

— 総説 —

ペプチドの経粘膜投与を目指した生分解性微粒子製剤の設計

山本 浩 充

要約：本総説ではペプチドの経粘膜投与 DDS 製剤の最近の動向を概説するとともに、我々が開発した微粒子製剤について紹介する。生分解性微粒子として、リン脂質から成るリポソーム、ポリ乳酸グリコール酸等の高分子から成るナノスフェアを取り上げた。これらの微粒子キャリアの表面を粘膜付着性高分子で修飾することで粘膜付着性を賦与し、吸収部位滞留性を向上させた。これにインスリンやカルシトニンを封入した経口投与製剤及び経肺投与製剤を開発した。キトサンで修飾した本製剤を、ラットに経口投与したところ、その粘膜付着性により溶液投与群、未修飾粒子投与群に比べ有意に薬理効果が持続した。また、ナノスフェアをネブライザーで噴霧しモルモットに経肺投与した結果、ナノスフェアが肺深部に沈着することにより、溶液投与群に比べ薬理効果が有意に持続した。これらの研究成果により、これまで困難とされてきたペプチドの経粘膜投与が可能であることを示した。

索引用語：粘膜付着性製剤、リポソーム、ナノスフェア、キトサン、ペプチド、エマルジョン溶媒拡散法、経肺投与製剤、ネブライザー

Design of Biodegradable Microparticulate Dosage Forms for Mucosal Peptide Delivery

Hiromitsu Yamamoto

Abstract: In this review, the recent topics of mucosal peptide delivery systems are overviewed. Furthermore, biodegradable microparticulate dosage forms developed by us are introduced. Phospholipid liposomes and nanospheres of biodegradable polymer were designed. Mucoadhesive microparticulate dosage forms were prepared by the surface modification of these drug carriers with a mucoadhesive polymer to prolong their residence time at the absorption site. Oral and pulmonary delivery systems with insulin or a calcitonin loaded microparticulate system were devised. Oral administration of peptide encapsulated microparticulate systems modified with chitosan to a rat significantly prolonged the pharmacological effects due to their mucoadhesive properties when compared with drug solution and non-modified microparticulate systems. After pulmonary administration of aerosolized nanosphere with a nebulizer to a guinea pig, the biological effects were more prolonged than with a drug solution due to the deep and homogenous deposition of nanospheres into the lung. These findings suggested the possibilities of mucosal delivery of peptide which is poorly absorbed via mucosa, by using biodegradable microparticulate dosage forms developed by us.

Keyphrases: mucoadhesive dosageform, liposome, nanosphere, chitosan, peptide, emulsion solvent diffusion method, pulmonaryly delivery, nebulizer

1. 緒 言

薬物を必要なとき、必要な場所に、必要とされる量を送達する、いわゆる薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム、DDS）の概念が提唱されて以来、この概念に基づいた様々な製剤が研究・開発されている。特に、近年では新規な薬物の開発が難しく、莫大な資金と時間が必要になっているため、既存の薬物に DDS を適用することにより、新規化合物の開発に匹敵する価値が見いだされるよ

うになってきている。また、バイオテクノロジーの発展に伴って、ペプチドやタンパク等が大量に生産され、医薬品として供されるようになってきた。しかし、これらの生理活性物質の多くは、微量で高活性を有し、また生体内半減期が短いため、製品化には高度な製剤学的工夫が要求される¹⁻³⁾。さらに、これらの多くは高分子であるため膜透過性が低く、消化酵素等によって分解されやすいため経口投与時のバイオアベイラビリティが低い。このため、生理活

性物質の多くは注射による頻回投与がなされている。注射は痛みを伴い、通院が必要となるケースが多いため、これら医薬品を非注射で投与できれば、痛みを伴わずまた、自己投与が可能となるため、患者のコンプライアンスの改善や生活の質向上につながると期待される。

以下、経粘膜投与を目的としたペプチドの DDS 製剤開発について最近の動向を紹介し、次に我々が開発した新規製剤について紹介したい。

2. ペプチド DDS 製剤

はじめに、ペプチドに関連した DDS 製剤について薬物の担体及び投与経路の観点から分類し、概説する。

2.1. 薬物担体 (薬物キャリア)

DDS を開発する目的として、製剤からの薬物放出速度のコントロール⁴⁻⁶⁾、新しい投与経路⁷⁻¹²⁾や吸収障壁の克服¹³⁾、標的臓器へのターゲティング¹⁴⁻¹⁶⁾が挙げられる。このような DDS 製剤を開発する場合、錠剤に代表されるシングルユニット製剤では、All or Nothing という言葉で形容されるように消化管内移動速度のばらつきにより、薬効の出現、持続時間が大きく異なってしまう^{17,18)} ため、顆粒剤のような複数の粒子から構成されるマルチプルユニット製剤が、経粘膜用 DDS 薬物担体として有用であると考えられる。

このようなマルチプルユニット型の放出制御デバイスを構築する手段として、ミクロンサイズあるいはサブミクロンサイズの微粒子に薬物を封入する方法が、薬物の吸収改善、薬効の持続化に有用であり注目されている¹⁹⁻²¹⁾。

以下には微粒子製剤の代表例としてリポソーム及びナノスフェアについて紹介する。

リポソーム製剤

リポソームは、細胞膜を構成しているリン脂質二分子膜からなる小胞で、小胞内部に水溶性薬物を、脂質二分子膜内部に疎水性薬物を封入できる。また粒子表面の修飾が比較的容易であることから、種々の機能を賦与しやすい。この性質を利用して表面を PEG 等で修飾し、静脈投与後の薬物の血中滞留性を持続させる、いわゆるステルスリポソームの研究²²⁻²⁴⁾や、細胞を認識する抗原をリポソーム表面に修飾してターゲティングする製剤の研究^{25,26)}などが行われている。さらにリン脂質は毒性が低く代謝可能なため、生体適合性に優れている^{27,28)}。反面、大量生産性が悪い、滅菌時や長期保存時における粒子の安定性が低い等の問題点も指摘されている^{29,30)}。

高分子微粒子製剤 (マイクロスフェア、ナノスフェア)

高分子微粒子製剤に関しては、乳酸の重合体(PLA)や乳酸とグリコール酸の共重合体(PLGA)、ポリイソブチルシ

アノアクリレート等の生体内で分解され毒性の低い基剤として用いた、マイクロスフェア、ナノスフェアに関する研究がなされている。皮下注射剤ではあるが、黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニストを乳酸・グリコール酸共重合体から成るマイクロスフェア内に封入し、1ヶ月に一度の投与で済むような製剤が上市されている^{31,32)}。このような高分子微粒子製剤において特にナノメートルサイズの粒子は、粒子自身が消化管で取り込まれるという報告³³⁻³⁵⁾もなされ、経粘膜投与用の薬物キャリアとして注目を集めている。我々は球形晶析法の一つであるエマルション溶媒拡散法により高分子微粒子製剤の粒子設計を行っており、これまでも種々のマイクロスフェア^{36,37)}や胃内浮遊性のマイクロバルーン^{38,39)}の開発に成功している。特に PLGA を基材としたナノスフェアの開発に成功して以来、PLGA ナノスフェアの経粘膜投与に関して種々検討を加えている。

