

博 士 論 文

難水溶性薬物シクロスポリン A の物性改変による
薬物動態制御

**Pharmacokinetic control of cyclosporine A, a poorly water-soluble drug,
with modification of physicochemical properties**

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科
博士論文である。

2015 年 3 月

大阪薬科大学

佐藤秀行
(Sato, Hideyuki)

論文中で用いた略語および記号

ADI	acceptable daily intake
ANOVA	a-one way analysis of variance
API	active pharmaceutical ingredient
AUC	area under the concentration versus time curve
BALF	bronchoalveolar lavage fluid
BCS	biopharmaceutics classification system
BHT	butylated hydroxytoluene
CFC	chlorofluorocarbon
C_{max}	maximum concentration
CMC	critical micelle concentration
CsA	cyclosporine A
CV	coefficient variation
DDS	drug delivery system
DE	dry-emulsion
DLS	dynamic light scattering
DMEM	dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DPI	dry powder inhaler
DSC	differential scanning calorimetry
FPF	fine particle fraction
FT-IR	fourier transform infrared spectrometer
GMO	glycerol monooleate
HPC	hydroxypropyl cellulose
hpGMO	highly purified glycerol monooleate
HPLC	high performance liquid chromatography
HPMC	hydroxypropyl methylcellulose
IEC	intestine epithelial cells
IL-2	interleukin-2
LD ₅₀	50% lethal concentration
LDH	lactose dehydrogenase
LSD	least significant difference procedure

MC	methylcellulose
MAT	mean absorption time
MeBMT	(4 <i>R</i>)-4-[(<i>E</i>)-2-butenyl]-4, <i>N</i> -dimethyl- <i>L</i> -threonine
MDA	malondialdehyde
MDI	metered-dose inhaler
MDT	mean dissolution time
MRT	mean residence time
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffer saline
PLM	polarized light microscopy
PM	physical mixture
pMB	poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine- <i>co-n</i> -butyl methacrylate)
PVP	polyvinylpyrrolidone
RH	relative humidity
RP	respirable powder
SEM	scanning electron microscopy
SD	solid dispersion
SMEDDS	self-microemulsification drug delivery system
SNEDDS	self-nanoemulsification drug delivery system
SMSD	self-micellizing solid dispersion
TEM	transmission electron microscopy
TBA	thiobarbituric acid
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
T _{max}	time to maximum concentration
T _{1/2}	half-life time
UPLC	ultra performance liquid chromatography
WM	wet-milling
XRPD	powder X-ray diffraction

緒論	1
第 1 章 湿式粉碎法を応用した固体分散体制剤	7
第 1 節 序論	7
第 2 節 実験方法	8
1-2-1 試薬	8
1-2-2 製剤調製法	8
1-2-3 溶解性評価	10
1-2-3-1 溶出試験	
1-2-3-2 溶解度測定	
1-2-3-3 再結晶	
1-2-4 固体物性	10
1-2-4-1 走査型電子顕微鏡	
1-2-4-2 粉末 X 線回折	
1-2-4-3 熱分析	
1-2-5 フーリエ変換赤外吸収スペクトルを用いた薬物-ポリマー間相互作用の検出	11
1-2-6 経口吸収性評価	11
1-2-6-1 動物	
1-2-6-2 薬物血中濃度測定法	
1-2-7 統計解析	12
第 3 節 実験結果及び考察	13
1-3-1 ポリマー化合物の製剤物性への影響	13
1-3-1-1 溶出性	
1-3-1-2 製剤中薬物の結晶性	
1-3-1-3 粒子形状	
1-3-2 薬物-ポリマー間における相互作用の評価	19
1-3-3 ラット経口投与後における薬物動態学的解析	22
第 4 節 小括	24

第 2 章 モノオレイン酸グリセリンを用いた Dry-emulsion 製剤	26
第 1 節 序論	26
第 2 節 実験方法	27
2-2-1 試薬	27
2-2-2 製剤調製方法	27
2-2-3 過酸化脂質測定	27
2-2-4 Dry-emulsion 製剤の固体物性	28
2-2-4-1 走査型電子顕微鏡	
2-2-4-2 粉末 X 線回折	
2-2-4-3 示差走査熱分析	
2-2-4-4 溶出試験	
2-2-4-5 透過型電子顕微鏡	
2-2-4-6 動的光散乱	
2-2-5 経口吸収性評価	29
2-2-5-1 動物	
2-2-5-2 薬物血中濃度測定法	
2-2-6 粉末吸入製剤調製	29
2-2-7 Dry-emulsion 粉末吸入製剤の製剤物性	29
2-2-7-1 走査型電子顕微鏡	
2-2-7-2 レーザー回折	
2-2-7-3 カスケードインパクターによる吸入特性	
2-2-8 肺組織傷害性	31
2-2-8-1 ラット肺胞由来 L2 細胞に対する細胞毒性	
2-2-8-2 <i>In vivo</i> における肺組織傷害性	
2-2-9 卵白由来 Ovalbumin を使用した喘息モデル動物作成	31
2-2-9-1 Ovalbumin 粉末吸入製剤の調製	
2-2-9-2 ラットに対する Ovalbumin 感作	
2-2-10 Dry-emulsion 粉末吸入製剤の動物モデルにおける抗炎症作用	32
2-2-10-1 気管支肺胞洗浄液中細胞数の計数	
2-2-10-2 フローサイトメトリー	
2-2-10-3 肺組織学的解析	

2-2-11	粉末吸入製剤投与後における薬物血中濃度測定	33
2-2-12	統計解析	33
第 3 節	実験結果及び考察	34
2-3-1	Dry-emulsion 製剤の物性	34
2-3-1-1	高純度モノオレイン酸グリセリンの酸化安定性	
2-3-1-2	物理化学的特性	
2-3-1-3	溶解性評価	
2-3-1-4	消化管吸収性	
2-3-2	Dry-emulsion の粉末吸入製剤への応用	40
2-3-2-1	高純度モノオレイン酸グリセリンの肺組織傷害性	
2-3-2-2	Dry-emulsion 粉末吸入製剤の物理化学的特性評価	
2-3-2-3	喘息モデルラットにおける抗炎症作用	
2-3-2-4	吸入製剤気道内投与後における薬物全身曝露	
第 4 節	小括	50
第 3 章	両親媒性コポリマーを用いた自己ミセル形成型固体分散体制剤	52
第 1 節	序論	52
第 2 節	実験方法	53
3-2-1	試薬	53
3-2-2	IEC-6 細胞を使用した毒性評価	53
3-2-3	製剤調製方法	53
3-2-4	溶出性	54
3-2-5	固体物性	54
3-2-5-1	走査型電子顕微鏡及び透過型電子顕微鏡	
3-2-5-2	偏光顕微鏡	
3-2-5-3	粉末 X 線回折	
3-2-5-4	動的光散乱	
3-2-6	ラット経口投与後における薬物血中濃度推移	54
3-2-6-1	動物	
3-2-6-2	薬物血漿中濃度測定法	
3-2-7	製剤安定性試験	55

3-2-7-1 製剤保存条件	
3-2-7-2 溶出試験	
3-2-8 統計解析	55
第 3 節 実験結果及び考察	56
3-3-1 IEC-6 細胞に対する細胞毒性	56
3-3-2 製剤の固体物性及び保存安定性	57
3-3-3 溶出性	60
3-3-4 製剤ラット経口投与後における消化管吸収性	62
第 4 節 小括	65
総括	67
謝辞	69
References	70

緒論

近年、High-throughput screening や Combinatorial chemistry を始めとする創薬技術の発達に伴い、数多くの医薬品候補化合物が効率的に生み出されている。しかし、創生される新規化合物における難溶性物質の割合が増加しており、約 70% 程度が難溶性薬物であると言われている [1]。これらは、治療薬候補として高いポテンシャルを持つものの、その溶解性の低さから臨床応用が非常に困難となっている。また、現在上市されている薬物の速放性経口製剤中の有効成分についても、約 40% が日本薬局方の通則で定義される「ほとんど溶けない」(<100 µg/mL) に分類されると報告がある [2]。溶解性の低さは、既存の難溶性の治療薬に関しても、薬物の高用量投与、投与後の血中濃度のばらつきや新たな剤形開発の制限等のデメリットをもたらしている。このような背景から、新医薬品の創生のみならず Product life cycle management の観点からも、実用的な溶解性改善技術開発が切望されている。

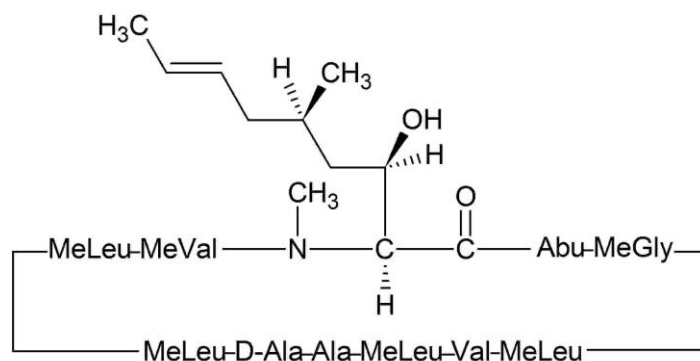
Biopharmaceutics Classification System (BCS) は、薬物の溶解性と膜透過性の高低に基づき、化合物を 4 つの Class に分類 (Fig. 1) することで大局的な消化管吸収挙動の考察を可能とした [3]。高い溶解性と膜透過性を有する

	High Solubility	Low Solubility
High Permeability	Class 1 High Solubility High Permeability (Rapid Dissolution for Biowaiver)	Class 2 Low Solubility High Permeability
Low Permeability	Class 3 High Solubility Low Permeability	Class 4 Low Solubility Low Permeability

Fig. 1 The Biopharmaceutics Classification System (BCS) as defined by Amidon *et al.* [3]

Class I 化合物は良好な経口吸収性を示す傾向にあり，創薬においては Class I に属する医薬候補化合物の選択が理想的である．一方，Class III 化合物は高い溶解性と低い膜透過性を特徴とし，膜透過性向上を目的とした吸収促進剤の添加やプロドラッグ化等による Bioavailability (BA) 向上が多数報告されている [4-6]．また，BCS class IV に属する薬物は低溶解性かつ低膜透過性という特性を持つために消化管吸収性が悪く，一般的に製剤化が難しいのが現状である [7]．一方，Class II 薬物においては溶解度の面に問題を認めるものの高い膜透過性を有するため，吸収過程において溶解速度律速の吸収を示し，化合物の物性，特に溶解性の変化が消化管における吸収性に大きく影響する [8]．このような特徴から，Class II 薬物においては溶解性の改善を主軸とした製剤開発が非常に効果的である．難溶性薬物の溶解性改善を目指した技術として，塩の形成，粒子の微細化，固体分散体制剤，シクロデキストリンを始めとする添加剤による複合体化及びエマルジョン製剤等，数々の手法が検討されており，これらの応用によって BCS class II 薬物の BA 及び薬理作用の向上が多数報告されている [9-12]．

Cyclosporine A (CsA) (Fig. 2) は，BCS class II に分類される難溶性薬物であり，薬理作用としてヘルパー T 細胞に対するインターロイキン-2 等のサイトカイン産生の阻害を示す [13]．この作用により強力な免疫抑制作用を示すため，現在臨床においては主に臓器移植後における拒絶反応の抑制，リウマチ等の自己免疫性疾患の治療薬として広く使用されている [14]．また，CsA にはこれ以外にも数多くの薬理作用が報告されており，抗真菌活性，抗寄生虫活性及び抗炎症作用等が確認されており，中でも強力な抗炎症作用は種々の炎症性疾患への応用が期待されている [15]．しかし，この様な臨床応用にあたり，CsA の物性の悪さ，すなわち高脂溶性 ($\log P$: 2.92) [16] であり溶解度が非常に低い (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ことに起因する CsA の消化管吸収・血中濃度のばらつき，狭い治療域のために副作用の発現が問題となるため，溶解性が優れる吸収再現性のよい製剤の開発が望まれている．また，現在上市されている製剤は注射剤を始めとする液体制剤，Emulsion 前濃縮液のソフトカプセル製剤のみであり，剤形選択，製剤安定性，製造コストのみならず臨床における患者の利便性やコンプライアンスの面からもハンドリングのよい固形製剤の開発が望まれている．



Abu: (2*S*)-2-アミノ酪酸, MeGly: *N*-メチルグリシン
 MeLeu: *N*-メチルロイシン, MeVal: *N*-メチルバリン

Fig. 2 Chemical structure of cyclosporine A.

近年, CsA が喘息モデル動物において, 喘息病態への寄与が大きいとされる好酸球の成熟・分化の抑制作用, 気道組織における好酸球浸潤抑制作用を示すことが報告されている [17, 18]. 動物モデルのみでなくステロイド依存性の慢性喘息患者に対する臨床試験 [19-21] においても CsA の有効性が認められており, CsA の喘息治療薬としての臨床応用が強く期待されている. しかし, 通常の製剤処方では低い BA 及び血中濃度のばらつきが問題となる. 加えて, 経口投与による使用では腎毒性や肝毒性を始めとする全身性の副作用発現が懸念されることから全身曝露を回避するための適切な Drug delivery system (DDS) の開発が求められる.

肺特異的な薬物送達はインスリン等の生理活性ペプチド [22-24] や, 難溶性薬物の吸入剤 [25-27] の新しい投与経路として注目されており, これまでに肺深部への到達率の高い製剤が多数開発されている [28-33]. 吸入製剤は, 呼吸器系疾患への適用が多く, 特に気管支喘息ならびに慢性閉塞性肺疾患等への適用が国内外を問わず少なくない. これらの疾患は呼吸器周辺を病変部位とするため, 患部特異的かつ低用量の投与が可能である吸入製剤は, 投与量の減量, 全身性副作用回避と薬効の向上の達成が可能であり, 呼吸器系疾患に対して最も効果的な剤形であると考えられる. 吸入剤の種類としては, 大きく分けて, ネブライザー, 定量噴霧器 (MDI: Metered-dose inhaler) 及び粉末吸入剤 (RP: respirable powder) の 3 種類が実用化されている (Table 1)

[34]. これらのうち、ネブライザー及び MDI は薬物を含む溶液を種々の手法によりエアロゾル化させたものを吸入する形態をとっている。一般的に、溶液状態における薬物は固形製剤と比較して化学的安定性が低く、保存期間中の薬物分解が危惧される。また、タンパク及びペプチド医薬品に関しては分解だけでなく溶液状態での凝集を示し、時として不溶性のフィブリル形成による細胞毒性が生じる [35]。一方、RP は固体粉末製剤であるため、保存安定性は溶液製剤と比較して高く、加えて局所に高濃度の薬物を送達可能であるために薬理効果の改善が期待できる。これらの観点から、RP の様々な有用性が示唆されるが、難溶性薬物を用いた RP においては、やはり有効成

Table 1 Advantages and disadvantages of respirable formulations [34].

Types	Proper ages	Advantages	Disadvantages
Nebulizer	Any age	No patient training High dose possible Dose modification possible No CFC release	Limited portability Long treatment regimens Excessive drug consumption Pressurised gas source required Contamination possible Performance variability Expensive Biotherapeutics unavailable
MDI	> 5 years	Portable and compact Short treatment time Simple formulations No contamination of contents High dosing reproducibility	Patient training required Device actuation required High pharyngeal deposition Cold sensation Potential for abuse Use of chloro fluoro carbon propellant Not all medications available
RP	> 5 years	Portable and compact Breath actuated Less patient training Short treatment time No propellant Biotherapeutics available	High inspiratory flow needed Oropharyngeal deposition Difficult to deliver high doses Not all medications available

分の溶解性が問題となりその製剤化及び臨床応用が限定される。薬効の発現には薬物の溶解が必須であり、加えて溶解速度が非常に遅い場合、不溶性微粒子は気道粘膜でのクリアランスをうける。そのため、十分な活性の発現には適切な製剤化が求められる。

薬物の体内動態を精査する際、複雑な吸収、分布、代謝及び排泄過程を理解するため、モーメント解析法によるデコンボリューション解析が非常に有用である (Fig. 3)。デコンボリューション法によって、製剤の崩壊・溶出から体外への薬物の排泄までの過程を平均溶解時間 (MDT: mean dissolution time)、平均吸収時間 (MAT: mean absorption time) 及び平均滞留時間 (MRT: mean residence time) に分解して考えることで、吸収、分布、代謝及び排泄過程における薬物の生態内動態の詳細情報を必要としない、時間的概念による解析が可能である。難溶性化合物の易溶化製剤化による溶解性及び膜透過性等の改善は MDT 及び MAT の短縮に繋がる。つまり、薬物の吸収に要する時間が短縮され、薬効発現までの時間が短い切れ味の良い製剤の開発が期待できる。製剤の溶解過程を考えると、溶解速度は Noyes-Whitney の式 [36, 37] に従うため粒子の微細化や固体分散体化は MDT の短縮に有効である。一方、吸収過程を考えると、膜透過性に影響を及ぼす製剤化、すなわち膜透過性を亢進させる Absorption enhancer の添加やミセル形成を特徴とする Emulsion 製剤や自己乳化型製剤 [38, 39] は MAT の短縮に効果的であると考えられる。

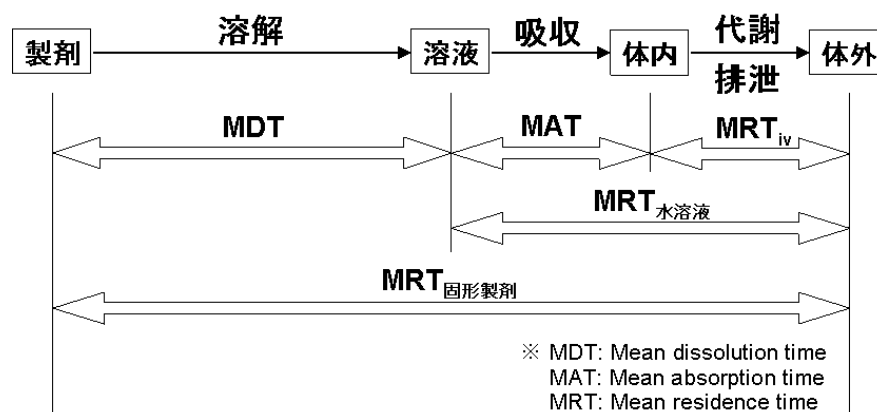


Fig. 3 Deconvolution method for solid formulations.

本研究では CsA の製剤化による物性改変が、薬物の吸収性や BA の向上等の生物薬剤学的な改善にもたらす影響を明らかとするため、アプローチの異なる 3 種の可溶化技術を適用した製剤を開発した。第 1 章では、CsA の固体分散体化による MDT の短縮をターゲットとし、CsA に対して湿式粉碎 (WM: Wet-milling) 法 [40] を適用した WM-SD (SD: Solid dispersion) 製剤について各種物性及び消化管吸収性評価を行った。第 2 章では、ミセル形成による膜透過性の向上を目指し、界面活性剤としてモノオレイン酸グリセリンを使用した Dry-emulsion (DE) 製剤を開発してその物性検討を行った。更に、肺特異的デリバリーのオプションとして RP への応用による副作用回避及び薬理作用改善に関する有用性評価として喘息モデル動物における抗炎症作用及び全身曝露リスク評価を行った。第 3 章では、WM-SD 製剤の新たな担体として自己ミセル形成能を有する両親媒性水溶性高分子である poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate) (pMB) を用いることで、WM-SD 製剤と Emulsion 製剤の特徴を併せ持つ自己ミセル形成型固体分散体 (SMSD: Self-micellizing solid dispersion) を開発して検討を行った。本検討では、特徴の異なる 3 種の製剤学的アプローチを用いて製剤化による物性改変が溶解性及び吸収過程に与える影響を明らかにし、BCS class II に分類される化合物に最適な製剤化アプローチの開発を試みる。

第 1 章 湿式粉碎法を応用した固体分散体制剤

第 1 節 序論

本章では、Wet-mill 法によって高い溶解性及び経口吸収性を有する CsA 固体分散体制剤の調製を試みた。難溶性化合物の水への溶解性を改善する手法として、微細化や固体分散体による非晶質化などが検討されており、操作が簡便またスケールアップが容易である等の理由から、粉碎による薬物の微細化が広く用いられている。粉碎法は大きく乾式粉碎と湿式粉碎に分類され、乾式粉碎においては通常 $1\ \mu\text{m}$ 程度の微粒子までの粉碎が可能である。一方、湿式粉碎では溶媒が一種の粉碎助剤となるため、粒子径をナノメートルオーダーにまで粉碎が可能である [41, 42]。微細化の結果、表面積の増加、すなわち Noyes-Whitney 式に従った溶解速度向上、Ostwald-Freundlich 式に従った溶解度向上を示すため微細化は溶解性改善に非常に有用である [36, 37]。

固体分散体は、「溶融法、溶媒法又は溶融-溶媒法により調製された、固体状態で不活性な担体又はそのマトリックス中に、1 種又はそれ以上の活性成分が分散したもの」 [43] と定義され、難溶性薬物の溶解性改善技術として注目されている [44-47]。固体分散体制剤の調製において、使用する製剤担体の適切な選択は分散している薬物の溶解度、溶出性、過飽和特性の発現また製剤安定性にも密接に関連する。固体分散体に適する担体について、これまで多数の報告がされており、セルロース誘導體、ポリビニルピロリドン、アクリル酸ポリマー、ポリエチレングリコール、糖アルコール及びコラーゲン等非常に多く化合物を用いた製剤の検討が行われている [48-52]。特にセルロース誘導體は医薬品添加物としての使用実績及びその毒性の低さから汎用性が高く、その有用性が多数報告されている。

本章では、CsA に対して Niwa ら [40] によって開発された Wet-mill 法を応用した新処方 of 固体分散体制剤の開発及び処方最適化を試みた。処方最適化検討では、セルロース誘導體を中心とした種々の水溶性高分子を製剤担体として利用した Wet-milled solid dispersion (WM-SD) 製剤を調製し、より高い溶解性をもつ固体分散体制剤を目指した検討を行った。調製した WM-SD 製剤は各種物性評価に加えて溶解性改善に寄与する薬物-ポリマー間における分子間相互作用の解析、経口吸収性改善の指標として、ラット経口投与後における CsA 血中濃度推移についても併せて検討を行った。

第 2 節 実験方法

1-2-1 試薬

CsA は ILS 株式会社 (Ibaraki, Japan) より提供された。Hydroxypropyl cellulose (HPC-H, HPC-L 及び HPC-SSL), Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Methylcellulose (MC), Polyvinylpyrrolidone (PVP K-30 及び K-90) 及び Pullulan は 信越化学 (Tokyo, Japan) より購入した。HPLC グレードのエタノール及びアセトニトリルは関東化学 (Tokyo, Japan) より購入した。臭化カリウム, 塩酸及び酢酸アンモニウムは和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。その他, 使用した試薬は市販の特級規格品を使用した。

1-2-2 製剤調製法

WM-SD 製剤は, Niwa らの方法 [40] を一部改変して調製した。

水溶性高分子は, MC, HPC-H, HPC-L, HPC-SSL, PVP K-30, PVP K-90, HPMC 及び Pullulan について検討を行った。Amorphous CsA を 100 mg 秤量し, 0.5 mm のジルコニアビーズとともに Thinky mixier (ARV-250, Thinky Co.Ltd., Tokyo, Japan) の容器に入れ, 3 mg/mL のポリマー溶液を加え攪拌を行った。本製剤の調製における攪拌/粉碎は, 4 段階から成っている。(1) 1,000 rpm で 2 min, 0.3 mL のポリマー水溶液を加えて攪拌, (2) 2,000 rpm で 2 min, 1.3 mL のポリマー水溶液を加えて攪拌, (3) 2,000 rpm で 2 min, 10 mL ポリマー水溶液を加えて攪拌, (4) 400 rpm で 1 min, 10 mL ポリマー水溶液を加えて攪拌した。粉碎後, 20 mL の懸濁液を液体窒素で凍結し, FD-81 freeze drier (Tokyo rikakikai. Tokyo, Japan) により凍結乾燥したものを WM/CsA 製剤とした。対照製剤として CsA と水溶性高分子を WM/CsA 製剤と同様の割合で混合した Physical Mixture (PM) を調製した。

含量は Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford, USA) より定量した。カラム温度は 65°C に設定し, 移動相としてアセトニトリル (A), 5 mM 酢酸アンモニウム (B) を用いた。詳細を以下の表に示す (Table 2)。

Table 2 Chromatographic conditions for determination of CsA amount.

