

ミダゾラムをリポソームまたは細粒化リポソームに封入することによる

バイオアベイラビリティと鎮静効果への影響について

谷村 博史

(平成 28 年 12 月 7 日受付)

緒 言

知的障害者は歯科治療に対する協力が得難く、通常的手段で歯科治療を十分に受けることが困難であることが多いため、鎮静や全身麻酔を併用して歯科治療が行われる場合がある。鎮静や全身麻酔を行う際、薬物の静脈内投与が一般的に行われているが、知的障害者にとって静脈路確保の際の刺入時の痛みも大きなストレスとなる¹⁾。そこで、そのストレスを軽減させるために、知的障害者の鎮静や全身麻酔の前に、前投薬として抗不安薬を投与することが少なくない²⁾。知的障害者に対する前投薬の投与方法としては、投与経路が非侵襲的であることが望ましい。その方法の一つとして、経口投与方法があり、投与薬物として抗不安作用や前向性健忘作用を有するベンゾジアゼピン系薬物のミダゾラムやジアゼパムが選択されることが多い³⁾。ジアゼパムはシロップ剤が市販されているが、年齢によって効果にばらつきがあり、適切な効果が得られるように処方するのが難しいとされている⁴⁾。一方、ミダゾラムは血中濃度と効果が相関しており、年齢によって変化することが少ないため、前投薬として頻用されている^{5,6,7)}。しかし、ミダゾラムには強い苦みがあり、経口投与が困難な場合がある。そこでミダゾラムの苦みをマスキングする方法として、Tomoyasu ら⁸⁾によりリポソームにミダゾラムを封入した経口用ミダゾラム封入リポソームが開発された。

リポソームとは、内側に親水相をもつ脂質二重層で構成された人工の閉鎖小胞で、水溶性、脂溶性を問わず様々な薬物を小胞内に包含することが可能であ

る⁹⁾。また、生体由来成分であるホスファチジルコリンとコレステロールから構成されており⁹⁾、生体適合性や生体内分解能に優れていることなどから Drug Delivery System (DDS) の分野において有用な薬物担体として研究されている^{10,11,12)}。カポジ肉腫 AIDS 患者に対して投与される静脈内投与のリポソーム製剤であるドキシソルビシン封入ステルスリポソーム製剤（米国で DOXIL[®]、ヨーロッパでは CAELYX[®]）などがその例である。

一方、リポソームの経口投与は、これまで抗真菌薬のグリセオフルビン¹³⁾ や糖尿病治療薬のインスリン¹⁴⁾ など経口投与の研究が行われてきた。脂質組成、調整法、バッファーなど、様々な実験条件でコントロールし、研究されてきたが¹⁴⁾、リポソーム封入インスリンの経口投与の研究は個体差が大きかったため実用化されていない。他にも多糖類のイヌリンや卵黄レシチンをリポソームに封入したものを経口投与した研究が行われており^{15,16)}、腸管でのイヌリンの吸収や、腸管でのリポソームの透過性が亢進している像が認められている。これまでの研究¹⁶⁾から、リポソームに薬物を封入し経口投与した場合、単体では吸収されにくい薬物も、リポソームに封入することで腸管においてリポソームとともに吸収が可能と考えられている。

ミダゾラム封入リポソーム溶液を経口投与した場合、ミダゾラム原液を経口投与した場合と比較してバイオアベイラビリティが高いことが報告されており⁸⁾、さらにミダゾラム封入リポソームを細粒化することによってよりバイオアベイラビリティが高くなることが報告されているが¹⁷⁾、それらの鎮静効果につい

では十分検討されていない。また、なぜリポソームまたは細粒化リポソームに封入されたミダゾラムのバイオアベイラビリティが高くなるのか不明である。

そこで、本研究では、ミダゾラム封入リポソーム溶液、細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液、およびミダゾラム原液を経口投与した際のバイオアベイラビリティを調べるとともに、鎮静効果の比較検討を行い、さらに、ミダゾラム封入リポソーム、および細粒化ミダゾラム封入リポソームのバイオアベイラビリティが高くなる機序を解明することを目的とした。

