

1 緒言

新薬開発に Combinatorial chemistry や High-through put screening が導入され、さらにはゲノム創薬が始まり、次世代医薬品候補として、難溶性、難吸収性、易分解性、高活性な薬物が数多く取りあげられるようになった。そのため、これらの化合物の製剤化のための物性改善や処方設計、さらには新しい投与ルートや投与方法の開発が強く望まれている。そのなかで、ナノ粒子製剤が注目されている。微粒子化(ナノオーダー化)により、上記薬物の物性が改善され、製剤に新しい機能を賦与できるからである。即ち、薬物粒子自身の溶解性(溶解度、溶解速度)が著しく向上する。さらに、これらの薬物粒子を高分子などの皮膜で被覆した微粒子薬物キャリアーは、薬物の放出制御や安定性を向上させるだけでなく、組織指向性(ターゲティング)や、組織付着性などの新機能を発現するようになる。それにより薬物の生物学的利用能や薬効が向上する。¹⁾ 例えば、経粘膜投与製剤の場合、後述するように、薬物キャリアーのサイズをサブミクロン化すると薬物キャリアーは粘膜層に侵入することが出来るようになり、結果的に薬物の放出を持続化でき生物学的利用能が向上する。さらに表面を粘膜付着性高分子でナノコーティングするとその効果は増大する。静注用薬物キャリアーは、細網内皮系 (reticuloendothelial system, RES) で貪食され、循環血流中から消失しやすい。然し、粒子径を 100nm 以下にしたり、表面を親水性化すると RES でトラップされ難くなり、血中滞留性が向上する事が知られている。局所投与されたナノ粒子製剤が、マクロファージに貪食され、それが遊走することにより組織内部まで侵入し薬理効果を向上させる事も見つかっている。これらのナノ粒子製剤には、リポソーム、高分子ミセル、高分子カプセルなどがある。ここでは、高分子球形晶析法による生体分解性、生体適合性の合成(乳酸・グリコール酸共重合体)並びに天然由来(キトサン)高分子のナノカプセルやナノスフェアの設計とペプチドやステロイドの製剤化への応用について我々の成果を中心に紹介する。

2 高分子球形晶析法

ナノ粒子製剤の設計法は、ブレイクダウンとビルトアップ法とに大別される。前者は、粒子を粉碎してそのサイズをサブミクロン化する方法である。粉碎は、乾式法または、湿式法でなされる。乾式法では、粉碎助剤 (PVP、微結晶セルロースなどの高分子や、糖、糖アルコール、アミノ酸などの水溶性物質) との混合粉碎法が開発されている。²⁾ ³⁾ 湿式粉碎は、乾式粉碎に比べて粉碎による限界粒子径を下げる事ができる。しかし、粉碎媒体の磨耗などに起因する異物の混入が問題であった。然るに、架橋度が非常に高い高分子からなる粉碎媒体が開発され、摩耗問題を解決した高エネルギー攪拌型粉碎機が利用できるようになった。超高圧ホモジナイザーを使用する方法も開発されている。⁴⁾ 本法には、サスペンションの粒度分布がシャープなため安定で且つ粒子が非晶質化するなどの特徴がある。リポソームや高分子ミセルは、リン脂質やブロック共重合体分子が組織(集合)化し粒子を形成したものでビルトアップ法に属する。リポソームの場合、生

成したりポソームをサイジング化し粒子径をより小さなもので揃えることができる(ブレイクダウン)特徴を有する。高分子カプセルは芯物質の作成法がビルトアップかブレイクダウンかによって決まる。噴霧乾燥法や液中乾燥法は、被乾燥液を微粒化している(ブレイクダウン)。球形晶析法は、晶析(溶媒置換法)により製した微結晶を系内で直接球状に凝集化(設計)したものである(ビルトアップ)。晶析系内に高分子を共存させたシステムが高分子球形晶析法である。高分子を晶析溶媒(貧溶媒)中に共存させ、これを相分離させる方法により、晶析・造粒粒子を被覆したりゼーバータイプのカプセルを製することができる。良溶媒中に高分子を共存させる場合には、系内で擬エマルションが形成される。エマルション滴からの溶媒の拡散(エマルション溶媒拡散法)により薬物と高分子が液滴内で共沈すればマイクロスフェアが得られる。高分子が界面で選択的に相分離すると、中空粒子が得られる(マイクロバルーン)。エマルション滴からの溶媒の拡散によって界面が揺らぎ、自己乳化が起こる場合にはナノスフェアが得られる。⁵⁾(Fig. 1) 本法のポイントは、エマルション滴の固化速度の調整と、粒子の凝集をいかに防ぐかにある。そのため、晶析溶媒中に PVA を添加する。主に PVA のケン化度の違いによってその作用が決まることが明らかになった。また、良溶媒中の高分子とは異なる高分子を晶析溶媒中に共存させることによって、粒子の表面を修飾し、新しい物性を創生(機能化)することもできる。以下に、エマルション溶媒拡散法を中心にした、高分子ナノ粒子製剤の設計とその機能を紹介する。

