高分子ナノ粒子を利用した薬物送達制御法

Polymeric Nanoparticle for Drug Delivery System

山本 浩充

Hiromitsu Yamamoto

Drug delivery system improves the efficacy of drug by the enhancement of absorption, controlling the body distribution and etc. This review reports the design method for drug delivery system with polymeric nanoparticle by surface modification. The fate of nanoparticle depends on the surface properties such as electrical charge, hydrophobicity as well as particle size. By modifying nanoparticles with polysorbate 80, the distribution percentage and retention time of nanoparticle in the brain tissue increased. By the modification with chitosan to provide positively charges, the cellular uptake of nanoparticle was increased. According to these results, the surface modified nanoparticulate system with the suitable material could deliver the drug more efficiently to the required tissue compared to the conventional dosage forms.

Keywords : Emulsion solvent diffusion method, Surface modification, Brain targeting, Gene delivery

1. はじめに

近年、バイオテクノロジーやエレクトロニクス、化学工学などの発展に伴って、医療技術はめざましい進歩を遂げている。特に、医薬品による治療に関しては、遺伝子レベルでの疾病原因の解明や、細胞表面に存在する受容体の構造なども遺伝情報に基づいて明らかにしたうえで医薬品の化学構造を最適化するなど、すでにゲノム創薬の時代に入っている。しかしながら、細胞レベルで有効性が確認されたとしても、実際

ヒトに用いる場合には、注射部位から治療部位へ、また、経口投与であれば消化管から吸収され治療部位へ薬物が到達しなければ、薬理効果は発揮されない。

薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム、DDS）は、薬物を疾患部位に効率良く送達させるための概念で、薬物の有効性を高めるための有用な手段である。DDSを実現させるためのシステムがこれまでも種々研究、報告されている。我々はサブミクロンサイズの高分子微粒子（ナノ粒子）を薬物担体（キャリアー）として用いた DDS 設計を行っている。特に、ナノ粒子表面を種々の物質で修飾することによって、例えば治療部位に長期に滞留させたり、薬物の送達量を高めたりなど、様々な機能性をナノ粒子へ賦与する試みを行っている。

本稿では、現在我々が行っている研究を中心に、ナノ粒子の DDS への応用について紹介したい。

2. 高分子ナノ粒子

医療用に供されるナノ粒子、特に、DDS に用いられるナノ粒子の基剤には、生体内に直接投与されたり、消化管などの粘膜から吸収されたりすることを考慮し、生体に毒性がなく、且つ、体内で酵素分解や非酵素的な加水分解などにより無毒な物質となり、排泄されるような高分子が選択される。代表的な高分子に

2008年3月7日受付

愛知学院大学 薬学部 製剤学講座

(〒464-8650 愛知県名古屋千種区楠元町1-100)

TEL 052-757-6771

Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

(1-100, Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan)

< 著者紹介 >

1992年3月岐阜薬科大学 薬学部卒業、1992年4月同大学大学院博士前期課程入学、1994年3月同課程修了、1994年4月岐阜薬科大学大学院博士後期課程、1995年4月岐阜薬科大学 製剤学教室助手、2004年~2005年フランクフルト ゲーテ大学（ドイツ）博士研究員、2005年4月粉体工学会 中部談話会世話人、2006年4月愛知学院大学・薬学部 製剤学講座助教授（現准教授）
専門：製剤工学、粒子設計工学

は、ポリ乳酸 (PLA)、ポリ乳酸グリコール酸 (PLGA) やポリアクリルシアノアクリレート (PACA) 等がある。

PLGA や PLA, PACA は生体内での分解速度が異なり、一般的に PACA は分解速度が速く、PLGA, PLA の順で遅くなる。このため、使用目的や適用部位等に応じて基剤となる高分子を選択することも重要なキーである。

これらの基剤を用いた薬物送達用ナノ粒子の調製法には、PLGA や PLA を基剤とするナノ粒子では、エマルジョン溶媒拡散法やエマルジョン溶媒留去法が、PACA を基剤とするナノ粒子では乳化重合法が主に用いられる。以下に簡単な調製法の特徴を述べる。

