

博士論文

非ラメラ液晶形成脂質を含有した皮下投与製剤の開発

Development of Subcutaneously Administered Formulations
Containing Non-Lamellar Liquid Crystal Forming Lipids

2022年3月

城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 博士後期課程

薬粧品動態制御学講座

岡田 明恵

博士論文

非ラメラ液晶形成脂質を含有した皮下投与製剤の開発

Development of Subcutaneously Administered Formulations
Containing Non-Lamellar Liquid Crystal Forming Lipids

本論文は城西大学大学院薬学研究科薬科学専攻博士論文(甲)である。

2022年3月

城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 博士後期課程

薬粧品動態制御学講座

岡田 明恵

目次

緒言	1
第 1 部 NLLC 形成脂質を用いた持続性注射剤の検討	7
第 1 章 水溶性中分子薬物含有持続性注射剤の調製および評価	7
第 1 節 試験方法	8
1. 試薬および試験材料	8
2. 持続性注射剤調製方法および処方	10
3. 偏光顕微鏡による偏光観察	11
4. SAXS 装置による NLLC 構造解析	12
5. 吸水試験	13
6. 放出試験	13
7. FD-4 定量法	13
8. 重回帰分析による解析	14
9. 動物試験	14
10. 皮下投与試験	14
11. 皮膚凍結切片作製と共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察	15
12. 統計解析	15
第 2 節 結果および考察	16
1. NLLC 構造観察	16
2. NLLC 構造解析	18
3. 製剤への水分吸水率 (%)	21
4. FD-4 放出率 (%)	22
5. 重回帰分析を用いた製剤からの FD-4 放出性に関わる因子の解明	26
6. 血漿中薬物濃度推移	28
7. 投与部位組織観察	32
第 3 節 小括	35
第 2 章 実使用を考慮した LA 内封持続性注射剤の調製および評価	37
第 1 節 試験方法	39
1. 試薬および試験材料	39
2. 持続性注射剤の処方および調製方法	40
3. 偏光観察	41
4. SAXS による NLLC 構造解析	41
5. Cryo-TEM 観察	41

6.	放出試験	41
7.	動物試験	41
8.	皮下投与試験	41
9.	統計解析	41
10.	LA の定量法	42
第 2 節	結果および考察	43
1.	製剤の偏光観察および SAXS 解析	43
2.	製剤からの <i>in vitro</i> 放出試験	47
3.	<i>In vivo</i> 試験	50
第 3 節	小括	54
第 2 部	NLLC 形成脂質を用いた微粒子製剤の検討	55
第 1 節	試験方法	57
1.	試薬および試験材料	57
2.	新規微粒子製剤の処方および調製方法	57
3.	SAXS による NLLC 構造解析	58
4.	Cryo-TEM 観察	58
5.	粒子径および表面電位測定	59
6.	粘度測定	59
7.	見かけの内封率(%)の算出	59
8.	^1H - ^1H nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) 核磁気共鳴(NMR)分光法による測定	60
9.	放出試験	60
10.	動物試験	61
11.	皮下投与試験	61
12.	LA の定量法	61
13.	統計解析	61
第 2 節	結果および考察	62
1.	調製製剤の外観観察	62
2.	粘度測定	62
3.	Cryo-TEM による観察および SAXS による構造断定	63
4.	NMR による LA 相互作用解析	65
5.	調製製剤粒子物性および LA 内封率	68
6.	<i>In vitro</i> 放出性評価	69
7.	BA に及ぼす投与製剤の影響	70
8.	BA に及ぼす製剤投与デバイスの影響	73

第3節 小括	77
総括	78
利益相反	82
謝辞	83
参考文献	84
付録 頸静脈カニューレーション手術	I
1. 頸静脈カニューレーション手術器具および消耗品	I
2. 23 G 注射針の加工方法	II
3. カニューレーションチューブの作成方法	III
4. 採血用延長チューブの作成方法	IV
5. 頸静脈カニューレーションラットの作成方法	V
6. 採血方法	XII
7. 参考資料	XIII

略語

AI	Artificial Intelligence
AUC	Area Under Curve
BA	Bioavailability
CMC	Critical Micelle Concentration
CPP	Critical Packing Parameter
<i>d</i>	Interplanar spacing
DDS	Drug Delivery System
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
FCC	Face-Centered Cubic
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran <i>M.W.</i> 4,000
FDA	Food and Drug Administration (アメリカ食品医薬品局)
<i>H2</i>	Reverse hexagonal
<i>i.d.</i>	Intradermal administration
IoT	Internet of Things
<i>i.v.</i>	Intravenous administration
LA	Leuprolide acetate
Log <i>RR</i>	Log Release Rate
Log <i>WAR</i>	Log Water Absorption Ratio
<i>M.W.</i>	Molecular weight
MC	MGE Content
MEMS	Micro Electro Mechanical Systems
MGE	mono- <i>O</i> -(5,9,13-trimethyl-4-tetradecenyl) glycerol ester
MN	Microneedle
MJ	MicronJet™
NCC	Number of Carbon Chains
NLLC	Non-Lamellar Liquid Crystal
PADB	Presence or Absence of Double Bond
PC	Phospholipids Content
PLGA	Poly-Lactide-co-Glycolide Acid

<i>Pn3m</i>	Reversed bicontinuous cubic
PSR	Pore Spacing Ratio
QOL	Quality of Life
Q1	Bicontinuous cubic
Q2	Reversed bicontinuous cubic
RMSE	Root Mean Square Error
SA	Sodium Azide
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
s.c.	Subcutaneous administration

記号

CL_{tot}	全身クリアランス
C_{max}	最高血中薬物濃度
C_{out}	製剤外層薬物濃度
C_{total}	製剤中薬物濃度
$t_{1/2}$	半減期
T_{max}	最高血中薬物濃度に達した時間

緒言

近年、世界の新薬市場では、医薬品に用いられる薬物としての注目が低分子化合物から中・高分子化合物(バイオ医薬品等)に移行し、世界の医薬品売上の上位を占めている[1-3]。一般的に、バイオ医薬品を用いた治療は点滴や注射により行われており、これらを用いた治療は基本的に通院を伴うため、患者の Quality of Life(QOL)の維持に加え、通院と仕事の両立支援も重要となる。近年の、Artificial Intelligence(AI)や Internet of Things(IoT)などの進展に伴う第4次産業革命はより働き方に大きく影響を与えられ、これらの技術を用いた新たな医薬品開発法について熟考する時期にも来ている。このことから、自己投与可能な製剤、投与回数を少なくする放出持続型製剤、さらに IoT を利用した薬物投与の最適化を支援する方法などの確立が急務と考えられる[4]。著者は、Drug Delivery System(DDS[5])に Micro Electro Mechanical Systems(MEMS)や IoT 技術を組み合わせ、ウェアラブルデバイスを用いて自己投与でき、かつ薬物放出性や吸収性を外部制御により可能とする装着型薬物送達システム(Installable DDS, iDDS)の開発を着想した。すでに、装着型デバイスによる生体モニタリングシステムの有用性に関する研究報告はある[6-8]、一方、著者が着想した薬物送達可能とする iDDS に関する報告はほとんどない。iDDS はアクセスがしやすい皮膚を投与部位としており、Figure 1 に示すような皮膚の上に適用するパッチ製剤や皮膚の中に投与する皮内および皮下注射用製剤などの DDS 製剤と低侵襲で薬物の投与が可能なマイクロニードル(MN)や電気エネルギーを駆動力としたイオントフォレシスなどの技術の組み合わせにより実現可能になると考えている。

一方、バイオ医薬品である抗体医薬品の投与では、アナフィラキシー様の副作用(インフュージョンリアクション)を示すことがあるため、長時間に渡って点滴投与を行う場合がある。Jin らは、薬物が徐々に血管またはリンパ管に移行する皮下注、皮内注、筋注等の種々投与方法によりインフュージョンリアクション等の副作用の低減につながることを報告している[9]。このような投与経路から、抗体医薬品を自己投与することが一般的になると、治療時間の短縮は患者に加え医療従事者の負担軽減につながる。本論文では、iDDS に応用可能な製剤を調製することを最終目標とし、はじめに、投与回数を減らすことができる持続性注射剤および持続的に投与可能な微粒子製剤の開発に注目した。

持続性注射剤は内封薬物を長期間放出し血中薬物濃度を維持することで効果を示す製剤全般を指し、Figure 2 にこれら製剤の種類をまとめた。製剤には、薬物の懸濁液からなる懸濁注射剤、固体やゲルからなる implant または pellet 製剤、生体適合性素材であるリン脂質を用いて調製さ

れるリポソーム製剤、生分解性素材であるポリ乳酸とグリコール酸を化学修飾したポリ乳酸グリコール酸 (PLGA) からなるマイクロスフェア製剤があり、治療薬として治療効果の改善、副作用の低減、QOL の改善に貢献している [10-13]。

閉鎖小胞であるリポソームは親水、親油性薬物を内封可能だが、低い薬物内封効率および低い製剤安定性が製剤開発工程で克服するポイントとなる。PLGA はポリ乳酸とグリコール酸の組成比や共重合体の分子量の違いでガラス転移点や加水分解速度が異なるため、薬物の放出速度を調整できる利点を有するものの水分の影響を受けやすく、粒子の付着凝集性が高いため、ハンドリングに乏しいなどの問題点がある。

本研究では、幅広い物性の薬物を封入可能で、より容易に製剤調製が可能な新規徐放性製剤の基剤の選択が重要 [14, 15] であると考え、持続性注射剤の基剤として、新規 DDS キャリアとして注目されている非ラメラ液晶 (NLLC) に注目した [16-19]。NLLC 構造 (Fig. 3) には、主に逆キュービック液晶 (Q2)、逆ヘキサゴナル液晶 (H2) などがあり、NLLC 構造形成には臨界充填パラメーター (CPP) が大きく影響する。NLLC は疎水基を外側に配する構造から高い生体接着性を有しており、非破壊的に含有薬物を放出し、難溶性化合物の可溶化、タンパク質高次構造の安定化に寄与することが明らかになっている [20-23]。

NLLC を自己形成する脂質としてモノオレイン酸グリセリル (GMO) とフィタントリオール (PHY) がよく知られており、水と接触することで NLLC を形成しする。すでに、GMO は医薬品添加剤としてアメリカ食品医薬品局 (FDA) で承認されている [24] もの、GMO は室温で固体、PHY は室温で高い粘性を有しているため製剤調製時に加温や粘性改善のために添加剤の利用などが必要であった。

そこでより簡便な NLLC 製剤調製を可能とするために、水と接触することで瞬時に NLLC を形成しかつ、室温で液体・低粘度な NLLC 自己形成脂質として、株式会社ファルネックスが開発した mono-O-(5,9,13-trimethyl-4-tetradecenyl) glycerol ester (MGE) に注目した。

本論文では、NLLC 形成脂質である MGE の持続性注射剤への有用性を評価するために、第 1 部では持続性注射剤の開発を行い、第 1 章では水溶性中分子蛍光薬物をモデル薬物に選択し製剤からの薬物放出挙動および吸水過程等について調査した。第 2 章では実使用を想定し、すでに使用実績がある脂溶性中分子薬物をモデル薬物として選択し徐放性を確認した。

第 2 部では、第 1 部で得られた知見をもとに、皮膚内安定性が乏しい報告がある酢酸リュープロレリン (LA) をモデル薬物として選択し、低侵襲な投与方法である MN 等の様々なデバイスで投与可能な MGE 添加微粒子製剤の調製を試みた。以上、これらの検討を通じ NLLC 形成脂質を

含有した皮下投与製剤の開発を行うことでiDDSに応用可能なMN等との併用利用を可能とする製剤の調製を試みた。

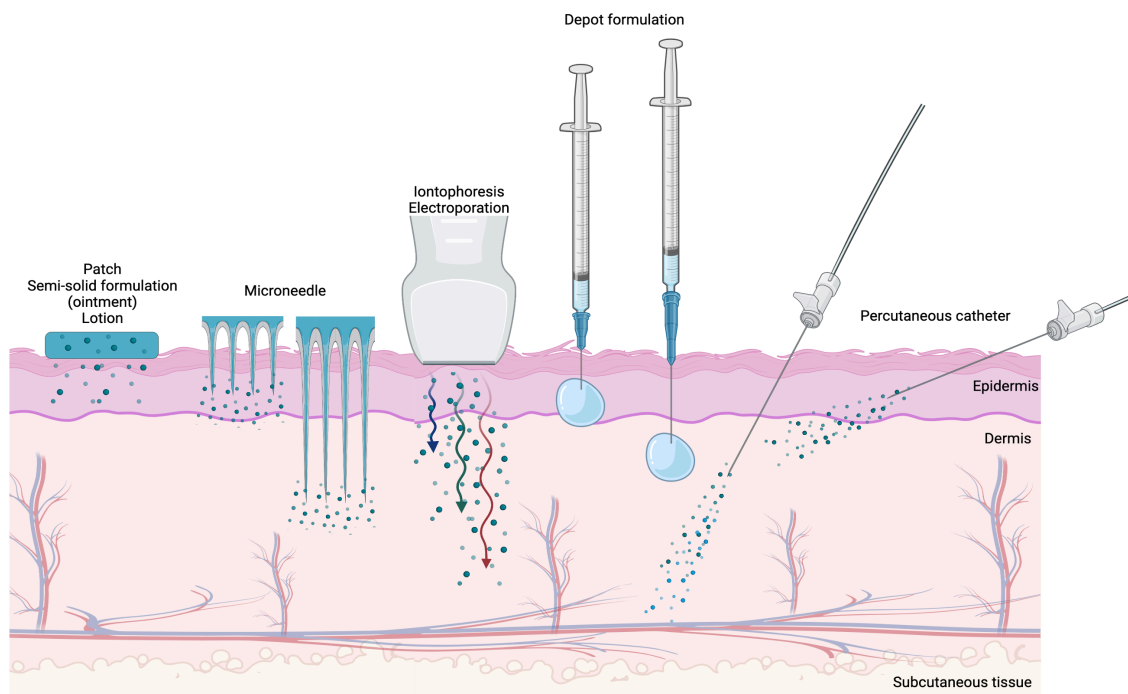


Fig. 1 Various drug delivery system through the skin. This system includes an injection system with a needle that allows the drug to be administered through the skin.

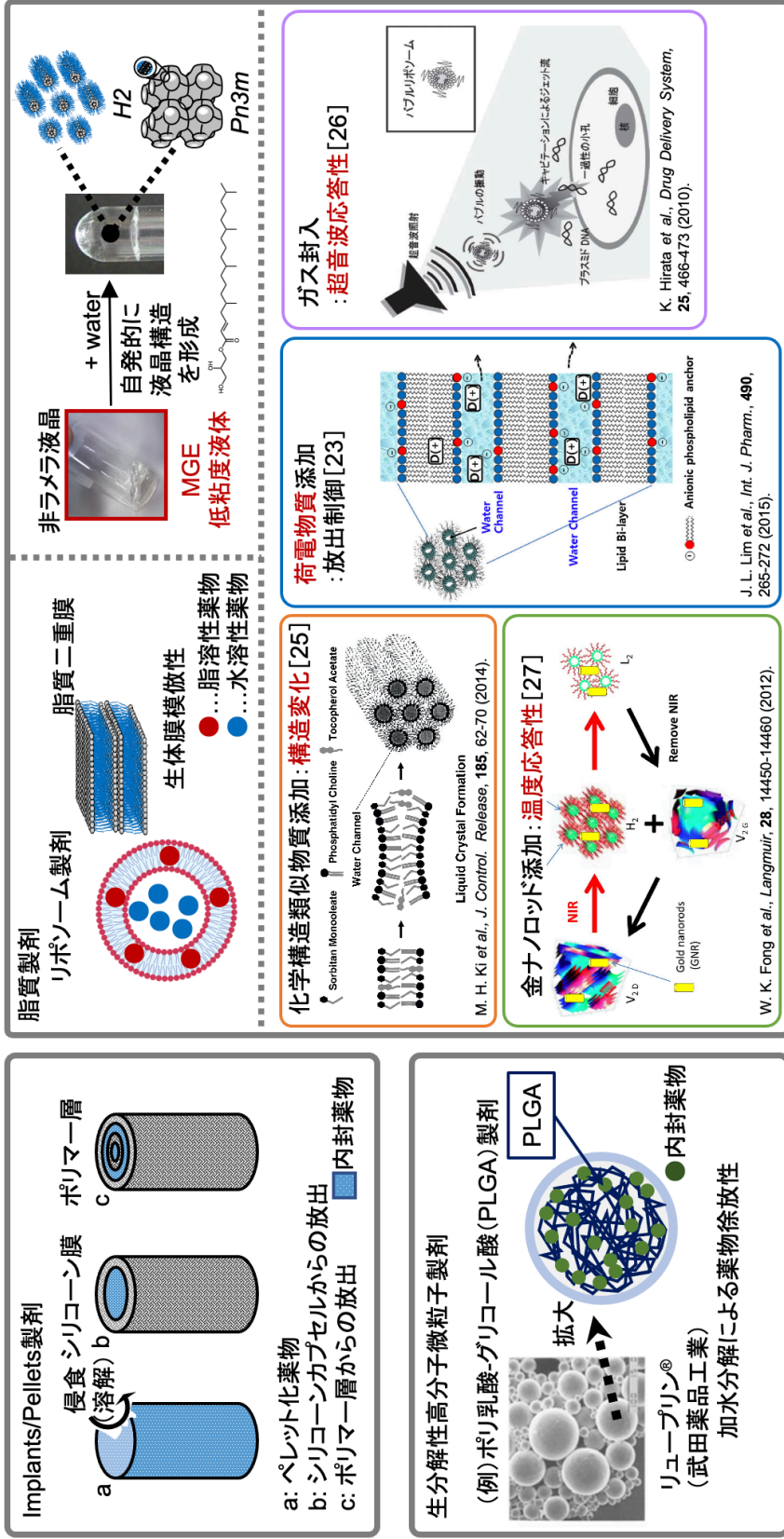


Fig. 2 Examples of controlled release of drug from formulations.

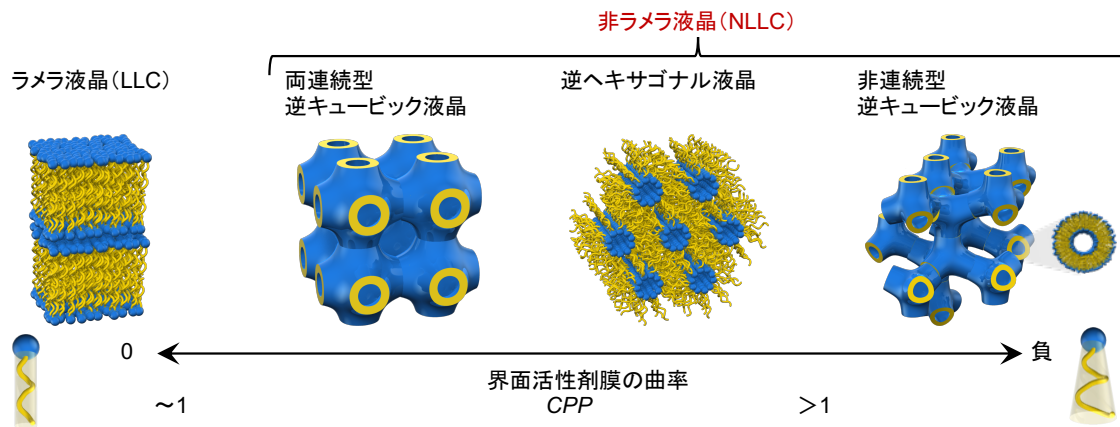


Fig. 3 Structure of NLLC

第1部 NLLC 形成脂質を用いた持続性注射剤の検討

第1章 水溶性中分子薬物含有持続性注射剤の調製および評価

前述したように、バイオ医薬品は世界の医薬品市場の主流となっている。一方、それらは消化管からのバイオアベイラビリティ(BA)が低いため経口投与が難しく、皮膚を介した皮下・皮内投与に加え経皮投与が投与経路として注目されている。経皮投与は肝初回通過効果の回避、経口 BA の低い薬物の効率的な送達に加え、長時間血中濃度の維持が可能である。近年、MEMS の進展により、経皮投与型デバイスが種々開発されており、MN、無針注射や熱穿孔等、低侵襲で薬物を皮下および皮内に直接投与が可能になる[6]。今後、投与デバイスと製剤の組み合わせは、バイオ医薬品の患者による自己投与方法として利用されると考えられる[7]。

投与デバイスと製剤を組み合わせた iDDS を実現するために、iDDS に応用可能な製剤として、近年 DDS キャリアとして研究が盛んに行われている NLLC を基剤とした持続性注射剤の調製を行った。NLLC は Figure 3 に示すような構造をとり、形成する界面活性剤等の CPP により、球状ミセル ($CPP < 1/3$)、 $Q1$ ($CPP < 1/3$)、ラメラ液晶 ($CPP \approx 1$)、 $Q2$ ($CPP \geq 1$)、 $H2$ ($CPP > 1$) を形成する[28]。NLLC は複雑な内部構造を形成することで高い薬物内封性(親水性、親油性等)および薬物放出制御能を有し[19, 29, 30]、また、内封したタンパク質の物理的安定性に寄与することが知られている[20, 31, 32]。形成する NLLC 構造は添加剤、温度、pH、含水量が影響することから[15, 23, 33, 34]、MGE を基剤とした持続性注射剤の開発を行うために薬物放出制御因子を明らかにする必要がある。

株式会社ファルネックスが開発した MGE ($0.47 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ (ずり速度 10 s^{-1})) に、種々飽和・不飽和リン脂質を添加し持続性注射剤を調製した。製剤のモデル薬物として水溶性中分子蛍光薬物である平均分子量 4,000 の Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4) を添加し、調製した製剤の物性評価(偏光観察、吸水試験、小角 X 線散乱 (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) 装置による構造決定、放出性評価)に加え、投与後 48 時間にわたる血中薬物濃度推移を評価し、MGE の持続性注射剤基剤としての有用性および NLLC 構造からの FD-4 の放出性に及ぼす因子の解明を試みた。

第1節 試験方法

1. 試薬および試験材料

FD-4 は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。Sodium azide (SA)、2-メチルブタン(イソペンタン)は、富士フィルム和光純薬株式会社(大阪, 日本)より購入した。NLLC 形成脂質の MGE は、株式会社ファルネックス(横浜, 日本)より供与された。飽和リン脂質として 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC)、 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DSPC)、 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)を、不飽和リン脂質として 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC)を選択し日油株式会社(東京, 日本)より購入した。Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80)は、東京化成工業株式会社(東京, 日本)より購入した。動物試験に用いたイソフルラン吸入麻酔液はファイザー株式会社(東京, 日本)、ヘパリン Na 注 5 千単位/5 mL は持田製薬株式会社(東京, 日本)より購入した。

Table 1 にモデル薬物、MGE、種々リン脂質の構造式および物理化学的パラメータを示す。

Table 1 Chemical structures and physical properties of FD-4, MGE and phospholipids.

	Structure	M.W.		
Fluorescein isothiocyanate-dextran MW4,000 (FD-4)		3,000 ~ 5,000		
	Structure	M.W.	Log P	CPP [36]
mono-O-(5,9,13-trimethyl-4-tetradecenyl) glycerol ester (MGE)		342.5	4.66	>1
	Structure	M.W.	XLogP _{3-AA} [35]	CPP [36]
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DMPC)		677.9	10.5	~1
1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DPPC)		734.0	12.0	~1
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DSPC)		790.2	13.2	~1
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DOPC)		786.1	12.8	~1

XLogP_{3-AA}...既知の化合物のLogP値をもとに、各原子の寄与の総和を計算し多変量線形回帰分析により算出した値

2. 持続性注射剤調製方法および処方

Table 2 に調製した種々製剤の組成を示す。攪拌子(PTFE 攪拌子ダブル十字型 D-10 F-4037-01、フロン工業株式会社、東京、日本)が入った 9 mL バイアル(ラボランスクリユー管瓶 No.3、AS ONE K. K.、大阪、日本)に、MGE、エタノールおよび Tween 80 を秤量した後、60 °C、500 rpm に設定したホットプレート(Hotplate Stirrer RSH-1DN, AS ONE K.K., 大阪、日本)にて 5 分間攪拌後、秤量した種々飽和・不飽和リン脂質を加え 60 °C、700 rpm で、さらに 1 時間攪拌した。なお、調製した製剤は、M $\alpha\beta$ と略し、M は、MGE、エタノール、Tween 80 を含有した基剤、 α は添加したリン脂質の種類(mc / pc / sc / oc)、 β は添加したリン脂質含有率(Mmc12 製剤は MGE / DMPC / エタノール / Tween 80 からなり、DMPC を 12%含有した製剤)を示す。製剤中 FD-4 含量が 15.6 mg/mL となるよう FD-4 をペレットペッスル(Thermo Fisher Scientific K.K., 東京、日本)を用い 2 分間混合した。なお、粉末状のリン脂質を溶解させるために用いたエタノールと Tween 80 は MGE のみからなる製剤を除くすべての製剤でそれぞれ 10%および 2%となるように添加した。

ただし、DPPC および DSPC を 48%含有した製剤は高濃度のリン脂質添加により室温で固体となったことから試験を実施しなかった。

Table 2 Composition of prepared formulations.

α	-	-	sc		oc		oe		og	
β	-	-	12	24	12	24	12	24	12	24
	m	M	Msc12	Msc24	Moc12	Moc24	Moe12	Moe24	Mog12	Mog24
MGE	100	88	76	64	76	64	76	64	76	64
DSPC	-	-	12	24	-	-	-	-	-	-
DOPC	-	-	-	-	12	24	-	-	-	-
DOPE	-	-	-	-	-	-	12	24	-	-
DOPG	-	-	-	-	-	-	-	-	12	24
Ethanol	-	10	10		10		10		10	
Tween 80	-	2	2		2		2		2	

*処方製剤中で、MGEはm、DSPCはsc、DOPCはoc、DOPEはoe、DOPGはogと略す。
また、MGE、エタノールおよびTween 80を含有する製剤をMで略す。

unit: %

*処方製剤中で、MGE は m、DMPC は mc、DPPC は pc、DSPC は sc、DOPC は oc と略す。また MGE はエタノールおよび Tween 80 を含有する製剤を M で略す。

3. 偏光顕微鏡による偏光観察

Table 3 に偏光顕微鏡の観察条件を示す。製剤の NLLC 構造形成の有無を偏光顕微鏡 (VHX-5000、株式会社キーエンス、大阪、日本) を用いて評価した。粘性ディスペンサー (M10 (本体) および CP10 (キャペラリー&ピストン)、エムエス機器株式会社、大阪、日本) を用い、製剤 10 μ L をスライドガラス (S9215、水縁磨フロスト t1.0 MAS、松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) に滴下した。その後、同量の 1/30 M pH 7.40 等張リン酸塩緩衝液 (pH 7.40 PBS) を製剤上に滴下後 15 分間静置し、カバーガラス (C018181、松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) をのせ、室温で観察した。

Table 3 Observation conditions with polarizing microscope.

Brightness	Shutter speed	Manual 4.8 ms
	Gain	Auto 70
Illumination	Epi-illumination	On 255
	Transmitted lighting	On 255
	Adjust brightness	40-70
Image quality UP HDR	Texture enhancement	25-50
	Contrast	50-80
	Color adjustment	5-100

4. SAXS 装置による NLLC 構造解析

SAXS 装置 (Nano-Viewer、リガク株式会社、東京、日本) を用いて NLLC 構造解析を行った。3 mL の pH 7.40 PBS 中で 48 時間吸水させた製剤を観察サンプルとし、測定は金沢大学理工研究域 (石川、日本) に委託した。室温 (25 °C) で測定を行った。

SAXS 測定で得られた回折ピークから、細孔間距離 (d) と格子面の Miller 指数 (hkl) を算出することで NLLC 構造の同定できる。Figure 4 に SAXS で得られる NLLC 構造特有の面間隔比と Miller 指数の例を示す [37, 38]。面間隔は、Bragg の式 (1) を用いて算出できる [39-41]。

$$2d \sin \theta = n \lambda \dots \dots (1)$$

ここで、 d (nm)、 λ は X 線波長、 θ はブラッグ角、 n は整数を示す。

SAXS 測定では構造の有無に加え構造の秩序性が評価でき、例えば、1st peak が小角側に移行するほど d が増加し NLLC 構造を形成するドメインが大きくなる、また、ピークの半値幅が 1 : 1 に近いほど均一な NLLC 構造を有していること等が確認できる。さらに、1st peak を基準にそれ以降のピーク比より、式 (2) および式 (3) を用いて算出される値より結晶構造を決定することができる (Fig. 4)。式 (2) に H2 構造、式 (3) に Q2 構造の d_{hk} および d_{hkl} の算出式をそれぞれ示す。

$$d_{hk}(hex) = \frac{a_{hex}}{(4/3)^{\frac{1}{2}}(h^2+hk+k^2)^{\frac{1}{2}}} \dots \dots (2)$$

$$d_{hkl}(cubic) = \frac{a_{cub}}{(h^2+k^2+l^2)^{\frac{1}{2}}} \dots \dots (3)$$

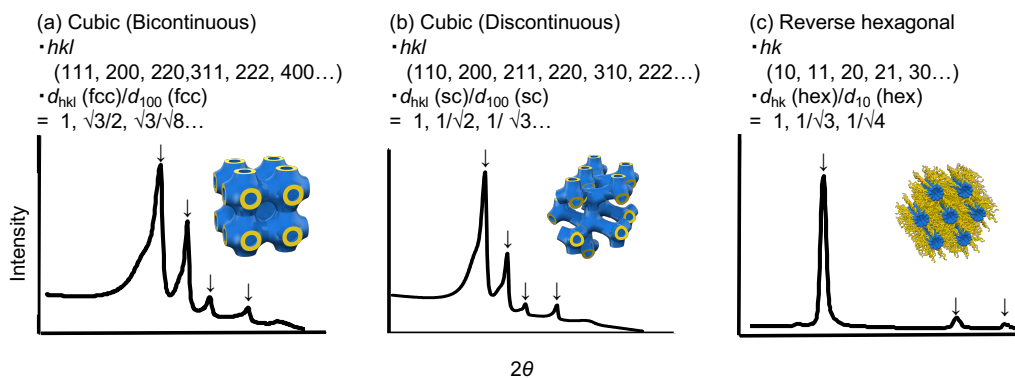


Fig. 4 Representative SAXS patterns of NLLC.

