

液晶構造を保持する脂質ナノパーティクルを用いた新規のDDSの開発

所 属 京都大学大学院薬学研究科
研究者 中野 実

要 旨

非ラメラ液晶構造を内部に保持した微粒子を調製することに成功した。微粒子はイオン透過性、脂質運動性、血中安定性等においてエマルションやリポソームとは全く異なる挙動を示し、二本鎖脂質による液晶微粒子が有力な新規薬物担体となる可能性が示唆された。

1. 研究目的

近年、生理学的に重要な機能を有する化合物が多数発見されているが、これらの多くは水に対し難溶性であり、医薬品として用いるには至適な血中キャリアが必要である。可溶化ミセルやエマルション、リポソーム製剤など、微粒子分散系が難溶性薬剤の投与形態として一般に用いられている。しかしながら、これらの分散系はその機能性や応用範囲にも限界がある。

そこで、今までとは全く異なるコンセプトから、微粒子分散系に新たな機能を与える方法を考案した。すなわち、液体と固体（結晶）の中間の性質を有する液晶を水中に分散させることで、エマルション（液体分散系）やサスペンション（固体分散系）、あるいはリポソームなど既存の分散系では見られない全く新しい機能や生体内崩壊メカニズムを有した微粒子が得られることが期待される。しかしながら、このような分散微粒子の調製は困難であるとされてきた。それは、微粒子の分散安定化に寄与する界面活性剤（乳化剤）が、同時に液晶構造を壊してしまうためであった。そこで、本研究において、高分子界面活性剤がこのような微粒子の調製に有効であると考え、実験を行った。

本研究では、脂質混合物を高分子乳化剤により分散微粒化し、得られた微粒子の構造、機能性を評価し、ドラッグキャリアとしての有効性を評価した。

2. 研究方法

2. 1. 微粒子の調製

脂質モノオレイン (MO)、オレイン酸 (OA)の混合物に対し 8 wt%の Pluronic F127 を混合後、脂質濃度が 10 mg/mLとなるようにリン酸緩衝液 (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH7)を加え約 80°Cで水和した。Vortex やホモジナイザーを用いて試料を粗分散させた後、高圧乳化機 (Nanomizer, 吉田機械興業)により 35 MPa、60°C、30 min の条件で分散微粒化を行った。得られた微粒子の粒径は動的光散乱 (DLS) (Photal LPA-3000/3100、大塚電子)により測定した。また、MO、OAの代わりに卵黄レシチン(EPC)、ジオレイン (DO)の混合物を用いた微粒子も調製した。

2. 2. X線小角散乱 (SAXS)

分散後に限外濾過により濃縮した試料、および、分散させていない水和試料を測定用ガラスキャピラリーに封入し、X線小角散乱測定 (理学電機)を行った。回折パターンから非分散試料が形成する液晶相、および、分散微粒子の内部構造を同定した。

2. 3. 時間分割蛍光異方性

微粒子内部の動的な構造情報を得るため、蛍光プローブ diphenylhexatriene propionic acid (DPH-PA) を導入した微粒子について時間分割蛍光異方性測定 (NAES-550、堀場製作所) を行い、膜中のプローブの揺動角を算出した。

2. 4. ^{13}C NMR

カルボニル炭素を ^{13}C 標識した OA (^{13}C -OA) を、MO に対し 5% 混合して微粒子を調製し、濃縮後 ^{13}C NMR 測定 (Varian Gemini 300) を行った。常磁性シフト試薬 EuCl_3 添加前後における標識炭素のケミカルシフトの変化を観察し微粒子内部へのイオン透過性を評価した。

2. 5. ゲル濾過クロマトグラフィ

疎水性蛍光プローブ cholesteryl 1-pyrenebutyrate を導入した微粒子をウシ血清アルブミン水溶液あるいはラット血漿と 30 min インキュベーション後、アガロースゲルカラムにより微粒子画分とタンパク画分とに分離し、それぞれのプローブ濃度を蛍光法、タンパク量、脂質濃度を酵素法により定量した。

2. 6. 血中滞留性

一晩絶食させた雄 Wistar ラット (weight ca. 200 g) の大腿静脈から蛍光プローブを導入した微粒子を投与し、一定時間後、頸静脈から採血し、遠心分離により得られたプラズマ中のプローブ及び MO 濃度を蛍光法及び酵素法により定量した。

