

化学結合による修飾をしていない。したがって、P e g - G - C S Fで問題となる副作用や抗原性に関しても心配する必要がなく、非常に安全で効果的な製剤として開発することが可能である。

皮下投与による血中濃度推移の実験結果では、本研究で作製した沈殿製剤において投与直後より血中濃度の上昇が見られている。また、投与後4日間の血中濃度測定の結果から半減期を比較してみると、溶液製剤に比べて本研究で開発した製剤の半減期はかなり長い。したがって、この製剤は沈殿物としての製剤なので、皮下投与の場合多少の血中移行に遅延が生じている可能性が考えられる。この製剤の投与において一時的な血中濃度の上昇も認められていない。これらのことから、おそらく皮下に投与された沈殿物から徐々に遊離されて血中に移行していつていると想定される。したがって、この沈殿製剤の血中移行については、大きな問題となる点はないものと考えてきける。タンパク医薬品の徐放剤の開発はこれまで多くの試みがなされてきたが実用化されたものはほとんどない。今回我々が開発したタンパク徐放化技術は、用いるタンパクの特性に適合した条件を見つけることにより更に多くのタンパク医薬品の徐放化に貢献しえるものである。従来の活性を保持しているG - C S Fを数日間徐放させることによりP e g - G - C S Fと同程度の薬効を期待できる。

この本研究によって新しく開発したG - C S F製剤の薬理学的作用について、その結果を示している。マウスに皮下投与して血中の循環白血球数の増加を指標にしてその効果の評価を行った結果を例として示した。従来の溶液製剤については、臨床的使用を想定して5日間の連続投与をして実験をおこなったが、連日の投与期間中では白血球増加作用が見られたものの、投与を中止すると直ちに白血球増加作用が消失した。この溶液製剤の作用持続が短いという結果は、血中濃度を測定した薬物動態の結果から類推することが可能である。一方、G - C S Fの沈殿製剤の場合は、1回の投与であったが、1 m g / k gでは投与2日後より7日後まで白血球増加作用の持続が認められ、また7日目以降の作用の減衰はゆっくりとしていて12日後まで白血球増加作用が持続していた。溶液製剤(0.2 m g / k g)の5日間の連日投与による白血球数増加と沈殿製剤(1 m g / k g)1回投与の白血球数増加のパターンは実験開始から5日間において非常に似通っており、その作用の強さもほぼ同等と見なせるものであった。また、この製剤において実験結果として示した0.1 m g / k gと1 m g / k gの場合を比較すると、白血球増加の程度およびその作用持続期間に用量依存性が認められた。

これらの結果は、このG - C S F沈殿懸濁製剤が生体においても有効性を示すこと、言い換えれば沈殿化によっては生物活性の低下が起きていないこ

とを示していると考えられる。

溶液製剤と沈殿製剤を生体に投与したときの薬理効果の消退について比較してみると、血中の薬物半減期と相関していると思われた。血中動態の実験結果で示した溶液製剤での短い半減期から考えて、G-C S F自身が血中でフリーになった場合には速やかに消失していくものと想定される。したがって、沈殿製剤のピーク後の緩やかな作用減衰の様子を合わせて考慮すると、本研究によって開発されたG-C S F沈殿製剤の場合薬物投与後の7日目以降においてもG-C S Fが血中に放出され続けていることが考えられる。沈殿製剤から投与量を10分の一に減らして実験を行ったときでも、薬理作用の衰退はゆっくりで白血球増加のピークから5日間の間薬理効果の持続が観察された。この結果は、この少量の投与量においても6日間程度は徐放され続け、そのために作用が現れていると解釈することができる。以上のように、動物に投与してその作用を実験で確かめた結果から、本研究で新たに開発したG-C S Fの沈殿製剤は長期間にわたる徐放性を有する製剤であることが判明した。

