

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14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成17（2005）年3月

平成14年度より平成16年度までの期間、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において、研究課題「ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発」について、以下に総括報告を行う。

## 目次

I	研究組織	1
II	補助金額	3
III	研究成果	5
	平成14年度	5
	平成15年度	8
	平成16年度	13
IV	研究発表	18
V	知的財産権の出願・登録状況	26
VI	健康危険情報	29

## I 研究組織

### 主任研究者

水島 裕

(東京慈恵会医科大学DDS研究所・所長)

### 分担研究者

上野 晃憲 (平成14年度～平成16年度)

(株式会社 LTTバイオファーマ 上席研究員)

(東京慈恵会医科大学客員教授・DDS研究所)

桧垣 恵 (平成14年度～平成16年度)

(東京慈恵会医科大学客員教授・DDS研究所)

石原 務 (平成14年度～平成16年度)

(東京慈恵会医科大学助手・DDS研究所)

田中 順三 (平成14年度～平成15年度)

(独立行政法人 物質・材料研究機構・生体材料センター・センター長)

小林 尚俊 (平成14年度)

(独立行政法人 物質・材料研究機構・生体材料センター・研究員)

生駒 俊之 (平成15年度)

(独立行政法人 物質・材料研究機構・生体材料センター・研究員)

## Ⅱ 補助金額（間接経費を含む）

平成14年度	57,600,000円
平成15年度	71,840,000円
平成16年度	35,054,000円
総額	164,494,000円

なお、経理事務については、東京慈恵会医科大学に委任した。

### Ⅲ 研究成果

研究実施年度毎に、その成果をまとめた。

#### 平成14年度

##### 研究要旨

ターゲット効果と徐放効果をあわせてもつナノ粒子 DDS 製剤の研究・開発と新しい徐放製剤の研究開発を行った。前者としては水溶性ステロイドなどのマイナスチャージを持つ薬物を金属により疎水化し封入する方法（金属法）を用いて200nmのPLGA粒子に封入した製剤が現在のところ最も優れているとの結果を得た。すなわち優れた徐放効果、ターゲット効果が *in vitro*, *in vivo* および薬効試験で証明された。徐放製剤については、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の性質の解明と更なる徐放を得るための炭酸カルシウムなどによる栓塞技術を開発し、将来の研究の基盤となる研究成績を得た。

##### A. 研究目的

これまでターゲット製剤、徐放製剤はわれわれの発明も含め多くあるが、この両者の性質をもつナノ製剤を開発すること、及び新規の徐放製剤を開発し、とくに再生医療の進歩に寄与することを目的とした。

##### B. 研究方法

徐放性ターゲットナノ製剤についてはPLGAやPLAを中心にどのキャリアーが適しているか、また炎症部位や血管病変部位へのターゲットのためにはどの程度の大きさのナノ粒子また表面に何を吸着したナノ粒子が良いかを検討する。そして徐放およびターゲット効果は封入した医薬品の薬物濃度、またはマーカーを粒子に封入することにより検討した。薬効は *in vitro* と *in vivo* で行った。前者としては関節リウマチ患者から得られた滑膜細胞からの炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  と IL-6 の分泌抑制で検討し、後者としては、type II コラーゲン関節炎、アジュバント関節炎などの炎症モデル動物を用いて行った。また、血管新生作用はマウスの耳介の一部を切断し阻血状態にし、切断された耳に起こる血管病変または血管新生に及ぼす薬物の効果から判断した。

##### C. 研究結果

###### 1. ステロイド封入ナノ粒子について

炎症部位へのターゲット効果をローダミン含有PLGA/PLAで検討したところ、200nmの粒子が適していたのでこれを用いることとした。封入するステロイドとしては効力の強い点からベタメタゾンを用いた。まず初めは脂溶性ベタメタゾンとしてベタメタゾンジプロピオネイトを用いた。封入率は優れていたが緩衝液中でのおよび培養マクロファージからの徐放試験では1日目で約50%が放出され、徐放の点でやや問題を示した。それでもin vitro およびin vivoの薬効ではベタメタゾン単独より優れた効果を示した。つぎに石原らが考案した亜鉛を作用させたリン酸ベタメタゾンの疎水性物を用いて検討したところ、脂溶性ベタメタゾンに比べ徐放効果が遥かに優れていた。これを用い、in vitro, in vivoの薬効試験を行ったところ、分担研究者のところで詳しく述べているように、極めて優れた成績が得られた。

