インスリン封入 PLGA ナノコンポジット製剤のビーグル犬への 経肺投与による血中グルコース濃度の評価

Evaluation of Glycaemia Control in Beagle Dogs by the Administration of Insulin Encapsulated PLGA Nano-composite Preparations

辻本 広行^a, 原 香織^a, 川島 嘉明^b

Hiroyuki Tsujimoto, Kaori Hara, Yoshiaki Kawashima

Received 27 June 2005 ; Accepted 8 August 2005

This paper describes pharmacological effect of inhaled PLGA nano-composite powder with insulin to beagle dogs as a preclinical test. By a novel particle assembly technique consisting of the spherical crystallization and freeze drying, two types of the nano-composite formulations were prepared for type 1 diabetes mellitus, the first one (preparation ①) was freeze dried insulin encapsulated PLGA nano-spheres with sugar alcohol; the second one (preparation ②) was the freeze dried PLGA nano-spheres with sugar alcohol and insulin. These preparations could easily reconstruct the original PLGA nano-spheres in saline, which were intratracheally into the dogs spontaneously breathing. The insulin solution was subcutaneously administered as a reference.

It was found that the PLGA nano-spheres administered intratracheally immediately appeared pharmacological effect and significantly prolonged glycemic effect compared to those of the subcutaneous injection. The pharmacological effects of the preparation ① and ② evaluated by the AAC of glycemic profile were approximately 3.5 times higher than the subcutaneous injection.

Furthermore, the preparation ② could reduce the dosage amount compared with the preparation ① to obtain the same pharmacologic effect.

Thus, the nano-composite preparations presented here could be formulated to the clinical test as a next stage.

Keywords : Pulmonary drug delivery, Insulin, PLGA nano-sphere, Composite particle, Beagle dog

1. 緒言

近年、ライフスタイルの変化や人口増加に伴い糖尿病患者が増加し、その関連医療費が増大している。国内での糖尿病患者数は740万人で、年間の関連医療費は1兆1,743億円(2001年厚生労働省調べ)に至っており、これは世界的な問題となっている。

代謝性疾患である糖尿病は、免疫異常やウィルス感染などにより膵臓のランゲルハンス島β細胞が破壊し、インスリン分泌不全となって発症するインスリン依存性のⅠ型と、遺伝的素質に加えライフスタイルが原因でインスリン作用の相対的不足によって発症するインスリン非依存性のⅡ型に大別される。これらの治療法は、患者の症状に応じて食事療法、運動療法、薬物療法などさまざまであるが、Ⅰ型患者のほとんどはインスリンを体外から摂取することで血糖値を制御する必要がある。このインスリンに代表される高分子ペプチド系薬物は、消化管での酵素分解を受けやすいので、利便性の良い経口投与で製剤では生体内利用率が極めて低くなる。そのため、皮下注射によるインスリン療法により、患者自身の手でインスリンが毎日頻回(1~5回)投与されている。2001年からは追加イン

粉体工学会春期研究発表会(2005年東京)、第21回 DDS 学会(2005年長崎)にて一部発表

^a 株式会社 ホソカワ粉体技術研究所

(〒573-1132 大阪府枚方市招提田近1-9) TEL 072-855-2231

Hosokawa Powder Technology Research Institute

(1-9, Shoudai-tajika, Hirakata 573-1132, Japan)

^b 愛知学院大学薬学部製剤学教室

(〒464-8650 名古屋市中千種区楠元町1-100) TEL 052-751-2561

School of Pharmaceutical Sciences, Aichi Gakuin University

(1-100, Kusumoto, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan)

スリン分泌を補う超即効型インスリン製剤が、続いて2003年からは超持続型インスリン製剤がそれぞれ臨床に導入され、それらを組み合わせることで生理的インスリン分泌パターンの再現が可能となっており、インスリン依存性患者のQuality of lifeは改善しつつある。しかし、注射投与時の苦痛を軽減し、さらに利便性を改善し患者のコンプライアンスを向上するためには、注射以外の製剤化が望まれることは記すまでもない。

