

総 説

血中滞留型リポソームの製剤設計と癌化学療法への応用

畝 崎 榮 細 田 順 一

東京医科大学病院薬剤部

【要旨】 ポリエチレングリコール (PEG) でリポソーム膜を修飾した PEG 修飾リポソームは、細網内皮系への取り込みを回避して高い血中滞留性を示す。抗癌剤を封入した PEG 修飾リポソームは、透過性の亢進した腫瘍新生血管壁を通過し、薬物を徐々に放出して優れた抗腫瘍効果を発現することから、癌化学療法におけるドラッグキャリアとして高い評価を得ている。また、癌温熱療法との併用によって局所加温された腫瘍部位で薬物を放出する血中滞留型温度感受性リポソームなども開発されている。

本稿では、癌化学療法への応用に向けた血中滞留型リポソームの製剤設計と機能およびその効果について解説する。

はじめに

近年、薬理活性の高い薬物が開発されるとともに、薬物の治療効果を最適化する目的の Drug delivery system (DDS) の開発が進められている。特に癌化学療法の分野においては、抗癌剤の副作用軽減と標的部位への選択性を向上するための DDS 構築が重要である。

リポソームはリン脂質の二分子膜よりなる細胞様の小胞である。1965 年、英国の Bangham¹⁾ によって発見されて以来、細胞膜モデルとして利用されるとともに、薬物キャリアや遺伝子キャリアとして多くの研究が進められている。リポソームは生体適合性が高く理想的な DDS キャリアであるが、他の微粒子製剤と同様に静脈内投与した場合、肝臓や脾臓などの細網内皮組織 (RES) へ取り込まれ、血中から速やかに消失する。この性質は RES やマクロファージを標的とする場合には長所となるが、それ以外の標的組織や血中の薬物徐放化を期待する場合には欠点となる。そのため、薬物を効率的に標的組織へ送達するためには、

RES に捕捉されるリポソームの割合を減らす工夫が必要となる。この問題点を克服するため開発された血中滞留型リポソーム^{2,3)} は、膜表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾したキャリアで、ステルスリポソームとも呼ばれる。

本稿では、PEG 修飾リポソームの物性と体内動態、固形癌組織へのターゲティング、温度感受性リポソームの開発などについて著者らの研究グループの報告を中心に DDS 展開の一端を紹介する。

PEG 修飾リポソームの物性と体内動態

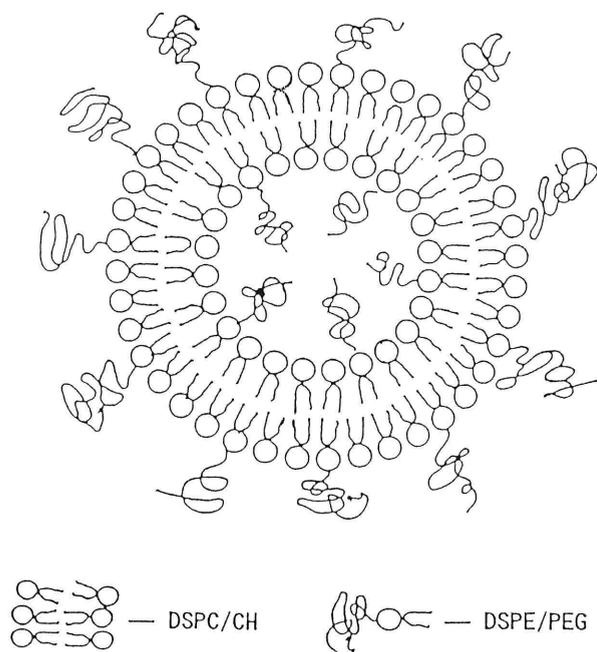
リポソームの体内動態は、血中での物理的安定性や RES への取り込みに大きく左右される。これらの要因は、リポソームの粒子径、膜表面電荷、リン脂質の種類 (Table 1) や脂質組成によって影響される⁴⁾。静脈内に投与されたりポソームの血中体内動態は二相性を示し、初期の急激な消失は RES への分布⁵⁾ を表している。膜を構成するリン脂質の相転移温度が高いほどリポソームの半減期は長く⁶⁾、さらにコレステロール

2002 年 10 月 5 日受付、2002 年 10 月 24 日受理

キーワード: ドキソルピシン、リポソーム、ポリエチレングリコール、ターゲティング、温度感受性
(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学病院薬剤部 畝崎 榮)

Table 1

egg phosphatidylcholine (egg PC)
phosphatidylglycerol (PG)
hydrogenated soy bean phosphatidylcholine (HSPC)
dimiristoylphosphatidylcholine (DMPC)
dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)
distearoylphosphatidylcholine (DSPC)
dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)



DSPC; distearoylphosphatidylcholine.

