

## 製剤添加剤による薬物の経肺吸収性の制御

山田 圭吾

## Control of Pulmonary Absorption of Drugs by Various Pharmaceutical Excipients

Keigo YAMADA

*Formulation Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 224-18 Ebisuno  
Hiraishi Kawauchi-cho, Tokushima City 771-0182, Japan*

(Received September 1, 2006)

In general, drugs are well absorbed from the lung, and the pulmonary absorption of therapeutic protein and peptide drugs, which are poorly absorbed from the gastrointestinal tract, was observed. However, locally acting drugs including antiasthmatic agents, bronchodilators, and expectorants should be localized for a long period in the lung tissues. In this study, the effects of various viscous vehicles on the absorption of theophylline and fluticasone propionate after intrapulmonary administration were examined in rats. Carrageenans were effective in regulating the absorption rate of these drugs. On the other hand, the bioavailability of therapeutic protein and peptide drugs with relatively high molecular weights from the pulmonary route is still poor when compared with the parenteral route. Therefore we examined the effects of chitosan and chitosan oligomers on the pulmonary absorption of interferon- $\alpha$  and salmon calcitonin in rats. Chitosan oligomers were effective in improving the pulmonary absorption of these drugs, and chitosan hexamer appeared to be markedly more effective than other oligomers. Furthermore, the present study indicated that chitosan oligomers did not cause any membrane damage to rat pulmonary tissues. In conclusion, it is suggested that various pharmaceutical excipients achieved the sustained pulmonary absorption of locally acting drugs and the improved pulmonary bioavailability for therapeutic protein and peptide drugs.

**Key words**—pulmonary delivery/absorption; peptide/protein delivery; chitosan; viscous vehicle

## 1. 序文

肺は、空気中から体内（血液中）に酸素を取り込み、体内で作られた炭酸ガスを空気中へ排出するガス交換の機能を果たしている呼吸器官であり、吸入された空気は、咽頭、気管、気管支、細気管支、終末気管支を通り、最終的に肺胞と呼ばれる分岐の最先端に到達する。

肺胞は、肺の最小基本単位であり、この部位で本来の生理機能であるガス交換が行われるが、肺に投与された薬物においても肺胞からの吸収が重要となる。成人において肺胞は、約3—4億個存在すると言われ、その表面積は約100 m<sup>2</sup>以上と広く、<sup>1)</sup>小腸粘膜の表面積に匹敵することが知られている。

また、肺胞の上皮細胞は主に肺胞表面全体の約

90%以上を占めるI型肺胞上皮細胞<sup>2)</sup>と肺胞表面活性物質の産生と分泌に関与しているII型肺胞上皮細胞<sup>3)</sup>からなる。また、肺胞表面は主にジバルミトイルフォスファチジルコリンなどのリン脂質からなる肺胞表面活性物質で覆われており、肺胞の安定化に寄与している。<sup>3)</sup>また、肺胞上皮細胞層の厚さは、わずか0.1—1  $\mu\text{m}$ であり、<sup>4)</sup>小腸の約40  $\mu\text{m}$ と比べて極めて薄く、タンパク分解酵素の含量が消化管と比較して少ないことが知られている。したがって、肺はガス交換のみならず薬物の吸収部位としても有利な組織学的特徴を有していると考えられる。

以上のような組織学的特徴から、一般に薬物の経肺吸収は消化管吸収に比べ速やかであり、水溶性薬物や高分子薬物でも比較的良好な吸収がみられることが報告されている。<sup>5,6)</sup>このように肺を介して薬物を全身的に移行させる際には薬物の吸収速度を高めたり、吸収量を増大させることが必要であるが、気管支喘息治療薬やインフルエンザ治療薬のように肺局所作用の発現を期待する薬物の場合、これら薬物

大塚製薬(株)製剤研究所 (〒771-0182 徳島市川内町平石夷野 224-18)

e-mail: kei\_yamada@research.otsuka.co.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウム S36 で発表したものを中心に記述したものである。

が肺内に滞留する時間を延長させることが治療効果の増大につながると考えられる。しかしながら、製剤添加物により薬物の経肺吸収速度を制御する報告はほとんどみられない。そこで本研究ではまず、各種増粘剤を薬物と併用し、これら混合物をラットに経肺投与することにより、気管支喘息治療薬の経肺吸収速度の制御を試みた。

一方、タンパクや生理活性ペプチドのような高分子薬物の経肺吸収は、消化管など他の吸収経路に比較すると比較的良好であるが、薬物によっては十分な吸収を望めないものも存在するため、添加物によるこれら高分子薬物の経肺吸収性の改善が必要である。近年、天然多糖であり安全性が高いキトサンやその誘導体が鼻粘膜<sup>7-9)</sup>や Caco-2 細胞単層膜<sup>10,11)</sup>において水溶性薬物の透過性を増大させることが報告されているが、高分子薬物の経肺吸収に及ぼすキトサン類の影響については不明な点も多い。そこで本研究では、タンパク・生理活性ペプチドの経肺吸収性に及ぼすキトサン及びキトサンオリゴマーの吸収促進効果についても検討を加えた。

最後に、経肺投与製剤をヒトに適用する際には、効率よく肺内に薬物を送達するデバイスシステムが不可欠であり、弊社が開発した粉末吸入用デバイスについて概説する。

## 2. 各種増粘剤による気管支喘息治療薬の経肺吸収性の制御<sup>12)</sup>

気管支喘息治療薬やインフルエンザ治療薬のように肺局所において薬理作用を期待する薬物の場合、これら薬物が肺組織内に滞留する時間を延長させることが治療効果の増大につながると考えられる。世界保健機構 (WHO) によると、近年、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の有病率、発現率が上昇し、世界での死亡原因の第 4 位となっている。したがって、COPD の治療が肺疾患領域において最も重要な課題の 1 つとなっており、治療効果を上げるためには COPD 治療薬を長時間に渡り肺組織内に滞留させることが必要であると考えられる。われわれは、これまでにゼラチンなどの各種増粘剤を併用することにより、水溶性低分子薬物である 5(6)-carboxyfluorescein (CF) の経肺吸収性の制御が可能となることが示され、肺局所において作用発現を期待する薬物の肺内滞留性の向上や肺から全身的循環への薬物の吸収性の制御に有用であることを明らかにし

ている。<sup>13)</sup>

一方、carrageenan は主としてキリンサイ属、ツノマタ属、スギノリ属に属する紅藻類海藻から抽出される細胞間粘質多糖の総称であり、同じく紅藻類から抽出される寒天や動物由来のゼラチンとは異なり、共存する金属塩やタンパク質によって物性を大きく変化させることができることや他の多糖類と混合することにより新規な物性を発現できることから、粘安定剤、ゲル化剤として食品 (プリン、ゼリーなど) や医薬品 (内服ゼリー、経腸栄養剤、口腔内崩壊錠など) を始めとして多くの工業製品に利用されている。<sup>14)</sup> したがって、carrageenan のこうした性質を用いれば薬物の経肺吸収性の制御が期待できると考え、気管支喘息治療薬として臨床で使用されているテオフィリンとプロピオン酸フルチカゾン (FP) を用いて carrageenan によるこれら気管支喘息治療薬の経肺吸収性の制御について検討を行った。

