硫酸化シクロデキストリンの難水溶性アルミニウム塩による
塩基性線維芽細胞増殖因子の安定化および放出制御福永和弘・石村公敬・土方重樹・菌田良一^{*1)},
入江徹美・上釜兼人^{*2)}

Stabilization and controlled-release of basic fibroblast growth factor by water-insoluble aluminum salts of cyclodextrin sulfates

Basic fibroblast growth factor (bFGF) is a prototype of heparin-binding growth factor family and could play a crucial role in wound healing processes. Water-insoluble aluminum salts of cyclodextrin sulfates (Al-CyD-Suls) were prepared, and their potential use in oral formulations of bFGF intended for treatment of gastrointestinal ulcers was investigated. Adsorbates of bFGF with Al-CyD-Suls were prepared by incubating the growth factor with a suspension of Al-CyD-Suls in water. The mitogenic activity of bFGF released from the adsorbate was almost comparable to that of the intact bFGF. Al-CyD-Suls significantly protected bFGF against proteolytic degradation by pepsin, compared with their sodium salts and other sulfated oligosaccharides tested. The *in vitro* release of bFGF from the Al- β -CyD-Sul adsorbate into isotonic phosphate buffer (pH 7.4) was sustained in proportion to a rise in the ratio of Al- β -CyD-Sul to the growth factor. The oral administration of the adsorbate of bFGF with Al- β -CyD-Sul had the most prominent healing effects on acetic acid-induced gastric ulcers.

These results suggest that Al-CyD-Suls may potentiate the healing effect of bFGF by both stabilizing and anchoring the growth factor at the site where its action is desired.

Kazuhiro Fukunaga・Kimihiro Ishimura・
Shigeki Hijikata・Ryouichi Sonoda^{*1)},
Tetsumi Irie・Kaneto Uekama^{*2)}

key words : basic fibroblast growth factor,
aluminum salts of cyclodextrin sulfates,
stabilization, controlled-release

シクロデキストリン (CyD) の水酸基に硫酸基がエステル結合した硫酸エステル化 CyDs (CyD-Suls) は, CyD 本来の包装特性に加えてヘパリン様活性を示すことから, 新しいタイプの機能性素材として有効利用が期待されている^{1,2)}.

一方, ヘパリン親和性を示す線維芽細胞増殖因子 (FGF) は正常組織に広く分布し, その生物活性は線維芽細胞のみならず血管新生, 血管内皮細胞などの増殖を促進し, 創傷治癒薬物として消化性潰瘍などの治療薬として期待されている³⁾.

しかし, FGF は熱, 酸, 消化酵素などに対してきわめて不安定である⁴⁾. FGF の薬理作用を考慮すると, FGF 含有製剤を創傷部位に直接適用し, 局所での安定性と作用の持続化を兼ね備えた製剤設計が望まれる⁵⁾.

これまでに, FGF のヘパリン親和性に着目して, ヘパリンやヘパリン類似の生理活性を示すデキストラン硫酸や CyD-Suls など硫酸化多糖類を用いた FGF の安定化に関する検討が活発に行われている^{6,7)}. しかし, これらの研究に用いられている硫酸化多糖類のナトリウム塩は水溶性であり, FGF のような水溶性蛋白質の持効化用担体としては適当とは思えない.

そこで本研究では, 従来抗潰瘍薬として使用されているショ糖硫酸エステルアルミニウム塩 (sucralfate) が難水溶性であり, 潰瘍部位に選択的に付着する特性に着目して⁸⁾, 各種 Na-CyD-Suls (α -, β -, γ -CyDs および 2-ヒドロキシプロピル (HP)- β -CyD) のアルミニウム塩 (Al-CyD-Suls) を調製し, ヒト塩基性 FGF (bFGF) の安定化および徐放化用担体としての有用性について検討した.

^{*1)} Department of Drug Formulations, Kaken Pharmaceutical Co. Ltd. 科研製薬株式会社中央研究所製剤研究部

^{*2)} Department of Physical Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University 熊本大学薬学部製剤学研究室

方 法

(1) 試薬および溶媒

bFGF は組みかえ DNA 技術により得られたアメリカ Scios-Nova 社製を使用した。3種の天然 CyDs は日本食品加工(株)より恵与されたものを使用した。HP- β -CyD(2-ヒドロキシプロピル基の平均置換度:6.3)は Wacker Chemicals 社より恵与されたものを使用した。Sucralfate は中外製薬(株)より恵与されたものを使用した。他の試薬および溶媒は市販特級品を用いた。溶媒としての水は注射用水を用いた。

