

徐放性の抗菌剤(ジベカシン)含有マイクロスフェアの 作製とその放出実験の結果について

山田 眞幹 高木 一平 馬場 駿吉

名古屋市立大学耳鼻咽喉科教室

西村 穰

名古屋第二赤十字病院耳鼻咽喉科

THE PRODUCTION OF MICROSPHERE CONTAINING ANTIBACTERIAL AGENT (DKB) AND THE RESULTS OF ITS RELEASING TEST.

Masamoto Yamada, Ippei Takagi, Shunkichi Baba

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University

Joh Nisimura

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya Daini Red Cross Hospital

We developed a new antibacterial chemotherapy using a microsphere containing on antibiotic. We selected poly LGA as a material of the microsphere which is a biodegradable polymer, and Dibekacin as an antibiotic.

We examined the pharmacokinetics of this microsphere both in vitro and in vivo.

The release of antibiotic, Dibekacin, showed 2peaks. The first peak indicated the early release while the second peak showed the delayed release of Dibekacin by the microsphere.

The result demonstrated the possibility of a new topical antibacterial chemotherapy in the field of otorhinolaryngology.

目 的

耳鼻咽喉科領域の感染症の多くは副鼻腔、中耳腔などのいわば“半閉鎖腔”に起こる感染症である。これらの部位には、物理的防御機構や液性免疫、細胞性免疫などの強固な生体防御機構が存在するが、ひとたび感染が生じると、その解剖学的特徴から排膿しにくく、炎症が遷延化する。その結果、線毛上皮が破壊され、粘液線毛機能等の感染防御機構が破壊すると反復感染を生じ、ついには慢性炎症

へと移行する。このような悪循環を抑止し、感染を終息させるためには、組織が修復されるまでの十分な期間、感染局所を無菌的に保つことが必要と考えられる。そこで我々は、徐放化抗菌薬を局所投与することが上述のごとき感染症の一治療手段となり得ると考え、Drug Delivery System (DDS) を用いて抗菌薬含有生体内分解性マイクロスフェアを作製した。そして、これよりの抗菌薬放出を経時的に測定し、このような局所徐放化抗菌化

学療法成立の可能性について検討した。

材料と方法

1. 生体内分解性ポリマー

抗菌薬を徐放化するための基剤としては、乳酸-グリコール酸共重合体 (LGA) を選択した、このうち、乳酸:グリコール酸比 1:1, 分子量10,000のもの (LGA-5010, 和光純薬工業製) を用いた。

2. 含有させる抗菌薬

マイクロスフェア内に含有させる抗菌薬としては、アミノ配糖体系抗生物質ジベカシン (DKB, 明治製薬株式会社より供与) を用いた。

3. DKB-LGA マイクロスフェアの作製

液中乾燥法¹⁾により作製した (Fig 1)。

Preparation of DKB-LGA microsphere

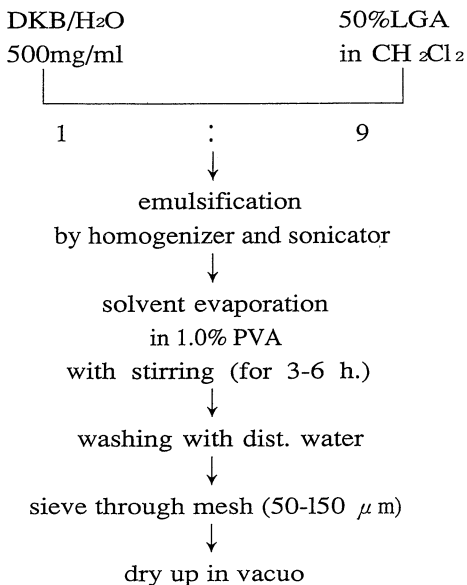


Fig. 1 DKB-LGA マイクロスフェアの作製法

すなわち、500mg/mlの濃度に調節したDKB水溶液と50% LGA ジクロロメタン溶液を1:9 (V/V)の割合で混合し、ホモジナイザー (Ultra-turrax, Junke and Kunkel社製), 続いて超音波粉砕器 (ultrasonic disruptor, UD200, Tomy社製) にて

乳化処理を行い、完全なエマルジョンとした。このエマルジョンを高速で攪拌中の1%ポリビニルアルコール (PVA) 溶液中に23Gの注射針を通して注入した。3時間攪拌した後、PVA溶液中に生じたマイクロスフェアをステンレスメッシュ (No. 100, No. 280) を通して直径50-150 μ mの分画を採取し、精製水で洗浄後真空乾燥させた。

4. in vitro における DKB-LGA マイクロスフェアからの DKB 徐放試験

作製したDKB-LGA マイクロスフェアを0.02Mリン酸緩衝液, pH 7.4 (PBS) にw/v比1:100で懸濁し, 37°Cで穏和な震盪を加えながら温置した。温置後, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日後にその上清を交換, 回収し測定まで-70°Cで保存した。

5. in vivo における DKB-LGA マイクロスフェアからの DKB 徐放試験

in vivo における徐放試験は慢性滲出性炎症モデルであるラット肉芽嚢胞²⁾を用いた (Fig. 2)。Donryu系雄性ラット, 130g前後を用い, エーテル麻酔下にて背部を剃