Column	Waters Acquity UPLC™ BEH C ₁₈ Column (Waters) (particle size: 1.7 μm, column size: Φ 2.1×50 mm)																					
Column temperature	65°C																					
Mobile phase	<p>Solution A: Acetonitrile Solution B: Milli Q containing 5 mM ammonium acetate Construct a gradient program as follow:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th><u>Time (min)</u></th> <th><u>% Solution A</u></th> <th><u>% Solution B</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> </tr> <tr> <td>1.00</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> </tr> <tr> <td>3.00</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>4.00</td> <td>95.0</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>4.01</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> </tr> </tbody> </table>	<u>Time (min)</u>	<u>% Solution A</u>	<u>% Solution B</u>	Initial	80.0	20.0	1.00	80.0	20.0	3.00	95.0	5.0	4.00	95.0	5.0	4.01	80.0	20.0	5.00	80.0	20.0
<u>Time (min)</u>	<u>% Solution A</u>	<u>% Solution B</u>																				
Initial	80.0	20.0																				
1.00	80.0	20.0																				
3.00	95.0	5.0																				
4.00	95.0	5.0																				
4.01	80.0	20.0																				
5.00	80.0	20.0																				
Detection	SQ detector (mass spectrometry) Ionization mode: Electron spray ionization (+) Selected ion recording: 1202, 1203 and 1204 (CsA)																					
Flow rate	0.25 mL/min																					
Injection volume	5 μL																					
Sample temperature	15°C																					
Acquisition time	5 min (for assay)																					
Retention time	CsA: ca. 3.0 min																					

1-2-3 溶解性評価

1-2-3-1 溶出試験

溶出試験は、溶出試験液としてミリ Q 水 100 mL 又は溶出試験第 1 液を用い、室温下で 300 rpm (SST-66: Shimadzu, Kyoto, Japan), 60 min の試験を行った。試料は WM/CsA 製剤, PM 製剤, Crystalline CsA 及び Amorphous CsA を CsA 量として 3 mg 含有する製剤量を秤量した。試験開始後 1, 3, 5, 10, 15, 30 及び 60 min において溶出液を 200 μ L 採取, 0.22 μ m メンブレンフィルターによりろ過し, 等量のエタノールで希釈したものを試料溶液とした。調製した試料溶液中 CsA は 1-2-2 に示した条件で UPLC/MS system を用いて定量した。

1-2-3-2 溶解度測定

非晶質状態の CsA の平衡溶解度 (水) の測定を行った。溶解度に対して過剰量の CsA (CsA 量として 1 mg/mL) をミリ Q 水中に懸濁し, 懸濁液を室温で 72 h 振盪した。振盪後, 懸濁液を 0.22 μ m メンブレンフィルターを用いるろ過し, 直ちに等量のエタノールを加えたものをサンプルとした。サンプル中 CsA の定量は, 1-2-2 に示した条件で UPLC/MS system を用いた。

1-2-3-3 再結晶

結晶状態の CsA を得るため, 過飽和状態の溶液の冷却することで CsA の再結晶化を行った。アセトンに過剰量の非晶質 CsA を溶解させ, -20°C 条件下で 24 h 静置し, 結晶を析出させた。析出した結晶は, ろ紙を用いてろ過を行い, 少量のアセトンで洗浄を行った。

1-2-4 固体物性

1-2-4-1 走査型電子顕微鏡

Crystalline CsA, Amorphous CsA, PM 及び WM/CsA 製剤の粒子形態を走査型電子顕微鏡により観察した。各サンプルは, カーボン両面テープで固定し, VE-7800 (Keyence, Osaka, Japan) を使用して撮影した。

1-2-4-2 粉末 X 線回折

WM/CsA 製剤中に含まれる CsA の結晶性評価のため粉末 X 線回折 (XRPD: Powder X-ray diffraction) による解析を行った。X 線回折パターンは D8 ADVANCE (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany) により測定し、管電圧：40 mA，管電流：35 kV (Cu) で測定を行った。測定は 4–40° の測定範囲で行い、4°/min のスキャン速度で行った。

1-2-4-3 熱分析

DSC Q1000 (TA instruments, New Castle, USA) を用いて分析を行った。測定は、アルミニウムパン中にサンプル約 3 mg を封入し、5°C/min の昇温速度で測定した。また、温度は高純度インジウムを用いて補正した。

1-2-5 フーリエ変換赤外吸収スペクトルを用いた薬物-ポリマー間相互作用の検出

薬物-ポリマー間における相互作用を検出するため、FT-IR を用いたスペクトル解析を行った。粉末サンプル (非晶質 CsA, PM 及び WM/CsA) 約 3 mg を約 300 mg 臭化カリウムとメノウ乳鉢中で良く混合/粉砕し、臭化カリウム錠剤法によって測定を行った。IR スペクトルは、IR Prestige-21 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて解像度 4 cm⁻¹，測定回数 40 回で測定した。得られたスペクトルは IR solution により解析を行った。

1-2-6 経口吸収性評価

1-2-6-1 動物

実験動物として、8 週齢 (体重：300–350 g) の SD 系雄性ラット (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) を 12 時間絶食後に使用した。ラット用固形試料および飲料水を自由に与え、室温 24±1°C で飼育した。本検討で実施した動物実験は、静岡県立大学の倫理規定に従って行った。

1-2-6-2 薬物血中濃度測定法

Amorphous CsA の水懸濁液または WM/CsA 製剤の水懸濁液をラットに対して経口投与した (10 mg CsA/kg)。また、BA 算出のため、生理食塩水に

分散させた Neoral[®] を 1 mg/kg で尾静脈より投与した。CsA の血中濃度は全血を用いて測定を実施した。薬物投与後は 1, 2, 3, 5, 7, 12 及び 24 h 後においてラット尾静脈より 400 μ L の血液を採取した。得られた血液に、内部標準物質として 2.5 μ g/mL タモキシフェン 50 μ L, ミリ Q 水 1.75 mL 及び 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 200 μ L を加えて溶血させた。この検体に対し、ジエチルエーテル/メタノール混液 (95/5) を 4 mL 加え、振盪機により抽出操作を行った。振盪後、エーテル層を分取し、窒素乾して残渣にアセトニトリル/水混液 (1/1) 200 μ L を加えて再溶解した。再溶解液にヘキサン 1 mL を加え激しく攪拌後、遠心分離し (15,000 $\times g$, 1 min) アセトニトリル層を分取して検体とした。血液サンプル中 CsA 濃度は、1-2-2 で示した UPLC/MS system を用いて行った。移動相は流速 0.25 mL/min で流し、アセトニトリル (A), 5 mM 酢酸アンモニウム (B) を用いた (Gradient condition : 0–1 min, 60–70% A; 1–2 min, 70% A; 2–3 min, 84% A; 3–3.5 min, 95% A; 3.5–4 min, 60% A)。薬物動態学的パラメーターは WinNonlin[®] (Ver. 4.1) を使用して算出した。

1-2-7 統計解析

データは平均 \pm 標準誤差 (Mean \pm SEM) で示した。各データの統計処理は、a one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて分散分析を行った後、Fisher の LSD 法 (least significant difference procedure) によって統計学的処理を行い、危険率 5% 以下をもって有意とした。

第 3 節 実験結果及び考察

1-3-1 ポリマー化合物の製剤物性への影響

本項では、WM/CsA 製剤の調製において製剤担体として使用する水溶性高分子の種類が製剤特性に与える影響を評価した。WM-SD 製剤に対し種々のポリマーを用いることで、より高い溶解性と消化管吸収性を有する粉末製剤の開発を試みた。本研究では、製剤担体として HPC-SSL, HPC-L, HPC-H, PVP K-30, PVP K-90, MC, HPMC 及び Pullulan の計 8 種類のポリマーを用いた。これらを用いて WM/CsA 製剤を調製した結果、いずれのポリマーを用いた場合においても、WM/CsA 製剤の収率は 90% 以上であった。

1-3-1-1 溶出性

Fig. 4 には、溶出液として水 (A) 及び溶出試験第 1 液 (B) を用いた溶出試験の結果を示した。溶出試験の結果、Amorphous CsA はいずれの条件下でも溶解性が悪く、溶出速度は非常に低いものであった。また、いずれのポリマーを用いた PM も、Amorphous CsA と同様の溶出挙動を示し、水溶性高分子の添加による CsA の溶解促進作用を示さなかった (Data not shown)。本研究で調製した WM-SD の中では、水溶性高分子として HPC 類を用いたものについて顕著な溶解性の改善を確認した。中でも、HPC-L 及び HPC-SSL を使用した製剤は Amorphous CsA と比較し、試験開始後 60 分で約 12 倍の溶出率を示した (Table 3)。また、Pullulan を使用した WM/CsA 製剤については、溶出性の改善を示さなかった。溶出試験第 1 液を用いた溶出試験では、試験液として水を用いた場合と比較し、HPMC 及び MC が若干の低値を示したが、その他製剤についてはほぼ同様の傾向を示した。Table 3 には、今回調製に使用したポリマーの分子量・粘度及び調製した製剤の物性をまとめて示した。HPC 類、PVP 類のように複数グレードのポリマーについて検討した製剤では、同種のポリマー中でより粘度の低いポリマーを用いた製剤について高い溶出性を示す傾向を確認した。Tantishaiyakul らの報告 [53] によると、piroxicam と PVP を用いた固体分散体でも同様の傾向が確認され、PVP K-90 よりも粘度の低い PVP K-30 や PVP K-17 を使用した固体分散体で高い溶解性を示す結果が得られている。一般的に、物質は大きく分けて二つの過程を経て溶出すると考えることができる。まず、薬物表面で

の溶解が起き、引き続き溶解した状態の薬物分子が溶媒中を拡散することで溶解が起こる。Stokes-Einstein の式によると、拡散定数は粘度に反比例して減少することから、高い粘度を持つ溶媒中では拡散速度が遅く、溶解速度が低下することがわかる。この知見から、今回用いた HPC 類や PVP 類の同

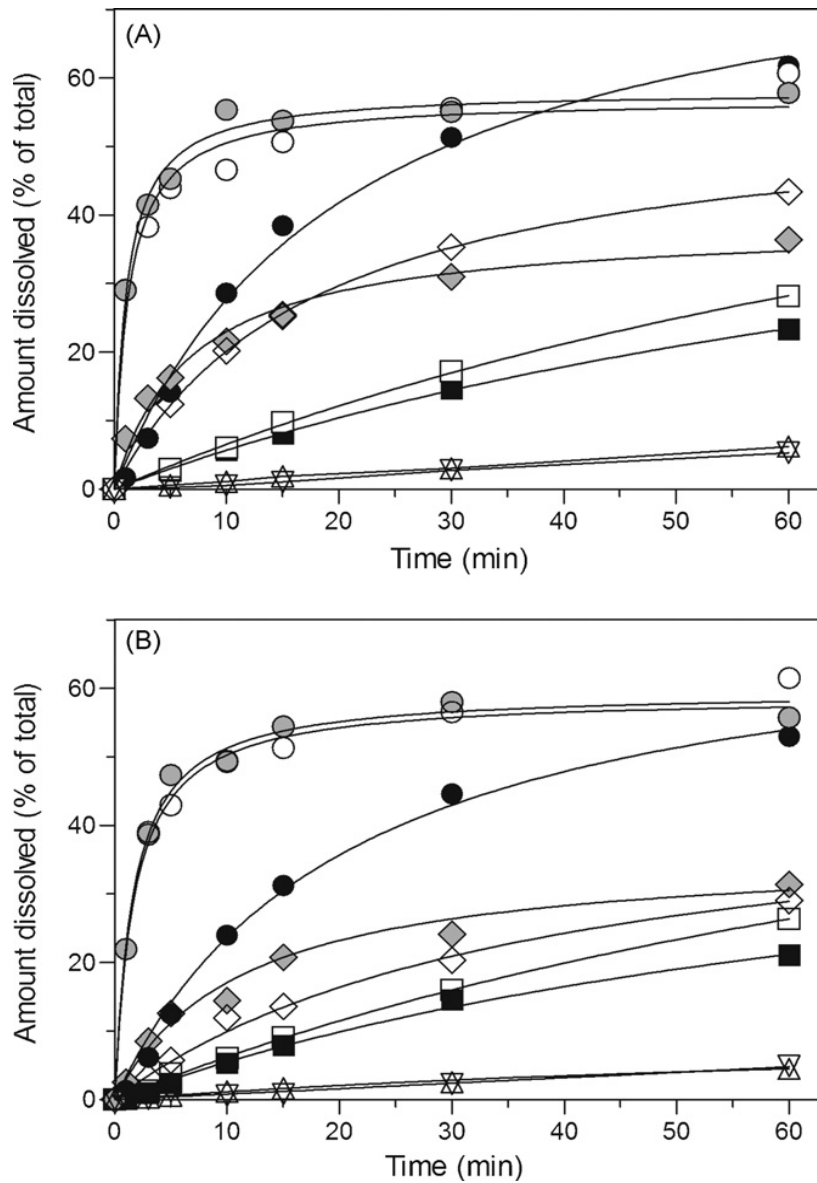


Fig. 4 Dissolution profiles of cyclosporine A samples, differently treated in deionized (A) water and (B) pH 1.2 solution. ∇ , amorphous CsA; \triangle , pullulan; \circ , HPC-SSL; \bullet , HPC-L; \bullet , HPC-H; \square , PVP K-30; \blacksquare , PVP K-90; \diamond , MC; and \blacklozenge , HPMC. Each bar represents mean \pm SE of 3 independent experiments.

シリーズ中ではより粘度が低いものについて溶解性が高いことが理論的に説明できる。しかし、HPC-H、MC は今回用いているポリマー中で高い粘度を持つポリマーであるが、Pullulan や PVP-K30 等を使用した WM 製剤と比較し非常に早い溶出速度を示すことから、固体分散体を調製する際に薬物と水溶性ポリマーの種類での適合性が存在すると考える。例えば、水溶性ポリマーの置換基や構造が変わることで水素結合を始めとした薬物-ポリマー間の相互作用が変化すること、それ以外にもポリマーの性質に依存して調製した製剤の濡れ性や粒径等が変化することなどが考えられる。

1-3-1-2 製剤中薬物の結晶性

Fig. 5 及び Fig. 6 には、HPC-SSL を使用した WM (HPC-SSL) についての XRPD と DSC の結果を示した。XRPD による測定の結果、Crystalline CsA では 6.8, 7.8, 9.3, 10.6, 12.5, 14.5, 15.1, 15.9, 16.7, 19.3, 22.2 及び 24.3° (2θ) において特異的な回折ピークを確認した。このピークは、Bertacche ら及び Lechuga-Ballesteros らによって報告 [54, 55] されている回折パターンと一致しており、Tetragonal 型の結晶であることを確認した。

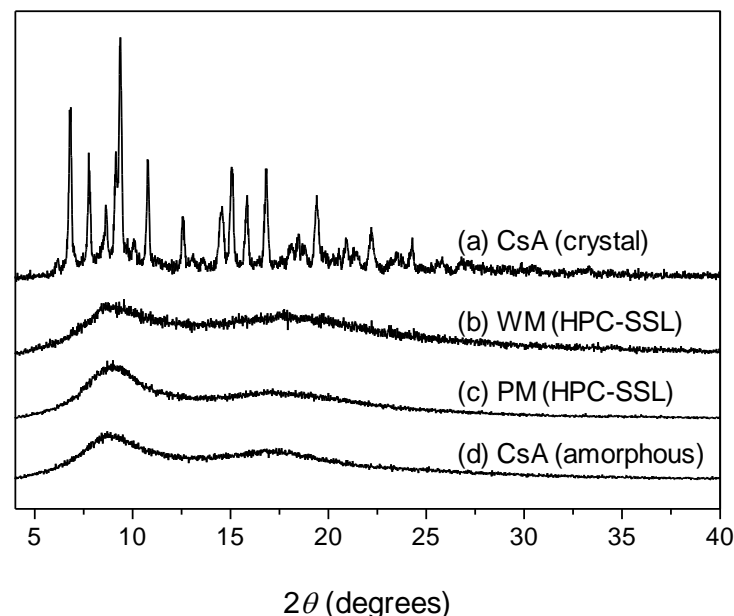


Fig. 5 Powder X-ray diffraction patterns of cyclosporine A samples. (a) crystalline CsA, (b) WM (HPC-SSL), (c) physical mixture of amorphous CsA and HPC-SSL, and (d) amorphous CsA.

CsA は Tetragonal 型及び Orthombic 型の結晶多形を持つことが知られており, Stevenson らはアセトンを用いた再結晶で Tetragonal 型の結晶を得ている [56]. 本検討においてもアセトンを用いた再結晶により結晶 CsA を調製しているため, Tetragonal 型結晶のパターンを確認した. 一方, WM (HPC-SSL), PM 及び非晶質 CsA において回折ピークは認められず Halo-pattern を示したことから, これらに含有される CsA は非晶質であることを確認した. また, DSC による分析の結果, Crystalline CsA において 115°C 付近に CsA の融点に由来する吸熱ピークを認めたが, PM 及び非晶質 CsA では 128°C 付近に吸熱ピークを認めた. この吸熱ピークのシフトは, CsA の固体-液体相転移に由来するものである [55]. 一方, WM (HPC-SSL) においては吸熱ピークの消失を確認した. 以上の結果より, WM-SD 製剤中 CsA は固体-液体相転移が生じず, 非晶質として安定に存在していると考えられる. 固体分散体中では水溶性高分子のマトリックス構造と薬物間における水素結合等の相互作用形成により, 薬物分子の運動性が低下し, 再結晶化の防止, つまり非晶質状態の安定性が向上することが報告されている [57, 58]. 今回調製した固体分散体制剤中においても, 非晶質状態の安定

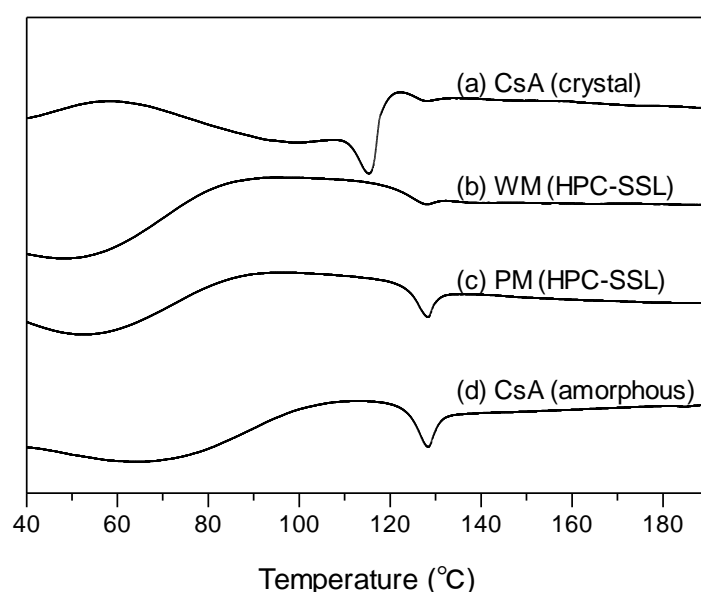


Fig. 6 Differential scanning calorimetry thermograms of cyclosporine A samples. (a) crystalline CsA, (b) WM (HPC-SSL), (c) physical mixture of amorphous CsA and HPC-SSL, and (d) amorphous CsA.

性の向上から、薬物-ポリマー間相互作用の存在の可能性が示された。Table 3 に、検討に使用した各ポリマーの物性及び各ポリマーを担体とした製剤の XRPD 及び DSC の分析結果について示した。いずれのポリマーを用いても、HPC-SSL を用いた製剤と同様の結果が得られ、WM/CsA 製剤中の CsA は非晶質として存在しており、製剤調製過程で結晶性は変化していないことを確認した。Tantishaiyakul らの報告 [53] によると、同じ種類のポリマーでは、より粘度の低いポリマーを使用した固体分散体で高い溶解性を示す結果が報告されている。HPC-L と HPC-SSL は同程度の溶出性を示したが、Tantishaiyakul らの報告を元に、これ以降の検討はより粘度の低い HPC-SSL を用いた製剤を評価した。

1-3-1-3 粒子形状

Fig. 7 には各検体の SEM 写真を示した。アセトンより再結晶を行った CsA 再結晶物 (A) は数 μm 程度の微細な結晶が凝集した形態をとっており、非晶質 CsA は約 50 μm 程度であった。一方、WM (HPC-SSL) は、粒子形状の変化が確認され、その粒子径は数 μm 程度であった。

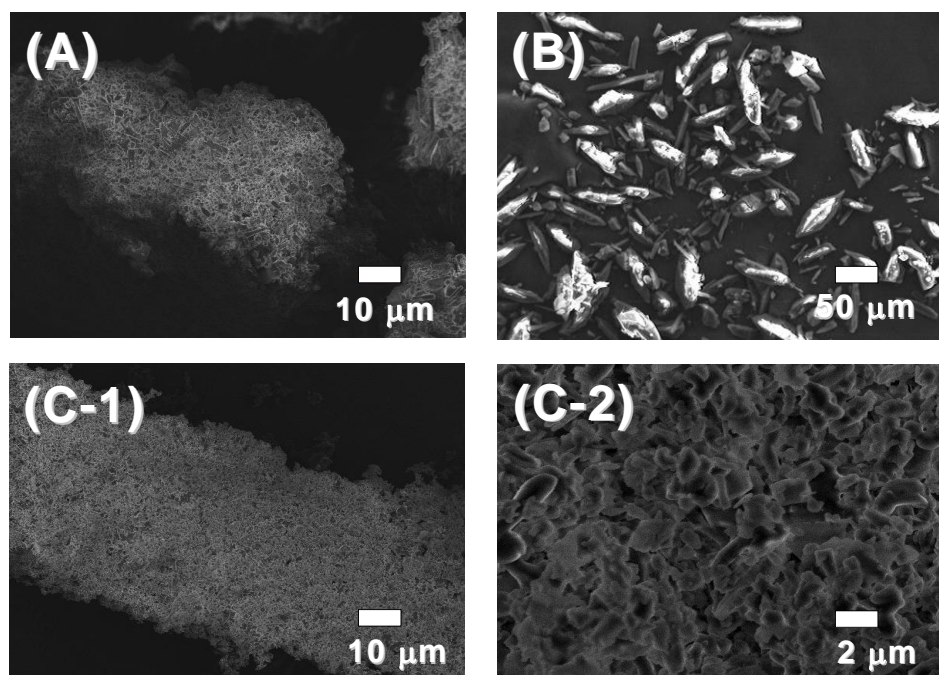


Fig. 7 Scanning electron microscopic images from cyclosporine A samples, including (A) recrystallized CsA, (B) amorphous CsA and (C-1, 2) WM (HPC-SSL).

Table 3 Physicochemical properties of cyclosporine A samples.

