リポソームによる抗菌薬製剤設計

特集 感染症と DDS

森部久仁一・丸山一雄*

Liposomal carrier system for antimicrobial agents

Amphotericin B (AmB), polyene macrolide antibiotics, has been used for the treatment of systemic fungal infections. It is necessary to administer at higher dosage to treat pulmonary aspergillosis, however, its clinical use is limited by toxic side effects. Several kinds of carrier system, such as liposomes, microsphere and polymer micelles, have been developed to resolve the problems. Liposomal formulations of AmB, which make it possible to reduce its toxicity and improve the therapeutic efficacy, have been developed and now on the market in USA and Europe. But, further improvements of the encapsulation of AmB in liposomes and therapeutic efficacy have still been required. Enhanced encapsulation of AmB in liposomes by complex formation between AmB and polyethylene glycol-lipid derivatives, DSPE-PEG, has clearly solved the problems, which have been investigated by us. Hydration by 9% sucrose solution and incorporation of DSPE-PEG are required for the high encapsulation efficacy. AmB-encapsulating PEG liposomes showed not only high encapsulation of AmB but also high retention of AmB in liposomes *in vitro* and long-circulation property *in vivo*. We also prepared the novel AmB-encapsulating PEG-immunoliposomes carrying monoclonal antibodies at the distal ends of the PEG chains. AmB-PEG-immunoliposomes and AmB-PEG liposomes showed the higher therapeutic effects on murine model of pulmonary aspergillosis than that of commercially used liposomes.

Many experiments on the encapsulation of antimicrobial agents in liposomes have been demonstrated, but there are not so much drugs-carrier system applied for therapy. Determination of the optimum functional carrier system should be important for the practical uses.

Kunikazu Moribe・Kazuo Maruyama*

key words : amphotericin B, liposome, polyethylene glycol, antibody, complex formation

抗菌薬は、病原体に殺菌的あるいは静菌的に作用する薬剤で、微生物により産生される抗生物質と合成抗菌薬に分類される。近年、各種起炎菌に対し高い細胞毒性を示す抗菌薬が数多く開発されている。しかし、溶解性や消化管からの吸収性がわるいこと、静脈投与の際、病巣に達する前に肝臓や脾臓などの細網内皮系組織 (RES) に取り込まれてしまうこと、などの理由で実際の治療効率は低いものが多い。また、標的組織や器官に対する選択性が欠如しているため、薬効量でも重篤な副作用が引き起こされるケースが数多く認められている。したがって、薬剤を病巣部位に有効量送達させるためには、薬物の生

体内挙動や封入性・放出性の制御、標的指向性などの機能を付与した薬物送達キャリアの開発が必要である。

一方、リポソームは、リン脂質の二分子膜よりなる閉鎖小胞で、薬物送達キャリアとして DDS への応用が期待されている。リポソームを用いる利点としては、毒性や抗原性が低いこと、脂溶性・水溶性両薬物の封入が可能なこと、サイズや脂質組成を変えることで体内分布や滞留時間の制御が可能なこと、抗体やリガンドの修飾による特定組織へのターゲティングが可能なこと、などがあげられる。したがって、抗菌薬をリポソームに封入することで、静注可能な抗菌薬製剤の開発、および副作用の軽減と治療効果の向上が期待できる。実際、リポソームを利用した抗菌薬製剤の研究開発が米国のベンチャー

* School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagami-ko, Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195 帝京大学薬学部薬剤学教室

Offprint requests to : Kazuo Maruyama

表 1 抗菌薬のリポソーム製剤の研究・開発状況

リポソーム製剤として開発中もしくは海外で市販されている抗菌薬	
• amphotericin B (商品名: AmBisome, GILEAD Sciences)	真菌症: 37 カ国で承認・販売
• nystatin (商品名: Nyotran, Aronex Pharmaceuticals Inc.)	真菌症: 欧米で Phase II, Phase III
• amikacin (商品名: MiKasome, GILEAD Sciences)	肺炎, 細菌感染症: 欧米で Phase II
リポソーム化の研究が報告されている抗菌薬	
• ampicillin, gentamicin, tobramycin, streptomycin, vancomycin, chloramphenicol など	

