薬 剤 学, **69** (5), 349–353 (2009)

≪若手研究者紹介≫

DDS技術の開発とその評価

柴 田 寛 子* Hiroko Shibata
国立医薬品食品衛生研究所

1. は じ め に

コラム執筆の依頼を受けた際，「今までの研究内容」を振り返り，同時に「今後の展望」を考えてみた．まとまりのある文章を書くのは困難だと思い躊躇したが，大変貴重な経験でもある．このような機会を与えてくださった編集委員の方々に感謝し，稿を進めたいと思う．

はじめてドラッグデリバリーシステム（DDS）という概念を耳にしたのは，静岡県立大学2年か3年の放射線の授業だったと思う．どのようにしてリポソームが創られ，いかにインテリジェントな戦略か，奥直人先生（現医薬生命化学分野教授）の話を必死でノートに書き込んだのを覚えている．純粋に，なるほど理にかなっている，と思った．例に漏れず，本題の放射線に関する授業内容は覚えていない．DDSへの希望とは裏腹に，くじ引きで決まった薬品資源学分野は，リポソームの研究をしていた薬品製造工学と経皮吸収などDDS製剤を扱っていた薬剤学の部屋に挟まれていた．けれど，辻邦郎教授，糠谷東雄助教授，石田均司講師のご指導のもと，大豆からの成分抽出とラットへの投与に奮闘していた日々が，今の筆者の礎を形成していると信じている．

*2002年静岡県立大学薬学部卒業，2007年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了，博士号取得．2007年4月より国立医薬品食品衛生研究所薬品部研究員．受賞歴：2006年，ファーマバイオフォーラム最優秀発表賞．日本薬剤学会第21年会最優秀発表者賞．モットー：チャレンジ精神を持って，何事も楽しむ．趣味：華道，映画鑑賞，上達しないテニス．
連絡先：〒158–8501 東京都世田谷区上用賀1–18–1
TEL: 03–3700–8486 FAX: 03–3707–6950
E-mail: h-shibata@nihs.go.jp

とにかく最先端の研究がしたい，誰も知らないことを発見して社会に貢献したい，他大学の大学院へ進学を希望した理由である．大きな大学へ行けば，大きな研究ができる，と短絡的に考えていた．そんな筆者にとって，阪大薬学部薬剤学分野のホームページはとても魅力的で，真弓忠範教授（現神戸学院教授，大阪大学名誉教授）の理念，斬新なアイディアに強烈なインパクトを受けた．生命現象に学び，その生命現象を応用して画期的な治療法を開発する．低分子化合物だけでなく，遺伝子やタンパク質，細胞そのものまでをも薬ととらえ，それらを必要な場所に必要な時間·必要な量を送達する“DDS技術”の開発を目指す．これが研究室の大きなテーマだったと理解している．真弓先生をはじめ，中川晋作助教授（現薬剤学分野教授），堤 康央助手（現毒性学分野教授）のご指導の下，研究に没頭できたことは，この上ない幸運だったと思う．

さて，このコラムの題名だが，内容と合っていないのではないかと，思われるかもしれない．前半に博士課程時代の研究成果「DDS技術の開発」を，後半は現在国立衛研で行っている仕事「DDS製剤の評価」について紹介する．二つをつなげる唯一のキーワードがDDSだったことをご了承いただきたい．

2. レセプターへの選択的ターゲティング能を付与した機能性人工タンパク質の創製

サイトカインや増殖因子など生理活性タンパク質は鋭い効果を発揮するため，“夢の治療薬”として期待されていた．しかしその多くは，複数のレセプターを介して多様な生理活性を示すため，目的とする治療作用だけでなく重篤な副作用を招いてしま

い，臨床応用は断念されている．この問題点を克服するには，疾患や治療目的に応じて，目的とするレセプターに対して選択的ターゲット能を有したアゴニストやアンタゴニストといった機能性人工タンパク質（アミノ酸改変タンパク質）を，迅速に創出できる方法が必要である．この創薬テクノロジーは，言いかえるならば，多様な生理作用の中から目的治療作用のみを選択的に引き出す“分子レベルの drug delivery system（DDS）”であり，蛋白質による疾病治療の最適化を目指した生物学的 DDS と位置づけられる．そこで筆者は，代表的な炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF）を対象とし，「目的レセプターの選択的ターゲティング能を有した機能性人工タンパク質創製技術の開発」を試み，その基礎情報の集積を図った．