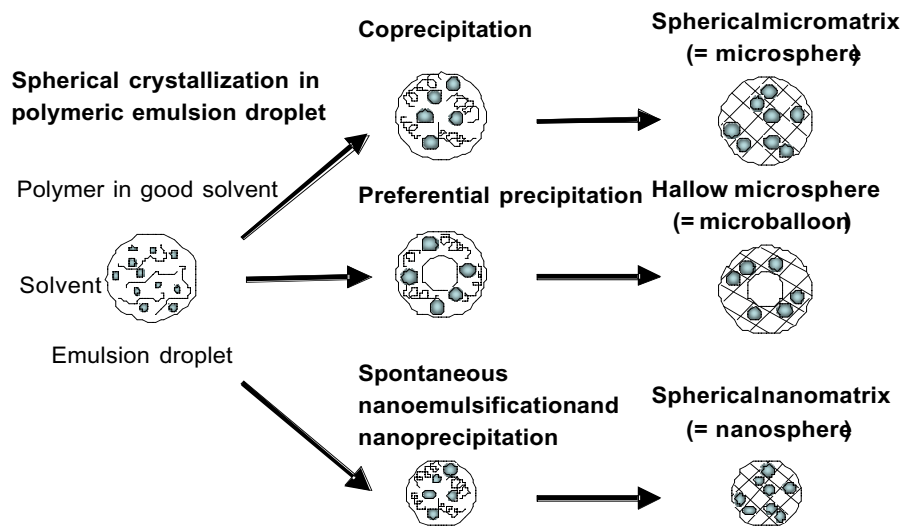


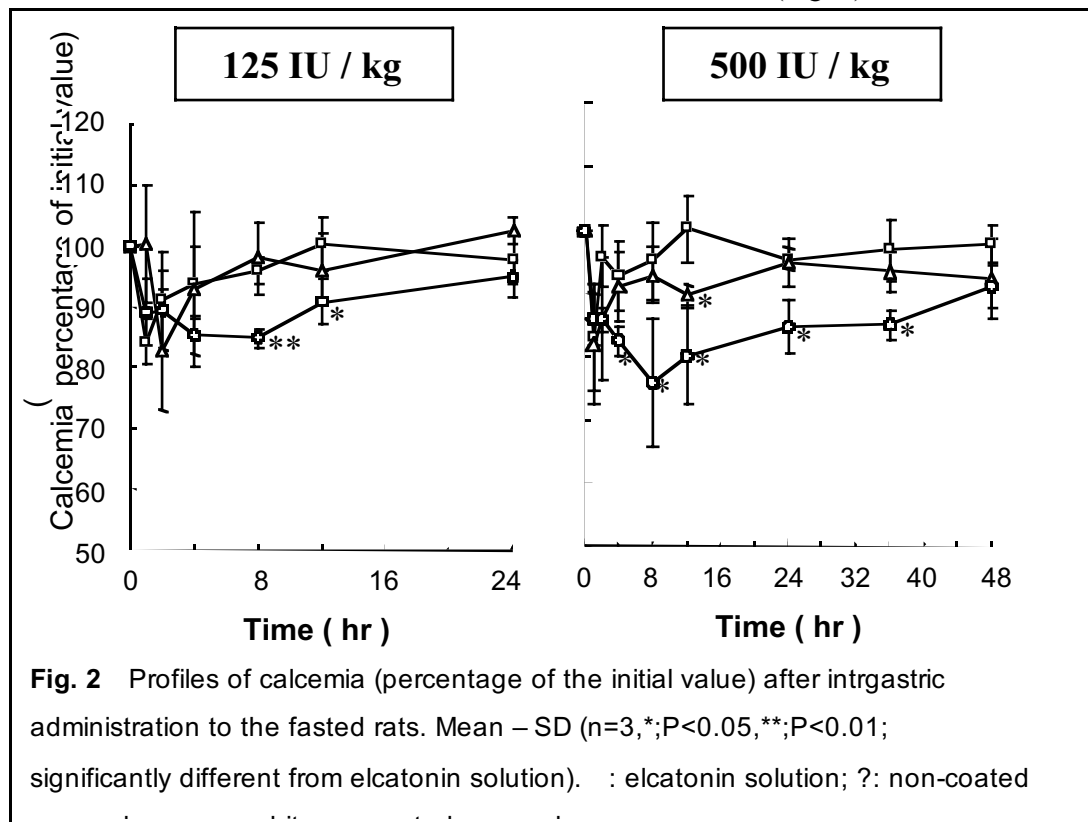
Fig. 1 Emulsion solvent diffusion process (Microsphere, Microballoon, Nanosphere)

