/1)の組成の方が GP 値は

高い値を示し、Chol 量が多くなると脱水和されていることが示唆された。また、どちらの DOTAP/Chol リポソーム、リポプレックスでも 5%PEG 修飾によって、有意に GP 値が低下し、水和したことが示された。誘電緩和時間測定を行ったところ、OH-Chol/DOPE (1/1)リポソームおよびリポプレックスの PEG 修飾量が増加すると緩和時間の増加が見られ、水和する傾向が観察された。DOTAP/Chol リポソームでは(1/1),(2/1)のどちらの組成でも PEG 修飾によって緩和時間に有意な差は確認されなかった。一方、リポプレックスにおいて(1/1)では PEG 修飾によって緩和時間に有意な差はみられなかったが、(2/1)では有意に緩和時間が延長し水和する傾向がみられた。これは、PBS 中で測定した GP 値から、5%PEG 修飾リポプレックスは水和しているという結果と一致した。

OH-Chol/DOPE リポプレックスの A549 細胞での細胞内取り込みでは PEG 修飾率が上昇すると細胞内取り込みが有意に低下した。また、A549 細胞での遺伝子発現では PEG 修飾率 0-1.5%では遺伝子発現に有意な差はみられなかったが、PEG 修飾率 5%では遺伝子発現が低下した。DOTAP/Chol リポプレックスでは(1/1)、(2/1)のどちらの組成でも PEG 修飾すると C26 細胞内取り込みが上昇した。また、遺伝子発現はどの組成のリポプレックスでも 5%PEG 修飾によって低下した。

#### D. 考察

##### (1) 凍結乾燥製剤中のインスリンの分子運動性と安定性との関連

種々の糖を添加剤として用いたインスリンの凍結乾燥製剤について、インスリンの残存量の時間変化から分解速度を見積もったところ、糖の安定化効果は保存温度や凍結乾燥前の水溶液の pH の影響を受けることが明らかになった。今後、インスリンのカルボニル炭素の緩和時間と分解速

度との間の関連を明らかにし、緩和時間に基づく安定性予測の可能性を検討する。

種々の糖を添加剤として用いた凍結乾燥製剤中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度とカルボニル炭素の  $T_1$  が関連することが明らかになった。タンパク質医薬品の安定性に対して、構造緩和を引き起こすスケールの大きな分子運動よりも局所的なスケールの小さな分子運動性が重要な役割を果たすことを示唆する結果と考えられる。タンパク質の例を増やし、普遍性について検討することが今後の課題と考えられる。また、なぜローカルな分子運動性と保存安定性が関連するのかというメカニズムに関する検討も必要であると考えられる。

##### (2) パルス磁場勾配 NMR による水の拡散係数の測定

パルス磁場勾配 NMR によって得られた水分子の拡散係数と誘電緩和時間の間には関連がみられた。これらの測定原理の異なる運動性パラメータを相補的に使用することにより、高分子添加剤や糖と水分子との相互作用をより詳細に解析できるようになると考えられる。今後、水分子の拡散係数に及ぼす濃度、温度の影響を検討し、有用性を明らかにする。

##### (3) PEG 修飾リポソームおよびリポプレックスの表面水和状態

遺伝子導入用リポソームベクターでは、一般にカチオン性脂質が用いられている。アニオン性の pDNA と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相互作用させるために、カチオン性リポソームと pDNA の(+/-)荷電比を調整してカチオン性に行っている。さらに *in vivo* での遺伝子送達のために、リポソームの表面を PEG で修飾している。従って、リポプレックスにおいては、pDNA とリポソーム脂質膜との強い静電的相互作用により、サイズや表面状態が変化するこ

とや、PEG 脂質が 4%以下のリポソーム修飾ではマッシュルーム構造をとり、それ以上ではブラシ状態をとることが知られている。これまではリポプレックスの表面状態は表面電位で評価されてきたが、ここでは PEG 修飾によるリポソームとリポプレックスの表面水和状態を測定し、その細胞内取り込み及び遺伝子発現への影響を調べた。

