高分子デリバリーを目的とした温度感受性リポソームの開発

奥 直人・藤本佳子・鳴瀬諒子・土井香苗子・湯山ゆきの・岡田昌二*

Application of thermosensitive liposomes for macromolecule delivery

It is useful if the bioactive macromolecules, such as cytokines, could be delivered to the desired site. Liposomes have been used successfully as carriers for various agents. Targeting of liposomes to the desirable site has been also achieved to some extent, and the release of the contents at the target site has been attempted by means of thermosensitive liposomes utilizing phase transition of lipid bilayer. Thermosensitive liposomes with internal solution of 2-fold higher osmotic pressure and sized through 200 nm-pore, released encapsulated macromolecules effectively when they were incubated at 40~42°C, since transient swelling during phase transition of liposomes with hyper-osmotic internal aqueous phase causes permeation of large molecules through lipid bilayer.

Long-circulating, serum stable, type of thermosensitive liposomes were also attempted to be prepared for practical usage of liposomes as a tool for macromolecule delivery.

Naoto Oku • Yoshiko Fujimoto • Ryoko Naruse •
Kanao Doi • Yukino Yuyama • Shoji Okada*

key words : liposomes, thermosensitivity,
long circulating, cytokines

腫瘍壊死因子(TNF)などのサイトカイン類は、微量で生理活性を示すことが知られている。特にTNFは腫瘍壊死活性を示すために、制癌に用いる試みが以前から行われてきた。しかしながら、サイトカイン類は代謝されやすく、また他の多くの生理活性も示すため、その臨床応用には標的部位への効率的なターゲティングが行われることなどが必要と考えられる。このような欠点を解決する方法として、サイトカイン類のカプセル化が試みられてきた。

ところで、リポソームは構成するリン脂質が生体成分であるため毒性や抗原性が低いこと、大きさや脂質組成を変化させることで体内分布や滞留時間を制御できることなど薬剤カプセルとして多くの利点を有するため、薬物送達システム(DDS)への応用が期待されている。実際に、リポソーム化により多くの薬剤で体内分布の変化、副作用の軽減や徐放化が見られてきた^{1,2)}。特に癌組織や炎症部位などの血管透過性が高い部位では、血中滞留性のよいリポソームにより薬物の効率的な送達が可能となる。このリポソームをサイトカイン類のキャリアとして用いる試みも多くなされてきた³⁾。しかしながら、サイトカイン類は分子量10~50 kDaと高分子であるため、リポソームを標的組織に送達できても、リポソームからの効率的な放出が問題となってくる。そこで筆者らは、高分子の放出を制御できるリポソームの開発を試みた。

標的組織での特異的な内封物放出を制御できるリポソームとしては、温度感受性リポソーム^{4,5)}や標的的感受性リポソーム⁶⁾が開発されている。前者は飽和脂質のゲル-液晶相転移を利用したもので、体温より数度高い相転移温度を有するリポソームを用い、局所の加温により相転移を誘発して特異的な薬物放出を行うものである。制癌剤内封リポソームでは、癌への温熱療法による効果も同時に期待でき、実際により結果が報告されている⁷⁾。

ところで伊賀らは、リポソーム内を高張化することで、より効率的な内封物の放出がみられると報告している^{8,9)}。以前に筆者らは、コロイド浸透圧の働く条件では相転移による透過性変化が高分子にも及ぶことを見出していた¹⁰⁾。今回、これらの知見を基に効率的な高分子放出型リポソームの開発を行った。このタイプのリポソームは、サイトカイン類などの高分子デリバリーに応用が期待される。さらにリポソームの血中滞留性を延長させ、より効果的に癌部位へ多くの薬物を到達させるた

* School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422 静岡県立大学薬学部
Offprint requests to : Naoto Oku

