

平成13年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

## 徐放機能を有するPLGAナノスフェアによるターゲッティング療法の確立

所 属 東京慈恵医大 DDS 研究所

研究者 石原 務

### 要旨

薬物徐放機能とターゲッティング機能を兼ね備えたナノスフェアを PLGA とレシチンにより開発した。このナノスフェアはマクロファージに顕著にとりこまれ、また生理塩濃度下・あるいは細胞内において薬物を1週間程度にわたり徐放することがわかり、新規の DDS 製剤として有用であることが示唆された。

### 1. 研究目的

現代の様々な疾病に対する薬物療法には、未だ数多くの問題点が残されている。その一つである副作用は、患者に対し心身的な負担を増大させ、医師に対しては治療法の選択を制限している。また、疾病によっては、頻繁に薬物を投与する必要性があり、これも患者にとって心身的及び金銭的な負担になっている。このような問題点を解決する手法がドラッグデリバリーシステム(DDS)である。

DDS の一つ概念である標的にのみ薬物を輸送し薬効を発現させる“ターゲッティング療法”の確立のため、これまで様々な方法が試みられてきた。それらは大きく二つに分類される。一つは、ターゲットとなる細胞・組織との分子レベルの特異的認識に基づくレセプター介在型の能動的ターゲッティングである。モノクローナル抗体の作製技術が開発されて以来、特に癌へのターゲッティングを目指した研究が盛んになったが、いまだ *in vivo* では大きな成果が得られていない。その原因としては、細網内皮系の細胞による貪食、肝臓へのトラップ、癌細胞の抗原との結合性の低さや癌細胞から放出された抗原による抗体の中和などが考えられている。また、その他のリガンドとして、トランスフェリン・アシアロフェツインなどのタンパク質やガラクトース・ヒアルロン酸などの糖鎖なども提唱されてきたが、臨床に応用されているものはない。もう一つのターゲッティングの方法は、薬物を複合化・封入するためのキャリアの親/疎水性、表面電荷、大きさ、柔らかさ、形などにより体内分布を制御する受動的ターゲッティングである。PEG で覆われた数十 nm のキャリアでは、その血中滞留性が増大し血管透過性が高い癌細胞部位への集積が確認されており、現在臨床応用への研究が進められている。

既に臨床で有用性が証明されたターゲッティング機能を有した DDS 製剤としては、水島らが開発したリポ製剤(リピッドマイクロスフェア)がある。リポ製剤は薬物を溶解したコアの油液とレシチンの表層からなる 200nm 程度の球状微粒子であり、血中投与により炎症巣や血管閉塞部位の血管内皮細胞・マクロファージに集積することが知られている。薬物としては、PGE1 を用いた Liple(吉富)、Palux(大正製薬)などが臨床利用されているのをはじめ、ステロイド剤も用いられている。このように、これまで薬効が高くても副作用のために利用が制限されてきたような薬物は、ターゲッティングが可能になることで、副作用も少なく少量で効果が発揮されるようになった。しかしながら、リポ製剤はコア部位に油液を用いているために薬物の徐放効果がなく一過性の薬理効果しか発揮できず、疾病・薬物の種類によっては制限・制約をうけてしまう。

ターゲッティングと並んで DDS の大きな概念の一つである“薬物の徐放制御”に関しても、多くの研究がおこなわれてきた。薬物のキャリアとしては、高分子・ミセル・リポソーム・マイクロカプセル・マイクロ/ナノスフェアなどがあるが、その中で徐放効果が確認されているのは、マイクロ/ナノスフェアを用いたものである。マイクロ/ナノスフェアに使われるマテリアルとしては、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)・ポリシアノアクリレート・ポリオルソエステルなどがあるが、中でも PLGA は生体内での安全性が確認されており徐放キャリアとして最も研究が進んでいる。

徐放機能を有した DDS 製剤としては、武田薬品工業が開発したリュープリンが既に臨床利用されている。この製剤は PLGA からなる微粒子内に薬物となるペプチドを封入したもので、皮下に投与することで数週間に及ぶ薬物徐放が達成されている。これまでの治療法では高頻度に投与する必要があったのに対し、この製剤により、ワンショットで長期の薬効が維持されるようになった。しかしながら、この製剤は、皮下に投与するため血中への薬物の持続放出はできるがターゲッティング能がなく薬物の体内分布を制御できない。

