薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (11) 1097-1103 (1980)

リポソームによるジブカインの局所麻酔作用の持続化とその機構¹⁾

岡野定輔, 芳賀 信, 渡辺善照, 吉村敬治²⁾

東北大学薬学部²⁾

Duration of the Local Anesthetic Action of Dibucaine by Liposomes and Its Mechanism¹⁾

TEISUKE OKANO, MAKOTO HAGA, YOSHITERU WATANABE, and KEIJI YOSHIMURA

Pharmaceutical Institute, Tohoku University²⁾

(Received March 21, 1980)

Duration of anesthetic action of dibucaine in the presence of liposome was studied, by using intradermal wheal methods in guinea pigs. The intermolecular interaction of dibucaine and liposomes was also studied *in vitro* in order to investigate the mechanism of the duration effect. When dibucaine was entrapped into liposomes, the decay of anesthetic action of the drug was inhibited and the duration time of anesthesia was prolonged. In case of liposomes composed of phosphatidylcholine and cholesterol, the degree of anesthesia ran parallel with the percentage of apparent entrapped dibucaine. It was suggested that ionic interaction played an important role in the binding of dibucaine and liposome having a negative charge.

Keywords—liposome; dibucaine; local anesthetic action; phosphatidylcholine; cholesterol; dicetylphosphate; ionic interaction; duration of drug action; intermolecular interaction; intradermal wheal method

リポソーム³⁾は脂質二重層構造を有する微小小球で、物理的、化学的に生体膜に類似点をもつことから、その構造や機能について多くの研究報告⁴⁾が行なわれている。リポソームは胞球内部に各種の溶質をトラップ (entrap) する性質をもつので、薬物の carrier としての応用が考えられ、これまでに抗生物質,⁵⁾ 制癌剤,⁶⁾ キレート剤,⁷⁾ インシュリン⁸⁾などをリポソームに封入して薬物の吸収や生体内分布を制御しようとする試みがなされてきた。

著者等は、リポソームの製剤学的応用を試みる研究の一環として、本研究において局所麻酔剤ジブカイン (2-butoxy-N-[2-(diethylamino)ethyl]-4-quinolinecarboxamide) について、モルモットにおけるこの薬物の局所麻酔作用 (以下、局麻作用と略す) におよぼすリポソームの影響について検討するとともに、その機構をジブカインとリポソームとの分子間相互作用の観点から *in vitro* で検討した。これらの検討の結果、リポソームにジブカインをトラップさせることにより、ジブカインの局麻作用の経時的減衰が抑制され、また作用持続時間が延長されることが明らかとなった。リポソームを構成する脂質が phosphatidylcholine (PC) と cholesterol (Chol)

1) 本報は「N-ヘテロ芳香族の電子的性状」第 69 報である。第 68 報: 岡野定輔, 堀江 孝, 小原弘子, 本橋 登, 薬誌, 100, 342 (1980)。

2) Location: Aobayama, Sendai, 980, Japan.

3) G. Gregoriadis, *New Eng. J. Med.*, 295, 704 (1976)。

4) a) A.D. Bangham, M.M. Standish, N. Miller, *Nature* (London), 208, 1295 (1965); b) D. Papahadjopoulos, N. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 625 (1967); c) J.A. Haxby, C.B. Kinsky, S.C. Kinsky, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 61, 300 (1961); d) K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 390 (1974)。

5) G. Gregoriadis, *FEBS Lett.*, 36, 292 (1973)。

6) A.W. Segal, G. Gregoriadis, C.D.V. Black, *Clin. Sci. Mol. Med.*, 49, 99 (1975)。

7) M.M. Jonah, E.A. Cerny, Y.E. Rahman, *Biochim. Biophys. Acta*, 401, 336 (1975)。

8) T. Tanaka, K. Taneda, H. Kobayashi, K. Okumura, S. Muranishi, H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 3069 (1975)。

の場合、局麻作用の持続化の度合とジブカインの見かけのトラップ率との間には対応関係が認められた。負の荷電物質を加えた PC-Chol-dicetylphosphate (DCP) 系のリポソームの場合は、ジブカインとリポソームとの相互作用にイオン結合の寄与が大きいことが明らかとなった。

