消化器内科のための DDS 技術

京都大学消化器内科・内視鏡部

仲瀬裕志・松浦 稔*

Technology of Drug Delivery System for Gastroenterologists

Many gastroenterologists have performed various treatments on several diseases such as inflammatory diseases and neoplastic diseases. Therefore, in the field of Gastroenterology, drug delivery system (DDS) is absolutely required for avoidance of drug-induced side effects. Development of DDS with polymeric materials such as biodegradable microspheres, etc., which could carry drugs and cytokines to targeted gastrointestinal tracts and liver, would contribute to future therapeutic strategy for gastrointestinal diseases.

消化器医は炎症性疾患、腫瘍性疾患など多彩な疾患を取り扱う。抗炎症および腫瘍治療をはじめとする様々な薬物療法が常に行われている。従って、Drug delivery system (以下 DDS) を最も必要とする専門分野の1つであるといえる。生体内分解吸収可能な microspheres をはじめとする薬物を担持する高分子材料を用いた薬剤、サイトカインの局所臓器への delivery system の開発が、今後の消化器疾患の治療に貢献する可能性は高い。

Hiroshi Nakase, Minoru Matsuura*

Keywords: drug delivery system, microspheres, inflammatory bowel disease, cytokine, growth factor

はじめに

消化器内科は炎症性疾患、腫瘍性疾患などの疾患を取り扱う科であり、様々な薬物療法が常に行われている。特に臓器をターゲットとした治療法は以前より行われてきた。本章では消化器医にとって必要なドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system, 以下 DDS) の知識および我々が取り組んできた炎症性腸疾患治療における DDS の重要性について論じる。

Drug delivery system (以下 DDS) とは、薬物の体内動態を精密に制御し、生体内に存在する特異的な作用点に望ましい濃度—時間パターンのもとに送達させることによって、最適な治療効果を得ることを目的とする概念である。例えば、臨床上よく使用する経口 Prodrug は科学的手法を利用して体内動態の改善を図った DDS といえる。具体的には、薬物の化学構造を修飾した誘導体のうち、それ自身は

不活性であるが、投与を妨げている障害をうまく回避して生体内に到達した後、さらに親薬物 (薬効を発現することができる状態) に還元され治療効果を発現するように設計されたものである。Prodrug の目的としては、動態制御のほかに、水溶性の付与など、製剤技術上の難点の解消や粘膜障害性の防止などがあげられる。

DDS は主として以下のように分類される。
(a)コントロールリリース：薬物を生体にコントロールされた速度で供給することにより作用部位で適切な濃度—時間パターンを得ることが可能な場合が多い。

(b)ターゲッティング：薬物に標的部位を指向する性質を与えること

(c)吸収改善：薬物の中ではその物理化学的性質から消化管や皮膚などの表面をまったく通過できないものが多数存在する。そこで、対象部位からのこうした薬物の効率の良い吸収を目指す。

特に(b)のターゲッティングは、薬物治療において治療効果と副作用のバランスの改善に直接つながる

* Department of Gastroenterology and Hepatology, Endoscopic Medicine

重要なアプローチと考えられる。¹⁾

DDSの実用化には、薬物の改良だけでは困難であり、薬物を担持する高分子材料あるいは無機材料などマトリックス材料の開発が必要である。がんおよび再生医療などを対象としたDDSについては、薬物を担持する高分子ミセルあるいはリポソームなどを利用する研究が著しく発展し、数々の臨床試験が行われている。DDSの研究において用いられている高分子構造は、ミセル、デンドリマー(樹状構造)およびリポソームなどが主な単体である。これらの高分子構造は他の構造に比べ多量の薬剤を運搬することができるという特徴がある。DDSの研究開発は、欧米においても日本と同様にがん治療、遺伝子治療、再生医療およびエイズ治療への応用を目指して活発に進められている。特にがん細胞へのターゲティングについては、ポリエチレングリコールおよびN-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリル(親水性ポリマー)に抗がん剤をペプチド結合させ、固形がんおよび転移性がん組織への抗がん剤を開発している。また、数nmと粒子径が小さいためより組織に到達しやすいと考えられているデンドリマー(樹状構造)に、抗がん剤のシスプラチンやメソトキセートを結合させる方法も開発されている。DDSが重要な理由は、以下のような効果に期待によるところが大きい。

