

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

活性蛋白の非注射型ナノDDS製剤  
(課題番号：H16-トランス-007)

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成17(2005)年3月31日

## 目次

### I 総括研究報告

活性蛋白の非注射ナノDDS製剤・・・・・・・・・・・・・・・・	3
主任研究者 水島 裕 (東京慈恵会医科大学DDS研究所所長)	

### II 分担研究報告

製剤の作製法の検討と吸収に関する研究・・・・・・・・	15
上野 晃憲 (東京慈恵会医科大学DDS研究所・客員教授)	
上野 幸生 (株式会社 LTTバイオフーマ 研究開発部 主席研究員)	

非注射型ナノDDS製剤の開発におけるシャペロンの応用 に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・	39
水島 徹 (熊本大学大学院医学薬学研究部教授)	

# I 総括研究報告

## 活性蛋白の非注射ナノDDS製剤

水島 裕 (東京慈恵会医科大学DDS研究所所長)

### 研究要旨

活性のあるたんぱく医薬としてまずインスリンを選び、ナノ製剤の作製、経皮投与による血糖降下作用、血中インスリン値および皮下組織のインスリンの免疫染色により、インスリンの経皮吸収を検討した。その結果、必ずしも十分ではないが、臨床試験にそのまま使用しうる製剤が作製することができたと思われる。

PLGAやポリスチレンの粒子を使用する方法、また経腸投与などの研究も行ったが、現在のところインスリンを金属イオン存在下で沈殿させたものを最終的には炭酸カルシウムで被覆した粒子を候補とした。この製剤の経皮投与により血糖値下降反応が認められた。また、細胞内シャペロンが非注射型ナノDDS製剤の開発に重要な役割を果たすと思われるので、たんぱく質のフォールディングについての研究を推進した。なお、本年度ではトランスレーショナル試験または臨床試験には至らなかった。

### A. 研究目的

今年度の厚生労働省の大型研究費の公募テーマの一つがナノテクノロジーおよびトランスレーショナルリサーチである。これまで我々は両者のテーマについて十分な経験を積んできたが、今年度新たに発見した独特の技術により活性たんぱくをナノ粒子化して、活性タンパクの経皮・経粘膜の吸収を上昇させる技術の開発を進めている。本技術の完成により、これまでほぼ不可能であったインスリンなどの活性たんぱくの経皮吸収が可能になると思われる。IRB認可の医学的臨床研究で同様の性質をもつ低分子ミセルナノ粒子がヒト皮膚でも充分吸収をするとのデータも得ているので、ヒトへの応用も充分可能と考えている。このナノ医薬品の開発が達成されれば、2010年には患者が2億人に達すると思われる糖尿病や開発途上国でのワクチン療法への応用を望ん

でいる治療技術のひとつであるので、当然医療における必要性は極めて高く、日本の経済に対する波及効果も極めて大きいと思われる。なお、我々は既にいくつかのDDS製剤を開発・実用化した経験があり、本研究で検討する医薬品と添加物の多くはすでに市販医薬品そのものと薬事法上使用認可されているものばかりで、しかもその認可用量範囲での製剤化であるので、開発が順調に進む可能性が極めて高い。本研究はインスリンのナノ粒子の作製からスタートするが、それが実用化まで最低で4～5年、長くとも7～8年であろうと考えている。

## B. 研究方法

まず、ナノ粒子作製方法の検討であるが、インスリンを脂溶化するための金属としては亜鉛、鉄、銅などを検討した。つぎに疎水基と陰イオン基を有する有機化合物の種類を検討した。種々の理由から、ミリスチン酸、オレイン酸、ラウリル酸およびそれぞれのナトリウムへ、またインスリン亜鉛と有機化合物を溶解させるためにはアセトン、エチルアルコールなどを検討した。さらに界面活性剤の種類を検討、さらに作製された一次ナノ粒子のカルボキシル基に、カルシウムイオンと炭酸イオンを付けるわけであるが、その量比の検討などを行った。そしてそれを一次、二次、三次のインスリン粒子と名づけた。それぞれの製剤につき、粒子径、含まれているインスリン量を測定した。

また、インスリンの経皮吸収試験であるが、作製された粒子をワセリン、グリセリンなどと混合し、マウスおよびラットの脱毛した背部に塗布し、血中グルコース値とインスリン値を測定した。また、インスリンの免疫染色法としてはインスリン塗布後、マウスの皮膚を採取し、切片を作成した後、二抗体免疫染色法で検討した。

