

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792341

研究課題名(和文)改良リポソーム製剤による「苦味薬物」効果的経口投与法の開発

研究課題名(英文)The development of effective oral administration of drugs which are bitter taste by the improved liposome

研究代表者

友安 弓子(Tomoyasu, Yumiko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40594809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で苦味のある抗不安薬ミダゾラム(注射剤)を封入したリポソームを開発したが、1週間しか封入率の安定性が保てず、苦味の消失も完全ではないと考えられる。本研究ではその開発したリポソームの長期保存法の検討および甘味の付与を目的とし研究を実施している。長期保存法として凍結乾燥法の確立を目的に、まずは前段階の研究を開始した。リポソームの凍結乾燥法や安定性の向上が言われているトレハロースやPEGを濃度を変えて添加し検討した結果、10%トレハロース、9%PEGを添加した際に最も高い封入率が得られ、保持率も維持できることを確認した。更に凍結乾燥後の封入率向上のため、細粒化法についても検討した。

研究成果の概要(英文)：We had developed the encapsulation of an i.v. formulation of midazolam which is bitter taste within liposomes and evaluated its pharmacokinetics on rabbits. However the liposome-encapsulated midazolam had a problem that midazolam remained stably encapsulated by liposomes for only 1 week and were not fully satisfactory regarding overcoming the bitter taste. Thus the aim of the present study was to examine the way to remain stably for a long time and added sweetness to the liposome. We start studying first step for the purpose of establishing the way of the freeze-drying as a long time stability. Trehalose and PEG which are reported increasing the stability of liposomes or freeze-drying liposomes were added to the liposome-encapsulated midazolam. As a result, the efficiency of liposomes to encapsulate midazolam containing 10% trehalose or 9% PEG were the highest and stably. Moreover, we studied the size reduction with the aim of increasing the efficiency of liposomes after freeze-drying.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：歯科麻酔学

1. 研究開始当初の背景

苦味、吸収および代謝の問題により経口投与が困難であったり、経口投与用として製剤化されていない薬物がある。

歯科麻酔の分野においても、抗不安薬であるミダゾラム注射薬は、鎮静を目的とした前投薬としてよく用いられている。ミダゾラム注射薬は非常に苦く、小児や知的障害者に経口投与するのは困難である。その苦味を和らげるために、香料やシロップ、砂糖との混合が考案されているが、それらにより嘔吐や誤嚥のリスクが高まり、また完全に苦味が消失しないという欠点がある。

そこで、ミダゾラム注射薬をそのまま経口投与するのではなく、苦味を改善した他の形状の経口用ミダゾラムの開発が必要であると考えた。さらに、鎮静という目的を考慮すると、口腔内では苦味がなく、かつ胃内ですばやく放出し、小腸での吸収を高めるような機能が必要である。それらを満たす機能性と安全性の面より、リポソームを応用できるのではないかと考えた。

リポソームは内側に水相をもつ脂質二重層で構成されており、様々な薬物を封入できる小胞ともちいられている。リポソームは毒性もなく、免疫上の問題もないという優れた特性を持ち、薬物を封入したリポソームは薬物担体としてヒトへの臨床応用もされている。さらに、リポソームに封入することで薬物の作用時間を延長させ、また薬物効果を変える方法も数多く報告されている。

最近では、局所麻酔薬をリポソームに封入することで、長時間安定した麻酔効果をもつ局所麻酔剤の開発にも応用されている。そこで、ミダゾラムをリポソームに封入することで苦味を軽減させ、また口腔内ではリポソームに封入したミダゾラムが放出せず、逆に酸性の胃内で放出し、すばやく小腸で吸収されるような臨床に即した機能を付与することを目的とした新規薬物担体の開発が可能ではないかと考えた。

以上の条件を満たすためには、生理的な pH (pH 7.4 付近) では安定しており、酸性の環境下では封入した薬物を放出する、pH 感受性リポソーム (図 1) を作製する必要がある。

2. 研究の目的

これまでの研究で、苦味のある抗不安薬ミダゾラム (注射製剤) を効率的にリポソームに封入し、酸性環境下で

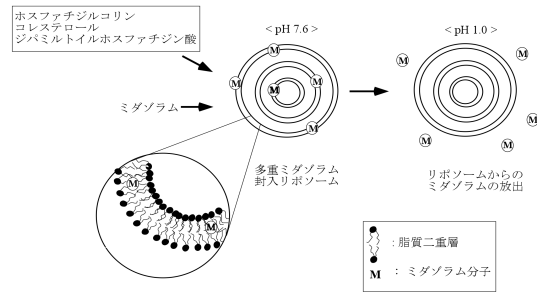


図 1. pH 感受性ミダゾラム封入リポソームの模式図

放出される経口用ミダゾラム封入リポソームを開発し (特許申請中)、その薬物動態についても検討した。(図 2) しかし、開発したミダゾラム封入リポソームは、1 週間しか封入率の安定性が保てないという問

