リポソームの粒子設計による経口、 経肺および点眼投与 DDS 製剤設計

岐阜薬科大学 薬物送達学大講座 製剤学研究室

小野寺理沙子*・田原耕平*・竹内洋文*

Advanced particle design of liposomes for drug delivery in oral, pulmonary and ocular administration

Colloidal drug carriers such as liposomes, lipid emulsions, and polymeric nanoparticles have great potential to deliver drugs effectively. This article demonstrates recent our successful results in drug delivery using liposomal systems, mainly by oral, pulmonary and ocular routes. Especially, particle design, including modification of the liposomal surface with polymers, is a key to drug delivery with these systems.

薬物を効率よく送達するために、リポソーム、リピッドエマルジョン、ポリマーナノパーティクルなどのコロイド薬物キャリアーの活用が有効である。本論文では、リポソームを用いた最近のわれわれのこの分野での研究成果を経口、経肺、点眼投与の各投与ルートに関して説明する。特に、ポリマーによる粒子表面修飾を含むリポソームの粒子設計が、そのキーポイントの1つであることを述べたい。

Risako Onodera, Kohei Tahara*, Hirofumi Takeuchi**

Keywords: liposome, drug delivery, oral, pulmonary, ocular

はじめに

われわれの研究室では、新しい製剤開発の基盤構築を目標に、微粒子から錠剤、顆粒のような固形製剤の構成成分である、いわゆる粉体の設計まで、医薬品製剤を粒子設計の立場から研究してきた。いずれの研究も最終剤形設計を意識し、さらに、患者さんにとって優しい製剤開発に繋がることを目標としている。DDS製剤開発に関してもこのような目標のもと、リポソームを中心とした微粒子キャリアによるペプチド薬物の経口吸収、経肺吸収、さらには点眼による後眼部送達へと研究を展開してきた。

リポソームは、水溶性、脂溶性いずれの薬物でも封入できる、表面特性の制御が容易、生体適合性が高いなど、DDSキャリアとして好ましい特性を多く有しており、早くからその利用が期待されてきた。先行している研究は、注射によるターゲティング製剤と思われる。研究レベルでは、経口投与インスリン製剤が先行していたが、実用化の観点では未だ大

きく後れをとっている。

経肺投与製剤は経口製剤同様、自己投与が可能であり、さらに吸収のバリアーも相対的には小さく、難吸収性薬物の投与方法として大きな可能性を有する投与方法である。実際、インスリン製剤は一旦、上市も達成されており、今後の展開も期待されている。また、眼科領域における薬物送達、特に網膜を中心とした後眼部への送達は、これまでほとんど試みられてこなかったが、薬物キャリアとしてリポソームを活用することによって可能となることが期待されている。

リポソームを中心として、これまでわれわれが試みてきた DDS研究を最近の研究展開を含めて紹介したい。

1. ポリマーコーティングリポソーム

われわれのリポソーム DDS研究は、粒子設計のキーワードに示されるように、リポソーム粒子の物理化学的特性と製剤機能との関係の解明、あるいは、製剤機能の付与を目指した特性改善を中心とし

* Pharmaceutical Engineering, Drug Delivery Technology and Science, Gifu Pharmaceutical University

図1 代表的なポリマーコーティングリポソーム

て行ってきた。

その代表的な研究は、ポリマーコーティングリポソームの設計である。リポソーム表面をポリマーで修飾する手法として、①リポソームの表面電荷を利用してイオンコンプレックスを形成させる、②水溶性高分子に導入した疎水基をリン脂質二重膜に貫入させる、といった方法を確立した(図1)。これらの表面修飾により得られた製剤特性としては、生体組織との相互作用の制御がある。これらのポリマーコーティングリポソームを用い、これまで得られた知見を以下に紹介する。

2. 表面修飾リポソームの経口投与製剤への応用

生体成分あるいはそれと類似の機能を有するペプチドおよびタンパクは、医薬品として大きな注目を集めている。しかし、一般的に酵素安定性に乏しく、また水溶性高分子であることから生体膜透過性も低い。よって、投与経路は筋肉内投与や皮下投与などの注射投与が一般的である。医薬品の経口投与製剤の開発には、これらの問題点を克服するための製剤設計が必要である。

