

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593055

研究課題名(和文) 経口投与用ミダゾラム封入ステルス型ナノ薬物キャリアの開発

研究課題名(英文) The development of stealth-typed midazolam-encapsulating nano drug carrier for oral administration

研究代表者

宮脇 卓也 (MIYAWAKI, Takuya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00219825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、静注用の薬物を経口投与するための薬物キャリアの開発を目的とした。薬物キャリアとしてリポソームを用い、ポリエチレングリコール(PEG)外包によるステルス効果およびナノレベルまで細粒化することによって、経口投与時の消化管および肝臓での代謝を減らし、薬物の利用効率(バイオアベイラビリティ)を高めることを期待した。薬物として静注用鎮静薬であるミダゾラムを用い、作製したPEG外包ミダゾラム封入ナノリポソームをウサギに経口投与した結果、ミダゾラムのバイオアベイラビリティが高くなっていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We developed a drug carrier for oral administration of intravenous drugs. We produced the pegylated and miniaturized midazolam-encapsulating liposome as a stealth-typed nano drug carrier in order to improve the bioavailability of midazolam. We orally gave them to rabbits and confirmed the effect of the pegylated and miniaturized midazolam-encapsulating liposomes on the bioavailability of midazolam. The results showed that the pegylated and miniaturized midazolam-encapsulating liposomes increased the bioavailability of midazolam orally administrated.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：歯学 薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 新薬の開発と平行して、薬物を生体に効果的に作用させるための薬物キャリアの開発は不可欠である。リポソームは古くから薬物キャリアとして注目されており、生体の細胞膜成分と同様の脂質膜であることから、生体に安全であることが最も優位な点である。さらに、脂溶性薬物のみならず、親水性薬物も封入することができること、リポソーム膜にターゲティングなどの機能を付与することができることなどの利点があり、すでに、静注用医薬品に応用されている。しかし、経口投与用製剤としての開発は進んでいないのが現状である。

(2) 歯科麻酔で多用されている静脈麻酔薬であるミダゾラムは静注用であるが、診療室の現場では、麻酔の導入薬として小児あるいは知的障害者に投与する際には、静注が困難なため経口投与されることが多い。しかし、本薬物は苦みが非常に強いこと、消化管および肝臓での初回通過効果によってバイオアベイラビリティが大きく低下することが欠点である。また、投与量が多くなる傾向にあるため、結果的に作用が遷延するという臨床的な問題点もあり、それらが経口投与の高いハードルになっている。そこで、薬物を甘味飲料水などに均一に混合することができ、それによって不快な味を回避し、さらにバイオアベイラビリティの高めることのできる、薬物封入微小キャリアの作製を模索していた。

(3) 本申請者は、まず、経口投与用薬物キャリアとして、静脈麻酔薬であるミダゾラムを封入した「経口投与用リポソーム製剤」を開発した(引用文献)。これは、薬物が口腔内では放出されず、薬物の苦みをマスクし、消化管で放出される機能を持ち、さらに消化管で効率よく吸収される機能を有している。本研究では、これを改良し、消化管での吸収性をさらに高めるとともに、肝臓での初回通過効果を回避するステルス型薬物キャリアの開発を展開することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、すでに開発している経口投与用ミダゾラム封入リポソームに、消化管での吸収をさらに高める効果と肝臓での初回通過効果を回避する効果(ステルス効果)を付与することである。そのために、本研究ではリポソームをポリエチレングリコール(PEG)で外包することでステルス効果を付与し、さらにリポソーム粒径をナノレベルまで細粒化することによって、消化管での吸収を高めることを目標とした。作製したPEG外包ミダゾラム封入ナノリポソーム溶液を動物(ウサギなど)に投与し、バイオアベイラビリティを評価すること計画した。

## 3. 研究の方法

(1) PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームの作製

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、ミダゾラム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、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、ミダゾラムをモル比 1:1:0.1:0.5 で混和し、この溶液に PEG を総脂質 mol 量の 9mol% になるように加え、エバポレーター(45 )を用いて蒸発させ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、0.1N 塩酸溶液 2ml を加え、ウォーターバス(60 )の中で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によって PEG 外包ミダゾラム封入リポソームを作製した。作製された PEG 外包ミダゾラム封入リポソームを、超音波破砕装置を用いて、超音波振動処理を施すことによって、リポソームをナノ化した。

