

生体適合性ヒドロゲルへのリポソームのカプセル化

佐藤 智典・武居 智

砂本 順三*

Effective Encapsulation of Liposomes by Biocompatible Hydrogels

by

Toshinori SATO, Satoshi TAKEI and Junzo SUNAMOTO*

An improved technique has been newly developed in order to overcome essential disadvantages of liposome and hydrogel each other in the biotechnological utilization. This methodology involves the encapsulation of egg lecithin liposome by such an appropriate hydrogel that does not give any serious damage to the liposome during the encapsulation procedure. Of various hydrogels, the copolymer of acrylic acid with vinylalcohol or vinylacetate seemed to be the best candidate for the present purpose.

Interactions between liposomes and hydrogels were investigated from three aspects: (1) spontaneous leakage of a water soluble fluorescent probe, carboxyfluorescein, as doubly encapsulated in liposome-hydrogel; (2) distribution of liposomes between bulk water phase and hydrogel, which was determined by monitoring an increase in the fluorescent intensity of diphenylhexatriene, DPH, as encapsulated in the liposomal membrane; and (3) retarded lipoxigenase peroxidation of linoleic acid as embedded in the liposomal membrane.

Through all the investigations, the encapsulation of liposome into hydrogel seemed to be a suitable technique applicable to the serum free mammalian cell culture and implantation in vivo as the biomedical material.

1. 序

現在のバイオテクノロジーの展開には目覚ましいものがあるが、動物細胞の大量無血清培養の効率の向上がその成否を握っていると言っても過言ではない。ここでは、動物細胞の無血清下での培養容器への接着性の向上が一つの課題である。*in vitro* では、元来容器に接着しないと増殖できない動物細胞を培養する場合、細胞の容器への接着は不可欠な初期条件である。しかも動物細胞を有用物質産生等の細胞本来の機能を維持したまま培養するためには、無血清条件下の方が望ましいと言われているが、¹⁾ 動物細胞の通常の容器への接着性は、無血清条件下では著しく低下する。また、

培養実験の初期では、細胞が生体内で受けていた内的恒常性から外れているため、細胞の生存環境が変化し、機能低下を引き起こす原因となっている。そこで、*in vitro* での細胞環境を良好に再現できれば、細胞の機能低下を防ぐことができる。更に、培養細胞と親和性に優れた高分子材料は、生体内での組織適合性も優れていると考えられる。

吸水性の高分子ヒドロゲルは、純水の場合自重の500~1000倍を、また1%食塩水でも50~100倍を吸収することができ、保水能力が極めて高い。また一方、生体に対する毒性が低く、三次元網目構造中に多量の水を包接している点で生体組織と類似している。²⁾ こ

の特性に着目して、もともと細胞接着性の悪いガラスシャーレを生体適合性の優れた高分子でコーティングすれば、通常のガラスシャーレをも動物細胞培養容器として使用できると期待される。また、無血清培養においては水に不溶性成分としてのコレステロールや長鎖脂肪酸の培地への供給に問題があり、これまでには血清アルブミンや非イオン性界面活性剤の利用が考えられてきたが、いずれも種々の点で問題が多い。

ところで、天然由来脂質を水中に再分散することで形成されるリポソームはその構造特性からも生体適合性が優れている。しかも水に不溶性および水溶性化合物のいずれをもカプセル化できる点でマイクロカプセルとしては極めて優れた生体適合性材料の一つである。しかし、上述のヒドロゲルもまた後者のリポソームもそのみでバイオテクノロジーでの材料として利用しようとするとき、やはり決定的な欠点を有している。ヒドロゲルは水を吸収後もその空孔が大きく、水溶性物質の保持能力が極めて低い。他方リポソームは化学的かつ機械的強度が非常に小さい。本研究者は、双方の欠点を相補することにより更に有用な生体適合性材料としての利用の途を開拓するべく検討を行ない、新しくリポソームそのものをヒドロゲルにカプセル化する方法を開発した。いまリポソーム自身が更に適切な物質をカプセル化しているとき、それはヒドロゲルによる「ダブルカプセル化」に外ならない。

本論文では、このダブルカプセル化法の有用性を調べるための基礎的研究の結果について述べる。

本研究で開発された「リポソームカプセル化ヒドロゲル」は2つの用途への適応が可能である。

- (1) 動物細胞の無血清培養用培地
- (2) 生体埋込型医用材料

1では、先述のように細胞親和性の優れたヒドロゲルが開発されれば、コレステロールおよびリノレイン酸のごとき水に不溶性物質を一旦リポソームにカプセル化し、さらに水溶性培養メEDIUMを含む水溶液と共にヒドロゲルに吸収させる。そのようなゲルで通常のガラスシャーレを被覆し、その上で細胞を培養することが期待できる。即ち無血清培養としての意義と培養容器の改良という2つの点を同時に解決できると考えられる。2では、リポソームそのものは生体内に投与したとき、非常に組織吸収性が速く、また生物分解性も速い。このことはまたマイクロカプセルとして機械的強度の低さにもつながる。一方、細胞親和性に優れたヒドロゲルは、同時に臓器に対する毒性も低いと考えられるので、体内埋込型医用材料としての利用も期待できる。しかし、ヒドロゲルは水と一緒に吸収した

水溶性物質の保持能力が低く、ヒドロゲル外にバルク水相が存在すると、いったんゲル内に吸収した物質をゲル外へ容易に放出する。そのために、例えば水溶性薬物をカプセル化したヒドロゲルを、生体内に埋め込んでも薬物の徐放効果は小さいと予想される。そのときには、ヒドロゲルの生物親和性を維持したまま、薬物の放出をコントロールする工夫が必要である。

