薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (8) 397-409 (1991)

酢酸リュープロレリン徐放性注射剤

戸口 始, 小川泰亮, 岡田弘晃,* 山本眞樹

武田薬品工業, 研究開発本部, 製剤研究所, 〒532 大阪市淀川区十三本町 2-17-85

Once-a-Month Injectable Microcapsules of Leuporelin Acetate

Hajime TOGUCHI, Yasuaki OGAWA, Hiroaki OKADA,*
and Masaki YAMAMOTO

Pharmaceutics Research Laboratories, Research and Development
Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.,
Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

Leuporelin (leuprolide, D-Leu⁶-(des-Gly¹⁰-NH₂)-LH-RH ethylamide) acetate is a super-active agonist of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). We developed once-a-month injectable microcapsules of this agonist by our novel in-water drying method. This depot formulation can release the drug at an apparent zero-order rate over one month with bioerosion of copoly (lactic/glycolic acid) utilized as a wall material of the polycore microcapsules. A dramatic prolonged depression of pituitary-gonadal axis, chemical castration, was achieved by the once-a-month injection in experimental animals; it expects a reliable efficacy for treating hormone-dependent prostatic, breast cancers and endometriosis. Studies on the dosage design of this new delivery system of leuporelin are summarized.

Keywords—leuporelin (leuprolide); injectable microcapsules; one-month release; copoly (lactic/glycolic acid); chemical castration; endometriosis; dosage design

1. はじめに

本製剤は, 1 回の注射で投与部位から 1 カ月間以上にわたって薬物を連続的に放出し, 前立腺癌, 子宮内膜症, 子宮筋腫などのホルモン依存性の疾病の治療に有効な, 新しい DDS (drug delivery system) である.¹⁻⁷⁾ 本剤は, 生体内分解性ポリマーである乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) を壁化合物とした平均粒子径, 約 20 μm のマイクロカプセル (mcp., 多核マイクロカプセル) 型注射剤で, 通常の懸濁剤と同様に 22—23 ゲージの細い注射針を用い容易に筋肉内あるいは皮下に投与できる (Fig. 1).⁸⁾ 薬物は PLGA が体内で加水分解される速度に従って徐放され, 放出制御した後のポリマーは投与部位から自然に消滅するので取り除く必要がない. 前立腺癌患者に対する, この mcp. の 1 回投与量は約 100 mg で, わずか 7.5 mg の薬物を含有する. すでに市販している水溶液注射剤では, 長期にわたって患者自身による毎日の皮下投与が余儀なくされていたが, 本製剤によって頻回注射の苦痛から患者を解放し, 投薬のコンプライアンスを一段と高めることができた. また, 薬物が長期間連続的に放出されることによって, 常に標的臓器が刺激され, より確実な down regulation による作用の増強が得られ, 投与量が水溶液注射剤の 1/4—1/8 になった.

酢酸リュープロレリン (酢酸リュープロライド, D-Leu⁶-(des-Gly¹⁰-NH₂)-LH-RH ethylamide acetate) は, 当社の藤野ら⁹⁾ によって世界に先駆けて合成された新しい高活性黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) アゴニストで, LH-RH の 100 倍近い活性を有する (Fig. 2). 本来, この化合物は脳の下垂体に作用して, 黄体形成ホルモン (LH), 卵胞刺激ホルモン (FSH) を放出させ, その結果, 精巣や卵巣に作用して性ステロイドの生合成を賦活し分泌を増大させる (Fig. 3). しかし, 高投与量の頻回投与を行うと, 下垂体の LH-RH リセプターの減少 (down regulation) を引き起こし, 逆に性ステロイドの生合成を抑制して生殖器を萎縮させる拮抗薬様作用がもたらされる. この下垂体を介した高次の性腺系の抑制は外科的去勢に相当し, いわゆる化学的去勢 (chemical

本総説は, 平成 3 年度日本薬学会技術賞の受賞業績を中心に記述したものである.

Fig. 1. Scanning Electron Micrographs of Leuporelin PLGA Microcapsules⁸⁾

castration) を引き起こすことができる。近年、この作用を利用して同様の高活性 LH-RH アゴニストにより、ホルモン依存性の癌（前立腺癌、^{10,11)} 乳癌、^{12,13)} 子宮内膜症、^{14,15)} 子宮筋腫^{16,17)}あるいは小児の中枢性思春期早発症¹⁸⁾などの疾患を外科手術することなく治療できるようになった (Fig. 3)。

一方、これらの治療効果を発現させ維持するには長期間の投与が必要であるが、これらの化合物は9—10個のアミノ酸からなる水溶性の高いペプチドで、粘膜透過性が低く、体内からの消失も速やかで、多くの場合、長期の頻回注射が余儀なくされる。そ

こで、我々は当初からより簡便で確実な製剤化を目指し検討を行ってきた。その中で、まず苦痛の少ない自己投与製剤として粘膜投与製剤を検討した。¹⁹⁻²⁷⁾ 当初は乳癌治療を目的としていたこともあって、比較的吸収が良好であった腔 (Fig. 4)、²⁰⁾ 鼻²⁷⁾について詳細に検討を進め、興味ある吸収促進剤を見出し、その可能性を示すことができた。しかし、初期臨床試験の結果では、いずれも動物で得た程の良好な吸収性を得ることができず、その上、生理的要因に基づく吸収のバラツキなどもあり実用化に至らなかった。ただ、この粘膜投与製剤の研究を通じて、薬物の血中濃度を持続させ、間断無くリセプターを刺激することが、より強い拮抗薬様作用につながることを見出した。²⁴⁾ また、溶液注射剤で行った乳癌の臨床試験では、当初、期待した程の良好な治療率を得ることができず、よりホルモン依存性の高い (70—80%) 前立腺癌に照準を合わせるようになった。

前立腺癌は欧米で多く、米国では年間8万人の新しい患者が発生しており、肺癌に次ぐ多い癌死を示している。また、癌の進行はそれ程速くないが、発見時にはすでに多くが骨に転移しているやっかいな癌でもある。本剤に

