冷却速度による doxorubicin 封入リポソームの形態制御とその形態形成機構

藤本泰輝，植田圭祐，東顕二郎，森部久仁一
千葉大学大学院　薬学研究院

Morphological control of doxorubicin-loaded liposomes by cooling rate and their formation mechanism

Taiki FUJIMOTO, Keisuke UEDA, Kenjirou HIGASHI, Kunikazu MORIBE
Graduate School of Pharmaceutical Science, Chiba University

Abstract

DOX 封入リポソームの脂質組成を変更することなく，冷却速度を変化させることで，その形態を制御できた。徐冷法 (65ºC → 4ºC, 1 ºC/min) では，直線状の DOX 構造体を内封する長球状のリポソームが得られた一方，急速凍結 (65ºC → − 196ºC → 4ºC) では，湾曲した DOX 構造体を内封した球状のリポソームが得られた。*In situ* SAXS 測定及び溶液 ^{1}H NMR 測定の結果，これらの形態の違いは，冷却速度に依存して生じる DOX 構造体の形成と脂質膜の剛性増大の時間的な順序によって決定されることが明らかとなった。

1．はじめに

リポソームは脂質二重膜から構成される球形の小胞であり，drug delivery system (DDS) として広く利用されている。特に，抗がん剤をリポソームに封入することで，腫瘍への選択的な送達性を高めるとともに，正常組織への曝露を抑え，副作用を低減することが可能となる。これまでに，約 10 種類の抗がん剤封入リポソーム製剤が上市され，また多くの非臨床・臨床研究が行われている [1]。一方，その組成や調製法は依然としてトライ & エラーで検討されており，処方設計法の確立は大きなハードルとなっている。

抗がん剤を封入した最初のリポソーム製剤として，doxorubicin (DOX) 封入リポソームである Doxil® が知られており，1995 年に米国食品医薬品局（FDA）によって承認された [2]。現在では，Doxil® の複数のジェネリック製剤が上市されているほか，さらなる機能性の向上を目指した DOX 封入リポソーム製剤の臨床開発も進められている。このように，DOX 封入リポソームは，30 年以上にわたる開発・臨床使用の実績を有し，DDS における，最も代表的なナノ粒子の一つであり続けている。

リポソームへの DOX 封入は，内水相と外水相の pH・イオン勾配を利用したリモートローディング法により実現されている (Fig. 1)。Doxil® においては，内水相に硫酸アンモニウムが用いられている。内水相中のアンモニウムイオン（NH_4^+）の一部はアンモニア（NH_3）とプロトン（H^+）に解離し，膜透過性の高い NH_3 が濃度勾配に従って脂質二重膜を透過して外水相へと移動する。これに伴い内水相にはプロトンが残存するため，内水相と外水相の間に pH 勾配が形成される。一方，外水相中の非イオン型 DOX は脂質二重膜を透過して内水相へ移行し，そこでプロトン化される。このように，NH_3 の流出と DOX の流入が交換的に進行することで，DOX がリポソーム内に封入される。さらに，内水相に移行した DOX は硫酸イオンと難溶性の DOX 硫酸塩を形成する。これにより内水相中の遊離 DOX 濃度が低く維持され，DOX のさらなる流入が促進されるとともに，封入された DOX がリポソーム内部に保持される。その結果，DOX を高い効率でリポソーム内水相に封入することが可能となる。

このように封入された DOX は，リポソーム内水相中で構造体を形成し，リポソームの形態変化を引き起こす。我々はこれまでに，DOX を硫酸アンモニウムによりリポソー

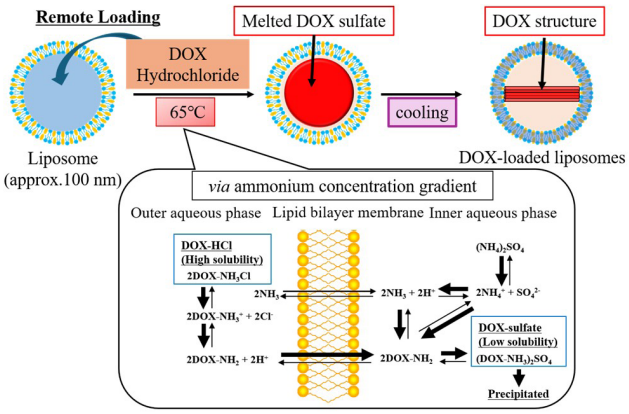


Figure 1　Schematic illustration of the remote loading method.

