疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたリポソームの架橋とレオロジー特性

橋崎 要,^{*,a} 梅田里紗,^a 三浦基文,^b 田口博之,^a 藤井まき子^a

Preparation and Rheological Properties of Cross-linked Liposomes Using Hydroxypropylmethylcellulose Bearing a Hydrophobic Anchor

Kaname Hashizaki,^{*,a} Risa Umeda,^a Motofumi Miura,^b Hiroyuki Taguchi,^a and Makiko Fujii^a^aLaboratory of Physical Chemistry, School of Pharmacy, Nihon University; 7-7-1 Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan; and ^bLaboratory of Molecular Chemistry, School of Pharmacy, Nihon University; 7-7-1 Narashinodai, Funabashi, Chiba 274-8555, Japan.

(Received October 27, 2019; Accepted December 5, 2019)

Hydrophobically-modified hydroxypropylmethylcellulose (HM-HPMC) is a thickener with a long hydrophobic alkyl side chain. In this study, we investigated the gelation ability and rheological properties of a liposome/HM-HPMC mixed solution. The liposome suspension and the HM-HPMC aqueous solution each had low viscosities, but the viscosity increased rapidly when they were mixed. This is thought to be due to the formation of a 3D network structure caused by the hydrophobic group of HM-HPMC penetrating into the liposomal bilayer membrane, crosslinking the liposomes together. This hypothesis was supported by the fact that gelation did not occur when hydroxypropylmethylcellulose without a hydrophobic group was used. The viscosity of the liposome/HM-HPMC mixed solution decreased rapidly when a shear was applied, but immediately returned to the original gel state when the shear was removed, indicating a reversible reaction. When a strong shear is applied, the hydrophobic group of HM-HPMC detaches from the liposome. When the shear is removed, the liposome is again cross-linked by HM-HPMC. From these results, it was revealed that liposome cross-linked gels can be prepared when HM-HPMC is used.

Key words—liposome; hydrophobically-modified hydroxypropylmethylcellulose; hydrogel; crosslink; small angle X-ray scattering; rheology

緒 言

リポソームは、生体膜の主要構成成分であるリン脂質からなる二分子膜の閉鎖小胞体である。¹⁾ リポソームは生体適合性が高く、二分子膜及び内水相に様々な薬物を封入できることから、薬物送達システムにおける薬物運搬体として利用されている。

近年、リポソームと水溶性高分子ゲルの両方の性質を併せ持つハイブリッド材料の開発が試みられており、水溶性高分子が形成する3次元網目構造中にリポソームが埋め込まれたゲル²⁾や、部分的に疎水化した水溶性高分子でリポソームを架橋したゲル^{3–11)}が報告されている。後者は、アルキル基やコレステロール基といった疎水基を化学修飾した疎水化水溶性高分子を利用するもので、リポソームに作

用させるとそれらが複合体を形成してゲル化することが知られている。これは水溶性高分子に導入された疎水基のアンカー効果によって、リポソームが架橋されるために生じる。このリポソーム架橋ゲルの特徴はその粘度のずり依存性にあり、強いずりを加えると水溶性高分子の疎水基がリポソームから抜け落ちて粘度が急激に低下する。このような特徴から、リポソーム架橋ゲルは注射によって体内への注入が可能で、体内に入ると再びゲルを形成することから、インジェクタブルゲル製剤として医療分野での利用が期待されている。¹⁰⁾ 一方、リポソームに作用させる疎水化水溶性高分子としては、ポリアクリル酸ナトリウムやポリオキシエチレン等の合成高分子の誘導体^{3,4,6)}のほか、セルロースやキトサン、アルギン酸ナトリウム等の天然高分子の誘導体^{5,7–11)}が報告されている。しかしながら、それらのほとんどが主鎖又は側鎖に電荷を持つ高分子電解質であるため、無機塩やpHの影響を受けてゲルが崩壊して

