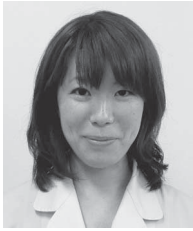


《若手研究者紹介》



DDS 機能を有する PLGA ナノ粒子の製剤設計開発と実用化

原 香 織* Kaori Hara

ホソカワミクロン株式会社 マテリアル事業本部 製薬・美容科学研究センター

1. はじめに

ドラッグデリバリーシステム (DDS, 薬物送達システム) は, 安全で効率の良い薬物治療を可能にする製剤設計の一手法として臨床応用が期待され, 多数研究報告されている。

当社は, 2001年~2004年のNEDO (新エネルギー・産業技術総合開発機構) の研究委託の中で, 岐阜薬科大学 (現愛知学院大学) 川島研究室から, DDS機能を有する薬物封入 PLGA (乳酸・グリコール酸共重合体) ナノ粒子を作製しうる「高分子球形析法」¹⁾ を技術導入し, 当社オリジナルの機械的粒子複合化技術と組み合わせて, 実用的なナノコンポジット型吸入製剤の設計・開発を進めていた。筆者が現職に配属された2004年頃からは, その研究成果を基盤として, PLGA ナノ粒子システムをコア技術とする DDS 受託研究や化粧品・育毛剤の製造販売事業へと展開している。本稿では, その研究活動の一端とその実用例について紹介する。

2. PLGA ナノ粒子の特徴

Fig. 1 に示すように, PLGA は生体内に存在する「乳酸」と「グリコール酸」がエステル結合によってランダム共重合したもので, 疎水性で非晶質のポリ乳酸 (PLA) と, 親水性で結晶性が高く有機溶媒に不溶であるポリグリコール酸 (PGA) の性質を相補

*2004年岐阜薬科大学卒業。同年株式会社ホソカワ粉体技術研究所入社。2009年ホソカワミクロン株式会社配属, 現在に至る。研究テーマ: 製剤学, 粉体工学。受賞歴: 2011年日本薬剤学会旭化成研究奨励賞受賞。連絡先: 〒573-1132 大阪府枚方市招提田近 1-9 Tel: 072-855-2231, E-mail: khara@hmc.hosokawa.com

した物性を持つ。両者の組成比や分子量の違いでガラス転移点や生体内分解速度が異なるため, 目的とする製剤設計に応じた基材を選択することにより薬物の放出速度を任意に設定できる。また, 生体内では, 投与初期 (ガラス状態) は非酵素的に, 後期 (ラバー状態) は酵素的に分解され²⁾, 最終的に水と二酸化炭素となって体外に排泄されるため安全である。FDA にも認可されており, 使用実績も多い。この特徴を利用した実用例に LHRH 誘導体を封入した直径約 20 μm の PLGA 粒子製剤 (リュープリン®) がある。本製剤によって, 1ヶ月または3ヶ月に1回の皮下投与の長期徐放システムが可能となり, 患者の QOL が向上し, 前立腺がんなどホルモン依存性疾患の治療に大きく貢献している。

また, PLGA はリポソームやエマルションといった他の薬物キャリア素材と異なり, 保形性を有する Rigid な固体高分子材料であるため, 固形製剤とし

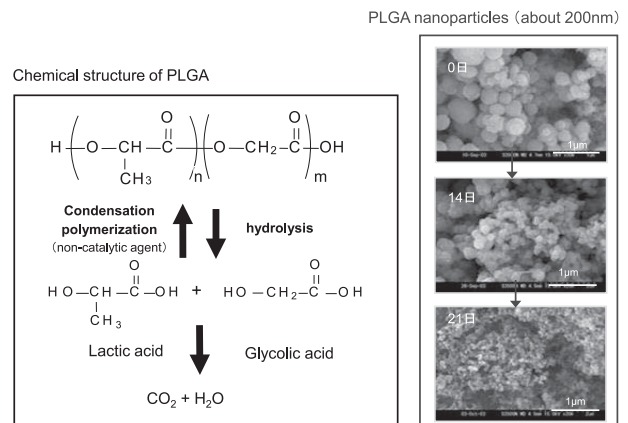


Fig. 1. Chemical structure of PLGA: poly (lactic-co-glycolic acid) and degradation behavior in the PBS solution.