- (1) 特定の作用だけを取り出すことや、特定の作用の発現を抑え込むことが可能となる
- (2) 効果がよりの確なものとなり、投与量の削減や適用拡大が期待できる。
- (3) 副作用のためドロップアウトした化合物を薬として蘇らせることもできる。

などがあげられる。一方、がん細胞への薬物のターゲティングの研究開発は、これまでがん細胞との抗原-抗体反応を利用し、抗がん剤をがんに集積させようとするアクティブターゲティングの原理に基づいて行われてきた。実験室レベルにおいて一定の成果が得られているが、動物実験においては成功していない。それは、目標とするがん抗原に類似の抗原が血液中および他の正常細胞表面に存在するので、目標部位に必要な量の薬物を集中できないためである。1986年 Enhanced Permeation and

Retention effect (EPR 効果) が提唱されてからは、固形がんに対するターゲティング研究は大きく変化した。EPR 効果とは、腫瘍組織では、正常組織に比べ血管透過性が著しく亢進しているため、高分子や微粒子が血管より流出しやすい。また、リンパ系が発達していないため、腫瘍組織に到達した物質は蓄積する。このような特性を EPR 効果といい、がん細胞に対する受動的ターゲティングを行ううえで重要な因子となっている。具体的には、がん組織では血管新生が盛んで、そのような新生血管の血管内皮には数 100 ナノメートルの間隙が存在する。この間隙を通過可能な大きさのリポソーム (100~200 ナノメートル) に水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を表面に修飾すると、血中を長時間滞留し、受動的に血管内皮間隙を介してがん組織に蓄積する。抗がん剤であるドキソルビシンを内封した PEG 修飾リポソーム Doxil は EPR 効果によりがん組織へ集積することから、カポジ肉腫などの治療に用いられている DDS 製剤として知られている。遺伝子・核酸を搭載したキャリアについても、PEG で修飾し EPR 効果でがん組織へデリバリーすることは有用な戦略である。しかしながら、キャリアが PEG で覆われていると、がん細胞への取り込みやその後のエンドソーム脱出を阻害される。この問題を解決するために、細胞外や細胞内の環境に応用したデバイスの設計が行われている。

消化管を標的とした DDS を目指して

消化管の構造と免疫システム：薬物の吸収の役割の中心を担うのは、小腸である。小腸の内腔は絨毛で覆われており、その絨毛を構成している小腸上皮細胞表面には、刷子縁とよばれる微絨毛が無数に存在する。小腸は栄養成分をはじめ多くの薬物にとっても吸収に適した部位となっている。しかしながら、脂質二重層で構成された形質膜をもつ上皮細胞が密に表面を覆っているため、水溶性の高い薬物や高分子薬物の場合には吸収が大きく制限される。加えて、消化管の粘膜表面は、外界からの抗原の侵入に対して防御的に働いている。この粘膜組織内には、様々な免疫担当細胞が存在しており、中でも侵入し

てくる抗原に対して重要な働きをするのが、粘膜関連リンパ組織である (mucosa associated lymphoid tissue) と考えられている²⁾。この組織は消化管以外の、気管支粘膜、鼻腔にも存在する。表面は follicle-associated epithelium (FAE) によって覆われており、その中に腸管内抗原を能動的に取り込む細胞が存在し、この細胞を M 細胞という。M 細胞によって取り込まれた抗原は FAE 下に分布する樹状細胞やマクロファージにうけわたされる。その結果、T 細胞の活性化、B 細胞のイムノグロブリン産生細胞への分化を促し、種々の抗原刺激に対して免疫寛容や細菌やウイルス感染に対する生態防御のために働く。大腸粘膜においても GALT は存在し、粘膜免疫の誘導を司るとされている。

