Effect of Microdroplet Preparations of Tetracain of Analgesic Potency

Masahiro Morimoto^{1*}, Tatsuo Hakuto¹, Takashi Imagawa²,
Mami Morimoto¹ and Nobuo Ro¹

¹*Department of Anesthesiology, Osaka Medical College, Osaka, Japan and*

²*Central Research Laboratories, The Green Cross Corporation, Osaka, Japan*

(Received 8 April 1996)

Abstract

Many studies have investigated embedding drugs in a phospholipid membrane to regulate absorption and distribution. In this study investigating a drug delivery system using phospholipid as a carrier, we prepared two kinds of tetracain in a liposome or lipid microsphere, and the stability and analgesic actions were tested in rats.

The stability test showed that there were no problems in the residual rate or entrapment rate of each drug solution. The test of analgesic actions in rats showed that the analgesic effects were slightly increased in each solutions. Furthermore, the liposome solution showed a slightly prolonged effect, suggesting a low diffusion from the site as well as good retention.

Key words : tetracain, microdroplet preparation, analgesic potency

局所麻酔薬のマイクロドロップレットに関する基礎的研究

森本 昌宏^{1*} 白藤 達雄¹ 今川 昂² 森本 真美¹ 盧 信夫¹

¹大阪医科大学 麻酔科学教室 *現 近畿大学医学部 麻酔科学教室

²(株)ミドリ十字中央研究所

はじめに

選択的に薬物を作用部位に集中させることができれば、最少必要量で最大の治療効果を得ることが可能であり、かつ、副作用を抑えることができる。こ

の考えに基づいて、薬物をリン脂質膜内に包埋し、それらの吸収や生体内分布を制御しようとする試みが多く成されている。リン脂質は水溶液中で脂質 2 分子膜を構成し、liposome と呼ばれる閉鎖性小胞体を形成し、その内部に薬物を包埋することが知られ

Table 1 Composition of tetracain-incorporated microdroplets

	liposome TET (pH 7.4)	lipo TET (pH 7.4)
tetracain (TET)	55 mg (free base)	76 mg (free base) ¹⁾
soybean oil	-	1000 mg ²⁾
egg yolk lecithin	500 mg	120 mg
glycerin	221 mg	221 mg
distilled water	proper amount	proper amount
total	10 ml	10 ml

1) Saturated solution of tetracain (free base) was used.

2) Solubility of tetracain (free base) in soybean oil was 153.836 mg/ml.

ており、抗生物質⁵⁾、制癌剤²⁾⁴⁾、生理活性物質等を包埋する試みが広く成されている。また、同様な観点から、大豆油の脂肪乳剤 (lipid microsphere) も粒子外側にリン脂質膜を有する脂質小粒子であることから、有用な薬物キャリアーと成り得るものと考えられ、栄養輸液として実用化されている。これら liposome と lipid microsphere の2種類のマイクロドロップレット液は脂質で構成された粒子との点では類似しているが、前者は水溶性、後者は脂溶性薬物を包埋するのに適した構造であり、製造学的には異なるものである。

今回、われわれは、この脂質をキャリアーとする drug delivery system 研究の一環として、長時間作用性の局所麻酔薬を作製すべく、free base の tetracain (Sigma 社製) (以下、TET) のマイクロドロップレット液2種類を調整し、その薬効についての基礎的検討を行った。また、作製した薬液の平均粒子径の測定、安定化試験も合わせて行った。

対象および方法

free base の TET、大豆油、YPL、グリセリンを **Table 1** に示す組成表に従って秤取し、全量が 10 ml になるように蒸留水を加えて軽く懸濁させた。TET を liposome 内に包埋したものを Liposome TET, lipid microsphere 内に包埋したものを Lipo TET として示す。

これを水浴中で超音波装置 (Branson Sonic Power 社製 Cell Disruptor 350) により 30 分間処理し、マイクロドロップレット液を作製した。その後、0.1 N

Fig. 1 Preparation of microdroplet formulations of tetracain.

C_M : Concentration of tetracain in microdroplet formulation
 C_F : Concentration of tetracain in filtrate

Fig. 2 Method for measurement of entrapping efficiency by ultrafiltration. **Fig. 3** Method for evaluation of anesthetic effect by electric stimulation.

HCl で pH を 7.4 に調整し、 $0.8\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過した後にゲル濾過法 (Pharmacia 社製 PD-10) により分画したものを試験用検体とした (Fig. 1).

