

— 総説 —

コンポジット化ナノ粒子薬物送達システムの設計

川島嘉明

要約：初めに薬物キャリアーの微粒化（ナノ化）により薬物送達システムの機能が向上する理由と、その機能を発揮させるための製剤化法として、コンポジットシステムが必用な理由を述べる。微粒子 DDS として、生体内分解性高分子ナノスフェアの調製法を化学的方法と物理化学的方法について概説し、著者等が開発した、高分子球形晶析法についてその原理と乳酸グリコール酸共重体（PLGA）ナノスフェアの調製法への応用例を紹介する。粒子の物理化学的コンポジット化法を概観し、著者等の噴霧乾燥法による調製例を紹介する。コンポジット化ナノ粒子 DDS の開発例として、経肺投与型粉末吸入システム（DPI）の設計を取り上げる。具体例として難溶性抗喘息薬のナノ晶析と凍結乾燥法によるナノコンポジット粒子 DPI の設計とモルモットへの経気管支投与による薬理作用の向上について述べる。インスリンの DPI システムとして、インスリン封入 PLGA ナノスフェアを噴霧乾燥流動層法によりコンポジットとする方法や、凍結乾燥 PLGA ナノスフェアをドライパウダー（オーダードミキシング）複合化装置でコンポジット化する方法について説明し、これらをラットへの経肺投与により血糖値降下作用が静脈注射と比較して有意に増大しその効果が持続化できたことについて述べる。現在、理想的な治療システムのための種々のナノテク DDS が開発されつつある。これらを製剤化するための新しいコンポジット化法の開発が急務である。

索引用語：コンポジットナノ粒子、PLGA ナノスフェア、高分子球形晶析法、吸入投与型インスリン DDS、噴霧乾燥流動層法、ドライパウダー複合化法

Design of a Nanocomposite Particulate Drug Delivery System

Yoshiaki KAWASHIMA

Abstract: Improving the function of a drug delivery system (DDS) with a micronized (nanosized) drug carrier and the composition of DDS required for developing them to a practical dosage form are explained. Physicochemical and chemical preparation methods of biodegradable polymeric nanospheres are described as a micronized particulate DDS. The principle of the polymeric spherical crystallization technique developed by us and their applications to prepare DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanosphere are introduced. Physicochemical methods for the preparation of a particulate composite are overviewed and the spray drying method developed by us is referred as a practical example. Development of a dry powder inhalation system with nanocomposite particulate DDS is described. The pharmacological action of a poorly soluble anti-asthmatic drug via pulmonary administration to guinea pig was improved with nanocomposite DPI prepared by nanocrystallization and freeze drying method. Insulin encapsulated PLGA nanosphere composite was prepared by a spray drying fluidized bed system and a dry powder composing (ordered mixing) system, which reduced significantly the blood glucose level with prolonged action administered intratracheally to rat compared to intravenous injection. Various updated DDS have been developed by using nanotechnology to find an ideal therapeutic system, which requires a novel composite system to develop them as practical dosage form.

Keyphrases: nanocomposite particulate system, PLGA nanosphere, polymeric spherical crystallization method, insulin inhalation DDS, spray drying fluidized bed method, dry powder composing system

1. 緒言

はじめに薬物送達システムの設計においてなぜナノ粒子システムに注目が集まっているのかを考えてみることにする。更には、それを製剤化する際の問題点とコンポジット化の意義を述べる。薬物送達システムの機能を時間的・空間的観点から纏めると、次のようになる。

- 1) ターゲティング機能：薬物を異物として生体に認識させず、体外に排除されることなく必要な場所に薬物を送達する機能。ステルスとかミサイル機能とも呼ばれる。
- 2) 放出制御機能：薬物を必要な時、必要な期間、必要な速度で放出する機能。コントロールド・リリース機能とも呼ばれる。
- 3) 吸収バリアー制御機能：薬物の吸収バリアーに逆らって、吸収速度や吸収量を増大させる機能。

これらの機能を言い換えると、ターゲティング機能は、薬物が体内で不必要な場所にも分布するのを防ぎ、標的部位に薬物を選択的に送達させる機能である。いわば、空間的（三次元的）な制御機能である。放出制御機能は、文字通り、時間的（四次元的）な制御機能である。吸収バリアー制御機能は、ターゲティング機能の一環とも見なせるが、物質の膜透過機構の解明と相俟って、これから注目される機能といえる。

製剤が、薬物とそれを運ぶ担体からなることを考慮し、薬物粒子と薬物キャリアーの微粒化（ナノ化）により DDS の空間的及び時間的制御機能がどのように改変されるかを論ずる。

最近の新薬の製剤開発におけるトピックスのひとつは、候補化合物としてしばしば開発ステージに上がってくる超難溶性薬物の製剤化への対処である（三次、四次元的制御）。薬物粒子のナノ化は、物理化学的にその溶解性を改善することができる。固体の溶解度は、粒子径がサブミクロンになると、そのサイズ効果が現れるようになり有意に増大するからである。これに加えて、粒子を非晶質化すれば、表面エネルギーが増大し、溶解度が更に増すことになる¹⁾。

$$\log S_2/S_1 = 2\sigma M / (2.303 \rho R T r_2)$$

ここで S_1 、 S_2 は粗大粒子 1、微細粒子 2 の溶解度、 r_2 は微細粒子の半径、 M は分子量、 σ は界面張力、 ρ は粒子密度である。

今ひとつのトピックスは、ペプチド・タンパク性薬物の経粘膜投与型製剤の開発であろう（三次元的制御）。これには、薬物キャリアーのナノ化がポイントになることが判ってきた。薬物キャリアーをサブミクロン化すると、薬物の酵素分解からの保護、薬物の放出制御などの、通常のキャリアーの機能に加えて、粘膜などの生体膜付着性の発現による組織滞留性の向上、それに起因する薬物の局所濃度

の増大、更には、生体膜を直接透過する機能などが付加されるからである²⁾。例えば、関節腔内に投与される粒子は、500nm（臨界粒子径）以下になるとマクロファージに貪食されやすくなる³⁾。また、粒子の表面の性質は、生体中の蛋白の吸着に深く関与するので、生体との相互作用を決める重要なファクターになる。

サブミクロンサイズの薬物キャリアーには、高分子カプセル、エマルション、リポソーム、高分子ミセルなどがある。高分子カプセルと後三者とを比較する時、最も異なる点は、高分子カプセルは固体粉体として扱われるのに対し、後三者は乳濁または懸濁状態で取り扱われる。そのため、後三者は保存中の薬物の化学的安定性のほか、薬物のリリースを含めた物理化学的安定性確保に留意が必要である。又、生体に適用したとき、薬物のリリース時間が、高分子カプセルの方が一般的に長時間であり、分解時間（クリアランス）が長い。これらの点と DDS 化の目的を考慮して、薬物キャリアーの種類が選択される。ここで、先に述べたように生体との相互作用を律する粒子径（臨界粒子径）を見極めることが重要である。又、キャリアーの壁膜剤は、言うまでもなく、生体分解性・適合性のものが望ましい。以上の観点から、ここでは、主にサブミクロンサイズの生体内分解性高分子微粒子（ナノカプセル、ナノスフェア）を中心に取り上げることにする。