5. 吸水試験

FD-4 非添加製剤 100 μ L を分画分子量 12,000 の Pur-A-Lyzer™ mini 12000 dialysis kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA., 以下透析チューブと略記)に入れ 0.01% SA 含有 pH 7.40 PBS に入れ吸水試験を行った。なお、製剤への吸水率は式(4)を用いて算出した。

$$\begin{aligned} & \text{48 時間後製剤吸水率(\%)} \\ & = ((48 \text{ 時間後製剤重量(g)} - \text{吸水試験前製剤重量(g)}) / \text{吸水試験前製剤重量(g)}) \times \\ & 100 \cdots \cdots (4) \end{aligned}$$

6. 放出試験

種々製剤 100 μ L を透析チューブに入れ、放出溶媒として 20 mL の 0.01% SA 含有 pH 7.40 PBS 20 mL で放出試験[42-44]を行った。試験中、アルミホイルで遮光しウォーターバス(AS ONE 株式会社, 日本, 大阪)中で 37 ± 0.02 °C の条件で 48 時間試験を行い経時的にレシーバ側から 500 μ L 溶液を採取し、同量の放出溶媒を戻した。なお、製剤からの FD-4 の放出率は式(5)を用いて算出した。

$$\begin{aligned} & \text{48 時間後 FD-4 累積放出率(\%)} \\ & = (48 \text{ 時間後 FD-4 累積放出量(ng)} / \text{製剤中 FD-4 含有量(ng)}) \times 100 \cdots \cdots (5) \end{aligned}$$

7. FD-4 定量法

蛍光強度(Ex 490 nm、 Em 515 nm)を蛍光分光光度計(RF-5300PC, 株式会社島津製作所, 京都, 日本)を用い、バンド幅(Ex 5.0 nm、 Em 10.0 nm)、感度(High)、レスポンス(Auto)の条件にて測定した。測定には石英セル(UV-1, 東ソーコーツ, 東京, 日本)を使用した。

8. 重回帰分析による解析

製剤からの FD-4 放出性に及ぼす要因を明らかにするため、説明変数として、48 時間後製剤吸水率 (Log Water Absorption Ratio : *Log WAR*)、48 時間後細孔間距離 (Pore Spacing Ratio : *PSR*)、製剤処方中 MGE 含量 (MGE Content : *MC*) とリン脂質含量 (Phospholipids Content : *PC*)、用いたリン脂質の炭素鎖数 (Number of Carbon Chains : *NCC*)、二重結合の有無 (Presence or Absence of Double Bond : *PADB*) を、目的変数を 48 時間後 FD-4 放出率 (*Log RR*) として重回帰分析を行った。ソフトウェアは、JMP[®] Pro (ver. 15.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、ステップワイズ法にて分析した。なお、変数選択には増減法を用い、閾値は 0.25 とした。

9. 動物試験

Wistar 系雄性ラット (体重 200 ± 20 g, 8 週齢) は三協ラボサービス株式会社 (東京, 日本) から購入した。ラットは、 25 ± 2 °C に調節され、12 時間ごとに明暗サイクル (on, off 時間: 9 : 00 - 21 : 00) を設定した部屋で飼育した。また、水と飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) を自由に摂取可能とした。すべての動物試験は城西大学動物試験規定に従い、城西大学全学動物試験管理委員会の承認 (JU18009) を得て行った。

10. 皮下投与試験

調製製剤の持続性を経時的な採血を行い確認する必要があることから、動物への頻回採血および麻酔による負担軽減のために、あらかじめ Wistar 系雄性ラットに頸静脈カニューレーションの手術を施し [45]、1 日休養日を設け試験した (頸静脈カニューレーション手術の詳細は付録を参照)。試験動物麻酔装置 (SN-487-OT Air, 株式会社シナノ製作所, 東京, 日本) を用いイソフルラン麻酔下ラットの右背部を剃毛後、23 G の注射針を介し種々製剤を皮下投与した。製剤投与後、48 時間経時的に 200 μ L 採血を行った。採血後は同量の生理食塩液をラット体内に注入した。得られた血液サンプルを遠心分離 ($21,500 \times g$, 5 min, 4 °C) し血漿を得た。得られた血漿 100 μ L に pH 7.40 PBS を 400 μ L 加え 5 分間ボルテックス (Vortex-gene 2 mixer, M&S Instruments Inc., 大阪, 日本) した後、遠心分離 ($21,500 \times g$, 5 min, 4 °C) し分光光度計を用いて測定した。

11. 皮膚凍結切片作製と共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察

第 1 部第 1 章 10. の皮下投与試験により投与した製剤を観察するため、試験終了後に製剤投与部位周辺の皮膚を 2 cm 四方で切除し摘出した。摘出した皮膚の製剤投与部分を傷つけないように簡単に皮下脂肪を取り除いた(Fig. 5a)後、フェザー剃刃 S 両刃(フェザー安全剃刃, 大阪, 日本)を用い、Figure 5b に示すように破線部で囲まれた製剤投与中心部を切り出した。摘出した皮膚組織を Figure 5c に示すようにティッシュ・テック クリオモルド プラスチック包埋皿(2号, サクラファインテックジャパン株式会社, 東京, 日本)に入れ、川本法用凍結包埋剤(SCEM, ライカマイクロシステムズ, 東京, 日本)を用いて包埋し、 -80°C イソペンタン中で急速凍結させた。垂直方向の皮膚凍結切片(厚さ $10\ \mu\text{m}$)をクライオスタット(CM3050S, ライカマイクロシステムズ, 東京, 日本)により作製し、共焦点レーザー顕微鏡(Scope: Fluoview FV1000, software: FV10-ASW, オリンパス株式会社, 東京, 日本)を用い観察した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた FD-4 および FDG の観察条件を Table 4 に示す。

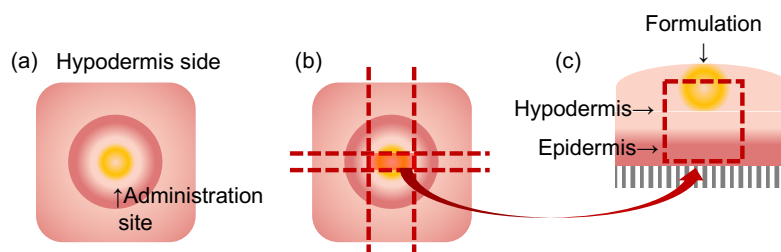


Fig. 5 Preparation of skin specimen. Top view of hypodermis site of excised skin (a, b). Side view of excised skin at formulation injected site (c).

Table 4 Observation conditions with confocal laser scanning microscope.

	FD-4/FDG	TD1
Wavelength (nm)	473	-
Scan speed ($\mu\text{m}/\text{pix}$)	100	-
Laser power (%)	19	-
HV (v)	307	64
Gain (x)	1.625	1.125
Off set (%)	7	9

12. 統計解析

JMP[®] Pro (ver. 15.0.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い棄却検定の後、Tukey-Kramer の HSD 検定、Dunnett 検定を用い統計解析した。いずれの場合も危険率 5%未満を有意と判断した。

第2節 結果および考察

1. NLLC 構造観察

NLLC 構造の多くが光学異方性を示すことから、偏光観察することで NLLC 特徴的な偏光画像が確認できる。しかし、偏光顕微鏡を用いた観察は、偏光を示す異方性の NLLC の観察には向いているものの、偏光を示さない等方性の NLLC の構造解析は適応できない。一方、SAXS を用いた解析では、回折による小角領域の散乱ベクトル長を測定し、面間隔比を Bragg の式により算出し、NLLC 構造を決定することができる。そこで、製剤の NLLC 構造形成の有無の確認には偏光顕微鏡を、詳細な NLLC 構造解析には SAXS を用いた。

Figure 6 に製剤の偏光画像を示す。FD-4 非添加製剤 (Fig. 6a) に水を付与することで偏光像が確認できたことから、異方性を有する NLLC の形成が示唆された。また、FD-4 含有製剤についても同様に評価した。Figure 6b に FD-4 含有 M 製剤に水を滴下し 15 分経過後の偏光画像とあらかじめ NLLC 構造をマイクロシリンジにて MGE と FD-4 水溶液を混合して得た製剤の偏光画像を示す。いずれの製剤も偏光像が確認できたことから FD-4 は NLLC 形成に影響を及ぼさないと考えられた。また本検討にて調製した製剤は、リン脂質の種類、添加量が異なるにもかかわらずいずれも偏光画像結果より、異方性を有する NLLC 構造を形成していると考えられた。さらに、*in vitro* 条件下だけでなく、皮下投与後に NLLC が形成するかを確認するため、ラット背部に M 製剤を投与し 48 時間経過後の製剤についても偏光顕微鏡を用いて観察した (Fig. 6c)。その結果、偏光画像が確認できたことから、M 製剤は皮下にて NLLC を自己形成したと考えられた。比較対象として、あらかじめ体外で NLLC を形成させた後、皮下に埋め込んだ製剤の 48 時間経過後の偏光画像も確認した。

これらの結果より、投与時に NLLC 構造を形成していなくても投与後に皮下で NLLC が形成されることが示唆された。

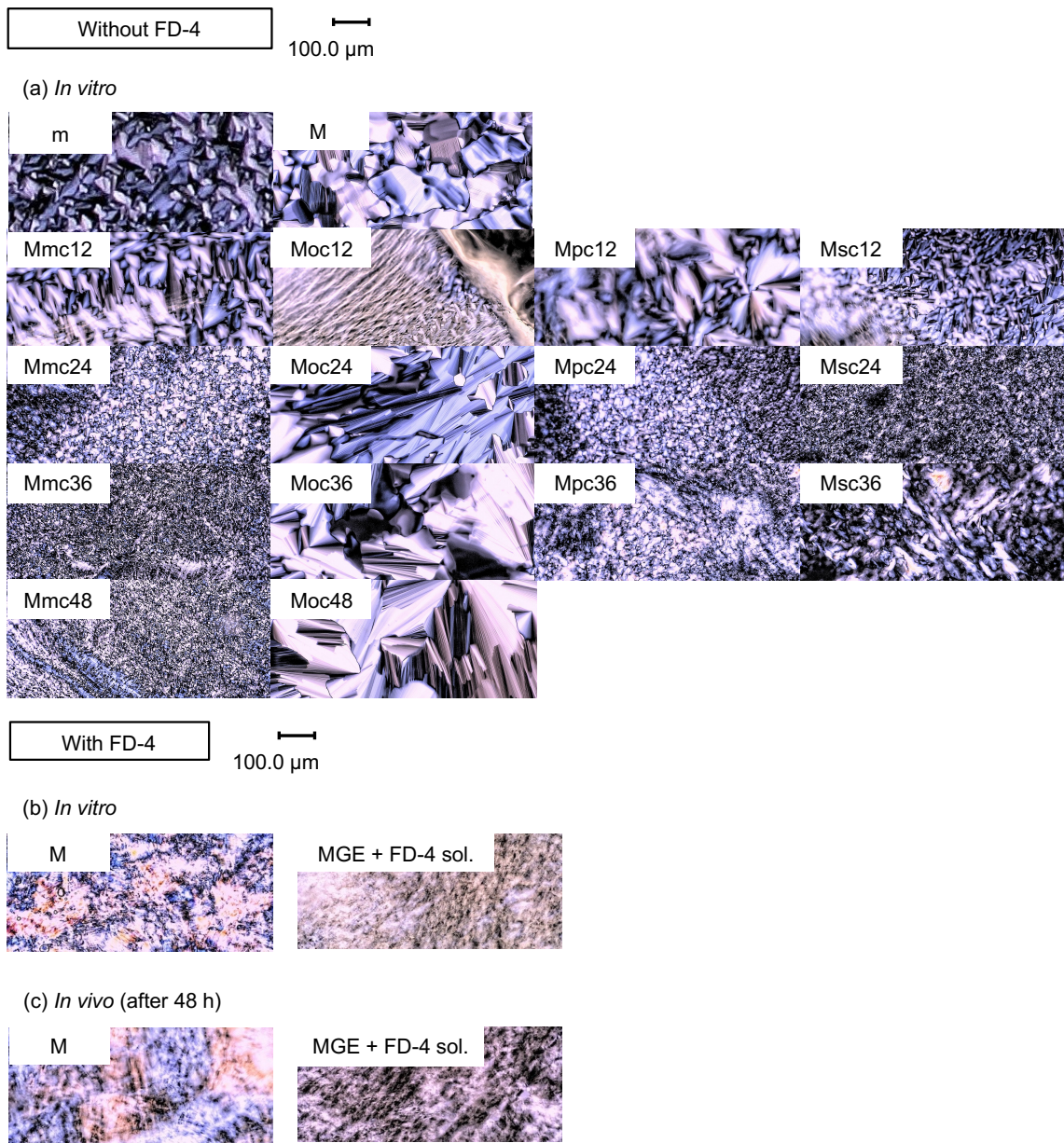


Fig. 6 Polarized images of prepared formulations after mixing with water.

2. NLLC 構造解析

Figure 7 に SAXS の回折ピーク、Table 5 に回折ピークの解析結果をもとに面間隔比から算出した結晶構造と Bragg の式より算出した d を示す。水を添加していない m 製剤や FD-4 を含有した m 製剤は、NLLC を形成していなかった。一方、 m 製剤や M 製剤に 48 時間 pH 7.40 PBS を吸水させた場合では、FD-4 の添加の有無に関わらず NLLC 構造を形成することが確認できた (Fig. 7a)。NLLC 構造は構成脂質の種類、濃度の影響を受けることが知られているが FD-4 の場合では、興味深いことに FD-4 の有無で 1st ピークのピークシフトが起きなかった。このことから、水溶性中分子蛍光薬物である FD-4 は NLLC 構造中の水チャンネルにのみ存在し、脂質側鎖に組み込まれていないことが示唆された。FD-4 添加による NLLC 構造の変化が生じなかったことから、調製した製剤について FD-4 非添加で SAXS 測定および構造解析を行った。 m 、 M 、 $Msc12$ 、 $Moc24/12$ の 5 種類の製剤は面間隔比が $1 : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{7}$ の $H2$ 構造、 $Msc24$ 製剤は $H2$ と $Q2$ に分類される面間隔比が $\sqrt{2} : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{6}$ の $Pn3m$ の混合構造、その他の 10 種類の製剤は $Pn3m$ 構造を有していることが確認された。

一般に、自己組織体の形状と両親媒性分子の構造の関係は、臨海充填パラメーター (CPP) で考察することができる。 CPP は自己組織体の界面における両親媒性分子の疎水基と親水基のそれぞれの占有空間の幾何学バランスを示す数値であり、両親媒性分子 1 個が占める面積 (a_0) と疎水部の長さ (L_c) とその体積 (V) を用いて式 (6) と定義される。

$$CPP = V / (a_0 L_c) \cdots \cdots (6)$$

すなわち、 CPP は親水部断面積と疎水部の長さからなる円筒の体積に対する疎水部の体積比で表される。 M 製剤は $H2$ 構造を示したことから CPP は 1 より大きく、これに対して CPP が 1 に近い値を示すリン脂質を添加したことで構造に変化が生じたと考えられた。

また、リン脂質の添加量が多くなるにつれてすべての製剤において 1st ピークが低角度側にシフトしていることが確認され、それに伴い d は大きくなった。Clogston らは、側鎖長が異なるモノアシルグリセロール (MAG) から NLLC を調製し、分子量が異なる薬物 (低分子薬物 (トリプトファン)、タンパク質、核酸等) を内封した製剤を調製した。調製製剤は $Pn3m$ や $H2$ 構造を形成し、また、MAG の側鎖の延伸および添加する薬物の分子量の増大とともに d が増加することを報告している [39, 40]。

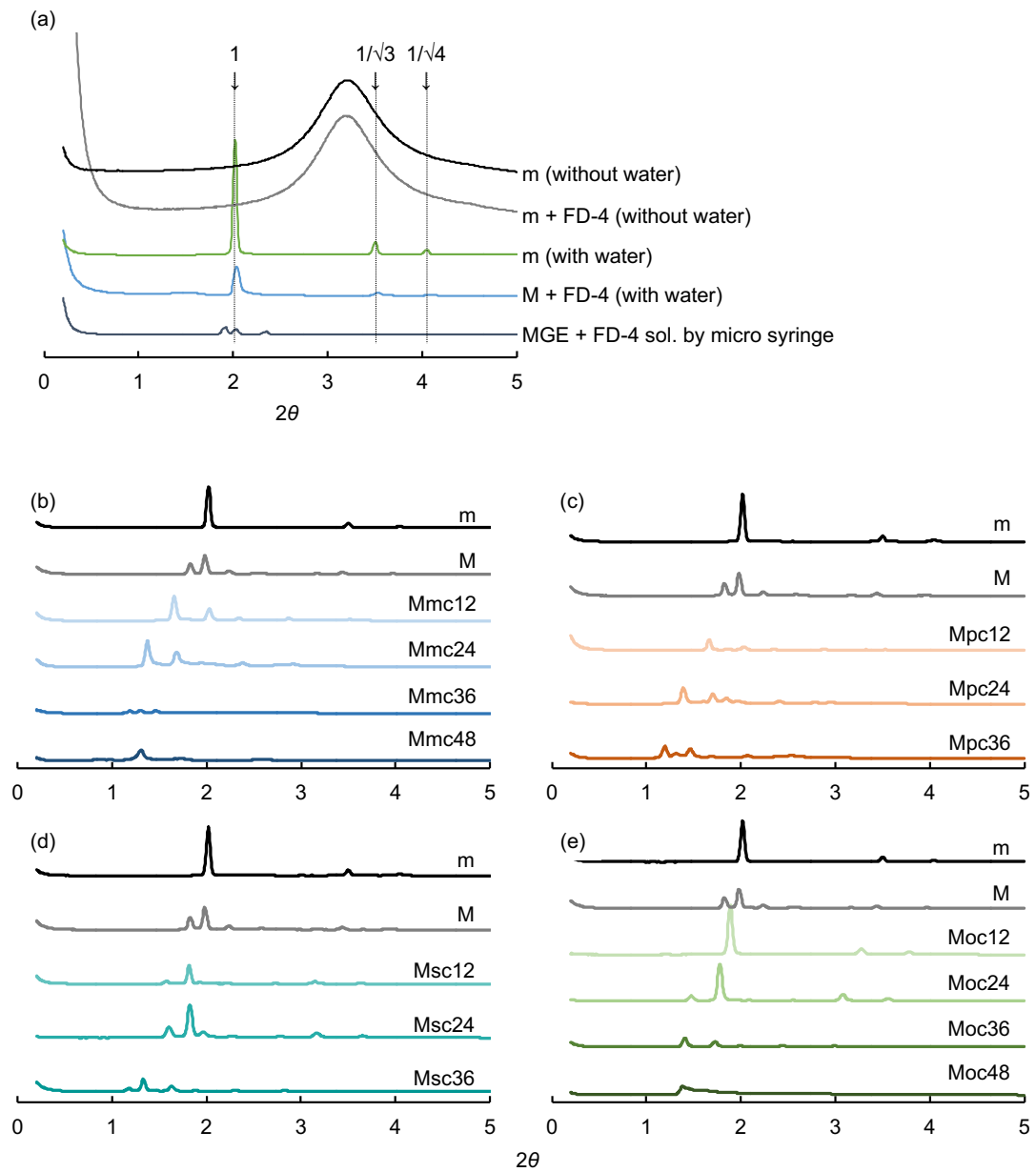


Fig. 7 Structural analysis by small angle X-ray. The analysis was done by dropping the formulations of control formulations (a), Mmc formulations (b), Mpc formulations (c), Msc formulations (d) and Moc formulations (e) to pH 7.40 PBS.

Table 5 Constructed structure and its interplanar spacing (*d*, nm) of prepared formulations.

Formulation	Liquid crystal structure	<i>d</i> (nm)
m	<i>H2</i>	4.36
M	<i>H2</i>	4.36
Mmc12	<i>Pn3m</i>	5.33
Mmc24	<i>Pn3m</i>	6.42
Mmc36	<i>Pn3m</i>	7.39
Mmc48	<i>Pn3m</i>	6.76
Mpc12	<i>Pn3m</i>	5.32
Mpc24	<i>Pn3m</i>	6.34
Mpc36	<i>Pn3m</i>	7.39
Msc12	<i>H2</i>	4.87
Msc24	<i>H2 + Pn3m</i>	5.49
Msc36	<i>Pn3m</i>	6.61
Moc12	<i>H2</i>	4.65
Moc24	<i>H2</i>	4.95
Moc36	<i>Pn3m</i>	6.28
Moc48	<i>Pn3m</i>	6.41

3. 製剤への水分吸水率(%)

Figure 8 に各製剤の 48 時間後の吸水率を示す。NLLC 形成脂質は水と接触し、一定の割合の水を吸水することにより NLLC を自己形成する。そこで各製剤を pH 7.40 PBS に浸漬させたときの吸水率(%)を算出した。製剤の多くが約 30~50%の高い吸水率を示し、Mmc48 製剤は M 製剤と比較し有意に高い吸水性を示した。

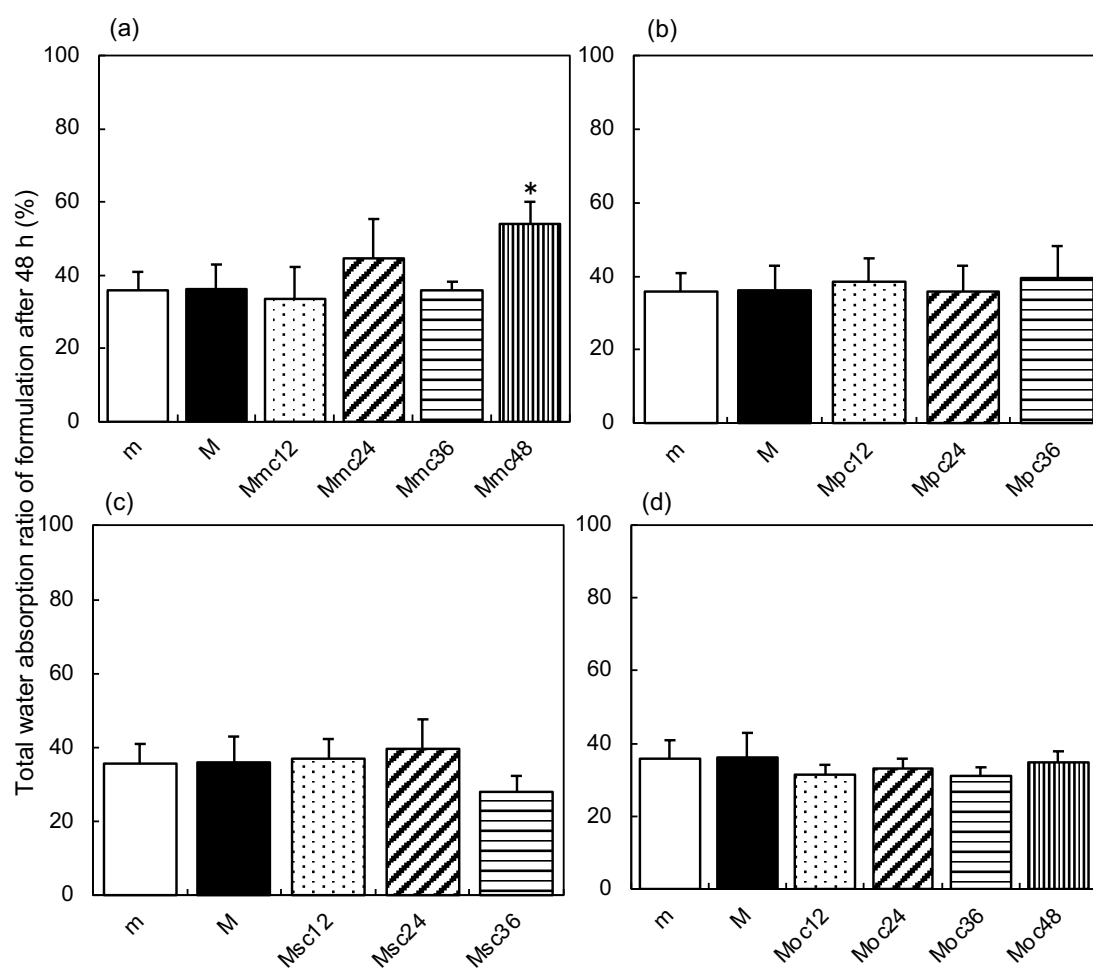


Fig. 8 Water absorption ratio into prepared formulations of Mmc formulations (a), Mpc formulations (b), Msc formulations (c) and Moc formulations (d). Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3-6). * Compared with M alone ($p < 0.01$).

4. FD-4 放出率(%)

Figures 9 および 10 に放出試験温度を 25 °C および 37 °C で放出試験を実施した際の各製剤からの 48 時間に渡る FD-4 の放出挙動と累積薬物放出率を示す。Mmc 含有製剤、Mpc 含有製剤、Msc 含有製剤および Moc 含有製剤の結果をそれぞれ(a)、(b)、(c)および(d)に示す。Mmc48 製剤を除き製剤中のリン脂質添加量の増加に伴い、FD-4 放出量が増加したが、Msc 含有製剤は他のリン脂質含有製剤と比較して、FD-4 放出率が低値であった。25 °C における SAXS 測定の結果(Fig. 7)、FD-4 は水で充填された細孔内(水チャンネル)に分布していることが示されていたこと、リン脂質の製剤中含量量の増加に伴い d が増加する傾向が確認できたことから、各放出試験温度における 48 時間累積放出率(%)と d の関係性を評価した(Fig. 11)。SAXS の測定温度が 25 °C であることから、同温度条件で実施した放出試験の放出性と d に高い関連性が示された($R^2 = 0.7869$)。一方、37 °C での放出試験の結果は d 値と高い相関性は認められなかった($R^2 = 0.4657$)。特に、Moc48 製剤は 37 °C において 25 °C 条件下よりも高い FD-4 放出性が確認された。また、他の製剤においても、25 °C 条件と比べて FD-4 放出に及ぼす脂質の種類・脂質含有量の影響についての挙動は類似していたが FD-4 放出量は高値を示した。これは、前述したとおり、NLLC 構造が温度の影響を受けるためであると考えられた。37 °C 条件下での FD-4 放出性は *in vivo* 血中濃度推移を予測する上で非常に重要であるが、37 °C 条件下での SAXS 測定が困難であることから、放出性に及ぼす因子の解明は 25 °C 条件下での放出性と SAXS のデータをを用いた。

次に、吸水率(%）、 d 、MGE 含有量、リン脂質含有量、リン脂質の炭素鎖数およびリン脂質の二重結合の有無をパラメーターとして製剤からの FD-4 放出率に及ぼす要因について、重回帰分析を用いて調査した。

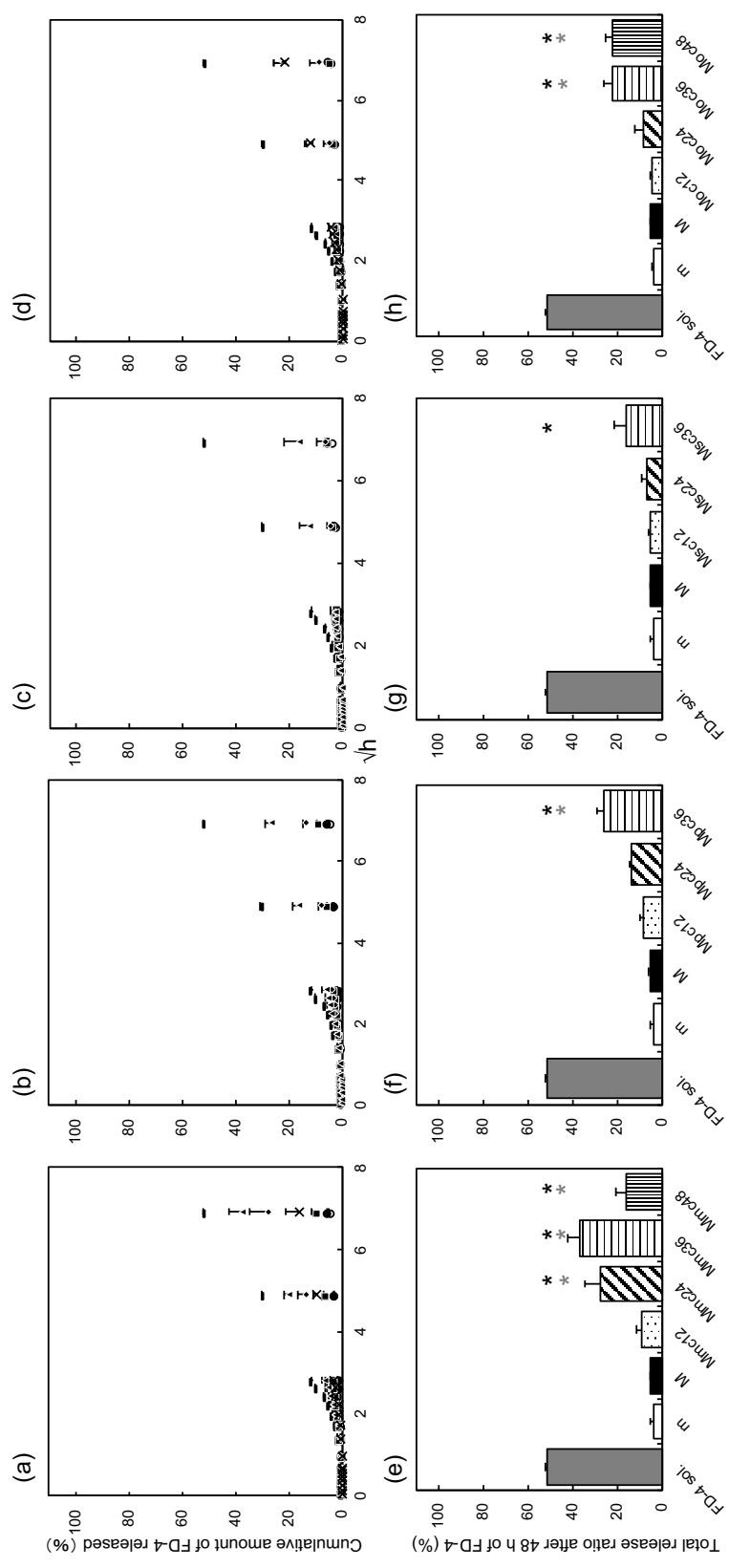


Fig. 9 FD-4 release ratio from MGE based formulation over 48 h at 25 °C. Release profile; Mmc formulations (a): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Mmc12 (■), Mmc24 (◆), Mmc36 (▲), Mmc48 (×). Mpc formulations (b): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Mpc12 (■), Mpc24 (◆), Mpc36 (▲). Msc formulations (c): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Msc12 (■), Msc24 (◆), Msc36 (▲). Moc formulations (d): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Moc12 (■), Moc24 (◆), Moc36 (▲), Moc48 (×). Release rate; Mmc formulations (e), Mpc formulations (f), Msc formulations (g) and Moc formulations (h). Each value shows the mean ± S.D. (n = 3-5). * Compared with m alone (p < 0.01).

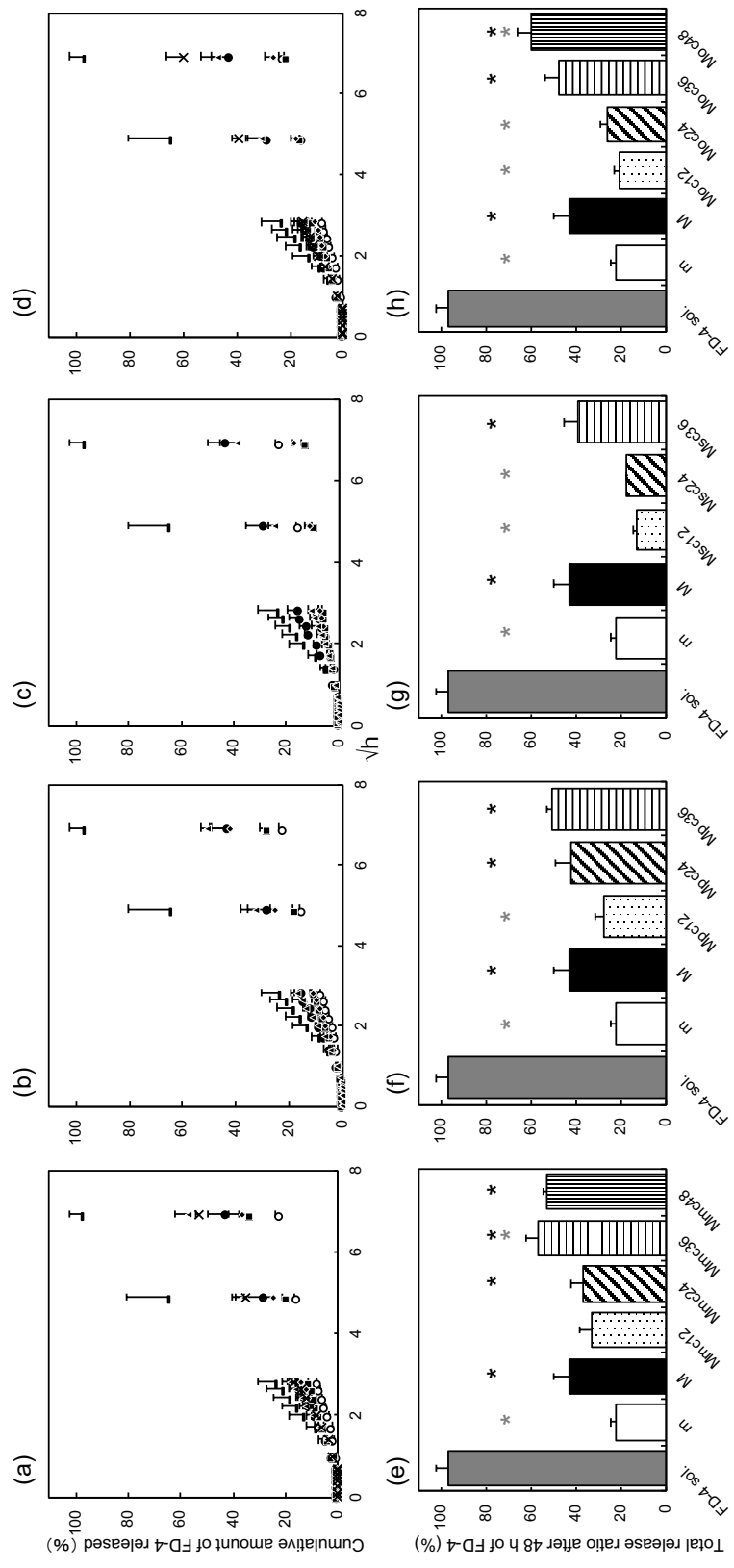


Fig. 10 FD-4 release ratio from MGE based formulation over 48 h at 37 °C. Release profile; Mmc formulations (a): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Mmc12 (■), Mmc24 (◆), Mmc36 (▲), Mmc48 (×). Mpc formulations (b): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Mpc12 (■), Mpc24 (◆), Mpc36 (▲). Msc formulations (c): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Msc12 (■), Msc24 (◆), Msc36 (▲). Moc formulations (d): FD-4 sol. (-), m (○), M (●), Moc12 (■), Moc24 (◆), Moc36 (▲), Moc48 (×). Release rate; Mmc formulations (e), Mpc formulations (f), Msc formulations (g) and Moc formulations (h). Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3-5). * Compared with M alone ($p < 0.01$).

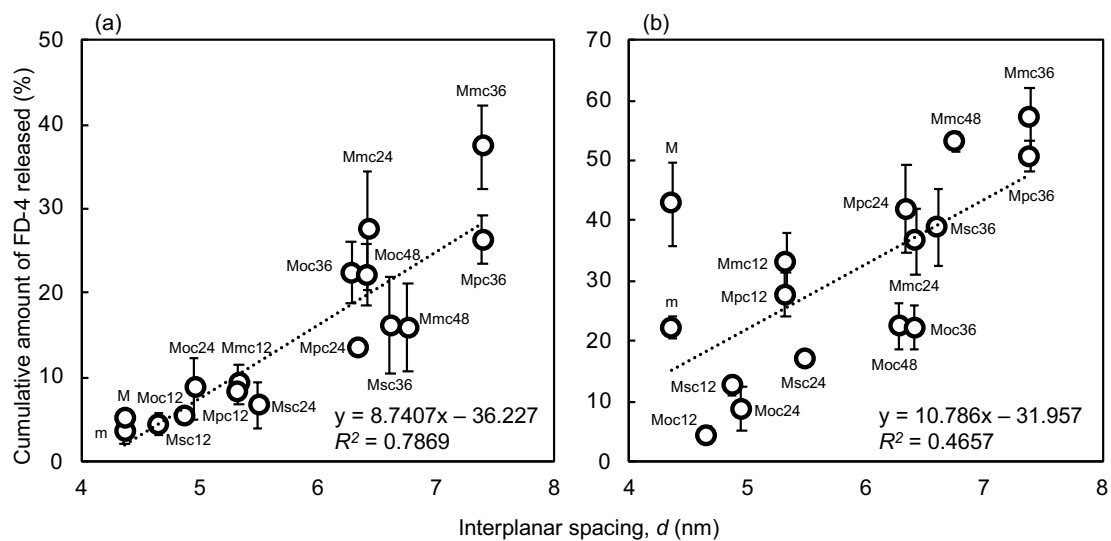


Fig. 11 Relationship between interplanar spacing obtained at 25 °C and the cumulative amount of FD-4 released at 25 °C (a) and 37 °C (b), respectively.