このような背景のもと、近年では、経口、注射以外のインスリン送達経路として、肺、鼻の経粘膜を利用するルート開発が研究されている。中でも経肺ルートは、たんぱく分解酵素が消化管に比べ少ないこと、肺胞の比表面積は約100m²と非常に広く小腸粘膜の表面積(200m²)に匹敵すること、また、上皮細胞が薄く血中への薬物移行が良いこと、さらには、肝初回通過効果を回避できることなどによって、高い生体内利用率を獲得するのに有利と考えられ注目されてきた。これまでに、噴霧乾燥技術でインスリンを複合粉末化した吸入製剤(Pfizer, Aventis, Nekar Therapeutics; Exubera)や、マイクロスフェアを応用した粉末吸入製剤(Pharmaceutical Discovery Corporation; TechosphereTM/insulin)など、いくつかの経肺吸入製剤¹⁾が米国を中心に臨床治験試験にかけられている。

著者らも、晶析法の一つである独自の水中エマルジョン溶媒拡散法^{2,3)}により、経肺粉末吸入製剤用のインスリンを封入したPLGA ナノスフェアを調製し、本ナノスフェアが経粘膜吸収性と徐放性に優れていることを報告^{4,5)}してきた。また、ナノスフェアを独自の機械式複合法^{4~8)}で糖アルコールとコンポジット化した製剤は、ハンドリング性と保存安定性に優れている。さらに、気中分散性については、in vitro カスケードインパクターの第2ステージ以降への到達度(Respirable fraction)は40%を越え、インスリンの高い肺送達率も実現している。そして、本製剤のラットにおける経気管支投与による血中グルコース濃度低下作用を示す総面積(AAC, Area above the curve, 時間濃度曲線上面積)は静脈注射に対し160%へと著しく向上し⁵⁾、前記臨床治験試験中のインスリン製剤がマイクロサイズにあることを考えると、著者らの製剤化法では、より優れた吸収促進性と徐放性の両機能を兼備したナノDDSインスリン製剤の開発が可能ではないかと考えた。

以上の背景から、著者らはインスリンを封入した

PLGA ナノスフェア製剤の臨床治験試験に向けて取り組むこととした。本論文では前臨床基礎試験の一つとして、ヒトと体内動態が類似するビーグル犬を用い、PLGA ナノスフェア製剤の血中グルコース濃度低下作用を皮下注射と比較評価し、本ナノスフェア製剤の高い薬理効果を見出したので報告する。

2. 実験方法

PLGA ナノスフェア製剤のビーグル犬への経肺投与に当たり、著者らの既報^{4,5)}の実験ではラットに対しシリンジ法で製剤を圧送して経気管支投与する方法が考案されたが、この方法は臨床に近い自発呼吸での吸入評価には不適と考えた。そこで、PLGA ナノコンポジット粒子を自発呼吸によって肺へ送達させるため、ヒト用の自発呼吸で薬剤を吸入するデバイス⁹⁾をビーグル犬の口に挟み投与する方法や、粉末エアロゾル化させたPLGA ナノコンポジット粒子を一定空間で生成させ、その環境下にビーグル犬を設置し吸入させる方法を試みた。しかし、前者の方法はビーグル犬の個体当たりの吸気量がヒトに対し1/5と少ないため、薬剤を十分に吸入させることが出来ず、また、呼吸のタイミングを制御することはできなかった。一方、後者の方法でも、鼻呼吸に伴う鼻腔内沈着物の発生とその吸収の問題が生じ、いずれの方法も採用できなかった。これらの予備検討を通じて、現状では粉末による投与は困難と判断した。以上の背景から、本研究の最終目標はインスリンを内包したPLGA ナノコンポジット粉末吸入製剤の開発であるが、本実験では調製したナノコンポジット製剤を少量の生理食塩水に分散させ、それを超音波ネブライザーによってミスト化し、気管挿入カテーテルを介してビーグル犬の自発呼吸により肺内へ送達する方法を考案した。すなわち、肺内には微量の水分が存在しており、粉末吸入製剤がドライパウダーとして理想的に吸入され肺内部に送達されると、ナノコンポジット粒子は微量水分を吸水し、ナノスフェア粒子を再構築する⁴⁾ものと考えられる。従って、本実験法では予めナノスフェア粒子を再構築させて吸入させたことになるので、実際に近い評価結果が得られるものと判断した。