ミダゾラムのバイオアベイラビリティが高くなる機序として、2つの仮説を考えた。第一に、ミダゾラムは肝臓で代謝されるため、リポソームに封入することによって、肝臓での代謝を直接回避することによってバイオアベイラビリティが高くなっている可能性である。これを証明するために、ミダゾラム封入リポソーム溶液を経口投与ではなく静脈内投与した際の血中薬物動態を調べ、ミダゾラム原液と比較することで、肝臓での代謝に影響を及ぼしているかどうかを検討することとした。第二に、リポソームに封入することによって、腸管からの吸収に影響を及ぼしている可能性である。リポソームに封入されたミダゾラムが、リポソームに封入されたまま腸管から吸収された場合、リンパ管を経由して、肝臓を通過せずに血液循環に運ばれるため、ミダゾラムのバイオアベイラビリティは高くなる。吸収されたリポソームの脂質は、リポタンパク質カイロミクロンの材料になることから¹⁸⁾、カイロミクロンに特異的な構造タンパク質であるアポリポプロテイン B-48 (ApoB-48)^{19,20)}の血中濃度の変化を評価することによって、第二の仮説が証明できると考えた。

よって、本研究では、ミダゾラム封入りリポソーム溶液、細粒化ミダゾラム封入りリポソーム溶液、およびミダゾラム原液を試験薬として、これらを経口投与した際のミダゾラム血中濃度および鎮静効果の評価（実験①）、試験薬を静脈内投与した際のミダゾラム血中濃度の評価（実験②）、試験薬を経口投与した際の ApoB-48 の血中濃度変化の評価（実験③）に分けて研究を行い、ミダゾラムをリポソームまたは細粒化リポソームに封入することによるバイオアベイラビリティと鎮静効果への影響を検討すること、さらに、バイオアベイラビリティが高くなる機序を解明することを目的とした。

材料ならびに方法

実験①：ミダゾラム封入りリポソーム溶液、細粒化ミダゾラム封入りリポソーム溶液、およびミダゾラム原液を経口投与した際のミダゾラム血中濃度および鎮静効果の評価

<実験①の材料ならびに方法>

①-1 ミダゾラム封入りリポソーム溶液の作製

保田の方法²¹⁾に準じて、ジパミトイルホスファチジルコリン (DPPC, Sigma, St Louis, USA)、コレステロール (Sigma, St Louis, USA)、ジパミトイルホスファチジン酸 (DPPA, Sigma, St Louis, USA)、ミダゾラム (Wako Pure Chemical Industries, 大阪) をクロロホルムとメタノール混合溶媒 (クロロホルム：メタノール=2：1) で希釈し、DPPC：コレステロール：DPPA=47.6：

47.6 : 4.76 の mol%比で混和し、ミダゾラム溶液を加えた。この混合溶液をエバポレーター（45℃）を用いて溶媒を除去し、脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムを1時間真空ポンプにかけ乾燥させた後、0.1 N 塩酸溶液を加え、ウォーターバス（50℃）の中で振盪させることにより、脂質フィルムからミダゾラム封入リポソームを浮遊させることによってミダゾラム封入リポソームの混濁液を作製した。作製したリポソーム混濁液から 0.5 ml を取り出し、pH7.6 の 0.2 M トリス-塩酸緩衝溶液を 7.5 ml 加え、ミダゾラム封入リポソーム混濁液を遠心分離器（TX-160 TOMY, 東京）を用いて、15000 G、4℃の条件下で 20 分遠心分離した。分離後上清を取り出し、リポソームの沈殿物に 0.2 M トリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）を 8 ml 加え、ミダゾラム封入リポソーム溶液の作製を行った。さらに、動的散乱システム（Zetasizer nano ZSP, Malvern, UK）を用いてミダゾラム封入リポソームの粒子径を測定した。

①-2 細粒化ミダゾラム封入リポソームの作製

ミダゾラム封入リポソームと同様の方法で作製したミダゾラム封入リポソーム抽出溶液を、森²²⁾の方法を参考に、浴槽型の密閉式超音波破碎装置（BioruptorUCD-200TM, コスモバイオ社, 東京）を用いて、浴槽内の水温を 10℃程度の低温に保ち、200 W で 20 KHz の超音波条件下で 20 分間超音波処理を行い、細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液を作製した。細粒化ミダゾラム封入リポソームについても、動的散乱システム（Zetasizer nano ZSP, Malvern, UK）を用いて粒子径を測定した。