消化器疾患の中でも、炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: 以下 IBD) の病因、病態は、約半世紀にわたって、原因が研究されてきている。しかしながら、根本的なところは未だ解決されていない。その病態生理は、単純なものではなく、遺伝子学的背景、感染、免疫といった多種多様な要因が複雑にからみあっている。この中でも、腸管における炎症を引き起こし、炎症を持続させる鍵となっている要因は免疫系の異常である。IBD の小腸、大腸粘膜では、活性化マクロファージの増加や機能異常、免疫担当細胞である T 細胞などの活性化が生じている。また、これらの免疫担当細胞と粘膜上皮細胞とのクロストークは互いの細胞自身をさらに活性化させ、種々のサイトカインを分泌し、その結果、持続的な炎症と粘膜障害を引き起こすと考えられている³⁾。

近年、我が国における IBD の患者数が増加しており、社会的問題となっている。消化器医にとって、炎症性腸疾患は避けることのできない疾患群の 1 つであることに間違いない。治療方法は薬物療法が主体であるが、多くの臨床医は、難治性炎症性腸疾患の治療方法としてステロイド剤をはじめとする免疫抑制剤の投与を行うことが多い。しかしながら、これら薬物自体の長期投与は、副作用を惹き起こす頻度が多くなることや、ステロイド剤の場合は長期投与により粘膜上皮再生抑制を惹き起こすことから、投与量の変更および投与の中止を余儀なくされることがしばしば経験される。したがって、炎症

の生じている局所に種々の免疫抑制剤が徐放可能となれば、副作用の少ない治療が可能となると考えられる。IBD の病態から考えると、粘膜固有層に存在する免疫担当細胞、主として抗原提示細胞としてはたらくマクロファージやリンパ球を直接制御することが IBD の治療戦略として重要であると考えられる。そこで、我々は Drug Delivery System (DDS) のシステムを用いることにより、これらの免疫担当細胞をターゲットとする治療方法の開発を試みた。マイクロスフェアの種類には大きく 2 種類に分けられる。1 つは nondegradable microspheres、もう 1 つは degradable microspheres である。前者に属するものには、polystyrene microspheres や cellulosic microspheres があげられる。これらは生体内で分解されず、体内に蓄積する傾向があり、臨床応用には好ましくない。一方、生体内分解吸収可能な後者には poly (L-lactic acid) (PLLA), poly (D,L-lactic acid) (PDLLA), poly (glycolic acid) (PGA), gelatin microspheres などが挙げられる。これらは、非酵素的な加水分解を受ける高分子であり、生体内に蓄積することはなく生体内にとって好ましいといえる。田畑らはこれら微粒子の表面荷電、および大きさを定めることにより、マクロファージをターゲットとすることを可能にしており、Ovalbumin (OVA) を含有させた microsphere を用いて、アジュバントがなくても経口免疫が可能となることや、interferon (IFN) 含有の gelatin microsphere を腹腔内投与することにより、マクロファージの腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を報告している。

我々は、この微粒子を用いて、ダブルエマルジョンからの液中乾燥法により、ステロイド剤の 1 種であるデキサメサゾン (Dexamethasone 以下: DX) を含有させることに成功し (Dx-microspheres)、さらに大きさを 4 μ M 以下に調整した。潰瘍性大腸炎モデルとして、BALB/c マウスにデキストラン硫酸投与による慢性腸炎モデルを作成し、一方、クローン病モデルとして、ラットに trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS) + エタノールを注腸することにより、腸炎を作成し、各モデルに Dx-microspheres と水溶性 Dx 単独を経口投与による治療効果を検討した^{4,5)}。