以上のように、単機能を持つ DDS 製剤は既に開発されているが、ターゲッティング・徐放という両機能を兼ね備えた DDS 製剤は未だ臨床利用されておらず、このような製剤を開発することは、薬物治療の応用範囲を一気に広げることができ臨床薬理において革新的な進歩を遂げると考えられる。そこで、本研究では、ターゲッティング機能と薬物徐放機能を有したキャリアの開発を PLGA とレシチンを用いおこなった(図 1)。このナノスフェアは、粒径を制御しレシチンで表面をコーティングすることで、生体内でリポ製剤と同様のターゲッティング能を持ち、かつ、薬物を封入した PLGA コアから薬物が徐放されることが期待できる。ナノスフェアへの内封薬物としては、血小板凝集抑制作用・血管拡張作用・cytoprotection・epidermal growth 作用などがある PGE1 あるいはそのプロドラッグ誘導体を利用し、慢性閉塞性動脈硬化症・膠原病に伴う Raynaud 現象や血管炎による虚血病変などの治療を目指す。さらに、ステロイド誘導体による炎症抑制効果についても検討をおこなう。

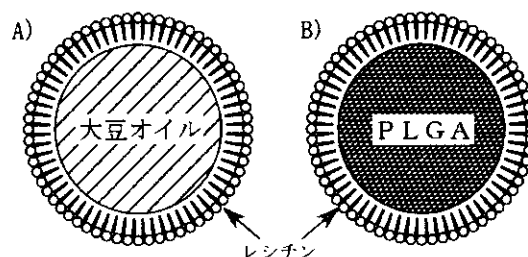


図 1. リポ製剤(A)とレシチン/PLGA ナノスフェア(B)

## 2. 研究方法

### 2-1 ナノスフェアの調製とその物性評価

ナノスフェアの調製は、O/W 型液中乾燥法によりおこなった。PLGA (PLGA5010, WAKO) 30mg、レシチン (WAKO) 3mg 及び薬物を 1ml ジクロロメタン中に溶解し、氷浴により冷却しながら PolytronPT-2100 (Kinematica、強度レベル 22) で攪拌した 25ml の蒸留水中に、27G の針を通してゆっくりと滴下した(図 2)。そのまま攪拌を 10 分間続けた後、スターラーにて室温で 2 時間攪拌を続け、ジクロロメタンを留去した。得られたナノスフェアは、限外ろ過 (Amicon、centriprepYM-10) で濃縮しゲルろ過 (ファルマシア、PD-10) により精製した。ナノスフェアは懸濁液として 4°C で、あるいは、懸濁液中に糖あるいは PEG を所定量添加し、アセトン/ドライアイスで凍結後凍結乾燥処理して保存した。ナノスフェアの重量は、添加剤を加えずに凍結乾燥しその乾燥重量から求めた。ナノスフェアに吸着したレシチン量は、1% の NBD ラベルレシチン (フナコシ) を混入したレシチンを用いてナノスフェアを調製し、水中あるいは 5% SDS 中で 13000g・10 分遠心後、その上清と沈殿中の蛍光強度を測定し求めた。ナノスフェアのゼータ電位及び粒径は、ELS-1000MH・DLS-1000MH (大塚電子) によりそれぞれ測定した。また、雲母上でナノスフェア懸濁液を風乾し、白金/パラジウムにて蒸着後(厚さ 40nm) 走査型電子顕微鏡 (SEM、日立) でナノスフェアの SEM 像をえた。

