

体内植え込み型架橋ゼラチンフィルムの薬物放出制御に関する基礎的検討

夏目秀視・坂之上和穏・杉林堅次・森本雍憲^{①)}、宮川 晃^{②)}、池口祥一^{③)}

Controlled release and permeation of mitomycin C from and through the gelatin films for implant

Gelatin films and lipid dispersed gelatin films were prepared by various crosslinking and/or fixing conditions and their utility as an implant was estimated. *In vitro* degradation of the gelatin films in pH 7.4 phosphate buffer at 37°C was prolonged by increase in fixing. *In vivo* degradation period was 2-3 times longer than *in vitro*. *In vitro* mitomycin C (MMC) permeation profiles through these films were changed by fixing condition. The permeation rate of MMC through the films was delayed with increase in the amounts of fixing agent and lipid (soy bean oil and lethitin) in the film. *In vitro* MMC release from MMC suspended-gelatin film was also changed by the fixing condition. Based on these results, further *in vitro* release experiments were carried out by 2- and 3-layer films, prepared by several layers as above, where release rate of MMC from one side was designed to be much faster than that from the other side. As a result, observed data were consistent with calculated value. It was suggested that gelatin and lipid dispersed gelatin film were available as a dosage form for delivery of drug by desired release or permeation rate.

Hideshi Natsume • Kazutoshi Sakanoue • Kenji Sugabayashi • Yasunori Morimoto^{①)}, Akira Miyagawa^{②)}, Shōichi Ikeguchi^{③)}

key words : gelatin film, lipid dispersed gelatin film, mitomycin C, drug release, drug permeation

生体内植え込み製剤は、種々の癌治療に頻繁に用いられている。その製剤設計は全身的な癌治療、

癌摘出手術前後の補助的な治療、あるいは癌原発巣や転移部位などある特定の局所への治療を目的として行われる¹⁻³⁾。

植え込み剤として重要な点は、生体適合性、分解性、それに薬物の放出性があげられる。胸水、腹水、腹膜播種、あるいは切除部位などをターゲットとした植え込み剤は、それらの部位を“effective compartment”として考えたときに、その部位への薬物移行率を高め、かつ副作用があらわれる“side effect compartment”への薬物移行率を極力抑えることのできるような薬物放出パターンを示すように設計されることが望ましい。したがって、制癌剤の物性や生体内動態、ならびにその effective compartment 中の環境、さらには個々の患者の症状にも応じたさまざまな薬物放出速度の得られるものが必要である。

一方、ゼラチンはカプセル剤の被膜材料として一般に用いられているばかりでなく、最近は薬物送達システム(DDS)における薬物担体や徐放性材料としても注目を集めている⁴⁻⁶⁾。

ゼラチンは、生体適合性、分解性にすぐれているので、植え込み剤としての用途も広いものと思われる。

そこで、ゼラチンを基本素材とする植え込み剤の開発を目的に、基剤組成の変更やゼラチンの化学的修飾により種々の薬物放出速度が得られるフィルムを調製して、その *in vitro*, *in vivo* 分解性、および薬物透過性について評価した。また、2層および3層フィルムを調製し、フィルム両側への薬物放出性を *in vitro* で評価した。

方 法

(1) ゼラチンフィルムの調製

種々のゼラチンフィルム(約 1g, 厚さ 0.995~

*¹⁾ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02, Japan 城西大学薬学部製剤学教室

*²⁾ Pharmaceutical Division, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 6-1 Ohtemachi, 1 Chome Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan 協和醸酵工業株式会社

*³⁾ First Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Shimo-tsuga-gun, Tochigi 321-02, Japan

