

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5672751号  
(P5672751)

(45) 発行日 平成27年2月18日(2015.2.18)

(24) 登録日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 K 31/437
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00
	1 0 7
	請求項の数 3 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-88727 (P2010-88727)	(73) 特許権者	000004466
(22) 出願日	平成22年4月7日(2010.4.7)		三菱瓦斯化学株式会社
(65) 公開番号	特開2011-219397 (P2011-219397A)		東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
(43) 公開日	平成23年11月4日(2011.11.4)	(72) 発明者	池本 一人
審査請求日	平成25年3月1日(2013.3.1)		新潟県新潟市北区太夫浜新割182番地
			三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内
		(72) 発明者	中野 昌彦
			新潟県新潟市北区太夫浜新割182番地
			三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内
		審査官	田中 耕一郎
			最終頁に続く

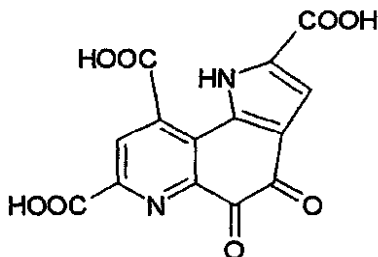
(54) 【発明の名称】ピロロキノリンキノンを含むリボソーム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(1)；

【化1】



10

で表されるピロロキノリンキノンジナトリウム塩とリン脂質及び/又は糖脂質とを pH が 1 から 8 で、60 から 190 で加温する工程と、  
ホモジナイザーを使用して分散させる工程とを含むことを特徴とする、  
ピロロキノリンキノン含有リボソームの製造方法。

【請求項2】

前記リン脂質がレシチンである請求項1記載の製造方法。

【請求項3】

前記レシチンが大豆レシチン又は卵黄レシチンである請求項2記載の製造方法。

20

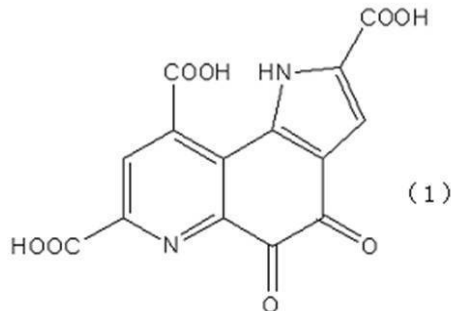
## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明で取り扱うピロロキノリンキノン（以下PQQと記す）は式1で表される構造の物質で、このフリー体又は塩を含むリポソームの技術に関する。

## 【化1】



10

## 【背景技術】

## 【0002】

PQQは新しいビタミンの可能性があると提案されており（例えば、非特許文献1参照）、健康補助食品、化粧品などに有用な物質として注目を集めている。さらには細菌に限らず、真核生物のカビ、酵母に存在し、補酵素として重要な働きを行っている。また、PQQについて近年までに細胞の増殖促進作用、抗白内障作用、肝臓疾患予防治療作用、創傷治癒作用、抗アレルギー作用、逆転写酵素阻害作用およびグリオキサラゼI阻害作用・制癌作用など多くの生理活性が明らかにされている。

20

## 【0003】

このPQQは、有機化学的合成法（非特許文献2）または発酵法（特許文献1）などの方法により得たPQQをクロマトグラフィーに供し、流出液中のPQQ区分を濃縮して、晶析により結晶化し（特許文献2）、乾燥して得ることができる。

## 【0004】

このPQQは栄養機能を強化した食品として使用することが期待されるが、酸性条件下では化学的に安定であるが、アルカリ条件下では分解しやすい。また、カルボニル化合物との反応性も有している。さらには強酸性では析出しやすい。そのため、pHの変化等に対応できる方法が求められている。また、吸収性を上げ、ピロロキノリンキノンの機能を向上させる方法も求められている。

30

## 【0005】

リポソームとは通常はリン脂質からなる脂質の膜でできたカプセル構造のことをいい、中に水相が閉じこめられている。リン脂質の分子は松葉のような形をしていて、頭の部分が親水性、葉のように見える部分が疎水性という2つの性質を併せ持っているため、水に放たれると親水性の部分が水と引きつけあい、リポソームを形成する。リポソームは、水溶性の成分をその親水性の部分に、油溶性の成分をその疎水性の部分に閉じこめることができる。リポソームは、薬剤を投与方法として主に医学の分野で注目されており、吸収性の向上や分散性の向上、安定性の向上の利点が一般的に知られ、経口、皮膚に塗布する用途で広く使用されている。そのためPQQを含むリポソームが求められている。