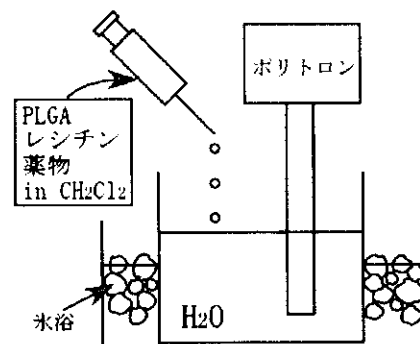


図 2. レシチン/PLGA ナノスフェアの調製

### 2-2 ナノスフェアへの薬物封入

ナノスフェア内へ封入する薬物は以下のものを用いた。ステロイドとして、ハイドロコルチゾン・酢酸ハイドロコルチゾン・酪酸プロピオン酸ハイドロコルチゾン (HBP)・ニプロピオン酸ベタメタゾン (BDP)、プロスタノイドとして、PGE1 及びそのカルボン酸と水酸基をエステル化した AS006、抗菌薬として、ミデカマイシン・酢酸ミデカマイシンを用いた。PLGA とレシチン及び 0.5mg~1mg の薬物をジクロロメタン中に溶解し、上記方法によりナノスフェアを調製した。えられたナノスフェアを 13000g で 10 分遠心し、上清中及び沈殿中に含まれる薬物を HPLC により定量した。HPLC は、水/アセトニトリル系で C4 逆相カラム (waters、Symmetry300) を用い 210nm あるいは 240nm の吸収を測定する系で解析された。薬物の放出挙動は、精製した薬物含有ナノスフェアを水、PBS あるいは 3% BSA 含有 PBS 中に分散し、4°C あるいは 37°C でインキュベートし、所定時間後、13000g で 10 分遠心した沈殿中の薬物を HPLC により定量し解析した。

### 2-3 ナノスフェアのマクロファージへの相互作用

マウス腹腔よりマクロファージを抽出し、100,000 cells/48well で播種し RPMI1640 培地 (FBS10% 含む) により数日培養した。培地交換後、ローダミンを薬物として封入したナノスフェアを添加し、1 時間半 37°C でインキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、所定時間後細胞を 4% 中性ホルマリン溶液で固定し蛍光顕微鏡 (IX-70、オリンパス) により観察した。

### 3. 研究成果

PLGA ナノスフェアは既に様々な方法により調製可能であることが報告されている。PLGA ナノスフェアを DDS 製剤として利用するには、その表面物性・粒径・薬物の封入率及び放出挙動を制御することなどが重要となる。これらの要素は調製時においてほとんどが決定されるので、有用なナノスフェアを作製するには調製法の最適化が必要になる。これまでもナノスフェアの表面修飾の試みが盛んに行なわれているが、元来生分解性のナノスフェア表面を修飾することは困難であり、また、コーティング剤として体内分解性が低い合成高分子を利用するなど安全性の問題なども存在していた。本研究では、生体内で安全性が確認されているレシチンを界面活性剤としてナノスフェアを形成させ、同時に表面へのコーティング剤として利用した。レシチン、PLGA 及び薬物をジクロロメタンに溶解し水相中で分散させる O/W 型液中乾燥法によりレシチン/PLGA ナノスフェアをえた。本調製法においては、様々な条件がナノスフェアの物性に影響を及ぼすと考えられる。それらは、レシチンや PLGA の量・レシチン/PLGA の重量比・ジクロロメタン量・水量・乳化装置の強度・溶媒除去の条件(温度や減圧操作)などであり、いくつかの条件に関してナノスフェアの物性に及ぼす影響を検討した。レシチン量を変えて調製したところ、レシチン量が多いほどナノスフェアの粒径が小さくなった。よって、レシチンが界面活性剤として機能していること及び任意に粒径制御が可能であることがわかった。また、ナノスフェアのゼータ電位(表面電位)値が、レシチンの非存在下で調製したナノスフェアに比べ大きくプラス側に変化したことから、表面の PLGA 末端のカルボン酸をレシチンが吸着することで覆い隠していると考えられる。さらに、レシチン/PLGA の重量比を 10%以上にしてナノスフェアを調製すると、遠心処理後の再分散性が維持されることや、ジクロロメタン量を多くする、あるいは、乳化装置の強度を強くすることで、小さな粒径のナノスフェアがえられることがわかった。最終的にはこのような条件を組み合わせ、i)分散安定性が高く、ii)遠隔塞栓を誘導しない大きさ(直径 300-500nm 程度)で、iii)ほぼ真球状のナノスフェアを調製することができた(図 3)。以下の実験では、この条件をベースにして調製したナノスフェアを使用した。蛍光ラベルしたレシチンを用い調製したナノスフェア懸濁液中に SDS を添加し遠心により上清と沈殿にわけたところ、ほぼ全レシチンが上清中に存在したので、レシチンが表面に局在していることがわかった。その吸着量を定量したところ、レシチンはナノスフェア全体に対し重量比で約 10% 程度を占めていることがわかった。