①-3 ミダゾラム濃度の測定

ミダゾラム濃度は、高速液体クロマトグラフィ（以下 HPLC）を用いて測定した。HPLC の移動相をアセトニトリル、蒸留水及び 0.25 M リン酸二水素カリウムの混合液とし、流速は 1.0 ml/min とした。カラムは TSK gel ODS-80Ts (Tosoh, 東京) を用いた。ミダゾラムの定量計算には、ジアゼパム (Wako Pure Chemical Industries, 大阪) を内部標準として、ジアゼパムのピーク面積に対するミダゾラムのピーク面積の比を算出する内部標準法を用いた。遠心分離前のミダゾラム封入りポソーム混濁液中の全ミダゾラム量に対する、遠心分離後のミダゾラム封入りポソーム沈殿物中のミダゾラム量の割合からミダゾラム封入率を算出した。細粒化ミダゾラム封入りポソームのミダゾラムの封入率は、超音波処理前に測定した。

①-4 *In vivo* 実験での対象動物

対象として、10~11 週齢、体重 2.08 ± 0.14 kg (1.94-2.20 kg) の雄クリーンニュージールランドホワイトウサギ（日本エスエルシー株式会社，浜松市）を 13 匹使用した。岡山大学動物実験委員会の指針に従い、同委員会の承認 (No. 0KU-2013029) を得て行った。室温は 25°C の飼育室にて固形飼料と水を与えながら 1 週間の予備飼育後、実験した。また実験 3 日前より固形飼料を AIN93M（オリエンタル社）の成分中のセルロースをアルファルファ（繊維質 30.0% 以下）と置換したものに變更し、実験 18 時間前より水のみを与え、絶食させた。

①-5 ウサギに試験薬を経口投与した際の血中濃度および鎮静レベルの評価

ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液を試験薬とした。いずれの試験薬についてもミダゾラムの

投与量が 2 mg/kg となるように、さらに溶液の pH が 7.6 となるように調整し、ミダゾラム原液は生理食塩水で、ミダゾラム封入りポソーム溶液と細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液は生食とトリス-塩酸緩衝溶液で 10 ml に希釈して、投与用は 10 ml に統一した。

試験薬投与前の準備として、ウサギをイソフルラン 2.5%~3.5%で麻酔し、末梢動脈から持続的に採血するために、鼠径部より大腿動脈にカテーテルを挿入した。また試験薬を投与するために、鼻から 14 cm の長さを目安に 6 Fr の胃管チューブを挿入した。最終的な胃管チューブの挿入長さは、送り込んだ空気音を聴診器で聴取して決定した。イソフルラン吸入による麻酔終了後 60 分以上経過してから、ウサギの脚の動きや開眼の状態から判断してウサギが覚醒したことを確認し、胃管チューブから試験薬を 60 秒間かけて経口投与し、その後 2 ml の生食で 10 秒間かけてチューブ内の溶液を後押しした。

試験薬投与前 (0 分)、投与後 5、10、20、30、60、90、120、180、および 240 分に 1.5 ml ずつ大腿動脈より採血した。採血後、1500 G、室温で 10 分間遠心分離を行い、分離した血漿をサンプルとして-30°Cで冷凍保存し、HPLC を用いて血中ミダゾラム濃度を測定した。

さらに、試験薬投与後の鎮静レベルの評価のために、採血時にウサギの両眼の上眼瞼下垂の状態を実験協力者が写真撮影した。写真撮影したものを、撮影日時、投与後からの時間をブラインドでランダムに配置して、後日、研究協力者 7 名が Verrill のサイン²³⁾を参考にした評価方法 (図 1) に従って、評価した。鎮静レベルは 4 段階に分類され、レベル 0 は上眼瞼の下垂が全く見られな

い状態、レベル1は上眼瞼の下垂が少しみられる状態、レベル2は上眼瞼の下垂が眼の半分程度にいたる状態、レベル3は眼のほとんどが隠れる程上眼瞼の下垂がみられる状態とした。レベル0は鎮静が全くみられない状態であり、数字が大きくなる程深い鎮静状態にあるとした。7名の評価点の中央値を、それぞれのウサギの採血時の鎮静レベルとした。

①-6 統計学的分析

統計学的分析には、統計処理ソフト (PRISM®Version4.0c, GraphPad Software, San Diego, USA) を使用し、血中ミダゾラム濃度の比較には Two-way ANOVA と Turkey' s multiple comparisons test を用い、各測定時における鎮静レベルの群間比較には Kruskal-Wallis test を用い、危険率 5%未満 ($P < 0.05$) で有意差ありとした。

実験②：試験薬を静脈内投与した際のミダゾラム血中濃度の測定

<実験②の材料ならびに方法>

ミダゾラム封入リポソーム溶液および細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液の作製は実験①と同様に行った。また、血中ミダゾラム濃度の測定方法も同様に行った。

