

## 《若手研究者紹介》



## 日本およびアイスランドでの DDS 研究成果の紹介

羽 田 乃 武 子\* Nobuko Hada

アイスランド大学薬学部

## 1. はじめに

日本から飛行機を乗り継ぐことおよそ 20 時間弱、英国の北西、北大西洋のほぼ中央にアイスランドという島国はある。人口約 30 万人、北海道と四国を合わせた程の大きさのこの小国は、島の一部が北極圏に接していながら、メキシコ湾流の影響により緯度の割には温暖である。アイスランドといえば、Björk などの世界的ミュージシャン、火山や氷河などの大自然、温泉、夏の白夜そして冬のオーロラなどが有名であるが、他に歴史、文学、エネルギー政策などの面でも非常に興味深い。アイスランドはこのような魅力あふれる国ではあるが、日本ではやはりまだまだ馴染みの薄い国なのかもしれない。アイスランドと間違われることもしばしばである。しかし 2008 年、世界金融危機で大きな経済危機に陥ったことがメディアを通して世界に伝えられ、日本での知名度も少なからず上がったことは皮肉なことである。

この国の南西部、世界最北の首都レイキャビクに筆者の勤めるアイスランド大学薬学部がある。教授を含めた教員が 9 人、1 学年の学生(B.S. 3 年+M.S.

2 年) 数は約 30 人と学部の規模は小さいが、Ph.D. コース (3~5 年) の学生は 10 人程在籍している。また、海外からの留学生も多い。2007 年 4 月から、縁あって本学部の Sveinbjörn Gizurarson 教授のもとで鼻から脳への drug delivery system (DDS) のプロジェクト研究を立ち上げるようになった。日本で博士の学位を取得し、研究者としてのスタート地点に立ったばかりの筆者にとって、このような機会をいただけたことは非常にラッキーなことであった。研究開始当時、注文した試薬が届くのに 3 ヶ月もかかったり、使用可能な HPLC が学部に 1 台しかなかったりと不便なこともあったが、全体を通してみれば大変楽しく貴重な経験をさせていただくことができた。

筆者の研究との出会いは大学 3 年の秋、恩師である杉林堅次教授の主宰する城西大学薬学部臨床薬物動態学 (現薬粧品動態制御学) 講座に配属した頃である。筆者はここで主に経皮 DDS の研究に携わり、研究の基礎からもの見方や考え方、さらに研究の面白さを学んだ。そして気づけば修士、博士課程と進学し、現在もアイスランドで研究生生活を続けているのであった。

さて、前置きが長くなったが、今回本コラムで紹介させていただく研究成果は、筆者が城西大学薬学部臨床薬物動態学講座にて大学院時代に携わった「培養皮膚を用いた新規 DDS の構築」に関する研究および現在ポスドクとしてアイスランド大学薬学部で行っている「薬物の鼻から脳への直接デリバリー」に関するプロジェクト研究の成果である。様々な分野の先生方、研究者や学生の方々に少しでも興味を持っていただけたら幸いである。

\*2000 年、城西大学薬学部薬学科を卒業後、同大学院薬学研究科に進学。2006 年 3 月、杉林堅次教授のもとで博士 (薬学) の学位を取得。2007 年 4 月より、アイスランド大学薬学部の Sveinbjörn Gizurarson 教授のもとで鼻から脳への DDS に関するプロジェクト研究に従事、博士研究員 (2009 年に任期終了予定)、現在に至る。2008 年、日本薬学会 Postdoctoral Presentation Award 受賞。研究モットー: Be innovative and sympathetic. 趣味: 旅と音楽。連絡先: Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Iceland, Hagi, Hofsvallagata 53, 107 Reykjavik, Iceland E-mail: nobuko@hi.is

