



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

迎 和生

The bioavailability and long-term stability of pegylated and
fine-grained liposome-encapsulated midazolam

Kazuo MUKAE

(平成 24 年 12 月 日受付)

緒 言

知的障害者は情動コントロールが未発達であり、情動の変化が外部行動に反映されやすいため、一般的に歯科治療は困難である¹⁾。一般に、知的障害者は歯科治療を行うのに十分な協力が得られないことが多いため、行動変容法が有効であるとされている²⁾。行動変容法が無効であった患者において、薬物による行動調整が行われている³⁾。行動調整に用いられる薬物として、ミダゾラムやジアゼパム、抱水クロラール、ドロペリドールやヒドロキシジン、ペンタゾシン、スコポラミン、クロニジン、ケタミンなどがあるが、抗不安作用を有するベンゾジアゼピン系薬物が使用されることが多い⁴⁾。知的障害者に対して、薬物を前投薬として投与する場合、投与経路が非侵襲的であり、速やかに効果を発現し作用時間が短いものが望ましい。経口投与が可能であり、良好な不安軽減効果や健忘効果が期待できるベンゾジアゼピン系薬物として、ジアゼパムとミダゾラムがあげられる。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⁵⁾。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、ミダゾラムが頻用されている⁶⁻⁸⁾。しかし、ミダゾラムには特有の強い苦味があるため、知的障害者の経口投与は困難な場合がある。そこで、ミダゾラムの苦味を軽減するため、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ている⁹⁾。

リポソームは生体膜と同じリン脂質二重層を有する閉鎖小胞で、水溶性、脂溶性を問わず薬物を包含することが可能である。また、生体由来成分で構成されており、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きた¹⁰⁻¹³⁾。生体内に経口投与されたりポソームは、その粒子径に応じて消化管内の移動時間や滞留性などが変化する¹⁴⁻¹⁶⁾、粒子径が小さいほど、その吸収効率は高いとされている^{17,18)}。

一方、生体には細網内皮系 (RES) と呼ばれる、外来異物に対する排出機構が存在し、リポソームも貪食細胞に捕捉されてしまい、血中安定性、滞留性に問題がある¹⁹⁾。この RES を回避するために、リポソーム表面をポリエチレングリコール (PEG) 修飾する方法 (PEG 化) が一般的に用いられている²⁰⁾。PEG は、エチレングリコールが重合した構造をもつ高分子化合物 (ポリエーテル) であり、一般的な構造式は $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ と表される。PEG は水、メタノール、ベンゼン、ジクロロメタンに可溶、ジエチルエーテル、ヘキサンには不溶である。タンパク質など他の高分子に PEG 構造を付加することを PEG 化という。PEG 化リポソームは、PEG 鎖が形成する水和相と PEG 鎖自体の立体障害によるオプソニン分子の吸着阻害により、貪食細胞による補足を回避するため、RES に取り込まれにくくなり、血中に長時間滞留する特性を有している²¹⁾。PEG 化リポソームは、貪食細胞のレーダーから逃れることから、ステルスリポソームとも呼ばれている²²⁾。

経口用ミダゾラム封入りポソームは、ミダゾラム原液と比較してバイオアベイラビリティ

ィが高いことが報告されているが⁹⁾、リポソームを PEG 化及び細粒化はしていないため、更にバイオアベイラビリティを向上できる余地があると考えられた。そこで、本研究では、経口投与したミダゾラム封入リポソームのミダゾラムのバイオアベイラビリティを向上させることを目的に、経口用ミダゾラム封入リポソーム（従来型リポソーム）を PEG 化及び細粒化することとした。

また、従来型リポソームは、3 週間保存するとミダゾラムの封入率が著しく低下することが報告されている⁹⁾。よって、PEG 化及び細粒化したミダゾラム封入リポソーム（PEG・細粒化リポソーム）の長期安定性を評価するために長期保存での封入率の変化もあわせて調べた。

材料ならびに方法

従来型リポソームの作製

保田²³⁾の方法に準じて、ホスファチジルコリン（Sigma, St Louis, MO, USA）、コレステロール（Sigma）、ジパミルトイルホスファチジン酸（Sigma）、ミダゾラム（Wako Pure Chemical Industries, Japan）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、この溶液をエバポレーター

