

DDS基剤としてのリポソーム  
～肝へのターゲティングに適した新素材の開発と  
リポソーム表面で促進される酵素反応の発見～

加藤 泰己

## DDS基剤としてのリポソーム

～肝へのターゲティングに適した新素材の開発と  
リポソーム表面で促進される酵素反応の発見～

加藤 泰己

## 目次

緒言	1
第1章 肝へのターゲティングに適した新素材の開発	4
第1節 脂溶性モデル薬物としての $\alpha$ -トコフェロールの 各種注射剤の体内動態	6
1-1. 処方	7
1-2. 内因性 $\alpha$ -トコフェロール	9
1-3. リポソーム処方の血漿中濃度推移と臓器分布	10
1-4. 有機溶媒処方とミセル処方の血漿中濃度推移と臓器分布	13
第2節 HCO60添加リポソームによる $\alpha$ -トコフェロールの 肝臓へのターゲティング	19
2-1. HCO60添加リポソーム及びHCO60ミセルの物理的性質	19
2-2. 静脈内投与後の血漿中濃度推移と臓器分布	22
2-3. 肝臓への集積性に及ぼすリポソームの投与量の影響	25
2-4. 100%PCリポソーム、60%HCO60添加リポソーム およびHCO60ミセルとラット血漿蛋白との相互作用	26
第3節 水性薬物（ドキソルビン）のHCO60添加リポソーム への内包化	31
3-1. HCO60添加リポソームの物理的性質	32
3-2. 塩酸ドキソルビンの内包	32
3-3. 塩酸ドキソルビンのリポソームからの放出性	35

3-4. リボソームと牛血清の相互作用の濁度測定による検討	3 6
3-5. ゼータ電位測定によるHCO <sub>60</sub> 添加リボソームの 牛血清アルブミンおよび牛血清との相互作用の検討	3 7
第4節 小括	4 1
第2章 リボソーム表面で促進される酵素反応の発見	4 2
第1節 各種リボソーム調製法によるインスリンの内包化と トリプシン消化からの保護	4 3
第2節 インスリンのトリプシン消化に及ぼすリボソームの影響	4 6
2-1. インスリンのトリプシン消化	4 7
2-2. 種々の大きさの中性リボソームとインスリンの相互作用	4 9
第3節 リボソームの電荷の影響	5 4
3-1. インスリンのトリプシン消化に及ぼすリボソームの 電荷の影響	5 4
3-2. 種々の電荷のリボソームとインスリンおよびトリプシンの 相互作用	5 6
第4節 小括	6 3
総括	6 5
実験の部	6 7



### 引用文献

85

## 論文目録

94

## 謝辭

95

## 緒言

リボソームおよび脂肪乳剤は薬物の目的臓器および病巣部へ効率よく送達させる手段として、約20年間注目されてきた。リボソームには、水溶性、脂溶性、両親媒性の薬物の何れでも内包可能である。一方、脂肪乳剤は栄養補給を目的とした医薬品として医療現場で既に使用されている。脂肪乳剤は脂溶性の薬物の内包に利用され、デキサメタゾン誘導体とプロスタグランジン類の脂肪乳剤製剤が上市され臨床応用されている。治療を目的としたリボソームの開発としては、欧州でアムホテリシンBリボソームが実用化され、米国でも数年後には市販される見込みである。

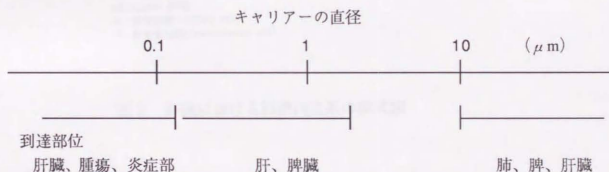


図1 薬物キャリアーの静脈内投与後の体内動態の一般概念

リボソームに限らず、体内、とりわけ血液に入った微粒子は生体の異物認識機構により体内から排除される。図1に示すように薬物キャリアーは静脈内投与後、直径10ミクロン以上では肺、脾、肝のいわゆる細網内皮系（RES）にキャリアーが集積し、約0.2ミクロン以下になると、RESを通過しはじめ、腫瘍や炎症部位に到達することができるとされている。特に、リボソーム、脂肪乳剤、ラテックス粒子等は血中

の蛋白質によりオプソニン化を受け、受容体介在のエンドサイトーシスの後、リソソーム内で分解される。また、粒子径が100 nm以上であれば図2に示すような肝臓の上皮に存在する約100 nmの細胞間隙を通過することができず、マクロファージであるKupffer細胞により貪食される。血中における持続性が必要な薬物には不都合な現象である。

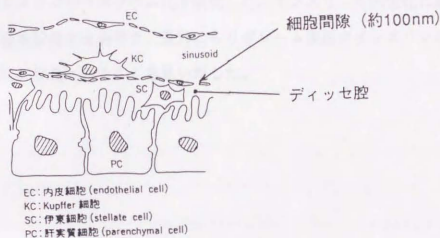


図2 肝臓における細網内皮系の模式図

一方、このようなリボソームの特徴から、肝臓へのターゲティングにリボソームがしばしば利用されている。しかし、未修飾のリボソームはKupffer細胞により貪食されるため、マクロファージの活性化を狙ったものや、癌の肝転移防止等、限られた目的以外に応用することは難しい。これに対し、実質細胞に存在するアシアロ糖蛋白受容体をターゲットとした、ガラクトース修飾リボソームやグリコフォリン等の糖蛋白修飾リボソームの研究が行なわれている。しかしながら、実質細胞、非実質細胞に対する選択性が少ないことや、コスト高等の問題も有り、実用化には至っていない。

著者らはこれらの問題を改善し、より簡便な肝指向性リボソームの開発を目標に本

研究に着手した。 $\alpha$ -トコフェロールをモデル薬物として、種々検討したところ、ポリオキシエチレン基を有する非イオン性界面活性剤であるHCO60（ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油）に肝指向性の性質があることを見いだした。HCO60をリボソームに添加することにより、脂溶性薬物のみならず、水溶性薬物にも適用可能な新規肝指向性リボソームを開発した。

一方、消化酵素からの保護や、注射後の血中酵素からの保護、肝へのターゲティングを目的にインスリンのリボソーム化を研究した。インスリンの内包化に適したリボソームの作製方法を研究する過程で、意外にもリボソーム表面でインスリンのトリプシンによる消化反応が促進されることを見いだした。

## 第1章 肝へのターゲティングに適した新素材の開発

種々の薬物キャリアーの内、リボソームは内包する薬物をあまり限定しない点で優れたキャリアーと言える。著者らはリボソームを基本素材として肝臓へのターゲティングを試みた。

1980年代までに以下のような報告がある。リボソームを静脈内に投与した場合、肝臓や脾臓に発達した細網内皮系 (RES) により速やかに捕捉され、血中から速やかに消失することが知られている。<sup>1)</sup> RESによる取り込みはリボソームの大きさ、<sup>2-6)</sup> 表面電荷、<sup>7, 8)</sup> リボソームの投与量、<sup>9, 10)</sup> リボソームを構成する脂質組成<sup>11-13)</sup> により左右される。これまでの研究では、大きなリボソームは肝臓の Kupffer 細胞や脾臓の fixed マクロファージに取り込まれる<sup>2-6)</sup> とされている。100 nm 以下のリボソームは肝臓の内皮細胞に存在する細胞間隙を通過し、ディッセ腔を通ることができることから肝臓の RES を回避するとされている。<sup>14)</sup> 同様に多くの研究者の報告でもリボソームの血中持続性はサイズが小さい程高くなるとされている。<sup>5, 6)</sup> これに対して最近、Allen<sup>15)</sup> や Liu<sup>16)</sup> の報告で、ガングリオシド GM1 を付与したリボソームの大きさを変えた場合、100 nm 以下の小さなリボソームでは、ガングリオシド GM1 によるステルス効果は発揮されず、むしろ肝臓への集積が増大することが明らかとなった。この現象については粒子径が小さくなるために約 100 nm の孔径のディッセ腔を通過し、肝臓の実質細胞に捕捉されたと考えられている。

ところで、リボソームを用いた肝臓へのターゲティングの研究が行われている。肝実質細胞中にはアシアロ糖蛋白質受容体が存在し、ガラクトース残基を認識する。ガラクトース残基を有する糖脂質、糖蛋白質、ガラクトースのコレステロール誘導体を用いてリボソームや低密度リボ蛋白 (LDL) を修飾し、肝臓中に存在する受容体を標的



とした方法が試みられている。<sup>17-21)</sup> さらに、グリチルリチンによりリボソームを修飾した研究もある。<sup>22)</sup> LDLのアポ蛋白にラクトースを還元的に共有結合させた場合、肝臓の実質細胞より、Kupffer細胞に集積することが報告されている。<sup>23)</sup>

In vitroの研究ではTween 80のような非イオン性界面活性剤をリボソームに4%添加することにより、マクロファージによる捕捉が上昇することも報告されている。<sup>24)</sup>



図3 1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol (DAPG)

## 第1節 脂溶性モデル薬物としての $\alpha$ -トコフェロールの各種注射剤の体内動態

$\alpha$ -トコフェロールを薬効成分とする医薬品は既に上市されている。また、 $\alpha$ -トコフェロールはリポソームの酸化防止剤<sup>2,5)</sup>として有望視されている。 $\alpha$ -トコフェロールのような水に難溶性の薬物の可溶化方法に関しては、エタノール、プロピレングリコール等の有機溶媒<sup>2,6)</sup>やエマルジョン、ミセルおよびリポソームなどのコロイド<sup>2,7-3,2)</sup>やシクロデキストリン<sup>3,3)</sup>の研究がある。本研究では $\alpha$ -トコフェロールのリポソームを中心に、ミセル、有機溶媒の各処方へのラットにおける静脈内投与後の血中濃度推移と臓器分布について検討した。

最近開発されたエクストルーダー (Extruder) を用いることにより、リポソームの粒子径を自在に調整できるようになった。そこで、本研究においてリポソームの粒子径の違いによる体内動態を詳細に検討し、血中で最も安定な粒子径を探索した。一方、ミセル処方を検討したところ、HCO 60 ミセルが肝集積性に優れていることを見いだした。

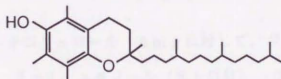


図3  $\alpha$ -トコフェロールの構造

### 1-1. 処方

リボソーム処方は $\alpha$ -トコフェロール 4mgに対して、大豆ホスファチジルコリン (Soy PC) 100mgを用いて脂質薄膜形成後、水和して大きな多重層リボソーム (MLV) を調製した。リボソームのサイジングには Extruder およびプローブ型超音波照射機を使用した (図4)。

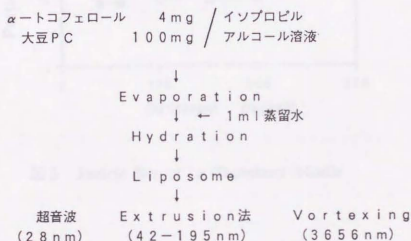


図4 リボソームの調製法

有機溶媒処方は $\alpha$ -トコフェロール 4mgに対して、ポリエチレングリコール (PEG) 400 0.7ml、エタノール (EtOH) 0.3ml用いて可溶化した。

ミセル処方は界面活性剤により形成されるミセルの大きさ (動的光散乱法、DLS) を指標に添加する非イオン性界面活性剤の量を決定した。 $\alpha$ -トコフェロール量を固定し、界面活性剤の量を増加させると、ミセルの粒子径は減少した (図5)。ミセルの粒

子径の減少が認められなくなった時の界面活性剤量を処方量とした。

各処方 ( $\alpha$ -トコフェロール 4 mg、1 ml 中) および粒子径を表 1 に示す。

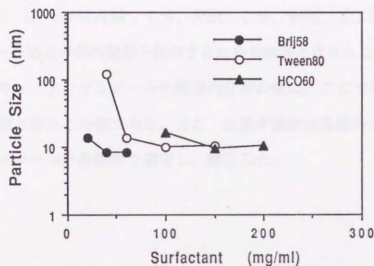


図 5 Particle Size of  $\alpha$ -Tocopherol Micelle

表 1 Formulation and Particle Size of  $\alpha$ -Tocopherol Injection

Type	Formulation		Particle Size (nm)
Cosolvents	PEG400 0.7ml, EtOH 0.3ml		
Micelle	Brij58	Brij58 40mg	9.2 $\pm$ 1.0
	Tween80	Tween80 100mg	9.6 $\pm$ 1.1
	HCO60	HCO60 150mg	10.0 $\pm$ 2.2
Liposome	28nm	Soy PC 100mg	28.4 $\pm$ 7.9
	42nm	Soy PC 100mg	42.2 $\pm$ 4.0
	75nm	Soy PC 100mg	74.5 $\pm$ 4.0
	106nm	Soy PC 100mg	105.8 $\pm$ 10.5
	151nm	Soy PC 100mg	151.4 $\pm$ 3.8
	195nm	Soy PC 100mg	194.5 $\pm$ 11.7
	3656nm	Soy PC 100mg	3655.6 $\pm$ 171.3

## 1-2. 内因性 $\alpha$ -トコフェロール

ラットの各臓器における内因性  $\alpha$ -トコフェロールを測定した。肝臓、脾臓、腎臓および肺における内因性  $\alpha$ -トコフェロールは文献値<sup>3,4)</sup>と一致した(表2)。また、個体差も少なく(各c vは肝臓; 7%, 脾臓; 5%, 腎臓; 11%, 肺; 6%)、 $\alpha$ -トコフェロール処方の体内動態を検討するための障害とはならないことが確認された。本研究における  $\alpha$ -トコフェロールの臓器内分布の値は、ここで得られた内因性  $\alpha$ -トコフェロール値で補正した値である。また、血漿中濃度は各処方の投与前における内因性  $\alpha$ -トコフェロールを各個体で測定し、補正した。

表2 Endogenous  $\alpha$ -Tocopherol in Various Tissues of Rats

Tissue	$\alpha$ -Tocopherol (mg/rat)	
	Results	Referece
Liver	0.273 $\pm$ 0.019	0.269
Spleen	0.026 $\pm$ 0.001	0.030
Lung	0.047 $\pm$ 0.003	0.045
Kidney	0.024 $\pm$ 0.003	0.024

Data represents the mean  $\pm$  SD of more than three rats.



### 1-3. リポソーム処方の血漿中濃度推移と臓器分布

リポソームの血漿中濃度推移を図6に臓器内分布を図7に示す。粒子径75 nmのリポソームが最も血漿中からの消失が遅かった。これに対して、MLV (3656 nm) は血漿中からの消失が最も速かった。予想に反して、超音波照射で得られた SUV (28 nm) は血漿中からの消失が速かった。臓器分布は75 nmリポソームの RES による捕捉が最も少なかった。脾臓への捕捉は42 nmから3656 nmへとリポソームの粒子径が大きくなるに連れ増大した。肺への取り込みはMLVが最大であった。肝臓への取り込みはSUV (28 nm) が最大であった。

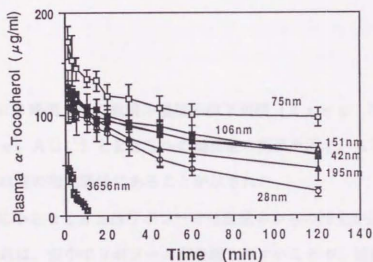


図6 Plasma Concentration of  $\alpha$ -Tocopherol after iv Administration of Liposome Formulation to Rats

Data represented are means  $\pm$  SD from more than three rats.

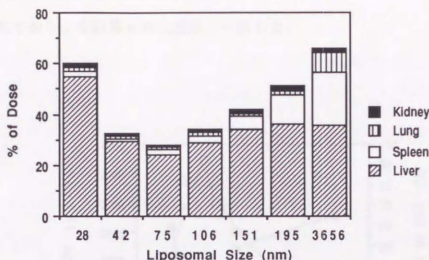


図7 Tissue Distribution of  $\alpha$ -Tocopherol at 2 hr after iv Administration of Liposome Formulation to Rats

Data represented are means from than three rats.