Rat croton oil pouch model

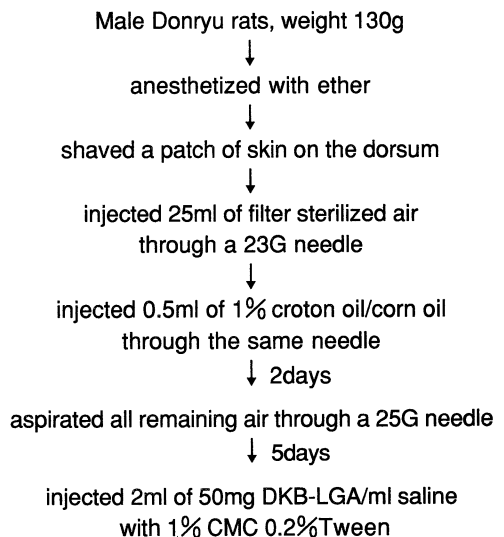


Fig. 2 ラット肉芽嚢胞の作製法

毛し、23G注射で皮下に25ml空気を注入し、空気嚢胞を作製した。続いてその嚢胞中に起炎剤として1%クロトン油含有コーン油0.5mlを23G注射針を用いて注入した。2日後、嚢胞内に残存する空気を吸引し、滲出液で満たされた肉芽嚢胞を作製した。その5日後、先に作製したDKB-LGAマイクロスフェアを0.1%カルボキシメチルセルロース、0.1%トウイン80を含む生理食塩水に50mg/mlの割合で懸濁し、その2mlを嚢胞中に注入した(マイクロスフェア群)。また、対照として同様にDKBを1mg/mlに調製した溶液2mlを嚢胞中に注入した(one shot群)。注入後、1, 3, 5, 7, 10, 14, 21日目に嚢胞内貯留液を採取し、測定まで-70°Cで保存した。

6. 採取溶液中のDKB濃度の測定

5. および6. で採取したDKB溶液は *Bacillus subtilis* AATCC 6633株を検定菌、測定培地を Mycin assay agar とするアガーホール法によりDKB濃度を測定した。

結 果

1. in vitro におけるDKB-LGAマイクロスフェアからのDKB放出

in vitro においてDKBはマイクロスフェアより二峰性に放出された (Fig 3)。マイクロスフェアからのDKBの放出量は、

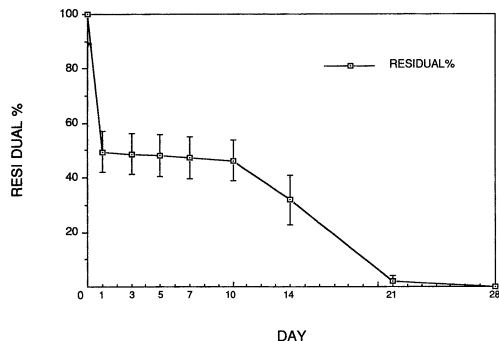


Fig. 3 in vitro におけるDKB-LGAマイクロスフェアからのDKB放出。

縦軸はDKB-LGAマイクロスフェア中に存在する残存DKB量(%)を表わす。

初期放出として第1日に50.4%が放出された。その後、10日より徐放相が始まり、14日までに68.2%、21日までに98%が放出され、28日までに全量のDKBが放出された。

また、マイクロスフェア100mgあたりの総DKB放出量は2mgであった。

2. in vivo におけるDKB-LGAマイクロスフェアからのDKB放出

マイクロスフェア群における嚢胞内貯留液中のDKB濃度の経時変化は、in vitroでの放出と同じく第1日の初期放出と5日からの徐放相を認めた (Fig 4)。徐放相は

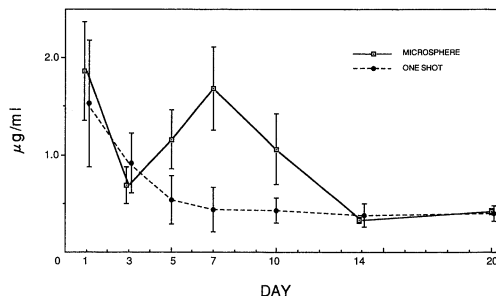


Fig. 4 in vivo におけるDKB-LGAマイクロスフェアからのDKB放出。

実線はマイクロスフェア群、破線はone shot群のラット肉芽嚢胞内滲出液中のDKB濃度の経時変化を示す。

約1週間続き、この間一定濃度以上の抗菌薬濃度を維持することが可能であった。

一方、one shot群における嚢胞内貯留液中のDKB濃度の経時変化は、第1日に最高値を示した後は、約5日で消失した。

考 察

局所抗菌薬化学療法は、感染局所に抗菌薬を直接投与するため、全身的投与では不可能な高い組織移行が得られ、また、全身的副作用の発現を避けることが可能である。耳鼻咽喉科領域においても、吸入療法、プレッツ置換法、点耳などの局所療法が行われ効果をあげている。しかしながら、これらは頻回の施行が必要で、反復感染の予防や慢性炎症に対す

