

## 混合 PEG-DSG 修飾リポソームのキャラクタリゼーションと殺細胞効果

佐塚 泰之,\* 鶴田 智子, 園部 尚

## The Characterization and Cytotoxicity of Mixed PEG-DSG Modified Liposomes

Yasuyuki SADZUKA,\* Tomoko TSURUDA, and Takashi SONOBE

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received June 23, 2004; Accepted September 28, 2004; Published online October 15, 2004)

It is known that polyethyleneglycol (PEG) modification of the liposome surface leads to the formation of a fixed aqueous layer around the liposomes due to interaction between the PEG polymer and water molecules, which prevents the attraction of opsonins. When a combination of PEG-distearolyglycerol (PEG-DSG) whose characteristics are remarkably different is used, interaction between molecules occurs, leading to increased fixed aqueous layer thickness (FALT). From this speculation, we studied the effect of both modification of PEG900-DSG and PEG2000-DSG modified liposome on FALT, cell uptake and biodistribution. The FALT of mixed PEG modified liposome increased, compared to that of each single PEG modified liposome. In this mixed modification, maximum FALT was shown at liposome modified by added PEG-2000 : PEG-900=2 : 1. This most suitable additional ratio was equal to actual incorporated ratio. On the other hand, cell uptake of mixed modified liposome containing doxorubicin (DOX) was similar with that of PEG2000 modified liposome. Furthermore, mixed PEG modification of liposome was tendency to increase cytotoxicity, compared to that of other modifications. After DOX contained liposome treatment, DOX distribution in the tumor and antitumor activity of DOX increase by mixed PEG modification. In conclusion, it was suggested that mixed PEG liposome (PEG-2000 : PEG-900=2 : 1) was useful for cancer chemotherapy.

**Key words**—liposome; polyethyleneglycol; fixed aqueous layer thickness (FALT); doxorubicin

## 緒 言

リポソームの polyethyleneglycol (PEG) 修飾は、リポソーム製剤の大きな問題点となっている細網内皮系組織 (RES) 捕捉の回避をはかることが可能であり、血中滞留性を向上させ passive targeting により組織集積をはかる有効な手段であることが知られている。<sup>1-8)</sup> これまで、リポソームの膜表面における PEG 分子の状態を物理化学的側面から検討することにより、PEG 修飾と血中滞留性増大との相関性を明らかにしようとする研究がいくつか行われている。<sup>5-7)</sup> さらに、界面電気化学的手法を用いてリポソーム膜表面に形成される固定水層の厚さ (FALT) が測定され、PEG 修飾リポソームの FALT が PEG 未修飾リポソームに比べて増大することが明らかとなっている。<sup>9-12)</sup> また、PEG 分子量の異なる 2 種類の PEG 脂質を混合して PEG 修

飾を行うことで、各々の単独 PEG 修飾に比べ FALT が増大すること、その混合比率には FALT を大きくさせる最適混合比が存在することが示されている。<sup>11)</sup> さらに FALT の増大に伴う組織分布性の改善及び抗腫瘍効果の増強が明らかとなり、リポソームの物性として、FALT が PEG リポソーム製剤の体内動態を決定する重要な因子の 1 つであることが位置付けられた。<sup>11)</sup> このような混合修飾による FALT の増大は、PEG 脂質の物性の指標であるオクタノール/水分配係数の異なるものの組み合わせにおいてもたらされることが報告されているため、<sup>11,12)</sup> 本論文では、この仮説に基づき FALT のさらなる増大をもたらす混合 PEG 修飾法の開発を試みた。リポソーム表面修飾物質として、無荷電の PEG 脂質誘導体である PEG-DSG (Fig. 1) を用い、物性の異なる 2 種類の分子量のうち、より PEG 鎖の長い組み合わせでの混合 PEG 修飾に着目した。単独分子量、又は物性の異なる 2 種類の分子量の PEG 脂質混合物で表面修飾したリポソームの

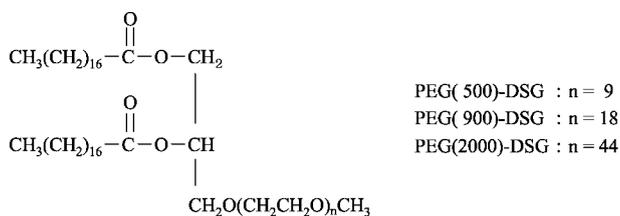


Fig. 1. Chemical Structure of PEG-DSG

FALT を界面電気化学的手法により明らかにし、FALT, リポソーム膜への PEG 導入率及び抗腫瘍剤 doxorubicin (DOX) を内封した場合の腫瘍細胞への取り込みと殺細胞効果, *in vivo* での組織分布性, 抗腫瘍効果に与える混合 PEG 修飾化の影響について検討した。

## 実験方法

**1. 試薬** L- $\alpha$ -distearoylphosphatidylcholine (DSPC), L- $\alpha$ -distearoylphosphatidyl-DL-glycerol (DSPG) はそれぞれ日本油脂株式会社シリーズの MC8080 (PC 純度 99.8%), MGL8080 (Na 塩型, PG 純度 99%以上) を用いた。Cholesterol は和光純薬株式会社より購入した。分子量 500, 900, 2000 の 1-monomethoxypolyethyleneglycol-2,3-distearoyl-glycerol (PEG-DSG2000) は日本油脂株式会社より供与された。リポソームを調製するために用いた DOX は、メルシヤン株式会社より提供された塩酸ドキソルピシン (doxorubicin hydrochloride, 力価 965  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) を用い、1.0 mg/ml DOX 水溶液 (DOXsol) は ADRIACIN<sup>®</sup>注 (注射用塩酸ドキソルピシン, 協和発酵株式会社) 10 mg (力価) /vial を注射用生理食塩水にて溶解し使用した。Eagle's Minimum Essential Medium は日水製薬株式会社より、Fetal Bovine Serum (FBS) は JRH Bioscience株式会社より、Cell Counting Kit-8 (WST-8 試薬) は同仁化学株式会社より購入し、その他の試薬はすべて特級試薬をそのまま用い、常法に従って調製して使用した。

