

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790036

研究課題名（和文） ニオソームを利用した抗がん剤の新規デリバリーシステムの設計と開発

研究課題名（英文） Development of novel delivery system for anti-cancer drugs using niosomes as drug carrier

研究代表者

大河原 賢一（OGAWARA KENICHI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30291470

研究成果の概要（和文）：

ニオソームは、非イオン性界面活性剤により構成された二重膜に被われた閉鎖小胞であり、リポソームと同様の構造的な特徴を有する分子集合体であることから、薬物キャリアとしての応用が期待されている。そこで本研究では3種類の異なる基本骨格ならびに様々な物理化学的特性を有する計10種類の非イオン性界面活性剤を用いて種々のニオソームを調製し、それらの物理化学的特性および体内動態特性に関して多面的な評価を加えた。さらに抗がん剤ドキソルビシン（DOX）を内封したDOX内封ニオソームを調製し、それらの体内動態特性ならびに抗腫瘍活性についても評価を加えた。検討の結果、ニオソーム表面をPEGで修飾することにより、静脈内投与後の血中滞留性が顕著に増大することが明らかとなった。さらにこれらPEG修飾ニオソームにDOXを内封した各種製剤を調製し、固形がんモデルマウスに静脈内投与したところ、経時的な腫瘍組織への移行と有意な抗腫瘍効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Niosomes are defined as non-ionic surfactant (NIS)-based vesicles possessing an aqueous core enclosed by bilayer structure like liposomes. In this study, we prepared various naked and PEGylated niosomes composed of NISs with diverse physicochemical properties, and evaluated in-vivo disposition characteristics of niosomes and anti-tumor activity of niosomes encapsulating doxorubicin (DOX-niosomes). Among NISs tested, PEGylated niosomes composed of Span 20, Span 40, Span 80 or Brij 72 exhibited dramatically longer blood circulation time than each corresponding naked niosomes. Among them, higher tumor disposition of DOX and significantly higher in-vivo anti-tumor activity were correspondingly confirmed in the case of PEGylated DOX-niosomes composed of Span 20 or Brij 72 than each naked niosomes. From these results, it was suggested that PEGylation of niosomes with adequate composition significantly prolonged their blood circulation time and delivered sufficient amount of DOX into tumor tissue. These pharmacokinetic advantages of DOX-niosomes would have led to potent in-vivo anti-tumor effect of DOX.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：薬剤学・製剤学

科研費の分科・細目：ドラッグデリバリー

キーワード：ニオソーム、非イオン性界面活性剤、抗がん剤、薬物送達システム

1. 研究開始当初の背景

ニオソームは、非イオン性界面活性剤により構成された二重膜に被われた閉鎖小胞であり、リポソームと類似した構造的な特徴を有する分子集合体である。ニオソームの構成成分として用いる非イオン性界面活性剤は、リン脂質と比べて純度が高いうえ、格段に安価であり、さらに非常に多くの異なった性質、種類の界面活性剤が利用可能である。したがってニオソームの調製は、内封する抗がん剤の物性を考慮に入れ、それに適した非イオン性界面活性剤を理論的に選択することが可能となると考えられる。このことは、ニオソームが様々な抗がん剤に対する新規薬物キャリアとして高い潜在能力を有することを示唆している。これまでにニオソームを用いた研究の報告例は国内外に若干あるものの、それらは主に経皮投与を目的としたものであり、非イオン性界面活性剤も特殊なものを選択している場合が多い。更に、それぞれの研究において、用いられている非イオン性界面活性剤選択の理論的根拠は示されていない。したがって静脈内投与を目的とした薬物キャリアとして利用可能な、つまり安全性ならびに安定性が担保されたニオソームを調製するために、非イオン性界面活性剤が具備すべき条件（物性）に関する情報は極めて断片的であり、不明な点が多く残されているのが現状である。これらの情報を理論的、かつ体系的に整理することができれば、安価で、純度に優れた臨床応用の期待できる新規ニオソーム製剤の合理的な設計が可能となる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、様々な基本骨格ならびに物性を有する非イオン性界面活性剤を選択してニオソームの調製を試み、薬物キャリアとして利用可能なニオソームを形成するために

