

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460226

研究課題名(和文) スギ花粉症根治療法のための新規減感作動性放出制御剤の設計と評価

研究課題名(英文) Development of sustained-release formulations for cedar pollen-specific desensitization therapy

研究代表者

岩尾 康範 (Iwao, Yasunori)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：30433022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：スギ花粉症特異的減感作療法を目指した徐放性製剤の開発を見据え、本法に有効な日本スギ花粉主要アレルゲン抗原Cry J1のアレルゲン量・放出速度の検討、徐放性マイクロスフェアの調製とCry j 1長期安定性評価を行った。CryJ1を感作したマウスにおいて、132 ng/day の速度でCryJ1を4週間持続投与することで免疫寛容が起こる可能性が示唆された。また、ゼロ次で徐放性を示すPLAPEG9604Hを用いたマイクロスフェアの調製に成功し、長期インキュベート後惹起されるCryJ1の構造変化は体内の減感作に影響を及ぼさないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop a sustained-release formulation for cedar pollen-specific desensitization therapy, we determined the necessary amount or released rate of cryptomeria japonica pollen 1 (CryJ1), one of main allergen antigens of Japan cedar pollen, and we tried to prepare sustained-release formulation with long-term stability of CryJ1. As a result, the CryJ1 released rate to lead to immune tolerances was found to be 132 ng/day, and we succeeded in preparing PLAPEG9604H microspheres containing CryJ1 showing the sustained release at zero order manner. In addition, any structural changes of the cryj1 after long-term incubation were not found to influence the desensitization therapy.

研究分野：製剤学

キーワード：減感作

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国ではアレルギー性鼻炎の患者数が著しく増加し、その罹患率は全国民の40%近くに達することが言われている。特に、中でもスギ花粉症の有病率は25%を占め、仕事、睡眠障害など患者の日常生活への影響も大きく(クオリティ・オブ・ライフ(QOL)の低下)、スギ花粉症は一種の社会問題となっている。現在、スギ花粉症への治療法としては、くしゃみ・鼻水・目の痒みといった発症したアレルギー症状を緩和させるため、抗ヒスタミン薬やステロイド薬の投与などの局所療法や全身療法、また、鼻穴に直接レーザー光線を照射して、粘膜を焼きつかせるレーザー手術療法などがあるが、いずれも対症療法にすぎず、その抜本的な問題解決には至っていない。しかしながら、近年、唯一の根治療法としての可能性が示唆されているものとして、減感作療法(抗原特異的免疫療法)に注目が集まっている。減感作療法とは、週に1-2回程度、花粉症アレルゲンエキスを皮下注射し、段階的に濃度を上げながら繰り返し(数年間)投与することで、免疫寛容を誘導する治療法である。しかしながら、患者は頻回な通院が必要となり、その負担は著しく大きく、コンプライアンスの低下を招くこと、また稀ではあるが重い副作用発現も危惧されている。したがって、花粉症アレルゲンタンパク質を、副作用が惹起されないような低用量・低速度で、かつ体内で長期間放出できる徐放性製剤を開発することができれば、患者のQOLは著しく増大し、医学臨床上、その意義は極めて大きい。

これまで我々は、熱溶融造粒法、微粒子コーティング法、湿式造粒法、液中高压乳化法などの種々の製剤学的手法を駆使することで、徐放性・pH依存性・優れた溶解性などの機能性を付与した製剤の開発に成功してきた。特に、骨形成促進作用を有する低分子薬物のマイクロスフェア・フィルムを作製した際には、乳酸重合体、グルコール酸重合体、乳酸-グルコール酸重合体など種々の生体内分解性合成高分子を新たに合成することで、3カ月以上の徐放性ゼロ次放出製剤の開発に成功しており、実際に臨床試験第II相試験までの製品開発の経験を有している。したがって、これらの経験を基に、花粉症アレルゲンに最適な新規合成高分子を見出し、組み合わせることで、切望される徐放性製剤の開発も可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、“花粉症根治療法のための新規減感作動性徐放性製剤”を開発するため、どのような期間・放出速度であれば、免疫寛容を誘導できるか、

どのような合成高分子を用いれば、高含量のアレルゲンを粒子に内封でき、徐放化できるか、

長期間、体内に粒子を埋め込んだ際、アレルゲン免疫原に変化はないか、
を明らかにする。

すなわち、定速で内容物を放出するAlzet浸透圧ポンプに、日本スギ花粉の主要アレルゲン抗原 *cryptomeria japonica pollen 1* (CryJ1) を内封後、花粉症モデルマウスに1カ月埋め込み、マウス体内免疫反応の詳細を検討した後、その放出速度に従うような新規合成高分子を用いたマイクロスフェア製剤を設計、評価する。さらに、長期保存中のCryJ1の構造変化や免疫原性について検討を行うことで、花粉症減感作療法に応用できる優れた放出制御能を有する新規微粒子製剤を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