3 ペプチドの経粘膜投与型ナノスフェア製剤

3.1 カルシトニンの乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノスフェア経口投与製剤⁶⁾
 注射に代わる経口投与ペプチド製剤の開発に永年期待が寄せられている。我々は PLGA ナノスフェアにエルカトニン(カルシトニンの誘導体)を封入した経口投与システムを開発しつつある。このシステムのコンセプトは、消化管内でのペプチドの酵素分解から

の保護、吸収サイトでの持続的な薬物供給（放出）である。マイクロスフェアなどの従来法では、前者はクリアーできるが、後者は難しい。しかるに、スフェアのサイズをナノオーダーにすることによって、スフェアの消化管粘膜層への吸着と粘膜層内への侵入が期待できる。さらには、消化管膜を透過する可能性もある。しかし、その確率の低さを考えると、消化管粘膜層内に、ナノスフェアを長く滞留させ薬物を持続的に放出させる方法が最も効果的と思われる。そこで PLGA ナノスフェアに粘膜付着機能を賦与するための表面改質を施した。改質基剤として、ポリアクリル酸、キトサン、アルギン酸ナトリウム等の粘膜付着性ポリマーの中からキトサンが選ばれた。その効果は期待通りで、キトサン修飾 PLGA ナノスフェアによるペプチド（エルカトニン）の経口投与システムを開発することができた。

PLGA ナノスフェアは、油中エマルジョン溶媒拡散法により調製した。得られたナノスフェアは、平均粒子径が約 400 ~ 600nm でほぼ単分散系である。キトサン修飾は、PLGA ナノスフェアをキトサン溶液中に分散させる吸着法により行った。キトサンによる表面修飾は、ゼータ電位の pH プロファイルの変化から確認できた。PLGA ナノスフェアの粘膜付着性は、摘出したラット反転腸管を PLGA ナノスフェアの懸濁生理食塩液中でインキュベーションし腸管への付着量を測定し確認された。その結果、PLGA ナノスフェアは、腸管の部位に関係なく広く付着することが判った。さらに、腸管粘膜層内に侵入することも確認された。エルカトニン封入キトサン処理 PLGA ナノスフェアの 500IU/kg をラットに経口投与したところ、表面未処理 PLGA ナノスフェア(12hr)に比べ、36hr にもわたり、血中の Ca レベルが有意に下がることが判った。(Fig. 2)



3.2 カルシトニンのキトサンナノスフェア経肺投与製剤⁷⁾

キトサンナノスフェアは、油中溶媒拡散法と溶媒留去法を組み合わせた方法によって調製された。平均粒子径、200~300nm のキトサンナノスフェア懸濁液を粉末吸入製剤化するために凍結乾燥をした。キトサンナノスフェアは、凍結乾燥中に著しい凝集を起こすが、トリポリリン酸ナトリウム (TPP) を添加すると凝集が抑えられ気中分散性にも優れた粉末化がなされることが判明した。TPP 処理キトサンナノスフェアの *in vitro* 吸入特性試験は、カスケードインパクターにスピンヘラーを装着してなされた。マイクロスフェアや、TPP 未処理ナノスフェアに比べ、TPP 処理キトサンナノスフェアは、劇的に吸入特性を改善する事が判明した。カスケードインパクターによる、質量平均空気力学径は、5.54 μm であった。

TPP 処理キトサンナノスフェアをシリンジ法によって、直接モルモットの肺内に投与した。投与後、直ちに肺を摘出し、6つの部位に分け付着量を測定した。キトサンナノスフェアは、ほぼ均等に各部位に送達され、80%以上が、肺胞部に到達することが判明した。しかも、ネブライザーによるキトサン処理 PLGA ナノスフェアの送達に比べ、付着部位滞留性に優れることも判明した。エルカトニン封入キトサン処理 PLGA ナノスフェアを、100IU/kg 投与した結果、乳糖粒子によるキャリアー吸入とほぼ同じ効果が得られ、しかもその効果が著しく延長し、24hr 以上にも及ぶことが判った。ネブライザーによるキトサン処理 PLGA ナノスフェアの送達に比べても、持続性の点ではほぼ同じであったがその効果が勝り有利である。(Fig. 3) 以上の結果は、エルカトニンがナノスフェアに封入され、酵素分解を