	Polymer characteristics		XRPD	DSC (Endothermic peak)	Dissolution amount after 60 min (%)
	Molecular weight (Da)	Viscosity (mPa·S)			
CsA (Crystal)	–	–	Tetragonal crystal	115°C	–
CsA (Amorphous)	–	–	Halo pattern	128°C	5.3
<i>Wet-milled CsA with</i>					
HPC-SSL	15,000–30,000	2.0–2.9 ^{a)}	Halo pattern	128°C	60.7
HPC-L	55,000–70,000	6.0–10 ^{a)}	Halo pattern	128°C	57.8
HPC-H	250,000–400,000	1000–4000 ^{a)}	Halo pattern	128°C	61.7
MC	ca 300,000	4000 ^{a)}	Halo pattern	128°C	22.3
HPMC 60SH	ca 100,000	50 ^{a)}	Halo pattern	128°C	36.4
PVP K-30	ca 40,000	4–9 ^{a)}	Halo pattern	128°C	28.1
PVP K-90	ca 360,000	50–90 ^{a)}	Halo pattern	128°C	23.4
Pullulan	200,000	100–180 ^{b)}	Halo pattern	128°C	6.2

a) 2% solution at 20°C. b) 10% solution at 30°C.

1-3-2 薬物-ポリマー間における相互作用の評価

本章では、FT-IR を用いて製剤化前後における赤外吸収スペクトル変化を解析し、薬物-ポリマー間における相互作用の検出を行った。CsA は 11 アミノ酸残基より構成される環状ペプチド (Fig. 8A) であるため、 $1,600\text{--}1,700\text{ cm}^{-1}$ 付近に Amide I バンドと呼ばれるペプチドやタンパク質の二次構造や高次構造の情報を示唆する領域があることが知られている。本検討では、Amide I バンドに注目しその解析を行った。

Fig. 8 には IR スペクトル (Fig. 8B) 及びその二次微分スペクトル (Fig. 8C) を示した。IR スペクトルにおいて、非晶質 CsA と PM のスペクトルで差異は認めなかったが、WM (HPC-SSL) のスペクトルは、ピークの波数が非晶質 CsA 及び PM の $1,635\text{ cm}^{-1}$ から $1,631\text{ cm}^{-1}$ へのシフトを確認した。この結果について更なる精査を行うため、IR スペクトルの二次微分スペクトルについて Zijlstra らの結果 [59] に従い各ピークを帰属して高次構造の解析を行った。Amorphous CsA 及び PM の二次微分スペクトルでは、 β -sheet: $1,624\text{ cm}^{-1}$, $1,636\text{ cm}^{-1}$, γ -loop: $1,647\text{ cm}^{-1}$, γ -turn: $1,661\text{ cm}^{-1}$, β -turn: $1,673\text{ cm}^{-1}$ 及び MeBMT ((4*R*)-4-*Z*-4,*N*-dimethyl-*L*-threonine): $1,684\text{ cm}^{-1}$ のピークを確認した。一方、WM (HPC-SSL) においては β -sheet: $1,626\text{ cm}^{-1}$, γ -loop: $1,644\text{ cm}^{-1}$, MeBMT: $1,679\text{ cm}^{-1}$ へのシフトを認め、 γ -turn, β -turn についてはピークの消失を確認した。Table 4 に Zijlstra らによるデータと比較した結果を示す。WM 製剤化によって、 β -sheets 構造に帰属されるピークはより高波数側に、 γ -loop, MeBMT turn のピークについてはより低波数側へのシフトした。以上の知見より、 β -sheet, γ -loop, MeBMT の構造に起因するピークのシフト、 γ -turn, β -turn ピークの消失は、CsA の高次構造の変化を示唆していることから、薬物-ポリマー間における相互作用の存在が示された。固体状態の CsA は分子中に存在する 4 つのアミド基が分子内水素結合の形成に寄与するが、溶液状態ではこれらのアミド基と水分子の間で分子間水素結合を形成するため CsA の高次構造が変化することが知られている [59]。本製剤中においても、CsA と HPC-SSL 間で水素結合等の分子間相互作用の形成によって CsA の高次構造が変化していると考えられる。固体分散体中において、薬物とポリマーが水素結合等の分子間相互作用により分散媒中でアモルファス状態を安定化すること、また難溶性薬物の

溶解性を改善すること [57, 58, 60] が報告されており、本製剤においても相互作用の形成によるアモルファス状態からの再結晶化抑制、薬物の溶解性の向上が示唆される。

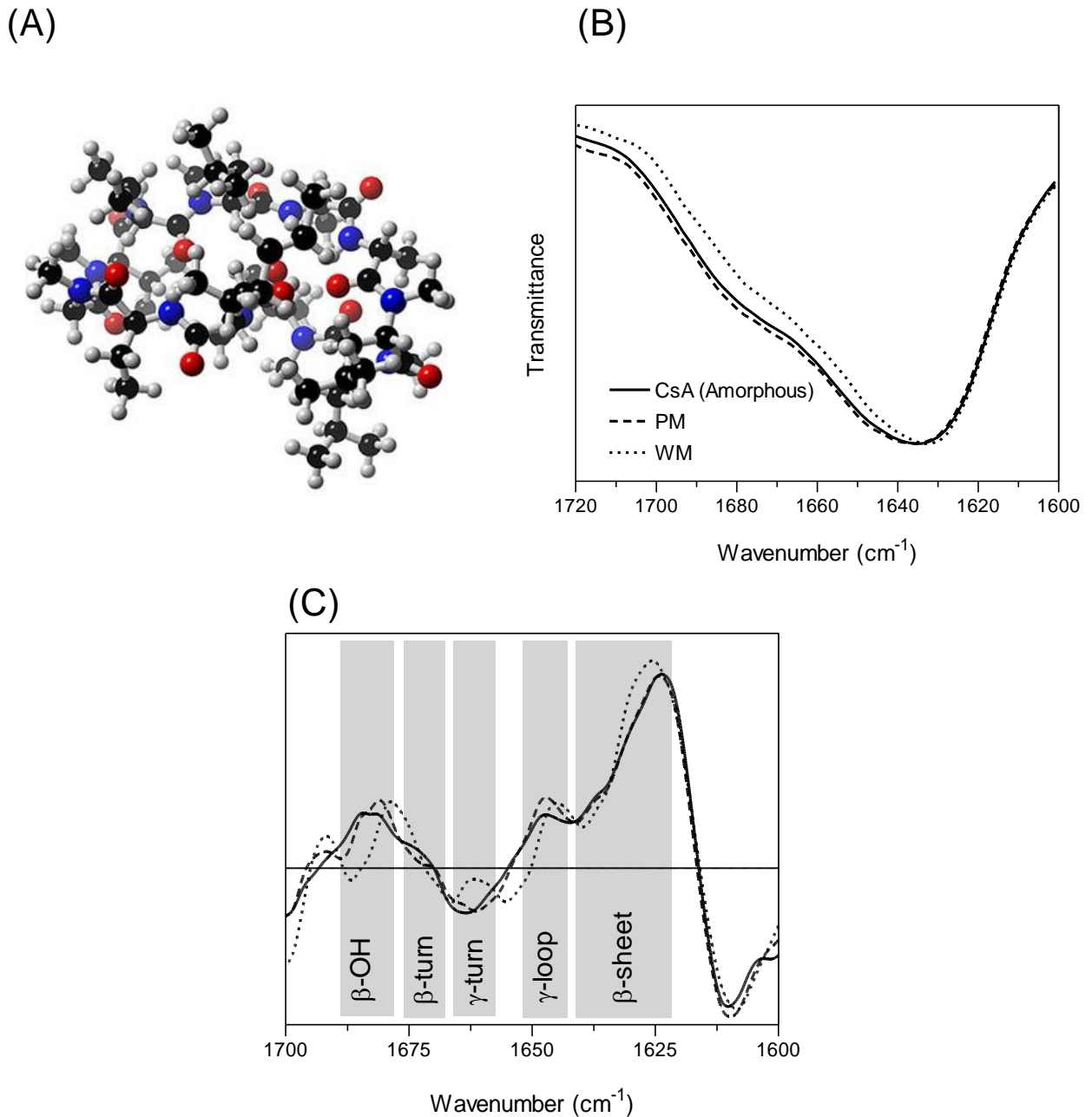


Fig. 8 FT-IR spectral analyses of cyclosporine A samples. (A) Chemical structure of CsA, (B) Baseline corrected and normalized amide I peak, and (C) Second derivative IR spectra. Solid line, amorphousCsA; broken line, physical mixture of amorphous CsA and HPC-SSL; and dotted line, WM (HPC-SSL).

Table 4 Peak positions of structural elements in secondary structure of cyclosporine A (Cosolvent and crystal data from Zijlstra *et al.* [59], and PM and WM (HPC-SSL) data from this study).

Sample	β -sheets	γ -loop	γ -turn	β -turn	MeBMT turn	
Cosolvent solution	1630	—	—	1663	1678	—
Crystal	1624	1636	1653	—	1674	1688
PM	1624	1636	1647	1661	1673	1684
WM (HPC-SSL)	1626	—	1644	—	—	1679

1-3-3 ラット経口投与後における薬物動態学的解析

溶解性の改善による消化管吸収性向上の指標として、ラット経口投与後における CsA の全血中濃度推移の測定を実施した。WM (HPC-SSL) 及び Amorphous CsA の水懸濁液をラットに経口投与 (10 mg CsA/kg) 後、経時的に薬物血中濃度の測定を行った。Fig. 9 には、投与後の CsA 血中濃度推移の結果を、Table 5 には実験結果より算出した各種薬物動態学的パラメータを示した。その結果、WM 製剤は製剤化により Amorphous CsA と比較して消化管吸収性が顕著に改善をしていることを確認した。非晶質 CsA における C_{max} は 404 ± 88 ng/mL, AUC_{0-24} は $4,620 \pm 993$ ng · h/mL であり、WM (HPC-SSL) 製剤は C_{max} が $2,060 \pm 320$ ng/mL, AUC_{0-24} が $23,800 \pm 3,190$ ng · h/mL であった。WM (HPC-SSL) 製剤は、Amorphous CsA と比較して C_{max} 及び AUC_{0-24} はそれぞれ約 5 倍、約 5 倍増加した。また、Amorphous CsA 及び WM (HPC-SSL) の絶対的 BA はそれぞれ 9.2% 及び 47.5% であった。

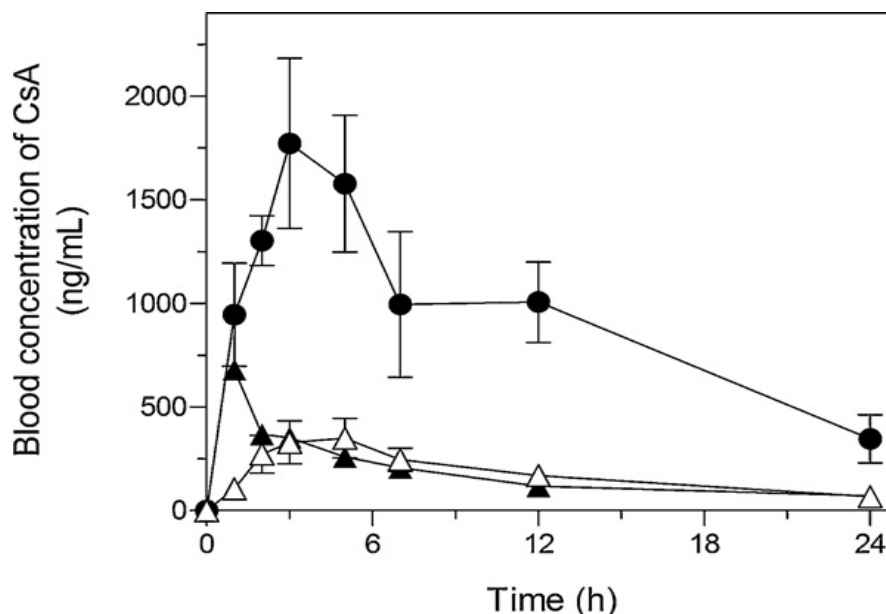


Fig. 9 Blood cyclosporine A concentrations after oral or intravenous administration of cyclosporine A formulations in rats. ▲, Neoral® (i.v., 1 mg CsA/kg); △, amorphous CsA (p.o., 10 mg CsA/kg); and ●, WM (HPC-SSL) (p.o., 10 mg CsA/kg). Data represent mean \pm SE of 6 experiments.

Table 5 Pharmacokinetic parameters of cyclosporine A formulations following oral administration or interavenous administration.

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng · h/mL)
WM (HPC-SSL) (10 mg CsA/kg, p.o.)	2,060±312	5.2±1.4	2.7±0.5	23,800±3,190 (CV: 12.8%)
CsA (Amorphous) (10 mg CsA/kg, p.o.)	404±88.0	4.2±0.7	4.9±1.7	4,620±993 (CV: 24.3%)
Neoral [®] (1 mg CsA/kg, i.v.)	-	-	1.12±0.18	5,010±1,290

C_{max} , maximum concentration; T_{max} , time to maximum concentration; $T_{1/2}$, half-life; and AUC₀₋₂₄, area under the curve of plasma concentration vs time from t=0 to t=24 after administration. Values are expressed as means±SE from 6 experiments.

本研究で用いた CsA は BCS class II に分類される薬物であり、高い膜透過性と低い溶解性を特徴とする薬物である [61]. BCS class II に分類される薬物は十分な膜透過性を有するので薬物の吸収は溶解律速となり、溶解性の改善によりその BA は向上することが報告されている [3]. 本検討では固体分散体化による溶解性の向上によって、消化管における顕著な吸収性の改善が観察されたと考える。更に、AUC₀₋₂₄ の値についてばらつきの指標となる CV 値を算出した結果、WM (HPC-SSL) 投与群で 12.8%、非晶質 CsA 投与群で 24.3% であり、製剤化によって個体間の BA のばらつきを軽減した。また、Amorphous CsA 投与群では WM (HPC-SSL) 投与群や Neoral[®] 投与群と比較してそれぞれ 1.8 及び 4.3 倍長い $T_{1/2}$ を示した。Amorphous CsA は溶出試験の結果からも明らかな通り溶解律速の吸収を示すため、Amorphous CsA 投与群ではみかけ上血液からの消失が遅延したように見える現象、すなわち Flip-flop 現象が起きていると推察される。

第 4 節 小括

本章で湿式粉碎に使用した自転/公転型攪拌機の Thinky mixer は、工学領域から薬学領域まで幅広く使用されており、薬学領域では前臨床試験の経口製剤調製等にも応用されている [40]。Thinky mixer の利点として、自転/公転容器による高い遠心力による強力な攪拌、ミリグラムオーダーの小スケールの粉碎が可能であることが挙げられる。Thinky mixer をジルコニアビーズによる湿式粉碎の攪拌装置として使用した例は、Takatsuka らや、Niwa らによって報告されており、薬物原末を 100–200 nm 程度の微細粒子にまで粉碎することに成功している [40, 62]。薬物の微細化は溶解性改善に非常に有効である反面、粒子の微細化に起因する流動性の低下及びハンドリングの悪化、比表面積の増大に伴う表面エネルギーの増大に起因する付着性、粉碎した微細粒子の凝集による粒子径の増大が危惧される。そこで、本章では水溶性高分子溶液中で湿式粉碎処理によって微細化した薬物懸濁液を凍結乾燥することで、水溶性高分子中に微細薬物粒子を均一に分散させた固体分散体を調製し、微細化及び固体分散体化による溶解性及び経口吸収性の向上と粉体特性改善の両方の同時達成を試みた。

本検討では HPC-SSL, HPC-L, HPC-H, PVP K-30, PVPK-90, MC, HPMC 及び Pullulan の計 8 種類の水溶性高分子を使用した WM/CsA 製剤の処方検討を実施した。その結果、HPC-L 及び HPC-SSL を用いた WM-SD 製剤について最も顕著な溶解性の改善を確認した。また、興味深いことに今回検討に使用したポリマーは、同化合物のグレード違いでは粘度に低い高分子の方がより早い溶出を示した。更に、調製した WM-SD 製剤の物性評価の結果、いずれのポリマーを用いた製剤においても製剤中 CsA はアモルファス状態を維持していることを確認した。CsA のアモルファス状態維持に関与している薬物-ポリマー間相互作用の検出のため、WM (HPC-SSL) 製剤について IR スペクトル測定を実施した。その結果、製剤中に分散する CsA の高次構造が変化していることから、分子間相互作用の存在が示された。更に、本製剤をラットに対して経口投与後の血中濃度推移を評価した結果、非晶質 CsA と比較して有意な吸収性の改善を確認し、 C_{max} 及び AUC_{0-24} はそれぞれ約 5 倍、約 5 倍増加した。CsA の WM-SD 製剤化の結果、薬物の溶解速度の改善、すなわち MDT の短縮により溶解律速の吸収を示す

CsA の吸収性改善を示した。単純拡散による膜透過は物質の濃度差を駆動力とする膜輸送として知られている。そのため、溶解性の改善が消化管における局所的な薬物濃度上昇を引き起こし、単純拡散による膜透過の速度を高めていると考えられる。

以上の知見より、本製剤技術の CsA の溶解性及び吸収性改善に対する有用性が明らかとなり、他の BCS class II 化合物への応用が期待される。

第 2 章 モノオレイン酸グリセリンを用いた Dry-emulsion 製剤

第 1 節 序論

近年、溶解性の改善技術の一つとして Emulsion 製剤が注目を集めており、実際に上市されている製剤においても本技術が多数応用されている。CsA についても現在 Emulsion 製剤, Micro-emulsion 製剤として臨床で広く使用されている [63, 64]。一般的に、Emulsion 製剤は、オイル、界面活性剤、補助界面活性剤及び薬物で構成される液体製剤であり、難水溶性化合物の溶解度及び吸収性を改善することが多数報告 [65-68] されている。しかし、溶解性改善について劇的な効果を示す反面、製剤が溶液状態であるためにいくつかの問題点が挙げられる。例えば、溶液状態に起因する安定性の低さ、ソフトカプセル製剤化のための製造コスト、また剤形の選択肢が少ないことが挙げられる。加えて、製剤中の可溶化剤による刺激性やアナフィラキシーについても報告されており [69]、これらの問題点を克服することが切望されている。そのため、固体の Emulsion 製剤、すなわち固体自己乳化型製剤 [70] や Dry-emulsion (DE) 製剤 [71] の開発が強く期待されている。

本章では、CsA の可溶化剤として毒性の低い Highly purified glycerol monooleate (hpGMO) を応用した CsA の DE 製剤 (DE/CsA) の開発を試み、各種製剤物性評価を行った。また、DE/CsA の消化管吸収性評価のためラット経口投与後における薬物血中濃度測定を実施した。更に、開発した DE 製剤について吸入製剤化を検討し、その有用性を確認した。評価には *in vitro* の人工気道モデルである Cascade impactor を使用した吸入特性評価に加え、溶解性の向上に伴う抗炎症作用の改善についても検討した。また、低用量局所投与による全身暴露リスクの軽減についても併せて評価を行った。

第 2 節 実験方法

2-2-1 試薬

NOFABLE[®] GO-991 (hpGMO: highly purified glycerol monooleate) 及び市販の Glycerol monooleate (GMO) は日本油脂株式会社 (Tokyo, Japan) から入手した。Respitose[®] は DMV pharma (Veghel, The Netherlands) から入手した。Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) 及びカナマイシンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。New born calf serum と horse serum は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した。Erythritol は Nikken Chemicals (Tokyo, Japan) から入手した。その他、使用した試薬は市販の特級規格品を使用した。

2-2-2 製剤調製方法

界面活性剤として hpGMO 又は GMO 500 mg を秤量し、CsA 500 mg, PVP K-25 1 g 及び 150 mL の水を加え、マグネチックスターラーを用いて分散させた。この懸濁液に対して賦形剤として Erythritol を 8 g 添加し、Mini spray dryer B-290 (Buchi, Switzerland) を使用して乾燥した (乾燥条件: Inlet temperature 140°C, Outlet temperature 70–80°C, air flow 800 N L/h, Feeding rate 2 mL/min)。調製した試料は使用までデシケーター中で保存した。

2-2-3 過酸化脂質測定

熱過酷条件下における hpGMO 及び GMO の過酸化脂質産生量の定量には、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances) 法を用いた。これらの脂質は 60°C 条件下で 5 及び 10 day 保存した。脂質は、0.1% (v/v) Tween 20 を含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液中に脂質として 1 mM となるように溶解した。次に、0.67% (w/v) チオバルビツール酸 (TBA: Thiobarbituric acid) 及び 1.0% (w/v) ジブチルヒドロキシトルエン (BHT: Butylated hydroxytoluene) を試料溶液に加え、95°C 条件下 30 min 反応させた。反応後、*n*-Butanol を加えて攪拌し、2,000 × *g* で遠心分離した後に *n*-Butanol 層を分取した。この液の波長 532 nm における吸光度を測定し、過酸化脂質の生成量を評価した。検量線の作成には、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (MDA: Malondialdehyde) を使用した。

2-2-4 Dry-emulsion 製剤の固体物性

2-2-4-1 走査型電子顕微鏡

1-2-4-1 に従って観察を行った。

2-2-4-2 粉末 X 線回折

1-2-4-2 に従って測定した。

2-2-4-3 示差走査熱分析

1-2-4-3 に従って測定した。

2-2-4-4 溶出試験

溶出試験は、溶出試験器 NTR 6100A (Toyama Sangyo, Osaka, Japan) を使用した。溶出液として蒸留水 900 mL ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$) を用い、パドル法 (50 rpm) によって試験を実施した。検体として結晶 CsA、非晶質 CsA 及び DE/CsA を CsA 量として 27 mg を試験器に添加した後、試験液を経時的に採取した。採取した試験液は、 $15,000 \times g$ で 5 min 遠心分離後に上清をメタノールで 20 倍希釈し、1-2-2 に示す条件で CsA 濃度を定量した。

2-2-4-5 透過型電子顕微鏡

1 mg の DE/CsA を 1 mL の水に分散後、水を除去して 2% 酢酸ウランを用いてネガティブ染色を行った。検体の観察には、H-7600 透過型電子顕微鏡 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いた。

2-2-4-6 動的光散乱

DE/CsA を水に分散させた際に形成されるミセル粒子径を評価した。DE/CsA として 0.1 mg/mL となるように水に再分散させた検体を Zetasizer Nano ZS (MALVERN, Worcestershire, UK) を用いて粒子径の測定を実施した。測定は 25°C 条件下で行った。

2-2-5 経口吸収性評価

2-2-5-1 動物

1-2-6-1 に示した通り。

2-2-5-2 薬物血中濃度測定法

非晶質 CsA 又は DE/CsA 製剤の水懸濁液を経口投与した (10 mg CsA/kg). 薬物血中濃度測定は 1-2-6-2 薬物血中濃度測定法に従って行った.

2-2-6 粉末吸入製剤調製

調製した DE/CsA に対し, DE/CsA:乳糖キャリア = 1:10 となるように Respitose[®] SV-003 (DMV, Veghel, Netherlands) を添加し DE/CsA-RP とした. また, DE/CsA-RP と同様の組成となるように CsA 及び乳糖を混合した CsA-RP, CsA を含まない hpGMO vehicle-RP 及び乳糖のみから構成される Control-RP を調製した (Table 6).

Table 6 Components of cyclosporine A-RP formulations.

	CsA	hpGMO	PVP K-25	Erythritol	Lactose
DE/CsA-RP	○	○	○	○	○
CsA-RP	○	-	-	○	○
hpGMO vehicle-RP	-	○	○	○	○
Control-RP	-	-	-	-	○

2-2-7 Dry-emulsion 粉末吸入製剤の製剤物性

2-2-7-1 走査型電子顕微鏡

1-2-4-1 に従って観察した.

2-2-7-2 レーザー回折

RP 製剤の粒径は LMS-300 (Seishin Enterprise Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した. 0.2 MPa の乾燥空気を送ることでキャリア粒子から DE/CsA 粉末を分散させた状態の粒子径を算出した.