調整した製剤について、 80°C 、8 時間までの加速試験を行い、定量値、残存率、トラップ率、平均粒子径の変化を確認し、その安定性についての検討を行った。なお、TET の定量値は液体クロマトグラフ法 (島津製作所製 LC-5A, SPD-2A, CTO-2A, C-R2A, Waters 社製 WISP-710B) によって測定した。トラップ率は限外濾過法 (Amicon 社製 MPS-3) によって測定し、Fig. 2 に示す式により計算した。また、平均粒子径は動的光散乱法 (Malvern 社製 Auto-sizer II c) により測定した。

これら薬液 $0.4\ \text{ml}$ を Wistar 系雄ラット (体重約 $270\ \text{g}$) の尾の先端から $5\ \text{cm}$ の部位に皮下注射した。その後、注射部位から $2.5\ \text{cm}$ 間隔で $12.5\ \text{cm}$ までの部位を $150\ \text{mM}$ NaCl で湿らせてから電気刺激装置 (日本光電社製 SEN-3201) による刺激を行った。なお、刺激は皮下注射後 180 分までの各々の時点で、ラットが反応を示すまで電圧を徐々に上げ、各々 1.5 秒間の負荷を行った (Fig. 3)。

negative control には 2.21 % グリセリン溶液 (pH 7.4), positive control には 0.5 % 塩酸 TET 液を用いた。

結 果

Fig. 4 に、それぞれの平均粒子径、粘度分布をレーザー光を用いて測定した結果を示す。Liposome TET の平均粒子径は $78.2\ \text{nm}$, Lipo TET は $143.4\ \text{nm}$ であり、両者の粘度分布は共に symmetrical であった。

安定性試験の結果を Table 2 に示す。定量値はそれぞれ $6.670\ \text{mg/ml}$, $6.127\ \text{mg/ml}$ であり、安定性を示す加熱後の残存率は 8 時間後にも変化はみられなかった。トラップ率は 80°C 、8 時間の加熱によっても変動はみられず、それぞれ 75.7 %, 83.8 % と高値であった。平均粒子径にも強い変化はみられなかった。

Table 2 Stability of liposome- and lipo-tetracaine

	heating* (hr)	TET (mg/ml)	remaining TET (%)	entrapment (%)	mean diameter (nm)
liposome-TET	0	6.670	100	76.2	78.2
	2	6.593	98.9	77.2	81.9
	4	6.379	95.6	77.3	79.7
	8	5.809	87.1	75.7	76.0
lipo-TET	0	6.127	100	84.6	143.4
	2	5.948	97.1	84.2	177.7
	4	5.609	91.5	83.1	185.4
	8	5.502	89.8	83.8	193.8

* heating at 80°C

Fig. 5 Anesthetic effect after injection of tetracain solution.
Responsibility to electric stimulus at various distances from injection point.

Fig. 6 Anesthetic effect after injection of liposome-tetracain.
Responsibility to electric stimulus at various distances from injection point.

Fig. 7 Anesthetic effect after injection of lipo-tetracain.
Responsibility to electric stimulus at various distances from injection point.

Fig. 8 Anesthetic effect after injection of tetracain formulations.
Responsibility to electric stimulus at 5 cm from injection point.

Fig. 5 に positive control として用いた 0.5 % 塩酸 TET 液での電気刺激試験の結果を示す。横軸は投与後の時間経過、縦軸はラットが反応を示した時点での電圧であり、それぞれの刺激部位での経時変化をプロットしている。

Fig. 6 に Liposome TET での結果を示す。0.5 % 塩酸 TET 液に比して、鎮痛効果が増強するものの、効果の消失の早いことが確認された。

同じく Lipo TET では、鎮痛効果は増強するもの

の、皮下注射後約 30 分間で効果の消失がみられた (Fig. 7)。

注射部位から 5 cm の部位での結果をまとめて Fig. 8 に示す。いずれのマイクロドロプレット液でも、0.5 % 塩酸 TET 液に比して、鎮痛効果が増強することが確認された。また、この部位では、Liposome TET でわずかながら効果の延長がみられ、注射部位からの拡散が小さく、滞留性の良いことが示唆された。

