

グリチルリチン高含有 PLGA マイクロスフェアの調製及びラット皮下投与後のグリチルリチンの胆汁中への排泄

大柳賀津夫,^{*,a} 新谷一博,^b 古閑健二郎^a

Preparation of PLGA Microspheres Encapsulating Highly Concentrated Glycyrrhizin and the Bile Elimination of Glycyrrhizin after Subcutaneous Administration in Rats

Kazuo OHYANAGI,^{*,a} Kazuhiro SHINTANI,^b and Kenjiro KOGA^a

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan, and ^bKanazawa Institute of Technology, 7-1 Ohgigaoka, Nonoichi, Ishikawa 921-8501, Japan

(Received April 26, 2009; Accepted September 24, 2009)

The aim of this study was to prepare poly (lactide-*co*-glycolide) (PLGA) microspheres encapsulating highly concentrated glycyrrhizin (GZ), a hydrophilic drug, and to compare the release characteristics of GZ in *in vitro* experiments and GZ elimination into bile after subcutaneous administration in rats. The preparation was carried out based on water drying using a (w/o)/w emulsion. The encapsulation rate of GZ in microspheres was 76% when the GZ concentration in the outer water phase was equal to that in the inner water phase for the preparation of (w/o)/w emulsion. The release of GZ from the microspheres showed a biphasic zero-order profile, that is, the behavior boundary was approximately 12 h. The release of GZ from the microspheres at the periods of 0.5–8 h and 12–672 h was 0.18 mg/h and 0.0012 mg/h, respectively. On the other hand, 0.25% of GZ administered (5.0 mg) was eliminated into bile by 12 h, and the bile clearance rate (1.13 ml/h) of GZ after the subcutaneous administration of the microspheres was the same as that (1.13 ml/h) after the administration of GZ solution. From the results, it is suggested that the initial controlled release (0.18 mg/h) of GZ from microspheres may be beneficial for the hepatic bioavailability of GZ.

Key words—glycyrrhizin; poly (lactide-*co*-glycolide); microsphere; subcutaneous; biphasic zero-order profile; bile elimination

緒 言

慢性肝炎は「6 ヶ月以上持続する肝機能異常の症例」と定義され、炎症の持続により肝硬変へと進展する。わが国における慢性肝炎のおよそ 70% は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に起因し、感染者は約 200 万人いると推定されている。^{1,2)} C 型肝炎治療の目標は、肝硬変への進展を抑止し肝発がんを予防することである。そのためにはウイルスの駆除が最も重要であり、完全消失例では肝炎の鎮静化はもとより肝線維化の改善、肝発がんの抑止が可能であり、生命予後の明らかな改善が得られる。¹⁾ ウイルスの完全除去が期待できる治療はインターフェロン (IFN) 療法のみであり、治療薬として IFN、IFN にポリエチレングリコール (PEG) を結合させて効果の持続化が図られた PEG-IFN、あるいは

PEG-IFN+リバビリンが用いられている。しかしながら、ウイルスを排除できない例も存在し、また副作用により投与を中止せざるを得ない例や投与禁忌例も少なくない。このような場合は、肝庇護薬を用いて alanine aminotransferase (ALT) 値を正常化ないし低値に維持し、肝線維化の進展抑制、肝発がんの抑制が治療目標となる。¹⁻⁴⁾

ALT 値低下を目的とした肝庇護薬の 1 つにグリチルリチン (GZ) 注射剤 (主成分: グリチルリチン酸モノアンモニウム塩; GZ-NH₄) がある。GZ-NH₄ はカンゾウ (甘草; *Glycyrrhiza glabra* L.) の有効成分の 1 つである (Fig. 1)。GZ 注射剤 (2 mg/ml) の投与法は、通常 1 日あたり 40–60 ml を連日静脈内投与で開始し、ALT 値が下げ止まったところで、ALT 値の再上昇に注意しながら 1–2 ヶ月毎に投与回数を減らし、週 2–3 回程度の間欠投与で維持する。¹⁾ GZ 製剤には錠剤も市販されているが、効果の面からもつばら注射剤が使用されている。し

^a北陸大学薬学部, ^b金沢工業大学

*e-mail: ohyanagi@p.kanazawa-u.ac.jp

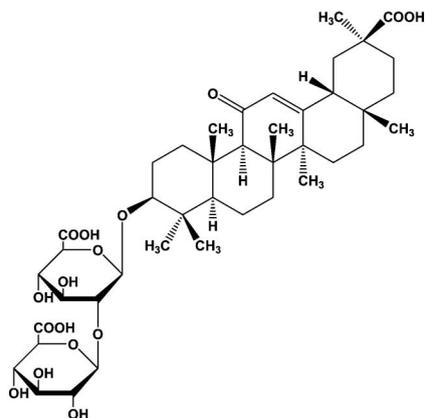


Fig. 1. Structure of Glycyrrhizin (GZ); $C_{42}H_{62}O_{16}$, Molecular Weight 822.94

