クロドロン酸内包リポソーム アプリケーションデータ

（1）クロドロン酸内包リポソーム物性データ

①リポソームの仕様

②リポソームの電子顕微鏡画像

（2）*in vitro*評価

（3）*in vivo*評価

①評価方法

②投与量の比較検討

③効果持続時間について

④他社製品との比較

（4）体内動態

①正常マウス

②担癌モデルマウス

（5）実施例

①マクロファージへの取込評価

②正常マウスの肝臓・脾臓マクロファージの除去効果

③正常マウスの脾臓マクロファージの除去効果

④胃がんモデルマウスの癌関連マクロファージの除去効果

（6）異常所見事例

①大量投与時

②i.p.投与による異常所見事例

③血球・肝機能・腎機能への影響

HYGIEIA BIOSCIENCE
株式会社 ヒュギエイアバイオサイエンス

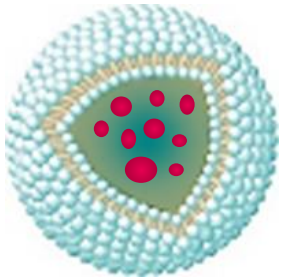
１）クロドロン酸内包リポソーム物性データ

① クロドロン酸内包リポソームの仕様

- クロドロン酸をリポソームに高濃度内包
- マクロファージの貪食を促進するリポソームを使用

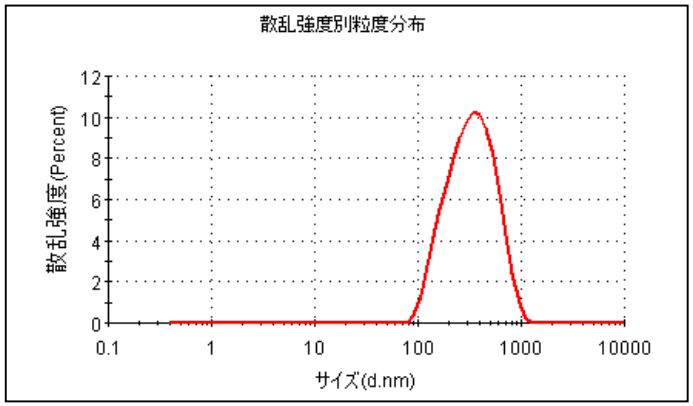
脂質組成　DPPC：DPPS：Chol =5:1:4（モル比）

DPPC：Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPS：Dipalmitoylphosphatidylserine



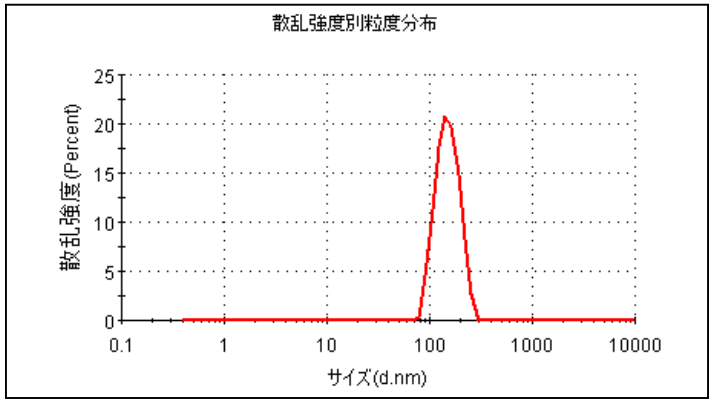
クロドロン酸内包リポソーム

項　目	
脂質濃度*1 (mg/mL)	45±20
クロドロン酸(mg/mL)	10.0±1
平均粒子径 (diameter, nm)	280±50
Ｚ電位 (mV)	-70 ±20



クロドロン酸内包リポソーム small

項　目	
脂質濃度*1 (mg/mL)	45±20
クロドロン酸(mg/mL)	6.5±0.7
平均粒子径 (diameter, nm)	140±40
Ｚ電位 (mV)	-70 ±20

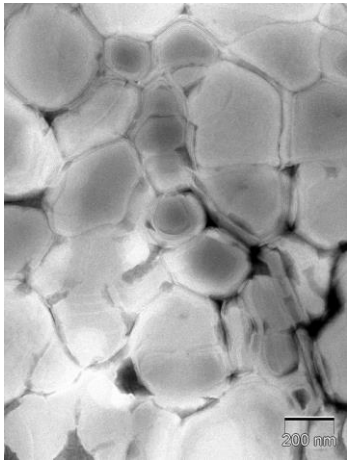


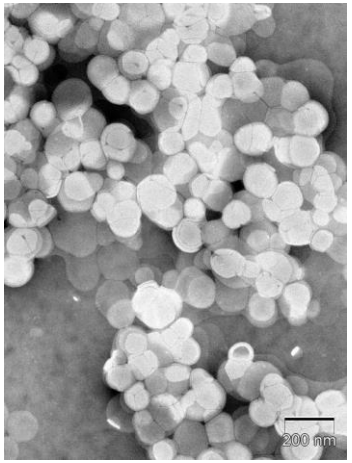
② 透過型電子顕微鏡によるリポソームの多重膜構造の確認

クロドロン酸内包
リポソーム

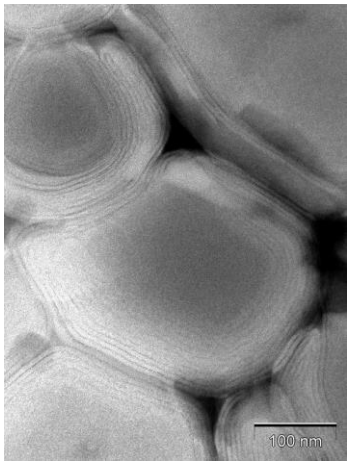
クロドロン酸内包
リポソーム small

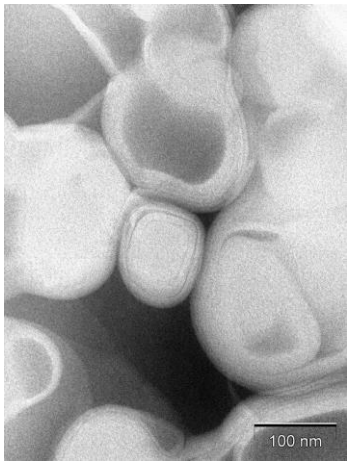
倍率
86700:1





倍率
289000:1

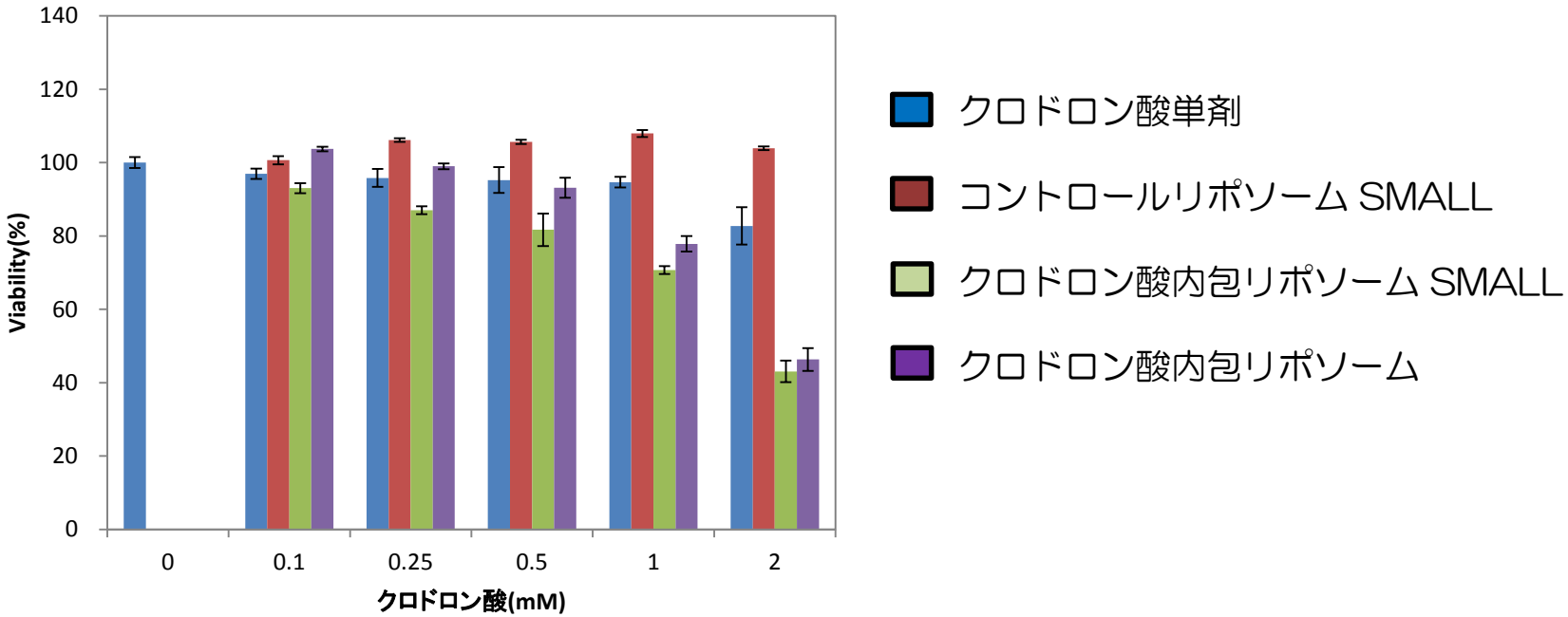




2%リン酸タングステン酸でネガティブ染色後、
透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus(日本電子)により撮像

