

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390011

研究課題名（和文）眼及び肺への局所投与時の微粒子の挙動解析に基づいた新規製剤の開発

研究課題名（英文）Novel Dosage form design for ocular and pulmonary drug delivery based on analysis of behavior of nano-particle as drug carrier

研究代表者

竹内 洋文 (Takeuchi Hirofumi) 岐阜薬科大学 薬学部 教授

研究者番号：50171616

研究成果の概要（和文）：

本研究では、リポソームなどの微粒子キャリアーを駆使し、薬物の吸収ルートを拡大し、多数の疾病に対して低侵襲薬物治療を可能とすることである。投与ルートとしては、微粒子薬物キャリアーを用いた点眼による薬物の後眼部送達であり、もう一つは経肺投与による肺局所治療、ペプチドの全身吸収を狙った製剤化である。本研究の成果から、薬物（エダラボン）を封入したナノサイズのリポソームにより、網膜障害を改善できることが *in vivo* の結果より明らかとなった。さらに、リポソーム表面を機能性ポリマーで表面修飾することにより、後眼部への薬物送達効率が飛躍的に向上することが分かった。リポソームを経肺投与製剤として応用した場合には、薬物徐放化の付与及び微粒子表面修飾技術により肺内での薬物滞留性コントロールができることが分かり、ペプチド医薬をリポソームへ封入した場合には、その薬理効果が持続することが明らかとなった。ペプチド、遺伝子などの経肺製剤の確立により、注射のみに頼っていた投与法が拡大され、コンプライアンスの大幅な改善が期待される。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research project is development of noninvasive drug delivery systems to promote drug delivery in several administration routes. Two administration routes are targeted in this study; One is ophthalmic delivery system to treat the diseases in posterior part of the eye and another is pulmonary system for both topical and systemic drug delivery for poorly absorbable drug such as a peptide drug. We succeeded in design of optimum particulate design of ocular delivery liposomal system and demonstrated its positive pharmacological effects on damage in retina with the liposomal eye drops. The effects are much improved by surface modification of the liposomal particles with suitable polymers. In pulmonary drug delivery, surface modification with polymers could control the retention of the carrier particles after administration. By using this liposomal system, a prolonged pharmacological effect of the peptide drug was observed in animal experiments. These results can strongly support to develop non-invasive drug delivery systems as an alternative to the former invasive drug administration such as an injection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
平成 22 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
平成 23 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学
キーワード：製剤学

1. 研究開始当初の背景

微粒子キャリアーは薬物送達において必須のデバイスであることは周知の事実であり、世界中で研究が展開されている。申請者も、現在までに主としてリポソーム、リビッドエマルジョン、生分解性高分子ナノスフェアの種々の微粒子の研究から表面修飾の手法を開発して、粘膜付着特性あるいは血中滞留性に優れた薬物キャリアーナノ粒子を設計し、それらの新しい *in vitro* 評価法の開発、動物を用いた *in vivo* 試験による有効性の評価を広範に展開してきた。本研究における目標の一つである点眼による薬物後眼部送達は、一般には不可能と考えられてきた。点眼 DDS に関するリポソーム等の微粒子製剤に関する研究は行われているが、眼表面(角膜、結膜)での滞留に関するものである。わが国では急速な高齢化に伴い緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症などの後眼部疾患が急増し(推定潜在患者数 1000 万人)、有効な薬物療法が望まれている。そのためには後眼部へ薬物を送達することが必須で、医療の現場からは点眼のような低侵襲治療が強く望まれている。我々の、微粒子の消化管内挙動に関する研究はその可能性を強く示唆するものであった。このような考えの下、申請者は研究分担者原との共同実験を開始し、微粒子製剤が点眼、あるいは硝子体投与後に後眼部に到達していることを、共焦点レーザー顕微鏡により視覚的に確認した。

