

200100299A

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

平成13年度 総合研究報告書

主任研究者 高田寛治 京都薬科大学薬物動態学教室教授

平成14年（2002年）4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

骨粗しょう症治療用カルシトニン経口製剤の開発

1

## 骨粗しょう症治療用カルシトニン経口製剤の開発

### (研究の背景)

#### 1. 本研究に至る社会的背景

高齢化社会の到来とともに高齢者の骨粗しょう症が増え、国内の患者数は推定で約二百万人、潜在患者を含めると約千万人であり、米国では約二千八百万人以上の潜在患者、世界中では既婚婦人の大体 80%に相当する 2 億人以上の潜在患者が示唆され、高齢化の進行に伴い今後患者数は増加すると予想されている。

従って、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から、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。

2000 年 6 月 16 日米国イリノイ州シカゴで開催された世界骨粗しょう症会議に於いて、世界骨粗しょう症基金 (IOF) の行った「女性の将来はどの程度あやういか」と題された調査報告の中で、①骨粗しょう症に対する女性自身の理解や危機意識が低いこと ②骨折を予防するための投薬が、適切な時期において行われているとは言い難いこと ③骨密度測定の頻度や骨密度測定機器及びその保有施設などが不十分であり、予防的措置をとり難いこと ④骨粗しょう症の薬物療法について閉経後女性の 80%以上が予防または治療薬の処置が施されていると医師は推測しているが、調査で回答した閉経後女性の 63%が骨粗しょう症の予防または治療のための服薬は行っていないと認識しているずれがあることなどが報告され、閉経後の女性の骨粗しょう症に由来する骨折を防ぐには至っていないことが強調されている。

「骨粗しょう症に苦しむ女性の 80%が骨粗しょう症と診断されるまでにリスク要因について知らないと答えたり、骨粗しょう症による骨折を予防するための医薬を服用していないと答えている」という報告は、骨密度減少の早期診断を行い骨折のリスクを最小限に抑制することが、閉経後女性の入院を減らし、骨粗しょう症治療に要する長期的医療費の抑制につながることを示唆している。

閉経後女性の骨粗しょう症の予防と治療についてその代表的なものをあげると、以下の療法があげられる。

- ①ホルモン補充療法 (HRT) ; HRT (エストロゲンあるいはプロゲステロンとの組み合わせ) は、のぼせや情緒不安定などの閉経にともなう諸症状をコントロールする目的だけでなく、骨密度減少を食い止め、骨折のリスクを減らすなどの骨粗しょう症の予防療法としての位置づけがなされている。
- ②選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERMs) ; 選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM ; サーム) はエストロゲン受容体に作用し、骨吸収を抑制する。例えば、まだ国内では承認されていないリリー社のラロキシフェン (製品名 Evista(r) ) は骨粗しょう症の治療と予防の適応で承認された唯一の SERM である。
- ③ビスフォスフォネート ; 非ホルモン系の骨粗しょう症の予防及び治療薬である。国内で

の骨粗しょう症の適応は未承認であるアレンドロネートとリゼドロネートは、骨密度を増加させ骨粗しょう症女性の骨折の発生率を抑える。

④カルシトニン；注射または鼻腔内吸入などにより投薬され、骨粗しょう症の女性の骨盤骨折を減少させる。

⑤カルシウム及びビタミンDの補充；高齢者の骨密度減少の抑制などが療法として有効とされている。

骨粗しょう症女性の骨盤骨折を減少させる効果のある骨粗しょう症薬として用いられているカルシトニンはサケやウナギ由来の蛋白ペプチド薬であり、現在のところ注射剤として臨床使用されており、8億ドル以上のサケカルシトニンの世界市場が予測されている。

前記のように、点鼻薬、肺吸収性エアロゾール製剤などが開発されつつあるが、前者は鼻汁とともに排出されたり、後者は吸入後に吸収部位の肺胞まで十分に到達せず、これらは有効な処方としては完成されていない。

高齢の骨粗しょう症患者の生活の質（Quality of Life；QOL）を考えると、今後カルシトニンの経口剤の開発が期待されている。カルシトニンの経口剤実現のためには、経口投与後、消化管内で消化酵素による加水分解を抑制し、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。

世界中のバイオベンチャー企業がゲノム発現蛋白ペプチド薬の経口製剤化に競っており、これまでリポソーム、マイクロエマルジョン（Cortex社）、マイクロカプセル、ポリエチレングリコール（PEG）修飾化（アムジェン社）、ビタミンB<sub>12</sub>修飾化（アムジェン社）などの技術が検討されてきているが、いずれも蛋白分解酵素による分解を阻止することはできず、まだゲノム発現蛋白ペプチド薬の経口製剤の実用化には至っていない。

最近、Emisphere社の蛋白 unfolding 技術（蛋白ペプチド薬の3次元構造をいったん unfold して線状構造とし、小腸吸収膜を透過させた後に再び本来の3次元構造に復帰させることにより薬効を引き出す技術）による高分子薬物の経口化が注目されている。

30種類もの薬剤に対して ①酸や酵素による薬剤の分解 ②小腸吸収部位における膜透過性 ③薬剤の消化管内における溶解性などの物性の改善技術が検討され、生理的条件下での薬物分子の取り得るコンフォメーションを考慮し、吸収膜を透過し得る薬物分子のコンフォメーションおよび治療効果を示す薬物分子のコンフォメーションを調節することで消化管における前記の3点をクリアし経口化を目指している。

即ち、胃内における酸と消化管における酵素による分解をより受け難いコンフォメーションを高分子の薬物分子にとらせるとともに、製剤自体が被膜コートされた形態をとる固形製剤であることにより胃内における分解はさらに抑制されている。

この経口製剤化の製造法は低コストの技術であり、スケールアップによる製造技術の確立が為されており、これまで注射用にしか適用されてこなかった薬物の簡便な経口適用が増えることが期待されている。

この実用化に近いとされる Emisphere 社の製剤システムによると、インスリンを用い

たサルを経口投与後のバイオアベイラビリティは約 30%にも達するものであったと報告されている。一方、ノバルティス社が 2000 年にこの蛋白 unfolding 技術を用いてカルシトニン経口製剤の臨床第 I 相試験を行った結果、骨粗しょう症治療に有効な血清中カルシトニン濃度の確保に成功したという報告を行っている。しかし、カルシトニンに比べて unfolding 剤の添加量が 100~1000 倍にも達し、高齢者患者の服用量は 1 回あたり約 10 カプセルと投与量が多すぎ、高齢者に対する副作用などの問題が懸念されている。

