

岐阜薬科大学博士（薬学）学位論文

難吸収性薬物の経口吸収性改善を目指した
消化管滞留性製剤の設計に関する研究

杉 原 光

2013年

目次

諸論	1
第1章 粘膜付着性リポソームの消化管滞留性評価	4
第1節 緒言	4
第2節 キトサン修飾リポソームの物性	4
第3節 キトサン修飾リポソームの消化管滞留性評価	6
第1項 粒子径及びキトサン修飾による粘膜侵入性に及ぼす影響	6
第2項 消化管内挙動の経時的変化	7
第3項 粒子径及びキトサン修飾による消化管滞留性に及ぼす影響	9
第4項 キトサン修飾による消化管滞留性の経時的変化	11
第5項 キトサン修飾リポソームの粘度	13
第4節 キトサン修飾リポソームの粘膜付着量	14
第5節 食餌の摂取が消化管滞留性に及ぼす影響	15
第1項 キトサン修飾による消化管滞留性に及ぼす影響	15
第2項 消化管内挙動の経時的変化	17
第3項 共焦点レーザー顕微鏡を用いた粘膜付着挙動評価	19
第6節 小括	21
第2章 インドメタシン封入粘膜付着性リポソームの製剤設計検討	22
第1節 緒言	22
第2節 インドメタシン封入キトサン修飾リポソームの物性	22
第3節 <i>in vitro</i> 薬物放出性評価	23
第4節 薬物吸収性評価	24
第1項 血漿中薬物濃度推移	24
第2項 <i>in vivo</i> 薬物放出性プロファイル	27
第5節 食間投与における薬物吸収性評価	28
第6節 小括	31
第3章 プランルカスト水和物の胃内滞留性製剤設計検討	32
第1節 緒言	32
第2節 プランルカスト水和物の物理化学的性質	33
第3節 胃内膨潤性製剤の設計コンセプトの検証	34
第1項 消化管の吸収面積、消化管滞留時間	34
第2項 ガンマシンチグラフィによるヒト消化管吸収部位差の評価	35
第4節 胃内膨潤性製剤の設計検討	37
第1項 膨潤層の設計検討	37
第2項 薬物放出層の設計検討	38

第3項	ビーグル犬に経口投与後の薬物吸収性評価	39
第5節	胃内膨潤性製剤のヒト体内挙動と血中動態評価	42
第1項	胃内膨潤性製剤の <i>in vitro</i> 薬物放出試験	42
第2項	胃内滞留性評価	43
第3項	薬物吸収性評価	45
第4項	投与タイミングによる血中動態の評価	47
第6節	小括	49
第4章	総括及び考察	50
実験の部		52
略語表		64
謝辞		65
引用文献		66

諸論

新薬開発においては、従来より経口製剤の開発に非常に重点が置かれている。医薬品製剤として経口製剤が望まれる理由として、食物の摂取と同じ経路であることから投与が自然で簡便であり、普段の生活でも違和感がないこと、また、消化管が薬物吸収に適した構造をとり吸収表面積が大きいことなどが挙げられる。しかし、医薬品の開発候補化合物の中で経口投与に理想的な生物薬剤学的性質を有するものは数少なく、十分な経口吸収性が得られないため多くの候補化合物がドロップアウトしてしまう¹⁻⁷⁾。経口投与による薬物の吸収を制限あるいは阻害することが知られている要素として、消化液中での溶解度不足、不安定性、また消化管上皮細胞における低透過性、特定の消化管部位における酵素的あるいは非酵素的分解、代謝、さらに消化管に存在する金属イオンとのキレート形成などが挙げられる。特に近年創出される医薬品候補化合物の多くは難溶解性、難膜透過性のいずれか、或いは両方の問題を抱えており⁸⁻¹¹⁾、医薬品の薬理作用を十分に発揮させるために薬物吸収性を改善する必要がある。

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、DDS に関する基礎研究が積み重ねられ、化合物が抱える難溶解性、難膜透過性という問題点を製剤学的に改善する試みがなされている。経口投与された薬物の吸収性及び血中動態を改善する方法として、プロドラック化¹²⁻²³⁾、薬物の微細化²⁴⁻³⁴⁾、固体分散体化³⁵⁻⁴⁵⁾、吸収促進剤の併用⁴⁶⁻⁵⁶⁾などに加え、マイクロカプセル、ナノパーティクル、リポソーム、エマルジョンなどの微粒子薬物キャリアーを用いて難吸収性薬物の消化管吸収性を改善した研究がいくつか報告されている⁵⁷⁻⁶⁵⁾。また、製剤の消化管内動態を積極的に制御し、薬物吸収性が適した消化管部位への滞留時間を増大させて、難吸収性薬物の吸収性及び血中動態を改善しようとする消化管滞留性製剤が期待を集めており、その代表的な製剤として粘膜付着性製剤、胃内滞留性製剤が挙げられる。

粘膜付着性製剤は、消化管粘膜に付着して消化管における製剤の滞留時間を延長することに加え、製剤からの薬物放出性を制御することによって吸収性と血中動態を改善する製剤であり、1985年に Longer らのグループによって粘膜付着性ポリマーを用いて薬物のバイオアベイラビリティを向上できることが報告されている⁶⁶⁾。微粒子薬物キャリアーを用いた粘膜付着性製剤として、脂肪酸のポリグリセロールエステルから成るマイクロスフェアを粘膜付着性ポリマーであるカーボポールで表面修飾することによってラット消化管粘膜に付着して消化管滞留性が向上し⁶⁷⁾、更に健常人に経口投与後のフロセミド及びリボフラビンの吸収性と血中濃度持続性が改善すること⁶⁸⁾、アルギン酸/キトサンナノパーティクル⁶⁹⁾やレクチンマイクロパーティクル⁷⁰⁾によってラットに経口投与後のインスリンの吸収性が増大、持続すること、また、グリクラジドをアルギン酸ビーズに封入することによって、市販グリクラジド錠よりも薬理効果が増大、持続化することが報告されている⁷¹⁾。

微粒子薬物キャリアーであるリポソームは1964年にイギリスの Bangham 等により発見さ

れた⁷²⁾内部に水相を有したリン脂質二分子膜からなる閉鎖小胞であり、水相及び油相の 2 相を有することに加え、リポソーム表面を修飾して体内動態を制御するための機能を付与することができるため、薬物動態を改善するための DDS キャリアーとして有用である。当研究室ではこれまでに負に帯電したリポソームの表面を正に荷電した粘膜付着性ポリマーであるキトサンで修飾したリポソーム (CS-Lip) を開発し、ラットに経口投与後のインスリンの薬理効果が増大、持続化することを明らかにしてきた^{73, 74)}。また、同様にペプチド性薬物であるカルシトニンについて、粘膜付着性ポリマーであるカーボポールで表面修飾したリポソームによって、CS-Lip 同様に薬理効果が増大することを確認している⁷⁵⁾。更に、CS-Lip の粒子径の影響について評価を行い、サブミクロンサイズに微細化した CS-Lip (ssCS-Lip) は、マイクロサイズのリポソームに比べてラット消化管粘膜の深部まで侵入し、薬理効果が経口投与後 120 時間まで持続することを明らかとしている^{76, 77)}。しかし、ssCS-Lip の薬物キャリアーとしての機能は確認できたものの、ssCS-Lip の消化管滞留挙動については十分に明らかにできていないことに加え、薬物吸収性についても、インスリンやカルシトニンはペプチド性薬物であるため血中濃度の検出が困難であり、バイオアベイラビリティといった指標で薬物吸収性の改善効果は明らかにできていない。上記のようにリポソームがペプチド性薬物の薬物キャリアーとして有用であることを示してきたが、低分子薬物のキャリアーとしても有用であると考えられ、特に難溶解性薬物の吸収性改善効果についても期待される。

一方、胃への製剤の滞留性を向上させて薬物を徐放し、薬物吸収性を改善する胃内滞留性製剤が知られている。胃内滞留性製剤化には大きく 3 つのアプローチがあり、上述したような粘膜付着性製剤、次に投与製剤の比重を小さくして胃内に浮遊させて幽門から遠ざけ、胃から排出されにくくする胃内浮遊性製剤、そして胃内水分を吸収して膨潤し、幽門通過を遅延させる膨潤性製剤が挙げられる。胃内滞留性製剤化を企図して、多くの臨床試験がそれぞれ、粘膜付着性⁷⁸⁻⁸²⁾、浮遊性⁸³⁻⁹⁵⁾及び膨潤性製剤⁹⁶⁻⁹⁸⁾について報告されており、胃内滞留性製剤は吸収ウィンドウを有するような薬物を経口持続性製剤として設計する際の革新的な製剤技術となり得る製剤化アプローチである。実際、消化管全体を通して十分に吸収される薬物は比較的少なく、大多数の薬物の透過性は近位小腸から大腸へと下降するにつれて低下するため、その応用が期待されている。

オノン®カプセル 112.5 mg (一般名：プラナルカスト水和物) はシステイニルロイコトリエン (cysLTs) 受容体拮抗剤であり、気管支喘息及びアレルギー性鼻炎が対象疾患である。しかし、プラナルカスト水和物は難溶解性、難膜透過性薬物であり、経口吸収性が非常に低く、1 日 2 回朝、夕食後にそれぞれ 2 カプセルずつ服用する必要がある。一方、同効能の薬剤として、SINGULAIR® (Merck) 及び ACCOLATE® (AstraZeneca) がそれぞれ上市されており、特に SINGULAIR®は半減期が長いことため 1 日 1 回投与型製剤である。このため、患者さんの QOL 改善のみならず、市場における商品的価値の向上という点からもプラナルカスト水和物を 1 日 1 回服用型の経口持続性製剤へと改良することは意義深い、プラナルカ

スト水和物が難吸収性薬物であるため、製剤設計に十分留意して進める必要がある。

そこで本研究は、難吸収性薬物の経口吸収性向上を目指した消化管滞留性製剤の設計を目的として検討を実施した。サブミクロン化したキトサン修飾リポソームをラットに経口投与した後の消化管内挙動を詳細に解析し、難吸収性薬物であるインドメタシンを封入したリポソームを設計した。ラットに経口投与後の吸収性から、難吸収性薬物であるインドメタシンの吸収性改善が可能であること、また、消化管滞留挙動を制御することによって血中濃度が持続することを明らかにできた。また、難吸収性薬物であるプラナルカストについて、ヒト消化管における吸収部位差を明らかとし、胃内滞留型持続性製剤としての設計を行った。ビーグル犬を用いた製剤設計コンセプトの確認、更にヒトにおける胃内滞留挙動及び血中動態評価を行い、吸収ウィンドウを有する難吸収性薬物の経口持続性製剤化に関する設計法を提示することができた。以下、各章にわたり、その研究経緯及び成果を詳述する。

尚、本論文は以下の如く、既に公表した論文を総括したものである。

- 1) Effects of food intake on the mucoadhesive and gastroretentive properties of submicron-sized chitosan-coated liposomes.
H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, H. Takeuchi
Chem. Pharm. Bull., 60(10) (2012) 1320-1323

- 2) Effectiveness of submicronized chitosan-coated liposomes in oral absorption of indomethacin
H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, H. Takeuchi
J. Liposome Res., 22(1) (2012) 72-79

第1章 粘膜付着性リポソームの消化管滞留性評価

第1節 緒言

当研究室ではこれまでにキトサン修飾したリポソームが優れた消化管粘膜付着機能を示し、難膜透過性物質であるペプチド性薬物のインスリンやカルシトニンについてラット経口吸収性が改善できることを明らかとしてきた⁷³⁻⁷⁵⁾。また、その粒子径をサブミクロンサイズに微細化することで消化管粘膜層への侵入性が向上し、薬理効果が増大する知見を得ている⁷⁶⁻⁷⁷⁾。しかし、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームのペプチド性薬物のキャリアーとしての有用性は確認できたものの、消化管滞留及び付着挙動については十分に明らかにできていない。胃は胃酸の分泌による強酸性環境下であることや、消化管環境下では胃液、膵液、腸液に含まれる酵素群、食餌成分の存在、また、胃や腸の運動性といった様々な刺激が製剤に加わり、粘膜付着性リポソームの機能性に影響を与えるものと考えられる。特に食餌により消化管環境が変化すると、粘膜付着性製剤の消化管滞留性に影響が生じる可能性があることから、食餌の影響を評価することは経口粘膜付着性製剤の設計を実施する上では重要な知見となる。

そこで本章では、当研究室で有用性を見出しているサブミクロン化キトサン修飾リポソームの *in vivo* 消化管粘膜付着挙動をより詳細に明らかにするために、絶食時及び摂食時における消化管内挙動をそれぞれ検討した。粒子径が異なるキトサン修飾及び未修飾リポソームをそれぞれ調製し、ラットに経口投与後の小腸各部位に存在するリポソームを共焦点レーザー走査顕微鏡で観察すると共に、それぞれの部位に分布したリポソームを定量して消化管滞留性を評価し、キトサン修飾リポソームの有用性について評価を行った。

第2節 キトサン修飾リポソームの物性

リポソームの粒子径、表面電荷、膜の流動性や透過性などの粒子物性は、薬物キャリアーの物理化学的安定性、生体内安定性を考える上で重要な因子である⁹⁹⁾。リポソームなどのコロイド分散系製剤は光学的、流体力学的、電気的な特性を併せもつことから、粒子物性をさまざまな方法で評価することができる。一般的に電子顕微鏡による粒子の観察¹⁰⁰⁾、光学的異方性に基づく形状予測¹⁰¹⁾、トラップ容積の測定¹⁰²⁾、蛍光プローブ法^{103,104)}、スピンドラベル法^{105,106)}、示差熱分析¹⁰⁷⁾や核磁気共鳴 (NMR)¹⁰⁸⁾による膜流動性評価が可能である。リポソームの表面特性、特にポリマーによる表面修飾の成否を推定する最も簡便な方法として、荷電リポソームの表面電位の測定が挙げられる。リポソーム粒子表面には電気二重層が形成されており、ポリマーが粒子表面に存在すると表面電位の変化が期待できるからである。媒質とリポソーム粒子との相対運動はこの電気二重層中のある面で起こる。この面を滑り面と呼び、この界面における電位差をゼータ電位と呼ぶ。ゼータ電位は、溶液の pH、イオン強度、電解質の組成を調節することによって変化する。真の粒子表面の電位を測定することは困難であるため、このゼータ電位を表面電位に代わる指標として用い

ることが多い。以下、このパラメーターを測定することにより、リポソームの表面特性を評価した。

薄膜水和-超音波処理法により調製した粒子径がマイクロサイズ、サブミクロンサイズの未修飾リポソーム及びキトサン(CS-15)で修飾したリポソームについて、精製水中、また pH4.4 酢酸緩衝液中においてゼータ電位を測定した結果を Table 1-1 に示した。また Fig.1-1 はゼータ電位をグラフにて示した。尚、当研究室の研究結果よりリポソームの脂質組成は、DSPC:DCP:Chole.=8:2:1 を使用し、キトサン濃度はコーティング量に飽和が認められた 0.3% とした。

未修飾リポソームのゼータ電位は組成中に含有したジセチルリン酸(DCP)により負の値を示したのに対して、キトサン修飾したリポソームのゼータ電位は正の値を示した。これはキトサン中のアミノ基に由来した正電荷と考えられる。このことからリポソーム表面にはキトサンによるコーティング層が形成されていることが確認された。

尚、精製水中に比べて酢酸緩衝液中において、また酢酸緩衝液の塩濃度が高くなるとリポソームのゼータ電位の絶対値が小さくなるのは、緩衝液中のイオンによって拡散二重層が圧縮されたためと考えられる。

以下、これらリポソームを用いて消化管滞留挙動の評価を行った。

Table 1-1 Particle size and zeta potential of non and chitosan coated liposomes. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %. (n=3)

	Particle size	Zeta potential (mV)		
		distilled water	10 mM A.B.	100 mM pH4.4 A.B.
Lip.	2.74 μ m	-69.7 \pm 1.8	-52.5 \pm 0.2	-24.3 \pm 1.7
ssLip.	206 nm	-44.7 \pm 0.4	-44.7 \pm 0.4	-24.0 \pm 1.4
CS-Lip.	6.90 μ m	60.2 \pm 0.2	52.4 \pm 0.3	40.5 \pm 1.7
ssCS-Lip.	269 nm	55.3 \pm 2.6	49.1 \pm 0.7	37.4 \pm 0.1

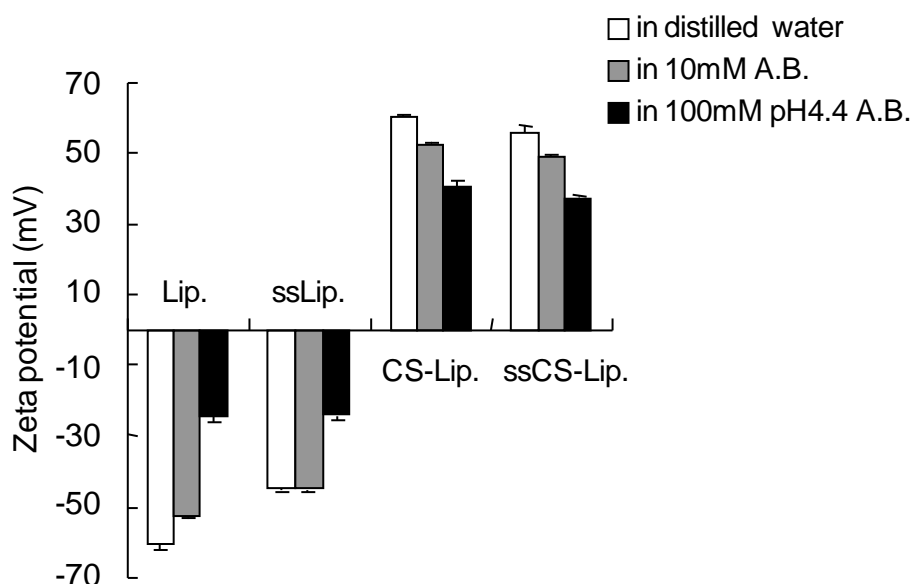


Fig.1-1 Zeta potential of non and chitosan coated liposomes in various medium. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %. (n=3)

第3節 キトサン修飾リポソームの消化管滞留性評価

第1項 粒子径及びキトサン修飾による粘膜侵入性に及ぼす影響

脂質蛍光マーカーである DiI を封入した粒子径がマイクロサイズ、サブミクロンサイズの未修飾及びキトサン修飾リポソームを 0.168 mg DiI/rat となるようにラットに胃内投与し、投与 60 分後の回腸上部における各種リポソームの粘膜付着・侵入性を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した結果を Fig.1-2 に示した。尚、図中の白線がそれぞれ小腸膜境界を、赤色部分がリポソームを示す。

キトサン表面修飾の有無によらず粒子径がマイクロサイズのリポソームでは、粘液層に粒子が留まっているのに対して、サブミクロン化したリポソームは粘膜層深部まで侵入し、漿膜側においても粒子の存在が確認された。この粘膜層侵入性増大の要因の 1 つとして、キトサンがタイトジャンクションを開口させる報告があることから¹⁰⁹⁻¹¹³、キトサン修飾リポソームがタイトジャンクションを開口し、小腸細胞間へと粒子が移行した可能性が考えられた。一方、未修飾リポソームも同様に粘膜層への侵入性が向上していることが確認できた。リポソームは生体の構成成分であるリン脂質の集合体であり、生体細胞との親和性が高いと考えられる。このため粘液層を通過したリポソームは小腸組織へと侵入したのではないかと推察された。

この *in vivo* 粘膜侵入性評価の結果から、当研究室で明らかにしているように⁷⁶⁻⁷⁷、粘膜層への粒子の侵入性を決定づけるのは粒子径であり、粒子径をサブミクロン化することで粘膜層への侵入性が顕著に増大することが確認された。

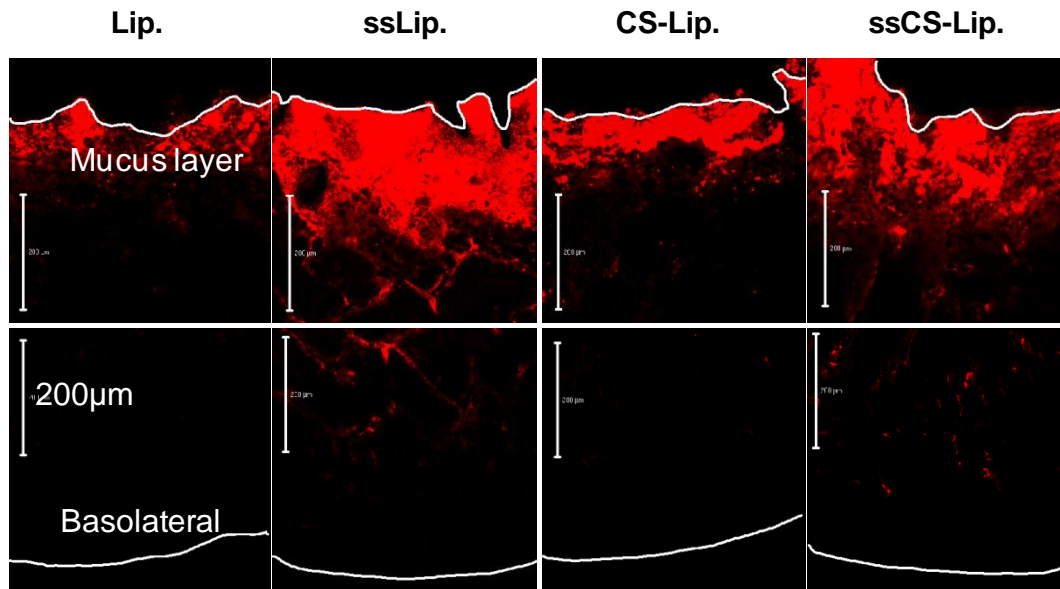


Fig.1-2 Mucopenetrative properties of various types of liposomes in upper ileum at 60 min after intragastric administration. The measured mean particle sizes of Lip, ssLip, CS-Lip and ssCS-Lip were 7.56 μ m, 224.7nm, 3.58 μ m and 281.2 nm, respectively. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %.