図8に2時間までの血漿中濃度曲線下面積 (Area Under the Curve、AUC) とRESへの捕捉量の関係を示す。AUCとRESによる取り込みは、ほぼ逆の相関関係にあることが示された。

非常に小さな28 nmリボソームは血漿中からの消失が速く、肝への移行性が高かった。これは、血中でリボソームが崩壊しやすいことや、補体、アポ蛋白等によるオプソニン化が主な原因と考えられた。

70-100 nmのリボソームの高い持続性はディッセ腔を通過できることにより得られたものと考えられた。

150 nm以上のリボソームは粒子径の増大と共に脾臓への取り込みが増大した。これは、Li u<sup>35)</sup>が考察したような濾過機構による物理的な捕捉が主であると考えられる。

また、肺への取り込みは $3\mu\text{m}$ 以上になると増大することが、A b r a<sup>36)</sup>により報告されており、今回得られた結果と一致した。

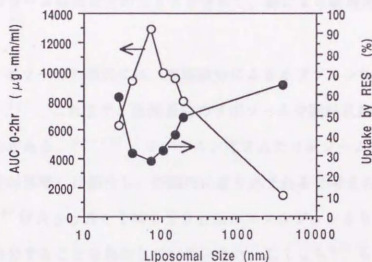


図8 Influence of Liposome Size on AUC and Uptake by RES (Liver, Spleen, Lung)

体内動態を検討する場合、コレステロールを添加したり、相転移温度の高いリン脂質を用いる等、硬いリポソームとすることが一般的に行われている。著者らは B l u m e<sup>37)</sup>の考えと同様に、コレステロールの添加は過コレステリン症を引き起こす可能性があることから使用を避けた。

A l l e n<sup>38)</sup>はHDLとSUVを $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションしたところe g g P Cは1時間で13%の脂質がHDLに移行したことを報告した。

リポソームが血中で完全に粒子としての存在がなくなる<sup>39, 40)</sup>か、単にリポソームの一部にp o r eが生じる<sup>41)</sup>のかは議論されている点である。

のように、血中におけるHDLへの脂質移行によるリポソームの分解は重要であ

る。この場合、 $\alpha$ -トコフェロールは移行した脂質と共にHDLに移り、肝臓による受容体介在の取り込みが起きている可能性が考えられる。

一般的にはMLVはリークも少なく、HDLへの脂質移行も少ないとされ、小さなリポソームの方がリーク、脂質移行共に大きいとされている。<sup>42, 43)</sup> 本実験においても、大きなリポソームはほぼ元の大きさを留めて、肺により物理的な捕捉を受けたものと思われる。

血中からのリポソームの消失には、血清成分によるオプソニン化が関連するものと考えられている。<sup>44)</sup> これまで、血清蛋白のリポソームや脂肪乳剤への結合と代謝に関する多くの報告がある。<sup>45-48)</sup> オプソニン化されたリポソームは肝臓の受容体(ApoB:E受容体等)に結合し、肝臓内に取り込まれると考えられている。<sup>43)</sup> Tajimaら<sup>49)</sup>はApoA-Iは230 nmのエマルジョンより27 nmの小さなエマルジョンに結合することを報告している。また、Liur<sup>50)</sup>も間接的にはあるが、DOPE/オレイン酸リポソームへの血漿蛋白の結合は小さいリポソームの方が多いと考察している。本研究においても、28 nmのリポソームにはApoEまたはその他の血漿蛋白が結合し、肝臓において受容体介在の取り込みが生じたものと推察される。

以上より、リポソームの中で血中で安定な大きさは70~100 nmであることがわかった。メンブランフィルターによる無菌化や保存安定性、およびエクストルーダーによる生産性等を考慮し、本研究の基本リポソームの大きさを100 nmとし、以後の検討を行なうことにした。

#### 1-4. 有機溶媒処方とミセル処方の血漿中濃度推移と臓器分布

有機溶媒処方とミセル処方の血漿中濃度推移と臓器内分布を図9、10に示す。有機溶媒処方は血漿中からの消失が速かった。ミセル処方はBrij 58 > Tween

80 > HCO60 の順に血漿中からの消失が速かった。

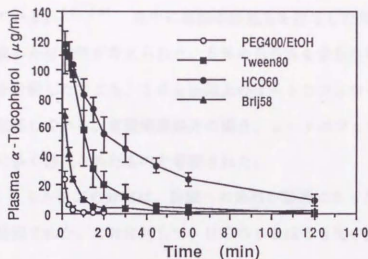


図9 Plasma Cocentration of  $\alpha$ -Tocopherol after iv Administration of Micelles or Water-Miscible Multi-Cosolvents Formulation

Data represented are means  $\pm$  SD from more than three rats.

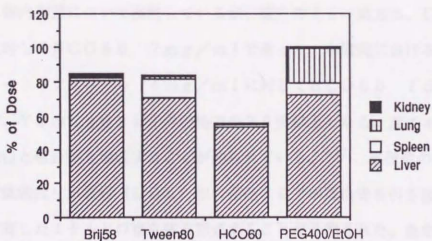


図10 Tissue Distribution of  $\alpha$ -Tocopherol at 2 hr after iv Administration of Micelles or Water-miscible Multi-Cosolvents Formulation

Data represented are means from more than three rats.



臓器内分布では、有機溶媒処方では約20%が肺に集積していることが特徴的であった。一般的には $7\mu\text{m}$ 以上の粒子径は肺に捕捉されることが知られている。<sup>51)</sup> 有機溶媒処方の場合、希釈することにより急激に薬物の溶解度が減少し、結晶析出することが知られている。<sup>52, 53)</sup> 血中に有機溶媒処方を投与した後、 $\alpha$ -トコフェロールの油滴が生成した可能性が考えられた。5%のBSAを含む生理的なリン酸緩衝液で有機溶媒処方を希釈したところ、 $10\mu\text{m}$ 以上の $\alpha$ -トコフェロールの微粒子が発生することを別途確認している。有機溶媒処方の場合、 $\alpha$ -トコフェロールの微粒子が血中で生成し、肺に多く捕捉されたものと考察された。

一方、ミセル処方の分布は、肝臓への集積が顕著であった。Brij 58は80%が肝臓に捕捉された。これに対して、HCO 60は53%が肝臓に捕捉された。Tween 80はこれらの中間に位置した。さらに、Brij 58、HCO 60は臓器集積量のほぼ全量が肝臓に集まる、すなわち肝指向性を有することが見いだされた。Brij 58は毒性が強いことから、医薬品には使用されていない。HCO 60は医薬品の添加物としても使用されていることから、本研究の目的である、肝臓へのターゲティングに有用な基剤と考えられた。

ここでミセル処方の体内動態を考察する。Yamaguchiら<sup>31)</sup>はCoQ10の処方による体内動態について検討しているが、彼らのミセル処方は、CoQ10  $1\text{mg/ml}$ に対してHCO 60  $7\text{mg/ml}$ であった。本研究におけるHCO 60ミセル処方は $\alpha$ -トコフェロール  $4\text{mg/ml}$ に対してHCO 60  $150\text{mg/ml}$ 使用しており、Yamaguchiらの処方の20倍以上となる。非イオン性界面活性剤は種々の蛋白と複合体を形成することが知られている。<sup>54)</sup> 本研究の系では血中の蛋白、例えば低密度リポ蛋白(LDL)中に存在するアポ蛋白等を引き抜き $\alpha$ -トコフェロールを含有したミセルとの複合体を形成することが予想された。血中の蛋白と複合体を形成することにより、肝臓に存在する受容体(LDL受容体等)を介した取り込みが生じた可能性が考えられる。これに対して、Yamaguchiらの系では界面活性剤が少ないため、血中の蛋白との複合体形成が生じにくいものと予想される。

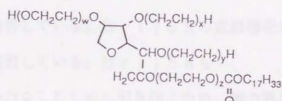
界面活性剤の種類の違いによる血中からの消失と臓器分布の差は、使用した界面活性剤の物性および構造の違いが原因と考えられる。各界面活性剤の物性と構造を表3と図11に示す。

表3 界面活性剤の物性

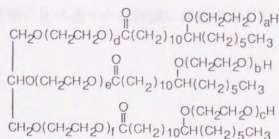
Surfactant	POE Number	HLB	CMC (M)
Brij58 [PEG(20) cetyl alcohol]	20	15.7 , 16	$7.7 \times 10^{-5}$
Tween80 [PEG(20) sorbitol monooleate]	20	15.0 , 16	$9.9 \times 10^{-6}$
HCO60 [PEG(60) hydrogenated castor oil] [cremophor RH60]	60	15 - 17	$2.6 \times 10^{-5}$



Brij 58



$$w + x + y + z = 20$$



Tween 80

$$a + b + c + d + e + f = 60$$

HCO-60

図11 界面活性剤の構造

物性面では膜蛋白の抽出等が親水性疎水性バランス (HLB) に左右され、HLB 値 12.5-14.5 の非イオン性界面活性剤が最も膜蛋白の抽出に適していることが知られている。<sup>55)</sup> しかし、本研究に用いた界面活性剤の間には大きなHLBの差はなく、むしろ界面活性剤の構造の違いが大きな要因と考えられる。ポリオキシエチレン (POEまたはPEG) 基の数はBrij 58、Tween 80は20、HCO 60は60である。また、図11のようにBrij 58は直鎖状の構造をしており、Tween 80、HCO 60は分岐した構造である。最近、Morita<sup>56)</sup> はリポソームをPEG化ホスファチジルエタノールアミンで修飾する際、長いPOE鎖の方が短いものに比べ血中滞留性を上げることが報告している。HCO 60のPOE鎖が60と他の界面活性剤より多いため、HCO 60ミセル処方では血漿中からの消失が比較的遅かったものと思われる。また、Tween 80の分岐したPOE鎖が $\alpha$ -トコフェロール微粒子の表面を効率よく覆うことができるため、同じPOE鎖でもBrij 58よりTween 80ミセルが血中持続性であるものと考察された。

さらに、HeleniusとSimons<sup>57)</sup> は1gのTriton X-100が2gのアポ蛋白をLDLから引き抜くことを報告している。Brij 58の直鎖構造はTriton X-100の構造 (図12) と類似している。Brij 58もTriton X-100と同様、多量のアポ蛋白をLDLから引き抜くため、他の界面活性剤に比べ速やかに肝臓に存在するLDL受容体により認識されることが考えられた。

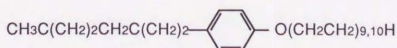


図12 Triton X-100の構造

これまで、 $\alpha$ -トコフェロールの種々の処方の静脈内投与後の体内動態を各処方と血漿蛋白との相互作用を中心に議論したが、その他の重要なポイントとしては次のようなものが挙げられる。

(1) 赤血球や血小板のような血液成分との相互作用

(2) 各処方の血液中での安定性

これらを解明するためにはさらに実験手法を変え詳細に検討する必要がある。

## 第2節 HCO60添加リボソームによる $\alpha$ -トコフェロールの肝臓へのターゲティング

非イオン性界面活性剤による微粒子のコーティングは肝臓による捕捉を減少させることが報告されている。<sup>58-62)</sup> しかしながら、非イオン性界面活性剤を肝臓へのターゲティングに応用した研究例はない。前節において、 $\alpha$ -トコフェロールの非イオン性界面活性剤ミセル処方、血漿中からの消失が速く、RESへの移行が顕著であった。これらのミセルの中でTween 80に脾臓への分布も比較的多く認められたが、Brij 58、HCO60は肝臓へ特異的に集積することが見いだされた。

著者らは、HCO60の構造が分岐していることからリン脂質と合わせることでよりリボソームを形成することができるのではないかと考えた。さらに、HCO60を添加したリボソームが肝指向性を示すであろうとの仮説を立て検討した。

### 2-1. HCO60添加リボソームおよびHCO60ミセルの物理的性質

$\alpha$ -トコフェロール 4mg、大豆PCとHCO60の合計 100mgより構成される大きなリボソームを調製後、エクストルーダーによりサイジング ( $0.1 \mu\text{m}$ ) した。

図13に示す電子顕微鏡写真のように、90%のHCO60を添加したものでも脂質二重膜を持つ閉鎖小胞を形成していることが確認された。興味深いのはHCO60を60%添加したリボソームの脂質二重膜の間隔がやや広がっていることである。これはHCO60が持つ水和水によって脂質二重層の間隔が広げられたものと推察された。

Poly(oxyethylene)-nonyl-phenyl alkyl



surfactant (Triton) をジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) リポソームに添加した場合、リポソームの繰り返し二重層 (repeat spacing) の間隔が広がることが報告されている。<sup>63)</sup> この報告によると、リン脂質の相転移温度以上において、POEの数が10では繰り返し二重層の間隔が約2 nm広がる。また、リン脂質の相転移温度以下においてはアルキル基のDPPC膜への侵入が少ないことからPOEの数が10では約0.5 nmしか広がらない。本研究で使った大豆PCは常温では相転移温度以上であることから、HCO60の添加により、繰り返し二重層の間隔が数nm程度広がったものと考察された。

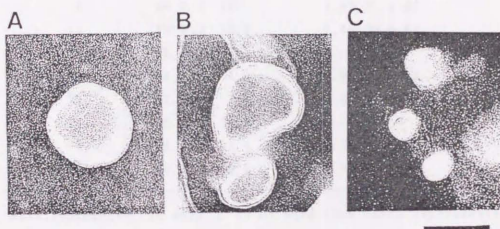


図13 Electron Microscope Images of Liposomes Containing Various Amounts of HCO60 by negative Staining

Magnification,  $\times 100,000$ ; size of bar, 100nm  
A, 100% PC; B, 60% HCO60; C, 90% HCO60.

表4にHCO60を添加したリポソームおよびミセルの物理的性質を示す。  
Zeta電位はHCO60の添加量には余り依存せず0.5-5 mVであった。5-7.5%のPEG-DSPCで修飾した場合は負に5-8 mVの電位<sup>64)</sup>であり、

HCO60添加リポソームは異なったものとなっている。また、粒子径はリポソームの作製を孔径100 nmのポリカーボネート膜によるエクストルージョン法によったが、90%のHCO60を添加したものは約65 nmと100 nmより小さくなった。

表4 Physical Properties of the PC Liposome,  
PC/HCO60 Liposomes or HCO60 Micelles

HCO60 (%)	Size (nm)	Zeta Potential (mV)
0	94.0 $\pm$ 13.7	2.02 $\pm$ 1.80
10	105.5 $\pm$ 5.3	0.46 $\pm$ 2.83
50	98.6 $\pm$ 3.9	—
60	92.7 $\pm$ 4.5	4.98 $\pm$ 1.03
70	92.4 $\pm$ 7.3	2.27 $\pm$ 2.84
80	95.0 $\pm$ 11.8	—
90	64.1 $\pm$ 14.4	3.24 $\pm$ 0.60
100	43.8 $\pm$ 4.8	4.92 $\pm$ 0.55

Data represents the mean  $\pm$  SD of more than three experiments.

Triton X-100は卵黄PCと2:1のモル比で混合ミセルを形成することが知られている。<sup>65)</sup> これに対して、HCO60の場合、90%のHCO60を添加した場合でも混合ミセルとはならなかった。これは、HCO60の構造の特徴が閉鎖小胞を形成するのに都合が良いことが原因と思われる。HCO60添加リポソームは図14のように、リポソーム膜中にHCO60の疎水部が突き刺さり、水溶性のPOE(PEG)鎖は水中に広がっているものと推察される。



図14 HCO60添加リポソーム推定構造

## 2-2. 静脈内投与後の血漿中濃度推移と臓器分布

第1節と同様にラットを用いて静脈内投与後の体内動態を検討した。血漿中 $\alpha$ -トコフェロール濃度推移を図15に示す。HCO60の添加量の増大と共に血中からの消失が速くなった。表5にAUCを示す。AUCはHCO60無添加のものに比べ60%

のHCO60を添加したものは3分の2に、80%のHCO60を添加したものは2分の1まで減少した。また、各臓器への分布を図16に示す。肝臓への集積量はHCO60の添加量に依存して肝臓への分布量が増加した。特に、HCO60を50%以上添加した場合肝臓への移行性の増大が顕著であった。HCO60無添加のものに比べ60%のHCO60を添加した場合は約2倍に、80%のHCO60を添加した場合は約3倍まで上昇した。

本実験に用いたリボソームの粒子径は80-90nmであり、ディッセ腔を通過する大きさと考えられ、肝実質細胞との接触が大きいことが予想される。リボソームの肝実質細胞による取り込みがHCO60の添加により増大した可能性が考えられる。

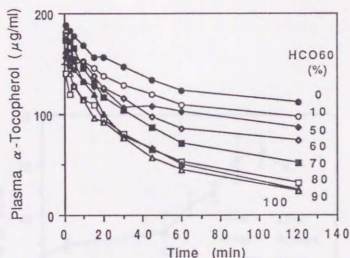


図15 Plasma Concentration of  $\alpha$ -Tocopherol after i.v. Administration of Liposomes Containing Different Amounts of HCO60 or HCO60 Micelles to Rats

Data represented are means from more than three rats.

表 5 AUC after i.v. Administration of Liposomes Containing  
Different Amounts of HCO60 or HCO60 Micelles to Rats

HCO60 (%)	AUC 0→2h ( $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$ )
0	15932 $\pm$ 638
10	14086 $\pm$ 693
50	12664 $\pm$ 278
60	11943 $\pm$ 481
70	10255 $\pm$ 1022
80	7570 $\pm$ 960
90	7665 $\pm$ 733
100	6894 $\pm$ 570

Data represented are means  $\pm$  SD from more than three rats.

