各種水溶性薬物封入 w/o/w emulsion の
製剤学的性質と体内動態

大河内秀昭・中野眞汎*

Studies on pharmaceutical properties and disposition kinetics of w/o/w emulsions containing some water-soluble drugs

Preparation of water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsions containing water-soluble drugs and disposition kinetics of vancomycin after administration of an aqueous solution and w/o/w emulsions were studied.

We used drug solution for an internal aqueous phase, oil mixture of Lipiodol Ultra-Fluid® and isopropyl myristate (4.5 : 5.5) containing 5 % HCO-40 for an oily phase and saline containing 5 % Pluronic® F-88 for an external aqueous phase with a composition of 1 : 4 : 5. W/o/w emulsions encapsulating water-soluble drugs such as vancomycin hydrochloride, doxorubicin hydrochloride, cytarabine and bovine serum albumin were prepared.

Among two methods of preparation, the method using a homogenizer was better for preparation of the w/o/w emulsion. The particle size of the w/o/w emulsion was smaller with an increase in rotation rate of the homogenizer (40.1 μm at 2,500 rpm and 2.81 μm at 20,000 rpm). The drug entrapment efficiency was increased with an increase in molecular weight of drugs and decreased with an increase in rotation rate of the homogenizer. When molecular weight and the particle size were smaller, drug release was faster.

Serum concentrations of vancomycin released from w/o/w emulsions after i.v injection depended on their particle sizes. The smallest w/o/w emulsion (2.81 μm) showed the highest serum concentration and the concentrations were higher than those after administration of vancomycin solution after 45 min following injection. The emulsion was found in the blood until 120 min after injection. Moreover, when the w/o/w emulsion (41.8 μm) was injected into the portal vein, the emulsion accumulated in

the liver. Considering from the serum concentration profile and the existence in the blood, the w/o/w emulsion may be expected to remain in the blood and show sustained drug release.

Hideaki Okochi・Masahiro Nakano*

key words : w/o/w emulsion, particle size, entrapment efficiency, drug release, pharmacokinetics

近年, colloidal drug delivery system の開発が盛んに行われており¹⁾, その一例として w/o/w type multiple emulsion (w/o/w emulsion) の製剤研究が注目され, 進められている²⁾. しかし, この製剤には安定性や薬物封入率のような, 調製時に克服すべき問題が依然として残っている. 加えて, 薬物放出機構や投与後の体内動態等についても満足しうる報告は少ない. すなわち, *in vivo* での検討が十分になされていないのが現状である.

以前に筆者らは, リピオドール・ウルトラフルイド® (LPD) と大豆油との混合油と界面活性剤プルロニック® F-88 (F-88) および HCO-40 を用いて, 薬物封入率が高くかつ安定な w/o/w emulsion が調製可能なことを報告した³⁾.

そこで本研究では, 二次乳化時における乳化機, 4 種の水溶性薬物を含有する w/o/w emulsion の調製, およびラットを用いた薬物水溶液ならびに w/o/w emulsion の体内動態についての検討を行った.

材料と方法

(1) 使用薬物と試薬

塩酸バンコマイシン (VCM, MW=1,485.73) は塩野義製薬 (株) より, シタラピン (MW=243.22) は日本新薬 (株) より, 塩酸ドキシソルピシン (DXR, MW=579.98) は協和発酵 (株) よりそれぞれ供与さ

* Department of Pharmaceutical Services, Kumamoto University Hospital, 1-1-1 Honjo, Kumamoto-shi, Kumamoto 860 熊本大学医学部附属病院薬剤部
Offprint requests to : Masahiro Nakano, Ph. D.

