

Fig.5 DSC heating traces observed with aqueous L-lysine solutions.

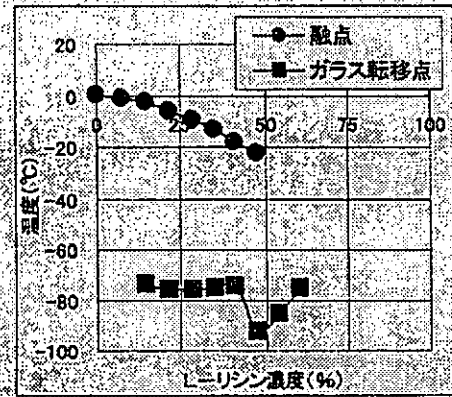


Fig.6 Solid-liquid state diagram of L-lysine -water system.

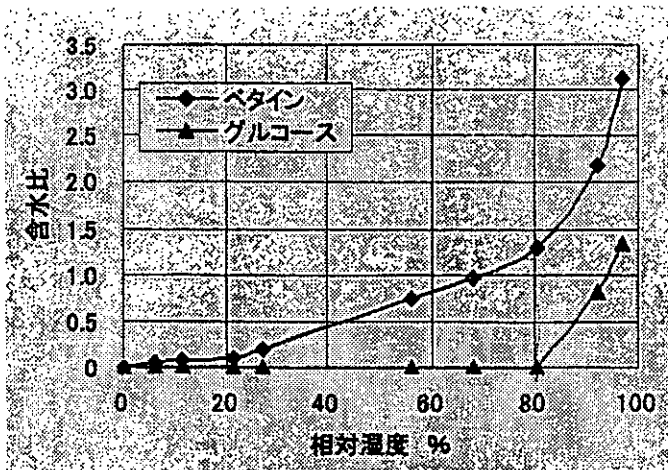


Fig.7 Water adsorption isotherms of glycine betaine and glucose. (30 °C)

ステロールグルコシドによるレチノイン酸封入リポソーム製剤の安定化に関する研究

(分担)研究者 米谷芳枝 星薬科大学医薬品化学研究所

リポソームの組成に糖脂質であるステロールグルコシド(SG)を用いて、レチノイン酸の封入率が高く、安定性の高いリポソーム製剤の調製を検討した。レチノイン酸は脂溶性薬物で、リポソーム化が困難であるが、SG を含有したジパルミトイルフォスファチルコリンリポソーム(SG-リポソーム)に封入した結果、レチノイン酸を約3モル%まで封入することができた。レチノイン酸封入 SG-リポソーム製剤は SG 非含有リポソーム製剤に比べて安定であり、4℃遮光下で24日間、83.1%薬物を含有し、平均直径は198.5nmであった。レチノイン酸の SG-リポソーム製剤は、80%のラット血清存在下で2時間インキュベーションすると、コレステロール含有リポソーム製剤より薬物の放出が少なく、安定であった。これらの結果から、SG がレチノイン酸と相互作用をしてリポソーム膜内で安定化していることが示唆された。レチノイン酸の SG-リポソーム製剤の担癌マウスにおける抗腫瘍効果は、平均生存日数では18.2日で、SG 非含有リポソーム製剤(14.1日)より高く、平均体重の減少は観察されなかった。レチノイン酸を含有するリポソーム製剤は薬物の生理活性を保持して、転移肝癌の治療に適用できる可能性が明らかになった。これらの結果から、リポソームの組成にステロールグルコシドを用いることにより、リポソームにレチノイン酸の封入率を高め、また、リポソーム製剤の安定性を高めることが可能となった。

#### A. 研究目的

レチノイドは天然と合成のビタミンAのアナログで、成長、再生、分化や免疫機能において重要な役割をする。レチノイン酸はレチノイドの一種で急性前骨髄性白血病(APL)、皮膚の扁平上皮細胞癌の治療に有効であることが知られ、臨床に用いられている。また、レチノイン酸は肝細胞のアポトーシス誘導薬である。しかし、レチノイン酸の経口投与は転移肝癌の治療においてマウスでは効果がないことが報告されている。