表 1 ゼラチンフィルムおよび脂質分散型ゼラチンフィルムの組成および固定化の条件

ゼラチンフィルム							
	ゼラチン (mg)	ソルビトール (mg)	グリセリン (mg)	緩衝液 (ml)	レシチン (mg)	大豆油 (mg)	
						Form.	
A-1	350	200	450	2.5	—	—	1
2	350	200	450	2.5	—	—	3
3	350	200	450	2.5	—	—	5
4	350	200	450	2.5	—	—	10
						Octyl.	
B-1	350	200	450	2.5	—	—	3
2	350	200	450	2.5	—	—	5
3	350	200	450	2.5	—	—	10
4	350	200	450	2.5	—	—	—
脂質分散型ゼラチンフィルム							
						Form.	
D-1	350	200	450	2.5	500	2000	3
2	350	200	450	2.5	500	2000	5
3	350	200	450	2.5	500	2000	10
4	350	200	450	2.5	100	500	10
5	350	200	450	2.5	100	1000	10
6	350	200	450	2.5	100	1500	10
7	350	200	450	2.5	500	3000	10
						Octyl.	
E-1	350	200	450	2.5	500	3000	3
2	350	200	450	2.5	500	3000	12
3	350	200	450	2.5	500	3000	21
4	350	200	450	2.5	500	3000	42

* : Aタイプのフィルム以外の処方には、すべて 2.5% Glu. が 0.4 ml 加えられている。

Glu. : glutaraldehyde. Form. : formaldehyde. Octyl. : octylaldehyde

1.005 mm) および脂質分散型ゼラチンフィルム(約 3 g, 厚さ 0.995~1.005 mm)を図 1 および表 1 に示したように調製した。

なお、精製ゼラチンはナカライトスク(株)より購入した。

可塑剤として、グリセリンおよび D-ソルビトールを用いた⁷⁾。

また、交叉結合剤として、グルタルアルデヒドを単独で用いるか、あるいはグルタルアルデヒドとホルムアルデヒド、またはオクチルアルデヒドを併用した。なお、マイトマイシン C(MMC、協和醣酵)を 1 w/w% 含有したゼラチンフィルム

は、基剤溶解後、その溶液中に MMC を均一に分散させ、それ以外は薬物を含まないフィルムと同様に調製した。

(2) ゼラチンフィルムの *in vitro* および *in vivo* 分解性の測定

① *in vitro* 分解性

ゼラチンフィルムまたは脂質分散型ゼラチンフィルムを約 100 mg になるように円盤状に切り、重量を正確に測定した。これを 37°C に温めた pH 7.4 リン酸緩衝液 30 ml 中に入れ、マグネットイックスターラーで攪拌した。このとき、攪拌子が直接フィルムに触れないようにした。

