

## リポソームの血中クリアランスに及ぼす粒子径の影響

澤原, 英幸  
九州大学薬学部薬剤学教室

後藤, 茂  
九州大学薬学部薬剤学教室

木下, 洋夫  
九州大学医療技術短期大学部一般教育

<https://doi.org/10.15017/227>

---

出版情報 : 九州大学医療技術短期大学部紀要. 20, pp.29-34, 1993-03. Kyushu University School of Health Sciences Fukuoka, Japan

バージョン :

権利関係 :

# リポソームの血中クリアランスに及ぼす粒子径の影響

澤原英幸\*、後藤 茂\*、木下洋夫\*\*

## Effect of the Particle Size on the Blood Clearance of Liposomes

Hideyuki SAWAHARA\*, Shigeru GOTO\* and Nadao KINOSHITA\*\*

### Summary

Liposomes having various sizes in the diameter were prepared, and the effect of the sizes on the kinetics of blood clearance was investigated. As the result, it was proved that there was the size to minimize the blood clearance of liposomes. The size was about 60 nm.

Keywords – double fluorescent labeling method ; liposomes ; particle size ; blood clearance

### 緒 論

リポソームの粒子径が体内動態に大きな影響を与えることは広く知られているが、詳細に検討した報告は少ない<sup>1-9)</sup>。今回我々が独自に開発したリポソームの体内動態評価法（二重蛍光標識法）<sup>10)</sup>を用いて、リポソームの血中クリアランスをリポソームの粒子径の違いから詳細に検討したところ、有用な知見を得たので報告する。

### 実験の部

#### 1) 試薬類

Carboxyfluorescein (CF) はEastman kodax社より購入したものをRalstonらの方法<sup>11)</sup>に従い精製を行なって用いた。calcein (CAL) は和光純薬の試薬特級をそのまま用いた。phosphatidylcholine (PC) はRodesらの方法<sup>12)</sup>及びBanghamらの方法<sup>13)</sup>を参考に卵黄より抽出、精製したものをAbramsonらの方法<sup>14)</sup>に従い薄層クロマトグラフィーで展開して（クロロホルム：メタノール：氷酢酸：水 = 250：74：19：3）不純物がな

いことを確認した後に用いた。cholesterol (chol) は和光純薬の試薬特級をそのまま用いた。その他の試薬類はすべて試薬特級クラスのものを用いた。

#### 2) CF封入small unilamellar vesicles (SUV) とCAL封入SUVの調整

前報<sup>10)</sup>と同様の方法で調整を行なった。すなわちPC 20  $\mu$ moleとChol 20  $\mu$ moleの脂質薄膜をナシ型フラスコ内壁に作成して、0.1M CF溶液2mlを加え、ミキサーで攪拌することによりmultilamellar vesicles (MLV)を調製した。続いて超音波発生装置 (Heat system – ultrasonics, inc., モデルW – 220)を用い、37℃で40分間MLVを超音波処理することによりSUVを調製した。未封入のCFは、DEAE Sephadex A – 25カラム (1.4 × 3.7cm)に吸着させ、phosphate buffered saline (PBS; 137mM NaCl, 2.6mM KCl, 6.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH7.4)でリポソームのみを溶出することにより分離除去した (Chart 1、(A))。またCAL封入リポソームは0.086M CAL溶液を用いて、CF封入リポソームの場合と同様の方法で調製を行なった。なお0.1M CF溶液と

