Solid-in-Oil(S/O)技術を利用した タンパク質の経皮デリバリーと経皮ワクチンへの応用

九州大学大学院 工学研究院 応用化学部門*

田原義朗*・後藤雅宏*

Transdermal protein delivery and immunization by a solid-in-oil nanodispersion technique

Transcutaneous vaccination is an attractive strategy that delivers antigen molecules topically into the skin to induce protective or therapeutic immune responses. In the last two decades, the skin has been regarded as a potential administration site for vaccines due to the abundant antigen presenting cells in the skin such as Langerhans cells and dermal dendritic cells, which are found in the epidermis or dermis. To create an efficient transcutaneous vaccine, the antigen needs to be penetrated across the stratum corneum, which is the outermost layer of the skin and possesses a high barrier function. To overcome this issue, various types of drug delivery systems have been proposed such as ultrasound, jet immunization and microneedles as physical methods, and penetration peptides, liposomes and nanoparticles as chemical methods. In this review, a solid-in-oil (S/O) nanodispersion, which is an oil-based drug carrier for proteins and peptides, and its application for transcutaneous protein delivery and vaccination are summarized. Along with comparing the S/O nanodispersion with the other oil-based drug carriers, the transdermal delivery of proteins such as insulin is introduced. Finally, basic immunological responses via transcutaneous administration with the S/O nanodispersion containing a model antigen, and researches on protect and therapeutic applications are summarized.

経皮ワクチンとは、皮膚から抗原を投与することで体内の抗原特異的な免疫を誘導し、感染の予防や疾病治療を行うことを目的とした医薬品である。経皮ワクチンの構築には、皮膚の高いバリア層を乗り越える DDS 技術が必要であり、20 年近くにわたる研究が行われてきた。本稿では、タンパク質やペプチドからなる抗原を油中にナノサイズで分散させる Solid-in-Oil(S/O)技術と、本手法を用いた経皮デリバリーや経皮ワクチンへの応用についてまとめた。最初に S/O 製剤の成り立ちと、他のエマルジョン製剤と比較したときの特徴について解説し、インスリンをはじめとしたタンパク質製剤の経皮デリバリーの研究について紹介する。続いて、現在までに行われてきた経皮ワクチンについて他の研究についても概観し、S/O 製剤を用いた経皮ワクチンのモデル抗原による基礎的検討、ならびに、実際の予防や治療効果について最新の研究を紹介する。

Yoshiro Tahara*, Masahiro Goto*

Keywords: Transdermal delivery, Transcutaneous vaccine, Solid-in-oil nanodispersion, Cancer vaccine, Pollinosis vaccine

1. はじめに

ナノテクノロジーの発展によって、多くの工学的技法が DDS 研究に応用されてきた。リポソームや高分子ミセル、ナノゲルなどがその代表例であるが、既存の DDS キャリアの研究領域とは異なる分野か

ら誕生したナノキャリアは、DDS の研究において新しい研究領域を拓くポテンシャルを有している。本稿では、本来酵素を有機溶媒中で使用するために開発された Solid-in-Oil(S/O)技術の DDS への展開について紹介し、経皮ワクチンへの応用における最新の成果について報告する。

* Department of Applied Chemistry,
Graduate School of Engineering, Kyushu University

2. Solid-in-Oil (S/O) 技術のはじまり

1990年代から2000年にかけて、有機溶媒中における酵素反応に関する研究のなかで、現在のS/O技術の原型となる凍結乾燥法を利用した界面活性剤と酵素の複合体の調製方法が開発された¹⁾。この方法は非共有結合的で、静電相互作用なども利用しない界面活性剤と酵素の複合法で、全量回収ができる点に大きなメリットがある。複合化されたそれぞれの酵素は、さまざまな有機溶媒中で高い活性を示すことが報告された。この当時、すでにSolid-in-Oilという言葉を用いたDDSに関する総説²⁾や、本手法を用いたポリ乳酸-グリコール酸のような高分子マイクロスフェアの調製法³⁾などは報告されていた。これらの研究と比較すると、ショ糖脂肪酸エステルのような低分子の疎水性界面活性剤を利用している点が特徴であり、酵素を含めた多くのタンパク質を有機溶媒中に安定にナノサイズで分散させることができる⁴⁾。本稿では、凍結乾燥法と、主にショ糖脂肪酸エステルを利用して調製したものをS/O製剤と呼び、基礎となったタンパク質の経皮デリバリー研究と、最新の経皮ワクチンへの応用展開について紹介する⁵⁾。