れた。ウシ血清アルブミン(BSA, MW=68,000)はシグマ社のフラクシオンVを用いた。LPDは小玉(株)の輸入市販品を購入した。ミリスチン酸イソプロピル(IPM), プルロニック® F-88, HCO-40はそれぞれ日本油脂(株), 旭電化工業(株), 日光ケミカルズ(株)より供与された。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

(2) W/o/w emulsion の調製法

W/o/w emulsion の調製はA法(homogenization 法)とB法(extrusion 法)の2種類を検討した。両調製法とも、まず内水相(薬物溶液, 2 ml)を油相(LPД: IPM=4.5: 5.5, 5 % HCO-40 含有, 8 ml)中に滴下後、超音波で1分間乳化し、w/o type emulsion を得た(一次乳化)。つぎにA法では、外水相溶液(5 % F-88 含有生理食塩液, 10 ml)に w/o type emulsion を徐々に滴下し、Polytron® homogenizer (Kinematica)で10分間攪拌して w/o/w emulsion を得た。B法では、A法と同様の方法で homogenizer で7,500 rpm, 10分間攪拌後、細孔径 3 μm のポリカーボネート膜を装着した Extruder® (Lipex Biomembrane)で押し出した。

(3) 薬物封入率測定および薬物放出試験

薬物封入率測定および薬物放出試験は前報³⁾に従った。すなわち、2 ml の w/o/w emulsion を透析膜(Spectra/Por 2®, 分子量 cutoff 12,000~14,000, Spectrum Medical)中に封入後、外水相溶液に対して6時間透析し、透析液中の薬物濃度をもとに封入率を推定した。同様に2 ml の w/o/w emulsion を 37°C, 200 rpm で攪拌下の生理食塩液に浸し、1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 および 72 時間目に透析液を採取し、経時的な薬物放出量の測定を行った。

(4) 粒子径の測定

粒度分布アナライザー(Model CIS-1, Gali)を用い、体積平均径を平均粒子径とした。

(5) 薬物濃度の定量

VCM の測定は Jehl ら⁴⁾の方法を、DXR の測定は増池ら⁵⁾の方法を参考に高速液体クロマトグラフィーで定量した。シタラビンおよび BSA は紫外外部吸光度計で定量した。

(6) 静脈内投与後の薬物体内動態の検討

薬物体内動態の検討は、VCM 封入 w/o/w emulsion を代表として行った。Wistar 系雄性ラット(7週齢)の大腿静脈および動脈にカニューレを挿入し、静脈側から VCM 溶液(10 mg/kg)および VCM 封入 w/o/w emulsion (VCM 量で 10 mg/kg)を投与した。投与後 5, 15, 30, 60, 120 および 180 分に動脈側から 0.5 ml ずつ血液を採取した。血液は 4°C, 10,000 rpm で 30 分間遠心し血清層、白色層(emulsion 層)、血球層に分離した。VCM 濃度は血清層を用いて前法³⁾に従い抽出、定量した。

(7) 生体内投与後の w/o/w emulsion 体内動態の検討

静脈内投与後の w/o/w emulsion の体内動態は、(6)で得られた emulsion 層を希釈し、光学顕微鏡(BH-2 および PH-6, Olympus)により観察した。臓器分布は、ラットの大腿静脈、肝動脈および門脈内に w/o/w emulsion を投与後 180 分に屠殺し、肝、脾、肺、腎および心臓を摘出して軟X線撮影(Softex type CSM, Nippon Softex)し、評価した。

結 果

(1) W/o/w emulsion の調製法および製剤評価に関する検討(表1, 図1)

二次乳化時の乳化機の評価を VCM 封入 w/o/w emulsion を用いて行った。表1(A)に示すように、A法では攪拌速度の上昇に伴い粒子径の低下が認められた(96.3 μm →2.81 μm)。封入率はわずかながら低下した(99.1%→88.7%)。薬物放出は攪拌速度の上昇、つまり粒子径の低下に伴い促進されたが、放出率は最大で4%程度であった。一方、B法では乳化前に約12 μm だった粒子径が乳化により増大した。しかしながら、VCM の封入率は99%以上と高い値を示した。薬物放出挙動は操作圧力の上昇に伴い抑制された。

(2) 各種水溶性薬物封入 w/o/w emulsion 調製とその評価(表2, 図2)

表2に、3種類の操作回転数で調製した3種の水溶性薬物封入 w/o/w emulsion の平均粒子径

表 1 Relationship between emulsifying machines(A : Polytron[®] homogenizer, B : Extruder[®]) and properties of w/o/w emulsions prepared by these machines*

A. Prepared with Polytron[®] homogenizer

Rotation rate	(rpm)	1,000	2,500	5,000	7,500	10,000	20,000
Mean diameter	(μm)	96.3	41.8	20.3	10.2	6.12	2.81
Entrapment efficiency	(%)	99.1	98.3	95.2	95.2	90.3	88.7

B. Prepared with Extruder[®]

Operation pressure	(kgf/cm ²)	Before extrusion	10	20	30	40	50
Mean diameter	(μm)	12.6	11.4	12.8	47.6	85.4	48.0
Entrapment efficiency	(%)	99.8	99.8	99.8	99.5	99.2	99.3

* Each value represents the mean of three experiments.

