

氏名	小藤 恭子
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第 284 号
学位授与の日付	平成 16 年 9 月 30 日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第 4 条第 2 項)
学位授与の題目	生体内分解性を有するキトサンゲルによる Drug Delivery System の開発
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	中垣 良一(自然科学研究科・教授), 宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授), 松下 良(自然科学研究科・助教授)

## 学 位 論 文 要 旨

A vehicle for controlled drug release was prepared using chitosan (CS), which is biocompatible and biodegradable. Spontaneous formation of spherical gel was observed when the CS solution was placed into an amino acid aqueous solution (pH 9.0). Controlled biodegradation and drug release from the CS gel were achieved by manipulating the CS properties. When the model anti-inflammatory drug prednisolone (PS) was injected subcutaneously into mice, it immediately started disappearing from the site. In contrast, sustained release of PS by CS gel allowed for near-constant levels of drug, and was able to prolong the duration of drug activity. This resulted in improved therapeutic efficacy against local inflammation as compared with that resulting from the injection of PS alone. Local supply of the minimum required dose results in a reduction in side effects by minimizing the transportation of the drug into the bloodstream. Furthermore, the possibility of using CS gel as a vehicle for the delivery of peptide and protein drugs was also investigated by preparing CS gel by chelation with metal ions, which resulted in a biodegradation-dependent drug release. Biodegradation of CS can be altered by changing the properties of CS. Hence, the use of metal ions to assist the formation of CS gel helped to achieve a greater control over model drug insulin release. Thus, CS gel appears to be promising as effective and biodegradable vehicles for the delivery of drugs.

近年、薬物治療の最適化を実現するため、体内動態の精密制御、及び、最適化を目的に、新規な製剤素材を用い、より効果的で、安全な Drug Delivery System (DDS) の開発が試みられている。なかでも、天然ムコ多糖類であるキトサン(CS)は、生体適合性、生体内分解性を有し、さらに、CS 自身が種々の薬理作用を有する等、製剤学的に大変ユニークな素因を有することから、優れた DDS 製剤素材として世界中から注目を集めている。しかしながら、これまで CS の製剤学的利用においては、製剤化に用いる試薬自身の毒性、それらを取り除くための洗浄過程での薬

物の漏出、生分解能の消失、有機溶媒や強アルカリ条件下による薬物の失活等の問題点があり、DDS 基剤としての利用度が制限されてきた。そこで、本研究では、生体適合性に優れた CS 製剤の実現のため、新たな製剤化法の開発を試み、得られた製剤について、その製剤学的機能を評価し、さらに CS 製剤の臨床応用への可能性について検討した。

## 1. CS の性状

CS は、カニ等の甲殻の成分であるキチン (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose の重合体) を部分的に脱アセチル化することにより得られる。CS は、キチン種や脱アセチル化時の条件等により、各々分子量、脱アセチル化度、アセチルグルコサミン配列等の物性が異なり、通常、分子量: 数千-数百万 Da、脱アセチル化度: 50-100% の範囲でそれらが任意に組み合わせられ、多くの種類が存在している。CS の各物性の相関性は低く、しかしながら、それらの物性は製剤学的特性に大きく影響を与える因子となることから、まず、それら物性の明確化を行った。

## 2. CS を用いた薬物保持担体の調製

CS は、弱酸との塩形成により水溶性を示す。CS 溶液をアルカリ水溶液中へ滴下すると、CS のアミノ基からの弱酸の遊離によりゲル化する。CS の pKa は約 6.5 であるが、その高分子特性のため、精製水中では  $\text{pH} \geq 12.5$  でなければ瞬時にゲル化できず、安定したゲルマトリックス(球状ゲル)を呈しない。しかしながら、水系条件下における pH 変化に起因するゾルーゲル転移が、系中に共存するアミノ酸濃度により、顕著に影響を受けることを見