## C. 研究成果

インスリンを水に対して不溶化する際にはカルシウム、鉄、銅、亜鉛のイオンを混和することにより行なったが、最も適していると思われたのは亜鉛イオンであり、ほとんどが沈降して均一な懸濁液が作製できた。検討内容とその結果を記載する。最初に生理活性たんぱく質またはペプチドを水不溶体とする。この水不溶体とする手段として最も好ましいものは、生理活性たんぱく質またはペプチドと沈澱物を形成する2価または3価の金属イオンを使用することであった。そのような2価または3価の金属イオンとしては、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、酢酸亜鉛などの亜鉛塩、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシ

ウムなどのカルシウム塩、塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩、塩化銅、硫酸銅などの銅塩で検討を行った。どのイオンにおいても沈殿形成は認められたが、なかでも亜鉛イオンを用いたときが好ましい結果であった。

疎水基と、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などの陰イオン残基を併せもつ化合物を配合する必要がある。1次粒子作製時に検討した疎水基と陰イオン基の両者を有する有機化合物としては、様々な有機化合物について調べたが、最終的にはミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、とパルミチン酸を中心にして検討した。今年度の成果としてのインスリンについては、ミリスチン酸が適当であると判断できる結果を得た。更に、陰イオンの基としては、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などいくつもの陰イオン残基を有する化合物で検討した。その結果、どの陰イオン基をもつ化合物でも1次粒子の作製は可能であるという結果であった。

界面活性剤の検討の結果としては、特にTwee n 8 0が最も適しているとの結果であり、それによって作製することとした。作製されたナノ粒子にカルシウムイオン、炭酸イオンを順次結合させていくわけであるが、種々検討した結果、塩化カルシウムと炭酸ナトリウムがよいとの結果であり、それを用いたカルシウムイオンに対する炭酸イオンの比はモル比で1 : 0. 0 5程度であればかなり良い粒子となるとの結果であった。

作製したインスリンナノ粒子の粒径はその条件により種々のものが得られた。小さなものは10~20 nm、通常は100~300 nm、大きなときは500 nmになるが、PK、PD試験ではかなり類似の成績が得られた。以下述べる動物実験の成績は、ミリスチン酸かミリシチン酸ナトリウムを用いたものである。インスリンナノ粒子のPK・PDを行なった。正常マウス 糖尿病マウスに三次ナノ粒子を中心に、50, 100, 200  $\mu$ gの投与で比較し、また種々の粒径のナノ粒子を各種正常、および糖尿病マウス・ラットで検討したところ、ばらつきはあるが類似の成績が得られた。表にしてまとめているが、正常マウスのd d Yと、糖尿病モデルマウスのd B / d Bおよびk k A yの3系統のマウスで、現インスリン製剤と本研究で作製したナノ粒子製剤との比較実験を行なった。現インスリン製剤は3から5  $\mu$ g / h e a dを背部皮内投与し、本研究のインスリンは200  $\mu$ g / h e a dの用量をグリセリンを基材とした製剤として背部皮膚に塗布した。その結果を表として示した。d d Yマウスにおいて、血糖降下作用が示された。また、糖尿病モデルマウス (d B / d Bおよびk k A yの両者共) でも血糖降下作用が認められた。これらのマウスにおける血糖降下作用は、モノマーのインスリンでの結果と比較して d B / d Bで55倍、 k k A yで57倍 であった。ナノ粒子化したインスリンにおいてはどのマウスにおいてもAUCは約20であり、現使用製剤のモノマーインスリ

ンではどのマウスにおいても約25程度であった。この結果からは、本研究の製剤が遜色ない薬理作用を発揮できることを示している。適用したインスリンが吸収されているか否かについて、マウスの採血を行ってインスリンの血中濃度を測定し、AUCとして換算した。血糖降下作用が認められた際の本製剤を経皮適用した動物の血中インスリン値は、現行製剤のモノマーインスリンの皮下投与と比較して、110倍であった。表の下段に示したように、ナノ粒子化した本製剤によると考えられるインスリン濃度の測定がなされた。