このように実用化される上で種々の視点から考慮して満足に値する蛋白ペプチドの経口化技術は見あたらず、また骨粗しょう症の特効薬のカルシトニンの経口製剤化は技術的にも付加価値は高く、高齢化社会を迎える社会的ニーズにも適合している。

## 2. 本研究に至る技術背景

本研究申請者は、天然及びゲノム発現による蛋白ペプチド医薬の経口製剤の開発を目的として、本研究に至るまでに主に下記の“3種の DDS 技術”の諸検討を行い、幾つかの知見を得てきた。

### ①経口腸溶性発泡デリバリーシステム；

経口投与後、胃では崩壊せず小腸上部で速やかに蛋白ペプチド薬を放出し、界面活性剤ミセルのなかに蛋白ペプチド薬を取り込むことにより蛋白分解酵素から蛋白ペプチド薬を保護し、配合した有機酸と界面活性剤の吸収促進作用を利用して経口吸収を可能とする技術で、例えば経口投与後の G-CSF の有効性は約 4%を示した。

### ②大腸内圧崩壊型大腸デリバリーカプセルシステム；

蛋白分解酵素活性の低い大腸まで蛋白ペプチド薬をデリバリーする技術で、例えば経口投与後の G-CSF の有効率は静注と比べて約 7%を示した。

### ③消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS : Gastrointestinal Mucoadhesive Patch System)；

非対称 (非球状) のマイクロカプセルまたはミリフィルム内に蛋白ペプチド薬を封入した製剤であり、経口投与後小腸吸収膜面に付着することにより蛋白ペプチド薬の吸収時間を長時間にわたり確保し、限定された空間内に蛋白ペプチド薬と安定化剤、吸収促進剤を保持することにより、含有する蛋白ペプチド薬に対する小腸管腔側からの消化酵素の攻撃を理論上 100%阻止し、小腸吸収細胞とシステム内との間における蛋白薬の高い濃度勾配を保ち、高分子化合物である蛋白ペプチド薬の経口吸収を可能とするシステムである。例えば G-CSF の経口投与により静注時に比べて約 23%もの有効性が得られた。

これらの蛋白ペプチドの経口化製剤技術に関する諸検討とその知見を基に、もっとも蛋白ペプチド医薬実用化の高い技術として消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) を位置づけることができた。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である蛋白ペプチド医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を提供する可能性を検討する本研究に至った。

## (本研究の内容)

### 1. 研究の目的

本研究は、消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) 技術を骨粗しょう症の特効薬カルシトニンに適用することにより、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可能性を検討する。

### 2. 技術課題

消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) は、水不溶性ポリマー膜から成る基底層、小腸各部位の pH を感応して溶解する各種の腸溶性膜から成る表層、中心部で蛋白ペプチド薬を保持する内層の 3 層構造から成り立っている。さらに蛋白ペプチドの小腸内における分解を抑制し小腸吸収膜透過性を高める処方工夫がなされている。

本研究で明らかにする技術課題は、このシステムをカルシトニンに適用するにあたり、①本研究の対象となる蛋白ペプチドであるカルシトニンの性状とこれに適合する小腸内における安定性を付与する安定化剤 (蛋白分解酵素阻害剤) ②小腸吸収膜透過性を亢進する吸収促進剤の選択 ③実際にカルシトニンの消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) の製剤化とそのシステムを製造するための装置などを構築することである。

#### 2-1 カルシトニンの性状とその安定化剤

カルシトニンは 32 個のアミノ酸 (1 位と 7 位で S-S 結合) からなる分子量が約 3604 のタンパク質ペプチドであり、哺乳類では甲状腺 C 細胞 (傍濾胞細胞) で、魚類・鳥類では鰹後腺で主に産生される。ヒトでは前駆体からプロセシングを受けてカルシトニンとカタカラシンに分類されている。カルシトニンの薬理効果としては、①血清 Ca イオン低下 (腸管からの Ca 吸収抑制、肝での Ca および P の取り込み促進、尿中・胆汁中への Ca の排泄促進、破骨細胞の活性抑制) ②性成熟、妊娠時の骨組織の保護 ③腎からの P、Na、Cl の排泄促進 ④胎児におけるビタミン D<sub>3</sub> の活性化などが主にあげられる。サケやウナギ由来のものが医薬用途に用いられている。カルシトニンは白色～淡黄かっ色の粉末で、わずかに不快な臭いがあり、味はわずかに苦い。水や 0.01N 塩酸又は酢酸に極めて溶けやすく、無水エタノール、アセトン、エーテル、クロロホルム又はベンゼンにほとんど溶けない。しゃ光下室温保存される。これらのカルシトニンの性状を考慮しつつ、一般的な蛋白ペプチドの消化管における安定化剤として知られる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、大豆トリプシンインヒビター STI、ロイペプチン、ベスタチン、ポリエチレングリコール (PEG) 6000、硬化蓖麻子油 (HCO60) などについて検討を行い、カルシトニンの安定化に効果のある添加剤を選択することが必要である。

## 2-2 カルシトニンの吸収促進剤

下記の SH 化合物、界面活性剤、クエン酸などとその組み合わせによるカルシトニンの小腸における吸収促進効果を検討し、最適なものを選択する。

### ①界面活性剤 Triton X-100 と SH 化合物

界面活性剤 Triton X-100 と SH 化合物 (N-アセチル-L-システイン, 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化合物) の組み合わせ

### ②SH 化合物 N-アセチル-L-システインと界面活性剤

SH 化合物 N-アセチル-L-システインと界面活性剤 (Triton X-100, 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 のいずれかの化合物) の組み合わせ

### ③デオキシコール酸ナトリウム

### ④タウロコール酸ナトリウムとクエン酸の組み合わせ

## 2-3 カルシトニン消化管粘膜附着性貼付システム製剤の製法検討

本検討のカルシトニン消化管粘膜附着性貼付システム (GI-MAPS) 製剤の製法に関する薬物充填と保持膜 (薬剤保持部) の調製、機能付加膜の調製、パンチングなどの検討を下記のとおりで行う。