図 1 Release profiles of vancomycin from w/o/w emulsions prepared by Method A and Method B*

(a) : Prepared by Method A using Polytron[®] homogenizer. ○ : 1,000 rpm.

□ : 2,500 rpm. △ : 5,000 rpm. ● : 7,500 rpm. ■ : 10,000 rpm. ▲ : 20,000 rpm

(b) : Prepared by Method B using Extruder[®]. ○ : before extrusion. □ : 10

kg/cm². △ : 20 kg/cm². ● : 30 kg/cm². ■ : 40 kg/cm². ▲ : 50 kg/cm²

* Each point represents the mean of three experiments.

表 2 Pharmaceutical properties of w/o/w emulsions containing doxorubicin, cytarabine or bovine serum albumin prepared with three different rotation rates*

Drugs		DXR			Cytarabine			BSA		
Rotation rate	(rpm)	2,500	7,500	20,000	2,500	7,500	20,000	2,500	7,500	20,000
Mean diameter	(μm)	41.2	10.2	3.03	41.7	11.2	3.21	40.6	10.5	3.11
Entrapment efficiency	(%)	51.2	40.1	30.2	52.4	40.9	32.1	98.2	90.2	87.1

* Each value represent the mean of three experiments.

と薬物封入率を示す。薬物封入率は、低分子量薬物 DXR(最高で約 51%)やシタラビン(最高で約 52%)に比較して、高分子量である BSA(最高で約 98%)が高値を示した。薬物放出は、DXR(24 時間

目で 40~80%放出)やシタラビン(24 時間目で 45~85%放出)では平均粒子径が小さいもののほど放出が速やかだったのに対して、BSA(72 時間目で 0.7~1.4%放出)の場合、粒子径が大きいほど

図2 Release profiles of doxorubicin, cytarabine and bovine serum albumin from w/o/w emulsions prepared with three different rotation rates

○ : 2,500 rpm. □ : 7,500 rpm. △ : 20,000 rpm

* Each point represents the mean of three experiments.

図3 Serum concentrations of vancomycin after i.v. administration of 10 mg/ml vancomycin solution and w/o/w emulsions entrapping vancomycin*

● : vancomycin solution

△ : w/o/w emulsion prepared at 2,500 rpm

□ : w/o/w emulsion prepared at 7,500 rpm

○ : w/o/w emulsion prepared at 20,000 rpm

* Each point represents the mean $\pm$ SEM of six rats.

速やかであった。

(3) 生体内投与後の薬物および w/o/w emulsion 体内動態の検討(図3, 4, 5)

静脈内投与後の血清中 VCM 濃度推移を図3に示す。w/o/w emulsion の粒子径に依存して薬物血中濃度に差が生じ、粒子径の小さいものほど高い血中濃度を示した。また、図4に明らかなよう

に、平均粒子径約 $3\mu\text{m}$ の w/o/w emulsion は、静注後 120 分まで血中で確認可能であった。w/o/w emulsion の組織分布については、門脈内投与後の軟X線写真(図5)より、平均粒子径約 $40\mu\text{m}$ の w/o/w emulsion の肝臓への蓄積が観察された。

考 察

W/o/w emulsion の臨床応用を考えると、高い安定性を持ち、水溶性薬物を効率的に封入可能な製剤の開発が必要である。本研究では、徐放性および標的指向化製剤としての w/o/w emulsion の調製と評価を目的に、水溶性薬物 VCM, DXR, シタラピンおよび BSA を対象に検討した。

まず、w/o/w emulsion の調製法は A 法が適当であった。つまり、A 法で調製すると、任意の粒子径に調節が可能で、薬物封入率も比較的高かった。B 法では、ポリカーボネート膜上で w/o type emulsion 粒子同士の合一が生じ、それらが強制的に押し出されるため粒子径の増大が観察されたと考えられる。薬物放出挙動に関して粒子径の減少に伴い放出速度が上昇するのは、微粒子化に伴う薬物放出面積の増大が原因であると考えられる。