#### D. 考察

今年度については、主にインスリンの注射によらない投与方法に適する製剤を作製するために、ナノ粒子化する方法について研究を行なった。インスリンは現社会において急増している糖尿病患者にとって必要不可欠なものであるが、現製剤は自己による皮下注射による治療が主に行われており、患者にとって非常に苦痛でありまた毎日（1回ないし2回）の投与義務があつて精神的にまた社会生活を営む上で、いろいろと不便な点が多いことは明らかである。もし、注射ではなく皮膚への塗布が可能になるとか、服薬が可能となれば、患者にとってのQOLが飛躍的に改善されるであろうことは容易に想像できる。また、徐放性を持たせることもできれば、1日に何回も投与することなくなることも可能になると思われる。

東京慈恵会医科大学DDS研究所においては、これまでにターゲット能を持った徐放性ナノ粒子製剤、たんぱく質医薬の徐放製剤、炭酸カルシウムのナノ粒子などを開発してきた。これらの製剤は、静脈内投与、皮下投与、経皮投与などで適用可能である。そこで、この技術を応用して幅広いたんぱく質医薬、特にインスリンの経皮吸収製剤の開発を目指した。ナノ粒子化することによって皮膚のバリアーを通過することができる可能性を考えた。インスリンをまず不溶化して有機溶剤と混和してから、水中に滴下して作製するナノ粒子の作製方法から検討を開始した。不溶化する方法については、これまでにG-CSFで経験をつんできているのでそれを参考に検討した。2価または3価の金属イオンについて、相当広範囲に検討した結果、やはり亜鉛イオンが最適であった。また、粒子として作製したあとの製剤化を考慮すると、その粒子が付着しあつたり凝集することがあると、見かけの粒子径が大きくなり経皮吸収されない可能性が考えられたので、均一なナノ粒子とするために、粒子作製時に添加する化合物について様々な検討を行った。その結果として、インスリン製剤作製にはミリスチン酸を存在させること、また界面活性剤としてTweenを用いることを見出した。それでもなお、作製した粒子の物理的および化学的安定性を

増すために、カルシウムイオンに炭酸イオンを用いて結果的には炭酸カルシウムのシェルとすることを考えた。この炭酸カルシウムでの被覆を行なわないインスリン粒子を皮膚に適用しても、その吸収は極端に悪いものであった（データは未発表）。一方、炭酸カルシウム被覆の本研究で作製したインスリンナノ粒子は、結果で示したように、経皮吸収され血中のインスリン濃度が上昇し、かつ血糖値の下降作用が認められる。したがって、この製剤が経皮吸収されるのには炭酸カルシウムでできた粒子であることが重要な要因となっている可能性がある。我々がこれまでに別の化合物に対して作製した炭酸カルシウムナノ粒子が、経皮投与で薬理学的効果を示しているという事実と矛盾しないと考えている。

この血糖値の下降作用は正常マウスばかりでなく、糖尿病の病態モデルマウスのd B/d Bマウスでもk k A yマウスでも認められたことから、糖尿病治療に用いることが可能であると思われる。事実、この製剤を皮膚に塗布したとき皮膚の角質層にインスリンが染色されることから、この製剤が経皮吸収されていることが証明されている。また、適用数時間後においてもその角質層で検出できることから、炭酸カルシウムのナノ粒子として長時間にわたって徐放している可能性も考えられる。このことは、経皮適用した動物実験での血糖値下降が1時間目から徐々に現れ始め実験を行なった6時間後でもなお継続していたという結果と一致している。なお、現インスリン製剤を皮下投与すると、投与30分後に降下は最大となり、3時間後には相当の効果の減弱が生じると対照的である。

現在までの実験結果では、効果をもとめるものの、投与量が皮下投与に比べてかなり大量でなければ同等の効果が得られていない。これは現在の作製方法でのインスリンの粒子内への封入率の問題であろう。これを改善することが今後重要な研究すべき事項である。

さて、本年は1年目であり、今後の方針を決めなければならない。今後の方針として考えられるのは、ラットでは効果があるが、他の動物で調べる。現在の製剤で、ヒトで検討してみる。現在の製剤を改良する。全く別のナノ粒子を用いる、の4つであろう。教科書的、文献的にマウス、ラットの皮膚とヒトで、薬物が吸収しやすい皮膚の薄い場所の組織像を比べてみると、構造的にそれほど差異は見られないので私どもは②の現在の製剤でヒトで検討してみる、を進めておきながら他の3つを平行検討するのがよいのではないかと考えている。この程度の吸収であれば臨床試験上まったく危険はなく、また2型の糖尿病の初期からも使えるという医学上の著しいメリットがあるため、倫理委員会を通して臨床試験をすることは医学的・倫理的に正しいと考えている。

