

—総説—

リポソームの物理化学的性質の新規な評価法及び 生体組織との相互作用制御に関する研究

中野浩士

要約：薬物の精密投与を達成するための有効な手段として、微粒子担体を用いた DDS (ドラッグデリバリーシステム) 製剤に対する期待が高まっている。薬物送達を目指した微粒子製剤を設計する場合、微粒子担体の粒子径、表面電荷及び表面特性などの粒子物性は、その物理化学的及び生体内安定性はもとより、その薬物送達機能を向上させる上で重要な因子である。微粒子担体としてリポソームは特に、これらの物性を制御しやすい担体として注目されている。従来、リポソームのようなサブミクロン粒子の物性を評価する手法としては、粒子径やゼータ電位測定、走査型及び透過型顕微鏡を用いた形状観察による評価などに限定されており、高機能な微粒子製剤を開発するためには、新しい視点での物性評価が強く求められている。本研究では、サブミクロン粒子の新規物性評価法の確立を目的とし、原子間力顕微鏡を用いて、リポソームの硬さについて評価を行った。また粒子の表面物性が生体組織との相互作用に与える影響に関して *in vitro* 及び *in vivo* にて評価し、リポソームの経肺投与型製剤としての可能性についても検討した。

索引用語：リポソーム、原子間力顕微鏡、ポリマー修飾、フローサイトメトリー、キトサン、経肺投与

Methods for Measuring Rigidity of Liposomes and Effect of Surface Modification of Submicron-sized Particles on Bio-interaction

Koji NAKANO

Abstract: The Drug Delivery System (DDS) raises expectations as an effective method of achieving precise administration of active pharmaceutical ingredients. Concerning formulating fine-particle products for drug delivery, physicochemical properties of particles, such as particle size, surface charge or surface condition are important factors for increasing the function of drug delivery. Liposomes as drug carriers are quite useful for controlling these properties. Methods for evaluating physicochemical properties of submicron-sized particles are limited to the measurement of particle size or zeta potential and observation of morphology with a scanning or transmission electron microscope. Therefore, a novel evaluation method is needed to develop a functional product of fine particles. The rigidity of liposomes is evaluated with an atomic force microscope for the purpose of establishing a novel evaluation method. The effects of surface properties on bio-interaction are also evaluated *in vitro* or *in vivo* then the possibility of polymer-coated liposomes as the dosage form for pulmonary administration is investigated.

Keyphrases: liposomes, atomic force microscopy, polymer coating, flow cytometry, chitosan, pulmonary administration

1. 緒言

近年、医薬品化合物開発の過程でスクリーニング及びその結果の候補として選出される医薬品化合物は多様化し、

岐阜薬科大学薬物送達学大講座製剤学研究室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1)

Laboratory of Pharmaceutical Engineering, Gifu Pharmaceutical University

(5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文 (甲第 105 号) の内容を中心にまとめたものである。

複雑な分子構造に由来して高分子量、または難水溶性という物理化学的性質を有する傾向を示してきている。それに伴い候補化合物の製剤化が困難となり、薬効が良好にも関わらず、開発初期段階で放棄される薬物が増加するようになってきた。

一方、医薬品開発時における付加価値により、薬物の体内動態を精密に制御し、薬物を「必要な時に、必要な場所に、必要な量だけ作用させる」ことで、副作用なく有効性を効率的に発揮させ、最適の治療効果を得ることを目的とする新しい理念及び技術、いわゆる薬物送達システム（DDS：Drug Delivery System）が20世紀後半に誕生し注目を浴びてきた。中でも薬物担体を用いる方法が、最も有用性が高いと考えられている。種々の微粒子担体の中でリポソームは最も研究がなされているものの一つである。リポソームは、リン脂質を水溶液中に懸濁して得られる細胞様小胞で、1965年にBanghamによって発見された。以降、生体膜モデルとして細胞膜やエンドサイトーシスの機構解明に利用され、製剤学の分野では薬物カプセルとしてDDS製剤への応用が検討されている。

薬物送達を目指したコロイド分散系製剤を設計しようとする場合、微粒子担体の粒子径、表面電荷、及び表面特性などの粒子物性は、その物理化学的安定性、生体内安定性はもとより、その薬物送達機能を向上させる上で重要な因子である。従来、このようなサブミクロン粒子の物性を評価する手法としては、動的光散乱法による粒子径測定や、レーザードップラー法を用いた粒子のゼータ電位測定、電子線を用いた走査型及び透過型電子顕微鏡などを用いた粒子形状観察による評価などに限定されてきた。しかし、より高機能な微粒子製剤を開発するためには、新規な粒子設計法の開発と共に、粒子物性を新しい視点で評価する手法の開発が強く求められている。

本研究では、新規物性評価法の確立を目的とし、原子間力顕微鏡を用いて、リポソームを視覚化し、従来の粒子径測定と原子間力顕微鏡（AFM）から得られた画像の解析結果を組み合わせることにより、従来の測定では困難なサブミクロンサイズのリポソームの硬さを予測する新たな指標の確立を行った。またポリマー修飾を施した微粒子担体の表面物性が、細胞及び生体組織との相互作用に与える影響に関して *in vitro* 及び *in vivo* にて評価し、リポソームの経肺投与型製剤としての可能性についても検討した。その研究経緯および結果について詳述する。

2. 原子間力顕微鏡を用いたリポソームの硬さ測定

一般に、リポソームの硬さは、脂質膜の流動性と密接な関係にあることから、リン脂質の種類、脂質組成中のコレステロール含量及び粒子径によって変化すると考えられている。これらの研究においても、脂質膜の特性変化に関

する情報から理論的に予測し議論している。他の研究も含め、リポソームの硬さに関する報告は、リポソームを構成する脂質膜の物性変化からの推測がほとんどである。その重要性は認識されてきたものの、リポソームのような微粒子の硬さを直接的に評価することは難しく、その方法に關しての報告は未だなされていない。今後、微粒子製剤に新たな機能を付与したり、薬物送達のための微粒子製剤を開発したりする場合には、微粒子製剤の硬さを簡便でかつ定量的に評価することが求められる。AFMを用いて微粒子の観察を試みた例は多く報告されているが¹⁻⁴⁾、形状観察が主眼であり、粒子物性評価には至っていない。

本章では、マイカ（雲母）上に吸着したリポソームの形状をAFMによる観察・解析することで、リポソームの硬さの新しい定量的な評価法の確立を試みた。薬物担体として使用可能な種々の組成のリポソームを調製後、AFMを用いて得られた画像を解析し求めた高さ方向の最頻値を、別途測定した動的光散乱法（DLS）から得られた粒子径値と比較し、粒子の硬さの指標を探索した。

ポリスチレン粒子の観察及び硬さ評価：Burchellらはポリスチレン粒子の形状が球形で、高いガラス転移点を持つことから、ポリスチレン粒子は室温条件下では変形しない硬い粒子であることを報告している⁵⁾。そのためポリスチレン粒子は非常に硬度が高く、AFM観察時においてもポリスチレン粒子の形状は変化しにくいと予想されることから、ポリスチレン粒子は微粒子の硬さの基準として使用するのに適していると考えた。

