

微粒子吸入による高分子薬物の全身及び肺局所送達

岡本浩一,* 檀上和美

Local and Systemic Delivery of High-Molecular Weight Drugs by Powder Inhalation

Hirokazu OKAMOTO* and Kazumi DANJO

Faculty of Pharmacy, Meijo University, 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

(Received September 29, 2006)

The pulmonary route has recently attracted attention as a noninvasive administration route for peptide and protein drugs, and an insulin powder for inhalation was approved by authorities in Europe and the USA. The present study examined usefulness of insulin and gene powders for systemic and local inhalation therapy. We prepared several dry insulin powders by spray drying to examine the effect of additives on insulin absorption. Citric acid appears to be a safe and potent absorption enhancer for insulin in dry powder. However, in the powder with citric acid (MIC0.2 SD) insulin was unstable compared with the other powders examined. To improve insulin stability, a combination of insulin powder and citric acid powder was prepared (MIC Mix). MIC Mix showed hypoglycemic activity comparable to MIC0.2 SD while the insulin stability was much better than that of MIC SD. Next, dry insulin powders with mannitol were prepared with supercritical carbon dioxide (SCF); the powder thus prepared reduced blood glucose level rapidly and was more effective than that prepared by spray drying. Chitosan-pDNA complex powders as a pulmonary gene delivery system were also prepared with SCF and their *in vivo* activity was evaluated. The addition of chitosan suppressed the degradation of pCMV-Luc during preparation and increased the storage stability. The luciferase activity in mouse lung was evaluated after pulmonary administration of the powders. The chitosan-pDNA powder with an N/P ratio=5 increased the luciferase activity to 27 times that of the pCMV-Luc solution. These results suggest that gene powder with chitosan is a useful pulmonary gene delivery system.

Key words—inhalation therapy; insulin; gene therapy; spray drying; supercritical carbon dioxide

1. はじめに

現在国内で製造承認されている吸入剤は、気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患、去痰、呼吸窮迫症候群、インフルエンザ（気道感染）などを適応としたものであり、すべて肺局所疾患治療目的でほとんどが低分子薬物を主薬としている。海外でも同様の傾向があるが、米国では肺局所疾患である嚢胞性線維症治療薬として分子量 33 kDa の rhDNase の吸入剤が 1996 年 12 月に承認されている。この製剤 (Pulmozyme® Inhalation Solution, Genentech 社) は rhDNase の 1 mg/ml 水溶液で、ネブライザー投与されている。¹⁾ 後述するように、肺は消化管からは吸収が困難な高分子医薬の吸収部位として注目されている。

吸入剤は大きく加圧式定量噴霧製剤、ネブライザー製剤、粉末吸入製剤の 3 種に分類できる。²⁾ 加圧式定量噴霧製剤は液化噴射剤（プロペラント）に溶解若しくは懸濁した薬物を計量バルブから一定量噴霧するもので、汎用されてきた。しかしこれまでプロペラントとして用いられてきたフロンガスが、オゾン層破壊効果のため 2006 年以降は吸入剤には使用できなくなり、いくつかの製剤は製造中止となっている。また、現在使用されている製剤ではプロペラントとして HFC-134a や HFC-227 のようなハイドロアルカン類（代替フロン）が用いられているが、これらには二酸化炭素より強い温室効果があり、環境への影響が懸念される。ネブライザーは多くの溶液の吸入に適し、老人や子供でも使い易い剤形である。これまでの吸入器は大きく携帯には不向きであり、また得られる粒子径も一般に大きく不均一なものであった。しかし、最近では携帯可能な小型のネブライザーが開発され（例えばオムロン社の

名城大学薬学部製剤学研究室 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150)

*e-mail: okamotoh@ccmfs.meijo-u.ac.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。

NE-U22), メッシュ式のネブライザーでは発熱もなく, 装置を傾けても液がこぼれないなど, 使い易くなっている. 粉末吸入器は, 患者の吸気を利用して微粒子を分散させるため, 動力が不要であり, 吸入器も小型で携帯に適する. 環境への負荷も小さく, 今後使用頻度が高まると考えられるが, 粒子径など製剤の精密な設計が要求される.

全身作用を目的とした高分子医薬の中でも, 糖尿病治療薬であるインスリン吸入剤の開発が世界的に精力的に進められている. その中で, ファイザー社のインスリン粉末吸入製剤である Exubera[®]は, 2006年1月に欧州と米国で相ついで製造承認を取得した. この製剤はマンニトール, グリシン, クエン酸ナトリウムを添加物として含む微粒子をブリストスターパックしたもので, 専用の吸入装置のチャンパー内に分散させた微粒子を吸入する.³⁾ Aradigm社と Novo Nordisk社が共同開発中の AERx[®]インスリン糖尿病管理システムでは, マイクロコンピュータで制御された特殊な携帯型ネブライザーでインスリン溶液を吸入する.

全身作用型あるいは局所作用型の高分子医薬吸入剤は今後も増えると考えられる. 以下では, 当研究室で行ったインスリンと遺伝子吸入剤の検討結果を紹介する.

2. 薬物吸収部位としての肺の特徴

肺胞を含めた肺の表面積は 100 m² 以上あり, 小腸の表面積に匹敵する.⁴⁾ 肺胞上皮はわずか 0.5—1.0 μm と薄い. 全身を流れる血流はすべて肺を通る. その結果, 平均的な肺血流速度は 5700 ml/min になり, この値は消化管の血流 (1125 ml/min) の 5 倍に相当する.⁵⁾ また, 吸入ステロイド薬として用いられているブデソニドやフルチカゾンの肺での代謝は低い, 消化管吸収時には大きな初回通過効果を受ける.⁶⁾ これらの知見は, 肺は広い表面積, 薄い上皮, 豊富な血流, 低い代謝酵素活性といった, 特に消化管からは吸収され難い高分子医薬の吸収部位としての利点を備えていることを意味する. ただし, たん白質の場合, 経口投与時ほどではないが代謝を受けることが知られている.^{7,8)} 他の特徴としては, ヒト成人の肺内液量が 10 ml 前後と少なく,⁹⁾ 難水溶性薬物の微粒子製剤からの薬物溶出性に影響を及ぼす可能性がある. 一方, 消化管内では部位による pH の変動が大きく弱酸性若しくは弱塩

基性薬物の解離状態が変動するが, 肺内 pH は 6.6 前後で一定していると考えられる.¹⁰⁾

低分子薬物の肺からの吸収は基本的に pH-分配仮説に従うが,^{11,12)} 水溶性の高分子も消化管に比べると吸収され易い. 例えば, 分子量 5000 を越える多糖類であるイヌリンは消化管からはほとんど吸収されないが, ラットの肺からは一次速度式に従い半減期約 225 分で吸収される. 分子量増加に伴い吸収速度は低下するものの, より高分子の多糖類も吸収される.¹³⁾ 松川らはラット肺胞上皮の初代培養細胞層からの種々のデキストランの透過速度を解析し, 分子半径 5 μm までは主に細胞間隙路を透過し, それ以上大きな分子はピノサイトーシスの寄与が大きくなると報告している.¹⁴⁾