CryJ1を用いて、花粉症モデルマウスを作製した。CryJ1抗原1ng/5 μ Lをマウスに鼻腔内投与し、その後、2,3週間後にも同様の抗原量で鼻腔内投与した。その一週間後から、0.1ng/5 μ Lの抗原を毎日7日間投与後、最終日から3日後に10ngの抗原でchallengeした際のくしゃみ、鼻かき回数を、また血清採取後、CryJ1血清IgEレベルをELISAにより調べ、有意にそれら値が上昇したマウスを花粉症モデルマウスとして選定した。次に、CryJ1を0.5-5ng/monthになるように一カ月放出できるAlzet浸透圧ポンプ(Alzet社)に内封した後、花粉症モデルマウス背中に埋め込んだ。1カ月後、Pumpを取り出し、その後、10ngの抗原でchallengeして、くしゃみ、鼻かき回数、また血清CryJ1IgEレベルなどを調べ、どの放出速度で免疫寛容を成し得ることができるか検討した。

新規合成高分子としては、以下のものを用いた(分子量、分子量分布が異なる3種類の乳酸重合体(poly(D,L-lactic acid): PLA)、4種類の乳酸-グルコール酸重合体(poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid): PLGA)、8種類の乳酸-ポリエチレングリコールブロック重合体(poly(D,L-lactic acid)-block-poly(ethylene glycol): PLAPEG)、5種類の乳酸-トリメチレンカーボネート共重合体(poly(D,L-lactic acid-co-trimethylene carbonate): PLATMC))。これらを600mg秤量しアセトニトリル溶液3mLで溶解させた後、50mg HSAおよびCryJ1水溶液を加え、ポジトロンホモジナイザー(KINEMATICA)にて23,000rpmで30秒間ホモジナイズした。得られたW/O溶液を、800mLの0.1% polyvinyl alcohol (PVA) 溶液に入れ、6,000rpmで1時間攪拌した。得られたW/O/W溶液はスターラーで一晩攪拌し、蒸留水で3回洗浄したのち、凍結乾燥することでマイクロス粒子を得た。得られた粒子の粒度分布、平均粒子径はMastersizer (Malvern)で測定す

ると同時に、タンパク質の内封率、粒子の収率、表面形状 (SEM, 日本分光) も評価した。また、PBS を用いた *in vitro* 放出性についても検討した。

CryJ1 内封粒子を 37 度で incubation 後、免疫寛容が認められた期間内におけるタンパク質自身の二次・三次構造変化の詳細を CD スペクトル (日本分光) で調べると同時に、DSC を用いて熱安定性を検討した。

4. 研究成果

ALZET PUMP 移植前、摘出後および最終感作後の CryJ1 特異的抗体価を測定した。ALZET PUMP 移植中に、アナフィラキシー等の副作用は見られなかった。最終免疫終了時において、生理食塩水、25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CryJ1 内封群の IgE 値は順に 0.40, 0.38, 0.23, 0.22 であった。このことから、CryJ1 内封濃度が高いほど IgE 産生は抑制され、50 及び 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CryJ1 内封群で IgE 値は約 1/2 に抑制されたことがわかった (Fig. 1)。また、IgG は、コントロールと比較して 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CryJ1 を投与したマウスにおいて高い値を示し、CryJ1 投与群間では濃度依存的に値が低下した。さらに、IgG2a は、コントロールに比べ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CryJ1 内封群はわずかに上昇し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内封群ではコントロールの約 3 倍に上昇し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内封群ではコントロールの約 1/2 に低下した。これらの結果から、CryJ1 の持続投与によりアレルギー反応が抑制され、特に CryJ1 を 132 ng/day の速度で放出させることで免疫寛容が誘導できる可能性が示唆された。

