

[Jpn. J. Hosp. Pharm.]  
 一般論文  
 21(4) 295-301 (1995)]

# シクロスポリンの消化管吸収に及ぼすジメチル- $\alpha$ -シクロデキストリンの影響<sup>†1</sup>

畑中久勝<sup>†2</sup>, 駒田富佐夫<sup>†3</sup>, 岩川精吾<sup>†4</sup>, 山上知佐子<sup>†4</sup>, 奥村勝彦<sup>\*†3</sup>

兵庫県立衛生研究所<sup>†2</sup>

神戸大学医学部附属病院薬剤部<sup>†3</sup>

神戸薬科大学<sup>†4</sup>

## Effect of Dimethyl- $\alpha$ -cyclodextrin on the Gastrointestinal Absorption of Cyclosporin<sup>†1</sup>

HISAKATSU HATANAKA<sup>†2</sup>, FUSAO KOMADA<sup>†3</sup>, SEIGO IWAKAWA<sup>†4</sup>,

CHISAKO YAMAGAMI<sup>†</sup> and KATSUHIKO OKUMURA<sup>\*†3</sup>

Hyogo Prefectural Institute of Public Health<sup>†2</sup>

Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Kobe University<sup>†3</sup>

Kobe Pharmaceutical University<sup>†4</sup>

(Received November 24, 1994)  
 (Accepted April 13, 1995)

The aqueous solubility of cyclosporin (CYA) was remarkably increased by the 2,6-di-methyl- $\alpha$ -cyclodextrin (DM- $\alpha$ -CD) complex, forming a higher order complex. Analysis of the phase solubility diagram at 37°C estimated the stoichiometric ratio of the main complex to be 1 : 3 (CYA : DM- $\alpha$ -CD) with a stability constant of 18600M<sup>-1</sup>. Kneading mixtures of CYA with DM- $\alpha$ -CD in various molar ratios (1 : 3 to 1 : 200) were prepared. The effects of DM- $\alpha$ -CD on the gastrointestinal absorption of CYA was then investigated in the rat. The mean absorption time and the mean residence time of CYA was shortened with the increase in the molar ratio of DM- $\alpha$ -CD to CYA. The maximal AUC was obtained after the administration of the 1 : 30 kneading mixture. A further increase in the molar ratio of DM- $\alpha$ -CD showed insignificant changes with regard to the extent of bioavailability. The bioavailability of each mixture was almost the same as or slightly higher than that of Sandimmun®.

**Keywords**—cyclosporin, solubility, dimethyl- $\alpha$ -cyclodextrin, complex, oral bioavailability

## 緒 言

<sup>†1</sup> 本報は日本薬学会第112年会(福岡, 1992年3月)で一部発表。

<sup>†2</sup> 神戸市兵庫区荒田町2-1; 2-1, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe, 652 Japan

<sup>†3</sup> 神戸市中央区楠町7-5; 7-5, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, 650 Japan

<sup>†4</sup> 神戸市東灘区本山北町4-19-1; 4-19-1, Moto-yamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe, 658 Japan

強力な免疫抑制作用を有する環状ポリペプチドであるシクロスポリン(CYA)は、臓器移植が定着しつつある今日、その役割は益々増大している。しかし、CYAの消化管吸収性は、内服後の食事<sup>1)</sup>および患者個々の消化運動性<sup>2)</sup>等によって大きく変動することが知られており、臓器移植患者の社会復帰のためには消化管吸収性のより確実

な製剤開発が必要である。また、最近の使用事例の増加に伴い、現在臨床で用いられている3製剤（経口用，2種；注射用，1種）以外に，治療目的に応じた多様な製剤の開発も望まれている。しかしながら，CYAは極端な脂溶性であるために有効な新規製剤の開発が容易でなく，界面活性剤を配合した経口用の固形製剤<sup>3,4)</sup>および $\alpha$ -シクロデキストリン( $\alpha$ -CD)との複合体化による点眼用の水性液剤<sup>5)</sup>について報告されているにすぎない。