出し、アミノ酸添加濃度上昇に伴い、球状ゲル形成可能な水溶液の pH が低下することを確認した(Fig. 1)。この現象は、アミノ酸に限らず、アミノ基を有する化合物(例えば、塩化アンモニウム等)の添加によっても同様に観察され、調製溶液における多量のアミノ基の存在により、CS のアミノ基からの弱酸の遊離が速やかに行われ、より低い pH 条件下において CS が瞬時にゲル化するものと考えられた。この緩和な水系条件下での新規な CS ゲル調製法の開発により、生体適合性に優れた素材のみによる CS の製剤化を実現した。

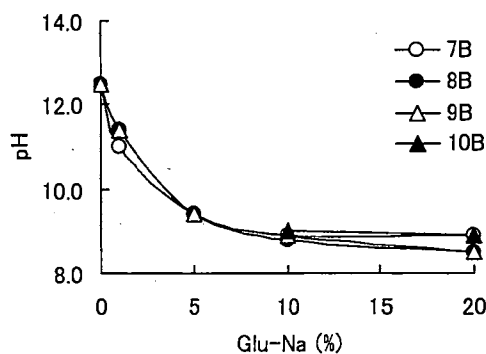


Fig. 1. Effect of sodium glutamate addition into preparative medium on the pH of gelation. Deacetylation degree of CS: 7B(70%), 8B(82%), 9B(91%), 10B(100%)

### 3. CS ゲルの製剤学的機能の評価

#### (a) CS ゲルからの薬物放出挙動とその制御

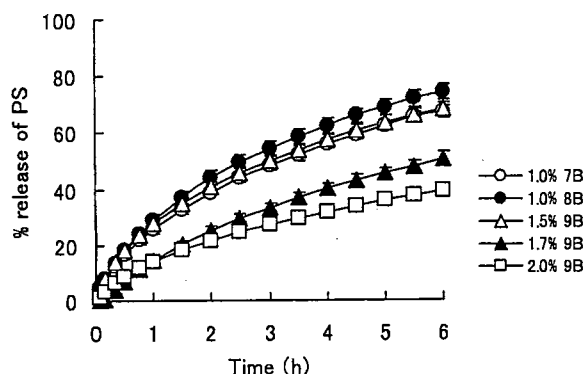


Fig. 2. The *in vitro* release profiles of PS from CS gel beads.

CS gel beads were prepared in 10% glycine aqueous solution (pH 9.0) for 25 min.

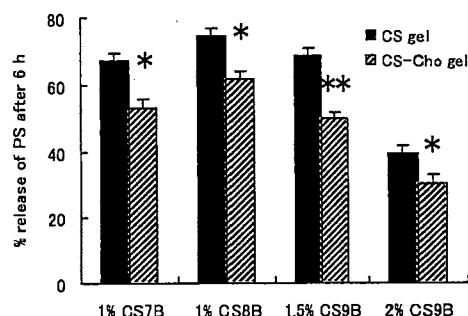


Fig. 3. Effect of chondroitin sulfate (Cho) treatment on the release of PS after dissolution test for 6 h.

CS hydrogel was modified in 1% Cho aqueous solution for 6h. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : significantly different from CS gel without Cho. (Student's *t*-test).

モデル薬物プレドニゾロン(PS) は、10% グリシン水溶液 (pH 9.0) 中で調製した CS ゲルへの固定化により徐放化された (Fig. 2)。この CS ゲルからの薬物の放出は、Higuchi 式に従い、CS ゲルマトリックスからの薬物の拡散により制御されることが示唆された。さらに、CS の種類や濃度の変化、または、アニオン性のムコ多糖類であるコンドロイチン硫酸を用い、カチオン性の CS と静電的複合体を形成させることにより、薬物放出挙動をコントロールすることが可能であった (Fig. 3)。また、CS ゲルからの薬物放出挙動は、固定化する薬物の溶解度や CS と薬物との相互作用等によっても影響された。

#### (b) CS ゲルの生体内分解挙動

CS の lysozyme による分解は、CS の物性、主に脱アセチル化度に依存し、脱アセチル化度が大きいものほど分解は抑制される傾向が示された (Fig. 4)。生体内においても、CS ゲルは確実に分解され、脱アセチル化度に依存した生分解挙動が観察された (Table 1)。また、コンドロイチン硫酸修飾により、生分解を抑制できることが示された。