ムに封入した際に，棒状の DOX 構造体を有する長球状のリポソーム及び湾曲した DOX 構造体を有する扁球状のリポソームの 2 種類の形態が得られることを報告している [3, 4]。リポソームの形態は投与後の体内動態を変化させ，治療効果に影響を及ぼす [5]。そのため，リポソームの形態変化を制御し，なぜその形態が形成されるのかを理解することは重要である。そこで，本研究では，製造工程における冷却速度によって DOX 封入リポソームの形態を制御するとともに，その形態形成機構を明らかにすることを目的とした [6]。

2．DOX 封入リポソームの調製

Hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC)/cholesterol = 3:2 の組成にて，125 mM の硫酸アンモニウム溶液を用いて，薄膜水和エクストルージョン法により粒子径約 100 nm のリポソームを調製した。その後，ゲルろ過により，リポソームの外水相を 270 mM propylene glycol 及び 20 mM HEPES を含む緩衝液 (pH 6.8) に置換し，リポソーム膜を介した硫酸アンモニウム勾配を作製した。DOX は，この硫酸アンモニウム勾配を利用したリモートローディング法によりリポソーム内水相へ封入した。 具体的には，リポソームの総脂質量に対して 10，20，30 mol% となるように DOX 塩酸塩溶液を添加し，65ºC で 30 分間加温した。加温中，DOX はリポソーム内外のイオン勾配を駆動力として内水相へ移行し，内水相中の硫酸イオンと難溶性の塩を形成することでリポソーム内部に保持される。DOX 封入後，65ºC から 4ºC まで 1 ºC/min の速度で冷却する徐冷法，65ºC の試料を液体窒素（− 196ºC）により急速に凍結し，その後 4ºC で融解させる急速凍結法を用いて冷却し，DOX 封入リポソームを調製した。

3．実験結果

3-1．形態観察

調製した各 DOX 封入リポソームの形態を評価する目的で，cryo-TEM 測定を行った（Fig. 2）。徐冷試料では，いずれの試料においても，直線状の DOX 構造体を内封したリポソームが認められた。DOX 封入量が 10 mol% の場合，DOX 封入による形態への影響はほぼ認められず，リポソームは球形を保っていた。DOX 封入量 20 mol% では，DOX 構造体が太くなり，リポソームを変形させることで，形態が長球状へと変化した。DOX 封入量の増大に伴い，DOX 構造体が成長することで膜に加わる力が増大し，脂質膜の変形が可能となった結果，リポソームの形態変化が生じたと考えられた。DOX 封入量 30 mol% においては，さらに DOX 繊維束状構造体が成長し，リポソームはより大きく変形した。

急速凍結試料においては，U 字型及びリング状の DOX 繊維束状構造体を内封したリポソームが観察された。DOX 封入量 10 mol% においては，リポソームは球形を維持していた。DOX 封入量 20 及び 30 mol% においては，リング状の構造体は幅が太くなった一方，リポソームは球

