

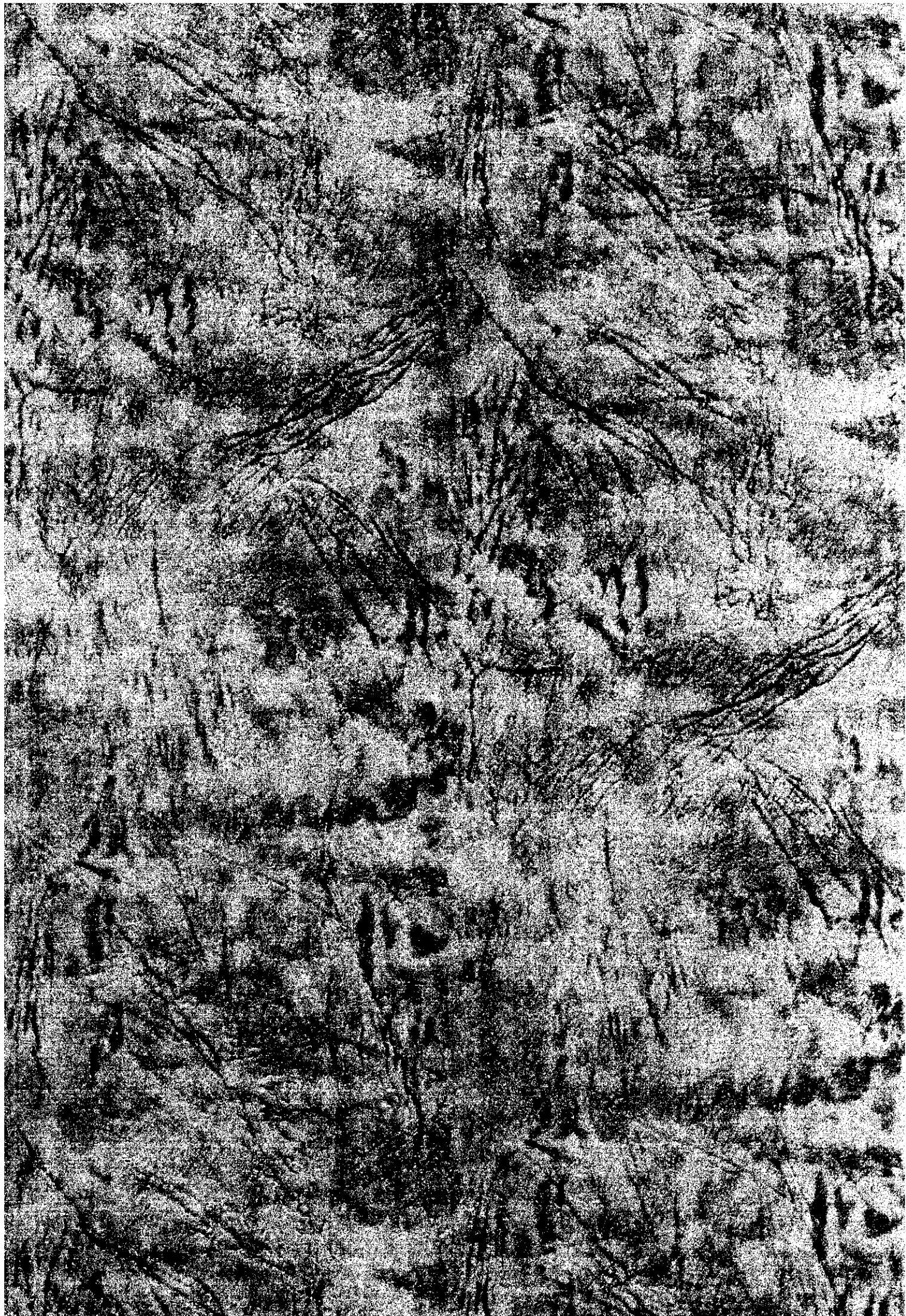
厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発

平成14年度 総合研究報告書

主任研究者 水島 裕

平成15（2003）年3月



## 目次

I. 総括研究報告	
ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発.....	1
水島 裕	
II. 分担研究報告	
1. 実験動物モデルを用いての効果の検討.....	9
上野 晃憲	
2. 徐放機能とターゲティング機能を有したPLGAナノスフェアの 開発に関する研究.....	13
石原 務	
3. 免疫応答並びにワクチン化におけるナノ微粒子の応用に関する 研究.....	27
檜垣 恵	
4. カルシウム系化合物を用いた薬物徐放性単体材料に関する研究.....	37
田中 順三、小林 尚俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	45
IV. 研究成果の刊行物・別冊.....	49

