

## 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

鳥本 龍磨, 岩永 一範\*, 宮崎 誠, 掛見 正郎

### Possibility of Interaction between Liposome and Concomitantly Administered Drug

Ryuma TORIMOTO, Kazunori IWANAGA\*, Makoto MIYAZAKI, and Masawo KAKEMI

*Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan*

(Received October 29, 2010; Accepted November 30, 2010)

Recently liposome has been used as an effective and attractive dosage formulation for doxorubicin or amphotericin B. The composition and structure of liposome are very similar to those of erythrocyte or lipoprotein; therefore, liposome may interact with the drugs having high-affinity to them. In this study, we studied that the possibility of liposome-drug interaction using L, $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol/ L, $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylglycerol = 3/3/4 (molar ratio) liposome (DPPC-lip) and cyclosporin A (CsA) as a negative-charged liposome and a model drug having high-affinity to erythrocyte, respectively. When CsA was incubated in rat's serum in the absence of DPPC-lip, CsA was bound to lipoprotein and albumin. On the contrary, a fraction of CsA was dissociated from them and interacted with DPPC-lip by the addition of liposome. Then, CsA (3 mg/kg) was intravenously administered to rats 60 min after administration of DPPC-lip (10 mmole phospholipid/kg). CsA concentration in whole blood was not changed by pre-dosing of DPPC-lip; however, the partition of CsA to erythrocyte slightly decreased in the presence of DPPC-lip. It is well-known that liposome administered to the body was recognized by reticuloendothelial system and uptaken into the liver to be decomposed. We also investigated the effect of DPPC-lip on the metabolic activity of rat's liver cytochrome P450 3A (CYP3A) using midazolam as a CYP3A substrate. Neither single dosing nor consecutive 7-days dosing of DPPC-lip affected to CYP3A activity. In conclusion, DPPC-lip is very safe dosage formulation regarding the drug-formulation interaction in blood, although liposome slightly affects the binding of CsA to erythrocyte or lipoprotein.

**Key words**—liposome; cyclosporin A; interaction; erythrocyte; CYP3A

### 緒言

1965年イギリスのBanghamらは卵黄フォスファチジルコリンの水への分散物がカチオンやアニオンを包含し得る閉鎖小胞を形成することを発見<sup>1)</sup>、この小胞は後にリポソームと呼ばれるようになった。リポソームは生体膜と同じリン脂質二重層を有していることから、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性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<sup>2-4)</sup>。すでにアムホテリシン B を封入した AmBisome<sup>5)</sup> やドキシルビシンを封入した Doxil<sup>6)</sup> を含む多くのリポソーム静脈内投与製剤が臨床応用されており、今後も薬物投与製剤として

\* 大阪薬科大学 薬剤学研究室, e-mail: iwanaga@gly.oups.ac.jp

のリポソームの応用が広がるものと期待される。したがって、このような DDS 製剤使用時においては薬物のみならず、製剤自体の体内動態や製剤による併用薬物の体内動態への影響を把握し、安全性に注意を払う必要が求められる。生体に投与されたリポソームは肝臓、脾臓などの細網内皮系 (reticuloendothelial system; RES) により認識・補足され、<sup>7,8)</sup>最終的に肝臓において崩壊・分解されることが知られている。一方、リポソームは発見当初よりその脂質二重層構造が注目され、人工赤血球としての応用も研究されているように、<sup>9-11)</sup>リポソームはその成分や構造において血球やリポプロテインと高い類似性を有している。そのため、血球あるいはリポプロテインと相互作用を示すような薬物の場合、薬物-リポソーム間において相互作用が生じる可能性は容易に予想される。さらにリポソームが最終的に集積する肝において、ヒトにおける主代謝酵素である cytochrome P-450 (CYP) は、体内の脂質、特にリン脂質により活性が影響を受ける可能性が報告されている<sup>12-15)</sup>ことから、リポソーム由来のリン脂質が肝において CYP の代謝活性に影響をおよぼす可能性も否定できない。

そこで本研究では、リポソームをより安全な薬物担体として利用することを目的として、血球やリポプロテインと親和性の高い薬物として cyclosporin A (CsA) をモデル薬物として用い、血液中におけるリポソームと CsA 間の相互作用の有無について検討を行った。また、肝における主代謝酵素である CYP3A をモデル酵素として、リポソームが肝 CYP3A 活性に与える影響についても併せて検討を行った。

## 実験方法

### 1. 試薬

cyclosporine A (CsA), bovine serum albumin

(BSA) および  $\beta$ -NADP<sup>+</sup> は Sigma Chemical 社 (St. Louis, MO) より、COATSOME EL-01-A は日油株式会社 (Tokyo, Japan) より、dimethyl sulfoxide (DMSO), midazolam, および diazepam は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。1'-hydroxy midazolam は Cerilliant 社 (Austin, TX) より、4-hydroxy midazolam は ULTRAFINE 社 (Manchester, UK) より購入した。glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase はオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬および溶媒は市販特級のものを用いた。

## 2. 血中におけるリポソームと CsA 間の相互作用に関する検討

### 2-1. *in vitro* ラット血清中における CsA とリポソームの相互作用

**2-1-1. ラット血清の調製** 実験動物には体重 280-330 g の Wistar 系雄性ラット (日本 SLC, Shizuoka, Japan) を使用した。水および標準固形飼料 (オリエンタル酵母, Tokyo, Japan) を自由に与え、12 時間毎の明暗サイクル (Light 6:00~18:00, Dark 18:00~6:00), 恒温 (24 ± 1°C) で 1 週間以上予備飼育を行った。ラットは実験前日にエーテル麻酔下、頸静脈にカニューレーション (ファイコンチューブ: 富士システムズ, PE50: Becton Dickinson / 心臓方向に 2 cm) を施した。挿入したカニューレと血管を結紮し、カニューレの一端を、皮下を通して後頭部へと導いた。その後切開部を縫合し、カニューレ内を生理食塩水で満たした。カニューレを介してラット頸静脈より血液を採取し 37 °C 下、12 時間静置後、遠心分離 (5,300 × g, 5 min) することにより血清を得た。Lowry 法<sup>16)</sup>によりタンパク濃度を測定した後、タンパク濃度が 5 g/dl になるように pH 7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) を用いて適宜希釈し実験に供した。

