

局所適用型製剤の試作とその薬物動態の  
マイクロダイアリシスによる評価

北 澤 英 徳



①

局所適用型製剤の試作とその薬物動態の  
マイクロダイアリスによる評価

北 澤 英 徳

## 目次

序論	1
第1章 コラーゲンと薬物の親和性に関する基礎的検討	4
第1節 材料と方法	4
(1) 試薬	4
(2) サンプルの調製	4
(3) 溶出試験	5
(4) 薬物の測定	5
(5) 溶出パラメータの算出	5
第2節 結果	6
(1) 各薬物の溶出挙動	6
(2) 溶出パラメータの算出	6
第3節 考察	8
第2章 アルギン酸ナトリウム添加コラーゲンの薬物放出制御	9
第1節 材料と方法	9
(1) 試薬	9
(2) サンプルの調製	9
(3) 溶出試験	10
(4) 薬物の測定	10
(5) アルギン酸ナトリウム添加による薬物の溶出	10
(6) アルギン酸ナトリウム添加濃度と薬物の溶出	10
(7) 溶出パラメータの算出	10
第2節 結果	10
(1) アルギン酸ナトリウム添加コラーゲンからの薬物の溶出挙動	10
(2) アルギン酸ナトリウム添加濃度と薬物の溶出挙動	13
(3) 溶出パラメータの算出	13
第3節 考察	14



第3章	局所適用型アミカシン(AMK)製剤の試作と マイクロダイアリシスによる動態評価	15
第1節	材料と方法	15
	(1) 試薬	15
	(2) 動物	15
	(3) AMK含有アルギン酸ナトリウム添加コラーゲン製剤の調製	16
	(4) AMK濃度の測定	16
	(5) 蛋白結合率の測定	16
	(6) マイクロダイアリシスによる <i>in vitro</i> での回収率	16
	(7) ラット肝ECFからの <i>in vivo</i> 回収	16
	(8) マイクロダイアリシスによるAMKの局所薬物動態	18
第2節	結果	18
	(1) AMKの蛋白結合率及びマイクロダイアリシスの回収率	18
	(2) マイクロダイアリシスによるAMKの動態解析	19
第3節	考察	20
第4章	P糖蛋白阻害剤シクロスポリンA(CyA)及びエトポシド(VP-16) 含有コラーゲン製剤の局所適用とその動態評価	22
第1節	材料と方法	22
	(1) 試薬	22
	(2) 動物	23
	(3) 薬物含有コラーゲンの調製	23
	(4) 溶出試験	23
	(5) VP-16濃度の測定	23
	(6) 蛋白結合率の測定	23
	(7) マイクロダイアリシスによる <i>in vitro</i> での回収	23
	(8) ラット肝ECFからの <i>in vivo</i> での回収	24
	(9) マイクロダイアリシスを利用したVP-16の局所薬物動態	24
	(10) VP-16の血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼすCyAの効果	24
第2節	結果	25
	(1) VP-16含有コラーゲン製剤の溶出試験	25
	(2) VP-16の蛋白結合率及びマイクロダイアリシスの回収率	25
	(3) VP-16の血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼすCyAの効果	26
第3節	考察	28



第5章	ドキソルビシン(DOX)含有フィブリン製剤の 局所適用とその動態評価	30
第1節	材料と方法	30
(1)	試薬	30
(2)	動物及び腫瘍細胞	30
(3)	DOX含有フィブリンの調製	30
(4)	溶出試験	31
(5)	DOX濃度の測定	31
(6)	マイクロダイアリシスによる <i>in vitro</i> での回収率	31
(7)	DOXの局所薬物動態とマイクロダイアリシスを用いた測定	31
第2節	結果	32
(1)	DOX含有フィブリン製剤の溶出挙動	32
(2)	DOXのマイクロダイアリシスによる回収	32
(3)	DOXの動態解析	33
第3節	考察	36
	総括	37
	参考文献	38



## 序論

近年開発された制癌剤の多くが治療の効率が低い割に副作用の発現が顕著で、これを克服するための試みとして外科医と製剤技術者との共同研究が開始され、その成果の公開の場として DDS 学会が創設され十余年が経過している。

薬物送達システム (DDS) の目的は、標的とする病巣に薬剤を選択的に到達させ、必要な量を必要な時間作用させることにある。すなわち、薬剤の標的へのターゲティングと放出制御が DDS の最も重要な機能である。DDS の導入により治療効果の改善が期待されている疾患としては、細胞毒作用のため治療係数が小さく投与が難しい抗癌剤をはじめとして、腎毒性を有するアミノグリコシド系抗生物質、炎症部位へのターゲティングを目的とした抗炎症薬などがあげられる。特に、癌化学療法においては、癌細胞が生体由来の細胞であるため正常細胞との違いが少なく、多くの抗癌剤は正常細胞にも作用するので、癌細胞を標的とする DDS はより効率の良い投与方法といえる<sup>1,2)</sup>。

輸送手段としては、リポソーム<sup>3)</sup>、マイクロスフェア<sup>4)</sup>、エマルジョン<sup>5)</sup>、高分子結合体<sup>6)</sup>などが開発されているが、臨床にまで用いられている DDS は極めて少ない。1993 年に発売されたスマンクスは、ネオカルチノスタチンをエステル結合させたスチレン-マレイン酸重合体のエマルジョン製剤で肝動注による肝癌のターゲティング療法として臨床で使用されているが、食欲不振、悪心・嘔吐、発熱などの副作用が高率に認められ、患者の QOL は大きく影響を受けている。

このように副作用で投与量が制限される薬物の治療効率を高めるためには、生体内で分解される担体を利用し、標的臓器近傍で薬物を徐々に放出させ、全身の循環系への移行を極力抑制する製剤が必要と考えられる。

一方、癌の化学療法においてダウノルビシン、ドキソルビシンなどの抗癌剤の多剤耐性が大きな問題となり、その耐性化のメカニズムとして



P糖蛋白がクローズアップされてきた<sup>7-11)</sup>。P糖蛋白は癌細胞内に流入した細胞毒の薬剤をエネルギー依存的に細胞外に排出するポンプ機能を有し、化学構造も作用機序も異なる種々の薬物に対し耐性化する分子量170kDaの特異な膜蛋白である。P糖蛋白は様々な正常組織の細胞膜上に発現しており、特に肝臓及び腎臓では、生体異物の体外への排出ポンプとして薬物の排泄に関与していることが、また、脳の網細血管では血液-脳関門機能として働いており、様々な生理機能に関与していることが明らかとなった<sup>12-15)</sup>。このP糖蛋白の作用を阻害する薬剤としては、カルシウム拮抗薬のベラパミル、免疫抑制薬のシクロスポリンなどが有名で<sup>16-18)</sup>、多剤耐性克服のために臨床試験も実施されている<sup>19-21)</sup>。本研究ではこの点を考慮した局所適用型製剤を試作し、モデル薬物にはシクロスポリンAとエトポシドを用いた。また、体液中の薬物濃度測定にマイクロダイアリシスを用いてみた。

マイクロダイアリシスは脳の神経伝達物質や脳内薬物濃度を測定する手段として開発されたが、その後、血液、肝臓、筋肉など様々な臓器で応用され、薬物の体内動態の解析に利用されている<sup>22-27)</sup>。マイクロダイアリシスの優れた点は、目的の臓器を破壊せずに持続的に臓器内の濃度を測定することが可能で、測定する際にサンプルの前処理が不要な上、他の成分のコンタミネーションを防ぐことができる点である。

本研究は、現在臨床で切除不可能な消化器腫瘍に対して、ブレオマイシンのような薬剤を直接患部にふりかけている医療の現状を知り、DDS製剤の開発を思い立った。そこで、DDS基剤として既に報告例があり、生体内で分解・吸収されるコラーゲン<sup>28-32)</sup>及びフィブリン<sup>33-36)</sup>に着目し、局所適用型製剤の試作を試みた。

まず、コラーゲンと各種薬物との結合性を *in vitro* の溶出試験を用いて検討し(1章)、更にアルギン酸ナトリウムを添加することにより、薬物の溶出がどのように変化するのかを検討した(2章)。

次に、適切な溶出挙動の確認されたアミカシン(AMK)含有アルギン酸



ナトリウム添加コラーゲン製剤をラットの肝臓表面に局所適用し、そこから放出される薬物の動態についてマイクロダイアリシスを利用して検討した（3章）。

さらに、P糖蛋白阻害剤シクロスポリン A (CyA)とその基質エトポシド (VP-16)とを含有するコラーゲン製剤を試作し、これをラット肝臓表面に装着し、P糖蛋白阻害作用によるVP-16の体内動態及びVP-16静注後のCyAによる血中動態の変化と胆汁排泄抑制効果について検討した（4章）。

一方、担体としてフィブリンを用いたドキソルビシン(DOX)含有アルギン酸ナトリウム添加フィブリン製剤を調製し、ラットの腫瘍表面に装着し、腫瘍内の薬物濃度及び循環血中への移行挙動を検討した（5章）。

その結果、溶出試験では、コラーゲンのみで至適な放出抑制が得られなかったため、適度な親和性を持つ基剤について検討したところ、アルギン酸ナトリウムが、薬物のコラーゲンからの放出を抑制する物質として極めて有用であることを見出した。次に、AMK含有コラーゲン製剤をラット肝臓表面に局所適用すると、肝細胞外液中のAMK濃度は長時間にわたり高いレベルに維持できることが判った。さらに、CyAを添加したVP-16含有コラーゲン製剤は、CyAによるVP-16の胆汁排泄を抑え、肝細胞外液中のVP-16濃度を極めて高濃度に維持できることを明らかにした。一方、DOX含有フィブリン製剤をラットの腫瘍表面に装着すると、腫瘍内のDOX濃度は血液中に比べ、極めて高濃度を維持できることを示した。

以上のことから、コラーゲン及びフィブリンをキャリアーとした局所適用型DDS製剤は極めて有用であり、治療効率の向上と副作用の軽減を目的とした剤型設計が可能であることを示すことができた。



## 第1章 コラーゲンと薬物の親和性に関する基礎的検討

市販のコラーゲンは牛の真皮由来の微繊維性で、血小板が接触すると血栓を生じ止血効果を現わす。また生体内に留置すると、約50日でペプチドまたはアミノ酸にまで分解される<sup>37,38)</sup>。コラーゲンの体内分解性と止血効果とを利用し、抗ガン剤をコラーゲン繊維に結合させ、切除不可能なガン組織の近傍に留置すれば、薬物の局所濃度を高め副作用の軽減と同時に手術部位の出血を抑え、より効率の良い治療を実施し得ると推測される。このキャリアーにどのような薬物が適当かを決定する目的で、コラーゲンと各種薬物との結合に関する検討を行なった。コラーゲンに各種薬物を吸収させて溶出試験を行ない、その結合性に関し検討した。

### 第1節 材料と方法

#### (1) 試薬

コラーゲンは牛真皮由来の微繊維性でシートタイプの Avitene<sup>®</sup> (ゼリア新薬)を用いた。溶出試験には、塩酸エピルピシン (EPI, 協和発酵), 5-FU (協和発酵), クロラムフェニコール (CP, 三共), 硫酸アミカシン (AMK, 萬有製薬), シスプラチン (CDDP, 日本化薬), マイトマイシン C (MMC, 協和発酵) の計6種類の化合物を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。また透析膜は分画分子量 12,000~14,000 の再生セルロース膜 (三光純薬)を使用した。

#### (2) サンプルの調製

薬物の濃度は、予試験の結果から適当と思われる濃度を規定し、EPI, 5-FU, CP, AMK, MMC, 及び CDDP の濃度をそれぞれ 2mg/ml, 1mg/ml, 3.3mg/ml, 10mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml に調製し、コラーゲンに吸着させた。また、吸着状態の経時的挙動を検索する目的で、溶出試験の直前に試料溶液をしみ込ませたもの (Wet Sample)とそれを1日室温で



自然乾燥させたもの (Dry Sample) とを調製し、溶出試験を行なった。対照 (Control) として単なる溶液を用い溶出試験を行なった。

### (3) 溶出試験

シートタイプのコラーゲンは、重量で約 8 倍量の水を添加しても原形を保持していることから、コラーゲン 50mg に薬物溶液を 0.4ml をしみこませた。これを Phosphate Buffered Saline (pH7.0, PBS) 1ml と共に透析チューブに入れ、50 または 100ml の PBS 中に浸し攪拌した。経時的に外液を採取し、遊離してくる薬物濃度を測定した。

