

スフェアにおいては、ある程度疎水化された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。

ナノスフェアの調製(金属イオン法)

前記調製法では、非水溶性の有機溶媒を使うことでエマルジョンを形成させているが、安定で微小なエマルジョンを形成するには界面活性剤の作用だけでは不十分であり、乳化装置を併用することが避けられない。しかし、乳化装置を利用しても最小で 200nm のナノスフェアしかえることができなかった。製造コストを考えると、できるだけ製造工程を少なくし大掛かりな装置を使わない方が望ましく、また、腫瘍組織には 200nm より小さなナノスフェアが集積しやすいとの報告もあるのでそのような粒径のナノスフェアも調製できる方が望ましい。さらに、水溶性薬物は化学的に疎水化することにより前記調製法でナノスフェア内に封入可能になるが、薬物によっては水溶性のまま体内で放出させた方が薬効やミクロ環境での動態の面から望ましい場合もあると考えられる。よって、このような、①乳化装置を使用しない簡便な製造法、②粒径 200nm 以下のナノスフェアが調製可能、③水溶性薬物の封入といった課題を克服する新規の調製法の開発を試みた。

種々の金属イオンは、生体にとって必須のものであり限度を超えなければその毒性は低く、また、種々の水溶性化合物と錯体を形成することが知られている。そこで、金属イオンを用いて様々な官能基を有する水溶性化合物の水中での沈殿形成能を評価した(表1)。その結果、実験に用いたほとんどのリン酸基を有する化合物では、亜鉛、鉄(2価あるいは3価)、銅、すず、アルミニウム存在下で濁りや沈殿形成が観察された。また、カルボキシル基を有したほとんどの化合物では、鉄(2価あるいは3価)、すず、アルミニウム存在下で濁りや沈殿が形成された。しかしながら、硫酸基を有した化合物と金属イオンとの間では、濁りや沈殿がみとめられなかった。よって、リン酸基あるいはカルボキシル基を有した化合物であれば、金属イオンにより疎水化できる可能性があることが示唆された。

リン酸ベタメサゾンあるいはリン酸リポフラビンを用い、亜鉛に対するモル比を変えて沈殿形成量を解析した結果、いずれも亜鉛とのモル比(亜鉛/リン酸化薬物)が 2 以上で 90% 程度が沈殿することが明らかになった。また、カルボキシル基を有するコハク酸ヒドロコルチゾンと第一鉄では、薬物の 50%程度を沈殿させるのに数倍モル量の鉄が必要で、50 倍モル量でも 70%程度の沈殿しか形成しなかった。よって、リン酸基-亜鉛の組み合わせの方が、より効率的に薬物を疎水化できることが示唆された。

薬物としてリン酸化ステロイドを用いナノスフェアの調製を試みた。金属イオンで疎水化したリン酸化ステロイド沈殿に、PLGA または PLA を溶解した水溶性有機溶媒のアセトンを加え十分に攪拌し、界面活性剤を溶解(または分散)した水中に滴下することでナノスフェアをえた(図3)。

金属イオンを用いずにリン酸化ステロイドと PLGA のみで調製したナノスフェア、および亜鉛あるいは第一鉄でリン酸化ステロイドを疎水

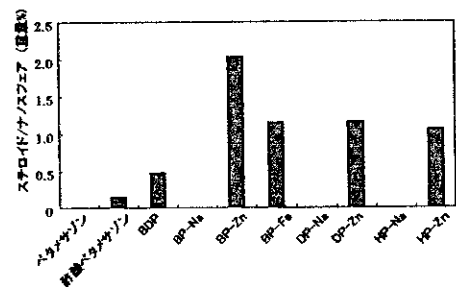


図7. 金属イオンによるステロイドのナノスフェア内封入
BDP: ベタメサゾンジプロピオネート, BP: リン酸ベタメサゾン, DP: リン酸デキサメサゾン, HP: リン酸ヒドロコルチゾン

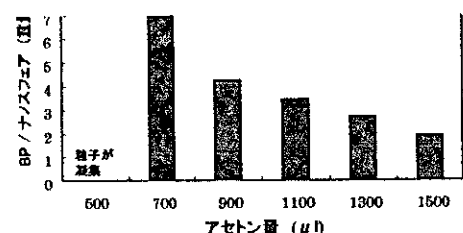


図8. アセトン量がナノスフェア内へのリン酸ベタメサゾン封入率に及ぼす影響

化して調製したナノスフェア中の薬物封入率を調べた。その結果、金属イオンが存在しない場合には、全くナノスフェア内にステロイドが封入されないのに対し、亜鉛あるいは第一鉄を用いることで顕著に PLGA ナノスフェア内への封入率が増加することが明らかになった(図 7)。

この調製法におけるリン酸ベタメサゾンの封入率およびナノスフェアの分散安定性・粒径を調べることで、種々の調製条件の最適化をおこなった。調製条件としては、有機溶媒の種類・量、有機溶媒中の PLGA 濃度/薬物濃度/亜鉛濃度、沈殿形成の際の亜鉛濃度/pH、界面活性剤の種類/濃度、有機溶媒の添加速度、水相の攪拌速度などが重要であると考えられ、それらを変えてナノスフェアを調製した。有機溶媒としては、アセトン以外にもアセトニトリル・DMSO・DMF・ジオキサンなどを試したが、アセトンで最も分散安定性が高いナノスフェアがえられることがわかった。また、アセトン中に低級アルコールを混和しておくと同量のアセトンを使用した場合に比べより小さなナノスフェアがえられることがわかった。これは、PLGA の貧溶媒である低級アルコールがアセトンより早く水と混和するためであると考えられる。PLGA やリン酸ベタメサゾン量を一定としてアセトン量を変化させたところ、少アセトン量ではナノスフェアが凝集してしまったが、ある量で分散安定性が高く、リン酸ベタメサゾンが高濃度封入されたナノスフェアが調製された。それ以上のアセトン量では分散安定性は高いが徐々に封入率が低くなり、粒径も小さくなることが明らかになった(図 8)。また、アセトン量を一定にして PLGA 量を変えると、PLGA 量が多いほど凝集しやすいことがわかった。アセトン量・PLGA 量を一定としてリン酸ベタメサゾン量を変えると、多いほどナノスフェア内への封入率は高くなるが一定量を超えるとそれ以上は高くならなかった。また、遠心で回収したリン酸ベタメサゾンと亜鉛からなる沈殿を水で洗浄処理すると、沈殿量自体は変化しなかったにも関わらず、ナノスフェア内への封入率が大きく低下した。水相中の界面活性剤として、Pluronic、Tween、Triton、ポリビニルアルコール、レシチンを用いた場合、封入率、粒径あるいは分散安定性に大きな影響を及ぼさなかった。また、その濃度を変えた場合にもナノスフェア形成に大きな影響を及ぼさなかった。アセトンの滴下速度および水相の攪拌速度を変えた結果、滴下速度が早いほど分散安定性が高いナノスフェアが調製され、また、分散安定性が高いナノスフェアをえるためには滴下速度に応じた最適の水相の攪拌速度が存在することがわかった。

以上より、ナノスフェア形成に界面活性剤の種類や濃度はほとんど影響を与えないが(ナノスフェアの分散安定性には影響を及ぼすが)、アセトン中の PLGA 濃度やアセトン/水の混和速度が大きく影響を及ぼすことがわかった。このような結果は、ナノスフェアの形成には、溶媒が水中に拡散・混和し PLGA が固体化・粒子化する過程が大きな役割を担っており、液中乾燥法とは違い界面活性剤の乳化作用には大きく依存しないためであると考えられる。

