

(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
 一般論文
 24(3): 205 — 213 (1998)

難水溶性薬物封入ポリ乳酸マイクロスフェアの新規調製法とその放出性

富山成章, 中野真汎*

熊本大学医学部附属病院薬剤部†

Preparation and Release Property of Polylactic Acid Microspheres Containing Slightly Water-soluble Drug

NARIAKI TOMIYAMA and MASAHIRO NAKANO*

Department of Pharmacy, Kumamoto University Hospital†

(Received July 9, 1997
 Accepted November 11, 1997)

Polylactic acid (PLA) microspheres containing theophylline as a slightly soluble representative drug were prepared using the o/w emulsion in-water drying method. A high trapping efficiency was observed when polymer solution of high concentration was used and the drug/polymer weight ratio was increased. However, the particle size of the microspheres became extremely large when the high concentration polymer solution was used.

Microspheres with a particle size of 88.6 μm were obtained when “sub-emulsification” was performed with the external aqueous phase with an equal specific gravity to the polymer solution. On the other hand, the trapping efficiency of the microspheres was dependent on both the drug encapsulated in the microspheres and the particle size of microspheres.

The release patterns of the drug from the microspheres showed an initial-burst release in all batches. The release rates of the drug from the microspheres prepared with the drug and polymer alone were very small. Therefore, an improvement in the drug release property of the microspheres was examined.

The release rates of the drug from the microspheres increased significantly depending on the amount of ethyl myristate that was incorporated as a release promoter.

Key words — microspheres, polylactic acid, ethyl myristate, release promoter

緒 言

標的指向性と放出制御という製剤設計は, drug delivery system, すなわち DDS の基本的な概念である. このような DDS の概念は, 微量で高活性の生理活性ペプチド類が大量生産されるようにな

ったことや, 薬物の副作用が大きな問題となってきたことにより, さらに重要視されてきている. また, 薬物の疾患に対する直接作用だけではなく, 患者の QOL やコンプライアンスといったことも重要視されてきている. このような状況のもと, 適切な製剤設計は, 創薬と同じく非常に重要となり, 様々な因子を考慮する必要下にある.

製剤設計, 特に DDS の考えを念頭に置いた場

† 熊本市本荘1-1-1; 1-1-1, Honjo, Kumamoto, 860-8556 Japan

合、目的を達成できる剤形に、分散系微粒子製剤が考えられる。具体的には、エマルション、リポソーム、マイクロスフェアなどがある。この中でマイクロスフェアとは、直径が μm 領域の球状高分子マトリクス内に薬物を含有した製剤である。マイクロスフェアは高分子マトリクス内に薬物が徐々に透過すること、高分子が徐々に分解することにより持続的に薬物を放出する。またマイクロスフェア表面を修飾することで指向性を持たせることも可能である。さらに固体/液体分散系であるため、微粉末化が可能であり、そのため長期保存が可能である。

実際の臨床の場合においても、化学塞栓療法のための剤形として応用されている¹⁾。

マイクロスフェアの調製においては、主に相分離法と液中乾燥法²⁾が知られている。液中乾燥法とは、まずマイクロスフェアの壁物質と薬物からなる相を分散相としたo/wエマルションを形成させ、徐々に分散相からの溶媒留去、蒸発によ

りマイクロスフェアを得る方法である(**Fig. 1**)。特に液中乾燥法は用いる有機溶媒が少ないこと、操作が簡便なことといったメリットを持つ。これらのメリットは、実際の臨床の場合においても、非常に重要な点と考えられる。

液中乾燥法を用いたマイクロスフェアの調製は、封入しようとする薬物の物性により乳化法を選択する必要がある。すなわち、脂溶性薬物ではo/w乳化法、水溶性薬物ではw/o/w乳化法により調製される。しかしながら従来の方法をそのまま用いても、難水溶性薬物の効率の良いマイクロスフェア内への封入は困難であると考えられる。これはw/o/w乳化法を用いた場合、薬物の水への溶解度に限度があるために内水相へ効率よく溶解できないこと、またo/w乳化法を用いた場合、油相中にほとんど溶解しないためである。また、難水溶性薬物を用いたマイクロスフェアの調製法に関する報告は少なく、さらに検討の余地があると考えられた。そこで難水溶性薬物の効率良

