

PLGA ナノ粒子の生体吸収性 DDS シートへの応用 Application of PLGA Nanoparticles for Bioabsorbable DDS Sheet Preparation

塚田 雄亮^a, 笹井 愛子^a, 辻本 広行^b, 海堀 昌樹^c, 山本 浩充^d

Yusuke TSUKADA, Aiko SASAI, Hiroyuki TSUJIMOTO, Masaki KAIBORI, Hiromitsu YAMAMOTO

^a ホソカワミクロン株式会社 マテリアル事業部 製薬・美容科学研究センター

Pharmaceutical and Beauty Science Research Center, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation

^b ホソカワミクロン株式会社 執行役員 マテリアル事業部 事業部長

Division Director, Material Business Division, Operating Officer, Hosokawa Micron Corporation

^c 関西医科大学 外科学講座 准教授

Associate Professor, Department of Surgery, Kansai Medical University

^d 愛知学院大学 薬学部 製剤学講座 教授

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

Abstract

We have been developing biocompatible and biodegradable Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide Acid) (PLGA) nanoparticles loaded with bioactive substance to create new functional medical system. The usefulness of PLGA nanoparticles as carriers for drug delivery system has ever been demonstrated in many cases. Focusing on one of the latest our developments, this technical note introduces the bioabsorbable medical sheet prepared utilizing PLGA nanoparticles.

1. はじめに

ナノ微粒子の DDS (Drug Delivery System: 薬物送達システム) 研究が盛んに行われて久しい。両親媒性分子の会合膜により安定化された液滴粒子のリボソーム (リン脂質の二重膜) を利用した製剤をはじめ、各種のユニークなナノ DDS 製剤が誕生している。標的部位 (腫瘍組織等) への選択的な薬物送達により副作用を低減しつつ有効性を高める等、それらの優れた治療効果による医療貢献は計り知れない。本分野の活発な研究や、革新的医薬品の国内開発の迅速活性化の流れから、今後ともナノ DDS が医療に果たす役割はますます高まることが期待される。

こうした趨勢の中、当社では生体適合性・吸収性で安全性の高い乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA: Poly-Lactide-co-Glycolide Acid) を基剤とするナノ粒子を用いた DDS 研究を精力的に進めてきた¹⁾。

PLGA ナノ粒子による封入薬物の吸収性改善と、徐放性を備えた医薬製剤や医療デバイスの開発が可能となっており、その中の幾つかは既に臨床試験が進められている。さらに、当社では PLGA ナノ粒子が薬物皮膚浸透性の増強作用を持つことをいち早く見出し、PLGA ナノ粒子を使った機能性化粧品や浸透型育毛剤を世界で初めて商品化した。

DDS 製剤ではこれまで、粉末吸入製剤²⁻⁸⁾ や腸溶性経口製剤 (錠剤、カプセル剤)⁹⁾、経鼻製剤、経皮製剤 (軟膏、クリーム、ゲル等)¹⁰⁻¹³⁾、注射製剤¹⁴⁾、血管内治療デバイス (ステント、バルーンカテーテル)^{15, 16)} 等の種々の投与経路・剤形で全身性及び局所作用を狙った開発において、PLGA ナノ粒子の広範で特異な有用性が示されている。本報では新たな試みとして、生体のあらゆる組織、臓器に直接貼付して、患部局所への高効率な薬物送達または全身作用を高め得る、安全性の高い生体吸収性 DDS シートの基本技

新素材を臨床応用するには用途に特異な機能性が要求されるのはもちろんのこと、高い安全性が問われる。その点 PLGA は、生体内で加水分解されて構成モノマーであり生体構成・医食成分でもある乳酸とグリコール酸に戻り、TCA 回路 (Tricarboxylic Acid Cycle) を経て水と二酸化炭素へと分解され、体外へ排泄される安全性の高い材料である。実績の点では、前立腺・乳がん用長期徐放性の皮下注射製剤 (リュープリン® 1989 年上市、武田薬品工業¹⁷⁾) のマイクロ

本製剤は PLGA の加水分解に伴い、徐々に封入成分を放出する事で、従来の製剤では毎日腹部注射を余儀なくされていたが、本製剤は、1, 3, または 6 か月に 1 回の皮下注射に代替して患者 QOL (Quality of Life) を飛躍的に高めた。