## 2. 培養皮膚を用いた新規 DDS の構築

近年の Tissue engineering (再生医療) 技術の進歩により, 重症火傷のような皮膚損傷に培養皮膚代替物を適用 (移植) する治療法が確立されつつあり, 様々な創傷治療の改善に貢献している<sup>1)</sup>. 重症火傷のような皮膚損傷の治療では創を直ちに覆うことが創傷処置の基本の1つであり, 同時にこのような皮膚損傷では2次感染の危険性が高く死亡の原因ともなるため, 2次感染に対する処置も必要となる. 現在その防止のため抗生物質軟膏等を用いた薬物治療が行われているが, この場合移植皮膚表面に抗菌薬を適用するよりも予め抗菌物質 (抗生物質, 抗菌ペプチドまたはその発現遺伝子) を封入した培養皮膚を製剤として直接適用する方が効果的な治療が期待できると思われる.

このような背景から, 筆者らは重症火傷や褥瘡などの重篤な皮膚欠損に用いることのできる新しい DDS として, 損傷皮膚の保護作用ばかりでなく2次感染の防止作用をも併せ持つような培養皮膚型貼付剤を考案し, その有用性に関する検討を行ってきた. 本 DDS は, 再生医療と薬物治療または遺伝子治療の2つの領域を融合させた画期的な製剤であると考えられる.

### 2.1 数学的アプローチに基づく抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性評価

本実験では, 市販の3次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high, 東洋紡) に塩酸テトラサイクリン (TC-HCl) またはクロラムフェニコール (CP) を負荷した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤 “drug-loaded LSE-high” を調製し, その有用性について数学的解析から評価を行った<sup>2)</sup>. まず, drug-loaded LSE-high からの薬物放出実験より LSE-high 中の薬物拡散係数 ( $D_{LSE}$ ) と初濃度 ( $D_0$ ) を, 薬物溶液からの薬物のstripped rat skin 透過実験より stripped skin 中の薬物拡散係数 ( $D_{skin}$ ) をそれぞれ算出した. 次に, drug-loaded LSE-high からの薬物のstripped skin 透過データを, 算出したパラメータ ( $D_0, D_{LSE}, D_{skin}$ ) と構築した2および3層拡散モデル (Fig. 1) を用いて解析し, 薬物のstripped skin/LSE-high 分配係数  $K_{skin/LSE}$  を算出した. さらに, それぞれの拡散モデルからstripped skin (損傷皮膚モデル) 中薬物濃度挙動をシミュレーションした. CP では2層

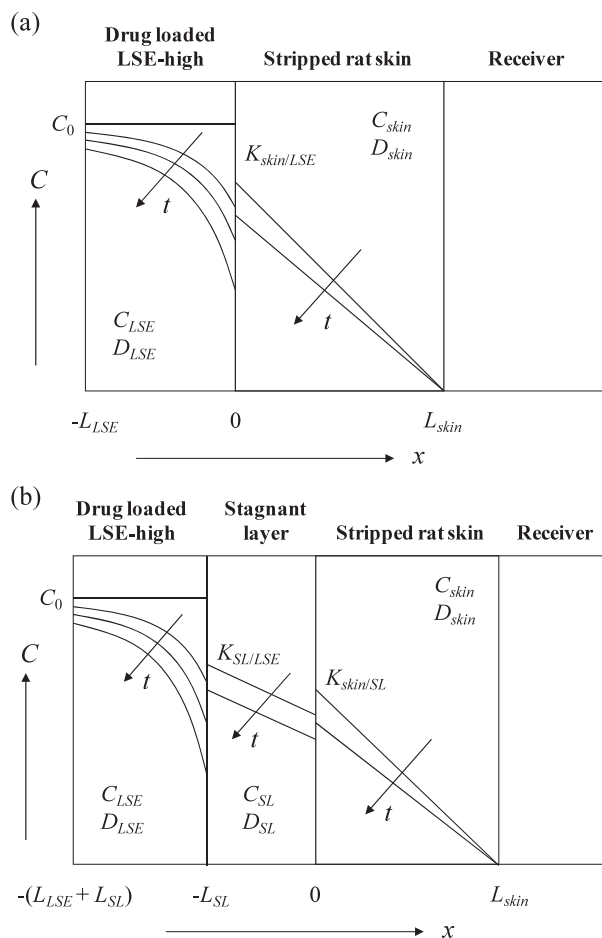


Fig. 1. Typical concentration-distance ( $C-x$ ) profiles of CP (a) and TC (b) in the LSE-high, stagnant layer and stripped skin at the skin permeation experiment. (a): Two-layered diffusion model. (b): Three-layered diffusion model.