AFM観察から求めた高さ方向の最頻値（H）と液中で動的光散乱法を用いて測定した平均粒子径（P）を比較し、その差異を評価した。AFM測定時に粒子の硬度を反映した変形が起これば、HがPと比較して大きく異なることが予想される。H/Pの値を採ると、粒子が軟らかく潰れた形状を示すとH/P比は小さくなり、逆に硬く形状を維持していると1に近い値を示すと考えられ、このH/P比は粒子の硬さの指標になることが期待される。サブミクロンサイズのポリスチレン粒子を用い、本評価法を適用した。粒子を基板に固定化して、AFM観察すると共に、得られた画像を解析することより、10 μm 四方の基板上に吸着している粒子の高さ方向の最頻値を求めた。また別途、粒子を精製水に分散させDLSより求めた粒子径値を測定した。Fig. 1に基板に吸着させたポリスチレン粒子の代表的なAFM画像を示す。得られた画像を高さ方向に解析し得られた最頻値から、基板上に吸着したポリスチレン粒子の高さは、DLSより測定した平均粒子径とほぼ同様の値を示した。そのため、高さ方向の最頻値はマイカ表面に吸着したリポソームの垂直方向の長さを表すことができると考えられた。得られた値からH/P比を算出した結果、H/P比は1に近い値を示したことから、AFM測定中にポリスチレン粒子の形状が大きく歪まなかったことが確認

された。このことは、Fig. 1 の画像において、ポリスチレン粒子は球形に近い形状であったことから、AFM 画像の解析結果はサブミクロンサイズの微粒子の形状を反映していることが確認された。

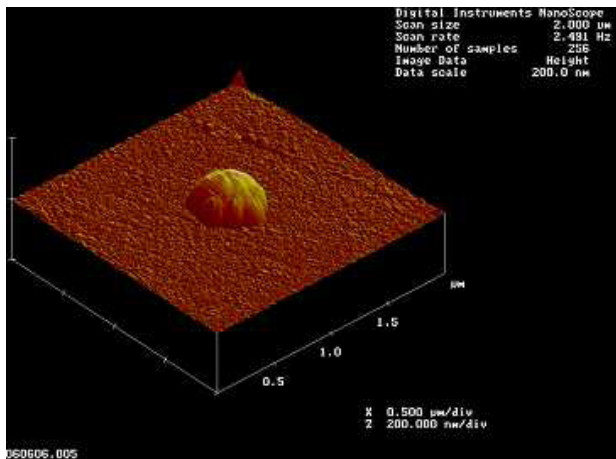


Fig. 1 An AFM image of polystyrene particle adsorbed onto surface modified mica. Concentration of polystyrene particle: 2.5 μg/mL, scale: 4 μm² × 200 nm.

リン脂質の種類による影響：リポソームの脂質二重膜は外相温度に依存して、その流動性が大きく変化する。この現象をゲルー液晶相転移といい、この相転移はリン脂質固有の相転移温度が存在することに由来する。一般にリン脂質の相転移温度は、リン脂質の炭化水素鎖の長さ、不飽和結合の有無、極性基の違いにより大きく異なる。そしてリン脂質の相転移温度は、リポソーム膜の流動性に影響を及ぼし、内封薬物の安定性及び保持性及びマクロファージの認識能など生体内の安定性に大きく関わってくる。そこで本項では、相転移温度の異なる3種類のリン脂質を用いて、リン脂質の種類が粒子の硬さに及ぼす影響について評価した。その結果、リン脂質として卵黄レシチン (EPC) 及びジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) を用いて調製したリポソームは、その形状が維持できず潰れた形状を示した。一方、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) を用いて調製したリポソームは、球形の状態を保っていることが観察された。

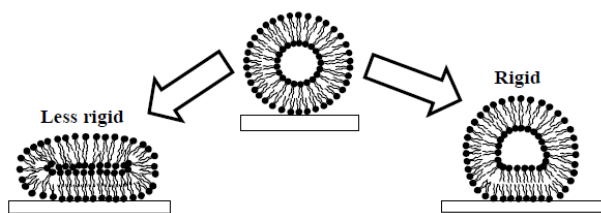


Fig. 2 A schematic model of liposomes adsorbed on the mica surface.

本実験では、リポソームの硬さの指標として、DLS に

よる粒子径とAFM画像を解析して求めた粒子の高さ方向の最頻値の比 (H/P 比) を仮定し、比較した。その結果 H/P 比は、リン脂質として EPC、DMPC、DSPC の順に大きくなった。これは EPC 及び DMPC の相転移温度が常温よりも低い、または同程度 (EPC : -15~-17 °C、DMPC : 23 °C) であるため、脂質膜は常温では液晶状態であり、膜の流動性が高く、揺らいだ状態であると考えられる。すなわち、脂質膜が揺らいだ状態にある EPC や DMPC で構成されるような粒子は軟らかく、基板に吸着した際に潰れてしまったと考察された。リポソームの吸着の模式図を Fig. 2 に示す。一方、DSPC は相転移温度が常温よりも高いため (55 °C)、常温付近では脂質膜がゲル状態であり、流動性が低く、硬い膜を保持していると考えられた。このことから、DSPC からなるリポソームは、基板への吸着時にそのままの形状を保ちやすかったと考察された。

これらの結果より、3種類のリポソームの H/P 比の差異は、構成するリン脂質の違いに依存したリポソームの硬さの変化を反映した。すなわち、相転移温度の傾向から推測されていたリポソームの硬さと、AFM を用いたリポソームの硬さ指標 (H/P) に良い相関が認められた。

コレステロール含量による影響：コレステロールは不飽和脂肪酸鎖を有するホスファチジルコリンに対し、膜透過性や流動性を低下させる。このコレステロールの添加効果は“膜安定化作用”として知られている。一方、飽和脂肪酸を有するホスファチジルコリンに対してはその相転移を消失させ、膜流動性を高めることが報告されている^{6,7)}。そこで本項では、リン脂質を DSPC に固定し、組成を DSPC : コレステロールとして、5 : 5、7 : 3 及び 9 : 1 (モル比) と変化させ、組成中のコレステロール含量がリポソームの硬さに及ぼす影響を評価した。

その結果、DSPC : コレステロールが 7 : 3 及び 9 : 1 のリポソームでは、5 : 5 のリポソームと比較して、得られた AFM 画像から、リポソームの形状をより良く維持していると判断された。Ladbrookeらは脂質組成中のコレステロール含量が 50 mol% を超える処方の場合、リン脂質の相転移温度が減少し、これは近接するレシチンの炭化水素鎖間の凝集力を減少させること報告している。また Utsumi らもコレステロールの添加は、ジパルミトイル、ジミリスチルレシチン/コレステロール/水系において、膜の流動性を増加させることを報告している^{8,9)}。