3. S/O 製剤の特徴

図1(A)にS/O製剤の概念図を示す。S/O製剤はタンパク質を水相に封入したWater-in-Oil(W/O)エマルションから水を除いたものであると理解することができ、タンパク質は疎水性界面活性剤に被覆された固体状態の複合体(solid)として油相に分散している。図1(B)にインスリンとミリスチン酸イソプロピル(isopropyl myristate, IPM: 経皮吸収促進効果をもつ油状基剤)で構成される物理混合物と、S/O製剤の写真を示す。親水性高分子であるインスリンはIPMに不溶であり沈殿を生じるが、S/O製剤化することで油中に均一に分散できる。動的光散乱法(DLS)によって測定したインスリン封入S/O製剤の粒子径は257 nmであり、S/O製剤はタンパク質を封入できるオイルベースのキャリアであることが明らかとなった⁶⁾。ここで表1に、DDS技術の観点からS/O製剤と他のエマルション製剤との比較を行った⁴⁾。W/O型のエマルションやマイクロエマルションと比較したS/O製剤の大きな特徴は、薬物濃度が可変であり、濃縮も可能であることである。他のW/O型のエマルション製剤では水相にタンパク質などの親水性薬物を封入することから、製剤全体として薬物の初濃度の低下は避けられない。一方で、S/O製剤は凍結乾燥によって界面活性剤と

図1 (A)S/O製剤の概念、(B)インスリンとIPMの物理混合物とS/O製剤⁶⁾

表1 S/O製剤とエマルション製剤との比較⁴⁾

	W/O エマルション	W/O マイクロエマルション	S/O 製剤
親水性薬物濃度	初濃度より低下	初濃度より低下	高濃度(濃縮も)可能
界面活性剤	可変 ^{*)}	高濃度(10 wt% 以上)	0.2~5 wt%
サイズ	1~50 μm	< 50 nm	50~300 nm
安定性	不安定~安定 ^{*)}	安定	安定

^{*)} W/O エマルションは、低い界面活性剤濃度でも調製可能であるが、安定性は低下する。

酵素の複合体を固体状態で保存できるため、加える油状基剤の量によって、製剤中の最終薬物濃度をコントロールすることができる。また多くの場合、必要な界面活性剤濃度も他の W/O 型のエマルション製剤よりも低くすることが可能である。さらに水相が存在しないことから、同一濃度の薬物と界面活性剤を用いた場合では、他の W/O 型の製剤では難しい、ナノメートル領域の非常に小さなサイズの粒子作成を実現することができる。このような特徴から S/O 製剤は、オイルベースの DDS において非常に高いポテンシャルを有した薬物キャリアであると考えられる。

4. タンパク質の経皮デリバリーへの応用

4-1. 経皮デリバリーの特徴と課題

経皮デリバリーは皮膚から薬を体内に送達する方法であり、外用剤をはじめとして古くから一般的に用いられている薬の投与方法である。近年では、経皮デリバリーによって皮膚局所だけではなく、全身性の効果をねらった製剤の開発が行われている。経皮デリバリーは他の薬の投与方法と比較すると、安全かつ簡便な方法であり、消化管や肝臓の通過を考慮する必要がないことから多くの薬において理想的な投与方法であると考えられている⁷⁾。しかしながら、一般的に薬物の経皮デリバリーの効率は悪く、現実的には多くの医薬品への展開はできていない。その最大の原因は、皮膚の高いバリア機能にあり、この分野における DDS 技術の発展が重要な鍵を握る。皮膚は、体表面側から表皮(約200 μm)、真皮(約2 mm)、皮下組織で構成されており、特に表皮最外層に存在する角層(約15 μm)は、水に不溶なケラチン層からなる高いバリア機能を有している。このた

