

[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
一 般 論 文
21(5) 384-388 (1995)

コラーゲンとアルギン酸ナトリウムを用いた薬物の放出制御

北澤英徳, 佐藤 均, 足立伊佐雄, 堀越 勇

富山医科薬科大学附属病院薬剤部†

Utilization of Microfibrous Collagen with Sodium Alginate for Controlled Release of Drugs

HIDENORI KITAZAWA, HITOSHI SATO,

ISAO ADACHI and ISAMU HORIKOSHI

Department of Hospital Pharmacy, Toyama Medical
and Pharmaceutical University†

(Received January 30, 1995)
(Accepted June 7, 1995)

We have developed prolonged release preparations of amikacin and epirubicin using microfibrous collagen (Aviten®) in combination with sodium alginate. The effect of sodium alginate on drug release from collagen was specially examined because an electrostatic interaction was expected between the carboxyl group of alginate and amino group of amikacin and epirubicin.

The release tests revealed that amikacin was rapidly released from the collagen, while its release was significantly delayed in the presence of sodium alginate in a concentration-dependent manner. Moreover, sodium alginate significantly retarded the release of epirubicin from collagen, despite the fact that epirubicin itself exhibited a strong affinity with collagen even in the absence of sodium alginate. Thus, it was shown that sodium alginate can be used to improve the controlled-release property of the microfibrous collagen preparation of certain drugs. Since the microfibrous collagen used is highly biocompatible, its preparations of amikacin and epirubicin with sodium alginate may be useful for local chemotherapy of bacterial infection and malignant tumor, respectively.

Keywords—microfibrous collagen, sodium alginate, controlled release, amikacin, epirubicin

緒 言

悪性腫瘍の中で抗癌薬が到達しにくい部位、あるいは切除不能な腫瘍部位に、生体内で分解・吸収されるコラーゲンを薬物キャリアーとして留置し、抗癌薬を目的部位で持続放出させ、薬物の局所濃度を高めるとともに、全身循環系への移行を最小限に抑える薬物送達システム (DDS) の開発

を目的として、まず各種薬物とコラーゲンとの親和性について検討した。

しかしコラーゲンのみでは臨床に応用できるほどの放出抑制特性が得られなかった¹⁾。そこで海藻由来のアルギン酸ナトリウム (以下 NaAlg と略す) を添加し、コラーゲンの特性改良を試みた。

NaAlg は褐藻類の細胞壁を構成する多糖類で、溶液は極めて粘稠である。創面に強く付着し出血部位を被覆して止血効果を示すとともに、血小板凝集能を亢進させ、フィブリンの形成を促し、止

† 富山市杉谷2630; 2630, Sugitani, Toyama,
930-01 Japan

血効果を示す。局所に適用しても、抗原性や刺激性が認められず²⁻⁶⁾、種々のケースで DDS の材料として利用されている^{7,8)}。今回は、先の実験でコラーゲンにほとんど親和性を示さなかった硫酸アミカシン (AMK) と、ある程度の親和性を示した塩酸エピルピシン (EPI) の二種の薬物を用い、NaAlg 添加コラーゲンからの薬物放出特性について検討した。

実験方法

1. 試料

コラーゲンはウシ真皮由来の微繊維状シートタイプのアビテン(ゼリア新薬製)を用いた。AMK は硫酸アミカシン注(萬有製薬製)を、EPI はフェルモルピシン注(協和発酵製)を、また NaAlg はアルト(共成製薬製)を使用した。他の試薬は特級を用いた。

2. サンプルの調製

12種のサンプルの組成を A~L とし Table 1 に示す。アビテンを薬物キャリアーとするものは、薬物のみの溶液、あるいは薬物の NaAlg 溶液をそれぞれ 0.4ml ずつアビテン 60mg に吸収させ、室温で徐々に乾燥させ調製した。NaAlg の最終濃度を 2.5mg/ml と 5mg/ml の2水準とし、AMK は 5mg/ml、EPI は 1mg/ml になるようそれぞれ調製した。

3. 溶出試験

2. で調製した薬物含有アビテンを pH 7.0 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1ml とともに分画分子量12,000~14,000の再生セルロース膜からなる透析チューブ(三光純薬製)に注入あるいは挿入し、これを 100ml の PBS 中に浸漬し外液を攪拌しながら、経時的に外液を採取し遊離薬物濃度を測定した。薬物の安定性を考慮し、AMK では室温で、EPI では 4°C で測定した。

