

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

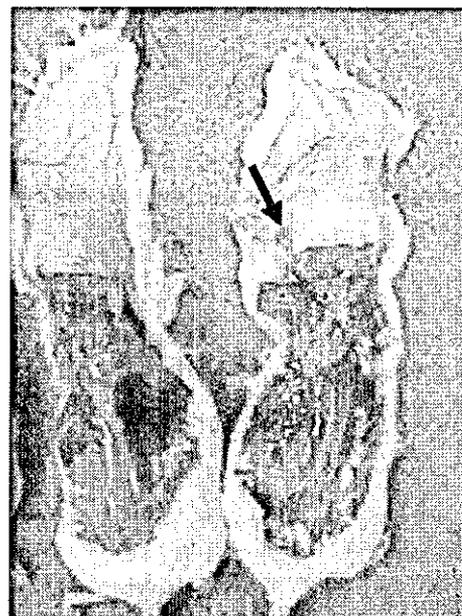
20/10/20(Tween)



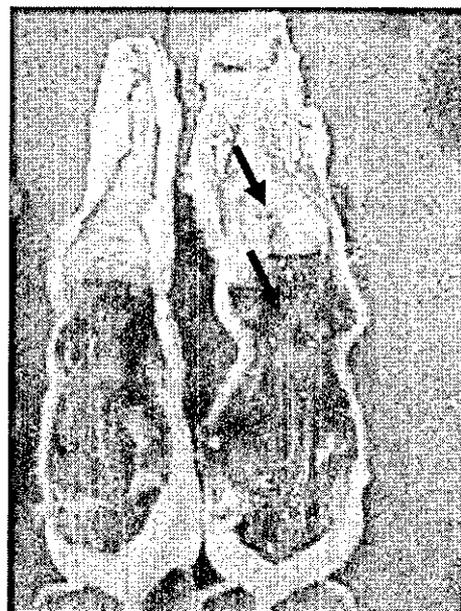
20/10/20(CMC)



5/2.5/5(DW)



10/5/20(DW)



て広範囲な脱毛が観察されたが、GCSF投与による影響ではないと考えている。背部皮膚を翻転して組織を観察したところ、10/5/20では組織に変化が認められなかったが、5/2.5/5では1匹の皮膚にわずかな増殖組織を観察した。これがGCSF製剤の投与に起因するものであるのかは不明である。

この沈殿製剤に界面活性剤を添加して投与した時の影響について検討した。図には、1%CMCに懸濁した製剤の投与をCMCと、0.01%Tweenに懸濁した製剤の投与をTweenと表した。皮膚表面の肉眼的観察においては、いずれのマウスにおいても特に顕著な変化を認めなかった。しかし、背部皮膚を翻転して観察したとき、Tweenでの投与マウスにおいては図中に矢印で表したように、血管の怒張ならびに組織癒着が認められた。1%CMC懸濁液投与においても、1匹に同様の变化を認めた。予備的実験において、大正実験として1%CMCまたは0.01%Tweenのみの投与によっては、このような変化を観察していない。

D. 考察

数多くの生理学的活性を有するたんぱく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たんぱく質についても、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、今後も更に多くのたんぱく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、たんぱく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、注射剤としてたんぱく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、たんぱく医薬品を開発する上での克服すべき問題点である。

G-CSF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-CSF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-CSF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。

沈殿製剤を作製する際に反応系に添加する物質として、二価の金属イオンについてはこれまでの結果から亜鉛が適当であり、また沈殿製剤の徐放性を

高めるための有機酸の塩としては炭酸水素ナトリウムが適当であることが判明している。これまでの本研究の成果として、*in vitro*における製剤からの溶出が極めて遅いことを明らかにし、またマウスとラットを用いたG-C S Fの作用の持続性についての実験からこれまでの製剤で十分な徐放性の沈殿製剤であることが確認されている。したがって、この沈殿製剤を治療に用いることを考慮すれば、G-C S Fの新しい製品開発へ向かうことが必要であろう。

これまでの沈殿製剤作製法を、実際の製品製造に持っていくにはその作製法が効率よいものでなければならないのは明白である。事実、G-C S Fの原末（原薬）自体が非常に高価なものであり、沈殿化にあたって数%のロスでさえも大きな経費の損失となり得るであろう。しかし、徐放性を失わずに原末（原薬）のロスを極力少なくした製法を確認する必要がある。

本研究で20 mMの濃度で作製したときの用いている亜鉛量は、添加物としての許容範囲以下である。この亜鉛量においてのリン酸と炭酸の組み合わせの検討で、G-C S Fの96%を沈殿内に取り込ませる条件を設定できたことから、製品製造への道は開かれたと考えられる。

この条件を確認する研究からは、マイナスイオンとしてのリン酸と炭酸はその絶対量が重要な要因となっているのではなく、リン酸と炭酸の比が1:2であることがG-C S Fの沈殿効率に大きく影響していることが示唆された。この量比においても、G-C S F量との相対的な量が影響し、相対量が少なくても多くても沈殿効率は低くなってしまふことが示された。このことから、G-C S Fと亜鉛が相互作用しあつて沈殿形成をする際には、マイナスイオンが存在することだけではなくそのマイナスイオンの性質も大きく影響していると考えられる。しかしながら、これらの4つの物質がどのようなイオン相互作用によって沈殿を形成し、また徐放というゆっくりとした溶解を生体で生じている理由については、不明な点が多く、現在までに明らかにはなっていない。