図1 高内圧温度感受性リポソームからの高分子の放出

リポソームはトレース量のマーカを含む 0.15 M (0.3 OsM, ○), 0.3 M (0.6 OsM, ●), 0.45 M (0.9 OsM, ▲), または 0.6 M (1.2 OsM, ■) のグルコン酸ナトリウム中で調製した。(a) はカルセイン, (b) は FD-10 をマーカーとし, PBS (0.3 OsM) 中で 10 分間インキュベーション後のマーカー放出%を示している。

め, RES 回避能を有する温度感受性リポソームについても検討を行った。長期血中滞留性リポソームとしては, これまでに筆者らが開発したグルクロン酸修飾リポソーム¹¹⁾を用いた。

材料

ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC), ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) およびグルクロン酸修飾のためのパルミチルグルクロニド (PGlcUA) は, 日本精化 (株) より御供与頂いた。カルセイン, 蛍光標識デキストラン (FITC-dextran): FD-10 (分子量 9400), FD-150 (分子量 14400), ジセチルリン酸 (DCP), コレステロール (Chol) は Sigma 社より購入した。reduced Triton X-100 は Aldrich 社より購入した。牛胎児血清は Hazleton 社製を, 非働化を行わずに使用した。

方法

常法により作製した脂質フィルムに, トレース量のカルセインまたはデキストランを含む種々の濃度のグルコン酸ナトリウム (pH 7.2) を加え, ハイドレーションを行った。液体窒素を用い凍結融解を 3 回繰り返したのち, Extrusion 法によりリ

ポソームを 200 nm, あるいは目的の大きさにサイジングした。内封されなかったマーカー物質は, ミクロ超遠心 (50,000 rpm, 5 分間) により分離除去した。マーカー物質の透過性測定はリポソームを一定時間, さまざまな温度でインキュベーションしたのち, ミクロ超遠心 (50,000 rpm, 5 分間) により放出したマーカーを分離し, その蛍光を測定することにより求めた。また, 100% 放出については, reduced Triton-X100 存在下, 熱処理によりリポソームを完全に可溶化して測定した。

結果

まず組成 DPPC/DSPC/DCP=9/1/1 の温度感受性リポソームを調製し, リポソーム内浸透圧を高張化したときにリポソームに内封されたマーカー物質が, 温度変化に対応してどのように放出されるかについて検討した。

図 1 は, リポソーム内浸透圧を 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 OsM とかえたときのマーカーの放出を示したものである。インキュベーションは PBS 中 (0.3 OsM) で行い, マーカーとしては低分子マーカーである分子量 622 のカルセインと, 高分子マーカーである分子量 9400 のデキストランを用いた。

図2 低調処理に対するリポソームの耐性
リポソーム(卵黄ホスファチジルコリン/
Chol/DCP=10:5:1)を $[^3\text{H}]$ グルコース
(○), $[^{14}\text{C}]$ デキストラン(分子量 75,000,
●)を含む 0.3 M グルコース溶液中で調製
し、低張のショ糖溶液中で30分間インキュ
ベーション後、リポソームから放出された
マーカー量を測定した。横軸はリポソーム
内液との溶質の濃度差を示す。(文献¹²⁾より
引用)

図1 aで示されるように、カルセインは 40°C 付近で放出され、その放出量は、リポソーム内圧を高張化することで80~90%に達することが明らかとなった。この結果は、伊賀らにより先に示されたシスプラチンをマーカーとした際に得られた結果^{8,9)}と一致するものであった。なお、ここには示していないが、50%血清存在下でも同様の検討を行ったところ、ほぼ同様のカルセイン放出曲線が得られた。

図1 bは高分子のデキストランを用いた場合であるが、低分子の場合と同様に、温度に依存した放出がみられ、この放出もリポソーム内浸透圧の高張化で促進された。すなわち相転移に伴う膜透過性変化が高分子に及ぶことを利用し、リポソーム内高張化で、効率的に高分子を放出するリポソームが調製できることが明らかとなった。なお、ここでは分子量9400(FD-10)のデキストランを用いたが、より高分子の分子量144000(FD-150)のデキストランについても検討した。その結果、FD-150もカルセインやFD-10と同様な温度依存的流出を示した(data not shown)。