\* 九州大学薬学部薬剤学教室

\*\* 九州大学医療技術短期大学部一般教育

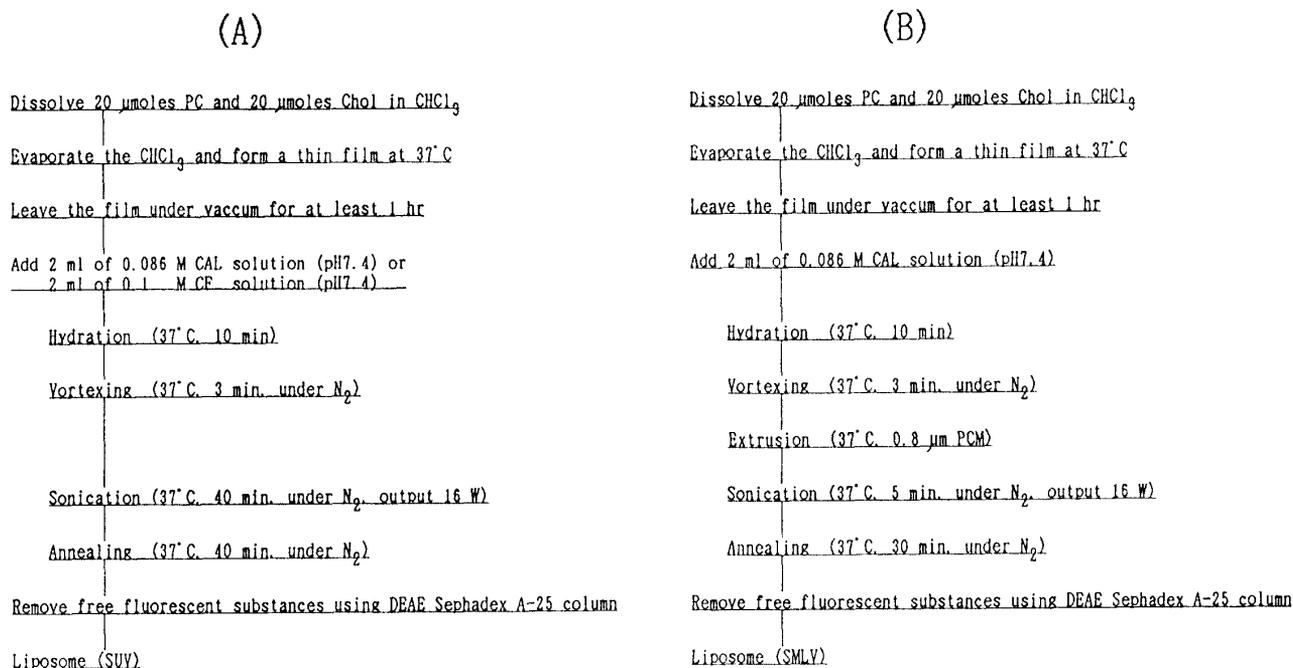


Chart 1 Preparation methods of CF-SUV or CAL-SUV, and CAL-SMLV

0.086M CAL溶液が血液と等張であることは凝固点降下法により確認を行なった。

### 3) CAL封入 small multilamellar vesicles (SMLV) の調製

PC 20  $\mu$ moleとChol 20  $\mu$ moleから成るCAL封入MLVの調製は前述の方法で行なった。このCAL封入MLVを5mlの注射筒に取り、予め孔径0.8  $\mu$ mのポリカーボネイトメンブレン (PCM; Nucleopore社) をセットしたスウィンロックホルダー (Nucleopore社) に固定し、注射筒内の圧力を手で調整しながら、1回イクストルージョンを行なった。続いて37°Cで5分間超音波処理を行なった後、37°Cで30分間アンニリングを行なった。未封入のCALをDEAE Sephadex A-25カラムで除去して、CAL封入SMLV懸濁液3.2mlを得た (Chart 1、(B))。

### 4) 超遠心法によるCAL封入リポソーム粒子とCF封入リポソーム粒子の分画の調整

CAL封入SUV3mlとCAL封入SMLV3mlにPBSを加え合計9mlとしたリポソーム懸濁液を分画に用いた。試料9mlを4本の10ml遠沈管に分けて1000gで30分間遠心分離を行ない、得られた上清を遠心用チューブ4本に分け、さらに14000gで30分間遠心分離を行なった。得られ