この条件で作製したG-C S Fの沈殿製剤に含まれる亜鉛量は添加物としての基準以下であるとしても、生体に投与する場合には、何らかの刺激性がある可能性がある。この製剤は皮下投与で適用することを計画しているので、皮膚に対しての刺激性については精査する必要がある。特にこの製剤は投与してから長期にわたって投与部位から溶出していくことが考えられるので、その部位における沈殿溶解におけるリン酸・炭酸・亜鉛の相互作用がどのようなになっているのかについて明らかにすることは重要であろう。そこで、G-C S Fが溶出するときに恐らくフリーな状態となると考えられる亜鉛については、その安全性については重要であるかもしれない。このG-C S F

製剤を皮下投与したマウスにおいて、全てではないにしろ一部に皮膚に変化が認められるものがあることも事実として認識されている。

そこで、本年度の研究成果として示したように、G-C S F 製剤にCMC またはTwee nを加えて懸濁液として投与した場合について検討を行った。粘性が高まったこれらの界面活性剤存在の液に懸濁させてマウス背部皮下に投与4日後の皮膚組織を観察したところ、これらの界面活性剤を入れな いで投与した場合に比べて、どちらの場合も皮膚および背部組織に変化が認められた。結果としては、CMCやTwee nを用いることで、亜鉛による組織障害が増強された事となった。この理由については、科学的にまだ明らかとはなっていない。しかし、今年度の実験結果からは、製剤に界面活性剤を添加することはあまり好ましいことではないことが示唆された。小動物においてのこの製剤の安全性はある程度あるものと考えられるが、大動物（イヌ、ブタ、サルなど）での検討がヒトへの適用へは不可欠であると考えられる。

E. 結論

本研究で沈殿製剤を開発するにあたり、亜鉛結合性たんぱく質としてのG-C S Fを選択し、亜鉛による沈殿物を作製して検討を行ってきた。その結果として、前年度までに、臨床応用の点で望ましい徐放速度と薬理作用の持続性を示す結果がラットやマウスで得られている。そこで、最終的製剤の作製のため、沈殿効率の優れた作製方法の検討を行い、ロスなくG-C S Fを沈殿製剤内に取り込ませることができた。実際の想定投与量から推定しても、十分な含有量であると結論された。また、安全性を確認するために、製剤を皮下投与してその皮膚刺激性を検討したが、マウスにおいては刺激性を多少認めるものの大きな影響であるとは結論されなかった。しかし界面活性剤の添加は、皮膚刺激性を高める結果であったので、最終的には添加しないほうが好ましいと結論された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 木村道夫、江藤智子、出雲信夫、水島裕 G-C S F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 7月 東京

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

1. 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

分担研究者 石原 務 東京慈恵医大DDS 研究所

研究要旨

薬物徐放機能とターゲティング機能を兼ね備えた静脈注射用 PLGA/P LA ナノスフェア製剤を新規調製法により開発してきた。昨年度までの動物実験等からこの製剤が DDS 製剤として有用であることがわかった。本年度は、臨床応用に向けた調製法の確立及び製剤としての有効性を更に向上させる試みを行なった。

A. 研究目的

現代の様々な疾病に対する薬物療法には、いまだ数多くの問題点が残されている。その一つである副作用は、患者に対し心身的な負担を増大させ、医師に対しては治療法の選択を制限している。また、疾病によっては、頻繁に薬物を投与する必要性があり、これも患者にとって心身的および金銭的な負担になっている。このような問題点を解決する手法がドラッグデリバリーシステム (DDS) である。

DDS の一つの概念である標的にのみ薬物を輸送し薬効を発現させる“ターゲティング療法”の確立のため、これまで様々な方法が試みられてきた。それらは大きく二つに分類される。一つは、ターゲットとなる細胞・組織との分子レベルの特異的認識に基づくレセプター介在型の能動的ターゲティングである。モノクローナル抗体の作製技術が開発されて以来、特に癌へのターゲティングを目指した研究が盛んになったが、いまだ *in vivo* では大きな成果がえられていない。また、その他のリガンド分子として、トランスフェリン・アシアロフェツインなどのたんぱく質やガラクトース・ヒアルロン酸などの糖鎖なども提唱されてきた。もう一つのターゲティングの方法は、薬物を複合化・封入するためのキャリアの親/疎水性、表面電荷、大きさ、柔らかさ、形などにより体内分布を制御するターゲティングである。ポリエチレンオキサイド (PEG) で覆われた数十 nm のキャリアでは、その血中滞留性が増大し血管透過性が高い