40

## 【0006】

さらにはPQQは脳機能改善が期待されているが、同様の機能を有するポスファチジルコリンやポスファチジルセリン（非特許文献4）との同時摂取が期待されており、リン脂質成分としてこれらはリポソーム原料に含まれることから、ピロロキノリンキノンのフリー体又は塩を含有するリポソームの提供とそれにより機能性が向上した組成物、その製造方法が求められている。

## 【0007】

これまで、PQQを電子メディエーターとして使用し、酵素をリポソームとして固定する

50

燃料電池は開発されている（特許文献3）。また、S-ニトロシル化合物を哺乳類に投与するための組成物として提案されているが、具体的な例はなく、製造方法についても記載がない（特許文献4）。リン脂質はそのままでは粘度が高く、リポソームにするにはクロロホルムのような溶剤に溶かし、フラスコ内部に液膜を形成して超音波で分散する方法が一般的であるが、この方法は生産性が低く、また、溶剤が残留する危険性がある。このように、具体的な溶液として提供する方法やそのための製造方法は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開平1-218597号公報

10

【特許文献2】特許第2072284号公報

【特許文献3】特表2006-508519号公報

【特許文献4】特表2001-518096号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】nature, vol422, 24April, 2003, p832

【非特許文献2】JACS、第103巻、第5599~5600頁（1981）

【非特許文献3】JACS、第111巻、第6822~6828頁（1989）

【非特許文献4】ファインケミカル、第34巻、No.11、第30-41頁（2005）

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、ピロロキノリンキノンのフリー体及び/又は塩を含むリポソームを提供することと効率的な製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

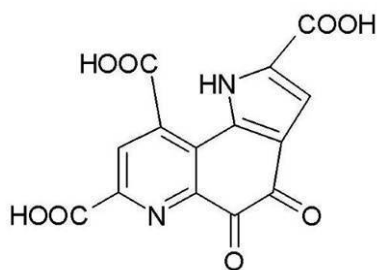
【0011】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、ピロロキノリンキノンの性質とリポソーム化の条件を鋭意検討した結果以下の方法により解決できることを見出した。

(1) 下記式(1)；

【化2】

30



で表されるピロロキノリンキノンのフリー体及び/又は塩を含むリポソーム組成物。

40

(2) ピロロキノリンキノンのフリー体及び/又は塩とリポソームとをpHが1から8で、60から190で加温する工程を含むことを特徴とするリポソーム組成物を含む溶液の製造方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明により、ピロロキノリンキノンのフリー体及び/又は塩を含む安定性の高いリポソームを効率的に製造することを可能とする。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】リポソーム粒子径

50

【図2】透析後のリポソーム粒子径

【図3】糖を添加したリポソームの粒子径

【図4】凍結融解処理した後のリポソーム粒子径

【図5】水素添加大豆リン脂質を用いた場合のリポソーム粒子径

【図6】吸収性試験の結果

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明で使用するPQQはフリー体、アルカリ金属塩であればよく特に限定されない。特に入手しやすい、フリー体、ジナトリウム体、ジカリウム体が使用しやすい。

【0015】

本発明に用いるリポソームは、リン脂質又は糖脂質を単独または混合して用いて調製される。生体に含まれるリン脂質の主成分にホスファチジルコリンがあり、レシチンとも呼ばれ、卵黄レシチン、大豆レシチン、精製大豆レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、ジセチルリン酸、ステアリルアミン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジレイノシトールアミン、カルジオリピン、セラミドホスホリルエタノールアミン、セラミドホスホリルグリセロール、およびこれらの混合物等の物質が使用できる。本発明には市販のホスファチジルコリンを用いることができる。例えば、日油製COATSOME NC-21（水素添加大豆リン脂質、PC含量90%以上）、日光ケミカルズ製NIKKOL レシノール S-10EX（水素添加大豆リン脂質、PC含量95%以上）を用いることができる。