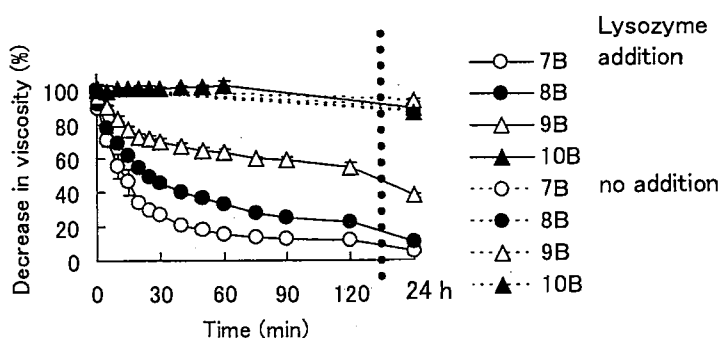


Fig. 4. Change of viscosity of CS solution in the presence of lysozyme.

なお、ゲル埋め込みによる炎症等は観察されず、CS ゲルの優れた生体適合性が示唆された。

Table 1. Effect of gel species on the number of gel beads remaining after implantation

After implantation (d)	1% CS7B		1% CS8B		1.5% CS9B		2% CS9B	
	CS	CS-Cho	CS	CS-Cho	CS	CS-Cho	CS	CS-Cho
1	3	5	5	5	5	5	5	5
3	0	1	0	4	5	5	5	5
5	-	0	-	0	4	5	5	5
7	-	-	-	-	4	5	4	4
14	-	-	-	-	2	5	1	5
28	-	-	-	-	0	5	0	5

CS: CS gel, CS-Cho: CS gel modified by chondroitin sulfate (Cho). Single bead was implanted into the air pouch of a mouse. Data represent the number of gel beads that remained and maintained their shape. (n=5).

#### 4. CS 製剤の応用

##### (a) 関節炎治療を目的とした関節腔内投与製剤

人口の高齢化に伴い、変形性関節炎等による関節炎の患者が増加傾向にある。このような疾患に対し、薬物の直接的な作用と全身性副作用の回避を目的に、副腎皮質ホルモン剤が関節腔内に投与される場合がある。しかしながら、投与部位からの薬物の消失が速やかで、十分な治療効果が得られない場合がある。また、投与直後には関節腔内の薬物濃度が高くなるため、軟骨組織への傷害や、薬物の血中への移行による全身性副作用の発現も懸念される。そのため、これら薬物の供給を量的、及び、時間的に制御し得る製剤の開発が望まれている。CS ゲルは、関節腔内に投与された場合、薬物保持担体としての役割を終えた後、生分解され消失し、さらに、CS 自身、または、その分解物が軟骨修復機能を示すことが期待できることから、関節炎治療を目的とした抗炎症薬 delivery のための優れた製剤素材と成り得る。そこで、CS ゲルの関節炎治療を目的とした関節腔内投与製剤としての可能性について検討した。マウス背部皮下に作製した空気嚢内に、抗炎症薬 PS 含有 CS ゲル、または、PS 懸濁液を投与し、経時的に血液中、空気嚢内、ゲル中に存在する PS 量を測定することにより、生体内におけるゲルから放出された PS の挙動について検討した。PS を単独で投与した場合、PS は難水溶性であるにも関わらず、容易に空気嚢内液に溶解し、空気嚢内から速やかに消失した。また、CS 等の高粘度物質の共存下においても、PS の滞留性向上は不可能であった。一方、PS を CS ゲル内に保持させた場合、適用部位に一定量の PS を長期間持続的に供給することが可能であった (Fig. 5a)。また、PS 単独投与時においては、投与直後に高い血中 PS 濃度が確認されたが、CS ゲルを用いた場合には、PS は血中にほとんど検出されず、全身性副作用を回避できる可能性も示された (Fig. 5b)。さらに、PS 単独投与 1 日後には、PS は投与部位からほとんど消失していたのに対し、PS を CS ゲル内に保持させた場合には、投与 3 日後においても、50% 以上の PS がゲル内に残存しており、その後も PS が適用部位に持続的に供給されることが確認された (Fig. 5c)。また、この生体内での薬物の供給は、CS 種の選択や、CS ゲル

