

Fig. 5. RT-PCR detection of LAT1, LAT2 and 4F2hc mRNAs in HeLa and C6 cells. First-strand cDNAs prepared from cultured C6 glioma and HeLa cells were used as templates for PCR amplification. The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide.

there was far less radioactivity in the normal tissue in the case of the image obtained with the D-isomer of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT: SUVs for D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT and L-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT were 0.488 and 0.874, respectively.

Finally, the in vivo tumor imaging in the brain tumor model was examined. Data were displayed as the image of

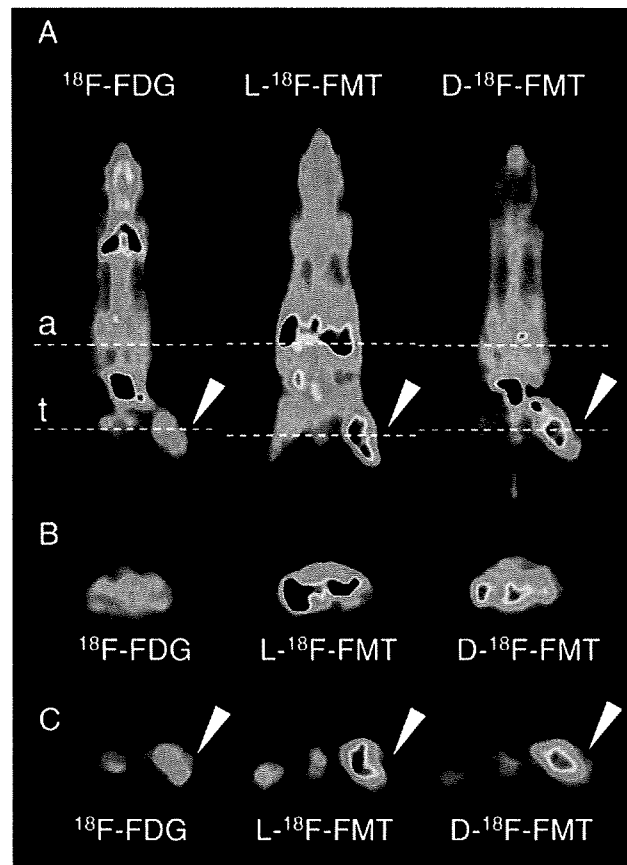


Fig. 6. Small-animal PET images of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, L-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT and D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT in tumor-bearing mice. Mice were inoculated with HeLa cells, and radiolabeled compounds were injected intravenously for the PET imaging. Coronal plane images (A), axial plane images of the abdominal region (B) and axial plane images of tumor implanted region (C) after injection of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, L-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT or D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT are shown. The broken lines "a" and "t" indicate the position of the axial plane image of the abdominal region (B) and the tumor region (C), respectively. The arrowhead points to the tumor. The typical images from multiple independent experiments ( $n > 3$ ) are shown.

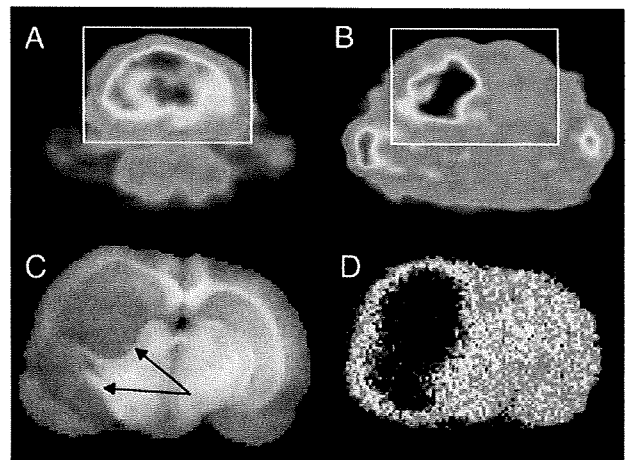


Fig. 7. Small-animal PET images of D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG in a brain tumor-bearing rat. PET imaging of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (A) and D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT (B) was performed in the same rat bearing a C6 glioma brain tumor. The brain area in the PET image is indicated by the square. After the PET study with D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT, brain slices were prepared to confirm the location of the tumor (arrows, C) and to detect the radioactivity of D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT in the brain by autoradiography (D). Note that images in (C) and (D) are expanded beyond the square region (brain). Five separate experiments were performed, and similar results were obtained. Data typical of one of them are shown here.

the D-isomer of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT in comparison with that of [ $^{18}\text{F}$ ]FDG in the rat C6 glioma orthotopic brain tumor model, as shown in Fig. 7. In this model of brain tumor, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG could not detect the tumor specifically due to the high background in the normal brain tissue (Fig. 7A). In contrast, D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT showed a lower accumulation in the normal region of the brain (Fig. 7B), and thus the tumor region in the brain was imaged. (Comment in Fig. 7C and D).

#### 4. Discussion

In the present study, we investigated the properties of  $^{18}\text{F}$ -labeled D- and L-isomers of artificial amino acid FMT in relation to their transport activity in cultured C6 glioma and HeLa cells. In addition, the specificity of amino acid transporters engaged in the transport of D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT was examined.

Concerning  $^{18}\text{F}$ -PET studies, positron emitter-labeled diagnostic drugs possess very high specific radioactivity: specific activities of D-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT, L-[ $^{18}\text{F}$ ]FMT and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG in the present study were  $115 \pm 10$ ,  $126 \pm 12$  and  $144 \pm 21$  GBq/ $\mu\text{mol}$ , respectively. Therefore, the experiment was performed by using amino acids at the tracer level concentration. The uptake study on the D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT in C6 glioma and HeLa cells in HBSS suggested that the incorporation was mediated by a stereo-selective amino acid transporter, since the L-isomer was incorporated much faster than the D-isomer (Fig. 1).

The release of D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT was examined by use of HeLa cells preloaded with each isomer

of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT. The release of D- $^{18}\text{F}$ ]FMT from the cells was slower than that of L-isomer (Fig. 2A). This result is consistent with the uptake data. Since intra/extracellular amino acid exchange was reported as a feature of the system L amino acid transport system [25], the presence of extracellular amino acid would enhance the release of intracellular [ $^{18}\text{F}$ ]FMT in system L. In fact, the release of both D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT was up-regulated by extracellular 100  $\mu\text{M}$  L-leucine, a typical substrate of system L (Fig. 2B). The physiological concentration of leucine in human plasma is approx. 100  $\mu\text{M}$ , as reported previously [34,37]. Considering the situation of tumor cells in the living body, there would be plenty of extracellular amino acids in the plasma; and they would have an effect on both the uptake and release of amino acid-related PET tracers.

To clarify the involvement of the transport system in [ $^{18}\text{F}$ ]FMT uptake, we examined the inhibition of uptake of the D- or L-isomer of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT by the L-isomer of various amino acids and by a system L selective inhibitor, BCH, in C6 glioma cells. BCH is an amino acid-related compound that competitively inhibits both LAT1 and LAT2. Large neutral amino acids (L-methionine, L-phenylalanine and L-tyrosine) and BCH inhibited the uptake of both D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT completely; but L-glycine, a small neutral amino acid, did not inhibit it at all (Fig. 3A). Furthermore, system L is known to be a  $\text{Na}^+$ -independent amino acid transporter [24,25]. To make clear the character of the transport system, we examined the  $\text{Na}^+$  dependency of uptake of D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT. The uptake of D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT was not affected by the presence of  $\text{Na}^+$  ions (Fig. 3B).

Moreover, the RT-PCR experiment done to determine the expression of the major system L transporters LAT1 and LAT2 and their functional associated protein 4F2hc indicated that both C6 glioma and HeLa cells expressed LAT1 and 4F2hc mRNA but not LAT2 (Fig. 5). These results suggest that the major transporter of system L in C6 glioma and HeLa cells was LAT1. Based on these results taken together, we conclude that both D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT were transported via LAT1 in C6 glioma and HeLa cells. However, the involvement of other transport systems in the actual or in the other tumors is possible.

The dose-dependent inhibitory effect of BCH on D- or L-isomer of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT uptake (Fig. 4A) indicated that there was little difference in the  $\text{IC}_{50}$  value between D- and L-isomers. Comparison of the inhibitory effect of D and L isomers of leucine on the uptake of FMT showed that the uptake of L- $^{18}\text{F}$ ]FMT was inhibited at low concentrations of these isomers (Fig. 4B and C). Under physiological conditions, the concentration of amino acids transported via the system L in the plasma is far higher than 100  $\mu\text{M}$  [34]. These data suggest that both D- and L-isomers of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT would be competitively transported by system L transporters.

To develop tumor-detecting agents, it is important to have not only higher accumulation in the tumor but also a lower background. This tumor/normal tissue ratio of accumulation highly influences the contrast obtained. Previous reports

indicated that the accumulation of [ $^{18}\text{F}$ ]FMT in tumors evaluated by SUV did not differ between D- and L-isomers during a 60-min post administration, but showed that the tumor/blood ratio was significantly different [32,33]. In the present study, we also observed that the SUV of L-isomer was quite similar to that of the D-isomer in tumor tissue, although the latter was only about one-half of the former in normal tissue. At the time point of 60 min, the tumor/blood ratio of D- $^{18}\text{F}$ ]FMT was twice as high as that of the L-isomer [32,33]. A previous report suggested that the L-configuration of amino acids is required for the optimal active reabsorption in the renal tubules [38]. D-Isomer of amino acids might be less reabsorbed and consequently more excreted than that of L-isomer. Therefore, as a result, the contrast imaging of tumors was achieved by D- $^{18}\text{F}$ ]FMT.

For in vivo evaluation of D- $^{18}\text{F}$ ]FMT, we adopted a mouse xenotransplantation model using human tumor cells as a small-animal model for predicting the accumulation of tumor tracer candidates in human tumor cells. [ $^{18}\text{F}$ ]FDG was accumulated not only in the tumor but also in the brain and in the heart. There was not a large difference between the accumulations of L- and D- $^{18}\text{F}$ ]FMT in the tumor. However, the accumulation of the tracer in the normal tissue around the tumor, abdominal, chest and brain region was considerably lower with D- $^{18}\text{F}$ ]FMT than with L- $^{18}\text{F}$ ]FMT. These results suggest that D- $^{18}\text{F}$ ]FMT is more suitable for a tumor-detecting agent.

Finally, we evaluated tumor imaging with D- $^{18}\text{F}$ ]FMT by using a rat allograft orthotopic brain tumor model. A current report suggests that there is a significant difference in some pathological and pharmacological features between orthotopic tumor models and ectopic tumor models in rodents [39]. Because the conditions of tissues and the bloodstream around the tumor are important for the evaluation of tumor-imaging agents, we selected a rat orthotopic tumor model. With rats bearing C6 glioma transplanted into their left middle brain, we conducted a small-animal PET experiment using D- $^{18}\text{F}$ ]FMT. The positron emitter-labeled tracer was injected via a tail vein. The brain tumor, which could not be detected by [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET due to high background, was imaged by D- $^{18}\text{F}$ ]FMT. The region of the tumor and autoradiographic image visualized on tumor slices well correlated with the D- $^{18}\text{F}$ ]FMT accumulation imaged by PET. These results suggest that D- $^{18}\text{F}$ ]FMT might be a useful tracer for tumor detection.