**2-1. 各種増粘剤によるテオフィリンの経肺吸収性の制御** まず、増粘剤を含まないテオフィリン溶液を 0.1 mg/body の用量で Wistar 系雄性ラットに静脈内投与あるいは Enna, Schanker<sup>15)</sup> の方法に準じて経肺投与を行い、テオフィリンの経肺吸収性について検討を行った。その結果、経肺投与後の血中テオフィリン濃度プロファイルは静脈内投与後と同様であり、テオフィリンの肺からの吸収は極めて速やかであることが確認された (Fig. 1)。さらに、この結果から算出した経肺投与時の Absolute Bioavailability (BA) は 104% となり、テオフィリンは肺から完全に吸収されることが明らかとなった。

次に、各種増粘剤を添加したテオフィリン溶液を同様に Wistar 系雄性ラットに経肺投与を行い、テオフィリンの経肺吸収性に及ぼす各種増粘剤の制御効果について検討を行った。結果を Fig. 2 に示したが、CF で経肺吸収性制御効果が認められた 5%



山田圭吾

大塚製薬株式会社製剤研究所 BA プロジェクトリーダー。1965 年徳島県生まれ。京都薬科大学薬学部卒業。京都薬科大学大学院薬学研究科修士課程修了 (指導教官 村西昌三教授)。1991 年大塚製薬株式会社入社。2005 年京都薬科大学大学院薬学研究科博士課程修了 (指導教官 山本 昌教授)。製剤開発のためのバイオアベイラビリティ (BA) 改善に関する検討を中心に研究を行っている。

ゼラチンを併用した場合、テオフィリンの血中濃度は、増粘剤を添加していないコントロールとほぼ同じ推移を示し、制御効果は認められなかった。一方、粘性が高く、弾力に富んだゲルを形成する carrageenan を用いてテオフィリンの経肺吸収性を検討した結果、1% *iota-carrageenan* の添加によりテオフィリンの最高血中薬物濃度 ( $C_{max}$ ) は抑制され、血中濃度は投与後 6 時間においても高い濃度を維持していた。1% *iota-carrageenan* と粘度が類似しているアルギン酸ナトリウム 2% や *iota-carrageenan* よりも固いゲルを形成する *kappa-carrageenan* を 1

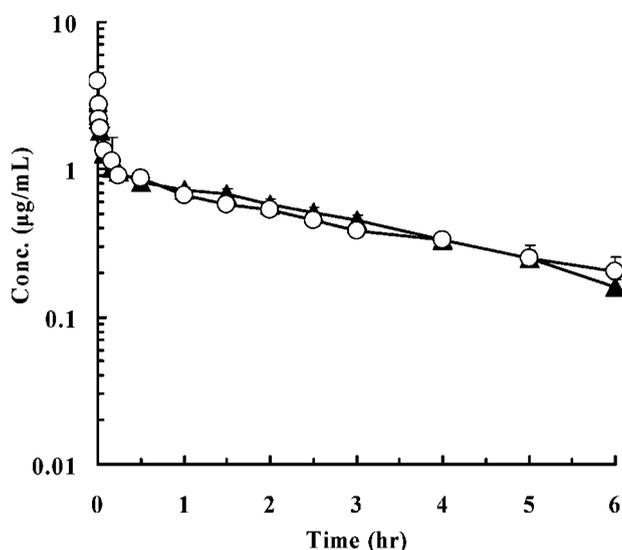


Fig. 1. Serum Concentration-time Profiles of Theophylline after Intratracheal or Intravenous Administration without Viscous Vehicles in Rats

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats.  $\circ$ : intratracheal administration,  $\blacktriangle$ : intravenous administration.

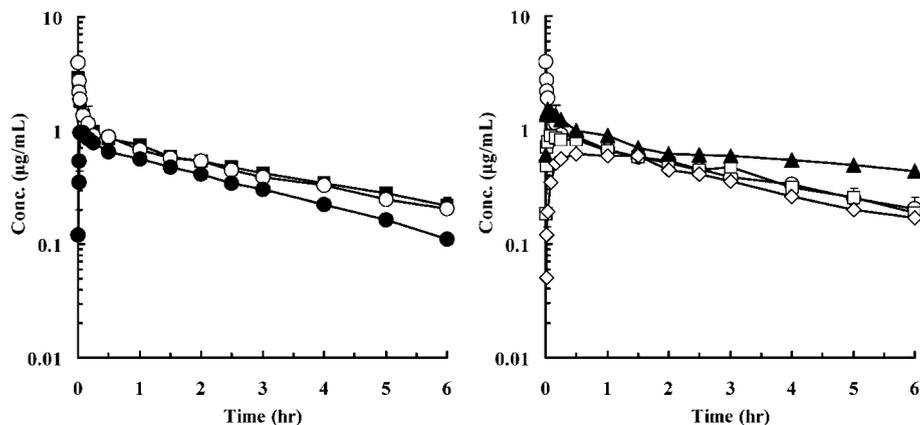


Fig. 2. Serum Concentration-time Profiles of Theophylline after Intratracheal Administration with Various Viscous Vehicles in Rats

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats.  $\circ$ : control,  $\blacksquare$ : 5% gelatin,  $\bullet$ : 2% sodium alginate,  $\blacktriangle$ : 1% *iota-carrageenan*,  $\diamond$ : 2% *iota-carrageenan*,  $\square$ : 1% *kappa-carrageenan*.

%添加した場合、さらに *iota-carrageenan* を 2% に増量して添加した場合は、テオフィリンの  $C_{max}$  はコントロールに比べて低下したが、血中テオフィリン濃度の持続は認められなかった。したがって、各種増粘剤によるテオフィリンの経肺吸収性のコントロールは、これら増粘剤の濃度と種類に依存することが示唆された。

Figures 1 and 2 から算出された薬物動態学的 (PK) パラメータを Table 1 に示した。5%ゼラチンを除く各種増粘剤の併用により、テオフィリンの  $C_{max}$  はコントロールと比べて有意に抑制され、すべての増粘剤の併用により最高血中薬物濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) は増大した。また、1% *iota-carrageenan* の添加により、テオフィリンの平均滞留時間 (MRT) と平均吸収時間 (MAT) が顕著に増大した。以上の結果から、*iota-carrageenan* はテオフィリンの経肺吸収性の制御に有用であることが示された。

**2-2. Carrageenan によるプロピオン酸フルチカゾンの経肺吸収性の制御** 吸入ステロイドとして臨床で汎用されている FP を用いて、*carrageenan* による経肺吸収性の制御について検討を行った。テオフィリンの経肺吸収性の制御に有用であった 1% *iota-carrageenan* を添加した場合、FP の  $C_{max}$  はコントロールと比較して抑制されたが、MRT の有意な増大は認められなかった。また、0.5% *kappa-carrageenan* を添加した場合、血中 FP 濃度の持続が認められ、MRT が増大することが確認された (Fig. 3, Table 2)。

Table 1. Pharmacokinetic Parameters of Theophylline after Intratracheal Administration in the Presence of Various Viscous Vehicles

