

別紙4

平成13年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

骨粗しょう症治療用カルシトニン経口製剤の開発

主任研究者 高田寛治 京都薬科大学薬物動態学教室教授

研究要旨

高齢化社会の到来とともに女性高齢者に特有の骨粗しょう症が増え、骨粗しょう症治療薬を用いた慢性的・予防的治療を行う必要性が医療上・医療経済上の深刻な問題となることが予測されている。従来の骨粗しょう症の予防や治療には、①ホルモン補充療法（HRT）②選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERMs）③ビスフォスフォネート、アレンドロネート、リゼドロネート、④カルシトニン、⑤カルシウム及びビタミンDの補充などの薬物療法が用いられている。特にカルシトニンの有効性は広く認められている。カルシトニンは蛋白質製剤であることから注射剤として投与されている。しかし、患者のQuality of Life（QOL）の改善や医療コストの削減のためには経口薬の開発が求められる。我々は蛋白質医薬品の経口製剤化を目的として、経口腸溶性発泡デリバリーシステム、大腸内圧崩壊型大腸デリバリーカプセル、消化管粘膜付着性貼付システム（GI-MAPS）について研究してきており、幾つかの製剤処方消化管粘膜付着性貼付システムに組み込むことにより実用性の高いシステムが得られることを把握している。本研究の目的は、我々のこれまでの知見を基に、骨粗しょう症治療用カルシトニン経口製剤を実用化するための基礎的知見を得ることである。カルシトニンを安定化するための添加剤と吸収性を高めるための吸収促進剤を生体酵素系標品や生体膜粗標品などを用いるin vitro実験系やラットへの経口投与によるin vivoの血中濃度の評価系を用いて評価を行った。その結果、プロテアーゼ阻害剤および界面活性剤などの組み合わせが有効であることを認め、カルシトニンとのモデル添加配合処方を決めた。消化管粘膜付着性貼付システムへこの配合処方を適用して、実際に調製し、安定性、消化管粘膜付着性および吸収性を評価したところ、実用性の可能性のあることを認めた。

分担研究者

芝田信人 京都薬科大学薬物動態学教室助教授
吉川由佳子 京都薬科大学薬物動態学教室助教授
喜里山暁子 京都薬科大学薬物動態学教室博士
研究員

Rama Prasad 京都薬科大学薬物動態学教室博士
研究員

A. 研究目的

高齢の骨粗しょう症患者の生活の質（QOL）を考えると、今後、カルシトニンの経口製剤の開発が期待される。しかし、カルシトニンの経口剤実現のためには、経口投与後、消化管内での消化酵素による加水分解を抑制し、かつ高分子であるための低い吸収膜透過性を改善することが必要となる。我々は、これまでに蛋白質の経口製剤化を目的に、①経口腸溶性発泡デリバリーシステム、②大腸内圧崩壊型大腸デリバリーカプセル、③消化管粘膜付着性貼付システム（Gastrointestinal Mucoadhesive Patch System；GI-MAPS）の3技術を検討してきたが、特に消化管粘膜付着性貼付システム（GI-MAPS）が最も実用化に近いことを把握していた。そこで本研究においてはこの消化管粘膜付着性貼付システムを骨粗しょう症の特効薬のカルシトニンに応用することにより、高齢者の骨粗しょう症の予防的治療に役立つ新規の経口製剤の開発の可能性を検討する。

B. 実験方法

1. カルシトニンの安定化剤の検討

サケカルシトニン（SCT）の消化管内における安定性を、デスマプレシン（DDAVP）、インスリンなどのペプチド・蛋白質薬物と比較するために、小腸上部の粘膜酵素標品（ラット小腸上部粘膜ホモジネート上清；0.5mg/ml 蛋白濃度）と小腸内容物中の胆汁酵素標品（ラット小腸内容物洗液上清；0.005mg/ml 蛋白濃度）を用いて、in vitro（pH7.4, 温度 37℃）でインキュベーションを行い、それぞれの分解の半減期 $t_{1/2}$ （min）値を求めて評価した。カルシトニン自体の安定性に加えて、安定化剤としてのヒト血清アルブミン（HAS）、ゼラチン、グリココール酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウム、アプロチニン、大豆トリプシン阻害剤 STI、ロイペプチン、ベスタチンを1%の濃度で添加したときの加水分解阻害効果を in vitro の条件で同様に評価して、消化管における安定化剤について検討した。

2. カルシトニンの吸収促進剤の検討

消化管からのカルシトニンの吸収に対する吸収促進剤の効果については、カルシトニン（0.25mg）と吸収促進剤（5%濃度）を含む20 μ lの薬液を空腸内に直接注入投与するか、4号ゼラチンカプセルのキャップ部の内側に水不溶性のエチルセルロース膜を形成後、カルシトニン（0.1mg）と吸収促進剤（5%濃度）を含む薬液5 μ lを内部に注入し、付着剤としてカーボポールを用いて切開したラット空腸に貼付（空