筆者らは先に，複合体化による悪性黒色腫の熱中性子捕捉療法時の標的物質としての有効性が証明されている。難溶性のパラボロノフェニルアラニンの可溶化ならびにバイオアベイラビリティ向上について各種CDを用いて検討した。その結果， $\alpha$ -CD誘導体との複合体化により顕著な溶解性の改善とそれに伴ってバイオアベイラビリティの上昇が認められることを明らかにした<sup>6,7)</sup>。

本報では，CYAを消化管吸収性の確実な新規の経口製剤開発を目的とし，各種CDによる可溶化を試みた。用いたCDごとにCYAの溶解性を評価するとともに，CYAの消化管吸収に及ぼすCD配合比の影響を2,6-di-O-methyl- $\alpha$ -CD(DM- $\alpha$ -CD)との練合体で調べた。

## 実 験 の 部

### 1. 試薬および溶媒

CYA，シクロスポリンD(CYD，内部標準として使用)，Sandimmun内用液および注射液はサンド薬品(株)より， $\alpha$ -CD，およびグルコシル- $\alpha$ -CD(G- $\alpha$ -CD)は塩水港精糖(株)より恵与されたものを使用した。DM- $\alpha$ -CDは和光純薬(株)製を，溶媒類は高速液体クロマトグラフ用を使用した。水は脱イオン蒸留水を再蒸留して用いた。

### 2. 溶解度測定

CYAの一定過剰量を共栓付試験管に入れ，種々の濃度の各CD溶液を添加して密栓し，20°Cおよび37°Cの条件下で溶解平衡に達するまで(20°C，6日間；37°C，10日間)振とうした。この液をあらかじめ各温度に保温しておいたメンブランフィルター(0.2 $\mu$ m)でろ過し，メタノー

ルで希釈後，CYAを以下に示す逆相条件の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。

### 3. 練合体の調製

モル比1:3から1:200までのCYAとDM- $\alpha$ -CDをメノウ乳鉢に取り，水を適量加え，約40分間混練した。ペースト状の練合体は室温で3日間減圧乾燥後，粉碎し，100メッシュの篩を通過した粉末を以下の実験に用いた。

### 4. CYA固体分散試料の調製

CYA:DM- $\alpha$ -CD(1:3)に対応する重量比のCYA(12mg)と溶性デンプン(34mg)を取り，アルコール10mlを加えて混和後，減圧下でアルコールを留去し，粉末のCYA固体分散試料とした。

### 5. 粉末X線回折

理化学電機(株)製Miniflex普及型粉末X線回折装置を使用し，下記の条件で測定した。X線源，Cu-K $\alpha$ 線；フィルター，Niフィルター；管電圧，30kV；管電流，10mA；時定数，1s；走査速度，2.4°(2 $\theta$ )/min；レンジ，120,000または240,000cps。

### 6. 溶出試験

粉末試料(CYA 1mg 対応量)を00号ゼラチンカプセル(日局XII)に充填した。溶出試験は日局XII溶出試験法第1法(回転バスケット法)に準じて行った。検液は溶解度測定法に示したと同様に処理し，カプセルからのCYA溶出値をHPLCで測定した。

測定条件：溶出液，日局第2液(pH 6.8)100ml；回転数，100rpm；温度，37°C。

### 7. ラットによる *in Vivo* 吸収実験

Wistar系雄性ラット(体重，200~250g)を投与前24時間絶食させて用いた。ただし，水は自由に摂取させた。

各練合体(CYAとして10mg/kg相当量)は水0.5mlで懸濁液とし，経口投与した。経時的に尾静脈より採取した血液試料は，CYAの測定まで冷凍保存(-20°C)した。なお，ラットは各採血の直前にエーテルで弱く麻酔した。

血中CYA濃度は柴田ら<sup>8)</sup>の方法を一部変更した方法で測定した。すなわち，血液100 $\mu$ lに内部

標準溶液 (CYD, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  エタノール) 100 $\mu\text{l}$ , 50mM 塩化マグネシウム溶液で調製した 0.1mM 硫酸デキストランナトリウム (分子量, 500kDa) 溶液 200 $\mu\text{l}$  および *n*-ヘキサン 5ml を加え, 1 時間振とう後, 5 分間遠心分離 (3,000rpm) し, 分取した上澄を 40°C の水浴上で窒素気流下で留去した. 残査を順相条件の HPLC 用溶離液 100  $\mu\text{l}$  に溶かし, その 80 $\mu\text{l}$  を検液として順相条件の HPLC で定量した.