LH-RH

leuporelin / leuprolide
(leuporelin acetate: m.w.=1269.47)

Fig. 2. Amino Acid Sequences of LH-RH and Leuporelin Acetate

Fig. 3. Schema of Pharmacological Effects and Clinical Application of Leuporelin Acetate

Fig. 4. Ovulation-Inducing Activity of Leuporelin after i.v. (□), s.c. (■), Oral (△), Rectal (◇), Nasal (☆) and Vaginal (○, without; ●, with 10% Citric Acid) Administration to Diestrous Female Rats²⁰⁾

よる治療の大きな特徴として、原発癌がホルモン依存性であれば転移した癌にも十分有効であり、外科的去勢による精神的、肉体的苦痛がなく同等の効果が得られることが挙げられる。また、現行のエストロゲン療法では心筋梗塞、血栓症などの重篤な副作用が危惧されるが本療法では全くその心配はない。²⁸⁾

そこで、我々の製剤化研究も大きく方向を転換し、投与回数を大幅に減少し、より確実な治療効果を得るため、長期間徐放性注射剤の開発研究に着手した。その結果、生体内分解性ポリマーであるポリ乳酸・グリコール酸を用い、独自の新しい水中乾燥法を確立して、1 カ月間放出型マイクロカプセル注射剤として実用化することに成功した。²⁹⁻³²⁾ なお、ちょうど同じ頃、ICI 社、³³⁾ Southern Research 社、^{34,35)} Syntex 社^{36,37)} が同様の LH-RH 誘導体の PLGA を用いた埋め込み剤あるいは相分離法を用いたマイクロカプセル注射剤の開発に取り組んでいた。その中で、当社の本製剤が 1989 年 1 月、米国で最初に他社に先駆け製造許可を受けることができた。それには、投与の容易さ(局所麻酔が不要、細い注射針の使用)、より連続的な薬物放出性、少ない残存溶媒、徹底した無菌環境・無菌操作による放射線滅菌の回避などの多くの点での優位性を指摘することができる。

本総説では、この徐放性注射剤の開発研究の経緯について概説する。

2. 生体内分解性ポリマー

長期徐放性注射剤の開発にあたり、水に難溶性のポリマーを壁化合物とした薬物のマイクロカプセルによる放出制御を検討した。ポリマーとしては薬物放出後、基剤がいつまでも投与部位に残存しないよう生体内分解性のものを用いることにした。そこで、すでに手術用縫合糸として長年の使用実績があるポリ乳酸 (PLA) あるいは PLGA (Fig. 5, 本製剤に使用している PLGA は DL-乳酸とグリコール酸のランダム共重合体) に着目し、十数種のこれらポリマーを合成して、ラット皮下に埋め込み生体内分解性を検討した。³⁸⁾ これらのポリマーは生体親

Fig. 5. Copoly (Lactic/Glycolic Acid) (PLGA)

Fig. 7. Correlation between Biodegradation and Molecular Weight of PLA⁸⁸⁾ (Mean±S.E., n=3) Fig. 6. Biodegradation of PLA and PLGA after s.c. Implantation in a Square Plate to Rats⁸⁸⁾ (n=3) Fig. 8. Correlation between Biodegradation and Copolymer Ratio of PLGA⁸⁸⁾ (Mean±S.E., n=3)

和性に優れ,³⁹⁾ 生体内で加水分解され生体内物質の乳酸, グリコール酸, 炭酸ガス及び水として排泄され, 安全性は極めて高いとされている。

生体内分解性の評価に用いた低分子量のポリマーの合成には, Nevin ら⁴⁰⁾ の強アニオン性イオン交換樹脂を触媒としたモノマー (DL-乳酸, グリコール酸) からの減圧脱水重合法を, 高分子量のポリマーについては, ジエチル亜鉛を触媒とし, 2 量体 (DL-ラクタイド) から合成する Woodland ら⁴¹⁾ の開環重合法によった。ポリマーは核磁気共鳴スペクトル (NMR) で乳酸/グリコール酸重合比を, gel permeation chromatography (GPC) によって分子量を測定した。ついで, これらのポリマーを融解圧縮法により厚さ 1 mm の平板とし, 10×10 mm に切断してラット皮下に埋め込み, 経時的に摘出して, その重量変化を測定した。代表例を Fig. 6 に示すが, 初期に重量変化のないラグタイムが見られ, その後 S 字曲線に従って重量が減少した。この重量の変化する部分を 1 次速度に近似して重量 100% との交点の時間をラグタイムとし, その傾きから消失速度を求め半減期を算出した。ポリマーの消失速度は分子量が大きくなる程, ラグタイムと半減期が比例して長くなり (Fig. 7), PLGA では, さらにグリコール酸の共重合比が 50% まで高くなる程, 分解・消失が速やかになった (Fig. 8)。

ポリマーの体内消失パターンは以下のように推定される。⁷⁾ すなわち, 体内投与後, まず水分子がポリマー内に速やかに浸透しポリマーを水和し膨潤させて加水分解を全体で進行させ分子量が漸次低下する。その後, 水溶性のオリゴマーが生じた時点で, その溶出に基づくポリマーの重量低下が開始する。これまでの期間が上述のラグタイムに相当する。その後, 加水分解の速度に伴ってほぼ 1 次速度で重量が低下していった。ところで, 1 カ月間放出型製剤の基剤としては, 1-2 カ月以内に投与部位から消失することが望ましい。Fig. 6 に示す PLGA (77/23)-11900 (乳酸/グリコール酸重合モル比-重量平均分子量), PLGA (89/11)-13600 のようなラグタイムが 1-2 週, 半減期が約 7 日程の比較的低分子量のものが目的になっていることが示唆された。すなわち, PLA