(2) Al•CyD-Suls の調製

Folkman らの方法¹⁾に準じて合成した CyD-Suls のナトリウム塩(Na•CyD-Suls)(10 g)を水(250 ml)に溶解後、21%塩化アルミニウム(300 ml)を攪拌しながら添加した。その溶液に 2 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 4.5 に調製し、室温で 1 時間攪拌した。析出した沈殿物を水洗後、60°C で 24 時間減圧乾燥し、白色粉末の Al•CyD-Suls を得た。

(3) Al•CyD-Suls の溶解度測定

Al•CyD-Suls の一定過剰量(40 mg)を水または pH 1.2 塩酸水溶液(1.5 ml)に添加し、25°C で振盪した。溶解平衡に達したあと、遠心分離し、上清中のアルミニウムおよび CyD-Suls を、それぞれ原子吸光分析(島津製原子吸光/フレイム分光光度計 AA-640-13)およびアンスロン硫酸法⁹⁾により定量した。

(4) bFGF の定量

Iwane らの方法¹⁰⁾に準じて、ヘパリンアフィニティーカラムを用い高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定した。ポンプ:東ソー(株)製コンピューターコントロールマルチポンプ CCPM, 検出器:東ソー(株)製 UV-8011 紫外吸光度計(277 nm), カラム:東ソー(株)製 TSK gel Heparin-5PW(7.5 i.d.×7.5 cm)を用いて測定した。

(5) 吸着試験

Al• β -CyD-Sul あるいは Al(OH)₃ の一定量をマイクロチューブに入れ、各濃度の bFGF 水溶液(1 ml)を加え、25°C で 3 時間振盪した。懸濁液を遠心分離したあと、上清中の bFGF を上述の HPLC 条件により定量し、吸着量を求めた。

(6) 安定性試験

bFGF(250 μ g)を吸着させた Al•CyD-Suls(25 mg)にブタ胃粘膜由来ペプシン(50 μ g)を含む pH 1.6 塩酸水溶液(900 μ l)を加え、37°C で 3 時間保温した。この検液を遠心分離し、上清を除去後、pH 5.0 のリン酸水素二ナトリウム・クエン酸緩衝液(900 μ l)を加えて振盪後、遠心分離し、上清中の bFGF 量を上述の HPLC 条件で測定し、その残存率から bFGF の安定性を評価した。水溶性 CyD およびデキストラン硫酸の場合は bFGF の吸着・脱着を行わず同様な操作を行った。

(7) 放出試験

Al• β -CyD-Sul(10 mg, 20 mg, および 40 mg)に bFGF(250 μ g)を含む水溶液(1 ml)を加え、bFGF を Al• β -CyD-Sul に吸着させたあと、遠心分離し、上清を除去した。その残渣に等張リン酸緩衝液(1 ml, pH 7.4)を加え 37°C で 24 時間保温した。経時的に上清(900 μ l)を採取し、bFGF 放出量を HPLC で測定した。なお、溶液採取後は同量の等張リン酸緩衝液を追加して溶出液量を一定に保った。bFGF の平均放出時間は山岡らのプログラム¹¹⁾を用いてモーメント解析により算出した。

(8) 酢酸潰瘍モデルにおける抗潰瘍効果

雄性 Sprague-Dawley ラット(8 週齢, 約 270 g)をエーテル麻酔し、胃を取り出し胃体部と前庭部の境界部の前壁に、氷酢酸(30 μ l)を染み込ませたペーパーディスク(直径:6 mm, Tokyo Roshi 製)を 20 秒間接触させた。その後、腹部を閉じ手術の翌日から 1 日 1 回経口ゾンデで試料を 14 日間投与(bFGF:50 μ g/kg, Al• β -CyD-Sul:10 mg/kg)した。15 日目にエーテル麻酔により屠殺し、潰瘍発現率および潰瘍面積(短径×長径)および深さ(0:損傷なし, 1:粘膜びらん, 3:深い潰瘍もしくは穿孔)を測定した。潰瘍指数は面積と深さの積から算出した。

結果と考察

Al•CyD-Suls は Na•CyD-Suls と同様に²⁾狭い範囲に分子量分布を持つ非晶質性混合物である。今回調製した Al•CyD-Suls は硫酸基当たり Al を 2 モル含有することから, sucralfate で報告されているように⁹⁾, 硫酸基と Al₂(OH)₅ 基の塩形

表 1 Adsorption of bFGF (250 $\mu\text{g/ml}$) on Al•CyD-Suls (25 mg/ml) in water at 25°C

