

20030620

厚生労働科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発

平成15年度 総合研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成16（2004）年3月

目次

I	総括研究報告	
	ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発	1
	水島 裕	
II	分担研究報告	
1	たんぱく医薬のドラッグデリバリーシステムの開発	13
	上野 晃憲	
2	徐放機能とターゲティング機能を有したPLGAナノスフェアの 開発に関する研究	24
	石原 務	
3	免疫応答並びにワクチン化におけるナノ微粒子の応用に関する 研究	45
	檜垣 恵	
4	カルシウム系化合物を用いた薬物徐放性単体材料に関する研究	52
	田中 順三、生駒 俊之	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV	研究成果の刊行物・別冊	67

I. 総括研究報告

ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発

主任研究者

水島 裕

東京慈恵会医科大学 DDS研究所

研究要旨

前年度に続き、大きく分けて3つのテーマについて研究を行った。

- ① ターゲット効果と徐放効果を併せて持つナノ粒子DDS製剤
- ② 金属を含む無機塩のみによる徐放性製剤
- ③ 多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子を用いた徐放製剤である。

このうち①に関しては約200nmのPLA粒子封入ステロイド剤、②に関してはG-CSFの徐放製剤がいずれも製剤研究、薬物動態・薬効試験、安全性の点から十分臨床応用可能なものとの研究成果が得られており、既に大手製薬会社との開発を前提とした共同研究に入っている。多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子製剤については、今回の報告において詳細は触れないが、すでに他の研究機関で応用され始めている。

なお、分担研究者檜垣らによって行われているナノ粒子を用いたワクチンの検討は次年度大きく進歩する予定である。

A. 研究目的

これまではターゲット製剤と徐放製剤はそれぞれ別個に研究されていたが、①のような両者の性質を併せ持つ製剤が臨床上さらに有益との観点から本研究を進めている。また、活性たんぱくを中心としてその徐放製剤が利用できることの意義は極めて重要であり、これまでのPLGAやPEG製剤以外の徐放製剤を開発するというわれわれの研究が将来臨床的に重要な価値が得られるものと考えている。

B. 研究方法

分担研究者の報告の部分で一部述べられているが、前年度までは作製した①に相当するターゲット+徐放ナノ粒子におけるキャリアー・粒子径・薬物の種

類などについて検討を行ってきたが、本年度においても更にその研究を推進するとともに昨年度の再確認を行った。PGE1のナノ粒子への封入の研究もある程度進めているが、この報告書においては最も実用化に向けて研究が進んだステロイドのナノ粒子について以下に述べる。

まず、再確認することを兼ねて、ステロイドとして何がよいか、疎水性を増すための金属として何がよいか、キャリアとしてPLGA、PLAのいずれかが優れているか、また実際の製剤にする場合の遊離ステロイドの除去や濃縮の効率的な方法を見出すことなどについて研究を行なった。更に、動物実験においては、関節リウマチのモデルを用いて実験例数を増やし、有効性および持続性についての確実性を検討した。

次に、最終的な製剤に動物由来のたんぱくなどが入らないほうが好ましいことから、無機塩を用いる徐放製剤作製に関する研究を行った。本年度は、種々の無機物質を用い、前回一部報告したたんぱく質を含むものと同等ないしそれ以上製剤作製が可能となる組合せについて検討した。検討した試験としては、製剤作製法の検討、薬物動態試験、さらに薬効試験として末梢白血球数の変動や脾細胞中の幹細胞の数を測定などを行った。

また、金属を用いず水酸アパタイト、炭酸カルシウムの粒子中に薬物を封入する方法を分担研究者の田中、生駒らが更に検討を加えた。

C. 研究結果

(1) ステロイド封入ナノ粒子

この研究内容については、分担研究者の報告で一部が述べられているか、述べられていない点も含めて、以下に述べる。

まず、ステロイドの種類およびキャリアの種類の検討の結果として、最終的にはPLAに亜鉛で疎水化した燐酸ベタメタゾン封入製剤で、粒子径が約200nm以下であるものが適しているとの結果が得られた。もちろん現在得られている製剤の作製方法が最終的な最適条件であるというわけではないが、この製剤によっても臨床応用すれば、現在のステロイド療法をはるかに凌ぐ良い成績が得られると考えられる。これは、タイプIIコラーゲン関節炎やアシュバント関節炎に本ナノ製剤を対照のヘタメタゾンと比較して得られた実験結果からも強く示唆される。