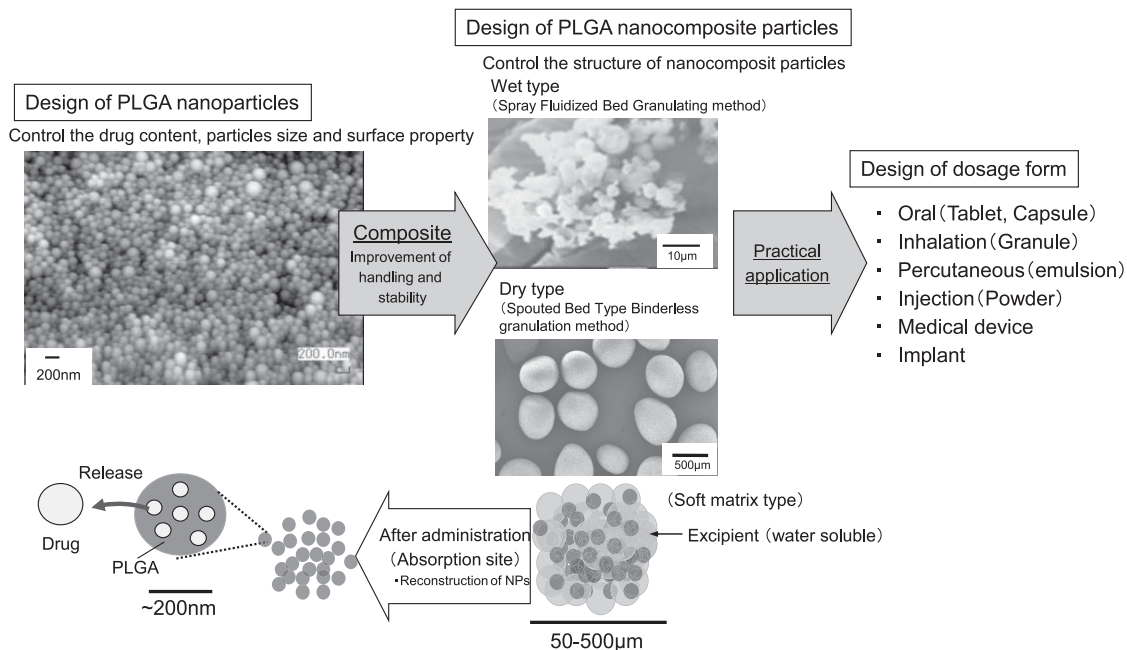


Fig. 2. PLGA nanoparticles design for practical application.

て取り扱え、用時調製粉末（注射）のほか、顆粒（吸入）、錠（経口）やエマルション（経皮）など、幅広い剤形へと適用可能である。

さらに特徴的なことは、その粒子サイズがナノオーダーである点である。従来のミクロン粒子に比べ、ナノ化されることで比表面積が急増し、生体との相互作用が顕著になり、粘膜層内への滞留・附着性が増す。そのため、吸収部位での薬物濃度が上がり、上述した徐放効果も加わって薬物の吸収性向上と薬効の持続性が見出されている。また、エンドサイトーシスにより細胞内に導入されやすく、細胞内へのターゲティングが強く求められる核酸、siRNA、アンチセンスなどの遺伝子キャリアとしても期待される³⁾。

3. PLGA ナノ粒子の調製法と量産技術

PLGA ナノ粒子は、川島らが考案した水中エマルション溶媒拡散法にて調製している。具体的には、PLGA と薬物を水混和性の有機溶媒へ溶解させておき、これを PLGA の貧溶媒となる水溶液中に滴下する際、エマルション界面での自己乳化作用により擬似的なエマルション滴が形成され、さらに、両溶媒の相互拡散によりエマルション滴内で PLGA と薬物を共沈させマトリックス化する方法である。本法は、溶媒の選択により疎水性から水溶性の薬物も適用で