かし、頻回の通院や穿刺等の苦痛を強いられる注射剤の長期にわたる使用は、患者にとって大きな負担となっている。GZは静脈内に投与された後、速やかに胆汁中に未変化体のまま排泄される。⁵⁻⁸⁾したがって、ターゲットとなる肝での保持率が悪いことからその利用率が劣っていることが窺える。肝での保持時間を延長させ、利用率を高めるため、また患者の頻回の通院や穿刺等の苦痛を軽減するためには、肝からのGZの体内動態に合わせた徐放性の製剤開発が期待されている。これまでGZの新製剤開発に関する検討は、大腸デリバリー製剤,⁹⁾坐剤,^{10,11)}点鼻剤^{12,13)}及び皮下注射剤^{12,13)}について行われており、それらの研究からGZの投与経路として、皮下投与の有用性が示唆されている。^{12,14)}

一方、長期徐放性を示す皮下投与製剤として最も成功した例は、乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)あるいは乳酸重合体(PLA)を用いた黄体化ホルモン放出ホルモン(LH-RH)アナログであるリュープロレリン酢酸塩製剤であろう。¹⁵⁻¹⁸⁾子宮内膜症、前立腺がんや閉経前乳がんなどの治療において、1ヵ月あるいは3ヵ月に1回の投与で治療を続けることが可能となっている。PLGAあるいはPLAはともに生体適合性を有する高分子化合物であり、投与後加水分解によって徐々に低分子化され、最終的に H_2O 及び CO_2 となって排泄される。投与後の消失は、乳酸：グリコール酸の重合比が50：50の場合が最も速く、乳酸の比率が上がるにつれて遅くなり、また分子量が大きいほど遅くなることわがわっている。¹⁷⁾そのため、比率や分子量の違いにより、薬物の高分子化合物からの溶出速度を任意に設計で

きる特徴がある。

以上のことに鑑み、1回の投与で長期間効果が持続するGZの皮下投与型製剤開発に向けた基礎検討として、GZを高率に含有するPLGAを用いたマイクロスフェアの調製、並びにその製剤からのGZ溶出挙動を検討した。本検討では、GZは既に開発されている高濃度GZ水溶液^{12,13)}を、PLGAは基礎検討であること及び溶出実験の簡便さから乳酸：グリコール酸重合比50：50タイプを使用した。

方 法

1. 試薬類 GZ- NH_4 (純度85%)は榊宏輝よりご恵贈頂いた。PLGAは、乳酸：グリコール酸重合比50：50、分子量40000-75000を使用し、Sigma-Aldrich Inc.から購入した。ポリビニルアルコール(PVA;平均重合度約500,けん化度86-90mol%),ソルビタンモノオレエート(Span 80,特級),L-アルギニン(特級)及びD-グルコース(特級)は和光純薬工業㈱から購入した。グリセリンは日興製薬㈱から局方品を購入した。外科用アロンアルファ(アロンアルファA「三共」[®])は第一三共㈱から購入した。そのほかの試薬・試液は、特級あるいは高速液体クロマトグラフ用を使用した。

2. 高濃度GZ- NH_4 水溶液の調製 既報^{12,13)}に従い、50mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)を用いて3.0%L-アルギニン含有100mg/mlGZ- NH_4 水溶液を調製した。

3. GZ- NH_4 含有マイクロスフェアの調製検討

3-1. 有機溶媒にアセトン、外水相にグリセリンを用いた場合 アセトン1.0mlにPLGA500mgを溶解させた溶液に高濃度GZ- NH_4 水溶液250 μ lを加え、マグネチックスターラー[MAG MIXER MD-41,ヤマト科学㈱]にて500rpm,30分間攪拌し(w/o)エマルジョンとした。これを1.0%PVA含有グリセリン-精製水混合液(グリセリン：精製水の質量比7：3)5.0gに添加し、ホモジナイザー(PT-MR 3100,ジェネレーターシャフト：DA3007/2E 7.5mm ϕ ,KINEMATICA Inc.)を用いて20000rpm,5分間攪拌し(w/o)/wエマルジョンとした。これをデジタルホットプレートスターラー[DP-2L,アズワン㈱]上で50 $^{\circ}C$,500rpmにて3時間攪拌しながら液中乾燥し、有機溶媒の揮散とともに固化した(w/o)エマルジョンを高速遠

心機 [GRX-250, (株)トミー精工] にて $41000 \times g$, 30 分間の条件で遠心分離して捕集した。捕集したエマルションをデジタルホットプレートスターラー上で精製水 15 ml にて 500 rpm, 10 分間洗浄し, 上述と同じ条件で高速遠心機にて再捕集, この洗浄操作を 3 回繰り返した。洗浄したエマルションを -80°C にて 24 時間放置後, 48 時間凍結乾燥 [FD-800, 東京理化学器械(株)] を行い, GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアを得た。得られたマイクロスフェアの回収率 (%) は, 次式により計算した。

$$\text{回収率} = \frac{\text{得られたマイクロスフェアの質量}}{\text{処方した GZ-NH}_4, \text{添加物並びに PLGA の質量の合計}} \times 100$$

また, (w/o) エマルションの白濁度について, 方法 3-2. におけるそれと比較するため, 別途調製した (w/o) エマルションをアセトンで 4 倍希釈し, この希釈溶液について 650 nm における吸光度 [UV-1200, (株)島津製作所] を測定した。