^a日本大学薬学部薬品物理化学研究室, ^b日本大学薬学部薬品分子化学研究室

*e-mail: hashizaki.kaname@nihon-u.ac.jp

Fig. 1. Chemical Structure of the Molecules Used in This Study

しまうケースがある。

そこで本研究では、リポソームの架橋に pH 安定性と耐塩性を有する疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロース (hydrophobically-modified hydroxypropylmethylcellulose; HM-HPMC) を用いた。ヒドロキシプロピルメチルセルロース (hydroxypropylmethylcellulose; HPMC) は、セルロースのメチル及びヒドロキシプロピルの混合エーテルであり、製剤添加物 (結合剤, 増粘剤, コーティング剤, 懸濁化剤, 崩壊剤, 分散剤等) として経口製剤及び局所製剤に広く使用されている。¹²⁾ 一方, HM-HPMC は, 上述した HPMC のステアシルオキシヒドロキシプロピルエーテルであり, HPMC に比べて高い界面活性や増粘効果を示すことが知られている。¹³⁻¹⁵⁾ また, HM-HPMC は非イオン性であり, 酸・塩基の影響を受け難く, 電解質との配合安定性に優れている。そのため, HM-HPMC を用いてリポソームを架橋することができれば, 様々な薬物を配合できるうえに, 生体内での安定性の向上も期待できる。そこで本論文では, HM-HPMC を用いたリポソームの架橋とそのレオロジー特性を詳細に検討した。

方 法

1. 試薬 水素添加大豆リン脂質 (hydrogenated soy phosphatidylcholine; HSPC) は, 日光ケミ

カルズ (株) (東京) の NIKKOL レシノール S-10EX (ホスファチジルコリン含量 95% 以上) を使用した。荷電物質であるジセチルリン酸 (dicetyl phosphate; DCP) は, Sigma-Aldrich (St. Louis) のものを使用した。クロロホルムは関東化学 (株) (東京) のものを使用した。HM-HPMC は, 大同化成工業 (株) (大阪) のサンジェローズ 60L (ステアシルオキシヒドロキシプロピル基の置換率が 0.3-0.6%) を使用した。HPMC は, 信越化学工業 (株) (東京) のメトロゾ 60SH10000 を使用した。水は注射用水を使用した。Figure 1 には, HSPC, DCP 及び HM-HPMC の構造式を示す。

2. HM-HPMC 水溶液の調製 注射用水をホットプレートスターラーで約 80℃ に加温し, HM-HPMC を加えて約 1 分間攪拌した。その後, 氷浴中で 30 分間攪拌して, 2.0% HM-HPMC 水溶液を調製した。

3. リポソーム懸濁液の調製 リポソームは常法に従って作製した。¹⁾ HSPC 0.093 g と DCP 0.007 g を容量 14 mL のガラス製の試験管に量り取り, クロロホルムを加えて溶解後, 窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去することにより試験管壁面に脂質薄膜を形成させた。さらに, クロロホルムを完全に除去するために減圧デシケータ中に一昼夜放置し, これにリン脂質濃度 (HSPC と DCP の合計) が 2.0% となるように注射用水 4.9 g を加えて 65℃ で水和・

膨潤し、ボルテックスミキサーで振とうして多重膜リポソームを調製した。これを 65°C の温浴中で加温しながら 10 分間超音波処理を行い、小さな一枚膜リポソームを作製した。なお、本研究で作製したリポソームは DCP による負電荷を有しているため、凝集を起こし難い。リポソームの粒子径及びゼータ電位は、2.0% リポソーム懸濁液を注射用水で適当に希釈し、ゼータ電位・動的光散乱測定装置 (Nicomp380 ZLS, Particle Sizing Systems Inc., Santa Barbara) を用いて、動的光散乱法及び電気泳動光散乱法により測定した。

4. リポソームと HM-HPMC 混合溶液の調製

あらかじめ調製しておいた 2.0% リポソーム懸濁液、2.0% HM-HPMC 水溶液及び注射用水を任意の割合で混合して調製した。例えば、混合溶液中のリン脂質濃度及び HM-HPMC 濃度がそれぞれ、1.5% 及び 0.3% の混合溶液は、2.0% リポソーム懸濁液 1.5 g と 2.0% HM-HPMC 水溶液 0.3 g に注射用水 0.2 g を加えて混合調製した。

