

である。L a t e x - C O O H については、径が、20 nm、50 nm、100 nm、200 nm、500 nmの大きさものを用意した。この粒子内に蛍光物質を封入したものを購入して使用した（ポリサイエンス社製、またはモレキュラープローブ社製）蛍光物質としてフルオロセン（緑色の蛍光を発する）またはローダミン（赤色の蛍光を発する）を封入したものを実験に使用した。実験には、ほとんどの場合、L a t e x - C O O H を使用した。対照実験として、ポリスチレンのみでできたものを使用した。

これらのポリスチレン粒子に、使用中の凝集を防止する目的で、PEG-オレイン酸を界面活性剤として添加した。この粒子を1次粒子として使用した。また、このポリスチレン粒子にカルシウムを添加して、カルボン酸にカルシウムを付加させたものを作製した。これ2次粒子として使用した。さらに、この2次粒子に炭酸ナトリウムを作用させて、炭酸イオンを付加したものも作製した。これを3次粒子として使用した。実験に用いる前に、凝集しているものを除去する目的で、遠心を行なってからその上清部分を用いた。

経腸吸収の実験においても。経皮吸収の実験においても、動物としてd d Yマウス（6～8週令、雄性、日本SLC）を用いた。経皮投与の場合は、実験前に背部の毛を刈ってから使用した。製剤としては、ワセリンを基材として作製したものを使用した。経腸投与においては、マウスを麻酔して開腹し、上部空腸内腔にL a t e x 粒子の溶液を100 μ lを投与した。投与後15分、30分、1時間後に胃より下部の消化管全てを摘出した。小片にした後抱埋して、凍結下でクリオスタットを用いて標本を切り出した。標本の観察は、光学顕微鏡でそのままの様子を観察した後、蛍光顕微鏡を用いて、蛍光物質の存在について調べた。

C. 研究結果

(1) ナノ粒子の作製について

① 不溶化するための金属イオンの検討

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。

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。

実験を行なった結果を総合的に観てみると、生理活性たんぱく質またはペプチドと2価または3価の金属イオンとの配合比は特に限定されず、両物質が結合することにより水不溶体が生じるに十分な比率であればよいことが明らかとなった。例えば、亜鉛イオンの場合には、生理活性たんぱく質またはペプチドと亜鉛塩とを、重量比で10：1から1：2程度とするのがよい結果であった。

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、あるいは生理活性たんぱく質またはペプチドを溶解した溶液のpH調節、イオン強度の変化などにより行うことも考えられるが、検討した結果では一応可能であると判断できる結果であった。なお、生理活性たんぱく質またはペプチド自体が水不溶性である場合には、そのまま使用することができると思われる。

最終的には、インスリンに亜鉛を加えて沈殿化する方法を用いることとした。また、亜鉛とインスリンの混合において、添加の順序を逆にしても最終的に作製される粒子の粒子径には変化は認められていない。

② 疎水基と陰イオンを有する有機化合物の種類を検討

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。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。

今年度の研究成果としては、疎水基と陰イオン残基を併せもつ有機化合物であればどのようなものでも使用することができるという結果である。しかし、中でもカルボキシル基を有する中長鎖有機化合物が特に優れている結果であった。そのような中長鎖有機化合物として検討したもののなかでは、ミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸およびパルミチン酸が好まし

い結果であった。

ミリスチン酸の代わりに他の飽和脂肪酸で行なってみたところ、パルミチン酸やステアリン酸の場合においても、ミリスチン酸に不飽和脂肪酸を混合した場合（オレイン酸、リノール酸、リノレン酸を10, 30, 50%混在させる）においても、出来上がった粒子径は50~100nmの大きさを満足いく大きさではあった。しかし、IRI値を調べてみると皮下投与するとすぐに壊れてしまうことを示す結果であった。これらのものを試しに、マウス皮下投与してみたが、血糖下降作用は認められなかった。したがって、インスリン製剤作製においては、ミリスチン酸のみを使用するのが最も適切であると考えられた。

添加する中鎖有機化合物が粉末である場合にはそのまま反応系に加えることは可能である。しかし、水に対しての分配係数が極端に小さい場合や溶液状である場合は、有機溶媒または含水有機溶媒中に溶解して使用することが必須となってくる。しかし、用いる有機溶剤が粒子形成に影響を及ぼす可能性は充分考えられる。そこで、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ところ、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどの低級アルコールで良い結果が得られた。なかでもアセトン、エタノールが好ましい結果であった。また、添加量について検討した結果、生理活性たんぱく質またはペプチドに対する中鎖有機化合物との配合重量比は、0.03~0.5程度とするのが好ましいことも判明した。以上の結果を踏まえて、今年度のインスリンの製剤化においては、ミリスチン酸をアセトンに溶解して添加する方法を選択した。