Viscous vehicles		$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$T_{max}$ (min)	$AUC_{\infty}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ )	MRT (min)	MAT (min)	BA (%)
Control		$3.96 \pm 0.55$	$0.25 \pm 0$	$240.9 \pm 43.2$	$266.7 \pm 65.1$	78.7	104.0
Gelatin	5%	$3.16 \pm 0.52$	$0.5 \pm 0.2$	$247.0 \pm 27.7$	$269.9 \pm 37.4$	81.9	106.6
Iota-carrageenan	1%	$1.59 \pm 0.04^{***}$	$1.4 \pm 0.4$	$499.5 \pm 55.2^{***}$	$572.3 \pm 92.1^{**}$	384.3	215.6
Iota-carrageenan	2%	$0.63 \pm 0.03^{***}$	$33.8 \pm 9.4^{***}$	$177.0 \pm 8.6$	$260.0 \pm 20.8$	72.0	76.4
Kappa-carrageenan	1%	$0.91 \pm 0.05^{***}$	$5.5 \pm 1.7$	$213.6 \pm 24.9$	$242.7 \pm 47.0$	54.7	92.2
Sodium alginate	2%	$0.99 \pm 0.52^{***}$	$3.5 \pm 0.9$	$146.3 \pm 5.7$	$178.7 \pm 11.5$	-9.3	63.2

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of three to four rats. \*\*  $p < 0.01$ , compared with the control. \*\*\*  $p < 0.001$ , compared with the control.

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of Fluticasone Propionate after Intratracheal Administration in the Presence of Carrageenans

Viscous vehicles		$C_{max}$ (ng/ml)	$T_{max}$ (min)	$AUC_{\infty}$ (ng $\cdot$ min/ml)	MRT (min)
Control		$3.12 \pm 0.45$	$52.5 \pm 7.5$	$870.6 \pm 75.8$	$244.8 \pm 6.8$
Iota-carrageenan	0.5%	$2.84 \pm 0.31$	$93.8 \pm 26.3$	$953.3 \pm 92.4$	$283.2 \pm 26.8$
Iota-carrageenan	1%	$1.75 \pm 0.24^*$	$210.0 \pm 71.4$	$676.8 \pm 136.0$	$298.8 \pm 52.5$
Kappa-carrageenan	0.5%	$3.62 \pm 0.09$	$225.0 \pm 56.8$	$1555.5 \pm 39.0^{***}$	$313.8 \pm 9.3^{**}$

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of three to four rats. \*  $p < 0.05$ , compared with the control. \*\*  $p < 0.01$ , compared with the control. \*\*\*  $p < 0.001$ , compared with the control.

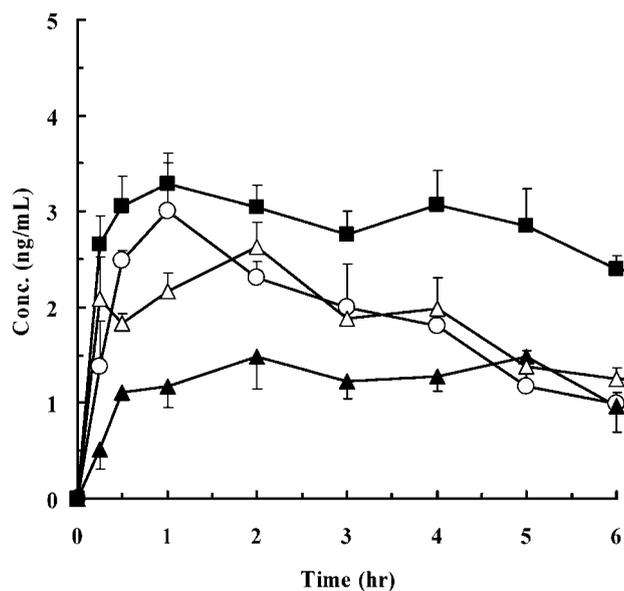


Fig. 3. Serum Concentration-time Profiles after Intratracheal Administration of Fluticasone Propionate with Carrageenans in Rats

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats.  $\circ$ : control,  $\blacktriangle$ : 1% Iota-carrageenan,  $\triangle$ : 0.5% Iota-carrageenan,  $\blacksquare$ : 0.5% Kappa-carrageenan.

健康成人を用いた臨床試験において、FPのドライパウダーを400  $\mu\text{g}$ の用量で単回吸入させた場合、血中濃度のピークは投与後30分に認められ、

その後血中濃度は徐々に減少し投与後8時間で検出限界以下となることが報告されている。<sup>16)</sup> また、喘息症状の発作の多くが早朝に発現することが報告されており、<sup>17,18)</sup> 早朝まで長時間に渡って喘息治療薬が肺内に滞留することが望まれる。本試験において、kappa-carrageenanを用いることによりラットにおいて投与後6時間まで高い血中FP濃度を維持していた。したがって、吸入喘息治療薬へのkappa-carrageenanの適応は、喘息患者の夜間並びに早朝の発作の抑制に有用であると考えられる。

**2-3. Carrageenanによるテオフィリンの肺組織内滞留性への影響** 次にiota-carrageenanによる薬物の肺組織内滞留性の評価を行った。増粘剤を添加したテオフィリン溶液をラットに経肺投与し、60分後の肺組織内テオフィリン残存量を測定した。増粘剤を含まないコントロール群におけるテオフィリンの残存量は投与量に対して2.4%であったが、5%ゼラチン添加では1.5%となり、残存量の増加は認められなかった。一方、1% Iota-carrageenanを添加した場合、肺組織内テオフィリン残存量は10.4%となり、コントロールと比較して顕著に増大した (Fig. 4)。

**2-4. Carrageenanによる肺内炎症性評価** Car-

rageenan の一種である lambda-carrageenan は、抗炎症剤の薬理活性評価のための起炎物質として使用されている。<sup>19)</sup> このため、テオフィリン及びプロピオン酸フルチカゾンの経肺吸収性制御において各々有用であった iota- 及び kappa-carrageenan の肺粘膜への炎症性について評価した。ラットにイソフルラン (約 0.1%) の吸入による軽麻酔下, Ho, Furst の方法<sup>20)</sup> に準じて固定したのち、テフロンチューブ (内径 0.8 mm, 外径 1.2 mm) を気管内に挿入した。このチューブを介して、1% の各 carrageenan 溶液をラットに経肺投与したのち、5 時間及び 24

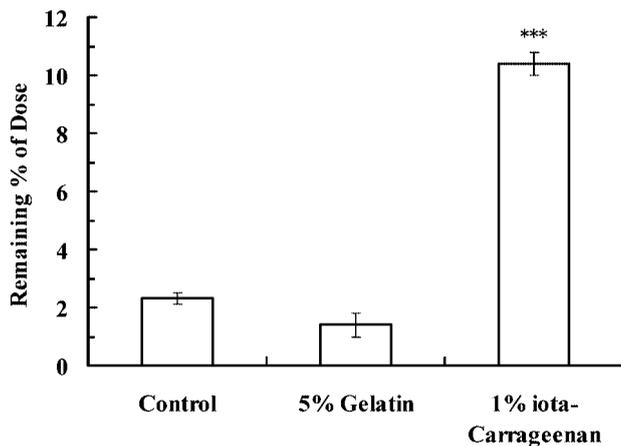


Fig. 4. Effect of Two Viscous Vehicles on the Remaining Percent of Theophylline in the Lung Tissue at 60 Min after Intratracheal Administration

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats. \*\*\* $p$  < 0.001, compared with the control.