であれば数千, PLGA であれば 90/10 から 50/50 の重合比で, 分子量が1万数千のポリマーが適当である。ただ, グリコール酸の重合比率が 50% 以上になると有機溶媒への溶解性が著しく低下し, 後記の水中乾燥法では調製が困難であること, さらに重合比率によって分解速度の変化が小さい (Fig. 8 で曲線の傾きがなだらかな部分) などの点を考慮して PLGA (75/25) が最適であると結論した。

また, 原料ポリマーについては, その後, 種々のポリマーを用いた mcp. の放出性評価の過程で, 水可溶性オリゴマーの含有量が多いとポリマーの安定性が悪くなり, 初期放出が増大する, いわゆる, トンネル効果が生じ, これを抑えるため, このオリゴマーをできるだけ除去し, 分子量分布を制御する必要があることが判明した。⁴²⁾ その後, 製剤化の見通しが得られた時点で, 和光純薬と共同で縮合触媒の残存しない合成方法を開発し, ポリマーの大量生産が可能になった。⁴³⁾

3. マイクロカプセルの調製

マイクロカプセル化の方法としてはすでに多くの方法が知られている。⁴⁴⁾ その中で, 無菌製剤であるため, できるだけ操作が簡単で注射用の原料が得易いこと, 残存溶媒の観点から使用する有機溶剤は数が少なく, 沸点が低いことが必要で, 我々は最初から水中乾燥法を選択し検討した。ただ, 本薬物のように水に極めて溶け易い化合物を水中で調製することはかなり困難であった。しかし, 種々検討の結果, W/O/W エマルジョン (ems.) を経た水中乾燥法によって高い封入率で, よく整った mcp. を得ることに成功した。^{30-32, 45)}

調製法の概略を Fig. 9 に示す。まず薬物をゼラチン水溶液に溶解し (W_1), ポリマーのジクロロメタン溶液 (O) に加えて W_1/O ems. とする。これをポリビニールアルコール (PVA) 水溶液 (W_2) 中に分散し $W_1/O/W_2$ ems. とする。これを攪拌しながら3時間程, 脱溶媒し W_1/O 相を固化する。まだ多くの有機溶媒を含むこの mcp. を $74\ \mu\text{m}$ のフルイを通して粗大粒子を除去した後, 遠心分離によって分取し, 水洗した後, 凍結乾燥して充分脱溶媒する。本法では沸点の低いジクロロメタンしか使用しておらず, プログラムされた加温乾燥行程を経て, 残存溶媒は USP に起案されたバルク中残存基準の 100 ppm を大幅に下回るまで低減できた。

この調製法を得るにあたっては, まず安定な W/O/W ems. を作ることが必要である。そこで, よく知られている水相, 油相にそれぞれ異なる HLB の界面活性剤を配合する方法をまず検討したが, うまく mcp. を得ることができなかった。一方, この薬物はカチオン性ペプチドであり界面活性作用を有し, PLA, PLGA も長いアルキル鎖の端に極性基であるカルボキシル基を有した一種の界面活性剤で, 極性が比較的高いジクロロメタンに溶解した場合, 他の界面活性剤を添加しなくても両者は充分安定な W/O ems. を形成することを見出した。さらに, 外水相中に保護コロイド剤として PVA を添加したが, この PVA はせん断された油滴の合一を防止し, mcp. の水濡れを良くして凝集を防止し, 安定な W/O/W ems. を形成し, よく整球された mcp. を得るのに極めて重要な役割を果たしている。

しかし, 本薬物のように水に極めて溶け易い化合物の場合, 安定な W/O/W ems. が調製できても水中乾燥の

Fig. 9. Preparation Procedure of Leuporelin Microcapsules Using in-Water Drying Method⁵⁾

TABLE I. Trap Ratio of Leuporelin Acetate in the Microcapsules Prepared with the Different Formula^{8,45)}

Polymer	Inner water phase (W ₁)			Oil phase (O)		Outer water phase (W ₂)	Trap ratio (%)
	Drug (mg)	Gelatin (mg)	Water (ml)	Polymer (g)	CH ₂ Cl ₂ (ml)	PVA ^{a)} soln. (ml)	
PLA-50000	200	0	2.5	2	10	100	6.7
PLA-50000	200	0	2.5	2	10	100	5.5
PLA-73000	200	500	2.5	2	10	100	70.4
PLA-50000	200	500	2.5	2	10	100	70.7
PLA-50000	200	500	2.5	2	10	100	71.5
PLA-15000	200	500	2.5	2	10	100	54.8
PLA-6800	200	500	2.5	2	10	100	55.8
PLGA (78/22)-10000	200	500	2.5	2	10	100	58.3
PLA-22500	400	400	2	4	5	200	57.8
PLA-22500	400	200	1	4	7.5	400	70.0
PLA-22500	400	100	0.5	4	10	400	61.8
PLA-22500	400	100	0.5	4	20	400	23.6
PLA-22500	400	100	0.5	4	5	400	111.0
PLGA (76/24)-13900	450	80	0.5	4	5	1000	99.7
PLGA (77/23)-12100	450	80	0.5	4	5	1000	107.7
PLGA (76/24)-14100	450	80	0.5	4	5	1000	95.7
PLGA (75/25)-14400	500	80	0.5	4	5	1250	95.9
PLGA (75/25)-14400	500	80	0.5	4	5	1250	94.8
PLGA (75/25)-14400	500	80	0.5	4	5	1250	95.9

a) Polyvinyl alcohol.