**2. PEG-DSG 修飾 (DOX 含有) リポソーム調製法** 各種リポソームの調製は、Bangham らの方法<sup>13)</sup>を改良<sup>8)</sup>して行った。まず、DSPC/cholesterol/DSPG (100 : 100 : 60  $\mu\text{mol}$ ) (PEG 修飾リポソームでは PEG-DSG 15  $\mu\text{mol}$ ) をクロロホルム : メタノール (4 : 1 (v/v)) 混液に溶解し、超音波処理により完全に分散させた。その後、窒素ガス気流

下ロータリーエバポレーターで有機溶媒を減圧留去してナスフラスコの内壁に lipid film を作り、さらにシリカゲルデシケータ中に入れ、真空ポンプを用いて溶媒を完全に留去した。これに 9.0% スクロース/10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 10 ml を加え、60°C で 10 分間水和膨張させ、窒素ガスバブリングにより窒素置換したのち、20 分間超音波処理してリポソーム分散液とした。さらに extruder 及びポリカーボネート製メンブランフィルターを用いた extrusion 法でサイズコントロールした。この PEG 未修飾リポソームを plain liposome (PL) とした。また、PEG 修飾リポソームは、以下のように表示した。

- PEG-DSG 500 修飾 liposome (PEG-DSG (500))
- PEG-DSG 900 修飾 liposome (PEG-DSG (900))
- PEG-DSG 2000 修飾 liposome (PEG-DSG (2000))
- PEG-DSG 2000 : 500 = 2 : 1 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 500 = 2 : 1))
- PEG-DSG 2000 : 900 = 1 : 2 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 900 = 1 : 2))
- PEG-DSG 2000 : 900 = 1 : 1 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 900 = 1 : 1))
- PEG-DSG 2000 : 900 = 3 : 2 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 900 = 3 : 2))
- PEG-DSG 2000 : 900 = 2 : 1 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1))
- PEG-DSG 2000 : 900 = 3 : 1 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 900 = 3 : 1))
- PEG-DSG 2000 : 900 = 4 : 1 修飾 liposome  
(PEG-DSG (2000 : 900 = 4 : 1))

DOX 含有リポソームは上記リポソーム調製法において、lipid film 作成時に DOX 10 mg (18  $\mu\text{mol}$ ) を加え、同様に調製した。ここで、作成したリポソームについて PEG 未修飾リポソームを plain liposomal DOX (PLDOX), PEG-DSG2000 修飾リポソームを PEG-DSG2000-liposomal DOX (PEG-DSG (2000)-LDOX), PEG-DSG900 修飾リポソームを PEG-DSG900-liposomal DOX (PEG-DSG (900)-LDOX), PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 修飾リポソームを PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1-liposomal DOX (PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1)-LDOX) とし

た。

調製した各種リポソームは、9.0%スクロース/10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 中で 16 時間透析を行い、内封されていない DOX を除去した。粒度分布及び ζ 電位の測定は、電気泳動光散乱光度計 ELS-8000 (大塚電子) を用いて測定した。また、FALT は、Shimada らの方法<sup>9)</sup>に基づいて算出した。

**3. ピクレート法による PEG-DSG 脂質導入率の測定法** PEG 導入率の測定に用いた PEG 修飾リポソームは、透析によってリポソーム内水相を 9.0%スクロース/10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0)、リポソーム外水相を 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)-150 mM NaCl 溶液とし、リポソーム内外に比重の差を持たせることにより、遠心分離可能にした。この PEG 修飾リポソームについて、それぞれの PEG 修飾リポソームを 30000×g で 2 時間遠心分離し、リポソームに導入された PEG 脂質とミセル状態の PEG 脂質を分離した。上清除去後、ペレットに同量の 10 mM Tris-HCl-150 mM NaCl を加え、超音波照射して再分散させた。この溶液について、含まれる PEG 脂質の量をピクレート法による直接定量法<sup>14,15)</sup>によって測定した。なお、混合 PEG 修飾リポソームにおいて、PEG2000 と PEG900 若しくは PEG2000 と PEG500 の分別定量は、それぞれの PEG 脂質のオクタノール/水分係数の違いを利用して、オクタノール抽出を行ったのち、分別定量した。

**4. DOX 内封量の測定** 透析前後の DOX 含有リポソーム液をクロロホルム：イソプロパノール混液 (1:1 (v/v)) と混和、抽出後、有機層の蛍光強度を分光蛍光光度計を用いて励起波長 500 nm、蛍光波長 550 nm で測定し、検量線を用いることにより DOX 量を算出した。

**5. PEG-DSG 修飾リポソーム化 DOX の腫瘍細胞への取り込み** DOX 細胞取り込みに対するリポソーム化及び PEG 修飾化の影響を調べるために、Ehrlich ascites carcinoma cell  $5.0 \times 10^6$  cells/ml に DOX 含有リポソームを DOX として  $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  添加し、37°C でインキュベートすることで、細胞内に DOX を取り込ませた。この後、氷冷し、150 g、3 分間遠心分離して上清を取り除き細胞をリン酸緩衝液 (pH 7.8) で 1 回洗浄したのち、同緩衝液 1.0 ml に再懸濁した。この細胞懸濁液について 4 項に

