

ミダゾラム封入リポソームの膜組成の違いがリポソームの性質

および経口投与後のミダゾラムの薬物動態に与える影響

西岡 由紀子

Effects of differences in membrane composition of midazolam-  
encapsulated liposomes on liposome properties and pharmacokinetics  
following oral administration of midazolam

Yukiko NISHIOKA

(令和元年 12 月 4 日受付)

## 緒 言

全身麻酔を併用した歯科治療や口腔外科処置は、歯科治療に非協力的な知的障害者や小児において行われることが多いが、術前の不安を軽減することを目的として前投薬が行われることがある<sup>1)</sup>。知的障害者や小児に対する前投薬の投与方法はその目的から非侵襲的であることが望ましく、その一つとして経口投与方法が挙げられる。前投薬の投与薬物としては、主に抗不安作用や前向性健忘作

脚注

用を有するベンゾジアゼピン系薬物が挙げられるが、その中でも経口投与が可能で、作用発現が速やかで短時間で代謝されるミダゾラムが選択されることが多い<sup>1,2)</sup>。しかし、ミダゾラムには特有の強い苦みがあるため、知的障害者や小児にとって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<sup>3)</sup>によって、ミダゾラムをリポソームに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。

リポソームは、脂質二重層から構成される人工の閉鎖小胞で、水溶性、脂溶性の様々な薬物を包含することが可能とされる微粒子である<sup>4)</sup>。主に生体膜由来のリン脂質やコレステロールなどから構成されており、毒性が低く生体適合性や生体内分解能に優れていることから、リポソームは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<sup>4,5)</sup>。抗悪性腫瘍薬であるドキシソルビシンや抗真菌薬であるアムホテリシン B などは静脈内投与用のリポソーム製剤として臨床応用されている一方で、リポソームの経口投与については、糖尿病治療薬のインスリンなどで研究が行われてきたが<sup>6)</sup>、個体差が大きく体内動態の安定化に問題があることから実用化されていない。

リポソームの物理化学的性質を表すものとして、薬物の封入率だけでなく、粒子サイズ(粒子径)や表面電荷(ゼータ電位)なども挙げられる。一般に、生体の毛細血管の直径が $5\mu\text{m}$ 程度であることから、薬物の粒子径が $5\mu\text{m}$ 以下であると血液中を循環するといわれており、さらにリポソームをはじめとする微粒子は $100\text{nm}$ 以下であると高い全身循環能を有すると報告されている<sup>7)</sup>。そのため、よりバイオアベイラビリティを高めるためには粒子径の制御が重要となる。

粒子径の調整には、超音波処理法やエクストルーダー法などが用いられている。また、リポソームの表面電荷は電氣的に中性、カチオン性、およびアニオン性が存在する。中性リポソームは一般的に毒性が低く、血清中で比較的安定であるといわれているが<sup>8)</sup>、カチオン性およびアニオン性リポソームのほうがより効率的に薬理効果を発揮できるという報告もある<sup>9)</sup>。カチオン性リポソームは遺伝子導入試薬として使用されることが多く、マイナスの電荷を帯電している細胞表面と相互作用し、細胞内に受動的に取り込まれることによって細胞内伝達が行われるとされているが<sup>10)</sup>、その特性から細胞毒性があることや細胞膜の破壊が引き起こされやすいことが問題とされている<sup>10,11)</sup>。アニオン性リポソームは中性リポソームと同様に低毒性であり生体に対して安全であるとされるが、貪食細胞に取り込まれやすく速やかに血中から消失してしまうという問題点も存在する<sup>12)</sup>。リポソームの表面電荷は直接測定することができないため、ゼータ電位を用いて評価される。ゼータ電位とは、液中に分散した粒子の表面の外側にあるすべり面における電荷によって発生する電位である。ゼータ電位の大きさは生体内クリアランス、組織分布、細胞内への取り込みに影響を及ぼすとされる重要な特性である<sup>13)</sup>。

以上のように、リポソームの粒子径や表面電荷は封入する薬物の体内動態や細胞相互作用に重要な役割を果たしており、それらはリポソームの膜組成によって大きく異なるとされる<sup>4,14)</sup>。前述の通り、リポソームはリン脂質を基本組成としているが、多くはコレステロールの添加によってリポソーム膜の物理的安定性を高めたり<sup>15)</sup>、表面電荷を操作するために荷電性脂質が添加されることが

ある。荷電性脂質にはさまざまな種類があり、Tomoyasu ら<sup>3)</sup>の開発したミダゾラム封入リポソームにはジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA) が用いられている。他にもリポソームにはジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジラウオイルホスファチジルコリン (DLPC)、ジミストイルホスファチジルコリン (DMPC)、そしてジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) なども使用されており、DOPC は Depicyt® (シタラビン) や DepoDur® (モルヒネ)、DMPC は Abelcet® (アムホテリシン B) や Visudyne® (ベルテモルフィン)、DSPC は DaunoXome® (ダウノルビシン) や Onivyde™ (イリノテカン) などの臨床応用にも用いられている<sup>16)</sup>。DLPC は臨床応用の報告はないが、研究において使用頻度が高い脂質である<sup>17,18)</sup>。