腫瘍組織への集積が確認されており、現在臨床応用への研究が進められている。

既に臨床で有用性が証明されたターゲティング機能を有したDDS製剤としては、本研究者らの一人が開発したリポ製剤(リピッドマイクロスフェア)がある。リポ製剤は薬物を溶解したコアの油液とレシチンの表層からなる200nm程度の球状微粒子であり、血中投与により炎症部位や血管障害部位の血管内皮細胞・マクロファージに集積することが知られている。薬物としては、PGE1を用いたLip1e(吉富)、PALUX(大正製薬)などが臨床応用されているのをはじめ、ステロイドも用いられている。このように、これまで薬効が高くても副作用のために利用が制限されてきたような薬物は、ターゲティングが可能になることで、副作用も少なく少量で効果が発揮されるようになった。しかしながら、リポ製剤はコア部位に油液を用いているために薬物の徐放効果がなく一過性の薬理効果しか発揮できず、疾病・薬物の種類によっては制限・制約をうけてしまう。

ターゲティングと並んでDDSの大きな概念の一つである“薬物の徐放制御”に関しても、多くの研究がおこなわれてきた。薬物のキャリアとしては、高分子・ミセル・リポソーム・マイクロカプセル・マイクロ/ナノスフェアなどがあるが、その中で徐放効果が確認されているのは、マイクロ/ナノスフェアを用いたものである。マイクロ/ナノスフェアに使われるマテリアルとしては、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)・ポリ乳酸(PLA)・ポリシアノアクリレート・ポリオルソエステルなどがあるが、中でもPLGAとPLAは生体内での安全性が確認されており徐放キャリアとして最も研究が進んでいる。徐放機能を有したDDS製剤としては、武田薬品工業が開発したリュープリンが既に臨床応用されている。この製剤はPLGAからなるマイクロ粒子内に薬物となるペプチドを封入したもので、皮下に投与することで数週間に及ぶ薬物徐放が達成されている。これまでの治療法では高頻度に投与する必要があったのに対し、この製剤により、ワンショットで長期の薬効が維持されるようになった。しかしながら、この製剤は、粒径が大きく皮下に投与するため血中への薬物の持続放出はできるがターゲティング能がなく薬物の体内分布を制御できない。

以上のように、単機能を持つDDS製剤は既に開発されているが、ターゲティング・徐放という両機能を兼ね備えたDDS製剤はいまだ臨床応用されておらず、このような製剤を開発することは、薬物治療の応用範囲を一気に広げることができ臨床薬理において革新的進歩を遂げると考えられる。そこで、本研究では、ターゲティング機能と薬物徐放機能を有したキャリアの開発をPLGA(あるいはPLA)とレシチンに代表される界面活性

剤を用いおこなった(図 1)。このナノスフェアは、調製時に粒径を制御しレシチンなど界面活性剤で表面を修飾することで、生体内でリポ製剤と同様のターゲティング能を持ち、かつ、薬物を封入した PLGA コアから薬物が徐放されることが期待できる。昨年度までに水溶性ステロイドをナノスフェア内に封入する新規調製法、そして、炎症動物モデルを用いナノスフェアの炎症抑制効果について検討をおこなった結果、この製剤が新規の抗炎症用 DDS 製剤として有用であることが示唆された。そこで、本年度は、ナノスフェアの最適化および臨床利用を見据えた大量調製の検討をおこなった。

B. 研究方法

1 金属イオンを利用した O/W 型溶媒拡散法

リン酸ベタメサゾン[®]を 100 μ l の水中に溶解し、0.5 M 酢酸亜鉛水溶液 500 μ l 中に添加した。13000 g で 5 分間遠心し、上清を除去し亜鉛-リン酸ベタメサゾンの沈殿をえた。この沈殿物中に、PLGA あるいは PLA 20 mg を溶解したアセトンを 500~1500 μ l 添加した。2 時間室温で静置後、この溶液(または懸濁液)を 0.5 重量%の界面活性剤を溶解した静置水溶液中にマイクロピペットで一気に添加した。えられたナノスフェア懸濁液は、1~2 時間室温で攪拌しながら放置後、EDTA 水溶液 (pH 8) を加え、限外ろ過で濃縮しゲルろ過(ファルマシア、PD-10)することで精製ナノスフェアをえた(図 2)。

ナノスフェアに封入されたリン酸ベタメサゾンは下記の方法で定量した。えられたナノスフェア懸濁液に対し 2.5 分の 1 ボリュームの 0.5 M EDTA 水溶液 (pH 8) を加え、20000 g で 20 分遠心した。上清を除去した後水を加え遠心によりナノスフェアを洗浄した。えられたナノスフェアは、アセトニトリルに溶解し、HPLC にてナノスフェア中のリン酸ベタメサゾン量を定量した。

2 ナノスフェアの大量調製

リン酸ベタメサゾン 0.75 g を 2 ml 水中に溶解した。PLA 5 グラムを溶解した 220 ml のアセトン溶液をスターラーで攪拌下 (600 rpm)、1 M 酢酸亜鉛水溶液 10.8 ml、続いてリン酸ベタメサゾン水溶液を添加した。この溶液を 1 時間室温で放置後、スリーワンモーター (300 rpm) で攪拌した 0.5% Pluronic F68 水溶液 2.5 L 中に、ロータリーポンプを用いて 1 ml/秒の速度で添加しナノスフェアを得た。調製後、0.5 M クエン酸ナトリウム水溶液 100 ml を添加し、

