

脳腫瘍治療を目指した表面修飾生分解性ナノ粒子の設計 Design of surface modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for brain tumor therapy.

加藤能豊、田原耕平、山本浩充、川島嘉明*
Yoshitoyo Kato, Kohei Tahara, Hiromitsu Yamamoto, Yoshiaki Kawashima*

愛知学院大学 薬学部 製剤学講座
Laboratory of pharmaceutical engineering, School of Pharmacy, Aichi-Gakuin University,
1-100 Kusumoto, Chikusa, Nagoya, 464-8650, Japan

Keywords:

1. 緒言

脳腫瘍は侵襲性の高い癌のひとつであり、一般的に外科的治療の後、化学療法と放射線治療を組み合わせた治療が行われる。しかしながら、脳には脳血液関門 (BBB) が存在し、解剖学的には脳毛細血管で内皮細胞同士の密着結合と、グリア細胞により形成されているため、薬物の血中から脳内への移行を制限している。BBBによって、物質の透過性はほとんどなく、抗癌剤などのある種の薬物は、脳毛細血管内皮細胞に発現するP糖タンパク質 (P-gp) などの排泄トランスポーターによって細胞外に排出されてしまうため、脳神経系疾患の化学療法は極めて難しい。

標的とする組織に薬物を送達する方法の一つとして、微粒子薬物キャリアを用いる方法がある¹⁾。Kreuterらは、脳への薬物送達を目的として、ポリブチルシアノアクリレートナノパーティクルを用いた研究を行っており²⁾、特に、Tween 80 で粒子表面を修飾することによって、血中のアポリボタンパクが粒子表面に付着することで、脳内に必須な脂肪酸の運搬体であるカイロミクロンとして認識されるようになり、脳血管上皮細胞から脳内への薬物透過量が増加すると報告している³⁾。

当研究室においても、生体内分解性に優れた乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) を基剤とするサブミクロ

ンサイズの薬物担体ナノスフェア (NS) を脳ターゲティングキャリアとして利用することを試みてきた。Kreuter等の報告と同様に、Tween80で表面修飾したPLGA NSを、ラット頸動脈から投与することで、NS自身が脳組織へ移行することを確認している。

そこで脳内薬物送達用PLGA NSを脳腫瘍治療へ応用することを目的として、ドキソルビシンを封入した表面修飾PLGA NSを調製し、ラット脳神経膠腫細胞を用いてその薬理効果及び、NSと培養細胞との相互作用メカニズムについて評価した。

本稿では、日本薬学会東海支部大学院生フォーラムで講演した「脳腫瘍治療を目指した表面修飾生分解性ナノ粒子の設計」を中心に紹介する。

2. 結果及び考察

2.1 PLGA NSの調製と物理化学的物性

DOX封入PLGA NSは、エマルジョン溶媒拡散法により調製した。まず、200 mgのポリ乳酸・グリコール酸と111.04 mgのアドリアシン (10 mgのドキソルビシンを含む) を6 mlのアセトン・エタノール・DMSO (1:1:1) 混液中に溶解させた。NSを蛍光標識する場合は、1 mgの6-クマリンをPLGA溶液に溶解し、このPLGA・薬物溶液を、1% PVA水溶液100 mL中に400 rpmで攪拌下、

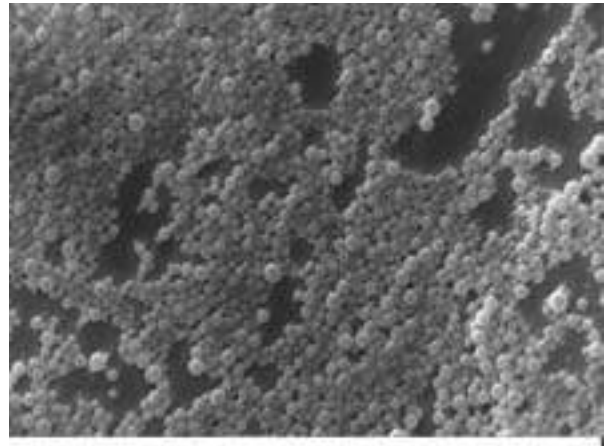
*Corresponding author.
Yoshiaki Kawashima
Tel: +81 52 757 6770; Fax: +81 52 757 6799.
*E-mail address: kawa@dpc.aichi-gakuin.ac.jp

滴下した。得られたNS懸濁液を遠心分離 (43,400 × g, 4°C, 10min) し、精製水で中に懸濁した後、凍結乾燥により未修飾PLGA NS粉末を得た。Tween 80で表面修飾を行う場合には、2% PVA溶液と2% Tween 80溶液の混液を外相として用いた。

Fig. 1にはエマルション溶媒拡散法により調製したPLGA NSの電子顕微鏡写真を、Table 1にはドキソルビシン (DOX) 封入PLGA NSの粒子径、ゼータ電位及び粒子中のDOX含有量を示す。未修飾、Tween 80修飾のいずれの粒子も、粒子径は200から300 nmのサブミクロンサイズで、電子顕微鏡写真で観察されるような球形粒子であった。PLGAの末端には、カルボキシル基が存在するため、未修飾PLGA NSのゼータ電位は負の値を示した。Tween 80修飾PLGA NSのゼータ電位は、未修飾の粒子と比較し、ゼータ電位に大きな違いは見られなかった。PLGA NS中のDOX含有量では、Tween 80で表面修飾することにより、未修飾のPLGA NSと比較して減少した。これは、Tween 80がミセルを形成しDOXが外相に分配しやすくなり、漏出してしまったと考えられた。