液晶相の膜よりなるリポソームでは、図2に示

すように、浸透圧変化により安定性が低下する¹²⁾。また、血清中ではリポソームの安定性が低下することも見出されている¹³⁾。ゲル相の膜よりなるリポソームでも、血清中で不安定であれば薬物やサイトカインのカプセルとしては適さないことになる。

そこでつぎに、これらのリポソームの血清中での安定性について検討を加えた。リポソーム内圧0.3, 0.6, 0.9, 1.2 OsMのリポソームについて、PBS中、50%血清中、 37°C での安定性を検討したところ、PBS中ではいずれのリポソームも安定であることが示された(図3)。また、血清中においては、内圧の上昇とともにリポソームの安定性が低下すること、しかしながらリポソーム内圧0.6 OsMのリポソームでは、8時間までリポソーム内からのカルセインの放出は少なく、比較的安定であることが示された。リポソームの実際の応用を考えた場合に、加温治療までに8時間を要することは考えにくいので、リポソーム内圧0.6 OsMのリポソームは実用化に適していると考えられる。以後の検討では、内圧0.6 OsMのリポソームを用いた。なお、ここには示していないが、 4°C 、2カ月間、PBS中でのリポソームの安定性を検討したところ、いずれのリポソームもカルセイン流出が10%以下であり安定であった。

薬物やサイトカインの送達を考えると、大きなリポソームを用いたほうが有利である。しかしながら、リポソームを血流中に投与したときに、その体内分布はリポソームサイズに大きく影響され¹³⁾、200 nm以下の小さなリポソームでは血中滞留性がよいとの報告がある¹⁴⁾。そこで、さまざまなサイズの温度感受性リポソームについて検討を行った。用いたいずれのサイズのリポソームも、温度に依存したマーカー放出を起こしたが、直径200 nm以上のリポソームでいちじるしい温度感受性を示したのに反し、100 nmの小さなリポソームではマーカー流出がある程度抑制されていた(data not shown)。小さなリポソームでは、その膜面の曲率のために相転移がブロードになることが知られており、ここで得られた結果はそのことを反映している。

ところで、飽和脂質のみからなるリポソームよりも、温度感受性を失わない程度にコレステロー

図 3 高内圧温度感受性リポソームの安定性

リポソームはトレース量のカルセインを含む, 0.3 M (0.6 OsM, ●), 0.45 M (0.9 OsM, ▲), または 0.6 M (1.2 OsM, ■) のグルコン酸ナトリウム中で調製した. このリポソームを PBS 中 (a), あるいは 50 % 牛血清中 (b) で 37°C でインキュベーションしたときのカルセイン放出%を示している.

図 4 コレステロールを含む高内圧リポソームの温度感受性

リポソームはトレース量のカルセインを含む 0.15 M (0.3 OsM, ○), 0.3 M (0.6 OsM, ●), 0.45 M (0.9 OsM, ▲), または 0.6 M (1.2 OsM, ■) のグルコン酸ナトリウム中で調製し, PBS 中で 30 分間インキュベーションした. リポソームの組成は DPPC/DSPC/DCP/Chol=9/1/1/2.5 (a), 8/2/1/2.5 (b), 7/3/1/2.5 (c) とした.

ルを含むリポソームのほうが血中安定性がよいと考えられている⁵⁾. そこで, リポソーム組成にコレステロールを加え, 内圧を高くしたリポソームで, 同様な温度依存的なマーカー放出がみられるかどうかについて検討した. なお, 今までの検討で高分子も低分子と同様に放出されることから, この実

験ではカルセインをマーカーとして用い, 検討を行った.