リポソームは毒性が低く、生体分解性脂質のベシクルで薬物の生体内分布を変化し、生物学的利用能を上昇させることが可能である。既に、リポソームを薬物の輸送担体として用いると、抗真菌薬や抗癌薬の治療係数を改良できることが明らかにされている。レチノイン酸をリポソーム化することは新規な

注射剤の開発となり、リンパ腫や白血病の治療においてレチノイン酸の有効性や持続性を高めることが可能となる。

これまでに私達は、ステロールグルコシド(SG)を含有したジパルミトイルフォスファチルコリンリポソーム(SG-リポソーム)にドキシソルビシン封入した SG-リポソーム製剤をマウスに静脈内投与すると、薬物を肝に集積させるので、M5076 転移肝癌のマウスの延命率を上昇させることを報告してきた。そこで、この研究ではレチノイン酸を封入した SG-リポソーム製剤の調製と安定性、また、M5076 の転移肝癌マウスにおける抗腫瘍効果についても調べた。

#### B 試料および方法

ジパルミトイルフォスファチルコリン(DPPC)とコレステロール(Ch)はシグマ製、レチノイン酸(ATRA)は

和光製、SGは大豆から抽出された混合物で龍角散から供与され、構造式を図1aに示す。その他の試薬は特級を用いた。

リポソームの調製は、逆相蒸発法を用いた。SG-リポソームの組成は、60  $\mu$  mol DPPC、10  $\mu$  mol SG、1~10  $\mu$  mol ATRA、30  $\mu$  mol Ch、非SG-リポソームの組成は、60  $\mu$  mol DPPC、1~10  $\mu$  mol ATRA、40  $\mu$  mol Chとした(図1b)。

リポソームの粒子径は動的レーザー光散乱計によって測定した。

レチノイン酸(図1c)のリポソームへの封入率は、HPLCによって測定した。

#### 安定性の測定

2.9mol%ATRA封入SG-リポソームを4℃と25℃の遮光下と非遮光下で保存後、ゲルろ過をして、リポソーム分画とフリーATRA分画のATRAをHPLCで定量して、リポソーム製剤の安定性を評価した。

80%のラット血清存在下での各ATRA封入SG-リポソームの安定性は、カルセインを封入したATRA・SG-リポソームを調製して、37℃で2時間インキュベーションしたときの放出されたカルセインの蛍光を定量して評価した。

#### 抗腫瘍効果

SPFの雌性C57BL/6マウスを東京実験動物から購入した。マウスのM5076は癌化学療法研究所の矢守博士から供与していただいた。治療は、癌を接種して8日目に2.9mol%ATRA封入SG-リポソームを0.585mg ATRA/kgで静脈内投与した。コントロールとしては生理食塩液を用いた。

#### C 結果および考察

ATRAは疎水性薬物であるので、リポソームの脂質膜に封入されると考えられ、その封入には限界があると推測される。調製時の各ATRA濃度、リポソームに封入されたATRA濃度とそのリポソームの粒子径を表1に示す。2.9mol%ATRAでは、SG-リポソームと非SG-リポソームでそれぞれ56.7%と64.2%と封入率に大きな違いは見られなかったが、非SG-リポソームでは封入率のばらつきが大きく、ATRAを封入すると不安定になることが示唆された(表1)。浅

井らは、約5mol%より過剰なATRAは、リポソームから分離してエマルジョンを作ると報告しているが、粒子径測定結果からは、1つのピークが観察されるのみであった。これらの結果から、SGがATRAと相互作用をしてリポソーム膜内で安定化していることが示唆された。

2.9mol%ATRA封入SG-リポソームの4℃と25℃での遮光下と非遮光下で20日間保存後のATRAの安定性を調べた結果、粒子径には大きな変化はなかったが(図2)、25℃で非遮光下では両リポソームとも不安定で、6日間でそれぞれ約7%と20%ATRAが残存した。25℃で遮光下ではSG-リポソームは、非SG-リポソームより安定であった。4℃で遮光下では非SG-リポソームは不安定であったが、2.9mol%SG-リポソームは安定で、24日後で83.1%のATRAが残存した(図3)。

80%のラット血清存在下でのSG-リポソームの安定性は、カルセイン封入ATRA・SG-リポソームを、37℃で2時間インキュベーションしたとき、9.1mol%ATRAを除き、カルセインの放出は少なく安定であった(図4a)。一方、カルセイン封入ATRA・非SG-リポソームは、カルセインを放出して不安定であった(図4b)。これらの結果から、血清存在下で安定であった2.9mol%ATRA・SG-リポソームをin vivoでの実験に用いることにした。