③ 界面活性剤の検討

このナノ粒子を製造するに際しては、水中に攪拌しながら滴下する方法でナノ粒子としての製剤化を図っている。しかし、上記の方法のみで粒子を作製すると、どうしても粒子同士の凝集を防げないことが判った。そこで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。いくつも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。これらの中で、非イオン性界面活性剤での成績が好まし

いものであった。

粒子作製時に加える量としての配合量の比については、実際に用いることができるかどうかのナノ粒子同士の凝集の程度に合わせて適宜選択することができるが、粒子作成に当たって中長鎖有機化合物を用いた場合にはモル比で0.3～0.03程度使用するのがもっとも良い結果であった。

そのような界面活性剤として検討した中では、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (Tweenシリーズ)、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなどの非イオン性界面活性剤が良い結果であった。その中でも、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル (Tweenシリーズ) が最も良い結果を示した。したがって、今年度に検討したインスリンでの製剤化においては、Tweenを使用して作製したものを利用することとした。

④ 粒子の被覆の条件検討

以上の条件設定により、生理活性たんぱく質またはペプチドを水不溶体として中長鎖有機化合物および界面活性剤を用いてナノ粒子（一次ナノ粒子）を作製するが、非常に不安定な粒子である。また、経皮吸収を目的として製剤化を試みているので、経皮吸収についてプレリミナリーに検討したところ、吸収率は極めて悪いと判断せざるを得ない結果であった。この粒子の生体内での安定性の向上や吸収率の上昇および吸収後の徐放性を高める目的で、更に工夫を加える検討を行った。

一次ナノ粒子を作製した後、2価または3価の金属塩、続いて2価または3価の塩基性塩と順次接触させることにより、金属塩と塩基性塩が順次結合して、結果的に一次ナノ粒子の周囲を水不溶性の金属塩が覆う状態を有する結合体を作製することである。これにより、粒子が物理的に安定することが期待される。

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る。そのうち、カルシウム塩、特に塩化カルシウムが良好な結果であった。添加する金属塩の量について検討したが、それほど大きな影響は認められていない。しかし、有効成分となる生理活性たんぱく質またはペプチドに対し、重量比で3～0.01程度であることがよいこ