(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従来型リポソームの懸濁液を作製した。作製したリポソーム懸濁液から 0.5ml を取り出し、pH7.6 の 0.2M トリスー塩酸緩衝溶液を 7.5ml 加え、4℃で冷蔵保存した。

PEG・細粒化リポソームの作製

従来型リポソームの作製方法と同様の過程で、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、およびミダゾラムの溶液に、PEG (Sigma) を総脂質 mol 量の 9mol%になるように加え、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、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。従来型リポソームと同様に、0.1N 塩酸溶液にリポソームを浮遊させることによって PEG 化ミダゾラム封入リポソーム懸濁液を作製した。このリポソーム懸濁液中に超音波照射装置 (SNIFIER250、BRANSON 社) のプローブを挿入し、Output5、Duty cycle30% で 5 分間超音波処理することによって細粒化を行い、PEG・細粒化リポソームを作製した。

リポソームの分取

従来型リポソームは遠心分離器 (TX-160 TOMY) 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 0.2M トリスー塩酸緩衝溶液 (pH7.6) を 8ml 加えた。一方、細粒化したリポソームは遠心分離で分取できないため、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて PEG・細粒化リポソームを分取した。ゲルろ過クロマトグラフィーは、直径 2.4cm、長さ 25cm の管にゲル Sephadex G-50 fine (GE Healthcare) を充填し、移動相には 1M トリスー塩酸緩衝溶液 (pH7.6) を用い、流速は 0.5ml/min とした。超音波照射処理をした溶液 2ml をゲル上端に添加した後、溶出液を 2ml ずつ連続して 50 fraction 回収した。

粒子径の測定

分取した従来型リポソームに 8ml の 0.2M トリスー塩酸緩衝溶液を加えた後、動的光散乱式粒度分布計 (DLS-6000、大塚) を用いて粒子径を測定した。また、PEG・細粒化リポソームは、ゲルろ過クロマトグラフィー後、最も白濁した fraction を測定することとした。

in vivo 実験での対象動物

対象として、10~11 週齢、体重 $2.06 \pm 0.05\text{kg}$ (2.0-2.1kg) の雄クリーンニュージーズ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。岡山大学動物実験管理委員会の承認を受けて行った (承認番号 OKU-2011229)。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）と置換したものに変更した。

in vivo 実験方法

ウサギは吸入麻酔薬であるイソフルラン 2.5%~4.0%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、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音を聞いて決定した。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原液、従来型リボソーム、または PEG・細粒化リボ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、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食で、リボソームは生食とトリス-塩酸緩衝溶液で 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、1,500G、室温で 10 分間遠心分離を行い、分離した血漿を-20℃で凍結保存した。

血漿サンプル中の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。前処理として、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 を血漿サンプル 0.5ml に加え、120 分/回の速度で振盪後、1,500G で 10 分遠心した後、エーテル層を分取した。エーテル層に蒸留水 4ml を加え、120 回/分で 10 分振盪後、1500G で再度遠心分離を行い、エーテル層を分取した。エーテルを蒸発乾固させ、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 $200\mu\text{l}$ 加え、 $50\mu\text{l}$ を HPLC 装置に注入した。

薬物動態解析

薬物動態の解析は Yamaoka ら²⁴⁾の非線形二乗法に基づいた薬物動態解析プログラム (multi.xls) を用いた。経口投与後におけるミダゾラムの血中濃度は一次吸収のある 1-コンパートメントモデルに基づいて推移するものと仮定し、時間 t におけるミダゾラムの血中濃度は上記プログラムにより当てはめて計算した。

長期保存におけるミダゾラムの封入率の変化

従来型リポソームおよび PEG・細粒化リポソームを作製し、分取後 4°C で冷蔵保存した。封入率は分取したリポソーム溶液中のミダゾラム濃度を、分取前のリポソーム溶液中のミダゾラム濃度で除することによって算出した。作製直後、3 週間後、6 週間後にリポソーム中のミダゾラム濃度を HPLC を用いて測定し、封入率を求め、比較検討を行った。