工業的に DDS 製剤として製造するためには、薬物を効率よくナノスフェア内に封入させることが必要である。そこで、本調製法における様々な薬物の封入率の評価をおこなった(図 4A)。ステロイド剤であるヒドロコルチゾンにおいては、それらの水酸基をエステル化することでナノスフェア内への封入率が高められることがわかった。また、PGE1 はほとんど封入させることができなかったのに対し、カルボン酸及び水酸基をエステル化した PGE1 のプロドラックの AS006 においては、封入率が顕著に高くなった。さらに、C4 逆相カラムを用い HPLC により薬物の水/アセトニトリル系での retention 時間を測定し封入率と比較したところ、retention 時間と封入率にほぼ正の相関関係が認められた(図 4B)。よって、この PLGA ナノスフェアにおいては、ある程度疎水化された低分子薬物であれば封入可能であり、様々な薬物に応用可能であることが示唆された。

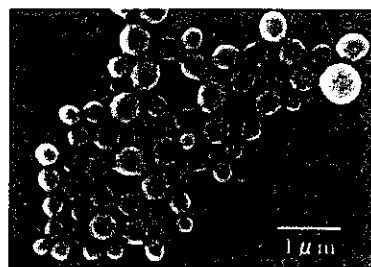


図 3. ナノスフェアの SEM 像

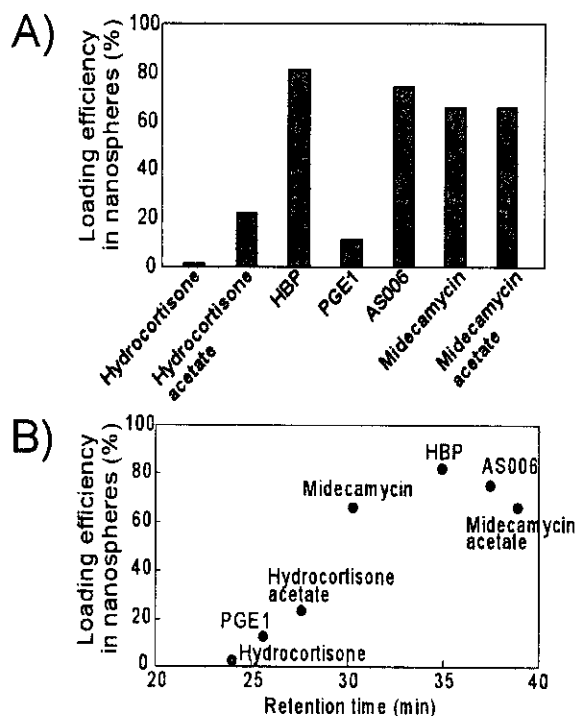


図 4. ナノスフェアと薬物の相互作用  
A)ナノスフェアへの薬物の封入、B)薬物封入率と逆相カラムによる薬物の retention 時間の相関

内相が液体で形成されているリポソームでは、脂質二重膜が生体内で不安定であるため薬物が漏れやすく一過性の薬効しか得られないが、このナノスフェアでは、PLGA の遮蔽効果により外相への漏れが大きく制限できると期待される。そこで、PLGA ナノスフェアからの薬物 (AS006) の放出挙動を測定した (図 5)。4°C の水中でインキュベートした場合には、10 日にわたりほとんど AS の放出が確認されなかった。また、37°C の水あるいは PBS 中では、徐々に AS が放出され 11 日目には 90% 近くの AS が放出された。一方 3%BSA を含んだ PBS 中では、初期に 30% 程度が一度に放出され、その後 4°C では極めて緩やかな放出挙動を示したのに対し、37°C では 4 日後に完全に AS が放出された。