**2-1-2. incubation 実験** リポソームとして COATSOME EL-01-A を使用した。COATSOME EL-01-A は 1 バイアル中に L, $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, L, $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) をそれぞれ 30, 40, 30  $\mu$ mol 含有した薬物を封入していない負電荷中空リポソームの凍結乾燥品である。使用時には適宜水を添加し水和させることにより平均粒子径約 100 nm の DPPC リポソーム (DPPC-lip) を調製した。ラット血清サンプル 450  $\mu$ l に、最終濃度が 0.1 または 1 mmol phospholipid/l となるように DPPC-lip を添加した後、37 °C で 5 分間 pre-incubation を行った。次に最終濃度が 10  $\mu$ g/ml となるように DMSO (最終濃度 0.5 %) に溶解した CsA を加え、合計 500  $\mu$ l で 60 分間 incubation を行った。Incubation 開始 60 分後、氷冷することで incubation を停止した。なお、無血清サンプルの場合には血清の代わりに PBS を添加した。得られたサンプルについてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

**2-1-3. ゲルろ過クロマトグラフィー** 直径 1.2 cm, 長さ 30 cm のガラス管にゲル Sephadex G-50 fine (GE Healthcare, Waukesha WI) を充填した。移動相には等張リン酸緩衝液 (PBS: pH7.4) を用い、流速は 0.5 ml/min とした。上記サンプル 500  $\mu$ l をゲル上端に添加した後、溶出液を 1 ml 毎に 30 fraction 回収した。

**2-1-4. 溶出液中 CsA および DPPC-lip 濃度の測定** 回収された各 fraction 1 ml に内標準物質として 5  $\mu$ M tacrolimus 100  $\mu$ l を加えた後、acetonitrile 1 ml および chloroform 1 ml を加え、15 分間振盪させた。その後、1200 × g で 10 分間遠心分離し、chloroform 層を回収した後、減圧下で蒸発乾固を行った。得られた残渣を 10 mM ammonium acetate : acetonitrile = 10 : 90 の混液 100  $\mu$ l に再溶解した後、以下に示す

条件下 LC/MS/MS 法によりサンプル中 CsA 濃度を測定した。溶出液中のリポソームの濃度は紫外可視分光光度法により 600 nm における濁度を用いて測定した。また、溶出液中のタンパク濃度は Lowry 法により測定した。

### 2-2. リポソームが CsA の *in vivo* 血中動態に与える影響

**2-2-1. 静脈内投与実験** 実験動物として、1-1 と同様、実験前日に頸静脈および大腿静脈にカニューレーションを施した Wistar 系雄性ラット (体重 280-330 g) を使用した。PBS : ethanol : DMSO = 89 : 10 : 1 の混液に 10 mg/ml の割合で CsA を溶解した。あらかじめ DPPC-lip (10 mmol phospholipid/kg) を大腿静脈より投与した後、60 分経過してから CsA 溶液 (3 mg/kg) を大腿静脈より bolus 投与した。なお、untreated 群には DPPC-lip の代わりに同容量の PBS を投与した。投与 180 分後まで経時的に頸静脈より血液を採取した。

**2-2-2. 血漿中 CsA 濃度の測定** 採血した血液をヘパリン処理済みのチューブに取り、遠心分離 (490 × g, 10 min) することにより得た血漿 100  $\mu$ l に内標準物質 (5  $\mu$ M tacrolimus) 100  $\mu$ l, acetonitrile 200  $\mu$ l を加えた後、ethyl acetate 0.6 ml を加え 5 分間激しく振盪し遠心分離 (5,300 × g, 5 min) した。上清を採取し、減圧下で蒸発乾固させた後、得られた残渣を 10 mM ammonium acetate : acetonitrile = 10 : 90 に再溶解し、LC/MS/MS 法によりサンプル中 CsA の定量を行った。

**2-2-3. 全血中 CsA 濃度の測定** ラット全血中 CsA 濃度は Koster RA らの方法<sup>17)</sup>に準じて測定した。すなわち、採取した血液 100  $\mu$ l に内標準物質 (5  $\mu$ M tacrolimus) 100  $\mu$ l, acetonitrile 200  $\mu$ l を加えた後、0.3 mM zinc sulphate 200  $\mu$ l, ethyl acetate 0.6 ml を加えた後、血漿サンプルと同様

の方法により CsA の抽出操作を行い LC/MS/MS 法によりサンプル中 CsA の定量を行った。

**2-2-4. LC/MS/MS 測定条件** System: ACQUITY™ Ultra Performance LC (Waters Co. Ltd., Milford, NE), Detector: ACQUITY™ UPLC TQ detector (Waters Co. Ltd., Milford, NE), Column: ACQUITY™ UPLC BEH C18 (1.7 μm) (2.1 i.d. × 50 mm, Waters Co. Ltd., Milford, NE), Mobile phase: 10 mM ammonium acetate: acetonitrile = 10:90, Flow rate: 0.2 ml/min, Ionization: ESI (positive), Column temperature: 50°C, Source temperature: 120°C, Desolvation temperature: 360°C, Desolvation gas flow: 600 l/hr, Cone gas flow: 50 l/hr, Cone voltage: 70 V, Collision energy: 94.0 eV, Detection: 1203.08 m/z > 127.9 m/z

**2-2-5. 統計学的解析** 得られたデータは平均値および標準偏差で表記した。平均値の差の検定には Microsoft Office Excel 2007 を用いて Student の t-検定を行った。

なお、有意水準は危険率 5% とし、\* で示した。

### 3. ラット肝 CYP3A 活性に及ぼすリポソームの影響

**3-1-1. リポソームの静脈内投与** 実験動物として、実験前日に頸静脈にカニューレを施した Wistar 系雄性ラット (体重 280-330 g) を使用した。実験開始 12 時間前より絶食させたラットに 0.05, 0.5, 5 mmol phospholipids/kg/day の DPPC-lip を単回、あるいは 3, 5, 7 日間にわたり連日投与した。