時間に気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を採取し、BALF 中の白血球数、タンパク質量及び乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。

各種 carrageenan 投与 5 時間後の白血球数は、carrageenan を含まないコントロールとほぼ同じであったが、24 時間後では lambda-carrageenan により単核球のわずかな増加と好中球の顕著な増加が認められた。また、iota-carrageenan は投与 24 時間後の単核球と好中球を増加させたが、kappa-carrageenan はコントロールとほぼ同じであった (Fig. 5)。

また、BALF 中のタンパク質量は投与 5 時間後及び 24 時間後ともに lambda-carrageenan によりコントロールと比べて有意に増加することが認められたが、iota- 及び kappa-carrageenan では有意な増加は認められなかった。一方、BALF 中の LDH 活性は lambda-carrageenan 投与 24 時間後においてのみ有意に増加することが認められた (Fig. 6)。Carrageenan は硫酸基を有するガラクトースの重合体であり、主鎖は D-ガラクトースが 1,3 結合及び 1,4 結合の繰り返しによって結合した二糖が基本単位となっている。<sup>21)</sup> Lambda-carrageenan は他の 2 種の carrageenans と比較して硫酸基の含有量が多いため、肺粘膜に対して明らかな障害性を示したと考えられた。硫酸基の含有量が比較的少ない iota-carrageenan では、すべての炎症性の指標 (BALF 中の好中球数、タンパク質量及び LDH 活性) におい

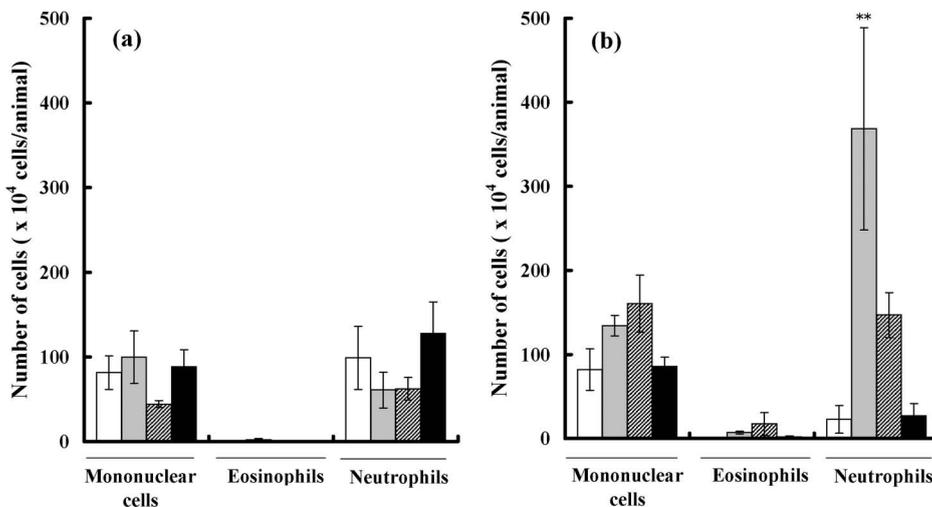


Fig. 5. Differential Leukocytes in Bronchoalveolar Lavage Fluid at 5 Hr (a) or 24 Hr (b) after Exposure of PBS (Open Bars), Lambda- (Gray Bars), Iota- (Hatched Bars), Kappa- (Filled Bars) carrageenans Administered to Lung

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats. \*\* $p$  < 0.01, compared with the control.

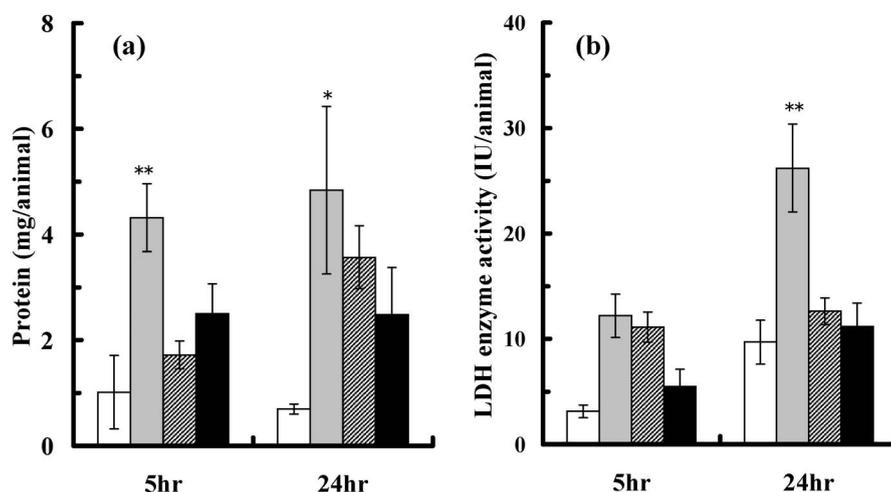


Fig. 6. Levels of Total Protein (a) and LDH Enzyme Activity (b) in Bronchoalveolar Lavage Fluid at 5 Hr or 24 Hr after Exposure of PBS (Open Bars), Lambda- (Gray Bars), Iota- (Hatched Bars), Kappa- (Filled Bars) carrageenans Administered to Lung. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with the control.

て、lambda-carrageenan と比較して顕著に低い値を示し、また kappa-carrageenan の投与では炎症性の指標は変化しなかった。

以上のことから、iota- 並びに kappa-carrageenan は喘息治療薬であるテオフィリンやプロピオン酸フルチカゾンの経肺吸収速度制御に有用であることが示された。さらに、これらの添加剤は肺組織に対して炎症や障害を惹起しないことが明らかとなった。したがって、本アプローチにより、肺局所作用発現を期待する薬物の治療効果の増大並びに副作用の低減につながる可能性が示唆された。

### 3. キトサンオリゴマーによるタンパク・生理活性ペプチドの経肺吸収性の改善

タンパクや生理活性ペプチドのような高分子薬物の経肺吸収は、消化管など他の吸収経路に比較すると比較的良好である<sup>5,6)</sup>が、薬物によっては十分な吸収を望めないものも存在する。このため、これらの高分子薬物の経肺吸収を改善するためにいくつかの製剤添加剤が必要となる。実際に、吸収促進剤やタンパク分解酵素阻害剤などの添加剤によりこれら高分子薬物の経肺吸収性が改善されることが報告されている。<sup>22-29)</sup>しかしながら、優れた促進効果を有する吸収促進剤は同時に肺粘膜に障害を与える可能性があり、有効かつ安全性の高い製剤添加剤の開発が望まれている。

キトサンは、甲殻類の甲殻や菌類の細胞壁を構成する成分であるキチンをアルカリ加水分解して部分的に脱アセチル化した  $\beta$ -1,4- ポリ-D- グルコサミン

