

<p>サブテーマ 1 : ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出 小テーマ 1-1: ウイルス肝炎からの肝発がん機構・進展因子の解明とその予防・治療法の開発 c) 生理活性物質を担持したナノキャリアによる肝疾患利用の試み</p>
<p>サブテーマリーダー 鹿児島大学医歯学総合研究科：教授 坪内博仁 研究従事者 宮崎県工業技術センター：主任研究員 清水正高、主任研究員 山本建次 宮崎大学医学部附属病院薬剤部：教授 有森和彦、奥村学、河野洋平、永田将司、日高宗明 株式会社キヨモトテックイチ：執行役員兼自動機部長 星野義郎 宮崎県産業支援財団：研究員 西片奈保子、技術スタッフ 古市佳代 鹿児島大学医歯学総合研究科：講師 桶谷真、医員 那須雄一郎、講師 宇都浩文、准教授 井戸章雄</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 肝細胞増殖因子（HGF）など多様な機能を有する生理活性物質を効果的に標的臓器・組織へ送達することができるドラッグデリバリーシステム DDS の確立を目指し、膜乳化技術に基づくエマルジョン型 DDS キャリアを開発する。さらに肝がん予防・肝硬変治療技術へと展開する。</p> <p>②研究の独自性・新規性 宮崎県工業技術センターが独自に開発して国内外で実用研究が進んでいる膜乳化技術を進展させ、水溶性物質を封入し、ナノレベルで液滴径をコントロールでき、さらに血中滞留性や肝指向性などの特異的機能を付与したキャリアを開発する。これらは他の追従がないオリジナル技術であり、生体安全性の高い新しい DDS が期待される。また、エマルジョン中に高濃度のアルコールを加えられるアルコール耐性エマルジョン、粒子径制御により血中滞留性が高まること、培養細胞での実験において細胞内にエマルジョン粒子が取り込まれることを明らかにし、タンパク質やペプチドなどの水溶性高分子物質の送達キャリアとしての有用性が示されている。</p> <p>③研究の目標</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズⅠ：HGF 代替物質を封入したエマルジョン滴径を 50～500nm でコントロールし、<i>in vivo</i> で血中滞留性向上と肝臓への特異的送達を確認する。 ・フェーズⅡ：HGF やインターフェロン（IFN）などの生理活性物質を封入したキャリア製剤の薬物動態を解析し、薬理および安全性試験を経て医薬品化の可能性を探索する。 ・フェーズⅢ：タンパク質封入型キャリアとして、血中滞留性や肝臓集積性を生かした DDS 製剤を提案する。静脈投与だけでなく他の投与形態での有効性を確認し、生理活性物質用 DDS キャリアの具体化・実用化を促す。
<p>研究の進め方及び進捗状況</p> <p>エマルジョンキャリアの微細化では、様々な多孔膜を利用した膜透過技術（膜乳化法の一つ）とキャリア組成（油剤、乳化剤、安定剤、浸透圧調整剤）の改良により、ナノサイズの微細化コントロールを達成した。モデル物質を封入した異なる滴径のキャリアをラットに静脈内投与し、モデル物質の血中濃度の経時的変化と一定時間後の各臓器への集積を測定し、血中滞留性並びに臓器集積性に及ぼす滴径の影響を明らかにした。多相ナノエマルジョンの微細化に必須となる水溶性物質の油中微粒子封入（S/O 化）法と粒子測定法を確立し、多様な油脂での封入を実現した。油中の封入物質の分散状態を測定するために、動的光散乱法での測定法を確立、長期間の保存安定性を確認した。また、HGF の封入にあたり活性保持させたままでの溶解液中の塩除去に向け、各種添加剤を検討した。IFN-β エマルジョンでは、添加剤の除去による高濃度封入エマルジョンを調製、培養細胞を用いた細胞増殖性試験を行い、細胞への効果・影響を検証した。シスプラチン（CDDP）エマルジョンの調製を検討し、灰化し、誘導結合プラズマ発光分析装置（ICP-AES）を用いた測定法を確立、エマルジョンの DDS 性能について詳細な分析と動物試験を行った。HSA 添加による CDDP の保持条件を見出し、培養細胞を用いた抗がん活性試験ならびにラット静脈投与による血中滞留性・臓器集積性試験を実施、エマルジョン製剤化による腎毒性低下と肝臓集積性について検討を継続中である。</p> <p>FITC 蛍光標識デキストラン（FD70）を封入した S/O/W 型ナノエマルジョンを、肝がん由来培養細胞 Huh-7 に添加し、細胞を蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーなどで測定し、エマルジョンによる細胞内導入とプラスミド封入エマルジョンによる遺伝子導入を見出した。各種培養細胞での取り込み試験と遺伝子導入試験を行い、細胞内導入現象の把握とエンドサイトーシス経路での取り込み確認を行った。</p>
<p>主な成果</p> <p>具体的な成果内容：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) エマルジョンキャリアの開発：静注型 DDS に必要な 200 nm 以下の滴径制御をクリアし、50 nm を実現した。また、高濃度アルコールを含有したエマルジョン系を見出し（特願 2005-101043・PCT/JP2006/306643）、さらにナノサイズのエマルジョンを製造できる高圧式膜透過装置（特願 2005-347020）を製品化した。 2) 水溶性物質の油中封入と粒子径測定法の確立：多相ナノエマルジョンの微細化に必須である物質の油中封入（S/O 化）は、油性乳化剤 PGCR の濃度に最適値があることを見出した。また、多様な油脂で封入でき、動的光散乱法により、S/O 中での BSA やデキストラン（平均分子量 7 万）などが平均粒径 40～60nm 程度の微粒子として測定できた。また S/O 化後 9 ヶ月後も粒子径に大きな変化がなく、長期安定性を確認できた。 3) 血中滞留性向上の実証と臓器への特異的送達：ラット静脈投与試験において、滴径 500 nm 以上のキャリアではモデル物質水溶液を投与した場合と同等の血中濃度推移を示した一方、滴径 150～250 nm では持続的な血中濃度推移が示され、物質本来の血中濃度半減期を延長できる機能を証明することができた（特願 2005-317608）。 4) エマルジョンによる細胞内導入の発見と検証：FD70 の水溶液添加では細胞内に蛍光は認められないのに対し、エマルジョンでは細胞質内に蛍光を認め、その蛍光は経時的に増加、点状→細胞質全体に広がるのがわかり、エンドサイトーシス経路で取り込まれ、細胞質内で封入物質放出が示唆された。この現象は、細胞種によって取り込み量に差異があり、接着系培養細胞では多くの細胞種では可能だが、浮遊系細胞での取り込みは現在までの