これらのナノスフェア粒子を製剤化する時、克服すべき問題点がある。それは、ナノスフェアの機能が生体内で期待通り発揮されないことが多いことである。その原因の一つは、製剤化中や、製剤化後の保存中に、製剤内でナノ粒子が凝集、融合し、その機能を失うためである。更には、吸収（ターゲット）部位で、製剤からオリジナルのナノ粒子が再生されない事による。この問題を解決すべく、著者らは、通常製剤として取り扱うことのできる、ナノ粒子を分散した状態で包含したミクロンサイズのコンポジット体の開発に取り組んでいる。それにより、ナノ粒子を通常製剤の方法で吸収部位まで送達し、局所で高濃度のオリジナルなナノ粒子をコンポジット体から再構築する仕組みを提案している。以下に、生体内分解性の高分子ナノスフェアの設計法とコンポジット化法を概観し、その具体例としてコンポジット化ナノ粒子による、経肺投与型 DDS の設計・開発を紹介する。

2. 生体内分解性高分子ナノスフェアの設計

高分子微粒子 DDS の製法は、化学的方法と物理化学的方法に大別される。前者の例として、界面重合法によるポリアルキルシアノアクリレート（PACA）ナノスフェア、後者の例として、相分離法や著者らが開発した高分子球形晶析法などによる PLGA ナノスフェアの例を挙げる事ができる。

2.1. 界面重合法による PACA ナノスフェアの調製

PACA ナノスフェアは、アルキルシアノアクリレートの界面重合によって調製される。シアノアクリレートの重合は、塩基存在下で開始されるアニオンックプロセスである。通常は、水の解離による水酸イオンが重合開始剤として利用される。この重合はとても速いので、pH を 3.5 以下に調整して行われる。これは、重合の停止が水素イオンによってなされる事にも因る⁴⁾ (Fig. 1)。

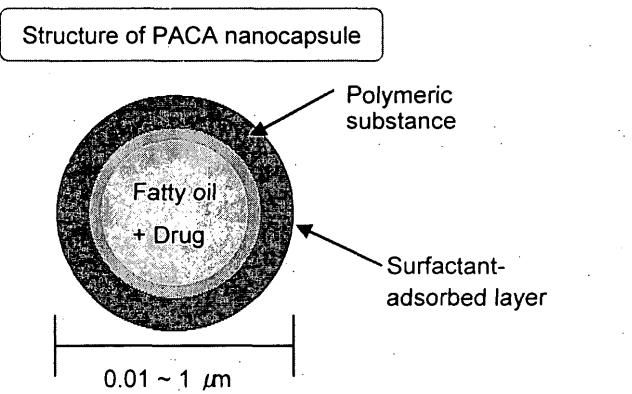
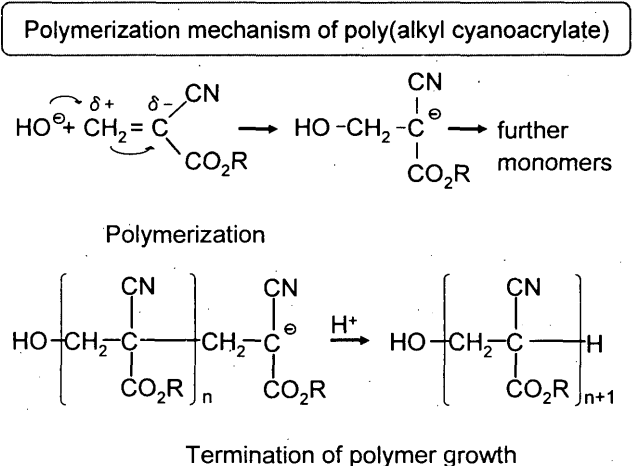


Fig. 1 Preparation mechanism and structure of PACA nanocapsule.

pH が低いほど、重合の停止が早く起こるので PACA の分子量が小さくなる。この重合反応は、pH の他、温度、モノマーや電解質の種類や濃度、乳化剤 (安定化剤) の添加などの影響を複雑に受ける。生成する PACA は、比較的分子量のため柔らかく、調製中に粒子同士が凝集しやすいので安定化剤の選択が重要である。具体例として、薬物を溶解した、中鎖や長鎖の脂肪酸とイソブチルシアノアクリレートのアルコール溶液をプルロニックなどの安定化剤水溶液中に分散させる方法がある。アルコールが水に移行し、油滴が形成されると同時に、油滴界面でイソブチルシアノアクリレートが重合を起こしポリイソブチルシアノアクリレート (PIBCA) ナノカプセルが形成される。その内部構造のイメージを Fig. 1 に示す⁵⁾。

重合度のばらつきや、オリゴマーの生成、残留モノマー、

更にはモノマーと薬物との反応などの制御に留意が必要である。PACA ナノスフェアは PLGA ナノスフェアなどに比べて、生体内分解速度が速く、2、3 日で体内から排泄される。インスリンを封入した PIBCA ナノカプセルを糖尿病ラットに経口投与したところ、長期間にわたり、血糖値を低下させる事ができたと報告されている⁶⁾。本報告は、インスリンの持効性経口剤の開発の可能性を示したもので価値がある。がんの化学療法における、多剤耐性の克服にナノスフェアを利用する試みがなされている。多剤耐性の発現の一因として、細胞膜中で P 糖タンパク (Pgp) が発現し、細胞中に取り込まれた薬物を細胞外に汲み出す事が知られている。これを回避するには、薬物をナノスフェアに取り込ませ、エンドサイトーシスでナノスフェアを細胞中に取り込ませて薬物を保護する方法がある。または、薬物の細胞膜の透過性を上げ、汲みだされる量を補う方法がある。ドキシソルピシンを封入した PACA ナノスフェアのドキシソルピシン耐性細胞 P388 に対する細胞毒性は、PLA や PLGA ナノスフェアに比べ著しく高い事が見出された。これは、薬物の放出が PLA や PLGA ナノスフェアでは速すぎる事が一因である。更に、PACA ナノスフェアでは、PACA が分解して生じたシアノアクリル酸が薬物とイオン対を形成し、薬物の膜中の拡散をたやすくしている。一方、PLA や PLGA ナノスフェアから放出された、フリーの薬物はリン脂質との静電的相互作用によって膜中の拡散が妨げられる⁷⁾。そのため、PLA や PLGA ナノスフェアでは薬物耐性が改善されない。

2.2. 物理化学的方法による PLGA ナノスフェアの調製

物理化学的方法では、既製の高分子が用いられるので、オリゴマーの生成や残留モノマーなどの問題を回避できる。文献上、確立された方法として、相分離法、エマルジョン溶媒蒸発法、高分子沈析法、高分子球形晶析法などが知られている。

相分離法は、高分子の良溶媒溶液に貧溶媒を注入し、高分子を相分離させる方法で、高分子が単一の場合と複数の場合とがある。前者の例として、PLGA の塩化メチレン溶液 (4%) に貧溶媒である、シリコンオイルを攪拌しながら添加し、PLGA の相分離を起こさせる方法がある。相分離液滴相を硬化剤 (プロピレングリコールオクタノエートデカノエート) で処理して、マイクロスフェアが得られる。本法で得た PLGA マイクロスフェアはリン酸緩衝液中に保存するとき、分子量がほぼ 15000 にまで減少すると可溶化が起き急激に重量が減少し分解する。興味深い事は、この分解の臨界分子量が、使用した PLGA の分子量や、乳酸・グリコール酸の組成比に関係がなくほぼ一定 (15,000) なことである⁸⁾。