## 8. HPLC

島津製作所製 LC-6A シリーズの装置を用い, 下記測定条件で CYA を定量した.

逆相条件: カラム, Nucleosil 5C18 ( $\phi$ 4.6mm  $\times$  250mm); 溶離液, アセトニトリル-水 (80:20); 検出器, UV (210nm); 流量, 1ml/min; 温度, 80°C.

順相条件: カラム, Wakosil 5SIL ( $\phi$ 4.6mm  $\times$  250mm); 溶離液, エタノール-*n*-ヘキサン (15:85); 検出器, UV (210nm); 流量, 1ml/min; 温度, 40°C.

## 結果および考察

### 1. CYA と CD との複合体形成

CYA の溶解度は, 測定時の室温によって著しく異なり, 低温時に高く, 高温時では低くなることが知られている<sup>9)</sup>. したがって, 温度による CYA の溶解度変化は CD との複合体形成にも少

なからぬ影響が有ると考えられた. そこで, 室温下 (20°C) と体温下 (37°C) で以下の検討を行った.

Fig. 1 の左は 20°C における各種 CD 添加による CYA の溶解度変化を示す.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の天然型 CD 溶液中での CYA の溶解度は, Kanai ら<sup>5)</sup> が報告しているように,  $\alpha$ -CD が最も高く,  $\gamma$ -CD が最も低かった. この結果から, CYA を構成する特定の疎水性アミノ酸残基を CD 分子が包接した複合体の形態が予想され, その包接には, より小さな空洞を有する  $\alpha$ -CD の方が空洞の大きい  $\beta$  や  $\gamma$ -CD よりも適しているためと考えられた. また, 天然型の  $\alpha$ -CD よりも溶解性の高い複合体を形成することが知られている<sup>10,11)</sup> 分岐形のグルコシル  $\alpha$ -CD (G- $\alpha$ -CD) 溶液中の CYA 溶解度は  $\alpha$ -CD と同程度であった. これに対して, DM- $\alpha$ -CD 溶液中では  $\alpha$ -CD 中より 3 倍以上高い溶解度を示した.

一方, 37°C (Fig. 1. 右) における CYA の溶解度は CD の種類や濃度に関係なく, 20°C の時の 40% 以下に減少しており, 温度の上昇によって起こる CYA の溶解度減少が CD との複合体形成にも大きく影響していることが明らかになった. しかし, いずれの温度においても CYA の可溶化には DM- $\alpha$ -CD との複合体化が最適と判断されたので, 以後の検討対象には主に DM- $\alpha$ -CD との複合体を用いることにした.