H/P 比を比較すると、コレステロール含量の増加に伴って、H/P 比は減少する傾向を示したことから、この H/P 比の減少傾向は、コレステロール含量変化に伴うリポソームの硬さの変化を反映していることが判った。このことから、組成中のコレステロール含量の変化に基づくリポソーム粒子の硬さを本測定法で評価できることが確認された。

粒子径による影響：リポソームの血中滞留性を決定する要因の一つに、リポソームの粒子径が挙げられる。リポソ

ームなどの微粒子担体は静脈内投与した場合、血液循環系からの消失、各組織への分布、臓器による吸収、組織間の移行、細胞表面への吸着、エンドサイトーシスや融合などの細胞との相互作用のいずれの過程においても、リポソームの粒子径は重要な因子である。その代表例として、癌組織の新生血管壁の孔の大きさが挙げられる。一般に、固形癌組織にある新生血管壁の孔は、正常組織の毛細血管壁窓の孔サイズ (0.03~0.08 μm) に比べて異常に大きく、概ね 0.1~0.2 μm の大きさの分子でも血管壁から漏れ出ることが知られている。この現象は EPR (Enhanced permeability and retention) 効果と呼ばれ、粒子径が 100 nm 以下のリポソームは容易に、癌組織新生血管壁孔を通過しやすい。またリポソームと補体系との相互作用にはサイズ依存性があり、小さいサイズのリポソームはオプソナイズされにくいという報告もされている¹⁰⁾。

リポソームの粒子径の違いはその硬さにも影響を及ぼすと考えられているが、それを実証する手段は知られていない。本研究では、本手法を適用することによりその差異を検出できるものと考え、組成をリン脂質：コレステロール：ステアリルアミンを 7:3:1 に固定し、エクストルーダー処理時のフィルター径を変えることにより、粒子径の異なるリポソームを調製し、その影響について評価した。その結果、いずれのリポソームも形状を保っていることが観察された。しかし、それぞれの H/P 比を比較した結果、0.1 μm の径を有するフィルターで調製したリポソームでは、他の 0.4 及び 0.8 μm のリポソームに比べてその H/P 比が大きく、H/P を指標とすることにより、粒子径の違いにより粒子の硬さが異なることを示せることが明らかとなった。

リポソームの粒子径と硬さの関係は、粒子径に依存した曲率に関係しているものと推察される。粒子径が小さいリポソームの場合、粒子中のリン脂質同士及びリン脂質とコレステロール間の分子相互作用は、粒子径が大きいリポソームよりも制限されている。粒子径が大きいリポソームを観察したところ、部分的にリポソームが平坦になっている箇所を観察され、その高さは 8 から 10 nm であった。Jassらは大きいリポソームのいくつかは、球状から平坦な脂質二重膜構造へ転移することを報告している¹¹⁾。このように、粒子径の小さいリポソームはその球状を維持しやすく硬い構造をしていると考えられた。

荷電物質の種類による影響：本項では、脂質組成中の荷電物質の種類がリポソームの硬さに与える影響について評価した。今回、正電荷物質としてステアリルアミン (SA) 及びジドデシルジメチルアンモニウムブロマイド (DDAB) を用いて電荷を有するリポソームを調製した。その結果、正電荷物質として DDAB を用いて調製したリポソームでは、SA を用いて調製したリポソームと比較して、潰れた形状のリポソームが観察され、H/P 比は約半分

であった。そのため、DDAB を用いて調製したリポソームでは、その形状を維持できないと考えられた。これは、DDAB の分子量が SA と比較して 200 ほど高いことや、分子構造が SA と異なり直鎖状でないため、リポソーム中に組み込まれるとヘテロナリポソームができてしまう可能性が示唆された。

リポソームの DDS への応用を企図した場合、電荷を調製する必要があることが多い。本結果に基づいてリポソームの硬さを考慮することにより、表面電荷は同一でも硬さの異なるリポソーム粒子を調製して両者の評価することが可能であり、本手法がリポソーム製剤の設計に有用であることを示唆する結果の一つであると考えられる。

各組成の比較：前項までに得られた H/P 比を比較して Fig. 3 に示す。図に示すように粒子径の違い、または同様の粒子径を有するリポソームでも組成中のリン脂質の種類、コレステロール量、正電荷物質の違いなどの要因によってその硬さが変化する様子が、H/P 比を比較することで明確に示され、H/P 比は微粒子の硬さの指標となると結論付けられた。

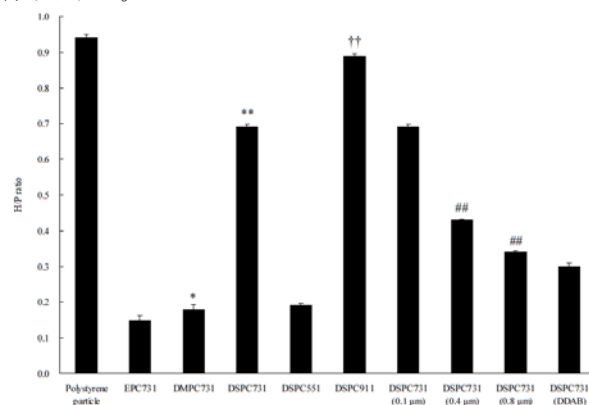


Fig. 3 Comparison of H/P ratio of various type of liposomes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: significantly different from the H/P ratio of EPC731, †† $p < 0.01$: significantly different from the H/P ratio of DSPC551, ††† $p < 0.01$: significantly different from the H/P ratio of DSPC731 (0.1 μm).

3. 表面修飾によるリポソームのマクロファージへの取り込みの抑制

DDS を用いた癌のターゲティング療法では、モノクローナル抗体に代表されるリガンドを、薬物担体に付与したアクティブターゲティングが盛んに研究されている。しかし、アクティブターゲティングの開発においても、薬物担体の全身血流中での滞留性確保は必須の条件である。また、非生体親和性物質を人体に投与すると、重篤なショック等の副作用の発現や効果の減弱が起こる可能性も懸念されている。そのため安全かつ高機能なパッシブターゲティング用薬物担体の設計を行うことは、信頼性の高い製剤設計の上で必須の検討事項である。

リポソームのポリマー修飾による粒子設計は、新たな表面修飾法として注目されている。本手法の特徴は、リポソーム懸濁液と予め調製したポリマー溶液を物理混合するという簡便な操作のみで表面修飾が可能である。リポソームを調製した後に表面修飾を行うために、選択的に粒子表面のみが修飾され、ポリマー分子が内水層に配向せず物理的安定性の向上が期待できる。当研究室でも本手法を用い、リポソーム表面を末端疎水化ポリビニルアルコール (PVA-R) にて修飾した場合、未修飾リポソームと比較して、血清存在下での粒子径の有意な凝集が認められないことを明らかにしている。この結果は、リポソーム表面に存在するPVA-R層が血清タンパクに対して立体的阻害効果を示したことを示唆している。また *in vivo* において、PVA-R修飾リポソームはRESによる取り込みを顕著に抑制し、それに伴い血中滞留性が有意に向上することを報告している^{12,13)}。