われわれは、消化管粘膜と親和性の高いキトサン

による、経口投与後の粒子の消化管での滞留時間の増大を企図して、リポソーム表面をキトサンで修飾したキトサン修飾リポソーム(CS-Lip)を調製した。摘出したラット腸管を用い、そこに封入したリポソーム懸濁液の粒子数を封入直後、一定時間インキュベート後にコールターカウンターで計数して比較する *in vitro* 評価法を確立し評価した結果、CS-Lip が最も大きな粘膜付着力を有していることを明らかにした¹⁻³⁾。さらに、代表的なペプチド薬物であるインスリン(糖尿病薬)も CS-Lip に封入することで、ラットに経口投与後、薬理効果(血糖値の変化)を持続的に低下させることを明らかにした^{2,3)}。また、別のペプチド性薬物カルシトニンを封入した場合も、ラットに経口投与後の薬理効果(血中カルシウム濃度の低下)が確認された⁴⁾。特筆すべき点は、いずれの場合も、ポリマー溶液に薬物を溶解し投与した場合には、このような効果は認められず、微粒子製剤化する必要性が確認された点である。また、リポソームの粒子径はその効果に大きく影響を与え、100nm程度と十分微細な場合は、リポソーム粒子が粘膜深部に侵入していることを見いだした。カルシトニン封入CS-Lip をサブミクロンサイズに調整すると(ssCS-Lip)、その薬理効果がきわ

めて長時間にわたって持続することが明らかとなった^{5,6)}(図2)。

上述の実験結果に基づいて、消化管内での微粒子の挙動を詳細に評価した。そのために、脂溶性蛍光マーカー(DiI)を封入したリポソームをラットに投与後、腸管を取り出し、部位ごとに切片を作成して共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察した^{5,6)}。その一例として図3に粒子径を制御していない粗大なりポソーム(MLV-Lip)、粒子径をサブミクロンサイズに調整したリポソーム(ss-Lip)、それらをキトサンコーティングしたもの(CS-Lip および ssCS-Lip)の4種について、投与2時間後という同一な条件で、評価した結果を示す。これらのCLS写真と比較すると、キトサンコーティングすることにより粒子の滞留性が向上していることがわかる。また、図3から観察される特筆すべき点は、ss-Lip、ssCS-Lip に関しては粘膜内の basolateral side に粒子の存在が確認されたことである。これらの観察は、粘膜内に粒子が浸入していることを強く示唆している。

さらに、経口投与後の ssCS-Lip の継続的な消化管内挙動を詳細に検討した。その結果、投与15分後では ssCS-Lip は十二指腸、空腸に存在し、回腸には到達しておらず、投与60分後に回腸上部へと

移行し、投与120分後には回腸下部へと移行する様子が確認された。また ssCS-Lip は、いずれの消化管部位においても粘膜層深部へと侵入している様子が確認されたことから、ssCS-Lip は、小腸粘膜に付着・侵入しながら、経時的に小腸内を移動していくことが明らかとなった。

一方、リポソームは上述したようにペプチド性医薬品のような分子量が大きく、かつ水溶性が高い薬物の薬物キャリアとして有用であるが、はじめにも述べたように水溶性、脂溶性いずれの薬物でも封入が可能である。よって、難吸収性の脂溶性薬物のキャリアとしての応用も期待できる。そこでわれわれは、モデル薬物として NSAIDs の一種であるインドメタシンを選択し検討を行った。インドメタシンは、関節リウマチや変形性関節炎などの炎症を伴う疾患に広く適用されているが、難水溶性であることに加え、経口投与した場合、胃や小腸の低pH環境により析出し、潰瘍などの消化管副作用を惹起する可能性がある。そのため、適切な製剤設計が望まれている。

サブミクロンサイズのキトサン修飾リポソームにインドメタシンを封入し、経口投与後の薬理効果を検討した。その結果、インドメタシン封入キトサン

図2 カルシトニン封入微細リポソームをラットに経口投与した後の血中カルシウム濃度の変化

図3 ラットに蛍光色素 (Dil) 封入リポソームを経口投与した2時間後の腸管断面 (空腸下部) の共焦点レーザー顕微鏡写真

修飾リポソームは、インドメタシン溶液投与の場合と比較して、有意に吸収性の向上ならびに持続化することが明らかとなった。これは、ssCS-Lip に封入することで、インドメタシンの胃内または小腸上部での析出を抑制したことに加え、消化管での滞留性の向上に起因するものと考えられる⁷⁾。

最近のわれわれの研究では、ペクチンにも粘膜付着性を付与する作用があることが判明しており、キトサンコーティングリポソーム同様に、カルシトニンの薬理効果の持続を報告している⁸⁾。一方、レクチンのように、特異的な相互作用により消化管粘膜と結合する物質も報告されている。われわれは、小腸粘膜の糖鎖に特異的に結合するレクチンを粘膜付着性ポリマーに結合させ、リポソーム表面の修飾に用いることでその効果が増大することを明らかにしている⁹⁾。さらに、キトサン-アプロチニン、ポリアクリル酸チオール化なども特徴のあるリポソームの表面修飾を可能とし、類似の薬物送達機能があることも判明しつつある¹⁰⁻¹²⁾。

