

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17210

研究課題名（和文）障害者歯科への臨床応用を目的とした経口用プロポフォール封入リポソーム製剤の開発

研究課題名（英文）Development of oral liposome-encapsulated propofol for clinical application in special needs dentistry

研究代表者

西岡 由紀子（Nishioka, Yukiko）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：80896530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：障害者歯科診療における麻酔前投薬として、効果発現および代謝の速いプロポフォールを内服できるようにすれば安全な麻酔の確立に繋がると考え、薬物キャリアであるリポソームを用いたプロポフォール封入リポソームの開発を目的とした。プロポフォール封入リポソームを作製し、ウサギに静脈内投与した結果、プロポフォール封入リポソームの生物学的利用能はプロポフォール製剤よりも高かった。一方、細粒化プロポフォール封入リポソームを経口投与した結果、血中プロポフォール濃度は低く、生物学的利用能の改善は得られなかった。プロポフォール封入リポソームの作製方法および投与経路について更なる検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

障害者歯科診療において薬物による行動調整が必要な知的障害者に対して、全身麻酔や鎮静の前投薬としてミダゾラムの経口投与が行われることがあるが、麻酔の覚醒が遅くなることから日帰り麻酔での安全性に問題があった。プロポフォールは効果発現と代謝が速いため調節性が良いが、脂肪製剤を乳化剤としてエマルジョンの形になっており消化管内で分解されないため、内服しても薬理効果が期待できない。そこで、プロポフォールを薬物キャリアであるリポソームに封入することで経口投与を可能にできると考え、プロポフォール封入リポソームの開発は、障害者歯科診療における安全な日帰り麻酔の確立につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop liposome-encapsulated propofol using liposomes, a drug carrier, as a preanesthetic medication for dental treatments under anesthetic management in special needs dentistry, because it is thought that propofol has a rapid onset of effect and metabolism, resulting in safe anesthetic management. Liposome-encapsulated propofol was prepared and administered intravenously to rabbits. The results showed that the bioavailability of liposome-encapsulated propofol was higher than that of propofol. On the other hand, oral administration of fine-grained liposome-encapsulated propofol resulted in lower blood propofol levels and did not improve bioavailability. Further studies are needed on the preparation method and route of administration of liposome-encapsulated propofol.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：麻酔薬 DDS リポソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

障害者歯科診療において麻酔による行動調整が必要な知的障害者に対して、麻酔前投薬として鎮静薬であるミダゾラムを内服させることがある。本申請者の研究室ではミダゾラムの効果を高めるために、リポソームを薬物キャリアとした経口投与用ミダゾラム封入リポソームを開発した。しかし、ミダゾラムは内服させると麻酔からの覚醒が遅くなることがあるため、日帰り麻酔をする場合が多い障害者歯科診療での安全性に問題があった。一方、静脈麻酔薬であるプロポフォールは効果の作用発現が速く、代謝も速いため、このプロポフォールを麻酔前投薬として内服することができれば、麻酔からの速やかな覚醒が期待できると考えた。しかし、プロポフォールは脂溶性であり、脂肪製剤を乳化剤としたエマルションの形になっているため、消化管内で分解されず、内服しても薬理効果が期待できない。そこで、プロポフォールをエマルションではなく、特別な薬物キャリアに封入させることができれば、内服可能にできると考えた。本申請者の研究室で開発したリポソーム作製の技術を用いて、安全な日帰り麻酔の確立のためにプロポフォール封入リポソームを麻酔前投薬として臨床応用可能にすることを目標とした。

2. 研究の目的

本研究では、リン脂質二重層から成るリポソームにプロポフォールを封入した、プロポフォール封入リポソームを開発し、封入率および粒子径を確認しリポソームの性質を評価し、*in vivo* 実験にてプロポフォール封入リポソームをウサギに投与して生物学的利用能を評価することを目的とした。また、新規購入した超音波破碎装置を用いてリポソームを細粒化して粒子径を調整し、細粒化リポソームが生物学的利用能（AUC）に与える影響を評価した。