5. 重回帰分析を用いた製剤からの FD-4 放出性に関わる因子の解明

25 °C 条件における FD-4 の各製剤からの放出率 (%) の対数値 ($\log RR$) は、式 (7) に示すように、 $\log WAR$ を除く PSR 、 MC 、 PC 、 NCC 、 $PADB$ の 5 つのパラメータで表すことができ、 MC 、 NCC 、を除くパラメータで p 値が 0.05 以下になった (Table 6)。予測に必要なパラメータ数は多いものの、高精度な予測が可能となった (Fig. 12)。得られた式より、 MC 、 PC 、 NCC は放出率に対してそれぞれ負の寄与を示し、 PSR および $PADB$ は正の寄与を示した。この結果より、水溶性中分子薬物である FD-4 の放出率は、 d を大きくし、さらには添加するリン脂質に二重構造を有するものを加えることによって放出制御が可能となった。

式 (7) より、MGE 含有量、リン脂質含有量、およびリン脂質の炭素鎖数が負の要因として作用し、 d および炭素鎖の二重結合の数が正の要因として選択された。MGE は水と接触することで H_2 構造を形成し、また、MGE 含有量が増加すると、FD-4 が徐放性を示したことから MGE 添加量は負の要因の裏付けとなった。一方、リン脂質鎖長の増加に伴い、放出される FD-4 の量は減少したものの、DMPC、DPPC、DSPC の CPP 値はほぼ同じ ($1/2 < CPP < 1$) であるため [46-49]、FD-4 の放出性と製剤中のリン脂質の炭化水素鎖長の関係を説明することは困難である。しかし、炭化水素鎖が長いほど、疎水基同士のファンデルワールス相互作用が高くなることで、リン脂質の炭化水素鎖の移動度の低下し、FD-4 の徐放性につながったと考えられる。一方、不飽和脂質鎖を持つリン脂質は二重結合の位置で曲がって開いた構造を形成するため、飽和脂質鎖を持つリン脂質よりも CPP が大きくなる [50] ことで緩い膜構造の変化が生じ、FD-4 の放出性が増加する可能性がある [51]。これらの結果は、種々 NLLC 構造を調製し NLLC 構造の放出性への影響を調査している Ki や Liang らの報告とも一致している [25, 52, 53]。また、Dellinger および Huang らはリン脂質にだけでなく界面活性剤等の構造類似物質を添加することで d が変化し [54, 55]、Huang らは、NLLC 構造からの放出性について、ラメラ相、キュービック相、ヘキサゴナル相、ミセルキュービックの順に放出速度が速くなることを報告している [56]。

$$\log RR = 0.434 PSR - 0.020 MC - 0.027 PC - 0.018 NCC + 0.304 PADB + 0.709$$

$$(R^2 = 0.82, RMSE = 0.14, p < 0.0001) \dots \dots (7)$$

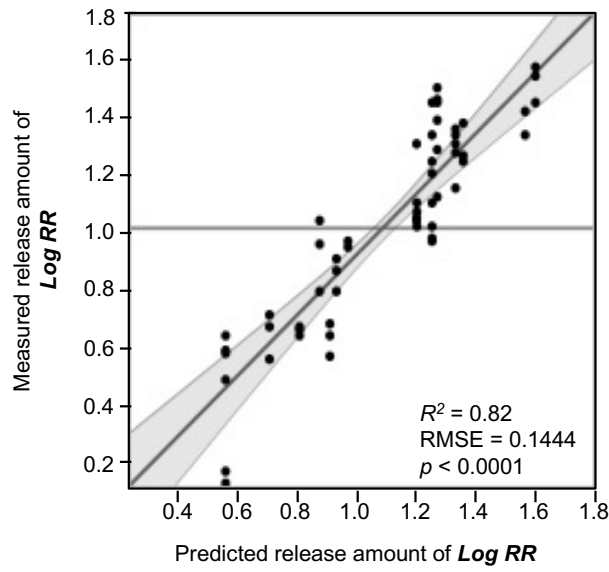


Fig. 12 Relationship between observed and predicted cumulative amount of FD-4 Log RR from various kinds of formulations.

Table 6 Selected parameters to predict log RR with multi-regression analysis.

Parameters	p value
PSR	0.00000
PADB	0.00000
PC	0.00874
MC	0.05359
NCC	0.08525

6. 血漿中薬物濃度推移

製剤皮下投与後の血中 FD-4 濃度推移の試験では、48%リン脂質含有製剤の調製が可能であった Mmc 製剤および Moc 製剤を用いた。まず、FD-4 水溶液を静脈内投与したときの血中濃度推移について調査した(Fig. 13)。

FD-4 水溶液および各製剤を皮下投与したときの血中濃度推移を Figure 14 に示す。FD-4 水溶液は投与後 24 時間目で定量限界を下回ったのに対し、Mmc 製剤および Moc 製剤では、 C_{max} が FD-4 水溶液と比較して低下したものの、48 時間目も定量可能であったことから FD-4 水溶液と比較し血中濃度を維持できることが明らかとなった。

FD-4 sol.を皮下投与すると投与後すぐに C_{max} が確認されその後 24 時間目で定量限界値(10 ng/mL)以下になった。M、Mmc 製剤および Moc 製剤)、投与後 48 時間経過後の血中濃度は M 製剤 27.14 ± 7.16 ng/mL、Mmc12 製剤 35.25 ± 5.28 ng/mL、Mmc24 製剤 30.12 ± 5.08 ng/mL、Mmc48 製剤 26.58 ± 8.87 ng/mL、Moc12 製剤 24.79 ± 8.11 ng/mL、Moc24 製剤 27.51 ± 12.86 ng/mL、Moc48 製剤 34.71 ± 8.71 ng/mL であった。しかしながら、Mmc 製剤および Moc 製剤を皮下投与後 48 時間経過後の血中濃度の差は、*in vitro* 放出試験(25 °C および 37 °C)で確認された製剤間の FD-4 放出量の差と比較してほとんど認められなかったことから、血中濃度維持に及ぼす脂質含有量の影響は、*in vivo* 条件下では確認されなかった。

次にリン脂質(mc/pc/sc/oc)含有量 12%製剤(Fig. 15)および 24%製剤(Fig. 16)を用いて FD-4 血中濃度維持に及ぼすリン脂質の種類の影響について調査した。

リン脂質含有量が 12%の製剤では、投与後 48 時間経過後の血中濃度は Mmc12 製剤が最も高く 35.25 ± 5.28 ng/mL であり、ついで Moc12 製剤(24.79 ± 8.11 ng/mL)、Msc12 製剤(20.92 ± 10.16 ng/mL)、Mpc12 製剤(9.01 ± 4.85 ng/mL)の順であった。

リン脂質含有量が 24%の製剤では、投与後 48 時間経過後の血中濃度は Mpc24 製剤が最も高く 44.18 ± 15.17 ng/mL であり、ついで Mmc24 製剤(30.12 ± 5.08 ng/mL)、Moc24 製剤(27.51 ± 12.86 ng/mL)、Msc24 製剤(19.8 ± 10.27 ng/mL)の順であった。これは、NLLC 構造形成に必要な水分量が、放出試験と比較し *in vivo* 試験では限られていたため均一な NLLC 構造形成が出来なかったため、各製剤における血漿中薬物濃度の違いが確認されなかったと考えられる。

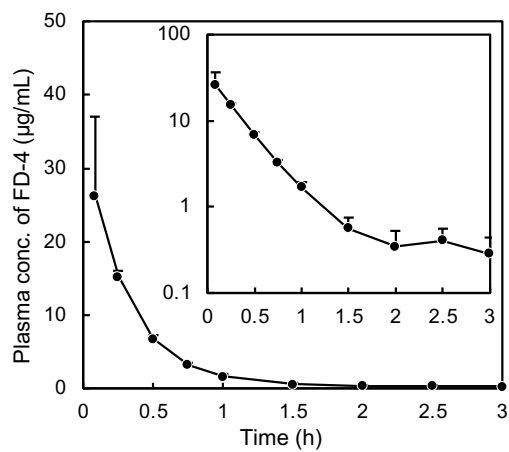


Fig. 13 Time course of FD-4 concentration in plasma after *i.v.* injection. Each value shows the mean \pm S.E. (n = 3-5).

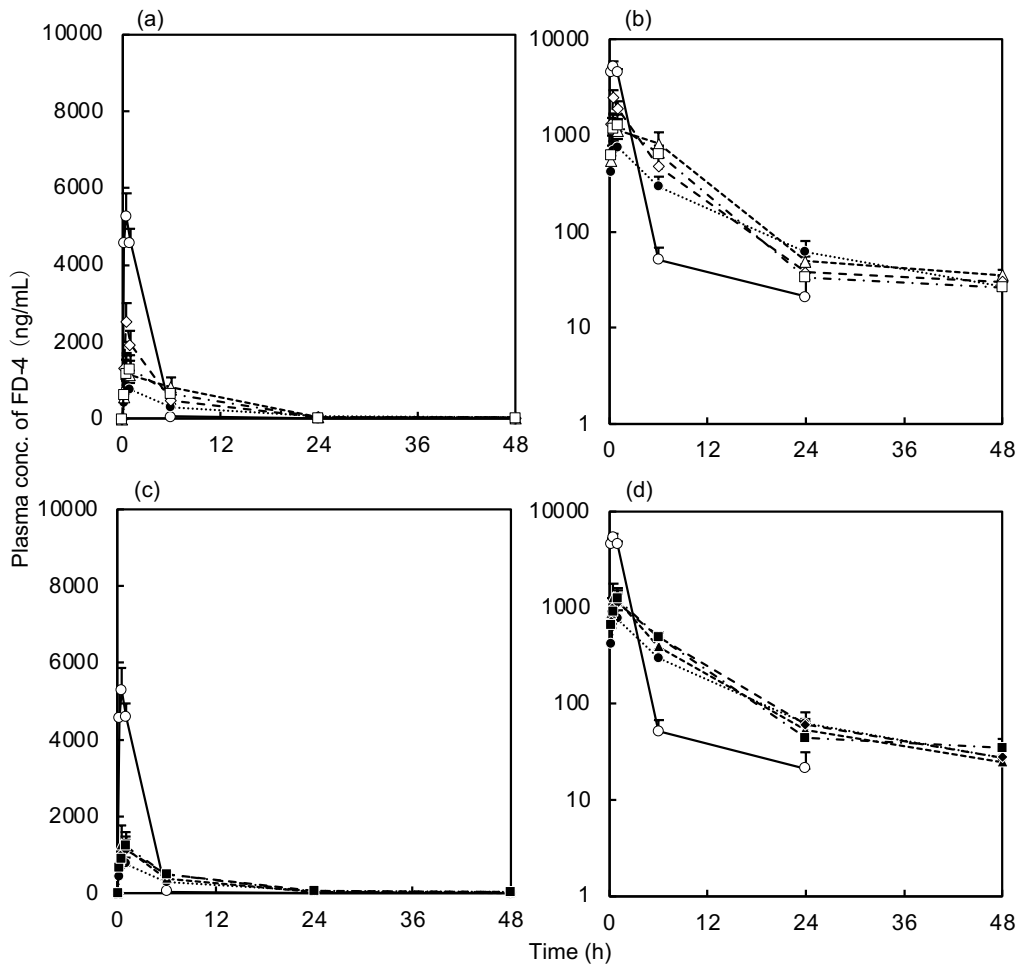


Fig. 14 Time course of FD-4 concentration in plasma after s.c. injection of prepared formulations of Mmc formulations (a), Logarithmic notation on the y axis of the Mmc formulations (b), Moc formulations (c), and Logarithmic notation on the y axis of the Moc formulations (d). Symbols: FD-4 sol. (○), M (●), Mmc48 (□), Mmc24 (◇), Mmc12 (△), Moc48 (■), Moc24 (◆) and Moc12 (▲). Each point shows the mean \pm S.E. (n = 3-4).

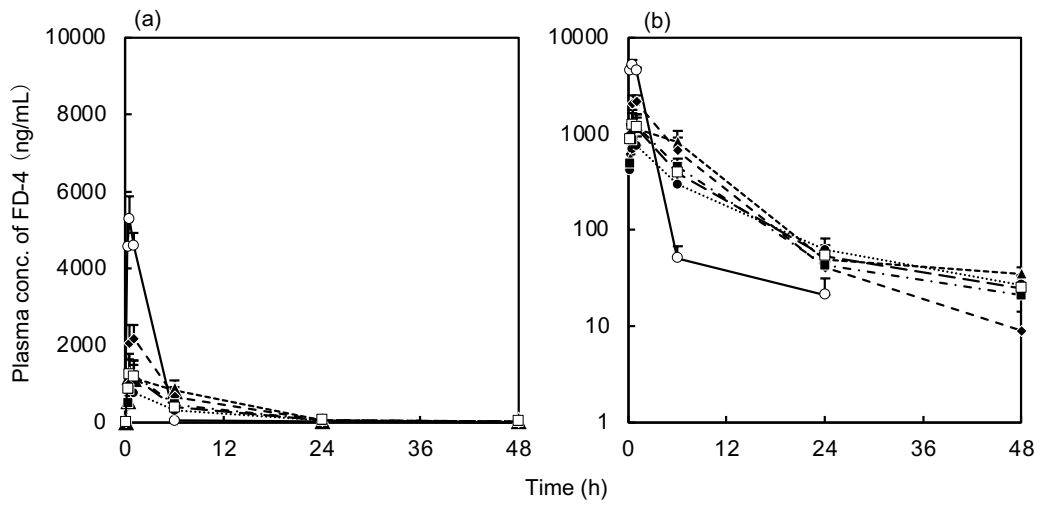


Fig. 15 Time course of FD-4 concentration in plasma after *s.c.* injection of prepared formulations (a), Logarithmic notation on the y axis (b). Symbols: FD-4 sol. (\circ), M (\bullet), Mmc12 (\blacktriangle), Mpc12 (\blacklozenge), Msc12 (\blacksquare), Moc12 (\square). Each point shows the mean \pm S.E. (n = 3-4).

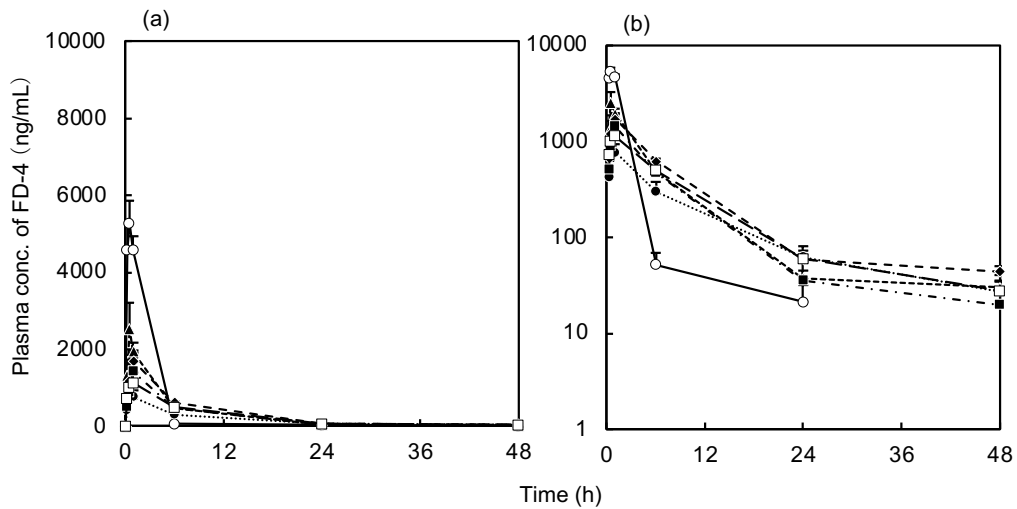


Fig. 16 Time course of FD-4 concentration in plasma after *s.c.* injection of prepared formulations (a), Logarithmic notation on the y axis (b). Symbols: FD-4 sol. (\circ), M (\bullet), Mmc24 (\blacktriangle), Mpc24 (\blacklozenge), Msc24 (\blacksquare), Moc24 (\square). Each point shows the mean \pm S.E. (n = 3-4).

7. 投与部位組織観察

Figure 17 に Mmc 製剤 (Mmc12, Mmc24, Mmc48) および Moc 製剤 (Moc12, Moc24, Moc48) について、製剤投与 1, 6, 24 および 48 時間経過後の皮下投与製剤目視観察、さらには、皮膚切片を作成し、FD-4 の皮膚内分布を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。

Mmc 製剤および Moc 製剤のいずれも製剤投与 1 時間後にはゲル状物質の形成が目視で確認することができた (Fig. 18a)。また、形成したゲル状物質は投与 48 時間後まで皮下に残存していることが確認された。製剤中の FD-4 は投与 1 時間後には皮膚の広範囲に分布していることが確認でき、投与 48 時間後も強い緑色蛍光が確認できたことから、皮下もしくは製剤中に FD-4 が残存していると考えられた。一方で、Mmc48、Moc24 および Moc48 製剤はもくしではゲル状物質が確認できたものの、凍結切片作成により内封されていた FD-4 が漏出してしまった。この結果により Mmc48、Moc24 および Moc48 製剤は投与後 1 時間では生体と接触している表層部にのみ、ゲル状物質が存在することが明らかになった。

Figure 18 にリン脂質添加量 12% の製剤について、投与 48 時間経過後の皮下注の製剤目視観察 (Fig. 19a)、さらには、皮膚切片を作成し、FD-4 の皮膚内分布を蛍光顕微鏡で観察 (Fig. 19b) した結果を示す。目視観察の結果から M、Mmc12、Mpc12、Msc12 および Moc12 製剤において製剤投与後 48 時間経過後も皮下組織にゲル状物質の形成が観察された。すべての製剤で蛍光強度の違いはあるものの皮膚に FD-4 の残存を示す蛍光が観察された。

Figure 19 にリン脂質添加量を 24% に固定した場合の製剤投与 1, 6, 24 および 48 時間経過後の皮下投与製剤目視観察 (Fig. 20a)、さらには、皮膚切片を作成し、FD-4 の皮膚内分布を蛍光顕微鏡で観察 (Fig. 20b) した結果を示す。目視観察の結果から M、Mmc24、Mpc24、Msc24 および Moc24 製剤において Mmc 製剤および Moc 製剤と同様に製剤投与後 1 時間で皮下組織にゲル状物質の形成が観察できた。

この結果より、皮下投与後 48 時間経過後においても投与製剤中に薬物の残存が確認されたことから、さらに薬物血中濃度を長期間にわたり維持可能な製剤の調製が可能であると考えられた。

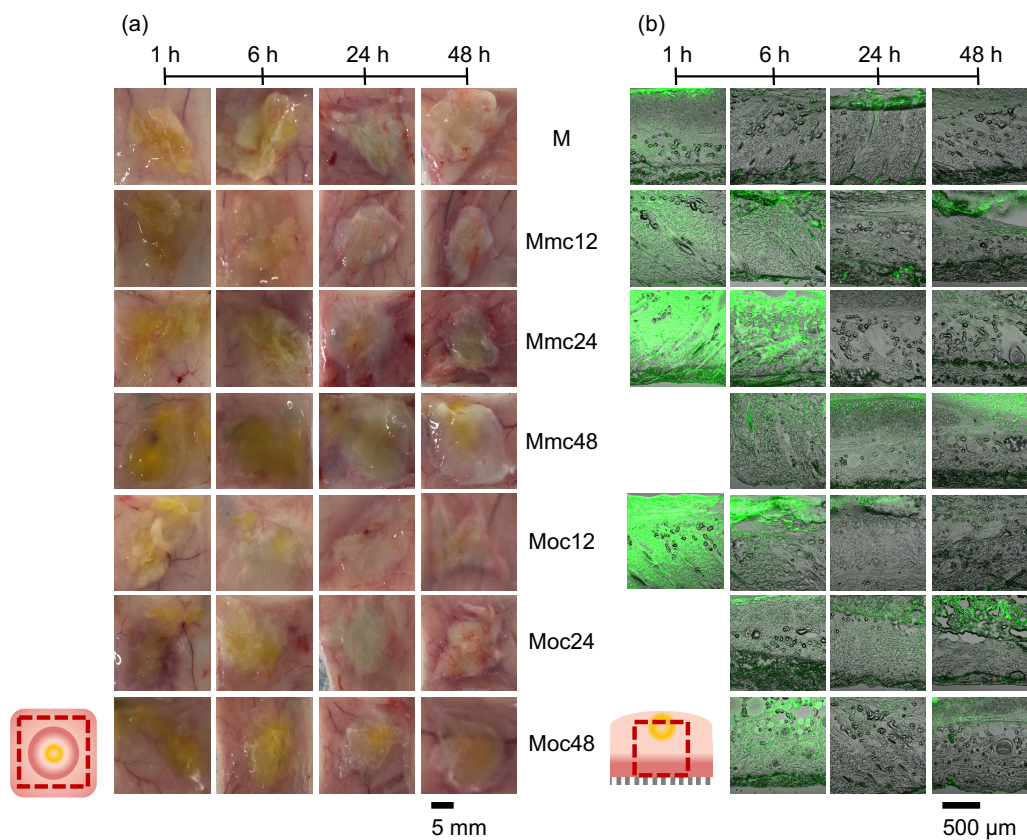


Fig. 17 Change in visual images of drug disposition after its injection of prepared formulations (M, Mmc12/24/48, Moc12/24/48) containing FD-4 (a). Change in fluorescence images at the drug administrated area (b).

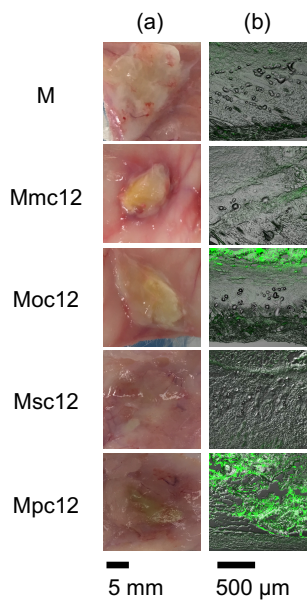


Fig. 18 Change in visual images of drug disposition after its injection of prepared formulations (Mmc12, Mpc12, Msc12, Moc12) containing FD-4 (a). Change in fluorescence images at the drug administrated area (b).

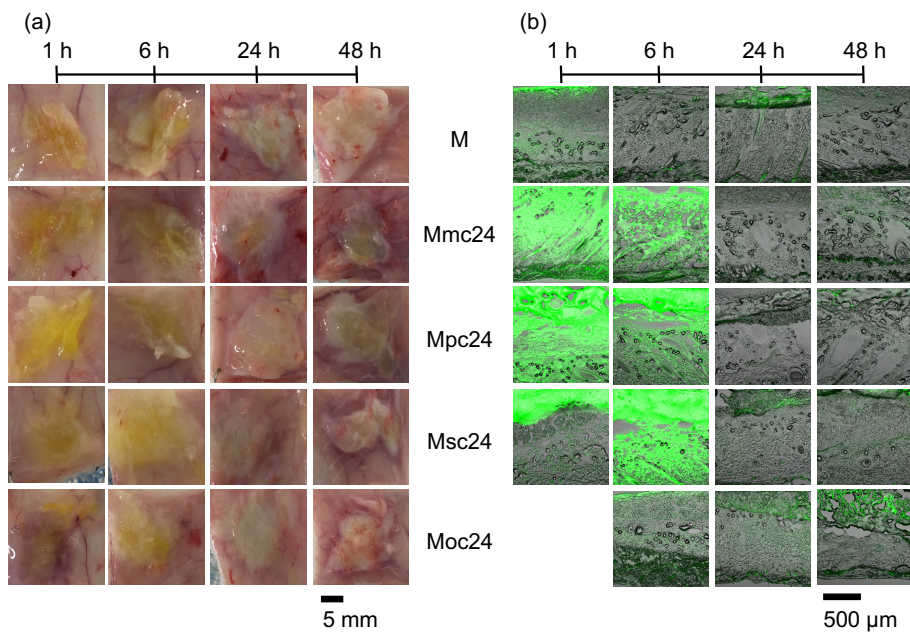


Fig. 19 Change in visual images of drug disposition after its injection of prepared formulations (Mmc24, Mpc24, Msc24, Moc24) containing FD-4 (a). Change in fluorescence images at the drug administrated area (b).

第3節 小括

NLLC は新規 DDS キャリアとして注目されており注射、経鼻、口腔内をターゲットとした製剤への応用が検討されている[57-60]。本章では、水と接触することで NLLC を形成する MGE を用い、水溶性中分子蛍光薬物である FD-4 をモデル薬物として選択し、FD-4 の放出性に及ぼす異なる種々飽和・不飽和リン脂質添加の影響を明らかにすることで MGE の持続性注射剤基剤としての可能性を調査した。水溶性中分子薬物である FD-4 の製剤からの放出性は d 、MGE 含有量、リン脂質含有量、リン脂質の炭素鎖の数、および炭素鎖の二重結合の 5 つのパラメーターにより変化する事がわかり、これらの結果より FD-4 は NLLC 構造中の水チャンネルに存在することが考えられた。

一方、Mmc 製剤および Moc 製剤をラット背部皮下投与後の FD-4 の血中濃度を確認したところ、FD-4 水溶液と比較し Mmc 製剤および Moc 製剤の投与の血中 FD-4 濃度は延長したものの、製剤間において有意差は認められなかった。しかしながら、皮下投与 48 時間経過後にも製剤中に FD-4 が残存していることが確認できたことから、より長期間にわたり血中濃度評価が可能な中分子薬物にてさらなる評価をする必要があると考えられた。これらの結果は、MGE にリン脂質を添加することで、中・高分子薬物の放出制御を可能とするための処方設計に関する有用な知見と考えられた。

第2章 実使用を考慮した LA 内封持続性注射剤の調製および評価

近年、我が国では、超高齢化による生産年齢人口の減少[61]が問題となっており、労働世代の労働時間の確保が重要な課題となっている。さらに、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の蔓延により、感染リスクのため通院にためらいを感じ、受診控えや持病の治療中断が問題となっており、これらは健康上のリスクを高めてしまう恐れがある。このことから、頻回投与が必要な薬物の徐放性送達を可能にする賦形剤の開発は、労働時間の確保につながるだけでなく、患者の生活の質を改善、症状の再発または悪化リスクの低減や医療従事者の負担軽減に役立つと考えられる。

現在、ペプチドや核酸を含む中分子薬(*M.W.* 1~5 kDa)は、疾患部位への親和性と選択性が高いため、次の標的治療薬として期待され世界の新薬市場の売上上位を占めている。今後、中分子薬を含め様々な物性を有する薬物の持続的送達を可能にするためには、持続送達を可能とする新規製剤素材の開発が重要である[62-64]。前章では持続性注射剤基剤として水と接触することで NLLC を形成する MGE を選択し製剤を調製した。NLLC は、難溶性薬物の溶解性を高め、タンパク質の高次構造の安定性向上に寄与することから新規製剤素材として注目されている[20, 31, 32]。MGE とリン脂質、水溶性中分子蛍光薬物である FD-4 を内封した持続性注射剤は、添加するリン脂質の種類や量により形成する NLLC 構造や、および FD-4 の放出性も変化した。このことから、本章では実使用されている薬物を選択し、MGE とリン脂質からなる製剤の有用性を調査することとした。実使用薬物としてホルモン製剤の代表的製剤として用いられている黄体形成ホルモン放出ホルモン(LH-RH)の薬効有効成分である LA に着目した。ペプチド医薬である LA は、皮膚中の P450 やペプチダーゼに容易に分解されることから薬物利用率が低く、血中濃度を維持するためには毎日 1 回腹部注射が必要で、患者にとって負担が大きかった。PLGA を担体としたマイクロスフェアに内封した薬物放出型製剤が開発により、一回の投与で薬効が 1 ヶ月~6 ヶ月間持続し患者の QOL 改善につながった。しかし、PLGA は水分の影響、粒子の付着凝集性が高く、ハンドリングに乏しいなどの問題があり、LA 以外のペプチド医薬での利用は進んでいない。そのため、今後の新薬開発において PLGA に加え幅広い物性の薬物封入が可能、より容易に製剤調製が可能な新規持続性注射剤基剤として NLLC に着目した。

すでに、Ki らは、ソルビタンモノオレエート、ホスファチジルコリン、酢酸トコフェロールで構成された NLLC 製剤を調製し、皮下投与後の製剤が体液と反応することで NLLC 構造を形成する製剤を開発し、調製製剤は 1 か月間にわたって LA の徐放性を示し、PLGA を基剤とした市販製剤と

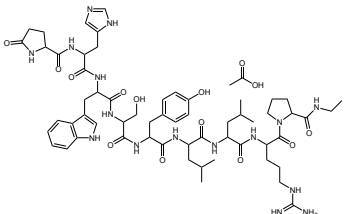
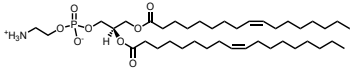
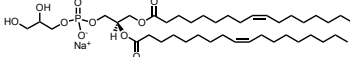
同様の血中濃度プロファイルを示すことを報告している[65]。このことから NLLC を自己形成できる処方、PLGA に代わる有用な基剤になりうると思われる。さらに、持続性注射剤の製剤設計をする上で、基剤がペプチドおよびタンパク質の安定化を有することは重要なポイントである[66]。しかし、PLGA 製剤は、PLGA 分解から生じる酸性生成物が製剤の pH を下げることで、薬物の安定性に影響を与える可能性があるため[67]、NLLC 構造内でのペプチドタンパク質の安定性改善効果は持続性注射剤基剤として大きな利点となる。第 1 部第 1 章では、持続性注射剤基剤として選択した MGE は皮下投与後体内で NLLC 構造を形成することを明らかにした。さらに、重回帰分析を行い NLLC からの FD-4 の放出性は、NLLC 構造が影響することを明らかにした[68]。本章では、持続性注射剤基剤としての MGE の有用性を示すため、実使用されている中性 pH (pK_a 約 6.0: ヒスチジンのイミドゾリル窒素)で正電荷を持つ線状ナノペプチドであり[69]、皮膚組織で不安定な LA をモデル中分子薬物として選択し[70]、製剤を調製した。第 2 章では調製製剤の物性評価に加え、皮下投与後の血中濃度プロファイルから MGE の BA 改善効果を明らかにすることを目的とした。

第1節 試験方法

1. 試薬および試験材料

LAは、新日本薬業株式会社(東京, 日本)より購入した。NLLC 形成脂質である MGE は第 1 部第 1 章と同様のものを用いた。飽和リン脂質である DSPC、不飽和リン脂質である DOPC は第 1 章と同様のものを用いた。不飽和リン脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DOPG) を選択し日油株式会社(東京, 日本)より購入した。エタノール、アセトニトリルは富士フィルム和光純薬株式会社(大阪, 日本)より購入した。ギ酸は、東京化成工業株式会社(東京, 日本)より購入した。Table 7 にモデル薬物および、リン脂質の構造式と物理化学的パラメーターを示す。

Table 7 Chemical structures and physical properties of model drug and phospholipids.

	Structure	M.W.	XLogP ₃ -AA [35]	CPP [36]	PI
Leuprolide acetate (LA)		1269.5	-	-	9.1
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)		744.0	10.6	>1	-
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DOPG-Na)		797.0	12.5	~1	-

2. 持続性注射剤の処方および調製方法

第 1 章で添加するリン脂質の側鎖長が 14 の DMPC と比較し側鎖長が 18 の DSPC および DOPC で徐放性が確認できたことから、側鎖長を 18 に固定しリン脂質を選択した。また、親水基の電荷の有無による LA の放出制御を期待し、親水基が中性のリン脂質(DSPC と DOPC)、弱い正電荷のリン脂質(DOPE)、負電荷のリン脂質(DOPG)を選択した。

Table 8 に M を含有製剤の組成を示す。製剤の調製は第 1 部第 1 章と同様の方法とし、製剤名は、 $M\alpha\beta$ と表し、M は用いた NLLC 形成脂質基剤、 α は添加したリン脂質の種類(sc / oc / oe / og)、 β は製剤中リン脂質含有率を示す。すなわち、Msc12 製剤は、NLLC 形成脂質である MGE にエタノールと Tween 80 を添加した M 製剤に、DSPC を 12%含有した製剤となる。いずれの製剤も製剤中 LA 含量が 37.5 mg/mL となるよう調製した。なお、粉末状のリン脂質を溶解させるため、エタノールと Tween 80 はすべての製剤でそれぞれ 10%および 2%添加した。また、本試験では、PLGA を基剤とした市販製剤であるリュープロレリン酢酸塩注射用キット 3.75 mg「NP」(ニプロ株式会社, 大阪, 日本)を比較として選択した。

Table 8 Compositions of MGE based depot formulations.

