

血栓選択的RGDバブルリポソームの開発 凍結乾燥製剤化に関する実験

研究分担者 丸山 一雄 帝京大学 教授

研究要旨 我々は、独自にバブルリポソームの膜表面に血栓（活性化血小板）特異的結合能を有する環状化RGDペプチドを修飾したRGD-バブルリポソーム（RGD-BL）を開発した。RGD-バブルリポソームは活性化血小板結合能を有し、超音波診断装置下で血栓造影能を有することが示された。そこで、RGD-バブルリポソームの実用化を考慮して、その凍結乾燥製剤化について検討した。RGD-バブルリポソームは凍結乾燥前後において、粒子径、パーフルオロプロパン含量、HUVEC細胞に対する結合性に大きな差異が認められず、長期保存可能な凍結乾燥製剤化を確立した。

A．研究目的

虚血性疾患の治療では、表1に示す様にt-PA、超音波、マイクロバブルの三者併用時に血流再開通率が最高値を示した臨床研究がある。三者併用による再開通率の向上のメカニズムは、血栓を形成しているフィブリンの網目構造が超音波の振動作用と超音波によるバブルの振動作用によって開口し、t-PAの血栓浸潤を促進させるためである。その際、バブルを血栓に集積させることが出来れば、より効率的に血栓溶解を促進できると推察される。

・脳梗塞治療における血流再開通率	
t-PA単独	23.9%
t-PA + TCD(経頭蓋超音波ドプラ)	40.8%
t-PA + TCD + マイクロバブル	54.5%

Reference...Molina CA et al. stroke, 2006.

表1 超音波、マイクロバブル併用による血栓溶解促進効果

バブルリポソームはパーフルオロプロパンを内封した超音波造影効果を有する小胞であり、超音波出力や周波数をコントロールすることにより、超音波診断のみならず、薬物・遺伝子デリバリー、発熱による温熱療法にも応用可能なツールである。さらにバブルリポソームには様々なターゲティング分子を容易に修飾可能であるため、標的組織・部位特異的な診断・治療が可能になると期待される。

このように様々な機能を有するバブルリポソームは疾病の診断から治療まで包括的に行うことのできる優れたツールになり得る。前年度までに、血栓（活性化血小板）に高発現するGPIIb/IIIa分子と高親和性を持つ環状化RGDペプチドを付与した環状化RGD-バブルリポソームを調製し（図1）、血栓集積能、血栓溶解能を評価した。その結果、RGD-バブルリポソームは超音波診断装置下で血栓造影能を有することが示されたが、調製後の安定性に欠くことが問題となった。そこで、RGD-バブルリポソームの実用化を考えると、調製してから使用までの保存安定が重要であり、凍結乾燥製剤化が必須条件であると考え、本研究を遂行した。

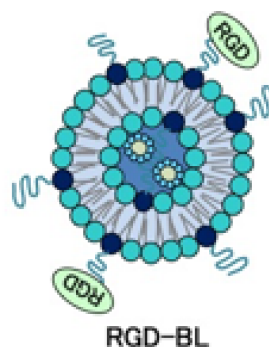


図1 RGD-バブルリポソームの模式図

B．研究方法

(1) BLの調製

脂質組成をDSPC: DSPE-PEG(2k)-OMe:

DSPE-PEG(3k)-Mal:cholesterol= 64: 1: 5: 30 (モル比) とし、総脂質量 100  $\mu\text{mol}$  をクロロホルム 4 mL に溶解させ、ジイソプロピルエーテル 4 mL と PBS 4 mL を加え、バス型ソニケーターでエマルジョン化を行った。その後、エバポレーターを用いて逆相蒸発法によりリポソームを調製した。これを凍結融解を 3 回繰り返した後、エクストルージョン法により粒子径を 100-200 nm に調整した。

調製したリポソームを二等分し、一方には 12.5 mmol の RGD ペプチド (CGGc(RGD fK)) 溶液を加え、もう一方には 12.5 mmol のコントロールペプチド (CGGc(DGR fK)) 溶液を加え、静かに攪拌しながら 4 晩で一晩反応させた。各種リポソームを 1 mg/mL となるように PBS で希釈し、このリポソーム懸濁液 2 mL を 5 mL バイアル瓶に入れた。C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> ガス 7.5 mL で置換・加圧し、バス型ソニケーターで 5 分間超音波照射することでバブルリポソームとした。