実 験 の 部

試料 試薬——ジブカインの塩酸塩 (mp 98.5°) は帝国化学産業製の日本薬局方規格品を精製することなく使用した。Chol (無水物, mp 149°) は Sigma 社 (St. Louis) の製品, DCP (mp 70°) は ICN pharmaceuticals 社 (Plainview) の製品, stearylamine (SA) (mp 51°) は東京化成工業の製品を用いた。PC は Faure⁹⁾ の方法にしたがって、新鮮な卵黄から抽出後溶媒分画し、Unisil (Clarkson 社) を用いたカラムクロマトグラフィー¹⁰⁾ で精製したものを使用した。精製した PC はクロロホルムに溶解し、窒素ガス置換を行なったのち -10° で保存した。緩衝液調製用の試薬、その他の無機試薬は市販特級品を使用した。水は新鮮な再蒸留水を用いた。

溶液——溶液の pH を変化する場合を除いて、ジブカインは pH 6.0 の等張リン酸塩緩衝液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 (5.56 \times 10^{-3}\text{M})$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4 (2.78 \times 10^{-2}\text{M})$ - $\text{NaCl} (1.18 \times 10^{-1}\text{M})$ 混液 (以下緩衝液という) に溶解した。

ジブカイン-リポソーム懸濁液の調製——リポソームの調製は Rahman 等¹¹⁾ の方法に準じた。各 20 μmol の PC および Chol (必要に応じて種々のモル比の荷電物質を添加) を 200 ml の共栓つき丸底フラスコ中で約 15 ml のクロロホルムに溶解したのち、溶媒を減圧留去し、ガラス壁に生じた脂質の薄膜に 5 ml のジブカイン溶液を静かに加え、室温にて Vortex ミキサーで 10 分間攪拌して懸濁液とした。懸濁液からの遊離のジブカインの除去は超遠心法によって行なった。すなわち、上記の方法で調製した懸濁液を 5°, 78000 g で 60 分間超遠心分離したのち上清液を除き、残ったペレットに 0.6 ml の緩衝液を加えて再び懸濁液とした。リポソームにトラップされたジブカイン量は、この時除いた上清液中のジブカインを定量し、この値を初めに仕込んだジブカイン量から差し引くことにより求めた。またジブカインとリポソームの混合懸濁液を調製するには、脂質薄膜に緩衝液のみを加えてリポソーム懸濁液をつくり、超遠心分離して得たペレットに計算量のジブカイン溶液を加えた。得られたジブカインとリポソーム混合懸濁液を再度超遠心分離し上清液中のジブカインを定量して、ジブカインの初期量から差し引くことによりリポソーム表面付近に吸着したジブカイン量を算出した。

In Vivo 実験 麻酔作用の判定——体重 300—350 g の雄性モルモットの背部を実験前日に除毛して、Bülbring 等¹²⁾ の方法に準じて実験した。すなわち、動物 3 匹を 1 群として、除毛したモルモットの背部正中線上の前後 2 ケ所に試料溶液 0.2 ml を皮内注射し、丘疹部に墨で円を描いた。試料を投与したのち、5 分間隔で丘疹の中心部およびその前後左右 6 ケ所をマンドリン線のピンで刺激した。ピンの機械的刺激により生ずる皮膚反射 (表皮収縮) の発現の有無を観察し、6 回の刺激に対して反射の見られなかった回数の平均値を求め、この数値をもって局麻作用の度合とした。

麻酔持続時間——上記の局麻作用の実験において、皮膚反射が完全に回復するまでに要する時間を麻酔持続時間とした。¹³⁾

In Vitro 実験 ジブカインの定量——下記の限外ろ過実験では限外ろ過のろ液を、また透析実験では透析外液をそれぞれ pH 5.6 の緩衝液で適宜希釈し、島津 GF-16 型ケイ光分光光度計 (セル光路長 1 cm) を用いて、Marturci 等¹⁴⁾ に準じて励起波長 325 nm, ケイ光波長 405 nm でケイ光強度を測定してジブカインを定量した。定量はケイ光強度-濃度の検量線が直線性を示す濃度範囲で行なった。