た上清約9mlを2分して、予め超遠心用チューブ (Hitachi社、5CNチューブ) 2本にそれぞれ敷いておいた10% sucrose phosphate buffer (10% sucrose、6.4mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、1.4mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.5ml上に静かに積層した。これをスィングロータ (RPS-50型) に固定して105000gで60分間遠心分離を行なった。遠心チューブを固定して、底部に針で小孔を開けリポソーム懸濁液を滴下させることによりペレット (約0.4ml) と上清 (約8.8ml) を回収した。上清は前回と同様に予め遠心チューブに敷いておいた10% sucrose phosphate buffer 0.6ml上に静かに積層し、159000gで180分間遠心分離を行ない、同様の方法でペレット (約0.4ml) と上清 (約8.6ml) を回収した。ペレットには小粒子径のリポソームが混入していたのでPBSで洗う操作を加えた。すなわち最初の1000g、30分間の遠心操作で得られたペレットをPBSで再懸濁して9mlの試料とし、以下同じ条件で遠心操作を行ない各ペレットを逐次洗った。なお分画操作はすべて4°Cで行なった。CF封入リポソーム粒子の分画はCF封入SUVのみを用いてCAL封入リポソームの場合とまったく同じ方法で調整した。遠心分離装置は、1000gの遠心操作には佐久間製作所のモ

デルSA-05Aを、14000gの遠心操作には同社のモデルM-160を、105000gと159000gの遠心操作には、日立工機社の分離用超遠心機（モデル65P）を用いた。得られた各分画は遠心分離条件の重力加速度を基準に1P, 14P, 105P, 159P, 159Sと名付けた。なお159Sは1回目の遠心上清と各ペレットの逐次洗い液の上清を併せて試料とした。

#### 5) CAL封入159Sリポソーム懸濁液の濃縮

分画したCAL封入159Sリポソーム懸濁液（約18ml）はそのまま動物実験に用いるにはCAL濃度が低すぎるので濃縮を行なった。すなわちAmicon社製のセントリフロー（CF25型）をコーンホルダーに装着して、リポソーム懸濁液が7ml以下になるように入れ、600gで遠心を行なって、セントリフロー上の液量が1.8ml程度になるまで濃縮を行なった。操作はすべて4℃で行なった。

#### 6) リポソームの粒子径の測定

リポソーム懸濁液の1滴をコロジオン膜上にした後、ろ紙で余分な水分を取り除き、2%酢酸ウラニル溶液を用いてネガティブ染色を行なった。透過型電子顕微鏡（JEOL社、1200EX型）下でリポソームの粒子像を観察しながら写真撮影を行ない、280個以上のリポソーム粒子のグリーン径（定方向径）を測定して粒度分布図を作成した。

#### 7) マウスにおけるリポソームの血中濃度推移の検討

マウスに投与するCFの最終濃度を100  $\mu$ Mと決め、CALの最終濃度は蛍光強度が100  $\mu$ M CFの蛍光強度と等しくなるように161  $\mu$ Mとした。すなわちCF封入159PリポソームとCAL封入14P, 105P, 159P, 159Sリポソームのそれぞれを混合して4種類の投与液を調整した。この投与液を5ml/kg体重の割合で29.6gから31.5gの体重のSlc:ICR雌マウスを用いて、それぞれ尾静脈内に投与した。投与後5, 10, 15, 20, 30分, 1, 2, 3, 4, 5時間に尾静脈から10  $\mu$ lずつ採血を行なった。血液は直ちに2.4mlの0.15M sucrose - 0.1M Tris - HCL等張緩衝液（pH 8.5）に入れ攪拌した後、1000gで10分間遠心を行ない血球成分を分離した。上清が溶血して

いないことを確認して、1mlずつ2本の小試験管に分けて4℃で保存した。CFとCALの分別定量は前報の方法<sup>10)</sup>に従い行なった。

## 結果と考察

### 1) CF封入SUVとCAL封入SUV, SMLVの調整

SUVの調製は超音波法で行なった。粒子径が100nmから200nmのリポソーム（SMLV）の調整には超音波法のみでは調整が不可能であったので、ポリカーボネイトメンブレンによるエクストルージョン法を同時に用いた。超音波法で調製したCAL封入SUVとエクストルージョン法で調製したCAL封入SMLVの保持効率はそれぞれ0.89%と1.09%であった。なおCF封入SUVの保持効率は0.72%であった。

