

分子運動性に基づく凍結乾燥・再水和法による薬物封入リポソーム製剤の安定性の評価に関する研究

(分担)研究者 米谷芳枝 星薬科大学医薬品化学研究所

リポソームの凍結乾燥・再水和 (dehydration-rehydration vesicle, DRV) 調製法は、疎水性薬物も親水性薬物も封入できる方法であり、また、リポソーム製剤を凍結乾燥品として安定に保存できる利点がある。しかし、再水和時におけるリポソーム膜の脂質成分の分子運動性によって、粒子径や薬物封入率などが変化する欠点がある。薬物としてプラスミド DNA を用いて、DNA の封入率が高く、粒子径の小さいリポソーム遺伝子ベクター製剤の調製とその安定性を検討・評価した。調製時のショ糖の添加量によるリポソームの粒子径と DNA 封入率の変化を調べたところ、ショ糖の添加量を増加すると、リポソームの粒子径および、DNA の封入率も低下することが明らかになった。最終的に、ショ糖の添加量を全脂質量に対して同量にすると、 $0.4 \mu\text{m}$ の粒子径で DNA の封入率が 60% 以上のものが調製できた。また、DNA 封入リポソーム製剤の安定性は再水和後のリポソーム粒子径の変化から評価し、1ヶ月位は安定であることが明らかとなった。

A. 研究目的

これまでは遺伝子治療用遺伝子導入リポソームベクターは、リポソームと DNA を混合して複合体にする方法が用いられている。この方法では複合体が時間とともに凝集して粒子径が大きくなるため、使用する直前に混合する。また、複合体では DNA は血中で直ちに酵素によって分解される。これらの点から DNA を封入したリポソーム凍結乾燥製剤は DNA を製剤として、また、体内において安定に保存できる理想的な製剤である。しかし、既に、凍結乾燥・再水和法で DNA をリポソームに封入することは報告されているが、調製後の粒子径が約 $0.6 \mu\text{m}$ と大きく、現段階では静脈内投与に用いることはできなかった。そこで、糖類を用いて DNA を封入し、なおかつ、静脈内投与可能な粒子径にしようとした。

リポソームの凍結乾燥・再水和 (dehydration-rehydration vesicle, DRV) 法は、疎水性薬物も親水性薬物も封入できる調製法であり、また、リポソーム製剤を凍結乾燥品として安定に保存できる

利点がある。しかし、再水和時にリポソーム膜の分子運動性によって粒子径や薬物封入率などが変化する欠点がある。そこで、平成13年度における抗癌剤ピラルビシンで封入率が高く、粒子径の小さいリポソーム製剤を調製した最適条件をもとに、本年度は DNA を高い効率で封入し、静脈内投与可能な粒子径 ($0.4 \mu\text{m}$ 以下) のリポソーム製剤の調製法と安定性を検討・評価した。

まず、リポソームベクターの脂質成分は、カチオン性脂質として DOTAP、中性脂質として DOPE、血清存在下においても粒子径が大きくなるように糖脂質としてステロールグルコシドに決定し、DNA のリポソームへの封入には凍結乾燥・再水和法を用いた。調製時での凍結乾燥と再水和において、凍結時に添加する糖の種類とその添加量、凍結後の水の蒸発速度、および再水和時に添加する水量について検討し、最適条件を求めた。さらに、糖類が凍結乾燥のどの過程でリポソームの粒子径や薬

物封入率に影響しているかを、リポソーム形成機構をもとに調べた。また、糖類のリポソーム製剤の安定性への影響についても検討し、さらに培養細胞を用いて、DNA封入リポソーム製剤中のDNAの安定性を遺伝子導入効率によって確認した。

B. 研究方法

リポソームは DRV 法で、成分としては精製卵黄 レ シ チ ン (PC) : dioleoyl phosphatidylethanolamine(DOPE) : 1,2-dioleoyl-3-(trimethylammonium) propane chloride (DOTAP) : β -sitosterol glucoside (Sit-G) : レチノイン酸 (RA) = 32:16:8:0~6:0~4 (モル比) (Table 1)を用いて、水和法によって多重層リポソームを作り、超音波処理して小さな一枚膜リポソームを調製した。これに各種類の糖と、ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA を総脂質に対して種々の比で加えて凍結乾燥し、得られた粉末に水を添加して再水和し、DNA 封入リポソームにした。リポソームの粒子径および表面電位は、電気泳動光散乱光度計(大塚電子(株))により測定した。DNA 封入率は、DNA を ^{35}S でラベル化し、超遠心分離(100 000 \times g、60分、4 $^{\circ}\text{C}$)により、リポソームと未封入の DNA を分離し、上清のラベル体のラジオ活性を測定し、リポソーム中の DNA 濃度を以下の式より算出した。