## 5. Conclusions

This study demonstrated that the artificial large neutral amino acid FMT was accumulated into tumor cells via amino acid transporters. The LAT1 system L transporter was suggested to be the transporter, at least in C6 glioma and HeLa cells. The uptake, release and exchange of L- $^{18}\text{F}$ ]FMT were more affected by a physiological concentration of extracellular amino acids than those of the D-isomer. D- $^{18}\text{F}$ ]F

FMT gave the high-contrast image of the tumor due to the low background. The utility of D- $^{18}\text{F}$ FMT was especially demonstrated in the orthotopic brain tumor model. Thus D- $^{18}\text{F}$ FMT appears promising as a tumor-detecting agent for PET diagnosis.

### Acknowledgments

We gratefully acknowledge Mr. Kengo Sato and Mr. Norihiro Harada (Hamamatsu Photonics K.K.) for the synthesis of D- and L-isomers of  $^{18}\text{F}$ FMT.

### References

- [1] Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T, Tamahashi N. Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med* 1994;35:104–12.
- [2] Ishiwata K, Vaalburg W, Elsinga PH, Paans AM, Woldring MG. Comparison of L-[ $^{11}\text{C}$ ]methionine and L-methyl-[ $^{11}\text{C}$ ]methionine for measuring in vivo protein synthesis rates with PET. *J Nucl Med* 1988; 29:1419–27.
- [3] Comar D, Cartron J, Maziere M, Marazano C. Labelling and metabolism of methionine-methyl- $^{11}\text{C}$ . *Eur J Nucl Med* 1976;1:11–4.
- [4] Ishiwata K, Vaalburg W, Elsinga PH, Paans AM, Woldring MG. Metabolic studies with L-[ $^{14}\text{C}$ ]tyrosine for the investigation of a kinetic model to measure protein synthesis rates with PET. *J Nucl Med* 1988;29:524–9.
- [5] Barrio JR, Keen RE, Ropchan JR, MacDonald NS, Baumgartner FJ, Padgett HC, et al. L-[ $^{11}\text{C}$ ]leucine: routine synthesis by enzymatic resolution. *J Nucl Med* 1983;24:515–21.
- [6] Casey DL, Digenis GA, Wesner DA, Washburn LC, Chaney JE, Hayes RL, et al. Preparation and preliminary tissue studies of optically active  $^{11}\text{C}$ -D- and L-phenylalanine. *Int J Appl Radiat Isot* 1981;32:325–30.
- [7] Lemaire C, Guillaume M, Christiaens L, Palmer AJ, Cantineau R. A new route for the synthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroaromatic substituted amino acids: no carrier added L-p-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorophenylalanine. *Int J Rad Appl Instrum [A]* 1987;38:1033–8.
- [8] Coenen HH, Kling P, Stocklin G. Cerebral metabolism of L-[ $^{18}\text{F}$ ] fluorotyrosine, a new PET tracer of protein synthesis. *J Nucl Med* 1989;30:1367–72.
- [9] Ishiwata K, Kawamura K, Wang WF, Furumoto S, Kubota K, Pascali C, et al. Evaluation of O-[ $^{11}\text{C}$ ]methyl-L-tyrosine and O-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoromethyl-L-tyrosine as tumor imaging tracers by PET. *Nucl Med Biol* 2004;31:191–8.
- [10] Wester HJ, Herz M, Weber W, Heiss P, Senekowitsch-Schmidtker R, Schwaiger M, et al. Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[ $^{18}\text{F}$ ] fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med* 1999;40:205–12.
- [11] Heiss P, Mayer S, Herz M, Wester HJ, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtker R. Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 1999;40:1367–73.
- [12] Tang G, Tang X, Wang M, Luo L, Gan M. Fully automated synthesis of O-(3-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoropropyl)-L-tyrosine by direct nucleophilic exchange on a quaternary 4-aminopyridinium resin. *Appl Radiat Isot* 2003;58: 685–9.
- [13] Tang G, Wang M, Tang X, Luo L, Gan M. Synthesis and evaluation of O-(3-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoropropyl)-L-tyrosine as an oncologic PET tracer. *Nucl Med Biol* 2003;30:733–9.
- [14] Ishiwata K, Kasahara C, Hatano K, Ishii S, Senda M. Carbon-11 labeled ethionine and propionine as tumor detecting agents. *Ann Nucl Med* 1997;11:115–22.
- [15] Tamemasa O, Goto R, Takeda A, Maruo K. High uptake of  $^{14}\text{C}$ -labeled D-amino acids by various tumors. *Gann* 1982;73:147–52.
- [16] Takeda A, Goto R, Tamemasa O, Chaney JE, Digenis GA. Biological evaluation of radiolabeled D-methionine as a parent compound in potential nuclear imaging. *Radioisotopes* 1984;33:213–7.
- [17] Goto R, Unno K, Takeda A, Okada S, Tamemasa O. Tumor accumulation of D-selenomethionine- $^{75}\text{Se}$  in tumor-bearing mice. *J Pharmacobiodyn* 1987;10:456–61.
- [18] Martineau M, Baux G, Mothet JP. D-Serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci* 2006;29:481–91.
- [19] Long Z, Sekine M, Adachi M, Furuchi T, Imai K, Nimura N, et al. Cell density inversely regulates D- and L-aspartate levels in rat pheochromocytoma MPT1 cells. *Arch Biochem Biophys* 2002;404: 92–7.
- [20] Bendikov I, Nadri C, Amar S, Panizzutti R, De Miranda J, Wolosker H, et al. A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007;90:41–51.
- [21] Katsuki H, Nonaka M, Shirakawa H, Kume T, Akaike A. Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrotical slices. *J Pharmacol Exp Therapeut* 2004;311:836–44.
- [22] Homma H. Biochemistry of D-aspartate in mammalian cells. *Amino Acids* 2007;32:3–11.
- [23] Kanai Y, Endou H. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab* 2001;2:339–54.
- [24] Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 1998;273:23629–32.
- [25] Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na<sup>+</sup>-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 1999;274:19745–51.
- [26] Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 1999;274:3009–16.
- [27] Kim DK, Kim IJ, Hwang S, Kook JH, Lee MC, Shin BA, et al. System L-amino acid transporters are differentially expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells. *Neurosci Res* 2004;50:437–46.
- [28] Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:291–302.
- [29] Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, et al. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255:283–8.
- [30] Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, et al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999;274:19738–44.
- [31] Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, et al. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 1999;274:34948–54.
- [32] Tsukada H, Sato K, Fukumoto D, Kakiuchi T. Evaluation of D-isomers of O- $^{18}\text{F}$ -fluoromethyl, O- $^{18}\text{F}$ -fluoroethyl and O- $^{18}\text{F}$ -fluoropropyl tyrosine as tumour imaging agents in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006;33:1017–24.
- [33] Tsukada H, Sato K, Fukumoto D, Nishiyama S, Harada N, Kakiuchi T. Evaluation of D-isomers of O- $^{11}\text{C}$ -methyl tyrosine and O- $^{18}\text{F}$ -fluoromethyl tyrosine as tumor-imaging agents in tumor-bearing mice: comparison with L- and D- $^{11}\text{C}$ -methionine. *J Nucl Med* 2006; 47:679–88.
- [34] Gitlitz PH, Sunderman Jr FW, Hohnadel DC. Ion-exchange chromatography of amino acids in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing. *Clin Chem* 1974;20:1305–12.

- [35] Oberdorfer F, Hull WE, Traving BC, Maier-Borst W. Synthesis and purification of 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose and 2-deoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-mannose: characterization of products by <sup>1</sup>H- and <sup>19</sup>F-NMR spectroscopy. *Int J Rad Appl Instrum [A]* 1986;37:695–701.
- [36] Takeda A, Tamano H, Oku N. Alteration of zinc concentrations in the brain implanted with C6 glioma. *Brain Res* 2003;965:170–3.
- [37] Fernstrom JD, Larin F, Wurtman RJ. Daily variations in the concentrations of individual amino acids in rat plasma. *Life Sci Pt* 1971;10:813–9.
- [38] Williams WM, Huang KC. Structural specificity in the renal tubular transport of tyrosine. *J Pharmacol Exp Therapeut* 1981;219:69–74.
- [39] Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* 1994;56:4–8.



## In Vivo Distribution of Liposome-Encapsulated Hemoglobin Determined by Positron Emission Tomography

\*Takeo Urakami, †Akira T. Kawaguchi, ‡Shuji Akai, \*Kentaro Hatanaka, \*Hiroyuki Koide, \*Kosuke Shimizu, \*Tomohiro Asai, §Dai Fukumoto, §Norihiro Harada, §Hideo Tsukada, and \*Naoto Oku

*\*Department of Medical Biochemistry and Global COE Program, and ‡Synthetic Organic Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka; †Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa; and §Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Shizuoka, Japan*

**Abstract:** Positron emission tomography (PET) is a non-invasive imaging technology that enables the determination of biodistribution of positron emitter-labeled compounds. Lipidic nanoparticles are useful for drug delivery system (DDS), including the artificial oxygen carriers. However, there has been no appropriate method to label preformulated DDS drugs by positron emitters. We have developed a rapid and efficient labeling method for lipid nanoparticles and applied it to determine the movement of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH). Distribution of LEH in the rat brain under ischemia was examined by a small animal PET with an enhanced resolution. While the blood flow was almost absent in the

ischemic region observed by [<sup>15</sup>O]H<sub>2</sub>O imaging, distribution of <sup>18</sup>F-labeled LEH in the region was gradually increased during 60-min dynamic PET scanning. The results suggest that LEH deliver oxygen even into the ischemic brain from the periphery toward the core of ischemia. The real-time observation of flow pattern, deposition, and excretion of LEH in the ischemic rodent brain was possible by the new methods of positron emitter labeling and PET system with a high resolution. **Key Words:** Liposome-encapsulated hemoglobin—Positron emission tomography—Pharmacokinetics—Brain ischemia—Drug delivery system.

Liposome encapsulation has been used for drug delivery system (DDS) in a wide range of applications, including chemotherapeutics (1), photosensitizers (2), and nucleic acid derivatives (3). Recently, human hemoglobin was encapsulated in liposome nanocapsule (liposome-encapsulated hemoglobin [LEH]) to be an artificial oxygen carrier as a substitute for red blood cells (RBCs) (4,5). In order to clarify the behavior of LEH in vivo, noninvasive, real-time imaging of their movement is desirable. Positron emission tomography (PET) is a noninvasive tech-

nique that has been used for clinical applications for diagnosis, as well as for functional evaluation. This technique can also be applied to pharmacokinetic studies to monitor the distribution and quantification of drugs far more quickly and cost-effectively than the conventional techniques requiring sacrifice and dissection of the animals (6,7). Nonetheless, there have been certain limitations in PET studies, including the labeling with positron emitters, its half-life, and difficulty in handling. When the small molecular-weight compound is a target, the compound has to be labeled directly with positron emitters. When it comes to labeling preformulated drugs such as DDS drugs and LEH, the process of the formulation requires specific facilities and multiple steps, prohibiting labeling the composition of DDS drugs or LEH with positron emitters with short half-lives. Therefore, we have developed a solid-phase transition (SopHT) method for labeling preformulated liposomal drugs (8). In the current study, LEH was labeled

doi:10.1111/j.1525-1594.2008.00702.x

Received May 2008; revised October 2008.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Naoto Oku, Department of Medical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan. E-mail: oku@u-shizuoka-ken.ac.jp

Presented in part at the 2007 Joint Congress of Japanese Society for Artificial Organs and the International Federation for Artificial Organs held on October 28–31, 2007 in Osaka, Japan.

with a novel [ $^{18}\text{F}$ ]-probe and SophT method ([ $^{18}\text{F}$ ]-labeled LEH), and administered to rats with cerebral ischemia after photochemically induced thrombosis (PIT) of the middle cerebral artery (MCA) (9). The flow pattern and distribution of LEH in rats with brain ischemia were continuously followed by an enhanced PET imaging system developed for small animal studies (Clairvivo, Shimadzu, Kyoto, Japan) (10).