め、親水性かつ高分子であるタンパク質の経皮デリバリーは、非常に困難であり⁸⁾、角層バリアを突破する技術が必要となる。

4-2. S/O製剤の利用

2008年より S/O 製剤の DDS 応用として、タンパク質の経皮デリバリーの研究がスタートした⁶⁾。S/O 製剤はタンパク質のような水にしか溶けない薬を油中にナノサイズで分散できる特徴をもつことから、前述の IPM などの経皮吸収促進剤として機能する油状基剤が使用できる。2008年の報告では、モデルタンパク質として FITC ラベル化インスリン(分子量約6 kDa)、緑色蛍光タンパク質(enhanced green fluorescent protein、EGFP : 分子量約27 kDa)、西洋ワサビペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase、HRP : 分子量約40 kDa)の S/O 製剤化を行い、すべてのタンパク質において *Yucatan micropig* のモデル皮膚において皮膚浸透性の向上が確認できた(図2(A)および(B))。このとき分子量が比較的低いインスリンは真皮まで、EGFP と HRP は表皮までの浸透が確認されている。また EGFP の蛍光や HRP の酵素活性は残存しており、モデルタンパク質ではあるが、活性をもった状態で経皮デリバリーが可能であることが確認された。さらに2012年の報告では、細胞膜透過性および経皮吸収促進を示すペプチドとして報告されていたオリゴアルギニンの添加効果について検討し、6 残基のアルギニン(R6)を用いることでインスリンの経皮透過に成功した(図2(C))⁹⁾。一般に、オリゴアルギニンは残基数が増えると細胞膜透過性が高くなることが知られているが、分子量と細胞毒性も増加するため皮膚浸透においては最適な長さが存在することが本結果より示唆された。

図2 (A) インスリンと(B)EGFP の皮膚浸透性⁶⁾、 (C) オリゴアルギニンの添加効果⁹⁾ * $p < 0.05$

5. 経皮ワクチンへの応用

5-1. 経皮ワクチンと DDS 技術

ワクチンは感染症に対する最も有効かつ経済的な方法であると認識されており、ライフサイエンスにおける重要な研究領域である。経皮ワクチンは、現在では主に注射剤によって投与されているワクチンを塗り薬や貼り薬によって皮膚から投与することを目指しており、非侵襲的で安全かつ簡便な手法であるといえる。特に、発展途上国で懸念される注射針の繰り返し使用の問題や、投与の際の医療従事者の確保の問題などがなく、非常時の大規模投与などの観点からも注目されている。

DDS技術を利用した経皮ワクチンでは、角層を越えた表皮内に存在するランゲルハンス細胞や、真皮内に存在する樹状細胞などに抗原をデリバリーすることが目標である。したがって粘着テープで物理的に角層を剥がすテープストリップ法による経皮ワクチンは、現実的には最も効果的な方法として用い

られており、臨床レベルの経皮ワクチンの報告¹⁰⁾や、分子量数百万の組換えウイルスであっても表皮内の免疫細胞へ送達することが可能であるという報告がある¹¹⁾。その他の高度な経皮吸収促進技術について、これまでの総説¹²⁾をもとに表2に参考文献をまとめた。タンパク質に限らない他の薬の経皮デリバリーと同様の技術が経皮ワクチンにおいても応用されており、主にデバイスを用いる物理的経皮吸収促進法として超音波法¹³⁾、エレクトロポレーション¹⁴⁾、Jet immunization¹⁵⁾、マイクロニードル¹⁶⁾など、化学的吸収促進法として、経皮吸収促進ペプチド¹⁷⁾、リポソーム¹⁸⁾、ナノ粒子¹⁹⁾、ハイドロゲルパッチ²⁰⁾、Layer-by-layer法²¹⁾、マイクロエマルジョン²²⁾などが報告されている。なかでもマイクロニードルの研究は最近大きく進展しており、臨床試験も始まっている。マイクロニードルとは数百マイクロメートルの長さの針であり、1998年に最初に経皮デリバリーが行われたマイクロニードルはシリコン加工したもの²³⁾であったが、その後、ポリ乳酸-グリコール酸