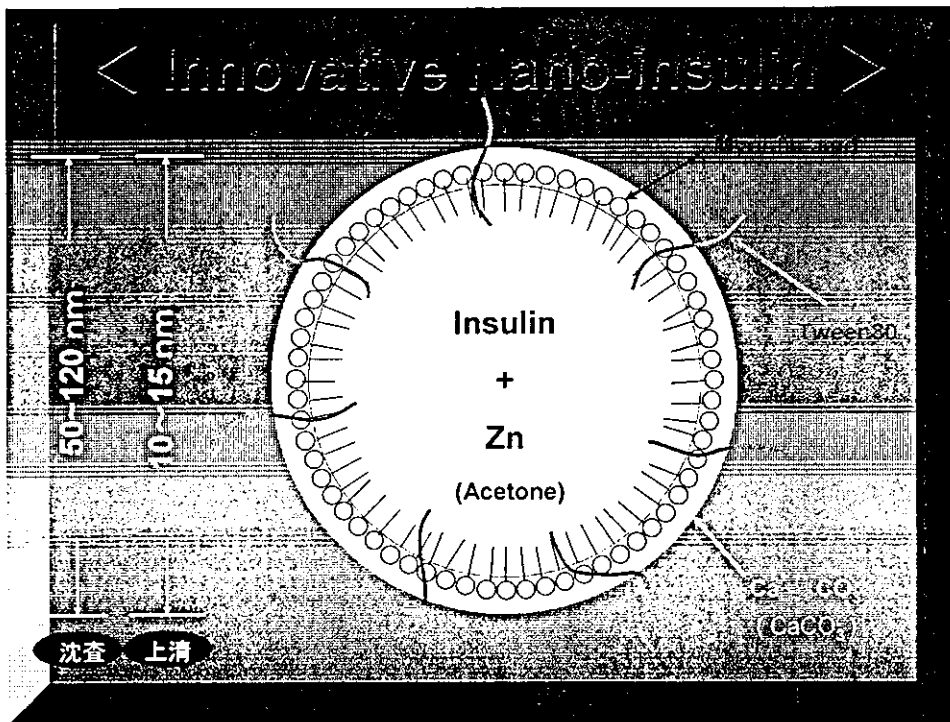


図 インスリン・ナノ粒子の模式図

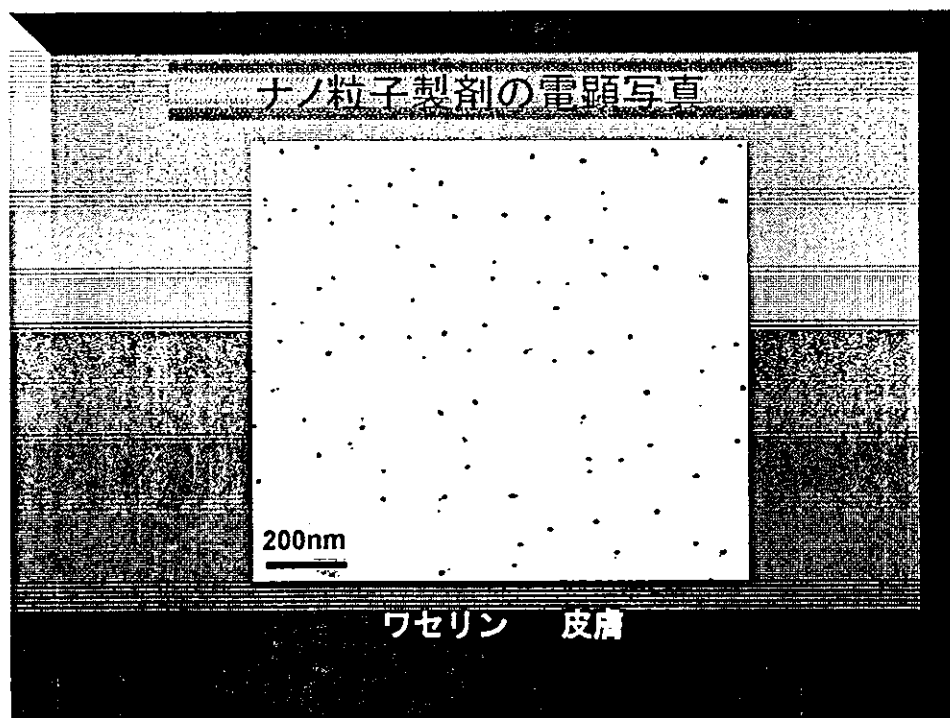


図 インスリン・ナノ粒子の顕微鏡写真

とを示唆する結果が得られている。

陽イオンで被覆したこの粒子（インスリンの場合はカルシウム用いているが、）は、生体に用いることを想定すると、物理的にも化学的にも安定性についてはそれほどの効果が期待されない。さらに、安定化する必要があるものと考えられるので、この陽イオンを付けた粒子を更に陰イオンを用いて強固な粒子とすることを検討することとした。そこで、2価または3価の陽イオンに対して2価または3価の塩基性塩を用いることを検討した。検討した陰イオンとしては、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である。検討した中では炭酸塩、特に炭酸ナトリウムが好ましい結果を示した。このときの添加する塩基性塩の配合量はそれほど影響しないことを示唆する結果であったが、用いた陽イオンとしての金属塩に対して陰イオンの金属塩のモル比が1.0～0.05程度であれば、かなり良い粒子となる結果であった。

(2) 作製したインスリンの粒子の様子

(1) で検討した様々な条件設定後に方法の項で述べた材料の組み合わせで作製したインスリン製剤についてその粒子径などを調べた。簡略化した図として、図1に示した。このとき製剤は水中に滴下する方法で作製したが、粒子すべてが沈殿物として回収されたわけではなかった。つまり、その反応液の上清にもインスリンを含む粒子が存在した。上清と沈査に分けて、その中に存在する粒子の粒子径について粒子アナライザーを用いて計測してみると、上清中には約10～15 nmの粒子径のものが多く存在し、沈査の中には約50～120 nmの粒子径のものが確認された。上清中の粒子を懸濁して顕微鏡で観察してみると、非常に均一な粒子として観察された。(図2)

(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

正常の ddY マウスにインスリン3次ナノ粒子を50、100、200 μg を塗布したところ、図3に示したように用量依存的な血糖降下作用が認められた。図に黒○で示したのはワセリンのみのネガティブコントロールであるが、絶食による血糖値下降はわずかであった。それに比べていずれの用量

ddY Mouseによる血糖降下作用 (経皮のdose responseとmonomer皮下注)