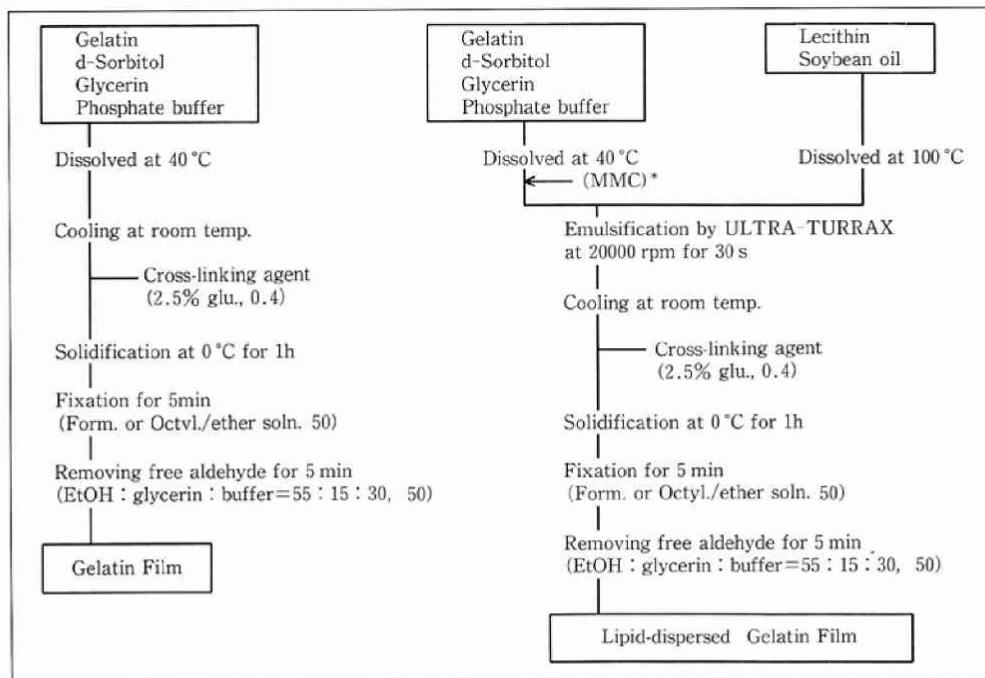


図 1 ゼラチンフィルムおよび脂質分散型ゼラチンフィルムの調整法

*MMC を懸濁含有するフィルムを調製する場合にはここで MMC を加えた。

経時的に上清 2 ml を採取し、同量の緩衝液を戻した。上清中に溶出したゼラチン量を Lowry 法別法を用いて、蛋白質量として定量した⁸⁾。

② *in vivo* 分解性

雄性ウイスター ラット(150~200 g)をペントバルビタールで麻酔後、正中線に沿って約 2 cm 開腹した。100 mg の円盤状に切り抜いたゼラチンフィルム、または脂質分散型ゼラチンフィルムを腹腔内の中腸間に留置した。

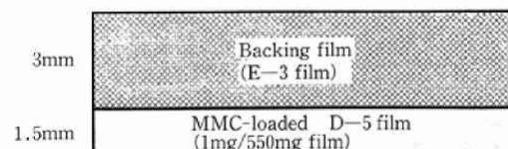
あらかじめ設定した日ごとに開腹し、残存しているフィルムを摘出してそのフィルムを溶解後、Lowry 法別法にてゼラチン残存量を蛋白質量として定量した。

(3) MMC のフィルム透過性測定

ゼラチンフィルム(厚さ約 1.0 mm)を 2-チャンバー拡散セル(有効表面積 0.785 cm² : セルの形状は有効表面積が小さいほかは既報⁹⁾と同様)に挿み、一方に MMC 懸濁 pH 7.4 リン酸緩衝液、もう一方に pH 7.4 リン酸緩衝液(receiver 側)を入れ、37°Cで攪拌した。