薬物動態では、Dx-microspheres の経口投与後、Dx の血中濃度は検出以下であり、Dx-microspheres を用いた治療方法は全身に与える影響はきわめて少ないと考えられた (図 1)。また、蛍光色素であるクマリンを含有させた微粒子を腸炎モデルマウスに経口投与後、大腸組織切片を作成し、微粒子の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡にて確認したところ、大腸粘膜内に存在するリンパ濾胞における取り込みが

図 1

In vivo retention ratio of IL-10 in the colon after rectal administration of gelatin microspheres containing ^{125}I -labeled IL-10 or ^{125}I -labeled IL-10 alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of the percentage of the radioactivity remaining in the colonic tissue ($n = 3$). #, $P < 0.05$ compared with IL-10-treated normal mice. ★, $P < 0.01$ compared with GM-IL-10-treated normal mice.

確認された (図 2)。体内分布の検討では放射性同位元素 ^{125}I をラベルした Dx (^{125}I -Dx) を微粒子に含有させ、腸炎モデルに投与することによって検討した。消化管(主として小腸と大腸)以外での取り込みはほとんど認められず、炎症大腸における ^{125}I -Dx の取り込みが有意に高値を示した。おそらく、炎症部位における局所において、immunoglobulin の産生の増加や、潰瘍面に存在する血液などが、微粒子の表面を覆い、マクロファージや M 細胞に取り込まれやすくなると考えられる。さらに、炎症部位においては M 細胞が増加することも報告されている。このことも、炎症部位において microspheres の腸管粘膜内への取り込みが増える理由の 1 つと思われる。IBD 患者の大腸粘膜を生検し、*in vitro* における上皮細胞からの microspheres の取り込みが検討されており、IBD 患者の大腸粘膜で $2\mu\text{M}$ 以下の microspheres が取り込まれる数は、正常人のそれと比較すると、有意に高いことが示された。さらに、LPS による刺激は、培養中の上皮からの microspheres の取り込みを増強させた。この結果は、microspheres が非炎症部位に比べて、炎症腸管粘膜から取り込まれやすくなることを示している。

図 2

(a) Fluorescence microscopy findings. The fluorescent-labeled PDLLA microspheres were predominantly present in the peripheral portion of the colonic lymphoid tissue of the DSS-treated mice 12 h after oral administration of microspheres.

(b) H&E staining at the same section ($\times 200$).

各炎症のマーカーであるミエロペルオキシダーゼ活性やNO産生量においてDx-microspheres群がDx群に比べて、有意に低値を示していた。さらに、大腸粘膜組織から、RNAを抽出し、proinflammatory cytokineやCOX-2の発現を検討した結果でも、Dx-microspheres群ではこれらの発現はほとんど認められなかった。さらに、これらの発現に重要な役割を果たす転写因子であるNF- κ Bの発現を検討した結果、Dx-microspheres群で核内での発現が低下していた。これらの結果から、Dx-microspheresが粘膜内もしくは、マクロファージの取り込まれることによって、Dxの粘膜内での持続的な徐放により、NF- κ Bの核内での発現を低下させ、炎症を抑制すると考えられた。

さらに、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 染色により、大腸粘膜での腸管上皮再生を検討した結果、Dx-microspheres群では、Dx群に比べ、大腸粘膜でのPCNA染色率は高いことが示された。これらの結果から、Dx-microspheresによる治療方法は全身および腸管上皮細胞再生に与える影響が少なく、優れた治療効果がえられることが明らかとなった。

サイトカインのデリバリーシステムの開発

炎症性腸疾患の病態にサイトカインバランス異常が関与していることから、これらに対する抗体や抗炎症性サイトカインの投与が行われつつある。しかしながら、サイトカインは半減期が非常に短いため、全身投与では抗体などに比べると非常にその効果が期待しにくく、投与量が多量になる可能性が考えられる。