一方、我々はリポソームの生化学的、機械的弱さを克服するためにリポソームの外表面を天然由来多糖誘導体で被覆するという新しい方法を開発しその有用性を証明してきた。³⁻⁶⁾ そこで本研究の目的とする「ダブルカプセル化」法を適用すれば、薬物包埋リポソームの生体内局所濃度を高め、且つカプセル化されている薬物の徐放効果も期待できる。

本論文では上述目的達成のための基礎実験としてまづリポソームとヒドロゲルとの相互作用において、ダブルカプセル化時のリポソームの安定性、ダブルカプセル化効率およびヒドロゲルにカプセル化されたリポソームの酵素分解抑制効果について検討した結果を報告する。

2. 実験

2-1 ヒドロゲル

本実験で使用したヒドロゲルは、市販または工業品をそのまま用いた。これらのヒドロゲルの主原料、架橋剤および外形を Table. 1 にまとめた。

2-2 リポソーム

卵黄レシチンは、卵黄より文献に従って抽出、精製した。⁷⁻¹⁰⁾ けい光プローブを標識した卵黄レシチンリポソームは、既に確立した方法に従って作製した。^{7,11,12)} 水溶性けい光プローブ、カルボキシフルオレッセン (CF, Eastman Kodak), を封入したリポソームは次の方法で作製した。⁷⁾ 50ml容のナス型フラスコ中30mgの卵黄レシチンをクロロホルムに溶解し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下溶媒を除去し、フラスコ底部に薄膜を形成させた。この薄膜を200mMのCFを含んだトリス緩衝液 (10mM トリス・HCl - 100mM NaCl, pH 8.6) の4mlで膨潤し、ボルテックスミキサーを用いて剝離した。えられた懸濁液を枝付試験管に移し、N₂気流下、水浴中 (0°C ~ 5°C) 20分間超音波照射 (Tomy, UR-200P, 25W) した。また脂溶性のけい光プローブ、ジフェニルヘキサトリエン (DPH, Aldrich), を包埋したリポソームは次の方法で作製した。^{11,12)} 先と同様、30mgの卵黄レシチンを用いて形成された薄膜を4mlのトリス緩

Table 1 Main source, bridging agent, and form of hydrogels used in this work

No	Code name of polymer	Main source	Bridging agent	Form
1	S-50M	acrylic acid-vinyl acetate		grain
2	S-50	acrylic acid-vinyl alcohol		grain(200 μ m)
3	N-100	sodium polyacrylic acid		grain(200 μ m)
4	P-3	sodium acrylic acid, acryl amide, or 2-acrylamide 2-methyl propane sulfonic acid, etc	acryl amide, acrylate, or acryl acid polyvalent metal salt	grain(500 μ m)
5	P-9			grain(750 μ m)
6	P-15			grain(1000 μ m)
7	2011	acrylic acid		fine powder
8	Arasorb	potassium acrylic acid	N,N'-methylenebis acryl amide	grain
9	IM-1000MPS	starch poly acrylate	polysaccharide	grain(20-40 μ m)
10	Aqua Keep 10SH	acrylic acid		grain

衝液で膨潤後剥離し、超音波照射した。得られたリポソーム懸濁液に1.0 mM DPH の THF 溶液を2.0 μ M となるように加え、さらに1分間超音波照射した。これらのけい光プローブを標識したリポソームは、セファローズ4Bカラム(ϕ 1.8 \times 43cm)を用いてゲル濾過し、多重層リポソーム(MLV)と小さな1枚膜リポソーム(SUV)とに分離した。脂質濃度はAllenらの方法¹³⁾に従って定量した。

脂質の自動酸化の実験に用いたリポソームは、けい光プローブを含まないSUVを上述の方法に従って作製した。

酵素によるリポソームの過酸化の実験では、不飽和脂肪酸、リノール酸(Sigma)、を含んだジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC, Sigma)リポソームを形成させて用いた。DMPCリポソームは前述の卵黄レシチンリポソームの場合と同じ方法により作製した。但し、超音波処理時の温度は37 $^{\circ}$ Cとした。このリポソーム懸濁液に1.65Mリノール酸のエタノール溶液3 μ lを加え、さらに1分間超音波照射を行った。これをトリス緩衝液で希釈し、脂質濃度を6.25mMとした。

多糖被覆リポソームは、先に調製したMLVあるいはSUVをプルランのコレステロール誘導体(CHP)で被覆して得た。¹⁴⁻¹⁶⁾即ち、卵黄レシチンリポソームの懸濁液に脂質の2分の1重量のCHP水溶液を加え、20 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした。ここで用いたCHPは、平均分子量5万のプルランに、100 μ gルコース当たり1.3個のコレステロールが置換されたものである。¹⁹⁾

2-3 ヒドロゲルへのリポソームのカプセル化

乾燥したヒドロゲル3mgを1cm角のけい光分光用セルにとり、これに脂質濃度0.3mMのSUV, MLVあるいはCHP被覆MLVの50~250 μ lを加え完全吸収させ、37 $^{\circ}$ Cで一定時間(0~24時間)インキュベーションした。その後トリス緩衝液を最終液量が2.05~2.15mlになるように加えた。