#### (2) パーフルオロプロパン (C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>) ガス封入量の測定

バブルリポソーム (BL) の入ったバイアル瓶を開封し、常圧とした後に、ガスタイトシリンジを用いて BL を採取した。このバブルリポソーム 500  $\mu\text{L}$  を測定用のバイアル瓶に移し、ガスクロマトグラフ (SHIMADZU GCMS-QP2010 +HS-20) により C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> ガス封入量を測定した。

#### (3) 粒子径の測定

BL の入ったバイアル瓶をバイアルオープナーで静かに開封し、常圧とした後に、PBS で 100 倍希釈した。この BL 懸濁液の粒子径を動的光散乱法により測定した。

#### (4) RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化と復水処理

RGD-バブルリポソーム懸濁液を 9% スクロースで希釈して 1 mg/mL とし、2 mL をバイアル瓶に入れた。その後、バイアル瓶内の気相部分をパーフルオロプロパン

7.5 mL で置換し、キャップした。さらにパーフルオロプロパン 10 mL で加圧し、バス型ソニケーターを用いて超音波照射した。その後、バイアル瓶のキャップを開け、液体窒素を用いて凍結した。このバイアル瓶を凍結乾燥器 (EYLA FDU-1100, DR C-1100) にセットし、凍結乾燥した後に、パーフルオロプロパンで常圧にし、さらに 7.5 mL のパーフルオロプロパンで加圧した。調製した凍結乾燥 RGD 修飾バブルリポソームを室温にて長期保存した。

使用直前に超純水 2 mL を加え攪拌することで復水した。

#### (5) HUVEC 細胞との結合実験

DiO 標識 RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤を腹水処理後、HUVEC 細胞との結合性を、4、15 分間接触させてフローサイトメトリーで評価した。

### C. 研究結果

#### (1) RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化と復水処理

RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化を 9% スクロースの溶媒のもとで行った結果、図 2 に示すようなケーキ状の凍結乾燥製剤が調製できた。9% スクロース以外の溶媒のものとは、凍結乾燥製剤化は困難であった。超純水を添加し、かるく振盪するだけで、凍結乾燥前の状態に戻ったので、パーフルオロプロパンガスの再封入を、造



図 2 RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤の形態と凍結乾燥前と復水処理後の形態の比較

影装置で確認したところ、図3のように、凍結乾燥前と同様の輝度を持つ超音波像を得ることができた。

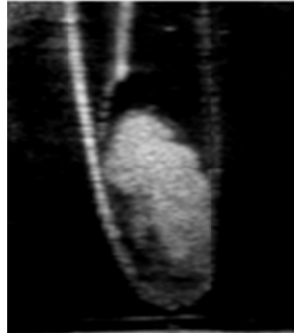


図3 復水処理後の凍結乾燥RGD-バブルリポソームの超音波造影能

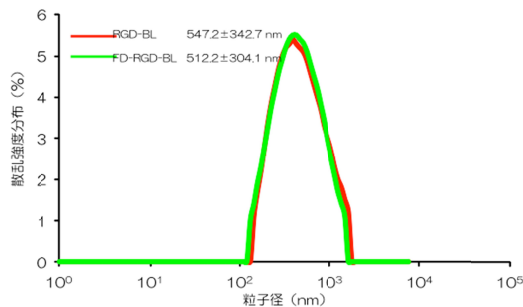


図4 凍結乾燥製剤化前後における粒子径の変化

図4に示すように、凍結乾燥前後における粒子径(=520nm)に大きな差異は無かった。したがって、RGD-バブルリポソームは9%スクロースの存在下で凍結乾燥ができ、長期間の保存が可能となった。

(2) 凍結乾燥RGD-バブルリポソーム製剤のパーフルオロプロパン保持量

復水した凍結乾燥RGD-バブルリポソーム500 μLをガスクロマトグラフィ用バイアル瓶に入れ、ゴム栓・アルミキャップで密封した後、超音波洗浄槽を用いて1分間超音波照射し、バブルを完全に崩壊させ、ガスクロマトグラフによりパーフルオロプロパンガスを測定した。