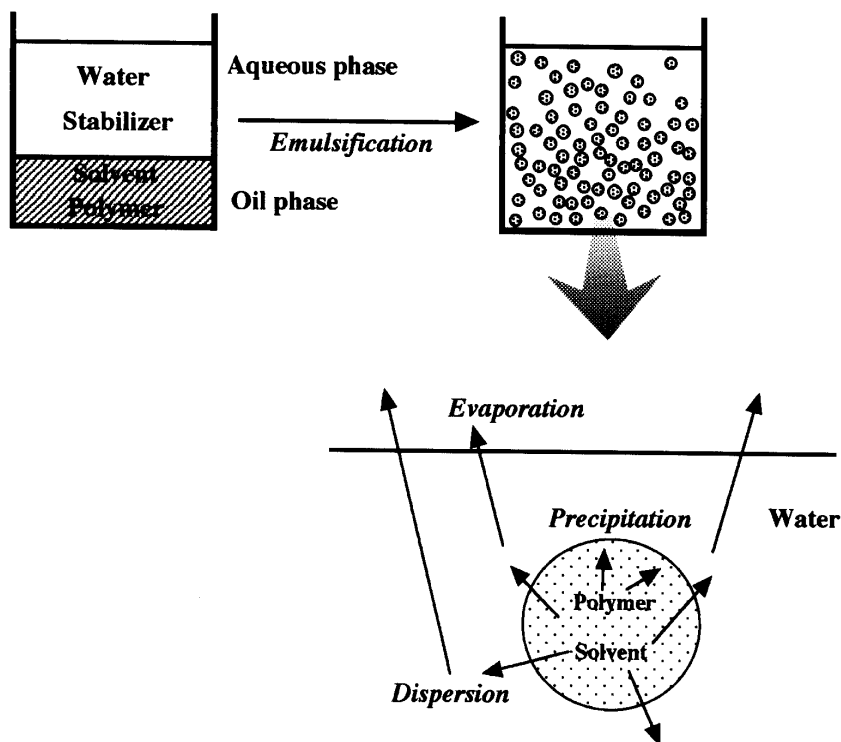


Fig. 1. Schematic Illustration of Preparation of Microspheres with Emulsion-in-water Drying Method

い封入を目的とし、新規調製法の開発とその放出性についての検討を行った。水への溶解度に限度のある薬物の例として、紫外部吸収を利用して定量の行いやすいことからテオフィリンを代表薬物として選択した。また、高分子としてはマイクロスフェアの壁物質として汎用される生体内分解性高分子、ポリ乳酸(以下 PLA と略す)を用いた。PLA は生体内で非酵素的に加水分解を受け、乳酸となり、最終的には炭酸ガスと水になって体外に排出される。このため PLA は臨床的に吸収性縫合糸や骨折固定材として利用されている³⁾。

実験方法

1. 使用薬物及び試薬

テオフィリンは和光純薬工業(株)の特級品を用いた。生体内分解性高分子である PLA (L 体、重

量平均分子量: 25,400) は三井東圧化学(株)、ポリビニルアルコール (EG-40, 以下 PVA と略す) は日本合成化学工業(株)より供与されたものを用いた。ウログラフィン60% (日本シエーリング(株)) は市販品を用いた。塩化メチレンは市販の一級品を蒸留して使用した。ポリソルベート80は関東化学(株)の特級品を用いた。パルミチン酸エチルエステルは和光純薬工業(株)の一級品を用いた。その他の試薬は市販の特級品をそのまま使用した。

2. テオフィリン含有マイクロスフェアの調製 (Fig. 2)

PLA 75mg を塩化メチレン 1.5-0.5ml に溶解した高分子溶液にテオフィリン15-25mg を加え、プローブ型超音波発生装置 (トミー精工, UR-20 P) にて氷浴中で2分間懸濁した。このサスペン