これらリポソームやナノスフェア以外にもリピッドナノスフェア^{40,41)}や高分子ミセル⁴²⁾など様々な薬物担体の研究が行われている。

2.2. 投与経路

経粘膜投与と言うことでまず挙げられるのが消化管であろう。その他にも鼻粘膜、口腔粘膜、気管支粘膜などが挙げられる。特に近年では肺が注目を集めている。

経口投与製剤 (粘膜付着性製剤)

患者の服用性等の点から、現在最も汎用されている製剤は経口投与製剤である。経口投与における生物学的利用能の改善、薬効を持続させるための製剤学的なアプローチの一つとして、消化管の移動速度を考慮した製剤設計法がある。このような製剤の代表例として、製剤の比重を軽くすることで胃液中に浮遊させる試みがある^{38,39,43,44)}。胃内浮遊製剤の代表例として、ジアゼパム徐放カプセルに応用された Hydrodynamically Balanced System (HBS)⁴³⁾や当研究室において開発されたマイクロバルーン^{41,42)}等が挙げられる。これらの方法の他に、生体膜との粘性性に優れた物質を添加剤として用いることで、製剤を消化管粘膜に付着させ、消化管内での滞留性の向上を図る、粘膜付着性製剤が注目を集めている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。粘膜付着性製剤は、付着部位において薬物の濃度勾配が形成されるので、消化管内移動時間の延長だけでなく、薬物吸収量の増加が期待できる。Fig. 1には粘膜付着性製剤の概念図を示す。

消化管粘膜と製剤との間に働く相互作用としては、静電的相互作用、水素結合、疎水結合といった非共有結合的相互作用、粘膜成分とポリマーとの絡み合いによる物理的な相互作用が考えられる。また、粘膜付着性物質としてはキトサン⁴⁸⁻⁵⁰⁾や細胞凝集因子であるレクチン^{33,51)}、ポリアクリル酸^{45,49,52-54)}等が報告されている。

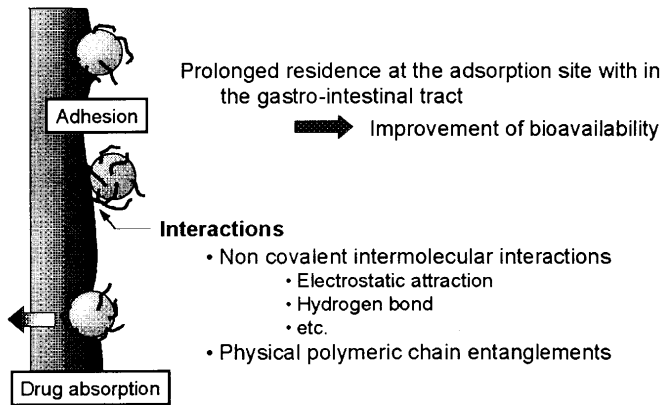


Fig. 1 Schematic image of mucoadhesive drug delivery system

粘膜付着性製剤以外のペプチドの経口投与製剤として直腸で薬物を放出するよう設計された製剤等多岐にわたるが今回それらの詳細については割愛する。

経肺投与製剤

市販されている経肺投与製剤のほとんどが喘息治療薬である。肺は消化管の 22~52%に相当する広い吸収面積を有し、脈管系が発達しているため、物質の粘膜透過が比較的容易である。また、分子量 1 万以上の物質が通過するという報告もなされており、ペプチドの投与経路として近年特に注目を集めている。

経肺投与製剤の投与方法は、加圧式定量噴霧器(MDI)による吸入、粉末を直接吸入させる方法^{8,55,56}、ネブライザー^{48,49}を用いる方法の 3 種類に大別される。このうち、現在の医療現場においては MDI が携帯性や手軽さといった点から最も汎用されている。しかし、MDI は装置からの薬剤放出のタイミングを吸気運動に同調させることが難しいため、投与方法が修得できていない治療初期において効果が得られない例も多く見られる。さらに、MDI の多くは噴射剤としてフロンガスを使用している。フロンガスには、オゾン層の破壊が指摘され、モントリオール議定書により使用禁止の決定がなされている。このため、これに代わる投与方法として、粉末吸入製剤やネブライザーを用いた湿式霧化による経肺投与製剤の開発が急務とされ、精力的に研究が行われている。

粉末吸入製剤では吸気により発生する気流によって粉末を分散・エアロゾル化させて吸入するので、噴霧と吸入を同調させ易い。また、装置も軽量で持ち運びやすいものが多い。しかし、粉体を微粒子状態で空气中に分散させるのは難しく、肺深部にまで薬剤を到達させるためには高度な粒子設計が要求される。一方、ネブライザーを用いた湿式霧化による経肺投与では、投与に長時間(約 5 分)を要するが吸入と呼吸の同調の難しさがなく、微細なミストを発生させるため、肺深部まで薬物を送達させることが可能である。ペプチドに関しては、これまでもインスリンやカ

ルシトニン等を用いた粉末吸入製剤あるいは湿式吸入製剤に関する研究⁶¹⁻⁶³が行われているが、高分子微粒子製剤を用いた経肺投与に関する研究はほとんどなされていないのが現状である。

3. ペプチドの経粘膜投与を目的とした生分解性微粒子製剤の設計

我々はペプチドの経粘膜投与を可能とする製剤の開発を企図し、生体適合性、生体内分解性の素材を用いた微粒子製剤を粒子設計した。すなわち生体膜成分であるリン脂質から成る閉鎖小胞に薬物を封入したリポソーム、および生体内分解性のポリマー内に薬物を内封したサブミクロンサイズの微粒子薬物担体(ナノスフェア)を調製し、経粘膜投与に適した製剤として粒子設計することを目的とした。以下に、我々の研究において得られた知見の一部を紹介したい。

3.1. 微粒子製剤の調製

高分子修飾リポソームの調製とその物性

リポソームの調製方法としては、薄膜水和法、逆送蒸発法、エーテル注入法などがある。我々は調製が簡単な薄膜水和法でリポソームを作成した。この方法は、有機溶媒にリン脂質(ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC, 中性)とジセチルホスフェート(DCP, アニオン性))を溶解し、ナス型フラスコ中で溶媒を減圧留去するとフラスコ壁に脂質の膜ができる。この中に薬物溶液を入れ加温振倒する事により膜が水和し、脂質の小胞(リポソーム)が形成される。得られたリポソームを、Table 1 に示す構造を有する高分子(末端アルキル修飾ポリビニルアルコール(PVA-R), コレステロール修飾ポリアクリル酸(PAA-R), キトサン)溶液と混合することによって、リポソーム表面の修飾を試みた。PVA-R 及び PAA-R は分子内に疎水性基を有し、リポソームと混合した場合、疎水性基をリポソームの脂質二分子膜に貫入させて表面に吸着する。また、キトサンはアミノ基により正に荷電しており、負に荷電している DCP とイオンコンプレックスを形成してリポソーム表面に吸着すると考えられる。