対象動物も実験①と同様に 10~11 週齢、体重 2.04 ± 0.06 kg (1.98-2.14 kg) の雄クリーンニュージーランドホワイトウサギ (日本エスエルシー株式会社, 浜松市) を 16 匹使用した。試験薬投与前の準備も同様であるが、イソフルラン吸入による麻酔下に、採血用に大腿動脈にカテーテルを挿入した後、試験薬を

投与するために、耳の耳介静脈に薬液投与路を確保した。終了後 60 分以上経過して、ウサギの脚の動きや開眼の状態から判断してウサギが覚醒したことを確認してから、耳介静脈から試験薬（ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、または細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液）を静脈内投与した。いずれもミダゾラムの投与量が 0.2 mg/kg となるように、さらに溶液の pH が 7.6 になるように調整し、ミダゾラム原液は生理食塩水で、ミダゾラム封入りポソーム溶液と細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液は生理食塩水とトリス-塩酸緩衝溶液で 1 ml に希釈して同量投与した。試験薬の急速投与後、0.1 ml の生理食塩水で後押しした。末梢動脈血のサンプルは、試験薬投与後 2、5、10、15、20、25、30、45、60、90、120、および 180 分に 1.5 ml ずつ大腿動脈より採血した。採血後、1500 G、室温で 10 分間遠心分離を行い、分離した血漿をサンプルとして-30℃で冷凍保存し、HPLC を用いて血中ミダゾラム濃度を測定した。血中ミダゾラム濃度の群間比較は実験①と同様に行った。

実験③：ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液を経口投与した際の ApoB-48 の血中濃度の測定

<実験③の材料ならびに方法>

ミダゾラム封入りポソーム溶液および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液の作製は実験①②と同様に行った。対象動物も実験①と同様に 10～11 週齢、体重 2.08 ± 0.15 kg (1.9–2.2 kg) の雄クリーンニュージーランドホワイトウサギ（日本エスエルシー株式会社、浜松市）を 15 匹使用し、試験薬（ミダゾラム原

液、ミダゾラム封入リポソーム溶液、または細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液) は実験①と同様に鼻から挿入した胃管チューブをとおして、60 秒間かけて投与し、その後 2 ml の生食で 10 秒間かけてチューブ内の溶液を生理食塩水で後押しした。投与量は 10 ml に統一した。血液サンプルは、実験①と同様に、あらかじめ挿入しておいた大腿動脈カテーテルから、試験薬投与前 (0 分)、投与後 60、120、および 180 分に 1.5 ml ずつ採取し、1500 G、室温で 10 分間遠心分離をした後、血漿をサンプルとして -35°C で冷凍保存した。

血中の ApoB-48 濃度は、専用の ELISA キット (Rabbit Apo B-48, シバヤギ) を用いて測定した。投与直後、0 分の ApoB48 の血中濃度 100%として、経時的な濃度変化を、0 分に対する%で示した。血中 ApoB48 濃度変化の群間比較は実験①と同様に行った。

結 果

実験①：ミダゾラム封入リポソーム溶液、細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液、およびミダゾラム原液を経口投与した際のミダゾラム血中濃度および鎮静効果の評価

<実験①の結果>

作製したミダゾラム封入リポソームの封入率は $82.0 \pm 7.5\%$ 、粒子径は $1017.0 \sim 2294.0 \text{ nm}$ ($86.9 \sim 100.0\%$)、細粒化ミダゾラム封入リポソームの封入率は $77.7 \pm 7.7\%$ 、粒子径は $125.6 \sim 134.0 \text{ nm}$ ($13.1 \sim 20.0\%$)、 $1084.0 \sim 1208.0 \text{ nm}$

(76.3～80.1%)であった。ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液をそれぞれウサギに経口投与したときの、血中ミダゾラム濃度の経時的变化を図 2 に示す。ミダゾラム封入りポソーム溶液では投与後 20、30、および 60 分においてミダゾラム原液と比較して血中ミダゾラム濃度が有意に高値であった。さらに、細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液では投与後 20、30、60、および 90 分においてミダゾラム原液と比較して血中ミダゾラム濃度が有意に高値であり、ミダゾラムをリポソームまたは細粒化リポソームに封入することによってミダゾラムのバイオアベイラビリティは高くなった。

ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液をそれぞれウサギに経口投与したときの、上眼瞼下垂の中央値の経時的な変化を図 3 に示す。3 群とも投与後 20～60 分に鎮静効果がみられた。全般的な鎮静効果については 3 群間で有意な差はみられなかったが、効果発現時間および効果時間に違いがみられ、細粒化リポソーム投与後に鎮静効果が早く現れる傾向がみられた。

