

## カチオン性高分子を用いたインスリンの粘膜吸収促進

関 俊 暢

## Enhancement of Insulin Absorption through Mucosal Membranes Using Cationic Polymers

Toshinobu SEKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

(Received May 21, 2010)

Cationic polymers (e.g., cationated gelatins, cationated pullulans and poly-L-arginines) have potential to promote transmucosal delivery of peptide and protein drugs without producing any toxic effects on epithelial cells. These cationic polymers could interact with the mucosal membranes and increase the number of pathways for water-soluble macromolecules in the tight junctions. In the case of insulin having negative charges in neutral solutions, interaction between the cationic polymers and insulin is also important to promote suitable delivery. An appropriate interaction can help insulin to access to cell surface, but too strong interaction suppresses insulin absorption. When the absorption-enhancing effects of sperminated pullulans and gelatin having different numbers of amino groups on the pulmonary absorption of insulin in rats were evaluated, their enhancing effects correlated with the amino group content. Cationic polymers having suitable charge density will be useful for pulmonary delivery systems of insulin.

**Key words**—insulin; cationic polymer; pulmonary delivery; tight junction; absorption enhancer

## 1. はじめに

インスリンなどのペプチド性医薬品は、その粘膜透過性の低さと酵素分解抵抗性の低さから、現在主に注射剤として利用されている。しかし、患者への負担を考えた場合、患者自身による服薬コントロールが容易な、経口剤、経鼻吸収剤、経肺吸収剤などの粘膜適用製剤の開発が望まれる。<sup>1)</sup> その達成のためには、解決すべき多くの製剤学的問題が存在するが、特にある程度以上の分子量を有する医薬品ではその粘膜透過性の改善が不可欠であり、吸収促進の方法の開発は意義深い。<sup>2)</sup> 吸収促進剤としてのカチオン性高分子は、水溶性高分子薬物の粘膜透過性を、粘膜上皮細胞に傷害を与えることなく効果的に促進することから、ペプチド性医薬品の製剤に用いる添加剤として注目されている。粘膜透過促進作用を有するカチオン性高分子としては、キトサン及びその誘導体、ポリアルギニン、カチオン化ゼラチン、カチオン化プルランなどが知られており、その

作用機構として、上皮細胞間のタイトジャンクションの開口作用が考えられている。<sup>3)</sup> 細胞表面は負に帯電しているため、カチオン性高分子は静電的相互作用により細胞表面と相互作用し、細胞間の結合を弱めるようなシグナルが生じる。その変化が可逆的なもので、また細胞自身の機能に悪影響を及ぼさなければ、ペプチド性医薬品の吸収改善を安全かつ有効に行うことができる。

本稿では、前半部で、上皮細胞間のタイトジャンクションの開口作用をカチオン性高分子の共通した作用機構であると仮定し、その開口状態の定量的評価について検討した結果を記述し、また後半部では、インスリンのカチオン化ゼラチン及びプルランによる経肺吸収促進の機構について、タイトジャンクションの開口以外の作用も含めて検討した結果を述べる。最後にカチオン化高分子を吸収促進剤として含むインスリンの経肺吸収製剤を開発するために残されている問題について考えを示す。

## 2. Renkin 式を用いたタイトジャンクション開口状態の定量的評価

上皮細胞間のタイトジャンクションの開口作用がカチオン性高分子の吸収促進機構であることは、多くの論文で述べられているが、その開口の様式につ

城西大学薬学部 (〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

e-mail: sekt1042@josai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S15 で発表したものを中心に記述したものである。