考 察

リン脂質は水に分散させると liposome と呼ばれる閉鎖性の小胞体を形成すること、また、大豆油脂乳剤も脂溶性薬物を包埋できることから、種々の薬物のキャリアーとしての応用が広く研究されている。Fig. 9 に liposome と脂肪乳剤である lipid microsphere の模式図を示す。liposome の外層はリン脂質の二重膜で構成され、内層には水分を保持できる構造となっていることから、脂溶性、水溶性の薬物を同時に包埋することができる。なお、Liposome TET はこの外層に包埋されている。一方、lipid microsphere の外層は一相のリン脂質膜であり、内部に大豆油を含んでいることから、脂溶性の薬物のみを包埋する。Lipo TET はリン脂質膜と大豆油に分散して包埋されている¹⁾⁶⁾。

このマイクロドロプレット液の局所麻酔への応用に関しては、1985 年、Haynes ら³⁾ がメトキシフルレンのマイクロドロプレット液を作製したと報告している。結果、一定の効果が 20 時間持続し、局所性が高く、組織毒性がなく、かつ、可逆的であるとしている。

この報告を受けて、われわれは、長時間作用性の局所麻酔薬を作製すべく、今回の TET に先立って藤沢アストラ社製 QX572、塩酸メピバカイン、ベンゾカインさらにはメトキシフルレン、トリクロルエチレンのマイクロドロプレット液の調整を試みた経験がある。結果、QX572、塩酸メピバカインは YPL 単独でマイクロドロプレット液を調整できたが、ベンゾカイン、メトキシフルレン、トリクロルエチレンは YPL 単独では調整は不可能であり、大豆油を添加した系により調整し得た。これら YPL 単独で調整できなかった 3 つの薬液については、使用したレシチンに問題があるのではと考え、Haynes ら³⁾ が使用したとする Sigma 社製レシチン (p-8640) を用いたが調整は不可能であった。また、今回と同様の方法により各々の薬液の定量値を測定したが、塩酸メピバカイン、ベンゾカインの定量値は調整値と一致したが、QX572 の定量値は調整値の約 80 %、同

Fig. 9 Schematic illustration for two types of microdroplets.

じくメトキシフルレンは 45～57 %、トリクロルエチレンは 28～67 % とそれぞれ大きく下回った。さらには、加熱試験により安定性についての検討を行ったが、定量値には大きな変化はみられなかったものの、ベンゾカイン、メトキシフルレン、トリクロルエチレンの平均粒子径は 2 倍以上の増加を示した。また、限外濾過によるトラップ率の検討ではベンゾカイン、メトキシフルレン、トリクロルエチレンはそれぞれ 86～99 %、92～100 %、100 % と高いトラップ率を示したが、一方、QX572 は約 20 %、塩酸メピバカインは 10 % 以下のトラップ率であり、ほとんどが内部に存在せず、水層に溶解していることを確認した。

以上の経緯により、今回、われわれは TET のマイクロドロプレット液 2 種類を調整し、その薬効についての基礎的検討を行った。結果、前述の 5 つの薬液との比較において、TET の安定性は満足のいくものであった。また、マイクロドロプレット化により鎮痛効果が増強することを確認したが、これは局所での神経膜への移行性、または、親和性の増強によるものと推察された。しかし、当初予想したリン脂質膜からの徐放効果による作用の延長は十分なものではなかった。

今後、さらに他の局所麻酔薬によるマイクロドロプレット液の調整を試みる予定である。

本稿の要旨は、第 17 回日本疼痛学会 (1995、福岡) において発表した。

文 献

- 1) Alpar, O., Liposomes as drug carriers, The Pharmaceutical Journal, Aug. **26**, (1989) 254-255.
- 2) Gregoriadis, G. and Neerunjun, E. D., Treatment of tumour bearing mice with liposome-entrapped actinomycin D prolongs their survival, Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, **10** (1975) 351-362.
- 3) Haynes, D. H. and Kirkpatrick, A. F., Ultralong-duration local anesthesia produced by injection of lecithin-coated methoxyflurane microdroplets, Anesthesiology, **63** (1985) 490-499.
- 4) Kramer, P. A. and Burnstein T., Phagocytosis of microspheres containing an anti-cancer agent by tumor cells in vitro, Life Sciences, **19** (1976) 515-519.
- 5) Lopez-Berestein, G., Liposomes as carriers of antimicrobial agents, Antimicrob. Agents Chemother., **31** (1987) 675-678.
- 6) Ostro, M. J. and Cullis, P. R., Use of liposomes as injectable-drug delivery systems, American Journal of Hospital Pharmacy, **46** (1989) 1576-1587.

Address for correspondence : Masahiro Morimoto, M.D.,
Department of Anesthesiology, School of Medicine,
Kinki University, 377-2 Onohigashi, Osakasayama 589,
Japan.
Tel : 0723-66-0221