カチオン性脂質としては、生体分解性が高く、pDNA と適度に相互作用をする脂質として、コレステロール誘導体 (OH·Chol) を選択した。リポソームの表面電位は、PEG 脂質の添加によって低下する傾向を示した。これは、OH·Chol の二級アミノ基の解離状態が PEG によって遮蔽されるためと推察された。また、GP 値からみたりポソームの水和状態は、PEG 修飾の増加によって水和する傾向を示し、リポプレックスでは脱水和する傾向を示した。誘電緩和時間測定からも、PEG 修飾リポソームにおいて、PEG 修飾が増加すると水和し、そのリポプレックスにおいては脱水和する傾向がみられた。GP 値は蛍光物質の分布するカチオン性脂質の極性基近傍の水和状態を反映している。誘電緩和時間は溶液中の水分子の平均の動きを反映しており、カチオン性脂質の極性基に水和した水分子と PEG 鎖に水和した水分子も緩和時間の増加に寄与していると推察される。したがって、リポソーム全体の水和状態を反映すると考えられる。

カチオン性脂質としてコレステロール誘導体 (OH·Chol) からなるリポソームやそのリポプレックスの水和状態は、PEG 脂質の添加によって GP 値は変化しなかったが、誘電緩和時間は高くなり、水和する傾向を示した。OH·Chol の二級アミノ基の解離状態が PEG によって遮蔽されるため GP 値に変動がなかったと推察された。リポプレックスの水の誘電緩和時間と細胞内取り込み量は負の相関性が見られた ( $R=0.946$ )。DOTAP からなるリポソームやそのリポプレックスの水

和状態は、GP 値と誘電緩和時間からも、PEG 修飾が増加すると水和する傾向がみられた。しかし、このリポプレックスでは、水和しても細胞内取り込みは高くなった。この場合は GP でも水和状態が測定できたことより、PEG のリポソーム表面での運動性が低いと考えられ、リポソームの表面にある正電荷によって細胞内に取り込まれたと推察した。

## E. 結論

(1) 凍結乾燥製剤中のインスリンの安定性に及ぼす糖の影響は凍結乾燥前の水溶液の pH や保存温度に大きく依存し、pH4.0 の水溶液から凍結乾燥した場合、50°C、60°C 保存においては検討した糖の中でスタキオースが最も大きな安定化効果を示し、スクロースは安定化効果を示さなかった。40°C 保存ではスクロースとスタキオースは同程度の安定化効果を示した。一方、pH7.0 の水溶液から凍結乾燥した場合、60°C 保存において、スクロースが最もインスリンを安定化した。凍結乾燥製剤中の  $\beta$ -ガラクトシダーゼの失活速度は用いる添加剤によって異なり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのカルボニル炭素の T<sub>1</sub> も添加剤の影響を受けた。失活速度は T<sub>1</sub> と関連し、T<sub>1</sub> を指標とした安定性予測の可能性が示唆された。