# I. 総括研究報告

# ナノテクノロジーを用いた新規DDS製剤の研究開発

主任研究者

水島 裕

東京慈恵会医科大学 DDS 研究所

## 研究要旨

ターゲット効果と徐放効果をあわせてもつナノ粒子 DDS 製剤の研究・開発と新しい徐放製剤の研究開発を行った。前者としては水溶性ステロイドなどのマイナスチャージを持つ薬物を金属により疎水化し封入する方法（金属法）を用いて200nmのPLGA粒子に封入した製剤が現在のところ最も優れているとの結果を得た。すなわち優れた徐放効果、ターゲット効果が *in vitro*, *in vivo* および薬効試験で証明された。徐放製剤については、多孔性ハイドロキシアパタイト微粒子の性質の解明と更なる徐放を得るための炭酸カルシウムなどによる栓塞技術を開発し、将来の研究の基盤となる研究成績を得た。

## A. 研究目的

これまでターゲット製剤、徐放製剤はわれわれの発明も含め多くあるが、この両者の性質をもつナノ製剤を開発すること、及び新規の徐放製剤を開発し、とくに再生医療の進歩に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

徐放性ターゲットナノ製剤についてはPLGAやPLAを中心にどのキャリアーが適しているか、また炎症部位や血管病変部位へのターゲットのためにはどの程度の大きさのナノ粒子また表面に何を吸着したナノ粒子が良いかを検討する。そして徐放およびターゲット効果は封入した医薬品の薬物濃度、またはマーカーを粒子に封入することにより検討した。薬効は *in vitro* と *in vivo* で行った。前者としては関節リウマチ患者から得られた滑膜細胞からの炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  と IL-6 の分泌抑制で検討し、後者としては、type II コラーゲン関節炎、アジュバント関節炎などの炎症モデル動物を用いて行った。また、血管新生作用はマウスの耳介の一部を切断し阻血状態にし、切断された耳に起こる血管病変または血管新生に及ぼす薬物の効果から判断した。

## C. 研究結果

### 1. ステロイド封入ナノ粒子について

炎症部位へのターゲット効果をローダミン含有PLGA/PLAで検討したところ、200nmの粒子が適していたのでこれを用いることとした。封入するステロイドとしては効力の強い点からベタメタゾンを用いた。まず初めは脂溶性ベタメタゾンとしてベタメタゾンジプロピオネイトを用いた。封入率は優れていたが緩衝液中でのおよび培養マクロファージからの徐放試験では1日目で約50%が放出され、徐放の点でや

や問題を示した。それでも *in vitro* および *in vivo* の薬効ではベタメタゾン単独より優れた効果を示した。つぎに石原らが考案した亜鉛を作用させたリン酸ベタメタゾンの疎水性物を用いて検討したところ、脂溶性ベタメタゾンに比べ徐放効果が遥かに優れていた。これを用い、*in vitro*, *in vivo* の薬効試験を行ったところ、分担研究者のところで詳しく述べているように、極めて優れた成績が得られた。

## 2. PGE 1 封入ナノ粒子

本年度は未だ再現性のある成績が得られていないので、分担研究者の報告には入っていないが、PGE 1 の 1 位と 9 位をエステル化した PGE 1 エルテルは 200 nm の PLGA 粒子に充分の量封入され、しかも理想的ではないが徐放効果を示した。この PGE 1 ナノ粒子を用い耳介の血管新生作用で検討したところ、対照群および PGE 1 単独群にくらべ、血管新生作用および血管拡張作用が明らかに強くみとめられた。これらの結果は詳しくは来年度報告する。しかしステロイドと同様、恐らく十分な水溶性誘導体をつくり、更に極性を増した化合物を合成した後、同じ金属法により PLGA に封入したほうが遥かに優れた成績が得られると考え、現在水溶性の強い PGE1 誘導体を合成中である。これによって恐らく現在の Lipop-PG (商品名：バルクス、リプル) より優れた DDS 製剤ができるものと思われる。

## 3. その他のナノ粒子

抗原を封入したワクチンについては、分担研究者檜垣恵によって述べられている。また、感染部位、癌組織にもナノ粒子は集中することから、現在抗癌薬、抗結核薬の封入などの研究を始めた。

## 4. 徐放製剤の検討

まず多孔性ハイドロキシアパタイト単独で多くの医薬品を検討したところ、BDNF、レシチン化 SOD などは同粒子に充分吸着し、優れた徐放効果が得られた。しかし、両薬剤とも臨床用量がかなり多いので実際の臨床には用いられないと思われる。一日投与量の少ないインターフェロンについて検討したところ、ハイドロキシアパタイト単独での徐放効果は充分ではなく、多糖体や金属などによりハイドロキシアパタイトの多孔を栓塞する方法を試みた。その場合はかなり優れた徐放効果が得られたが、いまだ充分再現性のある成績は得られていない。一方、物質材料研の田中、生駒らの研究によりハイドロキシアパタイトの物性が明らかになり、また炭酸カルシウムで多孔を栓塞する技術が開発された。それゆえ次年度はこれらの研究成績をもとに徐放製剤の研究を進めていく。