【0016】

糖脂質としてはジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド硫酸エステル、ガラクトシルセラミド、ガラクトシルセラミド硫酸エステル、ラクトシルセラミド、ガングリオシドG7、ガングリオシドG6、ガングリオシドG4、ジガラクトシルセラミド、およびこれらの混合物を用いることができる。

【0017】

基剤にステロールを添加してもよい。添加量は、リン脂質あるいは糖脂質に対して1/5重量が好ましい量の上限であり、1/10重量が更に好ましい。ステロールとしては、コレステロールが最も好ましいが、その他のステロールを使用してもよい。

【0018】

リポソーム組成物は、一般的な定法により製造することが可能であり、例えば、レシチンを有機溶剤、例えば、クロロホルムに溶解し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、フラスコの壁面に付着した脂質のフィルムにPQQ溶液を加えて製造することができる。しかし、この方法では操作が複雑で、毒性のある有機溶媒が残留する危険性があるうえに、そのための分析も必要になるために費用がかかるため、最適とは言えない。

【0019】

より好ましくはPQQを0.0001~2重量%に最終濃度になるように溶解した水溶液に、必要に応じステロール、多価アルコール、pH調整剤を加え、60~190℃に加熱し、ホモジナイザーにより分散することにより製造できる。ホモジナイザーを使用することで高い生産性で作ることが可能である。ここでPQQの上限濃度は溶解度の限度であり、これより高いと析出しやすく、下限濃度より低いとピロロキノリンキノンの機能が期待できない。

【0020】

PQQはアルカリ性では安定性が低いため、pHは8以下が好ましく、より好ましくは2から6である。8よりpHが高い場合はPQQが分解する。酸性にするのは安定性の面では問題がないが、溶解性が下がるために高含有にするのが困難になる。

【0021】

本発明のリポソームの大きさは0.05から100μmであることを特徴とする。リポソームの大きさはその機能性に応じて使い分けることができる。より好ましくはレシチンを使用し、PQQの重量濃度が0.01から1重量%であり、pHが2から6であり、大きさ

10

20

30

40

50

が0.05から100 μmのリポソーム溶液である。PQQの重量濃度がこれより低い場合は適切な効果を出せず、また、濃度が高い場合は温度を上げて溶解できないため、均一な溶液を作ることができない。また、pHがアルカリ性になるとPQQの分解が生じやすくなる。また、強酸性化ではPQQの溶解度が低く、リポソーム内の水層に維持できる濃度が低くなる。リポソームの大きさは容易に形成できる範囲である。0.05 μmより小さいリポソームの形成は難しく、また、100 μmよりも大きなリポソームも形成困難である。また、大きなリポソームは吸収性等の面では効果が小さいことが予想できる。

【0022】

高压乳化機も使用することができる。高压乳化機としてはプライミクス製 薄膜巡回型高速ホモキサー（T.Kフィルミックス）、マイクロフルイディックス製 超高压ホモジナイザー（マイクロフルイダイザー）、エム・テクニク製 内部せん断力型ミキサー（クレアミックス）、吉田機械興業製 湿式メディアレス微粒化装置（ナノマイザー）等を用いることができる。

10

【0023】

リポソームを形成した後に、透析、凍結融解、フィルター濾過、凍結乾燥、遠心分離等の処理を施すことでリポソームの精製やサイズのコントロールを行うことができる。

【0024】

次にこれらの操作について説明する。透析処理はリポソームが大きな分子集合体であるため限外濾過膜を通してできないことを利用する方法で、リポソーム内の水層だけを利用する溶液を作ることができる。PQQの場合、低分子であるため使用する限外濾過膜も低分子

20

【0025】

凍結融解はリポソーム溶液を冷却して凍らせ、次に溶解することでリポソーム外部にある物質の取り込み、この相変化に伴うサイズの変更を行う。この時にはポリオール類、例えばグリセリン、ソルビトール、キシリトール、ショ糖等を加えることでリポソーム脂質の分離を起こさず、操作を行うことができる。フィルター濾過は滅菌やサイズを一定にするために行う。凍結乾燥は粉体化やリポソームへの取り込みのために行う操作で、凍結に耐えうる組成にしなければならない。遠心分離は比重差を利用するもので濃縮等に使用できる。