5. レオロジー測定 レオロジー測定は、粘度・粘弾性測定装置 (HAAKE RS600 及び HAAKE MARS III, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham) を使用して 25°C で行った。また、溶媒の蒸発を防止するためにソルベントトラップを用いた。センサーの形状は試料の粘度に合わせて選択し、コーン型 (直径 35 mm 又は 60 mm, 角度 1°), ダブルコーン型 (直径 60 mm, 角度 1°) 及び平行型 (直径 60 mm, ギャップ 0.5 mm) を使用した。定常流粘度測定では、段階的に剪断応力を上げていき、各ステップで剪断速度の定常値を測定して粘度を求めた。構造回復測定では、剪断速度を $0.5 \text{ s}^{-1} \rightarrow 50 \text{ s}^{-1} \rightarrow 0.5 \text{ s}^{-1}$ の順に変化させたときの粘度の回復率を調べた。動的粘弾性測定では、線形粘弾性領域内のひずみを用いて、貯蔵弾性率 (G') 及び損失弾性率 (G'') の周波数依存性を調べた。

6. 小角 X 線散乱測定 小角 X 線散乱 (small angle X-ray scattering; SAXS) 測定は、SPRING-8 (佐用) において非結晶小角広角散乱回折実験用ビームライン (BL40B2) を用いて行った。試料は直径 2 mm の石英ガラスキャピラリーに封入した。X 線の波長は 0.1 nm, カメラ長は 2000 mm, 検出器には大面積型ピクセル検出器 (PILATUS-3S 2M, DECTRIS Ltd., Baden) を用いた。なお、測定は

Table 1. Gelation Ability of Liposome/HM-HPMC Mixed Solutions

		HM-HPMC concn. (%)			
		0	0.1	0.25	0.3
Phospholipid concn. (%)	0	×	×	×	×
	0.5	×	×	×	○
	1.0	×	×	○	○
	1.25	×	×	○	○
	1.5	×	×	○	○

○: Gel, ×: Sol.

Fig. 2. Appearance of a 1.5% Liposome/0.3% HM-HPMC Mixed Solution

25°C で行った。

結果及び考察

1. リポソーム/HM-HPMC 混合溶液の性状

混合前のリポソーム懸濁液について粒子径及びゼータ電位を測定したところ、平均粒子径は約 140 nm, ゼータ電位は約 -40 mV のリポソームが形成していることがわかった。このリポソーム懸濁液と HM-HPMC 水溶液を混合した際の流動性を目視によって確認した。Table 1 は、サンプルを容器ごと上下反転させた際に、垂れなかったものを○, 垂れたものを×で表している。リポソーム懸濁液及び HM-HPMC 水溶液は、混合前はいずれの濃度においても×の判定であったが、混合後はリン脂質濃度と HM-HPMC 濃度に依存して○で示すゲル化領域が広がることがわかった。Figure 2 には一例として、1.5% リポソーム/0.3% HM-HPMC 混合溶液の外観を示す。混合溶液はわずかに青白く半透

明で、適度な粘弾性を有していた。そこで、ゲル中におけるリポソームの溶存状態を調べるために SAXS 測定を行った。

Figure 3 には、1.0% リポソーム懸濁液及び 1.0% リポソーム/0.25% HM-HPMC 混合溶液の散乱曲線（散乱ベクトル q と散乱強度 $I(q)$ の関係）を示す。ここで $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ で、 θ は散乱角、 λ は X 線の波長である。一般に、多重膜リポソームやラメラ液晶の散乱曲線では、構造単位である二分子膜構造の周期性が複数の鋭い等距離ピークとして観測される。¹⁶⁾ しかしながら、本研究で調製したリポソームの散乱曲線においては、そのような鋭い複数ピークは観測されなかったことから、一枚膜リポソームが形成していると考えられる。さらに、二分子膜等の平板構造の散乱曲線では、両対数プロットの低 q 領域における直線の傾きが -2 を示すことが知られている。^{17,18)} 結果より、いずれの散乱曲線においても低 q 領域に傾き -2 の直線部分を認めたことから、二分子膜構造の存在を確認した。また、HM-HPMC を添加しても散乱曲線全体の形状はほとんど変化しなかったことから、二分子膜の厚さや内部電子密度分布といった局所構造もほとんど変化していないことがわかった。¹⁹⁾ これらの結果から、リポソームはゲル中にその構造を維持したまま存在していることが示唆された。