第 2 項 消化管内挙動の経時的変化

本項ではラットに経口投与後の消化管におけるリポソーム挙動について共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察すると共に消化管各部位に存在するリポソームを定量し、消化管粘膜付着・滞留挙動を評価した。本項では、まずサブミクロン化キトサン修飾リポソームが消化管内を移動する様子を経時的に評価した。

DiI を含有したサブミクロン化キトサン修飾リポソームをラットに 0.168 mg DiI/rat になるように経口ゾンデにて胃内投与し、投与後 15、60、120 分の小腸各部分について組織切片を作成し、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した結果を Fig.1-3 に示した。投与 15 分後ではリポソームは十二指腸、空腸に存在し、回腸には到達していなかったが、投与 60 分後には十二指腸に存在するリポソーム量は明らかに減少し、回腸上部へと移行し、投与 120 分後には回腸下部へと移行する様子が確認された。またサブミクロン化キトサン修飾リポソームは、いずれの部位においても粘膜層深部へと侵入している様子が確認された。このことからリポソームの消化管移行挙動が共焦点レーザー走査顕微鏡によって視覚的にかつ経時的に評価できることが確認でき、キトサン修飾リポソームは小腸粘膜に付着・侵入しながら、経時的に小腸内を移動してゆくことが明らかとなった。

また、サブミクロン化キトサン修飾リポソームを投与して 15、60、120 分後の胃、小腸各部位のリポソームの定量結果及び各部位のリポソーム量を合計し、投与量に対する割合を算出した結果を Fig.1-4 に示した。投与 15 分後では約 50%のリポソームが胃内に存在し

ているものの、空腸領域にも移行し、空腸下部までリポソームが移行していることがわかった。投与 60 分後になると、胃内から多くのリポソームが排出され、空腸下部、回腸上部に多く確認された。120 分後では胃に 10% 程度残存していたが、大部分が回腸に移行していた。このことから、胃内投与したリポソームは胃粘膜にも長時間付着し、胃内から排出されたリポソームは消化管内を経時的に移動することが確認され、共焦点レーザー走査顕微鏡による観察結果とよく一致することが確認できた。

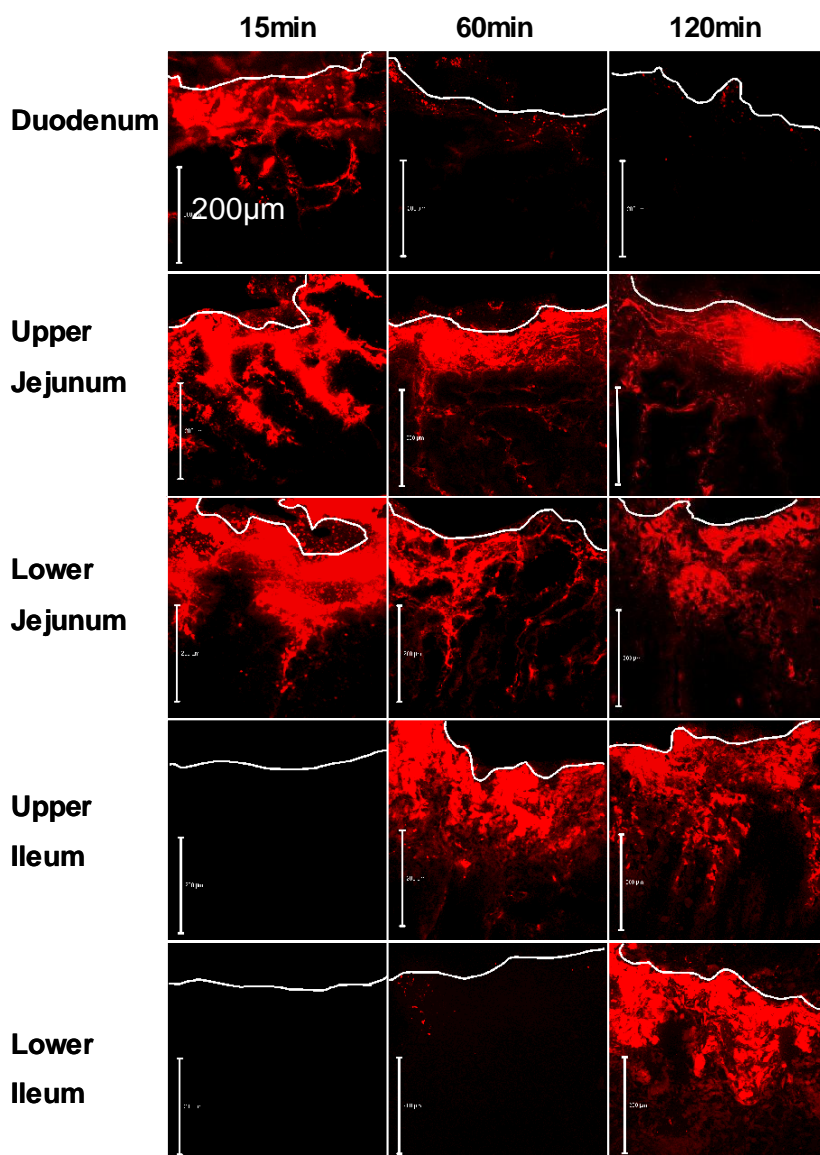


Fig.1-3 Confocal laser scanning microscopic images of ssCS-Lip in various parts of the intestinal tract as a function of time after intragastrical administration. The measured mean particle size of ssCS-Lip was 281.2nm. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %.

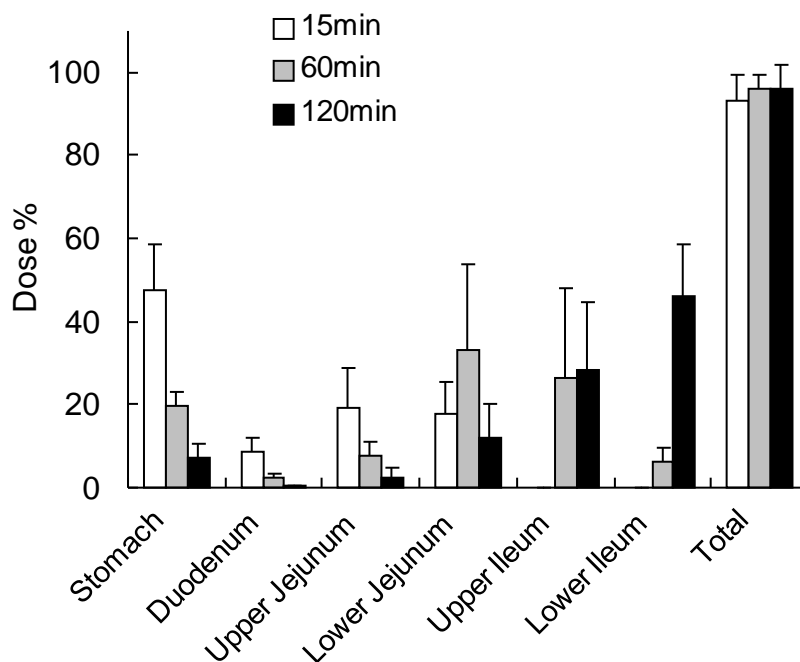


Fig. 1-4 Dose percentage of ssCS-Lip in various parts of the gastrointestinal tract at 15, 60, 120 min after intragastrical administration. The measured particle size of ssCS-Lip was 304.7 nm. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %. (n=4)
(H Takeuchi, Y Matui, H Sugihara, H Yamamoto, Y Kawashima, Int. J. Pharm., 303(2005)160-170)

第3項 粒子径及びキトサン修飾による消化管滞留性に及ぼす影響

第2項におけるキトサン修飾リポソームの消化管内挙動の経時的評価より、リポソームが消化管内を経時的に移動していく様子が確認された。そこで本項では、表面特性の異なるリポソームを経口投与し、一定時間経過後におけるリポソームの消化管内分布を定量的に比較検討し、消化管滞留性を評価した。

粒子径がマイクロサイズ、サブマイクロサイズの未修飾及びキトサン修飾リポソームをラットに経口投与し、投与60分後の消化管各部位におけるリポソーム量を定量した結果をFig.1-5に示した。未修飾リポソームの場合、いずれも胃に7%程度存在するものの、十二指腸、空腸上部にはほとんどリポソームは滞留しておらず、大部分は回腸領域へと移行していた。またマイクロサイズの未修飾リポソームについては胃及び小腸各部位からのリポソーム回収率が有意に減少したことから、大腸へと粒子が移行しているものと考えられた。一方、サブマイクロ化したキトサン修飾リポソームは、胃に約20%滞留し、また空腸や回腸上部に多く確認され、消化管上部に滞留していることが明らかとなった。この結果は、

マイクロサイズのキトサン修飾リポソームに比べてもその傾向は顕著であった。

第 1 項に示したりポソームの消化管粘膜層への侵入性向上の結果と併せて考察すると、サブミクロン化キトサン修飾リポソームの粘膜層深部への移行が、消化管滞留性向上の一因となっていると考えられた。以上のことから、リポソームをキトサンで表面修飾することで消化管粘膜に付着滞留し、更に粒子径をサブミクロンサイズに微細化することで胃への滞留性が顕著に向上すると共に小腸移動速度も遅延して、消化管滞留性が向上することが明らかとなった。

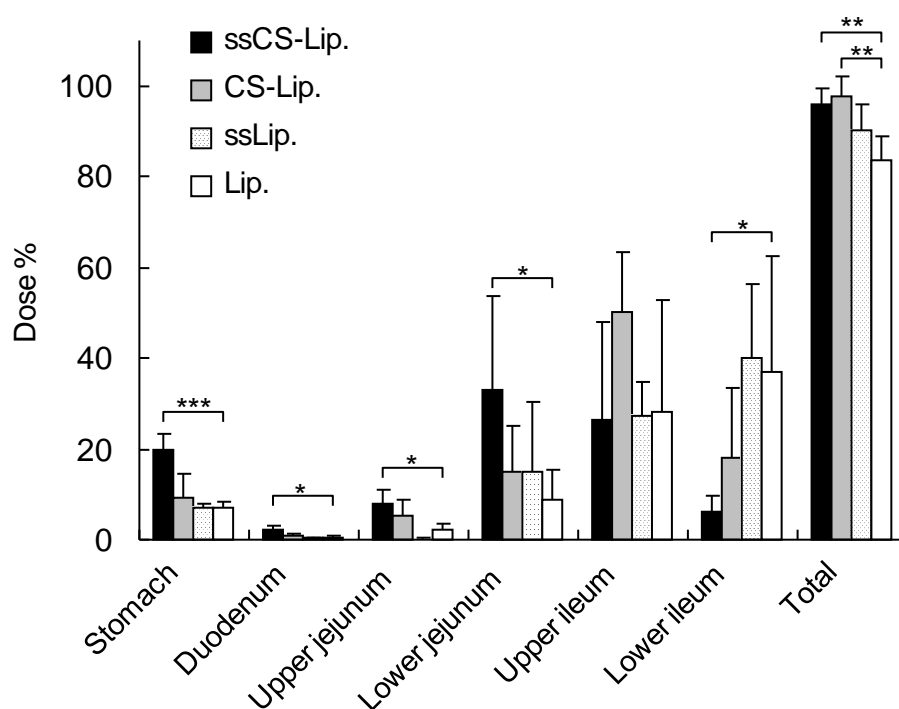


Fig.1-5 Retention profiles of various types of liposomes in the gastrointestinal tract at 60 min after intragastrical administration. The measured particle size of Lip, ssLip, CS-Lip and ssCS-Lip were 3.90 μm , 182.9 nm, 7.46 μm and 304.7nm, respectively. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: significantly different from Lip. (n=4) (H Takeuchi, Y Matui, H Sugihara, H Yamamoto, Y Kawashima, Int. J. Pharm., 303(2005)160-170)

第4項 キトサン修飾による消化管滞留性の経時的変化

前項までの検討で、サブミクロン化キトサン修飾リポソームはキトサンによる粘膜付着性及びサブミクロン化によって消化管粘膜への侵入性が向上し、消化管滞留性が最も向上することを明らかとした。しかし、サブミクロン化した未修飾及びキトサン修飾リポソームについての経時的・定量的な滞留性の違いはまだ十分に解明できていない。消化管におけるリポソームの滞留時間を明らかにすることは経口剤化処方設計において有益な情報となることから、サブミクロン化した未修飾及びキトサン修飾リポソームについて、消化管滞留性の経時的変化を直接比較した。

サブミクロン化したキトサン修飾リポソーム及び未修飾リポソームをラットに胃内投与し、投与 60、120 及び 240 分後の消化管各部位における滞留量を比較した結果を Fig.1-6 に示した。投与 60 分後において、未修飾リポソームは回腸下部に主に分布する傾向を示したのに対して、キトサン修飾リポソームは胃における滞留性が有意に向上し、また約 40 %が空腸に存在していることが確認できた。投与 120 分後において、胃及び小腸各部位に滞留した未修飾リポソームは投与量に対して 60%程度であったのに対し、キトサン修飾リポソームはほぼ全量が滞留していることが確認できた。投与 240 分後には未修飾リポソームの胃及び小腸各部位に滞留の滞留量は 8.2%まで低下したが、キトサン修飾リポソームの滞留量は 38.1%であった。これらの滞留挙動を比較すると、キトサン修飾リポソームは未修飾リポソームに比べてより遅く消化管を移動することが確認され、キトサンによる粘膜付着機能により消化管滞留性が向上し、240 分以上に渡って小腸に滞留することが確認できた。従って、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームは小腸を主たる吸収部位とする難吸収性薬物に対して、消化管との接触の機会を増大させて、吸収性改善を図るような効果が期待できると考えられた。

投与形態として、リポソーム懸濁液のようなマルチプルユニットタイプの場合、シングルユニットタイプに比べて粘膜層と相互作用するための機会が向上することから、これまで粘膜付着機能を有したマルチプルユニットタイプの投与形態が種々報告されてきた。秋山ら⁶⁷⁾は、粘膜付着機能を有したカーボポールからなるマイクロスフェアを投与後、胃及び小腸に残存するマイクロスフェア数をカウントして滞留パターンを評価し、胃への残存性が増大して胃内滞留時間が延長することを明らかにしている。宮崎ら¹¹⁴⁾は、デキストラン誘導体と酢酸酪酸セルロースで電荷的に相互作用させて調製したマイクロスフェアについて胃内滞留性が増大することを同様の方法にて評価している。これらのマイクロスフェアは消化管表面の粘膜層と相互作用するものであるが、薬物の吸収改善においては吸収部位における滞留時間を延長させるだけでなく、血管との距離を近づけることもまた重要である。したがって、粘膜侵入性を示す粒子は薬物吸収性において利点を有していると考えられる。我々が示したように粘膜侵入性は粒子径に依存しており、十分な粘膜侵入性を示すためには粒子径をサブミクロンサイズに制御する必要がある。秋山ら及び宮崎らの報告

したマイクロスフェアの粒子径は 100 μm 以上であることから、粘膜侵入性は期待できないと考えられる。一方、我々のサブミクロン化キトサン修飾リポソームは粒子径を 300 nm 程度に制御しており、更にキトサンはタイトジャンクションを開口させる機能も有している。従って、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームは特に難吸収性薬物の吸収性改善が期待できる薬物キャリアーであると考えられた。

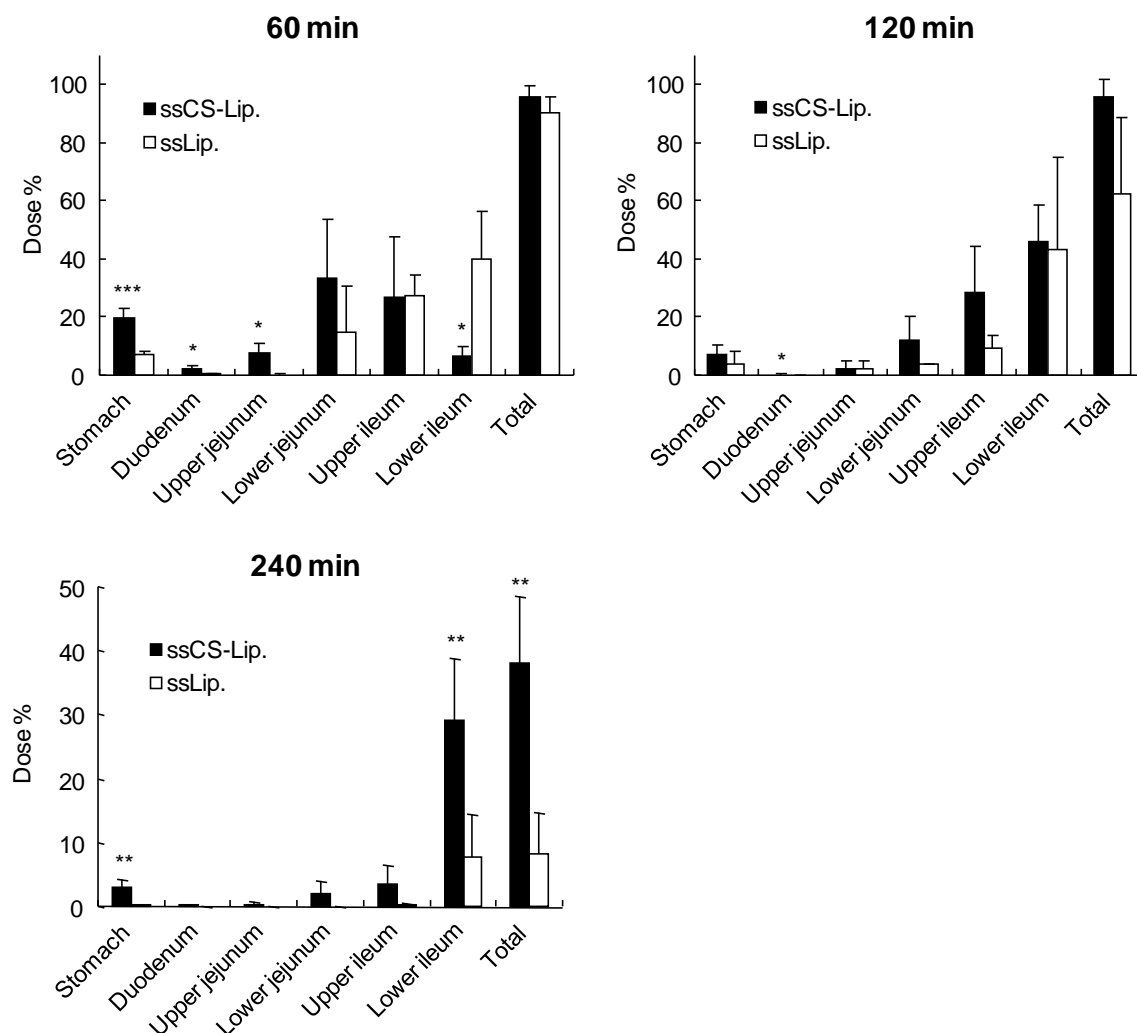


Fig.1-6 Retention profiles of ssCS-Lip and ssLip in the GI tract at 60, 120 and 240 min after i.g. administration. The measured mean particle sizes of ssLip and ssCS-Lip were 182.9 and 304.7 nm, respectively. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The chitosan concentration for the coating was 0.3 %. , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$: significantly different from ssLip. (n=4)

第5項 キトサン修飾リポソームの粘度

前項までの検討において、種々のリポソームの消化管滞留性を評価し、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームは最も消化管滞留性が向上することを示した。しかし、消化管滞留性に影響する製剤の物性として、製剤のもつ粘度が挙げられる¹¹⁵⁾。特にキトサンは高分子であるため、キトサン修飾リポソームの粘度が高くなって滞留性が向上したことも原因として考えられる。そこで本項では、滞留性向上の原因を明確にすることを目的としてキトサン修飾リポソームの粘度を評価した。

粒子径がマイクロサイズ、サブミクロンサイズの未修飾及びキトサン修飾リポソームの粘度を回転粘度計により測定した結果を Table 1-2 に示した。キトサン修飾、未修飾リポソームいずれも、粘度は低い数値となった。未修飾リポソームに比べて、マイクロサイズのキトサン修飾リポソームの粘度がやや高くなっているが、これはキトサンの添加により、粒子同士が架橋されたためと考えられた。これに対してサブミクロン化キトサン修飾リポソームは、超音波処理により分散性が向上しているために、粘度が減少したものと推察された。

以上のことから、これらリポソームの粘度は低く、本研究で認められた消化管滞留性向上が粘度によるものではないことが確認された。

Table 1-2 Viscosity of various types of liposomes measured by rotary viscometer at 25 °C. The formulation of liposomes was DSPC:DCP:Chol.=8:2:1, The chitosan concentration for the coating was 0.3 %.

	Particle size	Viscosity (mPa · s)
0.3 % CS-soln.	-	3.8
Lip.	3.59 µm	3.1
ssLip.	163 nm	2.6
CS-Lip.	8.90 µm	10.6
ssCS-Lip.	344 nm	3.1

第4節 キトサン修飾リポソームの粘膜付着量

前節では、経口投与後のリポソームの消化管滞留性を定量的に評価し、キトサン修飾リポソームは消化管移動が遅延して消化管滞留性が向上することを明らかにした。この滞留性向上の要因としては、リポソーム表面のキトサンと消化管粘膜の相互作用及び微細化したリポソームについては粘膜層深部への侵入性増大が挙げられるが、どの程度のリポソームが消化管粘膜に付着して滞留しているかは明らかではない。そこで本節では、管腔に存在するリポソームを洗浄により除去し、残存したリポソームを定量することで、消化管粘膜に付着したリポソーム量を明らかにすることを目的として検討を行なった。

サブミクロン化したキトサン修飾リポソームをラットに胃内投与し、投与 60 分後の小腸各部位の滞留量及び摘出した小腸各部位を洗浄した後のリポソーム付着量を Fig.1-7 に示した。尚、胃は適切な洗浄操作を行うことができなかったため示していない。小腸を洗浄することで腸管各部位のリポソーム量は顕著に減少し、回収率が有意に低下した。粘液層に存在するリポソームは洗浄によって洗い流されることと、消化管粘膜はターンオーバーする^{116,117)}ことから、粘膜の一部は洗浄液と共に洗い流されたと考えられた。しかし、洗浄した腸管各部位にリポソームは残存し、投与量に対して約 27%のリポソームは小腸粘膜に付着していることが確認できた。

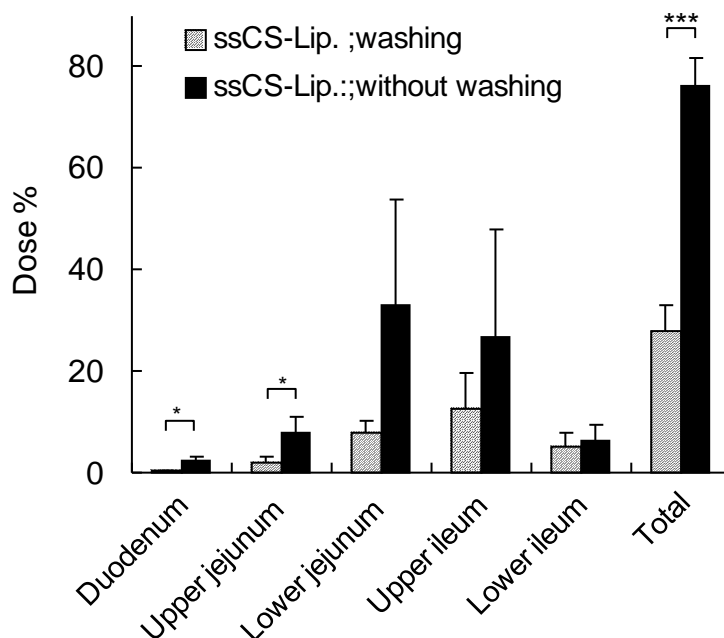


Fig.1-7 Dose percentage of ssCS-Lip with washing and without washing in various parts of the intestinal tract at 60min after intragastrical administration. *P<0.05, *P<0.001: significantly different, Particle size: washing---304.7 nm, without washing---272.2nm. (n=3~4)**

第 5 節 食餌の摂取が消化管滞留性に及ぼす影響

経口投与製剤の開発において留意すべきことは、食餌の摂取によって製剤の消化管移動速度、また製剤からの薬物放出特性が影響を受け、薬物の吸収性が変化する点である¹¹⁸⁾。食物の存在は薬物の吸収に影響することが知られており、薬物吸収性を増大させる、遅延させる、或いは低下させることがある¹¹⁹⁾。この薬物吸収性の変動の原因としては、まず食餌による胃排泄時間の変動が挙げられ、食餌の小腸への移行性が変動することによって薬物吸収性が影響を受けること、また、薬物が消化管腔内に存在する食餌と相互作用し、食餌に付着して薬物吸収を妨げる、或いは吸収を促進すること、更に、消化に伴って分泌される粘液が物理的な障壁となり、薬物の粘膜表面への到達を妨げることが挙げられる¹²⁰⁾。実際、インドメタシンを含有した粘膜付着錠は、食餌条件下においてイヌにおける経口吸収性を顕著に低下させることが知られており¹²¹⁾、また一方で、リボフラビンを含有した粘膜付着マイクロスフェアは絶食条件に比べて摂食条件下におけるヒト経口吸収性を増大させることが報告されている⁶⁸⁾。しかしこれらは、薬物吸収性が食餌の摂取によって影響を受けることを明らかにしているものの、食餌の摂取によって薬物キャリアーが受ける影響は評価しておらず、薬物キャリアーの粘膜付着挙動の変化については十分に明らかにされていない。

そこで本節では、サブミクロン化キトサン修飾リポソームが食餌の摂取によって受ける影響について明らかにするために、消化管滞留性及び粘膜付着挙動を定量的に、且つ視覚的な側面からも評価した。

第 1 項 キトサン修飾による消化管滞留性に及ぼす影響

前節までは、絶食条件下のラットにリポソームを投与した場合の消化管滞留性、粘膜付着挙動について評価した。本項では、絶食または食餌条件としたラットにリポソームを投与した場合の消化管滞留性を評価した。

48 時間絶食させたラット (fasted)、または投与 6 時間前から絶食させ、サブミクロン化したキトサン修飾、未修飾リポソームを胃内投与後、摂食としたラット (fed) について、投与 60 分後の消化管各部位におけるリポソーム滞留量を評価した結果を Fig.1-8 に示した。絶食条件下において未修飾リポソームの空腸下部と回腸における滞留量は顕著であったのに対し、摂食条件下においては滞留量が明らかに低下した。その一方で摂食条件下では 44.7%の未修飾リポソームが胃に滞留していた。キトサン修飾リポソーム群についても同様の傾向が認められ、絶食条件下では空腸や回腸上部に主に分布していたものの、摂食条件下では空腸下部や回腸へと移行し、胃には 40.9%も滞留していた。本結果より、摂食条件下において未修飾リポソーム、キトサン修飾リポソームはいずれも小腸における滞留性が低下したものの、キトサン修飾リポソームは未修飾リポソームに比べて回腸上部及び下部に有意に滞留していることが確認できた。胃と小腸各部位における滞留量の合計で表される回収率は、未修飾リポソームでは 59.5%であったことから、約 40%が大腸領域へと移行して