2-4 ヒドロゲルの顕微鏡観察

CF水溶液のみを吸収させ、膨潤したヒドロゲルの表面構造を、落射型けい光顕微鏡(Nikon, XF-EFD)により観察した。CFの励起波長に対応したB励起法(青色励起)によりCFを発色させ、透過光と組み合わせてゲルの形態を観察した。観察した形態は、顕微鏡撮影装置(Nikon, UFX-II)により写真撮影した。

2-5 けい光測定

CFおよびDPHのけい光強度の測定には150W Xeランプを光源にもつユニオン技研のけい光偏光解消装置(FS-501)を使用した。通常のけい光分光光度計では、セルの底部にヒドロゲルが沈降してくるため測光が不可能となる。そこで本装置を用いて、ゆるやかな攪拌下に測定した。CFの場合には、470nmに分光された光の垂直成分により励起し、けい光の平行成分(I_H)と垂直成分(I_V)をそれぞれフォトマルで観測した。検出側で偏光する前に、色ガラスフィルター(Hoya, Y-50およびY-54)により観測されるけい光波長を一定域でカットした。またDPHの場合には、360nmで励起し、L-39およびY-44のカッ

トオフフィルターを使用した。

全けい光量 (I) は次式により求めた。

$$I = I_V + 2GI_H \quad (1)$$

ここでG値は、2つのホトマルの検出感度の差による補正係数であり、本実験ではほぼ0.95であった。けい光測定は、コンピューター解析装置により自動的にけい光測定を行い、ゲートタイムを1秒とし、10回サンプリングしてその平均値を採用した。

ヒドロゲルより流出したリポソームの流出率 (%) は、プローブとしてリポソーム中にカプセル化されているCFあるいはDPHのけい光強度の時間変化から求めた。

% leakage of CF or DPH labeled liposome

$$= \frac{I_t - I_0}{I_\infty - I_0} \times 100 \quad (2)$$

ここで I_0 は、リポソーム懸濁液を完全吸収したヒドロゲルにさらに過剰のトリス緩衝液を加えた直後、 I_t は時間 t 後、また I_∞ は試料液を激しく攪拌してヒドロゲルからリポソームを完全に放出させたときのけい光強度を表す。特にCF封入リポソームの場合にはさらに10% Triton X-100の30 μ lを加えてリポソームをも完全破壊した時のけい光強度を示している。けい光強度の経時変化は、静置条件下、あるいは攪拌条件下で追跡した。攪拌する時は、あらかじめセル中に攪拌子を入れておき、分光器中に組み込まれているマグネティックスターラーにより、一定の速度で攪拌した。セル中にヒドロゲルが浮遊していると、正確なけい光量が測定できないので、測定時間の1分前に攪拌を停止し、ヒドロゲルが完全に沈降したあと、セル上澄のけい光強度を測定した。

CF封入リポソームをヒドロゲルにダブルカプセル化したときのCF自然流出に対するインキュベーション時間の影響は次式を用いて評価した。

$$\% \text{ leakage of CF} = (I'_0 / I_\infty) \times 100 \quad (3)$$

ただしこのときの I'_0 は、CFのけい光強度の時間変化が定常的になったとき、時間ゼロに外挿して求めた値である。

2-6 卵黄レシチンリポソームの自動酸化

S-50M ヒドロゲル5mgにSUV([レシチン]=6mM)溶液400 μ lを吸収させ、25 $^{\circ}$ Cの恒温槽でインキュベーションした。24時間後、1.5mlのトリス緩衝液で1.3mMに希釈後、激しく攪拌してヒドロゲルからリポソームを放出させた(結果3-5参照)。これから1mlを採取し、TBAテスト^{12,20)}により過酸化脂質量を定量した。TBAテストでは、活栓付試験管に0.1M

ヒドロキノンエタノール溶液の50 μ lを加えて、過酸化反応を停止させ、20% (W/v)トリクロロ酢酸水溶液の20 μ lを加えた。これに0.35% (W/v)TBA 酢酸水溶液の2mlを加えて100 $^{\circ}$ Cで15分間煮沸したあと、氷冷により反応を停止させた。生じた赤色生成物の532nmの特性吸収の増加量 ($dAbs$)^{21,22)} を紫外可視分光光度計(日立, 220)を用いて測定した。

2-7 リポキシゲナーゼによるリポソームの過酸化²³⁾

DMPCのSUV([レシチン]=6.25mM)400 μ lを種々の量のS-50M(1, 3, 5および7mg)に吸収させ、25 $^{\circ}$ Cで1時間放置した。リポソーム懸濁液を吸収したヒドロゲルに600 μ lの大豆リポキシゲナーゼ溶液(223ユニット/ml)を加えた。0-5分後に100 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して酵素を失活させ、これにトリス緩衝液4mlを加えて激しく攪拌したあと、濾過してゲルを除いた。濾液の235nmの吸光度を紫外可視分光光度計で測定した。過酸化生成量を、そのモル吸光係数($\epsilon_{235nm} = 28000$)より求め、反応時間(0-5分)に対してプロットした。この直線の傾きから過酸化速度 V_i [μ M/min]を算出した。

3 結果

3-1 ヒドロゲルの形態

十分に吸水したヒドロゲルの形態は大きく分けて粒状とゲル状の二種類に分類できた。粒状となるヒドロゲルはS-50M, S-50, P-3, P-9およびP-15であり、粒の大きさは、約1~2mmであった。その他のヒドロゲルはゲル状となった。粒状ヒドロゲルのうち、S-50Mでは、表面に径20~30 μ m程度のクレーター状の起伏がみられ、その部分では、吸収させたCFの発光はみられなかった(Fig. 1)。その他の粒状ヒド

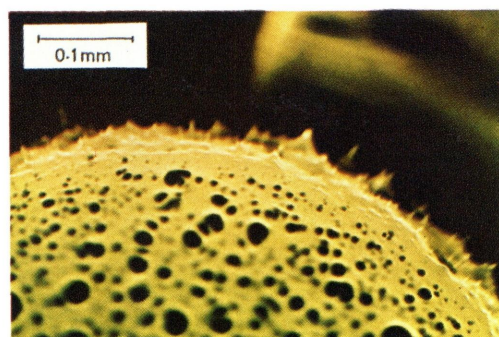


Fig. 1 Fluorescence microscopic investigation of hydrogel(S-50M) which absorbs an aqueous CF solution.

