九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

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⁽⁻⁹⁾。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)¹⁰⁾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^{III)} 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。phosphatidylch oline (PC) はRodesらの方法^{III)} 及びBangham らの方法^{III)} を参考に卵黄より抽出、精製したも のをAbramsonらの方法^{III)} 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:水酢酸: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[™]と同様の方法で調整を行なった。すな わちPC 20 µmoleとCho1 20 µmole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、ミキサーで撹拌することに 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 Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄; 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

(B)

(A)

Dissolve 20 µmoles PC and 20 µmoles Chol in CHCl ₃	Dissolve 20 µmoles PC and 20 µmoles Chol in CHCl ₃
Evaporate the CHCl ₃ and form a thin film at 37°C	Evaporate the CHCl ₃ and form a thin film at 37°C
Leave the film under vaccum for at least 1 hr	Leave the film under vaccum for at least 1 hr
Add 2 ml of 0.086 M CAL solution (pH7.4) or 2 ml of 0.1M CFsolution_(pH7.4)	Add 2 ml of 0.086 M CAL solution (pli7.4)
Hydration (37°C. 10 min)	Hydration (37°C, 10 min)
Yortexing(37°C3_minunder_N ₂)	Vortexing (37°C, 3 min. under N ₂)
	Extrusion (37°C. 0.8 µm PCM)
Sonication (37°C, 40 min. under N ₂ , output 16 W)	Sonication (37°C, 5 min. under N ₂ , output 16 W)
Annealing (37°C, 40 min. under N ₂)	Annealing (37°C. 30 min. under N ₂)
Remove free fluorescent substances using DEAE Sephadex A-25 column	Remove free fluorescent substances using DEAE Sephadex A-25 column
Liposome (SUV)	Liposome (SMLY)

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 μ moleとCho1 20 μ 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 μ 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℃で5分間超音波処理 を行なった後、37℃で30分間アンニーリングを 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分管遠心分離を行ない、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 Na₂HPO₄, 1.4mM K₂HPO₄) 0.5ml上に静かに積層した。これをスイングロー 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℃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の せた後,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 μ Mと 決め, CALの最終濃度は蛍光強度が100 μ M CF の蛍光強度と等しくなるように161 μ 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 μ 1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)に入れ撹拌した後,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 茂木下洋夫

いないことを確認して、1mlずつ2本の小試験官 に分けて4℃で保存した。CFとCALの分別定量 は前報の方法¹⁰ 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イ 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とイクストルージョン 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





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

fraction	diameter(nm) ^a
14P	197.0 ± 3.3
105P	88.6 ± 2.1
159P	62.5 ± 0.9
1598	45.3 ± 0.8
159P	56.8 ± 1.2
	fraction 14P 105P 159P 159S 159P



Figure 3–(A) Effect of Liposome Size on Clearance of Liposomes Containing CF (\blacksquare) or CAL (\bigcirc) 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.

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。粒度分布はその中から 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–(B) Effect of Liposome Size on Clearance of Liposomes Containing CF(\blacksquare) or CAL(\bigcirc) 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より小さくなっても 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"。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 — 33 —

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

- 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)
- C. A. Hunt, Y. M. Rustum, 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)
- 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)
- 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)
- 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.

— 34 —

Chem. Pharm. Bull., 34, 1249–1256 (1986)

- 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)
- 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)
- 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 pobe for liposome-cell interactions effect of impurities, and purification of the dye. Biochim. Biophys. Acta, 649, 133-137 (1981)
- 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)