リポソーム組成はそれぞれ DPPC/DSPC/DCP/Chol=9/1/1/2.5, 8/2/1/2.5, 7/3/1/2.5 のものを用いた. 結果を図 4 に示すが, いずれの組成のリポソームも温度依存的なカルセイン放出を示

図5 グルクロン酸修飾高分子放出型リポソームの温度感受性と安定性
リポソームはトレース量のカルセインを含む 0.3 M (0.6 Osm) のグルクロン酸ナトリウム中で調製し、50%血清中で 40°C (a) (circle), 42°C (a) (triangle), あるいは安定性をみる目的で 37°C (b) でインキュベーションした。リポソームの組成は DPPC/DSPC/PGlcUA=8/2/2 (open symbols), DPPC/DSPC/Chol/PGlcUA=8/2/1/2 (closed symbols) とした。

し、その放出はリポソーム内が高張なものほど効率的であった。また、以前からいわれているようにコレステロールは相転移をブロードにするため、体温より数度高い温度でカルセインを放出させるためには、より多くの DSPC を含ませることが必要であった。実際に、脂質組成 7/3 のリポソームでは、41~42°C で効率的な放出がみられた。

つぎに、臨床応用の際により効果的に癌部位へ薬物を到達させるために、ここで得られたリポソームに長期血中滞留性、RES 回避能を付与することを試みた。方法としてはグルクロン酸修飾を検討した。グルクロン酸修飾は、DPPC/Chol=1/1 のリポソームを用いた場合、効果的に RES 回避能を付与でき、担癌動物においてはこのリポソームが癌に集積しやすいことを見出している^{15,16)}。

そこで、DPPC/DSPC/PGlcUA=8/2/2、あるいはコレステロールを加えた DPPC/DSPC/Chol/PGlcUA=8/2/1/2 の組成のリポソームを調製した。リポソーム内浸透圧は 0.6 Osm とし、PBS 中あるいは血清中でのカルセインの放出をみた。図 5 に血清中でインキュベーションしたときの結果を示した。両リポソームとも、42°C で効率的なカ

ルセインの放出を起こし、この放出は 10~20 分という早い時期に起こることがわかった。このことより、グルクロン酸修飾温度感受性リポソームは、リポソーム内浸透圧をかけることで効率的な温度依存的透過性変化を示すということが示された。

それらのリポソームについて、PBS 中および血清中 37°C での安定性を検討した。PBS 中ではきわめて安定であったが (data not shown)、血清中では、加温治療までに必要と考えられる少なくとも 4 時間までは安定であることが示され、この安定性は組成にコレステロールを含んだリポソームで、より高いことが示された (図 5 b)。

考 察

本論文は、リポソームの DDS への応用の一貫として、サイトカイン類のような高分子を効果的に放出するリポソームの開発を行ったものである。飽和脂質のゲル-液晶相転移を利用した温度感受性リポソームを用いると、加温により特異的に薬物が放出される。相転移による透過性変化は高分子にも及び、特に浸透圧がかかる条件ではその放出が顕著である¹⁰⁾。またリポソーム内を高張化

することで、より効率的に内封物が放出されることが報告されている^{8,9)}。これらの知見を基に効率的な高分子放出型リポソームの開発を行った。すなわち、リポソーム内浸透圧を上げた温度感受性リポソームを調製し、高分子の透過性について検討した。

