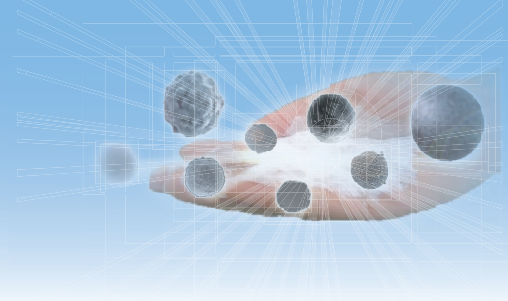




生体適合性 PLGA ナノ粒子の粒子設計技術と DDS 応用事例

Particle Design of Biocompatible PLGA Nanoparticles and its Application for DDS

塚田 雄亮¹, 辻本 広行², 三羽 信比古³, 山本 浩充⁴, 川嶋 嘉明⁵
Yusuke TSUKADA¹, Hiroyuki TSUJIMOTO², Nobuhiko MIWA³,
Hiromitsu YAMAMOTO⁴, Yoshiaki KAWASHIMA⁵

¹ ホソカワミクロン株式会社 マテリアル事業部 研究員

² 同 執行役員, マテリアル事業部 事業部長

³ 県立広島大学 名誉教授

⁴ 愛知学院大学薬学部 教授

⁵ 岐阜薬科大学 名誉教授

¹ Researcher, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

² Operating Officer, Manager, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

³ Emeritus Professor, Prefectural University of Hiroshima, JAPAN

⁴ Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Aichi Gakuin University, JAPAN

⁵ Emeritus Professor, Gifu Pharmaceutical University, JAPAN

抄 録

微粒子を用いる薬物送達システム（DDS: Drug Delivery System）の研究が盛んに行われている。著者らは、生体適合性であり生体吸収性でもある乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA: Poly-Lactide-co-Glycolide Acid）ナノ粒子を薬物キャリアとして用いる医薬品製剤や医療デバイス、機能性化粧品等の研究開発を進めてきた。PLGA ナノ粒子の実用化に際しては、著者らの粉体技術である機械的粒子複合法を適用することによって、それまで PLGA ナノ粒子の実用化に向けた課題であった凝集性やハンドリング性を克服できた。PLGA ナノ粒子は種々の投与ルートで多様な有用性が確認されており、最近では幾つかの製剤や医療デバイスが国内で臨床試験されるに至った。また、封入薬剤の皮膚浸透性ならびに毛包深部への送達性を顕著に高めることも見出し、それらのエビデンスを基に機能性化粧品や育毛剤用の基剤として実用化を果たしてもいる。

ABSTRACT

Various fine particles have been actively researched for Drug Delivery System (DDS) in the recent drug development. We have been developing poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles loaded with bioactive substances for pharmaceutical preparations, medical devices, functional cosmetics and so on. Regarding the practical application, the PLGA nanoparticle's weak points such as vigorous cohesiveness and low handling property have been dramatically improved by utilizing our powder processing technologies for designing composite particles. A lot of usefulness of our developed PLGA nanoparticles has been demonstrated in various administration routes. Clinical trials of preparations and devices using our PLGA nanoparticles have already been launched in Japan. Also we have found out the enhancement of drug's skin permeability by PLGA nanoparticles. Base on the evidences, we have already succeeded in commercialization of functional PLGA nanoparticles for skincare cosmetics and hair growth tonic.