得られた高分子修飾リポソームの粒子径は高分子の種類によらず約 5 μm であった。また、リポソーム粒子表面のすべり面における電荷、即ちゼータ電位を測定したところ、高分子にて修飾したリポソームではゼータ電位が未修飾リポソームに比して変化し、高分子によってリポソーム

Table 1 Properties of polymers used for liposome coating

Polymer	Structure	Note
Chitosan		Degree of deacetylation = 85 % Molecular weight = ca. 150,000
PVA-R	$C_{16}H_{33}-S-[CH_2-CH(OH)]_n-H$	Degree of polymerization = 480
PAA-R	$H-[CH_2-CH(COOH)]_n-[CH_2-CH(CO-O-Chol)]_m-H$	Molecular weight of PAA = 250,000

表面が修飾されていることが確認できた。この高分子修飾したリポソームを粘膜付着性実験に供した。

ナノスフェアの調製とその物性

ナノスフェアは、新規に二種類のエマルジョン溶媒拡散法（水中、油中エマルジョン溶媒拡散法）および油中相分離法を開発して調製した。

水中エマルジョン溶媒拡散法(WESD)

ポリマー及び薬物を有機溶媒（アセトン・エタノール混液）に溶解し、これをポリビニルアルコール(PVA)水溶液中に攪拌下滴下する。有機溶媒の液滴は一時的にエマルジョン滴を形成するが、溶媒が PVA 水溶液中に急速に拡散することにより液滴界面が大きく乱れることにより、自己乳化滴にサブミクロンサイズに微細化する（マランゴニ効果）。さらに有機溶媒の拡散が進行するとポリマーの溶解度の低下に伴って液滴サイズが保持されたままポリマーが沈積し、ナノメートルサイズの粒子(Fig. 2)が得られる。

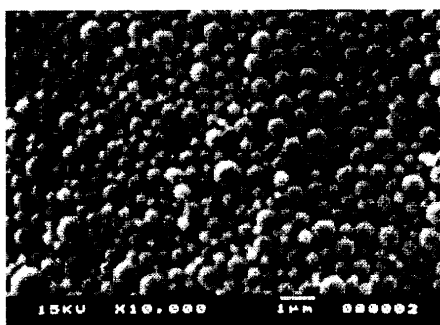


Fig. 2 The scanning electron microphotograph of PLGA nanospheres prepared by the emulsion solvent diffusion method in water

油中エマルジョン溶媒拡散法(OESD)

ポリマー、薬物および界面活性剤をアセトン・エタノール混液に溶解し、これを中鎖脂肪酸トリグリセリド(MCT)中に攪拌下滴下する。OESDでは、WESDで見られるような急速な溶媒の拡散が生じないため自己乳化が起こらず、さらにMCTの粘度が水に比べ高いため、ポリマー-薬物溶液中に添加した界面活性剤と攪拌力によってエマルジョン滴が微細化され、その後の溶媒留去によりポリマーと薬物が沈積し、ナノスフェアが得られる。

油中相分離法(PS)

PLGA・ジクロロメタン溶液に薬物水溶液を加え、高速ホモジナイザーにより乳化し、サブミクロンサイズの液滴から成る w/o 型エマルジョンを形成させる。この系内にMCTを攪拌下滴下するとジクロロメタンがMCT中に移行し、ポリマーのコアセルベーションが起きる。このときコアセルベートは界面エネルギー的に高い水滴表面を覆

うように生じて固化するので、ナノスフェアが得られる。

ナノスフェアの物性

得られたナノスフェアの粒子径は WESD ナノスフェアが約 250nm、OESD ナノスフェアが約 700nm、PS ナノスフェアが約 800nm であった。また、得られたナノスフェア懸濁液を凍結乾燥して得た粉末は、水中に容易に再分散でき元のナノスフェア懸濁液を再構築できた。これは、調製に用いた PVA がナノスフェア表面に残存し、粒子の濡れ性を高めているためだと考えられる。

モデルペプチドとして分子量 3363.82 のカルシトニン及び、分子量 363.4 の甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)を用い、ナノスフェアへの薬物の封入特性を調べた(Table 2)。

Table 2 Effects of preparation method on nanosphere recovery, drug content and drug recovery

	WSD		OESD		PS	
	TRH	Calcitonin	TRH	Calcitonin	TRH	Calcitonin
Nanosphere recovery (%)	85.7	92.6	74.7	77.7	54.5	66.9
Drug content (%)	0.0594	0.208	1.99	0.567	0.663	0.0303
Drug recovery (%)	1.07	19.5	31.2	44.5	7.59	2.05

WSD : emulsion solvent diffusion method in water
OESD : emulsion solvent diffusion method in oil
PS : phase separation method

薬物封入率は、調製法、薬物の種類によって異なる。油中エマルジョン溶媒拡散法で調製したナノスフェアでは、油への薬物の移行量が少なく、ポリマーと薬物が同時に沈積するため、薬物の種類によらず最も高い薬物封入率を示した。これに対し、油中相分離法では外相に油類を用いているにも関わらず、カルシトニンをほとんど封入することができなかった。これは、カルシトニンと PLGA との間に相互作用が働かないため、薬物のエマルジョン滴が効率よく PLGA のコアセルベート滴に覆われず、洗浄工程で薬物が溶出したため封入率が低くなったと考えられる。これに対し PLGA と相互作用する TRH では封入率が高かった。このような PLGA と薬物との相互作用は、PLGA のガラス転移点の変化から知ることができる⁶⁴⁾。データには示さないが TRH ではガラス転移点が移動したのに対しカルシトニンでは変化は認められ無いことを確認している。この様にナノスフェアへの薬物の封入は薬物自身の物性だけでなく PLGA を含めた物性を良く理解したうえで調製法を選択する必要がある。

日本薬局方第 2 液中における製剤からの薬物溶出挙動は、WESD、OESD ナノスフェアでは Higuchi 式で直線回帰でき、マトリックス型の薬物封入構造となっていることが推察される(Fig. 3-(b))。また PS ナノスフェアでは初期の溶出の後、溶出の休止期があり、再度溶出が開始する三相性の溶出挙動になった。溶出試験および調製機構より PS ナノスフェアへの薬物封入形態はリザーバー型になっていると推察される(Fig. 3-(a))。

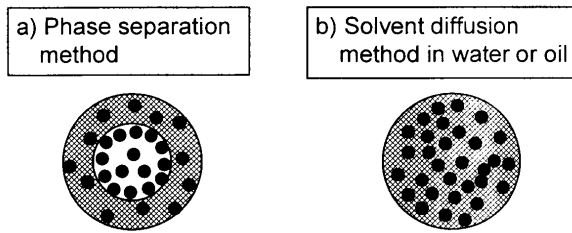


Fig. 3 Structure of nanospheres proposed based on their preparation mechanisms and drug release behaviors