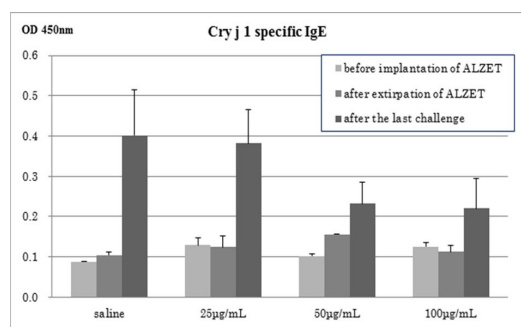


Fig. 1. CryJ1 特異的 IgE に対する各種内封 CryJ1 濃度の影響

モデルタンパク質として HSA を用いて、高分子に対する重量比率、超音波ホモナイザーの振幅強度など、最適な製造条件を見出した。種々の高分子を用いて調製した粒子はいずれも数十 μm の平均粒子径であったが、PLAPEG9604H が高いタンパク質内封率を示し (Fig. 2)、かつ、最もゼロ次放出挙動に近

い徐放特性を示した。そこで、PLAPEG9604H を用いて CryJ1 内封マイクロスフェアを調製し、HSA を内封した際と同様な粒子径、粒度分布、徐放性を示すことが明らかとなった。

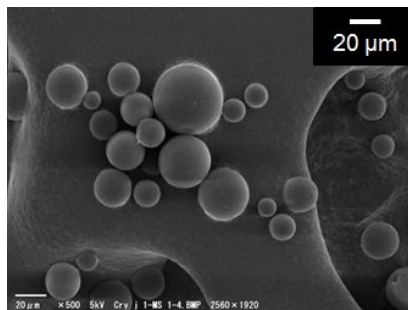


Fig. 2. CryJ1 内封 PLAPEG9604H の電子顕微鏡写真

CD スペクトルの結果、native CryJ1 において 228 nm 付近にピークが認められ、CryJ1 が α ヘリックス構造を有していることがわかった。その後、2 週間、4 週間インキュベートした際、その時間依存的にピークは 218 nm ヘシフトした。これは、CryJ1 が β シート構造を有することを表しているおり、インキュベートにより α ヘリックスから β シートへ構造がシフトすることが示唆された。Cry j 1 の分子表面には 4 つの IgE エピトープが露出しているが、分子間 β シート構造等が形成されることで、露出した IgE エピトープが埋没するかは不明であり、我々が得ている過去の *in vivo* の結果と考え合わせると、たとえ構造変化が惹起されたとしても、生体内で減感作を誘導できる可能性が考えられた。

以上より、花粉症減感作療法に応用できる放出制御能を有する新規微粒子製剤を開発に成功した。本知見は、今後、その他の主要アレルギー抗原を用いた減感作療法治療を可能にする製剤開発を行う際の、有用な基礎的知見になるものと思われる。

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 25 件)

- 1) Ranneh AH, Iwao Y, Noguchi S, Oka T, Itai S. Use of charged additives enhances the solubility and stability of the water-insoluble anticancer drug SN38 in liquid crystalline phase nanoparticles, cubosomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 515, 501-505 (2016).
- 2) Ali MA, Noguchi S, Watanabe M, Iwao Y, Itai S. Structure of anti-tumor drug 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin monohydrate and its solid state hydrolysis mechanism on heating. *Acta Crystallographica Section C*, 72,

743-747 (2016).

- 3) Watanabe M, Mizoguchi M, Aoki H, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Saturated fatty acids and fatty acid esters promotes the polymorphic transition of clarithromycin metastable form I crystal. *International Journal of Pharmaceutics*, 512, 108-117 (2016).
- 4) Ito Y, Maeda A, Kondo H, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Application of water-insoluble polymers to orally disintegrating tablets treated by high-pressure carbon dioxide gas. *International Journal of Pharmaceutics*, 511, 10-22 (2016).
- 5) Tanaka H, Iwao Y#, Izumikawa M, Sano S, Ishida H, Noguchi S, Itai S. Preparation of orally disintegrating tablets containing powdered tea leaves with enriched levels of bioactive compounds by means of microwave irradiation technique. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 64, 1288-1297 (2016). (#: Corresponding author)
- 6) Terada T, Tagami M, Ohtsubo T, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Sustained-release microsphere formulation containing an agrochemical by polyurethane polymerization during an agitation granulation process. *International Journal of Pharmaceutics*, 509, 328-337 (2016).
- 7) Ali MA, Iwao Y, Noguchi S, Oka T, Itai S. Preparation and Characterizations of SN-38 Encapsulated Cubosomes Containing α -Monoglyceride Additives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 64, 577-584 (2016).
- 8) Yoshino H, Yamashita K, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Quantitative appearance inspection for film coated tablets. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 64, 1226-1229 (2016).
- 9) Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Coletta A, Bienk K, Galliano M, Schiøtt B, Iwao Y, Ishima Y, Otagiri M. Mutants and molecular dockings reveal that the primary L-thyroxine binding site in human serum albumin is not the one which can cause familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860, 648-660 (2016).
- 10) Noguchi S, Atsumi H, Iwao Y, Kan T, Itai S. Nobiletin: a citrus flavonoid displaying potent physiological activity. *Acta Crystallographica Section C*, 72, 124-127 (2016).
- 11) Kamiya T, Kondo H, Hiroma H, Yamashita K, Sako K, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Impact of process parameters on Mg-St content and tablet surface wettability in the external lubrication method for a rotary tablet press. *Advanced Powder Technology*, 27, 193-198 (2016).
- 12) Mise R, Iwao Y, Kimura S, Osugi Y, Noguchi S, Itai S. Investigation of physicochemical drug properties to prepare fine globular granules composed of only drug substance in fluidized bed rotor granulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 63, 1070-1075 (2015).
- 13) Kajihara R, Noguchi S, Iwao Y, Yasuda Y, Segawa M, Itai S. Structural investigation of