非イオン性界面活性剤が具備すべき条件について体系的に整理することを試みた。また、調製に成功したニオソームのDDS製剤としての応用を念頭に、抗がん剤であるドキソルビシンを内封したニオソーム製剤を調製し、その有用性を体内動態特性、薬物の放出性、抗腫瘍効果といった観点から多面的に評価した。

3. 研究の方法

(1) ニオソームの形成が可能な非イオン性界面活性剤のスクリーニング

さまざまな分子量、相転移温度、HLB値を有する非イオン性界面活性剤をその基本骨格に基づいて分類し、それらを網羅的、且つ系統的にスクリーニングすることにより、ニオソームを形成可能な非イオン性界面活性剤を決定した。ニオソーム形成の有無は、調製した製剤の粒子径を測定することにより行った。

(2) 生体適合性の評価：生体膜に対する傷害性の有無の確認

本研究課題では、安全性の点においても優れたニオソーム製剤の調製を目指した。界面活性剤を主成分としているので、処方によっては、生体膜に対し、様々な作用を引き起こすことが予想される。そこで (1) の検討により粒子径150 nm以下のベシクルを形成可能であることが明らかとなったニオソームの溶血活性を評価することにより、生体膜に対しても安全性の高い製剤処方を選定した。

(3) モデル水溶性化合物の放出特性の評価

上述したようにニオソームは、リポソームに類似した構造的な特徴を有しており、内水相に薬物を封入することが可能である。そこでモデル水溶性化合物としてカルセインを選択し、(1)～(2)のスクリーニングにより選択されたニオソームにカルセインを封入し、そ

の放出特性を検討することで、水溶性化合物の保持能力について定量的な評価を加えた。

(4) 抗がん剤内封ニオソーム製剤の調製とその体内動態特性の評価

抗がん剤内封ニオソーム製剤の体内動態特性の評価は、(5)の結果と結び付けて議論するために、担がんマウスを用いて行った。用いる抗がん剤としては、まずはリポソームへの非常に高い内封方法が確立されているドキソルビシンを選択し、同様の方法を応用することにより、ドキソルビシン内封ニオソーム製剤の調製を試みた。実験は、コレステロール誘導体の³H-標識体を製剤処方中にトレーサーとして添加することにより放射標識したニオソーム製剤を担がんマウスに静脈内投与した後、各種サンプル中の放射活性を測定することで、ニオソームの血中濃度推移、および臓器、腫瘍組織への移行量を評価した。これらのニオソーム側の体内動態特性の検討に併せ、ドキソルビシンの血中濃度推移、臓器中濃度、腫瘍組織への移行量の時間推移も、高速液体クロマトグラフィーを用いて評価した。さらにニオソーム表面をPEGにより修飾したPEG修飾ニオソーム製剤も併せて調製し、その有用性を検証した。

(5) ドキソルビシン内封ニオソーム製剤による抗がん効果の評価

抗がん剤内封ニオソーム製剤による抗がん効果の評価は、製剤投与後、経日的に腫瘍のサイズを測定するとともに、マウスの生存日数を計測することにより行った。これらの検討に加え、副作用の指標として、薬物投与後の体重の推移も計測した。