いることが示唆された。一方、キトサン修飾リポソームの回収率は90.2%と未修飾リポソームに比べて有意に高い結果であったことから、食餌条件下においてもキトサン修飾リポソームはキトサンによる粘膜付着機能によって消化管滞留性が增大していることが明らかとなった。また、摂食条件下のラットでは両リポソームが胃に顕著に滞留する結果となった。これは胃の食物消化機能のため、食餌の摂取によって胃排出が妨げられ、その結果、両リポソームの多くが胃内に残存したものと考えられた。

インドメタシンを含有した粘膜付着錠をイヌに経口投与し、食餌の影響を評価した報告¹²⁾において、粘膜付着物質が食餌成分と複合体を形成したことがバイオアベイラビリティ低下の原因として挙げられている。我々の検討においては食餌条件下において消化管滞留性は低下したものの、キトサン修飾リポソームは未修飾リポソームに比べて高い消化管滞留性を示す結果であった。従って、食餌摂取後の消化管内挙動の変化は食餌成分との付着や粘膜付着機能の消失が原因ではなく、食餌を摂取することによる生理的な消化管運動性の増大によって引き起こされたものであると考えられた。

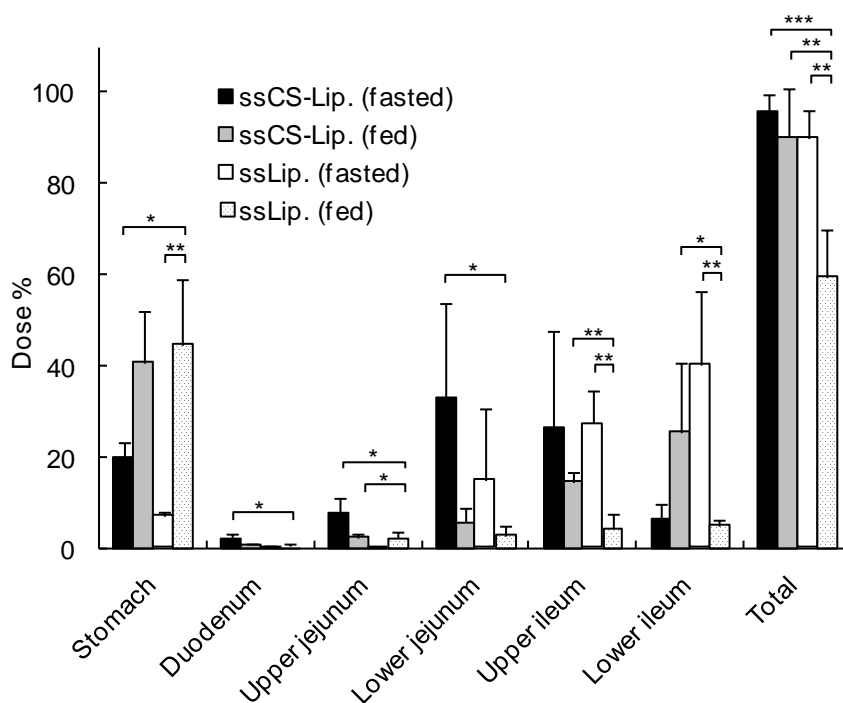


Fig.1-8 Effect of feeding on the gastrointestinal transition of ssCS-Lip and ssLip in various parts of the gastrointestinal tract at 60min after intragastric administration. The measured particle sizes of ssCS-Lip (fasted), ssCS-Lip (fed), ssLip (fasted) and ssLip (fed) were 304.7, 301.3, 182.9, and 198.4 nm, respectively. The formulation of the liposomes was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The concentration for coating was 0.3%. (*P<0.05, **P<0.01, *P<0.001: significantly different from ssLip (fed). (n=4 for each group).**

第2項 消化管内挙動の経時的変化

第3節第4項の検討において、サブミクロン化した未修飾及びキトサン修飾リポソームの消化管滞留性の経時的変化を絶食条件下のラットにおいて定量的に評価し、キトサン修飾リポソームがその粘膜付着機能によって消化管滞留性が顕著に向上することを明らかにした。そこで本項ではキトサン修飾リポソームの消化管滞留性に及ぼす食餌の影響について経時的に評価した。

サブミクロン化したキトサン修飾リポソームを摂食条件または絶食条件下のラットに胃内投与し、投与 60、120 及び 240 分後の消化管各部位におけるリポソーム滞留量を Fig.1-9 に示した。尚、食餌の摂取条件として、投与 48 時間前から絶食させ、投与後も絶食としたラット(Fasted)、または投与 6 時間前から絶食とし、投与直後に餌を与えたラット(Fed)とした。投与 60 分後のリポソーム消化管内分布として、絶食群では空腸下部や回腸上部に多くのリポソーム粒子が分布したのに対して、摂食群では回腸下部にまで移行していた。この傾向は、投与 120 及び 240 分後における分布もほぼ同様であり、摂食群ではより小腸下部へとリポソーム粒子が移行しており、キトサン修飾リポソームの小腸滞留性は摂食群において低下した。一方、投与 60 分後における摂食条件及び絶食条件下の胃における滞留量はそれぞれ、40.4、19.9%であり、摂食群では胃における滞留量が有意に増大した。同様の傾向がそれぞれ投与 120 及び 240 分後においても観察され、120 分後における摂食、絶食群の胃における滞留量はそれぞれ、28.3、7.3%であり、240 分後ではそれぞれ 11.5、3.1%であった。また、胃及び小腸各部位に分布したリポソームを合計すると、120 分後における摂食、絶食群でそれぞれ、60.4、96.0%、240 分後ではそれぞれ、22.5、38.1%であった。これらの結果から、サブミクロン化キトサン修飾リポソームは摂食条件下において小腸をより速やかに移行するものの、胃における滞留量は有意に向上することが分かった。

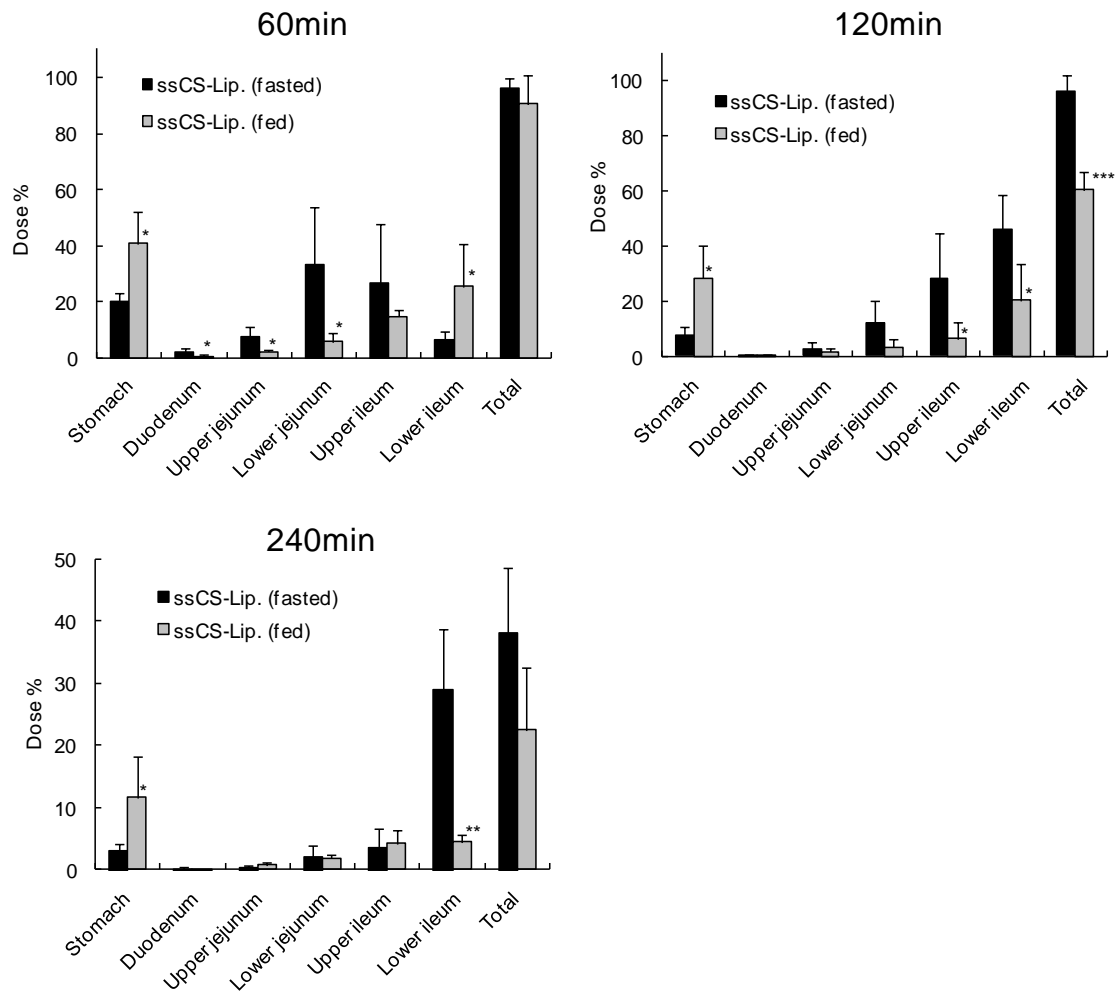


Fig. 1-9 Effect of feeding on the gastrointestinal transition of ssCS-Lip in various parts of the gastrointestinal tract at 1, 2, and 4 h after intragastric administration. The measured mean particle sizes of ssCS-Lip (fed) and (fasted) were 301.3 and 304.7 nm at 60 min, 265.7 and 304.7 nm at 120 min, and 247.4 and 270.6 nm at 240 min, respectively. The formulation of the liposomes was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The concentration for coating was 0.3%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from ssCS-Lip (fasted). (n=4 for each group)

第3項 共焦点レーザー顕微鏡を用いた粘膜付着挙動評価

粘膜の1つの機能として高分子や粒子などの透過を制限する点があり、粘膜の吸収腸細胞を介して体内に吸収されることは稀であると考えられている。第3節第1項で示したように絶食条件下のラット小腸を共焦点レーザー型顕微鏡で観察すると、サブミクロンサイズに制御したリポソームは、粘膜層深部へと侵入する様子が認められ、一方で粒子径3 μm 程度のリポソームではそのような移行は認めないことを示した。そのため、本項ではリポソーム粒子の粘膜侵入性に及ぼす摂食条件の影響を評価するため、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームの小腸内挙動について、絶食条件下と比較した。

摂食条件下又は絶食条件下のラットにサブミクロン化したキトサン修飾リポソームを胃内投与し、60分後のラット小腸各部位におけるリポソームの分布について共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した結果を Fig.1-10 に示した。摂食群及び絶食群を比較すると、摂食群については回腸下部へと移行している様子が観察され、前項で示したリポソーム小腸内分布の定量的評価結果とよく一致した。摂食群においてはリポソームがほぼ小腸全域に渡って存在し、また、いずれの部位においてもサブミクロン化キトサン修飾リポソームが粘膜層深部まで侵入している様子が確認でき、絶食群と同様に漿膜側においても粒子が確認できた。以上の観察結果から、食餌の摂取により絶食条件下に比べるとサブミクロン化したキトサン修飾リポソームの消化管滞留性は低下するものの、絶食条件下と同様の小腸粘膜侵入性を示すことが確認できた。

Jani らの消化管及び Caco-2 細胞を用いた報告¹²²⁾において、少量ではあるもののポリスチレンナノパーティクルが腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue, GALT) と通常の小腸細胞の双方を介して取り込まれ、体内に吸収されることを明らかとしている。我々の検討では、小腸組織切片を作成する際に GALT であるパイエル板を除いているため、リポソーム粒子の取り込みを説明する一つの機構として、細胞膜との特異的な結合を介さないような取り込みである吸着エンドサイトーシスの関与が考えられた。また、リポソーム粒子は小腸細胞の表面に到達する前に粘膜層を通過する必要があり、この粘膜層通過にリポソーム表面のキトサンとムチンとの相互作用が貢献しているものと考えられた。

以上の検討結果から、吸着エンドサイトーシスによってリポソームが取り込まれている可能性が高いと考えられるが、リポソーム粒子の吸収機構の解明にはより詳細な検討が必要であると考えられた。

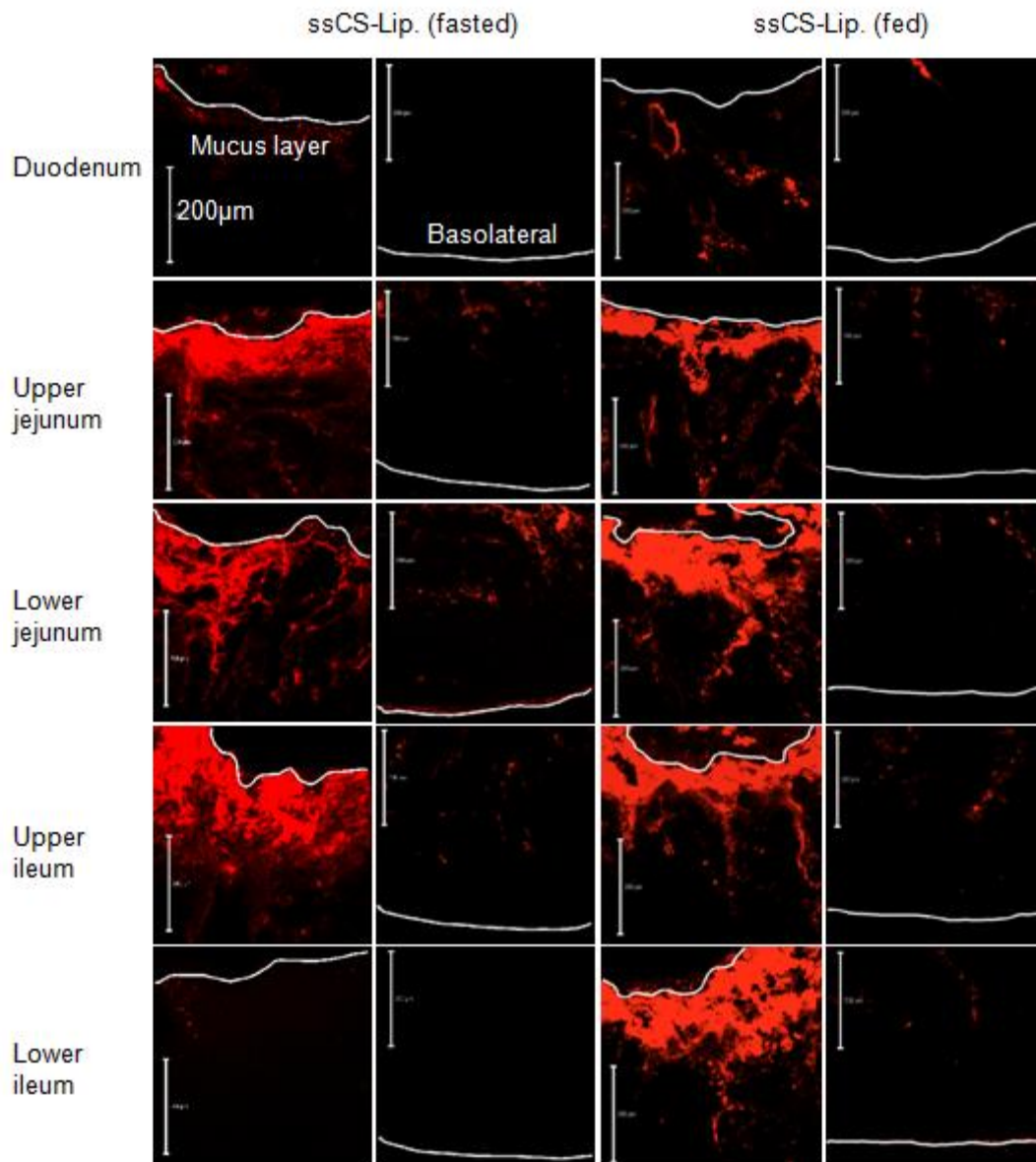


Fig. 1-10 Confocal laser scanning microscopic images of ssCS-Lip in various parts of the intestinal tract at 60 minh after intragastric administration under fasted and fed conditions. The measured mean particle sizes of ssCS-Lip (fasted) and (fed) were 320.2 and 290.3 nm, respectively. The formulation of the liposomes was DSPC:DCP:Chol = 8:2:1. The concentration for coating was 0.3%.

第6節 小括

粒子径がマイクロサイズ及びサブミクロンサイズのキトサン修飾リポソーム、未修飾リポソームを絶食及び摂食条件のラットに投与し、それらの消化管粘膜付着・侵入挙動を視覚的に、また定量的に評価して以下の知見を得た。

- 1) ラットに経口投与後のリポソーム消化管粘膜付着挙動を評価したところ、リポソームの表面特性に依存せず、粒子径に依存して侵入性が変化し、サブミクロンサイズのリポソームは粘膜層深部へ侵入することを確認した。
- 2) 各種リポソームの消化管滞留性を評価したところ、キトサンで表面修飾したリポソームは消化管上部に滞留し、消化管滞留性が增大することが確認され、滞留性向上にはキトサンによる表面修飾が大きく寄与していることが確認された。
- 3) リポソームの消化管滞留性は、粒子の微細化によっても向上し、特にサブミクロン化キトサン修飾リポソームは、消化管滞留性が最も増大した。このことから、粘膜付着作用に加えて、消化管粘膜層深部への粒子の移行が滞留性向上の一因となることが示唆された。
- 4) 食餌条件下では絶食条件と比べてリポソームがより小腸下部へと移行し、食餌の摂取によってリポソームの消化管滞留性が低下することが分かった。しかし、キトサン修飾リポソームは未修飾リポソームよりも滞留性が有意に向上し、食餌条件下においてもキトサンによる粘膜付着機能によって消化管滞留性が増大することが明らかとなった。
- 5) サブミクロン化したキトサン修飾リポソームは、食餌を摂取させた場合においても絶食条件下と同様に小腸粘膜層の深部まで侵入し、食餌が小腸内に存在する場合でも粘膜付着、侵入挙動が維持されることが明らかとなった。

第2章 インドメタシン封入粘膜付着性リポソームの製剤設計検討

第1節 緒言

前章までの評価では、粒子径及び表面特性が異なるリポソームの消化管粘膜付着挙動を評価し、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームは、消化管粘膜侵入性・付着性が増大して、消化管滞留性が最も向上する薬物キャリアーであることを明らかにした。そこで本章では、この粘膜付着性リポソームの有用性を確認するため、キトサン修飾リポソームを用いた薬物吸収性改善について検討を実施した。当研究室では既に、ペプチド性薬物であるインスリンやカルシトニンをリポソームに封入して経口投与し、血中グルコース、カルシウム濃度変化を評価して、薬物吸収性を評価し^{65, 73-75, 123}、特にカルシトニンを封入したサブミクロン化したキトサン修飾リポソームをラット経口投与後、120時間に渡って血中カルシウム濃度低下作用が持続することを明らかにしている^{76, 77}。しかし、この血中カルシウム濃度低下作用は薬理作用であるため、間接的な指標であり、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームの薬物キャリアーとしての機能は確認できたものの、カルシトニンの血中濃度の検出が困難であることから、バイオアベイラビリティといった指標で薬物吸収性の改善効果は明らかにできていない。

リポソームは上記ペプチド性薬物のように、分子量が大きく水溶性が高い薬物の薬物キャリアーとして有用であるが、リポソームの構造はリン脂質からなる脂質二重膜であり、その脂質部分は脂溶性薬物の担持に有用であり、難吸収性の脂溶性薬物のキャリアーとして応用できる可能性がある。Goundalkarらは脂溶性薬物のリポソームへの封入率は薬物の物理化学的性質とその脂溶性の両方に依存すると共に、脂質二重膜の組成や調製方法にも依存することを報告している¹²⁴。インドメタシンは非ステロイド性抗炎症薬であり、関節リウマチや変形性関節炎などの炎症を伴う疾患に広く適用されている。しかしながら、インドメタシンは難水溶性であることに加え、経口投与されたインドメタシンは胃や小腸潰瘍などの消化管副作用を惹起する可能性がある。

本章では、モデル薬物として選択した難吸収性薬物であるインドメタシンを封入したキトサン修飾リポソームを調製してラットに経口投与し、インドメタシンの血中濃度推移を評価して、低分子難吸収性薬物のキャリアーとしての消化管粘膜付着性リポソームの有用性を検討した。

第2節 インドメタシン封入キトサン修飾リポソームの物性

本節ではモデル薬物であるインドメタシン(IMC)を封入したキトサン修飾リポソームの調製を試みた。IMC最終濃度が0.5 mg/mLとなるように DSPC:DCP:Chole.=8:2:1 からなる薄膜を調製し、酢酸緩衝液にて水和後、超音波処理を施して粒子径をサブミクロンサイズに微細化した。このリポソーム懸濁液に0.6%キトサン溶液を等量添加し、再度超音波処理を施して調製したIMC含有リポソームの物性について Table 2-1 に示した。尚、封入率は、IMC

含有リポソーム懸濁液中に存在する未封入 IMC を超遠心により除いて算出した。

IMC 含有リポソームの粒子径は未封入りポソームと同様にサブミクロンサイズに制御することができ、また、調製後 37 °C で 12 時間インキュベーションを行った後もサブミクロンサイズの粒子径が維持され、安定であることが確認できた。粒子の表面電荷は、キトサン修飾リポソームの場合、IMC 未封入の表面電荷とほぼ同様の値であったのに対して、未修飾リポソームでは、精製水中におけるゼータ電位の絶対値がやや低下した。このことから、一部の IMC はリポソームの表面に存在する可能性が示唆された。尚、ゼータ電位の頻度分布はシャープな単一ピークを有していることから、調製したリポソーム懸濁液中に IMC のクラスターなどは存在しないと考えられた。IMC 封入率は、キトサン修飾、未修飾リポソーム共にほぼ 100% と高い値を示し、効率よく薬物を保持できることが確認された。

Table 2-1 Physicochemical properties of submicronized chitosan coated and non coated liposomes. Conc. of chitosan 0.3% (w/v).

	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)		Encapsulation efficiency (%)
		water	pH4.4 A.B.	
ssLip. empty	205.9	-44.7 ± 0.4	-24.0 ± 1.4	-
ssCS-Lip. empty	269.4	55.3 ± 2.6	37.4 ± 0.1	-
ssLip. IMC loaded	239.3	-36.9 ± 0.7	-25.4 ± 1.3	99.1
ssCS-Lip. IMC loaded	292.7	51.3 ± 0.3	34.2 ± 1.3	96.2

第 3 節 *in vitro* 薬物放出性評価

製剤から薬物を徐放させる方法として、ポリマーなどを使用して薬物の拡散を制御する方法があり、リポソームからの低分子薬物の徐放化に関して、リポソーム表面をポリマー修飾することで放出制御を達成した報告がある。Phetdee らは、低分子化合物である酒石酸について、未修飾リポソームでも徐放性が得られ、更にその徐放性が表面修飾したキトサン層の厚みに依存して延長することを明らかにしている¹²⁵⁾。また Zhuang らは、キトサン修飾リポソームに mitoxantrone を保持させることで徐放化が得られ、その徐放性は、キトサン修飾によるリポソーム膜の安定化によるものであることを報告している¹²⁶⁾。従って、我々が調製した IMC 封入キトサン修飾リポソームについても内封した IMC の徐放化が期待できる。

粒子径がサブミクロンサイズのキトサン修飾、未修飾リポソームからの IMC 溶出性を日本薬局方第 2 液中 (pH 6.8, 37 °C) において評価した結果を Fig.2-1 に示した。サブミクロン化したキトサン修飾リポソームからの薬物放出性は未修飾リポソームに比べると遅延する結果となり、いずれのリポソーム群についても試験開始 4 時間後には内封した IMC をすべて放出することが分かった。

未修飾リポソームの表面電荷は pH 4.4 酢酸緩衝液中にて -25.4 mV と負に帯電しているの

に対して、キトサン修飾リポソームはキトサン層によって 34.2 mV と正に帯電している。リポソームの表面修飾は、リポソーム表面の負電荷に対して正に帯電したキトサンが静電的に相互作用することによってキトサン修飾層を形成し、キトサンによるコーティング量の増大と共に正電荷も増大する。当研究室のこれまでの検討結果において、キトサン最終濃度として 0.3% で十分なコーティング層が形成されていることを確認している⁷⁶⁾。従って、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームで認められた薬物放出性の遅延は、キトサンコーティング層の存在によるものと考えられた。

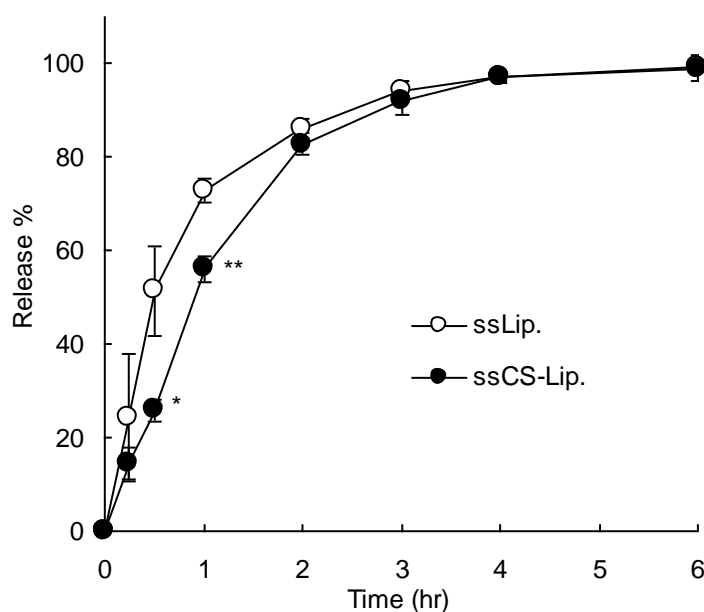


Fig.2-1 Release profiles of IMC from liposomes in JPNo.2 solution (pH 6.8) at 37 °C. The measured mean particle sizes of ssLip and ssCS-Lip were 239.3 and 292.7 nm, respectively. The formulation of liposome was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The chitosan concentration for the coating was 0.3%. *P<0.05, **P<0.01: significantly different from ssLip, (n=3).