腸内デバイス投与)することにより投与し、その後の濃度を指標として吸収改善性を評価した。吸収促進剤としては、界面活性剤の TritonX-100 と SH 化合物 (S-メチルシステイン、S-エチルシステイン、S-カルボキシメチルシステイン、ジチオスレオトールのいずれか) の組み合わせ、SH 化合物と界面活性剤 (ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、SDS のいずれか) の組み合わせ、胆汁酸のデオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム (1 mg) とクエン酸 (3 mg) の組み合わせについて検討した。

3. 消化管粘膜付着性貼付製剤の作製

支持板とアルミシールでディンプル (厚さ約 100 μm 、深さ約 1 mm) を作製し、エチルセルロースを塩化メチレン/エタノール系に溶解し水不溶性膜を作製する。このディンプル構造の容器内にカルシトニン、安定化剤、吸収促進剤などを含む薬液を充填し、凍結乾燥する。その後、薬剤の充填された容器の上に腸溶性ポリマー膜をキャスト法により薬物保持膜として上層する。さらに付着部に相当するカーボポールゲルまたはリング状に成型したカーボポール錠を密着させて消化管粘膜付着性貼付システムの構造体をつくり、ブロックヒーターで加温した熱圧着ポンチで切り抜き目的とする非対称 (非球状) のミリカプセルを調製した。

4. 製剤の評価

消化管粘膜付着性貼付製剤に PBS 緩衝液 400 μl を加えソニケーション後、遠心分離を行い、得た上清について HPLC 法、ELISA 法によりカルシトニンの定量を行い、含量均一性を評価した。溶出試験は、局方の方法に準じて行い、同様に HPLC 法、ELISA 法により測定した。消化管付着性は、付着性評価用製剤をイヌに経口投与を行い、経時的に X 線撮影により製剤が移動して付着した胃幽門部からの距離を指標として評価した。吸収性評価は、イヌに消化管粘膜付着性貼付製剤を経口投与し、血中カルシトニン濃度と血清中カルシウム濃度の変動を ELISA とカルシウムアッセイキットを用いて評価した。

C. 実験結果

1. カルシトニンの消化管内安定性

デスマプレシン (DDAVP; 分子量約 1100)、インスリン (分子量約 5800)、サケカルシトニン (SCT; 分子量約 3600) の上部小腸から得た粘膜酵素標品 (ラット小腸上部粘膜ホモジネート上清) または小腸内容物中の胆汁酵素標品 (ラット小腸内容物洗液上清) による分解安定性を $t_{1/2}$ を指標に評価した。小腸粘膜酵素による分解の受け易さはインスリン ($t_{1/2}=389\text{min}$) とサケカルシトニン ($t_{1/2}=55\text{min}$) でほぼ同程度だったが、デスマプレシンは極めて分解を受け難かった。 ($t_{1/2}=6\text{h}$) 胆汁酵素による分解を受け易く不安定なのがサケカルシトニンであり、インスリン ($t_{1/2}=5\text{h}$)、デスマプレシンの順に安定性を示した。サケカルシトニンは小腸内において小腸粘膜酵

素や胆汁酵素により極めて分解を受け易い蛋白質であり、高齢者などの骨粗しょう症患者への有効な経口投与適用を考える上で消化管内における安定性の改善が重要であることが示唆された。

次にヒト血清アルブミン (HAS)、ゼラチン、グリココール酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウム、アプロチニン、STI、ロイペプチン、ベスタチンなどのカルシトニンに対する安定化剤としての効果を、小腸上部の粘膜酵素標品 (ラット小腸上部粘膜ホモジネート上清) および小腸内容物中の胆汁酵素標品 (ラット小腸内容物洗液上清) を用いてカルシトニンの加水分解速度について調べた。

小腸上部粘膜酵素によるカルシトニンの加水分解に対する安定化効果は、ベスタチンやロイペプチンなどに有用性がみとめられた。小腸内容物中胆汁酵素によるカルシトニンの加水分解に対する安定化効果には、ベスタチン、ロイペプチン、アプロチニン、HAS などに有用性がみとめられた。ベスタチン、ロイペプチンは両酵素系によるカルシトニンの分解に対して抑制効果を示した。

2. カルシトニンの吸収促進剤

消化管での分解を抑制された蛋白質医薬が消化管内で食物などとともに腸の蠕動による物理的作用を受け、腸上部から空腸、結腸へと移動・排泄される過程で、特に薬物の主要吸収部位とされる小腸上部において膜透過を経て吸収されるためには吸収促進剤の添加を必要とする。吸収促進作用の検討対象としては、一連の SH 化合物と界面活性剤 TritonX-100 に着目した。SH 化合物の中には、臨床において 20% 液として 1~4 ml/回の用量で気道粘液溶解剤として去痰作用を示す薬物があり、TritonX-100 は膜可溶性に優れた界面活性剤であり吸収促進作用を有することを既に把握している。界面活性剤 TritonX-100 と種々な SH 化合物の組み合わせ、その他胆汁酸 (デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウムとクエン酸の組み合わせなど) による効果を、切開したラットの管空腸部に直接カルシトニンとともに注入投与するかまたはゼラチンカプセルキャップ内側に水不溶性のエチルセルロース膜を形成させてカルシトニンとともに注入しカーボポールで空腸部位に貼付させて投与 (空腸デバイス投与) したときの血中濃度への反映から評価すると、SH 化合物と TritonX-100 の組み合わせがもっとも高い血中濃度 (生物学的利用率; AUC) を示すことを確認した。