このような条件を最適化することにより、分散安定性が高く約 80~300nm 粒径のナノスフェアが調製できた。ナノスフェア中のリン酸ベ

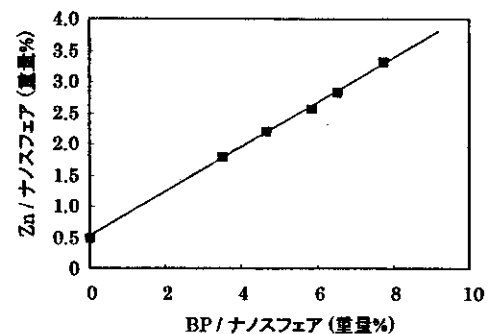


図 9. ナノスフェア内のリン酸ベタメサゾンおよび亜鉛含量
分子量 10,000 の PLGA で調製したナノスフェア

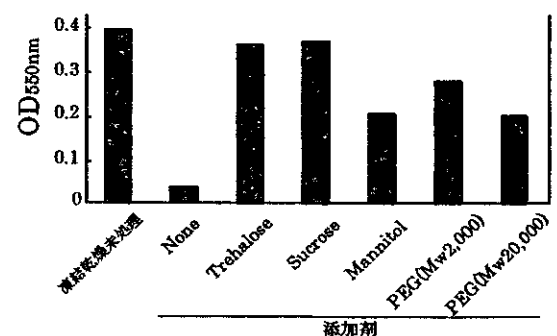


図 10. 添加剤がナノスフェアの再分散性に及ぼす影響

タメサゾン量はこれまでの解析では約 200nm のナノスフェアで 8 重量% まで封入できることがわかった。さらに、ナノスフェア内の亜鉛量はリン酸ベタメサゾン量に依存して含有されていることが ICP 発光分析による亜鉛定量より明らかになった (図 9)。

ナノスフェアの凍結保存

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、従来の PLGA 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、液中乾燥法でえられたナノスフェアを用い凍結乾燥条件を検討してみた。10% の種々の糖水溶液あるいは分子量の異なるポリエチレンオキサイド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、粒径および薬物残存量を測定した (図 10)。顕微鏡観察および濁度測定により、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かった。また、マンニトール・ポリエチレンオキサイド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、トレハロースおよ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 (Marquadi 解析重量平均値) が 319nm (SD 値 ± 136nm) 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 (SD 値 ± 158nm)、398nm (SD 値 ± 173nm) 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。ベタメサゾン をエステル化により疎水化した 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。金属イオン法で調製したナノスフェアを用い、界面活性剤が凍結乾燥処理後の再分散性に及ぼす影響を評価したところ、最も高くナノスフェアの再分散性が維持されていたのは Pluronic F68 であり、10% スクロース中で凍結乾燥した前後でのナノスフェアの粒径がそれぞれ 155nm (SD 値 ± 44nm)、152nm (SD 値 ± 52nm) と完全に一致していた。また、凍結乾燥処理時のスクロース濃度およびナノスフェア濃度を変えて凍

表 2 凍結乾燥処理時のショ糖濃度及びナノスフェア濃度の違いによるナノスフェアの粒径変化

		Sucrose conc. (%)			
		0	2	5	10
Nanospheres conc. (mg/ml)	5	AG	193(81)nm	131(40)nm	113(44)nm
	10	AG	AG	123(46)nm	127(57)nm
	15	AG	AG	AG	123(57)nm

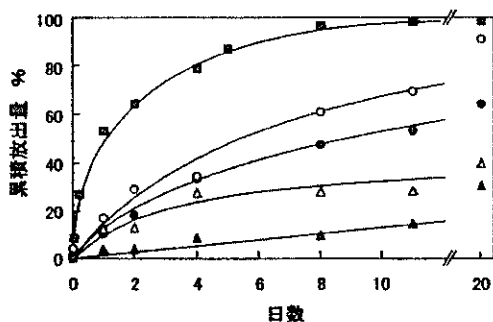


図 11. 希釈血清中でのナノスフェアからの

ステロイド放出挙動

■: PLA (分子量 2 万) を用い液中乾燥法により調製したナノスフェア。○: PLGA (分子量 1 万)、●: PLGA (分子量 2 万)、△: PLA (分子量 1 万)、▲: PLA (分子量 2 万) を用い金属イオン法で調製したナノスフェア。

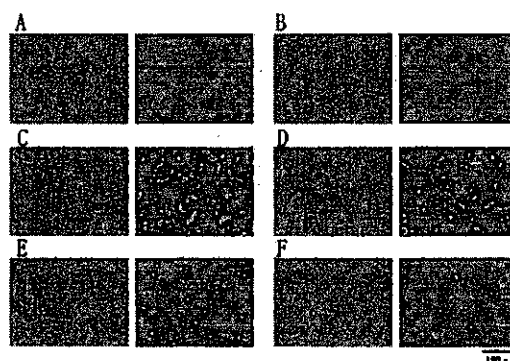


図 12. マクロファージへのナノスフェアの取り

込みおよび蛍光プローブの放出

A: 細胞のみ、B: リン酸化フルオレッセインを添加した細胞、リン酸化フルオレッセイン封入ナノスフェア添加後、C: 0h、D: 1 日、E: 3 日、F: 7 日後に細胞を観察

結乾燥処理前後での粒径を測定したところ、それぞれ再分散性を維持するのに最適な濃度が存在することがわかった(表 2)。

ナノスフェアからの薬物徐放挙動

代表的な DDS 用のキャリアの一つであるリポソームは、脂質二重膜が生体内で不安定であるため薬物が漏出しやすく一過性の薬効しかえられないが、このナノスフェアでは、PLGA という固相に薬物を内封することで外相への漏出が大きく制限できると期待される。そこで、えられたナノスフェアを FBS(ウシ胎児血清)/PBS(v/v=1)中に懸濁し、その放出挙動を解析した(図 11)。液中乾燥法で調製した BDP 封入ナノスフェアからは、早く BDP が放出され 6 日後には 80%以上がナノスフェアから放出されたのに対し、金属イオン法で調製したリン酸ベタメサゾン封入ナノスフェアでは、初期の放出が著しく抑制され、さらにも後も徐々に放出されることが明らかになった。また、分子量が小さい PLGA/PLA で調製したナノスフェアの方が、さらには、PLA よりも PLGA で調製したナノスフェアの方がより早くリン酸ベタメサゾンが放出されることが明らかになり、ナノスフェアからの放出挙動を制御できることがわかった。

炎症部位等には貪食性のマクロファージが多く集積することが知られており、ナノスフェアが病変部位でそのような細胞に取り込まれることで細胞から薬物が徐放されると考えられる。そこで、ナノスフェアのマクロファージによる取り込み能の評価および細胞内の薬物の残存性について検討をおこなった。金属イオン法でナノスフェアを調製するためには、蛍光プローブに酸性基が必要であるので、フルオレッセインアミンとリン酸グルコン酸を縮合し、リン酸化フルオレッセインを合成した。この蛍光プローブを封入した 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(図 12)。その結果、ナノスフェアが顕著にマクロファージに取り込まれることがわかった。さらに、ナノスフェアが取り込まれた後、1 週間後においても細胞内に有意な量のロードミンが残存し続けていることがわかった。しかし、顕微鏡観察では定量性がえられないので、実際にステロイド封入ナノスフェアを取り込んだ細胞から培地中に放出されたステロイド量を定量した。その結果、液中乾燥法で調製した BDP 封入ナノスフェアからは、極めて短時間で BDP が放出され 2 日後にはほぼ完全に放出されているのに対し、金属イオン法で調製したナノスフェアでは、およそ 3 日後までは 0 次放出に近い挙動を示し、その後も少しずつ放出され続け、7 日後においても少量ではあるが有意な量が持続放出されているが明らかになった(図 13)。