PLA と PLGA の良溶媒 (ジクロロメタン) 溶液を混合すると、両ポリマーは均一溶液にはならず相分離すること

が知られている。このとき、超音波をあてながら混合すると、PLGA の分離液滴が生成し、O/O エマルションが出来る。これを多量の貧溶媒の PVA 水溶液中に攪拌しながら注ぐと、O/O/W エマルションが生成し、ジクロロメタンを蒸発させると PLGA/PLA の二重膜高分子マイクロスフェアが調製される。核となる PLGA 中に薬物を分散させると、初期バーストを抑えた薬物放出が期待できる⁹⁾。エマルション溶媒蒸発法については、薬物の物性（親油性か親水性）によって用いられるエマルションの形態が異なる。親油性の場合には、高分子（PLGA）の有機溶媒（ジクロロメタン）溶液中に薬物を共存させ、これを水に分散した O/W エマルションを形成させ、溶媒を蒸発させてマイクロスフェアが調製される¹⁰⁾。薬物の封入率が高く徐放性も得られやすい。一方親水性の場合には、薬物を高分子溶液に溶解させることが難しいので、PLGA の有機溶媒溶液（ジクロロメタン）を外相とし、薬物水溶液を内相とする一次エマルションを調製し、これを水相（PVA 水溶液）に分散させた複合エマルション（W/O/W エマルション）として有機溶媒を蒸発除去させる方法が取られる。本法を利用して工業化された PLGA の長期徐放性（1~3 ヶ月間）マイクロカプセル製剤として、酢酸リュウプロレリンが良く知られている¹¹⁾。本製剤は、高活性 LHRH 誘導体を持続的に投与することで下垂体前葉の LHRH レセプターのダウンレギュレーションを惹起させ、結果的にテストステロンの分泌を抑制することで性ホルモン依存性の疾患（前立腺癌、子宮内膜症、乳癌など）の治療に使用されている。溶液の注射よりも有効性が高いこと、1 ヶ月当りの用量も 1/8~1/4 に減少できることから、その徐放性製剤としての有用性が立証されている。本マイクロカプセルにおいては、塩基性薬物と PLGA とのイオンの相互作用が高封入率と放出制御に非常に重要な役割を果たしている¹²⁾ (Fig. 2)。

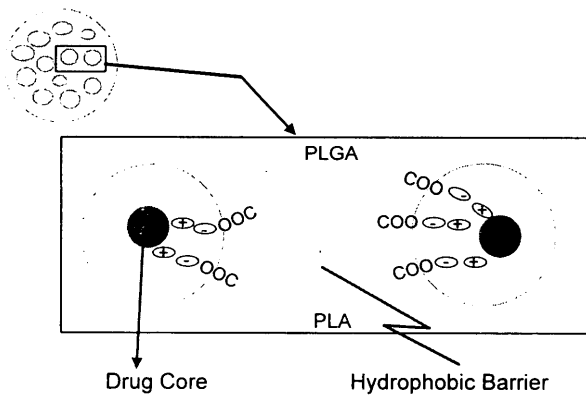


Fig. 2 Internal structure of leuprorelin microcapsule.

そのため、本相互作用がない他の水溶性薬物について同様な高封入率と放出制御を期待することは難しい。そこで、

薬物の種類に応じてその処方及び製造法の最適化が必要になる。特にタンパク性医薬品は、低分子薬物とは異なり、高次構造を保持して初めて生物活性を発揮するので、マイクロカプセル化の過程、特にエマルション形成時の水と有機溶媒(W/O)の界面での変性・失活に留意が必要である。この変性を回避するために固体状態のタンパクを分散する S/O/W 型水中乾燥法が採用されている。その際に、分散する固体状態のタンパクの粒子径を小さくすることがマイクロカプセル化における高封入率と放出制御を達成するためには重要である。タンパク性医薬品であるヒト成長ホルモン(hGH)のマイクロカプセル化においては、hGH を凍結乾燥する際に hGH の 10~20 倍モルの酢酸アンモニウムを添加すると hGH の粒子径が極小値となった。hGH の粒子径が小さいほど封入率は上昇すると共に、初期放出率が減少し、徐放相の血中濃度が高く維持されることが免疫抑制ラットにおいて確認された。本徐放性マイクロカプセル（2 週間製剤及び 1 ヶ月製剤）は、hGH 溶液連日皮下注射との比較において免疫抑制下垂体摘出ラットの体重増加は同等、体長増加および血中 IGF-I 濃度の上昇では有意に優ることが判明した^{13,14)}。

高分子沈析法は、油性担体、高分子、薬物をアセトンや、メタノール溶液に溶解させ、これを界面活性剤水溶液中に分散させることによって得られる微粒化油滴界面で高分子を沈積させる方法である。吉野等は、高分子としてポリイソブチルシアノアクリレート (PIBCA) を、界面活性剤としてポロキサマー（プルロニック F68）を使用して界面重合法よりも安定な PIBCA ナノスフェアを調製している¹⁵⁾。ポロキサマーは、油滴を安定化させるだけでなく、ナノスフェア表面に吸着し表面を修飾する作用を併せ持っている。PIBCA ナノスフェア（平均径、105nm）をラットに筋注したところ、48hr 後のリンパ節への蓄積量が、リピオドールエマルション(123nm)や、リポソーム(155nm)に比べ有意に高く、130 時間も滞留することを見出し、PIBCA ナノスフェアのリンパ指向性を明らかにした。本法が適用できる高分子の指標として、溶解度パラメーターが 10~13 のものであるとしている。

高分子球形晶析法は、著者らによって開発された球形晶析システムに高分子を共存させて、薬物と共に共沈させる方法である¹⁶⁾。球形晶析法¹⁷⁾の原理に従って、本法は球形造粒法 (SA 法) とエマルション溶媒拡散法 (ESD 法) とに大別される。SA 法は、晶析によって生じた薬物結晶を液中で直ちに造粒しさらに高分子を相分離させて造粒粒子表面を被覆する方法である。ESD 法は、薬物と高分子の良溶媒溶液を貧溶媒中に注ぎ、擬エマルション滴を形成させ、液滴界面を通しての良溶媒と貧溶媒の相互拡散により液滴内で高分子と薬物を共沈させる方法である。PLGA の良溶媒として、ジクロロメタンを使用するが、エタノールやアセトンなどの両親媒性溶媒を共存させるこ

とによって、薬物を溶解したり、両親媒性溶媒の外相への選択拡散により界面張力を減少させ、自己乳化を促す。最近、良溶媒として、アセトンを使用し、残留溶媒に留意したシステムも見出している¹⁸⁾。本システム（アセトン/エタノールまたはメタノール）は、ジクロロメタン/アセトンの系に比べて、ナノスフェアの収率が高く、粒子径は約300nmでアセトンの組成割合の影響を受けにくいことが判明した（Fig. 3）。

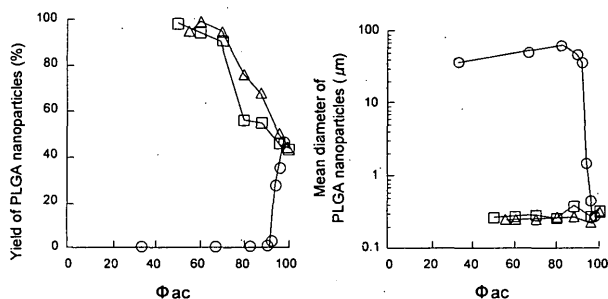


Fig. 3 Yield and mean diameter of PLGA nanoparticles.