### (1) 充填される薬物組成物がゲルの形態をとる場合

カプセル内に充填される薬効を示す主薬、安定化剤、吸収促進剤などが添加配合された薬剤がゲルの形態をとるとき、このゲル組成を決定することと、フィルム上に  $1.5\text{mm} \times 1.5\text{mm} \times \pi$  ( $7.07\text{mm}^2$ ) /フィルムの面積で 240 フィルムを調製できるように、 $8\text{cm} \times 8\text{cm}$  四方のエチルセルロース膜 (EC; 膜厚約  $20\mu\text{m}$ ) に上記の薬剤ゲルを均一にマウントすること、その後平らに展延したゲル上に腸溶性フィルムのヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート (HP55) を上層し、充分風乾するなどの手順で薬剤充填と保持膜 (薬剤保持部) の調製を検討する。次に、上記の薬物保持部に対して 10% エタノール膨潤の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用いて、粘膜附着層の調製を検討する。風乾後、支持板に載せ固定後、打ち抜き器 ( $3\text{mm}\phi$ ,  $115^\circ\text{C}$ ) をあてて押し付けてテフロンローラーをころがし、打ち抜き (パンチング) により非対称 (非球状) のミリカプセルを水循環式冷却ユニットの作動下で回収することを検討する。

### (2) 充填される薬剤組成物が凍結乾燥ペレットである場合

支持板+アルミシールでディンプル構造 (厚さ; 数  $100\mu\text{m}$ , 深さ; 約  $1\text{mm}$ ) の水不溶性膜 (エチルセルロース #100+ATBC) を塩化メチレン/エタノール系で調製し、次に、主薬、吸収改善剤、賦形剤などの薬液を前記の不溶性膜から成るディンプル構造の容器に充填し凍結乾燥する。その後、フィルム製造機を用いて、腸溶性膜をキャスト法により調製し、薬物保持膜として上層することを検討する。上記の薬物保持部に対して 10%

エタノール膨潤の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用いて、粘膜付着層の調製を検討する。構造的には、例えば、ディンプル（約5 mmφ）付エチルセルロース膜（厚さ数100 μm）の保護部、凍結乾燥ペレットの薬物含有部、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート膜など（厚さ数十μm）の薬物保持部、カーボポールリング錠（厚さ数百μm）の粘膜付着部より構成される。凍結乾燥ペレットを用いたデバイスのパンチングは、約7 mmφの120℃ブロックヒーターで保温した熱圧着打ち抜き器または約7 mmφの切り抜き器により目的とする非対称（非球状）のミリカプセルの調製を検討する。

#### 2-4 カルシトニン消化管粘膜付着性貼付システム製剤の製造装置の検討

これらの製法において、いずれにしてもこのゲル化または凍結乾燥により充填した薬剤を含む皮膜形成によるデバイスの調製やパンチングの機能を装置化する必要がある。

この一貫した消化管粘膜付着性貼付システム（GI-MAPS）の製造方式が、カルシトニン及びその安定性と吸収促進を付与する添加剤の配合組成ゲルに適合し得る製造システムと装置として構築されることが必要である。

#### 2-5 製剤の評価

##### (1) 含量均一性

本研究により検討された方法論で調製された製剤中に含まれる主薬のカルシトニンや配合添加剤（安定化剤、吸収促進剤）などの含量が均一であることが必要とされ、検証と保証が望まれる。

##### (2) 特徴及び機能評価

消化管粘膜付着性貼付システム（GI-MAPS）のコンセプトである機能と特徴（①経口投与後の消化管粘膜への付着 ②付着後の製剤・粘膜間における閉鎖空間の確保 ③閉鎖空間からの薬物の吸収改善）が検証され、カルシトニンの経口薬剤としての機能が評価、保証される必要がある。

### 3. 実験方法

#### 3-1 小腸内における安定化剤の検討

カルシトニンとしてはサケカルシトニン（SCT）を用いた。カルシトニン自体の小腸内における安定性の程度をみるために、デスマプレシン（DDAVP）、インスリンについても同様の検討を行い比較した。小腸上部の粘膜酵素としては4匹分のラット小腸上部粘膜ホモジネート上清混合を用い、小腸内容物の胆汁酵素としては3匹分のラット小腸内容物洗液上清混合を用いた。これらの酵素標品による分解の受け易さを *in vitro* における pH7.4 の条件で上記のそれぞれのペプチド蛋白の分解から  $t_{1/2}$  (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、さらに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、



STI、ロイペプチン、ベスタチン、ポリエチレングリコール (PEG) 6000、ポリオキシエチレン硬化蓖麻子油 (HCO60) などを添加したときの分解阻害効果を検討した。実験に用いたカルシトニンの濃度は 100  $\mu$ g/ml、添加した安定化剤の濃度は 1% として、pH7.4、37℃の条件下で粘膜蛋白濃度は 0.5mg/ml で 2 時間の反応、小腸内容物蛋白濃度は 0.005mg/ml で 15 分の反応を行って、カルシトニンの分解の程度を評価した。

### 3-2 小腸内における吸収促進剤の検討

小腸内における吸収促進剤による吸収促進の評価は、カルシトニン 0.25mg を含む 20  $\mu$ l の薬液を空腸内に直接注入するか、4号ゼラチンカプセルのキャップ部の内側に水不溶性膜 (エチルセルロース膜) を作製後、カルシトニン 0.1mg を含む薬液 5  $\mu$ l を注入し附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 (デバイス投与) することにより得られる血中濃度への反映から吸収性改善を評価した。

薬液にはカルシトニン (コントロール) またはカルシトニンと吸収促進剤が含まれる。吸収促進剤としては、界面活性剤の Triton X-100 (5%濃度) と SH 化合物 (N-アセチル-L-システイン; NAC, 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化合物の 5%濃度) の組み合わせ、SH 化合物の N-アセチル-L-システイン (5%濃度) と界面活性剤 (Triton X-100, 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 のいずれかの化合物の 5%濃度) の組み合わせ、デオキシコール酸ナトリウム (5%濃度)、タウロコール酸ナトリウム (1 mg) とクエン酸 (3 mg) の組み合わせなどが評価された。

ラット投与による評価で効果のあった吸収促進剤 (NAC+Triton X-100) について、同様にイヌの空腸にデバイス投与してその血漿中濃度より吸収促進効果を評価した。

### 3-3 分解阻害剤と吸収促進剤の併用効果

ラット空腸にデバイス投与を行い、有効性がみられた分解阻害剤と吸収促進剤の併用効果をバイオアベイラビリティより評価した。投与にあたっては、カルシトニン 0.1mg、分解阻害剤 (アプロチニン) 0.25mg、吸収促進剤 (NAC+Triton X-100) 0.25mg を含む 5  $\mu$ l の薬液を調製し、用いた。

