ポリ(3-ヒドロキシブチレート)を用いた
ミクロスフェアの薬物放出速度に関する実
験的研究(第1報)山本裕司^{*1)}, 阿部英喜・土肥義治^{*2)}, 久保秋夫・松本昭彦^{*1)}

An experimental study on the releasing rate of poly(3-hydroxybutyrate) microspheres

The releasing rate of poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB)-microspheres containing Lastet, an anti-cancer agent, was investigated both *in vitro* and *in vivo*.

The rate of the release of Lastet from P(3HB) microspheres was very small and only 20% was released during a 15-day period. The addition of glycerol tristearate (GTS) to P(3HB) increased the releasing rate of Lastet and P(3HB) microspheres which contained 25% GTS released 100% of the Lastet during a 10-day period. P(3HB) microspheres which contained 25% GTS and 10% Lastet were administered intraperitoneally to rats and the change of Lastet concentration in blood and tissue was investigated.

Although in low levels, Lastet was detected in the blood up to day 3 after administration but not on day 7. Lastet was detected in high levels in the peritoneal tissue up to day 3, but not on day 7, although the microspheres were confirmed histologically.

The change of the surface property of microspheres confirmed by scanning electron micrographs suggested that the decomposition of P(3HB) *in vivo* may be accelerated by some enzyme to increase the release of drugs.

Yuji Yamamoto^{*1)}, Hideki Abe,
Yoshiharu Doi^{*2)}, Akio Kubo,
Akihiko Matsumoto^{*1)}

key words : poly(3-hydroxybutyrate), microsphere,
lastet, controlled release

近年, drug delivery system の発展とともに種々の drug carrier が開発されている. なかでも生体内分解性高分子は生体内で加水分解あるいは酵素分解を受けるため, 体内に蓄積しないという利点を持っている.

そのため, 生体内分解性高分子を drug carrier としてその薬物徐放性が検討され, 臨床応用に向け種々の工夫^{1~10)}がなされている.

今回筆者らは, 微生物がつくる生体内分解性ポリエステルである poly(3-hydroxybutyrate) (以下 P(3HB)) を用い, ラステットを含有するミクロスフェアを調製し, 薬物放出速度のコントロールと, *in vitro* ならびに *in vivo* における薬物放出速度の相違について若干の知見を得たので報告する.

方 法

(1) ミクロスフェアの調製

ミクロスフェアは図1のごとく液中乾燥法により調製した. 粒子径は阿部¹⁰⁾の方法により塩化エチレン溶液中の P(3HB) の濃度を変化させることにより調製した.

① ラステットの放出速度

塩化メチレン溶液中に, P(3HB)・ラステットとともに脂質としてトリステン(GTS)を添加しミクロスフェアを調製した. このミクロスフェアを 37°C, pH 7.4 の 0.01 M リン酸緩衝液中に放置し, 適時サンプリングしてラステットの濃度を UV 測定した.

② ミクロスフェア表面の性状

ミクロスフェアの表面は走査電子顕微鏡により観察した.

^{*1)} First Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine, 3-46 Urafune Minami-ku Yokohama, 232 Japan 横浜市立大学医学部第一外科学教室

^{*2)} Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuda Midori-ku Yokohama, 227 Japan 東京工業大学資源化学研究所

図1 液中乾燥法

図2 P(3HB)/CH₂Cl₂ 濃度と平均粒子径

図3 トリスチリン含有率の違いによるラストット放出速度への影響

(2) *in vivo* における血中ならびに組織内濃度の推移

ラストット 12%, GTS 25% 含有する平均粒子径 50 μm のミクロスフェアを用いて, *in vivo* における薬物徐放性を検討した。体重 200 g 前後の Wistar 系ラットを用いて, ラストット 5 mg/kg 相当量のミクロスフェアを腹腔内に投与し, 血中および各組織内のラストット濃度を測定した。

また, 採取した腹膜の 1 部をグルタルアルデヒドにて固定し, 走査電子顕微鏡にてミクロスフェア表面の性状の変化を観察した。

結果

(1) ミクロスフェアの粒子径

P(3HB)/塩化メチレン溶液濃度が 5~30 mg/ml の範囲において平均粒子はその濃度に対して直線的に増加し, 平均粒子径 20~100 μm のミクロスフェアは調製可能であった(図2)。

