

由来)、GRP78と結合する物質5種(オオバコなど由来)を発見した。さらにこの物質が毒性を示さない濃度で、分子シャペロンを誘導することを見出した。この物質は本研究の目的である、毒性のない分子シャペロンの候補物質である。

一方、現在使用されている様々な医薬品の中から、分子シャペロンを誘導するものを検索したところ、非ステロイド系抗炎症薬が小胞体ストレスシャペロン(GRP78など)を誘導することを見出した。小胞体ストレスシャペロンの誘導には、ATF6, IRE1, PARKという3種の小胞体膜上に存在する受容体が関与することが知られているが、我々はこれらの全てが非ステロイド系抗炎症薬によって活性化されていることを示し、非ステロイド系抗炎症薬による小胞体ストレスシャペロン誘導機構を明らかにした。非ステロイド系抗炎症薬は、抗炎症作用以外にも、抗アルツハイマー病作用が知られているが、そのメカニズムはよく分かっていない。一方、GRP78などの小胞体ストレスシャペロンは、アルツハイマー病の原因である $\beta$ アミロイドの凝集を防ぐことが知られている。そこで我々は、非ステロイド系抗炎症薬による小胞体ストレスシャペロン誘導により、非ステロイド系抗炎症薬の抗アルツハイマー病作用が説明出来るのではないかと考えている。

### (3) 分子シャペロンに関する研究材料の整備

分子シャペロンに関する研究材料の整備に関しては、この2年間の研究でHSF1のノックアウトマウスの作成に成功し、またHSP105、HSP90、HSP70、HSP60、HSP47、HSPに8、GRP94、GRP78、ORP150、カルレティキュリン、カルネキシンに対して、精製たんぱく質、特異的な抗体、細胞内で発現するためのプラスミド、siRNAの整備を完了した。さらに現在、これらの遺伝子のノックアウトマウスの作成を行っている。

### D. 考察

GGAの分子シャペロン誘導機構(HSP70、及びHSP90への結合)が明らかになり、さらに同様の活性を持つ物質が、毒性のない分子シャペロン誘導剤になりうることが分かった。

また、非ステロイド系抗炎症薬による小胞体ストレスシャペロン誘導は、非ステロイド系抗炎症薬の抗アルツハイマー病作用を考える上で、大変重要な発見である。

### E. 結論

本研究で発見した分子シャペロンに関する研究材料は、活性たんぱく質の非

注射型ナノDDS製剤に有用である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions. *Biochem. Pharmacol.* 67, 575-585.
2. Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs. *Dig. Dis. Sci.* 49, 210-217.
3. Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells. *Cell Death Differ.* 11, 1009-1016.
4. Tanaka, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Cytotoxic synergy between indomethacin and hydrochloric acid in gastric mucosal cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1188-1192.
5. Tomisato, W., Tanaka, K., Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Aburaya, M., Li, D., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Yokomizo, K., and Mizushima, T. (2004) Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 1032-1039.
6. Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2004) Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res.* in press.
7. Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T.

- (2004) Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* in press.
8. Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., and Mizushima, T. (2005) Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin. *Dig. Dis. Sci.* in press.
  9. Sone, M., Hayashi, H., Yamamoto, H., Hoshino, T., Mizushima, T., and Nakashima, T. (2005) Upregulation of HSP by geranylgeranylacetone protects the cochlear lateral wall from endotoxin-induced inflammation. *Hearing Research* in press.
- 学会発表 (招待講演のみ)
1. 水島 徹 NSAID s 研究の新展開  
岡山大学医学部での招待講演 2004 (岡山)
  2. 水島 徹 NSAID s 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導約による保護 Heart Protection Forum 特別講演 (2004) 佐賀
  3. 水島 徹 NSAID s 潰瘍発症の分子機構と HSP 誘導約による保護 実験潰瘍学会イブニングセミナー (2004) 大津
4. Tohru Mizushima Mechanism of NSAID-induced gastric lesions and its protection by HSP inducers. International Symposium in Biohealth Products Research Center (2004) (Pusan)
  5. 水島 徹 NSAID s 研究の新展開  
愛媛県病院薬剤師会学術講演会 (2005) 愛媛
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許
    1. 胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症剤のスクリーニング方法  
特願 2004-19439 (2004 年 1 月 28 日)  
発明者：水島徹、水島裕
    2. 胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法  
PCT/JP2004/18722 (2004 年 12 月 15 日)  
発明者：水島徹、水島裕
  2. 実用新案  
該当なし
  3. その他  
該当なし