3-2. 有機溶媒にジクロロメタン, 外水相にグリセリンを用いた場合 ジクロロメタン 1.0 ml に PLGA 500 mg 及び Span 80 25 mg を溶解させた溶液に高濃度 GZ-NH₄ 水溶液 250 μl を加え, マグネチックスターラーにて 500 rpm, 30 分間攪拌し (w/o) エマルションとした。これを 1.0% PVA 含有グリセリン-精製水混合液 (グリセリン: 精製水の質量比 7:3) 5.0 g に添加し, ホモジナイザーを用いて 20000 rpm, 5 分間攪拌し (w/o)/w エマルションとした。以下, 液中乾燥以降の操作は, 方法 3-1. と同様に行った。

(w/o) エマルションの白濁度については, 希釈溶媒にジクロロメタンを用い, 方法 3-1. と同様に吸光度を測定した。

3-3. 有機溶媒にジクロロメタン, 外水相に高濃度 GZ 水溶液を用いた場合 ジクロロメタン 1.0 ml に PLGA 500 mg 及び Span 80 25 mg を溶解させた溶液に高濃度 GZ-NH₄ 水溶液 250 μl を加え, マグネチックスターラーにて 500 rpm, 30 分間攪拌し (w/o) エマルションとした。これを 1.0% PVA 含有高濃度 GZ-NH₄ 水溶液 5.0 ml に添加し, ホモジナイザーを用いて 20000 rpm, 5 分間攪拌し (w/o)/w エマルションとした。以下, 液中乾燥以降の操作は, 方法 3-1. と同様に行った。本法で得られた GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアの観察は走

査型電子顕微鏡 [JSM5400, 日本電子(株)] にて行い (Fig. 2), 粒度分布は画像解析装置 [SEMAFORE ver. 4, 日本電子(株)] を用いて測定した (Fig. 3)。

4. GZ-NH₄ 含有マイクロスフェア中の GZ 量測定 得られた GZ-NH₄ 含有マイクロスフェア中の GZ 濃度は, 十分に攪拌したマイクロスフェア中の任意の 3 点についてそれぞれ高速液体クロマトグラフ (HPLC) にて定量分析し, それらを平均して求めた。すなわち, マイクロスフェアをマイクロスパーテルで十分に攪拌後, 約 10 mg ずつスクリュウ管瓶 (13.5 ml) にそれぞれ取り, ジクロロメタン 1.0 ml を加えて密栓し, ソニケーター [Branson 1210, ヤマト科学(株)] を使用してマイクロスフェアを溶解させた。溶解後, それぞれに 10% アンモニア水 2.0 ml を加え, 振とう機 [Voltex Shaker VR-36, タイテック(株)] にて 500 rpm, 1 時間の条件で振とうした。振とう後, スクリュー管瓶を約 10 分間静置し, 上清 (水相) 約 1 ml を遠沈管 (15 ml) に移し, 遠心機 [2100, (株)久保田製作所] にて $1400 \times g$, 10 min の条件で遠心した。この上清 40 μl に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 960 μl を加えて 50 倍希釈とし, HPLC 分析用試料とした。標準としてスクリュウ管瓶に GZ-NH₄ 2 mg, PLGA 40 mg 及びジクロロメタン 1.0 ml を入れ, 密栓後, ソニケーターにて PLGA を溶解させた。溶解後, 10% アンモニア水 2.0 ml を加え, マイクロスフェアの場合と同様に振とう, 遠心を行い, 得られた上清 10 μl に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 990 μl を加えて 200 倍希釈とし, HPLC 分析用試料とした。

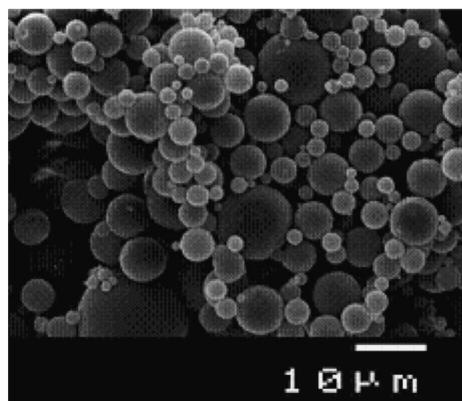


Fig. 2. Microspheres Encapsulating GZ-NH₄ Prepared by Method 3-3

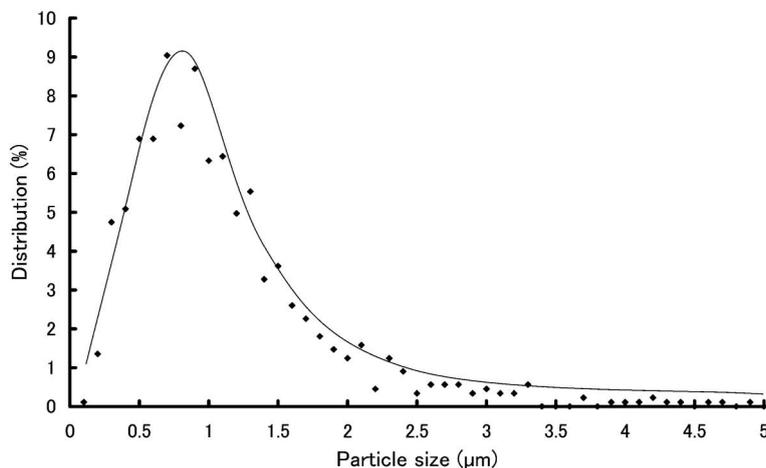


Fig. 3. Particle Size Distribution of Microspheres Encapsulating GZ-NH₄ Prepared by Method 3-3

