

能である。日本においても、ナノテクノロジーを活用した産業の黎明期であり、2010年には全体で20兆円から26兆円産業に達すると予測されている。そこで、産業界で「ナノテクビジネス推進協議会」が2003年10月に発足している。

B. 医療分野におけるナノテクノロジーの研究動向

1966年の映画「ミクロの決死圏」のSF的発想が現実のものになりつつあるといっても過言ではない。このナノテクを応用した様々な医療器具や製剤が完成に近づきつつある。以下に、わが国におけるナノテクと医療について概説したい。

内閣府総合科学技術会議³⁾において、「ナノテクノロジー・材料分野」は文部科学省、厚生労働省、経済産業省、農林水産省の府省「連携プロジェクト」として研究推進が図られ、その計画のトップにナノドラッグデリバリーシステム（ナノDDS、ナノ薬物送達システム）の開発とナノ医療デバイスの開発が提言されている。ナノDDSの具体的目標として4つがあげられている。そのテーマをわかりやすく説明すると、①「転移がん治療のためのDDS医薬品の市場投入」は末期癌であったとしても原発巣と転移巣を副作用なく安全に死滅させるDDS医薬品の開発であり、②「患者の薬物治療コンプライアンス改善のためのナノ技術による新しい投薬方法の提供」は、薬剤のコーティングやドライパウダー化、また化学修飾することにより徐放化を図り投与回数を減らすこと、さらに注射するしかなかった薬物を経口・経肺投与可能にすることを目標にしている。③「物理的エネルギー等による局所DDSの実用化」と④「遺伝子治療等に用いるキャリア材料の開発」は、リポソームや高分子ミセルなどにより遺伝子などを安全に効率よく目的箇所に運び、診断・治療することを目的にしている。また、ナノ医療デ

バイスとして、「テーラーメイド医療のためのDNAチップ・プロテインチップの開発・事業化」、「ナノテクを応用したスクリーニング機器の開発」、「在宅管理可能な非侵襲バイオセンサーの開発」、「MEM/NEM技術を用いた非・低侵襲で高機能の医療機器の開発」、「人工臓器などの身体機能代替人工器官の開発」が目標とされている。

医療・バイオ研究に關しての各省の対応については、文部科学省が「ナノテク・バイオテクノロジー・ITを活用した医療用機器等の開発」に、農林水産省が「ナノレベルでの生物機能活用技術の開発」に、経済産業省が「少量試料・短時間・同時多項目の革新的で高速・高感度の分析機器の開発」に、それぞれ数億円（平成16年度）の研究費を投入している。厚生労働省においては、ナノテクはゲノム創薬・再生医療と並び医療分野の重点課題の1つとされ、「身体機能の解析や補助または身体機能の代替機器の開発」（7億円、平成16年度）および「ナノテクノロジーを活用した安全で革新的な診断技術や治療技術の研究開発」（13億円、平成16年度）が進行中である。後者は厚生労働科学研究費萌芽の先端医療技術推進事業ナノメディシン研究分野⁴⁾として推進されている。今年度の20以上ある採択研究課題の研究内容は、①マイクロマシン・ナノバイオチップ・ナノデバイスを用いた生体情報計測システムとその装置の開発、②DNAチップなどを用いた遺伝子診断システムの開発、③薬物などを含有させたナノ粒子DDSの開発、に集約できる。

生体情報計測システムについては、以下のテーマがある。①術中に癌細胞・癌組織を可視化することにより病巣と正常組織の境界をその場で即時に識別可能にして癌の除去が簡便で確実にできる方法の開発、②内視鏡検査過程時において組織の生検採取をせずに「癌」などの病変部の診断が可能となるプローブの開発、③微細鉗子・カテーテルや微細内視鏡・極細ファイバースコープといった

新規ナノデバイスを作製することによって血管・消化管・関節などの管腔での診断・治療を行う方法の開発、④ナノセンサーを用いて心筋機能と血行動態を測定して心拍動を補助する装置の開発、⑤蛍光で生体内検出が可能な半導体ナノクラスターを腫瘍の局在診断に応用する方法の開発などである。

遺伝子診断システムとは、極微量の血液などの検体から、複雑な操作をせずに、特定領域の塩基量や特定遺伝子の発現を計測するシステムである。現在、①ECAチップ（電気化学的アレイ）をはじめとする各種チップによる様々な遺伝子発現の定量を迅速化する方法の開発、②核クロマチン転写制御を選択的に行う酵素を封入したナノサイズのミセルによる遺伝子レベルのナノ治療法の開発、③PETを用いた遺伝子発現の可視化方法の開発、などが行われている。

ナノテク医療分野で、最も数多く研究され実用化に近いものはDDSに関するものであろう。様々なナノレベルの技術で薬物のDDS化が試みられていて、それらの世界中で凌ぎを削る研究をあげるときりがなくなる。現時点で目的に応じたナノサイズの粒子のDDS製剤（ナノDDS）が工夫されており、すでに実用化されたものや臨床試験に入っているものが多数ある。以下では、ナノDDS製剤と治療を中心に論じていきたい。

C. ナノDDS製剤⁵⁾

DDSとは、薬物を作用させたい場所に到達（デリバリー）させて、望むべき時間に製剤から放出させることを目的に製剤化することである。たとえば、癌組織や病変部位などの治療部位に薬物を集中させる（ターゲティング）、あるいはゆっくりと溶解させて長時間作用させるという放出制御（徐放、コントロールドリリース）をもたせた製剤が考案されている。このようなDDS製

剤では結果的に薬物の総投与量を減ずることが可能になるので、副作用発現頻度が低減し、投与回数も少なくなり、患者のQOLの改善が実現する。もう1つのDDSとして、生体のバリアー（皮膚・腸管・粘膜・脳血管関門など）を通過させる方法や吸収促進を図る方法も検討されている。以上述べたターゲティング・徐放・バリアー通過を実現することを中心に、DDSの基礎的研究・開発研究が進められている。

DDS製剤開発は、グローバルな巨大製薬企業だけでなくほとんどの製薬企業が現在取り組んでいる研究テーマである⁶⁾。DDSに特化したバイオベンチャーも製薬企業と共同で研究開発に邁進している。そう遠くない将来に、多数のDDS製剤が上市することは想像に難くない。そのすべてがナノテクと関連があるわけではないが、多くはナノテクを利用したものである。実用化DDS製剤として、ポリ乳酸-グリコール酸（PLGA）もしくはポリ乳酸（PLA）の微小スフェア、リビッドナノスフェア、リポソーム製剤、ポリエチレングリコール（PEG）、修飾蛋白質（ペプチド）、プロドラッグなどがあり、中には単品で年間数百億円以上の売上高のものもある。ちなみに、前3者はナノ粒子のDDS製剤（ナノDDS）である。1974年に世界初のDDS製剤が上市されて以来、最近ではテレビコマーシャルにもDDSやナノDDSという言葉が現れ始めている。

