臨床使用時の DDS 医薬品の製剤機能特性保証

——輸液配合によるリポ PGE₁ 製剤の脂肪粒子中薬物残存率の変化——

黒崎勇二・日野美波理・山内恵太・神谷佳代・川崎博己*

*Drug delivery function of DDSs in clinical use :
Changes in phase-distribution of PGE₁ in lipid
emulsions after dilution with aqueous infusions*

To guarantee the drug delivery function of the DDS drugs in clinical use, supplementary information closely related to the diverse clinical usage is required in addition to information listed on the Products Information.

Changes in the phase-distribution of PGE₁ in lipo-PGE₁ (Palux inj. and Liple[®]), a targeting-type DDS, after 10-times dilution with 6 aqueous infusions frequently prescribed for clinical treatment, i. e., 5% Otsuka Toueki (Glucose Injection JP), Otsuka Seishokuchu (Isotonic Sodium Chloride Solution JP), Klinit[®] (Xylitol Injection JP), Physiosol[®]・3, Hartmann's Solution pH : 8 and Intralipos[®] 10%, were examined *in vitro*. Total amounts of PGE₁ and the amounts of PGE₁ in the aqueous phase were determined by the ultrafiltration method to estimate phase-distribution ratios of PGE₁ after 10-times dilution. Total amounts of PGE₁ did not decrease after the dilution with each aqueous infusion. The amount of PGE₁ in the lipid emulsion phase decreased from 87% to 75, 72, 61, 47 and 20% after the dilution with Physiosol[®]・3, 5% Otsuka Toueki, Klinit[®], Otsuka Seishokuchu and Hartmann's Solution pH : 8, respectively, but not with Intralipos[®] 10%. The release of PGE₁ from the lipid emulsions occurred in relatively short period of time after the dilution and the phase-distribution ratios of PGE₁ were unchanged throughout the experiment for 6 h.

These findings strongly suggest that the dilution with Hartmann's Solution pH : 8 and Isotonic Sodium Chloride Solution is not necessarily the recommended prescriptions for combination with lipo-PGE₁ in maintaining its drug delivery function by the pharmaceutical view points. High pH of

aqueous infusion combined with lipo-PGE₁ for dilution tends to increase the release.

Yuji Kurosaki・Bibari Hino・Keita Yamauchi・
Kayo Kamiya・Hiromu Kawasaki*

*key words : lipo-PGE₁, DDS, aqueous infusion,
lipid emulsion, drug information*

近年、種々の製剤機能特性を有する DDS 医薬品が臨床使用されているが、臨床使用時における製剤機能、特に標的指向能、の保証に関する情報は DDS 医薬品の多様な使用方法に比較すると十分とはいえない。

プロスタグランジン E₁ (PGE₁) は、dihomo- γ -linolenic acid を前駆体として生体内で産生され、強い血管拡張作用と血小板凝集抑制作用を有する¹⁾。他方、PGE₁ は溶液中²⁾および生体内³⁾において不安定であり、臨床使用上の問題点であった。今日では、製剤的にこれらの問題点を改善した PGE₁ の標的指向型 DDS 製剤であるリポ PGE₁ 製剤⁴⁻⁶⁾が開発され、慢性動脈閉塞症などの末梢循環障害に臨床応用されている⁵⁻⁸⁾。

脂肪粒子を薬物担体とする静注用 PGE₁ 製剤であるリポ PGE₁ 製剤は、製剤学的特性として「脂肪粒子が薬物担体として利用されているため生体内で不活化されにくく、注入局所での刺激性も少ない。また、脂肪粒子が特に障害された血管に分布しやすい特性を有することから、病変部位に効率よく PGE₁ を集積させることができ」ること、さらに使用に関しては「輸液に混和して」投与できることが添付文書に記載されている。しかしながら、リポ PGE₁ と市販の輸液製剤との配合試験項目^{9,10)}には、本 DDS 医薬品の製剤機能である病変部位指向性を保証するための指標と考えられる輸液配合時における薬物担体である脂肪粒子中に含

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan 岡山大学大学院薬学研究科医療薬学専攻
Offprint requests to : Yuji Kurosaki