HPLC の条件は既報^{19,20)}に従った。

マイクロスフェアへの GZ 封入率 (%) は、処方した GZ-NH₄ 中の GZ が、処方した PLGA 中にすべて封入された場合を 100% とし、回収率をもとに次式により計算した。

封入率 = 処方した GZ-NH₄ の質量 × 純度 (0.85)

$$\times \frac{\text{GZ の分子量}}{\text{GZ-NH}_4 \text{ の分子量}} \times \text{回収率}$$

方法 3-3. における封入率計算では、内水相中の GZ-NH₄ の質量を「処方した GZ-NH₄ の質量」とした。

5. *in vitro* 溶出実験 調製した GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアからの GZ 溶出実験は、日局溶出試験法 (パドル法) に準じ、日局崩壊試験法第 2 液を用いて行った。すなわち、試験器 [Magstir-Bath TMb-81, DISSOLUTION TESTER NTR-1000, 富山産業㈱] から試験液 10 ml を抜き取り、これに GZ-NH₄ 含有マイクロスフェア 500 mg (GZ として 9.65 mg 含有) を懸濁させ、20 G × 7 mm 針を付けたシリンジを用いて試験液に注入した。試験開始 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 及び 12 時間後、以後 240 時間後までは 12 時間毎、その後 672 時間後までは 48 時間毎に試験液を 0.5 ml 採取し、直ちにメンブランフィルター [孔径 0.2 μm, DISMIC[®]-13HP020, 東洋濾紙㈱] でろ過後、分析まで冷蔵保存した。試験液採取後は、直ちに同温・同量の第 2 液を試験器内に補充した。試験液中の GZ 濃度は、HPLC にて定量分析した。^{19,20)}

$$\text{GZ 溶出率} = \frac{\text{試験液に溶出した GZ 量}}{\text{試験液に注入したマイクロスフェアの GZ 量}} \times 100$$

6. *in vivo* 投与実験 7 週齢の SD 系雄ラット [三協ラボ㈱] を購入後、自由給水自由給餌の状態 で約 1 週間飼育した。実験前日に絶食させたラット (体重 240–260 g) にウレタンを腹腔内投与 (2.0 g/ml/kg) して麻酔した。このラットを 37°C にセットしたデジタルホットプレートスターラー (DP-2L) 上に仰向けに固定後、腹部中心を約 3 cm 切開し、胆汁採取用として胆管にポリエチレンチューブ (長さ 20 cm, PE10, Becton Dickinson and Co.) を挿入し、挿入部分を外科用アロンアルファで固めた。チューブのもう一端はエッペンドルフチューブ (2 ml) 中に入れた。その後ラット背部左側をつまみ、GZ 5.0 mg を含有する GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアを懸濁させた 5.0% ブドウ糖液 2.0 ml を 18 G × 38 mm 針を付けたシリンジにて皮下投与した。同様に、GZ-NH₄ を用いて調製した GZ 5.0 mg を含む 5.0% ブドウ糖液 2.0 ml を皮下投与したものを control とした。いずれも投与後、直ちに穿刺部位を外科用アロンアルファで塞いだ。投与開始直後、2, 4, 6, 8 及び 10 時間後にエッペンドルフチューブを交換、12 時間後まで胆汁を採取し、分析日まで冷蔵保存した。投与 12 時間後に脱血死させ肝臓を採取、並びに投与したマイクロスフェアを回収した。採取した肝臓並びに回収したマイクロスフェアは、分析日まで -80°C で保存した。胆汁及び肝臓中の GZ 濃度は、HPLC にて定量分析した。^{19,20)} ま

たマイクロスフェア中の GZ 残存量は、方法 4. に準じて、マイクロスフェア全量をジクロロメタンで溶解後 10%アンモニア水で GZ を抽出し、HPLC にて定量分析した。

ラットの購入、飼育及び実験手技に関する管理は、北陸大学において定められた動物実験管理規定に従い、承認を得た上で実施した。

GZ 投与 12 時間後における肝及び胆汁クリアランス (ml/h) は、次式により計算した。

$$CL_{\text{肝}} = \frac{\text{胆汁中への GZ 排泄速度 } (\mu\text{g/h})}{\text{肝臓中 GZ 濃度 } (\mu\text{g/ml})}$$

$$CL_{\text{胆汁}} = \frac{\text{胆汁中への GZ 排泄速度 } (\mu\text{g/h})}{\text{胆汁中 GZ 濃度 } (\mu\text{g/ml})}$$

胆汁中への GZ 排泄速度は、GZ 投与 10–12 時間後に胆汁中に排泄された GZ 量 (μg) を 2 で除した値を用いた。また胆汁中 GZ 濃度は、GZ 投与 10–12 時間後の胆汁中 GZ 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を 2 で除した値を用いた。

7. 統計解析 *in vivo* 投与実験における 2 群間解析には Student's *t*-test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果及び考察

1. GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアの調製

PLGA はアセトンあるいはジクロロメタンなどの有機溶媒には容易に溶解するが、水にはほとんど溶解しない。したがって、GZ のように親水性薬物を封入する PLGA マイクロスフェアの調製は、通常、薬物を溶解させた水相を内相に PLGA を溶解させた有機溶媒相を外相とする一次エマルジョン [(w/o) エマルジョン] を調製後、二次乳化により (w/o)/w エマルジョンを調製してから、有機溶媒を除去する方法がとられる。²¹⁾ この操作において、薬物の封入率をコントロールできる条件を設定すること、並びにマイクロスフェアのサイズを均一にすることが重要な問題となる。そこで、マイクロスフェアの回収率、マイクロスフェア内への GZ の封入率、マイクロスフェアの平均粒子径とそのサイズ分布をもとに簡易調製できる方法を検討した。

まず、PLGA への高濃度 GZ-NH₄ 水溶液の分散性向上を期待し、有機溶媒として両親媒性溶媒となるアセトンを選択した。また、二次乳化時に (w/o) エマルジョンの分散性向上並びに分散相からの有機

Table 1. Recovery of Microspheres and Encapsulation of GZ-NH₄ into Microspheres

Method	Recovery (%)	Encapsulation (%)
3-1	73	7
3-2	122	5
3-3	85	76

溶媒の除去を促進させる目的で、外水相に 1.0% PVA 含有グリセリン-精製水混合液を選択した (方法 3-1.)。^{22,23)} しかし、本法におけるマイクロスフェア回収率は 73% と概ね良好であったが、マイクロスフェアへの GZ 封入率は 7% であった (Table 1)。乳化粒子の量は、みかけ上の白濁の度合いに比例すると予測できるが、²⁴⁾ 本法では一次エマルジョン調製時、(w/o) エマルジョンが適切に形成されていないためか、調製時におけるその白濁の度合いは弱く観察された。そこで白濁度について、650 nm における吸光度を測定したところ 1.60 であり、GZ-NH₄ 封入率の高かった方法 3-3. (一次エマルジョン形成までは方法 3-2. に同じ) における 2.53 に比し低値であった。

そこで、有機溶媒をジクロロメタンに変え、(w/o) エマルジョン形成を確実なものとするために、界面活性剤である Span 80 を添加してマイクロスフェアの調製を試みた (方法 3-2.)。しかしながら本法では、マイクロスフェア同士の凝集がみられ、GZ の封入率も 5% であった (Table 1)。マイクロスフェア同士の凝集は、二次乳化時に PLGA 中にグリセリンが取り込まれたことによるものと考えられ、その結果、回収率は質量をもとに算出していることから 100% を超えたものと考えられた。本法における (w/o) エマルジョン形成では方法 3-1. よりも白濁の度合いが強くと観察され、実際、上述の通り吸光度も高く、Span 80 の添加は適切なエマルジョン形成に寄与するものと考えられた。

そこで次に、外水相を内水相と同じ高濃度 GZ-NH₄ 水溶液とする方法 3-3. を試みた。その結果、マイクロスフェアへの GZ 封入率は 76% と高値となり、回収率も 85% と良好であった (Table 1 and Fig. 2)。また、方法 3-2. のようなマイクロスフェア同士の凝集はみられなかった。Ogawa らはリユープロレリン酢酸塩の徐放性製剤調製において、

内水相の粘度を極端に高くして外水相との物理化学的性質を大きく変え、さらに内水相の流動性を低下させるため (w/o) エマルジョンの粘度も高くすることで、合一による薬物封入率低下を回避している。¹⁵⁾ さらに、リュープロレリン酢酸塩は塩基性のアミノ酸を有しているため、この塩基と PLGA 末端のカルボキシル基との静電的相互作用がマイクロスフェア内において安定な構造を保持し、もって薬物の高い封入率に重要な役割を果たしているとも報告している。²⁵⁾ これに対して、本法では高濃度 GZ 水溶液及び (w/o) エマルジョンの粘度調整を行っておらず、また GZ と PLGA との静電的相互作用が期待できないにもかかわらず、GZ のマイクロスフェアへの封入率は高値となった。得られた GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアは、粒子径 0.2-3 μm サイズのものが全体の 95% 以上を占め (Fig. 3)、色調は白~微黄白色であった。

以上の結果より、最も GZ 封入率の高かった方法 3-3. による GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアを用いて、以降の検討を行った。

2. *in vitro* 溶出実験 方法 3-3. により得られた GZ-NH₄ 含有マイクロスフェアについて、*in vitro* におけるマイクロスフェアからの GZ 溶出挙動を明らかにするため溶出実験を行ったところ、GZ の溶出に初期バーストがみられ、その後は溶出速度は低下し、ほぼ一定速度で GZ が溶出した (Fig. 4)。すなわち、初期バーストにより試験開始 12 時間後までに約 20% の GZ がマイクロスフェアから溶出し、672 時間後での GZ 累積溶出率は約 33% であった。試験開始 0.5 から 8 時間後まで、及び 12 から 672 時間後までのマイクロスフェアからの累積溶出量について近似直線を求めたところ、いずれも $R^2 > 0.8$ と直線性が高かった (Fig. 5)。さらに、これら近似直線の交点における時間を求めたところ 8.4 時間であった。これらのことは、試験開始約 8 時間後まで 0 次速度 (0.18 mg/h) にしたがってマイクロスフェアから GZ が溶出し、その後溶出挙動が変化して、再び 0 次速度 (0.0012 mg/h) にしたがって GZ が溶出していることを意味するものである。溶出過程で挙動が変化することは好ましいことではないが、初期バースト以降の溶出が非常に緩徐であり、最も分解速度の速いタイプの PLGA にて 4 週間での GZ 溶出量が封入量の 1/3 であった

