

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

目 次

課題番号

20000994A	61021	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷 統寿 ……	1
	61027	循環型社会に対応した有機性廃棄物の資源化処理システムの開発	○田中 勝 ……	9
	61100	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 ……	16
	61111	膜型人工肺を用いた小児用呼吸循環補助システムの開発（小児用ECMOシステムの開発）	中川 聡 ……	40
	61131	セラミックビーズを用いた抗原・抗体捕捉法による簡便な感染症診断技術の開発	田代 真人 ……	45
20000995A	61245	血液凝固線溶制御因子に関する基礎的研究並びに関連医薬品の有用性確保及び診断技術の確立	○内田恵理子 ……	54
20000996A	61248	酸性多糖類の医用材料としての応用に関する基礎的研究	○四方田千佳子 ……	64
	61268	人工臓器材料の長期間安全性評価に有用な指標に関する基礎的研究	土屋 利江 ……	74

酸性多糖類の医用材料としての応用に関する基礎的研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
研究者 四方田千佳子

分担研究者

- | | |
|--------------------|------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 宮崎玉樹 |
| (2) 生化学工業(株)東京研究所 | 大木 誠 |
| (3) 帝國製薬(株)製剤開発研究所 | 小西良士 |
| (4) 第一製薬(株)製剤技術研究所 | 奈田光正 |
| (5) ロート製薬(株)製品開発部 | 森岡茂夫 |
| (6) 大鵬薬品工業(株)製剤研究所 | 馬場一彦 |
| (7) 名古屋市立大学薬学部 | 米勢政勝 |
| (8) 長崎大学薬学部 | 中村純三 |

酸性多糖類の生体親和性、生体内分解性、安全性を活かす医用材料としての応用をめざし、基礎的検討を継続した。最終年度にあたり、酸性多糖類と医薬品等との相互作用をさらに詳細に検討し、経口剤としての医薬品修飾多糖の *in vivo* における有用性評価、外用パップ剤の臨床応用を実施した。

1. 研究目的

酸性多糖類には動物由来のグリコサミノグリカン、微生物由来のデキストラン硫酸、植物由来のアルギン酸等があり、それぞれが生物化学的に重要な機能を有しており、すでに種々の酸性多糖類が医薬品あるいは医薬品添加物として使用されている。これらの多糖類に関わる特性の解明を進め、それぞれの医用素材としての適切な有効活用をはかることを目的とし、基礎的な検討を行った。

最終年度に当たり、基礎的検討としては、ヒアルロン酸架橋ゲルと医薬品や蛋白との相互作用による構造形成を詳細に検討した。また、新たにドキシサイクリンと酸性多糖、二価金属イオンによる複合体やゲルの生成を見出し、その生成機構と外用ゲル剤としての応用の可能性を検討した。また、製剤への応用研究では、インドメタシン結合 HA の経口剤としての有用性の *in vivo* 評価、点眼薬への酸性多糖の適用、多糖類を利用した肝臓表面への薬物送達の検討及び酸性多糖類含有外用製剤のヒトによる臨床試験を実施した。

2. 研究方法

A. 酸性多糖類と医薬品の相互作用に関わる基礎研究

2.1 酸性多糖及び HA ゲルと医薬品の相互作用 酸性多糖と医薬品の相互作用の検討では特に両端に荷電を有するジアミン類を取り上げて、水溶液中での複合体形成を濁度、粒径測定、電気泳動光散乱(ELS)により検討した。ヒアルロン酸架橋ゲルと界面活性性医薬品により得られる収縮ヒアルロン酸ゲル中での構造形成の有無をX線散乱により検討した。さらに、新たにドキシサイクリンと酸性多糖、二価金属イオンによる複合体やゲルの生成を見出し、その生成機構と自然発症糖尿病マウスを用いて創傷治癒効果を検討した。

2.2 酸性多糖と BSA からなる構造体形成 BSA 界面への HA の吸着は水晶共振子微小天秤 QCM (ユーエスアイ・システム社製)により、その共鳴周波数の変化から測定した。BSA および HA 表面の表面構造の観察、さらに表面張力測定は原子間力顕微鏡 AFM を用いた。複合体の粒径、表面電位は動的な光散乱及び電気泳動光散乱により測定した。

2.3 医薬品の非晶質状態に及ぼす多糖類の影響 固体分散体は、薬物と高分子をエタノール/ジクロロメタン混液(1:1)に溶解し、スプレードライ機を用いて噴霧乾燥を行い薬物：高分子(1:2)固体分散体を調製した。高分子の結晶化抑制機構を解明するために、熱分析(DSC)、赤外吸収スペクトル(FT-IR)、ラマン吸収スペクトル(FT-Raman)測定を行った。

2.4 多糖類の粘度検出器による特性評価の試み サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の検出器として Viscotek T60A 検出器、東ソー RI-8022 示差屈折検出器を用い、ポンプ HP 社製 Iso ポンプ G1310A、

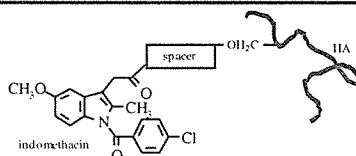
Shodex OHPakSB-G+OHPakSB-806HQ+OHPakSB-803HQ、溶離液 50mMNa₂SO₄+0.02%NaN₃、流速 0.5ml/min で測定した。

B.酸性多糖類の製剤への応用に関わる研究

2.5 医薬品結合 HA の合成と *in vivo* 有用性評価 インドメタシンとヒアルロン酸とを、スペーサーとしてグリコール酸 (HOCH₂CO₂H) を用いたエステル結合により、3種類のヒアルロン酸修飾インドメタシンを調製した(Table 1)。フェナシル基でカルボキシル基を保護したグリコール酸の水酸基とインドメタシンの

Lot No. X: spacer	Mode of bonding 1 ¹⁾	Mode of bonding 2 ²⁾	Molecular weight of HA ³⁾	Introduction ratio (%) ⁴⁾	Solubility
411	COCH ₂ O	ester	950,000	0.20	sparingly soluble
401	COCH ₂ O	ester	950,000	0.12	soluble
413	COCH ₂ O	ester	950,000	0.04	soluble

- 1) mode of bonding between HA and spacer
- 2) mode of bonding between spacer and IND
- 3) initial molecular weight
- 4) per HA 1 unit



