

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08104

研究課題名(和文) 経口投与可能なM細胞経由型ビタミンB12内封リポソーム製剤の検討

研究課題名(英文) Development of oral administered liposome contained vitamin B12 via the M cell

研究代表者

佐塚 泰之 (Sadzuka, Yasuyuki)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：90162403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胃がんなどによる胃摘出後に発症するビタミンB12 (VB12)の欠乏を原因とする巨赤芽球性貧血患者のQOL向上を目的とした経口投与型VB12製剤を開発することである。胃内因子なしにVB12を生体内へ吸収させるため、ウイルスと類似構造をしている薬物キャリアであるリポソームを使用し、免疫応答に寄与している腸管上皮細胞のパイエル板に存在するmicrofold cell(M細胞)から吸収されることを期待した。マウスに投与した結果、VB12内封リポソームは水溶液に比べて血中VB12濃度を増大させ、その吸収過程にはM細胞が関与している可能性が考えられリポソーム化による有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The formulation which be available for oral administration was studied for treating megaloblastic anemia based on deficient vitamin B12 (VB12) by stomach resection of gastric cancer patients, and improvement of patient's quality of life. Liposome, one of the drug carriers, was selected for taking into the body without gastric intrinsic factor. It was expected that liposome was taken up via the microfold cell (M cell) on Peyer's patch cells of intestinal epithelium cell because the structure of liposome looks like that of virus. VB12 loaded liposome was increased VB12 concentration in serum compared to VB12 solution when mice was orally administered. It was expected that the absorptive process was involved in M cell. Thus, the usefulness of liposome was suggested for treating megaloblastic anemia as orally administrated formulation.

研究分野：薬物送達を研究基盤としたリポソームへの機能性付与及び食品成分併用による医薬品の効果増強

キーワード：リポソーム 経口投与 M細胞 悪性貧血

1. 研究開始当初の背景

巨赤芽球性貧血は、ビタミン B12 (VB12) や葉酸の吸収不全で DNA 合成障害が生じ、骨髄に巨赤芽球が出現する貧血である。本疾患は、自己免疫疾患が関与する胃粘膜萎縮や胃がんなどによる胃摘出により VB12 の吸収に必要な内因子 (IF) の分泌が低下し、吸収に必要な IF-VB12 複合体が形成されないことによる貧血が大部分を占めている。そのため、経口投与ではほとんど治療効果を得ることができず、VB12 の筋肉内注射が主な治療法とされている。本治療は生涯継続する必要があることより、経口投与のような簡便な投与経路にて高い効果を発揮可能な治療方法が患者の quality of life (QOL) の向上に重要な事項であると考えた。

VB12 の効率的な吸収部位として腸管上皮細胞のパイエル板に存在する microfold cell (M 細胞) に着目した。M 細胞は腸管に存在する外来抗原をパイエル板の内側に輸送する細胞として発見されたものである。細菌・ウイルスなどの微生物を積極的に取り込み、基底膜側から排出して粘膜下の免疫担当細胞に供給することで免疫応答に寄与している。また、食餌により摂取した乳酸菌はパイエル板より取り込まれる。すなわち、M 細胞を経由した経路は生体内への吸収経路のひとつであると考えられる。

薬物キャリアのひとつであるリポソームは、脂質二分子膜により形成されるナノ粒子であり、膜表面に種々の物理的・化学的修飾をすることが可能である。臨床適応されているが、今もなお効果の増大と副作用の軽減を期待し、国内外で数多くの研究がなされている。その多くは抗がん剤をがん組織まで輸送することを目的としており、静脈内投与を想定した治療法となっている。その他、経肺投与や経鼻投与についても検討されているものがあるが、パイエル板の経路を目的とした経口投与製剤の開発検討は少ない。そこで、ウイルスを模したサイズコントロールや標的化が可能なパイエル板経路型製剤を開発を目指し、リポソームを薬物キャリアとして用いることが有用であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、胃がんなどによる胃摘出後に発症する VB12 の欠乏を原因とする巨赤芽球性貧血患者の QOL を向上させることを目的とした、経口投与型 VB12 製剤を開発することである。VB12 の吸収には胃壁より分泌される IF が必須であるため、胃摘出後は VB12 の吸収が困難となる。そこで、吸収経路として粘膜免疫システムの誘導・制御の役割を担う腸管上皮細胞のパイエル板に着目し治療可能な M 細胞経路型 VB12 内封リポソーム製剤の開発を試みた。本製剤は経口投与型であるため、その簡便性より不可逆的な神経障害の予防にも効果を発揮するものと期待し