であり、その化学構造はセルロースに類似している。<sup>30)</sup>キトサンの安全性については、*in vivo* 毒性試験により評価され、キトサンは無毒性で生分解性であると報告されている。<sup>30,31)</sup>近年、このキトサンやその誘導体を利用した徐放性基剤、<sup>32)</sup>大腸ターゲットィング、<sup>33)</sup>遺伝子デリバリーのための非ウイルス性ベクター<sup>34,35)</sup>などの研究が進められている。さらに、キトサンは粘膜付着性を有しており、この特性はマイナスに帯電している粘膜や細胞表面でイオンの相互作用によると考えられている。<sup>36,37)</sup>一方、キトサンやその誘導体が薬物の粘膜透過性を改善させることが報告されており、キトサンは十分な吸収を望めない薬物の消化管や鼻からの吸収を改善させる性質を有することが明らかになっている。<sup>5,6,38)</sup>しかしながら、薬物の経肺吸収性に及ぼすキトサンやその誘導体の影響についての報告はほとんどみられない。そこで、タンパク・生理活性ペプチドとしてインターフェロン- $\alpha$  (IFN) 及びサケカルシトニン (sCT) を用い、これらタンパク・生理活性ペプチドの経肺吸収性に及ぼすキトサン及びキトサンオリゴマーの吸収促進効果と安全性について検討を加えた。

**3.1 キトサンの物理化学的性質** キトサンとして、D- グルコサミンが各々 2, 4, 6 個  $\beta$ -1,4 結合したキトサンダイマー (dimer)、キトサンテトラマー (tetramer)、キトサンヘキサマー (hexamer) と、水溶性キトサン (WS)、キトサン EF (EF)、キトサン 10 (CS10) 及びキトサン 100 (CS100)

を用いた。まず、用いたキトサンのうち、WS, EF, CS10, CS100 については製造元の分子量規格が広い  
ため、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によりこれらキトサンのピーク保持時間における分子量  
を求めた。Table 3 に実験に用いたキトサンの分子量と脱アセチル化度をまとめた。キトサンオリゴ  
マーは、比較的分子量であり、dimer, tetramer, hexamer の分子量は各々 340, 663, 985 である。  
GPC により、WS のピーク保持時間における分子量は 1800 と算出され、主に D-グルコサミンが約  
11 個  $\beta$ -1,4 結合したキトサンオリゴマーであると考えられた。また、同様に算出された EF, CS10 及び  
CS100 のピーク保持時間における分子量は各々 48000, 22000 及び 96000 であり、これらは高い分子  
量を示した。一方、脱アセチル化度は、CS100 を除いてすべて 90% 以上であった。

### 3-2. キトサン及びキトサンオリゴマーによる IFN の経肺吸収性の改善効果

IFN は、ウイル

ス感染細胞が産生する抗ウイルスタンパクの一種  
で、腎癌や B 型及び C 型慢性活動性肝炎などに対  
して効能を有しており、一般的に皮下、筋肉内ある  
いは静脈内注射により投与されている。本研究にお  
いて、キトサンを添加せずに経肺投与を行った場合  
の IFN の absolute BA は、Patton et al. の報告<sup>39)</sup>  
を用いて算出すると 5.9% であった (Table 4)。この  
ことから、肺からの IFN の吸収性は消化管や他の  
部位からの吸収より高いものの、製剤添加物なしで  
はその吸収量は十分ではないことが確認された。し  
たがって、肺を介しての IFN を十分に全身移行さ  
せるためには、吸収促進剤が必要であると考えられ  
た。そこで、IFN の経肺吸収性に及ぼすキトサン  
及びキトサンオリゴマーの吸収促進効果について検  
討を行った。

イソフルラン吸入による軽度麻酔下、Ho, Furst  
の方法<sup>20)</sup>に準じてラットを固定したのち、テフロン  
チューブ (内径 0.8 mm, 外径 1.2 mm) の先端を  
気管内に挿入し、このチューブを介してキトサンオリ  
ゴマーである dimer, tetramer, hexamer, WS の  
0.5% 水溶液若しくは懸濁液に溶解させた IFN を  
 $1.0 \times 10^7$  IU/0.5 ml/kg の用量で経肺投与を行っ  
た。血中 IFN 濃度—時間プロファイルを Fig. 7 に  
示したが、IFN の経肺吸収はすべてのオリゴマー  
の添加によりコントロールと比較して改善され、  
 $C_{max}$  が増大することが認められた。特に D-グルコ  
サミンが 6 分子  $\beta$ -1,4 結合した hexamer を添加した  
場合、最も高い血中 IFN 濃度の増大が得られた。  
また、WS を添加した場合には、血中 IFN 濃度推  
移に二峰性が認められたが、WS をボールミル粉碎

Table 3. Molecular Weight and Deacetylation Degree of Chitosans and Chitosan Oligomers

Chitosans	MW (Da)	% Deacetylated
Dimer	340	100
Tetramer	663	100
Hexamer	985	100
WS	1800 <sup>a)</sup>	n.d. <sup>b)</sup>
CS 10	22000 <sup>a)</sup>	90 <sup>c)</sup>
EF	48000 <sup>a)</sup>	96 <sup>c)</sup>
CS 100	96000 <sup>a)</sup>	87 <sup>c)</sup>

a) Molecular weight determined from the peak retention time in GPC.

b) No data. c) Obtained from the manufacturer.

Table 4. Pharmacokinetic Parameters of IFN after Intratracheal Administration with 0.5% Chitosan Oligomers and Polymers

Chitosans	$C_{max}$ (IU/ml)	$T_{max}$ (hr)	$AUC_{\infty}$ (IU · hr/ml)	MRT (hr)	Comparative BA <sup>a)</sup> (%)	Absolute BA <sup>b)</sup> (%)
Control	375 ± 87	1.88 ± 0.52	2373 ± 586	5.83 ± 0.55	6.9	5.9
Dimer	817 ± 75**	1.50 ± 0.29	4871 ± 371*	5.75 ± 0.17	14.2	12.1
Tetramer	761 ± 55	1.63 ± 0.38	3978 ± 538*	6.08 ± 0.47	11.6	9.9
Hexamer	1006 ± 80***	2.00 ± 0	6105 ± 466**	5.12 ± 0.16	17.8	15.1
WS	670 ± 90	2.75 ± 0.75	5899 ± 731**	7.37 ± 0.65	17.2	14.6
EF	356 ± 72	3.13 ± 1.39	2812 ± 906	5.99 ± 0.71	8.2	7.0
CS 10	653 ± 119	2.00 ± 0	3891 ± 598	5.61 ± 0.75	11.3	9.6
CS 100	513 ± 105	2.75 ± 0.25	2926 ± 615	5.30 ± 0.63	8.5	7.2

Results are expressed as the mean ± S.E. of four rats. a) Compared to intramuscular injection. b) Calculated from serum concentration-time profile after intravenous administration of IFN in Ref. 39). \*  $p < 0.05$ , compared with the control. \*\*  $p < 0.01$ , compared with the control. \*\*\*  $p < 0.001$ , compared with the control.