カルボキシル基とを混合酸無水物法をもってエステル結合させた後、亜鉛/酢酸 (Zn/AcOH) によりフェナシル基を除去した。このカルボキシル基を再度混合

酸無水物とした後、ヒアルロン酸の水酸基と反応させてエステル結合させた。生成物をエタノール沈殿及び透析により精製し、核磁気共鳴(NMR)法によりインドメタシンの導入率を決定した。グリコール酸をスペーサーとするヒアルロン酸修飾インドメタシンを投与後 24 時間以降の血中濃度の経時変化、動物での薬効評価 (鎮痛効果、胃粘膜傷害低減効果) を検討した。血中インドメタシン血小板凝集法により検出し、ヒアルロン酸修飾インドメタシンの鎮痛効果は酢酸ライジング法を用いて測定した。胃粘膜傷害性は、胃を摘出後ホルマリン固定し、実体顕微鏡下で測定した胃の潰瘍の長さの総和を胃粘膜損傷指数とした。

2.6 前眼部における DDS 製剤の研究 各種酸性多糖の共存イオンによるゲル化を E 型粘度計により測定した。また、家兎前眼部における薬物の滞留性評価はフルオレッセイン溶液を点眼後、アンテリアフルオロメーターにより下眼瞼結膜メニスカス部の蛍光強度の変化を測定した。

2.7 多糖類を利用した肝臓への薬物送達 試料溶液の粘度測定は、回転粘度計により測定し、透析膜透過実験では、横型 Ussing chamber に透析膜を装着して、phenol red を含む高分子溶液を試料として、経時的に移行量を定量した。肝臓表面からの薬物移行実験では、Wistar 系雄性ラットを用い、ペントバルビタール麻酔下、肝臓(左葉)表面に円筒状のガラスセル(Fig.1、内径 9 mm、適用面積 0.64 cm²)

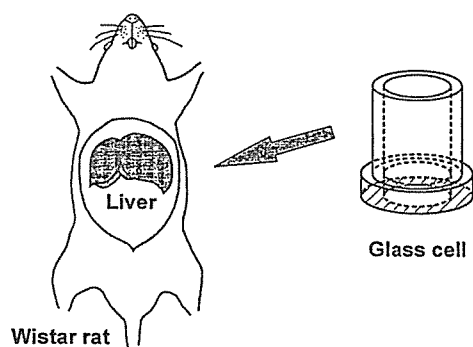


Fig.1 Glass cell for drug application on liver surface

をアロンアルファにより装着し、ガラスセル内に薬物溶液を投与後、左大腿部動脈に血液採血用ポリエチレンチューブを、胆管にポリエチレンチューブを挿入して、血液および胆汁を経時的に採取した。血液サンプルは遠心分離後、上清部分の血漿を定量に供した。

2.8 ヒアルロン酸含有外用製剤の臨床応用 吉草酸ベタメタゾン含有プロトタイプ製剤の臨床評価としては通常実施されることの多い 3 試験を実施した。治験薬は帝國製薬において製造したものを送付し試験に供した。また、臨床効果の評価に先立ち、健康人におけるパッチテストを実施し、吉草酸ベタメタゾンの血漿中濃度を測定した。

3. 研究成果

3.1 酸性多糖及び HA ゲルと医薬品の相互作用 まず、両端に荷電を有する一連のジアミン類とデキストラン硫酸との複合体生成を検討した。酸性多糖類の (分子内もしくは分子間) 架橋剤として作用するジアミン (陽イオン電解質) に関し、陽イオン電離基間距離の違いにより複合体形成 (例えば粒子径等) に何からかの影響が生じるのではないかと考えた。そこで、N.N.N'.N'-テトラメチルエチレンジアミン(TMED)、N.N.N'.N'-テトラメチルジアミノプロパン(TMDPr)、N.N.N'.N'-テトラメチルジア

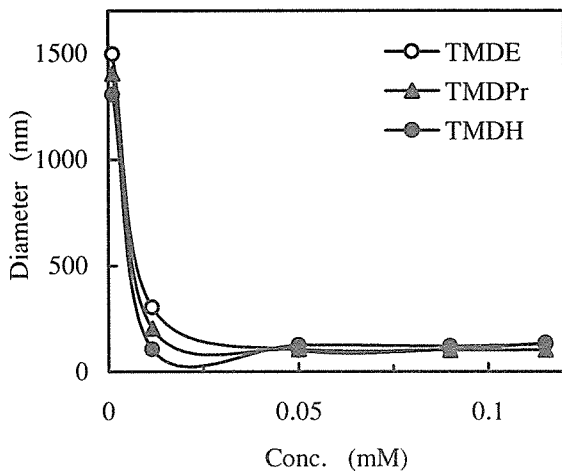


Fig.2 Influence of concentration of diamines on the diameter of the complex with dextran sulfate(1%) and diamines.

ミノヘキサン (TMDH)を用い、デキストラン硫酸 1w/v%溶液と混合して複合体を形成させ、その粒子径を測定し結果を Fig.2に示す。なお、溶液の pH は pH4 に調製し、ジアミン両末端を解離した状態とした。TMED、TMDPr、TMDH の電離基間距離はそれぞれ 3.84、5.04、8.78 Åであるが、複合体の粒径に及ぼす電離基間距離の影響は認められなかった。ここでは、ジアミン濃度の上昇により、複合体の粒子径が小さくなっていくことから、高分子内もしくは高分子間をジアミンが架橋しており、複合体の粒子径は、電解質の濃度により 100nm 程に制御できることが明らかとなった。

これまでに、ヒアルロン酸(HA)架橋ゲルの医薬品による収縮ゲル中で、医薬品の疎水的相互作用が大きく関与することを示してきたが、さらに収縮ゲル中での疎水基間相互作用による構造形成を捉えることを X線散乱測定により検討した。プロマジジン(PM)、

デカリニウム(DQ)、セチルピリジニウム(CPC)による HA の収縮ゲルについて、湿潤状態と乾燥状態で広角 X 線散乱、小角 X 線散乱測定を試みたところ、最も界面活性性の強い CPC の場合にのみ小角 X 線散乱の回折ピークが認められた(Fig.3)。CPC では、乾燥状態では回折角 $2\theta = 2.20^\circ$ に大きいピークが見られ、ブラックの反射式から $d=40.1\text{Å}$ の規則構造があることを意味し、CPC のしっぽの先端から N 原子までの距離が 20.0Å であることを考慮すると CPC の疎水基二つ分ということになる。従って、CPC が重層構造をとり、その周りに HA 鎖が存在することになる。他方、湿潤状態では、 2θ

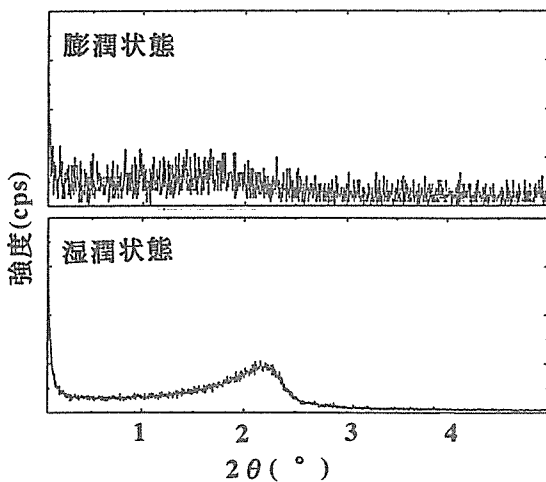


Fig.3 Small angle X-ray diffraction patterns for the contracted HA gel by cetylpyridinium chloride.