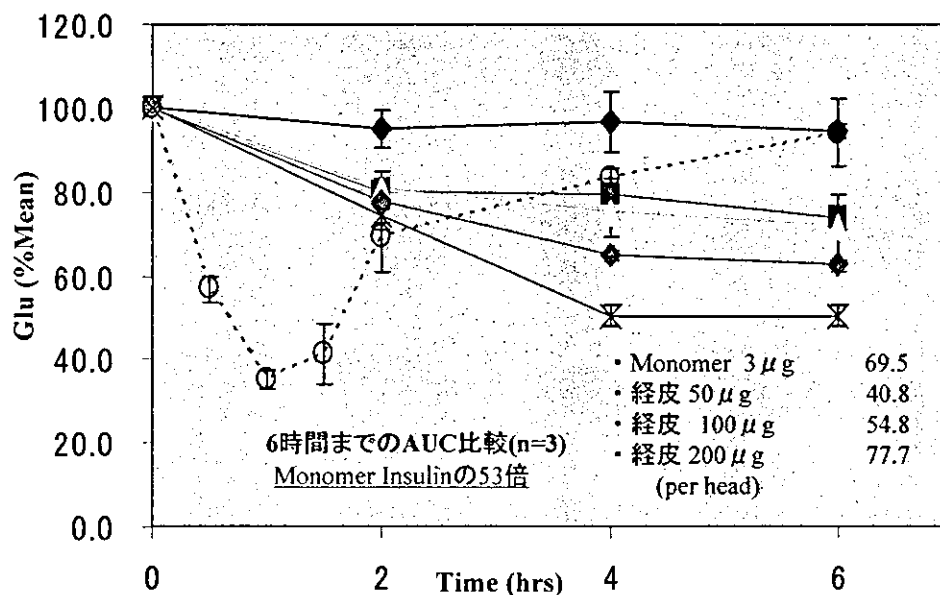


図 インスリン・ナノ粒子の経皮投与における血糖値の時間的变化と現製剤の皮下投与との比較

血糖降下作用 (AUC) と Insulin吸収量 (AUC)

	n数	Monomer (s.c.)		Nano insulin (dermal)		Dose比率
		Dose (μ g/head)	AUC (比較)	Dose (μ g/head)	AUC (比較)	
— 血糖降下作用 —						
ddY	20	3	27.8	200	22.2	83
dB/dB	7	5	25.1	200	18.2	55
kkAy	7	5	24.4	200	17.1	57
— Insulin 吸収 —						
ddY	4~5 (13)	3	11.9	200	7.2	110

* Monomer Insulinを経皮投与した際の血糖降下作用 および Insulin吸収は認められなかった。n=8, IRI: <15 μ U/ml, AUC: 1~2

においても、有意な下降効果が認められた。この結果は、背部皮膚に塗布したインスリン製剤が吸収されたことを示唆するものである。

ポジティブコントロールとしての現インスリン製剤を皮下投与した場合、投与後1時間を最大効果とする血糖値の下降が認められたが、その後の作用は減弱した。また、この製剤を経皮投与した場合においては、血糖値の降下作用は全く認められなかった。それに比べて本研究で作製したインスリンナノ粒子製剤では、6時間までの観察において、まだ血糖値の下降は維持され続けていた。その作用の強さを血糖が下降した効果をAUCの概念と同様にして、比較してみると、**Monomer insulin** を皮下投与した際の血糖降下作用と比較して、53倍であると計算された。

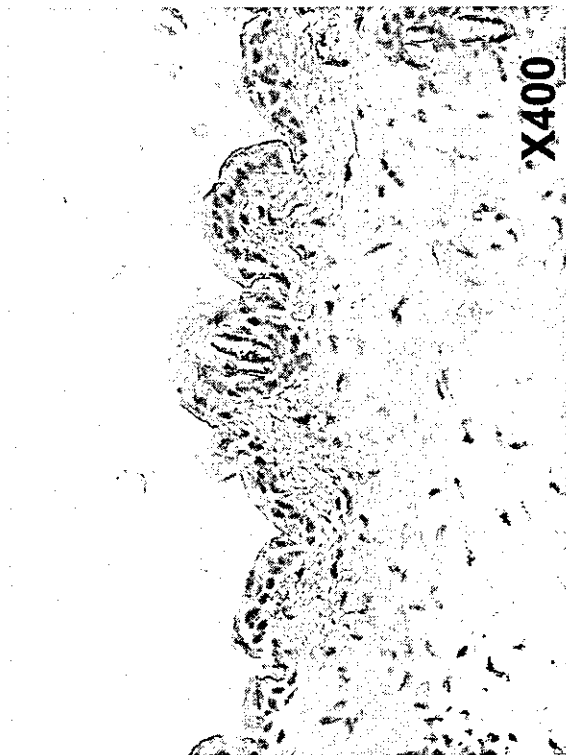
現在使用されている製剤の皮下投与に比べて、今回の実験においては経皮投与に用いたインスリンの量は大量であった。しかし、薬理学的効果としては、十分な効果を認めることができた。今後は、封入率上昇などの問題点克服がなされれば、実用化への可能性を示す結果であるといえる。