2-2-7-3 カスケードインパクトによる吸入特性

吸入特性の評価には人工気道モデルである Andersen 型 Cascade impactor (AN-200, Shibata Scientific Technology Ltd., Tokyo, Japan) (Fig. 10) を使用し, Aerosols/Physical Test and Determinations in USP23 に従い精査し

た。まず、DE/CsA-RP を日本薬局方 2 型 ヒドロキシプロピルーメチルセルロースカプセル (Qualicaps Co. Ltd., Nara, Japan) に製剤量として 30 mg 充填し、吸入投与器具 JetHaler[®] (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) に装着した。これを直角に折れ曲がったステンレス製円筒ジョイントの一端に水平に接続し、他端を Cascade impactor に設置した。カプセルに穴を開けた状態で一定の流速 (28.3 L/min) にて 30 s 吸引する操作を 5 回繰り返し行い、カプセル内の製剤を Cascade impactor の各ステージに分級した。各ステージに捕集された製剤に含まれる CsA 量を 1-2-2 に示した条件で UPLC/MS system を用い定量し、各ステージへの到達量を算出した。

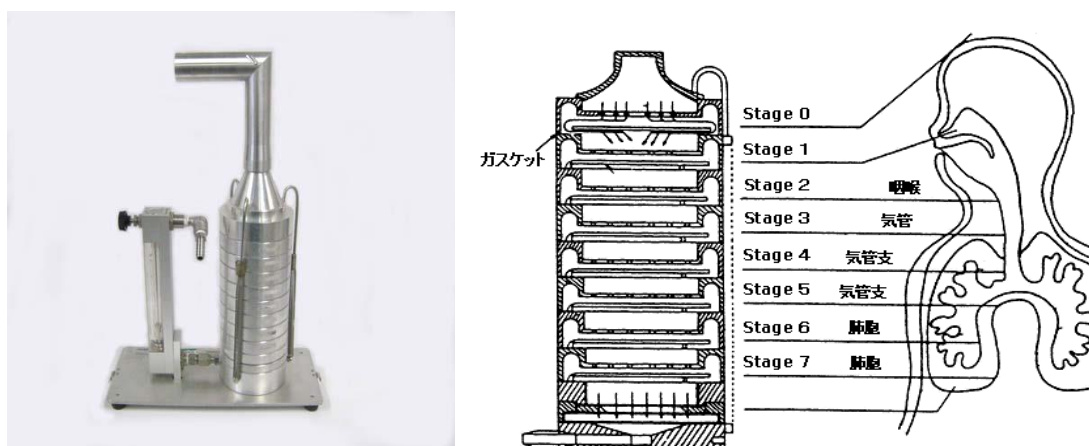


Fig. 10 Image of cascade impactor.

2-2-8 肺組織傷害性

2-2-8-1 ラット肺胞由来 L2 細胞に対する細胞毒性

L2 細胞は American Type Culture Collection (#CCL-149, Rockville, MD, USA) から入手した。細胞は、5% (v/v) New born calf serum, 5% Horse serum 及び 0.01% カナマイシンを含む DMEM 中で培養した。実験の前に、96-ウェルプレート中で 5×10^3 cell/well となるまで培養した。hpGMO の細胞傷害性を評価するため、hpGMO 0.1mg/mL となるように添加して 24 h インキュベーション後の乳酸脱水素酵素 (LDH: Lactose dehydrogenase) レベルを測定した。LDH の測定は Wako LDH-Cytotoxic test (Wako, Osaka, Japan) を使用して行った。また、陽性対照は Tween 20 を最終濃度として 2% となるように添加した。

2-2-8-2 *In vivo* における肺組織傷害性

ラットに対し、hpGMO vehicle-RP 及び Control-RP を気道内投与 (6 mg/rat) の 24 h 後において、血漿中 LDH レベルを測定し、添加剤の肺組織への傷害性について評価を行った。血液は尾静脈より採血を行い、LDH の測定は Wako LDH-Cytotoxic test (Wako, Osaka, Japan) を使用して行った。

2-2-9 卵白由来 Ovalbumin を使用した喘息モデル動物作成

2-2-9-1 Ovalbumin 粉末吸入製剤の調製

OVA (Ovalbumin) を賦形剤である Erythritol と混和させた後、A-O JET MILL (SEISHIN enterprise Co. Ltd., Tokyo, Japan) で約 5 μ m に微細粉末化した。得られた OVA 微粒子を OVA:乳糖キャリア = 1:10 となるように Respitose[®] SV-003 と混和し、OVA 粉末吸入製剤を調製した。

2-2-9-2 ラットに対する Ovalbumin 感作

OVA 感作は 0, 7 及び 14 day においてラット腹腔内に OVA (100 μ g) を水酸化アルミニウムゲル (5 mg) とともに投与することで行った。最終感作の 24 h 後にペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、OVA 粉末吸入製剤 6 mg (OVA 量として 100 μ g) を気道内投与器具 DP-4 (Ina research Inc., Nagano, Japan) を用いて気道内投与した。薬物の投与は、OVA 気道内投与

の 1 h 前に投与し，投与量は DE/CsA-RP, CsA-RP とともに 6 mg (CsA 量として 100 μ g) 投与した．陰性対照として乳糖で調製した Control-RP を使用した．

2-2-10 Dry-emulsion 粉末吸入製剤の動物モデルにおける抗炎症作用

2-2-10-1 気管支肺胞洗浄液中細胞数の計数

OVA 粉末製剤の気道内投与後 24 h 後において，ラットをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下，腹部下行大動脈より放血死させた後，気道を半切開しシリンジに接続したカニューレを挿入した．カニューレより Phosphate buffered saline (PBS) 5 mL を注入し，肺部を 15 回軽く押し生理食塩水を回収する操作を 5 回行って回収液を気管支肺胞洗浄液 (Bronchi alveolar lung fluid: BALF) とした．得られた BALF は直ちに 1,000 $\times g$ で 5 min 遠心し，上清を除去，1 mL の PBS で再懸濁した．懸濁後，細胞懸濁液を分取し等量の 0.4% トリパンプルー溶液を加え，Burker-turk 血球計算板を用いて細胞数の計数を行った．

2-2-10-2 フローサイトメトリー

2-2-11-1 で採取した BALF 中の細胞を分類するため，Flow cytometric hematology system (XT-2000iV, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) を使用して分析を行った．

2-2-10-3 肺組織学的解析

ラットを屠殺後，左葉肺を摘出し 10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定を行った．ホルマリンによる置換を確認後，PBS で 10 min (3 セット) の洗浄を行い 0.1% アジ化ナトリウムを含む 30% スクロース溶液中に一晩浸した．O.C.T. compound (Sakura finetek Japan Co. Ltd., Tokyo, Japan) に包埋した後，液体窒素で凍結し，CM1100 (ライカマイクロシステムズ株式会社，Tokyo, Japan) を用いて厚さ 12 μ m の凍結切片を作製した．作製した切片は気道における炎症性細胞浸潤を評価するため，ペルオキシダーゼ-ヘマトキシリン染色を行った．凍結切片を 0.01% 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB: 3,3'-Diaminobenzidine), 0.0001% H_2O_2 を加えた 0.05 M Tris-HCl

buffer (pH7.6) にて 10–20 min 発色させた。ヘマトキシリンで後染色し、エタノール脱水系とキシレンを介して封入した。

2-2-11 粉末吸入製剤投与後における薬物血中濃度測定

経口投与群においては、腎毒性を惹起すると報告されている投与量 [72] である 10 mg/kg (Neoral[®])、気道内投与群においては、抗炎症作用の評価で用いている 6mg DE/CsA-RP (100 µg CsA/rat) を用い、薬物投与後の全身暴露リスクの評価を行った。薬物投与後の 1, 2, 4, 6, 8, 13 及び 25 h においてラット尾静脈より 200 µL の血液をヘパリン処理したチューブに採取した。得られた血液は、1-2-6-2 に示す方法で血中 CsA 濃度を定量した。

2-2-12 統計解析

データは平均±標準誤差 (Mean±SEM) で示した。各データの統計処理は、a one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて分散分析を行った後、Fisher の LSD 法 (least significant difference procedure) によって統計学的処理を行い、危険率 5% 以下をもって有意とした。

第 3 節 実験結果及び考察

2-3-1 Dry-emulsion 製剤の物性

DE/CsA 製剤の調製に噴霧乾燥法を用いた結果，CsA の定量値は 97.8% で収率は 31.5% であった．これは，小スケールでの製造による歩留まりの悪さが原因であると考えられる．

2-3-1-1 高純度モノオレイン酸グリセリンの酸化安定性

本検討では DE 製剤の調製にあたり，界面活性剤として hpGMO を選択した．GMO は一般的に毒性の低い脂肪酸エステル型界面活性剤として乳化剤，可溶化剤及び分散剤として利用されるが，市販品の GMO 中には不純物として高度不飽和脂肪酸やアルデヒド類を始めとする酸化されやすい不純物が含まれるため，保存中の酸化による製剤の品質低下，また過酸化脂質による毒性や組織傷害性が危惧される．そこで，市販の GMO と DE 製剤の調製に使用した hpGMO の酸化安定性について評価を行うため，熱苛酷条件下 (60°C) で 10 day 保存後における過酸化脂質生成量を TBARS 法

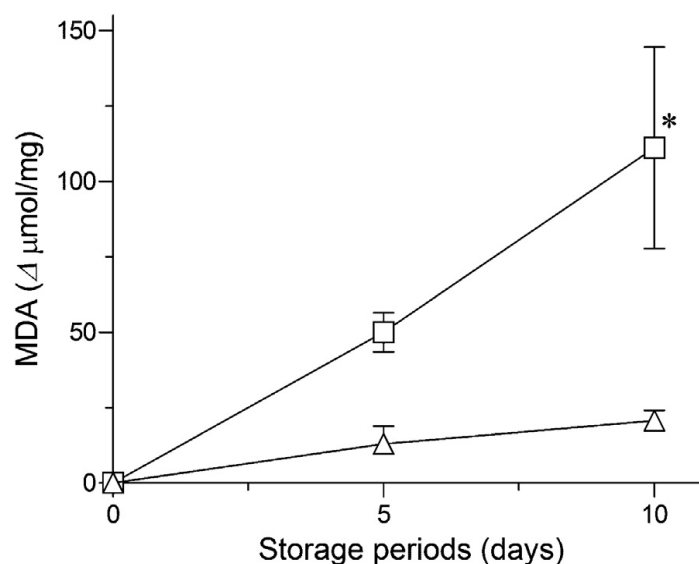


Fig. 11 Production of lipid peroxide in GMO (□) and hpGMO (Δ). The amount of lipid peroxide was measured by the TBARS method after 5 and 10 days of storage at 60°C. Data represent mean ± SE of 3 experiments. *p < 0.05 with respect to the hpGMO.

を用いて定量した (Fig. 11). その結果, 市販品 GMO の過酸化脂質生成量が $111 \mu\text{mol}/\text{mg}$ (MDA 量換算) の増加であったのに対し, hpGMO ではその増加が $20.7 \mu\text{mol}/\text{mg}$ と有意に低値を示した. hpGMO では, 高純度化に伴う不純物の除去によって, 酸化安定性が向上したと推察する.

また, 保存安定性の面において hpGMO を用いた DE 製剤は室温条件下にて保存が可能であるが, 市販品の GMO を使用した製剤では, 室温保存条件下にて製剤の融解を認めた. これは, 市販 GMO 中の不純物量が多いため凝固点降下が生じているためであると考えられる. そのため, DE 製剤の長期保存安定性を考慮した場合においても hpGMO の有用性が示された.

2-3-1-2 物理化学的特性

SEM による粒子形状観察, 製剤の水中への分散時におけるミセル形成及び DE/CsA 製剤の結晶性について評価した結果を示した (Fig. 12, 13).

DE/CsA 製剤の粒子形態を SEM によって観察した結果 (Fig. 12A), DE/CsA 製剤では CsA の結晶粒子を認めなかった. また, 水に分散させた際に形成されるミセルを TEM により観察した結果 (Fig. 12B), 均一な球形ミセルを形成しており, その粒子径は 500 nm 以下であった. DLS による

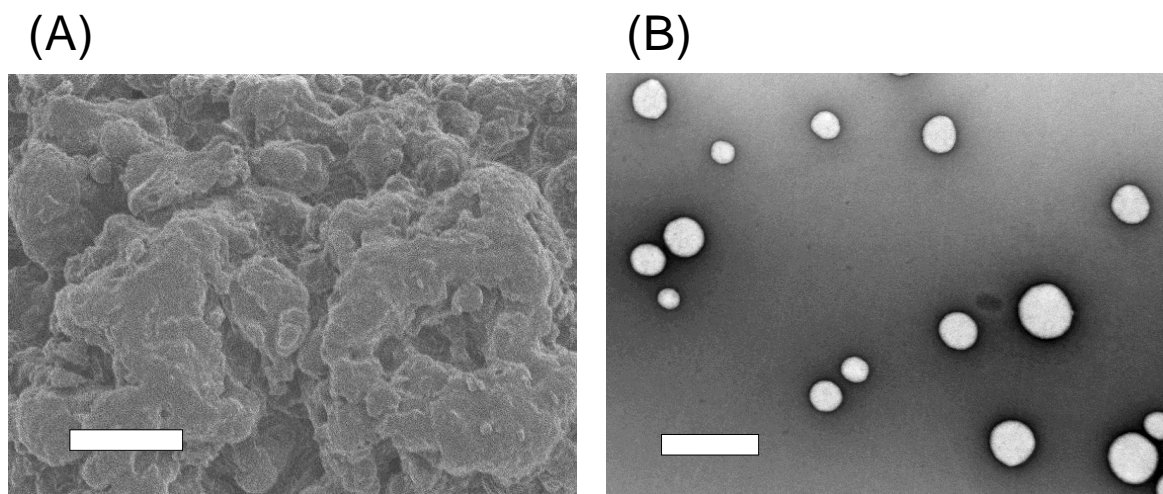


Fig. 12 Physicochemical characterization of CsA samples.

(A) Scanning electron microscopic image from DE/CsA. Bar represents $5 \mu\text{m}$.

(B) Transmission electron microscopic image of the DE/CsA re-dispersed in water. Bar represents 500 nm .

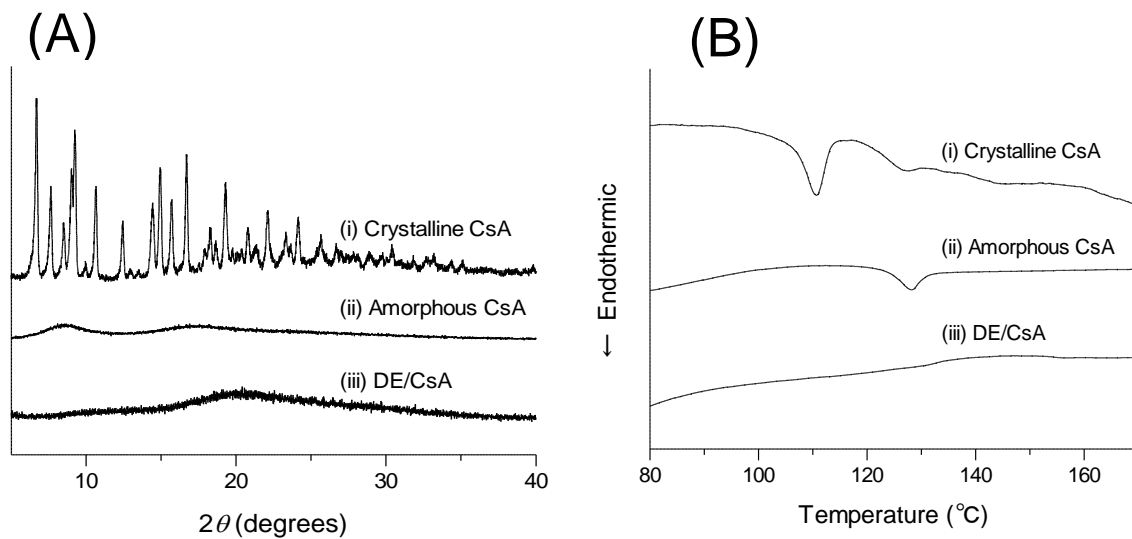


Fig. 13 Crystallinity of CsA samples. (A) Powder X-ray diffraction and (B) differential scanning calorimetry. (i) Crystalline CsA, (ii) amorphous CsA, and (iii) DE/CsA.

分析結果から、ミセルの平均粒子径は 317 nm であることを確認した。更に、XRPD を用いて結晶性を分析した結果 (Fig. 13A), 結晶状態の CsA ではシャープな回折ピークを認めたが、DE/CsA 製剤では Halo-pattern を示し、製剤中に含まれる CsA は非晶質として存在していることを観察した。DSC の結果 (Fig. 13B) からも、DE/CsA では融点に由来する吸熱ピークが消失していたことから、製剤中 CsA は非晶質であることを確認した。噴霧乾燥法により調製した製剤は、溶液状態から急速に溶媒が除去されるために、一般的に非晶質製剤が得られることが知られている [73]。GMO のミセル形成による可溶化効果に加え、噴霧乾燥による製剤の非晶質化及び粒子の微細化は CsA の溶解性改善に効果的に作用すると考えられる。

2-3-1-3 溶解性評価

DE/CsA の溶解性を評価するため、試験液として水を用いて溶出試験を行った (Fig. 14). その結果, Crystalline CsA 及び Amorphous CsA の溶出率は試験開始後 60 min においてそれぞれ定量限界以下及び 0.03% であった. 一方, DE/CsA における溶解度は試験開始後 1 min で 83% を示し, 60 min では非晶質 CsA の約 2100 倍の溶出率を示した. また, DE 製剤を水に再分散させた試料は, 室温下で 24 h 放置後においても沈殿物及び凝集等を認めなかったことから, 本製剤で形成されるミセルは安定に分散していることを確認した. DE 製剤の非常に早い溶出挙動は過去にも報告 [74] があり, DE 製剤化は CsA のみならず, 他の難水溶性化合物の溶解性, 吸収性及び薬効の改善に有用であると考ええる.

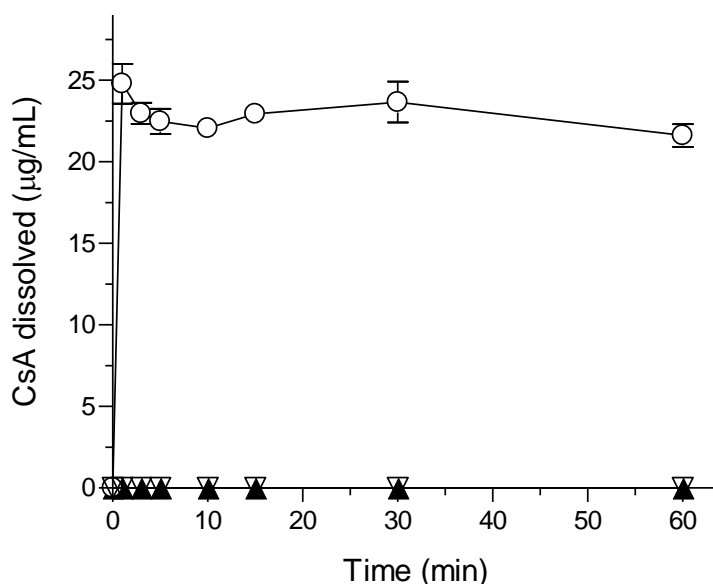


Fig. 14 *In vitro* dissolution behavior of CsA samples in water (37°C).
▲, Crystalline CsA; ▽, amorphous CsA; and ○, DE/CsA. Data represent mean ± SE of three experiments.

2-3-1-4 消化管吸収性

DE/CsA 及び非晶質 CsA の水懸濁液をラットに経口投与 (10 mg CsA/kg) 後, 経時的に薬物血中濃度の測定を行った. Fig. 15 には, 投与後の CsA 血中濃度推移の結果を, Table 7 には実験結果より算出した各種薬物動態学的パラメーターを示した. その結果, 非晶質 CsA における C_{max} は 407 ± 63 ng/mL, $AUC_{0-inf.}$ は $4,830 \pm 1,080$ ng · h/mL であり, DE/CsA 製剤は C_{max} が 841 ± 171 ng/mL, $AUC_{0-inf.}$ が $19,400 \pm 6,180$ ng · h/mL であった. DE/CsA 製剤は, 非晶質 CsA と比較して C_{max} 及び $AUC_{0-inf.}$ はそれぞれ約 2 倍, 約 4 倍の増加に留まり, 吸収性は改善されたものの第 1 章の WM (HPC-SSL) と比較して吸収性は低かった. 溶出試験の結果, DE 製剤化による溶出性の改善を確認していることから膜透過の部分で吸収に差が生じていると推察される. Emulsion 製剤の様にミセルを形成する製剤では, 時としてミセルと薬物間における相互作用が強く膜透過の傷害となる場合がある [75]. このような消化管の膜透過における傷害について評価するには, 本検討で使用した hpGMO と CsA に関して吸収機構の解明や相互作用解析が必要であると考えられる.

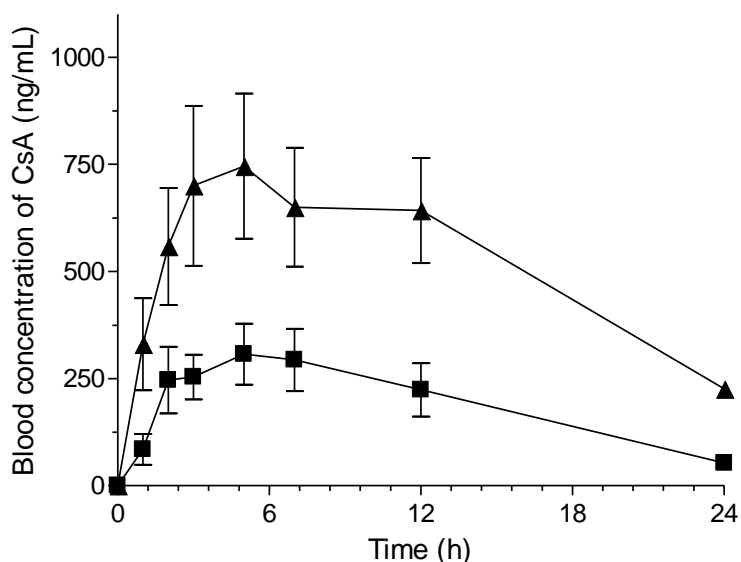


Fig. 15 Blood concentration of CsA samples after oral administration in rats. ▲, DE/CsA (p.o., 10 mg CsA/kg); and ■ amorphous CsA (p.o., 10 mg CsA/kg). Data represent mean \pm SE of 6 experiments.

Table 7 PK parameters of CsA samples after oral administration in rats.

	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	$\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)
DE/CsA (10 mg CsA/kg, p.o.)	841 \pm 171	6.8 \pm 1.8	10 \pm 3.7	19,400 \pm 6,180
Amorphous CsA (10 mg CsA/kg, p.o.)	407 \pm 63	4.8 \pm 1.6	4.7 \pm 0.5	4,830 \pm 1,080

C_{max} : maximum concentration; T_{max} : time to maximum concentration; $T_{1/2}$: half-life time of the drug; and $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$: area under the curve. Data represent mean \pm SE of 6 experiments.

