

コントラスト変調 SANS によるリポソーム内水相及び外水相界面の PEG 鎖コンフォメーション評価

Evaluation of PEG chain conformation on liposome inner and outer interface
by contrast-variation SANS

東 顕二郎¹⁾、植田 圭祐¹⁾、森部 久仁一¹⁾

Kenjiro HIGASHI, Keisuke UEDA, Kunikazu MORIBE

¹⁾千葉大院薬

(概要) 本研究では、リポソームの内水相及び外水相界面それぞれの PEG 鎖のコンフォメーション解明を目的として、PEG 鎖を内水相及び外水相界面の両方に修飾したリポソーム、及び外水相界面のみに修飾した粒子径約 100 nm リポソームについて SANS 測定を実施した。PEG 鎖の修飾量・位置の違いにより、SAXS プロファイルに変化が認められた。一方、その差はわずかであり、PEG 鎖のコンフォメーションを詳細に評価するには、より詳細な解析 (Core-shell モデルによるフィッティング解析) や重水素化脂質を用いた再測定が必要と考えられた。

キーワード:

SANS、リポソーム、PEG 鎖、ドラッグデリバリーシステム、コンフォメーション

1. 目的

薬物送達システム(DDS)であるリポソームへのポリエチレングリコール(PEG)界面修飾が広く検討されており、抗癌剤を封入した PEG リポソーム製剤として Doxi[®]及び Onyvide[®]がすでに上市に至っている。PEG リポソームでは、血中滞留性が増加するため、腫瘍組織への薬物ターゲティング能が向上する。これら、PEG リポソームの構造評価として、SAXS 及び SANS が汎用されているが、PEG 鎖のコンフォメーションまで議論した報告は数えるのみである。また、それらの報告も内水相と外水相界面の PEG 鎖が同じコンフォメーションを形成すると仮定して解析されたものがほとんどであり、各界面の PEG 鎖コンフォメーションを区別して評価した例は極めて限られる¹⁻³⁾。

近年申請者らは、NMR 法を用いてリポソーム(粒子径約 100 nm)の内水相と外水相界面の PEG 鎖ピークを区別して評価することに成功し、PEG 鎖の運動性及び電子的環境が各界面で異なることを見出した(Fig.1)。これは、内水相界面と外水相界面の脂質膜の曲率の違いにより、各界面の PEG 鎖コンフォメーションが異なるためと推察している。一方、NMR では PEG 鎖のコンフォメーションを評価するのは困難であり、他の手法によるアプローチが必須である。

そこで、本研究では SAXS 及び SANS(コントラスト変調 SANS 測定を含む)により、リポソームの内水相及び外水相界面それぞれの PEG 鎖のコンフォメーションを明らかにする。本研究課題では、PEG 鎖を内水相及び外水相界面の両方に修飾したリポソーム、及び外水相界面のみに修飾したリポソームについて SANS 測定を実施した。