ATRA・SG-リポソームの担癌マウスにおける抗腫瘍効果は、平均生存日数が18.2日であり、SG非含有リポソーム(14.1日)より高く、また、平均体重の減少は観察されなかった(表2)。これらの結果から、ATRAはリポソーム調製時に超音波や有機溶媒に触れるが、抗腫瘍効果の生理活性を保持していることが明らかになった。

#### D 結論

リポソームの組成にステロールグルコシドを用いることにより、リポソームにレチノイン酸の封入率を高め、また、リポソーム製剤の安定性を高めることが可能となった。レチノイン酸を含有する静脈内投与可能なリポソーム製剤は薬物の生理活性を保持して、M5076の転移肝癌に適用できる可能性を明ら

和光製、SGは大豆から抽出された混合物で龍角散から供与され、構造式を図1に示す。その他の試薬は特級を用いた。

リポソームの調製は、逆相蒸発法を用いた。SG-リポソームの組成は、60  $\mu$  mol DPPC、10  $\mu$  mol SG、1~10  $\mu$  mol ATRA、30  $\mu$  mol Ch、非 SG-リポソームの組成は、60  $\mu$  mol DPPC、1~10  $\mu$  mol ATRA、40  $\mu$  mol Chとした。

リポソームの粒子径は動的レーザー光散乱計によって測定した。

レチノイン酸のリポソームへの封入率は、HPLCによって測定した。

#### 安定性の測定

2.9mol%ATRA 封入 SG-リポソームを4℃と25℃の遮光下と非遮光下で保存後、ゲルろ過をして、リポソーム分画とフリーATRA 分画の ATRA を HPLC で定量して、リポソーム製剤の安定性を評価した。

80%のラット血清存在下での各 ATRA 封入 SG-リポソームの安定性は、カルセインを封入した ATRA・SG-リポソームを調製して、37℃で2時間インキュベーションしたときの放出されたカルセインの蛍光を定量して評価した。

#### 抗腫瘍効果

SPF の雌性 C57BL/6 マウスを東京実験動物から購入した。マウスの M5076 は癌化学療法研究所の矢守博士から供与していただいた。治療は、癌を接種して8日目に 2.9mol%ATRA 封入 SG-リポソームを0.585mg ATRA /kgで静脈内投与した。コントロールとしては生理食塩液を用いた。

#### C 結果および考察

ATRA は疎水性薬物であるので、リポソームの脂質膜に封入されると考えられ、その封入には限界があると推測される。調製時の各 ATRA 濃度、リポソームに封入された ATRA 濃度とそのリポソームの粒子径を表1に示す。2.9mol%ATRA では、SG-リポソームと非 SG-リポソームでそれぞれ 56.7%と 64.2%と封入率に大きな違いは見られなかったが、非 SG-リポソームでは封入率のばらつきが大きく、ATRA を封入すると不安定になることが示唆された(表1)。浅

井らは、約 5mol%より過剰な ATRA は、リポソームから分離してエマルジョンを作ると報告しているが、粒子径測定結果からは、1つのピークが観察されるのみであった。これらの結果から、SG が ATRA と相互作用をしてリポソーム膜内で安定化していることが示唆された

2.9mol%ATRA 封入 SG-リポソームの4℃と25℃での遮光下と非遮光下で20日間保存後の ATRA の安定性を調べた結果、粒子径には大きな変化はなかったが(図2)、25℃で非遮光下では両リポソームとも不安定で、6日間でそれぞれ約7%と20%ATRA が残存した。25℃で遮光下ではSG-リポソームは、非SG-リポソームより安定であった。4℃で遮光下では非SG-リポソームは不安定であったが、2.9mol%SG-リポソームは安定で、24日後で83.1%の ATRA が残存した(図3)。

80%のラット血清存在下での SG-リポソームの安定性は、カルセイン封入 ATRA・SG-リポソームを、37℃で2時間インキュベーションしたとき、9.1mol%ATRA を除き、カルセインの放出は少なくとも安定であった(図4a)。一方、カルセイン封入 ATRA・非 SG-リポソームは、カルセインを放出して不安定であった(図4b)。これらの結果から、血清存在下で安定であった2.9mol%ATRA・SG-リポソームを in vivo での実験に用いることにした。