Al•CyD-Suls	average degree of substitution of sulfate groups	bFGF adsorbed* (%)
Al• α -CyD-Sul	9.2	97.1 $\pm$ 2.5
Al• β -CyD-Sul	10.3	99.8 $\pm$ 1.3
Al• γ -CyD-Sul	12.9	97.5 $\pm$ 2.8
Al•HP- β -CyD-Sul	13.9	96.5 $\pm$ 3.7

* Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 3 determinations.表 2 Effects of additives (25 mg/ml) on stability of bFGF (250 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of pepsin (50 $\mu\text{g/ml}$, pH1.6) for 3 h at 37°C

CyDs	pH	remaining bFGF (%)*
Without additives	1.67	N.D.
α -CyD	1.67	N.D.
β -CyD	1.60	N.D.
γ -CyD	1.66	N.D.
HP- β -CyD	1.65	N.D.
Na• α -CyD-Sul	1.74	1.6 $\pm$ 1.3
Na• β -CyD-Sul	1.74	3.3 $\pm$ 1.4
Na• γ -CyD-Sul	1.73	5.1 $\pm$ 1.0
Na•HP- β -CyD-Sul	1.63	4.5 $\pm$ 3.2
Al• α -CyD-Sul	3.81	96.4 $\pm$ 1.2
Al• β -CyD-Sul	3.88	99.2 $\pm$ 2.6
Al• γ -CyD-Sul	3.82	96.5 $\pm$ 3.1
Al•HP- β -CyD-Sul	3.86	93.6 $\pm$ 2.1
Dextran sulfate	1.84	20.2 $\pm$ 9.6
Sucralfate	3.78	59.5 $\pm$ 6.1

* Each value represents the mean $\pm$ S.D. of 3 determinations.

成が主であることが示唆された。Al•CyD-Suls の水への溶解度はきわめて低く、たとえば、Al• β -CyD-Sul の水への溶解度は、Al として $20\pm 2\ \mu\text{g/ml}$ 、 β -CyD として $0.32\pm 0.03\ \text{mg/ml}$ であった。一方、Al の解離に伴って pH 1.2 塩酸水溶液中では Al• β -CyD-Sul の溶解度が上昇した (Al として $0.73\pm 0.04\ \text{mg/ml}$ 、 β -CyD として $1.17\pm 0.07\ \text{mg/ml}$)。

これまでに、Na•CyD-Suls がヘパリン類似の生理活性を示すことが知られている¹²⁾。そこで、bFGF のヘパリン親和性を利用して、4 種の Al•CyD-Suls への吸着挙動を比較検討した。表 1 に示すように、Al•CyD-Suls はいずれも bFGF に対して高い親和性を示し、CyD 空洞サイズや置換基の種類よりも、硫酸基の置換度に依存して親和

図 1 Freundlich isotherms of bFGF on Al• β -CyD-Sul and Al(OH)₃ in water at 25°C

性が変化した。図 1 は 25°C の水溶液中における Al• β -CyD-Sul および Al(OH)₃ に対する bFGF の吸着挙動を Freundlich 吸着式 (式 1)¹³⁾ に基づいてプロットした結果を示す。

$$\log X = \log k + 1/n \log C \cdots \cdots (1)$$

ここで、X および C は、それぞれ bFGF の吸着量 (mol/g) および溶液中の遊離 bFGF 濃度 (M) を示す。また、k および n はそれぞれの系に特有な係数である。bFGF は Al(OH)₃ よりも Al• β -CyD-Sul に対する親和性が高く、bFGF の吸着に Al 部位よりも CyD-Sul 部位が主に関与しているものと推察された。図には示していないが、bFGF の Al•CyD-Sul への吸着は溶液の pH やイオン強度の上昇に伴い減少することから、両者の静電的相互作用の関与が示唆された。

つぎに、吸着に伴う bFGF の細胞増殖活性の変化を調べるため、Al• β -CyD-Suls に吸着した bFGF をリン酸・クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で脱着し、線維芽細胞 (baby hamster kidney cells, BHK-21) に対する増殖活性を未処理の bFGF と比較

図2 Release profiles of bFGF from adsorbates containing bFGF (250 μ g) and Al· β -CyD-Sul into isotonic phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C

○ : Al· β -CyD-Sul (10 mg). ● : Al· β -CyD-Sul (20 mg) △ : Al· β -CyD-Sul (40 mg)

Each value represents the mean $\pm$ SD of 3 determinations.

