

制癌剤を内包したポリ乳酸微粒子製剤の調製とその徐放挙動

西野悟* 吉澤秀和* 夏越祥次**
愛甲孝** 幡手泰雄*** 北村吉朗*

Preparation and In Vitro Release Property of PLA Microspheres Enclosing Antitumor Agent

Satoru NISHINO*, Hidekazu YOSHIKAWA*, Shoji NATSUGOE**,
Takashi AIKO**, Yasuo HATATE*** and Yoshiro KITAMURA*

(Received October 31, 2000)

Recently, many antitumor agents are developed. Irinotecan hydrochloride (CPT) has a great side effect even though it is well effective against the cancer. Drug delivery system (DDS) medicine indicates that the release rate of medicine is constant for a long time. Therefore, in order to materialize the general idea of DDS, we applied microencapsulation technique to prepare biodegradable polymer microspheres (MS) enclosing antitumor drug having no side effect. Polylactide microparticles enclosing antitumor agent were prepared by solvent evaporation method under various operation conditions. The effects of operation parameter on release rate of drug and morphology of microparticles were studied.

Key word: DDS, microparticle, polylactide, antitumor agent, solvent evaporation, DSC

1 緒言

現在、多くの医薬品が開発され、我々はそれらの恩恵を広く受けている。医薬品の剤型には、固形のものから液状のものまで様々なものがある。また、投与方法から眺めると、経口的に処方するものや、静脈注射、筋肉注射で処方するもの様々である(橋田充, 1995)。しかしながら、現在開発されている製剤には、少なからず副作用の問題を伴う。ここで、Fig. 1 に一般製剤とドラッグデリバリーシステム(DDS)を考慮した製剤を投与した場合の組織中の薬物濃度の経時変化を示した。図のように治療域で一定の速度、長時間薬物を放出することのできる製剤がDDSを考慮した剤型と言える。そこで本研究ではDDSの概念を具現化すべく、薬物を生分解性高分子によってマイクロカプセル化(MS)することで副作用の軽減さらには医薬品の効果を上げることを試みた。特に、初期バーストに及ぼすマイクロカプセル調製条件の影響について、広範囲に条件を変化させて検討した。現在、さまざまな抗がん剤が開発されている。