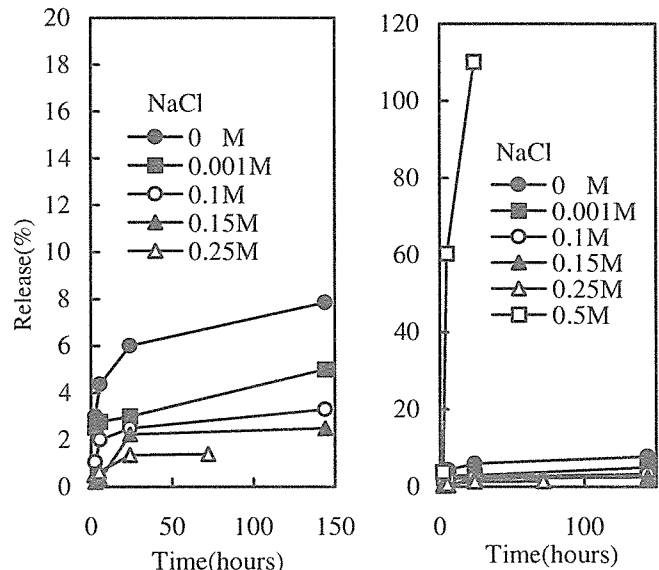


Fig.4 Release of cetylpyridinium from the contracted HA gel

$=1.6^\circ$ から 1.7° 付近に極大値を持つブロードなピークが見られ、これは $55.2\text{-}52.0\text{Å}$ に相当する。乾燥状態の構造を基に考えると、CPC は水和しないのでもとの大きさのまま (40.1Å) とすると、HA が水和することにより構造体の厚さが増し、 $12\text{-}15\text{Å}$ となり、同時に水の存在により構造規則性は乱されるために回折ピークがブロードになったと考えられる。さらに、このようなゲル内での吸着医薬品の構造形成が医薬品放出挙動に影響を及ぼすかどうか比較を試みた。PM では初年度に報告したように、イオン強度が大きくなるにつれ放出が多くなったが、今回検討した CPC では Fig.4 に示すように、イオン強度が大きくなるにつれて放出が抑制され、右図に示すように NaCl 濃度が 0.5M と異常に大きくなってはじめて多くの放出が認められた。この放出挙動の差は、HA ゲル中での医薬品の疎水

性基会合性の差と考えられ、CPCのようにゲル中で構造形成をしているような場合には、放出が強く抑えられると考えられた。

酸性多糖とドキシサイクリンによる複合体形成及びゲル形成では、昨年度の基礎的検討をさらに進めた。HAの分子量が低下するとゲル強度も低下し、DCの放出速度は速まった、十分な強度を有するゲル形成には、各々の組成に下限値が認められ、HA(分子量160万)は0.1%以上、DCはHAの等量以上、二価金属イオンはDC濃度の半量以上必要であった。HA-DC-二価金属イオンゲルからのDC放出

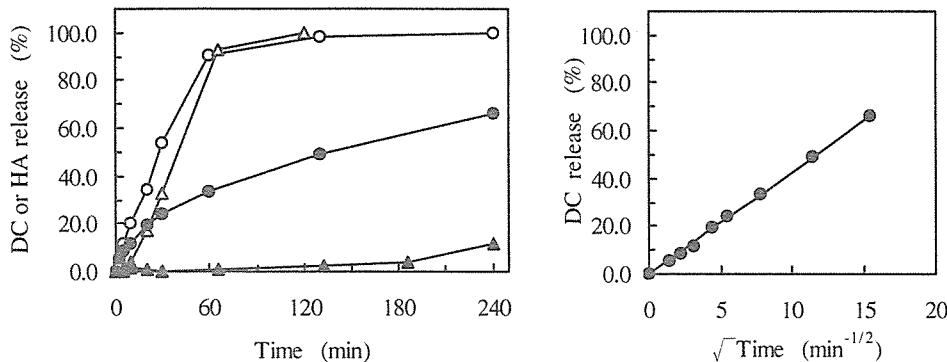


Fig. 5 DC release profiles from gels with different DC concentration

○, ●; DC release from gels △, ▲; HA release from gels

Hollow marks indicate data obtained by 0.4% HA+10mM DC+50mM MgCl₂, and filled marks indicate data obtained by 0.4% HA+10mM DC+50mM MgCl₂. Release tests were performed in 0.2M NaCl (30ml) at 37 °C

挙動は DC 濃度によって異なり、DCとHAが等量混合されたゲルでは、DCの放出とゲルの崩壊とが一致し、放出率は時間に対して直線的に増加した。DCがHAの等量以上混合された場合には、放出率は時間の平方根に対して直線的に増加した (Fig.5)。さらに、創傷治癒

評価では、対象群、投与群ともに創傷作製日からの体重変化は軽微であり、毛並み、行動などの一般状態には群間の差異が見られなかったが、明らかな創傷治癒促進は認められず、実験期間内に上皮化の見られた個体はいなかった。創傷作製から20日めにおいても創傷表面に壊死性物質が多く残存していたが、肉芽形成、膠原繊維増生、血管新生は行われていたため、治癒が遅延した状態であると考えられた。

3.2 酸性多糖とBSAからなる構造体形成

酸性多糖の自己組織化ナノ構造形成では、飽和BSA単分子膜へのHAの吸着を分子量の異なるHA₈₅、HA₂₁を用い測定した。HA、₂ChS分子ともにBSA膜表面で規則的な網目構造を形成し、メッシュサイズは分子量が小さくなるほど小さくなった。ChSのメッシュサイズはHAと比較して非常に細かい網目構造であり、酸性多糖の種類および分子量がメッシュサイズに影響を与えることが分かった。さらに、原子間力顕微鏡(AFM)により、膜表面と探針との接着力 F_{ad} を測定し、膜の表面張力 γ を求めた。PMLG薄膜へのBSAの吸着量が増加するに従い、 F_{ad} は増加し、 γ_{BSA} は増加した。飽和BSA膜上のHA吸着層の表面張力は、Fig.6に示されるように、分子量に顕著に依存した。分子量が85万のHA₈₅の場合NaHA吸着量が増加するに従い、 F_{ad} 、 γ_{HA} は減少したが、分子量が21万と小さいHA₂₁の場合、 F_{ad} 、 γ_{HA} は増加することが分かった。ChS吸着の場合は、吸着量が増加するに従い、

