(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
23(4) 319 - 325 (1997)

Lipo-PGE₁製剤における PGE₁の放出挙動

藤代成一^{a)}, 中村 均, 大森 栄, 北田光一

千葉大学医学部附属病院薬剤部[†]

Liberation of PGE₁ from Lipo-PGE₁ Preparations

SEIICHI FUJISHIRO^{a)}, HITOSHI NAKAMURA, SHIGERU OHMORI and MITSUKAZU KITADA

Division of Pharmacy, Chiba University Hospital, Faculty of Medicine, Chiba University[†]

(Received September 3, 1996)
(Accepted March 7, 1997)

A lipid emulsion containing PGE₁ within its lipid particles (Lipo-PGE₁) is expected to repected PGE₁ gradually from the lipid particles in clinical application. In medical practice, Lipo-PGE₁ is generally applied after being diluted with infusion fluids. PGE₁ is thus thought to be released rapidly from the lipid particles to the aqueous phase when Lipo-PGE₁ is diluted with infusion fluids. We have kinetically studied the release of PGE₁ from both the Lipo-PGE₁ and PGE₁ solution as a control, while varying both the quantity of the diluting fluid and the temperature. We kinetically simulated the release of PGE₁ from the lipid particles of Lipo-PGE₁. As a result, that Lipo-PGE₁ was thus suggested to release PGE₁ from the lipid particles rapidly after dilution.

Key words — lipid emulsion, PGE₁, Lipo-PGE₁

はじめに

エイコサノイドはプロスタグランディン, トロノキサン, ロイコトリエン (LT) など複数の化合物群に大別される。これらはオータコイドであり, 生成場所に近い生体の機能を調節し, 生体に加わる刺激に対して, その恒常性維持に関わっているものと考えられている。

プロスタノイドの一つプロスタグランディン

E₁ (PGE₁) は末梢血管拡張作用¹⁾, 血小板凝集抑制作用¹⁾, 赤血球変形能の改善作用²⁾, 過剰のノルアドレナリンの放出抑制作用³⁾, LT やヒスタミンの放出抑制作用⁴⁾などを持ち, その作用は多岐に及んでいる。

近年, PGE₁のもつ副作用の軽減と徐放化を目的とした DDS (Drug Delivery System) 化製剤が普及している。

PGE₁の注射用脂肪乳剤 (Lipo-PGE₁ 製剤) は脂肪粒子のもつ病変部位への集積性や生体内での PGE₁ 活性維持などを考慮した DDS 化製剤である。この製剤では, 脂肪粒子から PGE₁ が徐放されることが, 効果の面において重要と考えられ

[†] 千葉市中央区亥鼻 1-8-1; 1-8-1, Inohara, Chuo-ku, Chiba, 260 Japan

^{a)} 現所属: 財団法人佐々木研究所附属杏雲堂病院薬剤部

る。臨床においては、Lipo-PGE₁ 製剤は、一般的に種々の輸液に希釈されて用いられる。脂肪粒子によって包囲された PGE₁ も輸液によって希釈された場合、その含有量も微量であるため、たやすく脂肪粒子から離脱してしまうことも考えられ、その製剤学的な意義を失うことも懸念される。

Lipo-PGE₁ 製剤中の PGE₁ の分布挙動について、五十嵐ら⁵⁾は、Lipo-PGE₁ 製剤を生理食塩液などの輸液に希釈した場合、ただちに PGE₁ が脂肪粒子から遊離すると報告している。また、PGE₁ は分子内にカルボン酸を持つため、pH に依存してその解離状態が変化し、脂肪粒子への取り込み率が著しく影響されることも報告されている⁶⁾。水口ら⁷⁾は Lipo-PGE₁ 製剤を輸液で希釈すると、分配平衡の移動に伴い速やかに PGE₁ が脂肪粒子から遊離することを示している。