製剤的検討として、無菌室で製剤作製が容易にできるような簡便な製造法・精製法について種々検討を行った。製剤化において最も問題となる点、すなわち作製ナノ粒子に含まれないフリーのベタメタゾンの除去方法と作製粒

子製剤の濃縮については、透析用の濾過器を用いることにより充分可能であるという結果が得られている。

ステロイドのナノ粒子製剤については、製品化することを念頭において、製薬企業との共同研究を開始している。

(2) G-C S Fの徐放製剤

我々が従来の製剤作製に使用したたんぱく質や多糖体を用いずに、主として塩化亜鉛・炭酸ナトリウム・燐酸ナトリウムといった無機イオンを用いてその適切な配合を検討した結果、これまでと同様な形態の製剤が作製することができた。また、マウス・ラットでの長期の徐放性を示す薬物動態の結果も得られ、更に薬理作用としても強い持続作用が示された。薬物動態については、分担研究者が述べているように、投与量によりやや異なったパターンを示すことも判明した。また、それに平行して、血中白血球の増加作用についても同様の徐放性ならびに持続性を示す結果が得られている。最終的には大動物およびヒトにおける至適な投与量を決定しなければいけないと考えられる。それに加えて、再生医療に重要な役割を果たす造血幹細胞に対する作用についての詳細は、分担研究者の報告にあるが、現行のG-C S F製剤で実施されている毎日投与する場合に比へ、本研究で作製した徐放製剤を1回投与する場合のほうが幹細胞の産生効果が強かったと結論されている。

この製剤については、製薬企業と共同開発の研究に向けての第一段階として共同で研究を推進しているところである。

(3) その他の研究

破傷風トキソイドやヒトγグロブリンなどのワクチン用の抗原やたんぱくをナノ粒子内に取り込ませる検討および樹状細胞など免疫細胞のナノ粒子の取り込みや抗体価の検討については、分担研究者の檜垣によって報告されている。このナノ粒子を用いたワクチンの検討は次年度大きく進歩する予定である。

また、水酸アパタイトもしくは炭酸カルシウムを用いた徐放製剤作製の基礎検討については、分担研究者の田中および生駒の研究によって、1～10 μmの球形粒子の作製が可能になったこと、X線解析によって構造決定がされたこと、亜鉛を含有させることにより多孔面積の増加が生じたたんぱく結合性増加が増加することが示されている。ハイドロコルチゾン含有させて作製した炭酸カルシウム粒子の構造決定を行うと、作製条件によりハイドロコルチゾンの粒子へ取り込まれる量が異なってくるという結果、および多孔性粒子をハテライト型炭酸カルシウムで塞栓することによって薬物の超徐放性が得られることが期待できる結果などが得られている。

D. 考察

PGE1のターゲット徐放製剤・多孔性ハイドロキシアパタイト・炭酸カルシウム微粒子による徐放製剤・ナノ粒子のワクチンへの応用については、いずれも分担者の報告にあるように、その研究において進歩がみられている。これらの研究成果についての総合的な考察は次年度にまとめて行うとするが、本年度については臨床応用にかかなり近づいた①ステロイド封入ナノ粒子および②亜鉛を用いたG-CSFの徐放微粒子製剤について以下考察する。

① ステロイド封入ナノ粒子

ステロイド療法そのものについては近年に限ると著しく大きな改善・進歩があるとは言いがたいが、ステロイド薬は多くの炎症・免疫・アレルギー・血液疾患に対する治療薬として依然中心的な役割を占めている。薬剤そのもの、つまり新しい強力なステロイドの発見・製造についての進歩は今後も大きくは望めないところであろう。現在の時点では投与すると強い副作用が生じる可能性が高いことが知られているステロイドをナノ粒子の製剤にすることで、病変局所に特異的に集めて結果的に投与総量を減らすこと、また長期間の作用持続を達成することによって薬物の投与回数を減らすことが可能となるので、多くの患者にとって極めて有意義なものであると考える。即ち、ステロイドの徐放性ターゲット製剤の必要性・有用性が極めて高いことは、想像に堅くない。このような研究は本研究グループを除いて世界でも殆ど成功していないのが現状であろう。