薬物モデルとしてデキストランを用い検討を行ったところ、リポソーム内圧を高張化することで、PBS中、血清中で加温することにより、効率的なデキストランの放出がみられた。このリポソームの安定性を調べたところ、内圧が生理的等張の2倍以下の場合には、血清中、37°Cで8時間安定であり、実際の応用が可能であることが示された。これらのことより、高分子物質のドラッグキャリアとして温度感受性リポソームを用いることが可能であることが示された。さらにリポソームの安定性も考慮して、組成にコレステロールを含んだリポソーム、RES回避を目的としてグルクロン酸で修飾したリポソームについても検討したが、これらのリポソームも、PBS中、血清中で温度依存的なマーカーの放出を示した。RES回避を示す長期血中滞留性リポソームの制癌における温熱効果は、投与1日後では蓄積したリポソームからの加温による薬剤放出が主であるが、投与初期にあつては癌組織血管透過性の亢進が主で、これによりリポソームの癌部位への蓄積が高まるとも考えられている¹⁷⁾。いずれにせよ、高分子放出型リポソームが長期血中滞留性を有することにより、特に癌などの標的部位に、より効果的に薬物やサイトカインを送達できると考えられる。

今後、RES回避温度感受性リポソームについて、脂質組成が異なってもRES回避能を示すか、実際にサイトカイン類を内封でき、温度依存的に放出できるかを検討し、この高分子放出型リポソームを実用化に近づけたいと考えている。

文 献

- Hagiwara, A., Takahashi, T., Oku, N.: Cancer chemotherapy administered by activated carbon particles and liposomes. *CRC Crit. Rev. Oncology/Hematology* 9: 319-350, 1989.
- Gregoriadis, G. • ed.: *Liposome technology* 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, FL., 1992.
- Namba, Y., Oku, N.: Liposomal applications to cancer therapy. *J. Bioactive Compatible Polymers* 8: 158-177, 1993.
- Yatvin, M. B., Muhlensiepen, H., Porschen, W., Weinstein, J. N., Feinendegen, L. E.: Selective delivery of liposome-associated cis-dichlorocarbonylmineplatinun (II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. *Cancer Res.* 41: 1602-1607, 1981.
- Tomita, T., Watanabe, M., Takahashi, T., Kumai, K., Tadakuma, T. et al.: Temperature-sensitive release of adriamycin, an amphiphilic antitumor agent, from dipalmitoylphosphatidylcholine cholesterol liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 978: 185-190, 1989.
- Ho, R. J. Y., Rouse, B. T., Huang, L.: Target-sensitive immunoliposomes: preparation and characterization. *Biochemistry* 25: 5500-5506, 1986.
- Maruyama, K., Unezaki, S., Takahashi, N., Iwatsuru, M.: Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Biochim. Biophys. Acta* 1149: 209-216, 1993.
- Iga, K., Hamaguchi, N., Igari, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H. et al.: Heat-specific drug release of large unilamellar vesicle as hyperthermia-mediated targeting delivery. *Int. J. Pharm.* 57: 241-251, 1989.
- Iga, K., Hamaguchi, N., Igari, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H. et al.: Increased tumor cisplatin levels in heated tumors in mice after administration of thermosensitive, large unilamellar vesicles encapsulating cisplatin. *J. Pharm. Sci.* 80: 522-525, 1991.
- Oku, N., Nojima, S., Inoue, K.: Selective release of non-electrolytes from liposomes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* 595: 277-290, 1980.
- Namba, Y., Sakakibara, T., Masada, M., Ito, F., Oku, N.: Glucuronate-modified liposomes with prolonged circulation time. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 1663-1666, 1990.
- 奥 直人: リポソームの透過性に関する研究. 東京大学修士論文, 1977.
- Senior, J.: Fate and behavior of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 3: 123-139, 1987.
- Liu, D., Mori, A., Huang, L.: Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM₁-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1104: 95-101, 1992.
- Oku, N., Namba, Y., Okada, S.: Tumor accumulation of novel RES-avoiding liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1126: 255-260, 1992.
- Oku, N., Namba, Y., Takeda, A., Okada, S.: Tumor imaging with technetium-99m-DTPA encapsulated in RES-avoiding liposomes. *Nucl. Med. Biol.* 20: 407-412, 1993.
- Huang, S. K., Staffer, P. R., Hong, K., Guo, J. W. H., Phillips, T. L. et al.: Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res.* 54: 2186-2191, 1994.