2. リポソーム/HM-HPMC 混合溶液のレオロジー特性 リポソーム/HM-HPMC 混合溶液の流動性を明らかにするために粘度測定を行った。Figure 4 には、HM-HPMC 濃度を 0.3% に固定し、リン脂質濃度を变化させた混合溶液の剪断速度と粘度の関係を示す。結果より、剪断速度が遅いとニュートン流動を示すが、剪断速度が速くなると非ニュートン流動を示すことがわかった。また、リン脂質濃度が高くなるほどニュートン流動域の粘度が大きくなり、リン脂質濃度が 1% を超えると粘度の増加は鈍くなった。なお、得られたゲルは、18–25 G の注射針を通して容易に押し出すことができた。

Figure 5 には、リン脂質濃度及び HM-HPMC 濃度を变化させた際の混合溶液のゼロ剪断粘度を示す。なお、ゼロ剪断粘度は、剪断速度をゼロに外挿したときの粘度のことで、Fig. 4 のニュートン流動域における粘度値に等しい。結果より、リポソーム懸濁液単独のゼロ剪断粘度は、リン脂質濃度が 0.5,

Fig. 3. SAXS Profiles [Scattering Intensity $I(q)$ vs. the Scattering Vector q] at 25°C for 1.0% Liposome Suspension (a) and 1.0% Liposome/0.25% HM-HPMC Mixed Solution (b)

Fig. 4. Steady Flow-viscosity vs. Shear-rate Curves for the Liposome/HM-HPMC Mixed Solution at Various Phospholipid Concentrations at 25°C
HM-HPMC concentrations were fixed at 0.3%.

Fig. 5. Zero-shear Viscosity of the Liposome/HM-HPMC Mixed Solution at Various Phospholipid and HM-HPMC Concentrations at 25°C

1.5%のときそれぞれ 0.001013, 0.001319 Pa·s であり, リン脂質濃度を変化させてもゼロ剪断粘度はほとんど変化しない. 一方, HM-HPMC 水溶液単独のゼロ剪断粘度は, HM-HPMC 濃度が 0.1, 0.25, 0.3% のときそれぞれ 0.002607, 0.8365, 3.324 Pa·s であり, HM-HPMC 濃度に依存してゼロ剪断粘度は増加したが, この濃度範囲ではゲル化は起こらない. ところが, リポソーム懸濁液と HM-HPMC 水溶液を混合すると, リン脂質濃度及び HM-HPMC 濃度に依存してゼロ剪断粘度が急激に上昇した. 例えば, 0.3% HM-HPMC 水溶液のゼロ剪断粘度と 1.5% リポソーム/0.3% HM-HPMC 混合溶液のそれを比較すると, リポソーム懸濁液との混合によって 3.324 Pa·s から 94.89 Pa·s まで約 30 倍上昇し, ゴル状態からゲル状態へと変化した (Fig. 2). これらの結果から, リン脂質濃度及び HM-HPMC 濃度に依存して, 架橋点の数及び架橋点につながっている部分鎖の数が増えるために粘度が上昇したと考えられる. ここで, HM-HPMC の疎水基によるアンカー効果を裏付けるために, 疎水基が導入されていない HPMC を用いて検討を行った.

Figure 6 には, リポソーム/HPMC 混合溶液中の HPMC 濃度を 0.3% に固定し, リン脂質濃度を変化させた試料の定常流粘度測定の結果を示す. また, Table 2 には, リポソーム懸濁液, リポソーム/0.3% HPMC 混合溶液及びリポソーム/0.3% HM-HPMC 混合溶液のゼロ剪断粘度を示す. 結果より, リポソーム/0.3% HPMC 混合溶液のゼロ剪断粘度は 0.01–0.04 Pa·s であり, リポソーム/0.3% HM-

Fig. 6. Steady Flow-viscosity vs. Shear-rate Curves for the Liposome/HPMC Mixed Solution at Various Phospholipid Concentrations at 25°C

HPMC concentrations were fixed at 0.3%.