### (4) 薬物の測定

#### (a) MMC の定量

MMC は分光光度計 (U-3410, 日立) を用い、360nm における吸光度を測定した。

#### (b) AMK の定量

TDX システム (ダイナボット製) を用いて蛍光偏光イムノアッセイ (FPPIA) 法で測定した。

#### (c) CP, EPI<sup>39,40)</sup>, 5-FU, CDDP<sup>41)</sup> の定量

HPLC 法で以下の条件に従って測定した。

- 1) カラム ; TSK-Gel ODS-120A (46 x 250 mm)
- 2) 移動相 ; EPI: 0.005M Phosphate Buffer (pH4.5) - アセトニトリル (1:1), CP: 水-メタノール (3:7), 5-FU: 水-メタノール (9:1), CDDP: 水-メタノール (4:1)
- 3) 測定波長 ; EPI: Excitation; 470nm, Emission; 585nm, CP: 280 nm, 5-FU; 250nm, CDDP; 254nm, なお, CDDP は Andrews らの方法<sup>41)</sup> に従い Diethyldithiocarbamate (DDTC) 誘導体として測定した。

### (5) 溶出パラメーターの算出

溶出パラメーター (Rate of Release) を次式の様に定義し、単位時間あたりに溶出する薬物量から傾き (溶出速度) を算出した。

$$\text{Rate of Release} = (Q_n - Q_{n-1}) / (t_n - t_{n-1}) \quad (n \geq 1)$$

Q : 各時間における溶出量, t : サンプルング時間



## 第2節 結果

### (1) 各薬物の溶出挙動

6種類の薬物及びコントロールの、累積溶出量(%)—時間曲線を Fig. 1に示す。EPI, 5-FU 及び CP では溶出が多少遅れる傾向がみられたが、AMK はコントロールとほとんど差が認められなかった。

一方、CDDP 及び MMC の Wet Sample の溶出量は、CDDP で約 75%、MMC で約 70%、また、Dry Sample では MMC は約 10%、CDDP は殆ど溶出せず、他の3つの薬物では溶出量がほぼ 100%に達したのと対照的であった。

次に、溶出が 100%に達した薬物について、50%溶出時間を求めた結果を Table 1に示す。CP, EP 及び 5-FU は、対照に比し Dry Sample で 2~3 倍の遅れが観察されたが、AMK は 1.3 倍で溶出量に差は見られなかった。

### (2) 溶出パラメーターの算出

溶出に関するパラメーター (Rate of Release) を Table 2 に示す。各薬物とも負の一定値となり、EPI 及び 5-FU の値はコントロールとの間に有意な差が認められた。これらの差は Wet Sample より Dry Sample の方が顕著で溶出の遅れを示すものである。

Table 1. 50 % Release Time vs Drugs from Collagen

	5-FU	EPI	AMK	CP
Control (min)	12.1	72.2	67.8	27.9
Wet type (min)	19.6	101.1	73.4	34.3
Dry type (min)	26.9	174.1	89.4	68.6



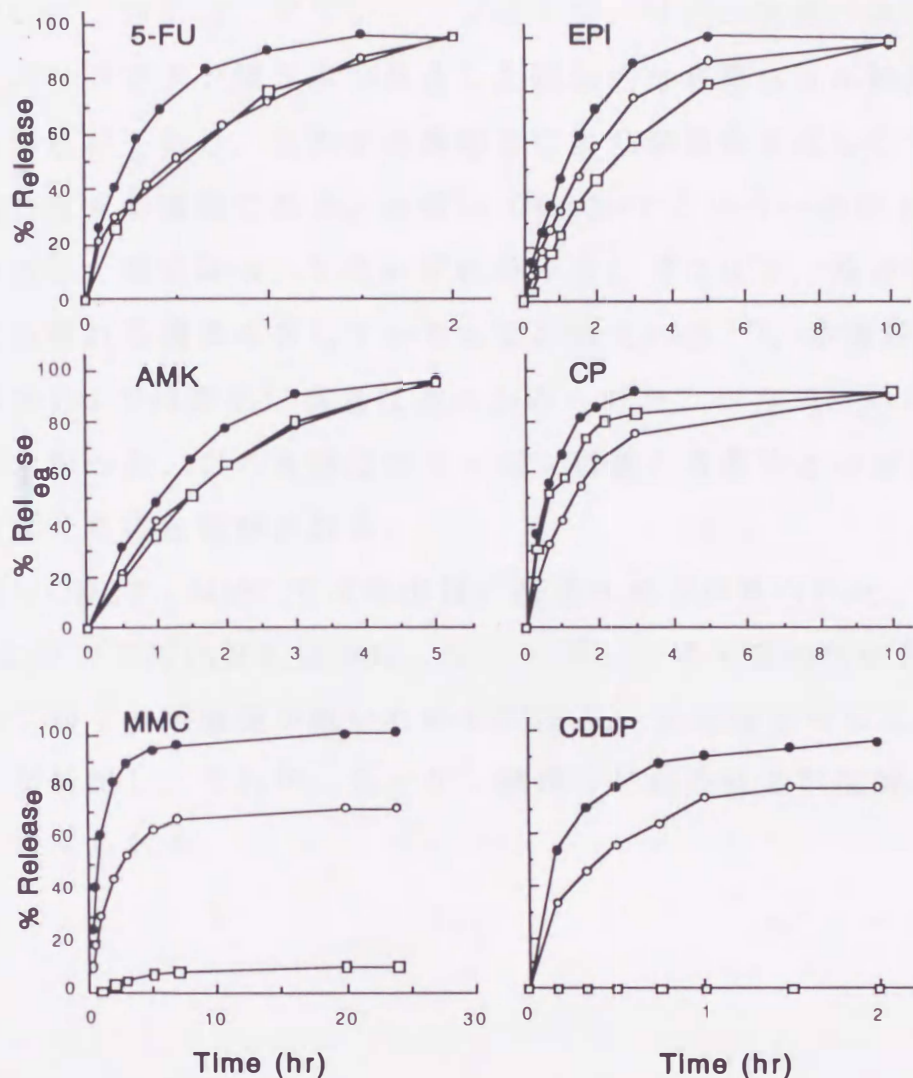


Fig. 1. Release Profiles of Drugs from Wet or Dry Type of Collagen Preparations  
 ● : Control (Solution), ○ : Wet type, □ : Dry type  
 Each point represent the mean of three experiments.

Table 2. Slopes for the Time vs. Rate of Release of drugs

	5-FU	EPI	AMK	CP
Control ( $10^{-3}$ )	-20.6	-4.89	-3.91	-6.31
Wet type ( $10^{-3}$ )	-12.6 <sup>a)</sup>	-3.27 <sup>b)</sup>	-2.95	-5.98
Dry type ( $10^{-3}$ )	-7.89 <sup>a)</sup>	-1.97 <sup>b)</sup>	-3.15	-4.10

a) Significantly different from control ( $p < 0.05$ )

b) Significantly different from control ( $p < 0.01$ )



### 第3節 考察

コラーゲン分子は、グリシン、プロリン、リジン含量の多い $\alpha$ 鎖とよばれるポリペプチド鎖3本が集合した規則的な3重らせん構造を有することが知られており、これが水素結合により架橋を形成したマトリックス構造を有する繊維である。 $\alpha$ 鎖は Gly-X-Y という一連のトリペプチドからなり、通常は X, Y のいずれか一方にプロリン、他方にはリジンが多く含まれる構造を有していると言われている<sup>42)</sup>。本実験に用いた EPI や 5-FU では溶出に有意な遅れがみられた。一方 AMK では遅れが見られなかった。この現象はコラーゲン繊維と各薬物との結合様式の差異に基づくものと推察される。

一方、CDDP, MMC では溶出量に顕著な低下が見られた。CDDP, MMC における溶出量の減少は、コラーゲンと不可逆的な結合をしたか、水に対する溶解度が低いため CDDP を一旦乾燥させたことにより CDDP が析出し、それがコラーゲン繊維中に包み込まれ溶解しなかったためと考えられる。



## 第2章 アルギン酸ナトリウム添加コラーゲンの薬物放出制御

前章で薬物とコラーゲンとの親和性について検討した結果、コラーゲンのみでは至適な放出挙動を推察できない場合のあることが示唆されたため、放出を適宜抑制させる目的で、数種の基剤をコラーゲンに加えたところ、アルギン酸ナトリウムが有望な添加剤であることが判った。

アルギン酸ナトリウムは、海藻由来の粘性のある多糖類で、出血創面に強く付着し出血部位を被覆し止血効果を示すとともに、血小板の凝集能を亢進し、フィブリン形成を促進し、止血効果を示す<sup>43-49)</sup>。加えて抗原性や刺激性はほとんど認められず、安全性に優れていることから理想的な基剤であると考えられる。そこで、抗生物質の硫酸アミカシン (AMK) 及び抗癌剤の塩酸エピルピシン (EPI) をモデル薬物とし、アルギン酸ナトリウムを添加したコラーゲンの薬物放出に及ぼす効果について検討した。

### 第1節 材料と方法

#### (1) 試薬

コラーゲンはシートタイプの Avitene<sup>®</sup> (ゼリア新薬) を用いた。AMK は硫酸アミカシン注<sup>®</sup> (萬有製薬) 及び EPI はファルモルピシン注<sup>®</sup> (協和発酵) を、アルギン酸ナトリウムはアルト<sup>®</sup> (共成製薬) を、その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。また透析膜は分画分子量 12,000~14,000 の再生セルロース膜 (三光純薬) を使用した。

#### (2) サンプルの調製

アルギン酸ナトリウムの最終濃度を 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, AMK は 5 mg/ml, EPI は 1 mg/ml になるようそれぞれ調製し、アルギン酸ナトリウム溶液に薬物を溶解後コラーゲンに吸着させ、3日間室温で徐々に乾燥後溶出試験を行なった。対照としては、薬物をアルギン酸ナトリウム溶液に溶解したサンプル及びアルギン酸ナトリウムを加えずにコラーゲンに吸着させたサンプルの二つを調製した。



### (3) 溶出試験

溶出試験は前章に準じ行なった。

### (4) 薬物の測定

#### (a) AMKの定量

TDXシステム (ダイナボット製)を用いて蛍光偏光イムノアッセイ法で測定した。

#### (b) EPIの定量

カラムは $\mu$  Bondasphere 5 $\mu$  C18-100 (Waters 社製), 移動相は0.005 Mリン酸バッファー(pH3)-アセトニトリル (1:1), 測定波長はEx; 470 nm, Em; 585nmで測定した。

### (5) アルギン酸ナトリウム添加による薬物の溶出

アルギン酸ナトリウムと薬物との親和性, さらにそれをコラーゲンと反応させた際の溶出挙動変化を試験した。

### (6) アルギン酸ナトリウム添加濃度と薬物の溶出

添加するアルギン酸ナトリウムの濃度による影響を観察する目的で, 2.5%と5%のアルギン酸ナトリウム溶液で試験を行なった。

### (7) 溶出パラメーターの算出

溶出パラメーター (Rate of Release)の算出は前章に従って行なった。

## 第2節 結果

### (1)アルギン酸ナトリウム添加コラーゲンからの薬物の溶出挙動

Fig.2にAMKの溶出試験の結果を示す。AMK溶液にアルギン酸ナトリウムを添加すると溶出に遅れがみられ, それをコラーゲンに吸着させ乾燥するとさらなる溶出量の低下がみられた。Fig.3にEPIの溶出試験の結果を示す。EPI溶液にアルギン酸ナトリウムを添加したものと, コラーゲンのみに薬物を吸着させた二つのコントロールでは, ほぼ同程度の溶出量の低下がみられ, アルギン酸ナトリウム存在下コラーゲンに吸着させた試料はさらに顕著な低下が観察された。



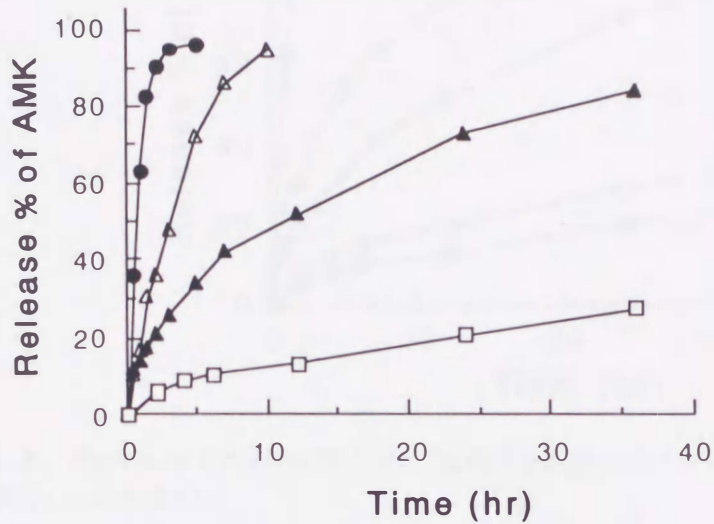


Fig. 2. Release Profiles of AMK in the Presence of Collagen and Sodium Alginate  
 ● : Control (AMK Solution)      △ : AMK+Collagen  
 ▲ : AMK+5 % Sodium Alginate      □ : AMK+5 % Sodium Alginate+Collagen  
 Each point represent the mean of three experiments.