現在の製剤をヒトに用いるとして、可能かどうか、また採算が合うかを検討



してみると次のようになる。特に2型の糖尿病患者の基礎分泌の補填には一日10～15単位で十分である。本経皮製剤が8時間もつとして、1回3～5単位、皮下注射の30倍必要として1回100～150単位、mgとすれば5mg以上、近いうちインスリンがバイオで1g2万円で作製できるとして、1回の経皮投与量が100円少し、つまり製剤として500円のを1日3回投与することで十分であり、採算も合い、医療経済上も間違いなくプラスになるものと思われる。

## E. 結論

本研究では、たんぱく質医薬の製剤を作製することが主な目標である。今年度の研究として、インスリンを取り上げ、亜鉛、ミリスチン酸を混合し、アセトンに溶かし水中で懸濁する方法により、ナノ粒子製剤の作製を試みた。その結果として、粒子内にインスリンを取り込ませた製剤の作製に成功した。この製剤の作製方法の概念については、条件検討を広範囲に行った。しかしながら、粒子径を自在にコントロールするところまでには至っていないこと、封入率がそれほど高くないことなど、まだ改善しなければならない点が残っているのも事実である。しかしながら、作製したインスリン・ナノ粒子を動物に投与した場合、たとえば皮膚への塗布によっても血糖値の下降ならびに血中インスリン濃度の上昇が確認された。この結果は、この製剤作製法が根本的に用いることができないというのではなく、粒子内への封入率さえ上昇すれば臨床的に使用可能であることを示唆しているものと思われる。

得られた結合体自体が目的とするナノ粒子そのものであり、驚くべきことに、このナノ粒子を経皮、経粘膜投与した場合に、当該ナノ粒子がキャリアーとして作用し、そこに含有された生理活性たんぱく質またはペプチドを良好に生体内吸収させるものであり、その生体内吸収性は高く、注射投与に代わり得るものとなる。

実験モデルとして使用したポリスチレン粒子の研究結果からは、今後さらに確認を行なう必要があると思われるが、経腸吸収用製剤の作製できる可能性が示唆された。

しかし、最も大切な血糖降下作用が未だ十分ではないとしても、このままの製剤でもヒトに応用することは可能であり、来年度は臨床試験を行う予定である。それとともに本製剤の改良か、全く別のナノ粒子を作るなどの研究も進めていきたいと思っている。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 上野晃憲、水島 裕 医療におけるナノテクノロジー Annual Review 呼吸器 2005 58-63 2004
2. T. Ishihara, N. Izumo, M. Higaki, E. Shimada, T. Hagi, L. Mine, Y. Ogawa, and Y. Mizushima Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile Journal of Controlled Release in press
3. 石原 務、出雲 信夫、水島 裕 ナノ微粒子製剤の開発とその DDS への応用 Pharm Tech Japan 20(13) 2621-2627 2004
4. 石原 務、出雲信夫、檜垣 恵、水島 裕 新しく開発中の薬剤①ーナノステロイドー 炎症と免疫 13(2) 143-147 2005
5. Ueno Y. Futagawa H. Takagi Y. Ueno A. Mizushima Y. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for new delivery system J. Contorlled Release In press
6. Mizushima Y. Ikoma T. Obata A. Futagawa H. Shimada E. Ishihara T. Ogawa Y. Tanaka J. Injectable porous hydroxylapatite microparticles for the delivery of protein and lipophilic drugs J. Contorlled Release In press
7. Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. Mizushima, T Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem. Pharmacol.* 67 575-585 2004
8. Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. Mizushima, T. Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs. *Dig. Dis. Sci.* 49 210-217 2004

- 9 . Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. Mizushima, T. NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells. *Cell Death Differ.* 11 1009-1016 2004
- 1 0 . Tanaka, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. Mizushima, T. Cytotoxic synergy between indomethacin and hydrochloric acid in gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull* 27 1188-1192 2004
- 1 1 . Tomisato, W., Tanaka, K., Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Aburaya, M., Li, D., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Yokomizo, K., Mizushima, T. Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 1032-1039 2004
- 1 2 . Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W. , Tsuchiya, T. Mizushima, T. Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res.* in press.
- 1 3 . Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T. Mizushima, T. Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* in press.
- 1 4 . Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Mizushima, T Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin. *Dig. Dis. Sci.* in press.