α	-	-	sc		oc		oe		og	
β	-	-	12	24	12	24	12	24	12	24
	m	M	Msc12	Msc24	Moc12	Moc24	Moe12	Moe24	Mog12	Mog24
MGE	100	88	76	64	76	64	76	64	76	64
DSPC	-	-	12	24	-	-	-	-	-	-
DOPC	-	-	-	-	12	24	-	-	-	-
DOPE	-	-	-	-	-	-	12	24	-	-
DOPG	-	-	-	-	-	-	-	-	12	24
Ethanol	-	10	10		10		10		10	
Tween 80	-	2	2		2		2		2	

*処方製剤中で、MGEはm、DSPCはsc、DOPCはoc、DOPEはoe、DOPGはogと略す。
またMGEはEthanolおよびTween 80を含有する製剤をMで略す。

unit: %

3. 偏光観察

第 1 章と同様に測定した。

4. SAXS による NLLC 構造解析

第 1 章と同様に測定した。

5. Cryo-TEM 観察

製剤は cryo-transmission electron microscope (Cryo-TEM, JEM-3100FEF, JEOL Ltd., Akishima, 東京, 日本)を使用し観察した。なお、観察は奈良先端科学技術大学院大学に委託した。製剤の 20 倍希釈液 1 μL を親水化銅グリッド(200 メッシュ、JEOL Corporation)に滴下し、染み込ませた後、急速凍結システム(EM-CPC、ライカマイクロシステムズジャパン, 東京, 日本)を使用して凍結溶媒としてエタンを使用して急速凍結した。

6. 放出試験

放出溶媒として、0.02% Tween 80 含有 pH 7.40 PBS を選択し、第一章と同様の方法で、7 日間試験した。得られたサンプルは測定まで -80°C で保存した。

7. 動物試験

第 1 章と同様の試験方法を用いた。なお、すべての動物試験は城西大学動物試験規定に従い、城西大学全学動物試験管理委員会の承認(JU20005)を得て行った。

8. 皮下投与試験

第 1 章と同様の方法で製剤を皮下投与した後、28 日間経時的に 100 μL を採血した。得られた血液サンプルを遠心分離($21,500 \times g$, 5 min, 4°C)し、血漿を得た。得られた血漿 50 μL にアセトニトリル 100 μL を加え 5 分間ボルテックス(Vortex-gene 2 mixer、M&S Instruments Inc., 大阪、日本)した後、遠心分離($21,500 \times g$, 5 min, 4°C)し除タンパクを施した後、上層を測定サンプルとし測定まで -80°C で保存した。

9. 統計解析

第 1 章と同様の統計処理を行った。

10. LA の定量法

LA の測定[68, 69, 71]にはシステムコントローラ(CBM-20A;株式会社島津製作所, 京都, 日本)、ポンプ(LC-20AD;株式会社島津製作所, 京都, 日本)、オートサンプラー(SIL-20AC;株式会社島津製作所, 京都, 日本)、カラムオーブン(CTO-20AC;株式会社島津製作所, 京都, 日本)、検出器(3200 QTRAP; 株式会社 AB Sciex, 東京, 日本)からなる LC-MSMS を用いた。また、得られたデータを解析ソフト(Analyst[®] version 1.4.2;株式会社島津製作所, 京都, 日本)を用いてデータ解析した。LA の測定にはカラムとガードカラム (ODP2 HP-2B 2.0 mm × 50 mm および ODP2 HPG-2A 2.0 mm × 10 mm, respectively (昭和電工株式会社, 東京, 日本))を用いた。LC の測定条件として、カラム温度は 40 °C に維持し、移動相は 0.1%ギ酸溶液 : アセトニトリル=7 : 3、流速は 0.2 mL/min、サンプル注入量は 10 µL で行った。MS/MS の測定条件は Electrospray ionization (ESI)法を用い、プリカーサーイオンとして m/z 605.30、プロダクトイオンとして m/z 249.00 で測定した。イオンスプレー電圧は 5000 V、ネブライザーガス圧は 80 psi、乾燥ガス流量は、10 L/min、乾燥ガス温度は 600 °C であり、LA の定量下限限界値は 0.1 ng/mL であった。

第2節 結果および考察

1. 製剤の偏光観察および SAXS 解析

Figures 20 に LA 含有 MGE 製剤の偏光観察画像を示す。偏光顕微鏡で観察した結果、LA を含有した場合でも MGE を含有した製剤は NLLC 構造を形成している可能性が示唆された。そこで、調製した製剤の NLLC 構造を明らかにするため、SAXS を用いて NLLC 構造を決定した。Figure 21 に各種製剤の SAXS の回折ピークを、Table 9 に Figure 21 の回折パターンより構造解析した結果と Bragg の式より算出した d を示す。また、NLLC 構造に及ぼす LA 添加の影響を明らかにするため、LA 未含有製剤(LA(-))および LA 含有製剤(LA(+))の SAXS 回折ピークを比較した。LA(+)製剤では、m、Moe12 および Moe24 製剤は、面間隔比が $1 : \sqrt{3} : \sqrt{4}$ の $H2$ 構造と $\sqrt{2} : \sqrt{3} : \sqrt{4}$ の $Pn3m$ の混合構造を、M、Msc12、Msc24、Moc12、Moc24、Mog12 および Mog24 製剤は $\sqrt{2} : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{6} : \sqrt{8} : \sqrt{9}$ の $Pn3m$ 構造のみを有していることが明らかになった。また、Moe 製剤を除くすべての製剤で、製剤中のリン脂質含有率が増加するにつれ、SAXS 回折ピークは小角側へピークシフトすることが確認された。一般に、第 1 章で述べたように、NLLC 構造は構成する両親媒性物質の臨界充填パラメータの影響を強く受ける。m および M 製剤は $H2$ 構造を形成することから $CPP > 1$ であると考えられた。また、本試験で用いた DSPC と DOPC は $CPP \sim 1$ の円筒状であり、これらは 2 分子膜ベシクルを形成することが知られている (Fig. 3)。そのため $CPP \sim 1$ のリン脂質を添加すると膜の曲率が正に変化するため、膜曲率が小さいラメラ構造や $H2$ 構造に相転移を起こす可能性がある。さらに、Yagmur らは、 $CPP \sim 1$ のモノオレイン酸ジグリセロールの極性基とモノリノレインの極性基と相互作用により、モノリノレインからなる NLLC 構造の水チャンネルのサイズが増大すると報告している [72]。このことから、リン脂質の製剤への添加は、膜の曲率変化に伴う NLLC 構造の変化や水チャンネルのサイズの増大に関与している可能性がある。DOPG は $CPP > 1$ であるが、電荷を有することで膜の曲率を低下させることが知られている [35]。一方、DOPE は、他のリン脂質と比較して親水基の占める体積が小さく $CPP > 1$ であることから、添加により膜の負の曲率が増加する。よって、DOPE を添加した時にのみ $Pn3m$ より負の曲率の高い $H2$ 構造が確認できたと考えられる。さらに、LA(-)製剤 (Fig. 21a~d) と LA(+)製剤 (Fig. 21e~h) の構造を比較すると、LA の添加により NLLC 構造は $H2$ から $Pn3m$ へ、もしくは $H2$ と $Pn3m$ の混成構造へと変化した。形成された構造は LA の添加により負の曲率が低下していることから、LA は MGE やリン脂質からなる脂質膜と疎水的に相互作用している可能性が考えられた。また、DOPG 含有製剤では LA の添加の有無による NLLC 構造変化が認められなかった。DOPG 含有製剤は DOPG の影響で膜の曲率変化が生じていることから、LA 添加

による更なる膜の曲率変化が生じなかったと考えられた。

Figure 22 に、調製した製剤の TEM 観察結果を示す。観察した製剤はいずれも NLLC 構造特有の格子状の構造(白矢印)が確認でき、TEM 解析からも NLLC 構造を形成していることが確認できた。

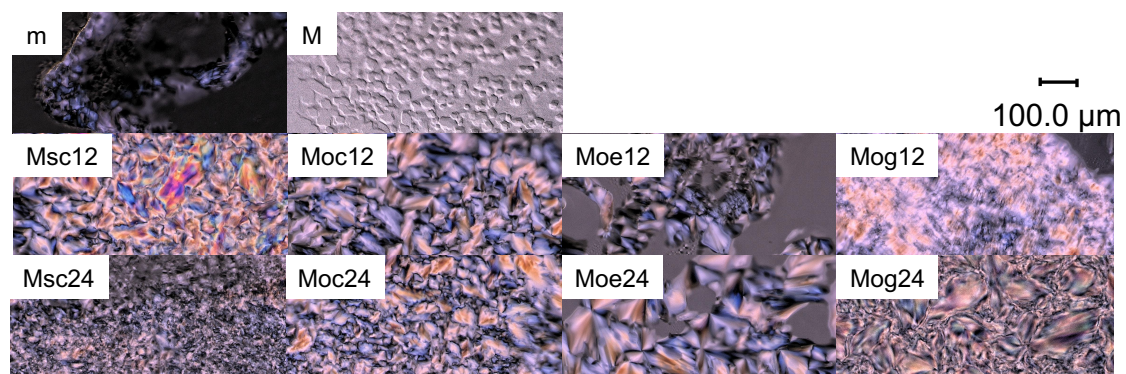


Fig. 20 Polarized images of MGE based formulations after mixing with pH 7.40 PBS.

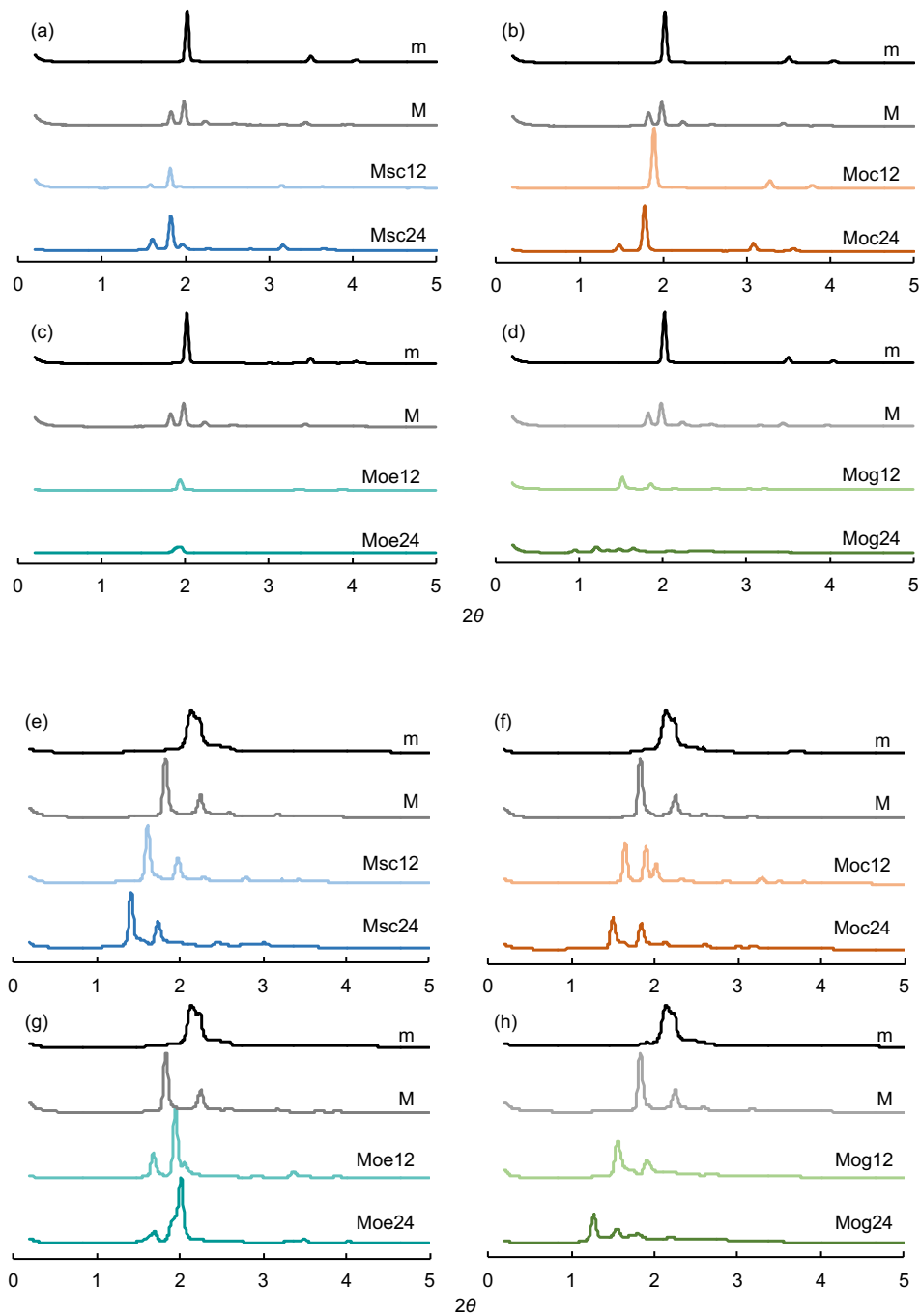


Fig. 21 Structural analysis of formulations gel by small angle X-ray. The constructed gel was obtained by dropping the depot MGE based formulations of Msc formulations (a), Moc formulations (b), Moe formulations (c), Mog formulations (d), LA containing Msc formulations (e), LA containing Moc formulations (f), LA containing Moe formulations (g) and LA containing Mog formulations (h) to PBS.

Table 9 Constructed structure and its interplanar spacing (d , nm) of prepared MGE based formulations.

Formulations	Without LA		With LA	
	Structures	d (nm)	Structures	d (nm)
m	$H2$	4.36	$H2 + Pn3m$	4.10
M	$H2$	4.36	$Pn3m$	4.82
Msc12	$H2$	4.87	$Pn3m$	5.46
Msc24	$H2 + Pn3m$	5.49	$Pn3m$	6.22
Moc12	$H2$	4.65	$Pn3m$	5.35
Moc24	$H2$	4.95	$Pn3m$	5.87
Moe12	$H2$	4.55	$H2 + Pn3m$	4.30
Moe24	$H2$	4.55	$H2 + Pn3m$	4.37
Mog12	$Pn3m$	5.82	$Pn3m$	5.65
Mog24	$Pn3m$	7.31	$Pn3m$	6.91

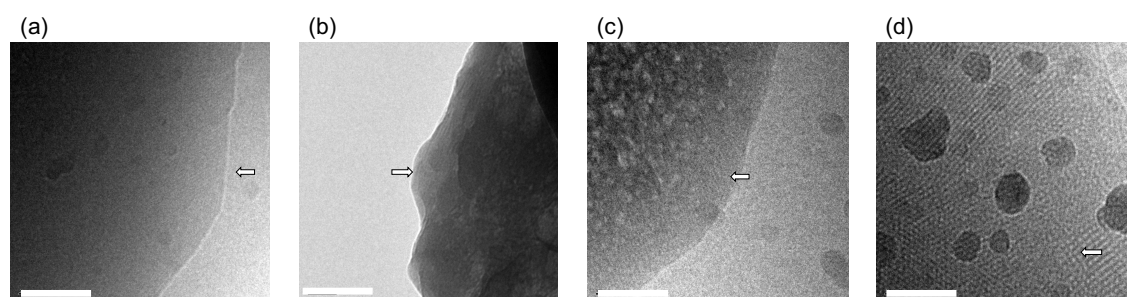


Fig. 22 Observation image by Cryo-TEM. m (a), M (b), Mog12 (c), Mog24 (d). White bar indicates 100 nm.

2. 製剤からの *in vitro* 放出試験

Figure 23 に MGE を基剤とした製剤からの 7 日間に渡る LA の放出挙動(a~d)および累積放出率(e~h)を検討した結果を示す。

製剤中に DSPC や DOPE を含有した製剤からの LA 累積放出率は、リン脂質の含有量に関わらず M 製剤と比較して有意に高値を示した。一方で、DOPG を含有した製剤からの LA 累積放出率は低値を示し、7 日間に渡る放出試験でも約 20%以下の放出率であった。

NLLC 製剤に内封された薬物の放出性はラメラ構造 > キュービック構造 > ヘキサゴナル構造 > ミセル構造の順で速いことが報告されている[29, 40]。しかしながら、DOPG を含有した製剤は $H2$ 構造を有しているにもかかわらず、 $Q2$ に分類される $Pn3m$ を形成している M 製剤と比較して高い放出性を示した。第 1 章で、FD-4 をモデル薬物として用いた場合には、形成された NLLC 構造の種類に関わらず、薬物放出性は d を用いて説明することができ、放出性は d の増大に伴い高値を示した。一方、LA の放出では、 d との関係は確認できず (Fig. 24)、LA の放出挙動は FD-4 と異なると考えられた。FD-4 添加の有無は FD-4 の様な水溶性薬物は形成された水チャンネルや構成脂質の極性基付近に分布すると考えられる。FD-4 添加の有無は形成される NLLC 構造に影響を及ぼしておらず、一方、DOPG を除く製剤では、LA は NLLC 構造に影響し、添加により膜の曲率が小さくなる方向に変化することが確認された。このことは、LA の疎水基部分が MGE およびリン脂質もしくはいずれかの疎水基部分と相互作用していることを示唆している。これらの相互作用は NLLC 構造の内部構造にも影響を及ぼしている可能性を示しており、これらの変化が DSPC や DOPC を含有した製剤からの LA 放出が M 製剤からの放出よりも高値を示した原因であると考えられた。

一方、Mog 製剤では、他の製剤と比較して低い放出性が確認された。LA の等電点は 9.1 であり、pH 7.40 条件下では正電荷を有する。そのため、Figure 25 に示したように、負電荷リン脂質である DOPG と静電的相互作用が生じることで徐放性を示したと考えられた。静電的相互作用を用いた内封薬物の徐放化に関する論文はすでに報告されており[23, 73, 74]、Lim らは正電荷を有するエンテカビル徐放化を酸性条件下 (pH 2.40 - 4.50) で負電荷を有する DOPG との静電的相互作用により成し遂げている。本検討では Mog12 製剤にて LA 徐放化に成功していることから、12%の製剤中 DOPG は LA の徐放化に十分な量であると考えられた。

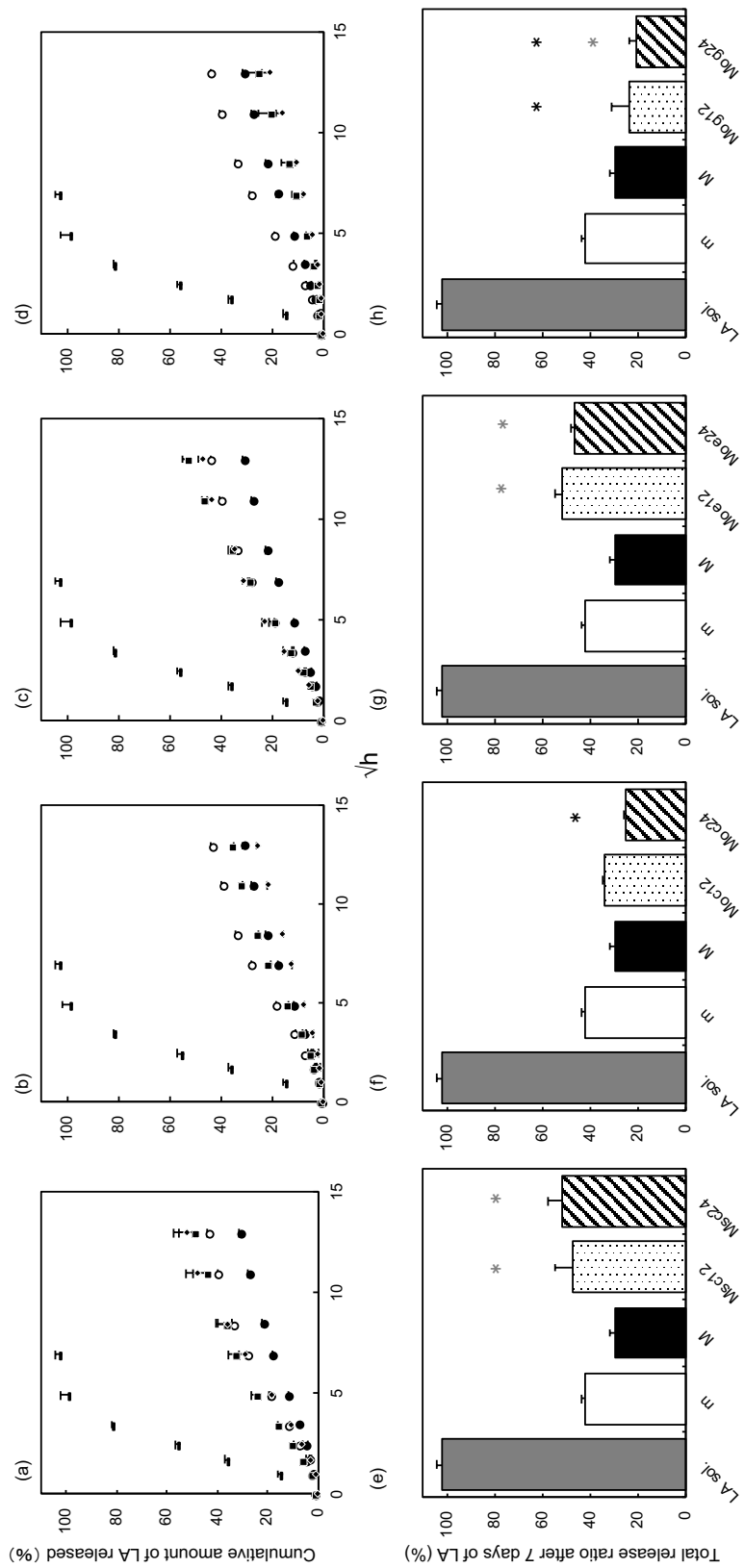


Fig. 23 LA release ratio from MGE based formulation over 7 days. Release profile; Msc formulations (a): LA sol. (-), m (O), M (●), Msc12 (■), Msc24 (◆). Moe formulations (b): LA sol. (-), m (O), M (●), Moe12 (●), Moe24 (◆). Mog formulations (c): LA sol. (-), m (O), M (●), Moe12 (■), Moe24 (◆). Moe formulations (d): LA sol. (-), m (O), M (●), Mog12 (■), Mog24 (◆). Release rate; Msc formulations (e), Moe formulations (f), Moe formulations (g) and Mog formulations (h). Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3-5). * Compared with m alone ($p < 0.01$). * Compared with M alone ($p < 0.01$).

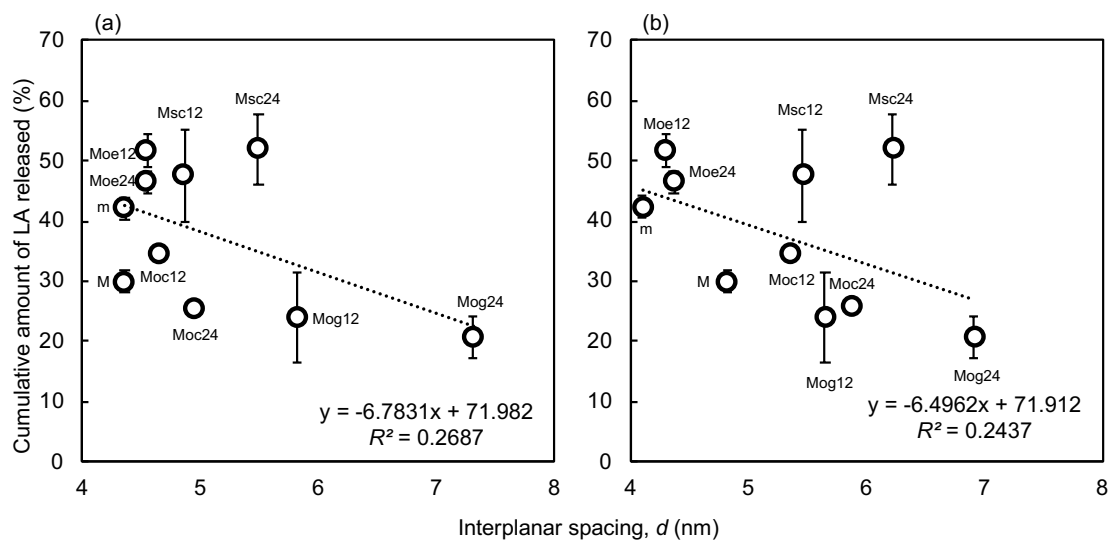


Fig. 24 Relationship between interplanar spacing and the cumulative amount of LA released. Interplanar spacing of without LA (a) and with LA (b).

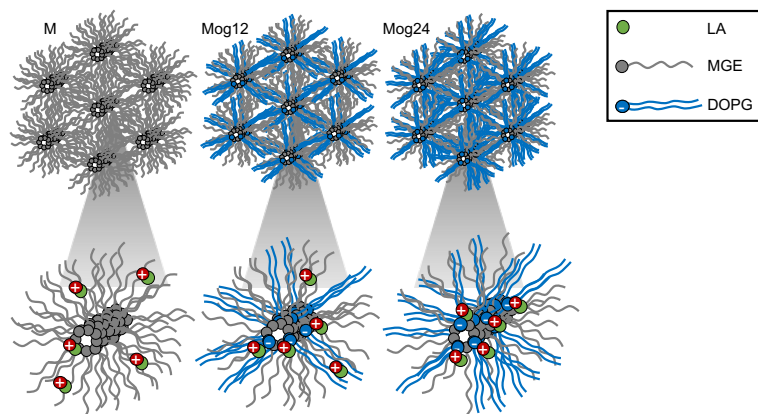


Fig. 25 Schematic representation of electrostatic interactions between LA and DOPG at pH 7.40 for M, Mog12 and Mog24.

3. *In vivo* 試験

Figure 26 に LA 水溶液を静脈内投与後の血中濃度の経時変化を示す。LA 水溶液の静脈内投与の結果から薬物動態パラメータである消失半減期($t_{1/2}$)は 0.35 (h)、全身クリアランス(CL_{tot})は 0.13 (L/h)であった。また、Figure 27a に、LA 水溶液、M 製剤、DOPG を含有する Mog12 および Mog24 製剤、および比較対象として市販されている PLGA を基剤とした LA 製剤を皮下投与したときの LA 血中濃度推移を示す。また、Figure 27a を片対数プロットしたグラフを Figure 27b に示す。LA 水溶液(○)を皮下投与すると LA は速やかに血中より消失し、投与後 6 時間後には定量下限限界値以下(0.1 ng/mL)となった。一方で、M 製剤、Mog12 および Mog24 製剤は投与後 21 日まで血中濃度の持続が確認できた。特に、Mog 製剤は投与 14 日後において M 製剤と比較して有意に高い LA 血中濃度を示すことが確認された。しかしながら、MGE を用いて調製した製剤は市販製剤と比較すると、皮下投与直後の LA 血中濃度が高値を示した。

Table 10 に製剤投与 21 日後までの血中濃度推移より算出した血中濃度-時間曲線下面積(AUC_{21day})および絶対的バイオアベイラビリティ(BA)を示す。 AUC_{21day} は、台形公式を用いて算出した。LA 溶液を投与して得られた BA 値は、4.31%であり、M 製剤では 63.8%、Mog12 製剤では 89.1%および Mog24 製剤では 78.0%、市販製剤では 25.3%であった。さらに、M 製剤および Mog 製剤に関しては、21 日目の血中濃度($Conc_{.21day}$)と各製剤投与時の LA の消失速度定数(k_{el})を用いて $AUC_{21day} + Conc_{.21day}/k_{el}$ より AUC_{∞} を算出した。その結果、M 製剤では BA 値が 66%、Mog12 製剤では 100%および Mog24 製剤では 90%の値となった。

LA 溶液投与時の BA 値は 4.31%と低値であった。これは、皮膚中に存在するペプチダーゼ等により LA が加水分解を受け速やかに代謝されることが原因であると考えられる。他の研究グループは、LA の皮内投与後の安定性を皮膚ホモジネート溶液により試験しており、LA 溶液添加 120 分後には 90%が加水分解を受けると報告している[70, 75-77]。したがって、M 製剤および Mog 製剤が LA 水溶液と比較し高い BA が得られた原因として、間接的ではあるものの製剤化することで製剤中の LA 安定性改善に寄与していることが示された。

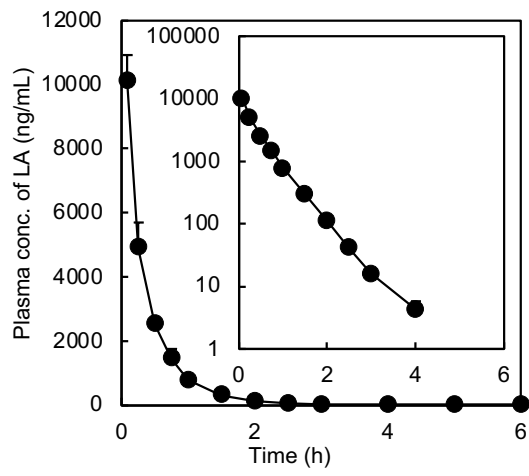


Fig. 26 Time course of LA concentration in plasma after *i.v.* injection. Each value shows the mean \pm S.E. (n = 3-5).

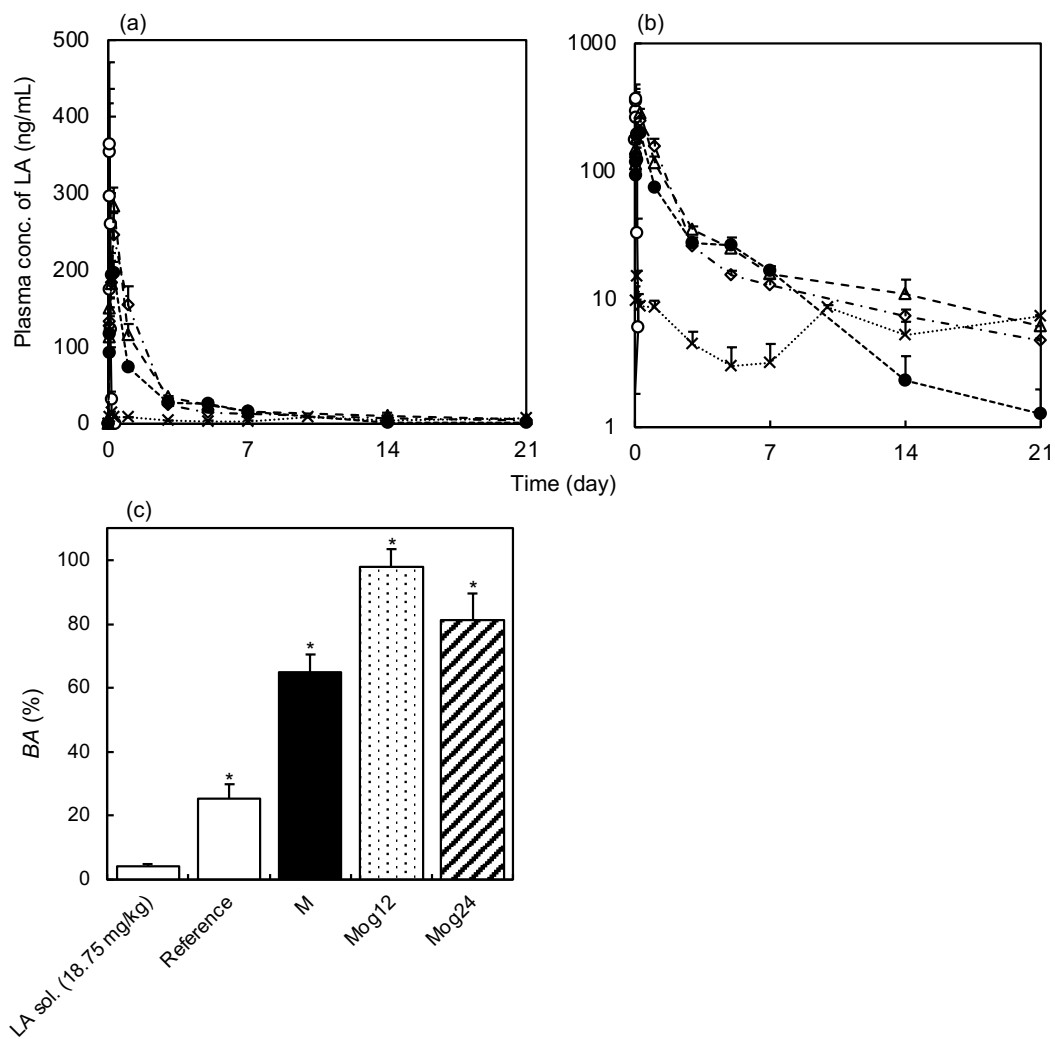


Fig. 27 Plasma LA concentration time profile over 21 days after s.c. injection (a), logarithmic notation on the y axis (b) and BA of each formulation (c). Symbols: LA sol. (\circ), Reference (\times), M (\bullet), Mog12 (Δ), Mog24 (\diamond). Each point shows the mean \pm S.E. ($n = 3-5$). * Compared with s.c. LA sol. (18.75 mg/kg) alone ($p < 0.01$).

Table 10 Pharmacokinetic parameters of leuprolide acetate after s.c. coadministration in rats. Each value shows the mean \pm S.E. (n = 3-5). ** Compared with s.c. LA sol. (18.75 mg/kg) alone ($p < 0.01$).