## MATERIALS AND METHODS

### Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH)

LEH (TRM-645) was supplied from Terumo Co. Ltd. (Tokyo, Japan). Relevant characteristics of the LEH have been reported (5). Briefly, it is a liposome capsule having 230 nm in mean diameter, containing human hemoglobin that had been eluted from RBCs outdated for transfusion. The liposome capsule is coated with polyethylene glycol to reduce aggregation and trapping by the reticuloendothelial system.

### Synthesis of a positron emitter-labeled probe, SteP2

The synthesis of 1-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-3,6-dioxatetracosane (SteP2) was reported elsewhere (8). Briefly, [ $^{18}\text{F}$ ]fluoride was produced with a cyclotron (HM-18, Sumitomo Heavy Industries, Tokyo, Japan) at the Hamamatsu Photonics PET Center, and the labeled compound was synthesized from the precursor (Fig. 1). The radiochemical purity was 100%. Specific radioactivity was not determined because its concentration was below the limit of quantification.

### Labeling of LEH

Labeling of LEH was performed by SophT method (8). About 100 MBq of [ $^{18}\text{F}$ ]SteP2 in ethanol solution was transferred to a glass test tube, and the solvent was removed completely at 90°C with helium gas flow. LEH solution was added to the vial with the [ $^{18}\text{F}$ ]-radiolabeled compound and incubated at 37°C for 15 min with 5-s mixing by vortex stirrer every 3 min. After the incubation, LEH solution was centrifuged at 100 000  $\times g$  for 15 min (Beckman, Fullerton, CA, USA), and the supernatant was transferred to a new tube. Radioactivity in the original tube for

labeling, supernatant, and precipitate was measured by curiometer (IGC-3, Aloka, Tokyo, Japan) to calculate the labeling efficiency. The effect of SophT method on physical properties of LEH was examined by use of Zetasizer Nano ZX (Malvern, UK).

### Animal model

In all experiments, rats were maintained and handled subject to the recommendations of the National Institute of Health, the guidelines of the University of Shizuoka, and the guidelines of the Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics. Photochemically-induced thrombosis model was prepared as previously reported with minor modifications (9). Male Sprague-Dawley rats (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) were anesthetized and maintained with 2% halothane in a mixture of 70% room air and 30%  $\text{O}_2$  throughout the following procedure. After infusion of rose bengal (20 mg/kg), photoillumination (200 000 Lux) was delivered for 20 min to the MCA through the dura by an optic fiber. After confirmation of thrombotic occlusion of the MCA, the incision was closed and transferred to the PET study.

### PET imaging of cerebral blood flow (CBF)

Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of chloral hydrate at 400 mg/kg, followed by continuous intravenous infusion at 100 mg/kg/h throughout the remaining experiment. To determine the regional CBF, [ $^{15}\text{O}$ ]H $_2\text{O}$  (7 MBq in 0.3 mL) was injected via tail vein with the rat fixed on an animal holder. The PET scan was started immediately after the administration of [ $^{15}\text{O}$ ]H $_2\text{O}$  and was performed for 2 min using an ultrahigh spatial resolution, small animal PET system, Clairvivo.

### PET imaging of [ $^{18}\text{F}$ ]-labeled LEH

Twenty minutes after the administration of [ $^{15}\text{O}$ ]H $_2\text{O}$ , LEH labeled with  $^{18}\text{F}$  positron emitter was injected into rats through the tail vein. The PET scan was started immediately after injection of the labeled LEH (7 MBq) and was continuously performed for 60 min. The radioactivity in the form of coincidence gamma photons was measured and converted to Bq/cm $^3$  of tissue volume by calibration after correction for decay and attenuation.

### Statistics

Data on positron emitter labeling efficiency, particle size, and zeta potential of LEH by SophT method were displayed as mean  $\pm$  standard deviation. Changes in LEH properties by labeling were determined by paired Student *t*-test.

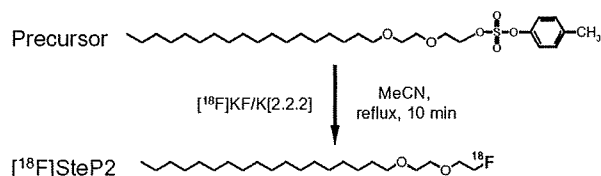


FIG. 1. Synthesis of 1-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-3,6-dioxatetracosane, [ $^{18}\text{F}$ ]SteP2.

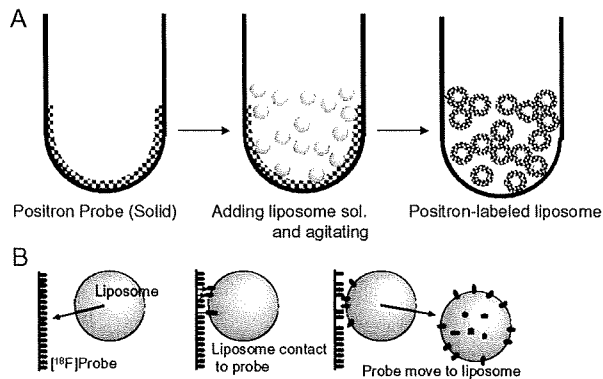


FIG. 2. The overview of positron emitter labeling procedure by SophT method. (A) Solvent-free positron emitter probe ( $^{18}\text{F}$ -probe) was prepared by semiautomated synthesizing system. Preformulated LEH was added to the tube and agitated gently. The solution was transferred and centrifuged to remove unbound probe. (B) During the agitation, the  $^{18}\text{F}$ -probe is transited to lipid phase of LEH directly.

## RESULTS

### Labeling of LEH by SophT method

The solid form of positron emitter labeled probe (Fig. 1) in a glass vial was prepared by semiautomated system (Fig. 2A). Supplied LEH (TRM-645) was added to the vial with  $^{18}\text{F}$ SteP2 and agitated to transfer the probe to the lipid bilayer surface of LEH (Fig. 2B). Incorporation of  $^{18}\text{F}$ SteP2 into lipid assemblies by SophT method was performed around the phase transition temperature of its lipid components to achieve high labeling efficiency. To protect the hemoglobin in LEH from the functional loss by heating, the labeling temperature was set at around  $37^\circ\text{C}$ . The labeling efficiency of LEH was  $46.4 \pm 4.8\%$ , and its radioactivity was high enough for positron imaging by the small animal PET system. The operation of SophT method did not affect the biochemical properties of LEH, such as the particle sizes (PRE  $216.5 \pm 7.9$  nm vs. POST  $211.0 \pm 1.8$  nm,  $P = \text{not significant [NS]}$ ) and zeta potentials (PRE  $-7.52 \pm 0.22$  mV vs. POST  $-7.40 \pm 0.66$  mV,  $P = \text{NS}$ ).

### Distribution of LEH in the ischemic region

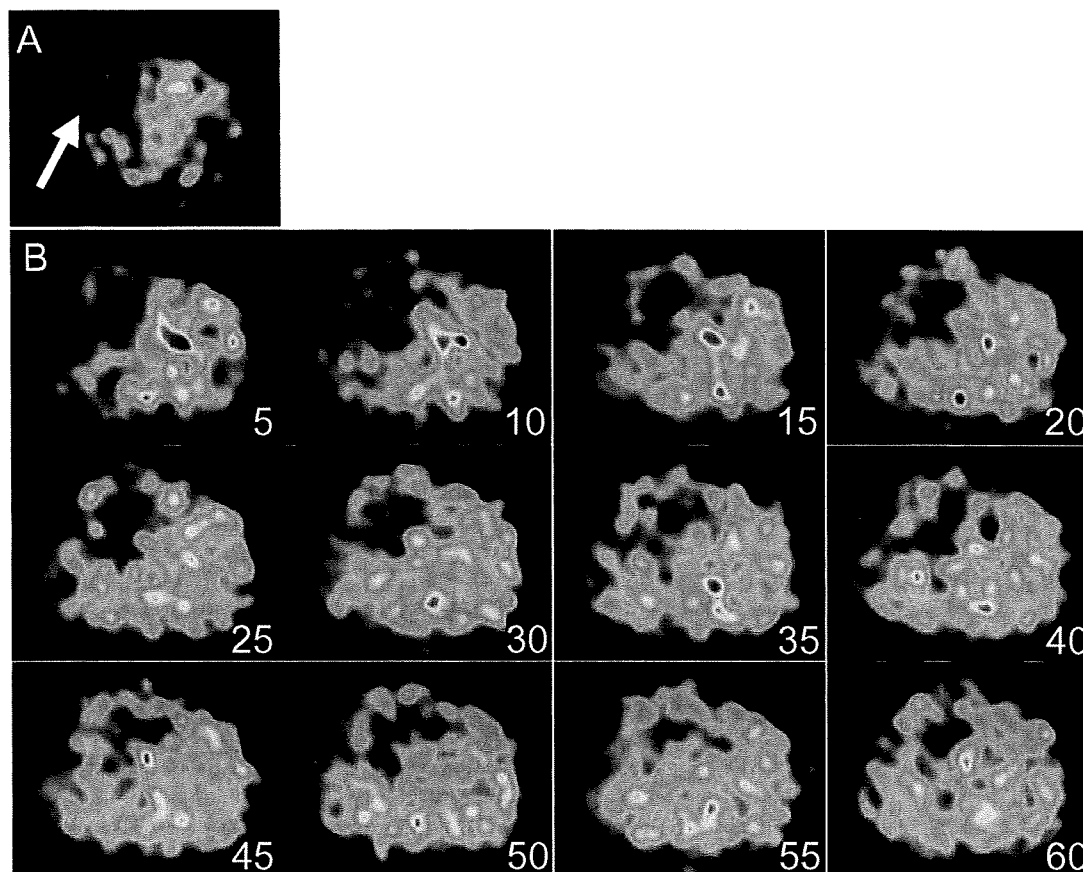
At first, the CBF in the ischemic region of the brain was examined by  $^{15}\text{O}$ H<sub>2</sub>O PET;  $^{15}\text{O}$ H<sub>2</sub>O was injected via tail vein and PET imaging was acquired for 2 min. The imaging of  $^{15}\text{O}$ H<sub>2</sub>O distribution (Fig. 3A) indicated the decrease of CBF in the left middle brain, downstream of the MCA occluded by PIT. After the confirmation of suppressed CBF in the left hemisphere,  $^{18}\text{F}$ -labeled

LEH was administrated via tail vein. The imaging of  $^{18}\text{F}$ -labeled LEH was acquired for 60 min, and images were integrated every 5 min (Fig. 3B). In the early phase, there was little signal of  $^{18}\text{F}$ -labeled LEH in the ischemic area determined by the immediately preceding  $^{15}\text{O}$ H<sub>2</sub>O PET images (Fig. 3A). During the 60-min scan, the radioactivity of  $^{18}\text{F}$ -labeled LEH was gradually increased in the cerebral cortex, but there was no detectable signal in the ischemic core, which corresponds to basal ganglia.

