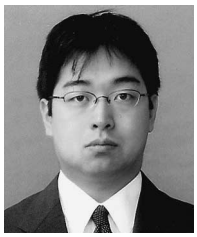
薬 剤 学, **67** (4), 242–245 (2007)

≪若手研究者紹介≫



抗炎症薬の化学修飾とリポソーム製剤による動態制御 —自己組織化型ナノ微粒子製剤の開発—

手 嶋 無 限 Mugen Teshima
長崎大学医学部・歯学部附属病院薬剤部

1. は じ め に

近年，薬物治療の最適化を図る目的で，様々なdrug delivery system（DDS）が開発されている．その中でも，脂質を溶液中で分散させることで自己組織化するナノ微粒子であるリポソームは，放出制御や標的指向性およびセンサー機能など，薬物の生体内挙動を制御するための多彩な機能を付与することが可能である．主にリン脂質から構成されているため，毒性や抗原性が低く，優れた生体適合性や生体内分解性を示すなどの利点を持つ．臨床において期待される製剤である．

リポソームは水溶性の薬物を閉鎖された脂質二重膜の小胞中に封じ込め包含するが，多くの薬物は脂質二重膜を容易に通過するため，効率よくリポソーム内に包含させることは難しい．一方，脂溶性の極めて高い薬物は，リポソームの脂質膜に高い割合で自然に取り込まれる．従って，薬物を脂溶性誘導体とすることにより，リポソーム作成時に薬物と脂質が同時に自己組織化されるナノ微粒子製剤を容易に作成することができる．しかし，これら製剤の合理的設計に関する情報は少ないのが現状である．

著者は，prednisolone（PLS）をモデル薬物として，脂溶性誘導体を合成し，各種のリポソーム製剤を作成し，製剤評価と動態評価を行った．一連の研究の概略を図1に示す．

2. 各種リポソームの調製と製剤評価[1,2)]

リポソームは超音波破砕法を用いて調製し，薬物としてはPLSおよびその脂溶性誘導体palmitoyl prednisolone（Pal-PLS）を合成し用いた．不飽和リン脂質egg yolk phosphatidylcholine（EggPC）および飽和リン脂質L-α-distearoylphosphatidylcholine（DSPC）に，cholesterol（Chol）を加えた．さらに，リポソーム膜表面のPEG修飾にはpolyethylene glycol（PEG）脂質誘導体L-α-distearoylphosphatidylethanolamine-PEG 2000または5000（DSPE-PEG 2Kまたは5K）を全脂質量の1 mol%添加し，計12種類のリポソームを調製した．

PLSは，強力な抗炎症作用や免疫抑制作用といった薬理効果により，多くの疾患の治療薬として用いられてきた．構造上にコレステロール骨格を有し，脂溶性が比較的高いことから，リポソームへの包含は容易であると思われている．実際，限外濾過を用いた方法において，PLSはリポソームへの高い包含率を示した．しかし，PLS包含リポソームをゲル濾過した結果，溶出液により希釈され速やかにリポソームから薬物が放出することが示された．また，水溶性誘導体prednisolone phosphateのリポソーム製剤化も報告されているが，その薬物包含率は極めて低くリポソームの内水相への包含の難しさが明

筆者紹介：2000年3月，福岡大学薬学部卒業．同年4月から1年間，厚生省認定薬剤師実務研修．2001年4月，長崎大学大学院薬学研究科博士前期課程入学，2003年3月修了．2003年4月，長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士後期課程に進学．2006年3月，博士号（臨床薬学）取得．同年4月，長崎大学医学部・歯学部附属病院薬剤部に入局．同年7月，日本薬剤学会第31回製剤セミナーPostdoctoral Presentation Award受賞．その他，2005年5月，共同発明者として“新規硝子体可視化剤”で特許申請．研究のモットー：臨床を指向した研究を通じ，幅広く医療へ貢献する．