統計処理

各実験における有意差は、統計処理ソフト (PRISM® Version 4.0c, GraphPad Software, San Diego, USA) を使用し、One-way ANOVA または Two-way ANOVA を用い、危険率 5 %未満 ($P<0.05$) で有意差ありとした。

結 果

細粒化（粒子径の比較）の結果

従来型リポソームと PEG・細粒化リポソームの粒子径の比較を行ったところ、従来型リポソームの平均粒子径は $1502.3\pm253.1\text{nm}$ ($n=6$) であり、PEG・細粒化リポソームの平均粒子径は $241.9\pm92.4\text{nm}$ ($n=6$) であった。図 1 は、従来型リポソームと PEG・細粒化リポソームの粒子径の代表的な分布を示している。

In vivo 実験の結果

ミダゾラム原液、従来型リポソーム、PEG・細粒化リポソームをそれぞれウサギに経口投与した時の、血中ミダゾラム濃度の経時的な変化を図 2 に示す。5、10、および 20 分においてミダゾラム原液と比較して、PEG・細粒化リポソームの血中ミダゾラム濃度は有意

に高値であった。さらに、5、および 10 分においては従来型リポソームと比較しても、PEG・細粒化リポソームの血中ミダゾラム濃度は高値であった。ミダゾラム原液、従来型リポソーム、PEG・細粒化リポソームの血中濃度曲線下面積（AUC）を図 3 に示す。ミダゾラム原液と比較して、PEG・細粒化リポソームの AUC は有意に高かったが、従来型リポソームと PEG・細粒化リポソーム間では AUC に有意な差は認められなかった。

長期保存における封入率の変化の結果

従来型リポソームと PEG・細粒化リポソームの長期保存における封入率の変化を図 4 に示す。リポソーム作製後 3 週間において、従来型リポソームの封入率は $50.7 \pm 3.8\%$ ($n=6$) で、PEG・細粒化リポソームの封入率は $78.7 \pm 4.5\%$ ($n=6$) であり、封入率が有意に高かった。また、リポソーム作製後 6 週間においても、従来型リポソームの封入率は $22.2 \pm 2.9\%$ ($n=6$) で、PEG・細粒化リポソームの封入率は $73.4 \pm 3.1\%$ ($n=6$) であり、封入率が有意に高かった。

考 察

PEG 化リポソームは、脂質フィルムを作製する段階で PEG を添加することにより作製される。本研究は、Tomoyasu ら⁹⁾の方法を用いてリポソームを作製し、PEG 化を行うこ

とした。PEG の種類は商品化されているだけでも多数存在し、PEG 化リポソームは、修飾する PEG の分子量、鎖長、末端基によってその性質は異なる²⁵⁾。多数ある PEG の中で、リポソームの PEG 化に頻用されるのは、N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine sodium salt (DSPE-PEG)であり^{22,23,26-28)}、PEG 化リポソームを薬物担体としたもので、唯一商品化されている抗悪性腫瘍剤のドキソルビシンを封入したリポソーム製剤である、ドキシル®にもこの PEG が用いられている²⁹⁾。よって、今回の研究ではリポソームの PEG 化に DSPE-PEG を用いることとした。

リポソームに対する PEG の修飾量は、修飾する PEG の種類を問わず、総脂質 mol 量の 3~10mol%であることが多い^{22,23,26-28,30,31)}。また、リポソームを PEG 化すると、薬物の封入率が低下するという報告がある^{32,33)}。そこで、予備実験で PEG の修飾量を総脂質量に対して 3、6、9mol%の PEG 化リポソームおよび従来型リポソームを作製し、作製直後および 1 週間後の封入率を測定し、比較したところ、作製直後および 1 週間後ともに、それぞれの封入率に有意差は認めず、短期間での封入率は PEG 化、PEG の修飾量と関係がないと考えられた。本研究においては、いくつかの報告^{30,31)}を参考に PEG の修飾量をリポソームの総脂質量に対して 9mol%となるように調整し、実験を行うこととした。