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
上野晃憲、水島裕	医療におけるナノテクノロジー	Annual Review 呼吸器 2005		58-63	2004
T. Ishihara, N. Izumo, M. Higaki, E. Shimada, T. Hagi, L. Mine, Y. Ogawa, and Y. Mizushima	Role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profile	Journal of Controlled Release			in press
石原務、出雲夫、水島裕	ナノ微粒子製剤の開発とそのDDSへの応用	Pharm Tech Japan	20(13)	2621-2627	2004
石原務、出雲信夫、檜垣恵、水島裕	新しく開発中の薬剤①ーナノステロイドー	炎症と免疫	13(2)	143-147	2005
Ueno Y. Futagawa H. Takagi Y. Ueno A. Mizushima Y.	Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for new delivery system	J. Contorlled Release			In press
Mizushima Y. Ikoma T. Obata A. Futagawa H. Shimada E. Ishihara T. Ogawa Y. Tanaka J.	Injectable porous hydroxylapatite microparticles for the delivery of protein and lipophilic drugs	J. Contorlled Release			In press

Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mio, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Role of direct cytotoxic effects of NSAIDs in the induction of gastric lesions.	<i>Biochem. Pharmacol.</i>	67	575-585	2004
Tanaka, K., Nishimoto, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Adaptive cytoprotection induced by pre-treatment with ethanol protects against gastric cell damage by NSAIDs.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	49	210-217	2004
Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	NSAIDs induce apoptosis through endoplasmic reticulum stress response in gastric mucosal cells.	<i>Cell Death Differ.</i>	11	1009-1016	2004
Tanaka, K., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Tsuchiya, T. <u>Mizushima, T.</u>	Cytotoxic synergy between indomethacin and hydrochloric acid in gastric mucosal cells.	<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	27	1188-1192	2004
Tomisato, W., Tanaka, K.,	Membrane permeabilization by	<i>Biochem. Biophys.</i>	323	1032-1039	2004

Katsu, T., Kakuta, H., Sasaki, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Aburaya, M., Li, D., Tsuchiya, T., Suzuki, K., Yokomizo, K., Mizushima, T.	non-steroidal anti-inflammatory drugs.	<i>Res. Commun.</i>			
Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T., Mizushima, T.	Induction of claudin-4 by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect.	<i>Cancer Res.</i>	in press.		2005
Arai, Y., Tanaka, K., Ushijima, H., Tomisato, W., Tsutsumi, S., Aburaya, M., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., Tsuchiya, T., Mizushima, T.	Low direct cytotoxicity of nabumetone on gastric mucosal cells.	<i>Dig. Dis. Sci.</i>	in press.		2005

Tomisato, W., Tanaka, K., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Yokomizo, K., Suzuki, K., Katsu, T., <u>Mizushima, T.</u>	Low direct cytotoxicity and cytoprotective effects of nitric oxide-releasing indomethacin.	<i>Dig. Sci.</i>	<i>Dis.</i>	in press.		2005
---	--	------------------	-------------	--------------	--	------