C H; cholesterol.

DSPE; distearoylphosphatidylethanolamine.

PEG; polyethylene glycol.

Fig. 1 Schematic illustration of PEG-liposomes.

を組み込むと物理的安定性が增大する⁷⁾。また、粒子径が 300 nm 以上の大きなリポソームは肝臓のクッパー細胞に取り込まれやすくなり⁸⁾、小さなリポソームほど血中からの消失は遅くなる。すなわち、リポソームが血中で長く安定して循環するには、相転移温度の高いリン脂質で硬い膜を構成し、表面電荷は中性で粒子径を小さくするなどの条件が必要となる。著者らは、血中滞留型リポソームを調製するにあたり、粒子径を約 100 nm、膜脂質組成比をジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC) とコレステロール 1:1 (モル比) とし、膜表面を PEG 脂質誘導体で被覆する製剤設計を行った (Fig. 1)。

PEG は単独でリポソーム膜へ組み込むことができ

ないので、アンカーとなる部分に脂質を結合し脂質誘導体とする必要がある (著者らは Fig. 1 に示すように DSPE をアンカーとして用いた)。一般的に用いる PEG の分子量は 1,000~5,000 (著者らは 2,000) で、鎖長が長すぎるとリポソーム膜に組み込まれにくくなる。リポソーム膜を PEG で覆うと、水和層が形成されて親水性が増しマクロファージとの接触が抑制される⁹⁾。さらに、水和層による立体障害により、血中での補体系蛋白および RES との相互作用やリポソーム相互の凝集が著しく抑制される¹⁰⁾。また、PEG の分子量および修飾量は、リポソーム膜上における水和層の厚さ、ひいてはリポソームの血中滞留性に影響する¹¹⁾ ので、使用目的に応じたものを選択する必要がある。このように RES を回避する PEG 修飾リポソームは、従来のリポソームに比較して血中半減期が著しく延長する²⁾。

リポソームは、親水性または疎水性にかかわらず薬物を封入することができる。親水性薬物は、リポソームの内水相に封入され、疎水性薬物はリポソームの膜中に組み込まれる。しかし、一般にリポソームへの薬物封入効率は高いとはいえず、製品化への一つの障壁となっていた。現在では、一部の弱酸性および弱塩基性薬物は、pH 勾配法¹²⁾ というリモートローディング法を用いることで効率良くリポソーム内に封入することが可能となった。例えば、弱塩基性のアントラサイクリン系抗癌剤ドキソルビシン (DXR) は、リポソームの外相をアルカリとし内相を酸性にするとその pH 勾配によって 100% 近くリポソーム内に封入することができる^{12,13)} (Fig. 2)。

腫瘍組織における PEG 修飾リポソームの新生血管透過性

現在行われている癌化学療法は、治療効果と副作用のつりあいの上で成立しており、癌細胞に影響を与えるだけの十分な薬物濃度を供給するには限界がある。さらに、固形癌組織では薬剤の分布に対して抵抗性をもつことが知られている。例えば、腫瘍組織は周辺の正常組織と比較して間質圧が高く薬剤が移行しにくいことが指摘されている。

一方、腫瘍組織に増生する新生血管は内皮細胞間に tight junction がなく不連続な間隙が形成されているため、高分子も容易に血管外へ漏出する。当然、小さな粒子径をもつリポソームは、血管透過性の亢進した新生血管壁を通過 (漏出) することが可能となる。つ