Route	Enhancer	Dose (mg/kg)	AUC (ng*h/mL)	S.E.	AUC _∞ (ng*h/mL)	BA (%)*
			<i>AUC</i> _{0-6 h}			
<i>i.v.</i>	-	5	3815.52	± 458.37	-	-
			<i>AUC</i> _{0-8 h}		<i>BA</i> _{0-8 h}	
s.c.	LA sol.	18.75	608.01	± 76.15	-	4.31
			<i>AUC</i> _{0-21 d}		<i>BA</i> _{0-21 d}	
s.c.	Reference	18.75	3620.13	± 647.79	6954.19	25.30**
	M		9311.63	± 778.88	9503.80	63.84**
	Mog12		14004.27	± 804.33	14850.28	89.05**
	Mog24		11623.29	± 1189.33	13457.09	78.03**

$$*BA = [(AUC_{s.c.}/Dose_{s.c}) / (AUC_{i.v.}/Dose_{i.v.})]$$

第3節 小括

MGE の持続性注射剤としての有用性を明らかにするために、第 1 部第 1 章では水溶性中分子薬物の放出性に NLLC 構造が関係することを明らかにした[78, 79]。第 1 部第 2 章では、第 1 章で得られた知見をもとに、モデル中分子薬物である LA の徐放性と生物学的利用能の改善を目的とした持続性注射剤を検討した。

第 1 章でモデル薬物として用いた FD-4 含有製剤とは異なり、LA は MGE または/およびリン脂質と相互作用し、形成する NLLC 構造に影響を与えることが明らかになった。さらに、製剤からの放出性は、形成された NLLC 構造の d の影響を受けず、徐放化するためには、負電荷リン脂質である DOPG との静電的相互作用を利用する必要があった。その結果、DOPG を添加した製剤では *in vitro* および *in vivo* 試験にて徐放性を確認することができた。iDDS として利用が可能な MN は、LA の投与デバイスとしても注目されている。しかしながら、MN を用いて LA を投与すると、皮膚内で代謝されるため生物学的利用率は高くないことが報告されている[70, 75]。本研究で用いた MGE を基剤とした製剤を用いることで、皮膚内で代謝を受けやすい中分子薬物の安定性改善にも寄与できる可能性が示された。しかしながら、MGE を基剤とした製剤の欠点として、体液と接触することで、粘性が著しく増大する。よって、iDDS として MGE を基剤とした製剤を用いる場合には投与時の粘性を低下させるための更なる工夫が必要である。

本章では、脂溶性中分子薬物である LA の放出性は負電荷リン脂質である DOPG との静電的相互作用が大きく影響していることを明らかにした。

第2部 NLLC 形成脂質を用いた微粒子製剤の検討

近年、少量で強力な薬理効果を示す核酸・ペプチド医薬品などの中分子化合物の研究が盛んに行われており、従来では治療が困難だった疾病の治療薬として注目されている。これらの有効性や安全性向上には DDS は欠かすことができない方法であり、様々な革新的な基盤技術の開発が求められている[80-83]。

ペプチドを利用した中分子医薬品は、低分子と抗体の利点を併せ持つことから、新たな創薬標的として注目されているが、これらペプチド医薬品の多くは膜透過性が低いため注射による静脈または皮下投与が一般的である[84]。投与経路の特徴として皮下投与は静脈投与と比較し、自己投与可能であり、通院に伴う時間的な制約や負担の軽減および医療費の削減に貢献できる[85-87]。また、薬物動態の観点では、静脈投与と比較し、皮下投与は最高血中濃度(C_{max})が低く、 C_{max} に達するまでの時間(T_{max})が遅くなり、血中濃度を持続させることができる[88]。そのため、短時間で薬効を発揮させたい薬物の投与経路として皮下投与は不向きであるが、長期間一定の濃度を維持させる目的では皮下投与を行うだけで薬効が持続するというメリットがある。さらに、皮下投与は静脈投与と比較し吸収速度が遅いことから投与により生じる過敏症などの副作用発現を抑えることができるため、高分子ペプチドであるモノクローナル抗体の投与方法としてしばしば用いられている[89]。

しかしながら、酢酸リユープロレリン(LA, *M.W.* 1.3 kDa)などのペプチドは皮膚内の加水分解酵素により代謝されやすく、LA 水溶液を皮下投与したときのバイオアベイラビリティは低値となることが報告されている[67, 90-92]。皮下投与薬物の *BA* は、リポソームなどの脂質を用いた粒子や PLGA などの高分子ポリマー粒子などの利用による安定性改善だけでなく、投与製剤の容量、pH や粘度等の影響を受けることが知られている。

リポソームなど脂質二分子膜からなる閉鎖小胞体は、薬物の極性にかかわらず薬物を内封することが可能であり、また、優れた生体適合性を有している[12, 93]。また、ポリエチレンオキシド(PEO)とポリプロピレンオキシド(PPO)で構成される Pluronic[®] F-127 などの非イオン性トリブロックポリマーを用いた高分子ミセル型製剤も広く使用されており[94-97]、Shriky らは、Pluronic[®] F-127 を基剤とした皮下投与型製剤を調製し、温度上昇に伴う Pluronic[®] F-127 のゲル化能に着目した薬物放出制御に関する研究成果を報告している[98]。さらに、リン脂質と Pluronic で構成された製剤は、薬物の細胞毒性低減[99]や血中滞留性改善[100]に寄与することが報告されている。

前章では、MGE を基剤とした自己組織化製剤を用いることで中分子モデル薬物である FD-4 や LA の徐放化や BA 改善に成功している。しかしながら、MGE は体液と接触することで著しく粘性が増加するため、自己投与型製剤としては、粘性を低下させるための処方検討が必要であった。

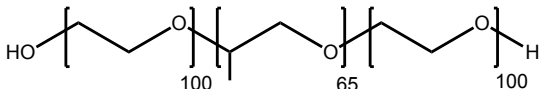
MGE は、NLLC 形成による薬物放出制御能を有するだけでなく、経鼻投与後の薬物の脳内移行性の向上[65]や経皮投与後の膜流動性変化による親水性薬物の吸収性増大[101]などに寄与することから、中・高分子ペプチドの BA 改善に効果があると考えられる。よって、前章と同様に MGE に注目し、MN やマイクロポンプなどのデバイスを用いて自己投与可能かつ、BA 改善効果や徐放能を有する NLLC 形成脂質—高分子界面活性剤からなる微粒子製剤を調製し、第 1 部第 2 章で得られた LA と DOPG の静電的相互作用を利用することで、MN などとの併用利用を可能とする粘性が低い、放出制御能および BA 改善能を有する皮下投与型製剤の調製を試みた。

第1節 試験方法

1. 試薬および試験材料

MGE、LA、DOPG、DOPC は第 1 部と同様のものを用いた。エタノールは富士フィルム和光純薬株式会社(大阪, 日本)より購入した。非イオン性トリブロックコポリマーである Pluronic® F-127 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)より購入した。Table 11 に Pluronic® F-127 の構造式および分子量を示す。

Table 11 Chemical structure and physical property of Pluronic® F-127.

	Structure	M.W.
Pluronic® F-127		~12,600

2. 新規微粒子製剤の処方および調製方法

製剤処方を Table 12 に、調製方法を Figure 28 に示す。製剤は Hydration 法を応用し、Ultrasonic(VC-505, 30 sec×3, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)を用い混合し 9 種類の製剤を調製した。MGE 含有製剤を MP と略し、続く下付数字は製剤中 MGE 含有濃度を表す(Fig. 28a)。MGE 非含有製剤は P で示し、濃度が異なる DOPG と DOPC からなるリポソーム製剤は、総脂質含有率を下付数字で示し Lipo_{1.0} および Lipo₁₀ と示す(Fig. 28b)。また、LA を含有しない MP₁₀ 製剤および P 製剤を調製し、それらの分散媒に LA を添加した製剤を Phy-MP₁₀ および Phy-P と示す(Fig. 28c)。

Table 12 Composition of prepared fine particle formulations.

mM	LA sol.	MP _{1.0}	MP _{5.0}	MP ₁₀	P	Lipo _{1.0}	Lipo ₁₀
MGE	-	1	5	10	-	-	-
Pluronic® F-127	-	1	5	10	10	-	-
DOPG	-	1.75	5.75	10.75	10.75	0.75	7.5
DOPC	-	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	2.5

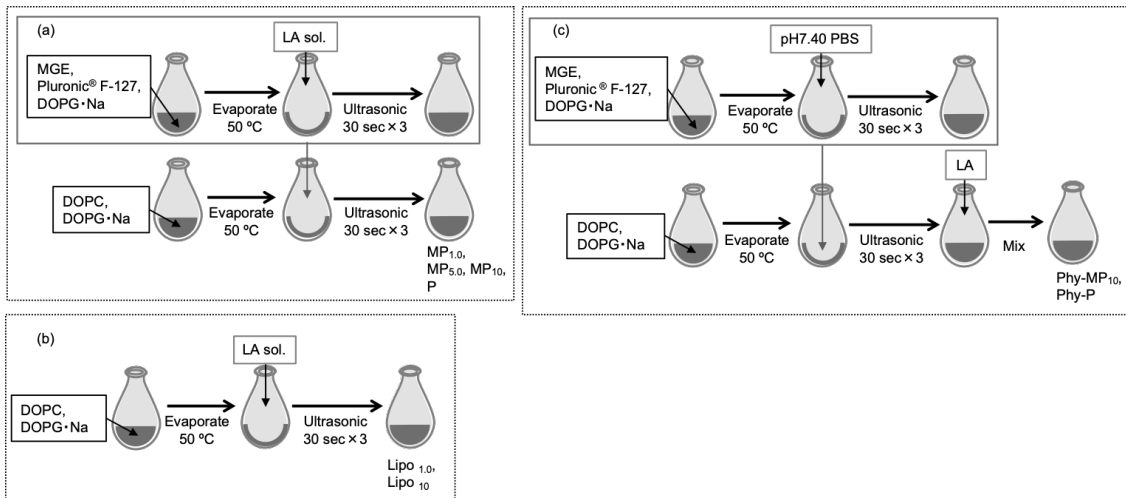


Fig. 28 Schematic diagram of the preparation procedure of lipid-based self-administrated formulations. MP and P formulations (a), Lipo formulations (b) and Phy-MP₁₀ and Phy-P (c).

3. SAXS による NLLC 構造解析

小角 X 線回折装置 (SAXSpase, Anton paar, Graz, Austria) を用いて構造解析を行った。測定は株式会社アントンパール・ジャパン (東京, 日本) に委託した。Table 13 に SAXS 測定条件を示す。SAXSpase は X 線を点照射ではなく線照射でサンプルを測定できることから、低濃度のサンプルの構造解析にも優れている [102, 103]。これらの特徴から、第 2 部では小角 X 線測定に SAXSpase を用いた。

Table 13 Observation condition with SAXS.

X-ray source	High-flux sealed-tube X-ray source : Cu K _α (λ=0.1542 nm)
Power	2 kW (50 kV / 40 mA)
Beam collimation	Line collimation
X-ray detector	Mythen R 1 k
Exposure time	2 h
Sample stage	TCStage 150 + Quartz glass for liquid

4. Cryo-TEM 観察

製剤は cryo-transmission electron microscope (Cryo-TEM, JEM-3100FEF, JEOL Ltd., Akishima, 東京, 日本) を使用し観察した。なお、観察は奈良先端科学技術大学院大学に委託した。製剤の 20 倍希釈液 1 μL を親水化銅グリッド (200 メッシュ, JEOL Corporation) に滴下し、染み込ませた後、急速凍結システム (EM-CPC, ライカマイクロシステムズジャパン, 東京, 日本) を使用して凍結溶媒としてエタンを使用して急速凍結した。通常観察に加えリンタングステン酸 (PTA) によりサンプルをネガティブ染色し観察した。

5. 粒子径および表面電位測定

Zetasizer Nano ZS (ZEN3600, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) を用い、粒子径は動的光散乱法、表面電位は光散乱電気泳動法により測定した。なお、調製製剤を精製水で 10 倍に希釈し、測定サンプルとした。

6. 粘度測定

電子磁気回転粘度計(以下 EMS 粘度計, EMS-100, 京都エレクトロニクス製造株式会社, 京都, 日本)を使用して、製剤の粘度を測定した[104-108]。粘度計は、回転磁界と回転子に取り付けられた 2 つの磁石がある。磁気を中心にサンプルと 2 mm のアルミ球を入れた滑らかな凹底の試験管をセットした。測定は 25 °C で行った。粘度は、各サンプルについて 50 回測定した平均値として算出した。

7. 見かけの内封率(%)の算出

Pluronic® F-127 含有製剤中の LA 内封率は、式(8)を用いて算出した。LA の製剤中薬物濃度 (C_{total}) は、調製製剤をアセトニトリルで 10 倍希釈後、5 分間のボルテックス (Vortex-gene 2 mixer, M&S Instruments Inc., 大阪, 日本)、5 分間の遠心分離 ($21,500 \times g$, 5 min, 4 °C) した後、得られた上層を pH 7.40 PBS と 1 : 1 で混合し、再度ボルテックスと遠心分離を行い、上層を測定サンプルとした。粒子径が 100 nm 以上の製剤は超遠心分離機 (himac CS120GX II Micro Ultracentrifuge, Eppendorf himac Technologies Co. Ltd., 茨城, 日本) を用い遠心分離 ($289,000 \times g$, 60 min, 4 °C) 後、得られた上層は上記に示した C_{total} 測定と同様に処理した。また、粒子径が 100 nm 以下の製剤についてはアミコンウルトラ (Amicon Ultra)-0.5 mL 遠心式フィルター (CF3K, Merck & Co., Inc., NJ, US) にてフィルター濾過し、得られたサンプルは C_{total} 測定と同様に処理した。

$$EE (\%) = (C_{total} - C_{out}) / C_{total} \cdots \cdots (8)$$

8. ^1H - ^1H nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) 核磁気共鳴 (NMR)分光法による測定

調製製剤(MP₁₀ および P 製剤)を構成する分子の分子間相互作用は NMR を用いて測定した。製剤は、pH 7.40 PBS の代わりに重水(D₂O)を用い調製した。また、帰属を明らかにするため、LA、Pluronic® F-127、DOPG および DOPC についてはそれぞれ D₂O に溶解させ測定したが、水と接触することで自己組織化する MGE については測定を行わなかった。NMR 分析は、コールドプローブ(^1H { ^{13}C / ^{15}N } 5 mm Triple Resonance ^{13}C Enhanced Cold Probe, VT, 700NB)を備えた NMR スペクトロメーター(Varian NMR System 700 MHz、Agilent Technologies Inc., CA, USA)を用いた。測定条件は、パルス幅は P および MP₁₀ 製剤でそれぞれ 10.05 μs および 10.75 μs 、緩和遅延 1.0 s、積算回数 16 回、混合時間 500 s、温度 298 K の条件で測定した。

9. 放出試験

種々製剤 100 μL を透析チューブ(第 1 部で用いたものと同様)に入れ、40 mL の pH 7.40 PBS を放出溶媒として用い、100 rpm の攪拌条件で温度 37 ± 0.02 °C、6 時間試験を行った。経時的にレシーバー側から 500 μL 溶液を採取し、同量の放出溶媒を戻した。得られたサンプルは測定まで-80 °C で保存した。なお、製剤からの LA の放出性は式(9)を用いて算出した。

$$\begin{aligned} & \text{7 日後 LA 累積放出率(\%)} \\ & = (\text{7 日後 LA 累積放出量}(\text{ng}) / \text{製剤中 LA 量}(\text{ng})) \times 100 \cdots \cdots (9) \end{aligned}$$

10. 動物試験

第 1 章と同様の動物を用いた。なお、すべての動物試験は城西大学動物試験規定に従い、城西大学全学動物試験管理委員会の承認 (JU20005) を得て行った。

11. 皮下投与試験

第一部では、中・長期的に採血を行う必要があり無麻酔下で採血を可能とするためあらかじめ頸静脈カニューレーション手術を施したラットを用いたが、本章では製剤投与後、短時間で採血を行う必要があるためラットを麻酔後仰向けの状態で試験を行い経時的に頸静脈から採血を行った。ラットを三種混合麻酔後、仰向けに寝かせ採血部である頸静脈および腹部をバリカンで剃毛した後、ラット腹部に注射筒 (Agilent Manual Syringe, Agilent Technologies, CA, USA) に一般的な皮下注射で用いられている注射針として 23 G 注射針 (TERUMO Co., 東京, 日本)、低侵襲的な注射針として用いられている 30 G 注射針 (ニプロディスポーザーブル眼内注射針、ニプロ株式会社, 大阪, 日本) を用い腹部に皮下投与した。また、近年、自己投与型デバイスとしてマイクロニードルが注目されていることから、MicronJet™ (以下 MJ と略記、NanoPass Technologies Ltd., Nes zione, Israel [109, 110]) を用いた皮内投与も行った。LA 投与量は 0.4 mg/kg (製剤投与量: 100 μ L/rat) および 2.0 mg/kg (製剤投与量 500 μ L/rat) とし、MJ による薬物の皮内投与は注射 1 箇所あたり 100 μ L が限度であることから、2.0 mg/kg を投与する際は、5 箇所にわけて製剤を投与した。一定時間ごとに頸静脈より採血を行い、採血後は 27G 翼状針 (TERUMO Co., 東京, 日本) 尾静脈を介して採血量と同量の生理食塩液をラット体内に注入した。得られた血液サンプルを第 1 部と同様に処理した。

12. LA の定量法

第 2 章と同様の方法を用いた。

13. 統計解析

第 1 章と同様の統計処理を行った。

第2節 結果および考察

1. 調製製剤の外観観察

Figure 29 に LA 水溶液と MP 製剤の目視観察結果を示す。調製した MP 製剤はいずれも透明であった。

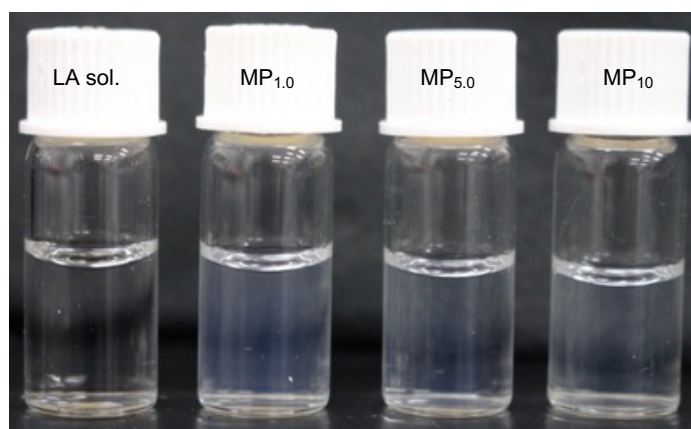


Fig. 29 Visible observations of prepared formulations with the naked eye.

2. 粘度測定

EMS 粘度計を用い投与製剤の粘度を測定したところ、LA 水溶液は 0.94 ± 0.01 (mPa·s \pm S.D.)、MP₁₀ 製剤は 20.28 ± 0.09 (mPa·s \pm S.D.)、P 製剤 14.12 ± 0.13 (mPa·s \pm S.D.)であった。

提供元である株式会社ファルネックスが MGE 単体を粘度・粘弾性測定装置 MARS (Thermo Fisher Scientific K.K., 東京, 日本)を用いて定常粘度測定を行い、ずり速度が 10 (s^{-1})の条件下で粘度が 0.47 (Pa·s)であることを報告している。粘度測定機器および測定条件が異なるため直接比較することはできないが、調製製剤は MGE 単体と比較し低粘度であることが示された。

3. Cryo-TEM による観察および SAXS による構造断定

Figure 30 に Cryo-TEM およびネガティブ観察の結果を示す。MP_{1.0}, MP_{5.0}, MP₁₀, P, Lipo₁₀ 製剤を Cryo-TEM およびそのネガティブ染色の観察結果より、MP_{1.0}, MP_{5.0}, MP₁₀, P 製剤ではミセル構造が確認された。特に、MP_{5.0}, MP₁₀, P 製剤はミセルが集合した構造を、一方、Lipo₁₀ 製剤はユニラメラ状のリポソームを形成していた。

Figure 31 に SAXS の結果を示す。MP_{1.0} では構造特有のピークが観察されなかったのに対し、MP_{5.0}, MP₁₀, P 製剤では $\sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{8}$ のピークが確認でき、解析を行ったところ、面心立方格子構造 (face-centered cubic, FCC 構造 [111, 112]) を有していることが認められた。Cryo-TEM および SAXS の結果より、MP_{5.0}, MP₁₀, P 製剤はミセルを形成し、ミセル同士が相互作用することにより、FCC 構造を形成していた。Pluronic[®] F-127 は微粒子製剤の調製で用いられており [97, 98]、臨界ミセル濃度 (CMC 0.8 wt%) 以上で自発的にミセルを形成することが知られている [113-115]。製剤中の Pluronic[®] F-127 濃度は CMC よりも高値 (10 mL あたり、MP_{1.0}: 1.26 wt%, MP_{5.0}: 6.30 wt%, MP₁₀: 12.6 wt%) であったことから、Pluronic[®] F-127 によるミセル形成が起こっていると考えられた。

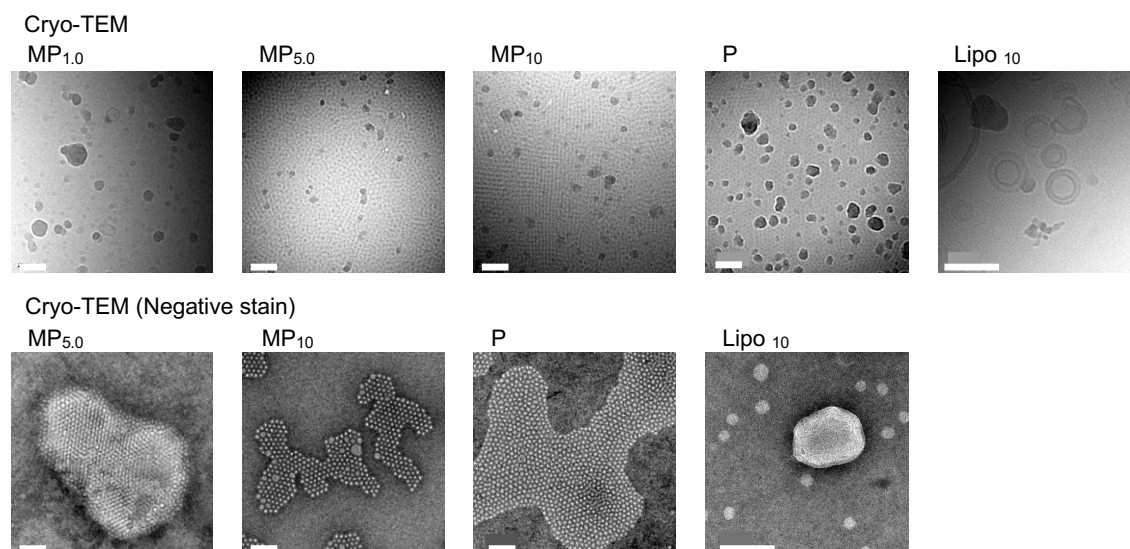


Fig. 30 Cryo-TEM and negative-stained cryo-TEM observation results. White bar indicates 100 nm.

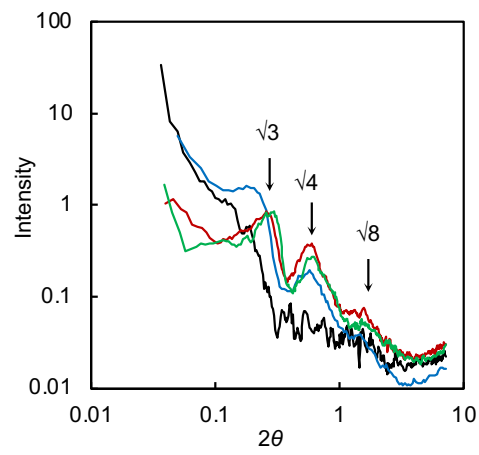


Fig. 31 Small-angle X-ray scattering observation results of MP and P formulations.

Black line: MP_{1.0}, blue line: MP_{5.0}, red line: MP₁₀, and green line: P.

4. NMR による LA 相互作用解析

P 製剤 (Fig. 32 a および b) および MP₁₀ 製剤 (Fig. 32 c および b) を用い、構成成分による分子間相互作用を $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ NOESY NMR にて解析した結果を示す。MP₁₀ および P 製剤の NOESY NMR スペクトルを比較し、MGE 由来のピークが MP₁₀ 製剤において 4.96 ppm 付近 (Figs. 32c および f_2) に確認できた。また、MGE は Pluronic[®] F-127 (Fig. 32 c および d, $f_1 = 0.93$ ppm) [116]、DOPG [117] や DOPC [118] のオレイル基 (それぞれ $f_1 = 1.50$ ppm および 2.19 ppm)、LA (Fig. 32 c および d, $f_1 = 1.77$ ppm) [119, 120] と相互作用することを確認した。また、Pluronic[®] F-127 を構成しているポリプロピレンオキシド (PPO) のメチル基 (0.97 ppm (Fig. 32s, f_2)) とメチレン基 (3.46 ppm (Fig. 32, f_2)) が相互作用していた。NMR、SAXS および Cryo-TEM の結果より調製した製剤は Figure 33 に示す粒子構造を形成していると考えられた。

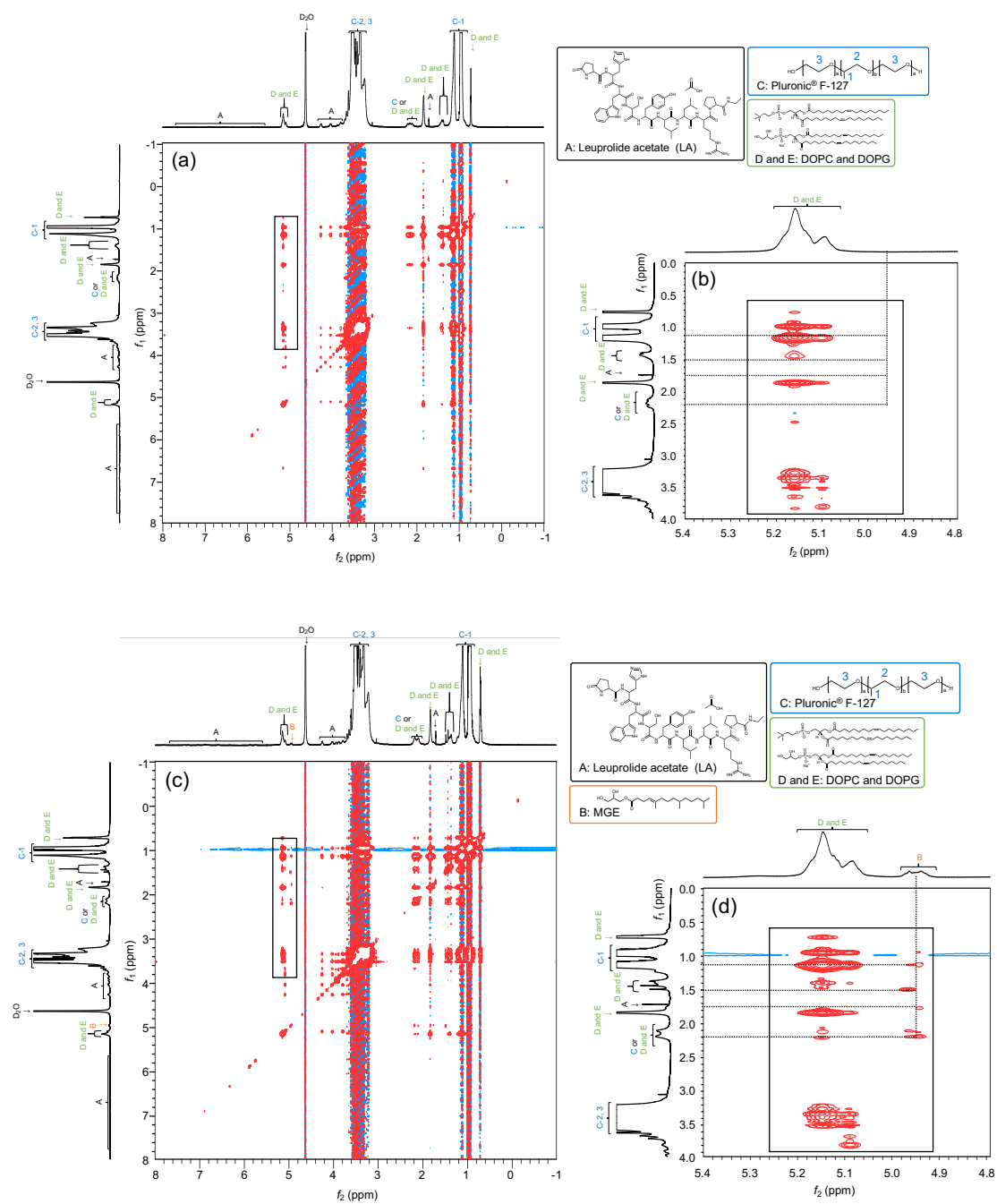


Fig. 32 $\{^1\text{H}-^1\text{H}\}$ NOESY NMR spectroscopy of P (a and b) and MP₁₀ (c and d). (b) and (d): Enlarged areas of the black boxes in (a) and (c), respectively.

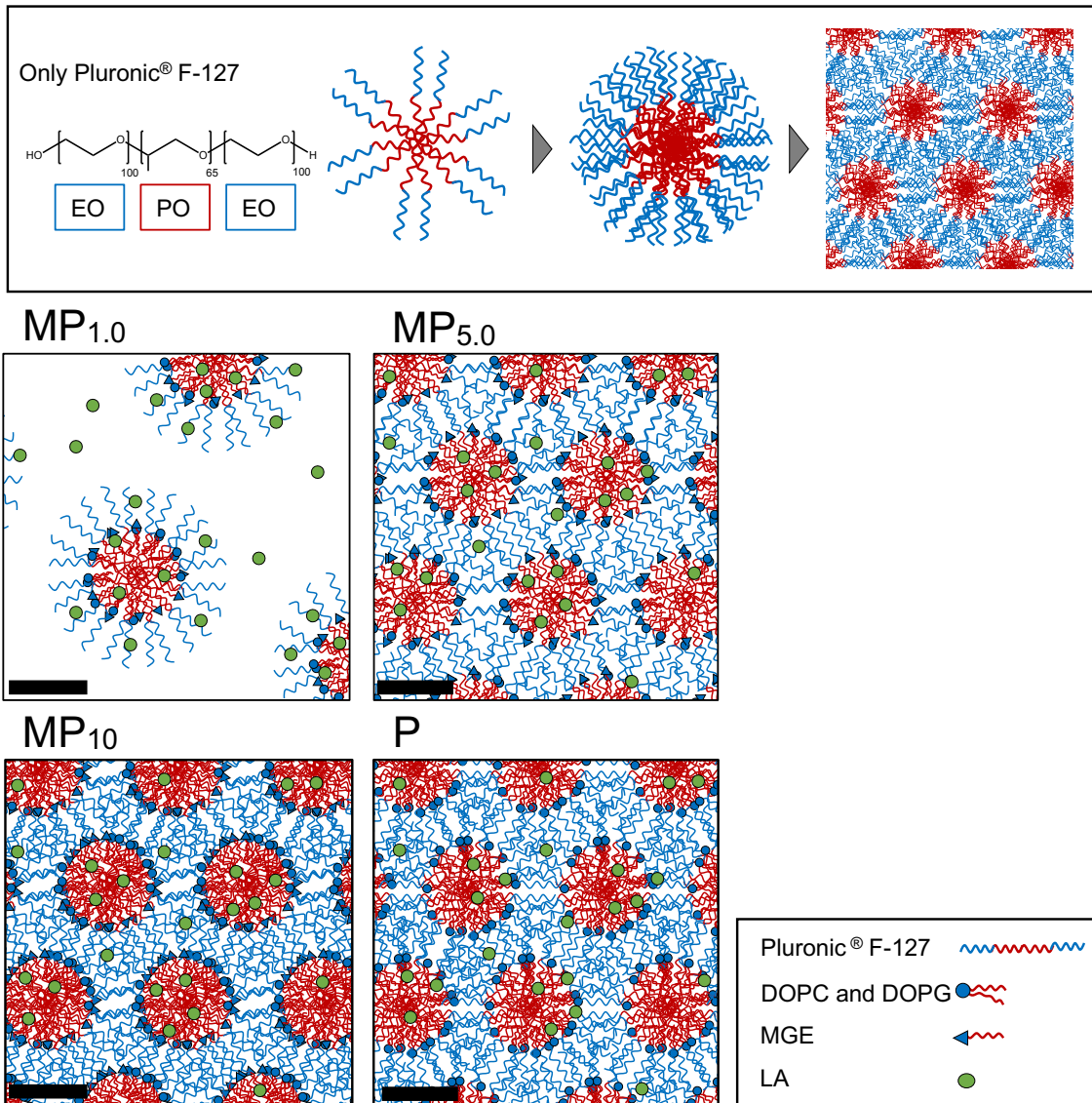


Fig. 33 Schematic representation of the morphology of the prepared formulations. Black bar indicates 5 nm.