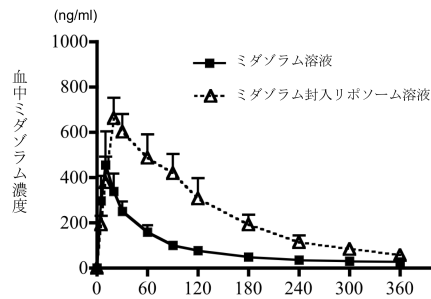


図 2. 血中ミダゾラム濃度の変化

題点があり、苦味の消失も完全ではないと考えられる。本研究では、さらなる臨床応用に向けて、第一にミダゾラム封入リポソームを長期にわたり安定して保存できるような方法について検討する。その方法として、凍結乾燥法が適していると考えられるが、その凍結乾燥法において高率の封入率が維持されるような安定した方法について検討する。

第二に、凍結乾燥後、長期保存したミダゾラム封入リポソームを *in vivo* 実験でウサギに経口投与し、その薬物動態や鎮静度について評価する。

第三に、リポソームに封入することでミダゾラムの苦味をマスキングするだけでなく、リポソーム組成中のリン脂質を糖脂質に変えることにより甘味を付与することを検討する。

本研究で開発したミダゾラム封入リポソームを凍結乾燥することで、長期保存できるようになれば、他の苦味のある薬物への応用も可能になる。また、リポソームの組成に糖脂質を用いて甘味を付与することで、より経口投与が容易になると考えられる。

様々な苦味のある薬物への応用といった社会貢献を視野に入れた改良を目的とする。

### 3. 研究の方法

*In vitro* 実験において、ミダゾラム封入リポソームを凍結乾燥させ、その封入率を測定する。高い封入率を維持でき、かつ長期保存が可能である組成、溶媒、手法について調べる。

凍結乾燥法の確立後、*in vivo* の実験において、凍結乾燥したミダゾラム封入リポソームをウサギに経口投与し、ミダゾラムの血中濃度を測定する。同時に鎮静効果についても調べる。さらに、リポソームの組成である脂質を糖脂質に変えて甘味の付与についても検討する。

具体的には

(1) ミダゾラム封入リポソームの臨床応用のための改良：凍結乾燥法の確立

保田の方法に準じてミダゾラム封入リポソームを作製する。

脂質の組成はホスファチジルコリン、コレステロール、ジパミルトイルホスファチジン酸で、クロロホルムとメタノールの混合溶媒で希釈し、それらに同溶媒で希釈したミダゾラムを加えて混和した溶液を、エバポレーターと真空ポンプを用いて溶媒を除去し、脂質フィルムを作製する。

これまでの研究では脂質フィルムに加える水溶液として 0.1N 塩酸溶液を用いて、それらをウォーターバスの中で超音波破砕し、脂質フィルムからリポソームを浮遊させ、ミダゾラム封入リポソーム懸濁液を作製した。

凍結乾燥により封入薬剤の保持率が低下するが、トレハロースを加えることにより安定性が向上するとの報告より、本研究で前述の脂質フィルムに加える塩酸溶液と、ミダゾラム封入リポソーム懸濁液に加える pH7.6 の 0.2M トリス塩酸緩衝液にトレハロースを加えて、その溶液を凍結乾燥させる。

数週間、1ヶ月、半年保存した後、緩衝液を加えて溶解し、封入率を高速液体クロマトグラフィー (HPLC: high speed liquid chromatography) で測定する。

トレハロースを加えても凍結乾燥後の薬剤封入率が安定しないもしくは高い封入率が得られない場合は、リポソームに polyethylene glycol (PEG) を修飾することでその安定性が向上するため、PEG 化リポソームについて検討する。

上記の方法で長期保存可能な組成、溶媒、手法について調べ、凍結乾燥法を確立する。

(2) *In vivo* 実験での凍結乾燥ミダゾラム封入リポソームの薬理作用確認

凍結乾燥したミダゾラム封入リポソームを *in vivo* の実験でウサギに投与し、大腿動脈から持続的に採血し、ミダゾラムの血中濃度を調べる。動脈血サンプルは液液抽出することにより不純物を取り除く。エーテル層に溶解させた後のようなステップでエーテル層を分取し、最後にエーテルを蒸発乾固させる。

