

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860131

研究課題名(和文) 脳性小児麻痺治療薬脳指向性エリスロポエチン含有PLGAナノスフェア製剤の開発

研究課題名(英文) Delivery of erythropoietin-loaded PLGA nanospheres to central nervous system via blood-brain barrier transport : Therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者

櫛川 舞 (HAZEKAWA, Mai)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：10509186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳性小児麻痺治療薬を目指したエリスロポエチン含有乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)ナノスフェア製剤の開発を目的とした。本研究では、エリスロポエチンの大量投与による副作用の発現を回避するため、エリスロポエチンの徐放性製剤化を行った。徐放性製剤化による副作用回避に加え、PLGAのガラス転移点で製剤調製を行うことにより、表面構造の改善および比表面積の低下が認められ、初期バーストの抑制、血液脳関門透過性の向上が認められたことから、本製剤は脳性小児麻痺治療薬として有用な製剤となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was development of erythropoietin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres for therapy of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Erythropoietin was encapsulated by poly as slow release formulation to reduce side effects. Furthermore, this particle showed low initial burst and high blood brain barrier permeability when this particle was prepared at glass transition temperatures of PLGA. These results were attributed to improvement the structure of surface in particle and decrease of specific surface area in particle. It was suggested that this particle might be useful in therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.

研究分野：医療薬学・製剤学

キーワード：エリスロポエチン ナノスフェア 自己修復 脳性小児麻痺 PLGA 脳移行性 徐放性製剤 初期バースト

1. 研究開始当初の背景

新生児期における脳障害は将来的な脳性麻痺の原因であり、成熟児では低酸素性・虚血性脳症 (HIE)、早産児では両側性脳室周囲白質軟化症、脳室内出血に起因することが多い。早産児において両側性脳室周囲白質軟化症を発症した場合、ほぼ 100%の確率で両下肢の痙直性麻痺を引き起こすことが知られており、発症予後の QOL の低下は極めて顕著であり、重篤な疾患の一つであるが、本疾患は確立した治療法がない。そのため、脳性小児麻痺の治療法の確立・治療薬の開発は急務である。

エリスロポエチン (EPO) は、1990 年から腎性貧血治療薬として使用されているが、新生児医療の分野においては、とくに低出生体重児においては生理的ともいえる貧血である「未熟児貧血」に対して EPO の造血効果が有効であることが明らかとなり、1996 年から未熟児貧血治療薬として広く使用されるようになった。EPO の受容体は腎、肝、肺などの多くの組織に存在していることが判明していたが、新たに脳にも存在することが発見されて以来、その中枢神経系における EPO の生理的作用が注目されるようになった。中でも、低酸素・再灌流時には脳内で発現することが明らかになり、脳虚血モデルでの脳神経保護作用や一定条件下での血液脳関門 (BBB) を介した神経保護作用が発見され、またコリン作動性ニューロンの活性化、網膜神経細胞の保護作用、ニューロンアポトーシス抑制効果などの多くの神経保護作用が明らかにされている。

新生児の HIE に対して脳低温療法が施行され、その効果が報告されているが、近年 EPO の有用性も報告されている。中等度の HIE において、低濃度の EPO を生後 48 時間以内に投与し、その後 2 週間繰り返して投与することで、生後 18 か月後の神経発達予後が改善されたとの報告がある。しかしながら、新生児における神経保護目的で、BBB の通過を考慮した EPO の大量投与は、造血による多血、血栓の形成、エンドセリンを介した高血圧、未熟児網膜症の増悪等の重篤な副作用を引き起こす。したがって、新生児に投与する場合には、大量投与を避けることが強く望まれる。

研究代表者は、これまでに薬物の副作用軽減を目的とした持続性注射剤 PLGA マイクロスフェアの開発に取り組んできた。その製剤の特徴は、生体内分解性高分子 PLGA を使用しており人体に安全な素材であり、徐放化により投与直後の血中濃度の上昇を劇的に抑制し、副作用発現を軽減する。1~3 か月間低濃度持続放出が可能であるため投与回数が軽減でき患者のコンプライアンスの向上も期待できる。

そこで、本研究では、EPO の脳内送達のため、粒子径が小さく、かつ安定に低濃度で血中濃度を維持できる剤形として PLGA

ナノスフェアの調製を試みた。大量投与による副作用の発現のリスク、短い半減期に伴う反復投与の必要性を考慮すると EPO の徐放性製剤化は非常に有用であると考えた。

本研究では、EPO の副作用を軽減し脳保護作用を期待した脳性小児麻痺治療薬としての EPO 含有 PLGA ナノスフェア製剤を調製し、EPO の徐放化、脳移行性の向上を目標に薬物放出性 (初期バースト)、脳移行性 (BBB 透過性) について *in vitro* 評価を行った。