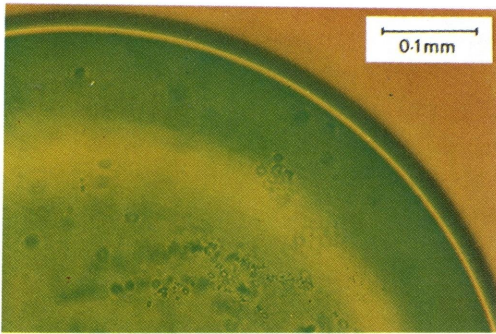


Fig. 2 Fluorescence microscopic investigation of hydrogel(S-50) which absorbs an aqueous CF solution.

ロゲルの表面は平坦で、CF の発光は均一であった。代表例として S-50 の場合の写真を Fig. 2 に示した。

3-2 CF 封入リポソームをダブルカプセル化したヒドロゲルからの CF の流出

CF 封入 SUV の150 μ lを 3 mgのヒドロゲルに吸収させ、30分間インキュベーションしたあと、2 mlのトリス緩衝液を加え、攪拌条件下で CF のもれを測定した結果をTable 2 に示した。表中のコントロール実験は、ヒドロゲル不在下での SUV からの CF の自然流出を示している。CF の流出率は(2)式により計算した。S-50M(アクリル酸-酢酸ビニル共重合体)とS-50(アクリル酸-ビニルアルコール共重合体)では、ダブルカプセル化時の CF の流出はほとんど見られなかった。それに対し、アクリル酸、アクリルアミド、あるいはスターチポリアクリレートを主原料とする他のヒドロゲルでは極めて短時間内に流失し、CF の流出量は約80%に到った。

3-3 S-50M からの CF 流出に対するダブルカプセル化の効果

上の実験によって CF 封入リポソームが S-50M には安定にカプセル化できることが判明したので、ダブルカプセル化の効果を次の4種の試料について検討した。

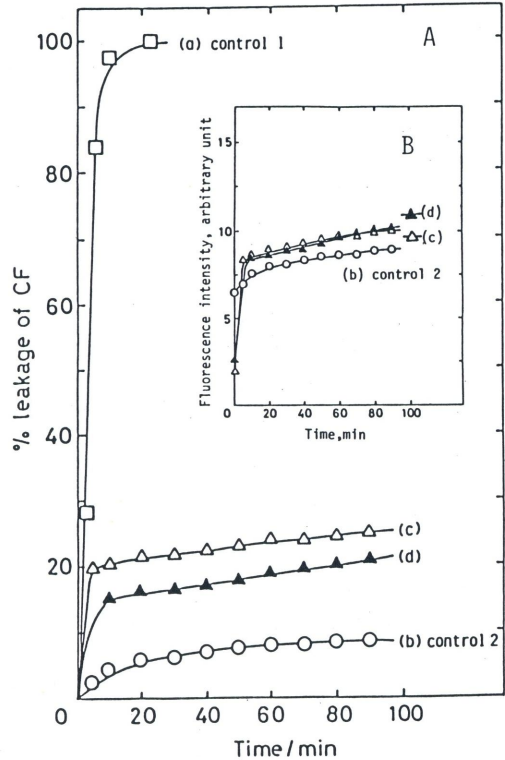


Fig. 3 Percent leakage of CF(A)and observed fluorescence intensity of CF released(B) from liposomes and hydrogels under stirring. (a); hydrogel(S-50M) (b); SUV (c)and(d); SUV doubly encapsulated by hydrogel(see text)

Table 2 Percent leakage of CF from liposome doubly encapsulated in hydrogel at 37°C as a function of time.

Time	% Leakage of CF ¹⁾										
	Without hydrogel	Hydrogel									
		S-50M	S-50	N-100	P-3	P-9	P-15	2011	Arasorb	IM-1000MPS	Aqua Keep 10SH
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2.8	9.3	13.9	55.7	82.9	83.8	88.8	74.1	81.6	83.4	57.4
10	4.0	10.2	15.0	61.5	80.3	82.4	86.1	77.2	83.6	84.0	65.2
20	5.0	11.1	16.0	72.9	84.8	83.4	87.0	77.6	84.2	83.7	78.2
30	5.8	11.9	17.0	78.6	85.4	84.2	87.7	78.1	83.9	83.7	85.4

1) Values were calculated by eq. 2.