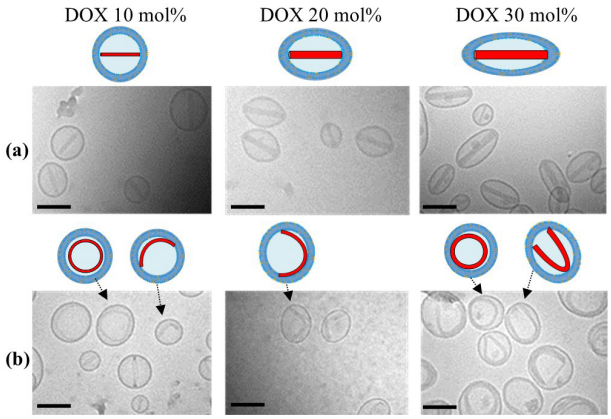


Figure 2 Cryo-TEM images of DOX-loaded liposomes (10–30 mol%) prepared with (a) slow cooling (65ºC to 4ºC at 1 ºC/min) and (b) rapid freezing (65ºC to − 196ºC with liquid nitrogen and re-heated to 4ºC). Each bar represents 100 nm.

形を維持していた。これは，DOX 構造体の末端同士が融合して閉じたリング構造を形成し，リポソーム膜を押し出す力が働いていないことが原因であると考察した。一方，U 字型の DOX 構造体を内封したリポソームでは，DOX 構造体の成長に伴い脂質膜に力が加わることで，扁球状のリポソームへと変形したが，その変形の程度は，徐冷によって調製された長球状のリポソームと比較して大幅に抑制されていた。

3-2．SAXS 測定

各リポソーム (DOX 封入量 30 mol%) について，25ºC で BL-10C において SAXS 測定を行った (Fig. 3)。バルク水中で調製した DOX 硫酸塩沈殿物では，q = 2.3 nm^{-1} に Bragg の回折ピークが観察された。このピークは，DOX 硫酸塩液晶が形成する六方晶格子の (hkl) = (100) 面に由来し，その格子定数は $a = b$ = 3.18 nm，c = 2.02 nm である [2]。徐冷及び急速凍結試料間で q = 2.3 nm^{-1} の回折ピークを比較すると，ピーク強度が徐冷試料と比較して急速凍結試料で

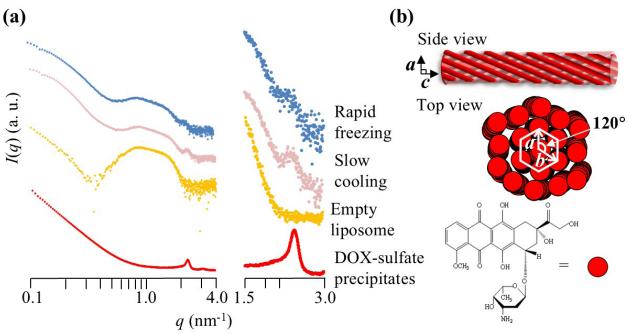


Figure 3 (a) SAXS profiles at 25°C in the full (q = 0.1–4.0 nm^{-1}) and expanded (q = 1.5–3.0 nm^{-1}) region and (b) schematic representation of a DOX-sulfate fiber-bundle with 3D hexagonal lattice: $a = b$ = 3.18 nm and c = 2.02 nm. The scattering parameter q is defined by $4\pi \sin\theta/\lambda$ (2θ, scattering angle; λ, the wavelength of X-rays).

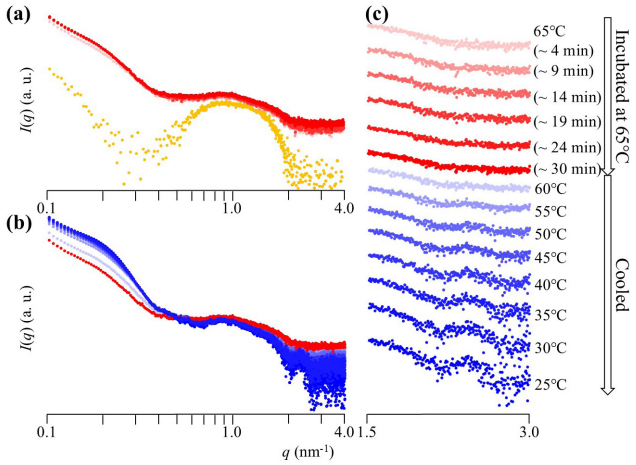


Figure 4 Overlapped *in situ* SAXS profiles (q = 0.1–4.0 nm^{-1}) during (a) incubation at 65°C for 30 min and (b) cooling from 65°C to 25°C at the rate of 1 °C/min. The yellow profile before incubation, which is a mixture of empty liposomes and DOX-HCl solution at 25°C, is also shown in (a). (c) Enlarged view (q = 1.5–3.0 nm^{-1}) of (a) and (b) combined.

