

— Article —

## 抗リウマチ薬の関節内投与のための最適製剤設計に関する基本的検討

釘山直子, 岩永一範\*, 宮崎 誠, 掛見正郎

## Design of Optimal Formulations for Intraarticular Administration of Anti-rheumatic Drugs

Naoko KUGIYAMA, Kazunori IWANAGA\*, Makoto MIYAZAKI, and Masawo KAKEMI

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki-city, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 14, 2011; Accepted November 21, 2011)

Rheumatoid arthritis shows the highest disease rate in autoimmune diseases. Therapeutic drugs for rheumatoid arthritis are classified into two categories, disease modifying anti-rheumatic drugs and anti-inflammatory drugs. Both drugs cause systemic side effects; therefore, the establishment of local administration of these drugs is desired for safe therapy. In this study, we investigated the intraarticular disposition of anti-rheumatic drugs (bucillamine and celecoxib) after local administration. When both drugs were administered to rat's ankle joint cavity as a control formulation (solution), both drugs quickly eliminated from the ankle joint cavity regardless of their physicochemical property and dosing amount.  $T_{1/2}$  of bucillamine and celecoxib in the joint cavity was approximately 4 min and 9 min, respectively. Liposome and microemulsion were chosen and evaluated as the formulations to retain drugs in the joint cavity.  $T_{1/2}$  of both drugs was prolonged more than 30 min by liposome. It is speculated that the entrapment of drugs in liposome increased apparent molecular weight of the drugs and decreased permeability of drugs through synovial membrane. Microemulsion also extended  $T_{1/2}$  of both drugs. Interestingly, the enhancing effect of drug retention in the joint cavity by microemulsion was significantly higher than that by liposome although the particle size of microemulsion was approximately 1/500 of liposome. The viscosity of microemulsion was much higher than that of liposome; therefore, this may relate to the higher retention of microemulsion in the joint cavity. In conclusion, the formulation with higher viscous property is promising for longer retention of anti-rheumatic drugs after intraarticular administration.

**key words** ----- Rheumatoid arthritis; intraarticular administration; liposome; microemulsion

## 緒 言

重症筋無力症, バセドウ病, 関節リウマチ, 全身性エリテマトーデスに代表される自己免疫疾患のうち, 関節リウマチは最も患者数が多く, 世界人口の約1%が罹患していると考えられている<sup>1)</sup>. 関節リウマチの特徴として, 可動関節の周辺を覆う滑膜細胞の異常増殖(パンヌス形成)があげられる. 滑膜細胞が炎症を起こすことで種々のサイトカインが分泌され, 炎症の増悪, 軟骨およ

び骨細胞の破壊が起こることにより悪化する<sup>2)</sup>. したがって, 発症初期の関節リウマチを抑制し, いかに正常な関節機能を維持するかが関節リウマチ治療において重要となる<sup>3)</sup>. しかし関節リウマチなどの自己免疫疾患は, 鑑別が難しく<sup>2)</sup>, 確定診断までに時間がかかることが多いのが問題とされている.

疾患修飾性抗リウマチ薬(Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs: DMARDs)として臨床で使用されている薬物は, 早期・増悪期に著効を

\* 大阪薬科大学 薬剤学研究室 〒569-1094 大阪府高槻市奈佐原4-20-1  
岩永 一範 Corresponding author: Kazunori Iwanaga, Ph. D. (iwanaga@gly.oups.ac.jp)

示すが、経口投与製剤として用いられるため全身性の副作用が強く、診断が確定するまで投与が見送られる傾向にある<sup>5,6)</sup>。このため、関節リウマチと診断された頃には既に病状が進行してしまい、DMARDsが無効なことが多い。今日、早期慢性関節リウマチ診断基準 (Table 1) に基づき、DMARDs やステロイド剤を早期から積極的に投与する Step-down bridge 療法が推奨されているが、重篤な副作用発現によるコンプライアンスの低下や、関節腔内の薬物濃度が治療域に達し、効果を発現するまでに数ヶ月を要するため<sup>7)</sup>、DMARDs の効果が十分発揮できていない<sup>6)</sup>。

全身性の副作用や低い治療効果の改善を行う方法の一つに、薬物の局所投与があげられる。薬物を関節腔内に直接投与することで局所の薬物濃度を維持し、全身性の副作用や遅効性などの改善を期待した関節内投与製剤がすでに実用化されている。しかし、局所への頻回の直接的薬物投与は患者の負担が大きく、治療効果はまだ十分とは言えず<sup>8)</sup>、製剤学的工夫による効果の持続性の改善が不可欠である。

本研究では、水溶性のリウマチ治療薬のモデルとして DMARDs の bucillamine を、また、脂溶性のリウマチ治療薬のモデルとして非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug : NSAIDs) の一つである celecoxib を用い、代表的な微粒子製剤としてリポソーム製剤およびマイクロエマルジョン製剤を用いて、これらを関節内に投与した際の関節内動態とそれに及ぼす各製剤の影響について検討した。