- : original SESD method (dichloromethane/acetone)
- △ : modified-SESD method (ethanol/acetone)
- : modified-SESD method (methanol/acetone)

貧溶媒中のPVAの物性は重要で、けん化度が高いもの（98.5%）より低いもの（80.0%）の方がナノスフェアの収率が高く、凍結乾燥後の再分散もしやすい。これは、けん化度の高いPVAの方がゲル化しやすく、ナノスフェアが凝集しやすくなることによる。

次に、エマルジョン溶媒拡散法によるペプチドの経粘膜投与を目指したペプチド封入PLGAナノスフェアの調製とその評価について紹介する。具体的な調製法は、ペプチドと高分子の良溶媒溶液（例えば、アセトン・エタノール混液）を、PVA水溶液に攪拌下滴下する。このとき、良溶媒が水相中へ急速に拡散移行し、液滴界面が乱れ、高分子溶液は自己乳化的にサブミクロンサイズのO/W型エマルジョンになる。エマルジョン滴からの良溶媒の拡散が更に進行し、高分子と薬物がエマルジョン滴内で沈積し、高分子ナノスフェアが得られる（水中溶媒拡散法）。得られたPLGAナノスフェアの代表的な電子顕微鏡写真をFig. 4に示す。

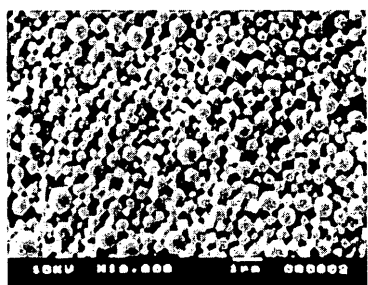


Fig. 4 Scanning electron microphotographs of nanospheres.

動的光散乱法により測定したナノスフェアの平均径は、約250nmで粒度分布幅も狭い。水中エマルジョン溶媒拡散法では、外層が水のため、水溶性のペプチドなどは、調製中にナノスフェアから漏出しやすい。これを防ぎ、薬物封入率を向上させるために、外相にも有機相（油）を使用した、油中エマルジョン溶媒拡散法を開発している。PLGAナノスフェアの粘膜付着性賦与は、粒子表面を吸着法により、ポリアクリル酸、アルギン酸ナトリウム、キトサンなどの粘膜付着性高分子で修飾（コーティング）する事によりなされた。ラット反転腸管を用いた、in vitro 粘膜付着性実験により、キトサン修飾PLGAナノスフェアが最も粘膜付着性が高いことが明らかにされた。カルシトニンを封入した、キトサン修飾ナノスフェアを、絶食下のラットに経口投与したところ、未修飾ナノスフェア投与群に比べ有意に、36時間にわたり血中カルシウム低下作用が持続した。この結果は、ナノスフェアが消化管粘膜に付着することにより、消化管内の滞留性が向上したためである。摂食下においても、ナノスフェアの粘膜付着機能は維持され、薬理効果の持続が認められた¹⁹⁾。このコンセプトは、肺粘膜においても機能し、インスリン封入キトサン修飾ナノスフェア懸濁液をネブライザーによりモルモットの肺に吸入させることによって、血糖降下作用を24時間以上にわたり発揮させることができた²⁰⁾。

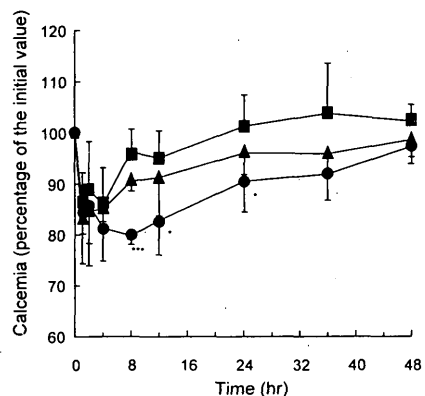


Fig. 5 Profiles of the blood calcium level after pulmonary administration of the elcatonin-loaded nanosphere suspension (100 IU/kg) to male guinea pigs (6 weeks).

- : elcatonin solution; ▲: non-coated PLGA nanospheres;
- : chitosan-coated PLGA nanospheres. Data are presented as the means \pm SD (n=5). ***p<0.001, *p<0.05 compared with elcatonin solution.

カルシトニン含有PLGAナノスフェアの水性懸濁液を超音波ネブライザーでエアゾール化し、レスピレータでモルモットに経肺投与した。キトサンコーティングPLGAナノスフェアは、カルシトニン溶液に比べ血中カルシウム濃度を有意に低下させその効果を24時間以上持続させることがわかった。未修飾PLGAナノスフェアは、キトサンコーティングPLGAナノスフェアに比べるとその効

果は低い (Fig. 5)。この結果は、肺内に沈着したキトサンコーティング PLGA ナノスフェアは、その粘膜付着性のため未修飾 PLGA ナノスフェアに比べ、肺からの排出時間が遅い (肺内滞留時間が長い) こと、ナノスフェア表面に吸着したキトサンが肺上皮細胞間隙 (タイトジャンクション) を開口し、PLGA から放出した薬物の吸収を促進するためと思われる。このキトサンの吸収促進作用は、モデル薬物 (FITC デキストラン、カルセイン) 溶液に、キトサンを溶解または、キトサンコーティング PLGA ナノスフェアを懸濁させることで、これらの薬物の経肺吸収量が分子量依存的に有意に増大することから類推された²¹⁾。

3. 粒子のコンポジット化法

粒子のコンポジット化は、複数成分の粒子から粒子複合体を作ることであり、単なるランダムな物理混合物とは異なる。機能の観点から言えば、コンポジット化により、物理混合物よりも機能が改善されたり、物理混合物には無い新しい機能が発現する場合を言う。製剤の分野で現在知られている物理的方法は、湿式法の流動層法、噴霧乾燥法、凍結乾燥法、乾式法の、オーダードミキシング法や混合粉碎法などがある。その他、超臨界流体を利用する方法や、溶融冷却法などがある。

湿式法は、添加剤を溶液又は、懸濁液として、これに薬物を分散させた後、溶媒を除去する方法である。このとき、添加剤には、結合剤やコーティング剤を用いることが多い。得られる粒子複合体の構造は、被覆 (コーティング) 型やマトリックス型に分類される。担体 (添加剤) 中に薬物がナノオーダー或いは分子レベルで分散した形態を固体分散体と呼ぶ。乾式法は、溶媒を用いず、直接粒子同士の相互作用を利用し、更にはせん断などの物理的エネルギーを付与することによってこれを助長させて調製する方法である。一般にオーダードミックスチャー型の複合体調製法として用いられる。複合体化装置としてハイブリダイザーやシータコンポーザー、メカノフュージョンシステム等が開発されている²²⁾。添加剤として軟化点の低い高分子やワックス類を処方すると、被覆型の複合体が得られる。微結晶セルロースなどの高分子を配合すると、マトリックス型が得られるが、無定形粉体混合物となることが多い。薬物が非晶質化した固体分散体も調製されている。超臨界流体法は、超臨界流体中での晶析法とみなされる。溶媒としては、二酸化炭素が比較的マイルドな条件で (温度 31.1°C、圧力 7.38MPa) 超臨界流体となること、無毒なこと、製品中に溶媒が残留しないこと等の理由から良溶媒、あるいは貧溶媒として選ばれる。溶融冷却法は、ワックス類や、高分子の溶融物に薬物を溶解又は分散させた物を冷却固化させて得られる。溶融物を噴霧冷却する噴霧凝固造粒法、溶融・連合、冷却、ペレット化を連続的に行う、エ