表2 経皮免疫における DDS 技術

物理的 経皮吸収 促進法	Ultrasound ¹³⁾ Electroporation ¹⁴⁾ Jet immunization ¹⁵⁾ Microneedles • Coated microneedles ^{16a~d)} • Hollow microneedles ^{16e~g)} • Dissolvable microneedles ^{16h~j)}
化学的 経皮吸収 促進法	Skin penetration peptide • Antennapedia homodomain ^{17a)} • Haptide ^{17b)} • LMWP ^{17c)} Liposomes (lipid vesicles) • Transfersome ^{18a~d)} • Niosome ^{18c,e,f)} • Ethosome ^{18g)} • Cationic liposome ^{18d,h,i)} • Vesosome ^{18j)} Nanoparticles • PLA nanoparticles ^{19a)} • Au nanoparticles ^{19b)} Hydrogel patch ²⁰⁾ Layer-by-layer films ²¹⁾ Microemulsion ²²⁾ S/O nanodispersion ²⁵⁾

などの生分解性ポリマーを用いたマイクロニードル²⁴⁾が開発されたことから、有望な物理的経皮吸収促進法として注目され、経皮ワクチンにおいてもインフルエンザワクチンや DNA ワクチンに関する論文がトップジャーナルに報告されている^{16h,i)}。わが国では中川らのグループによって、ヒアルロン酸から構成され、皮膚内で溶解するマイクロニードルが開発されており、安全性やインフルエンザ抗原に対する抗体産生などが人に対する臨床試験で実証されはじめて^{16j)}。抗原の投与量とマイクロニードル作成コストの削減、適切なガイドラインの整備などが今後の課題としてあげられているが、DDS技術を用いた経皮デリバリーにおいて最も実用化に近い技術の1つとして期待されている。

5-2. S/O 製剤による経皮ワクチン

化学的経皮吸収促進法の最後に、筆者らが研究を行ってきた S/O 製剤による経皮ワクチンについて紹介する。前述のように S/O 製剤はオイルベースのキャリアによってタンパク質の経皮デリバリーが可能であることがわかっており、経皮ワクチンも研

究当初からの重要なターゲットであった。

5-2-1. 免疫産生における基礎的検討

2010年に卵白アルブミン(ovalbumin、OVA)をモデル抗原として S/O 製剤による経皮ワクチンが報告された^{25a)}。投与は図3(A)のようにマウスの耳介部に S/O 製剤を封入したパッチを作る方法によって行われている。血中の抗体価を測定したところ、OVA の水溶液よりも高い抗体価が得られ、同等かそれ以上の抗体産生がモルモットやウサギにおいても確認された。その後、OVA をモデル抗原として経皮ワクチンでの免疫産生効果を上げるために、S/O 製剤のさまざまな改良が行われた。構成成分の最適化の観点から、ショ糖脂肪酸エステルの種類や濃度が検討された^{25b)}。図3(B)のようにショ糖ラウリン酸(炭素数12)の方がショ糖エルカ酸(炭素数22)よりも抗体産生が高く、その濃度は低い方がよいということが明らかとなった。これは S/O 製剤からの OVA の放出特性と関連しており(図3(C))、浸透メカニズムの観点から S/O 製剤の皮膚浸透では IPM によって角層バリアを越えた後のキャリアからの OVA 放出が重要であることが示唆された。経皮吸収促進の観点からは S/O 製剤を用いたインスリンの経皮デリバリーと同様にオリゴアルギニンの添加効果について検討された^{25c)}。インスリンで皮膚透過効果が確認された R6 について検討したところ、S/O 製剤と R6 を併用した場合、経皮ワクチンでも注射剤と同程度の抗体産生が得られることが確認された(図3(D))。また OVA と R6 を別々に S/O 製剤化した場合の抗体産生は低いことや、R6 によって皮膚内のランゲリン陽性細胞への取り込みが上昇することが明らかとなっている。また免疫活性化の観点から核酸アジュバントである CpG との併用も行われ、抗体産生の向上が確認されている^{25d)}。

5-2-2. 予防および治療効果の検討

前述のような基礎的評価によって、S/O 製剤の経皮ワクチンとしての可能性が見出された。そこで実際の予防および治療効果を確認するために担がんモデルと花粉症モデルによる検討が行われた。