5. 調製製剤粒子物性および LA 内封率

Figure 34 に調製した製剤の物性および LA 内封率を示す。粒子径は MP および P 製剤で 100 nm 以下、Lipo 製剤では 200~400 nm であり、粒度分布を示す PDI はすべての製剤で 0.4 程度であり均一な製剤の調製が可能であった。また、得られた粒子径は Figure 30 に示した Cryo-TEM 画像観察の結果とほぼ一致した。粒子表面電位は MP および P 製剤で中性付近、Lipo 製剤では負電荷を示した。MP および P 製剤は、粒子表面に Pluronic® F-127 の親水基である PEO による水相形成により電荷が中性付近を示したと考えられた。見かけの内封率は MP、P よび Lipo₁₀ 製剤で 60~90%を示した。MP および P 製剤で見かけの内封率が高かったのも PEO と LA が相互作用していたことが大きく影響したと考えられた (Fig. 33)。

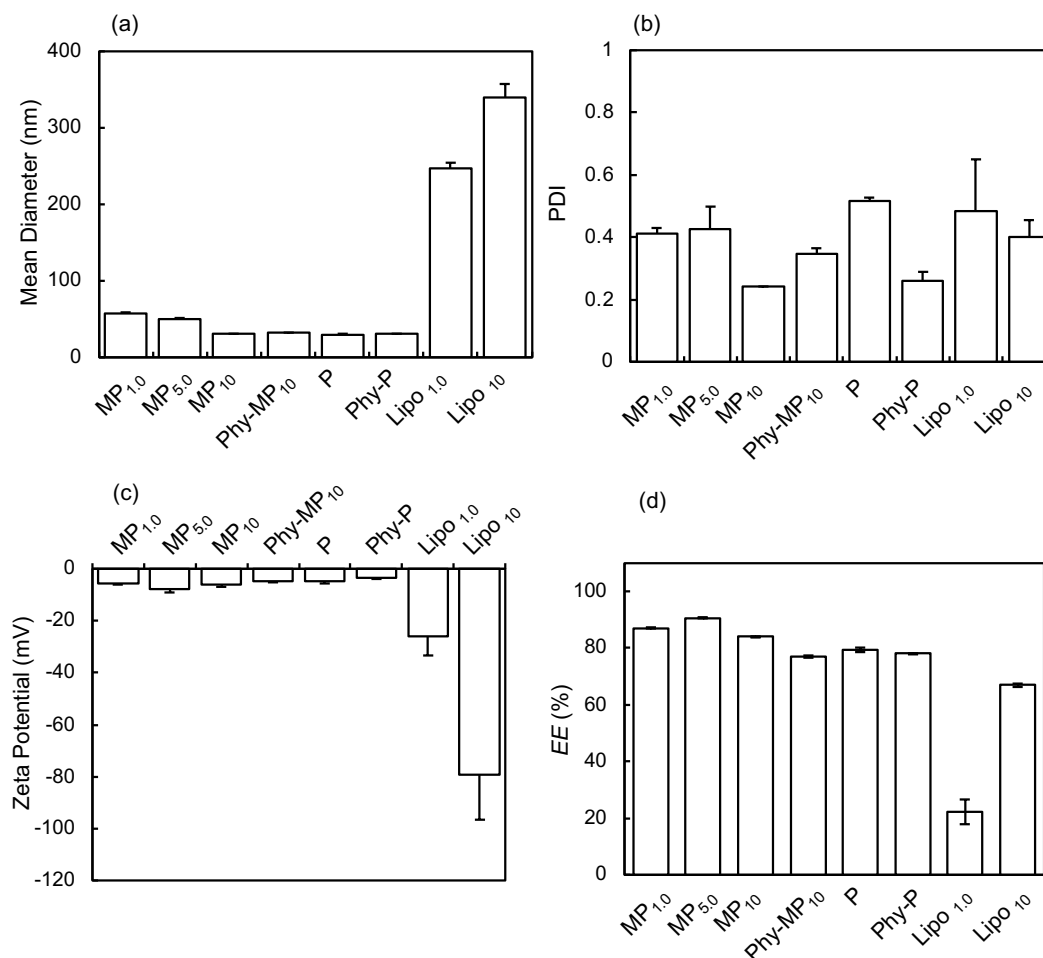


Fig. 34 Measurement of particle size (a), polydispersity index (b), zeta-potential (c), and entrapment efficacy of LA for prepared formulations (d). Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3).

6. *In vitro* 放出性評価

Figure 35 に製剤からの LA 放出性を示す。Lipo 製剤は LA を 6 時間で 40~60% 放出した。これは、Lipo 製剤に内封されている LA が少なく、Lipo 製剤の分散媒に LA が多く存在するためと考えられた。一方、MP 製剤および P 製剤では放出率が 20% 以下と低値となった。特に、MP 製剤では製剤中脂質濃度および Pluronic® F-127 の添加濃度の上昇に伴い、徐放性を示した。Phy-MP₁₀ および Phy-P 製剤からの LA 放出性は、MP₁₀ および P 製剤よりも高値を示した。Figure 34 に示した LA 内封率では、MP₁₀ と Phy-MP₁₀ 製剤、P と Phy-P 製剤ではほぼ同程度であった。よって、見かけの LA 内封率が同程度であったとしても、放出率に差が認められたことから、ミセル内の LA の存在する場所が異なる可能性が示唆され、放出率が高値を示した Phy-MP₁₀ および Phy-P 製剤では、粒子の外側に向けて配している DOPG の負電荷を有する親水基と正電荷の LA が相互作用し、LA がミセル外殻に存在しているのではないかと考えられた (Fig. 33)。

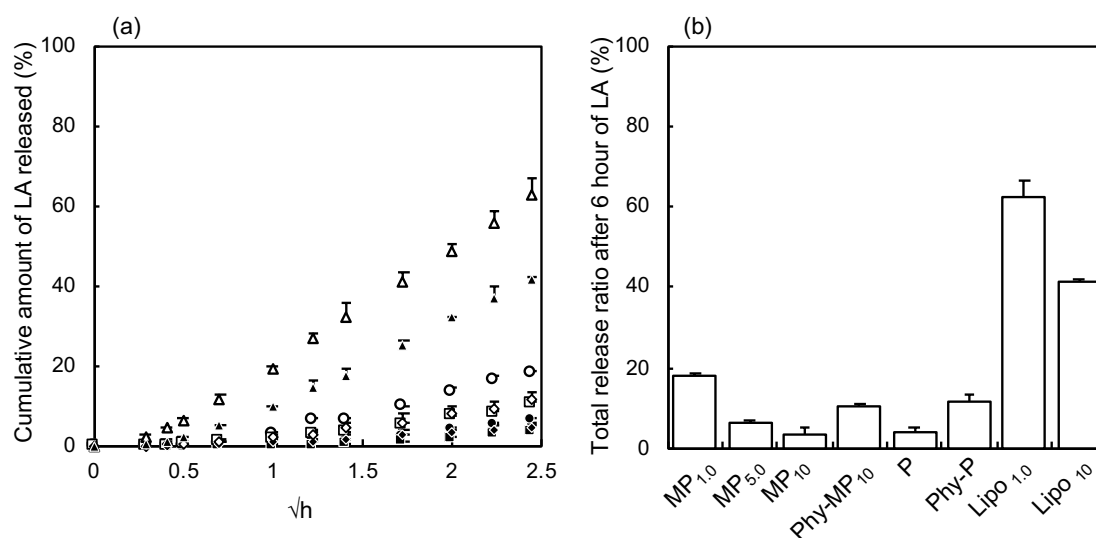


Fig. 35 LA release profile from each formulation (a). Symbols: MP_{1.0} (○), MP_{5.0} (●), MP₁₀ (■), Phy-MP₁₀ (□), P (◆), Phy-P (◇), Lipo_{1.0} (Δ), Lipo₁₀ (▲). Total release ratio after 6 hours of LA (%) (b). Each value shows the mean \pm S.D. (n = 3-5).

7. BA に及ぼす投与製剤の影響

Figure 36 に LA を 2.0 mg/kg で MP 製剤、P 製剤そしてそれぞれの Phy 製剤を投与した際の血中濃度プロファイルおよび AUC より算出した絶対的 BA 値を示す。LA 水溶液を皮下投与した時は、投与後すぐに血中濃度が上昇し、投与後 1.0 時間後には 34.2 ng/mL の C_{max} が得られた。ほぼ同様の血中濃度プロファイルが Lipo_{1.0} および Lipo₁₀ の投与により確認できた。投与製剤の中で最も高い血中 LA 濃度を示したのは、MP₁₀ 製剤を投与した時であり (C_{max} : 98.5 ng/mL, T_{max} : 4.0 h)、興味深いことに MP_{5.0} 製剤や Phy-MP₁₀ 製剤投与時では、LA 水溶液と比較してわずかに C_{max} が上昇しただけであった。また、P 製剤では C_{max} はわずかな上昇と T_{max} (6 h) の遅延が確認された。なお、EMS 粘度計を用い投与製剤の粘度を測定したところ、LA sol. は 0.94 ± 0.01 (mPa·s \pm S.D.)、MP₁₀ 製剤は 20.28 ± 0.09 (mPa·s \pm S.D.)、P 製剤 14.12 ± 0.13 (mPa·s \pm S.D.) であり、種々投与デバイスで容易に投与可能な粘度であった[121-124]。

MP_{1.0}、Lipo_{1.0} および Lipo₁₀ 製剤は、LA 水溶液投与とほぼ同程度の BA を得たが、MP₁₀ および P₁₀ 製剤を投与したときの BA は LA 水溶液と比べ、それぞれ 13 倍および 8 倍高値を示した。物理混合して調製した製剤を投与したときの LA の血中濃度推移を検討したところ、Phy-P 製剤では P 製剤と比較して C_{max} 値は同程度であるものの、 T_{max} が短くなった。一方で、Phy-MP₁₀ 製剤を投与したところ、MP₁₀ 製剤と比較して C_{max} は低値に、 T_{max} は短くなり、BA は 0.5 倍と低値を示した。

P 製剤投与後の LA 吸収性は LA 水溶液や Lipo 製剤を皮下投与したときと比較して高い値を示した。Figure 33 で示したように、P 製剤は Pluronic[®] F-127 由来の長い親水鎖が LA と相互作用していた。Rösler らは Pluronic[®] F-127 の親水性ブロック (PEO) は分散媒である水と水素結合し、また、Pluronic[®] F-127 の親油性ブロック (PPO) を内核とするミセルの外殻を形成することで、細胞への接着力やタンパク質の吸着を妨げると報告している[125]。この効果は、ミセルに封入されている薬物の加水分解や酵素による代謝から保護する作用に関係する。

このことから、ミセルに LA を内封することで BA が改善したのは投与部位での LA 安定性が改善されたためと考えられた。一方、Lipo 製剤を皮下投与した際の BA は LA 水溶液投与時と同程度であった。正に帯電した LA と負に帯電したリポソームが静電的相互作用していると考えられるが、Lipo 製剤からの LA 放出性は、LA が粒子表面もしくは分散媒に存在するように製剤を調製した物理混合製剤 (Phy-MP₁₀ および Phy-P 製剤) と比較して高値を示したことから、Lipo 製剤と LA の静電的相互作用は、MP 製剤と比較して弱く、LA の高い放出性が低い BA の原因と考えられた。また、MP_{1.0} 製剤の LA 放出性は Lipo 製剤よりは低いものの、BA 値は LA 水溶液と同程度であった。Figure 33 に示したように MP_{1.0} 製剤では、構築された構造の複雑さが他の MP 製剤

や P 製剤と比較して低下し、他の製剤より酵素などの影響を受けやすく皮内での代謝を受ける可能性が他の製剤よりも高いと考えられた。

MP₁₀ 製剤投与後の BA は他の製剤と比較して著しく高い値を示した。MP_{1.0}、MP_{5.0} および MP₁₀ 製剤中の MGE 含有量は、それぞれ 4.0%、12.7% および 50.2% となり、MGE 含有量が BA 改善効果に寄与している可能性が考えられた。Libster らは[103]、NLLC 形成脂質であるモノオレイン酸グリセリンを用いた親水性タンパク質を含有した製剤設計をしており、モノオレイン酸グリセリンとタンパク質の極性基同士の相互作用が、タンパク質の安定性の改善だけでなく、相互作用による疎水性の増加が膜透過性改善に寄与していると報告している。また、ミセルとの相互作用により、抗菌ペプチドの β ターン構造が増加することや、 β ターン構造が増加することにより、経細胞間隙経路を介した膜透過性が亢進するとの報告がなされている[126]。さらに、MGE 自身が膜流動性を高める効果があり、その効果は NLLC 構造を形成することで低下する可能性が報告されている[105]。本検討では、LA 構造の高次構造変化について調査していないが、MGE 添加により LA 透過性が改善された理由として、MGE および LA の親水性部分同時の弱い相互作用が皮内安定性改善や吸収促進効果に寄与していると考えられた。

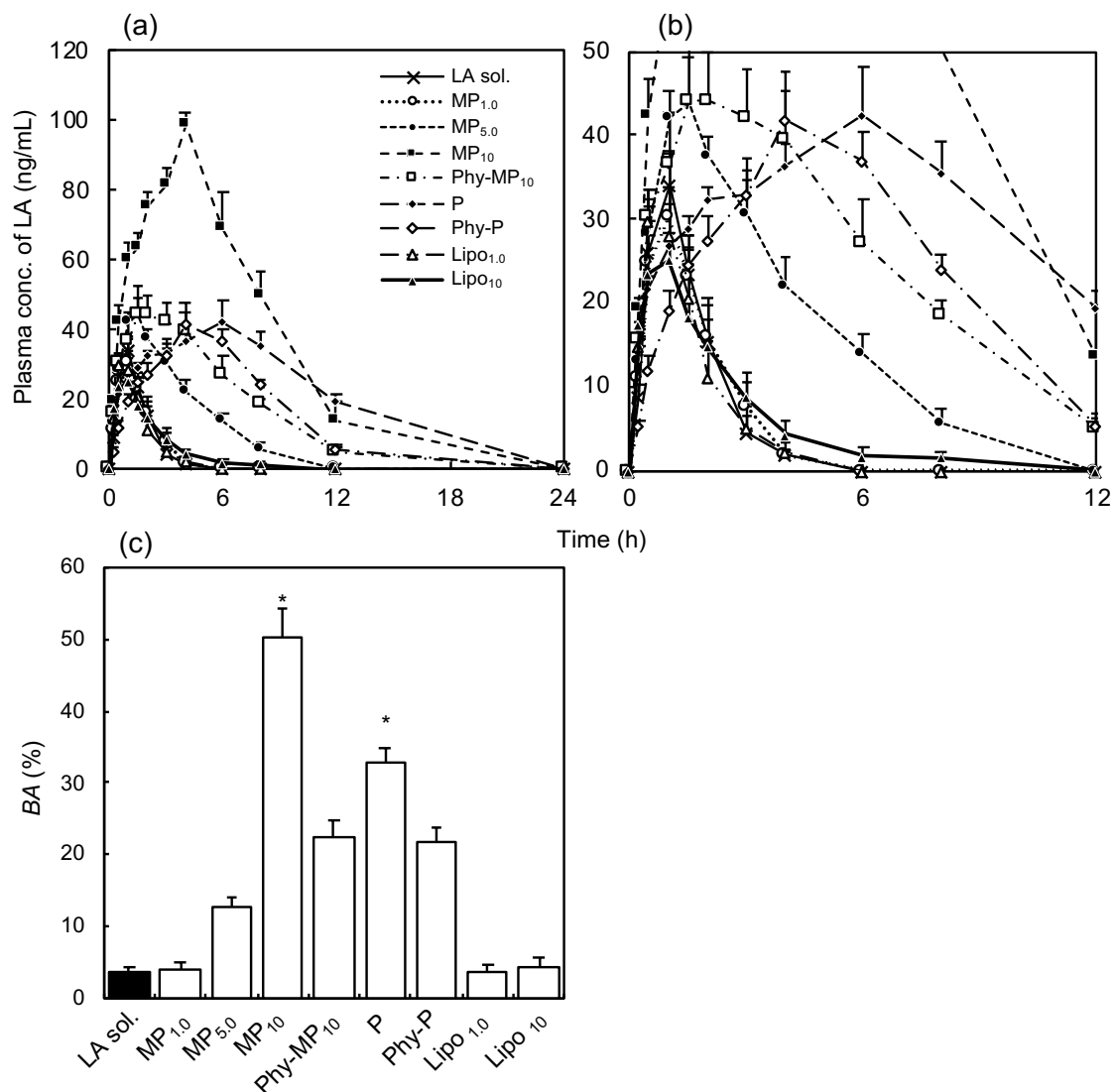


Fig. 36 Plasma LA concentration time profile over 24 hours after s. c. injection (2.0 mg/kg, a). Symbols: LA sol. (X), MP_{1.0} (○), MP_{5.0} (●), MP₁₀ (■), Phy-MP₁₀ (□), P (◆), Phy-P (◇), Lipo_{1.0} (△), Lipo₁₀ (▲). Enlarged view (b). Bioavailability of various formulations (c). Each value shows the mean ± S.E. (n = 4). *Compared with LA sol. (p < 0.01).

8. BAに及ぼす製剤投与デバイスの影響

30 G 注射針で皮下投与したとき、MJ にて皮内投与したときの血漿中 LA 濃度推移および BA を 23G 注射針の皮下投与と比較した。30 G 注射針で投与したときの結果を Figure 37 に MJ にて投与したときの結果を Figures 38 および 39 に示す。投与製剤として MP₁₀ 製剤を用いた。30 G 注射針で LA を 2.0 mg/kg 用量で皮下投与した結果、MP₁₀ 製剤を 30 G 注射針で皮下投与した際には、23 G 注射針で皮下投与した場合と比較して、C_{max} の低下および BA の低下が確認された。T_{max} に変化は認められないことから、LA 放出性の違い (Fig. 44) が C_{max} および BA の低下に関係していると考えられた。

Figure 38 に MJ にて 2.0 mg/kg (500 μL) の用量で LA を皮内投与したときの血中濃度推移と BA について調査した結果を示す。MJ による皮内投与は投与部位 1 箇所あたり 100 μL が限度であることから、MJ 投与では投与部位を 5 箇所に分けて投与した。また、対象として MJ で LA 溶液を投与したときの血中濃度推移および BA についても検討した。

LA 水溶液を MJ で皮内投与したときの血中濃度は、23 G 注射針で皮下投与したときの血中濃度推移と比較して C_{max} は増大し、T_{max} は短くなり、AUC は同程度であった。一方、MP₁₀ 製剤を MJ にて皮内投与すると、LA 水溶液を MJ にて投与した時と比較して、C_{max} の増加および T_{max} の延長が確認できた。この結果は、23 G 注射針で LA 製剤および MP₁₀ 製剤を皮下投与したときの結果と一致した。MP 製剤を 23 G 注射針で皮下投与したときと、MJ で皮内投与したときの LA 血中濃度推移を比較すると、C_{max} の低下および T_{max} の短縮、AUC の著しい低下が認められた。AUC の低下は 30 G 注射針で投与したときにも確認できたものの、LA 放出性に及ぼす影響は、30 G 注射針と MJ で大きな差がなかった。よって MJ で皮内投与したときの AUC の低下は、放出率の違いだけでは説明することができないと考えられた。MJ での投与は、投与容量の制限から 5 箇所に分けて投与した。分割投与が AUC に影響している可能性も考えられたことから、1 箇所投与 (0.4 mg/kg, 100 μL) したときの LA 血中濃度推移および AUC についても調査した (Fig. 39)。1 箇所投与でも 5 箇所投与時と同様に MP₁₀ 製剤を MJ で投与することにより AUC が著しく低下した。負に帯電した粒子を皮下投与すると、一部がリンパ管へ移行すること [127, 128]、また、粒子サイズ 100 nm 程度まではリンパ管へ移行できること [128]、さらに、薬物のリンパ管移行性は皮内投与のほうが皮下投与よりも速いこと [129] が知られていることから、MP₁₀ 製剤を皮内投与したときの著しい AUC の低下は製剤のリンパ管への移行の違いが影響していると考えられた。

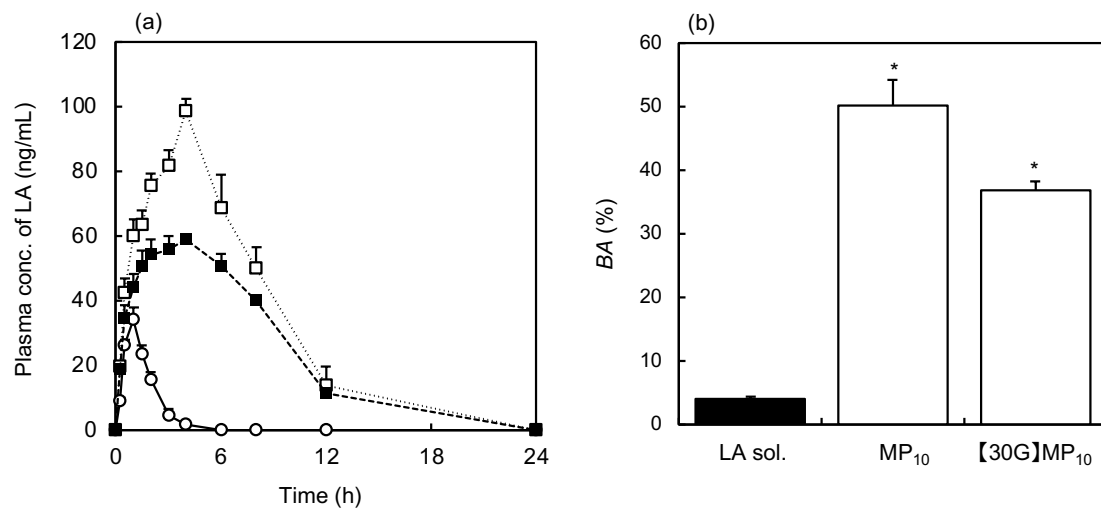


Fig. 37 Plasma LA concentration-time profiles over 24 hours after s.c. injection (2.0 mg/kg, a). Symbols: LA sol. (○), MP₁₀ (□), [30 G] MP₁₀ (■). Bioavailability of various formulations (b). Each value shows the mean ± S.E. (n = 4). *Compared with LA sol. (p < 0.01).

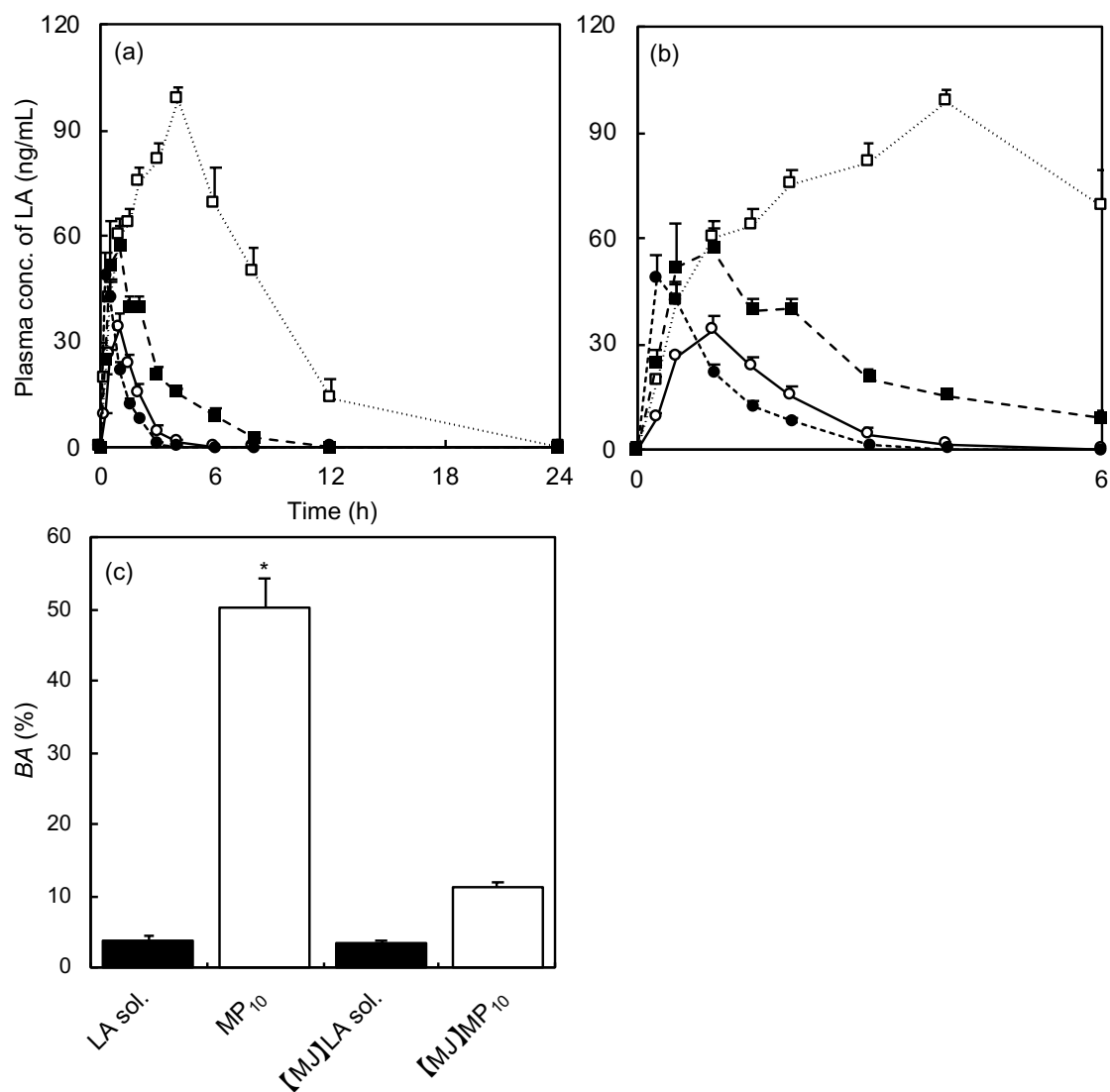


Fig. 38 Plasma LA concentration-time profiles over 24 hours after *s.c.* or *i.d.* injection (2.0 mg/kg, a). Symbols: LA sol. (○), MP₁₀ (□), [MJ] LA sol. (●), [MJ] MP₁₀ (■). Enlarged view (b). Bioavailability of various formulations (c). Each value shows the mean ± S.E. (n = 4). *Compared with LA sol. ($p < 0.01$).

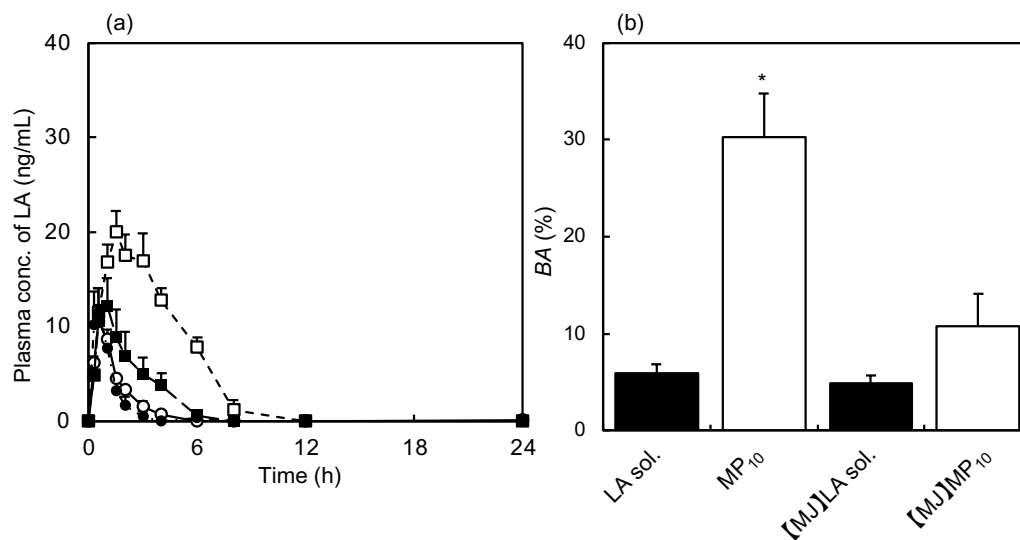


Fig. 39 Plasma LA concentration-time profiles over 24 hours after *s.c.* or *i.d.* injection (0.4 mg/kg, a). Symbols: LA sol. (○), MP₁₀ (□), [MJ] LA sol. (●), [MJ] MP₁₀ (■). Bioavailability of various formulations (b). Each value shows the mean ± S.E. (n = 4). *Compared with LA sol. ($p < 0.01$).

第3節 小括

本章では、低侵襲的な投与方法である MN での投与が可能な低粘度の MGE 含有製剤を調製し、皮膚内安定性が乏しい中分子ペプチド薬物 LA の皮内安定性向上および BA 改善効果を調査した。MGE を含有した MP 製剤の SAXS、Cryo-TEM および NMR の測定結果より、製剤は、MGE の自己組織化による H2 等の NLLC 構造を形成せず、FCC 構造を有したミセルを形成していた。LA は、MGE だけでなく Pluronic® F-127 やリン脂質と相互作用することで LA 吸収性が改善したと考えられ、また、LA 水溶液と比較し MP₁₀ 製剤で著しい BA 改善効果が見られたことから、間接的ではあるものの、製剤化による LA の皮内安定性改善が示唆された。一方で、調製した製剤投与後の LA 体内動態は、投与デバイスによる影響を受け、特に MN 投与デバイスである MJ で MP₁₀ 製剤を皮内投与した際には、BA が皮下投与と比較して低下した。高分子を皮内投与すると、その皮下投与と比較してリンパ管への移行性が高いことが知られている[129]。そのため MJ を用い MP₁₀ 製剤を皮内投与時の BA の低下は、製剤のリンパ管への移行が関与している可能性が示唆された。薬物を皮内投与した際の体内動態に関する研究は、皮下注射等や他の経粘膜経路と比較して十分な検討がなされていない。今後、iDDS 製剤について検討するためには、製剤設計について検討するだけでなく、全身循環移行性およびリンパ管移行性に及ぼす要因(粒子径、表面電位、投与容量、pH、粘性等)を明らかにする必要があると考えられた。

総括

2020 年からの新型コロナウイルス(COVID-19)の感染拡大に伴う、通院回数の低減、入院日数の減少に対する要求に加え、財政的な成約に関係した医療費削減への期待の観点より、自宅において自己投与可能な製剤に注目が集まっている。加えて、MEMS や IoT 技術の進展により、その技術への適応性を有する MN やマイクロポンプデバイスなど小型電子機器を更にした薬物投与システムの研究・開発が盛んに行われている。このことより、現在通院を伴う注射投与が、将来的にオンデマンド環境下で、革新的な薬物投与管理システムとなる可能性が考えられる。著者は、DDS に MEMS や IoT 技術を組み合わせて自己投与でき、かつ薬物放出性や吸収性を外部制御により可能とする iDDS の開発を着想した。すでに、装着型デバイスによる生体モニタリングシステムの有用性に関する研究がある一方、著者が着想した薬物送達を可能とする iDDS に関する報告はほとんどない。そこで本論文では、iDDS に応用可能な持続性注射剤の調製と、それを MN などに適用可能な製剤へと進化させることを試みた。その際、中分子薬を含め様々な物性を有する薬物の持続送達を可能とするために、新規製剤素材が重要と考え、NLLC に着目して利用することとした。NLLC は、疎水基を外側に配する構造から高い生体接着性を有しており、非破壊的に含有薬物を放出し、難溶性化合物の可溶化、タンパク質高次構造の安定化に寄与することが明らかになっている。本研究では、水と接触することで NLLC を形成する NLLC 形成脂質として株式会社ファルネックスが開発した MGE を選択し、第 1 部では、NLLC 形成脂質である MGE を利用した持続性注射剤の処方設計について、第 2 部では、MN に適用可能な微粒子製剤として用いた場合の処方設計とその有用性について評価した。

第 1 部 NLLC 形成脂質を用いた持続性注射剤の調製

第 1 章 水溶性中分子薬物を内封した持続性注射剤の調製および評価

第 1 章では、モデル薬物として水溶性中分子蛍光薬物として FD-4 を選択した。NLLC 形成脂質である MGE に側鎖長が 14~18 程度の種々飽和・不飽和リン脂質を添加し、リン脂質の種類や量が異なる 16 種類の製剤を調製した。SAXS 装置により調製製剤の測定を行い、NLLC 構造を判断したところ、MGE 単体では $H2$ 構造を示し、リン脂質の添加とともに $Pn3m$ 構造または $H2$ と $Pn3m$ 構造の両方の構造を形成していることがわかった。調製製剤に FD-4 添加して SAXS による構造解析をしたところ、NLLC 構造は変化しなかったことから、FD-4 は NLLC 構造の水チャンネルに存在していると考えられた。また、調製製剤からの FD-4 放出性には、NLLC 構造の d 、MGE 含有量、リン脂質含有量、リン脂質の炭素鎖数およびリン脂質の二重結合の有無の 5 つのパラメーターが影響することがわかった。調製製剤をラット背部皮下に投与したところ、コントロールである FD-4 で水溶液は投与後 24 時間で定量下限値を下回ったのに対し、調製製剤では 48 時間まで血中薬物の定量が可能であった。以上の結果より、MGE にリン脂質を添加して NLLC とすることにより、中・高分子薬物の放出制御が可能であり、新規持続性注射剤の開発に関する有益の知見が得られた。これらについては下記の論文にて報告した。

A. Okada, H. Todo, I. Hijikuro, S. Itakura, K. Sugibayashi, Controlled release of a model hydrophilic high molecular weight compound from injectable non-lamellar liquid crystal formulations containing different types of phospholipids, *Int. J. Pharm.*, **577**, 118944 (2020).