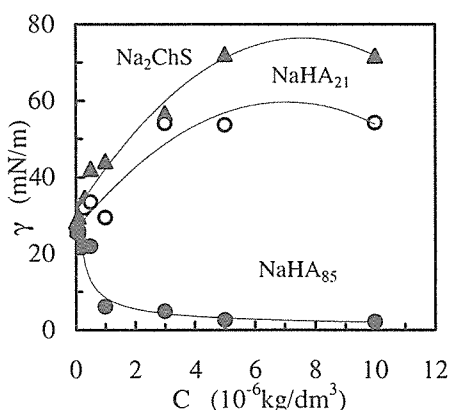


Fig. 6 Effect of NaHA and Na₂ChS adsorption on surface tension

HA₂₁と同様に γ_{ChS} は増加した。AFMにより、吸着量による膜表面構造の変化を観察した。また、飽和吸着膜のAFM画像からモル比 n_{BSA}/n_{NaHA} による飽和吸着膜の表面構造の変化を見ると、 C_{BSA} が低い時にひだが見られ、 C_{BSA} が増加するに従い球状の粒子が緊密に分布していると思われた。1個のHA-BSA複合体粒子は粒子表面にある1.2個のBSAを介し、PMLG膜へ吸着していることが明らかとなった。

3.3 医薬品の非晶質状態に及ぼす多糖類の影響

高分子としてヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)及びポリビニルピロリドン(PVP)を用い、薬物として3-bis(4-methoxyphenyl)methylene-2-indolinone (TAS-301)を用いた薬物：高分子(1:2)固体分散体のDSCを測定した結果、170-180°C付近の

結晶質薬物の融解ピーク及び60-110°Cでのガラス転移に伴うベースラインのシフトが特徴的に認められた。これに対応する融解熱（ピーク面積）及びガラス転移温度を Table 2 に示す。HPC 固体分散体

Table 2 DSC analysis results for TAS-301:polymer (1:2) solid dispersions before and after storing at 60 °C 80% RH for

Composition	Heat of fusion (J/g)		Tg (°C)	
	initial	after storing	initial	after storing
TAS-301 only	73.6	93.3	96	ND
TAS-301:HPC	7.8	15.6	68	ND
TAS-301:HPMC	0.0	3.1	101	ND
TAS-301:HPMCP	0.0	0.0	107	105

ND: not detected

には保存前から薬物の融解ピークが認められた。60°C 80%RH 3 日間保存後の融解熱は、HPC > HPMC > HPMCP 固体分散体の順であり、HPMCP 固体分散体は融解ピークが認められず保存後も非晶質状態が維持されていることが示された。これらの結果は前年度報告した粉末 X 線回折測定から求めた結晶化度の結果と一致していた。60°C80%RH 保存前のガラス転移温度は HPMCP > HPMC > HPC 固体分散体の順であり、ガラス転移温度の高い固体分散体ほど非晶質状態が安定に保持されることが明らかとなった。60°C80%RH 保存後は非晶質状態が保持されている HPMCP 固体分散体のみガラス転移が認められた。さらに、結晶析出効果に関する高分子間の差の原因を調べるために、物理的混合物、固体分散体 (60°C 80%RH 3 日間保存前後) の FT-IR 及び FT-Raman 測定を行った。固体分散体においては全体的な薬物のスペクトルの形状が物理的混合物と大きく異なり、760-820cm⁻¹ の methoxyphenyl の C-H 面外変角振動、1030cm⁻¹ 付近の methoxy 基の対称伸縮振動、1570cm⁻¹ 付近の芳香環の C=C 伸縮振動、1690cm⁻¹ 付近の C=O 伸縮振動、3200cm⁻¹ 付近の N-H 伸縮振動の薬物の各ピーク波数及び強度が変化した。これらは薬物の疎水性部分(methoxyphenyl 部)及び親水性部分(amido 部)と HPMCP との相互作用を示すと考えられる。60°C 80%RH 保存前後でスペクトルにほとんど差はなく、HPMCP 固体分散体は高温高湿下で保存しても薬物の存在状態に変化がないことが示された。薬物: HPC(1:2)系においても固体分散体形成によって同様の変化が認められるが、60°C80%RH 保存後は上述の全ピークの波数、強度が物理的混合物のそれに近くなった。すなわち HPC 固体分散体は高温高湿下に保存すると薬物と高分子の相互作用が減少することが示され、それが結晶化の主な原因と考えられた。FT-Raman スペクトルにおいても FT-IR と同様の変化が認められ、固体分散体においては薬物の親水性及び疎水性部分が高分子の親水性及び疎水性部分とそれぞれ相互作用して非晶質状態が維持されていることが示唆され、Carboxybenzoi 基を有する HPMCP はより強く疎水的に相互作用し、非晶質が高温高湿下でも安定に保持されたと考えられた。

3.4 多糖類の粘度検出器による特性評価の試み サイズ排除クロマトグラフィーの検出器として粘度検出器、90度方向の光散乱検出器、示差屈折検出器を用いることにより、比較的 low molecular weight の酸性多糖であるコンドロイチン硫酸ナトリウム (Chs) およびその注射剤の分子量、粘度測定を試みた。市販されている高純度試薬の、コンドロイチン硫酸 A (ChsA)、コンドロイチン硫酸 C (ChsC)、コンドロイチン硫酸ナトリウム・サリチル酸ナトリウム注の 11 検体の 3 回繰り返し測定を行った。11 製剤中の Chs の分子量は 8260-19600 の範囲にあり、分子量、粘度共に再現性良く測定された。さらに、ChsA 及び ChsC につき、低角度光散乱検出器による分子量評価を試みたところ、90 度光散乱検出器による値とほぼ一致し、分子量の小さな荷電性多糖類では 90 度光散乱装置のみで、正しい分子量値を得ることが出来ると思われた。また、Fig. 7 に示すように 13 種の Chs における分子量と極限粘度の対数プロットは良好な直線性を示し、これらの測定値の妥当性が確認された

3.5 医薬品結合 HA の合成と in vivo 有用性評価 インドメタシン導入率の異なる 3 種類の HA 修飾インドメタシンの経口投与後の血中濃度を血小板凝集法を用いて測定した結果、導入率が高いものほど血中への移行は遅れる傾向を示した (Table 3)。3 種類の HA 修飾インドメタシンで作用時間が異なることから、これらを等量混合した製剤の薬理効果を、酢酸ライジング法を用いて鎮痛効果を指標に検討した。混合剤はインドメタシン単味に比べ鎮痛効果がより長時間持続し、経口投与後 48 時間に