TNF は，その過剰発現がリウマチなど自己免疫疾患の発症や悪化に関与しており，TNF に対する中和抗体や可溶型 TNF レセプターなどの TNF 阻害剤が治療薬として臨床応用されている．しかし，TNF の二種類のレセプター（TNFR 1 および TNFR 2）を介した生理活性は宿主の生体防御に必須であるため，これら TNF 阻害剤は発癌率の上昇や結核感染症などの重篤な副作用を発現してしまう．一方で，自己免疫疾患によっては，どちらか一方のレセプターが病態の寛解に関わる場合もあり，従来までの TNF 阻害剤では逆に病態悪化を招くことが報告されている．従って，どちらか一方のレセプターのみを選択的に阻害できるアンタゴニストができれば，様々な炎症性疾患に対して安全かつ有効な治療戦略を展示できる．2 種類の TNF レセプターのうち，特に炎症反応の惹起に深く関与しているのは TNFR 1 である．そこで，ファージ表面提示法を応用して，TNFR 1 へのターゲティング能とアンタゴニスト活性を有した機能性人工 TNF の創製を試みた[1]．

これまで機能性人工タンパク質は，アミノ酸を一つずつ他のアミノ酸へ置換することで作製されようとしてきたため，膨大な時間と労力が掛かる上，目的とする機能性人工蛋白質は殆ど得られていない．その点研究室では，ファージ表面提示法を利用することで，1 億種類以上もの多様性を有した構造変異体ライブラリを構築し，この中から目的とする機能性人工蛋白質を創製できるシステムが確立されていた．そこで筆者はこのシステムを応用することで，TNFR 1 選択的アンタゴニストの創製を試みた．まずは，TNF レセプターとの結合領域にある 6 個のアミノ酸を，他の 20 種類のアミノ酸へ網羅的に置換した構造変異 TNF 発現ファージライブラリを作製した．その中から TNFR 1 への結合親和性を利用したパンニングという操作を繰り返すことで，TNFR 1 に強く結合するファージクローンを濃縮・回収した．回収された TNF 構造変異体クローンの TNFR 1 を介した生物活性を評価し，TNFR 1 に結合するが，生物活性を示さないクローンを複数同定した．これら候補クローンのうち，最も TNFR 1 選択性に優れ，かつ殆ど TNFR 1 を介した生物活性を示さないクローン（R1antTNF）について，詳細な機能評価を行った．

R1antTNF が野生型 TNF（wtTNF）と TNFR 1 の結合のみを選択的に阻害できるか検証するため，競合的 ELISA を行った．その結果，R1antTNF は wtTNF と TNFR 1 との結合は濃度依存的に阻害するのに対して，TNFR 2 との結合は全く阻害しないことが判明した（Fig. 1）．また，R1antTNF は wtTNF による TNFR 1 を介した細胞傷害活性を競合的に阻害し，アンタゴニスト活性を示すことを確認した．これら *in vitro* の結果から，R1antTNF は，TNFR 1 への選択的ターゲティング能とアンタゴニスト活性を有した機能性人工 TNF であることが判明した．ガラクトサミンと wtTNF の共投与によって誘発される急性肝炎モデルに対し，R1antTNF をガラクトサミン /wtTNF と同時に投与したところ，濃度依存的に肝障害マーカーである ALT の上昇が抑制された（Fig. 2）．さらに，ポチエチレングリコールで修飾した R1antTNF を，関節リウマチモデルであるコラーゲン関節炎モデルへ投与したところ，発症率が低下する傾向が認められ，関節炎スコアの上昇が有意に抑制された．以上の結果から，R1antTNF は *in vivo* においてもアンタゴニスト活性を示し，抗炎症効果を発揮することが明らかとなった．

このように，サイトカインの構造変異体が，レセプターに結合するにもかかわらず，そこから発現される生物活性に対して拮抗的に阻害した例は，世界的にも殆ど報告されていない．R1antTNF は上述してきた機能性人工タンパク質の創製システムの有用性を示すものである．また，R1antTNF の X 線結