## 2. PGE1封入ナノ粒子

本年度は未だ再現性のある成績が得られていないので、分担研究者の報告には入れていないが、PGE1の1位と9位をエステル化したPGE1エルテルは200nmのPLGA粒子に充分の量封入され、しかも理想的ではないが徐放効果を示した。このPGE1ナノ粒子を用い耳介の血管新生作用で検討したところ、対照群およびPGE1単独群にくらべ、血管新生作用および血管拡張作用が明らかに強くみとめられた。これらの結果は詳しくは来年度報告する。しかしステロイドと同様、恐らく十分な水溶性誘導体をつくり、更に極性を増した化合物を合成した後、同じ金属法によりPLGAに封入したほうが遥かに優れた成績が得られると考え、現在水溶性の強いPGE1誘導体を合成中である。これによって恐らく現在のLipoo-PG(商品名：パルクス、リプル)より優れたDDS製剤ができるものと思われる。

## 3. その他のナノ粒子

抗原を封入したワクチンについては、分担研究者檜垣恵によって述べられている。また、感染部位、癌組織にもナノ粒子は集中することから、現在抗癌薬、抗結核薬の封入などの研究を始めた。

## 4. 徐放製剤の検討

まず多孔性ハイドロキシアパタイト単独で多くの医薬品を検討したところ、BDNF、レシチン化SODなどは同粒子に充分吸着し、優れた徐放効果が得られた。しかし、両薬剤とも臨床用量がかなり多いので実際の臨床には用いられないと思われる。一日投与量の少ないインターフェロンについて検討したところ、ハイドロキシアパタイト単独での徐放効果は充分ではなく、多糖体や金属などによりハイドロキシアパタイトの多孔を栓

塞する方法を試みた。その場合はかなり優れた徐放効果が得られたが、いまだ充分再現性のある成績は得られていない。一方、物質材料研の田中、生駒らの研究によりハイドロキシアパタイトの物性が明らかになり、また炭酸カルシウムで多孔を栓塞する技術が開発された。それゆえ次年度はこれらの研究成績をもとに徐放製剤の研究を進めていく。

#### D. 考察

本事業申請時にすでにPLGAなどによる徐放性ターゲット製剤の研究は始まっており、また初期段階の成績をまとめた特許も提出していた。本年度の研究によりまず徐放性ターゲットナノ粒子については、どのポリマーが良いか、どの大きさが良いかなどをターゲットや徐放効果を調べることによりさらに明らかになった。特筆すべきことは、これまでは脂溶性薬物の方が適していると考えられたし、我々の前回の特許でもそのように記述したが、今回亜鉛を用いた燐酸ベタメタゾンなどの水溶性低分子の疎水化技術および封入技術がほぼ完成したことである。この金属法を用いると、これまで作製した徐放性ターゲット製剤にくらべ、徐放効果が優れるようになった。もちろんターゲットと徐放の両効果を備えた製剤はこれまで世界的に無く、我々の考えが初めてである。恐らくリン酸ベタメタゾンを用いたナノ粒子は今後組成をあまり変えることなく最終製剤になるであろう。そして使用されている成分が全て認可されている医薬品と基剤、そして認められている量なので今後の開発がかなり確実と考えられる。

一方PGE1ナノ粒子については、最終製剤に使う予定のPGE1誘導体の合成が未だ成功していないので、来年度それを用いた製剤が作製されることになるが、恐らくこれも現在使われているPGE1のDDS製剤より優れたものになると思われる。その他、抗癌薬、抗微生物薬、ワクチンとしても本ナノ粒子は役に立つものと考えられる。

次に、最近再生医療の研究が著しく盛んであるが、再生医療に使用する成長因子の使用が不可欠な場合が多い。局所投与するにしろ全身投与するにしろ、その徐放効果が極めて重要であることは、現在ほぼ専門家のあいだでは一致した意見になっている。我々の検討でも血管新生成長因子に関して、同じ投与量でも徐放製剤にするのとししないのでは、皮下における血管新生が著しく違うことを認めている。今後開発される我々の新しい徐放製剤がインターフェロン、インスリン、抗体などこれまでの医薬品とともに、FGF、HGF、BDNF、G-CSFなどの成長因子に応用され、再生医療に大きく貢献することを期待している。

