

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。

1. 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 の一つの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ターゲッティングである。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新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 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。

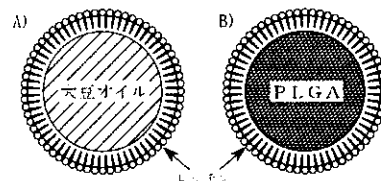


図 1. リポ製剤(A)とレシチン/PLGA ナノスフェア(B).

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。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)でナノスフェアの SEM 像をえた。

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 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・酪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。

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 μ 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 μ 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 PLA 20mg を溶解したアセトンを 500~1500 μ 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。えられたナノスフェア懸濁液は、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スフェアをえた。

ナノスフェアに封入された薬物は下記の方法で定量した。えられたナノス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スフェアを洗浄した。えられたナノスフェアは、2N の NaOH 水溶液中 12 時間 37°C で放置することで PLGA/PLA を分解し、HPLC にてナノスフェア中の薬物量を定量した。

2-4 ナノスフェアからの薬物放出挙動解析

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°C あるいは 37°C 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)により一晚培養した。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100 μ l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100 μ l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。

3. 研究成果

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。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-57.2mVであったのに対し、レシチン存在下では-6.6mVと大きくプラス側に变化したことから、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。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。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。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マイ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。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ボフラビンを用い、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が約 1 で大部分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。

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。

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したが、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。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、ナノスフェア内にはリン酸ベタメサゾンに対し約 2~3 倍モル量の亜鉛が存在していることが ICP 発光分析による亜鉛定量より明らかになった。

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。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(Marquadt 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 PluronicF68 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。

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 2)。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、さらにその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。

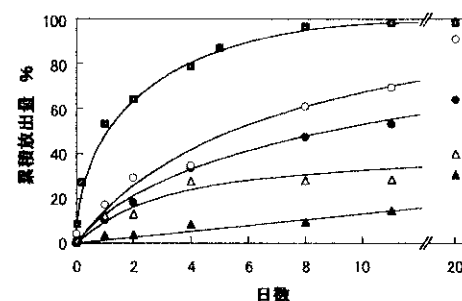


図 2. 希釈血清中のナノスフェアからのステロイド放出挙動
■: PLGA(分子量 2 万)を用い液中乾燥法により調製したナノスフェア。
○: PLGA(分子量 1 万)、●: PLGA(分子量 2 万)、△: PLA(分子量 1 万)、
▲: PLA(分子量 2 万)を用い金属イオン法で調製したナノスフェア。

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、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ダミンが残存し続けていることがわかった。また、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薬物量を定量した結果、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日後にはほとんどが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、2~3日後までは0次放出に近い挙動を示し、その後もゆるやかに放出され続け10日後においても少量ではあるが有意な量が放出されていることが明らかになった。

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グである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体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 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3)、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。

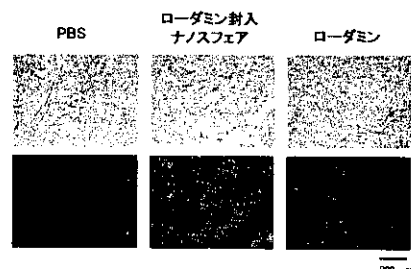


図3. ラット炎症部位の凍結切片の位相差および蛍光像

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、AS006を封入したナノスフェアをラットに静注し末梢血流量の変化を測定したところ、既存のリポ製剤(リポPGE1)では数分で血流値のピークをむかえたが、ナノスフェアではその数十倍以上の時間にわたり高い血流量値を維持し続けていた。よって、リポ製剤に比べこのナノスフェアでは薬物が徐放されていることが示唆された。しかし、この実験系では長時間にわたる連続測定が困難であったので、次にステロイド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、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を示したが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た(図4)。さらに、コラーゲン誘導関節炎モデルマウスを使い、その抗炎症効果を調べた場合にも、ナノスフェアでは少なくとも2週間にわたり強い抗炎症効果が維持されることが明らかになった。

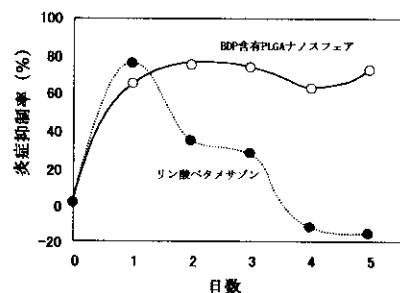


図4. ACIIモデルラットでの炎症抑制効果

4. 考察・まとめ

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てきた。

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。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つた。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。

水溶性の低分子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。それらとしては、水溶性の低分子薬物を溶解した水溶液を、PLGA を溶解した有機溶媒中に懸濁し、それを水中に滴下し減圧下有機溶媒を留去する方法(W/O/W 型液中乾燥法)や、川島らにより報告された PLGA と共に界面活性剤および水溶性の低分子薬物を溶解した有機溶媒を油液中に添加しナノスフェアを調製する方法(O/O 型溶媒拡散法)があった。しかし、前者は、薬物の初期バーストや小さな粒子をえにくい点などが、後者は、遠心操作を多用するなど製造過程が煩雑であるといった課題があげられる。さらには、PLGA 末端のカルボキシル基と水溶性薬物のアミノ基などとのイオン相互作用を利用し封入する方法があるが、これも、小さな粒子が調製しにくく、また、効率よく封入するには分子内に複数のカチオンが必要となる。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多く、また、調製時に 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省略により、調製したナノスフェアの濃縮を限外省略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かもしれない。それは、①ナノスフェア内にはリン酸ベタメサゾンに対し約 2~3 倍モル量の亜鉛が存在していること、②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、③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、④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推察される。その作用に関しては、まだ詳細は不明であるが、亜鉛がリン酸ベタメサゾンのリン酸基に結合しているのに加え、PLGAの末端に存在するカルボキシル基とも相互作用しているためではないかと思われる。

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。この結果も亜鉛による前記のような作用が起因となり、ナノスフェア内のステロイド分布が均一化した、あるいはPLGAの加水分解速度が遅くなったためではないかと推察している。また、分子量の異なるPLGAと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。

以下、結論を記す。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。

5. 研究発表

「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)、262、2002

6. 知的所有権の取得状況

1) 特許出願

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 出願日：平成14年5月31日