

アドリアマイシンのリポソーム封入体の 院内製剤化における基礎的検討^{*1}

廣谷芳彦, 前田義美, 山路 昭, 平岡栄一
大阪大学医学部附属病院薬剤部^{*2}

Basic Study for Liposomal Encapsulation of Adriamycin in Hospital^{*1}

YOSHIHIKO HIROTANI, YOSHIMI MAEDA,
AKIRA YAMAJI, EIICHI HIRAOKA

Department of Pharmacy, Osaka University Hospital^{*2}

(Received October 17, 1984)

Liposome-entrapped adriamycin (ADM-Lip) as hospital pharmacy product for injection was investigated for improving therapeutic effects of adriamycin. ADM-Lip was prepared from egg phosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine (molar ratio, 3:3:1), and separated from free adriamycin by dialysis. It was stable in dialysate of 0.01 M phosphate buffer with 0.85% NaCl (pH 7.4) at 37°. ADM-Lip increased the octanol-water partition coefficients to about 30 times as compared with those of the free form. Size of most ADM-Lip particles was less than 0.4 μm and, therefore, ADM-Lip could be prepared as sterile injection by filtration through 0.45 μm membrane filter.

Keywords—Liposome-entrapped adriamycin; hospital pharmacy product; adriamycin; egg phosphatidylcholine; cholesterol; stearylamine; octanol-water partition coefficient; sterile injection

アドリアマイシン (以下, ADM と略す) は anthracycline 系抗生物質で, 臨床的に広く用いられ多くの成人および小児の悪性腫瘍に有用である。¹⁾ しかし, 心毒性など副作用が強い²⁾ため, 適当な製剤学的修飾による副作用の軽減, 腫瘍選択性の増強が望まれている。その方法の一つとして, 脂質二重層をもつ閉鎖小胞であるリポソームの応用が考えられ, 多数の報告がある。³⁻⁷⁾

たとえば, Rahman ら⁸⁾は ADM をリポソームに封入することにより, マウスでの抗腫瘍活性を損うことなく ADM の心への移行を減少させ, その結果心毒性発現を防止する可能性を示唆した。

このような背景を基にし, 将来臨床への応用が期待さ

れるが, ADM のリポソーム封入体は溶液中では安定性は悪く, 必要時病院内で調製後, 直ちに投与することが必須である。そこで今回, ADM のリポソーム封入体を注射剤として院内製剤化することを試み, その基礎的検討を行ったので報告する。

実験の部

1. 試料

ADM の塩酸塩は, ファルミタリアカルロエルバ社製で, 協和醗酵工業株式会社より提供をうけた。また, プレオマイシン塩酸塩は日本化薬株式会社より提供を受けた。L- α -phosphatidylcholine(PC), cholesterol(Chol), stearylamine (SA) は, Sigma 社の製品を用いた。緩衝液調製用の試薬・溶媒は市販特級品を用いた。

2. アドリアマイシン-リポソーム (以下, ADM-Lip と略す) の調製

^{*1} 日本薬学会第 103 年会 (1983年, 東京) で発表。

^{*2} 大阪市福島区福島 1 丁目1-50; 1-50, Fukushima 1-chome, Fukushima-ku, Osaka-shi, 553 Japan

リボソームの調製は、Rahman ら³⁾の方法に準じた。66 μ mol の PC, 66 μ mol の Chol および 22 μ mol の SA を、20ml の共栓つき円沈管中で、5ml の有機溶媒（クロロホルム：エーテル＝1：1，v/v）に溶解後、溶媒を窒素で留去し、ガラス壁に生じた脂質の薄膜に ADM 5 mg を含む 0.01M リン酸塩緩衝生理的食塩水（pH 7.4）（以下、緩衝液と略す）10ml を静かに加え、室温にて Vortex ミキサーで10分間かくはんして懸濁液とした。この懸濁液を窒素ガス還流下、35°C の一定条件のもとで 20 分間超音波処理（Ultra Sonic Cleaner, Yoto, UC・0205, bath type）を行った。懸濁液からの遊離の ADM の除去は透析により行った。すなわち、懸濁液をあらかじめ煮沸して硫黄分を除去したセルロースチューブ（Visking 社製、²⁷/₃₂型）に入れ、500ml の緩衝液を外液として、4°C 下で約 200rpm の速さでかくはんしながら、40 時間以上透析した。その間、外液を 3 回交換した。透析後の内液、すなわちリボソームに封入された ADM を試料とし、その調製した同一日に以下の実験を行った。なお、この方法により調製した ADM-Lip のトラップ率は、平均 16.9%（n=4）であった。また、対照薬物として水溶性の抗ガン剤であるブレオマイシン（以下、BLM と略す）についても ADM と同様の方法でブレオマイシン・リボソーム（以下、BLM-Lip と略す）を調製し、そのトラップ率は 7.6%（n=2）であった。

