

氏 名	ほそ かわ とし ひと 細 川 俊 仁
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 717 号
学位授与の日付	平 成 16 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	脂質分散系製剤からの薬物放出制御に関する研究

論文調査委員 (主 査)  
教 授 橋 田 充 教 授 高 倉 喜 信 教 授 河 合 明 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

リポソームや脂肪乳剤等の脂質分散系製剤は静脈内注射後の薬物の血中持続時間の改善、副作用の低減、更には特定部位へのターゲティングのキャリアーとして期待されている。一方で各種血液成分との相互作用による物理的な不安定化やオプソニン化による肝臓や脾臓などの細網内皮系 (RES) の発達した組織への集積などの問題があり、開発の障壁のひとつとなっている。そこで著者は、脂溶性モデル薬物として KW-3902 を用いた脂肪乳剤製剤と水溶性モデル薬物としてマイトマイシン C (MMC) を用いたリポソーム製剤を調製し、薬物放出の観点からこれら脂質分散系製剤と血液成分との相互作用のメカニズムの解明に取り組むと共に、これら相互作用を利用した薬物放出制御システムの開発に向けて検討した。

#### I. 脂溶性モデル薬物として KW-3902 を用いた脂肪乳剤製剤の開発

水に対する溶解性の低い薬物、難溶解性薬物の注射剤化に対する古典的なアプローチとして、界面活性剤、有機溶媒、pH 調整又は包接体の利用など、様々な検討が行われてきた。しかし、これらの手法は投与部位での局所刺激性や静脈炎を引き起こし、患者の QOL を考えた場合に臨床現場では重篤な問題となる。一方、脂質分散系製剤は溶液処方への代替となり得るが、一般に脂質粒子がキャリアーとして働き、薬物自身の体内動態と異なる挙動を示すことから体内動態や臓器分布に対する脂肪乳剤製剤の影響を評価する必要がある。

最初に製剤の安全性を考慮し、原料となる卵黄レシチンの化学的安定性を評価した。褐変現象が卵黄レシチン中のホスファチジルエタノールアミンと還元糖との間に起こるメイラード反応に起因することを見出し、KW-3902 脂肪乳剤製剤の開発にはホスファチジルコリン (PC) 純度の高い (99%) 卵黄レシチンを選択した。

次に脂肪乳剤製剤の設計を行った。脂質分散系製剤の RES 回避にはその粒子径が大きな因子のひとつである。市販の脂肪乳剤はダイズ油：リン脂質の比が 100：12 であり約 250 nm の平均粒子径を持つ。この粒子径の脂肪乳剤は RES へ集積することが知られている。一方、注射剤の製造には無菌化工程が必須であり、100 nm 付近の粒子径がろ過滅菌に適する。脂肪乳剤の粒子径がダイズ油に対するリン脂質の比率に依存することを示し、ダイズ油：リン脂質の比を 1：1 にすることで約 130 nm の平均粒子径を持つ脂肪乳剤を得た。次に水を放出溶媒とする *in vitro* での脂肪乳剤からの薬物放出試験を実施し、粒子径の影響 (250 nm vs. 130 nm) を評価した。脂肪乳剤からの KW-3902 の放出は Fick の第一法則に従い、濃度勾配による拡散の理論で説明された。また透過係数 ( $P$ ) に着目し、放出メカニズムの解明を試みたところ  $P$  は粒子径に影響されずほぼ等しい値を示した (小さい脂肪乳剤： $1.78 \times 10^{-11}$  cm/s, 大きい脂肪乳剤： $1.76 \times 10^{-11}$  cm/s)。このことより脂肪乳剤からの KW-3902 の放出は脂質単分子膜の透過が律速であると結論した。一方、脂肪乳剤をラット血液と直接混合したところ、脂肪乳剤からの KW-3902 の各種血液成分への移行は速やかで 5 分以内に平衡状態となることが示された。これは、先に実施した脂肪乳剤からの水を放出溶媒とする薬物放出試験と比較し、非常に速いものであった。このことより、血液中において脂肪乳剤からの薬物の解離・放出はキャリアーと血液成分との衝突による直接的な接触が重要であると結論した。

溶液処方、脂肪乳剤処方及びリポソーム処方間での KW-3902 の体内動態をラットを用いて評価し、KW-3902 の脂質分

散系製剤が溶液処方での体内動態と同様であることを示した。また、ラット血液を用いた *in vitro* 試験で血球やアルブミン、リポ蛋白画分への KW-3902 の分布を測定し、KW-3902 の血液成分中への分布は製剤処方に関わらず同様であることを示した。

これまでの検討より、KW-3902 が脂肪乳剤やリポソームから血液成分へ直接かつ速やかに移行することが示されたことから、キャリアー性能の評価を目的として製剤—血液成分間の分配係数 ( $K_{fb}$ ) に着目した。そして、薬物の血液成分への移行の駆動力は分配平衡であることを結論した。また、キャリアーとしての効果は  $K_{fb}$  と合わせて、全血液量に対する製剤容量の比も影響することを示した。すなわち、 $K_{fb}$  が大きいほど、更に製剤としての投与容量が多い程、薬物がキャリアーに保持される割合が高くなることを示した。