2. 1 エマルジョン溶媒拡散法によるナノ粒子の調製

エマルジョン溶媒拡散法は、我々の研究室で開発されたナノ粒子調製法である^{1,2)}。高分子と封入する化合物 (薬物) を有機溶媒 (アセトンやメタノールなど水と混和する溶媒) に溶解し、この溶液をポリビニルアルコール水溶液中に攪拌下、滴下する。滴下後直ちに有機溶媒の水溶液中への拡散移行が生じるが、この拡散が急速に生じることで界面が乱れ、自己乳化的にサブミクロンサイズのエマルジョン滴が形成される。さらに溶媒の拡散が進行すると、エマルジョン滴内で水に溶解しない PLGA が薬物とともに沈積し、ナノメートルサイズの粒子が得られる。

本方法は、特殊な製造装置を必要とせず、得られる粒子径、粒度分布の再現性にも優れている。

2. 2 エマルジョン溶媒留去法によるナノ粒子の調製

エマルジョン溶媒留去法は、分散媒と混和しない有機溶媒中に高分子と薬物を溶解し、ホモジナイザーなどで高速せん断力をかけて、サブミクロンサイズのエマルジョン滴へと乳化する。その後有機溶媒を減圧留去することによりナノ粒子が得られる。

有機溶媒には一般にクロロホルムやジクロロメタンなどが用いられるため、残留溶媒などが懸念されるが、w/o/w 複合エマルジョン溶媒留去法等を利用することにより幅広い薬物の封入が可能である。

2. 3 乳化重合法によるナノ粒子の調製

アルキルシアノアクリレートモノマーの溶液を、pH を調整した水溶液に加え攪拌する。水素イオンによってモノマーの重合が促進され、高分子ナノ粒子が得られる。薬物は、重合している水溶液に加え粒子生成中に吸着させるか、ナノ粒子調製後、懸濁液中

に薬物を加えて吸着させるなどの方法が採られる。エマルジョン溶媒拡散法やエマルジョン溶媒留去法に比べ、薬物と高分子間に働く相互作用の有無が封入量や薬物溶出に大きく影響する。

3. ナノ粒子の薬物送達システムへの応用例

3. 1 ナノ粒子による脳への薬物送達

脳毛細血管は、他の組織の末梢血管よりも血管内皮細胞同士が密接に結合しているタイトジャンクションが長く、血液からの物質の移行は、細胞内を通過するルートを経由して行われる。さらに、細胞内ルートに関しても、ファゴサイトーシスなどの貪食活性も低く、分配係数に依存する膜透過型の移行ルートがメインである。このため、一般に分子サイズが小さく、脂溶性の高い物質ほど、脳への移行量が高くなる。しかし、栄養素などは脂溶性が低くても脳への移行率が高いが、細胞に対して毒性を示す抗ガン剤などでは、脂溶性が高いにもかかわらず、脳への移行性が低くなるといったケースも見られる。これには、P 糖タンパクなどの内皮細胞膜に存在するトランスポーターによる薬物排除機構の関与が報告されている。このように、脳は特異的な物質透過機構を有するため、脳への薬物送達は非常に困難となっており、中枢神経系疾患治療薬の開発が途中で中止となる割合は、他の疾患治療薬に比べ非常に高い。

中枢神経系疾患治療薬を脳に送達するための一つの手段として、表面修飾した高分子ナノ粒子を用いる方法がある。基本的なコンセプトとしては、粒子の表面を修飾することによって、生体内での分布や挙動をコントロールし、脳へ高濃度に薬物を蓄積させ、さらには脳血液関門を通過させることで、薬物送達の効率を向上させようとするものである。筆者が留学したゲート大学 J. Kreuter らのグループは、PACA ナノ粒子表面をポリソルベート 80 で修飾することにより、ナノ粒子表面にアポリボタンパク E が血中で吸着し、擬カイロミクロンとしてナノ粒子が脳内に移行し、薬物の送達量を向上できると報告している^{3,4)}。

一般に、血中に投与された微粒子は、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織 (Reticulo endothelial system, RES) によって取り込まれ、血中から速やかに消失する。この RES による粒子の取り込みには、免疫グロブリンや補体系タンパクが関与しており、これらのタンパクが粒子表面に吸着することで、マクロファージなどの貪食系細胞に認識されるようになり、粒子が捕食される。粒子へのタンパクの吸着は、粒子表面の疎

Fig. 1 Effect of administration route on the brain distribution of surface modified poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticle

水性が高いほど、また、正に荷電した粒子ほど高くなる。このタンパクの吸着を、ポリチレングリコールなどの親水性の高い高分子で修飾することで抑制し、粒子を長時間血中に滞留させることで脳内への移行量を増加させるといった試みも報告されている。