企業を中心に進められており、たとえば、難水溶性のポリエタマクロライド系抗生物質 amphotericin B (AmB) のリポソーム製剤 AmBisome® は、すでに欧米を中心に世界 37 カ国で販売されている。リポソームによる抗菌薬製剤の研究・開発状況を表 1 にまとめた。研究レベルでみると数多くの抗菌剤についてリポソーム製剤化が試みられているが、実用化された数はまだ少ないのが現状である。

抗菌薬をリポソームに封入することでその効果を最大限に引き出すためには、抗菌薬の製剤設計が重要である。特にリポソーム製剤については、前述の AmBisome にみられる従来型のリポソームに加えて、リポソームの表面にポリエチレングリコール (PEG) を修飾することで、RES 回避性と長時間血中滞留性を実現した PEG リポソームが有用である。すでに、抗癌剤のドキソルビシンを封入した PEG リポソーム製剤が欧米で販売されており、低投与量で高い治療効果を発揮している。

そこで本稿では、われわれが開発を進めてきたリポソームによる抗菌薬製剤設計として、難水溶性のポリエタマクロライド系抗生物質 AmB を封入した PEG リポソームの開発について概説する。AmB の効率のよい封入、PEG 修飾による血中滞留性の向上、抗体の修飾による肺へのターゲティング、この三つがリポソームを用いた抗菌薬設計の strategy である。さらに、同じポリエタマ系薬物のナスタチンについても、リポソーム製剤化の可能性について検討してきたので紹介する。

AmB 封入 PEG リポソーム: 製剤設計とそのメカニズム

起炎菌が真菌の場合、その生育を阻止する薬剤を抗真菌薬とよぶ。近年、ステロイド剤、広域抗菌薬、抗癌剤の使用、臓器移植における免疫抑制剤の使用、

しいては AIDS に代表される細胞性免疫の低下により、深在性 (内臓) 真菌症が問題となっている。特に感染抵抗力減弱者、免疫不全者では全身性感染となり、診断および治療が困難である。AmB は、ポリエタマクロライド系の抗生物質で、真菌細胞膜のエルゴステロールと結合し、その膜透過性を変えることから深在性真菌症の治療に用いられている^{1,2)}。

Fungizone は、AmB をデオキシコール酸ナトリウムで懸濁させた注射剤であるが、副作用が強いため局所投与やフルシトシンやフルコナゾールとの併用療法が行われているのが現状である。しかし、近年 DDS による副作用の軽減と治療効果の向上を目的とした新しい AmB 製剤が開発されてきた。たとえば、AmB のリポソーム製剤、AmBisome^{3,4)}、AmB の脂質複合体、Abelcet⁵⁾ は、Fungizone と比較して明らかな副作用軽減と治療効果の向上を示している^{6,7)}。また一方では、PEG のリン脂質誘導体 (DSPE-PEG) を用いることで AmB の血中滞留性および副作用軽減と治療効果の向上をめざす試みが、Van Etten ら^{8,9)}によってなされてきた。筆者らも、AmB に DSPE-PEG を相互作用させることで AmB を容易かつ多量にリポソームに封入できることを見だし、その体内動態や封入のメカニズムについて検討してきた^{10,11)}。さらに、DSPE-PEG の先端に抗体を付与したイムノリポソームを用いることで高い治療効果が得られている^{12,13)}。

AmB のように水やほとんどの有機溶媒に不溶な薬物を注射剤として製剤化する場合、まず薬物をその担体に効率よく安定に封入する必要がある。また、大量生産を考慮した場合、調製が容易であることが望ましい。AmB をメタノールに、DSPE-PEG をクロロホルムに溶解して混合後、他の脂質を加えて hydration 法でリポソームを調製すると、AmB を容易かつ多量にリポソームへ封入することが可能で