本研究で沈殿製剤を開発するにあたり、亜鉛結合性タンパク質としてのG-C S Fを選択し、亜鉛による沈殿物を作製して検討を行った。その結果として、本研究により開発したG-C S F沈殿製剤においては、臨床応用の点で望ましい徐放速度と薬理作用の持続性を示す結果が得られたと思われる。しかし、現時点では徐放速度をコントロールする因子を見出せずにいる。今後徐放を必要とするいろいろなタンパク医薬品にこの技術を応用していくには、この因子を見出すことが必要であると考えている。それにより、それぞれの医薬品にあった徐放速度を実現できる製剤設計が可能になるものと思われる。また、タンパク質は安定性に問題があることが多く徐放化の場合体内に長く安定な状態にすることも必要であろう。現段階の製剤の作製法を基に、改良すべき点に関してさらに検討を進めるつもりである。

## E. 結論

G-C S Fは造血幹細胞移植の目的とした末梢血幹細胞動員に使用されているが、やはり連日投与がおこなわれている。我々の開発した製剤の単回投与における末梢血幹細胞動員効果を調べたところ溶液製剤の連日投与と同等の効果を得ただけでなく、溶液製剤の場合幹細胞の動員効果は投与終了後1日だけであったのに対しわれわれの作製した製剤の場合は長期間維持していたことから、より多くの幹細胞を得る機会があることになる。このように、現在のG-C S Fの用法にたいしてわれわれの製剤の有効性が示せた。

## 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

- 1 石原務、出雲信夫、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕 水溶性薬物を封入した亜鉛/PLGAナノスフェアの開発、第19回日本DDS学会、6月19日 京都、Drug Delivery System, 18(3), 308P, 2003
- 2 出雲信夫、石原務、福慶あゆみ、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕 ステロイド封入亜鉛/PLGAナノスフェアを用いた抗炎症作用、第19回日本DDS学会、6月19日 京都、Drug Delivery System, 18(3), 308P, 2003
- 3 出雲信夫、石原務、福慶あゆみ、榎本真理子、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕。新規ステロイドDDS製剤(PLGA/PLAナノスフェア)の持続性抗炎症作用。第24回日本炎症・再生医学会 11月26日、京都