1 はじめに

昨今の創薬では、有望な低分子化合物の発掘が年々困難を極める中、既存低分子薬を水平展開するリポジショニング研究や、新たな薬効メカニズムを有する核酸・ペプチド等の中分子やタンパク質・抗体といった高分子薬を用いる研究、さらには幹細胞を用いる細胞医薬品の開発等が注目を集めている。これらの創薬の実現に向けては、必要な量の薬物を必要な場所に必要時間届ける、薬物送達システム（DDS: Drug Delivery System）の必要性がますます高まっている。中でも微粒子を薬物のキャリアに用いる DDS 研究が盛んに行われている。その代表例としては両親媒性分子の会合により粒子を形成するリポソーム（リン脂質の二重膜からなる小胞）や高分子ミセル、固体粒子のポリマー微粒子などが知られている。著者らは、生体適合性で生体吸収性でもある乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA: Poly-Lactide-co-Glycolide Acid）ナノ粒子を薬物キャリアとして用いる医薬品製剤や医療デバイス、機能性化粧品等の研究開発を進めてきた¹⁾。すでに幾つかの製剤や医療デバイスで臨床試験が行われており、化粧品分野では 2004 年に著者らが実用化して以来、種々の機能性化粧品や育毛剤を市場投入し続けている。本稿では、著者らの PLGA ナノ粒子技術の概要と共に、これまでの DDS 研究事例を紹介したい。

2 PLGA ナノ粒子の特徴および粒子設計

微粒子を医薬品として応用するには機能性発現だけでなく相応の安全性が必須である。その点、PLGA は乳酸とグリコール酸の共重合体であり、生体内では構成モノマーまで加水分解を受け、最終的に TCA 回路（Tri-Carboxylic Acid Cycle）で水と二酸化炭素に代謝される安全素材であり、生体吸収性素材として DDS 用途で長年にわたり幅広く研究されてきた。実用製品の成功例では、前立腺・乳がん用徐放性のマイクロカプセル（20~30 μm ）皮下注射製剤（リュープリン[®]、1989 年上市、武田薬品工業）²⁾ が著名である。本製剤の登場により、それまでの連日の静脈内投与が 1, 3, 6 ヶ月に 1 回の皮下投与へと変わり、患者の QOL（Quality of Life）が著しく改善された。このような薬物徐放は、PLGA の加水

分解に伴う段階的な粒子崩壊に伴って薬物が放出される機構にある。加水分解速度は PLGA の分子量やモノマー比によって異なり、薬物の放出期間の調節が可能である。

このような徐放性の PLGA 微粒子をサブミクロン程度まで微細化すると、比表面積の急増と体積減少によってその生体内挙動は大きく変化する。生体膜や粘膜層への滞留性や付着性、浸透性が高まり、封入している薬物の生体内吸収性が格段に向上する。また、細胞に取り込まれるようになり、核酸の細胞内輸送キャリアとしても応用できる。

このような PLGA ナノ粒子の調製法は幾つか提案されているが、著者らは「エマルション溶媒拡散法（ESD 法: Emulsion Solvent Diffusion method³⁾）を用いている（図 1）。ESD 法では溶媒の相互拡散で生じる自己乳化を基本原理とする点がユニークである。本法では必要となる強い外的エネルギー（超音波、高圧乳化、機械的せん断力等）は不要で、物理的安定性の低い核酸やペプチド等を封入したナノ粒子の調製に適している。

一般的にナノ粒子は凝集性や付着性が強い。特に低ガラス転移点の PLGA（例えば分子量 2 万、乳酸：グリコール酸モル比=3：1 であれば約 45℃）では、二次加工時や保管時の熱履歴の影響を受け粒子同士が融着・固化しやすく、いったんそのような状態になると再分散は非常に困難になるため作用点で DDS 機能が発揮されなくなる点が実用上の課題であった。本課題に対しては、著者らの粉体技術である機械的粒子複合法⁴⁻⁶⁾等を適用し克服できた。その一例では、マンニトール等の水溶性賦形剤のマトリックスに PLGA ナノ粒子を分散させたマイクロサイズ（数十~数百マイクロメートル）の複合粒子を作製することで、PLGA ナノ粒子同士の接触と融着を防ぐものである（図 2）。本製剤は生体中の水分でマトリックスが即溶し PLGA ナノ粒子が再分散することで本来の機能を発現する。また、本複合粒子はハンドリング性も良く、固形製剤化技術を適用できるため、錠剤やカプセル剤、粉末吸入製剤等、幅広い投与剤形へ加工できる点も特徴である。