ところ確認されていない。さらに蛍光タンパク質 GFP 発現プラスミド封入エマルジョンによって、細胞内の遺伝子発現も確認できた(特願 2007-93469)。

- 5) HGF エマルジョン調製の検討: HGF 活性を保持して油中封入するため、低塩濃度下の活性保持添加物を探索、非界面活性スルホベタン (NDSB) を見出したが、NDSB も油中封入が困難であり解決に至らなかった。
- 6) IFN- β エマルジョンの調製: IFN- β 製剤を透析し、乳糖を除去することで良好に S/O 化した IFN- β エマルジョンは、未封入エマルジョン及び IFN- β 水溶液と比較して、培養細胞の細胞増殖性を高め、エマルジョンによって細胞内に取り込まれた IFN- β が何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。しかし、エマルジョン中の IFN- β 分析手法が未確立で、動物等による効果確認試験も困難であることから、詳細な評価に至らなかった。
- 7) CDDP 担持型エマルジョンの調製と体内動態評価: CDDP は油中に保持することができず、保持物質としてタンパク質を用いた S/O への混合封入法を確立した。このエマルジョンは平均粒径 250nm で、調製 2 カ月後も漏洩率が約 3% と高い CDDP 保持率であった。このエマルジョンの培養細胞でのがん細胞増殖抑制試験を行ったところ、添加 24 時間後の IC₅₀ が水溶液よりも有意に低くなり、エマルジョン化による細胞内取り込み量の増加が推察された。またラットへの静脈投与試験を行った結果、Control 群 (CDDP 水溶液) と比較してエマルジョン投与群では血中濃度および臓器分布に大きな差異があることが明らかとなった。特に肝臓中濃度は、エマルジョン群で約 10 倍となり、肝臓移行性を向上させることが確認できた。一方、CDDP の主な副作用発現部位である腎臓への分布は 70% 程度に減少し、腎毒性が軽減されることが示唆された。