リポソームを細粒化する方法として、超音波処理法、エクストルージョン法、フレンチプレス法などがある。超音波処理法はリポソームに、超音波処理をすることにより、粒子の

細粒化を行うものである。手法が簡便であることから、最も頻用されているが、超音波処理時に発熱が起こるため、熱安定性の低い薬物をリポソームに封入するには好ましくない。また、超音波処理で用いるソニケーターにはプローブ型とバス型の 2 種類があるが、どちらもリポソームの細粒化に用いられている。エクストルージョン法やフレンチプレス法は、微細なリポソームを加熱すること無く調製できるので、抗悪性腫瘍剤のような熱に対して安定性の悪い薬物を封入するのに適している。本研究で作製するリポソームは、封入する薬物であるミダゾラムが、物理化学的に安定な薬物であることから、上記のどの方法を用いても細粒化が可能であると考えられた。超音波処理法に比較して、エクストルージョン法、フレンチプレス法は操作が煩雑で、特殊な器具を必要とするため、本研究では超音波処理法を用いてリポソームの細粒化を行うこととし、ソニケーターはプローブ型を用いることとした。

超音波処理法でリポソームを細粒化すると、リポソームの粒子径は数十 nm まで細粒化することができる³⁴⁾とされるが、予備実験において、従来型リポソームを 10 分以上超音波処理したところ、ミダゾラムの封入率が著しく低下した。5 分間の超音波処理後のリポソームの粒子径を、動的光散乱式粒度分布計を用いて測定したところ、従来型リポソームの粒子径は平均 1502.3nm であったが、細粒化した後の粒子径は平均で 241.9nm であった。超音波処理を長時間行うことにより、粒子径を更に小さくすることは可能であると考えられたが、今回の研究では、*in vivo* の実験において、リポソームに封入されたミダゾラムの必

要量を確保しなければならなかったため、5 分間の超音波処理で行うこととした。

本研究では、長時間にわたって動脈血を経時的に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⁹⁾はウサギに従来型リポソームを静脈内投与した時の血中時間-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。ヒトの小腸はミダゾラムを最も吸収する部位であり、また、ミダゾラムの代謝に関与する CYP3A を含むチトクロム P450 (CYP) を豊富に持つといわれている³⁵⁾。ウサギも同様に小腸に CYP3A 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³⁶⁾。よって、過去の研究⁹⁾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。

今回の研究は、薬物を経口投与するため、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でる可能性があると考えた。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った。そこで、繊維質の量を減量してウサギに与えることし、ウサギの餌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。

本研究で、ミダゾラム原液、従来型リポソーム、PEG・細粒化リポソームを経口投与したところ、PEG・細粒化リポソーム投与後のミダゾラム血中濃度は急速に上昇し、投与後 5

分、10 分においてミダゾラム原液および従来型リポソーム投与後の血中濃度よりも有意に高値となった。よって、従来型リポソームと比較してバイオアベイラビリティが向上したと考えられる。Tomoyasu ら⁹⁾は、ミダゾラム原液を経口投与した場合と比較して、従来型リポソームのバイオアベイラビリティは高くなったと報告している。これは、ミダゾラムがリポソームに封入されることによって、小腸での初回通過効果を回避したことによるものではないかと示唆している。本研究は、従来型リポソームの表面を PEG で修飾することによって、小腸での初回通過効果の回避をさらに促進し、RES の捕捉もある程度回避したのではないかと考えられる。

リポソームを経口投与に応用する際、リポソームがインタクトな形で腸管から吸収されるか否かが大きな研究課題となり、さまざまな角度から研究がおこなわれてきた¹⁴⁻¹⁸⁾。たとえば Patel ら³⁷⁾はウサギの回腸での灌流実験により、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) : コレステロール (Chol) : ジペプチジルカルボキシペプチダー (DCP) リポソームに封入したイヌリンが吸収されていることを認めた。また、Takeuchi ら¹⁷⁾の報告では、ラット胃内投与されたナノサイズ (182nm) のリポソーム粒子はマイクロサイズ (4.1 μ m) の同粒子に比較して空腸部や回腸部の粘膜層の深部へ有意に浸透することが示されている。本研究において、細粒化することによってリポソームがインタクトに胃腸管から吸収されたかどうかは不明であるが、バイオアベイラビリティが向上したことから、その可能性はある。