2）*in vitro* 評価

マクロファージ細胞株におけるクロドロン酸内包リポソームの影響



① RAW264.7細胞を 5×10^{3}cell/well （培地量 0.1mL）になるようにプレートに播種し、37℃、5%CO_2で24時間、培養
② 培養液の1/10量サンプルを添加
③ 1時間培養し、Wash
④ さらに、48時間培養
⑤ WST-8添加
⑥ 2時間、インキュベート
⑦ WST-8 測定（450 nm）

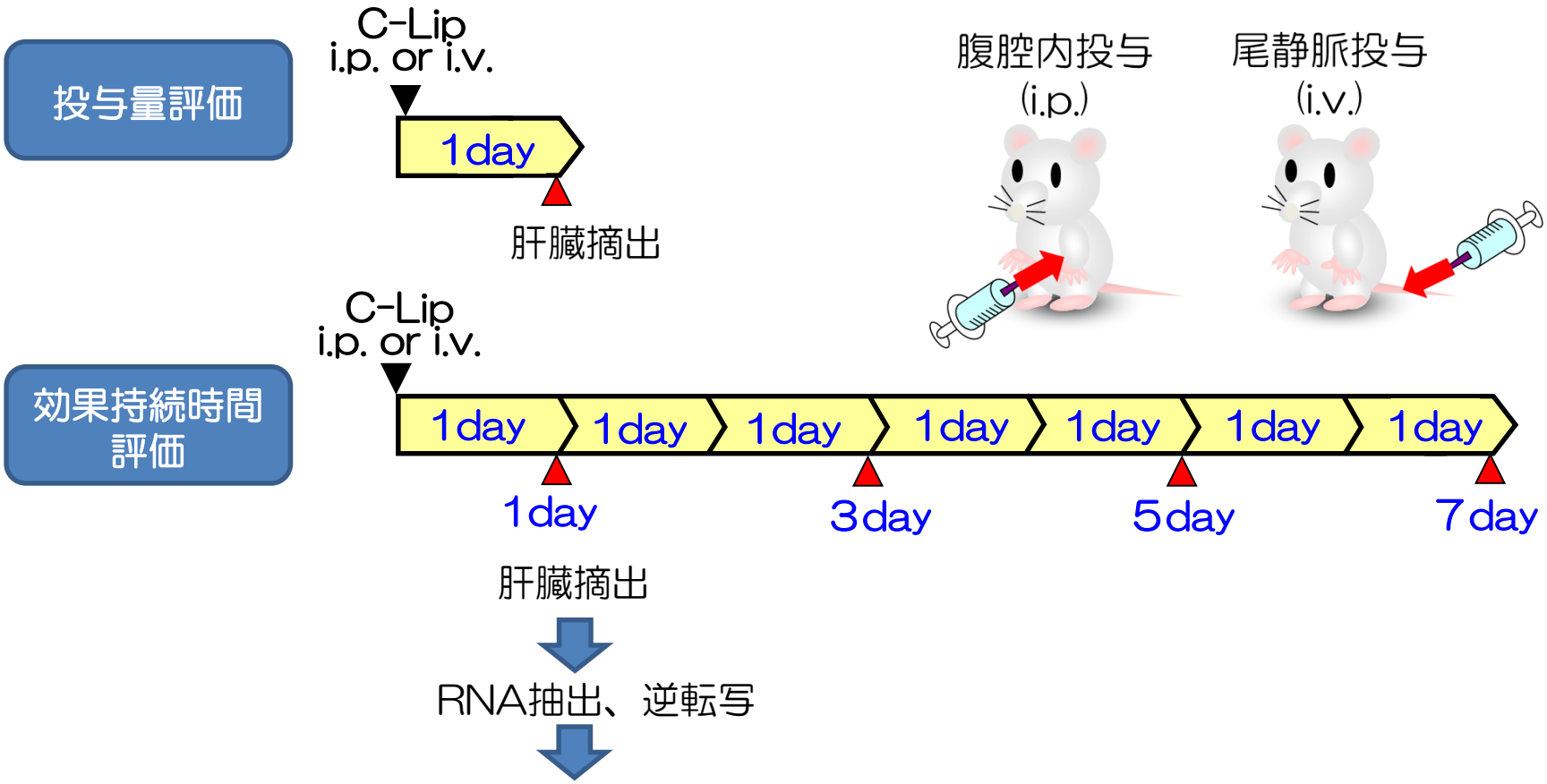
【クロドロン酸濃度　モル換算】

製品	クロドロン酸濃度	
	mg/mL	mM
クロドロン酸内包リポソーム	10.0	34.6
クロドロン酸内包リポソーム SMALL	6.5	22.5

3）*in vivo* 評価

① 生体内マクロファージへの影響　評価方法

正常マウス　：Balb/cCrSlc, female, 8 weeks,　N=3

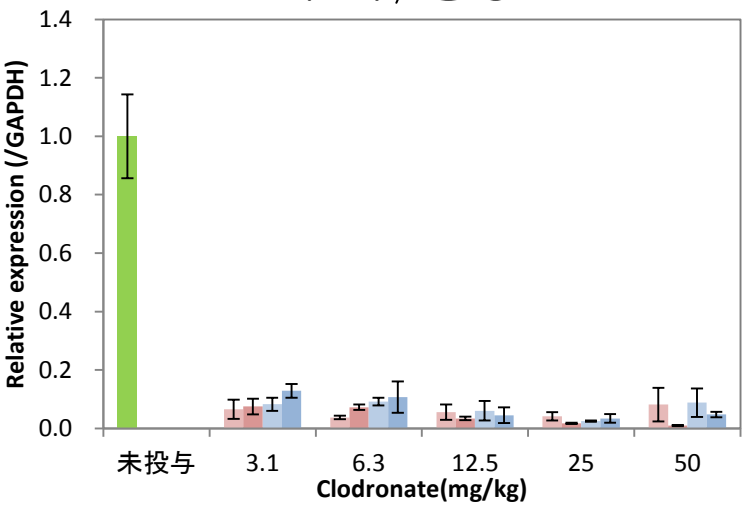


リアルタイムPCRにより、マクロファージのマーカー遺伝子であるF4/80および CD68の相対的な発現量を測定した。内在性コントロール遺伝子としてGAPDHを用いた。

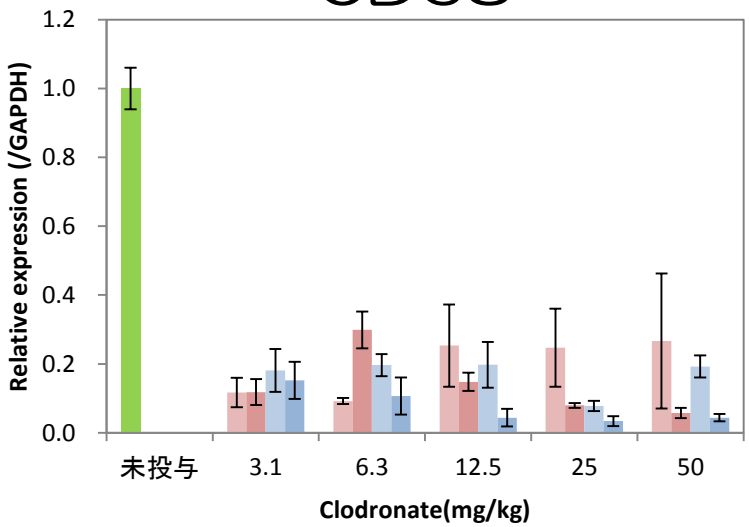
②クロドロン酸量を基準としたリポソーム投与量の比較検討

マウス：正常マウス　　時間：投与1日後
臓器　：肝臓

F4/80



CD68



マウス体重20gの場合の投与量

クロドロン酸 (mg/kg)	投与量（μL）	
	クロドロン酸内包リポソーム	クロドロン酸内包リポソーム SMALL
50.0	100	150
25.0	50	75
12.5	25	37.5
6.3	12.5	18.8
3.1	6.3	9.4

※投与量が少量の場合にはPBS(-)　で希釈して投与下さい。

- クロドロン酸内包リポソーム SMALL 腹腔内投与
- クロドロン酸内包リポソーム SMALL 尾静脈投与
- クロドロン酸内包リポソーム　腹腔内投与
- クロドロン酸内包リポソーム　尾静脈投与