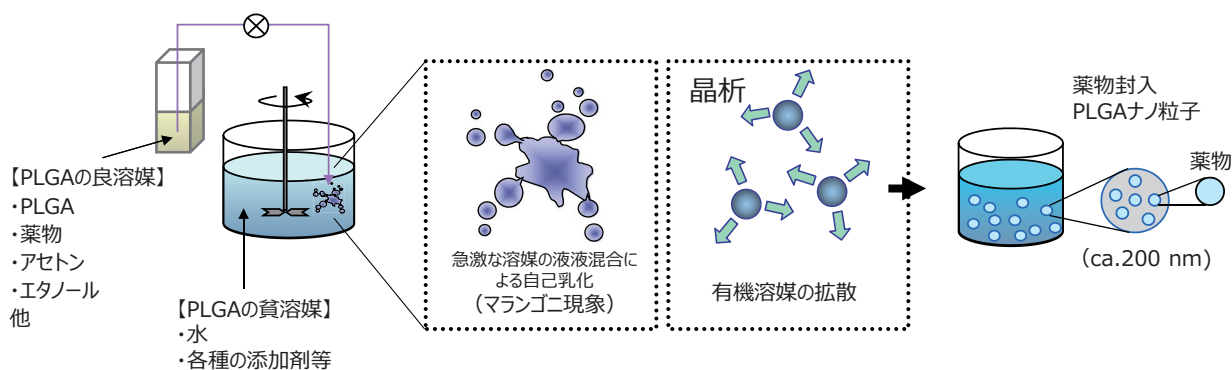


図1 エマルジョン溶媒拡散法 (ESD 法) による PLGA ナノ粒子の調製

Fig. 1 Preparation of PLGA nanoparticles by Emulsion Solvent Diffusion method.