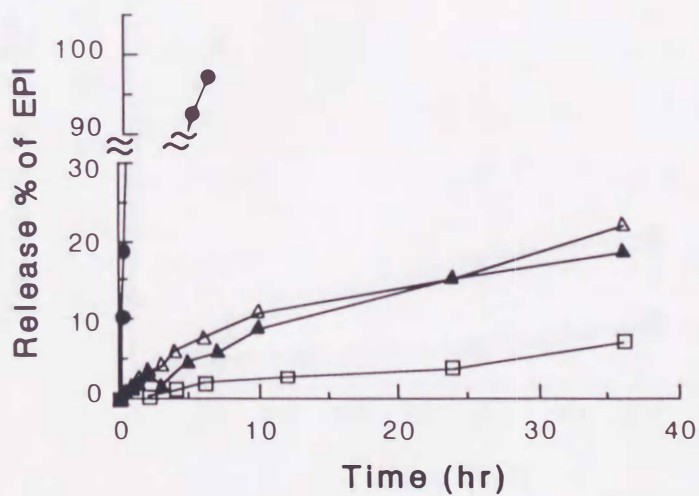
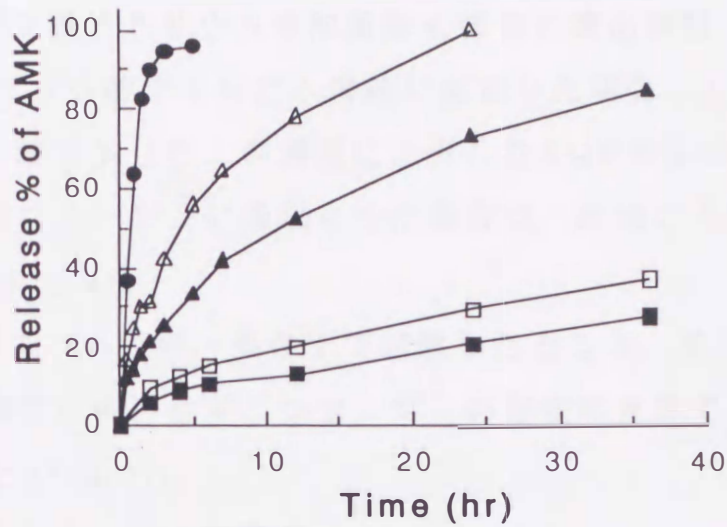


Fig. 3. Release Profiles of EPI in the Presence of Collagen and Sodium Alginate  
 ● : Control (EPI Solution)      △ : EPI+Collagen  
 ▲ : EPI+5 % Sodium Alginate      □ : EPI+5 % Sodium Alginate+Collagen  
 Each point represent the mean of three experiments.

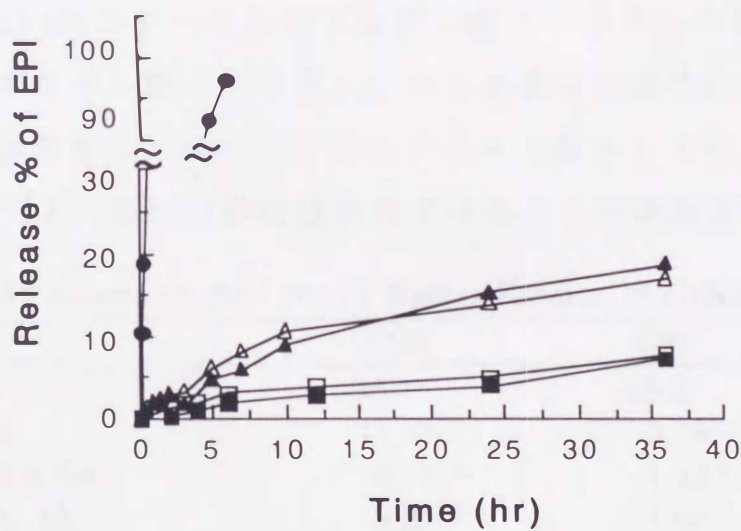




**Fig. 4.** Release Profiles of AMK from Collagen in a Different Concentration of Sodium Alginate

- : Control (AMK Solution)                      △ : AMK+2.5 % Sodium Alginate
- ▲ : AMK+5 % Sodium Alginate              □ : AMK+2.5 % Sodium Alginate+Collagen
- : AMK+5 % Sodium Alginate+Collagen

Each point represent the mean of three experiments.



**Fig. 5.** Release Profiles of EPI from Collagen in a Different Concentration of Sodium Alginate

- : Control (EPI Solution)                      △ : EPI+2.5 % Sodium Alginate
- ▲ : EPI+5 % Sodium Alginate              □ : EPI+2.5 % Sodium Alginate+Collagen
- : EPI+5 % Sodium Alginate+Collagen

Each point represent the mean of three experiments.



## (2) アルギン酸ナトリウム添加濃度と薬物の溶出挙動

AMKをアルギン酸ナトリウム溶液に添加した場合、2.5%及び5%溶液ではアルギン酸ナトリウムの濃度に依存したAMKの溶出の低下がみられたが、これをコラーゲンに吸収させた場合は、溶出に大きな差は認められなかった (Fig.4)。

一方、EPIについて同一条件下で試験したところ、溶出はアルギン酸ナトリウム濃度に依存せず、コラーゲンの存在の有無で差異が生ずることが判明した (Fig.5)。

## (3) 溶出パラメーターの算出

算出された放出速度をそれぞれの測定時間の中点に対して片対数プロットすると、いずれの場合も直線関係を示すことが判った。得られた薬物の溶出に関するパラメーターをTable 3に示す。コントロールに比べAMK、EPIともにコラーゲンとアルギン酸ナトリウムに親和性を示したが、AMKではアルギン酸ナトリウムに対する親和性はコラーゲンより強く、アルギン酸ナトリウム濃度に依存してAMKの溶出は顕著に抑制された。一方、EPIはコラーゲンとアルギン酸ナトリウムと双方に親和性を示したが、アルギン酸ナトリウムに対する濃度依存性は認められなかった。以上の結果から、コラーゲンとアルギン酸ナトリウムの併用によりAMKあるいはEPIの溶出速度は制御できることが確認された。

**Table 3.** Slopes for the Time vs. Rate of Release of AMK and EPI

	AMK	EPI
Control	-48.1	-25.9
With CS	-11.4 <sup>a)</sup>	-2.76 <sup>b)</sup>
With 2.5 % SA	-6.11 <sup>b,c)</sup>	-1.53 <sup>b)</sup>
With 5 % SA	-3.91 <sup>b,c,e)</sup>	-1.94 <sup>b)</sup>
With CS and 2.5 % SA	-1.21 <sup>b,d,f)</sup>	-0.82 <sup>b,c)</sup>
With CS and 5 % SA	-1.06 <sup>b,d,f)</sup>	-0.86 <sup>b,c)</sup>

a) Significantly different from control ( $p < 0.05$ )

b) Significantly different from control ( $p < 0.01$ )

c) Significantly different from CS ( $p < 0.05$ )

d) Significantly different from CS ( $p < 0.01$ )

e) Significantly different from SA ( $p < 0.05$ )

f) Significantly different from SA ( $p < 0.01$ )



### 第3節 考察

AMKはコラーゲンとの結合性は弱いですが、アルギン酸ナトリウム添加でAMKの溶出が顕著に改善され、アルギン酸ナトリウムの濃度が高いほど溶出速度が抑制された。一方、EPIはコラーゲンとアルギン酸ナトリウムに同程度の親和性を示し、両者の併用でさらに溶出が抑制された。コラーゲンはマトリックス構造を維持しており、アルギン酸ナトリウムも繊維構造で多くの水酸基を有しているため、二者の混合で複雑な立体構造が形成され、その間隙に薬物が進入し、これが薬物の徐放性に寄与していると考えられる。

以上の結果、コラーゲン単独では親和性が弱いですが、可逆的な結合様式を示す薬物は、アルギン酸ナトリウムとの組み合わせで溶出が適切に制御されることが判った。特にAMKは、アルギン酸ナトリウムの存在で溶出が顕著に抑制された。コラーゲンとアルギン酸ナトリウムに薬物を吸収させたDDS製剤は、薬物の局所濃度の持続と全身循環系へ移行の低下で副作用が軽減できることが本実験の結果から確認された。



### 第3章 局所適用型アミカシン製剤の試作とマイクロダイアリシスによる動態評価

外科手術後の細菌感染を防ぐために、抗生物質の筋注あるいは静注による全身投与が行われているが、全身性の副作用または患者のQOLの低下を招く恐れがある。局所に限定した抗生物質のDDS製剤であれば、標的臓器で高い薬物濃度を得ることが可能であり、循環血中の濃度が毒性レベルに達することもないため、理想的な投与手段であると考えられる。このようなDDS製剤を可能にするためには、生体内で分解・吸収され、薬物を徐々に放出するコラーゲンは理想的な担体である。抗生物質の中でも特にアミノグリコシド系抗生物質は、腎及び聴覚毒性を有し、その毒性は血中濃度と相関するため血中濃度のモニタリングを要する薬剤である。

そこで、前章で試作したAMK含有アルギン酸ナトリウム添加コラーゲン製剤を用いて、局所における薬物濃度を高め、循環系への移行を抑制ことを目的に、本製剤を局所適用し、AMKの動態をマイクロダイアリシスを用い検討した。

#### 第1節 材料と方法

##### (1) 試薬

コラーゲンはシートタイプのAvitene<sup>®</sup> (ゼリア新薬)を用いた。AMKは硫酸アミカシン注<sup>®</sup> (萬有製薬)を、アルギン酸ナトリウムはアルト<sup>®</sup> (共成製薬)を用いた。また透析膜は分画分子量12,000~14,000の再生セルロース膜 (三光純薬)を使用した。マイクロダイアリシスは、分画分子量20,000のMicrodialysis probe CMA/20 (全長24mm, 透析部10mm, BAS Ltd), 濾紙はGC50 (直径25mm, 東洋濾紙)を用い、その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

##### (2) 動物



Wistar系雄性ラット (250-300g, 三協ラボ)を使用した。

### (3) AMK含有アルギン酸ナトリウム添加コラーゲン製剤の調製

10mgのアルギン酸ナトリウムを0.4mlのAMK溶液(5 mg/ml)に加え、コラーゲンシートと反応させ3日間室温で乾燥させた。また、対象として直径25mmの濾紙2枚に同液を吸収させた。

### (4) AMK濃度の測定

TDXシステム(ダイナボット製)を用い、蛍光偏光イムノアッセイ法で測定した。

### (5) 蛋白結合率の測定

10  $\mu$ g/mlのAMK溶液をラット血漿に加え、限外濾過法により非結合型のAMK濃度を測定した。限外濾過にはCentrifree<sup>®</sup>(アミコン)を用い、4,000 rpmで5分間遠心分離した。

### (6) マイクロダイアリシス<sup>50,51)</sup>による *in vitro*での回収

AMKの最終濃度が10  $\mu$ g/mlのリンゲル液とラット血漿を調製し、その中にprobeを入れ、probeに一定の流速(3  $\mu$ l/min)でリンゲル液を循環させた。開始20分後より1時間透析液を集めAMK濃度を測定した。Microdialysis probeの構造をFig. 6に示す。

AMKの回収率は以下の式により算出した。

$$R_{\text{vitro}} = \frac{\text{dialysate concentration}}{\text{surrounding concentration}}$$

### (7) ラット肝ECFからの *in vivo*回収

ラットをペントバルビタールの腹腔内投与(50mg/kg)で麻酔後、ラットの肝右葉の中心にプローブを挿入し、接着剤(アロンアルファ, 三共)により固定した。AMK(10  $\mu$ g/ml)をインフュージョンポンプで1時間循環させ安定化後、透析液を1時間採取し、AMKの流入濃度と流出濃度を測定した。マイクロダイアリシスの模式図をFig. 7に示す。

肝細胞外液からのAMKの回収率は以下の式により算出した。

$$R_{\text{vivo}} = 1 - \frac{\text{effluent dialysate concentration}}{\text{influent dialysate concentration}}$$