この BSA 存在による AS の急激な放出は、AS のナノスフェア内の分布が影響していると考えられたので、BSA 及び SDS が存在する時のナノスフェア内の AS 残存率を解析してみた (図 6)。その結果、BSA の濃度に依存し残存率が低下し、SDS の存在下では、10~20% 程度の AS しか残存していなかった。PLGA/AS の重量比を高めるなど調製条件を変えてもこの分布の割合は変化しなかったことから、AS においては PLGA 層よりレシチン層への親和性が高いといえる。一方、ステロイド誘導体である BDP においては、SDS の添加によっても 90% 以上が PLGA 内に残存しており、薬物によりレシチン層と PLGA 層への分布が異なることがわかった。80% FBS 中においても同様に AS が遊離したので、AS 含有ナノスフェアは調製後以下の処理をおこなった。調製したナノスフェア懸濁液中に SDS を添加し、表面に存在するレシチンと AS を遠心により除去した。えられたナノスフェアを再度レシチン懸濁液中に分散させ超音波処理おこなうことで、表層に AS が存在しない AS 含有レシチン/PLGA ナノスフェアをえた。

PLGA は水中においてイオン強度や pH、温度などの影響を受け加水分解が進むことが知られている。よって、PLGA ナノスフェアを DDS 製剤として利用するには、懸濁液として保存するのではなく乾燥品として保存することが望ましい。しかし、今までの PLGA を使用した微粒子は、凍結乾燥処理による初期バーストでの薬物の漏れや再分散性の低さが問題になることがあった。そこで、このナノスフェアを用いそれらの影響を検討してみた。10% の種々の糖水溶液あるいは分子量の異なる PEG 水溶液中で凍結乾燥処理をし、水で再分散した時のナノスフェア懸濁液の濁度、粒径及び薬物残存量を測定した。顕微鏡観察及び濁度測定により、水のみ (添加剤なし) で凍結乾燥したナノスフェアでは、凝集体形成による濁度低下が認められ再分散性が著しく低