## D. 考察

本事業申請時にすでに PLGA などによる徐放性ターゲット製剤の研究は始まっており、また初期段階の成績をまとめた特許も提出していた。本年度の研究によりまず徐放性ターゲットナノ粒子については、どのポリマーが良いか、どの大きさが良いかなどをターゲットや徐放効果を調べることによりさらに明らかになった。特筆すべきことは、これまでは脂溶性薬物の方が適していると考えられたし、我々の前回の特許でもそのように記述したが、今回亜鉛を用いたリン酸ベタメタゾンなどの水溶性低分子の疎水化技術および封入技術がほぼ完成したことである。この金属法を用いると、これまで作製した徐放性ターゲット

製剤に比べ、徐放効果が優れるようになった。もちろんターゲットと徐放の両効果を備えた製剤はこれまで世界的に無く、我々の考えが初めてである。恐らくリン酸ベタメタゾンを用いたナノ粒子は今後組成をあまり変えることなく最終製剤になるであろう。そして使用されている成分が全て認可されている医薬品と基剤、そして認められている量なので今後の開発がかなり確実と考えられる。

一方PGE1ナノ粒子については、最終製剤に使う予定のPGE1誘導体の合成が未だ成功していないので、来年度それを用いた製剤が作製されることになるが、恐らくこれも現在使われているPGE1のDDS製剤より優れたものになると思われる。その他、抗癌薬、抗微生物薬、ワクチンとしても本ナノ粒子は役に立つものと考えられる。

次に、最近再生医療の研究が著しく盛んであるが、再生医療に使用する成長因子の使用が不可欠な場合が多い。局所投与するにしろ全身投与するにしろ、その徐放効果が極めて重要であることは、現在ほぼ専門家のあいだでは一致した意見になっている。我々の検討でも血管新生成長因子に関して、同じ投与量でも徐放製剤にするのとならないのでは、皮下における血管新生が著しく違うことを認めている。今後開発される我々の新しい徐放製剤がインターフェロン、インスリン、抗体などこれまでの医薬品とともに、FGF、HGF、BDNF、G-CSFなどの成長因子に応用され、再生医療に大きく貢献することを期待している。

## E. 結論

申請時テーマとした5つの項目のうち、主なテーマであるターゲットと徐放効果を合わせて持つナノ粒子製剤の研究に関しては、種々研究を行った結果、水溶性ステロイドであるリン酸ベタメタゾンナトリウムを亜鉛で疎水化したものを200nmのPLGA粒子に封入した製剤が最も適しているとの結果を得た。PGE1についても同様の研究を行っている。つぎに多孔性ハイドロキシアパタイトおよび栓塞技術との併用をはじめとする徐放製剤の研究に関しては、これらのキャリアーの性質の解析および栓塞技術が次第に確立した。そして一部の医薬品については徐放効果のあることが示された。これらの結果をもとにし、来年度さらに臨床応用に近づくよう研究を推進していく。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. 水島 裕 ナノテクノロジー・再生医療・DDS Drug Delivery System, 17(6), 459, 2002.
2. 水島裕 新しいDDS製剤の展望について 応用医薬、181(3)、12-39、2002.
3. 水島 裕 DDSの実際と将来、日本の医薬品展望 日本医学 (共立出版、高久史磨)、68-92、2002.
4. Takenaga M., Yamaguchi Y., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y. and Igarashi R. A novel sustained-release formation of insulin with dramatic reduction in initial

- rapid release. *J. Controlled Release* 79, 81-91, 2002.
5. Shoji Y. Shimada J. and Mizushima Y. Drug delivery system to control infectious diseases. *Curr. Pharm. Design*, 8, 455-465, 2002.
  6. Takenaga M., Yamaguchi Y., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y., and Igarashi R. A novel insulin formulation can keep providing steady levels of insulin for much longer periods. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1189-1194, 2002.
  7. Yamaguchi Y., Takenaga M., Kitagawa A., Ogawa Y., Mizushima Y., and Igarashi R. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives. *J. Controlled Release*, 81(3), 235-250, 2002.
  8. 水島 裕 第13章 今後の日本の医薬品開発と臨床試験 岩波講座 現代医学の基礎13(加藤隆一、水島裕編)、2002、229-247.
  9. Kanazawa H., Tsubayashi A., Nagata Y., Matsushima Y., Mori C., Kizu J., and Higaki M. Stereospecific analysis of loxoprofen in plasma by chiral column liquid chromatography with a circular dichroism-based detector. *J Chromatography A*, 948, 303-308, 2002
  10. Fukuya Y., Higaki M., Higaki Y., and Kawashima M. Effect of vitamin D3 on the increased expression of Bcl-xL in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 293, 620-625, 2002
  11. 檜垣 恵、 峰 リサ 関節リウマチにおける Toll-like レセプターの 発現 臨床免疫、38(6)、606-611、2002
  12. Kanazawa H., Okada A., Higaki M., Yokota H., Mashige F., and Nakahara K. Sterospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 Phenotype. *J Pharm Biomed Anal*, 30(6), 1817-1824, 2003