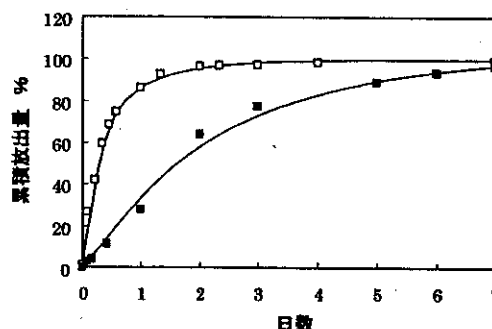


図 13. マクロファージに取り込まれたナノスフェアからのベタメサゾン放出挙動
■: 金属イオン法により調製したナノスフェア、□: 液中乾燥法により調製したナノスフェア。双方とも分子量 10,000 の PLGA を用いた。

次に血小板凝集抑制作用・血管拡張作用などがある PGE1 のナノスフェア内への封入を試みた。液中乾燥法では、前記のとおり PGE1 の封入率が低いためそのプロドラックである AS006 を利用した。3%BSA を含む PBS 中での PLGA ナノスフェアからの AS006 放出挙動を測定したところ、一気に 30%程度が放出されることがわかった。この BSA 存在による AS006 の急激な放出は、AS006 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 および SDS 存在下でのナノスフェア内の AS006 残存率を解析してみた。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 AS006 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、AS006 は PLGA 層よりレシチン層への親和性が高く、レシチン層に分布しやすいのだと思われる。一方、BDP では、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。そこで、AS006 封入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 AS006 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 AS006 が存在しない AS006 含有レシチン/PLGA ナノスフェアをえた。調製後のナノスフェアの表面電位値が -6.6mV であったのに対し、SDS 添加後には -57.2mV と大きく負に変化したことから、レシチンが表面から遊離されたことがわかる。また、その後レシチンを添加することで -6.3mV と SDS 添加前の値とほぼ同じ値になったのでレシチンが表面に再吸着していることが確かめられた。えられたナノスフェアをマクロファージに取り込ませ、培地中に放出される AS006 量を定量したところ、24 時間後にはほとんどの AS006 が放出されてしまうことがわかった。これは、AS006 が PLGA 層内でも表層近くに分布しているためではないかと考えられる。

ナノスフェアのターゲッティング能解析

生体内でナノスフェアがターゲッティング能を発揮するためには、ナノスフェアの表面を適切な物質で修飾することが重要である。本研究では、リポ製剤において炎症部位および血管閉塞部位への集積を誘導することが既に知られているレシチンを主として表面修飾剤として用いた。レシチンは、調製時に界面活性剤として機能することでナノスフェアの表面に局在し、粒径をも制御できることが明らかになった。また、Pluronic や Tween のようなポリエチレンオキサイド誘導體を利用して同様にナノスフェアが調製できることもわかった。さらに、ターゲッティングにはナノスフェアの粒径を制御することも重要であると考えられる。液中乾燥法で調製したナノスフェアでは、レシチンの量あるいは乳化装置の強度を変えることで 200nm ～数 μm の、金属イオン法では、有機溶媒量などを変えることにより $80\sim 300\text{nm}$ のナノスフェアが任意にえられることが明らかになった。ローダミンを封入した粒径が異なるナノスフェアのラットにおける体内動態を解析したところ、 200nm 程度の粒径のナノスフェアが顕著に炎症部位に集積していることが明らかになり(図 14)、このナノスフェアにはターゲッティング能が存在することが明らかになった。

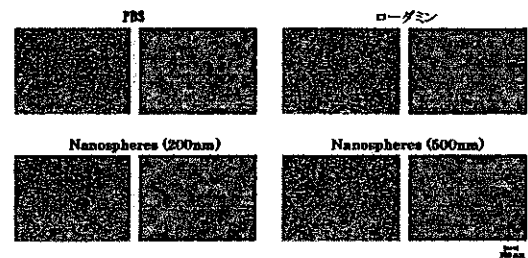


図 14. ラット炎症部位の凍結切片の位相差および蛍光像

疾病モデル動物での薬理作用解析

生体内での薬理効果を解析するため、ステロイド(ベタメサゾン)の抗炎症作用について検討した。ACII 炎症モデルラットを用い、ステロイド封入ナノスフェアの抗炎症効果を調べたところ、ステロイドをそのまま投与した時には、1 日目に強い抗炎症効果のピークを示し、その後 4 日目にはほとんど効果がなくなったのに対し、ナノスフェアを用いた時には、5 日後でも強い抗炎症効果を示し続け

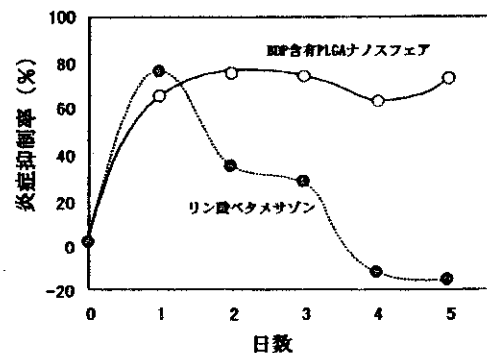


図 15. ACII モデルラットでの炎症抑制効果

た(図 15)。

D. 考察

この研究の特色は、臨床応用を見据え①生体内で安定・安全で、②薬物徐放機能と③ターゲティング機能を兼ね備えた静脈注射用ナノスフェア型製剤を開発する点である。これまで、多くの DDS 製剤が提唱・研究されてきたが、実際臨床応用にまで到達できたものは数少ない。基礎研究のレベルでは、様々なナノスフェアの開発がおこなわれてきたが、実際に製品化を考えると、ナノスフェア内への薬物封入率が低い、薬物の初期バーストの発生、不安定な薬物放出挙動、分散安定性が低いことや製造法が煩雑であるといった問題点が存在していた。このような諸問題を克服するため、本研究では、O/W 型液中乾燥法および金属イオン法の二通りの調製法を開発し、ナノスフェアの表面物性・粒径・薬物の封入率および放出挙動などの最適化を試みた。

液中乾燥法では、表面修飾剤・界面活性剤として生体内で安全性が確認されているレシチンを用いることで、遠隔塞栓を誘導しない大きさにまで任意に PLGA ナノスフェアの粒径制御ができた。また、リポ製剤と同様に表面のレシチンにより炎症部位等へのターゲティングができるとともに、糖脂質あるいは合成化合物なども表面に安定保持させることができ、標的組織を容易に拡大できると思われる。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。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(図 5, 6)。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、AS006 および 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、薬物によっては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と考えられる。

液中乾燥法で調製したナノスフェアでは、乳化装置を利用しても最小で 200nm のナノスフェアしかえることができず、また、水溶性の薬物は封入できなかった。①製造コストの面からはより簡便で、②ターゲティングとなる組織の範囲を広げるためにはより小さなナノスフェアを調製でき、そして、③薬物の利用範囲を広げるためには水溶性薬物をも封入できる調製法が望ましく、本研究では新規調製法として金属イオンを用いた調製法をも開発した。

