

氏 名 <sup>あお</sup>青 <sup>き</sup>木 <sup>ひろ</sup>宏 <sup>みつ</sup>光  
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)  
 学位記番号 論 薬 博 第 597 号  
 学位授与の日付 平成 10 年 11 月 24 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当  
 学位論文題目 Studies on in vivo Behaviour and Perfused Liver Uptake of Cationic Liposomes  
 in Rat  
 (カチオン性リポソームのラットにおける体内挙動および肝臓灌流法による取り込みに関する研究)  
 (主査)  
 論文調査委員 教授 半田 哲郎 教授 橋田 充 教授 中川 照真

### 論 文 内 容 の 要 旨

リポソームは、リン脂質、コレステロール等を主成分とした脂質二重層よりなる閉鎖小胞であり、その構成成分が脂質であることから毒性が低く、また親水性薬物に限らず親油性薬物も保持できる点から、有用な薬物運搬体と期待され様々な研究が行われている。しかしながら、内水相へ薬物を封入する際の効率の悪さが、リポソームを製剤化する際の一つの問題点となっている。また、全身投与時における細網内皮系による取り込みが、それ以外の組織へ薬物を送達する際の足枷となっている。そこで、本研究では、薬物の封入効率を高め、かつ細網内皮系への集積を回避するリポソームの開発を目的とし、リポソーム表面を新規に合成したアミノ糖脂質で修飾する方法を開発した。また、アミノ糖修飾リポソームを薬物運搬体として用いるために必要な物理化学的性質、体内動態について評価した。さらに、カチオン性リポソームが肝臓に取り込まれる過程を、血液成分との相互作用を考慮に入れ、肝灌流法を用いて評価し、カチオン性リポソームの肝臓取り込みメカニズムを明らかにした。

#### 第 1 章 アミノ糖修飾カチオン性リポソームの調製とSODの内封化

リポソームに正電荷を付与するために通常用いられているステアリルアミンは毒性が強く、臨床に用いるには不適と考えられる。そこで、筆者はこれに代わる塩基性脂質として、アミノ糖(グルコサミン)に脂肪酸がエステル結合したものを合成した。これをレンチン、コレステロールからなるリポソームに組み込み、extrusion法により粒子径を200nm前後に揃えたアミノ糖修飾リポソームを調製した。ヘキサミン定量により、添加したアミノ糖脂質が全てリポソーム膜中に分配していることを確認した。また、ゼータ電位の測定から、アミノ糖脂質を組み込んだリポソームは正に帯電していることが明らかとなった。さらに、マウスを用いた急性毒性実験からステアリルアミンリポソームに比べはるかに毒性が低いことが明らかとなり、筆者の合成したアミノ糖脂質はステアリルアミンに代わる有用な塩基性脂質であることが分かった。

このアミノ糖修飾リポソームを用い、タンパク質薬物モデルとしてSODの大量内封化を試みた。種々のリポソーム調製法で内封効率を比較検討した結果、通常の水和法でも未修飾リポソームに比べ、アミノ糖修飾リポソームは静電的相互作用により10倍のSODを内封化させることが可能であり、封入効率を上げることが難しいとされる蛋白製剤の内封化に有用であることが明らかとなった。

#### 第 2 章 アミノ糖修飾カチオン性リポソームの体内動態

種々のアミノ糖(グルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミン)脂質を合成し、extrusion法によりアミノ糖脂質を20 mol%含むカチオン性リポソームを調製した。静脈投与後の体内動態をラット用いて調べたところ、未修飾リポソームに比べ肝臓への取り込みが減少しており、血中滞留性の向上が見られた。さらに、比較のために合成した中性糖(グルコース、ガラクトース、マンノース)修飾リポソームの体内動態は、未修飾リポソームと有意な差は見られなかった。これより、糖鎖構造ではなく、正電荷が肝臓取り込み回避に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

次に、塩基性脂質を異なるモル比で組み込み、表面電荷密度の異なるカチオン性リポソームの調製し、その体内挙動を調べた。ゼータ電位として約+15mVのカチオン性リポソームは、未修飾リポソームに比べ肝臓の取り込みが低下し、血中滞留性が向上していた。しかし、塩基性脂質組成を高めた、ゼータ電位として+25mV以上のカチオン性リポソームの場合、逆に血中滞留性は低下し、肝臓、脾臓のリポソーム取り込み量は増加した。これらのことから肝臓の取り込みを抑制し、血中滞留性を向上させるためには、リポソームのゼータ電位として最適な電位(約+15mV)が存在することを明らかにした。

### 第3章 カチオン性リポソームの肝臓取り込みのメカニズム

カチオン性リポソームの肝臓取り込みのメカニズムを調べるために、ラット肝臓再灌流実験系を組み立て、リポソームの取り込みを測定した。緩衝液中でのリポソームの取り込み量は、リポソームの正電荷が大きいほど増加しており、カチオン性リポソームの取り込みには、肝細胞との静電的引力が主要因になっていることを明らかにした。