透析実験——Meyer 等¹⁵⁾ の透析法に準じて行なった。試料溶液 (以下内液という) 4 ml をセルロースチューブ (Visking 社製; 27/32 型) に入れ、これを 37° に保った 40 ml の緩衝液 (以下外液という) 中に入れて透析した。内液を約 200 rpm, 外液を 400—500 rpm の速さでスターラーで攪拌し、一定時間ごとに外液 0.5 ml を採取、同時に緩衝液 0.5 ml を外液に加えた。ここに採取した外液をジブカインの定量に供した。

限外ろ過——掛見等¹⁶⁾ の方法に準じて行なった。一端を糸で結んで袋状にしたセルロースチューブにジブカ

9) M. Faure, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **32**, 503 (1950).

10) 井上圭三, “生化学実験講座 3 巻, 脂質の化学,” 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1974, p. 259.

11) Y.E. Rahman, M.W. Rosenthal, E.A. Cerny, E.S. Moretti, *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 640 (1974).

12) E. Bulbring, I. Wajda, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **85**, 78 (1945).

13) 長坂光昭, 寺島美佐子, 浅井 肇, 伊藤磯雄, *薬誌*, **92**, 681 (1972).

14) J.D. Martucci, S.G. Schulman, *Anal. Chim. Acta*, **77**, 317 (1975).

15) M.C. Meyer, D.E. Guttman, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 33 (1970).

16) 掛見喜一郎, 有田隆一, 山科 肇, 小西良士, *薬誌*, **82**, 536 (1962).

イン-リポソーム懸濁液 4.0 ml を入れ、ガーゼで包んで袋を補強し、共栓遠沈管に入れてろ液が約 1 ml になるまで 3000 rpm で遠心分離したのちろ過した。得られたろ液についてジブカインを定量した。別に、リポソームを含まない試料溶液について対照の限外ろ過実験を行なった。限外ろ過のすべての操作は 20° の恒温室内で行なった。

結 果

I. *In Vivo* の検討

a. PC-Chol 系リポソーム 遊離ジブカインを含むジブカイン-リポソーム懸濁液をモルモット背部皮内に投与し、局麻作用を経時的に観測した結果を Fig. 1 に示す。図に示されているとおり、この実験においてリポソームを構成する脂質（モル比 1:1 の PC と Chol）の総濃度は 0, 2, 4, および 8 $\mu\text{mol/ml}$ と変化させた。脂質濃度が 2 $\mu\text{mol/ml}$ では、ジブカイン単独の場合にくらべてジブカインの局麻作用に著明な変化は認められなかったが、脂質濃度が 4 および 8 $\mu\text{mol/ml}$ になると局麻作用の経時的減衰は著明に抑制され、抑制の度合は脂質の量が多いほど大であった。Fig. 1 の挿入図にリポソームを構成する脂質量と局麻作用の持続時間との関係を示す。図に明らかなとおり、脂質量が多いほど作用持続時間は延長した。

Fig. 2 に、同一量 (0.065 mg) のジブカインを含むジブカイン溶液、ジブカインとリポソーム（ジブカインを含まず）の混合懸濁液、およびリポソーム（ジブカイン）懸濁液（トラップされたジブカインのみを含み、遊離のジブカインは含まない）の 3 種の試料について、局麻作用を経時的に観測した結果を示す。図に明らかなとおり、ジブカインとリポソームの混合懸濁液の場合は、ジブカイン単独の場合に比べて局麻作用の経時的減衰の抑制はほとんど認められなかったが、作用持続時間はやや延長した。リポソーム（ジブカイン）懸濁液の場合は、ジブカイン単独の場合と比較して局麻作用の経時的減衰は著明に抑制され、作用持続時間も著明に延長した。この事実はジブカインがトラップされることにより局麻作用が持続化したことを指示する。ジブカインとリポソームの混合懸濁液を投与したとき、ジブカイン単独投与の場合に比較して局麻作用の持続時間がやや延長したことは、主としてジブカインがリポソーム表面に吸着されることに起因し、リポソーム（ジブカイン）懸濁液投与の

Fig. 1. Effect of Lipid Concentration on the Time Course of Local Anesthetic Action of Dibucaine-Liposome Systems

Concn. of lipid: —○—, 0 $\mu\text{mol/ml}$; —■—, 2 $\mu\text{mol/ml}$; —●—, 4 $\mu\text{mol/ml}$; —▲—, 8 $\mu\text{mol/ml}$.