### 3-4 消化管粘膜附着性貼付システム (GI-MAPS) の製法検討

#### (1) 充填される薬剤組成物がゲルの形態をとる場合

本検討の消化管粘膜附着性貼付システム (GI-MAPS) の主薬、安定化剤、吸収促進剤などの添加配合されたカプセル内に充填される薬剤がゲルの形態をとるとき、ゲル組成は、例えば無水クエン酸 160mg、カーボポール 934P 15mg、カルシトニン 30mg、33.3(W/W)% HCO-60 300mg の計 505mg に占めるそれぞれの割合であり、これを用いたときフィルム上に 1.5mm x 1.5mm x  $\pi$  (7.07mm<sup>2</sup>) /フィルムの面積で 240 フィルムを調製できるよう

に、8 cm x 8 cm 四方のエチルセルロース膜 (EC ; 膜厚 20  $\mu$ m) に約 1.9 g のゲルを均一にマウントして後、平らに展延したゲル上に腸溶性フィルムのヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート (HP55) を上層し、充分風乾し、薬剤充填と保持膜 (薬剤保持部) を調製した。次に、上記の薬物保持部に対して 10% エタノール膨潤の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用いて、粘膜付着層の調製を検討した。風乾後、支持板に載せ固定後、打ち抜き器 (3 mm  $\phi$ 、115 $^{\circ}$ C) をあてて押し付けてテフロンローラーを回転させ、打ち抜き (パンチング) により非対称 (非球状) のミリカプセルを水循環式冷却ユニットの作動下で回収した。

#### (2) 充填される薬剤組成物が凍結乾燥ペレットである場合

支持板 + アルミシールでディンプル構造 (厚さ ; 数 100  $\mu$ m, 深さ ; 約 1 mm) の水不溶性膜 (エチルセルロース #100 + ATBC) を塩化メチレン/エタノール系で調製した。次に、主薬、吸収改善剤、賦形剤などの薬液を前記の不溶性膜から成るディンプル構造の容器 (薬物保持部) に充填し凍結乾燥した。その後、フィルム製造機を用いて、腸溶性膜をキャストリング法により薬物保持膜を調製した。さらに、上記の薬剤保持部に対して 10% エタノール膨潤の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用いて、粘膜付着層を調製した。構造的には、ディンプル (約 5 mm  $\phi$ ) 付エチルセルロース膜 (厚さ数 100  $\mu$ m) の保護部、凍結乾燥ペレットの薬物含有部、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート膜など (厚さ数十  $\mu$ m) の薬物保持部、カーボポールリング錠 (厚さ数百  $\mu$ m) の粘膜付着部より構成された。凍結乾燥ペレットを用いたデバイスのパンチングは、約 7 mm  $\phi$  のブロックヒーターで保温 (120 $^{\circ}$ C) した熱圧着打ち抜き器または約 7 mm  $\phi$  の切り抜き器により目的とする非対称 (非球状) のミリカプセルを調製した。

### 3-5 製剤の評価

有用であることが見出された吸収促進剤をカルシトニンとともに内層に配合して消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) を調製するにあたり、①消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) 調製中におけるカルシトニンの安定性と調製後の力価の確保 ②消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) からのカルシトニンの放出性と付着性の *in vitro* 評価が必要であり、フィルム製剤の含量均一性、付着性の評価、透過性評価、吸収性の評価を下記のとおり行った。

#### (1) フィルム製剤の含量均一性

フィルム製剤 1 個に PBS 緩衝液 400  $\mu$ l を加えソニケーションを行い、さらに 0.2N 塩酸 600  $\mu$ l を加えソニケーション後、12000rpm、5 分間遠心分離を行い、得た上清をサンプレップオムニ 13 を用いてろ過し含量試験溶液とする。定量方法は、タンパク定量法 (Cu-Folin 法)、HPLC 法、EIA 法により行った。

#### (2) 付着性の評価

付着性をみるために K3Wax/BaSO<sub>4</sub> (1/1 又は 2/1) より成る基剤層にカーボポール等の

各種付着剤より成る層を基剤層/付着層 (1/1) となるように設けて、打錠圧 0.2~1 トンで成型 (径 7, 5, 3 mm φ の 3 種) し付着性評価用製剤を作製した。この付着性評価用製剤をイヌ投与用カプセルに封入し、ビーグル犬 (オス) を用いて 24 時間絶食下、水 100ml とともに経口投与し、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求めて評価した。

### (3) カルシトニンの吸収促進剤の評価

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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評価した。

### (検討結果)

#### 1. カルシトニンの消化管内安定性

蛋白ペプチド医薬を経口で服用するにあたり、一般的には胃内でその強酸性 pH ( ) 2) により変性するとともに、小腸内で小腸粘膜のタンパク分解酵素や膵臓から分泌され十二指腸を経て小腸内に分泌されてくる胆汁酵素などによる蛋白ペプチド医薬の分解により、その生物学的利用率 (BA ; Bioavailability) を著しく低くする。

例えば、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) の小腸内における分解の程度 (小腸内安定性) を把握するために、小腸上部ホモジネート上清混合 (粘膜酵素) と小腸内容物洗液上清混合 (胆汁酵素) を用いて in vitro により pH7.4 でインキュベーションすることによりこれら薬物の分解の  $t_{1/2}$  と粘膜タンパク/薬物比からこれら蛋白ペプチド医薬の小腸内安定性を比較した結果を表 1 に示す。

表 1 に示すように、粘膜蛋白/薬物比と  $t_{1/2}$  を考慮して比較すると、小腸上部の粘膜部位ではインスリンとサケカルシトニンがほぼ同程度の粘膜酵素による分解の受け易さであるのに対して、デスマプレシンは極めて粘膜酵素による分解を受け難く安定であることが示された。また一方、小腸内容物の存在下での胆汁酵素によるデスマプレシン (DDAVP)、インスリン、サケカルシトニン (SCT) の分解の受け易さを同様に粘膜タンパク/薬物比と  $t_{1/2}$  を考慮して比較すると、もつとも分解を浮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、デスマプレシンという順に安定性を示した。

表-1 デスマプレシン、インスリン、カルシトニンの小腸内安定性

対象薬物	酵素の種類	比 (タンパク/薬物)	t <sub>1/2</sub>
デスマプレシン (DDAVP)	小腸上部粘膜酵素	9.0	5.4 h
	小腸内容物胆汁酵素	5.0	4.97 h
インスリン	小腸上部粘膜酵素	2	6.43 h
	小腸内容物胆汁酵素	2	1.1 min
サケカルシトニン (SCT)	小腸上部粘膜酵素	5	5.5 min
	小腸内容物胆汁酵素	0.01	5.5 min