3. アドリアマイシンの定量

ADM およびリボソームに封入した ADM の定量は、蛍光法⁹⁾により行った。すなわち、水溶液中の ADM の定量法は、試料 2 ml に 0.3N 塩酸含有 50% エタノール溶液 2 ml を加え、日立 204-S 型蛍光分光光度計を用いて、励起波長 470nm、蛍光波長 585nm で ADM のケイ光強度を測定し、ADM を定量した。BLM については UV (290nm) により定量した。リボソームに封入した ADM および BLM の定量は、1% のトリトン X-100 を試料と同量加えた後、煮沸した水の中に 30 分間浸し、水溶液中の ADM および BLM の定量と同様に行った。

4. 透析実験

Meyer ら⁹⁾の透析法に準じて行った。すなわち、試料 5 ml をセルロースチューブに入れ、これを 37°C に保った 100ml の緩衝液の中に入れ、約 300rpm の速さでスターラーでかくはんし一定時間ごとに外液 1 ml を採取、同時に緩衝液 1 ml を外液に加えた。この採取した外液を ADM の定量に用いた。

5. 油水分配率の側定

ADM-Lip 溶液 10ml と 1-オクタノール 10ml を 10 分間振とうした後、2000 rpm、10 分間遠心分離し、1-オク

タノール中の ADM-Lip 溶液と水層中濃度の比から油水分配率を求めた。なお、BLM の油水分配率は、ADM と同様の方法により行い算出した。

6. 粒子径の測定

ADM-Lip の粒子の大きさは、ネガティブ染色による電子顕微鏡写真上のリボソーム粒子（少なくとも 200 個以上）の直径を測定して求めた。電子顕微鏡用試料の調製は次の通りに行った。すなわち、ADM-Lip を緩衝液で適当な濃度に希釈した液を 1 滴、未固定のまま毛細管で放電処理した膜張りメッシュにのせ 1 分後に余分な水分をろ紙片で吸い取る。次に 1% リンタングステン酸染色液（pH 7.0）の 1 滴をパラフィルム上に置き、その滴表面に試料面を下にしてメッシュを浮かべ、1 分後に取り上げて、余分な液を除く。この試料を日本電子透過型電子顕微鏡（JEM-100cx）で検鏡した。

実験結果と考察

1. アドリアマイシンリボソームの in vitro での安定性に関する検討

ADM を封入したリボソームは、投与した後生体内に分布し、体液中で平行に達するまで保持させる必要がある。そこで、セルロース膜を用いた透析法で、体液のモデル溶液である 37°C、pH 7.4 の水溶液中での安定性を調べた結果を Fig.1 に示す。180 分でリボソームに封入していない遊離の ADM は、ほとんど 100% 透過した。しかし、PC・Chol・SA を成分とするリボソームに ADM を封入した ADM-Lip では、180 分での透過率は 1.4% となった。

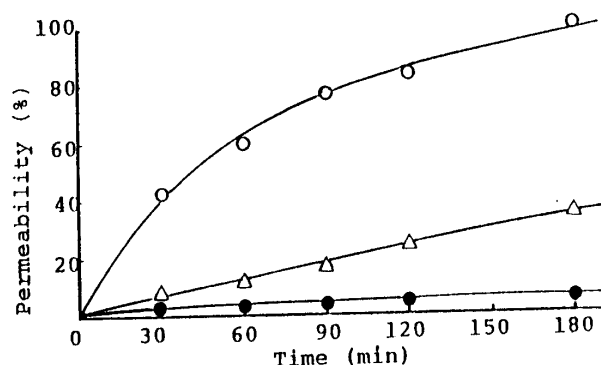


Fig. 1. Effect of Charged Lipid on the Permeability of Adriamycin

Composition of liposome (molar ratio)
 —○—, only adriamycin (no liposome)
 —△—, PC:Chol=1:1
 —●—, PC:Chol:SA=1:1:0.33 (ADM-Lip)

Condition of dialysis: 37°C, the buffer soln.