Concn. of dibucaine was 0.05% (w/v).

Composition of liposome: PC: Chol=1:1 (molar ratio).

Vertical bars indicate standard error of the mean of 6 experiments. Inserted graph shows the effect of liposome on the duration of anesthesia of dibucaine.

Fig. 2. Time Course of Local Anesthetic Action of Dibucaine-Liposome Systems on the Intracutaneous Wheal of Guinea-Pigs

—○—, dibucaine soln.; —▲—, mixture of free dibucaine and liposomal suspension (no dibucaine entrapped); —●—, dibucaine-liposome suspension free from non-entrapped dibucaine.
Each dose contained 0.065 mg of dibucaine.
Concn. of lipid: 8 μ mol/ml
Composition of liposome: PC: Chol = 1: 1 (molar ratio).
Vertical bars indicate standard error of the mean of 6 experiments.

場合に局麻作用の経時的減衰の抑制および作用持続時間の延長が見られたのは、ジブカインがリポソーム内相に封入され、または脂質構造に組込まれたことに起因すると考えられる。実験の部記載の超遠心法により、脂質濃度が 8 μ mol/ml の場合にリポソームにトラップされるジブカイン量を定量したこの結果、PC-Chol 系では懸濁液の調製に用いたジブカイン量の約 4% がトラップされることが判った。またジブカインとリポソームの混合懸濁液を再度超遠心分離して得られた上清液中のジブカインを定量し、初めに仕込んだジブカイン量から差し引いて求めた量は初期量の約 1% であった。したがって懸濁液の調製に用いたジブカイン量の約 3% がリポソーム内相に封入され、または脂質膜構造中に組みこまれ約 1% がリポソーム表面に結合（吸着）していると考えられる。

b. 荷電性脂質の影響 PC および Chol に加えて、負荷電を有する DCP または正荷電を有する SA を用いてリポソームを調製し、ジブカイン-リポ

ソーム懸濁液について局麻作用を観測した結果を Table I に示す。表の数値から明らかとなおり、PC-Chol-DCP 系リポソームの場合は、PC-Chol 系リポソームの場合に比べ局麻作用の度合および作用持続時間のいずれも減少した。一方 PC-Chol-SA 系リポソームの場合は、局麻作用の度合は PC-Chol 系リポソームの場合とほとんど差が認められなかったが、作用持続時間はやや延長した。

II. In Vitro の検討

a. リポソームからのジブカインの放出 リポソームにトラップされたジブカインのリポソームからの放出をセルロース膜を用いた透析法により経時的に観測した。以下の記述において、ジブカインの外液への透過率 (permeability) は次式 (1) により定義される値である。

$$\text{Permeability (\%)} = M_o / M_i \times 100 \quad (1)$$

ここで M_i は内液中に存在するジブカインの初量、 M_o は外液中に透過してきたジブカインの量である。Fig. 3

TABLE I. Effect of Liposomes on the Local Anesthetic Action of Dibucaine Hydrochloride

Test sample	Lipid ^{a)} (molar ratio)	State of Dibucaine	Degree of anesthesia ^{b)}	Duration time ^{c)} (min)
Dibucaine solution	None	Free	29.7 $\pm$ 1.3	44 $\pm$ 2
Dibucaine-liposome suspension	PC, Chol (1: 1)	Free and entrapped	32.8 $\pm$ 1.4	62 $\pm$ 3
Dibucaine-liposome suspension	PC, Chol, DCP (1: 1: 0.16) (1: 1: 0.33)	Free and entrapped	23.2 $\pm$ 1.0 23.8 $\pm$ 1.1	50 $\pm$ 3 46 $\pm$ 2
Dibucaine-liposome suspension	PC, Chol, SA (1: 1: 0.16) (1: 1: 0.33)	Free and entrapped	30.0 $\pm$ 2.6 32.0 $\pm$ 0.9	71 $\pm$ 3 76 $\pm$ 3

a) Abbreviations: PC, phosphatidylcholine; Chol, cholesterol; DCP, dicetylphosphate; SA, stearylamine.