一方、山口ら⁸⁾は、Lipo-PGE₁ は輸液で希釈された場合でも多くの PGE₁ を保持していると報告している。また、五十嵐らあるいは水口らとの結果の違いについては、脂肪乳剤から水相を分離する方法の違い、すなわちろ過法の選択が放出挙動の見解に差異を生じる要因の一つではないかと指摘している。

このように、Lipo-PGE₁ 製剤からの PGE₁ 放出については一致した見解は得られていない。そこで、著者らは Lipo-PGE₁ 製剤中の PGE₁ の挙動を調査するため、山口ら⁸⁾と同様に、口径24Åの透析チューブをろ過膜として用い、脂肪粒子からの PGE₁ 放出について検討を行った。

PGE₁ を含む脂肪粒子→透析チューブ内の水相→緩衝液への PGE₁ 透析について、一次式を用いて速度論的に解析した。対照として、同一の系で PGE₁ の緩衝溶液を用いたときの PGE₁ 透過も求めた。

これらの実験結果より、PGE₁ の透析膜透過と脂肪粒子からの放出挙動について考察したので報告する。

実験の部

1. 試薬

市販 Lipo-PGE₁ 製剤 (10 µg/2 ml; 表示値, Lot. 124C1) は T 社製、生化学用 PGE₁ (5 mg/A) はフナコシ製、透析チューブ (口径24Å, 厚さ0.03mm, 内径20mm) は Viskase Sales 社製のものを用いた。緩衝溶液 (pH 7.4) は 0.2M KH₂PO₄ と 0.2M NaHCO₃ を用いて調製し、NaCl によりイオン強度0.15に調製した。

2. PGE₁ および PGA₁ の定量

PGE₁ および PGA₁ をカラムにより分離後、ポストカラム反応法にてそれぞれを PGB₁ に変換し定量を行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定条件は以下の通りである。

検出器：紫外吸光光度計 L-4000 UP Detector, 検

出波長280nm, HITACHI 社製

移動相溶媒送液ポンプ：L-6000Pump, HITACHI 社製

反応液送液ポンプ：L-6000Pump, HITACHI 社製

カラム：SUPERIOREX ODS S-5µm, 4.6×150mm
SHISEIDO 社製

カラム温度：約25℃

移動相：0.02M KH₂PO₄ (pH 5.0)/CH₃CN(5/3)
(0.02M KH₂PO₄ は 1N KOH にて pH 5.0 に調整)

移動相流速：1.0ml/min

反応液：水酸化テトラメチルアンモニウムの4%
メタノール溶液

反応液流速：1.0ml/min

反応温度：60℃

3. Lipo-PGE₁ 製剤からの PGE₁ 放出

Lipo-PGE₁ 製剤からの PGE₁ 放出を求めるため、以下の実験を行った。すなわち、Lipo-PGE₁ 製剤 (6.58 µg/ml; 実測値) を透析チューブに入れ、この透析チューブを緩衝液 (pH 7.4) 中に浸し、一定温度の水槽中でインキュベートし、透析チューブから緩衝液中に透過してきた PGE₁ の量

を経時的に HPLC により測定した。

実験条件は、20℃において10倍、100倍希釈と37℃において10倍、100倍希釈である。10倍希釈の場合、Lipo-PGE₁ 製剤 4 ml を透析チューブに入れ、36ml の緩衝液中に浸した。100倍希釈の場合、Lipo-PGE₁ 製剤 2 ml を透析チューブに入れ、198ml の緩衝液中に浸した。

対照として、PGE₁ を緩衝液に溶解した液 (5.58 μg/ml) (PGE₁ 溶液) についても、Lipo-PGE₁ 製剤の場合と同様に実験を行った。

実験はすべて3回行い、その平均値を用いて解析を行った。

4. PGE₁ の透析チューブ透過に対する PGE₁ 濃度の影響

PGE₁ 初期濃度が PGE₁ の透析チューブ透過に与える影響を調べるため、37℃、100倍希釈時における、PGE₁ 溶液 (2.23 μg/ml, 5.58 μg/ml) からの PGE₁ 透過を求めた。実験はすべて3回行い、その平均値を用いて解析を行った。