のコンドロイチン硫酸修飾等によるゲルの生分解、及び、ゲルからの薬物拡散のコントロールにより制御が可能であった。

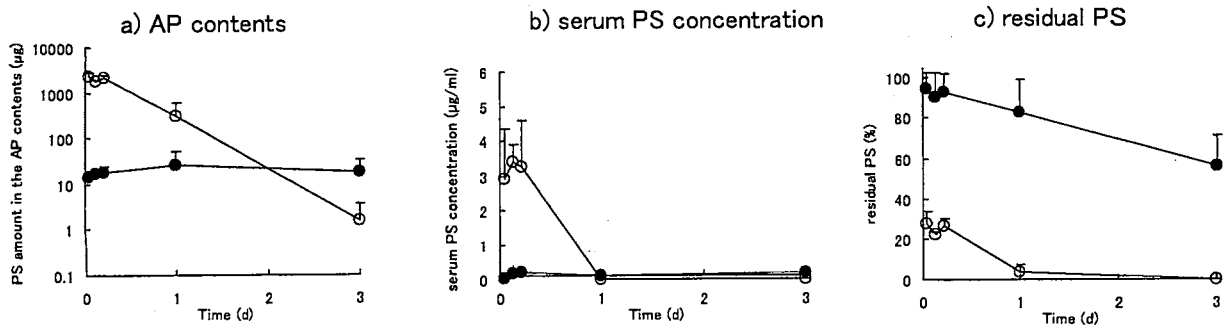


Fig. 5. Profiles of PS after implantation of CS gel beads retaining PS or injection of PS suspension with injection of carrageenan (CA) solution.

●: CS gel bead retaining PS (8.3 mg), ○: PS (8.3 mg) suspension. \* Residual PS in CS gel beads: PS in AP after release from CS gel beads was excluded.

現在臨床では、関節炎に対し副腎皮質ホルモン剤を単独で関節腔に投与するパルスの投与方法が行われている。局所炎症に対し薬物を炎症部位に滞留させる療法の、薬物を単回投与するパルス療法に比べ、有用であるかは明らかではない。そこで、CSゲルを用いた薬物放出制御

による局所炎症治療効果を薬物単回投与による場合と比較検討した。マウス背部皮下に作製した空気嚢内に起炎剤であるカラゲニン(CA)を投与することにより炎症を惹起させた。PS含有CSゲル、またはPS懸濁液を局所炎症部位に投与し、各種炎症指標(空気嚢内滲出液量、空気嚢内蛋白量、エバンズブルーの血管透過性、LDH活性、MPO活性、組織学的所見)の測定により、局所炎症治療効果を評価した。測定した全ての炎症指標において、CSゲルによりPSを持続放出させることにより、PS単回投与時に比べ、より効果的に炎症を抑制できることが示され、局所炎症治療に対するCS製剤の有用性が明らかとなった。

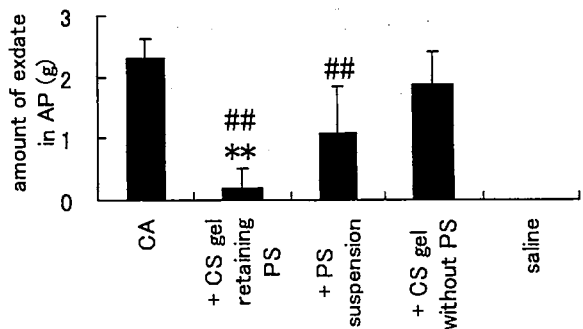


Fig. 6. Evaluation of therapeutic efficacy of CS gel retaining PS on amount of exudate in AP at 3 d after implantation and injection of CA solution. ## $p < 0.01$ : significantly different from CA, \*\* $p < 0.01$ : significantly different from PS suspension.