き、また、機械的な高せん断力を必要としないため、遺伝子、ペプチドやタンパクなども分解することなく封入できる。また、粒子表面を修飾すると、新しい機能性を賦与することもできる。現在では、数 10 mL のラボスケールから数 100 L の生産スケールまでの量産化技術、さらには粒子径を約 150 nm 程度に制御⁴⁾することで、加圧ろ過滅菌（無菌対応）可能な GMP 生産法を構築した。

4. PLGA ナノ粒子実用化のための複合化技術

PLGA ナノ粒子の実用化には、熱や水分の影響を受けやすく、またナノサイズであるがゆえに附着凝集性が強く、ハンドリング性が乏しいなどの PLGA ナノ粒子特有の短所を補うための製剤設計が必須となる。これらの課題に対し、筆者らは、例えば水溶性の糖アルコールや乳糖などのマトリックス内に PLGA ナノ粒子を分散するような機械的粒子複合化技術（凍結乾燥法、噴霧乾燥式流動層造粒法、圧縮・せん断法、噴流層型バインドレス造粒法）を開発してきた (Fig. 2)。複合化により、保存安定性が改善されるとともに、見かけ上マイクロ粒子としてふるまうのでハンドリング性も大幅に改善され、さらなる製剤加工処理を施せば、さまざまな投与剤形（例えば、粉末吸入製剤や、腸溶性コーティング錠）へ応用が可能となる。得られた製剤は、用時調製、な

いし投与後に体内で吸水すると、マトリックス部が即溶し、PLGA ナノ粒子が再構築され本来の機能を発現できる。

5. PLGA ナノ粒子のナノメディシンへの 応用展開例

NEDO のプロジェクトをきっかけに、Table 1 に示すようにさまざまな疾患に対する PLGA ナノ粒子の機能性が確認され、その一部は基礎研究から臨床応用へと進んでいる。

5.1 経肺投与製剤への応用

自発呼吸下にあるビーグル犬へインスリン封入 PLGA 粒子を経肺全身循環ルートで投与した筆者らの経験では、インスリンが肺から血中へ吸収され、皮下投与に比べ、約 3.5 倍の血糖降下持続作用を確認した (Table 1-④)。また、肺局所 (肺動脈) を標的としたモノクローリン誘導肺高血圧症ラットモデルに核酸 (NFκB デコイオリゴ) 封入 PLGA ナノ粒子の例では、NFκB の活性抑制に伴う肺動脈の血圧の低下が認められ、未投与群に比べ有意に生存率の延長が見られた (Table 1-⑥)。これらの薬理効果は PLGA ナノ粒子により封入薬物の細胞への取り込み量が向上したこと、粒子の肺粘膜層内への滞留時間の延長に伴い局所で高い薬物濃度勾配が維持され薬物の吸収率が向上したこと、さらには生体内酵素による薬物分解が抑制されたなど、前記した PLGA ナノ粒子の特徴に起因すると考えられた。また、これに関連して最近では、ラットにおいて FITC 結合 PLGA ナノ粒子を吸入させ FITC を免疫組織化学染色したところ、一部の粒子は投与 5 分で 1 型肺胞上皮細胞に取り込まれ、30 分後あたりから腎臓で検出された。一方、電子顕微鏡を用いた微細形態学的評価では、70 nm 前後の粒子は肺胞上皮細胞に取り込まれるのに対し、数 100 nm の粒子は肺胞マクロファージに優先的に貪食されることが確認されており、経肺投与後の PLGA ナノ粒子自体の動態も少しずつではあるが明らかになりつつある。

5.2 注射製剤への応用

ピタバスタチン封入 PLGA ナノ粒子のマウス下肢虚血モデルへの局所投与 (筋注) の例では、ナノ粒子化により血管新生能が格段に向上し、かつ側副血行路が発達して、虚血肢の有意な血流改善効果が確認されている (Table 1-⑨)。このときの投与量は、