### 2) 超遠心法によるリポソーム粒子の分画と透過型電子顕微鏡による粒子径の測定

各分画の量をFig.1に示している。透過型電子顕微鏡により各リポソーム分画の観察を行なったところ、CAL封入1Pリポソームは強い凝集が見られたので後の粒度分布ならびに血中クリアランスの実験は省いた。CAL封入14P, 105P, 159P, 159Sリポソームには凝集は認められず、すべてグリーン径の測定を行ない粒度分布図を作成した（Fig.2）。なお平均粒子径はTable I

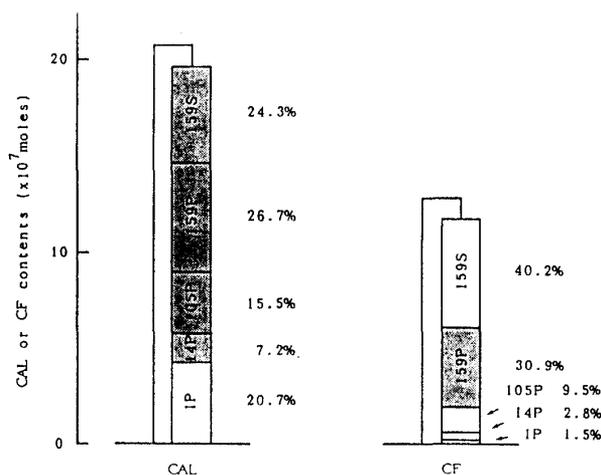


Figure 1 Fractionation of CF-SUV or CAL-SUV plus CAL-SMLV by Successive Centrifugation

The height of back bars represent total CF and CAL before fractionation. And the dotted areas represent the sample used in animal experiments.

に示した。CF封入リポソーム粒子の分画を得る場合、CF封入SUVのみを用いて遠心分離法に

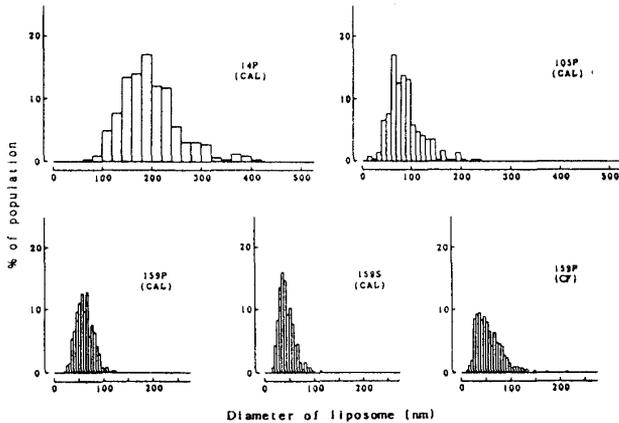


Figure 2 Frequency Distributions for Fractionated Liposomes Containing CF or CAL

"159P(CF)" is used as standard sample in animal experiments.

Table 1 Average diameter of fractionated liposomes

Entrapped	fraction	diameter(nm) <sup>a</sup>
CAL	14P	197.0 ± 3.3
	105P	88.6 ± 2.1
	159P	62.5 ± 0.9
	159S	45.3 ± 0.8
CF	159P	56.8 ± 1.2

a: values represent mean ± s. e.

より粒子径の異なる分画を調製した。各分画の量はFig.1に示している。粒度分布はそこから血中クリアランス実験の対照として用いたCF封入159Pリポソーム分画のみを測定した (Fig.2) 3) マウスにおけるリポソームの血中濃度推移の検討

CAL封入14P, 105P, 159P, 159Sリポソームに、それぞれCF封入159Pリポソームが等蛍光量になるように加えて4種のリポソーム混合投与液を調製した。これらのCFとCALのリポソームの混合液をマウスの尾静脈に投与した後の血中濃度推移の結果をFig.3-(A)とFig.3-(B)に示した。平均粒子径が近接しているCF封入159PリポソームCAL封入159Pリポソームの混合液を投与した場合、血中濃度推移は完全に一致することがわかる (c, c')。CF封入159PリポソームとCA封入105Pリポソームの混合液を投与した場合、粒子径の大きなCAL封入105Pリポソームの方が粒子径の小さなCF封入159Pリポソームより循環血液中から早く消失した (b, b')。より粒子径が大きなCAL封入14Pリポソームの消失はさらに速くなった (a, a')。しかし最