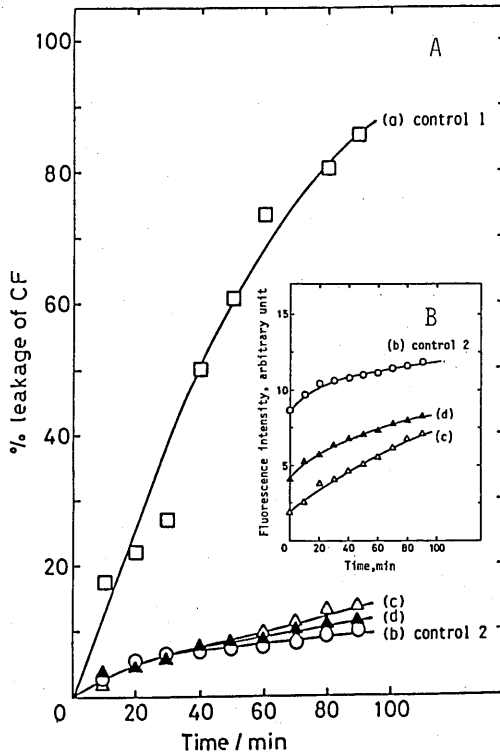


Fig. 4 Percent leakage of CF(A) and observed fluorescence intensity of CF released(B) from liposomes and hydrogels without stirring.

(a); hydrogel(S-50M)
 (b); SUV
 (c) and (d); SUV doubly encapsulated by hydrogel(see text)

- (a) 100 μ lの CF の水溶液をヒドロゲル (3 mg) に吸収させ膨潤させたあと 2 mlのトリス緩衝液で希釈 (コントロール 1)
 (b) 50 μ lの CF 封入 SUV をインキュベーションしたあと 2.0mlのトリス緩衝液で希釈 (コントロール 2)
 (c) ヒドロゲル (3 mg) に吸水能力限度内の量の CF 封入 SUV 50 μ lを吸収させ膨潤したあと 2.0 mlのトリス緩衝液で希釈
 (d) ヒドロゲル (3 mg) に吸水能力をやや上回る量の CF 封入 SUV 50 μ lとトリス緩衝液 0.2mlを吸収させ、膨潤させたのち 1.8mlのトリス緩衝液で希釈

(a)~(d)の実験での膨潤時間は30分間で温度は37°Cであった。(a)で用いた CF 水溶液はあらかじめ CF が濃度消光しない程度まで希釈して用いた。

まず(a)~(d)の試料の希釈調整後のけい光度 (I_0)を測定したあと、攪拌条件下で経時変化を追跡した。静

置時ではダブルカプセル化された場合 (cおよびd)の I_0 は(b)コントロール 2に比べて非常に小さい値となったが、攪拌を行なうとほとんどその差はなくなり、(Fig. 3 B 挿入図)初期流出量はほぼ同じであることを示した。(2)式に従って CF の流出率 (%) を計算すると、コントロール 1 では攪拌開始後直ちに CF の流出量は100%に達したのに対し、ダブルカプセル化した(c)と(d)では CF の流出量は大きく抑えられた (Fig. 3 A)。

次に、同様に作製した試料を静置条件下で経時的に追跡した。相対けい光強度から観測させた CF 流出量は(b)コントロール 2に対して試料(c)および(d)ではかなり低く抑えられた (Fig. 4 B 挿入図)。CF の流出率として表わすと、Fig. 4 A のように、(a)コントロール 1に対してヒドロゲルにカプセル化することにより CF の流出は極めて低く抑えられた。また(a)コントロール 1は、攪拌条件下 (Fig. 3 A)に比べ静置下 (Fig. 4 A)ではある程度抑えられているものの、いずれもかなりの速度で CF が流出した。

3-4 CHP被覆リポソームのヒドロゲルへのカプセル化

ダブルカプセル化に際してリポソーム (SUV)をプ

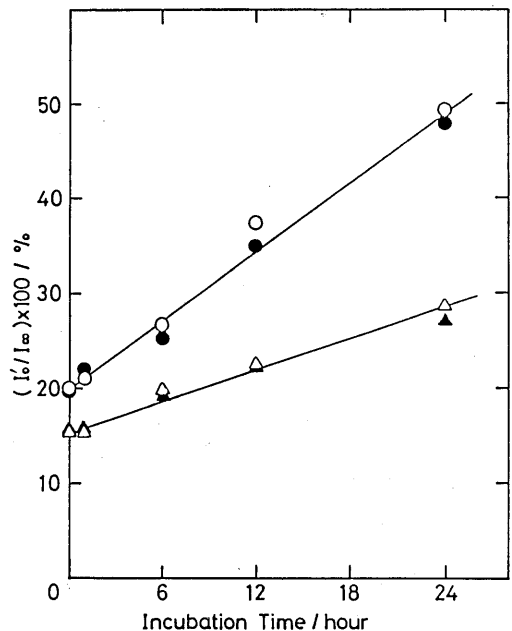


Fig. 5 Effect of polysaccharide on the stability of SUV encapsulated by hydrogels(S-50M) at 37°C.
 closed symbol ; SUV encapsulated by hydrogels
 open symbol ; without hydrogels
 circle ; conventional SUV
 triangle ; CHP-coated SUV

ルランのコレステロール誘導体 (CHP)により被覆し構造を強化^{14,15)} することによっても CF の流出を抑制することができた。しかしその結果は、単純リポソームの場合と同様にS-50MとS-50のヒドロゲルについてのみであり他のヒドロゲルでは多糖被覆をしてもCFの流出は抑制できなかった。そこでS-50Mにカプセル化されたCF封入りリポソームの安定性におけるCHP被覆効果を、インキュベーション時間依存性として観測し、CF流出率(%)を(9)式により計算した (Fig. 5)。