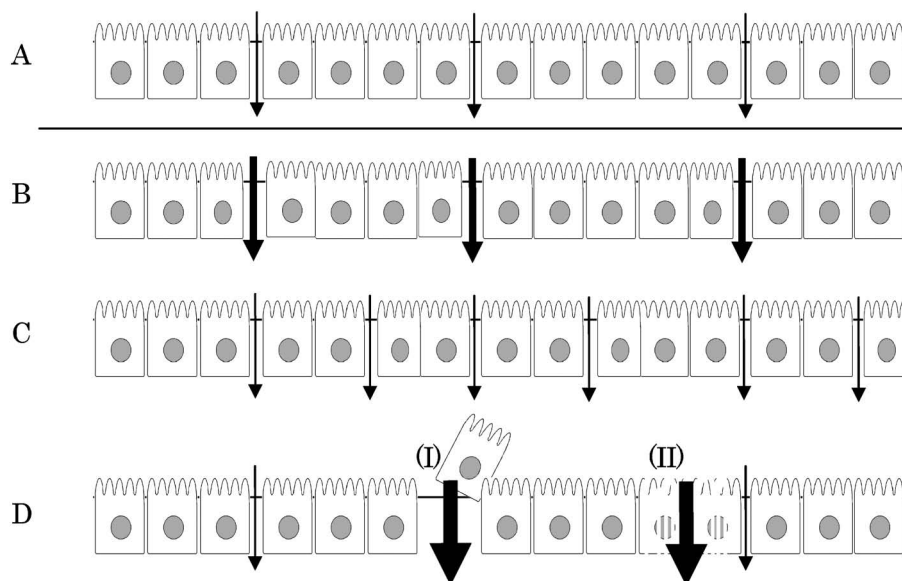


Fig. 1. Models of Permeation Routes for Water-soluble Large Molecules through Epithelial Cell Layers and the Effects of Penetration Enhancers on these Pathways

A: Normal conditions; a few paracellular pathways are “open” to allow the passage of relatively large molecules. B: Increase in size of the pathway produced by enhancers; the pathways increase in size and larger molecules are able to pass *via* these routes. C: Increase in the number of pathways by enhancers; the pathways increase and the permeability coefficient of each drug should be proportional to the number. D: Damage to epithelial cell layers by enhancers; undesirable changes in epithelial cell layers, such as emergence of cells (I) and complete loss of barrier functions of membranes (II) increase the permeability of all penetrants.

いては十分な議論がなされていない。Figure 1は、水溶性高分子化合物の上皮細胞層透過経路とその変化のモデルを示している。<sup>4)</sup> 分子量 4 kDa 程度の FITC でラベルされたデキストラン (FD4) を各種粘膜に適用した場合、特殊な処理を施さなくてもわずかではあるが透過が観察される。このことから本来は水溶性物質の透過バリアーであるタイトジャンクションを有する上皮細胞層でも、一部にそれらが透過可能な部分 (透過ルート) がコントロールの状態でも存在することが考えられる [Fig. 1(A)]. カチオン性高分子やほかのいくつかの吸収促進剤は、タイトジャンクションを開口するが、その様式には 3 種考えられる。1 つは、コントロールの状態でも存在する透過ルートの大きさがさらに開くような形式で開口する様式で、この場合より大きい分子の透過が可能となる [Fig. 1(B)]. 2 つ目は、通常の閉じた状態のタイトジャンクションが、促進剤により透過ルートに変化する場合で、個々の透過ルート自体の大きさは変化しないがその数が増える場合である [Fig. 1(C)]. この様式では、薬物の透過係数はその透過ルートの数に比例することになるが、より大きい分子が透過できるようになるわけではない。最後は、好ましくない変化であり、細胞の脱落や脂

質二重膜のバリアー機能の完全な消失などにより、より大きな穴が生じる場合である [Fig. 1(D)]. このような変化を生じさせるような促進剤は、安全に使用することはできない。B-D のどの変化がカチオン性高分子により生じているかを明らかにすることは、その安全かつ有効な使用と作用機構の解明において非常に有意義であると考えられる。

Renkin 式 Eq. (1) は、膜に存在する円柱状の透過経路を介した輸送に係わる式であり、ある大きさを有する薬物分子の膜透過性を、透過ルートへのアクセスのし易さとルート内での摩擦抵抗により説明する。<sup>5)</sup>

$$F\left(\frac{r_i}{R}\right) = \left(1 - \left(\frac{r_i}{R}\right)\right)^2 \left[1 - 2.104 \left(\frac{r_i}{R}\right) + 2.09 \left(\frac{r_i}{R}\right)^3 - 0.95 \left(\frac{r_i}{R}\right)^5\right] \quad (1)$$