表にしてまとめてあるが、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 $\mu\text{g}/\text{head}$ を背部皮内投与し、本研究のインスリンは200 $\mu\text{g}/\text{head}$ 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 dB/dBで55倍、kkAyで57倍であった。表から明らかなように、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。

Insulin 経皮吸収 (粒子及び非粒子monomer をマウス皮膚に塗布)

Insulin 粒子 200 μ g



Insulin monomer 200 μ g



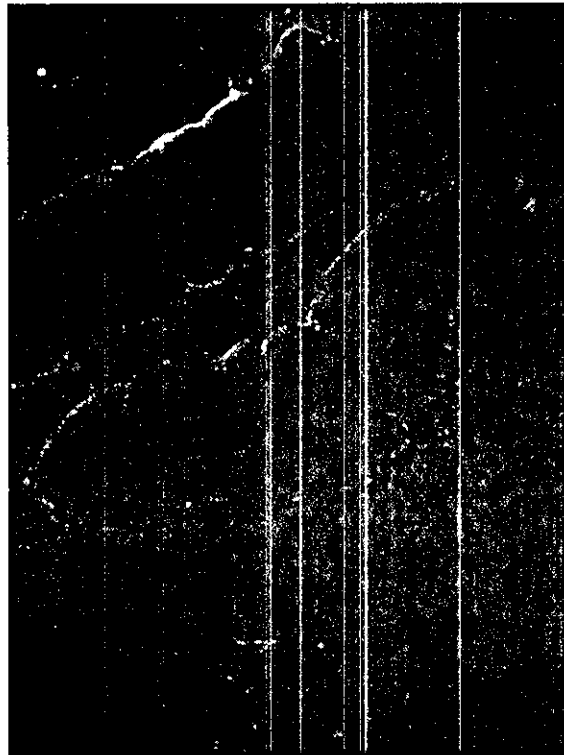
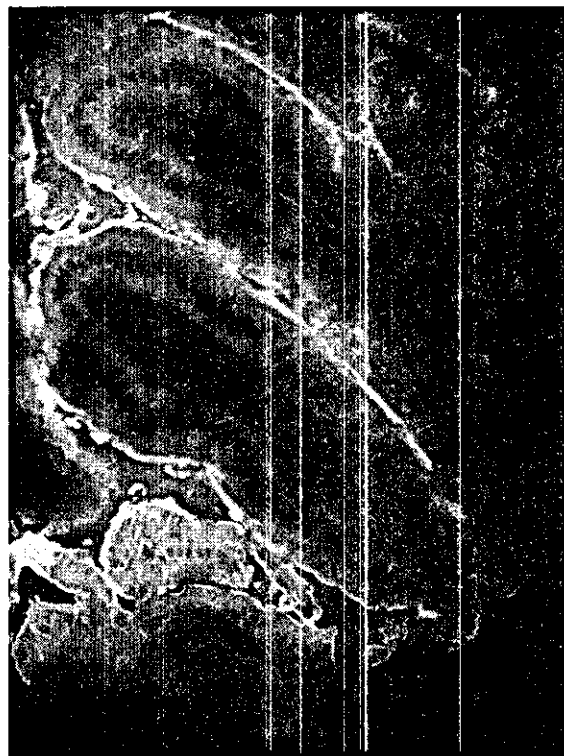
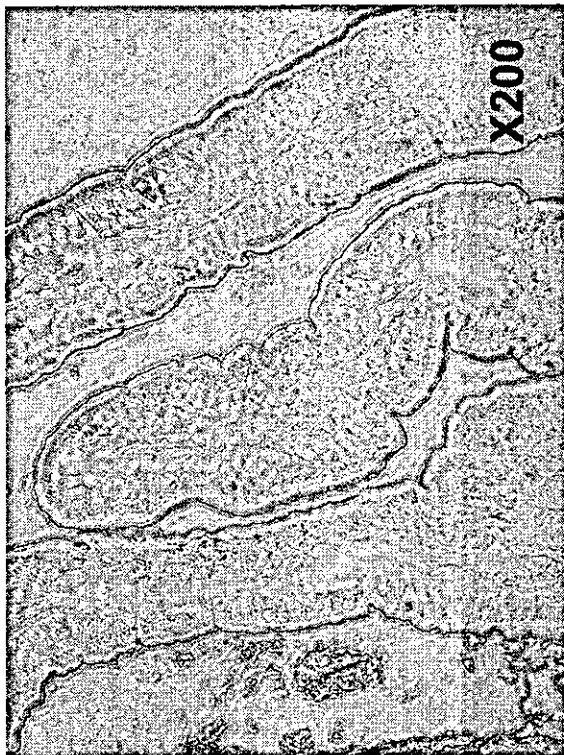
Polystyrene Latex 経腸吸収