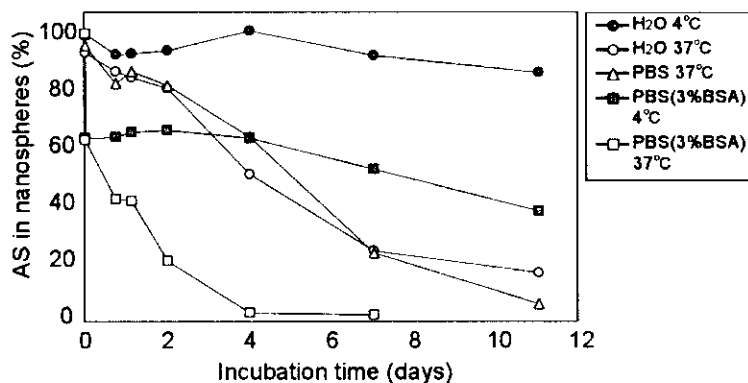


図 5. ナノスフェアからの AS の放出挙動

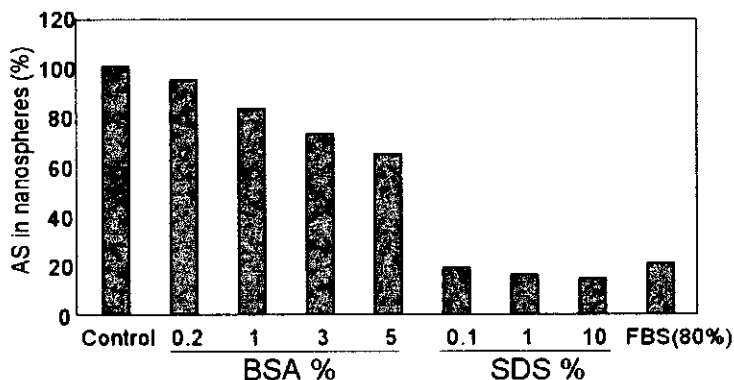


図 6. ナノスフェアからの AS の遊離

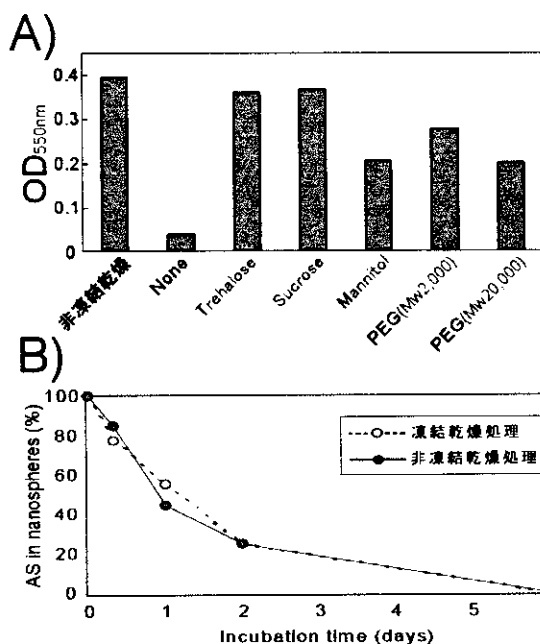


図 7. 凍結乾燥処理がナノスフェアに及ぼす影響。A) 添加剤がナノスフェアの再分散性に及ぼす影響、B) 薬物徐放への影響

かった(図 7A)。また、マンニトール・PEG を安定剤として添加した場合でも、有意な凝集が認められた。しかし、トレハロース及びスクロースにおいてはほぼ凍結乾燥処理前と同じ程度の濁度が維持されていたので、これらの粒径を光散乱により測定してみた。その結果、凍結乾燥処理をしていないナノスフェアの平均粒径(重量平均値)が 319nm であったのに対し、トレハロース・スクロースを添加したナノスフェアではそれぞれ 381nm、398nm とえられ、多少の凝集があるものの、再分散性が高いナノスフェアがえられた。また、糖濃度が高いほど再分散性が高いナノスフェアが得られることがわかった。薬物として AS あるいは BDP を封入したナノスフェアの、凍結乾燥処理後の薬物残存量を測定したところ、90%以上は残存しており大きな初期バーストはおきていないことがわかった。さらに、3%BSA 含有 PBS 中での AS の放出挙動を測定した結果、凍結乾燥処理の有無に関わらず同様の放出挙動をとっており、凍結乾燥による徐放への影響もみとめられなかった(図 7B)。

マクロファージのナノスフェアの取り込み能の評価及び細胞内の薬物の残存性について検討をおこなうため、蛍光プローブであるローダミンを封入した PLGA ナノスフェアを調製し、*in vitro* でマウス腹腔マクロファージへの取り込み挙動を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、ローダミンのみを添加した場合に比べナノスフェアに封入することで顕著にマクロファージに取り込まれることがわかった(図 8)。また、ナノスフェアが取り込まれた後、培地交換を行い 37℃ でインキュベートした結果、1 週間後においても細胞内に有意な量のローダミンが残存し続けていることがわかった(図 8)。