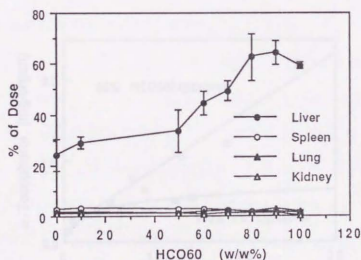


图 16 Tissue Distribution of  $\alpha$ -Tocopherol 2 hr after i.v. Administration of  
Liposomes Containing Different Amounts of HCO60 or HCO60 Micelles to Rats  
Data represented are means  $\pm$  SD from more than three rats.

### 2-3. 肝臓への集積性に及ぼすリボソームの投与量の影響

リボソームの投与量を変え、肝臓への $\alpha$ -トコフェロールの集積性の変化を検討した。処方表は表6に示すような、100%PCリボソームおよびHCO60添加リボソームを用いた。

表6 100%PCリボソームおよびHCO60添加リボソームの処方

(1ml中)

100%PCリボソーム		60%HCO60リボソーム	
$\alpha$ -トコフェロール	4 mg	$\alpha$ -トコフェロール	4 mg
PC	100 mg	PC	40 mg
		HCO60	60 mg

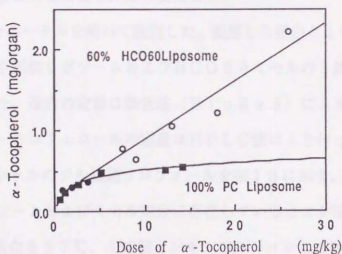


図17 Dose Dependency of Accumulation of  $\alpha$ -Tocopherol in Liver



図17に $\alpha$ -ートコフェロール換算のリボソームの投与量に対する $\alpha$ -ートコフェロールの肝臓への集積量を示した。100%PCリボソームには飽和現象が認められたが、HCO60添加リボソームには、投与した範囲内では飽和現象が認められなかった。

一般に肝臓によるリボソームの取り込みはKupffer細胞による貪食や、レセプター介在の取り込みが考えられている。<sup>66, 67)</sup> Kupffer細胞による取り込みは飽和することが知られている<sup>1)</sup>ことから、HCO60添加リボソームの取り込みにはKupffer細胞の関与が低いものと推察される。

#### 2-4. 100%PCリボソーム、60%HCO60添加リボソームおよびHCO60ミセルとラット血漿蛋白との相互作用

リボソームまたはミセルが血中に存在する蛋白質と複合体を形成するかどうか、また、 $\alpha$ -ートコフェロールがリボソームまたはミセルから蛋白質に引き抜かれるかどうかを知るため、ラット血漿蛋白との相互作用を検討した。

ラット血漿をエーテルを用いて脱脂した。脱脂した蛋白と100%PCリボソーム、60%HCO60添加リボソームおよびHCO60ミセルの3処方との相互作用をゲル濾過法で検討した。蛋白の定量は染色法(BioRad)により、リン脂質の定量は酵素法により、 $\alpha$ -ートコフェロールの定量はHPLC法により行った。

まず、イニシャルのゲル濾過プロフィールを図18に示す。3処方共、 $\alpha$ -ートコフェロールはリボソームおよびミセル画分に存在していることが確認された。

ラット血漿蛋白と37℃、1時間インキュベーションした後のゲル濾過プロフィールを図19に示す。100%PCリボソームおよび60%HCO60添加リボソームはイニシャルに比べ大きな変化は認められなかった。これに対して、ミセル処方では、 $\alpha$ -ートコフェロールの分布が変化し、溶出するフラクションが1フラクション後方にシフ

トした。

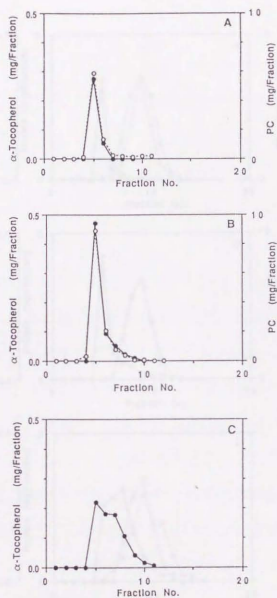


図18 Gel Filtration of 100% PC Liposome, 60% HCO60 Liposomes, or HCO60 Micelle

A, 100% PC liposomes; B, 60% HCO60 liposomes; C, HCO60 micelle

●,  $\alpha$ -tocopherol; ○, PC.

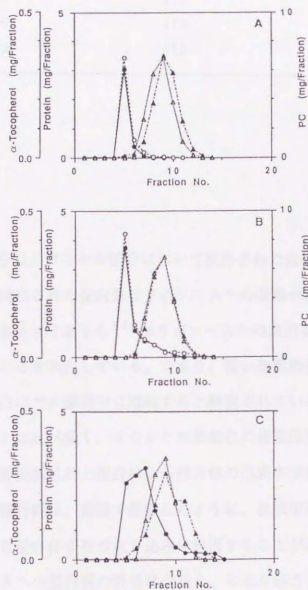


图 19 Gel Filtration of 100% PC Liposome, 60% HCO60 Liposomes, or HCO60 Micelle after Incubation with Rat Plasma Protein at 37°C

A, 100% PC liposomes; B, 60% HCO60 liposomes; C, HCO60 micelle  
 ●,  $\alpha$ -tocopherol; ○, PC; ▲, proteins; △, rat plasma proteins only.

表7 Amount of Plasma Protein in Liposome or Micelle Fraction

HCO60 (%)	Protein ( $\mu$ g/Fraction No. 5, 6)
0	181
60	152
100	456

リポソーム画分およびミセル画分において検出された血漿蛋白の量を表7に示す。リポソーム画分で検出された蛋白量はリポソームへの吸着が多いであろうとの予想に反して少なかった。Senior<sup>68)</sup>はリポソームへの血清蛋白の吸着はゲル濾過法により容易に外れることを報告している。つまり、弱い静電的相互作用や疎水性相互作用により吸着した蛋白はゲル濾過中に遊離すると解釈されている。ミセル画分で検出された蛋白はリポソームに比べ多く、ミセルと血漿蛋白の相互作用がかなり強いものであることが予想され、界面活性剤と蛋白による複合体の形成が示唆された。ミセル処方肝臓への速やかな移行性は、前節で推察したように、血液中の蛋白質との複合体形成により肝臓に存在する受容体介在の取り込みに起因することが示唆された。60% HCO 60添加リポソームへの蛋白質の吸着は少なく、ミセル処方とは異なった機構で肝臓に取り込まれている可能性が考えられた。

本実験ではAllen<sup>38)</sup>やGupta<sup>69)</sup>の報告のようにリポソームから血漿成分へのリン脂質の移行は観察されなかった。本実験系では脱脂した血漿蛋白を用いたため、リポ蛋白としての存在はない。従って、アポ蛋白のリポソームへの吸着はある程度起きるが、リン脂質を引き抜いて戻す所がないためアポ蛋白が吸着したままとなる

ことが予想される。

さらに、 $\alpha$ -トコフェロールは血中で100%PCリボソーム、60%HCO60リボソームおよびミセルから血漿蛋白へほとんど移行しないことが確認された。これは *in vivo* において $\alpha$ -トコフェロールがキャリアーに含有されたまま肝臓に集積した可能性を示唆するものと思われる。

本研究で使用した2種類のリボソームは100nm付近であることからディッセ腔を通過し、肝実質細胞に到達できる可能性が高い。HCO60添加リボソームはディッセ腔を通過後、肝実質細胞に到達し、さらに何らかの作用により100%PCリボソームに比べ多くのリボソームが捕捉されたものと思われる。100%PCリボソームとHCO60添加リボソームの差としては、1) オブソニンを受ける蛋白の種類が違う、2) HCO60が多量に含まれることから、PEGによる細胞融合<sup>70-72)</sup> が起きている、等が考えられる。肝臓への捕捉がHCO60の添加量が10-50%までは僅かに増加するだけであるのに対し、60%以上添加すると急激に増加したことは、PEG量の増大による細胞融合の可能性を示唆するものと思われる。PEGによるリボソームの融合は約30%以上のPEGを用いた時に起きるとの報告もある。<sup>73)</sup> Baumanら<sup>74)</sup> は *in vitro* でアシアロ糖蛋白受容体を組み込んだリボソームをPEGを併用し細胞に融合させた。PEG鎖が約15のPEG修飾脂質を50%と高濃度含有するリボソームが細胞と融合するという報告もある。<sup>75)</sup> しかしながら、HCO60添加リボソームの肝臓への取り込みの機構の解明には、さらに詳細な検討が必要である。

### 第3節 水溶性薬物（ドキソルビシン）のHCO60添加リポソームへの内包化

リポソームにHCO60を添加することにより脂溶性薬物である $\alpha$ -トコフェロールの肝臓へのターゲティングが可能となることを見いだした。本節では内包する薬物を脂溶性の $\alpha$ -トコフェロールから比較的水に対して溶解性の高い塩酸ドキソルビシン(DOX)に変え検討を加えた。DOXを図20に示す。

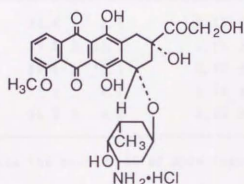


図20 Structure of DOX

DOXをリポソーム化する目的の1つに心毒性の軽減が挙げられている。<sup>76-78)</sup> さらにリポソーム化したDOXは癌の肝転移に有効であることが報告されている。<sup>79-81)</sup> DOXを内包する方法としては酸性リン脂質を用いて静電的にDOXをリポソームに結合させる方法<sup>82-84)</sup> や、pH勾配法を用いて高内包率を得る方法<sup>85-89)</sup> が知られている。本研究では、pH勾配法を用いてDOXをHCO60添加リポソームに内包することを試みた。



### 3-1. HCO60 添加リポソームの物理的性質

HCO60 を添加したリポソームの物理的性質を表8に示す。本節では卵黄PCを用いてリポソームを調製したが、先の大豆PCと同様な物理的性質であった。

表8 Physical Properties of Liposomes Containing Different Amounts of HCO60

HCO60 (%)	Size (nm)	Zeta Potential (mV)
0	94.4 ± 8.1	1.15 ± 1.15
10	97.5 ± 11.5	1.20 ± 2.76
60	85.6 ± 10.1	2.65 ± 2.22
90	77.3 ± 8.1	3.71 ± 1.87
100	26.5 ± 6.3	5.26 ± 1.12

Data represents the mean ± SD of more than three experiments.

### 3-2. 塩酸ドキソルビンの内包

pH勾配法によるDOXの内包化を試みた(図21)。最初に、pH2.2とpH10.5のpH勾配をつけた検討を行った。図22に示すように、EggPCからなるリポソームに10%のHCO60を添加しても内包率はほぼ100%を示した。60%以上の添加で内包率の低下が認められた。90%のHCO60を添加したリポソームの

場合でもリン脂質 0.8 mg に対し DOX が 0.1 mg 以上内包されていることから、リン脂質を基準として考えると非常に高い内包率であると言える。これらに対して、図 23 に示すようにコレステロールを重量比で 30% 含有させた場合、15℃ ではいずれの組成のリボソームでも内包率の低下が認められた。37℃ に反応温度を上げることで、内包率の上昇が認められた。さらに改良を加え、pH 2.2 と pH 9.2 の pH 勾配により比較的高い内包率が得られた。

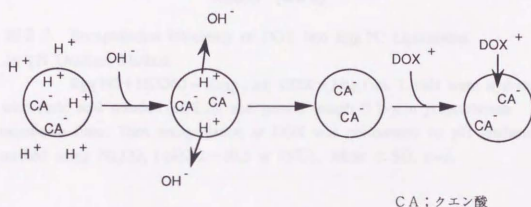


図 21 pH 勾配法による DOX の内包化

Maruyama ら<sup>90)</sup> は Ganglioside GM1 修飾リボソームに DOX を pH 勾配法によって内包させ、95% の内包率を得ている。彼らの研究では、Ganglioside GM1 の添加量は 6 mole % である。HCO60 添加リボソームの場合、HCO60 を 26 重量% 添加したものが彼らの条件に相当する。図 22、23 から 26 重量% の HCO60 を添加した場合、80% 以上の内包率を得ることが予測される。

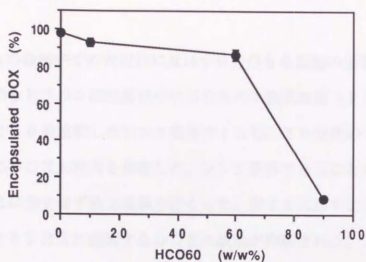


図 2-2 Encapsulation Efficiency of DOX into Egg PC Liposomes by pH Gradient Method

Egg PC+HCO60 = 10mg / ml; DOX = 1mg / ml. Lipids were hydrated with citric acid solution (pH2.2), and passed through 0.1- $\mu$ m polycarbonate membrane filter. Then encapsulation of DOX was performed by pH gradient method using  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH2.2 $\rightarrow$ 10.5 at 15 $^\circ\text{C}$ ). Mean  $\pm$  SD, n=3.

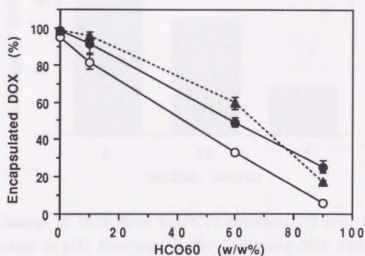


図 2-3 Encapsulation Efficiency of DOX into Egg PC/Cholesterol (7/3 w/w) Liposomes by pH Gradient Method

Egg PC+cholesterol+HCO60 = 10mg / ml; DOX = 1mg / ml.  
 ○, pH2.2 $\rightarrow$ 10.5 at 15 $^\circ\text{C}$ ; ●, pH2.2 $\rightarrow$ 10.5 at 37 $^\circ\text{C}$ ; ▲, pH2.2 $\rightarrow$ 9.2 at 37 $^\circ\text{C}$ .  
 Mean  $\pm$  SD, n=3.

### 3-3. 塩酸ドキシソルビンのリポソームからの放出性

リポソームの血清中での安定性に及ぼすHCO60添加の影響を検討した。

0.05mMのpH7リン酸緩衝液中に50%の牛胎児血清(FBS)を添加して、リポソーム溶液を50倍希釈したシンク条件で15℃、30分間のコレステロール添加リポソームからのDOXの放出を測定した。シンク条件であることから、内包されなかった遊離のDOXは除去せず放出実験を行なった。図24に示すように、HCO60を添加することによりFBSに起因するDOXの放出が抑制された。

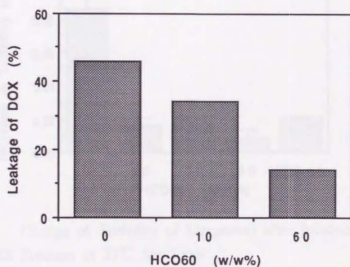


図24 Leakage of DOX from EggPC/Cholesterol (7/3 w/w) Liposomes after Incubation in pH7 Phosphate Buffer Containing 50% FBS at 15℃ for 30min

### 3-4. リポソームと牛血清の相互作用の濁度測定による検討

DOXを含まないリポソームとFBSとの相互作用を濁度により観察した。5% FBS水溶液または蒸留水中で37℃、5分間インキュベーションした後、450nmの吸光度を測定した。図25にFBS中の濁度と蒸留水中の濁度の差をFBSによる濁度の上昇として示す。HCO60を添加するとFBSによる濁度の上昇が抑制された。この濁度の上昇はリポソームへのFBS中の蛋白質の吸着に由来すると考えられる。従って、HCO60の添加はリポソームへの蛋白質の吸着を抑制するものと考察された。

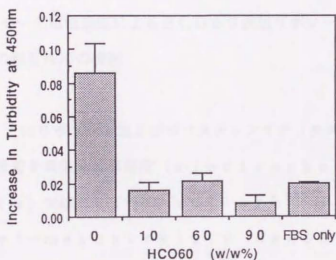


図25 Change of Turbidity of Liposomes after Incubation with 5% FBS Solution at 37℃ for 5 min

先に示したHCO60添加によるDOXの漏出抑制は、リポソーム表面をHCO60のPEG鎖が覆うことにより、血清蛋白等のリポソームへの結合が妨げられることによると考えられた(図26)。



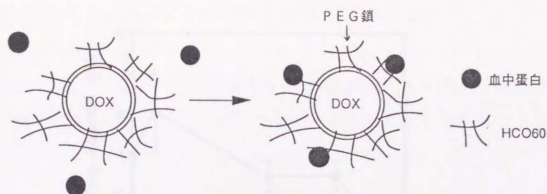


図26 HCO60添加によるリポソームからのDOX漏出抑制効果の予想機構

3-5. ゼータ電位測定によるHCO60添加リポソームの牛血清アルブミンおよび牛血清との相互作用の検討

Lawら<sup>91)</sup>はリポソームおよびポリスチレンラテックスへの牛血清アルブミン(BSA)の吸着を電気泳動移動度(electrophoretic mobility)で検討している。Mullarら<sup>58)</sup>およびTrosterら<sup>59)</sup>は、methyl-methacrylate nanoparticleと血清との相互作用についてZeta電位を測定して検討している。