表 1 リポ PGE₁製剤の輸液製剤との配合変化試験(医療用医薬品パンフレット¹¹⁾より抜粋)

分類		商品名	会社名	規格	判定
血液 代用剤	リンゲル製剤	ハルトマン液 pH：8-ミドリ	ミドリ十字	500 ml	○
	維持液	フィジオゾール 3 号	ミドリ十字	500 ml	○
糖類剤		5%大塚糖液	大塚	100 ml	○
		5%大塚糖液	大塚	500 ml	○
		キシリトール注射液	抹桑	500 ml	○

○: 配合後 24 時間で変化なし

まれる PGE₁量の変化についての検討項目は含まれておらず、医療用医薬品パンフレット¹¹⁾の製剤学的事項にも配合時の総 PGE₁量の変化に関する情報のみが記載されているに過ぎない(表 1)。リポ PGE₁製剤を希釈した際の脂肪粒子中の PGE₁量の残存率に関しては、緩衝液¹²⁾および生理食塩液¹³⁾を用いた検討例はあるが、臨床上情報が必要とされる各種輸液製剤との配合に関する知見はない。

今回、リポ PGE₁の配合試験項目^{9,10)}を参考に、6 種の市販の輸液製剤、すなわち、5%大塚糖液(日局ブドウ糖注射液)、大塚生食注(日局生理食塩液)、クリニット® 注 5%(日局キシリトール注射液)、フィジオゾール®・3 号、ハルトマン液 pH: 8-ミドリ、およびイントラリポス® 10%を選択し、リポ PGE₁製剤をこれらの輸液製剤で 10 倍に希釈した際の脂肪粒子中の PGE₁量の残存率を検討した。

方 法

(1) 試薬

リポ PGE₁製剤としては、パルクス® 注(大正製薬)およびリプル® (ミドリ十字)を用いた。混和する輸液製剤として、5%大塚糖液(大塚製薬)、大塚生食注(大塚製薬)、クリニット® 注 5%(小林製薬工業)、フィジオゾール®・3 号(ミドリ十字)、ハルトマン液 pH: 8-ミドリ(ミドリ十字)およびイントラリポス® 10%(ミドリ十字)を使用した。PGE₁の標品および 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene(DPH)はそれぞれシグマ社およびナカライテスク(株)から購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

(2) 配合試験

パルクス® 注あるいはリプル® を各輸液で 10 倍に希釈後よく混和した。混和直後および室温放置 2 時間および 6 時間における混和液中の総 PGE₁量と混和液の水相中 PGE₁量を HPLC にて定量した。

(3) 混和液中の総 PGE₁量

水口らの方法¹³⁾を一部変更した。すなわち、リポ PGE₁製剤の 10 倍希釈液(以下、混和液とする) 0.25 ml にエタノール 0.6 ml および n-ヘプタン 1.2 ml を加え抽出し、2,600 rpm×5 min で遠心分離後エタノール層を採取した。さらに n-ヘプタン層に対し 80%エタノール 0.36 ml による抽出操作を 2 回繰返した。得られた抽出物を 45°C 減圧下で乾固し、残留物に移動相を 0.5 ml 加え再溶解後、遠心分離し上清を試料溶液とした。

(4) 混和液の水相中の PGE₁量

MPS(No. 4010, Amicon)を用いた限外濾過法¹³⁾により行った。遠心条件は、2,000 rpm×5 min とし、濾液を水相とした。

(5) 定量法

ポストカラム反応法を用いる HPLC により PGE₁の定量を行った。送液ポンプおよび検出器は LC-9A および SPD-6A(島津製作所)を用い、検出波長は 280 nm に設定した。カラムは Superiorex ODS(4.6 φ×150 mm, 資生堂)を用い、試料注入量は 80 μl とした。反応コイルは φ 0.5 mm×10 m(60°C)とし、反応液には 4%水酸化テトラメチルアンモニウム・メタノール溶液(0.5 ml/min)を用いた。移動相は 20 mM KH₂PO₄ (KOH で pH 5.2 に調整): CH₃CN=55:45(0.4 ml/min)を用いた。

図 1 Time courses of changes in total amount of PGE₁ remaining after 10-times dilution of lipo-PGE₁ with 6 aqueous infusions at the room temperature. Lipo-PGE₁ was diluted with (a) Physiosol® 3, (b) 5% Otsuka Toueki, (c) Klintit® 5%, (d) Otsuka Seishokuchu, (e) Hartmann's Solution pH:8, or (f) Intralipos® 10%.