## 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

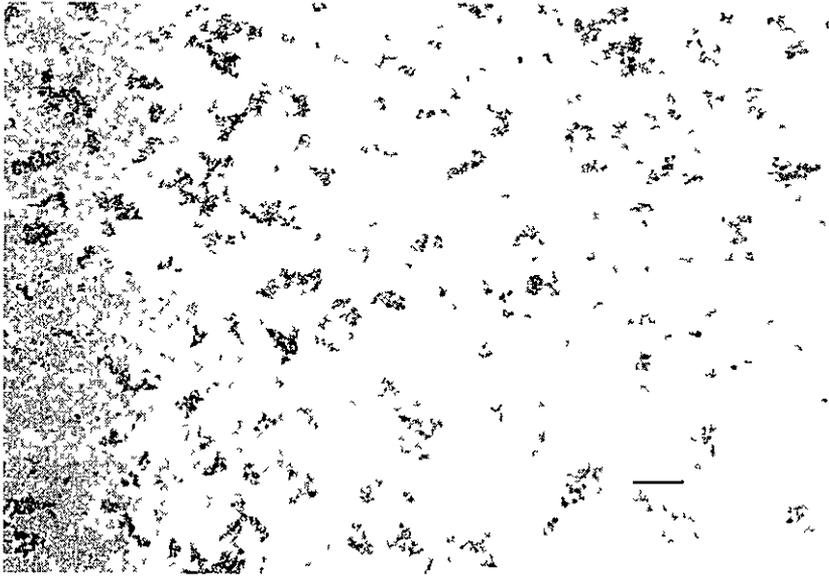


図1 G-C S F 製剤の顕微鏡写真 バーは10  $\mu$ mを示す。

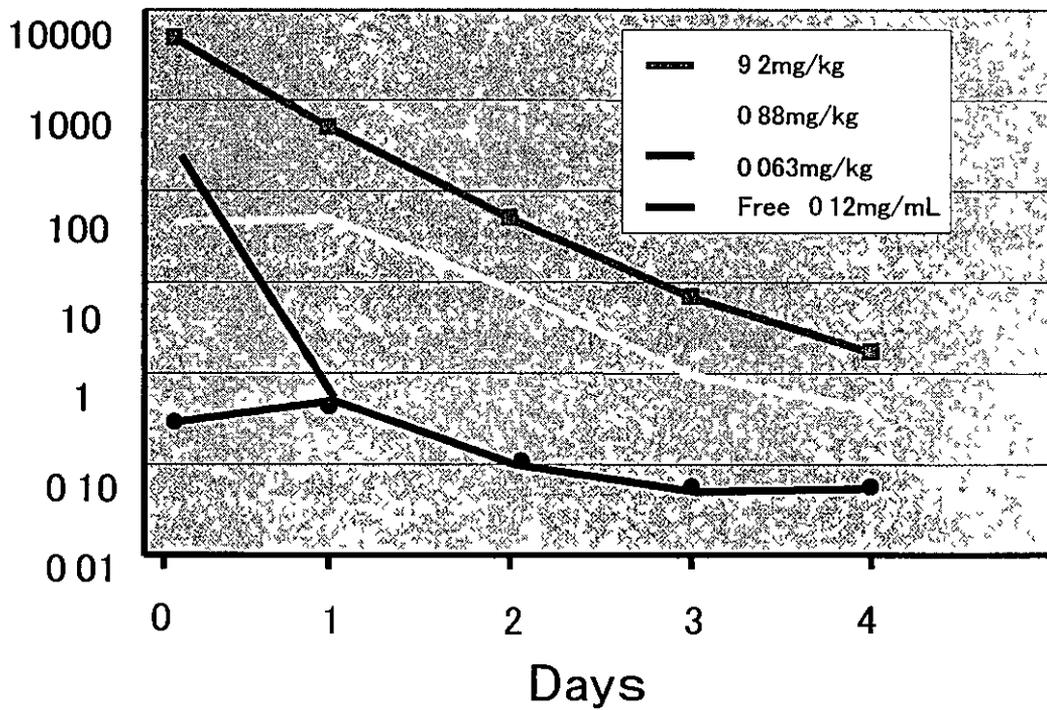


図2 G-C S F 製剤の血中濃度推移  
マウスに皮下投与したときの結果を示す。

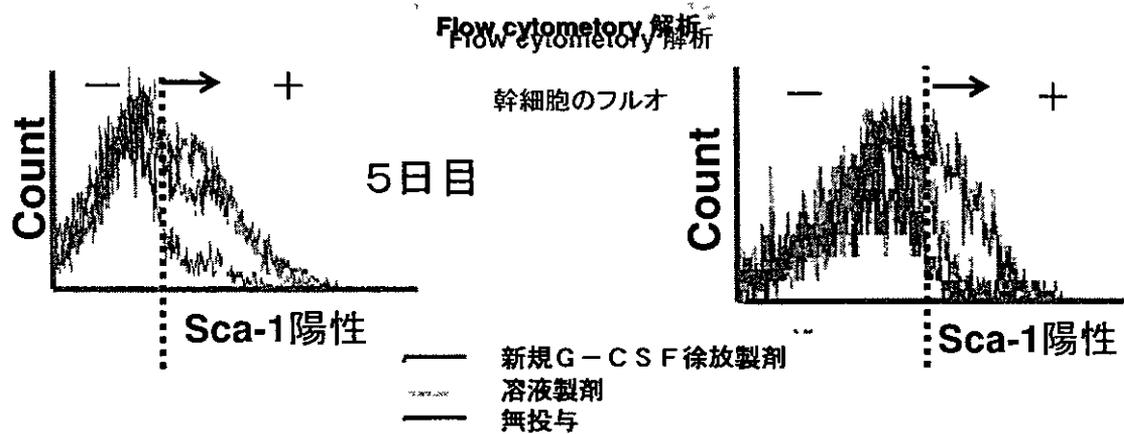


図3 マウス脾細胞培養におけるG-CSFによるSca-1発現の増加作用  
左が培養5日目、右が培養6日目の結果である。

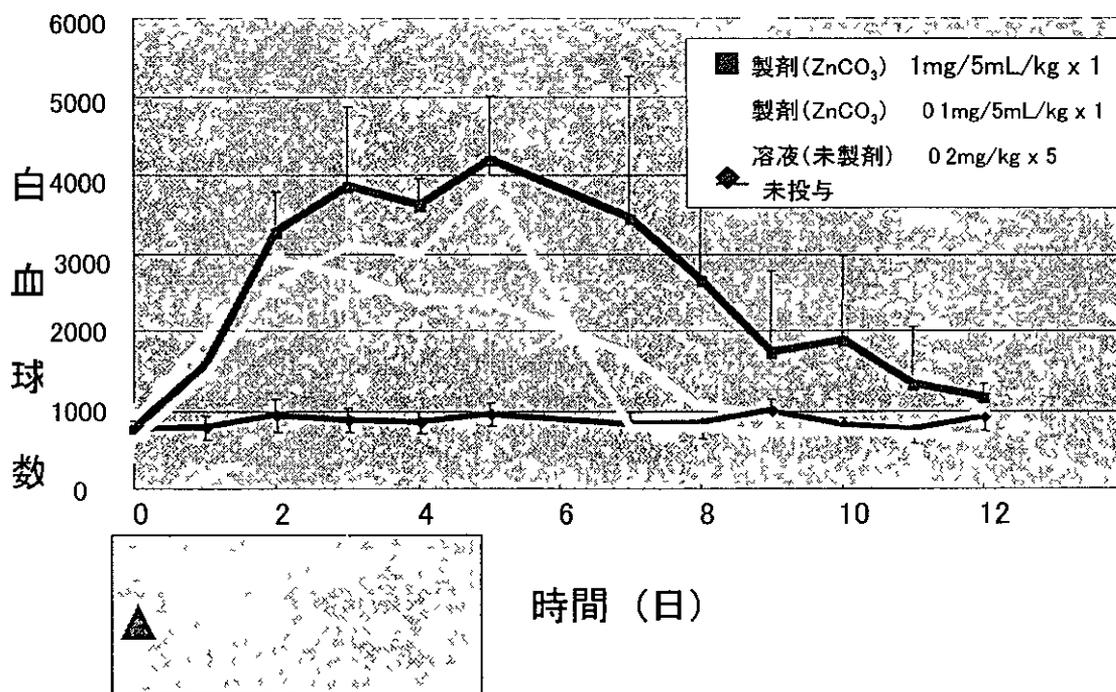


図4 G-CSFの皮下投与によるマウスにおける循環血液中白血球増加の時間的推移

# 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てきた。本年度は炎症動物モデルを中心に実験を行った結果、ステロイドを封入したこのナノスフェアは炎症部位にステロイドを集積させ、炎症部位で長期にわたりステロイドを徐放することがわかり、DDS 製剤として有用であることが明らかになった。

## 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ーの親/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 のキャリアーでは、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、本研究者らの一人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Lip1e(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、粒径が大きく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(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、調製時に粒径を制御しレシチンなど界面活性剤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。

昨年度は主として、ナノスフェアの新規調製法に関して報告してきたが、本年度は水溶性ステロイドをナノスフェア内に封入し、炎症動物モデルを用いナノスフェアの炎症抑制効果についての検討を中心におこなった。

## B. 研究方法

### (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) 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 (PLGA Mw8000, WAKO) 30mg、卵黄レシチン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Polytron PT-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(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。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。

### (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(図3)。

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℃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。

#### (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℃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で定量することによって解析した。

#### (5) ナノスフェアのマクロファージへの相互作用

10%プロテオソームペプトンを15ml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。

#### (6) タイプIIコラーゲン関節炎(マウス)での抗炎症作用

6週齢Balb/c系雌マウスに関節炎カクテル(IBL)を投与し、その3日後LPSを投与することで、タイプIIコラーゲン関節炎マウスとした。LPS投与2~3日後にナノスフェア(BP30μg)を単回静脈内投与した。また、対照としてBP(30μg)を2日間連続で皮下投与した。関節炎の抗炎症作用は薬物投与2日前よりマウスの四肢の腫れをスコア化して評価した。