また、生体には細網内皮系 (reticuloendothelial system: RES) と呼ばれる、外来異物に対する生体防御機構が存在する。主に肝臓や脾臓に存在しており、生体内に投与されたリポソームが外来異物として認識されると、RES の貪食細胞に捕捉されてしまい、リポソームの血中安定性や滞留性が低下する。そこで、この RES を回避するために、多くの研究ではリポソーム表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾する方法が用いられている<sup>19)</sup>。PEG はエチレングリコールが重合した構造を持つ高分子化合物であり、リポソーム表面に PEG による立体構造がつくられることによってリポソームが貪食細胞やオプソニンと相互作用することを阻害し、RES を回避することができるとされる。これにより、リポソームの血中滞留性の長時間化が可能であるといわれている<sup>20)</sup>。

これまでに、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<sup>3)</sup>、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<sup>21)</sup>。しかし、異なる脂質材料を用いて作製したミダゾラム封入リポソームを経口投与した場合のバイオアベイラビリティについての比較、検討はされていない。そこで本研究では、異なった荷電性脂質を用いて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を作製し、そのミダゾラム封入率、粒子径およびゼータ電位を比較し、膜組成がミダゾラム封入リポソームの性質に与える影響について評価することを目的とした。さらに、対称的な2種類の荷電性脂質を選択し、経口投与した場合の血中ミダゾラム濃度を評価することで、膜組成がミダゾラムの薬物動態に与える影響についても調べることにした。また、細粒化ミダゾラム封入リポソームにPEGによる表面修飾を行い、PEGがミダゾラムの薬物動態に与える影響についても評価することを目的とした。

## 材料ならびに方法

実験1：脂質組成の異なる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封入率、粒子径およびゼータ電位の評価

1-1. ミダゾラム封入リポソーム溶液の作製

保田<sup>22)</sup> および Tomoyasu ら<sup>3)</sup> の方法に準じて、L- $\alpha$ -ホスファチジルコリン (PCHL, Sigma, St Louis, USA)、コレステロール (Sigma, St Louis, USA) を基本組成とし、5種類の異なる荷電性脂質として、ジパミトイルホスファチジン酸 (DPPA, Sigma, St Louis, USA)、ジオレオイルホスファチジルコリン (ジオレオイルホスホコリン, DOPC, Sigma, St Louis, USA)、ジラウオイルホスファチジルコリン (ジラウオイルホスホコリン, DOPC, Sigma, St Louis, USA)、ジミストイルホスファチジルコリン (ジミリストイルホスホコリン, DMPC, Sigma, St Louis, USA)、およびジステアロイルホスファチジルコリン (ジステアロイルホスホコリン, DSPC, Sigma, St Louis, USA)、封入薬剤としてミダゾラム (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) で希釈した。各種荷電性脂質の構造を図 1 に示す<sup>22)</sup>。PCHL : コレステロール : 荷電性脂質 (DPPA、DOPC、DLPC、DMPC、または DSPC) = 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°C) 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、pH1.0 の 0.1 M 塩酸溶液を 2ml 加え、ウォーターバス (50°C) の中で振盪させ、脂質フィルムからミダゾラム封入りポソームを浮遊させることでミダゾラム封入り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 加え中性溶液とし、DPPA リポソーム、DOPC リポソーム、DLPC リポソーム、DMPC リポソーム、および DSPC リポソームの各種ミダゾラム封入りポソーム溶液を作製した。

第 1 図

## 1-2. ミダゾラムの封入率の測定

ミダゾラム濃度は、過去の報告に準じて<sup>3, 21, 23)</sup>、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。HPLC の移動相をアセトニトリル、蒸留水および 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。

作製した各種ミダゾラム封入リポソーム溶液を遠心分離器 (TX-160 TOMY, 東京) を用いて、15,000 G、4°C 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リポソーム溶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リ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。

## 1-3. 細粒化ミダゾラム封入リポソームの作製

作製した各種ミダゾラム封入リポソーム溶液を、森<sup>23)</sup>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°C 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。

#### 1-4. 粒子径およびゼータ電位の測定

細粒化する前の DPPA リポソーム（従来型 DPPA リポソーム）、DOPC リポソーム（従来型 DOPC リポソーム）、DLPC リポソーム（従来型 DLPC リポソーム）、DMPC リポソーム（従来型 DMPC リポソーム）、および DSPC リポソーム（従来型 DSPC リポソーム）について、動的光散乱システム (Zetasizer nano ZSP, Marvern 社, Marvern, UK) を用いて粒子径およびゼータ電位を測定した。