ファイバー透析膜（旭メディカルAPF-01D）により濃縮/精製した。

3 ナノスフェアの血中滞留性解析

リン酸ベタメサゾン封入ナノスフェアあるいはリン酸ベタメサゾン水溶液をマウス尾静脈より投与し、経時的に血漿を採取した。血漿中に含まれるベタメサゾン量をTR-FIA法により定量した。

4 ナノスフェアの in vivo での集積性解析

リン酸ベタメサゾンに代わり、蛍光色素であるローダミンを封入したナノスフェアを調製した。このナノスフェアをラット尾静脈より投与し、一定時間後に各臓器を採取した。各臓器をホモジナイズし、2倍量のアセトニトリルを添加後遠心し、上清中のローダミン量をHPLCにより定量した。なおラットとしては、アジュバント誘導関節炎モデルラットを用い、アジュバンド投与7日後にナノスフェアを投与した。

（倫理面への配慮）

研究開発は可能な限り試験管内の実験にて推進する予定であるが、医薬関連技術開発には最終的にその有用性を確認する為に動物実験が不可避である。但し、動物実験に際しては研究組織に参加しているすべての研究者が、その所属する施設における動物実験倫理規定を深く理解し、動物実験倫理委員会の認可を得る。動物実験における我々の基本的姿勢は、個々の研究者の動物に対する福祉と愛護の精神に基づく。そのうえで「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和55年3月27日総理府告示第6号）の基本原則を適用する。研究者の安全確保としては、研究開発に用いる薬物、試薬（特に毒劇物あるいは危険物）等から研究者が汚染あるいはその他の事故が起こらないような対策を講じると同時に、それらの保管・管理を厳密におこなう。また、動物実験あるいはその他の実験においても同様に研究者の安全確保に留意する。環境保全としては、研究開発において生じる使用後の実験器具、試薬等を廃棄する場合は、環境保全に留意しておこなう。これに関し各施設内での規定を遵守する。

C. 研究結果

（1）溶媒拡散法によるナノスフェアの大量調製

本研究で開発してきたナノスフェアを製剤として臨床利用するには、その大量調製が必須となる。乳化装置を必要とする液中乾燥法などに比べ、

本溶媒拡散法においては、ナノスフェア調製時に攪拌装置以外の機器を必要とせず、調製スケールの拡大が比較的容易であると推察される。そこで、PLA 5 グラムを1 バッチに利用しナノスフェアの大量調製を試みた。

昨年度までの小スケールでの調製では、BP 及び亜鉛間で沈殿を形成させた後、遠心により上清と分離をおこなってきた。しかし、大量調製においては可能な限り遠心操作を省略する方が望ましい。そこで、BP-亜鉛沈殿形成後ナノスフェアを調製するこれまでの方法（沈殿法）に変え、BP・酢酸亜鉛及びPLA をアセトン溶液中に溶解した後、界面活性剤入り水溶液中に添加しナノスフェアを調製する方法（一括法）を試みた。その結果、収率やBP 封入率に大きな違いはなかったことから、遠心操作を省略可能な一括法の方が、大量生産には適していると考えられた。また、一括法でのナノスフェア調製の再現性に関し検討をおこなった（図3）ところ、BP 封入率・PLA 回収率・BP 回収率とも調製ロット間に大きな差はみられず、ほぼ同品質の製剤が調製可能であることがわかった。

ナノスフェアの精製はファイバー透析によりおこなった。種々の素材の透析膜に関し検討をおこなった結果、APF-01D（旭メディカル）において最も回収率・精製度が高いナノスフェアがえられることがわかった。この透析膜を利用することにより、調製懸濁液を少なくとも100 倍は濃縮可能であり、最終的に10%程度の粒子懸濁液をえることができた。

（2）ベタメサゾンの血中濃度変化

リン酸ベタメサゾン200 μ g 水溶液あるいはリン酸ベタメサゾン200 μ g 封入ナノスフェアをマウス尾静脈より投与し、血漿中のベタメサゾン濃度を測定した（図4）。リン酸ベタメサゾン水溶液を投与した場合、投与10 分後に高いベタメサゾン濃度（約3000 ng/ml）を示し、その後徐々にその数値は減少した。一方、ナノスフェアを投与した場合には、投与10 分後の血漿中濃度は100ng/ml と非常に低い値を示し、その後も大きな濃度変化は認められなかった。よって、リン酸ベタメサゾンが血中で速やかに脱リン酸化されベタメサゾンに変化すること、及び、血中に投与された後もナノスフェア内に封入されているリン酸ベタメサゾンがバースト放出されずに粒子内に安定に存在することが示唆された。リポソーム製剤などの場合、血中での薬物保持安定性が悪く、キャリアから遊離しやすいという欠点が知られているが、この製剤の場合、固相中に薬物を封入することにより、薬物保持安定性が飛躍的に向上しているものと考えられる。