#### (7) アジュハント関節炎(ラット)での抗炎症作用

7週齢Lewis系雌ラットにエーテル麻酔下、ラットあたり300μgのアジュハントを左後足皮内に投与しアジュハント関節炎ラットとした。アジュハント投与14日後にナノスフェア(BP100μg)を単回静脈内投与した。また、対照としてPBSとBP(100μg)をそれぞれ単回皮下投与し、さらに、既に臨床利用されている抗炎症薬であるリメタゾンをリン酸デキサメタゾン量として100μg単回静脈内投与した。抗炎症作用は、ラット左後足容積を水置換法で測定することにより評価した。

#### (8) ナノスフェアの炎症部位へのターゲティング能評価

5週齢Wistar系雄ラットにエーテル麻酔下、ラットあたり1  $\mu\text{g}$  のカラゲニン<sup>®</sup>を左後足皮内に投与し、カラゲニン関節炎ラットとした。カラゲニン投与4時間後、ローダミンを封入したナノスフェアを単回静脈投与した。また、対照としてPBSとローダミン溶液をそれぞれ単回静脈内投与した。薬物投与2時間後放血し、左後足の凍結切片(厚さ4  $\mu\text{m}$ )をクリオスタットにより作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

### C. 研究結果

#### (1) ナノスフェアの調製

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。

昨年度報告したように、液中乾燥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200 nm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200 nm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。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200 nm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を用い、鉄・亜鉛・マグネシウムに対するモル比を変えて沈殿形成量を解析した結果(図4)、鉄あるいは亜鉛とのモル比(金属イオン/リン酸ベタメサゾン)が約1でほとんどが沈殿することが明らかになった。よって、リン酸ベタメサゾンと金属イオンが1対1で結合していることが示唆された。一方、マグネシウムでは数倍モル量添加しても全く沈殿が形成されなかった。

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(図5)。

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(図6)。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

心て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 80～300 nm 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 200 nm 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7)。

## (2) ナノスフェアの精製及び凍結保存

ナノスフェアの調製において、リン酸ベタメサゾンは仕込みの約 30～50%程度がナノスフェア内に封入される。しかし、封入されなかったリン酸ベタメサゾンは、外水相中に存在するので製剤化するにはナノスフェアを精製しなくてはならない。精製はファイバー透析によりおこなった。種々のファイバー透析膜を用い、その精製度を検討した結果(図8)、APF-01Dにおいてはナノスフェア内のリン酸ベタメサゾンは精製過程において約 20%減少しただけであったが、外水相中のリン酸ベタメサゾンは 90%程度減少しており、この透析膜を使用することで選択的に外相中(未封入の)リン酸ベタメサゾンのみが除去できることがわかった。一方、OP-02Wではナノスフェア内外相中のリン酸ベタメサゾン共に減少しており、ナノスフェアの精製には不適切であることがわかった。

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、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。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155 nm (SD値±44 nm)、152 nm (SD値±52 nm)と一致していた。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)。また、凍結乾燥前後でのリン酸ベタメサゾンのナノスフェア内への封入率を測定したところ、凍結乾燥後再分散すると20%程度の減少が認められ、バーストはほとんど起きていないことがわかった。

### (3) 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9)。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。

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うため、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10)。

#### (4) 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。また、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が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 $\mu$ m、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。そこで、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、約100～200nm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った(図11)。

#### (5) タイプIIコラーゲンマウスでの抗炎症作用解析

生体内での薬理効果を解析するため、タイプIIコラーゲンマウスを炎症モデル動物としてリン酸ベタメサゾン封入ナノスフェアの抗炎症作用について検討した。リン酸ベタメサゾン封入ナノスフェアを単回投与したところ、投与後強くその抗炎症作用が認められ、その作用は6日に渡り維持されていた。一方、リン酸ベタメサゾンを2日連日投与したマウスでは、薬物未投与のマウスに比べ強い炎症抑制作用は認められたが、ナノスフェアを投与した場合ほど、その抗炎症作用は強くなかった。(図12)。