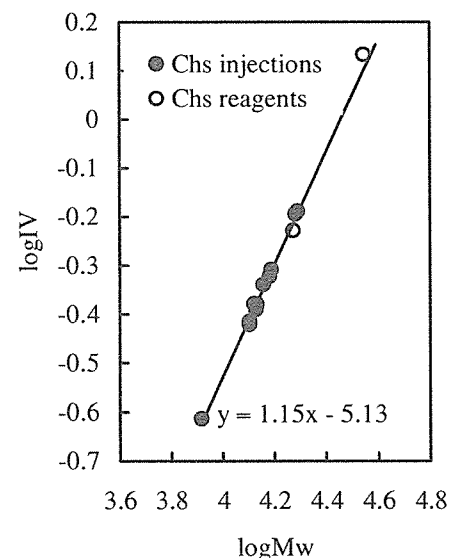


Fig.7 Relationship between Mw and IV for chondroitin sulfate

においても有意な鎮痛効果が認められた(Fig.8)。さらに、3種類のHA修飾インドメタシンを等量混合した製剤の胃粘膜障害性は、インドメタシン単味に比べ有意に低減した。

Table 3 Time course of hyaluronan-conjugated indomethacin (HA-IND) or indomethacin (IND) contents in blood by platelet aggregation assay

		Time (hour)				
		3	6	12	24	48
IND		-	++	++	+	+
HA-IND	Introduction ratio (%)					
Lot. 404	(0.04)	-	+	++	++	-
Lot. 401	(0.12)	-	+	+	+	+
Lot. 411	(0.22)	-	-	-	+	++

N=3, -:0/3, +:1/3, ++:2-3/3

3.6 前眼部における DDS 製剤の研究

まず、涙液中濃度のCaイオンによる酸性多糖水溶液の粘度上昇の有無を検討した。アルギン酸ナトリウム(AI)、カラギナン(Cr)、ペクチン(Pe)、ゲランガム(Ge)、ポリガラクトロン酸では、粘度が増加した。実際の点眼液はイオン性の有効成分や添加物を含む

上に、涙液中にも各種イオンが存在する。そこで、1価のイオンがCaイオンによる酸性多糖類の高粘度化に及ぼす影響を検討した。Caイオン無添加では、Peとは静電的な効果により、イオン強度が高くなるに従って粘度が低下したが、Crでは逆に上昇した。これはCrが1価のイオンとも相互作用して増粘するという事実と一致する。Caイオン添加後の粘度では、3種類の酸性多糖間で挙動が異なり、AIはイオン強度が高くなるほど粘度上昇がおさえられたが、Peは相乗的に粘度が高くなった。Crは1価イオンとの相互作用が強く、イオン強度が高い領域ではCaイオンによる粘度の上昇が認められなくなった。その他、pH、温度の粘性に及ぼす影響を検討し、Caイオンによる増粘効果はpHの影響をあまり受けないこと、Geでは前眼部表面の温度に近い35℃を境に急激に粘度が低下することが明らかとなった。さらに、涙液は非ニュートン流動性を有してまぶたの動きをスムーズにすることが知られている。ずり応力が粘度に影響し、涙液の物性と大きくかけ離れると点眼後に異物感を感じたり、また薬物滞留性にも影響すると考えられる。そこで、Caイオン添加前後の粘度のずり回転数依存性を検討した。AI、Pe、CrのいずれもCaイオン添加前はずり応力依存性がほとんど認められなかったが、Caイオンにより増粘したした場合、Peではずり応力依存性が顕著に認められた。これらの

Table 4 Interaction between mucin and acidic polysaccharides

	Ca ²⁺ (2mM)	Rotation(min ⁻¹)				
		100	50	20	5	1
Mucin	-	3.0	3.5	3.5	3.7	4.7
	+	1.4	1.4	1.4	ND	ND
Sodim Alginate	-	>6.0	7.0	7.3	7.3	ND
	+	>6.0	11.3	12.4	14.5	32.2
Alginate-Mucin (1:1)	-	>6.0	8.4	9.0	11.9	19.2
	+	>6.0	>12.0	>30.0	37.1	57.8
Pectin	-	1.1	1.1	1.0	ND	ND
	+	2.8	5.9	10.7	>120	>600
Pectin-Mucin (1:1)	-	2.2	2.3	2.4	ND	ND
	+	5.0	6.4	9.1	18.1	68.0
Carrageenan	-	>6.0	7.5	9.0	9.8	6.3
	+	>6.0	8.4	12.8	24.8	58.9
Carrageenan-Mucin (1:1)	-	>6.0	10.1	13.2	14.9	15.3
	+	>6.0	>12.0	18.8	42.8	140.0

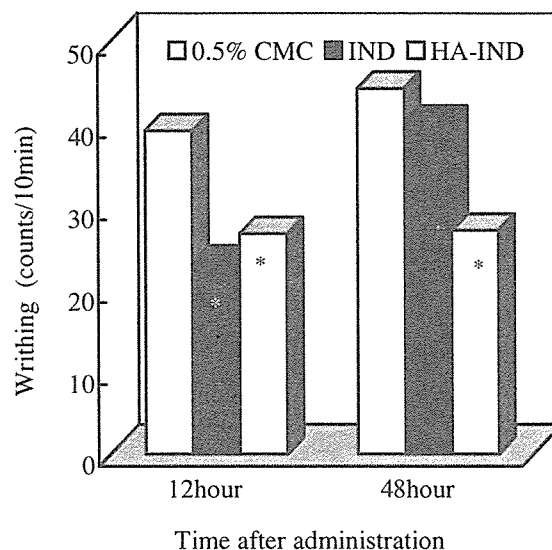


Fig. 8 Analgesic effects of HA-IND or IND acetic acid-induced writhing in mice (n=8-10) Significantly different from 0.5% CMC: *P<0.05

応答性の違いは多糖の構造の違いによるものと考えられる。さらに、角膜表面にはムチン層があり、これらと酸性多糖の影響を検討した。AI及びCrはムチン存在下で、Caイオン添加による粘度上昇が増強されたが、Peにはそのような傾向は認められなかった。

薬物の前眼部滞留性の評価では、点眼液にフルオロセインを0.001%添加後30μLをマイクロピペットにて家兔に点眼した。対照として、生理食塩水にフルオロセインを添加したものをを用いた。点眼後直ちに眼に光を照射し、強制瞬目を10回行い、試験0時間とした。アンテリアフルオロメーターにより涙液メニスカスの蛍光強度を適当な時間間隔を置いて測定し、蛍光強度の減少を涙液中の薬物の消失速度として評価した。なお、各測定時毎、光