図3 (A) マウスへの投与方法^{25a)}、界面活性剤の種類と濃度(OVA：界面活性剤の重量比)の(B)抗体産生への影響と(C)OVA放出特性への影響^{25b)}、(D)オリゴアルギニンの添加効果^{25c)} *p<0.05, **p<0.01

最初に E.G7がん細胞の OVA 恒常発現株を用いて、図4(A)のスケジュールで OVA 封入 S/O 製剤による予防効果が検討された。その結果、アジュバントを使用しない条件において、注射投与に匹敵するような腫瘍成長の抑制効果があることが明らかとなった^{25e)}。また B16 F10がん細胞を用いて、その MHC class I のエピトープである Trp-2 ペプチドを封入した S/O 製剤による予防効果の検討も行われており、腫瘍体積増加の抑制や転移の減少などが確認されている。さらに、花粉症モデルを用いた研究も行われており^{25f,g)}、モデル抗原にはスギ花粉における主要な7つの T 細胞エピトープの間を3残基のアルギニンリンカーで連結した7 crpR ペプチド(アミノ酸126残基、分子量約14.8 kDa)が使用された。図4(B)のように作成されたスギ花粉症モデルマウ

スに7 crpR 封入 S/O 製剤を耳介より経皮投与を行うと、アレルギー症状の指標である血中の IgE 抗体の総量は水溶液の経皮投与と同等であり、注射投与と比較して高い値であったが、スギ花粉抗原特異的な IgE 抗体価は、S/O 製剤の経皮投与が水溶液の経皮投与より低くなり、IgE 抗体の産生を抑制するワクチンとして注射投与と同程度の効果を示すことが示唆された。投与する抗原量が多い方が IgE 抗体産生の抑制効果が大きくなることが予想されたが、実際は抗原量が少ない方が効果が高い場合があり、注射投与においても同様であった。原因としては投与濃度の上昇によってペプチドの凝集が起こることや、S/O 製剤の粒子径が大きくなることが確認されており、系によって最適な抗原量が存在することがわかっている。

図4 (A) がんマウスによる予防効果の検討^{25e)}、(B) 花粉症モデルにおける検討(花粉症モデルマウスはスギ花粉抽出物と Alum の皮下投与を1週間隔で3回行い、その1週後にスギ花粉抽出物とヒスタミンの経鼻投与を6回行うことで作成した)^{25f)}
* $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$

6. おわりに

DDS研究における経皮ワクチンは、経皮デリバリーとワクチンデリバリーの2つの研究領域にまたがるデリバリーシステムの構築が必要である。筆者らのS/O製剤の研究においても、高い経皮吸収特性を示した製剤でも、経皮ワクチンとしての効果は上がらないという現象がみられることがある。今後はこれらの原因を解明するために所属リンパ節における抗原提示細胞へのデリバリー効率や、それ以降

のT細胞、B細胞への抗原情報の適切な受け渡しなど、ワクチンデリバリーとして詳細なメカニズム解明が行われる必要がある。現在までの研究でS/O製剤の経皮ワクチンとしての可能性は示されたと考えられ、他の投与方法においてもオイルベースの新しいDDSキャリアとして検討・発展することが期待される。