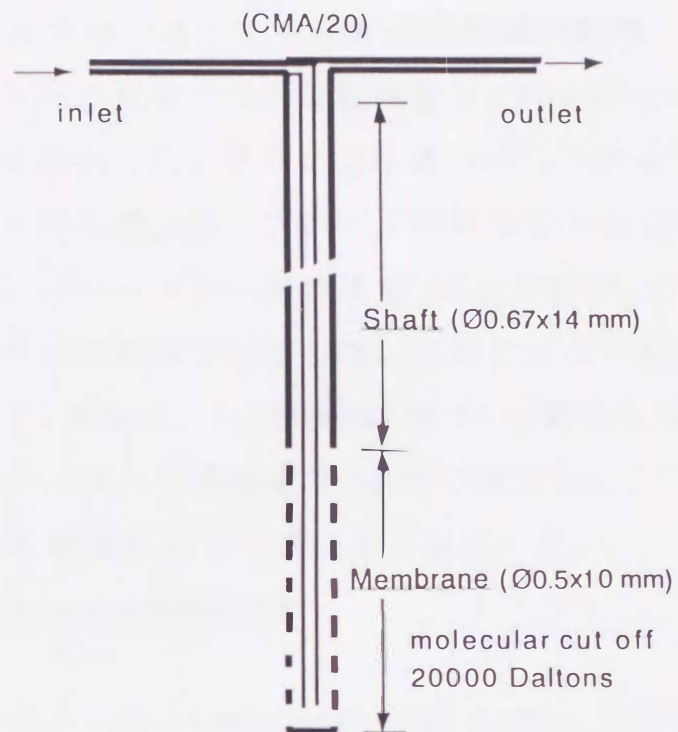


Fig. 6. Structure of a Microdialysis Probe

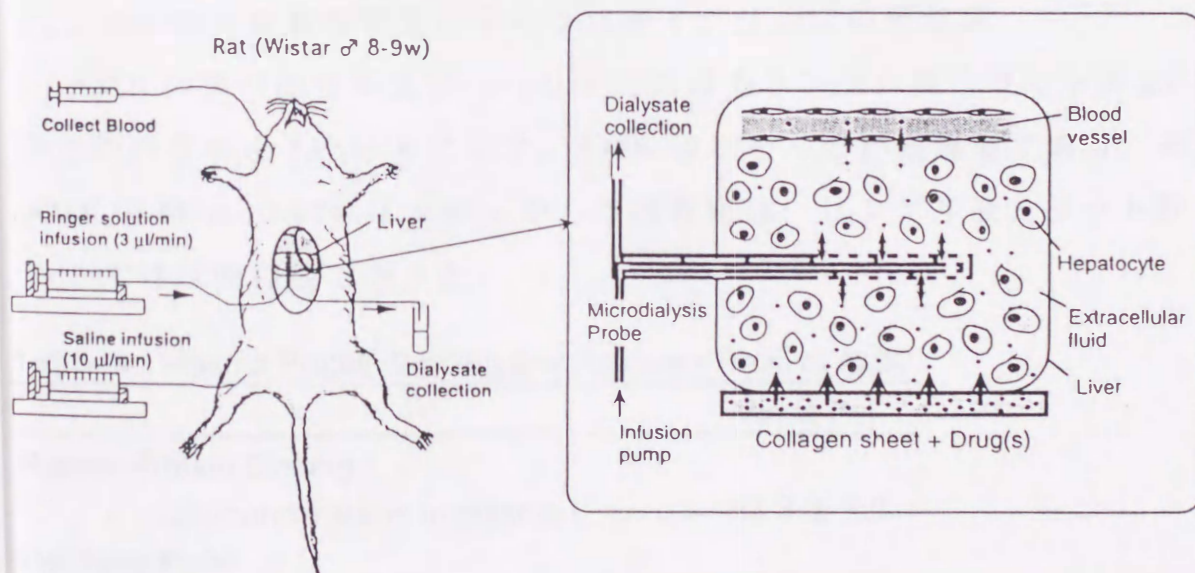


Fig. 7. Schema of *in vivo* Microdialysis in Rats



#### (8) マイクロダイアリシスによる AMK の局所薬物動態

ラットをペントバルビタールの腹腔内投与 (50mg/kg) で麻酔後大腿静脈にカニューレを挿入した。さらに正中線に沿って開腹し、肝臓の右葉の中心部にプローブを挿入後、プローブに対し平行に AMK 含有コラーゲンを添着した。プローブに一定の流速 (3  $\mu$  l/min) でリンゲル液を循環させ、1 時間毎に透析液を採取した。血液サンプルは大腿静脈のカニューレから 200  $\mu$  l 採取し、3,000RPM で 10 分間遠心分離後血漿を分離した。得られたサンプルは測定まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

肝 ECF の AMK 濃度は以下の式により算出した。

$$C_{\text{ECF}} = \frac{\text{effluent dialysate concentration}}{R_{\text{vivo}}}$$

薬動学的パラメーター (area under the curve, AUC; mean residence Time, MRT) はモーメント解析<sup>52)</sup>により算出した。

## 第 2 節 結果

### (1) AMK の蛋白結合率及びマイクロダイアリシスの回収率

AMK の蛋白結合率及び *in vitro* におけるリンゲル液とラット肝 ECF からの回収率を Table 4 に示す。AMK はほとんどが遊離型であり、また、AMK の Microdialysis probe からの回収率は、リンゲル液とラット肝 ECF でほぼ同程度であった。

**Table 4.** Plasma Protein Binding and Recovery Ratio of AMK

	Value (%)
Plasma Protein Binding	
Unbound fraction in plasma	95.3 $\pm$ 1.2
Recovery Ratio	
The liver ECF ( <i>in vivo</i> )	11.2 $\pm$ 1.9
Ringer's solution ( <i>in vitro</i> )	13.1 $\pm$ 0.2

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



## (2) マイクロダイアリシスによる AMK の動態解析

モーメント解析により得られた血漿中及び肝 ECF 中 AMK の薬動学的パラメーターを Table 5 に示す。コラーゲンを担体とした製剤を局所適用すると、対照として用いた濾紙に比べ、AUC 及び MRT は高い値を示し、AMK の血漿中と肝 ECF 中の MRT はそれぞれ 4~5 倍に増大した。さらに、薬物の肝 ECF -血漿 AUC 比は、コラーゲン製剤が濾紙に比し有意に高い値を示した ( $p < 0.05$ )。Fig. 8 に血漿中と肝 ECF 中の AMK 濃度の推移を示す。濾紙を用いた場合は 24 時間後には検出限界以下となったが。コラーゲン製剤は 24 時間後も  $2 \mu\text{g/ml}$  以上の比較的高濃度を維持した。

**Table 5.** Pharmacokinetic Parameters of AMK in Plasma and Liver ECF after Local Application of Collagen Sheet (CS) or Filter Paper (FP) Preparations

Parameter	AMK + SA + FP		AMK + SA + CS	
	Plasma	Liver ECF	Plasma	Liver ECF
AUC (hr · mg/ml)	14.3 ± 1.9	23.6 ± 5.8	31.9 ± 3.7 <sup>a)</sup>	93.8 ± 24.0 <sup>a)</sup>
MRT (h)	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.7	10.8 ± 1.7 <sup>a)</sup>	13.9 ± 5.0
AUC ratio <sup>c)</sup>	1.61 ± 0.24		2.95 ± 0.67 <sup>b)</sup>	

Data are expressed as the mean ± S.D. (n=3).

a) Significantly different from AMK+SA+FP ( $p < 0.01$ ).

b) Significantly different from AMK+SA+FP ( $p < 0.05$ ).

c) Liver ECF-to-plasma AUC ratio.



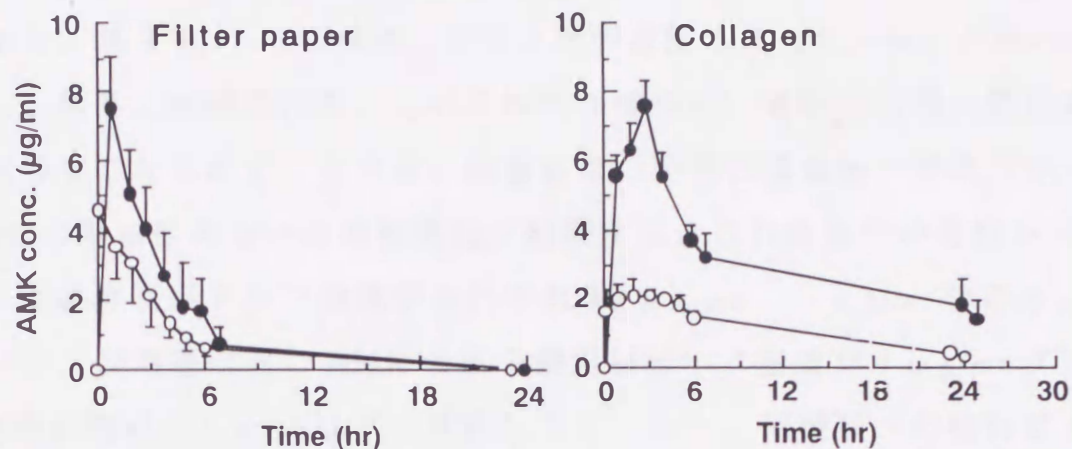


Fig. 8. Plasma (○) and Liver ECF (●) Concentrations of AMK after Local Application of the Filter Paper (Panel A) and Collagen Sheet (Panel B) Supplemented with 2.5% Sodium Arginate on the Surface of Rat livers. The dose of AMK is 2 mg in all the cases. Each point and vertical bar represent the mean  $\pm$  S.D. of three rats.

### 第3節 考察

コラーゲンをを用いた AMK の DDS 製剤について体内動態を検討した。AMK はそのほとんどが未変化体として腎臓から排泄され、肝代謝を受けないため<sup>5,3)</sup>、ラット肝臓表面に適用後の体内動態を解析する際のモデル薬物として最適と考えられる。今回試作した AMK 含有アルギン酸ナトリウム添加コラーゲン製剤の肝 ECF 中 AMK 濃度は、対照として用いた濾紙と比較し長時間高濃度を維持した。この AMK 濃度の持続は *in vitro* 試験の結果から明らかのように、AMK とアルギン酸ナトリウム及びコラーゲンとの高い親和性によると考えられる。一方、肝 ECF 中 AMK 濃度の測定に用いたマイクロダイアリシスは、従来の肝ホモジェネートを験体とする方法に比べ、肝臓表面に残存する薬物や抽出時の分解などを無視でき、サンプルを直接 HPLC に注入できるので、局所投与時の組織 ECF 中濃度を測定する手段として優れた装置であることが確認された。

Fig.8 に示すように、コラーゲン製剤適用後の肝 ECF 中 AMK 濃度は、2 相性の推移が観察され、24 時間後も  $2 \mu\text{g/ml}$  以上の比較的高濃度を維



持した。この2相性の第1相(0-6hr)は、アルギン酸ナトリウムあるいはコラーゲンと弱い結合状態のAMKがコラーゲンから急速に遊離した結果で、第2相(6-24hr)は、適度な結合状態にあったAMKが徐々に遊離した結果と推測される。この2相性の推移は、薬物が初期に標的臓器で高濃度になるので、手術後の細菌感染の防御に効果的と考えられる。AMKの腎毒性あるいは聴覚毒性が発現するとされる血中の毒性レベルは、ピーク濃度及びトラフ濃度がそれぞれ $30 \mu\text{g/ml}$ 、 $5 \mu\text{g/ml}$ である。コラーゲン製剤適用後のAMKの血中濃度はピーク濃度が $3 \mu\text{g/ml}$ 以下で、6時間以降は $2 \mu\text{g/ml}$ 以下を推移したことから、循環系への移行による毒性の発現は回避できると推察される。

一方、M. E. D. Boreら(1991)<sup>53)</sup>のAMKを静注した際のAUCを参考に、肝表面からの吸収率を算出すると、本製剤を用いた場合の吸収率は約75%で、肝臓からの吸収が良好であることが判った。

以上の結果から、アルギン酸ナトリウム含有コラーゲンシートにAMKを添加して肝臓表面に局所適用することは、局所に限定した組織ECFの薬物濃度を持続可能で優れた剤型であることが判明した。また、局所投与の評価に、マイクロダイアリシスが有用であることも確認できた。



## 第4章 P糖蛋白阻害剤シクロスポリンA及びエトポシド含有 コラーゲン製剤の局所適用とその動態評価

癌化学療法においては多剤耐性が大きな治療上の問題となっており、そのメカニズムはP糖蛋白による薬物の細胞外への汲み出しによることが明らかとなってきた<sup>7-11)</sup>。そこで、P糖蛋白阻害剤を抗癌剤と組み合わせて投与し、多剤耐性を克服しようとする試みがなされており、既に海外ではP糖蛋白阻害剤CyAを用いた臨床試験が実施されている<sup>19-21)</sup>。

一方、P糖蛋白は様々な正常組織の細胞膜上に存在していることが報告されており、特に肝臓及び腎臓では、異物の体外への排出ポンプとして薬物の排泄に関与していることが明らかとなっている<sup>54-57)</sup>。

本章では、P糖蛋白によるVP-16の胆汁排泄を抑える目的で、P糖蛋白阻害薬CyA及び抗癌剤エトポシド(VP-16)をコラーゲンに吸収させた局所適用型製剤を試作し、ラットの肝臓表面に装着させ、肝ECF中のVP-16濃度を高めることを試みた。さらに、VP-16の血中クリアランス及び胆汁クリアランスに及ぼすCyAの影響を知る目的で、CyAを併用した際のVP-16の体内動態についても検討した。

### 第1節 材料と方法

#### (1) 試薬

コラーゲンはAvitene<sup>®</sup> (ゼリア新薬)を用いた。エトポシド(VP-16)はペプシド注<sup>®</sup> (ブリストルマイヤーズスクイブ)を、シクロスポリンA(CyA)はサンディミュン注<sup>®</sup> (サンド薬品)を用いた。CyA末はサンド薬品より提供を受けた。また溶出試験の透析膜は分画分子量12,000~14,000の再生セルロース膜(三光純薬)を使用し、マイクロダイリシスは分画分子量20,000のMicrodialysis probe CMA/20(全長24mm,透析部10mm, B AS Ltd.)を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。