脳腫瘍に対する薬物治療において、メトトレキサートを頸動脈投与することによって、治療効果が飛躍的に向上することが知られている。これは、頸動脈投与された薬物が直接脳の方へ循環することで、薬物が高濃度に脳腫瘍へ移行したためである。そこで我々は、表面修飾した PLGA ナノ粒子について、頸動脈投与群と頸静脈投与群に分け、脳への分布量及び粒子の血中滞留性の観点より比較した。

Fig. 1 に示すように、表面修飾剤の種類によらず、いずれの粒子も投与 5 分後における頸動脈投与群の脳組織粒子濃度は、頸静脈投与群に比べ高い値を示した。また、頸動脈投与後の粒子の脳への滞留性については、表面修飾物質の種類に依存していた。未修飾ナノ粒子は、最も短い滞留性を示し、投与後 60 分で 5 分後の 25 % まで減少した。これは未修飾ナノ粒子と脳血管内皮細胞との相互作用が弱く、さらに、血液中の粒子は RES によって捕食されるためと考えられた。Poloxamer188 で修飾したナノ粒子も脳組織からの消失が速く、脳血管内皮細胞との相互作用が弱いことが予想された。一方、J. Kreuter らの報告と同様に、ポリソルベート 80 で表面修飾したナノ粒子では、高い脳内粒子濃度を示した。この粒子は血中粒子濃度も他の粒子に比べ高いことから、ポリソルベート 80 修飾によって RES 回避能がナノ粒子に賦与され、脳内粒子濃度向上に寄与していることが示唆された。

Fig. 2 Confocal laser scanning images of A549 cells after incubation with PLGA nanoparticle
a) PLGA nanoparticle (diameter; 215nm)
b) Chitosan coated PLGA nanoparticle (diameter; 245nm)
(Cells were incubated with nanoparticle suspension for 4hour at 37℃)

また、キトサン修飾ナノ粒子に関しては、血中からの粒子の消失が速いにもかかわらず、高い脳内粒子滞留性を示した。また、投与量を変化させても、脳内粒子濃度およびその滞留性は変化しなかった。キトサンは分子内にアミノ基を有しており、負に荷電している血管内細胞表面に静電的また水素結合を形成することによって、強く細胞表面に吸着し、脳内での滞留性が高まる一方、血管に吸着できなかった粒子は速やかに RES により消失したと考えられる。脳内滞留性の高かった 2 種のナノ粒子について、培養した脳血管上皮細胞との相互作用を共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価したところ、ポリソルベート 80 修飾ナノ粒子は、細胞内部まで粒子が取り込まれていたのに対し、キトサン修飾ナノ粒子では細胞表面上にのみ吸着粒子が観察され、細胞内には取り込まれていないことが確認された。一方、未修飾ナノ粒子では、細胞へわずかに吸着した粒子が観察されただけであった。この培養細胞を用いて得られた結果は、上記ナノ粒子の脳への分布に関する考察を支持しているものと考えられる。

3. 2 ナノ粒子による遺伝子送達

遺伝情報の解明に伴い、各種疾患にかかわる遺伝子欠損や、異常タンパクの原因となる遺伝子配列の解析も可能となってきた。これにより、遺伝子欠損であれば当該タンパクを産生するようなプラスミド DNA を導入してタンパクを産生させ治療するといった試みや、近年では RNA 干渉（短鎖の RNA によって、特定遺伝子配列を持つメッセンジャー RNA が切断され、タンパクが産生されなくなる現象）を利用して特定のタンパク質産生を抑制し、がん治療を行うなどの試みもなされている。このような治療では、

Dose ; pDNA 1 μ g, Medium ; DMEM, DOTAP/pDNA ; DOTAP 100 μ g/pDNA 1 μ g,
Particle size ; 283.2nm, Zeta potential ; 38.6mV
* $p < 0.05$; significantly different from pDNA

pDNA ; pCMV-luciferase, PLGA ; Poly (lactic-co-glycolic acid), DOTAP ;
N-[1-(2, 3-Dioleoyloxy) propyl]-N, N, N-trimethyl ammonium, CS ; Chitosan,
Non-PLGA NS ; Non-coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanosphere,
CS-PLGA NS ; Chitosan-coated poly (lactic-co-glycolic acid) nanosphere

Fig. 3 Effect of incubation time on transfection efficiency of pDNA loaded PLGA NS with A549 cell