●: drug, meshed area : polymer matrix

ナノスフェア表面の粘膜付着性高分子（アルギン酸ナトリウム(NaAlg), ポリアクリル酸(PAA), キトサン) による修飾もリポソームと同様に、ナノスフェア懸濁液とこれら高分子溶液を混合することにより行い、ゼータ電位の測定より修飾されていることが確認できた。

3.2. 粘膜付着性製剤の評価

調製した高分子修飾微粒子薬物キャリアの粘膜付着特性について評価した。粘膜付着性製剤に関する初期の研究では、in vitro において粘膜成分であるムチンとポリマーとの相互作用力を粘度変化による評価や⁵⁰⁾、小腸に膨潤させたポリマーを付着させた後それを脱着させるのに要する力による評価⁶⁵⁾、摘出小腸に付着したマイクロスフェアの数を計数する等の研究が行なわれてきた。また in vivo での研究では、ポリカーボフィルを錠剤とともに投与することによって錠剤の消化管移動時間を延長させる試み⁴⁶⁾や、実際に製剤を投与し血中濃度より評価するという検討がなされてきた。⁶⁶⁾。しかしながら、リポソームやナノスフェアのような目視による計数が不可能な微粒子担体の粘膜付着性評価方法に関する系統的な試みはほとんどなされていなかった。そこで、微粒子製剤の粘膜付着性を評価するに当たり、その評価法の確立も併せて行った。

高分子修飾リポソームの in vitro 粘膜付着性評価

リポソームはマイクロサイズであるため目視による計数はできないが、コールターカウンターによる計数が可能である。そこで、計数法に基づいた付着性評価実験を確立した。ラットより摘出した小腸にリポソーム懸濁液を内封し、インキュベート後取り出した懸濁液中のリポソーム粒子数をコールターカウンターにより計数した。インキュベート前後の粒子数変化より粘膜付着率を算出した。

ポリマーで表面修飾したリポソームはいずれも、未修飾のリポソームに比べ消化管粘膜に対する付着率が増加した。特にキトサンでコーティングしたリポソームは付着率が 46%であり、今回用いたポリマーの中で最も高い付

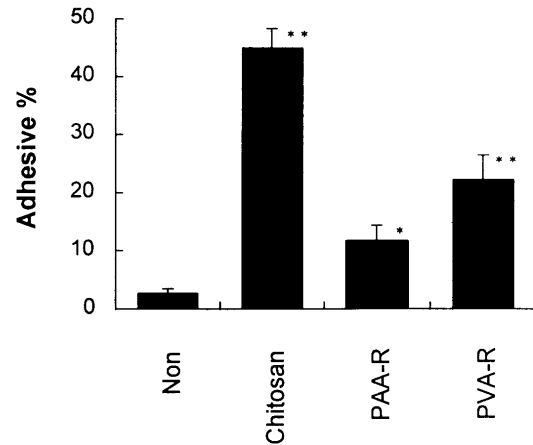


Fig. 4 Adhesive % of liposomes coated with various polymers to the rat intestine

Lipid composition ; DPPC:DCP = 8:2

Dispersion medium; phosphate buffer solution (pH 7.4)

These results are expressed as mean ± S.D. Significantly different from the value for non-coated liposomes at $p < 0.01$ (**) and $p < 0.5$ (*)

着率を示した。これに対し、PVA-R、PAA-R で修飾したリポソームは、10 から 20%程度の付着率であった(Fig. 4)。これらのポリマーによる付着性の違いは、ポリマーの官能基、修飾構造に起因していると考えられる。すなわち、アミノ基を有するキトサンでは、負に帯電している粘膜成分との間に水素結合やイオン結合等の非共有結合が生じ、付着力がより強く働く。これに対し、PVA-R や PAA-R では静電的な相互作用が働かないため、キトサンに比べ付着率が低下したと考えられる。さらに、キトサンは負に帯電しているリポソーム表面上の DCP とイオンコンプレックスを形成することで表面修飾しているため、修飾率が中性の PVA-R や負に帯電している PAA-R に比べ修飾量が多いことが考えられる。

次に、粘膜付着性の高かったキトサン修飾リポソームに着目し、キトサン修飾量と粘膜付着率との関係について

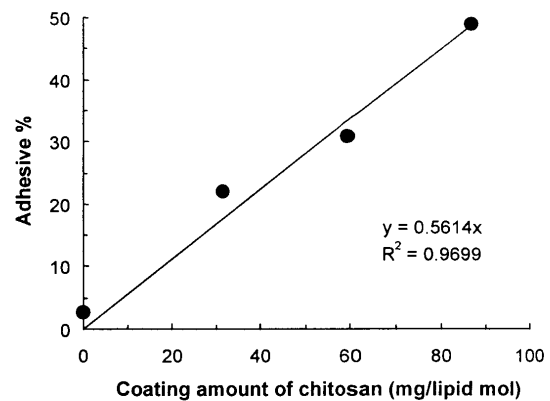


Fig. 5 Relationship between the coating amount of chitosan on liposomal surface and adhesive percentage to isolated rat intestine

も評価した(Fig. 5)。キトサン溶液の濃度を増加させることにより、リポソーム粒子を覆うキトサン量が増加し、それに伴ってキトサン修飾リポソームの粘膜付着率も増加した。さらに、粘膜付着率と表面修飾キトサン量との関係には、直線関係が認められた。これは、リポソーム表面に形成されたポリマー層により粘膜付着が起これ、リポソーム粒子表面を修飾するキトサン分子数が増加することで、個々の粒子と粘膜成分との相互作用力が増加したためと考えられる。

高分子修飾ナノスフェアの in vitro 粘膜付着性評価

さらに微細なナノサイズ領域の粒子では、マイクロサイズのリポソームのようにコールターカウンターによる計数はできない。そこで、PLGA ナノスフェアを蛍光標識し、蛍光光度測定により摘出小腸に付着した粒子量を定量する評価方法を確立した。すなわち、ナノスフェア懸濁液中に、ラット摘出反転腸管を浸しインキュベートした後、ラット反転腸管よりナノスフェアを抽出し定量した。

キトサン修飾 PLGA ナノスフェアは、リポソームの粘膜付着性実験結果と同様に、いずれの部位においてもコントロールあるいは他の粘膜付着性ポリマーで修飾したナノスフェアと比較して高い粘膜付着率を示した(Fig. 6)。これは、先にも述べたようにキトサンがアミノ基を有しており、負に帯電している粘膜成分との間に強い静電的相互作用が生じたこと、さらに粘膜成分との絡み合いによる物理的相互作用が生じたためと思われる。一方、負に帯電している PAA、NaAlg 修飾ナノスフェアの粘膜付着率は、コントロールと比較していずれの部位においても粘膜付着率の向上は認められなかった。

以上、キトサンで表面修飾した薬物キャリアはいずれも高い粘膜付着性を有し、キトサンが粘膜付着性賦与に有用であることが明らかとなった。

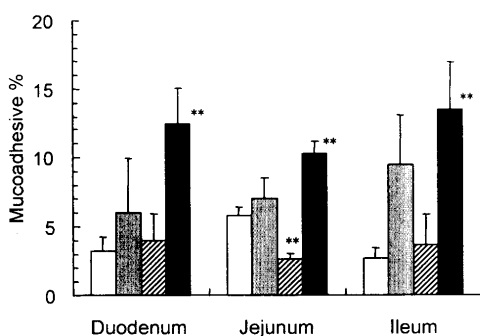


Fig. 6 Effect of the type of coating polymer on mucoadhesive percentage of PLGA nanospheres

□: Control (PVA), ▨: PAA, ▩: NaAlg, ■: Chitosan
Medium: saline

These results are expressed as mean \pm S.D. of three experiments.
Significantly different from the value for control at $p < 0.01$ (**).