しかしながら、これでは肝臓取り込み回避の最適値が存在することに矛盾する。そこで、血液をリザーバーに添加したところ、未修飾リポソームでは取り込みが増加したのに対し、+15mVに帯電しているカチオン性リポソームでは取り込みが大きく減少した。さらに、血清および赤血球を別々にリザーバーに添加したところ、赤血球を添加した場合にのみ、取り込みの大きな減少が観察された。これより、赤血球がカチオン性リポソームの取り込みに重要な役割を果たしていることを明らかにした。またin vitroの実験より、カチオン性リポソームが赤血球に静電的相互作用により結合することを確認した。

そこで、赤血球と静電的相互作用をしているカチオン性リポソームが、肝臓の取り込みを回避しており、一方、赤血球と相互作用していないフリーのカチオン性リポソームが、肝細胞との静電的相互作用により取り込まれるというモデルを考えられた。最適値の表面電荷密度をもつカチオン性リポソームは、フリーのリポソームの減少により、取り込みを回避すると考えられる。最適値以上の電荷を持つカチオン性リポソームの場合、フリーのリポソーム数はさらに少なくなるが、肝細胞との静電的相互作用がより強いいため、肝臓へ速やかに取り込まれるものと考えられる。

以上、アミノ糖脂質を用いることにより、低毒性のカチオン性リポソームを開発し、SODの大量の内封化に成功した。また、リポソームの表面電荷量を調節することにより、肝臓による取り込みを調節できることを示し、カチオン性リポソームの肝臓取り込みのメカニズムが、主に細胞と赤血球との間の静電的相互作用に基づくことを明らかにした。これらの知見は、臨床応用可能な薬物運搬体としてのリポソームの開発において、有用な基礎的知見となり得るものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

リポソームは、リン脂質、コレステロール等を主成分とした脂質二重層よりなる閉鎖小胞であり、有用な薬物運搬体として期待されている。しかしながら、内水相への薬物封入効率の低さや、全身投与時の細網内皮系による取り込みなどが問題点としてあげられている。申請者は薬物の封入効率を高め、かつ細網内皮系への集積を回避するリポソームの開発を目的とし、リポソームを新規に合成したアミノ糖脂質で修飾する方法を開発した。また、アミノ糖修飾リポソームを薬物運搬体として用いるために必要な物理化学的性質、体内動態ならびに肝臓取り込みについて評価し、以下の研究結果を得た。

リポソームに正電荷を付与するために通常用いられている毒性の強いステアリルアミンに代わる塩基性脂質として、アミノ糖(グルコサミン)に脂肪酸がエステル結合したものを新規に合成した。これをレシチン、コレステロールからなるリポソームに組み込み、カチオン性アミノ糖修飾リポソームを調製した。マウスを用いた急性毒性実験から、ステアリルアミンリポソームに比べはるかに毒性が低く、アミノ糖脂質がステアリルアミンに代わる有用な塩基性脂質であることが示された。

このアミノ糖修飾リポソームを用い、タンパク質薬物モデルとしてSODの内封化を試みたところ、未修飾リポソームに比べ、静電的相互作用により10倍のSODを内封化させることが可能であり、封入効率を上げることが難しいとされる蛋白質製剤の内封化に有用であることが示された。

アミノ糖修飾リポソームのラット静脈投与後の体内動態を調べたところ、未修飾リポソームに比べ肝臓の取り込みが減少しており、血中滞留性の向上が見られた。また、中性糖修飾リポソームとの比較から、糖鎖構造ではなく、正電荷が肝臓取り込み回避に重要な役割を果たしていることが示された。さらに、表面電荷密度の異なるカチオン性リポソームの体内挙動を調べたところ、肝臓の取り込みを抑制し、血中滞留性を向上させる最適な表面電位(リポソームのゼータ電位として約+15mV)が存在することが示された。

ラット肝臓灌流実験によりリポソームの取り込みを測定したところ、緩衝液中でのカチオン性リポソームの取り込みは、肝細胞との静電的引力が主要因になっていることが示された。また、赤血球がカチオン性リポソームの取り込みに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

この赤血球の効果の詳細な研究に基づき、赤血球と静電的相互作用をしているカチオン性リポソームが、肝臓の取り込みを回避しており、一方、赤血球と相互作用していないフリーのカチオン性リポソームが、肝細胞との静電的相互作用により取り込まれるというモデルが新たに提唱された。

以上、本研究は低毒性のカチオン性リポソームを新規に開発し、SODの大量の内封化に成功した。また、リポソームの表面電荷密度を調節することにより、肝臓による取り込みを調節できることを示し、カチオン性リポソームの肝臓取り込み機構が、主に細胞や赤血球との間の静電的相互作用に基づくことを明らかにした。これらの知見は、臨床応用可能な薬物運搬体としてのリポソームの開発において、有用な基礎的知見となり、リポソーム製剤開発に寄与するものと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成10年8月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。