

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成17(2005)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	3
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	15
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	27
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	39
檜垣 恵	
4. ハイロドキシアパタイト粒子を用いた製剤の開発	46
上野 晃憲、水島 裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別冊	61

# 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

今年度は、大きく分けて4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
- ④ として、ナノ粒子の免疫療法に関する研究である。

このうち①に関しては約200nmのPLA粒子封入ステロイド剤で検討を行い、②に関してはG-CSFの徐放製剤について検討を行った。いずれの製剤についても製剤研究、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。

③の多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子については、本研究で脂溶性薬物の注射に関する新しい治験が得られているほか、他の機関でもたんぱく医薬の徐放に応用されている。

④については、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今年度大きく進捗した。免疫療法の応用としては、DNAやSiRNAの細胞内移行、経皮吸収を目指して研究成績が得られている。

#### 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、

要旨の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るものと考えている。多孔性ハイドロキシアパタイト粒子は、今回の研究で初めて薬物療法への応用が始まったわけで、たんぱく医薬、脂溶性薬剤のDDSにどの程度の価値があるかを研究目的としている。また、ナノ粒子が細胞移行性が高まるとの成績から、これを遺伝子治療に応用する。

## B. 研究方法

総括報告書においては、研究方法については概略を述べるにとどめる。

まず、①のターゲットプラス徐放ナノ粒子ステロイド剤については、封入するものが脂溶性ステロイドがよいか、金属イオンを用いた水溶性ステロイドがよいかの検討を行って、更に金属塩の量など種々の条件を変えて検討した。その後、実用化を視野に入れてスケールアップによっても同じようなナノ粒子ができるかについて検討した。薬物動態・薬効試験では、ナノ粒子投与後の血中濃度・血中滞留性、ならびに肝臓・脾臓への蓄積性を検討した。

つぎに②のたんぱく徐放性製剤であるが、研究方法は製剤の作製について特にG-CSF、亜鉛、リン酸、炭酸の最適比について検討した。また最も問題となると思われる亜鉛による皮膚の刺激性についてマウスを用いて検討した。

③の多孔性ハイドロキシアパタイトについては、脂溶性薬物およびたんぱく医薬の封入法について検討した。④の免疫療法への応用については、感染患者や健康人のTNFなどのサイトカインの測定、免疫染色、末梢血の解析などの基礎検討を行った。

## C. 研究結果

### (1) ターゲット徐放性ナノステロイド製剤

前年度の報告にあるように、リン酸ベタメタゾンのように陰性荷電をもつステロイドに亜鉛を結合させたほうが脂溶性ステロイド剤に比べて優れていることをさらに確認した。つぎに、実用化を想定して、大量に製剤を作製することについてであるが、種々の工夫により臨床試験を行うために十分なくらいの量の製剤を作製しても、規格・安定性がほぼ同じであることを認めた。ベタメタゾンの血中濃度の変化から、本製剤のリン酸ベタメタゾンは体内でベタメタゾンに変換されること、またナノ粒子に封入したものは初期バーストがなく安定

して徐放されることが分かった。更に、ナノ粒子の体内動態解析により、炎症部位へナノ粒子がターゲットし、徐放することがローダミンなどの蛍光色素封入粒子を用いることにより明らかになった。一方、肝臓や脾臓の蓄積が強く、これが将来の問題点となりうることが示唆された。薬効試験では、おそらく遊離のベタメタゾンに比べ5倍程度抗炎症効果が強化されていることを認めた。

#### (2) 金属を含むG-CSFの徐放製剤

作製条件を変えて、沈殿製剤のG-CSFの取り込みを多くの実験結果から検討した。その結果、おそらくヒトに使う最終製剤はG-CSF 1mg、亜鉛ほぼ1mg、リン酸10ミリモル、炭酸20ミリモルがよいのではないかとの結果が得られた。皮膚への刺激性は、ほぼ亜鉛量により規定されているようであり、今後、もし上述の最終製剤の亜鉛量が多いとすれば、やや効果は犠牲にしても、亜鉛量の少ない製剤を作る必要がある。