実験②：試験薬を静脈内投与した際のミダゾラム血中濃度の測定

<実験②の結果>

ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液をそれぞれウサギに静脈内投与したときの、血中ミダゾラ

ム濃度の経時的変化を図 4 に示す。それぞれの試験薬投与で血中ミダゾラム濃度に有意な差はみられなかった。

実験③：ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液を経口投与した際の ApoB-48 の血中濃度の測定

<実験③の結果>

ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液をそれぞれウサギに経口投与したときの、血中 ApoB-48 の経時的変化を図 5 に示す。ミダゾラム封入りポソーム溶液およびミダゾラム原液間に有意な差はみられなかった。細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液では 120 および 180 分においてミダゾラム原液と比較して血中 ApoB-48 が有意に高値に維持されていた。

考 察

本研究では、長時間にわたって動脈血を採血する必要があったため、比較的大きな動物が実験対象となる。Tomoyasu ら⁸⁾ はウサギにミダゾラム封入りポソーム溶液を静脈内投与したときの血中時間-薬物濃度曲線は、同量のミダゾラム溶液を静脈内投与した場合と近似しているという報告している。また、ウサギも小腸にチトクロム P450 (CYP) 3A をもつことが知られており、ヒトと同様にミダゾラムが代謝されることが知られている²⁴⁾。よって、過去の研究^{8,17)} と同

様に、実験の対象動物としてウサギを用いることとした。薬物を経口投与する際、ウサギの消化管に滞留物が存在すると、滞留物により薬物吸収に影響を与え、実験結果がばらつく可能性がある。一般的に用いられているウサギの飼料の栄養素中で、最も消化に時間がかかると考えられるのは繊維質であるため、繊維質の量を減量してウサギに与えることとし、ウサギの飼料として通常使用されている AIN93M (オリエンタル社) の成分中のセルロースをアルファルファ (繊維質 30.0%以下) と置換したものを特注し、実験 3 日前よりその飼料を与えることとした。また摂食等の外因性脂質に反応する ApoB-48 の血中濃度をばらつきなく測定するために、Kinoshita ら²⁰⁾ の方法を参考に実験 18 時間前より水のみを与え、絶食にした。その結果、血中濃度の測定値に大きなばらつきはなく安定した結果が得られた。

ミダゾラム原液、ミダゾラム封入りポソーム溶液、細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液を経口投与したところ、Tomoyasu ら^{8,17)} の報告と同様にミダゾラム原液と比較して、ミダゾラム封入りポソーム溶液と細粒化ミダゾラム封入りポソーム溶液のバイオアベイラビリティが高くなった。ミダゾラムは肝臓において、肝ミクロゾームにおける酸化とグルクロン酸抱合を受けることが知られており、肝臓のミクロゾーム酵素である CYP のうち、CYP3A4 で代謝され、主として α -ヒドロキシミダゾラムが生成される。これはミダゾラムの 20-30% の臨床効力を有しているが、クリアランスはミダゾラムよりも大きいため、比較的早く体外に排泄され、代謝物による作用の延長は少ないとされる²⁷⁾。一般に、経口投与時のミダゾラムは肝臓や消化管内での初回通過効果を受けるため、投

与量の 24-50%しか循環系へは到達しないとされる^{18,28)}。ヒトの小腸はミダゾラムの代謝に関与する CYP3A を含む CYP を豊富に持ち、ミダゾラムを最も吸収する部位であるとされる²⁹⁾。ウサギも小腸に CYP3A をもつことが知られており²⁴⁾、ヒトと同様にミダゾラムの代謝が行われていると考えられる。一方、生体に投与されたリポソームは肝臓・脾臓などの細網内皮系より認識・補足され^{30,31)}、最終的に肝臓において崩壊・分解されることが知られている。リポソームが最終的に集積する肝臓において、ヒトにおける主体酵素であるチトクロム P450 (CYP) は体内の脂質、特にリン脂質により活性が影響をうける可能性が報告されていることから、リポソーム由来のリン脂質が肝臓において CYP の代謝活性に影響を及ぼす可能性も指摘されている³²⁻³⁵⁾。しかし、本研究結果では、ミダゾラム封入リポソーム溶液を静脈内投与しても血中濃度の上昇がみられなかったため、リポソームが肝臓での代謝活性に影響を及ぼしたとは考えられない。よって、リポソームが CYP の代謝活性に影響を及ぼしたとすれば、消化管内でのミダゾラム代謝が回避された可能性が考えられた。