(2) 糖や高分子医薬品添加剤の水溶液についてパルス磁場勾配 NMR によって測定した水分子の拡散係数は誘電緩和時間と関連することが明らかになった。

(3) 水の誘電緩和測定によって蛍光プローブを用いた方法(GP 測定)と同様に PEG 修飾リポソームの水和状態が測定できること、PEG の表面状態がリポプレックスの細胞内取り込みに影響することが明らかとなった。リポソーム表面での PEG のマッシュルーム・ブラシ分布状態も GP 測定と水の誘電緩和測定によって、推定できることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshie Maitani, Ayako Nakamura, Takumi Tanaka, Yukio Aso: Hydration of surfactant-modified and PEGylated cationic cholesterol-based liposomes and corresponding lipoplexes by monitoring a fluorescent probe and the dielectric relaxation time. *Int. J. Pharm.* **427**, 372-378 (2012).
- 2) Yoshioka S., Forney K. M., Aso Y., Pikal M. J.: Effect of Sugars on the Molecular Motion of Freeze-dried Protein Formulations Reflected by NMR Relaxation Times. *Pharm. Res.*, **28**, 3237-3247 (2011).
- 3) Miyazaki T., Aso Y., Kawanishi T.: Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of amorphous solids with and without polymers. *J. Pharm. Sci.*, **100**, 4413-4420 (2011).
- 4) Miyazaki T., Aso Y., Yoshioka S., Kawanishi T.: Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP. *Int. J. Pharm.*, **407**, 111-118(2011).
- 5) 宮崎玉樹、阿曾幸男：熱分析による非晶質医薬品の結晶化の評価。熱測定, **38**, 125-131 (2011).
- 6) 阿曾幸男, 太田鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹：医薬品添加剤の結晶化度測定法に関する研究。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**, 540-545 (2011).
- 7) Yoshioka, S., Aso Y.: Molecular Mobility of Freeze-Dried Formulation as Determined by NMR Relaxation times, and Its Effects on Storage Stability. Chap.13. In *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, 3rd Ed., Rey, L., May, J.C., Eds. Informa Healthcare, London, pp. 354-371. (2010).
- 8) Wang, B., Cicerone, M. T., Aso, Y., Pikal, M. J.: The impact of thermal treatment on the stability of freeze-dried amorphous pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 fusion protein. *J. Pharm. Sci.*, **99**, 683-700 (2010).
- 9) Y. Iwase, Y. Maitani, Dual functional octreotide-modified liposomal irinotecan leads to high therapeutic efficacy for medullary thyroid carcinoma xenografts. *Cancer Sci.* **103**(2), 310-6 (2012).
- 10) Shiraishi K, Harada Y, Kawano K, Maitani Y, Hori K, Yanagihara K, Takigahira M, Yokoyama M. Tumor Environment Changed by Combretastatin Derivative (Cderiv) Pretreatment That Leads to Effective Tumor Targeting, MRI Studies, and Antitumor Activity of Polymeric Micelle Carrier Systems. *Pharm Res.* **29**(1), 178-86 (2012).
- 11) FT Fatema, Y. MAITANI, T. AKAIKE, mRNA delivery through fibronectin associated liposome-apatite particles: a new approach for enhanced mRNA transfection to mammalian cell, *Biol. Pharm. Bull*, **35**(1), 111-5 (2012).
- 12) Y. Hattori, Y. Nagaoka, M. Kubo, H. Yamasaku, Y. Ishii, H. Okita, H. Nakano, S. Uesato, Y. Maitani, Antitumor effect of liposomal histone deacetylase inhibitor-lipid conjugates in vitro, *Chem. Pharm. Bull.* **59**(11), 1386-1392 (2011).
- 13) A. Wakasugi, M. Asakawa, M. Kogiso, T. Shimizu, M. Sato, Y. Maitani, Organic nanotubes for drug loading and cellular delivery. *Int J Pharm.* **413**(1-2), 271-278 (2011).
- 14) Y. Iwase, Y. Maitani, Octreotide-targeted liposomes loaded with CPT-11 enhanced cytotoxicity for the treatment of medullary thyroid carcinoma in vitro, *Molecular Pharmaceutics*, **8**(2), 330-337 (2011).
- 15) Y. Maitani, PEGylated lipidic systems with prolonged circulation longevity for drug