#### 学会発表

1. 2002.03.08 招待講演「National project of regeneration medicine and materials for DDS」 主催：Int.l Symposium on Bio-integrated materials and tissue
2. 2002.06.22 特別講演「再生医療における DDS の重要性」 主催：日本 DDS 学会
3. 2002.07.20 招待講演「Nano-and micro-sphere technology in the regeneration medicine」 主催：Controlled Release Society 29<sup>th</sup> Annual Meeting
4. 2003.02.13 特別講演「トランスレーショナルリサーチと産学連携」 主催：第36回日本痛風・核酸代謝学会
5. 石原 務、高木幸江、羽木智美、松石哲郎、水島 裕 レシチン/PLGA ナノスフェアの調製とそのDDS製剤としての評価、第18回日本DDS学会、6月21日(札幌)、*Drug Delivery System*, 17(3), 262P, 2002



## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- ①五十嵐理恵、北川晶、水島裕 徐放性製剤用結合体組成物、その製造法およびこれを含む徐放性製剤 出願番号 PCT/JPO2/04771
- ②石原務、水島裕 静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤 出願番号 2002-159190
- ③水島裕、高木幸江、羽木智美、生駒俊之 徐放性組成物、その製造方法およびその製剤 出願番号 2002-179788
- ④水島裕、高木幸江、羽木智美、生駒俊之 徐放性組成物、その製造方法およびその製剤 出願番号 2002-374173
- ⑤桧垣 恵、水島裕、浅野聡子、濱野弘一、原田義次 新規ハプテン抗原、並びにモノクロナール抗体及びそれを用いたダイオキシンの検出法 出願番号 2002-184301
- ⑥山口葉子、五十嵐理恵、水島裕、武永美津子、中村なつみ 炭酸カルシウム膜を表面に持つレチノイン酸 出願番号 2002-279000
- ⑦石原務、水島裕 徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤とその製造法 出願番号 2003-84895

### 2. 実用新案登録

特になし

### 3. その他

特になし

## II. 分担研究報告



## 実験動物モデルを用いての効果の検討

分担研究者 上野 晃憲 LIT バイオフーマ研究開発部

### 研究要旨

この研究においては、分担研究者らによって開発された方法によって作成した製剤が、どのような徐放性を示すのか、また生体において持続的な有効性を示すのか否かについて検討を行った。その結果、徐放性を持ちまた有効性が示された製剤化を方向付ける方法を示唆する結果が得られた。これらの結果は、今後改良・改善を進めていく上で、より徐放性のある有効な製剤の作成に生かしていくことができる重要な情報であると考えられた。

### A. 研究目的

ナノ化した薬物製剤を実際の生体に用いることによって、その動態・効果を明らかにし、有効で実用性のあるナノ医薬品の開発を目指すことを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. ハイドロキシアパタイト (HP) を用いた蛋白医薬品の徐放製剤の検討

ハイドロキシアパタイト (HP) の中にガンマグロブリンまたはインターフェロンを取り込ませ、その HP 粒子からの放出を In Vitro で検討した。その中でも徐放性が認められるものについては、マウスまたはラットの背部皮下に投与しその血中濃度を時間経過で調べた。眼底採血によって得られた血液中のフリーの薬物濃度をそれぞれのエンザイムイムノアッセイを用いて測定した。

#### 2. 炎症モデルを用いての実験

##### (1) 炎症部位へのターゲッティングの検討

ラットの後肢足蹠皮内に 1%カラゲニン溶液を 0.1 ml 投与して惹起したカラゲニン足浮腫モデルを用いて、色素としてのローダミンを含有させた PLGA 粒子を炎症惹起 4 時間後に静脈内投与し、その炎症部位へ PLGA 粒子が集積するかどうかを検討した。ローダミン含有 PLGA 粒子の粒子径は、500 nm と 200 nm の 2 種類を用意した。比較対照として、PLGA に取り込ませていないローダミンのみの投与も行った。ローダミンもしくはローダミン含有粒子の投与後 2 時間後に放血致死させてから、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、肺、体躯筋肉、炎症部位 (左足) を摘出し、切片を作成した。光学顕微鏡と蛍光顕微鏡によって同一視野を撮影し、ローダミンの存在箇所について調べた。