## 実験方法

### 1. 試薬

Bucillamine は大原薬品工業株式会社 (Shiga, Japan) から供与された。Celecoxib は Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, UK) から購入した。これらの薬物の化学構造式を Fig. 1 に示した。L- $\alpha$ -phosphatidylcholine hydrogenated (HEPC)、および cholesterol は Sigma-Aldrich Chemicals Co. Ltd. (St. Louis, MO) から購入した。Gelucire 44/14<sup>®</sup> は CBC 株

Table 1. Diagnostic Criterion for Early Rheumatoid Arthritis

criteria	
1	tender joint (3 or more joints)
2	swollen joint (2 or more joints)
3	joint stiffness in the morning
4	rheumatoid nodule
5	abnormal ESR or abnormal CRP
6	high-positive rheumatoid factor

patients with fulfillment > 2/6 are diagnosable as having early rheumatoid arthritis.

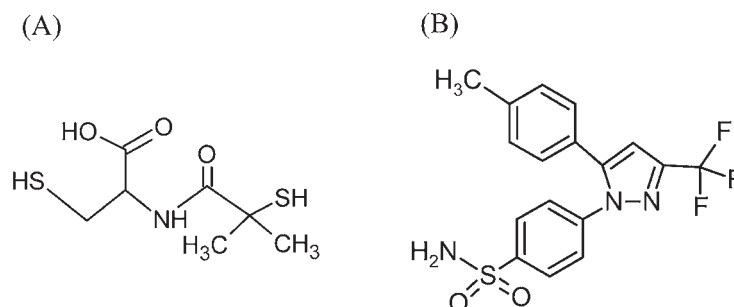


Figure 1 Chemical structures of (A) hydrophilic and (B) lipophilic anti-rheumatic drugs used in this study; (A) bucillamine (logP: 1.28, Mw: 223.31), (B) celecoxib (logP: 4.21, Mw: 380.31) .

式会社 (Tokyo, Japan) より供与された. Dicetyl phosphate (DCP), propylene glycol (PG) および polyethylene glycol 400 (PEG 400) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した. その他の試薬および溶媒は市販特級のものをを用いた.

## 2. 実験動物

実験動物として Wistar 系雄性ラット (体重 300 ~ 350g) (日本エスエルシー株式会社, Shizuoka, Japan) を用いた. 水および飼料を自由に摂取させ, 12 時間の明暗サイクル (Light 6:00~18:00, Dark 18:00~6:00), 恒温 (24 ± 1 °C) で一週間以上予備飼育を行った.

## 3. 薬物封入微粒子製剤の調製

### 3-1. 薬物封入リポソーム製剤の調製

#### 3-1-1. Bucillamine 封入リポソーム製剤の調製

リポソームの調製は Bangham 法に準じて行った.<sup>9)</sup> すなわち, ナスフラスコに各リン脂質と cholesterol および DCP の chloroform 溶液を秤取りし, chloroform で適宜希釈して混合した. その後, ロータリーエバポレーターを用いて減圧乾固し, 内壁に薄膜を形成させた. Bucillamine 封入リポソームの場合, 得られた薄膜に bucillamine を溶解した PBS 溶液 (10 mg/ml) を加え, vortex mixer を用いて薄膜を完全に剥離した. 得られたリポソーム懸濁液を 25,400 × g, 15 分間遠心分離し, 上清を PBS で置換する操作を 3 回繰り返すことにより未封入の bucillamine を除去し, bucillamine 封入リポソーム製剤とした.

#### 3-1-2. Celecoxib 封入リポソーム製剤の調製

Celecoxib 封入リポソームの場合, リポソームの調製は上記 bucillamine 封入リポソームと同様の方法により調製したが, celecoxib は脂溶性が高くリポソーム脂質二重膜内に保持されるため, chloroform 溶液 (0.5 mg/ml) としてリン脂質および cholesterol, DCP の chloroform 溶液に添加し,

薬物を含まない PBS で薄膜を完全に剥離することにより celecoxib 封入リポソームとした.

### 3-2. 薬物封入マイクロエマルジョン製剤の調製

#### 3-2-1. Bucillamine 封入マイクロエマルジョン製剤の調製

Bucillamine 封入マイクロエマルジョン製剤の調製は Itoh らの方法に準じて行った.<sup>10)</sup> すなわち, oil として使用する Gelucire 44/14<sup>®</sup> を 60°C に加温し融解後, Surfactant/Co-surfactant (S/CoS) として使用する PG/PEG 400 = 1/1 混液および bucillamine をそれぞれ秤取りし全てを混合した. その後, 超音波粉碎機 Ultrasonic Disruptor UD-201 (株式会社トミー精工, Tokyo, Japan) を用いて出力 50W にて 2 分間超音波処理することにより bucillamine を完全に溶解させた. この溶液をホットプレートスターラー PC-220 (タイテック株式会社, Saitama, Japan) で 60°C に加熱した後, water を添加し, 6 時間持続的に攪拌することによりマイクロエマルジョン製剤 (oil : S/CoS : water = 4 : 1 : 1) を得た. 製剤中 bucillamine 濃度は 10 mg/ml とした.

