

## 脳内への薬物送達を目的とした ポリ乳酸・グリコール酸ナノスフェアの設計

092A03 加藤 能豊

製剤学講座

### 【目的】

脳腫瘍など中枢系疾患の治療において、脳血液関門 (BBB) の働きによる、薬物治療成績の悪さが課題となっている。BBBでは、他の臓器の血管内皮に比べ細胞間がタイトジャンクションにより強固に接合しているため、細胞間ルートでの物質移動が制限されている。また、薬物が血管内皮細胞内に取り込まれたとしても、P糖タンパク質 (P-gp) によって血液中に排泄されるなど、薬物の中枢神経系への移行を難しくしている。当研究室では、生体内分解性・生体適合性に優れたポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) を基剤とする薬物送達用キャリアーであるPLGAナノスフェア (NS) の開発に成功し、このNSを脳ターゲティング用のキャリアーとして応用することを試みてきた。これまでの検討では、界面活性剤であるTween 80で表面修飾したPLGA NSをラット頸動脈から投与することにより、一部のNSが脳組織へ移行することが明らかにされている。

そこで、本研究では、薬物封入表面修飾PLGA NSを設計し抗腫瘍効果、鎮痛効果について培養細胞を用いた *in vitro* 実験ならびにラットを用いた *in vivo* 実験を実施し、その有用性について評価した。モデル薬物として抗癌剤であるドキソルビシン (Dox) とオピオイド系薬物であるロペラミド (Lop) を使用した。

### 【方法】

NSの細胞内取り込みの評価には、ヒト脳毛細血管内皮細胞株 (BMEC) とラット脳神経膠腫細胞株 (C6) を用いた。細胞をそれぞれコンフルエントになるまで培養し、その後6-クマリンで蛍光標識したNSを細胞に添加、蛍光度より取り込み量を算出した。細胞外への薬物排出評価には、C6細胞とマウス乳腺・ドキソルビシン耐性細胞株 (P-gp過剰発現細胞株、EMT6/AR1) を用いて評価した。NSを細胞に添加した後、一定時間細胞内に取り込ませる。その後培養液を交換し、培養を継続した。細胞内に残存するDox量より細胞外排出率を算出した。 *In vitro* での抗腫瘍効果は、MTS試薬 (promega) を

用いて細胞生存率より評価した。まずC6細胞をコンフルエントになるまで培養した後、NSを投与した。一定時間後、マルチモードプレートリーダー DTX 880 (BECKMAN COULTER) を用いて吸光度を測定した。吸光度に基づき算出した細胞生存率から抗腫瘍効果を評価した。 *In vivo* での抗腫瘍効果の評価方法は、まずC6細胞をWistarラット (6週齢) の左脳に移植し、脳腫瘍モデルラットを作製した。C6細胞を移植後、2、5、8日後に左頸動脈からサンプルを投与した。投与後の生存率に基づき抗腫瘍効果を評価した。鎮痛効果は、Tail-dipテストで評価した。サンプルをICRマウス (4週齢) の頸静脈に投与後、50°Cの温浴内に尻尾を浸し、反応時間から鎮痛効果を評価した。

### 【結果及び考察】

NSの細胞内取り込み評価では、Tween 80でNS表面を修飾することにより、未修飾NSと比較して、細胞内取り込み量が向上した。NSはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる事が分かっている<sup>1)</sup>。今回の結果は、界面活性剤であるTween 80の作用により細胞膜の流動性が向上したことにより、エンドサイトーシスが促進され、取り込みが向上したと考えられた。細胞外への薬物排出率は、Dox溶液では排出される割合が高いのに対して、Dox封入NSでは排出が抑制された。ポリブチルシアノアクリレートを基剤とするNSは、P-gpによる薬物の細胞外への排出を抑制することも報告されており、PLGA NSにおいても同様のメカニズムで薬物の排出が抑制されたと考えられた<sup>2)</sup>。次に *In vitro* における抗腫瘍効果では、Dox溶液に比べてDox封入NSにおいて、細胞に対する高い抗腫瘍効果が確認された。Doxを担持した状態で細胞内に取り込まれたNSは、P-gpの基質であるDoxの細胞外への排出を抑制する。そのため高い抗腫瘍効果が得られたと考えられた。 *In vivo* における抗腫瘍効果の結果をFig.1に示す。生理食塩水を投与したコントロール群では、30日前後にすべてのラットが死亡した。またDox溶液でも、50日までに死亡した。一方NS投与群では

生存期間が延長した。特にTween 80修飾NSでは、50日以上生存するラットが多く存在し、その中には、100日以上生存する長期生存ラットも認められた。また抗癌剤の副作用の1つである体重減少についても、NS投与群では抑制することができた。Lop封入NSを用いた鎮痛効果においてもLop溶液に比べて、高い鎮痛効果を示した。またLop封入NSにおいてもTween 80で修飾することで、未修飾NSに比べて持続的な鎮痛効果が得られた。

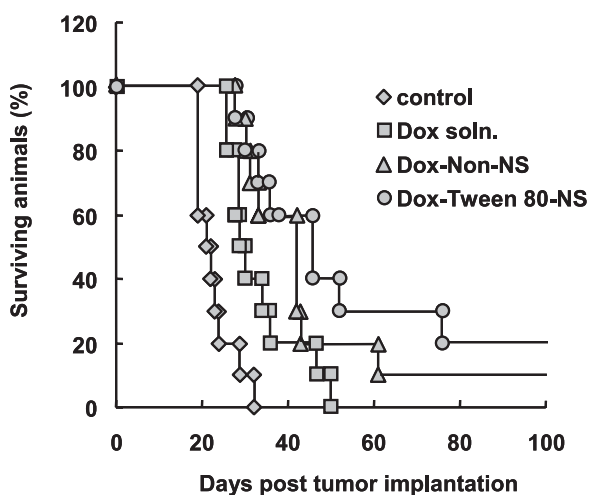


Fig.1 Kaplan-Meier survival curves of rats bearing intracranial C6 glioma tumors treated with Dox soln. and Dox-loaded PLGA NS

**【結論】**

Tween 80で表面修飾することで、NSの脳毛細血管内皮細胞への取り込みが向上した。さらにNS内に薬物を封入し、投与することで薬効の増強ならびに持続化が認められた。これらのことから、Tween 80で表面修飾したPLGA NSは脳内薬物送達キャリアーとして有効であることが示唆された。

**【文献】**

- 1) K. Tahara et al., Int. J. Pharm. 382 198-204, (2009)
- 2) K. Tahara, Y. Kato et al., J. Microencapsul. 28 29-36, (2011)