**3-1-2. ラット肝 CYP3A 活性測定** 単回投与の場合、DPPC-lip 投与から 3, 6, 12, 24, 48 時間後に、連続投与の場合、DPPC-lip の最終投与か

ら 12 時間後にラットを断頭することにより脱血し、正中線に沿って開腹した。肝臓を摘出し、常法にしたがってラット肝ミクロソーム懸濁液を得た。最終タンパク濃度が 0.2 mg/ml になるように調製したラット肝ミクロソームに、CYP3A 基質薬物として midazolam を添加 (最終濃度 20 μM) 後、NADPH-regenerating system (1.3 mM β-NADPH, 3.3 mM glucose-6-phosphate, 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase いずれも最終濃度) を加えることにより incubation を開始した。10 分後、氷冷 100 mM sodium carbonate 溶液を添加することにより酵素反応を停止させサンプルとした。内標準物質として diazepam 添加後、ethyl acetate を加え、抽出操作を行った。Ethyl acetate 層を採取後、減圧下で蒸発乾固させた後、得られた残渣を 10 mM ammonium acetate : acetonitrile = 50 : 50 の混液 100 μl に再溶解させた。下記条件にて midazolam の CYP3A による代謝産物である 1'-hydroxy midazolam および 4-hydroxy midazolam を LC/MS/MS 法により定量した。1'-hydroxy midazolam および 4-hydroxy midazolam の生成速度を CYP3A 活性の指標として用いた。

**3-1-3. LC/MS/MS 測定条件** System: ACQUITY™ Ultra Performance LC (Waters Co. Ltd., Milford, NE), Detector: ACQUITY™ UPLC TQ detector (Waters Co. Ltd., Milford, NE), Column: ACQUITY™ UPLC BEH C18 (1.7 μm) (2.1 i.d. × 50 mm, Waters Co. Ltd., Milford, NE), Mobile phase: 10 mM ammonium acetate : acetonitrile = 50 : 50, Flow rate: 0.3 ml/min, Ionization: ESI (positive), Column temperature: 40 °C, Source temperature: 120 °C, Desolvation temperature: 360°C, Desolvation gas flow: 600 l/hr, Cone gas flow: 50 l/hr, Cone voltage: 40 V, Collision energy: 48.0 eV, Detection: 342.1 m/z > 234.1 m/z (1'-hydroxy midazolam), 342.1m/z > 203.1

m/z (4-hydroxy midazolam)

## 結果と考察

### 1. CsA - リポソーム間における相互作用

CsA は血球移行性の高い (60-70 %) 薬物であることが知られている<sup>18)</sup>。一方、リポソームは赤血球と酷似した脂質二重膜構造を持つことから、血球移行性の高い CsA は、血中にリポソームが存在した際、CsA と赤血球間の相互作用に変化を生じる可能性がある。また、CsA は血液においてリポプロテイン等と親和性が高いことも知られている<sup>18)</sup>。リポソームはその構造上、リポプロテインと同様に脂質の会合体ととらえることができるため、CsA とリポプロテイン間の相互作用にも同様の変化を生じる可能性が考えられる。そこでまず、血清中における CsA の存在状態に対するリポソームの影響を調べることを目的として、DPPC-lip 添加、非添加時における血清中 CsA の存在状態の違いをゲルろ過クロマトグラフィーにより比較した。まずタンパク非存在下の状態で、リポソームと CsA 間の相互作用の有無を確認した。

PBS 中に CsA を溶解したサンプルをゲルろ過カラムに添加すると、Fig. 1 (A) に示すように全ての CsA はフラクション 18-21 に得られる遊離形 CsA として回収された。これに対してリン脂質濃度が 0.1 mmol phospholipid/l になるように DPPC-lip を添加すると、CsA の遊離形の回収量は DPPC-lip 非存在時と比較して約 77% に低下した。さらに、リポソームが回収されるフラクション 8-10 中に CsA の残量 (約 23%) が回収された (Fig.1 (B))。そこでリポソーム添加濃度を 1 mmol phospholipid/l に増大させたところ、Fig.1 (C) に示すように、遊離形 CsA の量は DPPC-lip 非存在時の 45% に低下する一方、DPPC-lip と相互作用を生じた CsA は 55% に増大した。これらの結果は、DPPC-lip と CsA の間

には明らかに相互作用が生じること、また、その相互作用は DPPC-lip 濃度に依存して増大することを示している。しかし、血中には脂溶性物質と相互作用を生じやすい血清タンパクやリポプロテイン等が存在していることから、血中に投与された CsA がリポソームと実際に相互作用を引き起こすかどうかについては明らかではない。そこでさらに血清中での CsA の存在状態に及ぼすリポソームの影響について検討した。

### 2. *in vitro* ラット血清中における CsA とリポソームの相互作用

ラットより得た血清中に、CsA を単独あるいは DPPC-lip とともに添加したサンプルを用いて、CsA の存在状態の変化について同様に検討した。ラット血清中に CsA のみを添加した際のクロマトグラムを Fig.2 (A) に示した。血清中には低密度リポタンパク (LDL; Low-density lipoprotein)、高密度リポタンパク (HDL; High-density lipoprotein)、albumin 等が存在しており、予備実験において LDL はフラクション 8-14 に、HDL はフラクション 16-18 に、また、アルブミンも HDL 同様フラクション 16-18 に溶出することをあらかじめ確認した。また、本溶出順序は同様の検討を行った報告<sup>19)</sup>とも一致した。血清中に CsA のみを添加した際、遊離形のフラクション (フラクション 18-21) からの CsA の回収は極めて低かったのに対して、LDL および、HDL あるいは albumin の溶出位置からそれぞれ約 42% および約 58% の CsA が回収され、ほぼ全量の CsA は血清タンパクと結合して存在していることが示された。これは CsA のタンパク結合率は 98% 以上であるとの報告<sup>20)</sup>と矛盾しないと考えられる。次に血清中にリン脂質濃度が 0.1 mmol phospholipid/l になるように DPPC-lip を添加したところ、HDL あるいは albumin の溶出位置からの CsA の回収量は減少したが、LDL の溶出位置からの回収は顕著に増大 (49%) した (Fig.2 (B))。本実験条