spherical hollow excipient Mannit Q by X-ray microtomography. *International Journal of Pharmaceutics*, 495, 140-143 (2015).

- 14) Nozawa K, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Effect of surfactants or a water soluble polymer on the crystal transition of clarithromycin during a wet granulation process. *International Journal of Pharmaceutics*, 495, 204-217 (2015). (IF=4.22)
- 15) Yamada K*, Iwao Y*, Bani-Jaber A, Noguchi S, Itai S. Preparation and evaluation of newly developed chitosan salt coating dispersions for colon delivery without requiring overcoating. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 63, 799-806 (2015). (*: Equal contribution)
- 16) Iwao Y. Efficient pharmaceutical formulation designs and their development using mathematical and statistical analysis. *Yakugaku Zasshi*, 135, 1129-1134 (2015). (Review article)
- 17) Funakoshi Y, Iwao Y, Noguchi S, Itai S. Effect of alkyl chain length and unsaturation of the phospholipid on the physicochemical properties of lipid nanoparticles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 63, 731-736 (2015).
- 18) Fujiki S, Watanabe N, Iwao Y, Noguchi S, Mizoguchi M, Iwamura, T, Itai S. Suppressed release of clarithromycin from tablets by crystalline phase transition of metastable polymorph form I. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 2641-2644 (2015).
- 19) Aoki H*, Iwao Y*, Mizoguchi M, Noguchi S, Itai S. Clarithromycin highly-loaded gastro-floating fine granules prepared by high-shear melt granulation can enhance the efficacy of *Helicobacter pylori* eradication. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92, 22-27 (2015). (*: Equal contribution)
- 20) Iwao Y, Banno N, Kakinuma M, Noguchi S, Itai S. Study of proper use and storage stability of surfactant in dissolution test. *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, 46, 171-179 (2015) (Japanese).
- 21) Bani-Jaber A, Kobayashi A, Yamada K, Haj-Ali DN, Uchimoto T, Iwao Y#, Noguchi S, Itai S. A newly developed lubricant, chitosan laurate, in the manufacture of acetaminophen tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 49-56 (2015). (#: Corresponding author)
- 22) Kajihara R, Noguchi S, Iwao Y, Suzuki Y, Terada Y, Uesugi K, Itai S. Structural changes of polymer-coated microgranules and excipients on tableting investigated by microtomography using synchrotron X-ray radiation. *International Journal of Pharmaceutics*, 481, 132-139 (2015).
- 23) Aoki H, Iwao Y, Uchimoto T, Noguchi S, Kajihara R, Ishida M, Takahashi K, Terada Y, Suzuki Y, Itai S. Fine granules showing sustained drug release prepared by high-shear melt granulation using triglycerin full behenate and milled microcrystalline cellulose. *International*

Journal of Pharmaceutics, 478, 530-539 (2015).
24) Iwao Y, Kimura S, Ishida M, Mise R, Yamada M, Namiki N, Noguchi S, Itai S. Preparation and evaluation of highly drug-loaded fine globular granules using a multi-functional rotor processor. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 63, 95-101 (2015).
25) Barman RK, Iwao Y, Noguchi S, Wahed MII, Itai S. Improving flow property of nifedipine loaded solid-lipid nanoparticles by means of silica for oral solid dosage form. Pharmacology & Pharmacy, 5, 1119-1129 (2014).