一般的には、循環血液中に存在する粒子の径が3nm以下の場合には腎臓から容易に排泄されてしまい、また400～500nm以上では異物排除システムによって捕捉され排除されてしまうので、このような粒子は長時間循環血液中に存在することが難しい。一方、病変部位の血管や癌組織では、正常な組織と異なり、血管内皮細胞間に約100～500nm程度の内皮細胞間隙が生じているため、約200nm程度のナノ粒子製剤は容易に血管外に漏出できる（図1）。この大きさの粒子製剤であ

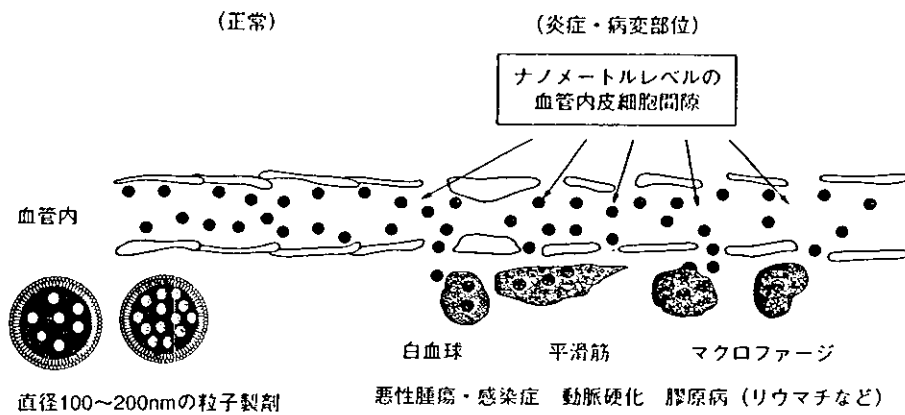


図1 病変部位へのナノ粒子のターゲッティング

正常な部位では血管内皮細胞は隙間なく重なり合っているが、病変部位（炎症・癌組織など）では血管内皮細胞間に100～500nmの間隙が生じている。血管内を循環する100～200nmのナノ粒子はその間隙から容易に病変部位に漏出できる。その部位での細胞に付着するか取り込まれて作用を発揮すると考えられる。

れば循環させながら到達目的部位にターゲットすることが可能である。その粒子の基材を変えることにより、薬物放出に徐放性を備えさせることができる。また、粒子外周を抗体や脂質などでコーティングすれば、特異的な細胞や組織に対してのみターゲットさせることも可能である。さらに、網内系に捕捉されにくい工夫も考案されている。今ではナノ粒子作製法が整い、水溶性物質・脂溶性物質・高分子物質などを封入したナノ粒子・ナノカプセルが臨床研究段階にある。

著者のひとりである水島らの研究⁷⁾によって作製されたナノDDS製剤のうち、世界最初のターゲット薬であるPGE1製剤（リプル・パルクス）およびステロイド製剤（リメタゾン）は1988年より販売されており、それ以外にも現在臨床試験実施中のものがある。また、慈恵医大DDS研究所で著者らが研究中のレシチンで被覆した新規ナノ粒子は、炎症部位に存在する白血球にターゲットされて作用する。これらのナノDDS製剤はターゲッティングと徐放性を併せもち、マウス・ラットでは1回投与で1週間以上効果が持続するものも作製されている。その中には、臨床試験段階

に入る予定のものがある。さらに、高分子物質の経口吸収および経皮吸収の製剤についても実用化が図られている。

D. 薬物投与方法とナノDDS製剤

薬物の効果発現には吸収率が大きく影響し、投与経路がその薬理作用に大きく影響する。一般的な薬物投与方法として経口投与または注射が繁用されている。しかし、経口投与では、服用の簡便さといった利点はあるものの、肝臓での代謝を受けること（初回通過効果）や薬物によっては吸収効率が極端に悪いといった欠点もある。ペプチド類・蛋白質や高分子薬物などはそのままでは、消化管からの吸収率が極端に悪く、たとえ吸収されてもリンパ管を経て循環するために効率が悪い。注射による薬物投与は、即効性という点で優れているが、患者にとって通院する、痛みを伴うなどの問題点があろう。

この肝初回通過効果を避ける利点を利用して、「皮膚から吸収させる」、「鼻腔・口腔・直腸などの粘膜から吸収させる」、「肺から吸収させる」、

といった試みがなされている。多数の化合物では皮膚角質層への透過性が低いために経皮吸収の効率は悪いが、圧力をかけて浸透させる方法や透過可能なナノ粒子の作製などが試みられている。また、粘膜吸収については、粘膜への付着性を増大させたDDS薬剤や粘膜を通過するナノ粒子製剤の開発が研究されているところである。多数の大学・企業において、それぞれの投与方法に適する大きさのナノDDS製剤の効果が検討されている。そのナノ粒子内に高分子化合物を封入するDDS技術が進歩してきているので、「不安定な蛋白質は注射以外では無理ではないか」という従来の考え方が覆りつつある。

E. 呼吸系におけるナノDDS製剤⁸⁾

呼吸器疾患の治療には吸入による投与が行われている。全身作用を目的としたときの経肺吸収性は、薬剤の粒子径によって影響され、約100nmから1 μ m程度の粒子径のものが望ましいとされる。つまり、これより大きい粒子は肺胞に達する前に気管や気管支に捕捉されてしまい、これより小さい粒子は呼気中に排出されてしまう。

肺胞と毛細血管の間に1層の上皮細胞しかないために、肺からの物質吸収はきわめて速い。経肺吸収は、担体を介した能動輸送の例も見出されて

いるが、一般的には受動的に行われているので、吸収効率もよいとされる。また、肺胞は、分子量5000のインスリンに対してよい透過性を示し、さらに分子量約40,000程度の高分子に対しても透過性に優れているとされているので、経肺投与に応用可能な薬物の範囲は広いと思われる。したがって、数百nmのナノ粒子製剤にして薬物を経肺投与する方法の開発は有用であろう。現時点では局所的作用を目的とした経肺投与が主であるが、全身作用を目的とした経肺投与ナノDDS製剤の開発が盛んに研究されている。現在、リポソーム製剤、ナノ粒子(NanoCrystals™)などにステロイド類、免疫抑制薬、蛋白質・ペプチド(抗原やサイトカインなど)を入れた製剤が作製されて検討中である。その他として、徐放性のマイクロ・ナノ沈殿製剤や製剤のドライパウダー化の検討ばかりでなく、溶液拡散システムおよび吸入装置のデバイスの開発も進んでいる。その例として、インスリン吸入製剤とその吸入装置が大手製薬企業(ノボノルディスク、ファイザー、アベンティス、イーライリリーなど)で開発中であり、臨床試験が進行中である。