本研究のもう一つの目標であるリポソーム微粒子による経肺の経肺投与による局所及び全身薬物投与は、申請者が消化管内での微粒子挙動を明らかにする研究を通して得た知見を活用、発展させ、慢性閉塞性肺疾患等の難治性疾患(局所投与)、ペプチド性薬物吸収(全身投与)の治療、薬物吸収向上への適用を狙うものである。本研究では、表面修飾リポソームの修飾ポリマーの特性によって、生体親和性の増大、肺胞マクロファージ細胞の貪食の回避を図り、目標達成を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、我々の開発した微粒子製剤設計及び解析技術を駆使、発展させ、微粒子製剤による 1) 注射投与に代わりうる薬物後眼部送達法、2) 経肺局所及び全身薬物投与法の 2 つの革新的な低侵襲薬物送達法を実用化

する製剤研究基盤を確立することを目的とする。特に、局所投与後の生体内での微粒子の挙動解析に焦点を合わせ、局所体内挙動を支配する微粒子の特性との関係を明らかにする。微粒子としてはリポソーム、ポリマー粒子に的を絞り、生体との相互作用における微粒子のサイズ及び表面効果をあらゆる側面から検討し、実験動物を使った定量的解析によりその有効性を実証する。そして、実際に開発が強く望まれている緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症などの後眼部疾患、副作用のないステロイド吸入剤の開発に直接結びつく研究成果を目指す。これらの新しい薬物送達システムの設計をとおり、微粒子 DDS 研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

微粒子点眼剤による薬物後眼部送達に関しては、モデル蛍光物質を用い、送達の定量解析、メカニズム解析を行う。同時に、原子間力顕微鏡を用いた微粒子キャラクタリゼーション法の確立、培養細胞を用いた微粒子製剤及び表面修飾ポリマーの安全性の評価を行い、新規な後眼部送達点眼製剤を設計する。また、研究分担者(原英彰)の有する評価技術(網膜観察、病態動物の利用)を活用して点眼後の粒子挙動と内封薬物の薬理効果の相関を明らかにする。

経肺投与微粒子製剤に関しては、肺内に投与された微粒子が肺内に存在する種々の異なる細胞とどのような相互作用をするか、それを如何に制御するかを、培養細胞を用いて精密に評価し、経肺微粒子製剤設計の基盤構築を行う。また、肺内分布、薬理効果測定を実験動物を用いて行う。また、海外共同研究者とはチオール基導入などによる新規ポリマー等の機能性評価を共同で行い、新規微粒子表面設計法の確立に活用する。

4. 研究成果

【平成 21 年度】

本研究は、我々の開発した微粒子製剤設計及び解析技術を駆使、発展させ、微粒子製剤による 1) 注射投与に代わりうる薬物後眼部送達法、2) 経肺局所及び全身薬物投与法の 2 つの革新的な低侵襲薬物送達法を実用化する製剤研究基盤を確立することを目的として検討をした。前者に関しては、リポソーム粒子の特性が、後眼部への移行性に及ぼす

影響を精査し、粒子径がマイクロサイズから100nmへと変化するにつれて、送達効率が高くなることを明らかにした。実際の製剤設計を視野に入れ、後眼部疾患治療用のモデル水溶性薬物のリポソーム封入効率の向上を目指し、リモートローディング法を適用し90%近い封入率を得ることに成功した。経肺投与リポソーム製剤に関しては、リポソーム表面をキトサン、部分疎水化ポリビニルアルコールで修飾し、それぞれ特徴のある肺内残存挙動を示すことを明らかにした。実際に、ペプチド性薬物カルシトニンを封入したこれらリポソームをラットに投与し、肺内挙動を反映した持続的な薬理効果が現れていることを確認した。これら、表面修飾リポソームは、細胞毒性が極めて低いことを培養細胞を用いて明らかにした。これらの成果は、さらに実際に開発が強く望まれている緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症などの後眼部疾患、副作用のないステロイド吸入剤の開発を目指すために、極めて有益な知見となる。