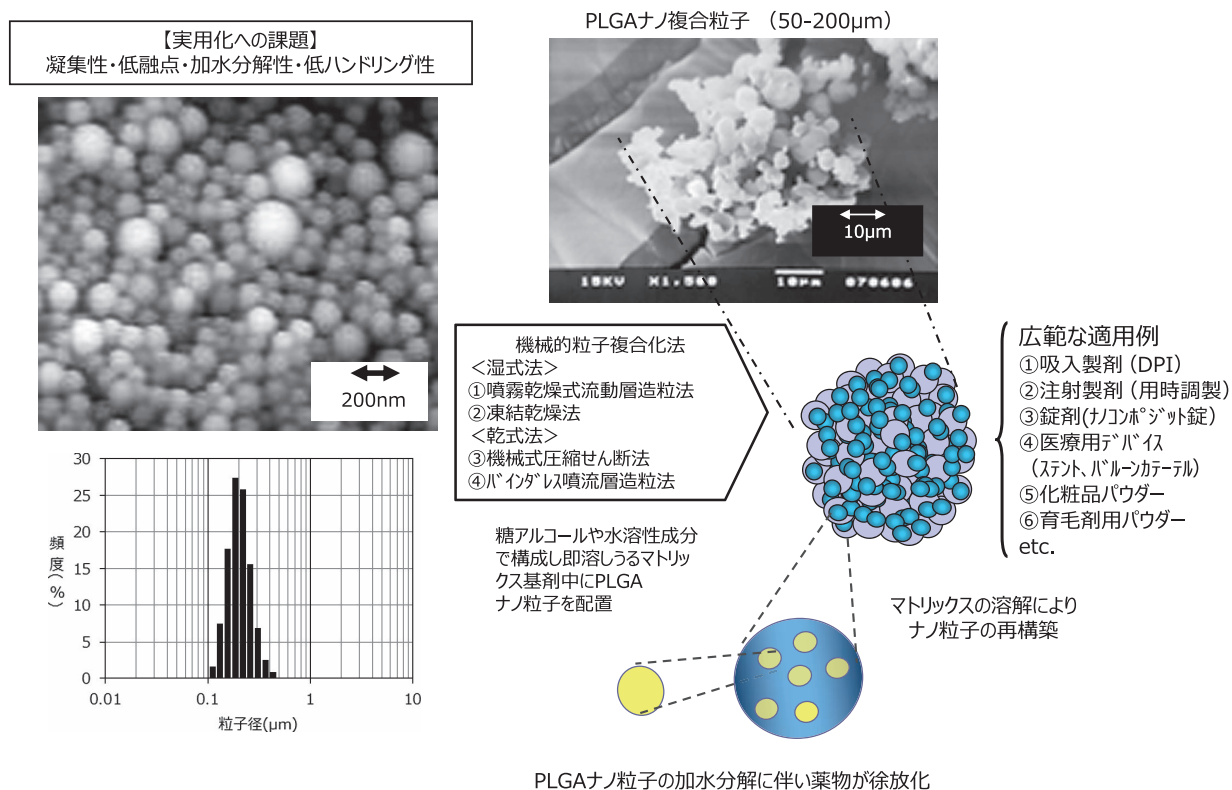


図2 粉体技術 (機械的粒子複合法) による PLGA ナノ粒子の技術課題の解決と適用拡大

Fig. 2 Overcoming the weak points and diversified applications of PLGA nanoparticles by powder processing technologies.

3 DDS 製剤・医療デバイスへの応用事例

PLGA ナノ粒子はこれまで種々の投与ルートで多様な有用性が報告されてきた (表1)。著者らは NEDO 事業 (2001~2004 年) において、糖尿病治療薬であるインスリンの皮下注射法に替わる低侵襲性の粉末吸入製剤技術を開発した⁴⁻⁷⁾。前述の機械的粒子複合法で作製するコンポジット粒子は流動性が良く吸入カプセルへの充填性に優れるだけでな

く、吸入デバイス内で肺深部へと効率よく到達可能な空気力学的径 (7 μm 以下) まで分散する。ここで発生した微粒子が肺内に沈着すると、肺内の水分を吸水して水溶性賦形剤が溶解することで PLGA ナノ粒子が再分散してインスリンを即効且つ持続的に全身作用させる。実際にインスリン封入 PLGA ナノ複合粒子製剤をラットやビーグル犬へ経肺投与した実験では、即効的に血糖値を低下させた後、その血糖値レベルをインスリン溶液の経肺・静脈・皮下投

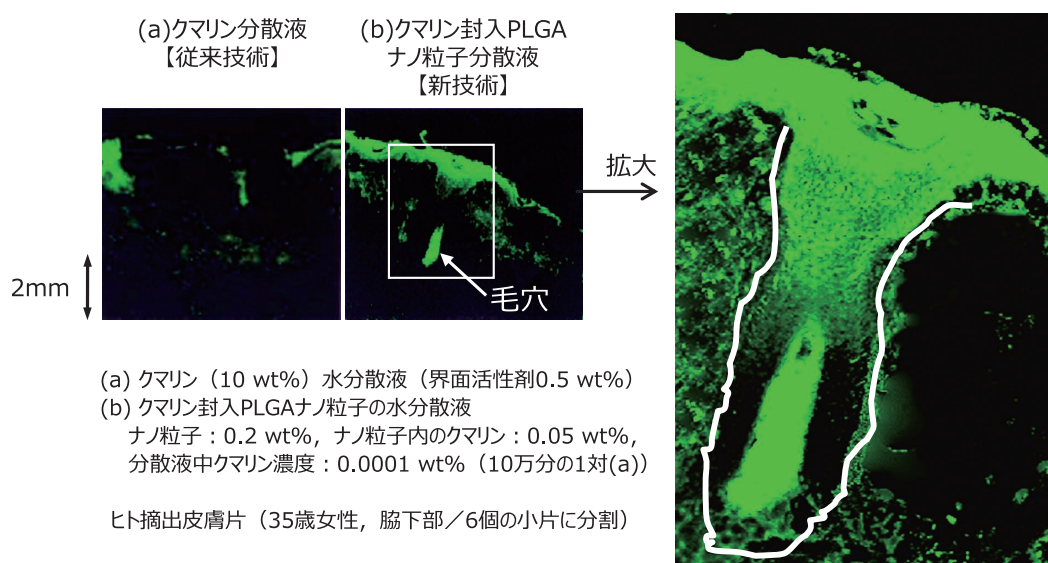
表 1 PLGA ナノ粒子の DDS 研究例
Table 1 Past R&D achievement of PLGA nanoparticles