薬物の肺内投与は多くの場合微細な液滴若しくは粉末を用いて行われる. 微粒子の粒子径は一般に難溶性薬物の溶解速度に大きく影響するが, 吸入剤の場合は呼吸器系内の微粒子分布に大きく影響する. 肺胞に微粒子を送達するためには空気力学径が 1—5 μm であることが望ましい.^{15,16)} これより大きいと気道に沈着し, また小さ過ぎると呼気とともに吐き出される. 空気力学径 (da) はその粒子の直径を比重 1 の球形粒子の直径に換算した値である. 粒子の比重を ρ とすると, 電子顕微鏡などで測定できる幾何学径 (dm) との間には次の理論式が成り立つ.

$$da = (\rho/F)^{0.5} dm \quad (1)$$

ここで, F は形状係数であり, 例えば球なら 1, 立方体なら 1.08 といった値を取る.¹⁷⁾

Eq. (1) から, 空気力学径が同じでも, 幾何学径が小さく密度が大きい粒子と, 幾何学径が大きく密度の小さい粒子が存在することが分かる. 微粒子の肺胞送達においては, 一般に大きくて軽い粒子, すなわち多孔性の微粒子が適している. 幾何学径が大きいことで粒子同士の付着凝集性が抑制でき, 分散性が向上する. また, 肺胞内にはマクロファージが存在し (健常人の肺洗浄液中の細胞の 93% がマクロファージである),¹⁸⁾ 外来性の異物を貪食するが, 幾何学径が 10 μm を越えると貪食され難くなる. このことから空気力学径が数 μm であっても, 多孔性微粒子であればマクロファージによる貪食を回避できる.¹⁹⁾ Edwards らは, インスリン含有微粒子を多孔性とするすることで, ラット肺内投与後の血糖

値降下作用が増強されることを示している。²⁰⁾

3. 吸収促進剤

消化管に比べ肺からの高分子吸収性は高いものの、低分子薬物ほどの速やかな吸収は期待できない。高分子医薬の肺からの吸収性あるいはバイオアベイラビリティ改善を目的とし、種々の添加物の吸収促進効果が検討されている。文献的には、胆汁酸、界面活性剤、脂肪酸、有機酸、酵素阻害剤などが検討され、一定の効果が認められている。²¹⁾しかし、その多くは溶液製剤からのペプチド吸収性改善を検討しており、実用的な微粒子製剤での吸収促進剤の検討例は少ない。当研究室では、有機酸であるクエン酸、界面活性剤である Span 85、酵素阻害剤バシトラシンが微粒子製剤をラット肺に投与した際のインスリン吸収性に及ぼす影響とその安全性を検討した。²²⁾

微粒子製剤はインスリンの 5.0 U/ml の溶液（クエン酸含有時）若しくは懸濁液（添加物なし、Span 85 若しくはバシトラシン含有時）を噴霧乾燥して調製した。出口温度が 120°C を越えるとインスリンが分解するという報告があるが、²³⁾ 今回の調製条件では出口温度を 70°C 以下に保っており、HPLC 分析ではインスリンの分解は認められなかった。Table 1 に調製した製剤の組成、回収率、液体クロマトグラフ法で定量したインスリン力値、カスケードインパクター法で測定した空気力学径を示した。クエン酸を添加した製剤は米粒状の形状であったが、それ以外の製剤は球形であった。インスリン力値の理論値は約 1.3 U/mg であり、クエン酸を添加した製剤ではほぼこの値となったが、他の製剤では低めの力値が得られた。クエン酸添加時の噴霧液中のインスリンは溶解しており、他の添加物と均一に混合した状態で微粒子化されていると考えられ

る。一方噴霧液に懸濁液を用いた場合、インスリン粒子が排気とともに排出された可能性がある。

微粒子製剤の投与方法とその薬理効果の評価法を Fig. 1 に示した。チップ内に一定量の微粒子製剤を量り取り、三方活栓を介して 1 ml のシリンジと接続した。三方活栓を閉じ、シリンジ内の空気を圧縮し、チップをラット気管に挿入したポリエチレンチューブと接続し、三方活栓を開く。圧縮空気の膨張力でチップ内の微粒子がラット肺内に分散投与される。²⁴⁾ 頸動脈カニューレから経時的に採血し、血糖値を測定した。血糖値降下率 (%) を投与したインスリン力値で除した値を ΔGlc と定義し、時間軸と ΔGlc 曲線で囲まれる面積 (AUC) の大きさで、血糖値降下度の大きさを評価した。安全性は肺上皮細胞から漏出する乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を指標とした。LDH は細胞質に存在する酵素で、細胞が障害を受けると細胞外に漏出する。微粒子による急性な肺障害性は微粒子投与 24 時間後に最大になるという報告がある。²⁵⁾ そこで、インスリン微粒

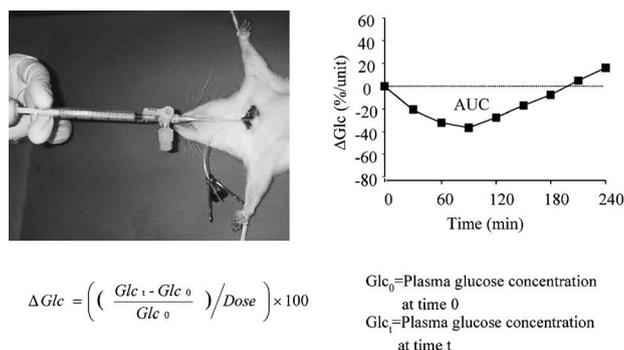


Fig. 1. Evaluation Method of Efficacy of Dry Insulin Powders in Rats

The powders taken in a disposable tip was dispersed in the rat trachea by releasing 1-ml air compressed in a syringe by opening a three-way stopcock connecting the tip and the syringe. The plasma glucose levels were determined with time and the area under the curve (AUC) was calculated.

