

水溶性デキストラン誘導体を用いた  
粘膜付着型徐放性微粒子製剤の開発

宮寄 靖則

星薬科大学  
図書館



0000060141

水溶性デキストラン誘導体を用いた  
粘膜付着型徐放性微粒子製剤の開発

# 目次

掲載論文目録	1
略号一覧	2
序論	3
第1章 高分子電解質複合体の形成に及ぼす諸因子の検討	5
第1節 水溶性デキストラン誘導体の置換基の解離度	7
第2節 pH および混合比の影響	9
第3節 分子量の相違	11
第4節 高分子電解質複合体形成反応の化学量論性	13
第5節 塩化ナトリウム添加の影響	15
第6節 本章のまとめ	17
第7節 実験の部	19
第2章 水溶性デキストラン誘導体混合物の粘膜付着性	20
第1節 水溶性デキストラン誘導体の粘膜付着性	21
第2節 物理混合物の粘膜付着性	23
第3節 粘膜付着機構	24
第1項 pH およびイオン強度の影響	24
第2項 接触時間の影響	25
第3項 分子量の影響	27
第4節 本章のまとめ	28
第5節 実験の部	29
第3章 マイクロスフェアからの薬物放出挙動	31
第1節 マイクロスフェアの調製	32

第2節	ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせによる影響	35
第3節	ポリアニオンとポリカチオンの混合比による影響	38
第4節	水溶性デキストラン誘導体含有量による薬物放出制御	40
第5節	本章のまとめ	43
第6節	実験の部	44
第4章	マイクロスフェアの消化管内挙動の解析	46
第1節	in vitro 水和挙動	47
第2節	in vitro 粘膜炎着性	50
第3節	in vivo 滞留性	52
第4節	消化管内挙動の解析	53
第5節	本章のまとめ	57
第6節	実験の部	58
第5章	経口投与後の薬物吸収挙動	60
第1節	テオフィリンおよびチアミンジスルフィドの in vitro 放出挙動	60
第2節	テオフィリンのバイオアベイラビリティ	62
第3節	チアミンジスルフィドのバイオアベイラビリティ	64
第4節	本章のまとめ	66
第5節	実験の部	67
第6章	総括および結論	70
謝辞		72
引用文献		73

## 掲載論文目録

本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

宮崎靖則, 谷古宇秀, 高山幸三, 反対荷電を持つデキストラン誘導体間の複合体形成に関する検討, *薬剤学*, **61**, 59-70 (2001).

(第1章)

宮崎靖則, 谷古宇秀, 永井恒司, 高山幸三, 固体状態におけるデキストラン誘導体の粘膜付着性の評価, *薬剤学*, **62**, 14-22 (2002).

(第2章)

Miyazaki Y., Yakou S., Nagai T., Takayama K., Release profiles of theophylline from microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate: effect of polyion complex formation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **29**, 795-804 (2003).

(第3章)

Miyazaki Y., Ogihara K., Yakou S., Nagai T., Takayama K., In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate, *Int. J. Pharm.*, **258**, 21-29 (2003).

(第4章)

Miyazaki Y., Ogihara K., Yakou S., Nagai T., Takayama K., Bioavailability of theophylline and thiamine disulfide incorporated into mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1744-1747 (2003).

(第5章)

## 略号一覧

本論文では、以下の略号を用いた。

AUC	area under the blood concentration-time curve (血中濃度-時間曲線下面積)
CAB	cellulose acetate butyrate (セルロースアセテートブチレート)
CDC	cationic dextran for cosmetics (塩化[2-ヒドロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロピル]デキストラン)
$C_{max}$	maximum drug concentration (最高血中濃度)
CMD	carboxymethyl dextran sodium (カルボキシメチルデキストランナトリウム)
CP	carbopol 934P (カーボポール 934P)
CS	chitosan (キトサン)
DDS	drug delivery system (薬物送達システム)
DS	dextran sulfate sodium (デキストラン硫酸ナトリウム)
EA	[2-(diethylamino) ethyl] dextran hydrochloride (塩化 2-ジエチルアミノエチルデキストラン)
HPC	hydroxypropylcellulose (ヒドロキシプロピルセルロース)
HPLC	high-performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
MDT	mean dissolution time (平均溶出時間)
MRT	mean retention time (平均滞留時間)
SEM	scanning electron microscopy (走査型電子顕微鏡)
TDS	thiamine disulfide (チアミンジスルフィド)
TH	theophylline (テオフィリン)
$T_{max}$	maximum drug concentration time (最高血中濃度到達時間)

## 序論

近年、医療における薬物療法の重要性がますます増大している。このような流れの中で、薬物の適用方法についても、有効性、安全性、あるいは使用性に関して最も優れた治療効果を与えるように、投与形態を工夫し、体内動態を精密に制御しようとするドラッグデリバリーシステム(DDS、Drug Delivery System)の考え方が広く認知されるようになった。優れた DDS の開発には、コントロールドリリース(Controlled Release)のためのマトリックス材料やターゲティング(Targeting)のためのキャリアー材料などをはじめとして製剤素材が重要な位置を占める。そこで現在に至るまで、ポリアクリルシアノアクリレート、ポリ乳酸、ポリエチレングリコールなど数多くの高分子が合成され利用されてきた。またアルブミン、ゼラチンなどの生体由来の高分子やデンプン、デキストランなど天然に存在する高分子が、安全性や生体適合性の観点から利用されてきた<sup>1)</sup>。

天然高分子であるデキストランは、*leuconostoc dextranum*, *L. mesenteroides* などによりショ糖から産生されるブドウ糖の重合体で、その結合の大部分が $\alpha$ -1, 6結合である高分子である。天然のデキストランを酸によって部分加水分解することによって、分子量をある程度の範囲にすることができる。デキストランは水溶性で、安全性が高く、医薬、食品および化粧品等の分野に広く応用されている。またデキストランの水酸基の一部を化学修飾して製した水溶性デキストラン誘導体も、医薬品や化粧品に利用されている。例えば、代表的なアニオン性デキストラン誘導体の 1 つであるデキストラン硫酸ナトリウムは高脂血症用剤として医療に用いられ<sup>2)</sup>、カチオン性の塩化[2-ヒドロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロピル]デキストランは毛髪保護や保湿性付与の目的で化粧品に配合されている<sup>3)</sup>。

一般に水溶性デキストラン誘導体は安全性が高く、生体適合性、生分解性を有している。このことから薬物分子に水溶性デキストラン誘導体をキャリアーとして化学結合させ、ターゲティングに利用する試みが行われてきた<sup>4)</sup>。しかし、デキストランの持つ高い水溶性から、そのほかの DDS に応用された例は少ない。この問題を解決するために脂溶性誘導体化する方法<sup>5)</sup>あるいは化学的に架橋する方法<sup>6)</sup>が考案されてきた。しかし、これらの方法を用いた場合、残留する有機溶媒や架橋剤による有害反応の恐れがある。

そこで本研究では、物理的な架橋方法の 1 つであるイオン結合による複合化を利用することを試みた。

互いに反対荷電を有する高分子電解質は、水溶液中で複合体を形成することが知られている<sup>7)</sup>。高分子電解質複合体の応用範囲は広く、分離膜、抗血栓性材料、蛋白質の分離、核酸の分離、酵素の安定化などに利用するための研究が行なわれている<sup>8)</sup>。製剤学の分野では薬物のコーティング<sup>9)</sup>やカプセル化<sup>10)</sup>などへ利用するための研究が行なわれてきたが、応用研究はあまり盛んではなかった。ところが近年、高分子電解質複合体は埋め込み製剤の薬物保持<sup>11)</sup>やコア-シェル型高分子ミセル<sup>12)</sup>に応用されるなど、その可能性が再び注目されている。

以上のような知見から、高分子電解質複合体形成反応を利用することにより、水溶性デキストラン誘導体は有用な DDS の素材となりうるものと考えられる。そこで本研究では、まず始めに反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体が高分子電解質複合体を形成する際に影響を及ぼす要因について調べた<sup>13)</sup>。その研究過程において水溶性デキストラン誘導体あるいは反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体の物理混合物が水和すると粘膜付着性を示すことが判明したため、*in vitro*において粘膜付着性に関する検討を行った<sup>14)</sup>。そして水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を用いたマイクロスフェアを開発し、このマイクロスフェアからの薬物放出性<sup>15)</sup>、粘膜付着性<sup>16)</sup>について検討した。さらに経口投与時の消化管内挙動<sup>16)</sup>および薬物吸収動態<sup>17)</sup>について検討し、その有用性について評価した。

## 第1章 高分子電解質複合体の形成に及ぼす諸因子の検討

水溶液中で、互いに反対の荷電を有する高分子電解質が複合体を形成することはよく知られている。このとき形成される高分子電解質複合体の性質は高分子の化学構造、分子量、柔軟性、官能基の種類、荷電密度、親水性—疎水性バランス、立体構造などに影響され、また反応条件、例えば水溶液の pH、イオン強度や温度、あるいは高分子の濃度や混合比によっても変化する<sup>7)</sup>。そこで本章では、まず水溶性デキストラン誘導体の解離度について調べ、次いで高分子電解質複合体の形成について検討した。高分子電解質複合体の形成に関しては、ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせ、混合比率および媒体の pH について検討した。また同じ誘導体で分子量の異なるものを用いて、複合体形成に及ぼす分子量の影響についても検討した。

使用した水溶性デキストラン誘導体の特性を Table 1-1 に、またその構造式を Figure 1-1 に示した。本研究では置換基を異にする4種類の水溶性デキストラン誘導体、すなわちアニオン性の弱電解質としてカルボキシメチルデキストランナトリウム(CMD)、強電解質としてデキストラン硫酸ナトリウム(DS)、そしてカチオン性の弱電解質として塩化[2-(ジエチルアミノ)エチル]デキストラン(EA)、強電解質として塩化[2-ヒドロキシ-3-(トリメチルアンモニオ)プロピル]デキストラン(CDC)を用いて検討した。

Table 1-1. Characterization of dextran derivatives.

Polymer	Molecular weight*	Ionizable groups	Degree of substitution (mol/A.G.U.**)
CMD10	10,000	-CH <sub>2</sub> COONa	0.83
CMD1000	1,000,000	-CH <sub>2</sub> COONa	0.95
DS8	8,000	-SO <sub>3</sub> Na	2.21
DS50	50,000	-SO <sub>3</sub> Na	2.25
DS500	500,000	-SO <sub>3</sub> Na	1.74
EA500	500,000	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -N <sup>+</sup> H(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> •Cl <sup>-</sup> or -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -N <sup>+</sup> H(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> •2Cl <sup>-</sup>	0.22 0.16
CDC10	10,000	-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •Cl <sup>-</sup>	0.40
CDC40	40,000	-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •Cl <sup>-</sup>	0.46
CDC1000	1,000,000	-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>2</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> •Cl <sup>-</sup>	0.40

\*Average molecular weight of dextran used for preparation.

\*\*Anhydroglucose unit.

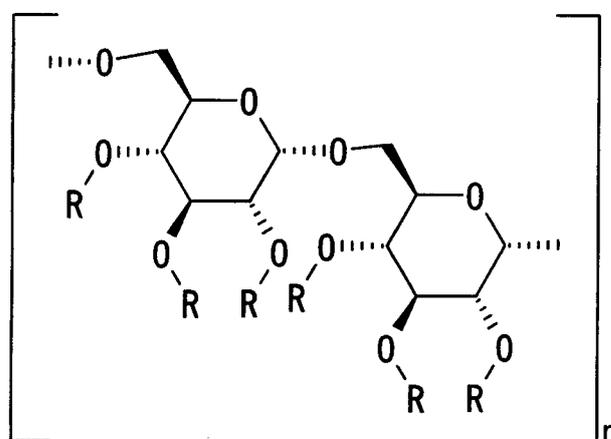


Figure 1-1. Schematic structure of dextran derivatives.

R = -H or ionizable group (ref. Table 1-1).

## 第1節 水溶性デキストラン誘導体の置換基の解離度

高分子電解質複合体形成反応の基礎として、水溶性デキストラン誘導体の置換基の各 pH における解離度を電位差滴定法により調べた。各水溶性デキストラン誘導体の解離曲線を Figure 1-2 に示す。アニオン性弱電解質である CMD は、pH2 以下ではほとんど解離せず、pH6 以上ではほぼ完全に解離した。CMD の解離度は pH によって大きく変化し、変曲点を pH4 にもつシグモイド曲線で示された。カチオン性弱電解質である EA の解離度は、シグモイド曲線を2つつなぎ合わせた形となり、変曲点は pH5.9 と 9.0 に認められた。EA は3種の解離基をもち、タンデム型の第4級アンモニウム基、シングル型の第3級アミン基、タンデム型の第3級アミン基が順次中和される<sup>18)</sup>。従って pH5.9 の変曲点はタンデム型の第3級アミン基によるもの、また pH9.0 の変曲点はシングル型の第3級アミン基によるものと考えられる。ここではタンデム型の第4級アンモニウム基による変曲点は観察されなかった。一方、強電解質である DS と CDC の解離度はいずれも大きく、それぞれ pH3 以下あるいは pH11 以上でわずかに低下するが、その他の pH 域ではほぼ 100% 近く一定であった。これは置換基である  $-\text{SO}_3\text{Na}$  あるいは  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \cdot \text{Cl}^-$  の解離が pH の影響をあまり受けないことを示唆する。

分子量の差による解離状態の変化は、強電解質である CDC で見られ、弱電解質である CMD では見られなかった。分子量の違いが解離度に及ぼす影響は、分子鎖の絡み合いによる解離の抑制に起因すると考えられるが、その影響は解離度の高い CDC で大きく解離度の低い CMD では大きくないことが示唆された。

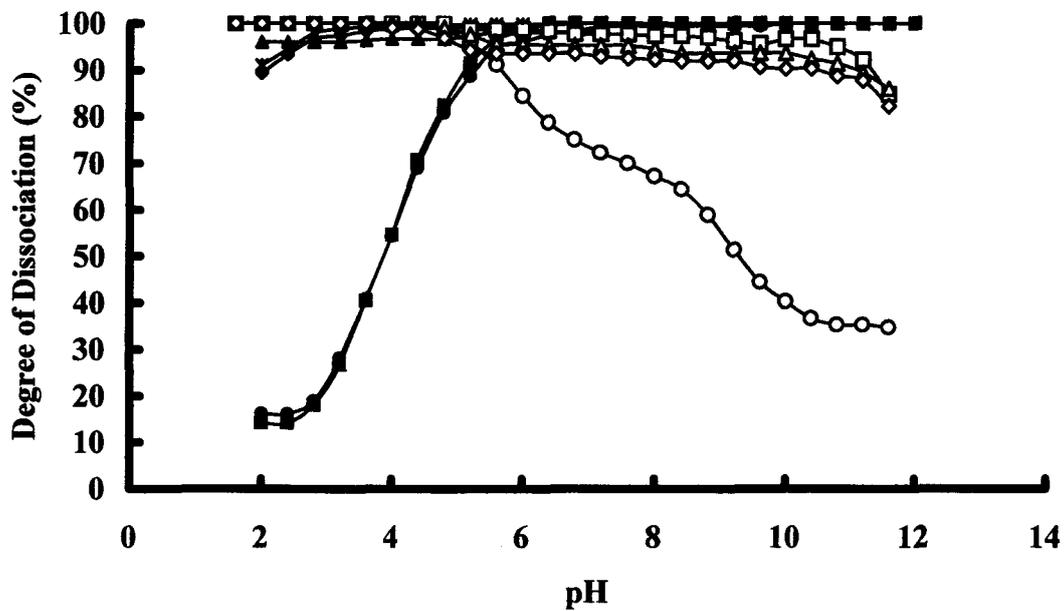


Figure 1-2. Degree of dissociation for ionizable groups of dextran derivatives as a function of pH in medium.

●, CMD10; ■, CMD1000; ▲, DS8; ◆, DS50; \*, DS500;

○, EA; □, CDC10; △, CDC40; ◇, CDC1000.

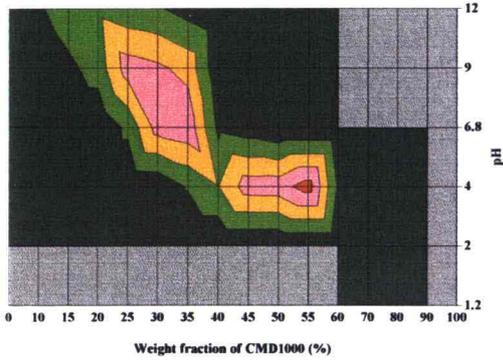
## 第2節 pH および混合比の影響

高分子電解質複合体の形成は、一方のポリイオンの希薄水溶液に他方のそれを添加し、混合物の濁度を測定することによって調べることができ、極大では中性の塩が形成される<sup>19)</sup>。Figure 1-3 に、所定の pH に調整したポリカチオンとポリアニオンの希薄水溶液を混合したときの混合溶液の濁度を示す。

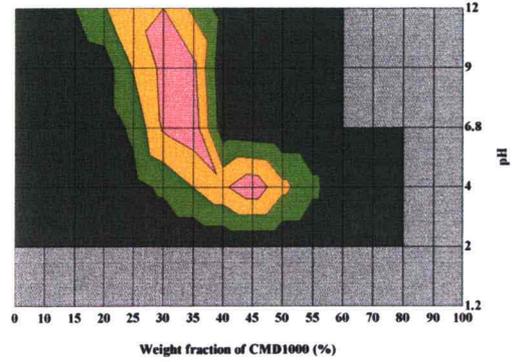
Figure 1-3a、3b に示したように CMD 系では pH1.2 において濁度は観察されなかった。これは pH1.2 では CMD がほとんど解離しないため、高分子電解質複合体が形成されなかったことを示唆している。同様に pH2.0 でも、Figure 1-3a の混合比 75:25 のときにわずかに濁度を示した以外、濁度は観察されなかった。pH4.0、6.8、9.0 のときはほぼ同等の高さの極大値を示した。pH4.0 と pH6.8 の間で一度濁度が低下しているが、これはこの間に測定点がないために見かけ上低くなったものと考えられる。そして pH12.0 のとき再びピークの高さが低下した。これは EA の解離度が低下したために高分子電解質複合体の形成量が減少したものと推察される。一方、CDC ではそのような低下は観察されなかった(Figure 1-3b)。これは EA と異なり CDC の解離度が pH12.0 においてもあまり低下しないことによると考えられる。

Figure 1-3c、3d に示した DS 系の場合、pH1.2、2.0 においても濁度が観察された。これは CMD と異なり DS では低い pH 域においても解離度が低下しないためと考えられる。Figure 1-3c において Figure 1-3a と同様に pH12.0 の極大値が低くなった。ここでも EA の解離度の低下による高分子電解質複合体の形成量の減少が起こったものと推察される。ポリアニオン、ポリカチオンの両方またはどちらか一方に弱電解質を用いた場合、即ち CMD/EA 系、CMD/CDC 系および DS/EA 系においては極大値を示す混合比が pH によって変化した。一方強電解質同士の場合、即ち Figure 1-3d に示した DS/CDC 系では溶液の pH に依らず極大値を示す混合比はほぼ同一であった。

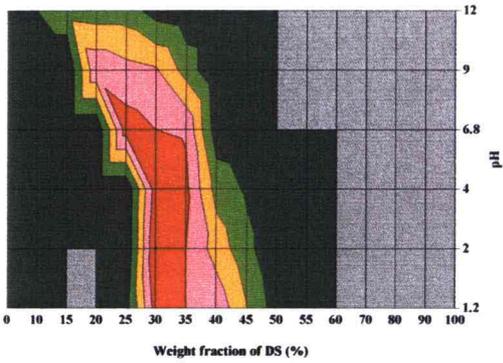
(a) CMD1000/EA500



(b) CMD1000/CDC1000



(c) DS500/EA500



(d) DS500/CDC1000

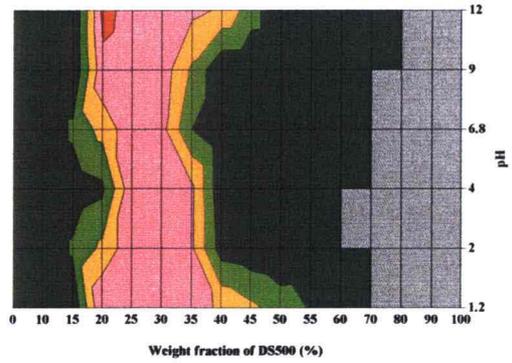


Figure 1-3. Turbidity mappings in the (a) CMD1000/EA500, (b) CMD1000/CDC1000, (c) DS500/EA500, (d) DS500/CDC1000 system.