過程で薬物が外水相に漏出しがちであり封入率の低下につながる。そこで、その解決法として外水相を薬物の飽和溶液にする方法⁴⁶⁾が行われているが、本薬物の溶解度は極めて高くこの方法は採用できない。そこで、内水相の粘度上昇による薬物拡散速度の低下を意図し、内水相にゼラチンを添加して W/O ems. の温度を低下させ W/O/W ems. として mcp. を調製し、6—7% であった封入率を 70% までに増加させることができた (Table I 上段)。³⁰⁾ この封入率の上昇は、温度を低下させることによる薬物とポリマーの相互作用の促進、それに伴う安定な W₁/O ems. の形成及び薬物コアの周りにミセル様のポリマーの再配列が生じポリマー相の強固な疎水性障壁が形成されることによると推測できる。この薬物とポリマーのイオン性相互作用は、薬物の勝手な拡散放出を抑制し、初期バーストの抑制とポリマーの分解に伴った薬物放出のメカニズムにも大きな役割を演じていることが、その後の検討で明らかになってきた (未発表)。

さらに、エマルジョン組成を検討し、内水相及び油相容積の減少などにより W/O ems. の粘度を上昇させ、より高い封入率を得ることができた (Table I 中段)。³²⁾ その後、さらに詳細に各行程のスケールアップを検討し、生産装置の工夫を行い、Table I 下段に示す処方、PLGA (75/25)-14000 を用い、常に 95% 以上の封入率が得られるようになった。

ただし、この W/O ems. 粘度をあまり高くし過ぎると (8000 cp 以上)、W/O/W ems. とする時のせん

Fig. 10. Scanning Electron Micrograph of Leuporelin Microcapsules Produced at the Hyperviscosity of the W₁/O Emulsion⁷⁾

断力が十分に働かず、Fig. 10 のようにヒモ状の mcp. が形成される。

4. 薬物放出性

合成した種々のポリマーを用いて mcp. を調製し薬物放出性を評価した。In vitro 放出試験は、mcp. を pH 7.0, 0.02% Tween-80 を含む 1/30 M リン酸緩衝液に 37°C で分散し、経時的にろ取して残存する薬物量を測定し放出率を推定した。測定には mcp. をジクロロメタン/pH 6.0 の上記リン酸緩衝液で抽出し、水相の薬物量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で定量した。In vivo 放出性は、mcp. をラット皮下あるいは筋肉内に投与し、経時的に周囲に生じた薄い肉芽組織と共に摘出し、上記抽出緩衝液中でホモジナイズした後、同様に抽出して定量を行った。なお、このペプチドは化学的には極めて安定で、最も安定な pH は約 4 である。したがって、mcp. 内の微小環境の pH は分解して生じた脂肪酸のオリゴマーによっておそらく酸性であろうと考えられるが、その中で安定であったことは長期徐放性製剤の薬物としては大変好都合であった。

Fig. 11 に in vitro, in vivo における薬物放出性を示す。³⁸⁾ 両者はよく対応しており、ポリマーの分解速度に応じた放出が見られた。分解が遅い PLA-22000, PLA-12000, PLGA (90/10)-21000 では 4 週後もわずかの放出であった。一方、PLA-6000, PLGA (75/25)-14500 では 4 週間にわたって徐々に薬物が放出され、後者では約 80% が放出されており、この実験で始めて放出制御の可能性が示唆された。なお、これらの放出性評価において in vivo で少し速い傾向にあるものの、両者は比較的良好に一致しており、mcp. からの薬物の放出がポリマーの酵素分解ではなく、主に水による加水分解によって制御されていることが示された。このことは投与部位、動物種による差が少ないことを意味し好都合である。

分解の遅いポリマーの場合、ラグタイムによる薬物放出の停止期間が見られるが、これをなくす目的で、ポリマーにモノオレイン酸グリセリドなどの界面活性剤や親水性化合物などを添加し、細孔水路を形成させたが、初期バーストが増大するのみで全体の放出を速くすることはできなかった。⁴⁷⁾ 種々検討の結果、結論として、1 カ月間にわたって薬物を連続的に放出するにはポリマーをうまく選択するしかなく、また、逆にそれによって再現性よく放出期間を制御できることが判明した。最終的にポリマーとして PLGA (75/25)-14000 を選択した。

この mcp. のラット皮下投与後の放出性を投与部位の薬物残存率で Fig. 12 に示す。^{48,49)} 初期バーストとして最初の 1 日間の放出量が約 20%, 4 週後に放出されず mcp. 中に残存している量が約 5% で、75% の薬物が 1

カ月間にわたりほぼ 0 次速度で有効に放出された。1 日あたりの平均放出速度は投与量の約 2.5% である。図には回帰直線を同時に示しているが、放出曲線をよく見ると緩やかな S 字曲線を描いている。これは本質的に 1 次速度で進行する初期のマトリックスからの拡散による放出 (初期放出, a) と、擬 1 次のポリマーの分解に伴った放出 (ポリマー分解期放出, b) とがうまく 1—2 週で重なり合い、見かけ

Fig. 11. In Vitro (A) and in Vivo (B) Release of Leuporelin from the PLA and PLGA Microcapsules³⁸⁾

(A) pH 7.0 phosphate buffer at 37°C. (B) Rat, s.c. ●, PLA-22000; ○, PLA-12000; ◇, PLGA(90/10)-21000; ◆, PLA-6000; ☆, PLGA(75/25)-14500.

Fig. 12. In Vivo Release of Leuporelin from the PLGA Microcapsules in Rats after s.c. Injection⁴⁹⁾ (Mean±S.E., n=5, Dose: 0.9 (●), 3 (△), 9 (□) mg)

上0次に近い放出が得られたものと考えられる。ポリマー分解期の放出が、この長期間徐放性製剤の放出期間を主に制御する重要なプロセスである。初期の1週間はポリマーの重量変化のない時期に相当し、その後、分解が進み水可溶性のオリゴマーの生成・溶出に伴って薬物が溶出されてくる。水分子はこのポリマー中に比較的速やかに浸入し、1—2日でポリマーを水和し mcp. を膨潤させ表面層から薬物を放出させると共に、ポリマーの分解を全体で進行させている。ポリマーの分解は1次速度であるが、後半には膨潤したマトリックス中の薬物の拡散速度が亢進し、薬物の放出がポリマーの消失速度より大きくなり0次に近くなると考えられる。投与部位のポリマーは6週後には痕跡程度にまで消失しているのが確認できた。また、この実験では薬物として0.9—9 mgの mcp. を投与しているが投与量に依存せず、いずれもほぼ同様の放出性を示した。