水溶性薬物を封入する方法はこれまでにいくつか提唱されてきた。PLGA、界面活性剤及び水溶性低分子薬物を溶解した有機溶媒を油液中に添加し、粒径 100~300nm 程度のナノスフェアを調製する方法(O/O 型溶媒拡散法)が報告されている。しかし、この方法では、調製する際に油液を用いているため遠心操作など精製に費やされる製造工程が多段階に及び大量調製が比較的困難であった。また、W/O/W 型液中乾燥法により、あるいは、酸化亜鉛を用いた S/O/W 型液中乾燥法調製により、タンパク質(ペプチド)を封入したマイクロ粒子が調製できることが知られている。しかし、このような液中乾燥法を利用した方法では、静脈注射可能でかつターゲティング能を有するような 300nm 以下のナノスフェアは調製が困難であった。さらに、カルボキシル基を有する水溶性薬物では、酸性にすることで薬物を疎水化することが可能であるが、PGE1 のように低 pH 下で変性する薬物も有り、また、酸性下では PLGA のエステル結合の分解も同時に促進される可能性がある。

本研究で開発した金属イオンを用いた方法では、中性に近い pH で水溶性薬物を疎水化

することができる上に、金属イオンが生体内のリン酸などと置換することで薬物は再び容易に親水化される。さらに、この調製法では、低速の攪拌機以外にいかなる乳化装置も必要がないうえに、薬物沈殿の回収操作をろ過により、調製したナノスフェアの濃縮を限外ろ過でおこなうことで遠心操作も不要になり、工業的にも極めて簡単にナノスフェアが調製可能である。また、前記してきたように、金属イオンを利用することで、①一般的には封入困難な水溶性低分子薬物をナノスフェア内に高濃度封入可能で、②低分子薬物の初期バーストが抑制され、③長い期間徐放可能であるナノスフェアが調製できることが明らかになった。

金属イオンの役割に関しては、水溶性薬物の疎水化に加え別の作用が存在していると思われる。武田薬品工業は、酸化亜鉛を用いた液中乾燥法により調製した PLGA マイクロ粒子では、PLGA 微粒子のガラス転移温度が上昇することおよびタンパク質の放出速度が遅くなることを報告している。そして、これは酸化亜鉛が PLGA のカルボキシル基と相互作用しているためだと考察している。本研究においても、①アセトン中に少量の酢酸亜鉛水溶液を添加すると酢酸亜鉛の沈殿が生じるが、PLGA を溶解したアセトン溶液中では、沈殿が生じなかったこと、②疎水性の BDP などと比べて、金属イオンを利用し調製したナノスフェアの方が高濃度薬物を封入できたこと、③ナノスフェアに高濃度薬物を封入するには沈殿形成に関与しない余剰の亜鉛イオンが必要であったことなどから、同様に亜鉛に別の作用が有ると考えられた。そこで、亜鉛の更なる役割について解析を試みた。リン酸ベタメサゾンの封入率が異なる PLGA (分子量 10,000) ナノスフェアを調製・精製し、その中に含まれる亜鉛含量を ICP 発光分析により定量した。その結果、リン酸ベタメサゾン量と亜鉛量が比例関係にあることが明らかになった (図 9)。その直線の傾きから、1mol のリン酸ベタメサゾンに対し 2.8mol の亜鉛を必要とすることがわかった。この値は、90%のリン酸ベタメサゾンを生沈させるのに必要であった亜鉛量 (亜鉛/リン酸ベタメサゾンのモル比で約 2~3) とほぼ一致していた。また、リン酸ベタメサゾンを加えずに、亜鉛と PLGA (分子量 10000) のみでナノスフェアを調製した結果、ナノスフェアあたり 0.51 重量%の亜鉛が含有され、その亜鉛/PLGA のモル比は 0.78 と算出された (図 9)。分子量 20000 の PLGA を用い調製した場合には、ナノスフェアあたり 0.28 重量%の亜鉛が含有され、亜鉛/PLGA のモル比は 0.87 となり分子量 10000 の PLGA ナノスフェアでのモル比とほぼ一致していることがわかった。さらに、ステロイドの放出速度は、金属イオンで調製したナノスフェアの方が、液中乾燥法で調製したナノスフェアより遅くなった。以上より、亜鉛の役割としては、薬物の沈殿形成を誘導するのに加え、PLGA ナノスフェアの形成に関与し、特に PLGA の末端のカルボキシル基と相互作用していることが示唆された。

分子量の異なる PLGA あるいは PLA を用い金属イオン法でナノスフェアを調製することで、大きく放出速度が異なることがわかり、疾病に応じて徐放制御ができることがわかった。一方、液中乾燥法で調製した AS006 封入ナノスフェアでは、短期で AS006 が放出されてしまった。よって、金属イオン法を用い、PGE1 あるいはその誘導体を封入したナノスフェアの調製を試みている。

約 200nm のナノスフェアが炎症部位に効率よく集積したことから、このナノスフェアがターゲティング能を有することがわかった。また、金属イオン法では最小で 80nm 粒径のナノスフェアが調製されており、腫瘍組織へのターゲティングも可能になるのではないかと考えられる。表面への修飾剤としては主としてレシチンを用いてきたが、今後さらにチャージを付加したりポリエチレンオキサイド誘導体などを用いることで最適なターゲティング能を有するナノスフェアを選別する必要がある。

以上より、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 ナノスフェア製剤が新規調製法により開発された。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、臨床への応用が期待できる。

B. 結論

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・障害血管等に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静脈注射用 PLGA (又は PLA) ナノスフェア製剤の開発を二つの調製法によりおこなった。第一の方法は、レシチンを界面活性剤および表面への修飾剤として用いた O/W 型の液中乾燥法である。この方法を用い、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。第二の方法(金属イオン法)は、水溶性の低分子薬物をも封入できる方法であり、金属イオンと薬物の相互作用を利用し、高濃度でナノスフェア内に封入することに成功した。この調製法では、PLGA および金属イオンで疎水化された薬物を有機溶媒中に溶解し、水中に滴下するだけでナノスフェアがえられ、従来の調製法に比べ医薬品化のための大量調製に適した簡便な調製法である。さらに、凍結乾燥処理をしてもナノスフェアの分散安定性が維持され、薬物の初期バーストも生じないことがわかった。

ナノスフェアの希釈血清中での薬物放出挙動を検討したところ、液中乾燥法で調製したナノスフェアでは、短期で薬物が放出されたのに対し、金属イオン法で調製したナノスフェアでは、長期にわたる徐放挙動を示した。蛍光プローブを封入した PLGA ナノスフェアのマクロファージへの取り込み挙動を解析した結果、顕著にマクロファージにナノスフェアが取り込まれることおよび蛍光プローブが徐々に細胞外に放出されていくことが明らかになった。さらに、細胞外への薬物放出挙動を測定したところ、金属イオン法で調製した PLGA ナノスフェアでは、1 週間にわたる徐放放出が認められた。

液中乾燥法で調製したナノスフェアでは、レシチンの量あるいは乳化装置の強度を変えることで 200nm~数 μ m の、金属イオン法では、有機溶媒量などを変えることにより 80~300nm のナノスフェアが任意にえられることが明らかになり、その中でも約 200nm 程度の粒径のナノスフェアが顕著に炎症部位に集積していることがわかった。また、炎症モデルラットを用いステロイド封入ナノスフェアの抗炎症効果を調べたところ、長期間強い抗炎症効果を示し続けることが明らかになった。