以下に、PLGA ナノコンポジット粒子の材料、調製法、投与方法、評価方法等について記す。

2.1 材 料

製剤に使用した材料は次の通りである。

- ・ポリマー基剤：乳酸・グリコール酸共重合体

Table 1 Administration and dose

Preparation	Administration method	Formula of preparations (wt %)			Amount of insulin in preparation (units/ mg)
		PLGA	Insulin (Internal of PLGA/ External of PLGA)	Trehalose (External layer of PLGA)	
Preparation ① ; PLGA nano-sphere freeze dried with sugar alcohol	Inhalation	32.44	0.89/0.00	66.67	0.25
Preparation ② ; PLGA nano-sphere freeze dried with both sugar alcohol and insulin	Inhalation	32.07	0.88/0.59	66.46	0.41
Preparation as control	Inhalation	33.33	—	66.67	—
Insulin solution	Hypodermic injection	—	100	—	28.0

(PLGA7520, 分子量20,000, 乳酸/グリコール酸=75/25, $T_g = 45^\circ\text{C}$, 和光純薬製)

・薬物: インスリン (ウシ由来, SIGMA 製, 28.0units / mg)

・分散安定剤: ポリビニルアルコール (PVA: ポバール403, クラレ製)

・賦形剤: トレハロース (林原製)

・分散液: 局方生理食塩水 (大塚製薬工場製, pH = 6.0 (pH メーターD-51, 堀場製作所製)), 精製水 (pH = 6.8)

その他の試薬は市販の特級グレードを用いた。

2.2 水中エマルジョン溶媒拡散法によるインスリン封入 PLGA ナノスフェアの調製法

インスリン 100mg を 0.01mol/l の塩酸 18ml に溶解させる。PLGA 2g をその良溶媒であるアセトン 100ml に溶解しポリマー溶液とし、前記のインスリン塩酸溶液と混液にする。これを 40℃ で攪拌下、貧溶媒である固形分濃度で 2wt % のポリビニルアルコール (PVA) 水溶液 250ml に、4ml/min の一定速度で滴下した。こうすると両溶媒の相互拡散によるエマルジョン液滴界面の乱れによる自己乳化作用によって、ナノメートルサイズのエマルジョン滴が調製される。その後、アセトンを留去して得られた PLGA ナノスフェア懸濁液は遠心分離法 (遠心加速度 41000g) で PLGA ナノスフェアの沈殿を回収し、精製水中で再懸濁させ、PLGA 表面に吸着できなかった余剰な PVA を除去する洗浄を行った後、-45℃ で凍結乾燥して粉末化した。なお、コントロール製剤用のインス

リンを封入しない PLGA ナノスフェアは、インスリン塩酸溶液を入れない方法で同様に調製した。

2.3 PLGA ナノスフェアコンポジット製剤の調製とインスリン含有率の評価

本実験ではインスリンを封入した 2 種のナノコンポジット製剤 (製剤①, 製剤②) と、インスリンを封入しない PLGA ナノコンポジット製剤 (コントロール製剤), そしてインスリン皮下注射製剤を調製した。

まず、製剤①と製剤②は前節で調製したインスリン封入 PLGA ナノスフェア粒子 350mg を 100ml の精製水に再懸濁させておき、その中へ、製剤①の調製にはトレハロース水溶液 50ml (精製水中にトレハロースを 700mg 含む) を、製剤②の場合にはトレハロースが溶解したインスリン懸濁液 50ml (精製水中にトレハロース 700mg とインスリンを 12.4mg 含む) をそれぞれ添加し、均一に混合後、-45℃ で凍結乾燥し PLGA ナノコンポジット製剤を得た。

次に、コントロール製剤の調製は、インスリンを封入しない PLGA ナノスフェアを用い、製剤①と同様の方法でコンポジット化した。この方法により既報^{4~8)}で報告したように、PLGA ナノスフェアの外層にトレハロースが複合化され、保存安定性と気中再分散性に優れたナノコンポジット粒子が得られる。さらに、インスリン皮下注射製剤の調製は 5.4mg のインスリンを正確に量り、生理食塩水を加えて全量を 100ml としたインスリン懸濁液を投与液 (pH = 6.0, インスリン濃度: 0.027mg/ml) とした。調製は用時