これらの結果から 37°C, pH 7.4 の体液モデル溶液中の条件下では, ADM はリポソームに保持されており, ADM-Lip は比較的安定と思われる。しかし荷電物質である SA を除いたリポソームでは (トラップ率は 7.3% [n=2] であった), 180 分までの透過率は 34% で, SA を含む ADM-Lip の透過率 1.4% に比べてやや不安定な傾向が認められた。このことにより荷電物質が安定化に関与しているものと思われるので, 以下 SA を含む ADM-Lip を以後の実験に用いた。

2. ADM-Lip の分配率に関する検討

リポソームに封入した ADM の物理化学的性質の一つとして油水分配率を求めた (Table 1)。

ADM のみの分配率は約 1 であったが, ADM-Lip に封入すると見かけの分配率が 38.7 となり高い値を示した。また BLM について同様の実験を行った結果, リポソームに封入した BLM¹⁰⁾ の見かけの分配率は 38.4 となり, ADM-Lip とほぼ同じ値となった。しかしながら BLM 自身は ADM と比べて水溶性の高い物質であるので, BLM のみの分配率は ADM に比較して極端に低くなっている。これらの結果から, リポソームに封入することより見かけの油水分配率が高くなり, ADM の場合, 約 30 倍脂溶性が高まることが確認された。また, この結果, ADM-Lip の脂溶性の増大自体が直接体内動態に影響をおよぼすかどうかは今後の検討が必要であるが, BLM の場合脂溶性を与えることにより血中濃度に持続性が見られる¹¹⁾ ので, ADM も同様の効果が期待される。

Table 1. Octanol-Water Partition Coefficients of Drugs Entrapped in Liposome

	drug (A)	drug entrapped in liposome (B)	(B) (A)
adriamycin (n=6)	1.15±0.45	38.7±8.1	33.7
bleomycin (n=4)	0.003±0.0001	38.4±0.6	12800

3. リポソームの粒子径

ADM-Lip の注射剤の製剤化を行う目的で, 先に述べた方法で調製した ADM-Lip の粒度分布を検討した。

Fig. 2. は, ADM-Lip をネガティブ染色法により調製した試料を透過型電子顕微鏡で撮影したものである。この写真をもとにして粒子径を測定した結果を Table 2 に示す。平均粒子径は 0.2~0.3 μ m で, 0.4 μ m 以下の粒子径をもつ ADM-Lip が大部分であった。したがって, ADM-Lip を注射剤として調製する場合, 懸濁性注射剤となるが, ADM-Lip の粒子径の測定結果より静脈投与

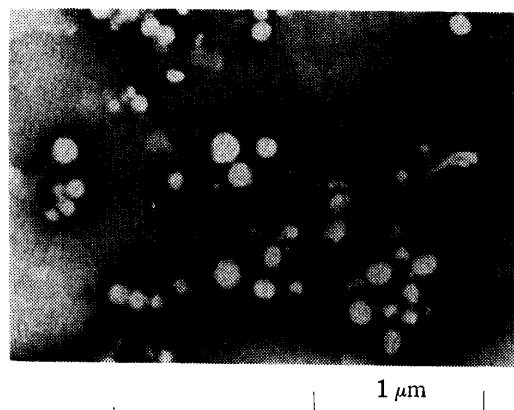


Fig. 2. Negative Stained Electron Micrograph of ADM-Lip

Table 2. Distribution of Particle Size of ADM-Lip Measured by Negative Stained Electron Micrograph

	particle size (μ m)			
	<0.2	0.2~0.3	0.3~0.4	0.4<
number of particles*	65	76	56	32
rate (%)	28.4	33.2	24.5	14.0

*number of total particles=229

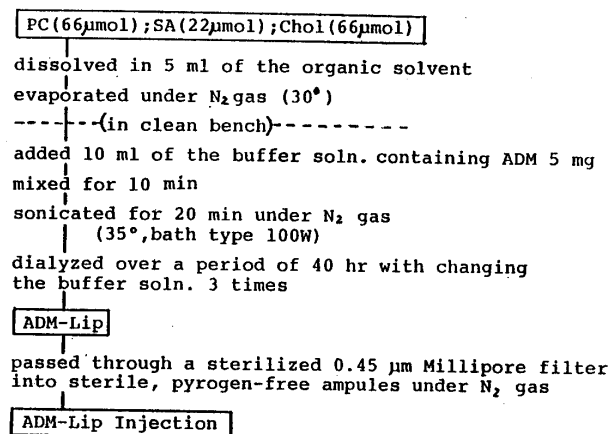


Fig. 3. Preparation of ADM-Lip Injection

が可能と判断できる。

4. 注射剤の院内製剤化

ADM を封入したリポソームを注射剤として製造するのに必要な無菌調製法について Richardson らの方法¹²⁾ に準じて検討した。リポソームは熱に対して不安定なために加熱滅菌ができないので, 滅菌は細菌ろ過法を用いた。0.45 μ m の細菌ろ過用メンブランフィルターを用いると, およそ 80% 通過し比較的損失を少なくろ過除菌が