本研究では、当研究室で開発されたPVA-R修飾リポソームとマクロファージ細胞との相互作用に関して新たにフローサイトメトリーを用いて評価を行った。近年、フローサイトメトリーにてDDS用微粒子担体を評価した実施例も報告されており、粒子設計分野においても有力なツールである^{14,15)}。本検討においては、細網内皮系の類洞と呼ばれる肝臓特異的な血管に存在するマクロファージ細胞のモデルとしてJ774細胞を選択した。

ポリマーを用いた表面修飾による影響：当研究室で開発された部分疎水化水溶性ポリマーで表面修飾したリポソームの評価は、主としてゼータ電位測定が利用され、未修飾リポソームと比較してゼータ電位の 0 方向へのシフト及び粒子径の増大が認められ、修飾ポリマー量の測定から、リポソーム膜表面に立体的なポリマー層が形成されることを明らかとしてきた。本項では、蛍光物質としてDiIを選択しEPC:Chol.=9:1からなる、約100nmにサイジングしたリポソームにPVA-Rで表面修飾を施したPVA-R修飾リポソームを、J774細胞とインキュベートさせた場合の相互作用について、フローサイトメトリーでの解析及び共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた視覚的な観察を行った (Fig. 4-5)。

フローサイトメトリーを用いて、PVA-R修飾リポソームと相互作用したJ774細胞から検出される1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorate (DiI) の蛍光強度の経時的な変化を測定した。その結果、J774細胞から検出されるDiIの蛍光強度は、経時的に増加することが判明した。また全てのインキュベート時間において、PVA-Rで修飾したリポソームは、未修飾リポソームと比較して、J774細胞から検出される蛍光強度が低いことが明らかとなった。

また共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた観察から、PVA-R修飾リポソームは未修飾リポソームと比較して、

J774細胞から検出されるDiIの蛍光が弱いことが明らかとなった。これらの結果から、J774細胞から検出されるDiIの発光の違いには、リポソーム表面に存在するPVA-R層が関与していることが強く示唆された。

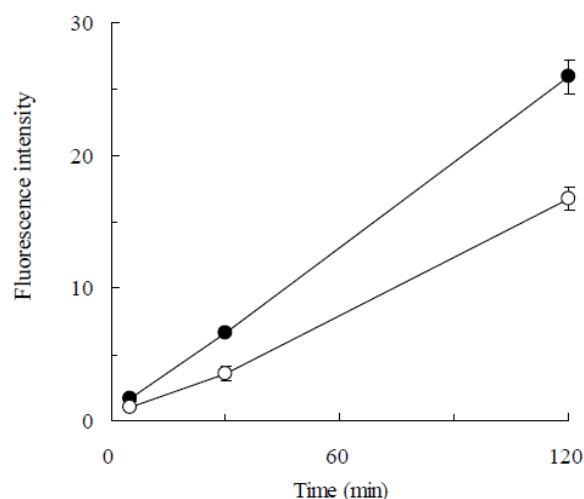


Fig. 4 Effect of PVA-R coating on the interaction with J774 cells (n=3). Lipid composition of liposomes: EPC:Chol.=9:1. ●: non-coated liposomes, ○: PVA-R-coated liposomes, lipid concentration: 1 mg EPC/mL, final PVA-R concentration: 0.5% (w/v).

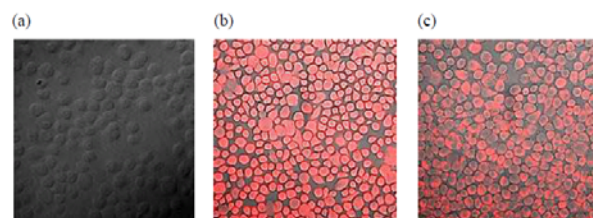


Fig. 5 CLSM images of DiI spots detected from J774 cells. (a) control, (b) non-coated liposomes, (c) PVA-R-coated liposomes, lipid concentration: 1 mg EPC/mL, final PVA-R concentration: 0.5% (w/v).

ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム表面に存在するPEG鎖は、リポソームと細胞を含む様々な分子との相互作用において、立体的な阻害効果を持つことが報告されている^{16,17)}。当研究室ではこれまでにPVA-R修飾リポソームが仔牛血清の存在下、血清タンパクとの相互作用を減弱させることを報告しており、PVA-R層が立体的なものであると考察している¹²⁾。今回の結果から、PVA-R修飾リポソームがJ774細胞との相互作用を抑制したことから、リポソーム表面に存在するPVA-R層がJ774細胞との相互作用に対しても、PEG修飾リポソームで認められるような立体的な阻害効果を持つことが示唆された。

コレステロール含量による影響：脂質組成中のコレステロール含量は、静脈投与後のリポソームの血中滞留性に影響を及ぼすことが知られている。そこで、コレステロー

ル含量の異なる EPC:Chol.=5:5 (EPC55) 及び 9:1 (EPC91) からなる PVA-R 修飾リポソームと J774 細胞との相互作用について同様に評価した。

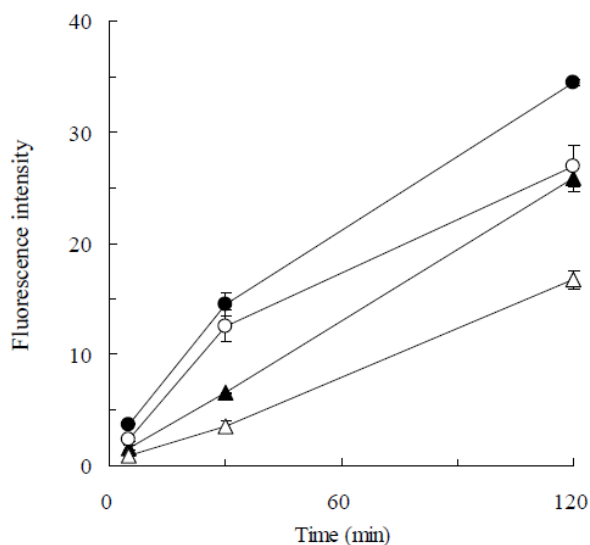


Fig. 6 Time courses of the fluorescence intensity of DiI in J774 cells that interacted with liposomes having different cholesterol content ($n=3$). Lipid composition of liposomes: EPC:Chol.=5:5 (circles) or 9:1 (triangles), closed symbol: non-coated liposomes, open symbol: PVA-R-coated liposomes, lipid concentration: 1mg EPC/mL, final PVA-R concentration: 0.5 % (w/v).

