

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

目 次

課題番号		
文献NO 20030933A KH61061	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 …… 1
KH61062 954A	生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究	土屋利江 …… 20
KH61063 955A	標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発	名取泰博 …… 29
KH61064 956A	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷統寿 …… 32
KH61065 957A	健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究	高鳥浩介 …… 36
KH62080 958A	ヒト肝特異的有機アニオントランスポーター遺伝子LST-1およびLST-2導入肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓組織の開発	松野正紀 …… 44
KH62083 959A	活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究	五十嵐理慧 …… 47

標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発

所属 国立国際医療センター研究所
臨床薬理研究部
研究者 名取 泰博

研究要旨 ターゲティング能を有するカチオン化脂質である TRX-20 を配合したリポソームは、平均粒子径が 85~114 nm で長い血中滞留性を示すこと、同リポソームはネフローゼ動物モデルにおけるステロイド剤の DDS として有効であることがわかった。

分担研究者

テルモ株式会社研究開発センター 木村 順治

A. 研究目的

現在、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症の進行を確実に阻止する方法はなく、その多くは慢性腎不全へと移行し、人工透析や腎移植を必要とするようになる。維持透析の普及は慢性腎不全患者の生命を救うという点では画期的な方法ではあるが、患者の平均余命は依然として正常人より10年以上短いと言われており、また患者の QOL の点からも慢性腎不全を阻止することが重要な課題であることに変わりはない。ステロイド剤は種々の腎炎の治療に広く用いられているが、その副作用が大きいこともあり、その使用には種々の制限がある。

木村らは新規に開発した塩基性脂質 TRX-20 (3,5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride) を添加したポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームが培養腎糸球体メサンギウム細胞に選択的に取り込まれることを見いだした。そこで本研究では、糸球体に指向性を有する新しい DDS 製剤の開発を目指し、同リポソーム (TRX リポソーム) にプレドニソロンを内封させたリポソーム製剤を用いて、副作用の少ない新しい腎疾患治療法を開発することを目的とする。

DDS 製剤にとって重要な性質のひとつは体内滞留性である。TRX リポソームはカチオン性脂質である TRX-20 の性質によって細胞ターゲティング能を有するが、一方ではそのカチオン性のために血中から速やかに除去される可能性もある。そこで今年度は TRX リポソームのラットにおける体内滞留性と粒子径の関係について調べた。

一方昨年度までの本研究では、標的指向性の効果を調べるための具体的な対象腎疾患として、急速進行性糸球体腎炎を取り上げた。急速進行性糸球体腎炎は病理学的には半月体性糸球体腎炎 (CreGN) 像を呈し、発症から数週間~数ヶ月で腎不全に至る

予後の悪い疾患であるが、その一部の患者にはステロイドパルス療法が有効と言われている。しかし CreGN は比較的まれな疾患であること、進行が早いことなどの理由により、コントロールスタディは行われていない。我々はこれまで CreGN の動物モデルを用いて臨床的、病理学的及び免疫組織化学的解析によりステロイドパルス療法の有効性を示した。そこで本研究において我々は、CreGN の動物モデルに対して、TRX リポソームにリン酸プレドニソロン (PSL) を内封させた場合の有効性を検討し、フリーの PSL よりも尿蛋白の上昇抑制、白血球浸潤、半月体形成、腎機能低下に対してより有効な治療効果を示すことを明らかにした。一方、ステロイド剤はネフローゼに対する治療にもしばしば用いられている。小児ネフローゼの主な原因疾患である微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) に対するステロイド剤の有効性は確立されており、また我が国ではその他の膜性腎症、巣状糸球体硬化症などについても投与されることが多い。ラットに puromycin aminonucleoside (PAN) を投与して作製する腎症は、その簡便性や再現性から広く用いられるネフローゼの動物モデルである。このモデルがヒトのどのタイプのネフローゼに対応するかは議論が分かっているが、モデルの作成条件によってはステロイド剤が有効であると報告されている。そこで今年度我々は、PAN 腎症ネフローゼモデルに対するステロイド剤の有効性を確認するとともに、TRX-20 リポソームに封入した場合の効果を調べることにした。