b) The number of the pricks failing to elicit a response during 30 min. (out of possible 36) is added up. The mean value of the sum from 6 separate tests indicates the degree of anesthesia, $\pm$ S.E.

c) Each value is the mean of 6 separate experiments, $\pm$ S.E.

Fig. 3. Plots of Permeability of Dibucaine against Time, observed in the Presence of Liposomes

Concn. of lipid: —○—, 0 $\mu\text{mol/ml}$; —■—, 2 $\mu\text{mol/ml}$;
—●—, 4 $\mu\text{mol/ml}$; —▲—, 8 $\mu\text{mol/ml}$; —●—, 8 $\mu\text{mol/ml}$
(mixture of dibucaine and liposomal soln.)
Concn. of dibucaine was 0.05% (w/v).
Composition of liposome: PC: Chol=1: 1 (molar ratio).

Fig. 4. Effect of Charged Lipids on the Permeability of Dibucaine

Composition of liposome (molar ratio):
—○—, no liposome; —●—, PC: Chol=1: 1;
—△—, PC: Chol: DCP=1: 1: 0.33;
—□—, PC: Chol: SA=1: 1: 0.33
Concn. of dibucaine was 0.05% (w/v).
Concn. of PC was 4 $\mu\text{mol/ml}$.

にジブカイン単独の場合および PC-Chol 系リポソームが存在する場合のジブカインの透過率の経時的变化を示す。図から明らかなとおり、ジブカイン-リポソーム懸濁液の場合はリポソームが共存しない場合と比較してジブカインの透過率が低下した。リポソームを構成する脂質の量が増加するにしたがってジブカインの透過率低下の度合は大となり、リポソームの存在によりジブカインのセルロース膜透過が抑制されることが明らかとなった。リポソームとジブカイン溶液を単に懸濁させた混合懸濁液の場合には、ジブカイン単独の場合より透過率は低下したが、ジブカイン-リポソーム懸濁液の場合ほどは低下しなかった。

ジブカインの透過率におよぼす荷電性脂質の影響を Fig. 4 に示す。Fig. 4 から明らかなように、PC-Chol 系リポソーム、PC-Chol-DCP 系リポソーム、PC-Chol-SA 系リポソームのいずれの系においても、ジブカイン単独の場合に比べてジブカインの透過率は低下した。PC-Chol-DCP 系リポソームの場合の透過率は DCP を含まない他の系の場合と比較して小であった。一方、PC-Chol-SA 系リポソームでは PC-Chol 系リポソームよりも透過率が大きくなる傾向が認められた。各種荷電性脂質の添加によりジブカインの透過率が変化したことは、ジブカインとリポソームとの相互作用に荷電性物質が何らかの影響を与えていることを示唆する。

b. ジブカインの見かけのトラップ率 リポソームによるジブカインのトラップ率を限外ろ過法によって検討した。以下の記述において見かけのトラップ率 (% apparent entrapped) は (2) 式で定義される値である。

$$\% \text{ apparent entrapped} = (C_0 - C_f) / C_0 \times 100 \quad (2)$$

ここで C_0 はジブカインの初濃度、 C_f はリポソームと結合していない遊離のジブカイン濃度である。ただし限外ろ過のさいにジブカインがセルロース膜に吸着することを考慮して、 C_0 としてリポソームを含まないジブカインのろ液を限外ろ過して得られたろ液の濃度を用いた。また C_f としては、ジブカイン-リポソーム懸濁液を 90 分間限外ろ過して得られたろ液の濃度をとった。 C_f は平衡透析の場合とは異なり内液中の遊離ジブカイン濃度とは完全に等しくならず、より小さな値を与えた。これはジブカイン分子と水分子のセルロース膜透過性の相違によるものと考えられる。したがって (2) 式で与えられる値は真のトラップ率より大きな値を与え、このため真のトラップ率と区別して見かけのトラップ率と表現した。