乳糖粒子によるキャリアー吸入とほぼ同じ効果が得られ、しかもその効果が著しく延長し、24hr 以上にも及ぶことが判った。ネブライザーによるキトサン処理 PLGA ナノスフェアの送達に比べても、持続性の点ではほぼ同じであったがその効果が勝り有利である。(Fig. 3) 以上の結果は、エルカトニンがナノスフェアに封入され、酵素分解を

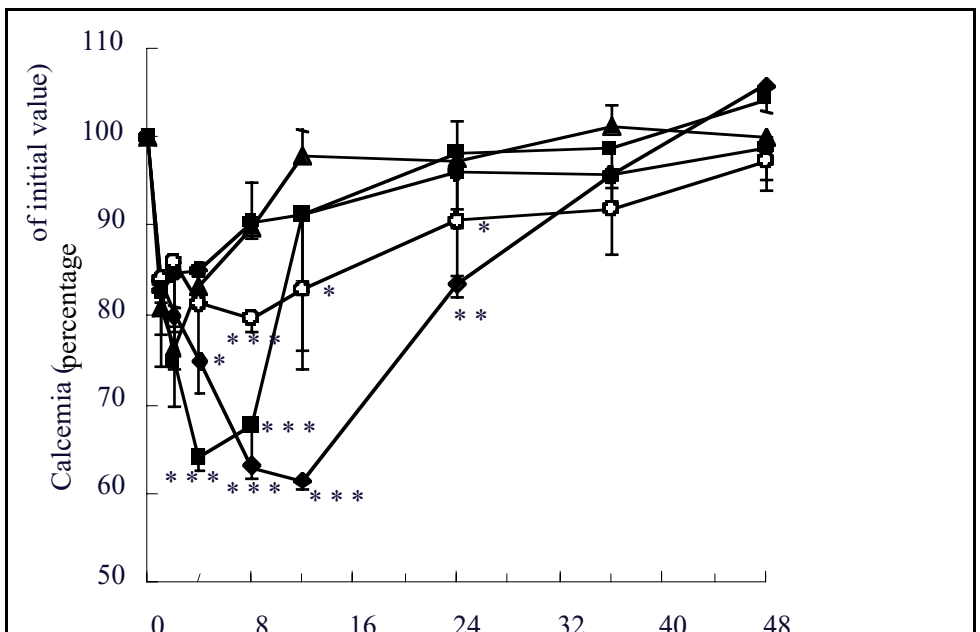


Fig. 3 Profiles of blood calcium (percentage of the initial value) after pulmonary administration of elcatonin to fasted guinea pigs. Dose; 100IU/kg, Mean \pm SD (n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; significantly different from elcatonin solution). ○: elcatonin solution; □: chitosan nanospheres with elcatonin; △: uncoated PLGA nanospheres

受けにくいこと、ナノスフェアは吸収部位に十分長く留まり、薬物を持続的に放出し、吸収に必要な濃度勾配を維持したことによると推察される。

更に、ネプライザーによるキトサン処理PLGAナノスフェアのエルカトニンの経肺投与実験では、キトサン溶液だけでなく、キトサン処理PLGAナノスフェア自身の吸収促進効果が確認されており興味深い。

4 ステロイドの局所投与型 PLGA ナノスフェア製剤^{8,9)}

慢性関節リウマチ、変形性膝関節症などの慢性関節疾患の薬物療法では薬物投与が長期にわたる為、全身性の副作用発現が問題となる。関節内に薬物を局所投与することによってこの副作用を回避できるが、局所での薬物有効濃度を長時間維持できない難点がある。これらをカバーする徐放性製剤として、難溶性のステロイド懸濁剤が開発されたが、新たに、結晶性疼痛の副作用が出現した。我々は、上記課題をクリアーしかつコンプライアンスにも優れた、月一回の投与で有効な徐放性製剤 (PLGA ナノスフェア) の開発を企図した。エマルション溶媒拡散法で調製した PLGA ナノスフェアをラットの膝関節中に投与し局所挙動を組織学的に評価した。滑膜表面には、マクロファージが出現し、その数が増大するとともに投与された滑液中の PLGA ナノスフェアを貪食した。その後、滑膜下層の脂肪組織深部にもマクロファージが認められるようになり、その結果、PLGA ナノスフェアは、滑膜中に移動し滞留することが判明した。粒子径が大きいマイクロスフェアの場合には、粒子は、マクロファージに取り囲まれるのみで貪食を受けず、滑膜中には移動しない。