4. 薬物の測定方法

1) AMK の定量

TDX システム(ダイナボット製)を用い蛍光偏光免疫測定(FPIA)法で測定した。

2) EPI の定量

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用して測定した。カラムは μ Bondasphere 5 μ C18-100 (Waters 社製)、移動相は 0.005M リン酸緩衝液(pH 3)-アセトニトリル(1:1)混合溶液を用い、蛍光検出器で励起波長を 470nm とし、585nm での蛍光強度測定を行った⁹⁾。

5. NaAlg の添加による薬物放出挙動の変化

サンプル A, B, D, E, G, H, J および K を用い、放出挙動を追跡した。

6. NaAlg の濃度差による薬物放出挙動の変化

NaAlg の濃度差が放出挙動に与える影響を観

Table 1. Composition of Samples (A~L) Prepared in This Study

Carrier	Additive and Drugs		D r u g s	
	Na Alg	AMK (5mg/ml)	E P I (1mg/ml)	
Collagen (-)	—	A	G	
	2.5%	B	H	
	5.0%	C	I	
Collagen (+)	—	D	J	
	2.5%	E	K	
	5.0%	F	L	

察する目的で, サンプル A, B, C, E, F, G, H, I, K および L を用い, 放出挙動を調べた.

結 果

サンプル B では放出が遅れがみられ, サンプル E ではさらなる放出量の低下が観察された. また, サンプル H と J では, ほぼ同程度の放出量の低下がみられ, サンプル K ではさらに顕著な放出低下が観察された. 結果をそれぞれ Fig. 1, および Fig. 2 に示す.

次に, NaAlg 濃度の違いが薬物放出に及ぼす影響について検討した. AMK を NaAlg 溶液に添加した場合, 2.5% および 5% 溶液では NaAlg

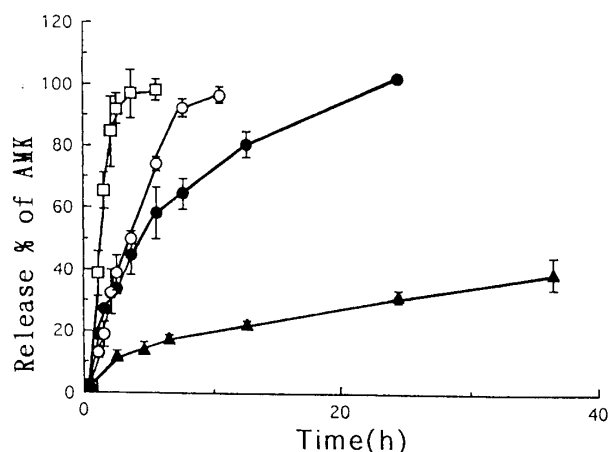


Fig. 1. Release Profiles of AMK in the Presence of Collagen and NaAlg

- : A (Control, AMK)
- : B (2.5% Na Alg and AMK)
- : D (Collagen and AMK)
- ▲ : E (Collagen, 2.5% NaAlg and AMK)

A collagens heet(Aviten®) was dripped with 0.4ml of drug solution, and dried up at room temperature for 3 days. The drug-incorporated collagen preparations were inserted into a dialysis tube (molecular cut off 12,000~14,000), and put into 100ml PBS. Aliquots of dialysing solution were sampled at designated times, and drug concentrations were measured by HPLC or FPIA.

Each point represents the mean $\pm$ S. D. (N=3)

の濃度に依存した AMK の放出の低下がみられたが, これをコラーゲンに吸収させたそれぞれのサンプル (E, F) では放出挙動に差異は認められなかった. 一方, EPI について同一条件下で試験したところ, 放出低下は NaAlg 濃度に依存せず, コラーゲンの存在の有無で差異を生ずることが判明した. 結果を Fig. 3, Fig. 4 に示す.

そこで, それぞれの薬物の放出速度を次式のよう

$$\text{Rate of release} = \frac{Q_n - Q_{n-1}}{t_n - t_{n-1}} (n \geq 1)$$

Q : 各時間における溶出量

t : サンプル時間

n : サンプル回数

算出された放出速度をそれぞれの測定時間の中点に対して片対数プロットすると, いずれの場合も直線関係を示すことがわかった. 得られたそれぞれの直線の傾きと相関係数 (r) をまとめて Table 2 に示す, 0 次放出の場合には傾きは 0 となり, 1 次放出では負の傾きを示す. この傾きが