顕著に低くなった。このピーク強度の低下は，DOX 構造体が直線状から湾曲状へと変化することで内部の DOX 分子配列が乱れ，DOX 硫酸塩液晶の結晶性が低下したことに起因すると考えられる。もう一つの可能性として，晶癖の違いが挙げられる。リポソーム内の閉鎖空間で形成された湾曲した DOX 構造体は，直線状の DOX 構造体と比較して細長く，六方晶格子における（100）面の数が少ないことも，q = 2.3 nm^{-1} のピーク強度低下に寄与した可能性が考えられた。

また，徐冷過程における直線状の DOX 構造体を内封したリポソームの形成過程を明らかにする目的で，*in situ* SAXS 測定を行った (Fig. 4)。まず，総脂質濃度に対して 30 mol% となるように DOX 塩酸塩溶液をリポソーム溶液と混合し，混合液をキャピラリーに封入した後，25ºC で SAXS 測定を行った。その後，キャピラリーを一度装置から取り外し，ホルダーの温度を 65ºC まで昇温した。65ºC に到達後，キャピラリーを再び SAXS 装置に設置し，4 分間の X 線露光と 1 分間の非露光を 1 サイクルとして，計 6 回繰り返した。続いて，SAXS 装置を 65ºC から 25ºC まで 5ºC 刻みで冷却した。各設定温度に到達後，試料を 3 分間静置して温度を安定化させ，その後 4 分間 X 線を照射して SAXS 測定を行った。加温前の SAXS プロファイルは，DOX 未封入リポソームのプロファイルとほぼ一致した (Fig. 3)。65ºC での加熱中において，q = 0.1–0.4 nm^{-1} および 2.0–4.0 nm^{-1} の領域において散乱強度が急激に増加した。これは，DOX がリポソーム内水相へ急速に封入されたことに起因すると考えられる。一方，Bragg ピークは観察されなかったことから，封入された DOX は融解状態で存在していることが示唆された。その後，1 ºC/min で徐冷したところ，q = 0.1–0.4 nm^{-1} 付近の散乱強度が増加する一方，q = 1.0–4.0 nm^{-1} 付近の散乱強度は減少した。さらに，q = 2.3 nm^{-1} に Bragg ピークが出現した。これらの変化は，DOX 硫酸塩の結晶化に伴う DOX 構造体の形成を反映していると考えられ，これらは 25ºC までさらに冷却することでより顕著となった。特に，65–50ºC の温度範囲で SAXS プロファイルに大きな変化が認められたことから，DOX 構造体の形成は主にこの温度範囲で進行することが示された。

3-3. 溶液 ^{1}H NMR 測定

DOX 構造体及びリポソーム膜における分子状態の変化を評価するため，徐冷法により調製した DOX 封入リポソーム（DOX 封入量 30 mol%）について，加熱・冷却過程における *in situ* 溶液 ^{1}H NMR 測定を行った（Fig. 5a)。まず，DOX 由来ピークの変化について検討した。加熱過程では，60ºC 以下において DOX 由来ピークは観察されなかった。これは，DOX 液晶性構造体中の DOX 分子運動性が低く，ピークが著しく広幅化したことによると考えられる。DOX 由来の NMR ピークは 70ºC で出現し始め，80ºC ではさらに鋭くなったことから，これらの温度域で DOX の分子運動性が増大したことが示された。以上の結果から，リポソーム内水相中における DOX 硫酸塩液晶の融解に伴い，70ºC から 80ºC において DOX ピークが認められたと考えられた。冷却過程では，50ºC で DOX 硫酸塩由来ピークが消失したことから，DOX 硫酸塩が液晶性構造体へ再結晶化したことが示された。特に，冷却過程の 60ºC および 70ºC における DOX 硫酸塩のピーク強度は，同一温度における加熱過程よりも大きくなった。加熱時および冷却時の 60ºC におけるスペクトルを Fig. 5b に示す。これらの結果から，1 ºC/min という徐冷条件においても，一部の DOX 硫酸塩はこれらの温度で再結晶化せず，過冷却液体状態として残存していることが示唆された。