3. 研究成果

3. 1. 非分散試料の液晶相形成

MO/OA/F127/buffer 混合非分散試料 (lipids/buffer = 10 mg/mL, F127/lipids = 0 および 8 wt%) は、両連続キュービック相から、逆ヘキサゴナル相、逆ミセルキュービック相等、種々の液晶相の形成を示す明瞭な SAXS パターンを与えた。まず、MO:OA=10:0 では、F127 が存在しない場合、6 次までの回折が観察され、 $Pn3m$ 型の両連続キュービック相が形成されていることが判明した。8% F127 の存在下では $Im3m$ 型の両連続キュービック相であることが判明した。一方、5:5 においては、F127 の有無によらず同一の回折が得られ、逆ヘキサゴナル(H_{II}) 相の形成が確認された。また、0:10 においても、回折パターンは F127 によって変化せず、 $Fd3m$ 型の逆ミセルキュービック相が形成されていることが判明した。

3. 2. 液晶相を有する分散微粒子の調製

F127 を全脂質の 8 wt% とし、脂質混合比 (MO:OA) を変え、高圧乳化法により微粒子の調製を行い、その粒径と内部構造をそれぞれ DLS、SAXS により評価した。その結果、キュービック相や逆ヘキサゴナル相を保持した微粒子 (キューボソーム、ヘキサソーム) が得られたことが判明した。粒子径は OA の割合の増加により、いったん減少し、その後増加するという傾向を示した。SAXS プロファイルは、OA の無い場合 (MO:OA = 10:0)、 $Pn3m$ の明瞭な第 1, 第 2 ピークと、より小角側に $Im3m$ の第 1 ピークが出現し、2 種類の両連続キュービック構造の共存が示唆された。 $Pn3m$ は F127 の非存在下で MO が形成する相であることから、この分散系において、F127 が存在せずに MO が $Pn3m$ を形成する領域があるものと推察される。すなわち、分散によって乳化剤である F127 は粒子表面の安定化に寄与し、粒子内部に F127 が枯渇する領域が出現するものと考えられる。9:1 から 6:4 においては、 $Im3m$ の回折ピークが観察された。この範囲においては、OA の増加によりピークが小角側に移動する傾向が見られた。これは、低濃度においては OA の解離度が高く、膜に正の曲率を与えるためと考えられる。この範囲における、OA の増加による粒径の減少も、OA の解離に

よって親水性が高まるためと解釈できる。5:5 から 2:8 においては H_{II} 構造を示唆する回折パターンが得られ、ヘキサソームの形成が明らかになった。1:9 および 0:10 では、 $Fd3m$ の回折パターンが得られ、逆ミセルキュービック相を内部に有する微粒子の形成が確認できた。 H_{II} および $Fd3m$ 構造の組成範囲では、OA の増加によりピークが広角側に移動した。またこの範囲においては F127 濃度を増加させると粒子径は減少したが、回折パターンは変化せず、内部構造が F127 濃度によって変化していないことが判明した。これは F127 は H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対する相溶性が非常に低いため、微粒子の分散安定性のみならず、内部構造に影響を与えないことを表している。

3. 3. キュボソーム内部の動的構造評価

キュボソーム中に導入した蛍光プローブ DPH-PA の時間分割蛍光異方性測定より粒子内部（キュービック相）の脂質膜の動的特性を評価した。疎水鎖の動きやすさの指標となる揺動角は MO キュービック相において約 59° と、Palmitoylcholine(POPC)リポソーム（ラメラ相）と比べて約 5° 大きいことが判明した。また、POPC リポソームに MO を最大 60% まで導入すると、MO の割合とともに揺動角は減少し、逆に、MO キュボソームに POPC を導入すると、MO の割合とともに増加した。この変化は膜に生じるパッキングストレスに起因していると考えられる。すなわち、負の曲率を有する MO を EPC ラメラ相へ導入することにより、脂質の側方圧力の上昇に伴ってアシル鎖の運動性が制限され、揺動角が減少し、キュービック相への転移とともにこのストレスが解消されることが考えられる。