できた。そこで Fig.3 に示すように、院内製剤として通常行われる無菌操作法によって除菌を行った。すなわち、膜成分を溶解し薄膜形成後の段階からクリーンベンチ内で無菌的に行い、先に述べた方法で調製した。ろ過除菌は、透析により遊離の ADM を取り除いた後に、Millipore社の0.45 μ m ステアリルメンブランフィルターを使用した。密封は窒素還流下で行い、一部無菌試験用に用いた。無菌試験法は、日本薬局方に準じて行ったが、いずれのサンプルにも微生物が認められなかった。これらの結果から、ADM-Lip の院内製剤化が可能であることが確認された。

謝辞 試料を提供していただいた協和醗酵工業株式会社ならびに日本化薬株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) 太田和雄, 加藤武俊, 天羽弘行, 星野章, 村上稔, 杉浦孝彦; 医学のあゆみ, **91**(4), 161 (1974).
- 2) 大熊 攻, 太田和雄: 癌と化学療法, **8** (4), 596 (1981).
- 3) A.Rahman, A. Kessler, N. More, B. Sikic, G.

Rowden, P. Woolley, P. S. Schein: Cancer Research, **40**, 1532 (1980).

- 4) S. Shinozawa, Y. Araki, T. Oda: Acta Med. Okayama (Japan), **35**(6), 395 (1981).
- 5) E. A. Forssen, Z. A. Tökes: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**(3), 1873 (1981).
- 6) T. R. Tritton, S. A. Murphree, A. C. Sartorelli: Biochem. Biophys. Res. Commun., **84**(3), 802 (1978).
- 7) R. J. Parker, K. D. Hartman, S. M. Sieber: Cancer Research, **41**, 1311(1981).
- 8) N. R. Bachur, A. L. Moore, J. G. Bernstein, A. Liu: Cancer Chemother. Rep., Part 1, **54**(2), 89 (1970).
- 9) M. C. Meyer, D. E. Guttman: J. Pharm. Sci., **59**(1), 33 (1970).
- 10) S. Pratima, D. K. Roy, INDIAN J. Exp. Biol., **17**, 952 (1979).
- 11) 藤田浩, 小川カツイ, 秋本英生, 木村禎代二: 鶴見歯学, **2** (1), 13 (1976).
- 12) V. J. Richardson, B. E. Ryman, P. F. Jewkes, M. H. N. Tattersall, E. S. Newlands: Int. J. Nucl. Med. & Biol., **5**, 118 (1978).

劇 胆汁分泌促進剤

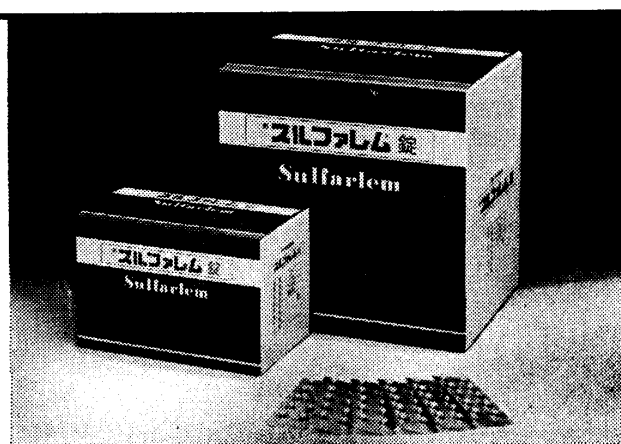
スルファレム錠

アネトールトリチオン 12.5mg/錠 含有

- 〔適 応 症〕** 下記疾患における利胆
胆道（胆管・胆のう）系疾患及び胆汁うっ滞を伴う肝疾患
- 〔用法用量〕** アネトールトリチオンとして通常成人 1回25mgを 1日3回経口投与
年令・症状により適宜増減

- 〔薬理作用〕** (1) 催胆作用
(2) 肝機能賦活作用（血中GSH値上昇 / 色素排泄能促進 / 尿素合成能促進 / 肝コレステロール量調整）

薬理作用の詳細及び使用上の注意については製品添付文書をご参照下さい。



- 〔包 装〕** 1,200錠 6,000錠
(PTP) 10錠×120 10錠×600
◇同一成分製剤にスルファレム丸(12.5mg/丸)があります。
規制区分: 劇 薬

薬価基準収載品

製 造 東菱薬品工業株式会社
東京都千代田区有楽町1-10-1
提 携 ラ テ マ 社 (フランス)

販売元
扶桑薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2丁目5 0 番地