

# リポソーム

Nicomp® および AccuSizer®

リポソームは、リン脂質で作られた球状の人工的な粒子で、医薬品および化粧品産業で使用されます。そのサイズおよび表面電荷は、リポソームの測定やモニタリングにとって重要な特性です。動的光散乱(DLS)は、サブミクロンのリポソームのサイズを測定するために使用されている、最も一般的な分析技術です。また、光学的粒子検出(SPOS)は、1 $\mu$ mより大きいリポソームのサイズを測定するために使用します。

Nicomp (ナイコンプ) DLSシステムと AccuSizer (アキュサイザー) SPOSシステムは、サイズおよびリポソームの電荷(ゼータ電位)の正確な測定のために、世界中の研究室で使用されています。

## 序論

リポソームは、腫瘍に対する化学療法薬の輸送のためのDDS担体として製薬産業で使用されている二重層小胞です。それらは、水性媒体と二重層を形成する非極性の末端に面した極性末端を有していて、二重層小胞の非極性鎖に結合極性端部を有するリン脂質で構成されています。医薬用途では、医薬品の活性成分(API)は、通常、リポソームの親水性ポケットに組み込まれているか、APIの親水性に応じて二重層の間に挟まれます(図1)。

承認が得られた最初の薬剤は、リポソームを使用するDOXIL®で、ドキソルビシンの改良型です。ドキソルビシン薬物は、ポリエチレングリコール(PEG)コーティングされたリポソームの親水性のポケット内に入ります。PEGコーティングは、安定性を向上させ、免疫系による検出および破壊を回避することで、循環中の半減期を長くします。リポソームの他の用途としては、バイオテクノロジーなどの分野での用途(siRNA送達、抗体配達)と美容(乳液やクリームなど)が挙げられます。

リポソームは、そのラメラ相(均一、または複層小胞)、サイズ(小型、大型、または巨大)および調製方法に応じて分類することができます。リポソームの主なタイプには、小型単層小胞(SUV)、小型多層小胞(SMV)、多層小胞(MLV)、大型単層小胞(LUV)、および巨大多層小胞(GMV)があります。したがって、リポソームの大きさの、正確で迅速な測定は、新規の効果的な薬物送達システムの開発に必須となります。

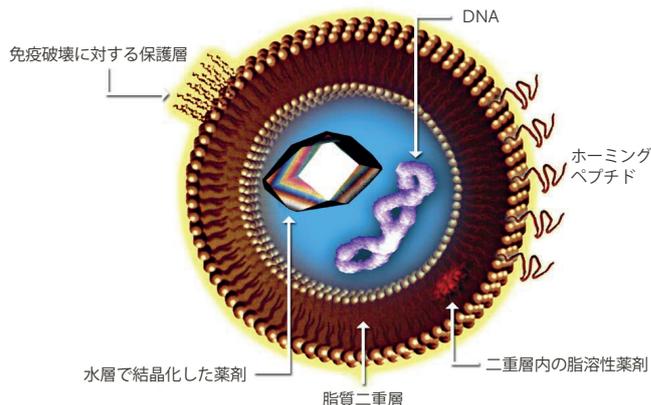


図1 薬剤送達のためのリポソーム



図2 ナイコンプ3000 DLSシステム

ほとんどのリポソームはサブミクロンサイズ(20~250 nm)で、好ましい粒子サイズ分析技術は、ナイコンプ(図2)のような動的光散乱(DLS)です。新規のGMVリポソーム(>5  $\mu$ m)には、DLSの分析には大きすぎるものがあります。それらはPSSの光学的粒子検出(SPOS)システム、アキュサイザー(図3)を用いて測定することができます。



図3 アキュサイザー SPOS システム  
シリンジインジェクションサンプラーモデル

## プロセス中のサイズ測定

ナイコンプとアキュサイザーを、製造プロセスの中で、リポソームのサイズを正確に測定するために使用しました。リポソームはメンブレンから押し出して製造します。図の4~6は、リポソームのサイズが小さくなるようにメンブレンフィルターを交換して、DLSのナイコンプで測定した結果です。