薬物の封入量は14%までほぼ同様の封入率、放出性を示したが、それを越すと mcp. の空隙率が上昇し初期放出が著明に増大した。これは水溶性薬物の増加によって、低濃度の時は閉鎖されていた内水相の薬物コアが連通し、細孔水路が増加し初期放出が増大するためであることが容易に想像できる。実際の製剤の薬物含有率は初期バーストが抑えられている9—10%に設定している。⁴⁵⁾

粒子の大きさは薬物放出性、分散性、通針性に影響するが、興味ある現象として薬物溶出速度に及ぼす影響がある。フルイによって分級した数 μm から125 μm の4種類の粒子径の mcp. の薬物放出性は、粒子径が小さくなるに従って初期の放出が速くなる傾向を示したが、粒子表面積、すなわち粒子径の2乗に比例する変化ではなく、予想外に小さい影響であった。その原因の1つとして、この mcp. には Fig. 1 の写真に見られるように内部に水が容易に浸入できる多くの細孔があり、薬物が放出可能な実際の表面はこの内部の細孔の表面も寄与していることが考えられる。すなわち、粒子の実際の表面積が最外層の表面だけではなく、この細孔を含めた、かなり大きいものであることを意味している。

実用上の放出性において、入浴、注射部位のもみ刺激の影響による思わぬ放出性の亢進 (dose dumping) を *in vitro*, *in vivo* (ラット) で調べたが、いずれも1カ月間の放出に影響を示さないことが確認できた (未発表)。

5. 薬物の血清中濃度

PLGA (75/25)-14000 を用いて調製した mcp. をラット、イヌの皮下ないし筋肉内に投与し、経時的に血清中薬物濃度を測定した。その結果、Fig. 13 に示すように4週間以上にわたって有効な薬物濃度が維持されていることが確認できた。⁴⁸⁾ また、投与量を1.35—6.75 mg

(100—500 $\mu\text{g/kg/d}$ 相当量) まで変化させラット皮下に投与した場合、投与量に比例した平衡血清中濃度と area under the blood concentration-time

Fig. 13. Serum Levels of Leuporelin Acetate in Rats (A) and Dogs (B) after i.m. (●) and s.c. (○) Injection of the PLGA Microcapsules⁴⁸⁾ (Mean $\pm$ S.E., $n=5$, Dose: 100 $\mu\text{g/kg/d}$, $C_{ss}=k/Cl_{tot}$)

a) $C_{3h}=20.6 \pm 5.6$ (●), 19.4 ± 4.9 (○) ng/ml.

Fig. 14. Serum Levels of Leuporelin Acetate in Rats (■), Dogs (▲), and Humans (●)^{a)} after i.v. Injection⁵⁰⁾ (Mean, $n=5$, Dose: 100 $\mu\text{g/kg}$)

a) Data by Sennello *et al.*⁵¹⁾

curve (AUC) を示した。⁵⁰⁾ さらに、1 カ月おきに 3 回反復投与した場合の血清中濃度及び尿中排泄率には大きな変化はなく、反復投与による薬物の代謝、排泄における変化、蓄積などの非線形の体内動態が生じていないことが示唆された。⁵⁰⁾

酢酸リュープロレリンの生理食塩水溶液をラット及びイヌに静脈内投与し測定した薬物血清中濃度⁵⁰⁾を Sennello らのヒトでの結果⁵¹⁾と合わせて Fig. 14 に示す。薬物の消失速度はラット>イヌ>ヒトの順で、2 コンパートメントモデルにあてはめて求めたラットの半減期は α 相でヒトの 1/3 倍、 β 相で 1/7 倍であった。皮下投与して求めた全身クリアランス (Cl_{tot} =投与量/AUC) は、ラットではヒトの 7.8 倍、イヌでは 2 倍であった。これらのクリアランスと mcp. からの 1 日放出量 (k , 投与量の 2.5%) から求めた平衡血清中濃度 ($C_{ss}=k/Cl_{tot}$) を Fig. 13 に示すが、それぞれ実測値とよく一致している。なお、ラットの 3—4 週で実測値が少し低い値であったが、これは主にラットの急速な体重増加に起因していると考えられる。また、アルゼット (ALZA 社) を用いてラットに薬物を一定速度で注入し、血清テストステロン、副性器重量の抑制を指標にして求めた最小有効濃度は 0.4—1 ng/ml であった。⁵²⁾ そこで、薬理効果に種差がないとして、ヒトの全身クリアランス (2.89 l/d/kg) からこの最小有効濃度を得るためのヒト (体重 70 kg) での 1 カ月の投与量を算出すると、3.2—8.1 mg ($8.1=1 \times 10^{-6} \times 2.89 \times 10^3 \times 30 \times 70 / 0.75$) となり、現在、米国での前立腺癌に対する投与量 7.5 mg にほぼ一致した。

6. 薬理効果

この徐放性製剤をラットに皮下投与して、血清テストステロン、精巣、前立腺及び精のうの重量変化を測定した結果、Fig. 15 に示すように投与量に比例した効果が得られ、100 μ g/kg/d 相当の投与量以上で 4 週間にわたる著明な抑制が得られ、前立腺癌への有効性が示唆された。⁴⁸⁾ また、この製剤をこの投与量でラットに 1 回投与した後、薬物の水溶液を再び投与 (負荷試験) して、LH, FSH, テストステロンの放出性を測定した。^{5,8)} それぞれの血清中濃度の AUC (0—8 時間) の増加を Fig. 16 に示す。いずれのホルモンも 5 週まで AUC の増加がほとんど完全に抑制されており、6 週後においても高度に有意な抑制が得られた。これは mcp. の 1 回投与で、薬物の有効量の放出が 5—6 週間持続していることを示すものである。また、10 週後にはこれらのホルモンの放出性は完全に回復した。一方、この製剤の特徴として、繰り返し投与の場合、Fig. 17 に示すように、ラット、イヌのいずれにおいても、2 回目、3 回目投与時に血清テストステロンがほとんど上昇せず持続した抑制が認められた。^{8,48)} このことは投与 4 週後においても、ほぼ完全に性腺機能が抑制されていることを示しており、投与直後の