第 4 節 薬物吸収性評価

第 1 項 血漿中薬物濃度推移

当研究室ではこれまでに、ペプチド性薬物であるカルシトニンを封入したサブミクロン化キトサン修飾リポソームをラットに経口投与後、薬理効果であるカルシウム濃度低下作用が 120 時間に渡って持続することを明らかとしている^{76,77)}が、ペプチド性薬物であることから、その吸収改善効果について薬物動態学的パラメーターを明らかにできていない。また、サブミクロン化キトサン修飾リポソームが低分子薬物についてどの程度機能を発揮するかは不明である。そこで本項では難吸収性モデル薬物としてインドメタシンを用い、

ラットに経口投与後の吸収性評価を実施した。

IMC を封入した未修飾、キトサン修飾リポソーム及び比較として IMC 水溶液、懸濁液をラットに胃内投与後、24 時間までの血漿中 IMC 濃度推移について Fig.2-2 に示した。IMC 水溶液及び懸濁液投与群に比べて両リポソーム投与群は、投与 2 時間後以降の血漿中 IMC 濃度が有意に高くなった。また、サブミクロン化キトサン修飾リポソーム群の血漿中濃度推移は、未修飾リポソーム群に比べて血漿中濃度の立ち上がりが緩やかとなり、長時間に渡って持続することが分かった。薬物動態学的パラメーターについて、Table 2-2 に示した。Cmax 及び AUC はいずれのリポソーム群についても溶液及び懸濁液投与群に比べると顕著に改善し、リポソーム群のバイオアベイラビリティは 90%以上の値を示した。これらの結果から、両タイプのリポソームを用いることによって IMC の経口吸収性を有意に改善できることが確認できた。

モデル薬物として用いた IMC は酸性薬物であり、低 pH 域における溶解性は非常に乏しい。IMC 水溶液群は懸濁液群に比べて吸収性が高い結果であったものの、バイオアベイラビリティは 50.5%と低い値であった。この原因として、IMC 溶液を投与後、低 pH 領域である胃又は小腸上部において IMC が析出した可能性が考えられ、その結果、IMC 溶液投与群の吸収性が乏しくなったものと推察された。一方、両リポソーム群は十分な吸収性を示す結果であった。リポソーム内部に IMC が封入されていることで胃又は小腸上部の低 pH 環境下における IMC の析出を抑制し、小腸中部以遠の pH 中性域において IMC を放出したものと考えられた。

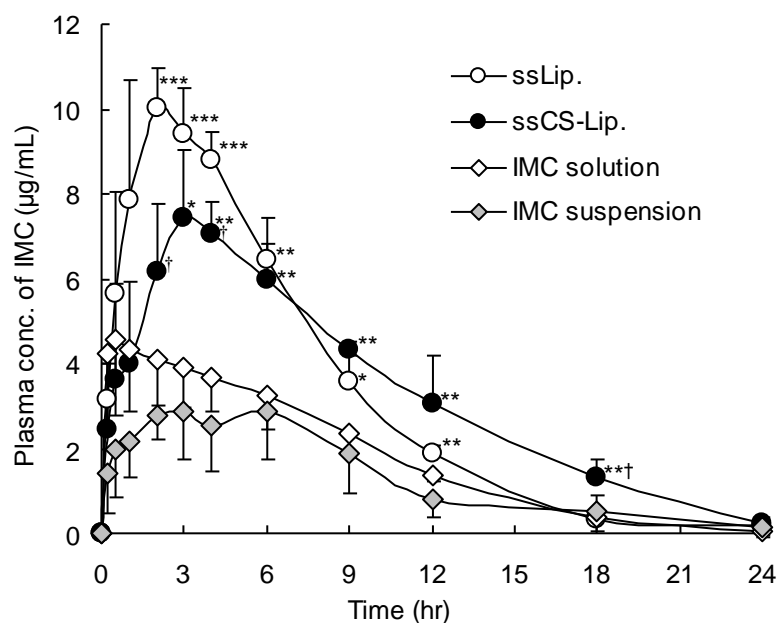


Fig.2-2 Plasma concentration-time profiles of IMC after intragastric administration of ssLip, ssCS-Lip, IMC solution and IMC suspension. The measured mean particle sizes of ssLip and ssCS-Lip were 307.5 and 274.9 nm, respectively. The formulation of liposome was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The chitosan concentration for the coating was 0.3%. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: significantly different from IMC solution, †P<0.05: significantly different from ssLip (n=4).

Table 2-2 Pharmacokinetic parameters of IMC after intragastric administration of ssLip, ssCS-Lip, IMC solution and IMC suspension. **P<0.01, ***P<0.001: significantly different from IMC solution, ††P<0.01, †††P<0.001: significantly different from ssLip.

	Dose mg/kg	Tmax hr	Cmax µg/mL	AUC µg/mL · hr	MRT hr	BA %
IMC soln.	2.0	0.8 ± 0.8	4.7 ± 1.7 ^{†††}	43.1 ± 8.6 ^{††}	6.4 ± 0.6	50.5 ± 10.0 ^{††}
IMC sus.	2.0	3.0 ± 2.2	3.2 ± 2.2 ^{†††}	31.6 ± 14.2 ^{††}	6.7 ± 1.5	37.1 ± 16.6 ^{††}
ssLip.	2.0	2.0 ± 0.8	10.3 ± 0.5 ^{***}	79.3 ± 9.6 ^{**}	5.7 ± 0.6	92.9 ± 11.2 ^{**}
ssCS-Lip.	2.0	3.3 ± 0.6 ^{**}	7.7 ± 1.2	79.5 ± 2.4 ^{***}	7.7 ± 0.8 ^{††}	93.1 ± 2.8 ^{***}

第2項 *in vivo* 薬物放出性プロファイル

IMC を封入した未修飾及びキトサン修飾リポソームをラットに投与後の *in vivo* における吸収プロファイルを見積もるため、経口投与後の血漿中 IMC 濃度プロファイルを、IMC 水溶液を静脈内投与後の血漿中 IMC 濃度プロファイルによってデコンボリューションして算出した *in vivo* 吸収プロファイルについて Fig.2-3 に示した。

未修飾リポソームの吸収プロファイルは投与 6 時間後からプラトーに達したのに対して、キトサン修飾リポソームは経口投与 12 時間に渡って IMC が持続的に吸収されることが分かった。これは第 3 節で明らかとしたように、キトサン修飾リポソームからの IMC の放出が持続していることと、また、第 1 章第 3 節で示したようにキトサン修飾リポソームの消化管上部への滞留性が向上したことが要因として挙げられる。これらの結果より、IMC 封入キトサン修飾リポソームの消化管上部への滞留性が向上して、IMC の溶解度がより高い小腸下部領域への移行が未修飾リポソームに比べて遅延し、持続的に吸収されたものと考えられた。

経口投与された IMC は消化管に対して刺激性を示すことがあり、胃や小腸に潰瘍を惹起するなどの消化管副作用を引き起こしてしまう可能性がある。リン脂質を含んだ IMC のゲル製剤は、ラットにおいて IMC 懸濁投与群に比べて消化管副作用を低減することが報告されており¹²⁷⁾、これはゲル化によって薬物の局所高濃度化が妨げられたことと、リン脂質による保護効果が要因であるとされている。我々の検討で使用した両リポソームにおいても高いバイオアベイラビリティを示したことから、IMC の析出は抑制されていると考えられ、IMC 含有リポソームとして設計することで、局所薬物濃度が低下し、消化管副作用の軽減が期待できる可能性が考えられた。

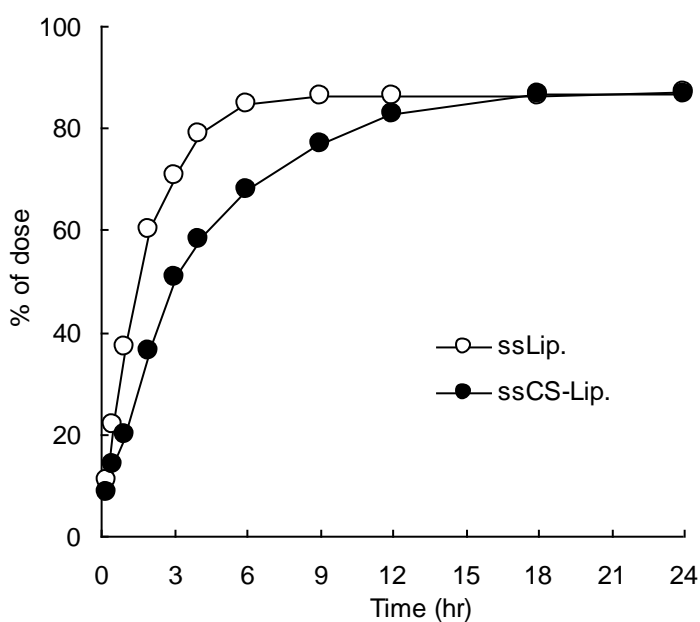


Fig.2-3 *In vivo* absorption profiles of ssLip and ssCS-Lip after intragastric administration.

第 5 節 食間投与における薬物吸収性評価

前節までの検討において、難溶解性薬物である IMC をサブミクロン化したキトサン修飾リポソームに封入することで胃や小腸上部における IMC の析出を抑制し、吸収性を改善できることを明らかとした。しかしながら、消化管は食餌の摂取によって pH、運動性が変化することに加え、食餌成分の存在によって薬物キャリアーは影響を受ける可能性が高い。第 1 章第 5 節において、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームの消化管粘膜付着機能は維持されるものの、食餌の摂取によって滞留性がやや低下することが明らかとなった。このような知見に基づいて、粘膜付着機能性製剤の食餌の摂取による影響を最小限に留める方法として、製剤の投与を食間投与とすることが挙げられる。そこで、サブミクロン化した IMC 封入キトサン修飾リポソームを食間投与した場合の吸収性を評価した。

サブミクロン化した IMC 封入キトサン修飾リポソーム及び IMC 水溶液をラットに経口投与し、2 時間後に食餌を摂取させた場合を食間投与として、IMC 血漿中濃度推移を評価した結果を Fig.2-4 に示した。いずれの製剤についても食間投与群における IMC 血漿中濃度推移は投与 6 時間後まで絶食群とほぼ同様であったが、6 時間後以降は両製剤とも絶食群に比べて血漿中濃度が低下する傾向を示した。しかしながら、キトサン修飾リポソーム群は、溶液群に比べて血漿中濃度が高く、持続した。食間投与後におけるバイオアベイラビリティについて Fig.2-5 に示した。キトサン修飾リポソーム群と溶液群のバイオアベイラビリティはそれぞれ 75.2 及び 34.8% であり、本結果から、食間投与においてもサブミクロン化キトサン修飾リポソームは経口吸収性を有意に改善することが明らかとなった。

IMC を含有した粘膜付着錠をイヌに経口投与後の吸収性は食餌の摂取によって顕著に低下することが報告されており¹²¹⁾、この原因としては食餌成分と粘膜付着性分が複合体を形成し、バイオアベイラビリティが低下したことが挙げられ、粘膜付着性製剤が絶食投与時と同様の機能を発揮することは困難であることが知られている。我々の検討結果では、IMC の吸収性は低下したものの、サブミクロン化したキトサン修飾リポソームを用い、食間投与とすることで IMC の経口吸収性を有意に改善することが示された。

以上より、サブミクロン化キトサン修飾リポソームは、食餌成分と顕著な相互作用を起こすことなく、また、食餌成分によってリポソームが破壊されることなく、薬物キャリアーの機能及び吸収改善効果を維持することが示唆され、粘膜付着機能性製剤としての有用性が確認できた。

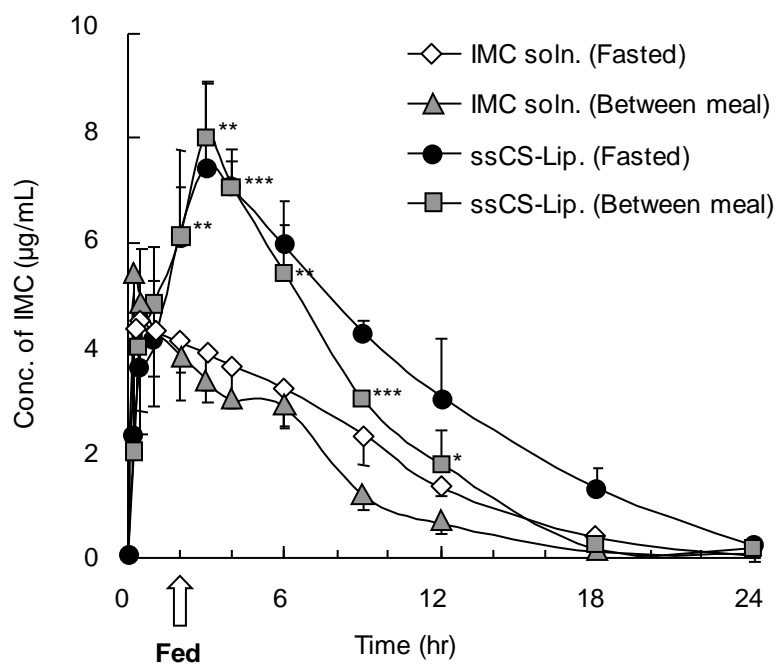


Fig.2-4 Plasma concentration-time profiles of IMC after intragastric administration of ssCS-Lip, or IMC solution to rats in the fasted or between meal administration. The measured mean particle sizes of ssCS-Lip (Fasted) and ssCS-Lip (Between meal) were 274.9 and 337.9 nm, respectively. The formulation of liposome was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The chitosan concentration for the coating was 0.3%. *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001: significantly different from IMC solution (between meal)(n=4).**

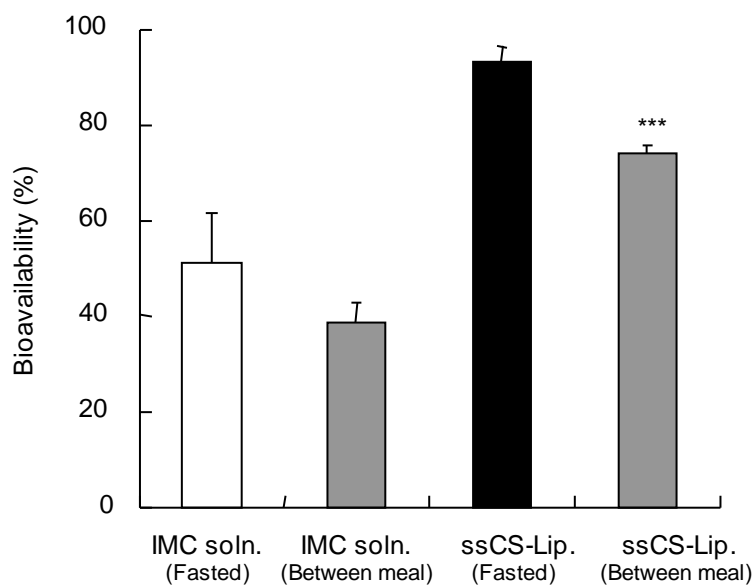


Fig.2-5 Bioavailability of ssCS-Lip and IMC solution after intragastric administration to rats in the fasted or between meal administration. The measured mean particle sizes of ssCS-Lip (Fasted) and ssCS-Lip (Between meal) were 274.9 and 337.9 nm, respectively. The formulation of liposome was DSPC:DCP:Chol=8:2:1. The chitosan concentration for the coating was 0.3%. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: significantly different from IMC solution (Between meal)(n=4).

第6節 小括

難吸収性モデル薬物である IMC を封入したサブミクロン化キトサン修飾リポソームを用いて、ラットに経口投与後の吸収性、また食餌の影響について評価し、以下の知見を得た。

- 1) モデル薬物である IMC をほぼ 100 %封入したサブミクロンサイズで安定なキトサン修飾リポソームを調製することができた。
- 2) IMC を封入したサブミクロン化したキトサン修飾リポソームの *in vitro* 薬物放出性を評価し、リポソーム表面に形成されたキトサン層によって、未修飾リポソームに比べて薬物放出が徐放化することが確認された。
- 3) IMC を封入したサブミクロン化したキトサン修飾リポソームをラットに経口投与して吸収性を評価し、IMC 溶液投与群に比べて吸収性が有意に向上することが明らかとなった。この吸収性改善効果はリポソーム内部に IMC が封入されていることで、胃又は小腸上部の低 pH 環境下における IMC の析出を抑制し、IMC の溶解に有利な小腸中部以遠の pH 中性域において IMC を放出したことが要因であると考えられた。
- 4) IMC の吸収性は未修飾リポソームに比べてキトサン修飾リポソームを用いることによって持続化した。これは、キトサン修飾リポソームから IMC が徐々に放出されたことと、消化管滞留性向上によって IMC の溶解度が高い小腸下部領域への移行性が未修飾リポソームに比べて遅延したことが要因として考えられた。
- 5) 粘膜付着機能性製剤の食餌の影響を最小限に留める方法として、食間投与を選択し、IMC 吸収性を評価したところ、絶食条件下に比べるとやや吸収性は低下したものの、IMC 溶液投与群に比べてサブミクロン化キトサン修飾リポソーム群はバイオアベイラビリティが有意に向上し、食間投与において薬物キャリアーの機能及び吸収改善効果が維持されることが確認できた。

第3章 プランルカスト水和物の胃内滞留性製剤設計検討

第1節 緒言

オノン®カプセル 112.5 mg (一般名：プランルカスト水和物) は小野薬品工業株式会社が開発した世界初のシステイニルロイコトリエン (cysLTs) 受容体拮抗剤であり、1995 年に日本で認可を受けて上市している。本剤は気管支喘息及びアレルギー性鼻炎を対象疾患として 1 日 2 回朝、夕食後にそれぞれ 2 カプセルずつ服用する製剤であるが、同効能の薬剤として、SINGULAIR® (Merck) 及び ACCOLATE® (AstraZeneca) がそれぞれ上市されており、特に SINGULAIR® は半減期が長いため 1 日 1 回投与型製剤である。このため、患者さんの QOL 改善のみならず、市場における商品的価値の向上という点からもプランルカスト水和物を 1 日 1 回服用型の経口持続性製剤へと改良することは意義深い。

1 日 1 回服用型製剤として設計する際、製剤の消化管滞留時間を十分に考慮する必要がある。健康成人男性においては非崩壊性のカプセルを服用後、大腸には 5 時間以内に移行し、その後大腸での滞留時間は平均 30 時間以上 (13~68 時間) であることから¹²⁸⁾、経口製剤の主たる滞留部位は大腸であり、経口持続性製剤は大腸において薬物を持続的に放出し、吸収されるように設計する必要がある。しかしながら、持続放出製剤は大腸において持続放出性或いは吸収性が十分に達成できないことがある。その 1 つの理由として、製剤の大腸における滞留時間は最も長いものの、薬物が溶解するために必要な水分量が限られており、特に難水溶性薬物は腸において十分に溶解しないことが挙げられる。プランルカスト水和物は水への溶解度が非常に低く、そのためプランルカスト水和物の処方設計を合理的に実施するためには大腸における吸収性を見積もる必要がある。しかし、ヒトとげっ歯類、イヌ、霊長類などの動物のバイオアベイラビリティの相関性は広範囲の薬剤において非常に乏しく、動物実験ではヒトの吸収性を予測することは非常に困難である¹²⁹⁾。従って、大腸における薬物吸収性をヒトにおいて見極めることが必要である¹³⁰⁾。

胃内滞留型持続性製剤は、胃内に長時間滞留して薬物を徐放化する技術であり、吸収ウィンドウを有するような薬物に対して革新的な経口持続性製剤化法になり得る製剤技術である。実際、消化管全体を通して十分に吸収される薬物は比較的少なく、大多数の薬物の透過性は近位小腸から大腸へと下降するにつれて低下し、L-ドーパやシプロフロキサシンのような化合物は上部腸では吸収ウィンドウが狭いことが示されており、その応用には期待が持たれている。胃内滞留型製剤化には大きく 3 つのアプローチがあり、その 1 つとして、前章までに示した、胃及び小腸壁に付着して製剤の消化管内挙動を制限する粘膜付着性製剤、次に投与製剤の比重を小さくして胃内に浮遊させて幽門から遠ざけ、胃から排出されにくくする胃内浮遊性製剤、そして胃内水分を吸収して膨潤し、幽門通過を遅延させる膨潤性製剤が挙げられる。胃内滞留性製剤化を企図して、多くの臨床試験に関する報告がそれぞれ、粘膜付着性⁷⁸⁻⁸²⁾、浮遊性⁸³⁻⁹⁵⁾及び膨潤性製剤⁹⁶⁻⁹⁸⁾についてなされているが、上市されている製品は非常に限られており、GLUMETZA® Tablets (metformin hydrochloride、Depomed Inc.)、GRALISE® Tablets (gabapentin、Depomed Inc.)及び JANUMET® XR (sitagliptin

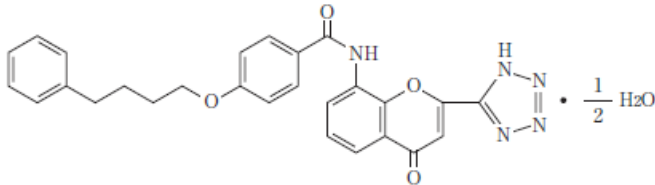
and metformin HCl、Depomed Inc.)の3品のみである。従って、胃内滞留性製剤として製剤設計を実施することは成功確率が低く、チャレンジングな試みであると言える。

本章ではプラナルカスト水和物の1日1回投与型製剤としての開発を目指して検討を行った。製剤の設計コンセプトを明確にするために難溶解性薬物であるプラナルカストのヒト消化管吸収部位差について評価を実施し、胃内滞留製剤化検討を実施した。膨潤性及び薬物放出性が異なる種々製剤を用いて、動物を用いた設計コンセプトの検証及びヒトにおける機能性評価を行ない、胃内膨潤性製剤としての可能性を検討した。

第2節 プラナルカスト水和物の物理化学的性質

プラナルカスト水和物の物理化学的性質を Table 3-1 に示した。プラナルカスト水和物は白色～淡黄色の結晶性の粉末で、においはなく、味はない。本化合物の水に対する溶解度は 1.2×10^{-3} mg/mL であり、ほとんど溶けない。また、日本薬局方溶出試験第1液及び第2液に対する溶解度もそれぞれ 0.1×10^{-3} 及び 0.8×10^{-3} mg/mL である。更に、Caco-2 (ヒト結腸癌由来株化細胞)膜透過性も低く、Biopharmaceutical Classification System において Class IV に分類される難溶解性、難膜透過性化合物であることから、経口持続性製剤として処方設計を実施する際にはその物性に十分留意して検討を進める必要があると言える。

