

肌温度感受性を有する細胞増殖因子送達ナノ粒子の開発

広島大学大学院医系科学研究科

長瀬 健一

In this study, we aimed to develop basic fibroblast growth factor (bFGF)-releasing nanoparticles for regeneration of dermal tissue. The nanoparticles were prepared by electrospray a bFGF-dispersed poly(D,L-lactide-co-glycolide) emulsion. bFGF-loaded PLGA nanoparticles can be developed by optimizing the applied electrospray voltage and the oil: water ratio of the emulsion. The prepared nanoparticles exhibited prompt release at the initial duration and continuous gradual release at the subsequent duration. These results indicated that the prepared bFGF-releasing nanoparticles would effectively deliver bFGF to dermal tissue.

1. 緒言

現在、皮膚の再生医療において細胞増殖因子 (Growth Factor) を疾患部位に効果的に働かせて、疾病部位を治療する治療法が注目を集めている。これらの細胞増殖因子は日常的に皮膚に作用させることで、皮膚機能を効果的に改善することが可能となるため、化粧品への応用が期待されている。しかし、これらの細胞増殖因子を肌内部に効果的に作用させる手法が確立されておらず、化粧品としての有効利用はできていない。また、これらの細胞増殖因子は安定性が著しく低いため、化粧品の状態で、活性を安定に維持する方法が必要である。

そこで本研究では、これらの細胞増殖因子の活性を維持したまま、効果的に表皮、真皮へと送達する機能性ナノ粒子を開発する。細胞増殖因子を内包したポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (PLGA) の生分解性高分子から構成されるナノ粒子を、電圧をかけて微粒子を作製するエレクトロスプレー法¹⁻⁴⁾により作製する。これにより、細胞増殖因子を生分解性高分子内に内包することで活性を安定に維持することができる。これにより、細胞増殖因子を効果的に肌に作用させるナノ粒子の開発を行う。

2. 方法

2.1. エレクトロスプレーによるナノ粒子作製

PLGAをアセトン:エタノール=9:1の混合溶媒に、40℃で加熱攪拌しながら溶解し、0.2 w/vのポリマー溶液を作製した(図1)。また、bFGFはあらかじめ0.5 μg/

μLに分注し、凍結保存しているものを融解し、水を加えて0.25 μg/mLのbFGF水溶液を得た。PLGA溶液にbFGF水溶液とSpan 80を加えボルテックスで攪拌し、分散させた。作製したエマルションを5 mLプラスチックシリンドルに入れ、電界紡糸装置により電圧を印可しながらポリマー溶液をアルミホイルに噴霧するエレクトロスプレーによりナノ粒子を作製した(図1)。この時、エマルションの水相:油相の比率、印可電圧を変化させて作製した(表1)。

2.2. ナノ粒子の物性評価

2.2.1. ナノ粒子の形状観察

作製したナノ粒子の形状を電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) により観察した。ナノ粒子をオスミニウムでコーティングし、FE-SEMによりナノ粒子の形状を観察した。ナノ粒子の粒子径は、FE-SEM画像をImageJによる画像処理により解析した。

2.2.2. ナノ粒子中のbFGF含有量の測定

クロロホルム1 mLおよび、超純水1 mLからなる混合溶媒を調整した。PLGA-bFGFを混合溶媒に入れ、短時間ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、1時間静置した後に水相を採取した。採取した水相中のタンパク質量をNanoOrange[®] Protein Quantitation Kitを用い、マイクロプレートリーダーにて蛍光を測定し、ナノ粒子が担持するbFGFの総量を測定した。

2.2.3. ナノ粒子のbFGF放出挙動

1 mLのPBS中に作製したbFGF含有ナノ粒子を浸漬し、37℃で振盪しながらインキュベートした。所定の時間に上澄み液を少量とり、NanoOrange[®] Protein Quantitation Kitを用いてサンプルの蛍光を測定し、PBS中に放出されたbFGFを定量した。

3. 結果および考察

3.1. 作製したナノ粒子の形状

エレクトロスプレーにより作製されたナノ粒子をFE-



Development of thermoresponsive nano-particle for effective delivery of growth factor