上記もしくは分担研究者報告にあるように、本研究によって種々検討を加えた結果、燐酸ヘタメタゾン亜鉛を疎水化し有機溶媒に溶かしたPLAに溶解し水中で約200nm以下の粒子を作製することに成功した。このステロイドのナノ粒子は炎症部位にターゲットする結果が得られている。更に、*in vitro*の検討では一週間程度にわたって徐放が持続することが明らかにされている。臨床的には関節リウマチ以外の免疫・炎症・血液疾患などにも有効であろうが、まず関節リウマチのモデルとしてのタイプIIコラーゲン関節炎とアジュハント関節炎で検討したところ、対照のヘタメタゾンに比べて少なくとも3倍以上は効果が増大し、持続性も上昇する結果が得られている。したがって、本研究で作製したこの製剤は、十分なターゲット能および徐放性を併せ持っていると考えられる。また、製剤作製にあたり使用した材料は常にすべて認可されているものなので、実用化までの道のりは早いと考えられる。今後検討すべき最も重要な点は、GMP対応で無菌的に容易に製剤が創れるか否かという点と静脈内投与による万一の塞栓といった副作用発生の可能性をなくす点などであろうと考えている。前者については

腎透析用の透析器を使うなどの工夫により精製濃縮が可能であり、今後製品製造レベルにスケールアップができて考えている。これらの結果を基に現在大手製薬会社と開発に向けて共同研究を行っており、実用化の可能性は極めて高い。それによりステロイドの効果と副作用をかなり分離でき、しかも患者に負担をかけない1～2週間に1回の注射で済む製剤ができるものと考えている。

② G-C S Fは、抗がん剤治療のときの白血球減少になくなくてはならない治療薬であるとともに、薬物性無顆粒球症などに対しては救命的な役割を果たす薬物であり、薬物としての価値は高いものである。また、最近進歩の著しい再生医療においても、血液疾患ばかりでなく心筋梗塞その他の治療薬として有用であると考えられている。ところが、G-C S F自身の半減期が短いために、現行のG-C S F療法では効果の持続のために毎日皮下注射しなければならないが、また薬物動態の結果からみて現行では投与したG-C S Fの損失が大きいと思われる。そこでいくつかの企業においてポリエチレングリコール結合G-C S Fなどの徐放製剤が検討されている。しかし、この製剤では、多量必要なことやコストが高いことが欠点であり、また恐らくポリエチレングリコールによる何らかの副作用が生じる可能性が考えられている。したがって、現在使用されているG-C S Fそのものを副作用のない製剤の形で徐放することが望まれる。

本研究では、最終的に亜鉛、炭酸カルシウム、燐酸というほぼ問題のない無機物のみを使用して作製したG-C S F製剤の効果が一週間以上継続し、しかも再生医療に役立つ幹細胞の産生も従来の製剤での方法より強いと思われる製剤が作製された。この製剤作製を製品化へ向けてスケールアップすることについてもあまり問題になるころはなく、製剤としての画期性はやや乏しいとの批判はないわけではないが、実用化の点では極めて優れた製剤と考えられる。現在大手製薬会社2社と開発に向けた共同研究契約を結び共同契約を行っており、実用化の可能性はかなり強いと考えられる。

E. 結論

前年度に引き続き、申請時のテーマについて研究を推進した。このうち最も研究の進捗したものが、ステロイドの徐放性ターゲット剤とG-C S Fの徐放製剤である。

ステロイドナノ粒子製剤に関しては製剤設計と薬効試験がほぼ終了している。製剤としては、燐酸ベタメタゾンを亜鉛で疎水化し、PLA（ポリ乳酸）

に封入した約200nmのナノ粒子が現段階では最もすぐれているとの結論に達している。本製剤の大量生産や安定性についても技術的に恐らく問題はないところまで進捗している。また、動物試験における薬効を検討した結果、タイプIIコラーゲン関節炎とアジュバント関節炎で対照薬に比へ、優れたターゲティングおよび徐放効果を示した。

G-CSF徐放製剤に関しては、前年度使用していた血清アルブミンや酸性多糖体を用いずに、亜鉛と無機塩のみによる徐放性製剤の開発に成功した。現行のG-CSF水溶性製剤の5日間連続皮下投与する場合に比べて、本製剤の1回のみ投与の場合のほうが血中好中球増加作用および脾臓幹細胞増加作用において優れていることが動物実験の結果から認められた。