経時的に receiver 側を全量採取し、薬物の定量に供した。また、実験を継続するため、新しい緩

(a) マトリックス型



(b) 膜制御型

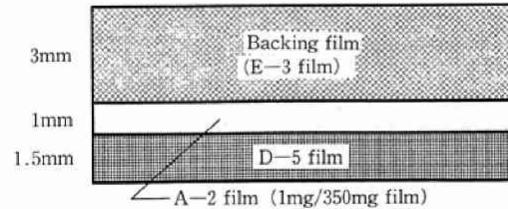


図 2 多層フィルムの模式図

衝液を加えた。なお、MMC の累積透過量および透過速度はフィルムの厚さ 1.0 mm の時の透過量および速度として示した。

(4) MMC 懸濁ゼラチンフィルムからの MMC の放出性の測定

MMC を懸濁含有するゼラチンフィルムの片面に、支持体として不透過性のポリエチレンテレフタレート(PET)フィルム(ニチバン、東京)を貼

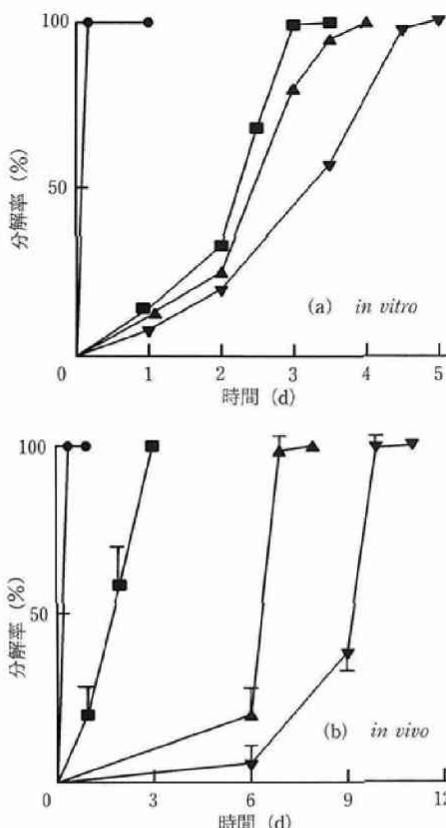


図 3 ゼラチンフィルム(タイプA)の *in vitro* および *in vivo* における分解性
 ●: A-1, ■: A-2, ▲: A-3, ▽: A-4

り、2-チャンバー拡散セルに挟んだ。PET フィルムの貼っていない側のチャンバー内に pH 7.4 リン酸緩衝液を入れ、37°Cで攪拌した。経時的に全量採取し、新しい緩衝液を加えた。

(5) 多層ゼラチンフィルムからの両側への MMC 放出性の測定

MMC を懸濁含有するフィルムの両側に MMC 透過性の異なるフィルムを貼り合わせた製剤を調製した(図 2)。これを2-チャンバー拡散セルに挟み、リン酸緩衝液を両側に入れ、37°Cで攪拌した。経時的に両側の試料を全量採取し、新しい緩衝液を加えた。

(6) MMC の定量

MMC の定量は、既報の方法に従い¹⁰⁾、高速液体クロマトグラフィーシステム(島津製作所)を用いて行った。

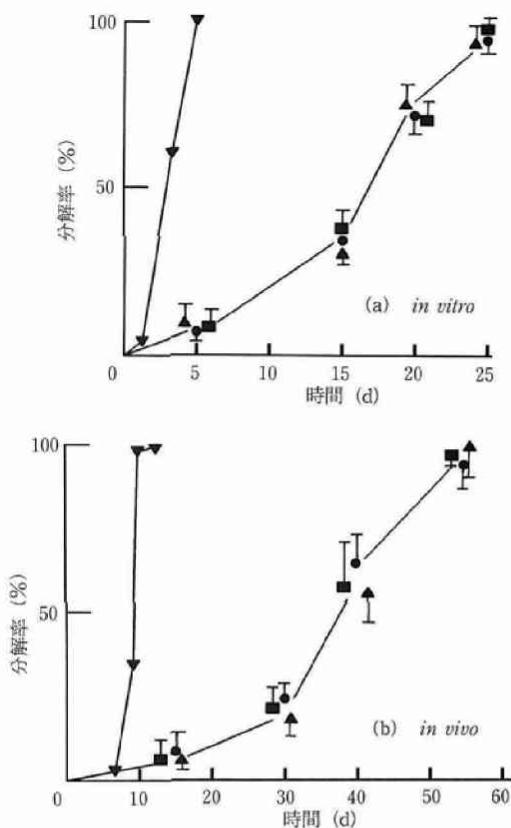


図 4 脂質分散型ゼラチンフィルム(タイプD)の *in vitro* および *in vivo* における分解性
 ●: D-1, ■: D-2, ▲: D-3, ▽: Form. 固定のみ

結果と考察

(1) フィルムの *in vitro* および *in vivo* 分解性

植え込み剤からの目的とする薬物放出挙動は、用いる薬物によって異なってくる。それゆえ、薬物の目的とする放出パターンおよび放出期間により、フィルムの調製を変更しなければならない。しかし、フィルムの形態変化を利用して厳密に薬物の放出をコントロールするのは非常にむずかしく、それゆえ、設置場所でその形態を保持しているほうが望ましい。

用いた薬物の期待する効果が2~3日持続すればよい場合には、形態の保持は4, 5日でもよい。また、時間依存型の薬物で1~2カ月、あるいは半年にわたりその効果を期待する場合には、その期間の1.5~2.0倍程度形態が保持されるべきで