カンプトテシン(CPT)は強力な抗腫瘍性を示すにもかかわらず、副作用が非常に強いという問題を抱えている。そこで、体内での薬物動態を精密に制御することが可能なドラ

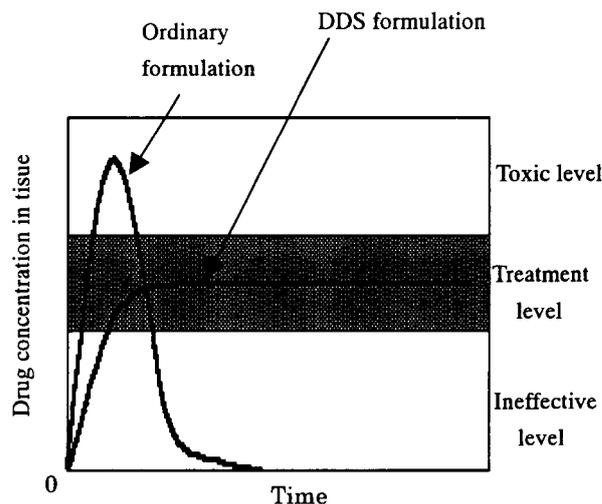


Fig. 1 Time course of drug concentration in tissue

* 岡山大学環境理工学部環境物質工学科

** 鹿児島大学医学部

*** 鹿児島大学工学部応用化学工学科

ックデリバリーシステム(DDS)の概念を取り入れ、薬物を生分解性高分子によりマイクロカプセル化することで副作用の軽減さらには医薬品の効果を上げることを試みた。

本研究では、調製プロセス条件の影響を定量的に検討し表面形態の変化と徐放速度との関係について検討した結果を報告する。

2 実験

2.1 ポリ乳酸微粒子製剤の調製

実験に使用した生分解性高分子は、ポリ乳酸(PLA)であり、D/L 比 1:1、重量平均分子量 113,500 のものを使用した。これらはすべてラクチドの開環重合によって作られた。**Fig. 2** にミクスフェアー (MS) 調製のフローチャートを示す。MS はシリコンオイルを連続相、アセトニトリル(AcN) 溶液を分散相とする液中乾燥法により調製した。分散相は AcN に膜となる PLA と芯物質として抗癌剤カンプトテシン(CPT)を加えたものである。この時、薬物が分散するように超音波洗浄機で超音波をあてた。調製した分散相を連続相に攪拌棒で攪拌させながら加え、o/o エマルジョンとした後、減圧下 40℃で 3 時間液中乾燥を行い、MS を調製した。調製条件を **Table 1** に示す。調製後の MS は、ガラスフィルターでろ過し、石油エーテルによる洗浄、回収後、一昼夜凍結乾燥した。**Fig. 3** に液中乾燥装置の概略図を示す。

2.2 PLA-MS の内包量測定

まず、調製した MS を 0.1g 秤量し、クロロホルム 3mL 中に溶解させ、さらにメタノール 50g を加える。その溶液を液体クロマトグラフィーにより測定した。この時、PLA が溶液中で白濁するため、フィルターでこした後に測定を行った。**Fig. 4** にそのフローチャートを示す。

2.3 PLA-MS の徐放実験

次に、調製した MS を用いて徐放実験を行った。徐放実験は 0.1g の MS を pH4 の緩衝液 30ml 中に入れ、37℃で恒温振盪し行った。所定時間毎に 0.1ml ずつサンプルを採取した。サンプリングはサンプリング時間の 5 分前に振盪止めを、MS を沈降させてから上澄みを採取した。そして、緩衝液中の薬物の濃度を蛍光分光計 (Ex. 365nm, Em. 440nm) により測定した。また、ここでの徐放率は、 $\text{徐放率} = \frac{\text{徐放量}}{\text{徐放量} + \text{未徐放量}}$ で算出した。

2.4 PLA-MS の未徐放量の測定

徐放実験をした後の溶液を濾過して、MS を採取する。得られた MS 中の未徐放の量を前述した内包量測定と同じ手順で測定した。

2.5 PLA-MS の示差熱分析 (DSC) 測定

調製した MS の DSC 測定を行った。測定は、昇温速度を 5℃/min、測定温度を室温から 200℃、窒素雰囲気中で行った。また、サンプルは各々 3mg とした。