Fig. 15. Inhibition of Serum Testosterone and Genital Organs in Rats after s.c. (Open) and i.m. (Solid) Injection of Leuporelin PLGA Microcapsules⁴⁸⁾ (Mean $\pm$ S.E., $n=5$, Dose: $\square$ 1, $\circ$ 10, $\star$ 100 μ g/kg/d, a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$)

Fig. 16. Challenge Test in Rats after s.c. Injection of Leuporelin PLGA Microcapsules⁸⁾ (Mean±S.E., $n=5$, Dose: 100 μg/kg/d (mcp.), 100 μg/kg (soln.), a) $p<0.01$)

婦人病で、約 80% がホルモン依存性であるとされている。自覚症状を示さない人も含めると、30, 40 歳代の女性の 4 人に 1 人の高い割合で発生し、半数の女性に不妊症が見られる。治療の目的で外科的に卵巣摘出を行うと、

Fig. 17. Serum Testosterone in Rats (A) and Dogs (B) after Repeated s.c. Injection of Leuporelin PLGA Microcapsules at the Dose of 100 (Rat) and 50 (Dog) μg/kg/d^{8,48)} (Mean±S.E., $n=5$)

a) $C_{8h}=27.1\pm5.2$ ng/ml.

一過性のテストステロンの上昇 (flare-up) が 2 回目以降の投与では見られず、より確実に強力な薬理効果につながることを示唆している。

次に、Jones ら⁵⁸⁾によって開発されたラットの子宮内膜症モデルを用いて本製剤の有効性を評価した。⁵⁴⁾ 子宮内膜症とは子宮内膜が異所性に増殖する

TABLE II. Effects on Experimental Endometriosis in Rats by 3 Weeks of Treatment of Leuporelin Acetate

Treatment	Dose (μg/kg/d)	n	Grade of response ^{a)}				% of regression ^{b)}	
			I	II	III	IV		
None		5	0	0	1	4	0	
Ovariectomy		5	3	2	0	0	100	d)
Microcapsules	100	13	7	5	0	1	92.3	d)
	10	5	1	1	2	1	40	e)
	1	5	0	1	0	4	20	n.s.
Daily s.c. soln.	100	4	0	4	0	0	100	d)
Daily nasal ^{e)}	100	4	1	1	2	0	50	e)

a) I, explant disappeared; II, explant present but no fluid; III, some fluid in explant; IV, growth approximates that before treatment. b) No. of regressed rats (I and II)/no. of treated rats × 100. Mann-Whitney U test; c) $p<0.05$; d) $p<0.01$; n.s., not significant ($p>0.05$). e) With 5% α-cyclodextrin.

当然のことながら、その後の出産は不可能である。しかし、本製剤による治療は一過性の、化学的去勢であるため、投与を中止すれば再び生殖機能は完全に回復し、出産を希望する若い患者には特に有用と考えられる。

上記のモデルラットに本製剤を投与すると雄性ラットの性腺系の抑制が得られた $100 \mu\text{g/kg/d}$ 相当の投与量で卵巣摘出にはほぼ匹敵する良好な治療効果が得られ、3 週後には移植した子宮内膜は顕著に縮小し 80% が消失した (Table II).⁵⁴⁾ この効果は、水溶液での毎日の連続投与よりも強く、吸収促進剤を添加して行った鼻粘膜投与より 10 倍以上の高い効果であった。この時の LH, FSH, エストラジオールの血清中濃度も、4 週間以上にわたって顕著に抑制されていた。なお、ラットにおける性周期は投与 8 週以降に正常に回復しているのが確認できた。

以上、PLGA (75/25)-14000 を用いた酢酸リユープロレリンの mcp. が、1 回の投与で 4 週間以上にわたり薬物を連続的に放出し、持続した血清中濃度、薬理効果を与えることを確認することができた。米国における臨床試験の結果、動物実験で設計した通り、ヒトにおいても 1 回の投与で 1 カ月以上にわたる持続した血中濃度が得られ、水溶液注射剤の 1/4 の投与量である 7.5 mg/月で所期の目的通り血清テストステロンを去勢レベル以下に抑制できた (Fig. 18).⁵⁵⁾

7. 工業化検討

工業化検討でもいくつかの新しいチャレンジを行った。⁴⁾ 中でも無菌性の保証では、ポリマーが低融点のため加熱滅菌はできず、また、放射線滅菌では薬物、ポリマー共に分解し、放出性が変化することから最終製品での滅菌を断念した。さらに、放射線照射による化合物の分解は複雑で多くの分解物を生じ、すべての分解物を同定し、毒性試験を実施することは極めて困難である。したがって我々は FDA の Aseptic Processing Guideline⁶⁰⁾ に従い、各工程で幾重もの無菌性の確認を行いながら、全工程を無菌操作により製造する方法を採用した。すなわち、各原料はすべて溶液としてろ過除菌し、工程を class 10 の無菌状態で操作した。製造時にはろ過用フィルターの完全性試験をその都度実施し、反復した行程管理を行った。設備は可能な限り密閉系とし、発塵部は陰圧にして汚染を防止した。さらに、バイアルの洗浄、乾燥、滅菌、粉末の充填、秤量、施栓などは極力ロボット化を進め、コンピュータ制御を取り入れるなど、当社独自の生産システムを開発した。また、製剤の無菌性試験では、mcp. 化の工程で殺菌性の強いジクロルメタンを使用しているため菌が内在することは考え難いが、分散後の試験に加えて、念のために内部の無菌性を評価する方法を検討し実施している。