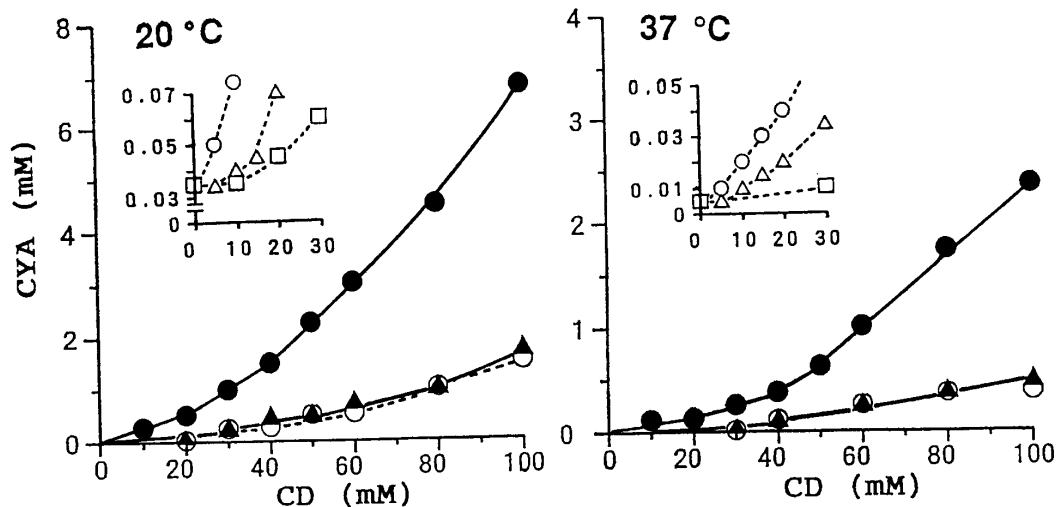


Fig. 1. Phase Solubility Diagrams of CYA/CD Systems in water at 20 and 37°C

○,  $\alpha$ -CD; △,  $\beta$ -CD; □,  $\gamma$ -CD; ▲, G- $\alpha$ -CD; ●, DM- $\alpha$ -CD

Table 1. Stability Constants of CYA with  $\alpha$ -CDs Complexes Calculated by Nonlinear Least-squares method in Water at 20 and 37°C

| Complex              | Temp.<br>(°C) | K <sub>1:1</sub><br>(M <sup>-1</sup> ) | K <sub>1:2</sub><br>(M <sup>-1</sup> ) | K <sub>1:3</sub><br>(M <sup>-1</sup> ) | K <sub>1:4</sub><br>(M <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|---------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| CYA/ $\alpha$ -CD    | 20            | 51                                     | 2500                                   | —                                      | —                                      |
|                      | 37            | 4                                      | 1000                                   | 3000                                   | —                                      |
| CYA/G- $\alpha$ -CD  | 20            | 60                                     | 2700                                   | —                                      | —                                      |
|                      | 37            | 5                                      | 1100                                   | 3300                                   | —                                      |
| CYA/DM- $\alpha$ -CD | 20            | 230                                    | 9300                                   | —                                      | —                                      |
|                      | 37            | 26                                     | 1600                                   | 18600                                  | —                                      |

Solubility of CYA in water at 20 and 37°C were  $2.9 \times 10^{-5}$  and  $2.4 \times 10^{-6}$  molar, respectively.

DM- $\alpha$ -CD 溶液中での CYA の溶解度相図は Higuchi ら<sup>12)</sup> の分類による Ap 形を示すことから、水溶液状態の CyA は DM- $\alpha$ -CD と高次の複合体形成が示唆された。そこで、20°C と 37°C の両温度における CYA と DM- $\alpha$ -CD との高次複合体の安定度定数を Uekama ら<sup>13)</sup> の方法に従い、両溶解度相図の曲線を非線形最小自乗法により解析し、算出した。Table 1 に両温度条件下で求めた各複合体の安定度定数を示す。20°C では主に CYA と DM- $\alpha$ -CD とのモル比 1 : 2, 37°C では 1 : 3 の複合体形成が示唆された。

このように、わずかな温度変化によって CYA と CD との複合体形成に相違が生じる原因は、温度によって CYA の立体構造が変化するためと考えられたが、詳細は不明である。

Fig. 2 は混練法により調製したモル比 1 : 3 の練合体と同モル比の物理的混合物の粉末 X 線回折パターンを示す。物理混合物 (c) では CYA と DM- $\alpha$ -CD の両成分由来のピークが混合した回折パターンとなっている。一方、練合体 (d) ではこれらのピークが完全に消失し、異なる回折パターンを示した。

しかし、固体分散試料も (d) と類似の回折パターンを示し、X 線回折では固体状態における CYA と DM- $\alpha$ -CD との複合体形成は証明できなかった。