## (2) 動物

Wistar系雄性ラット (250-300g, 三協ラボ) を使用した。

## (3) 薬物含有コラーゲンの調製

20mg/kg の VP-16 (20mg/ml) を 50mg のコラーゲンシートと吸収させ 3日間室温で乾燥させた。VP-16 含有 CyA 添加コラーゲンは、40mg/kg の CyA 末を VP-16 液に溶解後コラーゲンシートと反応させた。

## (4) 溶出試験

*in vitro* でのコラーゲンシートからの VP-16 の放出を、前章と同じ方法で行なった。

## (5) VP-16 濃度の測定<sup>58)</sup>

透析液及び血漿中 VP-16 濃度は HPLC 法で測定した。マイクロダイアリシスの透析液は無処理で直接 HPLC に注入した。血漿サンプル (100  $\mu$ l) は内部標準物質 (5, 5-diphenylhydantoin) 5  $\mu$ l とともに 0.5 ml のクロロホルムと混合し、10 分間振とうした後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清を減圧下 (50 $^{\circ}$ C) で濃縮乾燥後、120  $\mu$ l の移動相で溶解し、HPLC に注入した。HPLC は以下の条件で測定した。カラム; COSMOSIL C<sub>18</sub> (46x150mm, ケムコ), 移動相; methanol/water (51:49), 流速; 1.0 ml/min, 測定波長; 229nm

## (6) 蛋白結合率の測定

10 及び 100  $\mu$ g/ml の VP-16 溶液をラット血漿に加え限外濾過法により非結合型の VP-16 濃度を測定した。限外濾過には Centrifree<sup>®</sup> (アミコン) を用い、4,000 rpm で 5 分間遠心分離した。

## (7) マイクロダイアリシス<sup>50, 51)</sup>による *in vitro* での回収

VP-16 の最終濃度が 100  $\mu$ g/ml のリンゲル液を調製し、その中に probe を入れ、probe に一定の流速 (3  $\mu$ l/min) でリンゲル液を循環させた。開始 20 分後より 1 時間透析液を集め VP-16 濃度を測定した。

VP-16 の回収率は以下の式により算出した。

$$R_{\text{vitro}} = \frac{\text{dialysate concentration}}{\text{surrounding concentration}}$$



(8) ラット肝 ECF からの *in vivo* での回収

ペントバルビタール麻酔下で、ラットの肝右葉の中心にプローブを挿入し、接着剤（アロンアルファ，三共）により固定した。VP-16 (100  $\mu$ g/ml)をインフュージョンポンプで1時間循環させ安定化させた後、透析液を1時間採取し、VP-16の流入濃度と流出濃度を測定した。

肝 ECF からの VP-16 の回収率は以下の式により算出した。

$$R_{\text{vivo}} = 1 - \frac{\text{effluent dialysate concentration}}{\text{inluent dialysate concentration}}$$

(9) マイクロダイアリシスを利用した VP-16 の局所薬物動態

ラットをペントバルビタールの腹腔内投与 (50mg/kg)で麻酔後大腿静脈及び頸静脈にカニューレを挿入し、さらに正中線に沿って開腹し、肝臓の右葉の中心部にプローブを挿入後、プローブに対し平行に VP-16 含有コラーゲンを肝表面に添着した。プローブに一定の流速 (3  $\mu$ l/min)でリングル液を循環させ、1時間毎に透析液を採取した。血液サンプルは頸静脈のカニューレから 200  $\mu$ l 採取し、3,000 RPM で10分間遠心分離後血漿を分離した。得られたサンプルは測定まで-20℃で保存した。

肝 ECF の VP-16 濃度 ( $C_{\text{ECF}}$ ) は以下の式により算出した。また、VP-16 及び CyA の静脈内投与は大腿静脈より行った。

$$C_{\text{ECF}} = \frac{\text{effluent dialysate concentration}}{R_{\text{vivo}}}$$

(10) VP-16 の血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼす CyA の効果

ラットにエーテル麻酔下で、大腿動脈及び静脈にはカニューレ (PE-50) を、胆管にはカニューレ (PE-10) を、尿管にはカニューレ (PE-200) を挿入した。覚醒後、VP-16 (5 mg/kg) 単独あるいは CyA (10mg/kg) と併用で静注した。一定間隔で胆汁及び尿を集め、血液 (100  $\mu$ l) は胆汁及び尿の採集の中間点で採取した。得られたサンプルは測定まで-20℃で保存した。

血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼす CyA の効果を比較検討するために、モーメント解析<sup>52)</sup>により薬動学的パラメーター (total plasma clearance,  $Cl_{\text{tot}}$ ; area under the curve, AUC; mean residence



time, MRT)を, また以下の式により胆汁排泄クリアランス( $CL_{bile}$ )を算出した。

$$CL_{bile} = \frac{\text{excretion rate } (\mu\text{g}/\text{min})}{\text{plasma conc. } (\mu\text{g}/\text{ml})}$$

## 第2節 結果

### (1) VP-16含有コラーゲン製剤の溶出試験

*in vitro*のコラーゲンシートからのVP-16の溶出試験を行い, 50%溶出時間はコントロール及びコラーゲンでそれぞれ $286 \pm 56$ 分及び $224 \pm 38$ 分で, VP-16はコラーゲンとは殆ど結合していないことが判った。

### (2) VP-16の血漿蛋白結合率及びマイクロダイアリシスの回収率

*in vitro*及び*in vivo*におけるマイクロダイアリシスで採取した血漿の蛋白結合率及び回収率をTable 6に示す。VP-16の遊離型の割合は15-17%で, CyA添加により結合率は変化しなかった。また, *in vivo*におけるマイクロダイアリシスからの回収率は14-15%で, CyA添加により影響を受けないことが判った。一方, *in vitro*のリンゲル液からの回収率は約33%で肝ECFに比し有意に高い値であった。

**Table 6.** Plasma protein binding and *in vivo* recovery ratio of VP-16 in the absence or presence of CyA, and *in vitro* recovery ratio of VP-16 in Ringer's solution across the microdialysis probes. Mean  $\pm$  SD (n = 4).

	VP-16 only		VP-16 + CyA	
	10	100	10	100
VP-16 concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	10	100	10	100
CyA concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	-	-	20	200
Unbound fraction in plasma	$16.9 \pm 1.3$	$15.2 \pm 1.4$	$17.1 \pm 0.7$	$14.9 \pm 1.9$
<i>in vivo</i> recovery ratio from liver ECF	$15.2 \pm 1.8$	-ND	$14.7 \pm 1.6$	$14.4 \pm 2.0$
<i>in vitro</i> recovery ratio in Ringer's solution	$32.9 \pm 1.5$	-ND	-ND	-ND

ND: Not determined.



(3) VP-16の血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼすCyAの効果

VP-16含有コラーゲンシートをラットの肝臓に接着させた際の、肝ECF中及び血漿中のVP-16濃度をマイクロダイアリシスで測定した結果をFig. 9に示す。VP-16含有CyA添加コラーゲンを用いた場合、血漿中VP-16の $C_{max}$ が対照群の約1/2以下に抑えられた。また、肝ECF中のVP-16濃度は投与後速やかに一過性の上昇を示し、5時間後以降は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の比較的高濃度を24時間後も維持した。CyAを含まないVP-16含有コラーゲンでは、肝ECF中VP-16濃度は投与1~2時間後に一過性の上昇の後急速に減少し、24時間後には検出限界以下となった。モーメント解析による動態パラメーターをTable 7に示す。CyA添加によりVP-16の肝ECF中のAUC及びMRTは、それぞれ2倍及び3倍となり、肝ECF-plasma AUC Ratioは、肝臓に局所適用した場合および静注した場合で、それぞれ32~39及び0.17と著明な差が認められた。

**Table 7.** Pharmacokinetic parameters of VP-16 in plasma and liver ECF after local application of collagen sheet (CS) preparations to rat liver surface in the absence or presence of CyA, and after bolus intravenous administration of VP-16 with CyA. Mean  $\pm$  SD (n = 4).

Parameter	VP-16 + CS		VP-16 + CyA + CS		VP-16 + CyA (iv)	
	Plasma	ECF	Plasma	ECF	Plasma	ECF
AUC (hr $\cdot\mu\text{g/ml}$ )	6.70 $\pm$ 2.90 <sup>a)</sup>	207 $\pm$ 107 <sup>b)</sup>	16.1 $\pm$ 14.3 <sup>c)</sup>	451 $\pm$ 115 <sup>a)</sup>	170 $\pm$ 24	29.1 $\pm$ 7.3
MRT (hr)	1.62 $\pm$ 0.25 <sup>a)</sup>	3.79 $\pm$ 1.56	1.98 $\pm$ 0.46 <sup>d)</sup>	10.1 $\pm$ 1.8 <sup>a,e)</sup>	4.66 $\pm$ 0.85	2.31 $\pm$ 0.44
AUC ratio <sup>f)</sup>	32 $\pm$ 16 <sup>a)</sup>		39 $\pm$ 18 <sup>a)</sup>		0.18 $\pm$ 0.04	

a) Significantly different from VP-16 + CyA (iv) (p<0.01), as assessed by Welch's t-test.

b) Significantly different from VP-16 + CyA (iv) (p<0.05), as assessed by Welch's t-test.

c) Significantly different from VP-16 + CyA (iv) (p<0.01), as assessed by Student's t-test.

d) Significantly different from VP-16 + CyA (iv) (p<0.05), as assessed by Student's t-test.

e) Significantly different from VP-16 + CS (p<0.01), as assessed by Student's t-test.

f) Liver-to-plasma AUC ratio.

VP-16の血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼすCyAの効果を検討した結果をFig.10に示す。CyA併用によりVP-16の血中濃度が有意に上昇し、胆汁排泄が有意に減少した。VP-16の血漿クリアランスは、CyAを併用することにより、 $19.2 \pm 5.1$  ml/min/kgから $6.7 \pm 1.4$  ml/min/kgに減少し、その抑制率は65%であった。また、胆汁クリアランスはCyA併用により80-90%抑制された。一方、尿排泄クリアランスはVP-16単独投与では4ml/min/kgであったが、CyAの併用により3ml/min/kgに減少した。

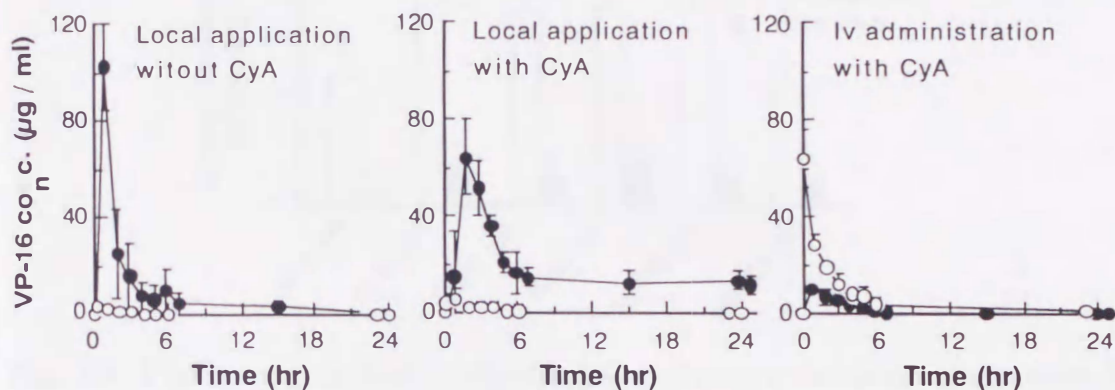


Fig. 9. Plasma (○) and liver ECF (●) levels of VP-16 after local application of collagen sheet (CS) preparations to rat liver surface in the absence (A) or presence (B) of CyA, and after bolus intravenous administration of VP-16 with CyA (C). The doses of VP-16 and CyA are 20 mg/kg and 40 mg/kg, respectively, in all the cases. Each point and vertical bar represent the mean  $\pm$  SD of 4 rats.