作製された PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームを、動的光散乱式粒度分布計を用いて粒径の分布を調べ、リポソーム粒径を確認した。また、位相差顕微鏡でリポソームのナノ化の状態を観察した。

次に、超音波振動処理したミダゾラム封入ナノリポソームを抽出するために、カラムを用いてゲルろ過を行い、ろ過された試料を順次収集して、HPLC でミダゾラム濃度を測定し、ミダゾラムの封入率を算出した。また、ミダゾラムの封入率が少なくとも1週間保たれていることを確認した。

(2) PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームの経口投与時のバイオアベイラビリティを評価

ウサギを吸入麻酔薬イソフルラン(2.5%~4.0%)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 14cm 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、聴診器で送りこんだ空気を聞いて決定した。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、胃管チューブからミダゾラム溶液(対照薬) PEG 外包もナノ化もしていない従来型のミダゾラム封入リポソーム、または PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームのいずれかを投与した。いずれもミダゾラムの投与量が 2mg/kg となるように、10ml に希釈して同量投与した。試験溶液は 60 秒間かけて胃管チューブより投与し、その後 2ml 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。

末梢動脈血のサンプルは、溶液投与前、投与後 5、10、20、30、60、90、120、180、240、300、および 360 分後に 1.0ml ずつ大腿動脈

より採血し、血中ミダゾラム濃度は高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて測定した。

作製したPEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソーム溶液の経口投与後の血中ミダゾラム濃度の推移と、ミダゾラム溶液の経口投与後の血中ミダゾラム濃度の推移とを比較し、経口投与時のミダゾラムのバイオアベイラビリティを評価した。

### (3) PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームのステルス効果についての評価

経口投与時と同様にウサギを麻酔し、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。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、耳介静脈からミダゾラム溶液(対照薬)またはPEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームのいずれかを投与した。いずれもミダゾラムの投与量が 0.2mg/kg となるように 1ml に希釈して同量投与した。

末梢動脈血のサンプルは、溶液投与前、投与後 2、5、10、15、20、25、30、45、60、90、および 180 分後に 1.0ml ずつ大腿動脈より採血し、血中ミダゾラム濃度は HPLC を用いて測定した。

作製したPEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームの静脈内投与後の血中ミダゾラム濃度の推移と、対照薬の静脈内投与後の血中ミダゾラム濃度の推移とを比較し、肝臓でのステルス効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームの作製

ナノ化前のPEG 外包ミダゾラム封入リポソームを、動的光散乱式粒度分布計を用いて粒径の分布を調べたところ、リポソーム粒径は 500~3000nm であった。超音波振動処置後は、超音波振動処置の強さ、時間、温度などの条件によってナノ化の状態に違いがみられたが、25%のリポソームが 100nm 以下の粒径レベルに達し、50%のリポソームが 200nm 以下の粒径レベル、90%のリポソームが 500nm 以下の粒径レベルにまでナノ化することができた。また、位相差顕微鏡でリポソームのナノ化の状態を観察した(図1)。さらに、ナノ化したPEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームのミダゾラムの封入率は 25%以上であり、その封入率が1週間以上保たれていることを確認した。

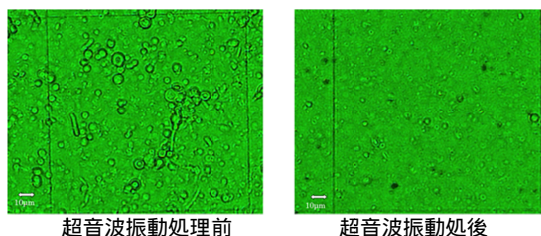


図1 位相差顕微鏡によるリポソームのナノ化の状態

### (2) PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームの経口投与時のバイオアベイラビリティを評価

ミダゾラム溶液(対照薬)、PEG 外包もナノ化もしていない従来型のミダゾラム封入リポソーム、またはPEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームを経口投与した際の血中ミダゾラム濃度の推移は、すべての溶液で投与後 10 分後にピークとなり、それぞれ 286.6ng/mL、348.0ng/mL、498.6ng/mL であり、ミダゾラム溶液(対照薬)およびPEG 外包もナノ化もしていない従来型のミダゾラム封入リポソームと比較して、PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソーム投与後の血中ミダゾラム濃度は有意に高かった(図2)。また、投与後 360 分までの血中濃度曲線下面積(AUC)においても、PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームが有意に高かった(図3)。以上の結果から、ミダゾラムをPEG 外包ナノリポソームにすることで、ミダゾラムのバイオアベイラビリティが高まることが示された。