- delivery in cancer therapeutics, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **21**, 27-34 (2011).
- 16) K. Kawano, Y. Maitani, Effects of polyethylene glycol spacer length and ligand density on folate receptor targeting of liposomal doxorubicin in vitro, *J Drug Delivery*, **160**, 967 (2011).
- 17) Y. Harada, T. Yamamoto, M. Sakai, T. Saiki, K. Kawano, Y. Maitani and M. Yokoyama, Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelles. *Int J Pharm.* **404**(1-2), 271-280 (2011).
- 18) T. Izumisawa, Y. Hattori, M. Date, K. Toma, Y. Maitani, Cell line-dependent internalization pathways determine DNA transfection efficiency of decaarginine-PEG-lipid, *Int J Pharm.* **404**, 264-270 (2011).
- 19) K. Kawano, Y. Maitani, Tumor permeability of nanocarriers observed by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging, *Yakugaku Zasshi*, **130**(12), 1679-1685 (2010).
- 20) K. Shiraishi, K. Kawano, Y. Maitani, Yokoyama M. Polyion complex micelle MRI contrast agents from poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine) block copolymers having Gd-DOTA; preparations and their control of T<sub>1</sub>-relaxivities and blood circulation characteristics. *J Control Release*, **148**, 160-167 (2010).
- 21) Y. Hattori, N. Kanamoto, K. Kawano, H. Iwakura, M. Sone, M. Miura, A. Yasoda, N. Tamura, H. Arai, T. Akamizu, K. Nakao, Y. Maitani, Molecular characterization of tumors from a transgenic mice adrenal tumor model: Comparison with human pheochromocytoma, *International Journal of Oncology*, **37**:695-705 (2010).
- 22) Y. Taniguchi, K. Kawano, T. Minowa, T. Sugino, Y. Shimojo, Y. Maitani, Enhanced Antitumor Efficacy of Folate-linked Liposomal Doxorubicin with TGF- $\beta$  Type I Receptor Inhibitor, *Cancer Science*, **101**, 2207-2213 (2010).
- 23) A. Hioki, A. Wakasugi, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani, Development of an In Vitro Drug Release Assay of PEGylated Liposome Using Bovine Serum Albumin and High Temperature, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1466-1470 (2010).
- 24) Y. Maitani, Lipoplex formation using liposomes prepared by ethanol injection. *Methods Mol Biol.*, **605**, 393-403 (2010).
- 25) Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga, Y. Maitani, Increase of therapeutic effect by treating nasopharyngeal tumor with combination of HER-2 siRNA and paclitaxel, *International Journal of Oncology*, **36**: 1039-1046 (2010).
- 26) K. Koga, Y. Hattori, M. Komori, R. Narishima, M. Yamasaki, M. Hakoshima, T. Fukui, Y. Maitani, Combination of RET siRNA and irinotecan inhibited the growth of medullary thyroid carcinoma TT cells and xenografts via apoptosis, *Cancer Science*, **101**: 941-947 (2010).
- 27) 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.*, **27**, 296-302 (2010).
2. 学会発表
- 1) 阿曾幸男、宮崎玉樹、奥田晴宏：<sup>13</sup>C-固体高分解能 NMR による市販製剤中のジヒドロピリジン系医薬品の存在状態の検討。日本薬学会第 132 年会(2012.3).
- 2) Yukio Aso, Tamaki Miyazaki, and Toru Kawanishi: Crystallinity of ground lactose