リポソームは脂質を用いて作製されるため、その保存に問題があるとされている³⁸⁾。リポソーム製剤として販売されているドキシル[®]の使用期限は 20 か月²⁹⁾であり、アムビゾーム[®]（アムホテリシン B 製剤）の使用期限は 36 か月³⁹⁾である。しかし、それらと比較しても従来型リポソームは、作製後 3 週間で封入率が著しく低下するという問題点があった。リポソームに封入した薬物の漏出の原因として、リポソーム膜の加水分解によるもの⁴⁰⁾、リポソーム同士が凝集、融合することによるものがある³⁸⁾。従来型リポソームは多重層リポソーム（Multilamellar Vesicles : MLV）であり、核内の薬物が漏出しにくいと考えられるが、従来型リポソームは、封入されたミダゾラムのモル濃度と、リポソームを構成しているホスファチジルコリンのモル濃度の比が 1:2 に達しており、ドキシル[®]のドキソルビシンとホスファチジルコリンのモル濃度の比 1:4 と比べて薬物のモル濃度の比が高い。よって、友安ら⁷⁾は、ミダゾラム分子はリポソームの中心の核のみならず、リン脂質膜にも封入されている可能性が高いと考え、そのために薬物が漏出しやすいのではないかと考察している。本研究で作製した PEG・細粒化リポソームは、リン脂質膜に封入されたミダゾラムのうち不安定なものが、超音波処理の段階で溶液中に漏出したため、その後の長期保存における封入率が改善していたのではないかと考えられた。また、リポソームは水溶液中で長期間保存するとリポソーム同士で融合し、粒子径が増大するとされている⁴¹⁾。リポソーム表面を PEG で修飾することにより、PEG 鎖が形成する水和相と PEG 鎖自体による立体障害により、リポソームは安定化し^{21,42)}、リポソーム同士の融合が抑制されたと考えられる。

さらに、凍結乾燥による長期保存の試みでは⁴³⁻⁴⁵⁾、リポソームの粒子径が小さい程、薬物の漏出が少ないとの報告があることから⁴⁶⁾、細粒化することも長期安定性を向上させた要因であったと考えられる。

結 語

本研究において、ミダゾラムを封入した従来型リポソームの PEG 化と細粒化を行った。ウサギを用いた *in vivo* 実験において、作製された PEG・細粒化リポソームを経口投与したところ、ミダゾラム原液を経口投与した場合と比較して高い AUC を示した。また、従来型リポソームと比較して、6 週間の封入率は高く維持された。リポソーム製剤を実用化させるために、バイオアベイラビリティおよび長期安定性は重要なファクターであるといえる。本研究によって作製された PEG・細粒化リポソームはまだ改良の余地はあるが、臨床応用が期待できるシーズであると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な研究機会を与えて頂き、御指導、御校閲を賜



りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野の宮脇卓也教授、細胞化学分野の保田立二名誉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学総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野の友安弓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学総合研究科歯科麻酔・特別支援歯学分野、細胞化学分野の諸先生方に深く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 千綿かおる, 武田文: 知的障害者施設入所者の歯科保健医療の課題は何か. 九州歯会誌, 64, 45-51, 2010.
- 2) 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.
- 3) 釜田隆, 河合峰雄, 田中義弘: 歯科麻酔的医療行為の医療経済(2) プロポフォルを用いた行動調整法. 日歯麻誌, 30, 510, 2003.
- 4) 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ー前投薬の工夫—Patient—Controlled Premedication—. 日臨麻会誌, 26, 48-56, 2006.
- 5) 山下年成, 伊藤寛, 全並秀司, 近藤薫, 江口武史, 成田清, 本多英邦, 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. 日臨外医会誌, 55, 1425-1429, 1994.
- 6) Ong, C.K.S., Seymour, R.A. and Tan, J.M.-H.: Sedation with midazolam lead to reduced pain after dental surgery. *Anesth. Analg.*, 98, 1289-1293, 2004.
- 7) Sheta, S.A. and AlSarheed, M.: Oral midazolam premedication for children undergoing general anaesthesia for dental care. *Int. J. Pediatr.*, 2009.