照射による強制瞬目を5回行った。測定結果を Fig.9 に示した。生理食塩水を用いた場合、蛍光強度は速やかに減少し、点眼後約5分で蛍光強度は一定となった。一方、Al、Pe、Cr ともに蛍光強度の減少はゆるやかであり、薬物の滞留性の向上が期待できる結果となった。Cr では Ca イオンのみの添加による粘度上昇から予測される滞留性より長くなったのは、ムチンとの相互作用による効果であると考えられる。一般的に良く用いられるセルロース系の増粘剤による滞留性の増大効果よりはるかに良い結果となった。

3.7 多糖類を利用した肝臓への薬物送達

In vitro 透析膜透過実験では、透析膜を介した phenol red の透過量(%)の経時変化を調べ、CMC-Na 1% および PVA 15% 添加による phenol red の放出制御を評価した。120 分後のレシーバー側に透過した薬物量は、control、CMC-Na 1%、PVA 15% の順に 15.7, 6.6, 4.2% と低下し、粘性添加剤を加えることにより、薬物放出が制御できる可能性が示された。

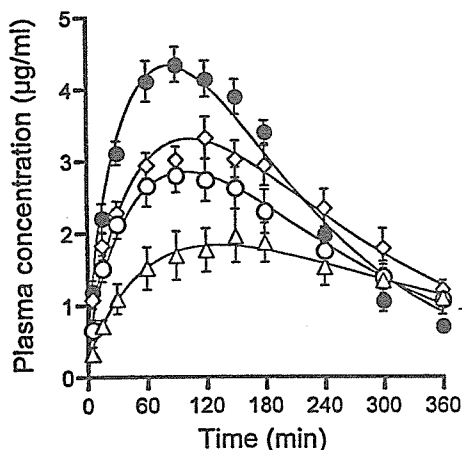


Fig.10 Plasma concentration profiles of phenol red at a dose of 2mg after application to the rat liver surface in the presence of CMC-Na and PVA

Curve show simulated function based on the pharmacokinetics parameters shown in Table 5. ●,Control;◇,1%CMC-Na;○,3%CMC-Na;△,15%PVA

Table 5 Pharmacokinetic parameters of phenol red at a dose of 2 mg after application to the rat liver surface in the presence or absence of CMC-Na and PVA^a

Condition	AUC _p (µg/ml min)	MRT _p (min)	MAT (min)	k _a (min ⁻¹ × 10 ⁻³)
Control	1046.1 ± 47.8	171.2 ± 6.8	94.5 ± 6.8	8.66 ± 0.5
CMC-Na 1%	1184.1 ± 94.5	288.4 ± 31.6*	211.7 ± 31.6*	6.25 ± 0.69*
CMC-Na 3%	1059.8 ± 166.5	312.8 ± 42.3*	236.1 ± 42.3*	6.12 ± 0.80*
PVA 15%	1154.1 ± 213.2	568.1 ± 87.4**	491.4 ± 87.4**	2.94 ± 0.36**

^a Significantly different from control: *P < 0.05, **P < 0.01.

phenol red の血漿中濃度-時間曲線をモーメント解析した結果を Table 5 に示した。control と粘性添加剤を加えた場合で比較すると、AUC_p については有意な差は認められなかった。そこで、肝臓表面投与後6時間までの値で比較すると、AUC_p 値は、CMC-Na 3% で control の 75%、PVA 15% で 55% と有意に低下していた。一方 MRT_p は、粘性添加剤を加えた場合、control に比べ 100 分以上延長した。ここで、肝臓表面投与時の MRT_p から静脈内投与の MRT_p(77 min)を差し引いて、平均吸収時間

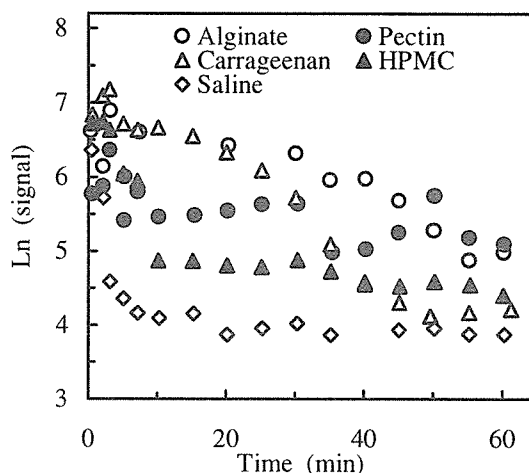


Fig. 9 Elimination of fluorescein from tear meniscus on the anterior ocular segment

そこで、肝臓表面投与での吸収動態における粘度の影響について検討した。Phenol red 溶液、CMC-Na を1あるいは3%、PVA を15%添加攪拌後、各粘稠薬液 0.2 ml を肝臓表面投与した。投与後6時間までの phenol red の血漿中濃度-時間曲線を Fig.10 に示している。粘性添加剤を加えた場合、C_{max} が大きく低下し、血漿中からの phenol red の消失は control よりも遅延した。特に、PVA 15% において、この傾向は顕著であり、放出制御の違いを反映する結果となった。この場合の phenol red の未変化体および抱合代謝物の胆汁中排泄速度-時間曲線では、control と比較すると CMC-Na では添加濃度の上昇に伴って、phenol red の胆汁中排泄が若干遅れる傾向を示したのに対し、PVA を添加した場合、phenol red の胆汁中排泄速度が有意に低下した。また、ガラスセル中残存率から得られる肝臓表面投与 6 時間までの吸収率は、control、CMC-Na 1%、CMC-Na 3% および PVA 15% でそれぞれ 73.1、68.6、60.5、48.7% と計算され、薬液の粘度により肝臓表面からの吸収速度を制御できる可能性が示された。胆汁中および尿中累積排泄率については、CMC-Na を加えた場合は若干低下したが、有意な差異は認められなかった。一方、PVA 添加時では、phenol red の胆汁中累積排泄率はいずれも、control の半分以下に有意に減少した。

MAT(min)を求めたところ、薬液の粘度上昇により、MATはcontrolの2倍以上に延長していた。

さらに、これまでに構築した一次吸収過程を組み込んだ2-コンパートメントモデルの適用を試みたところ、粘性添加剤を加えた場合もcontrolと同様に一次吸収過程を含んだ2-コンパートメントモデルで解析できることが明らかとなった。