いずれにしても、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ることが示唆され、高齢者などの骨粗しょう症への有効な適用を考えるうえで小腸内での安定性を確保する必要性があることが示された。

そこでサケカルシトニンの小腸内における安定性を改善させる最適な安定化剤の選択を行うために、HCO60、ポリエチレングリコール (PEG) 6000、ベスタチン、ロイペプチン、STI、アプロチニン、カプリン酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、ゼラチンD、ヒト血清アルブミン (HAS) などの安定化剤としての効果を、ラット小腸上部粘膜ホモジネート上清 (小腸上部粘膜酵素) およびラット小腸内容物洗液上清 (胆汁酵素) を用いて検討した。

#### (1) ラット小腸粘膜ホモジネート上清に対する効果

100 μg/ml 濃度のサケカルシトニンを 0.5mg/ml の小腸粘膜蛋白濃度に相当するラット小腸上部粘膜ホモジネート上清 (4 匹分) を含む混合系に対して、1% の添加濃度の安定化剤を添加し pH7.4、37°C で 2 時間反応させてその効果を検討したところ、表 2 に示したようにベスタチン、ロイペプチンなどに有用性がみとめられた。

#### (2) ラット小腸内容物洗液上清に対する効果

100 μg/ml 濃度のサケカルシトニン、0.005mg/ml の小腸内容物蛋白濃度に相当するラット小腸内容物洗液上清 (4 匹分) を含む混合系に対して、1% の添加濃度の安定化剤を添加し pH7.4、37°C で 15 分反応させてその効果を検討したところ、表 2 に示したようにベスタチン、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。

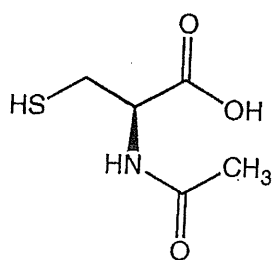
表-2 サケカルシトニンの安定化剤のスクリーニング ( n = 3, 平均値)

添加剤	反応後のサケカルシトニンの相対的生理活性	
	ラット小腸上部粘膜ホモジネート上清混合系	ラット小腸内容物洗液上清混合系
コントロール (反応開始時)	(100)	(100)
コントロール	86.2	100.8
HCO 60	40.4	0
PEG 6000	16.7	0
ベスタチン	96.3	104.4
ロイペプチン	86.5	121.9
STI	34.0	79.1
アプロチニン	60.1	106.6
カプリン酸ナトリウム	24.3	44.7
グリココール酸ナトリウム	70.0	39.4
ゼラチン	47.5	98.0
HSA	31.4	102.4

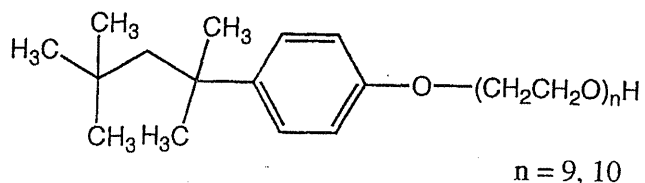
## 2. カルシトニンの膜透過性の改善

消化管での分解を抑制され活性を保持した蛋白ペプチド医薬分子は、消化管内で経口に採取された食物などとともに腸の蠕動運動による物理的作用を受け、腸内の上部から下部、大腸（空腸、結腸）へと移動・排泄される。その過程で、特に薬物の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必要がある。ところが、小腸上部において分子量の大きい蛋白ペプチド医薬は吸収膜を透過することが吸収の律速となることから、蛋白ペプチド医薬分子の膜透過性を亢進することが必要である。

そこで蛋白ペプチド薬物の経口服用には吸収膜の透過性を改善する必要があり、そのための吸収促進剤を検討した。特に、吸収促進作用の検討対象の化合物としては、SH 化合物の N-アセチル-L-システイン (NAC) と界面活性剤の Triton X-100 に着目した。N-アセチル-L-システイン (N-Acetyl-L-Cysteine ; NAC) 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ペプチド結合を分解しないで粘液構成成分であるムコタンパクの S-S 基を SH 基に解裂して去痰作用を示す薬剤であり、Triton X-100 は膜可溶化能に優れた非イオン系界面活性剤で膜可溶化時において膜蛋白質の失活が少ないメリットがある。それぞれの構造式は下記のとおりである。



N-Acetyl-L-Cysteine (NAC)



TritonX-100

n = 9, 10

これらの両化合物を基本に種々の界面活性剤やSH化合物との組み合わせによる吸収促進剤としての吸収性改善の評価を行うために、ラットの消化管を約3 cm 切開して空腸部位に薬液 20 $\mu$ l を直接注入するか、4号ゼラチンカプセルキャップ内側に水不溶性膜（エチルセルロース膜）を形成させ5 $\mu$ l の薬液を注入後付着剤としてカーボポールで空腸部位に貼付させて吸収性の改善を評価した。

検討対象の吸収促進剤は、①SH化合物のNACをベースにして種々の界面活性剤と組み合わせた2種の混合用法、②TritonX-100をベースにして種々のSH化合物を組み合わせた2種の混合用法、③タウロコール酸ナトリウムとクエン酸を組み合わせた混合用法、④デオキシコール酸ナトリウム単独、である。骨粗しょう症に対するカルシトニンの効用を主題にしているため、以下にカルシトニンを用いて検討した吸収促進剤の結果を示す。

図1にタウロコール酸ナトリウム（1 mg）とクエン酸（3 mg）の共存下でのカルシトニンの薬液 20 $\mu$ l（カルシトニン0.25mg）をラット空腸に注入投与したときの血中濃度パターン、図2に吸収促進剤としてデオキシコール酸ナトリウム（5%）、タウロコール酸ナトリウム（1 mg）+クエン酸（3 mg）、NAC（1 mg）+TritonX-100（3 mg）を添加した薬液 5 $\mu$ l（カルシトニン0.1mg）を投与したときの血中濃度パターンを示した。