示した方法で腫瘍細胞内の DOX 濃度を測定した。

**6. PEG-DSG 修飾リポソーム化 DOX の殺細胞効果** 5 項と同様に調製した細胞懸濁液を滅菌 96 well 細胞懸濁用マイクロテストプレート (FALCON) に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間インキュベーション後、PLDOX、PEG-DSG (900)-LDOX、PEG-DSG (2000)-LDOX、PEG-DSG (2000:900=2:1)-LDOX を各濃度 (0.01—10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) に希釈した後添加し、37°C で 48 時間インキュベートをを行った。その後、WST-8 試薬を添加し、37°C で 3 時間インキュベートをを行い、560 nm の吸光度を測定することにより、細胞生存数を算出した。薬物無添加群における細胞生存率を 100% とし、それぞれのサンプルにおける細胞生存率を算出した。

**7. Ehrlich 固形がんに対する PEG-DSG 修飾 DOX 含有リポソームの効果** CDF<sub>1</sub> 系雄性マウス (5 週齢、体重 20—25 g) の背部皮下に Ehrlich ascites carcinoma  $5 \times 10^5$  cells/animal を移植して固形腫瘍とし、移植 14, 17, 20 日目にマウスに PLDOX 及び PEG-DSG (900)-LDOX、PEG-DSG (2000)-LDOX、PEG-DSG (2000:900=2:1)-LDOX をそれぞれ DOX として 2.5 mg/kg の用量で、尾静脈内投与した。

移植後 23 日目にマウスを頸椎脱臼にて屠殺し、心臓採血後、背部固形腫瘍、肝臓、脾臓、心臓を摘出し、生理食塩液にて洗浄後、湿重量を測定した。各組織は Potter 型テフロンホモジナイザーを用い、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) で 10% ホモジネート液を調製し、4 項と同様の方法で DOX 濃度を測定した。

**8. 統計処理** 各データの統計解析は Student's *t*-test 及び ANOVA にて行った。

## 結 果

**1. PEG-DSG 修飾リポソームの粒径及び FALT PEG 未修飾リポソーム及び各種分子量の PEG-DSG 修飾リポソームについて、粒径の測定を行うとともに、ζ 電位より FALT を算出した。**

その結果、Table 1 に示すようにそれぞれのリポソームの粒径は同程度であり、PEG 修飾の影響は認められなかったが、FALT は、単独 PEG 修飾リポソームでは、PEG 分子量の増大に伴い増大し

た。また、PEG-DSG2000 と PEG-DSG900 の混合比率を変えて 2 種類の分子量の PEG により混合修飾したところ、FALT は PEG-DSG2000 の比率の増大に伴い増加し、比率 2 : 1 をピークに減少していくことが示された。PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1) 修飾リポソームは、これまで最大値を示した PEG-DSG (2000 : 500 = 2 : 1) 混合修飾の FALT (3.30 nm) よりも大きな値 (4.22 nm) を示すこと

Table 1. Particle Size and FLAT of PEG-DSG Mixed Modified-Liposomes

	Particle size (nm)	FLAT (nm)
Plain liposome	128.34 ± 2.70	0.34 ± 0.05
PEG-DSG (500)	121.30 ± 2.00	1.00 ± 0.01
PEG-DSG (900)	135.60 ± 7.35	2.10 ± 0.02
PEG-DSG (2000)	134.07 ± 3.75	2.52 ± 0.03
PEG-DSG (2000 : 500 = 2 : 1)	142.70 ± 5.10	3.30 ± 0.26
PEG-DSG (2000 : 900 = 1 : 2)	133.65 ± 0.02	1.78 ± 0.02
PEG-DSG (2000 : 900 = 1 : 1)	128.92 ± 10.93	2.55 ± 0.07
PEG-DSG (2000 : 900 = 3 : 2)	132.15 ± 0.04	2.69 ± 0.04
PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1)	145.58 ± 9.75	4.22 ± 0.09
PEG-DSG (2000 : 900 = 3 : 1)	135.80 ± 0.04	2.86 ± 0.04
PEG-DSG (2000 : 900 = 4 : 1)	134.07 ± 0.11	2.85 ± 0.11

FALTs are expressed as mean ± S.D. ( $n \geq 3$ ).

が明らかとなった。

**2. PEG-DSG 脂質導入量** PEG-DSG 脂質のリポソーム膜への導入率及び導入量 (Fig. 2) は、単独 PEG 修飾の場合、PEG2000 で PEG500 の約半分であり、PEG-DSG (2000 : 500 = 2 : 1) においても単独修飾の場合と同様の導入率を示し、実際の修飾率は 1 : 1 だった。一方、PEG-DSG2000 (46.4 ± 2.1%, 0.70 ± 0.03 mM) に比べて PEG-DSG900 (90.3 ± 7.4%, 1.4 ± 0.09 mM) でも PEG-DSG500 と同様に高い導入率を示したが、PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1) の混合修飾は、PEG-DSG900 の導入率が 91.5% (0.54 mM), PEG-DSG2000 の導入率が 102.0 ± 0.2% (1.03 ± 0.00 mM) であった。すなわち、PEG-DSG2000 の導入率は単独修飾の場合に比べ増加し、実際の修飾率も 2 : 1 だった。

**3. 混合 PEG-DSG 修飾リポソーム化 DOX の腫瘍細胞への取り込み及び殺細胞効果** 混合 PEG 修飾リポソーム化が DOX の腫瘍細胞への取り込みに与える影響を検討するため、Ehrlich ascites carcinoma cell を PLDOX, PEG-DSG (900)-LDOX, PEG-DSG (2000)-LDOX, PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1)-LDOX とインキュベーションし、細胞内 DOX 濃度を測定した。Figure 3 に示したように、Ehrlich ascites carcinoma cell における細胞内 DOX