#### (b) ペプチド及び蛋白性薬物放出制御製剤

生理活性ペプチドや蛋白性の薬物は、優れた薬効を有しながらも、生体内で活性を失いやすいため、これら薬物を効率よく標的部位に送達する担体の開発が望まれている。しかしながら、これら薬物は水溶性が高く、また、失活しやすいことから、これまで製剤への保持は困難とされてきた。緩和な水系条件下によるCS製剤の調製は、これら薬物の活性の保持と、蛋白性薬物のCSとの

相互作用による固定化が期待できる。そこで、CS ゲルを用いた蛋白性薬物放出制御の可能性について、インスリンをモデル薬物として検討を行った。蛋白性薬物は比較的水溶性が高いにも関わらず、CS と静電的相互作用を有することから、アミノ酸水溶液中で調製した CS ゲル内に固定化され、徐放化されることが確認された。また、コンドロイチン硫酸修飾により、さらなる放出制御が可能であった。また、ゲル内に固定化されたインスリンの活性は保持され、糖尿病マウスの血糖値を確実に低下させることが確認された。この蛋白性薬物-CS の相互作用に起因する放出特性の制御を目的に、金属イオンが、CS のアミノ基と錯体を形成し、さらに、蛋白性薬物の安定化にも寄与することに着目し、金属イオンを利用した新たな CS ゲル製剤を考案した。CS-金属イオン錯体形成能は金属種により異なり、銅が最も強い形成能を示した。また、ゲル形成は、CS の粘度、及び、金属イオンとの結合部位である CS 分子内のアミノ基の割合(脱アセチル化度)によっても影響された。ゲル中への金属イオンの取り込みは、調製溶液の金属イオン濃度上昇に伴い直線的に増加し、また、脱アセチル化度が大きい CS ほど多くの金属イオンを取り込んだ。このゲル内で、CS-インスリン-金属イオンの3者が同時に相互作用することにより、インスリンは100%固定化され、マトリックスからの拡散によってはほとんど放出されないことが確認された。また、この拡散は、銅イオンの取り込み量と相関し、銅の取り込み量が多い場合ほど抑制された (Fig. 7)。インスリン含有 CS-金属イオンゲルを糖尿病マウス皮下に投与すると、血糖値が徐々に低下し、インスリンがゲルから確実に放出されることが確認された。また、生分解が遅い CS9B ゲルを投与した場合、より長期間血糖値降下作用が持続し、インスリン単独投与時に比べ、AUC、及び、MRT が約50倍に増大した (Table 2)。これらの結果より、インスリンは CS ゲルの生体内分解に伴い放出され、CS 種の選択により、製剤の生体内分解挙動を制御することにより薬物放出をコントロールできることが明らかとなり、新規な蛋白性薬物放出制御のための CS 製剤を実現した。

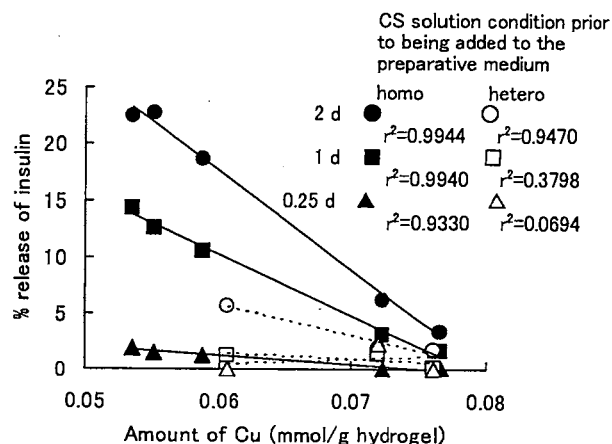


Fig. 7. Relationship between the percentage of insulin released after 0.25, 1 and 2 d from CS gel beads and the amount of Cu retained in CS gel matrix.

$r^2$ : correlation coefficients (subjected to least-squares fitting).

Table 2. Pharmacokinetic parameters of blood glucose after injection of insulin suspension or implantation of CS gel beads containing insulin into diabetic mice.