拡散モデルを用いて良好な解析結果が得られた. 一方, TC では LSE-high-stripped skin の2層膜間に stagnant layer を組み込んだ3層拡散モデルを用いることで良好な解析結果が得られた. これは, TC では LSE-high から stripped skin への薬物の分配に遅れが見られることによると考えられた.

これらの解析の結果, 表皮表面 (創傷面) 付近の薬物濃度は, 様々な細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) 以上であり, 本システムの有用性が示唆された. また, 本実験で構築された拡散モデルを用いた解析方法により drug-loaded LSE-high を皮膚適用したときの皮膚中薬物挙動がある程度予測可能であることが示唆された.

## 2.2 遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製に関する検討

これまでの研究により、抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性が示唆された一方で、封入した抗生物質の細胞毒性により培養皮膚細胞の viability が低下することも明らかとなった。そこで、抗生物質の代替として内因性抗菌ペプチドの発現遺伝子を培養皮膚の細胞に導入することができれば、培養皮膚の viability を低下させることなく抗菌活性を得ることができると考えた。我々は、ヒト皮膚にも発現し炎症時の感染防御に関与すると報告されている内因性抗菌ペプチドである human- $\beta$ -defensin-2 (hBD-2)<sup>3)</sup> に着目した。このようなヒト皮膚に存在する内因性抗菌ペプチドの遺伝子を培養皮膚に導入することで、より従来の培養皮膚に近くかつ2次感染防止作用を持つ培養皮膚型貼付剤が調製可能であると考えられる。

筆者らは、hBD-2の分泌能を有する遺伝子導入培養皮膚の構築を目指し、まず最初のアプローチとして、モデルたん白質を発現する遺伝子導入培養皮膚の調製法について検討した<sup>4)</sup>。本研究ではモデル遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) 発現遺伝子が組み込まれたプラスミドベクター pQBI25 を、培養皮膚として3次元培養真皮モデル (cultured dermis model; CDM) を用いて異なる調製法で遺伝子導入培養真皮を構築し、GFP 発現を観察した。遺伝子導入には HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) envelope vector (HVJ-E) を利用した。

実験の結果、予め細胞に遺伝子導入し GFP 発現が確認された遺伝子導入線維芽細胞を用いて培養真皮を構築する pre-transfection 法でも、培養真皮を構築してから遺伝子導入する post-transfection 法でも、培養真皮中に GFP の発現が確認され、遺伝子導入培養真皮を構築できることが示された。また、遺伝子導入による cell viability の低下はほとんど認められず、本調製法は培養真皮の viability を保持したまま遺伝子導入培養真皮を構築できることが示唆された。また、今回の調製法と実際に生理活性を持つペプチド (抗菌ペプチドなど) 発現遺伝子を用いることで、目的に応じた遺伝子導入培養皮膚を調製することが可能であると示唆された。