未修飾リポソームでは、各インキュベーション時間において、組成中のコレステロール含量の増加に伴い、J774 細胞から検出される DiI の蛍光強度が増加したことから、組成中のコレステロール含量の高い EPC55 では、コレステロール含量の低い EPC91 と比較して J774 細胞とより強く相互作用したと考えられた。

PVA-R修飾リポソームの場合では、組成中のコレステロール含量に関わらず、未修飾リポソームの場合と比較して、PVA-R修飾リポソームと J774 細胞との相互作用が減弱した。しかし未修飾の EPC91 と比較して、PVA-R修飾した EPC55 とインキュベートした J774 細胞から検出される DiI の蛍光強度は高い値を示した。このことから、脂質組成中のコレステロール含量が高いと、リポソーム表面に PVA-R が存在していても、PVA-R修飾による J774 細胞との相互作用に対する立体的阻害効果が現れにくいことが示唆された。

EPC55 及び EPC91 への PVA-R の仕込みに対する修飾効率を測定した結果、それぞれ 74.2 及び 32.6 % であったことを確認している。PVA-R は PVA の末端にアルキル鎖を有しており、組成中のコレステロール含量の増加に伴い、リポソーム膜表面の疎水化が進行し、PVA-R の貫入を促進すると考えられる。PVA-R の修飾効率の高さにも関わらず、EPC55 が J774 細胞との相互作用を抑制できなかった理由として、脂質組成中のコレステロール含量が過剰である可

能性が考えられる。Shin らは、脂質組成中のコレステロール含量が過剰となると、脂質二重膜中にコレステロールのクラスターが形成することを報告している¹⁸⁾。本検討で用いたコレステロール含量が 50% と高い脂質組成である EPC55 においても、同様に脂質二重膜中にコレステロールのクラスターの形成が予想される。形成されたコレステロールクラスターの存在により、リポソーム表面のコレステロール分布が不均一になったため、PVA-R がリポソーム表面を均一に表面修飾できず、EPC55 リポソームの膜表面に存在する PVA-R 層が、EPC55 リポソームと J774 細胞との相互作用に対し立体的阻害効果を示さなかったと推察された。今回の結果より、J774 細胞による PVA-R 修飾リポソームの取り込みを抑制するには、PVA-R でリポソーム表面を均一に修飾することが重要であると考えられた。

表面修飾時の PVA-R 濃度による影響：前項までにリポソームと J774 細胞との相互作用において、リポソーム表面に存在する PVA-R 層の有無だけでなく、脂質組成中のコレステロール含量もまた重要な因子であることが明らかとなった。そこで脂質組成を EPC55 とし、表面修飾時に用いる PVA-R 濃度が、PVA-R 修飾リポソームと J774 細胞との相互作用に与える影響について評価した。

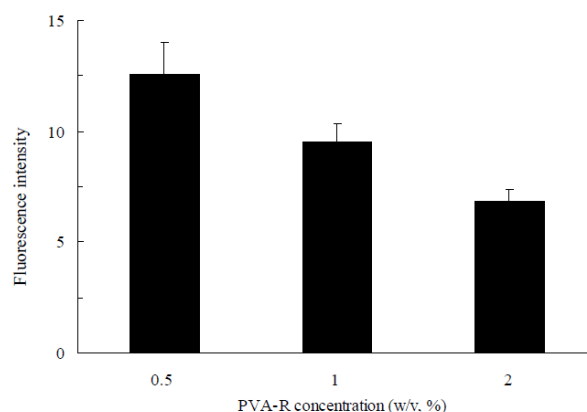


Fig. 7 Effect of PVA-R concentration in coating on the interaction with J774 cells ($n=3$). Lipid composition of liposomes: EPC:Chol.=5:5. Incubation time: 30 min, lipid concentration: 1 mg EPC/mL.

その結果、PVA-R 修飾リポソームを調製する際の PVA-R 濃度を増加させた場合、濃度に依存して J774 細胞から検出される DiI の蛍光強度が減少した。このことから、表面修飾時の PVA-R 濃度の増加は、PVA-R 修飾リポソームと J774 細胞との相互作用を減弱させることが明らかとなった。各 PVA-R 濃度で表面修飾を行ったリポソームは、ほとんど同じ粒子径を示したにも関わらず、表面修飾時の PVA-R 濃度を増加させると、EPC55 表面に存在する PVA-R 量が増加した (0.5、1 及び 2% PVA-R 修飾リポソームの表面 PVA-R 量: 45.4、82.2 及び 136.4 mg PVA-R/mmol lipid)。また前項において、最終 PVA-R 濃度として 0.5% で EPC55 を表面修飾した場合、PVA-R の不均一な修飾を引き起こ

してしまう可能性を見出している。しかし、今回の結果から、リポソームの表面修飾時の PVA-R 濃度の増加が、EPC55 に対する PVA-R の不均一な表面修飾を克服できる可能性が示唆された。そのため、リポソーム表面の PVA-R 量もまた J774 細胞との相互作用を制御する上で、重要な要因であることが明らかとなった。また他の部分疎水化ポリマーとして HPMC-R を用いた場合でも、ポリマー濃度の増加に依存して J774 細胞との相互作用を減弱できることが示唆された。

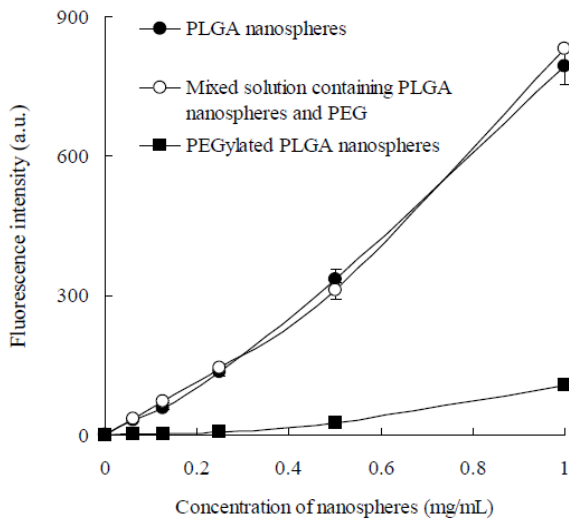


Fig. 8 Effect of the existence of PEG layer on the surface of PLGA nanospheres on the cellular interaction of PEGylated PLGA nanospheres ($n=3$). Incubation temperature: 37°C, molecular weight of PEG: 6,000, the content of PEG-PLGA: 10% (w/w), the concentration of nanospheres: 1.0mg/mL.

ここまでの検討において、リポソーム表面に存在する PVA-R 層が J774 細胞との相互作用に対して、立体的な阻害効果を示し、相互作用の抑制に有効であることを明らかにした。そこで本項では、同一手法を用いて、PEG 修飾ナノスフェアの粒子表面に配向した PEG 分子が J774 細胞との相互作用に与える影響について評価した。Fig. 8 に測定した結果を示す。未修飾ナノスフェアまたは PEG 溶液と未修飾ナノスフェアとの混合液では、インキュベートした J774 細胞から検出される DiI の蛍光強度は、インキュベート時のナノスフェアの濃度に依存して増加した。一方、PEG-PLGA を用いて調製した PEG 修飾ナノスフェアは、J774 細胞から検出される DiI の蛍光強度が、未修飾ナノスフェアまたは PEG 溶液と未修飾ナノスフェアとの混合液と比較して、全てのナノスフェア濃度において低いことが明らかとなった。この結果より、ナノスフェアと J774 細胞との相互作用は、PEG 層の有無により減弱することを明らかにした。さらに PEG 分子量及び PEG-PLGA 含量を変化させて、J774 細胞との相互作用について同様の評価を行った (Fig. 9-10)。その結果、PEG 分子量及び