HCO60添加リポソームと血中の蛋白質との相互作用をZeta電位を測定することにより検討した。尚、pH7の0.05Mリン酸緩衝液中で検討した。

10mg/mlのBSAを添加した場合、図27に示すように、卵黄PC(Egg PC)のみのリポソームでは負に8mVシフトした。BSAの等電点は4.7であり、本実験条件では負電荷を帯びていることから、BSAがリポソームに結合したものと考えられる。10%のHCO60を添加すると若干シフトを抑制する傾向を示した。しかし、HCO60を60%以上添加すると、BSAの結合量が増大した。

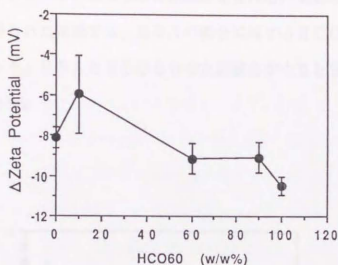


図2-7 Change of Zeta Potential of Liposomes Containing Different Amounts of HCO60 or HCO60 Micelles after Incubation with 1% BSA at 37°C for 10min

50% FBSとのインキュベーションでは図2-8に示すようにEgg PCのみのリポソームでは正に2.4 mVシフトした。血清中のApoB<sup>92, 93)</sup>やApoC-I、<sup>94)</sup> IgM、<sup>95)</sup> プラスミノゲン<sup>95)</sup>等の正電荷物質がリポソームに結合したものと推察される。HCO60を添加することによりZeta電位は負にシフトした。HCO60の添加によって血清中の正電荷物質のリポソームへの結合が抑制されたものと考えられる。

HCO60は多くの水和水を持つことが知られている。1gのHCO60は1.71gの水和水を持つ<sup>96)</sup>ことから、HCO60の添加により、リポソーム表面はHCO60に結合した水分子の層で覆われていることが考えられる。この水分子の層が、血清中に存在するアポ蛋白質のように脂溶性物質に親和性の高い物質の結合を抑制したものと考察される。また、BSAにはP-9と呼ばれる $\alpha$ -ヘリックスが3個存在するドメインがあり、この $\alpha$ -ヘリックスにより脂質膜との結合が生じると考えられている。<sup>97)</sup>

また、BSAとリボソームの相互作用は疎水の相互作用が重要とされている。<sup>98)</sup> しかし、本実験で得られた結果では、BSAの結合に対するHCO60の抑制効果が顕著に認められなかった。BSAとHCO60の水素結合が生じBSAと複合体を形成した可能性が考えられた。

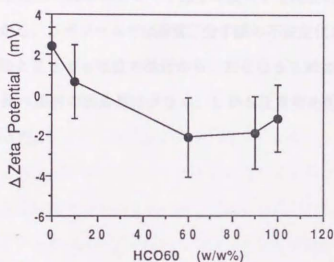


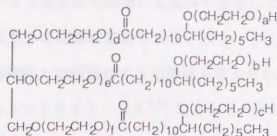
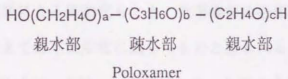
図28 Change of Zeta Potential of Liposomes Containing Different Amounts of HCO60 or HCO60 Micelles after Incubation with 50% FBS at 37°C for 10min

HCO60によるリボソームの修飾はPEG-PE (PEG-ホスファチジルエタノールアミン)、PEG-Chol (PEG-コレステロール)、PEG-DPG (PEG-ジパルミトイルグリセロール) によるリボソーム修飾と基本的には類似したものと考えられる。PEG修飾リボソームのin vitroにおける血液成分との相互作用をSeniorら<sup>68)</sup>が報告している。彼らはデキストランT500 (5%水溶液) とPEG6000 (5%水溶液) のtwo-phase partition

systemによる分析を行い、PEG修飾したリポソームへのマウス血漿蛋白の結合は無修飾リポソームに比べ少ないことを示した。一方、彼らはポロキサマーによるリポソームの表面コーティングでは血中持続性が得られなかったことも報告した。

著者らの選択したHCO60は図29に示すように構造的にはポロキサマーと異なり、リポソームにあたかもアイゼンのように突き刺さり、表面を広く覆うと予想される。一方、ポロキサマーは脂肪乳剤のように中心に核となる疎水性oilが存在するようなものには界面活性剤の疎水部をoil部分に侵入させ脂肪乳剤を効率良くコーティングができる。しかし、リポソームでは脂質二分子膜の不安定化を生じるものと考えられる。

ゲル濾過法とZeta電位の検討から、HCO60添加リポソームは100%PCリポソームに比べ蛋白の吸着量は少なく、しかも正電荷を帯びた物質の吸着が抑制されることが解かった。



$$a+b+c+d+e+f=60$$

**HCO-60**

図29 ポロキサマーとHCO60の構造

#### 第4節 小括

種々の大きさの中で、70～100 nmのリボソームが高い血中持続性を示すことが解かった。メンブランフィルターによる無菌化や保存安定性、およびエクストルーダーによる生産性等も考慮し、本研究の基本リボソームの大きさを100 nmとした。

また、肝指向性にはポリオキシエチレン基(PEG)を有する非イオン性界面活性剤HCO60が有用であることが見いだされた。

さらに、HCO60をリボソームに添加することにより、リボソームの肝臓への指向性が上昇した。

従来の肝臓指向型DDSは非実質細胞、特にKupffer細胞への分布も多く、マクロファージ活性化因子等のキャリアーには適しているが、肝臓の疾患を直接治療しようとする場合は問題となる。これに対し、60%以上のHCO60を添加したリボソームは肝臓の実質細胞に効率良く薬物を送達できる可能性が高い。さらに、製造方法が簡便であり、濾過滅菌による無菌化もでき、化学修飾の必要がないことから低コストであるなどの利点を備えており実用化に適したものと思われる。

HCO60添加リボソームは $\alpha$ -トコフェロールのような脂溶性薬物のみならず、塩酸ドキシソルピシンのような水溶性薬物にも適用できることが確認されたことから、肝臓癌や肝炎等の肝臓疾患への応用が期待される。

また、肝臓の実質細胞と細胞融合する可能性も考えられ、従来のリボソームの細胞内への侵入方法であるエンドサイトーシス<sup>9,9)</sup>によるものとは異なることが予想される。エンドサイトーシスされたリボソームはエンドソーム内に封入され、リソゾームにより捕捉された後、リン脂質と薬物が分解される。一方、細胞融合ではリボソーム内の薬物が細胞質内に放出されるため、リソゾームによる分解も比較的遅く、しかも細胞内の各種器官に直接薬物が作用可能となる。

最近、DNA、RNA等の細胞内への送達にリボソームの応用が研究されている。



## 第2章 リボソーム表面で促進される酵素反応の発見

リボソームの薬物キャリアーとしての研究が現在盛んに行われている。<sup>106, 107)</sup> 中でも、血中や消化管内等で酵素による分解からペプチド、蛋白を保護するために、リボソームがしばしば用いられている。

数多くのインスリンのリボソーム化研究が実施されてきた。<sup>108-114)</sup> 特に経口吸収を意識した研究が盛んである。in vivoでの成功例が多い反面、<sup>108-110)</sup>

リボソーム化することによっては消化管からの吸収促進は得られないと結論する報告もある。<sup>113)</sup>

Weingartenら<sup>115)</sup>はin vitro試験において、インスリンをリボソーム化することでペプシン、 $\alpha$ -キモトリプシン、トリプシンの3種類の酵素によるインスリンの消化を抑制できることを報告している。

一方、Wiessnerら<sup>115)</sup>はリボソームの表面上にインスリンが結合しやすいことをゲル濾過法で証明している。リボソーム表面にインスリンが結合することにより、内包率のover estimateが生じ、このことがインスリンリボソームによる治療効果の判断を誤らせる原因の一つとなることを指摘している。

著者らは酵素によるインスリンの消化抑制を目的として、インスリンのリボソーム化研究を開始した。REV法(逆相蒸発法)でリボソーム化すると確実にインスリンのトリプシンによる消化が抑制されたが、遊離のインスリンが多い場合、トリプシンによる消化がむしろ促進されることを見いだした。以後、リボソームの表面上におけるインスリンとトリプシンの反応性を中心に研究した。

リボソームとペプチド、蛋白との相互作用を知ることは、リボソームの血中における血液成分との脂質交換<sup>116-120)</sup>やオプソニン<sup>66, 121-123)</sup>等との相互作用や、生体膜上での生理活性ペプチドまたは蛋白の反応<sup>100)</sup>を知る上で重要と思われる。

## 第1節 各種リボソーム調製法によるインスリンの内包化とトリプシン消化からの保護

インスリンのリボソーム化を薄膜水和法 (HY法)、<sup>124)</sup> 逆相蒸発法 (REV法)、<sup>125)</sup> 凍結融解法 (FT法)<sup>126)</sup> の3法により行った。使用した脂質 (大豆ホスファチジルコリン、Soy PC) の量を変化させた。遊離のインスリンを除去せずにトリプシンと混合し、37℃、1時間インキュベーションした後、HPLC法によりインスリンの残存率を求めた。Sammonsら<sup>127)</sup>の方法に従い、イオン交換樹脂を用いて遊離インスリンを除去した後、リボソームを界面活性剤により破壊し、HPLCによりリボソームに内包されたインスリンを定量した。

図30に結果を示す。REV法でリボソーム化した場合、内包されたインスリンの全てがトリプシン消化から保護された。FT法では51mMのPCを用いた場合トリプシン消化後の残存率が内包率を下回った。HY法は内包率も低く、特に51mMのPCを用いた場合、内包率に比著しくトリプシン消化後の残存率が低かった。REV法は水溶性薬物のリボソーム化に適していると考えられている。<sup>128)</sup> REV法の場合、リボソームの内核水相にインスリンが内包され、リボソームの二分子膜からインスリン分子が突出しないものと考えられる。このため、内包されたインスリン分子が効率良くトリプシンから保護されたものと推測される。

これに対して、FT法やHY法の場合、内包されたインスリンのリボソーム内での存在位置が必ずしも内核水相のみではなく、リボソームの二分子膜を貫通したインスリン分子や表面に吸着したインスリンの存在も考えられる。本研究におけるインスリンの内包率の測定ではイオン交換樹脂を使用しており、遊離のインスリンのみならず、リボソーム表面に吸着したインスリンも除去されると考えられる。FT法、HY法におけるインスリンの内包率はリボソーム表面に吸着したインスリンは含まれず、二分子膜を貫通したしたものまで含むと思われる。

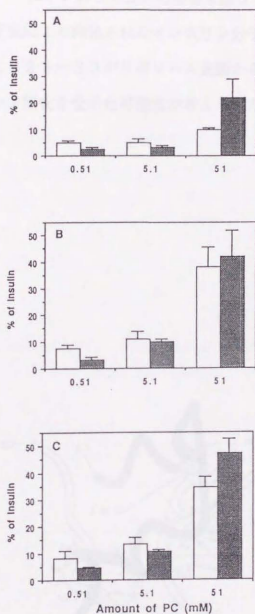


图 3 0 Residual Insulin after 1hr Degradation by Trypsin without Removing Free Insulin; Encapsulation Efficiency of Insulin Liposomes  
 A, HY-Method; B, REV-Method; C, FT-Method;  
 □, residual insulin; ■, encapsulation efficiency.  
 Data represented are means  $\pm$  SD from than three experiments.

ところで、インスリン分子には42%の $\alpha$ -helixが存在する。<sup>129)</sup> ペプチドや蛋白の $\alpha$ -helixが脂質二分子膜に包埋されることは良く知られている。<sup>130-132)</sup> Stenzら<sup>133)</sup> はインスリン分子の構造を図31のように示している。これから、FT法、HY法により内包されたインスリン分子のB鎖の $\alpha$ -helix部分が二分子膜上に存在しB26~30がリボソーム表面から外部に突き出しており、B29-Lysでトリプシン消化を受けた可能性が考えられた。

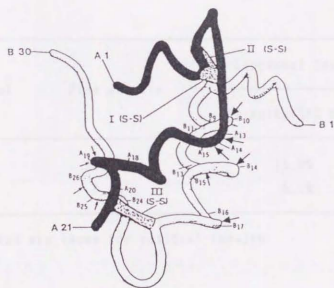


図31 Rope Model of the Three-Dimensional Structure of Insulin

## 第2節 インスリンのトリプシン消化に及ぼすリボソームの影響

HY法により調製した低内包率のインスリンリボソームの場合、遊離インスリンのみをトリプシン消化したものに比べ、インスリンの分解が速くなる傾向が示された(表9)。リボソーム表面から突き出したインスリンが消化されたとしても、遊離のインスリンのみを消化する速度以上の分解速度は生じないと考えられる。著者らはリボソーム表面上における消化反応の促進を想定した。

表9 Degradation of Free and Liposomal Insulin (HY-Method)  
without Removing Free Insulin by Trypsin

Time (min)	Free Insulin	Liposomal Insulin
		HY-Method(PC 5.1mM)
30	18.7%	11.3%
60	8.3%	5.1%

Data presented are those for residual insulin.

## 2-1. インスリンのトリプシン消化

インスリンのトリプシン消化の系に直径100 nmの空リポソームを添加したところ、添加したPC量に従い、インスリンのトリプシン消化が促進された(図32)。同様に、添加する空リポソームのPC量を一定にし、リポソームの粒子径を変えたところ、図33のように、粒子径が小さくなるに従い、インスリンのトリプシン消化が促進された。これはリポソームの総表面積の増大と共にインスリンのトリプシン消化が促進されたことを示唆している。これらより、リポソーム膜上でインスリンとトリプシンが反応していることが考えられた。

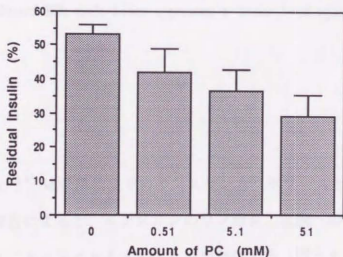


図32 Influence of Empty Liposomes on 15-min Degradation of Insulin by Trypsin

Insulin,  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin,  $4.3 \times 10^{-6}$  M. Tryptic digestion of insulin was performed in 0.01M pH7 phosphate buffer at 37°C.  
Mean  $\pm$  SD, n=3 or 7 (5.1mM PC).



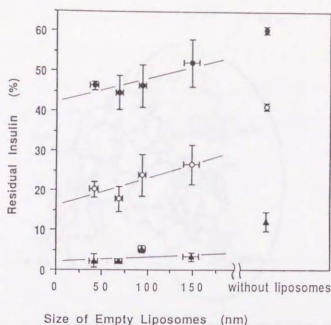


図3-3 Effect of Empty PC Liposome on Tryptic Digestion of Insulin

●, after 15 min; ○, after 30 min; ▲, after 60 min.

PC,  $5.1 \times 10^{-3}$  M; insulin,  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin,  $4.3 \times 10^{-6}$  M.

Tryptic digestion of insulin was performed in 0.01M pH7 phosphate buffer at 37°C. Mean  $\pm$  SD, n=3. Lines represent a linear least-squares analysis.