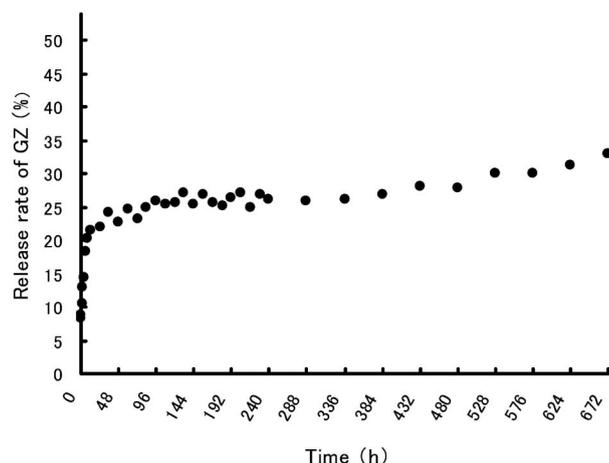


Fig. 4. Release Rate of GZ from Microspheres *in Vitro* until 672 h

The microspheres were prepared by Method 3-3.

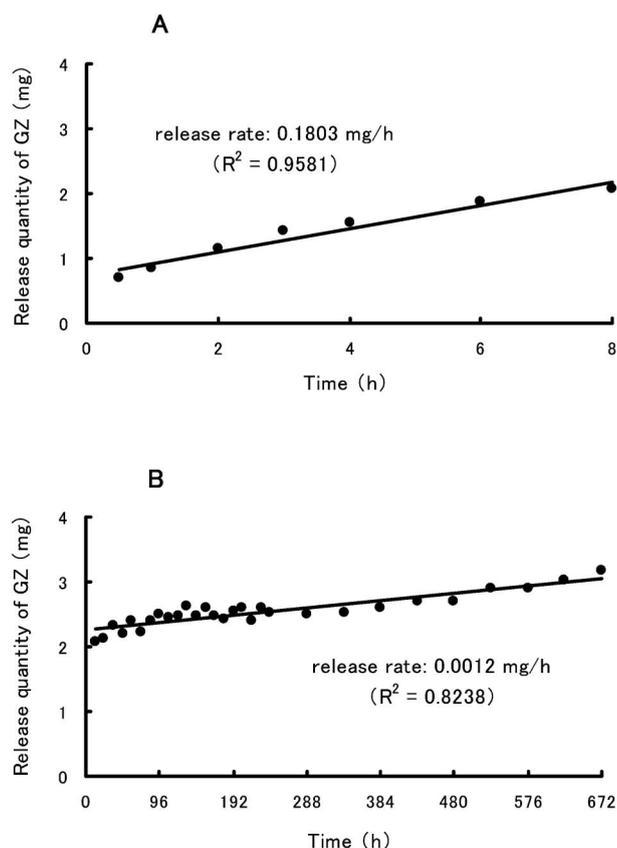


Fig. 5. Release Quantity of GZ from Microspheres and Release Rate *in Vitro*

A; Release profile from 0.5 h to 8 h, B; release profile from 12 h to 672 h, A and B are the same experiment results.

ことは、PLGA が GZ の徐放担体となり得ることを示唆するものと考えられる。

3. *in vivo* 投与実験 2 時間毎の胆汁中 GZ 濃

度推移より, control 群では投与直後から胆汁中への GZ の速やかな排泄がみられ, 投与 6 時間後には投与量の約 80% が排泄された. これに対してマイクロスフェア投与群では, 投与直後に若干の過剰な排泄がみられたが control 群ほど著しいものではなく, 投与 6 時間後以降はほぼ安定し, 12 時間での排泄量は投与量の 5% 弱であった (Fig. 6). また, 投与 12 時間後における肝臓中 GZ 濃度は, control 群では $11.7 \mu\text{g/ml}$, マイクロスフェア投与群では $8.84 \mu\text{g/ml}$ であった.

血液中の GZ は肝細胞に発現している輸送トランスポータータンパク質である organic anion transporting peptide 1 (Oatp1) を介して肝臓中に取り込まれ,²⁶⁾ ほとんど代謝を受けることなく multidrug resistance-related protein 2 (MRP2) を介して速やかに胆汁中に排泄²⁷⁾ されることから, 胆汁中に排泄された GZ 量をもって, 投与されたマイクロスフェア