HPMC 混合溶液のそれと比較して明らかに低値を示した. このことから, リポソーム/HM-HPMC 混合系も他のリポソーム/疎水化水溶性高分子混合系と同様に, 疎水基のアンカー効果によってリポソームが架橋されていると推察される (Fig. 7). なお, リポソーム/0.3% HPMC 混合溶液のゼロ剪断粘度がリン脂質濃度の増加に伴い 4 倍程度大きくなったことから, HPMC のメトキシ基やヒドロキシプロポキシ基がリポソームと相互作用している可能性が示唆された.

緒言でも触れたように, 疎水化水溶性高分子を用いたリポソーム架橋ゲルに強いずりを加えると, リポソームから疎水化水溶性高分子の疎水基が抜け落ちて粘度が急激に低下することが知られている.³⁻¹¹⁾ そこで, この現象の可逆性を調べるためにチクソトロピー性 (粘度回復性) を評価した. Figure 8 には, 1.5% リポソーム/0.3% HM-HPMC 混合溶液について, 低剪断速度 (0.5 s^{-1}) の測定から高剪断速度 (50 s^{-1}) の測定を経て再び低剪断速度 (0.5 s^{-1}) の測定を 1 サイクルとし, これを 5 回繰り返した際の粘度の経時変化を示す. 結果より, 各サイクルではほぼ 100% の粘性回復がみられたことから, ずりによる架橋構造の崩壊・再生は可逆的であることがわかった.

次に, リポソーム/HM-HPMC 混合溶液の粘弾性挙動を調べるために動的粘弾性測定を行った. Figure 9 には, HM-HPMC の濃度を 0.3% に固定し, リン脂質濃度を変化させた混合溶液の G' 及び

Table 2. Zero-shear Viscosity (Pa·s) of Liposome Suspension, Liposome/HPMC Mixed Solution, and Liposome/HM-HPMC Mixed Solution with Varying Phospholipid Concentrations

	Phospholipid concn. (%)				
	0	0.5	1.0	1.25	1.5
Liposome	0.00089	0.001013	0.001259	0.001186	0.001319
Liposome/0.3% HPMC	0.01024	0.01336	0.02068	0.02714	0.03706
Liposome/0.3% HM-HPMC	3.324	44.14	83.32	90.26	94.89

Fig. 7. Schematic Illustration of the Gelation Mechanism of Liposome/HM-HPMC Mixed Solution

G' の周波数依存性を示す。ここで、 G' は弾性すなわち固体としての性質を反映しており、 G'' は粘性すなわち液体としての性質を反映している。結果より、 G' と G'' はある周波数で交点を示し、交点よりも低周波数側では G'' が優位で、交点よりも高周波数側では G' が優位であった。このことから、リポソーム架橋ゲルは遅い動きに対しては粘性体としてふるまい、速い動きに対しては弾性体としてふるまうことがわかった。また、混合溶液中のリン脂質濃度が高くなるほど緩和時間（ G' と G'' の交点における周波数の逆数値）が長くなり、弾性を示す周波数領域が広がることもわかった。

結 論

本研究では、リポソーム/HM-HPMC 混合溶液のゲル化能やレオロジー特性について検討した。リポソーム懸濁液及び HM-HPMC 水溶液は、それぞれ単独では粘度が低い、それらを混合すると粘度が急激に上昇することがわかった。これは、HM-HPMC の疎水基がリポソーム二分子膜中に突き刺さりリポソーム同士を架橋することで、液全体に 3

Fig. 8. Cyclic 3-Step Shear Rate ($0.5 \text{ s}^{-1} \rightarrow 50 \text{ s}^{-1} \rightarrow 0.5 \text{ s}^{-1}$) Curve of a 1.5% Liposome/0.3% HM-HPMC Mixed Solution at 25°C

次元ネットワーク構造が形成されるためだと考えられる。この仮説は、疎水基を持たない HPMC を用いた場合にはゲル化しないことから裏付けられた。また、リポソーム/HM-HPMC 混合溶液の粘度は外力を加えると急激に減少するが、外力を除くとすぐに元のゲル状態に戻ったことから、この反応

Fig. 9. Variation in G' and G'' as a Function of Frequency at Different Phospholipid Concentrations in the Liposome/HM-HPMC Mixed Solutions at 25°C
HM-HPMC concentrations were fixed at 0.3%.