Table 3-1 Physicochemical properties of pranlukast hydrate

Structure	
Molecular formula	$C_{27}H_{23}N_5O_4 \cdot 1/2 H_2O$
Molecular weight	490.51
Melting point	231~235 °C
Solubility	1.2×10^{-3} mg/mL (25 °C, Water)
Caco-2 permeability	$1.52 \pm 0.02 \times 10^{-6}$ cm/sec

第3節 胃内膨潤性製剤の設計コンセプトの検証

第1項 消化管の吸収面積、消化管滞留時間

ヒト成人の消化管の生理的機能、長さ及び表面積について Table 3-2 に示した。小腸は長さ約 6 m、直径 3-5 cm であり、上部から十二指腸、空腸及び回腸の 3 つの部分に分けられ、それに続く大腸は長さ約 1 m、直径は 3-9 cm である。部位によってこれらの表面積には著しい差があり、大腸は 1.3 m² であるのに対して空腸は 180 m²、回腸は 280 m² である。一般的に小腸では吸収能力が大きい、これは表面積が大きいことに起因している。

一方、ヒトの消化管の各部位における液体及び固形食物の滞留時間を Table 3-3 に示した。これより、固形剤の場合は消化管滞留時間の約 85%は大腸に費やされ、わずか 15%が胃及び小腸に費やされることが分かる。

経口持続性製剤は 1 日複数回投与の即放錠で維持していた有効血中濃度を 1 回の服用で長時間に渡って血中濃度を維持する必要があることから、大腸において持続的に薬物を放出し、吸収させる必要がある。しかし、大腸は薬物が溶解するための水分量が少ないことと、表面積も小さいことから、薬物吸収性に適した部位であるとは言い難い。従って、特にプラナルカスト水和物のような難溶解性、難膜透過性薬物を経口持続性製剤として開発するためにはヒト消化管下部における薬物吸収性を見積もり、開発戦略を早期に決定することが必要であると考えられた。

Table 3-2 Function, morphology and physiology of the gastrointestinal tract ^{131, 132)}

Segment	Function	Size	Surface area	pH
		(Diameter x length)		
Stomach	Digestion of foods	15 x 20 cm	3.5 m ²	1-3.5
Duodenum	Neutralization of acids	3-5 x 20-30 cm	2 m ²	4-6.5
Jejunum	Absorption of nutrients	3-5 x 240 cm	180 m ²	5-7
Ileum	Absorption of nutrients	3-5 x 360 cm	280 m ²	6-8
Colon	Absorption of water	3-9 x 90-125 cm	1.3 m ²	6-8

Table 3-3 Transit time in segment of the gastrointestinal tract ¹³²⁾

Segment	Type of food	
	Liquid	Solid
Stomach	10-30 min	1-3 h
Duodenum	< 60 sec	< 60 sec
Jejunum & ileum	3 ± 1.5 h	4 ± 1.5 h
Colon	-	20-50 h

第2項 ガンマシンチグラフィによるヒト消化管吸収部位差の評価

本項ではプラナルカスト水和物が難溶解性、難膜透過性薬物であることから、経口持続性製剤としての製剤設計方針を決めるためにプラナルカスト水和物のヒト消化管吸収部位差について検討を行った。ヒト消化管吸収部位差を評価する方法として、消化管の任意の部位において封入した薬物を放出できる Enterion™ カプセルを用いた。Enterion™ カプセルは、¹¹¹In で標識されており、ガンマ線カメラを用いることによってヒト消化管内での移動をリアルタイムで追跡することが可能である。225 mg のプラナルカスト水和物を封入した Enterion™ カプセルを健常成人に経口投与後、胃、遠位小腸及び結腸にてプラナルカスト水和物を放出した後のプラナルカスト血中濃度プロファイルを図.3-1 に示した。胃において放出した後は、投与2時間後に最高血中濃度 (C_{max}) 545.7 ng/mL を示し、遠位小腸及び結腸にてそれぞれ放出した後は、投与1.5時間後に C_{max} がそれぞれ 143.4 及び 3.6 ng/mL を示した。また、投与後24時間までの AUC は(図.3-2)、胃で放出した場合は 2816.8 ng*hr/mL、遠位小腸では 427.3 ng*hr/mL、結腸では 39.7 ng*hr/mL となり、胃で放出した場合の吸収性に比べて遠位小腸及び結腸における吸収性はそれぞれ、1/7 及び 1/70 に低下することが分かった。

遠位小腸や結腸にプラナルカスト水和物を送達した場合は、胃において放出させた場合に比べて有意に低い吸収性を示す結果となり、プラナルカストはこれらの部位においては十分吸収されず、吸収ウィンドウがあることが分かった。従って、プラナルカスト水和物の経口持続性製剤設計としては胃内滞留性製剤化のアプローチによってのみ達成しうることが明らかとなった。

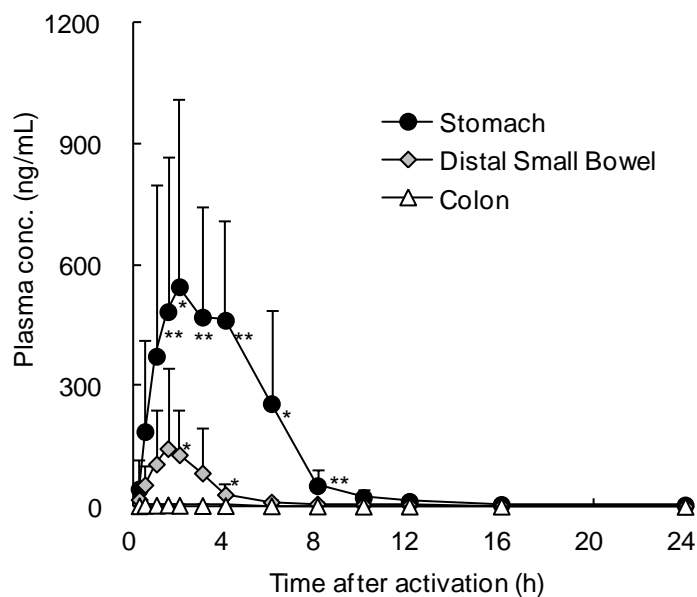


Fig.3-1 Plasma concentration profile of pramlukast in healthy volunteers after releasing 225 mg of pramlukast hydrate in the stomach, distal small bowel and colon, respectively. *P<0.05, **P<0.01: significantly different from the colon. Each value is the mean \pm S.D. (n=6).

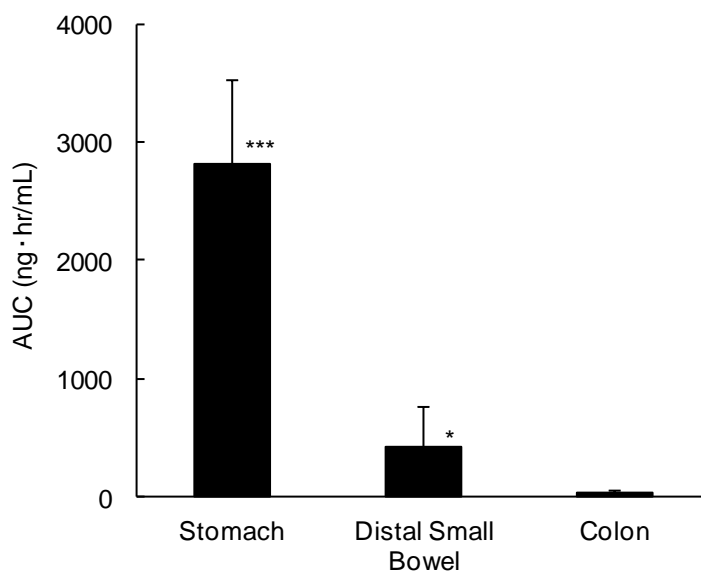


Fig.3-2 Area under the plasma concentration time curve (0-24 h) of pramlukast in healthy volunteers after releasing 225 mg of pramlukast hydrate in the stomach, distal small bowel and colon, respectively. *P<0.05, ***P<0.001: significantly different from the colon. Each value is the mean \pm S.D. (n=6).

第4節 胃内膨潤性製剤の設計検討

第1項 膨潤層の設計検討

胃内滞留性製剤としては、主に粘膜付着性製剤、胃内浮遊性製剤及び胃内膨潤性製剤の3つの製剤化アプローチが知られているが、プランルカスト水和物の投与量が多く、1日合計450 mg服用することから、最も服用体積が小さい胃内膨潤性製剤（Gastric Swelling System: GSS）について検討を実施した。GSSの製剤設計としては、GSSを胃内に十分な時間滞留させるために、胃幽門から容易に排出されないように胃内において十分な大きさに膨潤させる必要がある。一方、胃の生理機能は食物の消化であることから、膨潤後の膨潤層は胃の生理機能によって生じる物理的なストレスにも耐えうる強度を保持する必要がある。そこで、胃の食物消化を模倣した機械的ストレス下において膨潤層の膨潤性評価を行った。

GSS6及びGSS18の膨潤層を日局第一液（pH 1.2）に入れ、ガラスビーズ共存または非共存下において3時間振とうさせた後の膨潤率について Fig. 3-3 に示した。ガラスビーズ非共存下の場合、GSS6及びGSS18の膨潤率はそれぞれ、165.2及び257.3%と十分な膨潤性を示したのに対して、ガラスビーズ共存下の場合、45.1及び166.0%となり、GSS6では顕著に膨潤率が低下した。ガラスビーズ共存下においては、膨潤後に形成されるゲル層の破壊が顕著に起こる様子がGSS6については観察されたのに対して、GSS18のゲル層は機械的ストレス下においても破壊されず、膨潤性を保つことが確認できた。

GSS18の膨潤層処方中に占めるゲル化剤の割合は90%以上であり、また高分子量のHPMC 90SH-30000Fを含有するのに対して、GSS6のゲル化剤の割合は70%であり、また水溶性添加剤である乳糖を含有している。従ってGSS18の膨潤層は膨潤後も高粘性を保持することができ、機械的ストレスに対して構造的に安定であったものと考えられた。本結果より、GSS18は胃の過酷な生理条件下においても膨潤し、胃幽門直径よりも大きく膨潤することによって胃排出が遅延し、胃内に長時間滞留することが期待された。

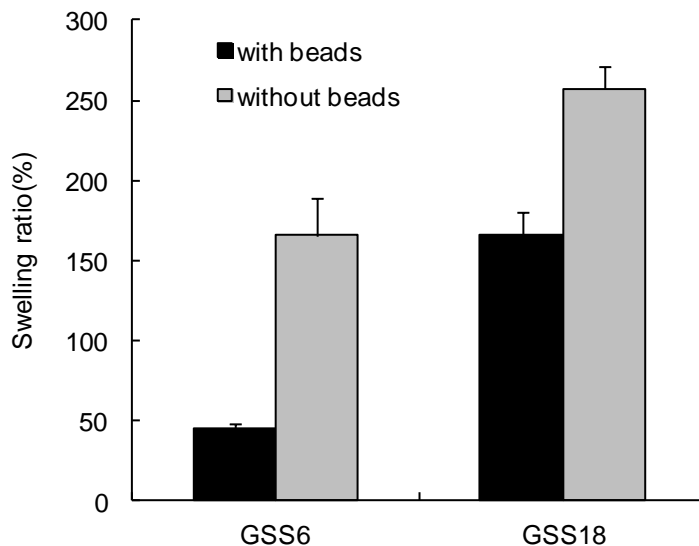


Fig. 3-3 Swelling ratio of the GSS6 and GSS18 swelling layers after 3 hr shaking with or without glass beads in the first fluid (pH 1.2) of the disintegration test. Each value is the mean \pm S.D. (n=3).

第 2 項 薬物放出層の設計検討

プラ nulカスト水和物は難溶解性薬物であり、第 2 節にて示したように日本薬局方溶出試験第 1 液に対する溶解度は 0.1×10^{-3} mg/mL と非常に乏しいため、薬物放出メカニズムとしては Diffusion ではなく、Erosion となると考えられる。従って、単層錠として設計すると膨潤機能と放出制御機能の両立が困難であることから、膨潤層と薬物放出層を有する 2 層錠として製剤設計を実施した。薬物放出層についても胃の機械的ストレス存在下においてプラ nulカスト水和物を持続的に放出する必要がある。そこで本項では、日本薬局方溶出試験法のパドル法において、パドル回転速度として 200 rpm の過酷な条件下で薬物放出性を評価した。

即崩壊錠及び 2 層錠である GSS6、GSS18 について日局第 1 液中におけるプラ nulカスト放出プロファイルを図 3-4 に示した。GSS6 はパドル回転速度 100 rpm において 6 時間でプラ nulカストをすべて放出したが、200 rpm の過酷な条件下では 3 時間でプラ nulカストをすべて放出する結果となった。一方、GSS18 はパドル回転速度 200 rpm の過酷な条件下においても 18 時間以上に渡ってプラ nulカストを持続的に放出することが確認できた。

GSS18 が過酷な *in vitro* 薬物放出試験条件においてもプラ nulカストを持続放出できた要因としては処方中の放出制御剤である HPMC 含量が 30% と高いことが挙げられる。この高い含量の HPMC によって放出層に形成されるゲル強度が向上し、過酷な条件下においても長時間に渡ってプラ nulカストを持続放出することができたものと考えられた。

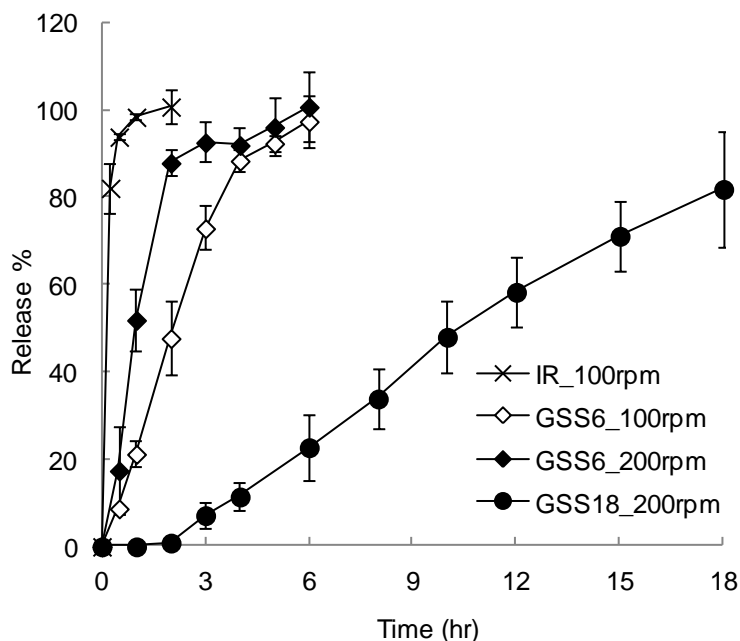


Fig.3-4 *in vitro* release profile of IR tablet, GSS6 and GSS18 at 100 or 200 rpm in the first fluid (pH1.2) of disintegration test. Each value is the mean \pm S.D. (n=3)

第3項 ビーグル犬に経口投与後の薬物吸収性評価

GSS は膨潤層と薬物放出層からなる 2 層錠であり、経口投与後胃内水分を吸収して膨潤し、幽門からの排出を遅延させて胃内に長時間滞留させ、プラシルカストを持続的に胃内にて放出させるコンセプトである (Fig.3-5)。本項では GSS の胃内滞留性と持続吸収性の基本コンセプトを確認するために、ビーグル犬に経口投与してプラシルカスト血漿中濃度プロファイルを評価した。尚、ポジティブコントロールとして非膨潤層と GSS18 の放出層からなる 2 層錠 (non-GSS18) を用いた。非膨潤層は水不溶性のエチルセルロースを用いていることから、胃内で崩壊せず、胃の機械的ストレスにも耐えうる。また、non-GSS18 の錠剤サイズは 18×9 mm であり、ビーグル犬の幽門直径はおよそ 7 mm¹³³⁾であることから、non-GSS18 はビーグル犬の幽門直径よりも十分大きく、長時間ビーグル犬胃内に滞留するものと考えられる。

即放錠、non-GSS18、GSS6 及び GSS18 をビーグル犬に胃内投与後 12 時間までの血漿中プラシルカスト濃度推移について Fig.3-6 に示した。GSS6 を投与して 6 時間後以降はプラシルカスト血漿中濃度が消失し、即放錠に比べて血中濃度の十分な持続化が認められなかったが、non-GSS18 及び GSS18 はいずれも投与 6 時間後以降においてもプラシルカストが血漿中に検出され、血中濃度が持続することが確認できた。薬物動態学的パラメーターについて Table 3-4 に示した。non-GSS18 及び GSS18 の T_{max}、MRT はいずれも即放錠に比べて有意に延長し、また AUC についても即放錠の 2.3 倍以上となり、有意に吸収性が向上した。本結果より、non-GSS18 及び GSS18 はプラシルカストの吸収性を改善し、かつ持続吸

収機能も有することが確認できた。

本実験とは別に GSS6 をビーグル犬に胃内投与して、開腹して胃内滞留挙動を確認したところ、投与 2 時間後においては GSS6 が胃内から排出されており、投与 1 時間後においてのみ、胃内に確認することができた。この観察結果は GSS6 が即放錠に比べて十分な血漿中濃度の持続化を示さなかった結果とよく一致した。また、投与 1 時間後に観察された GSS6 の形状は投与前に比べて明らかに小さく、胃の生理的なストレスによって膨潤層が破壊されていた。本結果は、Fig.3-3 に示したガラスビーズを用いた *in vitro* 膨潤性評価及び Fig.3-4 に示したパドル回転速度 200 rpm における *in vitro* 薬物放出試験の結果をよく説明した。一方、non-GSS18 の非膨潤層は投与後 6 時間においても形状が変化することなく胃内に滞留していることがビーグル犬開腹実験によって確認できた。この結果から、幽門直径よりも十分に大きくかつ十分な強度があれば胃内に滞留することが確認でき、non-GSS18 が胃内に滞留している間、胃の運動性と胃内容物によって薬物放出層からプラズルカストが Erosion により徐々に放出されたものと考えられた。また、GSS18 と non-GSS18 を投与後のプラズルカスト血漿中濃度プロファイルは同様であることから、GSS18 は胃内水分によって膨潤し、膨潤後も胃の生理的なストレスに対して十分なゲル強度を有したため、胃内に十分な時間滞留したものと考えられた。

以上より、ビーグル犬を用いた動態評価において GSS18 が胃内に長時間滞留し、難溶性薬物であるプラズルカストを持続的に吸収させる機能を有することが確認でき、GSS の製剤設計コンセプトが確認できた。

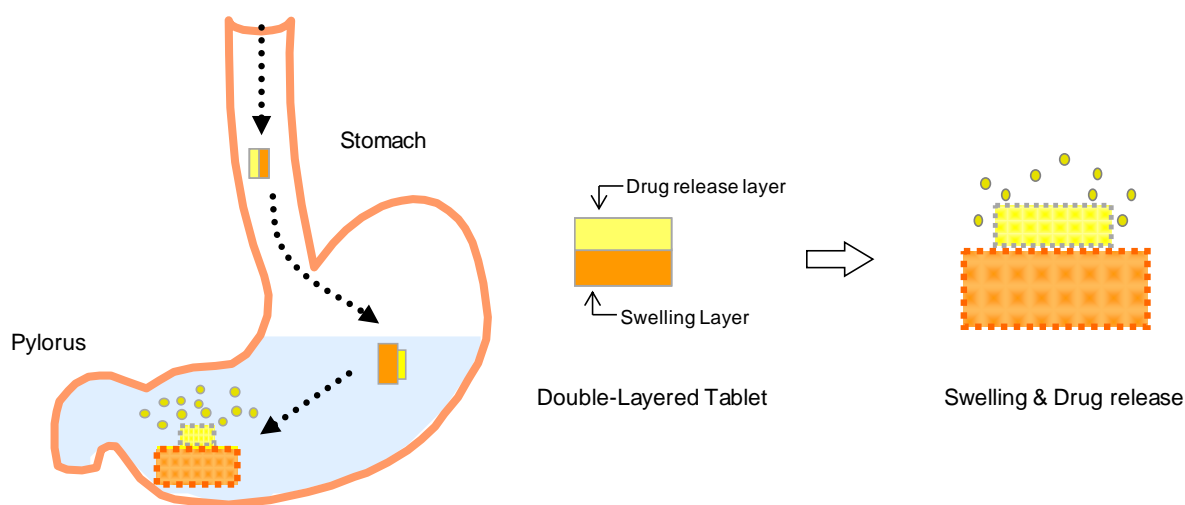


Fig.3-5 Schematic image for basic concept of GSS for gastric retention and drug release in stomach.

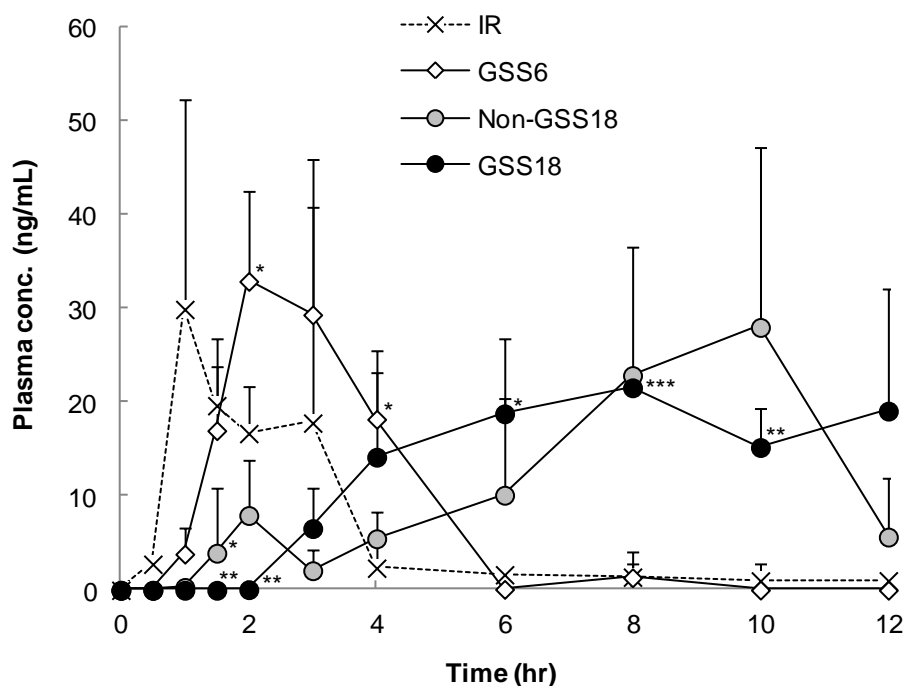


Fig.3-6 Plasma concentration-time profiles of pramlukast after intragastric administration of IR, GSS6, Non-GSS18 and GSS18 to beagle dogs. Each value is the mean \pm S.D. (n=4). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: significantly different from result for IR.