## E. 結論

申請時テーマとした5つの項目のうち、主なテーマであるターゲットと徐放効果を合わせて持つナノ粒子製剤の研究に関しては、種々研究を行った結果、水溶性ステロイドであるリン酸ベタメタゾンナトリウムを亜鉛で疎水化したものを200nmのPLGA粒子に封入した製剤が最も適しているとの結果を得た。PGE1についても同様の研究を行っている。つぎに多孔性ハイドロキシアパタイトおよび栓塞技術との併用をはじめとする徐放製剤の研究に関しては、これらのキャリアーの性質の解析および栓塞技術が次第に確立した。そして一部の医薬品については徐放効果のあることが示された。これらの結果をもとにし、来年度さらに臨床応用に近づくよう研究を推進していく。

## 平成15年度

### 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で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、キャリアーとして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的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が、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ー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した製剤で、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ジュバント関節炎に本ナノ製剤を対照のベ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・リン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べ、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んば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を含む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バ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について

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、燐酸ベタメタゾンを含む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バント関節炎で検討したところ、対照のベ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があると考えている。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ると考えている。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回の注射ですむ製剤ができるものと考えている。

## ② G-C S F 製剤について

G-C S Fは、抗がん剤治療のときの白血球減少になくし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ず、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ところはなく、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-CSF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、リン酸ベタメタゾンと亜鉛を疎水化し、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べ、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、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。

## 平成16年度

### 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多孔性ヒ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られ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、脂溶性薬物の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SiRNA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-CSF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。これにハイ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-CSF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-CSF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。多孔性ハイ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 SiRNA 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。

#### IV. 研究発表

##### 論文発表

1. 水島 裕 ナノテクノロジー・再生医療・DDS Drug Delivery System, 17(6), 459, 2002.
2. 水島裕 新しいDDS製剤の展望について 応用医薬、181(3)、12-39、2002.
3. 水島 裕 DDSの実際と将来、日本の医薬品展望 日本医学 (共立出版、高久史磨)、68-92、2002.
4. Takenaga M., Yamaguchi Y., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y. and Igarashi R. A novel sustained-release formation of insulin with dramatic reduction in initial rapid release. J. Controlled Release 79, 81-91, 2002.
5. Shoji Y. Shimada J. and Mizushima Y. Drug delivery system to control infectious diseases. Curr. Pharm. Design, 8, 455-465, 2002.
6. Takenaga M., Yamaguchi Y., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y., and Igarashi R. A novel insulin formulation can keep providing steady levels of insulin for much longer periods. J. Pharm. Pharmacol., 54, 1189-1194, 2002.
7. Yamaguchi Y., Takenaga M., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y., and Igarashi R. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives. J. Controlled Release, 81(3), 235-250, 2002.
8. 水島 裕 第13章 今後の日本の医薬品開発と臨床試験 岩波講座現代医学の基礎13(加藤隆一、水島裕編)、2002、229-247.
9. Kanazawa H., Tsubayashi A., Nagata Y., Matsushima Y., Mori C., Kizu J., and Higaki M. Stereospecific analysis of loxoprofen in

- plasma by chiral column liquid chromatography with a circular dichroism-based detector. *J Chromatography A*, 948, 303-308, 2002
- 1 0. Fukuya Y., Higaki M., Higaki Y., and Kawashima M. Effect of vitamin D3 on the increased expression of Bcl-xL in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 293, 620-625, 2002
- 1 1. 檜垣 恵、峰 リサ 関節リウマチにおける Toll-like レセプターの発現 *臨床免疫*、38 (6)、606-611、2002
- 1 2. Kanazawa H., Okada A., Higaki M., Yokota H., Mashige F., and Nakahara K. Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 Phenotype. *J Pharm Biomed Anal*, 30(6), 1817-1824, 2003
- 1 3. 水島 裕 細胞は薬か? *臨床医学* 19 (4)、296-298 2003
- 1 4. 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
- 1 5. 水島 裕 21世紀のDDS 血液・免疫・腫瘍 8(2) 109-111 2003-2004
- 1 6. 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
- 1 7. 水島 裕 リポ PGE1 製剤開発から20年 *Drug Delivery System* 18(5) 426-430 2003
- 1 8. 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 バイオミメティックス法 *日本複合学会誌* 29(4) 123-128 2003
- 1 9. Kanazawa H, Okada A, Higaki M, Yokota H, Mashige F, Nakahara K. Stereospecific analysis of Omeprazole in human plasma as a