第 2 章 実使用を考慮した LA 内封持続性注射剤の調製および評価

前章で調製剤からのモデル薬物の徐放性が確認できたことから、MGE を用いた NLLC の有用性を明らかにするためにモデル薬物として皮下 (pH7.40) にて正電荷を有している LA を選択し、MGE を基剤とした持続性注射を調製し、製剤からの LA 放出性評価、製剤を皮下投与後の LA の血中濃度推移を 21 日間にわたり評価した。前章において、リン脂質の種類や添加量により形成する NLLC 構造が変化することが分かり、特に、側鎖長が 18 程度の不飽和基を有するリン脂質で徐放性が確認できたことから、本章では、親水基が異なる不飽和基を有する側鎖長 18 のリン脂質を選択し、10 種類の製剤の調製を行った。SAXS 測定により調製剤の NLLC 構造解析を行ったところ、LA の添加の有無で NLLC 構造変化が確認できた。このことから第 1 章で用いた FD-4 と異なり、LA は MGE およびリン脂質と相互作用することで、MGE およびリン脂質により構築された NLLC 構造に影響を及ぼしていることが示唆された。また、製剤からの LA 放出性は負電荷リン脂質である DOPG を添加した製剤で徐放性が確認でき、徐放性が確認できた製剤について *in vivo* 試験を行ったところ、LA 水溶液と比較して有意な BA 改善効果を確認した。以上の結果より、pH7.40 環境下で LA と DOPG が静電的相互作用したことで LA の放出制御が可能であることを明らかにした。この知見は、含有薬物の物性に合わせた持続性注射剤の設計において有益なものである。これらについては下記の論文にて報告した。

A. Okada, H. Todo, S. Itakura, I. Hijikuro, K. Sugibayashi, A Lipid-Based Depot Formulation with a Novel Non-lamellar Liquid Crystal Forming Lipid, *Pharm. Res.*, **38**, 503-513 (2021).

第 1 部の結果より、NLLC 形成脂質である MGE は持続性注射剤基剤として有用であり、それにリン脂質などを添加していくことで、含有させる薬物の物性に合わせた放出制御が可能な注射剤を設計できると考えられた。

第3部 NLLC 形成脂質を用いた微粒子製剤の検討

前章では、MGE の持続性注射剤基剤としての有用性を明らかにしたものの、MGE を含む系は体液と接触すると瞬時に粘性が増加するため、自己投与可能な投与方法である MN やマイクロポンプデバイスを用いた持続的投与が困難であり、それが可能なように、粘性が低く、かつ BA 改善効果等を有する MGE 含有微粒子製剤の調製が必要と考えた。本章では、MGE と高分子界面活性剤である Pluronic® F-127 からなる微粒子製剤を調製し、第 1 部第 2 章において示した静電的相互作用による放出制御を利用し、LA を持続的に放出する皮下投与製剤の調製を試みた。すなわち、各組成を有する MGE と Pluronic® F-127 およびリン脂質からなる製剤を調製し、それらの特性を比較した。Cryo-TEM 観察の結果より、MP₁₀ 製剤はミセル形成し、SAXS 測定によりミセル同士が面心立方格子構造 (face-centered cubic, FCC) に配位していることがわかった。また、NMR の結果より、LA は構成脂質と相互作用していることも明らかになった。調製製剤をラット腹部に皮下投与したところ、LA 水溶液と比較して BA が、MGE を添加していない P 製剤では 8 倍、MP₁₀ 製剤は 13 倍改善した。これらの結果は今後の自己注射可能な注射剤の開発に貢献できる知見と考えられる。

以上の結果より MGE を主成分として、それにリン脂質を添加した NLLC 構造を有する皮下投与製剤は BA の改善および長期間にわたる薬物放出制御が可能であったことから、PLGA 等のポリマーを基剤とした持続性注射剤や懸濁製剤に代わる新規製剤として利用できる可能性が示唆された。また、ペプチド医薬の皮下投与後の吸収性だけでなく、皮内安定性の改善が期待できることから、著者が着想した薬物送達を可能とする iDDS への利用が可能であると考えられ、NLLC は、皮下投与製剤として有用であると考えられた。本研究の結果は、新しい時代の要求に応える新規 iDDS を開発するために有用な情報を提供したと考える。

利益相反

NLLC 形成脂質である MGE は株式会社ファルネックスより供与された。

謝辞

本研究に際し、終始懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 特任教授・城西国際大学 学長 杉林 堅次 先生、城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座 准教授 藤堂 浩明 先生、に深甚なる謝意を表します。

本研究遂行にあたりご指導頂きました城西大学薬学部有機薬化学研究室 教授 山ノ井 孝先生、城西大学薬学部機能性食品科学講座 教授 古旗 賢二 先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本論文校閲において適切なご助言を頂きました城西大学薬学部生物薬品科学講座 教授 田中 享 先生、城西大学薬学部薬剤学研究室 教授 関 俊暢 先生、城西大学薬学部栄養生理学講座 准教授 片倉 賢紀 先生に深謝いたします。

本研究の実施にあたり、御助言ならびに御激励を賜りました、城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座 助教 板倉 祥子 先生、城西大学薬学部 招聘教授 高山 幸三 先生に心より感謝の意を表します。さらに、本研究の遂行にあたり株式会社ファルネックスより NLLC 形成脂質の提供を承りました。第 1 部の頸静脈カニューレーションラット作成方法について城西大学薬学部生化学研究室 教授 畑中 朋美 先生、第 1 部の持続性注射剤の小角 X 線測定では、金沢大学理工研究域物質化学系物理化学研究室 准教授 太田 明雄 先生、第 2 部の微粒子製剤の小角 X 線測定では、株式会社アントンパール・ジャパン 高崎 祐一 様、製剤の Cryo-TEM 観察では、奈良先端科学技術大学院大学 藤田 咲子 先生、第 2 部の微粒子製剤の NMR 測定および解析では、城西大学薬学部栄養治療学研究室 教授 井上 裕 先生および城西大学機器分析センター 富田 惇輝 先生に有益なご助言とご教示を賜りました。

本研究に使用した Cryo-TEM 観察は文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム(奈良先端科学技術大学院大学)[課題番号: 04]の支援を受けて実施されました。

本研究の遂行ならびに論文執筆にあたり、Konstanty Wierzba 先生、Pajaree Sakdiset 博士、Gerard Lee See 博士の存在が大きな励みになったことをここに記すとともに深く感謝いたします。

有益な御意見ならびに本研究に御協力頂いた城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座諸氏に深く感謝致します。本研究のために犠牲になった動物に感謝の意を込め、追悼の意を表します。この論文は多くの方々に支えられたおかげで出来上がったものであると感じており、研究を進めるに当たり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記す事ができなかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に、温かい励ましをいつも送り続け支えてくれた家族に心から感謝します。

皆様ありがとうございました。

参考文献

- [1] I. T. Degim, N. Celebi, Controlled delivery of peptides and proteins, *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 99-117 (2006).
- [2] A. Patel, K. Cholkar, A. K. Mitra, Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches, *Ther. Deliv.*, **5**, 337-365 (2014).
- [3] A. C. L. Lee, J. L. Harris, K. K. Khanna, J. H. Hong, A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design, *Int. J. Molecular Sci.*, **20**, 1-21 (2019).
- [4] A. C. Anselmo, Y. Gokarn, S. Mitragotri, Non-invasive delivery strategies for biologics, *Nature Reviews Drug Discovery*, **18**, 19-40 (2018).
- [5] K. Park, Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *J. Control. Release*, **190**, 3-8 (2014).
- [6] A. Santos, M. S. Aw, M. Bariana, T. Kumeria, Y. Wang, D. Losic, Drug-releasing implants: Current progress, challenges and perspectives, *J. Materials Chem. B*, **2**, 6157-6182 (2014).
- [7] H. Lee, C. Song, S. Baik, D. Kim, T. Hyeon, D. H. Kim, Device-assisted transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **127**, 35-45 (2018).
- [8] M. S. Brown, B. Ashley, A. Koh, Wearable technology for chronic wound monitoring: current dressings, advancements, and future prospects, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **6**, 1-21 (2018).
- [9] J. F. Jin, L. L. Zhu, M. Chen, H. M. Xu, H. F. Wang, X. Q. Feng, X. P. Zhu, Q. Zhou, The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection, *Patient Prefer. Adherence*, **9**, 923-942 (2015).
- [10] D. Guo, New Developments in Long-Acting Injectable Nanoformulations, *Glob. J. Pharmaceu. Sci.*, **4**, 1-7 (2017).
- [11] M. S. Angst, D. R. Drover, Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology, *Clin. Pharmacokinet.*, **45**, 1153-1176 (2006).
- [12] L. Rahnfeld, P. Luciani, Injectable lipid-based depot formulations: Where do we stand? *Pharmaceutics*, **12**, 1-28 (2020).

- [13] N. V. Katre, Liposome-based depot injection technologies: How versatile are they? *Am. J. Drug Deliv.*, **2**, 213-227 (2004).
- [14] G. Hema, S. M. A. Arunagirinathan, J. R. Bellare, Self-assembled surfactant nanostructures important in drug delivery: A review, *Indian J. Exp. Biol.*, **45**, 133-159 (2007).
- [15] L. Mei, Y. Xie, Y. Huang, B. Wang, J. Chen, G. Quan, X. Pan, H. Liu, L. Wang, X. Liu, C. Wu, Injectable in situ forming gel based on lyotropic liquid crystal for persistent postoperative analgesia, *Acta Biomater.*, **67**, 99-110 (2018).
- [16] C. Guo, J. Wang, F. Cao, R. J. Lee, G. Zhai, Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery, *Drug Disc. T.*, **15**, 1032-1040 (2010).
- [17] D. H. Kim, A. Jahn, S. J. Cho, J. S. Kim, M. H. Ki, D. D. Kim, Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review, *J. Pharm. Inv.*, **45**, 1-11 (2015).
- [18] P. Rajak, L. K. Nath, B. Bhuyan, Liquid crystals: An approach in drug delivery, *Indian J. Pharm. Sci.*, **81**, 11-23 (2019).
- [19] A. Otte, B. K. Soh, G. Yoon, K. Park, Liquid crystalline drug delivery vehicles for oral and IV/subcutaneous administration of poorly soluble (and soluble) drugs, *Int. J. Pharm.*, **539**, 175-183 (2018).
- [20] C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. I. Salto, S. Engelskirchen, S. Ahualli, Monoolein: a magic lipid? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 3004-3021 (2011).
- [21] Y. M. Báez-santos, A. Otte, E. A. Mun, B. Soh, C. Song, Y. Lee, K. Park, Formulation and characterization of a liquid crystalline hexagonal mesophase region of phosphatidylcholine, sorbitan monooleate, and tocopherol acetate for sustained delivery of leuprolide acetate, *Int. J. Pharm.*, **514**, 314-321 (2016).
- [22] A. Zabara, R. Mezzenga, Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases, *J. Control. Release*, **188**, 31-43 (2014).
- [23] J. L. Lim, M. H. Ki, M. K. Joo, S. W. An, K. M. Hwang, E. S. Park, An injectable liquid crystal system for sustained delivery of entecavir, *Int. J. Pharm.*, **490**, 265-272 (2015).
- [24] C. Fong, T. Le, C. J. Drummond, Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by design, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 1297-1322 (2012).
- [25] M. Ki, J. Lim, J. Ko, S. Park, J. Kim, H. Cho, E. Park, D. Kim, A new injectable, liquid crystal system for one month delivery of leuprolide, *J. Control. Release*, **185**, 62-70

(2014).

- [26] K. Hirata, R. Suzuki, Y. Oda, N. Utoguchi, K. Maruyama, Drug delivery system utilized bubble liposome, *Drug delivery system*, **25**, 466-473 (2010).
- [27] W. K. Fong, T. L. Hanley, B. Thierry, N. Kirby, L. J. Waddington, B. J. Boyd, Controlling the nanostructure of gold nanorod-lyotropic liquid-crystalline hybrid materials using near-infrared laser irradiation, *Langmuir*, **28**, 144450-14460 (2012).
- [28] S. Bansal, A. Mittal, Extracting curvature preferences of lipids assembled in flat bilayers shows possible kinetic windows for genesis of bilayer asymmetry and domain formation in biological membranes, *J. Membrane Biol.*, **246**, 557-570 (2013).
- [29] R. Rajabalaya, M. N. Musa, N. Kifli, S. R. David, Oral and transdermal drug delivery systems: Role of lipid-based lyotropic liquid crystals, *Drug Des. Devel. Ther.*, **11**, 393-406 (2017).
- [30] Y. Chen, P. Ma, S. Gui, Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 1-12 (2014).
- [31] H. Evenbratt, A. Ström, Phase behavior, rheology, and release from liquid crystalline phases containing combinations of glycerol monooleate, glyceryl monooleyl ether, propylene glycol, and water, *RSC Adv.*, **7**, 32966-32973 (2017).
- [32] L. Boge, H. Bysell, L. Ringstad, D. Wennman, A. Umerska, V. Casisa, J. Eriksson, M. J. Guillou, K. Edwards, M. Andersson, Lipid-based liquid crystals as carriers for antimicrobial peptides: Phase behavior and antimicrobial effect, *Langmuir*, **32**, 4217-4228 (2016).
- [33] Z. Wu, R. G. Alany, N. Tawfeek, J. Falconer, W. Zhang, I. M. Hassan, M., Rutland, D. Svirskis, A study of microemulsions as prolonged-release injectables through in-situ phase transition, *J. Control. Release*, **174**, 188-194 (2014).
- [34] A. Butreddy, A. Narala, N. Dudhipala, Formulation and characterization of liquid crystalline hydrogel of agomelatin: In vitro and ex vivo evaluation, *J. App. Pharm. Sci.*, **5**, 110-114 (2015).
- [35] L. V. Hag, S. L. Gras, C. E. Conn, C. J. Drummond, Lyotropic liquid crystal engineering moving beyond binary compositional space-ordered nanostructured amphiphile self-assembly materials by design, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 2705-2731 (2017).
- [36] T. Cheng, Y. Zhao, X., Li, F. Lin, Y. Xu, X. Zhang, Y. li, R. Wang, L. Lai, Computation of

- octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge, *J. Chem. Inf. Model.*, **47**, 2140-2148 (2007).
- [37] G. Wörle, B. Siekmann, M. H. J. Koch, H. Bunjes, Transformation of vesicular into cubic nanoparticles by autoclaving of aqueous monoolein/poloxamer dispersions, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **27**, 44-53 (2006).
- [38] M. Nakano, T. Teshigawara, A. Sugita, W. Leesajakul, A. Taniguchi, T. Kamo, h. Matsuoka, T. Handa, Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/pluronic F127 system, *Langmuir*, **18**, 9283-9288 (2002).
- [39] J. Clogston, M. Caffrey, Controlling release from the lipidic cubic phase. Amino acids, peptides, proteins and nucleic acids, *J. Control. Release*, **107**, 97-111 (2005).
- [40] J. Clogston, G. Craciun, D. J. Hart, M. Caffrey, Controlling release from the lipidic cubic phase by selective alkylation, *J. Control. Release*, **102**, 441-461 (2005).
- [41] S. Phan, W. K. Fong, N. Kirby, T. Hanley, B. J. Boyd, Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release, *Int. J. Pharm.*, **421**, 176-182 (2011).
- [42] Y. M. Báez-Santos, A. Otte, K. Park, A fast and sensitive method for the detection of leuprolide acetate: A high-throughput approach for the in vitro evaluation of liquid Crystal Formulations, *Anal. Chem.*, **88**, 4613-4618 (2016).
- [43] E. Yamamoto, On vitro release method for liposome drug products, *Yakugaku zasshi*, **139**, 249-254 (2019).
- [44] D. Long, T. Gong, Z. Zhang, R. Ding, Y. Fu, Preparation and evaluation of a phospholipid-based injectable gel for the long-term delivery of leuprolide acetate, *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, 329-335 (2016).
- [45] E. K. Kmiotek, C. Baimel, K. J. Gill, Methods for Intravenous Self Administration in a Mouse Model, *J. Vis. Exp.*, **70**, 1-5 (2012).
- [46] C. Chang, R. Bodmeier, Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase, *Int. J. Pharm.*, **173**, 51-60 (1998).
- [47] T. Nguyen, T. Hanley, C. J. H. Porter, B. J. Boyd, Nanostructured liquid crystalline particles provide long duration sustained-release effect for a poorly water-soluble drug after oral administration, *J. Control. Release*, **153**, 180-186 (2011).
- [48] I. Martiel, L. Sagalowicz, R. Mezzenga, Phospholipid-based nonlamellar meso-phases for delivery systems: Bridging the gap between empirical and rational design, *Adv.*

Colloid Interface Sci., **209**, 127-143 (2014).

- [49] Y. Guo, S. Pogodin, V. A. Baulin, General model of phospholipid bilayers in fluid phase within the single chain mean field theory, *J. Chem. Phys.*, **140**, 1-9 (2014).
- [50] J. Zhai, N. Tran, S. Sarkar, C. Fong, X. Mulet, C. J. Drummond, Self-assembled lyotropic liquid crystalline phase behavior of monoolein-capric acid-phospholipid nanoparticulate systems, *Langmuir*, **33**, 2571-2580 (2017).
- [51] A. W. Dong, C. Fong, L. J. Waddington, A. J. Hill, B. J. Boyd, C. J. Drummond, Packing and mobility of hydrocarbon chains in phospholipid lyotropic liquid crystalline lamellar phases and liposomes: Characterisation by positron annihilation lifetime spectroscopy (PALS), *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 276-286 (2015).
- [52] X. Liang, Y. Chen, X. Jiang, S. Wang, J. Zhang, S. Gui, H II mesophase as a drug, delivery system for topical application of methyl salicylate, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **100**, 155-162 (2017).
- [53] D. Kim, A. Jahn, S. Cho, J. Kim, M. Ki, D. Kim, Lyotropic liquid crystal systems, in drug delivery: a review, *J. Pharm. Invest.*, **45**, 1-11 (2014).
- [54] Z. Yang, Evaluating the potential of cubosomal nanoparticles for oral delivery of amphotericin B in treating fungal infection, *Int. J. Nanomed.*, **9**, 327-336 (2014).
- [55] T. M. Dellinger, P. V. Braun, Lyotropic liquid crystals as nanoreactors for nano- particle synthesis, *Chem. Mater.*, **160**, 2201-2207 (2004).
- [56] Y. Huang, S. Gui, Factors affecting the structure of lyotropic liquid crystals and the correlation between structure and drug diffusion, *RSC Adv.*, **8**, 6978-6987 (2018).
- [57] R. Negrini, R. Mezzenga, pH-responsive lyotropic liquid crystals for controlled drug delivery, *Langmuir*, **27**, 5296-5303 (2011).
- [58] N. Muramatsu, H. Akiyama, Japan: super-aging society preparing for the future, *Gerontologist*, **51**, 425-432 (2011).
- [59] W. Y. Lee, M. Asadujjaman, J. P. Jee, Long acting injectable formulations: the state of the arts and challenges of poly (lactic-co-glycolic acid) microsphere, hydrogel, organogel and liquid crystal, *J. Pharm. Inv.*, **49**, 459-476 (2019).
- [60] Q. Li, N. Garti, D. Libster, A. Aserin, Nanoscience with liquid crystals, *Springer* (2014).
- [61] M. J. Rathbone, J. Hadgraft, M. S. Roberts, M. E. Lane, Modified-release drug delivery technology, *CRC Press*, Boca Raton, FL, USA. (2002).

- [62] D. S. Lee, S. J. Kim, G. W. Choi, Y. B. Lee, H. Y. Cho, Pharmacokinetic–pharmacodynamic model for the testosterone-suppressive effect of leuprolide in normal and prostate cancer rats, *Molecules*, **23**, 1-15 (2018).
- [63] H. Okada, One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 43-70 (1997).
- [64] J. A. D. Sequeira, A. C. Santos, J. Serra, F. Veiga, A. J. Ribeiro, Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants. nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs, *Elsevier*, p. 375-402 (2018).
- [65] G. L. See, F. Arce, S. Dahlizar, A. Okada, M. F. B. M. Fadli, I. Hijikuro, S. Itakura, M. Katakura, H. Todo, K. Sugibayashi, Enhanced nose-to-brain delivery of tranilast using liquid crystal formulations, *J. Control. Release*, **325**, 1-9 (2020).
- [66] A. Adjei, S. Love, E. Johnson, G. Diaz, J. Greer, F. Haviv, E. Bush, Effect of formulation adjuvants on gastrointestinal absorption of leuprolide acetate, *J. Drug. Target*, **1**, 251-258 (1993).
- [67] Y. Ito, H. Murano, N. Hamasaki, K. Fukushima, K. Takada, Incidence of low bioavailability of leuprolide acetate after percutaneous administration to rats by dissolving microneedles, *Int. J. Pharm.*, **407**, 126-131 (2011).
- [68] C. Rodrigues, C. Alves, A. J. Santosneto, C. Fernandes, F. M. Lan, Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **42**, 1342-1347 (2007).
- [69] Y. Zhan, X. Chen, X. Zhao, D. Zhong, Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of leuprolide in human serum, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877**, 3194-3200 (2009).
- [70] T. Katsila, E. Balafas, G. Liapakis, P. Limonta, M. M. Marelli, K. Gkountelias, T. Tselios, N. Kostomitsopoulos, J. Matsoukas, C. Tamvakopoulos, Evaluation of a stable gonadotropin-releasing hormone analog in mice for the treatment of endocrine disorders and prostate cancer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **336**, 613-623 (2011).
- [71] C. Rodrigues, C. Alves, A. J. Santosneto, C. Fernandes, F. M. Lan, Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **42**, 1342-1347 (2007).
- [72] A. Yagmur, L. de Campo, L. Sagalowicz, M. E. Leser, O. Glatter, Control of the internal

structure of MLO-based isosomes by the addition of diglycerol Monooleate and soybean phosphatidylcholine, *Langmuir*, **22**, 9919-9927 (2006).

- [73] R. Negrini, A. S. Ferrer, R. Mezzenga, Influence of electrostatic interactions on the release of charged molecules from lipid cubic phases, *Langmuir*, **30**, 4280-4288 (2014).
- [74] M. L. Lynch, A. O. Boateng, A. Hippe, K. Kochvar, P. T. Spicer, Enhanced loading of water-soluble actives into bicontinuous cubic phase liquid crystals using cationic surfactants, *J. Colloid. Interface Sci.*, **260**, 404-413 (2003).
- [75] H. Todo, Transdermal permeation of drugs in various animal species, *Pharmaceutics*, **9**, 1-11 (2017).
- [76] J. Clogston, G. Craciun, D. J. Hart, M. Caffrey, Controlling release from the lipidic cubic phase by selective alkylation, *J. Control. Release*, **102**, 441-461 (2005).
- [77] S. Z. Mohammady, M. Pouzot, R. Mezzenga, Oleoylethanolamide- based lyotropic liquid crystals as vehicles for delivery of amino acids in aqueous environment, *Biophys. J.*, **96**, 1537-1546 (2009).
- [78] A. Okada, H. Todo, I. Hijikuro, S. Itakura, K. Sugibayashi, Controlled release of a model hydrophilic high molecular weight compound from injectable non-lamellar liquid crystal formulations containing different types of phospholipids, *Int. J. Pharm.*, **577**, 118944 (2020).
- [79] W. K. Fong, T. Hanley, B. J. Boyd, Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery in vitro and in vivo, *J. Control. Release*, **135**, 218-226 (2009).
- [80] T. C. Roberts, R. Langer, M. J. A. Wood, Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **19**, 673-694 (2020).
- [81] D. J. Brayden, T. A. Hill, D. P. Fairlie, S. Maher, R. J. Mersny, Systemic delivery of peptides by the oral route: Formulation and medicinal chemistry approaches, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **157**, 2-36 (2020).
- [82] M. Danhof, K. Klein, P. Stolk, M. Aitken, H. Leufkens, The future of drug development: the paradigm shift towards systems therapeutics, *Drug Discov. Today*, **23**, 1990-1995 (2018).
- [83] D. S. Dimitrov, Challenges and opportunities for the subcutaneous delivery of therapeutic proteins, *J. Pharm. Sci.*, **899**, 1-26 (2012).
- [84] M. F. Powell, H. Grey, F. Gaeta, A. Sette, S. Colón, Peptide stability in drug

development: A comparison of peptide reactivity in different biological media, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 731-735 (1992).

- [85] D. S. Collins, M. Sánchez-Félix, A. V. Badkar, R. Mrsny, Accelerating the development of novel technologies and tools for the subcutaneous delivery of biotherapeutics, *J. Control. Release*, **321**, 475-482 (2020).
- [86] B. Bittner, W. Richter, J. Schmidt, Subcutaneous administration of biotherapeutics: An overview of current challenges and opportunities, *BioDrugs*, **32**, 425-440 (2018).
- [87] W. F. Richter, S. G. Bhansali, M. E. Morris, Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration, *AAPS J.*, **14**, 559-570 (2012).
- [88] J. A. D. Sequeira, A. C. Santos, J. Serra, C. Estevens, R. Seiça, F. Veiga, A. J. Ribeiro, Subcutaneous delivery of biotherapeutics: challenges at the injection site, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **16**, 143-151 (2019).
- [89] M. D. Rombouts, E. L. Swart, A. J. M. V. D. Eertwegh, M. Crul, Systematic review on infusion reactions to and infusion rate of monoclonal antibodies used in cancer treatment, *Anticancer Res.*, **40**, 1201-1218 (2020).
- [90] M. Rahimi, H. Mobedi, A. Behnamghader, Aqueous stability of leuprolide acetate: Effect of temperature, dissolved oxygen, pH and complexation with β -cyclodextrin, *Pharm. Develop. Tech.*, **21**, 108-115 (2016).
- [91] V. Sachdeva, Y. Zhou, A. K. Banga, In vivo transdermal delivery of leuprolide using microneedles and iontophoresis, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **14**, 180-193 (2013).
- [92] P. Karande, A. Jain, S. Mitragotri, Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 192-197 (2004).
- [93] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, Liposomal formulations in clinical use: An updated review, *Pharmaceutics*, **9**, 1-33 (2017).
- [94] A. M. Bodratti, P. Alexandridis, Formulation of poloxamers for drug delivery, *J. Func. Biomater.*, **9**, 1-24 (2018).
- [95] Z. Li, Y. Huang, S. Peng, X. Chen, L. Zou, W. Liu, C. Liu, Liposomes consisting of pluronic F127 and phospholipid: Effect of matrix on morphology, stability and curcumin delivery, *J. Dispers. Sci. Technol.*, **41**, 207-213 (2020).
- [96] J. M. R. Albano, D. Grillo, J. C. Facelli, M. B. Ferraro, M. Pickholz, Study of the lamellar and micellar phases of pluronic F127: A molecular dynamics approach, *Processes*, **7**,

1-11 (2019).

- [97] D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra, Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches, *Adv. Condens. Matter Phys.*, **2015**, 1-22 (2015).
- [98] B. Shriky, A. Kelly, M. Isreb, M. Babenko, N. Mahmoudi, S. Rogers, O. Shebanova, T. Snow, T. Gough, Pluronic F127 thermosensitive injectable smart hydrogels for controlled drug delivery system development, *J. Colloid Interface Sci.*, **565**, 119-130 (2020).
- [99] M. Managa, J. Britton, E. Prinsloo, T. Nyokong, Effects of Pluronic F127 micelles as delivering agents on the vitro dark toxicity and photodynamic therapy activity of carboxy and pyrene substituted porphyrins, *Polyhedron*, **152**, 102-107 (2018).
- [100] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, Block copolymer micelles in nanomedicine applications, *Chem. Rev.*, **118**, 6844-6892 (2018).
- [101] D. Libster, A. Aserin, N. Garti, Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications, *J. Colloid Interface Sci.*, **356**, 375-386 (2011).
- [102] T. Suzuki, T. Aoki, M. Saito, I. Hijikuro, S. Itakura, H. Todo, K. Sugibayashi, Enhancement of skin permeation of a hydrophilic drug from acryl-based pressure-sensitive adhesive tape, *Pharm. Res.*, **38**, 289-299 (2021).
- [103] A. Narvekar, S. L. Gawali, P. A. Hassan, R. Jain, P. Dandekar, pH dependent aggregation and conformation changes of rituximab using SAXS and its comparison with the standard regulatory approach of biophysical characterization, *Int. J. Bio. M.*, **164**, 3084-3097 (2020).
- [104] N. Allec, M. Choi, N. Yesupriya, B. Szychowski, M. R. White, M. G. Kann, E. D. Garcin, M. C. Daniel, A. Badano, Small-angle X-ray scattering method to characterize molecular interactions: Proof of concept, *Scientific Reports*, **5**, 1-12 (2015).
- [105] Y. Shimokawa, Y. Matsuura, T. Hirano, K. Sakai, Gas viscosity measurement with diamagnetic-levitation viscometer based on electromagnetically spinning system, *Rev. Sci. Instrum.*, **87**, 1-4 (2016).
- [106] K. Sakai, T. Hirano, M. Hosoda, Electromagnetically spinning sphere viscometer, *Appl. Phys. Express*, **3**, 1-4 (2010).

- [107] M. Hosoda, T. Hirano, K. Sakai, Accurate viscosity measurement of ethanol solution for determination of ultrasonic relaxation parameters, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **51**, 8-10 (2012).
- [108] M. Yasuda, N. Kurauchi, M. Nakamura, T. Hirano, K. Sakai, Application of electromagnetically spinning sphere viscometer for variety of viscosity measurement, *Nihon Reoroji Gakkaishi*, **39**, 29-35 (2011).
- [109] E. Kochba, Y. Levin, I. Raz, A. Cahn, Improved insulin pharmacokinetics using a novel microneedle device for intradermal delivery in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Technol. Ther.*, **18**, 525-531 (2016).
- [110] L. Xie, H. Zeng, J. Sun, W. Qian, Engineering microneedles for therapy and diagnosis: A survey, *Micromachines*, **11**, 1-28 (2020).
- [111] L. C. E. da Silva, A. C. Borges, M. G. de Oliveira, M. A. de Farias, Visualization of supramolecular structure of Pluronic F127 micellar hydrogels using cryo-TEM, *MethodsX*, **7**, 1-11 (2020).
- [112] Y. Y. Huang, J. Y. Hsu, H. L. Chen, T. Hashimoto, Existence of fcc-packed spherical micelles in diblock copolymer melt, *Macromolecules*, **40**, 406-409 (2007).
- [113] Y. Zhang, Y. M. Lam, Controlled synthesis and association behavior of graft Pluronic in aqueous solutions, *J. Colloid Interf. Sci.*, **306**, 398-404 (2007).
- [114] G. Gyulai, A. Magyar, J. Rohonczy, J. Orosz, M. Yamasaki, S. Bősze, Preparation and characterization of cationic pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles, *Express Polym. Lett.*, **10**, 216-226 (2016).
- [115] Y. Ding, Y. Wang, R. Guo, Diffusion coefficients and structure properties in the pluronic F127/n-C₄H₉OH/H₂O system, *J. Dispers. Sci. Technol.*, **24**, 673-681 (2003).
- [116] J. Ojha, R. Nanda, K. Dorai, NMR investigation of the thermogelling properties, anomalous diffusion, and structural changes in a Pluronic F127 triblock copolymer in the presence of gold nanoparticles, *Colloid Polym. Sci.*, **298**, 1571-1585 (2020).
- [117] G. Orädd, A. S. Andersson, L. Rilfors, G. Lindblom, E. Strandberg, P. E. Andréén, α -Methylene ordering of acyl chains differs in glucolipids and phosphatidylglycerol from *Acholeplasma laidlawii* membranes: 2H-NMR quadrupole splittings from individual lipids in mixed bilayers, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1468**, 329-344 (2000).
- [118] Z. Zhou, B. G. Sayer, D. W. Hughes, R. E. Stark, R. M. Epand, Studies of phospholipid

- hydration by high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance, *Biophys. J.*, **76**, 387-399 (1999).
- [119] D. K. Laimou, M. Katsara, M. T. I. Matsoukas, V. Apostolopoulos, A. N. Troganis, T. T. V. Selios, Structural elucidation of Leuprolide and its analogues in solution: Insight into their bioactive conformation, *Amino Acids*, **39**, 1147-1160 (2010).
- [120] J. D. Meyer, M. C. Manning, D. G. Vander Velde, Characterization of the solution conformations of leuprolide acetate, *J. Pept. Res.*, **60**, 159-168 (2002).
- [121] T. Heise, L. Nosek, S. Dellweg, E. Zijlstra, K. A. Præstmark, J. Kildegaard, G. Nielsen, T. Sparre, Impact of injection speed and volume on perceived pain during subcutaneous injections into the abdomen and thigh: a single-centre, randomized controlled trial, *Diabetes. Obes. Metab.*, **16**, 971-976 (2014).
- [122] C. Berteau, F. Schwarzenbach, Y. Donazzolo, M. Latreille, J. Berube, H. Abry, J. Cotten, C. Feger, P. E. Laurent, Evaluation of performance, safety, subject acceptance, and compliance of a disposable autoinjector for subcutaneous injections in healthy volunteers, *Patient Prefer. Adherence*, **5**, 379-388 (2010).
- [123] J. T. Jørgensen, J. Rømsing, M. Rasmussen, J. Møller-Sonnergaard, L. Vang, L. Musaeus, Pain assessment of subcutaneous injections, *Ann. Pharmacother.*, **30**, 729-32 (1996).
- [124] J. Bradshaw, S. White, T. Holden, Combining human needs with high viscosity formulations, *Oval Medical Technologies*, **2018**, 16-21 (2018).
- [125] A. Rösler, G. W. M. Vandermeulen, H. A. Klok, Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **64**, 270-279 (2012).
- [126] M. Sorensen, B. Steenberg, G. T. Knipp, W. Wang, B. Steffansen, S. Frokjaer, R. T. Borchardt, The effect of beta-turn structure on the permeation of peptides across monolayers of bovine brain microvessel endothelial cells, *Pharm. Res.*, **14**, 1341-1348 (1997).
- [127] M. Sánchez-Félix, M. Burke, H. H. Chen, C. Patterson, S. Mittal, Predicting bioavailability of monoclonal antibodies after subcutaneous administration: Open innovation challenge, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **167**, 66-77 (2020).
- [128] W. F. Richter, S. G. Bhansali, M. E. Morris, Mechanistic determinants of biotherapeutics

absorption following SC administration, *AAPS J.*, **14**, 559-570 (2012).