(3) ナノスフェアの体内動態解析

薬物の体内動態は、キャリアの物性に大きく影響を受ける。そこで、ナノスフェア表面に吸着させる界面活性剤の種類あるいは粒径の異なるナノスフェアを用い体内動態の解析をおこなった。薬物としては、リン酸ベタメサゾンに代わり、蛍光色素であるローダミンを封入したナノスフェアを用いた。このローダミン封入ナノスフェアを、ウシ胎児血清中に添加し、37℃・1時間インキュベート後、ナノスフェア内のローダミンを定量した結果、ローダミンのナノスフェアからのバースト放出は認められなかった。よって、このローダミン封入ナノスフェアをリン酸ベタメサゾン封入ナノスフェアの代わりとして用いことで、ナノスフェアの体内動態を評価できることが示唆された。ナノスフェアへの表面コーティング剤としては、種々の界面活性剤を利用した。ナノスフェアに対し等重量の界面活性剤を添加し、プローブタイプ超音波発振器により10秒間超音波照射した。得られたナノスフェアを20mMリン酸バッファー(pH7)中でと電位測定を行なった結果(図5)、いずれの界面活性剤を利用した場合でも、そのと電位値が変動しておりその表面が界面活性剤によりコートされていることがわかった。また、界面活性剤の種類によりそのと電位値が異なることから、界面活性剤の種類によりコーティングの形態が異なることが明らかになった。

そこで、アジュバンド関節炎ラットを炎症モデル動物として用い、このローダミン封入ナノスフェアを用い体内動態解析をおこなった(図6～9)。アジュバンド投与7日目のラットに、尾静脈からナノスフェアを投与し、3時間後に各臓器を採取、そのローダミン含量をHPLCにより定量した。粒径の異なる2種(似10nmあるいは120nm)のナノスフェアをラットに投与し、その各臓器への集積性を検討した結果、120nmのナノスフェアにおいて、肝臓・脾臓への集積性の減少、血中滞留性の増大が認められた。炎症足への集積性は、120nmのナノスフェアにおいて、210nmのナノスフェアに比べ2～4倍の増大が認められた。一方、コーティング剤の相違による体内動態の影響を検討したところ、210nmのナノスフェアでは大きな変化は認められなかった。一方、120nmのナノスフェアでは、Tween 80を用いたナノスフェアに比べ、NC-50(卵黄レシチン)やHCO-60を用いたナノスフェアで炎症足への集積性が向上することがわかった。

D. 考察

臨床利用を目指した製剤の開発において、その製造コストを抑制するこ

とは非常に重要であり、製造ステップを可能な限り簡略化することが求められる。本研究で示した溶媒拡散法では、ナノスフェア調製時に乳化装置を必要としない上に、遠心操作（沈殿回収操作）も不必要であることがわかった。このような簡便な調製法を構築することにより、製造コストの低減が期待できる。また、本製剤のようなヘテロな製剤を大量調製する際には、そのロット間での相違を極力小さくする必要もある。5 ロットにわたる再現性試験の結果、多少のばらつきはみられるものの、ほぼ同様のナノスフェアが調製できることがわかった。以上から、本ナノスフェアは、大量生産にも適応可能であると考えられる。

一般的に、コロイド粒子を血中に投与した場合、細網内皮系（RES）により貪食をうけ、速やかに血中から粒子は排除される。しかし、その血中滞留性を向上させることで、炎症部位や癌組織へ薬物をターゲティングさせる試みが数多く報告されてきた。このような効果（EPR効果）をコロイド粒子に付与（ステルス化）させるには、粒径が150 nm程度以下であることそして粒子表面を適切な化合物でコートすることが必要である。コート剤としては、血清たんぱく質などの吸着を抑制することが知られているPEG鎖などが広く用いられてきた。本研究でも、ナノスフェアのステルス化を試みた結果、120 nmのナノスフェアでは、血中滞留性の増大、肝臓・脾臓への蓄積性の減少、炎症部位への集積性の増大が認められた。よって、粒径が小さくなることで、RESへの取り込みが減少し、EPR効果により炎症部位への蓄積性が増大したものと考えられる。また、固体ナノ粒子へのコーティング剤として、Poloxamine 908やレシチンがステルス化を誘導することが報告されている。本研究で得られた結果からも、同様にPoloxamine 908やレシチンを利用することで炎症部位への集積性が増大した。よって、120 nm程度の粒径でレシチンなどにより表面コートしたナノスフェアにおいて、抗炎症作用も更に増大するのではないかと考えられる。

E. 結論

新規のDDS製剤として、薬物徐放機能とターゲティング機能を兼ね備えた静脈注射用PLGA（又はPLA）ナノスフェア製剤の開発を新規の調製法によりおこなった。この方法は、水溶性の低分子薬物をも封入できる方法であり、金属イオンと薬物の相互作用を利用し、高濃度でナノスフェア内に封入することに成功した。また、PLGAおよび金属イオンで疎水化された薬物を有機溶媒中に溶解し、水中に滴下するだけでナノスフェアがえられ、従来の調製法に比べ医薬品化のための大量調製に適した方