むすび

ナノテクを医療分野へ応用する研究は、ここ数年で格段の進歩を遂げている。日本では、すでに

表1 府省連携プロジェクトにおけるナノDDSの研究予測

内容	臨床研究開始予測
消化器癌や呼吸器癌などの治療のためのDDS	2004年～
吸入型ペプチドDDS	2005年～
ナノカプセル型人工酵素運搬体の開発	2006年～
siRNAデリバリーのためのDDS	2006年～
食品機能性成分送達システム	2006年～
量子ドットを用いたDDS	2007年～
局所光化学反応を利用した疾患部位選択DDS	2007年～
難治性疾患や遺伝子治療のための	2005年～
革新的キャリア材料の開発	2008年～

内閣府総合科学技術会議資料より(連携府省:文科省,厚労省,農水省,経産省)

骨再生材料・神経再生用チューブ材料・生体接着剤が開発されており、人工骨については企業への技術移転が開始され、人工靭帯は臨床研究への準備が進んでいる状況である。2004年の内閣府総合科学技術会議におけるナノDDSの近未来予測²⁾を表1にまとめた。そのほとんどが、今後数年で臨床研究に入ると予測されている。一方、ナノ医療デバイスについては、わが国が優位を有するバイオセンサーは2～3年後に、DNAチップは5年後までに、プロテインチップは10年以内に、それぞれの臨床研究が開始されると予測されている。診断用のDNA計測システム・マイクロバイオリアクター・薬剤スクリーニングシステム・癌疾病診断用抗体チップについては、10年以内が開発実現の目途である。このようなデバイスの開発により、低侵襲で迅速な診断が可能となるであろう。また、埋込型の身体機能代替人工臓器（人工心臓・人工臓腑など）の利用はその後になると予測されている。

バイオテクノロジーの進歩により多数の生理活性物質の大量産生が可能となっているが、そのままでは薬物としての有効性を期待できない。そこにナノDDS技術の導入なくしてその進展は望めないであろう。そして、現時点で注射でしか使用できない薬物を別の方法で投与することを可能にするナノDDSの開発も近々実現するであろう。高齢化社会に進みつつある現状では、老人医療ばかりでなく予防的医療の重要性も大きくなるであろう。そこで、ワクチン・遺伝子などを封入したナノDDS製剤の開発、および皮膚・粘膜・脳血管閥門を通過するナノDDSの開発などは必須になることは明らかである⁹⁾。

今後の数年の間、ナノテク自体の急速な発展に伴って、製剤ばかりでなくナノ医療技術の飛躍的な進歩が遂げられるであろうことは想像に難くない。

文献

- 1) 川合知二, 監. 図解 ナノテクノロジーのすべて. 工業調査会; 2001年.
- 2) 医療用極小システム・材料. 生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー. 内閣府総合技術会議参考資料「第2期科学技術基本計画の進捗状況について」. 2004年5月13日. p.4-5 (内閣府ホームページ <http://www8.cao.go.jp/cstp/>).
- 3) ナノバイオニック産業. 内閣府総合技術会議資料1「ナノテクノロジー・材料分野の産業発掘促進について—府省「連携プロジェクト」等による促進—」. 2003年7月14日. p.17-22 (内閣府ホームページ <http://www8.cao.go.jp/cstp/>).
- 4) 平成15年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業萌芽の先端医療技術推進研究ナノメディシン研究成果発表会要旨集. 財団法人医療機器センター発行. 2004年2月18日(厚生労働研究成果データベース <http://webabst.niph.go.jp/>, 医療機器センターホームページ <http://www.jaame.or.jp/>).
- 5) Cui D, Gao H. Advance and prospect of bionanomaterials. *Biotechnol Prog* 2003; 19: 683-92.
- 6) ドラッグ・デリバリー・システム(DDS). 日経バイオ年鑑2004. 日経BP社; 2003年11月. p. 495-506.
- 7) Mizushima Y. Lipo-prostaglandin preparation. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acid* 1991; 42: 1-6.
- 8) Courrier HM, Butz N, Vandamme F. Pulmonary drug delivery system: recent developments and prospects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Sys* 2002; 19: 425-98.
- 9) 水島 裕, 五十嵐理慧. VIII. 21世紀のDDS. In: I. 将来の医療とDDS. 今日のDDS「薬物送達システム」. 高橋俊雄・橋田 充, 編. 医薬ジャーナル社; 1999. p. 400-9.



ナノ微粒子製剤の開発と そのDDSへの応用

東京慈恵会医科大学 DDS研究所

石原 務, 出雲信夫, 水島 裕

TSUTOMU ISHIHARA, NOBUO IZUMO, YUTAKA MIZUSHIMA

DDS Institute, The Jikei University School of Medicine

The biodistribution of particles injected systemically is remarkably affected on their diameter. In our previous report, lipid emulsions with a diameter of approximately 200 nm injected intravenously was preferentially taken up by phagocytes such as macrophages in inflammatory sites. The carriers such as lipid emulsions and liposomes, however, cannot retain bioactive molecules for long-term under physiological environment. Thus, it is desirable to develop agents with a diameter of 200 nm or less that have a function of sustained release by encapsulating into solid particles consisting of biodegradable polymers such as poly(D, L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) and poly(D, L-lactic acid) (PLA) for anti-inflammatory therapy.

The purpose of this study was to develop PLGA or PLA nanoparticles with a size of less than 200 nm, encapsulating water-soluble corticosteroid, by a simple preparation method. The nanoparticles were prepared with zinc ion, betamethasone phosphate (BP), surfactant and PLGA (or PLA) by an oil-in-water solvent diffusion method. In this method, encapsulation efficiency of betamethasone phosphate in the nanoparticles and the size of the nanoparticles were significantly affected by various preparative factors such as the concentration of PLGA (or PLA) and the amount of zinc ion. Betamethasone phosphate encapsulated in the nanoparticles was gradually released in diluted serum and the release rate depended on the ratio of glycolide/lactide and molecular weight of PLGA or PLA. The nanoparticles were internalized in primary murine macrophage and betamethasone phosphate in macrophages was gradually released for at least 8 days to the medium *in vitro*. Further, anti-inflammatory effect of BP-loaded nanoparticles in rats with adjuvant-induced arthritis was higher, compared with that of Limethasone using in clinical therapy. Taken together, the nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate will be expected to use as a novel intravenous anti-inflammatory agent.