Absorbance:  0.00;  0.01-0.30;  0.31-0.60;  0.61-0.90;  0.91-1.20;  1.21-1.50.

### 第3節 分子量の相違

分子量の低い誘導体を用いて濁度試験を行った。Figure 1-4 に一例として pH6.8 での濁度曲線を示す。Figure 1-4a は分子量の低い CMD を用いた場合の濁度曲線で、分子量の高い場合とは異なり曲線がブロードになった。ポリカチオンの違いによる濁度曲線の違いを比較すると、CDC では極大を示す混合比の両側に広がるが、EA では右側（高濃度側）にのみ広がる傾向を示した。Figure 1-4b は分子量の低い DS を用いた結果であり、CMD と同様の傾向を示した。Figure 1-4c の分子量の低い CDC を用いた場合でも、分子量が低くなると曲線の広がりが大きくなった。この場合、濁度曲線は極大を示す混合比の左側（ポリアニオン低濃度側）に広がる傾向が見られた。いずれの場合も分子量が低くなると、極大を示す混合比以外の場合でも複合体が形成されやすくなった。これは分子量が小さくなることにより、空間的な制約が少なくなるためと考えられる。

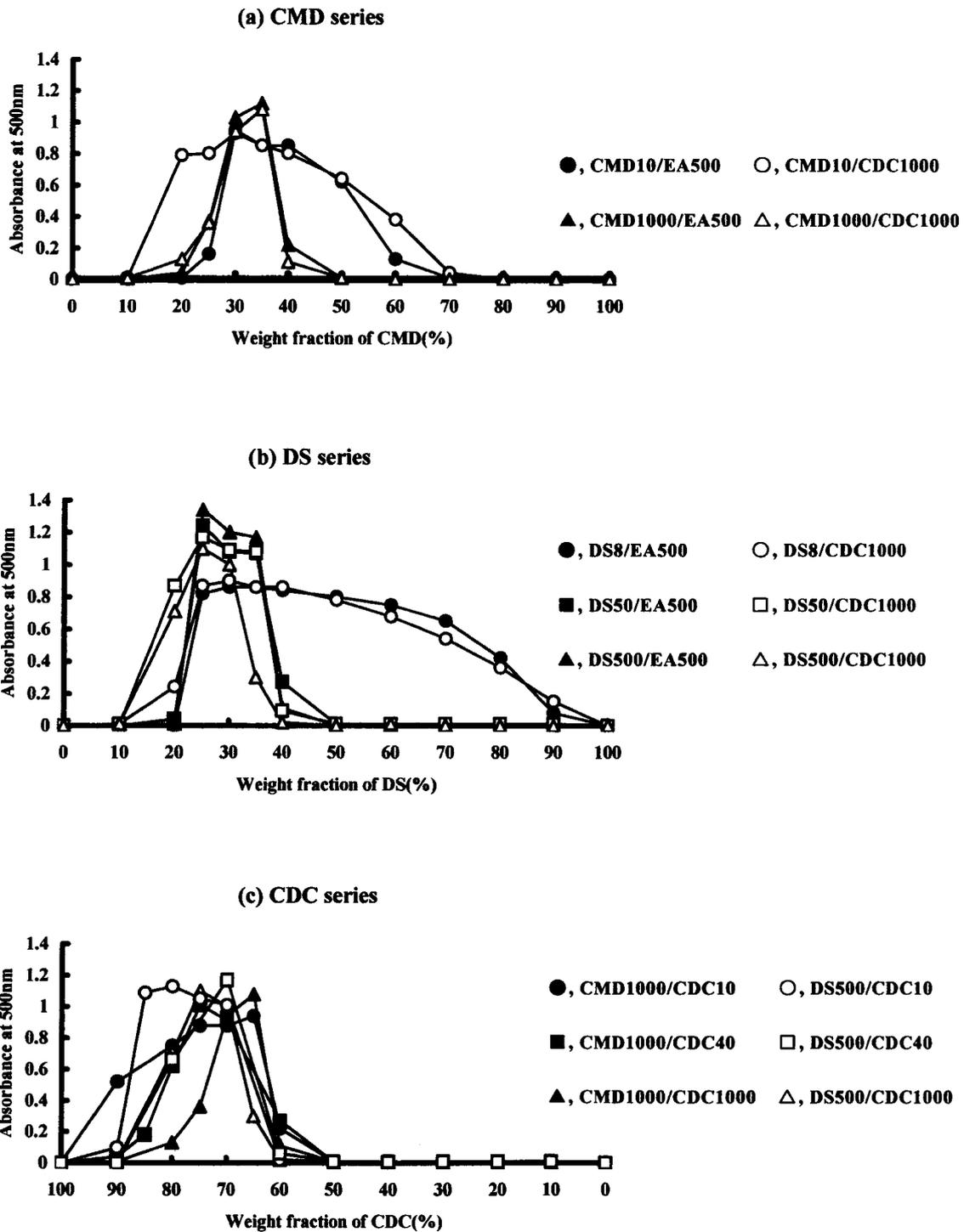


Figure 1-4. Relationship between polymer combination ratio and turbidity at pH 6.8.  
 (a) CMD series, (b) DS series, (c) CDC series.

## 第4節 高分子電解質複合体形成反応の化学量論性

ポリアニオンとポリカチオンが化学量論的に反応した場合、置換基の濃度と解離度の積はアニオンとカチオンで等しくなり、中性の複合体が形成される<sup>7)</sup>。そこで化学量論性が成立するとして計算した組成比を Figure 1-2 から求め、濁度測定の結果から求めた極大値を示す混合比とともに Figure 1-5 に示す。

Figure 1-5a に示した CMD/EA 系を見ると、CMD1000 では実験値と計算値は良く一致する。これに対し、CMD10 では pH の低下とともに CMD10 の比率の実験値が計算値より小さくなる傾向を示した。CMD は pH4.0 で解離度が低下するので、より多くの分子を必要とするが、分子量の低下とともに解離している置換基が複合体形成に有効に使われたものと推察される。Figure 1-5b の CMD/CDC 系では分子量に依らず実験値と計算値がほぼ一致した。一方 Figure 1-5c に示す DS/EA 系および Figure 1-5d に示す DS/CDC 系では、実験値が計算値より上に大きくずれる傾向を示した。これは DS の置換基が高密度 (Table 1-1) であるため、そのうちの多くが反応に関与できなかったことによると考えられる。実験値と計算値の差は 11% 前後であり、およそ半分の置換基は複合体形成に関与していない。このような場合には複合体形成に関与していない置換基が多く存在し、結果として複合体のネットチャージが増加すると推察される。また DS/EA 系で DS が低分子のとき実験値が pH に依らずほぼ一定の特異な挙動を示した。この原因の 1 つとして、pH の高い領域では解離している酸基の誘起効果によって未解離状態にある塩基が解離し、そのため DS の比率が大きくなったためと考えられる。

高分子電解質複合体形成反応の化学量論性に影響を与える因子として置換基の密度や立体配座が考えられている<sup>7)</sup>。これらの因子の影響を受けやすいものが DS、EA であることが明らかとなった。その理由として DS では置換度が高く、Figure 1-1 に示したように 1 つのピラノース環に約 2 個の置換基が導入されており、約半数の置換基はコンホメーション的に結合に関与できないためと考えられる。また EA では置換度は低い置換基にシングル型とタンデム型の二つが存在し、タンデム型の 3 級アミンと 4 級アンモニウムは同時には結合に関与できないなどの理由を挙げることができる。

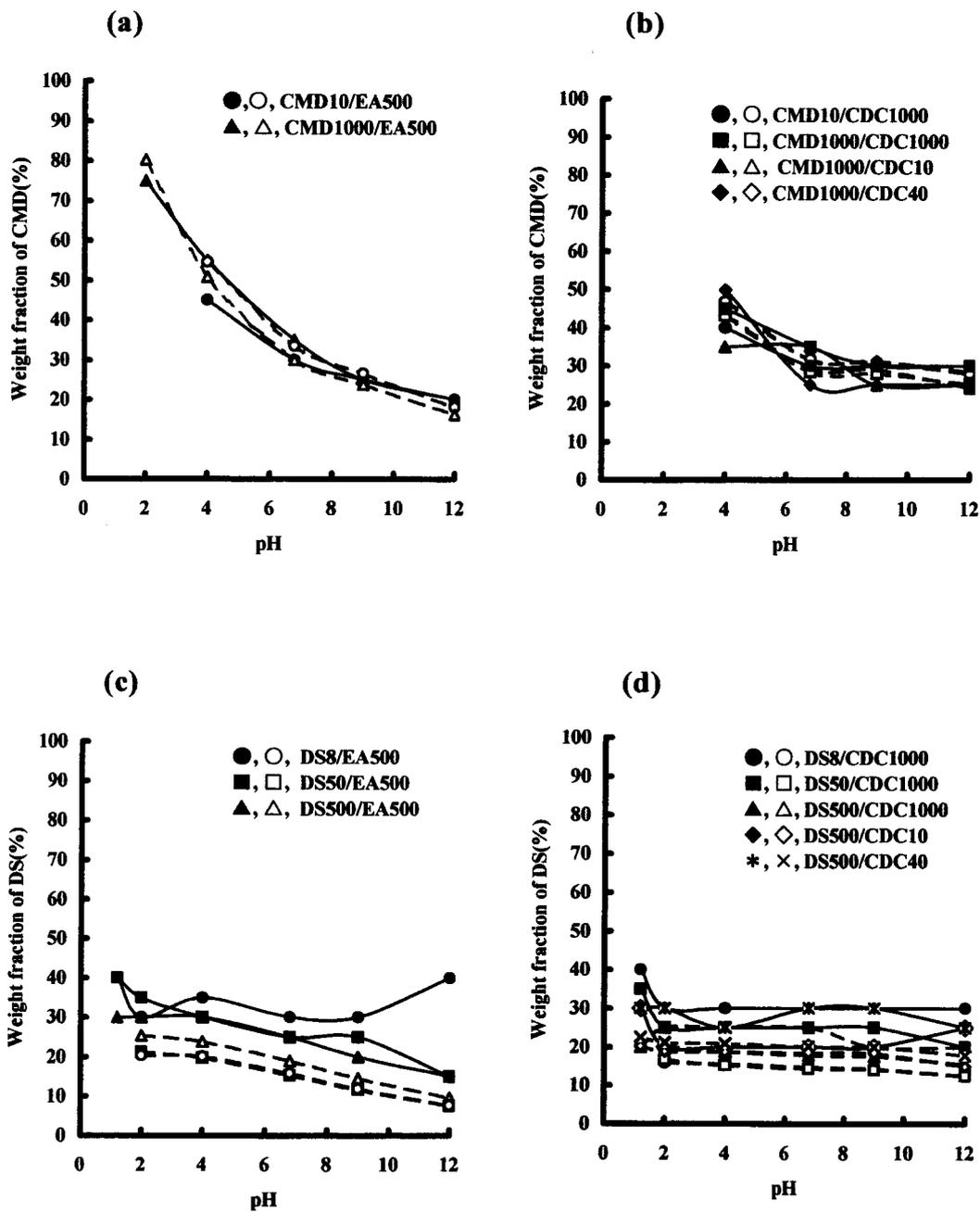


Figure 1-5. Relationship between pH and polymer combination ratio at maxima in turbidity curve. Closed symbols, experimental values; Open symbols, calculated values.

## 第5節 塩化ナトリウム添加の影響

CMD1000、DS500、EA500 および CDC1000 を用い、pH は 6.8 とし、塩化ナトリウムの添加濃度を変えて行なった濁度試験の結果を Figure 1-6 に示す。煩雑さを避けるため 5、15 及び 30mM の結果は図中から除いた。Figure 1-6a、b、c から、塩化ナトリウム濃度が大きくなるに従い極大値の値が大きくなることが分かった。一方 Figure 1-6d では塩化ナトリウムの有無、濃度に依らずほぼ同じ値の極大値を示した。これらのことから高分子の組み合わせが両方あるいは片方が弱電解質の場合、濁度が塩化ナトリウム添加の影響を受け、強電解質同士の場合には濁度は塩化ナトリウム濃度に無関係であることが分かった。強電解質同士の場合、高分子電解質複合体は中性の沈殿物として形成される。しかし弱電解質から形成された複合体は結合に関与していない置換基を多く持ち、両性電解質の性質を帯びるために溶解度が低下しない。その結果、塩化ナトリウムの添加により塩析効果が現れ、不溶化し濁度を示すようになるものと考えられる。

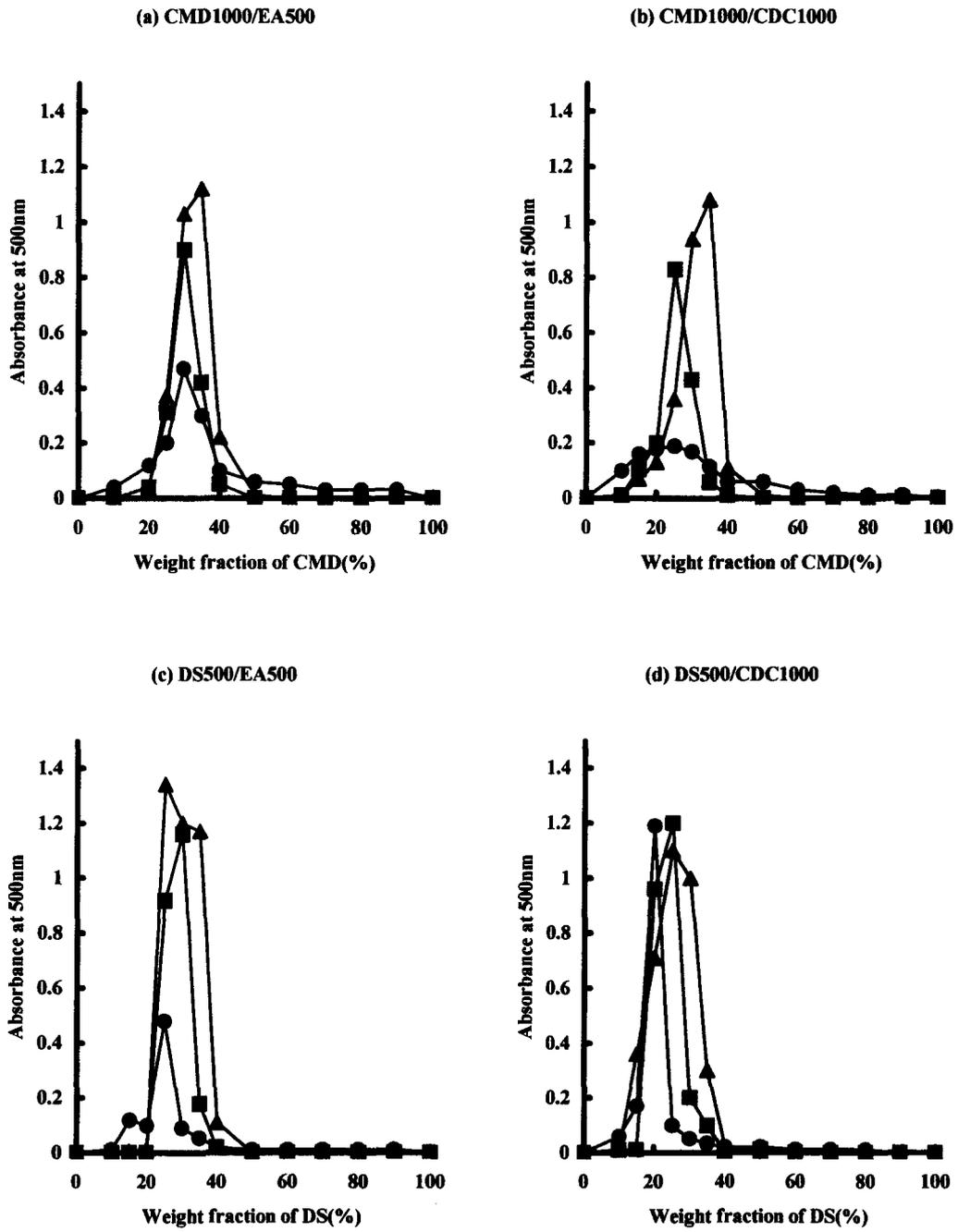


Figure 1-6. Influence of NaCl concentration on turbidity of (a) CMD1000/EA500, (b) CMD1000/CDC1000, (c) DS500/EA500, (d) DS500/CDC1000 system.

Concentration: ●, 0 mM; ■, 10 mM; ▲, 20 mM.

## 第6節 本章のまとめ

互いに反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体間における高分子電解質複合体の形成に影響を及ぼす諸因子について検討を行った結果、次のような知見を得た。

- (1) アニオン性弱電解質である CMD の解離度は pH によって大きく変化し、変曲点を pH4 にもつシグモイド曲線となった。カチオン性弱電解質である EA の解離度も pH によって大きく変化し、シグモイド曲線を2つつなぎ合わせた形となり、変曲点は pH5.9 と 9.0 に認められた。一方、強電解質である DS と CDC の解離度はそれぞれ pH3 以下あるいは pH11 以上でわずかに低下するが、その他の pH 域ではほぼ一定であった。
- (2) CMD/EA 系、CMD/CDC 系および DS/EA 系においては極大値を示す混合比が pH によって変化した。DS/CDC 系では溶液の pH に依らず極大値を示す混合比はほぼ同一であった。pH6.8 における極大値を示す混合比は、CMD/EA 系および CMD/CDC 系では 35:65、DS/EA 系および DS/CDC 系では 25:75 であった。
- (3) 分子量が低くなると濁度曲線の広がりが大きくなり、幅広い組成比を有する複合体が形成された。
- (4) 高分子電解質複合体形成反応の化学量論性を検討した結果、CMD/EA 系においては、CMD1000 を用いたとき実験値と計算値は良く一致したが、CMD10 を用いた場合 pH の低下とともに CMD10 の比率の実験値が計算値より小さくなった。CMD/CDC 系においては分子量に依らず実験値と計算値がほぼ一致した。一方 DS/EA 系および DS/CDC 系では、DS の比率の実験値が計算値より大きくなる傾向を示した。
- (5) 濁度は、高分子の組み合わせが両方あるいは片方が弱電解質の場合、塩化ナトリウム添加の影響を受け、強電解質同士の場合、塩化ナトリウム濃度に影響されなかった。弱電解質を用いた複合体は、両性電解質の性質を帯び、不溶化していないことが示唆された。

一連の濁度測定の結果から、高分子電解質複合体の形成反応に及ぼす水溶性デキストラン誘導体のポリアニオンとポリカチオンの組み合わせ、混合比率、主鎖の分子量そして媒体の pH の影響が明らかとなった。さらに形成された高分子電解質複合体の荷電状態も明らかとなった。高分子電解質複合体は組成により吸水性などが異なり、投与経路や適用部位などにあわせてポリアニオンとポリカチオンを適当に組み合わせることにより、製剤素材として応用範囲が広がるものと考えられる。

## 第7節 実験の部

### (1) 試薬

CMD10、CMD1000、CDC10、CDC40 および CDC1000 は名糖産業製(名古屋)、EA500、DS8、DS50 および DS500 はシグマ社製(St. Louis, USA)のものを用いた。その他の試薬は特級品を使用した。

### (2) 電位差滴定

高分子濃度を 1.62%(w/v)とした試料溶液 50 mL を 0.1N 塩酸あるいは 0.1N 水酸化ナトリウムで滴定した。CMD 及び DS の溶液には水酸化ナトリウムを 0.1 mol/L 添加し、EA 及び CDC の溶液には塩酸を 0.1 mol/L 添加したのものを用いた。また対照液には高分子を含まない 0.1 mol/L の塩酸あるいは水酸化ナトリウム水溶液 50 mL を用いて同様に滴定した。測定には pH メータ(F-22、堀場、京都)を用いた。なお電位差滴定を行うにあたり、CMD 及び DS は陽イオン交換樹脂(Amberlite IRA400)を用いて Na 型を H 型に、EA 及び CDC は陰イオン交換樹脂(Amberlite IR-120)を用いて Cl 型を OH 型としたものを用いた。