Entrapment efficiency (%)

$$= (C_{\text{total}} - C_{\text{supernatant}}) / C_{\text{total}} \times 100$$

ここで、 C_{total} は添加した総 DNA 濃度、 $C_{\text{supernatant}}$ はリポソームへの未封入の DNA 濃度を示す。

凍結乾燥前、後および再水和後の粒子の状態は、走査電子顕微鏡(日本電子、JEOL JSM-5600LV)によって観察した。

培養細胞としては、ヒト肝細胞 HepG2 細胞を用いた。

C. 研究結果

添加する糖の検討として、コントロールリポソーム(PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA=32:16:8:0:0)、Sit-G リポソーム(PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA=32:16:8:6:0)、Sit-G/RA リポソーム(PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA=32:16:8:6:4)にグルコース、乳糖、ショ糖を総脂質と同質量だけ添加したときのリポソームの粒子径とDNA封入率を測定した。その結果、リポソームの粒子径は、凍結乾燥・再水和前は50nm位であるが、再水和後は大きくなり、凍結時にショ糖を添加したとき最も大きくなることが明らかとなった。これらの結果より、糖としてはショ糖を使用することにした。ショ糖の添加量を総脂質に対して0.25から1.20まで変化させたとき、0.7から1.2位で、粒子径が155nmとほぼ一定になることから、ショ糖の添加量は総脂質と同質量が最適と考えた(Table 2)。次にSit-G/RAリポソームでショ糖の添加量をかえたときのリポソームの粒子径とDNA封入率を測定したところ、ショ糖の添加量が増加したときにリポソームの粒子径は151nm位に小さくなり、DNA封入率も36%位に低下した(Table 3)。これは、Sit-G/RAリポソームはRAによって表面の正電荷が低下したために、負電荷のDNAが封入されにくくなったと推察された。

コントロール、Sit-G、Sit-G/RAリポソームにおいて、ショ糖の添加量を総脂質と同質量添加したときのリポソームの粒子径とDNA封入率を測定したところ、3種類のリポソームにおいて粒子径が250nm位で、DNA封入率も65%以上の製剤が調製できることが明らかになった(Table 4)。

さらに、凍結後の水の蒸発速度が遅いほど、また、再水和状態において凍結乾燥粉末に添加する水の量が多いほど、再水和後のリポソームの粒子径は大きくなり、薬物封入率は低くなることが明らかになった。

DNAがリポソームの内水相に保持されている

かを調べるためにコントロール、Sit-G、Sit-G/RA リポソームにおいて、空のリポソームと DNA 封入リポソームの表面電位を比べたところ、封入前はそれぞれ 54.1mV、43.6mV、30mV、封入後は、51.7mV、44.6 mV、29.1. mV とほとんど変化がなかった。

リポソーム製剤中の DNA 活性を確認するために、培養細胞とインキュベーションして遺伝子導入し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を調べたところ、発現が見られた。

また、DNA リポソーム凍結乾燥製剤を1ヶ月以上4℃で保存したところ、再水和後のリポソームの粒子径は小さく、安定であることが明らかとなった。しかし、再水和後のリポソーム懸濁液状態では、1週間で粒子径が変化し、凝集が観察された。

D. 考察

これまでの、リポソームの凍結乾燥・再水和後の粒子径は糖を添加すると変わらず、封入された薬物は保持されていると考えられている。しかし、糖と薬物をリポソームとともに凍結乾燥後、再水和すると薬物が封入され、リポソームの粒子径が大きくなることは、一時的にリポソーム膜の流動性が上昇し薬物の透過性が上昇するか、リポソームの融合が起きているか、透過性の上昇とリポソームの融合が同時に起きているのか、またはリポソーム膜の再構築が行われている可能性がある。昨年度の研究では、走査電顕でのリポソームの観察結果から、凍結乾燥後にはリポソームのベシクル状態は観察されず、再水和後にはベシクル状態が観察されたので、破壊されたリポソームの膜構造は、再水和時に再構築が起きており、そのとき水に溶解した薬物がリポソーム内に進入すると推察した。すなわち、糖は膜を安定化するのではなく、膜を一時的に乱しているのではないかと推察される。