には可逆性があることもわかった。これは、強い外力が加わるとリポソームから HM-HPMC の疎水基が抜け落ち、外力を除くと再びリポソームが架橋されるためである。

以上の結果から、HM-HPMC を用いたリポソーム架橋ゲルは、リポソームとゲルの特性を併せ持った興味深い材料であることがわかった。また、そのレオロジー特性は従来の水溶性高分子ゲルとは異なることから、新たな製剤基剤としての利用が期待される。今後は、リポソーム架橋ゲルの安定性に及ぼす無機塩や pH の影響のほか、リポソームの内封率に及ぼす HM-HPMC の影響、ゲル製剤からの薬物の放出性等についても検討したいと考えている。

謝辞 サンジェロースを提供して頂いた大同化成工業株式会社に感謝する。本稿での研究の一部は、JSPS 科研費 (17K08468)、平成 31 年度日本大学学術研究助成金総合研究、平成 31 年度日本大学薬学部共同研究助成金の支援を受けて行われた。また、SAXS 測定は、大型放射光施設 SPring-8 の BL40B2 ビームラインを利用して行われた (2018A1200)。

利益相反 橋崎 要 (大同化成工業株式会社からサンジェロースの供与)。

REFERENCES

- 1) Bangham A. D., Horne R. W., *J. Mol. Biol.*, **8**, 660–668 (1964).

- 2) Hong J. S., Stavis S. M., Lacerda S. H. D., Locascio L. E., Raghavan S. R., Gaitan M., *Langmuir*, **26**, 11581–11588 (2010).
- 3) Løven K., Iliopoulos I., Audebert R., Olsson U., *Langmuir*, **11**, 1053–1056 (1995).
- 4) Meier W., Hotz J., Günther-Ausborn S., *Langmuir*, **12**, 5028–5032 (1996).
- 5) Marques E. F., Regev O., Khan A., Miguel M. D., Lindman B., *Macromolecules*, **32**, 6626–6637 (1999).
- 6) Ashbaugh H. S., Boon K., Prud'homme R. K., *Colloid Polymer Sci.*, **280**, 783–788 (2002).
- 7) Antunes F. E., Marques E. F., Gomes R., Thuresson K., Lindman B., Miguel M. G., *Langmuir*, **20**, 4647–4656 (2004).
- 8) Lee J. H., Gustin J. P., Chen T., Payne G. F., Raghavan S. R., *Langmuir*, **21**, 26–33 (2005).
- 9) Dowling M. B., Kumar R., Keibler M. A., Hess J. R., Bochicchio G. V., Raghavan S. R., *Biomaterials*, **32**, 3351–3357 (2011).
- 10) Lee J. H., Oh H., Baxa U., Raghavan S. R., Blumenthal R., *Biomacromolecules*, **13**, 3388–3394 (2012).
- 11) Oh H., Javvaji V., Yaraghi N. A., Abezgauz L., Danino D., Raghavan S. R., *Soft Matter*, **9**, 11576–11584 (2013).
- 12) The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition, Official monographs, Hypromellose.
- 13) “Japanese Pharmaceutical Excipients 2018,” Yakuji Nippo Limited, Tokyo, 2018, p. 432.
- 14) Saitoh I., Ikeda K., Takehara M., Takagishi Y., Obara S., Muto H., *Yakuzaigaku*, **52**, 272–279 (1992).
- 15) Kitamura T., Gang A., Shimizu Y., Shimamoto T., *FRAGRANCE JOURNAL*, **35**(7), 72–77 (2007).
- 16) Frühwirth T., Fritz G., Freiburger N., Glatter O., *J. Appl. Cryst.*, **37**, 703–710 (2004).
- 17) “Colloid Sciences IV: Experimental Methods for Colloid Sciences,” ed. by the Chemical Society of Japan, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo, 1996, pp. 72–75.
- 18) Matsuoka H., *J. Cryst. Soc Jpn.*, **41**, 213–226 (1999).
- 19) Aoki A., Akaboshi H., Ogura T., Aikawa T., Kondo T., Tobori N., Yuasa M., *J. Oleo Sci.*, **64**, 233–242 (2015).