3.8ヒアルロン酸含有外用製剤の臨床応用

HAを機能性を有する製剤添加剤として評価する目的で、吉草酸ベタメタゾン含有貼付剤（テープ剤）の臨床評価を行った。評価としては通常実施されることの多いアレルギー性接触皮膚炎、尋常性乾癬、蒼白化試験の3試験を実施した。治験薬は帝國製薬においてGMP基準に基づいて製造したものを送付し、Table 6に示すような方法、評価パラメーターで実施中である。なお、これらの臨床効果の評価に先立ち、健常人におけるパッチテストを実施したが、刺激性に問題はなかった。また吉草酸ベタメタゾンの血漿中濃度は検出下限値以下であった。臨床評価の結果は現在報告待ちの状況にあり、特に問題はなく、実用化できる評価が得られるものと思われる。また、本貼

付剤は米国FDAにもINDとして申請されており、FDAの指示により近々臨床評価が実施される予定になっている。

Table 6 Protocols of Clinical Studies of Betamethasone Valerate Tape

Indication	Allergic Contact Dermatitis	Chronic Plaque Psoriasis	Blanching Test
Drug	Active Tape Placebo Tape Active Cream Placebo Cream	Active Tape Active Cream	Active Tape
Assessment	Efficacy / Tolerability(ADR) (Colorimetry, Echography)(Score: PASI / SAPASI / TEWL)	Efficacy / Tolerability(ADR)	Blanching Score
Patient	26	~50 (right-left)	
Dosage	4 skin areas(Φ=13mm)	Tape(7×10cm ²) Cream(2.25mL)	
Duration	2 days (Treatment) 5 days (Monitoring)	30 (Treatment) 30 (Monitoring)	
Center	Univ.Modena(Italy) Prof. Stefania Seidenari	Univ.L'Aquila(Italy) Prof. Ketty Peris	Univ.Modena(Italy) Prof. Stefania Seidenari
Period	Sep.2000~Mar.2001	Sep.2000~Mar.2001	Mar.2001~Apr.2001

4. 考察

4.1 酸性多糖及びHAゲルと医薬品の相互作用

医薬品による収縮HAゲルの小角X線散乱では、CPCの場合に規則的な繰り返し構造が確認された。CPCは疎水性炭素鎖が大きく延びていて、HAのカルボキシル基に静電的に結合した後、近傍での疎水基間のラメラ構造を形成することが明らかとなった。その他のHAゲルを収縮させる医薬品では、HAゲル中にアモルファス状態で存在し、疎水的相互作用によりミセル様構造を形成していると思われた。このようなゲル中での規則構造の形成は、アクリル系合成ポリマーでは数年前に報告が見られ、CPCとの相互作用ではHAゲルの場合よりも明確な小角X線散乱のピークが報告されている。結合した界面活性剤間の相互作用は、高分子鎖のフレキシビリティが高いほど疎水基の配向が可能のために強くなると考えられ、HA鎖の自由度はアクリル系ポリマーほど大きくないこと、荷電基密度が2糖に一個と低いために、疎水基の存在密度も小さく、回折ピーク強度が小さくなっていると思われた。

酸性多糖とDCの混合溶液を加熱して溶解させ、二価金属塩化物を添加後冷却すると、HAの場合にはゲル化が認められた。DCは構造内に3箇所の荷電基を有するが、多価金属イオンとのキレート形成には、C10~12のフェノール性β-ジケトン部位が関与することが知られている。このゲルは、多糖鎖上に結合したDC同士が、二価金属イオンを介した配位結合性の架橋を生じ、多糖分子の占める空間に水を含んで形成される物理ゲルであると考えられた。そのため、分子量2-3万のアルギン酸ナトリウムでは、分子鎖の絡み合いによる高次構造が十分に形成されず、ゲル化しなかったものと思われた。創傷治癒評価で検討を行ったゲルでは、傷面積比の変化および病理的所見において治癒遅延が認められた。遅延の原因としては、ゲルから滲出した水の影響が考えられた。今後、ゲルの崩壊による滲出水分の制御を考慮することにより外用製剤としての応用が可能ではないかと考えられた。

4.2 酸性多糖とBSAからなる構造体形成

飽和BSA単分子膜へのNaHA吸着はLangmuir型吸着等温式に従い、飽和吸着では網目状構造を形成することが示唆され、NaHA₈₅、NaHA₂₁のメッシュサイズは153nm、113nmであり、分子量が小さくなるほど小さくなった。飽和BSA単分子膜へのNa₂ChS吸

着も Langmuir 型吸着等温式に従い、飽和吸着では NaHA と同様に網目状構造を形成し、そのメッシュサイズは非常に小さく 38nm となった。酸性多糖の吸着に伴い、飽和 BSA 単分子膜の表面張力 γ は変化し、NaHA₈₅ の場合 γ は低下したが、NaHA₂₁ および Na₂ChS の場合逆に増加した。これらから、酸性多糖の電離基密度の増加とともに、 γ は増加すると考えられた。

4.3 医薬品の非晶質状態に及ぼす多糖類の影響 疎水性薬物(TAS-301)の非晶質状態を安定化する各種高分子の作用に関してメカニズムの検討を行った。薬物と高分子の固体分散体の DSC 測定を行った結果、ガラス転移温度が高い固体分散体ほど薬物の非晶質状態が安定に保持されることが明らかとなった。FT-IR、FT-Raman 測定の結果より、固体分散体においては薬物の親水性及び疎水性部分が高分子の親水性及び疎水性部分とそれぞれ相互作用して非晶質状態が維持されていることが示唆され、Carboxybenzoi 基を有する HPMCP はより強く疎水的に相互作用し、非晶質が高温高湿下でも安定に保持されたと考えられた。酸性多糖 HA は薬物溶液からの結晶析出に対して抑制効果を示さず、溶液状態においても疎水性の強い高分子ほど強い結晶析出抑制効果を示した。

4.4 多糖類の粘度検出器による特性評価の試み 酸性多糖でも分子量の比較的小さな Chs の分子量評価は、90 度方向の光散乱装置で十分測定可能であること、分子量と粘度の測定値の対数プロットでは良好な直線関係が認められ、特性値の評価も可能と思われた。医薬品としての Chs の分子量に関する規格は現在設定されていない。同一製剤でも分子量、極限粘度値のばらつきがかなり大きいことが明らかとなった。

4.5 医薬品結合 HA の合成と *in vivo* 有用性評価 HA 修飾インドメタシンの血中存在様式に関しては、大腸において腸内細菌由来のヒアルロニダーゼにより低分子化された後、吸収され、肝臓および血清中のエステラーゼによりグリコール酸エステルが切断され、フリーのインドメタシンあるいは HA 断片が結合した状態のインドメタシンとなり、それらが薬理効果を示していると考えられる。HPLC による分析ではフリーのインドメタシンが 48 時間後ではほとんど検出されないことから、今後、LC/MS などの手法を用いた存在様式の解析が課題として残されている。