3. 研究の方法

(1) プロポフォール封入リポソームの作製、封入率および粒子径の測定

L- α -ホスファチジルコリン（Sigma, St Louis, USA）、コレステロール（Sigma, St Louis, USA）、ジミストイルホスホコリン（Sigma, St Louis, USA）、プロポフォール（動物用プロポフォール注 1%, マイラン, 大阪）をクロロホルムとメタノール混合溶液（クロロホルム：メタノール＝2:3）で希釈し、ホスファチジルコリン：コレステロール：ジミストイルホスホコリン：プロポフォール＝1：1：0.1：1のモル比でフッ素加工を施した梨型フラスコ内で混和した。この混合溶液を、エバポレーター（45℃）を用いて溶媒を蒸発させ、脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムを90分間真空ポンプにかけ乾燥させた後、アスコルビン酸・塩酸混合溶液を1mL加え、振盪させることにより、脂質フィルムからリポソームを浮遊させることでプロポフォール封入リポソームを作製した。

プロポフォールの濃度測定には、高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC）を用いた。HPLCの移動相をアセトニトリル、蒸留水および0.25M リン酸二水素カリウムの混合液とし、流速を1.0mL/minとした。分析用カラムにはLiChrospher（100-18(e), 4nmI.D, x 150nm, 5 μ m, Merck K Ca A, Darmstadt, Germany）を使用した。

作製したプロポフォール封入リポソーム溶液を遠心分離器（TX-160 TOMY, 東京）を用いて15,000G, 4℃の条件下で20分間遠心分離した。分離後上清を取り出し、リポソームの沈殿物にアスコルビン酸・塩酸混合溶液（pH4）を加え、プロポフォール封入リポソーム抽出溶液とした。プロポフォールの定量計算には、チモール（ナカライテスク株式会社, 京都）を内部標準物質として、チモールのピーク面積に対するプロポフォールのピーク面積の比を算出する内部標準法を用いた。プロポフォール封入リポソームの封入率は、内部標準法にて算出したプロポフォール濃度を用い、遠心分離前のプロポフォール封入リポソーム溶液中のプロポフォール量に対する、遠心分離後のプロポフォール封入リポソーム抽出溶液中のプロポフォール量の割合から算出した。

作製したプロポフォール封入リポソーム溶液を、サンプル密閉式超音波破碎装置（Bioruptor Type12, BM 機器社, 東京）を用いて、浴槽内の水温を10℃程度の低温に保ち、出力High、破碎時間および冷却時間を30秒間ずつとして15サイクルの条件下で超音波処理を行い、細粒化プロポフォール封入リポソーム溶液を作製した。プロポフォール封入リポソーム溶液および細粒化プロポフォール封入リポソーム溶液について、動的光散乱システム（Zetasizer nano ZSP, Malvern, UK）を用いて粒子径を測定した。また、作製したリポソーム粒子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。

(2) *in vivo* 実験

岡山大学動物実験管理委員会の承認を得て行った。

プロポフォール封入リポソーム溶液を静脈内投与した際の血中薬物動態の評価

対象として、10～11週齢、体重 2.20 ± 0.15 kg（1.9-2.4kg）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8匹使用した。室温25℃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、実験を行った。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。プロポフォール封入リボソーム溶液およびプロポフォール製剤 (動物用プロポフォール注 1%, マイラン, 大阪) を試験薬とし、いずれの試験薬についてもプロポフォールの投与量が 1 mg/kg となるよう調整し、プロポフォール封入リボソームはアスコルビン酸・塩酸混合溶液 (pH4) で、プロポフォール製剤はイントラリボス (イントラリボス輸液 10%, 大塚製薬, 東京) で投与量が 2 mL になるように希釈した。試験薬投与前の準備として、ウサギはイソフルラン 2.5~3.0% 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、試験薬を投与するために耳介静脈に薬剤投与用静脈路を確保した。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ウサギが覚醒したことを確認し、耳介静脈からプロポフォール封入リボソーム溶液またはプロポフォール製剤を投与した。試験薬は 10 秒間かけて投与し、その後 0.5 mL の生理食塩水で静脈路内の溶液を後押しした。試験薬投与後 1、3、5、10、30 および 60 分後に、1.0 mL ずつ大腿動脈より採血した。採血後、1,500G、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 -20 で凍結保存した。