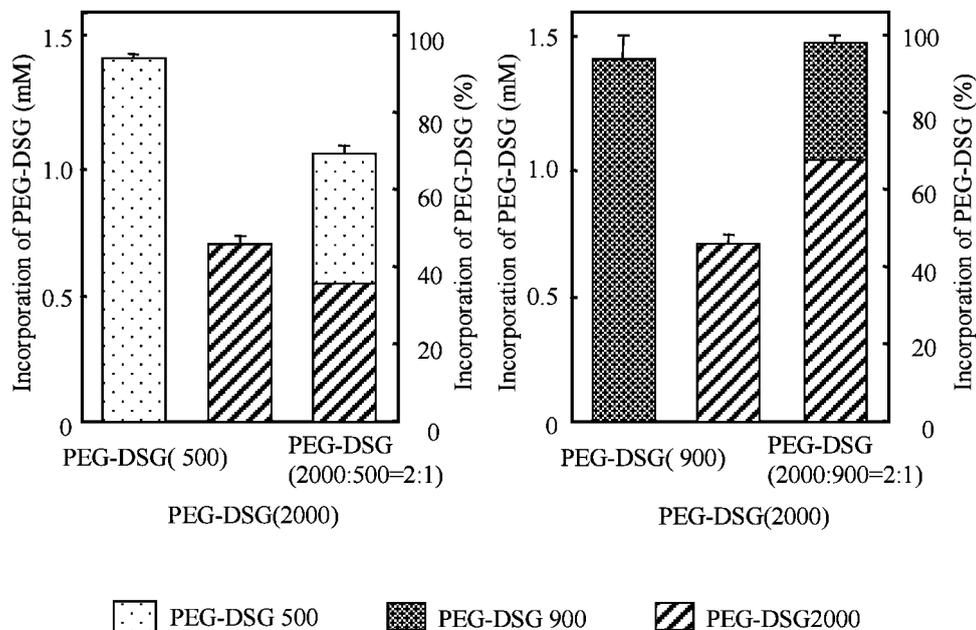


Fig. 2. Incorporation of PEG-lipid into the Liposomal Membrane  
Each column represents the mean ± S.D. of 4 samples.

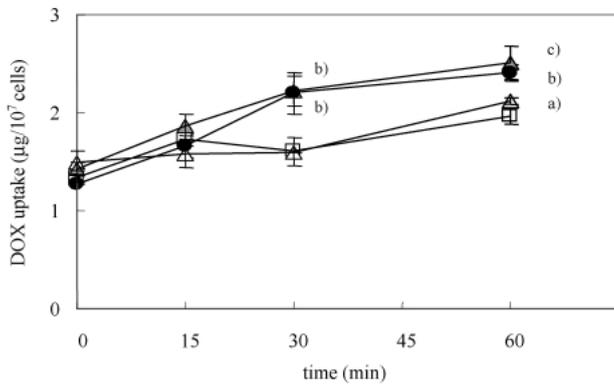


Fig. 3. Effects of PEG-modification on DOX Uptake into Ehrlich Ascites Carcinoma Cells

Ehrlich ascites carcinoma cells were incubated with  $5.0 \mu\text{g/ml}$  of DOX in the PLDOX ( $\square$ ), PEG-DSG (900)-LDOX ( $\triangle$ ), PEG-DSG (2000)-LDOX ( $\circ$ ) or PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX ( $\bullet$ ). Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 4 samples. Significant differences from the level of PLDOX are indicated by a)  $p < 0.05$ , b)  $p < 0.01$ , c)  $p < 0.001$ .

濃度は各群ともに経時的に上昇しており、インキュベート 30 分以降における細胞内 DOX 濃度は PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX  $\approx$  PEG-DSG (2000)-LDOX  $>$  PEG-DSG (900)-LDOX  $\approx$  PLDOX であった。

次に、Ehrlich ascites carcinoma に対する各リポソームの殺細胞効果を Table 2 に示す。IC<sub>50</sub> は PLDOX  $>$  PEG-DSG (900)-LDOX  $>$  PEG-DSG (2000)-LDOX  $>$  PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX の順となり、細胞内 DOX 取り込み量を反映して殺細胞効果が増強することが示された。

#### 4. Ehrlich 固形がんに対する PEG-DSG 修飾 DOX 含有リポソームの効果

Ehrlich ascites carcinoma 担癌マウスにおいて DOX の腫瘍増殖抑制効果に対するリポソーム PEG 修飾化の作用を検討したところ、Fig. 4 に示すような結果を得た。PLDOX 投与群、PEG-DSG (900)-LDOX 投与群の腫瘍重量はそれぞれ control 群 ( $4.26 \pm 0.66 \text{ g}$ ) の約 88%、70%であり、有意な腫瘍重量の低下は認められなかった。一方、PEG-DSG (2000)-LDOX 投与群、PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX 投与群の腫瘍重量はそれぞれ  $2.36 \pm 0.64 \text{ g}$ 、 $1.85 \pm 0.40 \text{ g}$  となり、PLDOX の効果のそれぞれ 3.6 倍 ( $p < 0.05$ )、4.7 倍 ( $p < 0.01$ ) という有意な腫瘍重量の低下をもたらした (Fig. 4(A))。さらに PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX 投与群の腫瘍中における DOX 濃度 ( $12.16 \pm 2.44 \mu\text{g/g protein}$ ) は、

Table 2. Cytotoxicity of Liposomal DOX on Ehrlich Ascites Carcinoma Cells

	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M DOX}$ )
PLDOX	$6.30 \pm 1.50$
PEG-DSG (900)-LDOX	$3.13 \pm 0.83$
PEG-DSG (2000)-LDOX	$2.85 \pm 0.15^a$
PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX	$2.43 \pm 0.17^a$

Ehrlich ascites carcinoma cells ( $1 \times 10^6$ ) were incubated with PLDOX, PEG-DSG (900)-LDOX, PEG-DSG (2000)-LDOX or PEG-DSG (2000 : 900=2 : 1)-LDOX. Cytotoxicities were determined by the WST-8 assay and expressed as mean IC<sub>50</sub>  $\pm$  S.D. ( $n=3-8$ ). Significant difference from the level of PLDOX are indicated by a)  $p < 0.001$ .