3. 4. キュボソーム内部へのイオン透過性

リン脂質リポソームの場合、イオンの膜透過性は非常に低いことが知られており、このことは ^{31}P NMR においてシフト試薬の添加によってピークの分裂が観察されることから確認できる。これは、リポソーム外葉のリン脂質のみが、カチオンであるシフト試薬と相互作用しケミカルシフトの変化が生じるのに対し、内葉のリン脂質はシフト試薬の影響を受けないためである。キュボソームにも ^{13}C NMR により同様の手法を適用し、イオンの粒子内部への透過性を評価した。この際、微粒子の構成脂質である MO は電荷を持たず、シフト試薬によるケミカルシフトの変化が起こらないので、5%の ^{13}C -OA を導入し、OA カルボニルピークの変化を観察した。OA カルボニル由来のピークは、179ppm に観察され、シフト試薬である Eu^{3+} 添加後、ピークは速やかに低磁場シフトし、元の位置にはシグナルが観察されなかったことから、微粒子内部の全ての OA が外部から添加された Eu^{3+} の影響を受けたことが判明した。OA は微粒子内部に分布していることから、イオンは微粒子内部に容易に浸入できることが明らかになった。

3. 5. キュボソームと血清アルブミンとの相互作用

キュボソームと BSA を 30 min インキュベーション後、ゲル濾過クロマトグラフィにより微粒子画分とタンパク画分とに分離した。その結果、微粒子画分における MO 濃度の低下、およびタンパク画分の MO 濃度の上昇が観察され、逆に、微粒子画分にはアルブミンは検出されなかった。このことから、キュボソーム中の MO がアルブミンによって引き抜かれたことが判明した。また、疎水性の蛍光プローブは MO が引き抜かれた後も微粒子側（F127 ミセル）に存在することが判明した。また、OA を含む微粒子の場合、OA の引き抜きも同時に起こることが明らかになった。

3. 6. キュボソームの血中滞留性

ラットにキュボソームを投与後 4 時間までの MO（グリセライド）及び蛍光プローブのプラズマ中濃度を評価した。その結果、プローブ濃度は時間とともに緩やかに減少し、4 時間後には投与直後のおよそ半分に低下したのに対し、グリセライド濃度は時間とともに増加し、40 分で投与直後

のおよそ3倍に上昇し、その後減少するという特異な挙動を示した。また、*in vitro*の実験から粒子が赤血球と強く相互作用することが示唆された。また、F127が血中のリポタンパクリパーゼの活性を押さえ、血中トリグリセライドレベルを上昇させることも判明した。これらの結果から血中グリセライド濃度の異常な変化をある程度説明できるが、詳細は現在不明である。しかしながら、この結果は明らかに微粒子の血中での安定性が低いことを意味している。

3. 7. 二本鎖脂質による非二分子膜液晶構造の形成とその分散化

卵黄レシチン(EPC)、ジオレイン(DO)はともに二本のアシル鎖を有する脂質である。これらを混合するとDOの割合の増加により、ラメラ液晶相から $Im3m$ 、 $Pn3m$ 、 H_{II} へと相変化することがX線小角散乱により明らかになった。F127を乳化剤として高圧乳化を行うと微粒子が得られた。EPC:DO=8:2 および 7:3 において粒子内部のキュービック相の形成は確認できなかったが、EPC:DO=6:4 および 5:5 においては粒子内部に H_{II} 相が形成されていることが判明した。さらに、このヘキサソームは血清アルブミンによる脂質の引き抜きを受けないことがゲルろ過実験より明らかになった。

4. 考察

4. 1. 液晶相の分散とF127の分散剤としての有効性

脂質は水中で疎水性相互作用によって会合し、種々の液晶相を形成する。その会合様式は分子の持つ親水、疎水基の大きさのバランスによって決まる。例えば、レシチンは曲率の無いラメラ相を形成するが、MOはやや負の自発曲率を有し、両連続キュービック液晶相を形成する。OAはMOと同じアシル鎖を有するが親水基が小さいため、膜に負の曲率を誘起する。従って、MOにOAを添加すると両連続キュービックから、逆ヘキサゴナル、逆ミセルキュービックへと相が転移する。脂質の種類や混合組成により膜の曲率を変化させ、これらの非ラメラ相を形成させることが出来る。