法であることが確認できた。

また、炎症モデルラットにおいて、有意に強い抗炎症効果を有することがわかり、ターゲティング能と徐放機能を有することが示唆された。さらに、ナノスフェアをステレス化することにより、ナノスフェアが炎症部位に集積しやすくなることがわかり、更に強い薬効を有する製剤が開発できると考えられる。以上より、このナノスフェアは、新規の DDS 製剤として有用であり臨床への応用が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 石原務 徐放性ナノ微粒子製剤の開発 Drug Delivery System 19(2) 136-137 (2004)
5. 石原務、出雲信夫、檜垣恵、水島裕 新しく開発中の薬剤①ーナノステロイドー 炎症と免疫 13(2) 143-147 (2005)

2. 学会発表

1. 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

2. 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、7月15日（東京）、Drug Delivery System、19(3)、237P、2004

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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

3. 実用新案

該当なし。

4. その他

該当なし。

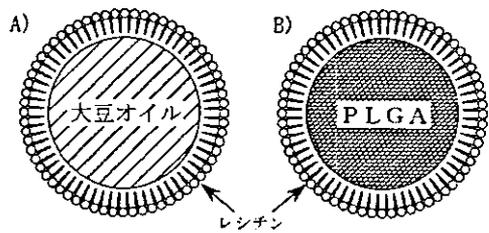


図1. リポ製剤(A)とレシチン/PLGA ナノスフェア(B)

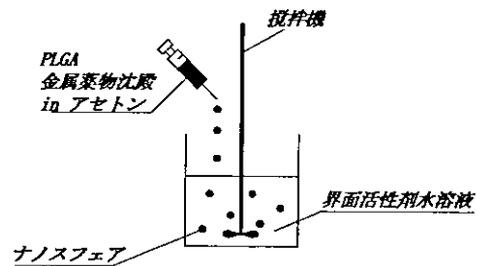


図2. O/W型溶媒拡散法

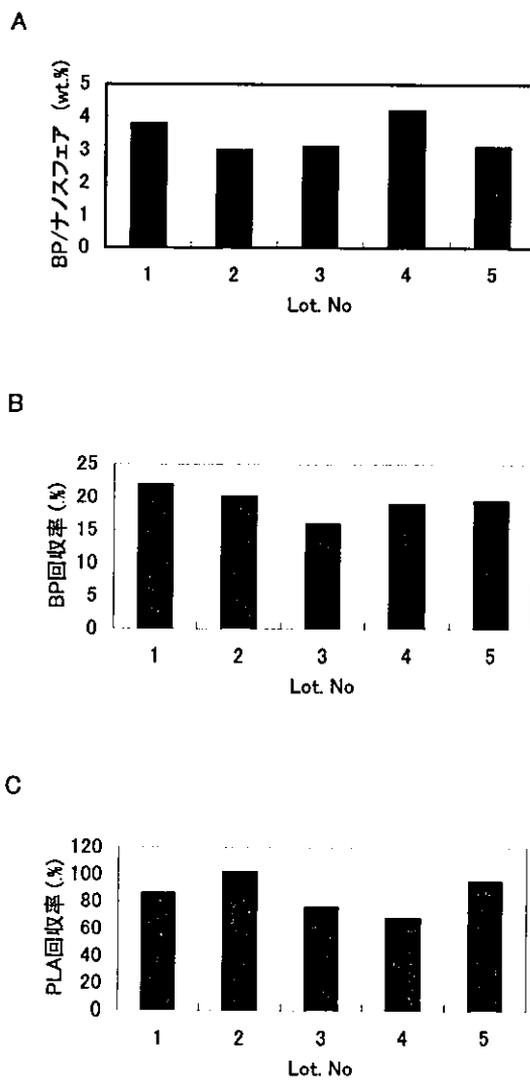


図3. O/W型溶媒拡散法(一括法)におけるナノスフェア調製の再現性試験
 A) ナノスフェア内へのBP封入率、B) 仕込みに対するBP回収率、C) 仕込みに対するPLA回収率