以上より、このナノスフェアは、in vivo においてもターゲティングおよび薬効の長期維持が可能であり、新規の DDS 製剤として有用であり、臨床への応用が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

①石原 務、水島 裕 発明の名称 「静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤」
出願番号：特願 2002-159190 号

②石原 務、水島 裕 発明の名称 「徐放性ターゲ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：特願 2003-84895 号

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

分担研究者 檜垣 恵 東京慈恵会医科大学 DDS 研究所 客員教授

研究要旨

本研究ではマイクロカプセルではなくさらに小さなナノ粒子(100nm-1 μ m)に抗原を内包することにより非特異的刺激を減少させ、樹状細胞への抗原の特異的な取りこみおよび抗原提示を促進して効果的な免疫応答の誘導をめざす。さらにナノ粒子へポリ I:C や非メチル化 DNA 封入して現在注目されている Toll-like レセプターを利用した樹状細胞への抗原取りこみによる細胞活性化を試みる。この方法の開発により種々のワクチン抗原量及び投与回数の減少、ひいては副作用の減少にも結びつくと考えられる。また、ナノ粒子にステロイドを封入した徐放製剤の開発により関節リウマチの治療に役立てる。

A. 研究目的

現在のワクチン研究の課題として徐放製剤による一回投与ワクチン、副反応を減少させるための注射によらない粘膜ワクチン、生ワクチンの力価保持可能な耐熱性ワクチンおよび多価ワクチンの開発が挙げられている。一方、近年の生来免疫の研究から樹状細胞が特異的な免疫応答を効率よく誘導する機構が明らかになってきた。今回われわれはこの樹状細胞に注目してワクチンへの応用研究を考えた。従来のワクチンやアジュバントでは CD8⁺T 細胞や Th1 タイプ T 細胞の誘導が弱い点が問題であったが、樹状細胞はプロフェッショナル抗原提示細胞の中で唯一ナイーブ T リンパ球に抗原提示を行い、一次免疫応答を誘導する能力を有している上にヘルパー T 細胞・キラー T 細胞の誘導、抗体産生、IL-12 産生を容易に惹起することができる。樹状細胞による抗原の取りこみはエンドサイトーシス(食作用)によるが、100-500nm の可溶性物質や液体は液相エンドサイトーシス(飲作用)、500nm-3000 nm の物質はマクロエンドサイトーシス(大飲作用)、さらに大型の粒子状抗原は貪食作用によって細胞内に輸送される。そのほかに C 型レクチンなどの細胞表面レセプターを介する吸着性エンドサイトーシスも存在する。非リンパ系組織に存在する未成熟樹状細胞はこれらの機構により外来物質を取り込み、プロセッシングを行いながら LPS や TNF, GM-CSF などの炎症性サイトカイン、T 細胞上の CD40L 刺激により成熟してリンパ組織へ移動してクラス I・クラス II 分子へ抗原ペプチドを結合して CD8⁺・CD4⁺ 陽性 T 細胞に抗原提示する。取りこみ機構のうち液相・マクロエンドサイトーシスと受容体を介する抗

原の取りこみが特に重要でピコモル・ナノモルオーダーの抗原量でも樹状細胞は十分に抗原提示することができることが知られている。われわれはこのピノサイトーシスに注目してワクチン抗原の特異的取りこみ亢進を行えば効果的な免疫応答が誘導できると考えて、以下に述べるナノ粒子の利用を考えた。従来、薬剤の標的部位への到達性と滞留性の向上、より精密な薬物放出制御の担体としてマイクロカプセル・マイクロスフェア、エマルション、リポソーム、高分子溶液のほかにナノカプセル・ナノスフェアが研究されている。生体内分解性素材としてのポリイソブチルシアノアクリレート、ポリヒドロキシグルタミン、ポリ乳酸、乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA)、アルブミン、架橋デンプンなどを利用して生体内分解性ナノスフェア・ナノカプセル (100nm-1000 nm) が開発されている。その機能は粒子径、表面電荷、表面の親水性により決まるが、静脈内投与で肝臓のクッパー細胞などの網内系に捕捉されるとされている。ワクチン抗原のマイクロカプセルとしては PLGA を用いた徐放型の破傷風トキソイド (TT) /ジフテリアトキソイド (DT) ワクチン (粒子サイズ 20 μm) の開発がすでに報告されている。これは、マイクロカプセル化による抗原の徐放遊離によって抗原の単回投与による簡便化と共に異なった biodegradation time をもったマイクロカプセルに封入することでブースターの効果を期待したものである。われわれも同様に徐放化ワクチンに関してはコラーゲンを担体とした TT/DT ワクチンを報告している (Vaccine 19:3091, 2001)。今回の研究ではマイクロカプセルではなくさらに小さなナノ粒子 (100nm-1 μm) に抗原を内包することにより非特異的刺激を減少させ、樹状細胞への抗原の特異的な取りこみおよび抗原提示を促進して効果的な免疫応答の誘導をめざす。さらにナノ粒子へポリ I:C や非メチル化 DNA 封入して現在注目されている Toll-like レセプターを利用した樹状細胞への抗原取りこみによる細胞活性化を試みる。この方法の開発により種々のワクチン抗原量及び投与回数の減少、ひいては副作用の減少にも結びつくと考えられる。一方、われわれは 20-45 μm サイズのポリスチレン粒子の利用によるインフルエンザ HA 抗原の経鼻投与の効果も報告もしているが (Vaccine 16:741, 1998)、樹状細胞が経粘膜投与の抗原にも反応することからナノ粒子を利用した経粘膜投与による免疫応答の誘導能亢進に関しての検討も行う。これらの方法は表皮内ランゲルハンス細胞を標的としたヘリウム粒子による無針 Powderject 系による表皮免疫法にも利用できると考えられる。一方、不活化ウイルスワクチンや DNA ワクチンにおいても樹状細胞は有効な標的となると考えられるのでその応用にもつながる研究と考えている。

さらに、関節リウマチの治療として滑膜樹状細胞を標的としたナノ粒子薬剤の検討も行う。われわれは関節リウマチにおける Toll-like レセプター (TLR) の研究の過程で自己免疫疾患患者では末梢血の TLR3 陽性樹状細胞の減少を見出し、炎症滑膜局所での TLR3, TLR9, TLR2/4 陽性細胞の局在を確認した (臨床免疫, 28:606, 2002)。それぞれの TLR に対するリガンド刺激による炎症性サイトカイン産生も認めている。滑膜組織における TLR9 陽性細胞の増加は特徴的で非メチル化 DNA の病態形成への関与を考えられた。そこで 200nm の PLGA ナノ粒子に脂溶性および水溶性ベタメサゾン封入して滑膜細胞への取り込みおよびサイトカイン産生にお与える影響を検討するとともに、タイプ II コラーゲン誘導マウス関節炎 (CIA) モデルにおける炎症の抑制効果を検討する。