#### 3-2-2. Celecoxib 封入マイクロエマルジョン製剤の調製

Celecoxib 封入マイクロエマルジョン製剤は, bucillamine 封入マイクロエマルジョン製剤と同様の方法により調製したが, 製剤中の celecoxib 濃度は 0.5 mg/ml とした.

## 4. 薬物投与後の関節内動態の評価

Sodium pentobarbital (大日本住友製薬株式会社, Osaka, Japan) 麻酔下, ラット左足首関節を切開により露出させた後, 関節内に各製剤 20  $\mu$ l をシリンジ 702N (Hamilton Company, Reno, NV) を用いることにより 30 秒間かけて投与した. 投与直後および 5, 10, 20, 30, 60 分後に別のシリンジを用いて滑液をそれぞれ 2  $\mu$ l 採取した. サンプル中の bucillamine および celecoxib の濃度は

以下の方法により測定した。

## 5. Bucillamine 濃度の測定

サンプル中 bucillamine 濃度は Beaudry らの方法<sup>11)</sup>に準じて行った。すなわち、得られたサンプル 2  $\mu\text{l}$  に、pH 9.2 トリス塩酸緩衝液 900  $\mu\text{l}$  および isobutyl acrylate (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) 98  $\mu\text{l}$  を加えて混合した後、90 分間室温で反応させ誘導体化した (Fig. 2)。反応後のサンプル 400  $\mu\text{l}$  に 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$  内標準物質 (Tiopronin) 含有 トリス塩酸緩衝液 : acetonitrile (95 : 5) 混液 100  $\mu\text{l}$  を加えて混合した。得られた溶液 200  $\mu\text{l}$  に acetonitrile 800  $\mu\text{l}$  を加えて混合後、5,300 $\times$  g、5 分間遠心分離することにより除タンパクを行った。この上清 800  $\mu\text{l}$  を窒素気流下で乾固させた。water : acetonitrile (1 : 1) の混液 150  $\mu\text{l}$  で再溶解させたもの 5  $\mu\text{l}$  を LC/MS に注入した。LC/MS による測定条件は以下の通りである。

System: ACQUITY<sup>TM</sup> Ultra Performance LC (Waters Co. Ltd., Milford, NE), Detector: ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC TQ detector (Waters Co. Ltd., Milford, NE), Column: ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ ) (2.1 i.d.  $\times$  50 mm, Waters Co. Ltd., Milford, NE), Mobile phase: (A) 10 mM ammonium acetate : (B) acetonitrile

Time (min)	A%	B%	flow (mL/min)
0.00	50	50	0.30
0.10	90	10	0.30
0.80	90	10	0.30
0.90	50	50	0.30

Ionization: ESI (negative), Internal standard:

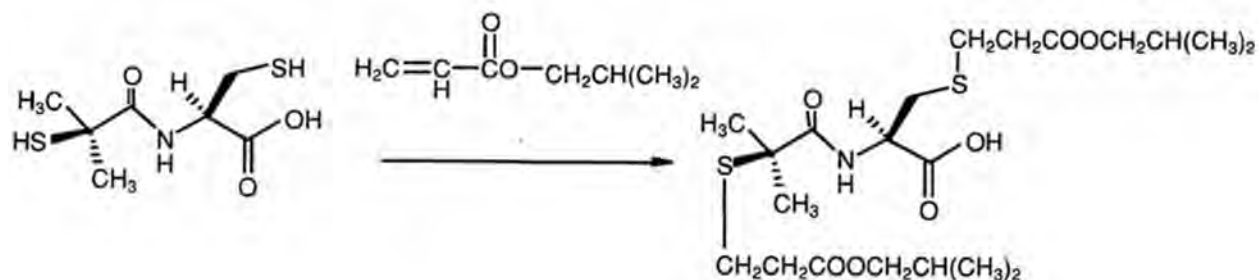


Figure 2 Derivatization of bucillamine with isobutyl acrylate for LC/MS assay.

tiopronin, Column temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$ , Source temperature: 120 $^{\circ}\text{C}$ , Desolvation temperature: 360 $^{\circ}\text{C}$ , Desolvation gas flow: 600 l/hr, Cone gas flow: 50 l/hr, Cone voltage: 35 V for bucillamine, 22V for tiopronin, Detection: 478.40 m/z for bucillamine, 290.26 m/z for tiopronin

## 6. Celecoxib 濃度の測定

サンプル中 celecoxib 濃度は Barrientos-Astigarraga らの方法<sup>12)</sup>に準じて行った。すなわち、得られたサンプル 2  $\mu\text{l}$  に、50  $\mu\text{l}/\text{ml}$  内標準物質 (Nimesulide) 含有 water : ethanol (50 : 50) 混液 100  $\mu\text{l}$  を加えて混合した後、窒素気流下で乾固させ、mobile phase 100  $\mu\text{l}$  で再溶解させたもの 5  $\mu\text{l}$  を LC/MS に注入した。LC/MS による測定条件は以下の通りである。