Table 3-4 Pharmacokinetic parameters of Pramlukast after intragastric administration of IR, GSS6, Non-GSS18 and GSS18 to beagle dogs. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: significantly different from result for IR. Each value is the mean \pm S.D. (n=4)

	Dose mg/body	Tmax hr	Cmax ng/mL	AUC ng/mL · hr	MRT hr
IR	75	1.8 \pm 1.0	42.4 \pm 13.9	65.0 \pm 19.2	2.8 \pm 0.5
GSS6	75	2.5 \pm 0.6	36.3 \pm 8.9	82.2 \pm 21.6	2.9 \pm 0.4
Non-GSS18	75	9.0 \pm 1.2***	36.5 \pm 11.2	146.4 \pm 27.4**	7.9 \pm 0.8***
GSS18	75	8.7 \pm 3.1*	27.0 \pm 3.0	158.4 \pm 22.4**	7.7 \pm 0.4***

第5節 胃内膨潤性製剤のヒト体内挙動と血中動態評価

第1項 胃内膨潤性製剤の *in vitro* 薬物放出試験

ヒトに経口投与後の *in vivo* における薬物放出性を予測することは困難であることから、GSS を投与後に持続的な血漿中濃度プロファイルを達成するために、2種の異なる徐放性を示す製剤で探索臨床試験を実施することとした。GSS12 と GSS24 をパドル回転速度 200 rpm の条件下で放出試験を実施した結果を Fig.3-7 に示した。GSS12 及び GSS24 はそれぞれプラニルカストを約 12 及び 24 時間に渡って徐々に放出する結果を示した。この徐放速度の違いは、GSS12、24 それぞれ、HPMC 90SH-100 及び HPMC90SH-4000 を用いており、HPMC のグレードを変更することによって制御している。尚、GSS12、24 の膨潤層はビーグル犬で十分な血中濃度持続性を認めた GSS18 の膨潤層と同様の膨潤性を示すことを *in vitro* 膨潤性評価にて確認している。これら 2 処方をヒトに経口投与して胃内滞留挙動と血漿中濃度プロファイルを評価し、いずれの処方がヒトにおいて十分な血中動態を示すか明らかにすることとした。

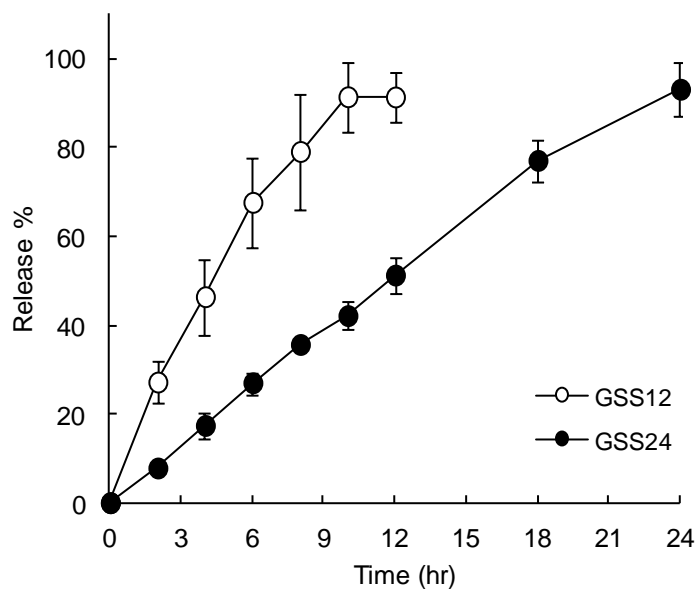


Fig.3-7 *in vitro* release profile of GSS12 and GSS24 at 200 rpm in the first fluid (pH1.2) of the disintegration test. Each value is the mean \pm S.D. (n=3).

第2項 胃内滞留性評価

薬物放出時間が異なる GSS12 及び GSS24 について、服用後の胃内滞留性を評価するために、健常人においてガンマシンチグラフィを用いた生体内挙動評価を実施した。尚、放射ラベル (^{153}Sm) は膨潤層に含有させ、FDA の規定する高脂質含有高カロリー朝食を摂取した後、5分以内に GSS を投与した。

GSS24 を健常人に投与した後の胃及び大腸における挙動をガンマシンチグラフィによって解析した写真を Fig. 3-8 に示した。投与 7.65 時間までは GSS24 が 2錠とも胃内に形状を保って滞留していることが確認され、12.13 時間後に大腸へと移行している様子が確認された。GSS12 及び GSS24 の胃排出時間をそれぞれ Table 3-5 に示した。GSS12 の平均胃内滞留時間は 8.53 時間であり、健常人 9 例中 6 例において、胃内滞留時間が 8 時間以上を示す十分な滞留性を示した。一方、GSS24 においても同様に 9 例中 6 例において胃内滞留時間が 8 時間以上を示し、平均胃内滞留時間は 10.12 時間であった。経口持続性製剤を食後投与した際の一般的な胃内滞留時間は 2.7 ± 1.5 時間と報告されていることから¹³⁴⁾、GSS12 及び GSS24 両製剤共に長時間胃内に滞留していることが明らかとなり、特に GSS24 は GSS12 に比べて滞留時間が延長することが分かった。一方、GSS24 は投与後 24 時間までに胃から排出或いは崩壊することから、GSS が胃内に蓄積されてゆく可能性は低いことが示唆された。

経口投与製剤の胃内滞留時間に最も影響を及ぼす要因は、食事条件である^{135, 136)}。食事成分中の脂質含量が胃からの内容物の排出性などの生理機能に影響を及ぼし、高カロリー食は低カロリー食に比べて胃内容物の排出を遅延させることが知られており¹³⁷⁾、結果として製剤の胃内滞留性に影響する。食事を摂取した直後は胃の幽門は閉じた状態となり、胃内容物の消化の進行と共に胃から内容物を排出する際に開口し、その幽門開口直径は $12.8 \pm 0.7 \text{ mm}$ ¹³⁸⁾である。加えて、幽門は括約筋であるため、加わる力によって伸縮し、幽門直径よりも大きい内容物であっても生理的な強制排出作用によって排出されてしまう。従って、胃内滞留性製剤は食後投与が必須であり、胃に十分な時間滞留するために膨潤後は十分な大きさや強度となって胃排出を回避する必要がある。今回の結果から、食後投与条件において GSS は十分な胃内滞留機能を有することが明らかとなった。

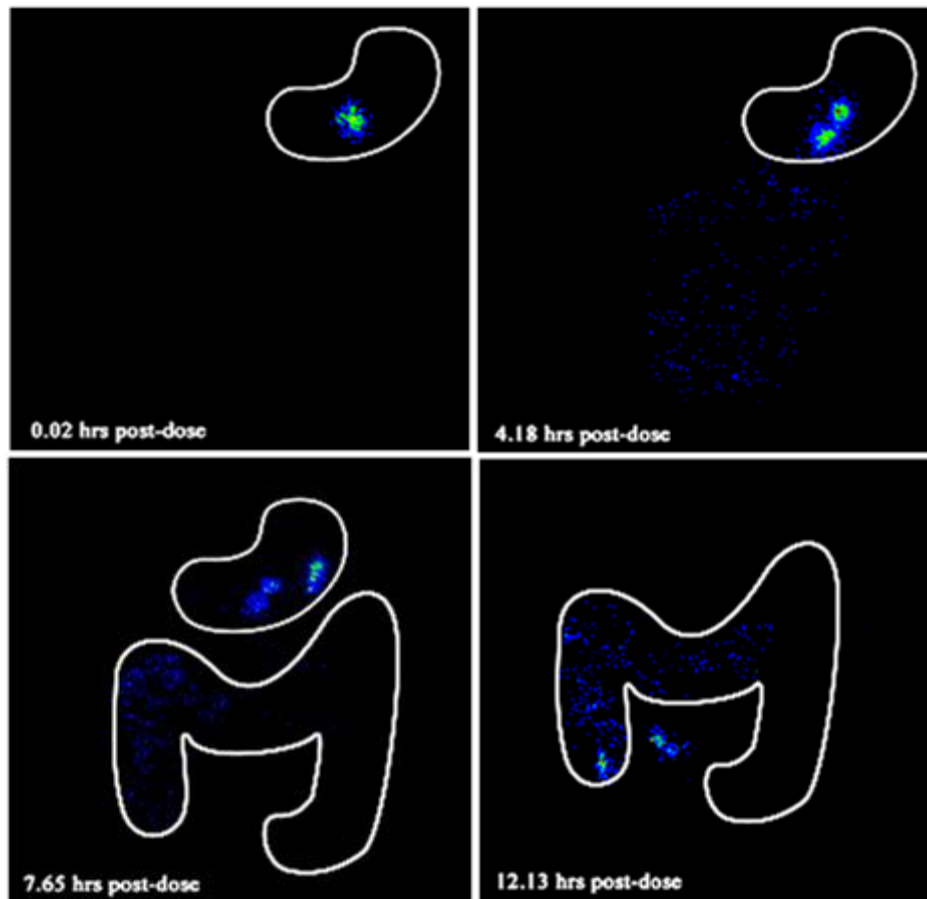


Fig.3-8 Scintiscan images of two tablets each containing 225 mg (total of 450 mg) pranlukast hydrate GSS24, each tablet radiolabelled with approximately 0.5 MBq ¹⁵³Sm administered to subject No.6 after a standard high calorie, high fat breakfast.

Table 3-5 Gastric emptying of two tablets each containing 225 mg (total of 450 mg) pranlukast hydrate GSS12 and GSS24, after a standard high calorie, high fat breakfast.

Subject No.	Gastric emptying (hours post-dose)	
	GSS12	GSS24
1 (1)	15-24 ^{*1}	13.43 ^{*2}
1 (2)	15-24 ^{*1}	13.43 ^{*2}
2 (1)	9.63	12.35 ^{*2}
2 (2)	9.63	12.35 ^{*2}
3 (1)	4.38	4.29 ^{*2}
3 (2)	4.38	4.29 ^{*2}
4 (1)	4.63	4.38
4 (2)	4.63	4.38
5 (1)	9.33	15-24 ^{*1}
5 (2)	9.33	15-24 ^{*1}
6 (1)	4.69	10.86
6 (2)	5.03	11.87
7 (1)	8.45	10.87
7 (2)	11.04 ^{*2}	10.87
8 (1)	9.27	11.89
8 (2)	9.63	13.58 ^{*2}
9 (1)	9.78 ^{*2}	5.78
9 (2)	9.78 ^{*2}	7.46
Mean	8.53	10.12
S.D.	3.35	3.90

*1: Gastric emptying and complete disintegration occurred during the interval between 15 and 24 hr. A value of 15 hr was used for calculation of the mean and S.D.; *2: Complete disintegration time (complete disintegration occurred before gastric emptying).

第3項 薬物吸収性評価

FDAの規定する高脂質含有高カロリー朝食を摂取した後、5分以内にGSS12及びGSS24を健常人に経口投与した後の血漿中濃度プロファイルについてFig. 3-9に示した。また、薬物動態学的パラメーターについてTable 3-6に示した。GSS12を投与後はプラナルカスト血漿中濃度Tmaxが6.2時間を示し、その後速やかに血漿中濃度が低下した。一方でGSS24を投与後のMRTは9.2時間となり、GSS12に比べて持続時間が長い結果となった。GSS24の血中濃度が持続した要因としては、薬物放出時間が長いことに加え (Fig.3-7)、胃排出時

間が長いこと (Table 3-5) が挙げられた。尚、プラルカスト血中濃度の MRT と GSS24 の胃排出時間の相関について Fig.3-10 に示すように、胃排出時間が長い程、持続時間が延長する傾向にあることが分かり、本結果をよく説明した。

また、投与量と食事条件は異なるものの、オノンカプセルを服用して 12 時間後の血漿中プラルカスト濃度は 6.8 ng/mL であり、MRT は 4.4 時間であった。GSS24 を服用して 12 及び 15 時間後の血漿中プラルカスト濃度はそれぞれ、103.7 及び 84.3 ng/mL であることから、GSS24 の血漿中濃度はオノンカプセルに比べて顕著に持続していることが確認できた。

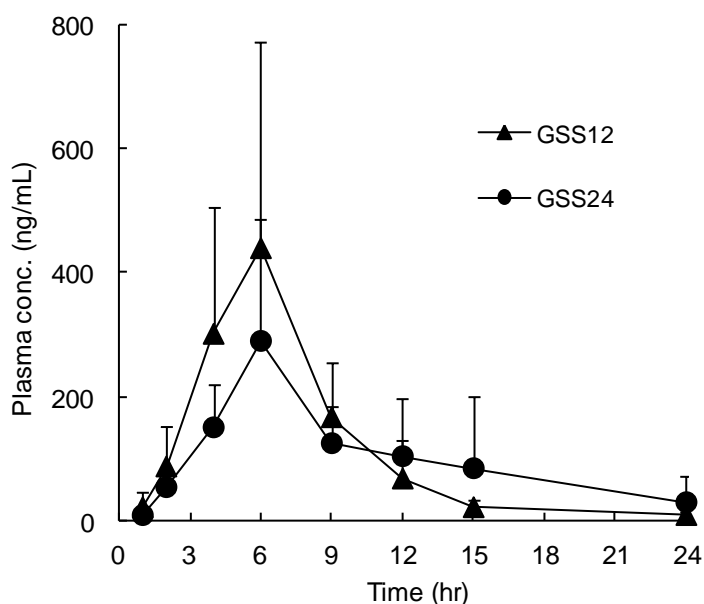


Fig.3-9 Plasma-concentration time profile of pranlukast after oral administration of GSS12 or GSS24 to healthy volunteers. Each value is the mean \pm S.D. (n=9).

Table 3-6 Pharmacokinetic parameter of pranlukast after oral administration of GSS12 or GSS24 to healthy volunteers. Each value is the mean \pm S.D. (n=9).

	After breakfast administration	
	GSS12	GSS24
Tmax (hr)	6.2 \pm 1.8	7.1 \pm 2.8
Cmax (ng/mL)	411.8 \pm 231.1	302.5 \pm 184.7
AUC (ng/mL \cdot hr)	2718.9 \pm 1190.1	2427.2 \pm 930.0
MRT (hr)	7.2 \pm 1.3	9.2 \pm 2.3

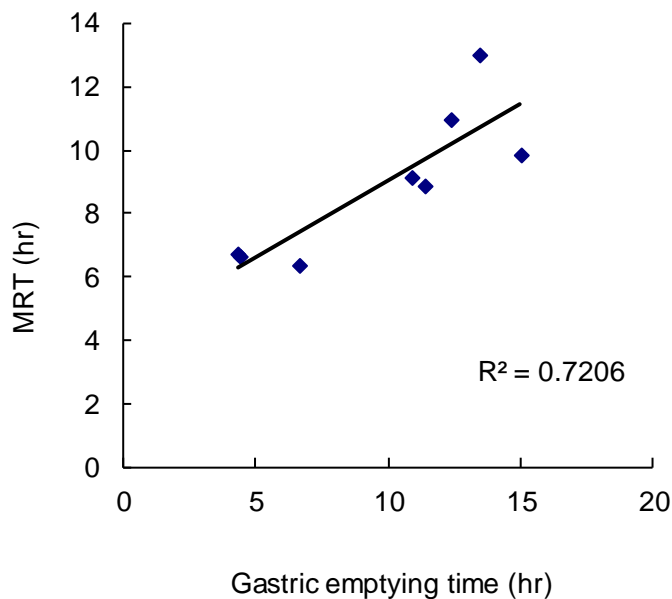


Fig.3-10 The correlation between plasma pranlukast MRT and gastric emptying time after breakfast administration of GSS24 to healthy volunteers. (n=9).

第4項 投与タイミングによる血中動態の評価

FDAの規定する高脂質含有高カロリー食を摂取した後、GSS24を服用した際の血漿中濃度推移について前項で示した。本項では夕食後投与した際の血漿中動態について評価した。FDAの規定する高脂質含有高カロリー食を21:00に摂取した後、GSS24を服用した際の血漿中濃度推移についてFig.3-11に示した。夕食後にGSS24を服用した場合、朝食後投与のプロファイルに比べて投与9～12時間後の血漿中薬物濃度は有意に高い結果となった。また、薬物動態学的パラメーターをTable 3-7に示した。夕食後投与時のTmax及びAUCはそれぞれ、10.5時間及び3241.5 ng*hr/mLとなり、MRTはいずれの投与条件でも同様であったが、夕食後投与の方がTmaxは延長し、AUCが増大する結果となった。

夕食後投与において吸収性が増大した要因の一つとして、夜間は消化管活動が低下することが知られており^{139,140}、夕食後投与の場合は胃からの製剤排出時間がより延長した可能性が考えられた。また、夕食後投与においてAUCが約1.3倍増大したことから、夕食を摂取した後にGSS24を服用することによってGSS24の胃内滞留時間がより延長し、最も吸収されやすい小腸上部における薬物吸収性を最大限に活用できたものと考えられた。

以上の結果から、GSSはプラナルカスト水和物のように消化管の吸収部位が限定される吸収ウィンドウを有する化合物の経口持続性製剤化に有用な技術であることが明らかになってきた。

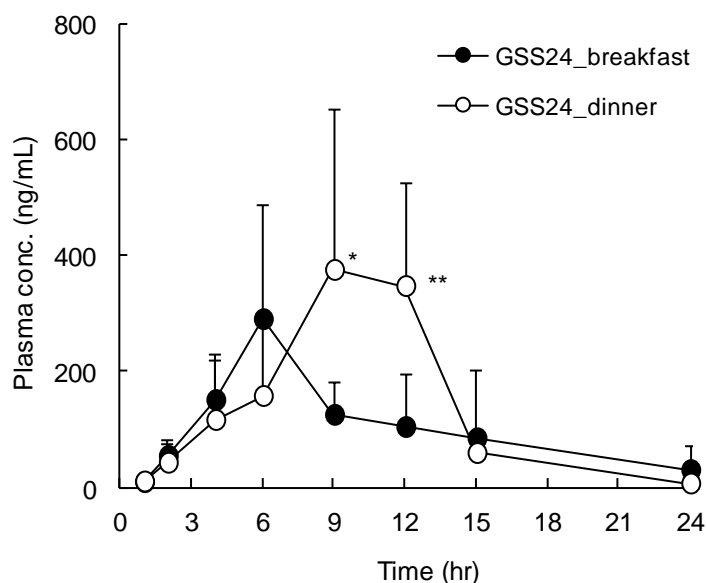


Fig.3-11 Comparison of plasma concentration-time profile of pramlukast after breakfast or evening meal administration of GSS24 to healthy volunteers. *P<0.05, **P<0.01: significantly different from GSS24_breakfast. Each value is the mean \pm S.D. (n=9).

Table 3-7 Pharmacokinetic parameter of pramlukast after breakfast or evening meal administration of GSS24 to healthy volunteers. **P<0.01, significantly different from breakfast. Each value is the mean \pm S.D. (n=9).

	GSS24	
	Breakfast	Evening meal
Tmax (hr)	7.1 \pm 2.8	10.5 \pm 1.6**
Cmax (ng/mL)	302.5 \pm 184.7	509.5 \pm 230.7
AUC (ng/mL \cdot hr)	2427.2 \pm 930.0	3241.5 \pm 1078.8
MRT (hr)	9.2 \pm 2.3	9.4 \pm 1.2

第 6 節 小括

難吸収性薬物であるプラ nulカスト水和物の経口持続性製剤化を目指し、ヒト消化管吸収部位差を評価して胃内膨潤性製剤化検討を実施した。ビーグル犬にて GSS の製剤設計コンセプトを検証し、また、ヒトにおいて GSS の胃内滞留挙動及び血中動態を評価し、以下の知見を得た。

- 1) プラ nulカスト水和物は **Biopharmaceutical Classification System** において **Class IV** に分類される難溶解性、難膜透過性薬物であり、製剤設計方針を見極めるためにヒト消化管吸収部位差を評価した。その結果、プラ nulカストには吸収ウィンドウがあり、遠位小腸及び結腸からの吸収性は非常に乏しく、吸収部位が小腸上部に限定されることが明らかとなった。本結果から、プラ nulカスト水和物を経口持続性製剤化するためには、製剤を胃内に滞留させて徐放する必要があることが分かった。
- 2) プラ nulカスト水和物の 1 日投与量が 450 mg と多いことから、服用体積が最も小さい胃内膨潤性製剤 (GSS) について検討した。胃の生理的なストレス存在下でも十分な大きさに膨潤して、かつ薬物を徐放するような製剤を企図して製剤設計検討を実施し、ガラスビーズ共存下でも十分に膨潤すると共に、パドル回転速度 200 rpm の過酷な条件下においてもプラ nulカスト水和物を持続放出する GSS が設計できた。
- 3) GSS18 をビーグル犬に投与して血中動態を評価し、即放錠に比べて **Tmax**、**MRT** は有意に延長することが確認でき、投与 12 時間以上に渡って血中濃度が持続した。また、**AUC** は即放錠の 2.3 倍以上となり、吸収性が有意に向上した。本結果より、GSS は難吸収性薬物であるプラ nulカストを持続的に吸収させる機能を有することが明らかとなり、製剤設計コンセプトが確認できた。
- 4) 2 種の異なる徐放性を示す GSS12 及び GSS24 をヒトに経口投与し、ガンマシンチグラフィによって胃内滞留挙動を評価したところ、いずれも十分な胃内滞留性を示すことが確認できた。特に GSS24 は 10 時間以上に渡って胃内に滞留し、プラ nulカスト血中濃度も持続化した。投与量と食事条件が異なるものの、市販品であるオノンカプセルに比べて血中濃度は明らかに持続する結果が得られた。また、GSS24 を夕食後投与したところ、**AUC** が 1.3 倍に増大し、夕食後投与において効果が最も発揮されることが分かった。これらの結果から、GSS はプラ nulカスト水和物のように消化管の特定の部位からしか吸収されないような吸収ウィンドウを有する化合物の経口持続性製剤化に有用な技術であることを明らかにできた。

第4章 総括及び考察

近年創出される多くの医薬品は難溶解性、難膜透過性のいずれか、或いは両方の問題を抱えており、医薬品の有効性を十分に発揮させるために、これらの問題を製剂的に改善すると共に、製剤に特殊な機能を付与して医薬品としての付加価値を向上させることが期待されている。消化管滞留性製剤は製剤の消化管滞留挙動を制御し、薬物吸収が適した部位への滞留時間を増大させようとする製剤であり、難吸収性薬物の吸収性向上が期待できる。また、持続的な薬物放出機能を付与することで、血中動態も改善し得ることから、経口持続性製剤としての応用も可能であり、服用回数を低減し、服薬コンプライアンスの向上も期待できる。著者は当研究室にて有用性を見出しているキトサン修飾リポソームの消化管滞留挙動を詳細に明らかとし、難吸収性薬物であるインドメタシンを封入したキトサン修飾リポソームを新たに設計して、インドメタシンの経口吸収性改善を達成すると共に、持続吸収機能を付与することができた。また、同様に難吸収性薬物であるプラナルカスト水和物を含む胃内滞留製剤を設計し、健常人において十分な時間胃内に滞留し、持続的に薬物を吸収させる胃内膨潤性製剤を設計することができた。以下に本研究で得られた知見を要約する。

1. 粘膜付着性リポソームの消化管滞留性評価

サブミクロン化キトサン修飾リポソームの消化管滞留挙動を明らかとすることを目的として検討を行なった。各種リポソームの消化管滞留性を比較した結果、キトサンで修飾したリポソームは消化管滞留性が向上し、特にサブミクロン化キトサン修飾リポソームは、キトサンによる粘膜付着作用に加えて、小腸粘膜層深部へと粒子が侵入することによって滞留性が向上することを確認した。食餌条件下では小腸の運動性の亢進によって小腸滞留性は低下するものの、胃への滞留性は向上し、サブミクロン化キトサン修飾リポソームは、食餌条件下においても未修飾リポソームに比べて消化管滞留性が高いことを確認した。また、食餌が小腸内に存在する条件下でも粘膜侵入性は維持されることを明らかとした。

2. インドメタシン封入粘膜付着性リポソームの製剤設計検討

難吸収性モデル薬物である IMC を封入したキトサン修飾リポソームを設計し、ラットに経口投与後の血中動態を評価したところ、IMC 溶液投与群に比べて有意に経口吸収性が改善できることを明らかとした。また、キトサン修飾リポソーム群は、リポソームからの IMC 放出性が遅延したことと、消化管滞留性が向上した結果、IMC の溶解に有利な小腸中部以遠の pH 中性域への移行が遅延し、未修飾リポソーム群に比べて IMC 血中濃度が持続化することを明らかとした。IMC 吸収性は食餌の影響を受けるものの、食間投与において IMC 溶液投与群に比べてキトサン修飾リポソーム群は吸収性が有意に向上することを明らかと

し、食間投与において薬物キャリアーの機能及び吸収改善効果が維持されることを確認した。

3. プランルカスト水和物の胃内滞留性製剤設計検討

難吸収性薬物であるプランルカスト水和物の経口持続性製剤化を目指して検討を行った。プランルカスト水和物のヒト消化管吸収部位差を評価し、製剤を胃に滞留させて徐放化させる必要があることを明らかとした。胃内滞留性製剤の設計を行い、胃の生理的ストレス下においても膨潤し、かつ持続的に薬物を放出する GSS を設計した。GSS をビーグル犬に投与して血中動態を評価したところ、即放錠に比べて経口吸収性が有意に向上することを明らかとした。健常人に GSS を投与後の胃内滞留挙動を評価したところ、胃に 10 時間以上に渡って滞留することが明らかとなり、製剤設計のコンセプトが確認できた。また、その血中濃度は、市販品であるオノンカプセルに比べて明らかに持続することを確認し、消化管の吸収部位が限定される吸収ウィンドウを有する化合物の経口持続性製剤化に有用な技術であることを提示することができた。

以上、難吸収性薬物の経口吸収性改善を目的として粘膜付着性リポソーム及び胃内膨潤性製剤の製剤設計を実施し、それぞれの消化管滞留機能を詳細に明らかした。また、難吸収性薬物の経口吸収性向上が達成できることを明らかとし、更に持続吸収性も付与できることを提示できた。本研究で提示した消化管滞留性薬物キャリアーの製剤設計は、難溶解性、難膜透過性医薬品の経口吸収性改善のための新しい製剤設計アプローチとして広汎な活用が期待される。