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 大石沙奈、岩尾康範、野口修治、劉季玲、前畑陽祐、渡辺和彦、下川義之、板井茂 "ゼラチン被膜と植物性被膜の物性比較" 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.200, 2016 年 3 月 27 日. (Poster 発表: 演題番号 27AB-pm150S)
2. 島田優輝、岩尾康範、野口修治、板井茂 "攪拌溶融造粒法を用いた苦味マスキング微小粒子の設計と評価". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.198, 2016 年 3 月 27 日. (Poster 発表: 演題番号 27AB-pm104)
3. 櫻井優紀子、岩尾康範、野口修治、板井茂. "攪拌溶融造粒法を用いた苦味マスキング微小粒子の設計と評価". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.202, 2016 年 3 月 27 日. (Poster 発表: 演題番号 27AB-pm208S)
4. 渡邊美笛、溝口緑理、青木肇、岩尾康範、野口修治、板井茂. "クラリスロマイシン/脂質 mixture におけるクラリスロマイシン結晶転移メカニズムの解明". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.111, 2016 年 3 月 28 日 (口頭発表: 演題番号 28M-pm05S)
5. 平井大貴、岩尾康範、野口修治、板井茂 "界面反応を伴う薬物の溶解挙動解析のための数理モデルの構築と評価". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.111, 2016 年 3 月 28 日 (口頭発表: 演題番号 28M-pm12S)
6. 増田瑠梨、神谷貴行、岩尾康範、野口修治、板井茂. "有効表面積を指標とした外部滑沢と内部滑沢の比較". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.111, 2016 年 3 月 28 日 (口頭発表: 演題番号 28M-pm13S)
7. 泉川雅裕、田中大智、岩尾康範、野口修治、板井茂. "マイクロウェーブを利用した漢方粉末含有口腔内崩壊錠の設計と評価" 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.111, 2016 年 3 月 28 日 (口頭発表: 演題番号 28M-pm14S)
8. 吉原尚輝、大杉裕貴子、岩尾康範、野口修治、浅田拓海、落合康、板井茂. "遠心転動造粒法を用いた難溶性薬物徐放性中空粒子の設計と評価". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.112, 2016 年 3 月 28 日(口頭発表: 演題番号 28N-pm03S)
9. 舟越由香、岩尾康範、野口修治、板井茂 "毛髪のダメージ改善を目的とした脂質ナノ

- 粒子製剤のヘアケア分野への応用". 日本薬学会第 136 年会 (横浜) プログラム集, p.113, 2016 年 3 月 28 日(口頭発表: 演題番号 28N-pm19S)
10. 犬飼晃基、瀧山圭、岩尾康範、野口修治、板井茂. "クラリスロマイシンのゲル化による溶出挙動への影響とゲル形成機構に関する研究". 日本薬学会第 31 年会 (岐阜) プログラム集, p.42, 2016 年 5 月 19 日(口頭発表: 演題番号 19B1-3)
 11. 西川充展、岩尾康範、野口修治、浅田拓海、落合康、板井茂. "球形中空粒子 (OPUSGRAN R) 技術造粒機構の解明". 日本薬学会第 31 年会 (岐阜) プログラム集, p.49, 2016 年 5 月 19 日(口頭発表: 演題番号 19F1-2)
 12. 岩城潤、岩尾康範、野口修治、板井茂 "Hydroxypropyl methylcellulose trimellitate を用いた転動流動コーティング装置 Multiplex Coater (MP-01) による腸溶性微粒子製剤の調製". 日本薬学会第 31 年会 (岐阜) プログラム集, p.65, 2016 年 5 月 19 日(ポスター発表: 演題番号 P19-25)
 13. 泉川雅裕、岩尾康範、野口修治、板井茂 "マイクロウェーブを利用した漢方エキス含有口腔内崩壊錠の設計と評価". 日本薬学会第 31 年会 (岐阜) プログラム集, p.72, 2016 年 5 月 19 日(ポスター発表: 演題番号 P21-21)
 14. アリ モハマド アシュラフ、岩尾康範、野口修治、岡俊彦、板井茂. "Preparation and Characterization of SN-38-Encapsulated Phytantriol Cubosomes Containing α -Monoglyceride Additives". 日本薬学会第 31 年会 (岐阜) プログラム集, p.74, 2016 年 5 月 19 日(ポスター発表: 演題番号 P21-42)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/pharmeng/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩尾 康範 (IWA0, Yasunori)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号: 30433022

(2) 研究分担者

板井 茂 (ITAI, Shigeru)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号: 80453059

野口 修治 (NOGUCHI, Shuji)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号: 60237823