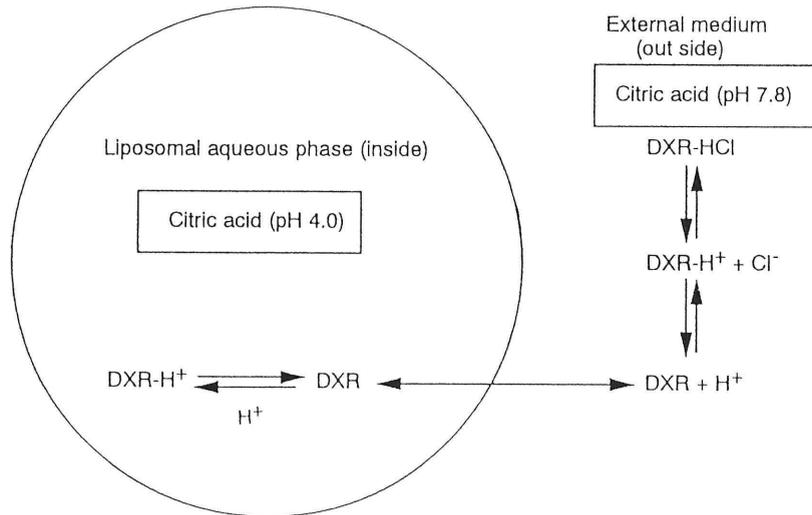


Fig. 2 Intraliposomal remote loading of DXR by creating a pH gradient between the intraliposomal aqueous phase and the external medium

