免疫賦活成分含有キトサンナノ粒子の調製と評価

Preparation and evaluation of chitosan-based nanoparticles containing immunestimulating agents

07119

研究代表者 星薬科大学医療薬剤学教室 教授 大 西 啓 Hiraku Onishi

In this work, chitosan-based nanoparticles were applied to enhance efficacy of the immunostimulating agents. Lactoferrin (LF) and fucoidan (FUC) were chosen as immunostimulating agents. As to LF, chitosan/alginate/calcium complex microparticles were prepared as its drug carrier. The microparticles had a size of 1 – 2 μm , and showed relatively high LF content. The LF content and release rate were depended on the concentration of the chitosan solution used for the treatment of microparticles. Efficacy was investigated by the pre-treatment with oral administration to rats with carrageenan-induced edema. The microparticles exhibited better efficacy than LF solution. In addition, chitosan-based nanoparticles containing FUC were prepared and evaluated on the usefulness. From the particle characteristics, N-trimethylchitosan(TMC)/FUC nanoparticles were considered to be possibly useful nanoparticles, rather than chitosan/FUC nanoparticles. TMC/FUC nanoparticles had a size of 320 nm and contained FUC at 47% (w/w). Efficacy was examined by the pre-treatment or post-treatment with oral administration using mice with sarcoma-180 solid tumor. In both treatments, TMC/FUC nanoparticles exhibited better suppression of tumor growth than FUC solution. The nanoparticles were considered to enhance the antitumor efficacy due to the promotion of immune induction etc. These results suggested the chitosan-based micro- or nanoparticles should be available for the enhancement of the functions of immunostimulating agents.

研究目的

近年、医薬が進歩したとはいえ、難治性あるいは慢性の疾患が多く存在しており、それらに苦しむ患者は多い。また、原因不明の疾患も多く、対症療法にとどまる場合が多いのが現状である。癌や免疫異常による疾患においては、薬剤の長期使用で副作用が起これやすく、QOLの悪化、長期的治療の困難さが指摘されている。このような中で、代替医療やサプリメントといった副作用の少ない、長期的療法が注目されている。筆者らのグループでは、今回、免疫系を介して有効性

を発揮することが知られているラクトフェリンとフコイダンに着目した。

ウシラクトフェリン（ラクトフェリン）は、経口投与において炎症や細菌感染、ウイルス性疾患に対する保護や改善効果を発揮することがマウス、ラットやヒトにおいて報告されている。小腸粘膜のレセプターや腸管免疫系の賦活化によることが考えられている¹⁻³⁾。ラクトフェリンの小腸粘膜レセプターや腸管免疫系への送達性の向上は、有効性の改善につながると思われる⁴⁻⁵⁾。

さらに、抗癌作用が期待されている機能性食品とし

てフコイダンが知られている。フコイダンは、免疫賦活作用や癌のアポトーシス、新生血管抑制作用を有し、かつ安全性が高いために、長期的使用が可能である⁶⁻⁸⁾。経口投与での免疫賦活には腸管免疫の賦活化が考えられている。

ラクトフェリン、フコイダンはいずれも小腸粘膜、腸管免疫系への効率的な送達が有効性の向上につながる事が期待される。ナノ粒子、マイクロ粒子のような微小粒子は、小腸において、高い粘液浸透性、粘膜上皮細胞への到達性や滞留性を有することが報告されており⁹⁾、それらの生理活性物質の有効性向上が期待される。本研究では、経口投与微粒子剤形の開発を行い、その有用性の検討を試みた。

研究成果の概要

1. ラクトフェリン微粒子製剤の開発と有効性の評価

1.1 はじめに

ラクトフェリンの微粒子製剤化について、キトサンを基材に用いて検討を行ったが、放出制御が必ずしも容易でないこと、キトサン微粒子は胃酸で膨潤溶解しやすいために腸溶性コーティング等の後処理が必要なこともあり、胃、腸全体で、微粒子状態を保ち、ラクトフェリンの保護が可能な微粒子の探索を行った。キトサン／アルギン酸／カルシウムからなる微粒子は、イオン架橋により、かなり安定な微粒子を形成することが報告されており¹⁰⁾、今回はこの複合体微粒子を利用して、ラクトフェリンの微粒子剤形開発を試みた。