表 2 AmB およびナイスタチンのリボソームへの封入量

脂質組成	モル比 (mol/mol)	溶 媒	AmB の封入量(±SD) ($\mu\text{g}/\text{mg lipid}$)	nystatin の封入量(±SD) ($\mu\text{g}/\text{mg lipid}$)
• DPPC/CH	2/1	9%スクロース	14(2.3)	13(2.7)
• DPPC/CH/DSPE-PEG2K	2/1/0.19	生理食塩水	10(2.3)	26(2.7)
• DPPC/CH/DSPE-PEG2K	2/1/0.19	9%スクロース	111(5.7)	84(6.1)

図 1
推測される AmB の
各種リボソームへの
封入状態

ある¹⁰⁾。この際、AmB は、生理食塩水で水和したり、DSPE-PEG を添加しないとほとんど封入されないが、DSPE-PEG を添加しスクロース溶液で水和すると、封入量は飛躍的に増大する(表 2)。したがって、AmB を効率よく封入するには、DSPE-PEG の存在と、糖溶液など非電解質溶液による水和が重要である。一方、AmB の封入量は DSPE-PEG の添加量と共に増加するものの分子量にはあまり影響されない。また、AmB の封入量は DSPE-PEG の添加により増加し、CH の添加により減少する。

このように、AmB の封入に及ぼす脂質組成の影響を検討してみると、DSPE-PEG の添加による AmB の封入量の増加には、AmB と DSPE-PEG と

の複合体形成が大きく関与していることが推察される。この複合体形成は、クロロホルム・水 2 相分配実験、³¹P-NMR 測定、吸収スペクトル変化から確認されており¹⁰⁾、AmB 誘導体、PEG 脂質誘導体を用いて封入量を検討した結果、AmB のアミノ基と DSPE-PEG のリン酸基が、AmB のポリエーテル部分と DSPE-PEG の PEG 鎖がそれぞれ相互作用していることがわかった。また、AmB は DSPE-PEG との複合体形成によりリボソームの膜表面付近に存在しているのに加えて、一部は脂質 2 分子膜のコア、つまり疎水部分にも存在していることが蛍光消光測定などにより確認されている¹¹⁾。さらに、AmB-PEG リボソームの *in vitro* での薬物保持性を検討した結

果、初期にバーストの放出(総薬物量の約8%)が認められるものの、その後は徐々に放出されることから、高い薬物保持性を示すことがわかった。

以上の結果から、AmBの各種リポソームへの封入状態を模式的に表すと図1のようになる。AmBのように製剤化が困難な薬物を製剤化する場合、薬物の封入性に加えて、その封入メカニズムや安定性を考慮したうえで、*in vivo*の実験に最適な組成を探索することが重要である。筆者らが検討したなかでは、DPPC/CH/DSPE-PEG 2 K(2/1/0.19, mol/mol)が最適な組成であった。以下に示す *in vivo* および治療実験は、この組成のリポソーム(AmB-PEG リポソーム)を用いて行った結果である。

AmB-PEG リポソーム、34A-AmB-PEG イムノリポソームの体内動態および治療効果

AmB-PEG リポソームを健常マウスに尾静脈投与すると、リポソームは長時間血中滞留性を示し、AmB 自身の動態もこれと同様のパターンを示す(図2)。

つぎに、リポソームに抗体を付与した AmB 封入 PEG イムノリポソームの調製を試みた。リポソームに抗体を付与する方法として、膜表面に直接抗体を付与する方法もあるが、高い血中滞留性と抗体の認識能を考慮した結果、PEGの先端に抗体を付与した、いわゆるペンダント型リポソームが *in vivo* の実験に最適であると判断した¹⁴⁾。そこで、PEGの先端にマウス肺血管内皮細胞を認識する抗体、34Aを付与したイムノリポソーム(34A-AmB-PEG イムノリポソーム)を調製し、AmBの封入量や健常マウスでの体内動態を検討したところ、AmBの封入量はAmB-PEG リポソームとほぼ同じであり、肺への高い集積性が認められた。