次に，リポソーム膜中の脂質アシル鎖由来ピークの変化を解析した。加熱過程では，0.9 および 1.3 ppm 付近のピーク強度が増加するとともに，明瞭なピークの先鋭化が認められた。この先鋭化は，HSPC の solid-ordered 相 (s_o) から liquid-disordered 相 (l_d) への相転移温度である 53.6ºC に近い，約 50ºC 付近で特に顕著であった [7]。先行研究では，cholesterol-rich 相または liquid-ordered 相 (l_o) 中のアシル鎖は，リン脂質そのものの相転移温度を中心とした広い温度範囲で相転移挙動を示すことが報告されている [8]。したがって，HSPC/cholesterol 膜中のアシル鎖の分子運動性は，加熱に伴い，約 50ºC を中心とした比較的広い温度範囲で増大したと考えられる。冷却過程では，ピーク強度の低下とともにピークの広幅化が認められた。特に，顕著な熱ヒステリシスはほとんど観察されず，加熱過程と冷却過程の同一温度において，脂質アシル鎖由来ピークの形状はほぼ一致していた（Fig. 5b)。このことから，1 ºC/min の徐冷条件では，脂質膜におけるリン脂質の相転移が温度変化に鋭敏に応答して進行し，それに伴ってアシル鎖の分子運動性が速やかに低下することが示唆された。

以上の *in situ* 溶液 ^{1}H NMR 測定の結果から，脂質膜は温度変化に速やかに応答して分子運動性を変化させる一方，

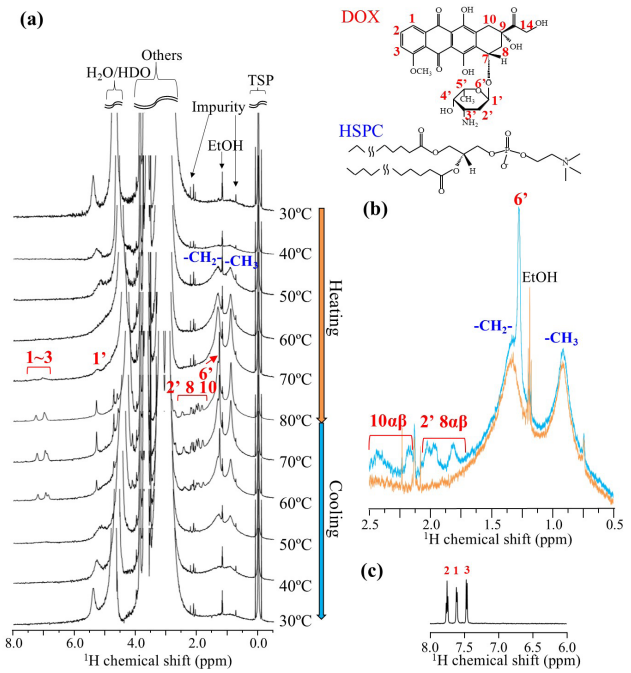


Figure 5 (a) *In situ* ^{1}H NMR spectra during heating and cooling processes of DOX-loaded liposomes (30 mol%) prepared with slow cooling and (b) enlarged spectra of 60°C during (orange) heating and (blue) cooling processes.