理論の部

PGE₁ の脂肪粒子からの放出を評価するため、以下のモデルを立てた。すなわち、PGE₁ は、①脂肪粒子から透析チューブ内の水相に放出され、②透析チューブ内の水相から透析膜を通過し緩衝液中に移動する、というモデルである。

時刻 t における、脂肪粒子中、透析チューブ内の水相、緩衝液中の PGE₁ と PGA₁ の総量をそれぞれ M_1 , M_2 , M_3 とし、①、②のステップの速度定数をそれぞれ k_1 , k_2 とすると、以下の式が成り立つ。

$$dM_1/dt = -k_1 M_1 \quad \cdots \cdots \cdots (1)$$

$$dM_2/dt = k_1 M_1 - k_2 M_2 \quad \cdots \cdots \cdots (2)$$

$$dM_3/dt = k_2 M_2 \quad \cdots \cdots \cdots (3)$$

$$M_3 = M_0 - M_1 - M_2 \quad \cdots \cdots \cdots (4)$$

ここで、 M_0 は最初に脂肪粒子中に含まれる PGE₁ と PGA₁ の総量である。

(1)–(4)式を解くと、

$$M_3 = M_0 [1 + \{k_1 \exp(-k_2 t) - k_2 \exp(-k_1 t)\} /$$

$$(k_2 - k_1)] \quad \cdots \cdots \cdots (5)$$

となる。

また、 k_2 を求めるため、PGE₁ 溶液について、以下の解析を行った。

PGE₁ および PGA₁ の透析膜の透過が一次の速度で起こる時、その透過速度は(6)式で表される。

$$dM_2/dt = -k_2 M_2 \quad \cdots \cdots \cdots (6)$$

したがって、(7)式が成り立つ。

$$\ln M_2 = -k_2 t + A \quad \cdots \cdots \cdots (7)$$

(7)式を用いて、各条件における PGE₁ 溶液の k_2 の値を求めた。

得られた k_2 の値を(5)式に代入し、適当な k_1 を代入すれば、理論曲線が得られる。本論文では、式を M_0 で除し、100を乗じて、透過してきた PGE₁ と PGA₁ 量を M_0 に対する百分率(透過%)で理論曲線を表した。

結果および考察

1. PGE₁ 溶液からの PGE₁ 透過速度定数に対する濃度の影響

PGE₁ の初期濃度が透過速度定数 k_2 に与える影響について、37℃、100倍希釈時において検討した。

Fig. 1 に PGE₁ 溶液 (2.23 μg/ml および 5.58 μg/ml) からの PGE₁ の透過%を示した。PGE₁ 濃度 2.23 μg/ml と 5.58 μg/ml の間で透過%に差異は認められず、両液ともに、約1時間後に PGE₁ は50%透過し、透過%が50%に達する時間はほぼ同じであった。

0–4時間の範囲で、(7)式に従って、 k_2 を求めた。2.23 μg/ml のとき $k_2 = 0.311 \text{ hr}^{-1}$ ($r = 0.972$)、5.58 μg/ml のとき $k_2 = 0.322 \text{ hr}^{-1}$ ($r = 0.944$) であり、透析チューブ内の PGE₁ 溶液の濃度によらず、 k_2 は一定であった。すなわち、PGE₁ 溶液からの PGE₁ の透析膜透過速度は 2.23–5.58 μg/ml の濃度範囲では一次式に従っており、このことは一次式による解析が妥当であることを示している。

Fig. 1. PGE₁ Permeation from PGE₁ Solution at 37°C
 Symbols : ○, PGE₁ (2.23 μg/ml) solution was dialyzed against 100-fold with a buffer (pH 7.4, 0.2 M KH₂PO₄ + 0.2 M NaHCO₃) ; ●, PGE₁ (5.58 μg/ml) solution was dialyzed against 100-fold with a buffer (pH 7.4, 0.2 MKH₂PO₄ + 0.2 M NaHCO₃)
 Each symbol represents mean of three experiments.