Oomenら<sup>134)</sup>は希薄状態でのインスリンとリボソームとの結合について報告している。彼らの報告によると、インスリンのリン脂質二重膜への結合には specific orientationが存在する(図3-4)。インスリンの dimerを形成する面でこの結合が起きているとしている。この報告における結合面からトリプシン消化を受ける部位であるB29Lysは外れている。インスリン分子のB鎖の  $\alpha$ -helix部分が二分子膜上に存在し、B26~30がリボソーム表面から外部に突き出すため、B29-Lysでトリプシン消化を受けた可能性が考えられる。

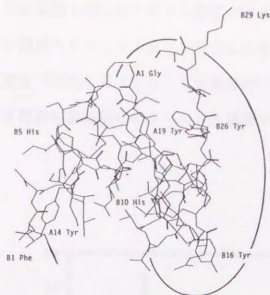


図34 インスリンのリン脂質二重膜への結合面の予想図

## 2-2. 種々の大きさの中性リボソームとインスリンの相互作用

次にインスリンと空リボソームの静電的吸着等の相互作用について検討した。方法はWiessnerらが報告したゲル濾過法に準じた。インスリンと空リボソームを25℃、5分間インキュベーションした後、ゲル濾過を行った。Bio-Rad Protein Assay dye reagentでリボソームとインスリンを染色した。100nmのリボソームとインスリンの場合溶出プロファイルを図35に示す。

リボソーム画分およびインスリン画分を分取し、各画分のインスリン量とリン脂質量を定量した。インスリンはBioRad Protein Assay dye reagentを用いて定量した。また、リン脂質は吸光度法により定量した。インスリン画分におけるリン脂質および、リボソーム画分のインスリンの定量値を表10に示す。pH7において、インスリンは大部分6量体として存在しているが、インスリン画

分ではインスリンの6量体1個に対してリン脂質が20分子の割合で検出された。リポソームを構成するリン脂質とインスリン分子が結合したものと思われる。リポソーム画分では、リン脂質1万分子に対してインスリン6量体が1個の割合で検出された。リポソーム1個当たり数十個から数百個のインスリン6量体が結合したものと推測される。

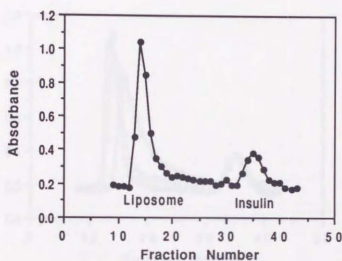


図35 Gel Filtration Profile after Incubation of Phosphatidylcholine Liposome with Insulin at 25°C for 5min

Liposome: 100 nm extrusion; insulin:  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin:  $4.3 \times 10^{-6}$  M; PC:  $5.1 \times 10^{-3}$  M; in 0.01M pH7 phosphate buffer. The gel filtration was performed using Sepharose CL-4B column (1.5×20 cm) equilibrated with diluted Dulbecco phosphate buffered saline. The elution profile was obtained by measuring of the absorbance at 595nm after the addition of BIO-RAD protein assay dye reagent.

表10 インスリン画分のリン脂質およびリポソーム画分のインスリンの定量

インスリン画分のリン脂質	リン脂質20分子 / インスリン6量体1個
リポソーム画分のインスリン	インスリン6量体1個 / リン脂質10,000分子

リボソームの粒子径を変え検討した。溶出プロフィールを図36に示す。40 nm付近のリボソームを用いた場合、著しいテーリングが認められた。リボソームの粒子径が小さいことも一因と考えられるが、リボソーム表面に吸着したインスリンを介したセファロースゲルとの静電的相互作用によることも考えられる。

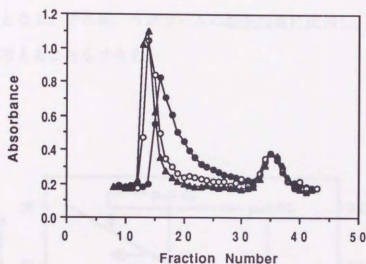


図36 Gel Filtration Profile after Incubation of Phosphatidylcholine Liposome with Insulin at 25°C for 5min

●, 30 nm extrusion; ○, 100 nm extrusion; ▲, 200 nm extrusion;  
insulin,  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin,  $4.3 \times 10^{-6}$  M; PC,  $5.1 \times 10^{-3}$  M;  
in 0.01M pH7 phosphate buffer.

リボソームへのインスリンの結合量とインスリンへのリン脂質の結合量を求めた(図37)。リボソームの粒子径が小さくなる程、インスリンのリボソームへの結合量は増加し、粒径40 nmのリボソームには約3割のインスリンが吸着した。これに対し

て脂質のインスリン画分における結合量はリボソームの大きさに依らず1割程度であった。リボソームの大きさが小さくなると、蛋白が結合しやすくなることが知られている。<sup>115, 135)</sup> Wiessnerら<sup>115)</sup>は小さなリボソームへのインスリンの結合が、リボソーム表面上に存在する割れ目(クレパス)に疎水的な相互作用で結合すると考えている。一方、リボソームの粒子径が小さいとリボソームの表面圧が小さくなり、蛋白が容易に吸着するようになるとも考えられている。McDonaldら<sup>136)</sup>によると、粒径20 nmのPCリボソームの表面圧は15 dy n/cmで粒径200 nmでは46 dy n/cmとなる。その他、リボソームの総表面積に比例し、インスリンの結合が増大したものとも考えることもできる。

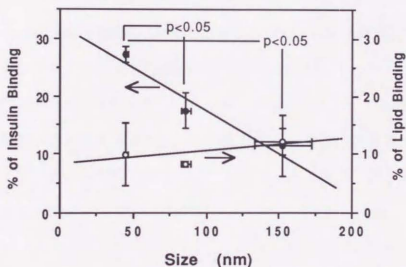


図37 Binding of Insulin onto Liposomes and Lipid Binding onto Insulin after Incubation of PC Liposome with Insulin at 25°C for 5 min

●, insulin binding; ○, lipid binding.

Data represented are as means  $\pm$  SD of three experiments. Lines represent a linea least-squares analysis. Significant differences from free insulin according to Student's t-test.

ところで、リボソームの血中における崩壊の原因として、リボソームから脂質が  $\alpha$ -helix 含量の高いアポ蛋白を多く含有する高密度リボ蛋白 (HDL) に移ることが知られている。<sup>120)</sup> 本実験で見いだされたインスリンへの脂質の結合も同様な機構で進行したものと推測される。



### 第3節 リボソームの電荷の影響

これまでの検討は、中性のリボソームを用いて行なった。ここでは、リボソームの電荷の影響がどのようなものであるかを詳細に検討した。

#### 3-1. インスリンのトリプシン消化に及ぼすリボソームの電荷の影響

空リボソームの電荷の影響について100nmのリボソームを用いて検討した。まず、インスリンのトリプシン消化について調べたところ、図38のように負電荷を有する空リボソームの促進効果が著しかった。中性リボソームにも促進効果が認められたが、正電荷を有するリボソームでは促進効果が認められなかった。Weingartenら<sup>11)</sup>はステアリルアミン (StA) 含有リボソームとインスリンを混合するだけで酵素による消化が抑制されることを報告している。StA含有の正電荷リボソームがインスリンのトリプシン消化を促進しないのはインスリンと正電荷リボソームの結合に起因していると考えられた。

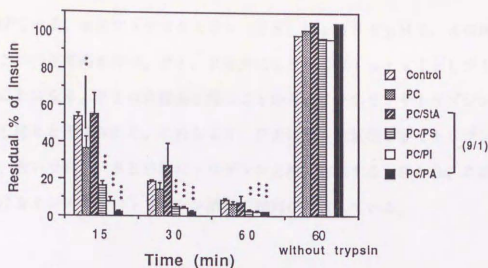


図38 Influence of Lipid Charge of Empty Liposomes on Degradation of Insulin by Trypsin

Lipids,  $5.1 \times 10^{-3}$  M; insulin,  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin,  $4.3 \times 10^{-6}$  M. in 0.01M pH7, 37°C. Data presented are means  $\pm$  SD of three or seven (PC) experiments. Significant differences from free insulin (Control) are according to Student's t-test; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Abbreviation: PC, phosphatidylcholine; StA, stearylamine;

PS, phosphatidylserine; PI, phosphatidylinositol; PA, phosphatidic acid.

トリプシンの pI が 10.1 - 10.8<sup>137)</sup> であることから、本実験における中性の水溶液中では正電荷を帯びている。負電荷を有するリボソームによる著しい促進作用は、負電荷リボソームとトリプシンとの間に生じる静電的な結合に起因すると考えられた。

Tocanne ら<sup>138)</sup> は、リン脂質のイオン化状態について詳しく総説で述べている。ホスファチジン酸 (PA) は pH 4 付近で 1 つの負電荷を持ち、pH 8 以上で 2 つの負電荷となる。このことから、PA は pH 7 において、およそ 1.5 個の負電荷を有することになる。一方、ホスファチジルイノシトール (PI) は pH 3 以上で 1 つの

負電荷を帯びている。ホスファチジルセリン (PS) は  $pH 5$  と  $pH 7.4$  の間で2つの負電荷と1つの正電荷を持つ。PI、PS共に  $pH 7$  では total として1つの負電荷を持つことになる。PIは水酸基を持つことから、インスリンやトリプシンと水素結合を形成し得ると予想される。これらより、PAは最も負電荷が多くトリプシンとの結合が強く、次いでPI、PSの順にトリプシンと相互作用すると思われ、この順列と本実験におけるインスリンのトリプシン消化の順列が一致している。

### 3-2. 種々の電荷のリボソームとインスリンおよびトリプシンの相互作用

リボソームへのインスリンの結合と、インスリンへのリン脂質の結合についてゲル濾過法を用いて検討した。トリプシンとリボソームの相互作用についてはゲル濾過法におけるトリプシンの回収率が低いことなど、実験手法上の問題点から Zeta meter による検討を行った。

インスリンとリボソームを  $25^{\circ}C$ 、5分間インキュベーションした後のゲル濾過の溶出プロフィールを図39に示す。正電荷を有するリボソームにはややテーリングが認められた。前述した方法でリボソームへのインスリンの結合量とインスリンへのリン脂質の結合量を図40に示す。インスリンのリボソームへの結合量において電荷による差は認められなかったが、リン脂質のインスリンへの結合量は、正電荷リボソームが多く、次いで負電荷リボソーム、中性リボソームの順であった。

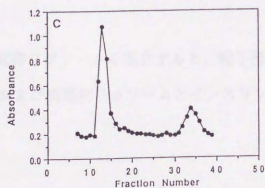
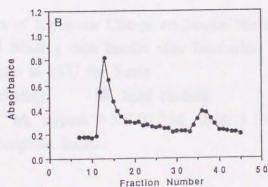
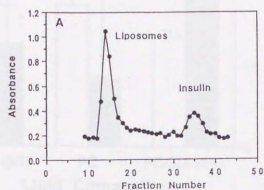


图 3-9 Gel Filtration Profile after Incubation of Various Charged Liposome with Insulin at 25°C for 5min

A, PC liposome; B, StA/PC liposome; C, PA/PC liposome;  
insulin,  $1.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ; trypsin,  $4.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ; PC,  $5.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  
in 0.01M pH7 phosphate buffer.

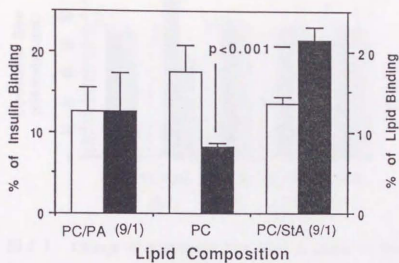


図 4 0 Influences of Liposome Charge on Insulin Binding onto Liposomes or Lipid Binding onto Insulin after Incubation of Liposome with Insulin at 25°C for 5 min

□, insulin binding; ■, lipid binding.

Insulin:  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin:  $4.3 \times 10^{-6}$  M; lipid:  $5.1 \times 10^{-3}$  M; in 0.01M pH7 phosphate buffer.

また、インスリンと正電荷リボソームを混合すると、粒子径の増大が認められた (図 4 1)。しかし、中性および負電荷リボソームとインスリンを混合しても粒子径の変化は認められなかった。



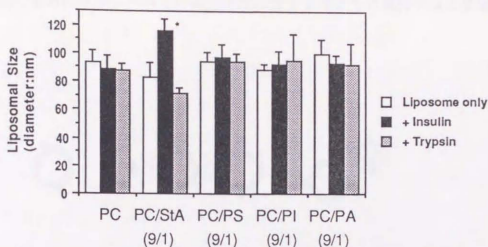


図 4-1 Change of Liposomal Size after Addition of Insulin or Trypsin to Empty Liposomes

Data represented are means  $\pm$  SD of three experiments.

Significant differences from liposomes only are according to Student's

t-test. \* $P < 0.05$ . Insulin:  $1.7 \times 10^{-5}$  M; trypsin:  $4.3 \times 10^{-6}$  M;

lipids:  $5.1 \times 10^{-3}$  M; in 0.01M pH7 phosphate buffer.

Fariasら<sup>139)</sup>は酸性下、負電荷リボソームはインスリンにより融合し、多量のインスリンがリボソームへ結合することを報告している。さらに、彼らは中性のpHでも酸性に比べ弱いながらもインスリンが負電荷リボソームに結合することも示している。インスリンの負電荷リボソームへの結合は正電荷リボソームとの間のイオン結合的な結合のような強いものではないと思われる。Perry<sup>142)</sup>らはインスリンがPCのクロロホルム溶液に比べPAのクロロホルム溶液に良く溶解することを報告している。負電荷リボソームとはインスリンのリジン (Lys) やアルギニン (Arg) のような正電荷アミノ酸残基とPAの負電荷部分とが相互作用し、中性リボソームではインスリンのグルタミン酸 (Glu) やアスパラギン酸 (Asp) のような負電荷アミノ酸残基とPCの正電荷のコリンとが相互作用するものと推測される。これらの結果よりインス



リンと3種類の電荷のリボソームとの相互作用は図42のように進行すると推定した。

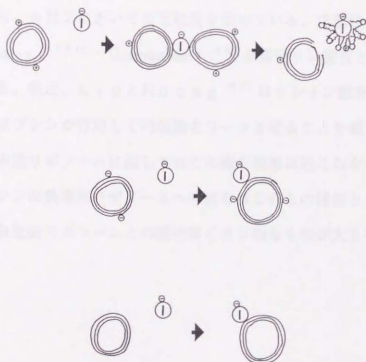


図42 リボソームとインスリンの相互作用の推定図

すなわち、正電荷リボソームとインスリンは主としてイオンのに結合し、速やかに融合や凝集を生じる。<sup>140, 141)</sup> 次いで、StAを中心とした脂質の集合体と共にインスリンがリボソーム上から離れ、インスリンの脂質による包囲が完了する。

一方、負電荷および中性リボソームとインスリンは分子全体のイオンのな結合だけでなく、Perryら<sup>142)</sup>の報告のようなPAとインスリンの作用のようにPA分子中の負電荷部分とインスリン分子中のLysやArgのような正電荷の部分との相互作用やPC分子中のコリン残基の正電荷とインスリン分子中のGluやAspの持つ負電

荷部分との静電的相互作用を生じるものと推察される。

次にトリプシンとリボソームの相互作用をZeta電位の測定によって検討した(図43)。トリプシンが正電荷および中性リボソームとは相互作用せず、負電荷リボソームと相互作用することが確認された。トリプシンは等電点が10.1-10.8であることから、pH7においては正電荷を帯びている。塩基性蛋白のCytochrom C、<sup>143)</sup> Interferon- $\gamma$ 、<sup>144)</sup> Gramicidine S<sup>145)</sup> が酸性リン脂質と容易に結合することが知られている。最近、L i uとH u a n g<sup>146)</sup> はオレイン酸を含有したDOPEリボソームにトリプシンが作用して内包物をリークさせることを報告している。彼らの報告によると、中性リボソームに関してはこのような現象は起こらないとしている。本研究で得たトリプシンの負電荷リボソームへの結合はこれらの報告と一致するものである。トリプシンと負電荷リボソームとの結合はイオンのなものが大きいと考えられた。

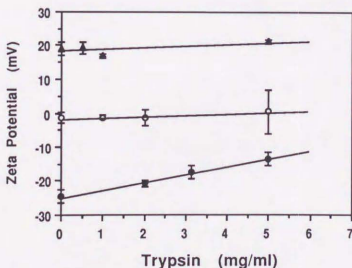


図43 Influences of Trypsin on Zeta Potential of Liposomes

○, PC liposome; ▲, StA/PC liposome; ●, PA/PC liposome.

Lipid:  $6.4 \times 10^{-4}$  M; in 0.05M pH7 phosphate buffer.

Incubation of liposome with trypsin was performed at 25°C for 5 min.

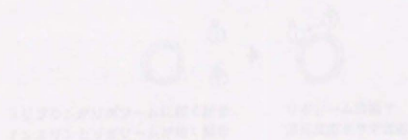
Mean  $\pm$  SD,  $n \geq 7$ . Lines represent a linear least-squares analysis.

