

***In situ* 極小角 X 線散乱測定による温度変化に伴うドキシソルビシン封入
リポソームの形態変化メカニズムの解明**
**Investigation of Morphological Changes Mechanism of Doxorubicin-loaded
Liposome Depending on Temperature by *In situ* Ultra Small-Angle X-ray
Scattering**

東 颯二郎^a, 徳本 大成^a, 佐久間 文絵^a, 藤本 泰輝^a, 福田 達也^b, 岩尾 康範^b,
宮本 鮎美^c, 小坂井 賢太^c, 田口 宗孝^c

Kenjiro Higashi^a, Taisei Tokumoto^a, Fumie Sakuma^a, Taiki Fujimoto^a, Tatsuya Fukuta^b, Yasunori Iwao^b,
Ayumi Miyamoto^c, Kenta Kozakai^c, Munetaka Taguchi^c

^a 千葉大学, ^b 和歌山県立医科大学, ^c 東芝ナノアナリシス (株)
^a Chiba Univ., ^b Wakayama Medical Univ., ^c Toshiba Nanoanalysis Corp.

本研究では、抗がん剤ドキシソルビシンを封入したリポソームの形態変化メカニズム解明を目的として、*in situ* 極小角 X 線散乱 (USAXS) 測定による評価を行った。65 °C から 55 °C までの冷却過程で USAXS プロファイルが大きく変化しており、リポソームの形態が変化したことが明らかとなった。これまでに、薬物封入リポソームの形態変化を *in situ* USAXS 測定で評価した報告はなく、本研究により医薬品製剤の分析法としての *in situ* USAXS 測定の有用性が示された。

キーワード： ドキシソルビシン封入リポソーム、*in situ* 極小角 X 線散乱、形態変化

背景と研究目的：

リポソームは脂質二重膜からなる閉鎖小胞であり、ドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアーとして広く用いられている。特に、抗がん剤を封入したリポソーム製剤は、腫瘍集積性の向上及び副作用の低減など、抗がん剤の治療効果を顕著に改善する。1995 年に抗がん剤であるドキシソルビシン (DOX) 封入リポソーム (Doxil[®]) がアメリカ食品医薬品局 (FDA) に初めて承認され、現在では 10 種類以上のリポソーム製剤が上市されており、また多くの非臨床・臨床研究が行われている。リポソーム製剤開発が盛んに行われている一方、これらの組成や調製は依然としてトライ&エラーで検討されており、処方設計法の確立はリポソーム製剤開発の大きなハードルとなっている。また、ナノ粒子のマクロ形態や封入された薬物のマイクロ構造・分子状態は、投与後のナノ粒子の体内動態に大きく影響する[1]。しかし、現状汎用されているナノ医薬品製剤の評価は粒子サイズ等を簡便に行うのみであり、ナノ医薬品製剤の品質保証が正確に行えているとは到底言えない。例えば、Doxil[®]の後発品の形態は楕円状と、先発品の形態である球状と異なり、その形態の違いのため細胞内取り込み及び抗がん作用が顕著に変化する[2]。今後、より効率的にリポソーム製剤を開発し、先発品及び後発品を問わず一定の品質のリポソーム製剤を市場に供給するためには、調製条件や組成が封入された薬物及びリポソームのマクロ形態・マイクロ構造・分子状態などの物理的特性に与える影響を精密に評価する必要がある。

本研究グループでは、薬物封入リポソームの物性に関する検討を行っており、特に調製条件や脂質二重膜の組成が薬物封入リポソームの構造に与える影響を評価している。これまでに、調製条件により DOX 封入リポソームの形態が大きく変化することを見出している [3]。DOX 塩酸塩溶液とリポソームを高温で混合すると、DOX は融解状態でリポソーム内水相に封入され、その後の冷却過程にリポソーム内水相で DOX 硫酸塩として結晶化し繊維束構造体を形成する。一方、脂質二重膜はインキュベーション時には流動性の高い液晶相にあるが、冷却過程の相転移により流動性の低いゲル相に変化する。さらに、近年の我々の研究により、冷却過程における DOX 繊維束構造体の形成速度と脂質二重膜の流動性低下速度が DOX 繊維束構造体とリポソームの形態に強く影響していることが示唆された (図 1)。1 °C/min の速度で徐冷した場合では、脂質二重膜の硬化の前に DOX 繊維束構造体が形成される。そのため、DOX 繊維束構造体が直線的に伸長し、流動性が高く柔らかい脂質二重膜を押し広げ楕円形のリポソームが得られる。一方、試料を液体