PLGA がナノ粒子化されると、比表面積の急増により生体膜や粘膜層への滞留性・付着性が増強され、浸透性も増しつつ徐放性が発揮されるため薬物の吸収性が格段に高まる。また細胞（数～数十 μm ）が外物質を取り込むエンドサイトーシスを受ける事ができ、細胞内デリバリーが可能となるため、次世代薬として期待される核酸医薬のキャリアとして応用できるようになる。



Fig. 1 The principle of Emulsion Solvent Diffusion method for preparing PLGA nanoparticles

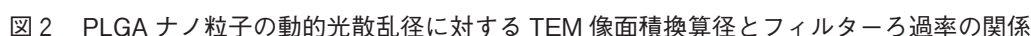


Fig. 2 TEM observation diameter and pressure filtration (0.2 μm) fraction as a function of light scattering diameter of PLGA nanosphere and their TEM images.

Light scattering diameter was (a) 102 nm, (b) 131 nm, (c) 163 nm, (d) 182 nm, and (e) 229 nm respectively.

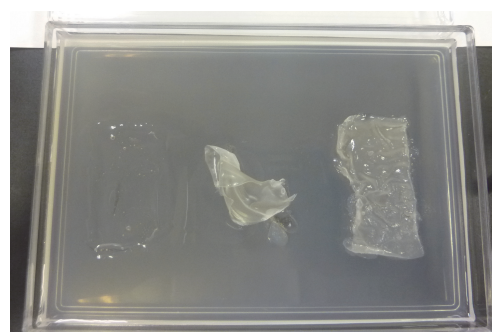
このコア技術は、1980年代当時の岐阜薬科大薬学部・川嶋研究室にてオリジナルに考案・開発が進められた微粒子調製システムの一翼を成す「水中エマルション溶媒拡散法」である¹⁸⁾。本法の原理は、水混和性有機溶媒の水への急速拡散時に発生するマランゴニ効果（自己乳化作用）による、自発的な微細エマルション滴の生成にある（図1）。本原理は、他法によるナノ微粒子形成に要する機械的エネルギー（超高压乳化、高速ホモジナイズ攪拌、超音波）を用いることなく、比較的穏やかな通常の混合攪拌を利用できる、熱やせん断力等で変性・分解・失活しやすい薬物の封入化に利点を持つ。これまでの商業量産化の過程において、粒子径制御やスケールアップに関する因子の詳細な理解も進んでいる¹⁹⁾。例えば、溶媒中のPLGA濃度の三乗根に対して粒子径は正比例の関係にあり、このことからエマルション滴中でPLGA分子がある一定の密度で集合体を形成し固化していると推測される。このような知見（図2）を活用した『ろ過滅菌（0.2 μ mメンブレンフィルター通過）対応型GMP量産システム』を当社が考案・構築し、治験用の無菌製剤粒子を供給してきた。

3. 生体吸収性 DDS シートへの応用

生体組織または臓器に直接貼付して治療を図るシート状の医療用製品が、長年臨床で使用されている。古くはコラーゲンやアルギン酸等の天然高分子や生体吸収性の合成ポリグリコール酸を支持体とした手術時の組織縫合補強材に始まり、近年ではiPS細胞等の再生医療分野における足場材料としても応用され、大阪大学医学部（澤教授ら）による小児重症心不全に対する心筋シート治療等が昨年行われる等、注目を集めている。

当社では、このような生体組織貼付シートを用いて患部にピンポイントで薬物デリバリーを果たす、生体

吸収性の『PLGA ナノ粒子分散型 DDS シート』を技術開発した（図3）。本シートは基剤自体が生体吸収性で体内残存性もなく、臨床利用されている安全な材料で調製されている。本シートは、生体組織表面の水分を吸水して素早く組織に貼りく。基剤の溶解に伴い放出されるPLGA ナノ粒子が、貼付した組織内部に浸透し、患部で薬物を徐放する。この時、ナノ粒子を含有する溶解したシート基剤が貼付部位から流れ落ちたり、別の組織に貼り付いたりしないよう、貼付側の反対面は基剤をゲル架橋して難溶化しつつシート構造強度を高めた二層構造体としている。生体組織を模擬した寒天培地上へのシート貼付試験結果を図4に示す。シート片面をゲル架橋しない一層構造（可溶化タイプ）では、貼付短時間（5分）でシート全体が溶解し、培地を傾斜させると溶解液は培地表面を流れ落ちたが、片面ゲル架橋シート（片面不溶化シート）では貼付数時間後もシート形状が維持され、培地傾斜に伴