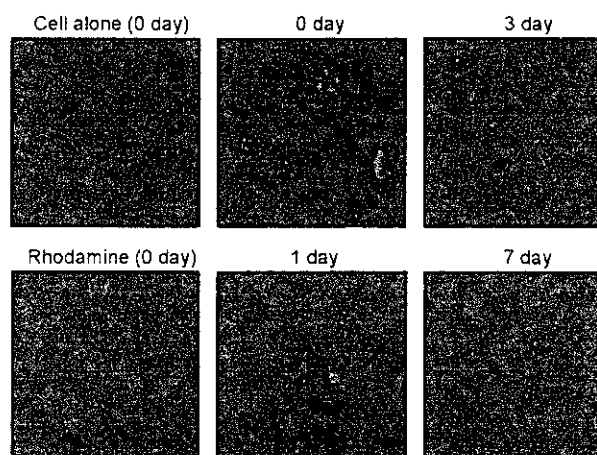


図 8. マクロファージへのナノスフェアの取り込み

#### 4. 考察

本研究では、レシチンを表面に配した PLGA ナノスフェアを O/W 型液中乾燥法によりえた。ナノスフェアの物性評価より、レシチンが PLGA に対し 10 重量%程度の割合で表面に局在していることがわかった。この値は、ナノスフェアの分散安定性を維持するのに必要なレシチン/PLGA 比とほぼ一致しており、レシチンが表面を完全に覆うことで表面が親水化され分散安定性が高まっているものと考えられる。また、凍結乾燥処理においても、その分散安定性が維持され初期バーストが抑制されていた。よって、凍結乾燥後の有効保存期間や保存温度をさらに検討する必要があるが、このナノスフェアが製剤として有用であることが示唆された。一般的に O/W 型液中乾燥法においては、疎水的な物質が PLGA に封入されやすいことがわかってはいるが、本研究においては、水酸基等をエステル化した薬物を用い、薬物の疎水性と封入率が正の相関を有していることが体系的に示された。したがって、薬物の物性をエステル化などにより変化させることで様々な薬物へ応用できることが示唆された。しかしながら、AS 及び BDP においてナノスフェア内の分布(レシチン層あるいは PLGA 層)が異なっていたので、その分布を制御できるように調製法などを再検討する必要がある。

レシチンは、ナノスフェアの分散安定性を維持するのに加え、既にレシチン化タンパク質で報告されているように細胞との親和性を増強する効果が期待される。しかしながら、本ナノスフェアでは、血清存在下で、血中タンパク質や脂質等との交換により、直ちに大部分のレシチンが遊離してしまったことから、細胞親和性の増強は期待できないと思われる。一方で、ラテックスなど疎水性微粒子表面に、補体成分などの血中タンパク質が吸着することでマクロファージへの取り込みが促進されるとの報告があり、レシチンの遊離がターゲティング能を消失させるとは言いきれないかもしれない。いずれにしても、このナノスフェアがリポ製剤と同様の挙動をとるか、今後体内分布を解析する必要がある。また、本ナノスフェアでは粒径が任意に制御できたので、様々な粒径のナノスフェアについても検討をおこなう予定である。さらには、レシチン層を安定化するために高分子などで被覆したり、PEG 鎖などを表面に導入することで、体内分布が大きく変化しリポ製剤とは違ったターゲティングをおこなえるかもしれない。

薬物の放出挙動は、ナノスフェアのおかれた環境により大いに影響を受けた。PBS 中では、10 日程度、3%BSA 含有 PBS 中では 4 日程度の徐放挙動を示し、細胞内では 1 週間は薬物モデルが細胞内留まっていた。これらの実験では、分子量が約 1 万で乳酸とグリコール酸の組成比が 1 対 1 という比較的分解が速い PLGA



を利用したので、この PLGA に代わり、ポリ乳酸(PLA)や分子量の高い PLGA を利用することで、その徐放速度をより遅く制御できると思われる。

#### 5. まとめ

大豆オイルとレシチンからなるリポ製剤は、生体内で炎症巣・障害血管等へ集積することが知られているが、その薬効発現は一過性である。そこで、本研究では、新規の DDS 製剤として、薬物徐放機能とターゲティング機能を兼ね備えた PLGA ナノスフェアの開発をおこなった。レシチンを界面活性剤およびナノスフェア表面へのコーティング剤として利用することで、レシチン/PLGA ナノスフェアを液中乾燥法によりえた。薬物のナノスフェアへの封入率を解析したところ、ステロイド・プロスタノイド・抗菌薬のいずれにおいても、その疎水性が増大するのに伴い封入率が高められることがわかった。また、生理塩濃度下において薬物が 1 週間程度の徐放挙動をとることや *in vitro* でナノスフェアがマクロファージに取り込まれ、その際封入した蛍光色素が 1 週間以上細胞内に残留していることがわかった。以上より、本ナノスフェアがターゲット・徐放機能を有した DDS 製剤として有用であることが示唆された。このナノスフェアを製剤として利用するには薬理効果をはじめ解析しなければならないことがまだ多く存在するが、本研究で目指している多機能型 DDS 製剤を開発することは、これまで治療不能であったような疾病に対して新たな治療法を提示しえるのと共に、医師及び患者への心身的負担を軽減させ、医療費そのものも低減させる効果がある。よって、臨床面のニーズに直結したものであり、成功した時の医療に与える意義は大きいと考えられる。

#### 6. 研究発表

なし

#### 7. 知的所有権の取得状況

なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社