4.6 前眼部における DDS 製剤の研究 点眼液の基剤（増粘剤）として酸性多糖類を粘度があまり高くない程度に少量配合することで点眼後に粘度を上昇させ、薬物の前眼部での滞留性を向上させることが可能であることが分かった。涙液成分、特に 1 価のイオンとの相互作用による増粘効果を利用して実用化されている Cr と比較した場合、Al や Pe はイオン強度依存性がなく、温度依存性も低い。さらに Al や Cr は涙液中に多く存在するムチンとも相互作用し、単にイオンとの相互作用だけで滞留性の増大が起こるのではないことがわかった。メチルセルロースを用いた温度応答性の点眼薬も実用化されているがこの場合は流過程での温度上昇によりゲル化するため、冷蔵保存する必要がある。この問題も Pe や Al では温度依存性が低いことから解決されるであろう。

まぶたの開閉時に前眼部に滞留している涙液の粘度が高い場合、薬物の滞留性は向上するものの、眼に異物感を認め、点眼後に使用感が悪いと感じてしまうが、粘度が低いと薬物の滞留性は悪くなるものの異物感を覚えることは少ない。通常涙液は非ニュートン流動性挙動を示すためそれに近い挙動を示す点眼液は異物感もなく薬物滞留性が良好であろうと期待できる。特に Pe は、この非ニュートン流動性を示し涙液類似の特性を付与することが可能と考えられる。

4.7 多糖類を利用した肝臓への薬物送達 粘性添加剤として CMC-Na および PVA を加えて薬液粘度を増大させた場合の肝臓表面投与後の薬物吸収動態について検討した。ガラスセルを用いた肝臓表面投与では、粘度の増大に伴い phenol red の最高血漿中濃度が減少し、一次吸収速度定数は有意に低下した。また、PVA 15% は低い粘度を示したにも関わらず、CMC-Na 以上に吸収速度を低下させており、添加剤の種類により肝臓表面からの薬物吸収動態への影響が異なることが示された。

4.8 ヒアルロン酸含有外用製剤の臨床応用 ヨーロッパ諸国の HA を医療へ活用しようとする積極的な動きで、比較的短期間のうちに臨床評価に移行できた。ただし、当面臨床評価の段階であり、HA の機能性を評価するための試験をさらに計画する必要がある。今後、臨床結果を裏付ける解析をすることが不可欠と思われる。

5 まとめ

HA 架橋ゲル中で、カチオン性界面活性剤による規則的構造形成が認められた。この構造形成と吸着医薬品の放出挙動には密接な関連が認められた。

酸性多糖と DC により熱可逆的な複合体を形成し、さらに二価金属イオンを添加すると HA 含水ゲ

ルを形成した。配合組成により、徐放性製剤として望ましい0次の薬物放出挙動を有するゲルの調製が可能であった。実際の製剤素材としての利用には、適度な湿潤環境を保つための剤形あるいは投与形体についての検討が必要であると思われた。

サイズ排除クロマトグラフィーにトリプル検出器を適用することにより、Chsの絶対分子量、極限粘度の評価が可能であった。

HA酸修飾インドメタシンは、エステル化度の違いにより作用持続性の異なるものが調製でき、それらの混合により持続性に優れ、インドメタシンの胃粘膜障害性を著しく軽減できる製剤の創出の可能性が明らかとなった。

前眼部における製剤の研究では、Al、Peはこれまでにない使用感や薬物の滞留性の優れた点眼剤を設計するための基剤として有用であることが明らかとなった。

肝臓表面投与法を臨床に応用する際に必要な製剤化のための基礎的な検討を行い、様々な知見を得ることができた。肝臓表面投与法の今後の実用化に向けて、最適な投与剤形や添加剤を選択し、薬物の肝臓表面からの吸収制御や肝臓内での滞留性向上を目指した更なる検討が必要であると考えられる。

HA含有外用製剤の開発では、欧米の積極的なHA応用の姿勢が明らかとなり、臨床における有効性が明らかにされようとしている。今後の応用を裏付ける基礎解析が不可欠となると思われた。

6. 研究発表

Miyazaki, T., Yomota, C. & Okada, S. Hyaluronate depolymerization following thermal decomposition of oxytetracycline. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 118-122 (2001).

Yomota, C. & Okada, S. Various interactions of drugs with the crosslinked hyaluronate gel. "New Advances in Polymer Gels", ACS Symp. Ser., in press (2001).

Nonogaki, T., Xu, S.H., Kugimiya, S., Sato, S., Miyata, I. & Yonese, M. Two dimensional auto-organized nanostructure formation of hyaluronate on bovine serum albumin monolayer and its surface tension. *Langmuir*, **16**, 4272-4278 (2000).

Inukai, M., Yu, J., Yomota, C. & Yonese, M. Preparation and characterization of hyaluronate-hydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled release device. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 850-854 (2000).

Xu, S., Yamanaka, J., Sato, S., Miyata, I. & Yonese, M. Characteristics of complexes between sodium hyaluronate and bovine serum albumin. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 779-783 (2000).

Toyotama, A., Kugimiya, S., Yamanaka, J. & Yonese, M. Preparation of a novel aggregate like sugar-ball micelles composed of poly(methylglutamate) and poly(ethyleneglycol) modified by lactose and its molecular recognition by lectin. *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 169-172 (2001).

Xu, S., Nonogaki, T., Tachi, K., Sato, S., Miyata, I., Yamanaka, J., & Yonese, M. Two dimensional auto-organized nanostructure formation of acid polysaccharides on bovine serum albumin monolayer and its surface tension. *Studies in surface sciences and catalysis*, in press.

Yu, J., Yamanaka, J., Sato, S., Miyata, I., Yomota, C. & Yonese, M. Recyclable characteristics of hyaluronate-polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases. *J. Control. Release*, in press.

Nishida, K., Nakakoga, Y., Sato, N., Kawakami, S., Mukai, T., Sasaki, H., Sakaeda, T. & Nakamura, J. Effect of viscous additives on drug absorption from the liver surface in rats using phenol red as a model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 397-402 (2000).

Sasaki, H., Yamamura, K., Mukai, T., Nishida, K., Nakamura, J., Nakashima, M. & Ichikawa, M. Pharmacokinetic prediction of the ocular absorption of an instilled drug with ophthalmic viscous vehicle. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1352-1356 (2000).

Sasaki, H., Yamamura, K., Mukai, T., Nishida, K., Nakamura, J., Nakashima, M. & Ichikawa, M. Modification of ocular permeability of peptide drugs by absorption promoters. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1524-1527 (2000).

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社