## II. 水溶性モデル薬物としてマイトマイシン C (MMC) を用いたリポソーム製剤の開発

リン脂質のゲル—液晶相転移を応用した温度感受性リポソームの温度依存的薬物放出を血漿存在下で評価した。PC からなる中性リポソームは常温時に薬物の漏出を示したのに対し、ホスファチジルグリセロール (PG) を含む負電荷リポソームは放出性能の増大が認められた。これは、血漿蛋白が静電的な相互作用によりリポソーム膜表面をコーティングすることで常温時に薬物保持能力を安定化し、膜脂質が相転移を起こす高温時には蛋白が疎水的な相互作用により脂質二分子膜内へ入り込み、温度依存的な薬物放出の効果を促進していることを熱分析や膜への結合蛋白の定量により示した。更に、膜へ結合する蛋白の同定を試み、SDS-PAGE によりアルブミンやアポリポ蛋白質など数種の血漿蛋白が選択的に結合していることを示した。これらの結果より、血漿蛋白の存在下における温度依存的薬物放出のメカニズムについて明らかとした。

以上、本研究では、脂肪乳剤粒子と血液成分との間に起こる脂溶性薬物の分配平衡に基づく薬物放出のメカニズムを明らかにした。また温度感受性リポソームからの薬物放出に関して、血漿蛋白存在下に負電荷を有したリポソームは加温時に薬物放出を増大させ、常温時に薬物保持を安定化させるメカニズムを明らかにした。これらの知見は今後の脂質分散系製剤を開発するにあたり、考慮すべき血液成分との相互作用について有用となる基礎的情報を提供するものと思われる。

## 論文審査の結果の要旨

リポソームや脂肪乳剤等の脂質分散系製剤は、注射剤として体内滞留性の改善やターゲティング等の機能を有することから応用が期待されているが、各種血液成分との相互作用による物理的な不安定化や、オプソニン化による肝臓や脾臓等の細網内皮系 (RES) 組織への集積等の問題を有する。申請者は、脂溶性モデル薬物 KW-3902 を用いた脂肪乳剤製剤と水溶性モデル薬物マイトマイシン C (MMC) を用いたリポソーム製剤を調製し、薬物放出の観点から脂質分散系製剤と血液成分との相互作用のメカニズムの解明に取り組むと共に、相互作用を利用した薬物放出制御システムの開発に向け検討を行った。

KW-3902 脂肪乳剤製剤の開発においては、最初に安全性等の観点から処方検討を行い、製剤の褐変現象が卵黄レシチン中のホスファチジルエタノールアミンと還元糖との間に起こるメイラード反応に起因することを見出し、ホスファチジルコリン (PC) 純度の高い (99%) 卵黄レシチンを選択した。また、RES 回避や製造における無菌化の視点より脂肪乳剤の粒子径に着目して製剤設計を行い、ダイズ油：リン脂質の比を 1:1 にすることで約 130 nm の平均粒子径を持つ脂肪乳剤を得た。次に、*in vitro* 薬物放出試験を行い、脂肪乳剤からの KW-3902 の単位面積あたりの放出が粒子径にかかわらず一定であること、また、脂肪乳剤をラット血液と混合することにより、KW-3902 が各種血液成分へ速やかに移行し 5 分以内に平衡状態となることを明らかにし、血液中での脂肪乳剤からの薬物の放出においては血液成分との相互作用が重要な役割を果たしていることを確認した。さらに、溶液製剤、脂肪乳剤及びリポソーム間で、KW-3902 のラット *in vivo* 体内動態及び血球やアルブミン、リポ蛋白画分への *in vitro* 分布を評価し、それぞれ差のないことを明らかにした。以上より、本製剤の *in vivo* 体内動態において、移行は血液成分への分配平衡に依存し製剤の投与容量に影響を受けることが示された。

次に、水溶性薬物の脂質分散系製剤に関する検討を行い、特に癌化学療法への応用などが期待されているリン脂質のゲル—液晶相転移を応用した温度感受性リポソームについて、その薬物放出特性を血液成分との相互作用の観点から詳細に検討した。PC からなる中性リポソームでは常温時にも水溶性薬物 MMC が漏出するのに対し、ホスファチジルグリセロール (PG) を含む負電荷リポソームでは温度感受性機能の向上が認められた。また、熱分析や膜に対する蛋白結合の測定により、静電的な相互作用に基づく血漿蛋白によるリポソーム膜表面のコーティングが、常温では薬物保持能力を安定化し、膜脂質

が相転移を起こす高温条件下では蛋白が疎水的な相互作用により脂質二分子膜内へもぐり込むことによって放出を促進していることに、本効果が起因していることを確かめた。更に、膜へ結合する蛋白の同定を試み、SDS-PAGEによりアルブミンやアポリポ蛋白質など数種の血漿蛋白が選択的に結合していることを明らかにして、血漿蛋白の存在下における温度感受性リポソームの薬物放出機構を示した。

以上、本研究では、脂肪乳剤粒子と血液成分との間に起こる脂溶性薬物の分配平衡に基づく薬物放出の機構を明らかにした。また温度感受性リポソームからの薬物放出に関して、血漿蛋白存在下に負電荷を有したりポソームが加温時に薬物放出を増大させ常温時に薬物保持を安定化させるメカニズムを明らかにした。これらの知見は今後の脂質分散系製剤の開発に対して、特に血液成分との相互作用の観点より有用な基礎的情報を提供するものと思われる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年8月26日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。