DOX 硫酸塩では過冷却に伴う応答の遅れが認められたことから，脂質膜の温度応答性は DOX 硫酸塩よりも高いことが示唆された。

3-4. 形態形成メカニズム

Cryo-TEM，*in situ* SAXS，*in situ* 溶液 ^{1}H NMR 測定の結果に基づき，冷却速度に依存した DOX 封入リポソームの形態形成機構を考察した（Fig. 6）。最終的なリポソーム形態は，DOX 硫酸塩の結晶化に伴う構造体形成と，脂質膜の相転移に伴う膜剛性の増大が生じる時間的順序によって決定されると考えられる。DOX は 65ºC において，硫酸アンモニウムのイオン勾配を利用してリポソーム内水相へ封入され，DOX 硫酸塩を形成する。この時，DOX 硫酸塩の融解温度範囲が 60–80ºC であることから，融解状態で存在すると考えられる。その後の冷却過程において，DOX 硫酸塩は結晶化し，液晶性構造体を形成する。リポソームが存在しないバルク水中では，DOX 硫酸塩はひも状の形態を示すことが報告されており [2]，リポソーム内水相中においても，DOX 構造体はまず長軸方向へ伸長すると予想される。徐冷条件では（Fig. 6a），DOX 硫酸塩の結晶化および剛直な液晶性構造体の形成が主に 65–50 ºC の温度範囲で進行することが示唆されている (Fig. 4)。よって，この構造体形成は，脂質膜が 53.6 ºC 付近の相転移に伴って剛性を増大させるよりも先に起こると考えられる。この場合，DOX 構造体が形成・伸長する際には脂質膜が比較的柔軟な状態にあり，直線状の DOX 構造体の伸長によって膜が押し広げられる。その結果，直線状の DOX 構造体を内封した長球状リポソームが形成されると考察した。一方，

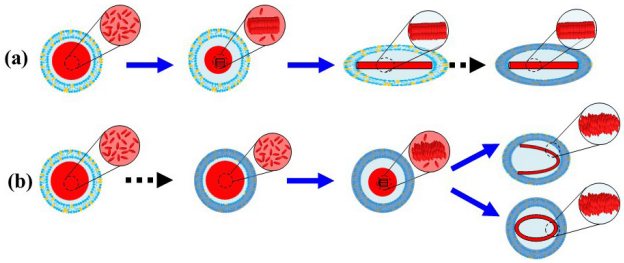


Figure 6 A proposed mechanism of morphological change of DOX-loaded liposome prepared with (a) slow cooling and (b) rapid freezing. The solid blue arrow shows the fiber-bundle formation and elongation via DOX-sulfate crystallization, while the dotted black arrow indicates stiffness increase by phase transition of the lipid membrane.

冷却速度の速い急速凍結条件では（Fig. 6b），DOX 構造体の形成と脂質膜の剛性増大の時間的順序が徐冷条件とは異なる可能性が考えられる。DOX 硫酸塩は徐冷条件においても過冷却状態を形成することから（Fig. 5b），-196ºC においても，DOX 硫酸塩が一時的に過冷却液体状態として存在すると予想される。一方，脂質膜中のアシル鎖の分子運動性は温度変化に速やかに応答することから（Fig. 5b），急速な温度低下に伴って脂質膜の剛性も速やかに増大すると考えられる。この場合，DOX 硫酸塩の結晶化及び構造体形成に先行して脂質膜が剛直化し，DOX 構造体の直線方向への伸長が膜によって制限される。その結果，DOX 構造体はリポソーム内水相中で湾曲しながら成長し，最終的に U 字型及びリング状の DOX 構造体を有する球状リポソームが形成されると考察した。