特許件数: 4

論文数: 7

口頭発表件数: 11

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

多相エマルジョンをナノサイズに微細化し、水溶性物質を高濃度で含有させた S/O/W 型エマルジョンや DDS への展開を試みた例は世界的にほとんどない。また、DDS キャリアとして本研究で示した高い血中滞留性を示した報告も例がない。よって世界水準と比較しても何ら遜色ないレベルにある成果と考えられる。

2 実用化に向けた波及効果

HGF 以外にも血中濃度半減期が短いために効果が発揮できない様々な生理活性物質への応用が可能である。例えば、IFN や TNF- α などを薬物の化学修飾なしに DDS 化し、半減期を長期化することができる。経口投与や経皮吸収の可能性も十分に期待できる。さらに、細胞内への物質導入キャリアとしては、遺伝子発現率をコントロールできるようになれば、遺伝子治療など *in vivo* での遺伝子導入キャリアとして有用となる可能性をもつ。

ナノサイズのエマルジョン製造技術は、医薬品分野だけでなく、食品や化粧品など工業的応用が大いに期待される。さらにナノエマルジョン製造膜乳化装置の実用化により、多様な分野からの実用化を前提にした波及効果が見込まれる。また、アルコールを高濃度に含有できるエマルジョンはこれまで化粧品や食品などの分野で必要とされてきたものであり、ナノエマルジョン製造技術とともに具体的な製品への応用の可能性が高い。

残された課題と対応方針について

ナノサイズのキャリアが従来考えられていたものとは異なる挙動・性質を持つことが示され、それに伴いキャリアの破壊や成分分析の手法確立が非常に困難であることが判明し、有機物を灰化分解した無機元素測定でのみ封入率や保存安定性など詳細な評価が可能であった。動物実験については臓器ごとの集積量を測定した後に目標組織・細胞への送達を確認する実験が必要であり、疾患モデルなどを用意できずに事業期間が終了したことが残念である。今後の課題として、組織学的手法での臓器の解析および疾患モデルでの評価が必要である。このキャリアはタンパク質や核酸などの有機高分子の担持における有用性が示され、今後更なる分野横断的研究が期待される。

本事業では、静脈投与のみを研究対象としたが、見出された成果からは、高分子が吸収・移行されにくい経口投与や経皮吸収型の送達キャリアとしての可能性が期待され、再度目標を探索し、より具体的な治療を前提にした DDS デザインを行い、実用化を目指すとともに、基盤技術としての広域な開発研究を進める予定である。

	JST 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	5,052	6,866	6,844	8,247	4,828	31,837	404	3,950	3,683	4,106	4,106	4,106	20,355	52,192
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	300	3,625	5,600	5,830	6,198	2,000	23,553	200	950	4,500	2,000	2,500	1,900	12,050	35,603
旅費	0	89	216	413	197	190	1,105	0	214	259	0	0	500	973	2,078
その他	27	46	32	465	560	302	1,432	0	0	0	2,203	0	100	2,303	3,735
小計	327	8,812	12,714	13,552	15,202	7,320	57,927	604	5,114	8,442	8,309	7,682	7,682	35,681	93,608

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST 負担による設備: なし

地域負担による設備: レーザー回折散乱式粒度分布測定装置 (島津製作所製 SALD-2000)、電気泳動光散乱測定計 (大塚電子製 ELS-800)、水分計 (京都電子工業製 MKA-3P)、蛍光顕微鏡 (オリンパス)