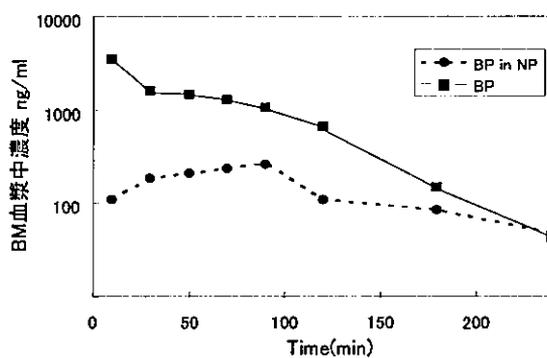


図4. ベタメサゾンのマウス血中濃度変化

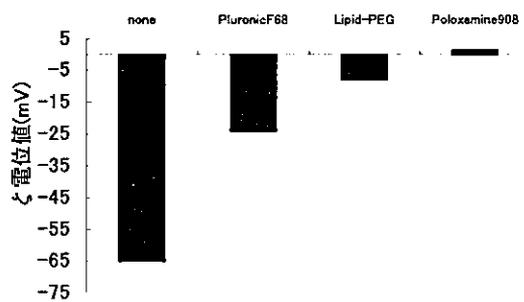


図5. コーティング剤の相違によるナノスフェアのζ電位変化

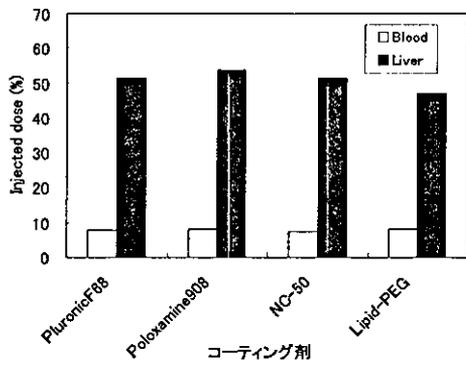


図 6. ナノスフェアの体内動態 (粒径 210nm)

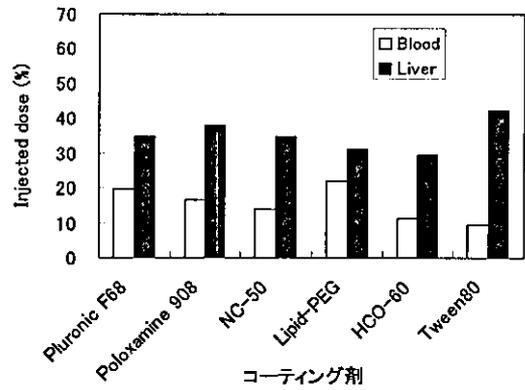


図 8. ナノスフェアの体内動態 (粒径 120nm)

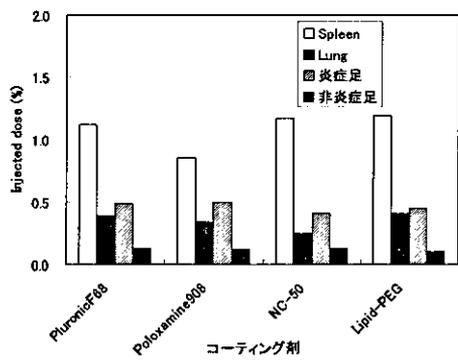


図 7. ナノスフェアの体内動態 (粒径 210nm)

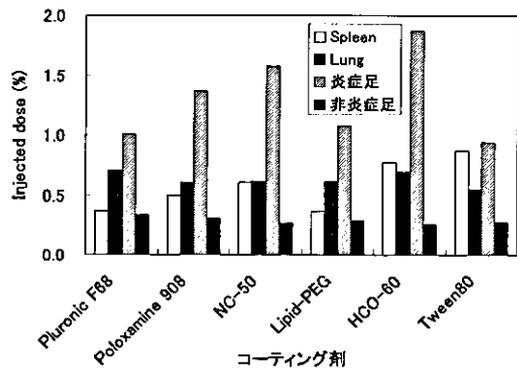


図 9. ナノスフェアの体内動態 (粒径 120nm)

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

分担研究者 檜垣 恵 東京慈恵会医科大学DDS研究所客員教授

研究要旨

本研究ではマイクロカプセルではなくさらに小さなナノ粒子(100nm-1 μ m)に抗原を内包することにより非特異的刺激を減少させ、樹状細胞への抗原の特異的な取りこみおよび抗原提示を促進して効果的な免疫応答の誘導をめざす。尋常性乾癬(以下 乾癬)およびアトピー性皮膚炎(AD)をターゲットとしてナノ粒子へポリ I:C や非メチル化 DNA 封入して現在注目されている Toll-like レセプターを利用した樹状細胞への抗原取りこみによる細胞活性化、インターフェロン産生を試みる。尋常性乾癬(以下 乾癬) 皮疹部における樹状細胞の表面抗原の解析により樹状細胞の種類および活性化状態を明らかにすると共に、どのような微生物成分により活性化して炎症性サイトカイン産生が引き起こされるかを調べる。さらに樹状細胞を炎症局所に誘導する重要なケモカインを同定し、これを抑制するプラスミド DNA および siRNA のナノ粒子化により効率的な経皮製剤を作製する。

A. 研究目的

乾癬は厚い鱗屑を伴う浸潤性紅斑が全身に生じる慢性炎症性皮膚疾患で、組織学的に表皮と角質の肥厚、種々の白血球浸潤、および血管新生を特徴とし、種々のサイトカイン、ケモカインや炎症関連分子の発現亢進が認められる。乾癬の皮疹部には樹状細胞とT細胞が、角質層には好中球が認められる。浸潤しているT細胞は主に皮膚ホーミングレセプター(CLA)陽性CD4およびCD8陽性のメモリーT細胞で、共にSTAT1によりTH1型免疫応答に分化し、CD25を強発現する活性型である。これらの活性型T細胞は患者末梢血でも増加している。乾癬は自己免疫疾患の可能性が高いが、自己反応