はじめに

2000年にアメリカで国家ナノテクノロジー計画が発表されて以来、21世紀はナノテクノロジーの世紀と「ナノテク」という言葉が世間にも認知されるようになった。情報通信、環境・エネルギー、そしてバイオテクノロジーなどの分野が牽引役となり産業に変革をもたらすこと

が期待され、これらの分野に応用可能な材料設計や材料工学の重要性が一層増していくと考えられている。

医療面においても診断/計測技術の開発や疾病治療用/予防用製剤の開発が鋭意進められており、1970年代から提唱されてきたドラッグデリバリーシステム (DDS) の技術を用いた医療用製剤は、まさにナノテクそのものといえる。薬物を微粒子内に封入したDDS製剤は、薬物の放出制御や標的組織/細胞へのターゲティングを可

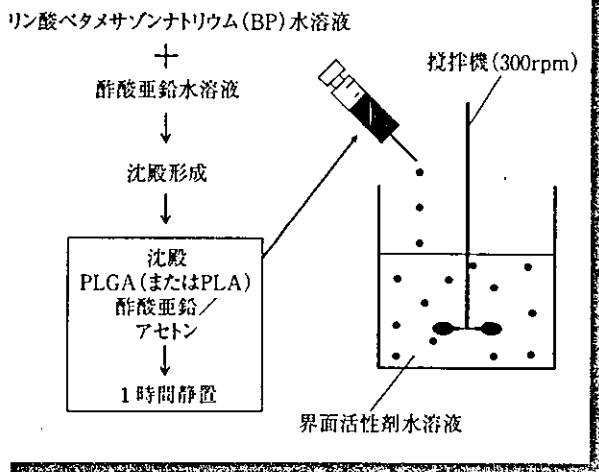


Fig. 1 Preparation of nanoparticles by a modified solvent diffusion method

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微粒子の分散安定性・粒径を調べることで、種々の調製条件の最適化を行った。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、界面活性剤の種類/濃度、有機溶媒の添加速度/水相の搅拌速度などが重要であると考えられる。有機溶媒としては、アセトン以外にアセトニトリル・DMSO・DMF・ジオキサンなどを用いたが、アセトンで最も分散安定性が高いナノ微粒子が得られることがわかった。PLGAおよびリン酸ベタメサゾン量を一定としてアセトン量あるいはアセトンに添加する酢酸亜鉛量を変化させたところ、アセトン量が多いほど、あるいは酢酸亜鉛量が少ないほど、小さなナノ微粒子が調製できた (Fig. 2)。一方、リン酸ベタメサゾンのナノ微粒子内への封入率は粒径に依存して高くなった。水相中に溶解する界面活性剤の種類は、封入率・粒径および分散安定性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搅拌速度を変えたところ、滴下速度が速いほど分散安定性が高いナノ微粒子が調製されること、そして、分散安定性が高いナノ微粒子を得るためには、滴下速度に応じた最適の水相の搅拌速度が存在することがわかった。このような結果は、ナノ微粒子の形成には、有機溶媒が水中に拡散・混和し、PLGAが固化・粒子化する過程が大きな役割を担っており、液中乾燥法とは異

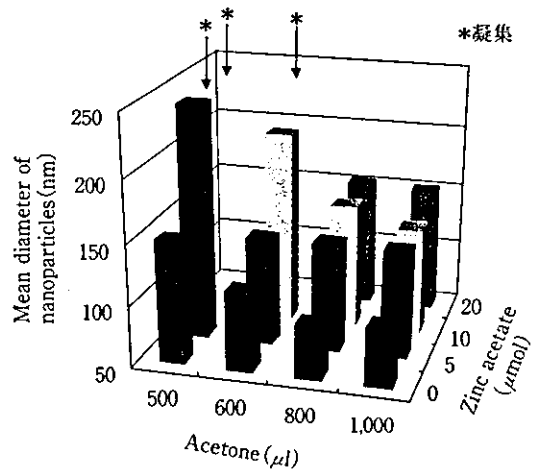


Fig. 2 Effect of volume of acetone and amount of zinc acetate on the diameter of nanoparticles. The nanoparticles were prepared with 20mg PLGA (Mw8000) and 4 mg BP.

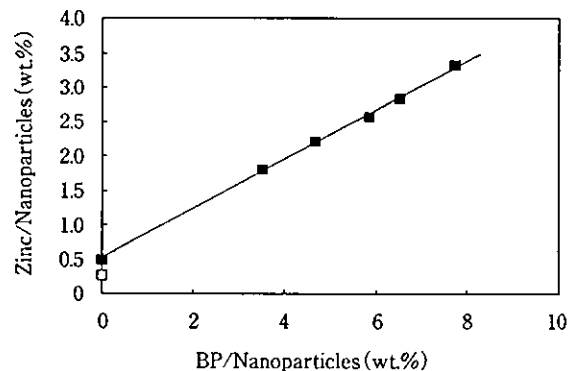


Fig. 3 Zinc and BP contents in nanoparticles
■ : nanoparticles prepared with PLGA (Mn 3400),
□ : nanoparticles prepared with PLGA (Mn 4700)

なり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。

このような種々の条件を最適化することにより、分散安定性が高く約80~300nm粒径のナノ微粒子が任意に調製できることがわかった。さらに、ICP発光分析によりナノ微粒子内の亜鉛量を定量したところ、ナノ微粒子内のリン酸ベタメサゾン量が増加するのに伴い、ナノ微粒子内の亜鉛量も増加すること、および異なる分子量のPLGAと亜鉛のみでナノ微粒子を調製すると、分子量の

新しく開発中の薬剤①

—ナノステロイド—

石原 務* 出雲信夫* 檜垣 恵** 水島 裕*

効果的な炎症抑制を目的とし、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ナノ微粒子製剤を開発した。このナノ微粒子は生分解性/生体適合性ポリマーであるポリ乳酸グリコール酸あるいはポリ乳酸から形成され、リン酸ベタメサゾンと亜鉛を内封している。炎症モデルの動物実験から、このナノ微粒子が炎症部位に集積し抗炎症効果が増強されることやリン酸ベタメサゾンの徐放による薬効の持続効果が認められた。さらに、現在臨床利用されている製剤よりもその薬効が強かったことから、このナノ微粒子は炎症抑制効果を有する新規の DDS 製剤としての利用が期待できる。

はじめに

炎症抑制を目的とした製剤はすでに多数輩出されているが、その薬効の持続や副作用低減という観点からは、いまだ十分に有用な製剤は開発されていない。われわれは、薬物としてデキサメタゾンパルミテートを大豆オイル中に溶解し表面を脂質で覆った粒径 200 nm の球状微粒子(リメタゾン)を開発し、すでに抗炎症薬として臨床利用されている。この製剤は静脈注射により血管中から炎症部位や血管障害部位に集積し薬効が増強されることが知られているが、薬物をオイル中に溶解し