#### (3) ハイドロキシアパタイト粒子製剤

多孔性ハイドロキシアパタイト粒子製剤の多孔の中に有機溶媒に溶解したエナント酸テストステロンやシクロスポリンAを封入して、CMCなどで懸濁化してから皮下注射したところ、現在使用されている製剤より優れた血中濃度のプロフィールを示した。また現在静脈内投与しか可能でない脂溶性薬剤にも応用できることが認められた。つぎにインターフェロンについてもこのハイドロキシアパタイト微粒子によく吸着し、徐放性が得られることが認められた。さらに同微粒子製剤は脂溶性薬剤の経口投与による経腸吸収製剤にも応用可能であった。

#### (4) ナノ粒子の免疫療法への応用

関節リウマチではI型インターフェロンを産生するTLR9陽性のPDCの減少が著明であった。SLEの炎症皮膚と異なり滑膜などの炎症局所への浸潤も認められず、慢性的な消耗もしくはリンパ節での停滞が考えられた。これらの機能の回復のためインターフェロン産生を誘導するプラスミドDNAを作成できた。皮下注射に加えて経皮塗布にて作用を発揮する可能性が示唆された。

### D. 考案

ステロイドのターゲット徐放製剤の意義およびG-CSFの徐放製剤の意義などについては前年度の報告書で詳しく述べたのでここでは省略する。ハイドロキシアパタイト多孔性粒子はカラムクロマトグラフィなど他の分野で応用されているが、これを薬物療法に応用したのはわれわれが初めてである。結果の項

および分担研究者が述べているように、本粒子にはたんぱく質がよく吸着するとともに脂溶性薬剤の皮下注射、静脈注射、経口投与に応用する可能性が示された。特にたんぱく製剤の吸着した粒子は、その後遊離を止める充填法を併用することにより、かなり長く生体内での徐放を示すことが認められ、われわれと共同研究契約を結んでいる他のベンチャーにより、成長ホルモンなどを中心に開発が進められ、おそらく来年度中には実用化に向けて大きく動き出すと思われる。これらもまずこの方法を考案したこの研究が重要であったことを示している。ナノ粒子の免疫療法に関する応用についても特にS i RNAが十分、目的とする細胞に取り込まれたり、経皮吸収することになれば、今後の治療学への応用が大いに期待される。

本年度が3年目なので、私どもの研究としても一区切りということになる。前々年度からも述べてきたことを総括すると、世界で初めてと思われるターゲットと徐放性機能を持つステロイドのナノ粒子についてはシオノギ製薬との共同研究も順調に進み、ひとつ問題となっている肝・脾への蓄積の問題があるが、おそらく本年半ばには正式の開発が始まり、非臨床試験へと移行するものと思われる。また、G-C S Fの徐放製剤についても、中外製薬との共同研究が進み、亜鉛の局所毒性が唯一の問題点である。それをクリアすればこれも本年度中に共同開発、つまり非臨床試験へと進むことを大いに期待している。これにヒドロキシアパタイト製剤の実用化が続こう。