- hydrate determined by  $^{13}\text{C}$ -NMR. American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting and Exposition (2011.10).
- 3) 阿曾幸男、宮崎玉樹、川西徹：等温マイクロ熱量計による非晶質ニフェジピン粉砕物の物理的安定性の評価. 日本薬剤学会第 26 年会(2011.5).
  - 4) 阿曾幸男、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タンパク質の放出制御 日本薬学会第 131 年会(2011.3)
  - 5) 宮崎玉樹、阿曾幸男、川西徹：非晶質ニフェジピンの核生成速度および結晶成長速度に及ぼす高分子添加剤の影響 日本薬学会第 131 年会(2011.3)
  - 6) Aso, Y., Miyazaki, T., Yoshioka, S., Kawanishi, T.: Correlation between storage stability of lyophilized beta-galactosidase and molecular mobility as determined by  $^{13}\text{C}$ -NMR relaxation time. Pharmaceutical Sciences World 2010 Congress in Association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
  - 7) Forney, K., Yoshioka, S., Aso, Y., Pikal, M.: Effect of sugars on molecular dynamics of lyophilized protein formulations, as determined by  $^{13}\text{C}$  NMR relaxation times. Pharmaceutical Sciences World 2010 Congress in Association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
  - 8) Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Different polymer content dependence between the nucleation rate and the crystal growth rate in amorphous nifedipine solid dispersions with PVP or HPMC. Pharmaceutical Sciences World 2010 Congress in Association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
  - 9) 阿曾幸男、太田 鋼、宮崎玉樹、川西 徹： $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR および熱刺激電流測定による乳糖水和物粉砕品の結晶性の検討 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5)
  - 10) 田中拓海、服部喜之、米谷芳枝 アンジオテンシン II 昇圧下におけるリポプレックスの腫瘍内分布 日本薬学会 第 131 年会(2011.3)
  - 11) 加藤真子、服部喜之、米谷芳枝 コラゲナーゼ処理による静脈内投与したリポプレックスの腫瘍集積性及び遺伝子発現への影響 日本薬学会 第 131 年会(2011.3)
  - 12) 玉井理大、川野久美、米谷芳枝 Sunitinib 封入正電荷リポソームの調整と抗腫瘍効果の評価 日本薬学会 第 131 年会(2011.3)
  - 13) 山作晴香、服部喜之、米谷芳枝 がん遺伝子導入用負電荷ポリマー被覆リポプレックス製剤の開発 日本薬剤学会 第 26 年会(2011.5)
  - 14) 岩瀬由布子、米谷芳枝 イリノテカン封入オクトレオチド修飾ナノ粒子製剤による甲状腺腫瘍がん治療効果 日本薬剤学会 第 26 年会(2011.5)
  - 15) 山口美智子、内藤陽子、青枝大貴、石井健、白石貢一、横山昌幸、米谷芳枝 Rhodamine 標識 PEG 修飾リポソームによる ABC 現象誘導の解明第 27 回日本 DDS 学会学術集会(2011.6)
  - 16) 中村由梨、昆真生、眞田絵実、浅川真澄、小木曾真樹、清水敏美、米谷芳枝 イリノテカン封入オーガニックナノチューブを用いた非球形キャリアーの体内分布の評価 27 回日本 DDS 学会学術集会(2011.6)
  - 17) Haruka Yamasaku, Yoshiyuki Hattori, Yoshie Maitani Enhanced tumor transfection after systemic injection of lipoplex coated with anionic polymers 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society(2011.7)
  - 18) 服部喜之、加藤真子、久保愛美、米谷芳枝 コラゲナーゼ処理した担がんマウスにおけるリポプレックスの腫瘍集積性及び遺伝子発現 アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011(2011.9)
  - 19) 中村司、服部喜之、大野浩章、藤井信孝、米谷芳枝 新規正電荷コレステロール誘導体を用いたナノ粒子製剤の前立腺がんに対する遺伝子

導入効率の評価 アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2011(2011.9)