クストルーダー法²³⁾、ワックス粒子と粉体を加熱下流動混合後冷却する流動層法などがある²⁴⁾。

ここでは湿式法の実例として、著者等の噴霧乾燥法により、乳糖と水溶性ゲル高分子とを複合体化して直接打錠可能なコントロールド・リリース基剤 (SDCOP) を開発した例を紹介する^{25, 26)}。本基剤に期待した機能は、噴霧乾燥法により非晶質化した乳糖の良好な圧縮成形性と水溶性高分子のゲル形成による徐放化能である。このような薬物放出制御能と直接打錠機能を兼ね備えた機能性基剤は現在のところ市販されておらず、付加価値の高い粒子設計と言える。調製した SDCOP は球形度が高く、その粒子径 (平均粒子径約 15 μ m) が一般に流動性が急激に低下する臨界粒子径 (50~100 μ m) 以下であるにも関わらず、流動性に優れ直接打錠が可能な粒子であった。この噴霧乾燥複合粒子の圧縮成形性を Fell らが提唱した錠剤引張強度²⁷⁾を用いて比較したところ、SDCOP の錠剤引張強度は、100%非晶質乳糖とほぼ同一で、且つ、市販の直接打錠用無水乳糖 (DCL21) 以上であり、良好な圧縮成形性を示した。又、圧縮成形性の劣るアセトアミノフェンを 50%混合して製したマトリックス錠剤においても、SDCOP は優れた圧縮成形性を示した。そこで、アセトアミノフェン含有モデル錠剤を用いて SDCOP の徐放化機能を検証した。

SDCOP を用いたマトリックス錠剤は、ゲル形成機能を持つアルギン酸ナトリウムの含量が基剤中に 10%であるにも関わらず、日本薬局方第 1 液 (pH1.2) 中ではアルギン酸ナトリウム原末をマトリックス錠剤用基剤として用いたときとほぼ同様な薬物放出挙動を示した。この結果は、薬物放出制御能にはアルギン酸ナトリウムのゲル形成能が寄与していること、及び、噴霧乾燥処理を施すことで基剤中のアルギン酸ナトリウムの分散・均一性が向上し、少量のアルギン酸ナトリウムでも有効にゲルネットワークを形成していることを示唆している。一方、局方第 2 液 (pH6.8) 中ではアルギン酸ナトリウムの溶解性が高いため速放性を示した。この場合に、SDCOP 含有錠剤の薬物放出速度が、アルギン酸ナトリウムを基剤とした錠剤の放出速度よりも速いのは、非晶質化した乳糖がより速やかに溶解するためと考えられる。又、結晶乳糖とアルギン酸ナトリウムの物理混合物を基剤として用いた場合は、いずれの試験液中でも極めて速い溶出を示したが、これは物理混合物では粒子間の緻密な結合が得られず、溶出試験液が速やかに錠剤中に浸透したためと推定している。以上の結果は、乳糖とアルギン酸ナトリウムの複合粒子化が、両物質の機能を併せ持つだけでなく、新たな製剤機能を付加できることを示唆している。調製した噴霧乾燥複合粒子を用いたマトリックス錠剤の溶出試験の結果から、アルギン酸ナトリウムが pH 感受性水溶性高分子であるために、マトリックス錠剤からの薬物放出挙動に溶出試験液 pH による差異が生じることが明らかとなった。そこで、SDCOP を外層基

剤とした有核錠を設計したところ、局方第1液では薬物放出が認められず耐酸性を示し、局方第2液では溶出初期に薬物放出が認められない時間(ラグタイム)を持った放出開始時間制御型製剤が設計できることが判明した²⁸⁾。

局方第2液中でのラグタイムの更なる延長及び制御を目的として、噴霧乾燥処理中にアルギン酸ナトリウムを極少量のキトサンで改質処理を行った。噴霧乾燥処理時に、乳糖とアルギン酸ナトリウムの混合溶液とキトサンの酢酸溶液を、異なるノズルから別々に噴霧回転円盤(アトマイザー)上に同時供給することで、基剤の溶解・浸食速度が遅延し、最大7時間までラグタイムの延長が可能となった。

予めアルギン酸-キトサンコンプレックスを溶液中で形成させた後に噴霧乾燥して得た基剤 (SD9:1) や噴霧乾燥複合粒子にキトサンを単に物理混合した基剤では、ラグタイムの延長は認められなかったことから、本手法によって得られる基剤中でのアルギン酸-キトサンコンプレックス (SD(AL/CS)) の分散・均一性がラグタイムの延長に重要であることが判明した (Fig. 6)。

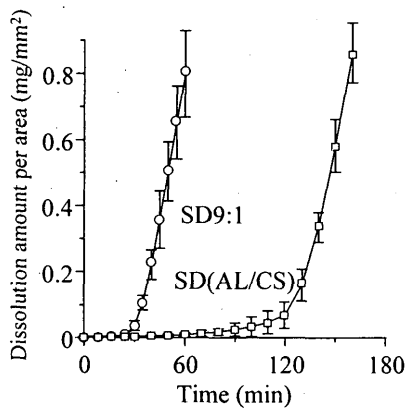


Fig. 6 Effect of dispersibility of sodium alginate chitosan complex in the matrix on prolongation of lag time.

次に添加剤 (担体) として、コロイダルシリカを用い、薬物としてトルブタミドを固体分散体化した例を示す。薬物とコロイダルシリカの処方比が 1:1 の時に完全にトルブタミドが非晶質化した固体分散体を調製することができた。薬物配合比を増加させると薬物の結晶性が增大したことから、薬物の非晶質化には、コロイダルシリカのシラノール基との相互作用が関与しており、フリーのシラノール基が無くなると薬物の結晶化が起きると推察された。これら固体分散体粒子からの薬物放出は、薬物配合比の増大とともに低下したことから薬物の非晶質化による溶解性改善への寄与も示唆された²⁹⁾。

4. コンポジット化ナノ粒子を用いた 粉末吸入製剤の設計

経肺投与は、従来から定量吸入法 (Metered Dose

Inhalation, MDI) が主流であったが、噴射剤として使用されるフロン (CFC) の全廃を受けて、代替フロンの開発と共に、粉末吸入法 (Dry Powder Inhalation, DPI) の開発が注目されている。DPI の設計ポイントは、吸入気流中での空気力学径が、0.5~7 μm の粒子のみが気管支や肺胞に到達し目的部位に沈着するところにある。気流中にナノ粒子を分散させることが出来ても、肺内に沈着することなく、呼気と共に排出されてしまう。その意味でも、ナノ粒子を標的的部位に沈着させるには、コンポジット化が必要になる。一方、粒子径が数 μm の微小粒子を製剤プロセス (例えば、カプセル充填) に供することは、その強い付着凝集性から一般に難しい。そこで、薬物粒子を造粒物としておき、気流中では崩壊させて目的のサイズの粉末にする方法 (造粒法) や、粗大 (20~30 μm) キャリアー粒子 (乳糖など) 表面に薬物粒子を吸着させておき、気流中でキャリアー粒子より分離・分散させる方法 (キャリアー法) が採られる。我々は、コンポジット化したナノ粒子をキャリアー法で DPI 製剤とした。

4.1. 難溶性抗喘息薬のナノ粒子化とコンポジット DDS 化

抗喘息薬は、経肺投与が有効であるといわれている。気管支などの薬物の作用組織 (部位) に直接薬物を送達し、局所での有効薬物濃度を増大させることが出来るからである。それにより、少量の薬物投与で静脈注射と同等またはそれ以上の効果を発揮させ、しかも、血中濃度を抑制することができ、副作用の防止も期待できる。モデル薬物として、ヒスタミン拮抗作用や抗ヒスタミン遊離作用を持った、難溶性の新規薬物 (YK113) を使用した。ナノ粒子化には、水中溶媒拡散法 (球形晶析法) に基づいた、ビルトアップ法を採用した⁴⁾。その理由は、薬物の結晶形をも晶析時に同時制御することを企図したからである。それによって、溶解性の改善も図る狙いである。具体的には、薬物の良溶媒飽和溶液 (メタノール:水=16:5 の混合溶媒) を PVA や、HPC などの水溶性高分子溶液中に注ぎ、晶析をさせる。ここで高分子は、晶析粒子表面に吸着し、表面改質剤とコンポジット化剤として働く。本法によって、粒子径が 250~400 nm のサブマイクロン一次粒子を得ることが出来た。未吸着高分子を洗浄・除去後、凍結乾燥して、高分子コンポジットナノ粒子を得た。コンポジット粒子は針状粒子の凝集物で、気中分散時に、約 8.6 μm の平均粒子径を示した。コンポジット粒子中の薬物は、非晶質化することが判明した。これは、晶析時薬物が過飽和状態から急激に析出するため、結晶配列が不規則になったためである。

コンポジット粒子中の薬物含量と、これを水中に再分散した時に得られる懸濁液の粒子径を Table 1 に示す^{30,31)}。プルロニックを使用した場合を除いて、いずれのコンポジット粒子とも容易に水中に再分散することができ、その平

均粒子径はナノオーダーであり、コンポジット化前のナノ粒子を再構築できることが判った。又、疎水基の寄与率が高い高分子ほど薬物粒子への吸着量が高いことが示された。コンポジット粒子の日本薬局方第2液中への溶解性を調べた結果を Fig. 7 に示す。

Table 1 Drug content and particle diameter of nanocomposite system.