以上述べたように本研究班のスタート以前から多少のデータはあったが、この3年で検討したものの大部分が実用化へと着々と進んでいると考えている。

## E. 結論

個々のテーマについては分担研究者の結論の項を参考にされたい。簡単にまとめると、ターゲット徐放性ナノステロイド剤については、大量生産の方法でもこれまでと同様な規格・安定性が得られ、動物実験でおそらく5倍近い抗炎症作用が認められた。問題点としては、肝臓・脾臓へのステロイドの長期蓄積であるが、臨床的には問題ないものと思われる。G-C S Fの徐放製剤であるが、亜鉛の局所毒性にやや問題点はあるが、そのほかの安全性に問題はなく、また現投与方法以下のG-C S Fで、しかも一回注射で十分の効果が認められることが示された。多孔性ヒドロキシアパタイトの粒子に脂溶性薬剤が封入でき、皮下、静注、経口のいずれの投与ルートにも応用されることが認められた。また、たんぱく医薬品もよく吸着し、徐放製剤に応用できることが示された。ナノ粒子を用いることにより、将来S i RNAの細胞内移行など免疫療法に応用されることが示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 上野晃憲、水島 裕 医療におけるナノテクノロジー Annual Review 呼吸器 2005、pp 58-63、中外医学社 2005
2. Tsutomu Ishihara, Nobuo Izumo, Megumu Higaki, Emi Shimada, Tomomi Hagi, Lisa Mine, Yasuaki Ogawa, and Yutaka Mizushima, Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile, Journal of Controlled Release (in press)
3. 出雲信夫、石原務 新規ステロイド DDS 製剤 PLGA/PLA ナノスフェア 医学の歩み 209(3) 184-185 (2004)
4. 石原務、出雲信夫、水島裕 ナノ微粒子製剤の開発とその DDS への応用 Pharm Tech Japan 20(13) 2621-2627 (2004)
5. 石原務 徐放性ナノ微粒子製剤の開発 Drug Delivery System 19(2) 136-137 (2004)
6. 石原務、出雲信夫、檜垣恵、水島裕 新しく開発中の薬剤①-ナノステロイド- 炎症と免疫 13(2) 143-147 (2005)
7. Kanazawa H, Okada A, Igarashi E, Higaki M, Miyabe T, Sano T, Nishimura R.. Determination of midazolam and its metabolite as a probe for cytochrome P450 3A4 phenotype by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatography A. 2004 ; 1031 : 213-218.
8. Higaki M, Ishihara T, Izumo N, Takatsu M, Mizushima Y. Treatment of experimental arthritis with PLGA nanoparticles containing betamethasone sodium phosphate. Ann Rheum Dis. Published Online



First [Feb 4, 2005]. Doi: 10. 1136/ard. 2004.

9. 檜垣 恵. キャッツクロー 機能性食品ガイド. 講談社, 2004;338-345

10. 檜垣 恵. 乾癬性関節炎の臨床. リウマチ科 2004; 31: 94-100

11. 石原 務、出雲信夫、檜垣 恵、水島 裕. 新しく開発中の薬剤ーナノステロイドー 炎症と免疫 2005; 13: 31-35.

12. Takatsu M, Higaki M, Kinoshita H, Mizushima Y, Koizuka I. Ear involvement in patients with Rheumatoid Arthritis. Otol Neurotol (in press)

## 2. 学会発表

1. 水島 裕 (会長講演) 新規テクノロジーによる抗加齢医療の進歩と学会の役割 第4回日本抗加齢医学会総会 6月13日

2. 水島 裕 ナノ DDS の動向と展望 日本エム・イー学会専門別研究会 第1回ナノメディシン研究会 7月28日

3. Mizushima Y. Trends of anti-aging medicine in Japan The 1st AOFAAM Scientific Conference & the 5th KA3M Annual Conference

4. 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

5. 檜垣 恵, 石原 努, 高津 光春, 浅野 聡子, 峰 リサ, 水島 裕. 実験的関節炎モデルにおけるナノステロイドの作用. 第48回日本リウマチ学会. 岡山. 2004. 4.

6. 浅野 聡子, 峰 リサ, 田村 幸久, 坪井 政治, 檜垣 恵, 水島 裕. 関節リウマチ患者における TLR 発現とインターフェロン産生. 第48回日本リウマチ学会. 岡山. 2004. 4.

7. 石原 務, 井上圭子, 嶋田 恵美, 檜垣 恵, 水島 裕. 医薬品封入ナノ粒子の皮膚組織への移行・効果と経皮吸収. 第20回日本 DDS

学会. 東京. 2004.7.