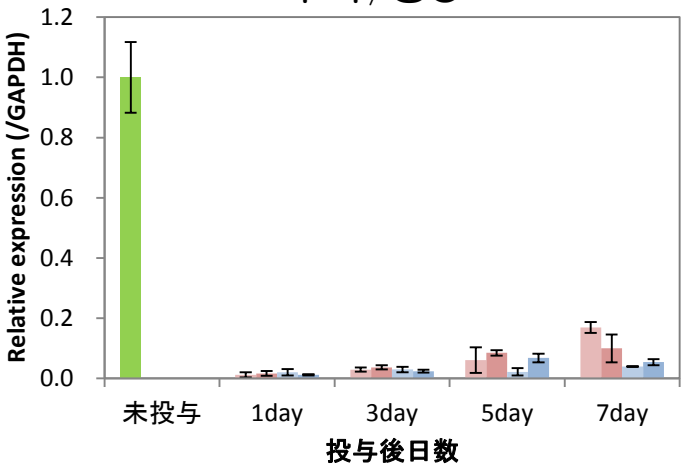
③ 異なる投与量における持続効果

マウス：正常マウス　　臓器：肝臓

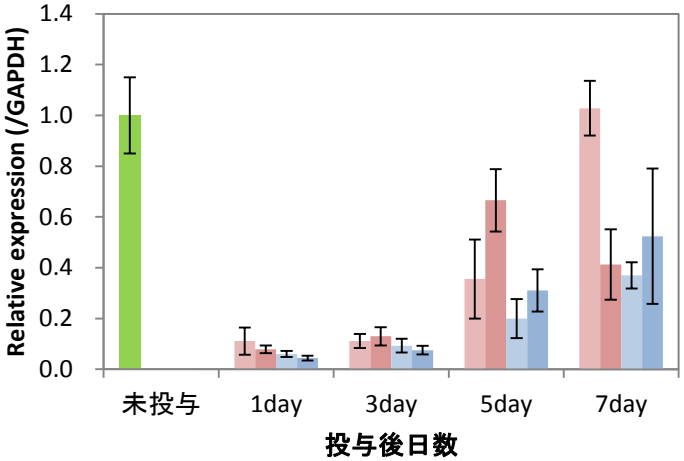
クロドロン酸内包リポソームSMALL　腹腔投与
クロドロン酸内包リポソームSMALL　尾静脈投与
クロドロン酸内包リポソーム　腹腔投与
クロドロン酸内包リポソーム　尾静脈投与