さらに、細粒化した後の DPPA リポソーム（細粒化 DPPA リポソーム）、DOPC リポソーム（細粒化 DOPC リポソーム）、DLPC リポソーム（細粒化 DLPC リポソーム）、DMPC リポソーム（細粒化 DMPC リポソーム）、および DSPC リポソーム（細粒化 DSPC リポソーム）についても、同様の方法で粒子径およびゼータ電位を測定した。

#### 1-5. 統計学的分析

統計学的分析には、統計処理ソフト (PRISM® Version7.0c, GraphPad Software, San Diego, USA) を使用し、One-way ANOVA および Tukey's multiple comparisons test を用い、有意水準は5%未満とした。

実験 2 : 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を経口投与した場合のミダゾラムの薬物動態の評価

#### 2-1. 対象動物

過去の報告に準じて<sup>3,21)</sup>、*in vivo*実験を行った。

対象として、10～11週齢、体重 $2.21 \pm 0.14$  kg (1.96–2.56 kg) の雄クリーンニュー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22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. OKU-2018069）を得て行った。室温が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。

## 2-2. リポソーム試験溶液の作成

実験1で作製した各種ミダゾラム封入リポソームのうち、実験1の結果からDPPAリポソームおよびDMPCリポソームを試験溶液として選択した。実験1-1と同様に行い、従来型DPPAリポソームおよび従来型DMPCリポソームを作製した。次に、実験1-3に従って、細粒化DPPAリポソームおよび細粒化DMPCリポソームを作製した。

さらに、PEGで修飾した細粒化ミダゾラム封入リポソームはDMPCを用いて、PCHL、コレステロール、およびミダゾラムの混合溶液に、森<sup>23)</sup>の方法を参考にL- $\alpha$ -ホルファチジルエタノールアミンメトキシポリエチレングリコール（DSPE-PEG, Sigma, St Louis, USA）を総脂質mol量の9mol%になるように加えて、実験1と同様の方法でPEGで修飾した細粒化ミダゾラム封入DMPCリポソーム（PEGで修飾した細粒化DMPCリポソーム）を作製した。

## 2-3. 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を経口投与した場合の血中ミダゾラム濃度の評価

試験溶液投与前の準備として、ウサギをイソフルラン 3%の濃度で麻酔し、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。また試験溶液を投与するために、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、ウサギの足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た。いずれの試験溶液についてもミダゾラムの投与量が 2 mg/kg となるように調整し、リポソーム溶液を生理食塩水で 10 ml に希釈して、全体投与量を 10 ml に統一した。胃管チューブから試験溶液を 60 秒間かけて経口投与し、その後 2 ml の生理食塩水で 10 秒間かけてチューブ内の溶液を後押しした。サンプルとして、溶液投与前 (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、1,500 G、室温で 10 分間遠心分離を行い、分離した血漿を $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

血中ミダゾラム濃度は液液抽出法にて測定した。採取した血漿に生理食塩水 0.5ml、0.1M リン酸二カリウム溶液 1ml、内部標準物質 (ジアゼパム  $2\mu\text{g/ml}$ ) 0.1ml、およびジエチルエーテル 5ml を加え、120 回/分の速度で 10 分間振盪後、1,400G で 10 分間遠心分離し、エーテル層を分取した。エーテル層に蒸留水 4ml を加えて同様の条件で 2 度目の振盪および遠心分離を行い、エーテル層を分取

した。エーテルを蒸発乾固させた後、残渣にメタノール：アセトニトリル：0.01Mリン酸二水素カリウム=2：9：9 で混ぜた溶液を 200  $\mu$ l 加えて混和させ、HPLC を用いてミダゾラム濃度を測定した。

#### 2-4. 統計学的分析

統計学的分析には、統計処理ソフト (PRISM® Version7.0c, GraphPad Software, San Diego, USA) を使用し、Two-way ANOVA および Sidak' s multiple comparisons test を用い、有意水準は 5%未満とした。

## 結 果

### <実験 1 の結果>

#### 1-1. 各種ミダゾラム封入リポソームのミダゾラム封入率の比較

ミダゾラム封入リポソームのミダゾラム封入率は、DPPA リポソームが 74.9  $\pm$  4.6%、DOPC リポソームが 88.2  $\pm$  4.2%、DLPC リポソームが 88.1  $\pm$  4.4%、DMPC リポソームが 85.3  $\pm$  4.1%、および DSPC リポソームが 81.4  $\pm$  8.6%であった。DPPA リポソームの封入率は、DOPC リポソームおよび DLPC リポソームと比較して有意に低かった (図 2)。

