

インターフェロンのエアロゾル吸入法および 経鼻投与方法による体内吸収の可能性

京都パストゥール研

喜多正和

神戸常盤短大・衛技

佐藤良暢

はじめに

ウイルス抑制因子として発見されたインターフェロン (IFN) は、既に一部の腫瘍やウイルス性疾患に対する抗癌剤あるいは抗ウイルス剤として臨床応用されている。現在、IFN の投与経路としては、 α 型あるいは γ 型 IFN は筋肉内投与、 β 型は静脈内投与が主に用いられているが、長期投与を考える場合、これらの投与方法は最善とは言えない。そこで、より有用な drug delivery system としてエアロゾル吸入法および点鼻投与方法を試み、IFN の体内吸収の可能性を、IFN 投与後の血中 IFN 活性と IFN により誘導される酵素の 1 つである 2-5 A 合成酵素活性を経時的に測定することにより検討した。

材料と方法

1. 対象および IFN 投与方法

IFN はリンパ芽球由来の精製ヒト α 型 IFN (比活性 1×10^8 IU/mg 蛋白以上) 凍結乾燥品を PBS で溶解して使用した。男女 20~35 歳のボランティア 5 名を対象に、点鼻投与の場合、IFN を 100 万 IU/0.2 ml に調整し、両鼻腔に 0.1 ml ずつ点鼻した。エアロゾル吸入の場合、100 万 IU/4 ml に調整後、立石電機社製超音波式エアロゾル発生器 NE-U 05 を用いてエアロゾル化 IFN を作製し吸入させた。IFN 投与後、1, 3, 6, 24 時間後に採血し、血清を分離後、血清中の IFN 活性ならびに 2-5 A 合成酵素活性を測定した。

2. IFN 力価測定法および 2-5 A 合成酵素測

定法

α 型 IFN 力価測定には、FL 細胞、水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いた 50% Cytopathic effect (CPE) 抑制によるマイクロアッセイを行い、ニュートラルレッド dye-uptake 法により力価を算出した。IFN 力価は国際標準 α 型 IFN である MRC 69/19 を標準とし、すべて国際単位 (IU) に換算した。

2'-5' oligoadenylate synthetase (2-5 A 合成酵素) 活性は 2-5 A 栄研 RIA キットを用いて測定した。

結果

1. IFN のエアロゾル吸入および点鼻投与後の血中抗ウイルス活性の経時的変化

各々の投与方法において、IFN が体内に吸収されることを直接的に証明する方法としては、IFN 投与後の血中 IFN 活性を測定するのが最も良い方法である。そこで、ボランティア 4 名を対象に、IFN 投与後の血中抗ウイルス活性を、FL 細胞、VSV を用いたバイオアッセイで測定した。

その結果、100 万 IU のエアロゾル化 IFN 吸入後、被験者 A, C においては 3 時間後、被験者 D においては 1 時間後に、投与前に比べ高い抗ウイルス活性が検出された (表 1)。しかし、投与前の血清中にも全ての被験者において 15~53 単位の抗ウイルス活性が認められたこと、また一般的には健康者の血清中には IFN 活性は検出されないことから、本実験で検出された抗ウイルス活性は IFN 特異的な抗ウイルス活

表1 IFN の点鼻投与, 吸入投与後の血中抗ウイルス活性の経時的变化

投与経路	投与後時間	抗ウイルス活性 (IU/ml)			
		被験者 A	被験者 B	被験者 C	被験者 D
点 鼻	0	21	18	27	ND
	1	17	16	36	ND
	3	17	13	33	ND
	6	16	12	28	ND
	24	13	10	27	ND
吸 入	0	53	15	27	18
	1	45	16	27	37
	3	116	19	42	14
	6	92	13	25	13
	24	74	15	29	16

性ではなく、血清中に含まれる非特異的抗ウイルス活性と考えられる。

そこで、非特異的抗ウイルス活性物質の影響を除くため、サンプル処理した細胞をPBSで2～3回洗浄し、細胞に吸着している非特異的抗ウイルス活性物質を除去後、バイオアッセイ

を行った。その結果、全ての血清中の抗ウイルス活性は検出限界濃度である3 IU/ml以下となり、エアロゾル化IFN吸入およびIFN点鼻投与後、血清中には特異的なIFN活性は検出できなかった(表2)。

表2 IFN の点鼻投与, 吸入投与後の血中IFN活性の経時的变化

投与経路	投与後時間	IFN 活性 (IU/ml)			
		被験者 A	被験者 B	被験者 C	被験者 D
点 鼻	0	<3	<3	<3	ND
	1	<3	<3	<3	ND
	3	<3	<3	<3	ND
	6	<3	<3	<3	ND
	24	<3	<3	<3	ND
吸 入	0	<3	<3	<3	<3
	1	<3	<3	<3	<3
	3	<3	<3	<3	<3
	6	<3	<3	<3	<3
	24	<3	<3	<3	<3

2. IFN のエアロゾル吸入および点鼻投与後の血中2-5A合成酵素活性の経時的变化

2-5A合成酵素はIFNによって誘導される酵素の1つであり、2-5A合成酵素活性を測定することにより、間接的にIFNの存在を証明できる。前結果から、IFNの体内吸収の可能性を直接的に証明することは不可能であったため、IFN投与後の血中2-5A合成酵素活性を測定することにより、間接的に体内吸収の可能