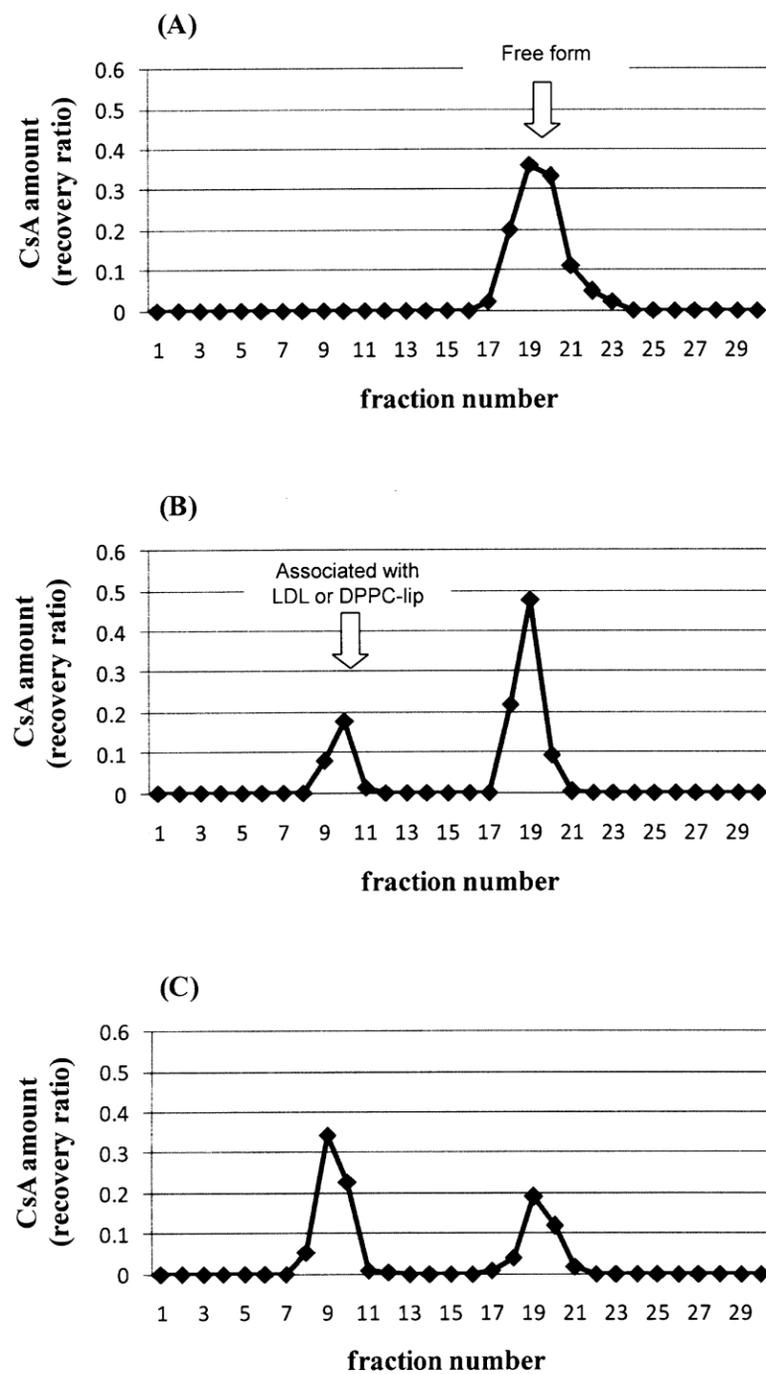


Figure 1 Gel filtration chromatogram of Cyclosporin A (CsA) in PBS samples; (A) 10 µg/ml CsA in PBS alone, (B) 10 µg/ml CsA with dipalmitoylphosphatidylcholine liposome (DPPC-lip) (0.1 mM phospholipid), (C) 10 µg/ml CsA with DPPC-lip (1 mM phospholipid).