血液中の脂質成分は、アポ蛋白と結合したりポ蛋白として血中に存在し、血流を介して脂質を各組織へ運搬する役割を担っている。血漿リポ蛋白はカイロミクロン、VLDL (very low density lipoprotein)、LDL (low density lipoprotein)、HDL (high density lipoprotein) の 4 分画に大きく分けられるが、これらの構造の表面にはアポ蛋白があり、リポ蛋白質の構造の安定化や、リポ蛋白代謝に関連する酵素の活性化、細胞表面にあるリポ蛋白受容体との結合など重要な役割を果たしている¹⁹⁾。小腸からは食事性に吸収された脂肪に由来するカイロミク

ロンが合成される。またアポ蛋白である ApoB-48 も小腸において合成される¹⁹⁾。この ApoB-48 はカイロミクロンに特異的な構造蛋白である¹⁹⁾。従って、ApoB-48 を測定することはカイロミクロンの濃度の指標として有力な手段であり、摂食後の外因性脂質輸送の観察には最適とされる¹⁹⁾。

本研究結果では、細粒化リポソームに封入したミダゾラム溶液を経口投与した際、投与後の血中 ApoB-48 変化はミダゾラム原液の場合と比較して高い傾向にあった。これは経口投与したリポソーム溶液の脂質が腸管から吸収された後、リンパ管を経由して、肝臓を通過せずに血液循環に運ばれたことを示唆している。また、有意差は認められなかったが、細粒化リポソーム投与後に鎮静効果が早く現れたことも、このことを裏付けていると考えられた。よって、リポソームに封入したミダゾラムは、腸管内でリポソームから放出されて吸収されるものと、小さいリポソームに封入されたものは、そのまま腸管から吸収されることが示唆された。

一方、ミダゾラム原液、ミダゾラム封入リポソーム溶液、および細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液の3群間で、全般的な鎮静効果に有意な差がみられなかった点について考察する必要がある。ミダゾラムは、血液脳関門(BBB: blood brain barrier)を通過するミダゾラム量に鎮静効果を向上させるだけの差がなかった可能性が考えられる。一般的に中枢作用薬では、脳内と血液中の遊離型薬物濃度との間に乖離が存在することが知られている²⁵⁾。また BBB は受動拡散において薬物の脂溶性が高いほど、また分子量が小さいほど通過しやすくなることが知られている²⁶⁾。しかし、リポソーム封入された薬物の BBB 通過に関する

る報告はみられないため、実際に脳内ミダゾラム濃度を測定することによって証明することができるのではないかと考えられる。また、ミダゾラムをリポソームに封入することによる、ミダゾラムの遊離型薬物濃度に及ぼす影響、さらにベンゾジアゼピン受容体結合への影響などについても検討する必要があると考えられた。

結 語

リポソームまたは細粒化リポソームに封入したミダゾラムを経口投与することによってミダゾラムのバイオアベイラビリティは高くなったが、これらを静脈内投与しても血中ミダゾラム濃度に有意な上昇がみられなかった。これらのことから、リポソームが肝臓でミダゾラムの代謝に直接影響を及ぼしたとは考えられず、消化管内でのミダゾラム代謝が回避された可能性が考えられた。一方、細粒化リポソームに封入したミダゾラムを経口投与した際、投与後の血中 ApoB-48 変化がミダゾラム原液の場合と比較して高い傾向にあったことから、経口投与されたリポソームのうち小さいものはそのまま腸管内で吸収され、リンパ管を経由して血液循環に運ばれている可能性が示唆された。また、リポソームまたは細粒化リポソームに封入したミダゾラムを経口投与した際の鎮静効果は、ミダゾラム原液と比較して全般的には有意な差はなかったことから、リポソームへの封入がミダゾラムの遊離型薬物濃度または BBB の通過などに影響を及ぼしたためではないかと考えられ、今後検討が必要であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野の宮脇卓也教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の実施に際し、終始懇切なる御指導と御教授を頂きました岡山大学大学院医歯薬総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野の友安弓子先生、森恵先生、産学官連携センターの赤星彰也先生に深く感謝致します。最後に、本研究を行うにあたり、貴重な御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野の諸先生方に深く御礼を申し上げます。