PEG-PLGA 含量を増加させることにより、ナノスフェアと J774 細胞との相互作用が減弱することも見出した。

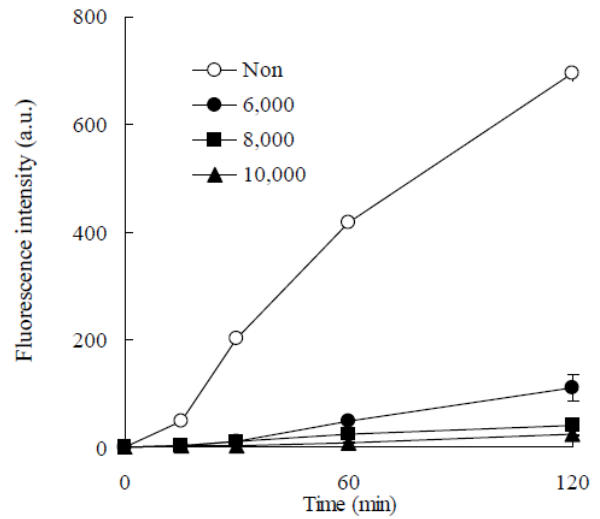


Fig. 9 Effect of PEG molecular weight on cellular interaction of PEG ylated PLGA nanospheres ($n=3$). Incubation temperature: 37°C, the content of PEG-PLGA: 10% (w/w), the concentration of nanospheres: 1.0 mg/mL.

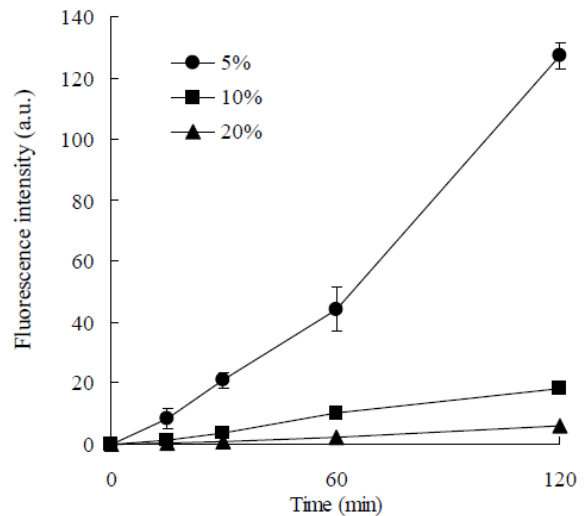


Fig. 10 Effect of the content of PEG-PLGA on cellular interaction of PEG ylated PLGA nanospheres ($n=3$). Incubation temperature: 37°C, molecular weight of PEG: 10,000, the concentration of nanospheres: 1.0mg/mL.

4. ポリマーによる表面修飾を用いたリポソームの肺内挙動の制御

近年、薬物送達経路として肺が注目されている。これは、ペプチド性薬物の消化管吸収には、障壁が多過ぎるため、代替の薬物吸収経路として肺粘膜を利用するというコンセプトである。また、肺での疾患に対して直接肺内に薬物を送達して効率を高めると共に副作用を低減しようという観点での研究も注目を集めている。

薬物を用いたリポソームの経肺投与に関して多くの報告がなされているが、肺内でのリポソームの挙動の制御に

関しての報告は多くはない。前述したリポソームの特徴の中でも、ポリマーを用いた表面修飾は、体内でのリポソーム自身の挙動を精密に制御することができる。今回ポリマーとして先の実験で用いたPVA-Rに加え、キトサンを使用した。キトサンは、リポソームに粘膜付着性を付加させ消化管粘膜層において、その滞留性を向上させ、薬物の吸収を高めることが可能である¹⁹⁾。

以上のことから、肺内への薬物投与においても、ポリマーを用いたリポソームの表面修飾を活用することにより、薬物の吸収及び滞留挙動を制御し、適切な薬物送達を行うことが可能であると考えられる。すなわち PVA-R 修飾リポソームでは、リポソームと細胞、特にマクロファージ細胞との相互作用が減少し、経肺投与後の薬物の滞留性が向上することが期待され、キトサン修飾リポソームでは、肺胞上皮細胞などの上皮細胞や肺粘膜との相互作用が増強し、さらにキトサンが持つタイトジャンクション開口作用によって、薬物の吸収が改善することが期待される。かかる背景より、経肺投与における薬物送達を目指したポリマー修飾リポソームの有用性を評価することを目的とし、蛍光標識したポリマー修飾リポソームを経肺投与した後の肺内挙動を評価した。

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた肺組織の観察：各ポリマー修飾リポソームの肺内動態を明確にすることを目的とし、クマリン-6 を用いて蛍光標識したポリマー修飾リポソームを投与し、5 時間後に摘出した肺組織中のリポソームの分布を共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した (Fig.11)。

未修飾及びキトサン修飾リポソームを比較した場合、キトサン修飾リポソーム投与群では、未修飾リポソーム投与群と比較して、クマリン-6 に由来する緑色蛍光が肺組織中に強く観察された。正に荷電しているキトサンは、負に帯電している細胞や組織と強い相互作用を示し、またキトサンが有する粘膜付着性を考慮すると、肺粘膜と強い相互作用を示すと考えられる。そのためキトサン修飾リポソームは、肺組織の上皮細胞や粘膜との高い相互作用の結果、未修飾リポソームと比較して、肺組織から強い蛍光が観察されたと考察された。

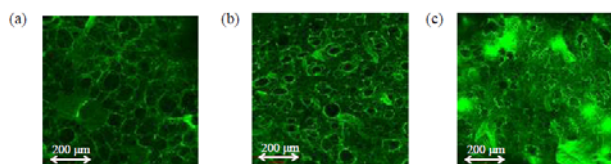


Fig. 11 CLSM images of lung tissue 5h after pulmonary administration of polymer-coated liposomes. (a) Non-coated liposomes, (b) Chitosan-coated liposomes and (c) PVA-R-coated liposomes, polymer concentration: chitosan; 0.1 % (w/v), PVA-R; 2 % (w/v), scale bar: 200 µm.