- 8) Johren, 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.
- 9) Tomoyasu, Y., Yasuda, T., Maeda, S., Higuchi, H. and Miyawaki, T.: Liposome-encapsulated midazolam for oral administration. *J. Liposome Res.*, 21, 166-172, 2011.
- 10) 鳥本龍磨, 岩永一範, 宮崎誠, 掛見正郎: リポソーム製剤が併用薬物の体内動態におよぼす影響について. 大阪薬科大紀, 5, 35-47, 2011.
- 11) Cukierman, E. and Khan, D.R.: The benefit and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 80, 762-770, 2010.
- 12) Dass, C.R. and Choong, P.F.: Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: in vivo proof of applicability. *J. Control. Release.*, 113, 155-163, 2006.
- 13) Andresen, T.L., Jensen, S.S. and Jorgensen, K.: Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog. Liquid Res.*, 44, 68-97, 2005.
- 14) Sanders, N.N., De.Smedt, S.C. and Demeester, J.: The physical properties of biogels and their permeability for macromolecular drugs and colloidal drug carriers. *J.*

Pharm. Sci., 89, 835-849, 2000.

- 15) 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. *Drug Delivery Syst*, 19, 511-519, 2004.
- 16) Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J. and Amidon, G.L.: The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.*, 10, 1568-1573, 1997.
- 17) Takeuchi, H., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. and Kawashima, Y.: Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int. J. Pharm.* 303, 160-170, 2005.
- 18) Jani, P.U., McCarthy, D.E. and Florence, A.T.: Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches: observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose. *Int. J. Pharm.*, 86, 239-246, 1992.
- 19) Ishida, T., Harashima H. and Kiwada, H.: Liposome clearance. *Biosci. Rep.*, 22, 197-224, 2002.
- 20) 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 therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11460-11464, 1991.

- 21) 小山裕之, 浅井知造, 畑中剣太朗, 清水広介, 横山昌幸, 石田竜弘, 際田弘志, 奥直人:
PEG 化ナノキャリア頻回投与による accelerated blood clearance 現象の機構解明. 薬
学雑誌, 129, 1445-1451, 2009.
- 22) Allen, T.M. and Hansen, C.: Pharmacokinetics of stealth versus conventional
liposomes: effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1068, 133-141, 1991.
- 23) 保田立二: リポソームの実験法, 病態生理, 10, 727-735, 1991.
- 24) Yamaoka, K., Tanigawa, Y. Nakagawa, T. and Uno, T.: A pharmacokinetic analysis
program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.*, 4, 879-885, 1981.
- 25) 佐塚泰之, 鶴田智子, 園部尚: 混合 PEG-DSG 修飾リポソームのキャラクタリゼーショ
ンと殺細胞効果. 薬学雑誌, 125, 149-157, 2005.
- 26) Mitchell, N., Kalber, T.L., Cooper, M.S., Sunassee, K., Chalker, S.L., Shaw, K.P.,
Ordidge, K.L., Badar, A., Janes, S.M., Blower, P.J., Lythgoe, M.F., Hailes, H.C. and
Tabor, A.B.: Incorporation of paramagnetic, fluorescent and PET/SPECT contrast
agents into liposomes for multimodal imaging. *Biomaterials*, 34, 1179-1192, 2013.
- 27) Bajelan, E., Haeri, A., Vali, A.M., Ostad, S.N., Dadashzadeh, S.: Co-delivery of
Doxorubicin and PSC 833 (Valspodar) by Stealth Nanoliposomes for Efficient
Overcoming of Multidrug Resistance. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 15, 568-582, 2012.
- 28) Zhuang, Y., Ma, Y., Wang, C., Hai, L., Yan, C., Zhang, Y., Liu, F. and Cai, L.:

PEGylated cationic liposomes robustly augment vaccine-induced immune responses:

Role of lymphatic trafficking and biodistribution. *J. Control Release*, 159, 135-142, 2012.