## 3. 中枢神経系 (CNS) 治療候補薬の鼻から脳への直接デリバリー

高齢化社会が急速に進む現在、アルツハイマー病や老人性痴呆のような難治性中枢神経系疾患の問題が重要性を増し、これら疾患の画期的な治療薬の開発が求められている。近年、抗悪性腫瘍薬であるメシル酸イマチニブ (Gleevec®, Glivec®) がアルツハイマー病の原因と考えられている脳内の  $\beta$ -アミロイドたん白の産生・蓄積を阻害することが報告された<sup>5)</sup>。この成果は、アルツハイマー病の新規治療薬開発のための第一歩となるであろう。しかしながら、血液と脳の間には血液脳関門 (BBB) と呼ばれる強固な薬物移行障壁が存在するため、一部の薬物や栄養素を除いて、一般に静脈内投与、経口投与された水溶性薬物の脳への移行性は悪く、中枢神経系疾患に対する治療薬開発の大きな障害となっている。そこで筆者らは、古くから報告されている鼻と脳とのつながりに着目し、脳への効率的な薬物送達を可能にする新規投与部位としての鼻粘膜の有用性について検討している。経鼻投与により様々な物質が脳脊髄液 (CSF) および CNS に効率的に移行するという報告が数多くある一方で、鼻腔から CSF または CNS への直接移行経路の証拠はないとする報告もある<sup>6)</sup>。また、鼻から脳への直接移行経路の存在を支持する数ある報告の中で、その移行メカニズムについて十分に論じているものは少ない。

本研究では、アルツハイマー病治療候補薬であるイマチニブを鼻粘膜から脳内に効率的に移行させることを最終目的とし、まず、経鼻投与後のイマチニブの鼻から脳への直接移行の有無、脳内移行性、脳からの消失過程について薬物動態学的に評価した。

経鼻 (*i.n.*) 投与後のイマチニブの脳内移行性さらには体内動態を明確にするために、マウスを用いた *in vivo* 評価系を構築した。本方法では、マイクロピペットを用いてマウスの鼻孔からイマチニブ製剤 (溶液) を投与 (投与 volume : 7  $\mu$ L/both nostrils) し、一定時間後に回収した血漿、脳および嗅球中の薬物濃度を測定した。*I.n.* 投与後 0~60 min のイマチニブ濃度の脳/血漿 (B/P) 比は、イマチニブ静脈内 (*i.v.*) 投与後のそれに比べ有意に高く、*i.n.* 投与がイマチニブの脳内送達のための投与経路として優れていることが示唆された。次に、*i.v.* 投与または



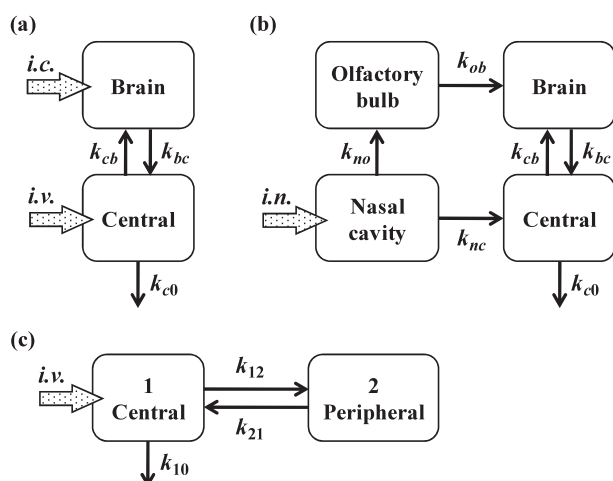


Fig. 2. Compartment models of imatinib following intravenous (*i.v.*) and intracranial (*i.c.*) injection (a), intranasal (*i.n.*) administration (b) and *i.v.* injection for analysis with linear 1- and 2-compartment models (c).

脳内 (*i.c.*) 投与後のイマチニブの血漿、脳中薬物濃度を2-コンパートメントモデルに基づく差分法により解析し、速度論的パラメータを算出した。また、*i.n.* 投与後のイマチニブの体内動態を詳細に解析するため、マルチコンパートメントモデルを構築した (Fig. 2)。*I.v.* および *i.c.* 投与から得られたパラメータとマルチコンパートメントモデルに基づく差分法を用いて、*i.n.* 投与後の血漿、脳および嗅球中薬物濃度を同時解析し、各コンパートメント間の移動速度定数 ( $k$ ) を算出した。この結果、*i.n.* 投与されたイマチニブは嗅球を介し脳内に移行するものの、脳内から血漿中へ速やかに排泄されることが示唆された。これは P-糖たん白質を介した排泄輸送機構によるものであると考えられる<sup>7)</sup>。また、鼻腔内のイマチニブは高い割合で鼻粘膜を介し血漿中へ吸収されることも示唆された。