#### IV 研究成果の刊行物・別冊



## 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

Table 1 Various nanoparticles developed for DDS

Type	ナノ微粒子の形成/構成	製品名/商品名
O/Wエマルジョン	油相/水相からなるエマルジョン	リプル(三菱ウェルファーマ) <sup>2)</sup> リメタゾン(三菱ウェルファーマ)
リボソーム	脂質二重膜からなる粒子	Doxil(SEQUUS Pharmaceuticals) Abelcet(Liposome Company)
疎水性高分子	液中重合	水相中での疎水性高分子の重合合成による粒子化
	液中乾燥/溶媒拡散	疎水性高分子の会合による粒子化
高分子ミセル	高分子内疎水性部位の会合による粒子化	PLGA/PLAナノ微粒子 NK911(日本化薬) <sup>3)</sup> コレステロール-プルラン(日本油脂)
無機化合物	無機化合物の結晶化・粒子化	アパタイト <sup>4)</sup> リン酸カルシウム <sup>5)</sup>
イオンコンプレックス	親水性高分子間のイオン結合による複合体(粒子)形成	カチオン性高分子および核酸(DNAなど)

能にし、薬効の持続や副作用の低減が期待できる。しかし、世界中で研究が進められているにも関わらず、実際臨床利用されているものは多くはない。その主たる理由は、投与する微粒子が生体のホメオスタシスによる影響を受け、その機能を十分に発揮できないことであり、DDS製剤開発のためには、その障害を克服する材料設計が必要になる。



## 1. ナノ微粒子製剤

DDS用微粒子を調製する際には、生分解性・生体適合性の材質を用いることが必須であり、薬物の担持能/放出挙動はその材質に大きく依存する。また、微粒子の粒径や表面物性が、生体内での微粒子の分布・動態に影響を及ぼすことも知られている<sup>1)</sup>。しかし、生体内では、微粒子表面にタンパク質などの種々の生体成分が吸着・作用することで、微粒子本来の疎水性度・形態・大きさ・表面電位・硬度などが変化し、DDS製剤としての機能が阻害される。したがって、適切な粒径・表面物性・材質を選択し、微粒子を調製することがDDS製剤の開発にとって重要であると考えられる。

DDS製剤として開発された、あるいは開発中のナノ微粒子製剤をその製造原理・構成別にTable 1にまとめた。水島らが開発したリボ製剤<sup>2)</sup>は、大豆オイル/水のエマルジョンを脂質で安定化し、オイル中に薬物を封入した200nm程度の球状微粒子であり、薬物として、

PGE1を含有したリプルやステロイドを含有したリメタゾンなどがすでに臨床で使われている。また、リボソーム製剤としてはアンホテリシンBを封入したAbelcetやドキソルビシンを封入したDoxilが臨床利用されている。ドキソルビシンを封入した高分子ブロック共重合体からなるミセル型ナノ微粒子(粒径約50nm)のNK911も現在Phase IIにあり、近い将来、臨床利用が期待される。さらに、ここ10年あまりにわたっては、DNAなど核酸分子を薬物とみなした、いわゆる遺伝子治療を目的としたナノ微粒子製剤の研究開発も盛んになっている。

上述したリボ製剤は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。しかしながら、リボ製剤はコア部位にオイル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・制約を受けてしまう。一方、武田薬品工業が開発したリュープリン<sup>6)</sup>は、コア部位に生分解性高分子である乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)を用いた微粒子製剤であり、薬物の放出速度を制御できるという利点を有しているが、粒径が大きく、ターゲティング機能はない。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型製剤の開発を行うことにした。



## 2. PLGA/PLA ナノ微粒子の調製


PLGAあるいは乳酸重合体(PLA)を利用したナノ微粒子は、さまざまな方法により調製可能であるが、その中でもO/W型液中乾燥法により調製されることが多い。この方法では調製時に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させ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200nm以下のナノ微粒子を得ることは困難であった。また、工業化を考えると、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い。さらに、ナノ化することにより、微粒子の比表面積が飛躍的に増大し、薬物の放出速度が加速されることが懸念されるので、長期の徐放を可能にする微粒子を調製する必要もある。一方、PLGA/PLA・界面活性剤および水溶性低分子薬物を溶解した水溶性有機