投与部位	標的部位	作用	薬物	評価方法	結果	応用分野	引用
眼	結膜 内皮細胞	局所	クマリン	In vitro	培養ラット眼瞼結膜内皮細胞に貪食	結膜疾患	Pharm Res. 2004, 21(4): 641-8 (Qaddoumi MG et al.)
鼻	鼻粘膜	局所	GFP プラスミド	In vivo (マウス)	鼻粘膜に遺伝子発現	鼻粘膜疾患 (アレルギー性 etc.)	J Nanosci Nanotechnol. 2004, 4(8): 990-4 (Kumar MN, et al.)
口	腸管粘膜	全身	カルシトニン カルシトニン	In vivo (ラット) In vivo	腸管粘膜層に付着。粘膜内に侵入 経口投与後数時間以内に腸管上皮を通過	注射製剤 (ペプチド etc) の代替製剤化	Pharm. Develop. Technol., 2000, 5, 77-85 (愛知学院大薬, 川島先生)
口	大腸	局所	Rolipram	In vivo (ラット)	炎症細胞に効率よく集積, 持続的な薬理効果を発揮	炎症性腸疾患	J Control Rel 1990, 13: 233-239 (Dange C, et al.)
口	大腸	局所	NF-κB デコイ核酸	In vivo (マウス)	炎症性スコアを有意に低下	炎症性腸疾患	J Pharmacol Exp Ther. 2001, 299: 775-781 (愛知学院大薬, 川島先生)
肺	肺胞	全身	エルカトニン インスリン	In vivo (モルモット) In vivo (ビーグル犬)	ナノ粒子から放出された薬物により血中カルシトニン濃度が低下 ナノ粒子から放出された薬物により血糖値が低下	注射製剤 (ペプチド etc) の代替製剤化	Biomaterial, 2011, 32, 870-878 (愛知学院大薬, 田原先生)
関節 窩	関節 窩	局所	フルオレセイン A ミン	In vivo (ラット)	炎症性関節滑膜中に移動, 滞留	慢性関節疾患	J Control Release, 2005, 102, 373-381 (愛知学院大, 川島先生)
血管	血管 内皮細胞	局所	FITC GFP プラスミド	In vitro In vivo (ブタ)	ステント留置後冠動脈平滑筋細胞内に貪食	薬物溶出ステント 動脈硬化症 血管再狭窄抑制	J Society of Powder Technology, 2005, 42, 11, 765-772 第 23 回日本 DDS 学会, 2007, 22, 3, 356 (済生会中和病院, 堤先生)
血管	血管 内皮細胞	局所	デキサメタゾン	In vivo (ラット)	炎症性関節滑膜中の移動, 滞留	慢性関節疾患	Pharm Res. 2002, 19(2): 132-9 (Horisawa E et al.)
血管	血管 内皮細胞	局所	NF-κB デコイ核酸	In vivo (ウサギ)	バルーン傷害部の新生内膜形成を抑制	薬物溶出型バルーンカテーテル 再狭窄抑制	Jpn J Interv Cardiol, 2007, 22, 3, 201-210 (九大医, 江頭先生, ホソカワ粉技研)
皮膚	皮膚	局所	ビタミン C 誘導体	In vitro	ヒト臍出皮膚片 (器官培養) の表皮, 真皮まで送達	経皮製剤 (アレルギー性疾患, 鎮痛 etc.)	Circulation. 1996, 94(6): 1441-8 (Guzman LA et al.)
皮膚	皮膚	局所	NF-κB デコイ核酸	In vivo (マウス)	遅延型アレルギー反応を抑制	経皮製剤 (アトピー性皮膚炎)	Circulation: Cardiovascular Interventions 7.6 (2014): 787-796 (阪大医, 森下先生, ホソカワ粉技研)