これらの問題を解決し、イマチニブの鼻から脳への移行性を改善するため、現在以下のような研究を行っている。i) *i.n.* 投与後のイマチニブの鼻腔内から全身循環系への吸収を抑制するために、局所血管収縮薬である塩酸エピネフリンをイマチニブ製剤に添加し同様の評価を行った。その結果、イマチニブ濃度の B/P 比は、塩酸エピネフリン添加群で有意に増加した。ii) イマチニブの脳から血漿中への消失を抑制するため、P-糖たん白質抑制薬である elacridar を皮下投与した後、イマチニブを *i.n.* 投与し同

様の評価を行った。本実験については、現在も検討中である。

以上のことから、*i.n.* 投与がイマチニブの脳内送達のための投与経路として優れていることが示唆されたが、より高い脳内貯留性を得るためにはさらなる製剤的検討が必要であると考えられる。

#### 4. おわりに

本稿では、これまでに筆者が日本およびアイスランドで携わることができた2つのテーマ、「経皮 DDS」および「経鼻 DDS」に関する研究成果を紹介してきた。難治性疾患に対する新規 DDS の構築とその評価法の確立というアプローチ方法の点で2つの研究には通じるものがあつた。DDS 開発の基礎として、その評価法の確立は非常に重要である。筆者がこれらの研究で用いた DDS 評価法は、他の様々な薬物や剤形の異なる製剤にも応用可能であるという点で意義のあるものであつたと考えられる。現在、様々な疾患に対する治療戦略の多様化により、さらなる DDS 技術の開発が必要とされている中で、筆者の研究が今後の DDS 研究の発展さらには臨床への応用に少しでも貢献できればと願っている。

最後に、筆者の研究に対する考え方やもの見方に多大な影響を与え、研究者としての基礎の部分を育ててくださった城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座の杉林堅次教授、ならびに常に筆者の意見や発想を尊重して自由に実験をさせてくださったアイスランド大学薬学部の Sveinbjörn Gizurarson 教授に深謝するとともに、これらの研究生活を通して出会うことのできた全ての方々から感謝いたします。Takk fyrir (アイスランド語で「ありがとうございました」) !

#### 引用文献

- 1) G.G. Gallico, N.E. O'Connor, C.C. Compton, O. Kehinde, H. Green, Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *N. Engl. J. Med.*, **311**, 448-451 (1984).
- 2) N. Hada, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Sugibayashi, Cultured skin loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: Mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics, *J. Control. Release*, **108**, 341-350 (2005).
- 3) J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.M. Sch-

- roder, A peptide antibiotic from human skin, *Nature*, **387**, 861 (1997).
- 4) N. Hada, H. Todo, F. Komada, K. Sugibayashi, Preparation and evaluation of gene-transfected cultured skin as a novel drug delivery system for severely burned skin, *Pharm. Res.*, **24**, 1473–1479 (2007).
  - 5) W.J. Netzer, F. Dou, D.M. Cai, D. Veach, S. Jean, Y.M. Li, W.G. Bornamann, B. Clarkson, H.X. Xu, P. Greengard, Gleevec inhibits beta-amyloid production but not Notch cleavage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12444–12449 (2003).
  - 6) P. Merkus, H.J. Guchelaar, D.A. Bosch, F.W. Merkus, Direct access of drugs to the human brain after intranasal drug administration?, *Neurology*, **60**, 1669–1671 (2003).
  - 7) H.Q. Dai, P. Marbach, M. Lemaire, M. Hayes, W.F. Elmquist, Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 1085–1092 (2003).