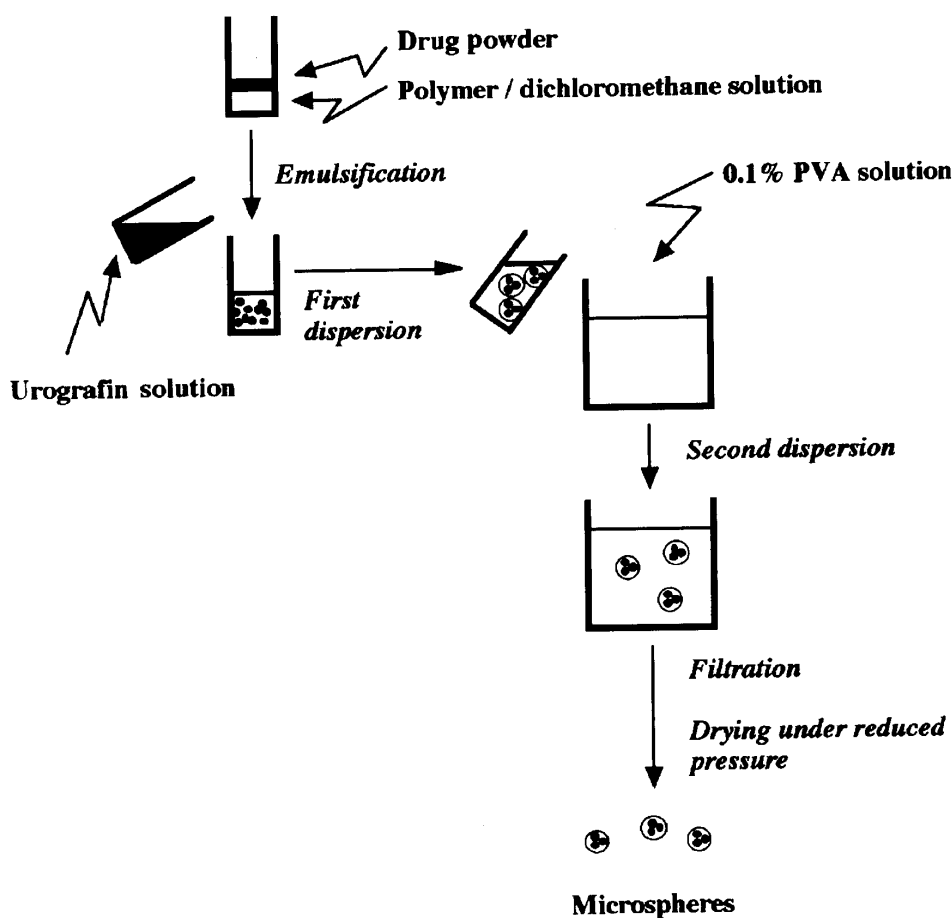


Fig. 2. Preparation of Microspheres with Emulsion in-water Drying Method

ジョンに高分子溶液とほぼ等比重になるよう調製した0.5% PVA 溶液とウログラフィン溶液の1:8の混液1.5mlを加え、ボルテックスミキサー (MS 1 Minishaker, 表面突起型, IKA Works, または Multi Flash Mixer, 表面平面型, 三田村理研工業) にて乳化した (1次分散)。このエマルジョンを、700rpm で攪拌している0.1% PVA 溶液100ml 中に分散した (2次分散)。約2時間後、生成したマイクロスフェアをろ取し、精製水で十分洗浄した後、減圧下で2日間乾燥した。

ミリスチン酸エチルエステルを添加したテオフィリン含有マイクロスフェアは、まずミリスチン酸エチルエステル22.5-37.5mg と PLA75mg を秤量し、塩化メチレン500 μ l を加え高分子溶液とした。20 μ m の篩で篩過したテオフィリン25mg を加え、プローブ型超音波発生装置にて氷浴中で2分間懸濁した。1次分散は Multi Flash Mixer を用い、5秒間行った。その他は無添加群に準じた。

3. マイクロスフェアの粒子径測定

マイクロスフェアの粒子径は、無作為に選んだ50-100個のグリーン径を光学顕微鏡により測定し、算術平均径を平均粒子径とした。

4. マイクロスフェア内薬物含有量の測定

スクリー瓶にマイクロスフェア約3mg を秤量した後、塩化メチレン2mlを加えてマイクロスフェアを完全に溶解させた。これに精製水5mlを加え、振盪機にて10分間水平方向に振盪した。3000 rpm, 4℃で10分間遠心分離し、水相を適宜希釈し、テオフィリン濃度を分光光度計 (島津製作所, UV-240) を用いて271 nm での吸光度を測定し、以下の値を算出した。

1) **Drug content** (薬物封入量, %): マイクロスフェア1mg 中に占める薬物の割合で、測定値より算出。

2) **Calculated drug content** (理論的薬物封入量, %): 調製時に用いた量より、理論的にマイクロスフェア1mg 内に含有される薬物の割合を算出。