Table 1. Formulation, Yield, Insulin Potency, and Aerodynamic Diameter of Dry Insulin Powders

Formulation code	Formulation (weight ratio) Mannitol : Insulin : Additive	Additive	Yield (%)	Insulin potency (U/mg)	Aerodynamic diameter (μm)
MI (susp.) SD	95 : 5 : 0 (suspension)	---	44.2	0.82	4.7
MIC 0.1 SD	93 : 5 : 2 (solution)	Citric acid	44.6	1.29	5.9
MIC 0.2 SD	91 : 5 : 4 (solution)	Citric acid	55.5	1.29	4.4
MIS 0.1	93 : 5 : 2 (suspension)	Span 85	46.7	0.51	---
MIS 1.0 SD	80 : 4 : 16 (suspension)	Span 85	12.4	0.35	4.3
MIB SD	75 : 4 : 21 (suspension)	Bacitracin	55.6	0.82	4.3

子製剤投与 24 時間後にリン酸緩衝液を用いて肺洗浄を行い、肺洗浄液中の LDH 活性を測定した。

血糖値効果作用の指標である AUC と安全性の指標である LDH 活性の関係を Fig. 2 に示した。インスリンのリン酸緩衝液溶液の肺内投与では、LDH 活性と AUC とともに低い値に抑えられた（ネガティブコントロール）。界面活性剤 Triton-X 100 生理食塩水溶液の肺内投与により洗浄液中の LDH 活性が上昇するという報告がある。²⁶⁾ ポジティブコントロールとして Triton-X 100 の 0.25% リン酸緩衝液溶液を用いてインスリンをラット肺内に投与したところ、肺洗浄液中 LDH 活性が著しく増加した。AUC 値も増加しているが、これは肺胞上皮に対する障害性の結果と考えられる。一方、インスリン微粒子製剤投与時の LDH 活性は Triton-X 100 溶液投与時に比べ低く抑えられた。特に MIC0.2 SD 投与時の LDH 活性はネガティブコントロール値と同程度に低く、かつ AUC 値は Triton-X 100 投与時に匹敵するほど増加した。また、肺障害時にはマクロファージなど肺洗浄液中の生細胞数が増加する。Triton-X 100 溶液投与時には生細胞数が増加したが、MIC0.2 SD 投与時の生細胞数はネガティブコントロールとほぼ同等であった。これらのことから、クエン酸は安全性が高くかつ微粒子製剤からのインスリン経肺吸収性改善に優れることが明らかとなった。

クエン酸がインスリンの血糖値降下作用を増強す

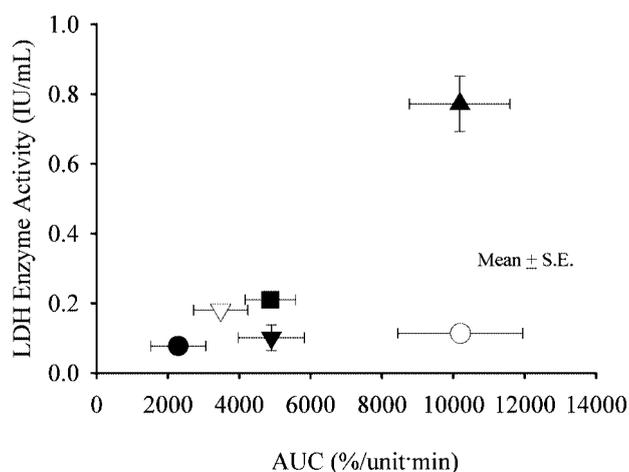


Fig. 2. Relationship between AUC of Δ Glc-time Curve and LDH Enzyme Activity in Bronchoalveolar Lavage in Rats

● : Insulin solution in phosphate-buffered saline at pH 7.4 (the negative control), ▲ : insulin solution in 0.25% Triton-X 100 solution (the positive control), ▼ : MI (susp.) SD, ○ : MIC0.2 SD, ▽ : MIS1.0 SD, and ■ : MIB SD.

る因子としては、肺局所における pH の低下が考えられる。インスリンは中性付近では通常 6 量体として存在し、分子量は 35000 前後になる。一方酸性条件下ではモノマーとして存在するため、²⁷⁾ 吸収に有利である。また、噴霧液中のインスリンが溶解していたことから、インスリン懸濁液から調製した他の製剤より微細なインスリン粒子が形成された可能性がある。さらに、肺局所 pH の低下による代謝酵素活性の低下、マクロファージの貪食能の低下など、生体側への影響も考えられる。吸収促進効果が肺粘膜障害性に起因することもあるが、²⁸⁾ クエン酸の場合、肺洗浄液中 LDH 活性の増加が認められなかったことから、その可能性は低い。

Span 85 によるインスリン経肺吸収促進効果²⁷⁾ 及び bacitracin によるインスリン、²⁸⁾ ウナギカルシトニン、²⁹⁾ サケカルシトニン³⁰⁾ の経肺吸収促進効果が報告されている。当研究室でもインスリン懸濁液での AUC に比べ、インスリン懸濁液に Span 85 を 1% 若しくは bacitracin を 10 mM 添加した際の AUC はともに 7 倍増加した。微粒子製剤でこれら添加物の効果が認められなかった原因には、高濃度の Span 85 ミセルとインスリンの相互作用や、代謝酵素の飽和（添加物を含まない微粒子製剤の AUC がリン酸緩衝懸濁液の AUC の 2.1 倍になった）などが推察される。

4. 安定性の改善

一般に低分子薬物の安定性は非晶質体より結晶体が優れるが、たん白質では、結晶化度の低下により安定性が改善される場合がある。³¹⁾ インスリンについても、温度 25°C 及び 40°C、相対湿度 0 から 75% での安定性試験で、結晶体よりも非晶質体の方が安定であることが報告されている。³²⁾ また、非晶質の糖を添加することで、微粒子製剤中のたん白質の安定性が報告されるという報告がいくつかある。³³⁾ 例えば、L-乳酸脱水素酵素、 β -ガラクトシダーゼ、L-アスパラギナーゼを凍結乾燥する際にマンニトールを添加すると安定性が改善されるが、その程度はマンニトールの結晶化度が低いほど大きい。³⁴⁾

Figure 3 に調製した微粒子製剤及び原料粉末の X 線回折パターンを示した。³⁵⁾ 今回われわれが用いたインスリン原末の結晶性は低く、噴霧乾燥による結晶化度の低下はほとんどないと考えられた。また MI (susp.) SD 及び MIC0.2 SD には強い回折パ

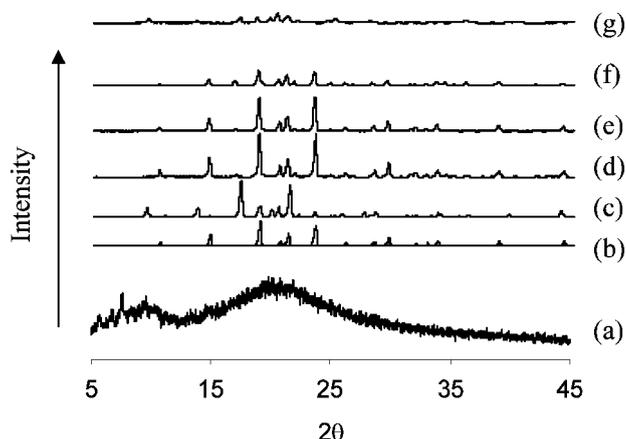


Fig. 3. Powder X-ray Diffraction Pattern

(a) Insulin bulk drug, (b) mannitol (α form), (c) mannitol (β form), (d) mannitol/insulin physical mixture, (e) mannitol/insulin/citric acid physical mixture, (f) MI (susp.) SD, and (g) MIC0.2 SD.