窒素に入れ-196℃まで急速に冷却する急速凍結法では、脂質二重膜の硬化の後に DOX 繊維束構造体が形成される。この場合では、流動性が低く固い脂質二重膜の中にある DOX 繊維束構造体は直線的に伸長することができず湾曲し、球形のリポソームが形成されると推察している。しかし、形態の異なる DOX 封入リポソームの形成メカニズムは依然として仮説段階に留まっており、これは高温時における DOX 封入リポソームの形態をこれまで実験的に直接評価できていないためである。そこで本研究では、高温状態においてもナノ粒子のマクロ形態に関する情報が得られる *in situ* USAXS を用いて、DOX 繊維束構造体とリポソームの形態評価を試みた。

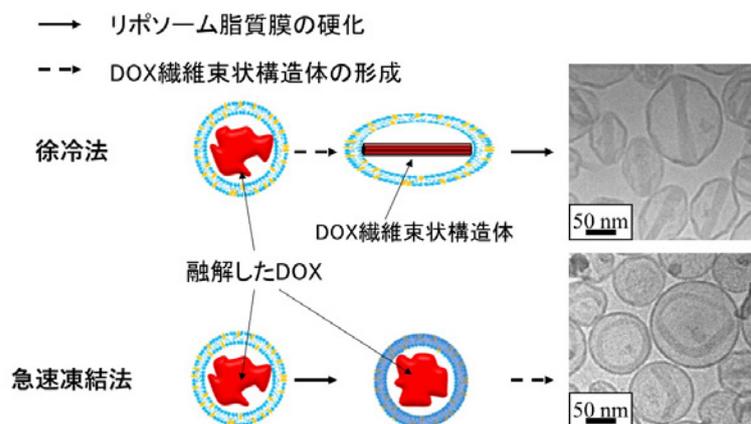


図 1. 冷却速度と DOX 封入リポソーム形態の関連性を示す模式図

実験：

試料：脂質として水素添加大豆リン脂質（HSPC）及びコレステロールを用い（HSPC/コレステロール= 9:1（w/w））、薄膜・水和エクストルージョン法により体積平均径約 100 nm のリポソームを調製した。その後、リポソーム内外に硫酸アンモニウム勾配を形成し、DOX が脂質に対して 30 mol%となるように DOX 塩酸塩溶液及びリポソームを混合した。混合後、65℃で 30 分間インキュベーションし、25℃まで冷却することでリポソーム内水相に DOX（DOX 硫酸塩として）を封入した DOX 封入リポソーム（懸濁液）を調製した。

実験条件：BL19B2 に於いて、DOX 封入リポソーム（懸濁液）の *in situ* USAXS プロファイルを取得した。試料を直径 2 mm 径のキャピラリーに封入し、これを温度可変装置 Instec 内の試料ステージに設置した。USAXS 測定は、使用エネルギー 18 keV、検出器 PILATUS3 2M、カメラ長 42 m、露光時間 10 分にて実施した。75℃まで試料を加温した後に 65℃まで冷却し、65℃から 45℃までの 2℃毎の冷却過程、さらに 25℃への冷却後の試料について USAXS 測定を行った。

結果および考察：

図 2 に 65℃から 25℃までの冷却過程の *in situ* USAXS プロファイルを示す。現状では各プロファイルのフィッティング解析が未実施のため、ここではプロファイル形状からの大凡の議論に留める。動的散乱法により得られた流体力学半径 (R_h) = 約 100 nm に対応する散乱ベクトル $q = 0.06 \text{ nm}^{-1}$ の傾きに着目し、冷却に伴う DOX 封入リポソームの粒子形態変化を評価した。65℃における $q = 0.06 \text{ nm}^{-1}$ 付近のプロファイルの傾きは大きく、これはリポソーム及び内水相の融解した DOX が共に球形で存在するためと考えられた。一方、65℃から 55℃の冷却過程で $q = 0.06 \text{ nm}^{-1}$ 付近のプロファイルの傾きは顕著に小さくなった。これは、リポソーム内水相で DOX 硫酸塩結晶化に伴い直線状の DOX 繊維束構造体が形成され、脂質二重膜を押し広げることでリポソームの形態が楕円形に変化したためと考察した。また、55℃から 45℃の冷却及び冷却後の 25℃においては、 $q = 0.06 \text{ nm}^{-1}$ 付近のプロファイルの傾きにほとんど変化は認められず、55℃から 25℃の冷却ではその形態が維持されることが明らかとなった。以上の結果より、*in situ* USAXS 測定により冷却過程におけるリポソーム形態変化をモニタリングできることが示され、リポソーム製剤の分析法としての *in situ* USAXS 測定の有用性が確認された。