関 俊暢

城西大学薬学部薬品物理化学講座教授。薬学博士。1987 年城西大学薬学研究科中退。1987 年～2002 年城西大学薬学部薬剤学講座 (助手)。2002 年～2008 年北海道薬科大学薬剤学分野 (講師～准教授、森本一洋教授の研究室)。2005 年～2006 年 ETH チューリッヒ薬学研究科留学。2008 年より現職。

ここで、 $r_i$ は透過する分子の半径、 $R$ は透過ルート  
の半径である。もし、分子の半径が透過ルート  
より十分に小さければ、この関数は1となり、膜透過  
速度は単純に各分子の拡散係数と濃度勾配に依存す  
る。一方、分子の半径と透過ルートの半径が近い場  
合、透過ルートへのアクセスは難しくなり、また内  
部では大きな摩擦抵抗を受ける。この式が成立する  
条件で、薬物の膜透過係数 ( $P_A$ ) や透過クリア  
ランス ( $CL_A$ ) は、Eqs. (2), (3) のように表される。

$$P_A = (A/L) \cdot D_i \cdot F \left( \frac{r_i}{R} \right) \quad (2)$$

$$CL_A = (A'/L) \cdot D_i \cdot F \left( \frac{r_i}{R} \right) \quad (3)$$

ここで、 $D_i$ は透過する分子の拡散係数、 $L$ はバ  
リアーの厚さである。また、 $A$ は膜表面で透過  
ルートが占める面積分率であり、空隙率 ( $\epsilon$ ) に等  
しいのに対し、 $A'$ はそれに有効透過面積を掛けた  
値で、膜表面で透過ルートが占める総面積になる。  
分子半径  $r_i$  は、Stokes-Einstein 半径として拡散係数  
 $D_i$  と関係づけることができるので [Eq. (4)],  $A/L$   
若しくは  $A'/L$  と  $R$  の値が決まれば、ある拡散係  
数を有する透過分子の透過係数若しくは透過クリア  
ランスが計算できる。<sup>6)</sup>

$$D_i = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (4)$$

ここで、 $k_B$ はボルツマン定数、 $T$ は絶対温度、 $\pi$   
は円周率、 $\eta$ は媒体の粘度である。 $A/L$ 若しくは  
 $A'/L$ と $R$ の値は、拡散係数既知の2つの薬物の  
 $P_A$ 若しくは $CL_A$ の測定により決定することができ  
る。

消化管粘膜のモデルである Caco-2 細胞単層膜を  
用いて、カチオン化ゼラチンの細胞間隙透過経路へ  
の影響を評価した。<sup>4)</sup> すなわち、エチレンジアミン  
化ゼラチン (EG)、スベルミン化ゼラチン (SG)、  
比較のためのカプリン酸 (C10)、EDTA を 0.2% 含  
む溶液を粘膜表面に作用させた場合の透過性の変化  
を、カルボキシフルオレセイン (CF,  $D=5.87 \times 10^{-6}$   
 $\text{cm}^2/\text{s}$ ,  $r=0.56$  nm) と FD4 ( $D=2.39 \times 10^{-6}$   
 $\text{cm}^2/\text{s}$ ,  $r=1.36$  nm) を細胞間隙透過マーカーとし  
て同時適用し、奨膜側に透過した量を分離定量して  
それぞれの透過性を評価した。Figure 2 に両マー  
カー分子の透過係数  $P$  の変化を示す。いずれの添  
加剤も両マーカー分子に対して促進作用を示した  
が、この条件では EDTA が最も高い効果を示し  
た。これらのデータを Renkin 式に当てはめること  
で、 $A/L$ と $R$ の値が求まる。得られた値を Fig. 3  
に示す。最も高い透過促進作用を示した EDTA  
において、 $A/L$ と $R$ の値はともに増大しており、細  
胞の脱落などが生じていることが懸念された。また、  
C10 においては  $R$  の増大が認められ、透過ルート  
自体の変化が示唆された。一方、カチオン化ゼラチ  
ンでは、 $A/L$  の変化に比較して  $R$  の変化はわずか  
であり、個々の透過ルートが大きくなることなく面  
積が増える、すなわち透過ルートの数が増加してい  
ると考えられた [Fig. 1(C)]。通常の閉じたタイト  
ジャンクションの一部が、透過ルートへと変化した  
と考えられる。このような変化の場合、既にある程  
度透過する薬物であれば、ルート数の増大に依存し  
て透過性が促進されるが、透過不能であったような  
大きな分子が促進剤の処理により透過可能となると