ピタバスタチンとして 0.4 mg/kg であり、経口 (連日) 投与に比べ 300 分の 1 程度であり、臨床応用する場合も、横紋筋融解症などの副作用のリスクを回避でき、低侵襲的な新規アプローチとして期待される。現在、九州大学橋渡し研究支援促進プログラムや、先端医療開発スーパー特区の支援 (江頭ら) によって安全性試験をほぼ完了し、臨床治験に向け GMP に準拠した粒子製造、臨床治験の準備が進められている。

5.3 医療デバイスへの応用

PLGA ナノ粒子は DDS 医薬製剤のほか、「PLGA ナノ粒子積層型バルーンカテーテル」や、「PLGA ナノ粒子積層型ステント」など新規医療デバイスへの応用研究も進んでいる。

バルーンカテーテルは、細長いチューブ (カテーテル) の先端に風船状のバルーンがついた医療機器で、狭窄ないし閉塞した血管 (冠動脈、末梢血管、透析用シャント血管など) 内部で膨らませ血流を確保する治療に用いられる。同様にステントは、網目の筒状の医療機器で、主に冠動脈の狭窄・閉塞部で、内部のバルーンを拡張させることで同時にステントを拡張し、その後留置することで血管を内部から支え続けることができる。いずれも手術で血流が改善されるものの、①血管がゴムのようになってしまいうリコイル現象、②炎症により血管径が細くなってしまいうネガティブ・リモデリング現象、③血管平滑筋細胞の遊走・増殖、などの原因で、30% 前後の割合で血管が再び狭くなり、狭心症、急性心筋梗塞を再発したり、再手術せざるを得ないことが問題とされている。

本開発のコンセプトは、Fig. 3 に示すように狭窄した血管と接触するデバイス表面に、あらかじめ再狭窄を予防するための治療因子を封入した PLGA ナノ粒子を積層することで、デバイス拡張時に炎症細胞へと効率的に送達し、治療効果を発揮させようというものである。

森下ら (阪大医) によって考案された、手術時の急性期の炎症反応抑制効果のある NF-κB デコイオリゴ核酸 (NDON) を封入した PLGA ナノ粒子を積層した PTA バルーンカテーテルのウサギ再狭窄モデルの評価では、病変部への NDON の導入効率は良好で、内膜傷害後に形成される狭窄病変に対する効果は、NDON を含有していない群に比べ、統計学

Table 1. Our DDS researches of PLGA nanoparticles.