	Drug content(%)	Particle size (nm)	
		Before F.D.	After F.D.*
PVA205(1%)	89.9	293.0	515.8
PVA405(1%)	82.7	270.5	799.1
PVAL-8(1%)	77.5	252.2	974.5
HPC-L(1%)	76.9	405.8	573.9
Pluronic(1%)	93.9	401.5	N.D.
Dextran(0.2%)	97.1	328.2	512.6

* : Redispersed in water after freeze-dry
N.D. : Not dispersible in water

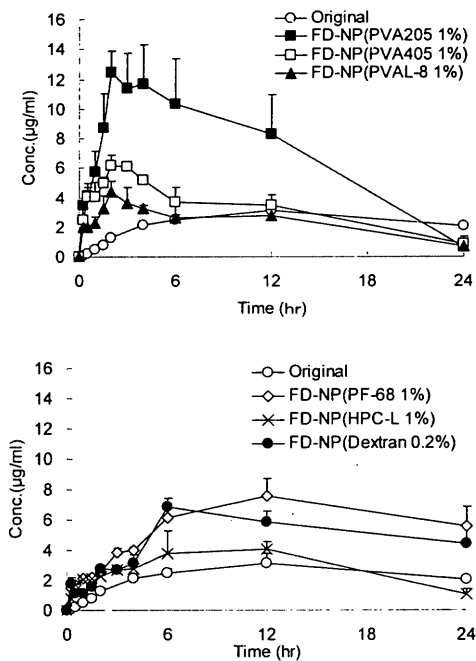


Fig. 7 Dissolution property of NP prepared with various soluble polymer.

Medium: JPXIV No.2 solution with 0.05% Tween80,
Test solution volume: 20mL, Powder amount: 4mg,
Temperature: 37°C, Stroke speed: 60 times/min

いずれのコンポジット粒子とも薬物原末(平均粒子径、11.0µm)に比べて高い溶解性を示した。特にけん化度の高い PVA205 コンポジット粒子にその効果が高いことが判った。これは、コンポジット粒子中の薬物粒子が非晶質化していること、コンポジット化高分子の表面改質効果により、薬物粒子の濡れ性が改善されたことによる。コンポジット粒子表面の濡れ性改善効果は、原末結晶 (571µg/m²)

よりもコンポジット粒子の高い水分吸着性 (846µg/m²) から判る。これらのコンポジット粒子は、それが肺内に吸入・沈着された時、薬物原末に比べ速やかに薬物を溶解させ、組織(作用部位)中の薬物濃度を高めるものと思われる。

4.2. コンポジットナノ粒子 DPI の吸入特性と薬理効果

乳糖を用いたキャリアー法により、薬物原末及びコンポジット粒子を DPI 化した。薬物及びコンポジット粒子の乳糖粒子表面への付着・固定化には、タッチミキサーまたは高速楕円ローター型粉体複合化装置(シータコンポーザー)を用いた。

In vitro 吸入特性は、ツインインピンジャーを用いて評価した。ツインインピンジャーは、空気力学径に依存した慣性力の違いを利用した分級装置であり、ステージ1とステージ2から構成されている。ステージ1とステージ2間の50%分離粒子径は6.4µmで、ステージ2に到達する粒子が肺内に到達するとみなされている。その割合をRF(%)で表した。タッチミキサーにより製したコンポジット粒子のキャリアー型DPIのRF値は、コンポジット粒子単独の場合と同等であった。シータコンポーザーによる、薬物原末及びコンポジットのRF値は、低くなる事が判った。シータコンポーザーでは、せん断力が強くかかり、薬物原末やコンポジット粒子のキャリアー粒子への固定化が強固になるため、キャリアーからの分離が難しくなるためと思われる。

In vivo 実験には Hartley 系雄性モルモットを用いた。吸入粒子の肺内分布は、経気管支投与後、気管、気管支、細気管支、肺胞を取り出し、沈着した薬物量を定量して求めた。In vitro 吸入特性に優れる、コンポジット粒子のキャリアーDPIは、In vivo 吸入特性も優れ、肺深部(肺胞)に薬物がよく送達された。

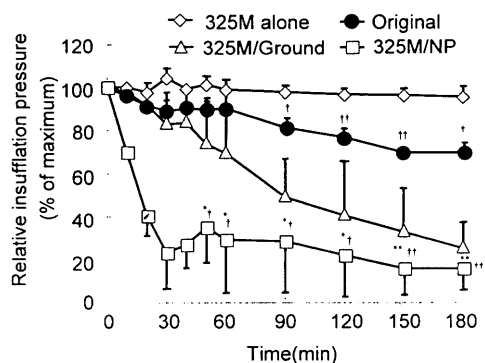


Fig. 8 Evaluation of pharmacological effect against histamine after administration via intratracheal route.

Administration amount (drug amount): 0.5mg, Ground: composite prepared by Theta-Composer (325M/ground=20/6), PM-NP: 325M/FD-NP (PVA205 1%) = 10/1, Only lactose and original: n=3, Ground: n=4, PM-NP: n=2

薬理効果の評価は粒子を経気管支投与後、一定時間ごとにヒスタミンを投与し、気管支収縮を惹起させ、気道抵抗を測定することにより行った。キャリアで運ばれたコンジット粒子では、原末の粉碎粒子を用いた場合に比べ、薬理効果が有意に短時間で発現し、またヒスタミンに対する拮抗作用も高い値を示した^{30,31)}(Fig. 8)。

これは、コンジット粒子の肺胞への送達量が多い事、沈着後速やかに薬物ナノ粒子を放出し溶解させ、薬物の局所濃度を高めるためと思われる。

5. ペプチド封入 PLGA ナノスフェアのコンジット化と経肺投与

著者等は、ペプチドの経粘膜投与を目指したポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノスフェアを開発している²⁰⁾。カルシトニンを封入した PLGA ナノスフェアをモルモットやマウスの気管支や胃内に直接投与すると、薬物溶液よりも血中カルシウム濃度が有意に減少し、それが持続する事を明らかにしている。本ナノスフェアをインスリンに適用し経肺投与型 DDS を開発した例を以下で紹介する。

5.1. インスリン封入 PLGA ナノスフェアコンジットを利用した DPI の設計

インスリン封入 PLGA ナノスフェアは、水中溶媒拡散法 (高分子球形晶析法) により製した。インスリンの塩酸溶液と PLGA のアセトン溶液の混液を、PVA 水溶液と、水酸化ナトリウム水溶液の混液中に攪拌下添加し、PLGA マトリックス中にインスリンが分散したナノスフェアを得た。溶媒の留去、水洗後凍結乾燥により、粉末化した。本ナノスフェアのコンジット化は、以下の2方法によった。