に行った。

以上のように調製した各製剤中の組成質量割合を **Table 1** に示す。ここで、製剤①と製剤②中のインスリン量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による実測値を記し、その値に基づき組成割合を算定した。HPLC によるインスリンの定量は次のように行った。製剤①と製剤②をそれぞれ 30mg 秤量し、精製水 10.0ml でメスアップしてトレハロースを溶解させた。このとき析出するインスリン封入 PLGA ナノスフェア (製剤①及び製剤②) と外層のインスリン (製剤②) は遠心操作 (41000g, -20℃, 20分) により固形分として単離でき、これにアセトニトリル 3.0 ml を加えると PLGA が一旦溶解し、インスリンが漏出する。このインスリンを 0.01mol/l 塩酸で溶解させつつ 10ml にメスアップすると、PLGA が再析出するので、これを遠心操作によって除去し、インスリンが溶解している上清 20μl を HPLC によって定量した。HPLC の操作条件としては、カラム (Finepak SIL300C18T-5, 日本分光製) を 40℃ に設定し、移動相 (アセトニトリル/1.2% 過塩素酸 = 35/65) の流速は 1.5ml/min にして、検出波長 214nm (検出器: SPD-6AV, 島津製作所製) で評価した。

製剤①は外層をトレハロースで複合化したので、インスリンは PLGA ナノスフェア内部にのみ封入されている。他方、製剤②は外層のトレハロースにもインスリンが含まれている。この製剤②については、初期の処方設定段階において、内部と外層に 1:1 の割合でインスリンを含浸させるように企図したが、晶析及び凍結乾燥プロセスでの各成分のロスもあって、HPLC 評価によってそれらの割合^{*1)} は 6:4 となった。いずれの PLGA ナノコンポジット製剤も、PLGA ナノスフェアとトレハロースの質量比はほぼ 1:2 になるようにした。こうして調製した製剤①と製剤②のインスリン濃度は各々 0.25units/mg と 0.41units/mg となって、同一ユニット投与条件下では、製剤②は外層を利用することで剤形の小型化が可能となった。ここで、今回調製した PLGA ナノスフェアの代表例として、**Fig. 1** は製剤①を水中へ再分散させた際の PLGA ナノスフェア粒子の動的光散乱法による粒度分布である。平均粒子径は 215nm であった。製剤

Fig. 1 Particle size distribution of insulin encapsulated PLGA nano-spheres of the preparation ① in water measured by dynamic light scattering method

②の PLGA ナノスフェアも同一バッチで晶析したため、平均粒子径はほぼ同一の 217nm であった。これらとは別のバッチで晶析した PLGA ナノスフェアからなるコントロール製剤も、ほぼ同様の 210nm であった。また、各製剤で粒子径分布についても大きな差は認められなかった。

2.4 PLGA ナノコンポジット製剤の投与方法

吸入システムの概略図を **Fig. 2** に示す。ここで、インスリンは分散溶媒の pH により溶解性や重合度が変化し、投与後の吸収性にも影響を及ぼすと考えられる。そこで、本実験ではそれらの変動を最小に抑制する目的として、pH = 6.0 の生理食塩水にインスリン濃度が一定になるように各製剤を用時に分散させるようにした。すなわち、製剤①及び製剤②の生理食塩水に分散した時のインスリン濃度は、前節に記した皮下注射用インスリン投与液の濃度と同一の 0.027mg/ml になるように、製剤濃度としては各々 3.01mg/ml と 1.83mg/ml にした。また、コントロール製剤は、製剤①と同一の濃度とした。その結果、各製剤添加後の生理食塩水の pH の変動はほとんど見られなかったため、本実験条件範囲では pH の影響を考慮に入れる必要が無いと判断した。