タウロコール酸ナトリウムとクエン酸の共存下でカルシトニン溶液をラットに注入（0.25mg/20 $\mu$ l）したときの吸収性（血漿中濃度）は、最高血中濃度（Cmax）の平均値が約70ng/ml、AUCが4.1 $\pm$ 3.5ng/ml $\cdot$ hrであり、デオキシコール酸ナトリウム共存下では血漿中濃度推移からCmaxは約25ng/ml、AUCは14.1 ng $\cdot$ hr /ml、タウロコール酸ナトリウムとクエン酸の共存下では同様にCmaxは約30ng/ml、AUCは16.5 ng $\cdot$ hr /ml、NACとTritonX-100の共存下ではCmaxが70ng/ml、AUCは30.5 ng/ml $\cdot$ hrであった。NACとTritonX-100の組み合わせが最も有効であり、Cmaxは約70ng/ml、AUCは30.5 $\pm$ 7.5（n=4）ng $\cdot$ hr /mlに増加し、カルシトニンの吸収性が大幅に改善されたことが示される。

図1 ラット空腸にカルシトニンを溶液注入したときの血中濃度パターン

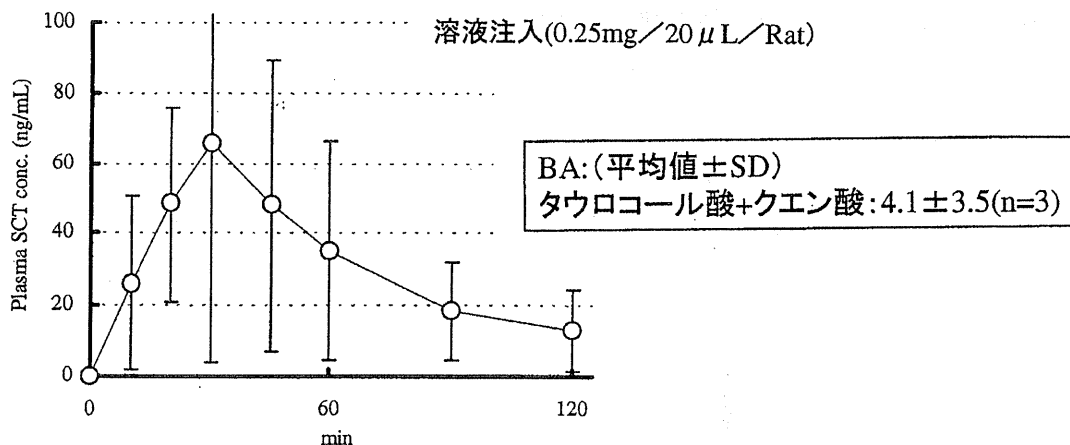
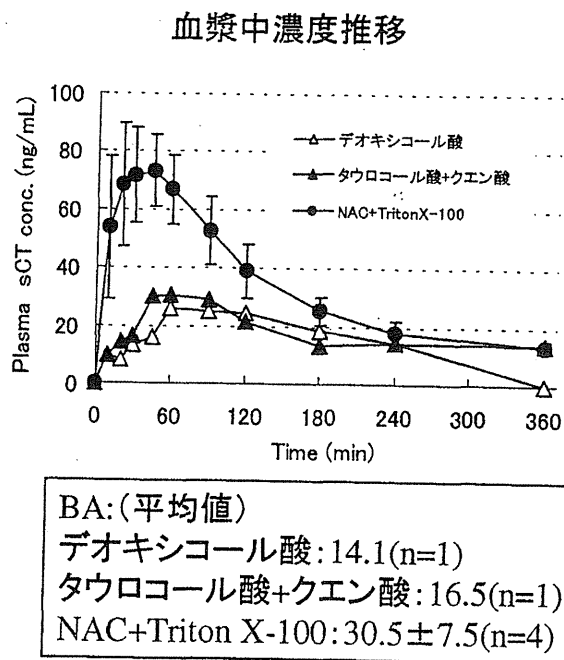


図2 ラット空腸デバイス投与によるカルシトニンの血中濃度パターン



次に、図3にビーグル犬（オス）の静脈内に投与したときの血中パターンと1匹当たりデバイス（カルシトニン 1 mg/15 μl/個）5個を用いた空腸デバイス投与したときの血中濃度パターンを示した。この時の空腸デバイス投与で用いられた吸収促進剤は NAC+Triton X-100 の組み合わせで匹あたり各々12.5mg の投与量であった、

また、図4に分解阻害剤と吸収促進剤を併用してラットに投与したときの血中濃度パターンを示した。吸収促進剤の NAC (0.25mg) と Triton X-100 (0.25mg) を添加して 0.1mg のサケカルシトニンを投与すると BA は 30.5 ng/ml·hr、さらに分解阻害剤のアプロチニンを 0.25mg 含有させて投与すると BA は 46.2 ng/ml·hr となり、併用効果がみられた。