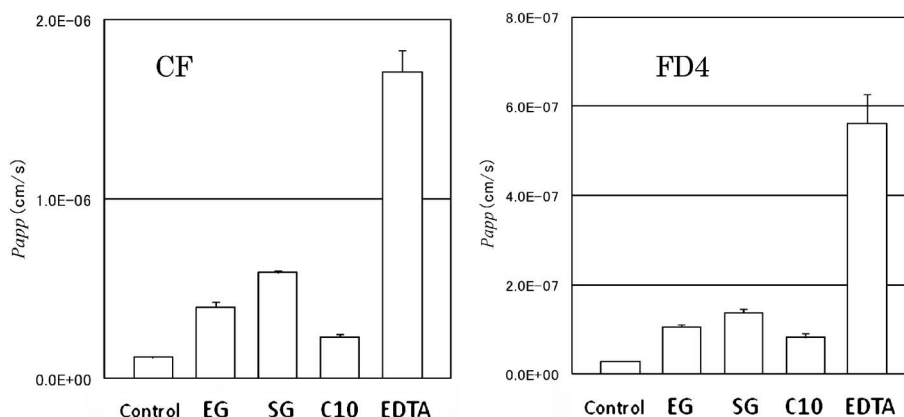


Fig. 2. Effect of Penetration Enhancers on the Permeability Coefficients of CF and FD4 through Caco-2 Cell Monolayers  
Each enhancer was applied as a 0.2% solution.

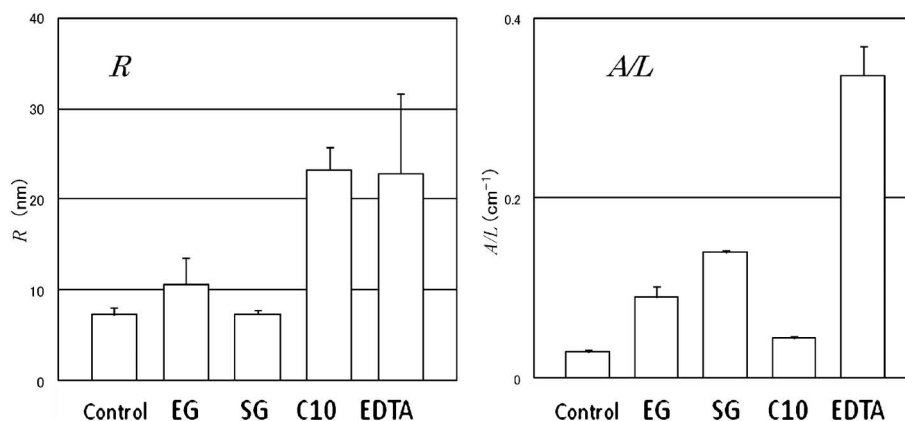


Fig. 3. Effects of Enhancers on the Values of  $R$  and  $A/L$  of Caco-2 Cell Monolayers  
Each enhancer was applied as a 0.2% solution.

このような効果は期待できない。このことは、カチオン化ゼラチンの限界を示すものであるが、別の見方をすれば、促進剤がもたらす状況が、正常な生理学的環境下での状況と大きく異なっているのではなく、安全性や可逆性という点では有利であることが期待できる。同様な *in vitro* における細胞間隙の変化は、気道上皮のモデルである Calu-3 細胞単層膜においても観察されている。<sup>7)</sup>