DNA や RNA が細胞内に取り込まれて初めて効果が発揮される。しかしながら、DNA や RNA といったヌクレオチドは親水性で、強い負電荷を有し、細胞膜を通過できないため、ベクターと呼ばれる担体を用いて細胞内への導入が行われる。我々は、ナノ粒子の遺伝子治療用のベクターとしての可能性についても検討している。

本来、RNA や DNA 等のヌクレオチドは、疎水性の PLGA が溶解するような有機溶媒中には溶解することができない。しかしながら我々は、ヌクレオチドをカチオンと複合体を形成させることによって有機溶媒中に分子レベルで分散させられることを見だし、この特性を利用して遺伝子封入 PLGA ナノ粒子の調製に成功した^{5, 6)}。この複合体の利用は、遺伝子の封入率の向上にも寄与し、pDNA の場合、複合体を形成せずに調製したナノ粒子内への封入率が 0.3 % であったのに対し、カチオン性脂質である DOTAP とともに複合化して調製を行ったナノ粒子では、封入率が 22 % へと向上した。

PLGA ナノ粒子は、PLGA が末端にカルボキシル基を有するため負に荷電しており、細胞内に取り込まれにくい。実際、ヒト肺上皮がん細胞である A549 細胞を用いた取り込み実験においても、取り込まれる粒子の量は少ない。これに対し、脳への送達にも利用したキトサンでナノ粒子の表面を修飾すると、細胞内への取り込み量が著しく増加した。(Fig. 2) 脳血管内皮

細胞とは異なり、他臓器の細胞では貪食活性があるため、細胞表面に吸着したキトサン修飾ナノ粒子はファゴサイトーシスなどによって細胞内に取り込まれることができ、遺伝子を細胞内部へ送達可能になったと考えられる。

Fig. 3 には、A549 細胞を用いて行った pDNA の遺伝子発現能評価の結果を示す。キトサンで粒子表面を修飾したナノ粒子は、未修飾ナノ粒子に比べいずれも pDNA がコードしているルシフェラーゼの活性が向上した。また、24 時間の時点では、DOTAP/pDNA 複合体はキトサン修飾ナノ粒子よりも高いルシフェラーゼ活性を示しているが、48 時間後の発現量を見ると、DOTAP/pDNA では発現量の減少が認められるのに対し、キトサン修飾ナノ粒子では発現量の減少は認められなかった。これは、取り込まれた DOTAP/pDNA の遺伝子発現が直ちに起こるのに対し、ナノ粒子では pDNA が粒子から放出された後、発現する。溶出試験を実施したところ、ナノ粒子からの pDNA の放出は抑制されていた。このキトサン修飾ナノ粒子をベクターとして用いることで、一度の投与で長期的に遺伝子が発現させられ、治療に有用であると期待される。

おわりに

生体内分解性、生体適合性高分子を基剤としたナノ粒子を薬物担体として用い、表面修飾法によって薬物

を作用部位へ効率良く送達させる手法について紹介した。

人体機能や疾病の発症原因の生理学的、生化学的解明が今後ますます進むことによって、高機能な DDS の開発も可能となると考えられる。また、患者間で異なる薬に対する感受性や代謝酵素活性などのバックグラウンドに基づいたテーラーメイド医療の実現も可能になるであろう。そのとき、今回紹介したナノ粒子

が、DDS やテーラーメイド医療の基盤技術の一つになりうるものと期待している。

〔謝辞〕本研究は、愛知学院大学・薬学部・川島嘉明教授、岐阜薬科大学・薬学部・竹内洋文教授、ゲーテ大学・J. Kreuter 教授の指導のもとで行った。実験を行った田原耕平助教、坂井剛志氏、宮崎雄太氏に感謝します。本研究の一部は、科学研究費(17790039)の支援の下、実施された。関係各位に感謝します。

References

- 1) Kawashima, Y., H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino and T. Niwa: "Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 41-48 (1998)
- 2) Yamamoto, H., Y. Kuno, S. Sugimoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima: "Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions", *J. Control Release*, **102**, 373-381 (2005)
- 3) Kreuter, J.: "Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 65-81 (2001)
- 4) Ambruosi, A., H. Yamamoto and J. Kreuter: "Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [^{14}C] poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles after i.v. administration in rats", *J. Drug Target*, **13**, 535-542 (2005)
- 5) Tahara, K., H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima: "Development of gene delivery system using PLGA nanospheres", *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1541-1548 (2007)
- 6) Tahara, K., T. Sakai, H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima: "Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery", *Int. J. Pharm.*, **354**, 210-216 (2008)