3) **Trapping efficiency** (封入効率, %): 薬物の封入効率で Drug content/calculated drug content とした値を百分率として算出。

5. *In vitro* 放出試験

バイアル瓶にマイクロスフェア約5mg を秤量した後、ポリソルベート80を0.1%含有した生理食塩液10mlを加えた。このバイアル瓶を37℃の恒温振盪槽中で振盪した。経時的に放出液を採取し、新しい放出液を補充した。採取した放出液を分光光度計 (島津製作所 UV-240) を用いて測定波長271nm での吸光度を測定し、薬物放出量を算出した。

結果及び考察

1. o/w 乳化型/液中乾燥法によるテオフィリン含有マイクロスフェアの調製法の検討

1-1 封入効率と粒子径に及ぼす処方および調製条件の影響

当初、粒子径を小さくする目的で PLA の溶媒である塩化メチレンの量を1.5mlとして調製したが、封入効率は約8%と薬物はほとんど封入されなかった。そこで塩化メチレンの量を1ml, 0.5mlと減少したところ、封入効率は大幅に向上した。しかし、粒子径は大幅に増加した (Table 1)。これは高分子濃度の増加により、粘度が高くなり、薬物の漏洩が減少したためと考察される。なお、塩化メチレンの残留は測定していない。極めて揮発性であることから、十分取り除かれていると考えられるが、ヒトへの投与が必要な段階では検討が必要と考えられる。

そこで、高分子溶液とほぼ等しい比重の水相を添加する補助的な乳化、すなわち1次分散を行い、その後PVA溶液に分散させる (2次分散) という二段階の乳化法を行った。当初の1次分散の攪拌条件 (IKA Works, MS 1 Minishaker を使用) において、粒子径は1次分散時間が20秒以上ではほぼ一定の値を示した。封入効率に関しても、若干の低下があったが、20秒では約70%であった (Table 2)。

Table 1. Effect of PLA Concentration on Pharmaceutical Parameters of PLA-microspheres Containing Theophylline (Drug : polymer=1 : 5)

		F 1	F 2	F 3
Dichloromethane	(ml)	1.5	1.0	0.5
Yield	(%)	71.3	74.3	59.9
Calculated drug content	(%)	16.7	16.7	16.7
Drug content*	(%)	1.4 ± 0.08	4.4 ± 0.02	13.5 ± 1.0
Trapping efficiency*	(%)	8.3 ± 0.5	26.8 ± 0.1	81.2 ± 5.9
Particle size*	(μm)	130.8 ± 33.6	236.6 ± 81.4	No measurement

* Each value represents the mean ± SD.

Table 2. Effect of 1st Dispersion Time on Pharmaceutical Parameters of PLA-microspheres Containing Theophylline (Drug : polymer=1 : 5)

		F 3	F 4	F 5	F 6	F 7
1st dispersion time	(sec)	0	10	20	30	40
Yield	(%)	59.9	86.2	72.6	79.3	75.7
Calculated drug content	(%)	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7
Drug content*	(%)	13.5 ± 1.0	13.2 ± 0.3	11.57 ± 0.5	11.29 ± 10.0	9.4 ± 0.7
Trapping efficiency*	(%)	81.2 ± 5.9	79.0 ± 1.9	69.4 ± 2.9	67.8 ± 5.8	56.4 ± 4.2
Particle size*	(μm)	No measurement	232.4 ± 74.4	139.3 ± 44.8	112.6 ± 41.0	129.7 ± 36.0

* Each value represents the mean ± SD.

Table 3. Effect of 1st Dispersion and Drug Powder through 20- μm Mesh on Pharmaceutical Parameters of PLA-microspheres Containing Theophylline (Drug : polymer=1 : 5, PLA concentration=20%)

		F 8	F 9	F 10	F 11
		Raw drug powder		Drug powder through 20-μm mesh	
1st dispersion time	(sec)	5	10	5	10
Yield	(%)	76.3	69.6	73.1	79.2
Calculated drug content	(%)	16.7	16.7	16.7	16.7
Drug content*	(%)	6.2 ± 1.3	6.3 ± 0.3	7.2 ± 0.4	7.0 ± 0.5
Trapping efficiency*	(%)	36.9 ± 26.2	37.6 ± 1.6	43.4 ± 2.1	41.7 ± 0.3
Particle size*	(μm)	80.5 ± 26.2	79.0 ± 32.9	82.6 ± 26.3	64.1 ± 23.2

* Each value represents the mean ± SD.