- 20) Y. Maitani Functional nanoparticles for cancer therapy 18th International Symposium on Microcapsulation(2011.9)
- 21) 若杉亜以, 浅川真澄, 小木曾真樹, 清水敏美, 米谷芳枝 オーガニックナノチューブを用いた新規ドラッグデリバリーシステムの構築 SORST シンポジウム(4) (2010. 1)
- 22) 服部喜之, 金本巨哲, 川野久美, 岩倉浩, 赤水尚史, 中尾一和, 米谷芳枝 副腎腫瘍自然発症遺伝子改変マウスの DNA マイクロアレイによる遺伝子解析 第 83 回日本内分泌学会 (2010.3)
- 23) 川野久美, 服部喜之, 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に対する抗癌剤微粒子製剤と分子標的薬の併用治療効果 第 83 回日本内分泌学会(2010.3)
- 24) 川野久美, 米谷芳枝 DCE-MRI を用いた TGF- $\beta$  阻害剤併用時の微粒子製剤の腫瘍移行性評価 日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 25) 泉澤友宏, 服部喜之, 戸潤一孔 米谷芳枝 プロテオグリカンを介したデカルギニン脂質/DNA 複合体の細胞内取り込み 日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 26) 岩瀬由布子, 米谷芳枝 オクトレオチド修飾リポソーム製剤の調製と in vitro 評価日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 27) 若杉亜以, 浅川真澄, 小木曾真樹, 清水敏美, 米谷芳枝 オーガニックナノチューブの薬物キャリアーへの応用日本薬学会 第 130 年会 (2010.3)
- 28) 尾上裕貴, 林京子, 李貞範, 米谷芳枝, 甲斐敬, 林利光 単純ヘルペスウイルス感染症治療におけるポリエチレンイミンの特性日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 29) 生形晴哉, 服部喜之, 米谷芳枝 アンジオテンシン II による昇圧下でのリポソーム製剤の腫瘍集積性の検討日本薬学会 第 130 年会 (2010.3)
- 30) 勢子祐貴, 服部喜之, 米谷芳枝 スニチニブ封入リポソーム製剤のラット副腎髄質褐色細胞腫担癌ヌードマウスに対する評価 日本薬学会 第 130 年会(2010.3)
- 31) 中野宏樹, 置田裕子, 石井佑太, 長岡康夫, 上里新一, 服部喜之, 米谷芳枝 新規遺伝子発現増強剤 DDTS-K-182 日本薬学会 第 130 年会 (2010.3)
- 32) Kanamoto, N., Takeuchi, Y., Hattori, Y., Yoshida, M., Kondo, E., Yamada, G., Fujii, T., Saijo, M., Nambu, T., Miura, M., Yasoda, A., Arai, H., Maitani, Y. and Nakao, K. Expression of folate receptor type  $\alpha$  gene in thyroid papillary carcinoma 第 14 回国際内分泌学会 (2010.3)
- 33) 中村太郎, 川野久美, 白石貢一, 横山昌幸, 米谷芳枝 腫瘍ターゲティング脂質微粒子 MRI 造影剤の調製と評価 第 5 回日本分子イメージング学会(2010.5)
- 34) 白石貢一, 川野久美, 米谷芳枝, 横山昌幸 高分子ミセル MRI 造影剤と ABC 現象の検証 第 5 回日本分子イメージング学会(2010.5)
- 35) 田中拓海, 阿曾幸男, 米谷芳枝 リポソームの表面水和状態と細胞内取り込み 日本薬剤学会 第 25 年会 (2010.5)
- 36) 田中拓海, 服部喜之, 米谷芳枝 アンジオテンシン II 昇圧下における正電荷リポソームの癌遺伝子送達 第 26 回日本 DDS 学会 (2010. 6)
- 37) 加藤真子, 服部喜之, 米谷芳枝 静脈内投与したリポプレックスの腫瘍集積性に及ぼすコラゲナーゼ処理の影響 第 26 回日本 DDS 学会 (2010. 6)
- 38) 坪田結香, 川野久美, 米谷芳枝 血中滞留性リポソームの腫瘍集積性に対する VEGF 受容体阻害剤の併用効果 第 26 回日本 DDS 学会 (2010. 6)
- 39) 荒金大介, 中澤裕太, 泉澤友宏, 宮下久徳, 石垣賢二, 林京子, 甲斐敬, 米谷芳枝 抗ウイルス剤ポリエチレンイミン(PEI)の弱毒化を目的

としたリポソーム及びキトサンの併用効果 第  
26回日本 DDS 学会 (2010. 6)

40) 白石貢一, 馬会利, 川野久美, 米谷芳枝, 横  
山昌幸 高分子ミセル MRI 造影剤の頻回投与に  
よる ABC 現象への影響と診断への有用性第 26  
回日本 DDS 学会 (2010. 6)

41) 白石貢一, 馬会利, 川野久美, 米谷芳枝, 横  
山昌幸 高分子ミセルキャリア内核の影響によ  
る ABC 現象の発現と回避性 第 26 回日本 DDS  
学会 (2010. 6)

42) 渡辺 和男, 金子 洵, 米谷 芳枝 葉酸修飾ポ  
リ-L-リシンコートリポソームの調製と細胞へ  
の取り込み評価 第 26 回日本 DDS 学会 (2010.  
6)