リン脂質の分子運動性は、水の分子運動性が変化する凍結、乾燥、再水和時に大きく影響され、

凍結時にトリハロースなどの糖を入れると、糖がガラス状態となり、脂質膜が安定化されることが報告されている。しかし、凍結・乾燥では、リポソーム膜中のリン脂質の分子運動性は未だ明らかになっておらず、薬物封入リポソームを凍結乾燥するとリポソームの形態のまま、すなわち、薬物をリポソーム内に保持した状態で凍結乾燥されたという報告もある。一方、凍結乾燥した空リポソームの粉末に薬物溶液を入れると封入されることも報告されている。このように、凍結・乾燥では、どの過程でショ糖がどのような作用をしているかが明らかになっていない。

凍結速度と乾燥過程での水の蒸発速度が遅いと、また、再水和過程で水の量が多いと粒子径が大きくなることが明らかになった。

また、糖の量を増加するとリポソームの粒子径が小さくなることから、凍結乾燥後、糖が膜近傍に存在し、脂質同士の凝集を制御している可能性が示唆された。糖の脂質への分子運動性に対する影響は糖と脂質との比によって異なり、その比が高いとリポソームの脂質膜を安定化し、その比が低いと膜の透過性を高めることが示唆された。

DNA がリポソームの内水相に保持されているかについて、空のリポソームと DNA 封入後のリポソームで表面電位を比べたところ、封入前と封入後ではほとんど変化がなく、DNA のリポソーム表面への電気的な吸着の可能性は低いことが示唆された。また、製剤中の DNA は、培養細胞でルシフェラーゼ遺伝子の発現が観察され、遺伝子導入後まで保持されていることが確認された。

DNA 封入リポソーム凍結乾燥製剤は安定であるが、再水和後のリポソーム懸濁液状態では、粒子径が変化し、凝集することが明らかとなった。

すなわち、凍結・乾燥・再水和では、凍結時にリポソーム内部に氷晶ができ、脂質二重膜が破壊し、再水和時に凍結後の融解時のように脂質間の疎水的相互作用によってリポソームが再構

成され、そのときに高濃度(0.5M)のシヨ糖存在下では、脂質間の相互作用を弱め、リポソーム膜を安定し、凝集を防止するが、低濃度では逆に膜構造を乱すことが明らかになった。

E. 結論

シヨ糖の添加量を全脂質量に対して同質量にすると、0.4 μm の粒子径で DNA の封入率が 60%以上の DNA 封入リポソーム凍結乾燥製剤が調製できること、また、この製剤の安定性は高いことが明らかとなった。

リポソームの膜構造は凍結乾燥によって破壊され、再水和時に再構築が起きて、そのとき少量の水に溶解された DNA がリポソーム内に進入すると推察した。糖の脂質への分子運動性に対する影響は糖と脂質との比によって異なり、その比が高いとリポソームの脂質膜を安定化し、その比が低いと逆に膜の透過性を高めることが示唆された。また、その膜の揺動は、融解・乾燥・再水和過程に起き、糖類は特に再水和過程に影響すると推察した。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai and Y. Maitani, Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles, *Int. J. Pharm.*, 252(1-2) 73-9 (2003).

K. Nakamura, Y. Maitani and K. Takayama, Regional intestinal absorption of FITC-dextran 4,400 with nanoparticles based on β -sitosterol β -D-glucoside in rats, *J. Pharm. Sci.*, 92(2) 311-8 (2003).

米谷芳枝, 永井恒司, overview-脂質パーティクル製剤, *Drug Delivery System*, 17(4), 314-320 (2002).

米谷芳枝, 遺伝子導入用リポソームキットとその調製法, *Pharm. Tech. Japan*, 16 (8), 1221-1229 (2000).