また、粒子径を100 μm 以下にするために1次分散の攪拌速度を上げる目的でボルテックスミキサーを変更した(Multi Flash Mixer, 三田村理研工業)。また、封入効率を増加させる目的でテオ

フィリン粉末を20 μm の篩にて篩過したものを使用した。これにより粒子径は約65 μm まで低下したが封入効率も大幅に低下した (Table 3)。また、F 9 と F11を比較した場合、F11の方が封入効

率は増加し、粒子径は低下した。粒子径の低下は、篩過したテオフィリン粉末を用いたことで、大きなテオフィリン粉末が除去され、攪拌に対する障壁が小さくなり、効率良く分散されたためと考えられる。

また、PVA濃度を従来の0.1%から1.0%と増加した。剪断力の増加による粒子径の低下を期待

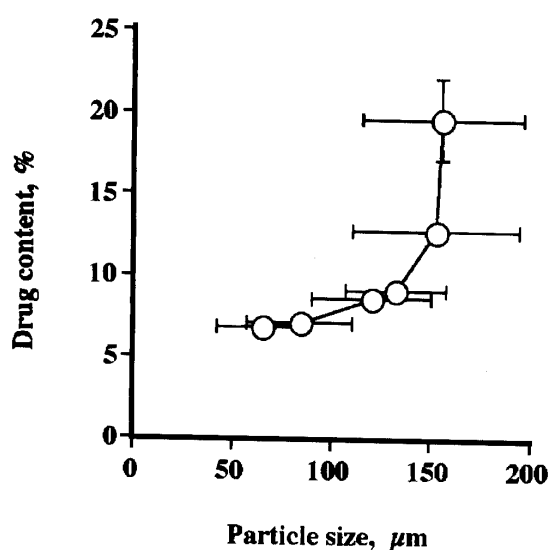


Fig. 3. Relationship between Particle Size and Drug Content of PLA-microspheres Containing Theophylline Prepared with Drug Powder through 20 μm Mesh

*Each point represents the mean \pm SD.

したが、封入効率、粒子径ともに大きな変化は認められなかった。

これらの結果から、本調製法において、マイクロスフェアの粒子径を低下させると薬物含量も低下する傾向が明らかとなった (Fig. 3)。

1-2 封入効率と粒子径に及ぼすテオフィリンと PLA の組成比の影響

テオフィリンと PLA の組成比について検討した。PLA の量を一定とし、テオフィリンと PLA の組成比を 1 : 5, 1 : 4, 1 : 3 と変えていくと、テオフィリン含有量、封入効率とも増加する傾向を示した (Table 4)。調製時、テオフィリンは粉末状態で高分子溶液中にほぼ均一に分散していると考えられる。薬物量が増大すると、分散しているテオフィリン粉末間の組み方がより複雑となり、薬物の外水相への漏洩を妨げていると考えられる。

そこで高い薬物含量と 100 μm 以下の粒子径をもち、ある程度の封入効率をもつマイクロスフェアを調製するために、テオフィリンと PLA の組成比を 1 : 3 とし、1 次分散に攪拌速度の速い Multi Flash Mixer を用いて調製した。封入効率は約 66% と若干低下するものの、薬物含量が 15.8%, 粒子径が約 90 μm のマイクロスフェアを調製することができた (Table 5)。

Table 4. Effect of Amount of Drug on Pharmaceutical Parameters of PLA-microspheres Containing Theophylline (PLA concentration = 20%)

	F 12	F 13	F 14
Amount of drug (mg)	15.0	18.8	25.0
Drug : Polymer (mg : mg)	1 : 5	1 : 4	1 : 3
Yield (%)	72.6	79.0	76.9
Calculated drug content (%)	16.7	20.0	25.0
Drug content* (%)	9.3 \pm 0.2	12.9 \pm 0.5	19.7 \pm 2.5
Trapping efficiency* (%)	55.9 \pm 1.4	64.5 \pm 2.6	78.8 \pm 10.0
Particle size* (μm)	131.0 \pm 25.4	150.8 \pm 42.0	154.2 \pm 40.7

* Each value represents the mean \pm SD.