種々検討した結果、ゼータ電位の測定条件は0.05Mのリン酸緩衝液中で行うこととした。従って、緩やかなトリプシンと中性および正電荷リボソームとの相互作用は塩の影響で測定できていない可能性もある。いずれにせよ、トリプシンと中性及び正電荷リボソームとの相互作用は強いものではないと結論された。

正電荷リボソーム



中性リボソーム



負電荷リボソーム



図4-4 リボソーム表面でトリプシンが結合する様子

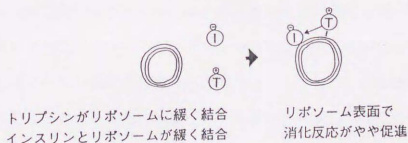
#### 第4節 小括

本反応の機構を図4-4に示す。負電荷リボソームの場合、インスリンとトリプシンがリボソーム表面に結合しトリプシンが容易にインスリンを攻撃する。中性リボソームの場合、インスリンがリボソーム表面に結合し、トリプシンがリボソームと緩やかな相互作用を起こすため若干ではあるが反応を促進する。正電荷リボソームの場合、インスリンがリボソームに結合し、次いでリボソームの融合または凝集が生じ、後にインスリンへのリン脂質の移行が起こる。インスリンを覆ったリン脂質がトリプシンの攻撃を抑制する。

負電荷リボソーム



中性リボソーム



正電荷リボソーム

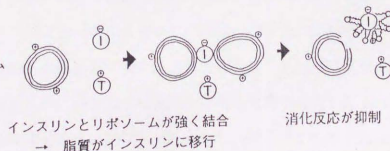


図4-4 リボソーム表面で促進される酵素反応の予想機構

本研究により得られた結果は、インスリンのリボソームを臨床応用する際、インスリンとリボソームの相互作用に十分注意を払う必要があることを示唆する。生体内に投与した後、リボソーム内から漏出したインスリンが酵素により速やかにリボソーム表面で消化される危険性を考慮しなければならない。さらに、リボソーム化の方法、脂質の電荷に十分配慮する必要があると言える。リボソーム化の方法はREV法が適しており、脂質の電荷は正電荷が良いと考えられる。

一方、Roslingら<sup>147)</sup>は正電荷リボソームの表面でプロトンピンとFactor Xaが会合することにより、プロトンピンが活性化されることを報告している。本研究で得られた結果も生体膜上における酵素反応を考える上で有用と考えられる。



## 総括

DDS基剤としてのリボソームについて研究した結果、新規な肝臓指向性を有するHCO60添加リボソームを見いだした。

本研究に使用した $\alpha$ -トコフェロールやインスリンの肝臓へのターゲティングは興味あるものである。また、塩酸ドキソルビシンも肝臓癌をターゲットとした場合、肝臓へのDDSは価値あるものと言える。HCO60添加リボソームは肝臓の実質細胞に集積することが推察され、これら3薬物のキャリアーとしては非常に都合の良いものであると言える。

本研究において見い出された肝臓へのターゲティングの新規キャリアーは、従来用いられているアシアロ糖蛋白受容体を標的としたガラクトース誘導体によるリボソームの修飾等とは異なり、リボソームの粒子径と表面の水和量の調節を組み合わせたものと言える。製造方法も簡便であることから、実用化に適したものと思われる。

また、PEG鎖による細胞融合能も期待できる点で優れたキャリアーになり得る。すなわち、リボソームの細胞内への取り込みはエンドサイトーシスが主とされている。このため、内包した薬物と共にリボソームがリソゾーム内で分解されてしまう欠点がある。HCO60添加リボソームの細胞との融合能が期待されることから、薬効発現に有効なキャリアーであることが考えられる。最近、アンチセンス医薬品の開発研究が盛んである。DNA等の核酸やDNAを標的とした化合物を選択的に核に到達させるには、従来のリボソームではリソゾーム中で分解される問題点がある。このため、エンドサイトーシス後、エンドソーム内のpHが低いことに着目した、pH感受性リボソームの研究が盛んである。原理的にはこの方法は可能であるが、実際の遺伝子発現の実験での結果は思わしくないのも現実である。本研究で得られた、粒子径100nmのHCO60添加リボソームは肝臓の実質細胞への遺伝子治療に有効であると推測される。



一方、インスリンを用いたりボソーム化研究で得られた知見は、リボソームの薬物キャリアーとしてだけの有用性以外に、生体成分である蛋白質やペプチドと生体膜の相互作用を考える上でもリボソームが有用な道具であることを認識させるものである。

生体膜上での酵素反応は生体内のあらゆるところで起きている。血小板上での凝固系の反応や腫瘍の正常細胞への侵入における酵素の働き等、界面での反応が重要と思われる。このような反応の生化学上の機構解明にとって、コロイド次元、言い換えれば分子集合体の界面における相互作用を知ることは有意義であると思われる。

さらに、本研究のような生体膜のモデルとしてのリボソームの応用は21世紀に克服されるべきAIDSウイルス、肝炎ウイルスへの治療法を考える上でも重要な手段となることも予想される。

## 実験の部

### I. 第1章の実験

#### I-1. 第1節の実験

##### 1. 試薬

d l- $\alpha$ -トコフェロール、メタノール、エタノール、2-プロパノール、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸、酢酸アンモニウムは関東化学より、PEG 400、Br i j 58は和光純薬より、Tween 80は花王より、HCO 60、大豆ホスファチジルコリン (Soy PC、Ep i k u r o n 200) は日光ケミカルより、大豆油は日興製薬より入手した。

##### 2. $\alpha$ -トコフェロール含有ミセルの調製

処方検討を予め実施し、処方を決めた。Tween 80の場合は、20 mgの $\alpha$ -トコフェロールと500 mgのTween 80を6 mlの2-プロパノールに溶解した。Br i j 58の場合は、20 mgの $\alpha$ -トコフェロールと200 mgのBr i j 58を6 mlの2-プロパノールに溶解した。HCO 60の場合は、20 mgの $\alpha$ -

コフェロールと750mgのHCO60を4mlのメタノールに溶解した。これらの溶液を減圧乾燥した後、5mlの蒸留水を加えて、ボルテックスミキサーにより攪拌し、ミセルを形成させた。

### 3. リポソームの調製

40mgの $\alpha$ -コフェロールと1gの大豆PCを5mlの2-プロパノールに溶解した後、減圧乾燥した。9mlの蒸留水を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し多重リポソームを得た。

Huangら<sup>148)</sup>の方法に準じて、SUV (Small unilamellar vesicles; 28nm) はMLVより窒素ガス雰囲気下、超音波照射 (Branson MODEL W185, 70W, 0°C) 2分間、1分間の冷却のサイクルを2回行うことにより調製した。

Hopeら<sup>128)</sup>の方法に準じて、LUV (Large unilamellar vesicles; 42~195nm) はMLVより、エクストルuder (Lipex) を用いて、ポリカーボネートメンブランフィルター (Nucleopore、孔径0.05~0.3 $\mu$ m) を10回通過させ調製した。

### 4. 動物実験

雄性ウィスターラット (200~300g) は市販の飼料 (F-2、船橋農場製; 50mg/kgのビタミンE、20.8%の蛋白、4.5%の脂肪、3.4%の繊維、10.7%のアミノ酸、58.6%の炭水化物を含有) を与えた。ラットをウレタン麻醉処理 (1g/kg, i. p.) し、頸動脈および大腿静脈にカニューレションした。

種々の $\alpha$ -トコフェロール注射剤を大腿静脈より投与した。投与量は $\alpha$ -トコフェロールとして $4\text{ mg/kg}$ 。経時的に頸動脈より採血（0.3 ml）した。2時間後にラットを致死させ、肝臓、肺、脾臓、腎臓を採取した。

#### 5. $\alpha$ -トコフェロールの血漿中濃度の測定

血液試料はヘパリン処理し、遠心分離（3000 rpm、15分）を行い血漿を得た。0.15 mlの血漿に対し、1 mlのメタノールを加え、更に5 mlのジエチルエーテルを加え抽出した。溶液から不溶性蛋白を遠心分離（3000 rpm、5分）により除去した。有機溶媒を減圧留去した後、0.25 mlのHPLC移動相により $\alpha$ -トコフェロールを再溶解した。この液をHPLC分析した。血漿中からの $\alpha$ -トコフェロールの回収率はほぼ100%であった。また、ラットの内因性の $\alpha$ -トコフェロールを予め測定し補正した。

#### 6. $\alpha$ -トコフェロールの臓器内濃度の測定

摘出した臓器に2-プロパノールを加え、ホモジナイズした。さらにこのホモジネートにジエチルエーテルを添加し、10分間振とうした。有機溶媒層を集め、減圧乾燥した後、1 mlのHPLC移動相により $\alpha$ -トコフェロールを再溶解した。この液をHPLC分析した。全臓器からの $\alpha$ -トコフェロールの回収率は約80%であった。

## 7. $\alpha$ -トコフェロールのHPLC分析

LC-9A液体クロマトグラフィー、RF-530蛍光HPLCモニター、SCL-6Bシステムコントローラー、C-R6Aクロマトパックより構成される島津HPLCシステムを使用した。カラムは4.6×250mm LiChrosorb RP-8、10  $\mu$ mを、ガードカラムは4×25mm YMC ODS-A、5  $\mu$ mを使用した。移動相はメタノール：0.2M pH4.0酢酸緩衝液（92：8）を用いた。 $\alpha$ -トコフェロールの検出は励起波長286nm、発光波長330nmで行った。

## 8. 粒子径測定

ゼータ電位は大塚電子株式会社製、電気泳動光散乱光度計（ELS-800）により測定した。

## 9. データ解析

$\alpha$ -トコフェロールのAUC (Area under the curve) は台形法より求めた。また、データは平均値±標準偏差 ( $\sigma_n$ ) で表示した。



## I-2. 第2節の実験

### 1. 試薬

d l- $\alpha$ -トコフェロール、メタノール、エタノール、2-プロパノール、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸、酢酸アンモニウムは関東化学より、HCO60、大豆ホスファチジルコリン (Soy PC, Epikuron 200) は日光ケミカルより、モリブデン酸アンモニウムは和光純薬より入手した。

### 2. $\alpha$ -トコフェロール含有ミセルの調製

20 mg の  $\alpha$ -トコフェロールと 500 mg の HCO60 を 4 ml のメタノールに溶解した。これらの溶液を減圧乾燥した後、5 ml の蒸留水を加えて、ボルテックスミキサーにより攪拌し、ミセルを形成させた。

### 3. $\alpha$ -トコフェロール含有リポソームの調製

40 mg の  $\alpha$ -トコフェロールと、大豆 PC と HCO60 の合わせて 1 g を 5 ml の 2-プロパノールに溶解した後、減圧乾燥した。9 ml の蒸留水を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し多重層リポソームを得た。さらに、Hope ら<sup>128)</sup>の方法に準じて、エクストルーダー (Lipex) を用いて、ポリカーボネートメンブランフィルター (Nucleopore、孔径 0.1  $\mu$ m) を 10 回通過させた。



#### 4. 動物実験

第1節と同様に行った。尚、リボソームの投与量依存性に関する実験では、投与後、3時間後にラットを致死させ、肝臓に集積した $\alpha$ -トコフェロールを測定した。

#### 5. $\alpha$ -トコフェロールの血漿中濃度の測定

第1節と同様に行った。

#### 6. $\alpha$ -トコフェロールの臓器内濃度の測定

第1節と同様に行った。

#### 7. HPLC分析

第1節と同様に行った。

#### 9. ラット血漿蛋白との結合

ラット血漿の脱脂はScannuら<sup>149)</sup>の方法に従ってエーテルを用いて行った。粉末血漿蛋白は窒素ガスおよび減圧乾燥により得た。得られた粉末を蒸留水で再溶解した。不溶性物質を遠心分離(3000rpm, 10分, 5℃)で除去後、ポリスルホン製

メンブランフィルター ( $0.2\mu\text{m}$ , Filterite) により濾過した。この蛋白溶液は小分けして  $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザーに保存した。蛋白濃度は  $40\text{mg/ml}$  であることを予め測定し求めた。

結合実験を行う時、凍結した蛋白を室温で融解した。 $0.5\text{ml}$  のリボソーム溶液と  $0.5\text{ml}$  の蛋白溶液を混合し  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $60$  分間インキュベートした。インキュベーション後、 $0.5\text{ml}$  の混合液を速やかに Sepharose CL-6B (Pharmacia) カラム ( $1.5\times 20\text{cm}$ ) に注入し、Dulbecco 生理的リン酸緩衝液により  $25^{\circ}\text{C}$  で溶出した。溶出液を  $3\text{ml}$  ずつフラクションコレクターで採取した。これらの各フラクションの溶出液の内  $1\text{ml}$  を採り HPLC により  $\alpha$ -トコフェロールの定量を行った。各フラクションの溶出液の内  $1.5\text{ml}$  ずつ採り、エタノール  $3\text{ml}$  とエーテル  $1\text{ml}$  を添加した。これらの有機溶媒を混合した溶液を減圧乾燥した。乾燥後、エタノール  $3\text{ml}$ 、エーテル  $1\text{ml}$  を添加し、浴槽型超音波装置を用いて超音波照射しリン脂質および  $\alpha$ -トコフェロールを可溶化した。この懸濁液を蛋白沈澱とリン脂質溶液および  $\alpha$ -トコフェロールを分離するため  $3000\text{rpm}$ 、 $10$  分間の遠心分離操作を行った。本操作を 2 回行い、上清と沈澱物を分離した。窒素ガスおよび減圧により乾燥後、蛋白沈澱を  $0.1\text{ml}$  の  $0.02\text{N HCl}$  を加え溶解した。蒸留水で 5 倍希釈した BIO-RAD PROTEIN ASSAY dye reagent を  $5\text{ml}$  添加し、蛋白濃度を定量した。一方、上清のリン脂質溶液は減圧乾燥し、 $1\text{ml}$  のエタノールを添加し再溶解した。リン脂質濃度は酵素法 (デタミナー PL、協和メデックス) により求めた。

## 10. 粒子径測定

第 1 節と同様に行った。

## 11. ゼータ電位の測定

第1節と同様に行った。

## 12. 電子顕微鏡観察

MaginとWeinsteinの方法<sup>150)</sup>に従って、ネガティブ染色法による電子顕微鏡観察を行った。炭素被覆銅グリッド(150-Bメッシュ)は応研商事製を使用した。リボソーム懸濁液を一滴グリッドに滴下し、1分後に取り除いた。2%モリブデン酸アンモニウムをグリッドに滴下し、8分後に取り除いた。グリッドを乾燥させた後、Hitachi H-7000(75kV)で電子顕微鏡観察した。

## 13. データ解析

第1節と同様に行った。有意差検定はStudent-t検定によった。

### I-3. 第3節の実験

#### 1. 試薬

リン酸第二ナトリウム、リン酸第一カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、メタノール、エタノール、2-プロパノール、は関東化学、Triton X-100、Brij 58、クエン酸は和光純薬、Tween 80は花王、HCO 60、大豆ホスファチジルコリン (Soy PC、Epikuron 200) は日光ケミカル、大豆油は日興製薬より入手した。牛血清アルブミン (BSA) はシグマ社より、牛胎児血清 (FBS) はギブコ社より入手した。卵黄ホスファチジルコリン (Egg PC) は日油リポソームより入手した。塩酸ドキソルピシン (DOX) はファルミタリア カルロエルバより入手した。

#### 2. HCO 60 添加空リポソームの調製

合計 1 g の卵黄 PC または卵黄 PC / コレステロール (7/3 重量比) と HCO 60 を 5 ml の 2-プロパノールに溶解した後、減圧乾燥した。9 ml の蒸留水を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌し多重層リポソームを得た。さらに、Hope<sup>128)</sup>の方法に準じて、エクストルーダー (Lipex) を用いて、ポリカーボネートメンブランフィルター (Nucleopore、孔径 0.1  $\mu$ m) を 10 回通過させた。

### 3. pH勾配法による塩酸ドキシリンの内包

2 mg の DOX を 1 ml の蒸留水に溶解した。内包化は 2 種類の方法で行った。第 1 の方法は、100  $\mu$  l の DOX 溶液を 20  $\mu$  l のリボソーム懸濁液に添加した。次いで、80  $\mu$  l の 100 mM 炭酸ナトリウム溶液を加えた。この時の pH 勾配は pH 2.2 と pH 10.5 であった。第 2 の方法は 100  $\mu$  l の DOX 溶液を 20  $\mu$  l のリボソーム懸濁液に添加した。次いで、20  $\mu$  l の蒸留水と 60  $\mu$  l の 50 mM 炭酸ナトリウム溶液を加えた。この時の pH 勾配は pH 2.2 と pH 9.2 であった。これらのリボソームと DOX の混合液を 15 および 37  $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。

### 4. DOX の内包率の測定

リボソーム内の DOX の内包率は Mayer<sup>8,9)</sup> の方法に従って測定した。DOX とリボソームの混合液を 25 mM pH 7.0 リン酸緩衝液で 50 倍希釈した。この溶液の 600 nm における吸光度をゼロとした。1 N NaOH を 3 ml のサンプルに対して 50  $\mu$  l (FBS を含むサンプルの場合は 100  $\mu$  l) 添加し pH を 7 から 11 に上昇させた。速やかに、600 nm の吸光度を測定した。この値より遊離の DOX 量を得た。0.2% の Triton X-100 溶液の 600 nm における吸光度をゼロとした。2.0% Triton X-100 溶液を 3 ml のサンプルに対して 30  $\mu$  l 添加して、リボソームを破壊し内包された DOX と遊離の DOX に由来する 600 nm の吸光度を測定した。内包率は次式より求めた、

$$\text{内包率\%} = (1 - \text{遊離 DOX の OD}_{600} / \text{全 DOX の OD}_{600}) \times 100$$