た。申請者らは既報および自験データに基づき、経口投与された VB12 内封リポソームは M 細胞を経由して吸収することにより VB12 を補充することができる、簡便で優れた巨赤芽球性貧血の治療および予防を行うことができるとの仮説をたてた。以上の理由より、経口投与可能な M 細胞経路型 VB12 内封リポソームを開発することを目的とし検討した。

3. 研究の方法

3.1 リポソームの調製・物性評価

リポソームの調製には構成脂質として distearoylphosphatidylcholine (DSPC)、コレステロールおよび荷電脂質である distearoylphosphatidyl glycerol (DSPG) を 20:20:12 μ M で用い、リポソーム膜表面には分子量が 2000 の 1,2-distearoylglycerol-3-methyl-polyoxyethylene2000 (PEG2000-DSG) を修飾した。薬物として VB12 であるシアノコバラミンを選択した。しかしながら VB12 は生体内に存在する物質であるため本リポソームが生体内へ移行したことを正確に評価できるか否かが懸念された。そこで、予試験にはモデル薬物としてカルボキシフルオレセイン (CF) を用いることとした。リポソームの調製はバンガム法もしくは凍結融解法にて行い、薬物の内封量や物性を比較し検討に用いた。いずれの調製方法においても構成脂質および PEG を有機溶媒に溶解後、エバポレーターを用いて薄膜を形成した。10 mg/mL となるように VB12 もしくは CF を溶解した 9% スクロース / 10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) で薄膜を再水和し VB12 内封リポソームを調製した。その後凍結融解法のみ液体窒素での凍結と 43 °C での融解を 5 回繰り返した。いずれの調製方法でも内封されていない VB12 もしくは CF は透析により除去した。

バンガム法にて調製したりポソームおよび凍結融解法で調製したりポソームをそれぞれ BL、FML とした。また、バンガム法で DSPC を 5 倍量にしたリポソームを BL-5、DSPG を含まないリポソームを BL-G、PEG 未修飾リポソームを BL-P とした。

3.2 マウス鼻腔粘膜単層上皮細胞層でのリポソーム移行性検討

本検討にはモデル薬物である CF 内封リポソームを用いて検討した。C57BL/6 マウス (雄性、6 週齢) にイソフルラン麻酔下でリポソームを経鼻投与した。CF として 0.73 μ g/animal となるように片鼻 2.5 μ L ずつ投与した。投与 5、10、20、60 分後に採血および鼻腔内洗浄を行い、それぞれのサンプルを回収した。CF 濃度は励起波長 490 nm、蛍光波長 530 nm における蛍光強度を測定することにより算出した。

3.3 モデル薬物を用いた経口投与による吸収評価

C57BL/6 マウス(雄性、13 週齢)に非麻酔下で CF 内封リポソームもしくは CF 水溶液を経口投与した。投与 1 時間後にイソフルラン麻酔下で採血を行い、血中へ移行した CF 濃度を測定した。測定はマイクロプレートリーダーを使用した(励起波長 490 nm、蛍光波長 530 nm)。

3.4 VB12 内封リポソームの経口投与による吸収検討

C57BL/6 マウスに各リポソームを VB12 として 45 ng/animal となるように 1 日 2 回 5 日間経口投与した。最終投与日の翌日に採血および臓器の摘出を行った。

採血した血液は、血清中のタンパク除去後、高速液体クロマトグラフィーにて血中 VB12 濃度を測定した。

また、摘出した腸管内を PBS 1.0 mL で洗浄し、洗浄液についてもタンパク除去を行い、血清中 VB12 濃度の測定と同様に腸管内に残存している VB12 濃度を測定した。その他の摘出臓器は PBS でホモジネートし、タンパク除去操作を行った。

腸管内および各組織中 VB12 の量は以下の条件で高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。移動相: 10 mM リン酸二水素ナトリウム/アセトニトリル(85:15, v/v)、流速: 1.0 mL/min、注入量: 10 μ L、カラム温度: 40、測定波長: 550 nm、カラム: TOSHO TSK-GEL ODS-100V, 5 μ m, 4.6 mmID \times 15 cm。