性T細胞および自己抗原は明らかにされておらず、T細胞の活性化機構は不明な点が多い。一方、近年、生来免疫の研究が進歩すると共に、樹状細胞がインターフェロン（IFN）を介したT細胞活性化による病態形成に中心的な役割を果たしている事が明らかになった。樹状細胞はプロフェッショナル抗原提示細胞の中で唯一ナイーブTリンパ球に抗原提示を行い、一次免疫応答を誘導する能力を有している細胞でヘルパーT細胞・キラーT細胞の誘導、抗体産生、IL-12産生を容易に惹起することができる。TH1型の免疫応答では活性化型樹状細胞からのIL-23およびIL-12産生、およびTh1およびTc1細胞からのIFN- γ 産生、およびそれに引き続く遺伝子発現により炎症が引き起こされる。一方、Toll-likeレセプター（TLR）の発見により病原微生物産物のPathogen-associated molecular pattern（PAMP）の認識機構が明らかになってくると共に骨髄球系樹状細胞（MDC）に加えて形質細胞様樹状細胞（PDC）が同定された。MDCは単球・マクロファージと同様にグラム陰性菌のリポ多糖（LPS）を認識するTLR4およびグラム陽性菌のペプチドグリカン（PGN）やリポタイコ酸（LTA）を認識するTLR2を産生してIL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインを産生する。dsRNAに相当するポリI:Cを認識するTLR3を特異的に発現するMDCもIL-12の産生を引き起こす。一方、PDCはssRNAやイミキモドを認識するTLR7と共に細菌由来の非メチル化オリゴヌクレオチド（CpG ODN）を認識するTLR9の発現が特徴的で食細胞能は低いが多量のIFN- γ を産生する。これらの点よりTH1型の免疫応答が優位となる乾癬での樹状細胞活性化の解明は非常に興味深い。そこで、乾癬患者の末梢血および炎症皮膚での樹状細胞の表面抗原（TLRおよびC型レクチン受容体を含む）などの性状および種々のPAMPsに対するサイトカイン・ケモカインの産生能を解析することは乾癬の病因にせまると共に病態解明に大きく寄与できる研究と考えて、この2年間で解析を行う。さらに細菌由来DNAによるPDCのIFN- γ 産生および局所でのケモカイン産生の検討は今後の治療法の開発にも大きく貢献できると考えられた。さらに樹状細胞が経粘膜投与の抗原にも反応することからナノ粒子を利用した経粘膜投与による免疫応答の誘導能亢進に関しての検討も行う。これらの方法は表皮内ランゲルハンス細胞を標的とした表皮免疫法にも利用できると考えられる。一方、不活化ウイルスワクチンやDNAワクチンにおいても樹状細胞は有効な標的となると考えられるマラリアを標的に検討をすすめる。

B. 研究方法

(1) 末梢血TLR発現の検討(フローサイトメトリーおよびRT-PCR)

乾癬患者および健常人より血液を採取し、フィコール法にて末梢血単核球(PBMC)を分離する。TLR2/4/6/9 (FITC標識抗体を用いる) およびBDCA1/3/4 (RD標識を用いる) の抗原発現をフローサイトメトリーで検索する。さらにIsogen処理したPBMCよりmRNAさらにcDNAを調整してTLR1-10のPCRを行うとともにリアルタイムPCRで定量を行う。可能であればアトピー患者など他の皮膚疾患患者との比較も行う。

(2) 末梢血中およびPBMCの産生するサイトカインの測定 (ELISAおよびRT-PCR)

乾癬患者および健常人血漿中のTNF- α , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-12p70の炎症性サイトカイン、IL-4, IL-10の抗炎症性サイトカインおよびIFN- γ , IP-10をELISAで測定する。一方、PBMCに種々のPAMPs (LPS, PGN, LTA, Poly (I:C), PAM3CSK, ODNs) を添加して24時間培養後の上清を採取し、上記サイトカインを同様に測定する。同時に培養刺激6時間後のPBMCよりmRNA/cDNAを調整してサイトカインmRNA発現をリアルタイムRT-PCRで定量する。この実験においてもアトピー患者など他の皮膚疾患患者との比較も行う。

(3) 生検組織の免疫染色 (蛍光法およびABC法)

乾癬患者より採取した皮疹部、無疹部、および健常人の正常皮膚の生検組織を用いる。OCTコンパウンドに封入後、凍結切片を作製する。樹状細胞マーカー (CD1アール、CD11c、CD123のほかにCD83, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4) およびTLR ②/3/4/9、サイトカイン (TNF- α , IL-12) ・ケモカイン (MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10), I-TAC (CXCL11), SDF-1 (CXCL12), MIP-1 \cdot (CCL3), MIP-3 \cdot (CCL19), MIP-3 \cdot (CCL20), SLC (CCLに1))、ケモカインレセプター (CCR6, CCR7) の免疫組織染色を蛍光法およびABC法で行う。

(4) 生検組織のTLR抗原およびサイトカイン・ケモカイン遺伝子発現の検討 (RT-PCR)

生検組織よりmRNA/cDNAを調整して、リアルタイムRT-PCR法によりTLR (1-10) 抗原、サイトカイン (TNF- α , IL-12,