第 2 図

### 1-2. 各種ミダゾラム封入リポソームおよび細粒化したミダゾラム封入リポソームの粒子径の比較

細粒化前のミダゾラム封入リポソームの粒子径は、従来型 DPPA リポソームが  $2304.2 \pm 48.0$  nm、従来型 DOPC リポソームが  $3002.0 \pm 667.3$  nm、従来型 DLPC リポソームが  $2326.6 \pm 332.7$  nm、従来型 DMPC リポソームが  $2573.2 \pm 262.0$  nm、および従来型 DSPC リポソームが  $2028.8 \pm 439.7$  nm であった。5 群間に有意差はみられなかった (図 3A)。

細粒化後のミダゾラム封入リポソームの粒子径は、細粒化 DPPA リポソームが  $90.4 \pm 3.3$  nm、細粒化 DOPC リポソームが  $141.8 \pm 30.1$  nm、細粒化 DLPC リポソームが  $158.6 \pm 24.1$  nm、細粒化 DMPC リポソームが  $122.5 \pm 25.7$  nm、および細粒化 DSPC リポソームが  $125.2 \pm 12.6$  nm であった。細粒化 DPPA リポソームの粒子径は、細粒化 DOPC リポソームおよび細粒化 DLPC リポソームと比較して有意に小さかった (図 3B)。

第 3 図

### 1-3. 各種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ゼータ電位の比較

細粒化前のミダゾラム封入リポソームのゼータ電位は、従来型 DPPA リポソームが  $-35.5 \pm 2.0$  mV、従来型 DOPC リポソームが  $-14.8 \pm 1.9$  mV、従来型 DLPC リポソームが  $-14.3 \pm 1.7$  mV、従来型 DMPC リポソームが  $-18.9 \pm 2.7$  mV、および従来型 DSPC リポソームが  $-21.0 \pm 3.0$  mV であった。従来型 DPPA リポソームのゼータ電位は、他のリポソームと比較して有意に低かった。また、従来型 DSPC リポ

ソームのゼータ電位は、従来型 DOPC リポソームおよび従来型 DLPC リポソームと比較して有意に低かった (図 4A)。

細粒化後のミダゾラム封入リポソームのゼータ電位は、細粒化 DPPA リポソームが $-40.8 \pm 1.3$  mV、細粒化 DOPC リポソームが $-16.0 \pm 0.6$  mV、細粒化 DLPC リポソームが $-12.2 \pm 0.7$  mV、細粒化 DMPC リポソームが $-13.8 \pm 0.6$  mV、および細粒化 DSPC リポソームが $-16.4 \pm 0.5$  mV であった。細粒化 DPPA リポソームは、他の細粒化リポソームと比較して有意に低かった。また、細粒化 DOPC リポソームおよび細粒化 DSPC リポソームのゼータ電位は、2 群間に有意差はなく、それぞれともに細粒化 DLPC リポソームおよび細粒化 DMPC リポソームと比較して有意に低かった (図 4B)。

第 4 図

#### <実験 2 の結果>

従来型 DPPA リポソームおよび従来型 DMPC リポソーム溶液をそれぞれウサギに経口投与した場合の、血中ミダゾラム濃度の経時的な変化を図 5 に示す。細粒化する前のミダゾラム封入リポソームでは、両群間に有意差はみられなかった。

第 5 図

また、細粒化 DPPA リポソームおよび細粒化 DMPC リポソームをそれぞれウサギに経口投与した場合の、血中ミダゾラム濃度の経時的な変化を図 6 に示す。細粒化 DPPA リポソームと比較して、投与後 10、20、30、および 60 分において細粒化 DMPC リポソームの血中ミダゾラム濃度が有意に高値であった。

第 6 図

さらに、細粒化 DMPC リポソームおよび PEG で修飾した細粒化 DMPC リポソームをそれぞれウサギに経口投与した場合の、血中ミダゾラム濃度の経時的な変化を図 7 に示す。細粒化 DMPC リポソームと比較して、投与後 20 分において PEG で修飾した細粒化 DMPC リポソームの血中ミダゾラム濃度は有意に低値であった。細粒化 DMPC リポソームの血中ミダゾラム濃度は、細粒化 DPPA リポソームと比較して有意に高く示されたが、PEG で修飾することによって、血中ミダゾラム濃度の低下がみられた。

第 7 図

## 考 察

リポソームを構成する脂質は、多くは生体のリン脂質二重層を構成するリン脂質が使用されている。ミダゾラム封入リポソームを作製するにあたり使用した脂質材料は L- $\alpha$ -ホスファチジルコリンを主体とし、膜の物理的安定性を高めるためにコレステロールを添加したものを基本としている。本研究では、そこに荷電状態を変化させるため 5 種類の異なる荷電性脂質を加えることで、膜の性質を変化させることを目的とした。Tomoyasu ら<sup>3)</sup>の開発した、従来のミダゾラム封入リポソームは PCHL、コレステロール、DPPA およびミダゾラムから構成されている。一方、本研究で使用した DOPC、DLPC、DMPC、および DSPC はそれぞれ炭素鎖数の異なるホスファチジルコリンであるが、これらの脂質を用いたミダゾラム封入リポソームの性質についての検討はされていない。そこで、従来の