## DISCUSSION

Real-time visualization of liposomal nanocapsule, including LEH, is desirable to clarify its pharmacodynamics and mechanism of action. Liposomal nanocapsules would be labeled with  $^{18}\text{F}$ fluorodeoxyglucose (11,12) or water-insoluble  $^{18}\text{F}$ fluorodipalmitin (13), although the labeling of liposome with these radioactive probes usually requires modification or reconstitution of its membrane. Furthermore, liposomal drugs are the products of multiple steps (4,5), requiring much longer process than the half-lives of commonly used positron emitter nuclei,  $^{11}\text{C}$  (20 min) or  $^{18}\text{F}$  (108 min). Thus, labeling preformulated DDS drugs or substituting components of liposome is impractical. In the present study, we tested 1- $^{18}\text{F}$ fluoro-3,6-dioxatetracosane (Fig. 1) and found a high labeling efficiency without changing the physiological or electrical properties of LEH. A small animal PET system with a high spatial resolution made possible in vivo imaging of  $^{18}\text{F}$ -labeled-LEH in a rat brain ischemia model. The moment-to-moment distribution of LEH was clearly visualized in the ischemic area confirmed by the  $^{15}\text{O}$ H<sub>2</sub>O PET. These findings suggest that  $^{18}\text{F}$ SteP2 is a promising PET probe for imaging of LEH in vivo in small animals used with a PET system with a high resolution and signal to noise ratio (10).

We recently reported that the administration of LEH significantly reduces the size of cerebral infarction (14) in PIT model in the rat as well as in the primate (15); the cerebral cortex was preferentially protected than basal ganglia. The disparate effects prompted the current study to evaluate a hypothesis that LEH improve microcirculation and O<sub>2</sub> delivery (14,15). The current observation that  $^{18}\text{F}$ -labeled LEH signal gradually increased in the cortex but not in basal ganglia during the initial 60 min after administration are compatible with the hypothesis. The histological results (14,15) were also in accordance with the distribution of  $^{18}\text{F}$ -labeled LEH. These results may lead to a clue to the mechanism of action of



**FIG. 3.** PET imaging of  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  and  $[^{18}\text{F}]\text{SteP2}$  distribution in an ischemic rat brain. (A)  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  was administered via tail vein. The distribution of  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  was scanned by small animal PET system, Clairvivo. The original data were reconstructed and 2-min data were integrated to an image. The arrow presented the ischemic region in the left brain of the PIT thrombosis of MCA model rat. (B) LEH labeled with  $[^{18}\text{F}]\text{SteP2}$  was administered via a tail vein 20 min after the  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  PET scanning. The data were acquired for 60 min and integrated every 5 min. Although the figure shows the typical images obtained in one experiment, another three separate experiments with the same procedure were performed and obtained similar results.

LEH in the focal organ ischemia and/or infarction. Awasthi and coworkers previously reported that LEH had the significant oxygen-carrying and delivery capacity, and improved hypovolemia-induced decrease in cerebral metabolic rate of oxygen by the use of  $[^{15}\text{O}]\text{-PET}$  (16). The results obtained in this study are consistent with their results.

Stability of  $[^{18}\text{F}]\text{SteP2}$  in LEH in the bloodstream is an important issue. We previously examined the stability of  $[^{18}\text{F}]\text{SteP2}$  in the liposomes composed of distearoylphosphatidylcholine and cholesterol, of which characteristics are similar to that of LEH composed of hydrogenated phosphatidylcholine, cholesterol, and stearic acid. Our results indicated that the transfer of  $[^{18}\text{F}]\text{SteP2}$  to serum components, including lipoprotein, was less than 10% after incubation in 50% fetal bovine serum for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  (8). Therefore, PET images obtained in this study may reflect LEH biodistribution.

## CONCLUSIONS

Labeling LEH with  $[^{18}\text{F}]\text{SteP2}$  provided a high labeling efficiency in a short period of time, and allowed the real-time visualization of LEH in the rat vivo by an enhanced PET system. This labeling-and-detection PET system may make experimental evaluation of new drugs in small animals possible and easier than the current testing on larger animals or humans using regular PET system.

**Acknowledgments:** This study was supported by a grant from Central Shizuoka Cooperation of Innovative Technology and Advanced Research in Evolution Area (City Area) of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), COE Program in the 21st Century of MEXT, and CREST of Japan Science and Technology Agency (JST), Saitama, Japan.



## REFERENCES

1. Adler-Moore J. AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(Suppl. 5):S3-7.
2. Minko T, Pakunlu RI, Wang Y, Khandare JJ, Saad M. New generation of liposomal drugs for cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:537-52.
3. Pedroso de Lima MC, Neves S, Filipe A, Duzgunes N, Simoes S. Cationic liposomes for gene delivery: from biophysics to biological applications. *Curr Med Chem* 2003;10:1221-31.
4. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs* 2009;33:139-45.
5. Kaneda S, Ishizuka T, Goto H, Kimura T, Inaba K, Kasukawa H. Liposome-encapsulated hemoglobin, TRM-645: current status of the development and important issues for clinical application. *Artif Organs* 2009;33:146-52.
6. Buchan P. Smarter candidate selection—utilizing microdosing in exploratory clinical studies. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2007;59:7-27.
7. Bergstrom M, Grahnen A, Langstrom B. Positron emission tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:357-66.
8. Urakami T, Akai S, Katayama Y, Harada N, Tsukada H, Oku N. Novel amphiphilic probes for [<sup>18</sup>F]-radiolabeling preformed liposomes, and determination of liposomal trafficking by positron emission tomography. *J Med Chem* 2007;50:6454-7.
9. Takamatsu H, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Neuroprotective effects depend on the model of focal ischemia following middle cerebral artery occlusion. *Eur J Pharmacol* 1998;362:137-42.
10. Mizuta T, Kitamura K, Iwata H, et al. Performance evaluation of a high-sensitivity large-aperture small animal PET scanner: clairvivo PET. *Ann Nucl Med* 2008;22:447-55.
11. Oku N, Tokudome Y, Tsukada H, Kosugi T, Namba Y, Okada S. In vivo trafficking of long-circulating liposomes in tumour-bearing mice determined by positron emission tomography. *Biopharm Drug Dispos* 1996;17:435-41.
12. Oku N, Tokudome Y, Tsukada H, Okada S. Real-time analysis of liposomal trafficking in tumor-bearing mice by use of positron emission tomography. *Biochim Biophys Acta* 1995;1238:86-90.
13. Marik J, Tartis MS, Zhang H, et al. Long-circulating liposomes radiolabeled with [<sup>18</sup>F]fluorodipalmitin ([<sup>18</sup>F]FDP). *Nucl Med Biol* 2007;34:165-71.
14. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat: evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery. *Stroke* 2007;38:1626-32.
15. Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, Ogata Y, Tsukada H. O<sub>2</sub> affinity, dose-response relationship, and long-term effect of artificial O<sub>2</sub> carrier after brain ischemia and reperfusion in the primate [Abstract]. *Stroke* 2007;38:599.
16. Awasthi V, Yee SH, Jerabek P, Goins B, Phillips WT. Cerebral oxygen delivery by liposome-encapsulated hemoglobin: a positron-emission tomographic evaluation in a rat model of hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 2007;103:28-38.

## PEG化ナノキャリア頻回投与による accelerated blood clearance 現象の機構解明

小出裕之,<sup>a</sup> 浅井知浩,<sup>a</sup> 畑中剣太郎,<sup>a</sup> 清水広介,<sup>a</sup>  
横山昌幸,<sup>b</sup> 石田竜弘,<sup>c</sup> 際田弘志,<sup>c</sup> 奥 直人\*<sup>a</sup>

**Elucidation of Accelerated Blood Clearance Phenomenon Caused  
by Repeat Injection of PEGylated Nanocarriers**

Hiroyuki KOIDE,<sup>a</sup> Tomohiro ASAI,<sup>a</sup> Kentaro HATANAKA,<sup>a</sup> Kosuke SHIMIZU,<sup>a</sup>  
Masayuki YOKOYAMA,<sup>b</sup> Tatsuhiro ISHIDA,<sup>c</sup> Hiroshi KIWADA,<sup>c</sup> and Naoto OKU\*<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan, <sup>b</sup>Medical Engineering Laboratory Research Center for Medical Science, Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan, and <sup>c</sup>Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima, 1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan

(Received July 30, 2009)

Liposomes modified with polyethylene glycol (PEG) can stably exist in the bloodstream because the PEG on the liposomes attracts a water shell to the liposomal surface. Since these liposomes are long circulating nanocarriers, they are used as drug and gene delivery tools. Repeat injection of PEGylated liposomes, however, is known to induce the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. In the ABC phenomenon, PEGylated liposomes that are injected subsequent to the first injection are cleared rapidly from the bloodstream and accumulate in the liver, resulting in loss of their long-circulating characteristics. The induction of ABC phenomenon is related to the production of anti-PEG IgM from splenic B cells. To elucidate the mechanism of the phenomenon, we firstly examined the relationship between the induction of ABC phenomenon and the concentration of PEGylated liposomes, and observed that the high dose of those did not induce the phenomenon. Next, we investigated whether polymeric micelles trigger ABC phenomenon or not. Finally, the size-dependency of ABC phenomenon was investigated by use of variously sized PEGylated liposomes and polymeric micelles having PEG chains. Our data suggest that the initiation of ABC phenomenon would be size-dependent, and particles smaller than 30 nm did not induce ABC phenomenon. We anticipate that the elucidation of the ABC phenomenon will be helpful for the development of DDS formulations.