復水処理しても、図5に示すように、7μL/mg lipidの封入量が得られ、ほぼ凍結乾燥前に戻ることが認められた。

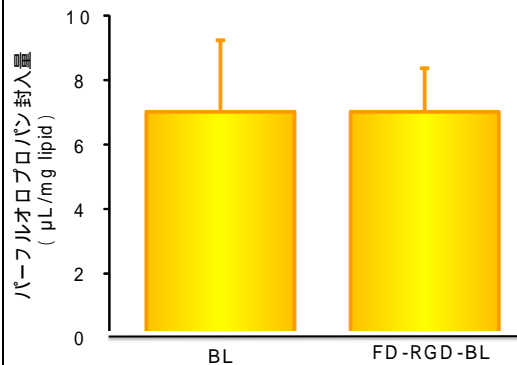


図5 凍結乾燥前と後における封入パーフルオロプロパン量の比較

(3) 凍結乾燥RGD-バブルリポソーム製剤のHUVEC細胞との結合性実験

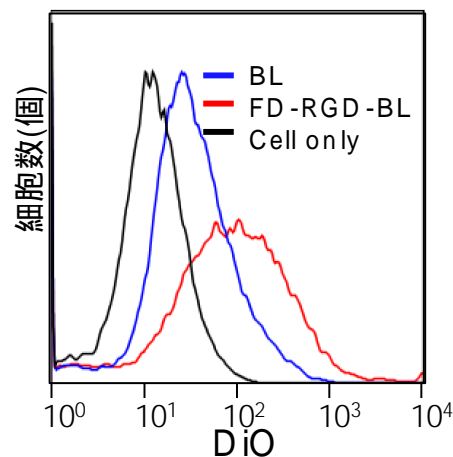


図6 HUVEC細胞との結合性実験

DiO標識RGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤を腹水処理後、HUVEC細胞との結合性を評価したところ、図6.に示すように凍結乾燥前と同様な結合性が見られ、凍結乾燥による影響は見られなかった。

#### D. 考察

9%スクロースの溶媒下で調製されたRGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化において、9%スクロースは膜保護作用を有し、腹水処理をしても元の状態に戻すことができた。このような凍結乾燥操作は、リポソーム製剤でも多用されている方法で、他にトレハロースもRGD-バブルリポソームの凍結乾燥製剤化に用いることができると考えられる。凍結乾燥状態のバブルリポソームの形態について興味あるが、電顕等で調べる必要があり、本研究では遂行出来なかった。SONAZOIDも凍結乾燥製剤と供給されているが、RGD-バブルリポソームと同様の凍結乾燥形態をしていると考えられる。凍結乾燥製剤化によって、長期間の保存が可能となり、また、純水の添加と振盪だけで凍結乾燥前の状態に完全に戻ることから、実用化に一步前進したと言える。

#### E. 結論

RGD-バブルリポソームは凍結乾燥前後において、粒子径、パーフルオロプロパン含量、HUVEC細胞に対する結合性に大きな差異が認められず、長期保存可能な凍結乾燥製剤化を確立できた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kohsuke Hagiwara, Toshihiko Nishioka, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Yasuhiro Nishida, Kiyoshi Iida, Huai Luo, Robert J. Siegel. Thrombus targeted perfluorocarbon containing liposomal bubbles for enhancement of ultrasonic thrombolysis - in vitro and in vivo study - J. Thrombosis and Haemostasis. 11, 1565-1573, 2013
- 2) Nobuhito Hamano, Yoichi Negishi, Kyohei Takatori, Yoko Endo-Takahashi,

Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Takuro Niidome, Yukihiko Aramaki.

Combination of Bubble liposomes and high-intensity focused ultrasound (HIFU) enhanced antitumor effect by tumor ablation.

**Biological & Pharmaceutical Bulletin** 37(1), 174-177, 2014.

- 3) Ren Koda, Jun Koido, Naoto Hosaka, Shinya Onogi, Takashi Mochizuki, Kohji Masuda, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama.

Evaluation of active control of Bubble liposomes in a bifurcated flow under various ultrasound conditions.

**Advanced Biomedical Engineering** 3, 21-28, 2014

#### 2. 学会発表

- 1) 小田雄介, 鈴木亮, 小俣大樹, 根岸洋一, 川上茂, 樋口ゆり子, 橋田充, 丸山一雄  
日本薬学会第134年会、2014, 3, 27  
凍結乾燥バブルリポソームの開発と特性評価
- 2) 丸山一雄  
第17回日本栓子検出と治療学会、2014, 10, 04  
バブルリポソームによる超音波セラノスティクス
- 3) Daiki Omata, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Johan Unga, Mutsumi Seki, Hitoshi Uruga, Yoichi Negishi, Kazuo Maruyama  
Focused Ultrasound 2014 Int. Symposium 2014, 10, 13  
**Brain Targeted Gene Delivery by Combining Bubble Liposomes and Ultrasound**