Intensity Weighted Distribution

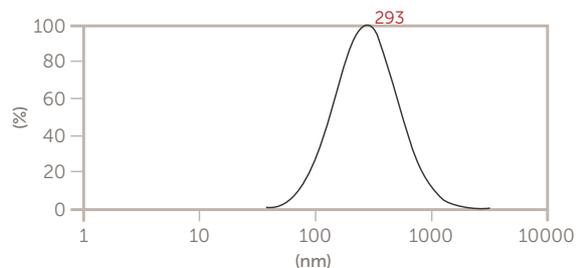


図4 押し出し前のリポソームサイズ

Intensity Weighted Distribution

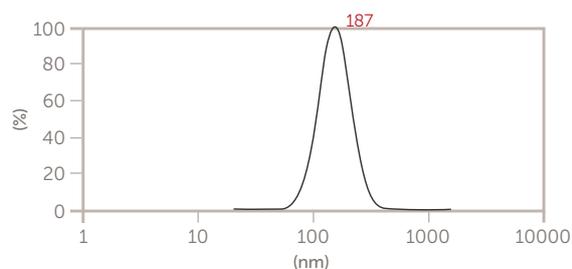


図5 リポソームサイズ  
0.4 μm メンブレン処理 3 回

Intensity Weighted Distribution

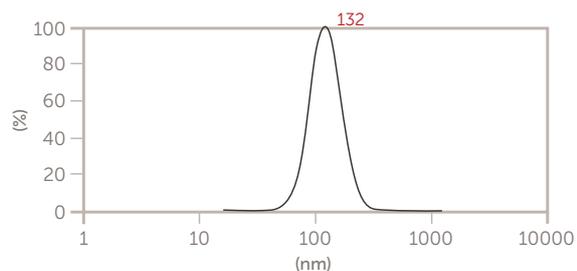


図6 リポソームサイズ  
0.1 μm メンブレン処理 3 回

巨大多層 (GMV) リポソームを、糖ドープ脂質フィルム水相法を用いて製造しました。リポソームのサイズは、遠心分離し、膜フィルターから押し出すことで、減少しました。図7~10は、リポソームの大きさの変化を、アキュサイザー-SPOSシステムを用いて測定した結果です。