**Key words**—polyethylene glycol; liposome; accelerated blood clearance; polymeric micelle; nanocarrier

### 1. はじめに

リポソームは、生体の細胞膜を構成しているリン脂質からなる人工細胞様微粒子である。したがって、生体適合性が高く、体内では薬物を分解酵素などから保護しながら運搬できるため、理想的なDDS運搬体と考えられている。薬物をリポソーム

内に封入することによって、副作用を軽減でき、通常の投与量以上の投与が可能となる。そこで期待されるのが、抗がん剤などの重篤な副作用を引き起こす治療薬の封入である。抗がん剤の多くは、細胞自体若しくはDNAに致命的な障害を引き起こすように設計されている。ところが、がん細胞以外の正常細胞でも、骨髄の造血細胞や口腔粘膜、消化管粘膜、毛根細胞など細胞分裂が盛んな部位では抗がん剤の作用を受け易い。しかし、リポソームなどのキャリアで薬物を包み込むことで、薬物の体内動態が劇的に変化し、副作用の軽減をはかることができる。また、がんは、自身の増殖のために既存の血管だけでは足りず、新たな血管(新生血管)を周辺につくる(血管新生)<sup>1)</sup>。その血管構造は既存の血管と

<sup>a</sup>静岡県立大学大学院薬学研究科医薬生命化学講座(〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1), <sup>b</sup>東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター医用エンジニアリング研究室(〒105-8461 東京都港区西新橋3-25-8), <sup>c</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部(〒770-8505 徳島市庄町1-78-1)

\*e-mail: oku@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS1で発表したものを中心に記述したものである。

は異なり、新生血管内皮細胞同士がまばらな間隙を形成しているため、100 nm 程度の粒子が間隙を通過できることから、リポソームなどのナノキャリアは、その間隙を通過し、がんへの集積性が高いことが知られている (enhanced permeability and retention effect: EPR 効果).<sup>2)</sup> この EPR 効果を最大限に利用するためにリポソームに長期血中滞留性を持たせることは、がんへの集積性を高めることにつながる。ところが、生体には外来異物に対する排出機構があり、リポソームも例外ではなく、肝臓や脾臓を中心とする細網内皮系組織 (reticuloendothelial system, RES) の貪食細胞に捕捉されてしまう。この RES を回避し、長期血中滞留性を持たせるために最も汎用されているのが、ナノキャリア表面への polyethylene glycol (PEG) のコーティングである。PEG を修飾したリポソームは、立体的に安定であり、表面に固定水和相を形成することで補体や抗体によるオプソニン化を防ぎ、免疫細胞による貪食を回避するため RES に取り込まれ難く、血中に長時間循環滞留する特性を有している。<sup>3,4)</sup> その結果、がんや炎症部位への薬物送達を可能にすることが知られている。<sup>5)</sup> また、DDS ナノキャリアの1つである高分子ミセルは、内部にコアとなる疎水性部位、外側には PEG 鎖を施すことにより親水性部位を持つ構造をとっている。<sup>6)</sup> この PEG 鎖の効果により、リポソームと同様に長時間の血中滞留性を得ることができる。高分子ミセルは、サイズ的设计が可能であるとともに、内部の疎水性部位に疎水性相互作用を利用することで薬物を封入することができる。<sup>7)</sup> このほかにも、静電相互作用、水素結合などを利用して DNA やタンパク質などの高分子をミセルに封入することができる。<sup>8)</sup>

このように、PEG 修飾ナノキャリアが長期血中滞留性を有している事実は一般的に知られているが、近年、PEG 修飾リポソームの頻回投与時において、血中からの急速なクリアランスが起こる現象、accelerated blood clearance (ABC) 現象が報告された。<sup>9,10)</sup> 筆者らは ABC 現象の機構解明を目的として、PEG 修飾ナノキャリアの投与濃度、投与間隔が及ぼす ABC 現象への影響、高分子ミセルによる ABC 現象誘導の有無を検討した。さらに、初回投与時に様々なサイズのナノキャリアを投与し、ABC 現象誘導におけるサイズ依存性の検討を行っ

た。本稿ではこれらの結果を中心に ABC 現象について概説する。

## 2. PEG 修飾リポソーム頻回投与による ABC 現象の誘導

PEG を修飾したリポソームは本来長期血中滞留型ナノキャリアとして開発されており、免疫原性、毒性が少ないといった多くの利点を有しているため、薬物のデリバリーツールとして汎用されている。ABC 現象の機構を解明するため、まずマウスを用い PEG 修飾リポソームの単回投与を行った。その結果、投与 24 時間後では血液中におよそ 10%、肝臓には 50% ほど移行していた (Fig. 1)。しかし、PEG 修飾リポソームの繰り返し投与を行った場合には、本来の長期血中滞留効果を失い、2 回目投与時から 24 時間後には血中から急速にクリアランスされ、投与したリポソームの血中での残存率が非常に低くなっていた。さらに、その血中から消失したリポソームの多くが肝臓への移行し、蓄積が増加していた (Fig. 1)。このように、繰り返し投与による血中からの急速な消失と、肝臓への蓄積が ABC 現象の特徴である。しかし、PEG 修飾リポソームに細胞障害性作用を持つドキシソルビシンを内封させた PEG-Dox をマウスに投与した場合、2 回目に投与したリポソームは ABC 現象を示さなかった。

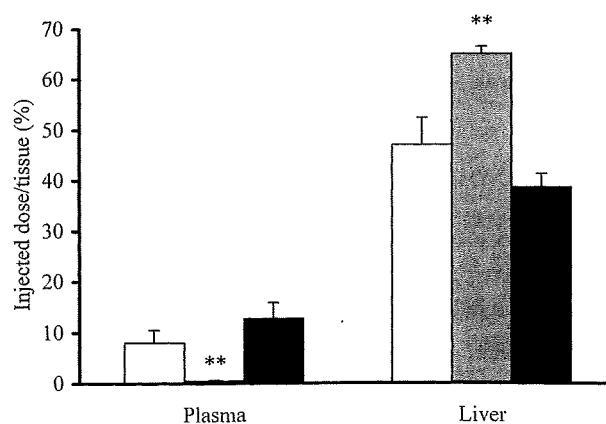


Fig. 1. Biodistribution of <sup>3</sup>H-labeled PEGylated Liposomes in Mice

BALB/c mice were intravenously injected with PBS, PEGylated liposomes (2 μmol phospholipids/kg), or PEG-Dox liposomes (2 μmol phospholipids/kg). Three days after the pretreatment, <sup>3</sup>H-labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into these mice (5 μmol phospholipids/kg). Twenty-four hours after the second injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data (n=5) are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. Data represent PBS (open bar), PEGylated liposomes (gray bar) and PEG-Dox liposomes (closed bar), respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: \*\*p<0.01.

ABC 現象は、初回投与時のリポソームが脾臓 B 細胞によって認識されることによって、IgM 抗体を産生し、誘導されることが示唆されている。<sup>11)</sup> そのため、PEG-Dox を前処理したことで、リポソームを認識した脾臓 B 細胞が殺傷され、抗体が産生されず、ABC 現象が誘導されなかったと考えられる。<sup>12)</sup> 現在臨床使用されている Doxil<sup>®</sup> は、PEG-Dox と同じようにドキシソルピシンが内封してあるため ABC 現象を起こさないと考えられる。リポソーム製剤が開発された当初は、このような理由から ABC 現象が見落とされていたと考えられる。ドキシソルピシンのような細胞障害性の薬物を内封した場合には ABC 現象が起こらないとしても、DDS キャリアに内封する薬物は細胞障害性の薬部のみでなく、近年 small interfering RNA (siRNA) を始めとする核酸医薬品のデリバリー手段としてもリポソームが用いられていることから、<sup>13,14)</sup> ABC 現象の誘導は DDS 製剤開発において重大な問題となり得る。

### 3. PEG 修飾リポソーム投与濃度の ABC 現象への影響

ABC 現象について検討するにあたり、単回投与時において長時間血中に滞留するリポソームを調製した。PEG 修飾リポソームの構成脂質に飽和脂肪酸である Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を選択し、Cholesterol, Distearoylphosphatidylethanolamine-*N*-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] (MPEG-DSPE) を 10 : 5 : 1 の割合にて混合、薄膜法によりリポソームを調製した。DPPC は、その構造の中に不飽和部分を有していないため、安定性が高いリポソームを調製することができる。また、DPPC を含有したリポソームは、その安定性ゆえ、体内に投与した場合においても分解される割合が低く、内封した薬物の保持能も高い。Figure 1 に示す実験においては、初回投与時における PEG 修飾リポソームはマウスに対して 2  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg、2 回目の投与時には、PEG 修飾リポソームを 5  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg となるように投与を行った。一方、Fig. 2 にデータを示した実験においては投与濃度を上げた場合における ABC 現象誘導の有無を確認するため、1 回目、2 回目の両投与時において 100  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg にて投与を行った。その結果、低濃度の場合において顕著に

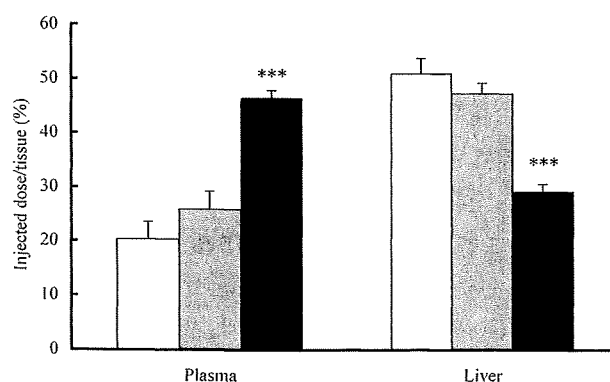


Fig. 2. No Induction of the ABC Phenomenon at High Dose Priming of PEGylated Liposomes

BALB/c mice were intravenously injected with PBS, PEGylated liposomes (100  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg) or PEG-Dox (100  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg). Three days later, <sup>3</sup>H-labeled PEGylated liposomes were intravenously injected (100  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg). Twenty-four hours after the second injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data in the graph represent percentage of the injected dose per tissue and S.D. Data ( $n=5$ ) represent PBS (open bar) and PEGylated liposomes (gray bar) and PEG-Dox (closed bar) respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: \*\*\* $p<0.001$ .

表れていた ABC 現象が、高濃度の場合においては誘導されておらず、コントロールとして用いた PBS 投与群と同等、若しくはそれ以上に 2 回目に投与したリポソームが血中に残っていた。さらに、ABC 現象の特徴の 1 つである肝臓への蓄積も増加していなかった。このように、高濃度のリポソームにおいて ABC 現象が誘導されなかった理由の 1 つとして考えられるのが、以下に示す免疫応答反応の変化である。PEG 修飾リポソームの繰り返し投与によって誘導される ABC 現象は、TI-2 antigen に対して働くと考えられている T 細胞非依存的な B 細胞の免疫応答によることが示唆されている。<sup>15)</sup> 通常、体外から体内に異物が侵入した際、マクロファージが抗原提示を行い、その提示を B 細胞が認識し、T 細胞の助けを借りることによって B 細胞が抗体産生細胞となり、産生された抗体の反応を介して異物の排除を行う。<sup>16,17)</sup> しかし、繰り返し構造を持つリポ多糖などの場合においては、T 細胞の助けを借りることなく、異物を認識した B 細胞が活性化し、抗体を産生して異物を排除する。<sup>18)</sup> リポソーム膜表面に修飾した PEG 脂質も同じように ethylene 鎖の繰り返し構造を持っており、T 細胞非依存的な B 細胞の反応が惹起されている可能性が考えられている。この T 細胞非依存的な B 細胞の反応の特徴として、低濃度の場合においては B 細胞のみの働き

によって異物の排除が行われるが、高濃度、すなわちより多くの異物が侵入した場合には、B細胞のみでは異物の排除が困難となり、いわゆる免疫寛容を引き起こすことが知られている。同様に、高濃度のリポソームを投与した場合においても、免疫寛容が引き起こされ、低濃度のときに誘導されていたABC現象が誘導されなかったことが推測できる。したがって、ABC現象が誘導されないよう、適切な投与濃度設定し、治療を行うことは、ABC現象を回避する戦略として有用な手段の1つに挙げることができる。

#### 4. PEG修飾リポソーム再投与後の体内動態

PEG修飾リポソーム再投与後の血中からの消失と肝臓への蓄積の経時的变化を確認するために、2回目の投与から1, 3, 6時間後にマウスを解剖し、血中残量と、肝臓への蓄積変化を測定した (Fig. 3)。その結果、コントロール群においては、投与1時間後で約70%程度、投与6時間後においても血中での残存率が50%以上という高い値を維持していた。しかし、PEG修飾リポソームを繰り返し投与した群においては、血中からの消失が投与1時間後においても既にみられ、55%程度まで落ち込んでいた。さらに、投与6時間後では30%程度まで減少していた。また、肝臓への蓄積は、6時間後において

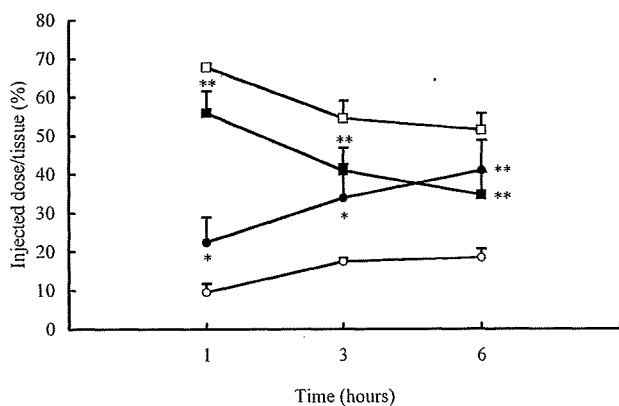


Fig. 3. Time-course of the Biodistribution of  $^3\text{H}$ -labeled PEGylated Liposomes

BALB/c mice ( $n=5$ ) were intravenously injected with PBS or PEGylated liposomes ( $2\ \mu\text{mol}$  phospholipids/kg). Three days after the pretreatment,  $^3\text{H}$ -labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into these mice ( $5\ \mu\text{mol}$  phospholipids/kg). At 1, 3 and 6 h after the injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data are presented as a percentage of the injected dose per plasma priming with PBS (opened square) or PEGylated liposomes (closed square), and that per liver priming with PBS (opened circle) or PEGylated liposomes (closed circle), respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$ .

