脂質・界面活性剤混合ミセルを用いた IL-2 の
大腸粘膜吸収に関する研究西田勝浩・浜辺 豊・松浦俊彦・大澤正人・生田 肇・
斉藤洋一^{*1)}、吉川広之^{*2)}、村西昌三^{*3)}*Study of administration of rIL-2 with mixed micelles into large intestine*

For we aimed at establishing enteral administration route of cytokine recombinant interleukin-2 (rIL-2) to enhance its effects, absorption of rIL-2 through the large intestine was investigated in the rats. rIL-2 (5×10^5 units/rat) dissolved in distilled water and lipid-surfactant mixed micelles (MM), which is composed of linoleic acid and sodium-taurocholate, as an absorption promoter was administered into the large intestine from rectum. During 5 hours after administration of rIL-2, the blood and the lymph were periodically taken from the jugular vein and the thoracic duct, respectively. The serum and lymphatic concentrations of rIL-2 were both undetectable in rats receiving rIL-2 dissolved in distilled water. By contrast, in rats receiving rIL-2 dissolved in MM, the lymphatic concentration showed a high level, 52 units/ml, whereas the serum concentration remained under the detectable level. Thus, the increase in the lymphatic selectivity of rIL-2 is considered due to its macromolecular weight ranging about 15000.

Based on these results, it may be concluded that rIL-2 with MM can be remarkably absorbed from the large intestine and specifically transferred into the lymphatic system.

Masahiro Nishida・Yutaka Hamabe・
Toshihiko Matsuura・Masato Ohsawa・
Hajime Ikuta・Yoichi Saitoh^{*1)}
Hiroshi Yoshikawa^{*2)}, Shozo Muranishi^{*3)}key words : mixed micelles, rIL-2,
rectal administration, drug delivery system,
lymphatic selectivity

細胞性免疫の賦活作用を有するサイトカインとして interleukin-2 (IL-2) は広く知られているが、大量投与では重篤な副作用もあり、さまざまな投与方法が検討されている。今回、筆者らは IL-2 を選択的にリンパ系へ移行させることにより効果的なリンパ球活性を得、また、副作用を抑えることを目的として IL-2 の腸管内投与を試みた。

しかし、IL-2 は高分子 (MW: 15,420) であり、腸管からの吸収が不良であるため、粘膜吸収作用を持つ脂質・界面活性剤混合ミセルとともに経直腸的に投与し、IL-2 の吸収促進およびリンパ系への移行について検討した。

材料と方法

(1) 使用薬剤

消化管において著明な吸収促進作用を示す脂質・界面活性剤混合ミセル (混合ミセル) および recombinant IL-2 (rIL-2) を使用した。混合ミセルは融合性脂質として linoleic acid (Sigma), 界面活性剤として sodium-taurocholate (Sigma) を用いた。IL-2 は塩野義製薬より供与された rIL-2 (1×10^6 U/100 μ g) を使用した。

(2) 薬液調整

混合ミセルは linoleic acid と sodium-taurocholate をそれぞれ 40 mM になるように蒸留水に溶解、氷冷下にて 4 分間超音波処理し調整した。

経直腸的に投与する薬剤は混合ミセル+rIL-2 (5×10^5 U/Body) 1 ml と蒸留水+rIL-2 (5×10^5 U/body) 1 ml の 2 群とした。

(3) 実験手技 (図 1)

Wistar 系雄性ラット (体重 300~350 g) をウレタン皮下注麻酔後、腹部正中を約 3 cm 切開し、横隔膜直下の腹部大動脈後面に走行する腹部胸管

^{*1)} First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine 神戸大学医学部第一外科教室

^{*2)} Department of Drug Dosage Form Design, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University 富山医科薬科大学薬学部薬剤設計学教室

^{*3)} Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University 京都薬科大学製剤学教室

図1 実験方法
(Wistar 系雄性ラット 300~350 g BW)

図2 血中およびリンパ液 IL-2 濃度

を剥離，露出した．これにヘパリンを満した径 0.6 mm のポリエチレンチューブを挿入留置した．ポリエチレンチューブよりリンパ液が十分に流出するのを確認したあと，直腸内に粘膜を傷つけないように 3 Fr アトムチューブを挿入し，2 種類の薬液を漏れないように注入した．つぎに，肛門を結紮閉鎖し薬液を大腸内に貯留させ，3 時間後に開放し排出させた．