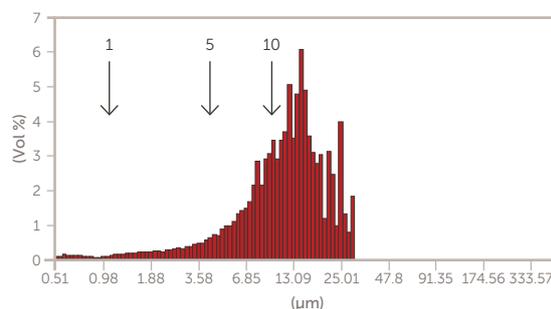


図7 遠心前のGMVリポソーム

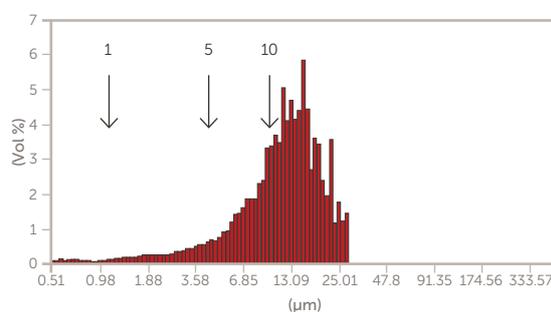


図8 遠心後のGMVリポソーム

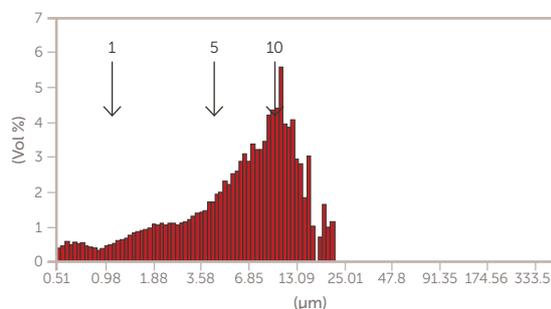


図9 GMVリポソーム  
5 μm フィルター処理

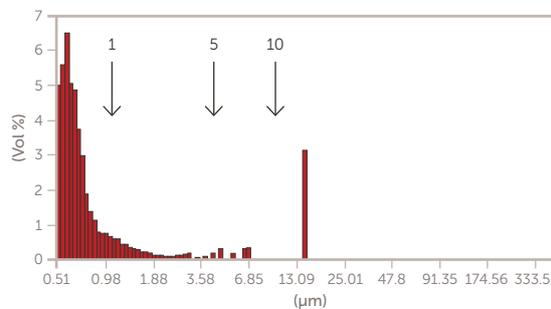


図10 GMVリポソーム  
10 μm フィルター処理

## カチオン性リポソーム

カチオンの脂質から成るリポソームDOTAP(N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate)は、アニオン性RNAおよびDNAヌクレオチドの有効な担体です。リポソームのカチオン帯電により、脂質二重層へのヌクレオチドの封入効率と、カチオンチャージを持つ細胞への取り込まれる効果が向上します。PEGコートしたカチオン性リポソームは、血清による凝集を防止し、循環寿命を向上するため、腫瘍組織への蓄積能力があります。

カリフォルニア大学デービス校の研究<sup>2</sup>では、マイクロRNAのカプセル化のため、カチオン性のDOTAPリポソームを調製しました。マウスに静脈内注射するため、リポソームの大きさは非常に重要で、最終サイズが約100 nmより大きい必要があります。カチオンコートしたリポソームのサイズを図11に示しています。

### Gaussian Summary

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Mean diameter                                   | 132.5 nm                     |
| Standard deviation                              | 44.0 nm (33.2%)              |
| Normalized standard deviation (Coeff. of Var'n) | 0.332                        |
| Variance (P.I.)                                 | 0.110                        |
| Chi squared                                     | 0.577                        |
| Baseline Adj.                                   | 0.000%                       |
| Z-Avg. Diff. Coeff                              | 3.51E-008 cm <sup>2</sup> /s |

### Intens-WT Gaussian Distribution

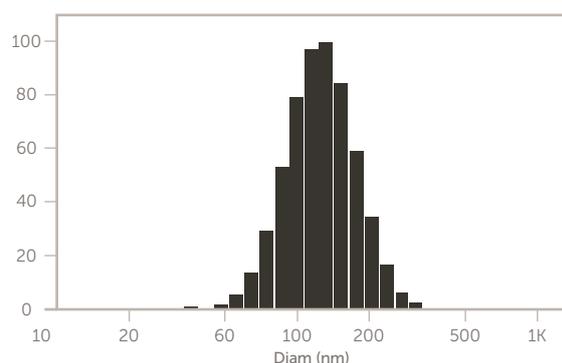


図11 カチオンコートしたリポソームのサイズ

## 長期循環リポソーム

デービス校フェラーラ研究室の研究<sup>2</sup>では、リポソームを、ポジトロン放出断層撮影 (PET) による頭頸部腫瘍の視覚化を改良するためのナントレーサーとして使用するため、<sup>64</sup>Cuで標識しています<sup>3</sup>。

このリポソーム (標準的にはHSPC/コレステロール/DSPE-PEG2K) は、様々な多くの用途に適しており、安定性が高く、長期循環リポソーム (Long Circulation Liposomes) の調製に適した薬剤です。HSPC : コレステロール : DSPE-PEG2K のモル比が55.5 : 39 : 5.0 の処方を使用して、6-BAT-PEGで<sup>64</sup>Cu標識化しました。<sup>64</sup>Cu-リポソームは、様々な癌に蓄積し、敏感なトレーサーとして、またナノセラフィックのための生体内分布の指標として働きます。<sup>64</sup>Cu標識化LCLリポソームのサイズを図12に示します。

