ノ ー ト

エタノール注入法によって得られたリポソームの粒子径と安定性に対するコエンザイム Q_{10} と添加物の影響上 野 實^{a)}・菊 池 宏^{a)}・加 藤 慎 治^{a)}・大 沢 重 光^{b)}・渋 沢 孝 一^{b)}東京理科大学理学部応用化学科 (東京都新宿区神楽坂 1-3)^{a)}エーザイ (株) 技術研究センター (埼玉県本庄市南 2-3-14)^{b)}Effect of Coenzyme Q_{10} and Other Additives on the Stability and the Size Distribution of Liposome obtained by Ethanol Injection MethodMinoru UENO^{a)}, Hiroshi KIKUCHI^{a)}, Shinji KATO^{a)}, Shigemitsu OHSAWA^{b)},
and Kohichi SHIBUSAWA^{b)}Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Science University of Tokyo
(1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo)^{a)}Eisai Co., LTD. Honjo Laboratory (2-3-14 Minami, Honjo-shi, Saitama)^{b)}

Single bilayer liposomes (SUV type) were obtained from an ethanol solution of egg lecithin. Co-enzyme Q_{10} (CoQ_{10}), used for treating heart disease, was incorporated into the liposomes. Liposome stability and effects of various additives (Polyethyleneglycol and Soybean oil) were evaluated on the basis of average particle size as measured by AUTOSIZER. This stability increased by the incorporation of CoQ_{10} and the addition of Soybean oil. The increase in liposome particle size was greater by the addition of Polyethyleneglycol than that of liposomes only incorporated by CoQ_{10} .

1 結 言

生体膜を構成する主成分であるリン脂質を水中に分散させると、二分子膜構造の小胞体 (リポソーム) を形成する^{1), 2)}。リポソームは、その構造上の特性から生体膜機能解明のモデル系として数多く研究がなされてきた²⁾が、その有用性は薬剤、酵素、ホルモンさらには遺伝子までも封入することができる効率的な担体としても高く評価されている^{3)~6)}。リポソームを薬物担体として用いる場合にはリポソームの内容積とともにその粒子径分布が製剤学的に重要である^{7), 8)}。本研究では、血管内滞留時間の長い、安定で小さな一枚膜リポソーム (SUV) ができるとされるエタノール注入法^{9), 10)}を用い、薬物の取り込みに伴う粒子径分布の変化、及び添加剤の効果を検討した。

著者らは、前報¹¹⁾において、リポソーム中への DL- α -tocopheryl acetate の保持率や安定性について報告した。その際、DL- α -tocopheryl acetate はリポソームサスペンション中で良い分散性を示すため、リポソームの外側の水相にも分散している可能性があり、リポソーム

内部へ完全に取り込まれたかどうか確証が得られなかった。そこで、本研究では、エタノール、水に不溶でレシチンの存在下でのみ溶解する Co-enzyme Q_{10} (略記号 CoQ_{10} , Fig.-1) を用いた。

CoQ_{10} は、心臓疾患の基礎的治療薬として近年注目されている。非タンパク性の脂溶性物質^{12)~17)}であるため、現段階では経口投与の形態をとっている¹⁸⁾が、リポソーム内にカプセル化して血液内に注入すれば、より効果的な薬効を示すことが期待される。

Fig.-1 Structural formula of Co-enzyme Q_{10} .

2 実 験

2.1 試 料

リポソーム構成成分のリン脂質は、前報¹¹⁾と同様の egg lecithin (略記号 EL, 旭化成工業社製) を用いた。薬物としては、前記の CoQ_{10} (エーザイ社製) を、添加

剤は前報¹¹⁾と同様に、水溶性高分子としてポリエチレングリコール (略記号 Ma, 日本油脂社製, 商品名 Ma=crogol, 分子量 400), 油脂として大豆油 (略記号 So, エーザイ社製) を用いた。

実験で使用した水は、ミリポア社製 MILLI-R/Q water purifier を用いてイオン交換処理したもので、その電導度は 1×10^{-6} S/cm であった。