Fluospheres 1mg マウスの空腸上部に注入 5分後

20 nm



100 nm



② インスリン投与したマウス皮膚切片の観察

現行製剤のモノマーインスリンを背部皮下に投与し、また本研究のインスリンナノ粒子はグリセリンを基材とした製剤として背部皮膚に適用した。どちらの製剤についても200 μ gを投与した。適用した背部の部位の皮膚切片を作成して、免疫染色を行なうことによりインスリンの存在を調べた。その結果を図に示した。上段は摘出皮膚の表層部分の写真であり、下段は皮膚の下層部分の結果である。すなわち、皮膚の途中の部分を省いて示した。モノマーインスリンにおいては、下段に示したように、角質の下の部分にはその存在が確認されず、おそらく吸収されてしまって皮膚の組織中には残存していないと考えられる結果であった。一方、本製剤の場合は、図の左下に示したように、皮膚角質の下にインスリンの存在が認められた。これは、ナノ粒子化された状態で存在している可能性を示していると思われる。

(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

PLAまたはPLGAの種類を変えて、インスリン含有ナノ粒子作成を行なった結果を以下の表にまとめて示した。表におけるデータは、作成した粒子のうちの遠心によって得られた沈殿した粒子に関してである。作製した粒子内のインスリン濃度は、ほぼ同じでポリマーによる影響は認められなかった。粒子の重量についても、ポリマーによる違いは認めなかった。作製されたナノ粒子内にどれだけの量が封入されたかについて、粒子からインスリンを放出させてからELISAで測定した。その結果は、いずれの場合でも0.1%程度であり、ポリマーの種類や分子量による影響を認めなかった。更に、粒子径を調べてみると、200から340 nmの平均粒子径であるという結果であった。この粒子径では経皮吸収を目的とするには大きいように思われる。

表 インスリンナノ粒子作成におけるポリマーの影響

PLA/PLGA	粒子内インスリン濃度 [ug/ml]	粒子重量 [mg/ml]	粒子内インスリン封入率 [%]	平均粒子径 [nm]
PLA 0005	2.4	2.1	0.11	211.9
PLA 0010	2.1	1.8	0.12	205.7
PLA 0020	2.3	1.9	0.12	216.3
PLGA 5005	2.7	2.3	0.12	241.1
PLGA 5010	2.2	2.4	0.09	340.3
PLGA 5020	2.9	2.6	0.11	252.7

PLGA5005をアセトンに溶解するが、粒子作製に当たりそのアセトン量（結果的にはPLGA量を反映する）を変化させて、粒子を作製した。粒子作製時のインスリンの溶液とアセトンの混液中のアセトン濃度を変化させて検討を行った。それ以外については、上記作製法のままである。インスリンの溶液とアセトンの混液（表では粒子液と表示）中のアセトン濃度は、10, 20, 30%になるように調整した。その結果を下記の表にまとめた。アセトンの濃度を増加させると、粒子径が大きくなる傾向があった。アセトンを10%の状況においてもその粒子径は約200nm程度であった。粒子内に封入されたインスリンの量については、アセトン20%において2.2 μ g/mlであり、前述の結果とあまり変わらない数値であった。

表 インスリンナノ粒子作成におけるアセトンの影響

粒子液アセトン濃度 [%]	粒子内インスリン濃度 [ug/ml]	平均粒子径 [nm]
10	1.9	191.5
20	2.2	292.7
30	0.8	622.2