DPPA リポソームに加えて、DOPC、DLPC、DMPC、および DSPC の 4 種類のホスファチジルコリンを荷電性脂質として使用し、各種リポソームの性質について比較した。リポソーム膜の安定性は、pH や温度などの周囲環境の条件以外にも<sup>24)</sup>、リポソームを構成する脂質の種類や形状、相転移温度などによっても影響される<sup>25,26)</sup>。DPPA リポソームのミダゾラム封入率および細粒化後の粒子径が他のリポソームと比較して最も低く示された要因のひとつとして、リポソームを構成するリン脂質の形状の違いが考えられる。リン脂質は親水基と疎水基の大きさのバランスによってシリンダー型、コーン型、および逆コーン型に分類される。DOPC、DLPC、DMPC、および DSPC はいずれもシリンダー型を示すが、DPPA は親水基が小さいためコーン型を示しており<sup>27)</sup>、異なったリン脂質の形状がミダゾラム封入率および粒子径に影響を与えたのではないかと考えられた。

また、一般的に DPPA はアニオン性の荷電性脂質として知られており、DOPC、DLPC、DMPC、および DSPC は電氣的に中性である。このことから細粒化前後を問わず DPPA リポソームのゼータ電位が有意に低く示されたと考えられる。一方で、DOPC、DLPC、DMPC、および DSPC が中性のリン脂質であるにも関わらず、いずれのリポソームにおいてもゼータ電位は負の値を示した。Makino ら<sup>28)</sup>は、中性リポソームのゼータ電位がゼロにならない理由として、リポソーム膜を構成するリン脂質二重層における親水基の構造変化の可能性を報告している。ホスファチジルコリンの親水基はマイナスの電荷をもつリン酸基とプラスの電荷をもつコリン基のエステル結合からなり、電氣的に中性を保っている。詳細なメカニズムは明らかではないが、各種リン脂質の有する相転移温度に関連してエス

テル結合の方向に変化が生じる可能性があり、その結果リポソーム表面が帯電すると考えられている<sup>28)</sup>。各種脂質の相転移温度は異なっており DSPC>DMPC>DLPC>DOPC であり、以上の理由から、各種リポソームのゼータ電位に違いが生じたと考えられる。

次いで、実験2の動物実験で経口投与するミダゾラム封入りリポソームは、実験1の結果をもとに選択した。まず、ゼータ電位がリポソームの体内動態に影響することから、ゼータ電位に重点を置き、最もゼータ電位が低く示された DPPA リポソームを選択することとした。これまでの報告<sup>21)</sup>から、細粒化することでミダゾラム封入りリポソームのバイオアベイラビリティがより高くなることを踏まえて、比較対象として、細粒化した後のゼータ電位が DPPA リポソームと最も乖離しており、かつ粒子径が DPPA リポソームに近いものとして、DMPC リポソームが適当であると考えた。

本研究の動物実験では、長時間にわたり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対象となること、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ことから<sup>29)</sup>、過去の研究<sup>3,21)</sup>に準じて、実験の対象動物としてウサギを用いることとした。また、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、実験結果にばらつきが生じる可能性がある。一般的に用いられているウサギの飼料の栄養素の中で、繊維質が最も消化に時間がかかると考えられるため、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

繊維質 30.0%以下) と置換したものを特注し、動物実験 3 日前より繊維質の量を減量した飼料を与えることとした。

従来型 DPPA リポソームと従来型 DMPC リポソームを比較して血中ミダゾラム濃度に有意な差はみられなかったが、細粒化することで、細粒化 DPPA リポソームと比較して細粒化 DMPC リポソームは有意に血中ミダゾラム濃度の増加がみられた。一般的には、ゼータ電位の絶対値が増加すれば、その反発力から溶液中の粒子の分散性が安定し、粒子が凝集しにくくなるといわれている<sup>30)</sup>。細粒化 DPPA リポソームのゼータ電位 (平均-40.8mV) は、細粒化 DMPC リポソームのゼータ電位 (平均-13.8mV) と比較して絶対値が大きいため、粒子が凝集しにくくなることが想定され、細粒化 DPPA リポソームのバイオアベイラビリティが高くなることが期待されたが、血中ミダゾラム濃度は低くなるという矛盾した結果となった。

さらに、リポソーム表面を PEG で修飾することで高い血中薬物濃度を長時間維持できると報告されていることから<sup>31,32)</sup>、PEG による修飾によって細粒化 DMPC リポソームのさらなる血中ミダゾラム濃度の増加が期待できるかどうか、その影響についても検討したが、PEG で修飾することで血中ミダゾラム濃度は低下した。

以上のように、予測に反した結果が示された原因検索をするために、細粒化ミダゾラム封入リポソーム溶液をネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM, H-7650, 日立, 東京) を用いて粒子の状態を観察した。図 8 に各種細粒化ミダゾラム封入リポソームの TEM 像、図 9 に粒度分布 (Zetasizer nano ZSP を使用) を