##### (2) アジュバント関節炎モデルにおける PLGA 製剤の抗炎症効果の検討

ヒト結核乾燥死菌含有フロインドアジュバント 50  $\mu$ l をラット左足蹠皮内に投与し、14 日後にベタメタゾンを PLGA 内に取り込ませた製剤を静脈内に投与してその炎症効果を検討した。足浮腫の容積は 1 日 1 回測定を薬物 (PLGA) 投与前より 6 日間行った。対照薬物群として PLGA を用いていないベタメタゾンを皮下に投与して、その抗炎症効果と比較した。

### (3) 血管再生モデル実験における効果

マウスの右耳介の基始部の一部を切断して血液を供給する動脈を 1 本のみを残すことにより、その耳介組織への血流低下を生じさせた。その結果として血管新生が起こってくるモデルを作成を検討した。この組織内血管新生を定量的に分析できる方法の開発を試みた。その上で、FGF やナノ医薬品がこのモデルにおいて血管新生を増強させる効果があるのかについての検討を行った。

## C. 研究結果

### 1. ハイドロキシアパタイト (HP) を用いた蛋白医薬品の徐放製剤の検討

様々な温度によって調整されたハイドロキシアパタイトの多孔部分に、たんぱく医薬品を 2 価のイオン、コンドロイチン硫酸、ヒト血清アルブミンなどを用いて沈殿を生じさせ、徐放性医薬品になり得るのかを調べた結果、数時間で放出されてしまうものから数日に亘って放出が持続するものが明らかにされた。以上の実験で比較的徐放性が認められるものについて、マウスまたはラットの背部皮下に投与し血中にフリーの薬物が検出できなくなるまで測定をおこなったが、ハイドロキシアパタイトに取り込ませないで投与したものに比べて、徐放性が認められるものもあったが、画期的な徐放性・持続性が示されたものはあまり認められなかった。現在は血清アルブミンを用いない方法の検討を始めたところである。

### 2. 炎症モデルを用いての実験

#### (1) 炎症部位へのターゲティングの検討

PLGA に取り込ましたローダミンを投与して、各臓器における分布状態を蛍光顕微鏡で観察したところ、体躯筋肉標本においては径 200 nm、径 500 nm のものともに分布するのは認められなかった。肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、肺の各臓器においては、径 200 nm、径 500 nm のものともに分布 (集積) が認められた。このとき径の大きさによる違いは認められなかった。一方、炎症部位である左足の組織においては、径 200 nm のものの集積は認められたが、径 500 nm のものは集積が認められなかった。また、PLGA に取り込ませないローダミンを投与した場合は、いずれの組織・部位においてもローダミンの特異的な集積は認められなかった。

#### (2) アジュバント関節炎モデルにおける PLGA 製剤の抗炎症効果の検討

抗炎症作用を持つベタメタゾンを薬物として選び、それを PLGA に取り込ませた (径 200 nm) 粒子の投与による抗炎症効果の強さと持続性について、PLGA に取り込ませないフリーのベタメタゾンと比較しながら検討を行った。フリーのベタメタ

ゾンは600  $\mu\text{g}$ , PLGAに取り込ませたものは300  $\mu\text{g}$ を投与したが、投与後1日目より観察した期間中に亘り、PLGAに取り込ませた方の抗炎症効果が強かった。

### (3) 血管再生モデル実験における効果

マウスの耳介の切断により一時的な血流低下が生じるが、その後組織内に血管新生が生じてきて1週間後においても一部切断した耳介組織は壊死による脱落は生じなかった。bFGFを投与したマウスにおいては、肉眼的観察において血管新生と思われる微細血管の数が明らかに増加していた。組織写真から血管数および血管の総走行距離、分岐数などをコンピュータによって解析し、数値化する方法を検討している。同時に、ナノ医薬品が特異的に血管新生している場所に集積するかどうかについて検討を開始している。

## D. 考察

この研究により、ナノ医薬品としては200 nmの径の粒子が炎症部位や血管新生部位などに特異的に集積することが明らかとなった。また、それより大きい500 nmでは一般的な臓器に分布するが、炎症部位などには集積しないことも明らかとなった。これらの結果は、炎症部位もしくは新生血管の存在する部位へ特異的に薬物を集積させるためには200 nm程度の大きさの粒子として投与することが望ましいことが示唆された。