ATRA・SG-リポソームの担癌マウスにおける抗腫瘍効果は、平均生存日数が18.2日であり、SG非含有リポソーム(14.1日)より高く、また、平均体重の減少は観察されなかった(表2)。これらの結果から、ATRA はリポソーム調製時に超音波や有機溶媒に触れるが、抗腫瘍効果の生理活性を保持していることが明らかになった。

#### D 結論

リポソームの組成にステロールグルコシドを用いることにより、リポソームにレチノイン酸の封入率を高め、また、リポソーム製剤の安定性を高めることが可能となった。レチノイン酸を含有する静脈内投与可能なリポソーム製剤は薬物の生理活性を保持して、M5076 の転移肝癌に適用できる可能性を明ら

かにした。

## E 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. Shimizu, K. Tamagawa, N. Takahashi, K. Takayama, and Y. Maitani, Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid – loaded liposomes contained sterylglucoside mixture, *Int. J. Pharm.*, 258(1-2) 45-53 (2003).

K. G. Lau, S. Chopra and Y. Maitani, Entrapment of bleomycin in ultra-deformable liposomes, *S.T.P. Pharm.* 13(1) 241-245 (2003).

X. Qi, M. H. Liu, H.Y. Liu, Y. Maitani, and T. Nagai, Topical econazole delivery using liposomal gel, *S.T.P. Pharm.* 13(4) 241-245 (2003).

N. Takahashi, K. Tamagawa, K. Shimizu, T. Fukui, and Y. Maitani, Effects on M5076-hepatic metastasis of retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, fenretinide entrapped in SG-liposomes, *Biol Pharm Bull.* 26(7)1060-3 (2003).

C. Xiao, X. Qi, Y. Maitani, and T. Nagai, Sustained-release of cisplatin from multivesicular

liposomes: potentiation of antitumour efficacy against S180 murine carcinoma, *J. Pharm. Sci.*, in press.

Y. Maitani, K. Nakamura, and K. Kawano, Application of sterylglucoside-containing particles for drug delivery, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, accepted..

### 2. 学会発表

田村麻衣、永井恒司、米谷芳枝、エタノール注入法による微粒子製剤の特性、日本薬学会 122年会 (長崎)2003 年 3 月

Y. Maitani, S. Yano, and K. Hayashi, Liposome vector containing biosurfactant-complexed DNA and entrapping DNA as herpes simplex virus thymidine kinase gene delivery system *in vitro* and *in vivo*: *Proceedings of 6<sup>th</sup> international conference of Liposome Advances*, p.109, London, UK, Dec. 15-19, 2003.

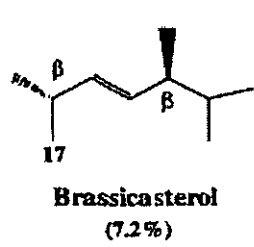
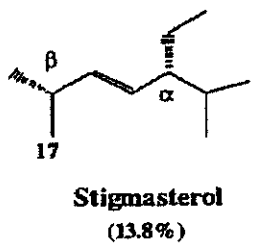
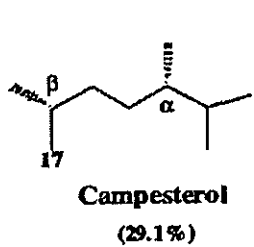
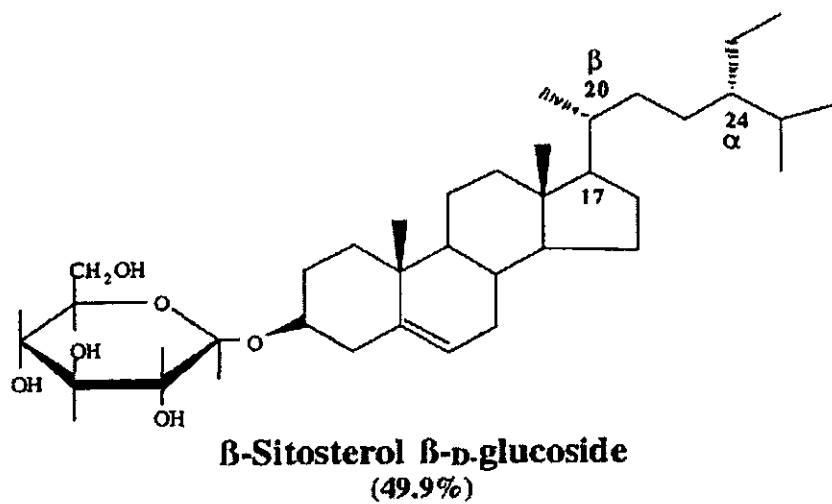