文献

- 1) Okazaki S., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 455-460 (1997)
- 2) Cleland J.L., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 71-84 (1997)
- 3) Morita T., *et al.*, *J. Control. Release*, **69**, 435-444 (2000)
- 4) Tahara Y., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **438**, 249-257 (2012)
- 5) Kitaoka M., *et al.*, *Biotechnol. J.*, **11**, 1375-1385 (2016)
- 6) Tahara Y., *et al.*, *J. Control. Release*, **131**, 14-18 (2008)
- 7) Zaffaroni A., *et al.*, *Technovation*, **1**, 135-146 (1981)
- 8) Mitragotri S., *et al.*, *J. Control. Release*, **86**, 69-92 (2003)
- 9) Tahara Y., *et al.*, *MedChemComm*, **3**, 1496-1499 (2012)
- 10) a) Seo N., *et al.*, *PNAS*, **4**, 371-376 (2000)
b) Frech S.A., *et al.*, *Lancet*, **371**, 2019-2025 (2008)
- 11) Skountzou I., *et al.*, *Vaccine*, **24**, 6110-6119 (2006)
- 12) a) Bal S.M., *et al.*, *J. Control. Release*, **148**, 266-282 (2010)
b) Li N., *et al.*, *Vaccine*, **29**, 6179-6190 (2011)
- 13) Tezel A., *et al.*, *Vaccine*, **23**, 3800-3807 (2005)
- 14) Zhao Y.L., *et al.*, *Vaccine*, **24**, 1282-1290 (2006)
- 15) a) Williams J., *et al.*, *Vaccine*, **18**, 1939-1943 (2000)
b) Roberts L.K., *et al.*, *Vaccine*, **23**, 4867-4878 (2005)
- 16) a) Mikszta J.A., *et al.*, *Nat. Med.*, **8**, 415-419 (2002)
b) Crichton M.L., *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 4562-4572 (2010)
c) Zhu Q., *et al.*, *PNAS*, **106**, 7968-7973 (2009)
d) Gill H.S., *et al.*, *J. Control. Release*, **117**, 227-237 (2007)
e) Damme P.V., *et al.*, *Vaccine*, **27**, 454-459 (2009)
f) Matriano J.A., *et al.*, *Pharm. Res.*, **19**, 63-70 (2002)
g) Ding Z., *et al.*, *J. Control. Release*, **136**, 71-78 (2009)
h) Sullivan S.P., *et al.*, *Nat. Med.*, **16**, 915-920 (2010)
i) DeMuth P.C. *et al.*, *Nat. Mater.*, **12**, 367-376 (2013)
j) Hirobe S., *et al.*, *Biomaterials*, **57**, 50-58 (2015)
- 17) a) Schutze-Redelmeier M.P.M., *et al.*, *Vaccine*, **22**, 1985-1991 (2004)
b) Frankenburg S., *et al.*, *Vaccine*, **25**, 4564-4570 (2007)
c) Huang Y. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **49**, 2724-2727 (2010)
- 18) a) Paul A., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, **25**, 3521-3524 (1995)
b) Gupta P.N., *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 295-301 (2005)
c) Gupta P.N., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **293**, 73-82 (2005)
d) Mahor S., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **340**, 13-19 (2007)
e) Jain S., *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**, 1177-1184 (2005)
f) Vyas S.P., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **296**, 80-86 (2005)
g) Mishra D., *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **33**, 424-433 (2008)
h) Wang J., *et al.*, *Exp. Dermatol.*, **16**, 724-729 (2007)
i) Cheng J.Y., *et al.*, *J. Control. Release*, **135**, 242-249 (2009)
j) Mishra V., *et al.*, *Vaccine*, **24**, 5559-5570 (2006)
- 19) a) Mattheolabakis G., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **385**, 187-193 (2010)
b) Huang Y., *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 9086-9091 (2010)
- 20) a) Ishii Y., *et al.*, *J. Control. Release*, **131**, 113-120 (2008)
b) Matsuo K., *et al.*, *J. Control. Release*, **149**, 15-20 (2011)
- 21) Su X., *et al.*, *ACS Nano*, **3**, 3719-3729 (2009)
- 22) a) Cui Z., *et al.*, *Pharm. Res.*, **20**, 16-23 (2003)
b) Cui Z., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **317**, 187-191 (2006)
- 23) Henry S., *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922-925 (1998)
- 24) McAllister D.V., *et al.*, *PNAS*, **100**, 13755-13760 (2003)
- 25) a) Tahara Y., *et al.*, *Chem. Commun.*, **46**, 9200-9202 (2010)
b) Kitaoka M., *et al.*, *MedChemComm*, **5**, 20-24 (2014)
c) Kitaoka M., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **458**, 334-339 (2013)
d) Kitaoka M., *et al.*, *Pharm. Res.*, **32**, 1486-1492 (2015)
e) Hirakawa Y., *et al.*, *MedChemComm*, **6**, 1387-1392 (2015)
f) Kitaoka M., *et al.*, *AAPS PharmSciTech*, **16**, 1418-1424 (2015)
g) Kitaoka M., *et al.*, *Bioeng. Transl. Med.*, **2**, 102-108 (2017)