さらにマウス肺アスペルギルス症モデルを用い、各種リポソーム製剤を感染直後から5日間尾静脈投与し、その延命効果を観察した(図3)^{12,13)}。その結果、投与28日後における生存率は、AmB-PEG リポソーム 1mg/kg 投与で16.7%、2mg/kg 投与で83.3%、34A-AmB-PEG イムノリポソーム 1mg/kg 投与で50%、2mg/kg 投与で100%であった。一

図2 AmB-PEG リポソームの血中滞留性

図3 AmB-PEG リポソームおよび34A-AmB-PEG イムノリポソームの治療効果

方、AmBisomeの場合、1mg/kg および2mg/kg 投与で生存率は16.7%であり、100%の生存率を得るには、10mg/kg以上の投与が必要であった。なお、コントロールマウスは6日までに全マウスが死亡し、Fungizoneでは1mg/kg投与で全マウスが死亡した。AmBisomeの場合、AmBがリポソームの膜中に存在することから放出性が悪く、低投与量では効果が低いと考えられる。したがって、34A-AmB-PEG イムノリポソーム、およびAmB-PEG リポソームを用いることで、FungizoneやAmBisomeと比較して低投与量で高い治療効果が得られることがわかった。

ナISTATIN封入リPOZOMの研究と開発状況

ナISTATINは、AmBと類似のポリエン構造をもつがその性質は大きく異なっている。ナISTATINは、AmBより広い抗菌スペクトルを示し、AmBが効かない真菌に対しても効果を発揮する。しかし、AmBより毒性が強いため、これまでのところ表在性真菌症の治療にしか用いられていない。そこで、毒性の軽減と静脈投与を目的とした、ナISTATINのリPOZOM化の研究が、Beresteinらにより行われてきた¹⁵⁻¹⁷⁾。現在、ナISTATINのリPOZOM製剤、Nyotranが米国で臨床試験に入っている。筆者らも、ナISTATINのPEGリPOZOMへの封入性やそのメカニズムを検討してきたが、AmBとナISTATINの膜に対する親和性の違いがその製剤化に大きく影響することがわかってきた^{18,19)}。

つまり、ナISTATINは、AmBと比較してステロールが添加されていない膜への親和性が強く、一方でDSPE-PEGとの相互作用は弱い。したがって、ナISTATINのリPOZOMへの封入性は、AmBと異なった結果となる(表2)¹⁸⁾。ナISTATINの場合、その毒性も考慮すると、AmBの場合より薬物の放出性が抑制されるような製剤設計が必要であると考えられる¹⁹⁾。

おわりに

抗菌薬のリPOZOM化に関する研究は、表1に示したように、水溶性抗菌薬についても行われてきたが、フリーと比較して顕著な効果を示すものが少ないため、実用化されていないのが現状である。医薬品のリPOZOMへの封入が最も顕著な効果を示すのは、やはり難水溶性薬物を封入した場合であろう。DSPE-PEGとの複合体形成のように効率的な薬物の封入法が利用できれば、これまで製剤化が困難だった難水溶性医薬品への応用が可能になる。また、PEGや抗体を付与することにより、機能性リPOZOMの調製が可能である。もちろん、抗体を付与した製剤の使用には制限があり、現段階ではまだ実用化されていない。しかし、抗体を付与したリPOZOM

製剤が日本でも臨床試験に入っており、今後の進展が期待される。

リPOZOM以外にもマイクロスフィアや高分子ミセルなどが、医薬品のキャリアとして精力的に研究されているが、いずれも抗菌薬の封入性、キャリアの機能性といった点で一長一短がある。どの担体を用いるにせよ、薬とキャリアの性質を考慮したうえでの製剤設計が必要となるであろう。