表 2 *In vitro* および *in vivo* におけるゼラチンフィルムおよび脂質分散型ゼラチンフィルムの 50% 分解時間

ゼラチンフィルム								
	50% 分解時間 (d)			50% 分解時間 (d)			50% 分解時間 (d)	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
A-1	1.0 h	—	B-1	>60	—	C-1	6.0	—
A-2	2.0	2.5	B-2	>60	—	C-2	6.0	—
A-3	2.5	6.5	B-3	>60	—	C-3	6.5	—
A-4	3.0	9.0	B-4	4	—	C-4	6.0	—

脂質分散型ゼラチンフィルム								
	50% 分解時間 (d)			50% 分解時間 (d)			50% 分解時間 (d)	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
D-1	17	40	E-1	10	—			
D-2	17	40	E-2	4	—			
D-3	17	40	E-3	6	—			
			E-4	6	—			

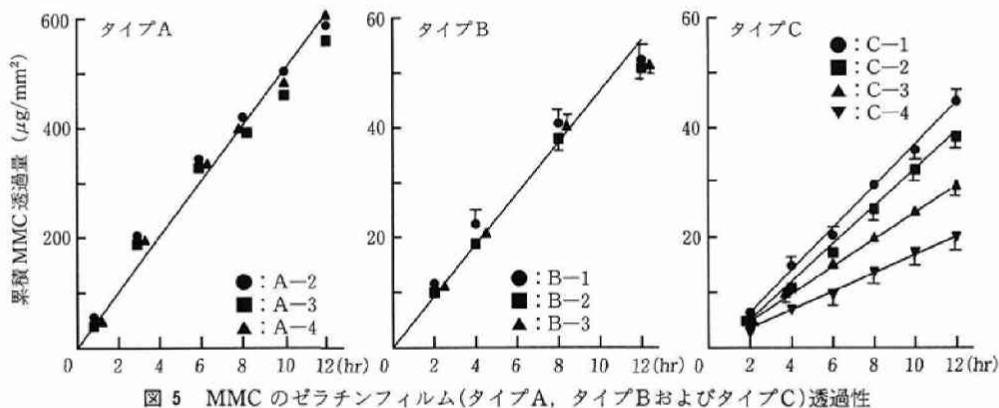


図 5 MMC のゼラチンフィルム(タイプA, タイプB およびタイプC)透過性

ある。多くの薬物に応用することを考えれば、調製したフィルムが、必ず生体内で分解されるならば、その形態保持期間はながければながいほどよいことになる。

図3に、タイプAのゼラチンフィルムの、また図4にタイプDの脂質分散型ゼラチンフィルムの *in vitro* および *in vivo* 分解性を示した。フィルムの分解は、*in vitro*, *in vivo* のどちらにおいてもある時点から急激に溶解するS字曲線様のパターンを示した。これらの溶解パターンは、タイプB, C および Eにおいても同様であった。また、*in vivo*においては *in vitro* よりも分解時間は約2~3倍遅かった。

表2に調製したフィルムの *in vitro* および *in vivo* における50%溶解時間を示した。*in vitro* に

おけるフィルムの分解は、タイプAのフィルムの場合、添加したホルムアルデヒド濃度に依存して遅くなるのに対して、他のタイプのフィルムではほぼ同じ時間に分解した。フィルムの分解速度は、グルタルアルデヒドとホルムアルデヒド、またはオクチルアルデヒドを併用することで、グルタルアルデヒドあるいはホルムアルデヒド単独で用いるよりも遅くなり、その遅延効果はホルムアルデヒドとの併用のほうが大きかった。

これらの結果より、交叉結合剤の併用でフィルムの分解抑制効果はいちじるしく増加し、それは、交叉結合剤のある添加濃度以上でほぼ一定になるものと思われた。また、タイプB~Eのなかでもっともフィルムの分解が速いと予想されるタイプCでも2週間以上体内に残存すると思われた。加え