高分子修飾微粒子製剤の in vivo 粘膜付着性評価

in vitro において粘膜付着性の高かったキトサン修飾リポソーム、ナノスフェアにペプチドを封入し、薬理効果の面から粘膜付着性について評価した。

キトサン修飾リポソームの in vivo 粘膜付着性評価

モデルペプチドとしてインスリンを封入したキトサン修飾リポソームを調製し、Wistar 系雄性ラットにゾンデ針を用いて胃内投与し、その後の血中グルコース濃度推移を調べた(Fig. 7)。

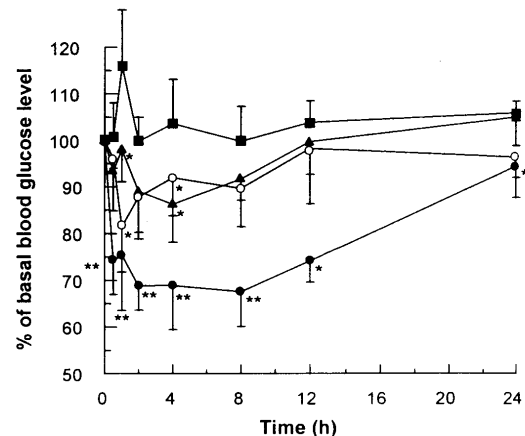


Fig. 7 Change in serum glucose level (%) after oral administration of insulin (24IU/rat)
●: Chitosan-coated liposome, ○: Non-coated liposome,
▲: Insulin solution, ■: Control
Each value represents the mean SE of four or five rats; * : $p < 0.05$, ** : $P < 0.01$.
Lipid composition : DPPC:DCP=8:2
Polymer concentration : 0.75%

対照である生理食塩液投与群では、ほとんど血中グルコース濃度の変化は認められなかった。インスリン溶液及び未修飾リポソーム投与群では、対照群と比べそれぞれ投与1時間後及び4時間後に有意な血中グルコース低下作用が認められた。しかし、いずれも8時間後には元の血中グルコース濃度に戻った。これに対し、キトサン修飾リポソーム投与群では、投与30分後から血中グルコース濃度が有意に低下し、8時間後で1%、12時間後で5%の危険率で有意な差が認められた。未修飾のリポソームと比較しても30分から12時間にわたり有意な差が認められた。この結果は、リポソームをキトサンで修飾することにより、粘膜付着機能が賦与され、消化管にリポソームが付着し消化管移動速度が遅延したためと考えられる。

キトサン修飾ナノスフェアの in vivo 粘膜付着性評価

モデルペプチドとして骨粗鬆症治療薬であるカルシトニンを封入したナノスフェアを絶食下のラットに胃内投与し、血中カルシウム濃度推移を測定した。(Fig. 8)

カルシトニン溶液投与群では、投与後急速に血中カルシウム濃度は減少し、投与開始1時間後に最小血中カルシウム濃度値を示した。しかし、投与2時間後には初期の血

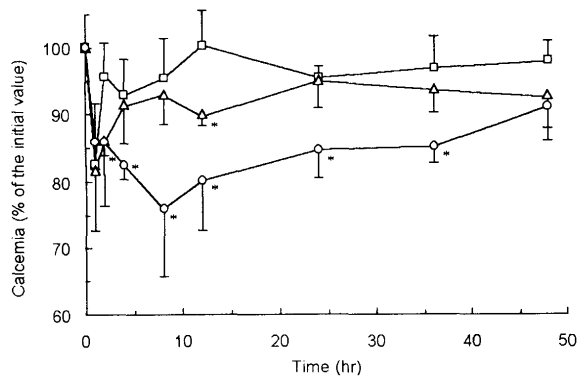


Fig. 8 Profiles of calcemia (percentage of the initial value) after intragastric administration
 □: Calcitonin solution, △: Non-coated nanospheres,
 ○: Chitosan-coated nanospheres
 Dose : 500 IU/kg
 These results are expressed as mean ± S.D. of three experiments.
 Significantly different from the value for calcitonin solution at $p < 0.05$ (*).

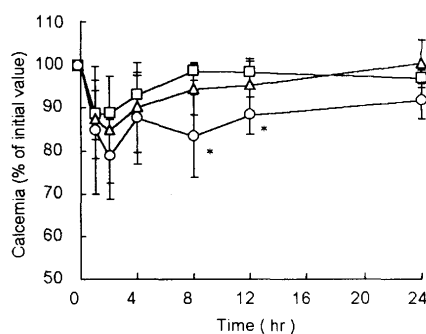


Fig. 9 Effect of feed on calcemia after intragastric administration of calcitonin loaded PLGA nanospheres
 □: Calcitonin solution, △: Non coated nanospheres,
 ○: Chitosan-coated nanospheres
 Dose : 500 IU/kg
 These results are expressed as mean ± S.D. of three experiments.
 Significantly different from the value for calcitonin solution at $p < 0.05$ (*).

中カルシウム濃度に戻った。このことから、カルシトニンは一部インタクトな形で消化管粘膜から生体内へ吸収されるが、生体内での安定性が低いため、一過性の薬理効果しか示さなかったと考えられる。未修飾ナノスフェア投与群では、カルシトニン溶液投与群と比較して、わずかに血中カルシウム降下作用の増加及び持続が認められた。これは、カルシトニンをナノスフェア内に封入することにより消化管内酵素によるカルシトニンの分解が抑制されたためと思われる。一方、キトサンで表面修飾したカルシトニン封入 PLGA ナノスフェアをラットに胃内投与した群では、血中カルシウム降下作用が最も強く現われ、溶液投与群及び未修飾ナノスフェア投与群と比較して、投与後 36 時間にもわたる有意な血中カルシウム降下作用が認められた。これらの結果より、キトサン修飾ナノスフェアは消化管粘膜に広く付着し、吸収を持続化させたと考えられる。また、食餌の影響についても検討したが、絶食時に比べて薬理効果の強さや持続性は低下するものの、キトサンの粘膜付着機能は維持され、カルシトニン溶液や未修飾ナノスフェアに比べ薬効を持続化できることが明らかになった。