(4) 検体の採取

両投与群ともに末梢血および胸管リンパ液を経時的に採取した．末梢血は右頸静脈に挿入したカニューレより，薬剤投与直前，投与後 30 分，1 時間，1 時間 30 分，2 時間 30 分，3 時間 30 分，4 時間 30 分に採取した．胸管リンパ液は薬剤投与 1 時間前から投与直前まで，薬剤投与後 0~1 時間，1~2 時間，2~3 時間，3~4 時間，4~5 時間で採取した．

表 1 投与薬剤

I. distilled water+IL-2
(蒸留水 1 ml+5×10 ⁵ U/body rIL-2)
II. mixed micelle ^{*)} +IL-2
(混合ミセル+5×10 ⁵ U/body rIL-2)

^{*)} LA と Na-taurocholate を等モル (40 mM) となるように蒸留水に加え，氷冷下で 4 分間超音波処理した．

図3 IL-2 の消化管吸収およびリンパ移行

(5) rIL-2 の濃度測定

rIL-2 濃度は，Gemzime 社の ELISA キットにて測定した．測定限界値は 100 ng/ml である．

結果

混合ミセル+rIL-2 投与群では胸管リンパ液中 rIL-2 濃度は投与後 1 時間で最高値 (約 52 U/ml) を示し，以後漸減し，5 時間後は約 20 U/ml であったが，血中濃度は測定限界以下で推移した．また，蒸留水+rIL-2 投与群での胸管リンパ液および血中の rIL-2 濃度は測定限界濃度以下であった (図 2)．

考察

IL-2 は抗原やマイトジェンなどの刺激を受けた T 細胞より放出される糖蛋白で，その生物学的作用は T 細胞の分化・増殖，細胞障害機能を有する免疫担当細胞の誘導や活性化などがあげられる．IL-2 は T リンパ球の増殖を促進する物質として発見され，T 細胞増殖因子とよばれており，近年 Rosenberg ら²⁾ は IL-2 とともに培養したリンパ球に非特異的な細胞障害性が生じることを発見

し、これらは lymphokine-activated killer cell (LAK 細胞)と名付けられた⁸⁾。動物実験においても IL-2 単独あるいは IL-2 と LAK 細胞の併用投与によりすぐれた免疫能亢進と抗腫瘍効果を示しており、臨床応用に際しても一部の疾患に効果が得られている。しかし、その作用をさらに増強させるためには一定の期間 IL-2 の血中レベルを保つ必要があり、これを全身投与する場合には IL-2 の血中での半減期が短いため、大量かつ頻回に投与することになる。ところが高濃度の IL-2 は発熱・悪寒・倦怠感などの全身症状、食欲不振・嘔吐・下痢などの消化器症状、さらには vascular leak syndrome (VLS) と称される血管の透過性亢進から生じる肺水腫・胸腔水貯留等の重篤な副作用を惹起する危険性があり、投与に際しては十分な注意が必要となる。このため、効率的な IL-2 の投与方法として脾動脈内投与⁴⁾や徐放性を有する IL-2 mini-pellet⁵⁾ などが試みられており、良好な成績が報告されている。

さらに、今回筆者らが施行した IL-2 の腸管内投与は、腸管のリンパ系への移行を目的にしたものであるが、IL-2 の分子量は約 15,000 と高分子のため大腸粘膜からの吸収は不良であり、その吸収促進を図るために IL-2 を消化管の粘膜吸収促進作用を持つ脂質・界面活性剤混合ミセルとともに経直腸的に投与した。混合ミセルが薬剤の消化管吸収を促進させる機序としては、可溶化され細かく分散された融合性脂質が拡散により上皮細胞に取り込まれ細胞膜のリン脂質と相互作用し、一時的に複合体を形成し二重層以外の形態とさせ、また膜の流動性を上昇させることにより、生体膜を不安定化状態にし、膜透過性を亢進させるためと推測されている⁶⁻⁸⁾。

また、混合ミセルによる腸管粘膜の損傷は認められず、反復の投与が可能である^{10,11,15)}。さらに吸収された IL-2 は高分子のため、血液・リンパ関門をリンパ系へと選択的に移行し、リンパ指向性が得られたと考えられる(図3)⁹⁾。これにより、IL-2 の濃度は流量の少ないリンパ液中ではより高くなり、流量が多く代謝されやすい血中では低くなったと考えられる。また、吉川らは interferon においても本投与方法にて同様のリンパ指向性が得られると報告している¹²⁻¹⁵⁾。