Administration	Target region	Action	Particle size	Model drug	Method	Result (Dynamic state of PLGA nanoparticles)	Application	Quote (Research Organizations)
Mouth	Enteric mucosa	Systemic	400 nm	Calcitonin	<i>In vivo</i> (Rat)	Adhesion and uptake into the mucosa	Alternate product of Injection (peptide etc.)	① Pharm. Develop. Technol., 2000, 5, 77-85 (Prof. Kawashima, Aichi Gakuin Univ.)
Mouth	Colon (inflammatory cells)	Local	200 nm	NFκB decoy oligo nucleotides (NDON)	<i>In vivo</i> (Rat)	Effective delivery to the inflammatory cells and continuation of pharmacological effect	Inflammatory bowel disease	② Biomaterials, 2011, 32, 870-878 (Prof. Kawashima, Aichi Gakuin Univ., HMC)
Lung	Alveolar	Systemic	650 nm	Elicatonin	<i>In vivo</i> (Cavy)	Decrease in the level of blood elcatonin	Alternate product of injection (peptide etc.)	③ J. Control. Release, 2005, 102, 373-381 (Prof. Kawashima, Aichi Gakuin Univ.)
			200 nm	Insulin	<i>In vivo</i> (Beagle dog)	Decrease in the level of blood sugar		
Blood vessel (ischemia lesion)	Small pulmonary artery, Alveolar macrophage	Local	200 nm	Pitavastatin NFκB decoy oligo nucleotides (NDON)	<i>In vivo</i> (Rat, monocrotaline-induced PAH)	Improved survival rate	Pulmonary artery hypertension (PAH)	⑤ Hypertension, 2009, 53, 877-883 (Prof. Egashira, Kyushu Univ., HMC)
			200 nm	(Fluorescence: FITC) (GFP plasmid)	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (Pig)	Uptake by human coronary artery smooth muscle cells and gene expression		⑥ Hypertension, 2011, 57, 343-350 (Prof. Egashira, Kyushu Univ., HMC)
Injection	Vascular endothelial cells	Local	200 nm	Pitavastatin	<i>In vivo</i> (Murine)	Enhanced recovery of blood perfusion to the ischemic limb, increased angiogenesis and arteriogenesis	Neovascularization	⑦ Jpn. J. Interv. Cardiol., 2007, 22 (3), 201-210 (Prof. Egashira, Kyushu Univ., HMC)
			200 nm	Pitavastatin	<i>In vivo</i> (Murine)	Enhanced recovery of blood perfusion to the ischemic limb, increased angiogenesis and arteriogenesis		⑧ JACC: Cardiovascular Intervention, 2009, 2 (4), 277-283
Skin	Lung	Systemic	260 nm	None	<i>In vivo</i> (Mouse)	No effect on the cancer (melanoma cells) metastasis	—	⑩ Oncology Reports, 2006, 16, 1215-1220 (Prof. Miwa, Prefectural University of Hiroshima, HMC)
			200 nm	Pro vitamin C Hinokititol	<i>In vitro</i> (Human skin)	Permeability into epidermis and dermis (human skin)		⑪ J. Soc. Powder Technol., 2004, 41 (12), 867-875
<i>Ex vivo</i>	Skin	Local	200 nm	NFκB decoy oligo nucleotides (NDON)	<i>In vivo</i> (Mouse)	Inhibition of delayed type allergic reaction	Transdermal therapeutic system (Atopic dermatitis)	⑫ Bioorgan. Med. Chem. Lett., 2007, 17, 4771-4777 (Prof. Miwa, Prefectural University of Hiroshima, HMC)
			200 nm	Imatinib mesylate	<i>In vivo</i> (Rabbit)	Suppression of neointima formation and cell proliferation		⑬ The First-Asian Symposium on Pharmaceutical Sciences and Technology, 2007, 86-89, July 28-30 (Prof. Morishita, Osaka Univ., HMC)
	Vein graft	Local	200 nm	Imatinib mesylate	<i>In vivo</i> (Rabbit)	Suppression of neointima formation and cell proliferation	Vein graft failure	⑭ Circulation, 2008, 118, 65-70 (Prof. Egashira, Kyushu Univ., HMC)

(HMC: Hosokawa Micron Corporation)

的に有意に再狭窄を抑制することが確認されている。これは、バルーン拡張時剥れた粒子が、炎症細胞内へ直接移行したことに起因すると考えられる。

また、江頭らは、従来技術では担持が困難であった親水性薬剤（遺伝子含む）をも PLGA 粒子へ封入し、これを独自に開発したカチオン電着コーティング法によって複雑形状のステント表面に均一に積層・固定化した、薬剤封入 PLGA 粒子積層型ステントを考案した。本法は、電流や PLGA 粒子の表面電

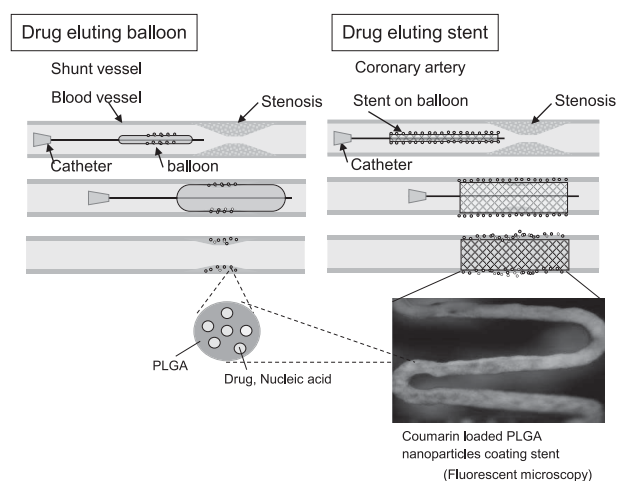


Fig. 3. Application for the medical device of PLGA nanoparticles.