ターンが認められた。MI (susp.) SD のパターンは α 型マンニトール、MIC0.2 SD のパターンは β 型のマンニトールの回折パターンと一致した。微粒子調製に用いたマンニトールは α 型であったことから、MIC0.2 SD では噴霧乾燥過程でマンニトールの結晶転移がおこったと考えられる。

これらの微粒子製剤を温度 60°C 、相対湿度 0 から 75% 下に保存し、インスリン力値を HPLC 法により経時的に測定した。1 次反応速度定数より算出された半減期を Fig. 4 に示した。MI (susp.) SD の半減期はインスリン原末とほぼ同等であった。これは、インスリン原末自体が非晶質体であり、噴霧乾燥時の非晶質化度増加による安定性改善効果がほとんど得られなかったこと、及びマンニトールを添加したもののその結晶化度が高く、十分な安定化効果が得られなかったためと考えられる。また、前章で肺内投与時の血糖値降下度が強くかつ肺局所刺激性が小さいことが示された MIC0.2 SD では、著しく安定性が低下することが明らかとなった。乾燥条件下で $40, 50, 60^{\circ}\text{C}$ での一次分解速度定数を求めて作成したアレニウスプロット (相関係数 = 0.99) から MIC0.2 SD の 25°C での安定性を推定したところ、150 日でインスリン力値が 10% 以上低下するという結果が得られ、安定性の改善が必要であることが示唆された。また、電気泳動では、 60°C で保存した MIC0.2 SD 中にインスリンの凝集物が増加していることが確認された。

インスリン溶液は酸性若しくは塩基性条件下で不

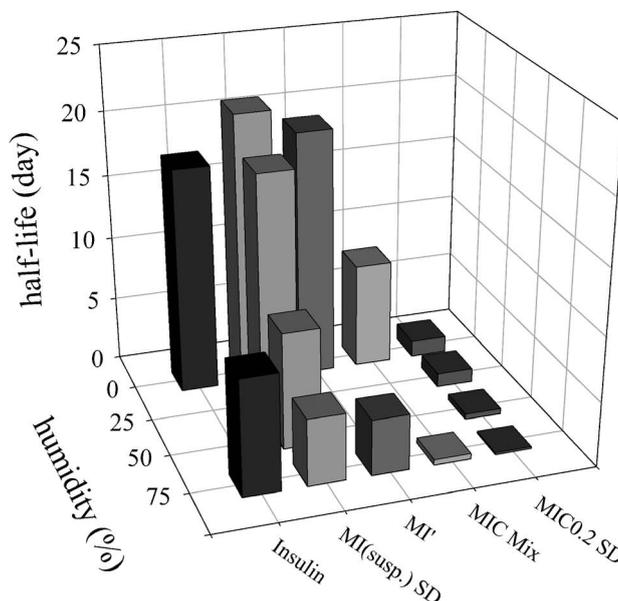


Fig. 4. Stability of Insulin Bulk Drug and Dry Insulin Powders at 60°C

The stability samples were assayed at 0, 1, 2, 3, 5, and 10 days after placing them in a stability chamber at 60°C /dry or 25, 50, and 75% relative humidity.

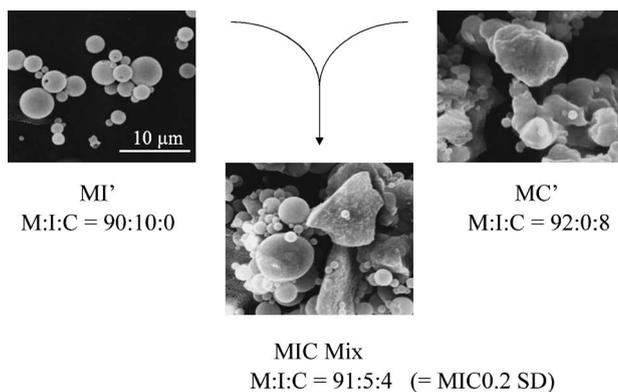


Fig. 5. Strategy to Improve Stability of Insulin Formulated with Citric Acid

安定になることが報告されている。³⁶⁾ 微粒子製剤中でもクエン酸がインスリンの安定性低下の原因であることが推察できる。安定性と有効性に優れたインスリン微粒子製剤を開発する目的で、Fig. 5 に示す方法で混合微粒子製剤を調製した。マンニトールとインスリン (重量比 90 : 10) からなる微粒子 MI' とマンニトールとクエン酸 (同 92 : 8) からなる微粒子 MC' をそれぞれ噴霧乾燥法で調製した。MIC0.2 SD 調製時には、噴霧液中でインスリンは溶解していたが、MI' 調製時にはインスリンを懸濁状態で噴霧乾燥した。得られた MI' と MC' を等重

量混合することで、マンニトール：インスリン：クエン酸=91：5：4からなる MIC Mix を調製した。この混合比は前章で優れた安全性と血糖値降下作用を示した MIC0.2 SD と同じである。実際、MIC Mix をラット肺内投与したのちの血糖値時間推移は、MIC0.2 SD 投与後のそれと同等であった (Fig. 6)。

調製した製剤中のインスリンの安定性を 60°C で測定した (Fig. 4)。シリカゲル乾燥条件下での MIC Mix の半減期は 8.5 ± 1.8 日 (平均 \pm S.D.) で、MI (susp.) SD に比べると半分以下であった。また、MI の半減期は MI (susp.) SD とほぼ同等であったことから、MIC Mix 中では、MC' 中のクエン酸が MI' 中のインスリンの安定性に影響したものと考えられる。一方、クエン酸を含有する MIC0.2 SD の半減期 1.3 ± 0.3 日と比較すると MIC Mix の半減期は 6.5 倍に延長した。したがって、インスリンとクエン酸を別々の粒子として微粒子化して混合製剤とする方法は、優れた血糖値降下作用を失うことなくインスリンの保存安定性を改善できる簡便かつ有効な手法であると言える。

安定性上の問題点としては、加湿条件下 (相対湿度 75%) での安定性が低いことが挙げられる。これは MIC Mix に限ったことではなく、クエン酸を含まない MI (susp.) SD や MI' でも観察されている (Fig. 4)。

5. 超臨界二酸化炭素晶析法

前章までの検討では、噴霧乾燥法によりインスリン微粒子製剤を調製した。噴霧乾燥法は微粒子調製

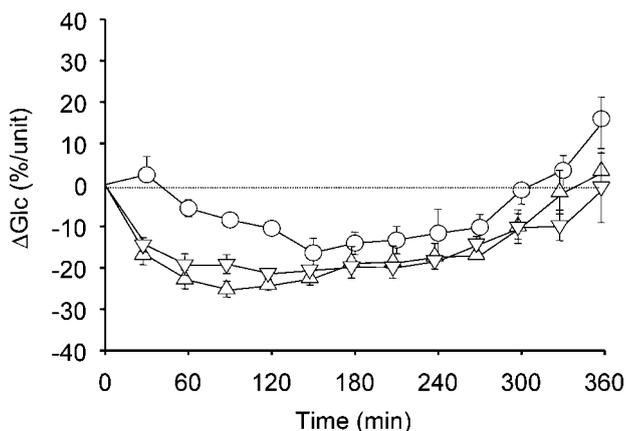


Fig. 6. Profile of the Plasma Glucose Level Following Intratracheal Administration of Dry Insulin Powders in Rat
Each point represents the mean \pm S.E. ○ : MI (susp.) SD, △ : MIC SD, and ▽ : MIC Mix.