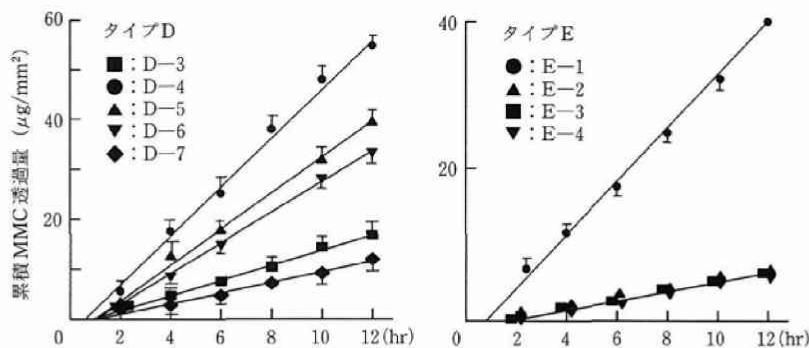


図 6 MMC の脂質分散型ゼラチンフィルム(タイプDおよびタイプE)透過性

表 3 ゼラチンフィルムおよび脂質分散型ゼラチンフィルムの MMC 透過速度

ゼラチンフィルム					
	透過速度 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2 \text{ h}$)		透過速度 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2 \text{ h}$)		透過速度 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2 \text{ h}$)
A-2	40.68	B-1	4.08	C-1	3.73
A-3	41.03	B-2	3.76	C-2	2.40
A-4	42.53	B-3	3.62	C-3	3.14
				C-4	1.67
脂質分散型ゼラチンフィルム					
	透過速度 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2 \text{ h}$)		透過速度 ($\mu\text{g}/\text{mm}^2 \text{ h}$)		
D-3	1.52	E-1	3.72		
D-4	4.28	E-2	0.63		
D-5	3.67	E-3	0.66		
D-6	1.10	E-4	0.68		
D-7	1.38				

て、*in vitro* と *in vivo* の 50% 分解時間をくらべると、それらのランクオーダーは同じであり、このことから *in vitro* 分解実験法が有用であることが示唆された。

(2) MMC のゼラチンフィルム透過性

MMC のタイプ A～C のフィルム透過性を図 5 に示した。タイプ A および B のフィルムの MMC の透過は、添加したホルムアルデヒドの濃度に依存せずほぼ一定であったが、グルタルアルデヒドを併用したタイプ B の透過速度はタイプ A にくらべ約 1/10 に減少した。

一方、グルタルアルデヒドとオクチルアルデヒドを併用したタイプ C では、添加したオクチルアルデヒド濃度に依存して MMC の透過速度はさらに減少し、タイプ C-4 でタイプ A の約 1/25 となった。

MMC のタイプ D および E のフィルム透過性を図 6 に示した。ホルムアルデヒドの固定化濃度を 10% とし、含有させる脂質の濃度を増加させたタイプ D の場合、MMC の透過速度は脂質量に依存して減少した。一方、脂質含有量を一定とし、添加したオクチルアルデヒド濃度を増加させたタイプ E の場合、比較的低濃度のタイプ E-1 のフィルム以外 MMC の透過速度はほぼ同程度であった。

これらタイプ D および E の脂質分散型ゼラチンフィルムからの MMC の透過性は、タイプ C および D からのそれよりもさらに遅くなり、MMC 透過速度は、タイプ D-5 でタイプ A の約 1/40、タイプ E-2～4 で約 1/70 であった。