投与量 50mg/kg の場合

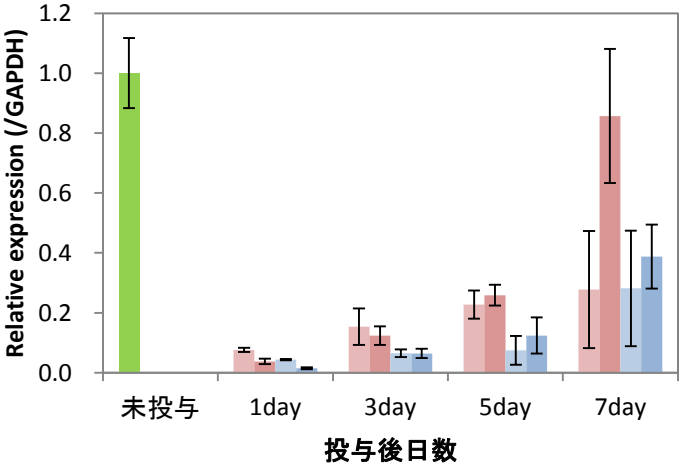
F4/80

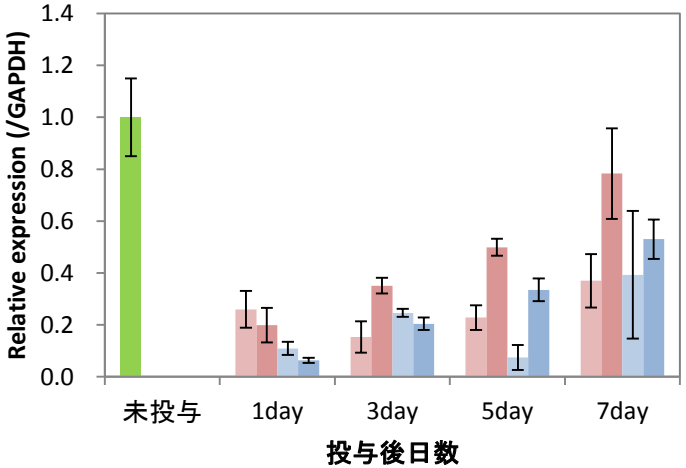


CD68



投与量 １2.5mg/kg の場合





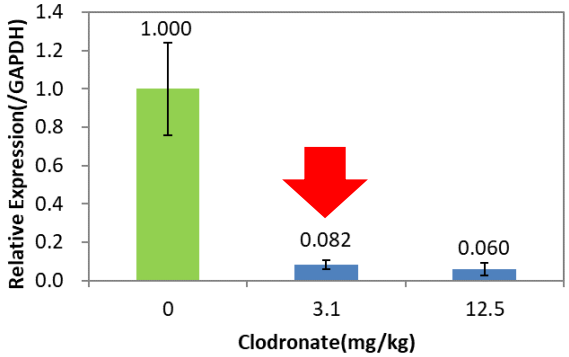
④ 他社製品との比較

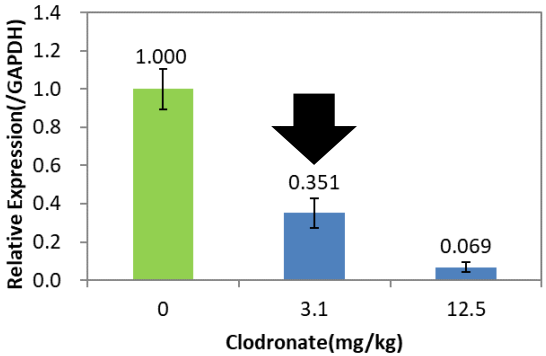
マウス：正常マウス　　投与経路：腹腔投与
時間　：投与1日後　　臓器　　：肝臓

クロドロン酸内包
リポソーム

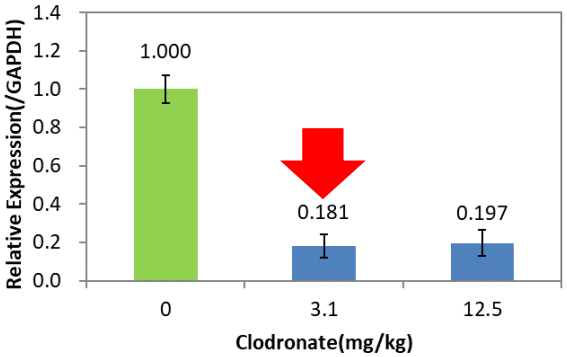
他社製品

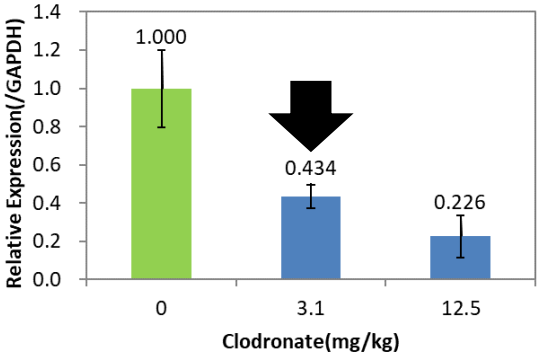
F4/80





CD68





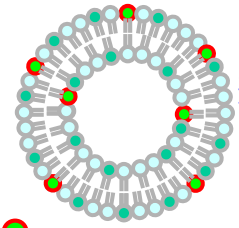
少ない投与量で高い効果！

４）体内動態

① 正常マウスにおけるクロドロン酸内包リポソームの体内動態

方法

リポソーム



粒子サイズ
約300nm

Fluorescent labeling lipid :DiR
DiR content :　0.2mol% of total lipid

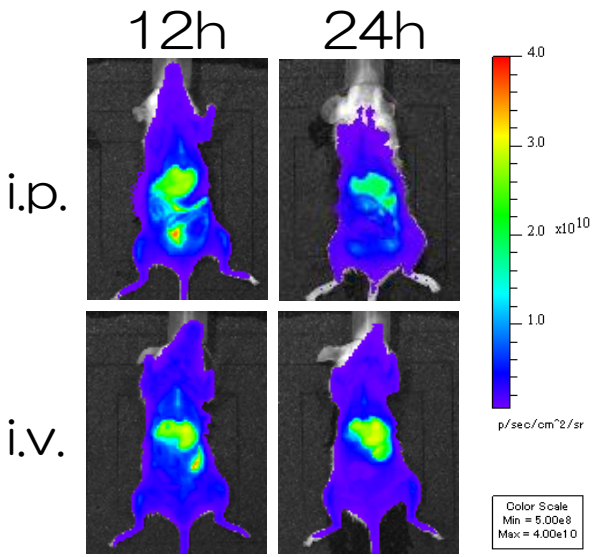
- 使用動物

Mouse : Balb/cCrSlc, female, 8weeks　(N=3)
投与量 : 0.1mL（脂質量 6.1mg）

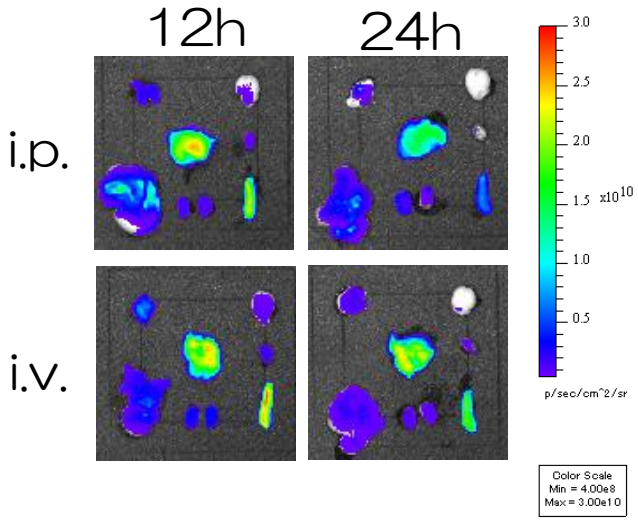
- 検出装置

in vivo imaging system:
IVIS Lumina Ⅱ
（住商ファーマインターナショナル）
Ex: 745nm, Em: 810-875nm

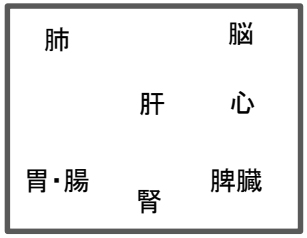
in vivo 蛍光イメージング結果



ex vivo 蛍光イメージング結果

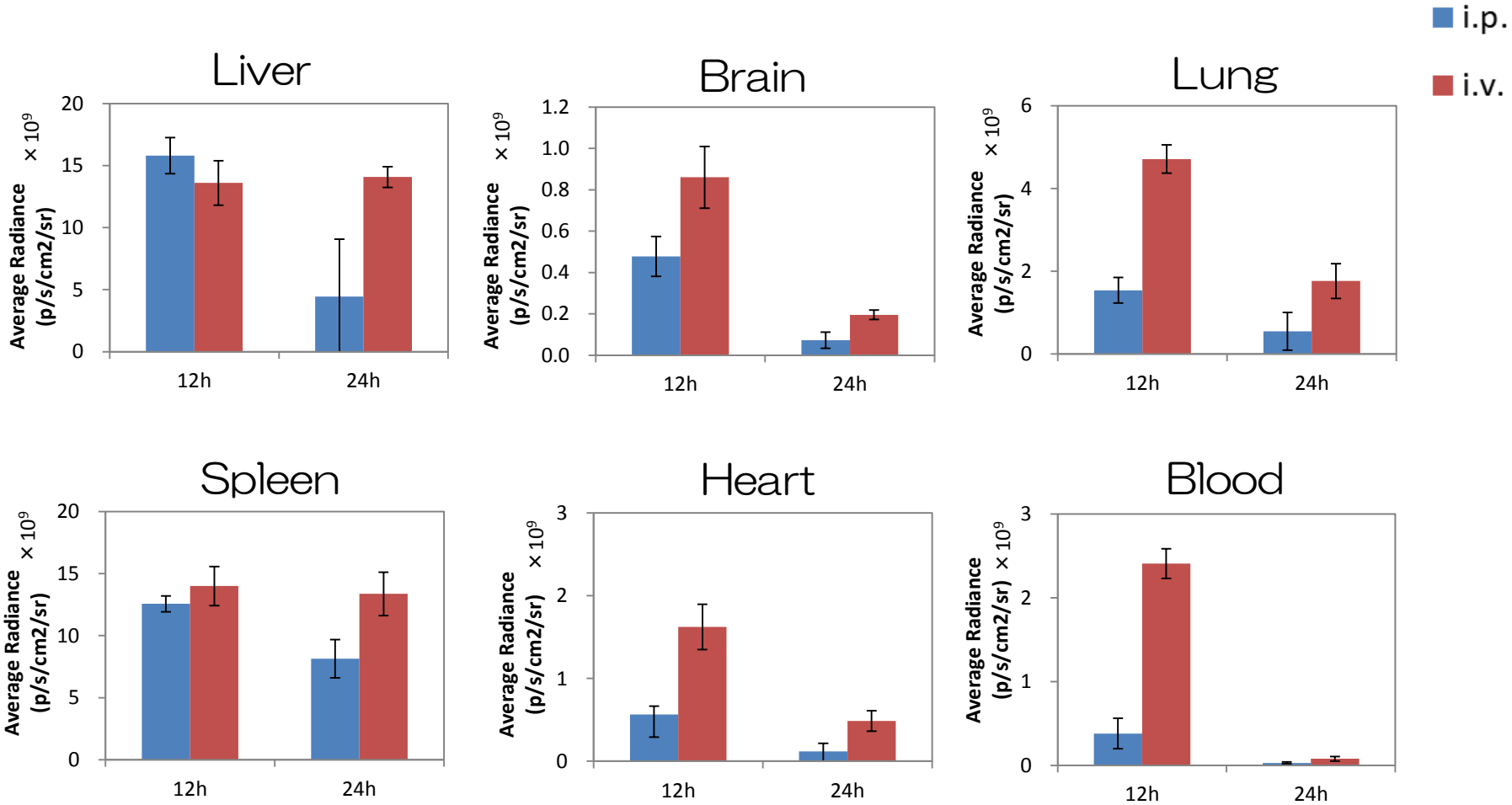


各臓器の配置



*ex vivo*蛍光イメージング結果（数値化）

ROIで各臓器を囲み、Average Radiance(p/sec/cm^2/sr)を算出した

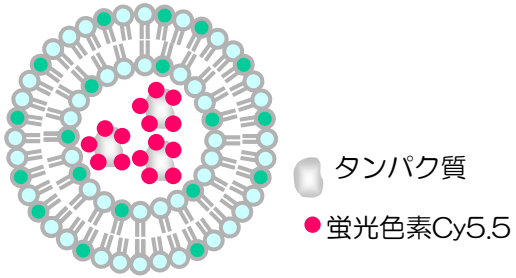


Bloodは下大静脈より全採血し、96wellプレートに0.1mL注入

② 担癌モデルマウスでの粒子サイズの異なるリポソームの体内動態

方法

リポソーム



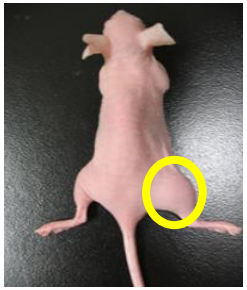
- 担癌モデルマウス

Mouse： Balb/c Slc-*nu/nu*, female, 6 weeks
Cells　:マウス腹水癌細胞
（Ehrlich ascites tumor ：EAT）
投与量 ： 0.2mL　i.v.投与
（脂質量 8.6mg）