B. 研究方法

(1) 粒子サイズの検討

取り込みおよび免疫付与能の検討のためまずポリスチレンを用いて粒子サイズを検討する。種々の大きさのポリスチレン(PS)粒子 (100nm, 500nm, 10000 nm, 4500nm) にヒトガンマグロブリン(HGG)または破傷風トキソイド(TT)を吸着させる。一方、Balb/c または C57BL/6 マウスの骨髄から磁気ビーズを用いたネガティブセレクション CD5, CD45R, CD11b, Gr-1, TER119 陰性の幹細胞を分離するとともに脾臓より CD2, CD3, CD45R, Gr-1, 4-7, TER119 陰性の成熟樹状細胞を単離する。IL-4/GM-CSF 存在下で上記 HGG/TT-PS 粒子を培養樹状細胞に添加した後、マウス腹腔内に投与して経時的に後眼窩静脈より採血して、抗 HGG/TT 抗体価を ELISA にて検討する (図 1)。

(2) PLGA ナノ粒子の作成

製法は物理化学的な方法で行う。生体内分解性のポリ乳酸・ポリグリコール酸 (PLGA) を用いてエマルション滴 (抗原・PLGA・有機溶媒) から溶媒を外相の油相 (0/0 エマルション) に拡散させ、液滴内で薬物と高分子を共沈させるエマルション溶媒拡散法でマトリック型 (スフェア) のナノカプセルを、W (抗原液) / O (PLGA 有機溶媒液) 型エマルションの外相に PLGA の食溶媒を添加して PLGA を相分離させるエマルション相分離法によりリザーバー型のナノカプセルを作製する。粒子の大きさはポリスチレン粒子で得られた結果を参考にして界面活性剤 (レシチン) およびコレステロール量により調節する。抗原としては破傷風トキソイド (TT) (PLGA-TT) およびインフルエンザ HA 抗原 (PLGA-HA) を使用する。さらに抗原の代わりに FITC またはローダミン粒子を内包したものも作製する。試験管内でのナノ粒子から抗原の溶出は経時的に上清中のトキソイドおよびたんぱく量を定量して測定する。PLGA-ステロイド (脂溶性ベタメサゾン BDP および水溶性ベタメサゾン BSP) は本研究の共同研究者である東京慈恵医科大学の石原博士が作製したものを用了。

(3) ナノ粒子の樹状細胞への取りこみ

上記の方法で 6 週令のメス Balb/c および C57BL/6 マウスより樹状細胞を分離し、PLGA-TT および PLGA-HA を同様に添加する。FITC を内包した粒子の取りこみ率をフローサイトメトリーで検討することにより最適な粒子サイズを確認する。さらに TLR3 リガンド (ポリ I:C) など粒子表面を修飾することによる特異的取りこみの亢進も検討する。一方、抗原含有ナノ粒子の取りこみによる樹状細胞の活性化は IL-12p40, p35 の産生を ELISA および RT-PCR により確認する。同様に IL-1, TNF \cdot , IL-10 などの炎症性サイトカイン産生も ELISA および RT-PCR にて定量する。CCR および TLR 2 \cdot 3 \cdot 4 \cdot 9 の発現変化もフローサイトメトリーおよび定量 PCR にて検討する。

(4) マウス ex vivo 実験

図 1 と同様に試験管内で PLGA-TT, PLGA-HA をマウス樹状細胞に添加したのち同系マウスに戻して抗体価の上昇, 細胞障害性 T 細胞の誘導を検討する。

(5) PLGA-TT 粒子のマウス皮下投与実験

6週令のメス Balb/c(Th2 タイプ)および C57BL/6(Th1 タイプ)マウスの皮下に 5・g の TT 抗原を含有する PLGA ナノ粒子を接種する。陽性コントロールとしてはアラムを併用した抗原投与を 2 週間隔で 3 回行う。投与後 48 週まで 4 週間隔で後眼窩静脈より採血して血清を得る。抗 TT 抗体価はゲラチン粒子凝集法により測定して抗体価の上昇と持続を検討する。防御抗体として重要な抗体の IgG2a サブクラスは ELISA で測定する。一方、T細胞の増殖反応は抗原投与後 2 週および 24 週後の各マウス群のリンパ節細胞を調整し、サイミジン取りこみにより測定する。一方、アイソトープラベルした TT 抗原を用いたナノ粒子の組織分布も検討する。さらに抗 TT 抗体を用いて経時的に TT-ナノ粒子の樹状細胞への取りこみを皮下組織および胸腺・リンパ節の免疫組織染色により確認する。

(6) ナノステロイドの滑膜細胞への取り込みおよびサイトカイン産生に与える影響

培養滑膜細胞を用いて PLGA-BDP, PLGA-BSP, BDP, BDP, BSP を 10⁻⁸M 添加したのち 4 時間後に洗浄、直後および 4 日後に 1 μg/ml の LPS もしくは PGN で刺激した。得られた培養上清の TNF-α および IL-6 は ELISA にて測定した。

(7) コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデルマウスを用いたナノステロイドの検討

7~8 週令 Balb/c もしくは DBA/1 マウスの尾静脈より、関節炎用抗体カクテルを 0.5ml (2mg) 静注し、3 日後に LPS 溶液 0.1ml (50 μg) を腹腔内注射する。LPS 投与 2 日後にナノステロイド 0.3ml (30 μg/head) を静注する。体重測定、関節スコア (図 7; Score0: 普通のみかけと曲がり、Score1: 発赤と浮腫、Score2: 目に見える関節の湾曲、Score3: 強直を認める曲がり) および四肢の測定を行った。

C. 研究結果

1. 細胞分離

図 2 のフローサイトメーターで示すように脾臓および骨髄より幹細胞の分離が行われた。

2. 粒子サイズ

走査電顕 (SEM) および原子力間 (AFM) により約 200nm サイズの PLGA 粒子の作製が認められた。

3. 抗体産生および細胞性免疫の誘導

図 5 に示すように 100nm サイズの PS 粒子に吸着 TT 抗原が exvivo で樹状細胞をパルスした時に効率的な抗体産生が認められた。さらに図 6 に示すように CpG をアジュバントに用いると細胞性免疫の誘導も可能であった。

4. ナノステロイドの効果

滑膜細胞の炎症性サイトカインの産生に関してはフリーの薬剤と比べてナノステロイドは取り込み効率もよく LPS/PGN 刺激によるサイトカイン産生も長期にわたり抑制することをしました (図 9)。またタイプ II コラーゲン誘導マウス関節炎モデルにおいて PLGA ナ

ノ粒子に内包した水溶性ベタメタゾンは著明な抑制効果を示した (10)。

D. 考察と結論

ナノワクチンに関しては樹状細胞に特異的に取り込まれるナノ粒子サイズを明らかにし、免疫応答を示すところが明らかになった。今後さらにアジュバントの検討により効率化をはかっていく

また水溶性ナノステロイドは関節炎モデルで著効を示したことより今後さらにアジュバント関節炎モデルでの検討をお子成る。。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. Kanazawa H., Okada A., Higaki M., Yokota H., Mashige F., and Nakahara K. Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 Phenotype. *J Pharm Biomed Anal*, 15, 30(6), 1817-1824, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