表 3 に、フィルムの厚さを 1.0 mm としたときの、すべてのタイプのフィルムの MMC の透過速度を示した。フィルムを通る MMC の透過速度

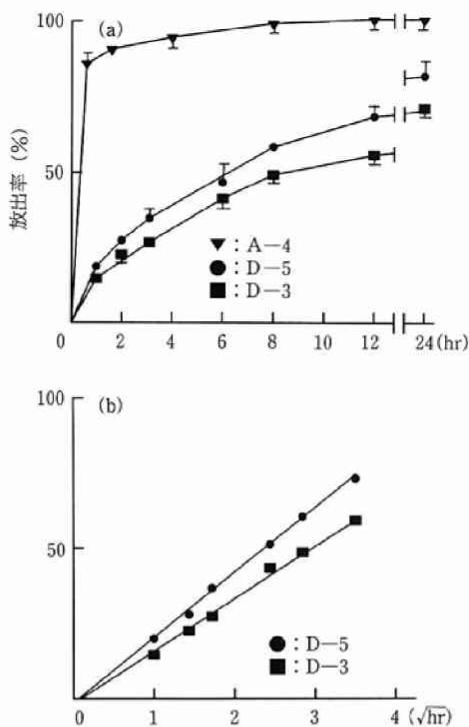


図 7 MMC を含有する脂質分散型ゼラチンフィルムからの MMC の放出
a : 時間にに対する累積 MMC 放出率
b : 時間の平方根に対する累積 MMC 放出率

は、 $42.53 \mu\text{g}/\text{mm}^2 \cdot \text{h}$ から $0.63 \mu\text{g}/\text{mm}^2 \cdot \text{h}$ まで
さまざまに調製できることが明らかとなった。

(3) ゼラチンフィルムからの MMC の放出性

図 7 a に MMC を懸濁含有するタイプ A-3, D-3 および D-4 フィルムからの MMC の時間に対する % 放出量を、図 7 b に時間の平方根に対する % 放出量を示した。フィルムからの MMC の放出速度は、交叉結合剤の併用、脂質含量の増加でいちじるしく減少した。なお、MMC の放出性は Higuchi, T. の式¹¹⁾ に従った。

(4) 多層ゼラチンフィルムからの MMC の両側への放出性

以上の結果を踏まえ、腹腔内の固形癌切除部位の残存微小癌病巣を effective compartment と想定し、植え込み剤の調製を試みた。すなわち、病巣側への薬物放出速度を速くし、反対側への放出速度を遅くするように設計した(図 2)。図 2 a は

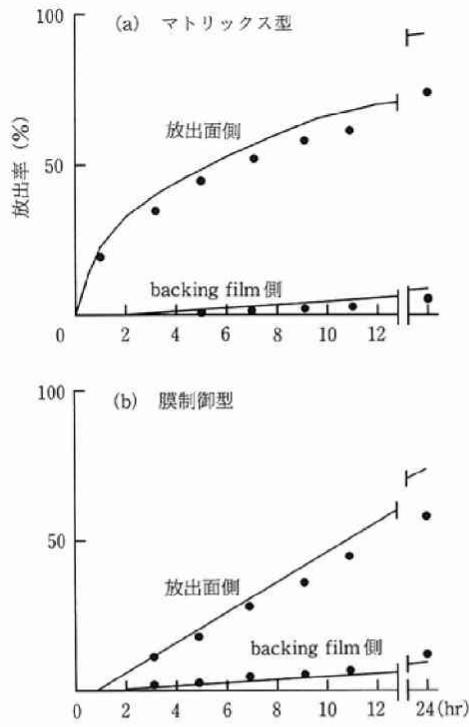


図 8 多層フィルムの放出面側(仮想癌部位被覆側)および Backing Film 側(非被覆側)への MMC の放出
—: 計算値, ●: 実測値

貼付初期から薬物が放出し、かつそれがほぼ 24 時間で終了するように 2 層にしたフィルムで、病巣側には MMC を懸濁含有するタイプ D-5 フィルムを、反対側には E-3 フィルムを用いるように設定した。また、膜の厚さは、それぞれ 1.5 および 3.0 mm とした。

したがって、病巣側への MMC 放出は図 7 の MMC 懸濁 D-5 フィルムとほぼ同様であり、反対側への MMC の放出速度は図 6 の E-3 フィルムの MMC 透過速度の約 1/3 になることが予想される。