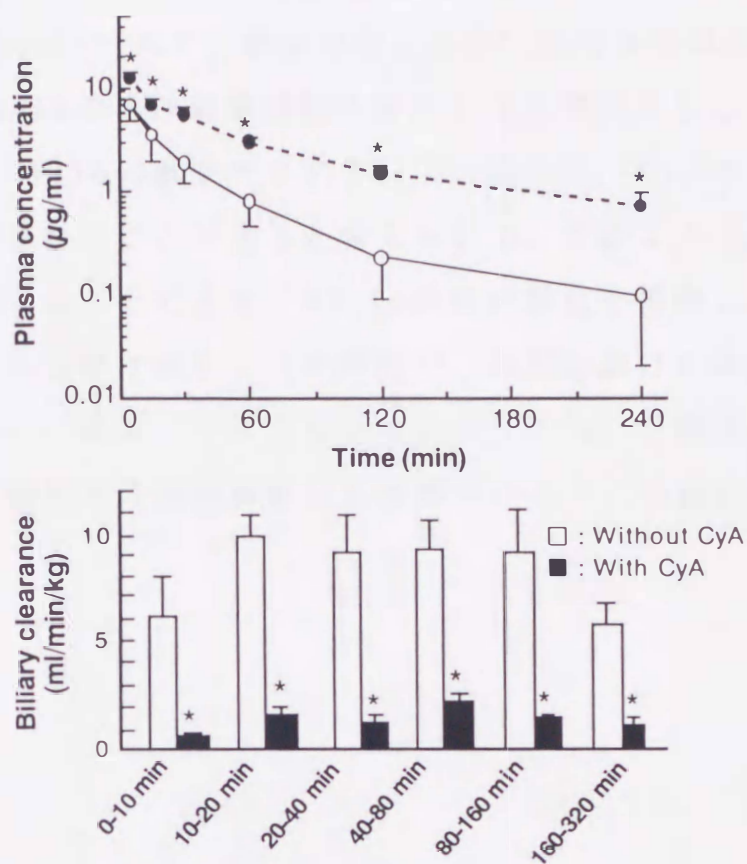


Fig. 10. Plasma concentration profiles (A) and biliary excretion clearances (B) of VP-16 after its intravenous administration (5 mg/kg) without (open symbol or column) or with (closed symbol or column) 10 mg/kg of CyA. Each value and vertical bar represent the mean  $\pm$  SD of 7 (without CyA) and 4 (with CyA) rats. \*Significantly different from VP-16 only administration ( $p < 0.05$ ), as assessed by Student's t-test.

### 第3節 考察

P糖蛋白阻害薬CyA及びVP-16含有の局所適用型コラーゲン製剤を試作し、ラットの肝臓表面に装着し、VP-16の体内動態を解析した。コラーゲンを薬物キャリアーとした局所適用型製剤は、全身循環血液中に移行する薬物量を抑え、局所薬物濃度を高めることが判った。このことから制癌剤の副作用を軽減し、局所制癌効果を高め得ることが確認できた。

一方、CyAの併用により肝ECF中VP-16濃度の持続化が認められたが、これはCyAが肝細胞膜上に存在するP糖蛋白の汲み出し作用を阻害し、VP-16の胆汁排泄を抑制した結果と推測されたため、VP-16の血中クリアランス及び胆汁排泄に及ぼすCyAの効果を検討したところ、VP-16単独

投与時の血中クリアランス及び尿排泄クリアランスはそれぞれ19ml/min/kg, 4ml/min/kgであり, 尿排泄によるVP-16の排泄は約25%程度と考えられる。VP-16の排泄経路は胆汁排泄と尿排泄であることから<sup>59)</sup>, CyA併用によるVP-16の血中クリアランスの減少は, CyAによりVP-16の胆汁排泄が抑制されたことによると考えられる。このように, P糖蛋白阻害剤CyAを併用することにより, VP-16の胆汁排泄を抑制し, 肝ECF中のAUC及びMRTを上昇させることが可能で, 局所における本DDS製剤の有用性が確認された。また, マイクロダイアリシスは, P糖蛋白等による肝臓内の薬物-薬物相互作用の解析にも応用できることが確認された。



## 第5章 ドキソルビシン含有フィブリン製剤の局所適用とその動態評価

前章までは、微繊維性コラーゲンを担体とした局所適用型製剤を検討してきた。本章では同様に生体内で分解・吸収される担体としてフィブリンに注目し、ドキソルビシン(DOX)含有アルギン酸ナトリウム添加フィブリン製剤を試作し、担癌ラットの腫瘍近傍に本製剤を留置し、腫瘍内ADR濃度をマイクロダイアリシスを用いて検討した。同時に血中DOX濃度も測定し循環系への移行についても解析した。

### 第1節 材料と方法

#### (1) 試薬

フィブリンはBeriplast P<sup>®</sup> (ヘキスト薬品) を、ドキソルビシン(DOX) はアドリアマイシン注<sup>®</sup> (協和発酵) を、アルギン酸ナトリウムはアルト<sup>®</sup> (共成製薬) を用いた。また透析膜は分画分子量12,000~14,000の再生セルロース膜(三光純薬)を使用した。マイクロダイリシスは分画分子量20,000のMicrodialysis probe CMA/20 (全長24mm, 透析部10mm, BAS Ltd.) を、その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

#### (2) 動物及び腫瘍細胞

ドンリュウラット(220-250g, 三協ラボ)を使用し、ラット肝腫瘍細胞(AH60C)をCancer Cell Repository (東北大学)より入手し、腹水中で継代培養した。1x10<sup>7</sup>個のAH60C細胞をラットの背中皮下に植え付け、腫瘍の長径が1.5~2 cmに成長してから試験に使用した。

腫瘍の体積は以下の計算式により算出した<sup>6)</sup>。

$$V (\text{cm}^3) = (\pi/6)(d_1)(d_2)^2$$

#### (3) DOX含有フィブリンの調製

6mgのADR, 8mgのフィブリンノーゲン及び2.5mgのアルギン酸ナトリウムを0.1mlのアプロチニン液で溶解し、これをA液とした。次にアプロチ

ニン液と同量の塩化カルシウム液で300単位のトロンピン末を溶解し、使用する直前にA液と混合し、直径約10mm、厚さ約2mmのDOX含有フィブリンを調製した。

#### (4) 溶出試験

*in vitro*におけるフィブリンからのDOXの放出を、アルギン酸ナトリウム添加の有無により、前章と同じ方法で行なった。

#### (5) DOX濃度の測定<sup>61)</sup>

*in vitro*の溶出試験及びMicrodialysis probeからの回収率の測定は、蛍光分光器(RF-503A, 島津)にて、励起波長500nm, 測定波長580nmで測定した。

*in vivo*の透析液及び血漿中濃度はHPLC法で測定した。マイクロダイアリシスの透析液は無処置で直接HPLCに注入した。200  $\mu$ lの血漿サンプルは20  $\mu$ lの40%硫酸亜鉛及び200  $\mu$ lのメタノールと混合し10秒間振とうした後、15,000gで10分間遠心分離し、その上清をHPLCに注入した。HPLCは以下の条件で測定した。カラム; COSMOSIL C<sub>18</sub> (46x150mm, ケムコ), 移動相; 0.28 M Sodium formate Buffer (pH 3.55)/acetone/isopropanol (65:30:5), 測定波長; EX; 470nm, EM; 585nm

#### (6) マイクロダイアリシス<sup>46,47)</sup>の*in vitro*回収率

DOXの最終濃度が10  $\mu$ g/mlのリングル液を調製し、その中にprobeを入れ、probeに一定の流速(3  $\mu$ l/min)でリングル液を循環させた。開始20分後から1時間の透析液を集めDOX濃度を測定した。

DOXの回収率は以下の式により算出した。

$$R_{\text{vitro}} = \frac{\text{dialysate concentration}}{\text{surrounding concentration}}$$

#### (7) DOXの局所薬物動態とマイクロダイアリシスを用いた測定

担癌ラットにペントバルビタールの腹腔内投与(50mg/kg)で麻酔後、腫瘍の中心部に測定プローブを挿入した。ラットの背部を小切開し6mgのDOXを含有するペレット状のアルギン酸ナトリウム添加フィブリン



を腫瘍部に添着した。手術後、プローブに一定の流量 (3  $\mu$  l/min) のリンゲル液を循環し、1.5 時間毎に透析液を採取した。血液は眼窩静脈から 2, 5, 7 及び 24 時間後に 200  $\mu$  l 採取し、3,000RPM で 10 分間遠心分離後血漿を分離した。得られたサンプルは測定まで -20°C で保存した。

腫瘍 ECF の DOX 濃度は以下の式から算出した。

$$C_{\text{tumor}} = \frac{\text{effluent dialysate concentration}}{R_{\text{vitro}}}$$

薬動学的パラメーター (area under the curve, AUC; mean residence time, MRT) はモーメント解析<sup>52)</sup>により算出した

## 第 2 節 結果

### (1) DOX 含有フィブリン製剤の溶出挙動

*in vitro* の溶出試験の結果を Fig. 11 に示す。DOX は透析チューブ及びフィブリンに若干の吸着がみられ溶出量が減少したが、アルギン酸ナトリウムを添加したフィブリン製剤からの DOX の溶出は極めて緩徐で、13 日後の溶出は約 33% となった。次に、溶出挙動をモーメント解析した結果を Table 8 に示す。DOX はフィブリン存在下で溶出が有意に抑制され、アルギン酸ナトリウム添加により更に顕著に抑制された ( $p < 0.05$ )。

Table 8. Mean Residence Time (MDT) of Doxorubicin (DOX) Preparations

	DOX solution	DOX+FG	DOX+FG+SA
MDT(hr)	3.72 $\pm$ 0.03	8.67 $\pm$ 1.16 <sup>a)</sup>	80.8 $\pm$ 30.3 <sup>a)</sup>

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

a) Significantly different from DOX solution ( $p < 0.05$ ).

FG: Fibrin glue, SA: Sodium alginate

### (2) DOX のマイクロダイアリシスによる回収

マイクロダイアリシスを用いた *in vitro* におけるリンゲル液からの回収率は、6.04  $\pm$  1.07% (mean  $\pm$  SD, n=4)であった。

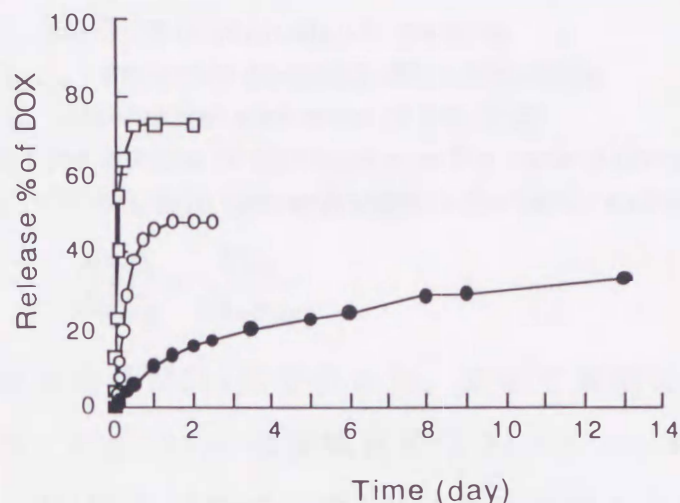


Fig.11. Release profiles of Doxorubicin (DOX) in the absence or presence of fibrin glue and sodium alginate

□ : DOX solution                      ○ : DOX + Fibrin glue  
 ● : DOX + Fibrin glue + Sodium alginate

Each point represent the mean of three experiments.

(3) DOX の動態解析

AH60C 腫瘍細胞を背部に移植した担癌ラットに、DOX 含有アルギン酸ナトリウム添加フィブリン製剤を局所適用した際の薬物動態パラメーターを Table 9 に、その典型的な腫瘍 ECF 及び血中 DOX 濃度推移を Fig.12 に示す。腫瘍内 DOX 濃度は局所適用後 2~4 時間で速やかに上昇し、その後緩やかに減少した。血中 DOX 濃度は腫瘍内濃度に比し、極めて低レベル (25ng/ml 以下)であった。腫瘍内と血中 AUC との比は 300~2700 で、血中への移行が極めて少なく、フィブリンを担体として用いた DDS は治療上極めて有用な剤型であることが確認された。

Tumor-to-Plasma AUC Ratio と腫瘍サイズとの関係を Fig. 13 に示す。両者間に高い負の相関性 ( $r=0.882$ )が認められた。この相関性の意味を解明するため、次の計算式を立てた。

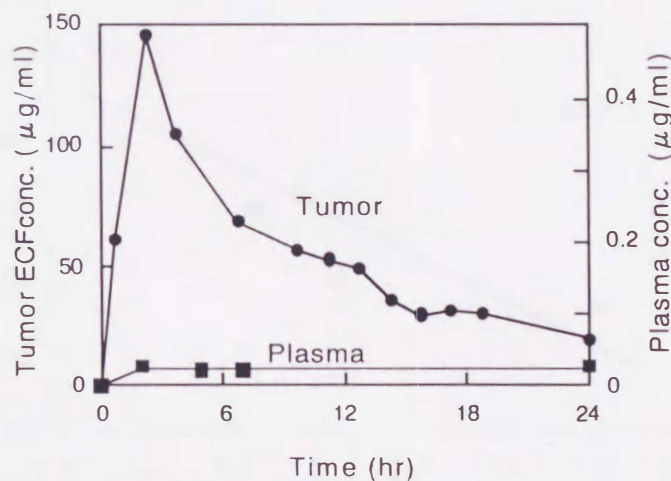


$$V_d \frac{dC_p}{dt} = CL_{\text{efflux}} \cdot C_t - CL_p \cdot C_p \quad (1)$$