与群よりも長く維持することで数倍高い AAC (Area Above the Curve: 時間曲線上面積) を示した^{5,7)}。このような PLGA ナノ粒子の経肺投与後の体内動態を調べるラットへの経肺投与実験では、80 nm 程度の粒子では I 型肺胞上皮細胞に取り込まれ基底膜を通過し全身吸収経路(血流)に乗るようになり、数百 nm の粒子では肺胞マクロファージに貪食されやすいことが病理組織学的に検証されている^{8,9)}。

経口投与においても PLGA ナノ粒子の有用性が確認されている。カルシトニンを封入した PLGA ナノ粒子のラットへの経口投与では、血中カルシウム濃度が薬物溶液投与群に比べ有意に減少し、その効果は 12 時間持続する¹⁰⁾。さらに大腸炎モデル(マウス)への経口投与においては、PLGA ナノ粒子が炎症組織に集積しやすいことも見出され、従来困難であった核酸の経口投与による潰瘍性大腸炎への有効性が示された^{11,12)}。本評価では、PLGA ナノ粒子への核酸の封入によって、胃内(強酸)及び腸内(分解酵素)環境下での核酸の分解及び失活を回避して大腸内の標的細胞内へ効率良く核酸を送達することが可能となり、核酸単体の経口投与では全く改善しなかったモデルマウスの炎症性活動指数を有意に改善した。その後の実用化研究において、本核酸封入 PLGA ナノ粒子を配合した腸溶性の錠剤やカプセル剤の量産製剤化技術の基盤を構築できている¹²⁾。

経皮投与に関しては、PLGA ナノ粒子は、薬物の皮膚浸透性を高め、且つその薬効を持続できることが各種の皮膚浸透実験等により実証されている。蛍光マーカー(クマリン)での評価結果(図 3)によると¹³⁾、単純なクマリン分散液(a)に比べ、クマリンを PLGA ナノ粒子に封入して分散液(b)として塗布することにより、毛穴及び皮膚深部へのクマリン浸透量は大幅に増大した。同様に脂溶性ビタミン C 誘導体を用いた場合、一般的な剤型である O/W エマルションと比べると、塗布 4 時間後までの真皮中での還元型ビタミン C の累積量は 10 倍以上高まった(図 4)。この真皮中でのビタミン C の検出は、PLGA ナノ粒子製剤では 48 時間後まで続いたのに対し、エマルション製剤では 7 時間後には消失しており、PLGA ナノ粒子による薬物徐放効果によるものと示唆された¹³⁾。また、育毛成分のヒノキチオールを用いた評価でも、毛穴深部への送達能が単なるアルコール水溶液投与群に比べ数倍高まることを見出されている¹⁴⁾。これらの結果から、PLGA ナノ粒子は封入成分の皮膚浸透性を高め、持続的な薬理効果をもたらす有用な化粧品・育毛剤用基剤であると考えられた。実際に、PLGA ナノ粒子の初の実用化例として機能性化粧品 NanoCryosphere[®] (2004 年)、浸透型育毛剤 NanoImpact[®] (2005 年)へと応用している。



写真・評価: 県立広島大学 細胞死制御工学研究室 (名誉教授 三羽 信比古)

図 3 PLGA ナノ粒子による薬物皮膚浸透性の亢進作用評価
Fig. 3 Enhanced skin permeability of drug by PLGA nanoparticles.