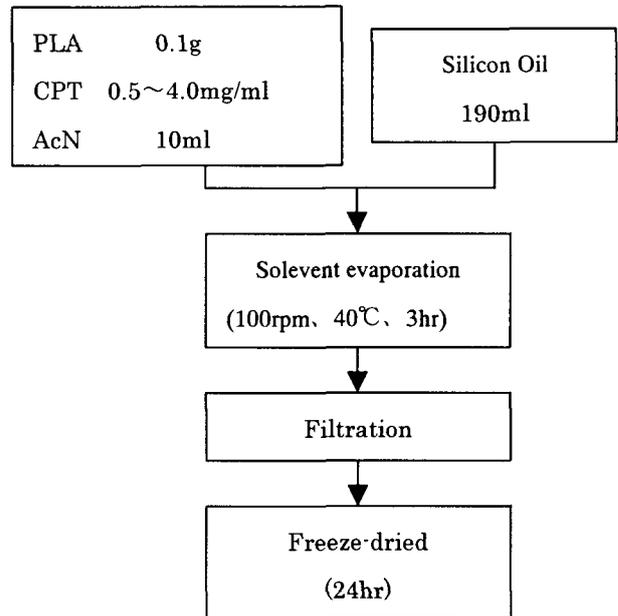


Fig. 2 Preparation flow chart of PLA MS

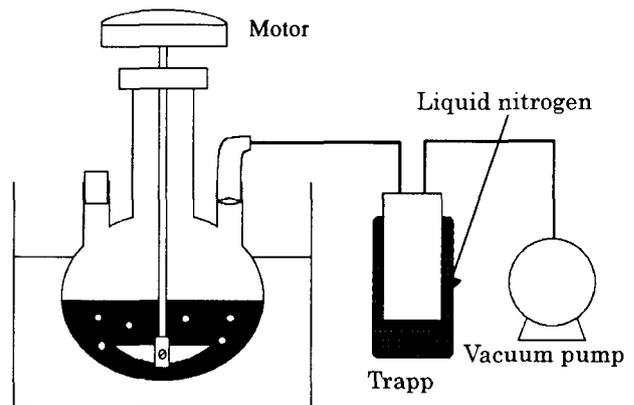


Fig. 3 Schematic illustration of apparatus of solvent evaporation

Table 1 Preparation condition of PLA-MS

Drug content [mg]	PLA concentration [wt%]	Stirring speed [rpm]	Temperature [°C]	Time [hr]
5	11.3	100	40	3
10				
20				
30				
40				

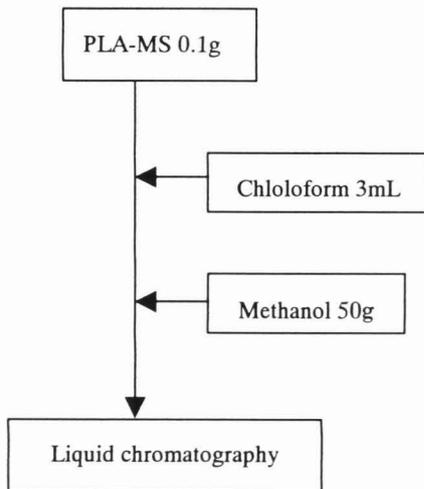


Fig. 4 Flow chart of measurement of drug content

3. 結果と考察

3.1 走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真

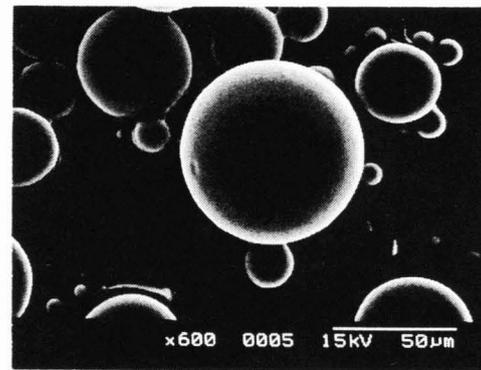
調製した MS の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を Fig. 5 に示す。本実験で調製した MS の平均粒径は、薬物添加量を変化させたにもかかわらず一定で、ほぼ $50\mu\text{m}$ であった。これは液中乾燥時の攪拌速度を一定にしたため、同程度の大きさの分散油滴が生成したことに起因していると考えられる。図から明らかなように、分散相中の薬物量を多くするほど MS 表面の凹凸が深く、かつ激しくなっていくのがわかる。その傾向は特に分散相中の薬物量を 2mg/ml 以上にした時に顕著に表れた。CPT の AcN に対する溶解度は 2mg/ml であり、未溶解の薬物は分散液滴中に分散している。このため液中乾燥することで分散液滴の滴径が縮小し、界面近傍に偏析した未溶解薬物に沿って、MS 表面の morphology が決定されたと考えられる。

3.2 PLA-MS の内包量測定結果

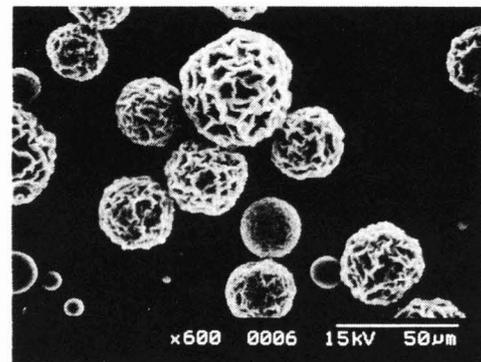
内包量測定の結果を Table 2 に示す。これらの結果より、薬物内包率は分散相中の薬物量に依存せず、ほぼ 80% と一定であった。液中乾燥時の分散液滴内は PLA を溶解しているため粘度が高く、さらに内包している薬物が連続相には溶解しないため、分散相薬物濃度が飽和濃度以下およびそれ以上の場合において、内包率がほぼ等しくなったと考えられる。