では両投与群に20%以上の差がみられた。この結果より、ABC現象は2回目投与後1時間以内という早い時間帯でみられることが明らかとなった。投与量をさらに少なく設定した場合、投与6時間後には血中からすべてのリポソームが排除されている可能性が考えられる。がんなどの標的部位への送達など、薬物デリバリーキャリアとしての機能を発揮する前に血液中から消失してしまうため、前項目でも示したように、キャリアの適切な投与量の設定が重要なファクターとなる。

#### 5. PEG鎖を有した高分子ミセル初回投与によるABC現象への影響

高分子ミセルもリポソームと同様に有用なDDSキャリアの1つとして考えられている。しかし、高分子ミセルがABC現象の誘導に関与するかどうかは、明らかになっていない。われわれは、PEG鎖を有した高分子ミセル Poly(ethylene glycol)-*b*-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) (PEG-PBLA) を用い、 $2.9\ \text{mg/kg}$  にてマウス尾静脈内に投与し、その3日後に約100 nmに調製したPEG修飾リポソームを投与することで、PEG鎖を有した高分子ミセルPEG-PBLAがABC現象を惹起するか否か、体内動態解析を行い検討した [Fig. 4(A)]。その結果、PEG-PBLAを投与した場合においても、PEG修飾リポソームを投与した時と同じように、2回目に投与したリポソームが血中から消失されており、肝臓への蓄積が増加していた。

ABC現象の誘導には、初回投与時のリポソームに対して、脾臓B細胞におけるIgM産生が深く関与していることが示唆されている。<sup>11)</sup>そこでわれわれは、高分子ミセル投与から3日後、すなわち2回目のリポソーム投与日に該当する日にマウスの血液を採取し、血清中に存在するPEG鎖に対するIgM (抗PEG-IgM抗体)量を測定した [Fig. 4(B)]。その結果、コントロール群と比較して、IgM産生量が顕著に増加していることが明らかとなった。これまで、ABC現象はPEG修飾リポソームにおいてのみ観察されていたが、PEG鎖を有した高分子ミセルによってもPEG修飾リポソームと同様にABC現象が誘導されることを明らかにした。さらに、高分子ミセルの投与によって体内の免疫機構が応答することで抗PEG-IgM抗体が産生されることも確認された。このことは、リポソームやミセルに

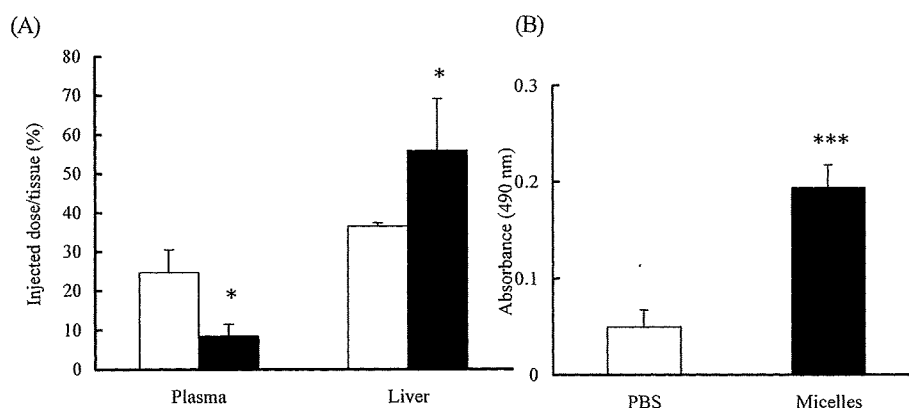


Fig. 4. Induction of the ABC Phenomenon Priming with Polymeric Micelles

BALB/c mice were intravenously injected with PBS or PEG-PBLA (2.9 mg/kg). (A) Biodistribution of the test-dose  $^3\text{H}$ -labeled PEGylated liposomes: Three days after the pretreatment,  $^3\text{H}$ -labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into these mice ( $5 \mu\text{mol}$  phospholipids/mouse). Twenty-four hours after the second injection, the mice were sacrificed, and the radioactivity in the plasma and each organ (only liver data shown) was determined. Data ( $n=5$ ) are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. (B) Anti-PEG IgM in the serum collected at day 3 after the pretreatment with PBS (open bar) or PEG-PBLA (closed bar), respectively. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 separate experiments. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

限らず、DDS技術としてナノキャリアを用いる場合にはPEG鎖によるABC現象の誘導に注意する必要があることを示している。

#### 6. PEG修飾キャリアのサイズ違いによるABC現象誘導の有無

PEG鎖を有した高分子ミセルにおいてもABC現象が誘導されることから、ABC現象が様々なキャリアに対して誘導され得ることが示唆された。そこで様々なサイズのPEG修飾リポソーム、高分子ミセルを初回に投与し、サイズの違いによるABC現象誘導の有無について検討を行った。今回の検討では、まず100 nm以上の検討として約119 nm, 261 nm, 795 nmのPEG修飾リポソームを初回に投与し、2回目の投与には約100 nmに調製したPEG修飾リポソームを用いた (Fig. 5)。その結果、100 nm以上のPEG修飾リポソームを最初に投与した場合においては、2回目投与リポソームの体内動態に、初回投与リポソームのサイズの違いによる差はみられず、すべてのサイズにおいて2回目に投与したPEG修飾リポソームが、投与後急速に血中から消失した。このことより100–800 nmサイズのリポソームでは、同様にABC現象が誘導されることが明らかになった。次に、Fig. 4で初回投与時に高分子ミセルを用いた場合においてもPEG修飾リポソームと同様にABC現象が誘導されることが明らかになったことから、100 nm以下のPEG修飾ナノキャリアとして、50.2 nm (PEG-PBLA), 31.5

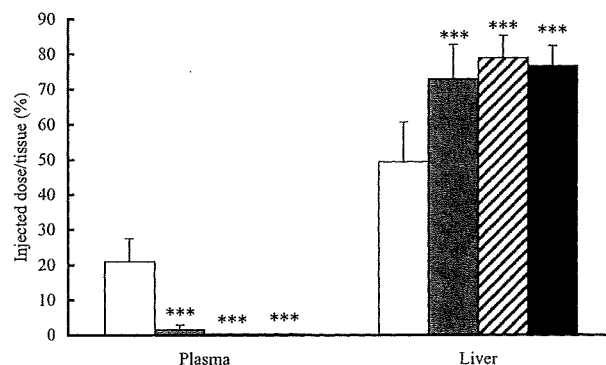


Fig. 5. Biodistribution of Test-dose PEGylated Liposomes after the Preadministration of Various Sized Ones

BALB/c mice ( $n=5$ ) were intravenously injected with PEGylated liposomes ( $2.0 \mu\text{mol}$  phospholipids/kg) with 119, 261 or 795 nm sizes. Three days later,  $^3\text{H}$ -labeled test-dose PEGylated liposomes ( $5.0 \mu\text{mol}$  phospholipids/kg) were administered *via* a tail vein. Twenty-four hours later, the mice were sacrificed and the radioactivity in the plasma and liver was determined. Data are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. priming with PBS (open bar), 119 nm (gray bar), 261 nm (hatched bar), and 795 nm (closed bar) PEGylated liposomes, respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: \*\*\* $p < 0.001$ .

nm (PEG-P (Asp (pentyl))), 9.7 nm (PEG-P (Asp (nonyl))) の高分子ミセルを用いて検討を行った (Fig. 6)。高分子ミセルを用いることで、リポソームにおいては調製が困難な約50 nm以下の粒子を容易に調製することができる。上記したそれぞれのサイズの高分子ミセル (Fig. 7) を初回に投与した後、先ほどと同じように約100 nmに調製したPEG修飾リポソームを2回目に投与し、体内動態を調べた。その結果、初回に50.2 nmの高分子ミセ

ルを投与した群においては ABC 現象が観察されたのに対し、31.5 nm と 9.7 nm のサイズの高分子ミセルを前投与した群では ABC 現象は観察されなかった。これまで、生体内に入った異物の中で、サイズの大きいものほど、免疫細胞に認識されやすく、

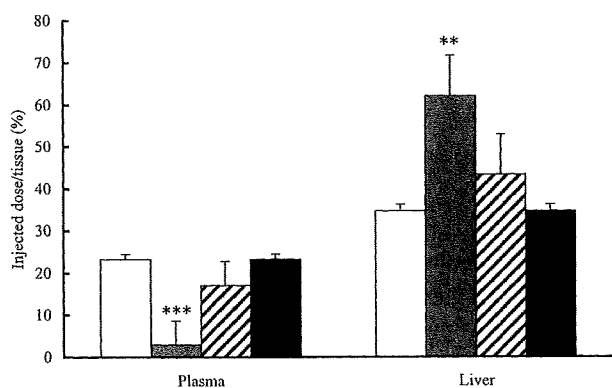


Fig. 6. Biodistribution of Test-dose PEGylated Liposomes after Preadministration of Polymeric Micelles with Various Sizes

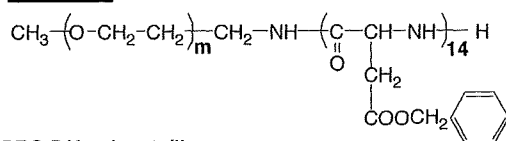
BALB/c mice ( $n=5$ ) were intravenously injected with polymeric micelles (2.9 mg/kg) having 9.7, 31.5 or 50.2 nm sizes. Three days later,  $^3\text{H}$ -labeled PEGylated test-dose liposomes (5.0  $\mu\text{mol}$  phospholipids/kg) were administered *via* a tail vein. Twenty-four hours later, the mice were sacrificed and the radioactivity in the plasma and each organ was determined. Data are presented as a percentage of the injected dose per tissue and S.D. priming with PBS (open bar), 9.7 nm (closed bar), 31.5 nm (hatched bar), and 50.2 nm (gray bar) polymeric micelles, respectively. Significant differences against PBS group are shown with asterisks: \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$ .

