

# アスコルビン酸誘導体を用いた新規薬物含有ナノ微粒子製剤の開発

千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室

森部 久仁一、山本 恵司、東 顕二郎

Ascorbic acid is widely known as antioxidant agent. Recently, many ascorbic acid derivatives were produced for improvement of the stability. Ascorbyl 2,6 dipalmitate (ASC-DP) is a fatty ester derivative of ascorbic acid. It can't form micelle or liposome structure by itself. However, ASC-DP-distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG) complex was found to form stable nanoparticles. In this study, we prepared and characterized drug-incorporated ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles. DSPE-PEG was used as one of a solubilizing agent. AmphotericinB (AmB) was used as a model drug. Nanoparticles were prepared by hydration method. ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles were prepared at a molar ratio of 1/1. AmB-loaded nanoparticles were prepared from ASC-DP/DSPE-PEG (1/1 molar ratio) with 10%mol of AmB. Toxicity of AmB-loaded nanoparticles were examined and compared with that of Fungizone<sup>®</sup> using ddy mouse. Mice were injected intravenously with a single dose of AmB-loaded samples. Minimum lethal dose (MLD) was defined as the minimum dose that produces death in all mice. Renal and hepatic functions were detected by measuring the serum urea, creatinine, GOT and GPT concentrations. The concentration of AmB in plasma after intravenous administration of each sample was determined by high-pressure liquid chromatography. ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles were obtained with the size of ca. 75-110nm. ASC-DP nanoparticles were prepared only when PEG-lipid derivatives were used as solubilizing agent. ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles enable to incorporate hydrophobic drugs, such as AmB, nystatin, fluconazole, and clarithromycin. AmB (10mol%)-loaded nanoparticles were obtained with an average particle size of ca. 170nm and were stable for more than 1 week. MLD of Fungizone was 4.0mg/kg, while that of AmB(10mol%)-loaded nanoparticles was up to 12mg/kg. When AmB (10mol%) nanoparticles or Fungizone was administered to mice at a dose of 2.0mg/kg, Fungizone showed higher renal and hepatic toxicity than AmB(10mol%)-loaded nanoparticles. These results indicated that incorporation of AmB in ASC-DP/DSPE-PEG reduced the toxicity of AmB. AmB(10mol%)-loaded nanoparticles demonstrated higher plasma concentration of AmB than Fungizone when samples were administered to mice at a dose of 1.0mg/kg. In conclusion, AmB was successfully loaded in ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticulate system. Because the nanoparticulate system was applicable for the other hydrophobic drugs, it would become a promising drug carrier system.

## 1. 緒言

アスコルビン酸は抗酸化作用を持ち、医薬品、化粧品原料及び食品添加物等として広く用いられている。近年、アスコルビン酸の安定性を向上させる目的で各種アスコルビン酸誘導体が合成されている。Ascorbyl dipalmitate (ASC-DP) は、アスコルビン酸の2位及び6位にパルミトイル基を導入することにより脂溶性を持たせた誘導体で、抗酸化作用を示すことから化粧品基材等に用いられている。一方 Polyethylene glycol (PEG) 脂質誘導体は、疎水性の脂質部位に親水性のPEGが結合したもので、乳化剤あるいはリポソーム製剤の血中滞留性向上を目的として使用されている。我々は、ASC-DPとPEG脂質誘導体である Distearoyl phosphatidylethanolamine-PEG2000 (DSPE-PEG) からなる複合体が水中において、サブミクロンレベルの新規微粒子を形成することを見出した。そこで、本研

究では、新規薬物担体の調製を目的として、薬物封入ナノ微粒子の調製と物性評価及び毒性・体内動態の検討を行った。

## 2. 実験

用いた主な化合物の構造式を Fig. 1 に示す。モデル薬物にはアンホテリシンB (AmB) を用いた。ASC-DP と DSPE-PEG を種々のモル比で有機溶媒 (クロロホルム、メタノール) に溶解させ、溶媒留去により薄膜を調製した。この薄膜に水系溶媒 (蒸留水、リン酸緩衝液 pH7.4) を加え水相とし、得られた微粒子について粒度分布及びゼータ電位測定を行った。ASC-DP ナノ微粒子形成条件を検討するため、各種可溶化剤を用いたスクリーニングを行った。また、ASC-DP/DSPE-PEG ナノ微粒子に封入できる難水溶性薬物のスクリーニングを行った。全数致死量 (MLD) は AmB 封入製剤を各種用量でマウスに尾静脈投与し3時間以内での致死数から評価した。腎毒性の指標 (Cre、BUN) と肝毒性の指標 (GOT、GPT) は、AmB 封入製剤を AmB 量として 1 mg/kg または 2 mg/kg マウスに尾静脈投与したのち 48 時間後の血液サンプルを採取することで評価を行った。各種製剤の血中滞留性は、試料をマウスに尾静脈投与したのち経時的に血液試料を採取し、C18 BOND-ELUTE を用いて AmB を抽出後、HPLC で定量した。