ゼラチンやコラーゲンあるいはヒアルロン酸、アルギン酸などの高分子混合物を架橋することによりハイドロゲルを作製し、細胞成長因子やサイトカイン水溶液を凍結乾燥高分子ハイドロゲル内に固定化することが報告されている。さらに、生体内でハイドロゲルは時間とともに分解するが、その分解速度はハイドロゲルの架橋の程度によってコントロールできるのである。田端泰彦（京都大学再生医科学研究所）らは、生体内に毒性の小さい生体吸収性ゼラチ

ンハイドロゲルを利用した細胞増殖因子の徐放化の研究を進めている。血管新生因子の1つである塩基性繊維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)をゼラチンハイドロゲルから徐放することにより、血管新生を誘起させている。この手法を用いることにより腸管局所のサイトカインの放出が可能とならないだろうか？

代表的な抗炎症性サイトカインであるinterleukin-10 (IL-10)は、Th1有意な免疫反応を抑制し、マクロファージからの炎症性サイトカインの分泌を抑制することからクローン病患者に投与されている。しかしながら、全身投与では容量依存性の副作用が生じることが報告されている。したがって、IL-10の腸管局所へのdeliveryが可能となればこれらの副作用を軽減できると考えられる。そこで我々は、このIL-10の腸管局所における徐放が可能なgelatin microspheres containing IL-10 (GMIL-10)を作成した⁶⁾。In vitroにおける溶出試験では、GM-IL10から48時間以内に含有された約90%のIL-10が徐放されることが証明された。さらに、正常群に比べて、腸炎群ではIL-10の大腸における残留率は有意に高く、48時間まで認められた(図3)。

図 3

In vivo retention ratio of IL-10 in the colon after rectal administration of gelatin microspheres containing ¹²⁵I-labeled IL-10 or ¹²⁵I-labeled IL-10 alone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of the percentage of the radioactivity remaining in the colonic tissue (n = 3). #, P < 0.05 compared with IL-10-treated normal mice. ★, P < 0.01 compared with GM-IL-10-treated normal mice.

IL-10 ノックアウトマウス (約 4 週令) に対して、GM-IL10 (IL-10 として $0.05\mu\text{G}$) と IL-10 単独 ($0.05\mu\text{G}$) を週 3 回注腸投与、4 週間後に治療効果を検討した。IL-10 単独注腸投与群は腸炎の抑制が認められなかったが、GM-IL10 投与群では、腸炎の抑制効果が認められた (図 4)。また、腸管内でのマクロファージを分離し、CD40 の発現や IL-12 の遺伝子レベルでの発現を検討した結果 GM-IL10 投与群で有意にその発現が低下していた (図 5)。TNBS 腸炎ラットにおいても、同様の治療効果が認められた。

以上のことから、GM-IL10 による腸管局所への IL-10 の徐放が、新しいサイトカイン療法の 1 つになりうる可能性が示唆された。現在、これらの microspheres による治療方法は、臨床応用にむけて検討中である。以上、DDS を応用した実験段階の炎症性腸疾患治療法について述べた。DX-microspheres や gelatin microspheres に関しては

臨床応用に向け、さらなる検討を積み重ねていきたいと考えている。

上皮再生の観点からみた DDS

前項で述べたように、IBD 治療においては上皮再生にも注目する必要がある。その理由として、IBD の病態において、腸管粘膜のバリアー機能の破綻が重要な役割を果たしているからである。腸管粘膜のバリアー機能の破綻は、腸管内抗原が粘膜固有層に存在する免疫担当細胞と相互作用することにより、腸管粘膜局所での炎症反応の誘導および持続・遷延化に重要な役割を果たしている。従って、免疫抑制を主とした従来の治療法に加え、腸管上皮のバリアー機能の回復を目指した新たな治療法が注目されている。bFGF は強力な血管新生作用を有することから、当初、血管性病変や虚血性心疾患に対する治

