

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | ワールニー リーサツジャクーン<br>Warunee Leesajakul  |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学)   |
| 学位記番号    | 薬博第552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1項該当   |
| 研究科・専攻   | 薬学研究科創薬科学専攻  |
| 学位論文題目   | Preparation and Characterization of Lipid Nanoparticles Containing Nonlamellar Liquid Crystalline Phases<br>(非ラメラ液晶相を有する脂質ナノ微粒子の調製と物性評価に関する研究) |
| 論文調査委員   | (主査)<br>教授 半田 哲郎 教授 橋田 充 教授 松崎 勝巳  |

### 論文内容の要旨

近年、生理学的に重要な機能を有する化合物が多数発見されているが、これらの多くは水に対し難溶性であり、医薬品として用いるには至適な血中キャリアが必要である。可溶性ミセルやエマルジョン、リポソーム製剤など、微粒子分散系が難溶性薬剤の投与形態として一般に用いられている。しかしながら、これらの分散系はその機能性や応用範囲にも限界がある。申請者は、非ラメラ液晶相であるキュービック相や逆ヘキサゴナル相を水中に分散させた、新たな微粒子分散系(キュボソーム、ヘキソソーム)の開発に取り組んだ。このような分散微粒子の調製は、微粒子の分散安定化に寄与する界面活性剤(乳化剤)が、同時に液晶構造を壊してしまうため困難であるとされてきたが、申請者は、高分子界面活性剤がこのような微粒子の調製に有効であると考え、研究を行った。本研究では、高压乳化法により非ラメラ液晶相を有する脂質ナノ微粒子を調製し、得られた微粒子の構造をX線小角散乱法により評価するとともに、微粒子の血漿成分との相互作用を評価した。

#### 第一章

##### Monoolein/Oleic Acid/Pluronic F127 混合系の液晶分散微粒子の調製

Monoolein (MO)/Oleic Acid (OA) 混合水合物は脂質組成に依存して、両連続キュービック ( $C_D$ ) 相、逆ヘキサゴナル ( $H_{II}$ ) 相、逆ミセルキュービック ( $C_{MIC}$ ) 相を形成した。これらの非ラメラ液晶相のうち  $C_D$  相は Pluronic F127 の存在下では別の両連続キュービック ( $C_P$ ) 相への転移を示したが、 $H_{II}$  及び  $C_{MIC}$  相は F127 による構造変化を示さなかった。このことから、高分子界面活性剤である F127 は脂質との相溶性が比較的低く、分散剤として有効であることが示唆された。高压乳化により、粒径数百 nm の微粒子が得られ、微粒子内部に液晶構造が保持されていることが判明した。微粒子の内部構造も脂質組成に依存し、OA の増加により  $C_P$  から  $H_{II}$ 、 $C_{MIC}$  へと変化した。これは OA が MO に比べ膜により大きな負の曲率を与えるためである。さらに、内部構造は pH にも強く依存し、分散媒の pH 変化によりキュボソームからヘキソソームへの転移が観察された。このことから、分散媒中のイオン(プロトン)は粒子内部に侵入できることが明らかとなった。

#### 第二章

##### キュボソームの血漿成分との相互作用

MO が形成する両連続キュービック相を F127 により分散微粒化したキュボソームに疎水性の蛍光プローブを導入し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、キュボソームと血漿成分との相互作用を観察した。キュボソームは buffer 中では安定であるが、アルブミンによる脂質引き抜き、リポ蛋白質との融合、エステラーゼによる加水分解作用を受けて、速やかに崩壊することが判明した。ラット静脈投与後のキュボソームの血中滞留性を評価した結果、蛍光プローブ濃度は時間とともに緩やかに減少し、4 時間後には投与直後のおよそ半分に低下したのに対し、グリセライド濃度は投与直後からほとんど検出されなかった。この結果は、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果と矛盾しないものであり、MO は代謝を受けて速やかに血中から消失し、疎水性の蛍光プローブは残った F127 ミセルに可溶化された状態で血中に滞留することが判明した。