Fig. 2. PGE₁ Permeation from PGE₁ Solution at 20°C
 Symbols : ○, PGE₁ (5.58 μg/ml) solution was dialyzed against 100-fold with a buffer (pH 7.4, 0.2 M KH₂PO₄ + 0.2 M NaHCO₃) ; ●, PGE₁ (5.58 μg/ml) solution was dialyzed against 10-fold with a buffer (pH 7.4, 0.2 M KH₂PO₄ + 0.2 M NaHCO₃)
 Each symbol represents mean of three experiments.

2. PGE₁ が透析 tube を透過するときの速度定数 k_2

PGE₁ 溶液 (5.58 μg/ml) を透析チューブに入れて、緩衝液中に浸し、透析チューブ内の水相から透析膜を通過し緩衝液中に移動してきた PGE₁ を測定した。

Fig. 2 と Fig. 3 には、20°C で 10 倍、100 倍希釈の場合の透過プロファイルと 37°C で 10 倍、100 倍希釈の場合の透過プロファイルをそれぞれ示した。20°C と 37°C のいずれの場合においても、100 倍希釈のほうが PGE₁ の透過が速い傾向にあった。(7)式に従い、 t と $\ln M_2$ をプロットしたところ、0 - 4 時間の範囲では、良好な直線関係が得られた ($r > 0.944$)。この直線の傾きから k_2 を求めた。Table 1 には、各条件における k_2 を示した。一定温度では希釈倍率が高いほど、また、一定希釈倍率では温度が高いほど、 k_2 は大きい傾向にあった。ここで求めた k_2 を (5) 式に代入し、適

Fig. 3. PGE₁ Permeation from PGE₁ Solution at 37°C
 Symbols : ○, PGE₁ (5.58 μg/ml) solution was dialyzed against 100-fold with a buffer (pH 7.4, 0.2 M KH₂PO₄ + 0.2 M NaHCO₃) ; ●, PGE₁ (5.58 μg/ml) solution was dialyzed against 10-fold with a buffer (pH 7.4, 0.2 M KH₂PO₄ + 0.2 M NaHCO₃)
 Each symbol represents mean of three experiments.

Table 1. Rate Constant k_2 (hr^{-1}) of PGE_1 Permeation through the Dialysis Membrane

	10-fold	100-fold
20°C	0.173	0.299
37°C	0.275	0.322

当な k_1 を代入すれば, Lipo- PGE_1 製剤からの PGE_1 放出をシミュレーションできる.

3. Lipo- PGE_1 製剤からの PGE_1 放出

Lipo- PGE_1 製剤からの PGE_1 放出挙動を評価するため, Lipo- PGE_1 製剤 ($6.58 \mu\text{g/ml}$) を透析チューブに入れて, 緩衝液中に浸し, 緩衝液中に移動してきた PGE_1 を測定した.

Fig. 4 と Fig. 5 には, 20°C と 37°C で Lipo- PGE_1 製剤を希釈したときの透過プロファイルを開印でそれぞれ示した. 実線は(5)式を用いて, k_1 を変化させたときのシミュレーション曲線である.

20°C の場合, 10倍, 100倍希釈いずれの場合に

においても, k_1 を 10hr^{-1} 以上としたときにシミュレーション曲線は実測値とよく一致した. このことから, k_1 は 10hr^{-1} 以上と見積もることができる. PGE_1 の脂肪粒子からの放出半減期は, $k_1 = 10\text{hr}^{-1}$ としたときの4.2分という値が理論上もっとも長い値となる. すなわち, Lipo- PGE_1 製剤を希釈すると, 放出半減期4.2分以内という極めて短い時間で, PGE_1 は脂肪粒子から放出されると考えた.