2. 学会発表

森田紗絵, 米谷芳枝, 永井恒司, 高山幸三, ステロールグルコシド含有リポソーム遺伝子ベクターの処方検討, 日本薬学会 122 年会(千葉)2002 年 3 月

川野久美, 高山幸三, 永井恒司, 米谷芳枝, ピラルビシン封入肝ターゲットイングリポソーム製剤の調製と評価, 日本薬剤学会第17年会(静岡), 2002 年 3 月

川野久美, 高山幸三, 永井恒司, 米谷芳枝, DRV 法によるピラルビシン封入リポソームの調製と抗腫瘍効果の検討, 第18回日本 DDS 学会(札幌)2002 年 6 月

K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai, G. Gregoriadis, Y. Maitani, Preparation and antitumor effects of pirarubicin-encapsulating liposomes for liver cancer treatment, the Controlled Release Society 29th annual meeting, 2002, July, Korea.

Table 1 Liposome formulations for entrapment of 200 μ g plasmid DNA

Formula	Liposome	PC:DOPE:DOTAP:Sit-G:RA (μ mol)
1	Control	32:16:8:0:0
2	Sit-G	32:16:8:6:0
3	Sit-G/RA	32:16:8:6:4

Table 2 Effect of increasing sucrose:lipid weight ratio on the size of empty Sit-G-liposomes (n=3)

Sucrose/lipid (mg/mg)	Diameter (nm) average \pm SD
0.25	309.8 \pm 13.6
0.70	155.4 \pm 11.2
1.20	155.2 \pm 1.3

Table 3 Effect of increasing sucrose:lipid weight ratio on size (n=3) and entrapment efficiency of Sit-G/RA liposomes (n=2)

Sucrose/lipid (mg/mg)	Entrapment efficiency (%)	Diameter (nm) average \pm SD
0	89.5	704.0 \pm 176.8
1	65.9	185.8 \pm 45.5
2	36.1	151.7 \pm 7.1

Table 4 Characterization of Sit-G and Sit-G/RA-liposomes prepared with a sucrose:lipid weight ratio of 1 (n=3)

Liposomes	Entrapment efficiency (%)	Diameter (nm) average \pm SD	Zeta-potential (mV)
Control	97.3	194.1 \pm 3.5	51.7 \pm 0.8
Sit-G	91.4	243.8 \pm 35.7	44.6 \pm 3.4
Sit-G/RA	65.9	185.8 \pm 45.5	29.1 \pm 0.3

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima	Molecular mobility-based prediction of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital in PVP solid dispersions.	J. Pharm. Sci., submitted.			
S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima	Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamics simulation.	Pharm. Res. accepted			2003
S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima	Different molecular motions in lyophilized protein formulations as determined by laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times.	J. Pharm. Sci.,	91,	2203-2210	2002
Y. Aso, S. Yoshioka, J. Zhang and G. Zografi	Effect of water on the molecular mobility of sucrose and PVP in a colyophilized formulation as measured by ¹³ C-NMR relaxation time.	Chem. Pharm. Bull.	50	822-826	2002
S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima and Nicholas F. Cappuccino	A comparison of the analysis of covariance (ANCOVA) and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products.	Chem. Pharm. Bull.	50	881-883	2002
阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄、	凍結乾燥製剤の安定性に及ぼす水の影響	低温生物工学会誌	48	42-46	2002
N. Murase, M. Ruike, S. Yoshioka, C. Katagiri and H. Takahashi	Glass transition and ice crystallisation of water in polymer gels studied by oscillation DSC, XRD-DSC simultaneous measurements and Raman spectroscopy	Amorphous Food and Pharmaceutical Systems		339-346	2002
K. Kawano, K. Takayama, T. Nagai and Y. Maitani	Preparation and pharmacokinetics of pirarubicin loaded dehydration-rehydration vesicles	Int. J. Pharm	252	73-9	2003
K. Nakamura, Y. Maitani and K. Takayama in rats	Regional intestinal absorption of FITC-dextran 4,400 with nanoparticles based on [[beta]]-sitosterol [[beta]]-D-glucoside	J. Pharm. Sci	92	311-8	2003
米谷芳枝、永井恒司、overview-脂質パーティクル製剤		Drug Delivery System	17	314-320	2002

20021033

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
P.25の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。