B. 研究方法

リポソームはレシチン：コレステロール：TRX-20：ポリエチレングリコール (PEG) 5000-DSPE = 50:42:8:0.75 (mol 比) からなる脂質成分を用いて調製した。また本研究に用いた粒子径の異なる4種類のリポソームの性状を表1に示す。

表1 TRX リポソームの性状

Characteristics	0.05 μ m	0.1 μ m	0.2 μ m	0.4 μ m
Mean particle size*	84.9 nm	114.3 nm	184.1 nm	285.9 nm
Zeta-potential	7.9 mV	5.2 mV	3.0 mV	2.4 mV
HSPC concentration	9.71 mg/mL	11.45 mg/mL	12.11 mg/mL	11.77 mg/mL

(* : Dynamic light scattering)

これら4種のリポソームをローダミンにて蛍光標識し、SD系ラットに静注した。1, 3, 6, 24及び48時間後に採取した血液からクロロホルム・メタノールにて脂質を抽出し、そこに含まれるローダミンの蛍光を測定することにより、血中リポソーム濃度を測定した。

腎症の治療実験に用いたリン酸プレドニソロンナトリウム内封リポソーム、空のリポソーム、及びリン酸プレドニソロンナトリウム粉末はテルモ株式会社より供給されたものを用いた。いずれの薬剤も生理食塩水により溶解あるいは希釈した。PAN腎症はWistar系ラット(雄、150-170g体重)にpuromycin aminonucleoside (Sigma)の生理食塩水溶液(4mg/100g体重)を頸静脈投与して作製した。陰性コントロール群には同量の生理食塩水を投与した。リン酸プレドニソロンナトリウム(Free-Pred)投与群(n=8)は腎炎惹起日から連日20mg/kg体重を9日目まで尾静脈投与した。ステロイド内封リポソーム(Lipo-Pred)投与群(n=5)はリン酸プレドニソロンナトリウムとして15mg/kg体重を腎炎惹起当日のみ尾静脈より投与した。未治療群には生理食塩水を連日投与した。ラットは腎炎惹起前及び惹起日より6日目までの隔日と9日目に代謝ケージに24時間入れて採尿し、尿蛋白をピュレット法により測定した。統計解析はStatViewを用いたANOVA法により行った。

C. 研究成果

図1

Blood concentration of HSPC in rats treated with TRX-Liposomes

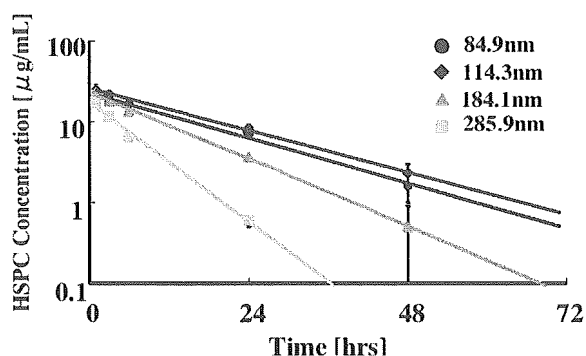


図1に4種の平均粒子径を有する各TRXリポソームの半減期を示す。粒子径の大きい2種は小さいものと比較して半減期が短いことがわかった。

この結果から計算した各種パラメータを表2に示す。最も平均粒子径の大きいTRXリポソームは約5時間の半減期であるのに対し、粒子径114.3nmのTRXリポソームの半減期は14時間であった。またさらに小さい粒子径84.9nmのリポソームの半減期は13.1時間と、114.3nmのリポソームとほぼ同程度であり、これらのサイズが体内滞留性が長く、キャリアーとして適切であることが示された。