### Gaussian Summary

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Mean diameter                                   | 122.8 nm                     |
| Standard deviation                              | 16.2 nm (13.2%)              |
| Normalized standard deviation (Coeff. of Var'n) | 0.132                        |
| Variance (P.I.)                                 | 0.017                        |
| Chi squared                                     | 0.173                        |
| Baseline Adj.                                   | 0.078%                       |
| Z-Avg. Diff. Coeff                              | 3.78E-008 cm <sup>2</sup> /s |

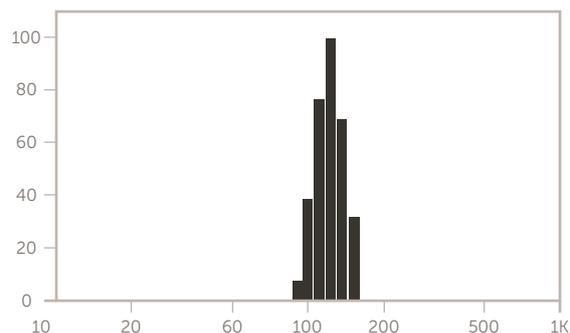


図12 <sup>64</sup>Cu標識化LCLリポソームのサイズ

## 温度感受性リポソーム

また、温度感受性リポソームは、特定の標的部位で粒子の内容物を放出するように処方されています。ある研究<sup>4</sup>では、pH感受性のドキソルビシン(DOX)と銅の複合体(CuDox)を温度感受性リポソームのリゾ脂質含有のコア(LTSLs)に形成しました。これらのリポソームはDPPC:DSPE-PEG2k:MPPCがモル比で86:4:10です。銅TEAリポソーム(銅(II)、グルコン酸塩、トリエタノラミン(TEA))を、リポソーム膜を介して塩勾配を誘導するために、非カプセル化された銅TEAから分離しました。MPPC銅TEAリポソームの大きさを、図13に示します。

### Gaussian Summary

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Mean diameter                                   | 139.3 nm                     |
| Standard deviation                              | 30.8 nm (22.1%)              |
| Normalized standard deviation (Coeff. of Var'n) | 0.221                        |
| Variance (P.I.)                                 | 0.049                        |
| Chi squared                                     | 2.059                        |
| Baseline Adj.                                   | 0.000%                       |
| Z-Avg. Diff. Coeff                              | 3.34E-008 cm <sup>2</sup> /s |

### Intens -WT Gaussian Distribution

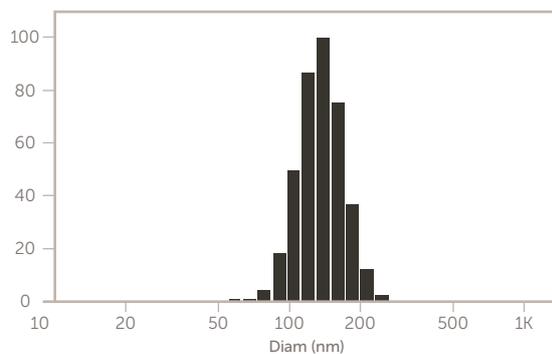


図13 MPPC-銅 TEA リポソーム

調製したリポソームがサイズを持つと、TEA勾配により、治療薬ドキソルビシンが担持されます。お茶が出るようにドキソルビシンは、リポソームに入りこみます。

## <sup>89</sup>Zr で標識したリポソームのゼータ電位

別の研究<sup>5</sup>では、<sup>89</sup>Zrで標識したリポソームを作製し、1週間かけて長期循環リポソームの薬物動態を評価しました。放射性元素は、脂質二重層、リポソームの表面、または親水性の内部空洞内に隔離されます。この研究では、リポソームのサイズ分布をナイコンプ DLSで測定しており、その結果は114~120 nmでした。同時にゼータ電位も、ナイコンプの位相解析光散乱モード(PALS)とディップセルを用いて測定しました。測定の条件は、電極間0.4 cmに12 V/cmの電界を印加し、スモルコフスキーの制限を使用しました。図14に測定結果を示しています。繰り返し測定で非常に再現性のある結果が得られています。