#### (6) アジュバンド関節炎ラットでの抗炎症作用

さらにナノスフェアの抗炎症作用を検討するため、アジュバンド関節炎ラットを炎症モデル動物として用いた。まず、リン酸ベタメサゾンの抗炎症作用を検討したところ(図13)、投与量に依存して炎症率が減少することがわかった。また、連投をおこなうと日ましにその炎症率は減少するが、投与を止めると翌日からは炎症率が減少に転じることがわかり、リン酸ベタメサゾンは一過性の薬効しかなくなることがわかった。リメタゾンに含有されているデキサメサゾンを投与した場合には、同量のベタメサゾンを投与した場合に比べ、強い抗炎症作用を示していた。さらに、皮下投与と静脈内投与を比較したところ、投与1日目にわずかに静脈内投与した場合の方が強い抗炎症作用を示すか、その後はほとんど変わらないことがわかった。以上よりこのモデルが炎症モデルとして有用

てあることが確認されたので、種々の条件でナノスフェアを調製し、それらの抗炎症作用について検討した。まず、異なる粒径のナノスフェアを調製し静脈内投与したところ、粒径の大きい粒子において投与1日目の抑制効果が弱い、その後は粒径に依存せずほとんど同様の抑制効果を示した(図14)。ナノスフェアの基質となるポリマーを変えて調製したナノスフェアについて検討すると、PLGAで調製したナノスフェアでは、1日目に強い抗炎症作用が認められたが、その後徐々にその作用は減少した。一方、PLA(Mw14000)で調製したナノスフェアでは、その作用が1週間に渡り持続されていた(図15)。ナノスフェアの表面に吸着させる界面活性剤の種類を変えて調製したナノスフェアでは、いずれの界面活性剤を用いた場合にも有意な差は認められなかった(図16)。さらに、リメタゾンを投与した場合には、1日目に強い抗炎症作用が認められたが、その後徐々にその作用は減少した(図17)。以上から、ナノスフェアを投与すると、リン酸ベタメサゾンを3倍量投与した場合と同等の炎症抑制効果が1日目に認められ、このナノスフェアがターゲティング効果によりその炎症作用を増強させていることが示唆された。また、1日目以降抗炎症効果が持続してきたことから、このナノスフェアを投与すると、リン酸ベタメサゾンが徐放されていると考えられる(図17)。その効果は、7日目の軟X線画像からも明らかであった(図18)。

#### 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して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。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。そこで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

100～300 nm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、静脈注射可能かつターゲティング能を有するような300 nm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省略により、調製したナノスフェアの濃縮をファイバー透析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。

また、本方法の調製法で分子量の異なるPLGAあるいはPLAを用いナノスフェアを調製すると、用いたポリマーの種類により大きく薬物の放出速度が異なることがわかり、疾病に応じて徐放制御できることがわかった。

生体内分布での実験においては、約100～200 nm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。さらに、金属イオン法では最小で80 nm粒径のナノスフェアが調製されており、腫瘍組織など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、アジュバンドの実験から修飾剤の種類は大きく炎症率に影響を及ぼさなかったことから、特にレシチンに限定されるものではないのかもしれない。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と考えられる。

## E. 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ッ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新規の調製法によりおこなった。この方法(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。また、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。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。

本調製法では、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100~200nm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、タイプIIコラーゲンマウス・アジュバンド関節炎ラットのいずれにおいても、初期に強い抗炎症効果を示すのと共にその作用が長期間に渡り維持されることが明らかになり、ターゲッティング能と徐放機能を有することが示唆された。

以上より、このナノスフェアは、*in vivo*においてもターゲッ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

- 1 石原務、出雲信夫、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕 水溶性薬物を封入した亜鉛/PLGAナノスフェアの開発、第19回日本DDS学会、6月19日(京都)、Drug Delivery System, 18(3), 308P, 2003
- 2 出雲信夫、石原務、福慶あゆみ、浅野聡子、高津光晴、檜垣恵、上野晃憲、水島裕 ステロイド封入亜鉛/PLGA ナノスフェアを用いた抗炎症作用、第19回日本DDS学会、6月19日(京都)、Drug Delivery System, 18(3), 308P, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録情報