粘膜付着性製剤をはじめとする経口投与製剤において留意すべきことは、食餌の種類や量などによって製剤からの薬物放出特性や製剤の消化管移動速度、薬物自身の吸収率が影響を受けると言うことである。そこで、試験期間中ラットに自由に餌を与え、食餌がキトサン修飾ナノスフェアの薬理効果に及ぼす影響について検討した(Fig. 9)。

摂食状態のラットの場合でも、カルシトニン溶液、未修飾ナノスフェア投与群と比較して、キトサン修飾カルシトニン封入ナノスフェア投与群では投与後 12 時間にも及ぶ血中カルシウム低下作用の持続化が認められた。よって、消化管内に食物が存在することで、キトサン修飾ナノスフェアの粘膜付着率は低下するが、付着した粒子によって持続的に薬物を吸収させることができ、摂食条件下においても粘膜付着性製剤が有用であることが明らかになった。

以上、微粒子製剤をキトサンで表面修飾することにより消化管粘膜付着性が賦与でき、これまで難しいとされてきたペプチド性医薬品の経口投与を可能にすることができた。

3.3. 微粒子薬物担体を用いた経肺投与製剤の開発

PLGA ナノスフェアは、粉末化しても水中に容易に分散でき、元の懸濁液を再構築できる。また、リボソームにくらべ物理的に安定であることから、ネブライザーによる経肺投与製剤に応用した。すなわち PLGA ナノスフェア内に生理活性ペプチドを封入することによって、肺内での酵素分解からの保護、放出制御に加え、経肺投与したナノスフェアが直接肺粘膜を通過し、血流中に移行することによる全身作用が期待できる新剤形の開発を企図した。

In vitro 肺内到達性評価

現在市販されているネブライザーには、薬液に超音波を照射して噴霧する超音波型、圧縮空気により薬液を噴霧するエアジェット型などがある。これらのネブライザーの問題点として、薬液が多量に装置内に残留してしまう、水が優先的に霧化されることにより装置内において薬物溶液の濃縮が起こるなどの問題点が指摘されてきた^{67,68)}。近年これらの問題点を改善しさらにポータブルなネブライザーが開発された。このネブライザーは篩型超音波ネブライザーと呼ばれ、毛細管現象により管に薬液を吸い上げ、超音波と噴霧メッシュの共振作用により霧化する。薬液が超音波振動を受けるのはごく短時間なので薬物の分解は起こらず、薬液のほぼ全量を霧化でき、濃縮も起こりにくいといった特徴を有する⁶⁹⁾。

まず、篩型超音波ネブライザーとエアジェット型ネブライザーを用いて、ナノスフェアの噴霧特性について、米国薬局方において人工肺モデルとして収載されているカ

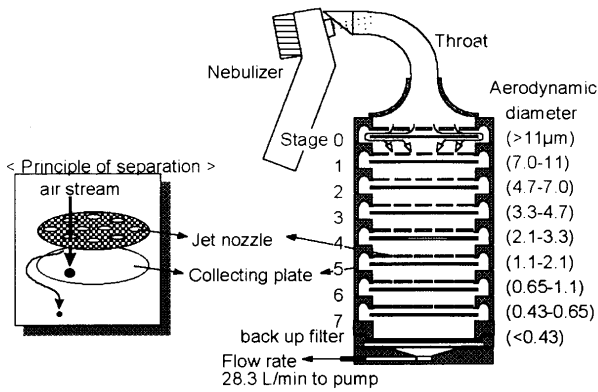


Fig. 10 Evaluation of deposition patterns with cascade impactor

スクードインパクトター(Fig. 10)を用い、ネブライザーより発生するミストの *in vitro* 肺到達性を評価した(Fig. 11)。

篩型超音波ネブライザーで噴霧された液滴は、空気力学径が 2.1~3.3 μm に相当するステージ 4 に最も多く沈着し、肺到達性の指標となるステージ 2 から 7 に沈着した割合(Respirable Fraction, RF)は、70%以上の高い値(薬物溶液:73.4%, ナノスフェア懸濁液:71.0%)を示した。これに対し、エアジェット型ネブライザーでは、装置の欠点でもある装置内への薬液残存割合が多いため(薬液、ナノスフェア懸濁液でそれぞれ 40.0%, 25.2%)、RF は低くなった。またデータには示していないが、マイクロメーターサイズの粒子をネブライザーで噴霧した場合、90%以上の粒子がネブライザー内に残留し噴霧する事ができなかった。以上の結果からナノスフェアは、その粒子径が発生する噴霧ミスト径に比べ微細であるため、溶液と同様に噴霧可能であり、さらにその噴霧パターンにも影響を及ぼさないことが明らかになった。

ナノスフェアの *in vivo* 吸入実験

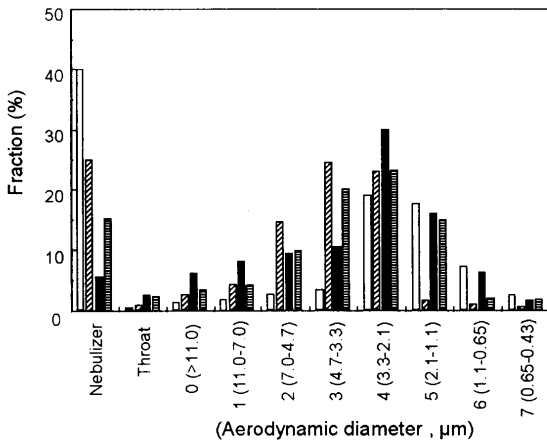


Fig. 11 Effect of nebulization from insulin solution or nanosphere suspension on deposition patterns in cascade impactor

- : insulin solution (air-jet nebu.),
- ▨ : NS suspension (air-jet nebu.),
- : insulin solution (sieve type ultrasonic nebu.),
- ▩ : NS suspension (sieve type ultrasonic nebu.)

ナノスフェアを Fig. 12 に示す実験装置を用いて動物を用いた吸入実験を行った。本装置はネブライザーから発生したミストが一旦チャンバー内でたまり、この中で露点に達することでミスト濃度が一定に保たれる。このチャンバー内から人工呼吸器により吸引し、モルモットに対して一定量のエアロゾルを暴露させることができる。

モルモットにエバンスブルー水溶液を経肺投与したときの、肺内部でのミストの沈着分布を調べた。エアロゾル

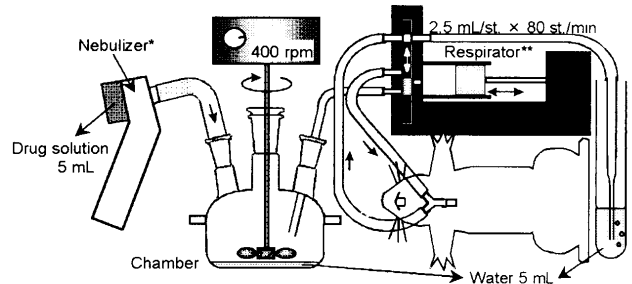


Fig. 12 Pulmonary administration system for animal studies

Nebulization time : 20 min	Drug solution : Evans blue solution (6mg/mL)
Nebulization volume : 3mL	Insulin solution (0.15mg/mL)
Nebulization rate : 0.15mL/min	Nanosphere suspension (4.4 mg/mL)
	Guinea pig : male, 9 weeks(400~500 g)

*Nebulizer: sieve type ultrasonic nebulizer [NE-03(mesh 6.7μm), OMRON]
 **Respirator: Volume controlled rodent respirator [Model 683, Harvard apparatus, Inc.]