$C_p$  : the DOX cocentration in plasma  
 $CL_{\text{efflux}}$  : the tumor-to-blood efflux clearance  
 $CL_p$  : elimination clearance of the drug  
 $V_d$  : the volume of distribution in the central compartment  
 $C_t$  : the average concentration in the tumor extracellular fluid

$$\frac{AUC_t}{AUC_p} = \frac{CL_p}{CL_{\text{efflux}}} \quad (2)$$

DOX の血漿中濃度推移は(1)式で表され、0 から無限大まで積分すると(2)式がえられる。Fig. 13 の相関関係から Tumor-to-Plasma AUC Ratio ( $AUC_t / AUC_p$ ) が腫瘍容積( $V$ )に反比例すること及び  $CL_p$  が腫瘍容積に依存しないパラメーターであることから、 $CL_{\text{efflux}}$  は腫瘍容積に比例することが判った。

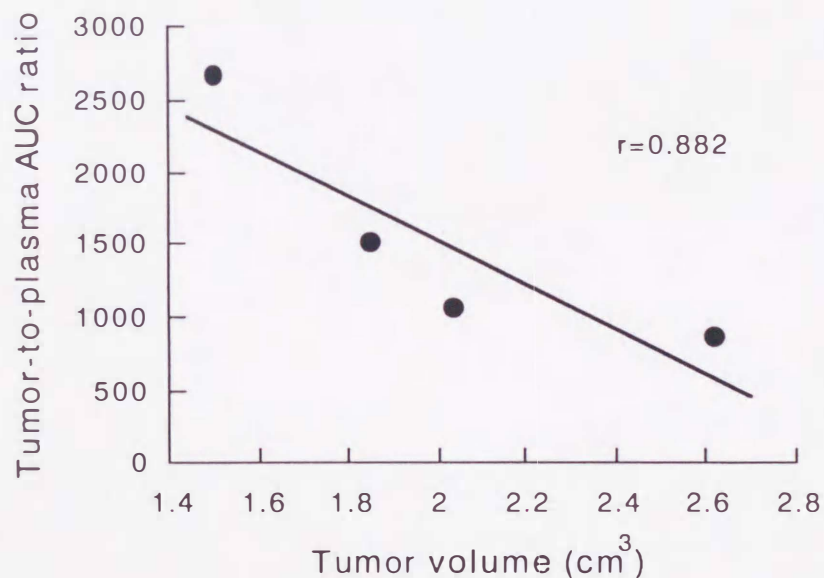


**Fig. 12.** Typical Concentration Profiles of Doxorubicin in the Tumor and Plasma after Local Delivery of Fibrin Glue Containing Doxorubicin on the Rat Tumor Surface

A fibrin glue preparation (i.e., a disc with a diameter of 10 mm and a thickness of 2 mm) containing doxorubicin (6 mg) and sodium alginate (2.5 mg) was applied on the surface of an AH60C tumor grown subcutaneously at the back of rats, and drug concentrations in the tumor extracellular fluid (closed circles; left axis) were monitored by a microdialysis method for 24 hr. Drug concentrations in plasma (open circles; right axis) were also measured and compared with those in the tumor.

**Table 9.** Pharmacokinetic Parameters of DOX in Plasma and Tumor ECF after Local Application of Fibrin Glue Containing DOX and Sodium Alginate

Parameters	Rat No.				Mean $\pm$ S.D.
	1	2	3	4	
Plasma					
MRT (hr)	9.8	10.7	9.5	13.2	10.8 $\pm$ 1.7
AUC (hr $\cdot$ $\mu$ g/ml)	0.54	1.11	0.42	0.54	0.65 $\pm$ 0.31
Tumor					
MRT (hr)	8.1	4.7	6.5	9.5	7.2 $\pm$ 2.1
AUC (hr $\cdot$ $\mu$ g/ml)	465	1189	638	1440	933 $\pm$ 458
Tumor tissue volume (cm <sup>3</sup> )	2.62	2.04	1.85	1.50	2.00 $\pm$ 0.47
Tumor-to-plasma AUC ratio	863	1071	1519	2667	1530 $\pm$ 806



**Fig. 13.** The Relationship between Tumor Volume and Tumor-to-Plasma AUC Ratio of Doxorubicin after Local Delivery of Fibrin Glue Containing Doxorubicin on the Rat Tumor Surface

The tumor volume and tumor extracellular fluid-to-plasma AUC ratio of doxorubicin (Table 1) were correlated well with a correlation coefficient ( $r$ ) of 0.882.



### 第3節 考察

*in vitro* の溶出試験の結果より、DOX はフィブリンと親和性があり、アルギン酸ナトリウム添加により溶出が遅延されることが確認された。

既に4章及び5章でマイクロダイアリシスの有用性については述べたが、腫瘍 ECF 中 DOX 濃度の測定にも応用可能であることが確認された。ノンコンパートメント解析の結果、腫瘍 ECF の MRT 及び AUC はかなり変動した。この変動の原因は腫瘍サイズによる可能性があったため、腫瘍サイズと腫瘍 ECF の AUC の相関性を検討したところ相関係数 ( $r$ ) が 0.760 で負の相関が認められた。次に、腫瘍サイズと Tumor-to-Plasma AUC Ratio の相関を検討したところ、相関係数 ( $r$ ) が 0.882 で、更に強い負の相関が認められた。これは腫瘍サイズと腫瘍からのクリアランスが比例することを意味し、大きな腫瘍ほど網細血管系が発達していると考えると、説明のつく結果である。

## 総括

コラーゲン及びフィブリンを担体とする局所適用型製剤を試作し、マイクロダイアリシスを利用してその動態を検討した。アルギン酸ナトリウムを添加するとコラーゲンからの AMK 及び EPI, フィブリンからの DOX の薬物放出が適正に制御できることが確認された。局所適用型 AMK 含有アルギン酸ナトリウム添加コラーゲン製剤をラット肝臓表面に適用した所, 肝 ECF 中の AMK 濃度が長時間維持される事が判った。P 糖蛋白阻害薬 CyA 及び VP-16 含有コラーゲン製剤を肝臓に適用すると, P 糖蛋白による VP-16 の汲み出し阻害により, VP-16 の胆汁排泄が抑制され, 肝 ECF 中の VP-16 濃度が長時間維持された。フィブリンを担体とした ADR の局所適用型製剤を試作し, 担癌ラットの腫瘍に装着したところ, 腫瘍組織内薬物濃度は血中濃度に比べ極めて高濃度を維持する事が判った。以上のことから, コラーゲン及びフィブリンは, 局所適用型 DDS 製剤の基剤として有望であり, 一方マイクロダイアリシスは本製剤を局所適用した際の薬物動態を評価するのに優れた測定方法であることが判った。



## 引用文献

- 1) H. Hashida, Development of drug delivery systems for cancer chemotherapy and its implicated problem, *Drug Deliv. Syst.*, 7, 5-14 (1992)
- 2) Y. Ikada, Molecular design of DDS, *Drug Deliv. Syst.*, 6, 151-158 (1992)
- 3) V. V. Ranade, Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers, *J. Clin. Pharmacol.*, 29, 685-694 (1989)
- 4) L.S. Grayson, J.F. Hansbrough, R.L. Zapata-Sirvent, T. Kim, S.Kim, Pharmacokinetics of DepoFoam gentamicin delivery system and effect on soft tissue infection, *J. Surg. Res.*, 55, 559-64 (1993).
- 5) H. Natsume, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *In vitro* release profile of mitomycin C from albumin microspheres: Extrapolation from macrospheres to microspheres, *Pharm. Res.*, 8, 185-190 (1991).
- 6) S. S. Sampath, K. Garvin, D. H. Robinson, Preparation and characterization of biodegradable poly (L-lactic acid) gentamicin delivery systems, *Int. J. Pharmaceut.*, 78, 165-174 (1992).
- 7) J. L. Biedler and H. Riehm, Cellular resistance to Actinomycin D in chinese hamster cell *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies, *Cancer Res.*, 30, 1174-1184, (1970)
- 8) M. Inaba, H. Kobayashi, Y. Sakurai, and R. K. Johnson, Active efflux of Daunorubicin and Adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia, *Cancer Res.*, 39, 2200-2203 (1979)
- 9) N. Kartner, J. R. Riordan, and V. Ling, Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines, *Science*, 221, 1285-1288 (1983)
- 10) C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman, and I. B. Roninson, Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell*, 47, 381-389 (1986)
- 11) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagosi, and Y. Sakurai, Increased accumulation of Vincristin and Adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors, *Cancer Res.*, 42, 4730-4733 (1982)
- 12) D. M. Lieberman, R. A. F. Reithmeier, V. Ling, J. H. M. Charuk, H. Goldberg, K. L. Skorecki, Identification of P-glycoprotein in renal brush border membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 244-252 (1989)
- 13) C. C. Cardo, J. O'Brien, J. Buccia, D. Casals, J. Bertino, M. Melamed, Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues, *J. Biol. Chem.*, 38, 1277-1280 (1990)



- 14) J. P. Marie, N. A. Brophy, M. N. Ehsan, Expression of multidrug resistance gene *mdr1* mRNA in a subset of normal bone marrow cells, *Br. J. Haematol.* 81, 145-152 (1992)
- 15) P. Van der Valk, c. Van Kal Ken, H. Ketelaurs, Distribution of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic tissues, *Ann. Oncol.*, 1, 56-60 (1990)
- 16) L. M. Slater, P. Sweet, M. Stupecky, and S. Gupta. Cyclosporin A reverses Vincristine and Daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia *in vitro.*, *J. Clin. Invest.* 77, 1405-1408 (1986).
- 17) H. M. Coley, P. R. Twentyman, and P. Workman, Improved cellular accumulation is characteristic of anthracyclines which retain high activity in multidrug resistant cell lines, alone or in combination with verapamil or cyclosporin A, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 4467-4475 (1989).
- 18) K. V. Speeg, A. L. Maldonado, J. Liaci, and D. Muirhead, Effect of cyclosporin on colchicine secretion by a liver canalicular transporter studies *in vivo*, *Hepatology*, 15, 899-903 (1992).
- 19) A. M. Yahanda, K. M. Adler, G. A. Fisher, N. A. Brophy, J. Halsey, R. I. Hardy, M. P. Gosland, B. L. Lum, and B. I. Sikic. A phase I trial of etoposide with cyclosporine as a modurator of multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.*, 10: 1624-1634 (1992)
- 20) A. F. List, C. Spier, J. Greer, S. Wolff, J. Hutter, R. Dorr, S. Salmon, B. Futscher, M. Baier, and W. Dalton, Phase I/II trials of Cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifir in acute luekemia, *J. Clin. Oncol.*, 11, 1652-1660 (1993)
- 21) B.L. Lum, S. Kaubisch, A. M. Yahanda, K. M. Adler, and I. Sikic, Alteration of etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics by cyclosporine in a phase I trial to modulate multidrug resistance, *J. Clin. Oncol.*, 10, 1635-1642 (1992).
- 22) B. K. Malhotra, M. Lemaire, and R. J. Sawchuk, Investigation of the distribution of EAB 515 to cortical ECF and CSF in freely moving rats utilizing microdialysis, *Pharm. Res.*, 11, 1223-1232 (1994).
- 23) Y. S. Kang, T. Terasaki, and A. Tsuji, Dysfunction of choline transport system through blood-brain barrier in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 13, 10-19 (1990)
- 24) Y. Deguchi, T. Terasaki, S. Kawasaki, and A. Tsuji, Muscle microdialysis as a model study to relate the drug concentration in tissue interstitial fluid and dialysate. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 14, 483-492 (1991)
- 25) Y. Deguchi, T. Terasaki, H. Yamada, A. Tsuji, An application of microdialysis to drug distribution study: *In vivo* evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of b-lactam antibiotics in interstitial fluid, *J. Phamacobio-Dyn.*, 15, 79-89 (1992).