2-3-2 Dry-emulsion の粉末吸入製剤への応用

2-3-2-1 高純度モノオレイン酸グリセリンの組織傷害性

Emulsion 製剤等の可溶化剤として界面活性剤や有機溶媒等を含有する製剤の臨床応用にあたり、添加剤の組織への刺激性や傷害性が問題となる。実際、界面活性剤等による消化管、粘膜及び皮膚への傷害性も報告されており、実用化のために組織傷害性を評価することは非常に重要である [76, 77]。そのため、毒性や刺激性を示す可能性のある化合物の代替、製剤化技術による添加物の削減等、これらを回避するための研究も行われている [78, 79]。本研究で使用した GMO は毒性の低いとされる脂肪酸エステル型非イオン性界面活性剤であるが、GMO の肺組織に対する毒性は明らかになっていない。そこで、ラット肺胞由来 L2 細胞を使用した *in vitro* 試験及びラットに対して実際に hpGMO 製剤を気道内投与した系における *in vivo* 試験の両面から評価を行い肺組織に対する傷害性を評価した。

In vitro 系の評価では、L2 細胞への hpGMO 暴露後における LDH 濃度を指標に細胞傷害性の評価を行った (Fig. 16)。その結果、*in vitro* において hpGMO 暴露群は Control 群と比較して LDH の上昇が認められず、L2 細胞における傷害性をほとんど有さないことを確認した。*In vivo* 系の評価では、hpGMO vehicle-RP または Control-RP 製剤をラット気道内投与後における血漿中 LDH 濃度を指標とし、肺組織における傷害性評価を行った。その結果、hpGMO vehicle-RP 投与群の製剤投与後における血漿中 LDH 濃度は Control-RP 及び初期値からの有意な変化を認めず、*in vivo* においても傷害性が低いことを確認した。本検討で得られた結果は *in vitro* 及び *in vivo* のいずれの系においても対照群と比較して LDH の上昇をほとんど示さなかった。この結果と酸化安定性に関する結果から、hpGMO は高い安定性と安全性を有する添加剤であることを確認した。

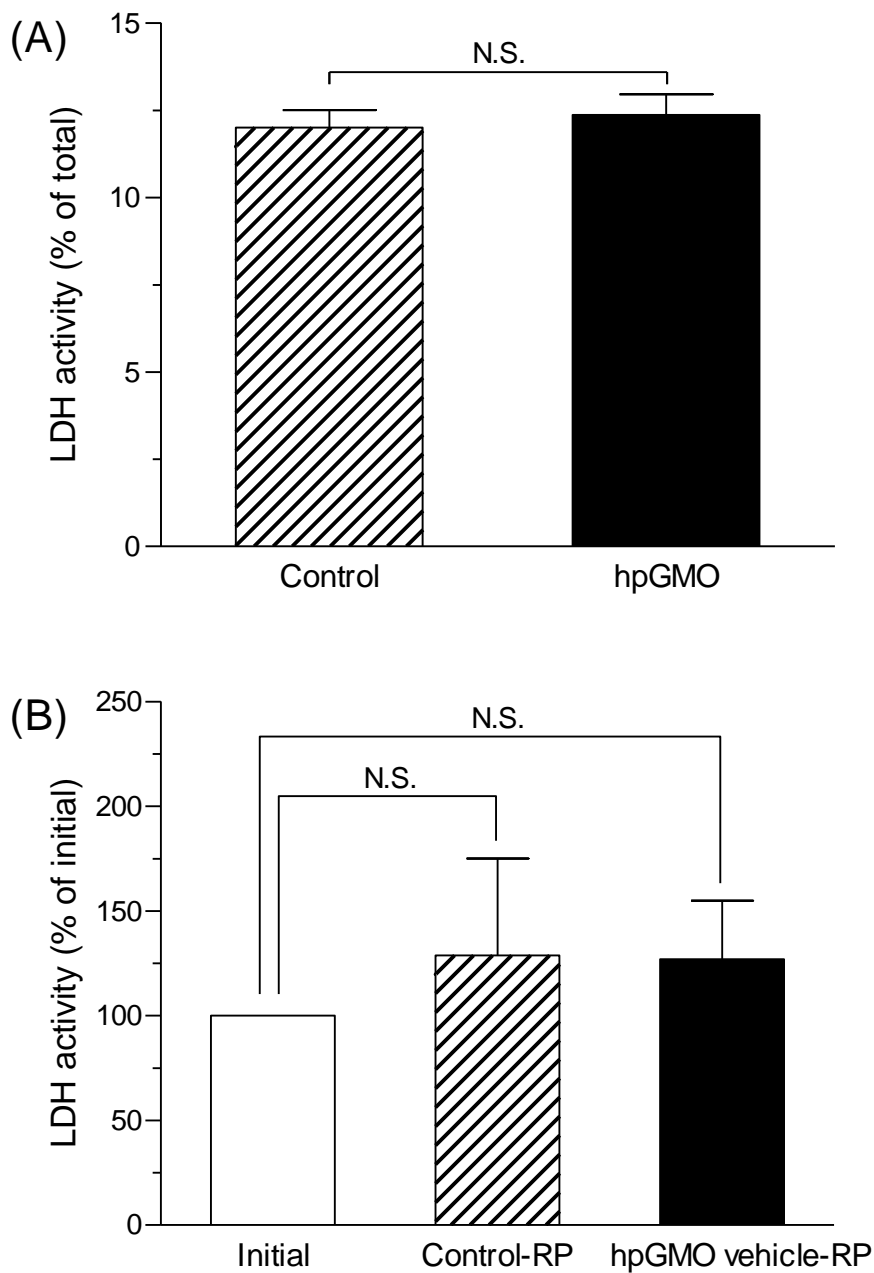


Fig. 16 *In vitro/in vivo* toxicity assessment of the hpGMO. (A) Release of LDH from rat alveolar L2 cells. Data represent mean \pm SE of 4 experiments. (B) LDH level in rat plasma. Plasma LDH level was measured at 24 h after i.t. administration of control-RP or hpGMO vehicle-RP. Data represent mean \pm SE of 4–6 experiments. N.S., not statistically significant.

2-3-2-2 Dry-emulsion 粉末吸入製剤の物理化学的特性評価

DE/CsA から調製した DE/CsA-RP 製剤について、SEM による性状観察、レーザー回折による粒子径評価を行った (Fig. 17). 噴霧乾燥法により調製した粒子は数 μm 程度の微細粒子であり、粒子径の小ささに起因する流動性の悪さがカプセルからの放出性に影響する. そこで、本検討ではキャリア法、すなわち DE/CsA 微細粒子を粉末吸入製剤の担体として分級されている乳糖 (Respitose[®] SV-003) と混合することで RP 製剤の流動性を改善した. SEM による観察の結果、DE/CsA-RP は約 $50 \mu\text{m}$ の乳糖キャリア粒子の表面に DE/CsA の微細粒子が付着した形態であることを確認した. また、この製剤について 0.2 Mpa の圧縮空気分散させた際の粒子径を測定した結果、二峰性の粒度分布を示し、平均粒子径はそれぞれ $2.9 \mu\text{m}$ 及び $55.0 \mu\text{m}$ であった. これらの粒子径は、それぞれ DE/CsA 微細粒子とキャリアの粒子径を示している. よって、DE/CsA の噴霧乾燥粒子は吸入に適切であるとされる $1 \mu\text{m}$ から $5 \mu\text{m}$ の粒子径を有することを確認した [80]. また、微

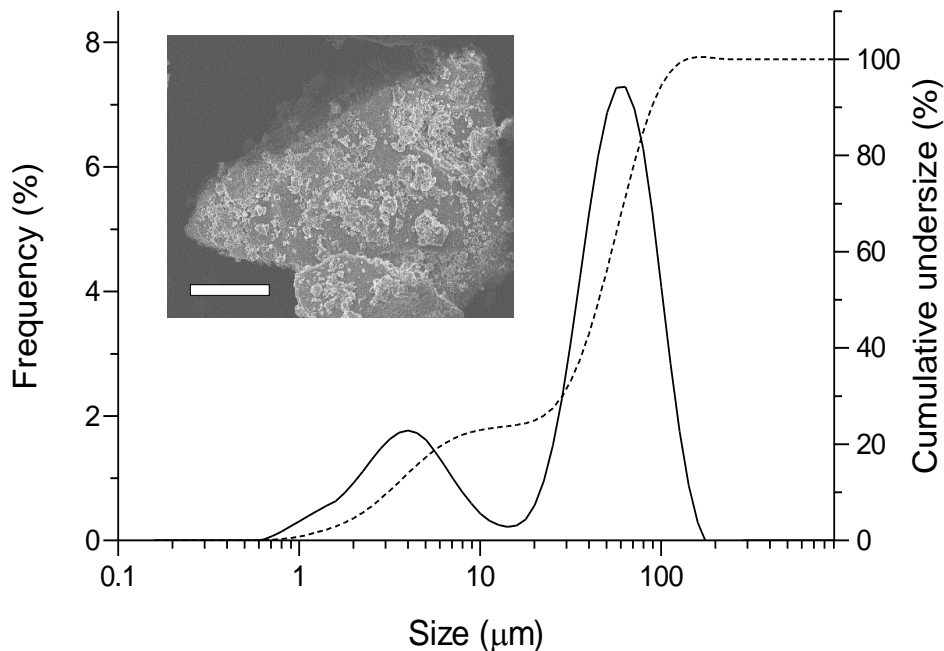


Fig. 17 Appearance and particle size distribution of the DE/CsA-RP. Bar represents $20 \mu\text{m}$.

細粒子では流動性が低いためハンドリングの悪さや表面エネルギーの増大による凝集・付着性等が問題となるが、乳糖キャリアの添加により流動性が改善され、SEM 写真において微細粒子の凝集を認めなかった。更に、本製剤の吸入特性について詳細な評価を行うため、カスケードインパクターによる空気力学的粒子径の測定と分散特性評価を行った (Fig. 18)。測定の結果、DE/CsA-RP 製剤のカプセルからの放出量は 86% であり、Stage 2 よりも下 (空気力学的粒子径 5.8 μm 以下) に到達する量、すなわち気管から肺胞まで到達する理論量である Fine particle fraction (FPF) 値は 11% であった。一般的に市販される吸入製剤の FPF 値は 10–30% 程度 [81] であることから本製剤は分散性に関して改善が必要であると考えられる。カスケードインパクターの結果、製剤中 CsA のほとんどが Stage 0 及び Stage 1 に分布していることから、キャリア粒子に付着している DE/CsA 微細粒子の解離が不十分であったと考える。

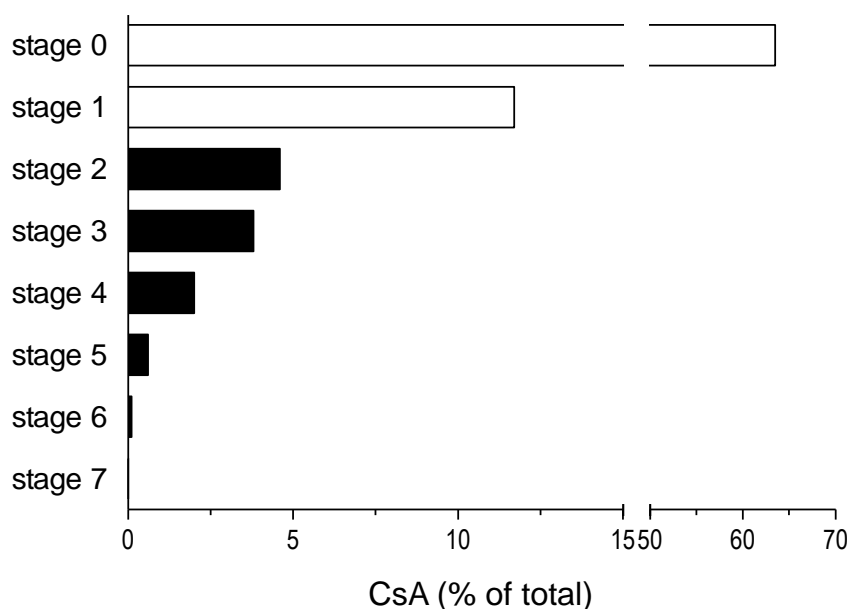


Fig. 18 Aerodynamic particle size distribution of DE/CsA-RP (black bar represents fine particle fraction). The deposition pattern of DE/CsA-RP was analyzed by a JetHaler[®] with an airflow rate of 28.3 L/min.

2-3-2-3 喘息モデルラットにおける抗炎症作用

DE/CsA-RP の抗炎症作用を評価するため、OVA 喘息モデル動物を用いて肺の組織学的解析及び BALF 中の細胞計数及び分類を行った。本検討で用いた OVA 感作動物は、OVA 粉末吸入製剤を応用した新規 asthma モデルであり、従来から用いられている超音波ネブライザーを用いた OVA ミストによる感作 [82-85] と異なり、長期安定性と吸入特性に優れた OVA 粉末吸入剤を調製できる点、気道内投与により感作を行うことで肺局所における炎症を惹起可能である点が大きな特徴となっている [86]。本検討では、OVA 気道内投与の 1 h 前に DE/CsA-RP、CsA-RP 又は Control-RP を投与し、OVA 製剤投与の 24 h 後において肺組織と BALF の採取を行った。CsA

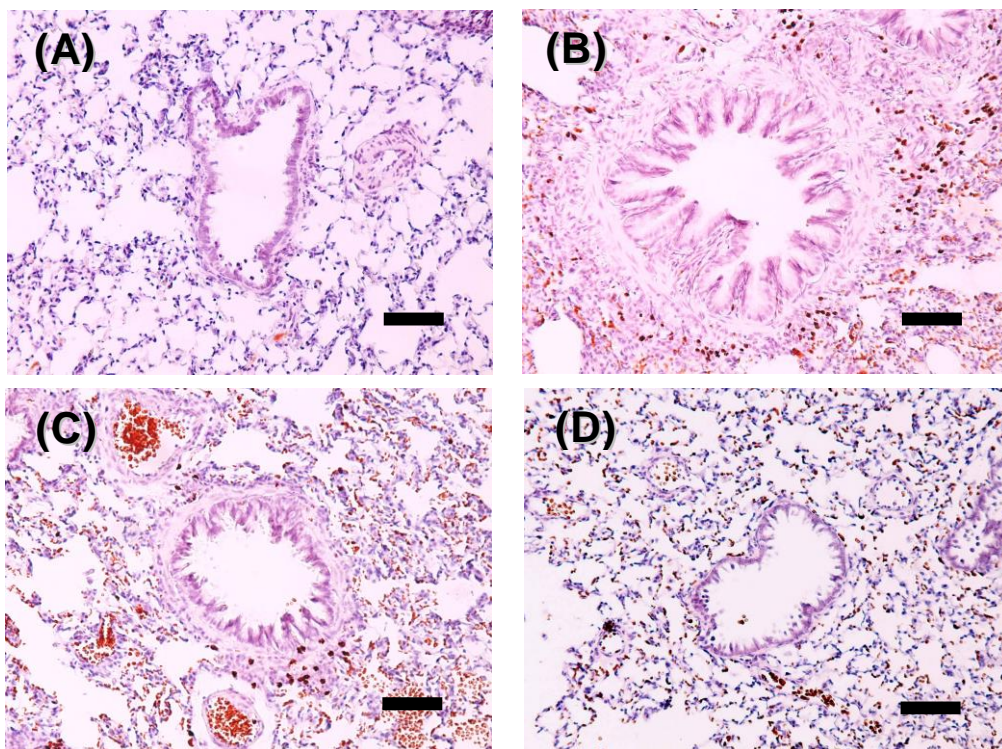


Fig. 19 Histological evaluation of inflammatory cell infiltration in the lung tissues and epithelial-wall thickness from the OVA-sensitized rats. Infiltrated inflammatory cells in the lung tissue sections were visualized by peroxidase staining followed by haematoxylin staining.

(A) Control-RP (unsensitized); (B) Control-RP (OVA-sensitized); (C) CsA-RP (OVA-sensitized); and (D) DE/CsA-RP (OVA-sensitized). Each scale bar represents 100 μm .

Table 8 Assessment of infiltrated cell numbers into the lung tissues and respiratory epithelium thickness. Data represent mean \pm SE of 9–10 experiments.

	Control-RP	OVA-sensitized rats		
		Control-RP	CsA-RP	DE/CsA-RP
Number of infiltrated cells ($\times 10^2$ cells/mm)	0.9 \pm 0.3	5.7 \pm 1.3*	2.2 \pm 0.4	1.7 \pm 0.5
Respiratory epithelium thickness (μ m)	14.7 \pm 2.5	77.2 \pm 10.6*	35.7 \pm 6.5	18.3 \pm 1.5

*, $p < 0.01$ with respect to Control-RP group

投与量設定 (100 μ g/rat) は Fukaya らの研究を基に検討した [87]. Fig. 19 には, Control-RP 投与群 (unsensitized), Control-RP (OVA-sensitized) 投与群, CsA-RP (OVA-sensitized) 投与群, DE/CsA-RP (OVA-sensitized) 投与群の肺組織切片の Peroxidase/Haematoxylin 染色写真を示した. Control-RP (OVA-sensitized) 投与群では, 顕著な炎症性細胞の浸潤と気道粘膜組織の肥厚を認めた. また, CsA-RP (OVA-sensitized) 投与群においても若干の炎症性細胞浸潤と組織の肥厚を確認した. 一方, DE/CsA-RP (OVA-sensitized) 投与群では炎症性細胞浸潤, 組織の肥厚をほとんど認めず, Control-RP (unsensitized) とほぼ変わりのない組織を示した. Table 8 には, 気道組織における単位面積当たりの炎症性細胞数と, 気道上皮の肥厚の測定結果を示した. その結果, Control-RP (OVA-sensitized) 投与群では Control-RP (unsensitized) と比較し, 細胞浸潤数は 6.3 倍, 気道の肥厚は 5.3 倍と有意な上昇を確認した. 一方, DE/CsA-RP 及び CsA-RP 投与群では Control-RP (OVA-sensitized) 投与群と比較し, 炎症性細胞の浸潤を 70% 及び 61% 抑制していた. 気道上皮の肥厚においては, それぞれ DE/CsA-RP 投与群で 76% 及び CsA-RP 投与群で 54% の減少を示した. 今回の評価では, CsA-RP 投与群においても若干の抗炎症作用を認めた. これは今回, 肺の摘出及び BALF 採取を行った time point が OVA 気道内感作の 24 h 後であったため, CsA-PR 中に含まれる CsA が緩やかに溶出して弱い薬理作用を示したためだと考えられる.

DE/CsA-RP による炎症抑制作用の詳細な評価のため、BALF 中総細胞数の計数と、フローサイトメーターによる炎症性細胞の分類を行った。Fig. 20 には、BALF 中の総細胞数の計数結果を示した。その結果、DE/CsA-RP (OVA-sensitized) 及び CsA-RP 投与群 (OVA-sensitized) においては、Control-RP (OVA-sensitized) 投与群で見られる細胞数の増加をそれぞれ 98% 及び 63% 抑制した。BALF 中の細胞をフローサイトメーターによって分類した結果 (Fig. 21), OVA 感作モデル動物においては単球及び好中球の顕著な増加と好酸球の若干の増加を認めた。一方、DE/CsA-RP (OVA-sensitized) 投与群ではこれらの炎症性細胞の増加を抑制し、CsA-RP よりも強力な抗炎症作用を示した。本モデル動物では、喘息病態に特徴的な好酸球の増加の他に、好中球及び単球の増加が顕著に認められた。活性化された好中球は、マトリックス構造を破壊するプロテアーゼ類や活性酸素種を生成し、肺組織における傷害を惹起、更に慢性閉塞性肺疾患の病態を惹起する [88]。DE/CsA-RP 投与群においては、これらの炎症性細胞の増加も抑制されていることから、喘息、また好中球性の炎症を特徴とする慢性閉塞性肺疾患に対する治療に対する有効性が示唆された。

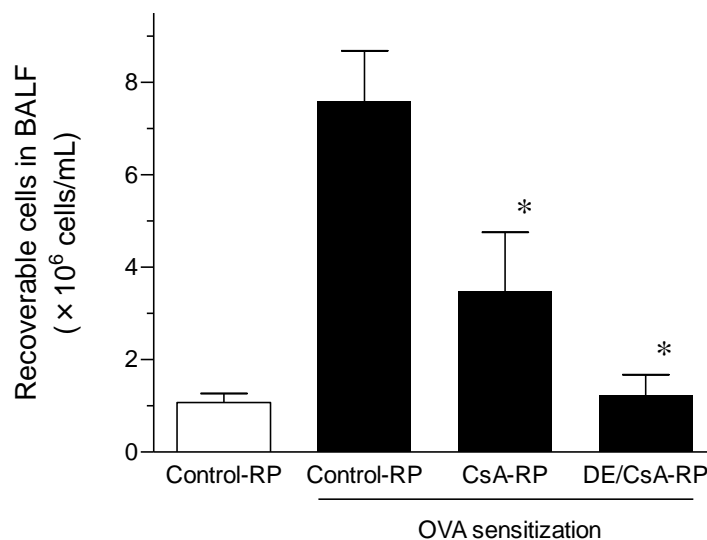


Fig. 20 Anti-inflammatory effects of DE/CsA-RP in OVA-sensitized rats. Inflammatory cells recruited in BALF were counted. Data represent the mean \pm SE of 6–7 rats. *, $p < 0.01$ with respect to antigen-sensitized rats with inhaled Control-RP.

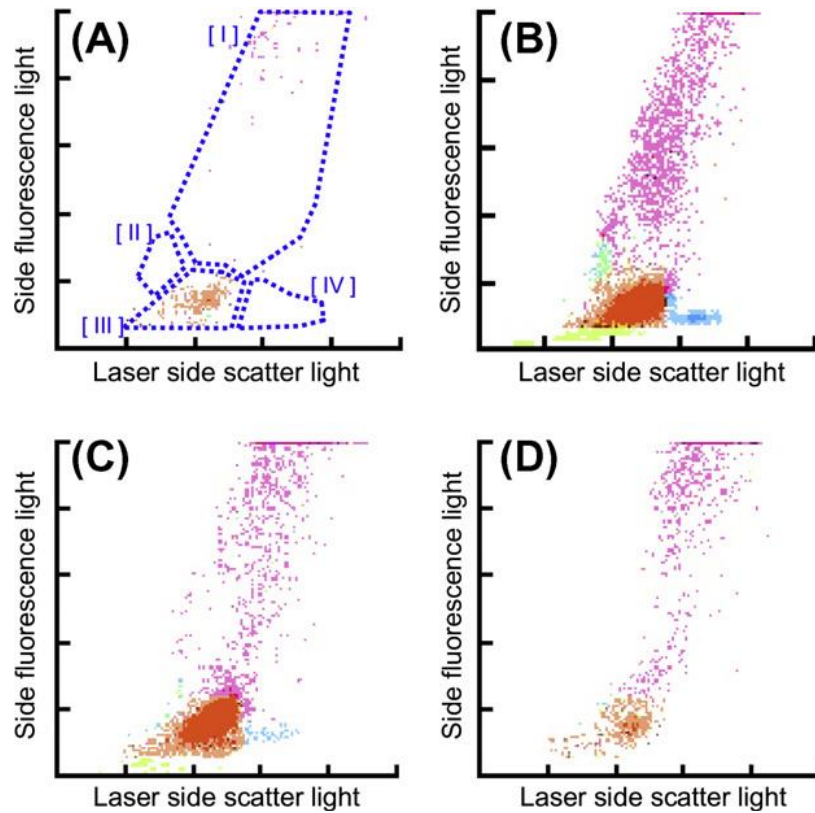


Fig. 21 Cytogram of BALF from OVA-sensitized rats. (A) Control-RP (unsensitized); (B) OVA-sensitized rat; (C) OVA-sensitized rat with pretreatment of CsA-RP; and (D) OVA-sensitized rat with pretreatment of DE/CsA-RP. Cells in BALF were classified as (I) monocytes, (II) lymphocytes, (III) neutrophils, and (IV) eosinophils.