8. 田村 哲也, 喜多 知子, 遠藤 剛, 金 泰秀, 中川 隆之, 石原 務, 檜垣 恵, 伊藤 壽一. ナノ微粒子製剤の内耳移行性に関する検討. 第20回日本DDS学会. 東京. 2004.7.
9. 後藤 真央子, 石原 務, 檜垣 恵, 水島 裕, 金澤 秀子. 硬質ナノ微粒子の調製とその薬物キャリアとしての評価. 第20回日本DDS学会. 東京. 2004.7.
10. 石原 務, 出雲 信夫, 酒井 勉, 上野 晃憲, 檜垣 恵, 神野 英生, 北原 健二, 水島 裕. ターゲット・徐放性ナノステロイド粒子による抗炎症効果. 第25回日本炎症・再生医学会. 東京. 2004.7.
11. 石原 務, 出雲信夫, 酒井勉, 上野晃憲, 檜垣恵, 神野英生, 北原健二, 水島 裕. ターゲット・徐放性ナノステロイド粒子による抗炎症効果. 第25回日本炎症・再生医学会, 7月13日(東京), 炎症・再生, 24(4), 418P, 2004
12. 木村道夫, 江藤智子, 出雲信夫, 水島裕. G-CSF徐放製剤による白血球増多効果の維持. 第25回日本炎症・再生医学会. 東京. 2004.7

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

1. Zinc-containing sustained-release composition, its preparation, and method for producing the same  
PCT/JP2004/4791 (出願日2004年4月1日)  
発明者: 木村道夫, 江藤智子, 水島裕
2. 薬物封入多層構造微粒子及びその製造方法  
PCT/JP2004/5007 (出願日2004年4月7日)  
発明者: 田中順三, 生駒俊之, 水島裕

3. 重水素減少水からなるリウマチ予防、治療剤及び飲料  
特願 2004-170673 (出願日 2004年6月9日)  
発明者：檜垣恵、水島裕、臼井龍夫、関邦博、矢崎リサ
4. 薬物含有徐放性微粒子、その製造法、及びそれを含有する製剤  
PCT/JP2004/8188 (出願日 2004年6月11日)  
発明者：水島裕、小川泰亮、田中順三、生駒俊之
5. 経粘膜吸収用薬物封入ナノ粒子  
特願 2004-205259 (出願日 2004年7月12日)  
発明者：水島裕、上野幸生、宇田川雅恵、亀山美栄子、鈴木嘉樹、関根準三
6. 核酸含有ナノ粒子  
特願 2004-205842 (出願日 2004年7月13日)  
発明者：石原務、檜垣恵、村上安子、水島裕
7. 生理活性たんぱく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  
PCT/JP2004/12718 (出願日 2004年9月2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
8. 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  
PCT/JP2004/13418 (出願日 2004年9月15日)  
発明者：水島裕、石原務、嶋田恵美
9. 薬物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非経口投与用製剤  
PCT/JP2004/15026 (出願日 2004年10月12日)  
発明者：石原務、水島裕、鈴木潤、関根準三、山口葉子、五十嵐理慧
10. 異なる粒子径を有する薬物封入ナノ粒子の作製方法及び当該方法で得られたナノ粒子  
特願 2004-324455 (出願日 2004年11月9日)  
発明者：水島裕、金子圭子、大関祐美子

2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他  
該当なし

## 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

本研究においては、分担研究者・研究協力者らによって開発された方法によって作製したGCSFの沈殿製剤が、どのような徐放性を *in vitro* で示すのかを明らかにし、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現存するGCSF製剤（溶液製剤）と比較検討を行い沈殿製剤に1週間以上の効果持続性があることを示してきている。そこで、本年度においては、ペプチド医薬（G-C S F）を用いて作製した製剤を用いて更に検討を加えた。G-C S F沈殿製剤作製法については最終的段階にはいつてきたが、実際の生産に移行する前段階として作製条件による沈殿の効率について調べた。また、その作製法による沈殿製剤の添加物の安全性について実際に生体に投与して検討し、作製法の新たな検討の必要性の有無について調べた。