System: ACQUITY<sup>TM</sup> Ultra Performance LC, Detector: ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC TQ detector

Column: ACQUITY<sup>TM</sup> UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ ) (2.1 i.d.  $\times$  50 mm, Waters Co. Ltd., Milford, NE), Mobile phase: 10 mM ammonium acetate: acetonitrile = 10 : 90, Ionization: ESI (negative), Internal standard: nimesulide, Column temperature: 40 $^{\circ}\text{C}$ , Source temperature: 120 $^{\circ}\text{C}$ , Desolvation temperature: 360 $^{\circ}\text{C}$ , Desolvation gas flow: 600 l/hr, Cone gas flow: 50 l/hr, Cone voltage: 58 V for celecoxib, 34 V for nimesulide, Detection: 380.09 m/z for celecoxib, 307.04 m/z for nimesulide

## 7. 各投与製剤の粒子径測定

関節内投与実験に用いたリポソーム製剤およびマイクロエマルジョン製剤の 37°C における粒子径を Zetasizer nano-S (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) を用いて動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering) により測定した。

## 8. 各投与製剤の粘度測定

関節内投与実験に用いた PBS 溶液, PEG 400 50% 溶液, リポソーム製剤およびマイクロエマルジョン製剤の 37°C における粘度を, 回転粘度計 BIORHEOLIZER® E 型 (株式会社東京計器, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

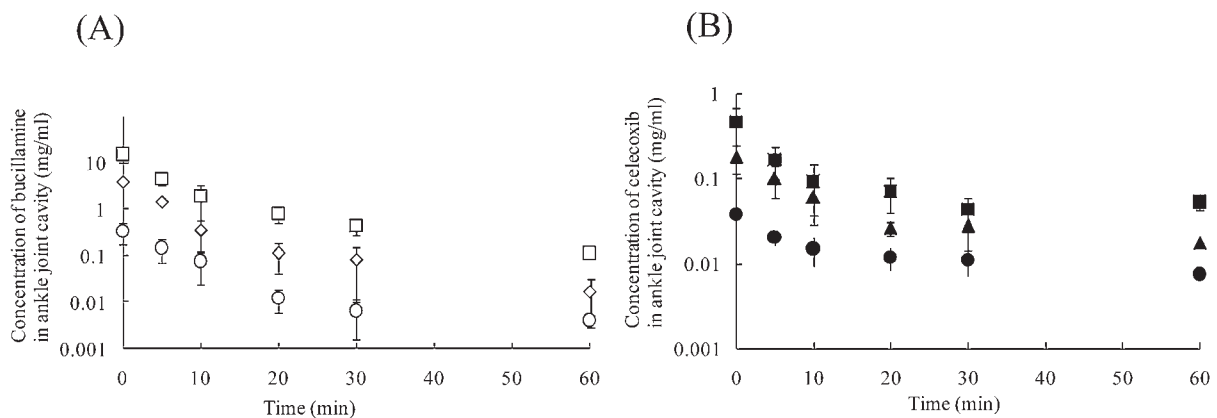
## 9. 統計学的解析

得られたデータは平均値および標準偏差で表記した。Control 製剤投与群と各製剤投与群の比較には Dunnett's 検定を行った。なお, 有意水準は危険率 1% とし, \* で示した。

## 結果と考察

### 1. 関節内からの薬物消失速度の評価

リウマチ患者に対する薬物の関節内投与は, 患部に対する薬物暴露量を大きくすることが可能である反面, 患者に対する負担が大きい薬物投与方法である。したがって, 可能な限り薬物投与回数を減少させることが可能な投与製剤が望まれる。しかし, 関節内に投与された薬物の動態についてはほとんど明らかにされておらず, 合理的な製剤設計を行うためには, この点について明らかにする必要がある。そこでまず, 水溶性薬物の例として bucillamine を緩衝液に溶解させて関節内に投与した (control 製剤)。投与後の関節内 bucillamine 濃度の時間的変化を Fig. 3A に示した。Bucillamine は投与後 20 分以内の極めて速やかな消失と, それに続く緩やかな消失の二相性の消失を示した。投与濃度を 1~25 mg/ml の範囲で変化させたところ, 二相性の消失に変化は認められなかった。このデータを 2-compartment model にあてはめることにより, 初期の速やかな消失相における半減期及び 20 分後以降に見られる緩やかな消失相の半減期を算出し, Table 2 に示した。その結果, bucillamine は半減期 4 分程度



**Figure 3** Time course of remaining concentration of drugs in ankle joint cavity after intraarticular administration as control formulations; (A) bucillamine (administered as solution) and (B) celecoxib (administered as 50% PEG solution).