ハイドロキシアパタイトの多孔内にたんぱく医薬品を沈殿させことによる徐放化した製剤の開発についての問題点がいくつか明らかになり、改良を加えることにより製剤化の可能性が高まることが予想される。ハイドロキシアパタイトの生成のやり方によって生体に投与してからの消退が異なるような結果が得られているので、ハイドロキシアパタイトの作成方法の検討も必要かと考えられる。また、多孔内に沈殿物を形成させる条件についても更に検討を加え、含有医薬品量の多い製剤作成の検討も必要であることが考えられた。

## E. 結論

ナノ化した微粒子製剤を用いて、In VitroまたはIn Vivoにおける放出もしくはその効果を調べ、徐放化製剤の可能性について検討した。その結果としては、概ね徐放化製剤として使用できる可能性が考えられたが、改良・改善すべき点もいくつかあることが示唆され、さらに検討する必要があることが考えられた。

ナノ化した微粒子を目的とする部に集積させるためには、その大きさが重要であることが明らかにされた。抗炎症作用をもつ薬物などを炎症部位に集積させるためには、200 nm程度の径の粒子が最適であることが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特になし

## **G. 研究発表**

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## **H. 知的財産権の出願・登録情報**

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 徐放機能とターゲティング機能を有した PLGA ナノスフェアの開発に関する研究

分担研究者 石原 務 東京慈恵医大 DDS 研究所

### 研究要旨

薬物徐放機能とターゲティング機能を兼ね備えた静脈注射用 PLGA ナノスフェア製剤を新規調製法により開発した。このナノスフェアは水溶性薬物をも高濃度で封入可能であり、病変部位に薬物を集積させ、病変部位で長期に薬物が徐放されることがわかり、DDS 製剤として有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

現代の様々な疾病に対する薬物療法には、いま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を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のおよ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* では大きな成果がえられていない。また、その他のリガンド分子として、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。もう一つのターゲティングの方法は、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ターゲティングである。ポリエチレンオキサイドで覆われた数十 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腫瘍組織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ティング機能を有した DDS 製剤としては、本研究者の一人が開発したりポ製剤(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部位や血管障害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)などが臨床応用されているのをはじめ、ステロイドも用いられている。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)・ポリ乳酸 (PLA)・



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 と PLA 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応用されている。この製剤は PLGA からなるマイクロ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、ターゲティング・徐放という両機能を兼ね備えた DDS 製剤はいまだ臨床応用されておらず、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命的進歩を遂げると考えられる。そこで、本研究では、ターゲ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(あるいは PLA)とレシチンに代表される界面活性剤を用いおこなった(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修飾することで、生体内でリポ製剤と同様のターゲティング能を持ち、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 Raynand 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、ステロイドによる炎症抑制効果や抗がん剤による抗腫瘍効果についても検討をおこなう。

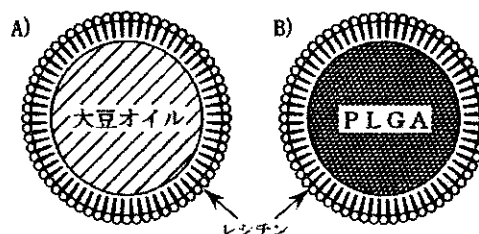


図 1. リポ製剤(A)とレシチン/PLGA ナノスフェア(B)

## B. 研究方法

### 2-1 ナノスフェアの調製とその物性評価

ナノスフェアは、O/W 型液中乾燥法あるいは金属イオンを利用した O/W 型溶媒拡散法により調製した。

### 2-2 O/W 型液中乾燥法

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、卵黄レシチン(WAKO) 3mg および薬物を 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)あるいは超音波照射器(TOMY)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。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。えられたナノスフェアは、限外ろ過で濃縮しゲルろ過(ファルマシア、PD-10)により精製した。ナノスフェアは、懸濁液中に糖を所定量添加し、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(図 2)。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、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

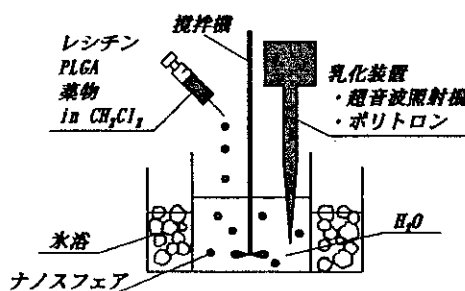


図 2. O/W 型液中乾燥法

フェアのゼータ電位および粒径は、ELS-1000MH・FPAR-1000(大塚電子)によりそれぞれ測定した。また、走査型電子顕微鏡(SEM、日立)あるいは環境制御型電子顕微鏡(ESEM、Nikon)でナノフェアのSEM像をえた。