## 2. CYA の溶出挙動

Fig. 3. は CYA と DM- $\alpha$ -CD とのモル比が

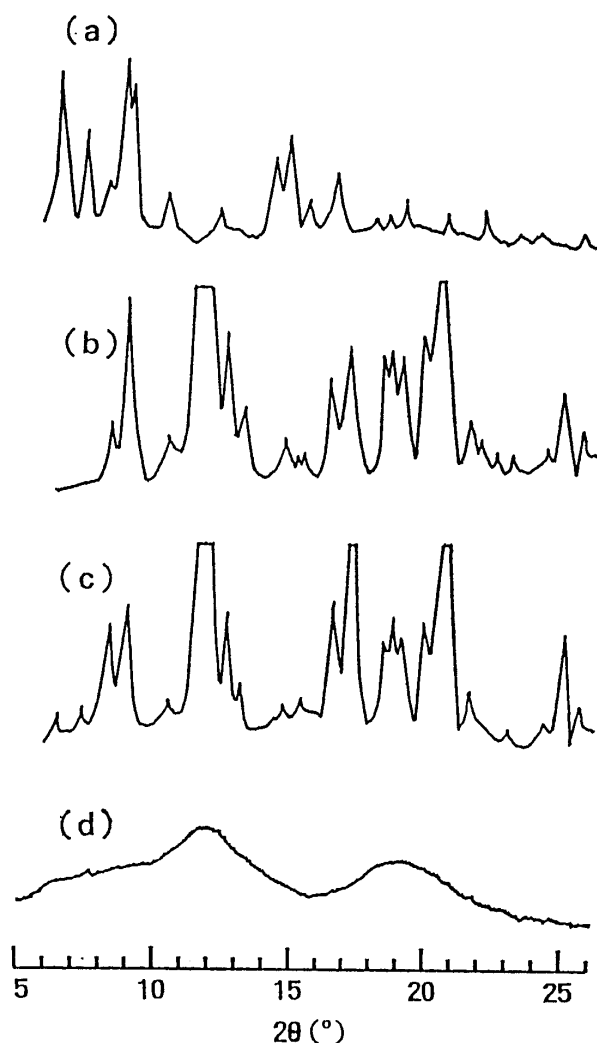


Fig. 2. Powder X-Ray Diffraction Patterns of CYA/DM- $\alpha$ -CD Systems  
(a), CYA ; (b), DM- $\alpha$ -CD ; (c), 1 : 3 (CYA- $\alpha$ -CD) physical mixture ; (d), 1 : 3 (CYA : DM- $\alpha$ -CD) kneading mixture

異なる各練合体および固体分散試料をゼラチンカプセルに入れ、カプセルからの CYA の溶出挙動を示す。溶解度相図に基づいて調製したモル比 1 : 3 の練合体は、溶解度の高さから顕著な溶出率向上が期待されたが、その溶出率は予想外に低かった。しかし、その溶出速度および溶出率ともに固体分散試料よりも明らかに高い。この結果は、CYA と DM- $\alpha$ -CD が固体状態においても固体分散による非晶質化とは異なる相互作用をしていることを示唆した。また、1 : 3 以上に DM- $\alpha$ -CD を配合した練合体では、CD 配合比を増加するに

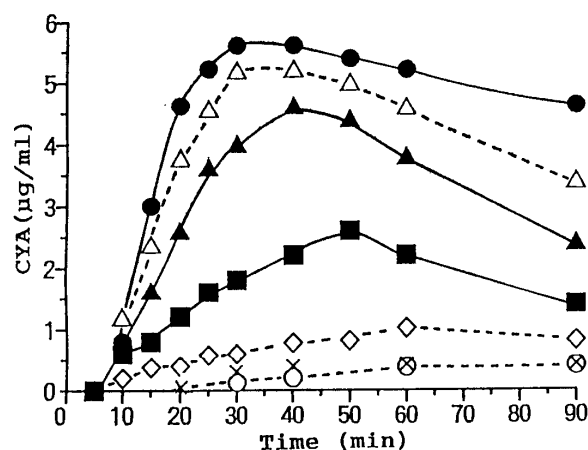


Fig. 3. Dissolution Profiles of CYA from Capsules Containing CYA/DM- $\alpha$ -CD Kneading Mixtures with Various Molar Ratios and CYA/Starch Solid Dispersion in JP XII 2nd Fluid at 37°C, Measured by the Rotation Basket Method  
○, CYA; ◇, 1:3 (CYA:DM- $\alpha$ -CD) kneading mixture; ■, 1:30 kneading mixture; ▲, 1:60 kneading mixture; △, 1:100 kneading mixture; ●, 1:200 kneading mixture; ×, CYA/starch solid dispersion