Keys; (A) ○ : 1 mg/ml, ◇ : 10 mg/ml, □ : 25 mg/ml, (B) ● : 0.1 mg/ml, ▲ : 0.5 mg/ml, ■ : 1 mg/ml  
Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3-4 experiments.

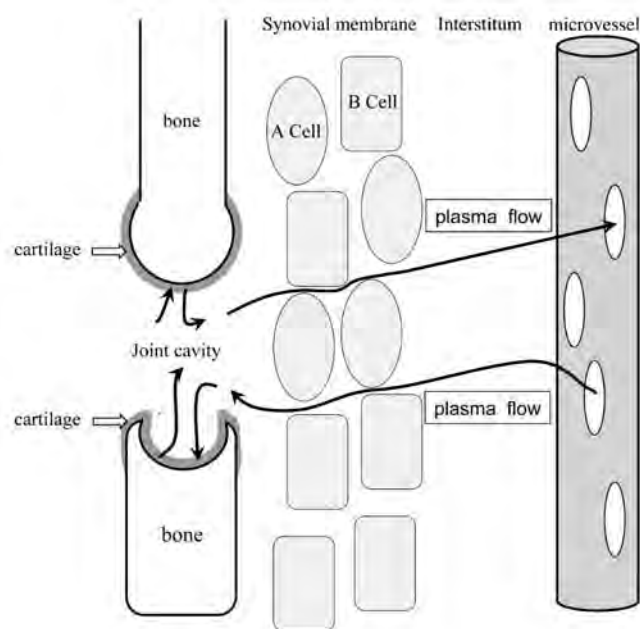
**Table 2.** Elimination of Drugs from Ankle Joint Cavity after Intraarticular Administration as Control formulations

Drug concentration mg/ml	$\lambda_{\alpha}$ $\text{min}^{-1}$	$T_{\alpha 1/2}$ min	$\lambda_{\beta}$ $\text{min}^{-1}$	$T_{\beta 1/2}$ min
bucillamine				
1	$0.171 \pm 0.011$	$4.0 \pm 0.3$	$0.035 \pm 0.003$	$19.8 \pm 1.3$
10	$0.191 \pm 0.055$	$3.7 \pm 0.7$	$0.047 \pm 0.012$	$14.7 \pm 0.8$
25	$0.185 \pm 0.035$	$4.0 \pm 1.0$	$0.048 \pm 0.003$	$14.4 \pm 0.5$
celecoxib				
0.1	$0.062 \pm 0.064$	$11.3 \pm 1.1$	$0.011 \pm 0.004$	$54.6 \pm 20.2$
0.5	$0.077 \pm 0.017$	$9.2 \pm 1.8$	$0.010 \pm 0.018$	$85.1 \pm 9.9$
1	$0.083 \pm 0.020$	$8.8 \pm 2.4$	$0.007 \pm 0.013$	$77.1 \pm 19.2$

Bucillamine and celecoxib was intraarticularly administered as a solution (dissolved with PBS) and 50 % PEG solution, respectively. Each parameter was calculated by fitting to two-compartment model. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 3–4 experiments.

で消失し、投与 20 分後には初期濃度のわずか 3% 程度に低下することが明らかとなった。次に脂溶性薬物の例として celecoxib を 50% PEG 水溶液 (control 製剤) として関節内に投与した。投与後の関節内 celecoxib 濃度の時間推移を Fig. 3B に示した。Celecoxib は投与濃度が 0.1~1 mg/ml の範囲において bucillamine 同様、二相性の消失を示し、速やかに関節内から消失することが分かった。半減期を算出したところ (Table 2), 約 9~11 分程度であり、薬物の物性 (脂溶性) を問わず、また、投与量に依存することなく、関節内に投与さ

れた薬物は極めて速やかに消失することが明らかとなった。そこで、以降の関節内投与実験においては、bucillamine の場合 10 mg/ml に、celecoxib の場合 0.5 mg/ml に投与濃度を固定し、いずれの薬物においても、投与 20 分後までの関節内濃度データにもとづき解析を行うこととした。正常状態の滑膜細胞は通常 1~2 層で、基底膜や細胞間の接合を欠き、滑膜血管より滲出した血漿成分は細胞間を自由に通過できるため、関節腔内への血漿成分の流入および排出は容易な構造となっている (Fig. 4)<sup>13)</sup>。そのため、関節腔内に投与された薬