ナノ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 およびそのカルボキシル基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、レシチンおよび0.5mg~1mgの薬物をジクロロメタン中に溶解し、前記方法によりナノフェアを調製した。えられたナノフェアを13000gで10分遠心し、上清中およ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, Symmentry300)を用い210nmあるいは240nmの吸収を測定する系で解析した。

#### (倫理面への配慮)

研究開発は可能な限り試験管内の実験にて推進する予定であるが、医薬関連技術開発には最終的にその有用性を確認する為に動物実験が不可避である。但し、動物実験に際しては研究組織に参加しているすべての研究者が、その所属する施設における動物実験倫理規定を深く理解し、動物実験倫理委員会の認可を得る。動物実験における我々の基本的姿勢は、個々の研究者の動物に対する福祉と愛護の精神に基づく。そのうえで「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)の基本原則を適用する。研究者の安全確保としては、研究開発に用いる薬物、試薬(特に毒劇物あるいは危険物)等から研究者が汚染あるいはその他の事故が起こらないような対策を講じると同時に、それらの保管・管理を厳密におこなう。また、動物実験あるいはその他の実験においても同様に研究者の安全確保に留意する。環境保全としては、研究開発において生じる使用後の実験器具、試薬等を廃棄する場合は、環境保全に留意しておこなう。これに関し各施設内での規定を遵守する。

#### 2-3 金属イオンを利用したO/W型溶媒拡散法(金属イオン法)

種々の水溶性低分子薬物を100 $\mu$ lの水中に溶解し、0.5M酢酸亜鉛水溶液あるいは0.5M塩化第一鉄水溶液500 $\mu$ l中に添加した。13000gで5分間遠心し、上清を除去し亜鉛-低分子薬物あるいは鉄-低分子薬物の沈殿をえた。この沈殿物中に、PLGAあるいはPLA20mgを溶解したアセトンを500~1500 $\mu$ l添加した。2時間室温で静置後、この溶液(または懸濁液)を0.5重量%の界面活性剤を溶解した静置水溶液中にマイクロピペットで一気にあるいは400rpmで攪拌した水溶液中に27Gのシリンジを通し種々の速度で添加した。えられたナノフェア懸濁液は、1~2時間室温で攪拌しながら放置後、EDTA水溶液(pH8)を加え、限外ろ過で濃縮しゲルろ過(ファルマシア、PD-10)することで精製ナノフェアをえた(図3)。

ナノフェアに封入された薬物は下記の方法で定量した。えられたナノフェア懸濁液に対し2.5分の1ボリュームの0.5MEDTA水溶液(pH8)を加え、20000gで20分遠心した。上清を除去した後水を加え遠心によりナノフェアを洗浄した。えられたナノフェアは、2NのNaOH水溶液中12時間37℃で放置することでPLGA/PLAを分解し、HPLCにてナノフェア中の薬物量を定量した。

#### 2-4 ナノフェアからの薬物放出挙動解析

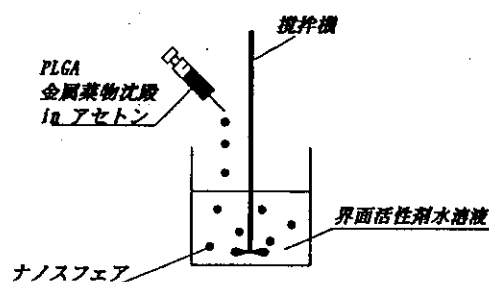


図3. O/W型溶媒拡散法(金属イオン法)

薬物の放出挙動は、精製した薬物含有ナノスフェアを3%BSA含有PBS中あるいはFBS(ウシ胎児血清)/PBS(v/v=1)中に分散し、4℃あるいは37℃でインキュベートし、所定時間後20000gで20分遠心してえられたナノスフェア中の薬物量をHPLCで定量することで解析した。

### 2-5 ナノスフェアのマクロファージへの相互作用

10%プロテオースペプトンを1.5ml腹腔内投与して刺激したマウス腹腔からマクロファージを採取し、600,000cells/12wellで播種しマクロファージSFM培地(Gibco)により一晩培養した。培地交換後、PLGAまたはPLAナノスフェアを添加し、2時間37℃でインキュベートした。PBSおよび培地で8回細胞を洗浄した後、所定時間ごとに培地中に含まれるベタメサゾン量あるいはPGE1量をELISAにより定量した。また、薬物のモデルとして、蛍光プローブを封入したナノスフェアを調製し、同様にマクロファージにとりこませ所定時間後細胞を4%中性ホルマリン溶液で固定し蛍光顕微鏡(IX-71、オリンパス)により観察した。