図3 イヌに空腸デバイス投与したときの血中濃度

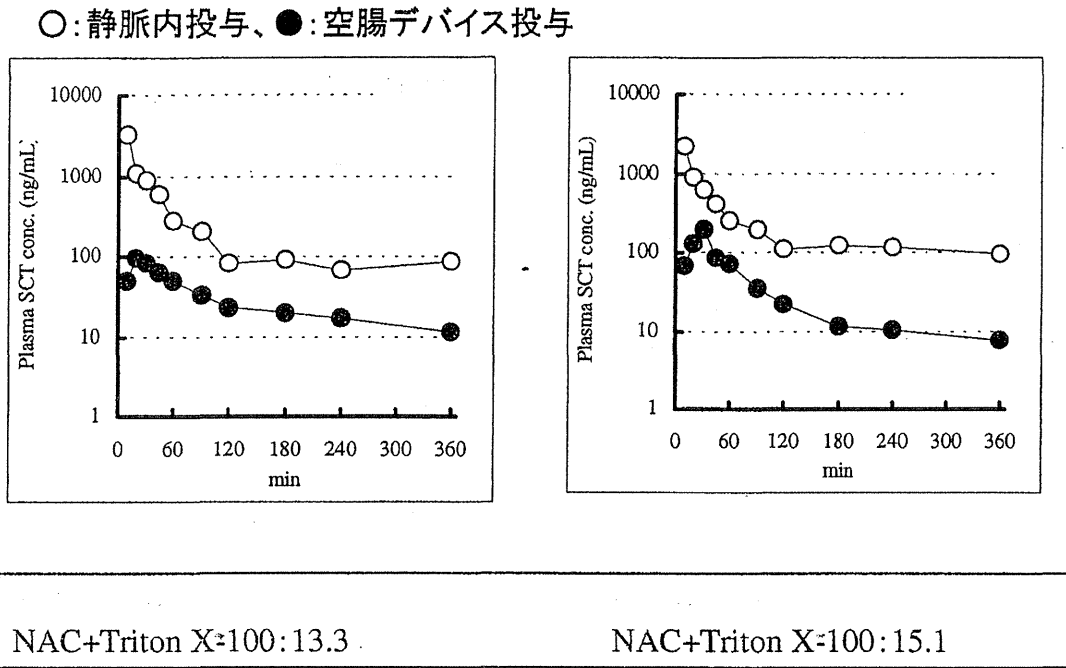
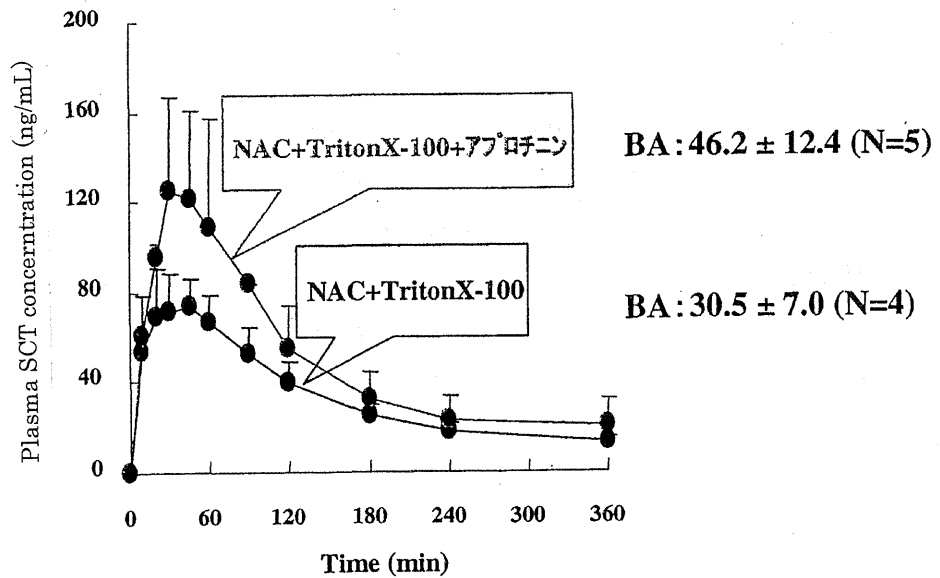


図4 分解阻害剤と吸収促進剤の併用効果



処方: 0.25mg N-アセチルシステイン+ 0.25mg TritonX-100 / 0.1mg SCT / 5 μL Saline

処方: 0.25mg N-アセチルシステイン+ 0.25mg TritonX-100 + 0.25mg aprotinin / 0.1mg SCT / 5 μL Saline



### 3. 付着に関する検討

付着性をみるために K3Wax/BaSO<sub>4</sub> (1/1 又は 2/1) より成る基剤層にカーボポール等の各種付着剤より成る層を基剤層/付着層 (1/1) となるように設けて、打錠圧 0.2~1 トンで成型 (径 7, 5, 3 mm φ の 3 種) し、付着性評価用製剤を作製した。この付着性評価用製剤をイヌ投与用カプセルに封入し、ビーグル犬 (オス) を用いて 24 時間絶食下、水 100ml とともに経口投与し、経時的に X 線撮影により製剤の移動して付着した胃幽門部からの距離を求めて評価した。カーボポール含有付着製剤とコントロール製剤の各々について白と青の色を付けた 7 mm φ の径の 10 個をイヌに投与し、消化管内分布を測定したときの胃幽門部からの距離 (cm) と分布する製剤の個数を調べたところ、明らかに投与後 3 時間の分布の個数はコントロールと比較すると前部にみられるので、カーボポールによる付着性が示された。一方、カルシトニン含有消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) 製剤の付着性評価も、同様に消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) 製剤化を行った後、ラット小腸粘膜を用いた安定性試験・溶出試験を行った後、付着性試験を行い評価したところ、イヌ X 線フィルム撮影により消化管内に付着していることが示されていた。

### 4. フィルム製剤の含量均一性

フィルム製剤 1 個に PBS 緩衝液 400 μl を加えソニケーションを行い、さらに 0.2N 塩酸 600 μl を加えソニケーション後、12000rpm、5 分間遠心分離を行い、得た上清をサンプレップオムニ 13 を用いてろ過し、含量試験溶液として、蛋白定量法 (Cu-Folin 法)、HPLC 法、EIA 法により定量 (n=20) を行ったところ、平均の値は蛋白定量 (Cu-Folin 法) で 92.1±26.1%、HPLC 法で 80.3±18.9%、EIA 法で 85.4±16.5% となり、特に HPLC 法では分解物のピークも検出できた。これらの方法を使い分けして含量均一性を評価することにした。その結果、調製したカルシトニン含有消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) のフィルム製剤の含量均一性があることが示された。