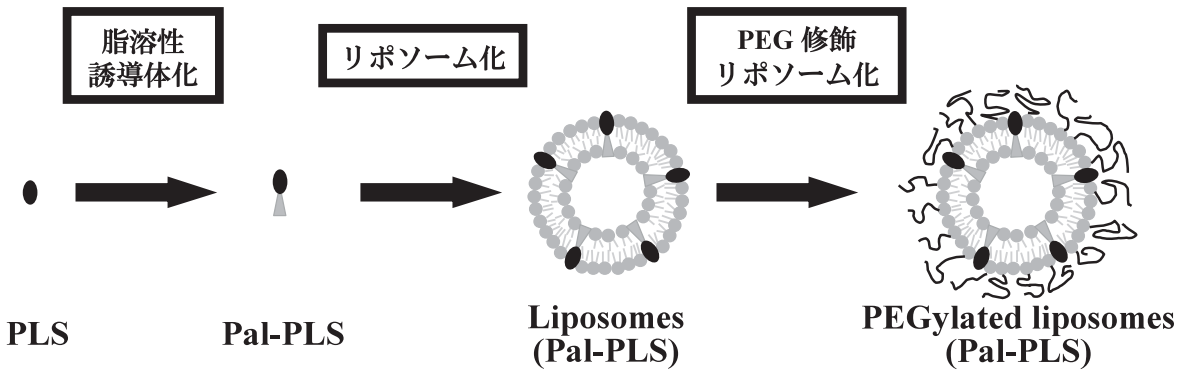


図 1　自己組織化型ナノ微粒子製剤の開発の概略

らかとなっている．一方，Pal-PLS を包含したリポソームは，限外濾過において高い薬物包含率を示し，ゲル濾過の過程においても薬物を安定にリポソームに保持した．これらの結果は，薬物の極めて高い脂溶性がリポソームへの安定な取り込みに重要であることを示している．

また，生体内に投与後のリポソームは，“循環血による希釈”や“生体成分との相互作用”により影響を受ける．そこで，その影響を調べるため，Pal-PLS 包含リポソームにラット血漿を添加後，ゲル濾過を行った．その結果，Pal-PLS 包含リポソーム（EggPC/Chol＝3/2, molar ratio）でさえも，ラット血漿添加により薬物放出が促進された．この薬物放出の程度は，リポソームの構成脂質の組成により違いが認められた（EggPC/Chol と DSPC/Chol）．さらに，polyethylene glycol（PEG）脂質誘導体を添加し，膜表面を水溶性の中性高分子により修飾することで（EggPC/Chol/DSPE-PEG 2K または 5K = 3/2/0.05, molar ratio），リポソームからの薬物放出を有意に抑制できた．これらの結果は，リポソームの脂質組成の選択や PEG 修飾を行うことで，リポソームからの薬物放出に対する生体成分の影響を制御できることを示唆するものである．すなわち，リポソームへの薬物の安定保持には，自己組織化するための薬物自身の脂溶性と，リポソーム自身の製剤修飾の両方が重要である．

3. 肝臓ターゲティング型リポソーム製剤の開発[2,3]

Wistar 系雄性ラットを用い，PLS および Pal-PLS の薬液を静脈内投与後の体内動態を比較したところ，PLS も Pal-PLS も静脈内投与後，速やかに血中から消失した．Pal-PLS は，消失に伴い親薬物 PLS が出現し，体内では PLS に速やかに変換される誘導体であることが示された．この結果は，*in vitro* におけるラット血液中および肝臓ホモジネート中での安定性実験の結果からも確認されている．また，Pal-PLS は，PLS と比較して約 20 倍多く肝臓へ移行した．血液中の palmitic acid は，アルブミンと結合し，肝臓へ移行することが既に報告されている．従って，同様の機序により，Pal-PLS がアルブミンを利用して肝臓に集積したものと考えられる．脂溶性の誘導体は生体成分との結合が上昇する場合が多く，生体成分の特殊な挙動を利用したターゲティングが可能かもしれない．