法として多用されているが、調製スケールが小さいと回収率が低く、また、短時間ではあるが原料が高温状態になり、たん白質が分解することがある。^{37,38)} たん白質や遺伝子などの高分子医薬では、経済面あるいは安定性の面で望ましくない。近年、微粒子調製法として、超臨界流体を用いた晶析法が注目されている。そこで本章では、超臨界二酸化炭素中でインスリン微粒子を調製し、その有効性を検討した。

物質は、温度・圧力条件により、固体、液体、気体のいずれかの状態で存在するが、ある温度 (臨界温度) 以上では、気体をいくら圧縮しても液体とならなくなる。この臨界温度と臨界圧力を超えた領域の物質を超臨界流体と呼ぶ (Fig. 7)。超臨界流体の密度は液体に近く、気体に比べて特に親油性物質に対する溶解能が高く、また粘度は気体と同程度に低く、液体中に比べて物質移動が速やかに起こる。特に二酸化炭素は臨界圧力 7.38 MPa、臨界温度 31°C と扱い易い圧力、温度領域に臨界点を持ち、不燃性で、また、溶媒として扱う場合、常温、常圧で気体になるので分離操作が簡単であるといったメリットがあるため、抽出溶媒として、有機合成反応や分離操作に用いられている。³⁹⁾

超臨界流体を用いた微粒子調製法は、超臨界流体を薬物に対する良溶媒として用いる方法と貧溶媒として用いる方法に大別される。⁴⁰⁾ 超臨界流体が薬物の良溶媒である場合、高圧下で超臨界流体に薬物を溶解後、減圧することで薬物を微粒子化できる。この原理に基づいた方法に、RESS (rapid expansion

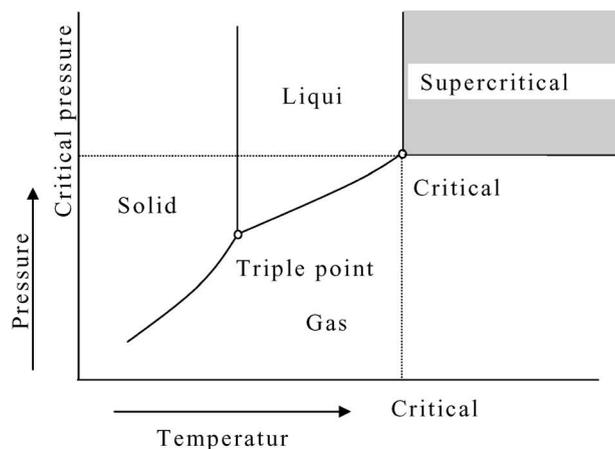


Fig. 7. Phase Diagram of a Pure Substance

of supercritical solution) 法及び PGSS (particles from gas saturated solutions) 法がある。一方、超臨界流体が薬物の貧溶媒である場合、薬物を良溶媒に溶解した溶液に、貧溶媒として超臨界流体を加えて溶解度を低下させ、薬物を析出させることができる。この方法は GAS (gas anti-solvent) 法と呼ばれる。逆に、超臨界二酸化炭素中に薬物溶液を噴霧する方法に、ASES (aerosol solvent extraction system) 法、SAS (supercritical fluid antisolvent) 法、PCA (precipitation with compressed antisolvents) 法、SEDS (solution enhanced dispersion by supercritical fluids) 法がある。

Figure 8 に今回用いた超臨界二酸化炭素晶析装置の概略を示した (温度 35°C, 圧力 12–15 MPa)。MIC0.2 SD と同組成の微粒子製剤 (MIC SCF) 調製では、マンニトール/インスリン/クエン酸の混合水溶液を V-字型ノズルの一端から流し (0.035 ml/min), 他端から二酸化炭素 (5.7 g/ml) とエタノール (0.665 ml/min) の混合流体を流した。水は超臨界二酸化炭素と混合しないが、エタノールを補助溶媒として用いることで均一な 3 成分系ができる。その結果、溶質の溶解度が低下し、MIC SCF が得られた。二酸化炭素のみをカラム内に流して残留している水とエタノールを除去後、抜圧することで微粒子が回収できた。試料溶液 2 ml を用いた際の回収率は 83% で、試料溶液 100 ml を用いて噴霧乾燥した際の回収率 56% を大きく上回った。また、MI (susp.) SD と同組成の微粒子製剤 (MI SCF) 調製時には、ジメチルスルフォキシド (DMSO) にマンニトールとインスリンを溶解し、エタノールは用いずに二酸化炭素中に分散させた。この系では、V-字型ノズルの先端が詰まり易かったので、2 本のノズルを並行に並べて調製を行った。回収率は

89% に達した。⁴¹⁾

超臨界二酸化炭素晶析法及び噴霧乾燥法により調製した製剤の *in vitro* 吸入特性をカスケードインパクターにより検討した。⁴²⁾ 空気力学的粒子径は超臨界二酸化炭素晶析法及び噴霧乾燥法により調製した製剤とも肺適用製剤として有用な 7 μm 以下となった (Table 2)。また、MIC SCF においては、他の製剤と比較して肺深部に相当する Stage 2 以降への到達率が増大し、空気力学的粒子径は 3.2 μm となった。しかしながら MI SCF は、空気力学的粒子径は 7 μm 以下となったものの、噴霧乾燥製剤及び MIC SCF と比較して気道に相当する Stage 0, 1 への到達量が多くなった。

MI (susp.) SD を肺内投与した際の血糖値降下作用には 30 分の time lag がみられ、ゆっくりとした血糖値降下作用がみられた (Fig. 6)。一方、MI SCF では肺内投与後速やかな血糖値降下作用がみられ、MI SCF 肺内投与後の血糖値は、MI (susp.)

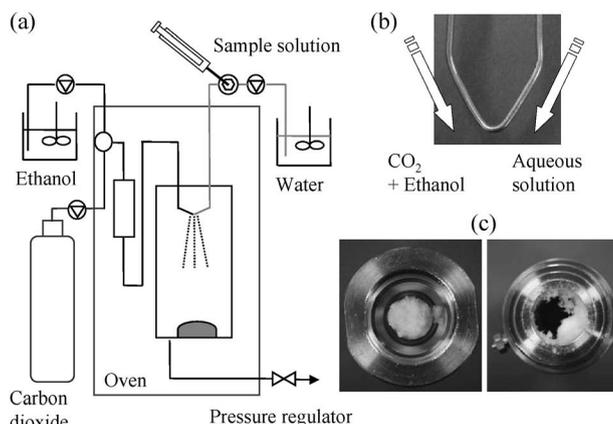


Fig. 8. Precipitation of Insulin Dry Powders in Supercritical Carbon Dioxide

(a) Schematic diagram of precipitation apparatus, (b) V-shape nozzle, and (c) product on the bottom filter (left) and column wall (right).