30

【0026】

本発明のリポソーム組成物を調製する際に、本発明の効果を損なわない範囲で他のステロール、ポリオキシエチレンステロールエーテル、多価アルコール、pH調整剤、非イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、油剤、保湿剤、水溶性高分子、抗酸化剤、紫外線吸収剤、キレート剤、防腐剤、抗菌剤、着色剤、香料等を配合することができる。また、コエンザイムQ10、アスコルビン酸誘導体、トコフェロール、アラキドン酸、DHA、レチノール誘導体等のビタミン類やイチョウエキス、カンカエキス等の植物抽出液等を配合したリポソームにすることもできる。

【0027】

本発明のリポソーム組成物は、リポソームが分散した水溶液、水中油型乳化組成物、油中水型乳化組成物、多重乳化組成物、多層状剤のいずれでもよい。こうして調製される溶液には、更に、薬剤学的に許容されている他の製剤素材を常法により適宜添加混合してもよい。添加しうる製剤素材としては特に限定されず、例えば、乳化剤、緊張化剤、緩衝剤、溶解補助剤、矯臭剤、防腐剤、安定化剤、抗酸化剤などが挙げられる。

40

【0028】

本発明による溶液組成物の保存方法としては、特に限定されず、低温保存、密閉容器による嫌氣的保存、遮光保存などを用いることができる。こうして調製される本発明の溶液は、冷蔵あるいは室温で保存した際に、析出物なく安定に保存できる。

【実施例】

50

## 【0029】

以下に実施例及び調製例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例および調製例のみに限定されるものではない。大豆レシチンはJUNSEI、ピロロキノリンキノジナトリウム(PQQ Na2)は三菱ガス化学、その他はWAKOの試薬を使用した。

## 【0030】

## 実施例1

## リポソーム溶液の作製

3g/L PQQ Na2水溶液100gに大豆レシチン3.0g加えた。この時のpHは3.5であった。約80に加温しながら、NISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転、室温に下げ10分処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。均一な溶液で3週間以上安定であった。

10

## 【0031】

## PQQ濃度測定

上記のリポソーム溶液を等量のジメチルスルホキシドを加え、下記の溶離液で希釈してPQQ濃度を測定した。測定は島津製作所、高速液体クロマトグラフィー、LC-20Aで、カラムはYMC-Pack ODS-TMS(5μm)、150x4.6mm I.D.を40で溶離液100mM CH<sub>3</sub>COOH/100mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(30/70, pH5.1)を1.5mL/minで260nm検出した。その結果、PQQの濃度変化は観測されず、本発明の条件で作ることが出来たPQQ含有リポソームは、濃度低下は起きなかった。

20

## 【0032】

## リポソーム粒子径測定

リポソーム粒子径は細胞や生体への吸収性、安定性において重要な因子である。そこで作成した粒子径を測定した。

SEISHIN LMS-350を使用して、水に分散して粒度分布を求めた。この装置では0.1μmが検出下限である。図1に結果を示す。縦軸は体積換算での割合を示す。体積換算で正規分布50% 0.6μmで粒子径を累積したグラフの百分率での90%の粒子径であるx90が2.0μmであった。PQQの濃度を維持した安定なリポソームを製造することができた。

## 【0033】

## 実施例2

## リポソーム溶液の透析

実施例1のリポソーム溶液では、リポソーム内部の水溶液と外側の水溶液にPQQが存在する。そこで内部だけに存在させるために透析を行った。

透析キットSlide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Thermo)に約3ml加え、水で透析をおこなった。3日間室温で行った後、溶液を回収すると6mlに増加していた。溶液は赤から黄色の濁った液に変化した。これをDMSOでリポソームを壊しPQQ濃度を実施例1と同様に分析した結果、0.23g/LのPQQになっていた。元の溶液から85%が透析されていた。残りが内部であると考えられる。さらにリポソームの粒子径を実施例1と同様に測定した。図2に結果を示す。浸透圧差があるために粒子径が大きくなっていた。