(2) *in vitro* におけるラストット放出速度

ラストット 10% を含有した P(3HB) ミクロスフェアはリン酸緩衝液中では, 10 日間で含有量の約 20% しか放出されず, その後の放出はほとんどみられなかった。

GTS 10% を含有する P(3HB) ミクロスフェアは, 10 日間で約 70% のラストットを放出した。

GTS 25% を含有した P(3HB) ミクロスフェアは, 10 日間でほぼ 100% のラストットを放出した(図3)。

(3) *in vitro* におけるミクロスフェア表面の性状

P(3HB) のミクロスフェアの走査電顕像では, ミクロスフェアの表面は直径約 1 μm の小さな孔が多数みられた。

GTS を含有するミクロスフェアの表面は, 直径約 1 μm の小さな孔と, 直径約 5 μm の大きな孔が混在していた(図4)。また, 15 日後のミクロスフェア表面の性状は実験開始前と大きな違いはみられなかった(図5)。

図4 ミクロスフェアの表面性状

a: P(3HB) ミクロスフェア, b: GTS 25%含有 P(3HB) ミクロスフェア

図5 リン酸緩衝液中のミクロスフェア表面の変化

a: 実験前, b: 15日後

このことから、リン酸緩衝液中ではミクロスフェア内のラストットは P(3HB)の崩壊により放出されるのではなく、表面に形成された channel を通じて放出されるものと思われる。

(4) *in vivo* における放出速度

ミクロスフェア投与後の血中濃度は、ラストット単独投与群と比較して、最高血中濃度は約 1/10 と低値であった。さらに、ラストット単独投与群

では6時間後の血中ラストットは検出されなかったが、ミクロスフェア投与群では3日後まで低値ながら検出された(図6)。

組織内濃度も同様に、3日目までは後腹膜に高濃度に検出され、縦隔内にも血中濃度と比較して高濃度のラストットが検出された。

しかし、血中濃度の推移と同様7日目にはラストットは検出されなかった(表1)。

図6 血中ラストレット濃度の推移

表1 組織内ラストレット濃度の推移 (μg/g)

	6 hr	72 hr	168 hr
liver	5.93	0.41	0
kidney	3.49	0.51	0
retroperitoneum	7.64	18.3	0
mediastinum	2.12	0.46	0

(5) 組織内のミクロスフェア表面の性状

投与3日目の腹膜に付着したミクロスフェアは、大きな channel を有し、表面はやや粗造になっていた。7日目にはミクロスフェアは腐食され、表面はさらに粗造になり、菲薄化していた。また、崩壊したミクロスフェアも観察された(図7)。

考 察

P(3HB)は、D(-)-3-ヒドロキシブチレートモノマーユニットとする、ポリエステルである。生体内では加水分解、あるいは酵素による分解を受けるため、drug carrier として drug delivery system に応用する際、体内に蓄積しないという利点を有している。しかし、生体内での分解速度は遅い¹¹⁾ため、drug carrier として用いた場合、薬物放出速度はきわめて遅いという欠点がある。

こうした問題点を解決するため、Juni ら⁶⁾は、P(3HB)に種々の脂肪酸エステルを添加したミクロスフェアを調製し、その薬物放出速度を検討し、ブチルエステル、あるいはエチルエステルを添加した際に放出速度ははやくなり、さらに脂肪酸エ

図7 腹腔内におけるミクロスフェアの性状の変化
a:投与後3日目. b:投与後7日目

ステルの濃度により放出速度がコントロール可能であったと報告している。

今回筆者らも、P(3HB)に脂質としてGTSを添加し、その薬物徐放性を検討した。その結果Juni ら⁶⁾の報告と同様その徐放性は改善し、トリステアリンの濃度変化により放出速度をコントロールすることが可能であった。