荷の調整によりステント表面の PLGA 粒子層の厚み（薬剤量）を能動的に制御でき、これと併せて PLGA 自体の分子量や組成を変えることによって薬剤の溶出タイミング（濃度&時間）や細胞内での滞留時間の制御が可能である。ブタ冠動脈の留置実験では、内膜と中膜に PLGA 粒子が少なくとも 28 日間滞留することが確認され、抗炎症作用を持つ NDON などの遺伝子やたんぱく質、内皮再生に関わる血管新生因子やスタチン、分子標的薬のイマチニブなど、内膜の再生を阻害せずに平滑筋細胞の増殖を抑制する薬剤への検討が広がっている。ステント留置後に生ずる新生内膜の平滑筋細胞の遊走・増殖は留置後 7~14 日後より始まることが知られており、本ステントは、薬剤を効率よく、かつ持続的に細胞内に送達しうる革新的血管内医療デバイスとなるものと期待されている（Table 1-⑦）。

6. PLGA ナノ粒子の育毛剤・化粧品への応用展開例

PLGA ナノ粒子が粘膜層への浸透だけでなく、皮膚（角質層から真皮層）への封入薬物の浸透性を促進させる特徴は、ヒト摘出皮膚片を用いた三羽ら（県立広島大学）との共同研究で見出された（Fig. 4）。

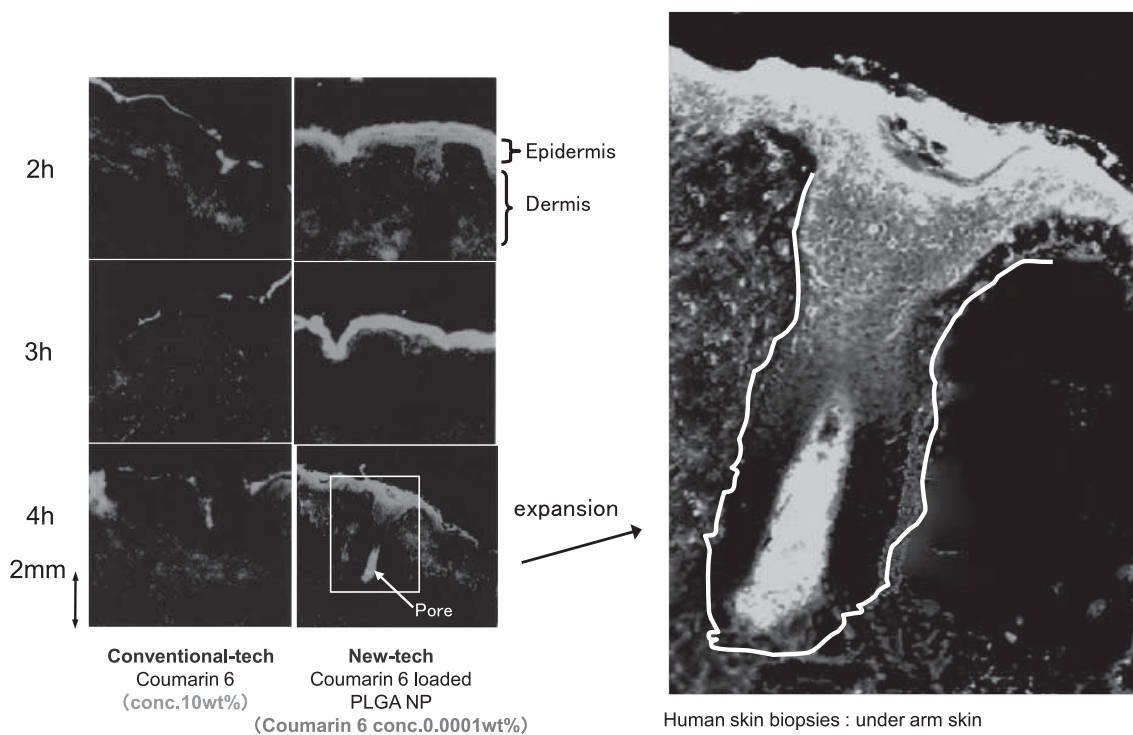


Fig. 4. Permeability examinations of PLGA nanoparticles on human skin by confocal laser scanning fluorescence microscope (Photo and evaluation: Prefectural University of Hiroshima, Prof. Miwa).