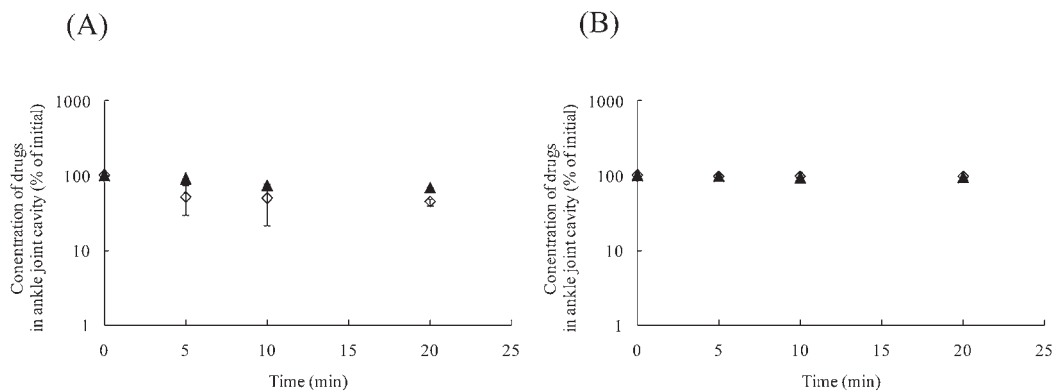
**Figure 4** Schematic diagram of plasma disposition between joint cavity and blood vessels.

物は血漿成分の流出とともに消失するため、半減期が極めて短くなると考えられる。従って、製剤学的な工夫を施すことにより、投与直後の速やかな関節内からの薬物の消失を回避することが極めて重要であると考えられる。

## 2. 薬物の関節内動態に及ぼすリポソームの影響

関節内に投与された薬物は極めて速やかに消失したことから、薬物は容易に滑膜層を通過できると考えられる。そこで、薬物の消失速度を低下させる方法として微粒子製剤の応用を試みた。まず、微粒子製剤の例としてリポソームを投与製剤として両薬物を関節内投与した。HEPCを主構成脂質とするリポソームに *bucillamine* あるいは *celecoxib* を封入して関節内に投与した後の関節内薬物濃度変化を Fig. 5A に示した。また、control 製剤投与時同様、関節内からの消失半減期を算出し、Table 3 に示した。Bucillamine およ

び *celecoxib* の半減期はそれぞれ 34 分、31 分となり control 製剤投与時と比較して有意に延長した。このようにリポソーム製剤使用時において、封入薬物の種類が異なっているにも関わらず、ほぼ同程度の半減期を示すことが明らかとなった。また両薬物のリポソームからの放出性は、いずれも 1 時間で 10% 程度とほぼ同程度に安定である (data not shown) ことから、算出された半減期はリポソーム自体の関節内からの消失に由来するものと考えられる。一般に水溶性薬物はリポソームの内水相に保持され、薬物の特性に応じた速度で放出され、脂溶性薬物は脂質二重膜部分に強固に保持されることを考え合わせると、リポソーム製剤は *celecoxib* のような脂溶性薬物に対して、関節内においてより高い薬物濃度を維持し得るものと考えられる。本研究において *bucillamine* および *celecoxib* の投与に用いたリポソームの粒子径は、それぞれ、 $1187 \pm 281$  nm,  $1943 \pm 376$  nm と大きな粒子径を有するため、リポソーム化に伴う薬物分子の見かけのサイズの増大により滑膜の



**Figure 5** Time course of remaining concentration of drugs in ankle joint cavity after intraarticular administration as particular formulations; (A) liposome and (B) microemulsion.

Keys; ◇ : *bucillamine*, ▲ : *celecoxib*

Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 3-4 experiments.

**Table 3.** Effects of Formulations on Drug Elimination from Ankle Joint Cavity

<i>bucillamine</i> formulations	$\lambda_{\alpha}$ $\text{min}^{-1}$	$T_{\alpha/2}$ min	<i>celecoxib</i> formulations	$\lambda_{\alpha}$ $\text{min}^{-1}$	$T_{\alpha/2}$ min
control	$0.191 \pm 0.055$	$3.7 \pm 0.7$	control	$0.077 \pm 0.017$	$9.2 \pm 1.8$
liposome	$0.020 \pm 0.004$	$34.1 \pm 6.2^*$	liposome	$0.031 \pm 0.016$	$30.8 \pm 23.3^*$
microemulsion	$0.007 \pm 0.001$	$106.9 \pm 12.2^*$	microemulsion	$0.005 \pm 0.005$	$119.8 \pm 38.6^*$

Each parameter was calculated by fitting to two-compartment model.

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 3-4 experiments.

\*p < 0.01 vs control group

透過性が低くなったものと推察される。滑液中に投与した salicylate や paracetamol のタンパク結合率は小さいため速やかに消失するのに対して、diclofenac はタンパク結合率が大きいので、見かけの分子量増大にともなって滑膜透過速度が低下し、関節腔からの消失が遅延することが報告されており<sup>14)</sup>、薬物分子の見かけのサイズは薬物の関節腔からの消失速度を決定する重要な因子であると考えられる。