3.3 PLA-MS の DSC 測定

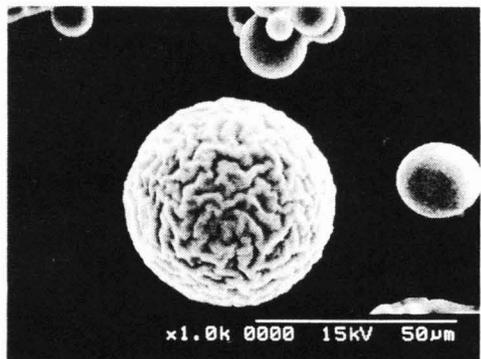
Fig. 6 に DSC による熱分析の結果を示す。図より、 45°C 付近の吸熱ピークは MS のマトリックスである、PLA のガラス転移によるものと考えられる。そして、分散相薬物量が $5, 10\text{mg}$ の MS では、吸熱ピークが低温側と高温側にそれぞれ 2 つ観察される。これに対し、分散相薬物量が 20mg 以上の MS では、吸熱ピークは低温側に移動している。したがって、MS のガラス転移温度は、分散相薬物量の増加に伴



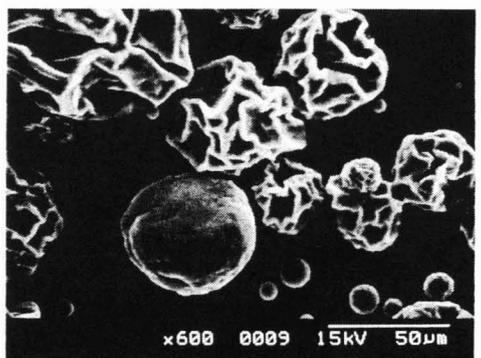
Drug content 0.5mg/ml



Drug content 2.0mg/ml



Drug content 3.0mg/ml



Drug content 4.0mg/ml

Fig. 5 SEM photographs of PLA-MS

Table 2 Enclosing efficiency of PLA-MS

Drug content [mg]	Enclosing amount [mg]	Enclosing efficiency [%]
5	0.43	86.0
10	0.76	76.0
20	1.68	84.0
30	2.41	80.3
40	3.26	81.5

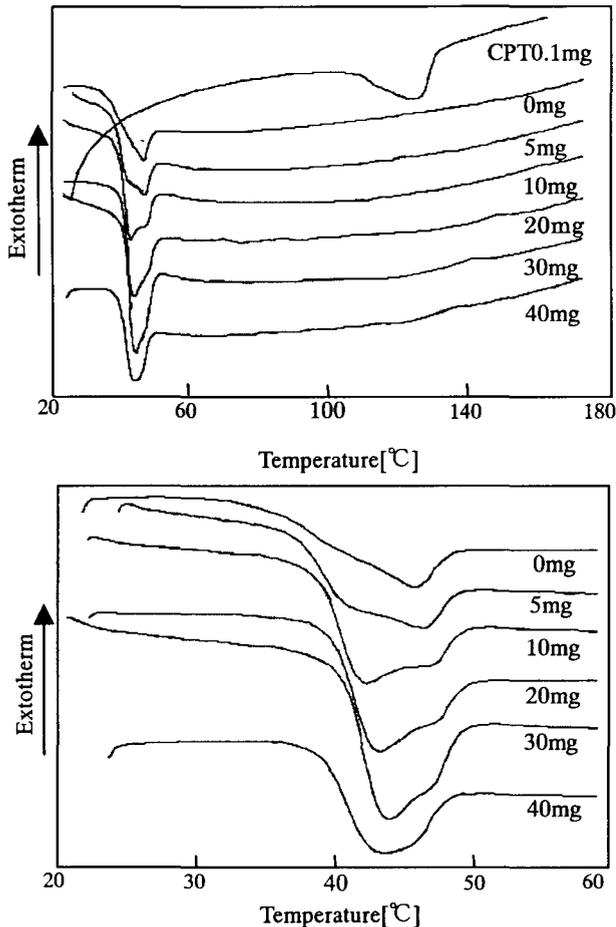


Fig. 6 The influence of drug content in the dispersed phase on DSC curves of PLA-MS