2.2 実験方法

リボソームの調製 (平沢製作所社製 Auto Dispenser FH-10S 使用), 及び粒子径分布の測定 (MALVERN 社製 AUTOSIZER Model 700 使用) は前報¹¹⁾と同様に行った。ただし, EL-エタノール溶液を純水中へ注入するときの諸条件, Ma, So の添加量は, 前報¹¹⁾において得られた, エタノール注入法で, 小さく, かつ均一で安定なリボソームを調製するための最適条件を用いた。

なお, リン脂質測定用酵素試薬 San assay PL (三光純薬社製) を用いて, 島津紫外分光光度計 UV-120-02 で, リボソームサスペンション中の EL 濃度を測定した結果, 3 週間経過しても 140~150 mg/100 mL という一定の値を示した。

2.2.1 CoQ₁₀ の取り込みに対するリボソームの粒子径測定

次に示す 4 種類の系 (I~IV) についてリボソームの粒子径, 及びその安定性を調べた。それぞれの系について, EL-エタノール溶液に含まれる EL, 添加剤, CoQ₁₀ の量を示す。ただし, CoQ₁₀ は, それぞれの量について他の条件は変えずにリボソームを調製したことを意味する。

I) CoQ₁₀ の単独取り込み系

EL-150 mg, CoQ₁₀-75, 150, 300 mg

II) Ma 添加時の CoQ₁₀ 取り込み系

EL-150 mg, Ma-2 g, CoQ₁₀-37.5, 75, 150, 300 mg

III) So 添加時の CoQ₁₀ 取り込み系

EL-150 mg, So-20 mg, CoQ₁₀-37.5, 75, 150, 300 mg

IV) Ma, So 添加時の CoQ₁₀ 取り込み系

EL-150 mg, Ma-2 g, So-20 mg, CoQ₁₀-37.5, 75, 150, 300 mg

なお, 調製したリボソームサスペンションは窒素置換して, 20~25°C で静置保存した。リボソームサスペンション中の CoQ₁₀ の濃度は, 前述の分光光度計を用いて波長 412 nm で測定し, 同様に保持率の経時変化を検討した。

2.2.2 リボソームサスペンションの電子顕微鏡写真の撮影

EL 150 mg, Ma 2 g, So 20 mg, CoQ₁₀ 75 mg を含むリボソームサスペンション (系 IV) を調製して, 前報¹¹⁾と同様の方法 (日本電子社製 JEOL-100 B 使用)

で, 粒子像を撮影した。また, 得られたネガフィルムをもとに投影拡大像から粒子径分布を求め, 実際に測定した粒子径分布と比較した。

3 実験結果及び考察

3.1 CoQ₁₀ の取り込みに対するリボソームの粒子径測定

3.1.1 粒子径及び均一性

Fig.-2 は, CoQ₁₀ のリボソーム内への取り込みを粒子径で示したものである。曲線 1~4 は平均粒子径を示し, 5~8 は粒子径分布のピーク値を示している。また, 系別に見ると, 曲線はそれぞれ 1, 5 は系 I を, 2, 6 は系 II を, 3, 7 は系 III を, 4, 8 は系 IV を示している。なお, 曲線 1~8 の系の成分をまとめて **Table-1** に示した。

Table-1 The numbering of the curves in the **Fig.-2** and their corresponding compositions.

Curve No.	Mean size	Peak	Egg Lecithin (150 mg)	Coenzyme Q ₁₀ (37.5~150 mg)	Macrogol (2 g)	Soybean oil (20 mg)
			(150 mg)	(37.5~150 mg)	(2 g)	(20 mg)
1	5		○	○		
2	6		○	○	○	
3	7		○	○		○
4	8		○	○	○	○

Fig.-2 The effect of Co-enzyme Q₁₀ on particle size of liposome.