【平成 22 年度】

・微粒子点眼剤による薬物後眼部送達

水溶性の蛍光物質および実際に治療への適用が期待できる薬物数種を微粒子(リポソーム)内にリモートローディング法を用いて高効率で封入する手法を確立した。得られた薬物封入リポソームからの薬物放出速度は、リポソーム組成によって制御可能であることを明らかにした。調製したリポソーム微粒子を、点眼投与および眼内注射投与後の局所体内挙動を LCMS を用いて解析し、後眼部に送達されていることを確認した。その内の1つの薬物に関しては、研究分担者と共同して、薬理効果が顕著に認められることを明らかにした。同時に、培養細胞を用いて調製した微粒子製剤及び表面修飾ポリマーの安全性の評価を行い、新規な後眼部送達点眼剤の確立のための基盤データを取得した。

・経肺投与微粒子製剤

薬物送達効率の向上を目指し、海外共同研究者とも協力してレクチンと粘膜付着性ポリマーとのコンジュゲートを調製し、細胞親和性評価、微粒子表面修飾特性、安全性評価を行い、その粘膜親和性に関する基本特性、投与後の有効性を明らかにした。肺内投与後の局所体内挙動を、動物実験により評価し、リポソームの表面修飾によって肺内挙動を制御できることを明らかにした。それらの結果を培養細胞を用いて精密に評価し、実証する結果を得た。肺内送達用のモデル薬物に関しても、リモートローディング法で高封入率が得られること、また、リポソーム組成、表面修飾によって薬物放出速度を制御できることを明らかにし、持続性の薬効を示す吸入製剤を設計する基盤技術を確立した。

以上の研究成果の一部は口頭発表すると共に論文としても公表をした。

【平成 23 年度】

・微粒子点眼剤による薬物後眼部送達

前年度までの研究成果に基づき、網膜ストレスへの効果が期待できるエダラボンをリモートローディング法を用いて封入したリポソームを調製し、網膜障害モデル動物を用い、その効果を評価した。その結果、エダラボンをリポソームに封入して点眼投与することにより、有意に網膜での障害を軽減できることが明らかとなった。さらに、リポソーム表面をポリエルリジン(PLL)で修飾できることを明らかにした。得られたPLL-リポソームは安定性、後眼部送達特性において、未修飾リポソームより優れていることを明らかにした。また、水溶性非ステロイド薬物に関してリモートローディング法で高効率で封入した薬物をウサギを用いて点眼実験を行い、溶液投与と比較して有意に網膜近傍に送達されていることも明らかにした。

・経肺投与微粒子製剤

リポソーム製剤の経肺投与の実用化を目指し、リポソーム懸濁液のネブライザーによる噴霧時の特性を評価し、噴霧液中にリポソーム粒子が目的量含まれていることを明らかにした。肺内送達用のモデル薬物をリモートローディング法で封入したリポソームに関しても、その特性を維持したまま噴霧されうることを実証した。さらに、粉末製剤化も試み、リポソーム粒子が凍結乾燥時にも薬物を保持したままにしている条件を明らかにした。以上の研究成果の一部は口頭発表すると共に論文としても公表をした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Shimazaki H, Hironaka K, Fujisawa T, Tsuruma K, Tozuka Y, Shimazawa M, Takeuchi H, Hara H. Edaravone-loaded liposome eyedrops protect against light-induced retinal damage in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 有, 52, 2011, 7289-7297, DOI: 10.1167/iavs.11-7983
2. Hironaka K, Fujisawa T, Sasaki H, Tozuka Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H. Fluorescence investigation of the retinal delivery of hydrophilic compounds via liposomal eyedrops. Biol Pharm Bull, 有, 34, 2011, 894-897, DOI:

10.1248/bpb.34.894

3. Hironaka K, Inokuchi Y, Fujisawa T, Shimazaki H, Akane M, Tozuka Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H. Edaravone-loaded liposomes for retinal protection against oxidative stress-induced retinal damage. *Eur J Pharm Biopharm.* 有, 79, 2011, 119-125, DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.01.019
 4. Murata M, Nakano K, Tahara K, Tozuka Y, Takeuchi H. Pulmonary delivery of elcatonin using surface-modified liposomes to improve systemic absorption: polyvinyl alcohol with a hydrophobic anchor and chitosan oligosaccharide as effective surface modifiers. *Eur J Pharm Biopharm.* 有, 80, 2012, 340-346, DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.10.011
 5. Abdallah MAKHLOF, Martin WERLE, Yuichi TOZUKA, Hirofumi TAKEUCHI, Nanoparticles of Glycol Chitosan and Its Thiolated Derivative Significantly Improved the Pulmonary Delivery of Calcitonin, *Int. J. Pharm.* 有, 397, 2010, 92-95, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.07.001
 6. Werle M, Makhlof A, Takeuchi H, Carbopol-lectin conjugate coated liposomes for oral peptide delivery, *Chem. Pharm. Bull.* 有, 58(3), 2010, 432-434, DOI: 10.1248/cpb.58.432
 7. 竹内洋文, 人に優しい製剤設計 - ナノ粒子を利用した経口製剤、後眼部送達用点眼剤の開発 -, *未来材料*, 無, 10, 2010, 5-10
 8. 竹内洋文, 杉原光, ポリマーコーティンググリポソームによるカルシトニンの経粘膜吸収, *薬学雑誌*, 有, 130, 2010, 1135-1142
 9. K. Hironaka, Y. Inokuchi, Y. Tozuka, M. Shimazawa, H. Hara, H. Takeuchi, Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye, *J. Control. Rel.* 有, 136, 2009, 247-253. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.02.020
 10. M. WERLE, H. TAKEUCHI, Chitosan-aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterisation and in vivo evaluation. 有. *Int. J. Pharm.*, 370(1-2): 2009, 26-32. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.11.013
 11. M. WERLE, H. TAKEUCHI, A. BERNKOP-SCHNÜRCH, Modified chitosans for oral drug delivery, *J Pharm Sci.*, 有, 98, 2009, 1643-1656, DOI: 10.1002/jps.21550
 12. M. WERLE, K. HIRONAKA, H. TAKEUCHI, Development and in vitro characterization of liposomes coated with thiolated poly(acrylic acid) for oral drug delivery *Drug Dev Ind Pharm.* 有, 35, 2009, 209-215, DOI: 10.2174/187221109788452221
 13. M. WERLE, H. TAKEUCHI, Oral protein delivery: a patent review of academic and industrial approaches, *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 有, 3, 2009, 94-104, DOI: 10.2174/187221109788452221
 14. M. WERLE, H. TAKEUCHI, Chitosan-aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterisation and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.*, 有, 370(1-2), 2009, 26-32. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2008.11.013
 15. 竹内洋文, ナノテクノロジーと吸入療法. *吸入療法*, 無, 1, 2009, 62-67
- 〔学会発表〕(計 30 件)
1. 竹内洋文 ナノ材料の医療応用、体内動態 ナノ材料の安全性・社会受容に関するシンポジウム 2012年1月24日 京都市、京都リサーチパーク
 2. K.Hironaka, Y. Tozuka, K. Tahara, H. K. Tsuruma, M. Shimazawa, Hara H., Takeuchi. Design of a liposomal ocular delivery system targeting the posterior segments of the eye Asian Federation for Pharmaceutical Science Conference 2011 9th-12th December 2011Kuala Lumpur, Malaysia
 3. 塚本敏雅、廣中耕平、藤澤卓也、佐々木