3. 表面修飾リポソームの経肺投与への応用

肺は、肺がん、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) など、今後増加が予想される難治性疾患を抱える臓器である。また、消化管と同様吸収面積が大きく、肺胞上皮細胞の厚みも $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ と薄いこと、さらに消化管と比較してタンパク質分解酵素が少ないことなどから、ペプチド性医薬品の投与、吸収部位として大きな期待が寄せられている。このような背景から、粉体工学に基づいた粉末吸入剤の設計、微粒子 DDS 製剤など、吸入製剤に関する検討が続けている。

経口投与時にペプチド性薬物の吸収性を改善することが明らかとなっていた粘膜付着性をもつキトサン修飾リポソームを、経肺投与製剤として応用することを試みた。カルシトニンを封入したキトサン修飾リポソームを用いてラットへ経肺投与を行った結果、経肺投与されたキトサン修飾リポソームは持続的に血中カルシウム濃度を低下させることが明らかとなった¹³⁾。肺は消化管とは異なり閉鎖系であるため、経口投与の場合と比べると未修飾のリポソーム

も持続的に効果を示したが、投与後24時間のカルシウム濃度で効果を比べると、キトサン修飾リポソームのほうが有意にその効果は大きく、また、持続性も向上することがわかった。すでに山本ら¹⁴⁾によって報告されているように、投与直後の吸収促進効果もキトサン修飾リポソームを用いた際に確認された。

さらに、経肺投与後のリポソームの肺内挙動を評価するため、DiI を封入したいくつかの表面修飾リポソームを調製し、ラットに経肺投与した。経肺投与後、気管支肺胞洗浄液(BALF)および肺組織中に残存する DiI 濃度を定量し評価した。その結果、キトサンおよび部分疎水化ポリビニルアルコール(PVA-R)を表面修飾剤として用いたポリマーコーティングリポソームがそれぞれ特色のある挙動を示すことが明らかとなった(図4)。キトサン修飾リポソームは BALF よりも肺組織に残留し、PVA-R 修飾リポソームは逆に BALF により多く残留することが明らかとなった。PVA-R により表面修飾したリポソームへは、PVA の立体的なコーティング層により生体との親和性が制御されていることが推定される。さらに、実際にカルシトニンを封入してこれらのポリマー修飾リポソームの薬理効果を評価したところ、いずれの場合においても薬理効果がより持続化することが明らかになっている。PVA-R の

場合には、薬物はリポソームに封入されたまま肺内に滞留し徐々に放出されるため、このような薬効の持続化を示したと現時点では結論している。

肺内の滞留性の向上は、ペプチド性薬物に限らず、例えば、COPD など局所投与による治療が期待される疾患に対しても有効に活用できよう。また、低分子薬物の気管支および肺内の滞留も内封薬物の徐放化が達成できれば、その治療効果を高めることが期待される。

このような観点から、われわれは siRNA、低分子薬物のリポソームへの封入、細胞レベルでの有効性の評価、細胞毒性など検討を進めている。キャリアのリポソームはカチオン化により有効性が増大することは以前より知られていたが、細胞毒性とのバランスで適正なカチオン化を与える処方設計、溶解状態では細胞毒性を示す物質もリポソームに組み込むことによりそれを大きく低減できることなどの実験事実に基づいて、製剤開発につなげる研究を展開している。また、肺内滞留性の評価においても低侵襲性を目指し、IVIS を活用し、リポソームキャリアの長時間の滞留を明らかにしている¹⁵⁾。

4. 点眼による薬物の後眼部送達

後眼部に存在する網膜は、人が物を見るのに重要

図4 ラットへ経肺投与後の表面修飾リポソームの肺内挙動

図5 蛍光マーカー(緑色)を封入したリポソームをマウスに点眼して30分後に観察した網膜の共焦点レーザー顕微鏡画像

な役割を果たしており、この部分での疾患は視野狭窄、あるいは失明といった重篤な症状へと繋がる。わが国においても急速な高齢化に伴い緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症などの後眼部疾患が急増し(推定潜在患者数1,000万人)、有効な薬物療法が望まれている。後眼部への薬物送達が必要な場合には、現在は、眼の硝子体内へ直接薬物溶液を注射する侵襲的投与方法が主体であり、点眼では後眼部に薬物を送達できないといわれている。眼球への注射は、眼球に傷をつけること、繰り返し投与した場合の副作用の回避が難しいことなどの多くの問題を抱えている。