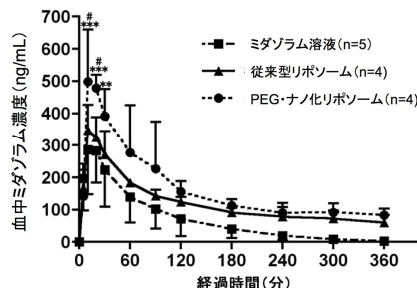


図2 経口投与後の血中ミダゾラム濃度の推移

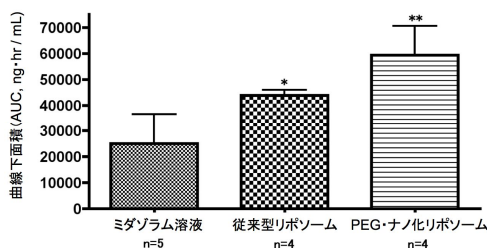


図3 血中ミダゾラム濃度 - 時間曲線下面積(AUC)

### (3) PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームのステルス効果についての評価

ミダゾラム溶液(対照薬)またはPEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームを静脈内投与した際の血中ミダゾラム濃度の推移は、投与後 2 分後では、対照薬と比較して、PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソーム投与後の血中濃度がやや高い値を示したが、投与 5 分後以降の血中濃度は有意な差は認められなかった(図4)。これらの結果から、ミダゾラムをPEG 外包およびナノ化することによって、肝臓での代謝を回避するステルス効果が付与されていたとしても有意なものではないことが示唆された。よって、PEG 外包ミダゾラム封入ナノリポソームの経口投与によ

ってバイオアベイラビリティが高くなるのは、消化管でのミダゾラムの代謝の抑制および消化管からの吸収率の増加によるものではないかと示唆された。

友安 弓子 (TOMOYASU, Yumiko)  
森 恵 (MORI, Megumi)

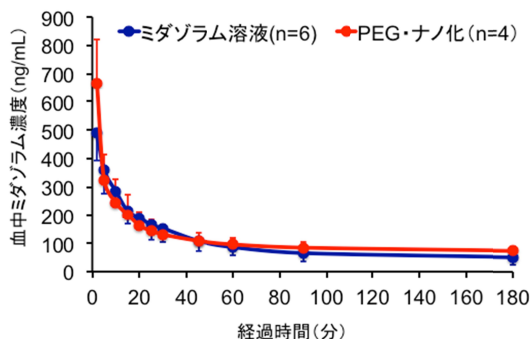


図4 静脈内投与後の血中ミダゾラム濃度の推移

#### <引用文献>

Tomoyasu Y, Yasuda T, Maeda S, Higuchi H, Miyawaki T. Liposome-encapsulated midazolam for oral administration. J Liposome Res. 2011; 21: 166-172.

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

1. Megumi Mori, Hitoshi Higuchi, Minako Ishii-Maruhama, Yumiko Tomoyasu, Shigeru Maeda, Takuya Miyawaki, The development of liposome-encapsulated midazolam for oral sedation, 93th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Boston, USA, March 11-14, 2015.

2. 森 恵,友安 弓子,樋口 仁,前田 茂, 宮脇 卓也, ポリエチレングリコール修飾 (PGE 化)および細粒化したミダゾラム封入りポソームの封入率改善の検討, 第42回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 新潟市, 2014年10月11-12日.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

宮脇 卓也 (MIYAWAKI, Takuya)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 00219825

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

保田 立二 (YASUDA, Tatsuji)  
岡山大学・名誉教授  
研究者番号: 30092357

##### (4)研究協力者