用いるポリマーをPLGA5005として、前述の方法で作製したインスリン・ナノ粒子を用いて検討を行った。このとき、粒子内への封入されるインスリン量に対する影響を調べるために、インスリン・亜鉛・PLGAの混ざったアセトン溶媒を滴下していく外相の水溶液のpHを変化させて粒子作製した。pHの調整は、0.01N HClおよび0.01N NaOHを混合することにより、pHを2から12までに行なった。その結果、pHが2のときに粒子内の封入率が下がり、逆にpHが12のときは封入率が上昇した。その間のpHにおいては、封入したインスリン濃度はほぼ2 μ g/mlであり、上記の実験結果と同様の値であった。そのときの粒子径を測定した結果についても表にしてあるが、粒子径は極めて大きいものになってしまう傾向であった。pH12のときの粒子径は160nm程度であって最も小さいものであった。したがって、アセトンを滴下する水溶液のpHが作製される粒子の径に影響を与えることが示唆された。

表 分散液のpHの影響

分散液 pH	粒子内インスリン 濃度 [ug/ml]	平均粒子径 [nm]
2.0	0.6	402.7
4.0	2.5	229.0
6.0	2.0	275.2
7.0	2.5	213.0
8.0	2.0	595.1
10.0	2.5	762.3
12.0	6.6	160.5

② ポリスチレンLatex粒子での検討

ポリスチレン粒子は2社から購入した。ローダミンが封入されているものは、蛍光色素が漏れ出ることが多く、ポリスチレンLatex内にあるのか、漏れ出たものであるのかの区別がつきにくかった。したがって、フルオロセンを封入したものを用いることとした。しかし、ポリサイエンス社製のものは比較的漏れやすいので、できるだけモレキュラープローブ社製のものを使用することとした。

製品として購入したものにおいても、遠心をすると同量の蛍光物質が上清中に存在するために、できるだけフリーの蛍光物質が少ないようにして使用することにした。例えば、エタノールを加えると更に溶出量が増加した。50 nm以上の大きさの粒子については、一度遠心後してから使用した。しかし20 nmの粒子については、遠心をしてでもポリスチレン粒子が沈降しないために、完全にフリーのものを除去できていないものを使用した。

麻酔下で、マウス空腸内にポリスチレン粒子を注入してその後摘出し切片を標本とした。図には、100 nmの粒子の結果と20 nmの粒子の結果を代表例として示した。顕微鏡写真は、上段に明視野での観察、下段には蛍光顕微鏡での観察を、それぞれ上段と下段に示した。右に示した粒子径のポリスチレン粒子100 nmの場合は、腸管の絨毛部分にほとんど蛍光色素が認められない状況であった。50 nm以上の大きさのポリスチレン粒子においては、100 nmでの結果とほぼ同様のものであった。図の左側に示したポリスチレン粒子の径が20 nmの場合は、絨毛部分に強く蛍光を発していることが確認された。また、絨毛内にも蛍光物質の存在を示す結果であった。

D. 考察

この血糖値の下降作用は、正常マウスばかりで今年度については、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-C S F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っ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T w e e n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。

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。

炭酸カルシウム被覆ナノ粒子以外において、封入率を上昇させることができないかについて検討を行った。これまでに製剤化の経験があるポリマーを用いたナノ粒子内に封入できるかどうかについての基礎的研究を行なってみた。インスリンの炭酸カルシウムナノ粒子製剤は、作製した溶液中での沈降物として得られる。粒子径をアナライザーで測定すると、平均粒子径が約100 nm程度であった。ポリマーとして、PLAもしくはPLGAを用いても、同じ位のナノ粒子製剤が作製できる技術を我々の研究室では保持しているので、検討を行った。結果としては、封入は可能であるが、封入率が約2%程度であった。また、PLAとPLGAの分子量を変えても、またインスリンの溶液の状態を変化させても、大きな変化は認められなかった。さらに、検討した条件下で作成された粒子の径は、100 nmよりも遥かに大きいものであった。この大きさでは、経皮吸収には不適であると結論せざるを得なかった。今後は、このポリマーを用いても100 nm以下の粒子径の製剤作製法の技術も開発しているので、工夫することは可能であると考えている。