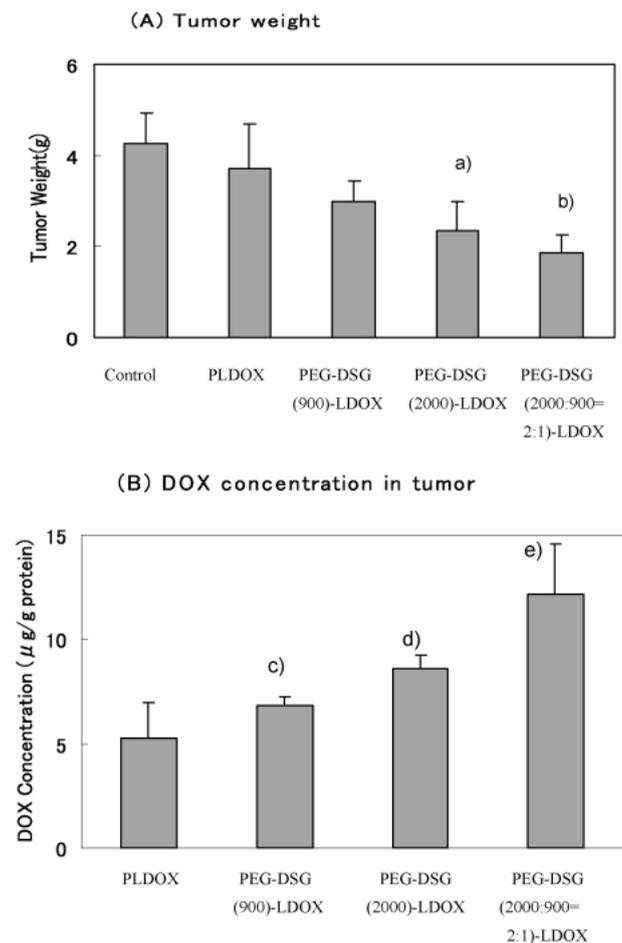


Fig. 4. Effects of PEG-modification on Change of Tumor Weight Induced by DOX (A) and DOX Concentration in the Tumor (B) of Ehrlich Ascites Carcinoma-bearing Mice  
a)  $p < 0.05$ , b)  $p < 0.01$  vs control group, c)  $p < 0.05$ , d)  $p < 0.01$ , e)  $p < 0.001$  vs PLDOX group.

PLDOX 投与群 ( $5.27 \pm 1.67 \mu\text{g/g protein}$ ) の 2.3 倍に増加しており、混合修飾による DOX の腫瘍集積性の向上 ( $p < 0.001$ ) が認められた (Fig. 4(B))。

また、この時の血漿中 DOX 濃度 (Fig. 5(A))

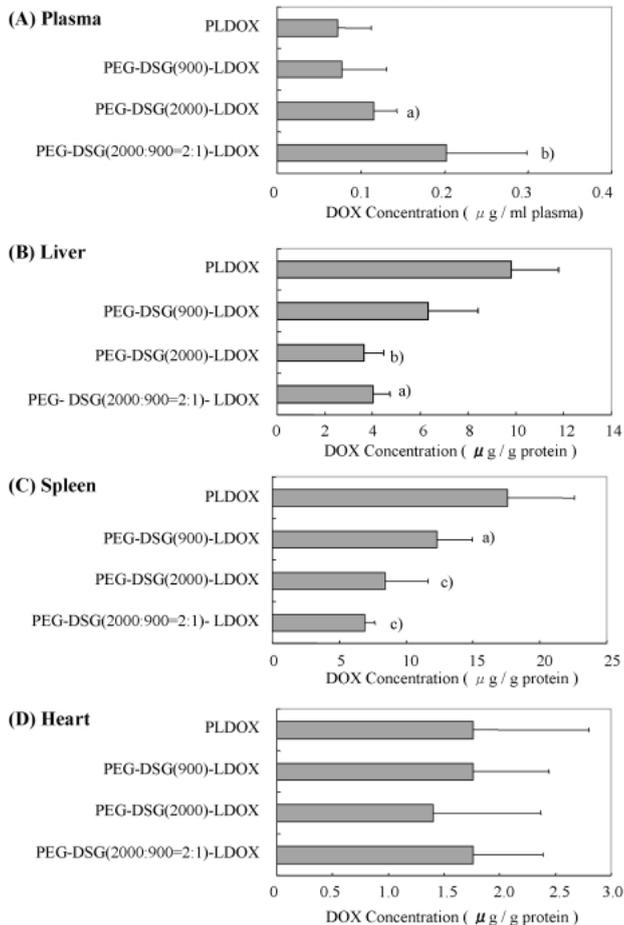


Fig. 5. Effects of PEG-modification on DOX Concentration in Plasma and Tissues

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of 8–9 mice. Significant differences from the level of PLDOX group are indicated by a)  $p < 0.05$ , b)  $p < 0.01$ , c)  $p < 0.001$ .

は PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1)-LDOX 投与群で  $0.20 \pm 0.09 \mu\text{g/ml plasma}$  であり, PLDOX 投与群 ( $0.06 \pm 0.04 \mu\text{g/ml plasma}$ ) に比べ有意に高い値を示した ( $p < 0.01$ ). 肝臓中 DOX 濃度 (Fig. 5(B)) は PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1)-LDOX 投与群で  $4.03 \pm 0.70 \mu\text{g/g protein}$ , PEG-DSG (2000)-LDOX 投与群  $3.63 \pm 0.81 \mu\text{g/g protein}$  を示し, ともに PLDOX 投与群に比べ有意に減少した. 同様に脾臓中 DOX 濃度 (Fig. 5(C)) も PEG-DSG (2000 : 900 = 2 : 1)-LDOX 投与群, PEG-DSG (2000)-LDOX 投与群で PLDOX 投与群の約 39% ( $p < 0.001$ ), 48% ( $p < 0.001$ ) に減少し, 顕著なりポソームの PEG 修飾効果が認められた.

一方, 心臓中 DOX 濃度 (Fig. 5(D)) は各群において有意な差は認められなかった.

## 考 察

リポソームの PEG 修飾は, リポソーム膜表面に存在する PEG ポリマーと水分子との相互作用によりリポソーム表面に表面固定水層が形成され, これにより血中での異物認識物質であるオプソニン分子のリポソームへの結合が阻害され, RES による取り込みの減少, 血中滞留性の増大をもたらすと考えられている.<sup>1–8)</sup> リポソーム膜表面上に存在する PEG 脂質の濃度が大きくなった場合, PEG 分子のオーバーラップにより PEG 分子が長く伸びた状態, すなわち ‘brush’ 構造に移行すると言われており, このような状態では血中タンパクがリポソーム表面に接することができないため, 高い血中滞留効果を示すと考えられている.<sup>5–7,16–19)</sup> しかしながら, PEG 脂質導入率, 血中における PEG 修飾安定性には限界があり, リポソーム表面に形成される FALT もプラトーに達してしまうため, PEG リポソームの効果を増大させることは困難であると考えられている.<sup>20)</sup> 一方で, 分子量の異なる PEG 分子を組み合わせて表面修飾したりポソームについて, 長鎖 PEG と短鎖 PEG との役割分担についての検討が行われており,<sup>11,12,21)</sup> 混合修飾の有用性が示唆されている. その際, PEG 脂質の物性であるオクタノール/水分配係数が異なるもの同士で組み合わせることが FALT 増大に必要であることが明らかとなっており,<sup>11,12)</sup> PEG-DSG2000 と PEG-DSG500 との混合修飾により FALT が増大したことが明らかとなっている.<sup>11)</sup> そこで, この理論により, PEG-DSG2000 と物性が異なり, PEG-DSG500 より PEG 鎖の長い PEG-DSG900 を用い, PEG-DSG2000 と混合修飾し, リポソームの混合 PEG 修飾化が FALT やリポソームへの PEG 導入率, 及び腫瘍細胞に対する殺細胞効果に与える影響について検討した.

単独分子量の PEG 修飾リポソームの FALT は, 分子量が大きい PEG 脂質で修飾したもののほど増大した. 一方, PEG-DSG2000 と PEG-DSG900 の混合比を変化させ, その混合物でリポソーム表面を修飾した場合, その混合比に FALT が最も大きくなる最適比 (PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1) の存在が認められた. この結果より, これまで検討されてきた PEG-DSG2000 と PEG-DSG500 の混合修飾の場

合と同様に、長鎖 PEG と短鎖 PEG による混合 PEG 修飾によって単独分子量の PEG 修飾に比べ FALT が増大することが示唆された。つまり、長鎖 PEG の隙間に短鎖 PEG が入り込むことにより、長鎖 PEG の 'mushroom' 構造が 'brush' 構造に近づいた状態になるためと考えられた。このとき、短鎖 PEG の比率が大きすぎると、リポソーム表面上に短鎖 PEG で修飾された部分が多くなり、その FALT は短鎖 PEG 単独修飾リポソームの FALT と長鎖 PEG 単独修飾リポソームの FALT の間の値を取ると考えられる。逆に短鎖 PEG の比率が小さすぎると、短鎖 PEG が長鎖 PEG の 'mushroom' 構造に及ぼす効果が現れず、その FALT は長鎖 PEG の FALT とほぼ同じ値となると考えられる。これらのことから PEG の混合比には最適比が存在するものと考えられる。

分子量が大きい PEG は、PEG 分子の親水性増大に伴いリポソーム膜上に高濃度で存在しにくくなることが示されており、<sup>15,22,23)</sup> PEG 導入率は単独修飾の場合、PEG-DSG2000 は約 46%、PEG-DSG500 は約 95% であった。一方、PEG-DSG2000 : 500 = 2 : 1 混合修飾の場合、リポソームでの PEG 導入率は、それぞれの PEG 脂質で単独修飾時と同程度の導入率で導入され、PEG-DSG2000 : 500 = 2 : 1 修飾リポソームの実際の導入量は PEG-DSG2000 : 500 = 1 : 1 であることが明らかとなっている。<sup>12)</sup> しかし、PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 混合修飾における PEG 導入率は PEG-DSG900 は単独修飾の場合 (90%) と同様に導入されるが、PEG-DSG2000 は単独修飾では約 46% であったものが PEG-DSG900 と混合修飾によりほぼ 100% まで増加することが示され、2000 : 500 と異なり PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 修飾リポソームにおいては実際の導入量も PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 であることが明らかとなった。この PEG-DSG2000 の導入率の増加のメカニズムについてはいまだ明らかとなっていないが、このことも PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 修飾リポソームの FALT 増大に一部起因していると考えられる。

一方、リポソームに内封された DOX は腫瘍に分布したのち、細胞内に移行することが必須である。また、リポソームは細胞表面に吸着したのちエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれると考え