PLGA ナノスフェアを、マンニトールの水溶液中に懸濁させ、これを噴霧乾燥式流動層装置アグロマスター内に噴霧し、乾燥と造粒を同時に行い、マンニトール中に PLGA ナノスフェアが分散したコンジット体を得た。装置の吸気温度が高い (80℃) 場合には、平均約 4μm の球形の一次粒子が緩やかに凝集した造粒物であったが、吸気温度が低い場合 (55℃) には、一次粒子が融合した造粒物であった。そのため、気流中の分散性は、前者の造粒物の方が高く DPI として望ましいことが判った³³⁾。

そこで、前者の条件で、6-クマリンで標識したナノスフェアを 10%含有したコンジット体を調製した。これを 200mg 採り、水を滴下した所、わずか 0.9mL で標識粒子がコンジット体から分離し、分散することが観察された。分散粒子の粒子径は、約 260 nm で、オリジナルなナノスフェアが再構築されることが確認された。この結果は、肺内に吸入され沈着したコンジット粒子は、肺胞表面の少

ない水分によってもナノスフェアを再生し、薬物がナノスフェアから放出され吸収されるものと思われる。ナノスフェアの含有率が 10%以上になると、ナノスフェア同士がコンジット内で接触するようになり、調製温度が PLGA のガラス転移点よりも高い場合には、融着が生じ、オリジナルなナノスフェアが再構築されなくなることが判明した。

先の方法で調製した、PLGA ナノスフェアと吸入用グレードの乳糖 (325M, DMV) を 1 : 4 の組成割合でドライパウダー複合化装置、メカノフュージョン内 (Fig. 9)²²⁾ に採り、種々のクリアランスとローターの回転速度、処理時間でコンジット体を調製した。ここで、乳糖粒子は、キャリアとしてもコンジット化剤としても働く。クリアランスを狭く、ローターの回転数を速く、処理時間を長くすると、PLGA ナノスフェアの固定化効率上がるが、PLGA が融着し、乳糖表面でフィルム状になる事が判った。そのため、コンジット粒子を水中に再分散させるとき、オリジナルなナノスフェアを再構築できなかった。最適なクリアランスを選ぶと、回転速度に関係なく、ナノスフェアを再生することができた。

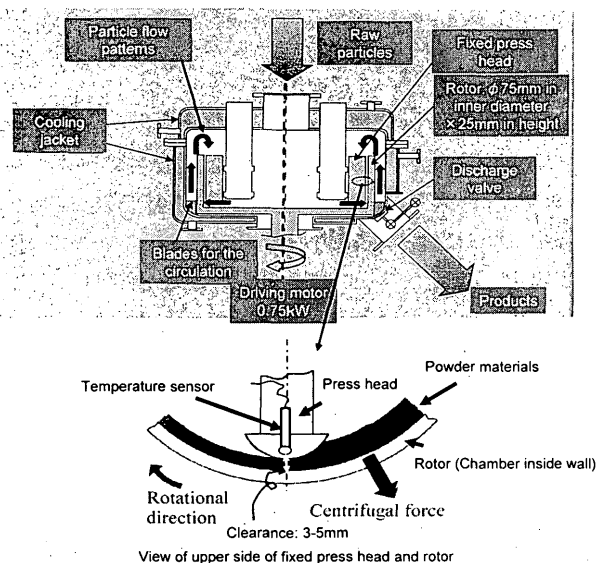


Fig. 9 Rotating chamber structure and basic principle of Mechanofusion system.

5.2. インスリン封入 PLGA ナノスフェアコンジットの吸入特性と薬理効果

アグロマスターにより製した造粒物型コンジットの in vitro 吸入特性を、カスケードインパクターで調べた (Fig. 10)。対照として、PLGA ナノスフェアの凍結乾燥粉体を使用した。対照品は、流動性が悪いため、吸入デバイスの種類に関係なく、カプセルからの放出量 (OE 値) が少なく肺内到達率 (RF 値) が低い。ここで OE 値は 100% - カプ

セル内残留%であり、0.5~7.0 μm のステージへの到達%を表わす。

powders (device)	OE (%)	RF (%)
□ freeze-dried NS (Spinhaler)	50.8 \pm 7.1	7.7 \pm 0.9
□ nanocomposite particles (Spinhaler)	70.4 \pm 5.9	16.3 \pm 1.1
▨ nanocomposite particles (Ehaler)	74.7 \pm 6.9	40.1 \pm 3.6
■ nanocomposite particles (Jethaler)	84.8 \pm 8.6	42.0 \pm 3.9

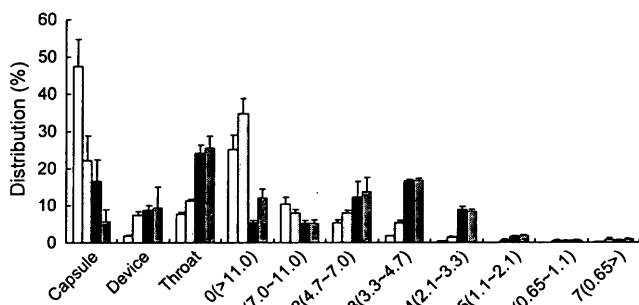


Fig. 10 In vitro inhalation behavior of PLGA nanocomposite particle prepared by Agglomaster®.

一方、コンポジット体は、流動性が改善され、吸入デバイスからのOE値が増大し

、RF値も有意に増大した。使用した吸入デバイスは、Spinhaler®、Jethaler®、E-haler®の3種類である。Spinhaler®はカプセル内に充填した粉末を吸気によりカプセル表面に使用時穿孔された細孔より放出させる機構を有している。Jethaler®は、吸入空気がカプセル内にも導入され粉末がカプセル内でも流動化するように改良されたものである。E-haler®は、デバイス内に攪拌ミル機構を内蔵しており凝集粉末の解砕機能を持つ。特にE-haler®を使用した場合には、造粒物は一次粒子まで崩壊し易くなり、吸入特性が増大した。

キャリアー型のコンポジット体のそれは、複合化装置のクリアランス幅、ローターの回転速度、処理時間の影響を受けた。これらのパラメーターを最適化(クリアランス5mm、回転速度370rpm、処理時間15分)すると、RF値は、スピンヘラーを用いた吸入で、44.5%に達した。

これらのコンポジット体を、シリンジ法により、ラットに経気管支投与し、PLGA ナノスフェアの肺内沈着分布を調べた³²⁾(Fig. 11)。肺胞、細気管支への沈着率は、ツインインピンジャーによる、RF値にほぼ対応する事が判った。

インスリンを封入した、PLGA ナノスフェアの凍結乾燥粉末及びそのコンポジット体をシリンジ法で、経気管支投与し、その薬理効果を評価した。キャリアー型のコンポジット体の結果をFig. 12に示す³²⁾。

インスリン溶液の経肺及び静脈投与群では、薬理効果が速やかに現れるが、8時間後には、グルコースは、元の血

中濃度に戻った。一方、コンポジット体投与群は、6時間後に、最も低い血中グルコース濃度を示し24時間後に元の血中濃度に戻る、持続的な薬理効果を示した。血中グルコース濃度下面積を比較すると、コンポジット体は、溶液の経気管支投与の、3.38倍、静脈投与の、1.6倍に当たり、高い薬理効果と持続性が示された。これは、インスリンをPLGA ナノスフェアに封入して徐放化できたこと、更に、これをコンポジット体にする事によって、効果的に肺胞部に送達し局所で再生できた事による。

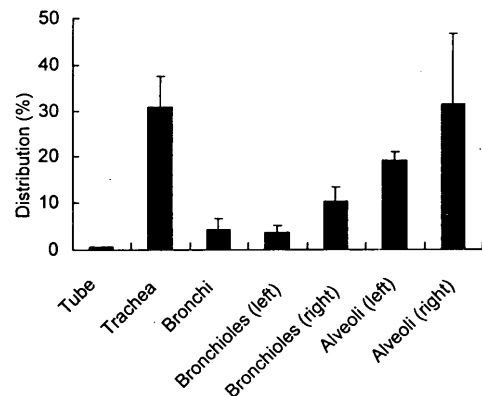


Fig. 11 Deposition distribution of composite particles in lung.