Fig. 1a Chemical structure of the soybean-derived sterylglucoside mixture (SG). The numbers in parentheses represent the mixture ratio in SG.

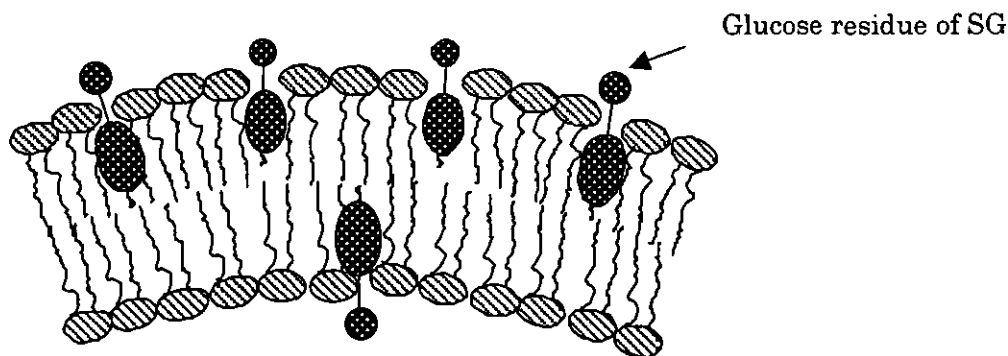
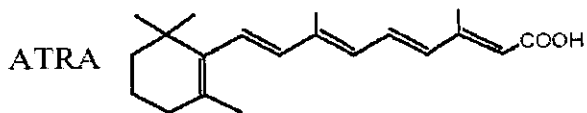


Fig. 1b Schematic representation of molecular interaction between DPPC and SG in liposomes



M.W. 300  
m.p. 180-182°C/ethanol

Fig. 1c Chemical structure of retinoic acid (ATRA)

Table 1  
Effects of ATRA/lipid (mol%) on entrapment efficiency and particle size of SG and non-SG liposomes after gel filtration<sup>a</sup>

Liposomes	ATRA/lipid (mol%)	ATRA ( $\mu\text{M}$ )	Entrapment efficiency (%)	Mean particle size
SG liposomes	0	-	-	162.1 $\pm$ 1.7
	1	23.7 $\pm$ 4.2	84.5 $\pm$ 15.2	171.6 $\pm$ 6.3
	2.9	47.3 $\pm$ 19.4	56.7 $\pm$ 23.3	174.3 $\pm$ 4.7
	4.8	52.8 $\pm$ 26.7	38.0 $\pm$ 19.2	157.8 $\pm$ 2.0
	9.1	125.0 $\pm$ 19.4	45.0 $\pm$ 0.7	167.4 $\pm$ 5.3
Non-SG liposomes	0	-	-	172.6 $\pm$ 1.9
	1	28.8 $\pm$ 19.2	103.6 $\pm$ 69.0	155.4 $\pm$ 3.7
	2.9	53.5 $\pm$ 25.1	64.2 $\pm$ 30.1	175.6 $\pm$ 4.7
	4.8	110.6 $\pm$ 49.7	79.6 $\pm$ 35.8	182.8 $\pm$ 11.0
	9.1	140.0 $\pm$ 66.9	50.4 $\pm$ 24.1	191.3 $\pm$ 6.7