プロポフォール封入リボソーム溶液を経口投与した際の血中薬物動態の評価

対象は先の実験と同条件下に、10~11 週齢、体重 2.22 ± 0.07 kg (2.12-2.34 kg) の雄クリーンニュージランドホワイトウサギを 8 匹使用した。プロポフォール封入リボソーム溶液およびプロポフォール製剤を試験薬とし、いずれの試験薬においてもプロポフォールの投与量が 1 mg/kg となるよう調整し、プロポフォール封入リボソームはアスコルビン酸・塩酸混合溶液 (pH4) で、プロポフォール製剤はイントラリボスで投与量が 10 mL になるように希釈した。試験薬投与前の準備も同様に、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 6Fr 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聞いて決定した。胃管チューブからプロポフォール封入リボソーム溶液またはプロポフォール製剤を投与した。試験薬は 60 秒間かけて投与し、その後 10 秒間かけて 2 mL の生理食塩水でチューブ内の溶液を後押しした。試験薬投与後 1、3、5、10、30 および 60 分後に、1.0 mL ずつ大腿動脈より採血した。採血後、1,500G、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 -20 で凍結保存した。

プロポフォール封入リボソーム溶液および細粒化プロポフォール封入リボソーム溶液を経口投与した際の比較

先の実験と同様に 10~11 週齢、体重 2.22 kg および 2.06 kg の雄クリーンニュージランドホワイトウサギを 2 匹使用した。プロポフォール封入リボソーム溶液および細粒化プロポフォール封入リボソーム溶液を試験薬とし、いずれの試験薬においてもプロポフォールの投与量が 4 mg/kg となるよう調整し、アスコルビン酸・塩酸混合溶液 (pH4) で投与量が 10 mL になるように希釈した。その他の条件は実験 (2) - と同様とした。

HPLC を用いた血中プロポフォール濃度の測定

各血漿サンプル 200 μ L に、ヘプタン 900 μ L を加え、3,000rpm で 10 分間遠心分離し液-液抽出を行った。有機層から 600 μ L 採取し、これに内部標準物質であるチモール 40 μ L、0.1M リン酸二水素カリウム 50 μ L を加え、混和物を 3,000rpm で 10 分間遠心分離した後、HPLC を用いてプロポフォール濃度を測定した。投与後の血中濃度の経時的变化と血中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) を算出した。

(3) データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。統計学的解析には、統計ソフト (GraphPad Prism ver. 4R, San Diego, USA) で、Two-way analysis of variation (ANOVA) post-hoc Sidak's multiple comparisons test または Mann-Whitney test を用い、危険率 5% 未満 ($P < 0.05$) で有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) プロポフォール封入リボソームの封入率および粒子径の評価

作製したプロポフォール封入リボソームの封入率は $32.68 \pm 7.46\%$ (22.59~47.23%) であった (図 1)。細粒化前のプロポフォール封入リボソームの粒子径は 124.9~183.3 nm と 418.7~675 nm の二相性であった (図 2)。透過型電子顕微鏡でもさまざまな大きさのリボソームが観察された (図 3)。

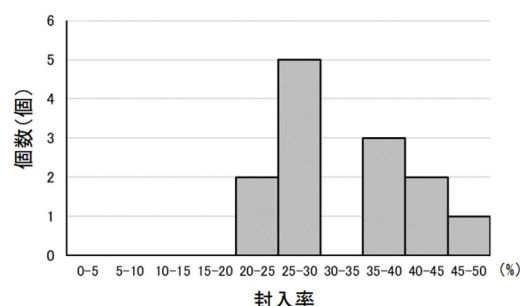


図 1 プロポフォール封入リボソーム溶液におけるプロポフォールのリボソームへの封入率の分布

細粒化プロポフォル封入リボソームの粒子径は 173.4 ~ 222.5nm が 76.7% を占めており、多くが細粒化されていた (図 4)。透過型電子顕微鏡においても細粒化されたリボソームが観察できた (図 5)。