非分散試料のX線回折から、F127は $Pn3m$ 相に対しては混合して $Im3m$ 相へと変化させるが、 H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対してはほとんど相互作用しないことが明らかとなった。このことはこれらの液晶相の分散を行う上で重要な知見を与える。水に溶解しないこれらの液晶相を分散させるためには、用いる分散剤として、比較的親水性の高い界面活性剤が要求される。しかしそれらは高い正の自発曲率を持っているため、液晶相とよく混ざり合うならば膜の曲率を大きく変化させてしまう。低分子の界面活性剤ではその傾向が強いのにに対し、高分子界面活性剤であるF127は脂質との相溶性が低く、分散剤として有効であると結論づけられた。実際、F127を用いて高圧乳化法を行った結果、脂質液晶相を保持した微粒子、キューボソーム、ヘキサソームが得られることが判明した。

4. 2. キュボソームおよびヘキサソームの特性

NMRの結果から、外から加えられたイオンは容易にキューボソーム内部に浸透することが判明した。イオンは微粒子表面のF127の層を透過した後、内部キュービック相の水のチャンネルを自由に移動するものと考えられる。このことから、リポソームのように水溶性物質を微粒子に封入するのは困難であることが示唆された。しかし、脂質膜表面や内部に親和性のある薬物に対しては、広い表面積を有するこの微粒子が有効であると考えられる。

キューボソームとリポソームを用いた時間分割蛍光異方性測定から、脂質膜のダイナミクス、特に、脂質の曲率と膜の側方圧力の関係の評価することができた。これまで不可能であった液晶相の分光学的評価が、この液晶分散化技術により可能となった。膜のパッキングストレスは、そこに存在する酵素の活性や蛋白質の機能に大きな影響を与えるはずであり、その研究においてもこの液晶分散

微粒子が有効であると考えられる。

微粒子の DDS への応用を考える上で、血漿タンパク質との相互作用を明らかにする必要がある。その中でも血清アルブミンは MO や OA と結合することが知られており、この微粒子の代謝挙動を左右する可能性がある。実際、微粒子中の MO、OA は血清アルブミンと結合し、速やかに微粒子外へ引き抜かれることがゲル濾過クロマトグラフィにより明らかとなった。このことはこの微粒子が血中において急速に崩壊することを示している。調製、保存時においては安定でありながら、血中投与後速やかに薬物が放出されるというメカニズムは、一つの投与形態として有効であると考えられる。しかしながら、微粒子からの薬物の *sustained release* を想定するとこの特性は不利であり、血中での微粒子の早い崩壊挙動を改善する必要性が生じた。そこで、以下のように二本鎖脂質による新規の微粒子の調製に着手した。

4. 3. 二本鎖脂質によるヘキサソームの調製

キューボソーム、ヘキサソームの液晶担持微粒子としての特性を最大限に生かすためには、血漿タンパク質による構成脂質の引き抜きという微粒子崩壊メカニズムを回避させなければならない。そのためには、微粒子の構成脂質を変える必要がある。脂肪酸やモノグリセリドはアルブミンに対して高い親和性を有するが、二本鎖の脂質は結合しないので、ジグリセリドやリン脂質などを加えることでこの崩壊メカニズムを軽減あるいは回避できると考えられる。EPC と DO の混合物は *Im3m*、*Pn3m*、 H_{II} を形成することが X 線回折により判明した。F127 を用い高圧乳化を行うと、EPC の割合が多いと分散過程で多量のリボソームが形成されてしまうため、キューボソームの調製は出来なかったが、EPC と DO の等量混合物ではヘキサソームの調製が可能であることが判明した。この微粒子は予想通り、血清アルブミン水溶液中でも安定であることが判明した。

5. まとめ

高分子界面活性剤を用いた液晶相の分散安定化に成功し、液晶相の分光学的評価を可能にするなど、ほぼ順調に研究が進捗し、一定の成果を得た。微粒子の血中安定性という課題を解決すべく、今後は二本鎖脂質によるヘキサソームを新規薬物担体の有力候補として、*in vivo*、*in vitro* での検討を行う予定である。

6. 研究発表

Nakano, M., Teshigawara, T., Sugita, A., Leesajakul, W., Taniguchi, A., Kamo, T., Matsuoka, H., & Handa, T. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/ Oleic Acid/ Pluronic F127 System. *Langmuir* **18**, 9283-9288 (2002).

7. 知的所有権の取得状況

なし