Kenichi Nagase

Graduate School of Biomedical and Health sciences, Hiroshima University

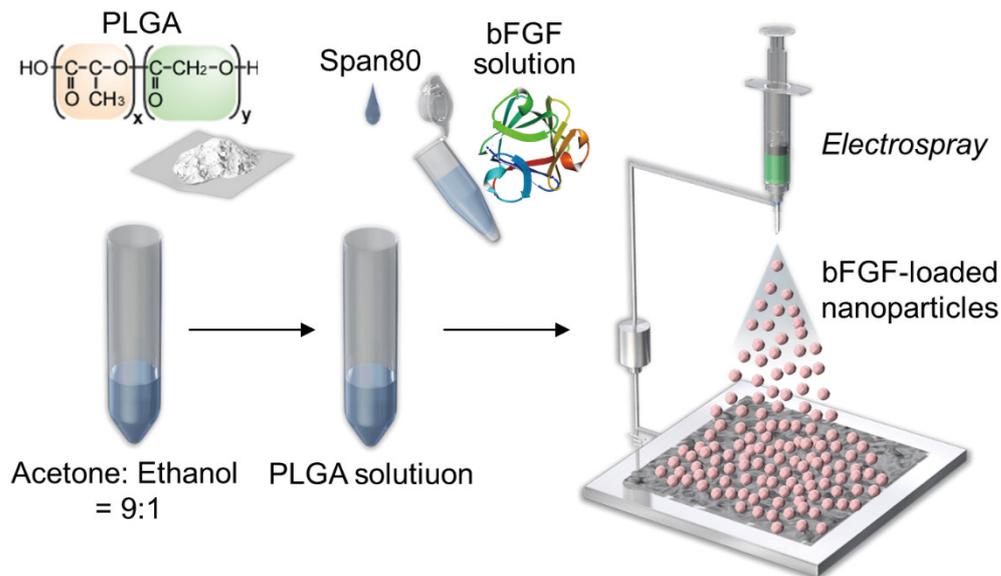


図1 エレクトロスプレーによるナノ粒子作製方法

表1 エレクトロスプレー条件

Code ^{a)}	PLGA concentration (w/v)	Volume ratio of oil phase and water phase (Oil phase: Water phase)	Applied voltage (kV)	Flow rate of emulsion (mL/h)	Spray time (min)
12kV-500	0.2	500:1	12.0	2.0	45
15kV-500	0.2	500:1	15.0	2.0	45
20kV-500	0.2	500:1	20.0	2.0	45
15kV-200	0.2	200:1	15.0	2.0	45

a) Named using the applied voltage and oil-to-water ratio.

SEMにより観察した (図2)。印加電圧が12.0 kVではエレクトロスプレーの電圧が不十分ではないため、粒子状にならなかった。印加電圧が15.0 kVの場合では粒子径が均一な凝集体を形成していることがわかった。また、印加電圧が20 kVの場合は、粒子径がより小さくなり単一の粒子としてアルミホイル状に分散して付着していることがわかった。この状態ではアルミホイルから回収するのが困難であるため、印可電圧は15 kVが最適であるとわかった。また、印可電圧15 kVでエマルションの油相：水相の比率を変化させたところ、O:W=500:1の方がO:W=200:1よりも粒子径が小さいことがわかった。これは、これは水溶液の比率が小さい方がより揮発性が高くなるためであると考えられる。

これらの結果より、印可電圧15.0 kV、油相：水相の比率O:W=500:1が均一なナノ粒子を作製するのに適したエレクトロスプレーの条件であることがわかった。

3.2. 作製したナノ粒子のbFGF含有量

作製したナノ粒子に含まれているbFGFの総量を測定した (表2)。印加電圧が高い15 kVで作製したナノ粒子の方が12 kVで作製したナノ粒子よりもbFGFの含有量が小さいことがわかった。これは、12 kVで作製したナノ粒子はシート状の構造を取っているため、体積が大きくなりbFGFの含有量も大きくなったと考えられる。また、油相の割合が小さい15kV-200の方がbFGFの量が小さくなった。これは、油相の割合が小さい15kV-200は粒子径が大きくなるが、粒子に含有されているbFGFの量は増えないことを示している。

3.3. 作製したナノ粒子のbFGF放出挙動

作製したナノ粒子の生理条件下でのbFGF放出挙動をリン酸緩衝液に浸漬することで観察した (図3)。24時間以内での放出挙動を比較すると、6時間で40%程度のbFGF