### (3) 置換基の解離度

電位差滴定における対照液と試料溶液の滴定量の差を pH に対してプロットすることにより求めた。

### (4) 濁度の測定

所定の水素イオン濃度に調整した 0.05%(w/v)アニオン水溶液と 0.05%(w/v)カチオン水溶液の比率を変えて混合し、37°C で 30~60 分振とう後に 500 nm における吸光度を分光光度計(UV-1600、島津、京都)で測定し濁度とした<sup>20)</sup>。なおすべての水溶液に塩化ナトリウムを 20 mM 添加した。また塩化ナトリウム添加の影響を調べるためには、塩化ナトリウム濃度を 0、5、10、15、20 及び 30 mM とするほかは同様に行なった。

## 第2章 水溶性デキストラン誘導体混合物の粘膜炎着性

高分子素材の持つ粘膜炎着性に関する研究は数多くあり<sup>21-25)</sup>、合成高分子ではカーボポール、ポリカーボフィル、天然高分子ではカルボキシメチルセルロース、キトサンなどがよく研究されている。またその手法としては、固体試料を扱う張力試験、溶液系で高分子とムチンの相互作用を評価する粘度試験や濁度試験など多岐に渡るが、標準として確立された手法はない。そのなかで張力試験は、化学的な相互作用だけでなく機械的な力も検出することができ最も汎用されている方法である。本研究では、固形製剤としての応用を視野に入れてこの方法を用いた。

モデル粘膜炎としては、家兎の胃粘膜炎やラット腸管粘膜炎などが多用されているが、均一なものを得ることが難しくデータのばらつきが大きい<sup>26)</sup>。そこで我々は簡便かつ再現性良く粘膜炎着性を比較検討する方法として、ブタ胃粘膜炎から精製されたムチンを用いる方法<sup>27)</sup>を採用した。また粘膜炎着性が広く認められている高分子として、カーボポール934P(CP)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、キトサン(CS)を対照として用い粘膜炎着力の指標とした。

本研究では、in vitro における粘膜炎着性を圧縮成型物の形で評価することを目的とした。まず始めに個々の水溶性デキストラン誘導体を単独で用いた場合の粘膜炎着力を評価し、次いで反対荷電をもつ2種類の水溶性デキストラン誘導体の混合物について、ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせ、混合比率および環境因子であるpHとイオン強度の影響について検討した。また同じ誘導体で分子量の異なるものを用いて、粘膜炎着力に及ぼす分子量の影響についても検討した。

## 第1節 水溶性デキストラン誘導体の粘膜付着性

4種類の水溶性デキストラン誘導体、即ち CMD、DS、EA および CDC について、それぞれを単独で用いた場合の付着力を対照と比較した。対照にはアニオン性の粘膜付着性高分子として CP を、中性のものとして HPC を、カチオン性のものとして CS を用いた。Figure 2-1 に pH1.2 イオン強度 0.2 mol/L および pH6.8 イオン強度 0.2 mol/L に調整した緩衝液を用いたときの付着力を示す。対照として用いた高分子の中では、CP が最も大きな付着力を示し、次いで HPC、CS の順であった。CS と CP の間には有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。いずれの高分子においても、pH による付着力の差に有意差は認められなかった。一方、pH1.2 条件下の CDC を除いたすべての水溶性デキストラン誘導体の付着力が CS の付着力より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また CP と比較してすべての水溶性デキストラン誘導体の付着力は有意差がなく同等の値を示した。CP は付着力の強い高分子として広く認識されている高分子であり、これと有意差がなく同等であることから、水溶性デキストラン誘導体も有用な粘膜付着性高分子であると考えられる。

また 4 種類の水溶性デキストラン誘導体の中では、pH6.8 条件下の CMD と CDC の間に有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められたが、その他では認められなかった。いずれの水溶性デキストラン誘導体においても、pH の違いによる有意な変化は見られなかった。

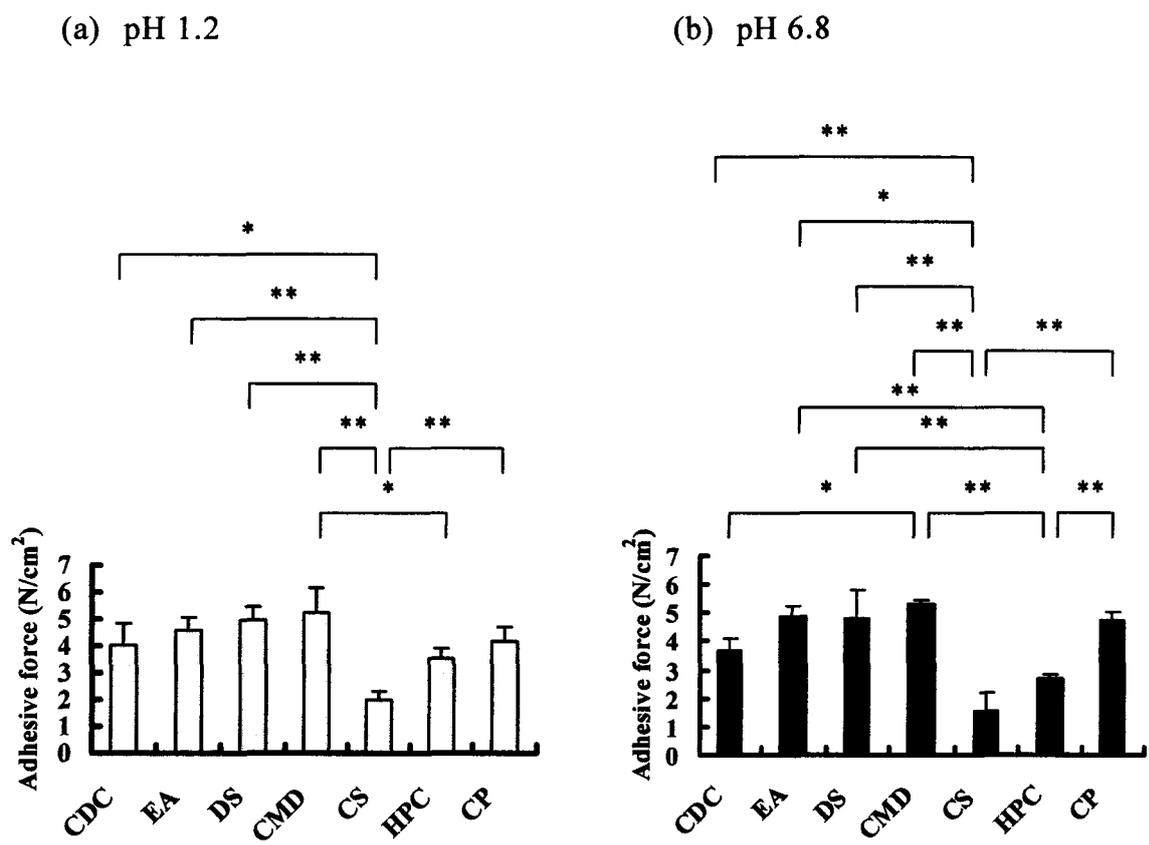


Figure 2-1. Comparison of adhesive force of the polymer tablets ( $n = 3$ , mean  $\pm$  S.D.).  
Significant difference, \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

## 第2節 物理混合物の粘膜炎着性

反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体を組み合わせて調製した物理混合物の付着試験の結果を Figure 2-2 に示す。CMD/EA および CMD/CDC 系の高分子電解質複合体形成反応は、pH1.2 では CMD が解離しないため起こらず、pH6.8 では混合比 35:65 のとき極大を示す(第1章第2節)。しかし Figure 2-2 (a)をみると、付着力は pH あるいは混合比率の影響をほとんど受けていない。また CMD/EA と CMD/CDC の比較においても付着力に差がなく、カチオンの差による違いも見られなかった。DS/EA および DS/CDC 系の高分子電解質複合体形成反応は、pH1.2 と pH6.8 で差はなく、混合比 25:75 のとき極大を示す(第1章第2節)。Figure 2-2 (b)をみると、pH の付着力に及ぼす影響はほとんどなく、混合比の影響も見られなかった。また DS/EA 系と DS/CDC 系との間に有意な違いは見られなかった。以上のことから、水溶性デキストラン誘導体のポリアニオン、ポリカチオンの組み合わせ、混合比率、緩衝液の pH は、混合物の付着力に影響を及ぼさないことが分かった。

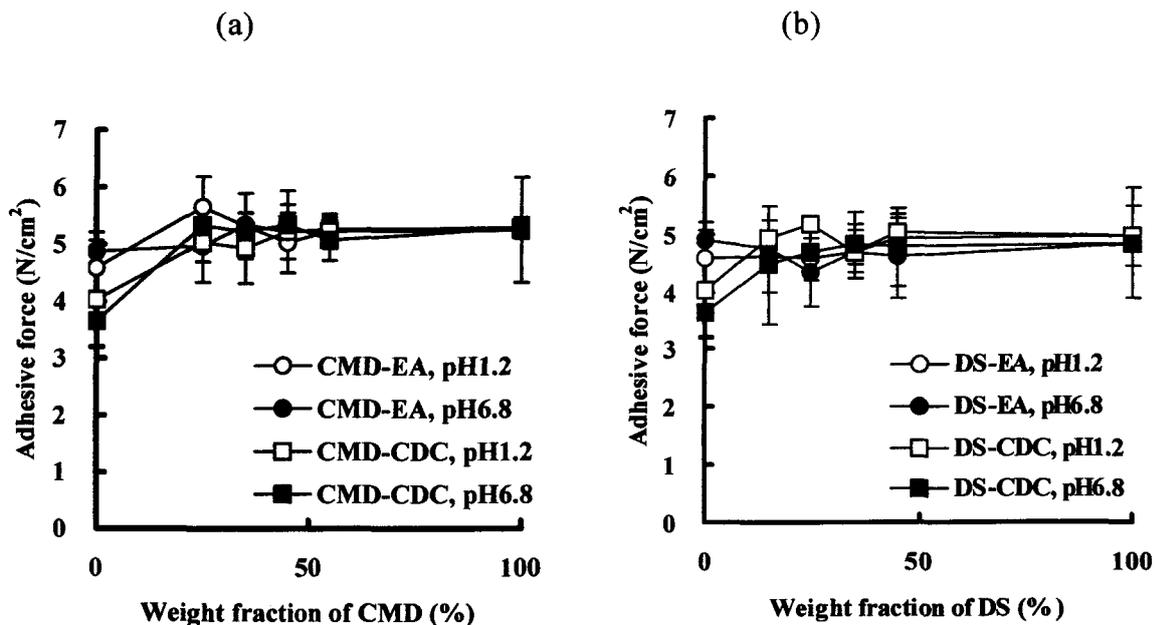


Figure 2-2. Influence of the mixing ratio on the adhesive force of the tablets prepared from oppositely charged dextran derivative mixture ( $n = 3$ , mean  $\pm$  S.D.).

(a) CMD-EA and CMD-CDC system, (b) DS-EA and DS-CDC system.

### 第3節 粘膜炎着機構

#### 第1項 pH およびイオン強度の影響

粘膜炎着機構は、まず粘膜炎着性物質と粘膜炎が密着し、次に分子鎖の相互侵入、絡み合い、化学的な相互作用が起こり、付着力を示すと考えられている<sup>28)</sup>。そして水素結合やファンデルワールス力などの化学的な相互作用が付着に関して大きな役割を果たしている場合、pH およびイオン強度の影響を受けると考えられている。Table 2-1 に混合物の付着力に対する水和に用いた緩衝液の pH とイオン強度の影響をまとめて示した。いずれの系においても pH、イオン強度の付着力に及ぼす影響は小さく、有意差は認められなかった。また pH あるいはイオン強度の影響に一定の傾向は見られなかった。このように pH およびイオン強度の影響が小さいことから、水溶性デキストラン誘導体の場合、付着における化学的な相互作用の寄与は小さいことが示唆された。

Table 2-1. Influence of pH and ionic strength on the adhesive force of mixture tablets (N/cm<sup>2</sup>).

pH	Ionic strength (mol/L)	CMD-EA	CMD-CDC	DS-EA	DS-CDC
		35:65	35:65	25:75	25:75
pH 1.2	0.2	5.31±0.57	4.92±0.62	4.56±0.36	5.18±0.11
	0.5	5.68±1.33	6.01±0.84	5.63±0.38	5.29±0.16
	0.8	5.05±1.12	5.16±0.13	5.55±0.42	5.06±0.26
pH 6.8	0.2	5.33±0.21	5.21±0.10	4.33±0.58	4.68±0.36
	0.5	4.99±0.15	4.96±0.16	5.38±0.47	5.09±0.29
	0.8	4.30±0.73	5.48±0.64	5.57±0.60	4.83±0.39

Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

## 第2項 接触時間の影響

次に接触時間の影響を調べた。Figure 2-3 は接触時間が付着力に及ぼす影響を示している。いずれの系においても、接触時間が長くなるに従い付着力が増加した。これは接触時間と共に分子鎖の相互侵入が進み、付着力が増加したものと考えられる。付着力の増加はポリアニオンの種類によって異なる傾向を示した。ポリアニオンに CDC を用いた系では接触時間の増加とともに付着力が増すのに対し、ポリアニオンに EA を用いた系では 120 秒値まで大きく増加し、その後はゆるやかに増加した。CDC 系と EA 系の間で、120 秒値 ( $p < 0.05$ )、240 秒値 ( $p < 0.01$ ) で各々有意差が認められた。

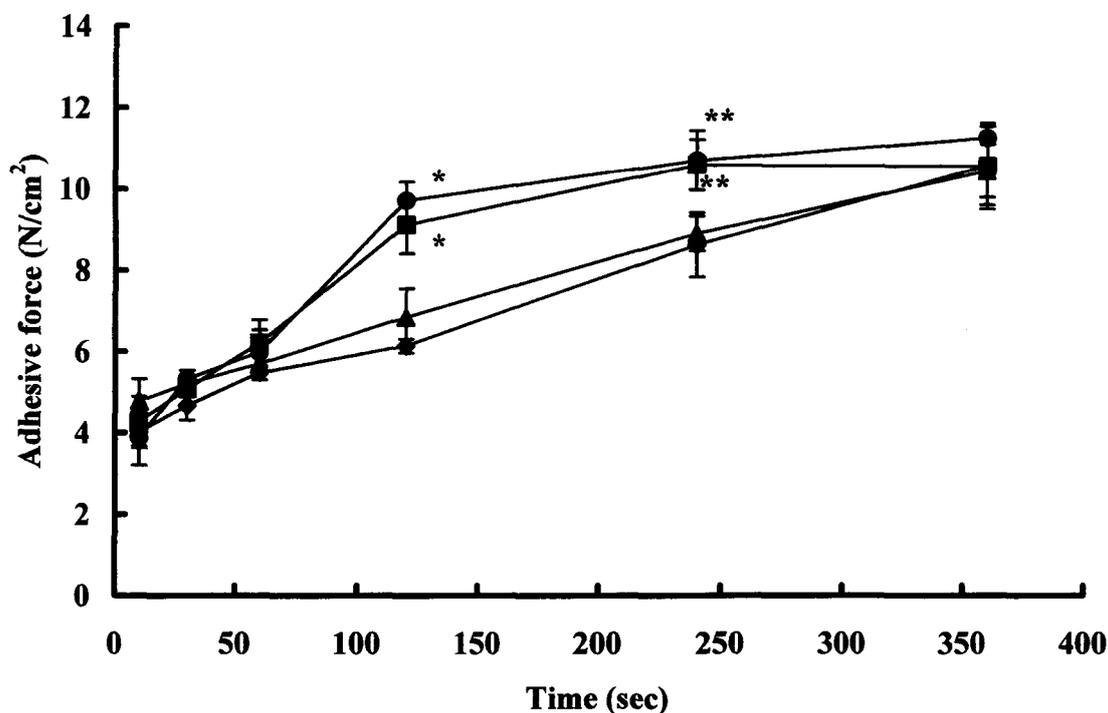


Figure 2-3. Influence of contact time on the adhesive force of mixture tablets ( $n = 3$ , mean  $\pm$  S.D.). Keys: ●, CMD/EA; ▲, CMD/CDC; ■, DS/EA; ◆, DS/CDC system. The asterisks represent significant differences from CMD/CDC and DS/CDC,  $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$ .

接触時間の影響をより詳細に検討するために、Figure 2-3 のデータを Vasenin の式<sup>29)</sup>により解析した。

$$\sigma(t) \sim t^\alpha \quad \text{Eqn 2-1}$$

ここで  $\sigma(t)$  は時間  $t$  秒のときの付着力、 $\alpha$  は指数を示し、その値は、付着力が接触時間の影響を受ける場合、0.25 から 0.5 の間となる。それぞれの系について求めた  $\alpha$  値を Table 2-2 にまとめて示す。ポリカチオンに EA を用いた場合、 $\alpha$  値は 0.25 から 0.5 の間の値を示した。ポリカチオンに CDC を用いた場合、 $\alpha$  値は 0.22、0.26 と EA 系より小さな値となった。このことからポリカチオンに EA を用いた系と CDC を用いた系では付着機構に差異があり、EA を用いた系の方が付着において相互侵入と絡み合いがより重要な役割をもつことが示唆された。

Table 2-2. Relationship between the adhesive force and contact time.

Sample name	Exponent	Correlation coefficient
CMD-EA	0.32	0.96
DS-EA	0.28	0.95
CMD-CDC	0.22	0.91
DS-CDC	0.26	0.93

The exponent is determined from the equation,  $\sigma(t) \sim t^\alpha$ .

### 第3項 分子量の影響

DS/CDC 系において、付着力に及ぼすデキストラン分子量の影響を検討した結果を Table 2-3 に示す。分子量の小さい DS および CDC を用いたものと中間の分子量のものでは、付着力に有意な差は認められなかった。しかし、分子量の大きな水溶性デキストラン誘導体を用いた圧縮成型物の付着力は、分子量の小さいものと比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に大きな値を示した。付着に関して化学的な相互作用の寄与が大きい場合、分子量の影響は余り大きくならないと考えられている<sup>29)</sup>。

一連の付着力測定の結果から、水溶性デキストラン誘導体混合物の付着機構においては、分子鎖の相互浸入、絡み合いが支配的であり、化学的な相互作用の寄与は小さいものと考えられた。

Table 2-3. Effect of molecular weight of dextran derivatives on the adhesive force of DS-CDC tablets.

	DS	CDC	Adhesive force (N/cm <sup>2</sup> )
Low	8,000	10,000	3.64 ± 0.37 *
Medium	50,000	40,000	3.47 ± 0.55 *
High	500,000	1,000,000	4.68 ± 0.36

Each value represents the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

\*  $p < 0.05$ , significantly different from result for high molecular weight.