なお、上記の2製剤に関しては既に開発を目的として大手製薬会社と共同研究に入っている状況にある。

このほかの製剤の開発、即ちPGE1の徐放性ターゲット製剤の開発、ヒトロキシアパタイト・炭酸カルシウム微粒子による徐放製剤の開発、およびナノ粒子のワクチンへの応用については来年度も継続して研究推進を計り、最終結果を出したいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 水島 裕 細胞は薬か? 臨床医学 19(4)、296-298 2003
- 2 水島 裕 中国の医薬品開発における日本の協力 日中医学 17(6) 2-8 2003
- 3 水島 裕 21世紀のDDS 血液・免疫・腫瘍 8(2) 109-111 2003-2004
- 4 水島 裕 再生医療 官・学・産の取り組み 序 炎症と免疫 11(2) 115-116 2003
- 5 水島 裕 リポPGE1製剤開発から20年 Drug Delivery System 18(5) 426-430 2003
- 6 生駒俊之、田中順三 自己組織化機構による骨・軟骨系複合材料の開発 バイオミメテックス法 日本複合学会誌 29(4) 123-128 2003
- 7 Kanazawa H, Okada A, Higaki M, Yokota H, Mashige F, Nakahara K

- Stereospecific analysis of Omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype J Pharma Biomed Anal 30 1817-1824 2003
- 8 檜垣 恵 炎症と栄養 Food Style 21 7 39-42 2003
- 9 檜垣 恵 乾癆性関節炎の臨床 リウマチ科 31 94-100 2004
- 10 Kanazawa H, Okada A, Igarashi E, Higaki M, Miyabe T, Sano T, Nishimura R Determination of midazolam and its metabolite as a probe for Cyp3A4 phenotype by liquid chromatography-mass spectrometry J Chromatography A 1031 213-218 2004
- 11 Takatsu M, Higaki M, Kinoshita M, Koizuka I Ear involvement in patients with Rheumatoid Arthritis Otol Neurotol in press
- 12 T Ikoma, H Kobayashi, D Walsh, S Mann, J Tanaka Microstructure and Mechanical Properties of Fish Scale of Pagrus Major J Structural Biology 142(3) 327-333 2003
- 13 Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J Walsh D, Mann S Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromis niloticus Int J Biol, Macromol 32(3-5) 199-204 2003
- 14 Chinenn N, Tamihara M, Nakagawa M, Shinozaki K, Yamamoto E, Mizushima Y, Suzuki Y Action of microparticles of heparin and alginate crosslinked gel when used as injectable artificial matrices to stabilize basic fibroblast growth factor and induce angiogenesis by controlling its release J Biomed Mater Res 67A(1) 61-68 2003

2. 学会発表

- 1 水島 裕 (特別講演) 再生医療と行政「文部科学省の政策と今後の産官学連携の展望」第19回日本組織工学会 6月12日 東京
- 2 水島 裕 (特別講演) 新しいDDS製剤の基礎研究 第19回日本DDS学会、6月20日 京都
- 3 水島 裕 (特別講演) 末梢血管の再生医療 第20回日本サーモロジー学会 6月21日 東京
- 4 水島 裕 (特別講演) 再生医療と臨床薬理 第24回日本臨床薬理学会年会 12月12日 横浜
- 5 水島 裕 (招待講演) Innovative nano-technology for drug delivery system 7th US-Japan Symposium on Drug Delivery System 12月18日 ハワイ (米国)
- 6 水島 裕 (シンポジウム) オールトランスレチノイン酸 (ATRA)

- のナノ粒子化による加齢皮膚再生効果の増強 第24回日本炎症・再生医学会 11月26日 京都
- 7 石原務、出雲信夫、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕 水溶性薬物を封入した亜鉛/PLGAナノスフェアの開発、第19回日本DDS学会、6月19日 京都、Drug Delivery System, 18(3), 308P, 2003
 - 8 出雲信夫、石原務、福慶あゆみ、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕 ステロイド封入亜鉛/PLGAナノスフェアを用いた抗炎症作用、第19回日本DDS学会、6月19日 京都、Drug Delivery System, 18(3), 308P, 2003
 - 9 高津光晴、檜垣恵、肥塚泉、田村幸久、三宅信冒、坪井声示。関節症における生化学マーカーの検討。第47回日本リウマチ学会 2003年4月
 - 10 生駒俊之、田中順三、水島裕 “炭酸カルシウムを用いた薬物徐放材料の開発” 第25回日本バイオマテリアル学会大会、2003,12,17、大阪
 - 11 生駒俊之、東紀史、田中順三“アパタイト/多糖類複合球形微粒子の合成” 第7回生体関連セラミックス討論会、12月4日、東京
生駒俊之、田中順三“亜鉛含有アパタイト多孔質微粒子の合成”シンポジウム 分子複合系の構築と機能、12月3日、東京
 - 12 T Ikoma, J Tanaka “Spherical microparticle of calcite covered with hydroxyapatite” International Japan-Korea Seminar on Ceramics, 11月20-22日, Shimane
 - 13 生駒俊之、田中順三“リン酸カルシウム/生体高分子複合界面設計と生体材料” 第16回DVXa研究会、8月06-08日、筑波
 - 14 T Ikoma, I Sekiya, T Muneta, J Tanaka “Porous materials of hydroxyapatite/biopolymers nanocomposites through self-organization”, 6月14-17日、The 5th International Conference on Intelligent Materials, Penn Stater Conference
 - 15 出雲信夫、石原務、福慶あゆみ、榎本真理子、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕。新規ステロイドDDS製剤（PLGA/PLA ナノスフェア）の持続性抗炎症作用。第24回日本炎症・再生医学会 11月26日、京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1 徐放性ターゲティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤とその製造法（テーマ 徐放性ナノステロイド） 特願2003-84695（2