<参考文献>

- 1) 吉岡真由美, 関野仁: SRPを行ったことで行動変容の見られた自閉症スペクトラム患者の14年間の治療経験. 日歯周誌 **52**, 245-254, 2010.
- 2) 城茂治, 佐藤健一: 障害者の麻酔管理; 歯科麻酔学(金子讓監修, 福島和昭, 原田純, 嶋田昌彦, 一戸達也, 丹羽均編). 第7版, 医歯薬出版, 東京, 2011, 461-474 頁.
- 3) 重見研二, 水野省司, 大西佳子, 木村命子: 満足感を追求した麻酔-特に術前のケアマインド-前投薬の工夫-Patient-Controlled Premedication-. 日臨麻会誌 **26**, 48-56, 2006.
- 4) 山下年成, 伊藤寛, 全並秀司, 近藤薫, 江口武史, 成田清, 本田英邦, 堀内格, 津田喬子: 小児外科領域における麻酔前投薬の検討 ジアゼパムシロップとブロマゼパム坐剤を対比して. 日臨外医学会誌 **55**, 1425-1429, 1994.
- 5) Ong, CKS., Seymour, RA. and Tan, JM.-H.: Sedation with midazolam lead to reduced pain after dental surgery. *Anesth. Analg.*, **98**, 1289-1293, 2004.
- 6) Sheta, SA. and Al Sarheed, M.: Oral midazolam premedication for children undergoing general anaesthesia for dental care. *Int. J. Pediatr.*, **10**, 1155-1162, 2009.
- 7) Jöhren, P., Jackowski, J., Gangler, P., Sartory, G. and Thom, A.: Fear reduction in patient with dental treatment phobia. *Br. J. Oral*

- Maxillofac. Surg.*, **38**, 612-616, 2000.
- 8) Tomoyasu, Y., Yasuda, T., Maeda, S., Higuchi, H. and Miyawaki, T. :
Liposome-encapsulated midazolam for oral administration. *J. Liposome Res.*, **21**, 166-172, 2011.
- 9) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三編; リポソームの一般論, リポソーム. 南江堂, 東京, 1988, 5-25 頁.
- 10) 鳥本龍麿, 岩永一範, 宮崎誠, 掛見正郎: リポソーム製剤が併用薬剤の体内動態に及ぼす影響について. 大阪薬科大紀 **5**, 35-47, 2011.
- 11) Cukierman, E. and Khan, DR. : The benefit and challenges associated with the use of drug delivery system in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 762-770, 2010.
- 12) Dass, CR. and Choong, PF. : Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: *in vivo* proof of applicability. *J. Control Release*, **113**, 155-163, 2006.
- 13) Ong, SG., Ming, LC., Lee, KS. and Yuen, KH. : Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin - loaded liposomes: *Pharmaceutics*, **8**, E25, 2016.
- 14) Shenfield, M. and Hill, J. : Infrequent response by diabetic rats to insulin-liposomes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **9**, 355-361, 1982.

- 15) Patel, HM., Tuzel, NS. and Stevenson, RW. : Intracellular digestion of saturated and unsaturated phospholipid liposomes by mucosal cells. Possible mechanism of transport of liposomally entrapped macromolecules across the isolated vascularly perfused rabbit ileum. *Biochem. Biophys. Acta.*, **839**, 40-49, 1985.
- 16) Kimura, T., Higaki, K. and Sezaki, H. : Transmucosal passage of liposomally entrapped drugs in rat small intestine. *Pharm. Res.*, **1**, 221-224, 1984.
- 17) 迎和生: ポリエチレングリコール修飾 (PEG 化) 及び細粒化したミダゾラム封入リポソームのバイオアベイラビリティ及び長期安定性に関する研究. 岡山歯誌 **32**, 1-9, 2013.
- 18) Nordt, SP. and Clark, RF. : Midazolam: a review of therapeutic uses and toxicity. *J. Emerg. Med.*, **15**, 357-365, 1997.
- 19) 山村卓: レムナントリポ蛋白の代謝と臨床的意義. *Prog. Med.*, **26**, 2483-2498, 2006
- 20) Kinoshita, M., Matsushima, T., Mashimo, Y., Kojima, M., Kigure, M. and Teramoto T. : Determination of immuno-reactive rabbit apolipoprotein B-48 in serum by ELISA. *Exp. Anim.*, **59**, 459-467, 2010.
- 21) 保田立二: リポソームの実験法. 病態生理 **10**, 727-735, 1991.
- 22) 森 恵: ミダゾラム封入リポソームをポリエチレングリコール修飾お

よび細粒化する方法に関する検討-粒子径及びミダゾラム封入率に与える影響-. 岡山歯誌 **35**, 1-9, 2016.