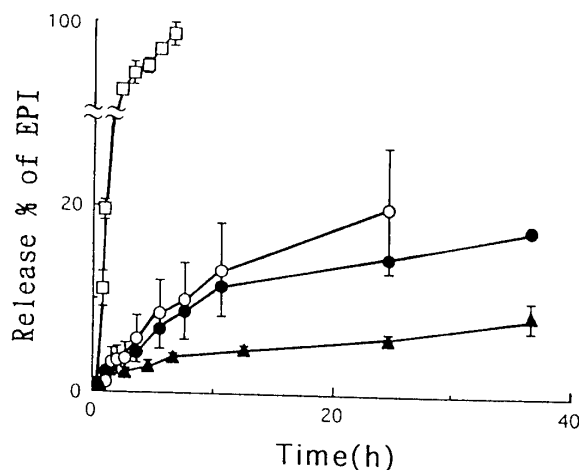


Fig. 2. Release Profiles of EPI in the Presence of Collagen and NaAlg

- : G (Control, EPI)
- : H (2.5% Na Alg and EPI)
- : J (Collagen and EPI)
- ▲ : K (Collagen, 2.5% NaAlg and EPI)

Detailed experimental conditions were described in the legend to Fig. 1.

Each point represents the mean $\pm$ S. D. (N=3)

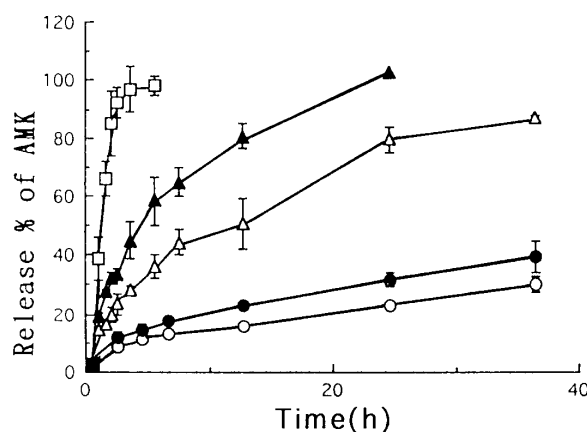


Fig. 3. Release Profiles of AMK from Collagen in a Different Concentration of NaAlg

- : A (Control, AMK)
 ▲ : B (2.5% NaAlg and AMK)
 △ : C (5% NaAlg and AMK)
 ● : E (Collagen, 2.5% NaAlg and AMK)
 ○ : F (Collagen, 5% NaAlg and AMK)

Detailed experimental conditions were described in the legend to Fig. 1.

Each point represents the mean $\pm$ S.D. (N=3)

大きいほど放出速度が速いことを意味している。

コントロールに比べ、AMK、EPIともにコラーゲンおよびNaAlgに親和性を示したが、AMKではNaAlgに対する親和性はコラーゲンより強く、NaAlg濃度に依存してAMKの放出は顕著に抑制された。一方、EPIはコラーゲンとNaAlgの双方に親和性を示すが、NaAlgの濃度に依存性は認められなかった。以上の結果から、コラーゲンとNaAlgの併用によりAMKあるいはEPIの放出速度はさらに抑制されることが確認された。

考 察

AMKはコラーゲンとの親和性は弱いですが、NaAlg添加でAMKの放出が顕著に抑制され、NaAlgの濃度が高いほど放出速度が抑制された。一方、EPIはコラーゲンとある程度の親和性があり、NaAlg添加で、顕著ではないがさらなる放

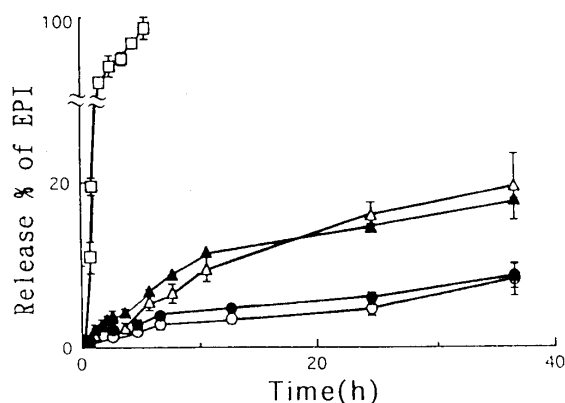


Fig. 4. Release Profiles of EPI from Collagen in a Different Concentration of NaAlg

- : G (Control, EPI)
 ▲ : H (2.5% NaAlg and EPI)
 △ : I (5% NaAlg and EPI)
 ● : K (Collagen, 2.5% NaAlg and EPI)
 ○ : L (Collagen, 5% NaAlg and EPI)

Detailed experimental conditions were described in the legend to Fig. 1.