- 003年3月26日) 発明者 石原務、水島裕
- 2 薬物封入多層構造微粒子 (テーマ 炭カルナノ粒子) 特願2003-103215 (2003年4月7日) 発明者 生駒俊之、田中順三、水島裕
 - 3 亜鉛含有徐放性組成物、その製剤及びその製造法 (テーマ G-CSF 特願2003-126503 (2003年5月1日) 発明者 木村道夫、江藤智子、水島裕
 - 4 静脈注射用組成物、その製造法、およびその製剤 (テーマ 徐放性ナノステロイド) PCT/JP03/06571 (2003年5月27日) 発明者 石原務、水島裕
 - 5 徐放性組成物、その製造方法およびその製剤 (テーマ HApナノ粒子) PCT/JP03/07251 (2003年6月9日) 発明者 水島裕、高木幸江、羽木智美、生駒俊之
 - 6 レチノイン酸ナノカプセル (テーマ レチノイン酸ナノ粒子) 特願2003-172493 (2003年6月17日) 発明者 山口葉子、五十嵐理慧、水島裕、武永美津子、中村なつみ
 - 7 薬物の徐放性微粒子製剤及びその製造方法 (テーマ HApナノ粒子) 特願2003-173431 (2003年6月18日) 発明者 水島裕、小川泰亮、田中順三、生駒俊之
 - 8 生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる外用剤 (テーマ 炭カルナノ粒子) 特願2003-312031 (2003年9月3日) 発明者 水島裕、上野幸生、山口葉子、五十嵐理慧、鈴木潤、石原務
 - 9 脂溶性薬物封入微粒子、その製造法およびそれを含有する製剤 (テーマ HApナノ粒子) 特願2003-323287 (2003年9月16日) 発明者 水島裕、石原務、嶋田恵美
 - 10 多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子の粒径の調整方法、および当該方法により得られるナノ粒子 (テーマ レチノイン酸ナノ粒子) PCT/JP03/13180 (2003年10月15日) 発明者 山口葉子、五十嵐理慧、水島裕、武永美津子、中村なつみ
 - 11 多価金属無機塩被覆レチノイン酸ナノ粒子含有組成物 (テーマ レチノイン酸ナノ粒子) PCT/JP03/13181 (2003年10月15日) 発明者 山口葉子、五十嵐理慧、水島裕、武永美津子、中村なつみ
 - 12 INTRAVENOUS NANOPARTICLES FOR TARGETING DRUG DELIVERY AND SUSTAINED DRUG RELEASE (テーマ 徐放性

ナノステロイド) PCT/JPO4/
1日) 発明者 石原務、水島裕

(2004年3月1

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

1 水島裕 中華人民共和国国際科学技術協力賞 2004年1月20日

II. 分担研究報告

たんぱく医薬のドラッグデリバリーシステムの開発

分担研究者 上野 晃憲 LTTバイオファーマ研究開発部

研究要旨

この研究においては、分担研究者らによって開発された方法によって作成した製剤が、どのような徐放性を示すのか、また生体において持続的な有効性を示すのか否かについて検討を行った。本年度においては、ペプチド医薬（G-CSF）を用いて製剤を作製して検討した。その結果、徐放性をもちまた有効性が示すたんぱく医薬の製剤を作製できる方法を示唆する実験結果が得られた。今後改良・改善を進めていく必要があるけれども、より徐放性のある有効なたんぱく医薬の製剤の作製に生かしていくことができる重要な情報であると考えられた。