前述の経口投与後のリポソーム微粒子の挙動の解析に基づき、点眼製剤にもこの知見を応用することを検討している。培養細胞を用いた *in vitro* 試験において眼粘膜においても同様な微粒子薬物キャリアの効果があることを確認したうえで、実際にマウスを用いて蛍光マーカーとしてクマリン-6を封入したリポソーム懸濁液を点眼し、網膜を観察したとこ

ろ、ナノサイズのリポソーム粒子は後眼部に届いていることが示された¹⁶⁾。図5にその一例を示すが、リポソーム粒子のサイズ、脂質の種類(リポソームの硬さ)を制御することによりその程度が異なることがわかっている。

マウスを用いて脂溶性蛍光物質であるクマリン-6を封入した物性の異なるリポソーム懸濁液を点眼し、網膜における蛍光強度を観察した。リポソームの網膜への送達効率を比較するために、多くの後眼部疾患に関係する細胞が含まれる神経節細胞層(ganglion cell layer : GCL)の隣層に位置する、内網状層(inner plexiform layer : IPL)中の蛍光強度を数値化し、粒子物性の違いによる網膜への送達効率を相対的に評価することを試みた。平均粒子径を600nm, 300nm, 200nm, 100nmに制御したリポソームを点眼したところ、粒子径が小さくなるほど送達効率は向上し、100nmのリポソームにおいて蛍光強度は最大となった(図6)。

次に、リポソームを構成するリン脂質が点眼後

の網膜への送達効率に及ぼす影響を評価した。相転移温度の異なるリン脂質を用い、Distearoyl phosphatidylcholine (DSPC、相転移温度55℃)または Egg phosphatidylcholine (EPC、相転移温度-5℃~-15℃) リポソームの網膜への送達効率を評価した。いずれのリポソームも約100nmで、ほぼ同等のゼータ電位を有するのにも関わらず、EPCよりも相転移温度が高く、比較的硬い脂質膜を有するDSPC リポソームを点眼した場合のほうが、網膜において強い蛍光強度を示すことが明らかとなった。

リポソームの点眼投与に関してもポリマー表面修飾による粒子設計が有効であることもわかりつつある¹⁷⁾。1つは、リポソーム内に抗炎症薬のジクロフェナクナトリウムを封入する際に、酢酸カルシウム勾配法により、ほぼ全量の薬物を内水相に封入した Distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) リポソームを調製することができたが、粒子径が増大する傾向にあり、一部のリポソームの凝集が認められた。そこで、PVA や PVA-R で表面修飾することにより、薬物封入時に生じるリポソームの凝集を抑制することができ、粒子径を約100nm にすることができた。これまでの検討で、眼内移行においては、粒子径を小さくするほど効果が高いことがわかっており、この表面修飾により送達効率を確保できている。もう1つは、眼表面と積極的に相互作用すると思

られるポリマーでナノサイズのリポソームを表面修飾して滞留性を高める可能性を検討している。現在までの検討で、ポリ-L-リジン (PLL) を適正な濃度で使用すると、リポソーム粒子の凝集を起こさず、表面修飾可能なことがわかっている。また、PLL の分子量に関しても最適なもの (PLL15000 (MW; 15000~30000)) があることも明らかになっている。これまでの検討では、生体の相互作用の点では、分子量の大きいほうが有利であったが、点眼の場合は、送達効率の粒子径への依存度が大きく、あまり分子量が大きすぎると多少の凝集が起こることが原因となり、送達効率が低下するものと考えている。

点眼投与された薬物が後眼部へ到達するためには、①全身経路、②角膜経路、③強膜経路、④結膜経路などが考えられている。蛍光マーカーとしてクマリン-6を封入したリポソームの場合、対側眼の網膜において蛍光が観察されなかったことから、①の全身投与の影響は小さいと考えている。また、角膜上皮に蛍光は観察されたが、水溶性の組織である実質と内皮細胞の蛍光は弱かったため、②の角膜経路の可能性も低い。③の強膜経路に関しては、投与後の全眼同時観察により、強膜の前眼部から後眼部への濃度勾配が観察され、その可能性が示唆されている。しかし、網膜内側から外側にかけて蛍光強度の勾配も観察され、また、強膜のバリアー能が高いことを考え合わせると、リポソームが網膜外側から単純に送達されたとは結論しがたい。これに対して、結膜のバリアーは角膜や強膜ほど強固ではなく、結膜から吸収された薬物は線維柱帯網、虹彩基、毛様体扁平に侵入するといわれている。点眼されたリポソームはこれらの組織が関与する非角膜経路によって眼表面から後眼部に向かって移行している可能性はきわめて大きい。