からの GZ 溶出挙動をある程度論じることができると考えられる. すなわち, control 群において短時間に約 80% もの GZ が胆汁中に排泄されたことは, 投与された GZ の多くが皮下から速やかに血液中に移行し, 続けて Oatp1 を介して肝臓中に取り込まれ, さらに MRP2 を介して胆汁中に排泄された結果と考えられた. 一方, マイクロスフェア投与群において, 投与 12 時間後の胆汁中 GZ 排泄量が投与量のわずか 5% 弱であったことは, PLGA によって GZ 溶出が徐放化され, その結果 GZ の血液中への移行が遅延した, あるいは GZ の肝臓中への取り込み又は胆汁中への排泄において飽和がみられたことが原因と考えられた. そこで, GZ の代謝過程での飽和の有無を確認するため, 投与 12 時間後における肝及び胆汁クリアランスを算出した (Table 2). control 群における GZ の肝及び胆汁クリアランスはそれぞれ 3.85 ml/h 及び 1.13 ml/h , マイクロスフェア投与群ではそれぞれ 0.73 ml/h 及び 1.13 ml/h であった. 加えて, 体重 $240\text{--}280 \text{ g}$ の SD 系雄ラットに対して 20 mg/kg の GZ を静脈内急速投与し, GZ の体内動態を検討した既報²⁰⁾ との比較から, GZ の肝臓中への取り込み又は胆汁中への排泄いずれにおいても飽和は認められなかった. さらに, マイクロスフェア投与群における GZ の肝クリアランスが control 群のそれに比し低値であったこと, また投与 12 時間後におけるマイクロスフェア中の GZ 残存量は 4.6 mg (投与量の 92%) であったことから, マイクロスフェア投与群では PLGA によって GZ 溶出が徐放化されたと考えられ, これらのことにより投与 12 時間後における胆汁中 GZ 排泄量がわずかであったと推察された. このことは *in vivo* においても, PLGA が GZ の徐放担体となり得ることを支持するものであると考えられる.

これまでに肝細胞内 GZ 濃度と肝庇護効果の関係を検討した報告は見当たらない. Koga らは, GZ

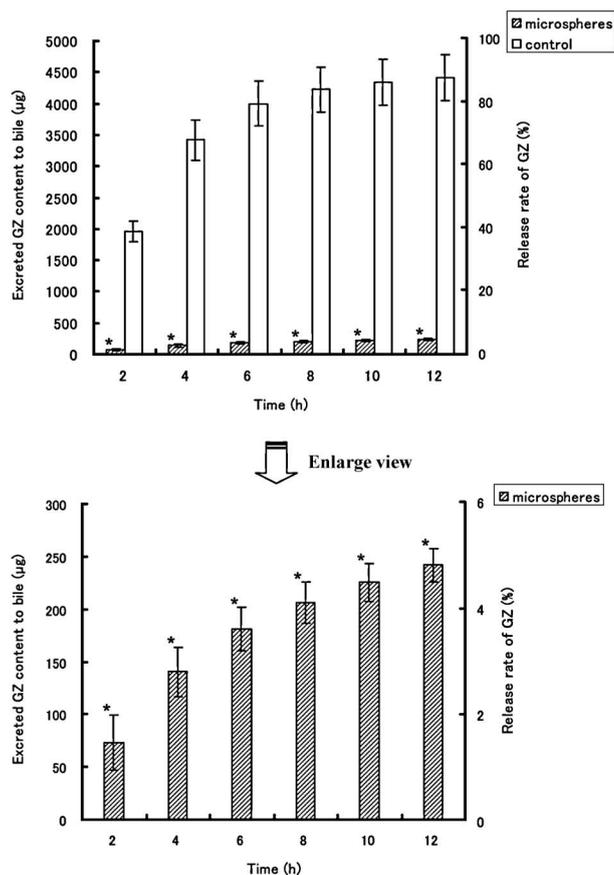


Fig. 6. Excreted GZ Content to Bile and Release Rate of GZ from Microspheres after Subcutaneous Administration at the Dose of 5 mg GZ to Rats

Data represent the mean \pm S.D. of four experiments, *: $p < 0.01$ (vs. control, student *t*-test).

Table 2. Liver and Bile Clearances of GZ at 12 h after Subcutaneous Administration at the Dose of 5 mg GZ to Rats

Control (ml/h)	
Liver	3.85
Bile	1.13
Microspheres administration (ml/h)	
Liver	0.73
Bile	1.13

の多くが体内に長く留まらず、ほとんど代謝を受けることなく速やかに胆汁中に排泄されるというこれまでの報告^{5-8,25,26)}から、ALT 値を抑制する作用が肝細胞内の GZ 濃度と相関すると仮定すれば、血液中 GZ 濃度と比べて十分に低いレベルで肝細胞保護作用を発現し、ALT の細胞外への放出を抑えていると考察している。¹⁴⁾ 今回検討した GZ の皮下投与において、製剤の工夫を行わず投与した場合は、GZ はそのほとんどが短時間で胆汁中へ排泄されるため、臨床に応用しても従来の静脈内投与同様、頻回の投与が必要になることが容易に予想される。これに対して、PLGA を用いたマイクロスフェア製剤とすることで、同製剤からの GZ 溶出が徐放化された。マイクロスフェアからの GZ 溶出速度と肝庇護効果との検討は今後必要であるが、臨床では少ない投与回数で治療を行えることが期待できる。