従って溶出速度および溶出率は向上し、溶出後の CYA 溶解値の低下も減少した。この結果から、固体練合体から溶出した CYA は DM- $\alpha$ -CD と複合体を形成しているが、この複合体の保持には一定濃度以上の CD が必要であり、溶出液で CD が希釈されると容易に CYA と CD に解離する。しかし、過剰の CD 存在下ではその解離は防止できるものと考えられた。

なお、G- $\alpha$ -CD で調製した各モル比の練合体は同じモル比の DM- $\alpha$ -CD との練合体より遙かに低い溶出率であった。

### 3. 経口投与後の CYA の吸収

Fig. 3 の *in vitro* 溶出試験の結果から、*in vivo* で CYA の吸収性評価には 1:30 以上に DM- $\alpha$ -CD を配合した練合体を用いることにした。各練合体をラットに経口投与し、CYA の消化管吸収挙動に及ぼす練合体中の CD- $\alpha$ -CD 配合比の影響を調べると同時に、これらのバイオアベイラビリティを Sandimmun 投与後のそれと比較した。各練合体投与後の平均血中 CYA 濃度の

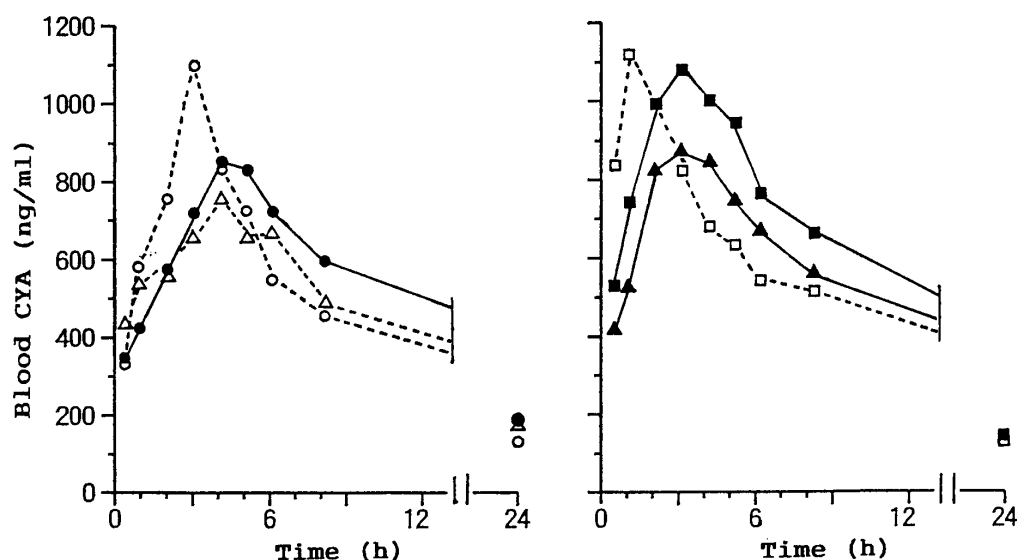


Fig. 4. Blood Concentration Time Curves of CYA after Oral Administration of CYA/DM- $\alpha$ -CD Kneading Mixtures at the Dose Level of 10mg of CYA/kg of Rat

○, Sandimmun; ●, 1:30 (CYA:DM- $\alpha$ -CD) kneading mixture; △, 1:60 kneading mixture; ▲, 1:80 kneading mixture; □, 1:140 kneading mixture; ■, 1:200 kneading mixture  
Each point represents the mean of those experiments (n=3~4).  
The standard error bars are omitted for clarity.

経時変化を Fig. 4 に示す. 個体差によるデータの変動は比較的大きいが, 練合体中の CD 配合比によって CYA の吸収挙動に一定の傾向が見られた. すなわち, CYA と DM- $\alpha$ -CD の配合比が 1:140 までの練合体では CD 配合比の増加にしたがって CYA の最高濃度時間 ( $T_{max}$ ) が短縮し, 最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) が上昇した. 例えば, 1:30 の練合体投与では  $T_{max}$  が約 4 時間後に見られ,  $C_{max}$  が約 850ng/ml を示したのに対し, 1:140 の練合体では  $T_{max}$  が約 1 時間後,  $C_{max}$  は約 1,100ng/ml となった. この傾向は *in vitro* 溶出試験の結果とよく一致するものであり, 練合体中の CD 配合比の増加にしたがって溶出性が向上し, その結果 CYA の消化管吸収速度が上昇したためと思われる. しかしながら, 溶出試験で最も高い溶出率を示した 1:200 の練合体は,  $T_{max}$  が投与 3 時間後に見られた. この原因は, 過剰の CD によって試料溶液の粘性が増加し, 胃内排出速度が遅延したために CYA の吸収が遅くなったものと考えられた.