した。その結果、脱着後の bFGF および未処理 bFGF の ED₅₀ 値は、それぞれ 1.84 ng/ml および 1.71 ng/ml であり、脱着後の bFGF は未処理 bFGF と同等の生物活性を保持していることが確認された¹⁵⁾。

bFGF を消化性潰瘍治療薬として経口投与で用いる場合、プロテアーゼに対する安定性を確保する必要がある。そこで、酸性条件下で働くペプシンを用い、bFGF に対する各種 CyDs の安定化効

果を検討した(表2)。bFGF 単独をペプシン (50 μ g/ml, pH 1.6) 存在下、37°C で3時間保温すると、bFGF はほぼ完全に分解した。3種の天然 CyDs や HP- β -CyD は bFGF の安定性を改善しなかったが、Na·CyD-Suls は bFGF の分解をわずかに抑制した。

一方、Al·CyD-Suls に吸着した bFGF は保温3時間後においても95%以上残存し、bFGF のいちじるしい安定性の改善が認められた。その際、Al·CyD-Suls 添加により懸濁液の pH が上昇したことから、Al·CyD-Suls による安定化には、bFGF と Al·CyD-Suls の静電的相互作用に加えて、Al·CyD-Suls による pH 変化に伴いペプシン活性が减弱したこともその要因であろうと推察される。また、これら Al·CyD-Sul の安定化効果はデキストラン硫酸や sucralfate よりも強力であった。

Al·CyD-Suls の場合、CyD 空洞の両入口周囲に負電荷をおび、高度に水和した硫酸基が空間的に密な状態で配向するため、他の直鎖硫酸化多糖よりも bFGF と効率よく相互作用し、安定化に有利に働くものと考えられる¹⁴⁾。さらに、pH 7.0 における α -キモトリプシンによる bFGF の分解に対しても、Al· β -CyD-Sul は Na· β -CyD-Sul よりも顕著な安定化効果を示した¹⁵⁾。

bFGF/Al· β -CyD-Sul 吸着体は水中で長時間安定に存在したが、等張リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中では吸着体から bFGF が徐々に遊離した。図2に示すように、bFGF/Al· β -CyD-Sul 吸着体 (bFGF として 250 μ g) から bFGF が徐々に放出され、その平均放出時間は Al· β -CyD-Sul 含量の増加に伴い延長した。このように、Al·CyD-Suls 量をかえることにより、bFGF の放出速度を任意に制御可能なことが示唆された。

bFGF は創傷治癒過程における肉芽形成に影響を及ぼし、創傷治療を促進することが報告されている¹⁶⁾。そこで、bFGF 含有処方を実験皮下に埋め込み、その肉芽形成促進能を比較したところ、Al· β -CyD-Sul 吸着体は bFGF/Al(OH)₃ 系や bFGF/Na· β -CyD-Sul 系よりも有意な肉芽形成促進作用を示した¹⁵⁾。

これらの結果から、bFGF/Al· β -CyD-Sul 吸着体を経口投与すると、プロテアーゼにより失活す

図3 Effects of oral administrations of bFGF (50 µg/kg/day) with Al·β-CyD-Sul (10 mg/kg/day) on healing process of acetic acid-induced gastric ulcers in rats.

Each value represents the mean ± SE of 9 ~ 11 rats. The value in parenthesis in the incidence of ulcers in the acetic acid-treated rats.

^{a)} Evaluated 14 days after the treatment with acetic acid. * : P < 0.01 vs. control.

** : P < 0.01 vs. bFGF alone.

ることなく潰瘍治療促進作用を効率よく発揮するものと期待される。そこで、ラット酢酸潰瘍モデルを用いて bFGF 含有処方の治療効果を評価した(図3)。

その結果、括弧内に示す潰瘍発現率には有意な差は認められなかったが、潰瘍指数は、対照(注射用水) ≥ bFGF 単独 > Al·β-CyD-Sul 単独 > bFGF/Al·β-CyD-Sul 吸着体の順に減少し、治療促進効果が観察された。ここで、bFGF 単独群と対照群の間に有意な差が認められなかったのは、bFGF は経口投与後、消化酵素などにより速やかに失活したためと思われる。また、Al·β-CyD-Sul 単独においても潰瘍治療効果がみられたのは、CyD-Suls が抗炎症作用を有すること¹⁷⁾や sucralfate でみられるような制酸作用や抗ペプシン作用を示すためと推察される¹⁸⁾。

今回用いた Al·CyD-Suls は、CyD の空洞周囲に硫酸基が密に配向した構造を有し、ヘパリンやデキストラン硫酸にくらべて構造的な不均一性などの問題は少ない。また、CyD-Suls は非経口投与時の臓器障害性や局所刺激性が低く¹⁹⁾、bFGF の