### 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たんぱく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、たんぱく医薬としてG-C S F（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-C S F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て用いられている。また、薬物性顆粒球減少症、再生不良性貧血、H I V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-C S F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たんぱく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）としてのたんぱく医薬品が十分な徐放性を示すことを明らかにし、たんぱく医薬の徐放性製剤の開発を

試みてきた。しかしながら、動物性たんぱく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、無機化合物のみでたんぱく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

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たんぱく質での沈殿製剤作製を行った。水溶性有機酸塩および水溶性多価金属イオン塩の種類と濃度を変え、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を作製法した。すなわち、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。亜鉛については酢酸亜鉛が、また水溶性有機酸としては炭酸水素ナトリウムとリン酸が最適な組み合わせであると昨年度までの成果であるので、その条件に合わせて作製したものを今年度用いることにした。

皮内投与したときに生じる皮膚への刺激性について検討するために、酢酸亜鉛濃度と炭酸水素ナトリウム濃度を変化させてG-C-S-F製剤を作製した。作製された粒子の大きさやその均一性について、それぞれに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が、全て均一な大きさで皮下投与が可能な大きさの粒子であった。

局所刺激作用の有無やその程度について、製剤作製における界面活性作用物質の存在の影響について調べる目的で、カルボキシメチルセルロース(CMC)もしくはTween 80を用いて製剤を懸濁したものを用意した。

### (2) 作製条件による製剤への薬物取り込みの変化

本製剤の作製に添加する物質の組み合わせは亜鉛・リン酸・炭酸として作製したが、その添加濃度については、G-C-S-Fを一定(1 mg/ml)にしたとき、亜鉛濃度を10 mMから40 mMまで変化させ、リン酸は2.5 mMから40 mM、また炭酸は5 mMから160 mMまでの範囲で、様々な組み合わせについて行なった。

### (3) 皮膚への刺激性

ddYマウス(12週令、オス)の背部皮下に、上記の方法で作製したいくつかのG-C-S-F沈殿製剤を0.3 ml投与して皮膚の組織変化が生

じるのかについて検討した。皮膚の観察は、薬物投与4日後に頸椎脱臼後に背部皮膚を翻転して肉眼での観察を行なった。

界面活性剤を加えないで作製したもの、CMC (1%) または Tween 80 (0.01%) の添加によって作製したものを用いて比較検討を行った。

## C. 研究結果

### (1) 作製条件による製剤への薬物取り込みの変化

G-CSF濃度を1mg/mlと一定にして、沈殿作成時に亜鉛濃度を10mM, 20mM, 40mMの条件とした。リン酸の濃度と炭酸の濃度については、亜鉛濃度を勘案して設定した。表に示したように、亜鉛の濃度に応じて、用いるリン酸と炭酸の濃度比を一定の範囲に定めて検討を行った。持続的な薬理作用が示されているので、将来的には製品化を目指している。したがって、医薬品として生産する際にはその生産効率は極めて重要な事項であり、検討することは必須の内容であることは明白であろう。

表で示したように、Supで示した反応液上清中に沈殿せずに残ったものの割合(最初に用いたG-CSF量を100%としている)と、Pptで示した沈殿に含まれるG-CSF量の割合(沈殿効率と記載する)を調べた。表の最右にはSupとPptで回収されたG-CSF量から換算した全体としての回収率を示した。

表で示した条件においては、全体の回収率は特に変化はなく、93%以上の計算上の回収率となっているので、この結果から沈殿形成の効率について考察が可能であると考えられた。

全体の傾向として、炭酸濃度を高めると沈殿効率は減少した。しかし、亜鉛濃度が10mMと20mMのときは、リン酸濃度に比べて同程度の濃度の炭酸濃度では、やはり沈殿効率が減少する傾向にあった。したがって、亜鉛・リン酸・炭酸の濃度比が沈殿効率に影響を与えることが示唆された。全体的に観てみると、リン酸と炭酸の濃度の比が1:2のときに沈殿効率が低い傾向にあった。