4. 研究成果

(1) ニオソームの形成が可能な非イオン性界面活性剤のスクリーニング

基本構造の異なるSpan、Brij、シヨ糖脂肪酸エステルから、合わせて10種類の非イオン性界面活性剤選択し、検討に用いた。ニオソームの構成成分として、非イオン性界面活性剤、コレステロール、Dicetylphosphate (DCP) を用い、ハイドレーション法により調製を行った(Naked ニオソーム)。また、ポリエチレングリコール (PEG) を導入した、PEGニオソームも同様に調製した。調製した各ニオソームの粒子径、及び表面電位を測定した。その結果、いずれのニオソームも、100 nm前後から200 nm前後の粒子径を有する分子集合体が形成されていることが確認された。またNaked ニオソームの表面は、DCPの影響により生じたと考えられる負電荷が認められたが、PEGニオソームは、表面がPEGにより修飾されているため、表面電荷の絶対値が0付近にまで抑制されていることが明らかとなった。

(2) 生体適合性の評価：生体膜に対する傷害性の有無の確認

非イオン性界面活性剤には脂質可溶化能があるため、細胞膜へ傷害をもたらす可能性がある。そこで、調製したニオソームの安全性の指標として、ニオソームの赤血球細胞膜に対する傷害性（溶血活性）を評価した。その結果、高い溶血活性を示したニオソームが複数確認された一方で、Span 40、Span 80、Brij 52、シヨ糖脂肪酸エステル (S-970、S-1170) を用いて調製したニオソームの溶血活性は低い値を示したことから、これらニオソームは投与後も安全性が高いものと推察された。

(3) モデル水溶性化合物の放出特性の評価

上述した通り、ニオソームは非イオン性界面活性剤により形成される二重膜に覆われた構造を有するため、内水相を有する。そのためニオソーム内部には水溶性を有する薬物が保

持可能となる。したがって、それら内封薬物の放出性を製剤技術により制御することができれば、内封薬物の薬効の持続化が達成できると考えられる。そこでまず、水溶性薬物であるカルセインの放出特性を検討することで、調製したニオソームが内水相を有するかの確認と、内封したカルセインの保持能の評価を加えた。その結果、いずれのニオソームにおいても、時間依存的にカルセインの放出が確認された。更に実験終了時におけるカルセインの放出量は、最も高いカルセインの放出性が確認されたSpan 80においても内封量の40%強に過ぎないことから、水溶性薬物であるカルセインが、二重膜内部の内水相へと封入されており、さらにその保持能も十分に高い事を示すと考えられた。

(4) ドキソルビシン内封ニオソーム製剤の調製とその体内動態特性の評価

ラットを用いた予備検討により、優れた血中滞留性が認められた5種のPEGニオソームにドキソルビシンを内封し、腫瘍組織への移行性を含めた体内動態特性について、固形がんモデルマウスを用いて評価した。その結果、いずれの製剤においても、ニオソーム自身の高い血中滞留性、及び腫瘍組織への経時的な移行が確認できた。また、内封薬物であるドキソルビシンについても、ニオソーム同様に高い血中滞留性、及び経時的な腫瘍組織への移行が認められた (Fig. 1)。

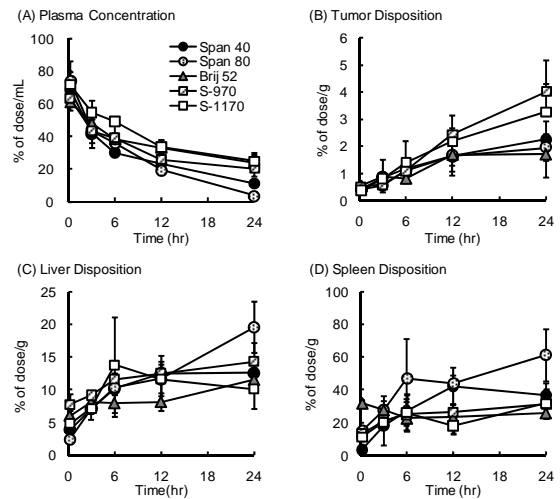


Fig. 1 Plasma Concentration-Time Profile and Tissue Distribution of PEG Niosomes after Intravenous Injection into C-26 Tumor-Bearing Mice

Results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 4).