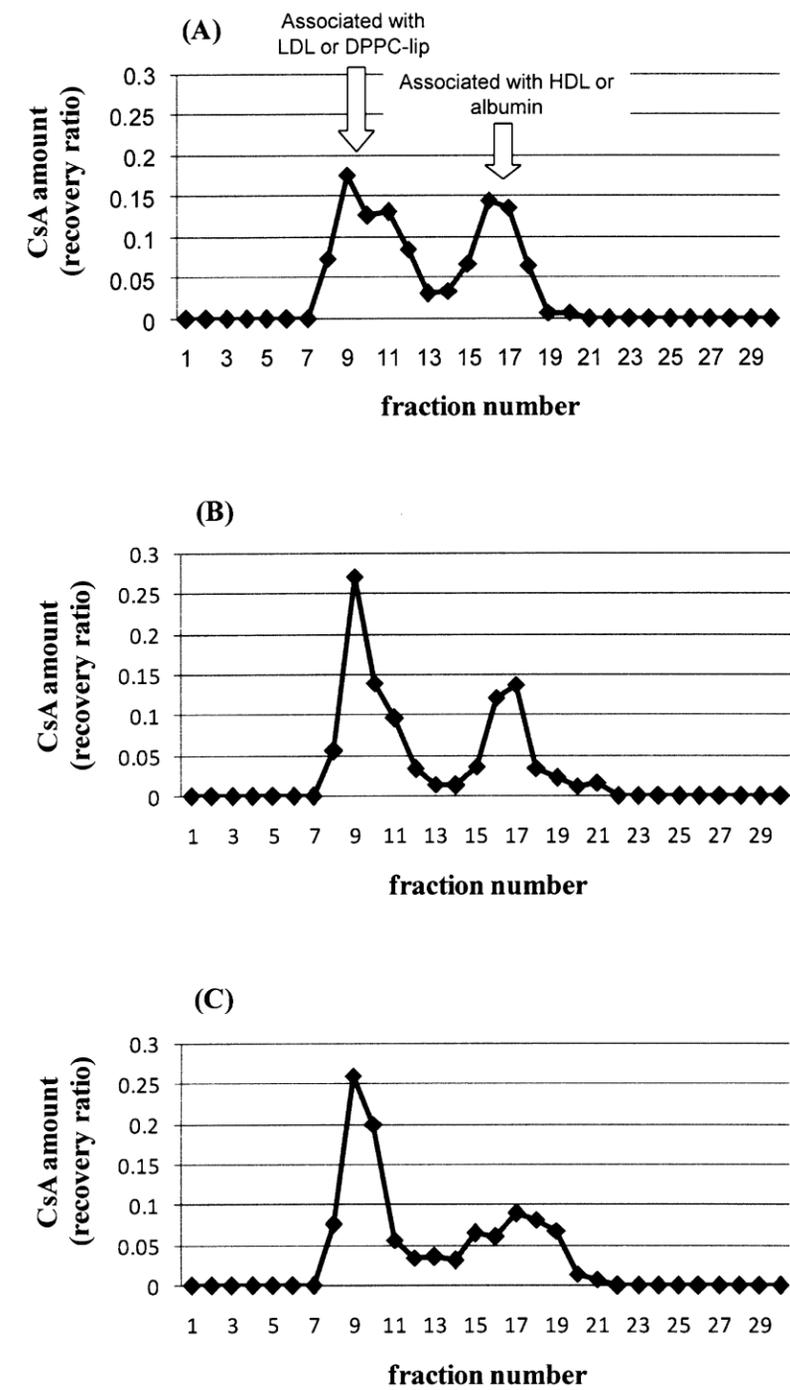


Figure 2 Gel filtration chromatogram of Cyclosporin A (CsA) in rat serum samples; (A) 10 µg/ml CsA in rat serum alone, (B) 10 µg/ml CsA with dipalmitoylphosphatidylcholine liposome (DPPC-lip) (0.1 mM phospholipid), (C) 10 µg/ml CsA with DPPC-lip (1 mM phospholipid).

件では LDL と DPPC-lip は分離定量することが不可能であったが、DPPC-lip 添加時のフラクション 8-14 付近の CsA の回収量の増大は、リポソームと相互作用を起こした CsA に起因する可能性がある。そこで、添加リポソームの濃度を 1 mmol phospholipid/l に増大させて同様の検討を行った。その結果、Fig.2 (C) に示すように、0.1 mmol phospholipid/l リポソーム添加時と比較して、LDL の溶出位置からの回収はさらに増大 (52%) した。よって、CsA のように血清成分と相互作用が大きい薬物とリポソームを併用投与すると、血清成分と結合しやすい薬物がリポソーム膜表面に吸着するかあるいは内部に取り込まれる等、CsA の存在状態が変化する可能性がある。このリポソームと薬物間の相互作用はリポソームを構成する脂質組成等の違いによっても種々変化するものと推察される。

### 3. CsA の *in vivo* 血中動態に与えるリポソームの影響

これまでの検討により CsA は DPPC-lip と *in vitro* 血清中において相互作用を示すことが明らかとなった。そこでさらに *in vivo* の条件においても同様に相互作用が生じるかどうかについて検討を行った。なお本実験においてはサンプル取り扱いの簡便性を考慮して全血中および血漿中 CsA の濃度を測定した。ラットに DPPC-lip を静脈内投与 60 分後、CsA を投与した際の全血中 CsA 濃度の時間推移を Fig.3 (A) に示した。DPPC-lip 前処置の有無にかかわらず、全血中 CsA 濃度は 3 相性の消失を示すことが明らかとなった。また、両群において全血中 CsA 濃度にほとんど差は認められなかった。ヒトにおける CsA の体内動態は 3 相性の消失を示すことが示されており、<sup>21-23)</sup> ラットの場合もこれらの報告に一致した。同様の実験条件下、血漿中 CsA 濃度の時間的推移を Fig.3 (B) に示した。

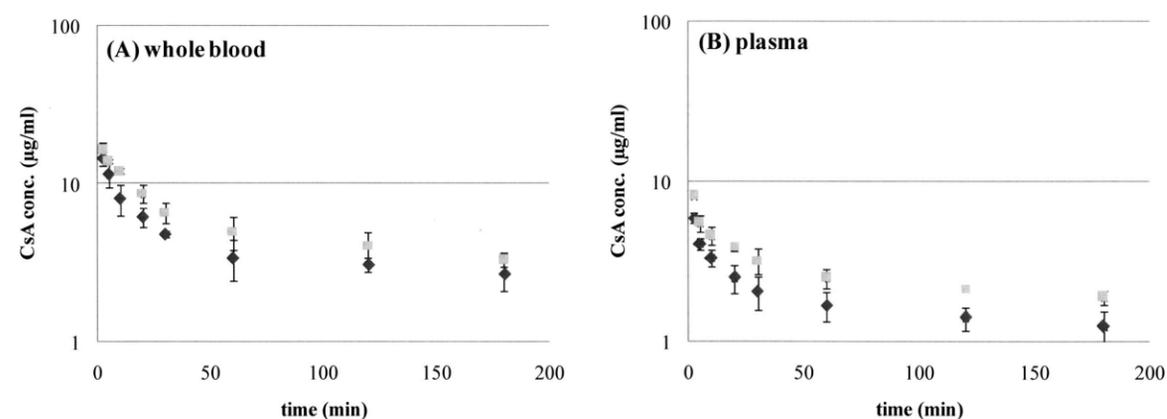


Figure 3 Effects of pre-dosing of dipalmitoylphosphatidylcholine liposome (DPPC-lip) on the pharmacokinetics of Cyclosporin A (CsA) in rats; (A) CsA concentration in whole blood and (B) CsA concentration in plasma.