1.2 実験方法

キトサン／アルギン酸／カルシウム複合微粒子の調製については、アルギン酸／カルシウム微粒子を液中乾燥法により調製し、これをキトサン溶液処理する2段階の方法で調製した。アルギン酸ナトリウム (Al-Na: 和光純薬工業 (株), 80-120cP) 300mgとウシラクトフェリン (LF: NRLファーマ (株)) 150mgを水20mlに溶解し、1000rpmで撹拌している1%セスキオレイン酸ソルビタン (SO-15) 含有流動パラフィン400ml中に滴下し、1時間撹拌した。その後、10% (w/v) 塩化カルシウム水溶液 4 mlを添加し、さらに15分間撹拌した。その後、撹拌を止め、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下、37℃で乾燥を行った。乳化

状態が微粒子懸濁状になった時点で溶媒留去を止め、n-ヘキサンを添加して混和し、1500×gで10分間遠心分離を行った。沈殿物は、n-ヘキサンを用いて3回洗浄した。デシケーター中で乾燥し、アルギン酸／カルシウム複合微粒子 (Al/Ca-MP) を得た。Al/Ca-MP中のLF含有率は、粒子を日局15の第1液中に懸濁し、沈殿物を日局15の第2液に溶解し、それぞれに溶解したLFの量をBCAプロテインアッセイにより求め、算出した。

Al/Ca-MP 800mgを0.5% (w/v) キトサン (Ch: 大日精化(株), 超低粘度)の1%酢酸水溶液に投入し、1時間撹拌した。1500×gで10分間遠心分離を行い、沈殿物を水で3回洗浄し、デシケーター中で乾燥し、キトサン／アルギン酸／カルシウム複合微粒子 (Ch/Al/Ca-MP) を得た。LF含有率は、酢酸水溶液と洗浄液中のLF量をBCAプロテインアッセイにより求め、もとのLF量から差し引くことにより算出した。

粒子の性状は、白金コーティング後に走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM-5600LV) を用いて観測し、粒子径、形状を調べた。また、Ch/Al/Ca-MP 10mgを日局15の第1液3 mlに分散し、37℃で毎分100回の振とう条件で2時間インキュベートを行い、1500×gで10分間遠心分離後、沈殿物に日局15の第2液 3 mlを添加し、5時間同様にインキュベートを行った。その際、一定時間後に遠心分離し、上澄100μlを採取し、放出したLF量をBCAプロテインアッセイにより求めた。

得られた微粒子の効果を判定するために、カラゲニン浮腫に対する炎症抑制効果について検討した。浮腫作成 5, 3, 1 日前に50mg LF eq./kg/dayの投与条件で、微粒子の生理食塩液懸濁液、LFの生理食塩液の水溶液、生理食塩液 (コントロール) をテフロンチューブを装着した経口ゾンデを用いて胃内に投与した。1%カラゲニンの生理食塩液溶液0.1mlを後肢足蹠皮下に注入し、その後、その第一関節までの体積を測定し、浮腫の大きさを調べた。また、初期放出の影響を取り除くために、第1液で1時間インキュベートした後の粒子を遠心分離して採取し、これを用いて同様にカラゲニン浮腫抑制効果を検討した。

1.3 結果と考察

Al/Ca-MPは全体として90%以上の回収率で得られ、LFもほぼ90%回収された。Ch/Al/Ca-MPに対する粒子特性をTable 1に示した。平均粒子径1.65μmでLF含有率22%のものが得られた。粒子生成量が初期

Table 1 Preparative conditions, yields and particle characteristics of Ch/Al/Ca-MP

Product	Al/Ca-MP (mg)	0.5% Ch solution volume (ml)	Produced amount (mg)	Yield (%, w/w)	LF content (%, w/w)	LF recovery (%)	Mean particle size (μm)
Ch/Al/Ca-MP	800	340	295 ± 5	38 ± 2	22 ± 5	52 ± 9	1.65 ± 0.15

Yield was calculated as the ratio of the product amount to the total amount of the used substances.