多糖で被覆することにより明らかにCF流出速度および流出量共に約半分に抑制されたが、更にヒドロゲルにダブルカプセル化することによる効果の向上は全く認められなかった。

3-5 DPH 標識リポソームのヒドロゲルからの漏出

DPH を標識したSUV, MLV, および CHP 被覆MLV を種々のヒドロゲルに吸収させ、トリス緩衝液で希釈後、攪拌条件下あるいは静置条件下でのリポソームのヒドロゲルからの流出を経時的に観測した。DPH はリポソームから放出され水相へ移行することはないので、この実験によりリポソームそのもののヒドロゲルからの放出量および速度を評価することが可能である。観測されたけい光強度 (I_t) は、測定開始後約10分で定常的になり、それ以上の流出は認められなかった。Table 3に、30分後におけるリポソームのヒドロゲルからの流出率(%)を(2)式により計算してまとめた。

攪拌条件下ではN-100以外のヒドロゲルではリポソームは100%バルク水相へ流出した。しかし、静置

Table 3 Percent leakage of DPH-labeled liposome from various kinds of hydrogels at 37°C for 30 min.

Experimental condition	Liposome	% Leakage of liposome ¹⁾				
		S-50M	S-50	N-100	P-9	IM-1000 MPS
Under stirring	SUV	100	100	50	100	100
	MLV	100	100	70	100	100
Without stirring	SUV	4	8	2	27	1
	MLV	4	10	2	6	2
	CHP-coated MLV	1	2	4	4	2

1) Values were calculated by eq. 3.

条件下では、ヒドロゲルからのリポソームの流出は顕著に抑制され、またP-9を除いていずれも30分後にはリポソームのヒドロゲルからの流出は停止した。静置条件下、粒状吸水ポリマーでは、ゲル状のものと比較して、SUV やMLV の流出量は高かったが、MLV をCHPで被覆することで大幅な流出抑制がみられた。

3-6 S-50M ヒドロゲル中のリポソームの自働酸化

リポソームをヒドロゲルにカプセル化させて24時間後に TBA テストを行った。そのとき532nmの特性吸収の増加量 (dAbs)は0.047±0.001であった。dAbsは3回の実験から求めた。リポソームだけのdAbsは0.048±0.001であったことから、脂質自働酸化に対するダブルカプセル化の効果はないと考えられた。

3-7 S-50M ヒドロゲル中のリポソームのリボキシゲナーゼによる過酸化

Fig. 6に、観測されたリノール酸の過酸化速度(V_i)を、リポソームをカプセル化するのに用いたヒドロゲル量との関係から示した。ヒドロゲル使用量を増加するに従い、リポソームの酵素酸化は抑制された。6.25 mMの脂質に対して7 mgのヒドロゲルが存在すると酸

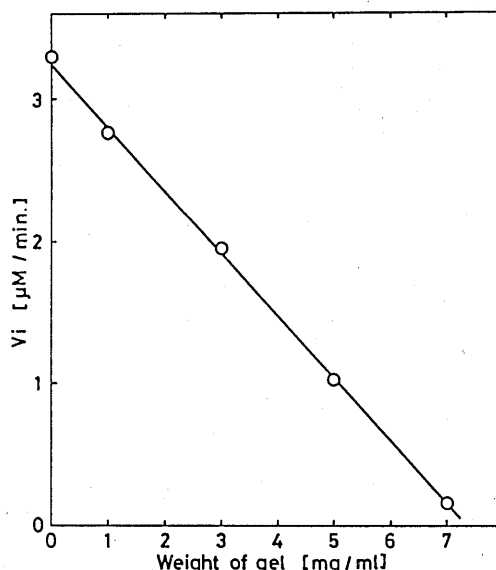


Fig. 6 Retarded lipoxygenase peroxidation of linoleic acid in DMPC liposomes encapsulated in hydrogel (S-50M) at 25°C as a function of gel amount
 [DMPC]= 2.5×10^{-3} M
 [linoleic acid]= 2.8×10^{-4} M
 [lipoxygenase]=223 Units / 1ml
 Total=1.0ml with 10mM Tris-HCl buffer (pH 8.9), $\mu=0.1$ (NaCl)

化はほぼ完全に抑制され、400 μ lのリポソーム溶液を100%吸収するためには最低7mgのヒドロゲルが必要であった。

4 考察

CF 封入リポソームは細胞障害性の高い薬物や界面活性剤の刺激を受けると、内包しているCFを放出する。^{2,24,25)} ヒドロゲルへのCF封入リポソームの吸水時においても同様の現象がみられ、ヒドロゲルとの相互作用でリポソームが受けた刺激の程度に応じたCFの流出が観測された。Fig. 1の結果は、アクリル酸-酢酸ビニルおよびアクリル酸-ビニルアルコール共重合体のヒドロゲルは相互作用に際してリポソーム膜を乱すことなく、安定なダブルカプセル化が可能であることを示している。それに対し、他の種類のヒドロゲルでは、吸水時にリポソームを急速に崩壊した。その原因のひとつとしてポリマー中のモノマー成分の残存が考えられる。そこでヒドロゲルを純水に対して3日間透析を行ったのち、ダブルカプセル化に用いたが、それでもCFリポソームの崩壊は避けられなかった。一方、P-3, P-9, および P-15では疎水性の高い界面活性剤が残存している可能性も考えられる。²⁵⁾

pH8.6のトリス緩衝液を吸水能力限界まで吸収させた時、S-50MとS-50ではバルクpHの変化はみられなかったが、他のヒドロゲルではpH6.1~6.7まで低下し、明らかに酸性成分の混在が示唆された。