図 2 b は一定の速度で病巣に薬物を送り込むように 3 層にしたフィルムで、病巣側にはタイプ D-5 のフィルムを、中央に MMC を懸濁含有する A-2 フィルムを、反対側には E-3 フィルムを用いることとした。また、膜の厚さは、それぞれ 1.5, 1.0 および 3.0 mm とした。MMC を懸濁含有する A-2 フィルムからの MMC の放出は非常に速

く、両側に挟んだD-5およびE-3フィルムがMMCの透過律速となるので、病巣側への薬物放出速度は図6のD-5フィルムの2/3に、また反対側へのMMCの放出速度は図6のE-3フィルムのMMC透過速度の約1/3になることが予想される。

図8に、これら2種のフィルムからの両側へのMMCの%放出量を示した。用いた膜の種類や膜厚を考慮に入れ、先のMMCの放出および透過実験データに基づき計算して得た曲線と実測値とはよく一致し、これらフィルムを種々に組み合わせることで、希望とする薬物放出を得られることが明らかとなった。

結語

以上、薬物放出制御の観点から、膜製剤としての植え込み剤のシステム設計を行った。その結果、モデル薬物として用いたMMCの放出速度や膜透過速度を、膜の調製条件を種々に変えることにより、2オーダー近くかえることができた。また、膜透過制御製剤として利用すれば、その膜厚によっても透過速度をコントロールできる。加えて、より脂溶性の高い固定化剤を用いればさらにさまざまな薬物放出速度の得られる製剤ができるであろう。

今回は膜製剤として評価したが、ペレットや球形顆粒といった製剤にも容易に応用が可能であり、植え込み剤としての用途は広いものと期待される。

文献

- 渡辺 寛, 飯塚紀文, 未舛恵一, 行徳素通: 植込型徐放性制がん剤(Im-SRA)の開発とその臨床応用. *Oncologia* 20: 105-114, 1987.
- 小野田正, 阪上賢一, 松岡順治・他: Interleukin 2(IL-2)徐放製剤とnHuTNF- α の抗腫瘍性相乗効果の検討. *Drug Delivery System* 6: 381-385, 1991.
- Ogawa, Y., Okada, H., Heya, T., Shimamoto, T.: Controlled Release of LHRH Agonist, Leuprolide Acetate, from Microcapsules: Serum Drug Level Profiles and Pharmacological Effects in Animals. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 439-444, 1989.
- Yoshioka, T., Hashida, M., Muranishi, S., Sezaki, H.: Specific Delivery of Mitomycin C to the Liver, Spleen, and Lung: Nano- and Microspherical Carriers of Gelatin. *Int. J. Pharmaceut.* 8: 131-141, 1981.
- Tabata, Y., Uno, K., Muramatsu, S., Ikada, Y.: *In Vivo* Effect of Recombinant Interferon Alpha A/D Incorporated in Gelatin Microspheres on Murine Tumor Cell Growth. *Jpn J. Cancer Res.* 80: 387-393, 1989.
- Komatsu, M., Tagawa, K., Goto, S.: Biopharmaceutical Evaluation of Gelatin Microcapsules of Sulfonamides. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 262-268, 1983.
- Griffenhagen, G.: *J. Am. Pharm. Assoc. Pract. Ed.* 17: 810, 1956.
- 菅原 潔, 福島正美: タンパク質の定量法: 生物化学実験法. 化学出版センター, 1977.
- Okumura, M., Sugibayashi, K., Ogawa, K., Morimoto, Y.: Skin Permeability of Water-Soluble Drugs. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1404-1406, 1989.
- Natsume, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y.: *In Vitro* Release Profile of Mitomycin C from Albumin Microspheres: Extrapolation from Macrospheres to Microspheres. *Pharm. Res.* 8: 185-190, 1991.
- Higuchi, T.: Mechanism of Sustained-Action Medication Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices. *J. Pharm. Sci.* 57: 1145-1149, 1963.