4．まとめ

本研究では，DOX 封入後の冷却速度を変化させることで，DOX 封入リポソームの形態を制御できることを明らかにした。特に，急速凍結条件では，リング状および U 字状の DOX 構造体を内封し，直線状の DOX 構造体を内封するリポソームと比較して形態変化が大きく抑制されたリポソームを選択的に得ることができた。さらに，冷却過程において，比較的遅い時間スケールで進行する DOX 構造体の形成と，速やかに進行する脂質膜の剛性増大の時間的順序が，DOX 封入リポソームの最終形態を決定することを明らかにした。組成を変更することなくリポソーム形態を制御できる冷却速度の調節は，リポソーム製剤の設計および品質管理に有用な手法となることが期待される。

謝辞

本研究へご支援いただいた皆様へ深く感謝申し上げる。本研究の一部は，JSPS 科研費（課題番号：24K02162）の助成を受けて実施した。また，SAXS 測定は，高エネルギー加速器研究機構（KEK）Photon Factory BL-10C において，共同利用課題（課題番号：2019G532，2021G562，2023G596）のもと実施した。SAXS 測定に際して多大なる

ご支援を賜った Photon Factory のスタッフの皆様に深く感謝申し上げる。

引用文献

[1] M. Biscaia-Caleiras et al., J. Control. Release. **373**, 617 (2024).
[2] X. Li et al., Biochim. Biophys. Acta Biomembr. **1415**, 23 (1998).
[3] N. Takahashi et al., J. Pharm. Sci. **107**, 717 (2018).
[4] T. Tokumoto†, T. Fujimoto† et al. (†: Co-first author), Langmuir, (2026), in press.
[5] P. Wibroe et al., J. Control. Release. **221**, 1 (2016).
[6] K. Nishimura†, T. Fujimoto† et al. (†: Co-first author), Chem. Commun. **61**, 9876 (2025).
[7] H. Kitayama et al., Chem. Pharm. Bull. **62**, 58 (2014)
[8] J. Clarke et al., Biophys. J. **90**, 2383 (2006).

（原稿受付日：2026 年 9 月 7 日）

著者紹介

藤本泰輝　Taiki FUJIMOTO



千葉大学大学院薬学研究院　製剤工学研究室　博士後期課程 2 年
〒 260-8675
千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
e-mail: taifuji8@chiba-u.jp

略歴：千葉大学大学院医学薬学府先端創薬科学専攻　博士後期課程在籍。
最近の研究：薬物封入リポソームの形態・構造・ダイナミクス解析。
趣味：ソフトテニス。釣り。

植田 圭祐　Keisuke UEDA



千葉大学大学院薬学研究院
製剤工学研究室　助教
〒 260-8675
千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
e-mail: keisuke@chiba-u.jp

略歴：2015 年千葉大学大学院医学薬学府博士後期課程修了。同年，千葉大学大学院薬学研究院助教。2019 ～ 2020 年米国 Purdue 大学客員研究員。博士（薬科学）。
最近の研究：NMR や電子顕微鏡を用いた，難水溶性薬物製剤における溶解・過飽和現象ならびに脂質ナノ粒子の形成機構・品質特性の分子レベル解析。

東 顕二郎　Kenjirou HIGASHI



千葉大学大学院薬学研究院
製剤工学研究室　准教授
〒 260-8675
千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
e-mail: ken-h@faculty.chiba-u.jp

略歴：2006 年千葉大学大学院薬学研究院博士課程修了，2007 年千葉大学大学院薬学研究院助教，2014 年同テニュアトラック講師。2018 年同准教授，博士（薬学）。
最近の研究：分子製剤学に基づいた中分子薬物の溶解性改善製剤および薬物封入ナノ粒子製剤の開発と物性評価法の確立。
趣味：サウナ，旅行，読書。

森部久仁一　Kunikazu MORIBE
千葉大学大学院薬学研究院　製剤工学研究室　教授
〒 260-8675　千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
e-mail: moribe@faculty.chiba-u.jp

略歴：2014 年千葉大学教授。薬学博士。
最近の研究：難水溶性薬物の溶解性改善製剤およびナノ粒子製剤の開発と，製剤からの薬物溶出・膜透過機構の分子レベルでの解明。