6. あとがき

生体内分解性ポリマーが DDS の基剤として研究され始めて 20 年以上になるが、製品として世に出たのは LH-RH 誘導体の徐放性製剤が始めてである。優れた DDS 素材とその機能に適した薬物の素晴らしき出会いを感じさせる。我々はこのポリマーの生体適合性に着目し、これを合成し、独自の水中乾燥法で簡単なマイクロカプセルとすることによって、水溶性ペプチドの 1 カ月間の長期にわたる 0 次放出制御製剤を開発することができた。この製剤の開発には 10 年以上を要したが、これによって、この薬物の医学的有用性を一段と高めることができた。また、前立腺癌、⁵⁶⁾ 子宮内膜症⁵⁷⁾のみならず、他のいくつかのホルモン依存性の疾病^{58,59)}の新しい治療法として、その有効性が証明され大いに期待されている。現在、前立腺癌には米国、カナダ、フランスなど 15 カ国で、子宮内膜症には米国、フランス、イタリアなど 7 カ国で適用が許可され、その他数カ国で子宮筋腫、イタリ

Fig. 18. Plasma Leuporelin Acetate (A) and Serum Testosterone (B) in Humans after i.m. Injection of the PLGA Microcapsules⁵⁵⁾ (Mean, Mean $\pm$ S.E., $n=53$)

●, mcp. (7.5 mg); ■, soln. (daily s.c., 30 mg/month);
▲, mcp. (every 4 weeks, 7.5 mg).

アで乳癌への適用が許可されている。なお、この生体内分解性ポリマーを用いた徐放性注射剤の製剤技術は、他のペプチド⁶⁰⁾及び薬物の徐放化技術としてさらに応用可能であると考えられる。

近年、多くの生理活性ペプチド、プロテインを医薬とするための研究が一層活発になっている。しかし、これらの生理活性物質の多くは、生体の巧妙なホメオスタシス（生体恒常性）の複雑なフィードバックによって支配されており、治療効果の発現には、投与の量、時期、場所を制御することが極めて重要である。したがって、粘膜投与製剤、放出制御製剤、特に必要な時のセンサーを備えた放出制御製剤、さらには必要な場所を送る標的指向性製剤など、生体内の多くの巧妙なシステムをまねした、より高度の機能を有する DDS の開発研究に大きな期待が寄せられている。⁶¹⁾ 今回の徐放性製剤の開発ではポリマーの合成から薬理効果まですべてを自らが手がけたが、今後の DDS にはより高度な技術が要求されることが必至である。したがって、医学、生物学、工学、化学、薬学など、多くの分野の英知を集め、産学のより緊密な共同研究が必要であると考えられる。また、すでに多くのベンチャー企業が鎬を削っているように、優れたアイデアの実現にはかなりの高い障壁が有り、相当のエネルギーの集約を覚悟しなければならないと考えられる。

謝辞 最後に、この徐放性注射剤の基本設計及び工業化研究は、他に当研究所の部谷敏郎、猪狩康孝、井上弥生、福田みちる、亀井幸江、富田義直、石塚憲三、浅田賢輔、高田重行、前寺耕一、津川芳彦氏らとの共同研究で行われたものである。また、本剤が世に出るまでには分析、安全性試験、生産、臨床試験、申請など多くの部門の関係者の積極的なご協力を頂いた。中でも、Dr. J. H. Seely, Mr. D. Sundberg, 大林幹彦博士らの TAP Pharm. の方々には、世界に先駆けて行った米国での開発に一方ならぬご尽力を頂いた。また、この研究は美間博之、島本次雄前製剤研究所長及び矢敷孝司、山崎 巖博士らのご指導により開始したものである。さらに、当社の小西新兵衛会長、杉野幸夫前研開本部長、西川正夫、藤野政彦、中山 亮博士及び会社幹部の方々には終始、御指導、御鞭撻を頂いた。稿を終えるに当たり、皆様に深く感謝すると共に心から厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 戸口 始, 治療, **73**, 31 (1991).
- 2) H. Toguchi, *J. Int. Med. Res.*, **18** (suppl. 1), 35 (1990).
- 3) 小川泰亮, “創薬のための分子設計,” 川田 純, 寺田 弘, 藤田稔夫編, 化学増刊 116 号, 化学同人, 1989, p. 223.
- 4) 小川泰亮, 富田義直, *Pharm. Tech. Japan*, **5**, 1121 (1989).
- 5) H. Okada, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, Vol. 16, 1989, p. 12.
- 6) H. Okada, T. Heya, Y. Igari, M. Yamamoto, Y. Ogawa, H. Toguchi, T. Shimamoto, “Current Communications in Molecular Biology: Therapeutic Peptides and Proteins; Formulation, Delivery, and Targeting,” D. Marshak, D. Liu (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989, p. 107.
- 7) 岡田弘晃, 粉体と工業, **22**, 55 (1990).
- 8) H. Okada, T. Heya, Y. Ogawa, H. Toguchi, T. Shimamoto, *Pharm. Res.*, **8**, 584 (1991).
- 9) M. Fujino, T. Fukuda, S. Shinagawa, S. Kobayashi, I. Yamazaki, R. Nakayama, J. H. Seely, W. F. White, R. H. Rippel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 406 (1974).
- 10) T. W. Redding, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6509 (1981).
- 11) N. Faure, F. Labrie, A. Lemay, A. Belanger, Y. Gourdeau, B. Laroche, G. Robert, *Fertil. Steril.*, **37**, 416 (1982).
- 12) E. S. Johnson, J. H. Seely, W. F. White, E. R. DeSombre, *Science*, **194**, 329 (1976).
- 13) E. R. DeSombre, E. S. Johnson, W. F. White, *Cancer Res.*, **36**, 3830 (1976).
- 14) D. R. Meldrum, R. J. Chang, J. Lu, W. Vale, J. Rivier, H. L. Judd, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**, 1081 (1982).
- 15) A. Lemay, G. Quesnel, *Fertil. Steril.*, **38**, 376 (1982).
- 16) M. Filicori, D. A. Hall, J. S. Loughlin, J. Rivier, W. Vale, W. F. Crowley, Jr., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **147**, 726 (1983).
- 17) R. Maheux, C. Guiloteau, A. Lemay, A. Bastide, A. T. A. Fazekas, *Fertil. Steril.*, **42**, 644 (1984).
- 18) W. F. Crowley, Jr., F. Comite, W. Vale, J. Rivier, D. L. Loriaux, G. B. Cutler, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **52**, 370 (1981).
- 19) 岡田弘晃, 武田研究所報, **42**, 150 (1983).