Table 2 は Fig. 4 の血中濃度変化をモーメント法で求めた, CYA 体内動態パラメーターを示す. 各練合体投与後の CYA の血中濃度時間曲線下面積 (AUC) は Sandimmun の場合と同程度

か, 僅かに高い値を示した. しかし, CD 配合比が異なる練合体間での有意差は認められなかった. 通常, 難吸収性の薬物では  $C_{max}$  の増大や  $T_{max}$  の短縮は, その薬物の絶対的バイオアベイラビリティ ( $F$ ) の向上につながる. しかし, 本練合体では期待した  $F$  の向上は認められなかったが, 各練合体によって  $C_{max}$  や  $T_{max}$  が異なっても一定の  $F$  が確保できることが判明した.

一方, 経口投与した練合体中の CD 配合比と CYA の平均滞留時間 (MRT) および平均吸収時間 (MAT) は Fig. 5, 6 に示すように, 明らかな相関性が認められた. 練合体中の CD 配合比を増加すれば MRT および MAT は短縮し, 減少させれば延長した. これらの結果は, CYA の体内滞留時間が変化しないものと仮定すると, 練合体中の CD 配合比によって一定の  $F$  を確保した状態で, その吸収速度をコントロールできることを示している.

以上の検討結果から, CYA を DM- $\alpha$ -CD で可溶化することにより, CYA の水性液剤のみならず, CYA の吸収時間をコントロールできる新規の経口製剤開発の可能性が示唆された.

Table 2. Kinetic Parameters following Intravenous and Oral Administration of CYA-DM- $\alpha$ -CD Kneading Mixtures with Various Molar Ratio to Rats

| Molar ratio<br>(CYA:DM- $\alpha$ -CD) | Dose of CYA<br>(mg/kg) | n | MRT<br>(h)     | MAT<br>(h) | AUC <sub>0-24</sub><br>(h·ng/ml) | AUC <sub>0-inf</sub><br>(h·ng/ml) | F    |
|---------------------------------------|------------------------|---|----------------|------------|----------------------------------|-----------------------------------|------|
| Sandimmun (IV)                        | 2                      | 3 | 7.9 $\pm$ 0.4  | ---        | 14219.3 $\pm$ 152                | 15200 $\pm$ 220                   | ---  |
| Sandimmun (PO)                        | 10                     | 3 | 11.4 $\pm$ 0.6 | 3.5        | 11268.7 $\pm$ 342                | 13500 $\pm$ 289                   | 17.7 |
| 1:30                                  | 10                     | 3 | 16.8 $\pm$ 4.7 | 8.9        | 11663.5 $\pm$ 323                | 15600 $\pm$ 2330                  | 20.6 |
| 1:60                                  | 10                     | 4 | 15.3 $\pm$ 2.8 | 7.4        | 10261.9 $\pm$ 1252               | 13200 $\pm$ 2230                  | 17.0 |
| 1:80                                  | 10                     | 4 | 11.0 $\pm$ 0.4 | 3.1        | 11259.3 $\pm$ 133                | 12800 $\pm$ 142                   | 16.8 |
| 1:140                                 | 10                     | 3 | 12.3 $\pm$ 2.2 | 4.4        | 11202.0 $\pm$ 520                | 13400 $\pm$ 1320                  | 17.6 |
| 1:200                                 | 10                     | 3 | 11.0 $\pm$ 2.2 | 3.1        | 13279.4 $\pm$ 897                | 15100 $\pm$ 4110                  | 19.9 |

Each value represents the mean  $\pm$  S.D.