LF recovery was the ratio of the incorporated LF amount to the used LF amount.

These results are expressed as the mean $\pm$ S.D. (n=3).

Fig.1 SEM image (A) and particle size distribution (B) of one lot of Ch/Al/Ca-MP. n=150 for B.

量からかなり低下してしまうのは、キトサン溶液処理時にAl/Ca-MP中に過剰に残存した塩化カルシウムが溶け出すことによるものと考えられた。Ch/Al/Ca-MPの粒子形状とサイズをFig.1に示した。Fig.2は、LFのCh/Al/Ca-MPからの放出挙動を示す。1時間で約60%が初期放出し、その後、徐々に放出することが示された。また、この放出試験の際、第1液、第2液中いずれにおいても、粒子は懸濁状態を保つことが確認された。Ch/Al/Ca-MPは、ほぼ球状で1-2 μm のサイズで、初期バーストはあるものの、LFを徐放する微粒子として挙動することが確認された。なお、本調製条件では、サブミクロンオーダーの粒子を得ることは難しかった。今回のSO-15含有流動パラフィンのW/O乳化条件では難しいことが考えられた。しかしながら、得られた粒子サイズも十分小さく、小腸上皮や腸管免疫系への送達が可能であることが考えられた。

動物実験においては、そのままの微粒子および初期放出を取り除いた微粒子両方について検討をしたが、そ

Fig.2 Release profiles of LF in the sequential incubation in JP15 1st fluid (pH 1.2) for 2 h and subsequently in JP15 2nd fluid (pH 6.8) for 5 h. Each point represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

れぞれの結果をFig.3, Fig.4に示した。いずれにおいても、LF溶液群に比べ、微粒子群は優れた浮腫抑制効果を示した。Ch/Al/Ca-MPは、徐放性微粒子として、優れたLFの効果を向上しうる製剤であることが示された。

2. トリメチルキトサン／フコイダン複合微粒子の調製と有効性の評価

2.1 はじめに

フコイダン (FUC) は、硫酸化多糖類で負電荷を有しており、キトサンなどのポリカチオンとイオンコンプレックスを形成し、凝集することが知られている(11)。本研究では、キトサンおよびトリメチルキトサンを用いて、フコイダンとのイオン架橋型のナノ粒子の調製を行うことを試みた。最初に、流動パラフィン分散媒とする液中乾燥法と水溶液中で混合するイオン架橋法を試みたが、液中乾燥法ではナノ粒子の調製が困難であったため、イオン架橋法を用いて調製を行うこととした。得られたナノ粒子について、in vitro とin vivoでフコイダンナノ粒子の有用性の評価を行った。

Fig.3 Change in right hind paw volume after intracutaneous injection of carrageenan to the footpad of the right hind paw in rats (250–260g). Samples were administered intragastrically at 50mg LF eq./kg 5, 3 and 1 days before carrageenan injection (total dose = 3×50 mg LF eq./kg). The results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n=3). * $P < 0.05$ vs. Control (Dunnett t post hoc test).