学会発表

- 1 . 石原務、井上圭子、嶋田恵美、檜垣恵、水島裕、医薬品封入ナノ粒子の皮膚組織への移行・効果と経皮吸収、第 20 回日本 DDS 学会、7 月 15 日（東

京)、Drug Delivery System、19(3)、237P、2004

- 2.
2. 水島 裕 (会長講演) 新規テクノロジーによる抗加齢医療の進歩と学会の役割 第4回日本抗加齢医学会総会 6月13日
3. 水島 裕 ナノ DDS の動向と展望 日本エム・イー学会専門別研究会 第1回ナノメディシン研究会 7月28日
4. Mizushima Y. Trends of anti-aging medicine in Japan The 1st AOFAAM Scientific Conference & the 5th KA3M Annual Conference
5. 水島 裕 (特別講演) 再生医療と行政「文部科学省の政策と今後の産官学連携の展望」 第19回日本組織工学会 6月12日 東京
6. 水島 徹 NSAID s 研究の新展開 岡山大学医学部での招待講演 2004 (岡山)
7. 水島 徹 NSAID s 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導約による保護 Heart Protection Forum 特別講演 (2004) 佐賀
8. 水島 徹 NSAID s 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導約にとる保護 実験潰瘍学会イブニングセミナー (2004) 大津
9. Tohru Mizushima Mechanism of NSAID-induced gastric lesions and its protection by HSP inducers. International Symposium in Biohealth Products Research Center (2004) (Pusan)
10. 水島 徹 NSAID s 研究の新展開 愛媛県病院薬剤師会学術講演会 (2005) 愛媛

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### (1) 特許

1. 胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症剤のスクリーニング方法  
特願 2004-19439 (出願日 2004 年 1 月 28 日)

発明者：水島徹、水島裕

2. 経粘膜吸収用薬物封入ナノ粒子

特願 2004-205259 (出願日 2004 年 7 月 12 日)

発明者：水島裕、上野幸生、宇田川雅恵、亀山美栄子、鈴木嘉樹、関根準三

3. 生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる外用剤

PCT/JP2004/12718 (出願日 2004 年 9 月 2 日)

発明者：水島裕、上野幸生、山口葉子、五十嵐理慧、鈴木潤、石原務

4. 薬物を含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子らなる非経口投与用製剤

PCT/JP2004/15026 (v 2004 年 10 月 12 日)

発明者：石原務、水島裕、鈴木潤、関根準三、山口葉子、五十嵐理慧

5. 異なる粒子径を有する薬物封入ナノ粒子の作製方法及び当該方法で得られたナノ粒子

特願 2004-324455 (出願日 2004 年 11 月 9 日)

発明者：水島裕、金子圭子、大関祐美子

6. 胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法

PCT/JP2004/18722 (出願日 2004 年 12 月 15 日)

発明者：水島徹、水島裕

(2) 実用新案

該当なし

(3) その他

該当なし

## II 分担研究報告

## 製剤の作製法の検討と吸収に関する研究

分担研究者

上野 晃憲 (東京慈恵会医科大学D D S研究所・客員教授)

上野 幸生 (株式会社 L T T バイオファーマ 研究開発部 主席研究員)

### 研究要旨

たんぱく質医薬品の静脈内投与以外の投与方法で使用可能な製剤の開発をめざし、インスリンを用いて検討を行った。今年度の成果として、動物実験ではあるが、皮膚に塗布することによって血中インスリン濃度の上昇および血糖値の持続的下降を認めた。この製剤は、炭酸カルシウムで被覆されたナノ粒子である。実用化を目指すには封入率を上げる必要性が示唆された。他の製剤として生体分解性のポリマーのナノ粒子についても検討したが、現在のところ経皮適用可能な粒子径までの製剤化に至っていない。経腸吸収用の製剤の開発を目指して、20 nmから500 nmの粒子径の粒子を用いて検討を行ったところ、吸収される可能性を示唆する結果が示された。