各種水溶性薬物封入 w/o/w emulsion を調製し評価したところ、VCM や BSA のような比較的高分子量の大きい薬物が高い封入率を示すのに対して、DXR やシタラピン等の低分子薬物は封入率が低かった。一方、薬物放出は低分子薬物ほど速やかであり、高分子ほど放出が遅延した。w/o/w

图 4 Optical photomicrographs of w/o/w emulsion before and after intravenous injection (Each bar represents 12.5 μm)

图 5 Soft X-ray photographs of each organ after intraportal injection of three types of w/o/w emulsions

emulsion からの薬物放出挙動は、封入薬物の油相透過性や emulsion 表面の放出面積、さらには油の性質(粘度)等に依存すると考えられる。したがって、一般に水溶性が高い高分子薬物ほど放出速度が低下し、emulsion 中への保持能が高まると考えられる。BSA の薬物放出は、粒子径(放出面積)に依存せず長期間にわたっていたが(72 時間目で最大 1.5%)、これは表面からの放出のみならず、相分離や滲透圧の影響による emulsion の破壊等にも由来すると考えられる。

W/o/w emulsion とその封入薬物の体内動態にもっとも大きく影響する因子は、粒子径である。図 3 から明らかなように、粒子径の小さな w/o/w emulsion ほど血中濃度が高く、特に 20,000 rpm で調製した w/o/w emulsion (平均粒子径=2.81 μm) は 45 分以降、VCM 溶液投与後の血中濃度値を凌いだ。また、図 4 に示すように、投与後 120 分まで血中に w/o/w emulsion の存在が確認されている。つまり、図 3 の 45 分以降の血中濃度の持続は、血中を滞留する w/o/w emulsion からの薬物徐放を示しているものと考えられる。

一方、粒子径の増大に伴い血中濃度が低くなる点に関して、末梢毛細血管や肺、肝および脾臓のような組織に w/o/w emulsion が捕捉されることが考えられる。しかし、毛細血管を除く他の組織における組織内ヨウ素(LPD 由来)含量を測定したところ、有意にヨウ素が蓄積している臓器は発見できなかった。

静注以外に、肝動注および門脈内注射後の w/o/w emulsion の動態を軟 X 線写真で検討した。

その結果、平均粒子径 41.8 μm の w/o/w emulsion を門脈内注射後の肝臓の写真に、emulsion の貯留(血管の塞栓)が観察された。一方、他の臓器への蓄積はほとんど認められなかった。この原因として、w/o/w emulsion の生体内での安定性の関与が考えられる。

今後、w/o/w emulsion の研究に関して、さらに安定な製剤の開発、ならびに薬物の放出機構の解明や、生体内投与後の正確な体内動態の解析および把握等が必要となるものと考えられる。

本研究の一部は第 10 回日本 DDS 学会(東京)で発表した。

文 献

- 1) Muller, R. H. (ed.) : Colloidal carrier for controlled drug delivery and targeting. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1991.
- 2) Higashi, S., Shimizu, M., Nakashima, T., Iwata, K., Uchiyama, F. et al. : Arterial-injection chemotherapy for hepatocellular carcinoma using monodispersed poppy-seed oil microdroplets containing fine aqueous vesicles of epirubicin. *Cancer* 75 : 1245-1254, 1995.
- 3) 大河内秀昭, 中野眞汎 : 水溶性薬物封入 w/o/w type multiple emulsion の調製と放出性に関する基礎的検討. *DDS* 9(1) : 31-38, 1994.
- 4) Jehl, F., Grlion, C., Thiettry, R. C., Monteil, H. : Determination of vancomycin in human serum by high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 : 503-507, 1985.
- 5) 増池健年, 大獄純一, 小波蔵政弘, 野田忠晴, 武本宜教 : 高速液体クロマトグラフィー法による生体試料中のアドリアマイシンとその代謝物の定量(第 2 法)抽出法による組織の分析. *薬学雑誌* 104 : 620-623, 1984.