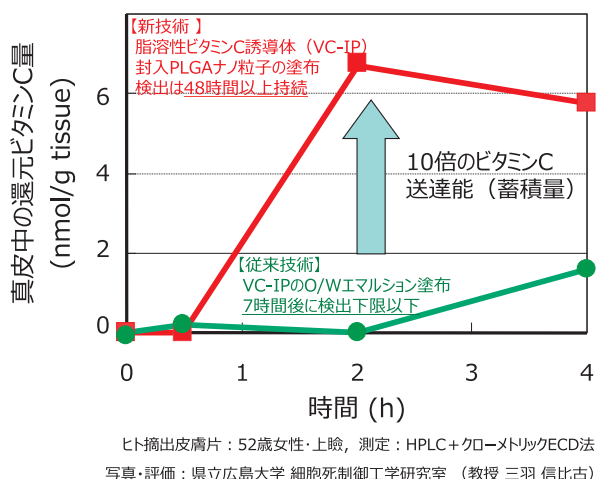


図4 PLGA ナノ粒子による皮膚深部へのビタミンC送達

Fig. 4 Vitamin C delivery into skin by PLGA nanoparticles.

さらには、生体組織に直接貼付できる、PLGA ナノ粒子を含有した生体吸収性の DDS シート技術を開発している (図5)¹⁵⁾。本シートは、素早く生体組織に貼りつき、その後はシート基剤の溶解に伴いシート中の粒子が生体組織に浸透して薬物を徐放する。貼付側の反対面は、シート基剤がゲル架橋しており、構造強度を高めているため、貼付場所から剥がれ落ちることはない。本シート技術の有用性は、ヒト腫瘍移植肝がんマウスモデルを用いて検証された (表2)。ある抗がん剤 (50 μ g) 溶液の腹腔内投与群及び抗がん剤 (9 μ g) 含有シートの腫瘍部貼付群では、生理食塩水の腹腔内投与を行う control 群に対して生存率は改善しなかった。これに対して、抗がん剤 (27 μ g) 含有シート及び抗がん剤 (8 μ g)

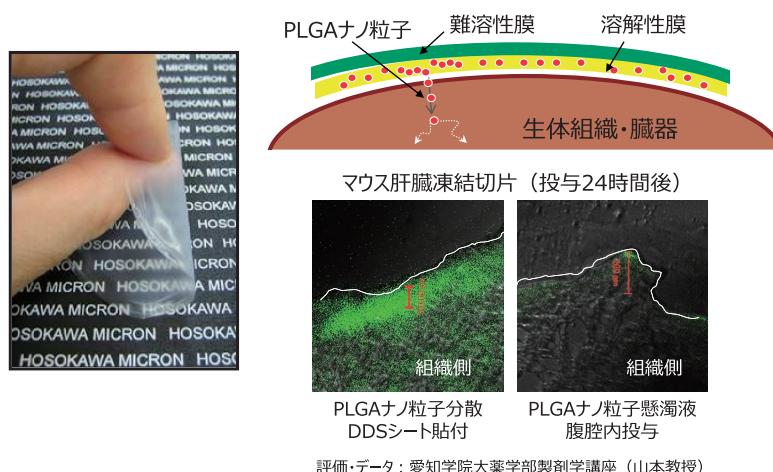


図5 PLGA ナノ粒子含有生体吸収性 DDS シートによる生体組織中への薬物浸透性の亢進作用

Fig. 5 Enhanced permeability of drug into living tissues by bioabsorbable DDS sheet containing PLGA nanoparticles.