2. 研究の目的

脳保護作用を有する EPO は、脳性小児麻痺治療薬としての可能性に注目されているが、BBB の通過を考慮した大量投与による副作用の発現が懸念されている。そこで、本研究では、EPO 含有 PLGA ナノスフェア製剤を開発し、EPO の徐放化により血中濃度を低濃度で持続させることにより副作用発現を抑制した安全な製剤として、かつ脳保護作用による機能再生効果を有する新規製剤として、新生児医療における脳性小児麻痺治療に貢献することを目的とした。初期バースト抑制のためのナノスフェア調製時の外水相の温度条件に関する検討結果も併せて報告する。

3. 研究の方法

(1) EPO 含有 PLGA ナノスフェアの調製方法
ナノスフェアの調製には、w/o/w 型エマルション溶媒留去法を用いた (図 1)。EPO-alpha (BioVision), EPO-beta (BioVision) およびキトサン (和光純薬) をそれぞれ 2%酢酸水溶液で溶解し、PLGA7505 (L/G=3, MW:5,000) を溶解した CH₂Cl₂ 溶液中に滴下し、60 秒間超音波照射し 1 次エマルション (w/o) を形成させた。次に、0.5%PVA (ポリビニルアルコール) 水溶液中に 1 次エマルションを加え 60 秒間 4000 rpm で攪拌し、2 次エマルション (w/o/w) を形成させた。溶媒留去後、遠心分離し、ナノスフェアを回収し凍結乾燥し、実験に供した。

自己修復を利用した製剤調製時には、2 次エマルション調製時の外水相の温度を PLGA のガラス転移点に保温し、溶媒留去を行った。

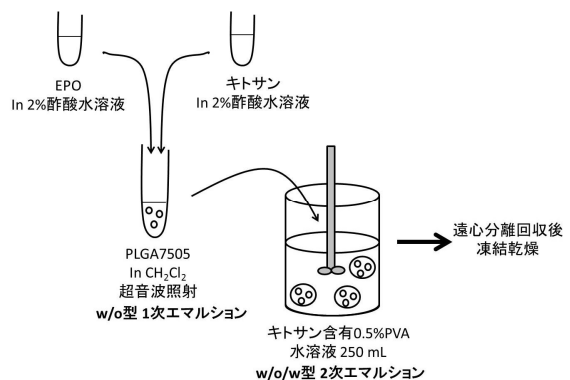


図 1 .EPO 含有 PLGA ナノスフェアの調製方法

(2) 封入率・封入効率の算出

調製したナノスフェアに DMSO を加え、超音波により十分に溶解させた。溶解液中の EPO 濃度を ELISA kit (abcam) を用いて定量し、封入率・封入効率を算出した。

$$\text{封入率 (\%)} = \frac{\text{薬物質量}}{\text{ナノスフェア質量 (薬物 + 高分子)}} \times 100$$

$$\text{封入効率 (\%)} = \frac{\text{実測封入率}}{\text{理論封入率}} \times 100$$

(3) 薬物放出性試験

調製したナノスフェアに 0.2 (w/v) % Tween80 含有 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7) を加え、ポルテックスおよび超音波により均一に分散させた後、37 恒温層で静置した。経時的にサンプルを採取し、サンプル中(上清及び残渣)の EPO 濃度を ELISA kit (abcam) を用いて定量し、薬物放出率を算出した。

(4) 粒子径測定

ナノスフェアを 0.2% Tween80 溶液で分散させ、Multisizer™ 3 Coulter Counter® (Beckman Coulter, Inc.) で粒度分布、平均粒子径を評価した。

(5) SEM 画像

ナノスフェアの表面を Tiny SEM (テクネックス工房) を用いて SEM 画像を撮影し、画像を用いて評価した。

(6) ガラス転移点測定

ナノスフェアのガラス転移点は、DEC-60 (島津製作所) を用いて測定した。

(7) 比表面積測定

ナノスフェアの比表面積は、ガス吸着装置 3FLEX (マイクロメリティックス) 前処理装置 Smart VacPrep (マイクロメリティックス) を用いて測定した。

(8) 血液脳関門 (BBB) 透過性評価

ナノスフェアの BBB 透過性は、BBB Kit (ファーマコセル株式会社) を用い、Papp および Pe 値により評価した。

4. 研究成果

(1) EPO 含有 PLGA ナノスフェアの粒子径、封入率、薬物放出性 (初期バースト) 評価

EPO 含有 PLGA ナノスフェアを調製し、整粒性に富んだ表面構造の滑らかな粒子を得た。キトサン添加剤の粒子径は、キトサン非添加剤と比較して小さかった。

キトサン添加剤の封入率・封入効率は、キトサン非添加剤と比較して有意な差は認められなかった。

EPO 含有ナノスフェア製剤からの薬物放出は、約 3~5 日間、低濃度での持続放出が認められたことから、EPO 溶液投与時よりも本製剤投与後の血中濃度は低いことが予想され、副作用発現のリスクが軽減された製剤であると考えられた。