表2

Pharmacokinetic parameters of TRX-Liposomes in rats

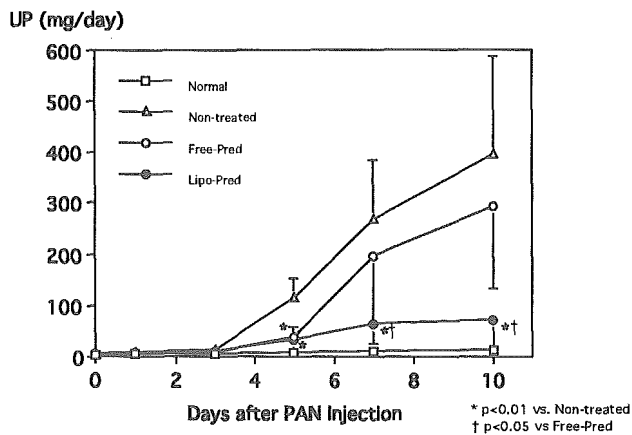
Parameter	84.9nm	114.3nm	184.1nm	285.9nm
C_0 [μ g/mL]	22.7 \pm 0.9	25.8 \pm 2.7	22.7 \pm 0.9	17.6 \pm 0.8
k_{el} [1/h]	0.054 \pm 0.008	0.051 \pm 0.008	0.076 \pm 0.008	0.145 \pm 0.010
$t_{1/2}$ [h]	13.1 \pm 1.9	14.0 \pm 2.3	9.2 \pm 0.9	4.8 \pm 0.3
AUC [μ g h/mL]	444.5 \pm 43.3	507.7 \pm 30.3	292.3 \pm 17.7	118.2 \pm 5.7
MRT [h]	19.1 \pm 2.5	20.6 \pm 3.5	13.2 \pm 1.3	6.7 \pm 0.6
CL_{eq} [mL/min/kg]	0.091 \pm 0.009	0.079 \pm 0.005	0.137 \pm 0.008	0.339 \pm 0.016
V_{dis} [mL/kg]	103.0 \pm 3.6	97.0 \pm 13.9	108.2 \pm 4.0	135.9 \pm 6.9

Each value represents the mean \pm S.D. of three rats.

一方、腎症の治療におけるTRXリポソームの腎糸球体指向性の効果について、今年度はネフローゼモデルであるPAN腎症を取り上げた。同腎症においてはPAN投与後5日目までに蛋白尿が出現し、その後次第に尿蛋白レベルが上昇して10日目頃にプラトーに達する。また本モデルでは、PANの投与量が多いとステロイド剤の効果が出ないことが知られている。そこで最初に、1~5mg/100g体重のPANを投与し、10日目までの尿蛋白の変化を調べた。その結果、4mg/100g体重のPANの投与により尿蛋白の増加が確認されたことから、本実験においては、同量のPANを用いることにした。

次に、同モデルに対するステロイド剤の効果について検討した。フリーのステロイド剤(20mg/kg体重)を連日投与した群では、5日目の尿蛋白の上昇を有意に抑制したが、その後は未治療群との間に有意差はなくなり、10日目まで尿蛋白が増加した。それに対して、リポソームに封入したステロイド剤(15mg/kg体重)を腎症惹起当日にのみ一回投与した群では、未治療群と比べて10日目まで尿蛋白の増加が有意に抑制され、またフリーステロイド群との比較においても7日目以降に有意に低い尿蛋白レベルを示した。これらの結果から、本研究に使用したTRX-20修飾リポソームの糸球体指向性は、ネフローゼの動物モデルとして広く用いられているPAN腎症において、ステロイド剤の治療効果を有意に高めることが明らかとなった。