の沈着率はそれぞれの小葉の重量にほぼ比例し、肺胞部、気管支末端部への沈着率も高く、エアロゾルが肺深部に高い割合で到達していることが判明し、*in vitro* 実験の結果と一致した。

実際にインスリン封入ナノスフェアをモルモットに経肺投与し、血中グルコース濃度推移より経肺投与用薬物担体としてのナノスフェアの有有用性について検討した(Fig. 13)。

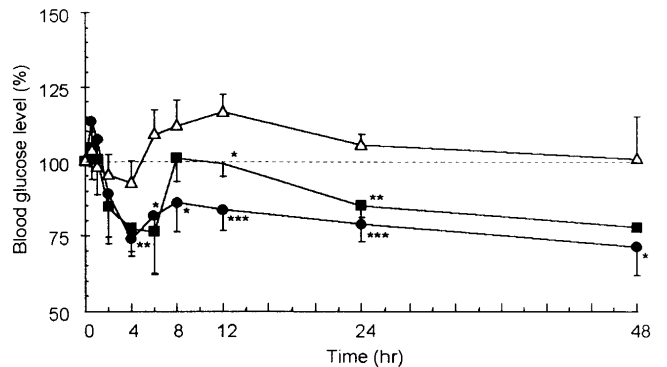


Fig. 13 Profiles of blood glucose level after pulmonary administration of insulin nanosphere suspension

(△): control (blank NS), (■): insulin solution, (●): insulin loaded nanosphere suspension
 Dose : 3.9IU/kg
 These data are expressed as mean ± S.D. of two experiments. Significantly different from the control at p<0.001 (***), p<0.01 (**) and p<0.05 (*).

Table 3 生分解性微粒子薬物担体の特徴

	利点	欠点
リポソーム	<ul style="list-style-type: none"> 細胞膜成分であるリン脂質を用いるため、生体適合性に優れている。 水溶性薬物は内水相に、疎水性薬物は脂質二分子膜内に封入することができる。 表面修飾がし易く、新たな機能を賦与することができる。 粒子径の制御が容易である。 	<ul style="list-style-type: none"> 生体内での安定性が乏しく、生体内界面活性剤やpH変化等の外的刺激により薬物を漏出しやすい。投与法、投与経路が制限を受ける。 物理的安定性に乏しく、凝集融合が起こりやすい。また、滅菌処理等が困難である。 リポソーム自体を粉末化して保存することが難しく、内封した薬物が分解する可能性がある。
PLGA ナノスフェア	<ul style="list-style-type: none"> 生理的、物理的安定性が高く、薬物を長期にわたり放出させる持続性製剤として利用可能である。 粉末化が容易で、薬物の安定性を損なわない。 PLGAは非酵素的に加水分解され、分解物も無毒である。 	<ul style="list-style-type: none"> 粒子に薬物を封入するのが難しく、薬物保持効率が低い。 粒子の調製に有機溶媒が必要であり、ペプチド等が失活する可能性がある。 リポソームと比較して粒子表面の修飾が困難である。 調製に使用した有機溶媒が粒子内に残留する可能性がある。

インスリン封入ナノスフェア投与群では、インスリン水溶液を投与したときと同様に、経肺投与後2時間から血中グルコースが減少し始め、4~6時間でグルコース濃度が最小になった。その後インスリン溶液投与群では、投与後8時間で元の血中グルコース濃度に回復したのに対し、ナノスフェア懸濁液は48時間以上にわたり初期値の約80%の血中グルコース濃度を維持した。この結果より、霧化されたナノスフェアを含むミストが肺深部に到達して沈着し、インスリンを徐々に放出することで持続的に薬物が吸収されていることが明らかになった。

また現在、粘膜付着性ナノスフェアを用いた経肺投与製剤やナノスフェアの粉末吸入製剤についても開発を行っており、興味深いデータが得られつつある。

4. おわりに

我々の研究を通してリポソームやナノスフェア等の生分解性微粒子薬物担体を利用した経粘膜投与製剤開発の指針を示すと共に、ペプチドの経粘膜投与を可能にする新しい非注射型DDS製剤の設計法を提示することができた。Table 3には、我々の研究結果や文献からの情報を基礎にした微粒子製剤の特徴をまとめる。薬物担体の特徴だけでなく、薬物の性質をよく把握し、DDS機能を最大限に発揮できるよう、粒子設計することが求められる。

引用文献

- 1) E. Likpa, J. Crison, and G.L. Amidon. *J. Controlled Release*, **39**, 121 (1996)
- 2) G.M. Pauletti, S. Gangwar, G.T. Knipp, M.M. Nerurkar,

- F.W. Okumu, K. Tamura, T.J. Siahaan, and R.T. Boychardt, *J. Controlled Release*, **41**, 3 (1996)
- 3) C. Passirani, G. Barratt, J.P. Devissaguet, and D. Labarre. *Pharm. Research.*, **15**, 1046 (1998)
- 4) J. Sudo, H. Iwase, J. Terui, K. Kakuno, M. Soyama, K. Takayama and T. Nagai, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **67** (1998)
- 5) J. Priborsky, K. Takayama, T. Nagai, D. Waitzova and J. Elis, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4915 (1987)
- 6) H. Natsume, S. Iwata, K. Ohtake, M. Miyamoto, M. Yamaguchi, K. Hosoya, D. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **185**, 1 (1999)
- 7) Y. Watanabe, Y. Mizufune, N. Utoguchi, K. Endo and M. Matsumoto, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1991 (1998)
- 8) Y. Kawashima, T. Serigano, T. Hino, H. Yamamoto and H. Takeuchi, *Pharm. Res.*, **15**, 1753 (1998)
- 9) Y.C. Lee and S.H. Yalkowsky, *Int. J. Pharm.*, **181**, 71 (1999)
- 10) Y.L. He, S. Murby, G. Warhurst, L. Gifford, D. Walker, J. Ayrton, R. Eastmond and M. Rowland, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 626 (1998)
- 11) M. Saah, W.M. Wu, K. Eberst, E. Marvanyos, N. Bodor, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 496 (1996)
- 12) C.K. Kim and J.H. Han, *J. Microencapsul.*, **12**, 437 (1995)
- 13) M.E. Brewster, P.J. Druzgala, W.R. Anderson, M.J. Huang, N. Bodor, *E. Pop, J. Pharm. Sci.*, **84**, 38 (1995)
- 14) M. Saah, W.M. Wu, K. Eberst, E. Marvanyos, N. Bodor, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 496 (1996)
- 15) C.K. Kim and J.H. Han, *J. Microencapsul.*, **12**, 437 (1995)
- 16) M.E. Brewster, P.J. Druzgala, W.R. Anderson, M.J. Huang, N. Bodor and E. Pop, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 38 (1995)
- 17) N. Kaniwa, N. Aoyama, H. Ogata and A., *Ejima, J. Pharm. Dyn.*, **11**, 563 (1998)