## 第4節 本章のまとめ

水溶性デキストラン誘導体およびその物理混合物の粘膜付着性について、in vitro において検討を行い、次のような知見を得た。

- (1) 水溶性デキストラン誘導体の付着力は、pH1.2 条件下の CDC を除いて、CS の付着力より有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。またすべての水溶性デキストラン誘導体の付着力は CP と比較しては有意差がなく同等の値を示した。またその付着力に pH による差は見られなかった。
- (2) 混合物の付着力は、水溶性デキストラン誘導体のポリアニオンとポリカチオンの組み合わせおよび混合比率に影響されなかった。
- (3) 混合物の付着力に及ぼす pH およびイオン強度の影響は小さかった。またすべての混合物において、接触時間が長くなるに従い付着力が増加した。DS/CDC 系において、分子量の大きな水溶性デキストラン誘導体を用いた混合物の付着力は、分子量の小さいものと比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に大きな値を示した。これらの結果から、物理混合物の粘膜付着においては分子鎖の相互侵入および絡み合いが支配的であり、化学的な相互作用の寄与は小さいことが示唆された。
- (4) ポリカチオンに EA を用いた系と CDC を用いた系では付着機構に差異があり、EA を用いた系の方が付着において分子鎖の相互侵入と絡み合いがより重要な役割をもつことが示唆された。

一連の付着力測定の結果から、反対荷電を有する水溶性デキストラン誘導体の物理混合物は CP と同等の付着力を示し、製剤素材として用いる際、粘膜付着性という新たな機能を持つことが示された。

## 第5節 実験の部

### (1) 試薬

CMD (Mw 1,000,000)、CDC (Mw 10,000、40,000、1,000,000)、EA (Mw 500,000)、および DS (Mw 8,000、50,000、500,000)は、第1章と同じものを用いた。CP は BF グッドリッチ製 (Ohio, USA)、HPC (type H) は日本曹達製 (東京)、CS (type H) はアルドリッチ製 (St. Louis, USA)、ムチン (type III) はシグマ製 (St. Louis, USA) を用いた。その他の試薬は特級品を使用した。

### (2) 圧縮成型物の調製

試料高分子を、IR プレス (島津、京都) を用いて、 $25 \text{ kgf/cm}^2$  の圧力で 30 秒間圧縮することにより直径 8 mm、質量 150 mg の円柱型の圧縮成型物を調製した。分子量の影響を調べる実験以外は、すべて分子量の大きい誘導体を用いた。付着に用いる平面の面積は  $0.50 \text{ cm}^2$  であった。

### (3) ムチンディスクの調製

プラスチック製の円盤に直径 20 mm の円形のろ紙を接着剤で貼り、その上に 10% ムチン懸濁液 0.32 mL を流延し、表面が平らになるようにして静置した。付着試験には室温に 6 時間静置したものを用いた。ムチン層の厚さは  $96 \pm 23 \mu\text{m}$  で質量は  $41 \pm 2.3 \text{ mg}$  であった (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 5$ )。

### (4) 付着試験

付着試験は、Figure 2-4 に示すようにレオメータ (NRM2002D.D、不動工業、東京) を用いて行った。圧縮成型物(6)を、可動試料台(8)に固定したプラスチック製のプラットホーム(7)に瞬間接着剤を用いて固定し、ムチンディスク(2,3,4)はそれと向き合ったプローブ(1)に、ムチン層(4)が下になるように両面テープを用いて固定した。圧縮成型物の上面に緩衝液(5)  $40 \mu\text{L}$  を載せ、60 秒間放置した後、圧縮成型物とムチンディスクを  $1.96 \text{ N/cm}^2$  の力で接触させた。30 秒後に両者を  $20 \text{ mm/min}$  の速度で引き離し、そのときに必要な力を測定し付着力とした。測定は繰り返し 3 回行った。

用いた緩衝液の pH は 1.2 と 6.8 であり、イオン強度は塩化ナトリウムを添加する

ことにより、0.2、0.5 および 0.8 mol/L に調整した。接触時間の影響を調べる実験では、圧縮成型物とムチンディスクを接触させた後、所定の時間が経過してから引き離した。そのほかの操作はすべて同様に行った。

(5) データ処理

付着力の差の検定は一元配置分散分析法により行い、Tukey の方法を用いて多重比較を行った。

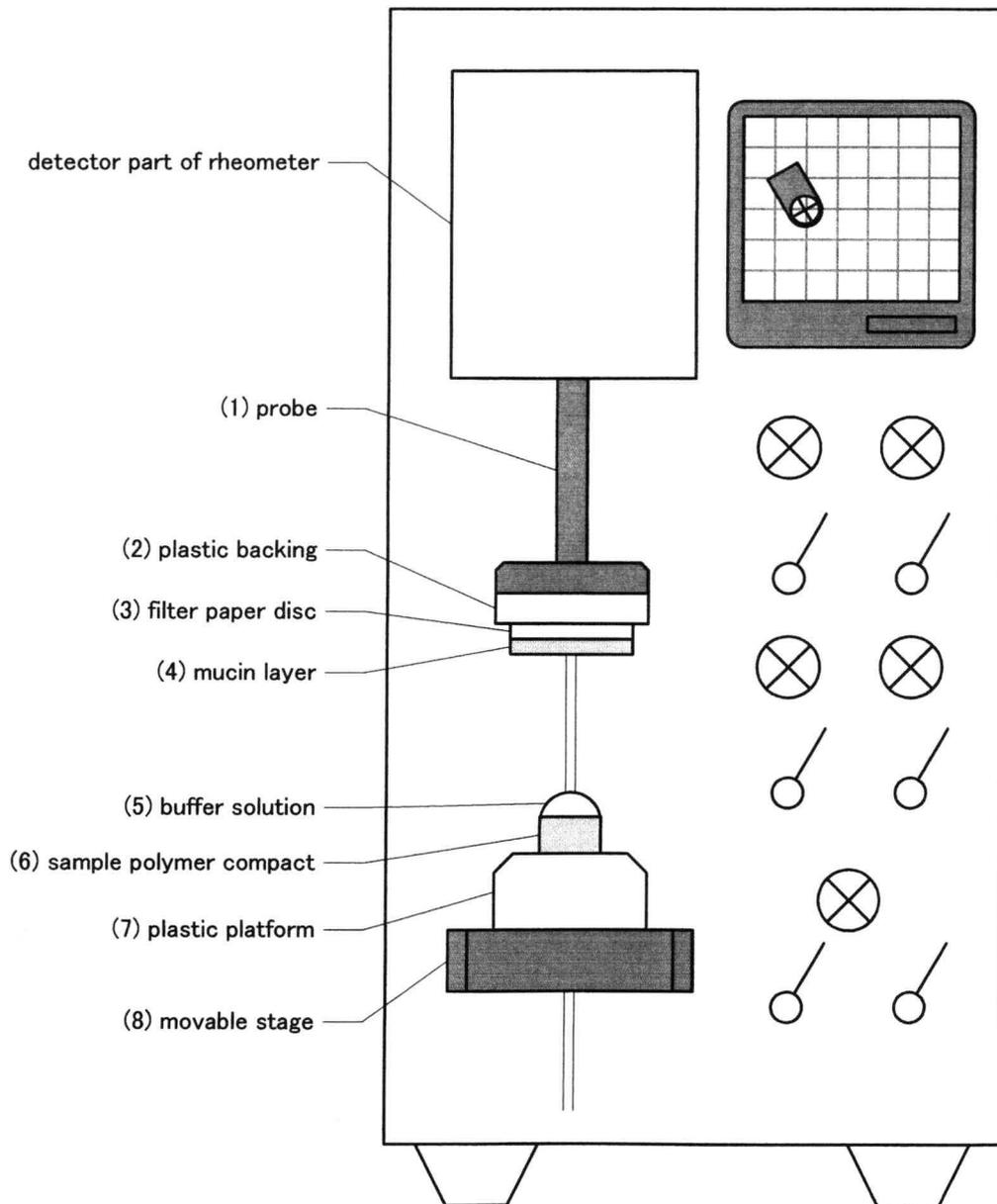


Figure 2-4. Schematic representation of experimental setup for determination of adhesive force.

### 第3章 マイクロスフェアからの薬物放出挙動

水溶性デキストラン誘導体を、そのままの形で経口投与製剤の素材として使用した例は少ない。CMD を錠剤の賦形剤に用いた例<sup>30-33)</sup>が見られるに留まる。これは水溶性デキストラン誘導体が消化管液に速やかに溶解し、速やかな薬物放出が起こるので放出制御型製剤への応用が難しいためと考えられる。こうした問題を解決する方法の1つとして、デキストラン鎖をエピクロルヒドリン等を用いて化学的に架橋する方法<sup>6)</sup>がある。しかし残留した架橋剤によって予期せぬ副作用が発生する可能性があり、医薬品には適さない。そこで本研究では薬物溶出中に高分子電解質複合体を形成し、架橋されたマトリックスを作る物理混合物を製剤素材とする方法<sup>34)</sup>を選択した。しかし微粒子製剤へ応用する場合、表面積が大きいため物理混合物とするだけで放出を抑制することは困難である。そこで物理混合物が作る親水性マトリックスを強固に保ち形状を保持するために、疎水性高分子マトリックスを利用したハイブリッドマイクロフェアの調製を試みた。

即ち本章においては、親水性マトリックスとして水溶性デキストラン誘導体の物理混合物、疎水性マトリックスとしてセルロースアセテートブチレート(CAB)を用いたマイクロフェアを調製した。さらにモデル薬物としてテオフィリンを用い、薬物放出挙動に影響を与える因子について検討した。

## 第1節 マイクロスフェアの調製

マイクロスフェアの調製は油中乾燥法<sup>35)</sup>によって行った。即ち、CABを溶解したアセトン15 mL中にテオフィリンおよび水溶性デキストラン誘導体を分散させ、この懸濁液をシヨ糖脂肪酸エステル(DK F-10) 0.75 gを分散させた流動パラフィン150 mL中に攪拌下投入しエマルションを形成させ、その後加温することによりアセトンを留去しマイクロスフェアを調製した。

ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせを異にする水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を親水性マトリックスとして用いることにより、4種類のマイクロスフェアを調製した。調製したマイクロスフェアの処方と回収率、粒子径、薬物含量をTable 3-1に示した。マイクロスフェアの組成は、テオフィリン20%、CAB25%、水溶性デキストラン誘導体55%とした。またポリアニオンとポリカチオンの混合比は複合体形成量が極大となる混合比、即ちCMD/EA-MSおよびCMD/CDC-MSにおいては35:65、DS/EA-MSおよびDS/CDC-MSにおいては25:75とした。いずれのマイクロスフェアにおいても良好な回収率と薬物含有率が得られた。また平均粒径はおよそ1,000  $\mu\text{m}$ であった。4種類のマイクロスフェアの表面と断面のSEM写真をFigure 3-1に示した。表面写真から、マイクロスフェアは表面に大きな凹みを持つものの、いずれもほぼ球形であることがわかった。また断面写真からは、マイクロスフェアがモノリス型の構造を持つことがわかった。

Table 3-1. Particle characteristics of microspheres prepared from various combinations of polyanions and polycations.

Sample name	CAB (g)	TH (g)	CMD (g)	DS (g)	EA (g)	CDC (g)	Yield (%)	Mean diameter ( $\mu\text{m}$ )	Drug content* % (w/w)
CMD/EA-MS	1.5	1.2	1.155	—	2.145	—	99.1	1,005	19.5 $\pm$ 0.7
CMD/CDC-MS	1.5	1.2	1.155	—	—	2.145	98.7	1,015	18.9 $\pm$ 1.8
DS/EA-MS	1.5	1.2	—	0.825	2.475	—	97.6	1,001	20.6 $\pm$ 0.8
DS/CDC-MS	1.5	1.2	—	0.825	—	2.475	96.8	1,028	20.2 $\pm$ 1.3

\* The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

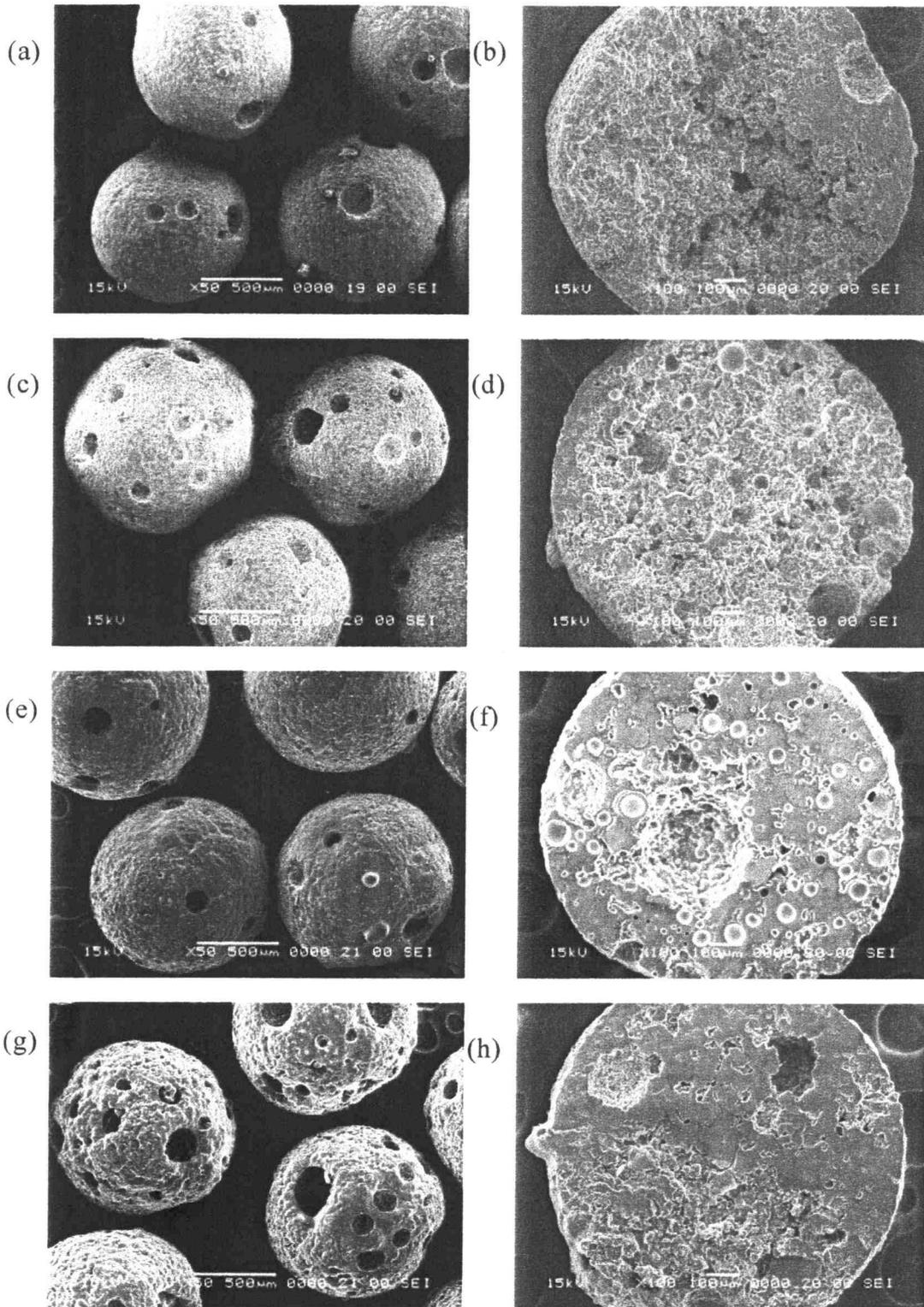


Figure 3-1. Scanning electron micrographs of microspheres (a, c, e, g) and their cross-sections (b, d, f, h). Key: (a and b), CMD/EA-MS; (c and d), CMD/CDC-MS; (e and f), DS/EA-MS; (g and h), DS/CDC-MS.

## 第2節 ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせによる影響

前節において調製した4種類のマイクロスフェアからの薬物放出挙動について検討した。Figure 3-2 に、放出液に日本薬局方 XIV 崩壊試験法第1液および第2液を用いたときの、各マイクロスフェアからのテオフィリンの放出曲線を示した。CMD/EA-MS および CMD/CDC-MS からのテオフィリンの放出は、いずれの放出液中においても速く、4時間後にほぼ100%放出した。一方、DS/EA-MS および DS/CDC-MS においては放出が抑制され、100%放出するまでに8時間を要した。4種類のマイクロスフェア間の相違をより鮮明とするため、各マイクロスフェアからのテオフィリンの平均溶出時間 (MDT, mean dissolution time)<sup>36)</sup>を算出し Figure 3-3 に示した。いずれの放出液においても DS/EA-MS がもっとも大きな MDT を示した。

薬物放出に及ぼす放出液の pH の影響を明らかとするために、各マイクロスフェアごとに第1液と第2液での放出曲線を、次式において定義される similarity factor ( $f_2$ )<sup>37)</sup>を用いて検討した。

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{Eqn 3-1}$$

ここで、 $R_t$ は  $t$ 時間後の対照製剤の放出率、 $T_t$ は  $t$ 時間後の被験製剤の放出率、 $n$ は測定点の総数を示す。similarity factor はすべての測定点での放出速度の類似性を評価するもので、薬物放出モデルに依存せずに放出曲線を特徴付けることができる<sup>38)</sup>。なお  $f_2$  は 0 から 100 までの値をとり、 $50 \leq f_2 \leq 100$  のとき2つの放出曲線が類似していることを示す。DS/EA-MS および DS/CDC-MS の  $f_2$  はそれぞれ 58.0 および 70.4 であり、第1液と第2液中での放出曲線は類似していた。このことから、DS/EA-MS および DS/CDC-MS からの薬物放出は pH 非依存的事であることが示唆された。一方、CMD/EA-MS および CMD/CDC-MS の  $f_2$  はそれぞれ 40.8 および 49.7 であり、その薬物放出挙動は pH の影響を受けることが示唆された。これは DS が強電解質であり、EA および CDC がカチオン性高分子であることから、いずれの放出液中においても十分に電離し、複合体形成反応が同じように行われたのに対し、CMD は弱電解質であり、

第1液中では十分に解離せず複合体形成反応が進まなかったためと考えられる。

以上のように水溶性デキストラン誘導体の組み合わせにより、薬物放出挙動が異なることが示された。

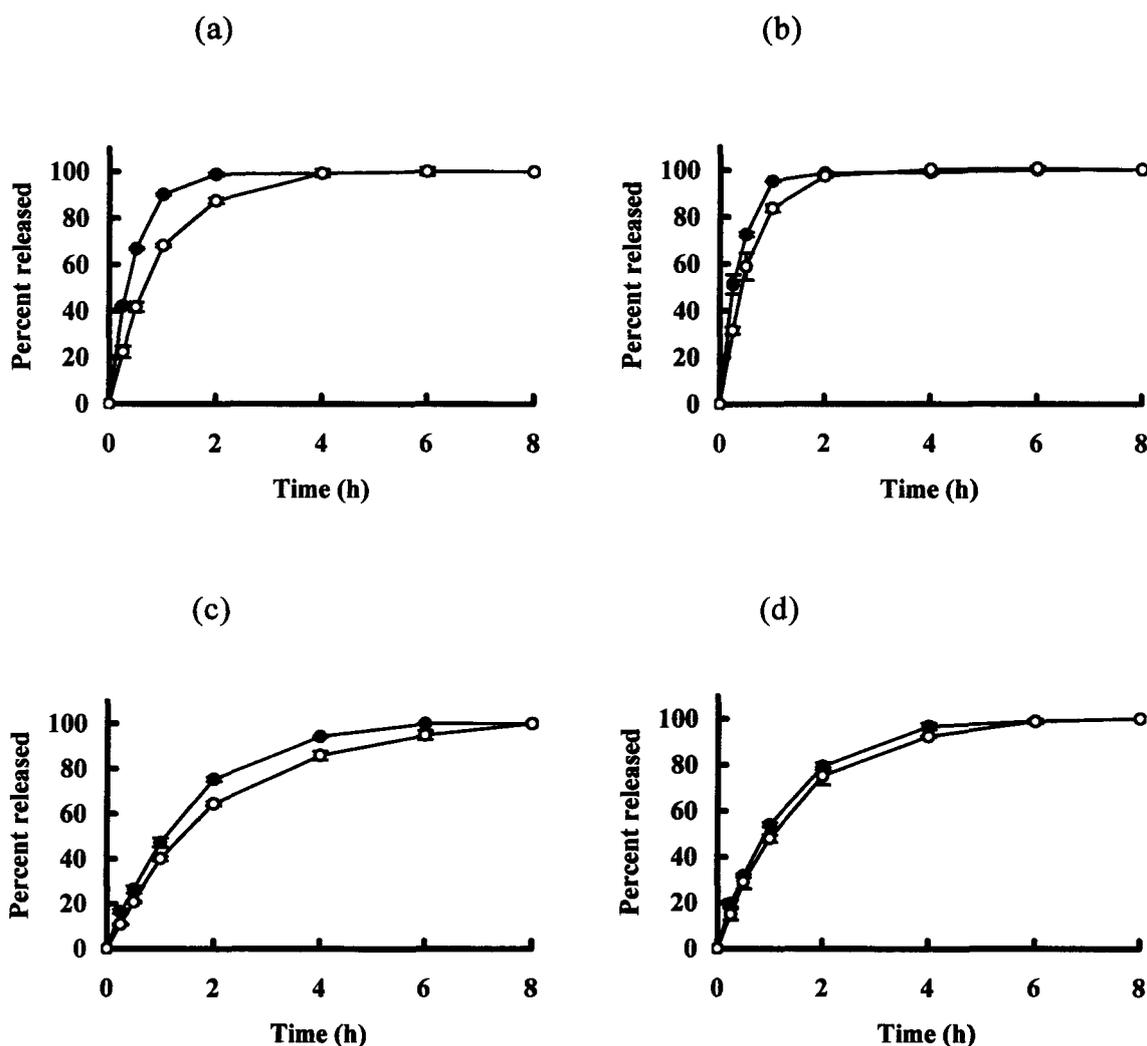


Figure 3-2. Drug release profiles from microspheres. The experiments were performed using the JP XIV 1st (●) and 2nd fluid (○) at 37°C. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Key: (a) CMD/EA-MS, (b) CMD/CDC-MS, (c) DS/EA-MS, (d) DS/CDC-MS.