Results are expressed as the mean of 3 determinations. Dotted line represents the initial level.

(6) 検量線の作成

PGE₁の標品のエタノール溶液を作製し、各輸液製剤で希釈して標準溶液とした。水相中 PGE₁量測定に際しては混和液と同条件で標準溶液を限外濾過し、検量線溶液を作製した。リポ PGE₁製剤原液およびイントラリポス® 10%による混和液の水相中 PGE₁量測定時の検量線溶液は、PGE₁のエタノール溶液を精製水で希釈した液について混和液と同条件で限外濾過を行い作製した。ピーク面積を用いた検量線はすべて良好な直線性($r > 0.994$)が認められた。

(7) pH の測定

各輸液製剤の pH をデジタル pH メーター (HM-30V, 東亜電波) にて測定した。

(8) 総 PGE₁量の残存率および脂肪粒子中 PGE₁量の残存率の算出

輸液配合後 t 時間における混和液中の総 PGE₁量 ($D_{total,t}$) は、混和直後を 100% とした際の経時的な残存率 (式 1) として示した。

$$\text{総 PGE}_1\text{量の残存率 (\%)} = D_{total,t} / D_{total,0} \times 100 \quad (1)$$

輸液配合後の脂肪粒子中 PGE₁量の残存率 (PG_{lipid}) は総 PGE₁量と水相中 PGE₁量 (D_{aq}) から式 2 に従い算出した。但し、リポ PGE₁の脂肪粒子相と水相の容積比は 0.11 : 0.89¹²⁾ とし、輸液配合後も脂肪粒子相の容積に変化はないものとした。

$$PG_{lipid} (\%) = (D_{total,t} - D_{aq,t}) / D_{total,0} \times 100 \quad (2)$$

(9) 濾液中の脂肪粒子量の測定

定法¹⁴⁾に従い、イントラリポス® 10%の脂肪粒子を DPH で蛍光標識 (200 μ M 相当) し、これを

図2 Time courses of changes in phase-distribution ratios of PGE₁ in the lipid emulsions (PG_{lipid}) after 10-times dilution of lipo-PGE₁ with 6 aqueous infusions at the room temperature

Lipo-PGE₁ was diluted with (a) Physiosol® 3, (b) 5% Otsuka Toueki, (c) Klinit® 5%, (d) Otsuka Seishokuchu, (e) Hartmann's Solution pH:8, or (f) Intralipos® 10%.

Results are expressed as the mean of 3 determinations. Dotted line represents the PG_{lipid} level in lipo-PGE₁.

さらに大塚生食注で10倍希釈して得た20 μ M 相当のDPHを含有する10倍希釈イントラリポス溶液を試料溶液とした。脂肪乳剤試料溶液を(4)と同一条件で限外濾過し、限外濾過される脂肪粒子量を濾液中のDPH量から算出した。DPHの定量は、エタノールで希釈後の分光蛍光光度計(F-4500, 日立)による蛍光強度の測定(Ex. 352 nm, Em. 432 nm)により行った。脂肪乳剤試料溶液から作製した脂肪粒子量の検量線は良好な直線性($r > 0.999$)を示した。

結果と考察

(1) 輸液配合後の総PGE₁量の経時変化

医療用医薬品パンフレット¹¹⁾には「配合変化なし」の判定基準として、外観変化がないこと、平

均粒子径が300 nm以下であること、およびPGE₁量が配合直後値と比較して90%以上であること(表1)が記載されている。そこで、輸液配合直後に対する総PGE₁量の残存率の経時的な変化を検討した(図1)。すべての配合例で総PGE₁量は各種輸液製剤による10倍希釈直後の値の90%以上であった。平均粒子径の測定は今回行っていないが、いずれも肉眼的な外観変化を認めなかったことから、今回検討した配合例はいずれも、医療用医薬品パンフレット¹¹⁾の判定基準に従えば「配合変化を認めなかった」であった。