Each point represents the mean $\pm$ S.D. (N=3)

出抑制が認められた。

コラーゲンと薬物との相互作用については、分子内に共鳴構造や負の荷電をもつEPIは強い親和性を示し、このような構造を有していないAMKではこれが弱かったことから¹⁾、コラーゲン分子内のリジン残基と薬物との間に静電気的な結合が生じていると考えられる¹⁰⁾。一方、NaAlgは高分子物質であり、水溶液中では $-\text{COO}^-$ 基による負の荷電を有する。したがってEPIやAMKと静電気的結合をすると考えられ¹¹⁾、AMKのように分子内に $-\text{NH}_2$ 基を有する場合には、より高い親和性を示すと考えられる。またコラーゲンはリジン残基による正荷電を、NaAlgはカルボン酸による負荷電を有し、それに基づく静電的結合を示すと考えられるので、薬物-コラーゲン-NaAlg間の静電気的結合の強さがEPIとAMKの放出挙動に反映したと考えられる。

また、コラーゲン繊維は立体的構造を維持しているので、その空隙に薬物あるいはNaAlgと薬

Table 2. Slopes and Correlation Coefficients(r) for the Time vs. Rate of Release Curves of Amikacin (AMK) and Epirubicin (EPI)

	A M K		E P I	
	Slope($\times 10^{-2}$)	r	Slope($\times 10^{-2}$)	r
Control	- 4 8. 1	0. 9 9	- 2 5. 9	0. 9 1
Collagen	- 1 1. 4 ^{a)}	0. 8 6	- 2. 7 6 ^{b)}	0. 7 7
Na Alginate(2.5%)	- 6. 1 1 ^{b, c)}	0. 8 4	- 1. 5 3 ^{b)}	0. 8 7
Na Alginate(5%)	- 3. 9 1 ^{b, c, e)}	0. 6 5	- 1. 9 4 ^{b)}	0. 7 6
Collagen-Na Alginate(2.5%)	- 1. 2 1 ^{b, d, f)}	0. 7 8	- 0. 8 2 ^{b, c)}	0. 8 3
Collagen-Na Alginate(5%)	- 1. 0 6 ^{b, d, f)}	0. 7 1	- 0. 8 6 ^{b, c)}	0. 5 2

a):Significantly different from control (P<0.05)

b):Significantly different from control (P<0.01)

c):Significantly different from collagen (P<0.05)

d):Significantly different from collagen (P<0.01)

e):Significantly different from Na Alginate(2.5%) (P<0.05)

f):Significantly different from Na Alginate(2.5%) (P<0.01)

物との複合体が侵入すると考えられ、ここからの薬物の拡散が徐放性に寄与しているとも考えられる。しかし、いずれも推測の域を脱していない。

以上の結果から、コラーゲン単独では親和性が弱い、ある程度の親和性を有する薬剤は、コラーゲンと NaAlg の組み合わせで、さらに放出が抑制されることがわかった。特に AMK は NaAlg 存在下で薬物の放出が飛躍的に抑制された。コラーゲンと NaAlg に正または負荷電をもつ薬物を吸収させ、乾燥後に局所適用すれば、局所に限定した化学療法における持効化が可能となり、全身に拡散する薬物量を低下させ、副作用の軽減につながる可能性が本実験の結果から推測された。

引用文献

- 1) 北澤英徳, 足立伊佐雄, 堀越 勇, *DDS*, **8**, 175-179 (1993).
- 2) 醍醐皓二, 薬理と治療, **11**, 401-407 (1983).
- 3) 醍醐皓二, 薬学雑誌, **101**, 464-469 (1981).
- 4) 醍醐皓二, 薬学雑誌, **102**, 573-578 (1982).
- 5) 醍醐皓二, 薬学雑誌, **105**, 171-182 (1985).
- 6) 山田千秋, 薬学雑誌, **107**, 53-59 (1987).
- 7) 村田慶史, 前田忠士, 山本 隆, 村田克己, 河島進, *DDS*, **8**, 199-203 (1993).
- 8) 上村邦夫, 黒野幸久, 池田 憲, *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **20**, 33-40 (1994).
- 9) 増池健年, 大獄純一, 武本宣教, 薬学雑誌, **104**, 614-619 (1984).
- 10) 中村桂子, 松原健一, “細胞の分子生物学第2版”, 教育社, 東京, 1990, pp.802-814.
- 11) 日本生化学, “生化学データブック[1]”, 東京化学同人社, 1979, pp.495.