- 23) O' Neil, R., Verrill, P.J., Aellig, W.H. and Laurence, D.R. : Intravenous diazepam in minor oral surgery. Further studies. *Br. Dent. J.*, **128**, 15-18, 1970.
- 24) Nakamura, T., Okada, K., Nagata, K. and Yamazoe, Y. : Intestinal cytochrome P450 and response to rifampicin in rabbit. *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 232-239, 2000.
- 25) 楠原洋之: 血液脳関門の分子構造と薬物輸送. *Drug Delivery Syst.*, **27**, 370-380, 2012.
- 26) 大槻純男: 脳関門輸送の分子機構と脳への DDS. *Drug Delivery Syst.*, **21**, 102-110, 2006.
- 27) Reves, J.G., Glass, P.S. and Lubarsky, D.A. : Intravenous anesthetics (Miller, R.D. ed: Miller' s Anesthesia, 7th ed). Churchill Livingstone, NY, 719-768, 2010.
- 28) Sakuda, S., Akabane, T. and Teramura, T. : Marked species differences in the bioavailability of midazolam in cynomolgus monkeys and humans. *Xenobiotica.*, **36**, 331-340, 2006.
- 29) Nishimura, T., Amano, N., Kubo, Y., Ono, M., Kato, Y., Fujita, H., Kimura, Y. and Tsuji, A. : Asymmetric intestinal first-pass metabolism causes minimal oral bioavailability of midazolam in

- cytomolgus monkey. *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1275–1284, 2007.
- 30) Ishida, T., Harashima, H. and Kiwada, H.: Liposome Clearance. *Biosci. Rep.*, **22**, 197–224, 2002.
- 31) Yan, X., Scherphof, GL. and Kamps, JA.: Liposome opsonization. *J. Liposome. Res.*, **15**, 109–139, 2005.
- 32) Kim, KH., Ahn, T. and Yun, CH.: Membrane properties induced by anionic phospholipids and phosphatidylethanolamine are critical for the membrane binding and catalytic activity of human cytochrome P450 3A4. *Biochemistry.*, **42**, 15377–15387, 2003.
- 33) Ahn, T., Guengerich, FP. and Yun, CH.: Membrane insertion of cytochrome P450 1A2 promoted by anionic phospholipids. *Biochemistry.*, **37**, 12860–12866, 1998.
- 34) Imaoka, S., Imai, Y., Shimada, T. and Funae, Y.: Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P450 3A form and mechanism of their activation of catalytic activity. *Biochemistry.*, **31**, 6063–6069, 1992.
- 35) Ingelman-Sundberg, M., Hagbjork, AL., Ueng, YF, Yamazaki, H. and Guengerich, FP.: High rates of substrate hydroxylation by human cytochrome P450 3A4 in reconstituted membranous vesicles: influence of membrane charge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 318–322, 1996.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
機能再生・再建科学専攻
口腔・顎・顔面機能再生制御学講座
歯科麻酔・特別支援歯学分野
(指導：宮脇卓也教授)

図の説明

図1 ウサギの鎮静レベルの評価方法

レベル0：上眼瞼の下垂が全く見られない状態

レベル1：上眼瞼の下垂が少しみられる状態

レベル2：上眼瞼の下垂が眼の半分程度にいたる状態

レベル3：眼のほとんどが隠れる程上眼瞼の下垂がみられる状態

図2 試験薬経口投与後の血中ミダゾラム濃度の推移

Midazolam：ミダゾラム原液

LE-Midazolam：ミダゾラム封入りポソーム

Miniaturized LE-Midazolam：細粒化ミダゾラム封入りポソーム

* $P < 0.05$ (Midazolam vs Miniaturized LE-Midazolam)

** $P < 0.01$ (Midazolam vs Miniaturized LE-Midazolam , Midazolam vs LE-Midazolam)

図3 試験薬経口投与後の鎮静レベルの推移

Midazolam：ミダゾラム原液

LE-Midazolam：ミダゾラム封入りポソーム

Miniaturized LE-Midazolam：細粒化ミダゾラム封入りポソーム

図4 試験薬静脈内投与後の血中ミダゾラム濃度の推移

Midazolam：ミダゾラム原液

LE-Midazolam：ミダゾラム封入りポソーム

Miniaturized LE-Midazolam：細粒化ミダゾラム封入りポソーム

図5 試験薬経口投与後の ApoB-48 の推移

Midazolam：ミダゾラム原液

LE-Midazolam：ミダゾラム封入りポソーム

Miniaturized LE-Midazolam：細粒化ミダゾラム封入りポソーム

* $P < 0.05$ (Midazolam vs Miniaturized LE-Midazolam)