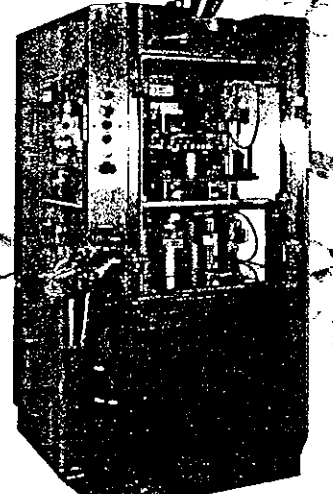
溶媒を油液中に添加しナノ微粒子を調製するO/O型溶媒拡散法や、疎水性低分子薬物を封入できるO/W型溶媒拡散法が川島らにより報告されてきた<sup>7-9)</sup>。そこで、この方法をベースにし、粒径200nm以下で長期にわたる薬物の徐放放出が可能なナノ微粒子の調製を行った。

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さまざま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、リン酸基を有する化合物では、亜鉛、鉄、銅、錫あるいはアルミニウム存在下で濁りや沈殿形成が観察され、金属イオンにより疎水化できることがわかった。そこで、薬物としてリン酸ベタメサゾン(BP)を用い、ナノ微粒子の調製を試みた。酢酸亜鉛で疎水化したリン酸ベタメサゾン沈殿と、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ナノ微粒子を得た(Fig. 1)。

モデルで、レベルで、選べるAQUARIUS  
**AQUARIUS series**

AQUARIUSシリーズは、製品切替時間の短縮及び清掃性能の向上を目的に開発された最新鋭水洗高速回転式錠剤機です。本シリーズは、機内打錠エリア及び回転盤臼穴の自動洗浄を実現したAQUARIUSと回転盤交換による金型の外段取りを実現したAQUARIUS3から構成されています。AQUARIUSシリーズは従来の錠剤機の概念を打ち破った新時代の錠剤機です。





**AQUARIUS3**  
回転盤脱着真空水洗高速回転式錠剤機

株式会社 菊水製作所

本社工場 〒604-8483 京都市中京区西ノ京南上合町104番地 TEL 075-841-6326(代) FAX 075-803-2077  
東京営業所 〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町二丁目2番3第三ビル3階 TEL 03-3252-5966(代) FAX 03-5295-8065

製品目録  
錠剤機/フェライト成型機/セラミック成型機/樹脂成型機/カーボンブラシ成型機/造粒機/混合・練合機/真空造粒コーティング機/その他製薬化学工業用機械