<sup>a</sup> Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

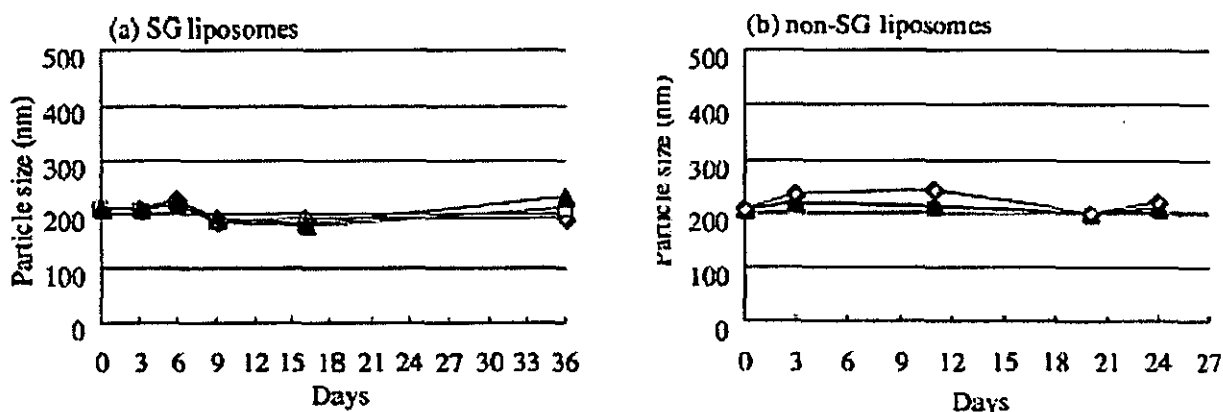


Fig. 2. Change of mean diameter of liposomes prepared with 2.9 mol% ATRA at 4 and 25°C as a function of time. ( $\diamond$ ) 25°C (open), ( $\square$ ) 25°C (close), ( $\blacktriangle$ ) 4°C.

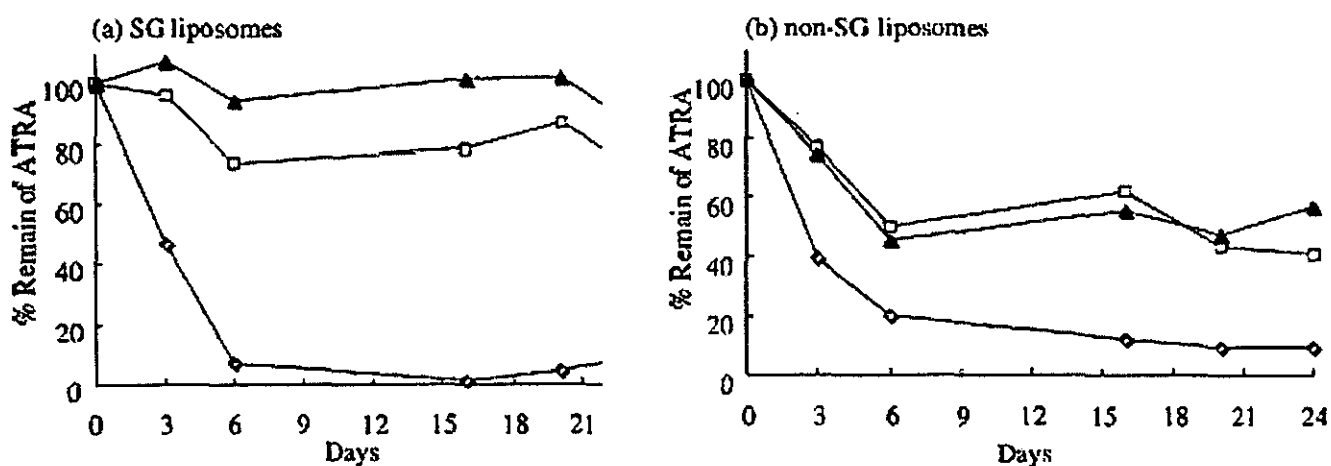


Fig. 3. Percentage of remaining ATRA in liposomes prepared with 2.9 mol% ATRA composed of SG liposomes (a) and non-SG liposomes (b). ( $\diamond$ ) 25°C (open), ( $\square$ ) 25°C (close), ( $\blacktriangle$ ) 4°C.

Table 2  
Effect of ATRA-loaded SG liposomes on hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma

Preparation	Dose (mg/kg)	Survival time (days)			I.L.S. (%) <sup>a</sup>	Mean body weight change (%) <sup>b</sup> (S.D.)
		15 days	Mean (S.D.)	Median		
Saline		0.9	14.1 (0.9)	15		6.9 (5.8)
SG liposomes	0.585	7.9	18.2 (2.7) <sup>c</sup>	18	20.0	7.9 (2.1)

<sup>a</sup> Percentage increase in life span,  $[(T/C - 1) \times 100 (\%)]$ , where *T* and *C* represent the median survival time (days) of the treated and control animals, respectively.