次に，Pal-PLS を包含した EggPC/Chol および DSPC/Chol リポソームを Wistar 系雄性ラットへ静脈内投与後の体内動態を検討した．各リポソーム製剤は，Pal-PLS 単独投与時に比べ，薬物の血中からの消失がわずかに延び，肝臓において 5 倍以上（PLS に比べ 100 倍以上）の集積が認められた．すなわち，PLS の“肝臓ターゲティング製剤”として臨床応用できる可能性が示された．PLS は自己免疫性肝炎の第一選択薬であり，劇症肝炎においては免疫を司る Kupffer 細胞に作用することで，肝細胞壊死抑制効果を発揮する．PLS を選択的に肝臓へ移行させることで，これら肝臓疾患に対する治療効果の向上が期待できる．

4. 血中滞留型リポソーム製剤の開発[2,3]

PEG 修飾リポソームは，“長期血中滞留型リポソーム製剤”として開発され，“enhanced permeability and retention effect（EPR）効果”を指向したパッシブターゲティングによって，reticuloendothelial system（RES）への移行を回避し，各種癌

への臨床効果の向上が確認されている．現在，本邦においても doxorubicin 包含 PEG 修飾リポソーム Doxil® が臨床で用いられている．上述したように，*in vitro* 実験において，PEG 修飾による薬物放出の抑制が確認されている．

そこで，PEG 脂質誘導体を添加した Pal-PLS 包含リポソームを調製し，Wistar 系雄性ラットへ静脈内投与後の体内動態を検討した．その結果，Pal-PLS を包含した PEG 修飾リポソームでは，Pal-PLS の血中半減期が Pal-PLS 単独投与時に比べ，25 倍以上延長した．また，肝臓への移行では，PEG 修飾を行っていないリポソームに比べ，その値は約 70% 減少した．従って，薬物の肝臓への取り込みを回避したことが，血液中での長時間の滞留化を可能にしたものと考えられる．一方，PEG 脂質の添加量を減少することにより，半減期を短縮することができた．すなわち製剤修飾により，PLS の，“長時間血中滞留型製剤”として応用できる可能性が示された．副腎皮質ホルモンは少量の持続投与により，ショック状態の時に活性化される NF-κB の働きを抑制し，炎症性サイトカインを含めた様々なメディエータを転写段階で制御できることが報告されている．従って，PLS を長時間血中に滞留させることで，単回投与による臨床効果の向上が期待できる．

5. より精密な動態制御を目指して

肝臓への製剤取り込み過程と薬物取り込み過程を解析する目的で，肝臓灌流実験系を用い，薬物包含リポソームの肝臓への移行動態について詳細な速度論的解析を行っている．現在までに，薬物包含リポソームの肝臓内取り込みには，“薬物包含リポソームの状態で両方が取り込まれるもの”と“薬物包含リポソームが血管内皮または肝臓細胞と接触することにより薬物が肝臓へと移行するもの”が存在することを見出した．従って，脂溶性薬物の製剤設計ならびにリポソームを利用した薬物ターゲティングシステムの開発には，リポソームの取り込みを制御する方法と薬物の移行状態を制御する方法が重要であると考えられる．取り込み挙動の解析を進めることでさらに有用な情報を提供したいと考えている．

また，製剤的な観点から，さらなる工夫を進めている．すなわち，水溶性のカチオン性高分子 polyethyleneimine 25000（PEI 25K）を用いて，palmitoyl-PEI 25K（Pal-PEI 25K）の合成を行い，自己組織化する成分のひとつとして可能性を評価している．PEG 修飾と PEI 修飾を組み合わせたハイブリッド高分子修飾リポソームを Wistar 系雄性ラットへ静脈内投与後した結果，PEI 修飾量の増加に伴い血中の薬物消失が促進することを見出した．表面の荷電によるものと考えられるが，分布や動態，薬物移行の程度などが興味深い．リポソームへの多彩な脂質や高分子脂質の導入により，より精密な薬物動態制御が達成出来るものと期待している．