DM資料請求カードNo.351

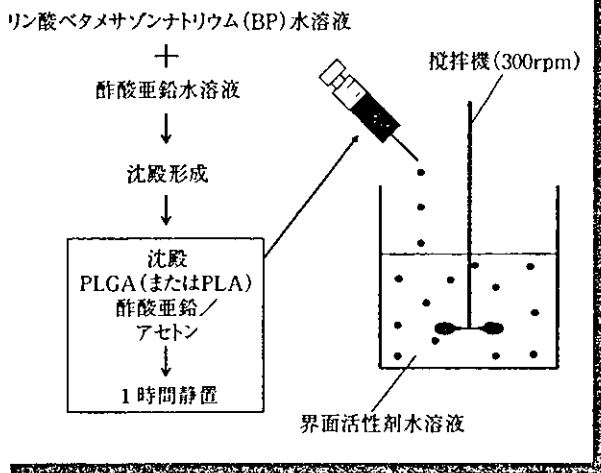


Fig. 1 Preparation of nanoparticles by a modified solvent diffusion method

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

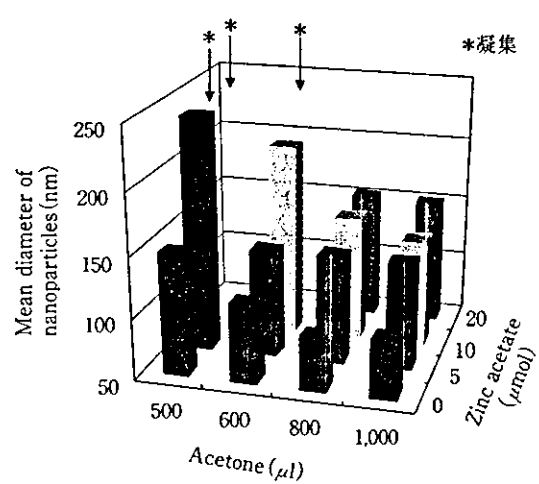


Fig. 2 Effect of volume of acetone and amount of zinc acetate on the diameter of nanoparticles. The nanoparticles were prepared with 20mg PLGA (Mw8000) and 4 mg BP.

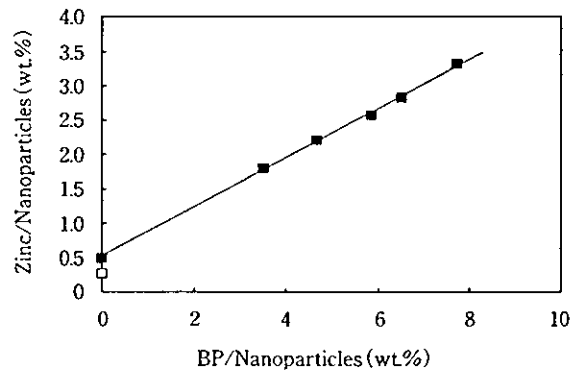


Fig. 3 Zinc and BP contents in nanoparticles  
■ : nanoparticles prepared with PLGA (Mn 3400),  
□ : nanoparticles prepared with PLGA (Mn 4700)

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

大きいPLGAで調製したナノ微粒子内の亜鉛含量が少ないことがわかった(Fig. 3)。したがって、亜鉛の役割としては、リン酸ベタメサゾンの沈殿形成を誘導するのに加え、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. PLGA/PLAナノ微粒子からのリン酸ベタメサゾン放出

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、O/W型液中乾燥法で調製したプロピオン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子では10日あまりで薬物が全放出されたのに対し、本方法で調製したナノ微粒子では、より長期にわたるリン酸ベタメサゾンの徐放挙動を示した。また重合体の種類や分子量に依存した薬物放出挙動をとることが明らかになった(Fig. 4)。さらに、このナノ微粒子が *in vitro* でマクロファージに顕著に取り込まれること、そして、細胞内に取り込まれたナノ微粒子か

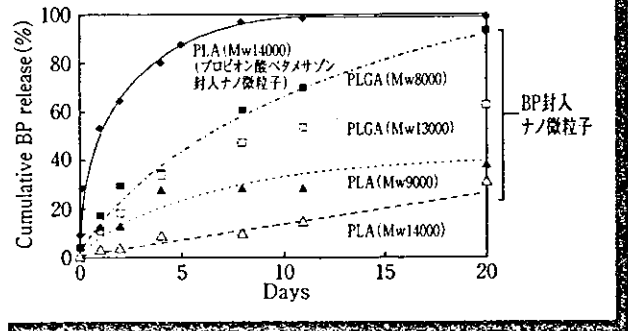


Fig. 4 Release profile of BP from nanoparticles in FBS/PBS solution (50% v/v) at 37°C

ら細胞外(培地中)にリン酸ベタメサゾンが1週間以上にわたって徐放されていることがわかった(Fig. 5)。一方、O/W型液中乾燥法で調製したプロピオン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子は、より分解速度が遅いPLAで調製したにも関わらず、本方法で調製したPLGAナノ微粒子よりも速やかに薬物が放出された。これらの結果は、