これらのカチオン性高分子による細胞間隙透過性の変化が *in vivo* でも観察されるかについて、各種分子量の FITC ラベルデキストラン (FD4, FD10, FD40, FD70) のラット鼻腔内投与後の吸収に及ぼすポリ-L-アルギニン (pArg) の効果から検討した。<sup>8)</sup> すなわち、血中濃度推移からデコンポリューション計算により吸収速度を求め、適用濃度との関係から  $CL_A$  を得た。FD4 と FD40 の  $CL_A$  について Renkin 式に当てはめ、 $A'/L$  と  $R$  の値を得るとともに、それらの値を用いて拡散係数と  $CL_A$  の関係に関するシミュレーション曲線を作成し、FD10 と FD70 のデータがその直線上にプロットされることを確認した。Renkin 式による解析の結果、pArg の適用時には  $R$  の値の増加なしに、 $A'/L$  が 30 倍以上大きくなっていることが示され、pArg においても、そして *in vivo* においても細胞間隙の透過経路の数を増やすことで吸収の促進がなされていることが明らかになった。

### 3. インスリンのカチオン化ゼラチン及びカチオン化プルランによる経肺吸収促進

前項で述べたような機構がカチオン性高分子の吸収促進機構であった場合、各薬物の  $P_A$  若しくは

$CL_A$  の期待値は、その分子量のみに依存することになる。しかし実際に、各種ペプチド性医薬品の粘膜吸収促進を試みた場合、観察される値は期待値より低く、またその程度はペプチド性医薬品の種類によって異なる。例えば、われわれが行った予備検討の結果では、pArg はカルシトニンには高い効果を示すが、インスリンに対してはほとんど効果を示さない。一方、EG, SG, スペルミン化プルラン (SP) はインスリンの鼻粘膜吸収促進に効果が高く、逆にカルシトニンには効果が低い。ペプチド性医薬品はその等電点の違いにより中性溶液中での解離状態が異なり、例えばカルシトニンは正の、インスリンは負の電荷を有している。カチオン性高分子はインスリンのような負の荷電を有するペプチドと相互作用すると考えられるが、その程度はカチオン性高分子の正電荷の密度に依存する。インスリンとカチオン性高分子を粘膜上に適用する際、この静電的相互作用により濁りが観察されるが、この生じた粒子からのインスリンの放出は、電荷密度の高い pArg では低く、SG, SP などでは高いことが明らかとなっている (未発表データ)。このことはインスリンの吸収促進作用の両者間の違いに深く関わっていると推察される。

肺の粘膜は、総面積が広く薬物透過性も高いため、ペプチド性医薬品の適用部位として可能性が高い。<sup>9)</sup> インスリンの経肺吸収製剤が開発されれば、患者自身による投薬管理がより容易になり、コンプライアンスの改善が期待できる。カチオン性高分子をその際の吸収促進剤として利用する場合、上述の理由から SG や SP が有望である。そこで、ラット

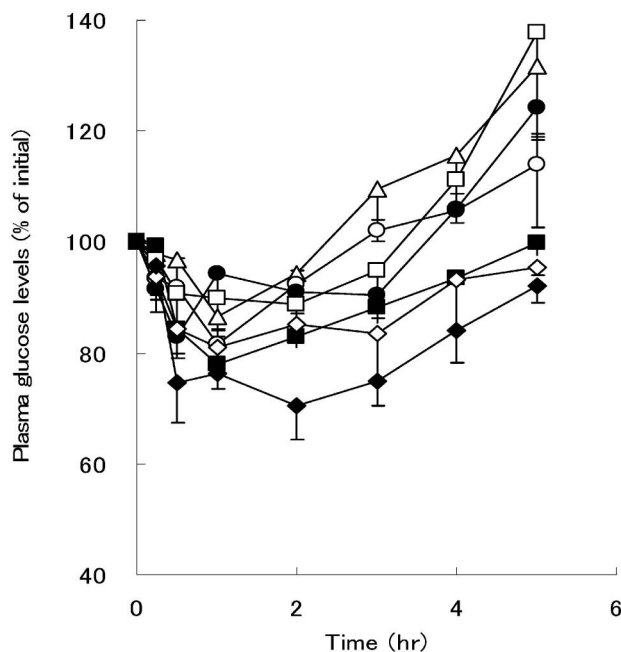


Fig. 4. Effect of Sperminated Polymers on the Glucose Levels in Plasma after Pulmonary Administration of Insulin in Rats

Control (PBS),  $\Delta$ ; insulin (10 IU/kg) alone,  $\circ$ ; insulin (10 IU/kg) with NP 0.1%,  $\square$ ; insulin (10 IU/kg) with NG 0.1%,  $\bullet$ ; insulin (10 IU/kg) with SG 0.1%,  $\blacksquare$ ; insulin (10 IU/kg) with SP-L 0.1%,  $\diamond$ ; insulin (10 IU/kg) with SP-H 0.1%,  $\blacklozenge$ .