40

## 【0034】

## 実施例3

3g/L PQQ - Na2水溶液100gにソルビトール5g、大豆レシチン3.4g加えた。この時のpHは3.5であった。約80に加温しながら、NISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転、室温に下げ10分処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。均一な溶液で3週間以上安定であった。リポソームの粒子径を実施例1と同様に測定した。結果を図3に示す。正規分布50% 0.6μmでx90が2.0μmであった。

## 【0035】

## 実施例4

## 凍結融解処理

50

実施例3で得られたリポソーム溶液を - 20 に冷却して凍結し、それを室温で融解した。この操作を3回繰り返した。リポソームの粒子径を実施例1と同様に測定した。結果を図4に示す。正規分布50% 2.8 μmでx90が4.5 μmであった。凍結融解によりリポソームの粒子径が大きくなった。

【0036】

実施例5

3g/L PQQ - Na2水溶液100gにCOATSOME NC-21(水素添加大豆リン脂質)3.0g加えた。この時のpHは3.5であった。約80 に加温しながら、NISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転、室温に下げ10分処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。リポソームの粒子径を実施例1と同様に測定した。結果を図5に示す。正規分布50% 3.8 μmでx90が6.8 μmであった。レシチンの種類を変えることで大きさを変えることができた。

【0037】

実施例6

3g/L PQQ - Na2水溶液100gに卵黄レシチン3.0g加えた。この時のpHは3.5であった。約80 に加温しながら、NISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転、室温に下げ10分処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。リポソーム溶液を作成することができた。

【0038】

実施例7

3g/L PQQ - Na2水溶液100gに大豆レシチン3.0g加え、コエンザイムQ10(三菱ガス化学)を0.06g加えた。この時のpHは3.5であった。約80 に加温しながら、NISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転、室温に下げ10分処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。リポソーム溶液を作成することができた。

【0039】

実施例8

実施例3で作製した溶液10mlをステンレス製バットに加え、-80 で凍結した。これを凍結乾燥器で乾燥を1晩行い、粉末を得た。

【0040】

実施例9 混合試験

日油製PS50-ホスファチジルセリン50重量%含有粉末(澱粉含有)1.2gと実施例1の溶液2gを混合した。粉末は均一な分散であった。

【0041】

比較例1

3g/L PQQ - Na2水溶液100gに大豆レシチン3.0g加えた。この時のpHは3.5であった。室温でNISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。全体に均一にならず沈殿物が存在した。

【0042】

比較例2

3g/L PQQ - Na2水溶液100gに水酸化カリウム溶液を加えpHを10以上にした。30 で一晩放置した後、PQQは60%になっており、リポソーム形成前に分解した。

【0043】

比較例3

水100gに大豆レシチン3.0g加え約80 に加温しながら、NISSEI AM-3ホモジナイザーで30分7000回転、室温に下げ10分処理した。処理後、蒸発減少した水分を追加した。PQQを含まないリポソームを作成した。

【0044】

比較例4

3g/L PQQ - Na2水溶液100gに濃塩酸を加えpHを0.8にした。PQQは析出

10

20

30

40

50

し、溶液は透明になった。PQQは溶解していないため、リポソーム形成してもリポソーム内に取り込めない。

【0045】

吸収性試験

PQQは培養動物細胞に対して非常に高濃度にすると細胞の増殖を抑える。これを利用してリポソーム化により動物細胞を使用して細胞吸収がどのように変化するかを試験した。

実施例10

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-DHFR)を MEM+10%牛胎児血清の培地で5%CO<sub>2</sub>, 37℃で培養してした。イワキ製96穴プレート使用し、1個の穴に6500個の細胞になるように100μlの培地とともに加え、一晚培養した。培養液を抜き、所定の試験濃度の培地を加えた。1日培養後、培地を入れ替え同仁化学 WSTアッセイキットを使用して1時間反応させ、450nmの吸光度を測定した。この時の吸光度は細胞数に比例する。

10

【0046】

試験サンプルは、PQQジナトリウム、大豆レシチン-PQQリポソーム(実施例1)と、大豆レシチンリポソーム(比較例3)を用いた。これらのサンプルを培地で希釈して試験した。各サンプル2回行い平均化した。