また、GTSを含まないミクロスフェアの表面は、塩化メチレンが蒸発したあとと思われる直径1 μmの小さな孔がみられたが、GTSを含有する

ミクロスフェアの表面は、直径 $5\mu\text{m}$ の大きな孔を有していた。GTS を添加した P(3HB) のガラス転移温度は、P(3HB) のみのガラス転移温度と差はみられない(未発表)ことから、GTS と P(3HB) とは相溶性を持たず、このことが GTS を含有した P(3HB) の表面に大きな孔を生じた原因と思われた。

さらに、リン酸緩衝液中の P(3HB) の分子量は、10 日間で約 80% までしか低下しない(未発表)こと、および実験前後でミクロスフェアの表面の性状に違いがみられないことから、ラステットは P(3HB) の崩壊により放出されるのではなく、ミクロスフェアの表面に形成された孔を通じて放出され、ラステットの徐放性の相違は、ミクロスフェアの表面に形成された孔の大きさの違いによって生じたと思われる^{7,10)}。

GTS を添加し、ラステットを含有した P(3HB) ミクロスフェアを、ラットの腹腔内に投与すると、7 日目には腹膜にミクロスフェアの存在が確認されたにもかかわらず、腹膜のラステットは検出されず、*in vitro* の結果とは違っていた。

また、ミクロスフェアの表面は粗造となり、菲薄化し、崩壊している所見が得られたことから、P(3HB) は生体内(腹腔内)では加水分解だけでなく、ある種の酵素によっても分解され⁹⁾、*in vitro* とは違った徐放性が得られたものと思われた。

したがって、P(3HB) を drug carrier として用いる場合、こうした生体内での分解を考慮した設計が必要と思われた。

文 献

- 1) Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Kato, Y.: Drug-carrier property of albumin microspheres in

- chemotherapy. V. Antitumor effect of microsphere-entrapped adriamycin on liver metastasis of AH7974 cells in rats. Chem. Pharm. Bull. 29: 1433-1438, 1981.
- 2) Mason, N., Thies, C., Cicers, T. J.: *In vivo* and *in vitro* evaluation of a microencapsulated narcotic antagonist. J. Pharm. Sci. 65: 847, 1976.
- 3) 山口良平: ポリ L-乳酸を素材とする制癌剤徐放システムについての実験的研究. 日外会誌 88: 401-402, 1987.
- 4) 朝倉庄志, 加藤弘文, 安田雄司, 高橋憲太郎, 岡田慶夫・他: 癌リンパ節転移に対する制癌剤のターゲティング療法. リンパ学 61: 65-72, 1988.
- 5) Yoshikawa, H., Nakao, Y., Takada, K., Muranishi, N., Wada, R. et al.: Targeted and sustained delivery of Aclarubicin to lymphatics by lactic acid-oligomer microsphere in rat. Chem. Pharm. Bull. 37: 802-804, 1989.
- 6) Juni, K., Nakano, M., Kubota, M.: Controlled release of Aclarubicin, an anticancer antibiotic, from poly- β -Hydroxybutyric acid microspheres. J. Control. Rel. 4: 25-32, 1986.
- 7) Kubota, M., Nakano, M., Juni, K.: Mechanism of enhancement of the release rate of Aclarubicin from poly- β -hydroxybutyric acid microspheres by fatty acid esters. Chem. Pharm. Bull. 36: 333-337, 1988.
- 8) Saito, T., Tomita, K., Juni, K., Ooba, K.: *In vitro* and *in vivo* degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in rat. Biomaterials 12: 309-312, 1991.
- 9) Brophy, M. R., Deasy, P. B.: *In vitro* and *in vivo* studies on biodegradable polyester microparticles containing sulphamethizole. Int. J. Pharmaceut. 29: 223-231, 1986.
- 10) 阿部英喜, 山本裕司, 土肥義治: 制癌剤ラステットを含有したポリ(3-ヒドロキシブチレート)微粒子のドラッグデリバリーシステムへの応用. 高分子論文集 49: 61-67, 1992.
- 11) Miller, N. D., Williams, D. F.: On the biodegradation of poly- β -hydroxy-butyrate (PHB) homopolymer and poly- β -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. Biomaterials 8: 129-137, 1987.