さらに各ニオソーム製剤からのドキソルビシンの放出性について、透析法、及びがん細胞を用いたMTTアッセイ法により評価した結果、Span 80、及びBrij 52製剤からのドキソルビシンの放出性は5種の製剤の中で、比較的高いことが示された。一方でSpan 40、S-970、S-1170製剤からのドキソルビシンの放出性は極めて低いことが示された (Fig. 2)。

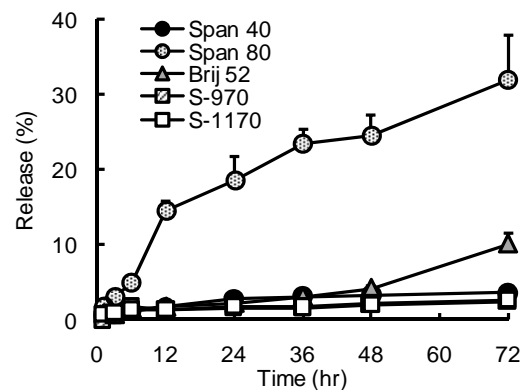


Fig. 2 Doxorubicin Release Properties from PEG Niosomal Doxorubicin Assessed by Dialysis Study Results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 3).

(5) ドキソルビシン内封ニオソーム製剤による抗がん効果の評価

ドキソルビシンを内封した各製剤の固形がんモデルマウスにおける抗腫瘍効果の評価を行った。実験はいずれのニオソームも、ドキソルビシンとして2 mg/kgの投与量で行い、対照群には生理食塩水を投与した。その結果、投与後14日目までは、すべての製剤投与群において、生理食塩水投与群と比べて有意な腫瘍増殖抑制効果が確認された。中でも、Brij 52、及びS-970製剤の抗腫瘍効果は、投与後20日目の時点においても持続しており、腫瘍増殖速度も有意に低下していることが明らかとなり、これらPEGニオソーム製剤の有用性が示された (Fig. 3)。

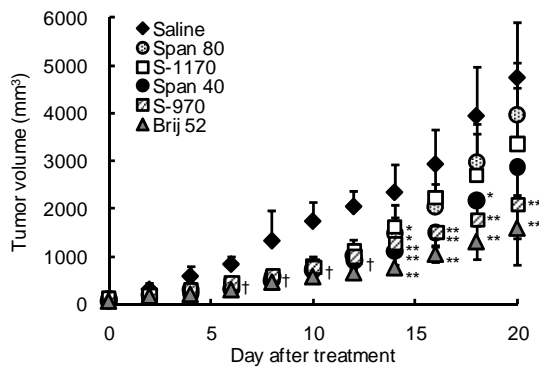


Fig. 3 Anti-Tumor Effect of PEG Niosomal Doxorubicin after Intravenous Injection into C-26 Tumor-Bearing Mice at a Dose of 2 mg/kg as Doxorubicin
Results are expressed as the mean \pm S.D. (n = 6).
** p < 0.01; * p < 0.05, compared with Saline.
† p < 0.01, compared with Saline for all niosomes.

(6) 総括

本研究で得られたこれらの知見は、有効かつ安全ながん化学療法への応用を念頭に置いた、最適なニオソーム製剤の設計に対して、有益な基礎的情報を提供するものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

大河原 賢一、西口 修平、宮田 竜也、木村 聡城郎、檜垣 和孝、ドキソルビシン内封ニオソーム製剤の調製とその体内動態特性及び抗腫瘍効果の評価、第27回日本DDS学会、2011年6月10日、東京大学

西口 修平、宮田 竜也、大河原 賢一、木村 聡城郎、檜垣 和孝、In-Vivo Disposition Characteristics and Anti-Tumor Activity of Doxorubicin-Encapsulating Niosomes、日本薬物動態学会 第25回年会、2010年10月9日、大宮市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河原 賢一 (OGAWARA KENICHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：30291470