2-3-2-4 吸入製剤気道内投与後における薬物全身曝露

CsA の経口投与による使用は、血中濃度上昇に伴う腎毒性、肝毒性及び神経傷害等の全身性副作用の発現が懸念される [89, 90]. Bohdanecka らは、ラットにおいて CsA 10 mg/kg 経口投与時に血中クレアチニンが有意に上昇することを確認しており、この投与量での CsA による腎障害が示唆される [72]. 本項では、投与経路の違いによる薬物全身曝露の差異及び毒性発現のリスクを明らかにするため、薬効発現量の気道内投与群と毒性発現量の経口投与群における薬物血中濃度推移を比較した。気道内投与群では、抗炎症作用の評価に用いた投与量 (100 µg CsA/rat), 経口投与群では腎毒性を惹起すると報告されている 10 mg/kg を用いて検討した。

Fig. 22 には経口投与後における血中濃度推移の結果を、Table 9 には実験結果から算出した各種パラメーターを示した。その結果、経口投与群においては C_{max} 及び AUC_{0-inf} はそれぞれ 3,200 ng/mL 及び 35,500 ng·h/mL を

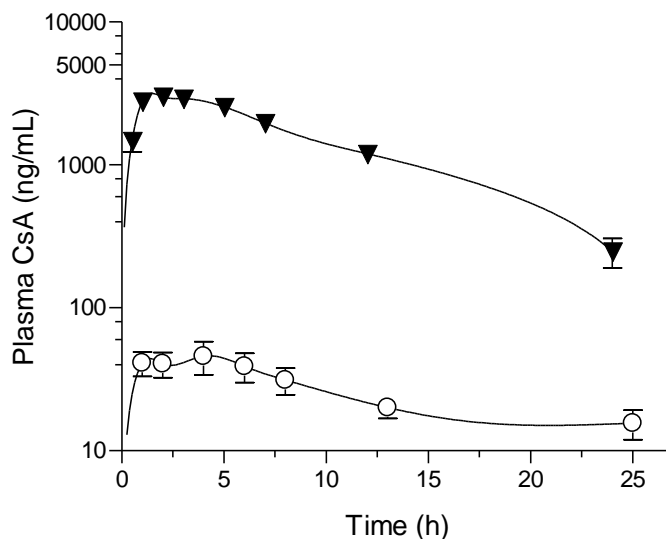


Fig. 22 Systemic exposure of CsA in rats after oral and intratracheal administration of CsA formulations. ○, intratracheal administration of DE/CsA-RP (100 µg CsA/rat); and ▼, oral administration of Neoral® (10 mg CsA/kg body weight of rat). Data represent mean ± SE of 6–7 experiments.

Table 9 Pharmacokinetics parameters

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	$AUC_{0-inf.}$ (ng · h/mL)
DE/CsA-RP (100 µg CsA/rat, intratracheal)	50±11	4.2±0.8	8.3±0.6	764±184
Neoral® (10 mg CsA/kg, oral)	3,200±170	2.3±0.6	5.8±0.6	35,500±3,200

C_{max} : maximum concentration; T_{max} : time to maximum concentration; $T_{1/2}$: half-life; and $AUC_{0-inf.}$: area under the curve of plasma concentration vs time from t=0 to t=infinity after administration. Values are expressed as means±SE from 6 experiments.

示した。一方、気道内投与群で C_{max} 及び $AUC_{0-inf.}$ は、それぞれ 50 ng/mL, 764 ng · h/mL であった。局所作用を指向した粉末吸入製剤として使用することで、毒性を発現する投与量を経口投与した群と比較し、全身曝露を約 50 分の 1 まで抑えられることを確認した。以上の結果より、DE/CsA 製剤の RP 製剤としての応用は、薬物の全身曝露の減少に繋がり全身性副作用回避に貢献するものと考えられる。

第 4 節 小括

本章では、CsA の溶解性及び吸収性の更なる向上を目指し、hpGMO を界面活性剤として使用した DE 製剤の開発を試みた。また、DE 製剤を RP 製剤として応用し、OVA 喘息モデル動物に投与することでその抗炎症作用の向上、更には全身曝露リスクの軽減についても併せて評価を行った。

まず、hpGMO の酸化安定性について市販の GMO を対照として評価を行った結果、GMO の高純度化により熱条件保存下における過酸化物の生成が減少することを確認した。hpGMO を添加剤として適用することで保存期間中における品質の劣化が抑制され、より保存安定性の高い DE 製剤の調製が可能であると考えられる。また、物性評価の結果から DE 製剤は水中に分散時、数百 nm 程度のミセル形成を形成し、難溶性薬物である CsA の溶解性を改善していることを確認した。溶解性改善に伴う消化管吸収性の向上を評価した結果、 C_{max} 及び AUC_{0-inf} の向上は非晶質 CsA と比較してそれぞれ 2 倍及び 4 倍に留まった。製剤化による溶解性の改善を確認していることから、CsA と hpGMO 間における安定な相互作用の形成に起因する膜透過性における障害が示唆される。

次に、投与量減少と気道への局所投与による抗炎症作用の改善及び副作用回避を指向した DDS として、DE/CsA-RP 製剤に関する検討を実施した。まず、hpGMO の *in vitro/vivo* における肺組織への傷害性について評価した結果、hpGMO の単回投与は肺組織に対する傷害性や刺激性をほとんど示さなかった。しかし、長期間投与の毒性や安全性は不明であるため、今後検証が必要であると考えられる。本章では、DE/CsA 微細粒子のハンドリング向上や付着性の軽減を目的とし、キャリア法によって RP 製剤を調製した。DE/CsA は噴霧乾燥によって数 μm の微細粒子を形成し、キャリアとして混合した 60 μm 程度の乳糖キャリアの表面に付着した形状をしており、レーザー回折の結果から DE/CsA 製剤の微細粒子は 2.9 μm 、キャリア粒子は 55.0 μm であることを確認した。今回、噴霧乾燥法によって調製した DE/CsA の微細粒子は、吸入製剤として最適な粒子径を有していたが、カスケードインパクターを使用した *in vitro* 吸入特性評価の結果からは分散性について更なる改善が必須であると考えられた。喘息モデルラットを用いた *in vivo* における抗炎症作用評価では、DE/CsA-RP はその物理的混合物であ

る CsA-RP と比較して強い抗炎症作用を示した。更に、DE-RP 製剤化することで、投与量の減量及び局所投与による薬物全身暴露の大幅な減量が可能であり、DE-RP 製剤は抗炎症作用の改善のみならず全身性副作用回避に有用であることが確認された。

一般的に、局所投与及び局所作用を指向した吸入製剤は薬物の全身性曝露の回避に有用であり、CsA の様な腎毒性や肝毒性等の全身性副作用を発現するリスクのある薬物の副作用回避を指向した製剤として非常に効果的である。そのため、CsA に関して肺移植や喘息を対象疾患とした吸入製剤について多数の検討がなされている [91, 92]。しかし、CsA の可溶化液体製剤のエアロゾルを吸入剤として投与した例では、可溶化のために添加した有機溶媒や Castor oil 等による局所刺激性の発現が懸念される。また、溶液状態における薬物溶液の安定性についても課題が残る。そのため、可溶化剤や有機溶媒を添加剤として使用する液体製剤は、患者に対する安全性及び保存安定性等が臨床応用において大きな壁となる。このような背景から、吸入製剤の開発においては添加剤として hpGMO の様な刺激性の低い可溶化剤を用いた DE 製剤等の粉末吸入製剤の開発が望ましいと考えられる。

以上の知見より、hpGMO の添加剤としての有用性が示され、抗炎症作用の向上及び副作用の回避を指向した DDS 製剤として、本製剤の喘息治療への応用が期待される。

第 3 章 両親媒性コポリマーを用いた自己ミセル形成型固体分散体制剤

第 1 節 序論

本章では WM-SD 製剤の溶解性及び消化管吸収性のみならず保存安定性の向上を目指し、両親媒性の水溶性高分子である poly[MPC-co-BMA] (pMB) を製剤担体とした固体分散体制剤の調製を行った。pMB の様な親水性ユニットと疎水性ユニットを有する水溶性高分子は、ミセル形成による可溶化能を有するため難溶性化合物の物性改善を指向した固体分散体の新たな担体化合物として有用であると考えられる [39, 93, 94]。pMB を担体として使用することで、WM-SD 製剤と DE 製剤の特性を併せ持つ自己ミセル形成型固体分散体 (SMSD : Self-micellizing solid dispersion) の形成が可能であると考えられる。つまり、SD 化による溶出性の改善とミセル形成による膜透過性の向上、すなわち MDT 及び MAT の短縮によって薬物の消化管吸収改善に繋がる可能性がある。実際、pMB を BCS class II に分類される難溶性薬物である Tranilast に応用したナノクリスタル固体分散体制剤においてもその溶解性及び吸収性の改善が報告されている [95]。このように、pMB は難溶性化合物の物性改変に効果的であると考えられるが、CsA のような分子量の大きい化合物への適用に関する報告はなく、実現可能性について明らかになっていない。本章では、第 1 章で紹介した WM 法に対して水溶性高分子として pMB を適用することで CsA の SMSD 製剤化を試みた。まず、pMB の消化管に対する傷害性について評価を行うため IEC-6 (Rat small intestine epithelial cells) を用いて細胞傷害性について検討を行った。調製した製剤は、各種製剤物性評価に加え、40°C/75% 相対湿度 (Relative humidity: RH) で保存後における性状、結晶性及び溶出性についても併せて評価した。更に、溶出性の改善に伴う経口吸収性向上を評価するため、ラットに対して本製剤を経口投与後における CsA の血中濃度を経時的に測定し、CsA の BA を算出した。

第 2 節 実験方法

3-2-1 試薬

PUREBRIGHT® MB-37-50T (pMB) (Fig. 23) は日本油脂株式会社 (Tokyo, Japan) から入手した. Respitose® SV-003 は DMV pharma (Veghel, The Netherlands) から入手した. DMEM 及びカナマイシンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. New born calf serum と horse serum は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した. その他, 使用した試薬は特級規格品を使用した.

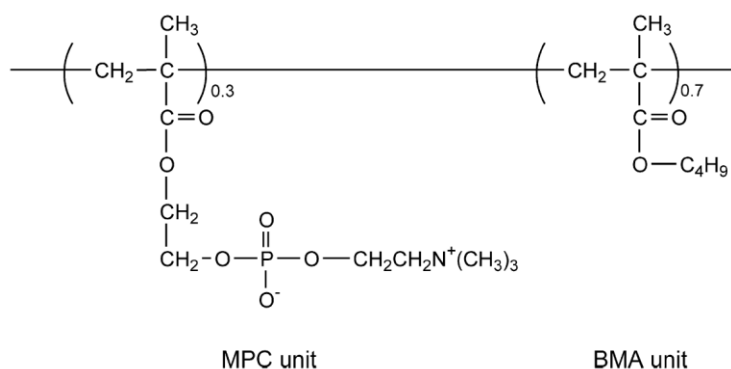


Fig. 23 Chemical structure of poly[MPC-co-BMA].

3-2-2 IEC-6 細胞を使用した毒性評価

IEC-6 細胞は RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan) より入手した. IEC-6 細胞は細胞は, 10% (v/v) new born calf serum 及び 0.01% カナマイシンを含む DMEM 中で培養した. 実験の前に, 96-ウェルプレート中で 5×10^3 cell/well となるまで培養した. pMB の急性細胞毒性を評価するため, pMB 又は陽性対照として非イオン界面活性剤の Polysorbate 80 を 0.3-3,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加して 24 h のインキュベーション後の LDH 漏出量を測定した. 定量は Wako LDH-Cytotoxic test (Wako, Osaka, Japan) を使用した.

3-2-3 製剤調製方法

SMSD/CsA は, 1-2-2 の条件を一部改変して調製を行った. 30 mg の CsA に対し, 0.1 mm のジルコニアボール (Nikkato Co., Ltd, Osaka, Japan) を 2.5 g 及び 20 mg/mL pMB 水溶液を加えた. 本製剤の調製における攪拌/粉砕は,

2 段階から成っている。(1) 2,000 rpm で 2 min, 0.5 mL のポリマー水溶液を加えて攪拌, (2) 400 rpm で 2 min, 8.0 mL のポリマー水溶液を加えて攪拌した。粉碎後, 8.5 mL の CsA/ポリマー溶液懸濁液を液体窒素で凍結し, FD-81 freeze drier (Tokyo rikakikai. Tokyo, Japan) により凍結乾燥したものを SMSD/CsA 製剤として用いた。

3-2-4 溶出性

溶出試験は, 試験液として 100 mL の蒸留水を用い SST-66 (Shimadzu, Kyoto, Japan) による 100 rpm の攪拌条件で実施した ($37 \pm 0.5^\circ\text{C}$)。結晶 CsA, 非晶質 CsA 及び SMSD/CsA を CsA 量として 10 mg となるように秤量して試験に用いた。採取した溶出液は $15,000 \times g$ で 5 min 遠心分離した後, 上清をエタノールで 2 倍希釈したものを試料溶液とした。CsA は 1-2-2 に示した条件で UPLC/MS system を用いて定量した。

3-2-5 固体物性

3-2-5-1 走査型電子顕微鏡及び透過型電子顕微鏡

2-2-7-3 及び 2-2-7-4 に従って観察を行った。

3-2-5-2 偏光顕微鏡

製剤中 CsA の結晶状態を視覚的に確認するため, 偏光顕微鏡 ECLIPSE E600 POL microscope (Nicon, Tokyo, Japan) による観察を行った。

3-2-5-3 粉末 X 線回折

1-2-4-2 に従って測定した。

3-2-5-4 動的光散乱

2-2-7-5 に従って測定した。

3-2-6 ラット経口投与後における薬物血中濃度推移

3-2-6-1 動物

1-2-6-1 に示した通り。

3-2-6-2 薬物血漿中濃度測定法

非晶質 CsA, SMSD/CsA の水懸濁液を 10 mg CsA/kg でラットに対して経口投与後, 尾静脈から経時的 (0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 12 及び 24 h) に 400 μ L の血液を採取した. 採取した血液は 10,000 $\times g$ で遠心分離して血漿を採取し, 測定まで -20°C 条件下で保存した. 得られた血漿に, 内部標準物質として 500 ng/mL タモキシフェンのアセトニトリル溶液 10 μ L を加え, 2 倍量のアセトニトリルを用いて除タンパクを行った後, 0.22 μm フィルターでろ過したものを血漿サンプルとした. 対照試料として Neoral[®] を用いた. また, 絶対的 BA の測定のため, ジメチルスルホキシドに溶解した CsA を 0.5 mg/kg で静脈内投与した群についても薬物血中濃度の測定を実施した. 血漿サンプル中 CsA 濃度は, 1-2-2 で示した UPLC/MS system の測定条件を用いて測定した. 薬物動態学的パラメーターは WinNonlin[®] (Ver. 4.1) を使用して算出した.

3-2-7 製剤安定性試験

3-2-7-1 製剤保存条件

調製した SMSD/CsA を $40^{\circ}\text{C}/75\%RH$ 条件下 (開放系) で 4 week 保存した. 保存後の検体は, 粒子形態観察, 結晶性, 再分散性及び溶出性について評価を行った.

3-2-7-2 溶出試験

3-2-4 に従って試験を実施した.

3-2-8 統計解析

1-2-7 に示す方法によって統計処理を行った.

第 3 節 実験結果及び考察

3-3-1 IEC-6 細胞に対する細胞毒性

界面活性剤等の両親媒性化合物はミセルの形成によって可溶化又は溶解補助能を有するため溶解性改善に効果的であるが、粘膜や消化管に対する傷害性を示すことが知られている [77]. pMB は, biocompatible な化合物として知られており, 難水溶性薬物の可溶化剤として注射剤での検討も行われている [96]. しかし, 化合物の投与時における傷害性は明らかとなっていないため, 本研究では pMB の消化管における組織傷害性を精査するためラット小腸由来 IEC-6 細胞を用いて *in vitro* 細胞傷害性試験を行った. 対照物質として, 毒性の低い非イオン性界面活性剤である Polysorbate 80 (Acceptable daily intake : 25 mg/kg/day) を用いた.

pMB 及び Polysorbate 80 の 0.3 $\mu\text{g/mL}$ から 3,000 $\mu\text{g/mL}$ の溶液を IEC-6 細胞に対して暴露後, LDH の漏出量を測定した結果を Fig. 24 に示した. その結果, Polysorbate 80 暴露群の 100 $\mu\text{g/mL}$ 暴露後 24 h において, LDH の放出は有意に上昇しており, その放出量は総 LDH の 25% にも及

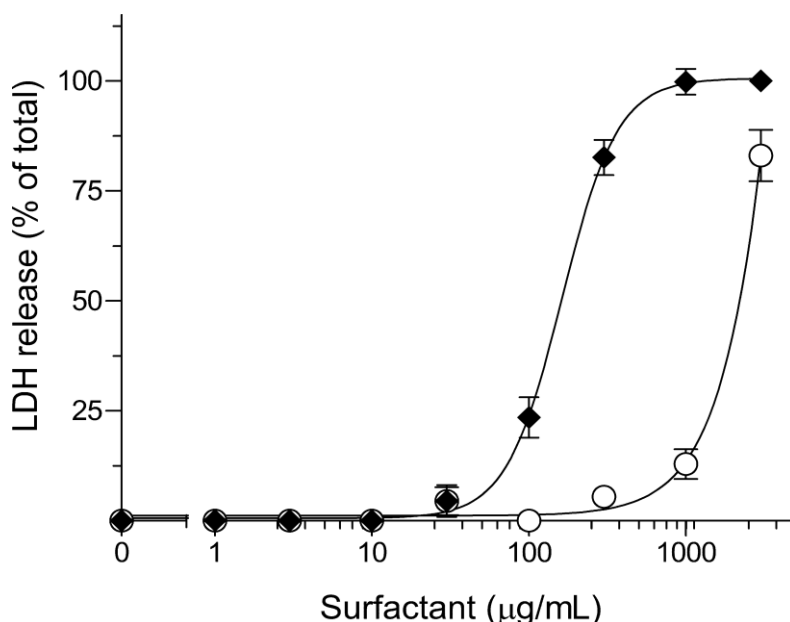


Fig. 24 *In vitro* cytotoxicity of surfactants in rat intestinal IEC-6 cells. LDH leakage, a surrogate marker for cytotoxicity, from IEC-6 cells was measured after incubation for 24 h with various concentrations of polysorbate 80 (◆) or poly[MPC-co-BMA] (○). Data represent mean \pm SE of 4 experiments.

んだ。一方、pMB では 100 µg/mL 暴露において LDH はほとんど上昇しなかった。In vitro 試験の結果から、LD₅₀ (50% Lethal concentration) を算出した所、Polysorbate 80 が 161 µg/mL であったのに対し pMB は 2,198 µg/mL であった。以上の結果から、pMB の IEC-6 細胞に対する傷害性は Polysorbate 80 と比較して有意に低く、高い安全性を確認した。

3-3-2 製剤の固体物性及び保存安定性

SMSD/CsA 製剤の粒子形態を評価するため、SEM 及び偏光顕微鏡による観察を行った (Fig. 25)。SEM による観察の結果、結晶 CsA は粗い柱状結晶であり、非晶質 CsA は不規則な形状であった。一方、SMSD/CsA においては粒子形状の明らかな変化が認められ、第 1 章で調製した WM 製剤と同様の粒子形態を示した。また、これらの検体について偏光顕微鏡により観察を行った結果、SMSD/CsA 製剤では結晶 CsA で観察された偏光性を認めず、製剤中の CsA は非晶質であることを確認した。

更に、CsA の結晶性について詳細に分析するため、XRPD を用いた評価を行った (Fig. 26)。分析の結果、結晶 CsA においては Tetragonal form に由来する回折ピークを確認したが、SMSD/CsA ではピークを認めず、製剤中 CsA は非晶質状態を維持しており、この結果は偏光顕微鏡による観察結果と一致した。

WM-SD 製剤や SMSD 製剤のような非晶質固体分散体は、保存中の非晶質状態の安定性が問題となるため 40°C/75%RH 条件下開放系で 4 week 保存後における性状及び結晶性を確認した (Fig. 25, 26)。検討の結果、SMSD/CsA 製剤は保存後でも性状及び結晶性は変化せず、SMSD/CsA 製剤の高い安定性を確認した。

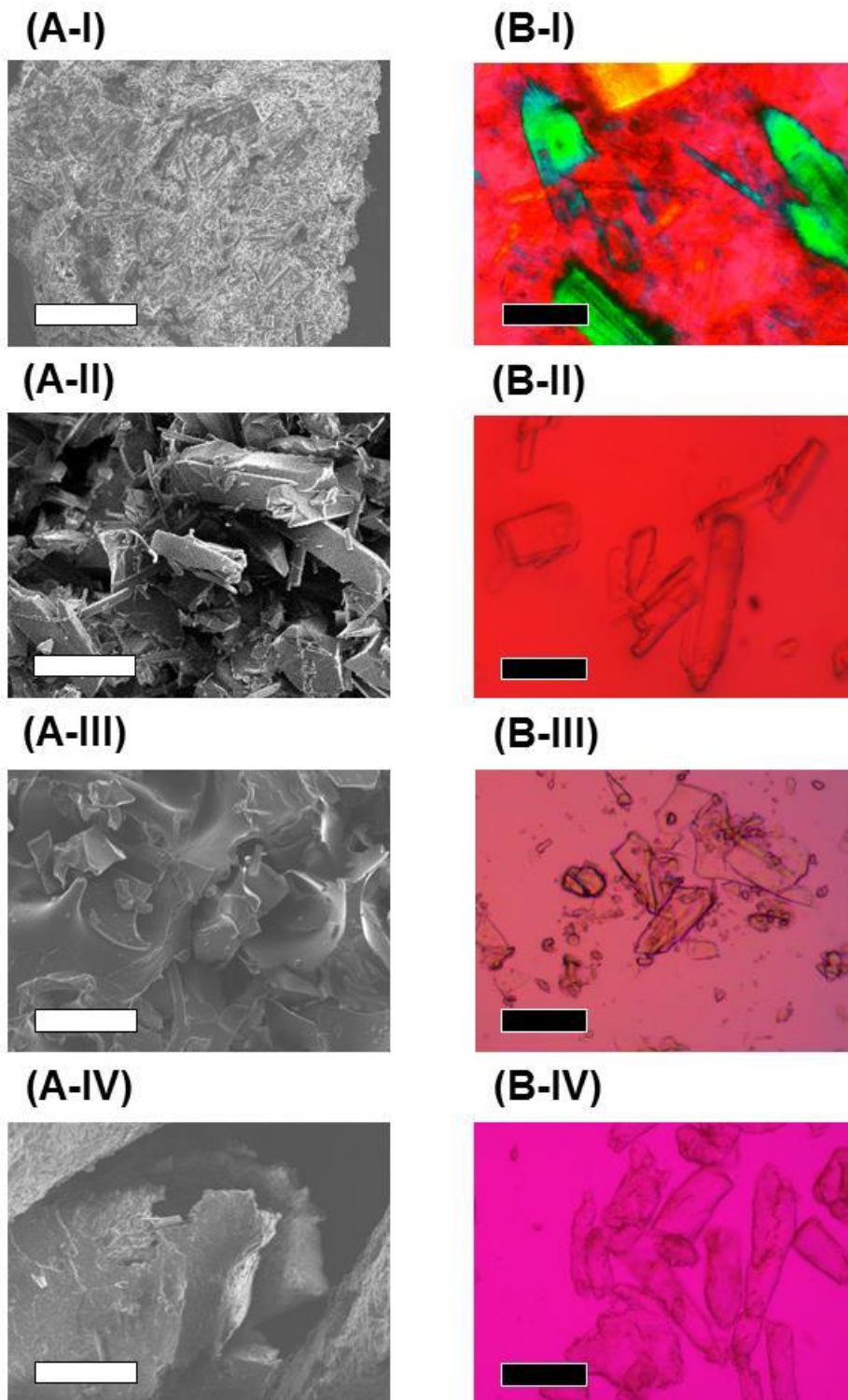


Fig. 25 Micrographic images of CsA samples. (A) Scanning electron microscopic and (B) polarized light microscopic observations. (I) Crystalline CsA, (II) amorphous CsA, (III) SMSD/CsA, and (IV) SMSD/CsA stored at 40°C/75% RH for 4 weeks. White and black bars represent 40 μm and 100 μm, respectively.