例えば、脂溶性ビタミンC誘導体の水分散液(O/Wエマルジョン)に比べ、これを封入したPLGAナノ粒子(200 nm)の水分散液塗布では4時間で累積浸透量は10倍以上高まり、48時間後も真皮内にビタミンCが検出された(O/Wエマルジョンでは7時間程度)(Table 1-⑪)。筆者らは、育毛成分について、その作用部位である毛乳頭・毛母細胞への浸透と持続的作用を目的として、このようなPLGAナノ粒子の経皮DDSキャリアとしての有用性に着目し、新規な『固体分散型(固/液タイプ)』の育毛剤の設計・開発を行った⁵⁾。育毛成分をPLGAナノ粒子に封入し、これをさらに育毛成分を溶解させたローションに分散したものである。毛包のあるヒト臍出頭皮片へのヒノキチオール水分散液とヒノキチオール封入PLGAナノ粒子水分散液投与の比較では、後者は前者に比べ毛包部を中心に2.5~5倍程度強い発光(浸透)が観察され、成分の浸透性促進効果が確認された。関連し、剃毛したC3Hマウスによる育毛検証例では、PLGAナノ粒子配合製剤は市販の育毛剤に比べ、ヘアサイクルの休止期から成長期への移行を促進させることも検証された(Table 1-⑫)。

本研究成果を基盤とした、商品化開発の折には、PLGAナノ粒子特有の付着・凝集性のため流動性やハンドリング性を改善し、また低ガラス転移点(45°C程度)や加水分解に起因する粒子加工や保管・流通時の熱、水による品質低下を回避しうる製法が求められた。これらに対し、賦形剤中にPLGAナノ粒子が分散相として構造制御されたPLGAナノ複合粒子を設計し、その最適化を進めることで、熱安定性に優れ、育毛ローション(液)と混合すると、その中で賦形剤のみが即溶しPLGAナノ粒子が再分散(構築)し、ナノ粒子分散ローションが形成された。工業化検討を経て2006年には、本PLGAナノコンポジット粒子の量産専用工場を立上げ、自社育毛剤の量産・実用化に成功している。さらには他社ブラ

ンドの育毛剤・化粧品の製造販売も手がけている。

7. おわりに

PLGAナノ粒子と出会ってから約9年が過ぎようとしている。NEDOの研究成果を基盤としてPLGAナノ粒子の機能化、製剤設計など、基礎研究から実用化(商品化)までの一連の研究開発に携わることができ、本稿はその一端を紹介した。今後さらに知見を重ね、本技術を大切に育て、多様な製剤ニーズに対応した製剤開発を基に、社会に貢献していきたい。

本研究開発は、愛知学院大学 川島先生、山本先生、岐阜薬科大学 竹内先生、田原先生と、著者および著者の所属研究センターの辻本センター長、塚田主任研究員らとの産学共同を特徴とした成果です。多くの関係者にご指導やご協力頂きましたことを、本紙面をお借りして深謝申し上げます。

引用文献

- 1) Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino, T. Niwa, Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion diffusion methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 41-48 (1998).
- 2) S. J. Holland, B. J. Tighephilip, L. Gould, Polymers for biodegradable medical devices. I. The potential of polyesters as controlled macromolecular release system, *J. Control. Release*, **4**, 155-180 (1986).
- 3) K. Tahara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, Cellular uptake mechanisms and intracellular distributions of polysorbate 80-modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for gene delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **75** (2), 218-224 (2010).
- 4) Y. Tsukada, K. Hara, Y. Bando, C.C. Huang, Y. Kousaka, Y. Kawashima, R. Morishita, H. Tsujimoto, Particle size control of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications, *Int. J. Pharm.*, **370**, 196-201 (2009).
- 5) <http://www.nanoimpact.jp/>