を用いてインスリンの経肺吸収に及ぼす SG 及び SP の効果を検討した。<sup>10)</sup> すなわち、インスリン 10 IU/kg を MicroSprayer<sup>®</sup>を用いて気管深部から肺に向かって投与し、その後の血中グルコース濃度の推移を吸収促進剤の有無において比較した。その結果を Fig. 4 に示す。SG 若しくは SP (低スペルミン化プルラン, SP-L 若しくは、高スペルミン化プルラン, SP-H) を 0.1% 含む系は、促進剤を含まない系やカチオン化していないゼラチンやプルラン (それぞれ NG 及び NP) を含む系と比較して、血糖低下作用が強く、かつ持続している。またこの SG や SP の効果は、試験した範囲においては導入した陽電荷が多い場合に促進作用が強いことが、スペルミン導入量が多い SP-H と導入量が少ない SP-L の比較から示唆された。投与 5 時間後において、肺胞内を洗浄し、その回収液中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出を比較したところ、ポジティブコントロールである界面活性剤 Triton-X 100 やタウロコール酸ナトリウムなどと比較して、LDH の漏出量は低く、組織障害性も低いことが示された。

このインスリンの経肺吸収に対する SG や SP の効果は、前項で述べた上皮細胞間のタイトジャンク

ションの開口作用によると考えられるが、それ以外の作用についても検討する必要がある。すなわち、インスリンの分解過程における酵素的分解の抑制作用、インスリンの粘膜表面における濃縮作用、インスリンの会合状態の修飾作用などである。先に述べたように、インスリン吸収に対する SG や SP の効果は pArg と比較して強いが、この違いがインスリンとカチオン性高分子により形成される粒子からのその放出性の違いだけではなく、ここに示すような吸収促進作用に係わるその他の作用の違いに関係していることも十分考えられる。

前項に示した Renkin 式による解析の結果を利用し、インスリンの透過係数の期待値を計算することができ、その値と実測の透過係数の比較から透過過程における分解の程度を推察できる。<sup>4)</sup> すなわち、Fig. 3 に示したような  $A/L$  と  $R$  の値に基づき、拡散係数  $D$  と透過係数  $P$  の関係のシミュレーションカーブを描き、別にインスリンの  $D$  の測定を行って、 $P$  の値を予測する。そして、実測の  $P$  と予測値の比が粘膜透過過程における分解により規定されていると考える。溶液中で会合性を示さないようなペプチド性医薬品では、分子量の値から  $D$  の値を計算し、 $P$  の期待値を得ることも可能であるが、インスリンの場合、中性溶液では主に 6 量体として存在しているため、 $D$  の実測値が必要となる。Figure 5 は、Calu-3 細胞単層膜における  $D$  と  $P$  の関係のシミュレーションカーブである。<sup>7)</sup> インスリンの  $D$  の実測値は  $1.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  であり、この値からインスリンの  $P$  の期待値が得られる。Table 1 には、Fig. 5 の計算に用いたパラメータとインスリンの  $P$  の実測値と予測値を、促進剤である SG (0.2%) の有無で比較して示した。インスリンの  $P$  の実測値は、その  $D$  から予測される値の 1/10 以下であり、透過過程における分解などによって透過性が低下していることが示された。SG 共存下においてもその傾向は変化せず、SG には透過過程におけるインスリンの分解を抑制する効果を期待できない。

カチオン性である SG や SP は、アニオン化しているインスリンと前述のように相互作用すると考えられるが、粘膜上に適用した場合には、その表面に存在する陰電荷との相互作用、すなわち、促進剤-インスリン-細胞表面の 3 者間の相互作用について考える必要がある。そこで、赤血球をモデル細胞と