表2 抗がん剤封入 PLGA ナノ粒子含有 DDS シート技術による肝がんモデルマウスの生存率改善

Table 2 Improved survival rate in mouse model implanted human hepatoma cells by DDS sheet containing PLGA nanoparticles loaded with anti-cancer drug

投与サンプル	抗がん剤投与量	生存率改善効果 ¹⁾
抗がん剤溶液を肝がん部に腹腔内投与	50 μ g	なし
抗がん剤含有 DDS シートを肝がん部に貼付	9 μ g	なし
抗がん剤含有 DDS シートを肝がん部に貼付	27 μ g	あり (シート化による DDS 効果)
抗がん剤封入 PLGA ナノ粒子含有 DDS シートを肝がん部に貼付	8 μ g	あり (PLGA ナノ粒子化+シート化による 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

封入 PLGA ナノ粒子含有シートでは生存率を有意に改善した。また、クマリンを用いたマウス肝臓組織中への浸透性評価結果では、投与 24 時間後において、クマリン封入 PLGA ナノ粒子懸濁液の腹腔内投与に比べ、シート貼付ではクマリンの組織浸透性を顕著に高めた。本結果より胆肝がんへの実用化研究を進めていると共に、種々の薬剤を用いて他の疾患を対象に臨床応用を目指した研究開発も進めている。

4 おわりに

粉体技術を活用することで PLGA ナノ粒子の弱点である凝集性や低ハンドリング性を克服し、実用化の道を拓くことができた。化粧品や育毛剤分野では 10 余年にわたり実感値の高い製品として市場からの評価もいただいている。医療用途においても臨床試験が始められており、今後の実用化による社会貢献が期待される。

References

- 1) Tsukada Y., Tsujimoto H., Miwa N., Yamamoto H., Kawashima Y., PLGA Nanosphere Platform for Nano-medical System, in: Courtney Winthrop (Ed.), *New Developments in Polylactic Acid Research*, Nova Science Publishers, 2014, pp. 153–182 (2014).
- 2) Toguchi H., Ogawa Y., Okada H., Yamamoto M., “Once-a-Month Injectable Microcapsules of Leuporelin Acetate”, *YAKUGAKU ZASSHI*, 111 (1991) 397–409.
- 3) Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Hino T., Niwa T., Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45 (1998) 41–48.
- 4) Yamamoto H., Hoshina W., Kurashima H., Takeuchi H., Kawashima Y., Yokoyama T., Tsujimoto H., 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, *18(2)* (2007) 215–228.
- 5) 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 (2004) 245–253.
- 6) 辻本 広行, 原 香織, 塚田 雄亮, 川島 嘉明, 羽多野 重信, 噴流層型バインダ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*, 44(6) (2007) 459–464.
- 7) 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) (2005) 765–772.
- 8) Hara K., Tsujimoto H., Tsukada Y., Huang C.C., Kawashima Y., Tsutsumi M., Histological examination of PLGA nanospheres for intratracheal drug administration, *International Journal of Pharmaceutics*, 356 (2008) 267–273.
- 9) Hara K., Tsujimoto H., Huang C.C., Kawashima Y., Ando R., Kusuoka O., Tamura K., Tsutsumi M., Ultrastructural and immunohistochemical studies on uptake and distribution of FITC-conjugated PLGA nanoparticles administered intratracheally in rats, *Journal of Toxicologic Pathology*, 25 (2012) 19–26.
- 10) Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Kuno Y., Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin, *Pharmaceutical Development and Technology*, 5 (2000) 77–85.
- 11) Tahara K., Samura S., Tsuji K., Yamamoto H., Tsukada Y., Bando Y., Tsujimoto H., Morishita R., Kawashima Y., Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease, *Biomaterials*, 32 (2011) 870–878.
- 12) 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) (2013) 513–518.
- 13) 辻本 広行, 原 香織, Huang C.C., 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) (2004) 867–875.
- 14) Tsujimoto H., Hara K., Tsukada Y., Huang C.C., Kawashima Y., Arakaki M., Okayasu H., Mimura H., Miwa N., Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17 (2007) 4771–4777.
- 15) 塚田 雄亮, 笹井 愛子, 辻本 広行, 海堀 昌樹, 山本 浩充, PLGA ナノ粒子の生体吸収性 DDS シートへの応用, *粉砕*, 59 (2016) 111–116.