安定化および徐放化用担体として有用なことから、他の蛋白性薬物への有効利用が期待される。

本研究の一部は、第9回日本 DDS 学会(京都)において発表した。

文 献

- 1) Folkman, J., Weisz, P. B., Joullie, M. M., Li, W. W., Ewing, W. R. : Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Sciences* 243 : 1490-1493, 1989.
- 2) Pitha, J., Mallis, L. M., Lamb, D. J., Irie, T., Uekama, K. : Cyclodextrin sulfates : characterization as polydisperse and amorphous mixtures. *Pharm. Res.* 8 : 1151-1154, 1991.
- 3) Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G. : Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8 : 95-114, 1987.
- 4) Arakawa, T., Horan, T. P., Narhi, L. O., Rees, D. C., Schiffer, S. G., Holst, P. L., Prestrelski, S. J., Tsai, L. B., Fox, G. M. : Production and characterization of an analog of acidic fibroblast growth factor with enhanced stability and biological activity. *Protein Engineering* 6 : 541-546, 1993.
- 5) Davidson, J. M., Klagsbrun, M., Hill, K. E., Buckley, A., Sullivan, R., Brewer, P. S., Woodward, S. C. : Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J. Cell Biol.* 100 : 1219-1227, 1985.
- 6) Kajio, T., Kawahara, K., Kato, K. : Stabilization of basic fibroblast growth factor with dextran sulfate. *FEBS Letters* 306 : 243-246, 1992.
- 7) Tsai, P. K., Volkin, D. B., Dabora, J. M., Thompson, K. C., Bruner, M. W., Gress, J. O., Matuszewska, B., Keogan, M., Bondi, J. V., Middaugh, C. R. : Formulation design of acidic fibroblast growth factor. *Pharm. Res.* 10 : 649-659, 1993.
- 8) Nagashima, R., Hirano, T. : Selective binding of sucralfate to ulcer lesion I. Experiments in rats with acetic acid-induced gastric ulcer receiving unlabelled sucralfate. *Arzneim.-Forsch.* 30 : 80-83, 1980.
- 9) Nagashima, R., Yoshida, N. : Sucralfate, a basic aluminum salt of sucrose sulfate I. Behaviors in gastroduodenal pH. *Arzneim.-Forsch.* 29 : 1668-1676, 1979.
- 10) Iwane, M., Kurokawa, T., Sasada, R., Seno, M., Nakagawa, S., Igarashi, K. : Expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor in *E. Coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 146 : 470-477, 1987.
- 11) Yamaoka, K., Nakagawa, T., Uno, T. : Statistical moment in pharmacokinetics. *J. Pharmacok. Bio-*

- pharm. 6 : 547-558, 1978.
- 12) Shing, Y., Folkman, J., Weisz, P. B., Joullie, M. M., Ewing, W. R. : Affinity of fibroblast growth factors for β -cyclodextrin tetradecasulfate. *Anal. Biochem.* 185 : 108-111, 1990.
 - 13) Florence, A. T., Attwood, D. : *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Macmilian Press, London, 1981, p 196-205.
 - 14) Burke, C. J., Volkin, D. B., Mach, H., Middaugh, C. R. : Effect of polyanions on the unfolding of acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 32 : 6419-6426, 1993.
 - 15) Fukunaga, K., Hijikata, S., Ishimura, K., Sonoda, R., Irie, T., Uekama, K. : Aluminium β -cyclodextrin sulphate as a stabilizer and sustained-release carrier for basic fibroblast growth factor. *J. Pharm. Pharmacol.* 46 : 168-171, 1994.
 - 16) Buntrock, P., Jentzsch, K. D., Heder, G. : Stimulation of wound healing, using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. I. Quantitative and biochemical studies into formation of granulation tissue. *Exp. Path.* 21 : 46-53, 1982.
 - 17) Szejtli, J. : *Cyclodextrin Technology*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 1988, p 57.
 - 18) Nagashima, R. : Mechanisms of action of sucralate. *Clinical Gastroenterology* 3 : 117-127, 1981.
 - 19) Shiotani, K., Uehata, K., Irie, T., Uekama, K., Pitha, J. : Parenteral use of cyclodextrin sulfates : protection against gentamicin nephrotoxicity in rats. (ed. Hedges, A. R.), *Minutes of the 6th International Symposium on Cyclodextrins*, Editions de Santé, Paris, 1992, p 567-570.