37°C, 10倍希釈の場合, 一次式に従って PGE_1 の透過がおこる範囲(0-4時間)では, k_1 を 10hr^{-1} 以上としたときにシミュレーション曲線は実測値とよく一致した. 37°C, 100倍希釈の場合, シミュレーション曲線は実測値とは一致しなかったが, $k_1 = 10\text{hr}^{-1}$ 以上としたときが最も近似していた. このことから, 20°C の場合と同様に, 37°C においても, PGE_1 は脂肪粒子から, 希釈によってただちに放出されていると考えた.

温度, 希釈倍率を変化させて実験を行ったが, いずれの場合においても, 希釈により脂肪粒子か

(a) Simulation curves of PGE_1 permeation from Lipo- PGE_1 ($6.58 \mu\text{g/ml}$) solution, dialyzing against 10-fold at 20°C

Each open circle represents mean of three experiments.

(b) Simulation curves of PGE_1 permeation from Lipo- PGE_1 ($6.58 \mu\text{g/ml}$) solution, dialyzing against 100-fold at 20°C

Each open circle represents mean of three experiments.

(a) Simulation curves of PGE₁ permeation from Lipo-PGE₁ (6.58 μ g/ml) solution, dialyzing against 10-fold at 37°C. Each open circle represents mean of three experiments.

(b) Simulation curves of PGE₁ permeation from Lipo-PGE₁ (6.58 μ g/ml) solution, dialyzing against 100-fold at 37°C. Each open circle represents mean of three experiments.

Fig. 5

ら速やかに PGE₁は放出されており、脂肪粒子からの PGE₁放出は温度あるいは希釈倍率 (10倍から100倍の範囲) に、ほとんど影響されないと考えた。

以上のことから、Lipo-PGE₁製剤は使用時に輸液によって希釈された場合、生体内に投与される前に大部分の PGE₁が水相中に放出されており、その DDS 化製剤としての意義を失っていることが示唆された。この結果は、五十嵐ら⁵⁾あるいは水口ら⁷⁾の結果とよく一致する。

山口ら⁸⁾は、透析チューブからの PGE₁の経時的な透過量を脂肪粒子からの PGE₁の経時的な放出量として評価しており、脂肪粒子からの PGE₁の放出が平衡に達するまで6-8時間必要であると報告している。山口らの解析は、透析膜透過が律速ではなく、脂肪粒子からの PGE₁の放出が律速であるという仮定の上に成り立っている。しかしながら、今回、山口らと同様の方法で実験した結果、 k_1 は k_2 に比べ30-60倍大きく ($k_1=10$ とし

たとき)、PGE₁の透析膜透過が律速であることがわかった。したがって、山口らは脂肪粒子からの PGE₁の放出を評価しているのではなく、PGE₁の透析チューブの透過だけを評価した可能性がある。そのため、山口らの結果は五十嵐ら⁵⁾、水口ら⁷⁾あるいは著者らの結果と異なっていると考えられる。

Lipo-PGE₁製剤からの PGE₁放出挙動を検証するため、PGE₁溶液を対照として、温度・希釈倍率を変えた同一の系で、PGE₁の脂肪粒子からの放出、透析膜透過を速度論的に解析した。その結果、Lipo-PGE₁製剤は希釈により、数分という単位の時間で脂肪粒子から大部分の PGE₁を放出していることが示唆された。

引用文献

- 1) Carlson, L. A. et al., *Lancet*, **1**, 155 (1973).
- 2) 山口寛ほか, 現代医療, **17**, 447 (1985).
- 3) 道林勉ほか, 脈管学, **21**, 255 (1981).

-
4) 北村諭ほか, 日本胸部疾患学会誌, 18 , 447(1980).	7) 水口和生ほか, 基礎と臨床, 26 , 419-425 (1992).
5) 五十嵐理ほか, 炎症, 8 , 243-246 (1998).	8) Yamaguchi, T. et al., <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 42 , 646-650 (1994).
6) Teagarden, D. L. et al., <i>Pharm. Res.</i> , 5 , 482-487 (1988).	