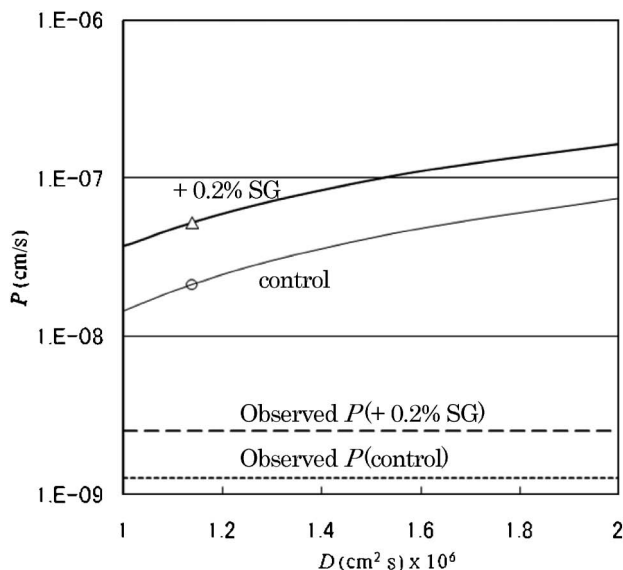


Fig. 5. Relationship between  $D$  of Penetrants and the  $P$  through Calu-3 Cell Monolayers, and the Calculated ( $\circ$ ,  $\Delta$ ) and Observed (---, ---)  $P$  of Insulin

Table 1. Parameters of Calu-3 Cell Monolayers, and the Calculated and Observed  $P$  of Insulin through the Layers

	$A/L$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$R$ (nm)	Calculated $P$ ( $\text{cm/s}) \times 10^8$	Observed $P$ ( $\text{cm/s}) \times 10^9$
Control	0.0775 $\pm 0.0143$	10.4 $\pm 4.2$	2.13	1.28 $\pm$ 0.92
+0.2% SG	0.157 $\pm 0.042$	11.7 $\pm 3.1$	5.25	2.89 $\pm$ 2.74

Mean  $\pm$  S.D.

して、この3者間の相互作用をゼータポテンシャルの測定により評価した。<sup>10)</sup> その結果を Fig. 6 に示す。赤血球自身は負に帯電しているが、それに SP を処理すると赤血球表面に SP が結合してゼータポテンシャルは正を示す。一方、赤血球にインスリンを共存させてもゼータポテンシャルはほとんど変化しないが、SP を処理した赤血球ではそのゼータポテンシャルはほとんど消失する。これは、赤血球表面に結合した SP に、さらにインスリンが結合したことによると考えられる。同様な相互作用が粘膜表面でも生じれば、粘膜の表面近傍にインスリンが高濃度に濃縮され、そのことが吸収の促進に一部寄与することも考えられる。比較のために行った正電荷を有するカルシトニンでは、カルシトニン自身の赤血球膜への相互作用が推察されるものの、SP の効果は示されていない。

インスリンは中性溶液中で主に 6 量体として存在

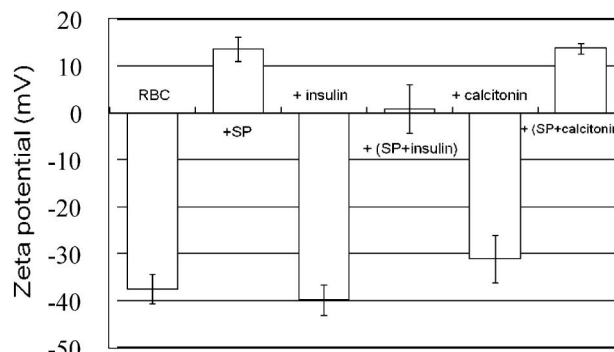


Fig. 6. Effect of Insulin, Calcitonin and SP on the Zeta Potential of Red Blood Cell (RBC)