Keys; ■ : with DPPC-lip, ◆ : without DPPC-lip

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

DPPC-lip 前処置の有無に関わらず血漿中濃度は全血中濃度と比較して低い値を示していることから、CsA は血球への分配が大きく、全血での濃度測定の必要性を改めて示すものと考えられた。また、DPPC-lip 前処置群の血漿中濃度は無処置群と比較して高い値を示す傾向が認められた。全血中および血漿中 CsA 濃度の時間推移データに対してモーメント解析を施すことにより算出された CsA の体内動態パラメータを Table 1 に示した。まず、全血中濃度より得られたパラメータは DPPC-lip の前処置の有無により血中濃度下面積 (AUC: Area Under the time-concentration Curve)、全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) および消失半減期 ( $T_{1/2}$ ) に有意な差は認められなかった。*in vitro* における結果から CsA の *in vivo* 血中動態は変化することが予想されたものの、実際には大きな変化は認められないことが示された。一方、血漿中濃度より得られたパラメータから DPPC-lip の前処置により  $CL_{tot}$  の値は有意に低下することが明らかとなった。これは DPPC-lip に結合した CsA のクリアランスは血漿中タンパクと結合した CsA や非結合形の CsA のクリアランスと比較して小さい可能性を

示している。しかしながら、全血中でのクリアランスに有意な変化は認められなかったことから、CsA の体内動態に大きな変化はないものと推察される。一般に血液中薬物濃度 ( $C_{blood}$ ) と血漿中薬物濃度 ( $C_{plasma}$ ) の間には以下のような関係がある。

$$C_{blood} = \{(1 - Hct) + Hct \times K\} \times C_{plasma} \quad (1)$$

ここで、Hct はヘマトクリット値を、K は血球-血漿間の分配係数を示す。また、式 (1) の両辺を時間に対して積分すると、以下のように変形できる。

$$AUC_{blood} = \{(1 - Hct) + Hct \times K\} \times AUC_{plasma} \quad (2)$$

そこで、Table 1 において得られたデータおよびラットの Hct 値を 0.41 として (2) 式に代入すると、DPPC-lip 無処置群の K 値は 1.82 となり、これは血球分配率 (血球中薬物濃度 / 全血中薬物濃度) が約 0.56 であることに相当し、これまでの報告と非常に良く一致する。<sup>18)</sup> また、DPPC-lip 前処置群の K 値は約 1.20 となり、これは血球分配率

Table 1 Pharmacokinetic parameters of cyclosporin A (CsA) after intravenous administration to rats.

	AUC ng·h/ml	$CL_{tot}$ ml/min	$T_{1/2}$ h
<b>whole blood</b>			
without DPPC-lip	2920.8 $\pm$ 286.8	1.03 $\pm$ 0.10	5.66 $\pm$ 2.4
with DPPC-lip	3132.8 $\pm$ 214.0	0.96 $\pm$ 0.07	4.08 $\pm$ 1.0
<b>plasma</b>			
without DPPC-lip	2183.6 $\pm$ 236.3	1.37 $\pm$ 0.12	6.51 $\pm$ 3.9
with DPPC-lip	2896.3 $\pm$ 174.5*	1.04 $\pm$ 0.15*	6.73 $\pm$ 2.9

CsA (3mg/kg) was intravenously injected to rats 1 h after administration of DPPC-lip (10 mmol phospholipid/kg).

Each parameter was calculated based on the moment analysis.

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three rats.

\* $p < 0.05$  vs without DPPC-lip group

が約 0.45 に相当する。このことからリポソームの前処置により血球分配率が約 0.1 程度低下することが明らかとなった。この理由について、リポソーム非存在時に血球に結合している CsA は約 60% 程度であるが、リポソームが存在すると約 10% 程度が血球から解離し、リポソームと相互作用するため、見かけ上、血漿中濃度が増大すると考えればこれらの現象を合理的に説明することが可能である。しかしながら、CsA の主たる存在状態は血球と結合した状態であるため、この程度の変化では体内動態に大きな影響は及ぼさないと推察される。

#### 4. ラット肝 CYP3A 活性に及ぼすリポソームの影響

生体に投与されたリポソームは RES に認識され最終的には肝臓に集積することが知られている。<sup>7,8)</sup> また近年、肝における主たる薬物代謝酵素 CYP が脂質、特にリン脂質により活性が影響を受ける可能性が報告されている。<sup>12-15)</sup> そこで多くの薬物に対する代謝酵素である CYP3A に着目し、ラット肝 CYP3A 活性におよぼすリポソームの影響について検討を行った。まず、DPPC-lip を静脈内単回投与した際の CYP3A 活性 (midazolam の水酸化活性を指標) を測定し、DPPC-lip 無処置群の CYP3A 活性に対する比 (CYP3A activity ratio) を算出して Fig.4 に示した。前処置に用いる DPPC-lip の投与量を 0.05, 0.5, 5 mmol phospholipid/kg と変化させた (Fig. 4(A), Fig. 4(B), Fig. 4(C)) が、DPPC-lip の投与量に関わらず、midazolam から 1'-hydroxy midazolam 及び 4-hydroxy midazolam への代謝活性ともに DPPC-lip 無処置群と比較して有意な差は認められなかった。また、投与後 6, 12 時間経過後にわずかに CYP3A 活性は上昇傾向を示したものの無処置群と比較して有意な差は認められず、リポソームの単回投与はラット肝 CYP3A 活性に影響を与えないことが明らかとなった。そこで次に DPPC-lip を 3, 5, 7 日間連続投