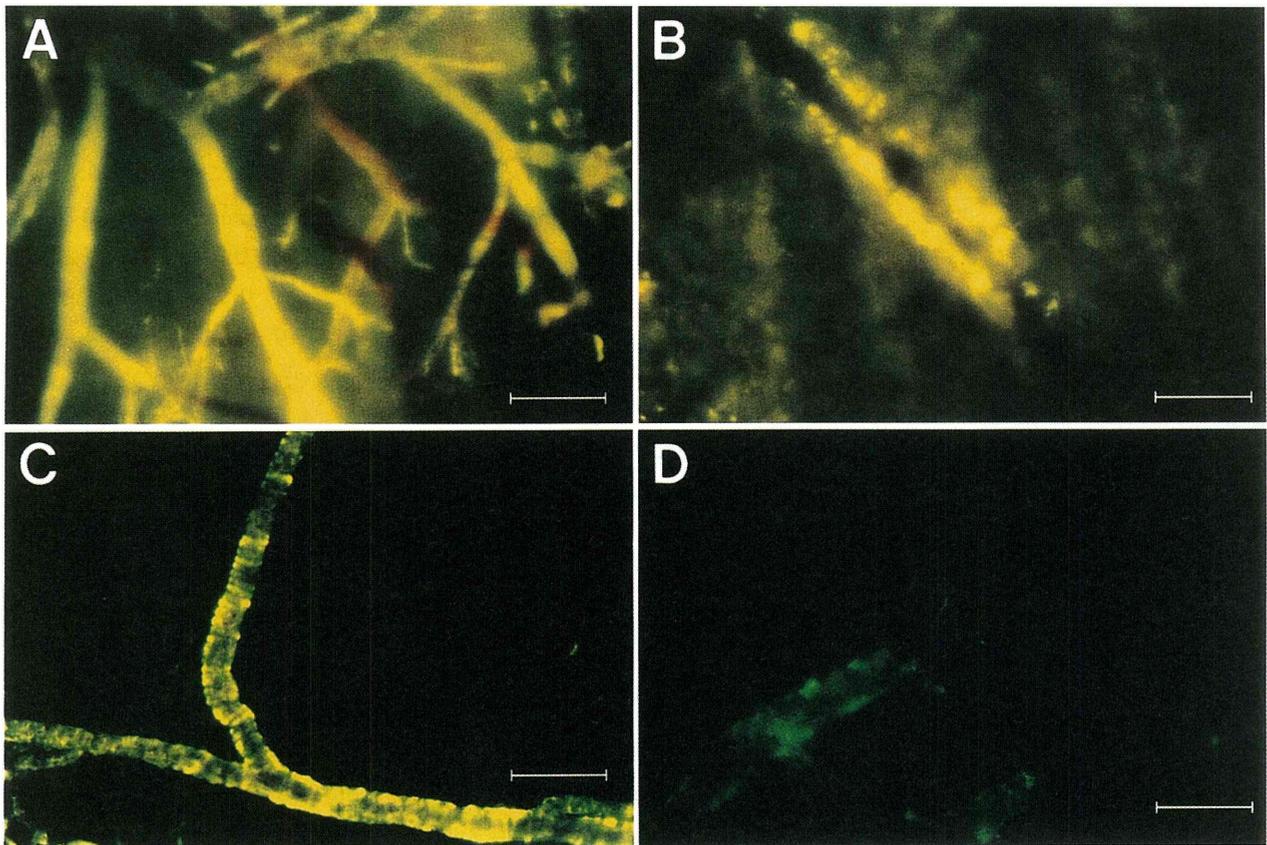


Fig. 3 Microscopic localization of DiI-PEG-liposomes in tumor (A, B) and normal tissue (C, D). (A) Fluorescence image of tumor microvasculature at 30 min after DiI-PEG-liposomes injection. (B) Liposome localization in the tumor was perivascular. The photograph was taken at 2 days after DiI-PEG-liposomes injection. (C) In normal tissue, extravasation of DiI-PEG-liposomes was not detected. Only fluorescent spots within the vessel wall were observed. The photograph was taken 1 day after DiI-PEG-liposomes injection. (D) In normal tissue, fluorescence image at 2 after DiI-PEG-liposomes injection. Fluorescence intensity in the vessel wall gradually decreased. Bar, 100 μ m.

まり、PEG 修飾リポソームのように血中を長時間循環するキャリアほど、その機会は増大し腫瘍組織へ集積することになる。

そこで、蛍光色素 (DiI) を標識した PEG 修飾リポソーム (粒子径約 100 nm) を担癌マウスに投与し蛍光分布を視覚的に検討した結果、腫瘍組織では時間経

過とともに血管壁の外腔周囲にリポソームの血管透過を示唆する蛍光スポットが多く観察された¹⁴⁾ (Fig. 3A, B)。一方、正常組織の血管では、そのような状態は全く見られない (Fig. 3C, D)。また、腫瘍組織のリポソームによる蛍光分布は極めて不均一で、同一血管においても漏出の激しい部分とまったく漏出しない部分に分かれた。血管透過性は新生血管形成期の第I期と壊死の第IV期に高くなるといわれており、リポソームの分布もおおむね不均一になると考えられる。また、血管壁を通過したリポソームは、血管あるいはリンパ管からの回収が少なく、血管周囲の組織間隙に蓄積する。前田¹⁵⁾らは、このような腫瘍組織における微小脈管レベルでの高分子やリピッドの特異的な動態を、ドラッグキャリアとしてのEPR (enhanced per-

meability and retention) 効果として評価している。このEPR効果は、リポソームの固形癌組織へのターゲティングにおいて重要な因子となる。

PEG修飾リポソームによる固形癌へのターゲティング

リポソームをキャリアとしてより効率の高いターゲティングを得るためには、腫瘍組織の新生血管に到達するための血中滞留性と血管内皮細胞間隙を透過できるサイズ (粒子径) が重要である。この条件を満たす血中滞留型リポソーム (粒子径約100 nm) にDXRを封入し担癌マウスにおいて実験を行った結果、腫瘍組織内のDXR濃度が時間経過とともに高くなり¹⁶⁾、癌の退縮と延命効果が示された¹⁷⁻²⁰⁾ (Fig. 4,

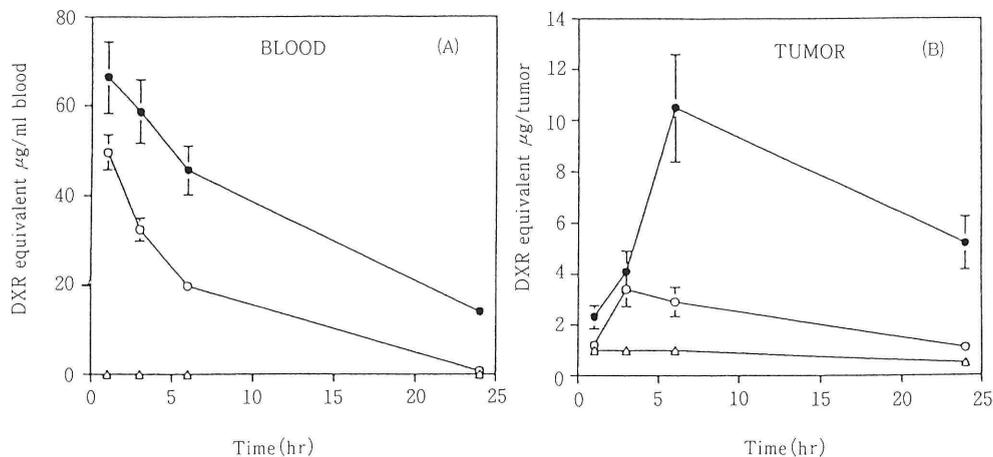


Fig. 4 DXR levels in blood (A) and tumor (B) after i.v. injection of free DXR (△), DXR-liposome (○) and DXR-PEG-liposome (●), into tumor-bearing mice at a dose of 5 mg DXR/kg.