図2
Effect on Urinary Protein Excretion



D. 考察

昨年度までの本研究において我々は、TRX-20 を含む PEG 修飾リポソームは腎メサングウム細胞に対して選択的に結合することを明らかにしてきた。本年度の研究において、血中滞留性の検討から TRX リポソームの最適な粒子径は約 110 nm であることが明らかとなった。これは代表的な PEG 化リポソームであるドキシソルピシン含有リポソーム (Doxil®) の最適な粒子径 (75~130 nm) の報告とほぼ一致する。また、大きい粒子径のリポソームはクーパー細胞に取り込まれやすいため血中からの消失速度が速いことが考えられた。

PEG化リポソームは膜表面の立体構造により血中における滞留性が長いことが明らかになっている。TRX リポソームのラットにおける半減期は14.0時間であり、カチオン化脂質配合にもかかわらず、血中滞留性の長いリポソームが得られることが明らかとなった。

本研究では、DDS としての TRX リポソームの有用性を調べるために、腎疾患の治療に広く使われているステロイド剤を封入したリポソームを用いている。ステロイド剤は抗炎症作用、免疫抑制作用が強い反面、易感染性などの副作用も強いためにその多用には問題が多い。本研究は糸球体に指向性を有するリポソームにステロイド剤を内封させることにより、副作用を抑えて効果的に糸球体障害を抑制することを試みた。昨年度までの本研究において我々は、病理学的には半月体性糸球体腎炎の像を呈する急速進行性糸球体腎炎の動物モデルを用いて、その有効性を明らかにしてきたが、今年度はネフローゼ症候群のモデルとして PAN 腎症に対する同製剤の有用性を調べた。その結果、リポソーム封入ステロイド剤を腎症惹起当日に1回投与するだけで尿蛋白の増加を有意に抑制することが明らかとなった。

PAN 腎症はネフローゼのモデルとして広く用いられているが、本研究で行った頸静脈投与を行うと、病初期のネフローゼがいったん回復した後に、次第に再び尿蛋白が増加し、数ヶ月から半年を経た後に巣状糸球体硬化症を呈するようになることが知られている。本研究では、その時期まで観察することができなかったが、同モデルを用いてこれまで報告されている様々な治療実験においては、病初期の病態を改善させる治療法が、しばしばその後の巣状糸球体硬化症の発症をも抑制する。またヒトにおけるステロイド反応性の微小変化型ネフローゼ症候群が、次第にその反応性が悪くなり、ついにはステロイド抵抗性の巣状糸球体硬化症に進展するとの考え方もある。これらの知見を総合すると、本研究で得られた効果が、長期的な巣状糸球体硬化症に対しても何らかの有効性を示す可能性が考えられ、今後の研究が待たれる。

E. 結論

TRX リポソームはラットにおいて顕著な体内滞留性を示すこと、その滞留時間は粒子径に大きく依存し、平均粒子径が114 nmのリポソームが最も長い滞留性を示すことが明らかとなった。これらの結果から、110 nmの粒子径を有するTRXリポソームはカチオン化による細胞選択性を有しつつ、薬剤等のキャリアーとして生体に利用可能な長い半減期を保持していることがわかった。

また、TRX リポソームに封入させたステロイド剤は、半月体性糸球体腎炎の動物モデルのみならず、ネフローゼ動物モデルにおいても有用性を示すことがわかった。

F. 研究発表

黒崎靖夫、関口有信、川原一夫、清水恵美子、上田努、島村京子、宮岡象三、宮島勝春、木村順治: Effect of TRX-20 liposomes size on the prolonged circulatory life in rat、日本薬学会第 123 年会、長崎、平成 15 年 3 月

宇和野幹子、加藤里奈、名取有美子、宮澤しのぶ、森本克己、牛島秀人、萩原仁美、木村順治、名取泰博: 半月体性糸球体腎炎モデルに対するリポソーム内封ステロイド剤の治療効果、第 47 回日本腎臓学会総会、宇都宮、平成 16 年 5 月発表予定

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成15年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成16年9月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社