29) ヤンセンファーマ株式会社: ドキシル注 20mg 医薬品インタビューフォーム (http://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/800155_4235402A1025_1_001_1F)

30) Li, C., Cui, J., Wang, C., Zhang, L., Xiu, X., Li, Y., Wei, N., Li, Y. and Zhang, L.: Encapsulation of vinorelbine into cholesterol-polyethylene glycol coated vesicles: drug loading and pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, 63, 376-384, 2011.

31) Li, C., Cui, J., Wang, C., Wang, J., Li, Y., Zhang, L., Zhang, L., Guo, W. and Wang, Y.: Lipid composition and grafted PEG affect in vivo activity of liposomal mitoxantrone. *Int. J. Pharm.*, 362, 60-66, 2008.

32) Nikolova, A.N. and Jones, M.N.: Effect of grafted PEG-2000 on the size and permeability of vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1304, 120-128, 1996.

33) Hashizaki, K., Taguchi, H., Itoh, C., Sakai, H., Abe, M., Saito, Y. and Ogawa, N.: Effects of poly(ethylene glycol) (PEG) concentration on the permeability of PEG-grafted liposomes. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 53, 27-31, 2005.

34) Huang, X., Caddell, R., Yu, B., Xu, S., Theobald, B., Lee, L.J. and Lee R.J. Ultrasound-enhanced microfluidic synthesis of liposomes. *Anticancer Res.*, 30,

463-466, 2010.

- 35) 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 cynomolgus monkey. *Drug Metab. Dispos.*, 35, 1275-1284, 2007.
- 36) 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.
- 37) Patel, H.M., Tuzel, N.S., Stevenson, R.W.: 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. *Biochim. Biophys. Acta.*, 839, 40-49, 1985.
- 38) 田中恵子, 宮嶋孝一郎: 糖を用いるリポソームの凍結乾燥とその防御機構. 膜, 18, 156-163, 1993.
- 39) 大日本住友製薬株式会社: アムビゾーム点滴静注用 50mg 医薬品インタビューフォーム
(https://ds-pharma.jp/product/ambisome/pdf/ambisome_inj_interv.pdf)
- 40) 片山洋子: Liposome の分解と吸収. 消化と吸収. 10, 83-86, 1987.
- 41) 奥直人: リポソームを用いる新しいドラッグデリバリーシステム: 乾燥、凍結融解、保存を含めた技術紹介と問題点. 33, 13-19, 1987.

- 42) 武岡真司: 分子集合科学を利用した人工血液の創製. 人工血液, 13, 136-147, 2005.
- 43) Winden, E.C. and Crommelin, D.J.: Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. *J. Control. Release*, 58, 69-86, 1999.
- 44) Harrigan, P.R., Madden, T.D. and Cullis, P.R.: Protection of liposomes during dehydration or freezing. *Chem. Phys. Lipids*, 52, 139-149, 1990.
- 45) Aso, Y. and Yoshioka, S.: Effect of freezing rate on physical stability of lyophilized cationic liposomes. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 53, 301-304, 2005.
- 46) Tanaka, K., Takeda, T., Fujii, K. and Miyajima, K.: Freeze-drying of liposomes prepared by sonication and extrusion techniques. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 2653-2656, 1991.



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

歯科麻酔・特別支援歯学分野

(指導：宮脇卓也教授)

図表の説明

図 1. リポソームの粒子径の分布

A : 従来型リポソーム

B : PEG・細粒化リポソーム

図 2. 血中ミダゾラム濃度の経時的変化

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$: PEG・細粒化リポソームとミダゾラム原液との比較

$P < 0.05$: PEG・細粒化リポソームと従来型リポソームとの比較

平均値±標準偏差を示す。

図 3. 血中濃度曲線下面積

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$: ミダゾラム原液との比較

平均値±標準偏差を示す。

図 4. ミダゾラムの封入率の変化

*** $P < 0.001$: 直後の封入率との比較

平均値±標準偏差を示す。