そこで、PLGA ナノスフェアに水溶性ステロイド(リン酸ベタメタゾンナトリウム)を封入し、これを関節炎を惹起させたウサギの膝関節腔内に注入し薬効と安全性を評価した。Fig. 4 に、関節腫脹を炎症惹起前後の膝関節の外径の差で表わし、その経時変化を示した。ナノスフェア投与群では、ほぼ1ヶ月にわたり、関節腫脹が抑制されることが判明した。ステロイドを関節投与する時の副作用として、関節軟骨の破壊が報告されている。そこで、ナノスフェア投与 42 日後の関節軟骨中の成分であるグリコサミノグリカン及びヒドロキシプロリン量を測定した。ナノスフェア投与群の関節軟骨中の両成分量はコントロールのそれと変わらないことが判った。これらの結果は、本法で開発された PLGA

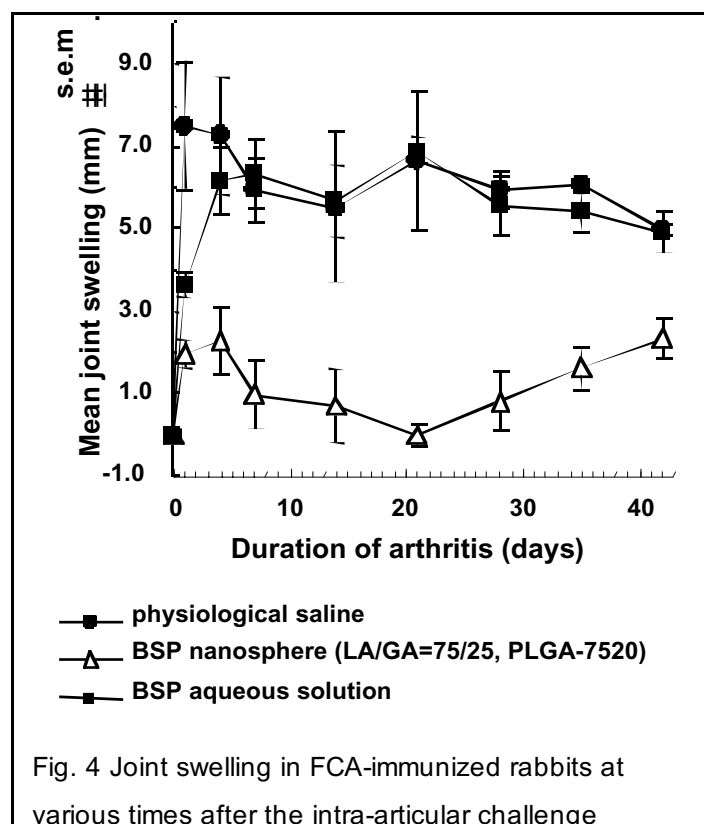


Fig. 4 Joint swelling in FCA-immunized rabbits at various times after the intra-articular challenge

ナノスフェアが企図した関節注入型の新規治療システムとして機能することを示している。

5 結言

高分子ナノ粒子製剤の魅力は、物理化学的な粒子としての新機能の他、細胞レベルでの生体との相互作用が新たに発現することである。この両機能の相互関係を定量的に記述することが高分子ナノ粒子製剤を新規DDS製剤として発展させるための次のステップである。高分子ナノ粒子製剤の効率的な調製法とそのスケールアップ法の確立にも新展開が期待される。

参考文献

- 1) Y. Kawashima, Nanoparticulate systems for improved drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **47**, 1-136 (2001)
- 2) 高畑英夫, 西岡由紀子, 大沢孝, *粉体と工業*, **24**, 53 (1992).
- 3) 仲井由宣, *薬学雑誌*, **105**, 801 (1985).
- 4) R.H. Miller, B.H.L. Bhm, M.J. Graue, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology* ed by D.L. Wise, Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, pp345-357.
- 5) Y. Kawashima, *Handbook of Powder Technology Vol. 9 (Powder Technology and Pharmaceutical Processes)* ed by D. Chulia, M. Deleuil, Y. Pourcelot, Elsevier, Amsterdam, 1994, pp493-512.
- 6) Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kuno, *Pharm. Develop. Technol.*, **5**, 77-85, (2000)
- 7) Y. Kawashima, 6th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, December 16-21, (2001), Maui
- 8) E. Horisawa et al., *Pharm. Res.*, **19**, 132-139, (2002)
- 9) E. Horisawa et al., *DDS*, **16**, 334, (2001)