3.5 VB12 内封リポソームの消化管内における安定性評価

半透膜の内側に VB12 内封リポソームを添加し、経時的に半透膜内側のリポソームをサンプリングした。外液には模擬胃液として第 17 改正日本薬局方にて規定されている溶出試験法第 1 液(pH1.2)、もしくは模擬腸液として溶出試験法第 2 液(pH6.8)を用いた。サンプリングしたサンプル中の VB12 濃度は適当な濃度に希釈し、高速液体クロマトグラフィーを用いて検量線より半透膜を透過しなかった、すなわち崩壊していないリポソーム内 VB12 濃度を算出した。高速液体クロマトグラフィーは前項と同じ条件で行った。

4. 研究成果

4.1 VB12 内封リポソームおよび CF 内封リポソームの物性

VB12 内封リポソームの物性データを Table 1 に示した。いずれの調製条件・調製方法においてもエクストルージョン法にて 100~150 nm の大きさに整粒された。表面電位は荷電脂質を含まない BL-G のみプラスに帯電し、PEG を修飾しない BL-P において絶

対値が最も大きくなった。VB12 の内封率はいずれの調製条件・調製方法でも差は認められず 1~2%の間であった。FML の VB12 内封率が 1.76%であり、他に比べてわずかに高い傾向が示されたが、調製の度に値が大きく変動し安定して高率を得ることができなかった。一方、BL は調製毎の変動が小さく、常に同程度の内封率を得ることができた。FML において内封率にバラツキが認められた理由として、凍結融解法は凝固点降下を利用した調製方法であるため、凍結融解を繰り返す際のわずかな違いが影響した可能性が考えられた。PEG を修飾しない BL-P においてもわずかに高い値が認められたが、その差がわずかであったこと、またリポソームの形態を保ったまま生体内へ移行した場合に免疫系を回避できることを考慮し、本検討では PEG を修飾している BL を使用することとした。

Table 1 Evaluation of physical properties of liposome

Liposome	Particle size(nm)	Zeta potential(mV)	VB ₁₂ entrapped ratio(%)
BL	135.2	-19.20	1.18
FML	142.9	-9.79	1.76
BL-5	132.9	-10.50	1.41
BL-G	141.3	4.03	0.69
BL-P	143.3	-36.10	1.60

さらに、モデル薬物である CF を内封したリポソームも調製し物性を評価した。粒子径は 120.6 ± 1.9 nm であり VB12 内封リポソームと同様の物性を示した。ただし、CF のほうがリポソームへの内封効率が良好であり、CF 内封率は VB12 の約 10 倍となる $10.9 \pm 0.7\%$ であった(データは示していない)。

以上の結果より、これらリポソームは同様の物性を有することが明らかとなったので、CF 内封リポソームをモデル製剤として予試験を実施し、その後 VB12 内封リポソームを用いて検討した。

4.2 マウス鼻腔粘膜単層上皮細胞層でのリポソームの生体内への移行

本検討では経口投与後に腸管上皮細胞に存在する M 細胞を経由して吸収されるリポソーム製剤の開発を目的としているが、鼻腔粘膜単層上皮細胞層に存在する M 細胞は腸管上皮細胞に存在する M 細胞と同様の機能を有することが報告されていることより、予試験として簡便に評価可能な鼻腔粘膜の M 細胞からの生体内への移行を評価した。

研究実施計画において、鼻腔粘膜単層上皮細胞層における M 細胞に対するリポソームの透過性を評価するために、positive control

として ovalbumin を投与し、血中の総 IgA 抗体価を測定する予定であった。しかしながら、このモデルの作成には1か月余りを有し、本来の目的とは異なるところに時間をかけることが不相当であると考えられたため、本検討には蛍光色素である CF をマーカーとして用いて検討することとした。

経鼻投与したリポソームは CF 水溶液に比べて鼻腔内より速やかに消失していることが明らかとなった(Fig. 1)。一方で、投与5分後の血中 CF 濃度はリポソーム投与群のほうが高かったことより(Fig. 2)、リポソームは投与後速やかに鼻腔内から血中へ移行したことが示唆された。リポソームのほうが水溶液よりも速やかに粘膜を透過したことより、リポソームの移行には鼻腔粘膜の M 細胞が関与している可能性が考えられた。