(2) 輸液配合後の脂肪粒子中PGE₁量の経時変化

リポPGE₁製剤は、薬物担体である脂肪粒子が病変部位に効率よく集積することを利用した標的

図3 Relationship between the pH values of 5 aqueous infusions and the phase-distribution ratios of PGE₁ in the lipid emulsions (PG_{lipid}) after 10-times dilution with the infusions

Each point represents the mean $\pm$ S. D. of 3 determinations. Dotted line represents the PG_{lipid} level in lipo-PGE₁.

Key: (a) Physiosol®・3号; (b) 5% Otsuka Toueki; (c) Kliniit® 5%; (d) Otsuka Seishokuchu; (e) Hartmann's Solution pH: 8; (f) Intralipos® 10%.

表2 配合した輸液製剤の pH

輸液	pH	
	測定値	規格値*
5%大塚糖液	4.25	3.5-6.5
大塚生食注	5.99	4.5-8.0
クリニット® 注5%	5.96	4.5-7.5
フィジオゾール®・3号	4.73	4.0-5.2
ハルトマン液 pH: 8-ミドリ	7.88	7.8-8.2
イントラリポス® 10%	7.43	6.5-8.5

*添付文書の規格値

指向型 DDS 医薬品であり、DDS 医薬品としての製剤機能特性を保証するためには、臨床使用時における各種の輸液製剤と配合後の脂肪粒子中 PGE₁ 量の経時変化に関する情報が必要と考えられる。

リポ PGE₁ 製剤の脂肪粒子中に分布する PGE₁ の割合 (PG_{lipid}) は $86.6 \pm 0.6\%$ であった。イントラリポス® 10% による 10 倍希釈では $87.0 \pm 1.6\%$ と、この値に全く変化を認めなかった。しか

しながら、その他の輸液製剤による 10 倍希釈後の PG_{lipid} 値は、フィジオゾール®・3号で $74.5 \pm 0.8\%$ 、5%大塚糖液で $71.9 \pm 2.3\%$ 、クリニット® 注 5% で $60.9 \pm 5.3\%$ 、大塚生食注で $46.8 \pm 1.2\%$ 、ハルトマン液 pH: 8-ミドリでは $20.1 \pm 0.5\%$ と低下 (図 2) し、リポ PGE₁ 製剤に配合する輸液の選択は配合後投与された PGE₁ の病変部位到達量に大きな影響をおよぼす可能性が示唆された。生理食塩液による 10 倍希釈時のリポ PGE₁ 製剤の脂肪粒子中 PGE₁ 残存率の結果は、同じく限外濾過法を用いて検討された水口らの結果¹³⁾とよく一致した。

なお、いずれの配合例においても、脂肪粒子中 PGE₁ 量の経時変化がきわめて小さいことから脂肪粒子から水相への PGE₁ の遊離は、配合直後の比較的短時間内に起こるものと推察された。

PGE₁ は生体内では主に肺において代謝される³⁾ことが知られており、輸液配合により水相中に遊離された PGE₁ は静脈内で比較的速やかに代謝不活化されるため十分な作用を期待できない。したがって、10 倍希釈時にリポ PGE₁ 製剤の薬物担体である脂肪粒子中の PGE₁ 量が 50% 以下となった大塚生食注およびハルトマン液 pH: 8-ミドリが処方上リポ PGE₁ 製剤と併用される場合、配合には特別な注意を要することが示唆された。

一方、リポ PGE₁ 製剤を希釈する目的で低用量の輸液を配合する場合、イントラリポス® 10% など静注用脂肪乳剤やフィジオゾール®・3号、あるいは 5%大塚糖液を用いれば希釈後の水相中への PGE₁ の遊離が少なく、希釈後もリポ PGE₁ の製剤機能特性を損なわない輸液であることが示唆された。今後、*in vivo* における薬効を指標とする輸液配合時のリポ PGE₁ 製剤の「製剤機能特性」の保証に関するさらなる検討が必要であるが、今回得られた *in vitro* の知見もリポ PGE₁ 製剤の臨床使用に関する重要な医薬品情報であると考えられる。