肝臓への移行が上昇するという報告がある。<sup>19-21)</sup>したがって、サイズの大きいリポソームは容易に免疫細胞に認識され、体内の免疫を活性化し ABC 現象が誘導されるが、サイズの小さい高分子ミセルでは、脾臓 B 細胞に認識され難く、免疫細胞の活性化が起こり難いため、ABC 現象が誘導され難いことが示唆された。キャリアのサイズを小さくすることは、ABC 現象回避の有用な手段の一つとして考えられる。

## 7. おわりに

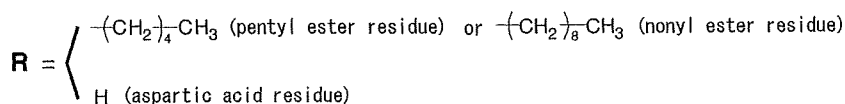
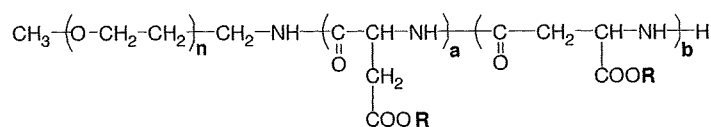
以上述べたように、ABC 現象は PEG 修飾リポソームのみならず、PEG 鎖を有した高分子ミセルを初回に投与した場合によっても誘導され、PEG 鎖特異的な IgM が産生されることが明らかとなった。さらに、ABC 現象の誘導は初回投与のキャリアのサイズに依存し、より小さいものほど ABC 現象は誘導され難いことを明らかにした。核酸医薬品や細胞障害活性を持たない薬物のキャリアとしてリポソーム、高分子ミセルなどのナノキャリアを用いる場合、単回投与によって根治にたどり着くことは考え難く、繰り返し投与が必要不可欠となる。Doxil<sup>®</sup>のような DDS 抗がん剤の繰り返し投与の場合には、内封されている薬物の効果によって ABC 現象は誘導されないが、そのほかの薬物や核

### PEG-PBLA



### PEG-P(Asp(pentyl))

#### and PEG-P(Asp(nonyl))



copolymer	Molecular weight (M.W.)	M.W. of PEG block	Number of Asp Units (a+b)	Esterification degree <sup>1)</sup> (%)	Diameter <sup>2)</sup> (nm)
PEG-PBLA	15000	12000	14	100	50.2
PEG-P(Asp(pentyl))	9000	5000	22	75	31.5
PEG-P(Asp(nonyl))	10000	5000	22	72	9.7

Fig. 7. Composition of Block Copolymers

1) Esterification degree = (number of ester residues) / (number of ester residues + number of aspartic acid residues)  $\times 100$  (%). This degree was determined by  $^1\text{H-NMR}$  measurement. 2) Weighted average diameter determined by dynamic light scattering.

酸医薬品の場合には、繰り返し投与によって誘導される ABC 現象を回避することは、解決しなければならない問題であると考えられる。今回紹介した ABC 現象の機構や、サイズや投与量の変化による ABC 現象回避の可能性はまだまだほんの一部であるに過ぎず、さらなる機構解明と回避方法の探索が望まれる。われわれは本機構の解明を通してさらなる回避方法を探ることにより、DDS 製剤開発の一助になることを期待している。

#### REFERENCES

- 1) Risau W., *Nature*, **386**, 671-674 (1997).
- 2) Muggia F. M., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 7-8 (1999).
- 3) Allen T. M., Hansen C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 133-141 (1991).
- 4) Lasic D. D., *Nature*, **380**, 561-562 (1996).
- 5) Sakakibara T., Chen F. A., Kida H., Kunieda K., Cuenca R. E., Martin F. J., Bankert R. B., *Cancer Res.*, **56**, 3743-3746 (1996).
- 6) Gaucher G., Dufresne M. H., Sant V. P., Kang N., Maysinger D., Leroux J.C., *J. Control. Release*, **109**, 169-188 (2005).
- 7) Yokoyama M., Okano T., Sakurai Y., Ekimoto H., Shibasaki C., Kataoka K., *Cancer Res.*, **51**, 3229-3236 (1991).
- 8) Kataoka K., Itaka K., Nishiyama N., Yamasaki Y., Oishi M., Nagasaki Y., *Nucleic. Acids Symp. Ser. (Oxf)*, **49**, 17-18 (2005).
- 9) Laverman P., Brouwers A. H., Dams E. T., Oyen W. J., Storm G., Van Rooijen N., Corstens F. H., Boerman O. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 996-1001 (2000).
- 10) Ishida T., Ichikawa T., Ichihara M., Sadzuka Y., Kiwada H., *J. Control. Release*, **95**, 403-412 (2004).
- 11) Ishida T., Ichihara M., Wang X., Kiwada H., *J. Control. Release*, **115**, 243-250 (2006).
- 12) Ishida T., Atobe K., Wang X., Kiwada H., *J. Control. Release*, **115**, 251-258 (2006).
- 13) Akita H., Harashima H., *Contrib. Nephrol.*, **159**, 13-29 (2008).
- 14) Asai T., Suzuki Y., Matsushita S., Yonezawa S., Yokota J., Katanasaka Y., Ishida T., Dewa T., Kiwada H., Nango M., Oku N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 243-248 (2008).
- 15) Ishida T., Wang X., Shimizu T., Nawata K., Kiwada H., *J. Control. Release*, **122**, 349-355 (2007).
- 16) Liu Y. J., Oldfield S., MacLennan I. C., *Eur. J. Immunol.*, **18**, 355-362 (1988).
- 17) Liu Y. J., Zhang J., Lane P. J., Chan E. Y., MacLennan I. C., *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2951-2962 (1991).
- 18) Beringue V., Demoy M., Lasmezas C. I., Gouritin B., Weingarten C., Deslys J. P., Andreux J. P., Couvreur P., Dormont D., *J. Pathol.*, **190**, 495-502 (2000).
- 19) Senior J. H., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **3**, 123-193 (1987).
- 20) Patel H. M., Moghimi S. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 45-60 (1998).
- 21) Ishida T., Harashima H., Kiwada H., *Biosci. Rep.*, **22**, 197-224 (2002).



# リポソーム DDS の医療応用

静岡県立大学薬学部医薬生命化学

Tomohiro Asai 浅井知浩

Naoto Oku 奥直人

本稿では、リポソームについての簡単なイントロダクションの後、臨床を中心に国内外のリポソーム製剤について詳しく述べ、そして基礎研究の最新動向についても紹介する。国内では2003年承認のVisudyne<sup>®</sup>を皮切りに3品目のリポソーム医薬品が相次いで承認されており、リポソームの臨床応用が進展し始めている。一方、基礎研究の最新動向として、我々が世界に先駆けて開発してきた癌新生血管に標的化したリポソームについて述べる。また、リポソームは次世代医薬品としての期待が大きい small interfering RNA (siRNA) のベクターとしても注目されており、最後に核酸医薬におけるリポソーム研究について解説する。

## KEY WORDS

- ◇リポソーム
- ◇アクティブターゲティング
- ◇新生血管
- ◇Dual-targeting
- ◇siRNA

## はじめに

本稿ではリポソーム DDS についてその最新動向を紹介するが、はじめに「DDS 研究」と本学術誌名の「血管医学」との係わりについて述べてみたい。我々リポソーム研究者に限らず、ほとんどすべての DDS 研究者にとって「血管医学」の理解は非常に重要な意味を持つ。なぜなら、何らかの薬を DDS 技術によって疾患部位に送り届ける際、血管のバリア能あるいは脆弱性、血管密度、局所における発現分子等は、しばしば DDS の成否の鍵を握る。特に DDS 製剤の静脈内投与では、標的組織における血管構造の特徴が DDS の効果を大きく左右する事が珍しくない。わかりやすい具体例では、脳へのデリバリーであれば血管の堅牢なバリア能が DDS の障壁となり、癌へのデリバリーであれば新生血管の脆弱性がナノ粒子等を用いた DDS の効果を充進させ得る。我々 DDS 研究者は、標的組織の血管構造や発現分子をヒントにし、どのような DDS 製剤を設計すべきかを考える事ができる。薬が血管を移動し、標的組織内において最初に出会う細胞が血管内皮細胞である事を考えれば、「血管医学」の理解が DDS 研究にとって非常に重要な意味を持つのも当然かもしれない。

次にリポソームの基礎について、できるだけ簡略化して述べておきたい。リポソームは、生体膜の主要成分であるリン脂質を水中に懸濁して得られる閉鎖小胞であり、生体膜モデルとしてあるいは DDS キャリアとして多様な研究がなされてきた。本稿では DDS キャリアとしてのリポソームに焦点を絞って記載する。リポソームは、水溶性の物質を内水相に、脂溶性の物質を脂質二重膜に封入する事が可能である。リポソームは、低分子化合物のみならず、核酸やタンパク質などの高分子のキャリアにもなり得る。リポソームは、粒子のサイズ調整が容易であり、脂質組成を工夫する事によって膜の硬さや表面電位を調節する事もまた容易である。リポソームの表面をペプチド、抗体、あるいは糖鎖などで修飾する事により、特定の機能を付与する事もできる。リポソームの基礎と応用について興味がある方は、よく纏まった成書が出版されているので参照されたい<sup>1)</sup>。

次にリポソームの応用分野についてであるが、構成分子が生体成分由来であるがゆえ、安全性が高いナノカプセルとして多岐にわたる分野で既に製品化されている。実際リポソームは、抗癌剤や抗真菌剤等の医薬品、美白や保湿効果を持つ化粧品、遺伝子導入用試薬等の研究試薬等が国内外で実用化に至っている。なか

でもリポソーム医薬品については詳しく後述する。実用化されたりポソーム製品について少し補足しておきたいのが、例えば化粧品の場合、成分としては脂質名が記載されており、必ずしもリポソームと明記されているわけではない。試薬も同様であり、添付書類の中にその試薬がリポソームである事が明記されているとは限らない。従って、市場でリポソーム技術がどの程度、どのような形で活用されているかは一般にあまり知られていないが、実際には既に数多くのリポソーム製品が市場に存在している。

### リポソームの医療応用

深在性真菌症を適応とするリポソーム製剤 AmBisome<sup>®</sup> が1990年にアイルランドで承認されて以降、リポソームは種々の疾患治療において世界中で用いられるようになった(表1)。AmBisome<sup>®</sup> は、抗真菌剤アムホテリシンBを含有するリポソーム製剤であり、世界40ヵ国以上で使用されている。AmBisome<sup>®</sup> は、水素添加大豆リン脂質、ジステアロイルホスファチジルグリセロール、およびコレステロールから構成されるリポソームの脂質2重膜にアムホテリシンBを含

有する製剤である。アムホテリシンBは、コレステロールに対する親和性が高いが、真菌が持つエルゴステロールに対する親和性は更に高く、この事によってAmBisome<sup>®</sup> は選択的に薬効を示すといわれている。リポソーム化していないアムホテリシンBは、腎機能障害等が問題となっていたが、AmBisome<sup>®</sup> ではこの腎毒性が大幅に軽減されている。AmBisome<sup>®</sup> は日本国内では2006年に承認された。