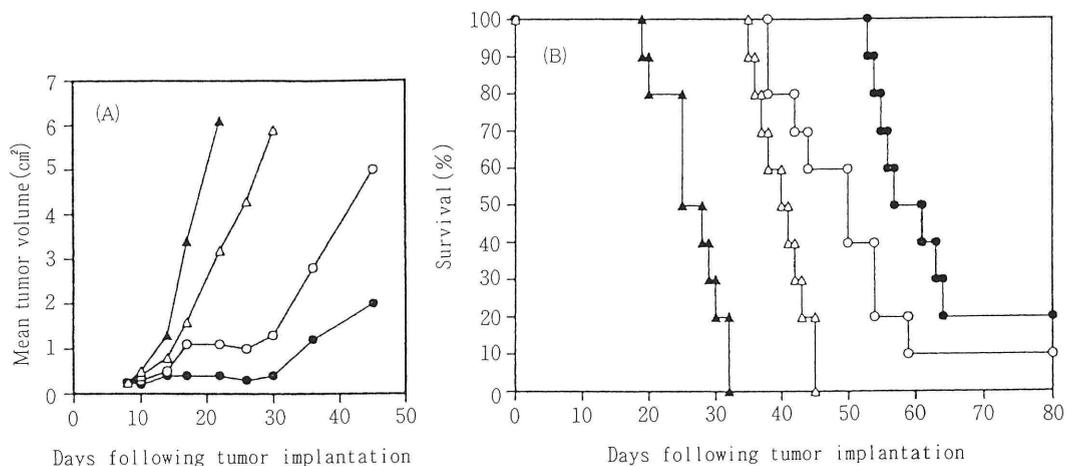


Fig. 5 Effect of DXR-PEG-liposomes after i.v. multiple injection on tumor growth (A) and survival of mice (B). Control (▲), of free DXR (△), DXR-liposome (○), DXR-PEG-liposome (●). Mice were inoculated s.c. with colon 26 cells on day 0. Treatment began 8 day later was repeated on day 11 and 14. Free DXR or liposomal DXR was injected at a dose of 5 mg DXR/kg.

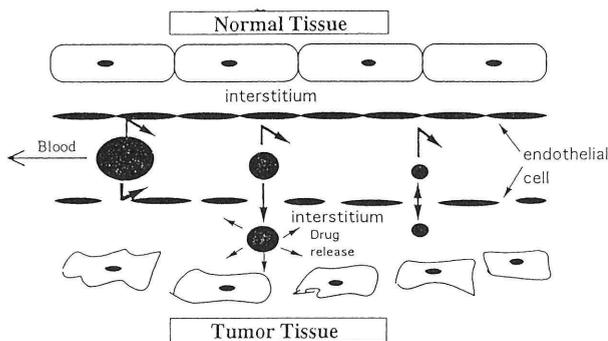


Fig. 6 Schematic illustration of passive targeting by DXR-PEG-liposomes to solid tumor.

5). この時、PEG の分子量を 5,000 よりも大きくすると腫瘍への集積性と抗腫瘍効果が減少した²¹⁾。このことから、固形癌へのターゲティングにおいて PEG の至適分子量は 5,000 以下であることが示唆された。また、家兎を用いた実験では、リポソーム化すると DXR による骨髄抑制等の副作用も軽減されることが判明している²²⁾。抗癌剤を内封した PEG 修飾リポソームは、EPR 効果により新生血管を通過したあと腫瘍組織の間に蓄積し、局在するリポソームから放出された DXR が癌細胞へ移行し抗腫瘍効果を発現すると考えられる (Fig. 6)。この DDS の成功は、腫瘍側の組織学的な特徴と PEG 修飾リポソームの特性がうまく合致した結果である。