性を検討した。

表3に2-5A合成酵素活性の実測値を示したが、IFN投与前の値は37.7～80.5 pmol/dlと個体差はあるものの、すべて健常者における正常値の範囲内であり、測定法自体には問題はなかった。しかし、投与前の値に個体差が認められることより、個体毎の変動は検討できるが、全体の平均値では単純に比較することは問題である。そこで、個体差を補正し、全体の変動を

表3 IFNの点鼻投与、吸入投与後の血中2-5A合成酵素活性の経時的変化

投与経路	投与後時間	2-5A合成酵素活性 (pmol/dl)				
		被験者A	被験者B	被験者C	被験者D	被験者E
点鼻	0	37.7	49.8	30.3	50.3	ND
	1	22.7	101.1	60.8	34.9	ND
	3	33.5	64.2	71.2	69.8	ND
	6	63.8	73.8	60.9	69.7	ND
	24	46.9	75.6	54.4	65.2	ND
吸入	0	37.7	72.8	80.5	45.2	54.5
	1	22.7	44.0	42.1	66.8	39.7
	3	33.5	38.1	47.6	47.0	27.8
	6	63.8	73.5	106.3	53.4	55.3
	24	46.9	54.6	97.7	36.4	41.9

表4 IFNの点鼻投与、吸入投与後の血中2-5A合成酵素活性の経時的変化(補正值)

投与経路	投与後時間	2-5A合成酵素活性 (%)					平均 ± SD
		被験者A	被験者B	被験者C	被験者D	被験者E	
点鼻	0	100	100	100	ND	ND	100
	1	203	201	69	ND	ND	158 ± 77
	3	129	235	139	ND	ND	168 ± 59
	6	148	201	139	ND	ND	163 ± 34
	24	152	180	130	ND	ND	154 ± 25
吸入	0	100	100	100	100	100	100
	1	60	52	148	73	61	79 ± 39
	3	89	59	104	51	52	71 ± 24
	6	169	132	118	101	101	124 ± 28
	24	124	121	81	77	75	96 ± 25

検討するため、IFN投与前の2-5A合成酵素活性の値を100%とし、個々の値を補正したものを表4に示した。

その結果、エアロゾル化IFN吸入1時間後の2-5A合成酵素活性は、被験者Cを除きIFN投与前よりむしろ低下しており、投与1, 3, 6, 24時間後の平均値をとっても上昇は認められなかった。一方、IFN点鼻後の2-5A合成酵素活性は、投与1, 3, 6, 24時間後いずれにおいても投与前に比べ、平均値において1.5倍の上昇が認められ、被験者Bにおいては、IFN投与後1.8~2.3倍の上昇が認められた。

考 察

IFNのエアロゾル吸入法および点鼻投与法におけるIFNの体内吸収の可能性を検討した

結果、直接的証明である血中IFN活性は検出されなかったが、間接的証明である血中2-5A合成酵素活性の上昇がエアロゾル吸入法では認められなかったものの、点鼻投与法では認められた。

点鼻投与の場合、IFNは主に鼻粘膜から吸収されると考えられ、エアロゾル吸入の場合、気道粘膜からの吸収が主であると考えられる。本実験で使用した超音波式吸入器NE-U05のエアロゾル平均粒径は10~30μmであることから、IFNのほとんどが上気道で吸着されると考えられる。

これらの結果より、IFNは鼻粘膜から吸収される可能性は高いが、上気道粘膜からは吸収されないと考えられる。しかし、使用したIFNの量が100万単位と少量であること、点鼻投与

法とエアロゾル吸入法では液量の違いがあり、粘膜の単位面積当たりの濃度に差があることなども考慮する必要があると考えられる。

討 論

質問；大越（東邦大大橋）

インターフェロンの場合、鼻の状態により吸収の差がでるのか否か。

応答；喜多（京都パストゥール研）

鼻粘膜、気道粘膜の状態は日差あるいは個体差があり、実験においては十分に考慮する必要があると考える。本実験のボランティアは健常者であり、特に鼻疾患を持っていない。また、日差や個体差の影響を排除するためには個体数を増やすことが重要である。

質問；間島（三重大）

インターフェロンの分子量はどれくらいか。鼻腔を全身の投与経路とする場合には分子量が大きいと不良になるのではないか。

応答；喜多（京都パストゥール研）

本実験で使用した IFN は α 型で、分子量は約 21,000 ~ 23,000 である。この分子量の物質は鼻粘膜からの吸収は困難であるが、吸収促進剤などの使用により可能になると考えられる。

追加応答；高坂（東北大）

エアロゾルとして薬液を鼻内投与した場合には粘液層が物理的バリアとして働き粘液纖毛輸送により効果的に排除されるため組織への移行がかなり抑制されていることが基礎的にも知られている。従ってエアロゾル療法の効果を論ずる時は、単に腔内濃度を見るだけではなくて、本講演のような組織内移行に関する基礎的検討が重要な意味をもってくるものと考えられる。