る治療としては患者の通院負担が大きく、治療に対するコンプライアンスが低下し、満足な治療効果が得られないことが多い。以上の観点から抗菌薬を徐放化することにより、これらの局所療法の短所が改善されれば治療効果を増大し得ると考え、DDSを用いて局所徐放化抗菌薬化学療法の開発を試みた。

まず、抗菌薬を徐放化するための基剤としては、乳酸-グリコール酸共重合体を選択した (Fig 5)。このポリマーは水の存在下で

random
poly (dl-lactide-co-glycolide) : LGA

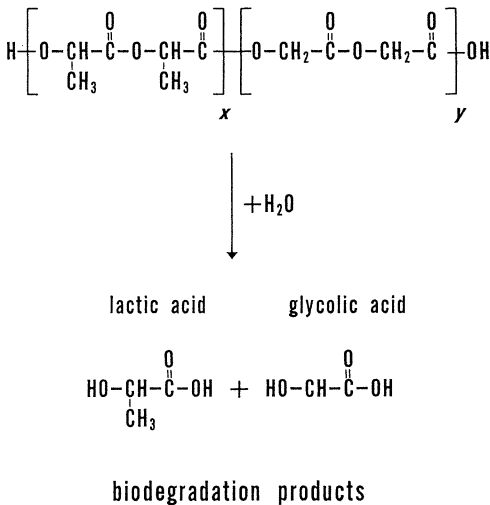


Fig. 5 乳酸・グリコール酸共重合体の化学構造式

ほとんどが非酵素的に加水分解されて乳酸とグリコール酸に分解されるため、生体にほぼ無害で、すでに生体内分解性の縫合糸や、lutenizing hormone-releasing hormone の徐放剤³⁾⁴⁾として用いられている。

一方、耳鼻咽喉科領域の局所療法に使用する抗菌薬には Table 1 に挙げた条件が必要である。そのような条件を満たすものとしてアミノ配糖体系抗生物質が挙げられるが、そのなかでも抗菌力、抗菌スペクトルからDKBを選択した。また、アミノ配糖体系抗生物

耳鼻咽喉科領域の局所抗菌薬化学療法剤の条件

- ① 抗菌力がよいこと
- ② 粘膜への刺激性が少ないこと
- ③ いやなニオイや味が少ないこと
- ④ 抗原性が低いこと
- ⑤ 安定性が高いこと

Table 1 耳鼻咽喉科領域における局所抗菌薬の条件

質は水に極めてよく溶けるという性質を有しており、LGAにより徐放化する際、含有率を高くできるという利点を持つ。

上記を使用してDKB-LGA マイクロスフェアを作製し、in vitro, in vivoにおけるDKBの放出動態を検討した。マイクロスフェアからのDKBの放出は、第1日目までに初期放出として約50%が放出され、残りの約50%が徐放相として放出された。このような二峰性のDKB放出は、DDSにおけるcontrolled releaseの観点から見ると、アミノ配糖体系抗生物質は用量依存性の抗菌作用を有するため、初期放出時に高濃度で作用させた後、徐放相でMIC以上を維持するという放出動態は理にかなったものと考えられる。また、in vitroにおいては初期放出と徐放相の間隔が約1週間存在するが、in vivoでは徐放相は5日目からとin vitroより早く始まり、初期放出と徐放相がほぼ連続している。これは、マイクロスフェアが、炎症組織の加水分解酵素により分解されたり、マクロファージに貪食されて⁵⁾DKBの放出が早まったために生じたものと考えられる。滲出液中に放出されたDKB濃度については、閉鎖腔である嚢胞中へのマイクロスフェア投与量が限られるため、1 μg/ml程度ではあるが、約1週間一定量以上の抗菌薬濃度を維持することが可能であった。以上よりDKB-LGA マイクロスフェアが、耳鼻咽喉科領域の感染症に対する新しい局所抗菌薬化学療法の担い手となりうる可能性が示

唆された。

また、LGA マイクロスフェアの安全性については、種々の実験⁶⁾により証明されているが、線毛上皮および粘液繊毛機能に対する影響については報告されておらず、今後検討を加える予定である。

文 献

- 1) Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, et al. : A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertil. Steril.*, 31 : 545-551, 1979.
- 2) Robert A, Nezamis JE : The granuloma pouch as a routine assay for anti phlogistic compounds. *Acta Endocrinol.*, 25 : 105-112, 1957.
- 3) Sanders LM, Kent JS, McRae GI, et al. : Controlled release of a lutenizing hormonereleasing hormone analogue from poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Pharm. Sci.*, 73 : 1294-1297, 1984.
- 4) Shimamoto T : Pharmaceutical aspects. Nasal and depot formulations of leuprolide. *J. Androl.*, 8 : S14-16, 1987.
- 5) Tabata Y and Ikada Y : Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of Llactic acid / glycolic acid homo-and copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, 22 : 837-858, 1988.
- 6) 高木一平 : 抗原含有の生体内分解性マイクロスフェアを用いた新しい減感作療法の研究. *名古屋市立大学医学会雑誌*, 42 : 269-285, 1992.