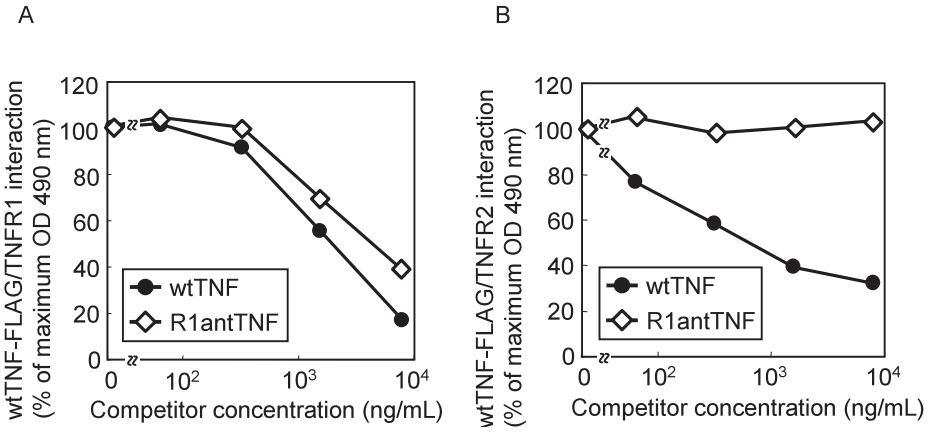

Fig. 1. Competitive bind of wtTNF and R1antTNF to TNFR1 and TNFR2. Different concentrations of wtTNF and R1antTNF were premixed with a fixed concentration of wtTNF-FLAG and added to TNFR1-(A) or TNFR2-(B) coated plates. Binding of wtTNF-FLAG was detected.

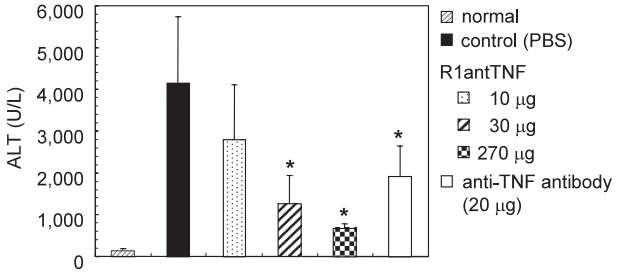

Fig. 2. Serum concentration of ALT on GalN/wtTNF-induced hepatitis mice. Blood samples were collected 9 h after the challenge. The serum concentration of ALT (alanine aminotransferase) was measured ($n=6$). *: $p<0.05$ versus control group.

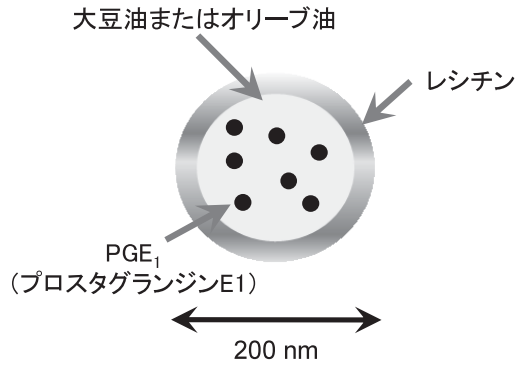

Fig. 3. リポ PGE_1 製剤の構造

晶構造解析から興味深い知見が得られており，新規TNF阻害剤の開発につながるものと考えられる．今後，本システムが他のサイトカインへ応用されることで，既成概念を覆す画期的な機能性人工タンパク質や治療戦略が開発されるものと期待している．

3. リピッドマイクロスフェア製剤の製剤機能・品質評価

筆者は現在，国立医薬品食品衛生研究所薬品部に就職し，川西徹部長，四方田千佳子室長のご指導の下，主にDDS技術を応用した機能性製剤の評価法に関する研究を進めている．リポソーム製剤などナノ粒子製剤は，臨床開発や製品化が進んでいるものの，評価基準等が設定されておらず，品質確保の方策は十分に確立されていない．そこで，このようなDDS製剤の開発·評価ガイドラインの作成に繋がる基礎データの集積を試みている．静岡県立大学では隣の研究室で，阪大では隣のチームが扱っていたリポソームを研究することとなり，何か因縁を感じている．さて，このコラムでは，リピッドマイクロスフェア（LM）製剤の製剤品質評価を行った結果を紹介する[2]．

プロスタグランジン E_1（PGE_1）は，強力な血管拡張作用および血小板凝集抑制作用を発揮するものの，非常に血中半減期が短いうえ，多様な生理作用による副作用を発現してしまう．そこで，この PGE_1 を微細な脂肪粒子に溶解し，レシチンでコーティングすることで安定化させたLM製剤，リポ-PGE_1 製剤が開発された（Fig. 3）．リポ PGE_1 は病変部位に効率よく集積し，少量で優れた有効性と安

全性を示す．現在では，慢性動脈閉塞症に伴う阻血性潰瘍や，糖尿病に伴う皮膚潰瘍，経上腸間膜動脈性門脈造影における造影能の改善などに広く臨床応用されている．既に特許が切れており，先発品2製剤，後発品2製剤が市販されている．しかし近年，医療現場において，リポ PGE_1 を先発品から後発品に変更したところ，点滴静注時に輸液ルート内に固形浮遊物を認め，滴下しなくなる現象が報告された．これまでに，アルカリ性条件下にカルシウムイオンが存在することで，固形浮遊物が生成し，滴下速度が低下することが指摘されている．この製剤自体の pH は5付近に設定されており，静脈炎や血管痛を緩和する目的で，pH の高い輸液（ハルトマン pH8 HD）を使う，もしくは 7% 炭酸ナトリウム溶液を添加する場合に，このような配合変化が起きたようである．そこで，上記4製剤について，各種輸液と懸濁した後に，先発品と後発品の間で製剤品質に差があるのかどうか検証した．