次に、この SH 化合物と TritonX-100 の組み合わせにカルシトニンの安定化剤としてアプロチニンを加えて、同様にカルシトニンの血中濃度への反映を指標に評価すると、吸収促進剤と安定化剤の効果が相乗してさらに高い血中濃度 (生物学的利用率) を示した。

3. 消化管粘膜付着性貼付製剤の作製

支持板とアルミシールでディンプル構造を作製し、エチルセルロースを塩化メチレン/エタノール系に溶解し水不溶性膜を作製した。この容器内にカルシト

ニン、安定化剤（アプロチニン等）、吸収促進剤（SH化合物と TritonX-100 の組み合わせ）などを含む薬液を充填し、凍結乾燥した。

その後、薬剤の充填された容器の上に腸溶性膜をキャスト法により薬物保持膜として上層し、さらに付着部に相当するカーボポールゲルまたはリング状に成型したカーボポール錠を密着させて消化管粘膜付着性貼付システムの構造体をつくり、ブロックヒーターで加温した熱圧着ポンチで切り抜き目的とする非対称（非球状）のミリカプセルを調製した。

4. 製剤の評価

消化管粘膜付着性貼付製剤に PBS 緩衝液 400 μ l を加えソニケーション後、12000rpm で5分間遠心分離を行い、得られた上清を HPLC 法、ELISA 法によりカルシトニンの定量を行った結果、良好な含量均一性がみとめられた。付着性評価用製剤をイヌ投与用カプセルに封入して経口投与を行い、経時的に X 線撮影を行った。製剤が移動して付着した胃幽門部からの距離を指標にして評価した結果、明らかに投与3時間後における付着性評価用製剤の分布は付着性を有しないコントロール製剤と比べると、大部分が前部に存在した。従って、本研究における製剤処方により試験的製剤は設計どおり小腸上部に到達し、貼付剤により付着していることが示唆された。イヌ投与用カプセルに消化管粘膜付着性貼付製剤を封入して経口投与を行った後、血中濃度と血清中カルシウムレベルの変動を ELISA システムとカルシウムアッセイキットを用いて評価したところ、期待どおりのカルシウム濃度の上昇が認められ、カルシトニンの生理活性の発現が期待された。

D. 考察

本研究における検討により、カルシトニンの消化管における安定化剤と消化管上皮細胞膜からの吸収を促進し得る吸収促進剤を見出し、両者の配合によりカルシトニンの経口吸収性が高まることが明らかとなった。次にこの配合処方によりカルシトニン、安定化剤および吸収促進剤を消化管粘膜付着性貼付システムに適用した。本システムは消化管に付着し、カルシトニンが徐放され、その生物学的利用率を高めていることがみとめられたが、今後はそのメカニズムを科学的に実証することが求められる。

現在のところ、手動により製剤を調製しているが、さらに科学的な実証を進めるためには、この非対称（非対照）のミリカプセルの製造工程を装置化する必要がある。

現在、フィルム製造、薬剤の充填、圧着、打ち抜きを連続的に全自動で行うために、非対称ミリカプセル製造装置の試作検討を進めている。その製造プロセスは、①水不溶性ポリマー（エチルセルロース）を用いて基底膜を作る。②基底膜をマイクロ加工技術を用いて調製した鑄型に押し当てることにより

直径約 3 mm、深さ約 100 μ m のディンプルを 10cm² の部分に約 100 個作製する。③ディンプルにカルシトニン及び安定化剤、吸収促進剤を充填する。④小腸の上部、中部、下部のいずれかの部位で溶解する pH 感応性ポリマーフィルムを上から接着する。⑤ 100 個/10cm² の非対称ミリカプセルをパンチャー法により打ち抜く。

この製造装置が完成することにより、配合処方の適正化と試作評価による医薬品としての妥当性の検証、臨床試験に向けた研究開発の方向性がより一層明確化するものと考えられる。

E. 結論

本研究により、SH 化合物と TritonX-100 の併用がカルシトニンの吸収促進に効果があることがみとめられた。さらに、カルシトニンの消化管における安定化剤との併用によりさらにカルシトニンの経口による吸収性は高まる可能性が示唆された。この配合処方でもカルシトニンを消化管粘膜付着性貼付システムへ適用したところ、製剤設計どおり、消化管上部に貼付付着し、カルシトニン徐放する可能性を示唆する知見が得られた。