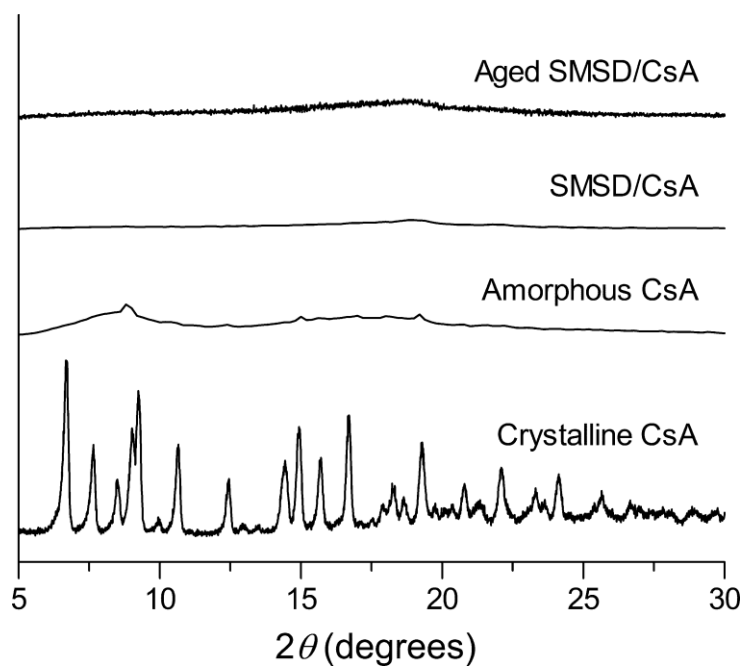


Fig. 26 Powder X-ray diffraction analyses of crystalline CsA, amorphous CsA, SMSD/CsA, and SMSD/CsA stored at 40°C/75% RH for 4 weeks.

3-3-3 溶出性

pMB は水中に分散させた際、ミセルを形成して難溶性化合物が封入されることで溶解性の向上を示す。pMB の臨界ミセル濃度は $10 \mu\text{g/mL}$ との報告がある [97]。今回溶出試験を実施した条件下で pMB 濃度は約 $560 \mu\text{g/mL}$ であることから、溶出液中でミセルの形成が示唆される。pMB が形成するミセルの特性を評価するため、SMSD/CsA を水中に分散後、TEM による観察を行った。観察の結果、SMSD は水中において 100 nm 程度の均一な球形のミセルを形成しており (Fig. 27A), DLS による粒子径測定の結果、その粒子径は 178 nm であった (Fig. 27B)。

本製剤の溶出性を評価するため、non-sink 状態における溶出試験を試験液として水 (37°C) を用いて行った (Fig. 28)。その結果、SMSD/CsA は非晶質 CsA と比較して非常に速やかな溶出を示し、溶出試験の開始 3 分後に $35 \mu\text{g/mL}$ の溶出量を示した。非晶質 CsA の水における溶解度は $20.6 \mu\text{g/mL}$ [45] であることから、溶出試験開始直後においては溶解度の 1.5 倍程度の過飽和を確認した。しかし、CsA の溶解量は徐々に低下し、試験開始後 20 min に飽和濃度である $20 \mu\text{g/mL}$ でプラトーとなった。

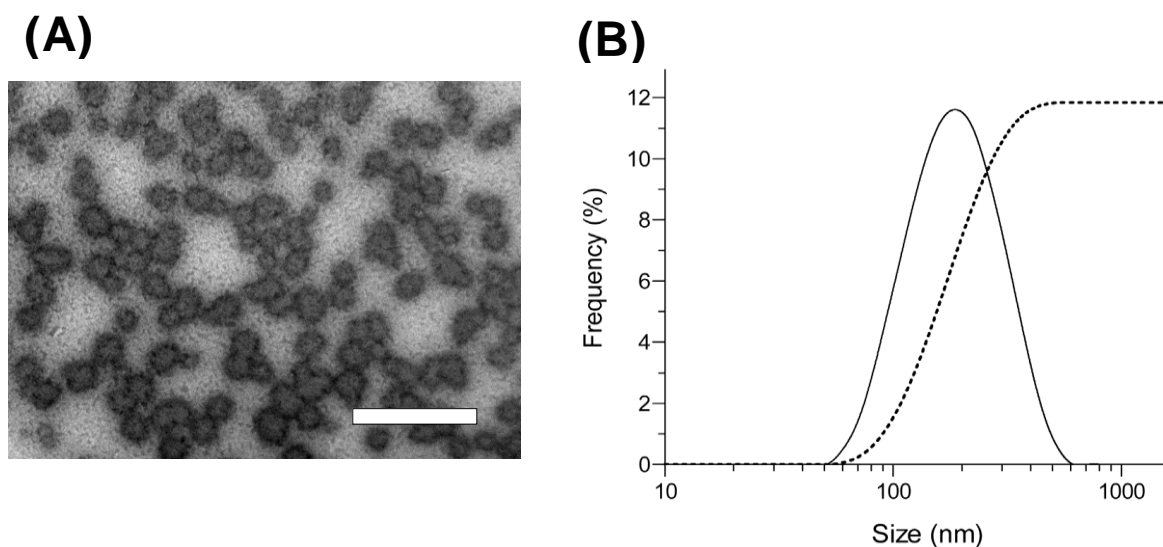


Fig. 27 Transmission electron microscopic image of SMSD/CsA dispersed in distilled water (A) and Particle size distribution of SMSD/CsA in distilled water as determined by dynamic light scattering (B). Bar represents 500 nm.

次に、SMSD/CsA の保存後の溶出挙動を評価するため、40°C/75%RH 条件下で 4 week 保存後の検体について溶出試験を行った。その結果、保存前の製剤と同等の溶出挙動を示し、高い保存安定性を確認した。加えて、溶出試験 2 h 後において試験液中での沈殿や凝集等を示さず、ミセルの再分散性についても保存前から変化を認めなかった。以上の知見より、pMB は CsA を有効成分とする場合、高い可溶化能及び保存安定性を有する非晶質固体分散体の製造が可能であることを確認した。一般的に、非晶質固体分散体の安定化には、非晶質状態の分子を高分子マトリックス中にトラップ又は薬物-ポリマー間相互作用の形成により、薬物分子の運動性を制限することに起因すると考えられている [98]。今回の使用した pMB においても、高分子マトリックス中のへのトラップや薬物-ポリマー間相互作用の形成が安定化に寄与していると考えられる。

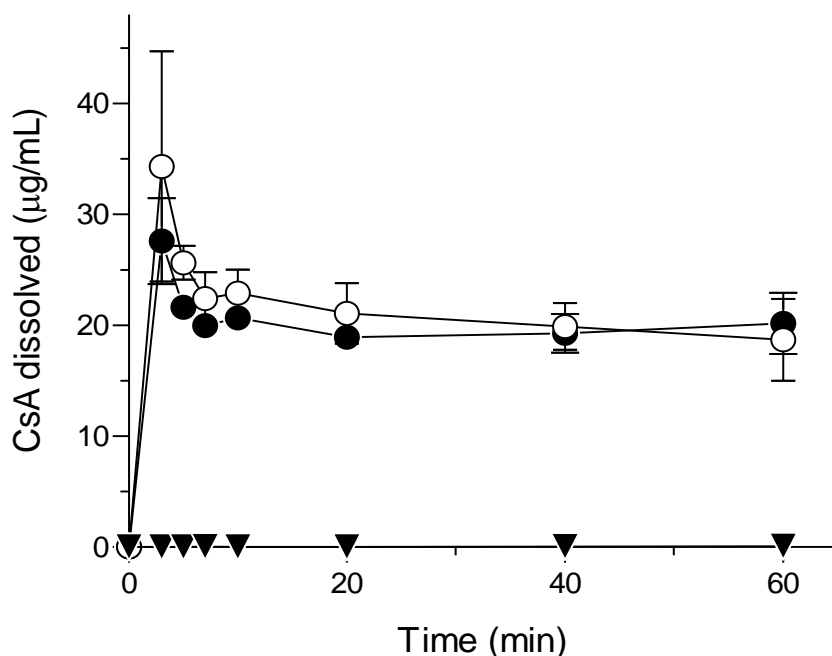


Fig. 28 Dissolution profiles of amorphous CsA, SMSD/CsA, and aged SMSD/CsA in distilled water under non-sink condition. ▼, Amorphous CsA; ○, freshly prepared SMSD/CsA; and ●, SMSD/CsA stored at 40°C/75% RH for 4 weeks. Each bar represents mean \pm SE of 3 independent experiments.

3-3-4 製剤ラット経口投与後における消化管吸収性

Emulsion 製剤を始めとする可溶化製剤は、難溶性化合物の溶解性及び吸収性の向上を指向しており、特に BCS class II に分類される薬物への応用が効果的である。BCS class II 化合物は、溶解速度律速の吸収過程を特徴とするため僅かな溶解性の改善が BA の劇的な向上に繋がることもある。CsA の SMSD 化による消化管吸収性の改善を評価するため、ラットに対し非晶質 CsA 又は SMSD/CsA の水懸濁液を経口投与後 (10 mg CsA/kg) における薬物血中濃度推移の測定を実施した。対照試料として、臨床で使用されている CsA の自己乳化型製剤である Neoral[®] を使用して比較検討した。

投与後における血中濃度推移及び薬物動態学的パラメーターを Fig. 29 及び Table 10 に示した。非晶質 CsA を投与した結果、 C_{max} 及び AUC_{0-24} はそれぞれ 116 ng/mL 及び 589 ng・h/mL であった。一方、SMSD/CsA の投与群においては血中濃度が有意に上昇しており、 C_{max} 及び AUC_{0-24} はそれぞれ 1,280 ng/mL 及び 26,300 ng・h/mL を示し、これらの値は非晶質 CsA 投与群と比較して、それぞれ 11 倍及び 45 倍であった。更に、血中濃度の個体間のばらつきを CV 値によって評価した結果、非晶質 CsA 投与群及び SMSD/CsA 投与群の CV 値はそれぞれ 58% 及び 21% であり、製剤化による血中濃度のばらつきの減少を確認した。

一方、Neoral[®] に関して C_{max} 、 AUC_{0-24} 及び CV 値を求めた結果、2,788 ng/mL、32,400 ng・h/mL 及び 13% であり、SMSD/CsA 製剤投与群と比較して更に高い全身曝露を示し、血中濃度のばらつきも小さかった。Neoral[®] は、従来の CsA 経口製剤である Sandimmun[®] で問題となる胆汁酸分泌量や食事の影響などによる CsA の吸収のばらつきを改善した製剤であり、消化管内の胆汁酸分泌量に左右されず、摂取した水または胃液中でミセルを形成する Emulsion 前濃縮製剤である。Neoral[®] を始めとする Emulsion 前濃縮製剤は、通常室温下において溶液状態であり、多数の添加剤を含有しており、その刺激性や組織傷害性が問題となる [69]。加えて、製造プロセスが複雑、製造コストが高い、長期安定性また剤形選択の少なさが問題となる。これらの点において、製造プロセスが簡便な固形製剤である SMSD/CsA 製剤は吸収性こそ Neoral[®] に及ばないものの高い安全性と安定性のみならず固形製剤としての利便性及び応用性を有することから CsA の溶解性及び吸収性

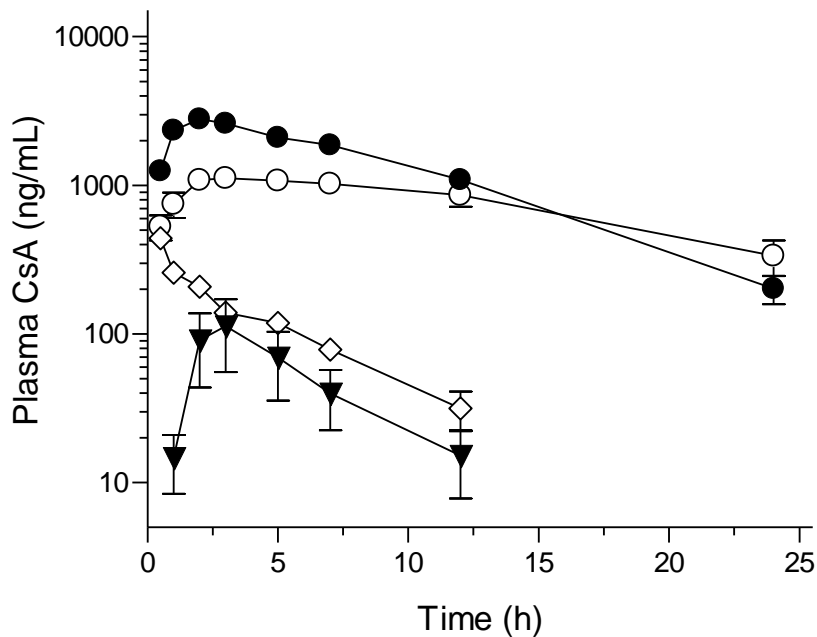


Fig. 29 Systemic exposure of CsA in fasted rats after oral administration of CsA samples suspended in distilled water (1 mL) or intravenous administration of CsA solution. ▼, Amorphous CsA (10 mg/kg body weight of rat, p.o.); ○, SMSD/CsA (10 mg CsA/kg, p.o.); ●, Neoral[®] (10 mg CsA/kg, p.o.); and ◇, CsA solution (0.5 mg/kg, i.v.). Data represent mean ± SE of 4–5 experiments.

の改善技術としての応用が期待される。Amorphous CsA, SMSD/CsA 製剤及び Neoral[®] の絶対的 BA を算出するため、0.5 mg/kg 静脈内投与における AUC₀₋₂₄ を算出した。この結果を基に、絶対的 BA を算出した結果、Amorphous CsA, SMSD/CsA 製剤及び Neoral[®] の BA はそれぞれ 0.7%, 29.4% 及び 36.2% であった。近年、自己乳化型製剤は難水溶性薬物、特に脂溶性の高い薬物の吸収性改善に活用されている [70]。自己乳化型製剤は形成するミセルのサイズによって、Self-micro emulsification drug delivery system (SMEDDS) 及び Self-nano emulsification drug delivery system (SNEDDS) に分類される [99]。ミセルのサイズは、経口投与後における BA に影響することから、製剤処方及び製法の最適化により SMSD/CsA のミセルサイズを制御することで更なる BA の向上が期待される。

Table 10 Pharmacokinetic parameters of CsA formulations.

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC ₀₋₂₄ (ng·h/mL)	BA (%)
SMSD/CsA (10 mg CsA/kg, p.o.)	1,280±118	4.8±1.9	26,300±5517 (CV: 21.0%)	29.4
Neoral [®] (10 mg CsA/kg, p.o.)	2,788±259	2.3±0.6	32,400±4150 (CV: 12.8%)	36.2
Amorphous CsA (10 mg CsA/kg, p.o.)	116±57	3.4±0.4	589±292 (CV: 49.6%)	0.7

C_{max} : maximum concentration; T_{max} : time to maximum concentration; and AUC₀₋₂₄: area under the curve of blood concentration vs. time from t = 0 to t = ∞ after administration. The numbers in parentheses indicate coefficients of variation in AUC₀₋₂₄. Values are expressed as means ± SE from 4 to 5 experiments.

第 4 節 小括

本章では、CsA の溶解性及び吸収性のみならず、保存安定性の向上を指向した製剤の開発を目的とし、自己ミセル形成能を有する両親媒性水溶性高分子である pMB を担体とした SMSD 製剤の開発及び評価を行った。

まず、pMB について細胞傷害性評価を行った結果、pMB は毒性の低い非イオン性界面活性剤である Polysorbate 80 と比較して ICE-6 細胞に対する傷害性は低く、消化管における低刺激性及び高い安全性を確認した。次に、SMSD/CsA 製剤の物性評価から製剤中 CsA は非晶質として存在しており、非晶質固体分散体を形成していることを確認した。溶出試験の結果から CsA の速やかな溶出を確認し、DE 製剤と同様の速やかな溶出挙動を認めた。これらの物性評価の結果から DE 製剤の特性を併せ持つ製剤であることを確認した。更に、本製剤の保存安定性を 40°C/75%RH 条件下で評価した結果、4 week の保存前後で粒子形態、結晶性、溶出性及びミセル形成能は変化せず本製剤の高い安定性を確認した。SMSD/CsA 製剤の消化管吸収性評価の結果、吸収性に関しては Neoral[®] には及ばないものの固形製剤として高い吸収性を示し、その有用性が示された。

本研究で着目した非晶質固体分散体制剤は、溶解性改善のための製剤化技術の一つとして多数の論文や特許が報告されているものの、上市されている製品へ応用されている例は非常に少ない [99]。この理由の一つとして製剤の保存安定性の問題が挙げられる。非晶質化した薬物の保存中における結晶化が原因となり、溶出挙動の変化、更には結晶多形による溶出・吸収性の変動等についても危惧される。実際、CsA の WM-SD 製剤に関する製剤の保存安定性試験の結果、40°C/75%RH 条件下で 4 週間保存後の製剤は、保存前と比較して結晶性について変化は見られなかったものの、保存中の結晶成長や凝集等による溶出性の低下が報告されている [100]。一方、SMSD 製剤は同条件下で 4 week 保存後においても、性状、結晶性及び溶出性はほとんど変化せず高い安定性を示した。また、現在臨床で使用される CsA 製剤の Neoral[®] は液体製剤の Emulsion 前濃縮製剤であり、製造コストや安定性、剤形選択の面で短所が存在するが、SMSD 製剤は固体状態として得られるため溶液状態に起因するデメリットの克服が可能である。以上の知見を考慮すると、pMB を担体とする CsA の SMSD 製剤化は高い溶解性、吸収

性及び保存安定性を達成するのみならず、錠剤や顆粒剤等の様々な固形製剤への応用が可能な実用性の高い製剤であると考える。

今後、SMSD/CsA 製剤の経口製剤としての応用のみならず、ジェットミルや噴霧乾燥等による粒子径コントロールを行い、易溶化した CsA の高い抗炎症作用を効果的に発現可能な粉末吸入製剤としての応用が期待される。

総括

経口投与後の消化管吸収性が悪い薬物は、吸収過程において個体間の薬物血中濃度のばらつきが大きくなりやすく、結果として薬理効果の個体差が懸念される。特に、BCS class II 薬物は溶解律速の吸収過程を経るため、消化管吸収性や BA は化合物の溶解性に大きく影響される。本研究では、BCS class II の難溶性薬物である CsA をモデル化合物とし、湿式粉碎法による SD 製剤、固体 Emulsion の DE 製剤、更に新規製剤担体として両親媒性高分子を使用した SMSD 製剤の開発により、CsA の溶解性及び吸収性の向上による動態制御を試みた。また、開発した製剤の局所作用及び全身性副作用回避のためのオプションとして、RP 製剤開発を併せて検討した。

第 1 章では、高い溶解性と消化管吸収性を有する CsA 固体分散体制剤の開発を目指し、HPC 類を始めとする計 8 種類の水溶性高分子を用いた WM-SD 製剤の処方検討とその物性評価を行った。その結果、いずれのポリマーを用いた場合も非晶質固体分散体の調製に成功し、調製に用いたポリマー中では HPC-SSL が最も顕著な溶解性改善作用を示すことを確認した。本製剤について、薬物ポリマー間の相互作用を評価した結果、製剤化によって製剤中 CsA の高次構造が変化し、CsA 分子と高分子の間で分子間相互作用の形成が溶解性や安定性の改善に寄与する可能性が示唆された。また、本製剤の経口吸収性は非晶質 CsA と比較して有意な改善を示し、非晶質 CsA と比較して C_{max} 及び AUC_{0-24} はそれぞれ約 5 倍、約 5 倍増加した。これらの結果から、本製剤の CsA の溶解性及び吸収性改善に対する有用性が明らかとなり、他の BCS class II 化合物への応用が期待される。

第 2 章では、CsA の更なる溶解性及び吸収性の向上を目指し、固体 Emulsion 製剤である DE 製剤の開発を試みた。本検討では、界面活性剤として高純度かつ低毒性である高純度モノオレイン酸グリセリンの添加により、高い酸化安定性と低い組織傷害性を有する製剤の調製を達成した。また、物性評価の結果、DE/CsA は水中で均一なミセルを形成し、顕著な溶出挙動の改善を示した。本製剤の消化管吸収性を評価した結果、ラット経口投与後の C_{max} 及び AUC_{0-inf} は非晶質 CsA 投与群と比較してそれぞれ 2 倍及び 4 倍に留まった。更に DE 製剤の応用性を評価するため、DE/CsA 製剤を RP 製剤として適用し、その吸入特性及び喘息モデルラットにおける抗

炎症作用について評価を行った。RP 製剤の吸入特性評価の結果、DE/CsA の微細粒子は吸入製剤として最適な粒子径を有していたが、カスケードインパクトによる評価から RP 製剤の分散性は不十分であり添加剤や担体粒子について最適化の必要性を確認した。一方、DE/CsA-RP は喘息モデル動物において CsA と担体の物理的混合物と比較して有意に高い抗炎症作用を示した。加えて、RP 製剤の病変部位への局所的投与及び投与量の減量により、薬物全身暴露の大幅な減量が可能であることを確認した。以上より、本製剤の喘息モデル動物における有用性が示され、溶解性向上と局所投与・局所作用を指向した製剤化による抗炎症作用改善及び副作用の回避のための DDS 製剤として、喘息治療への応用が期待される。

第 3 章では、WM-SD 製剤に対し、新規添加剤である pMB を製剤担体として選択することで、高い溶解性と保存安定性を有する自己ミセル形成型固体分散体制剤の開発を試みた。まず、pMB の毒性評価を行った結果、ICE-6 細胞に対する傷害性は低いことから、消化管に対する低い刺激性、傷害性を明らかにした。また、pMB を WM 製剤の担体として用いることで CsA の溶解性を大幅に改善し、短時間ではあるが溶解度の 1.5 倍程度の過飽和を達成した。更に、本製剤の保存安定性を 40°C/75%RH 条件の開放系で評価した結果、4 week の保存前後で粒子形態、結晶性、溶出性及びミセル形成能は変化せず本製剤の高い安定性が示された。消化管吸収性評価の結果、SMSD 製剤の消化管吸収性は Neoral[®] には及ばないものの固形製剤として高い吸収性を示した。今後、SMSD/CsA 製剤の経口製剤としての応用のみならず、ジェットミルや噴霧乾燥等による粒子径コントロールを行った粉末吸入製剤としての応用が期待される。

本研究によって得られた知見より、特徴の異なる 3 種の製剤学的アプローチによる物性改変が生物薬剤学的特性に与える影響が部分的に明らかとなり、さらに CsA の吸入製剤への応用に関する有用性も示された。特に第 3 章で着目した SMSD 製剤は WM-SD 製剤と DE 製剤の両方の特徴を有するため、MDT 及び MAT の両方の短縮による吸収時間短縮による吸収性の改善が示唆される。今後の更なる製法/処方最適化の検討が、他の BCS class II 化合物の溶解性及び吸収性改善、原薬物性に合わせた製剤化アプローチを用いた動態制御に貢献することが期待される。

謝辞

このような研究の機会を賜り、また本研究を遂行するにあたり終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究科薬物動態学分野 尾上 誠良教授及び静岡県立大学薬学部薬食研究推進センター 山田 静雄特任教授に心より深く感謝いたします。

本論文に関し、懇切丁寧なご指導と御助言を頂きました、臨床薬学分野 賀川 義之教授、創剤科学分野 板井 茂教授、実践薬学分野 内田 信也准教授に深く感謝の意を表します。