このようにして、それぞれの分散液は超音波ネブライザー (NE-U17, オムロンヘルスケア製) に仕込み、1.0ml/min の一定流量でミストを発生させ、それを 12.0l/min の気流を流通させたメイン配管 (帯電防止処理したテフロンホース、内径 15mm) 内へ混合させた。メイン配管中のミストの一部は、犬の自発呼吸によってバイパス配管 (帯電防止処理したポリエチレンホース、内径 19mm) 内へ流れ込み、さらにビーグル犬の気管支に挿入したカテーテル (低圧カフ付気管内チューブ、材質: 塩化ビニール (PVC)、内径 8mm) を介して肺内まで送達される。このとき、

*1 製剤①の HPLC 実測値は PLGA ナノスフェア内部のインスリン含有量と見なせ、この値は、同一バッチ晶析作製したナノスフェアからなる製剤②のナノスフェア内部のインスリン含有量にも適用でき、これと製剤②のトータルインスリン含有量の実測値を用いて、内部と外層 (トータル値 - 内部値) のインスリン量が算定された。

Fig. 2 Schematic diagram of inhalation system of PLGA nano-composite particles

ビーグル犬の自発呼吸によって圧力変動の少ない安定した吸入を遂行するために、バイパス配管分岐後のメイン配管には逆止弁を設け、補助エアーを取り込ませて本システムの排気量を一定するようにした。一方、ビーグル犬が吸入しない余剰ミストは、メイン配管に設置した回収瓶と回収フィルター（ガラス繊維フィルター、GB-100R、アドバンテック東洋製、捕集効率99.99%（JIS Z 8901；0.3 μ m フタル酸ジオクチル粒子）で捕集した。

なお、本システムによる PLGA ナノコンポジット製剤の、ビーグル犬の自発呼吸による肺への吸入時間は10min に設定した。

次に、PLGA ナノコンポジット製剤の比較対照としたインスリン懸濁液は、ビーグル犬の背部皮下に注射した。このとき、インスリン投与量はヒトの臨床治験データ（0.15units/kg）に基づき、ビーグル犬の平均的な体重を10kg として1.5units に設定した。ビーグル犬は3匹（雌、12～16ヶ月齢、体重はそれぞれ7.25kg, 11.10kg, 10.10kg）使用し、インスリン皮下注射、コントロール製剤、製剤①、製剤②の順に、2週間の休薬期間を設けつつ投与した。

2. 5 血中グルコース濃度評価

インスリン製剤の投与25分前に橈側皮静脈から1.0ml 採血し、これを標準血中グルコース濃度とした。その後、ペントバルビタールナトリウム（ネプタール、大日本製薬製）を静脈から投与して麻酔し、ビーグル犬（投与前16～18時間から投与後24時間絶食）を側臥してカテーテルを気管内に挿管し吸入システムと接続した。その後、10分間吸入させた後、一定時間ごと（投与終了0.17, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24時間後）に採血し、遠心分離して得た血清を自動血液分析装置（TBA-200FR、東芝製）により、酵素法（HK-

G6PDH 法）で血中グルコース濃度を測定した。また、インスリン溶液の皮下投与も吸入投与と同条件にて採血し、血中グルコース濃度を測定した。

2. 6 PLGA ナノコンポジット製剤のミスト分布測定

ビーグル犬が吸入しているミスト径を評価する目的として、ビーグル犬の吸入実験と同条件下で、吸入システムの気管挿入カテーテルの先にカスケードインパクター（ITP02-105, In Tox Products 製）を接続して、各製剤のミストを発生させ7段階に分級捕集（吸入流量500ml/min、捕集時間5min）した。この捕集にはガラス繊維フィルター（GB-100 R、アドバンテック東洋製）を用い、捕集前後の乾燥させたフィルターの質量差から各段の製剤捕集質量を求め、空気力学的径を評価した。

2. 7 PLGA ナノコンポジット製剤のビーグル犬吸入量評価

ビーグル犬の PLGA ナノコンポジット製剤吸入量を評価する目的として、本実験では、気管挿入チューブに吸引ポンプとして実験動物用人工呼吸器（SN-480-3、シナノ製作所製）をガラス繊維フィルター（GB-100R、アドバンテック東洋製）を介して接続し、吸入システムをビーグル犬の製剤吸入状態と同一条件で運転した。人工呼吸器はピストンと逆止弁から構成されるポンプで、吸気と呼気とを繰り返す。人工呼吸器の運転条件はビーグル犬の麻酔下呼吸回数12回/min と呼吸量208ml/回に設定し、ミストを発生させた。10分間の模擬吸入運転を実施し、ガラス繊維フィルターに吸入空気を通過させ捕集した製剤の質量を測定し吸入量を求めた。