(3) 脂肪粒子中薬物残存率に対する pH の影響

PGE₁ の pKa は 4.89¹⁵⁾であり、pH の上昇に伴い解離型 PGE₁ の割合が増する¹⁶⁾ことから希釈に伴うリポ PGE₁ 製剤からの水相中への PGE₁ の遊

離も pH5 付近から著しく増大することが報告されている^{12,13)}。

リポ PGE₁ 製剤に輸液製剤配合後の脂肪粒子中 PGE₁ 量の変化(図 2)と輸液製剤の pH(表 2)の関係を図 3 に示した。イントラリポス® 10%(図 3(f))を除く 5 種類の輸液製剤では、輸液製剤の pH が低い方が薬物担体である脂肪粒子中の PGE₁ の残存率が高い傾向が認められた。Yamaguchi ら¹²⁾は、イオン強度を一定にした pH 5.5 および 7.4 の緩衝液による希釈時のリポ PGE₁ 製剤の脂肪粒子中 PGE₁ 残存率を透析法により評価し、PGE₁ の分布の変化には PGE₁ の解離に伴う溶解度変化が関与すると考察している。しかし、今回検討した輸液製剤については、pH が 4~8 の領域において pH と PGE₁ の分布の関係は必ずしも pH の変化に伴う溶解度変化だけで説明できず、イオン強度や輸液製剤の組成の違いなど pH 以外の輸液側の因子も配合後の PGE₁ の分布に関与する可能性が示唆された。

(4) 脂肪粒子の限外濾過膜透過の可能性

Yamaguchi ら^{12,17)}は透析法により緩衝液による希釈時のリポ PGE₁ 製剤の脂肪粒子中 PGE₁ の残存率を検討し、平衡時には大部分の PGE₁ の水相中への遊離を認めるものの、この平衡には 6~8 時間を要するため、点滴時間を考慮すれば pH7 以上の輸液で希釈しても脂肪粒子中 PGE₁ の保持率を高いレベルで維持したままで投与できると考察している。しかし、この点について藤代ら¹⁸⁾は、透析法による評価では水相に遊離された PGE₁ の透析膜の透過が律速であることを明らかにし、透析法においても脂肪粒子から水相への PGE₁ の遊離は数分間で起こると報告している。

限外濾過法¹³⁾による評価に関しては、使用する限外濾過膜の分子量分画が約 3 万と比較的大きいため小さな脂肪粒子が限外濾過膜を透過する可能性があることが指摘されている¹²⁾。そこで、リポ PGE₁ 製剤の薬物担体である脂肪乳剤粒子(イントラリポス® 10%)を親油性の蛍光標識化合物 DPH で標識した脂肪乳剤試料溶液を調製し、濾液中の DPH の蛍光強度からの限外濾過膜を透過する脂肪粒子量の推定を試みた。限外濾過前の試

料溶液に対する濾液中の DPH 量の割合は $0.061 \pm 0.043\%$ ($n=4$) であり、今回の評価に際し、脂肪粒子の限外濾過膜透過による影響はほとんどないことが明らかとなった。

まとめ

6 種類の市販の輸液製剤と配合後のリポ PGE₁ 製剤の脂肪粒子中薬物残存率の変化について検討を行った結果、混和液中の総 PGE₁ 量の低下は認められなかったが、脂肪粒子中の PGE₁ 量が比較的短時間に著しく低下する例が認められた。配合変化試験に従い総 PGE₁ 量を指標^{9,10)}として評価すると、本研究に用いた 6 種の輸液製剤はすべて「配合変化を認めなかった」となる。しかし、リポ PGE₁ 製剤が DDS 医薬品として有する標的指向性という製剤機能特性の観点から配合変化の再評価を行った結果、一部の輸液では配合することによって比較的速やかに脂肪粒子中の PGE₁ 量が著しく低下することが *in vitro* で明らかとなり、臨床使用時に DDS 医薬品としてのリポ PGE₁ 製剤の「製剤機能特性」が十分保証されない可能性が示唆された。