また、製剤調製のための原薬をご提供して下さった ILS 株式会社 開発グループ 常務 水元 隆博様、製剤調製にご協力頂いた摂南大学薬学部薬品物性化学研究室 橋本 直文教授、弓樹 佳曜助教、製剤物性の評価にご協力頂いた、松山大学薬学部薬品物理化学研究室 山内 行玄准教授、日本ベーリンガー・インゲルハイム株式会社神戸医薬研究所長 和田 耕一様、製剤分析研究部 川端 洋平様に心より感謝いたします。

研究の遂行のみならず、研究生活でも実に多くの方のお力添えをいただきました、小川 久美子学士、青木 陽介修士、湖城 吉紀修士及び鈴木 寛貴修士をはじめとする薬物動態学分野の皆様心から深く感謝いたします。また、日頃からのご指導と共に激励して下さった大阪薬科大学製剤設計学研究室 戸塚 裕一教授、門田 和紀講師に感謝の意を込めて深く御礼申し上げます。

最後に、これまで暖かく見守り育ててくださり、このような機会を与えて下さった両親を始めとする家族、妻、友人に心より深く感謝いたします。

2015 年 3 月

佐藤 秀行

References

1. Ku MS, Dulin W. [A biopharmaceutical classification-based Right-First-Time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from First-In-Human to clinical Proof-Of-Concept] *Pharm Dev Technol*, **17**: 285-302 (2010)
2. Takagi T, Ramachandran C, Bermejo M, Yamashita S, Yu LX, Amidon GL. [A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan] *Mol Pharm*, **3**: 631-643 (2006)
3. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. [A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability] *Pharm Res*, **12**: 413-420 (1995)
4. Deshmukh DD, Nagilla R, Ravis WR, Betageri GV. [Effect of dodecylmaltoside (DDM) on uptake of BCS III compounds, tiludronate and cromolyn, in Caco-2 cells and rat intestine model] *Drug Deliv*, **17**: 145-151 (2010)
5. Harde H, Das M, Jain S. [Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle] *Expert Opin Drug Deliv*, **8**: 1407-1424 (2011)
6. Cao F, Ping QN, Chen J. [Research of oral prodrugs: opportunities and challenges] *Yao Xue Xue Bao*, **43**: 343-349 (2008)
7. Pouton CW. [Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system] *Eur J Pharm Sci*, **29**: 278-287 (2006)
8. Lobenberg R, Amidon GL. [Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards] *Eur J Pharm Biopharm*, **50**: 3-12 (2000)
9. Li Y, Song J, Tian N, Cai J, Huang M, Xing Q, Wang Y, Wu C, Hu H. [Improving oral bioavailability of metformin hydrochloride using water-in-oil microemulsions and analysis of phase behavior after dilution] *Int J Pharm*, **473**: 316-325 (2014)
10. De Smet L, Saerens L, De Beer T, Carleer R, Adriaensens P, Van Bocxlaer J,

- Vervaet C, Remon JP. [Formulation of itraconazole nanococrystals and evaluation of their bioavailability in dogs] *Eur J Pharm Biopharm*, **87**: 107-113 (2014)
11. Sinha S, Ali M, Baboota S, Ahuja A, Kumar A, Ali J. [Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir] *AAPS PharmSciTech*, **11**: 518-527 (2010)
 12. Siissalo S, de Waard H, de Jager MH, Hayeshi R, Frijlink HW, Hinrichs WL, Dinter-Heidorn H, van Dam A, Proost JH, Groothuis GM, de Graaf IA. [Nanoparticle formulation of a poorly soluble cannabinoid receptor 1 antagonist improves absorption by rat and human intestine] *Drug Metab Dispos*, **41**: 1557-1565 (2013)
 13. Underwood SL, McMillan S, Reeves R, Hunt J, Brealey CJ, Webber S, Foster M, Sargent CA. [Effects of cyclosporin A administered into the airways against antigen-induced airway inflammation and hyperreactivity in the rat] *Eur J Pharmacol*, **420**: 165-173 (2001)
 14. Calderon E, Lockey RF, Bukantz SC, Coffey RG, Ledford DK. [Is there a role for cyclosporine in asthma?] *J Allergy Clin Immunol*, **89**: 629-636 (1992)
 15. Yau WL, Blisnick T, Taly JF, Helmer-Citterich M, Schiene-Fischer C, Leclercq O, Li J, Schmidt-Arras D, Morales MA, Notredame C, Romo D, Bastin P, Spath GF. [Cyclosporin A treatment of *Leishmania donovani* reveals stage-specific functions of cyclophilins in parasite proliferation and viability] *PLoS Negl Trop Dis*, **4**: e729 (2010)
 16. el Tayar N, Mark AE, Vallat P, Brunne RM, Testa B, van Gunsteren WF. [Solvent-dependent conformation and hydrogen-bonding capacity of cyclosporin A: evidence from partition coefficients and molecular dynamics simulations] *J Med Chem*, **36**: 3757-3764 (1993)
 17. Khan LN, Kon OM, Macfarlane AJ, Meng Q, Ying S, Barnes NC, Kay AB. [Attenuation of the allergen-induced late asthmatic reaction by cyclosporin A is associated with inhibition of bronchial eosinophils, interleukin-5, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and eotaxin] *Am J*

- Respir Crit Care Med*, **162**: 1377-1382 (2000)
18. Lee YC, Kim SH, Seo YB, Roh SS, Lee JC. [Inhibitory effects of *Actinidia polygama* extract and cyclosporine A on OVA-induced eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma] *Int Immunopharmacol*, **6**: 703-713 (2006)
 19. Alexander AG, Barnes NC, Kay AB. [Trial of cyclosporin in corticosteroid-dependent chronic severe asthma] *Lancet*, **339**: 324-328 (1992)
 20. Matusiewicz R, Urbankowska B. [Effect of cyclosporine A on the clinical state and spirometric parameters in patients with steroid-dependent bronchial asthma] *Pneumonol Alergol Pol*, **60**: 53-57 (1992)
 21. Moss RB. [Alternative pharmacotherapies for steroid-dependent asthma] *Chest*, **107**: 817-825 (1995)
 22. Amidi M, Pellikaan HC, de Boer AH, Crommelin DJ, Hennink WE, Jiskoot W. [Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery] *Eur J Pharm Biopharm*, **68**: 191-200 (2008)
 23. Qian F, Mathias N, Moench P, Chi C, Desikan S, Hussain M, Smith RL. [Pulmonary delivery of a GLP-1 receptor agonist, BMS-686117] *Int J Pharm*, **366**: 218-220 (2009)
 24. Ohmori Y, Onoue S, Endo K, Matsumoto A, Uchida S, Yamada S. [Development of dry powder inhalation system of novel vasoactive intestinal peptide (VIP) analogue for pulmonary administration] *Life Sci*, **79**: 138-143 (2006)
 25. Onischuk AA, Tolstikova TG, Sorokina IV, Zhukova NA, Baklanov AM, Karasev VV, Dultseva GG, Boldyrev VV, Fomin VM. [Anti-inflammatory effect from indomethacin nanoparticles inhaled by male mice] *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, **21**: 231-243 (2008)
 26. Tam JM, McConville JT, Williams RO, 3rd, Johnston KP. [Amorphous cyclosporin nanodispersions for enhanced pulmonary deposition and dissolution] *J Pharm Sci*, **97**: 4915-4933 (2008)

27. Tolman JA, Williams RO. [Advances in the pulmonary delivery of poorly water-soluble drugs: influence of solubilization on pharmacokinetic properties] *Drug Dev Ind Pharm*, **36**: 1-30 (2010)
28. Niwa T, Mizutani D, Danjo K. [Spray freeze-dried porous microparticles of a poorly water-soluble drug for respiratory delivery] *Chem Pharm Bull*, **60**: 870-876 (2012)
29. Duret C, Merlos R, Wauthoz N, Sebti T, Vanderbist F, Amighi K. [Pharmacokinetic evaluation in mice of amorphous itraconazole-based dry powder formulations for inhalation with high bioavailability and extended lung retention] *Eur J Pharm Biopharm*, **86**: 46-54 (2014)
30. Duret C, Wauthoz N, Sebti T, Vanderbist F, Amighi K. [New respirable and fast dissolving itraconazole dry powder composition for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis] *Pharm Res*, **29**: 2845-2859 (2012)
31. Duret C, Wauthoz N, Sebti T, Vanderbist F, Amighi K. [New inhalation-optimized itraconazole nanoparticle-based dry powders for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis] *Int J Nanomedicine*, **7**: 5475-5489 (2012)
32. Sansone F, Aquino RP, Del Gaudio P, Colombo P, Russo P. [Physical characteristics and aerosol performance of naringin dry powders for pulmonary delivery prepared by spray-drying] *Eur J Pharm Biopharm*, **72**: 206-213 (2009)
33. Carvalho SR, Watts AB, Peters JI, Liu S, Hengsawas S, Escotet-Espinoza MS, Williams RO, 3rd. [Characterization and pharmacokinetic analysis of crystalline versus amorphous rapamycin dry powder via pulmonary administration in rats] *Eur J Pharm Biopharm*, **88**: 136-147 (2014)
34. Onoue S, Hashimoto N, Yamada S. [Dry powder inhalation systems for pulmonary delivery of therapeutic peptides and proteins] *Expert opinion Ther Patents*, **18**: 429-442 (2008)
35. Onoue S, Ohshima K, Debari K, Koh K, Shioda S, Iwasa S, Kashimoto K, Yajima T. [Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils] *Pharm Res*, **21**: 1274-1283 (2004)

36. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. [Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms] *Pharm Res*, **15**: 11-22 (1998)
37. Horter D, Dressman JB. [Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract] *Adv Drug Deliv Rev*, **46**: 75-87 (2001)
38. Wang J, Li L, Du Y, Sun J, Han X, Luo C, Ai X, Zhang Q, Wang Y, Fu Q, Yang Z, He Z. [Improved oral absorption of Doxorubicin by amphiphilic copolymer of lysine-linked ditocopherol polyethylene glycol 2000 succinate: *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation] *Mol Pharm*, **12**: 463-473 (2015)
39. Linn M, Collnot EM, Djuric D, Hempel K, Fabian E, Kolter K, Lehr CM. [Soluplus[®] as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs *in vitro* and *in vivo*] *Eur J Pharm Sci*, **45**: 336-343 (2011)
40. Niwa T, Hashimoto N. [Novel technology to prepare oral formulations for preclinical safety studies] *Int J Pharm*, **350**: 70-78 (2008)
41. Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, Toguchi H, Liversidge GG, Higaki K, Kimura T. [Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs] *J Control Release*, **111**: 56-64 (2006)
42. Wu Y, Loper A, Landis E, Hettrick L, Novak L, Lynn K, Chen C, Thompson K, Higgins R, Batra U, Shelukar S, Kwei G, Storey D. [The role of biopharmaceutics in the development of a clinical nanoparticle formulation of MK-0869: a Beagle dog model predicts improved bioavailability and diminished food effect on absorption in human] *Int J Pharm*, **285**: 135-146 (2004)
43. Chiou WL, Riegelman S. [Pharmaceutical applications of solid dispersion systems] *J Pharm Sci*, **60**: 1281-1302 (1971)
44. Kawabata Y, Yamamoto K, Debari K, Onoue S, Yamada S. [Novel crystalline solid dispersion of tranilast with high photostability and improved oral bioavailability] *Eur J Pharm Sci*, **39**: 256-262 (2010)

45. Onoue S, Sato H, Ogawa K, Kawabata Y, Mizumoto T, Yuminoki K, Hashimoto N, Yamada S. [Improved dissolution and pharmacokinetic behavior of cyclosporine A using high-energy amorphous solid dispersion approach] *Int J Pharm*, **399**: 94-101 (2010)
46. Tanaka Y, Inkyo M, Yumoto R, Nagai J, Takano M, Nagata S. [Nanoparticulation of poorly water soluble drugs using a wet-mill process and physicochemical properties of the nanopowders] *Chem Pharm Bull*, **57**: 1050-1057 (2009)
47. Nekkanti V, Pillai R, Venkateswarlu V, Harisudhan T. [Development and characterization of solid oral dosage form incorporating candesartan nanoparticles] *Pharm Dev Technol*, **14**: 290-298 (2009)
48. Cilurzo F, Selmin F, Minghetti P, Gennari CG, Demartin F, Montanari L. [Characterization and physical stability of fast-dissolving microparticles containing nifedipine] *Eur J Pharm Biopharm*, **68**: 579-588 (2008)
49. Patterson JE, James MB, Forster AH, Rades T. [Melt extrusion and spray drying of carbamazepine and dipyridamole with polyvinylpyrrolidone/vinyl acetate copolymers] *Drug Dev Ind Pharm*, **34**: 95-106 (2008)
50. Janssens S, Roberts C, Smith EF, Van den Mooter G. [Physical stability of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethyleneglycol 6000/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends] *Int J Pharm*, **355**: 100-107 (2008)
51. Al-Obaidi H, Brocchini S, Buckton G. [Anomalous properties of spray dried solid dispersions] *J Pharm Sci*, **98**: 4724-4737 (2009)
52. Jachowicz R, Czech A. [Preparation and evaluation of piroxicam-HPMCAS solid dispersions for ocular use] *Pharm Dev Technol*, **13**: 495-504 (2008)
53. Tantishaiyakul V, Kaewnopparat N, Ingkatawornwong S. [Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone] *Int J Pharm*, **181**: 143-151 (1999)
54. Bertacche V, Pini E, Stradi R, Stratta F. [Quantitative determination of amorphous cyclosporine in crystalline cyclosporine samples by Fourier transform infrared spectroscopy] *J Pharm Sci*, **95**: 159-166 (2006)

55. Lechuga-Ballesteros D, Abdul-Fattah A, Stevenson CL, Bennett DB. [Properties and stability of a liquid crystal form of cyclosporine-the first reported naturally occurring peptide that exists as a thermotropic liquid crystal] *J Pharm Sci*, **92**: 1821-1831 (2003)
56. Stevenson CL, Tan MM, Lechuga-Ballesteros D. [Secondary structure of cyclosporine in a spray-dried liquid crystal by FTIR] *J Pharm Sci*, **92**: 1832-1843 (2003)
57. Shimpi SL, Chauhan B, Mahadik KR, Paradkar A. [Stabilization and improved *in vivo* performance of amorphous etoricoxib using Gelucire 50/13] *Pharm Res*, **22**: 1727-1734 (2005)
58. Tobyn M, Brown J, Dennis AB, Fakes M, Gao Q, Gamble J, Khimyak YZ, McGeorge G, Patel C, Sinclair W, Timmins P, Yin S. [Amorphous drug-PVP dispersions: application of theoretical, thermal and spectroscopic analytical techniques to the study of a molecule with intermolecular bonds in both the crystalline and pure amorphous state] *J Pharm Sci*, **98**: 3456-3468 (2009)
59. Zijlstra GS, Rijkeboer M, Jan van Drooge D, Sutter M, Jiskoot W, van de Weert M, Hinrichs WL, Frijlink HW. [Characterization of a cyclosporine solid dispersion for inhalation] *AAPS J*, **9**: E190-199 (2007)
60. Al-Obaidi H, Buckton G. [Evaluation of griseofulvin binary and ternary solid dispersions with HPMCAS] *AAPS PharmSciTech*, **10**: 1172-1177 (2009)
61. Wu CY, Benet LZ. [Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system] *Pharm Res*, **22**: 11-23 (2005)
62. Takatsuka T, Endo T, Jianguo Y, Yuminoki K, Hashimoto N. [Nanosizing of poorly water soluble compounds using rotation/revolution mixer] *Chem Pharm Bull*, **57**: 1061-1067 (2009)
63. Johnston A, Marsden JT, Hla KK, Henry JA, Holt DW. [The effect of vehicle on the oral absorption of cyclosporin] *Br J Clin Pharmacol*, **21**: 331-333 (1986)

64. Kovarik JM, Mueller EA, van Bree JB, Tetzloff W, Kutz K. [Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation] *J Pharm Sci*, **83**: 444-446 (1994)
65. Nipun TS, Ashraful Islam SM. [SEDDS of gliclazide: Preparation and characterization by *in-vitro*, *ex-vivo* and *in-vivo* techniques] *Saudi Pharm J*, **22**: 343-348 (2014)
66. Ogawara K, Abe S, Un K, Yoshizawa Y, Kimura T, Higaki K. [Determinants for *in vivo* antitumor effect of angiogenesis inhibitor SU5416 formulated in PEGylated emulsion] *J Pharm Sci*, **103**: 2464-2469 (2014)
67. Mutyam SK, Bejugam NK, Parish HJ, Reddy VM, Bogatcheva E, Shankar GN. [Permeability enhancing lipid-based co-solvent and SEDDS formulations of SQ641, an antimycobacterial agent] *Pharm Dev Technol*, **1** -10 (2014)
68. Devalapally H, Silchenko S, Zhou F, McDade J, Goloverda G, Owen A, Hidalgo IJ. [Evaluation of a nanoemulsion formulation strategy for oral bioavailability enhancement of danazol in rats and dogs] *J Pharm Sci*, **102**: 3808-3815 (2013)
69. Dye D, Watkins J. [Suspected anaphylactic reaction to Cremophor EL] *Br Med J*, **280**: 1353 (1980)
70. Onoue S, Uchida A, Kuriyama K, Nakamura T, Seto Y, Kato M, Hatanaka J, Tanaka T, Miyoshi H, Yamada S. [Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q₁₀ with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors] *Eur J Pharm Sci*, **46**: 492-499 (2012)
71. Yin YM, Cui FD, Kim JS, Choi MK, Choi BC, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. [Preparation, characterization and *in vitro* intestinal absorption of a dry emulsion formulation containing atorvastatin calcium] *Drug Deliv*, **16**: 30-36 (2009)
72. Bohdanecka M, Schuck O, Chadimova M, Sedivy J, Glagolicova A, Skibova J, Kunes J, Dobesova Z, Stuchlik M, Vesela J, Kazdova L. [Nephrotoxicity of cyclosporin A in hereditary hypertriglyceridemic rats]

- Physiol Res*, **48**: 437-443 (1999)
73. Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Mooter G. [Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: formulation and process considerations] *Int J Pharm*, **453**: 253-284 (2013)
 74. Dollo G, Le Corre P, Guerin A, Chevanne F, Burgot JL, Leverage R. [Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs] *Eur J Pharm Sci*, **19**: 273-280 (2003)
 75. Fischer SM, Brandl M, Fricker G. [Effect of the non-ionic surfactant Poloxamer 188 on passive permeability of poorly soluble drugs across Caco-2 cell monolayers] *Eur J Pharm Biopharm*, **79**: 416-422 (2011)
 76. Lu G, Moore DJ. [Study of surfactant-skin interactions by skin impedance measurements] *Int J Cosmet Sci*, **34**: 74-80 (2012)
 77. Narkar Y, Burnette R, Bleher R, Albrecht R, Kandela A, Robinson JR. [Evaluation of mucosal damage and recovery in the gastrointestinal tract of rats by a penetration enhancer] *Pharm Res*, **25**: 25-38 (2008)
 78. Lv FF, Li N, Zheng LQ, Tung CH. [Studies on the stability of the chloramphenicol in the microemulsion free of alcohols] *Eur J Pharm Biopharm*, **62**: 288-294 (2006)
 79. Sha X, Yan G, Wu Y, Li J, Fang X. [Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells] *Eur J Pharm Sci*, **24**: 477-486 (2005)
 80. Frijlink HW, De Boer AH. [Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery] *Expert Opin Drug Deliv*, **1**: 67-86 (2004)
 81. Bisgaard H. [Delivery of inhaled medication to children] *J Asthma*, **34**: 443-467 (1997)
 82. Ram A, Singh SK, Singh VP, Kumar S, Ghosh B. [Inhaled carbenoxolone prevents allergic airway inflammation and airway hyperreactivity in a mouse model of asthma] *Int Arch Allergy Immunol*, **149**: 38-46 (2009)
 83. Su YC, Peng HJ, Wang SR, Han SH, Tsai JJ. [Effects of BCG on ovalbumin-induced bronchial hyperreactivity in a guinea pig asthma model]

- J Microbiol Immunol Infect*, **34**: 25-34 (2001)
84. Zhu MM, Zhou QH, Zhu MH, Rong HB, Xu YM, Qian YN, Fu CZ. [Effects of nebulized ketamine on allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats] *J Inflamm*, **4**: 10 (2007)
 85. Zuberi RI, Apgar JR, Chen SS, Liu FT. [Role for IgE in airway secretions: IgE immune complexes are more potent inducers than antigen alone of airway inflammation in a murine model] *J Immunol*, **164**: 2667-2673 (2000)
 86. Misaka S, Sato H, Yamauchi Y, Onoue S, Yamada S. [Novel dry powder formulation of ovalbumin for development of COPD-like animal model: Physicochemical characterization and biomarker profiling in rats] *Eur J Pharm Sci*, **37**: 469-476 (2009)
 87. Fukaya H, Iimura A, Hoshiko K, Fuyumuro T, Noji S, Nabeshima T. [A cyclosporin A/maltosyl-alpha-cyclodextrin complex for inhalation therapy of asthma] *Eur Respir J*, **22**: 213-219 (2003)
 88. Chung KF. [Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease] *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **4**: 619-625 (2005)
 89. Bechstein WO. [Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management] *Transpl Int*, **13**: 313-326 (2000)
 90. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. [Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies] *Curr Opin Crit Care*, **7**: 384-389 (2001)
 91. Niven RW. [Toward managing chronic rejection after lung transplant: the fate and effects of inhaled cyclosporine in a complex environment] *Adv Drug Deliv Rev*, **63**: 88-109 (2010)
 92. Groves S, Galazka M, Johnson B, Corcoran T, Verceles A, Britt E, Todd N, Griffith B, Smaldone GC, Iacono A. [Inhaled cyclosporine and pulmonary function in lung transplant recipients] *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, **23**: 31-39 (2010)
 93. Liu X, Lu M, Guo Z, Huang L, Feng X, Wu C. [Improving the chemical

- stability of amorphous solid dispersion with cocrystal technique by hot melt extrusion] *Pharm Res*, **29**: 806-817 (2011)
94. Xu M, Zhang C, Luo Y, Xu L, Tao X, Wang Y, He H, Tang X. [Application and functional characterization of POVACOAT, a hydrophilic co-polymer poly(vinyl alcohol/acrylic acid/methyl methacrylate) as a hot-melt extrusion carrier] *Drug Dev Ind Pharm*, **40**: 126-135 (2014)
 95. Onoue S, Kojo Y, Suzuki H, Yuminoki K, Kou K, Kawabata Y, Yamauchi Y, Hashimoto N, Yamada S. [Development of novel solid dispersion of tranilast using amphiphilic block copolymer for improved oral bioavailability] *Int J Pharm*, **452**: 220-226 (2013)
 96. Wada M, Jinno H, Ueda M, Ikeda T, Kitajima M, Konno T, Watanabe J, Ishihara K. [Efficacy of an MPC-BMA co-polymer as a nanotransporter for paclitaxel] *Anticancer Res*, **27**: 1431-1435 (2007)
 97. Ishihara K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. [Polymeric Lipid Nanosphere Consisting of Water-Soluble Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-*n*-butyl methacrylate)] *Polym J*, **31**: 1231 - 1236 (1999)
 98. Alam MA, Ali R, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM. [Solid dispersions: a strategy for poorly aqueous soluble drugs and technology updates] *Expert Opin Drug Deliv*, **9**: 1419-1440 (2012)
 99. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. [Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications] *Int J Pharm*, **420**: 1-10 (2011)
 100. Sato H, Kawabata Y, Yuminoki K, Hashimoto N, Yamauchi Y, Ogawa K, Mizumoto T, Yamada S, Onoue S. [Comparative studies on physicochemical stability of cyclosporine A-loaded amorphous solid dispersions] *Int J Pharm*, **426**: 302-306 (2012)