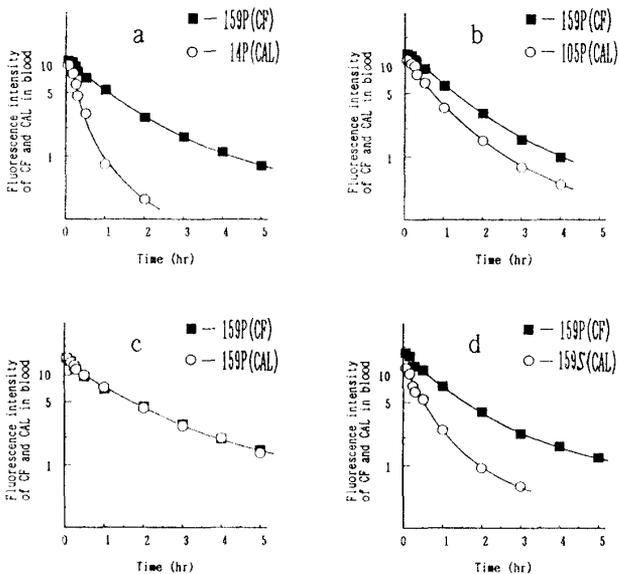


Figure 3-(A) Effect of Liposome Size on Clearance of Liposomes Containing CF (■) or CAL (○) from the Circulation

14P, 105P, 159P and 159S represent the name of fractionated CAL-liposomes (shown in figure 2) incorporated with CF-liposomes (159P). The samples are intravenously injected into a individual mouse, and fluorescent intensities of CF and CAL are measured.

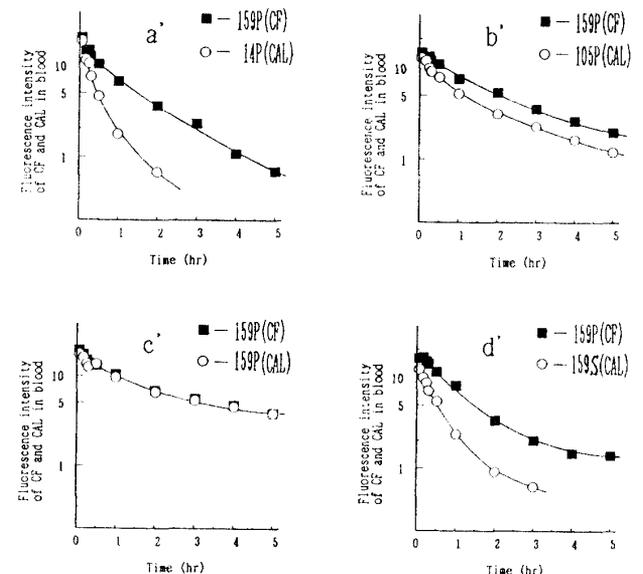


Figure 3-(B) Effect of Liposome Size on Clearance of Liposomes Containing CF (■) or CAL (○) from the Circulation

Experiment conditions are identical to those described in figure 3-(A)

も粒子径が小さなCAL封入159SリポソームとCF封入159Pリポソームの混合液を投与すると、粒子径の小さいCAL封入159Sリポソームの方がCF封入159Pリポソームよりも速く消失することがわかり (d、d')、循環血液中に滞留し易い至適な粒子径があることがわかった。Fig.3の結果をモーメント解析法により薬物速度論的解析を行なった結果をFig.4に示した。すなわち個々のマウスについてCFとCALの平均血中滞留時間 (MRT) を算出してその比をとり、リポソームの平均粒子径とMRT比の関係をグラフに示した。Fig.4より、平均粒子径が約60nmのリポソームのMRTが最も長く、これよりも粒子径が大きくなると、ほぼ直線的にMRTが短くなり、また平均粒子径が約60nmより小さくなくても急速にMRTが短くなることがわかった。

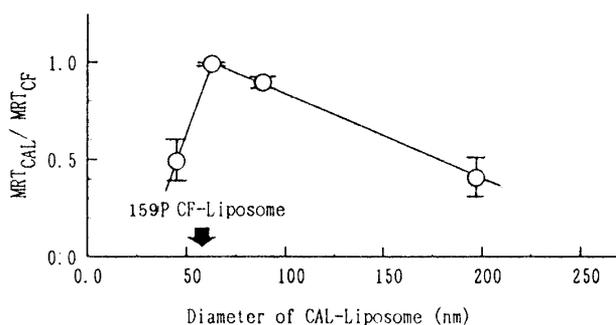


Figure 4 Relationship between Liposome Size and MRT

The arrow shows the mean size of CF-liposomes (159P). Each point with a vertical bar represents the mean  $\pm$  s.d.