一方、未修飾及び PVA-R 修飾リポソームを比較した場

合、PVA-R 修飾リポソーム投与群の肺組織から、クマリン-6 に由来する緑色蛍光の大きな集合が観察された。すでに当研究室から報告されている *in vitro* 及び *in vivo* での結果より、PVA-R 修飾リポソームでは、リポソーム表面にフレキシブルで立体的な PVA-R 層が形成され、立体的な阻害効果を示すと考えられる。PVA-R 修飾リポソームは肺内でも同様な挙動を示すことが示唆された。

表面修飾がリポソームの肺内挙動に与える影響の定量的評価：各ポリマーによる表面修飾がリポソームの肺内動態に与える影響について、リポソームの蛍光標識として CA を用い、摘出した肺組織及び気管支肺胞洗浄液 (BALF: Bronchoalveolar lavage fluid) 中の CA を定量し、リポソームの肺内挙動の定量的評価を行った。

Fig. 12 には、各種ポリマー修飾リポソーム投与 5 時間後における、肺組織及び BALF 中への分布を投与量に対する割合で示す。また Fig. 13 には、表面修飾時のポリマー濃度を変化させたときの、各種ポリマー修飾リポソームの肺内挙動を示す。

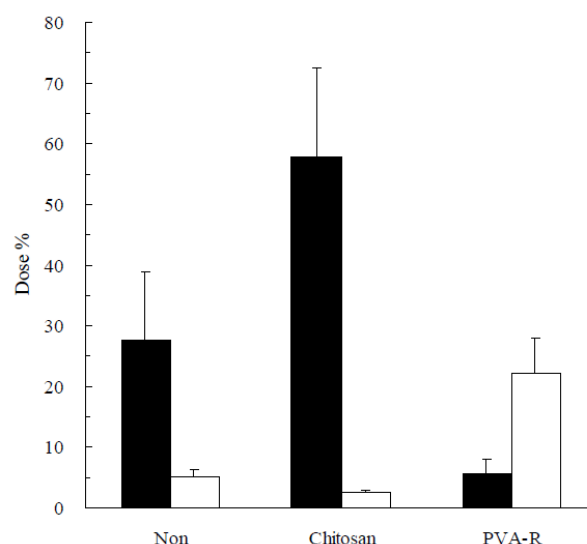


Fig. 12 Effects of a polymer coating on the behavior of polymer-coated liposomes in the lungs after pulmonary administration ($n=3-6$). Dose: 1.61mg DSPC/15.63µg CA/0.2mL/rat. Closed bar: lung tissue, open bar: BALF. Chitosan: 0.1 % (w/v) chitosan-coated liposomes, PVA-R: 2 % (w/v) PVA-R-coated liposomes.

キトサンを用いてリポソームに表面修飾を施したキトサン修飾リポソームは、他のリポソームと比較して、肺組織中に多くの CA に由来する蛍光が観察された。また、表面修飾に用いるキトサンの濃度を 0.1 から 0.3 % と増加させて、キトサン修飾リポソームを調製し経肺投与した結果、0.3 %キトサン修飾リポソームは 0.1 %キトサン修飾リポソームとほぼ同程度の挙動を示した。

得られた結果より、投与されたキトサン修飾リポソームは消化管粘膜と同様に、肺粘膜と強く相互作用したため、

未修飾リポソームと比較して肺組織から多くの CA が検出されたと考えられた。また、表面修飾に用いるキトサンは最終濃度として、0.1 % で十分な粘膜付着性を有することが明らかとなった。今回得られた結果を基に、報告されている知見と併せて考察すると、キトサン修飾リポソームは経口投与だけでなく経肺投与においても有用な薬物担体となりうる可能性が示唆された。一方、PVA-R を用いて表面修飾を施した PVA-R 修飾リポソームは、未修飾及びキトサン修飾リポソームと比較して、BALF 中に多くの CA が検出される傾向を示した。

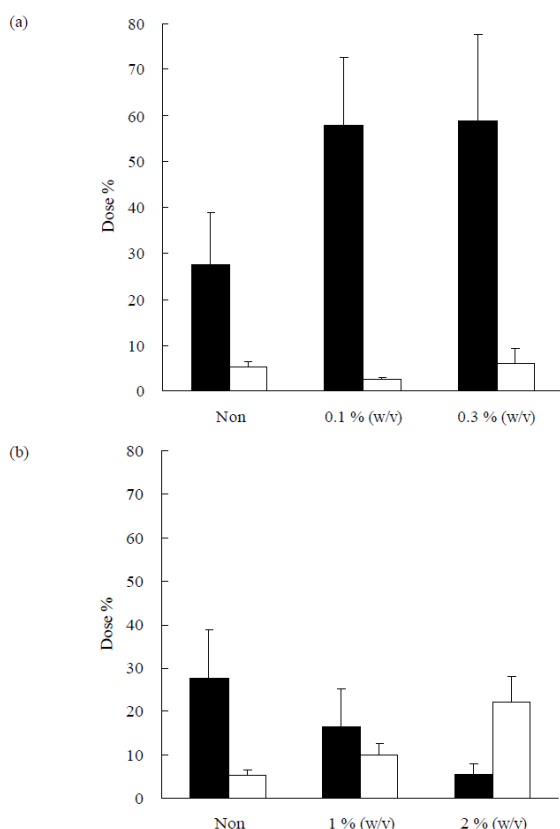


Fig. 13 Effects of polymer concentration on the behavior of polymer-coated liposomes in the lung after pulmonary administration ($n=3-6$). (a) 0-0.3 % (w/v) chitosan-coated liposomes, (b) 0-2 % (w/v) PVA-R-coated liposomes. Closed bar: lung tissue, open bar: BALF.

このことから、PVA-R 修飾リポソームは肺組織と直接相互作用するよりも、肺上皮被覆液中に多くが滞留していることが示唆された。PVA-R 修飾リポソームが肺上皮被覆液中へ滞留する傾向を示した原因として、リポソーム表面に存在する PVA-R 層の立体的な阻害効果が関与していると考えられ、PVA-R 層はリポソームと肺組織または肺胞マクロファージとの相互作用を抑制していると推察される。表面修飾時に用いる PVA-R 濃度を変化させて PVA-R 修飾リポソームを調製し同様の評価を行ったところ、表面修飾時に添加する PVA-R 量に依存して肺組織から検出される蛍光量が減少し、BALF から検出される蛍光

量が増加した。また、表面修飾時の PVA-R 濃度を増加させるにつれて、リポソーム表面上の PVA-R 量が増加することを実験的に確かめている。

これらの結果より、リポソーム表面に存在する PVA-R 量が増加したことで、PVA-R 層が密になった結果、立体的な阻害作用が強くなったためと考えられた。針谷らは、PEG 修飾リポソーム表面の PEG 鎖による立体的な阻害効果は、表面に存在する PEG 鎖の量に依存することを報告している²⁰⁾。PVA-R 修飾リポソームについても、静脈投与後の血中滞留性の向上は、リポソーム表面に存在する PVA-R 量に依存することが示されている¹³⁾。得られた結果より、PVA-R 修飾リポソームは、肺内においても同様な制御が可能であることが明らかとなった。

ポリマー修飾リポソームの肺障害性評価：リポソームは、生体に対して安全性が高いことが知られているが、肺組織に対する安全性については報告が少ない。Henderson らは、細胞の溶解、細胞膜の障害または肺胞毛細管閉門を介したタンパク質のトランスダクションが生じた場合、BALF 中の乳酸脱水素酵素や総タンパク質量が増加するため、BALF 中のタンパク質濃度は、肺組織に対する急性障害の指標として用いることができると報告している²¹⁾。そこで、今回投与した各種ポリマー修飾リポソームの肺粘膜に対する障害性の指標として、BALF から検出されるタンパク質濃度で評価した。