図1 Ex Vivo Immunization

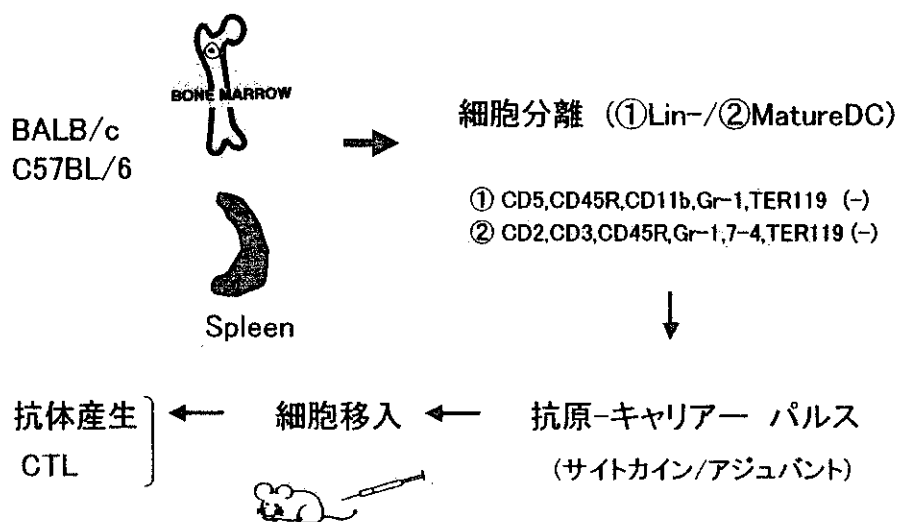
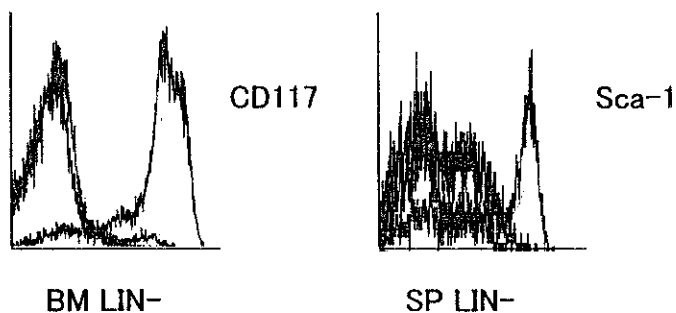


図2 FCM



		Lin (-)			
		Cell (100%)	Lin (-)	Sca-1	CD117
	Sp	6.4×10^7	5.0×10^5	2.4×10^5	1.3×10^5
			0.78%	0.38%	0.20%
10W	BM	1.0×10^7	6.0×10^5	2.1×10^4	5.0×10^5
			6.00%	0.21%	5.10%

図3 ナノ粒子 SEM

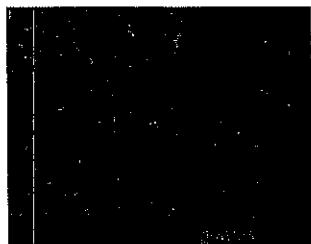


図4 ナノ粒子 AFM

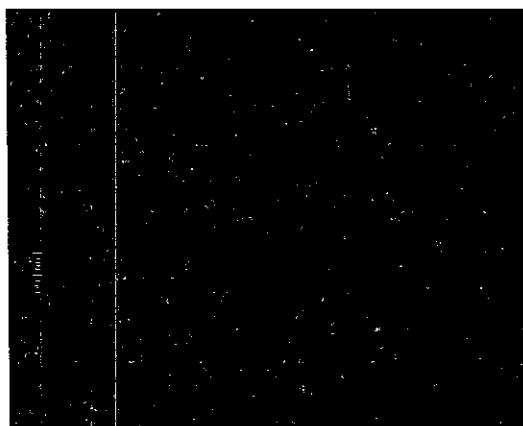


図5 Ab production (BALB/c : MDC)

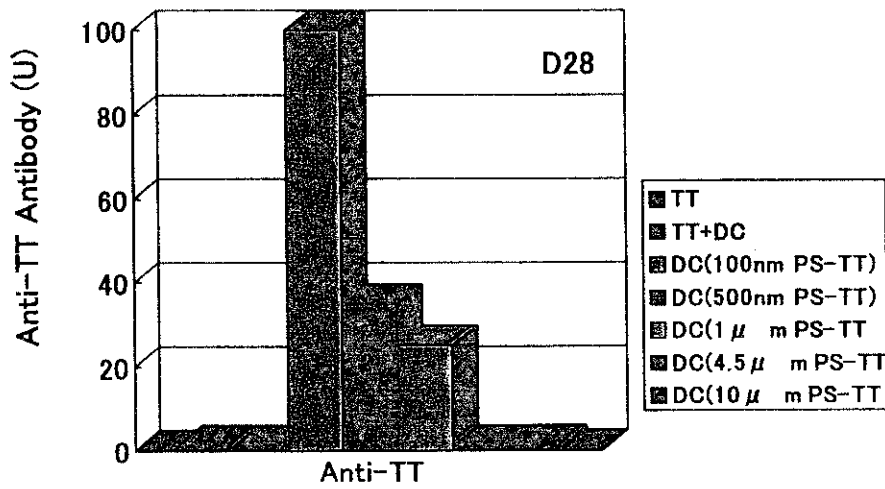


図6 T cell proliferation (C57BL/6)