### 3. 薬物の関節内動態に及ぼすマイクロエマルジョンの影響

次にリポソーム以外の微粒子製剤として、種々の薬物に対するドラッグキャリアーとして期待されているマイクロエマルジョン<sup>15, 16)</sup>を用いて bucellamine および celecoxib を関節内投与した。関節内の各薬物濃度推移を Fig. 5B に、薬物濃度推移より算出された半減期を Table 3 に示した。Bucellamine をマイクロエマルジョンに封入することにより関節内からの薬物の消失速度は顕著に低下し、投与 20 分後においても関節からの消失はほとんど認められなかった。算出された半減期は約 107 分と control 製剤及びリポソーム製剤と比較して顕著に延長した。一方、celecoxib をマイクロエマルジョンを用いて投与した場合も同様に、関節内からの消失は極めて遅く、半減期は約 120 分であった。それぞれの薬物の control 製剤投与時と比較して半減期は顕著に延長していることが示された。いずれの薬物についても、有効な関節内濃度は明らかにされていないため、本研究で設定した各薬物投与量が最適か否かについては薬理効果を含めた総合的な研究が必要となるが、マイクロエマルジョン製剤および前述のリポソーム製剤ともに調製時の含有薬物濃度は任意に変更できることから、使用薬物に応じて最適投与量を含有する製剤を調製することが可能であると思われる。一方、薬物の消失速度遅延効果のメカニズムについては、マイクロエマルジョン製剤の場合もリポソーム製剤と同様に微粒子化による見かけのサイズの増大効果が影響したものと推察され

た。しかしながら、本研究で使用した bucellamine および celecoxib の投与に用いたマイクロエマルジョンの粒子径は、それぞれ  $3.6 \pm 0.4$  nm,  $3.1 \pm 0.3$  nm と極めて小さく、リポソームと比較しても粒子径は約 500 分の 1 程度である。したがって、マイクロエマルジョンの場合には、薬物分子自体の大きさと比較するとはるかに大きいものの、リポソーム使用時の消失速度との差については粒子径の違いのみでは説明できないことが明らかとなった。抗がん剤の静脈内投与製剤としてリポソームを使用する場合に認められる EPR 効果<sup>17)</sup>についても、その粒子径が約 100~200 nm 程度の場合に癌細胞により作られた新生血管の血管壁からの流出が大きくなることを利用したものであり、本実験で使用した数 nm 程度のマイクロエマルジョンが滑膜透過時において、粒子サイズが原因で透過性がリポソーム製剤以上に低下することは考えにくい。そこで生体に投与された製剤の動態を決定する因子として、製剤が有する粘度に着目し以下の検討を行った。

### 4. 薬物の関節内動態に及ぼす製剤粘度の影響

上記の検討から、マイクロエマルジョン使用時においては、粒子径以外の因子が関節内からの薬物の消失速度低下に寄与していることが示唆された。そこで本研究で使用した全ての製剤の粘度を測定し、Table 4 にまとめた。その結果、マイクロエマルジョンの粘度は極めて高く、リポソームと比較しても顕著に高いことが明らかとなった。また、celecoxib 使用時における control 製剤 (50% PEG 水溶液) と bucellamine 使用時における control 製剤 (水溶液) の粘度の比較により、製剤への PEG の添加によって粘度が増大していることが明らかとなった。そこで、bucellamine について水溶液、20% PEG 溶液、50% PEG 溶液をあらたに調製し、関節内投与実験を行った。結果を Fig. 6 に示した。また、各溶液の粘度および関節内からの消失速度定数を算出し、Table 5 にまとめた。20% PEG 溶液、50% PEG 溶液いずれに

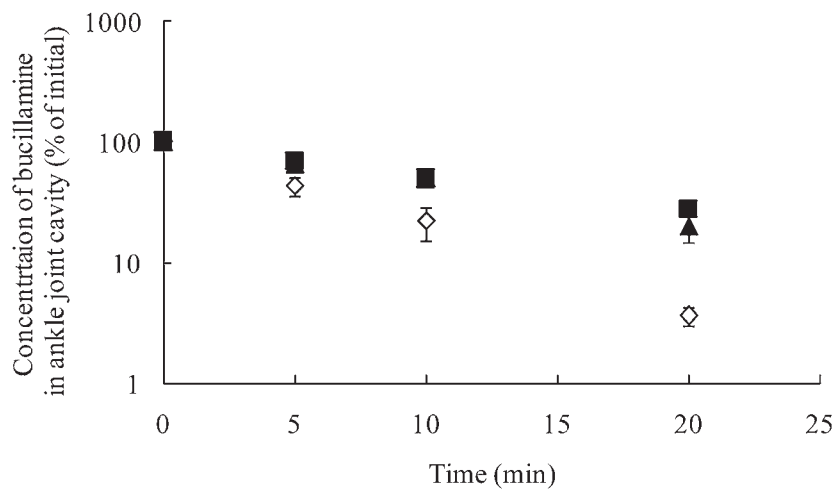


**Table 4.** Viscosity of Each Formulations

bucillamine formulations	viscosity mPa/s	celecoxib formulations	viscosity mPa/s
control (PBS)	0.98 ± 0.2	control (50% PEG)	7.89 ± 0.2
liposome	1.20 ± 0.1	liposome	1.20 ± 0.1*
microemulsion	122.0 ± 3.5*	microemulsion	112.6 ± 6.7*

Each value represents the mean ± S.D. of three experiments.