	Insulin suspension	1%CS7B	2%CS9B
AUC <sub>(0-360 h)</sub> (mg·h/dl)	2072.0±754.1	24284.1±4817.8*	97222.5±20814.1 <sup>#</sup>
D (%)	0.96±0.35	11.24±2.23*	45.01±9.64 <sup>#</sup>
MRT (h)	3.2±0.6	74.3±1.9*	162.7±24.0 <sup>#</sup>
T <sub>min</sub> (h)	2.3±1.0	24.0±0.0*	140.0±31.9 <sup>#</sup>

AUC: areas under the reduction of blood glucose concentration-time curve from 0 to 360 h; D: extent of reduction of blood glucose levels (D) from 0 to 360 h assessed from the ratio of AUC/AUC<sub>tot</sub> (total area under the baseline (blood glucose level: 600 mg/dl) - time from 0 to 360 h was calculated); MRT: mean residence times obtained through the ratio of AUMC (area under the first moment curve from 0 to 360 h)/AUC. T<sub>min</sub>: minimum blood glucose concentration times. \*p<0.01: significantly different from insulin suspension. <sup>#</sup>p<0.01: significantly different from CS7B gel beads.

### まとめ

緩和な水系条件下での CS 製剤化法の開発により、生体適合性に優れた CS ゲル製剤の調製を実現した。本 CS ゲルは、CS の物性の差異により薬物保持担体としての薬物放出制御能、生分解性等の機能を種々にコントロールでき、薬物の供給制御が可能なデバイスと成り得ることが示された。また、本 CS ゲルを用い、抗炎症薬を長期間持続的に供給することにより、局所炎症治療効果を改善し、同時に投与部位での急激な薬物濃度上昇を抑制することにより全身性副作用発現回避の可能性も示された。さらに、ペプチド・蛋白性薬物放出制御製剤としての有用性も確認され、CS ゲルの臨床応用の可能性が示唆された。本研究において開発した CS 製剤は、薬物治療の最適化を実現するための優れた DDS 素材として、高齢化に対応した医療や、癌治療、再生医療などの今後の医療において患者の QOL 向上に貢献することが期待できる。また、種々のユニークな特性を利用して、医療や食品分野のみならず、農業、化粧品など、様々な領域において貢献できるものとする。

## 学位論文審査結果の要旨

天然ムコ多糖類であるキトサン（CS）は、生体適合性と生体内分解性を有する安全なドラッグデリバリー製剤素材として注目を集めているが、CSを医薬品製剤として利用する際に発生する製剤化試薬の毒性、試薬を取り除く洗浄過程における薬物の漏出、有機溶媒や強アルカリ条件下における薬物の失活等の問題があるため、ドラッグデリバリーシステム（DDS）基材としての利用度が制限されていた。本研究は、CSの生体内分解性を活用したDDSの開発を試み、新しい発想に基づいた製法によりCSの球状ゲルの創製を完成させ、臨床応用への可能性を追求したものであり、以下に記述する成果を得た。

- 1) 水系条件下においてアミノ酸を共存させることによってゾルーゲル転移が影響を受けることを発見し、アミノ酸濃度の上昇に伴いより低いpH条件下で球状ゲルを形成させる新規なCSゲル調製法を開発した。
- 2) アニオン性高分子コンドロイチン硫酸とカチオン性CSゲルと静電的複合体を形成させることにより、ゲル内に含有させた薬物の放出速度のコントロールが可能であった。
- 3) 抗炎症薬プレドニゾン（PS）を含有させたCSゲルをマウス背部皮下空気嚢内に埋め込んだとき、一定量のPSを長時間放出し、PS単独投与に比べてより効果的に局所炎症を抑制するとともに、PSの血中移行を制限することが可能であった。
- 4) 銅イオンを共存させることによりインスリンを100%含有させて拡散による放出を完全に抑制したCSゲルを糖尿病マウス皮下に投与したとき、ゲルは皮下内分解により徐々にインスリンを放出し、長時間にわたり血糖降下作用を示した。

本研究により、安全性の高いCSゲル調製法が確立され、含有させた低分子薬物やペプチド性薬物の放出をコントロールすることが可能なDDS基材としてのCSゲルの開発に初めて成功した。本研究成果は、薬物治療の最適化を実現するための優れたDDSの開発に新しい道を拓くものであり、博士（薬学）に値するものと判定した。