リポソームに蛍光標識として封入されたクマリン-6は、水中では漏出することはない。しかし、組織中に侵入したリポソームは、どこまでもその形状を維持できる保証はなく、この実験だけからは網膜付近で観察された蛍光が、リポソーム内部に封入されたクマリン-6なのか、リポソームから漏出したクマリン-6なのかを区別することはできない。しかしながら、リポソームのリン脂質や粒子径依存的

図6 クマリン-6を封入したリポソームをマウスに点眼して30分後の網膜送達効率

に送達効率が増加すること、さらに水溶性の FITC-デキストランを封入したリポソームでも類似の後眼部送達画像が得られたことなどを考慮すると、その形状を保持したリポソーム自体が網膜付近に集積している可能性が高いと現時点では考えている。

文献

- 1) Takeuchi H., Kawashima Y.: Pharmaceutical research on liposome and lipid microsphere as a drug carrier. Hyoumen, 32, 423-429 (1994).
- 2) Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y.: Mucoadhesion of polymer-coated liposomes to rat intestine in vitro, Chem. Pharm. Bull., 42:1954-1956 (1994).
- 3) Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y.: Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes, Pharm. Research., 13: 896-901 (1996).
- 4) Takeuchi H., Matsui Y., Yamamoto H., Kawashima Y.: Mucoadhesive properties of Carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats, J. Control. Release., 86:235-242 (2003).
- 5) Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y.: Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery, Adv Drug Delivery Reviews, 47:39-54 (2001).
- 6) Takeuchi H., Matsui Y., Sugihara H., Yamamoto H., Kawashima Y.: Mucopenetration of submicron-sized, chitosan-coated liposomes designed for oral administration of peptide drugs. Int. J. Pharm., 303, 160-170(2005)
- 7) Sugihara H., Yamamoto H., Kawashima Y., Takeuchi H.: Effectiveness of submicronized chitosan-coated liposomes in oral absorption of indomethacin, J. Liposome Res., 22(1) 72-79 (2012)
- 8) Thirawong N., Thongborisute J., Takeuchi H., Sriamornsak P.: Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes, J. Controlled Release, 125(3): 236-245 (2008).
- 9) Werle M., Makhlof A., Takeuchi H.: Carbopol-lectin conjugate coated liposomes for oral peptide delivery. Chem. Pharm.

おわりに

医薬品製剤はますます多様化しており、ここに述べた研究はその一面を捉えているにすぎない。薬学の基本である、患者さんのための製剤開発、そのための研究という基本方針のもとに今後も研究を進展させていきたい。

- Bull., 58(3), 432-4, (2010)
- 10) Werle M., Takeuchi H.: Chitosan-Aprotinin coated Liposomes for Oral Peptide Delivery: Development, Characterisation and In Vivo Evaluation, Int. J. Pharm., 370(1-2):26-32. (2009)
 - 11) Werle M., Hironaka K., Takeuchi H.: Development and in vitro characterization of liposomes coated with thiolated poly(acrylic acid) for oral drug delivery, Drug Dev. Ind. Pharm., 35:209-215 (2009)
 - 12) Werle M., Takeuchi H., Bernkop-Schnürch A.: Modified chitosans for oral drug delivery; J. Pharm. Sci., 98, 1643-1656 (2009)
 - 13) Murata M., Nakano K., Tahara K., Tozuka Y., Takeuchi H., European J. Pharm. and Biopharm., 80, 340-346 (2012)
 - 14) 山本 昌：新規吸収促進剤を用いたペプチド・タンパク性医薬品の消化管吸収性の改善，[遺伝子医学MOOK別冊 ペプチド・タンパク性医薬品の新規DDS製剤の開発と応用，メディカルドゥ，pp.30-40(2011)]およびその引用文献
 - 15) Murata M., Tahara K., Takeuchi H.: Real-time in vivo imaging of surface-modified liposomes to evaluate their behavior after pulmonary administration. Eur. J. Pharm. Biopharm., 86, 115-119 (2014).
 - 16) Hironaka K., Inokuchi Y., Tozuka Y., Shimazawa M., Hara H., Takeuchi H.: Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. J. Control. Release., 136, 247-253 (2009)
 - 17) Fujisawa T., Miyai H., Hironaka K., Tsukamoto T., Tahara K., Tozuka Y., Ito M., Takeuchi H.: Liposomal diclofenac eye drop formulations targeting the retina: Formulation stability improvement using surface modification of liposomes. Int. J. Pharm., 436:564-567, 2012.