- 仁志、田原耕平、戸塚裕一、竹内洋文
眼科治療を目的とした表面修飾リ
ポソームの設計 第21回日本病院薬剤
師会東海ブロック学術大会・平成23年
度 日本薬学東海支部例会 平成23年
11月23日(水・祝)名古屋・ウイン
クあいち
4. 英 林, 田原耕平, 戸塚裕一, 唐 星,
竹内洋文 Fluorescence investigation
of lipid emulsion for retinal delivery
via eyedrops
 5. 第21回日本病院薬剤師会東海ブロッ
ク学術大会・平成23年度 日本薬学東
海支部例会 平成23年11月23日
名古屋・ウインクあいち
 6. 佐々木 仁志、廣中 耕平、田原 耕平、
戸塚 裕一、竹内 洋文 点眼による網膜
への薬物送達を目指した表面修飾リポ
ソームの設計とその有用性評価, 第49
回 粉体に関する討論会 2011年
11月14日 岩手県盛岡市 いわて県
民情報交流センター「アイーナ」8階 会
議室 803
 7. 佐々木仁志、廣中耕平、唐澤圭一、田原
耕平、戸塚裕一、竹内洋文 リポソーム
点眼剤の表面特性とその眼内挙動に
関する研究, 第28回 製剤と粒子設計
シンポジウム 2011年10月28日 ホテル
ニューオータニ大阪・大阪市
 8. 竹内洋文 最近の製剤設計と製剤プロセ
ス 化学工学会第43回秋季大会 2011年
9月16日 名古屋工業大学、名古屋市
 9. 廣中 耕平、鳶 博樹, 藤澤 卓也, 戸
塚 裕一, 鶴間 一寛, 嶋澤 雅光, 原 英
彰, 竹内 洋文 点眼したエダラ
ボン封入リポソームの網膜障害に対す
る保護効果 第27回日本 DDS 学会
2011年6月9日 東京大学本郷
キャンパス(東京都文京区本郷7-3-1)
 10. 竹内洋文 経肺投与・吸入製剤開発のた
めの粒子設計基盤研究 日本薬剤学会第
26年会 2011年5月29日~31日 タワー
ホール船橋、東京
 11. 竹内洋文 Recent Advances in
Pharmaceutical Dosage Form Design
Silpakorn大学特別講演会 2011年5月6
日 Silpakorn大学、Nakhon Pathom、
Thailand
 12. 竹内洋文 Particle Design for Recent
Dosage Form Development The second
Asian Synposium on Pharmaceutical
Sciences and Technology 2011年9月
20日~9月21日 西安市、中国
 13. 竹内洋文 リポソームによる眼科 DDS 中
部3公立大学新技術説明会 2011年1月
27日 東京
 14. 竹内洋文 Design and Characterization
of Liposomal Nano-particles For
Effective Drug Delivery Chungnam
National University International
Symposium 2011年1月19日 韓国
 15. 竹内洋文, 人に優しい薬物送達システ
ム, JST イノベーションブリッジ, 2010
年3月1日, 東京
 16. H. Takeuchi: Design and
characterization of liposomal
nano-particles for effective drug
delivery. 3rd International Symposium
on Bioimaging, NINS Okazaki
Conference Center, Okazaki, 2010年1
月19日
 17. 竹内洋文, 微粒子による薬物送達のコ
ンセプトと実現, 名古屋市立大学大学
院講義, 2010年5月20日, 名古屋
 18. 竹内洋文, 晶析からナノテクノロジー
の今後の製剤開発への応用の可能性,
パウレック東京講演会 2010年5月28
日 埼玉
 19. 竹内洋文 DDS 研究と製剤研究 岐阜薬科
大学相互研究発表会 2010年7月3日 岐
阜大学大学院医学研究科
 20. 竹内洋文: Research and Development of
Novel Dosage Forms Based on Particle
Design, Symposium on Preparation of
Bioparticles and Their Application
Technology, 上海、Sep. 27, 2010
 21. 竹内洋文: ナノテクノロジーと製剤開発、
第2回ナノテクノロジー講演会、三郷(埼
玉) 2010年10月7日
 22. H. Takeuchi: Systemic and specific
drug delivery with liposomal systems,
Nanjin, China, Nov. 6, 2009
 23. H. Takeuchi: Systemic and specific
drug delivery with liposomal systems,
Zhejiang University, China, Nov. 8,