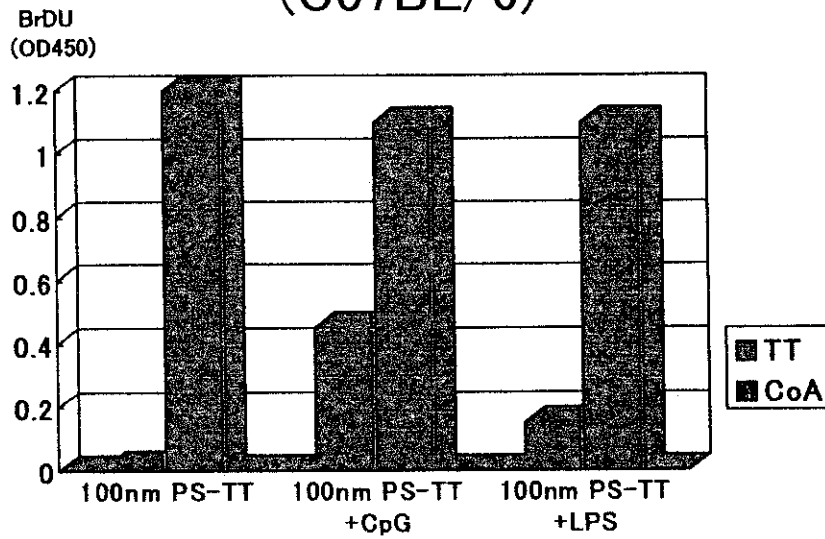


図7

スコアー

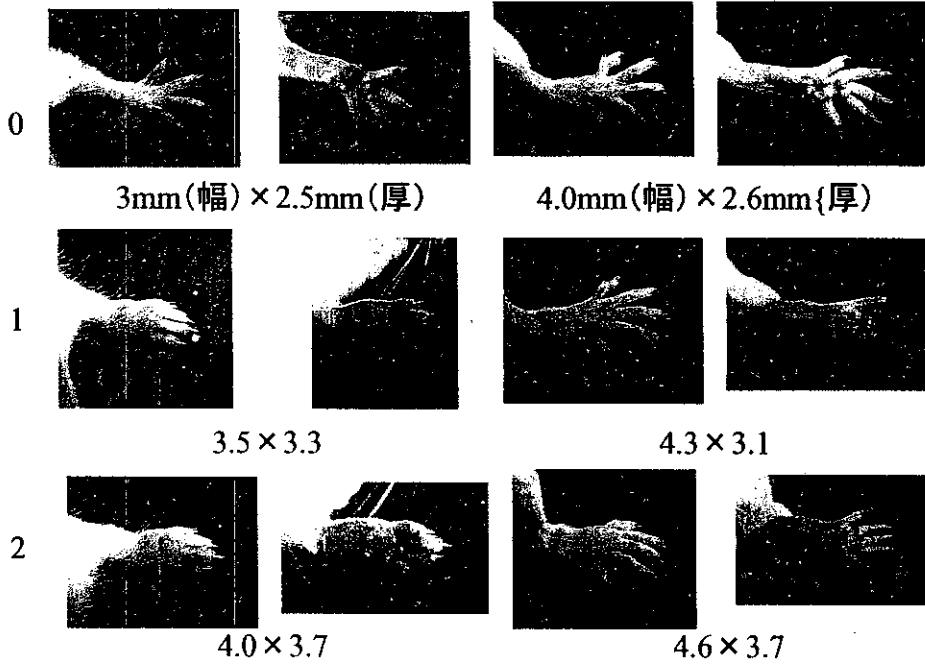


図8 コラーゲン関節炎モデルの抑制

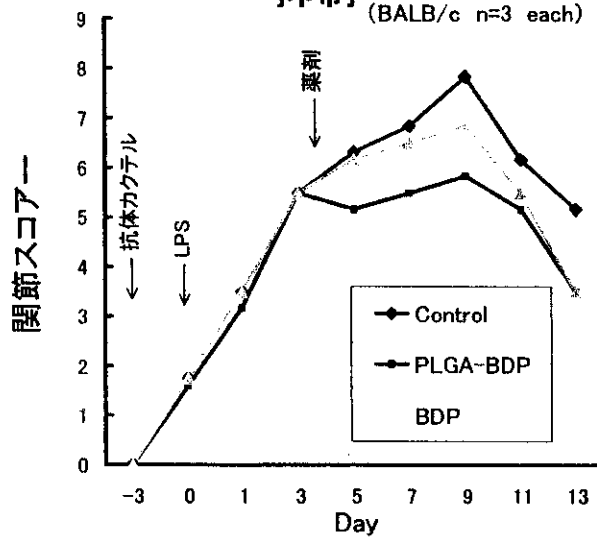


図9 LPS刺激培養RA滑膜細胞のTNF- α 産生の抑制

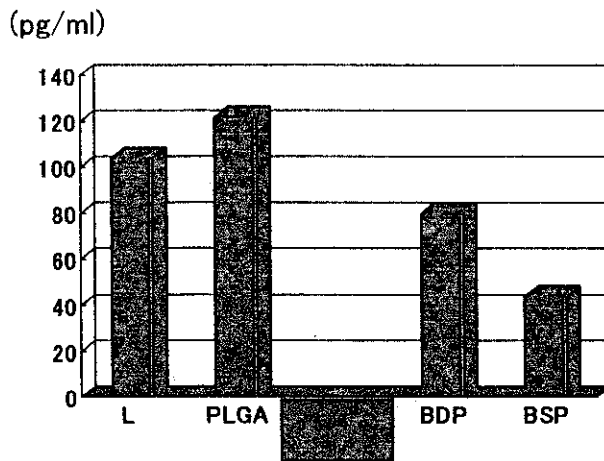
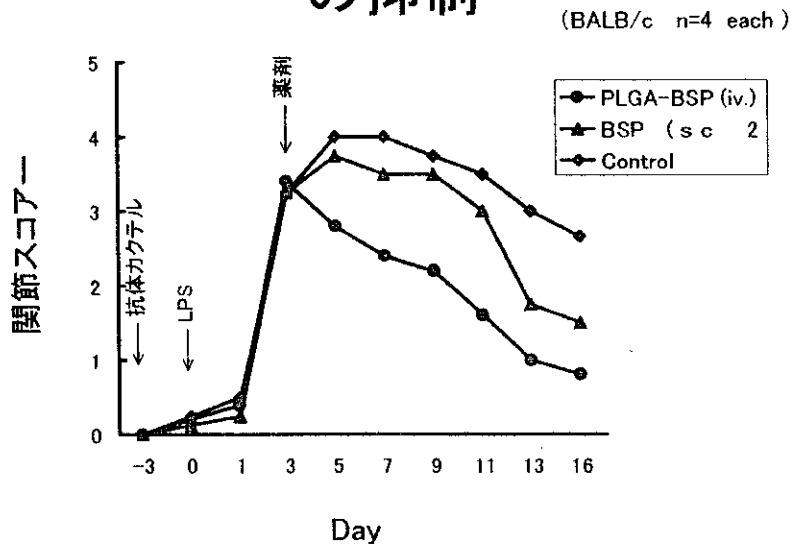


図10 コラーゲン関節炎モデルの抑制



カルシウム系化合物を用いた薬物徐放性担体材料に関する研究

分担研究者 田中 順三 独立行政法人 物質・材料研究機構 センター長
小林 尚俊 独立行政法人 物質・材料研究機構 主幹研究員

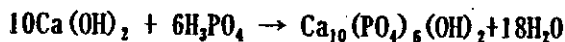
研究要旨 蛋白質吸着特性に優れたリン酸カルシウムの多孔質微粒子をスプレイドライヤー法にて作製し、その諸特性を明らかにした。また得られた多孔を炭酸カルシウムによる栓塞する技術開発を行い、薬物の超徐放を達成させるための技術開発を行った。

A. 研究目的

水酸アパタイト (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は骨や歯の無機成分であり、生体親和性の優れた材料として知られている。これまで整形外科領域では、焼結体・多孔質体・顆粒状材料が骨充填材・セメント材などとして臨床応用されている。また、アパタイトはタンパク質の吸着特性が優れているためカラム用素材として用いられ、リン酸カルシウムを薬物キャリアーとした薬剤送達システム (DDS) としても研究が行われている。本研究では、注射用徐放製剤として多孔質リン酸カルシウムを用いて超徐放を実現するための薬物担体材料の開発及び栓塞技術の確立をした。

B. 研究方法

HAp 微結晶は、激しく攪拌した 0.5mol/l の水酸化カルシウム懸濁液に 0.6mol/l のリン酸水溶液を 20ml/min の滴下速度で加え、室温で合成した。以下に反応式を示す。



最終 pH を 7.8 に調整し、熟成のため一晩攪拌を行った。得られた HAp 懸濁液を二流体ノズルのスプレイドライヤーで噴霧し、多孔質 HAp 球形粒子を作製した。噴霧条件は入り口温度 180℃・出口温度 80℃・噴霧圧 1.5Mpa とした。さらに球形粒子を 400、600、800、1000、1200℃ の各温度でそれぞれ焼成した。作製した粒子の諸特性は、比表面積・細孔分布測定 (BET 法) ・走査型電子顕微鏡 (SEM) ・透過型電子顕微鏡 (TEM) ・レーザー回折式粒度分布測定・赤外線スペクトル分析 (IR) ・X 線回折測定 (XRD) ・ゼータ電位測定を用いて評価した。

スプレイドライした多孔質 HAp 粒子の細孔を炭酸カルシウムにて栓塞を行った。1mol/l の塩化カルシウム水溶液 (10ml) に 500mg の HAp 粒子を加え、10 分間攪拌を行った。遠心分離後、凍結乾燥を行い、更に 1mol/l の炭酸ナトリウム水溶液 10ml 中に分散させた。遠心分離後、凍結乾燥を行い細孔の栓塞を行った。得られた粒子は IR、XRD、SEM 観察により評価を行った。