既述の *in vivo* 実験の場合と同一の濃度条件で調製した PC-Chol 系ジブカイン-リポソーム懸濁液について、見かけのトラップ率とリポソームを構成する脂質の濃度との関係をしらべた結果を Fig. 5 に示す。リポソームを構成する脂質濃度の増加にともなって、ジブカインの見かけのトラップ率は増大するのが認められた。リポソームとジブカイン溶液の混合懸濁液中の見かけのトラップ率はジブカイン-リポソーム懸濁液の場合より小

Fig. 5. Plots of % Apparent Entrapped Dibucaine against Concentration of Lipid

—●—, dibucaine entrapped in liposome;
 —●—, mixture of dibucaine and liposomal suspension
 (no dibucaine entrapped).
 Concn. of dibucaine was 0.05% (w/v).
 Composition of liposome: PC: Chol=1:1 (molar ratio).

Fig. 7. Effect of Ionic Strength (μ) on the % Apparent Entrapped Dibucaine

—△—, PC: Chol: DCP=1:1:0.33;
 —●—, PC: Chol=1:1 (molar ratio).
 Concn. of dibucaine was 0.05% (w/v).
 Concn. of PC was 4 μ mol/ml.

Fig. 6. Effect of Charged Lipids on the % Apparent Entrapped Dibucaine

—△—, PC-Chol-DCP system;
 —□—, PC-Chol-SA system
 Concn. of PC was 4 μ mol/ml.
 Composition of liposome: PC: Chol=1:1 (molar ratio).

く、この差異はジブカインがリポソームに封入もしくは組み込まれたことに起因すると考えられる。

Fig. 6 に、PC-Chol-DCP 系および PC-Chol-SA 系のリポソームについて、PC-荷電物質 (DCP または SA) のモル比に対してジブカインの見かけのトラップ率をプロットした。図に明らかなとおり、SA を添加したリポソーム系においては、無添加のリポソーム系に比べて PC に対する SA のモル比が増加するにしたがってジブカインの見かけのトラップ率はやや小さくなる傾向が認められた。一方、DCP を添加したリポソーム系では PC に対する DCP のモル比が増加するにしたがって見かけのトラップ率は大きくなった。

c. イオン強度の影響 ジブカインの見かけのトラップ率におよぼすイオン強度 (μ) の影響を Fig. 7 に示す。PC-Chol 系リポソームでは、見かけのトラップ率はほとんど μ の変化の影響を受けず、ほぼ一定

の値を示した。また PC-Chol-SA 系リポソームの場合にも、見かけのトラップ率は μ の影響を受けなかった (図省略)。一方、PC-Chol-DCP 系リポソームの場合には、 μ の低下にともなって見かけのトラップ率が大きくなる傾向が認められた。負荷電物質を添加したリポソーム系において見かけのトラップ率がイオン強度の影響を受けて変化したことは、ジブカインと PC-Chol-DCP 系リポソームとの相互作用にイオン結合が寄与していることを示唆する。

考 察

上記において著者等は、ジブカインの局麻作用についてジブカインを単独投与した場合とジブカインをリポソームにトラップさせた場合との局麻作用効果を比較観察するとともに、*in vitro* でジブカインとリポソームの分子間相互作用を検討した。

遊離のジブカインを含むジブカイン-リポソーム懸濁液を用いた場合に観察された局麻作用の経時的減衰の抑

制および持続時間延長の効果は、遊離のジブカインを含まないリポソーム懸濁液を用いた Fig. 2 の実験結果からより明確に説明される。すなわちジブカインが吸着、組み込み、封入など何らかの形でリポソームにトラップされる結果として局麻作用が持続化されたと考えられる。ジブカインの threshold 濃度は約 $0.45 \text{ mM}^{17)}$ であり、この値以上のジブカイン溶液を投与した場合には Fig. 1 の脂質濃度 0 の場合とほぼ同様な局麻作用の経時の変化を示し、持続化は見られなかった。この結果は、ある閾値以上のジブカインがリポソームにトラップされ徐放化するために局麻作用の持続化が発現するのであり、ジブカイン-リポソーム懸濁液中の遊離のジブカイン量にはあまり依存しない事を示唆している。PC-Chol 系で脂質濃度が $8 \mu\text{mol/ml}$ の場合にリポソームにトラップされる量が仕込んだジブカイン量の約 4% であるにもかかわらず、Fig. 1 において顕著な持続化が見られたのはこのような理由によると考えられる。