A 研究目的

臨床で使用されているあるいは臨床開発が進んでいるタンパク医薬品にドラッグデリバリーシステムを導入した製剤化技術を開発し、それら医薬品の効果の増強や使用法の改善を図ることを目的とした。今年度においては、タンパク医薬としてG-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）の製剤を作製し、その徐放的効果について検討を行った。

G-CSFは、主としてガンの化学療法によって生じる好中球減少に対し用いられている。また、薬物性顆粒球減少症、再生不良性貧血、HIV感染症、造血細胞移植などにも用いられている。しかし、一般的には5日間の連続投与が行われており、投与を止めると直ちにその作用が減弱する。したがって、1回の投与で長時間作用が持続する製剤化が可能となれば、このG-CSFによる治療法が格段に改善されると考えられる。

これまでに酸性ムコ多糖（コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸など）とγ-グロブリンや血清アルブミンのような動物性タンパクとを用いて酸性条件（約pH3）で作製する水不溶性沈殿物（ムコ製剤）としてのタンパク医薬品が十分な徐放性を示すことを明らかにし、タンパク医薬の徐放性製剤の開発を試みてきた。しかしながら、動物性タンパクを用いての製剤化はいろいろな点で問題がある。そこで、動物性の材料を用いずに、無機化合物のみでタンパクの徐放性製剤の開発を試みた。

B. 研究の方法

(1) 製剤の作製方法の検討

水溶性有機酸塩と水溶性の多価金属イオンの塩とを混合すると水不溶性沈殿物が生じる。この性質を利用することにより、G-C S Fのような亜鉛結合性タンパク質での沈殿製剤作製を試みた。水溶性有機酸塩および水溶性多価金属イオン塩の種類を変え、またその組み合わせを変えることにより、効率の良い沈殿物製剤の作製法を検討した。更に、G-C S F、水溶性有機酸塩、水溶性多価金属イオン塩の最適な量比を検討し、効率の良い作製法を検索した。また、最適な組み合わせにおいても、その2種類の塩の添加順序の影響についても検討を加えた。

このG-C S Fの沈殿物を製剤化するにあたり、凍結乾燥を用いる方法を検討し、その条件について調べた。

作製された粒子の大きさやその均一性についても、作製された沈殿製剤の沈殿粒子について光学顕微鏡で観察を行った。

凍結乾燥して作製した製剤の安定性について、37℃で4週間保存して調べた。タンパクの構造変化が生じているのかを検討する目的で、G-C S FのELISAを用いてその濃度を測定した。

(2) 血中動態の検討

作製したG-C S F沈殿製剤を水溶液に懸濁した。この懸濁製剤は、皮下投与する注射針で投与可能であった。9.2 mg/kg、0.88 mg/kg、0.063 mg/kgの用量で皮下投与し、4日後まで採血してその血中濃度の時間的推移を調べた。その際に、この製剤化を行っていない現在用いられているG-C S F (溶液製剤)を0.12 mg/kgを投与して、同様に採血して、比較検討をおこなった。

投与した動物はddYマウス(7週令)で、その背部皮下に薬物を投与した。投与直後、1日後、2日後、3日後、4日後に眼底採血を行って血液を得た。薬物血中濃度の測定は、ELISAによる酵素免疫測定法によって行った。

(3) 持続的効果の検討

① 造血幹細胞増加作用

マウス脾臓幹細胞を用いて、G-C S F刺激によって発現してくる細胞マーカーのSc a-1が陽性となっている細胞数をフローサイトメトリーでカウントして、その作用を検討した。G-C S F無投与(コントロール)、現在用いられているG-C S F製剤(溶液製剤)、および当研究の方法に

よって作製したG-C S F沈殿製剤(懸濁製剤)の3者で作用を比較した。培養系に薬物を投与し、培養5日目と6日目でS c a - 1陽性細胞数を調べた。

② マウスにおける持続的効果

作製したG-C S F製剤を1mg/kg、0.1mg/kgを1回マウスの背部皮下に投与して、循環血液中の白血球数の推移を投与12日後まで調べた。また、この製剤化を行っていないG-C S F(溶液製剤)を0.2mg/kg/日の用量で5日間連続投与(投与総量は1mg/kg)してその作用を比較した。白血球数は、自動血球カウンターを用いて測定し、mm³あたりの数で表した。