## 5. DOXのリボソームからの放出性

pH勾配法で作製したDOXリボソームを5%FBSを含む25mM pH 7.0リン酸緩衝液で50倍希釈した。この希釈液を15℃、30分間インキュベートした。DOXの内包率を求め、イニシャルのDOXの内包率から、DOXの放出率を算出した。

## 6. 濁度測定による空リボソームと牛血清の相互作用

空リボソーム(10mg/ml)を5%FBS水溶液中または蒸留水中で、37℃、5分間インキュベート後、450nmにおける吸光度を測定し濁度とした。FBS中の濁度と蒸留水中の濁度の差より、FBS由来のリボソームの濁度変化を求めた。

## 7. ゼータ電位測定による牛血清アルブミンまたは牛血清との相互作用検討

各処方0.5mg/mlと1%BSAまたは5%FBSを含有する0.05M pH 7.0リン酸緩衝液を混合して、37℃、10分間インキュベーション後、ゼータ電位を測定した。また、予め各処方0.5mg/mlの0.05M pH 7.0リン酸緩衝液中のゼータ電位を測定しこれと比較した。

## 8. 粒子径測定

第1節と同様に行った。

## 9. ゼータ電位の測定

第1節と同様に行った。

## 10. データ解析

データは平均値±標準偏差 ( $\sigma n$ ) で表示した。

## II. 第2章の実験

### 1. 試薬

インスリン ( $24.4 \text{ IU/mg}$ ) はシグマ社より入手した。トリプシンはギブコ社のブタ由来トリプシン ( $2.5\%$  溶液) を用いた。ホスファチジルコリン (PC) は大豆ホスファチジルコリン (Epikuron 200) を日光ケミカルより入手した。ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS) はシグマ社より入手した。ステアリルアミン (StA) は和光純薬より入手した。Triton X-100 は和光純薬より入手した。グリココール酸ナトリウムはシグマ社より入手した。試薬は全て入手したものをそのまま使用した。

### 2. インスリンのトリプシンによる消化

インスリンは  $0.02 \text{ N HCl}$  で  $2 \text{ mg/ml}$  に溶解後  $0.05 \text{ M pH 7}$  リン酸緩衝液で5倍希釈したものをストック溶液 ( $400 \mu\text{g/ml}$ ) とした。トリプシンは蒸留水で  $200 \mu\text{g/ml}$  に希釈したものをストック溶液とした。消化実験は、インスリンを  $1.7 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、トリプシンを  $4.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、脂質量を  $0 \sim 5.1 \times 10^{-2} \text{ M}$  用いて  $37^\circ\text{C}$  で行った。経時的に試料を採取し氷で冷却した。試料液  $1 \text{ ml}$  に対し  $0.5 \text{ ml}$  の  $5\%$  Triton X-100 と  $0.5 \text{ ml}$  の  $0.2\%$  グリココール酸ナトリウムを加えた。この液を速やかに HPLC 分析した。Triton X-100 はリボソームを溶解する目的で加え、グリココール酸ナトリウムはインスリンの吸着防止剤と HPLC 分析における内部標準物質として用いた。

### 3. リボソーム製造法

#### A. 水和 (HY) 法 (Hydration Method、HY-Method)

基本的にはBanghamらの方法<sup>124)</sup>に準じて作製した。脂質をエタノールまたはクロロホルムに溶解し、減圧下完全に溶媒留去した。残存した脂質薄膜に0.5 mlのインスリン溶液(200  $\mu$ g/ml)を加え、Vortexingした。この懸濁液を2分間Bath型超音波照射機で超音波照射した。尚、遊離のインスリンは除去せずそのまま用いた。

#### B. REV法 (Reverse phase evaporation vesicles、REV-Method)

基本的にはSzokaらの方法<sup>125)</sup>に準じて作製した。脂質をエーテルに溶解し、この液に0.5 mlのインスリン溶液(200  $\mu$ g/ml)を加えVortexingした後、5分間Bath型超音波照射機により超音波照射し、W/O型エマルジョンを得た。このエマルジョンを減圧下、溶媒留去しゲルを形成した。このゲルをVortexingし完全にエーテルを留去すると転相が起こり、REVが形成された。尚、遊離のインスリンは除去せずそのまま用いた。

#### C. 凍結融解 (FT) 法 (Freeze-thawing method、FT-Method)

基本的にはPickらの方法<sup>126)</sup>に準じて作製した。脂質をエタノールに溶解し、減圧下溶媒を留去した。残存した脂質薄膜に0.5 mlのインスリン溶液(200  $\mu$ g/ml)を加え、Vortexing後、2分間Bath型超音波照射機により超音波

照射した。この懸濁液を $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに保存し凍結後、室温(約 $25^{\circ}\text{C}$ )で融解した。この凍結融解を3回繰り返した。尚、遊離のインスリンは除去せずそのまま用いた。

#### D. 空リボソームの製法

Banghamらの方法<sup>124)</sup>に準じてMulti-lamellar vesicleを作製後、Hopeらの方法<sup>128)</sup>に準じてLUVET (Large uni-lamellar vesicles by extrusion techniques)を作製した。脂質をエタノールまたはクロロホルムに溶解し、減圧下完全に溶媒留去した。残存した脂質薄膜に0.5 mlの蒸留水を加え、Vortexingした。この懸濁液を2分間Bath型超音波照射機で超音波照射した後、Extruderを用いて粒子径を $0.1\mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブランフィルター(Nucleopore)を10回通過させ、約 $0.1\mu\text{m}$ の大きさに揃えた。

#### 4. イオン交換樹脂を用いたリボソーム中のインスリンの内包率の測定

Sammonsらの報告<sup>127)</sup>に従って、遊離のインスリンをアニオン交換樹脂で除去後、界面活性剤でリボソームを崩壊させ内包されたインスリンをHPLC分析し、定量した。

予め、AG1-X2 (BioRad) アニオン交換樹脂を蒸留水で洗浄し使用時に水分を濾紙で除去した。ガラスバイアル中に $100\mu\text{g}$ のインスリンに対して、交換樹脂を $100\text{mg}$ 入れ、ローテーターII (太陽科学工業)で緩やかに1分間回転し搅拌した。この液をミニカラム (Poly-Pep Chromatography



Columus、BioRad) に入れ、これをディスポーザブル試験管に入れて、遠心分離 (2000 rpm-5 分間) を行なった。ディスポーザブル試験管に溶出した液を採取した。この試料液 1 ml に対し 0.5 ml の 5% Triton X-100 水溶液と 0.5 ml の 0.2% グリコール酸ナトリウム水溶液を加えた。この混合液を速やかに HPLC 分析した。

Triton X-100 はリボソームを溶解する目的で加え、グリコール酸ナトリウムはインスリンの吸着防止剤と HPLC 分析における内部標準物質として用いた。

## 5. HPLC 分析

HPLC 分析機器は、ポンプ (日立 655-15 Liquid Chromatograph)、可変式 UV モニター (日立 Variable wavelength UV monitor)、データーシステム (島津 Chromatopac C-R2Ax)、インジェクター (REODYNE)、カラム (Waters Nova-Pak C18) を用いた。

移動相は 0.1 M 過塩素酸ナトリウム-0.01 M リン酸水溶液: アセトニトリル = 2:1 に Triton X-100 を 0.01 W/V% となるよう加えた。試料に内部標準物質としてグリコール酸ナトリウムを加え、20  $\mu$ l ループを用いて注入し、210 nm の波長で検出した。

## 6. リボソームの粒子径測定

第 1 章と同様に行なった。

## 7. インスリンの空リボソームへの結合

インスリンの空リボソームへの結合実験は、脂質量を $5.1 \times 10^{-3}$  M、インスリン量を $1.7 \times 10^{-5}$  M用いて、0.01 M pH7リン酸緩衝液中、25℃、5分間インキュベートし行った。インキュベーション後、試料0.5 mlをSephacrose CL-4B (ファルマシア) カラム ( $1.5 \times 20$  cm) に注入し、10倍希釈したDulbecco生理的リン酸緩衝液により25℃で溶出した。溶出液を1 mlずつフラクションコレクターで採取した。これらの各フラクションの溶出液の0.4 mlを採りガラス試験管に移し、0.4 mlの蒸留水を加えた後、50  $\mu$  lのBIO-RAD PROTEIN ASSAY dye reagent (Bio Rad) を添加した。この溶液の595 nmの吸光度を測定することにより、溶出プロフィールを得た。

リボソーム画分を0.4 mlずつ採り1本の試験管に集め、エタノール3 mlとエーテル1 mlを添加した。同様な操作をインスリン画分にも行った。これらの有機溶媒を混合した溶液を減圧乾燥した。乾燥後、エタノール3 ml、エーテル1 mlを添加し、リン脂質を可溶化した。この懸濁液をインスリン沈澱とリン脂質溶液を分離するため3000 rpm、10分間の遠心分離操作を2回行った。インスリン沈澱は0.1 mlの0.02 N HClに溶解し、0.9 mlの0.05 M pH7リン酸緩衝液を加え、50  $\mu$  lのBIO-RAD PROTEIN ASSAY dye reagentを添加し、インスリン濃度を定量した。一方、上清のリン脂質溶液は減圧乾燥し、0.5 mlの蒸留水と1.5 mlのエタノールを添加した。この溶液の230 nmにおける吸光度を測定し、リン脂質の濃度をイニシャルの空リボソームを用いた検量線から求めた。

## 8. トリプシンの空リボソームへの吸着

空リボソームは $6.4 \times 10^{-4}$  Mの脂質より構成され、トリプシンは0.5~5 mg/mlの濃度範囲で、0.05 M pH 7リン酸緩衝液中、25℃、5分間インキュベートした。インキュベーション前後における溶液中のリボソームのゼータ電位を測定した。

## 9. ゼータ電位測定

第1章と同様に行なった。

## 10. データ解析

データは平均値±標準偏差( $\sigma n$ )で表示した。有意差検定はStudent-t検定による。

## 引用文献

- 1) K. J. Hwang, "Liposomes, From Biophysics to Therapeutics", ed.by M. J. Ostro, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1987, pp109-156.
- 2) R. L. Juliano and D. Stamp, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 651 (1975).
- 3) Y. Sato, H. Kiwada and Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 4244 (1986).
- 4) Y. E. Rahman, E. A. Cerny, K. R. Patel, E. H. Lau and B. J. Wrigth, *Life Sci.*, 31, 2061 (1982).
- 5) J. Senior, J. C. W. Crawley and G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 1 (1985).
- 6) M. Ogiwara, *Gastroenterologia Japonica*, 19, 34 (1984).
- 7) G. Gregoriadis and D. E. Neerunjun, *Eur. J. Biochem.*, 47, 179 (1974).
- 8) C. Kirby, J. Clarke and G. Gregoriadis, *Biochem. J.*, 186, 591 (1980).
- 9) R. M. Abra and C. A. Hunt, *Biochim. Biophys. Acta*, 666, 493 (1981).
- 10) T. Tanaka, K. Taneda, H. Kobayashi, K. Okumura, S. Muranishi and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 3069 (1975).
- 11) M. M. Jonah, E. A. Corny and Y. E. Rahman, *Biochim. Biophys. Acta*, 401, 336 (1975).
- 12) T. M. Allen and J. M. Everest, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226, 539 (1986).
- 13) H. H. Spanjer, M. van Galan, F. H. Roerdink, J. Regts and G. L. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta*, 863, 224 (1986).
- 14) R. L. Juliano, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2, 31 (1988).
- 15) T. M. Allen, C. Hansen and J. Rutledge, *Biochim. Biophys. Acta*, 981, 27 (1989).
- 16) D. Liu, A. Mori and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1104, 95 (1989).
- 17) A. Surolis and B. K. Bachlawat, *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 760 (1977).
- 18) G. Gregoriadis and E. D. Neerunjun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 537

(1975).

19) Y. Yoshioka, Y. Banno, K. Ohki, T. Morita, Y. Mizukami and Y. Nozawa, *Yakuzai Gaku*, 46, 247 (1986).

20) T. Hara, H. Ishihara, Y. Aramaki and S. Tsuchiya, *Int. J. Pharm.*, 67, 123 (1991).

21) T. J. C. van Berkel, J. K. Kruijt, H. H. Spanjer, J. F. Nagelkerke, L. Harkes and H. J. M. Kempen, *J. Mol. Chem.*, 260, 2694 (1985).

22) H. Tsuji, S. Osaka and H. Kiwada, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1004, (1991).

23) M. K. Bijsterbosch, G. J. Ziere and T. J. C. van Berker, *Mol. Pharmacol.*, 36, 484 (1989).

24) B. Kronberg, A. Dahlman, J. Carlfors, J. Karlsson and P. Artursson, *J. Pharm. Sci.*, 79, 667 (1990).

25) G. Gregoriadis ed. by, "Liposome Technology," Vol.I, 1984, CRC Press Inc., Florida, p153.

26) N. Rajagopalan, C. M. Dicken, L. T. Ravin and L. A. Sternson, *J. Parenteral Sci. Technol.*, 42, 97 (1988).

27) C. L. Fortner, W. R. Grove, D. Bowie and M. D. Walker, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 32, 582 (1975).

28) Y. Mizushima, Y. Wada, Y. Etoh and K. Watanabe, *J. Pharm. Pharmacol.*, 35, 398 (1983).

29) Y. Mizushima, T. Hamano and K. Yokoyama, *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 49 (1982).

30) S. S. Davis, C. Washington and P. West, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 507, 75 (1987).

31) H. Yamaguchi, K. Watanabe, M. Hayashi and S. Awazu, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, 768 (1984).

32) G. Chanem, C. Laduron, G. Atassi, J. M. Ruyschaert and J. Hildebrand, *Cancer Treatment Reports*, 67, 1031 (1983).

33) M. E. Brewster, J. W. Simpkins, N. S. Hara, W. C. Stern and N. Bodor, *J. Parenteral*



*Sci. Technol.*, 43, 231 (1989).

- 34) 生化学データブック, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1979, p1300.
- 35) D. Liu, A. Mori and L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1066, 159 (1991).
- 36) R. M. Abra, C. A. Hunt and D. T. Lau, *J. Pharm. Sci.*, 73, 203 (1984).
- 37) G. Blume and G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta*, 1029, 91 (1990).
- 38) T. M. Allen, *Biochim. Biophys. Acta*, 640, 385 (1981).
- 39) C. Kirby and G. Gregorisdis, *Biochem. J.*, 199, 251 (1981).
- 40) J. Damen, J. Regts and G. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 538 (1981).
- 41) G. Scherphof and H. Morselt, *Biochem. J.*, 221, 423 (1984).
- 42) R. L. Richards, R. C. HabberSett, I. Scher, A. S. Janoff, H. P. Schieren, L. D. Mayer, P. R. Cullis and C. R. Alving, *Biochim. Biophys. Acta*, 855, 223 (1986).
- 43) A. R. Tall, I. Tabas and K. J. Williams, *Methods Enzymol.*, 128, 647 (1986).
- 44) R. L. Juliano, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2, 31 (1988).
- 45) D. A. Tycell, V. J. Richardson, and B. E. Ryman, *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 469 (1977).
- 46) S. M. Moghimi and H. M. Patel, *FEBS Lett.*, 233, 143 (1988).
- 47) S. M. Moghimi and H. M. Patel, *Biochim. Biophys. Acta*, 984, 379 (1989).
- 48) T. M. Allen, G. A. Austin, A. Chonn, L. Lin, and K. C. Lee, *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 56 (1991).
- 49) S. Tajima, S. Yokoyama, and A. Yamamoto, *J. Biol. Chem.*, 258, 10073 (1983).
- 50) D. Liu and L. Huang, *Biochemistry*, 28, 7700 (1989).
- 51) 瀬崎仁編集, 医薬品の開発Vol.13, 薬物送達法, 広川書店, 東京, 1989, p189.
- 52) S. H. Yalkowsky, S. C. Valvani and B. W. Johnson, *J. Pharm. Sci.*, 72, 1014 (1983).
- 53) S. D. Patel and S. H. Yalkowsky, *J. Parenteral Sci. Technol.*, 41, 15 (1987).
- 54) A. Helenius and K. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 29 (1975).