ているために薬物の徐放機能がなく持続的な薬効を発揮できない。そこで、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微粒子製剤を生分解性/生体適合性ポリマーであるポリ乳酸グリコール酸(poly lactic acid glycolic acid: PLGA)あるいはポリ乳酸(poly lactic acid: PLA)を用い開発することにした(図 1)。

1. PLGA/PLA ナノ微粒子(ナノステロイド)の調製と解析

本研究では、Niwa ら²⁾により報告された O/W 型溶媒拡散法をベースにして PLGA/PLA からなりステロイドと亜鉛イオンを含有したナノ微粒子の調製をおこなった。水溶性のリン酸ベタメサゾンを酢酸亜鉛により疎水化し、得られた沈殿物と PLGA/PLA を溶解したアセトン溶液を界面活性剤水溶液中に滴下することでリン酸ベタメサゾンと亜鉛を含有した新規のナノ微粒子(ナノステロイド)を調製することに成功した³⁾。この調製法の種々の条件を最適化することにより、分散

〔キーワード〕

DDS
ナノ微粒子
ターゲティング
薬物徐放
ステロイド

* ISHIIHARA Tsutomu, IZUMO Nobuo, MIZUSHIMA Yutaka/東京慈恵会医科大学 DDS 研究所

** HIGAKI Megumu/聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター感染免疫研究室

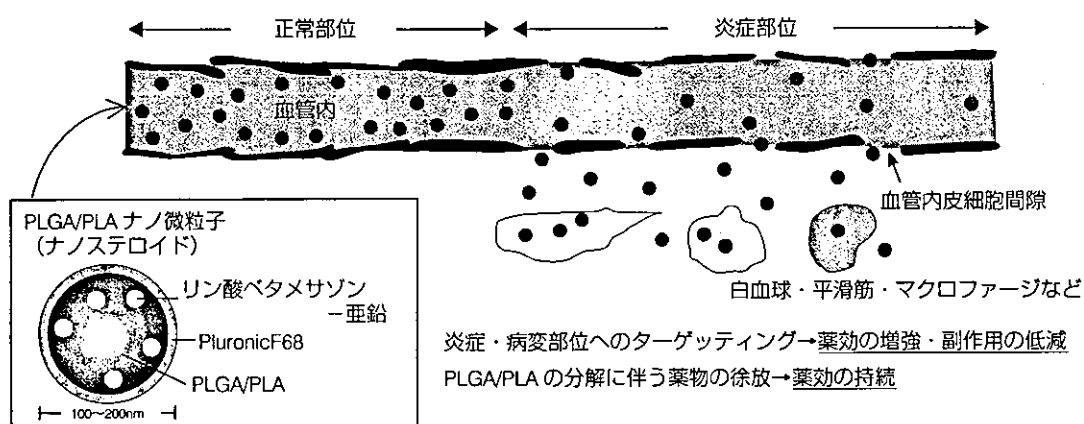


図 1. ステロイド封入ナノ微粒子による炎症抑制

安定性が高く約 80~250 nm の粒径のナノ微粒子が任意に得られることがわかった。亜鉛は、リン酸ベタメサゾンを疎水化し粒子内へ封入されやすくするのに加え、亜鉛が PLGA 末端のカルボキシル基と相互作用することでナノ微粒子の形成に寄与していると思われる³⁾。

また、ナノ微粒子の希釈血清中での薬物放出挙動を検討したところ、亜鉛を含有していないナノ微粒子では 10 日あまりで全放出されたのに対し、本方法で調製した亜鉛を含むナノ微粒子では、より長期にわたる徐放挙動を示した。このような徐放挙動は、粒子内の亜鉛が PLGA の加水分解に伴い生じる遊離酸を中和し PLGA の分解速度を遅めているためではないかと考えられる。またポリマーの種類や分子量に依存し、さまざまな薬物放出挙動を示すナノ微粒子が調製できることが明らかになり、疾病の種類に応じ最適な放出挙動を示すナノ微粒子製剤が適宜供給できると考えられる。

2. ナノ微粒子と細胞との相互作用 (In vitro)

マクロファージや好中球などの貪食細胞は、炎症部位に集積することが知られている。そこで、このナノ微粒子に対するマクロファージの貪食能の評価をおこなった。腹腔マクロファージをマウスから採取し、蛍光色素であるローダミンを封入

したナノ微粒子を添加したところ、顕著にマクロファージ内にナノ微粒子が取り込まれていることが明らかになった。また、リン酸ベタメサゾンを封入したナノ微粒子を同様にマクロファージに取り込ませ、培地中に放出されてくるベタメサゾンを定量した結果、本方法で調製したナノ微粒子では、少なくとも 8 日にわたり徐放されていることがわかった。

さらに、*in vitro* での薬効を調べるため、リポ多糖 (lipopolysacchride : LPS) 刺激をしたヒト滑膜細胞にナノ微粒子を取り込ませ、腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α) の産生能を評価した。その結果、リン酸ベタメサゾンのみを添加した細胞では、添加後 1 日目に強い TNF- α 産生抑制が認められたが 4 日目には抑制効果は認められなかった。一方、リン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子では、1 日目・4 日目とも強い TNF- α 産生抑制が認められ、細胞内に取り込まれたナノ微粒子が細胞内でベタメサゾンを徐放していることが明らかになった。また、インターロイキン (IL)-6 においても同様の産生抑制が認められた。以上から、このナノ微粒子を生体内に投与することにより、炎症部位の貪食細胞などにより取り込まれ、その後、炎症部位でベタメサゾンが持続的に効果を示すものと期待できる。

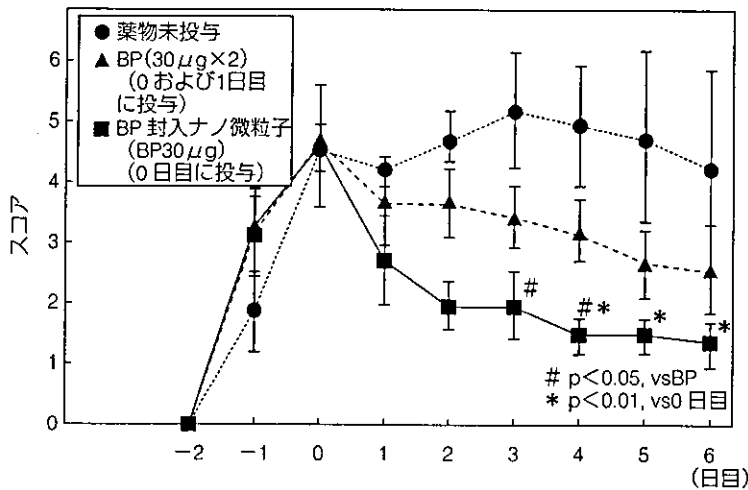


図 2. タイプIIコラーゲン誘導関節炎モデル(マウス)におけるリン酸ベタメサゾン(BP)封入ナノ微粒子の抗炎症効果

3. 炎症モデル動物によるナノ微粒子の抗炎症効果

リン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子をマウスに静脈注射しベタメサゾンの血中濃度を測定したところ、同量のリン酸ベタメサゾンを投与した場合にくらべナノ微粒子では著しく低い血中濃度を示した。よって、血中でもリン酸ベタメサゾンがバースト放出されず安定に微粒子内に封入されていることがわかった。また、カラゲニン関節炎モデル(ラット)にローダミンを封入したナノ微粒子を静脈注射し、2時間後に炎症部位の切片像を蛍光顕微鏡で観察した結果、100~200 nm 程度の粒径のナノ微粒子が炎症部位に集積していることがわかった。