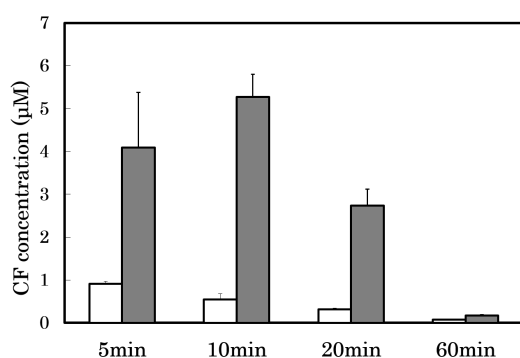


Fig. 1 CF concentration of intranasally administered CF liposome and CF solution. Each column represents mean ± S.D (n=4).

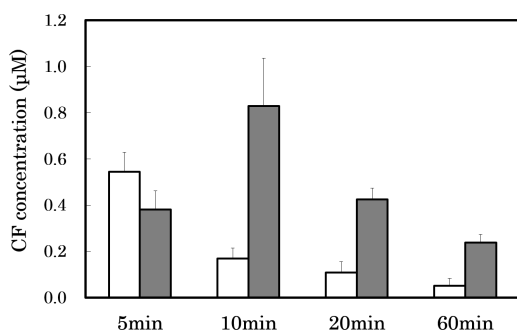


Fig. 2 CF concentration in serum after oral administration of CF liposome and CF solution. Each column represents mean ± S.D (n=4).

4.3 モデル薬物を用いた経口投与による生体内への吸収

M 細胞での取り込みを調べるモデル薬物として CF を内封したリポソームを経口投与した結果、血中にて CF の存在が確認された(Fig. 3)。CF 水溶液も血中で検出されたが、IF に結合していないと吸収されることがない VB12 の場合、VB12 水溶液では血中へ移行しないと考えられる。すなわち、リポソーム化した CF も血中で検出されたことは、リ

ポソーム化した物質が吸収され血中へ移行したことを明らかにする結果であると考えられる。本結果は、リポソームに内封した VB12 は生体内へ移行することが期待されるものであり、さらにこの経路として、M 細胞が関与していることが考えられた。

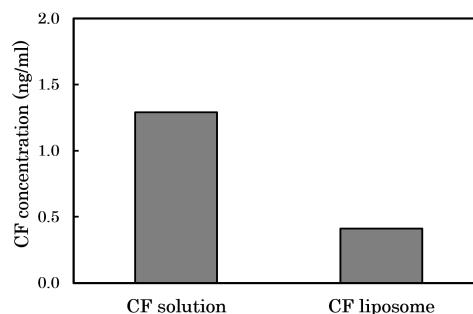


Fig. 3 CF concentration in serum after oral administration of CF liposome. Each column represents mean ± S.D (n=4).

4.4 VB12 内封リポソームの経口投与による吸収検討

VB12 内封リポソームをマウスに経口投与した結果、血清では VB12 水溶液投与群に比べリポソーム投与群の VB12 濃度が高かった。一方、腸管内容物中においては VB12 水溶液投与群に比べてリポソーム投与群の VB12 濃度が低かった(Fig. 4)。このことから経口投与された VB12 は消化管のパイエル板 M 細胞を経由し血中へ移行されることが示唆された。また、本検討では正常マウスを使用しており、IF が存在しているため水溶液投与群でも VB12 の吸収が認められたが、胃摘出後には水溶液の吸収はされないことが考えられるため、リポソーム化による有用性が示唆された。

このときの各臓器中 VB12 濃度を測定した結果、肝臓、腎臓中の VB12 濃度は、水溶液投与群とリポソーム投与群で差は認められなかった(図には示していない)。脾臓中の VB12 濃度はリポソーム投与群でわずかに低レベルである傾向が認められた。リポソーム投与群のほうが血中 VB12 濃度が高かったことより、リポソームは免疫系を回避し血中に滞留している可能性が考えられた。