- 18) H. Bechgard, A.B. Hansen and H. Kofod, *Proceedings of Optimization of Drug Delivery*, Copenhagen, pp67-79 (1982)
- 19) 韓梅, 渡来仁, 保田立二, 児玉洋, *Drug Delivery System*, **13**, 13 (1998)
- 20) S. Bonduelle, C. Pimienta, J.P. Benoit, and V. Lenaerts, *Europ. J. Pharm.*, **41**, 27 (1995)
- 21) 森下真莉子, 永井恒司, *Drug Delivery System*, **10**, 329 (1995)
- 22) H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Toyoda, H. Toyobuku, T. Hino and Y. Kawashima, *Int. J. Pharm.*, **164**, 103 (1998)
- 23) T. Yuda, K. Maruyama and M. Iwatsuru, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1347 (1996)
- 24) G. Blume and G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1029**, 91 (1990)
- 25) N. Emanuel, E. Kedar, E.M. Bolotin, N.I. Smorodinsky and Y. Barenholz, *Pharm. Research*, **13**, 352 (1996)
- 26) T. Tanaka, S. Suzuki, T. Masuko and Y. Hashimoto, *Jpn J Cancer Res.*, **80**, 380 (1989)
- 27) Y.M. Rustum, C. Dave, E. Mayhew and D. Papahadjopoulos, *Cancer Res.*, **39**, 1390 (1979)
- 28) R.M. Abra, C. A. Hunt and D.T. Lau, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 203 (1984)
- 29) E.C.A. van Winden and D.J.A. Crommelin, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, **43**, 295 (1997)
- 30) J. du Plessis, C. Ramachanderan, N. Weiner and D.G. Müller, *Int. J. Pharm.*, **127**, 273 (1996)
- 31) Y. Ogawa, H. Okada, M. Yamamoto and T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095 (1988)
- 32) H. Okada, Y. Doken, and Y. Ogawa, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1044 (1996)
- 33) N. Hussain, P.U. Jani, and A.T. Florence, *Pharm. Research*, **14**, 613 (1997)
- 34) P.U. Jani, A.T. Florence and D.E. McCarthy, *Int. J. Pharm.*, **84**, 245 (1992)
- 35) P.U. Jani, G.W. Halbert, J. Langridge and T. Florence, *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 821 (1990)
- 36) Y. Kawashima, T. Niwa, T. Handa, H. Takeuchi, T. Iwamoto and Y. Itoh, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 425 (1989)
- 37) Y. Kawashima, T. Niwa, T. Handa, H. Takeuchi, T. Iwamoto, Y. Itoh, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 68 (1989)
- 38) Y. Kawashima, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino and Y. Itoh, *J. Controlled Release*, **16**, 279 (1991)
- 39) Y. Kawashima, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino and Y. Itoh, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 135 (1992)
- 40) 五十嵐理慧, 武永美津子, 水島裕, DDS の進歩, 49-55 (1995)
- 41) 関純造, *Membrane*, **23**, 126 (1999)
- 42) 片岡一則, 第 16 回 製剤と粒子設計シンポジウム講演要旨集, 107 (1999)
- 43) P.R. Sheth and J. Tossounian, *Drug. Develop. Ind. Pharm.*, **10**, 313 (1984)
- 44) M. Ichikawa, S. Watanabe and Y. Miyake, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 1062 (1991)
- 45) E. Ilan, S. Amselem, M. Weisspapir, J. Schwarz, A. Yogev, E. Zawoznik and D. Friedman, *Pharm. Research*, **13**, 1083 (1996)
- 46) M.A. Longer, H.S. Ch'ng and J.R. Robinson, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 406 (1985)
- 47) K.M. Tur, H.S. Ch'ng and S. Baie, *Int. J. Pharm.*, **148**, 63 (1997)
- 48) S. Miyazaki, A. Nakayama, M. Oda, M. Takada and D. Attwood, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 745 (1994)
- 49) A. Bernkop-Schnurch and M. Pasta, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 430 (1998)
- 50) E. E. Hassan and J. M. Gallo, *Pharm. Research*, **7**, 491 (1990)
- 51) J. M. Irache, C. Durrer, D. Duchene and G. Ponchel, *Pharm. Research*, **13**, 1716 (1996)
- 52) P. Esposito, I. Colombo and M. Lovrecich, *Biomaterials*, **15**, 177 (1994)
- 53) C. Li, P. P. Bhatt and T. P. Johnston, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 919 (1998)
- 54) Y. Akiyama, N. Nagahara, T. Kashihara S. Hirai and H. Toguchi, *Pharm. Research*, **12**, 397 (1995)
- 55) F. Komada, S. Iwakawa, N. Yamamoto, H. Sakakibara and K. Okumura, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 863 (1994)
- 56) G.P. Martin, A.E. Bell and C. Marriott, *Int. J. Pharm.*, **44**, 57 (1988)
- 57) L.E. Masinde and A.J. Hickey, *Int. J. Pharm.*, **100**, 123 (1993)
- 58) F.M. Sakr, *Inter.J.Pharm.*, **86**, 1 (1992)
- 59) S. Kobayashi, S. Kondo and K. Juni, *Pharm Research*, **13**, 80 (1996)
- 60) D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan and R. Langer, *Science*, **276**, 1868 (1997)
- 61) R.S. Pillai, B.L. Hughes, R.K. Wolff, J.A. Heisserman and M.A. Dorato, *J. Aerosol Med.*, **9**, 227 (1996)
- 62) P.R. Byron and J.S. Patton, *J. Aerosol Med.*, **7**, 49 (1994)
- 63) Y. Fukuda, T. Tsuji, T. Fujita, A. Yamamoto and S. Muranishi, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 891 (1995)
- 64) I. Yamakawa, Y. Tsushima, R. Machida and S. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2870 (1992)
- 65) C.M. Lehr, J.A. Bouwstra, E.H. Schacht and H.E. Junginger, *Int. J. Pharm.*, **78**, 43 (1992)
- 66) C.M. Lehr, J.A. Bouwstra, W. Kok, A.G. DeBoer, J.J. Tukker, J.C. Verhoef, D.D. Breimer and H.E. Junginger, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 402 (1992)
- 67) K.M.G. Taylor, G. Venthoeye and A. Chawla, *Int. J. Pharm.*, **85**, 203 (1993)
- 68) O.N.M. McCallion, K.M.G. Taylor, M. Thomas, A.J. Taylor, *Int. J. Pharm.*, **129**, 123 (1996)
- 69) 村山史秀, 亀田誠, 高松勇, 村上寿茂, 土居悟, 豊島協一郎, *アレルギー*, **28**, 45 (1996)

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文 (乙第 242 号) の内容を中心にまとめたものである。