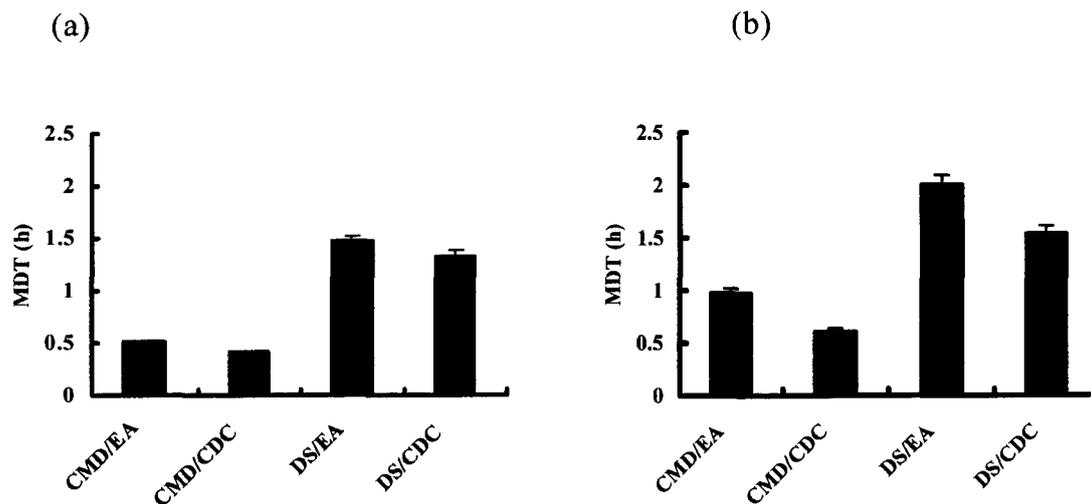


Figure 3-3. Comparison of MDT of TH from microspheres prepared from various combinations of polyanions and polycations. Data shown are the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Key: (a) JP XIV 1st fluid, pH1.2, (b) JP XIV 2nd fluid, pH6.8.

### 第3節 ポリアニオンとポリカチオンの混合比による影響

ポリアニオンとポリカチオンの混合比が薬物放出に及ぼす影響について、DS/CDC系を用いて検討した。調製したマイクロスフェアの処方と回収率、粒子径、薬物含量をTable 3-2に示した。マイクロスフェアの組成は、すべてテオフィリン 20%、CAB 25%、水溶性デキストラン誘導体 55%とした。またポリアニオンとポリカチオンの混合比は0:100、15:85、25:75、35:65、100:0とした。マイクロスフェアの回収率および薬物含量は良好であり、粒子径はほぼ同じで、DS/CDCの混合比の違いによる影響は小さかった。

Table 3-2. Effect of DS/CDC mixing ratio on yield and particle characteristics of microspheres.

Sample	CAB (g)	TH (g)	DS (g)	CDC (g)	DS/CDC ratio	Yield (%)	Mean diameter ( $\mu\text{m}$ )	Drug content* % (w/w)
M1	1.5	1.2	—	3.3	0:100	95.2	1,016	21.1 $\pm$ 1.0
M2	1.5	1.2	0.165	2.805	15:85	96.5	1,091	20.6 $\pm$ 2.8
M3	1.5	1.2	0.825	2.475	25:75	96.8	1,028	20.2 $\pm$ 1.3
M4	1.5	1.2	1.155	2.145	35:65	95.5	1,057	20.6 $\pm$ 1.5
M5	1.5	1.2	3.3	—	100:0	88.8	938	22.0 $\pm$ 1.5

\* The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

DS/CDC の比率の変化が薬物放出に及ぼす影響を評価するため、各マイクロスフェアからのテオフィリンの MDT を測定し、その結果を Figure 3-4 に示した。M3 からの MDT がもっとも大きな値を示し、テオフィリンの放出が強く抑制されていることが認められた。DS/CDC 系において 25:75 は複合体形成量が極大を示す混合比であり、複合体の形成が MS からの薬物放出に大きな影響を及ぼすことが示された。

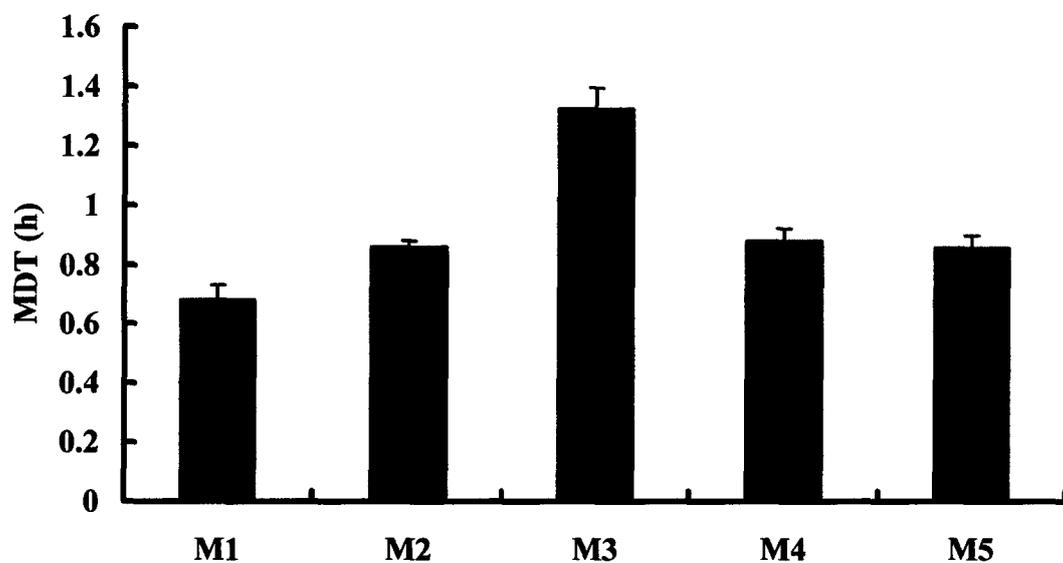


Figure 3-4. Influence of the DS/CDC mixing ratio on MDT of TH from microspheres. Data shown are the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

#### 第4節 水溶性デキストラン誘導体含有量による薬物放出制御

マイクロスフェア中の親水性マトリックスと疎水性マトリックスの比率が薬物放出に及ぼす影響について検討した。調製したマイクロスフェアの処方と回収率、粒子径、薬物含量を Table 3-3 に示した。マイクロスフェア中の薬物量は 20% で一定とし、水溶性デキストラン誘導体と CAB の比率は 3:5 から 19:5 まで変化させた。3:5 よりも水溶性デキストラン誘導体の比率を減少させると、マイクロスフェアを得ることができなかった。親水性マトリックスの比率が増すと、回収率が向上し、平均粒子径が大きくなった。分散相の薬物と高分子との比率が変化すると、最終的に得られるマイクロスフェアの粒子径も変化すると報告されている<sup>39)</sup>。本研究においても、水溶性デキストラン誘導体が増えることにより分散相の粒径が大きくなり、その結果マイクロスフェアの粒子径が大きくなったものと推察される。

Table 3-3. Effect of hydrophilic/hydrophobic polymer ratio on particle characteristics of microspheres.

Hydrophilic/ hydrophobic ratio	CAB (g)	TH (g)	DS/CDC (g)	Yield (%)	Mean diameter ( $\mu\text{m}$ )	Drug content* % (w/w)	Formation
3:5	1.5	0.6	0.9	78.4	559	21.0 $\pm$ 1.0**	A1
5:5	1.5	0.75	1.5	77.7	999	25.8 $\pm$ 1.3	A1.5
7:5	1.5	0.9	2.1	84.9	964	25.0 $\pm$ 1.2	A2
11:5	1.5	1.2	3.3	96.8	1,028	20.2 $\pm$ 1.3	A3
15:5	1.5	1.5	4.5	98.3	1,049	18.6 $\pm$ 0.7	A4
19:5	1.5	1.8	5.7	99.7	1,081	19.5 $\pm$ 0.2	A5

\*The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

\*\*The microspheres are sieved at 500-600  $\mu\text{m}$ .

Figure 3-5 に各マイクロスフェアからのテオフィリンの放出曲線を示す。親水性マトリックスの比率の低い、A1 からの薬物放出がもっとも抑制された。親水性マトリックスの比率が増すにつれて放出が速まり、A5 からのテオフィリンの放出率は4 時間でほぼ 100% となった。

マイクロスフェア中の親水性マトリックスと疎水性マトリックスの比が各マイクロスフェアからの MDT に及ぼす影響を Figure 3-6 に示した。親水性マトリックスの比率が増すに従って、MDT が直線的 ( $r^2 = 0.97$ ) に減少した。これはテオフィリンの放出が主に親水性マトリックスを通して行われるためと考えられる。この結果から薬物放出速度が親水性マトリックスと疎水性マトリックスの比により、調節できることが示唆された。

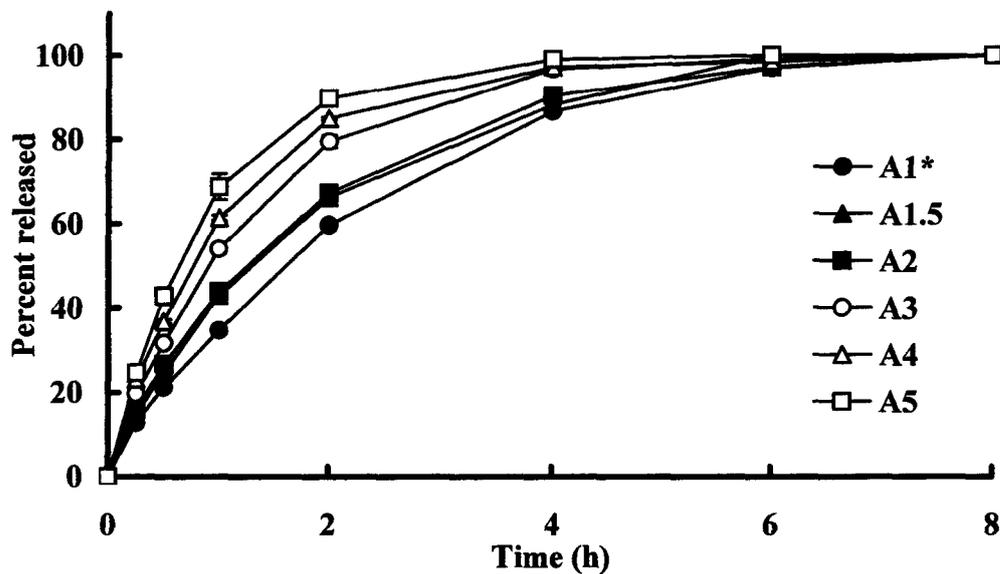


Figure 3-5. Drug release profiles from microspheres consisting of DS/CDC. The experiments were performed using the JP XIV 1st fluid, pH1.2, at 37°C. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). \* Microspheres sieved at 500-600  $\mu$ m.

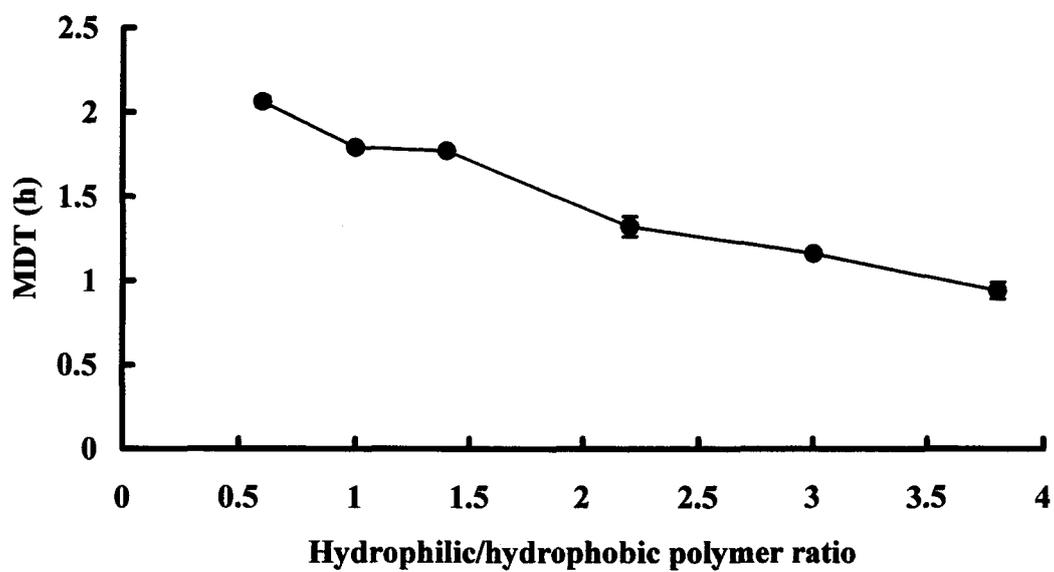


Figure 3-6. Influence of hydrophilic/hydrophobic polymer ratio on MDT in DS/CDC system. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

## 第5節 本章のまとめ

水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を親水性マトリックスとし、CAB を疎水性マトリックスとしたマイクロスフェアを調製した。さらにテオフィリンをモデル薬物として用い薬物放出挙動に影響を与える諸因子について検討した結果、次のような知見を得た。

- (1) 水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を親水性マトリックスとし、CAB を疎水性マトリックスとしたハイブリッドマイクロスフェアを油中乾燥法により調製することができた。マイクロスフェアはほぼ球形で、モノリス型の構造を示した。
- (2) ポリアニオンとポリカチオンの組み合わせを異にする水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を親水性マトリックスとして用いた 4 種類のマイクロスフェアの中で、DS/EA-MS からの薬物放出がもっとも抑制された。また、DS/EA-MS および DS/CDC-MS からの薬物放出は第 1 液と第 2 液で変化しなかった。
- (3) DS/CDC 系を用いて、ポリアニオンとポリカチオンの混合比が薬物放出に及ぼす影響について検討した結果、複合体形成量が極大を示す混合比において MDT がもっとも大きな値を示した。このことから複合体の形成がマイクロスフェアからの薬物放出に大きな影響を及ぼすことが示された。
- (4) マイクロスフェア中の薬物比率を一定とし、水溶性デキストラン誘導体と CAB の比率を変化させることにより、薬物放出を制御できることがわかった。

以上より、水溶性デキストラン誘導体の物理混合物が薬物放出試験中に複合体を形成することにより、DS/EA および DS/CDC 系では pH に依存しない優れた徐放性を示し、有用な放出制御製剤であることが示された。

## 第6節 実験の部

### (1) 試料

CMD (Mw 1,000,000)、CDC (Mw 1,000,000)、DS (Mw 500,000)、EA (Mw 500,000)は第1章と同じものを用いた。テオフィリンはシグマ製 (St. Louis, USA)を用いた。以上の試料は 100-mesh で篩過後(150  $\mu$ m 以下)を使用した。CAB (Mw 30,000)はフルカ製 (Buchs, Switzerland)を、ショ糖脂肪酸エステル (DK F-10)は第一工業製薬製(京都)を、流動パラフィン(日本薬局方)を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

### (2) マイクロスフェアの調製

CAB を溶解したアセトン溶液 15 mL にテオフィリンおよび水溶性デキストラン誘導体を分散した液を、ショ糖脂肪酸エステルを 0.5%含有する流動パラフィン 150 mL 中に、20℃、攪拌下(300 rpm)注いだ。大気圧下で攪拌を続け、エマルジョンを形成させた。30分後加温を開始し 50℃に達した後、アセトンを留去するためにさらに 30分間 50℃を維持した。その後 20℃まで冷やし、静置後デカンテーションした。マイクロスフェアを 50 mL のヘキサンを用いて 3回洗浄し、減圧下室温で乾燥させた。

### (3) 粒子径の測定

平均粒子径はふるい法によって求めた。即ち、日本薬局方のふるいを用い、電磁振動ふるい器 (M-2 形、筒井理化学器械、東京)で 3分間ふるった後、各ふるい上のマイクロスフェアの重量を測定することにより重量平均粒子径を求めた。以下の実験では粒子径 1,000-1,180  $\mu$ m のマイクロスフェアを試料とした。

### (4) 薬物含量の測定

およそ 10 mg のマイクロスフェアを精密に秤量し、塩化メチレン 50 mL に投入した。室温で 30分間超音波 (85W、AU-25C 型、アイワ医科工業、東京)処理し、メンブランフィルター (0.2  $\mu$ m) でろ過後、274 nm の吸光度を測定することにより薬物濃度を求めた。

### (5) SEM 写真

金を蒸着後、走査電子顕微鏡(JSM-5600LV、日本電子、東京)で観察した。

(6) 薬物放出試験

放出試験は日本薬局方 XIV 溶出試験法第 2 法(パドル法)に準じて、第 1 液および第 2 液 900 mL を用いて、液温  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、回転数 100 rpm で行った。試験開始後所定の時間に放出液 5 mL を採取し、メンブランフィルター( $0.45 \mu\text{m}$ )でろ過して試料溶液とした。なお採取後直ちに同温同量の放出液を補充した。試料溶液中のテオフィリン濃度は、274 nm における吸光度を測定しあらかじめ作成した検量線から求めた。また試験は 3 回繰り返して行った。

## 第4章 マイクロスフェアの消化管内挙動の解析

徐放性製剤において、通常の製剤と比較して内包された薬物のバイオアベイラビリティが低下する事例が報告されている<sup>40)</sup>。これは薬物の放出時間に対して吸収部位における滞留時間が短いために起こるものと考えられている。したがって、徐放性マイクロスフェアに粘膜付着機能を付与することは、マイクロスフェアと吸収部位の粘膜との接触時間の延長をもたらし、薬物の吸収速度あるいは吸収量の改善につながるものと期待される。秋山ら<sup>41)</sup>は、吸収部位が上部消化管に限定されるフロセミドあるいはリボフラビンを含む粘膜付着性マイクロスフェアを作製し、そのバイオアベイラビリティが向上したと報告している。

第2章において示したように、水溶性デキストラン誘導体の物理混合物は優れた粘膜付着性を持っている。したがって水溶性デキストラン誘導体を組み込んだ製剤においては粘膜付着性を有する可能性が考えられる。そこで本章では、第3章において開発したマイクロスフェアの粘膜付着性について検討した。始めにラット反転腸管を用いて *in vitro* で検討し、次いでラットに経口投与後の消化管内分布について検討した。さらに消化管内残留データをモデル解析することにより、消化管内でのマイクロスフェアの移動挙動について検討した。

本章においては、水溶性デキストラン誘導体として DS と EA の混合物を用いて製したマイクロスフェアを使用した。

## 第1節 in vitro 水和挙動

Table 4-1 に本章で用いたマイクロスフェアの処方と回収率、平均粒子径および薬物含量を示す。すべてのマイクロスフェアは 40%の疎水部 (CAB) と 60%の親水部 (テオフィリンおよび水溶性デキストラン誘導体) からなっている。対照として調製した MS には、水溶性デキストラン誘導体の代わりに、粘膜付着性を持たない乳糖 (Lac) を用いた。MS-1, MS-2 および MS-3 は粘膜付着性をもつ水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を、それぞれ 50%、40% および 30% 配合した。DS/EA の混合比は、高分子電解質複合体形成量が極大を示す混合比である 1:3 に固定した。Table 4-1 に示すように、平均粒子径は 612-718  $\mu\text{m}$  の範囲にあり、薬物含有率は仕込み量より若干多かった。平均粒子径は DS/EA の含有量にほとんど影響されなかった。

Table 4-1. Formulation and characterization of microspheres.