2009

24. 竹内洋文：微粒子が可能にする薬物送達、富山-岐阜研究交流会、2009年12月8日
25. 竹内洋文：ナノ粒子で画期的な網膜の低侵襲治療を！、北陸・東海8大学 研究シーズ発表・展示会、2009年10月5日（名古屋、名古屋大学シンポジオホール）
26. H. Takeuchi: Specific drug delivery with liposomal systems in the eye and lung, Asian Federation Pharmaceutical Sciences, Oct 17, 2009、福岡
27. 竹内洋文：ドラッグデリバリーシステム（DDS）を利用した点眼薬の後眼部への薬物移行、岐阜薬科大学特別研究費報告会、2009年7月22日、（岐阜：岐阜薬大）
28. 竹内洋文：微粒子およびその表面特性を利用したDDS：第27回物性物理化学研究会特別講演：2009年6月19日（京都）
29. H. Takeuchi : Surface Design of Particles for Pharmaceutical Dosage Forms, International Powder Technology Form inACHEMA,2009年5月12日, 2009、フランクフルト
30. H. Takeuchi: Nanotechnology and Engineering in Designing Pharmaceutical Dosage Forms, Silpakorn University, 2009年5月6日、タイ

〔図書〕(計 5件)

1. 竹内洋文, ペプチド性薬物の経口・経肺吸収をめざしたポリマーコーティングリポソームの設計, ペプチド・タンパク性医薬品の新規 DDS 製剤の開発と応用 (遺伝子医学 MOOK 別冊), 2011, pp.124-133
2. Martin WERLE, Hirofumi TAKEUCHI : Strategies to overcome the enzymatic barrier. Oral Delivery of Macromolecular Drugs, Springer, 2009, pp.65-84
3. Pornsak SRIAMORNSAK, Jringjai THONGBORISUTE, Hirofumi TAKEUCHI : Liposome-based Mucoadhesive Formulations for Oral Delivery of

Macromolecules. Oral Delivery of Macromolecular Drugs , Springer, 2009, pp.169-194

4. 竹内洋文, 戸塚裕一 : くすりに学ぶナノ粒子・ナノカプセルの作り方。「究極のかたちをつくる」日刊工業新聞社, pp.47-55 (2009)]
5. 竹内洋文 (分担執筆): 造粒の基礎「分野/材料別 造粒事例と頻出 Q&A 集」情報機構, pp.3-12, (2009)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)
名称: ジクロフェナクナトリウムを封入した後眼部送達用ポリマーコーティングリポソーム
発明者: 北川豊、竹内洋文、廣中耕平
権利者: わかもと製薬
種類: 特願
番号: 2010-103099
出願年月日: 2010年4月28日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: PROMPT NUCLEIC ACID DELIVERY CARRIER COMPOSITION
発明者: 竹内洋文
権利者: 竹内洋文、大塚製薬
種類: 特許
番号: 特許 NO.97143
取得年月日: 2012年1月10日
国内外の別: 海外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内洋文 (岐阜薬科大学 薬学部 教授)
研究者番号: 50171616

(2) 研究分担者

戸塚裕一 (岐阜薬科大学 薬学部 准教授)

研究者番号: 50312963

原英彰 (岐阜薬科大学 薬学部 教授)

研究者番号: 2038171

田原耕平 (岐阜薬科大学 薬学部 助教)

研究者番号: 30454325

(3) 連携研究者

Martin WERLE (Syngenta Crop Protection・Strategy Manager, PhD)

Pornsak SRIAMORNSAK (Silpakorn University・Associate Professor)