結 論

慢性肝炎における肝庇護療法は長期にわたることから、患者にとってできる限り少ない通院・穿刺回数で済むことが望まれる。そのため、肝庇護薬として繁用されている GZ 注射剤に匹敵する効果を有し、投与回数が少ない新たな製剤が開発されれば、患者にとっての負担軽減は小さくない。投与経路として皮下投与は、静脈内同様、穿刺による痛みやリスクは避けられないが、製剤が徐放性であればそれらを軽減でき、有用な投与経路となることはリユープロレリン酢酸塩の徐放性製剤が示している。今回、投与量や溶出量と治療効果との関係については検討していないが、肝庇護療法では比較的大量の GZ の投与が必要となることから、少ない製剤投与量で高い治療効果を上げるために、開発される製剤は、より GZ 含有量の高い製剤であることが望まれる。

今回の検討では、外水相を内水相と同一にするという調製法により、水溶性薬物である GZ を高率に PLGA 中に封入させることに成功した。この方法では、回収した外水相を再度使用できるという利点も有する。また、調製したマイクロスフェアの粒子径並びにその分布から大きなバラつきはみられず、GZ 高含有マイクロスフェアの簡易調製法を提示できたと考えている。さらに調製した製剤からの GZ 溶出では、*in vitro* 及び *in vivo* とともに初期バースト

がみられるものの、最も消失の速い乳酸：グリコール酸の重合比 50：50 のタイプでもその後十分な徐放化がみられた。今回の基礎検討結果は、今後の GZ 皮下投与型徐放性製剤開発に道を開いたと言える。

謝辞 本研究の一部は北陸大学特別研究助成によるものであり、深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Nishiguchi S., "Today's Therapy 2007," eds. by Yamaguchi T., Kitahara M., Fukui T., Igaku-Shoin Ltd., Tokyo, 2007, pp. 373-377.
- 2) Saito T., Misawa K., Shinzawa H., Kawata S., *Yamagata Med. J.*, **25**, 7-15 (2007).
- 3) Arase Y., Ikeda K., Murashima N., Chayama K., Tsubota A., Koida I., Suzuki Y., Saitoh S., Kobayashi M., Kumada H., *Cancer*, **79**, 1494-1500 (1997).
- 4) Kumada H., *Oncology*, **62** (Suppl. 1), 94-100 (2002).
- 5) Ichikawa T., Ishida S., Sakiya Y., Sawada Y., Hanano M., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 672-675 (1986).
- 6) Ishida S., Sakiya Y., Ichikawa T., Taira Z., Awazu S., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 212-218 (1990).
- 7) Ishida S., Sakiya Y., Ichikawa T., Taira Z., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1917-1920 (1992).
- 8) Shimamura H., Suzuki H., Tagaya O., Horie T., Sugiyama Y., *Pharm. Res.*, **13**, 1833-1837 (1996).
- 9) Shibata N., Ohno T., Shimokawa T., Hu Z., Yoshikawa Y., Koga K., Murakami M., Takada K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 441-447 (2001).
- 10) Fujioka T., Kondou T., Fukuhara A., Tounou S., Mine M., Mataka N., Hanada K., Ozaka M., Mitani K., Nakaya T., Iwai T., Miyakawa H., *Hepatol. Res.*, **26**, 10-14 (2003).
- 11) Koga K., Takekoshi K., Kaji A., Hata Y., Ogura T., Fujishita O., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 154-163 (2006).
- 12) Koga K., Takekoshi K., Tomoyama M., Fujishita O., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 414-419 (2006).

- 13) Koga K., Takekoshi K., Fujishita O., *JP Kokai Tokkyo Koho*, P2007-45788A (2007).
- 14) Koga K., Kawashima S., Shibata N., Takada K., *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1103-1114 (2007).
- 15) Ogawa Y., Yamamoto M., Okada H., Yashiki Y., Shimamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095-1103 (1988).
- 16) Ogawa Y., Yamamoto M., Takada S., Okada H., Shimamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1502-1507 (1988).
- 17) Ogawa Y., Okada H., Yamamoto M., Shimamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2576-2581 (1988).
- 18) Okada H., Doken Y., Ogawa Y., Toguchi H., *Pharm. Res.*, **11**, 1143-1147 (1994).
- 19) Koga K., Tomoyama M., Ohyanagi K., Suzuki T., Hamada Y., *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **18**, 161-167 (2008).
- 20) Koga K., Tomoyama M., Ohyanagi K., Takada K., *Biopharm. Drug Dispos.*, **29**, 373-381 (2008).
- 21) Kawashima Y., *Yakuzaigaku*, **66**, 224-238 (2006).
- 22) Suzuki T., Kitazawa T., Matsumoto A., Suzuki A., *JP Kokai Tokkyo Koho*, P2002-12670A (2002).
- 23) Nunofuji T., Yamamoto K., Arai T., *JP Kokai Tokkyo Koho*, P2003-252751A (2003).
- 24) Torres L. G., Iturbe R., Snowden M. J., Chowdhry B. Z., Leharne S. A., *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **302**, 439-448 (2007).
- 25) Okada H., Yamamoto M., Heya T., Inoue Y., Kamei S., Ogawa Y., Toguchi H., *J. Control. Rel.*, **28**, 121-129 (1994).
- 26) Ismail M. G., Stanca C., Ha H. R., Renner E. L., Meier P. J., Kullak-Ublick G. A., *Hepatol. Res.*, **26**, 343-347 (2003).
- 27) Horikawa M., Kato Y., Tyson C. A., Sugiyama Y., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 23-33 (2002).