4 つの系とも, CoQ₁₀ の取り込みにより粒子径は増加した。まず, 系 I を見てみると, 粒子径がほぼ直線的に増大し, 平均粒子径は 150 nm, 分布のピーク値は 100 nm 付近が最大である。前報¹¹⁾で, EL 単独系によって調製したリボソームは, 粒子径分布のピーク値が 40 nm 付近であることから, ユニラメラ構造であると判断し

た。そこで、CoQ₁₀を取り込ませた場合もユニラメラ構造であると仮定すると、このような粒子径の増大より、CoQ₁₀がリポソームの二分子膜の構成成分になっていると考えられる。また、それは、Fig-1に示したように、CoQ₁₀が親水部と疎水部の両方を持ち合わせ、レシチンと類似の構造であることから推測できる¹³⁾。系II、III、IVでもCoQ₁₀の取り込みとともに、ある程度粒子径は増加した。しかし、最大値は平均粒子径で150 nm、粒子径分布のピーク値で100 nm程度であり、CoQ₁₀量150 mg以上の添加では粒子径の増大はほとんど見られなかった。この事実から、小さなユニラメラ構造のリポソーム(SUV)には薬物担体として保持容量に限界があると考えられ、CoQ₁₀を保持させる場合には、EL 150 mgに対してCoQ₁₀ 150 mg付近が限界値であると考えられる。

次に、系Iと、これにMaを添加した系IIの粒子系を比較してみた。CoQ₁₀を75 mgまで添加した場合は、Maの添加によって粒子径が小さくなる効果が表れた。しかし、CoQ₁₀を150 mg以上添加した場合は、Maの添加効果がほとんど見られなかった。これは、CoQ₁₀がリポソームの構成成分として二分子膜中に多量に入ることと考えられる。

Soの添加については、系IIIの結果として曲線3、7に示されるように、粒子径に及ぼす添加効果は見られなかった。

以上、粒子径に関しては、Maを添加した系II、IVで、CoQ₁₀の単独取り込み系と比較して小さくなる結果が得られ、Maがリポソーム融合防止剤として有効に作用していることが確認された。

3.1.2 安定性

Fig-3は、各系の安定性を示したものである。調製日を基準として時間を追ひ、粒子径分布のピーク値の変化率を計算し安定性の目安とした。ただし、各系は、リポソームの保持容量の限界を考え、CoQ₁₀を75 mg取り込ませたものを選んだ。なお、各系の成分及びその添加量はTable-2にまとめた。

Fig-3中には、比較のために前報¹¹⁾で報告した、EL単独系(曲線9)、Ma単独添加系(曲線10)、及びSo単独添加系(曲線11)を示した。EL単独系に比べ、Ma単独添加系は経過時間とともに粒子径分布のピーク値は大きく変化した。この事実より、Maの単独添加ではリポソーム粒子は安定化されないことがわかる。しかし、So単独添加系は、約1か月経過しても粒子径分布のピーク値の変化はほとんどなく、Soがリポソーム粒子を安定化させる効果があることがわかる¹¹⁾。

系I～IVの安定性の評価は、曲線12～15である。系I(曲線12)は曲線9に示したEL単独系の経時変化率と比べ変動が少なく、CoQ₁₀を取り込ませるだけでも

リポソーム粒子の安定性が増す傾向が示された。この事実は、CoQ₁₀が二分子膜の構成成分として取り込まれているとすれば理解できる。Maを添加した系II(曲線13)は、系Iに比べて経時変化率の低下の割合が大きい。つまり、曲線10と同様に、Maの添加によってはリポソームは安定化されない傾向がここでも示された。これに対して、Soを添加した系III(曲線14)と系IV(曲線15)は、曲線11に示したSo単独添加系と同様、良い安定性が得られた。

Table-2 The numbering of the curves in the Fig-3 and their corresponding compositions.

Experiment No.	Curve No.	Egg lecithin (150 mg)	Coenzyme Q ₁₀ (75 mg)	Macrogol (2 g)	Soybean oil (20 mg)
—	9	○			
—	10	○		○	
—	11	○			○
I	12	○	○		
II	13	○	○	○	
III	14	○	○		○
IV	15	○	○	○	○

Fig-3 The ratio of the difference in particle size (P) measured at arbitrary days to initial particle size (P_1). (see Table-2 about composition of each number)

本研究で用いたCoQ₁₀の保持量の経時変化については、25日経過してもすべてのリポソームサスペンションに対して、3%以下の変化率であった。また、沈殿物は見られず、CoQ₁₀がエタノール、水に不溶であるので、すべてリポソーム中に保持されていると判断した。

3.2 リポソームサスペンションの電子顕微鏡写真の撮影

Fig.-4 に系IVのリポソームの粒子像を示す。きれいな球形を形成していることがわかり、また、CoQ₁₀ がリポソームに完全に取り込まれていることが確認された。

Fig.-4 The transmission electron micrograph of liposome. Micrographs were taken at an magnification of 25000.