2.2 実験方法

N-トリメチルキトサン (TMC) は、Sievalらの方法を用いて調製したが、one-stepで得られた8%トリメチル化度のものを使用した。ナノ粒子調製は、TMC (10mg) を20mlの水に溶解後、FUC (焼津水産化学工業 (株)) 10mgを含む水溶液10mlを攪拌下に徐々に滴下した。得られた懸濁液を670 $\times$ gで10min遠心して、上澄みを採取した。上澄みはさらに、36000 $\times$ gで20min遠心して、その沈殿物を採取し、これをFUC含有TMCナノ粒子 (FUC/TMC-NP) とした。FUC含有キトサンナノ粒子 (FUC/CH-NP) については、CH (10mg) を20mlの1%酢酸水溶液に溶解し、FUC滴下とそれ以降の操作は、FUC/TMC-NPと同様に行い、調製した。

各粒子は、乾燥後に白金コーティングし、走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM-5600LV) を用いて観測し、粒子径、形状を調べた。また、粒子の水性懸濁液について、大塚電子社製の動的光散乱装置ELS-800を用いて粒子サイズ、粒度分布を測定した。FUC/TMC-NP中のFUC含有率については、FUC、TMCの元素分析値からN/C比を調べ、粒子のN/C比から、FUCとTMCの組成比を算出した (FUC/CH-NPについては、

Fig.4 Change in right hind paw volume after intracutaneous injection of carrageenan to the footpad of the right hind paw in rats (180–200g). Samples were administered intragastrically at 50mg LF eq./kg 5, 3 and 1 days before carrageenan injection (total dose = 3×50 mg LF eq./kg). The results are expressed as the mean $\pm$ S.E. (n=3). * $P < 0.05$ vs. Control (Dunnett t post hoc test).

サイズが大きく、収率も低かったために、組成検討は行わなかった)。

FUC/TMC-NPの有用性を検討するために、in vivoで抗腫瘍効果を検討した。約30gの雄性ddyマウスを用い、Sarcoma-180(東北大学加齢研より提供) 1×10^6 個を腋下部皮下に移植して固形腫瘍担癌モデルとした。投与実験は、腫瘍移植前投与(Pre-treatment)と腫瘍移植後投与(Post-treatment)の2つのスケジュールで行った。すなわち、Pre-treatmentでは、移植前13日から1日前までを隔日で計7回、毎回15mg FUC eq./kgのdoseで胃内に投与した。Post-treatmentでは、移植後1日目から13日目まで隔日で計7回、毎回15mg FUC eq./kgのdoseで胃内に投与した。腫瘍サイズは、移植7日目から腫瘍について長径 $\times$ (短径)²/2で求めた。

2.3 結果と考察

得られた各粒子の粒度分布をFig.5に、走査電顕像をFig.6に示した。FUC/CH-NPは、平均粒子径が約2.8 μ mで、収率も約21%であり、いわゆるナノ粒子として扱うことは難しいこと、収率が低いことから、更なる検討を要することが見出されたため、これ以降の検討は行わなかった。FUC/TMC-NPについては、平均粒子径が320nmとナノオーダーで、収率も比較的高く、FUC含有率47%、封入効率34%であり、ナノ粒子として優れていることが認められた(Table 2)。

動物実験による薬効評価については、Fig.7に結果を示した。いずれにおいても、コントロール群に比べ、FUC溶液、FUC/TMC-NPいずれも腫瘍サイズの抑制傾向を示した。また、FUC/TMC-NPはFUC溶液よりも高い腫瘍増殖抑制を示し、コントロールに対しては有意に抑制した。同時に体重測定を行ったが、いずれ

Fig.5 Size distribution profiles of FUC/TMC-NP (A) and FUC/CH-NP (B) in dynamic light scattering.

Fig.6 Scanning electron micrographs of FUC/TMC-NP (A) and FUC/CH-NP (B). The length of the white bar is 1 μ m and 2 μ m in A and B, respectively.

Table 2 Particle characteristics of FUC/TMC-NP

Particle size (nm)	Total yield (%)	FUC content (% w/w)	FUC loading efficiency (%)
325 ± 36	35.7 ± 0.8	46.9 ± 1.6	33.5 ± 1.9

The results are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

Fig.7 Tumor growth profiles in mice bearing S-180 by pre-treatment (A) and post-treatment (B). The results are expressed as the mean ± S.E. (n=3). The error bar is not described if it is smaller than the symbol. * $p < 0.05$ vs. Control.