## 医薬品業界のFA化促進にIWAKUROの各種自動機械

### PTP自動包装集積ライン

**PTP仕様**

本体能力：6,000錠/分 (2シート取り300ショット)  
 特長：①運転、保守、生産管理用コンピューター搭載  
 ②8時間ノンストップ運転  
 ③錠剤充填部(詰まり、欠け、欠錠チェック)トリプルチェック  
 ④新方式、シート4列増列、シート積上、補給装置

No.856P  
No.857P



各種自動包装机・製薬機械設計製作

**株式会社 岩黒製作所**

〒939-0418 富山県射水郡大門町布目沢480-2 TEL(0766)53-1116 FAX(0766)53-1727

DM資料請求カードNo.9

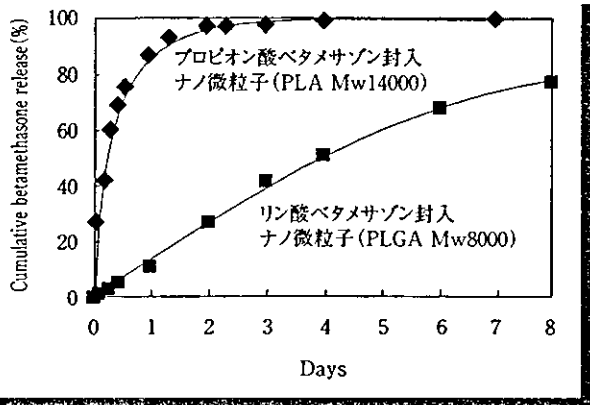


Fig. 5 Release of betamethasone from macrophages after phagocytosis of nanoparticles.

PLGAの加水分解に伴い生じる遊離酸を亜鉛が中和しPLGAの分解速度を遅めているため、あるいは、調製法の相違により薬物の粒子内分布が異なるためではないかと考えられる。



#### 4. リン酸ベタメサゾン含有PLGA/PLA ナノ微粒子の薬理効果

##### ① *in vivo*での炎症部位へのターゲッティング

カラゲニン関節炎モデルラットに蛍光プローブを封入したナノ微粒子を静脈内投与し、2時間後に炎症部位の切片像を顕微鏡観察した結果、100~200nm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、この範囲の粒径のナノ微粒子を用い、その抗炎症作用について検討した。

##### ② タイプIIコラーゲン誘導関節炎マウスでの抗炎症作用

生体内での薬理効果を解析するため、タイプIIコラーゲン誘導関節炎マウスを炎症モデル動物として用いた。リン酸ベタメサゾン30 $\mu$ g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 $\mu$ gを2日連日投与したマウスに比べ、有意に強く、かつ持続性のある抗炎症作用が認められた。

##### ③ アジュバンド誘導関節炎ラットでの抗炎症作用

さらにナノ微粒子の抗炎症作用を検討するため、アジュバンド誘導関節炎ラットを炎症モデル動物として用いた。ナノ微粒子の表面に吸着させる界面活性剤の種類を

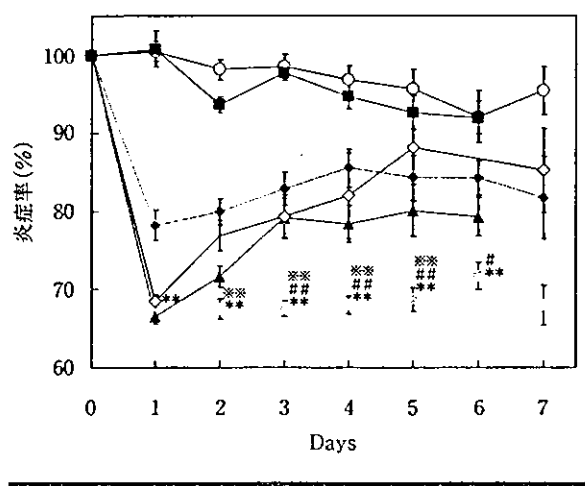


Fig. 6 Anti-inflammatory effect of BP-loaded nanoparticles in rats with adjuvant-induced arthritis