Sample	CAB (g)	TH (g)	Lac (g)	DS (g)	EA (g)	Yield (%)	Mean diameter ( $\mu\text{m}$ )	Drug content % (w/w) <sup>a</sup>
MS	1.0	0.75	0.75	—	—	82.5	612	30.8 $\pm$ 1.5
MS-1	1.0	0.25	—	0.313	0.937	80.6	673	12.4 $\pm$ 0.3
MS-2	1.0	0.5	—	0.25	0.75	78.9	650	23.9 $\pm$ 1.5
MS-3	1.0	0.75	—	0.188	0.562	77.0	718	32.1 $\pm$ 2.0

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

マイクロスフェアが水と接触後どのような変化を示すのかを CCD カメラを用いて観察した。水に接触して1分および5分後のマイクロスフェアの写真を Figure 4-1 に示した。1 分後、マイクロスフェアの表面に小さな突起が現れ、5 分後には突起が大きくなりマイクロスフェアの外に大きく広がった。その程度は、MS-3、MS-2、MS-1 の順に大きくなった。この突起はマイクロスフェア表面に到達している水溶性デキストラン誘導体の一部が、水和し膨潤したためにマイクロスフェアの外側に突き出てきたものと思われる。これは CP とポリグリセロール脂肪酸エステルで製した粘膜付着性マイクロスフェアで観察された現象<sup>42)</sup>と類似していた。対照の MS ではこのような変化は観察されなかった。

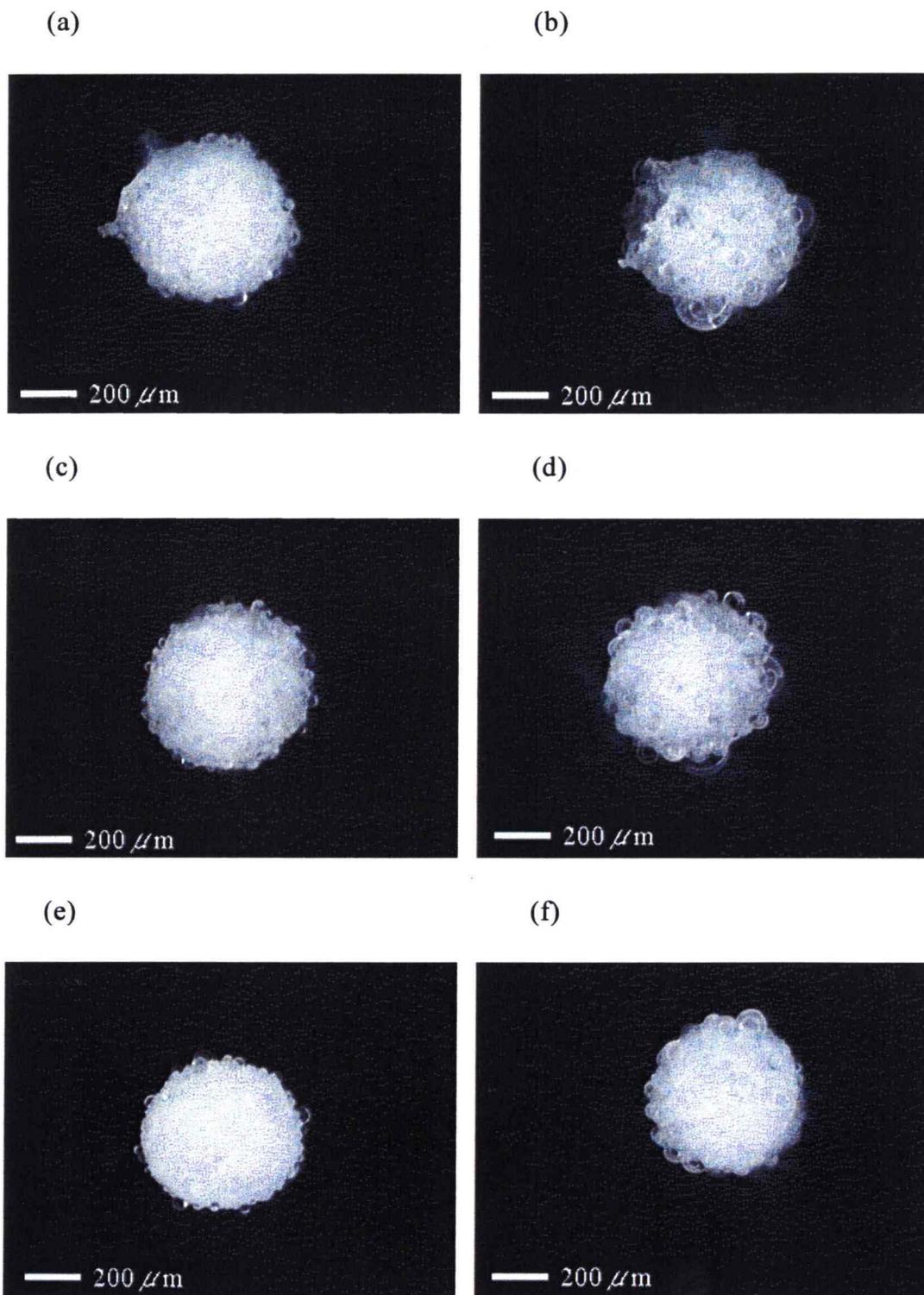


Figure 4-1. Photographs of microspheres 1 min (a, c, and e) and 5 min (b, d, and f) after contact with water. (a and b) MS-1, (c and d) MS-2, (e and f) MS-3.

## 第2節 in vitro 粘膜付着性

マイクロスフェアの粘膜付着性をラットの反転腸管を用いて検討した。反転腸管法は実験が容易で汎用性がある<sup>43)</sup>。さらに一定時間ごとに粘膜付着率を測定することにより、経時変化を追うことができる。Figure 4-2 に Table 4-1 に示したマイクロスフェアの粘膜付着試験の結果を示す。Figure 4-2 に示すように、MS-3 および MS では速やかに脱着が起こり、1 時間後それぞれ 50% および 41% であった。一方、MS-1 および MS-2 では脱着は緩やかに起こり、1 時間後の付着率はそれぞれ 79% および 76% を示した。MS と MS-1 ( $p < 0.01$ ) および MS と MS-2 ( $p < 0.05$ ) の間に有意差が見られた。以上のことから、マイクロスフェア中の水溶性デキストラン誘導体含量が粘膜付着性に影響することが示された。MS-1 および MS-2 においては 1.5 時間後でも 75% が付着していたが、その後急速に剥がれ落ちた。これは水溶性デキストラン誘導体の水和が進み、分子鎖全体がマイクロスフェアの外へ溶出したためと思われる。MS-3 においては、マイクロスフェア中の水溶性デキストラン誘導体が少ないために初期に水和が遅く、付着が不十分であったものと考えられる。

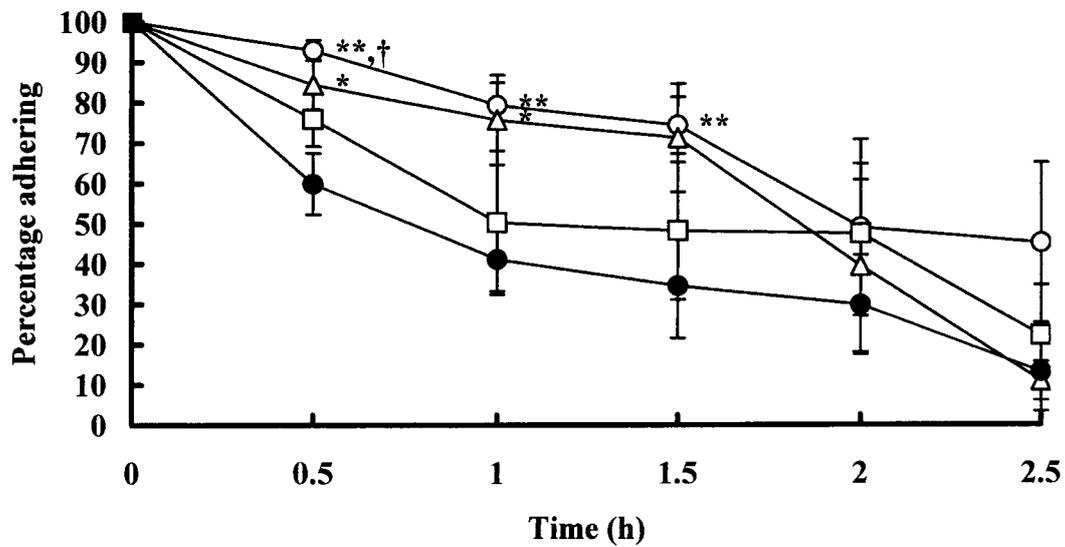


Figure 4-2. In vitro mucoadhesion of microspheres to the rat small intestinal mucosa. (●) MS, (○) MS-1, (△) MS-2, (□) MS-3. The results are represented as the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$  or  $4$ ). The asterisks represents significant difference from MS, \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ . †: Significant difference from MS-3 ( $p < 0.05$ ).

### 第3節 in vivo 滞留性

マイクロスフェアをラットに経口投与し一定時間後に剖検することにより、マイクロスフェアの消化管内での滞留性を検討した。Figure 4-3に投与1、3、5時間後におけるマイクロスフェアの消化管内分布を示す。1時間後MS-2の80%以上が胃に滞留していた。3時間後、MS-2のほとんどが小腸下部に滞留していた。一方、1時間後MSの25%が胃に、50%が小腸中部に滞留していた。3時間後、MSのほとんどが小腸下部に滞留していた。一部はすでに小腸を通過し大腸に達していた。このことから、MS-2はin vivoにおいても速やかに水和し、胃粘膜に付着し、長時間そこに滞留することが分かった。しかし3時間後MS、MS-2ともに胃には残存していなかった。この結果は、in vitroの付着試験の結果(Figure 4-2)とよく一致する。MSおよびMS-2のin vitroでの1時間後の付着率は、それぞれ41%と84%であるが、2.5時間後の値は同程度で低い。これは水溶性デキストラン誘導体の水和が進みマイクロスフェアの外に溶出することにより、マイクロスフェアの粘膜付着性が低下したためと考えられる。

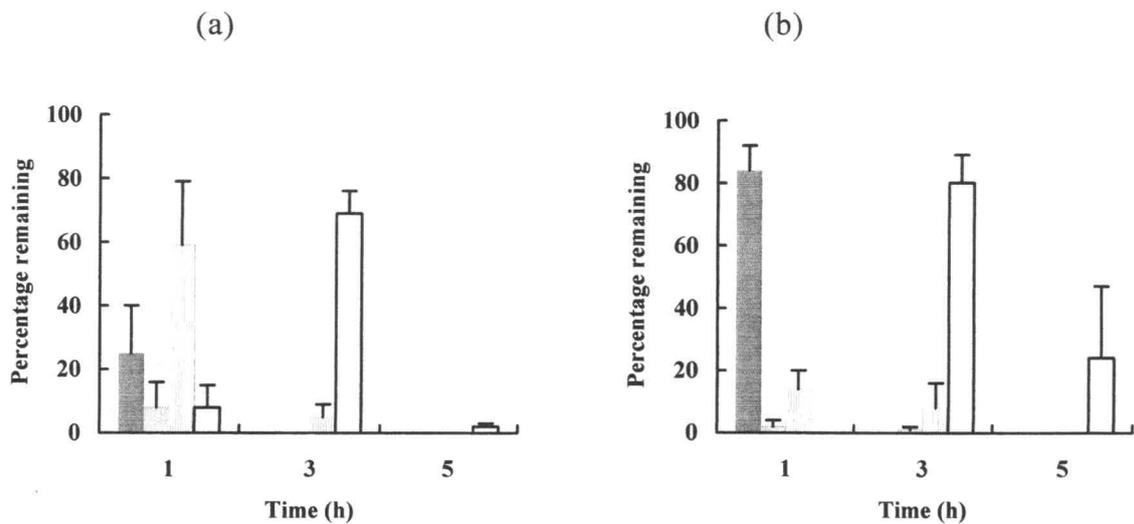


Figure 4-3. Distribution of (a) MS and (b) MS-2 in the stomach and upper, middle and lower segment of the small intestine in rats. (■) stomach, (▨) upper segment, (▩) middle segment, and (□) lower segment of the small intestine. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

## 第4節 消化管内挙動の解析

消化管内移動挙動について、秋山ら<sup>42)</sup>のモデルを用いて検討した。このモデルは以下の仮定に基づいている。(1)投与されたマイクロスフェアは、ラグタイム  $T_s$  時間後 1 次式に従って胃から排出される。(2)マイクロスフェアは小腸の各部位を 0 次式に従って移動する。(3)マイクロスフェアは小腸の上部、中部、下部をそれぞれ  $T_u$ 、 $T_m$  および  $T_l$  時間かけて移動し大腸に達する。

このモデルに従えば、 $t$  時間後のマイクロスフェアの胃内残留率  $R_s$  は次式で表される。

$$R_s = 10^2 \quad (t \leq T_s) \quad \text{Eqn 4-1}$$

$$R_s = 10^{2-K_s(t-T_s)} \quad (t > T_s) \quad \text{Eqn 4-2}$$

ここで定義される  $K_s$  は胃排出速度定数である。そして  $t$  時間後のマイクロスフェアの胃および小腸上部の残留率  $R_{su}$  は次式で表される。

$$R_{su} = 10^2 \quad (t \leq T_s + T_u) \quad \text{Eqn 4-3}$$

$$R_{su} = 10^{2-K_s(t-T_s-T_u)} \quad (t > T_s + T_u) \quad \text{Eqn 4-4}$$

$t$  時間後のマイクロスフェアの胃、小腸上部および小腸中部の残留率  $R_{sum}$  は次式で表される。

$$R_{sum} = 10^2 \quad (t \leq T_s + T_u + T_m) \quad \text{Eqn 4-5}$$

$$R_{sum} = 10^{2-K_s(t-T_s-T_u-T_m)} \quad (t > T_s + T_u + T_m) \quad \text{Eqn 4-6}$$

$t$  時間後のマイクロスフェアの胃、小腸上部、小腸中部および小腸下部の残留率  $R_{suml}$  は次式で表される。

$$R_{suml} = 10^2 \quad (t \leq T_s + T_u + T_m + T_l) \quad \text{Eqn 4-7}$$

$$R_{suml} = 10^{2-K_s(t-T_s-T_u-T_m-T_l)} \quad (t > T_s + T_u + T_m + T_l) \quad \text{Eqn 4-8}$$

また 50% 胃排出時間  $T_{s50}$  および 50% 大腸到達時間  $T_{50}$  はそれぞれ以下の式で表される。

$$T_{s50} = T_s + (2 - \log 50) / K_s \quad \text{Eqn 4-9}$$

$$T_{50} = T_s + T_u + T_m + T_l + (2 - \log 50) / K_s \quad \text{Eqn 4-10}$$

非線形最小 2 乗プログラム MULTI<sup>44)</sup>を用いて、このモデル式に残存率データを当て

はめて算出したパラメータを Table 4-2 に示す。さらに Figure 4-4 に Table 4-2 に示したパラメータを用いて作成したマイクロスフェアの消化管内残存曲線を示す。Figure 4-4 に示すように、この曲線と実測値は非常に良く一致し、本研究で開発したマイクロスフェアにこのモデルを用いることの妥当性が示された。

Table 4-2. Rate and time constants for gastrointestinal transit of MS and MS-2.

		MS	MS-2
$K_s$	(h <sup>-1</sup> )	0.63	0.53
$T_s$	(h)	0.00	0.85
$T_u$	(h)	0.22	0.02
$T_m$	(h)	0.69	0.14
$T_l$	(h)	1.88	1.72
$T_u + T_m + T_l$	(h)	2.79	1.87
$T_{s50}$	(h)	0.48	1.42
$T_{50}$	(h)	3.27	3.29

$K_s$ , first-order gastric emptying rate constant;  $T_s$ , lag time;  $T_u$ , transit time through upper small intestine;  $T_m$ , transit time through middle small intestine;  $T_l$ , transit time through lower small intestine;  $T_{s50}$ , time required for 50% of microspheres to leave stomach;  $T_{50}$ , time required for 50% of microspheres to reach colon.

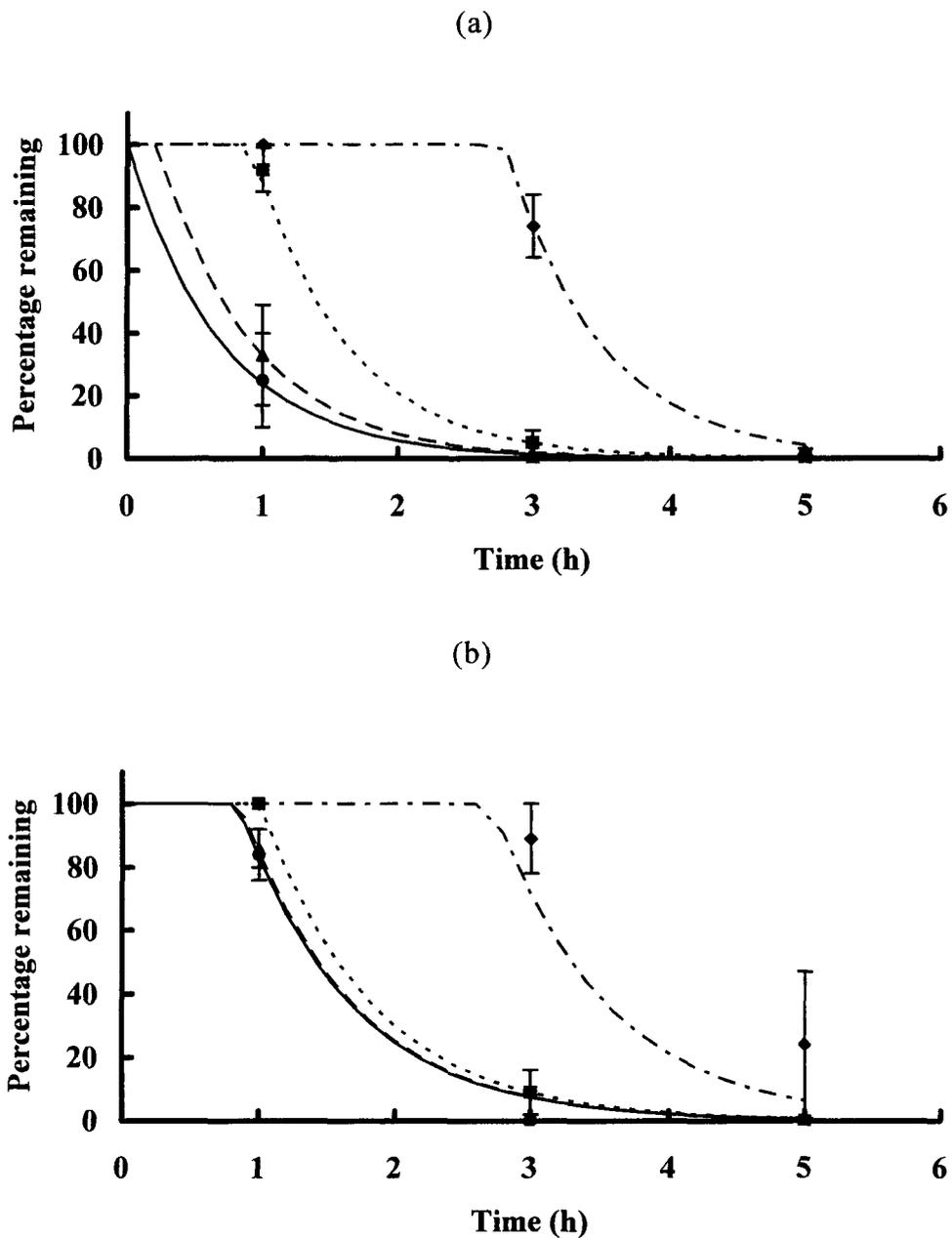


Figure 4-4. Percentage of (a) MS and (b) MS-2 remaining in the stomach (●), stomach and upper small intestine (▲), stomach and upper and middle small intestine (■), and stomach and upper, middle and lower small intestine (◆) with computer-generated gastrointestinal transit profiles. (—) stomach, (---) stomach and upper small intestine, (.....) stomach and upper and middle small intestine, (-.-.-) stomach and upper, middle and lower small intestine. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