(左) 可溶化タイプ：貼付短時間（5分）で溶解
(中) 両面不溶化タイプ：貼付性不良、シート形状変形
(右) 片面不溶化タイプ：貼付性良好

図4 DDS シートの貼付性に及ぼすシート構造の影響
Fig. 4 The effect of sheet structure on adhesiveness of DDS sheet to the agar medium

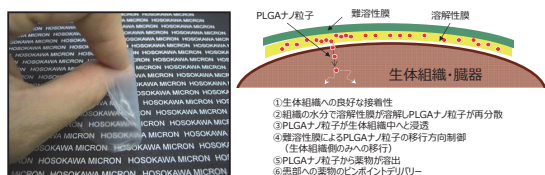


図3 PLGA ナノ粒子を分散配合した生体組織貼付用 DDS シート

Fig. 3 Bioabsorbable DDS sheet preparation containing PLGA nanoparticles

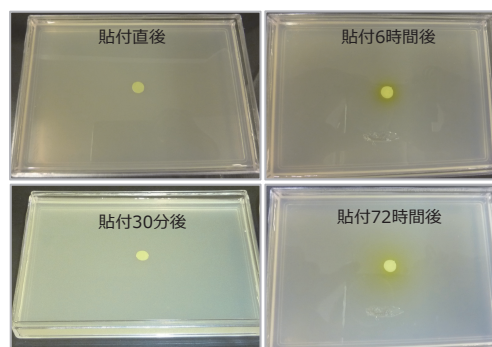


図5 DDS シートからの薬物浸透性評価
Fig. 5 Evaluation of drug permeability into agar medium from DDS sheet

うシート離れも見られなかった。これに対して両面ゲル架橋を施したシートでは培地への貼付性が著しく損なわれ、吸水に伴い大きく変形した。また、片面架橋シートの貼付状態は別の in vivo 試験で数日レベル継続することを確認している (data not shown)。このようなシート中に蛍光マーカー FITC を封入した PLGA ナノ粒子を分散させ、同じく寒天培地へ貼付すると、6 時間後には培地中に FITC が拡散し始め、時間と共に広がっていく事が目視で観察された (図 5)。本シート技術の有用性を示すため、著者らの共同研究において、抗がん剤封入 PLGA ナノ粒子分散型シートによるヒト腫瘍移植マウスモデルの有意な生存率改善効果を検証している (表 1)。抗がん剤単体溶液の腹腔内投与群 (抗がん剤として $50\text{ }\mu\text{g}$ 、以下括弧内は各投与群の抗がん剤投与量を示す) 及び抗がん剤単体含有シートの腫瘍部位直接貼付群 ($9\text{ }\mu\text{g}$) ではコントロール群 (生理食塩水の腹腔内投与) に対して有意な生存率改善効果が見られなかったのに対し、抗がん剤

単体含有シート ($27\text{ }\mu\text{g}$) 及び抗がん剤封入 PLGA ナノ粒子含有シート ($8\text{ }\mu\text{g}$) では有意な生存率改善効果を示した。また、蛍光マーカー (クマリン -6) を用いた同マウス肝臓凍結切片 (投与 24 時間後) の蛍光顕微鏡観察を実施したところ (図 6)、クマリン -6 封入 PLGA ナノ粒子を単純に水懸濁液として腹腔内投与するのに比べ、DDS シート化して直接貼付する事で、クマリン -6 封入 PLGA ナノ粒子の組織浸透性が顕著に高まっており、本 DDS シート技術の薬物デリバリー増強作用が確認できている。本 DDS シート技術は現在、進行性末期の胆肝がん領域の他、幾つかの薬剤・疾患領域を対象にした研究テーマで検証が進んでおり、今後の臨床応用に向けた開発が進められている。