亜鉛濃度が低い10mMのときは、沈殿に含まれるG-CSF量が減少して、調べた条件の範囲では43%から80%程度であった。これらの沈殿効率は、今後製剤化へのステップアップを行なうに当たり、あまりにも低すぎると思われる。したがって、亜鉛の皮膚刺激性の毒性試験には、この沈殿効率のために用いないこととした。

亜鉛濃度20mMでの製剤作成をこれまで基本としてきている。現在



表 G-C S F 製剤作製の材料の量比とその沈殿への収率

No	Zn(mM)	リン酸(mM)	炭酸(mM)	Sup(%)	Ppt(%)	Total(%)
1	10	2.5	5	16.2	77.6	93.8
2			10	11.8	82.8	94.6
3			20	20.9	73.7	94.6
4		5	5	42.5	54.4	96.9
5			10	28.4	63.5	91.9
6			20	49.1	45.1	94.2
7		10	5	50.6	45.0	95.6
8			10	52.0	44.4	96.4
9			20	53.1	43.9	97.0
10	20	5	5	28.2	69.1	97.3
11			10	9.2	84.2	93.4
12			20	5.4	90.9	96.3
13			40	6.9	90.3	97.2
14		10	10	12.5	86.0	98.5
15			20	2.1	94.3	96.4
16			40	1.2	95.2	96.4
17		15	15	27.3	73.1	100.4
18			30	14.5	82.0	96.5
19			60	31.9	64.9	96.8
20		20	10	26.4	69.2	95.6
21			20	29.6	67.8	97.4
22			40	36.5	61.2	97.7
23			80	41.0	56.9	97.9
24		40	10	10	9.0	85.0
25	20			2.3	91.4	93.7
26	40			0.7	92.0	92.7
27	80			ND	96.9	96.9
28	20		20	2.1	94.1	96.2
29			40	ND	94.7	94.7
30			80	ND	94.8	94.8
31	30		15	1.7	90.6	92.3
32			30	1.9	91.3	93.2
33			60	6.6	86.8	93.4
34	40		20	14.3	83.4	97.7
35			40	21.5	77.3	98.8
35			80	27.2	69.2	96.4
37		160	47.9	47.9	95.8	

の段階では、亜鉛20 mM、リン酸10 mM、炭酸20 mMで作成したものを製剤化していくことを想定している。この条件においては、約95%が沈殿物に回収される。リン酸濃度を半分の5 mMにすると、炭酸濃度を40 mMまで増加させても90%程度しか回収されない。炭酸濃度を減らすと、より沈殿効率が悪くなることが判明した。また、リン酸濃度を15 mMや20 mMに増加すると、いくら炭酸濃度を変化させても沈殿効率は90%を超える結果は得られなかった。

亜鉛濃度を40 mMに上げると、やや全体的に沈殿効率が低下する傾向にあった。この条件においてはリン酸濃度も炭酸濃度も亜鉛濃度との比率を考慮して設定したために、どちらもかなり高い濃度での条件設定となった。この実験事実から、リン酸と炭酸のイオンが亜鉛およびGCSFから成る沈殿形成に対する影響があることが示唆される。過剰なマイナスイオンの存在が沈殿形成の際にカチオンとの相互作用に影響していると考えられる。

今回検討した実験結果から、沈殿形成の条件としては亜鉛：リン酸：炭酸が2：1：2の比率が適当であると考えられる。しかし、GCSF量を1 mg/mlのときは、亜鉛濃度が10 mMでは十分な沈殿効率が得られない可能性が高い。