Formulation development of novel drug-encapsulated nanoparticles using ascorbyl acid derivatives

Kunikazu Moribe\*, Keiji Yamamoto, Kenjiro Higashi

Laboratory of Pharmaceutical Technology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

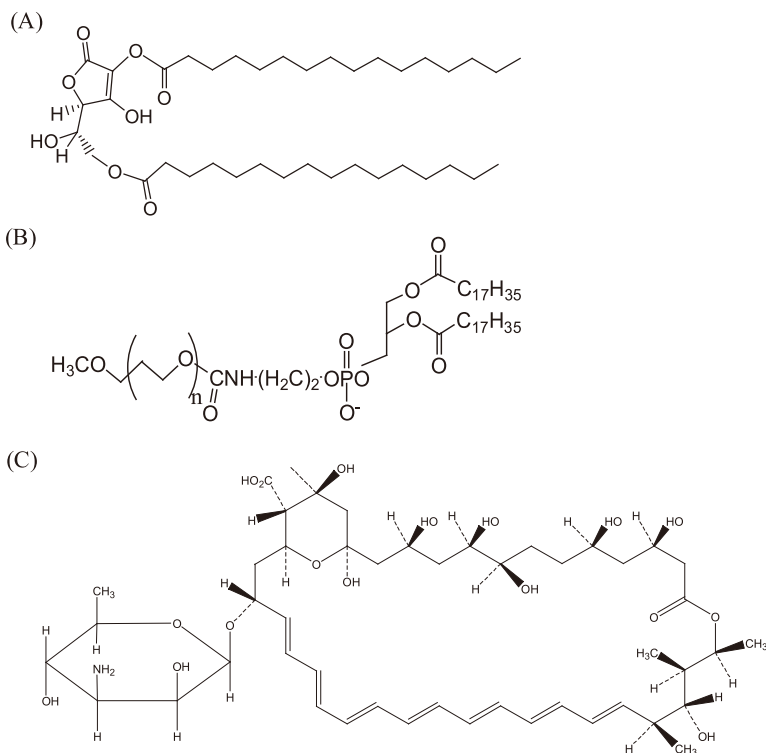


Table 1 The mean particle size of the drug (10 mol%)/ASC-DP/DSPE-PEG (1:1 molar ratio) nanoparticles.

Drug	Mean particle size (nm)	
	After hydration	After storage for 24h
Amphotericin B	170	162
Nystatin	125	120
Fluconazole	79	76
Clarithromycin	133	126
Acetohexamide	189	159
Vitamin D <sub>3</sub>	90	89
Coenzyme Q <sub>10</sub>	102	96
Thioctic acid	80	80

Fig.1 Chemical structure of ascorbyl-2,6-dipalmitate (ASC-DP), (B) dis tearoylphosphatidylethanolamine polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG), and (C) AmB.

### 3. 結果および考察

ASC-DPと各種界面活性剤をモル比 1:1 の組成で調製した試料について、微粒子形成の検討を行った。その結果、ASC-DP/DSPE-PEGを用いた系では、平均粒子径75-110 nmの微粒子形成が認められ2週間後においても安定に存在するのが観察された。一方、その他の界面活性剤を用いた系では、24時間後には凝集が観察され安定な微粒子は得られなかった。ASC-DP、DSPE-PEG モル比 1:1 の微粒子へ封入可能な薬物について検討したところ、AmB、ナイスタチン、フルコナゾール、クラリスロマイシンといった難溶性医薬品や脂溶性ビタミン、サプリメントで封入可能であることがわかった (Table 1)。

ASC-DP/DSPE-PEG ナノ微粒子懸濁液について安定性を評価したところ、2週間にわたって凝集が見られず、粒子径にほとんど変化は認められなかった。安定性に寄与すると考えられる微粒子表面の電荷を評価した結果、ASC-DP/DSPE-PEG 微粒子の表面は -37.9 mV に帯電しており、静電反発力が微粒子の安定性に寄与していると考えられた。

次に ASC-DP/DSPE-PEG からなる薄膜調製段階において、抗真菌薬 Amphotericin (AmB) を 10% 添加し、薬物封入検討を行った。AmB を添加した試料について粒度分布測定を行ったところ、平均粒子径 170 nm の微粒子形成が認められ、さらに 24 時間後においても AmB の凝集によ

る沈殿が見られず、安定に存在することが観察された。このことから、得られた微粒子には AmB が封入可能であることが明らかとなった。次にゼータ電位測定を行い微粒子表面の電荷を評価したところ、薬物未封入の微粒子の電位は -39 mV、AmB 封入微粒子の電位は -34 mV と負電荷の電荷を示し、静電反発力が微粒子の安定化に寄与しているものと考えられた (Table 2)。