- 55) G. W. Bruding, S. T. Worland, K. Sauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 683 (1983).
- 56) A. Mori, A. L. Klivanov, V. P. Tochilin, and L. Huang, *FEBS Lett.*, 284, 263 (1991).
- 57) A. Helenius and K. Simons, *J. Biol. Chem.*, 247, 3656 (1972).
- 58) R. H. Muller, K. H. Wallis, S. D. Troster and J. Kreuter, *J. Controlled Release*, 20, 237 (1992).
- 59) S. D. Troster, K. H. Wallins, R. H. Muller, and J. Kreuter, *J. Controlled Release*, 20, 247 (1992).
- 60) L. Illum and S. S. Davis, *J. Pharm. Sci.*, 72, 1086 (1983).
- 61) J. E. O'Mullane, K. Petrak, L. E. F. Hutchinson and E. Tomlinson, *Int. J. Pharm.*, 63, 177 (1990).
- 62) L. Illum, I. M. Hunneyball and S. S. Davis, *Int. J. Pharm.*, 29, 53 (1986).
- 63) K. Arnold, Y. M. Lvov, M. Szogyi and S. Gyorgri, *Studia Biophysica*, 113, 7 (1986).
- 64) M. C. Woodle, L. R. Collins, E. Sponsler, N. Kossovsky, D. Papahajopoulos and F. J. Martin, *Biophys. J.*, 61, 902 (1992).
- 65) A. A. Ribeiro and E. A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta*, 332, 26 (1973).
- 66) R. L. Juliano, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2, 31 (1988).
- 67) C. L. Bisgaier, M. V. Siebenkas and K. J. Williams, *J. Biol. Chem.*, 264, 862 (1989).
- 68) J. Senior, C. Delgado, D. Fisher, C. Tilcock and G. Gregoriadis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1062, 77 (1991).
- 69) C. M. Gupta, A. Bali and S. Dhawan, *Biochim. Biophys. Acta*, 648, 192 (1981).
- 70) Q. F. Ahkong, D. Fisher, W. Tapion and J. A. Lucy, *Nature*, 253, 194 (1975).
- 71) H. Ohno, N. Simidzu, E. Tsuchida, S. Sasakawa, K. Honda, *Biochim. Biophys. Acta*,

649, 221 (1981).

72) C. L. Smith, Q. F. Ahkong, D. Fisher and J. A. Lucy, *Biochim. Biophys. Acta*, 692, 109 (1982).

73) A-R. Viguera, M. Mencia and F. M. Goni, *Biochemistry*, 32, 3708 (1993).

74) H. Baumann, E. Hou and D. Doyle, *J. Biol. Chem.*, 255, 10001 (1980).

75) M. C. Woodle and D. D. Lasic, *Biochim. Biophys. Acta*, 1113, 171 (1992).

76) J. A. E. Balazsovits, L. D. Mayer, M. B. Bally, P. R. Cullis, M. McDonell, R. S. Ginsberg and R. E. Falk, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 23, 81 (1984).

77) E. A. Forssen and Z. A. Tokes, *Proc. Natl. Acad. USA*, 78, 1873 (1981).

78) A. Gabizon, A. Neshore and Y. Barenholz, *J. Natl. Cancer Inst.*, 77, 459 (1986).

79) A. Gabizon, D. Goren, Z. Fuks, Y. Barenholz, A. Dagan and A. Meshorer, *Cancer Res.*, 43, 4730 (1983).

80) A. Gabizon, D. Goren, Z. Fuks, A. Meshorer and Y. Barenholz, *Br. J. Cancer*, 51, 681 (1985).

81) E. G. Mayhew, M. H. Goldrosen, J. Vaage and Y. M. Rutum, *J. Natl. Cancer Inst.*, 78, 707 (1987).

82) F. Olson, E. Nayhew, D. Maslow, T. Rustum and F. Szoka, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18, 471 (1986).

83) P. Rosa and F. Clementi, *Pharmacology*, 221 (1983).

84) N. Kojima, N. Ueno, M. Takano, H. Yabushita, M. Noguchi, M. Ishihara and K. Yagi, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 8, 471 (1986).

85) L. D. Mayer, M. B. Bally, M. J. Hope and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 816, 294 (1985).

86) L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis and A. S. Janoff, *Biochim. Biophys. Acta*, 817, 193 (1985).

87) L. D. Mayer, M. B. Bally and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 857, 123

(1986).

88) L. D. Mayer, M. B. Bally, M. J. Hope and P. R. Cullis, *Chem. Phys. Lipids*, 40, 333 (1986).

89) L. D. Mayer, L. C. L. Tai, M. B. Bally, G. N. Mitilenes, R. S. Ginsberg and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1025, 143 (1990).

90) K. Maruyama, A. Okamoto, S. Kojima, A. Suginaka, M. Iwaturu, *Drug Deliv. System*, 7, 345 (1992).

91) S. L. Law, W. Y. Lo, S. H. Pai and G. W. Teh, *Int. J. Pharm.*, 43, 257 (1988).

92) A. L. Catapano, R. L. Jackson, E. B. Gilliam, A. M. Gotto and L. C. Smith, *J. Lipid Res.*, 19, 1047 (1978).

93) B. C. Melnik and S. F. Melnik, *Anal. Biochim.*, 171, 320 (1988).

94) M. J. Chapman, *Methods Enzymol.*, 128, 70 (1986).

95) 日本生化学会編, 生化学データブック I, 東京化学同人, 東京, 1979, pp129-135.

96) Y. Saito and T. Sato, *Yakugaku Zasshi*, 112, 763 (1992).

97) L. A. M. Garcia, P. S. Araujo and H. Chaimovich, *Biochim. Biophys. Acta*, 772, 231 (1984).

98) S. L. Law, W. Y. Lo, S. H. Pai, G. W. Teh and F. Y. Kou, *Int. J. Pharm.*, 32, 237 (1986).

99) D. Hoestra, R. Tomasini and G. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta*, 542, 4561 (1978).

100) "リボソーム", 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編集, 南江堂, 東京, 1988.

101) G. Gregoriadis ed. by, "Liposome Technology," Vol.III, CRC Press Inc., Florida, 1984.

102) C. Nicolau, A. Legrand, A. Cudd and E. Grosse, "Medical Application of Liposomes," ed. by K. Yagi, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1986, pp169-185.

103) J.-Y. Legendre and F. C. Szoka, *Pharm. Res.*, 9, 1235 (1992).

- 104) C.-Y. Wang and L. Huang, *Biochemistry*, 28, 9508 (1989).
- 105) C.-Y. Wang and L. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7851 (1987).
- 106) G. Gregoriadis ed. by, "Liposome Technology," Vol.II, CRC Press Inc., Florida, 1984.
- 107) R. L. Juliano, "Liposome," ed. by M. J. Ostro, Dekker, New York, 1983, pp53-86.
- 108) H. M. Partel and B. E. Ryman, *FEBS Lett.*, 62, 60 (1976).
- 109) G. Dapergolas and G. Gregoriadis, *Lancet*, 16, 824 (1976).
- 110) N. Das, M. K. Basu and M. K. Das, *Biochem. Int.*, 16, 983 (1988).
- 111) M. M. Partel and B. E. Ryman, *Biochem. Soc. Trans.*, 5, 1054 (1977).
- 112) R. W. Stevenson, H. M. Partel, J. A. Parsons and B. E. Ryman, *Diabetes*, 31, 506 (1982).
- 113) C. Weingarten, A. Moufti, J. F. Desjieux, T. T. Luong, G. Durand, J. P. Devissaguet and F. Puisieux, *Life Science*, 28, 2747 (1981).
- 114) C. Weingarten, A. Moufti, J. Delattre, F. Puisieux and P. Couvreur, *Int. J. Pharm.*, 26, 251 (1985).
- 115) J. H. Wiessner and K. J. Hwang, *Biochim. Biophys. Acta*, 689, 490 (1982).
- 116) J. V. Chobanian, A. R. Tall and P. I. Brecher, *Biochemistry*, 18, 181 (1979).
- 117) A. R. Tall and P. H. R. Green, *J. Biol. Chem.*, 256, 2035 (1981).
- 118) J. Damen, J. Regts and G. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta*, 712, 444 (1982).
- 119) D. Hoekstra and G. Scherphof, *Biochim. Biophys. Acta*, 551, 109 (1979).
- 120) J. N. Weinstein, R. D. Klausner, T. Innerarity, E. Ralston and R. Blumenthal, *Biochim. Biophys. Acta*, 647, 270 (1981).
- 121) M. J. Hsu and R. L. Juliano, *Biochim. Biophys. Acta*, 720, 411 (1982).
- 122) F. Roerdink, N. M. Wassef, E. C. Richardson and C. R. Alving, *Biochim. Biophys. Acta*, 734, 33 (1983).
- 123) A. Chonn, S. C. Semple and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1070, 215



(1991).

- 124) A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 51, 241 (1989).
- 125) F. Szoka and D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4194 (1978).
- 126) U. Pick, *Arch. Biochem. Biophys.*, 212, 186 (1981).
- 127) M. C. Sammons, B. R. DeMark and M. S. McCracken, *J. Pharm. Sci.*, 75, 838 (1986).
- 128) M. J. Hope, M. B. Bally, L. D. Mayer, A. S. Janoff and P. R. Cullis, *Chem. Phys. Lipids*, 40, 89 (1986).
- 129) Y. Pocker and S. B. Biswas, *Biochemistry*, 19, 5043 (1980).
- 130) P. Kanellins, A. Y. Romans, B. J. Johnson, H. Kercret, R. Chioveti, T. M. Allen and J. P. Segrest, *J. Biol. Chem.*, 255, 11464 (1980).
- 131) L. A. M. Garcia, P. S. Araujo and H. Chaimovich, *Biochim. Biophys. Acta*, 772, 231 (1984).
- 132) K. Kondo, S. Kimura and Y. Imanishi, *Biochemistry*, 29, 3631 (1990).
- 133) F. B. Stenz, A. E. Kitabchi, J. W. Schilling, L. R. Schronk and M. Seyer, *J. Biol. Chem.*, 264, 20275 (1989).
- 134) R. P. Oomen and H. Kaplan, *Biochemistry*, 26, 303 (1987).
- 135) S. F. Greenhut and M. A. Roseman, *J. Biol. Chem.*, 260, 5883 (1985).
- 136) R. C. MacDonald and R. I. MacDonald, *J. Biol. Chem.*, 263, 10052 (1988).
- 137) 生化学辞典, 今堀和友, 山川民夫監修, 東京化学同人, 東京, 1984, p887.
- 138) J-F. Tocanne and J. Teissie, *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 11 (1990).
- 139) R. N. Farias, A. L. Vinals and R. D. Morero, *J. Biol. Chem.*, 261, 15508 (1986).
- 140) J. H. Wiesner, H. Mar, G. Baskin and K. J. Hwang, *J. Pharm. Sci.*, 77, 432 (1988).
- 141) J. Y. Lai, D. D. Chow and K. J. Hwang, *J. Pharm. Sci.*, 77, 432 (1988).
- 142) M. C. Perry, W. Tampion and J. A. Lucy, *Biochem. J.*, 125, 179 (1971).

- 143) D. E. Green and S. Fleischer, *Biochim. Biophys. Acta* , 70, 554 (1963).
- 144) H. Ishihara, T. Hara, Y. Aramaki, S. Tsuchiya and K. Hosoi, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1536 (1991).
- 145) G. D. Eytan, R. Broza and Y. Shalitin, *Biochem. Biophys. Acta* , 937, 387 (1988).
- 146) D. Liu and L. Huang, *Anal. Biochem.*, 202, 1 (1992).
- 147) J. Rosing, G. Tans, H. Speijer and R. F. A. Zwaal, *Biochemistry* , 27, 9048 (1988).
- 148) C. Huang, *Biochemistry* , 8, 344 (1969).
- 149) A. M. Scanu and C. Edelstein, *Anal. Biochem.*, 44, 576 (1971).
- 150) R. L. Magin and J. N. Weinstein, "Liposome Technology," Vol.III, ed. by G. Gregoriadis, 1984, CRC Press Inc., Florida, p.142.

## 論文目録

本論文は以下の論文を基に作成したものである。

1) Y. Kato, K. Watanabe, M. Nakakura, T. Hosokawa, E. Hayakawa and K. Ito. Blood Clearance and Tissue Distribution of Various Formulations of  $\alpha$ -Tocopherol Injection after Intravenous Administration. *Chem. Pharm. Bull.*, 41, 599 (1993).

2) Y. Kato, K. Watanabe, T. Hosokawa, E. Hayakawa and K. Ito. Modification of Liposomes by Addition of HCO60. I. Targeting of Liposomes to Liver by Addition of HCO60 to Liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

3) Y. Kato, T. Hosokawa, Y. Okubo, E. Hayakawa and K. Ito. Modification of Liposomes by Addition of HCO60. II. Encapsulation of Doxorubicin into Liposomes Containing HCO60. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

4) Y. Kato, T. Hosokawa, E. Hayakawa and K. Ito. Influence of Liposomes on Tryptic Digestion of Insulin. *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 457 (1993).

5) Y. Kato, T. Hosokawa, E. Hayakawa and K. Ito. Influence of Liposomes on Tryptic Digestion of Insulin. II. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学薬学部教授、井上圭三博士ならびに同助手、梅田真郷博士に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

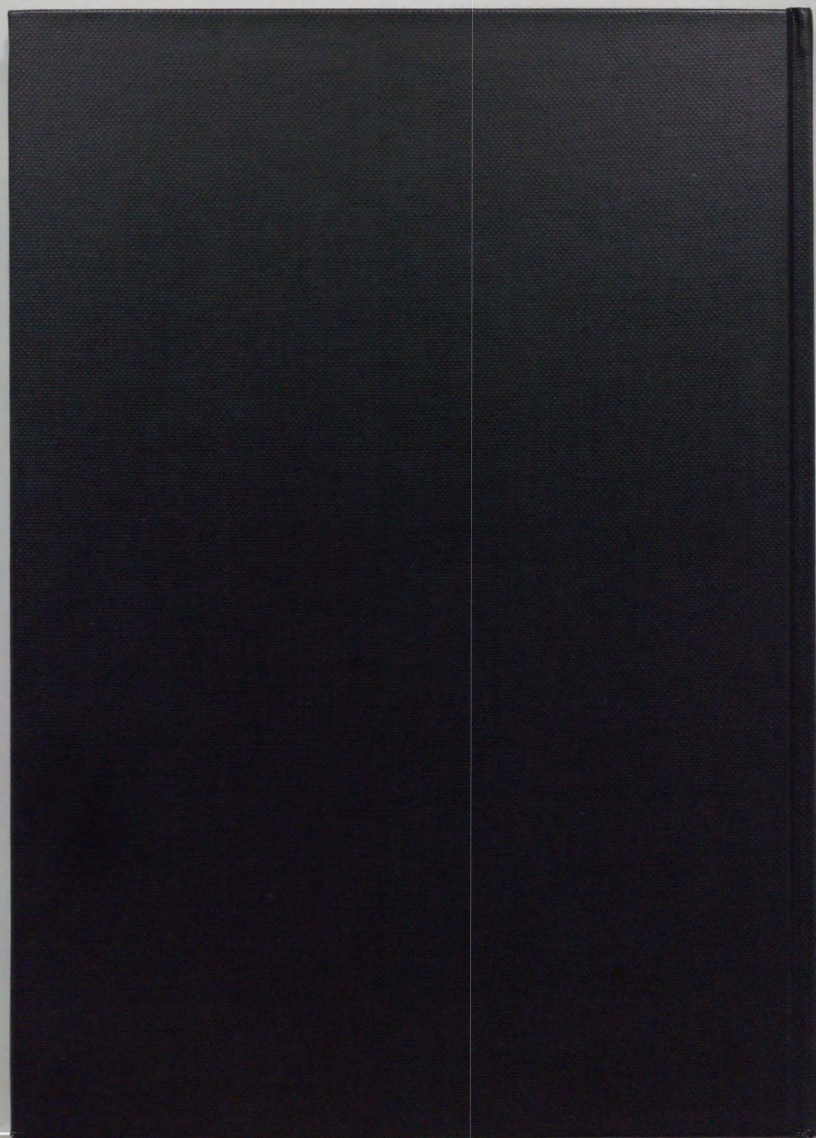
本論文提出にあたって、貴重な御支援を賜りました協和発酵工業株式会社富士工場長兼医薬研究所長、平田正博士ならびに貴重な御助言を賜りました静岡県立大学薬学部教授、広田貞雄博士に深謝し、厚く御礼申し上げます。

また本研究を遂行するにあたり、御助言、御協力を頂きました同富士工場製造部、伊藤邦雄部長、同医薬研究所製剤研究所、黒田徳幸所長ならびに主任研究員、早川栄治博士に厚く御礼申し上げます。

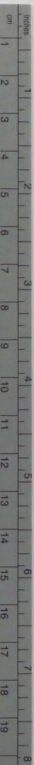
さらに本研究を行なうにあたって、御協力を頂きました同医薬研究所製剤研究所、細川俊仁研究員、中倉政司研究員、大久保雄一研究員、渡邊恭子元研究員、友田寛研究員、勝間田博恵女史、川口祐司氏、岩田見二氏、長沼弘毅氏をはじめ所員の方々ならびに同医薬研究所、望月治美氏に深く感謝致します。

最後に、論文発表の機会を与えて頂いた同会社幹部の方々に厚く御礼申し上げます。

1993年







# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