本研究の分担者の研究によって、たんぱく質のフォールディングが調節可能となれば粒子内への封入率を上げる技術の開発へと繋がる可能性もあると思われる。

ポリスチレン自体は、生体で分解されないためそのままインスリン製剤として利用することは想定していない。しかし、経皮投与以外の投与経路、例えば経腸吸収製剤の開発の可能性を探る手段として今年度の研究に用いて検討した。蛍光物質が封入されたポリスチレン粒子を用いての経腸吸収の観察において、結果に示したように20 nmの粒子では絨毛部分に蛍光を認めた。絨毛内部まで蛍光が認められたので、吸収されている可能性が考えられる。しかし、この大きさの粒子についてはポリスチレン粒子から漏れ出ている蛍光物質を完全に排除していないので、粒子が絨毛に付着しているのか、内部に入り込んでいるのかについては確定的な結論は今回の実験結果からは断定ができない。今後確認する必要があると考えられる。もし、この大きさの粒子が経腸吸収するのであれば、インスリンなどのたんぱく質医薬を封入した20 nm程度の粒子製剤を開発することには意義があるものとする。

E. 結論

本研究の分担研究として、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、インスリンを例にして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ている。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。

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を示唆された。

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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

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 (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 (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 (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からなる非経口投与用製剤
PCT/JP2004/15026 (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 (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 (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

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

水島 徹 熊本大学大学院医学薬学研究部教授

研究要旨

我々は非注射型ナノDDS製剤の開発には、たんぱく質の高次構造を制御するたんぱく質、分子シャペロンの研究が重要であると考え研究を行っている。GGA（世界で唯一の毒性のない分子シャペロン誘導剤）が毒性を示さないのになぜ分子シャペロンを誘導するのか、即ちGGAによる分子シャペロン誘導機構を検討し、分子シャペロンの発現に必須な転写因子（HSF1）を不活性化している因子（HSP70, HSP90）とGGAが結合することを発見した。そこでGGAは、これらの不活性化因子を阻害しHSF1を活性化することにより、分子シャペロンを誘導していることが分かった。また、HSP70, 及びHSP90と結合する物質を天然物から発見し、これが毒性のない新たな分子シャペロン誘導剤であることを示した。また分子シャペロンに関する研究材料（ノックアウトマウスなど）の整備を行った。

A. 研究目的

細胞内にはたんぱく質が正しいフォールディング（高次構造・折り畳み構造）をとるのを積極的に助けている一群のたんぱく質（分子シャペロン）が存在する。分子シャペロンは、合成されたばかりのたんぱく質が正しいフォールディングをとることを助けるだけ

でなく、ストレスによってそのフォールディングが異常になってしまったたんぱく質を正常に戻すことも出来る。このように分子シャペロンは細胞内でたんぱく質の品質管理を行っている興味深い分子群である。

そこで我々は、分子シャペロンを利用して、たんぱく質に正しいフォール

ディングをとらせる技術を開発している。この技術は非注射型ナノ DDS 製剤を開発するために大変重要であると考えられる。

B. 研究方法

(1) GAによる分子シャペロン誘導機構の解明。

グラニルゲラニルアセトン (GGA) が毒性を示さないのに分子シャペロンを誘導するという事は、未だ解明されていない分子シャペロン誘導経路のいずれかの段階にGGAが作用していることを示唆している。従ってGGAが分子シャペロンを誘導するメカニズムを検討した。具体的には、放射標識したGGAを用いて、まずGGA結合たんぱく質の検索系を確立した。次に、ヒト細胞粗抽出液中に、GGA結合たんぱく質を発見したので、複数のカラムクロマトグラフィーを用いて、その結合たんぱくを精製した。

(2) 毒性のない分子シャペロン誘導剤のスクリーニング

漢方医薬研究振興財団から生薬成分、漢方薬などを供与して頂き、毒性のないシャペロン誘導剤のスクリーニングを行った。具体的には、HSP70,HSP90、GRP78と結合する物質を検索した。

(3) 分子シャペロンに関する研究材料の整備

種々の分子シャペロンに関して、抗体、過剰発現プラスミド、精製たんぱく質などを整備した。

C. 研究結果

(1) GGAによる分子シャペロン誘導機構の解明。

我々はヒト胃粘膜細胞の粗抽出液中にGGAと結合する因子を発見した。そこでこの因子を、イオン交換、及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、そのアミノ酸配列を決定したところ、HSP70、及びHSP90であった。HSP70、及びHSP90は、分子シャペロン誘導に主要な役割を果たしている転写因子HSF1に結合し、それを不活性化することが知られている。そこでGGAは、これら不活性化因子(HSP70、及びHSP90)に結合し阻害することにより、HSF1を活性化し、その結果分子シャペロンを誘導していると考えられる。

(2) 毒性のない分子シャペロン誘導剤のスクリーニング

次に我々は、生薬成分、漢方薬などから、HSP70,HSP90、GRP78と結合する物質を検索した。その結果、その結果、HSP70,HSP90を結合する物質5種(朝鮮あさがお、ウワウルシなど