CF封入リポソームを実細胞モデルとして考えると²⁷⁾ CFの流出を誘起し易いヒドロゲルは実細胞へ障害を与え、一方、安定なカプセル化ができるヒドロゲルでは細胞への親和性が高いことが予想される。事実、RPMI-1640 (10% FCS 存在下) 中、マウスの繊維芽L細胞のヒドロゲルへの接着性を観察すると、S-50MとS-50では良好な接着がみられたのに対し、他のヒドロゲルでは全く接着がみられなかった。細胞のヒドロゲルへの接着、増殖性はヒドロゲルの含水率や電荷に依存していることが、既に長岡らによって報告されている。²⁸⁾ それによると、ヒドロゲルの含水率が高い程細胞増殖の足場となるポリマー実質部分率が減少するため、付着細胞量が減少する。しかし本実験で用いたヒドロゲルの含水率はいずれも7重量%以下であって、細胞の接着性に差をもたらすような違いはなかった。ポリメチルメタクリレート (PMMA) ステレオコンプレックスゲルは、高含水率でも活発な細胞増殖がみられることが知られている。²⁸⁾ ところが isotactic / syndiotactic 比の異なる、すなわち表面の性質あるいは分散状態が異なる PMMA 膜では、細胞

の増殖に差がみられている。²⁸⁾ 我々の実験でも、アクリル酸主体のヒドロゲルと共重合成分 (酢酸ビニル、またはビニルアルコール) を含んだものとは、リポソームの安定性や細胞の接着性に顕著な差がみられたことから、ポリマーの構造特性が重要であることは明白である。

今回の実験で、S-50M および S-50は、細胞培養容器や生体内埋込型医用材料に要求される生体適合性の点で可成り有望であることがわかった。しかしヒドロゲルからのカプセル化物質の徐放機能を期待しても、水溶性物質の保持能力の低さから、吸収されている物質は、直ちにバルク水相へ放出される (Fig. 3 および 4)。そこで我々は、このようなヒドロゲルの欠点を補う方法として、リポソームを用いたダブルカプセル化法を考案した。リポソームは水溶性、脂溶性いずれの物質をもカプセル化でき、ヒドロゲルよりも保持能力が高い。しかし、生体内に投与したとき、リポソーム自身も酵素や蛋白により膜の破壊を受け容易に内包物を放出し、^{14,15)} そこでカプセル化物は容易に代謝され短時間で循環系より消失、体外へ排出される。¹⁵⁻¹⁷⁾ このようなリポソームの分散性や構造不安定性といった欠点は、ヒドロゲルにカプセル化され不溶化されることによって克服できると考えられた。即ちリポソームのヒドロゲルへのカプセル化で双方の欠点を互いに補い、長所を助長すると期待できた。

本研究で達成できた“ダブルカプセル化”の利点は大きく次の2つにまとめられる。

- i) ヒドロゲル内カプセル化物質の流出抑制
- ii) リポソームの酵素による分解抑制

まず、水溶性けい光プローブを用いて調べた流出はヒドロゲルのみでは攪拌条件下で瞬時に100%に達した (Fig. 3 A)、静置条件下でも1時間後に70%であった (Fig. 4 A)。ヒドロゲル中に吸収された小分子は、バルク水相が存在すると自由に拡散していることは明白である。またCFがリポソームに封入されたうえでヒドロゲルに吸収されると、静置条件下ではヒドロゲルから漏出したCFの量は大きく抑えられた (Fig. 4 A)。Fig. 4の結果はCFのバルク水相への拡散がダブルカプセル化により抑制されたことと、リポソーム自身の拡散がヒドロゲル中にカプセル化されることにより抑制されたという2つの点を証明している。リポソーム自身の拡散が抑制されたことは、DPH 標識リポソームのカプセル化実験によってさらに確認された。リポソームのヒドロゲルからの流出は、ヒドロゲルの構造に依存した。N-100やIM-1000 MPSの非粒状ヒドロゲルは粒状ヒドロゲルに比較して、リポ

ソームの流出率は低かった。粒状ヒドロゲルの中でも、特に P-9 では SUV の流出率は高かったが、サイズの大きい MLV や CHP 被覆 MLV では大巾に流出量は低下した (Table 3)。このような結果は、顕微鏡観察の結果と相俟って、ヒドロゲルの種類によっては三次元網目構造とポアサイズに差のあることを示唆している。

リポソームを生体適合性材料として利用しようとするとき、脂質過酸化生成物が細胞や組織に障害を与えることが予想される。^{29,30)} そこで、脂質過酸化が顕著に起こるような系では、それを抑制する必要がある。ところが、S-50M にカプセル化された卵黄レシチンリポソームの自働酸化はヒドロゲルカプセル化によっても抑制されなかった。このことは、不飽和脂質の自働酸化はリポソーム膜内に溶解している酸素によって起こり、ヒドロゲルはこれを防止し得ないことを示している。しかし、一方、リポキシゲナーゼによる過酸化は、リポソームがヒドロゲルにカプセル化されることで明らかに抑制され、リノール酸の過酸化速度 (V_i) はヒドロゲル使用量に依存していた (Fig. 6)。リポソームがヒドロゲルに100%吸収された時点で、酵素による過酸化がほぼ完全に抑えられたことより、今回用いた酵素はヒドロゲル内に入り込めないことを示唆している。このことは、生体内に埋め込まれた場合も、ダブルカプセル化されたリポソームは、酵素との接触から避けられリポソームの酵素分解を防ぐことができることを示唆している。