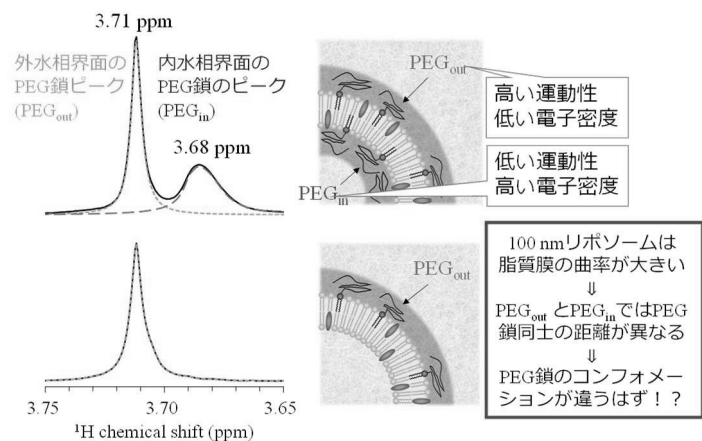


Fig. 1 (上)内水相と外水相界面の両方及び(下)外水相界面のみに PEG 鎖を修飾したリポソームの NMR スペクトルおよび模式図

2. 方法

リポソームの組成には *h*-DSPC(非重水素置換体)/コレステロール/DSPE-PEG2000 = 60:40:0、5、10 (mol %) を用いた。リポソームの粒子径は薄膜水和エクストルージョン法により約 100 nm に制御した。さらに、pre-mixed 法により内水相及び外水相界面の両方に PEG 鎖を修飾したリポソームを、post-insertion 法により外水相界面にのみ PEG 鎖を修飾したリポソームを調製した。各 PEG リポソームを重水で調製したリン酸緩衝液 (*d*-PBS, pH 7.4) に分散した懸濁液を、厚さ 2 mm 溶液試料用石英セルに封入し、37 °C で SANS 測定を行った。カメラ長は 10 m, 4 m, 2 m を用いて、十分な SN 比が得られるまで露光した (露光時間: 1~2 時間)。SANS プロファイルの解析には Igor を用いた。

3. 結果及び考察

Fig. 2 には、調製した 3 種類の各リポソームの SANS プロファイルを示す。PEG 修飾無しのリポソームと比較して、PEG 修飾リポソームでは $q = 0.06 \text{ nm}^{-1}$ 付近のプロファイルに変化が認められた。さらに、PEG 修飾リポソーム同士を比較した場合では、 $q = 0.1 \sim 0.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近に差が認められた。これらの変化は、PEG 鎖の修飾量及び修飾位置の違いを反映していることが示唆された。一方、各リポソーム間で観察された SANS プロファイルの差はわずかであり、本結果のみでは詳細な議論は困難であった。

現在、Core-shell モデル(ρ_1 =内水相、 ρ_2 =内水相 PEG 鎖、 ρ_3 =内水相脂質頭部領域、 ρ_4 =内水相脂質アルキル鎖領域、 ρ_5 =外水相脂質頭部領域、 ρ_6 =外水相 PEG 鎖、 ρ_7 =外水相)を用いたフィッティング解析により、各リポソームの SAXS 及び SANS プロファイルから PEG 水和層の厚みを評価する検討を行っている。また、SANS 測定で PEG 鎖に由来する差を強調するため、重水素置換した脂質を用いたコントラスト変調 SANS 測定を予定している。

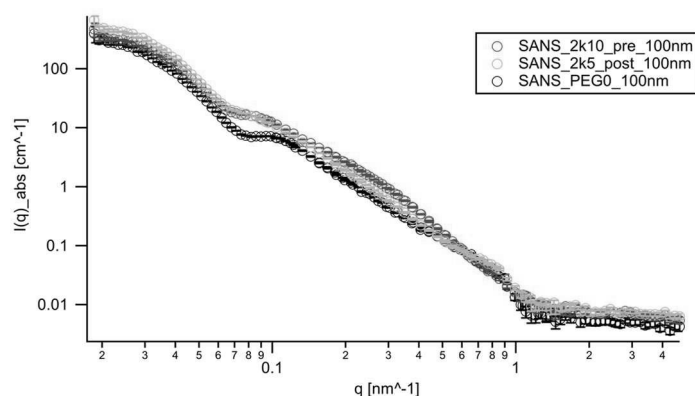


Fig. 2 PEG修飾量・位置が異なる粒子径約100 nm リポソームのSANSプロファイル (37 °C) ; (黒) PEG修飾無しのリポソーム、(黄色) 外水相界面にPEGを5 mol%修飾したリポソーム、(赤) 内水相と外水相界面にPEG 10 mol%を修飾したリポソーム

4. 引用(参照)文献等

- 1) L. Arleth and C. Vermehren *J. Appl. Cryst.*, 2010, 43, 1084-1091
- 2) Z. Varga, A. Wacha, U. Vainio, J. Gummel, A. Bota, *Chem. Phys. Lipid*, 2012, 165, 387-392
- 3) S. Fujii, M. Sakuragi, K. Sakurai, *ACS Symposium Series*, 2017, 1271, Chapter 5