点滴静注時の滴下速度の減少や輸液ルートが詰まる原因として，脂肪粒子の粒子径が増大しているのではないかと考えられた．生理食塩水，乳酸リンゲル液，混合アミノ酸輸液など計7種類の輸液に懸濁した後，経時的に動的光散乱法（DLS）で平均粒子径を測定した．後発品をハルトマン pH8 HD 輸液に懸濁した際，輸液ルートに凝集物が観察されたものの，大きな平均粒子径の変化は殆ど認められず，他の輸液でも大きな変化は認められなかった．そこで，0.5 μm 以上の粗大粒子数をカウントできる単一粒子光学検知法（SPOS）を使って，輸液に懸濁した製剤中の粗大粒子数を測定した．その結果，後発品とハルトマン pH8 HD 輸液の混合液中で，1 μm 以上の粗大粒子数が著しく増加していることが判明した．また，同じく乳酸リンゲル液であるラクテック輸液に炭酸ナトリウム液を混ぜて pH を低くした輸液と後発品を混合した場合も同様の傾向が認められた．一方で，先発品をこれら2種類の輸液と混合した場合，粗大粒子数に大きな変化は認められなかった．また，他の輸液に後発品を懸濁しても，粗大粒子数に変化は認められなかった．

リポ PGE_1 製剤の後発品に関する報告の中には，PGE_1 の粒子内保持率が低いという報告もあった．リポ PGE_1 製剤は，脂肪粒子のもつ病変部位への集積性や，生体内での PGE_1 活性維持を目的としたDDS 製剤である．従って，製剤機能を発揮するには，脂肪粒子内に PGE_1 が安定に保持されていることが重要である．そこで，各製剤を輸液中で透析することによって，PGE_1 粒子内保持率を測定し，輸液や製剤によって PGE_1 保持率に変化があるかどうか検証した．その結果，ハルトマン pH8 HD とラクテック輸液に炭酸ナトリウム液を混ぜた場合は，生理食塩水と比較して極めて速く粒子内保持率が低下したものの，各製剤間で粒子内保持率に差は認められなかった．

以上の結果から，後発品を特定の輸液と懸濁して点滴静注する際，1 μm 以上の粗大粒子数の大幅な増加が，滴下速度が低下する，又は輸液ルートが詰まる原因の一つとであることが示唆された．PGE_1 粒子内保持率を測定したところ，先発品より後発品の PGE_1 粒子内保持率が低いということはなく，先発品と後発品で臨床効果が大きく異なる可能性はかなり低いものと考えられる．また，今回の検討では，SPOS 法を使うことで，DLS による平均粒子径の測定だけでは分からなかった粒子径分布の変化を検出することができた．従って，SPOS 法による粗大粒子数の測定は，輸液との配合変化など LM 製剤や脂肪乳剤の製剤安定性を評価するのに有効な方法であると言える．

4. お わ り に

筆者の研究生活は就職を機に，開発型の応用科学からレギュラトリーサイエンス（評価科学）へと大きく方向転換した．レギュラトリーサイエンスは，狭義には規制基準や行政に関連した科学と理解され，応用科学とは視点や価値基準が全く異なるものである．しかし，見ている先にあるのは DDS 製剤であることに変わりはない．昨今の DDS 製剤への期待は大きく，創薬技術の進化と伴に，DDS 技術もより高度なものへと進化し，多種多様な DDS 製剤が開発されるであろう．従って，DDS 製剤の有効性・安全性を担保するための品質評価法・評価基準の設定は急務である．微力ながら，DDS 製剤の開発・評価ガイドラインの作成を通じて，我が国における DDS 製剤・技術開発の促進に貢献できればと願っている．

引 用 文 献

1) H. Shibata, Y. Yoshioka, A. Ohkawa, K. Minowa, Y. Mukai, Y. Abe, M. Taniai, T. Nomura, H. Kayamuro, H. Nabeshi, T. Sugita, S. Imai, K. Nagano, T. Yoshikawa, T. Fujita, S. Nakagawa, A. Yamamoto, T. Ohta, T. Hayakawa, T. Mayumi, P. Vandeenabeele, B.B. Aggarwal, T. Nakamura, Y. Yamagata, S. Tsunoda, H. Kamada, Y. Tsutsumi, Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist, *J. Biol. Chem*., **283**, 998–1007 (2008) .
2) H. Shibata, H. Saito, C. Yomota, T. Kawanishi, Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: Alteration in the number of large particles in infusion solutions, *Int. J. Pharm*., in press.