そこで、関節リウマチモデルの1つであるタイプIIコラーゲン誘導関節炎モデル(マウス)でのリン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子の抗炎症効果をスコア化することにより調べた⁹⁾。リン酸ベタメサゾン 30 µg を封入したナノ微粒子を単回静脈内投与したところ、リン酸ベタメサゾン 30 µg を2日連日投与したマウスにくらべ、投与3~4日目で有意に強い抗炎症効果が認められ、その効果は少なくとも6日目まで持続していた(図2)。さらに、アジュバント関節炎モデル(ラット)を炎症モデル

動物として用いリン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子の抗炎症効果を検討した⁹⁾。ナノ微粒子の基質ポリマーを変えて調製したリン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子を静脈内投与した結果、PLGAで調製したナノ微粒子では、1日目に強い抗炎症効果が認められたが、その後徐々にその効果は弱まった。一方、PLGAより分解速度の遅いPLAで調製したナノ微粒子では、持続的な抗炎症効果が認められた。そこで、PLAで調製したこのナノ微粒子と他の製剤との比較をしたところ(図3)、ナノ微粒子では、投与後1日目に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認められた。よって、このナノ微粒子が炎症部位に集積(ターゲティング)していると考えられる。また、リン酸ベタメサゾンのみあるいはすでに臨床利用されている静脈注射用抗炎症薬であるリメタゾンを投与した場合には、2日目以降徐々にその炎症抑制効果が弱まったが、このナノ微粒子では少なくとも1週間にわたり有意に腫れが抑制されつづけた。よって、このナノ微粒子はリン酸ベタメサゾンを炎症部位で徐放していると考えられる。その炎症抑制効果は、薬物投与7日目の肢関節部位の軟X線画像からも明らかであった(図4)。以上より、このナノ微粒子が従来の製剤にくらべ高い抗炎症効果を有することが明らかになった。

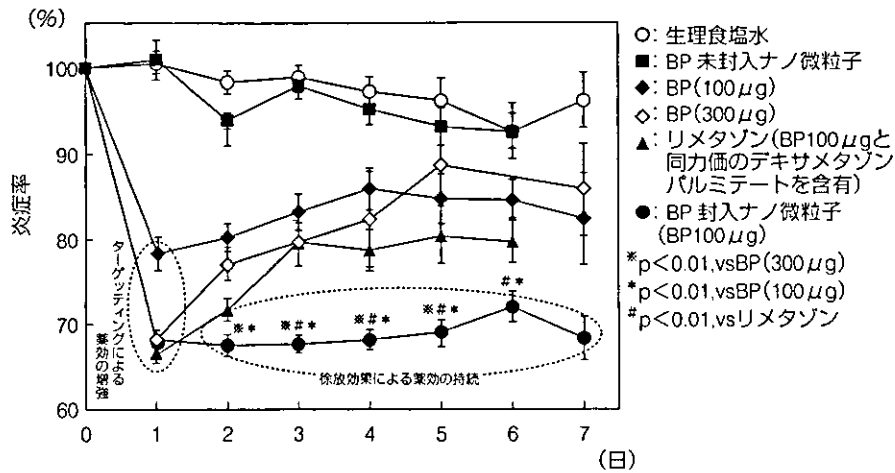


図 3. アジュバント誘導関節炎モデル(ラット)におけるリン酸ベタメサゾン(BP)封入ナノ微粒子の抗炎症効果

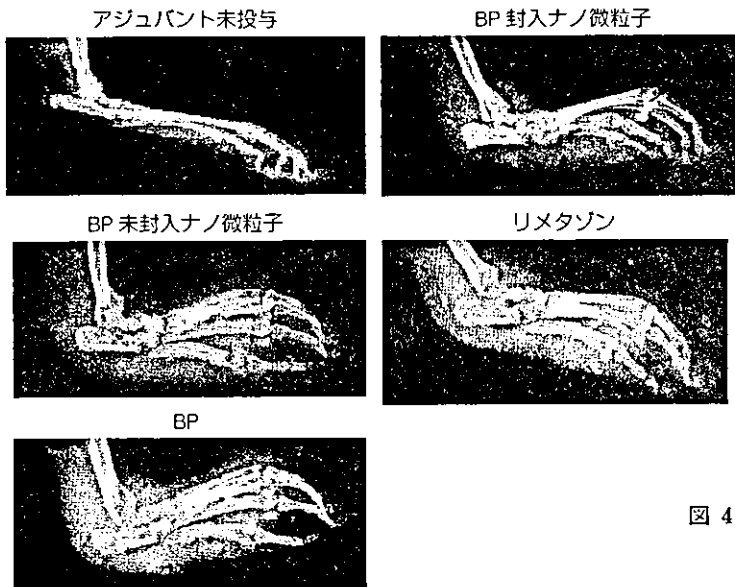


図 4. アジュバント誘導関節炎モデル(ラット)肢関節部位の軟X線画像(薬物投与7日目)

おわりに

亜鉛を用いた本方法により、水溶性のリン酸ベタメサゾンを封入した新規の PLGA/PLA ナノ微粒子を調製することに成功した。ナノ微粒子内に亜鉛を含有させることで、高率でリン酸ベタメサゾンをナノ微粒子内へ封入でき、かつ、リン酸ベタメサゾンの徐放を可能にしていることがわ

かった。炎症モデルの動物実験から、ナノ微粒子が炎症部位に集積し抗炎症効果が増強されることやリン酸ベタメサゾンの徐放による薬効の持続効果が認められた。さらに、現在臨床利用されている製剤よりもその薬効が強かったことから、このナノ微粒子は炎症抑制効果を有する新規の DDS 製剤として有用であると考えられる。

文 献

- 1) Mizushima Y *et al* : Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. *Ann Rheum Dis* 41 : 263-267, 1982
- 2) Niwa T *et al* : Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J Control Release* 25 : 89-98, 1993
- 3) Ishihara T *et al* : The role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profiles. *J Control Release* (submitted)
- 4) 石原務ほか : ナノ微粒子製剤の開発とその DDS への応用. *Pharm Tech Japan* 20 : 2621-2627, 2004
- 5) Higaki M *et al* : Treatment of experimental arthritis with PLGA nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Ann Rheum Dis* (in press)

も反応し、カルシウムを中心としたシグナル経路を活性化する蛋白質であるといえる。今後、これら細胞レベルの知見をもとに *in vivo* における生理学的な意義が明らかにされていくと期待される。

- 1) Clapham, D.: TRP channel as cellular sensors. *Nature*, 426: 517-524, 2003.
- 2) Hara, Y. et al.: LTRPC2 Ca^{2+}

-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell*, 9: 163-173, 2002.