DXR を封入した PEG 修飾リポソームは、既に米国で DOXIL[®] (欧州では CAELYX[®]) という商品名でカポジ肉腫や卵巣癌に使用されている。DXR は心筋組織との親和性が高く、蓄積的な心毒性があることから投与量が制限されているが、リポソーム化することにより体内分布が変化し心毒性が著しく軽減されることが判明している。カポジ肉腫患者における DOXIL[®] の体内動態パラメータは 2-コンパートメントモデルにしたがい、 α 相の半減期は 3.2~4.9 時間、 β 相では 45.2 時間と長く、AUC の 95% が β 相で消失する。また、投与 72 時間後のカポジ肉腫中の DXR 濃度は DXR 単独投与と比較して約 5 倍高いことが報告されている²³⁾。現在、各癌種に対して他の抗癌剤との併用療法や放射線との併用などの臨床試験が進められている。

PEG 修飾温度感受性リポソームと温熱療法

飽和アシル基をもつリン脂質は、その炭素鎖の長さに応じた固有の相転移温度を有する。このようなリン脂質で構成されたりポソーム膜は相転移温度以下で

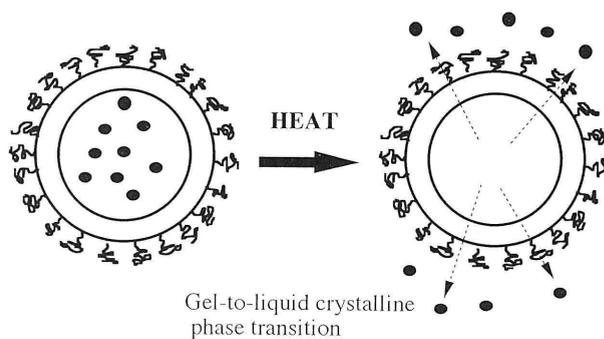


Fig. 7 Schematic illustration of design of TSL.

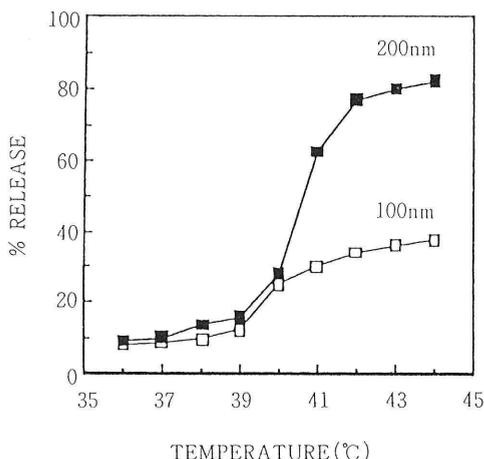


Fig. 8 Effect of liposomal size on Temperature-dependent release of calcein from thermosensitive liposomes (diameter of 100 nm and 200 nm)

は流動性が低く、密なラメラ構造 (ゲル相) となるが、それ以上の温度では流動性が高くなり粗いラメラ構造 (液晶相) をとり透過性が高くなる。この性質を利用すると、癌温熱療法によって局所加温された腫瘍部位で内封した抗癌剤を放出する温度感受性リポソーム (thermosensitive liposome; TSL) (Fig. 7) を調製することができる。実際には DSPC とジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を 9:1 (モル比) の割合でリポソーム膜を構成すると、温熱療法に都合のよい 42°C 付近で薬物を放出する TSL が得られる²⁴⁻²⁶⁾。また、その場合の温度感受性は粒子径によって異なり、ある程度の滞留性と薬物放出性を保つ粒子径は 200 nm くらいが適していると考えられる (Fig. 8)。

これにもとづき、DXR を封入した PEG 修飾 TSL を担癌マウスに投与し、腫瘍部位を局所加温すると、高い DXR 腫瘍内濃度と著しい延命効果が示されている²⁷⁻²⁹⁾。本システムでは、温熱療法と化学療法を組み合わせることで相加的または相乗的な効果が期待