AmB 封入ナノ微粒子の臨床応用を目的とし、MLD 及び Cre, BUN, GOT, GPT を指標として急性毒性を評価した。その結果、MLD は市販薬の Fungizone (4mg/kg) と比較して、ナノ微粒子製剤の方が顕著に高い値 (12mg/kg) を示し、ナノ微粒子化による毒性の軽減が示された。また、AmB 封入ナノ微粒子は Fungizone と比較して、AmB の重篤な副作用である腎毒性及び肝毒性を顕著に抑制した。ナノ微粒子に封入した AmB の血中滞留性を Fungizone と比較したところ、AmB 封入ナノ微粒子において優位な血中滞留性の増大が観察された (Fig. 2)。

### 4. 総括

以上の結果から、AmB を封入した ASC-DP/DSPE-PEG ナノ微粒子は市販の Fungizone と比較して優れた AmB 製剤であることが明らかとなった。ASC-DP/DSPE-PEG ナノ微粒子には他の難水溶性の薬物の封入も可能であることから、薬物送達キャリアーとしての利用が期待できる。今

Table 2 Mean particle size and zeta-potential of AmB/ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles. <sup>a)</sup>

Sample	Mean particle size (nm) <sup>b)</sup>		Zeta-potential <sup>c)</sup> (mV)
	After hydration	Storage for 24 h	
ASC-DP/DSPE-PEG	67 ± 7	63 ± 5	-39.0 ± 4.3
AmB (1 mol%) /ASC-DP/DSPE-PEG	122 ± 8	122 ± 8	-37.2 ± 1.4
AmB (5 mol%) /ASC-DP/DSPE-PEG	135 ± 2	157 ± 3	-32.6 ± 0.6
AmB (10 mol%) /ASC-DP/DSPE-PEG	170 ± 7	162 ± 5	-33.9 ± 0.4

<sup>a)</sup> Entrapment efficacy of AmB, which was evaluated by passing the sample solution through 0.8mm filter, was more than 99% in each samples.

<sup>b)</sup> Mean ± S.D., n = 3

<sup>c)</sup> Mean ± S.D., n = 5

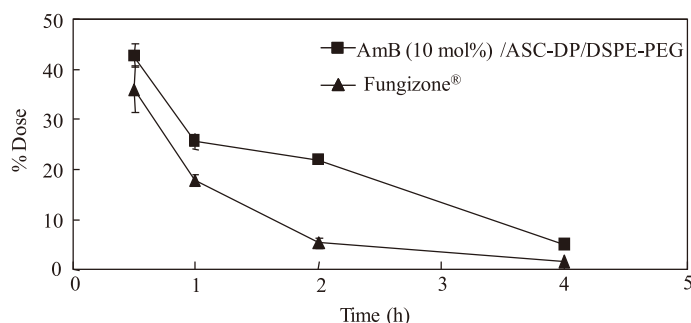


Fig.2 Plasma concentration of AmB after mice were intravenously administered AmB/ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles or Fungizone at a dose of 1.0 mg/kg. Each point represents the mean ± SD (n = 3-5).

後は、ナノ微粒子形成に及ぼす組成の影響や得られたナノ微粒子の構造について検討していく予定である。

なお、本研究成果の詳細は参考文献1に発表した。

(参考文献)

- 1) Moribe K., Maruyama S., Inoue Y., Suzuki T., Fukami T., Tomono K., Higashi K., Tozuka Y., Yamamoto K., Ascorbyl dipalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs. *Int. J. Pharm.*,387, 236-243 (2010).
- 2) Tanaka, H., Yamamoto, R., Pharmaceutical studies on ascorbic acid derivatives. *Yakugakuzasshi* 86, 376-383 (1996).
- 3) Spiclin, P., Gäsperlin, M., Kmetec, V., Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *Int. J. Pharm.* 222, 271-279 (2001).
- 4) Gopinath, D., Ravi, D., Rao, B.R., Apte, S.S., Renuka, D., Rambhau, D., Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. *Int. J. Pharm.* 271, 95-113 (2004).
- 5) Inoue, Y., Yoshimura, S., Tozuka, Y., Moribe, K., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Yamamoto, K., Application of ascorbic acid 2-glucoside as a solubilizing agent for clarithromycin: solubilization and nanoparticle formation. *Int. J. Pharm.* 331, 38-45 (2007).
- 6) Moribe, K., Tanaka, E., Maruyama, K., Iwatsuru, M., Enhanced encapsulation of amphotericin B into liposomes by complex formation with polyethylene glycol derivatives. *Pharm. Res.* 15, 1737-1742 (1998).