MS-2 の胃排出速度定数  $K_s$  は、MS より僅かに小さな値を示した。胃排出のラグタイム  $T_s$  は、MS では 0.003 時間となり、ラグタイムなしに排出が起きると考えられた。また MS-2 では 0.85 時間となり、胃粘膜に付着することにより胃内に滞留することが示された。一方、小腸における MS-2 の通過時間  $T_u$ ,  $T_m$  および  $T_l$  は、MS より短かった。このことから胃を通過した MS-2 は小腸には付着しないことが分かった。これは水和が進むことにより水溶性デキストラン誘導体がマイクロスフェアの外に溶出し、その結果胃粘膜から剥がれた MS-2 は、再び小腸粘膜に付着することができないためと考えられる。

Montisci ら<sup>45)</sup>は、レクチン-ポリ乳酸マイクロスフェアの in vivo 粘膜付着性は粘膜表面との非特異的な相互作用と特異的な相互作用のバランスで決まり、腸管においては特異的な相互作用に比べ非特異的な相互作用の方が支配的であると報告している。胃粘膜から剥がれた MS-2 は、MS よりも親水的な表面を持ち、粘膜表面と相互作用を起こすことができなくなったものと考えられる。結果的に、50%大腸到達時間  $T_{50}$  は MS-2 と MS の間に差がなかった。しかし、MS-2 の 50%胃排出時間は MS の 3 倍である 1.42 時間を示した。

以上の結果から、MS-2 は胃粘膜ターゲティング製剤として、あるいは胃内滞留時間を延長する製剤としての可能性が示された。

## 第5節 本章のまとめ

第3章において開発したマイクロスフェアの *in vitro* 粘膜付着性および経口投与後の消化管内移動挙動について検討した結果、以下の知見を得た。

- (1) マイクロスフェアの水和挙動を観察した結果、水に接触後非常に速やかに水溶性デキストラン誘導体の膨潤が起こり、マイクロスフェア表面への突出が見られた。
- (2) マイクロスフェアの *in vitro* 粘膜付着性についてラットの反転腸管を用いて検討した結果、水溶性デキストラン誘導体含量が40%および50%のマイクロスフェアでは、1.5時間後においても75%以上が付着していた。
- (3) マイクロスフェアをラットに経口投与後胃および小腸を直接剖検した結果、水溶性デキストラン誘導体含量が40%のマイクロスフェアでは1時間後に80%以上が胃内に残存していた。一方、対照のマイクロスフェアでは1時間後25%が胃内にあった。両者とも3時間後にはほとんどが小腸下部に移行した。
- (4) マイクロスフェアの消化管内移動挙動についてモデルを用いて検討した結果、水溶性デキストラン誘導体含量40%のマイクロスフェアは対照のマイクロスフェアに比べて胃排出時間が延長していた。また50%大腸到達時間には差がなかった。

以上のことから、水溶性デキストラン誘導体を用いて調製したマイクロスフェアは、胃粘膜に付着し胃内滞留時間を延長するため、胃粘膜ターゲティング製剤あるいは消化管上部に吸収部位を持つ薬物のDDSとして有用であると考えられた。

## 第6節 実験の部

### (1) 試料

DS(Mw 500,000)、EA(Mw 500,000)は第1章と同じものを用いた。テオフィリンはシグマ製(St. Louis, USA)を、乳糖は和光純薬製(大阪)を用いた。以上の試料は200-meshで篩過後(75 $\mu$ m以下)を使用した。CAB(Mw 30,000)、ショ糖脂肪酸エステル(DK F-10)、流動パラフィンは第3章と同じものを用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

### (2) マイクロスフェアの調製

攪拌の回転数を400 rpmとする他は、第3章と同様に行った。平均粒子径は第3章と同様にして求めた。以下の実験には粒子径425-710 $\mu$ mのマイクロスフェアを用いた。薬物含量は超音波処理時間を10分間とする他、第3章と同様にして求めた。

### (3) 水和挙動の観察

CCDカメラ(VH-5900、KEYENCE、東京)で観察下、スライドガラス上に置いたマイクロスフェアにピペットで水を3滴滴下した。1分および5分後に水和したマイクロスフェアを静止画に収めた。

### (4) In vitro 粘膜付着性試験

絶食したラット(300-350 g、雄性、Sprague-Dawley strain、三協ラボ)を安楽死させ、小腸を摘出した。5 cmの長さに切り出した小腸を、ガラス棒を用いて反転させ両端を結紮した。この反転腸管上に100個のマイクロスフェアをできるだけ均等に散布した。これを生理食塩液8 mLを入れた試験管(10 mL)内に、全体が液中に沈むようにタコ糸でつるした。その後水平方向に振とうしながら37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。0.5、1、1.5、2および2.5時間後に腸管を取り出し、新しい生理食塩液8 mLを入れた別の試験管(10 mL)内に素早く移し変えてインキュベートを続けた。このとき腸管を取り出したあとに試験管中に剥がれ落ちたマイクロスフェアの個数を数え、次式より付着率を算出した。

$$\text{Adhering \%} = \left( 100 - \sum_{t=0} Nt \right) / 100 \times 100 \quad \text{Eqn 4-11}$$

ここで  $Nt$  はインキュベーション開始  $t$  時間後の剥がれ落ちたマイクロスフェアの数を表す。

#### (5) 消化管内挙動

24 時間絶食したラット (300–350 g、雄性、Sprague–Dawley strain、三協ラボ) に、先端にポリエチレンチューブを装着した胃ゾンデを用いて、マイクロスフェア 100 個を 0.2 mL の水と共に経口投与した。1、3、5 時間後にエーテルを用いてラットを安楽死させ、胃および小腸を摘出した。さらに小腸は均等に 3 分割した。胃および小腸を縦方向に裂き、内部に残存するマイクロスフェアの個数を数えた。なお、動物実験は星薬科大学動物実験指針に基づいて行った。

#### (6) 統計処理

統計処理は Student's unpaired t-test により行った。 $p$  値が 0.05 以下のとき有意であると判定した。

## 第5章 経口投与後の薬物吸収挙動

経口投与された薬物の消化管吸収は腸管粘膜の薬物透過性のみならず、製剤の消化管移動速度によって決められる。消化管内の滞留時間は吸収可能な薬物量に影響し重要である。粘膜付着型製剤は消化管粘膜に付着することにより、消化管内に留まる時間を延長する<sup>46)</sup>。従って、薬物吸収部位に局在し、残留すれば薬物のバイオアベイラビリティは向上すると考えられる。そこで消化管全域から吸収されるテオフィリン<sup>47)</sup>と吸収部位が上部消化管に限られるチアミンジスルフィド<sup>48)</sup>を用いたマイクロスフェアを調製し、経口投与後の薬物吸収挙動について検討した。

### 第1節 テオフィリンおよびチアミンジスルフィドの in vitro 放出挙動

調製したマイクロスフェアの処方と薬物含量を Table 5-1 に示した。いずれのマイクロスフェアも良好な薬物封入効率を示した。

Table 5-1. Formulation and drug content of non-adhesive (MS) and adhesive microspheres (Ad-MS).

Sample name	TH (g)	TDS (g)	CAB (g)	DS (g)	EA (g)	Lac (g)	Drug content % (w/w)
TH, MS	0.75	—	1.0	—	—	0.75	30.8 ± 1.5
TH, Ad-MS	0.5	—	1.0	0.25	0.75	—	23.9 ± 1.5
TDS, MS	—	1.5	1.0	—	—	—	63.8 ± 3.4
TDS, Ad-MS	—	0.5	1.0	0.25	0.75	—	23.3 ± 0.2

The results are expressed as the mean ± S.D. ( $n = 3$ ).

Figure 5-1 にマイクロスフェア(直径 425-600  $\mu\text{m}$ )からの in vitro 薬物放出挙動を示す。粘膜付着性マイクロスフェアと粘膜付着性を持たないマイクロスフェアからの薬物放出は類似しており、テオフィリンの場合 4 時間で 90%、チアミンジスルフィドの場合 2 時間で 85%が放出された。両薬物の放出速度の差は放出液に対する溶解度の違い(テオフィリン 8.2 mg/mL<sup>49)</sup>、チアミンジスルフィド 37.7 mg/mL<sup>50)</sup>)によるものと思われる。

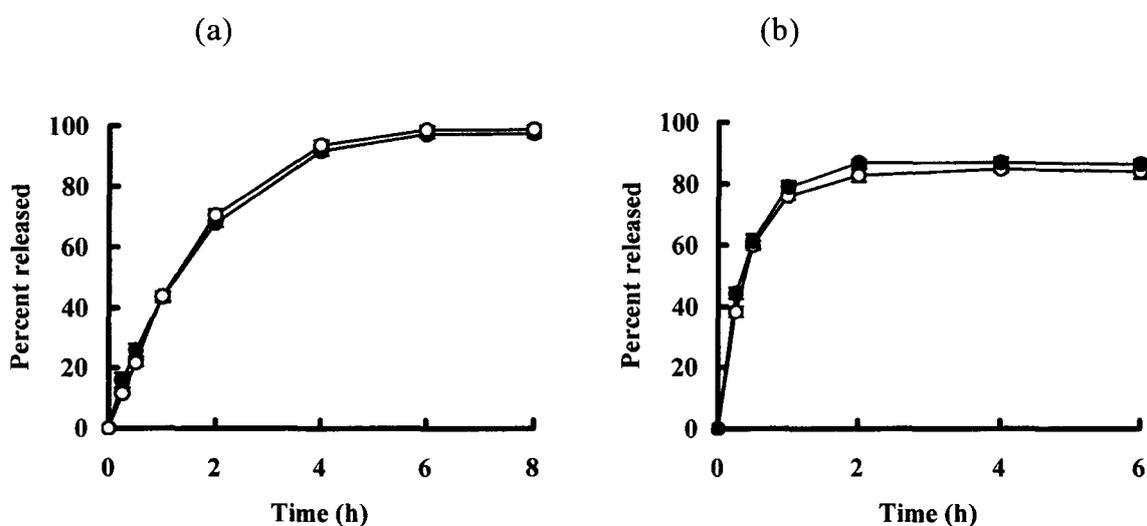


Figure 5-1. Release profiles from MS (●) and Ad-MS (○) in the JP XIV 1st fluid containing 0.1% polysorbate 80 at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). (a) theophylline, (b) thiamine disulfide.

## 第2節 テオフィリンのバイオアベイラビリティ

テオフィリン末をアラビアゴム水溶液に懸濁したもの、MSあるいはAd-MSをラットに1回経口投与後の血漿中テオフィリン濃度を10時間にわたり測定した。Figure 5-2は投与量を10 mg/kgとしたときの血中濃度時間曲線を示す。懸濁液では投与1時間後に最高値が観察された。これに対してMSおよびAd-MSにおいては血中濃度が抑えられ維持された。Table 5-2に薬物動態パラメータ値をまとめて示す。懸濁液と比較して、MSおよびAd-MSにおいては最高血中濃度( $C_{max}$ )が減少し、最高血中濃度到達時間( $T_{max}$ )および平均滞留時間( $MRT_{\infty}$ )が大きくなった。MSとAd-MSの間には有意な差はなかった。

徐放性製剤では、薬物放出が終了する前に吸収部位を通過することにより、血中濃度時間曲線下面積(AUC)が低下することがある<sup>51)</sup>。粘膜付着性マイクロスフェアにおいては消化管内挙動が変化するが薬物動態パラメータは変化しなかった。これはテオフィリンが大腸を含む消化管全域から吸収されるためと考えられる<sup>47)</sup>。

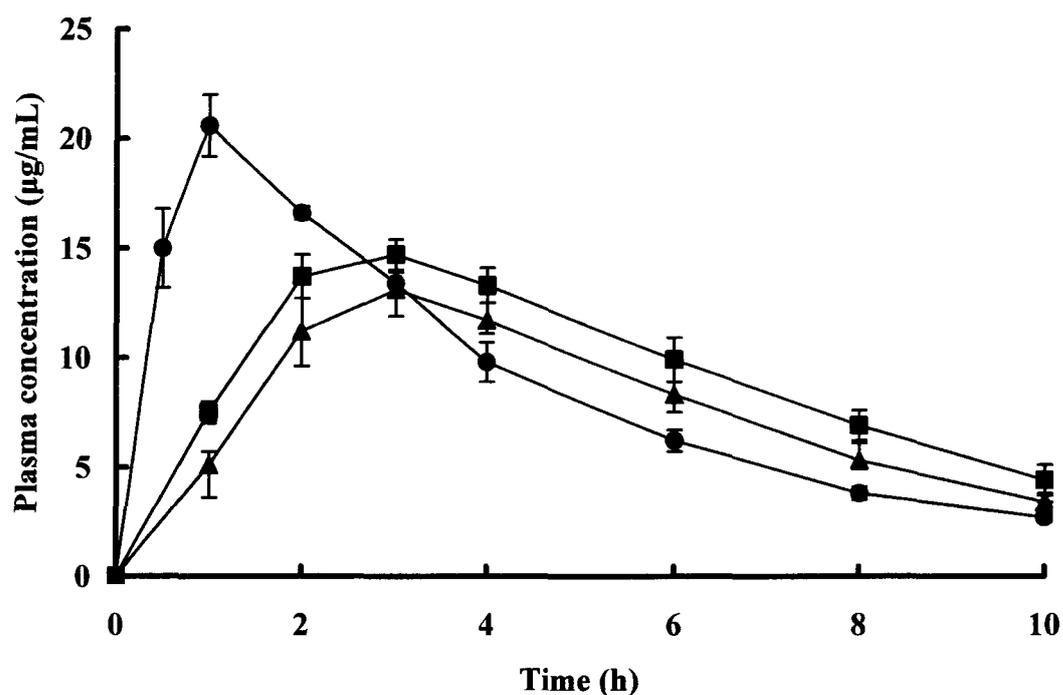


Figure 5-2. Plasma concentration-time profiles of TH after oral administration of (●) TH suspension, (▲) MS, (■) Ad-MS to rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

Table 5-2. Pharmacokinetic parameters for the TH suspension, MS, and Ad-MS after oral administration at a dose of 10 mg/kg in rats.

Dosage form	$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$T_{max}$ (h)	$AUC_{\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ )	$MRT_{\infty}$ (h)
Suspension	$19.2 \pm 2.3$	$1.1 \pm 0.2$	$100.8 \pm 8.5$	$4.8 \pm 0.2$
MS	$11.4 \pm 2.7^{**}$	$3.0 \pm 0.4^{**}$	$93.3 \pm 20.9$	$6.4 \pm 0.4^{**}$
Ad-MS	$13.8 \pm 1.3^*$	$3.0 \pm 0.4^{**}$	$117.2 \pm 20.1$	$6.8 \pm 0.8^{**}$

The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ).

The asterisks represent significant difference from the suspension, \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

### 第3節 チアミンジスルフィドのバイオアベイラビリティ

Figure 5-3 にチアミンジスルフィドの水溶液、MS あるいは Ad-MS をラットに 3 mg/kg 経口投与後の血漿中チアミン濃度の変化を示す。縦軸の 0 はベースラインを示し、そこからの変化量に対して薬物動態解析を行った。薬物動態パラメータを Table 5-3 に示した。水溶液と MS の間にはすべてのパラメータにおいて有意差はなかった。一方 Ad-MS は、Figure 5-3 に示すように水溶液および MS に比べて血中濃度レベルが長時間維持された。また Table 5-3 に示すように  $AUC_{\infty}$  の値が有意に増大し、バイオアベイラビリティの増大が見られた。これは Ad-MS が胃粘膜に付着することにより胃内滞留性が向上し、その結果消化管上部に吸収部位を持つチアミンジスルフィドの吸収率が増大したものと考えられる。さらに Ad-MS が薬物を 2 時間以上かけて放出させるために、 $MRT_{\infty}$  が延長したものと考えられる。

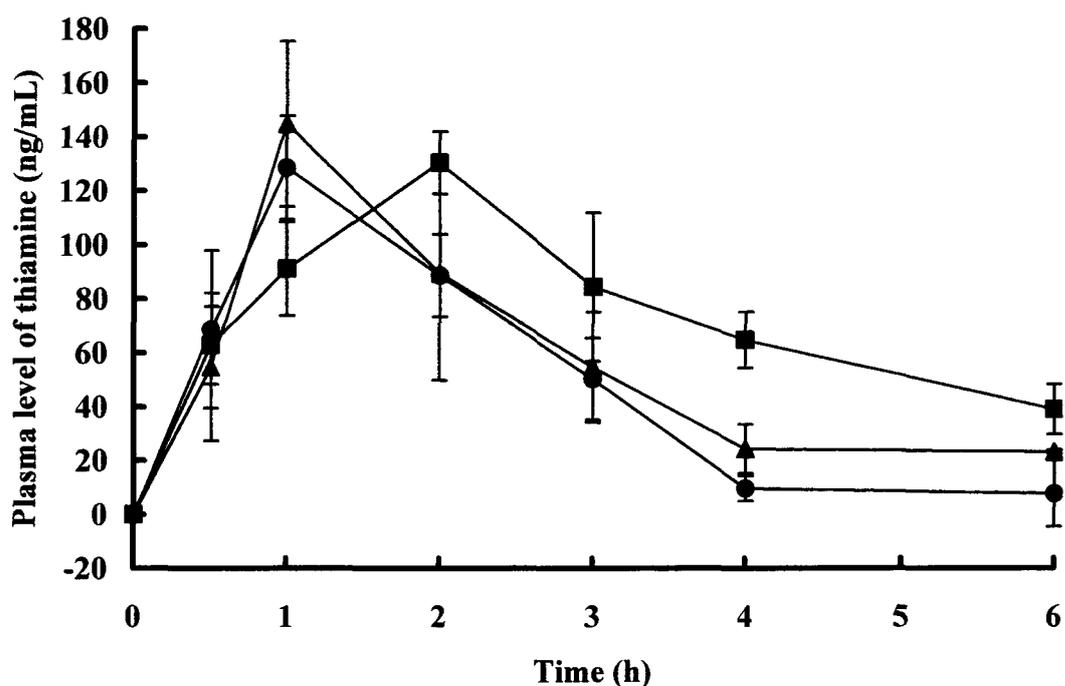


Figure 5-3. Mean plasma levels of total thiamine after oral administration of (●) TDS solution, (▲) MS, (■) Ad-MS to rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).

Table 5-3. Pharmacokinetic parameters for the TDS solution, MS, and Ad-MS after oral administration at a dose of 3 mg/kg in rats.

Dosage form	$C_{max}$ (ng/mL)	$T_{max}$ (h)	$AUC_{\infty}$ (ng·h/mL)	$MRT_{\infty}$ (h)
Solution	122.4 $\pm$ 42.6	1.15 $\pm$ 0.25	316.7 $\pm$ 103.8	2.22 $\pm$ 0.56
MS	122.0 $\pm$ 9.3	1.10 $\pm$ 0.62	319.6 $\pm$ 134.4	2.40 $\pm$ 1.16
Ad-MS	111.3 $\pm$ 37.2	1.60 $\pm$ 0.48	683.6 $\pm$ 269.1* <sup>†</sup>	5.76 $\pm$ 2.47* <sup>†</sup>

The results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$ ).

\*: Significant difference *versus* solution,  $p < 0.05$ .

<sup>†</sup>: Significant difference *versus* MS,  $p < 0.05$ .