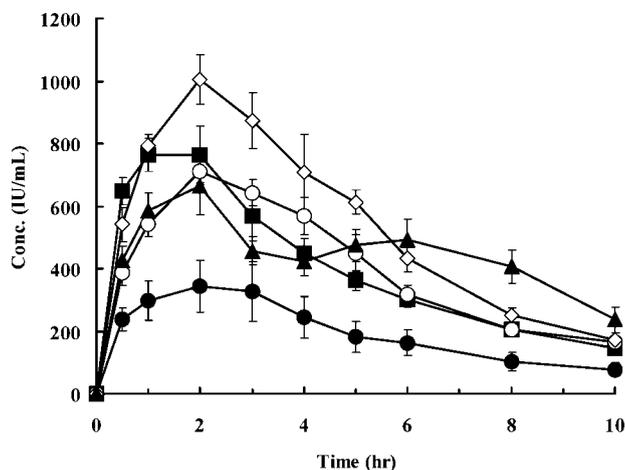


Fig. 7. Serum Concentration-time Profiles after Intratracheal Administration of IFN with 0.5% Chitosan Oligomers in Rats

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats. ●: control, ■: dimer, ○: tetramer, ◇: hexamer, ▲: WS.

して溶解性を高めた場合、二峰性が消えて、hexamer を添加した場合とほぼ同じ血中 IFN 濃度推移を示した。

次に、高分子量のキトサンである EF, CS10 及び CS100 の 0.5% 懸濁液を添加して同様に経肺投与を行った。CS10 並びに CS100 を添加した場合の血中 IFN 濃度は、コントロールと比較してやや上昇したが、EF 併用時は IFN の経肺吸収改善効果は認められなかった (Fig. 8)。

Figures 7 and 8 の結果から算出された 4 種のキトサンオリゴマー並びに 3 種のキトサンを各々 0.5% 添加して経肺投与した際の IFN の PK parameters を Table 4 にまとめた。IFN の  $C_{max}$  は dimer と hexamer の添加により、無限大時間までの血中薬物濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{\infty}$ ) はすべてのキトサンオリゴマーの添加によりコントロールと比較して有意に増大した。特に hexamer の添加により、IFN の  $C_{max}$  及び  $AUC_{\infty}$  はコントロールと比較して各々 2.7 倍及び 2.6 倍に増大し、absolute BA は 15.1% まで改善された。一方、高い分子量を持つ EF, CS10, CS100 の添加では、IFN の経肺吸収性に有意な影響を及ぼさなかったが、これはこれらキトサンが高分子量であるため水にほとんど溶解しないことが原因であると考えられた。

**3-3. キトサンオリゴマーによるサケカルシトニンの経肺吸収性の改善効果** IFN の経肺吸収改

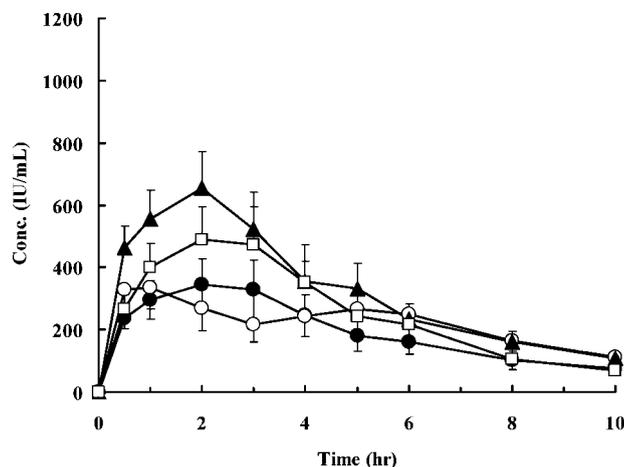


Fig. 8. Serum Concentration-time Profiles after Intratracheal Administration of IFN with 0.5% Chitosan Polymers in Rats

Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of four rats. ●: control, ▲: CS10, ○: EF, □: CS100.

善効果が認められた hexamer 及びボールミル粉碎した WS によるサケカルシトニン (sCT) の経肺吸収改善効果について検討を行った。イソフルラン吸入による軽度麻酔下ラットを同様に固定し、直径約 20  $\mu$ m のミストを発生させる IA-1C MicroSprayer™ (Penn-Century, Inc.) の先端を気管内に直接挿入したのち、0.1  $\mu$ g/0.1 ml/rat の用量で経肺投与した。その結果、sCT による血中カルシウム濃度低下作用は、これら 2 つのキトサンオリゴマーの添加により改善されることが確認され、PD パラメータを算出すると、2 つのオリゴマーを添加することにより、有意なカルシウム低下作用の増大が認められた (Fig. 9)。ヘキサマーを添加した際の Pharmacological availability (PA) % は、コントロールと比較して 4.3 倍に増大し、生理活性ペプチドである sCT においてもキトサンオリゴマーによる経肺吸収性改善効果が確認された (Table 5)。

#### 3-4. キトサンオリゴマーによる肺粘膜障害性

キトサンは、生体に対して安全性が高いことが知られているが、肺粘膜に対する安全性については知られていない。そこで、肺粘膜に対するキトサンオリゴマーの安全性について検討を行うために、キトサン投与後の肺組織について、病理組織学的評価を行った。Figure 10 にキトサンオリゴマー及びポリマー溶液投与後 72 時間の病理組織像を示した。キトサンヘキサマー投与後の像をみると、肺胞マクロファージが点在していたが、コントロールの等張り

ン酸緩衝液 (PBS) とほぼ同程度であった。また、水溶性キトサンでは若干の炎症性細胞の集簇が認められた。一方、pH4 の酢酸緩衝液で溶解させた分子量 22000 の CS10 を投与した場合、強い炎症細胞の集簇が確認された。また、pH 4 の酢酸緩衝液のみを投与した場合においても強い炎症細胞の浸潤及び集簇が観察された。Dimer, tetramer, hexamer などのキトサンオリゴマーは水に対して高い溶解性を

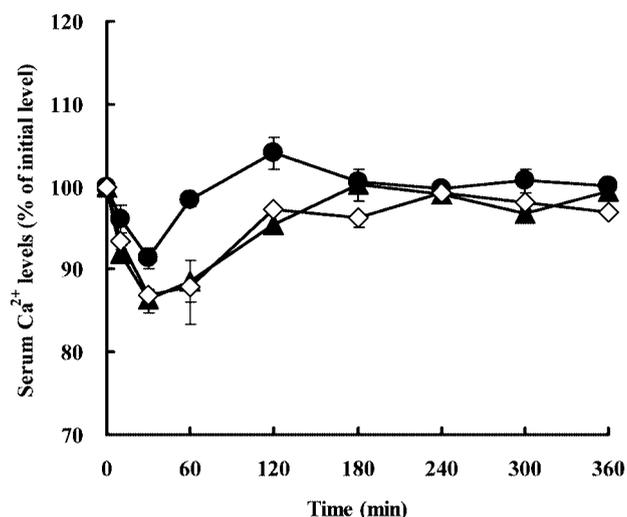


Fig. 9. Changes in Serum Ca<sup>2+</sup> Levels after Intratracheal Administration of sCT with 0.5% Chitosan Oligomers in Rats  
Results are expressed as the mean±S.E. of four rats. ●: control, ◇: hexamer, ▲: ball-milled WS.