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 別添4

書籍							
著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yoshioka, S., Aso Y.	Molecular Mobility of Freeze-Dried Formulation as Determined by NMR Relaxation times, and Its Effects on Storage Stability.	Rey, L., May, J.C.	Freeze Drying/ Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products,	Informa Healthcare	London	2010	354-371
雑誌							
発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年		
Yoshie Maitania, Ayako Nakamura, Takumi Tanaka, Yukio Aso	Hydration of surfactant-modified and PEGylated cationic cholesterol-based liposomes and corresponding lipoplexes by monitoring a fluorescent probe and the dielectric relaxation time.	Int. J. Pharm.	427	372-378	2012		
Sumie Yoshioka, Kelly M. Forney, Yukio Aso, Michael J. Pikal	Effect of Sugars on the Molecular Motion of Freeze-dried Protein Formulations Reflected by NMR Relaxation Times.	<i>Pharm. Res.</i>	28	3237-3247	2011		
Tamaki Miyazaki, Yukio Aso and Toru Kawanishi	Feasibility of atomic force microscopy for determining crystal growth rates of nifedipine at the surface of	<i>J. Pharm. Sci.</i>	100	4413-4420	2011		

	amorphous solids with and without polymers.				
宮崎玉樹、阿曾幸男	熱分析による非晶質医薬品の結晶化の評価	熱測定	38	125-1 31	2011
阿曾幸男, 太田鋼, 宮崎玉樹, 川西 徹	医薬品添加剤の結晶化度測定法に関する研究	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	42	540-5 45	2011
Tamaki Miyazaki, Yukio Aso, Sumie Yoshioka and Toru Kawanishi	Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP.	<i>Int. J. Pharmaceutics</i>	407	111-11 8	2011
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.	<i>J. Pharm. Sci.</i>	99(2)	683- 700	2010
Y. Iwase, Y. Maitani	Dual functional octreotide-modified liposomal irinotecan leads to high therapeutic efficacy for medullary thyroid carcinoma xenografts.	<i>Cancer Sci.</i>	103 (2)	310-6	2012
Shiraishi K, Harada Y, Kawano K, Maitani Y, Hori K, Yanagihara K, Takigahira M, Yokoyama M.	Tumor Environment Changed by Combretastatin Derivative (Cderiv) Pretreatment That Leads to Effective Tumor Targeting, MRI Studies, and Antitumor Activity of Polymeric Micelle Carrier	<i>Pharm. Res. Pharm Res.</i>	29(1)	178-8 6	2012

	Systems.				
FT Fatema, Y. MAITANI, T. AKAIKE	mRNA delivery through fibronectin associated liposome-apatite particles: a new approach for enhanced mRNA transfection to mammalian cell,	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	35(1)	111-5	2012
Y. Hattori, Y. Nagaoka, M. Kubo, H. Yamasaku, Y. Ishii, H. Okita, H. Nakano, S. Uesato, Y. Maitani	Antitumor effect of liposomal histone deacetylase inhibitor-lipid conjugates in vitro,	<i>Chem. Pharm. Bull.</i>	59(11)	1386-1392	2011
A. Wakasugi, M. Asakawa, M. Kogiso, T. Shimizu, M. Sato, Y. Maitani	Organic nanotubes for drug loading and cellular delivery.	<i>Int J Pharm.</i>	413(1-2)	271-278	2011
Y. Iwase, Y. Maitani	Octreotide-targeted liposomes loaded with CPT-11 enhanced cytotoxicity for the treatment of medullary thyroid carcinoma in vitro.	<i>Molecular Pharmaceutics</i>	8(2)	330-337	2011
Y. Maitani	PEGylated lipidic systems with prolonged circulation longevity for drug delivery in cancer therapeutics,	<i>Journal of Drug Delivery Science and Technology</i>	21	27-34	2011
K. Kawano, Y. Maitani	Effects of polyethylene glycol spacer length and ligand density on folate receptor targeting of liposomal doxorubicin in	<i>J Drug Delivery</i>	160	967	2011