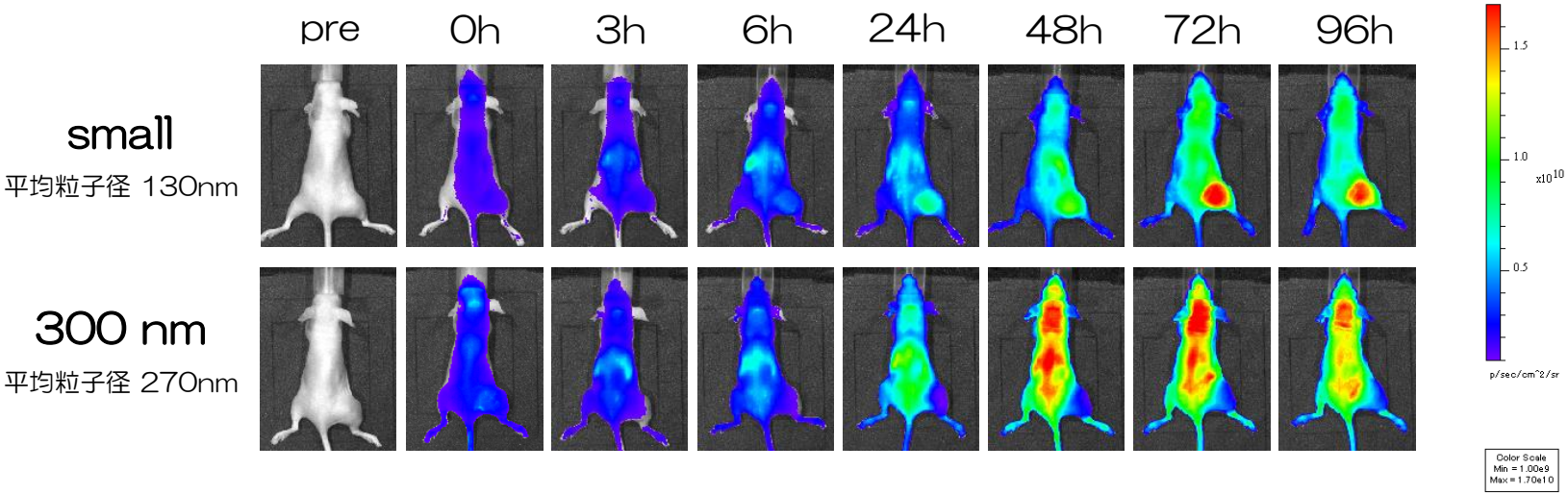
- 検出装置

in vivo imaging system:
IVIS Lumina Ⅱ
（住商ファーマインターナショナル）
Ex: 640nm, Em: 695-770nm

移植部位



in vivo 蛍光イメージング結果

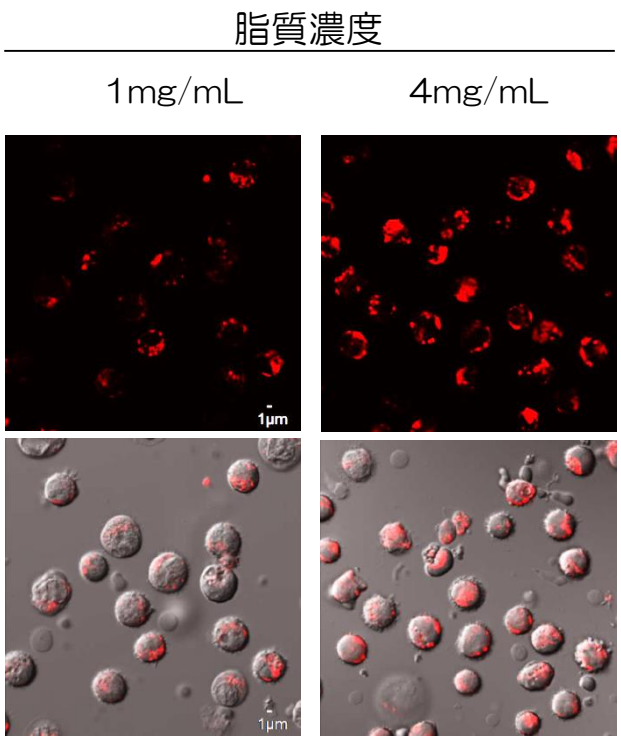


５）実施例

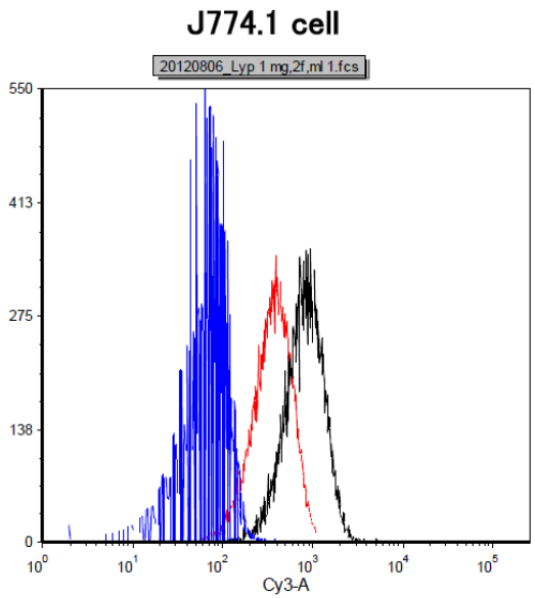
① 蛍光色素Cy3を内包したリポソームのマクロファージへの取込

薬剤をリポソームに内包化し、マクロファージの食作用を利用することで、マクロファージへの薬剤の取り込みが促進されることを狙っています。

本製品と同じ脂質組成を用いたリポソームのマクロファージへの取り込み能を確認しました。



貪食時間:3時間
倍率:×120（×40, zoom 3）

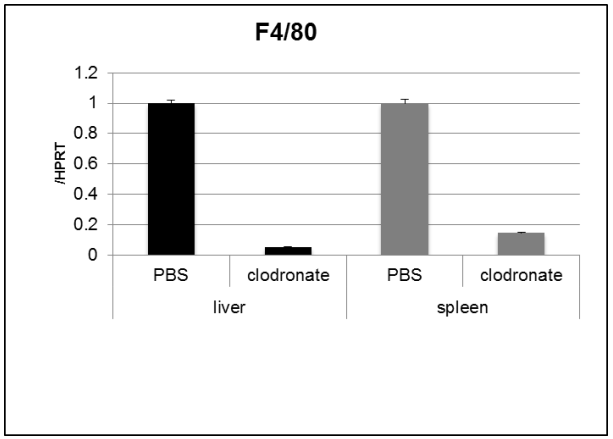


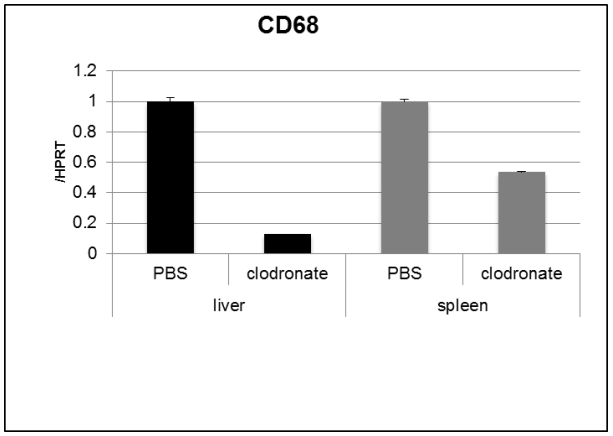
青： 添加なし
赤： 1.0 mg/ml, 貪食3時間
黒： 4.0 mg/ml, 貪食3時間
※顕微鏡写真と同サンプル

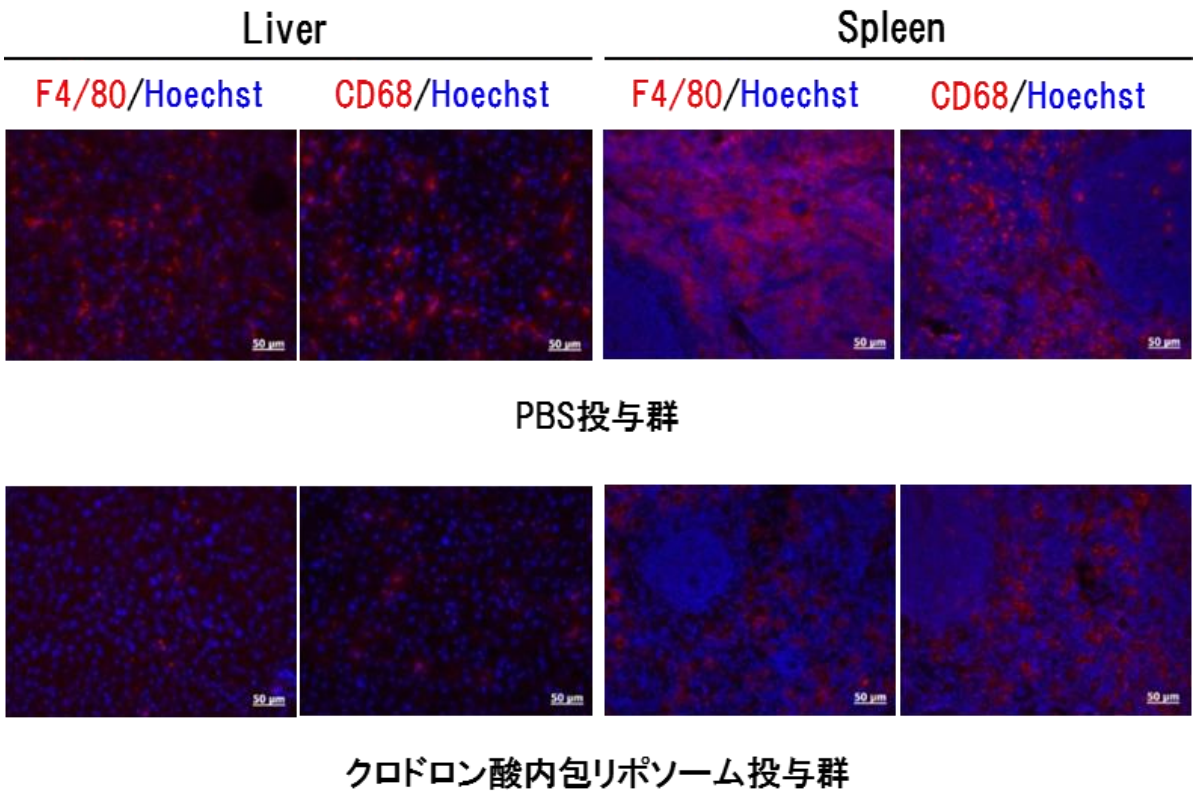
データ提供：
神戸学院大学 薬学部 李 英培 先生

② クロドロン酸内包リポソーム （300 nm）による正常マウスの肝臓及び脾臓マクロファージの除去効果

本製品２００μLを正常マウスの腹腔内に投与し、投与24時間後に、肝臓および脾臓を摘出して、リアルタイムPCR（左図）および組織免疫染色（右図）を行いました。





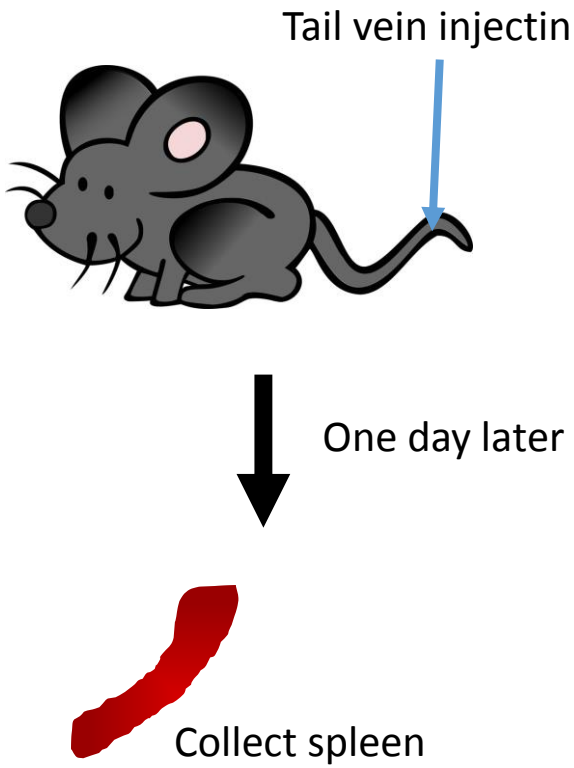


（データ提供： 東京大学 分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野 榎本 豊 先生）

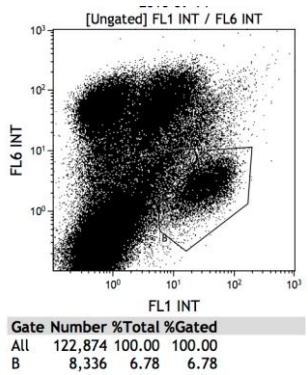
③−1　クロドロン酸内包リポソーム（300 nm）による正常マウスの脾臓マクロファージの除去効果