有しているが、分子量が高くなると水に対してほとんど溶解せず、酢酸、塩酸、コハク酸などの希酸に溶解する。経肺吸収改善効果を発現するために希酸を必要としないキトサンオリゴマーは肺粘膜への安全性を考慮した場合においても製剤添加物として有用であると考えられた。

#### 4. 粉末吸入用デバイスの開発

最後に、経肺用製剤をヒトに投与する際には、効率よく肺内に薬物を送達するシステムが必要である。ここでは、弊社が開発中の粉末吸入用デバイスについて簡単に紹介する。ODPI システムは、ペプチドや蛋白質に適した新しい粉末吸入システムであり、良好な安定性、優れた吸入特性などの特徴を有し、現在弊社 ODPI 事業部において開発が進められている。<sup>40,41)</sup> 一方、Swinghaler<sup>®</sup> (Fig. 11) は、耐

Table 5. Pharmacodynamic Parameters of sCT after Intratracheal Administration with 0.5% Chitosan Oligomers

Chitosan oligomers	A%	PA%	Ratio
Control	1.19±0.38	2.14	—
Hexamer	5.13±0.96**	9.24	4.3
WS (Ball-milled)	4.37±0.78*	7.87	3.7

Results are expressed as the mean±S.E. of four rats. A%: Changes in the serum calcium concentration,  $A\% = (1 - AUC_{0-360\text{ min}} / 100\% \times 360\text{ min}) \times 100$ , PA%: the percentage of pharmacological availability,  $PA\% = (A\%_{\text{pulmonary}} / A\%_{i.v.}) \times (\text{Dose}_{i.v.} / \text{Dose}_{\text{pulmonary}})$ , \*  $p < 0.05$ , compared with the control. \*\*  $p < 0.01$ , compared with the control.

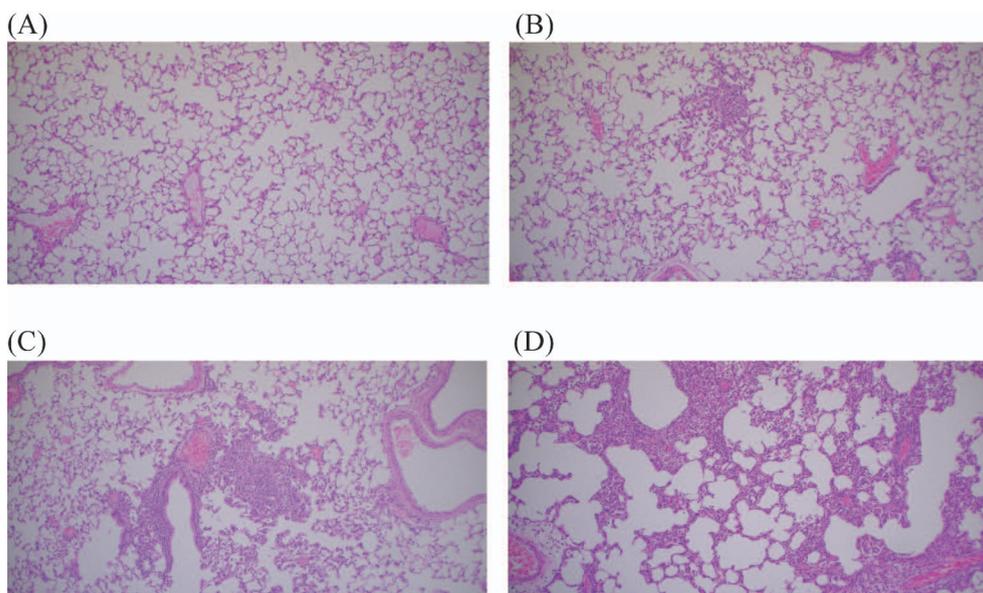


Fig. 10. Histopathological Observation (100×Magnification) of Rat Lung Tissue at 72 Hr after the Exposure with Chitosan Oligomers and Polymer  
(A): Control, (B): 0.5% hexamer, (C): 0.5% WS, (D): 0.5% CS10 solution.

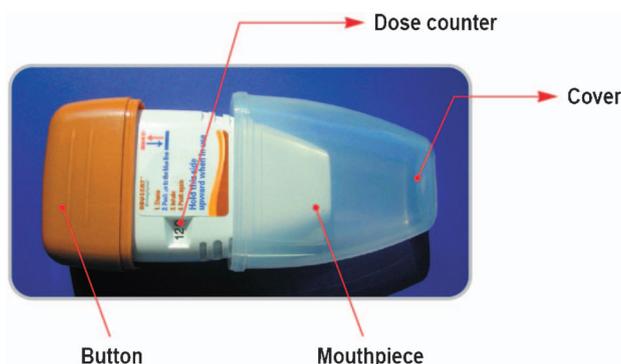


Fig. 11. Swinghaler®

静電気性の素材を用いて開発されたマルチドーズタイプの吸入デバイスであり、気管支喘息治療薬の適用を中心に開発中である。

吸入ステロイド薬である Budesonide を Swinghaler® に適用し、健康成人に投与した際の初期吸入速度と PK プロファイルの関係について Fig. 12 に示した。アストラゼネカ社のパルミコートタービュヘイラー® では、吸入速度の立ち上がりが遅い被験者において血漿中 Budesonide 濃度が低くなる傾向が認められた。一方、Swinghaler® では吸入速度による PK プロファイルへの影響は小さいことが確認されたことから、小児や高齢者においても安定した喘息治療効果が得られるものと考えられた。

## 5. 結論

気管支喘息治療薬の経肺吸収性制御に *iota-* 並びに *kappa-carrageenan* が有用であり、肺局所作用発現を期待する薬物の治療効果の増大並びに副作用の低減につながる可能性が示唆された。また、キトサンオリゴマーはタンパク及び生理活性ペプチドの経肺吸収性改善に有用な添加物であることが示唆された。以上のように本研究から、各種製剤添加剤の利用により、肺局所作用発現を期待する薬物に対しては経肺吸収性の持続が、また十分な吸収が得られない高分子薬物に対しては経肺吸収改善が達成された。