\*p < 0.01 vs control group



**Figure 6** Time course of remaining concentration of bucillamine in ankle joint cavity after intraarticular administration as solutions containing various concentrations of PEG. Keys; ◇ : 0% PEG in PBS, ▲ : 20% PEG in PBS, ■ : 50% PEG in PBS. Each point represents the mean ± S.D. of 3-4 experiments.

**Table 5.** Relationship between Viscosity of PEG Solution and Bucillamine Elimination

formulations	viscosity mPa/s	$\lambda_{\alpha}$ min <sup>-1</sup>
PBS	0.98 ± 0.2	0.171 ± 0.011
20% PEG	1.90 ± 0.3*	0.079 ± 0.016*
50% PEG	7.21 ± 0.1*	0.064 ± 0.003*

Each value represents the mean ± S.D. of three experiments.

\*p < 0.01 vs PBS group

においても PBS 使用時と比較すると有意に消失速度は低下し、低下の度合は投与液の粘度に依存することが示された。以上のことから、微粒子製剤を用いて薬物を関節内に投与した際、薬物の関節内からの消失には製剤の粒子径および粘度の両因子が影響を及ぼすものの、粘度の寄与が大きいことが明らかとなった。

## 結 論

以上の検討より、薬物を関節内に投与した後の、関節内からの消失速度は薬物の物性にかかわらず極めて速いことが明らかとなった。また、薬物の関節内滞留性の増大を目的として微粒子製剤を使用した場合、製剤の粒子径および粘度の両方が寄

与して薬物の消失が遅延するが、粘度の寄与の方が大きいことが示唆された。現在の製剤技術を駆使すれば、微粒子製剤の粒子径制御および製剤粘度の制御はいずれも容易であることから、薬物の特徴に応じて最適な粘度および粒子径を有するリウマチ治療薬の関節内投与製剤の開発が可能であると期待される。このような製剤を利用することにより薬物の投与回数を減らすことが可能となり、患者のQOL改善に貢献できると考えられる。

### REFERENCES

- 1) Ochi T., "Diagnostic manual of rheumatic arthritis" ed. by Japan Rheumatism Foundation Information Center for Arthritis and other Rheumatic Conditions, 2004, pp. 58-70.
- 2) Kashiwazaki S., "Zusetsu Byoutai Naika Kohza, Vol. 16, Allergy-Connective tissue disease," ed. by Takaku H., Medical View Co. Ltd., Tokyo, 1994, pp. 192-205.
- 3) Nishioka K., *Jpn. J. Rehabil. Med.*, **43**, 658-660 (2006).
- 4) Saraux A., Berthelot J. M., Chales G., Le Henaff C., Thorel J. B., Hoang S., Valls I., Devauchelle V., Martin A., Baron D., Penne Y., Botton E., Mary J. Y., Le Goff P., Youinou P., Cukierman E., Khan D. R., *Arthritis. Rheum.*, **44**, 2485-2491 (2001).
- 5) Arnett F. C., Edworthy S. M., Bloch D. A., McShane D. J., Fries J. F., Cooper N. S., Healey L. A., Kaplan S. R., Liang M. H., Luthra H. S., *Arthritis. Rheum.*, **31**, 315-324 (1988).
- 6) Chita Pharmaceutical Care. ([http://chitapc.org/pc/RA\\_TISIKI.pdf](http://chitapc.org/pc/RA_TISIKI.pdf)), cited 13 October, 2011.
- 7) Tett S. E., *Clin. Pharmacokinet.*, **25**, 392-407 (1993).
- 8) Reeback J. S., Chakraborty J., English J., Gibson T., Marks V., *Ann. Rheum. Dis.*, **39**, 22-24 (1980).
- 9) Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965).
- 10) Itoh K., Tozuka Y., Oguchi T., Yamamoto K., *Int. J. Pharm.*, **238**, 153-160 (2002).
- 11) Beaudry F., Proulx D., Furtado M., *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 805-812 (2004).
- 12) Barrientos-Astigarraga R. E., Vannuchi Y. B., Sucupira M., Moreno R. A., Muscara N. M., Nucci G. D., *J. Mass Spectrom.*, **36**, 1281-1286 (2001).
- 13) Itoh J., Nose M., "Chronic rheumatic arthritis" ed. by Mizushima Y., Nankodo Co. Ltd., Tokyo, 1989, pp. 214-231.
- 14) Owen S. G., Francis H. W., Roberts M. S., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **38**, 349-355 (1994).
- 15) Kovarik J. M., Mueller E. A., van Bree J. B., Tetzloff W., Grevel J., Kutz K., *J. Pharm. Sci.*, **83**: 444-446 (1994).
- 16) Lawrence M. J., Rees G. D., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **45**, 89-121 (2000).
- 17) Maruyama K., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 161-169 (2011).