### A. 研究目的

現在たんぱく質の医薬品の重要性が高まってきており、また多数のたんぱく質医薬品が開発されつつある。しかし、これらの医薬品については、現在静脈内投与が主であって、またその薬理学的な効果を持続するためには頻回の投与を余儀なくされている。それは主に、高分子であるために吸収が極端に低いこと、また消化管に存在するペプチダーゼなどにより分解を受けてしまうためである。本研究においては、このような医薬品を注射によらずに投与する方法を創出するために、まず注射以外の投与方法で利用できる製剤の作製を試みることを本年度の主な目的としている。

たんぱく質の医薬品は多数あるが、今年度については現在皮下投与が行われているインスリンについて検討を行った。インスリンは、生理活性のあるたんぱく質(ペプチド)として、比較的分子量が低く化学的に安定であるので扱いやすい。インスリン適用となっている患者は相当な数に上っており、潜在的な患者数も増加しているのが現状である。これらの患者にとって、毎日の自己による皮下投与は相当な精神的・肉体的な負担となって

いる。現段階で、インスリンについては経肺吸収を目的とした製剤の開発が進められているが、吸収効率など問題点が指摘されているのも事実である。もし皮下の塗布が可能になれば、かなりのQOL改善となることは明らかであろう。また、たばく医薬が消化管から効率よく吸収されるようになれば、これらの薬物を注射でしか投与していない現状の革命的な進歩となることが期待される。

投与方法の候補としては、経口投与による胃粘膜からの吸収と小腸および大腸からの吸収がひとつであり、また経皮からの吸収もひとつであろう。しかし、薬物を吸収させるに当たり製剤から溶出した状態で生体に入るのではなく、例えばナノ粒子内に薬物を封入して、そのナノ粒子そのものが生体に入っていくことを目標として研究を推進した。

我々は、これまでにナノ粒子、特に150 nmの粒子径のナノ粒子、が治療薬到達目的部位にターゲットされることを見出して、いくつかの薬物について製剤化を行ってきている。また、徐放性を併せ持った製剤の開発も行っている。本研究においては、以上の技術を利用した経腸吸収用または経皮吸収用に適したナノ粒子を作製する方法を検討し、更にたばく医薬の生物学的活性を失わせることなくその粒子内に封入することを検討した。

現在進められているDDS製剤開発において、経皮吸収においてはほんのわずかな吸収率しかない。これをブレイクスルーした経皮吸収用のナノ粒子を作製し、それがある程度の薬物徐放性をも併せ持つものにするべく検討を開始する。

また、吸収させる部位などの検討については、この研究の確認のため、また更なるブレイクスルーのために、生体分解性のないポリスチレンナノ粒子をひとつのモデルとして検討する。

## B. 研究方法

### (1) ナノ粒子の作製方法の検討

#### ① 不溶化するための金属イオンの検討

生理活性を有するたばく質として、今年度はインスリンを選んで検討した。インスリンを2価または3価の陽イオンと混和することにより、沈殿物を生成した。このときの陽イオンとして検討をおこなったのは、2価または3価の金属イオンとして、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、酢酸亜鉛などの亜鉛塩、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウムなどのカルシウム塩、塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩、塩化銅、硫酸銅などの銅塩である。それぞれのイオン濃度を変化させたり、pHの条件を設定したり、イオン強



度を変化させたりして粒子作製条件の詳細について検討を加え、最大の沈殿が生じる条件を検討した。

その他の水不溶化方法として、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、キトサンなどの酸性または塩基性多糖体と接触させることについても検討を行った。

#### ② 疎水基と陰イオンを有する有機化合物の種類の検討

水に対して不溶化したたんぱく質の水溶液に、疎水基と陰イオン懸塊を併せ持つ中鎖有機化合物を有機溶剤に溶かしたものおよび界面活性剤の水溶液を混ぜたものを、大量の水を入れたビーカーに攪拌しながら滴下してナノ粒子を作製した。この粒子を1次粒子として使用した。様々な有機化合物について調べたが、最終的には中鎖鎖樹化合物としてミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、とパルミチン酸を中心にして検討した。陰イオンの基としては、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などいくつかの陰イオン残基を有する化合物で検討した。これらの有機酸を溶解させるのに用いる溶媒について、種類や濃度について検討を行った。そのような有機溶媒として、アセトニトリル、ジオキサン、低級アルコールなどについて広範囲に調べた。