5 結論

薬物をカプセル化したリポソームを適当なヒドロゲルでダブルカプセル化することで、薬物の流出を大きく抑制でき、またリポソーム自身のバルク水相への分散性も抑えることができた。さらに、リポソームは表面に細胞認識素子を容易に付与することができ、一方、ポリマーもより適切なモノマー成分を選ぶことで生体適合性を改善することができる。リポソームや培養細胞とヒドロゲルとの相互作用から判断して、アクリル酸-酢酸ビニル共重合体およびアクリル酸-ビニルアルコール共重合体は生体適合性に優れていることが判明した。さらに予備的実験ではあるが、アクリル酸-酢酸ビニル共重合体はラットの腹腔内へ埋め込んでも肝機能を始め全く何の障害を示さないことを認めている。³¹⁾ それ故、このようなヒドロゲルヘリポソームをカプセル化した系は、細胞培養用基材あるいは生体内埋込型医用材料として極めて有望であることが判明した。

謝辞 本研究は長崎県技術開発研究委託の助成の下に行った。御協力頂いた平薬品産業株式会社並びに長崎県経済部に感謝いたします。

参考文献

- 1) D. Barnes and G. Sato, *Cell*, **22**, 649 (1980)
- 2) J. D. Andrade Ed., *Hydrogels for Medical and Related Applications*, ACS Symposium Series 31 (1976)
- 3) 砂本順三, *ファルマシア*, **21**, 1229 (1985)
- 4) J. Sunamoto and K. Iwamoto, *Therapeutic Drug Carrier Systems*, Ed. by S. D. Bruck, CRC Press, 117 (1986)
- 5) J. Sunamoto, *Medical Application of Liposomes*, K. Yagi Ed., 121 (1986)
- 6) J. Sunamoto, T. Sato, R. M. Ottenbrite, *Current Topics in Polymer Science*, Hanser(1986) 印刷中
- 7) J. Sunamoto, H. Kondo, and A. Yoshimatsu, *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 52 (1978)
- 8) W.S. Singleton, M.S. Gray, M.L. Brown, and J.L. White J. *Am. Oil. Chem. Soc.*, **42**, 53 (1965)
- 9) A.J. De Koning, *J. Chem. Educ.*, **51**, 48 (1974)
- 10) B.J. White, C. L. Tipton, and M. Dressel, *J. Chem. Educ.*, **51**, 533 (1974)
- 11) K. Iwamoto, J. Sunamoto, K. Inoue, T. Endo, and S. Nojima. *Biochim. Biophys. Acta*, **691**, 44 (1982)
- 12) J. Sunamoto, Y. Baba, K. Iwamoto, and H. Kondo, *Biochim. Biophys. Acta*, **833**, 144 (1985)
- 13) R. J.L. Allen, *Biochem. J.*, **34**, 858 (1940)
- 14) J. Sunamoto, K. Iwamoto, M. Takada, T. Yuzuriha, and K. Katayama, *Polymers in Medicine*, E. Chiellini and P. Giusti Eds, Plenum Press, 157 (1984)
- 15) J. Sunamoto, K. Iwamoto, M. Takada, T. Yuzuriha, and K. Katayama, *Recent Advances in Drug Delivery Systems*, J.M. Anderson and S.W. Kim Eds, Plenum Press, 153 (1984)
- 16) M. Takada, T. Yuzuriha, K. Katayama, K. Iwamoto, and J. Sunamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 237 (1984)
- 17) J. Sunamoto, M. Goto, T. Iida, K. Hara, A. Saito, and A. Tomonaga, *Receptor Mediated Targeting of Drugs*. G. Gregoriadis, G. Poste, J. Senior, and A. Trouet Eds, 359 (1985)

- 18) A. Tomonaga, Y. Ueda, M. Hirota, A. Saito, K. Hara, M. Goto, and J. Sunamoto, *Macrophage Biology*, S. Reichard and M. Kojima Eds., Alan R. Liss, Inc., 613 (1985)
- 19) J. Sunamoto, H. Kodo, T. Sato, T. Taguchi, and H. Hamasaki, 未発表
- 20) M. Sato and M. Uchiyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1118 (1971)
- 21) N.A. Porter, J. Nixon, and R. Isaac, *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 506 (1976)
- 22) M. Uchiyama and M. Mihara, *Anal. Chem.* **86**, 271 (1978)
- 23) M.J. Gibian and R.A. Galaway, *Bioorganic Chemistry I*, E.E. Van Tamelen Ed., Academic Press, 117 (1977)
- 24) J. Sunamoto, K. Iwamoto, T. Uesugi, K. Kojima, and K. Furuse, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2891 (1984)
- 25) C.J.O'Connor, R.G.Wallence, K.Iwamoto, T.Taguchi, and J.Sunamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 95 (1985)
- 26) 公開特許公報, 昭53-46389 (1978)
- 27) 村上幸人, 砂本順三共著, 酵素・生体膜モデルの化学, 南江堂, 103 (1981)
- 28) 長岡昭二, 鈴木慈郎, 小林茂保, 糸賀正明, 円沢宏, *膜*, **3**, 59 (1978)
- 29) R.O.Recknagel, *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145 (1967)
- 30) A.L. Tappel, *Pathological Aspects of Cell Membranes Vol. 1*, Academic Press(1973)
- 31) 五十君裕玄, 砂本順三, 未発表