沼賀拓郎, 片野正展, 森 泰生 / Takuro NUMAGA, Masahiro KATANO and Yasuo MORI
岡崎国立共同研究機構生理学研究所液性情報部門, 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野

薬理学・毒性学

新規ステロイド DDS 製剤 PLAG/PLA ナノスフェア

Corticosteroid-loading PLA-nanosphere

ステロイド剤はその抗炎症作用により関節リウマチなど広く臨床で利用されているが、副作用が多く使用には十分な注意が必要である。現在、ステロイドの DDS 製剤としてリポ製剤(リメタゾン)がすでに臨床適用されている。この製剤は投与量の低減を可能としているが、十分な持続性を有さない。著者らは、リン酸ベタメタゾン(BP)を封入した PLGA/PLA ナノスフェアを独自の手法により開発してきた。そこで実験的炎症モデルを用いることで、このナノスフェアの抗炎症作用の評価を行い、DDS 製剤としての有用性を検討した。

PLGA/PLA ナノスフェアの徐放作用とターゲティング作用

マクロファージは貪食細胞であり、炎症部位に多く存在することが知られている。そこでマウス腹腔マクロファージを用い、ナノスフェアが徐放作用を有するかを調べるため、ローダミン封入ナノスフェアを取り込ませた。その結果、7日後においてもなおローダミンの蛍光が観察され、徐放作用を有することが示唆された。また、関節リウマチモデルとしてよく使用

されるアジュバント関節炎モデル(ラット)を用い、ナノスフェアがターゲティング作用を有するかを調べるため、ローダミン封入ナノスフェアを静脈内投与した。その後、アジュバントを投与した左後足の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により観察した。また、対照としてローダミン溶液を静脈内投与した。その結果、ローダミン溶液では強い蛍光は観察されなかったが、ローダミン封入ナノスフェアで強い蛍光が観察されターゲティング作用を有することが示唆された(図1)。

実験的炎症モデル動物を用いた抗炎症作用

実際の薬物の効果を調べるためには動物実験が必須である。そこで、関節リウマチモデルのひとつであるタイプIIコラーゲン誘導関節炎モデル(マウス)での抗炎症作用を調べた。BP(30 μ g)封入ナノスフェアの単回投与は BP(30 μ g)単独2回投与と比較し、投与3~4日目で有意に低下した。また、BP封入ナノスフェアは投与前に比較し、投与4日目より有意に低下し、その作用はすくなくとも6日目まで持続した。また、アジュバント関節炎モデル(ラット)を用い、BP封入ナノスフェアの抗炎症作用を水置換法(ラット左後足容積)で測定した。その結果、投与1日目において BP(100 μ g)封入ナノスフェアの単回投与は、BP(300 μ g)単回投与と同等の抗炎症作用を示した。また、BP(100 μ g)封入ナノスフェアの抗炎症作用はすくなくとも1週間持続し、BP(300 μ g)単回投与やリポ製剤(リメタゾン)に比べ、有意に強い抗炎症作用を持続することがわかった(図2)。

おわりに

ステロイド封入 PLGA/PLA ナ

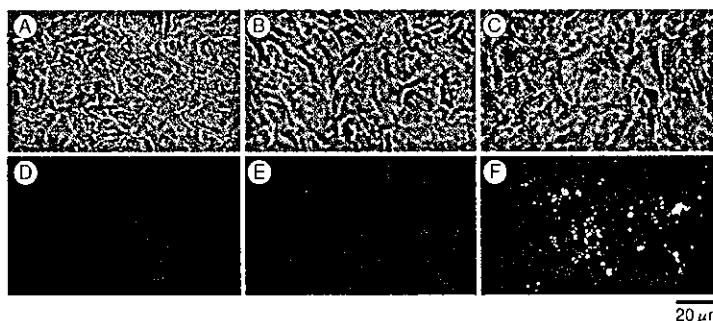


図1 ナノスフェアの炎症部位のターゲティング作用

アジュバント関節炎モデル(ラット)の炎症部位はローダミン封入ナノスフェアの投与により強い蛍光を観察した。

A, B, C: 位相差像(A: 生理食塩水投与, B: ローダミン溶液投与, C: ローダミン封入ナノスフェア投与)。

D, E, F: 蛍光像(D: 生理食塩水投与, E: ローダミン溶液投与, F: ローダミン封入ナノスフェア投与)。

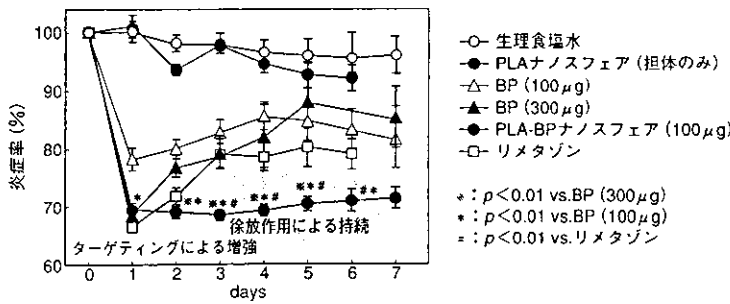


図2 アジュバント関節炎におけるBP封入ナノスフェアによる抗炎症作用

アジュバント関節炎モデル(ラット)の炎症は、BP未封入ナノスフェアの投与において抑制されなかった。各薬物投与群は投与1日目でBP未封入ナノスフェアに対し、有意に足の腫れを低下させた。BPナノスフェアの抗炎症作用は少なくとも1週間以上持続した。また、BPナノスフェア(100μg)投与1日目の抗炎症作用は、BP(300μg)投与(フリー)の作用と同等の効果を示した。

ノスフェアの強力な持続的な抗炎症作用は、ターゲティング作用と徐放作用をあわせもつことが示唆された。この製剤は従来の製剤に比べ、投与量と投与頻度の減少が可能で、臨床で用いられれば著しく有用であると考えられる。