<sup>b</sup> Average and standard deviation of body weight change from 0 to 13.

<sup>c</sup> *P* < 0.01 compared to value for saline group.

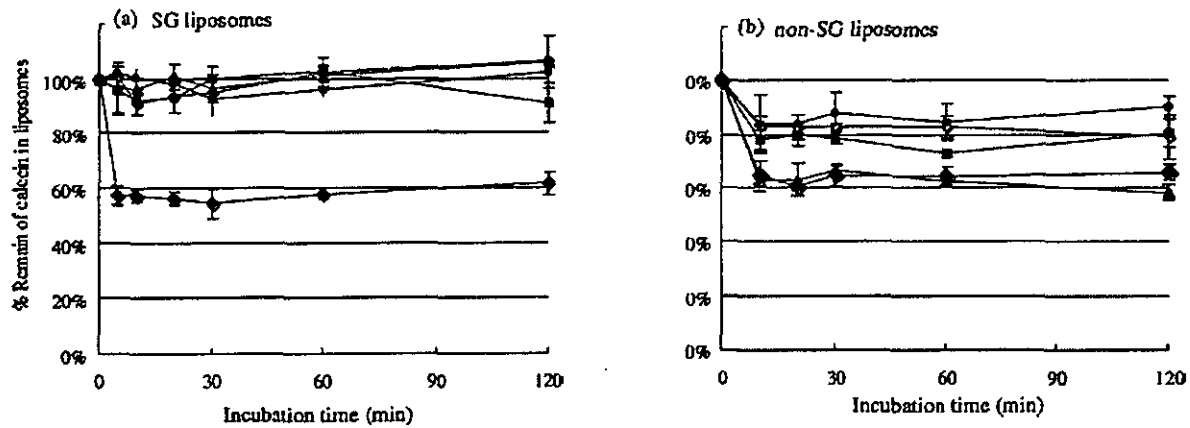


Fig. 4. Time-course of calcein release from liposomes in 80% rat serum. ATRA in the lipid mixture was 0% (◇), 1.0% (■), 2.9% (●), 4.8% (▲), 9.1% (◆). Each value represents mean  $\pm$  S.D. (*n* = 3).



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.	93,	384-391	2004
S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima	Molecular mobility of lyophilized poly(vinylpyrrolidone) and methylcellulose as determined by the laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times of <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C	Chem. Pharm. Bull.	51,	1289-1292	2003
S. Yoshioka, S. Tajima, Y. Aso, S. Kojima	Inactivation and aggregation of $\beta$ -galactosidase in lyophilized formulation described by Kohlrausch-Williams-Watts stretched exponential function,	Pharm. Res.	20	1655-1660	2003
S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima	Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamics simulation	Pharm. Res.	20	873-878	2003
村勢則郎	高分子ゲルビーズの凍結と乾燥	低温生物工学会誌	49	63-67	2003
N. Murase	Vitrified water in frozen polymer gels	Proceeding of International Congress of Refrigeration		ICR0377	2003
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. Shimizu, K. Tamagawa, N. Takahashi, K. Takayama, and Y. Maitani	Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid - loaded liposomes contained sterylglucoside mixture	Int. J. Pharm	258(1-2)	45-53	2003
W. Junping, K. Takayama, T. Nagai, Y. Maitani	Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid, vitamin E and cholesterol	Int. J. Pharm	251	13-21	2003
K. Nakamura, K. Takayama, T. Nagai, Y. Maitani	Regional intestinal absorption of FITC-dextran 4400 with nanoparticles based on $\beta$ -sitosterol $\beta$ -D-glucoside in rats	J. Pharm. Sci.	92	311-318	2003
N. Takahashi, K. Tamagawa, K. Shimizu, T. Fukui, and Y. Maitani	Effects on M5076-hepatic metastasis of retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide, fenretinide entrapped in SG-liposomes,	Biol Pharm Bull.	26(7)	1060-3	2003

20031262

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