C. 研究結果

(1) 製剤作製方法の検討

G-C S Fを効率的に共沈させるにあたりいろいろな有機酸塩を検討した。リン酸塩や炭酸塩で調べた結果、炭酸塩が良好な結果を示した。多価の金属イオンとしていくつかのイオン種について検討を行ったが、二価のイオンが良い成績を示した。その中でも、カルシウムイオンに比べて、遥かに亜鉛イオンが良い結果であった。酢酸亜鉛や塩化亜鉛では、G-C S Fの沈殿する効率には大きな差はなかった。炭酸塩の種類について検討を行った結果、炭酸水素ナトリウムが最も良い結果であった。また、亜鉛については、酢酸亜鉛が、炭酸水素ナトリウムと組み合わせたとき、良好な結果であった。さらに、それぞれの添加量、添加濃度についても検討を加えて、G-C S Fの沈殿化が最も生じる最適条件を設定した。この条件では、用いたG-C S Fのほぼ100%が沈殿するという結果である。

このG-C S F沈殿製剤を作製するに際して上記の炭酸塩と亜鉛イオンの添加順序による影響を調べた結果、どちらを先にG-C S Fと反応させても同じ結果が得られた。すなわち、添加する順序によらず、用いたG-C S Fの99%以上が沈殿物となることが明らかとなった。

この沈殿製剤を作製する際に用いる有機酸および金属イオンの組み合わせやその量比により、徐放性が異なってくるという結果も得ている。

以上のようにして作製した沈殿物を製剤化するために、凍結乾燥する条件について検討した。マンニトールを添加して凍結乾燥することで、沈殿物の凝集などが防御され、その後水溶液として懸濁することが可能であった。また、懸濁した製剤から、G-C S Fは100%回収された。更に、マンニトールを用いた製剤化を行っても、徐放効果には影響しないことも明らかとな

っている。

この沈殿物製剤を水溶液に懸濁したものを光学顕微鏡で観察し、その粒子の均一性や大きさについて調べた。その結果は、図1に示してあるように、極めて均一な粒子であり、懸濁した状態においても特に大きな凝集塊は観察されなかった。その個々の粒子径は、ナノメートルで表される大きさであった。薬物を投与する際に注射針を用いるが、懸濁の状態でも容易に注射することが可能であった。

この製剤を37℃で保存しても、4週間安定であることも明らかとなった。

(2) 血中濃度の動態

ddYマウスの背部皮下に投与して、眼底採血により採取した血液中の濃度を測定した。沈殿製剤化していない溶液製剤の場合、急激な血中濃度の減少が観察された。そのとき投与後1日目では測定可能であったが、2日後では測定限界以下にまでになった。

一方、沈殿化した製剤の場合、0.063 mg/kgの投与においても4日後でも測定可能であった。投与量を増加するにつれて、それに相応した高い血中濃度の結果となった。

結果として半減期について比較を行うと、溶液製剤の血中半減期に比べて、沈殿製剤化したものの半減期は3倍から4倍延長した。また、本研究で作製した沈殿製剤において、用いた投与量の範囲では、半減期はほぼ同じであった。

(3) 造血細胞に対する作用

マウスの脾細胞を採取して培養を行う際に、G-CSFを添加してSc a-1陽性細胞を出現させる実験を行った。現行で用いられているG-CSF（溶液製剤）または本研究により作製された沈殿懸濁製剤を培養液に入れて、実験開始後5日目および6日目でSc a-1陽性の細胞数について調べた。その結果、5日目においてはどちらのG-CSFを用いてもSc a-1陽性を示す細胞が無投与（コントロール）に比べて有意に増加した。しかし、6日目になると、溶液製剤ではSc a-1陽性細胞が急激に減少してコントロールレベルと差異がない程度にまでなった。沈殿懸濁製剤の場合は、6日後においてもSc a-1陽性細胞の増加が観察された。

この結果は、本研究で作製した沈殿懸濁製剤において、G-CSFが活性をもった状態で製剤化されていることを示すものである。また、この製剤化によりより作用時間の長い製剤となっていることも明らかである。

(4) マウスの血中循環白血球数に対する作用

現行のG-CSF製剤(溶液製剤)は、5日間の連続投与がなされている。したがって、臨床での使用に則した実験を計画し、G-CSFの溶液製剤を0.2mg/kgの投与量で5日間連続投与した。また、投与総量を同じにして、本沈殿懸濁製剤(1回のみ投与、1mg/kg)と比較した。