In vitro 実験において、負電荷をもつ PC-Chol-DPC 系リポソームでは DCP 無添加の場合に比べてリポソームからのジブカインの放出が抑制され、添加する DCP 量の増加にともなって見かけのトラップ率は大きくなった。また溶液のイオン強度が増加するにつれて見かけのトラップ率は低下した。これらの結果は、DCP 添加により負の表面荷電をもつようになったリポソームがジブカイン (pK_a 8.3, 実験条件では正に荷電) とイオン結合するためと考えられる。一方、正荷電をもつ SA を添加した系では、SA 無添加の系に比べてリポソームからのジブカインの放出はわずかに促進された。SA の添加量を増加しても、またイオン強度の変化に対しても見かけのトラップ率に変化はほとんど認められなかった。したがって PC-Chol-SA 系リポソームとジブカインとの相互作用へのイオン結合の寄与は少ないと考えられる。荷電物質を含まない PC-Chol 系リポソームとジブカインとの相互作用は、見かけのトラップ率がイオン強度変化の影響を受けないこと、また Wilschut 等¹⁸⁾ の報告により疎水結合的であると考えられる。

In vitro 実験では、リポソームの成分として DCP を加えた時の方が DCP を加えない場合より、ジブカインの見かけのトラップ率が大きくなり、リポソームからのジブカインの放出も抑制されるのが観察された。SA を加えた場合には SA を加えない場合より見かけのトラップ率は小となり、リポソームからのジブカインの放出がやや促進された。これらの事実は *in vitro* の実験結果で、DCP 添加により局麻作用時間が短縮され、SA 添加により延長された事実と対応しない。両種の実験結果がこのように対応しなかった原因としては、*in vivo* の場合にはジブカイン-リポソームの分子間相互作用以外の他の因子が関与していることが考えられる。すなわち *in vivo* では、DCP の添加によってリポソームの表面荷電が負になる結果としてリポソームがホスホリパーゼ A_2 等の酵素による加水分解を受けやすくなり、反対に SA 添加により受けにくくなることや、¹⁹⁻²¹⁾ 荷電物質によって出来るリポソームの粒径が異なってくる²²⁾ ためにリンパ毛細管への移行速度が影響を受けること、また表面荷電によって細胞との相互作用の仕方が異なること²³⁾ など別の要因が関与する可能性が考えられる。

以上、本研究においてはリン脂質を主成分とするリポソームにジブカインをトラップさせることによって、薬物の局麻作用を持続化し得る事実を明らかにするとともに、その機構をジブカインとリポソームの分子間相互作用の観点から検討した。本研究で明らかとなった諸事実は、リポソームの製剤学的応用に新しい可能性を示唆するものと考えられる。

- 17) A. Goldstein, L. Aronow, S.M. Kalman, "Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology," 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, 1974, pp. 753-754.
- 18) J.C. Wilschut, J. Regts, H. Westenberg, G. Scherphof, *Biochem. Biophys. Acta*, **433**, 20 (1976).
- 19) R. Granson, M. Waite, *Biochemistry*, **17**, 4029 (1978).
- 20) P. Quinn, R.M.C. Dawson, *Biochem. J.*, **119**, 21 (1970).
- 21) C. Willman, H.S. Hendrickson, *Arch. Biochem. Biophys.* **191**, 298 (1978).
- 22) M.H. Richards and C.R. Gardner, *Biochem. Biophys. Acta*, **543**, 508 (1978).
- 23) G.S. Poste, D. Papahadjopoulos, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1603 (1976).