られている。<sup>24)</sup> そこで、腫瘍細胞への DOX の取り込み及び腫瘍細胞での DOX の殺細胞効果について *in vitro* での検討を行った。これまで、FALT の増大が腫瘍細胞における DOX 取り込みに影響を及ぼさないということが明らかとなっており、<sup>11)</sup> 本結果でも、腫瘍細胞内 DOX 取り込みは、PEG-DSG2000 単独修飾と PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 混合修飾において差は認められず FALT の増大により腫瘍細胞における DOX 取り込みが低下することはなかった。リポソーム内封薬物の取り込み形態としては、(1)エンドサイトーシスにより、リポソームがそのままの形を保持したままで細胞内に取り込まれて内封薬物を放出する、(2)リポソーム膜と細胞膜の吸着、融合によりリポソーム内部の薬物が細胞内に放出される、(3)リポソームから漏出した薬物が水溶液の状態で細胞内に取り込まれる、などが考えられる。PLDOX に比べ PEG-DSG2000 単独修飾と PEG-DSG2000 : 900 = 2 : 1 混合修飾リポソームの細胞取り込みは有意に増大していたことから、PEG 修飾リポソームの細胞内取り込みにはリポソーム膜と細胞膜の吸着、融合、及びエンドサイトーシスなどが大きく寄与していると考えられる。PEG は細胞膜融合を促進するという報告があり、<sup>25-30)</sup> PEG が水溶液中で水素結合し、自由水を消失させ、膜表面に近接した外水相の水の構造を変化させ、脂質二分子膜表面の極性基の水和状態を変化させるために膜融合が起こると言われている。<sup>27,28)</sup> 一方で PEG との相互作用によりリポソームが安定化され、<sup>16)</sup> リポソーム同士の融合が抑制されるという報告もある。<sup>31,32)</sup> また、リポソーム膜表面に PEG が存在することにより、細胞とリポソームとの相互作用が立体的に障害される危険性について示唆されている。<sup>30-32)</sup> しかしながら、リポソームの PEG 修飾化による FALT の増大はかならずしもリポソームの細胞取り込みを妨げるものではないということが示唆された。なお、本結果はリポソーム本体の動きではなく内封薬物の移動を示している。Drug carrier としてのリポソームの動きを考えると、リポソーム本体の動きではなく薬効を有する内封薬物の分布が重要であると考えられる。一方、リポソームから内封薬物である DOX の漏出が DOX の細胞取り込みに影響を与える可能性が十分にあるが、リポソームの PEG 修飾はリポソームから内封

薬物の漏出を抑制することが示されており,<sup>12)</sup> PEG修飾化による細胞移行性の増大に薬物漏出の影響は小さいと考えられる。

さらに殺細胞効果の指標となる  $IC_{50}$  については PLDOX, PEG-DSG (900)-LDOX, PEG-DSG (2000)-LDOX, PEG-DSG (2000:900=2:1)-LDOX の順に殺細胞効果が増強される傾向が認められ、特に PEG-DSG2000 単独修飾と PEG-DSG 2000:900=2:1 混合修飾は PEG 未修飾の場合に比べ、有意な殺細胞効果を示した。すなわち、腫瘍細胞への DOX 取り込みを反映して混合 PEG-DSG2000:900=2:1 修飾でより優れた殺細胞効果が現れていることが明らかとなった。リポソームの PEG 修飾は血中においてオプソニンの付着を妨げ、RES 捕捉の回避により血中滞留と passive targeting による腫瘍集積を果たす。EPR 効果により腫瘍に集積した PEG 修飾リポソームは、一部の PEG がリポソーム膜から離脱、腫瘍細胞に移行する<sup>23)</sup> ことによりリポソームと腫瘍の親和性を上昇させ、細胞取り込みの増加と殺細胞効果の増強をもたらす可能性が示唆された。

そこで *in vitro* で認められた混合 PEG-DSG 2000:900=2:1 修飾の有用性が *in vivo* においても反映されているかを評価するため、Ehrlich ascites carcinoma 担癌マウスを用い、DOX の抗腫瘍効果に対する FALT の影響について検討した。PLDOX 投与群に比べて PEG-DSG (2000)-LDOX 投与群、PEG-DSG (2000:900=2:1)-LDOX 投与群で有意な腫瘍重量の減少が認められ、著しい腫瘍増殖抑制効果を示した。また、各剤型最終投与 72 時間後の腫瘍中における DOX 濃度は PEG-DSG (2000:900=2:1)-LDOX > PEG-DSG (2000)-LDOX > PEG-DSG (900)-LDOX > PLDOX であった。このことから、FALT の増大が大きい PEG-DSG2000:900=2:1 混合修飾では腫瘍中 DOX 濃度の増大による腫瘍重量の減少、すなわち、抗腫瘍効果の増強がもたらされることが示唆された。PEG 修飾を行わない場合に比べ PEG-DSG900 修飾の FALT の増大は *in vivo* においてほとんど効果を示さなかったことから、効果を発揮するのに、ある値以上の FALT が必要であると考えられる。また、血漿中で、FALT の増大による血中滞留性の向上が認められ、肝臓、脾臓中における DOX 濃度は

PLDOX に比べ PEG-DSG (2000:900=2:1)-LDOX 投与群、PEG-DSG (2000)-LDOX 投与群で有意に低い値を示した。すなわち、FALT の増大は RES 回避能の増大、血中滞留性の向上、passive targeting による腫瘍集積性の増大を導くことが明らかとなった。以上より、分子量が異なる PEG 脂質を組み合わせるリポソーム表面修飾により FALT と抗腫瘍効果との相関性が示唆され、混合 PEG 修飾の有用性が示唆された。

一方、DOX は広い抗腫瘍スペクトルと強い抗腫瘍作用を示すがその副作用として循環器系に及ぼす作用、特に心筋障害、心不全が報告されている。<sup>33,34)</sup> このため、血中滞留性の増大により副作用の増大が生じる可能性が懸念されたが、心臓中 DOX 濃度には各群間で有意な差は認められなかったことから、FALT の増大に伴う血中滞留性の増大による副作用の増強は生じないと考えられた。

