

氏名	森 恵
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第5329号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	ミダゾラム封入リポソームをポリエチレングリコール修飾および細粒化する方法に関する検討 -粒子径及びミダゾラム封入率に与える影響-
論文審査委員	松本 卓也 教授 西田 崇 准教授 宮脇 卓也 教授

学位論文内容の要旨

<緒 言>

知的障害者は歯科治療を行う上で、協力が得られず、歯科治療を十分に受けることが困難であることが多いため、鎮静や全身麻酔を併用して歯科治療が行われることが多い。知的障害者に対して、鎮静や全身麻酔の前に抗不安薬の麻酔前投薬が用いられることがあり、前投薬の投与方法の一つとして経口投与方法がある。投与薬剤としては、抗不安作用や健忘作用のあるベンゾジアゼピン系薬剤であるミダゾラムが用いられることが多い。ミダゾラムには特有の強い苦味があるため、リポソームにミダゾラムを封入した経口用のミダゾラム封入リポソーム（従来型リポソーム）が開発された。リポソームとは、脂質二重層で構成された人工の閉鎖小胞であり、水溶性、脂溶性を問わず様々な薬物を包含することが可能であり、有用な薬物担体として研究が行われてきた。

リポソームの経口投与については、リポソームの粒子径に応じて消化管内の滞留性や吸収効率が変化し、粒子径が100nm程度であると、その吸収効率は高いとされている。また、生体には肝臓や脾臓に細網内皮系とよばれる、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、滞留性が低下する。この細網内皮系を回避するために、リポソーム表面をポリエチレングリコール（PEG）で表面修飾（PEG化）し、リポソームの表面構造を変化させる方法が用いられている。よって、ミダゾラム封入リポソームをPEG化および細粒化することでバイオアベイラビリティを高めることが期待できる。しかし、PEG化および細粒化によって粒子径やミダゾラムの封入率に差が生じる可能性がある。そこで本研究では、従来型ミダゾラム封入リポソームをPEG化することによって、粒子径およびミダゾラムの封入率にどのような影響があるかを調べ、さらにPEG化したミダゾラム封入リポソームを細粒化する方法が、粒子径およびミダゾラムの封入率にどのような影響を与えるかを調べた。

<方 法>

従来型ミダゾラム封入リポソームは、ジパミトイル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、およびミダゾラムで作製した。PEG化ミダゾラム封入リポソームは、従来型リポソームの作製方法と同様の過程でPEGを加え作製し、PEG化・細粒化ミダゾラム封入リポソームは、PEG化ミダゾラム封入リポソームを超音波処理することで作製した。リポソームに封入されたミダゾラムは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定し、封入率を計算した。粒子径は、動的光散乱システムを用いて測定した。さらに、透過電子顕微鏡を用いて、細粒化前後のミダゾラム封入リポソームの観察を行った。統計学的分析にはMann-Whitney testまたはKruskal Wallis testを用い、post-hocテストとしてDunn's testを用いて検定を行った。有意水準は5%未満とした。

<結 果>

PEG化リポソームの平均粒子径と従来型リポソームの平均粒子径に有意な差は認めなかった。PEG化リポソームのミダゾラム平均封入率と従来型リポソームのミダゾラム平均封入率に有意な差は認めな

かった。PEG化したミダゾラム封入リポソームを、室温（24℃付近）下で、200Wで20KHzの超音波の条件下で細粒化を行った場合、超音波処理5分後の粒子径と比較して、20分および30分後の粒子径は有意に大きくなっていた。室温下で超音波処理した際のミダゾラムの封入率は5分、10分、20分、および30分の超音波処理で有意な差は認められなかった。超音波装置の浴槽内温度を10℃程度の低温にコントロールし、200Wで20KHzの超音波条件下で、PEG化したミダゾラム封入リポソームの細粒化を行った結果、超音波処理20分および30分後の粒子径は100nm程度になっており、5分後の粒子径と比較して有意に小さくなっていた。低温下で超音波処理した際のミダゾラム封入率は、5分、10分、20分、および30分の超音波処理で有意差は認められなかった。透過電子顕微鏡での観察では、室温下での超音波処理によってリポソームの凝集がみられたが、低温下ではみられなかった。