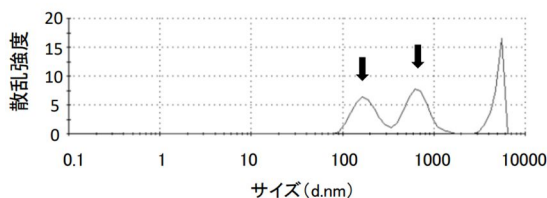


図 2 プロポフォル封入リボソームの粒子径の分布
矢印は二相性のリボソームを示している。

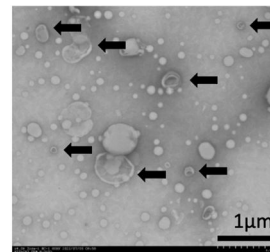


図 3 プロポフォル封入リボソームの電子顕微鏡像
矢印はリボソームを示している。

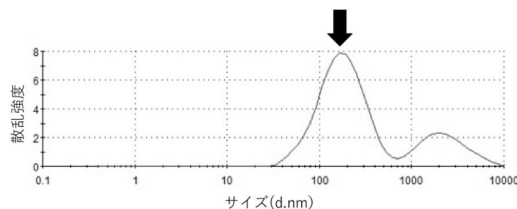


図 4 細粒化プロポフォル封入リボソームの粒子径の分布
矢印のピークが細粒化リボソームを示している。

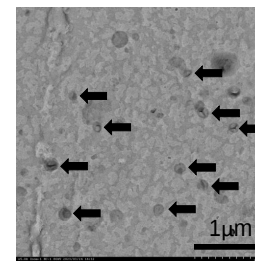


図 5 細粒化プロポフォル封入リボソームの電子顕微鏡像
矢印は細粒化リボソームを示している。

(2) プロポフォル封入リボソーム溶液またはプロポフォル製剤をウサギに 1 mg/kg 静脈内投与した結果、プロポフォル封入リボソーム溶液では、投与後 1 分の時点でプロポフォル製剤と比較して血中プロポフォル濃度が有意に高値であった (図 6)。プロポフォル封入リボソーム溶液およびプロポフォル製剤の AUC は、それぞれ $3406.8 \pm 747.9 \mu\text{g/mL/min}$ 、 $2104.4 \pm 86.9 \mu\text{g/mL/min}$ であり、プロポフォル製剤と比較して、プロポフォル封入リボソームの AUC は有意に高かった (図 7)。

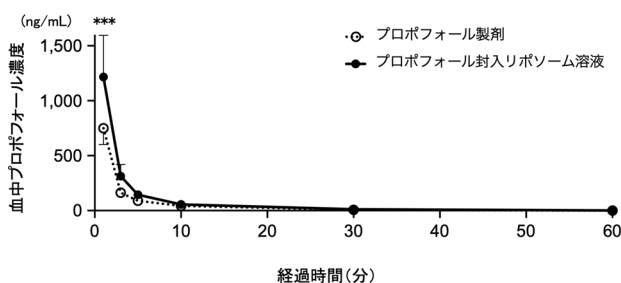


図 6 静脈内投与後の血中プロポフォル濃度の経時的変化の比較
点線と白丸: プロポフォル製剤
実線と黒丸: プロポフォル封入リボソーム溶液
平均値 $\pm$ 標準偏差
*** $P < 0.0001$: プロポフォル製剤との比較

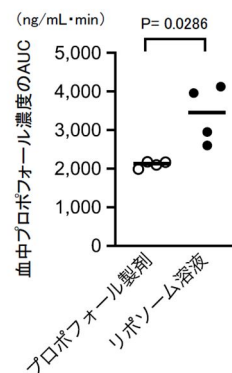


図 7 静脈内投与後の血中プロポフォル濃度-時間曲線下面積 (AUC) の比較
白丸: プロポフォル製剤
黒丸: プロポフォル封入リボソーム溶液
バーは中央値を示している。

(3) プロポフォル封入リボソーム溶液またはプロポフォル製剤をウサギに 1 mg/kg 経口投与した結果、両試験薬ともに、血中プロポフォル濃度は投与後 60 分まで測定検出限界未満であった (図 8)。