与した際の影響について同様の検討を行った。なお本実験では、単回投与時において最も CYP3A 活性上昇の傾向が大きかったリポソーム最終投与 12 時間後に活性を測定した。その結果、Fig.5 に示すように連続投与の日数にかかわらず CYP3A 活性は影響を受けなかった。また、この傾向はリポソームの投与量に依存しなかった。リン脂質の CYP に対する影響として、陰イオン性リン脂質により CYP 活性が誘導されることが多く報告されているが、<sup>12-15)</sup> そのような傾向は認められなかった。これは、リポソームを 1 週間程度連続投与した場合でも、構成リン脂質がマイクロソームへと取り込まれ、機能的な変化を起こしたり、相互作用を引き起こして CYP 活性が変化したりしないことを示している。これらのことより、DPPC より構成されるリポソームの単回あるいは連続投与は肝 CYP3A 活性に影響を与えず、安全な DDS 製剤であると考えられる。しかし、他の脂質組成のリポソームについてはさらなる検討が必要であると考えられる。

#### 結 論

以上の検討より、血球分配の大きなモデル薬物として用いた CsA をリポソームと併用投与した際には血球分配が低下し、血球から解離した CsA がリポソームと相互作用する可能性が示された。しかし、その割合は僅かであることから CsA の体内動態が大きく変化するには至らないと考えられる。一方、リポソームは単回、頻回連続投与に関わらず肝 CYP3A に対する影響は認められないことが明らかとなった。よってリポソームは血球分配の大きな薬物と併用した際にも相互作用を生じにくく、安全な投与製剤であると考えられる。

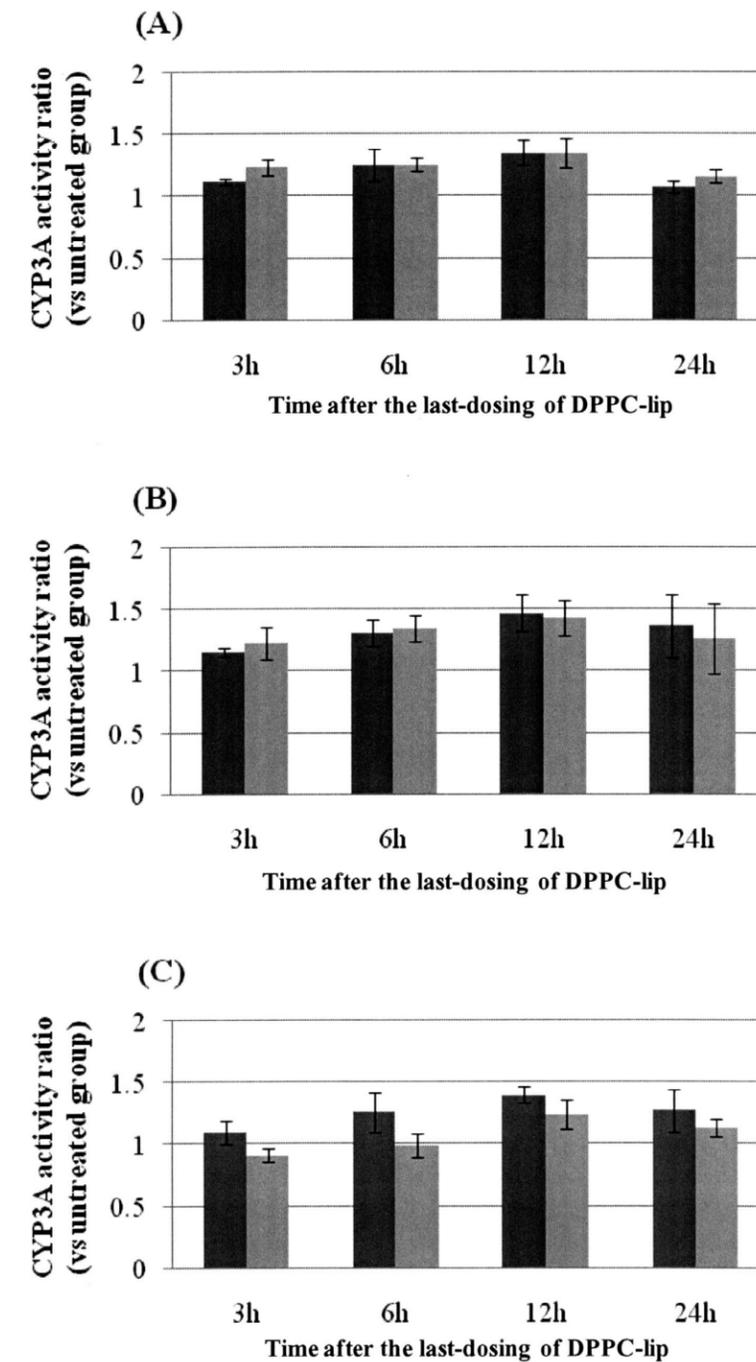


Figure 4 Changes in cytochrome P450 3A (CYP3A) activity in rats liver after single intravenous administration of dipalmitoylphosphatidylcholine liposome (DPPC-lip); (A) 0.05 mmol/phospholipid/kg, (B) 0.5 mmol/phospholipid/kg, (C) 5 mmol/phospholipid/kg. Keys; ■ : 4-hydroxy midazolam, ▒ : 1'-hydroxy midazolam. Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 to 4 experiments.