今回のこの結果のほとんどは東京慈恵会医科大学 DDS 研究所で行った研究である。

出雲信夫¹、石原 務² /
Nobuo Izumo and Tsutomu Ishihara
第一薬科大学薬理学教室¹、東京慈恵会医科大学 DDS 研究所²

循環器内科学 心筋細胞におけるオートファジー

Autophagy in cardiac myocytes

アポトーシスが元来生体にとって不要な細胞を除去する生理的現象であるのに比べ、オートファジーも元来、不要な細胞内小器官のターンオーバーのために同じ細胞内のリソソームが細胞内小器官を貪食し、リサイクルする生理的現象である。しかし、オートファジーの異常により細胞自身が死に至るという“autophagic cell death”という細胞死の概念が最近注目を浴びている。これは、アポトーシスに続く第2の programmed cell death ともよばれる¹⁾、神経細胞や心筋細胞など最終分化細胞に生じやすいとされ、とくに神経変性疾患での関与が従来報告されてきた。形態学的にはリソソームの細胞内小器官の貪食像である autophago-

some とよばれる空胞変性(vacuolar degeneration)が特徴的であり、空胞には変性したミトコンドリア像やミエリン様構造物がみられる。リソソーム蛋白分解酵素の cathepsin 群は、リソソーム内での貪食や、細胞内に漏出して細胞質での蛋白分解に重要な役割を果たしている。

心臓におけるオートファジー

以前より、培養心筋細胞が低栄養や低酸素状態にさらされると autophagic cell death がみられることが知られている²⁾。Danon 病はオートファジーに必要な蛋白のうち Lamp-2 の先天性異常を有するが、本疾患では心筋細胞に auto-

phagic cell death がみられ、心不全に陥る^{3,4)}。最近、拡張型心筋症、弁膜症、高血圧性心疾患などによるヒト不全心において、autophagic cell death に特徴的な心筋細胞死の存在が報告されている⁵⁻⁸⁾。重要な点は、その頻度がアポトーシス細胞の頻度よりも数10倍から100倍程度高いことである。

ハムスターでは心筋症の病態を呈するいくつかのストレインがみられ、ヒト心筋症のモデルとして有用である。多くのモデルでは若年期より心筋細胞の脱落がはじまり進行性に多発性の脱落巣が形成され、線維化が著明となり、心拡大、心収縮力の低下をきたして心不全死に至る。しかし、これらのモデルにおける心筋細胞死の様式については不明な点が多く、心筋細胞死の様式は現在まで明らかにされていない。著者らは心筋症ハムスターのうち δ-sarcoglycan の遺伝子異常を呈する UM-X 7.1 系統において、高頻度に心筋細胞のオートファジーがみられることを見出した(図1)。δ-sarcoglycan の遺伝子異常による心筋症はヒトでも報告されている。

心臓におけるオートファジーの意義

心筋細胞のオートファジーによ

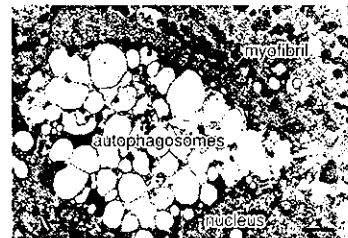


図1 UM-X 7.1 系統ハムスターの心臓にみられた心筋細胞のオートファジー

Autophagosome 内には変性したミトコンドリア、ミエリン様構造物がみられる。スケールバー: 1μm。

徐放性ナノ微粒子製剤の開発

石原 務 東京慈恵医科大学 DDS 研究所



1992年東京工業大学生命理工学部生体分子工学科を卒業後、同大学院生命理工学研究科バイオテクノロジー専攻に進学、1997年“核酸キャリアとしての機能性ナノパーティクルの開発”のテーマにて博士(工学)の学位を取得。同年より日本学術振興会特別研究員として同大学に勤務。この間、テキサス大学 South Western Medical Center にて David Corey 氏のもと、ペプチド核酸およびペプチド-DNA コンジュゲートによるアンチジーン効果の研究に従事。LTT 研究所(現 LTT バイオファーマ社)勤務を経て、2001年より東京慈恵医科大学 DDS 研究所助手として、抗炎症作用を有するナノ微粒子製剤の開発に取り組んでいる。

(いしはら つとむ)

DDS を目指した医薬品のキャリアとしては、高分子・ミセル・リポソーム・マイクロ/ナノ微粒子などが利用されているが、そのなかでも PLGA に代表される生分解性高分子からなる微粒子製剤は、薬物の放出速度を制御でき、かつ血中などで薬物を比較的安定に担持することができるという利点を有している。筆者は、研究室に配属されて以来 DDS 製剤の研究開発を行い、主としてナノ微粒子の開発に従事してきた。当初行っていた研究は、肝実質細胞へのターゲティングを目指した PLGA ナノ微粒子の開発であり、表面をポリビニルベンジルラクトノアミド(PVLA)という側鎖にガラクトースを有するポリマーで修飾することにより、*in vitro* および *in vivo* でナノ微粒子が特異的に肝実質細胞に取り込まれることを明らかにした^{1,2)}。また、渡米していた期間には、ペプチド核酸などオリゴ核酸分子の医薬品として可能性を探究し^{3,4)}、遺伝子デリバリーを目指し核酸分子を担持できる多層型 PLGA ナノ微粒子の開発も行ってきた^{5,6)}。

東京慈恵医科大学 DDS 研究所所長である水島 裕先生は、薬物を溶解したコアの油液とレシチンの表面層からなる微粒子(リポ製剤、リピッドマイクロスフェア)を開発し、この製剤が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を見いだし

た。そしてすでに薬物として PGE₁ を用いたリプル(三菱ウェルファーマ)・パルクス(大正製薬)やステロイドを用いたリメタゾン(三菱ウェルファーマ)が臨床利用されている。しかしながら、リポ製剤は、コア部に油液を用いているために薬物の徐放作用が低く、疾病・薬物の種類によっては使用上制約を受けてしまう。そこで、水島先生のもと、筆者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微粒子型製剤の開発に携わることになった。

基礎研究のレベルでは、さまざまなナノ微粒子の開発が行われてきたが、実際に製品化を考慮すると、薬物封入率の低さ、薬物の初期バースト、微粒子の低い分散安定性や多段階に及ぶ製造/精製過程などといった問題点が存在していた。筆者は、このような諸問題を克服するため、リン酸基を有する水溶性低分子化合物が亜鉛イオン存在下で疎水化されやすいことを利用し、亜鉛イオンで疎水化させたリン酸ベタメサゾン(BP)と PLGA をアセトン中に溶解し、レシチンや界面活性剤を分散(または溶解)した水中に滴下する溶媒拡散法⁷⁾によりナノ微粒子を調製した(図1)。

その結果、① アセトン量などを交えることにより 80~300 nm のナノ微粒子が任意に得られること、② ナノ微粒子に対し最大 8 重量%まで