示す。細粒化 DPPA リポソームの粒度分布では約 80nm で分布のピークを示しているが (図 9A)、TEM 像では、さらに小さな粒子が観察された (図 8A)。一方、細粒化 DMPC リポソームは細粒化 DPPA リポソームと比較して粒子が大きく観察され (図 8B)、粒度分布も約 90nm でピークを示しており (図 9B)、100nm 前後の粒子径が多いと考えられた。リポソームを経口投与した場合、リポソームの粒子径が 100nm 程度であると腸管吸収効率が高くなることが報告されており<sup>33,34)</sup>、リポソームの粒子径は小さいものが望ましいとされている。しかし、小さすぎても血管壁に取り込まれやすくなる、薬物の貯蔵能を低下させるなどのデメリットがあるといわれている<sup>35)</sup>。TEM 像で観察された細粒化 DPPA リポソームは粒子径が非常に小さいため吸収効率が低下し、その結果血中ミダゾラム濃度の上昇がみられなかったのではないかと考えられた。以上の考察を踏まえて、本研究の結果からは、経口投与した場合、ゼータ電位の絶対値は必ずしも血中ミダゾラム濃度に有利な影響を与えないことが示唆された。

一方、PEG で修飾した細粒化 DMPC リポソームの粒子は凝集像が観察されており (図 8C)、粒度分布の 2 つのピークがみられた (図 9C)。PEG はリポソームの凝集を防ぐ<sup>36,37)</sup>といわれている一方で、凝集させるという報告もある<sup>38)</sup>。ミダゾラム封入リポソームに対する PEG の修飾は、リポソームの凝集を引き起こしてしまい、特に経口投与の場合においては PEG の有効性が低くなるのではないかと考えられた。

以上の理由から、細粒化 DPPA リポソーム、細粒化 DMPC リポソーム、および PEG で修飾した細粒化 DMPC リポソームの 3 群間に血中ミダゾラム濃度に差がみ

第 8 図

第 9 図

られたと考えられた。リポソームの経口投与に関する報告は少なく、経口投与後の吸収や分布のメカニズムについてはいまだ明らかにされていないため<sup>39)</sup>、今後の課題としてその解明に努めるとともに、DPPA リポソームおよび DMPC リポソーム以外の DOPC リポソーム、DLPC リポソームおよび DSPC リポソーム、さらには他の脂質を用いて、よりバイオアベイラビリティの高いミダゾラム封入リポソームの作製を検討する必要があると考えられる。また、血中ミダゾラム濃度と脳内ミダゾラム濃度は必ずしも相関していないと考えられるため<sup>21)</sup>、今後その鎮静効果の違いについても検討していく必要があると考えられた。

## 結 語

本研究の結果より、ミダゾラム封入リポソームの膜組成の違いが、ミダゾラム封入率、粒子径およびゼータ電位に影響を及ぼすことが示された。さらに、細粒化したミダゾラム封入リポソームを経口投与した場合においても、膜組成の違いが血中ミダゾラム濃度に影響を及ぼすことが示された。今後、経口用ミダゾラム封入リポソームの吸収と分布のメカニズムの解明と、よりさまざまな脂質を用いてバイオアベイラビリティの高いミダゾラム封入リポソームの作製を検討していく必要があると考えられた。

## 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産学官連携センターの小林和子助教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) O' Sullivan, M. and Wong, G.K.: Preinduction techniques to relieve anxiety in children undergoing general anaesthesia. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, **13**, 196-199, 2013.
- 2) 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.
- 3) Tomoyasu, Y., Yasuda, T., Maeda, S., Higuchi, H. and Miyawaki, T.: Liposome-encapsulated midazolam for oral administration. *J. Liposome Res.*, **21**, 166-172, 2011.
- 4) Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. and Nejati-Koshki, K.: Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.*, **8**, 102, 2013.
- 5) Cukierman, E. and Khan, D.R.: The benefit and challenges associated with the use of drug delivery system in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 762-770, 2010.
- 6) Wu, W., Lu, Y. and Qi, J.: Oral delivery of liposomes. *Ther. Deliv.*, **6**, 1239-1241, 2015.
- 7) 山本浩充, 竹内洋文, 川島嘉明: 粒子物性制御による微粒子ドラッグデリバリーシステムの機能設計. *Drug Delivery Syst.*, **17**, 321-329, 2002.