Table 2. *In vitro* and *In vivo* Evaluation of Dry Insulin Powders (Mean \pm S.E.)

Formulation code	Aerodynamic diameter ^{a)} (μm)	Output efficiency ^{a,b)} (%)	Respirable fraction ^{a,c)} (%)	AUC ₀₋₃₆₀ $\times 10^{-3}$ (%/unit \times min)	Insulin potency ^{c)} (unit/mg)
MI SCF	6.4 \pm 0.1	71.8 \pm 1.4	26.6 \pm 0.7	4.5 \pm 0.2	1.3
MIC SCF	3.2 \pm 0.1	77.8 \pm 0.6	47.6 \pm 2.1	6.6 \pm 0.4	1.3
MI (susp.) SD	4.7 \pm 0.1	87.4 \pm 0.6	30.6 \pm 4.0	2.9 \pm 0.7	0.82
MIC 0.2 SD	4.4 \pm 0.1	82.2 \pm 0.5	30.0 \pm 0.8	6.0 \pm 0.5	1.3

^{a)} Aerodynamic diameter, output efficiency, and respirable fraction were determined with Andersen Cascade Impactor. ^{b)} Percent of total powder mass exiting from capsule and device. ^{c)} Percent of the drug mass on the respirable fraction (under 7.0 μm) of the impactor divided by emitted dose.

SD 投与時と比較して製剤投与 30, 60, 90, 120 分後
で有意に低い値を示した。MI SCF 肺内投与 360 分
までの AUC は、MI (susp.) SD と比較して 1.5 倍
高くなった (Table 2)。また、MIC SCF 及び MIC
SD では、製剤中に含有されるクエン酸の効果によ
り MI (susp.) SD よりも速やかな血糖値低下作用が
みられた。MIC SCF と MIC SD の経肺投与後の
 Δ Glc- 時間曲線はほぼ一致し、AUC 値もほぼ同様
な値を示した。

MI (susp.) SD はインスリンの水懸濁液から、MI
SCF はインスリンの DMSO 溶液から調製された。
そこで、微粒子製剤調製時の試料液中インスリン溶
解状態が得られた微粒子からの吸収性に及ぼす影響
について検討した。インスリンを塩酸に溶解後水酸化
ナトリウムで中和すると水溶液が得られる。この
溶液を噴霧乾燥することで MI SD 製剤を調製し、
ラット肺内投与後の血糖値低下作用について検討し
た。しかし、MI SCF 製剤は MI SD 製剤より高い
吸収性を示したことから、超臨界二酸化炭素晶析製
剤が噴霧乾燥製剤より血糖値降下作用が強いことが
確認できた。

6. 遺伝子吸入剤

遺伝子を適切なベクターとともに静脈内投与する
と、肺で発現することが報告されている。しかし肺
での遺伝子発現は比較的短時間で低下し、時間とと
もに肝臓での発現が増加する。さらに、血液中での
遺伝子の安定性は低い。⁴³⁾ 鼻腔から肺胞にいたる呼
吸器系には吸入により薬物を送達することができる
ので、肺疾患の遺伝子治療では、遺伝子を吸入剤化
することで、肺局所に効率よく遺伝子を送達でき
ると期待できる。遺伝子溶液をネブライザーで吸入
する方法が検討されているが、液滴の微細化の過程
で遺伝子が分解することが報告されている。^{44,45)} ま
た、溶液製剤中での遺伝子の安定性も低く、^{46,47)} 長
期間の保存には不向きである。したがって、遺伝子
を吸入用微粒子製剤化することで、肺局所疾患の遺
伝子治療の有用性が飛躍的に高まると考えられる。

超臨界二酸化炭素晶析法による遺伝子微粒子調製
は 2001 年に始めて報告された。⁴⁸⁾ 6.9 kb のプラス
ミド遺伝子に賦形剤としてマンニトールを加えた水
溶液を、イソプロパノールをコソルベントに用いて
二酸化炭素中に噴霧し微粒子化した。しかし、得ら
れた微粒子中のプラスミド遺伝子のほとんどが分解

し、スーパーコイル型 DNA は 7% しか残らなかつ
た。超臨界二酸化炭素と水が接触すると炭酸が生
じ、水の pH が 3 以下に低下する。⁴⁹⁾ 緩衝成分を添
加することで、pH 低下を抑えることが可能であ
る。⁵⁰⁾ 遺伝子は酸性条件下で不安定であるので、酢
酸ナトリウムを添加して調製過程の pH 低下を抑制
したところ、得られた微粒子中の遺伝子の 80% が
スーパーコイル型で存在していた。

遺伝子溶液の肺内投与により肺組織内で遺伝子が
発現することは報告されているが、⁵¹⁻⁵³⁾ 遺伝子微
粒子製剤の *in vivo* での有効性を報告した例はほと
んどない。ルシフェラーゼをコードするプラスミド
遺伝子 pCMV-Luc とトレハロースを 1:9 で混合し
た噴霧乾燥微粒子により、pCMV-Luc を 200 μ g ラ
ット肺内に投与した例では発現は認められていな
い。⁵⁴⁾ そこで、Fig. 8 に示した装置で超臨界二酸化
炭素晶析法により遺伝子微粒子製剤を調製し、マウ
ス肺内投与後の遺伝子発現を検討した。⁵⁵⁾

装置の操作条件はインスリン製剤調製時と同じで
ある。調製溶液の組成は、マンニトール 60 mg に
対し pCMV-Luc を 0.12 mg とした (DP0 とする)。
また、カチオン性ベクターとして有用性が報告され
ているキトサン^{56,57)} を 0.14, 0.28, 若しくは 0.57
mg 添加した製剤 (DP2.5, DP5, DP10 とする) を
調製した。これらの製剤中の遺伝子由来のリンとキ
トサン由来の窒素のモル比 (N/P 比) はそれぞれ
2.5, 5, 10 である。

得られた粒子は、MI SCF 製剤に類似した長方形
であり、レーザー散乱法で測定した平均粒子径は
12-13 μ m であった。調製直後の微粒子製剤中のプ
ラスミド DNA の安定性を電気泳動法で確認した
(Fig. 9)。DNA は分解の過程で、スーパーコイル
型からオープンサーキュラ型へ、ついでリニア型へ
と変化し、⁴⁶⁾ さらに分解が進むと断片化して電気泳
動で特定のバンドが認められなくなる。キトサンを
含まない DP0 では、スーパーコイル型 DNA がほ
とんど残存せず、遺伝子の分解が確認された。キ
トサンの添加割合の増加に伴いスーパーコイル型
DNA のバンドが強く現れることが確認できた。キ
トサンは $pK_b=7.7$ の弱塩基性物質である。⁵⁷⁾ した
がって、酢酸ナトリウムと同様、超臨界二酸化炭素
と接触した水溶液の pH 低下を防ぎ、遺伝子の分解
を抑制すると考えられる。また、遺伝子とキトサン

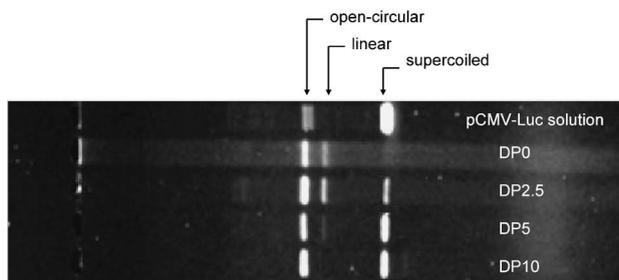


Fig. 9. Integrity of pCMV-Luc in Powders Just after the Preparation

The solution of pCMV-Luc powders containing 0.06 mg of pCMV-Luc was loaded on a 0.6% agarose gel containing ethidium-bromide. Electrophoresis was carried out with a current of 100 V for 2 h in TAE running buffer.