4. おわりに

PLGA ナノ粒子は、高い安全性と DDS 機能性を兼

表 1 抗がん剤封入 PLGA ナノ粒子分散 DDS シートによる肝がんモデルマウスの生存率改善
Table 1 Improved survival rate in mouse model implanted human hepatoma cells by DDS sheet containing anti-cancer drug loaded PLGA nanoparticles

投与サンプル	抗がん剤投与量	生存率改善効果 ¹⁾
抗がん剤溶液 (腹腔内投与)	$50\text{ }\mu\text{g}$	なし
抗がん剤含有シート貼付	$9\text{ }\mu\text{g}$	なし
抗がん剤含有シート貼付	$27\text{ }\mu\text{g}$	あり (シート化 DDS 効果)
抗がん剤封入 PLGA ナノ粒子分散シート貼付	$8\text{ }\mu\text{g}$	あり (PLGA ナノ粒子 DDS 効果)

1) コントロール (生理食塩水の腹腔内投与群) に対する有意差 ($\alpha < 0.01$) マン・ホイットニー U 検定、投与 60 日 (最大)、抗がん剤溶液 (腹腔内投与群) 及びコントロール群: 各 n13, その他投与群: 各 n12

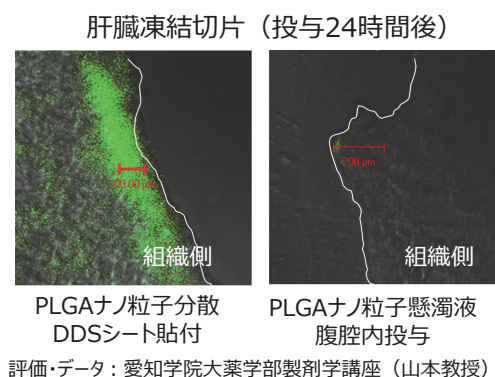


図 6 肝がんモデルマウスに対する PLGA ナノ粒子分散型 DDS シート貼付による蛍光マーカー (クマリン -6) の組織浸透性増強作用

Fig. 6 Enhanced permeability of fluorescent marker Coumarin-6 into targeted liver tissues of mouse model transplanted human hepatoma cells by administered DDS sheet containing PLGA nanoparticles

備し、革新的な医薬製剤や医療デバイスの実現を切り拓く可能性を秘めている。既に化粧品、育毛剤としては実用化されてから十余年にわたり実感値の高い製品として愛顧いただいております、製剤や医療デバイスの臨

床応用も実現してきている。今回紹介した DDS シートを含め、ひとつでも多くの PLGA ナノ粒子技術に応用した DDS 関連製品の開発・実用化を通じて社会貢献を果たしたい。