本製品を正常マウスに尾静脈投与し、投与１日後の脾臓を摘出して、FACS解析を行いました。

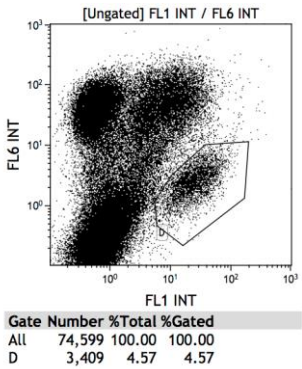
Mice: B6, female, 6weeks



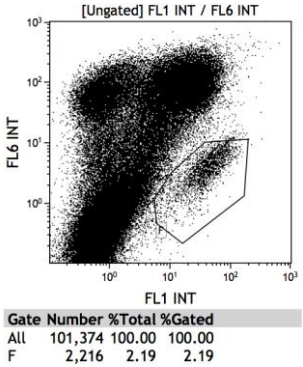
control



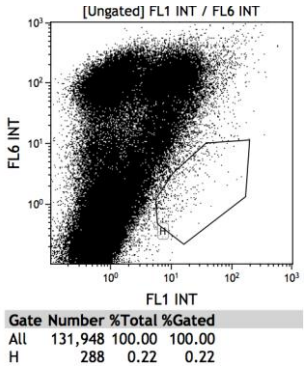
5ul



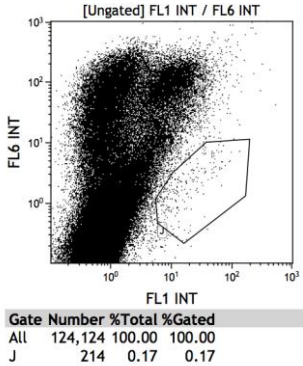
10ul

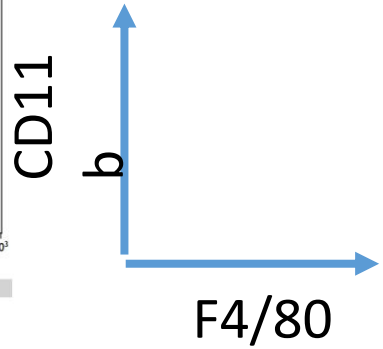


20ul



50ul

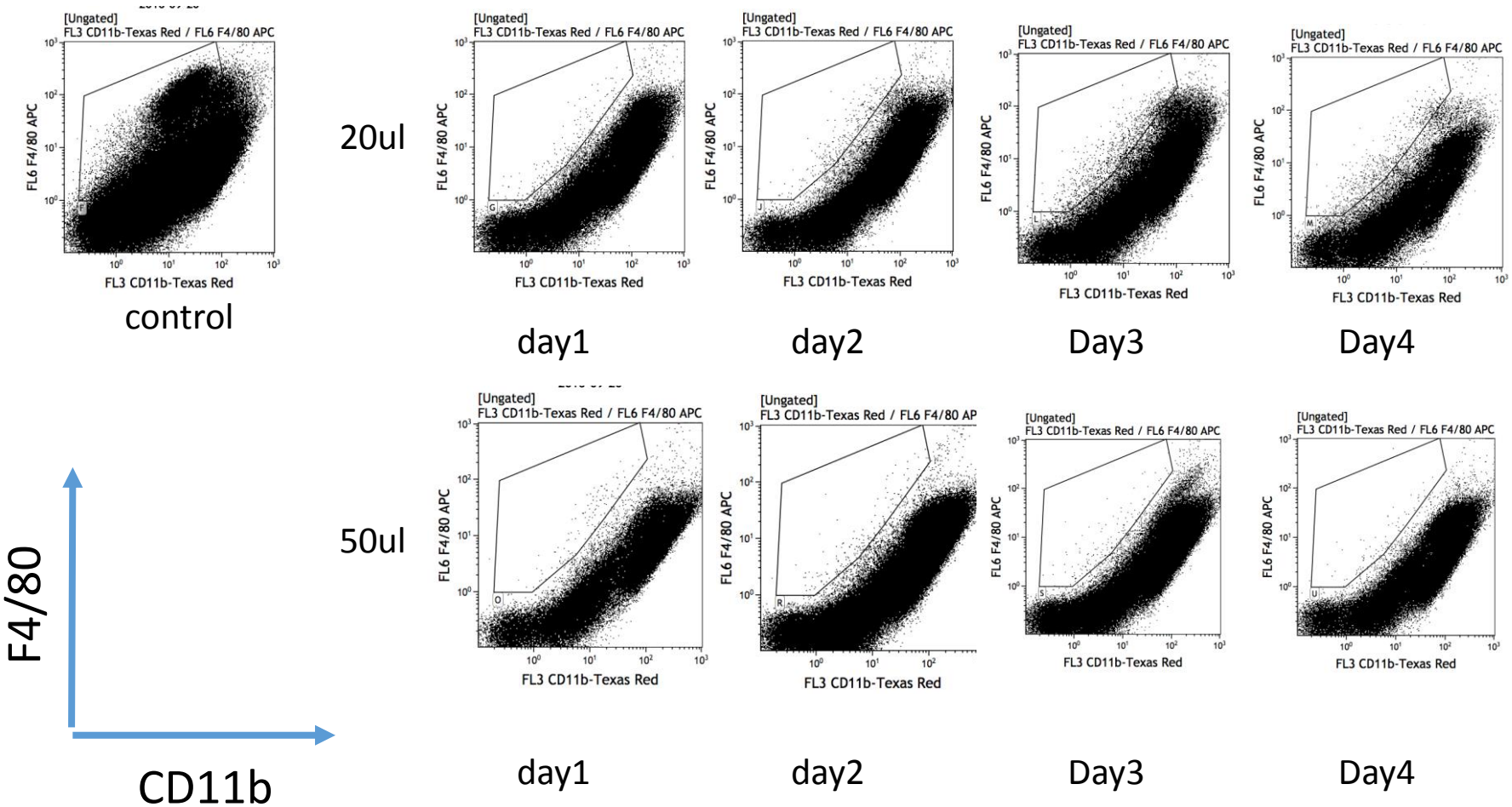




（データ提供： 筑波大学　医学医療系　解剖学発生学研究室　濱田　理人 先生）

③−2　クロドロン酸内包リポソーム（300 nm）による正常マウスの脾臓マクロファージの除去効果

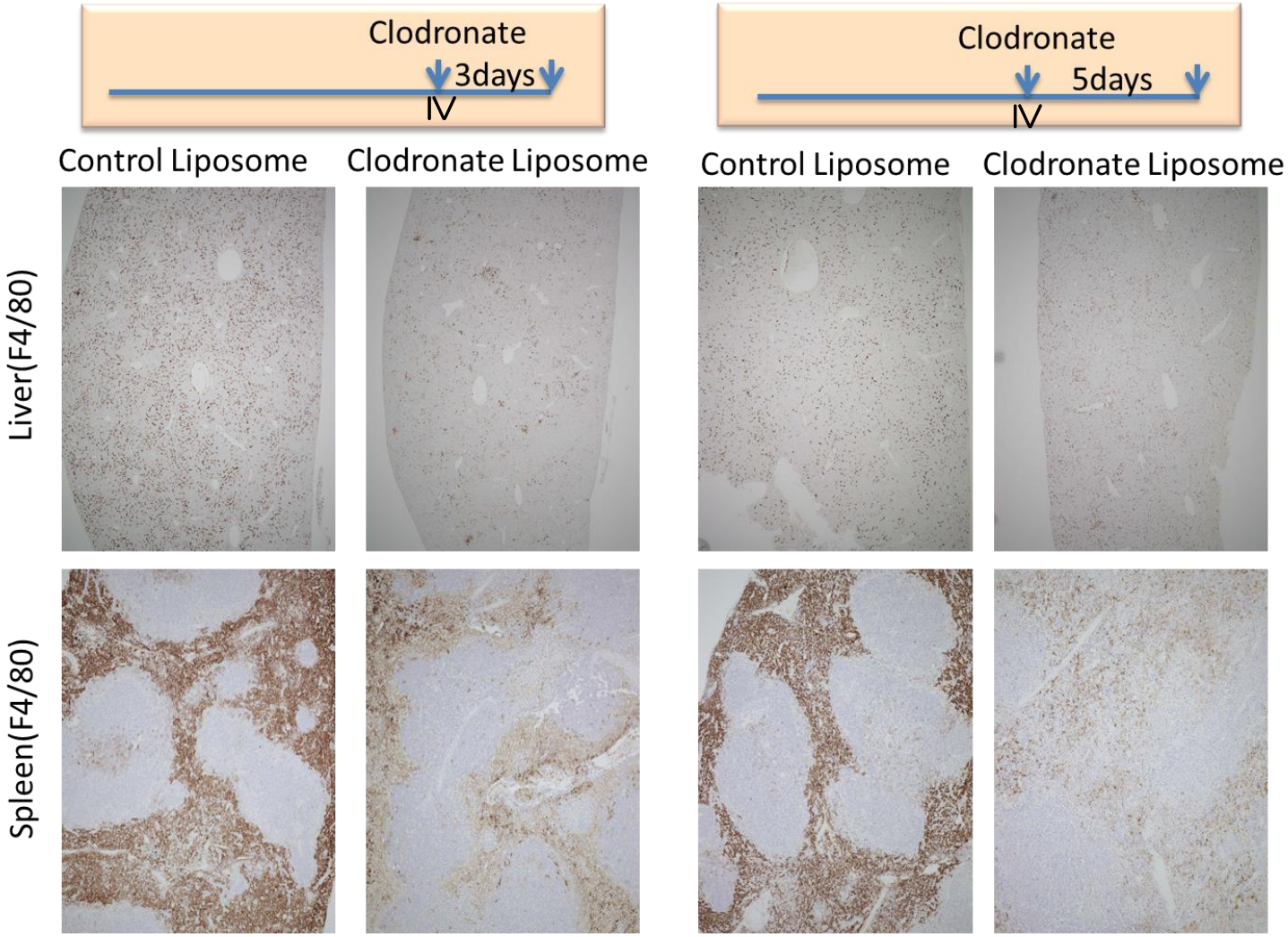
本製品を正常マウスに尾静脈投与し、投与１日、2日、３日、4日後の脾臓を摘出して、FACS解析を行いました。