最近Liuらも血中クリアランスを最小にする粒子径があると報告している<sup>7)</sup>。彼等は血中クリアランスを最小にするリポソームの粒子径が70~200nmであると指摘しており、70nm以下の小さいリポソームの大部分は肝臓に取り込まれることを証明している。今回我々は約60nmのリポソームの血中クリアランスが最小になることを証明した。両者の違いについては、Liuらはリポソーム表面をガングリオシドGM1で被覆したものを実験に用いたので、粒子径が200nm程度の比較的大きなリポソームであっても血中クリアランスを小さく保てるためと考えられる。このように血中クリアランスを最小にするリポソ-

ームの粒子径が構成成分の異なるリポソーム間で異なるという現象は興味深いものであり、今後原因究明のために詳細な検討を行う必要がある。

## 要 約

色々な粒子径を持ったリポソームを作成し、粒子径がリポソームの血中クリアランスの動力学に与える影響について検討した。その結果、リポソームの血中クリアランスを最小にする粒子径があることが証明され、その値は約60nmであった。

## 引用文献

- 1) R. L. Juliano and D. Stamp : The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63, 651-658 (1975)
- 2) C. A. Hunt, Y. M. Rustom, E. Mayhew and D. Papahadjopoulos : Retention of cytosine arabinoside in mouse lung following intravenous administration in liposomes of different size. *Drug Metab. Dispos.*, 7, 124-128 (1979)
- 3) Y. E. Rahman, E. A. Cerny, K. R. Patel, E. H. Lau and B. J. Wright : Differential uptake of liposomes varying in size and lipid composition by parenchymal and kupffer cells of mouse liver. *Life Sci.*, 31, 2061-2071 (1982)
- 4) T. M. Allen and J. M. Everest : Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 226, 539-544 (1983)
- 5) H. Kiwada, S. Obara, H. Nishiwaki and Y. Kato : Studies on the uptake mechanism of liposomes by perfused rat liver. I. An investigation of effluent profiles with perfusate containing no blood component.

- Chem. Pharm. Bull., 34, 1249–1256 (1986)
- 6) R.L. Magin, J.M. Hunter, M.R. Niesman and G. A. Bark : Effect of vesicle size on the clearance, distribution, and tumor uptake of temperature-sensitive liposomes. *Cancer Drug Deliv.*, 3, 223–237 (1986)
  - 7) D. Liu, A. Mori and L. Huang : Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1104, 95–101 (1992)
  - 8) Y. sato, H. Kiwada and Y. Kato : Effects of dose and vesicle size on the pharmacokinetics of liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 4244–4252 (1986)
  - 9) R.M. Abra and C.A. Hunt : liposome disposition in vivo III. Dose and vesicle-size effects. *Biochim. Biophys. Acta*, 666, 493–503 (1981)
  - 10) H. Sawahara, S. Goto and N. Kinoshita : Double fluorescent labeling method used for a study on liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 227–229 (1991)
  - 11) E. Ralston, L.M. Hjelmeland, R.D. Klausner, J. N. Weinstein and R. Blumenthal : Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions effect of impurities, and purification of the dye. *Biochim. Biophys. Acta*, 649, 133–137 (1981)
  - 12) D. N. Rhodes and C. H. Lea : Phospholipids 4. On the composition of hen's egg phospholipids. *Biochem. J.*, 65, 526–533 (1957)
  - 13) A. D. Bangham, M. W. Hill and N. G. A. miller : Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods Membr. Biol.*, 1, 1–68 (1974)
  - 14) D. Abramson and M. Blecher : Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of naturally occurring phospholipids. *J. Lipid Res.*, 5, 628–631 (1964)