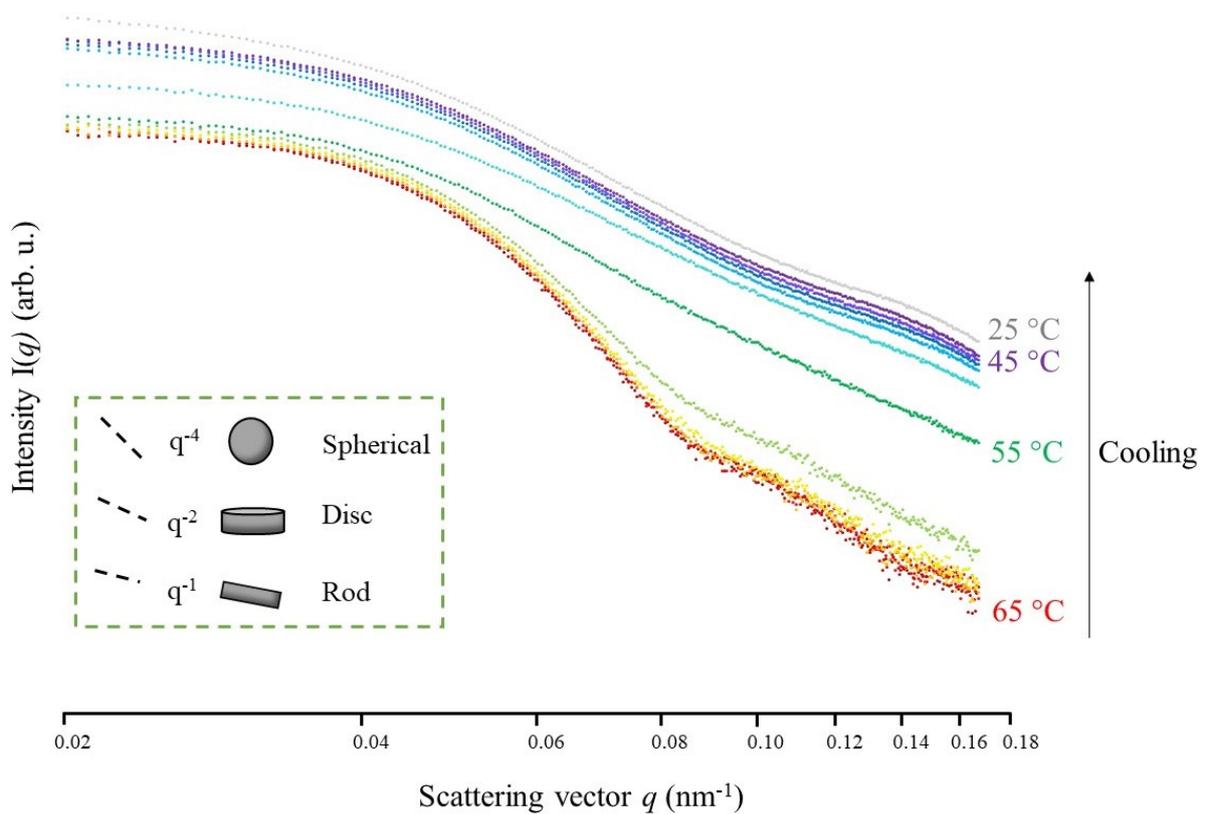


図 2. DOX 封入リポソームの冷却過程 (65°C→25°C) における *in situ* USAXS プロファイル

今後の課題：

q レンジを考えると図 2 の USAXS プロファイルには、DOX 繊維束構造体 (約 80–100 nm) とリポソーム (約 100 nm) 両方の形態情報が含まれているが、それぞれの散乱がプロファイルに与える影響は不明であった。そこで、本プロファイルについてフィッティング解析を実施したが、変数が多くフィッティングの妥当性を検証できなかった。そこで、リポソーム単独 (DOX 封入なし) 及び DOX 封入リポソーム (リポソームの変形がない低い DOX 封入量) 等について追加の *in situ* USAXS 測定を行い、参照プロファイルを取得する。本追加実験により、フィッティング解析の妥当性を検証することで、冷却過程における DOX 封入リポソームの形態変化メカニズムを詳細に明らかにできると考えられる。上記のフィッティング解析のための基礎データを取るため、BL19B2 での追加実験が必要であり、新たに課題申請を予定している。

参考文献：

- [1] Chauhan V., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50(48)**, 11417–11420 (2011)
- [2] Wibroe P., *et al.*, *J. Control. Rel.*, **221**, 1–8 (2016)
- [3] Takahashi, N., *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **107 (2)**, 717–726 (2018)