### 2-6 疾病モデル動物実験

8週齢Lewis系雌ラットを用い、アジュバンドとして6mg/ml M. Butyricum Desiccated含有Adjuvant Incomplete Freund溶液100μlを尾根部に投与した。アジュバンド投与6日後、左足の足底に1%カラゲニン含有生理食塩水を100μl投与し、さらに24時間後ナノスフェアを尾静脈より投与した。薬物投与前、投与後5日間の足の腫れを1日ごとにボリュームメーター(MK-550, 室町機械)を用いて測定した。

## C. 研究結果

### ナノスフェアの調製(液中乾燥法)

本研究では、液中乾燥法(特許出願中)および金属イオンを用いた溶媒拡散法(金属イオン法)(特許出願準備中)の二通りの方法によりナノスフェアの調製をおこなった。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、表面修飾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の形成に利用し、同時に表面への修飾剤として用いた。レシチン、PLGAおよ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。



図4. ナノスフェアのESI像

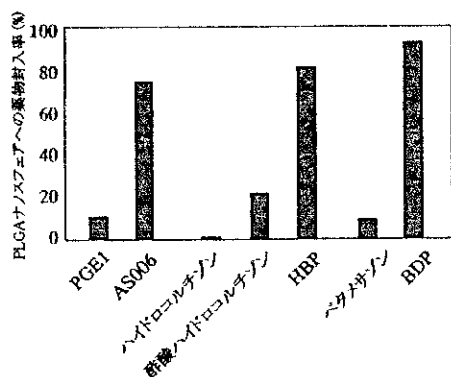


図5. ナノスフェアへの薬物封入

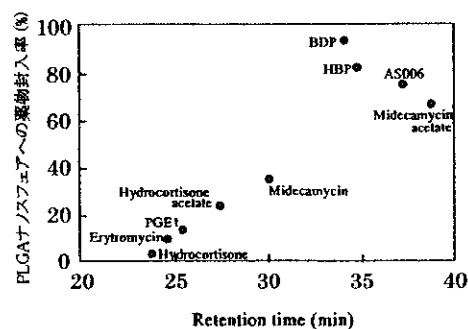


図6. 薬物の疎水性とナノスフェアへの薬物封入率との相関

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およ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)値を測定したところ、レシチン非存在下で調製したナノスフェアが $-57.2\text{mV}$ であったのに対し、レシチン存在下では $-6.6\text{mV}$ と大きくプラス側に変化したことから、表面の PLGA 末端のカルボキシル基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、①分散安定性が高く、②遠隔塞栓を誘導しない大きさ(直径 200-500nm 程度)で、③ほぼ真球状のナノスフェアを調製することができた(図 4)。また、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。ステロイド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、カルボキシル基および水酸基をエステル化した PGE1 のプロドラッグの AS006 においては、封入率が顕著に高くなった(図 5)。ナノスフェア中への薬物封入率と逆相カラムによる薬物の HPLC 解析により、薬物の逆相カラムへの retention 時間と封入率にほぼ正の相関関係が認められた(図 6)。よって、この PLGA ナノ

表 1. 水溶性低分子化合物と金属イオンによる沈殿形成

化合物名	ナフトエ酸		PGE1	ベンゼンスルホン酸		ナフタレンスルホン酸		ナフトリン酸		リン酸ベタメサリン		リン酸リボフラビン	
	安息香酸	ナフトル酢酸		コハク酸	ヒドロコルチゾン	フェニルリン酸	ニトロフェニルリン酸	リン酸チキサメサリン	Tris-O緩衝液				
構造式													
CaCl <sub>2</sub> (pH7.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	
NiCl <sub>2</sub> (pH7.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
CuCl <sub>2</sub> (pH7.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> (pH6.3)	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
ZnCl <sub>2</sub> (pH6.1)	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	
MgCl <sub>2</sub> (pH7.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SnCl <sub>2</sub> (pH1.6)	-	+++	+++	+++	++	-	-	+++	++	++	+++	+++	++
FeCl <sub>2</sub> (pH3.8)	-	+	+	++	+++	-	-	+	+++	+	+++	+++	+++
FeCl <sub>3</sub> (pH2.0)	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++
AlCl <sub>3</sub> (pH3.2)	-	++	++	+++	+++	-	-	-	++	-	+++	+++	+++
HCl(3N)	-	+++	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-

10mM 濃度で水溶性低分子化合物を溶解した Tris-Cl 緩衝液(0.1M, pH7.8)と 50mM 濃度の金属イオン水溶液を同量混合し、その濁りを観察した。  
 - ; 溶解状態、+ ; わずかに濁りが観察、++ ; 濁りが観察、+++ ; 濁りが生じ沈殿が形成