文 献

- 1) Bolard J: How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 864: 257-304, 1986.
- 2) Hartsel SC, Hatch C, Ayenew W: How does amphotericin B work? Studies on model membrane systems. *J Liposome Res* 3: 377-408, 1993.
- 3) Adler-Moore JP, Proffitt RT: Development, characterization, efficacy and mode of action of AmBisome, a unilamellar liposomal formulation of Amphotericin B. *J Liposome Res* 3: 429-450, 1993.
- 4) Van Etten EWM, Otte-Lambillio M, Van Vianen W, Ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IAJM: Biodistribution of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) in uninfected immunocompetent mice and leucopenic mice infected with *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 35: 509-519, 1995.
- 5) Janoff AS, Boni LT, Popescu MC, Minchey SR, Cullis PR et al.: Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc Natl Acad Sci* 85: 6122-6126, 1988.
- 6) Gates G, Pinney RJ: Amphotericin B and its delivery by liposomal and lipid formulations. *J Clin Pharmacol Ther* 18: 147-153, 1993.
- 7) Hiemenz JW, Walsh TJ: Lipid formulations of amphotericin B. *J Liposome Res* 8: 443-467, 1998.
- 8) Van Etten EWM, Van Vianen W, Tjhuis R, Storm G, Bakker-Woudenberg IAJM: Sterically stabilized amphotericin B-liposomes: toxicity and biodistribution in mice. *J Control Release* 37: 123-129, 1995.
- 9) Van Etten EWM, Ten Kate MT, Stearne LET, Bakker-Woudenberg IAJM: Amphotericin B liposomes prolonged circulation in blood: In vitro antifungal activity, toxicity, and efficacy in systemic candidiasis in leucopenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1954-1958, 1995.
- 10) Moribe K, Tanaka E, Maruyama K, Iwatsuru M: Enhanced encapsulation of amphotericin B into liposomes by complex formation with polyethylene glycol derivatives. *Pharm Res* 15: 1737-1742, 1998.
- 11) Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M: Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes. *Int J Pharm* 193: 97-106, 1999.
- 12) Kohno S, Otsubo T, Tanaka E, Maruyama K, Hara K: Amphotericin B encapsulated in polyethylene glycol-immunoliposomes for infectious diseases. *Adv Drug Delivery Rev* 24: 325-329, 1997.
- 13) Otsubo T, Maruyama K, Maesaki S, Miyazaki Y, Tanaka E et al.: Long-circulating immunoliposomal amphotericin B against invasive pulmonary aspergillosis in mice.

- Antimicrob Agents Chemother 42 : 40-44, 1998.
- 14) Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L et al. : Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1234 : 74-80, 1995.
 - 15) Mehta RT, Hopfer RL, Gunner LA, Juliano RL, Lopez-Berestein G : Formulation, toxicity, and antifungal activity in vitro of liposome-encapsulated nystatin as therapeutic agent for systemic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 31 : 1897-1900, 1987.
 - 16) Mehta RT, Hopfer RL, McQueen T, Juliano RL, Lopez-Berestein G : Toxicity and therapeutic effects in mice of liposome-encapsulated nystatin for systemic fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 31 : 1901-1903, 1987.
 - 17) Wallace TL, Paetznick V, Cossum PA, Lopez-Berestein G, Rex JH et al. : Activity of liposomal nystatin against disseminated *Aspergillus fumigatus* infection in neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 41 : 2238-2243, 1997.
 - 18) Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M : Encapsulation characteristics of nystatin in liposomes : effects of cholesterol and polyethylene glycol derivatives. *Int J Pharm* 188 : 193-202, 1999.
 - 19) Moribe K, Maruyama K, Iwatsuru M : Spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes. *Int J Pharm* 201 : 37-49, 2000.