#### ③ 界面活性剤の検討

生成したナノ粒子同士の凝集を避けるために、適量の界面活性剤を添加することについて検討を行った。いくつかの界面活性作用をもつ化合物を粒子作成時に同時に添加して検討することにより、粒子外層へ界面活性化合物を露出させて生成した粒子同士の付着を阻止する程度について調べた。アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、天然系界面活性剤からいくつかの化合物について検討をおこなった。

#### ④ 粒子の被覆の条件検討

作製された1次粒子が不安定であるので、更に外から2価または3価の陽イオンを接触させることによりイオンを付着させて有機酸との結合させることを考えた。更に、このイオンで被覆された粒子に、塩基性の塩を加える工夫についても検討を加えた。

2価または3価の金属イオンとして検討したのは、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硫酸カルシウムなどのカルシウム塩、酢酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛塩、塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩、または塩化銅、硫化

銅などの銅塩であった。

また、2価または3価の塩基性塩としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウムなどの炭酸塩、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウムなどのリン酸塩、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウムなどのシュウ酸塩、乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウムなどの乳酸塩、尿酸ナトリウム、尿酸カリウム、尿酸カルシウムなどの尿酸塩などによる検討を行った。

## (2) インスリン製剤作製の様子

(1) で検討した研究結果として、一応のインスリンを薬物とした経皮または粘膜への適用を目的とした製造方法を確立した。模式的な図として、図1にその様子を示している。まだ、最終的な細かい検討事項は残っていると考えている。以下にその方法を記載する。

まず、生理活性たんぱく質またはペプチドを酸性、塩基性または中性の水に溶解し、その溶液に2価または3価の金属イオンを加え、生理活性たんぱく質またはペプチドを水不溶体とする。この懸濁液に、中長鎖有機化合物と界面活性剤を有機溶媒あるいは含水有機溶媒に溶解した液を加え、溶解または懸濁させ、この溶液を多量の水に分散しながら加える。この溶液を1～30分間程度攪拌することにより、一次ナノ粒子が作製される。かくして作製された一次ナノ粒子を含有する溶液に、2価または3価の金属塩を加え、1～30分間攪拌し、次いで2価または3価の塩基性塩を加え、1～30分攪拌することにより本発明のナノ粒子を製造することができた。

以上の方法で製造されたナノ粒子の溶液を凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥等することにより溶媒を除去して製剤用組成物として作製できれば、適宜製剤基剤、添加剤等を使用することにより、外用剤を調製することができる状況である。

このとき、すべてが沈殿粒子として回収されているのかどうかについて、反応液の上清部分と沈殿部分について粒子の存在とその粒子径について調べた。

## (3) インスリン製剤の薬理学的効果の検討

### ①Insulin ナノ粒子の経皮吸収実験について

Insulin 1mg (ICN; insulin human recombinant) と塩化亜鉛 0.5mg (和光純薬工業) を混合して沈殿化し、アセトンに溶解したミリスチン酸ナトリウム 0.5mg (和光純薬工業) と混和して水中に滴下して作製したナノ粒

子を、更に炭酸カルシウムで被覆したものを使用した。以後の記述において、1次粒子は陽イオンを用いる前の段階のもので、2次粒子は、陽イオンを用いて作製したもの、3次粒子は更に陰イオンの操作を行ったものとする。

使用動物としては、3系統のマウスを用いた。ddY マウス (7-8 週齢、雄性、日本 SLC) を正常マウスとして比較するために用いた。糖尿病を発症するモデルマウスとして、dB/dB マウス (10 週齢、雄性、日本クレア) および kkAy マウス (12 週齢、雄性、日本クレア) を用いた。どのマウスも、購入後は東京慈恵会医科大学動物実験施設において予備飼育期間を経てから実験に使用した。また、実験内容については東京慈恵会医科大学動物実験委員会にて、登録・許可を受けてから実施した。