**謝辞** 本研究を行うに当たり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学薬剤学教室 山本 昌教授に深甚なる謝意を表します。

また、終始有益な御助言と御協力を賜りました京都薬科大学薬剤学教室 藤田卓也助教授、岡田直貴助手（現、大阪大学大学院講師）に深謝致します。

さらに、実験の一部にご指導、御協力頂きました

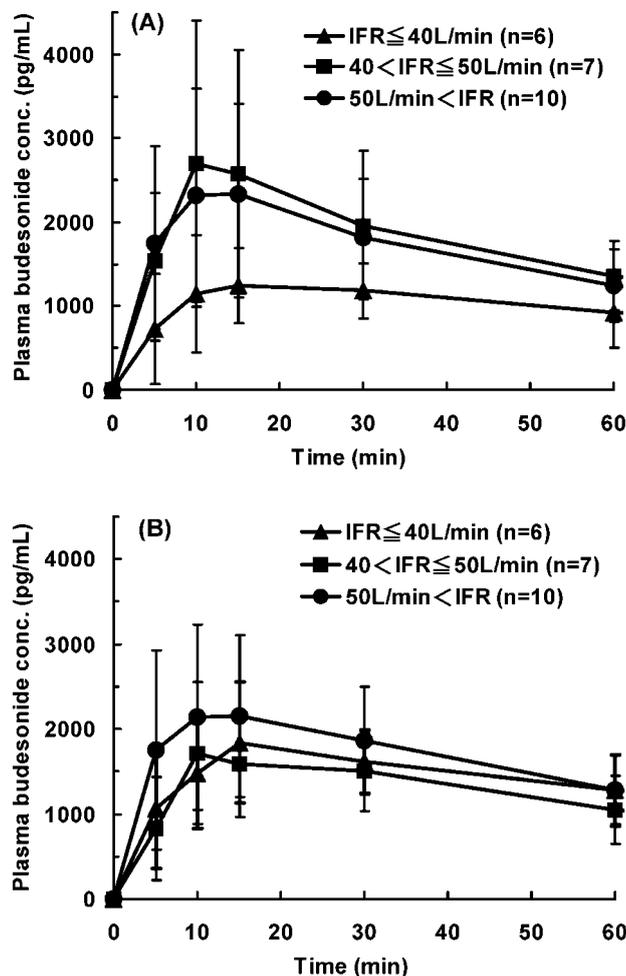


Fig. 12. Effect of Inspiratory Flow Rate (IFR) at 100 Min after Reaching the 5 l/min on Plasma Concentration-time Profiles of Budesonide after Inhalation at a Dose of 800 µg in Human

(A): Pulmicort Turbuhaler, (B): Swinghaler. Results are expressed as the mean ± S.D.

京都薬科大学薬理学教室 河野茂勝教授、奈邊 健助教授並びに京都薬科大学薬剤学教室の諸氏、大塚製薬㈱製剤研究所 小富正昭所長を始め、多くの関係者に感謝致します。

## REFERENCES

- 1) Yu J., Chien Y.-W., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 395-453 (1997).
- 2) Yang X., Ma J.-K.-A., Malanga C.-J., Rojanasakul Y., *Int. J. Pharm.*, **195**, 93-101 (2000).
- 3) Batenburg J.-J., *Am. J. Physiol.*, **262**, L367-L385 (1992).
- 4) Wearley L.-L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **8**, 331-394 (1991).

- 5) Illum L., Farraj N.-F., Davis S.-S., *Pharm. Res.*, **11**, 1186–1189 (1994).
- 6) Tengamnuay P., Sahamethapat A., Sailasuta A., Mitra A.-K., *Int. J. Pharm.*, **197**, 53–67 (2000).
- 7) Dyer A.-M., Hinchcliffe -M., Watts -P., Castile -J., Jabbal-Gill I., Nankervis R., Illum L., *Pharm. Res.*, **19**, 998–1008 (2002).
- 8) Schipper N.-G.-M., Olsson S., Hoogstraate J.-A., deBor A.-G., Varum K.-M., Artursson P., *Pharm. Res.*, **14**, 923–929 (1997).
- 9) Schipper N.-G.-M., Varum K.-M., Artursson P., *Pharm. Res.*, **13**, 1686–1692 (1996).
- 10) Enna S.-J., Schanker L.-S., *Am. J. Physiol.*, **222**, 409–414 (1972).
- 11) Wigley F.-M., Londono J.-H., Wood S.-H., Shipp J.-C., Waldman R.-H., *Diabetes*, **20**, 552–556 (1971).
- 12) Yamada K., Kamada N., Odomi M., Okada N., Nabe T., Fujita T., Kohno S., Yamamoto A., *Int. J. Pharm.*, **293**, 63–72 (2005).
- 13) Yamamoto A., Yamada K., Muramatsu H., Nishinaka A., Okumura S., Okada N., Fujita T., Muranishi S., *Int. J. Pharm.*, **282**, 141–149 (2004).
- 14) Ikeda S., *FFI J.*, **208**, 801–806 (2003).
- 15) Enna S. J., Schanker L. S., *Am. J. Physiol.*, **222**, 409–414 (1972).
- 16) Adachi M., Wada J., *Rinsho Iyaku*, **10**, 17–29 (1994).
- 17) Barnes P., Gerald G.-F., Brown M., Dollery C., *N. Engl. J. Med.*, **303**, 263–267 (1980).
- 18) Kiyokawa H., Yonemaru M., Horie S., Kasuga I., Ichinose Y., Toyama K., *Respirology.*, **4**, 37–45 (1999).
- 19) Winter C.-A., Risley E.-A., Nuss G.-W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544–547 (1962).
- 20) Ho W., Furst A., *Oncology*, **27**, 385–393 (1973).
- 21) Ikeda S., *FFI J.*, **208**, 801–806 (2003).
- 22) Okumura K., Iwakawa S., Yoshida T., Seki T., Komada F., *Int. J. Pharm.*, **88**, 63–73 (1992).
- 23) Komada F., Iwakawa S., Yamamoto N., Sakakibara H., Okumura K., *J. Pharm. Sci.*, **83**, 863–867 (1994).
- 24) Kobayashi S., Kondo S., Juni K., *Pharm. Res.*, **11**, 1239–1243 (1994).
- 25) Todo H., Okamoto H., Iida K., Danjo K., *Int. J. Pharm.*, **220**, 101–110 (2001).
- 26) Yamamoto A., Umemori S., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 14–18 (1994).
- 27) Morita T., Yamamoto A., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H., *Pharm. Res.*, **11**, 909–913 (1994).
- 28) Yamamoto A., Okumura S., Fukuda Y., Fukui M., Takahashi K., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1144–1147 (1997).
- 29) Yamamoto A., Iseki T., Ochi-Sugiyama M., Okada N., Fujita T., Muranishi S., *J. Control. Release*, **76**, 363–374 (2001).
- 30) Singla A.-K., Chawla M., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1047–1067 (2001).
- 31) Chobot V., Kremenak J., Opletal L., *Ceska Slov. Farm.*, **44**, 190–195 (1995).
- 32) Miyazaki S., Yamaguchi H., Yokouchi C., Takada M., Hou W.-M., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4033–4038 (1998).
- 33) Tozaki H., Komoike J., Tada C., Maruyama T., Terabe A., Suzuki T., Yamamoto A., Muranishi S., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1016–1021 (1997).
- 34) Richardson S.-C.-W., Kolbe H.-V.-J., Duncan R., *Int. J. Pharm.*, **178**, 231–243 (1999).
- 35) Thanou M., Florea B.-I., Geldof M., Junginger H.-E., Borchard G., *Biomaterials*, **23**, 153–159 (2002).
- 36) Lehr C.-M., Bouwsta J.-A., Schacht E.-H., Junginger H.-E., *Int. J. Pharm.*, **73**, 43–48 (1992).
- 37) Henriksen I., Green K.-L., Smart J.-D., Smistad G., Karlsen J., *Int. J. Pharm.*, **145**, 231–240 (1997).
- 38) Artursson P., Lindmark T., Davis S.-S., Illum L., *Pharm. Res.*, **11**, 1358–1361 (1994).
- 39) Patton J.-S., Trinchero P., Platz R.-M., *J. Control. Release*, **28**, 79–85 (1994).
- 40) Yamashita C., *Pharm. Stage*, **4**, 59–65 (2004).
- 41) Yamashita C., *Yakuzaigaku*, **65**, 19–22 (2005).