い、低下することが分かった。その結果より、薬物と PLA の間になんらかの相互作用があると考えられる。そして、その相互作用が大きくなることによって、MS 表面のモルフォロジーが変化したと考えられる。

3.4 徐放曲線

徐放実験により得られた徐放曲線を Fig. 7 に示す。図より、分散相薬物量増加に伴い、初期における薬物の徐放率が高いことがわかる(初期バースト)。薬物の拡散速度は、粒子の表面積と濃度差に比例する。Fig. 5 の SEM 写真から分かるように、薬物の内包量が増えるに伴い、MS 表面の凹凸が大きくなる。したがって、薬物内包量の多い MS ほど、平均粒径がほぼ等しいため、MS の表面積は増加すると考え

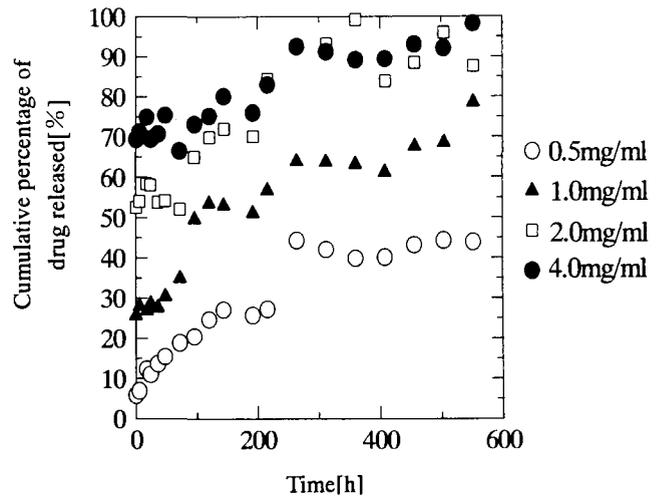


Fig. 7 The influence of drug content in the disperse phase on CPT release property of PLA-MS

られる。さらに、分散相薬物量が 2.0mg/ml 以上の条件で調製した MS では、エマルジョン調製時、分散液滴内には、未溶解の薬物が微粉として分散している。このような微粉は、これまでの研究から液中乾燥において、液滴界面へ偏析する傾向が指摘されている(K. Tokuda et al, 1998)。このため、MS 表面近傍での薬物担持量は、仕込み量に比べ高くなる。これらの理由から、分散相中の薬物量の増大に伴って、初期バーストが著しく現れたものと推察される。

一方、分散相薬物量が低い MS (0.5mg/ml, 1.0mg/ml) では、徐放開始後 10 日ごろから、徐放速度の低下が認められる。これは、MS 中の PLA の重量平均分子量が 113,500 と高く、表面近傍に存在する薬物の徐放が終了し、内部に存在する薬物の徐放が極めて遅いためと考えられる。

4. 結言

カンプトテシンを内包したポリ乳酸微粒子製剤の調製を試みた結果、分散相に溶解せず固体として析出している薬物を用いると、表面近傍に偏析した薬物が初期バーストの原因となった。

カンプトテシンを内包したポリ乳酸微粒子製剤の熱的特性を DSC により調べたところ、分散相薬物量の増加に伴い、ガラス転移温度が低下し、そのことが微粒子製剤のモルフォロジーを決定した。

以上を総括すると、芯物質(薬物)と膜物質(ポリマー)の相互作用を生じる場合、徐放特性には多大な影響を与えるため、微粒子製剤の調製にはその有無を考慮することが重要であると言える。

参考文献

- K. Tokuda, S. Natsugoe, M. Shimada, T. Kumanohoso, M. Baba, S. Takao, K. Nakamura, K. Yamada., H. Yoshizawa, Y. Hatate and T. Aikou: *International Journal of Cancer*, **76**, 709-712 (1998)
橋田充 : ドラッグデリバリーシステム 化学同人 (1995)