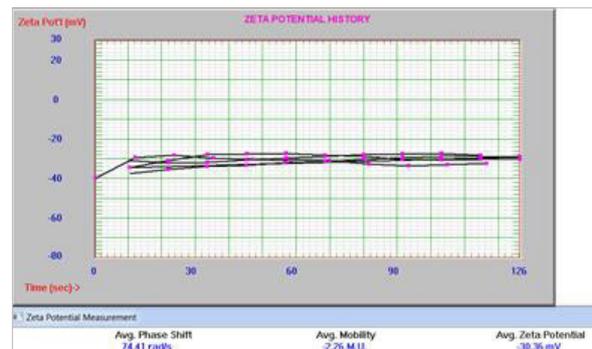


図14 NH2-PEG2kリポソームのゼータ電位

## 参考文献

- <sup>1</sup> Aoki, N. & Hashimoto, M., Hashimoto Electronic Industry CO. and Yoshimura, T. Liposome Engineering Laboratory, *Measurement of Liposome Size Distribution Using Nicomp 380 and AccuSizer 780 AD*, presentation, July 2013
- <sup>2</sup> Thanks to Elizabeth Ingham, Azadeh Kheiriloom and Jai Seo from the Dr. Katherine Ferrara Lab in the Department of Biomedical Engineering at UC Davis for sharing these data and helping to create this document.
- <sup>3</sup> Mahakian, L. et.al., *Comparison of PET Imaging with <sup>64</sup>Cu-Liposomes and <sup>18</sup>F-FDG in the 7,12-Dimethylbenz[a] anthracene (DMBA)-Induced Hamster Buccal Pouch Model of Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma*, Mol Imaging Biol (2013)
- <sup>4</sup> Kheiriloom, A. et.al., *Complete regression of local cancer using temperature-sensitive liposomes combined with ultrasound-mediated hyperthermia*, Journal of Controlled Release, 172 (2013)
- <sup>5</sup> Seo, J. et.al., *The pharmacokinetics of Zr-89 labeled liposomes over extended periods in a murine tumor model*, Nuclear Medicine and Biology 42 (2015)

## 詳細情報

詳細情報および最新情報については、インテグリスまでお問い合わせください。  
[www.entegris.com](http://www.entegris.com) の「[お問い合わせ](#)」ページから最寄りのインテグリスをご確認いただけます。

## 販売条件

全ての購入は、インテグリスの「販売条件」に従うものとします。インテグリスの「販売条件 (Entegris Terms and Conditions of Sale)」は、[www.entegris.com](http://www.entegris.com) のホームページのフッターにある「[販売条件](#)」をクリックすると、閲覧または印刷することができます。



## 日本インテグリス合同会社

東京 | TEL (03)5442-9718 FAX (03)5442-9738 〒108-0073 東京都港区三田1-4-28 三田国際ビルディング  
大阪 | TEL (06)6390-0594 FAX (06)6390-3110 〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-1-1 新大阪プライムタワー  
九州 | TEL (092)471-8133 FAX (092)471-8134 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東1-13-9 いちご博多駅東ビル

Entegris®, Entegris Rings Design®, およびその他の製品名は Entegris, Inc. の商標です。詳細は[www.entegris.com](http://www.entegris.com)の[規定/商標](#)をご覧ください。全てのサードパーティの製品名、ロゴ、企業名、商標、登録商標は、それぞれその所有者に帰属します。それらの使用は、商標権所有者との提携、同者による支援、推奨を示すものではありません。

©2018-2021 Entegris, Inc. | All rights reserved. | 7127-10535ENT-0421JPN