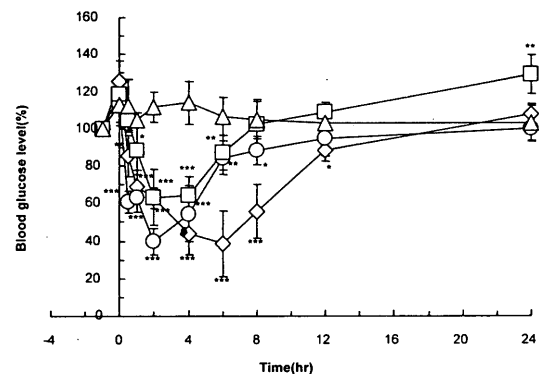


Fig. 12 Pharmacological effect of composite particles with insulin loaded PLGA nanosphere administered intratracheally.

◇ : Composite particles with insulin loaded PLGA nanosphere
○ : intravenous administered insulin solution
□ : intratracheally administered insulin solution
△ : intratracheally administered saline solution as control group
Dose of insulin: 3.0IU/rat. n=3, significantly different from control group (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, student t-test)

6. 結 言

薬物キャリアーの微粒子化によるDDSの機能向上は、その特異な生体との相互作用の助長作用にある。この作用は、粒子径と表面の物性により決まることが明らかにされつつある。その臨界粒子径を明らかにし、粒子径を精密に制御する必要がある。表面の物性をどのように設計するか

のコンセプトの確立が望まれる。これらの微粒子システムを実際の製剤にするには、その機能を保持し安定化できるコンポジット化法が必要である。熱が掛からず残留溶媒をクリアできる、超臨界流体中でのコンポジット化法は魅力でありスケールアップや、生産効率の改善が急務である³³⁾。噴霧乾燥流動層法は、ナノ粒子の2次粒子設計し、更にそれを2次粒子化することができ、粉末吸入DDSの設計に適した方法といえる。ペプチドのナノスフェアの経口DDS化においてもコンポジット化がキテクノロジーとなることは明らかで、最適処方設計と圧縮成形法の確立が望まれる。更に、新しいコンポジット化基剤(添加剤)の開発が必要になる。化学的方法と共に、既存物質の機能を如何に高めるかの粒子設計法の開発も必要である。これらによって、ナノテク薬物キャリアーが実際のDDSとして機能するのである。

7. 謝 辞

本総説の骨子は、新エネルギー産業技術総合開発機構(NEDO)のプロジェクト(13K293)の研究成果を纏めたものである。共同研究者の、岐阜薬科大学、竹内洋文助教授、山本浩充助手、ホソカワ粉体技術研究所横山豊和博士、辻本広行博士、プロジェクトに関わった大学院生諸氏に深謝する。

8. 参考文献

- 川島嘉明; “粒子設計工学”, 粉体工学会編, pp.1-12, 産業図書 (1999)
- H. Takeuchi, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Adv. Drug Delivery Revs*, **2001**, *47*, 39-54.
- E. Horisawa, K. Kubota, I. Tuboi, K. Sato, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, *Pharm. Res.*, **2002**, *19*, 132.
- 川島嘉明; *PHARM TECH JAPAN*, **2004**, *20*(1), 25-40.
- J.Kreuter, “Nanoparticles”, *Colloidal Drug Delivery System*, Marcel Dekker, **1994**, p.225.
- C. Damge, C. Michel, P. Couvreur, *J. Control. Rel.*, **1990**, *13*, 233-239.
- C.Dubernet, E. Fattal, P. Couvreur, “Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology” D.L. Wise. Edt., Marcel Dekker, **2000**, p.287.
- M. Husmann, S. Schenderlein, M. Lück, H. Lindner, P. Kleinebudde, *Int. J. Pharm.*, **2002**, *242*, 277-280.
- T. H. Lee, J. Wang, C-H Wang, *J. Control. Rel.*, **2002**, *83*, 437-452.
- N. Wakiyama, K. Juni, M. Nakano, *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, *29*, 3363-3368.
- H. Okada, Y. Doken, Y. Ogawa, H. Toguchi, *Pharm. Res.*, **1994**, *11*, 1143-1147.
- H. Okada, M. Yamamoto, T. Heya, Y. Inoue, S. Kamei, Y. Ogawa, H. Toguchi, *J. Control. Rel.*, **1994**, *28*, 121-129.
- S. Takada, Y. Yamagata, M. Misaki, K. Taira, T. Kurokawa, *J. Control. Rel.*, **2003**, *88*, 229-242.
- S. Takada, T. Kurokawa, M. Misaki, K. Taira, Y. Yamagata, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2003**, *55*(7), 951-961.
- Y. Nishioka, H. Yoshino, *Adv. Drug Delivery Revs*, **2001**, *47*, 55-64.
- T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou and Y. Kawashima, *J. Control. Rel.*, **1993**, *25*, 89-98.
- Y. Kawashima, M. Okumura, H. Takenaka, *Science*, **1982**, *216*, 1127.
- H. Murakami, Y. Kawashima, T. Niwa, T. Hino, H. Takeuchi, M. Kobayashi, *Int. J. Pharm.*, **1997**, *149*, 43-49.
- Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kuno, *Pharm Dev Technol.*, **2000**, *5*(1), 77-85.
- Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, S. Fujioka, T. Hino, *J. Control. Rel.*, **1999**, *62*, 279-287.
- H. Yamamoto, Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, *J. Control. Rel.*, **2005**, *102*(2), 373-381.
- 山本浩充, 倉嶋誉, 片桐大介, 楊明世, 竹内洋文, 川島嘉明, 横山豊和, 辻本広行, *薬理学*, **2004**, *4*, 25.
- K. Nakamichi, T. Nakano, S. Izumi, H. Yasuura, Y. Kawashima, *J. Drug Rel. Sci. Technol.*, **2004**, *14*(3), 193.
- 孕石愛雄, 北沢義夫, “粒子設計と製剤技術” 川島嘉明編, 薬業時報社, **1993**, p129.
- H. Takeuchi, T. Yasuji, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Pharm. Develop. Technol.*, **2000**, *5*, 355-363.
- H. Takeuchi, T. Yasuji, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *S. T. P. PHARM SCIENCE*, **2000**, *10*, 173-180.
- J.T. Fell, J.M. Newton, *J. Pharm. Sci.*, **1970**, *59*, 688-.
- H. Takeuchi, T. Yasuji, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Pharm. Res.*, **2000**, *16*, 94-99.
- H. Takeuchi, S. Nagira, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Powder Technol.*, **2004**, *141*, 187-195.
- 川島嘉明, *粉体工学会誌*, **2004**, *41*(6), 418.
- S. Hiraoka, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, PSWC2004 Abstract, p225.
- 山本浩充, 保科亘, 倉嶋誉, 竹内洋文, 川島嘉明, 横山豊和, 辻本広行, *粉体工学会誌*, **2004**, *41*(7), 514-521.
- 堤敦司, *粉体工学会誌*, **2000**, *37*, 887-896.