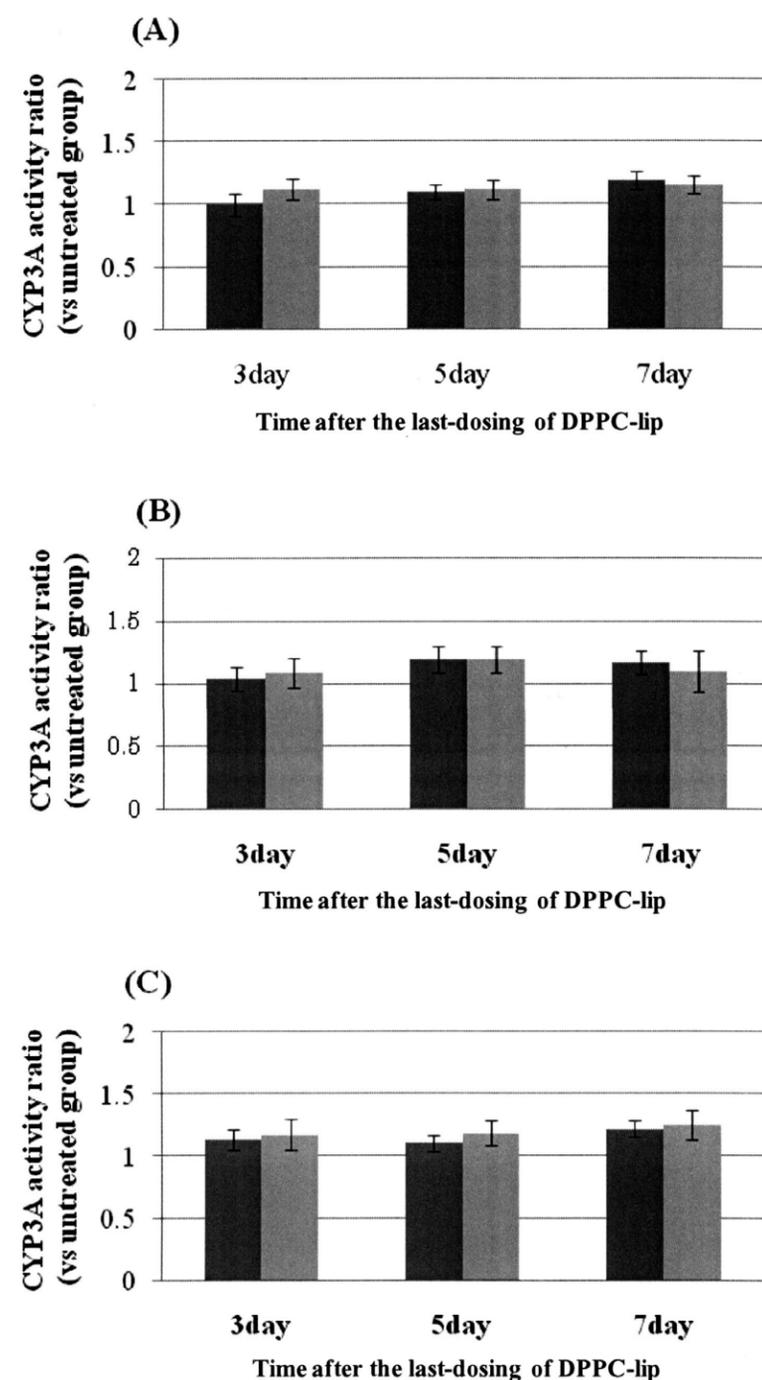


Figure 5 Changes in cytochrome P450 3A (CYP3A) activity in rats liver after consecutive intravenous administration of dipalmitoylphosphatidylcholine liposome (DPPC-lip); (A) 0.05 mmol/phospholipid/kg, (B) 0.5 mmol/phospholipid/kg, (C) 5 mmol/phospholipid/kg.

Keys; ■ : 4-hydroxy midazolam, ■ : 1'-hydroxy midazolam.

Each bar represents the mean ± S.D. of 3 to 4 experiments.

## REFERENCES

- Bangham A.D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, **13**, 238–252 (1965).
- Dass C. R., Choong P. F., *J. Control. Release*, **113**, 155–163 (2006).
- Andresen T. L., Jensen S. S., Jørgensen K., *Prog. Lipid Res.*, **44**, 68–97 (2005).
- Cukierman E., Khan D. R., *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 762–770 (2010).
- AmBisome<sup>®</sup>, Package Insert, Dainippon Sumitomo Pharma Co. Ltd., June (2009).
- Doxil<sup>®</sup> Injection, Interview Form, Janssen Pharmaceutical K. K., September (2009).
- Ishida T., Harashima H., Kiwada H., *Biosci. Rep.*, **22**, 197–224 (2002).
- Yan X., Scherphof G. L., Kamps J. A., *J. Liposome Res.*, **15**, 109–39 (2005).
- Yamaguchi M., Fujihara M., Wakamoto S., Sakai H., Takeoka S., Tsuchida E., Hamada H., Azuma H., Ikeda H., *ASAIO J.*, **55**, 200–205 (2009).
- Sakai H., Sou K., Horinouchi H., Kobayashi K., Tsuchida E., *J. Intern. Med.*, **263**, 4–15 (2008).
- Sakai H., Sou K., Horinouchi H., Kobayashi K., Tsuchida E., *Artif. Organs.*, **33**, 139–45 (2009).
- Kim K. H., Ahn T., Yun C. H., *Biochemistry*, **42**, 15377–15387 (2003).
- Ahn T., Guengerich F. P., Yun C.-H., *Biochemistry*, **37**, 12860–12866 (1998).
- Imaoka S., Imai, Y., Shimada T., Funae Y., *Biochemistry*, **31**, 6063–6069 (1992).
- Ingelman-Sundberg M., Hagbjork A. L., Ueng Y. F., Yamazaki H., Guengerich F. P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 318–322 (1996).
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–75 (1951).
- Koster R. A., Dijkers E. C., Uges D. R., *Ther. Drug Monit.*, **31**, 116–25 (2009).
- Neoral<sup>®</sup> Interview Form, Novartis Pharma K. K. November (2009).
- Seki J., Sonoke S., Saheki A., Koike T., Fukui H., Doi M., Mayumi T., *Int. J. Pharm.*, **275**, 239–48 (2004).
- Campana C., Regazzi M. B., Buggia I., Molinaro M., *Clin. Pharmacokinet.*, **30**, 141–179 (1996).
- Brynskov J., Freund L., Campanini M. C., Kampmann J. P., *Scand. J. Gastroenterol.*, **27**, 961–967 (1992).
- Wu G., Cossetti P., Furlanut M., *Pharmacol. Res.*, **34**, 47–57 (1996).
- Fanta S., Jönsson S., Backman J. T., Karlsson M. O., Hopppu K., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **64**, 772–784 (2007).
- Japan SLC INC., <http://jslc.co.jp/inform/2007data/wistar2007.pdf>.