なお、その他の実験方法は、結果と考察の中でその都度記述する。

	Aero dynamic mean diameter (μm)	Prospective delivery ratio from bronchi to alveoli (%) Stage 2~7	Prospective delivery ratio to alveoli (%) Stage 5~7
Preparation ①	1.50	87.6	46.3
Preparation ②	2.51	74.7	21.8
Preparation as control	1.84	82.9	38.7

Fig. 3 In vitro inhalation property of PLGA nano-composite particle suspensions measured by cascade impactor

3. 結果と考察

3. 1 PLGA ナノコンポジット製剤の in vitro カスケード吸入特性評価

カスケードインパクト法で測定した PLGA ナノコンポジット製剤のミスト径分布を Fig. 3 に示す。気管支に相当する第 2 ステージ（空気力学的径で $4.0\ \mu\text{m}$ ）以降に回収されたミスト頻度は 74.7~87.6% と高値を示した。そして肺胞に対応する第 5 ステージ（ $1.05\ \mu\text{m}$ ）以降への到達率は 21.8~46.3% となった。3 種の製剤の空気力学的平均径は $1.50\sim 2.51\ \mu\text{m}$ と微小であり、気管支への送達率については大差が見られなかった。肺胞への送達率は製剤①とコントロール製剤ではほぼ同等であり、製剤②はそれらと比較すると半分程度の値となった。これは製剤①及びコントロール製剤は製剤②に比べ分散液中での設定製剤濃度（製剤①及びコントロール製剤： 3.01mg/ml ，製剤②： 1.83mg/ml ）が 1.64 倍高く、その分だけ Table 1 の組成割合から、PLGA ナノスフェアの含有量は多くなるので気液界面の張力を下げていると推論され、これが気液界面でのより微細なミストの生成に寄与し、肺胞への到達率を高めているものと推定した。

3. 2 PLGA ナノコンポジット製剤の血中グルコース濃度の変化と薬理効果

3. 2. 1 血中グルコース濃度の変動プロファイル

相対的な血中グルコース濃度の経時変化を Fig. 4 に示す。インスリン皮下注射の結果は皮下から速やかに吸収されるため、投与後 10 分値から血中グルコース濃度の低下が見られ、4 時間で 75% になってピークを迎え、その後の 8 時間の時点で作用が消失している。

次に、インスリンを含まない PLGA ナノコンポジットのコントロール製剤の吸入投与の結果は、血中グルコース濃度の経時の変化がほとんど認められていない。このことから、PLGA ナノコンポジット粒子自体の吸入行為、並びに基剤としての PLGA ナノスフェアが血中グルコース濃度の変動に影響を及ぼさないことが確認された。

製剤①と製剤②の吸入に伴う血中グルコース濃度は、インスリン皮下注射と同様に、投与後 10 分値から低下していた。特に製剤①では、皮下注射より投与直後の低下が速く、即効性が認められた。このことは、カスケードインパクトの結果から考えると、製剤①の PLGA ナノスフェアは製剤②に比べ、血中へインスリンが移行しやすい肺胞部位へより多く送達さ

Table 2 Pharmacological effect of insulin encapsulated PLGA nano-spheres

	Effect dosage of insulin acted on beagle dogs (units)	AAC* (h × %)	AAC*/effect dosage of insulin acted on beagle dogs (h × %/ units)	Relative pharmacological effect on the basis of insulin solution
Preparation ①	0.29	86.3	298	383
Preparation ②	0.26	70.1	270	347
Insulin solution	1.5	116.7	77.8	100

* AAC : Area above the curve

Fig. 4 Pharmacological effect of composite particles with insulin encapsulated PLGA nano-sphere administered intratracheally (n = 3) Points = mean, error bars = SD