- 8) Angelini, G., Pisani, M., Mobbili, G., Marini, M. and Gasbarri, C.: Neutral liposomes containing crown ether-lipids as potential DNA vectors. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 2506-2512, 2013.
- 9) Nie, Y., Ding, H., Xie, L., Li, L., He, B., Wu, Y. and Gu, Z.: Cholesterol derivatives based charged liposomes for doxorubicin delivery: preparation, *in vitro* and *in vivo* characterization. *Theranostics*, **2**, 1092-1103, 2012.
- 10) 曾宮正晴, 黒田俊一: 非カチオン性リポソームによる核酸医薬送達法の可能性. *Drug Delivery Syst.*, **31**, 35-43, 2016.
- 11) Fröhlich, E.: The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 5577-5591, 2012.
- 12) Honary, S. and Zahir, F.: Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review(part 2). *Trop. J. Pharm. Res.*, **12**, 265-273, 2013.
- 13) 厚生労働省: リポソーム製剤の開発に関するガイドライン.  
[http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine\\_j/20160328\\_liposome\\_0328-19.pdf](http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/20160328_liposome_0328-19.pdf) (2019. 11. 1)
- 14) Honary, S. and Zahir, F.: Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review(part 1). *Trop. J. Pharm. Res.*, **12**, 255-264, 2013.

- 15) 中野浩士: リポソームの物理化学的性質の新規な評価法及び生体組織との相互作用制御に関する研究. 岐阜薬科大学紀要, **58**, 19-28, 2009.
- 16) Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N. and Khan, W.: Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, **9**, E12, 2017.
- 17) Rezler, E.M., Khan, D.R., Lauer-Fields, J., Cudic, M., Baronas-Lowell, D. and Fields, G.B.: Targeted drug delivery utilizing protein-like molecular architecture. *J. Am. Chem. Soc.*, **25**, 4961-4972, 2007.
- 18) Chen, W., Duša, F., Witos, J., Ruukonen, S.K. and Wiedmer, S.K.: Determination of the main phase transition temperature of phospholipids by nanoplasmonic sensing. *Sci. Rep.*, **8**, 14815, 2018.
- 19) Papahadjopoulos, D., Allen, T.M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S.K., Lee, K.D., Woodle, M.C., Lasic, D.D., Redemann, C. and Martin, F.J.: Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutics efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 11460-11464, 1991.
- 20) 湯田勉, 丸山一雄, 岡本亜紀, 石倉千代治, 岩鶴素治: ポリエチレングリコール付与によるリポソームの長時間血中滞留性. *Drug Delivery Syst.*, **6**, 433-436, 1991.

- 21) 谷村博史: 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. 岡山歯誌, **36**, 1-9, 2017.
- 22) 保田立二: リポソームの実験法. 病態生理, **10**, 727-735, 1991.
- 23) 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.
- 24) Roy, B., Guha, P., Bhattarai, R., Nahak, P., Karmakar, G., Chettri, P. and Panda, A.K.: Influence of lipid composition, pH, and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug. *J. Oleo. Sci.*, **65**, 399-411, 2016.
- 25) Karjiban, R.A., Shaari, N.S., Gunasakaran, U.V. and Basri, M.: A coarse-grained molecular dynamics study of DLPC, DMPC, DPPC, and DSPC mixtures in aqueous solution. *J. Chem.*, Article ID: 931051, 2013.
- 26) Monteiro, N., Martins, A., Reis, R.L. and Neves, N.M.: Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R. Soc. Interface*, **11**, 20140459, 2014.
- 27) Kassas, N., Tanguy, E., Thahouly, T., Fouillen, L., Heintz, D., Chasserot-Golaz, S., Bader, M.F., Grant, N.J. and Vitale, N.: Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their

- localization during frustrated phagocytosis. *J. Biol. Chem.*, **292**, 4266-4279, 2017.
- 28) Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H. and Kondo, T.: Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential. *Biophys. Chem.*, **41**, 175-183, 1991.
- 29) 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.
- 30) Sun, D., Kang, S., Liu, C., Lu, Q., Cui, L. and Hu, B.: Effect of zeta potential and particle size on the stability of SiO<sub>2</sub> nanospheres as carrier for ultrasound imaging contrast agents. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **11**, 8520-8529, 2016.
- 31) Kibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P. and Huang, L.: Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS. Lett.*, **268**, 235-237, 1990.
- 32) Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C. and Gregoriadis, G.: Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 77-82, 1991.

- 33)小野寺理沙子, 田原耕平, 竹内洋文: リポソームの粒子設計による経口、経肺および点眼投与 DDS 製剤設計. *Drug. Delivery. Syst.*, **30**, 121-128, 2015.
- 34)竹内洋文: 経口ドラッグキャリアとしてのポリマーコーティングリポソームリポソーム. *Drug. Delivery. Syst.*, **19**, 511-519, 2004.
- 35)Bozzuto, G. and Molinari, A.: Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine*, **10**, 975-999, 2015.
- 36)Yoshioka, H.: Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials*, **12**, 861-864, 1991.
- 37)Bozó, T., Mészáros, T., Mihály, J., Bóta, A., Kellermayer, M.S.Z., Szebeni, J. and Kálmán, B.: Aggregation of PEGylated liposomes driven by hydrophobic forces. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **147**, 467-474, 2016.
- 38)Oginara, T., Takamoto, Y., Kumazawa, H. and Hayashi, H.: The reversible aggregation-disaggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes with and without polyethylene glycol. *Jpn. J. Electroph.*, **40**, 7-11, 1996.
- 39)He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z. and Wu, W.: Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B*, **9**, 36-48, 2019.

