

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 31 日

採択番号	2019-共同-9		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するためのドラッグデリバリーシステムの開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	とけし まなぶ 渡慶次 学	北海道大学大学院工学研究院応用化学部門・教授	
研究分担者	まえき まさとし 真栄城 正寿	北海道大学大学院工学研究院応用化学部門・助教	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>本研究は、抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するためのドラッグデリバリーシステム (DDS) を開発することを目的とする。</p> <p>トキソプラズマは人獣共通感染性の細胞寄生性原虫であり、ヒトでは妊婦が初感染した場合、流・死産や先天性トキソプラズマ症を引き起こすほか、エイズ患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者にトキソプラズマ性脳炎を起こす。いくつかの治療薬が開発されているが、トキソプラズマは脳などにシストして存在するため、血液脳関門を突破して脳内に抗トキソプラズマ薬を送達することは困難である。</p> <p>申請者は、DDS への応用を目的として、マイクロ流体デバイスを利用した脂質ナノ粒子やポリマーミセルの作製に取り組んできた。薬物の送達効率は、ドラッグキャリアのサイズに大きく依存するため、サイズを精密に制御できるマイクロ流体デバイス (MFD) は、次世代の DDS 用キャリア作製システムとして期待されている。申請者らが開発した MFD は、10nm のサイズ分解能で、精密に DDS キャリアを作製することができる。また、10nm の極小キャリアを作製することができることから、従来は血液脳関門の存在により送達が困難とされていた脳に薬物を送達することができる可能性がある。</p> <p>そこで本研究では、さまざまな組成・サイズのドラッグキャリアを作製し、抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するための DDS の開発に取り組む。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するために、①10 nm の DDS キャリア粒子の作製、②抗トキソプラズマ薬内包粒子の作製、③作製した粒子の活性評価(in vitro、および、in vivo アッセイ)を行った。</p> <p>①10 nm の DDS キャリア粒子の作製</p> <p>脳への薬物送達が可能である 10 nm 以下のキャリア粒子を作製するために、PEG 脂質を主原料とした脂質ミセル系を選択した。PEG 脂質として DMG-PEG2K を用い、粒子の安定性と薬剤保持能を向上させるために、中性リン脂質である DSPC、および、コレステロールを用いた。粒子の作製には、申請者が開発したマイクロ流体デバイスによるエタノール注入法を用いた。まず、脂質組成が粒径に与える影響を評価した結果、PEG 脂質濃度が高いほど粒径が小さくなることが明らかとなった。総脂質濃度が 20 mM で PEG 脂質濃度が 80% (モル比) 以上の場合、流量条件に依存せずほぼ 10 nm の粒子が生成した。また、最小で 8 nm の粒子を作製可能であり、脳への薬物送達が可能である脂質組成を見出した。一方で、PEG 脂質濃度が 60% 以下の場合、原料溶液の流量条件によって、粒径を 10 nm～18 nm に制御できることが分かった。作製した粒子を 4℃で保管し、粒径安定性を評価した。その結果、PEG 脂質の比率が 80% の粒子は、2 週間の保存で多分散度はわずかに低下したが、平均粒径の変化は確認されなかった。</p> <p>②抗トキソプラズマ薬内包粒子の作製</p> <p>キャリア粒子への抗トキソプラズマ薬の搭載を試みた。作製した脂質ミセルは内部が疎水性のため、抗トキソプラズマ薬の中から、疎水性度が比較的高いピリメタミンを第一候補とした。一方で、ピリメタミンが脂質の溶媒であるエタノールに溶解しない可能性が考えられた。そこで、ピリメタミンの溶解度を考慮して、DMSO とエタノールの混合溶液をピリメタミン、および、脂質の溶媒とした。DMSO とエタノールの比率、ピリメタミン濃度、および、脂質濃度を最適化した結果、50%～60% エタノールを用いることで、ピリメタミンや脂質が凝集することなく、粒径 18 nm 前後でピリメタミンを内包した単分散の粒子を作製することに成功した。粒子調製時の流量をさらに高流量条件にすることで、粒子の小粒径化が期待できる。</p> <p>③作製した粒子の活性評価</p> <p>作製した粒子を蛍光色素で標識し、宿主細胞、および、原虫への取り込みを in vitro アッセイによって評価した。また、粒子自体による宿主細胞への細胞毒性の評価も並行して行った。蛍光顕微鏡による観察の結果、細胞内への取り込みは観察されなかった。また、サンプル濃度が 10% の場合は顕著な細胞毒性が確認され、PEG 脂質濃度が高い方が毒性が高い傾向にあった。PEG 脂質リッチな粒子は、細胞への取り込み効率が低下することが知られている。本研究においては、粒径制御・安定性には PEG 脂質が有効であるが、in vitro 実験の結果を踏まえて、PEG 脂質濃度を低減させるなど脂質系の最適化が必要であると考えられる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>Preparation of pyrimethamine encapsulated lipid nanoparticles using a microfluidic device for toxoplasmosis, Yang Yi, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, 化学系学協会北海道支部 2020 年冬季研究発表会, 2B17, 2020 年 1 月 29 日</p>