実験の部

第 1 章の実験

1.1 試料

高純度リン脂質である L- α -ジステアрилホスファチジルコリン (DSPC, COATSOME MC-8080) は日本油脂社製を使用した。脂質添加剤であるジセチルリン酸 (DCP)、コレステロール (Chole.) は SIGMA 社製を使用した。粘膜付着性ポリマーであるキトサン (脱アセチル化度: 85%, 分子量: 150,000) は片倉チッカリン社製を使用した。脂質マーカーである 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorate (DiI) は LAMBDA 社製を用いた。他はすべて特級試薬を用いた。

1.2 リポソームの調製

1.2.1 Multi-lamellar vesicle リポソーム (Lip.) の調製

DSPC 161 mg, DCP 9.7 mg, Chole. 27.9 mg (脂質組成 DSPC:DCP:Chole. = 8:2:1), DiI 1.68 mg になるようにナス型フラスコに取り、少量のクロロホルムにて溶解した。溶媒をロータリーエバポレーター (RE-46, Yamato) にて減圧留去して脂質薄膜を得た。減圧下一晩乾燥した薄膜に 100 mM の pH4.4 酢酸緩衝液を 5 mL 加え、60°C の水浴上で加温し、タッチミキサー (MT-31, Yamato) で水和した後、10°C で 30 分間インキュベーションして Lip. を調製した。

1.2.2 Small uni-lamellar vesicle リポソーム(ssLip.)の調製

1.2.1 で調製した Lip. を氷冷下超音波処理 (Sonifier 250, Branson, Duty cycle 75%, Out put 2 (40~50W)、3 min×3) し、粒子径がサブミクロンサイズの ssLip. を調製した。

1.2.3 キトサン修飾 Multi-lamellar vesicle リポソーム (CS-Lip.) の調製

1.2.1 で調製した Lip. に、100 mM の pH4.4 酢酸緩衝液に溶解させた 0.6% キトサン溶液を攪拌下等量混合し、10°C で 1 時間インキュベーションして CS-Lip. を調製した。

1.2.4 キトサン修飾 SUVs リポソーム (ssCS-Lip.) の調製

1.2.2 で調製した ssLip. に、100 mM の pH4.4 酢酸緩衝液に溶解させた 0.6% キトサン溶液を攪拌下等量混合し、10°C で 1 時間インキュベーションした。その後、1.2.2 と同様に超音波処理し、粒子径がサブミクロンサイズの ssCS-Lip. を調製した。

1.3 リポソームの粒子径測定

調製したリポソームを大過剰の精製水で希釈し、そのときの粒子径を動的光散乱法

(LPA-300、大塚電子)により測定した。マイクロサイズのリポソームは、レーザー遮断法 (GALAI-Cisl、セントラル科学貿易)により測定した。サブミクロンオーダーのリポソームはLPA-300、マイクロオーダーのリポソームはGALAIにより測定した。

1.4 リポソームのゼータ電位測定

調製したリポソームを大過剰の精製水、又は100 mMのpH4.4酢酸緩衝液にて希釈し、リポソーム粒子のゼータ電位をZeta Master (Malvern Instruments)を用いて測定した。

1.5 リポソームの *in vivo* 消化管粘膜附着挙動評価

1.5.1 動物への投与条件

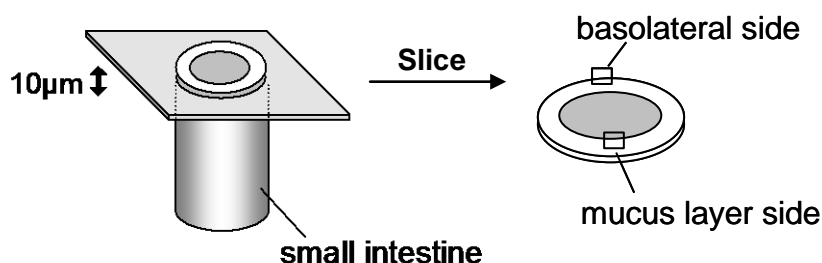
動物はSLC社製のWistar系雄ラット13週齢を用いた。48時間絶食させたラットに、DiI投与量が0.168mgDiI/ratになるようにリポソームを経口ゾンデにて胃内投与した。尚、食餌の摂取による影響を評価する際は、ラットを6時間絶食させ、リポソームの投与と同時にラットに食餌を摂取させた。

1.5.2 ラット摘出腸管の作成

リポソームを投与して一定時間後にラットを過麻酔にて致死させ、小腸を摘出した。小腸を胃直下から15cmごとに切り分けてそれぞれ、十二指腸、空腸上・下、回腸上・下とし、それぞれ腸管内を生理食塩水20mLで洗浄した。

1.5.3 共焦点レーザー走査顕微鏡による粘膜附着挙動観察

ラット摘出腸管を丸型試料ステージに乗せ、組織凍結液 (Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound)を添加してCryostat (CM1850、LEICA)で-20℃にて急速に凍結させて固定し、10 μ mの厚さになるように腸管に対して垂直方向に切断して小腸組織切片を作成した。組織切片をプレパラートに取り、粘膜層側と漿膜側を、それぞれ共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM510、ZEISS、Ex:550nm、Em:570nm)にて観察した。



1.6 リポソームの *in vivo* 消化管滞留性の定量的評価

1.6.1 動物への投与条件

動物は SLC 社製の Wistar 系雄ラット 13 週齢を用いた。48 時間絶食させたラットに、DiI 投与量が 0.168 mg DiI/rat になるようにリポソームを経口ゾンデにて胃内投与した。尚、食餌の摂取による影響を評価する際は、ラットを 6 時間絶食させ、リポソームの投与と同時にラットに食餌を摂取させた。

1.6.2 リポソームの消化管滞留量の定量的評価

リポソームを投与して一定時間後にラットを過麻酔にて致死させ、胃及び小腸を摘出した。小腸を胃直下から 15 cm ごとに切り分けてそれぞれ、十二指腸、空腸上・下、回腸上・下とした。各部位に生理食塩水 3 mL 添加後、高速ホモジナイザー(Polytron、power control unit 6)にて高速攪拌し、胃及び腸管ホモジネート液を調製し、このホモジネート液 0.3 mL にクロロホルム:メタノール=1:1 混液 6 mL を加えて、40 分間振とうして DiI を有機層に移行させた。その後、遠心(3500 rpm、10 min)により分離した上層の有機層の蛍光強度を蛍光光度計(F3010、HITACHI)にて測定した。

蛍光光度計の測定条件(DiI)

Ex wavelength : 550nm

Em wavelength : 570nm

Time average : 5sec

Ex band pass : 5nm

Em band pass : 5nm

Response : 2sec

1.7 リポソームの消化管粘膜付着量の定量的評価

1.6.1 と同様にリポソームをラットに投与し、所定時間経過後、ラットを過麻酔にて致死させ、胃及び小腸を摘出した。小腸を胃直下から 15 cm ごとに切り分けてそれぞれ、十二指腸、空腸上・下、回腸上・下とした。それぞれ腸管内を生理食塩水 20 mL にて洗浄した。以下 1.6.2 と同様にして蛍光光度計によりリポソーム量を定量した。

第 2 章の実験

2.1 試料

高純度リン脂質である L- α -ジステアрилホスファチジルコリン (DSPC, COATSOME MC-8080) は日本油脂社製を使用した。脂質添加剤であるジセチルリン酸 (DCP)、コレステロール (Chole.) は SIGMA 社製を使用した。粘膜付着性ポリマーであるキトサン (脱アセチル化度: 85%, 分子量: 150,000) は片倉チッカリン社製を使用した。モデル薬物であるインドメタシン(IMC)は住友製薬社製のものを使用した。他はすべて特級試薬を用いた。

2.2 IMC 封入リポソームの調製

DSPC 161 mg, DCP 9.7 mg, Chole. 27.9 mg (脂質組成 DSPC:DCP:Chole.=8:2:1), IMC 5 mg になるようにナス型フラスコに取り、少量のクロロホルムにて溶解した。溶媒をロータリーエバポレーター (RE-46, Yamato) にて減圧留去して脂質薄膜を得た。減圧下一晩乾燥した薄膜に 100 mM の pH4.4 酢酸緩衝液を 5 mL 加え、60°C の水浴上で加温しタッチミキサー (MT-31, Yamato) で水和した。以降は 1.2 と同様の手法により、IMC を封入した未修飾リポソーム(ssLip.)及びキトサン修飾リポソーム(ssCS-Lip.)を調製した。尚、IMC 最終濃度は 0.5 mg/mL となるように調製した。

2.3 IMC 封入リポソームの物性評価

粒子径及びゼータ電位はそれぞれ 1.3、1.4 と同様の方法にて測定した。

2.4 IMC 溶液及び懸濁液の調製

IMC をリン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解させて IMC 溶液、酢酸緩衝液 (pH4.4) に懸濁させて IMC 懸濁液とした。また、IMC をリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解させて静脈内投与用 IMC 溶液とした。尚、IMC 最終濃度は 0.5 mg/mL となるように調製した。

2.5 *In vitro* 薬物放出試験方法

透析チューブ(カットオフ径 12-14,000Da、フナコシ)を 7 cm に切り、IMC 仕込量が 0.5 mg となるようにチューブ内に IMC 含有リポソームを添加した。これを日本薬局方第 2 液 (100mL、37°C)中で回転させ、経時的にサンプリングした。

溶出液 0.1 mL を取り 0.1M リン酸緩衝液(pH8.10) 0.1 mL および 0.5M クエン酸緩衝液 (pH4.75) 0.5 mL を加えて、pH5.0 付近にし、n-heptane(3%イソアミルアルコール含有)5 mL を加えて 20 分間振とう抽出した。これを 15 分間 3000 rpm で遠心分離し、n-heptane 4 mL をとり、0.1M NaOH 1 mL を加えて 15 分間振とうした。これを 12 分間 3000rpm で遠心分離し、n-heptane 層を吸引して除いた後、水層を共栓付試験管に入れて、50°C の恒温槽中で 30 分間加温した。冷後、蛍光強度を蛍光光度計 (F3010、HITACHI) にて IMC 濃度を測定した。

尚、測定条件は以下の通りである。

Ex wavelength : 295nm

Em wavelength : 375nm

Time average : 10sec

Ex band pass : 3nm

Em band pass : 3nm

Response : 2sec

2.6 薬物吸収性評価

2.6.1 動物への投与条件

動物は SLC 社製の Wistar 系雄ラット 8 週齢を用いた。12 時間絶食させたラットに、2 mg IMC/kg となるようにリポソームを経口ゾンデにて胃内投与した。また、静脈内投与については、0.5 mg IMC/kg となるように頸静脈より投与した。尚、投与後 2 時間後から摂食条件とした場合を食間投与とした。

2.6.2 血中濃度の測定方法¹⁴¹⁾

投与後一定時間ごとにラットの頸静脈より採血し、遠心操作(3,000 g, 10 min)により血漿を分取した。得られた血漿 0.1 mL に、0.1M リン酸緩衝液(pH8.10) 0.1 mL および 0.5M クエン酸緩衝液(pH4.75) 0.5 mL を加えて、pH5.0 付近にし、n-heptane(3% イソアミルアルコール含有)5 mL を加えて 20 分間振とう抽出した。これを 15 分間 3000 rpm で遠心分離し、n-heptane 4 mL をとり、0.1M NaOH 1 mL を加えて 15 分間振とうした。これを 12 分間 3000 rpm で遠心分離し、n-heptane 層を吸引して除いた後、水層を共栓付試験管に入れて、50°C の恒温槽中で 30 分間加温した。冷後、蛍光強度を蛍光光度計 (F3010、HITACHI) にて IMC 濃度を測定した。尚、測定条件は以下の通りである。

Ex wavelength : 295nm

Em wavelength : 375nm

Time average : 10sec

Ex band pass : 3nm

Em band pass : 3nm

Response : 2sec

2.7 薬物動態学的パラメーターの算出方法

ラット血漿中薬物濃度について、WinNonlin Standard Edition version 4.0.1 (SCI, Apex)によりノンコンパートメントモデル解析を行なって各種動態パラメーターを算出した。血漿中薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)は対数線形台形法により算出した。

尚、バイオアベイラビリティは以下の計算式により算出した。

$$\text{Bioavailability} = \frac{\text{AUC}_{\text{po}}/\text{D}_{\text{po}}}{\text{AUC}_{\text{iv}}/\text{D}_{\text{iv}}}$$

2.8 *in vivo* 薬物吸収プロファイルの算出方法

静脈内投与後の血中濃度プロファイルを MULTI により指数関数近似し、経口投与後の血中濃度プロファイルをデコンボリューションし、投与量に対する割合を算出し、*in vivo* 吸収プロファイルとした。

第3章の実験

3.1 試料

プランルカスト水和物は小野薬品工業株式会社製を使用した。放出制御剤として、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC 90SH-100, 400, 4000) は信越化学工業社製、メタクリル酸コポリマー (Eudragit® L 100-55) は Evonik 製を使用した。膨潤化剤として、キサントタンガム (Echogum® T)、グアーガム (KT-0104) は大日本住友製薬社製、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC 90SH-30000F) 及びエチルセルロース (N10F) は信越化学工業社製、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-L) は日本曹達社製を使用した。放射性標識物質として、サマリウム (^{152}Sm) は CK gas Products 社製を使用した。結合剤として、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-SSL) は日本曹達社製を使用した。崩壊剤として、ヒドロキシプロピルセルロース (L-HPC-22) は信越化学工業社製を使用した。滑沢剤として、ステアリン酸マグネシウムは太平化学工業社製を使用した。賦形剤として、乳糖は Carter Holt Harvey 社製、微結晶セルロース (Avicel PH-101) は旭化成社製を使用した。その他の試薬については日本薬局方試薬或いは特級試薬を用いた。

3.2 GSS の製造

3.2.1 膨潤層の調製

キサントタンガム (40.0%, w/w)、HPMC 90SH-400 (23.3%, w/w)、グアーガム (6.7%, w/w)、乳糖 (20.0%, w/w) 及び微結晶セルロース (10.0%, w/w) を混合し、GSS6 膨潤層の打錠用粉末とした。キサントタンガム (50.0%, w/w)、HPMC 90SH-30000F (40.0%, w/w) 及び微結晶セルロース (10.0%, w/w) を混合し、GSS18 膨潤層の打錠用粉末とした。キサントタンガム (40.0%, w/w)、HPMC 90SH-30000F (35.0%, w/w)、グアーガム (16.7%, w/w)、微結晶セルロース (7.8%, w/w) 及びステアリン酸マグネシウム (0.5%) を混合し、GSS12 及び GSS24 膨潤層の打錠用粉末とした。*in vitro* 膨潤試験用膨潤層として用いる場合は、これら打錠用粉末 200 mg を直径 8 mm の臼に充填し、10 kN の打圧にて圧縮 (WPM-2, 東洋マテリアル社製) して用いた。

3.2.2 *in vitro* 薬物放出試験及びビーグル犬投与用 GSS6, GSS18, non-swelling GSS18, IR tab の調製

プランルカスト水和物 (81.6%, w/w)、乳糖 (10.2%, w/w) 及び HPC-SSL (8.2%, w/w) を精製水に懸濁させて、噴霧乾燥し (L-8 Spray drier, 大河原化工機社製)、プランルカスト水和物含有噴霧乾燥粉末を得た。この噴霧乾燥粉末と GSS6 の場合は HPMC 90SH-100、GSS18 の場合は HPMC 90SH-4000、乳糖、微結晶セルロース、HPC-SSL 及びステアリン酸マグネシウムを混合し、薬物放出層用の打錠用粉末とした。また、GSS6 及び GSS18 膨潤層用の打錠用粉末は、3.2.1 で調製した粉末を用いた。

2層錠である GSS の製造は打錠を2段階で行なった。薬物放出層を白に充填し、予圧縮した後、膨潤層を薬物放出層の上に充填し、打錠機 (TAB-ALL, 岡田精工) にて本圧縮し、18×9 mm の錠剤を得た。Non-Swelling GSS18 は、エチルセルロース、微結晶セルロース、乳糖、HPC-L 及びステアリン酸マグネシウムを混合し、GSS18 用薬物放出層を仮圧縮した上に充填して同様に本圧縮して 18×9 mm の錠剤を得た。ネガティブコントロールとして、IR tab の調製を行った。プラニルカスト含有噴霧乾燥粉末と L-HPC-22 及びステアリン酸マグネシウムを混合し、白に充填して圧縮して直径 8 mm の錠剤を得た。これらの処方について、Table 5-1 に示した。尚、いずれもプラニルカスト水和物含有量は 75 mg である。

Table 5-1 The formula of the tablets

Component	Quantity (mg/tablet)			
	IR tab	GSS6	GSS18	Non GSS18
Pranlukast SD	91.4	91.4	91.4	91.4
HPMC 90SH-100	-	20.0	-	-
HPMC 90SH-4000	-	-	120.0	12.0
Lactose	-	16.6	49.8	49.8
HPC-SSL	-	2.7	8.0	8.0
Microcrystalline cellulose	-	-	122.8	122.8
L-HPC-22	3.9	-	-	-
Mg-St	1.0	2.7	8.0	8.0
Xanthan gum	-	120.0	200.0	-
Guar gum	-	20.0	-	-
Lactose	-	60.0	-	60.0
Microcrystalline cellulose	-	30.0	40.0	80.0
HPMC-90SH-400	-	70.0	-	-
HPMC-90SH-30000F	-	-	160.0	-
Ethyl cellulose	-	-	-	200.0
HPC-L	-	-	-	60.0
Mg-St	-	1.5	-	2.0
Total	96.3	433.4	800.0	802.0

3.2.3 ヒト投与用 GSS12 及び GSS24 の調製

プラニルカスト水和物 (81.6%, w/w)、乳糖 (10.2%, w/w) 及び HPC-SSL (8.2%, w/w) を精製水に懸濁させて、噴霧乾燥し (L-8 Spray drier, 大河原化工機社製)、プラニルカスト水和物含有噴霧乾燥粉末を得た。この噴霧乾燥粉末と GSS12 の場合は HPMC 90SH-100、GSS24 の場合は HPMC 90SH-4000、メタクリル酸コポリマー及び乳糖を流動層造粒機 (GPCG-1,

Glatt) にて混合し、HPC-SSL (5%, w/w) を結合剤として用いて造粒した。その造粒顆粒を乾燥後、ステアリン酸マグネシウムと混合し、薬物放出層用の打錠用粉末とした。また、キサントランガム、HPMC 90SH-30000F、グアーガム、微結晶セルロース、酸化サマリウム (¹⁵²Sm) 及びステアリン酸マグネシウムを混合し、膨潤層用の打錠用粉末とした。

2層錠である GSS の製造は打錠を2段階で行なった。薬物放出層を白に充填し、予圧縮した後、膨潤層を薬物放出層の上に充填し、打錠機 (TAB-ALL, 岡田精工) にて本圧縮し、17.5×7.5 mm の錠剤を得た。GSS12 及び 24 の組成について、Table 5-2 に示した。尚、GSS12 及び 24 はいずれもプラナルカスト水和物として 225 mg 含有する。GSS12 及び 24 は Good Manufacturing Practice (GMP) 環境下にて製造した。

Table 5-2 Composition of the tablets evaluated in the healthy volunteer study

Component	Quantity (mg/tablet)	
	GSS12	GSS24
Pranlukast SD	274.3	274.3
HPMC 90SH-100	112.5	-
HPMC 90SH-4000	-	112.5
Methacrylic acid copolymer	31.5	31.5
Lactose	6.7	6.7
HPC-SSL	16.0	16.0
Mg-St	9.0	9.0
Xanthan gum	120.0	120.0
HPMC 90SH-30000F	105.0	105.0
Guar gum	50.0	50.0
Microcrystalline cellulose	23.5	23.5
Samarium oxide	10.0	10.0
Mg-St	1.5	1.5
Total	760.0	760.0

3.3 *in vitro* 試験

3.3.1 *in vitro* 膨潤性評価

日本薬局法第一液 (pH1.2) 15 mL を添加したプラスチック容器にガラスビーズ (直径 10 mm: 30 g, 5 mm: 6 g) を充填し、GSS 膨潤層を添加して 180 strokes/min にて3時間振とうした。試験前後の膨潤層の重量を測定し、3時間後の重量/試験開始時の重量×100 にて膨潤率を算出した。

3.3.2 *in vitro* 薬物放出性評価

0.1% Tween80 を含有した 37°C の日本薬局法第一液 (pH1.2) 900 mL 中に GSS を投入し、パドル回転数 100 または 200 rpm にて試験し、経時的に放出液を 5 mL サンプリングした。サンプリング液に pH6.8 リン酸緩衝液を加えて薬物を溶解し、260 nm にて吸光度を測定し、放出率を算出した。

3.4 *in vivo* 試験

3.4.1 GSS のビーグル犬を用いた吸収性評価

3.4.1.1 動物への投与条件

動物は北山ラベス社製の体重 9.41~10.81 kg の TOYO ビーグルを用いた。50 g の食餌を摂取させた後、プラシルカスト水和物投与量が 75 mg/body となるようにゾンデにて胃内投与した。尚、水道水は自由摂取させた。

3.4.1.2 試験方法

投与後一定時間ごとに前腕静脈より、ヘパリンを含有したチューブに 1 mL 採取し、4°C で 10 分間 1,700 g にて遠心分離して血漿を得て、測定まで -20°C で保存した。

3.4.2 プラシルカスト水和物のヒト消化管吸収部位差の評価方法

3.4.2.1 被験者

プラシルカスト水和物のヒト消化管吸収部位差の評価は、試験への参加について文書による説明と同意が得られた 18 から 45 歳で体重が理想体重 (Metropolitan Life Table、1979) の ±25% 範囲内の 6 名の健康な男性を用いて実施した。尚、この試験は Quorn Research Review Committee の倫理審査において承認を受けている。また、この試験は the Committee for Proprietary Medical Products (CPMP) によって承認された International Conference on Harmonisation (ICH) GCP ガイドラインに従って実施されており、Administration of Radioactive Substances Advisory Committee (ARSAC) の要求を含めた全ての必要な規制に適合している。

3.4.2.2 試験方法

消化管吸収部位差は完全無作為化非盲検 3-way クロスオーバー比較試験にて実施した。225 mg のプラシルカスト水和物を充填した Enterion™ カプセルを投与後、胃、遠位小腸及び結腸にてプラシルカスト水和物を放出した。尚、放射標識である technetium-99m diethylene triamine pentaacetic acid (≤ 4 MBq, $^{99m}\text{Tc-DTPA}$) をプラシルカスト水和物と共に内封し、カプセルからの内容物の放出を視覚的に確認した¹⁴²⁾。また、消化管内のカプセルの移動は、カプセルを indium-111 (≤ 1 MBq, ^{111}In) で標識して被験者の前方からガンマカメラ (General Electric Maxicamera) にて撮影して確認し、カプセルが標的部位に到達した後、カプセルを

活性化して内容物を放出させた。活性化までは 10 分間隔で 50 秒間画像を取得し、活性化後 4 時間まで撮影した。その後、活性化後 8 時間までは 20 分間隔で画像を撮影し、その後活性化 12、16 及び 24 時間後にそれぞれ撮影した。

被験者は投与前の深夜から絶食し、投与した後、昼食まで 5 時間絶食とした。夕食は投与後およそ 9 時間後に摂取した。その後、食事は投与後 24 時間（朝食）、29 時間（昼食）、33 時間（夕食）に摂取した。被験者は 200 mL の水を投与後 2 時間に飲み、昼食後以降はカフェインを含んでいない飲料を自由に服用した。

3.4.2.3 血液の採取方法

静脈より血液を各ポイント 6 mL ずつ、ヘパリンを含有したチューブに採取し、4°C で 10 分間 1,600 g にて遠心分離して血漿を得て、測定まで -20°C で保存した。

3.4.3 GSS のヒト胃内滞留挙動及び血中動態評価

3.4.3.1 被験者

GSS のヒト胃内滞留挙動及び血中動態評価は、試験への参加について文書による説明と同意が得られた 18 から 45 歳で体重指数（Body Mass Index, BMI）が 18~30 kg/m² の 9 名の健康な男性を用いて実施した。尚、この試験は Quorn Research Review Committee の倫理審査において承認を受けている。また、この試験は the Committee for Proprietary Medical Products (CPMP) によって承認された International Conference on Harmonisation (ICH) GCP ガイドラインに従って実施されており、Administration of Radioactive Substances Advisory Committee (ARSAC) の要求を含めた全ての必要な規制に適合している。