しているため、それを 2 量体や単量体にすることができれば、そのことだけでも透過の促進が期待できる。SG や SP をインスリンと共投与するとき、一時的に凝集体を形成するが、透過自体はそこから放出されたインスリンにより生じると考えられ、その際のインスリンの会合状態についても検討が必要である。これまでの検討で、酸性で溶解させたインスリン溶液を中和する際に SP を共存させると、2 量体が生じ易くなることを示唆する結果が動的光散乱測定により示されているが (未発表データ)、ほかの測定技術により同じ現象を確認するまでには至っていない。更なる検討が必要と考えている。

4. インスリンの経肺吸収製剤を開発するために

カチオン化高分子を吸収促進剤として含むインスリンの経肺吸収製剤を開発するためには、解決しなければならない課題は多い。ある種のカチオン性高分子は遺伝子治療やワクチン開発を目的とした細胞内への物質の送達にも利用させており、カチオン性吸収促進剤自身やそれに付随したほかの成分の上皮細胞内への移動とそれに伴う生じる細胞の生理機能変化についてはさらに詳細に検討する必要がある。<sup>11)</sup> その変化のいくつかは、直接的若しくは間接的に、カチオン性高分子促進剤による細胞間隙開口に係わることも考えられるが、副作用として好ましくない反応を引き起こす可能性についても十分調査しなければならない。また、タイトジャンクション開口の可逆性についても、安全性との係わりから評価が必要である。

負電荷を有するインスリンはカチオン性高分子と相互作用して粒子を形成するが、実際に投与された生体中で、どのようにその粒子からインスリン及び

促進剤が放出するののかについて更なる検討が必要である。特に経肺投与製剤では、投与薬物の粒子径が肺胞組織への薬物送達効率に深く係わるので、適切な粒子径を有し、かつ確実な吸収促進効果とインスリン放出が得られるように製剤を処方設計し、その調製法を確立するためには多くの努力が必要になると予想される。

#### 5. まとめ

カチオン性高分子は、粘膜上皮細胞に障害を与えることなく、ペプチド性医薬品の吸収を促進する添加剤として有望である。その機構は、主に細胞間隙のタイトジャンクションの開口であるが、促進剤-薬物-細胞表面の3者間の相互作用も吸収の過程に係わっており、その程度を最適に制御することも有効な製剤設計において重要であろう。特にインスリンの経肺吸収の促進においては、SGとSPはpArgよりその点で優れており、粒子径の制御と安全性に関する十分な検証がなされれば、その実用化が期待できる。

**謝辞** 本研究は、北海道薬科大学並びに城西大学薬学部においてなされたものであり、ご指導賜った北海道薬科大学森本一洋教授、城西大学薬学部森本雍憲教授、従二和彦教授、夏目秀視教授に感謝の意を表します。また、有益なご助言を賜った城西大学薬学部大竹一男助教に感謝いたします。さらに研究にご協力頂いた研究室のスタッフ・大学院生諸氏にお礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Wearley L. L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **8**, 331-394 (1991).
- 2) Davis S. S., Illum L., *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 1107-1128 (2003).
- 3) Natsume H., Iwata S., Ohtake K., Miyamoto M., Yamaguchi M., Hosoya K., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Int. J. Pharm.*, **185**, 1-12 (1999).
- 4) Seki T., Kanbayashi H., Nagao T., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1393-1401 (2006).
- 5) Renkin E. M., *J. Gen. Physiol.*, **38**, 225-243 (1954).
- 6) Seki T., Harada S., Hosoya O., Morimoto K., Juni K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 163-166 (2008).
- 7) Seki T., Kanbayashi H., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *Int. J. Pharm.*, **338**, 213-218 (2007).
- 8) Seki T., Hosoya O., Natsume H., Sato I., Egawa Y., Nakagawa H., Juni K., Morimoto Y., *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **19**, 331-335 (2009).
- 9) Gonda I., *J. Aerosol Med.*, **19**, 47-53 (2006).
- 10) Seki T., Fukushi N., Chono S., Morimoto K., *J. Control. Release*, **125**, 246-251 (2008).
- 11) Ohtake K., Maeno T., Ueda H., Natsume H., Morimoto Y., *Pharm. Res.*, **20**, 153-160 (2003).