- [129] A. J. Harvey, S. A. Kaestner, D. E. Sutter, N. G. Harvey, J. A. Mikszta, R. J. Pettis, Microneedle-based intradermal delivery enables rapid lymphatic uptake and distribution of protein drugs, *Pharm. Res.*, **28**, 107-116 (2011).

付録 頸静脈カニューレーション手術

第 1 部では NLLC 形成脂質の持続性注射剤基剤としての有用性を評価するために中・長期的にラットの採血を実施する方法として、ラットに頸静脈カニューレーションを施した。以下に詳細を示す。

1. 頸静脈カニューレーション手術器具および消耗品

Table S1 に手術に用いる器具を Table S2 にカニューレーション手術で用いた消耗品を示す。

Table S1 手術器具

	実験器具名		必要数	購入元
a.	先曲がり先細無鉤ピンセット	A-12-1	2	
b.	先曲がり先細無鉤ピンセット	A-12-2	2	
c.	技工ピンセット	A-20	1	
d.	先曲がり先鋭ピンセット	MA-47	2	
e.	小反剪刀 両鋭	B-13	1	株式会社夏目製作所, 東京, 日本
f.	マイクロ鉗子 直型	ME-1	2	
g.	マイクロ剪刀 直型	MB-50-7	1	
h.	探り棒	E-15	1	
i.	外科用強弯角針	C-24-505-2	1	
j.	外科用強弯角針	C-24-505-5	1	

Table S2 消耗品

	消耗品名		購入元
A.	シラスコン®医療用チューブ	100-00N, 内径-外形:0.5-1.0	株式会社カネカメディクス, 大阪, 日本
B.	ポリエチレンチューブ	SP45, 内径-外形:0.58-0.96	株式会社夏目製作所, 東京, 日本
C.	23G注射針	NN-2325R	テルモ株式会社, 東京, 日本
D.	1 mLシリンジ	SS-01T	テルモ株式会社, 東京, 日本
E.	ブレード絹製縫合糸白	C-23-B1 (No. 5-0)	株式会社夏目製作所, 東京, 日本
F.	ブレード絹製縫合糸白	C-23-B1 (No. 3-0)	株式会社夏目製作所, 東京, 日本
G.	極豆マップ画鋏	AZ-891	株式会社ソニック, 大阪, 日本

2. 23 G 注射針の加工方法

頸静脈カニューレシヨンの部品を用意するために 23 G のニードルを加工した。

Figure S1 に示すように 23 G 注射針(C)を加工用機器 (Minimo[®] One series ver. 2 Power Pack)で加工し、①、②、③に切り分けた。

切断後それぞれの切断面のバリをヤスリで丁寧に取り除く。その後、それぞれのパーツに 30 G 注射針に通し、注射針内部に残留する金属片等除去した。

- ①...手術および採血の際に使用する部品
- ②...採血時に用いる延長用チューブと頸静脈カニューレシヨントューブを連結するための部品
- ③...体内に留置するシラスコンチューブとポリエチレンチューブを連結するための部品

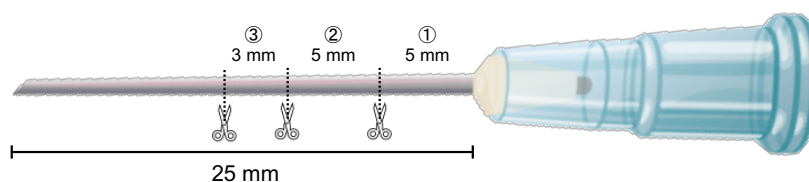


Figure S1 23 G 注射針の切断箇所

3. カニュレーションチューブの作成方法

頸静脈カニュレーション手術の際、ラット体内に埋め込むカニュレーションチューブを作成した。

Figure S2 に体内留置用カニュレーションチューブの作成方法を示す。

- (1) シラスコンチューブ(A)を 100 mm、ポリエチレンチューブ(B)を 150 mm に垂直切断する。
- (2) ポリエチレンチューブ(B)に部品③を 2/3 挿入する。金属挿入ポリエチレンチューブ部分をシラスコンチューブにて覆う。
- (3) ポリエチレンチューブ、シラスコンチューブ、金属が重なっている部分を手術用縫合糸(E)で 3 回きつく結ぶ。
- (4) 体内留置後、チューブがラットに噛みちぎりにくくする必要があり、チューブの方向を変えるため、金属結合部位から約 3 cm のポリエチレンチューブ部分をお湯で温め、約 45°に曲げる。

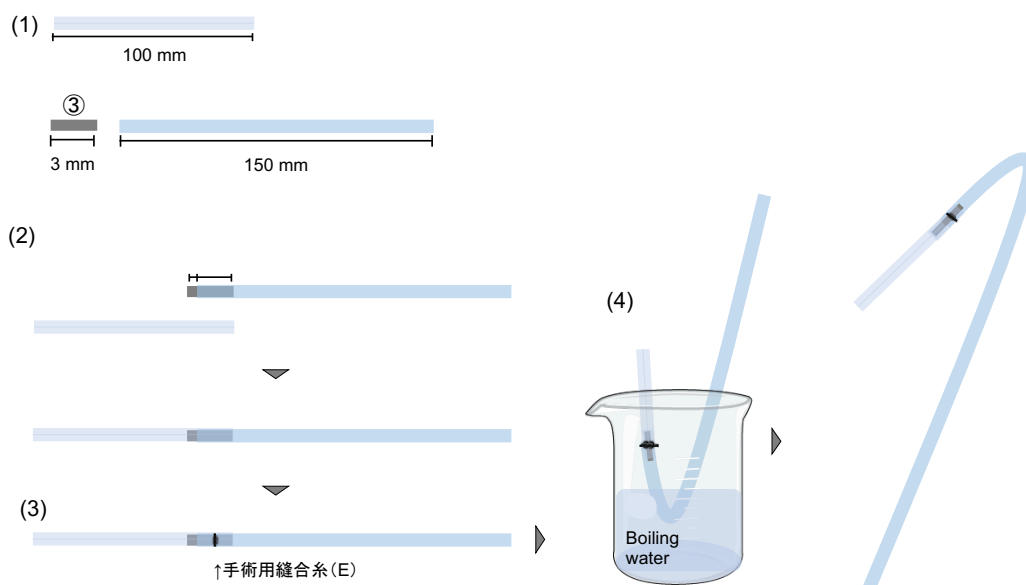


Figure S2 体内留置用カニュレーションチューブの作成方法

4. 採血用延長チューブの作成方法

採血時にラット背面に露出しているチューブから直接採血することは困難であることから、延長用のチューブを作成した。

Figure S3 に採血用延長チューブの作成方法を示す。ポリエチレンチューブ(B)を 200 mm に垂直切断する。切断したポリエチレンチューブに②の金属部品を 1/2 程度挿入する。

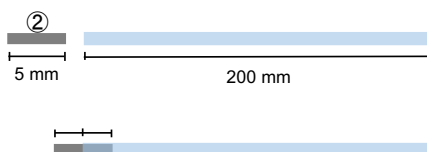


Figure S3 延長用チューブの作成方法

5. 頸静脈カニューレレーションラットの作成方法

ラット頸静脈カニューレレーションの手術を行う場合、イソフルランを試験動物麻酔装置(SN/487-OT Air、株式会社品の製作所、東京、日本)を用いた吸入麻酔、または三種混合麻酔{塩酸メドメジン(0.15 mg/kg、日本全薬工業株式会社、福島、日本)、ミダゾラム(2 mg/kg、サンド株式会社、東京、日本)、ベトルファール(2.5 mg/kg、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京、日本)となるように注射用水(大塚製薬株式会社、東京、日本)にて調製}を腹腔内投与または皮下投与し、手術を行った。

手術中切開部の乾燥防止のために生理食塩液を適宜使用した。また頸静脈カニューレーションチューブを留置後チューブ内での血液凝固を防止する目的で、生理食塩液で 20 倍に希釈したヘパリン(持田製薬株式会社、東京、日本)溶液を使用した。

- (1) Figure S4 にラットの剃毛箇所を示す。手術を行う前に、視野の確保および衛生上の目的から背部と首周辺の 2 箇所をバリカンで丁寧に剃毛する。とくに、背部はラットの肩甲骨の頂上を剃毛する。

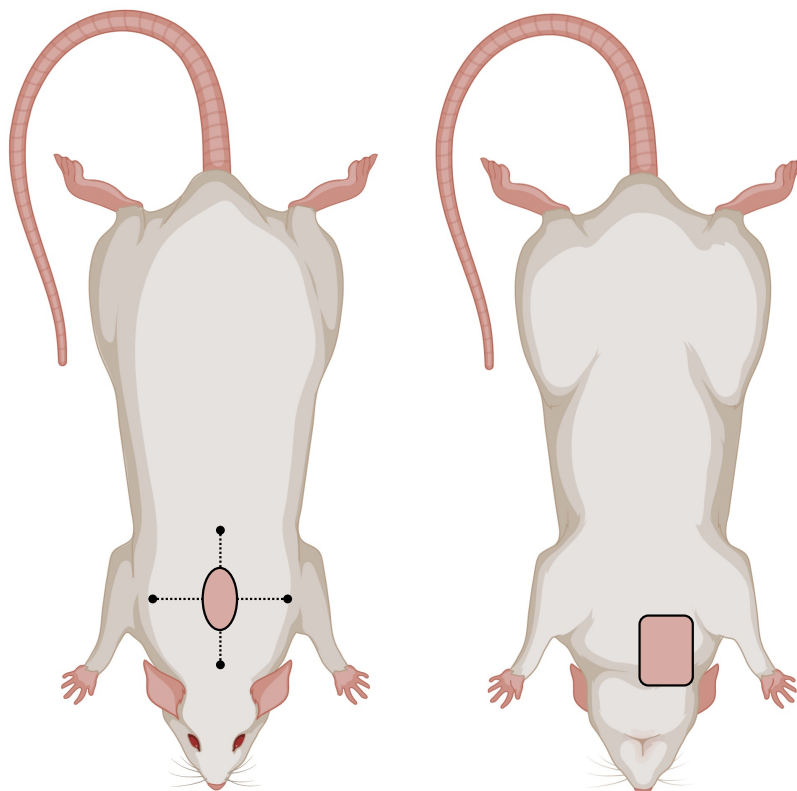


Figure S4 剃毛部について

(2) Figure S5 に切開部について示す。カニュレーションチューブを埋め込んだ後、採血チューブを出す部分を切開する。肩甲骨上部の皮膚を軽くつまみ(先曲がり先細無鉤ピンセット(a))、3 mm 程度切開(小反剪刀両鋭(e))する。仰向けにし、頸静脈にカニュレーションを挿入する手術を行うため、向かって左首元の静脈が脈打つ付近の皮膚をつまみ 5~10 mm 程度切開する。切開部は生理食塩液を含ませた脱脂綿で拭い乾燥しないようにする。

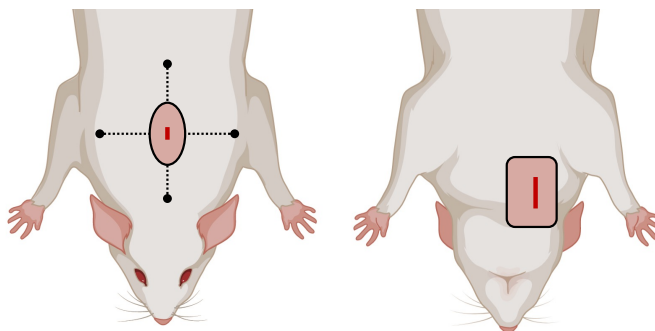


Figure S5 切開部について

- (3) カニュレーションチューブを挿入するために、Figure S6 に頸静脈露出の方法を示す。首元を切開すると筋肉が見える(Fig. S6 I)。筋肉を先曲がり先細無鉤ピンセット(a)でしっかりと掴み一回で筋肉を裂き切り静脈を露出させる。静脈に付着している筋肉や脂肪を先曲がり先鋭ピンセット(b)で取り血管を独立させる(Fig. S6 II)。

[注意点]切開箇所によってカニュレーション手術が困難になるため慎重に切開する。

例えば、下半身側に切開すると胸筋膜が見え静脈が一部しか見えない(Fig. S6 III)。

また、頭部側に切開しすぎると静脈末端となるため静脈が分岐している(Fig. S6IV)ためチューブを静脈内に入れることが難しい。

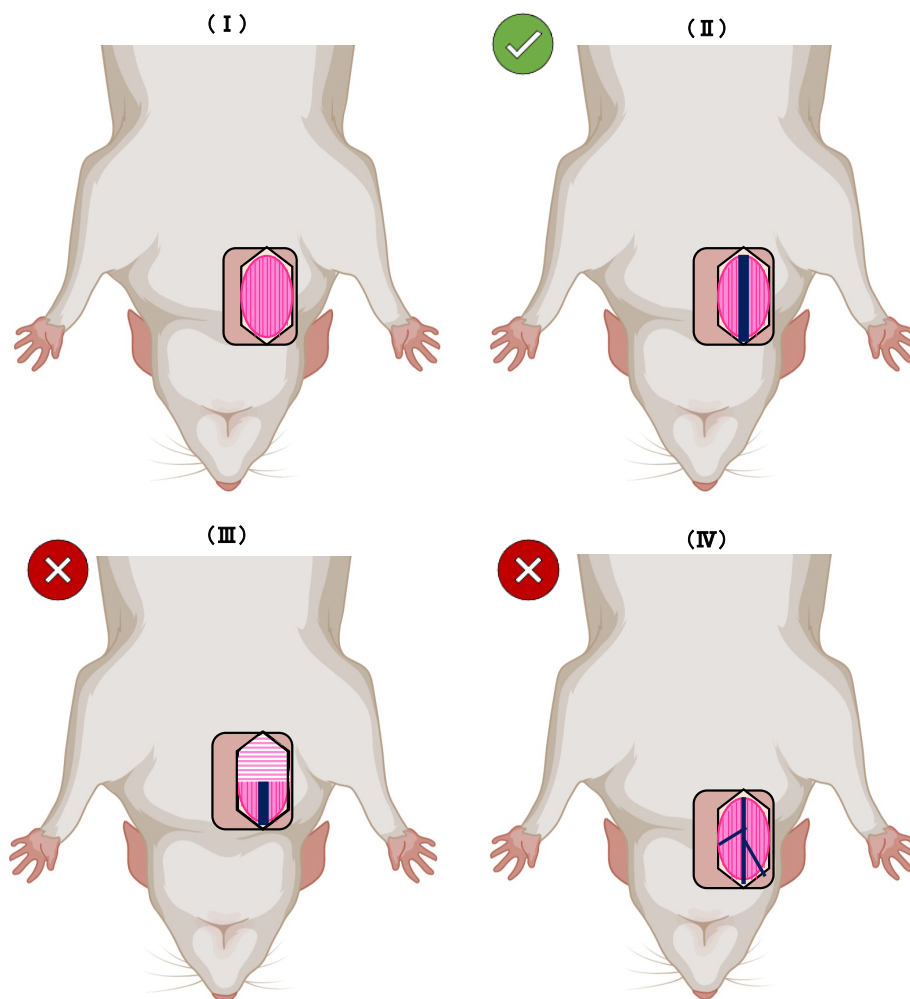


Figure S6 頸静脈露出

(4) 頸静脈露出後のカニューレションチューブ挿入工程を Figure S7 に示す。血管とチューブを固定するために、独立させた静脈の下に縫合糸(手術用縫合糸(E))を3本通し均一に広げる(Fig. S7 I, 図ではわかりやすく糸の色を変えている)。

3.で作成したカニューレションチューブを通した探り棒(h)を右皮下に添わせ背面切開部位にポリエチレンチューブ側が背部に露出するように貫通させる。

探り棒からカニューレションチューブを慎重に外し、チューブ内を生理食塩液で満たす。

カニューレションチューブのシラスコンチューブ側を約 25 mm に切る(Fig. S7 II)。

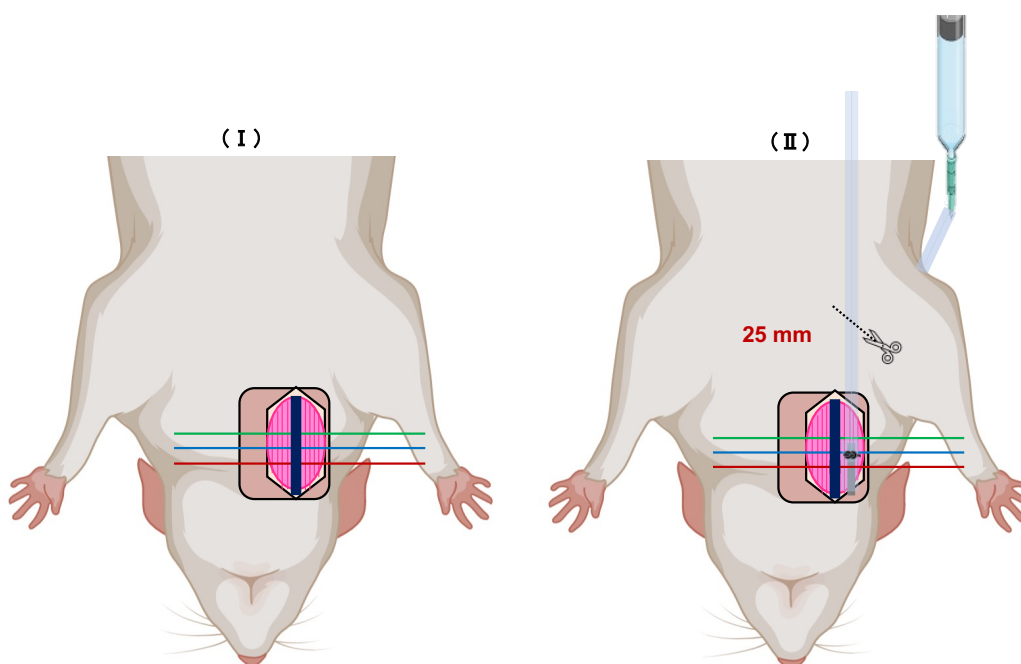


Figure S7 カニューレションチューブ挿入①

- (5) 血管を切開し血管にカニュレーションチューブ挿入する。挿入方法を Figure S8 に示す。まず、頭部側の静脈を糸(赤)で3回結び血流を止める(Fig. S8 I)。4.で取り除いた探り棒の平たい部分を頸静脈の下に入れ約60~90°の角度で血管を切る(Fig. S8 II, マイクロ剪刀 直型(g))。カニュレーションチューブを挿入しやすいように左手で切開した血管の上部を持ち上げる(先鋭ピンセット(d))。右手でカニュレーションチューブの先端をもち(先曲がり先細無鉤ピンセット(a))血管に添わせ心臓に向かって金属部位まで入れる(Fig. S8 III)。

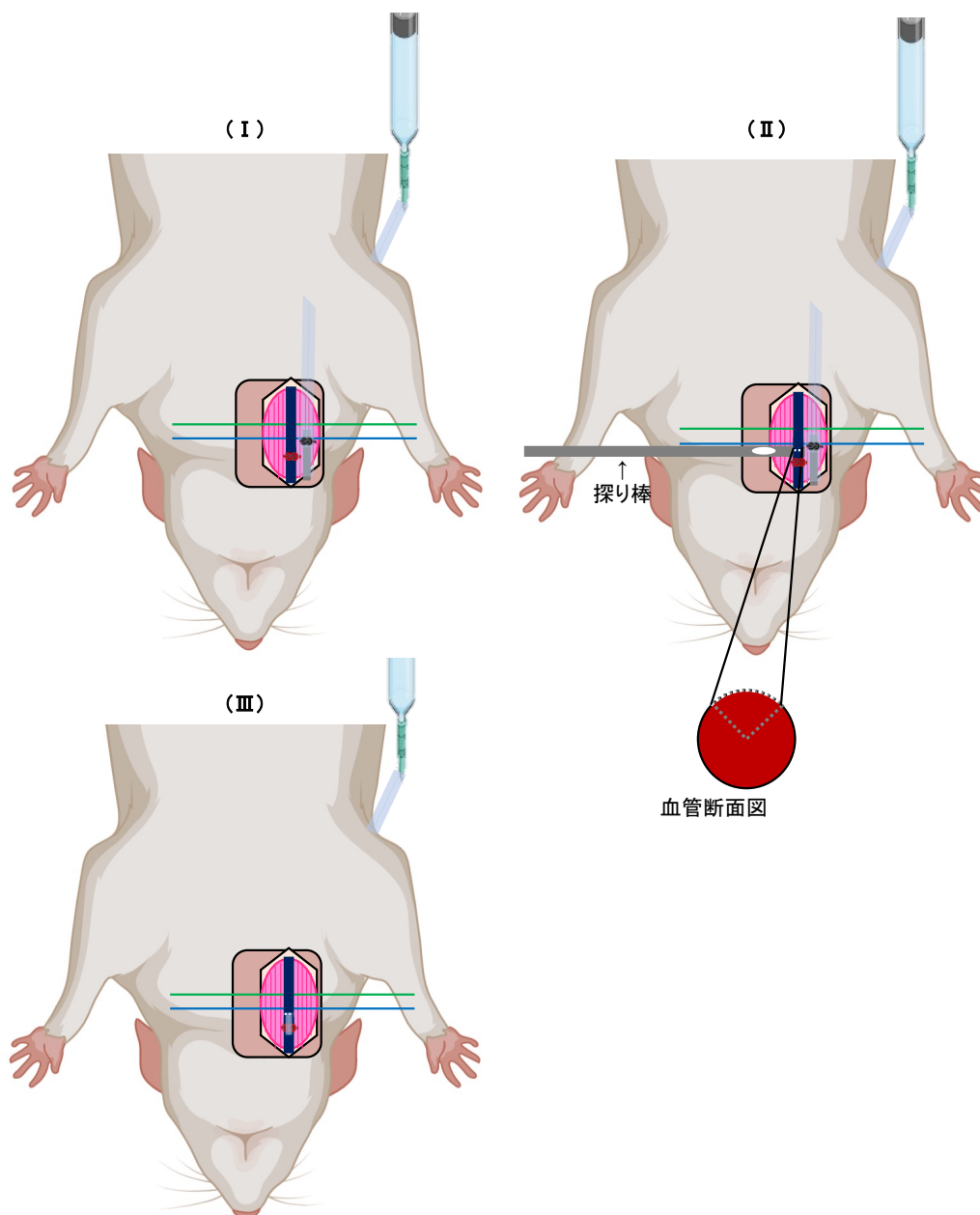


Figure S8 カニュレーションチューブ挿入工程②

- (6) 頸静脈にチューブ挿入後の固定の方法を Figure S9 に示す。カニュレーションチューブの連結部分を血管に挿入後、腹部側の糸(緑)で血管を結ぶ(チューブ上ではなく金属の連結部位で結ぶ(Fig. S9 I))。一度目は軽く結び採血可能か確認後きつく結び直し計 3 回結ぶ。採血確認後、チューブ内に血液が残存していると血液が凝固しチューブが詰まるため、採血確認の度に採血量+100 μ L の生理食塩液を入れる。
- 中央の糸(青)も頸静脈に挿入したチューブの金属上で結び、術後、ラットが動いた場合にチューブが移動しないように周辺の皮下組織とともに 3 回結ぶ(Fig. S9 II)。

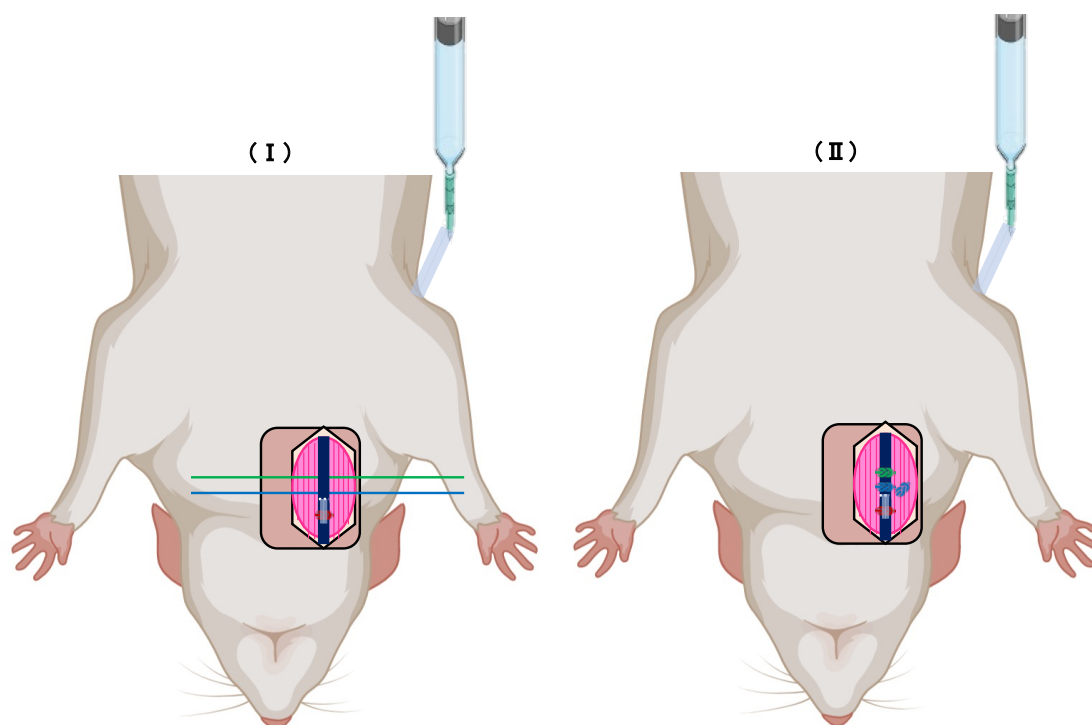


Figure S9 カニュレーションチューブ固定

(7) 静脈にチューブを挿入後切開部の縫合箇所を Figure S10 に示す。5 mm 間隔に傷を縫合（手術用縫合糸(F)）する。縫合は必ず3回きつく結ぶラットをうつ伏せにして同様に縫合する（Fig. S10 I）。術後チューブ内で血液が凝固しないよう20倍に希釈したヘパリンを100 μ L 充填する。

カニューレーションチューブを25 mm程度に垂直切断する。カニューレーションチューブの切り口に栓（加工した画鋏(G)）をする（Fig. S10 II）。Figure S10 示すようにラットの顔周辺にカニューレーションチューブが向かないように注意する（Fig. S10 III~VI）。

術後は1ゲージ1匹ずつ収容する。試験の開始は手術による体重減少が止まり手術前の体重に戻った状態で行う。また、体重だけでなく毛並みや摂食状況、傷口の状態を注意深く観察する。

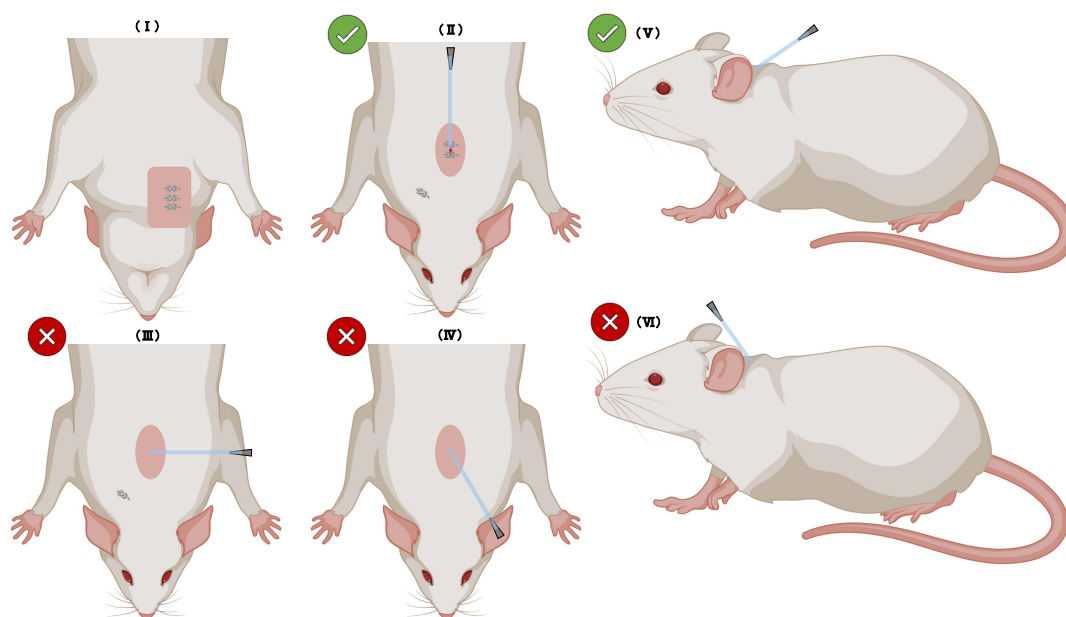


Figure S10 縫合および適正なチューブ位置

6. 採血方法

Figure S11 に採血手順を示す。

- (I) ふきんや軍手などでラットの視野を覆い、ラットを落ち着かせる。ラットが落ち着いたら、チューブの栓を取る。チューブは軽くつまみ血液の流出がないようにする。
- (II) 延長用チューブが付いた生理食塩液入りシリンジをカニューレーションチューブにつなげる。接続後、延長用チューブが外れないよう、ラット頭上にとどまるようにする。
- (III) カニューレーションチューブ内に充填したヘパリン除去用の生理食塩液入りシリンジを取り除く。
- (IV) 血液の流入を確認後、ヘパリン処理をしたシリンジに付け替える。
- (V) 採血する。
- (VI) 生理食塩液入り注射針に付け替え、採血量と同量の生理食塩液をカニューレーションチューブから注入する。
- (VII) カニューレーションチューブ内での血液凝固防止の為 100 μ L の 20 倍希釈ヘパリン溶液をカニューレーションチューブに充填する。
- (VIII) 血液の逆流を防ぐために画鋲の針でカニューレーションチューブに栓をする。

一連(I～VIII)の作業時間は1分程度で行う

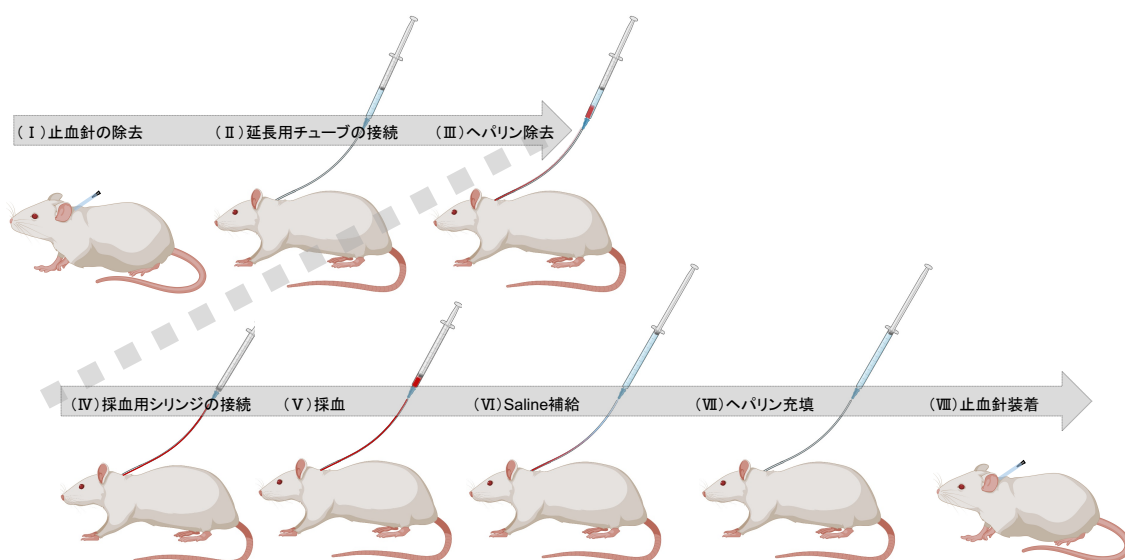


Figure S11 採血手順

7. 参考資料

- E. K. Kmiotek, C. Baimel, K. J. Gill, Methods for Intravenous Self Administration in a Mouse Model., *J. Vis. Exp.*, **70**, 1–5 (2012).
- 岩城 隆昌, 早川 敏之共著, ラットの断面解剖アトラス, アドスリー (2008).
- 日本実験動物技術者協会, 図解・実験動物技術集 I, アドスリー (1994).
- 日本実験動物技術者協会, 図解・実験動物技術集 II, アドスリー (1998).