## 第4節 本章のまとめ

粘膜付着性マイクロスフェアをラットに経口投与し、薬物動態を解析した結果、次のような知見を得た。

- (1) *in vitro* における薬物放出挙動が同等で、粘膜付着性の有無が異なるマイクロスフェアを調製した。テオフィリンの場合4時間で90%以上、チアミンジスルフィドの場合2時間で85%以上放出した。
- (2) ラット経口投与後の薬物動態を解析した結果、テオフィリンの場合、懸濁液と比べAd-MSでは $C_{max}$ が低下し、 $T_{max}$ および $MRT_{\infty}$ が延長した。しかしMSとAd-MS間では薬物動態パラメータに有意差が見られなかった。
- (3) ラット経口投与後の薬物動態を解析した結果、チアミンジスルフィドの場合、水溶液およびMSと比べ、Ad-MSでは $AUC_{\infty}$ および $MRT_{\infty}$ の値が有意に増大した。

このことから、粘膜付着性マイクロスフェアは消化管上部に吸収部位を持つ薬物のバイオアベイラビリティを向上させるのに有用な製剤であることが示された。

## 第5節 実験の部

### (1) 試料

DS(Mw 500,000)、EA(Mw 500,000)は第1章と同じものを用いた。テオフィリンおよび乳糖は第3章と同じものを用いた。以上の試料は200-meshで篩過後(75  $\mu\text{m}$ 以下)使用した。CAB(Mw 30,000)、ショ糖脂肪酸エステル(DK F-10)、流動パラフィン(第3章と同じものを用いた)。チアミンジスルフィドはICN Biomedicals製(Aurora, USA)、7-(2-ヒドロキシエチル)テオフィリンは東京化成工業製(東京)、酸性ホスファターゼ(EC31.3.2)はナカライテスク製(京都)を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

### (2) マイクロスフィアの調製

第4章と同様の方法で行った。直径425-600  $\mu\text{m}$ のマイクロスフェアを試料とした。薬物含量の測定は第4章と同様の方法で行った。チアミンジスルフィドの場合は、237 nmにおける吸光度を測定した。

### (3) In vitro 薬物放出試験

放出試験は日本薬局方XIV溶出試験法第2法(パドル法)に準じて、第1液にポリソルベート80を0.1%添加した液900 mLを用いて、液温 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、回転数60 rpmで行った。試験開始後所定の時間に放出液5 mLを採取し、メンブランフィルター(0.45  $\mu\text{m}$ )でろ過して試料溶液とした。なお採取後直ちに同温同量の放出液を補充した。試料溶液中のテオフィリン濃度は274 nmにおける吸光度を、チアミンジスルフィド濃度は242 nmにおける吸光度を測定し、それぞれあらかじめ作成した検量線から求めた。また試験は3回繰り返して行った。

### (4) 薬物動態試験

24時間絶食したラット(300-390 g、雄性、Sprague-Dawley strain、三協ラボ)に、テオフィリンの場合10 mg/kg、チアミンジスルフィドの場合3 mg/kgの投与量になるように、ポリエチレンチューブを装着した胃ゾンデを用いてマイクロスフェアを0.2 mLの水と共に投与した。対照として、テオフィリンの場合2%(w/v)懸濁液(5%アラビアゴム水溶液に懸濁)を、チアミンジスルフィドの場合0.5%(w/v)水溶液をそ

れぞれ用いた。テオフィリンでは 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 時間後にチアミンジスルフィドでは 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 時間後に尾静脈から採血した。ラットは試験開始 10 時間後まで絶食条件下に置いた。血液は採取後直ちに 3,000 rpm で 3 分間遠心分離し、得られた血漿は測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお、動物実験は星薬科大学動物実験指針に基づいて行った。

#### (5) テオフィリンの定量

血漿中テオフィリン濃度の測定は、内標として 7-(2-ヒドロキシエチル)テオフィリンを用い逆相 HPLC 法によって行った。HPLC の装置は LC-10AS (島津、京都) を、検出器には SPD-10AV UV/VIS (島津、京都) を用い、室温下、274 nm の吸光度を測定した。カラムは Shim-pak ODS (4.6 $\times$ 1.5 cm、島津、京都) を用いた。移動相にはアセトニトリル:0.01M 酢酸バッファー(pH4.0)の 1:9 の混合物を用い、流速は 2 mL/min とした。

定量操作の前に、凍結した血漿を室温に戻し凝集物を取り除いた。血漿 100  $\mu\text{L}$  をスピッツ管に入れ、内標 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を含むメタノール 200  $\mu\text{L}$  を添加し、30 秒間ボルテックスをかけ、その後 12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み 100  $\mu\text{L}$  を HPLC 測定の試料溶液とした。

#### (6) 血漿中チアミンレベルの解析

血漿中全チアミン濃度は塩化水銀(II)で誘導体化した後順相 HPLC 法<sup>52)</sup>により定量した。除蛋白は過塩素酸によって行った。pH 4.5 の酢酸バッファー中で酸性ホスファターゼにより一昼夜酵素的に加水分解することにより、すべてのチアミンエステルを遊離チアミンに変換し、その後チアミンをチオクロームに酸化した。チオクロームをイソブタノールで抽出し、LiChrosorb NH<sub>2</sub> column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\phi$   $\times$  250 mm)を装着した HPLC によりチアミン濃度を求めた。装置は LC-10AS (島津、京都)、検出器は PF-10AXL (島津、京都)を用い、室温下、365 nm (excitation) および 440 nm (emission) で蛍光強度を測定した。移動相にはメタノールとジエチルエーテルの容量比 1:3 の混合液を用い、流速は 2 mL/min とした。

#### (7) 薬物動態解析

$C_{\text{max}}$  および  $T_{\text{max}}$  は、血中濃度データを 1-コンパートメントモデルを用いて解析

することにより求めた。 $AUC_{\infty}$ は最終測定時間までは台形法によって、その後は1次式で近似して求めた。 $MRT_{\infty}$ はモーメント法によって求めた<sup>53)</sup>。

(8) 統計処理

分散分析を行った後、Tukeyの方法で多重比較を行った。 $p$ 値が0.05以下のとき有意であると判定した。

## 第 6 章 総括および結論

水溶性デキストラン誘導体はその安全性から製剤素材として有望であると考えられる。しかし水に対する溶解度が高いことから、単独で製剤に用いても放出制御や消化管移行制御等の新規素材としての有効性を示すことは難しい。そこで高分子複合体形成反応を利用して新しい機能を持つ製剤開発への応用を試みた。まず複合体形成について詳細に検討した。その研究の中で水溶性デキストラン誘導体の複合体が粘膜付着性を示すことを見い出した。次に複合体の製剤への応用として、水溶性デキストラン誘導体を用いたマイクロスフェアの調製を試みた。調製したマイクロスフェアは、薬物徐放性および粘膜付着性を有し、経口投与後長時間胃内に滞留することによって、消化管上部に吸収部位を持つ薬物のバイオアベイラビリティを向上させることを見い出した。

本研究で得られた知見を以下に要約する。

- (1) 複合体形成について希薄水溶液を用いた検討を行った結果、中性域において極大値を示すポリアニオンとポリカチオンの混合比は、CMD を用いた場合、質量比 35:65、DS を用いた場合 25:75 であることがわかった。
- (2) 粘膜付着性について、水溶性デキストラン誘導体を圧縮成型シムチン膜をモデル粘膜として検討した結果、カーボポール 934P と同等の付着力を示し、pH、イオン強度の影響を受けなかった。
- (3) 製剤への応用として、水溶性デキストラン誘導体の物理混合物を親水性マトリックスとし、CAB を疎水性マトリックスとしたマイクロスフェアを調製した。マイクロスフェアからの薬物放出について、テオフィリンを用いて検討した結果、DS/EA および DS/CDC において pH 非依存性の徐放化効果が得られた。また疎水性高分子と水溶性デキストラン誘導体との配合比率により放出を制御することができた。
- (4) マイクロスフェアの粘膜付着性について、ラット腸管を用い *in vitro* において検討した結果、DS/EA 混合物を 40%以上含有する場合に高い粘膜付着性が認められた。
- (5) マイクロスフェアの有用性を評価する目的で、ラットに経口投与した結果、胃内滞留性が認められた。消化管内挙動を数値的に解析した結果、粘膜付着性を持たない

マイクロスフェアに比べ胃排出時間が著しく延長していた。また、薬物吸収動態についてチアミンジスルフィドを用いて検討した結果、粘膜付着性を持たないマイクロスフェアに比べ AUC、MRT が著しく増大した。

結論として、水溶性デキストラン誘導体の物理混合物は薬物徐放性および粘膜付着性を併せ持つことが明らかとなった。これを微粒子製剤へ応用することにより、胃粘膜付着型徐放性マイクロスフェアを開発し、薬物のバイオアベイラビリティを向上させることができた。

近年、胃粘膜付着型微粒子製剤は *Helicobacter pylori* の除菌薬への応用が期待されている<sup>54,55)</sup>。秋山ら<sup>56)</sup>は CP を用いて胃粘膜付着型微粒子製剤を調製し、アモキシシリンを長時間胃内に滞留させることにより *Helicobacter pylori* の除菌効果を向上させることに成功している。しかし CP は粘膜刺激性があり<sup>57)</sup>、またその溶解性が pH の影響を受けるため薬物放出挙動も pH によって変動する<sup>58)</sup>。一方、水溶性デキストラン誘導体の物理混合物は安全性も高く、その組み合わせによっては pH 非依存性の薬物放出制御機能を有している。以上のような観点から、今後、粘膜付着性と薬物徐放性を併せ持つ新規な DDS 素材としての利用が期待される。また粘膜付着型徐放性製剤の応用範囲は経口投与のみに留まらない<sup>59)</sup>。すなわち、鼻粘膜や口腔粘膜、直腸粘膜などに適用することが可能であると考えられる。

以上のように、本研究において開発された粘膜付着型徐放性微粒子製剤は、今後さまざまな DDS 剤形への応用が期待される。

## 謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました星薬科大学薬剤学教室 高山幸三教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の実施と学位取得の機会を恵与され、さらに多大なご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京女子医科大学附属第二病院薬剤部 谷古宇秀博士に謹んで御礼申し上げます。

研究の当初より様々なご高配を賜りました星薬科大学医療薬剤学教室 町田良治教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多大なご助力を頂きました東京女子医科大学附属第二病院薬剤部 荻原加奈子氏に心より感謝いたします。

最後になりましたが、本研究に際し、日ごろよりご理解とご協力を頂きました東京女子医科大学附属第二病院薬剤部の皆様に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 堀了平監修, “改訂 図解 夢の薬剤 DDS”, 薬業時報社, 東京, 1997.
- 2) Parfitt K., *MARTINDALE The Extra Pharmacopoeia*, Thirty-second Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1999, p1571.
- 3) 名糖産業、社内資料.
- 4) Mehvar R., Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents, *J. Control. Rel.*, **69**, 1-25 (2000).
- 5) Edman P., Ekman B., Sjöholm I., Immobilization of proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 838-842 (1980).
- 6) Hovgaard L., Brøndsted H., Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, **36**, 159-166 (1995).
- 7) 中島章夫, 高分子電解質間の相互作用, “化学総説 17 卷, 高分子の相互作用と機能”, 学会出版センター, 東京, 1977, pp199-209.
- 8) Dumitriu S., Chornet E., Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **31**, 223-246 (1998).
- 9) Wheatley M.A., Chang M., Park E., Langer R., Coated alginate microspheres. Factors influencing the controlled delivery of macromolecules, *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 2123-2135 (1991).
- 10) 近藤保編, “マイクロカプセル”, 日本規格協会, 東京, 1991.
- 11) Muniruzzaman Md., Tabata Y, Ikada Y, Complexation of basic fibroblast growth factor with gelatin, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **9**, 459-473 (1998).
- 12) Harada A, Kataoka K, Formation of polyion complex micelles in aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol)segments, *Macromolecules*, **28**, 5294-5299 (1995).
- 13) 宮崎靖則, 谷古宇秀, 高山幸三, 反対荷電を持つデキストラン誘導体間の複合体形成に関する検討, *薬剤学*, **61**, 59-70 (2001).

- 14) 宮崎靖則, 谷古宇秀, 永井恒司, 高山幸三, 固体状態におけるデキストラン誘導体の粘膜付着性の評価, *薬剤学*, **62**, 14-22 (2002).
- 15) Miyazaki Y., Yakou S., Nagai T., Takayama K., Release profiles of theophylline from microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate: effect of polyion complex formation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **29**, 795-804 (2003).
- 16) Miyazaki Y., Ogihara K., Yakou S., Nagai T., Takayama K., In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate, *Int. J. Pharm.*, **258**, 21-29 (2003).
- 17) Miyazaki Y., Ogihara K., Yakou S., Nagai T., Takayama K., Bioavailability of theophylline and thiamine disulfide incorporated into mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1744-1747 (2003).
- 18) Gubensek F., Lapanje S., Potentiometric titration studies of diethylaminoethyl dextran base, *J. Macromol. Sci.-Chem.*, **A2**, 1045-1054 (1968).
- 19) 中島章夫, ポリイオンコンプレックスの理論と応用, *化学と工業*, **27**, 746-750 (1974).
- 20) 宮崎靖則, 小幡かおり, 谷古宇秀, 大淵満寿美, 福室憲治, デキストラン誘導体のテオフィリン徐放錠への応用, *病院薬学*, **19**, 178-183 (1993).
- 21) Nagai T., Machida Y., Buccal delivery systems using hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **11**, 179-191 (1993).
- 22) Miyazaki S., Nakayama A., Oda M., Takada M., Attwood D., Chitosan and sodium alginate based bioadhesive tablets for intraoral drug delivery, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 745-747 (1994).
- 23) Taylan B., Capan Y., Güven O., Kes S., Hincal A.A., Design and evaluation of sustained-release and buccal adhesive propranolol hydrochloride tablets, *J. Control. Rel.*, **38**, 11-20 (1996).
- 24) Remuñán-López C., Portero A., Vila-Jato J.L., Alonso M.J., Design and

- evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery, *J. Control. Rel.*, **55**, 143-152 (1998).
- 25) Hägerström H., Paulsson M., Edsman K., Evaluation of mucoadhesion for two polyelectrolyte gels in simulated physiological conditions using a rheological method, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **9**, 301-309 (2000).
  - 26) Wong C.F., Yuen K.H., Peh K.K., An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables, *Int. J. Pharm.*, **180**, 47-57 (1999).
  - 27) Tamburic S., Craig D.Q.M., A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **44**, 159-167 (1997).
  - 28) Tur K.M., Ch'ng HS., Evaluation of possible mechanism(s) of bioadhesion, *Int. J. Pharm.*, **160**, 61-74 (1998).
  - 29) Peppas N.A., Buri P.A., Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues, *J. Control. Rel.*, **2**, 257-275 (1985).
  - 30) Chwialkowska L., Krowczynski L., Carboxymethyl-dextran as pharmaceutical aid in tablets. I. Properties of granulates obtained by means of sodium salt of carboxymethyl-dextran, *Acta Pol. Pharm.*, **25**, 577-581 (1968).
  - 31) Chwialkowska L., Krowczynski L., Carboxymethyl-dextran as pharmaceutical aid in tablets. II. Properties of tablets prepared by means of carboxymethyl-dextran, *Acta Pol. Pharm.*, **25**, 583-590 (1968).
  - 32) Chwialkowska L., Krowczynski L., Carboxymethyl-dextran as a pharmaceutical aid in tablets. III. Study of solubility rate of acetylsalicylic acid from tablets, *Acta Pol. Pharm.*, **26**, 45-50 (1969).
  - 33) Chwialkowska L., Krowczynski L., Carboxymethyl-dextran as a pharmaceutical aid in tablets. IV. Swelling capacity of acid form of carboxymethyl-dextran, *Acta Pol. Pharm.*, **26**, 51-55 (1969).
  - 34) Miyazaki Y., Yakou S., Nagai T., Takayama K., The effect of polyion complex formation on in vitro/in vivo correlation of hydrophilic matrix tablets, *J.*

- Controlled Rel.*, **91**, 315-326 (2003).
- 35) 宮崎靖則, 谷古宇秀, 荒井一俊, 大淵満寿美, 福室憲治, 疎水性デキストラン誘導体を用いたテオフィリンマイクロスフェアの調製と放出特性, 第 37 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 1993 年 11 月.
  - 36) Tanigawara Y., Yamaoka K., Nakagawa T., Uno T., New method for the evaluation of in vitro dissolution time and disintegration time, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1088-1090 (1982).
  - 37) Moore J.W., Flanner H.H., Mathematical comparison of dissolution profiles, *Pharm. Tech.*, **20**, 64-74 (1996).
  - 38) Costa P., Lobo J.M.S., Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 123-133 (2001).
  - 39) Shukla A.J., Price J.C., Effect of drug (core) particle size on the dissolution of theophylline from microspheres made from low molecular weight cellulose acetate propionate, *Pharm. Res.*, **6**, 418-421 (1989).
  - 40) Akimoto M., Furuya A., Maki T., Yamada K., Suwa T., Ogata N., Evaluation of sustained-release granules of chlorphenesin carbamate in dogs and humans, *Int. J. Pharm.*, **100**, 133-142 (1993).
  - 41) Akiyama Y., Nagahara N., Nara E., Kitano M., Iwasa S., Yamamoto I., Azuma J., Ogawa Y., Evaluation of oral mucoadhesive microspheres in man on the basis of pharmacokinetics of furosemide and riboflavin, compounds with limited gastrointestinal absorption sites. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 159-166 (1998).
  - 42) Akiyama Y., Nagahara N., Kashihara T., Hirai S., Toguchi H., In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres prepared for the gastrointestinal tract using polyglycerol esters of fatty acids and a poly(acrylic acid) derivative. *Pharm. Res.*, **12**, 397-405 (1995).
  - 43) Santos C.A., Jacob J.S., Hertzog B.A., Freedman B.D., Press D.L., Harnpicharnchai P., Mathiowitz E., Correlation of two bioadhesion assays: the everted sac technique and the CAHN microbalance, *J. Control. Rel.*, **61**,

- 113-122 (1999).
- 44) Yamaoka K., Tanigawara Y., Nakagawa T., Uno T., A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer, *J. Pharmacobio. Dyn.*, **4**, 879-885 (1981).
  - 45) Montisci M.J., Dembri A., Giovannuci G., Chacun H., Duchêne D., Ponchel G., Gastrointestinal transit and mucoadhesion of colloidal suspensions of *Lycopersicon esculentum* L. and *Lotus tetragonolobus* Lectin-PLA microsphere conjugates in rats. *Pharm. Res.*, **18**, 829-837 (2001).
  - 46) Helliwell M., The use of bioadhesives in targeted delivery within the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Del. Rev.*, **11**, 221-251 (1993).
  - 47) Staib A.H., Loew D., Harder S., Graul E.H., Pfab R., Measurement of theophylline absorption from different regions of the gastro-intestinal tract using a remote controlled drug delivery device, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **30**, 691-697 (1986).
  - 48) Rindi G. and Laforenza U., Thiamine intestinal transport and related issue: recent aspects, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **224**, 246-255 (2000).
  - 49) Fassihi A.R. and Munday D.L., Dissolution of theophylline from film-coated slow release mini-tablets in various dissolution media, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 369-372 (1989).
  - 50) Aoyagi N., Ogata H., Kaniwa N., Koibuchi M., Shibazaki T., Ejima A., Mizobe M., Kohno K., Samejima M., Bioavailability of sugar-coated tablets of thiamine disulfide in humans. I. Effect of gastric acidity and *in vivo-in vitro* correlation, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 281-291 (1986).
  - 51) 山原弘, 池上謙吾, 久保博昭, 大沢孝, 村田一夫, 小林征雄, 野田和夫, 徐放性顆粒のバイオアベイラビリティに及ぼす放出速度の影響, *薬剤学*, **55**, 99-107 (1995).
  - 52) Weber W. and Kewitz H., Determination of thiamine in human plasma and its pharmacokinetics, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 213-219 (1985).
  - 53) Yamaoka K., Tanigawara Y., Uno T., Statistical moments in pharmacokinetics,

- J. Pharmacokint. Biopharm.*, **6**, 547–558 (1978).
- 54) Shah S., Qaqish H., Patel V., Amiji M., Evaluation of the factors influencing stomach-specific delivery of antibacterial agents for *Helicobacter pylori* infection, *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 667–672 (1999).
- 55) Cuña M., Alonso M.J., Torres D., Preparation and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres containing amoxicillin–resin complexes for drug delivery to the gastric mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**, 199–205 (2001).
- 56) Nagahara N., Akiyama Y., Nakao M., Tada M., Kitano M., Ogawa Y., Mucoadhesive microspheres containing amoxicillin for clearance of helicobacter pylori, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2492–2494 (1998).
- 57) Bottenberg P., Cleymaet R., de Muych C., Remon J.P., Coomans D., Michotte Y., Slop D., Development and testing of bioadhesive, fluoride-containing slow-release tablets for oral use, *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 457–464 (1991).
- 58) Singla, A.K., Chawla, M., Singh, A., Potential applications of carbomer in oral mucoadhesive controlled drug delivery system: a review. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 913–924 (2000).
- 59) Vasir J.K., Tambwekar K., Garg S., Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, **255**, 13–32 (2003).