- 1 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2003-84695号 出願日2003年3月26日

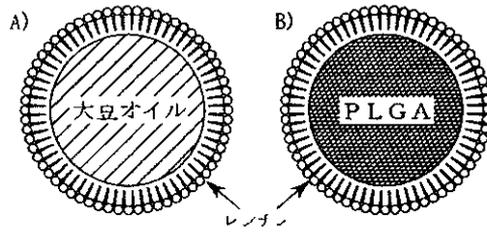


図1 リポ製剤(A)とレシチン/PLGA ナノスフェア (B)

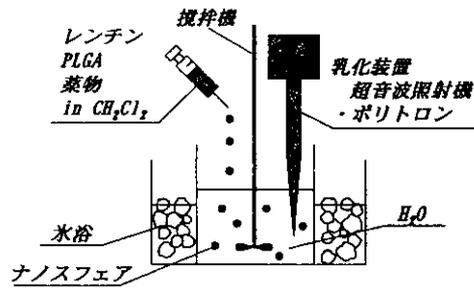


図2 O/W型液中乾燥法

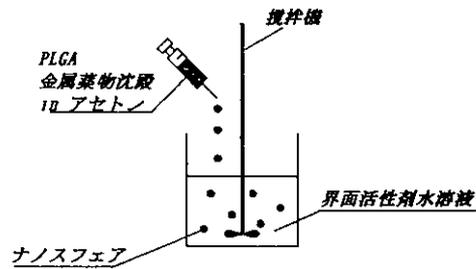


図3 O/W型溶媒拡散法(金属イオン法)

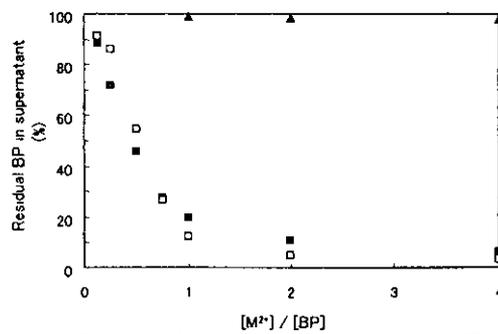


図4 金属イオン存在下でのステロイドの沈殿形成 (M<sup>2+</sup>, ■, iron(II) chloride, □, zinc acetate, ▲, magnesium chloride)

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	安息香酸	ナフトエ酸 ナフトール酸	PGC コハク酸 トコトリコリン	ベンゼンスルホン酸 トコトリコリン	ナフトルスルホン酸 フェニルルホン酸	ナフトール酸 ニトロフェニルルホン酸	リン酸ベタメサゾン リン酸デキサメサゾン	リン酸ロコルチゾン Tris-CI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-CI 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

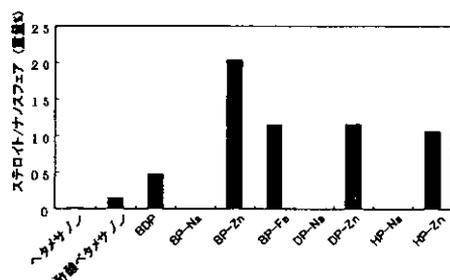


図5 金属イオンによるステロイドのナノスフェア内封入  
 BDP ヘタメサゾンプロピオネート BP リン酸ヘタメサゾン  
 DP リン酸デキサメサゾン HP リン酸ハイトロコルチゾン

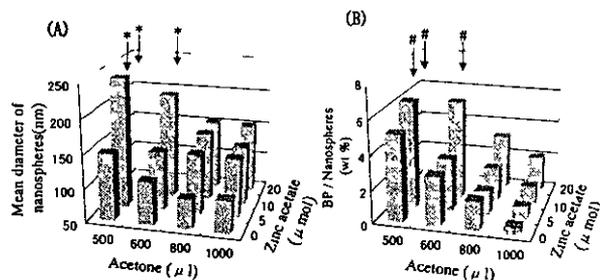


図6 アセトン量及び酢酸亜鉛量がナノスフェアの粒径(A)及びリン酸ベタメサゾン封入率(B)に及ぼす影響 \*凝集 #未測定