Table 5. Effect of 1st Dispersion Condition on Pharmaceutical Parameters of PLA-microspheres Containing Theophylline (Drug : polymer=1 : 3)

F 14		F 15
1st dispersion condition	Mild Vortex mixing	Vigorous Vortex mixing
1st dispersion time (min)	20	5
Yield (%)	76.9	80.4
Calculated drug content (%)	25.0	25.0
Drug content* (%)	19.7 ± 2.5	15.8 ± 0.9
Trapping efficiency* (%)	78.8 ± 10.0	63.4 ± 3.7
Particle size* (μm)	154.2 ± 40.7	88.6 ± 23.6

* Each value represents the mean ± SD.

2. マイクロスフェアからの薬物放出性

今回調製したマイクロスフェアからのテオフィリンの放出プロファイルを図 4 に示す。

マイクロスフェアからのテオフィリンの放出は、初期の速い放出を持つ二相性の放出プロファイルを示した。8 日間でのマイクロスフェアからのテオフィリンの放出は若干の放出が見られただけであり、薬物封入量が多いほど、また粒子径が小さいほど大きくなる傾向を示した。一般にマイクロスフェアからの薬物放出機構は、マイクロ

スフェアマトリクス内への水の浸透に伴う薬物拡散や高分子の分解によるものとされている⁴⁾。今回用いた PLA は分子量が 25,400 と比較的大きい。このため 8 日間で PLA はほとんど分解していないと考えられ⁵⁾、マイクロスフェア表面付近のテオフィリンのみがマトリクス中を拡散し、放出したと考えられる。

3. パルミチン酸エチルエステルの放出促進剤としての添加による薬物封入効率、ならびに薬物放出への影響

薬物の放出が遅いことが明らかとなったため、脂肪酸エステルであるミリスチン酸エチルエステルの添加による放出促進を試みた。

本研究室では、放出性の改善を目的として脂肪酸エチルエステルの添加により、放出性が制御可能なことを報告している⁶⁾。脂肪酸エチルエステルの炭素鎖が長いほど、高い放出促進効果が期待できる。今回、これらの結果から高い放出促進が期待された炭素数 14 の脂肪酸エステル、ミリスチン酸エチルエステルの添加を試みた。脂肪酸エステル類は人体に対して安全な可塑剤と考えられるが、臨床へ応用の際には、生体適合性についての検討が必要と考えられる。

薬物封入量は添加物の処方量増加に伴い低下した (Table 6)。Table 1 の結果から、高分子溶液の粘度が高いほどマイクロスフェアへの薬物の封

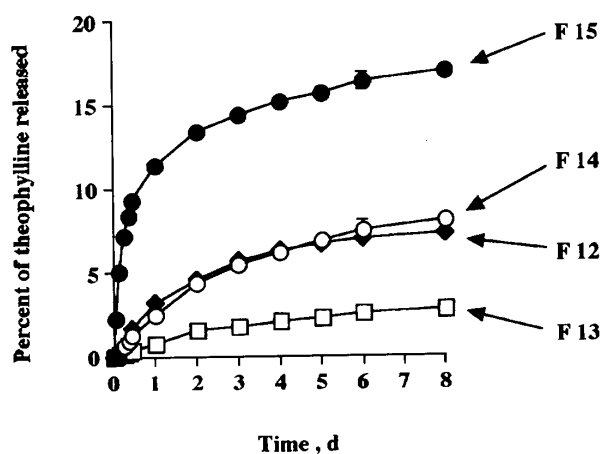


Fig. 4. Release Profiles of Theophylline from PLA-microspheres in Normal Saline Containing 0.1% Polysorbate 80

*Each point represents the mean ± SEM (n=3).

Table 6. Effect of Amount of Ethyl Myristate on Pharmaceutical Parameters of PLA-microspheres Containing Theophylline

		F 15	F 16	F 17
Level of ethyl myristate (% of polymer)		0	30	50
Yield	(%)	80.4	70.9	68.0
Calculated drug content	(%)	16.7	20.0	25.0
Drug content*	(%)	15.8 ± 0.9	16.2 ± 0.4	14.4 ± 0.2
Trapping efficiency*	(%)	63.4 ± 3.7	64.7 ± 1.7	57.5 ± 3.7
Particle size*	(μm)	88.6 ± 23.6	99.4 ± 28.0	80.3 ± 22.6

* Each value represents the mean ± SD.