本研究は、「DDS 医薬品の臨床使用時の製剤機能特性の保証」に関する医薬品情報の必要性を示すものであり、本研究分野は行政科学(レギュラトリーサイエンス)として今後積極的に取り組まれるべき検討課題であると考えられる。

文 献

- 1) 仲川義人, 細谷 順: プロスタグランジン(PG)E₁, E₂ 製剤. 医薬ジャーナル 29: 2383-2389, 1993.
- 2) Monkhouse DC, Van Campen L, Aguiar AJ: Kinetics of dehydration and isomerization of prostaglandins E₁ and E₂. J. Pharm. Sci. 62: 576-580, 1973.
- 3) Golub M, Zia P, Matsuno M, Horton R: Metabolism of prostaglandins A₁ and E₁ in man. J. Clin. Invest. 56: 1404-1410, 1975.
- 4) 水島 裕: 各種 lipid microsphere 製剤. Drug Delivery System 3: 203-208, 1988.
- 5) 清川重人, 原本俊一, 玉手純子, 東海林洋子, 星 恵子・他: PG 含有リビッドマイクロスフェアの動脈硬化部位へのターゲティング. Drug Delivery System 2: 35-40, 1987.
- 6) 宮内好正: プロスタグランジンによる末梢血管障害の治療. 日本臨床 52: 2182-2186, 1994.

- 7) Mizushima Y, Yanagawa A, Hoshi K : Prostaglandin E_1 is more effective, when incorporated in lipid microspheres, for treatment of peripheral vascular diseases in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 35 : 666-667, 1983.
- 8) 星 恵子, 柳川 明, 清川重人, 水島 裕 : Lipo PGE_1 (PGE_1 封入脂肪微粒子)の末梢血管障害を対象とした比較試験. *医学のあゆみ* 134 : 291-295, 1985.
- 9) 幸保文治, 中村美佐江, 矢野満江, 高田麻美, 坪内美保・他 : 市販リポ PGE_1 製剤の配合変化. *医薬ジャーナル* 25 : 371-395, 1989.
- 10) 山口哲夫, 福島由美子, 松川弘美, 西崎 香, 河原敬二郎・他 : 市販静注用プロスタグランジン E_1 製剤(リポ PGE_1)の配合変化(第2報). *薬理と治療* 23 : 565-577, 1995.
- 11) パルクス® 注, 医療用医薬品パンフレット, 大正製薬, p. 36-37, 1995.
- 12) Yamaguchi T, Tanabe N, Fukushima Y, Nasu T, Hayashi H : Distribution of Prostaglandin E_1 in lipid emulsion in relation to release rate from lipid particles. *Chem. Pharm. Bull.* 42 : 646-650, 1994.
- 13) 水口和生, 寺岡和彦, 久次米敏秀, 梅田貴文, 庄野文章・他 : リポ PGE_1 製剤の安定性と Lipid Microsphereからの PGE_1 の遊離. *基礎と臨床* 26 : 1647-1652, 1992.
- 14) Schachter D, Schinitzky M : Fluorescence polarization studies of rat intestinal microvillus membranes. *J. Clin. Invest.* 59 : 536-548, 1977.
- 15) 医薬品インタビューフォーム リプル®, ミドリ十字, p. 3, 1995.
- 16) Teagarden DL, Anderson BD, Petre WJ : Determination of the pH-dependent phase distribution of Prostaglandin E_1 in a lipid emulsion by ultrafiltration. *Pharm. Res.* 5 : 482-487, 1988.
- 17) Yamaguchi T, Fukushima Y, Itai S, Hayashi H : Rate of release and retentivity of Prostaglandin E_1 in lipid emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 1256 : 381-386, 1995.
- 18) 藤代成一, 中村 均, 大森 栄, 北田光一 : Lipo- PGE_1 製剤における PGE_1 の放出挙動. *病院薬学* 23 : 319-325, 1997.