○：未投与，■：BP未封入ナノ微粒子，◆：BP (100 $\mu$ g)，◇：BP (300 $\mu$ g)，▲：リメタゾン，□：BP封入ナノ微粒子 (BP100 $\mu$ g)  
 ※※：P<0.01,vs BP (300 $\mu$ g)  
 \*\*：P<0.01,vs BP (100 $\mu$ g)  
 ##：P<0.01,vs リメタゾン

変えて調製したリン酸ベタメサゾン封入ナノ微粒子では、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。また、ナノ微粒子の基質重合体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)で調製したナノ微粒子では、持続的な抗炎症効果が認められた。そこで、このナノ微粒子と他の製剤との比較をしたところ (Fig. 6)、ナノ微粒子では、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。したがって、このナノ微粒子はターゲッティング機能を有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リポ製剤のリメタゾンをリン酸ベタメサゾン100 $\mu$ gと同力価となるよう投与した場合には、2日目以降徐々に炎症抑制作用が減少したが、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続けた。よって、このナノ微粒子はリン酸ベタメサゾンを生体内で徐放していると考えられる。





## 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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>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と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<sup>3,4)</sup>。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

\* ISHIHARA 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

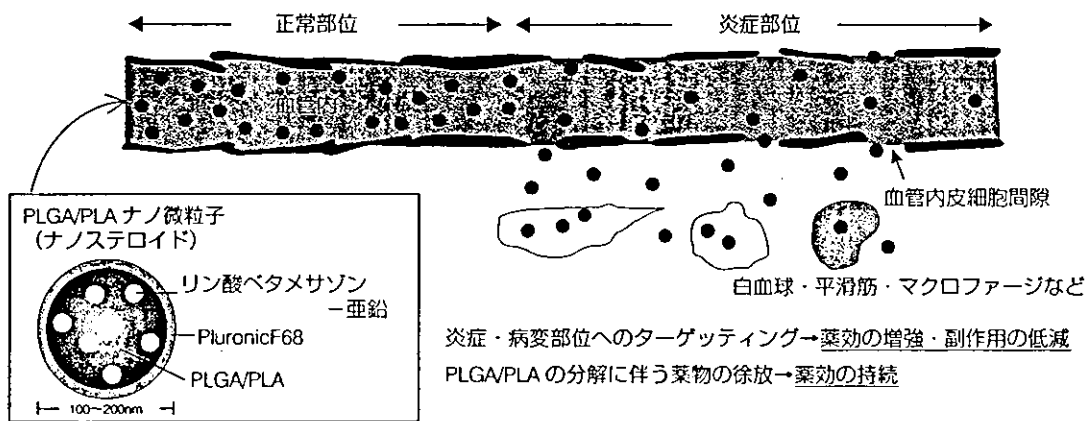


図 1. ステロイド封入ナノ微粒子による炎症抑制

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<sup>3)</sup>。

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- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$  : TNF- $\alpha$ ) 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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。