試験濃度は500, 250, 125, 62, 31, 16, 8, 4, 2, 1, 0.50μMで行った。

全細胞数が無添加と比較して10%少なくなる添加量はPQQジナトリウムでは500μM, 実施例1のリポソーム溶液では31μMであった。比較例3のリポソーム単独の場合は、細胞濃度の急激な低下はなかった。リポソーム化により16倍吸収性が上がっていると考えられる。図6にPQQを添加しない時の細胞濃度の平均を100とした各条件での濃度をグラフに示す。

20

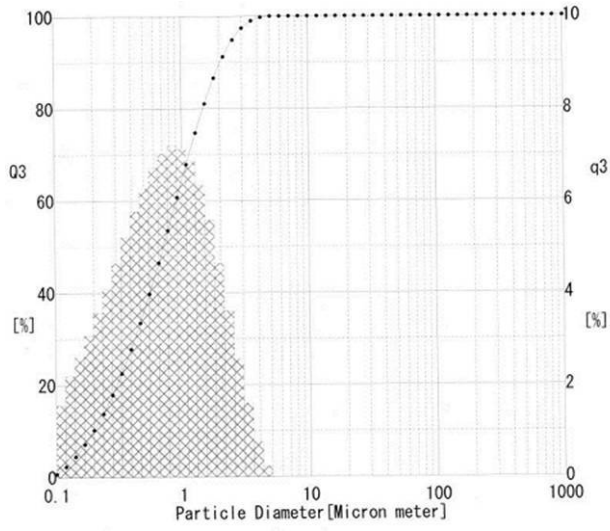
【産業上の利用可能性】

【0047】

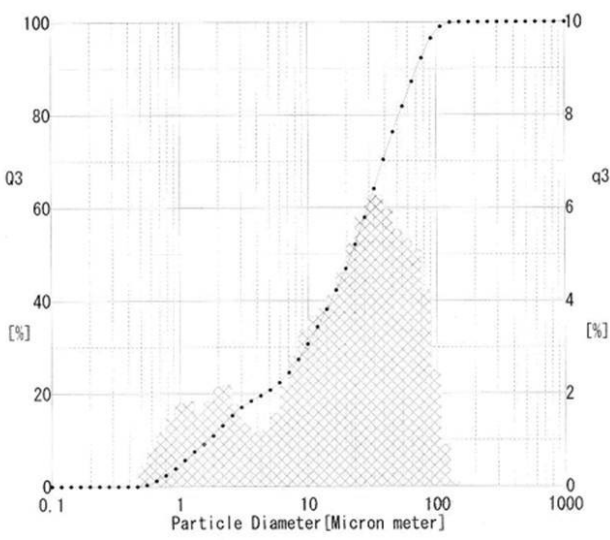
本発明の溶液は、医療用、化粧用、食品用、園芸用、酪農用など広い範囲で使用できる。より具体的な形態としては、注射剤、輸液、液剤、点眼剤、内服液剤、ローション剤、ヘヤートニック、化粧用乳液、スプレー液、エアロゾル、ドリンク液、液体肥料、保存用溶液などが挙げられる。