- 20) H. Okada, I. Yamazaki, Y. Ogawa, S. Hirai, T. Yashiki, H. Mima, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1367 (1982).
- 21) H. Okada, I. Yamazaki, T. Yashiki, H. Mima, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 75 (1983).
- 22) H. Okada, T. Yashiki, H. Mima, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 173 (1983).
- 23) H. Okada, Y. Sakura, T. Kawaji, T. Yashiki, H. Mima, *Cancer Res.*, **43**, 1869 (1983).
- 24) H. Okada, I. Yamazaki, Y. Sakura, T. Yashiki, T. Shimamoto, H. Mima, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **6**, 512 (1983).
- 25) H. Okada, I. Yamazaki, T. Yashiki, T. Shimamoto, H. Mima, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 298 (1984).
- 26) H. Okada, "Peptide and Protein Drug Delivery," V. H. L. Lee ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1991, p. 633.
- 27) 平井真一郎, 岡田弘晃, 矢敷孝司, 島本次雄, 日本薬学会第 105 年会要旨集, 金沢, 1985, p. 797.
- 28) The Leuprolide Study Group, *New Engl. J. Med.*, **311**, 1281 (1985).
- 29) 岡田弘晃, 山本眞樹, 小川泰亮, 矢敷孝司, 島本次雄, 日本薬学会第 105 年会要旨集, 金沢, 1985, p. 790.
- 30) 岡田弘晃, 小川泰亮, 矢敷孝司, 公開特許公報, 昭 60-100516 (1985).
- 31) H. Okada, Y. Ogawa, T. Yashiki, U.S. Patent, 4652441 (1987).
- 32) 山本眞樹, 高田重行, 小川泰亮, 公開特許公報, 昭 62-201816 (1987).
- 33) F. G. Hutchinson, 公開特許公報, 昭 57-150609 (1982).
- 34) T. R. Tice, D. R. Cowsar, *Pharm. Technol.*, **8**, 26 (1984).
- 35) T. W. Redding, A. V. Schally, T. R. Tice, W. E. Meyers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 5845 (1984).
- 36) J. S. Kent, D. H. Lewis, L. M. Sanders, 公開特許公報, 昭 57-118512 (1982).
- 37) L. M. Sanders, J. S. Kent, G. I. McRae, B. H. Vickery, T. R. Tice, D. H. Lewis, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1294 (1984).
- 38) Y. Ogawa, H. Okada, M. Yamamoto, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2576 (1988).
- 39) D. E. Cutright, J. D. Beasley, B. Pereg, *Oral Surg.*, **32**, 165 (1971).
- 40) R. S. Nevin, U.S. Patent, 4273920 (1981).
- 41) J. H. Woodland, S. Yalles, D. A. Blake, M. Helrich, F. J. Meyer, *J. Med. Chem.*, **16**, 897 (1973).
- 42) 山本眞樹, 岡田弘晃, 小川泰亮, 宮川 力, 公開特許公報, 昭 62-54760 (1987).
- 43) 田中幹晃, 小川泰亮, 宮川 力, 渡辺俊雄, 公開特許公報, 昭 61-28521 (1986).
- 44) 近藤朝士, "マイクロカプセル," 日刊工業新聞社, 1980.
- 45) Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Okada, T. Yashiki, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1095 (1988).
- 46) R. Bodmeier, J. W. McGinity, *J. Microcapsulation*, **4**, 289 (1987).
- 47) Y. Ogawa, M. Yamamoto, S. Takada, H. Okada, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1502 (1988).
- 48) Y. Ogawa, H. Okada, T. Heya, T. Shimamoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 439 (1989).
- 49) 岡田弘晃, 高分子, **39**, 678 (1990).
- 50) H. Okada, Y. Inoue, T. Heya, H. Ueno, Y. Ogawa, H. Toguchi, *Pharm. Res.*, **8**, 787 (1991).
- 51) L. T. Sennello, R. A. Finley, S.-Y. Chu, C. Jagst, D. Max, D. E. Rollins, K. G. Tolman, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 158 (1986).
- 52) H. Okada, T. Heya, Y. Igari, Y. Ogawa, H. Toguchi, T. Shimamoto, *Int. J. Pharm.*, **54**, 231 (1989).
- 53) R. C. Jones, *Acta Endocrinol.*, **106**, 282 (1984).
- 54) H. Okada, T. Heya, Y. Ogawa, T. Shimamoto, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 744 (1988).
- 55) R. Sharifi, M. Soloway, the Leuprolide Study Group, *J. Urol.*, **143**, 68 (1990).
- 56) FDA: Guideline on Steril Drug Products Produced by Aseptic Processing, June 1987.
- 57) A. M. Dlugi, J. D. Miller, J. Knittle, Lupron Study Group, *Fertil. Steril.*, **54**, 419 (1990).
- 58) A. J. Friedman, B. Benacerraf, D. Harrison-Atlas, B. Gleason, R. L. Barbieri, I. Schiff, *Fertil. Steril.*, **51**, 251 (1989).
- 59) M. Kappy, T. Stuart, A. Perelman, R. Clemons, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **69**, 1087 (1989).
- 60) T. Heya, H. Okada, Y. Tanigawara, Y. Ogawa, H. Toguchi, *Int. J. Pharm.*, **69**, 69 (1991).
- 61) 瀬崎 仁, 薬誌, **109**, 611 (1989).