2.2 PLGA NSの細胞内移行性

表面修飾PLGA NSのラット脳神経膠腫細胞 (C6細胞, RIKEN Cell Bank)への取り込み挙動を、共焦点レーザー顕微鏡(LSM-510 META, ZEISS)により視覚的に評価した。(Fig. 2)。観察には、細胞培養液にPLGANS懸濁液を加えて2時間インキュベートした後、細胞表面を洗浄したサンプルを用いた。未修飾のNSと比較し、Tween 80で修飾したNSは、細胞内においてより強い6-クマリンの蛍光が観察されたことから、Tween 80による表面修飾によりPLGA NSの細胞内への取り込み量が増加することが示された。このことは、粒子表面に吸着したTween80の界面活性作用によって、細胞膜の流動性が向上し、NSが細胞内にエンドサイトーシスを経由して取り込まれやすくなったためと考えられた。



× 10,000 — 1 μm

Fig.1 Scanning Electron microphotograph of PLGA nanosphere prepared by emulsion solvent diffusion method.

2.3 DOX封入PLGA NSの抗腫瘍効果

DOX封入PLGA NSのC6細胞に対する抗腫瘍効果をM TS法により評価した (Fig. 3)。DOX溶液を添加した細胞群においては、24時間後の細胞生存率は、約10%で非常に低くなったのに対し、48時間後には、生存率が増加し腫瘍細胞の増殖が観察された。この理由として、一時的に細胞内に侵入したDOXが、時間の経過とともにP糖タンパクにより排泄されたため、培養後期には薬物の効果が低下したためと考えられた。一方、DOXを封入したPLGA NSを添加したC6細胞は、48時間後における細胞生存率が著しく低下し、高い抗腫瘍効果が見られた。これは、DOXを封入した状態でPLGA NSが細胞内へ取り込まれ、細胞内におけるP糖タンパクによる薬物排出が抑制されることにより、細胞内にPLGA NSが長時間滞留したためと考えられる。また、今回の実験では、未修飾とTween 80表面修飾PLGA NSの抗腫瘍効果に差が見られなかった。Tween 80表面修飾により、NSの細胞内取り込み量は増加するが、粒子あたりの薬物含有量が低下

Table 1. Physicochemical properties of DOX-loaded PLGA NS.

	Particle size (nm)	Polydispersity	Zeta potential (mV)	DOX contents (%)
Non-PLGA NS	289	0.142	-23.6	9.94
Tween 80-PLGA NS	255	0.086	-23.5	8.60

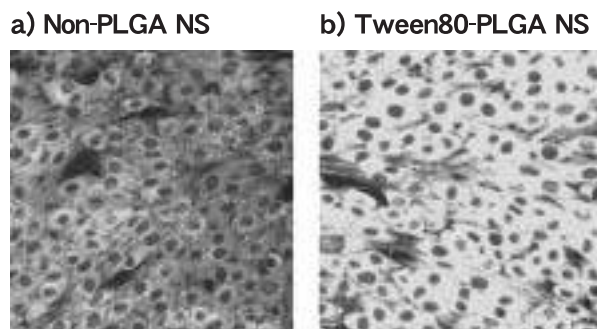


Fig.2 Confocal laser microscopy images of C6 cells incubated with 6-coumarin loaded PLGA nanosphere (magnification $\times 40$). a) Non-PLGA NS, b) Tween 80-PLGA NS. Scale bar, 20 μm .

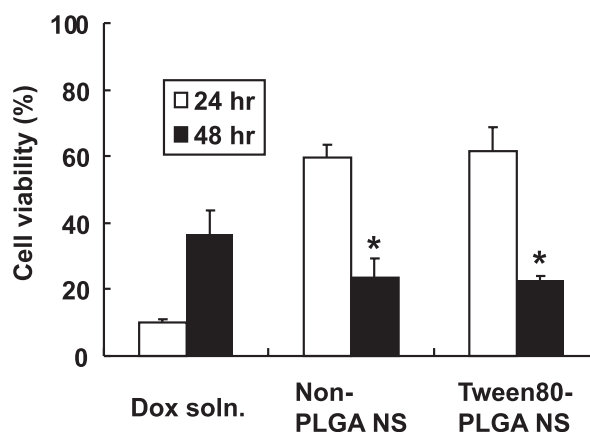


Fig.3 Cytotoxic effects of DOX solution, DOX-loaded Non-PLGA NS, and DOX-loaded Tween80-PLGA nanosphere on C6 cells. Results are means \pm S.D. of 8 experiments ; statistically significant differences from free DOX are denoted by asterisks (* $P < 0.05$).

するため (Table 1)、未修飾PLGA NSとほぼ同じ細胞生存率を示したと考えられた。

3. 結論

本研究の成果より、表面修飾PLGA NSは、脳腫瘍治療に有効な薬物キャリアとなりうることが示唆された。今後は、本稿で調製したPLGA NSのin vivoにおける挙動について評価する予定である。

4. 終わりに

今回、私は日本薬学会東海支部学術講演会に設けられた大学院フォーラムで初めて学会発表をしました。初めてということもあり、自分が納得いくような発表はできませんでした。

これを機に、何が考察するためには必要なのか、またそれらのデータを得るためにはどのような実験が必要となるかなど、今回の経験を通して多くのことを知ることができました。今後、よりよい研究ならびにその発表ができるように努力していきたいと思っています。

参考文献

- 1 Kreuter J, *Drug Deliv*, **47**, 65-81 (2001).
- 2 Ramge P, Unger R E, Oltrogge J B, Zenker D, Begley D, Kreuter J, Von Briesen H, *J Neurosci*, **12**, 1931-1940 (2000).
- 3 Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina S E, Engelhardt B, Alyautdin R, von Briesen H, Begley D J, *Pharm Res*, **20**, 409-416 (2003).