できる。DXR以外にも、シスプラチンや5-FUなどを封入した温度感受性PEG修飾リポソームの臨床応用が期待されている。

リポソームの限界と展望

粒子径の小さなPEG修飾リポソームは、EPR効果によって腫瘍新生血管を通過し、長時間組織中に保持される。しかし、高分子のリポソーム自身が間質を通過して癌細胞まで到達することは難しいと考えられる。一方、低分子薬物は、濃度拡散によって分布するため癌細胞に容易に移行できる。したがって、抗癌剤を封入したPEG修飾リポソームでは、間質で放出された抗癌剤が拡散により標的癌細胞まで到達して薬効を発現すると考えられる。一方で、薬物の腫瘍集積濃度が高い割に効果が少ないのではという指摘がある。当然のことながら、リポソーム内に封入された薬物は薬効を示さない。したがって、組織に集積したりリポソームから薬物が経時的または濃度的にどのくらいの割合で放出されるかが効果発現の重要な要因となる。しかし、現時点では、局所での薬物放出過程を制御することは難しい。今後は、温熱療法との併用、リポソーム膜への抗体の付与や膜融合機能をもたせるなどの機能性の工夫が必要と考えられる。また、高い血中滞留性のため、薬物の体内分布が変化することによってhand-foot syndrome(手足症候群)という予期せぬ副作用も報告されている³⁰⁾。ただし、この場合、3週間以上の投与間隔をあけることで副作用の発現を抑制できる²³⁾。

リポソームの最近の動向として、ドラッグキャリアだけでなく遺伝子キャリアとしての有用性が注目されている。ウイルスに替わる安全性の高いベクターとして臨床応用もされるようになってきた。今後は、多角的な機能性を具備したりリポソームの開発が期待される。現在、リポソーム製剤の開発は、欧米のベンチャー企業を中心に展開されており、本稿で紹介したドキシソルビシンの他、アムホテリシンB、ダウノルビシンが既に市販されている。また、ナイスタチン、ゲンタマイシン、ビンクリスチンなどが治験の最終段階にある。わが国では、アムホテリシンB封入りリポソームや抗体を付与したドキシソルビシン封入りリポソームが治験段階にあり、臨床使用できる日が待たれる。今後、薬物療法におけるDDS製剤の果たす役割は大きく、その発展が期待されている。

文 献

- 1) Bangham AD, Standish MM, Watkins JC: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**: 238-252, 1965
- 2) Klibanov AL, Maruyama K, Huang L: Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* **268**: 235-237, 1990
- 3) Blume G, Cevc G: Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1029**: 91-97, 1990
- 4) Hwang KJ: Liposomes. (eds) Ostro MJ, Marcel Dekker Inc, New York, 109, 1987
- 5) Rosa P, Clementi F: Absorption and tissue distribution of doxorubicin entrapped in liposomes following intravenous or intraperitoneal administration. *Pharmacology* **26**: 221-229, 1983
- 6) Senior J, Gregoriadis: Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: The effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sci* **30**: 2123-2136, 1982
- 7) Damen J, Regts J, Schephof G: Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins. Dependence on cholesterol content and phospholipid composition. *Biochim Biophys Acta* **665**: 538-545, 1981
- 8) Patel HM, Tuzel NS, Ryman BE: Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *Biochim Biophys Acta* **761**: 142-151, 1983
- 9) Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G: Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly (ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1062**: 77-82, 1991
- 10) Needham D, McIntosh TJ, Lasic DD: Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1108**: 40-48, 1992
- 11) Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, Ishikura C, Kojima S: Effect of molecular weight in amphipathic polyethyleneglycol on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. *Chem Pharm Bull* **39**: 1620-1622, 1991
- 12) Mayer LD, Bally MB, Cullis PR: Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochim Biophys Acta* **857**: 123-126, 1986
- 13) 細田順一、畝崎 榮、丸山一雄、岩鶴素治: ポリエチレングリコール修飾リポソームへのドキシソルビシン封入方法と安定性の評価。 *薬剤学* **58**: 23-28, 1998