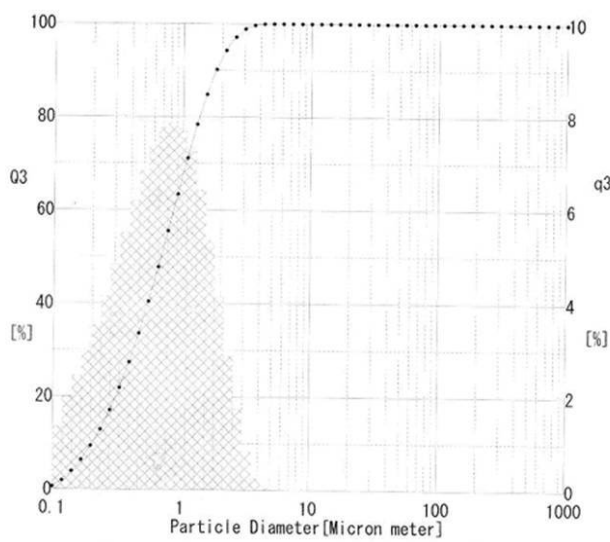
【 図 1 】



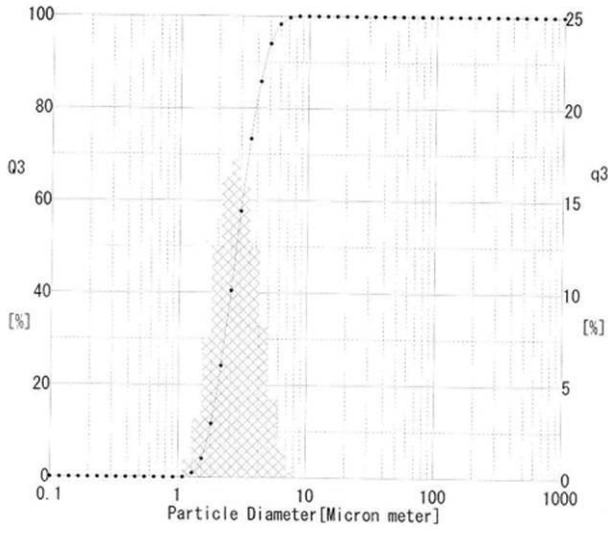
【 図 2 】



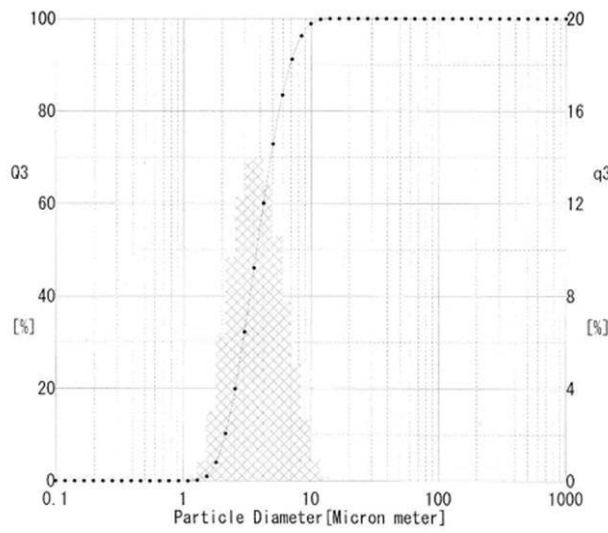
【 図 3 】



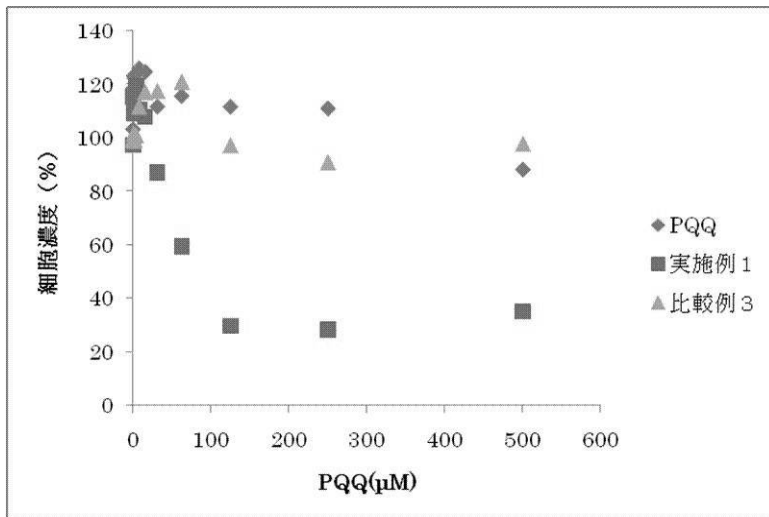
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	27/12	(2006.01)	A 6 1 P	27/12	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
			A 6 1 P	35/00	

- (56)参考文献 特表2005-530786(JP,A)  
 国際公開第2004/010924(WO,A1)  
 国際公開第2007/095175(WO,A1)  
 国際公開第2012/157721(WO,A1)  
 L.B.Zimmerman, et al., Analytical Biochemistry, Jun.2010, 401, pp182-187

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 3 1 / 0 0 - A 6 1 K 3 3 / 4 4  
 A 6 1 K 9 / 0 0 - A 6 1 K 9 / 7 2  
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - A 6 1 K 4 7 / 4 8  
 C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S  
 ( S T N )