入効率は良くなる傾向を示した。このことから、ミリスチン酸エチルエステル添加による封入効率の低下は、高分子溶液の粘度が低下したためと推測される。

こうして調製したマイクロスフェアからのテオフィリンの放出プロファイルを Fig. 5 に示す。ミリスチン酸エチルエステル添加量が多いほど高い放出性を示した。また、ミリスチン酸エチルエステル添加群でも無添加時と同様に、初期に大きな放出を持つ二相性の放出プロファイルを示した。放出性は、ミリスチン酸エチルエステルの添

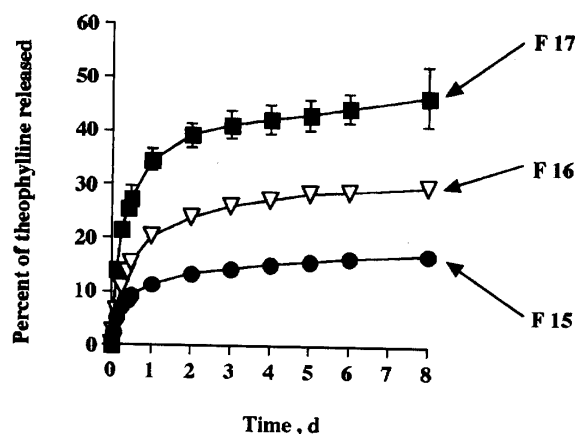


Fig. 5. Release Profiles of Theophylline from PLA-microspheres Containing Ethyl Myristate in Normal Saline Containing 0.1% Polysorbate 80

*Each point represents the mean ± SEM (n = 3).

加量が多いほど高い放出性を示したが、主に初期バーストを促進し、その後の放出はあまり変わらないものであった。ミリスチン酸エチルエステルはPLAと同様に塩化メチレンに溶解する。このためマイクロスフェア内の構造はPLAとミリスチン酸エチルエステルから成るマトリックス中にテオフィリンが分散した状態であると考えられる。また、ミリスチン酸エチルエステルなどの脂肪酸エステルによる放出促進機構は、脂肪酸エステルにより形成された細孔中に薬物が溶解し拡散すること、脂肪酸エステルが抜けた後の細孔に水が浸透することで薬物放出を促進すると考えられている⁶⁾。これらのことより、テオフィリンはミリスチン酸エチルエステルに不溶であるために、主に後者の機構により放出促進効果が得られると考察される。しかしながら、ミリスチン酸エチルエステルによる放出促進効果が、主に初期の放出を増大させたのは、放出液のマトリックス内への拡散がマイクロスフェア表面付近に限られるためと考察される。

ま と め

今回、難水溶性薬物であるテオフィリンのマイクロスフェア化を液中乾燥法にて試みた。高濃度の高分子溶液を用いること、1次分散を行うこと、また処方変更により、封入効率が約63%、粒子径100 μm以下のマイクロスフェアが調製可能

であった。こうして調製したマイクロスフェアからの薬物放出は低いものであり、放出性は薬物封入量と粒子径に依存する傾向が認められた。さらに、放出性改善を目的としてミリスチン酸エチルエステルを添加を試みた。ミリスチン酸エチルエステルを含有したマイクロスフェアからの薬物放出は、初期バーストを示すものの、放出率は大幅に増加した。

—
このように薬物封入量、封入効率については大幅な改善が認められたものの、放出性に関しては、いまだ多くの改善の余地があると考えられる。

引用文献

- 1) 市原知文, “動注がん化学療法—基礎と臨床—”, 田口錢男, 中村仁信編, 癌と化学療法社, 東京, 1986, pp. 334-341.
- 2) N.Wakiyama, K.Juni and M.Nakano, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3363-3368 (1981).
- 3) 筏義人, “生分解性プラスチックハンドブック”, 土肥義治編, エヌ・ティー・エス, 東京, 1995, pp. 279-291.
- 4) 部谷敏郎, 岡田弘晃, 小川泰亮, 膜, **20**, 270-275 (1995).
- 5) R.A.Miller, J.M.Brady and D.E.Cutright, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 711-719 (1977).
- 6) K.Juni, J.Ogata, N.Matsui, M.Kubota and M.Nakano, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1609-1738 (1985).