以上、高分子界面活性剤 Pluronic F127 が、非ラメラ液晶相を有する脂質ナノ微粒子の調製に有効であり、種々の液晶相

の分散化が可能であることを明らかにした。また、この脂質ナノ微粒子の血中での崩壊に関わる因子について解明した。

### 論文審査の結果の要旨

近年、生理学的に重要な機能を有する化合物が多数発見されているが、これらの多くは水に対し難溶性であり、医薬品として用いるには至適な血中キャリアが必要である。可溶化ミセルやエマルジョン、リボソーム製剤など、微粒子分散系が難溶性薬剤の投与形態として一般に用いられている。しかしながら、これらの分散系はその機能性や応用範囲にも限界がある。申請者は、非ラメラ液晶相であるキュービック相や逆ヘキサゴナル相を水中に分散させた、新たな微粒子分散系（キュボソーム、ヘキソソーム）の開発に取り組んだ。このような分散微粒子の調製は、微粒子の分散安定化に寄与する界面活性剤（乳化剤）が、同時に液晶構造を壊してしまうため困難であるとされてきたが、申請者は、高分子界面活性剤がこのような微粒子の調製に有効であると考え、研究を行った。本研究では、高圧乳化法により非ラメラ液晶相を有する脂質ナノ微粒子を調製し、得られた微粒子の構造を X 線小角散乱法により評価するとともに、微粒子の血漿成分との相互作用を評価した。

まず、Monoolein (MO) /Oleic Acid (OA) 混合水合物は脂質組成に依存して、両連続キュービック ( $C_D$ ) 相、逆ヘキサゴナル ( $H_{II}$ ) 相、逆ミセルキュービック ( $C_{MIC}$ ) 相を形成した。これらの非ラメラ液晶相のうち  $C_D$  相は Pluronic F127 の存在下では別の両連続キュービック ( $C_P$ ) 相への転移を示したが、 $H_{II}$  及び  $C_{MIC}$  相は F127 による構造変化を示さなかった。このことから、高分子界面活性剤である F127 は脂質との相溶性が比較的低く、分散剤として有効であることが示唆された。高圧乳化により、粒径数百 nm の微粒子が得られ、微粒子内部に液晶構造が保持されていることが判明した。微粒子の内部構造も脂質組成に依存し、OA の増加により  $C_P$  から  $H_{II}$ 、 $C_{MIC}$  へと変化した。これは OA が MO に比べ膜により大きな負の曲率を与えるためである。さらに、内部構造は pH にも強く依存し、分散媒の pH 変化によりキュボソームからヘキソソームへの転移が観察された。このことから、分散媒中のイオン（プロトン）は粒子内部に侵入できることが明らかとなった。

さらに、Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) /Cholesterol (Chol) 混合物の  $H_{II}$  相を F127 を用いて同様に分散すれば、ヘキソソームが調製できることを示した。

次に、MO が形成する両連続キュービック相を F127 により分散微粒化したキュボソームに疎水性の蛍光プローブを導入し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、キュボソームと血漿成分との相互作用を観察した。キュボソームは buffer 中では安定であるが、アルブミンによる脂質引き抜き、リポ蛋白質との融合、エステラーゼによる加水分解作用を受けて、速やかに崩壊することが判明した。ラット静脈投与後のキュボソームの血中滞留性を評価した結果、蛍光プローブ濃度は時間とともに緩やかに減少し、4 時間後には投与直後のおよそ半分に低下したのに対し、グリセライド濃度は投与直後からほとんど検出されなかった。この結果は、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果と矛盾しないものであり、MO は代謝を受けて速やかに血中から消失し、疎水性の蛍光プローブは残った F127 ミセルに可溶化された状態で血中に滞留することが判明した。

一方、DOPE/Chol ヘキソソームは MO キュボソームに比べ、血漿中での安定性が高いことも明らかになった。

以上、高分子界面活性剤 Pluronic F127 が、非ラメラ液晶相を有する脂質ナノ微粒子の調製に有効であり、種々の液晶相の分散化が可能であることを明らかにした。また、この脂質ナノ微粒子の血中での崩壊に関わる因子について解明した。

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。

さらに平成16年8月25日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。