が複合体を形成することで物理的あるいは化学的な分解を抑制する可能性も考えられる。

得られた遺伝子微粒子をマウス肺内に投与し (pCLV-Lucとして $3 \mu\text{g}$), 9時間後の肺組織中ルシフェラーゼ活性を測定したところ, DP5 で最も活性が高くなり, pCMV-Luc $3 \mu\text{g}$ の水溶液をマウス肺内に投与したときの 27 倍の活性を示した。また, DP5 肺内投与後のルシフェラーゼ活性の経時変化をキトサンの代わりに酢酸ナトリウムを添加した製剤 (DPSA) と比較したところ, DP5 の発現が有意に高く (Fig. 10) キトサンのベクターとしての有用性が示された。

DP0 及び DP5 を 40°C で 4 週間まで保存し, 遺伝子の安定性を電気泳動法により調べ, キトサンを含まない遺伝子溶液 ($60 \mu\text{g}/\text{ml}$, SL0) とキトサンを $\text{N/P}=5$ で含む遺伝子溶液 (SL5) の安定性と比較した (Fig. 11)。SL0 では 1 週間後, SL5 では 3 週間後に, DNA はほぼ完全に分解した。一方, DP0 及び DP5 では, スーパーコイル型 DNA が 4 週間後でも確認でき, 遺伝子を微粒子製剤化することで溶液に比べ安定性が改善できることが示された。またキトサンを加えることにより安定性をさらに改善できることが分かった。リニア型 DNA の発現能は低いが, オープンサーキュラ型 DNA の発現能はスーパーコイル型とほぼ同等であることから,^{58,59)} DP5 の遺伝子発現能は高く維持されていると考えられる。そこで, 4 週間保存後の製剤をマウス肺内に投与し, 遺伝子発現能を調べた。 25°C 若しくは 40°C で保存した SL0 及び SL5 では, キトサン添加の有無に係わらずほとんどルシフェラーゼは発現しなかった。一方, DP0 及び DP5 では, 40°C

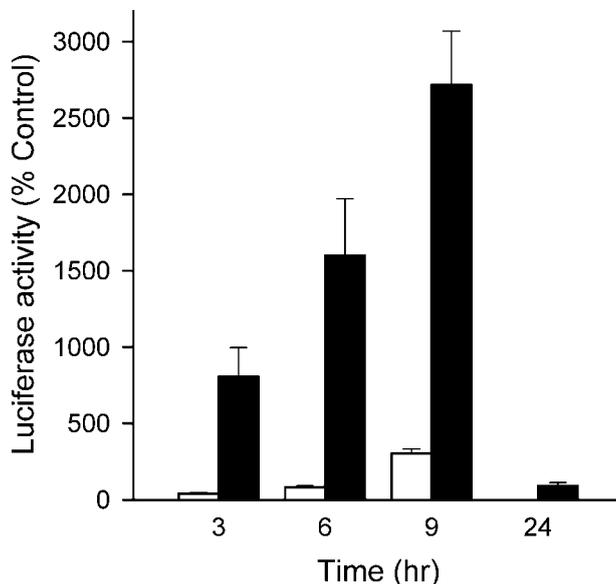


Fig. 10. Luciferase Activity after the Pulmonary Administration of pCMV-Luc Powders with Time

□ : DPSA and ■ : DP5. The error bars indicate S.E for 3 to 8 experiments. The 24 hr data for DPSA are not available.

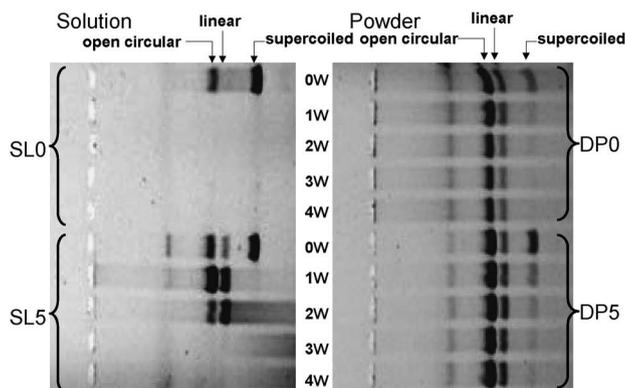


Fig. 11. Integrity of pCMV-Luc in Powders Placed on Stability Study at 40°C

で 4 週間保存した後も高いルシフェラーゼ活性を示した。特にキトサンを添加した DP5 の遺伝子発現能が高く, 保存安定性に優れた遺伝子製剤であることが示された。

7. おわりに

肺は消化管から吸収が困難な高分子医薬の吸収部位として有利な性質を備えている。しかし, 呼吸という生命維持にとって重要な器官であるだけに, 肺への薬物投与はその有用性と安全性を十分検証した上でなされるべきである。特に全身作用薬を投与する場合, 肺以外のルートと比較して十分な有用性が認められない限り, 臨床現場には受け入れられない

であろう。このような理由から、これまでに全身作用を目的とした吸入剤は製品化されてこなかったと考えられる。しかし、2006年に欧米で相ついで吸入型インスリン製剤の製造許可がおりたことは、新たな吸入剤の展開への扉を開いたといえる。また、肺局所疾患の治療においては、吸入剤の有用性は明らかである。当研究室の検討で、インターフェロン β をコードする遺伝子製剤の吸入により、肺転移が効果が抑制される結果も得られている。今後、吸入器の開発も含め、ますます高分子医薬による吸入療法が進展することを期待したい。

謝辞 本研究を遂行するに当たり、ご指導ご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科橋田 充先生、高倉喜信先生、名城大学薬学部金田典雄先生、村田富保先生に感謝申し上げます。また、本研究の一部は文部科学省科学研究費のご援助を賜りました。ここに敬礼申し上げます。