以上より、混合 PEG-DSG2000:900=2:1 修飾リポソームは既知の混合 PEG-DSG2000:500=2:1 修飾リポソームと異なり、従来考えられていた PEG 脂質のコンフォメーションの変化に加えて、PEG-DSG2000 の導入率が増加することに起因して FALT が増大し、これに基づいてさらなる血中滞留性の向上がもたらされると考えられた。さらに殺細胞効果も高いことから、*in vivo* において腫瘍部位に集積すれば、良好に腫瘍細胞内に移行し、効果を発揮することが予想され、より有用性が高い混合 PEG 修飾であることが示唆された。

**謝辞** PEG 脂質を含むリポソーム構成脂質を御供与下さいました日本油脂株式会社に深謝致します。

## REFERENCES

- 1) Needham D., McIntosh T. J., Lasic D. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1108**, 40-48 (1992).
- 2) Klibanov L., Maruyama K., Beckerleg A. M., Torchilin V. P., Huang L., *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 142-148 (1991).
- 3) Yuda T., Pongpaibul Y., Maruyama K., Iwatatsuru M., *J. Pharm. Sci. Jpn.*, **59**, 32-42 (1999).
- 4) Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C., Gregoriadis G., *Biochim. Biophys. Acta*,

- 1062, 77–82 (1991).
- 5) Kuhi T. L., Leckband D. E., Lasic D. D., Israelachvili J. N., *Biophys. J.*, **66**, 1479–1488 (1994).
  - 6) Torchilin V. P., Omelyanenko V. G., Papisov M. I., Bogdanov A. A., Trubetsloy V. S., Heron J. N., Gentry C. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1195**, 11–20 (1994).
  - 7) Janzen J., Song X., Brooks D. E., *Biophys. J.*, **70**, 313–320 (1996).
  - 8) Sadzuka Y., Nakai S., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., *J. Drug Targeting*, **3**, 31–37 (1995).
  - 9) Shimada K., Miyagishima A., Sadzuka Y., Nozawa Y., Mochizuki Y., Ohshima H., Hirota S., *J. Drug Targeting*, **3**, 283–289 (1995).
  - 10) Zeisig R., Shimada K., Hirota S., Arndt D., *Biochem. Biophys. Acta*, **1285**, 237–245 (1996).
  - 11) Sadzuka Y., Nakade A., Hiram R., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., Sonobe T., *Int. J. Pharm.*, **238**, 171–180 (2002).
  - 12) Sadzuka Y., Nakade A., Tsuruda T., Sonobe T., *J. Control Release*, **91**, 271–280 (2003).
  - 13) Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, **13**, 238–252 (1965).
  - 14) Favretto L., Tunis F., *Analyst*, **101**, 198–202 (1976).
  - 15) Shimada K., Matsuo S., Sadzuka Y., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota S., Sonobe T., *Int. J. Pharm.*, **203**, 255–263 (2000).
  - 16) Needham D., Stoicheva N., Zhelev D. V., *Biophys. J.*, **73**, 2615–2629 (1997).
  - 17) Kenworthy A. K., Hristova K., Needham D., McIntosh T. J., *Biophys. J.*, **68**, 1921–1936 (1995).
  - 18) Nikolova A. N., Jones M. N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1372**, 237–243 (1998).
  - 19) Du H., Chandaroy P., Hui S. W., *ibid.*, **1326**, 236–248 (1997).
  - 20) Matsuo S., Shimada K., Miyagishima A., Sadzuka Y., Nozawa Y., Hirota S., *Prog. Drug Deliv. Syst.*, **VI**, 1–10 (1997).
  - 21) Needham D., McIntosh T. J., Zhelev D., *J. Liposome Res.*, **8**, 24–25 (1998).
  - 22) Hirota S., *Int. J. Pharm.*, **162**, 185–194 (1998).
  - 23) Sadzuka Y., Kishi K., Hirota S., Sonobe T., *J. Liposome Res.*, **13**, 157–172 (2003).
  - 24) Miller C. R., Bondurant B., McLean S. D., McGovern K. A., O'Brien D. F., *Biochemistry*, **37**, 12875–12883 (1998).
  - 25) Haque M. E., McIntosh T. J., Lentz B. R., *Biochemistry*, **40**, 4340–4348 (2001).
  - 26) Tilcock C. P. S., Fisher D., *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 53–61 (1979).
  - 27) Aldwinckle T. J., Ahkong Q. F., Bangham A. D., Fisher D., Lucy J. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 548–560 (1982).
  - 28) Saez R., Alonso A., Villena A., Goni F. M., *FEBS Lett.*, **137**, 323–326 (1982).
  - 29) Boni L. T., Stewart T. P., Alderfer J. L., Hui S. W., *J. Memb. Biol.*, **62**, 65–70 (1981).
  - 30) Ohno H., Maeda Y., Tsuchia E., *Biochim. Biophys. Acta*, **642**, 27–36 (1981).
  - 31) Hong R., Huang C., Tseng Y., Pang V., Chen S., Liu J., Chang F., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 3645–3652 (1999).
  - 32) Jhonstone S. A., Masin D., Mayer L., Bally M. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1513**, 25–37 (2001).
  - 33) Minow R. A., Benjamin R. S., Gottleb J. A., *Cancer Chemother. Rep.*, **6**, 195–201 (1975).
  - 34) Von Hoff D. D., Layard M. W., Basa P., Davis H. L., Von Hoff A. L., Rozenzweig M., Muggia F. M., *Ann. Intern. Med.*, **91**, 710–717 (1979).