最後に、測定によって得られたリポソームの粒子径分布が信頼されうかを確認するために、Fig.-4 に示した粒子像を使って粒子径を統計処理し、結果を Fig.-5 に示した。統計処理による粒子径分布のピーク値は 60 nm であり、測定によって得られた粒子径分布のピーク値 63 nm と良い一致を示したことから、測定値が充分信頼できるものであることを確認した。

Fig.-5 Particle size distribution of liposomes obtained by a transmission electron microscope [●], and by AUTOSIZER [○].

4 総 括

本研究で得られた結果をまとめてみると、次の通りである。

- 1) CoQ₁₀ の取り込みにより、リポソームの粒子径は増大した。これは、CoQ₁₀ がリポソームの二分子膜の構成成分となることを裏づけている。同時に、SUV リポソームに保持容量の限界があることを確認した。

また、CoQ₁₀ の単独取り込みにより、リポソームは安定化した。これは、リポソームの薬物担体としての役目から考えて、好ましい性質と言える。

- 2) EL 単独系と同様、CoQ₁₀ の取り込み系においても、Ma の添加によって、リポソームの粒子径は小さくなる傾向を示した。ここで、Ma はリポソームの表面を覆い融着を防いでいると考えられる。しかし、同時に、リポソームの安定性を低下させる効果も見られた。
- 3) So の添加によって、リポソームの安定性は増した。So は二分子膜の炭化水素鎖部分に配向して膜を堅固なものとし、二分子膜の崩壊を防いでいると考えられる。
- 4) Ma と So を同時に添加することによって、CoQ₁₀ 単独取り込み系よりも、小さく、均一で安定なリポソームが得られた。

(昭和 61 年 6 月 12 日受理)

References

- 1) A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 2) C. Huang, *Biochemistry*, **8**, 344 (1969)
- 3) M. Finkelstein, G. Weissman, *J. Lipid Res.*, **19**, 289 (1978)
- 4) G. Dapergolas, G. Gregoriadis, *Lancet*, **2**, 824 (1976)
- 5) A. Huang, L. Huang, S.H. Kennel, *J. Biol. Chem.*, **255**, 8015 (1980)
- 6) D.A. Tyrell, T.D. Heath, C.M. Colly, B.E. Ryman, *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 259 (1976)
- 7) R.L. Juliano, D. Stamp, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 651 (1975)
- 8) C.A. Hunt, Y.M. Rystum, E. Mayhew, D. Papahadjopoulos, *Drug Metab. Dispos.*, **7**, 124 (1979)
- 9) M. Haga, *Kagaku-no-Ryouiki*, **36**, 651 (1976)
- 10) S. Batzri, E.D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 1015 (1973)
- 11) M. Ueno, A. Ohkuma, H. Kikuchi, S. Ohsawa, K. Shibusawa, *Yakugaku zasshi*, **105**, 224 (1985)
- 12) P. Minchell, *Biochemical Soc. Transactions*, **4**, 14 (1976)
- 13) T. Yuzuriha, M. Takada, K. Katayama, *Biochim. Biophys. Acta*, **759**, 286 (1983)
- 14) "Biomedical and Clinical Aspects of Co-enzyme Q", **Vol. 1**, Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1977)
- 15) "Biomedical and Clinical Aspects of Co-enzyme Q", **Vol. 2**, Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1980)
- 16) "Biomedical and Clinical Aspects of Co-enzyme Q", **Vol. 3**, Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1981)
- 17) "Biomedical and Clinical Aspects of Co-enzyme Q", **Vol. 4**, Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1981)
- 18) K. Folkers, D. Cooley, *J. Vit. Res.*, **40**, 380 (1970)