図 4

Effects of GM-IL-10 and IL-10 on the colonic mucosa of IL-10^{-/-} mouse. a, histologic findings of the colon in IL-10^{-/-} mouse with various treatments. (A), group A (nontreated IL-10^{-/-} mouse); (B), group B (GM-treated IL-10^{-/-} mouse); (C), group C (IL-10-treated IL-10^{-/-} mouse); (D), group D (GM-IL-10-treated IL-10^{-/-} mouse); (E), normal mice. b, histologic scores of the colon. A score of 4 represents maximal injury and a score of 0 no injury. Data are means ± S.E. (n = 5 for each group). ■, group A (nontreated IL-10^{-/-} mouse); ▨, group B (GM-treated IL-10^{-/-} mouse); ▩, group C (IL-10-treated IL-10^{-/-} mouse); ▤, group D (GM-IL-10-treated IL-10^{-/-} mouse); ■, controls. * ,P < 0.01 versus groups A, B, and C.

図 5

Flow cytometric analysis of CD40 expression on Mac-1-positive cells in the lamina propria and spleen of IL-10 -/- mice after treatment with GM-IL-10 and IL-10. CD40 expression on Mac-1-positive cells was up-regulated in IL-10 -/- mice in the lamina propria and spleen (black line). CD40 expression was down-regulated in the GM-IL-10-treated group (red line), but not in the IL-10-treated group (blue line) in the lamina propria and spleen.

療薬剤として注目されてきた。しかし、*in vitro* における検討から上皮細胞に対する細胞増殖効果が明らかにされ、更に、実験動物モデルを用いた検討から、bFGF は眼、皮膚、神経など様々な臓器において創傷治癒を促進することが明らかとなり、現在では、褥瘡に対する治療薬剤として既に臨床応用されている。我々は、実験大腸炎モデルの1つである

DSS 腸炎モデルを用いて、bFGF の腸炎改善効果およびその作用機序について検討してきた⁷⁾。その結果、DSS 腸炎に伴う体重減少は bFGF 治療群で抑制され、早期の体重回復を認めた。その効果は濃度依存的で。無治療群と比較し bFGF 5.0 mg/kg と 1.0 mg/kg の治療群で有意であった (図 6)。組織学的検討結果では bFGF 治療群、特に 5.0 mg/kg の治

図 6

(A) bFGF投与後の組織学的所見 (HE染色)

(B) Histological score

図 7

療群で、良好な crypt の再生と炎症細胞浸潤の軽減が認められた。また、bFGF 5.0 mg/kg と 1.0 mg/kg の治療群で有意に Histological score の低下が認められた(図 7)。このように bFGF の腸管局所における delivery が腸炎改善効果を示すことがあきらかとなった。すでに増殖因子 EGF を gelatin とエマルジョンし、潰瘍性大腸炎患者に注腸投与する臨床研究がなされている。我々も現在 bFGF の腸管局所徐放可能な delivery system を開発中である。

おわりに

消化器内科のために必要な DDS の知識と我々が取り組んでいる炎症性腸疾患に対する新しい DDS 治療について述べさせていただいた。種々の消化器疾患に対する DDS 開発は、今後も重要な研究課題である。

文献

- 1) 橋田 充著 ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たな挑戦— 化学同人 1995年 9-20
- 2) Langmann JM& Rowland R. The number and distribution of lymphoid follicles in human large intestine. J. Ant. 1986;194:189
- 3) Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 1997;92:5s-11s
- 4) Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, et al. Development of an oral drug delivery system targeting immune-regulating cells in experimental inflammatory bowel disease: A new therapeutic strategy. J. Pharmacol. Exp. Ther 2000; 292: 15-21.
- 5) Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, et al. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. J. Pharmacol. Exp. Ther 2001; 297: 1122-1128.
- 6) Nakase H, Okazaki K, Chiba T. Rectal administration of gelatin microspheres containing interleukin-10 induce potent down-regulation of CD40 expression on Mac-1 positive cells in chronic murine colitis. J Pharmacol Exp Ther. 2002;301:59-65.
- 7) Matsuura M, Okazaki K, Nishio A, Nakase H, et al. Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. Gastroenterology. 2005;128:975-86.