- 26) D. O. Scott, C. E. Lunte, *In vivo* microdialysis sampling in the bile, blood, and liver of rats to study the disposition of phenol, *Pharm. Res.*, 10, 335-342 (1993).
- 27) 渡辺裕司, マイクロダイアリシス, *生体の科学*, 44, 153-158 (1993)
- 28) R. B. Phinney, S. D. Schwartz, D. A. Lee, B. J. Mondino, Collagen-shield delivery of Gentamicin and Vancomycin, *Arch. Ophthalmol.*, 106, 1599-1604 (1988)
- 29) X. Zhang, U. P. Pichora, M. F. A. Goosen, Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: Optimization of release properties, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 718-724 (1994).
- 30) T. Miyata, M. Fususe, Y. Yamane, Y. Noishiki, A biodegradable collagen membrane with slow-release heparin, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 34, 687-691 (1988).
- 31) K. Fujioka, Y. Takada, S. Satoh, T. Miyata, Novel delivery system for proteins using collagen as a carrier material: Mini pellet, *J. Control. Rel.*, 33, 307-315 (1995).
- 32) K. Fujioka, Y. Takada, S. Sato, T. Miyata, Long-acting delivery system of interferon: IFN minipellet, *J. Control. Rel.*, 3, 317-323 (1995).
- 33) F. Greco, L. de Palma, N. Spagnolo, A. Rossi, N. Specchia, and A. Gigante, Fibrin-antibiotic mixtures: an *in vitro* study assessing the possibility of using a biologic carrier for local drug delivery. *J. Biomed. Mat. Res.* 25: 39-51 (1991).
- 34) Y. Takahashi, S. Minami, T. Ohta, T. Suga, N. Fujioka, and M. Mai, Experimental study on local attachment of Beriplast P membrane including MMC, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, 18, 1944-1946 (1991).
- 35) W. Hirakawa, K. Kadota, T. Asakura, M. Niuro, S. Yokoyama, H. Hirano, K. Yatsushiro, Y. Kubota, and Y. Shimodozono, Local chemotherapy for malignant brain tumors using methotrexate-containing fibrin glue, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, 22, 805-809 (1995).
- 36) T. Kubota, K. Matsui, M. Ohtani, and S. Takasaki, Local chemotherapy by a sustained-release preparation with fibrin seal against the operative wound in head and neck cancer, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, 22, 877-882 (1995).
- 37) 渡辺義二, 他, 肝手術に対する微繊維性コラーゲン止血剤の使用経験, *外科診療*, 25, 1068-1072 (1983)
- 38) W. J. Cameron, et al., A new topical hemostatic agent in gynecologic surgery, *Obstet. Gynecol.*, 51, 118-122 (1978)
- 39) T. Masuike, J. Odake, and Y. Takemoto, Determination of Adriamycin and its metabolites in biological samples using high performance liquid chromatography I. analysis of serum and plasma by direct injection method, *Yakugaku Zasshi.* 104, 614-619 (1984)



- 40) T. Masuike, J. Otake, M. Kohagura, T. Noda, and Y. Takemoto, Determination of Adriamycin and its metabolites in biological samples using high performance liquid chromatography I. analysis of tissues by extraction method, *Yakugaku Zasshi.*, 104, 620-623 (1984)
- 41) P. A. Andrews, W. E. Wung, S. B. Stephan, B. Howell, A High performance liquid chromatographic assay with improved selectivity for Cisplatin and active platinum(II) complexes in plasma ultrafiltrate, *Anal. Biochem.*, 143, 46-56 (1984)
- 42) K. Nakamura, K. Matubara, *Molecularbiology of The Cell. 2ndEdition*, Kyouikusya, Tokyo, 802-814 (1990)
- 43) K. Daigo, C. Yamada, Y. Wada, M. Yamaji, S. Okuda, M. Okada, and T. Miyazato, Pharmacological studies of sodium alginate on gastrointestinal bleeding, *Yakugaku Zasshi*, 101, 458-463 (1981)
- 44) K. Daigo, M. Yamaji, C. Yamada, Y. Wada, S. Okuda, M. Okada, and T. Miyazato, Pharmacological Studies of Sodium Alginate. III. Acceleration of Fibrin Formation by Sodium Alginate, *Yakugaku Zasshi*, 101, 464-469 (1981)
- 45) K. Daigo, C. Yamada, M. Yamaji, M. Okada, T. Miyazato, H. Komiya, Pharmacological Studies of Sodium Alginate. IV. Erythrocyte Aggregation by Sodium Alginate, *Yakugaku Zasshi*, 102, 573-578 (1982)
- 46) K. Daigo, M. Yamaji, C. Yamada, k. Matsui, T. Miyazato, H. Komiya, Y. Horiuchi, Studies on Local Hemostatic and Healing Effects of Sodium Alginate (Alto and Alman), *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 11, 391-399 (1983)
- 47) K. Daigo, C. Yamada, M. Yamaji, M. Okada, T. Miyazato, Y. Horiuchi, H. Komiya, Pharmacological Studies of Sodium Alginate. V. Effect of Sodium Alginate on Platelet Aggregation, *Yakugaku Zasshi*, 105, 171-182 (1985)
- 48) Y. Yamada, N. Nakagiri, and K. Daigo, Effect of Sodium Alginate on Fibrinolysis, *Yakugaku Zasshi*, 107, 53-59 (1987)
- 49) K. Daigo, M. Yamaji, and C. Yamada, The influence on blood coagulation by sodiumalginate, *Jpn. Pharmacol. Ther.*, 13, 4455-4461 (1985)
- 50) Y. F. Wang, S. L. Wong, R. J. Sawchuk, Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: Application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit CSF and thalamus, *Pharm. Res.*, 10, 1411-1419 (1993).
- 51) A. L. Quelled, S. Dupin, A. E. Tufenkji, P. Genissel, and G. Houin, Microdialysis: an alternativefor *in vitro* and *in vivo* protein binding studies, *Pharm. Res.*, 11, 835-839 (1994).
- 52) K. Yamaoka, T. Nakagawa, T. Uno, Statistical moments in pharmacokinetics, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 6, 547-558 (1978)



- 53) M. E. D. Broe, L. Verbist, and G. A. Verpooten, Influence of dosage schedule on renal cortical accumulation of amikacin and tobramycin in man, *J. Antimicrobial Chemother.*, 27, 41-47 (1991)
- 54) Y. Kamimoto, Z. Gatmaitan, J. Hsu, and I. M. Arias, The function of Gp170, the multidrug resistance gene product, in rat liver canalicular membrane vesicles, *J. Biol. Chem.*, 264: 11693-11698 (1989).
- 55) T. Colombo, M. Zucchetti, and M. D'Incalci, Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269, 22-27 (1994).
- 56) K. V. Speeg and A. L. Maldonado, Effect of the nonimmunosuppressive cyclosporin analog SDZ PSC-833 on Colchicine and Doxorubicin biliary secretion by the rat *in vivo*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34, 133-136 (1994)
- 57) B. L. Lum, M. P. Gosland, S. Kaubisch, and B. I. Sikic, Molecular targets in oncology: Implication of the multidrug resistance gene, *Pharmacotherapy*, 13, 88-109 (1993).
- 58) R. J. Strife, I. Jardine, and M. Colvin, Analysis of the anticancer drugs etoposide (VP-16-213) and teniposide (VM 26) by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr.*, 224, 168-174 (1981).
- 59) 中井由美, 夏目, 則男, 入江毅, 落合光子, 伊津源一, 中牧容子, 橋本豊, 石橋正  
元, イヌおよびラットにおけるEtoposideの吸収・排泄, *薬物動態*, 123-141 (1986)
- 60) S. Takemori, K. Tazawa, H. Nagae, T. Shimizu, Y. Masuko, M. Okamoto, M.  
Fujimaki, Hyperthermia for cancer with dextran magnetite using tubular implant,  
*Jpn. J. Cancer Chemother.*, 9, 1648 (1992).
- 61) A. Andersen, D. J. Warren, L. Slordal, A sensitive and simple high-performance  
liquid chromatographic method for the determination of Doxorubicin and its  
metabolites in plasma, *Ther. Drug Monit.*, 15, : 455 (1993)

## 付記

第1章の内容は、北澤英徳, 足立伊佐雄, 堀越 勇, “コラーゲンと薬物の親和性に関する基礎的研究,” *Drug Deliv. Syst.*, **8**, 175-179 (1993)として報告した。

第2章の内容は、北澤英徳, 佐藤 均, 足立伊佐雄, 堀越 勇, “コラーゲンとアルギン酸ナトリウムを用いた放出制御,” *病院薬学*, **21**, 384-388 (1995)として報告した。

第3章の内容は、H. Kitazawa, H. Sato, I. Adachi, I. Horikoshi, “Microdialysis Assessment of Microfibrous Collagen Containing Sodium Alginate for Local Delivery of Amikacin,” *Yakuzaigaku*, **56**, 232-238 (1996)として報告した。

第4章の内容は、H. Sato, H. Kitazawa, I. Adachi, I. Horikoshi, “Microdialysis Assessment of Microfibrous Collagen Containing a P-Glycoprotein-Mediated Transport Inhibitor, Cyclosporin A, for Local Delivery of Etoposide,” *Pharm. Res.*, **13**, 1563-1567 (1996)として報告した。

第5章の内容は、H. Kitazawa, H. Sato, I. Adachi, Y. Masuko, I. Horikoshi, “Microdialysis Assessment of Fibrin Glue Containing Sodium Alginate for Local Delivery of Doxorubicin in Tumor-Bearing Rats,” *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 278-281 (1997)として報告した。



## 謝辞

本研究の機会を与えられ、終始御指導と御鞭撻を賜りました富山医科薬科大学附属病院薬剤部堀越勇教授、足立伊佐雄助教授に深く感謝申し上げます。

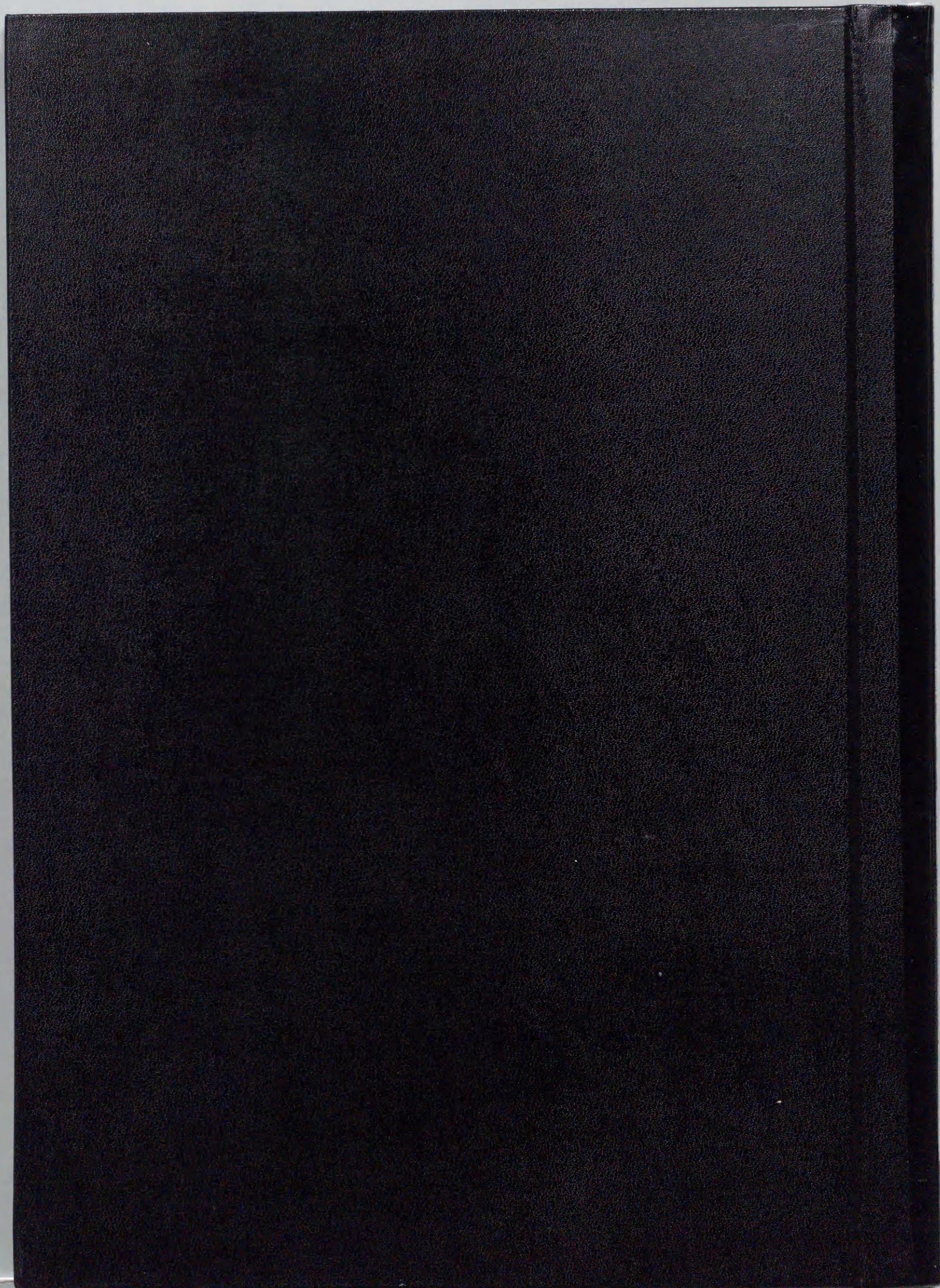
また、本研究を進めるにあたり直接の御指導を賜りました佐藤均助手に深く感謝申し上げます。

そして、本研究に協力された佐藤康裕修士、小柴明美、中山隆夫、岡田保美、小暮路子学士に厚く御礼を申し上げます。

最後に、長年にわたり、様々な御便宜を計って頂きました、富山医科薬科大学附属病院薬剤部職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

1997年3月







Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