経皮投与による血糖降下作用を調べる目的で、経皮投与の実験前日に ddY マウスの後頭部～背上部にかけて毛刈りを行った。実験中の血糖値をコントロールする目的で、経皮投与の 1 時間前に絶食をし、実験時間中は水のみを与えた。作製した insulin 3 次ナノ粒子を白色ワセリン (和光純薬工業) を基材としてよく混ぜて投与用サンプルを作製した。インスリンの投与量として 1 匹あたり 50、100、200  $\mu\text{g}$  を、あらかじめ毛刈りしておいた部分に塗布して経皮投与した。塗布前、塗布 30 分、1、1.5、2、4、6 時間後に微量の採血を尾静脈から行い、そのときの血糖値を直ちに簡易血糖測定器 (アベンティスファーマ社ダイアセンサー) を用いて測定した。対照実験として、現在使用されているインスリン製剤の Monomer Insulin を 3  $\mu\text{g}/\text{head}$  の用量で皮下投与して比較した。なお、同様に採血を行って、血液中のインスリン濃度の測定も行った。測定は液体クロマトグラフィー (東ソー AIA-600) を用いて行った。

また、糖尿病モデルマウス dB/dB および kkAy にも同じ 3 次ナノ粒子 200  $\mu\text{g}$  をワセリンを基材として作製したものを背部皮膚に塗布し、同様の時間経過で採血して、血糖値の時間変化を調べた。

## ② 背部皮膚の免疫染色

本研究で作製したインスリンナノ粒子 200  $\mu\text{g}$  をグリセリンを基材としてその含量が 30% になるように背部皮膚に塗布する製剤を作製した。ddY マウスの背部の毛を兵部塗布の前日に刈っておいた。製剤を塗布 1 時間後に、エーテル麻酔により死亡させてから製剤を塗布した背部の皮膚を剥離して凍結切片を作製した。マイクロトームを用いて、切片を作成し、ヒストファイン マウススティンキット (ニチレイ) によって免疫組織染色を行った。その後、光学顕微鏡で 400 倍の拡大で観察を行なった。

比較対照の実験として、現在使用されている溶液製剤 Monomer insulin

200  $\mu$ g を、d d Yマウスの背部に同様に塗布し1時間後に皮膚切片を採取して、凍結切片を作製した。上記方法と同じ方法にて染色を行なったから、光学顕微鏡で組織観察を行なった。

#### (4) 他のナノ粒子化製剤への試みの検討

##### ① PLA/PLGA粒子化の検討

東京慈恵会医科大学DDS研究所において、これまでにいくつものDDS製剤の開発を行ってきている。そのひとつに、生体での分解が可能であるポリマー（ポリ乳酸PLA、またはポリ乳酸グリコール酸共重合体PLGA）を用いたナノ粒子製剤がある。現在、100nm程度の作成法も確立している。そこで、これまでの作成方法に準じたやり方で、たんぱく質医薬品に応用可能であるかについて検討した。

インスリンについて以下の方法での検討を行った。

0.1N HClに溶解した50mg/mlインスリン20  $\mu$ lと0.5M酢酸亜鉛20  $\mu$ lを混合して沈殿を生成させた、この沈殿とアセトンに溶解したPLAまたはPLGA 40mg/mlを500  $\mu$ lに溶解した。この溶液を蒸留水5ml中に分散し、に、000 r.p.m 3分間遠心分離して上清を粒子液とした。粒子液を14,000 r.p.m 10分間遠心分離して、沈殿（粒子内）および上清（粒子外）のインスリン濃度をELISA法で測定した。また、同様に得た沈殿を蒸留水に再分散した後凍結乾燥し、粒子重量を測定した。粒子アナライザーを用いて粒子径を測定した。作成する際に、用いたPLAは0005, 0010, 0020の3種類で、PLGAは5005, 5010, 5020の3種類である。

次に、PLGA5005を用いて作製する粒子について、封入含量を増加させる目的で、アセトン量を変化させたり、塩酸濃度を変えてのpHによる影響についても検討を行った。

##### ② ポリスチレンナノ粒子での検討

経皮投与または経腸投与の可能性を探るため、また更なるブレイクスルーのために、生体分解性のないポリスチレンを材質とするが、様々な大きさのナノ粒子が入手可能なので、ポリスチレン粒子を用いてのモデル実験を計画した。

ポリスチレンLatex粒子として、2種類のものを用意した。ひとつはポリスチレンのみでできた約60nmの粒子であり、もう1種類はポリスチレンカルボキシレートでできた粒子（Latex-COOHと略す）