参考文献

- 1) 辻本広行, 川島嘉明 “医工薬／産官学連携の研究体制を特徴とする PLGA ナノスフェアシステムのプラットフォームとナノメディカルシステムへの展開および実用化” 製剤機械技術学会誌, 20 (4), 5-14 (2011)
- 2) H. Yamamoto, W. Hoshina, H. Kurashima, H. Takeuchi, Y. Kawashima, T. Yokoyama and H. Tsujimoto, “Engineering of poly (dl -lactic- co -glycolic acid) nanocomposite particles for dry powder inhalation dosage forms of insulin with the spray-fluidized bed granulating system”, *Advanced Powder Technology*, 18(2), 215-228 (2007)
- 3) 山本浩充, 倉嶋誉, 片桐大介, 楊明世, 竹内洋文, 川島嘉明, 横山豊和, 辻本広行, “粒子複合化装置メカノフュージョンを用いた粉末吸入インスリン製剤用ポリ乳酸グリコール酸 PLGA ナノコンポジット粒子の設計”, *薬剤学*, 64, 245-253 (2004)
- 4) 辻本広行, 原香織, 塚田雄亮, 川島嘉明, 羽多野重信, “噴流層型バイングレス造粒法を用いた粉体吸入製剤用 PLGA ナノコンポジット粒子の調製”, *粉体工学会誌*, 44 (6), 459-464 (2007)
- 5) 山本浩充, 保科亘, 倉嶋誉, 竹内洋文, 川島嘉明, 横山豊和, 辻本広行, “噴霧乾燥式流動層造粒装置による粉末吸入インスリン PLGA ナノコンポジット粒子の設計”, *粉体工学会誌*, 41, 514-521 (2004)
- 6) 辻本広行, 原香織, 川島嘉明, “インスリン封入 PLGA ナノコンポジット製剤のビーグル犬への経肺投与による血中グルコース濃度の評価”, *粉体工学会誌*, 42 (11), 765-772 (2005)
- 7) K. Hara, H. Tsujimoto, C. C. Huang, Y. Kawashima and M. Tsutsumi “Histological Examination of PLGA Nanospheres for Intratracheal Drug Administration”, *Int J Pharm*, 356 (1-2), 267-73 (2008)
- 8) K. Hara, H. Tsujimoto, C. C. Huang, Y. Kawashima, R. Ando, O. Kusuoka, K. Tamura and M. Tsutsumi, “Ultrastructural and Immunohistochemical Studies on Uptake and Distribution of FITC-Conjugated PLGA Nanoparticles Administered Intratracheally in Rats”, *J Toxicol Pathol.*, 25, 19-26, 2012
- 9) 塚田雄亮, 辻本広行, 渡辺元, 杉本敬之, 中野修身, 牧野寛史, 山本浩充, 森下竜一 “PLGA ナノ粒子を用いた核酸医薬の経口 DDS 製剤化技術の開発” *粉体工学会誌*, 50 (7), 513-518 (2013)
- 10) 辻本広行, 原香織, C.C. Huang, 横山豊和, 山本浩充, 竹内洋文, 川島嘉明, 赤木訓香, 三羽信比古, 球形晶析法で調製した乳酸・グリコール酸共重合体ナノスフェア (PLGA NS) の経皮浸透性評価, *粉体工学会誌*, 41 (12), 867-875 (2004)
- 11) H. Tsujimoto, K. Hara, Y. Tsukada, C. C. Huang, Y. Kawashima, M. Arakaki, H. Okayasu, H. Mimura and N. Miwa, ; “Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects”, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17, 4771-4777 (2007)
- 12) 塚田雄亮, 笹井愛子, 辻本広行, 山本浩充, 川島嘉明, 三羽信比古; “PLGA ナノスフェアの化粧品への応用”, *COSMETIC STAGE*, 7 (4), 42-50 (2013)
- 13) 辻本広行, “PLGA ナノ粒子配合の機能性化粧品, 頭皮料の開発”, *薬剤学*, 67 (6), 385-391 (2007)
- 14) M. Kubo, K. Egashira, T. Inoue, J. Koga, S. Oda, L. Chen, and K. Sunagawa, “Therapeutic neovascularization by nanotechnology-mediated cell-selective delivery of pitavastatin into the vascular endothelium”. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 796-801 (2009)
- 15) K. Nakano, K. Egashira, S. Masuda, K. Funakoshi, G.

- Zhao, S. Kimura, T. Matoba, K. Sueishi, Y. Endo, Y. Kawashima, K. Hara, H. Tsujimoto, R. Tominaga and K. Sunagawa, "Formulation of Nanoparticle-Eluting Stents by a Cationic Electrodeposition Coating Technology", JACC: Cardiovascular Interventions, 2(4), 277-283 (2009)
- 16) 塚田雄亮, 辻本広行, 山本浩充, 川島嘉明, "PLGA ナノ粒子積層型薬物溶出ステントの開発", 化学工業, 2012 年 7 月号, 52-58 (2012)
- 17) Toguchi, H., Y. Ogawa, H. Okada and M. Yamamoto: "Once-a-Month Injectable Microcapsules of Leuporelin Acetate", YAKUGAKU ZASSHI, 111, 397-409 (1991)
- 18) Y. Kawashima, 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", Eurp J Pharm Biopharm, 45, 41-48 (1998)
- 19) Y. Tsukada, K. Hara, Y. Bando, C. C. Huang, Y. Kousaka, Y. Kawashima and H. Tsujimoto, "Particle size control of poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for sterile applications", Int. J. Pharm., 370(1), 196-201 (2009)