の群においても体重低下は認められず、毒性は少ないことが示唆された。Pre-treatmentにおいて高い抑制効果を示したことから、FUC/TMC-NPは免疫増強効果をもつ可能性があるものと考えられた。また、移植後投与でもFUC/TMC-NPは、効果を増強する可能性があるかと推察され、新生血管抑制やアポトーシス誘発効果への影響も示唆された。今後詳細なメカニズムについての検討が望まれるが、FUC/TMC-NPは、FUCの抗腫瘍効果を高める微粒子剤形として有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Wakabayashi H., Abe S., Teraguchi S., Hayasawa H., Yamaguchi H. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(7), 1587-1591 (1998).
- 2) Takakura N., Wakabayashi H., Ishibashi H., Teraguchi S., Tamura Y., Yamaguchi H., Abe S. Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(8), 2619-2623 (2003).
- 3) Ishikado A., Imanaka H., Takeuchi T., Harada E., Makino T. Liposomalization of lactoferrin enhanced its anti-inflammatory effects via oral administration. *Biol. Pharm. Bull.*, 28(9), 1717-1721 (2005).
- 4) 木元博史, ラクトフェリン腸溶錠により血清脂質の改善が認められた症例, *Milk Science*, 53(4), 313-314 (2004).
- 5) Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol. Life Sci.*, 62(22), 2560-2575 (2005).
- 6) Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S., Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Bi. Chem. Pharmacol.*, 65(2):173-179 (2003).
- 7) Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M., Nakano T. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from *Sporophyll of Undaria pinnatifida*. *In Vivo*, 17(3), 245-249 (2003).
- 8) Hyun J.H., Kim S.C., Kang J.I., Kim M.K., Boo H.J., Kwon J.M., Koh Y.S., Hyun J.W., Park D.B., Yoo E.S.,

- Kang H.K. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells., *Biol. Pharm. Bull.*, 32(10), 1760-1764 (2009).
- 9) Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Kuno Y. Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin., *Pharm. Dev. Technol.*, 5(1), 77-85 (2005).
- 10) Wittaya-areekul S., Kruenate J., Prahsarn C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone., *Int. J. Pharm.*, 312(1-2):113-118 (2006).
- 11) Nakamura S., Nambu M., Ishizuka T., Hattori H., Kanatani Y., Takase B., Kishimoto S., Amano Y., Aoki H., Kiyosawa T., Ishihara M., Maehara T. Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization., *J. Biomed. Mater. Res. A*, 85(3), 619-627 (2008).
- coated alginate/calcium complex microparticles loaded with fluorescein-labeled lactoferrin., *Yakugaku Zasshi.*, 129(12), 1507-1514 (2009).
- 2) Onishi H., Koyama K., Sakata O., Machida Y. Preparation of chitosan/alginate/calcium complex microparticles loaded with lactoferrin and their efficacy on carrageenan-induced edema in rats., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 36(8), 879-884 (2010).
- 3) Hayashi K., Onishi H., Sasatsu M., Machida Y. Preparation and Antitumor Effect of N-Trimethylchitosan/Fucoidan Complex Nanoparticles. *Curr. Nanosci.*, submitted.

学会発表

発表論文

- 1) Koyama K., Onishi H., Sakata O., Machida Y. Preparation and in vitro evaluation of chitosan-

- 1) Hayashi K., Onishi H., Sasatsu M., Machida Y. Preparation and evaluation of N-trimethylchitosan nanoparticles containing fucoidan., 68th International Congress of FIP (2008).
- 2) 大西 啓, 小山憲一, 町田良治. ラクトフェリン経口投与のための微粒子製剤開発, 日本薬学会第129年会 (2009).
- 3) 大西 啓, 小山憲一, 坂田 修, 町田良治. ラクトフェリン含有微粒子製剤の調製と有効性の検討, 第24回キチンキトサンシンポジウム (2010).