## 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 各種荷電性脂質の構造式

DPPA: ジパミトイルホスファチジン酸

DOPC: ジオレオイルホスファチジルコリン

DLPC: ジラウオイルホスファチジルコリン

DMPC: ジミリストイルホスファチジルコリン

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリン

### 図2 各種ミダゾラム封入りポソームのミダゾラム封入率

DPPA: ジパミトイルホスファチジン酸を組成としたリポソーム (n=5)

DOPC: ジオレオイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DLPC: ジラウオイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DMPC: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

統計学的分析は One-way ANOVA および Tukey' s multiple comparisons test を用いて行った。データは平均±標準偏差で表している。

\*P< 0.05 vs. DPPA

### 図3 各種ミダゾラム封入りポソームの粒子径

DPPA: ジパミトイルホスファチジン酸を組成としたリポソーム (n=5)

DOPC: ジオレオイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DLPC: ジラウオイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DMPC: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

A は細粒化する前の各種ミダゾラム封入りポソームの粒子径、B は細粒化した後の各種ミダゾラム封入りポソームの粒子径を示している。

統計学的分析は One-way ANOVA および Tukey' s multiple comparisons test を用いて行った。データは平均±標準偏差で表している。

\*\*P< 0.01, \*P< 0.05 vs. DPPA

#### 図4 各種ミダゾラム封入リポソームのゼータ電位

DPPA: ジパミトイルホスファチジン酸を組成としたリポソーム (n=5)

DOPC: ジオレオイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DLPC: ジラウオイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DMPC: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

DSPC: ジステアロイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (n=5)

Aは細粒化する前の各種ミダゾラム封入リポソームのゼータ電位、Bは細粒化した後の各種ミダゾラム封入リポソームのゼータ電位を示している。

統計学的分析はOne-way ANOVAおよびTukey's multiple comparisons testを用いて行った。データは平均±標準偏差で表している。

\*\*\*\*P<0.0001 vs. DPPA

####P<0.0001, ##P<0.01 vs. DSPC

††††P<0.0001, ††P<0.01 vs. DOPC

#### 図5 細粒化前のミダゾラム封入リポソームを経口投与した場合の血中ミダゾラム濃度の経時的変化

DPPA-liposome: ジパミトイルホスファチジン酸を組成としたリポソーム (黒三角、点線) (n=5)

DMPC-liposome: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成としたリポソーム (黒丸、実線) (n=4)

統計学的分析はTwo-way ANOVAおよびSidak's multiple comparisons testを用いて行った。データは平均±標準偏差で表している。

2群間に有意差はみられなかった。

図6 細粒化後のミダゾラム封入リポソームを経口投与した場合の血中ミダゾラム濃度の経時的変化

m-DPPA-liposome: ジパミトイルホスファチジン酸を組成とし、細粒化したリポソーム (黒三角、点線) (n=5)

m-DMPC-liposome: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、細粒化したリポソーム (黒丸、実線) (n=4)

統計学的分析は Two-way ANOVA および Sidak' s multiple comparisons test を用いて行った。データは平均±標準偏差で表している。

\*\*\*\*P< 0.0001, \*\*\*P<0.001, \*P 0.05

図7 細粒化後のミダゾラム封入リポソームおよびポリエチレングリコール (PEG) で修飾した細粒化後のミダゾラム封入リポソームを経口投与した場合の血中ミダゾラム濃度の経時的変化

m-DMPC-liposome: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、細粒化したリポソーム (黒丸、実線) (n=4)

m-P-DMPC-liposome: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、PEG で修飾し、細粒化したリポソーム (白丸、実線) (n=4)

統計学的分析は Two-way ANOVA および Sidak' s multiple comparisons test を用いて行った。データは平均±標準偏差で表している。

\*P< 0.05

図8 各種細粒化ミダゾラム封入リポソームの透過型電子顕微鏡像

A: ジパミトイルホスファチジン酸を組成とし、細粒化したリポソーム

B: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、細粒化したリポソーム

C: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、PEG で修飾し、細粒化したリポソーム

スケールバーは 1 $\mu$ m を表している。

図9 各種細粒化ミダゾラム封入リポソームの粒度分布

A: ジパミトイルホスファチジン酸を組成とし、細粒化したリポソーム

B: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、細粒化したリポソーム

C: ジミリストイルホスファチジルコリンを組成とし、PEG で修飾し、細粒化したリポソーム

縦軸は散乱強度 (%)、横軸は粒子径 (nm) を示している。