本検討の目的は胃摘出患者の巨赤芽球性貧血治療を目的としているため、実施計画では VB12 欠乏モデルを用いた検討を実施する予定であった。VB12 欠乏モデル動物の作成方法として VB12 欠乏飼料による食餌プロトンポンプ阻害剤投与による内因子分泌阻害、外科的処置による胃摘出の3つを挙げた。しかしながら、研究期間において VB12 欠乏モデルを作成することができなかった。理由を以下に記す。1 つ目の方法は当初試みたが、マウスに VB12 欠乏飼料を与えても肝臓に蓄積している VB12 を全て消失させるためには年単位の時間がかかることが

明らかとなり、さらにはモデル動物の母親の代より VB12 不含試料を与える必要があったため断念した。2 つ目の方法は IF 分泌阻害のメカニズムが本検討の目的とするものと一致しなかったため、この方法でのモデル作成は却下した。3 つ目の方法は胃の外科的切除を行う予定であった連携研究者の西塚が海外に赴任したため、物理的に技術指導をしてもらうことができず、モデル動物の作成に至らなかった。以上の理由より、本研究期間における *in vivo* 検討は全て胃を持つ正常マウスを用いて行った。

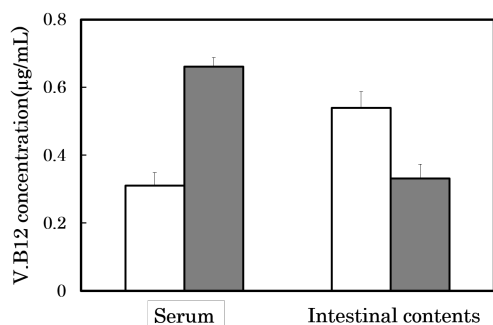


Fig. 4 VB12 concentration after five times oral administration
 VB12 solution VB12 liposome
 Each column represents mean ± S.D (n=5-6).

4.5 VB12 内封リポソームの消化管内における安定性評価

人工胃液である溶出試験第 1 液中では、開始 5 分で 35% の CF がリポソームより放出した (データは示していない)。開始 30 分後までは約 50% が放出しなかったことより、半分はリポソームの形態のままであることが示唆された。

一方、人工腸液である溶出試験第 2 液中では 1 時間半以上経過後も 50% 以上のリポソームが VB12 を放出しなかった。5 時間後でも 21% が残存していた (データは示していない)。

本検討では正常マウスで *in vivo* 検討を実施したため、リポソームが胃で全て崩壊し溶液状態で腸へ移行することが懸念されたが、本溶出試験の結果より、リポソームの形態を保ったまま腸への移行が可能であったことが示唆された。また、VB12 水溶液投与群と VB12 内封リポソーム投与群で血中 VB12 濃度や腸管内容物の VB12 濃度が異なっていたのはリポソームの形態を保持したものが小腸まで到達し、M 細胞を例とする何かしらの吸収経路を利用した生体内への移行であったことが明らかとなった。

以上の結果より、適切な脂質組成により経口投与可能なリポソームを調製できること

が明らかとなり、本リポソームは腸管まで到達後には M 細胞を例とする吸収経路を用いて生体内へ移行することが示唆された。さらに、鼻粘膜に存在する M 細胞においてはリポソームが速やかに血中へ移行することが明らかとなったことより、薬物キャリアであるリポソームの経鼻投与によるワクチン投与や治療にも応用できる可能性が期待された。

今後、胃を摘出し胃内因子が分泌されない条件での動物を使用し、VB12 内封リポソームが VB12 水溶液よりも優れた血中濃度を与えることを明らかとする。さらに免疫染色を行いパイエル板 M 細胞への VB12 内封リポソームの移行について、そのメカニズムを含めてより詳細に検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 平野里佳子、杉山育美、佐塚泰之、胃全摘患者の悪性貧血治療/予防を目的とした経口 VB12 製剤の検討、日本薬学会第 138 年会、2018 年
- 2) 杉山育美、玉山康太、佐塚泰之、悪性貧血の治療を目的としたリポソーム製剤の開発検討、日本薬学会 第 137 年会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐塚 泰之 (SADZUKA, Yasuyuki)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：90162403

(2) 研究分担者

杉山 育美 (SUGIYAMA, Ikumi)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80509050

(3) 連携研究者

及川 浩樹 (OIKAWA, Hiroki)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：50285582

西塚 哲 (NISHIZUKA, Satoshi)
岩手医科大学・医学部・特任教授
研究者番号：50453311

(4) 研究協力者

()