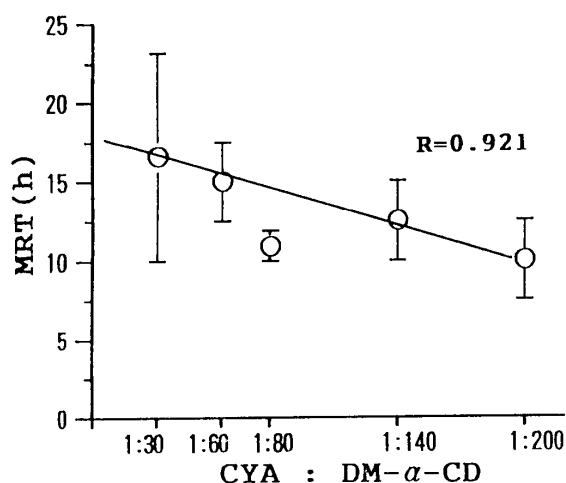


Fig. 5. Correlation between Molar Ratio of CYA to DM- $\alpha$ -CD and Mean Residence Time (MRT) of CYA after Oral Administration of CYA/DM- $\alpha$ -CD Kneading Mixtures with Various Molar Ratios to Rats

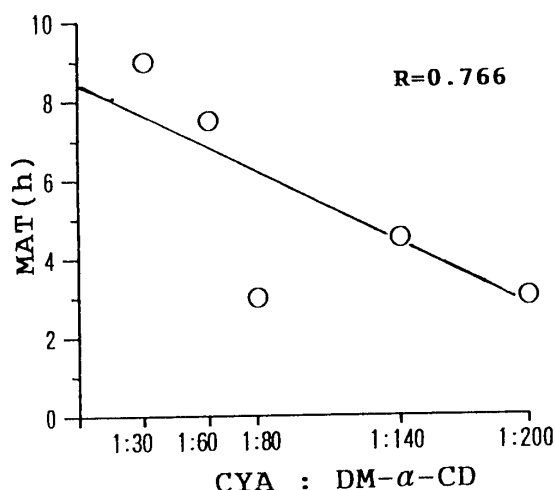


Fig. 6. Correlation between Molar Ratio of CYA to DM- $\alpha$ -CD and Mean Absorption Time (MAT) of CYA

### 引用文献

- 1) N. Ohnisi, S. Iwakawa, K. Okumura, *Jpn. J. Ther. Drug Monit.*, **9**, 25-31 (1992).
- 2) F.Q.Romeo, N. Ohnisi, K. Umeda, F.Komada, S.Iwakawa, K. Okumura, *Drug Metabo. Dispo.*, **21**, 141-143 (1993).
- 3) K.Takada, Y.Oh-hashi, M.Muranishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 471-474 (1989).
- 4) H.Y.Abdallah, M. Mayersohn, *Pharm. Res.*, **8**, 518-522 (1991).
- 5) A.Kanai, R.M.Alba, C.Kobayashi, A.Nakajima, K.Kurihara, T.Yokoyama, M.Fukami, *Transplant. proc.*, **21**, 3150-3152 (1989).
- 6) H.Hatanaka, F.Komada, M.Siono, U.Mishima, K.Okumura, *Pigment Cell Res.*, **5**, 38-40 (1992).
- 7) H.Hatanaka, F.Komada, U.Mishima, K.Okumura, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 1054-1057 (1993).
- 8) M.Shibata, T.Minouchi, Y.Hayashi, H.Shibata, T.Ono, H.Shimakawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1977-1980 (1989).
- 9) G. Imaños, *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 287-289 (1991).
- 10) Y.Okada, Y.Kubota, K. Koizumi, S.Hizukuri, T.Ohfuji, K.Ogata, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2176-2185 (1988).
- 11) Y. Okada, K. Koizumi, K. Ogata, T. Ohfuji, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3096-3099 (1989).
- 12) T. Higuchi, K.A. Connors, *Adv. Anal. Instrum.*, **4**, 117-212 (1965).
- 13) K.Uekama, Y.Horiuchi, M.Kikuchi, F.Hirayama, *J. Incl. Phenom.*, **6**, 167-174 (1988).