## (2) 皮膚への刺激性

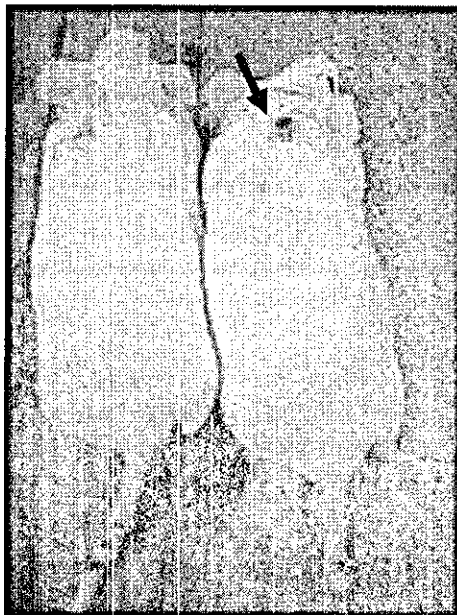
前述した最適と思われるGCSF沈殿製剤作製法、つまりGCSF 1 mg/mlでリン酸10 mM・炭酸20 mM(図においては20/10/20(DW)と表す)、の条件で作製した沈殿物(現製剤と図に示す)を、ddYマウスの背部皮内に0.5 ml投与して、その背部皮膚を時間経過(4日間)で肉眼観察を行なった。

この製剤(20/10/20(DW))を投与したときに、約半数近くのマウスに、程度の差はあるものの肉眼的観察によって変化が認められた。しかし、マウスにおいては軽度なものであった。図に20/10/20(DW)現製剤と示してある結果からも、頸部にわずかながら脱毛が認められた。しかし、背部の皮膚を翻転して皮膚の変化や背部筋肉組織の変化を観察したところ、観察部位において大きな変化を認める頻度は低いものであった。

リン酸と炭酸の亜鉛に対する比率は同じに設定して亜鉛の量を半分量または4分の1に減らして製剤を作製し、その皮膚刺激性についての検討を行った。その結果を、図においては、それぞれ10/5/20(DW)と5/2.5/5(DW)で表した。肉眼的な背部の外からの観察において、10/5/10の1匹において脱毛を認めたが、そのほかのマウスにおいてはGCSFによる影響は認めなかった。なお、5/2.5/5のマウスの1匹におい

図 GCSF製剤の背部皮下投与4日後の様子

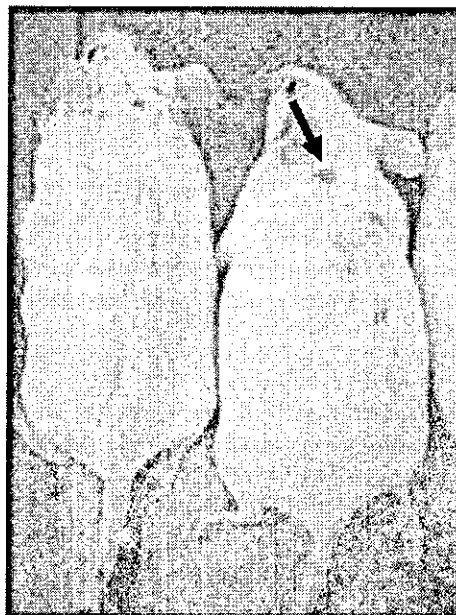
20/10/20 (CMC)



20/10/20 (Tween)



10/5/10 (DW)

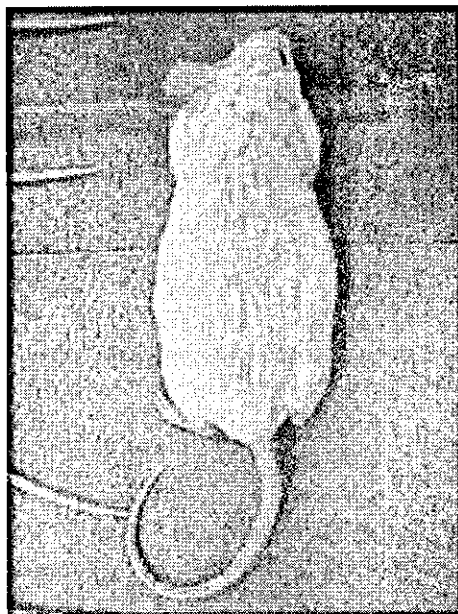


5/2.5/5 (DW)



図 GCSF製剤の背部皮下投与4日後の様子(上段)と背部皮膚を翻転したときの様子(下段)

未投与



20/10/20(DW)現製剤