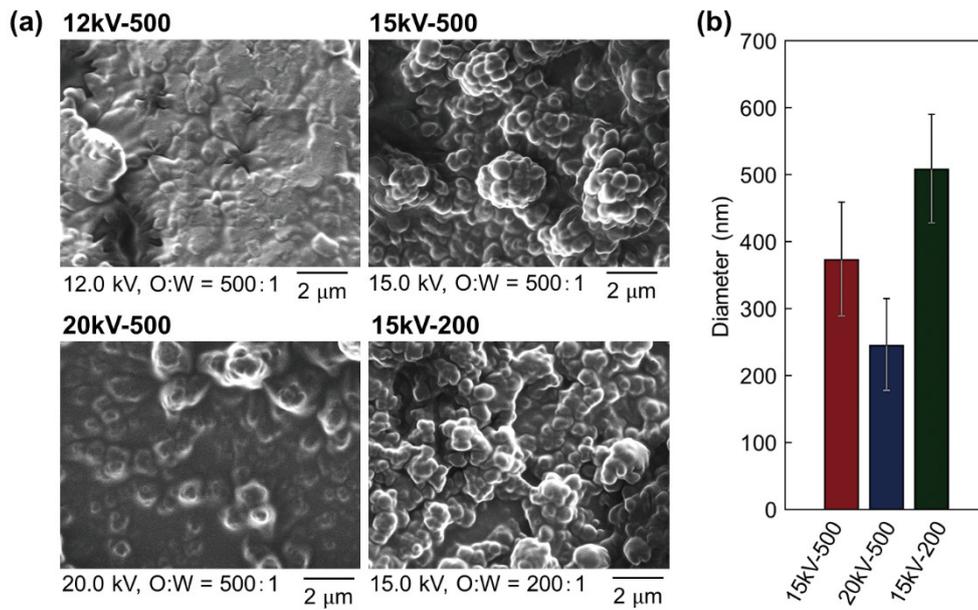


図2 FE-SEMによる作製ナノ粒子の形状評価

表2 ナノ粒子のbFGF含有量

Code ^{a)}	Amount of bFGF (ng)
12kV-500	819.73
15kV-500	740.33
15kV-200	651.73

a) Named using the applied voltage and oil-to-water ratio.

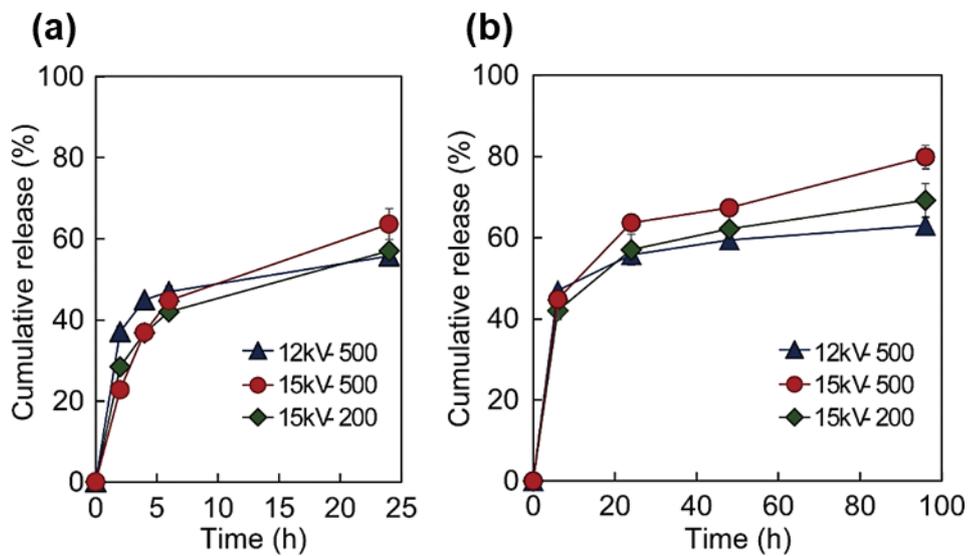


図3 ナノ粒子のbFGFの放出挙動の観察

を放出することがわかった。これはナノ粒子の表層付近に含有しているbFGFが放出されたためであると考えられる。96時間後までの放出挙動を観察したところ、12kV-500、15kV-200のbFGFの放出は24時間からそれほど変わらないのに対して、15kV-500のbFGF放出は約80%程度にまで上昇した。これは、15kV-500の粒子の形状が生理条件でのPLGAの分解とbFGFの放出に適しているためと考えられる。これらの結果より、15kV-500のナノ粒子が生体内でのbFGFの放出に適していることが示された。

4. 総括

本研究では、生分解性高分子であるPLGAで皮膚の再生を促すbFGFを内包したナノ粒子を作製した。様々な条件でエレクトロスプレーを行ったところ、印可電圧15kV、油相：水相の比率O：W = 500：1が均一なナノ粒子を作製するのに適した条件であることがわかった。また、bFGFの放出挙動を観察したところ、96時間で80%のbFGFの放出が可能であった。これらの結果より、作製したナノ粒

子は生体内で効果的なbFGF放出を促すことが示唆された。今後はナノ粒子の表面修飾による機能化により、さらなる機能性向上が期待できる。

(引用文献)

- 1) I. K. Shim, H. J. Chung, M. R. Jung, S. Y. Nam, S. Y. Lee, H. Lee, S. J. Heo, and S. J. Lee, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **102**, 3639-3648, (2014).
- 2) H.-J. Chung, J.-T. Kim, H.-J. Kim, H.-W. Kyung, P. Katila, J.-H. Lee, T.-H. Yang, Y.-I. Yang, and S.-J. Lee, *J. Control. Release*, **205**, 218-230, (2015).
- 3) K. Nagase, Y. Nagumo, M. Kim, H.-J. Kim, H.-W. Kyung, H.-J. Chung, H. Sekine, T. Shimizu, H. Kanazawa, T. Okano, S.-J. Lee, and M. Yamato, *Macromol. Biosci.*, **17**, 1700073, (2017).
- 4) K. Nagase, M. Nagaoka, Y. Nakano, and R. Utoh, *J. Control. Release*, **366**, 160-169, (2024).