（データ提供： 筑波大学　医学医療系　解剖学発生学研究室　濱田　理人 先生）

④－１　クロドロン酸内包リポソーム small による胃がんモデルマウスの肝臓及び脾臓マクロファージの除去効果

本製品２００μLを胃がんモデルマウス（Ganマウス）に尾静脈投与し、投与3日後（左図）および5日後（右図）の肝臓および脾臓を摘出して、組織免疫染色（F4/80）を行いました。

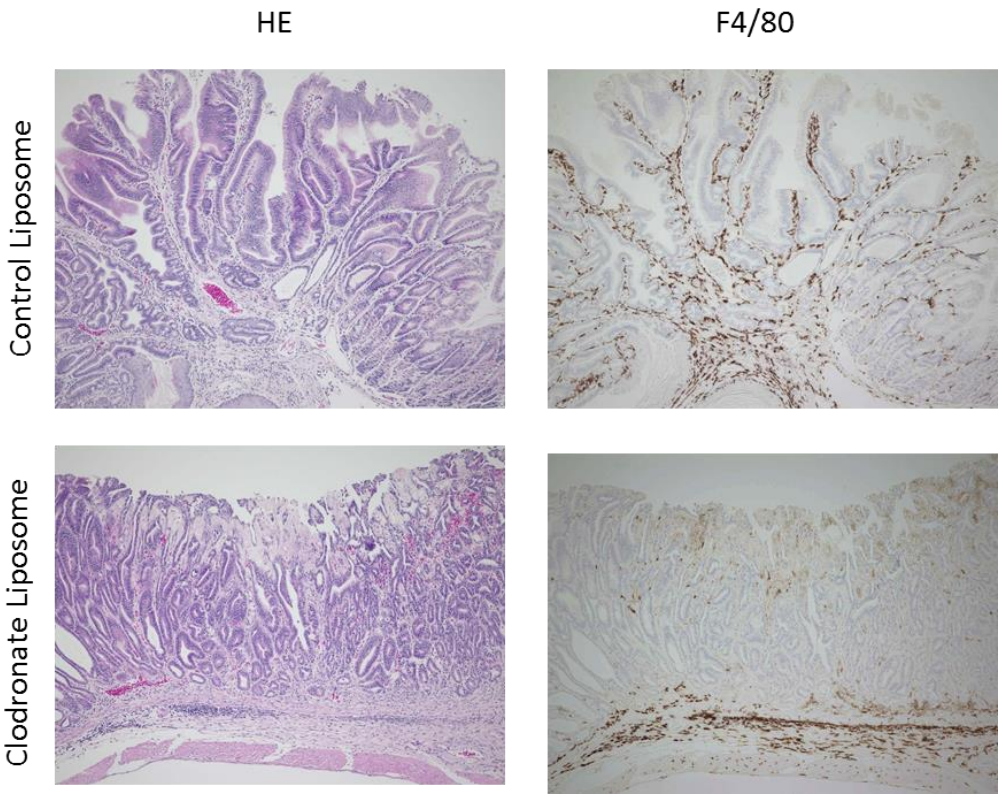


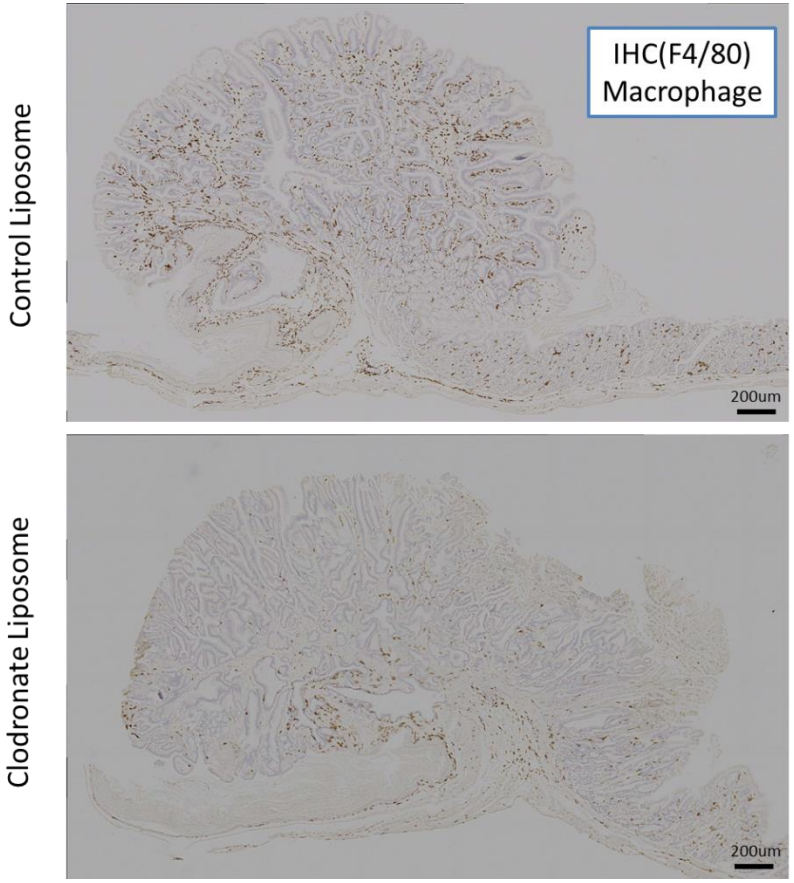
● **茶色の部分がマクロファージ**

（データ提供： 金沢大学がん進展制御研究所　腫瘍遺伝学研究分野　大島　正伸 先生）

④－２　クロドロン酸内包リポソーム small による胃がんモデルマウスの腫瘍関連マクロファージ（TAM）の除去効果

本製品２００μLを胃がんモデルマウス（Ganマウス）　尾静脈投与し、投与5日後の腫瘍組織を摘出し、HE染色および組織免疫染色（F4/80）を行いました。





- 茶色：マクロファージ
- 紫：細胞全体を染色

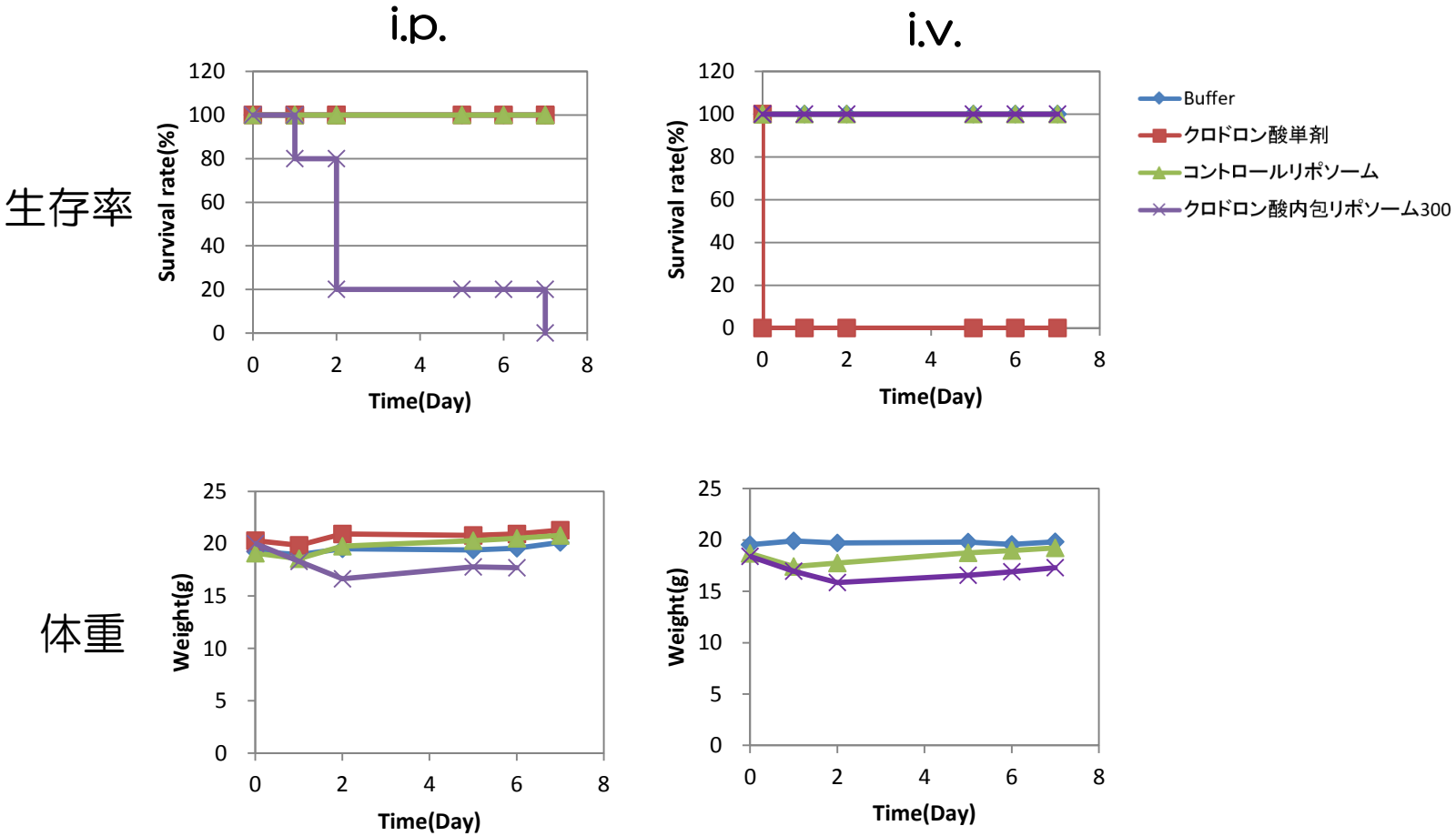
（データ提供： 金沢大学がん進展制御研究所　腫瘍遺伝学研究分野　大島　正伸 先生）