- 14) Unezaki S, Maruyama K, Hosoda J, Nagae I, Koyanagi Y, Nakata M, Ishida O, Suginaka A, Iwatsuru M, Tsuchiya S: Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by in vivo fluorescence microscopy. *Int J Pharm* **144**: 11-17, 1996
- 15) Matsumura Y, Maeda H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* **46**: 6387-6392, 1986
- 16) Unezaki S, Maruyama K, Ishida O, Takahashi N, Iwatsuru N: Enhanced tumor targeting of doxorubicin by ganglioside GMI-bearing long-circulating liposomes. *J Drug Target* **1**: 287-292, 1993
- 17) Unezaki S, Maruyama K, Ishida O, Suginaka A, Hosoda J, Iwatsuru M: Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating amphipathic poly(ethylene glycol). *Int J Pharm* **126**: 41-48, 1995
- 18) 石田 理、丸山一雄、畹崎 榮、杉中昭典、高橋則行、岩鶴素治: ポリエチレングリコール付与リポソームによるドキソルビシンの固形癌への移行量増加と抗腫瘍効果。 *DDS* **9**: 185-192, 1994
- 19) 畹崎 榮、細田順一、丸山一雄、岩鶴素治: 血中滞留型リポソームによる固形癌への Passive Targeting. *Organ Biology* **3**: 61-68, 1996
- 20) Nagae I, Koyanagi Y, Ito S, Tanabe Y, Unezaki S: Liposome Drug Delivery System for Murine Neuroblastoma. *J Pediatric Surgery* **33**: 1521-1525, 1998
- 21) Hosoda J, Unezaki S, Maruyama K, Tsuchiya S, Iwatsuru N: Antitumor activity of doxorubicin encapsulated in poly(ethyleneglycol)-coated liposomes. *Biol Pharm Bull* **18**: 1234-1237, 1995
- 22) 細田順一、畹崎 榮、松村正史、前 彰、丸山一雄、岩鶴素治、土屋晴嗣: ドキソルビシン封入ポリエチレングリコール修飾リポソームの骨髄毒性。 *薬剂学* **59**: 51-56, 1999
- 23) Coukell AJ, Spencer CM: Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin. *Drugs* **53**: 520-538, 1997
- 24) 畹崎 榮、松村正史、大谷芳彦、高橋則行、丸山一雄、岡本亜紀、岩鶴素治: pH 勾配法によるドキソルビシン封入温度感受性リポソームの調製と評価。 *DDS* **7**: 37-41, 1992
- 25) 畹崎 榮、丸山一雄、石田 理、岩鶴素治、高橋則行: ドキソルビシン封入ガングリオシド GMI 修飾温度感受性リポソームの調製と生体内動態。 *DDS* **8**: 169-174, 1993
- 26) Maruyama K, Unezaki S, Takahashi N, Iwatsuru N: Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Biochim Biophys Acta* **1149**: 209-216, 1993
- 27) Unezaki S, Maruyama K, Takahashi N, Koyama M, Yuda T, Suginaka A, Iwatsuru, N: Enhanced delivery and antitumor activity of doxorubicin using long-circulating thermosensitive liposomes containing amphipathic polyethyleneglycol in combination with local hyperthermia. *Pharm Res* **11**: 1180-1185, 1994
- 28) 野牛道晃、伊藤伸一、長江逸郎: 神経芽腫に対する温熱化学療法の基礎的研究。 *東医大誌* **52**: 424-437, 1994
- 29) 堀部俊哉: アドリマイシン封入血中滞留型熱感受性リポソームと温熱療法の併用に関する実験的研究。 *東医大誌* **53**: 559-570, 1995
- 30) Gordon KB, Tajuddin A, Guitart J, Kuzel TM, Eramo LR, VonRoenn J: Hand-Foot syndrome associated with liposome-encapsulated doxorubicin therapy. *Cancer* **75**: 2169-2173, 1995

Application and design of long-circulating liposomes in drug delivery system

Sakae UNEZAKI, Junichi HOSODA

Department of Pharmacy, Tokyo Medical University Hospital

Abstract

The current status of newly developed polyethyleneglycol coated liposome (PEG-liposome) were described in this review. PEG coating on the liposomal surface reduces the uptake by reticuloendothelial system to prolong the circulation in blood. Passive targeting with PEG liposomal carrier system has been investigated in the field of cancer chemotherapy. Doxorubicin-encapsulated PEG-liposome showed high blood levels and the greatest tumor accumulation, resulting in effective retardation of tumor growth and prolongation of survival times. Long-circulating liposomes (PEG-liposome) are able to traverse the endothelium of blood vessels in tumors and extravasate into interstitial space. Moreover, encapsulated drug was released from extravasated liposomes in the tumor. Also, it is possible to design thermosensitive liposomes which can release entrapped drugs at local hyperthermia. The design and function of long-circulating thermosensitive liposomes have been outlined in this review

<Key words> Doxorubicin, Liposomes, Polyethyleneglycol, Targeting, Thermosensitive