<結 論>

ミダゾラム封入リポソームをPEG化および細粒化することでバイオアベイラビリティが高まることを期待し、本研究では、従来型ミダゾラム封入リポソームのPEG化および細粒化による粒子径およびミダゾラムの封入率への影響を調べた。その結果、ミダゾラム封入リポソームはPEG化によって、粒子径およびミダゾラム封入率に影響がないことが示された。さらに、室温下でPEG化ミダゾラム封入リポソームを超音波処理すると、処置時間とともにリポソームの凝集が起り、粒子径が大きくなる傾向があるのに対して、超音波装置の浴槽内の水温を10℃程度の低温にコントロールし、200Wで20KHzの超音波条件下で、20分以上超音波処理することで100nm程度の粒子径になり、ミダゾラムの封入率の低下はみられなかった。今後、脂質やPEGの種類などを検討する余地があると考えられるが、さらに改良することで経口用薬物担体としての臨床応用が期待できると考えられた。

論文審査結果の要旨

知的障害者歯科において、鎮静や全身麻酔を併用して歯科治療を行う際に、麻酔前投薬として抗不安および健忘効果のあるミダゾラムが経口投与されることが多い。しかし、ミダゾラムには強い苦みがあるため、患者にとって飲みやすい薬剤形状の開発が望まれている。その対策の1つとしてミダゾラムをリポソームに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。一方、リポソームに封入された薬物は、リポソームをポリエチレングリコール修飾(PEG化)および細粒化することによって、バイオアベイラビリティが向上することが知られている。特に、リポソームの粒子径を100 nm程度まで細粒化すると、消化管内での吸収効率が高くなることが報告されている。本研究は上記のことを鑑み、従来型リポソームをPEG化し、さらに100 nm程度まで細粒化するための最適な作製条件を検討し、PEG化した細粒化ミダゾラム封入リポソームを作製し、評価したものである。

従来型リポソームは、ジパミトイルホスファチジルコリン、コレステロール、ジパミトイルホスファチジン酸、およびミダゾラムで作製し、その作製の過程でL- α -ホスファチジエタノールアミンメトキシポリエチレングリコールを加えることによってPEG化ミダゾラム封入リポソームを作製した。ミダゾラムの封入率は、リポソーム溶液中のミダゾラム全体量に対するリポソームに封入されているミダゾラム量の割合で求めた。ミダゾラム量は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。リポソームの細粒化は密閉式超音波破碎装置を用いて行い、室温下で、超音波の条件を200Wで20KHzとし、処理時間を5分、10分、20分、30分とした。細粒化したPEG化ミダゾラム封入リポソームは、ゲル濾過クロマトグラフィー法を用いて分取した。リポソームの粒子径は動的光散乱システムを用いて測定し、さらに透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

その結果、従来型ミダゾラム封入リポソームとPEG化ミダゾラム封入リポソームの封入率および粒子径に有意な差は見られず、PEG化による影響はないと考えられた。細粒化による影響については、封入率に有意差は認められなかったが、粒子径は5分後と比較して、20分および30分後で有意に大きくなっていった。透過型電子顕微鏡でリポソームを観察したところ、リポソームの凝集した像が観察された。室温下で行った超音波処置の間に超音波破碎装置の浴槽内温度が上昇したことが明らかとなり、これが原因であると考えられた。そこで、浴槽内温度を10℃程度に維持して細粒化実験を行ったところ、5分後の粒子径と比較して20分および30分後の粒子径は有意に小さくなっており、100 nm程度の粒子径になっていた。透過型電子顕微鏡で確認したところリポソームの凝集像はなく、封入率にも影響がなかった。

以上の結果から、本論文では超音波装置の浴槽内の水温を10℃程度の低温に維持し、200W、20KHzの超音波条件下で、20分以上超音波処理することが適切であると結論づけている。本研究で検討された方法にはまだ改良の余地はあるが、本研究から得られた知見は新しいドラッグデリバリーシステムの開発に繋がる可能性があり、意義深いと考えられる。

よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。