６）異常所見事例

① 大量投与時

クロドロン酸内包リポソーム（300 nm） 100mg/kgを腹腔内投与（i.p.）・尾静脈内投与(i.v.)を行った。

Mouse： Balb/cCrSlc, female, 6 weeks, N＝5



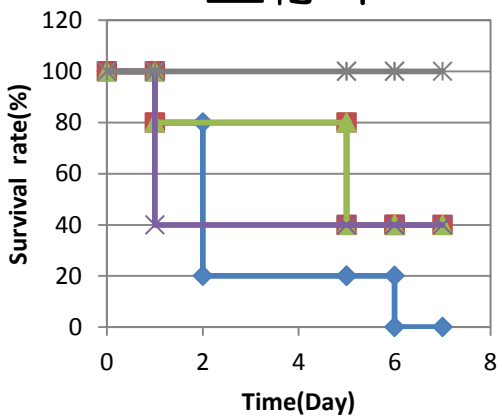
i.v.投与より、i.p.投与による副作用の方が強く見られます

② i.p.投与による異常所見事例

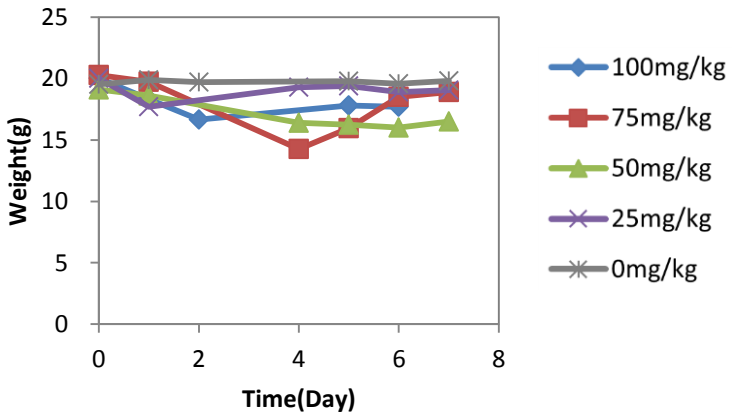
クロドロン酸内包リポソーム（300 nm） をi.p.投与した。
クロドロン酸 100mg/kg, 75mg/kg, 50mg/kg, 25mg/kg

Mouse： Balb/cCrSlc, female, 6 weeks,　N＝5

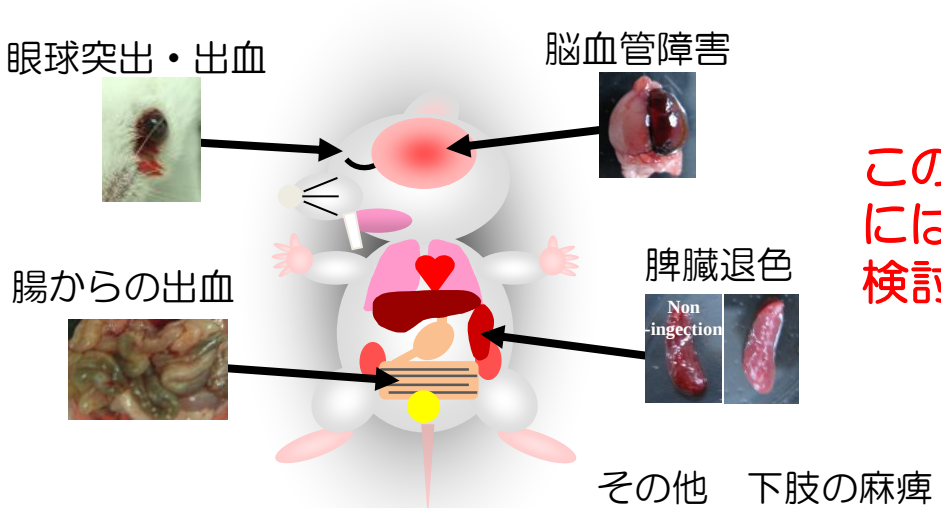
生存率



体重



異常所見事例



このような症状が出た場合には、投与経路、投与量を検討して下さい。

③ 血球への影響 その１

クロドロン酸内包リポソーム（300 nm）を投与

・白血球への影響（血液的検査）

投与経路	腹腔内投与	尾静脈内投与
投与量	50mg/kg	50mg/kg
マウス	Balb/cCrSlc, female, 8 weeks、N＝3	
血液分析装置	XT-1800iV（シスメックス）	
検査項目	白血球数	

投与後日数	未投与	i.p. 1	i.p. 3	i.p. 5	i.v. 1	i.v. 3	i.v. 5
白血球	38.2 ±2.6	90.2 ±57.0	85.0 ±25.8	77.6 ±20.0	33.3 ±39.0	60.1 ±29.6	83.8 ±34.7
好中球	**5.7** ±0.8	**65.1** ±47.0	**25.8** ±24.0	**30.7** ±1.6	19.1 ±28.2	6.3 ±0.6	17.6 ±9.2
リンパ球	29 ±4.7	14.7 ±2.2	54.6 ±49.8	39.7 ±21.3	8.7 ±4.3	49.8 ±29.1	57.9 ±22.4
単球	2.1 ±1.8	9.6 ±7.9	3.1 ±0.7	5.5 ±0.6	5.1 ±7.5	2.9 ±1.0	6.3 ±2.9
好酸球	1.5 ±0.1	0.6 ±0.5	1.4 ±0.8	1.7 ±0.9	0.2 ±0.3	1.2 ±0.2	1.8 ±0.2
好塩基球	**0** ±0.0	**0.3** ±0.2	**0.2** ±0.1	**0.1** ±0.0	**0.2** ±0.2	0 ±0.1	**0.2** ±0.3

×10^2cells/μL

・赤血球・血小板への影響（血液学的検査）

投与経路	腹腔内投与	尾静脈内投与
投与量	50mg/kg	50mg/kg
マウス	Balb/cCrSlc, female, 6 weeks、N=5	
血液分析装置	XT-1800iV（シスメックス）	
検査項目	赤血球数、血小板	

投与後日数	未投与	i.p. 1	i.p. 3	i.v. 1	i.v. 3
赤血球	878 ±22	854 ±107	912 ±58	942 ±18	956 ±24
血小板	**98** ±16.1	**39.9** ±38.5	**61.1** ±38.8	80.9 ±9.2	**53.7** ±10.3

×10^4cells/μL

③ 肝機能・腎機能への影響 その２

クロドロン酸内包リポソーム（300 nm）を投与

・肝機能・腎機能への影響（血液生化学的検査）

投与経路	腹腔内投与	尾静脈内投与
投与量	25mg/kg	50mg/kg
マウス	Balb/cCrSlc, female, 6weeks、N=5	
生化学自動分析装置	富士ドライケム3500v(富士フィルム)	
検査項目	肝機能（ALT・AST・GGT）、腎機能（CRE・BUN）	

ALT：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AST：アラニンアミノトランスフェラーゼ
GGT：γ-GTP（γ-グルタミルトランスペプチターゼ）
CRE：クレアチニン
BUN：尿素窒素

投与後日数	未投与	i.p.		i.v.	
		1	3	1	3
ALT (U/L)	52 ±45	264 ±224	165 ±207	57 ±11	83 ±28
AST (U/L)	221 ±126	863 ±687	935 ±1196	438 ±134	376 ±99
GGT (U/L)	1 ±0	2 ±2	3 ±4	4 ±1	9 ±3
CRE (mg/dL)	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0	0.1 ±0.0
BUN (mg/dL)	19.6 ±1.7	23.2 ±2.6	17.5 ±3.6	21.9 ±5.2	17 ±1.2