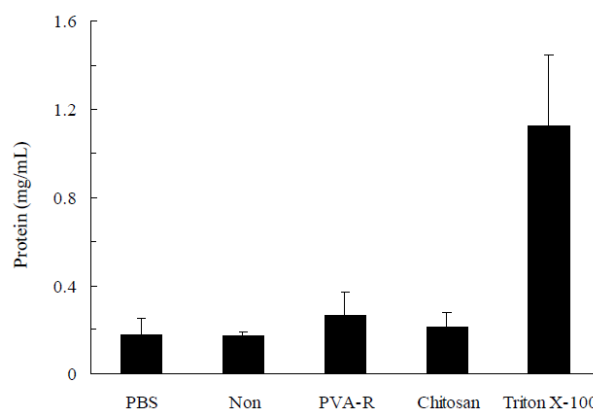


Fig. 14 The amount of total protein in bronchoalveolar lavage fluid at 5h after pulmonary administration of polymer-coated liposomes to the lung ($n=3-5$). PBS: phosphate buffered saline, Non: Non-coated liposomes, PVA-R: 2 % (w/v) PVA-R-coated liposomes, chitosan: 0.1 % (w/v) chitosan-coated liposomes.

ポジティブコントロールとして Triton X-100 を投与した場合、ネガティブコントロールであるリン酸緩衝液 (PBS) 及び各種ポリマー修飾リポソームと比較して、BALF 中のタンパク質濃度は高い値を示した。ポリマー修飾リポソームは、いずれも PBS とほぼ同じタンパク質濃度を示した。この結果は、ポリマー修飾リポソームの経肺投与における肺組織への障害性は非常に低いことを示し

ている。ポリマー修飾リポソームは、肺に直接投与されても障害性は極めて低く、薬物送達の担体として安全であることが明らかとなった。

5. 結論

原子間力顕微鏡を用いたリポソームの硬さ測定：AFMを用いてリポソームの形状を観察した結果、その形状はリン脂質の種類、コレステロール含量、粒子径及び荷電物質の種類によって影響を受けた。動的光散乱法による粒子径とAFM画像を解析して求めた粒子の高さ方向のモード値の比(H/P比)を算出し比較したところ、これらの値が粒子の特性と相関し、H/P比をリポソームの硬さを評価する新たな指標とできることを明らかにした。

表面修飾によるリポソームのマクロファージの取り込みの抑制：末端疎水化ポリビニルアルコール(PVA-R)を用いて修飾リポソームを調製し、モデル細胞として選択したマウスマクロファージ細胞株(J774細胞)との相互作用をフローサイトメトリーにて評価した。その結果、リポソームとJ774細胞との相互作用は、PVA-R修飾の有無、コレステロール含量、修飾時のPVA-R濃度及び用いる部分疎水化ポリマーの種類に依存して減弱することを明らかにした。これらの結果から、PVA-Rによる表面修飾は、リポソームの生体内における細胞との相互作用を抑制する有効な手段になり得ることを示した。

ポリマーによる表面修飾を用いたリポソームの肺内挙動の制御：経肺投与後の肺内挙動が制御可能なポリマー修飾リポソームを得ることを目的とし、ポリマー修飾リポソームの設計及びその肺内挙動について評価した。その結果、ポリマー修飾リポソームの肺内挙動は、ポリマーの種類や表面密度などの表面特性と密接な相関があることが明らかになった。さらに、ポリマー修飾リポソーム投与による肺組織障害性は認められなかったことから、安全な経肺投与型の薬物担体であることを明らかにした。

以上、AFMを活用してリポソームの粒子の硬さの新しい評価法を確立した。また、表面物性を変化させることにより、細胞及び生体組織との相互作用を制御し得ることを明らかにし、実際に薬物担体として活用できることを動物実験により示し、リポソーム製剤の設計に有用な知見を提示することができた。

6. 謝辞

本総説を終えるに際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学 薬物送達学大講座 製剤学研究室 竹内洋文教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関して種々の貴重な御助言を賜りました川島嘉明前教授(現在、愛知学院大学 薬学部 製剤学講座 教授)

に深甚なる謝意を表します。本研究全般にわたり御協力頂きました岐阜薬科大学製剤学研究室の出身者各位、研究生に感謝致します。本研究の一部は、ホソカワ粉体工学振興財団の奨学金の援助(平成17年度 研究者育成のための助成)により行われました。

7. 参考文献

- 1) Tokumasu F., Jin A. J., Feigenson G. W., Dvorak J. A., *Ultramicroscopy*, **97**, 217–227 (2003).
- 2) Moller C., Allen M., Elings V., Engle A., Muller D. J., *Biophys. J.*, **77**, 1150–1158 (1999).
- 3) Rotsch C., Jacobson K., Candeelis J., Radmacher M., *Ultramicroscopy*, **86**, 97–106 (2001).
- 4) Umemura K., Ishikawa M., Kuroda R., *Anal. Biochem.*, **290**, 232–237 (2001).
- 5) Burchell M. J., Cole M. J., Lascelles S. F., Khan M. A., Barthet C., Wilson S. A., Cairns, D. B., Armes S. P., *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **32**, 1719–1728 (1999).
- 6) Inoue K., *Biochim. Biophys. Acta.*, **339**, 390–402 (1974).
- 7) Seelig A., Seelig J., *Biochemistry*, **13**, 4839–4845 (1984).
- 8) Ladbrooke B. D., Williams R. M., Chapman D., *Biochim. Biophys. Acta.*, **150**, 333–340 (1968).
- 9) Utsumi H., Inoue K., Nojima S., Kwan T., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1219–1225 (1976).
- 10) Harashima H., Sakata K., Funato K., Kiwada H., *Pharm. Res.*, **11**, 402–406 (1994).
- 11) Jass J., Tjarnhage T., Puu G., *Biophys. J.*, **79**, 3153–3163 (2000).
- 12) Takeuchi H., Yamamoto H., Toyoda T., Toyobuku H., Hino T., Kawashima Y., *Int. J. Pharm.*, **164**, 103–111 (1998).
- 13) Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H., Kawashima Y., *J. Control. Rel.*, **68**, 195–205 (2000).
- 14) Ibrahim S. F., van den Engh G., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 5–12 (2003).
- 15) Hai M., Bernath K., Tawfik D., Magdassi S., *Langmuir*, **20**, 2081–2085 (2004).
- 16) Zeisig R., Shimada K., Hirota S., Arndt D., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1285**, 237–245 (1996).
- 17) Ishiwata H., Sato S. B., Kobayashi S., Oku M., Vertut-Doi A., Miyajima K., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1907–1913 (1998).
- 18) Shin Y. K., Freed J. H., *Biophys. J.*, **55**, 537–550 (1989).
- 19) Takeuchi H., Thongborisute J., Matsui Y., Sugihara H., Yamamoto H., Kawashima Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 1583–1594 (2005).
- 20) Harigai T., Kondo M., Isozaki M., Kasukawa H., Hagiwara H., Uchiyama H., Kimura J., *Pharm. Res.*, **18**, 1284–1290 (2001).
- 21) Henderson R. F., *Environ. Health Perspect.*, **56**, 115–129 (1984).