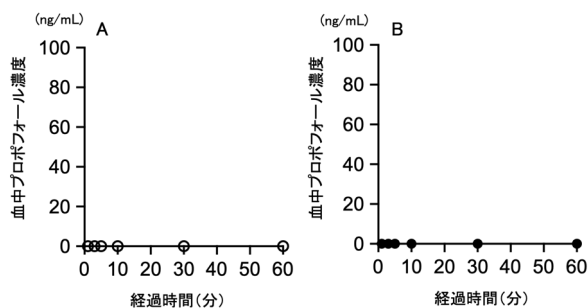


図 8 1mg/kg 経口投与後の血中プロポフォル濃度の経時的変化の比較
A: プロポフォル製剤、B: プロポフォル封入リボソーム溶液

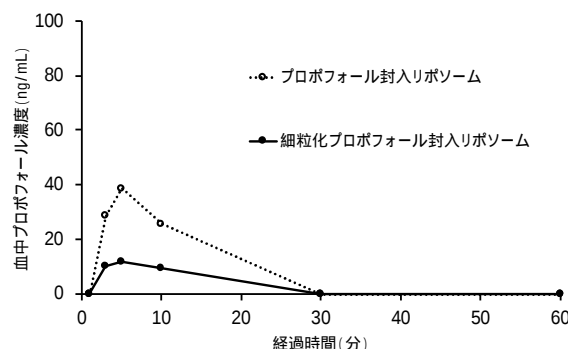


図 9 4mg/kg 経口投与後の血中プロポフォル濃度の経時的変化の比較
点線と白丸: プロポフォル封入リボソーム
実線と黒丸: 細粒化プロポフォル封入リボソーム溶液

(4) プロポフォル封入リボソームまたは細粒化プロポフォル封入リボソームをウサギに 4mg/kg 経口投与した結果、両試験薬ともに血中プロポフォル濃度は測定できたが、プロポフォル封入リボソームと比較して、細粒化プロポフォル封入リボソームの投与後 1, 3, 5 および 10 分時点での血中プロポフォル濃度は低い傾向が示された (図 9)。

(5) 考察

以上の結果より、プロポフォル封入リポソームの作製は可能であることが示された。しかし、プロポフォル封入リポソームの作製にあたり、封入率は 20～50%と決して高くない結果となった。この理由の 1 つとして、プロポフォルは脂溶性が高く、プラスチックだけでなくガラス製の実験器具に吸着しやすいことが挙げられる。そのため、本実験では脂質フィルムを作製するガラス製の梨型フラスコの内面にフッ素加工を施した。また、試薬として使用する際には、過去の報告（文献 1）に従って抗酸化剤であるアスコルビン酸を添加した。しかし、リポソームの組成によって封入率は変化するため、高い封入率を得られる最適ナリポソームの組成をさらに検討していく必要があると考えられた。

また、プロポフォル封入リポソーム溶液を 1 mg/kg 静脈内投与した場合、プロポフォル製剤と比較して血中プロポフォル濃度が 1 分後において有意に高値であったことから、これはプロポフォルをリポソームに封入することで肝臓での代謝を回避した可能性が考えられるが、過去の報告（文献 2）では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と考察されていることも踏まえると、リポソームが肝臓以外での代謝が血中濃度に影響を及ぼした可能性が示唆された。

一方で、プロポフォル封入リポソーム溶液およびプロポフォル製剤を 1 mg/kg 経口投与した場合、両試験薬においても血中プロポフォル濃度は上昇しなかった。これは 1 mg/kg の経口投与ではプロポフォルが比較的少量であったためと考えられた。そこで、4 mg/kg のプロポフォル封入リポソーム溶液を経口投与したところ、血中プロポフォル濃度は測定できた。リポソームは粒子径をサブミクロンサイズに調整することで、腸管粘膜への吸収効率が向上することが報告されている（文献 3）。そこで、プロポフォル封入リポソームを細粒化することで、経口投与時の血中プロポフォル濃度が上昇することを期待し、新規購入した超音波破碎装置を用いて細粒化に成功した。しかし、4 mg/kg の経口投与の結果、細粒化プロポフォル封入リポソームの方が血中プロポフォル濃度が低くなり、細粒化による生物学的利用能の改善は得られなかった。これらの結果より、今後、麻酔前投薬としてのプロポフォル封入リポソームの臨床応用を実現を目標として、プロポフォル封入リポソームの作製方法および投与経路について、更なる検討が必要であると考えられた。

<引用文献>

- Jensen GM, Ashvar CS, Bunte SW, Barzak CD, Bunch TH, Fahrner RL, Hu N, Kennavane J, Pham H, Skenes C, Yang S. A liposomal dispersion formulation of propofol: formulation, pharmacokinetics, stability, and identification of an oxidative degradant. *Theor Chem Account* 119: 291-296, 2008.
- 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.
- 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 System* 30: 121-128, 2015.

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 宇治田仁美、西岡由紀子、中納麻衣、三宅沙紀、樋口 仁、宮脇卓也
2．発表標題 プロポフォール封入リボソームの開発
3．学会等名 第50回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4．発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------