- ◆ Preparation ① Intratracheally administered PLGA nano-composite solution
- ▲ Preparation ② Intratracheally administered PLGA nano-composite solution
- As control group intratracheally administered PLGA nano-composite solution
- Subcutaneous administered insulin solution

れており、そこで、PLGA ナノスフェアの比較的表面上に封入されていたインスリンが即効的に溶出し、血中へ速く吸収された結果と推論した。

他方、製剤②は皮下投与結果とほぼ同等の即効性が認められた。即効性に寄与し得る肺胞以降への送達ミスト割合は、製剤①に比べ半数程度であるものの、本製剤ではPLGA ナノスフェアの外層に含浸されたインスリンがPLGA ナノスフェア表面に吸着^{*2)}するので、この吸着インスリンがPLGA ナノスフェアに同伴されて肺胞部に送達し溶出することが、製剤②の即効性向上に寄与していると推定した。

さらに製剤①及び製剤②とも12時間にわたり薬理効果が持続し、インスリン皮下注射に比べ顕著な持効性が認められた。特に、投与後30分から10時間程度

まで血中グルコース濃度(相対値で約90%)は変動の少ない安定した推移が認められた。これらの結果は既報のラットの実験^{4,5)}と同様に、インスリンをPLGA ナノスフェアに封入することにより、肺胞部でインスリンが徐放化される機能を賦与できた結果と推定され、その安定した血中グルコース濃度の制御性については、今後、処方最適化を進めていくことでインスリン徐放性から基礎インスリンレベルの確立にも貢献しうる可能性が示唆された。

3. 2. 2 薬理効果

インスリン製剤の薬理効果は、Fig. 4から血中グルコース濃度低下作用を示す総面積(AAC)を算出し、これをビーグル犬が摂取したインスリン量で除した値(%×時間/units)を指標とした。また、各製剤の相対的薬理効果を比較するために、インスリンの皮下投与値を基準(=100%)にTable 2に表示した。

2. 7のPLGA ナノコンポジット製剤のビーグル犬の吸入量を求める実験により、製剤①と製剤②の吸入速度は各々0.116mg/minと0.064mg/minとなったので、ビーグル犬が10分間の吸入試験で摂取した有効インスリン量はそれぞれ0.29unitsと0.26unitsであった。AAC値をこれらのユニット値で除し、皮下注射の結果を100%とした相対的薬理効果は、各々383%と347%となっており、いずれもインスリン皮下投与法の効果を大きく上回った。これは前述したように、PLGA ナノスフェアが肺胞まで送達し、その滞留時間が延長されるため、薬物の徐放効果や酵素分解の抑制効果が皮下投与法に比べ現れるためと考える。

*2 インスリンを封入していないPLGA ナノスフェア懸濁液(生理食塩水)に、PLGA とインスリンの配合比が製剤②と同一になるようにインスリンを添加し分散させた。それを超音波処理に10分かけ、その後、遠心分離によってインスリン溶液からPLGA ナノスフェアを沈殿させ分離し、これを生理食塩水で再分散後、凍結乾燥して得たナノスフェア粉末にはインスリンが検出(含有率:0.2wt%, 測定:HPLC)される。すなわち、製剤②の場合、インスリン懸濁液中で超音波分散されているPLGA ナノスフェア表面にはインスリンが一定量吸着し、それらは吸入時、ナノスフェア粒子と同伴されると考えられる。

また、製剤②は、PLGA ナノスフェア含有量が少ないに関わらず、製剤①とほぼ同等の薬理効果を示していた。製剤②は、前述のカスケードインパクト評価から、肺泡に到達する PLGA ナノスフェア粒子の頻度は小さいものの、第2ステージ以降のミスト頻度は同等であるので、PLGA ナノスフェアの外層中に含浸されていたインスリンが分散液中でやや大きなミストとなって飛翔し、気管支や細気管支に沈着しているものと考えられる。これらの部位は肺泡に比べ吸収速度は遅いと考えられるが、インスリンの到達作用部位が製剤①に比べて拡大され、広範囲の組織部位から血中に移行することによって薬理効果が向上したのではないかと推定する。さらに、製剤②は PLGA ナノスフェアの外層にインスリンを高含量で配合できるので、高い薬理効果を兼ね備えつつ、製剤①に比べて剤形の小型化が可能となったので、今後、臨床治験試験への応用において有用な粒子設計法であると考えられた。