溶液製剤の5日間連続投与により、循環血液中の白血球数は増加した。投与中止翌日までは白血球の増加が認められたが、その後急激にその作用は消失して未投与群の白血球数にまで減少した。沈殿懸濁製剤は、投与後2日後で十分な効果が認められ、その後7日後まで循環白血球数の増加した状態が継続し続けた。その後徐々に減少していったが、元の白血球数レベルに戻ったのは投与後12日目であった。溶液製剤(0.2mg/kg、5回)と沈殿製剤(1mg/kg、1回)での白血球増加のピーク高さの強さを比較すると、ほぼ同等のものであった。

沈殿懸濁製剤を10分の一に減らして(0.1mg/kg、1回投与)検討を行った。その結果、循環白血球の増加が観察された。溶液製剤(0.2mg/kg、5回)の投与後3日後までの白血球増加の程度は、沈殿懸濁製剤(1mg/kg、1回)の場合と比べて、少し弱い程度であった。このとき作用持続の期間は短く3日目以降徐々に増加の作用が徐々に弱くなっていったが、元のレベルに戻るまでには1mg/kgのときと同様に5日を要した。

以上の結果は、炭酸水素ナトリウムと酢酸亜鉛の組み合わせで作製した沈殿製剤での結果である。図としては示さないが、酢酸亜鉛に代えて、塩化亜鉛を用いて作製した製剤においても実験を行ったが、同様の循環白血球数の増加が持続的であるという結果が得られている。

D. 考察

数多くの生理学的活性を有するタンパク質が医薬品として活用されている。また、強い生理学的活性を持つ新規のタンパク質についても、再生医学などの分野で利用すべく、医薬品として活用する試みがなされていて、今後も更に多くのタンパク質医薬品の開発が進められていくことは容易に推察される。しかしながら、タンパクを医薬品として利用・開発する際に問題点となるのは、経口剤としての開発は吸収・有効性の点で問題があって困難であるので、現時点ではほとんどの場合注射剤として用いざるを得ないことである。また、注射剤としてタンパクを投与したとしても、血中での分解などにより、それほど長い有効性の維持が示されないことがほとんどであることも、タン

パク医薬品を開発する上での克服すべき問題点である。

G-C S Fの場合も、その血中半減期の短さから、5日間の連日注射による投与が一般的に行われている。本研究における動物実験においても、現在使用されているG-C S F製剤を5日間連日投与して実験したが、この連日投与を中止すると直ちにその効果が消失してしまうことが示されている。このようなG-C S Fの注射剤の長期間の連日投与は患者に多大の苦痛をもたらしているのが現状である。そこで一回の投与で長期間薬効が期待できる製剤の開発が求められている。

現在、ポリエチレングリコール (P e g) のような大きな化学物質をタンパクに結合させ、血中からのクリアランスを遅延させることで薬効の持続化を図る技術が開発され、インターフェロンなどに応用されている。最近G-C S Fの用法の改善策としてポリエチレングリコールを化学的にG-C S Fに結合させたP e g-G-C S Fが開発された。ポリエチレングリコールを結合させることで血中半減期が延長し従来の連日投与が単回投与で済むような製剤となっている。しかしながら、G-C S Fと分子量が同程度の化学物質を結合させていることから、タンパク自身の生物活性は低下することを余儀なくされている。また、同時に大きな分子に対する新規の抗原性の問題も完全には否定し得ない。

本研究において作製したG-C S F製剤は、無機イオンと微量の金属イオンでG-C S F分子を修飾することなく攪拌によって沈殿化させたものである。実験結果に示したように、この沈殿製剤の粒子径はナノメートルで表される大きさであり、通常皮下投与で用いられる注射針を難なく通過して投与することができる。また、マンニトールを用いて、凍結乾燥品の形で製剤化しているが、E L I S Aで測定しても損失が認められないので、凍結乾燥による構造変化などは生じていないと考えられる。更に、この状態で長期間保存しても安定である。したがって、この製造法で製剤を作製しても十分であると考えている。現段階では実験室レベルでの製造スケールであるが、将来的に工業的生産スケールにするには、今後いくつもの問題点を克服する必要があるが、G-C S Fに特有な困難さは克服可能であると考えている。

細胞培養の実験において、このG-C S F沈殿製剤は現行の溶液製剤と同等の活性があることが示されている。したがって、沈殿化することによってG-C S Fタンパクの不可逆的な変性は生じていないために、タンパクあたりの活性低下が認められなかったと考えられる。この点では、活性低下が認められるP e g-G-C S Fに比べて優れているといえる。また、製剤化において使用したものは、安全性が確認され現在添加物として認められているものばかりであり、その使用量も認可の範囲である。さらに、化学的構造では、