REFERENCES

- Chan H. K., Clark A., Gonda I., Mumenthaler M., Hsu C., *Pharm. Res.*, **14**, 431-437 (1997).
- Okamoto H., *Yakkyoku*, **56**, 2443-2449 (2005).
- Morishita M., *Yakuzaigaku*, **64**, 358-363 (2004).
- Suarez S., Hickey A. J., *Respir. Care*, **45**, 652-666 (2000).
- Benowitz N., Forsyth R. P., Melmon K. L., Rowland M., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**, 87-98 (1974).
- Lipworth B. J., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 697-705 (1996).
- Shen Z., Zhang Q., Wei S., Nagai T., *Int. J. Pharm.*, **192**, 115-121 (1999).
- Hsu M. C. P., Bai J. P. F., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 507-514 (1998).
- Vanbever R., Mintzes J. D., Wang J., Nice J., Chen D. H., Batycky R., Langer R., Edwards D. A., *Pharm. Res.*, **16**, 1735-1742 (1999).
- Schanker L. S., Less M. J., *Drug Metab. Dispos.*, **5**, 174-178 (1977).
- Enna S. J., Schanker L. S., *Am. J. Physiol.*, **223**, 1227-1231 (1972).
- Lanman R. C., Gillilan R. M., Schanker L. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 105-111 (1973).
- Enna S. J., Schanker L. S., *Am. J. Physiol.*, **222**, 409-414 (1972).
- Matsukawa Y., Lee V. H. L., Crandall E. D., Kim K. J., *Pharm. Res.*, **14**, 541-545 (1997).
- Kanig L. J., *J. Pharm. Sci.*, **52**, 513-535 (1963).
- Bosquillon C., Lombry C., Preat V., Vanbever R., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 2032-2041 (2001).
- Crowder T. M., Rosati J. A., Schroeter J. D., Hickey A. J., Martonen T. B., *Pharm. Res.*, **19**, 239-245 (2002).
- Hunninghake G. W., Gadek J. E., Kawanami O., Ferrans V. J., Crystal R. G., *Am. J. Pathol.*, **97**, 149-206 (1979).
- Snipes M. B., Clem M. F., *Environ. Res.*, **24**, 33-41 (1981).
- Edwards D. A., Hanes J., Caponetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew M. L., Mintzes J., Deaver D., Lotan N., Langer R., *Science*, **276**, 1868-1871 (1997).
- Okamoto H., *Drug Deliv. Syst.*, **20**, 443-451 (2005).
- Todo H., Okamoto H., Iida K., Danjo K., *Int. J. Pharm.*, **220**, 101-110 (2001).
- Stahl K., Claesson M., Lilliehorn P., Linden H., Backstrom K., *Int. J. Pharm.*, **233**, 227-237 (2002).
- Okamoto H., Aoki M., Danjo K., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1028-1035 (2000).
- Moore S. R., Black A., Evans J. C., Evans N., Holmes A., Morgan A., *Environ. Res.*, **24**, 275-285 (1981).
- Henderson R. F., Damon E. G., Henderson T. R., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **44**, 291-297 (1978).
- Okumura K., Iwakawa S., Yoshida T., Seki T., Komada F., *Int. J. Pharm.*, **88**, 63-73 (1992).
- Yamamoto A., Umemori S., Muranishi S., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 14-18 (1993).
- Morita T., Yamamoto A., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H., *Pharm. Res.*, **11**, 909-913 (1994).
- Kobayashi S., Kondo S., Juni K., *Pharm. Res.*, **11**, 1239-1243 (1994).
- Lai M. C., Topp E. M., *J. Pharm. Sci.*, **88**,

- 489–500 (1999).
- 32) Pikal M. J., Riggsbee D. R., *Pharm. Res.*, **14**, 1379–1387 (1997).
- 33) Imamura K., Iwai M., Ogawa T., Sakiyama T., Nakanishi K., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1955–1963 (2001).
- 34) Izutsu K., Yoshioka S., Terao T., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 5–8 (1994).
- 35) Todo H., Okamoto H., Iida K., Danjo K., *Int. J. Pharm.*, **271**, 41–52 (2004).
- 36) Brange J., *Pharm. Res.*, **9**, 715–726 (1992).
- 37) Broadhead J., Rouan S. K., Rhodes C. T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 458–467 (1994).
- 38) Mumenthaler M., Hsu C. C., Pearlman R., *Pharm. Res.*, **11**, 12–20 (1994).
- 39) Mishima K., *Pharm. Tech. Jpn.*, **16**, 365–373 (2000).
- 40) Okamoto H., *J. Soc., Powder Technol., Jpn.*, **43**, 426–433 (2006).
- 41) Todo H., Okamoto H., Iida K., Danjo K., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2475–2486 (2003).
- 42) “The United States Pharmacopeia 29/The National Formulary 24,” United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2006, pp. 2617–2636.
- 43) Niven R., Pearlman R., Wedeking T., Mackeigan J., Noker P., Simpson-Herren L., Smith J. G., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1292–1299 (1998).
- 44) Birchall J. C., Kellaway I. W., Gumbleton M., *Int. J. Pharm.*, **197**, 221–231 (2000).
- 45) Eastman S. J., Tousignant J. D., Lukason M. J., Murray H., Siegel C. S., Constantino P., Harris D. J., Cheng S. H., Scheule R. K., *Hum. Gene Ther.*, **8**, 313–322 (1997).
- 46) Cherg J. Y., Talsma H., Crommelin D. J. A., Hennink W. E., *Pharm. Res.*, **16**, 1417–1423 (1999).
- 47) Li B., Li S., Tan Y. D., Stolz D. B., Watkins S. C., Block L. H., Huang L., *J. Pharm. Sci.*, **89**, 355–364 (2000).
- 48) Tservistas M., Levy M. S., Lo-Yim M. Y., O’Kennedy R. D., York P., Humphrey G. O., Hoare M., *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 12–18 (2001).
- 49) Toews K. L., Shroll R. M., Wai C. M., Smart N. G., *Anal. Chem.*, **67**, 4040–4043 (1995).
- 50) Sellers S. P., Clark G. S., Sievers R. E., Carpenter J. F., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 785–797 (2001).
- 51) Weiss D. J., Strandjord T. P., Liggitt D., Clark J. G., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2287–2293 (1999).
- 52) Brown A. R., Chowdhury S. I., *J. Aerosol Med.*, **10**, 129–146 (1997).
- 53) Stribling R., Brunette E., Liggitt D., Gaensler K., Debs R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 11277–11281 (1992).
- 54) Freeman D. J., Niven R. W., *Pharm. Res.*, **13**, 202–209 (1996).
- 55) Okamoto H., Nishida S., Todo H., Sakakura Y., Iida K., Danjo K., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 371–380 (2003).
- 56) Richardson S. C., Kolbe H. V., Duncan R., *Int. J. Pharm.*, **17**, 231–243 (1999).
- 57) Lee K. Y., Kwon I. C., Kim Y. H., Jo W. H., Jeong S. Y., *J. Control. Release*, **51**, 213–220 (1998).
- 58) Kimoto H., Taketo A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 325–330 (1996).
- 59) Adami R. C., Collard W. T., Gupta S. A., Kwok K. Y., Bonadio J., Rice K. G., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 678–683 (1998).