癌治療に使用されているリポソーム製剤としてはDoxil<sup>®</sup> (欧名: Caelyx<sup>®</sup>) が代表的な成功例として挙げられる。Doxil<sup>®</sup> は、抗癌剤ドキシソルビシン(doxorubicin: DOX)を内封したポリエチレングリコール(PEG)化リポソーム製剤である。硬い膜組成のリポソーム表面をPEGでコーティングしているため、生体内で肝臓や脾臓のような細網内皮系組織に補足されにくく、高い血中滞留性を示す。Doxil<sup>®</sup> を含めリポソームの一般的な癌への標的化機構は、脆弱な新生血管に起因する透過性亢進によってリポソームが集積し、そのうえ腫瘍内にリンパ管が乏しいために局所に留まるといふ、いわゆる enhanced Permeability and retention (EPR) 効果<sup>2)</sup> を利用している。Doxil<sup>®</sup> のよう

な長期血中滞留型のリポソームは、長時間にわたってEPR効果を発揮するため、結果として高い癌集積性を示す。このような標的化機構はパッシブターゲティングと称される。Doxil<sup>®</sup> ではDOXの血中濃度が高く維持されるが、そのほとんどがリポソーム内に封入された状態であり、DOXの副作用である心毒性はリポソーム化によって著しく軽減される。このDoxil<sup>®</sup> は、1995年にエイズ関連カポジ肉腫に適応を有する抗悪性腫瘍剤としてアメリカで承認されたのを皮切りに、これまで約80ヵ国で承認されている。現在では、転移性乳癌や難治性卵巣癌への適応が欧米で認められている。国内においては2007年にエイズ関連カポジ肉腫治療薬として承認され、今年になって効能追加で難治性卵巣癌への適応が認められた。

表1 臨床で使用されている主なリポソーム医薬品

製品名	薬効成分	適応	承認
AmBisome <sup>®</sup>	アムホテリシンB	深在性真菌症	1990(欧) 1997(米) 2006(日)
Doxil <sup>®</sup> /Caelyx <sup>®</sup>	ドキシソルビシン	エイズ関連カポジ肉腫 難治性卵巣癌 転移性乳癌*	1995(米) 1996(欧) 2007(日)
DaunoXome <sup>®</sup>	ダウノルビシン	エイズ関連カポジ肉腫	1997(米)
Myocet <sup>®</sup>	ドキシソルビシン	転移性乳癌	1999(欧)
Visudyne <sup>®</sup>	ベルテポルフィン(BPD-MA)	加齢性黄斑変性症	1999(欧) 2000(米) 2003(日)
DepoCyt <sup>®</sup>	シタラピン	髄膜炎治療	1999(米)

\*: 日本では未適応。



Doxil<sup>®</sup> の他にも DOX を含有するリポソーム製剤としては Myocet<sup>®</sup> があり、北米やヨーロッパで転移性乳癌を適応として承認されている。抗癌剤関連のリポソーム製剤としては、その他にも DaunoXome<sup>®</sup> がアメリカで 1997 年に承認されており、エイズ関連カポジ肉腫に適応を有している。DaunoXome<sup>®</sup> は、抗癌剤ダウノルビシンを内封したリポソーム製剤である。近年では、抗癌剤ビンクリスチンのリポソーム化製剤 Marqibo<sup>®</sup> が欧米において成人急性リンパ球性白血病の希少薬に指定され、開発が進行中である。

リポソーム製剤は、光線力学療法 (photodynamic therapy : PDT) 用の光増感剤としても実用化されている。1999 年に欧米で承認された Visudyne<sup>®</sup> は、PDT 用の光増感物質含有リポソームであり、加齢性黄斑変性症の治療に用いられている。これまでに世界 70 ヶ国以上で承認されており、国内においても 2003 年に承認された。Visudyne<sup>®</sup> は、光増感物質である benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA, Verteporfin) がリポソーム脂質 2 重膜内に封入されたリポソーム製剤である。PDT では照射された部位でのみ光増感物質が働いて細胞を傷害するため、その他の部位への副作用をほとんど示さない。PDT は癌治療への応用が期待されている技術でもある。BPD-MA は、長波長側に励起波長を持つために組織透過性が高く、また生体内のヘムなどのクロモフォアに吸収されにくいという利点を持つが、難水溶性のために生体への投与が困難であった。そこで、Visudyne<sup>®</sup> の場合にはリポソームを BPD-MA の可溶化剤として用いる形で製剤化がなされた。Visudyne<sup>®</sup> のリポソーム組成は、卵黄ホスファチジルグリセロールおよびジミリスチルホスファチジルコリンからなり、生体で不安定な柔らかい膜のリポソームである。そのため、Visudyne<sup>®</sup> を生体内に投与すると、BPD-MA は LDL のような血清タンパク質に速やかに移行し、リポソームではなく LDL が運搬体となって血液中を循環する。Visudyne<sup>®</sup> は、代謝が速く血中半減期が短いリポソーム製剤であり、この点で既述の Doxil<sup>®</sup> と

は好対照なりポソーム製剤といえる。しかし、このことが逆に光過敏症が起こりにくく、治療後に長期間暗所に留まる必要がないという治療に重要なメリットを生んでいる。

以上で述べた以外のリポソーム製剤としては、髄膜炎治療薬 DepoCyt<sup>®</sup> が 1999 年にアメリカで承認されている。これまでの臨床における使用実績が表わしているように、リポソームはヒトに対しての安全性が担保され、製剤工学的にもある程度完成された DDS キャリアであるといえる。現在臨床試験中のリポソーム製剤も数多くあり、今後リポソーム技術は医療の進歩に貢献していくと思われる。

ところで、国内に限定してリポソームの医療応用の現状を纏めると、2003 年承認の Visudyne<sup>®</sup> が初のリポソーム医薬品であり、2006 年に AmBisome<sup>®</sup>、2007 年に Doxil<sup>®</sup> と、ここ 5~6 年の間に次々とリポソーム製剤が承認されたところである。欧米と比較すると、AmBisome<sup>®</sup> と Doxil<sup>®</sup> が 10 年以上遅れて承認されるなど、これまでリポソーム製剤のドラッグラグは著しいものがあつた。しかし、ここにきてようやくリポソーム製剤の医療応用が進む機運が高まってきており、今後は国内のリポソーム研究の「From bench to bedside」が大いに進むことを期待したい。

### ◆ 癌新生血管に標的化したリポソーム ◆

パッシブターゲティングによるリポソーム DDS は、Doxil<sup>®</sup> に代表されるようにすでに臨床応用に至っている。そのパッシブターゲティングを上回る効果を期待し、抗体などのリガンドを DDS に利用する標的化方法は、アクティブターゲティングと称される。アクティブターゲティングによるリポソーム DDS は、多くの基礎研究においてその有効性が証明されてきており、癌治療の臨床試験が実施されているものも幾つかある。アクティブターゲティングによる第 2 世代のリポソーム製剤の医療応用が期待されている。

癌細胞に対して親和性を有する何らかのリガンドを結合したリポソームは、癌の組織内においてリポソ-

ム表面上のリガンドと癌細胞上の受容体との相互作用を介してアクティブターゲティングの効果を発揮する。しかし、これは投与されたりボソームが癌細胞めがけて移動していくわけではなく、相互作用の機会を得るためにも、まず EPR 効果によってリボソームが癌組織に到達する必要がある。したがって、その標的化機構は EPR 効果の延長線上にある 2 次的なターゲティングといえる。言い換えれば、癌細胞へのアクティブターゲティングは、リボソームが新生血管間隙を通過して癌組織内へ集積するステップが律速段階になると考えられる。癌細胞に標的化したりボソームは、癌の新生血管密度によってリボソームの集積量が増減し、その事によって抗癌活性が左右される可能性が高い。更に EPR 効果によって集積したりボソームは、そのほとんどが新生血管近傍の間隙に留まるため<sup>2)</sup>、血管から離れた癌細胞に対しては抗癌剤を放出制御するな

ど、また別の工夫が必要になる。

そこで我々は、癌細胞へ酸素や栄養を運ぶ役割を担い、それ自身が治療標的となり得る腫瘍新生血管へのアクティブターゲティングを考案した。腫瘍新生血管は、正常血管とは発現分子のプロファイルが異なるため、特定の分子を標的としたアクティブターゲティングが可能である。腫瘍新生血管を標的としたりボソームは、血流に面した癌新生血管を標的としており、EPR 効果の延長線上にある 2 次的な標的化とは異なった効果を望むことができる。このような DDS によって抗癌剤を増殖性内皮細胞に作用させ、新生血管を選択的に破壊する事が可能となれば、薬が到達しにくい癌細胞や薬が効きにくい癌細胞に対しても、兵糧攻めによる間接的なダメージを与える事ができるはずである(図 1)。このようなコンセプトのもと、我々は世界に先駆けて腫瘍新生血管標的化リボソームを開発し、

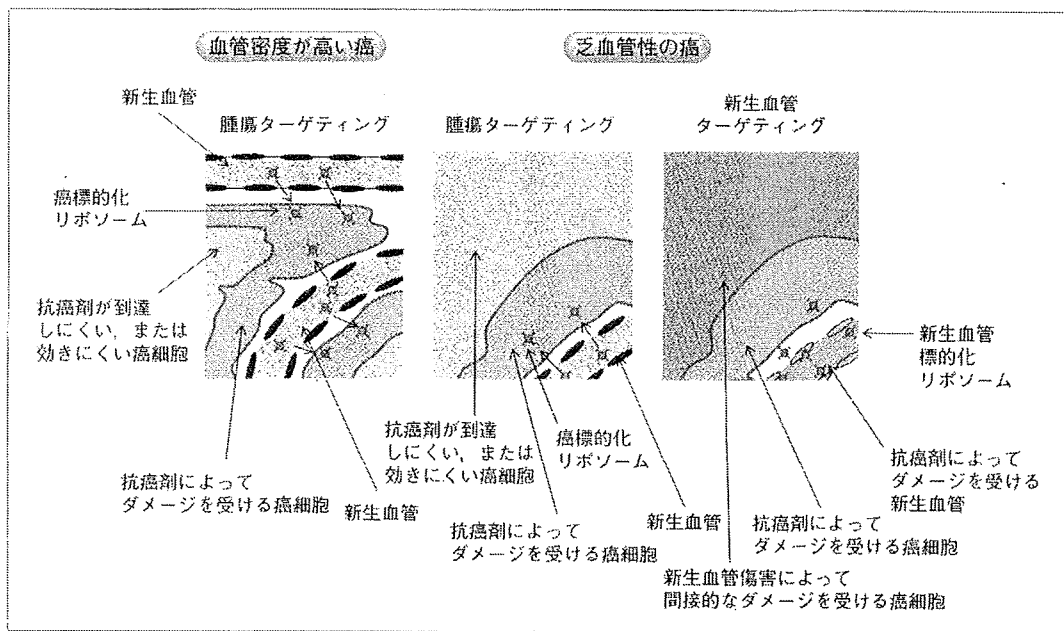


図 1. 新生血管標的化リボソームを用いた DDS の概念

癌細胞に標的化したりボソームは、血管が多い癌では EPR 効果が高く、アクティブターゲティングの効果が発揮されやすい(左図)。しかし、乏血管性の癌では、EPR 効果が低いことが律速段階となり、血管から離れた癌の治療は難しい(中央図)。一方、新生血管標的化リボソームは、抗癌剤による癌細胞への直接的なダメージに加え、新生血管の破壊を介した兵糧攻めによる治療効果が期待できる(右図)。(文献 10 より改変)