### 5. 消化管粘膜付着性貼付システム (GI-MAPS) の製法

#### (1) 薬剤保持部の製造方法

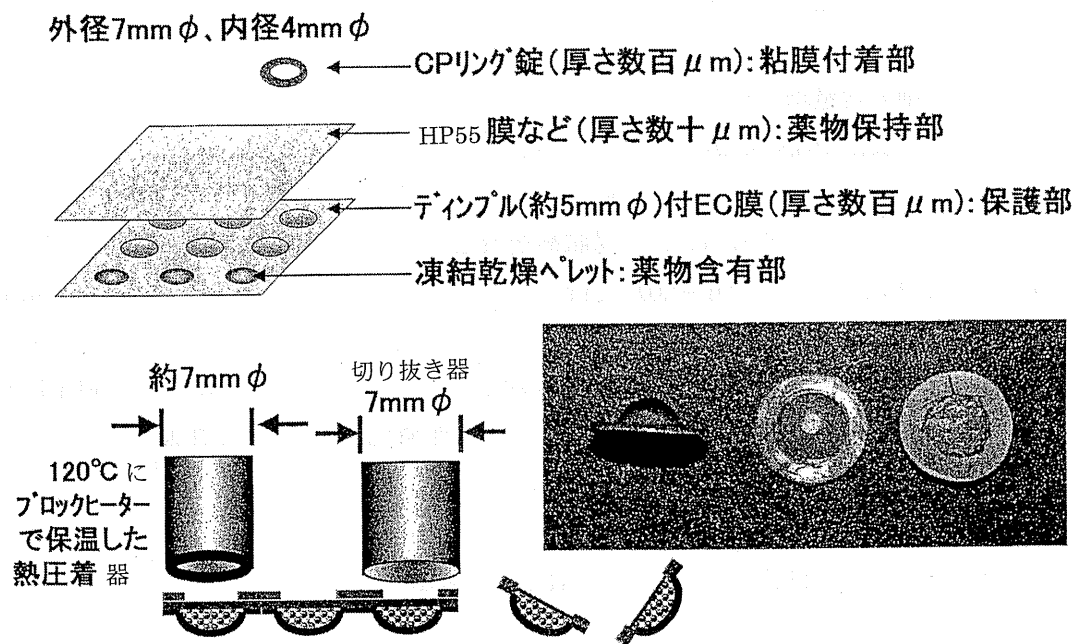
##### (方法 1) 薬剤ゲルと打ち抜き

ゲル組成は無水クエン酸 160mg、カーボポール 934P 15mg、薬剤 (蛋白ペプチド) 30mg、33.3% (w/w) HCO-60 300mg を配合し、240 フィルム (1 フィルム ; 1.5mm X 1.5mm X π=7.07mm<sup>2</sup>) を調製することを目標とする。まず、8 cm X 8 cm 四方の EC 膜に約 1.9g のゲルを均一にマウントし、そのうえに腸溶性フィルムを重ねゲルシートを調製する。次に、支持板に充分風乾したゲルシートを載せ、腸溶性フィルムの側にテフロンローラー、EC フィルム側に圧着器 (3 mm φ、115°C) を当てて仮止めを行い、その後打ち抜きを行い、回収することによりゲルシートの打ち抜きを行う。ゲルのシートへの塗布、パッチングによるシートのロスなどにより回収率は 30% 以下と推定された。

(方法2) 凍結乾燥ペレットとパンチング

支持板とアルミシールで作製したディンプル構造にエチルセルロース (EC#100) と ATBC を塩化メチレン/エタノール混合溶液に溶解したものを充填後風乾し、水不溶性膜を調製する。次に、主薬、吸収改善剤、賦形剤を含む薬液を充填し、凍結乾燥によりペレット化する。腸溶性膜または水溶性膜をキャスト法 (フィルム製造機) により調製する。粘着付着層はカーボポールゲル (10%エタノール膨潤ゲル) またはリング状の成型カーボポール錠を用いる。CP リング錠 (粘膜付着部; 厚さ数百  $\mu\text{m}$ )、HP-55 膜 (薬物保持部; 厚さ数十  $\mu\text{m}$ ) シート、ディンプル (保護部) 構造に充填装着した EC 膜 (厚さ数百  $\mu\text{m}$ ) に凍結乾燥ペレット (薬物含有部) を充填したシートを重ね合わせ、120°C にブロックヒーターで保温した熱圧着器と切り抜き器 (7 mm  $\phi$ ) を用いてミリカプセル化した。図5に消化管粘膜付着性貼付システム製剤の構造体の概略と切り抜き器の略図を示す。

図5 消化管粘膜付着性貼付システム製剤の構造体と切抜きポンチ



## 6. 製造装置の検討

本検討における消化管粘膜付着性貼付システム (Gastrointestinal Mucoadhesive Patch System (GI-MAPS)) の製剤化を行う装置は、フィルム製造装置、充填・圧着・打抜き装置より構成される。

ポリマー溶液をヒーターで加熱加温しているテフロンコーティングベルトに載せフィルム化しフィルム巻取り装置により巻き取っていく。フィルム製造装置の試作過程でエチルセルロースを用いてフィルム化するにあたって、ポリマー溶液充填機使用後の付着ポリマーの拭き取り洗浄に労力を要するのと、運転によりベルトが左右のどちらかに偏る傾向があり、ベルト固定ねじの締め具合を体得する必要がある。フィルムの厚みの設定にあたって、ポリマー溶液供給装置の供給厚み (クリアランス) を  $20\mu\text{m}$ 、 $40\mu\text{m}$  と固定し、ベルトのたわみをなくす工夫を要した。両サイドに不定期にポリマーの塊ができ、解消する必要があった。フィルムの厚みの不均一が拡大し、ベルトのたわみを今後修正することが必要であった。打ち抜き機試作のためのフィルムとして、①12gのエチルセルロース (#100) を 100ml の塩化メチレンとエタノール混液 (5 : 1) に溶解し、乾燥温度  $50^{\circ}\text{C}$ 、フィルム作製スピード約 7 cm/分で 11m 調製した。②25gのエチルセルロース (#100) を 100ml の塩化メチレンとエタノール混液 (1 : 1) に溶解し、TEC10%を乾燥濃度  $40^{\circ}\text{C}$ 、フィルム作製スピード約 7 cm/分で 7 m と 3.5m 調製した。③18gのエチルセルロース (#10) を 100ml の塩化メチレンとエタノールの混液 (5 : 1) に溶解し、TEC25%を乾燥温度  $40^{\circ}\text{C}$ 、フィルム作製スピード約 8 cm/分で 4 m と 8 m (厚み  $30\sim 70\mu\text{m}$ ) 調製した。④15g のヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS-M) を 100ml の塩化メチレンとエタノールの混液 (1 : 1) に溶解、TEC25%を乾燥温度  $40^{\circ}\text{C}$ 、フィルム作製スピード約 5 cm/分で 3 m と 7 m (厚み  $15\sim 50\mu\text{m}$ ) を調製した。

実験的にこれらの調製したフィルムを用いて、薬剤充填・圧着・打ち抜きを行い、カルシトニンの試作 GI-MAPS を試作調製するとともに、薬剤充填・圧着・打ち抜き装置、フィルム圧着打ち抜き装置の製作を進めている。

### (今後の課題)

本研究による技術を用いて医薬品製剤として開発し販売するためには、アシンメトリーミリカプセルの製造工程を装置化する必要がある、最終的にはミリカプセルの打ち抜き工程が重要である。この打ち抜きとしては、 $10\text{cm}^2$ あたり 100 個のアシンメトリーミリカプセル (直径  $3\mu\text{m}$ 、奥行き  $100\mu\text{m}$ ) を連続的に全自動で行うことが要求され、製造装置として、フィルム製造装置と充填・圧着・打抜き装置のパンチングマシンの開発を現在進めている。これらの製造装置が完成されることにより、医薬品としての試作評価、臨床試験、認可にむけた動きが急速に進み出すものと思われる。