(2) EPO 含有自己修復 PLGA ナノスフェア製剤の初期バースト評価

溶媒留去法により製剤を調製する際に、使用する PLGA のガラス転移点に外水相を保温して調製を行うと初期バーストが抑制される事実を明らかにした。その理由として、高分子のガラス転移点で保温することにより、高分子の自己修復作用が起こり、粒子表面がより滑らかな構造になることが SEM 画像により分かった。さらに、粒子表面の違いを数値化するため比表面積を測定したところ、ガラス転移点に保温した製剤は、室温調製を行った製剤と比較して、有意に比表面積が減少していた。粒子の表面および内部の細孔が減ることで安定した薬物放出が得られたことが初期バースト抑制の一因だと考えられた。

(3) EPO 含有 PLGA ナノスフェア製剤の BBB 透過性評価

EPO 含有 PLGA ナノスフェア製剤の BBB 透過性について BBB Kit を使用して評価を行った。

キトサン添加が BBB 透過性に与える影響と自己修復が BBB 透過性に与える影響の 2 種の検討を行った。まず、キトサン添加剤とキトサン非添加剤の BBB 透過性を比較したところ、キトサン添加剤は高い BBB 透過性を示した。その理由として、カチオン性高分子であるキトサン添加により、粒子表面に正電荷が付加されたことが要因の一つであると考えられた。次に、製剤調製時の外水相を高分子のガラス転移点に保温した製剤 (自己修復製剤) と非自己修復製剤の BBB 透過性を比較したところ、自己修復製剤は高い BBB 透過性を示した。その理由は、粒子表面構造の改善に起因することが SEM 画像より示唆された。

本開発製剤は、EPO 含有徐放性製剤の一つの剤形を提案するものであり、徐放化による副作用軽減、高い BBB 透過性から脳性小児麻痺治療薬としての有効性が期待できる。また、キトサン添加による BBB 透過性向上と自己修復を応用した調製方法による初期バースト抑制および BBB 透過性向上という本研究で得られた知見は、今後のタンパク含有徐放性製剤開発への応用が期待できる。

< 引用文献 >

加藤稲子、エリスロポエチンの脳保護作用、医学のあゆみ、240 巻、3 号、2012、225-227

Mizuno K. et al, Pretreatment with low dose of erythropoietin ameliorates brain damage in periventricular leukomalacia by targeting late oligodendrocyte progenitors: a rat model. Neonatology, 94(4), 2008, 255-266

Liu W. et al, Neuroprotective potential of erythropoietin and its derivative carbamylated erythropoietin in periventricular leukomalacia. Exp. Neurol., 230(2), 2011, 227-239

Zhu C. et al, Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy, Pediatrics, 124, 2009, e218-e226

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hazekawa M, Morihata K, Yoshida M, Sakai Y, Uchida T., The angiogenic effect of ONO-1301, a novel long-acting prostacyclin agonist loaded in PLGA microspheres prepared using different molecular weights of PLGA, in a murine sponge model. Drug. Dev. Ind. Pharm., 40, 2014, 1435-1442
DOI:10.3109/03639045.2013.828220.

〔学会発表〕(計 4 件)

櫛川舞、原口珠実、吉田都、内田享弘
自己修復を利用したOVA含有PLGAマイクロスフェア製剤の初期バースト抑制効果
日本薬学会第135年会、2015年3月25日～28日、神戸サンポートホール(兵庫県神戸市)

櫛川舞、原口珠実、吉田都、内田享弘
PGI₂アゴニスト含有PLGA自己修復マイクロスフェアの調製に関する検討 - 初期バーストに及ぼすガラス転移点の影響 -
第64回日本薬学会近畿支部大会、2014年10月11日、京都薬科大学(京都府京都市)

櫛川舞、原口珠実、吉田都、内田享弘
PGI₂アゴニスト含有自己修復マイクロスフェアの調製と評価
日本薬剤学会第29年会、2014年5月20日～22日、大宮ソニックシティビル(埼玉県さいたま市)

Hazekawa M, Haraguchi T, Yoshida M, Uchida T., The angiogenesis effect of a novel long acting prostacyclin loaded-PLGA microspheres prepared using different molecular weight in murine sponge model.

40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2013年7月21日～24日、Hawaii Convention Center (Hawaii, USA)

〔その他〕

ホームページ等

臨床製剤学研究室ホームページ

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~rseizai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛川舞 (HAZEKAWA, Mai)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：10509186