6. お わ り に

以上の研究成果は，薬物を脂溶性誘導体化しリポソームに含有することで，自己組織化型ナノ微粒子製剤を形成させ，製剤的な修飾をさらに付与するこ

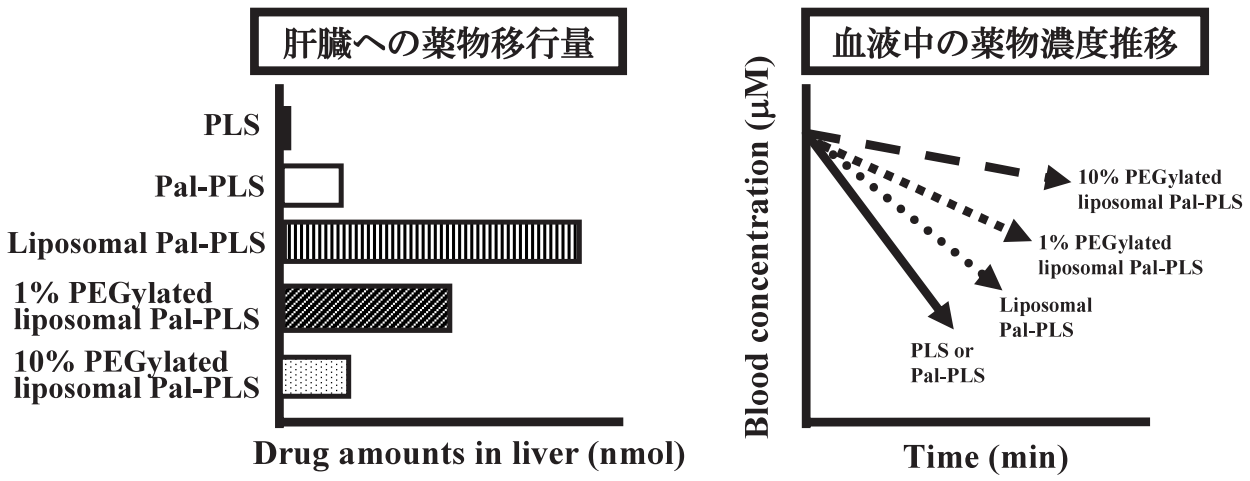


図 2　薬物体内動態実験の結果の概要

とで，薬物の血中滞留性を増加させたり，臓器標的化を可能にできることを実証している．この手法と評価法は，様々な薬物の新製剤開発にも応用できる．本研究結果の概要を図２に示す．今後，自己組織化型ナノ微粒子製剤としてのリポソームの可能性をさらに広げたいと考えている．

本研究を遂行するにあたり，ご指導賜りました長崎大学医学部・歯学部附属病院薬剤部・佐々木均教授，長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・中村純三教授，中嶋幹郎教授，西田孝洋助教授ならびに京都大学大学院薬学研究科・川上　茂助手に深謝すると共に，研究にご協力頂きました大学院生の方々に感謝致します．

引　用　文　献

1) M. Teshima, S. Kawakami, K. Nishida, J. Nakamura, T. Sakaeda, H. Terazono, T. Kitahara, M. Nakashima, H. Sasaki, Prednisolone retention in integrated liposomes by chemical approach and pharmaceutical approach, *J. Control. Release*, **97** (2), 211–218 (2004).
2) M. Teshima, S. Fumoto, K. Nishida, J. Nakamura, K. Ohyama, T. Nakamura, N. Ichikawa, M. Nakashima, H. Sasaki, Prolonged blood concentration of prednisolone after intravenous injection of liposomal palmitoyl prednisolone, *J. Control. Release*, **112** (3), 320–328 (2006).
3) M. Teshima, S. Kawakami, S. Fumoto, K. Nishida, J. Nakamura, M. Nakashima, H. Nakagawa, N. Ichikawa, H. Sasaki, PEGylated liposomes loading palmitoyl prednisolone for prolonged blood concentration of prednisolone, *Biol. Pharm. Bull*., **29** (7), 1436–1440 (2006).