3.4.3.2 試験方法

第 1 相では 2 種類の GSS について朝食後投与における胃内滞留挙動をガンマシンチグラフィにより評価すると共に、血中動態を比較し、第 2 相では選択した GSS を夕食後投与して血中動態を評価する 2 相クロスオーバー比較試験として実施した。

第 1 相試験では、GSS12 及び GSS24 に中性子照射をし、膨潤層に含有させた ¹⁵²Sm をガンマ線放出核種である ¹⁵³Sm に変換して、それぞれ GSS を放射標識し (≤ 0.5 MBq)、それぞれ 2 錠ずつ健常人に経口投与した (225 mg/錠)。

被験者は投与前の深夜から絶食し、09:00 に FDA の規定する高脂質含有高カロリー朝食を摂取し、5 分以内に 240 mL の水と共に GSS を服用した。被験者は投与 2 時間後に 180 mL の水を飲み、投与 4 時間後以降はカフェインを含んでいない飲料を自由に服用した。また、投与 4 時間後に通常カロリーの昼食を摂取し、およそ投与 9 時間後に夕食を摂取し、24 時間後に朝食を摂取した。

消化管内の GSS の挙動は、被験者の前方からガンマカメラ (General Electric Maxicamera) にて撮影して確認し、投与後 12 時間までは 15 分間隔で 50 秒間画像を取得し、その後、30

分間隔で投与後 15 時間まで撮影し、胃排出時間、GSS が完全に崩壊する時間を算出した¹⁴²⁾。

第 1 相試験の結果に基づいて、GSS24 を第 2 相試験にて投与した。被験者は投与前の正午から絶食し、21:00 に FDA の規定する高脂質含有高カロリー食を摂取し、5 分以内に 240 mL の水と共に GSS を服用した。被験者は投与 2 時間後に 180 mL の水を飲み、投与 4 時間後以降はカフェインを含んでいない飲料を自由に服用した。また、投与日の次の日の 8:00 に通常カロリーの朝食、12:00 に昼食、18:00 に夕食を摂取した。

3.4.3.3 血中濃度の採取方法

静脈より血液を各ポイント 3 mL ずつ、ヘパリンを含有したチューブに採取し、4°C で 10 分間 1,600 g にて遠心分離して血漿を得て、測定まで -20°C で保存した。

3.5 血中濃度の測定方法

100 μ L の血漿を 50 μ L の内部標準溶液(6-Methyl-4-oxo-8-[4-(4-phenylbutoxy)benzoylamino]-2-(tetrazol-5-yl)-4H-1-benzopyran, 10 μ g/mL in chloroform-ethanol; 50/50, v/v)、500 μ L の 0.3 M KH_2PO_4 及び 2 mL の酢酸エチルと混合し、10 秒間攪拌混合した後、1,000 rpm にて 5 分間遠心分離して有機相をバイアルに分取した。2 mL の酢酸エチルを水相に加え、10 秒間攪拌混合し、1,000 rpm にて 5 分間遠心分離し、有機相をバイアルに分取し、溶媒を遠心エバポレーター (CC-105, トミー精工) にて減圧留去した。残渣に 100 μ L の 10 mM 酢酸アンモニウム-アセトニトリル混液 (50/50, v/v) を加えて溶解させ、6,000 rpm で 10 分間遠心分離してフィルターろ過 (Centricut UF, クラボウ) して、10 μ L を LC/MS/MS に注入し、以下の条件でプラナルカスト水和物濃度を測定した。

LC 条件 (Agilent 1100 series)

カラム : C18 column (YMC-Pack MB-ODS, 50 \times 2.1 mm, 5 μ m,)
移動相 : 10 mM 酢酸アンモニウム-アセトニトリル混液 (50/50, v/v)
流速 : 0.2 mL/min
カラム温度 : 25 °C

MS/MS 条件 (API-4000TM, AB SCIEX)

Multiple reaction monitoring (MRM) : m/z 480.1 \rightarrow 423.7 (プラナルカスト水和物)
: m/z 493.3 \rightarrow 196.8 (内部標準物質)

3.5 薬物動態解析方法

血漿中薬物濃度について、WinNonlin Standard Edition version 4.0.1 (SCI, Apex)によりノンコンパートメントモデル解析を行なって各種動態パラメーターを算出した。血漿中薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)は対数線形台形法により算出した。

略語表

DDS	: ドラッグデリバリーシステム
Lip.	: 未修飾リポソーム
CS-Lip.	: キトサン修飾リポソーム
ssLip.	: サブミクロン化未修飾リポソーム
ssCS-Lip.	: サブミクロン化キトサン修飾リポソーム
DSPC	: L- α -ジステアリルホスファチジルコリン
DCP	: ジセチルリン酸
Chole.	: コレステロール
DiI	: 1,1'-ジオクタデシル-3,3',3'-テトラメチルインドカーボシアニンパークロレート
IMC	: インドメタシン
Cmax	: 最高血中濃度
Tmax	: 最高血中濃度到達時間
AUC	: 血中濃度-時間曲線下面積
MRT	: 平均滞留時間
BA	: 生物学的利用率
GSS6, 12, 18, 24:	6、12、18 及び 24 時間放出型胃内膨潤性製剤
Non-GSS18:	18 時間放出型非膨潤性製剤
HPMC	: ヒドロキシプロピルメチルセルロース
FDA	: アメリカ食品医薬品局

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学製剤学研究室竹内洋文教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導と御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学名誉教授川島嘉明先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関して種々の貴重な御助言を賜りました愛知学院大学製剤学教室山本浩充教授、岐阜薬科大学製剤学研究室田原耕平講師、小野薬品工業株式会社研究本部水無瀬研究所製剤研究部西浦昭雄博士、安部和也博士に深謝致します。

本研究に際し、試料の提供を賜りました片倉チッカリン株式会社、日本油脂株式会社に感謝いたします。また、探索臨床試験を実施するにあたり、ご尽力頂いた Quotient Clinical 社 Ian Wilding 博士、Alyson Conner 氏に深謝致します。

本研究全般にわたりご協力頂きました岐阜薬科大学製剤学研究室の各位、同研究室の出身者各位、研究生各位、並びに小野薬品工業株式会社研究本部水無瀬研究所製剤研究部の松井祐司氏（現在、エーザイ株式会社）に感謝致します。

引用文献

- 1) S. Venkatesh, RA Lipper, *J. Pharm. Sci.*, 89(2) (2000)145-154
- 2) H. Van De Waterbeemd, DA Smith, K Beaumont, DK Walker, *J. Med. Chem.*, 44(9)(2001)1313-1333
- 3) Ajay, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2(12)(2002)1273-1286
- 4) EH Kerns, L Di, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2(1)(2002)87-98
- 5) A Alanine, M Nettekoven, E Roberts, AW Thomas, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 6(1)(2003)51-66
- 6) CR Gardner, CT Walsh O Almarsson, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(11)(2004)926-934
- 7) JG Lombardino, JA 3rd Lowe, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(10)(2004)853-862
- 8) T Sakaeda, N Okamura, S Nagata, *Biol. Pharm. Bull.*, 24(8)(2001)935-940
- 9) MC Wenlock, RP Austin, P Barton, AM Davis, PD Leeson, *J. Med. Chem.*, 46(7)(2003)1250-1256
- 10) M Vieth, MG Siegel, RE Higgs, *J. Med. Chem.*, 47(1)(2004)224-232
- 11) PD Leeson, AM Davis, *J. Med. Chem.*, 47(25)(2004)6338-6348
- 12) H. Asada, T. Douen, M. Waki, S. Adachi, T. Fujita, A. Yamamoto, S. Muranishi., *J. Pharm. Sci.* 84(6)(1995) 682-687
- 13) P Ettmayer, GL Amidon, B Clement, B Testa, *J. Med. Chem.*, 47(10)(2004)2393-2404
- 14) R Djaldettir, N Giladi, S Hassin-Baer, H Shabtai, E Melamed, *Clin. Neuropharmacol.* 26(6)(2003)322-326
- 15) M Danta, G Dusheiko, *Int. J. Clin. Pract.*, 58(9)(2004)322-326
- 16) SJ Hadziyannis, GV Papatheodoridis, *Infect. Ther.* 2(4)(2004)475-483
- 17) B Testa, *Biochem. Pharmacol.*, 68(11)(2004)2097-2106
- 18) G Milano, JM Ferrero, E Francois, *Br. J. Cancer*, 91(4)(2004)2097-2106
- 19) FG Hayden, L Jennings, R Robson, *Antiviral Ther.*, 5(3)(2000)205-213
- 20) M Yoshikawa, S Nishiyama, O Takaiti, *Hypertens. Res.* 18(Suppl. 1)(1995)S211-S213
- 21) J Van Gelder, S Deferme, L Naesens, *Drug Metab. Dispos.*, 30(8)(2002)924-930
- 22) T Chapman, J Mcgavin, S Noble, *Drugs*, 63(15)(2003)924-930
- 23) BP Kearney, JF Flaherty, J Shah, *Clin. Pharmacokinet.*, 43(9)(2004)595-612
- 24) O Kayser, C Olbrich, V Yardley, AF Kiderlen, SL Croft, *Int. J. Pharm.*, 254(1)(2003)73-75
- 25) BE Rabinow, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3(9)(2004)785-796
- 26) GC Rao, MS Kumar, N Mathivanan, Me Rao, *Pharmazie*, 59(1)(2004)5-9
- 27) Y Wu, A Loper, E Landis, *Int. J. Pharm.*, 285(1-2)(2004)135-146
- 28) E Merisko-Liversidge, GG Liversidge, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63(2011)427-440

- 29) D Juenemann, E Jantratid, C Wagner, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 77(2011)257-264
- 30) Rapamune product. Available from: <http://www.rxlist.com/rapamune-drug.htm>
- 31) Emend oral product. Available from: <http://www.rxlist.com/emend-drug.htm>
- 32) Megace ES product. Available from: <http://www.rxlist.com/megace-es-drug.htm>
- 33) Megace ES product UK. Available from: <http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/346/SPC/Mgace+160+mg+Tablets/>
- 34) B Deschamps, N Musaji, JA Gillespie, *Int. J. Nanomedicine*, 4(2009)185-192
- 35) J Breitenbach, M Magerlein, *Pharmaceutical extrusion technology*. Marcel Dekker, New York, (2003) p.245-260
- 36) WL Chiou, S Riegelman, *J. Pharm. Sci.*, 60(1971)1281-1302
- 37) S Prodduturi, KL Urman, JU Otaigbe, *AAPS PharmSciTech* 8(2007)E1-E10
- 38) S Janssens, G Van den Mooter, *J. Pharm. Pharmacol.*, 61(2009)1571-1586
- 39) Sporanox product. Available from: <http://www.rxlist.com/sporanox-drug.htm>
- 40) Intelence product. Available from: <http://www.rxlist.com/intelence-drug.htm>
- 41) Prograf product. Available from: <http://www.rxlist.com/prograf-drug.htm>
- 42) Crestor product. Available from: <http://www.rxlist.com/crestor-drug.htm>
- 43) Gris-PEG product. Available from: <http://www.rxlist.com/gris-peg-drug.htm>
- 44) N Aoyagi, H Ogata, N Kaniwa, *J Pharmacobiodyn*, 5(1982)120-124
- 45) Kaletra product. Available from: <http://www.rxlist.com/kaletra-tablets-drug.htm>
- 46) S. Muranishi, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 7(1) (1990)1-33
- 47) P Artursson, T Lindmark, SS Davis, *L Illum, Pharm. Res.* 11(9)(1994)958-964
- 48) T Lindmark, T Nikkila, P Artursson, *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 85(6)(1996)608-611
- 49) M Tomita, M Hayashi, S Awazu, *J. Pharm. Sci.* 85(6)(1996)608-611
- 50) T Lindmark, N Schipper, L Lazorova, AG De Boer, P Artursson, *J. Drug Target.*, 5(3)(1998)215-223
- 51) T Lindmark, Y Kimura, P Artursson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284(1)(1998)362-369
- 52) DZ Liu, EL Lecluyse, DR Thakker, *J. Pharm. Sci.*, 88(11)(1999)1161-1168
- 53) Y Mine, JW Zhang, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 130(2)(2003)135-142
- 54) BP Ross, SE Decruz, TB Lynch, K Davis-Goff, I Toth, *J. Med. Chem.*, 47(5)(2004)1251-1258
- 55) A Leone-Bay, H Leipold, D Sarubbid, B Variano, T Rivera, RA Baughman, *Pharm. Res.*, 13(2)(1996)222-226
- 56) X Ding, P Rath, R Angelo, *Pharm. Res.* 21(12)(2004)2196-2206
- 57) AT Florence, AM Hillery, N. Hassain, PU Jani, *J. Control. Release*, 36(1-2)(1995)39-46
- 58) H Chen, V Torchilin, R. Langer, *J. Control. Release*, 42(3)(1996)263-272
- 59) AJ Humberstone, WN Charman, *Adv. Drug Delivery Rev.* 25 (1997)103-128
- 60) S Yang, J Zhu, Y Lu, B Ling, C Yang, *Pharm. Research*, 16(1999)751-757

- 61) MA Clark, BH Hirst, MA Jepson, *Adv. Drug Delivery Rev* 43(2-3)(2000)207-223
- 62) GP Carino, JS Jacob, E Mathiowitz, *J. Control. Release*, 65(1-2)(2000)261-269
- 63) A Dembri, MJ Montisci, JC Gantier, H Chacun, G Ponchel, *Pharm. Resarch*, 18(4)(2001)467-473
- 64) MA Kisel, LN Kulik, IS Tsybovsky, AP Vlasov, MS Vorob'yov, EA Kholodova, ZV Zabarovskaya, *Int. J. Pharm.* 216(1-2)(2001)105-114
- 65) H Takeuchi, H Yamamoto, Y Kawashima, *Adv. Drug Delivery Rev.* 47(1)(2001)39-54
- 66) MA Longer, HS Ch'ng, JR Robinson, *J. Pharm. Sci.*, 74(1985)406-411
- 67) Y Akiyama, N Nagahara, T Kashihara, S Hirai, H Toguchi, *Pharm. Res.* 12(1995)397-405
- 68) Y Akiyama, N Nagahara, E Nara, M Kitano, S Iwasa, I Yamamoto, J Azuma, Y Ogawa, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50(1998)159-166
- 69) B Sarmento, A Ribeiro, F Veiga, P Sampaio, R Neufeld, D Ferreira, *Pharm. Res.*, 24(2007)2198-2206
- 70) B Kim, J Jeong, K Park, J Kim, *J. Control. Rel.*, 102(2005)525-538
- 71) R Al-Kassas, O Al-Gohary, M Al-Faadhel, *Int. J. Pharm.* 341(2007)230-237
- 72) AD Bangham, MM Standish, JC Watkins, *J. Mol. Biol.*, 13(1965)238-252
- 73) H Takeuchi, H Yamamoto, T Niwa, T Hino, Y Kawashima, *Chem. Pharm. Bull.* 42(1994)1954-1956
- 74) H Takeuchi, H Yamamoto, T Niwa, T Hino, Y Kawashima, *Pharm. Res.* 13(1996)896-901
- 75) H Takeuchi, Y Matsui, H Yamamoto, Y Kawashima, *J. Control. Release*, 86(2003)235-242
- 76) H Takeuchi, Y Matui, H Sugihara, H Yamamoto, Y Kawashima, *Int. J. Pharm.*, 303(2005)160-170
- 77) H Takeuchi, J Thongborisute, Y Matsui, H Sugihara, H Yamamoto, Y Kawashima, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57(2005)1583-1594
- 78) R. Khosla, S.S. Davis, *J. Pharm. Pharmacol.* 39(1)(1987) 47-49
- 79) D. Harris, J.T. Fell, H.L. Sharma, D.C. Taylor, *J. Control. Release*, 12(1)(1990)45-53
- 80) S.J. Jackson, D. Bush, A.C. Perkins, *Int. J. Pharm.* 212(1)(2001)55-62
- 81) M. Säkkinen, T. Tuononen, H. Jürjenson, P. Veski, M. Marvola, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19(5) (2003)345-353
- 82) M. Säkkinen, J. Marvola, H. Kanerva, K. Lindevall, M. Lipponen, T. Kekki, A. Ahonen, M. Marvola, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57(1)(2004)133-143
- 83) H.M. Ingani, J. Timmermans, A. Moës, *Int. J. Pharm.* 35(1-2)(1987)157-164
- 84) J. Timmermans, A.J. Moës, *J. Pharm. Sci.* 83(1)(1994)18-24
- 85) W. Phuapradit, S. Bolton, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17(8)(1991)1097-1107
- 86) G.A. Agyilirah, M. Green, R. duCret, G.S. Banker, *Int. J. Pharm.* 75(2-3)(1991)241-247
- 87) A.K. Hilton, P.B. Deasy, *Int. J. Pharm.* 86(1)(1992)79-88

- 88) M. Oth, M. Franz, J. Timmermans, A. Moës, *Pharm. Res.* 9(3)(1992)298-302
- 89) K.E. Gabr, T.M. Borg, S.T.P. *Pharm. Sci.* 10(2)(2000)181-186
- 90) M. Chavanpatil, P. Jain, S. Chaudhari, R. Shear, P. Vavia, *Int. J. Pharm.* 304(1-2)(2005) 178-184
- 91) H. Bechgaard, F.N. Christensen, S.S. Davis, J.G. Hardy, M.J. Taylor, D.R. Whalley, C.G. Wilson, *J. Pharm. Pharmacol.* 37(10)(1985)718-721
- 92) Y. Kawashima, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, Y. Ito, *J. Control. Release* 16(3)(1991)279-289
- 93) F. Atyabi, H.L. Sharma, H.A.H. Mohammad, J.T. Fell, *J. Control. Release* 42(2)(1996)105-113
- 94) L. Whitehead, J.T. Fell, J.H. Collett, H.L. Sharma, A.-M. Smith, *J. Control. Release* 55(1)(1998) 3-12
- 95) W. Swicki, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53(1)(2002)29-35
- 96) J.A. Fix, R. Cargill, K. Engle, *Pharm. Res.* 10(7)(1993)1087-1089
- 97) G. Gusler, J. Gorsline, G. Levy, S.Z. Zhang, I.E. Weston, D. Naret, B. Berner, *J. Clin. Pharmacol.* 41(6)(2001)655-661
- 98) E.A. Klausner, E. Lavy, M. Barta, E. Cserepes, M. Friedman, A. Hoffman, *Pharm. Res.* 20(9) (2003)1466-1473.
- 99) K. Shimada, S. Matsuo, Y. Sadzuka, A. Miyagishima, Y. Nozawa, S. Hirota and T. Sonobe, *Int. J. Pharm.*, 203(2000)255-263
- 100) S. Perrett, M. Golding and W.P. Williams, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43(3) (1991)154-161
- 101) 北原文雄、古澤邦夫、分散・乳化系の化学(1979)
- 102) N. Oku, D.A. Kendall and R.C. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta*, 691(1982)332-340
- 103) H.J. Galla and E. Sackmann, *Biochim. Biophys. Acta*, 339(1974)103-115
- 104) J.M. Vanderkooi and J.B. Callis, *Biochem.*, 13(1974)4000-4006
- 105) J.L. Rigaud, C.M. Gray-bobo and C. Taupin, *Biochim. Biophys. Acta*, 373(1974)211-223
- 106) E. Sackmann, H. Träuble, H.J. Galla and P. Overath, *Biochem.*, 12(1973)5360-6369
- 107) P. Devaux and H. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.*, 94(1972)4475-4481
- 108) Y.K. Levin, N J M. Birdsall, A.G. Lee and J.C. Metcalfe, *Biochemistry*, 11(1972)1416-1421
- 109) L. Illum, N. F. Farraj and S. S. Davis, *Pharm. Res.*, 11(8)(1994)1186-1189
- 110) N.G. Schipper, S. Olsson, J.A. Hoogstraate, A.G. deBoer, K.M. Varum and P. Artursson, *Pharm. Res.*, 14(7)(1997)923-929
- 111) P. Artursson, T. Lindmark, S.S. Davis and L. Illum, *Pharm. Res.*, 11(1994)1358-1361
- 112) G. Borchard, H.L. Lueßen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, Claus-M. Lehr, H.E. Junginger, *J. Control. Release*, 39(2-3)(1996)131-138
- 113) V. Dodane, M.A. Khan, J.R. Merwin, *Int. J. Pharm.* 182(1999)21-32
- 114) Y. Miyazaki, K. Ogihara, S. Yakou, T. Nagai, K. Takayama, *Int. J. Pharm.*, 258(2003)21-29
- 115) P.K. Gupta, J.R. Robinson, *Int. J. Pharm.*, 125(1995)185-193
- 116) C.M. Lehr, F.G.J. Poelma, H.E. Junginger and J.J. Tukker, *Int. J. Pharm.*, 70(1991)235-240

- 117) M.J. Montisci, A. Dembri, G. Giovannuci, H. Chacun, D. Duchene and G. Ponchel, *Pharm. Res.*, 18(6)(2001)829-837
- 118) 橋田充, *経口投与製剤の設計と評価*, (1995)
- 119) R.D. Toothaker, P.G. Welling, *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 20(1980)173-199
- 120) N. Washington, C. Washington, C.G. Wilson, *Physiological Pharmaceutics: Barriers to drug absorption*. 2nd ed. (2001) p. 133
- 121) E. Hosny, Y. El-Sayed, M. Al-Meshal, A. Al-Angary, *Int. J. Pharm.* 112 (1994)87-91
- 122) P.U. Jani, G.W. Halbert, J. Langridge, A.T. Florence, *J. Pharm. Pharmacol.* 42(1990)821-826
- 123) H. Takeuchi, Y. Shimotori, H. Yamamoto, T. Hino and Y. Kawashima, *Drug Deliv. Syst.*, 12(1997)347-352
- 124) A. Goundalkar, M. Mezei, *J. Pharm. Sci.* 73(1984)834-835
- 125) M. Phetdee, A. Polnok, J. Viyoch, *Int. J. Cosmet. Sci.* 30(2008)285-295
- 126) J. Zhuang, Q. Ping, Y. Song, J. Qi, Z. Cui, *Int. J. Nanomed.*, 5(2010)407-416
- 127) G. Liversidge, J. Dent, W. Eickhoff, *Pharm. Res.* 6(1989)44-48
- 128) J.G. Hardy, C.G. Wilson, E. Wood, *J. Pharm. Pharmacol.* 37(12)(1985)874-877
- 129) G.M. Grass, P.J. Sinko, *Drug Discovery Today*, 6(12)(2001)S54-S61.
- 130) I.R. Wilding, *PHARMA TECH JAPAN*, 20(4)(2004)67-80.
- 131) R. Mersny, in *Controlled Drug Delivery. Challenges and Strategies*, K. Park, Ed., Washington DC: American Chemical Society (1997)107
- 132) A. Parr, *39th Annual International Industrial Pharmaceutical Research and Development Conference*, 39(1997)Ch 3
- 133) R.A. Hinder, K.A. Kelly, *Am. J. Physiol.* 233(4)(1977)E335-340
- 134) G. Chawla, P. Gupta, V. Koradia, A.K. Bansal, *Pharm. Tech.* 27(2003)50-68.
- 135) S. Sangekar, W.A. Vadino, I. Chaudry, A. Parr, R. Beihn, G. Digenis, *Int. J. Pharm.* 35(3)(1987)187-191
- 136) S.Y.E. Hou, V.E. Cowles, B. Berner, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carr. Syst.* 20(6)(2003)461-497
- 137) S.S. Davis, J.G. Hardy, M.J. Taylor, D.R. Whalley, C.G. Wilson, *Int. J. Pharm.* 21(3)(1984)331-340
- 138) J. Timmermans, A.J. Moës *J. Pharm. Sci.*, 82(8)(1993)854-859
- 139) A.J. Coupe, S.S. Davis, F.E. David, I.R. Wilding, *J. Control. Release* 20(1992)155-162
- 140) A.J. Coupe, S.S. Davis, D.F. Evance, I.R. Wilding, *Int. J. Pharm.* 78(1-3)(1992)69-76
- 141) Y. Watanabe, K. Yokoyama, M. Yamaji, F. Tanaka, M. Matsumoto, *Yakugaku zasshi*, 105(1985)278-283
- 142) R. Menon, E. Cefali, I. Wilding, H. Wray, A. Connor, *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 30(9)(2009)508-516