IL-2 の投与方法として本法を施行することにより、その血中濃度を上昇させずに、リンパ液中の濃度を上昇させることで副作用を軽減させ、また IL-2 が局所作動性のサイトカインであることより、IL-2 の通過する局所のリンパ系および全身の免疫能が賦活され、腸管の腫瘍に対しても抗腫瘍効果が期待できる。

以上の結果より、今後は IL-2 の本投与方法による LAK, NK 活性などの細胞性免疫の賦活程度、さらには移植腫瘍による抗腫瘍効果を検討していきたい。

文 献

- 1) 山下 昭, 名和行文, 福本哲夫, 小谷正彦: ラット胸管リンパ採集法. 免疫実験操作法 A 584-589, 1971.
- 2) Rosenberg, S. A., Grimm, E. A., McGrogan, M. et al.: Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in *Escherichia coli*. *Science* 223: 1412-1415, 1984.
- 3) Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z. et al.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh-solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155: 1823-1841, 1982.
- 4) Naito, K., Pellis, N. R., Kahan, B. D.: Continuous intrasplenic interleukin-2 combined with antigen-specific chemoimmunotherapy. *Arch. Surg.* 121: 1415-1420, 1986.
- 5) Matsuoka, J., Sakagami, K., Shiozaki, S. et al.: Development of an interleukin 2 slow delivery system. *Trans. A. S. A. I. O.* 34: 729-731, 1988.
- 6) Muranushi, N., Kinugawa, M., Nakajima, Y., Muranishi, S., Sezaki, H.: Mechanism for the induction of the intestinal absorption of poorly absorbed drugs by mixed micelles I. effects of various lipid-bile salt mixed micelles on the intestinal absorption of streptomycin in rat. *Int. J. Pharm.* 4: 271-279, 1980.
- 7) Muranushi, N., Nakajima, Y., Kinugawa, M., Muranishi, S., Sezaki, H.: Mechanism for the induction of the intestinal absorption of poorly absorbed drugs by mixed micelles II. Effects of the incorporation of various lipids on the permeability of liposomal membranes. *Int. Pharm.* 4: 281-290, 1980.
- 8) Muranushi, N., Takagi, N., Muranishi, S., Sezaki, H.: Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids* 28: 269-279, 1981.
- 9) Bocci, V., Naldini, A., Corradeschi, F., Lencioni, E.: Colorectal administration of human interferon- α . *Int. J. Pharm.* 24: 109-114, 1985.

- 10) Nuranishi, S., Muranushi, N., Sezaki, S. : Improvement of absolute bioavailability of normally poorly absorbed drugs : Inducement of the intestinal absorption of streptomycin and gentamycin by lipid-bile salt mixed micelles in rat and rabbit. *Int. J. Pharm.* 2 : 101-111, 1979.
- 11) Nuranishi, S., Yoshikawa, H., Sezaki, H. : Absorption of 5-fluorouracil from various regions of gastrointestinal tract in rat. Effect of mixed micelles. *J. Pharm. Dyn.* 2 : 286-294, 1979.
- 12) Yoshikawa, H., Nuranishi, S., Sugihara, N. et al. : Mechanism of transfer of bleomycin into lymphatics by bifunctional delivery system via lumen of small intestine. *Chem. Pharm. Bull.* 31 : 1726-1732, 1983.
- 13) Yoshikawa, H., Sezaki, H., Muranishi, S. : Mechanism for selective transfer of bleomycin into lymphatics by a bifunctional delivery system via the lumen of large intestine. *Int. J. Pharmaceut.* 13 : 321, 1983.
- 14) Yoshikawa, H., Takada, K., Nuranishi, S., Satoh, Y., Naruse, N. : A method to potentiate enteral absorption of interferon and selective delivery into lymphatics. *J. Pharm. Dyn.* 7 : 59-62, 1984.
- 15) Yoshikawa, H., Takada, K., Satoh, Y., Naruse, N., Nuranishi, S. : Potentiation of enteral absorption of human interferon alpha and selective transfer into lymphatics in rats. *Pharm. Res.* 2 : 249-250, 1985.
- 16) 黒田大介, 浜辺 豊, 加藤道男, 斉藤洋一, 吉川広之, 村西昌三 : 脂質・界面活性剤混合ミセルおよびデキストラン硫酸により粘膜吸収とリンパ指向性を高めた食道癌化学療法に関する研究. *DDS* 2 : 9-15, 1987.