残渣をメタノール、アセトニトリル、リン酸二水素カリウムの溶液に溶かし、HPLC 装置に注入する。移動層の流速は 1.0ml/min、カラムの温度は 40 とし、214nmUV 吸収分光測光器を用いる。

同時に、凍結乾燥したミダゾラム封入リポソームを投与したウサギの鎮静度を評価し、その臨床効果についても確認する。

(3) 甘味の付与

リポソーム作製時のリポソームの組成として、これまでの研究ではリン脂質を用いているが、糖脂質に変えることでリポソーム自体に甘味が付与できるのではないかと考える。

これまで糖脂質で薬剤封入リポソームを作製した研究はなく、甘味の付与に関しても不明であるが、まずは糖脂質に変えることでの封入率や安定性について確認する。

糖脂質にはスフィンゴ糖脂質とグリセロ糖脂質があり、まずは植物に多く含まれるグリセロ糖脂質を用いて作製する。グリセロール骨格にガラクトースやグルコースをもつグリセロ糖脂質を用いることで、甘味の付与が可能ではないかと考えられる。リポソーム組成中のリン脂質を糖脂質に変更しても高い封入率や安定性が得られるか、および長期保存が維持できるかどうかを調べる。

4. 研究成果

平成 23 年度は、ミダゾラム封入リポソームの臨床応用のための改良として凍結乾燥法の確立を目的に研究を開始した。凍結乾燥により封入薬剤の保持率が低下するが、トレハロースを加えることにより安定性が向上するとの報告より、脂質フィルムに加える塩酸溶液と、ミダゾラム封入リポソーム懸濁液に加える緩衝液に濃度の異なるトレハロースを加えて封入率の保持を検討した。まずは懸濁液中の封入率に差が出るか、また最も高い封入率が得られるトレハロースの濃度を検討したところ、トレハロースが 10% で最も高く、92% の封入率が得られた。また 3 週間後の保持率も 86% と軽度低下を認めただけで安定性が得られていた。しか

し、トレハロースを添加して凍結乾燥を行ってもミダゾラムの保持率が低下したままであったため、PEG を修飾することを更に検討した。リポソームの組成中に加える PEG の濃度を変えて検討したところ、PEG を加えると、どの濃度においてもやや封入率が低下するが、PEG 9%で最も高い 80%の封入率が得られ、3 週間後も保持率が維持できた。

平成 24 年度はトレハロースおよび PEG 添加なし、10%トレハロース添加あり、10%トレハロースおよび 9%PEG 添加ありのミダゾラム封入リポソームの凍結乾燥を行い、比較検討した。リポソームへのミダゾラムの封入率は添加なし 20%に比べ、10%トレハロース添加ありでは 27%と増加していたが、10%トレハロースおよび 9%PEG 添加ありでは 12%と低下していた。

平成 25 年度は 10%トレハロース添加したリポソームの長期保存について、3 週間後に加え、6 週間後、3 か月後、6 か月後でもミダゾラム封入率の経過をおった。更に、ミダゾラム封入リポソームを細粒化する方法を確立するための前段階の研究を開始した。従来型を細粒化すると封入されていたミダゾラムが流出してくるため、リポソームの組成を変更したり、細粒化する装置を工夫したり、10%トレハロースや PEG を添加したりなど封入率の維持および向上を検討している。今後は細粒化法を確立し、更には高い封入率を保つ細粒化後のミダゾラム封入リポソームの凍結乾燥を行っていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 友安弓子、迎和生、森恵、樋口仁、前田茂、宮脇卓也、経口用ミダゾラム封入リポソームの長期保存のための改良、第 40 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会、2012.10.6、アクロス福岡(博多)
- (2) 迎和生、友安弓子、樋口仁、前田茂、保田立二、宮脇卓也、経口用ミダゾラム封入リポソームのナノ化及び PEG 化の効果、第 27 回中国・四国歯科麻酔研究会、2012.7.29、岡山大学病院(岡山)
- (3) 迎和生、友安弓子、林知子、前田茂、宮脇卓也、経口用ミダゾラム封入リポソームのナノ化および PEG 化の試み、第 39 回日本歯科麻

酔学会総会・学術集会、2011.10.9、神戸国際会議場(神戸)  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

友安 弓子 (TOMOYASU YUMIKO)、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助教

研究者番号：40594809

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：