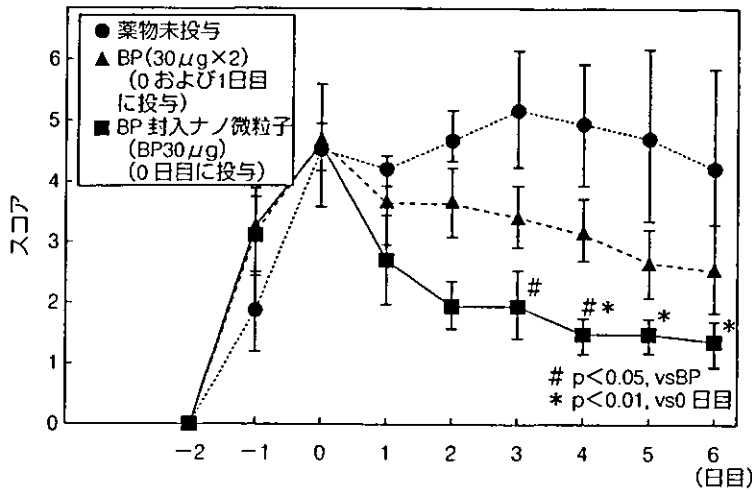


図 2. タイプIIコラーゲン誘導関節炎モデル(マウス)におけるリン酸ベタメサゾン(BP)封入ナノ微粒子の抗炎症効果

### 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<sup>5)</sup>。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<sup>9)</sup>。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。

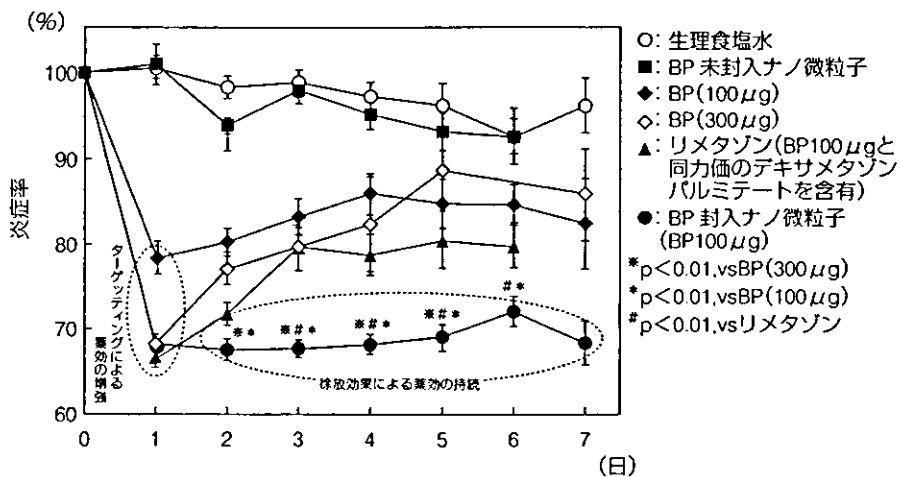


図 3. アジュバント誘導関節炎モデル(ラット)におけるリン酸ベタメサゾン(BP)封入ナノ微粒子の抗炎症効果

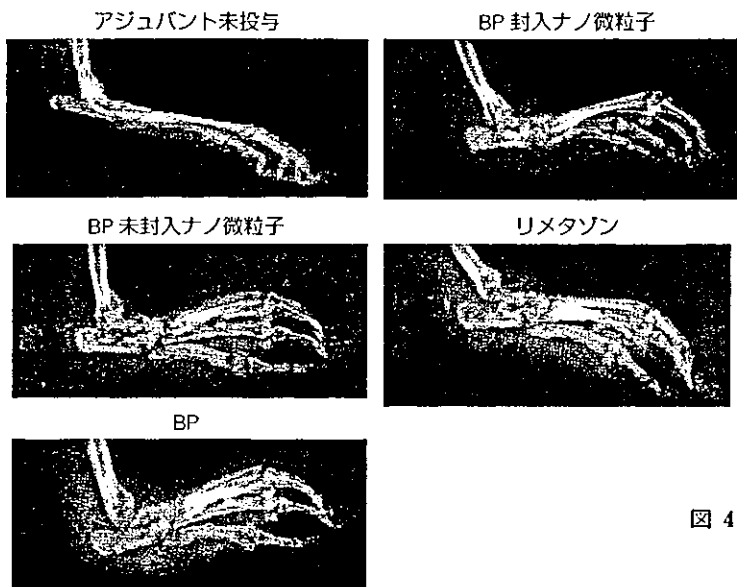


図 4. アジュバント誘導関節炎モデル(ラット)肢関節部位の軟X線画像(薬物投与7日目)

### 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。