4. 結 言

本報では、インスリン封入 PLGA ナノコンポジッ

ト粒子による I 型糖尿病患者向け粉末吸入製剤の開発を目指した前臨床試験として、本ナノコンポジット製剤を世界で初めてビーグル犬へ経肺投与し、血中グリコール濃度の低下作用を評価し、以下のことが分った。

- 1) インスリン封入 PLGA ナノスフェア製剤の経肺投与により、血中グリコール濃度の低下作用が確認された。
- 2) インスリンの皮下注射に対する相対的薬理効率は、347~383% にまで達した。また、PLGA ナノスフェアに封入することにより、肺泡まで送達され、インスリンの徐放化機能が賦与された結果、皮下注射法と同等の即効性と顕著な持続性が認められた。
- 3) PLGA ナノスフェアの内部と外層にインスリンを含浸させた製剤は、剤形の小型化に有利であり、高い薬理効果を兼ね備えていた。
- 4) 安定した血中グルコース濃度の推移は、インスリンの徐放性から基礎インスリンレベルの確立にも有益な手法となりうる可能性が示唆された。

References

- 1) Sakagami, H.: "Hai kyuunyu insulin", Drug Delivery System, pp. 474-476 (2003)
- 2) Kawashima, Y., M. Okumura and H. Takenaka: "Spherical Crystallization: Direct Spherical Agglomeration of Salicylic Acid Crystals during Crystallization", *Science*, **216**, 1127-1128 (1982)
- 3) Kawashima, Y., H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino and T. Niwa: "Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion diffusion methods", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **45**, 41-48 (1998)
- 4) Yamamoto, H., W. Hoshina, H. Kurashima, H. Takeuchi, Y. Kawashima, T. Yokoyama and H. Tsujimoto: "Engineering of Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanocomposite Particle for Dry Powder Inhalation Dosage Forms of Insulin with Spray Fluidized Bed Granulating System", *J. Soc. Powder Technol., Japan*, **41**, 514-521 (2004)
- 5) Yamamoto, H., H. Kurashima, D. Katagiri, M. Yang, H. Takeuchi, Y. Kawashima, T. Yokoyama and H. Tsujimoto: "Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanosphere Composite Prepared with Mechano-fusion Dry Powder Composition System for Improving Pulmonary Insulin Delivery with Dry Powder Inhalation", *Yakuzaigaku*, **64** (4), 245-253 (2004)
- 6) Yokoyama, T., H. Tsujimoto, H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima: "Particle Design by Fine Particle Dry Bonding to Prepare Pharmaceutical Composite Particles Using a Newly Developed Model of Mechano Fusion", 2004 ROC-Japan Joint Symposium on Particle Design, Nanotechnology and Drug Delivery, May 9-11, 2004, Hsinchu, pp. 135-136 (2004)
- 7) Tsujimoto, H., T. Yokoyama, C. C. Huang, H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima: "The Application of Particle Design on Dry Powder Inhalation (DPI) Using Poly Lactide-co-glycolide (PLGA) Nanospheres", 2004 ROC-Japan Joint Symposium on Particle Design, Nanotechnology and Drug Delivery, May 9-11, 2004, Hsinchu, pp. 271-272 (2004)
- 8) Tsujimoto, H., K. Hara, C. C. Huang, T. Yokoyama and Y. Kawashima: "The Applications of Biodegradable Poly Lactide-co-Glycolide (PLGA) Nanospheres for Pulmonary and Transdermal Drug Deliveries", *FOODS & FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN*, **210**, No. 5, 437-448 (2005)
- 9) Noura, N., A. Yanagawa, T. Kudo, T. Okuno, T. Nakagawa, J. Shimada, H. Ohoki, S. Nakamura and K. Ishizeki: "Functional comparison of newly developed DPI device with already marketed Spinhaler", *Japanese journal of inflammation*, **16**, No. 2 (1996)