

高分子 microsphere を用いた硝子体内薬剤投与の試み

森寺 威之*, 小椋祐一郎*, 本田 孔士*, 和田 良一**, 玄 丞然**, 筏 義人**

*京都大学医学部眼科学教室, **京大医用高分子センター

要 約

生体内分解吸収性高分子である、乳酸等の重合体による高分子 microsphere を、薬剤徐放システムの基剤として用いることが可能であるか検討を加えた。液中乾燥製法による、5-FU を含む、乳酸重合体、乳酸グリコール酸共重合体 microsphere を用い、in vitro において5-FU の放出を測定した。in vivo において、5-FU を含まない microsphere を、有色家兎眼の硝子体腔内に注入し、その消失を観察した。硝子体切除術を施行した家兎眼においても、その動態を観察した。また、ERG を用いて網膜への影響を調べた。in vitro では、乳酸重合体 microsphere では、5-FU の放出は7日間持続した。in vivo では、硝子体内に注入した microsphere は、約1カ月半で分解消失した。硝子体切除眼では、その消失は促進された。ERG、組織学検査では、非注入眼と比べ、明かな異常は認めなかった。この高分子 microsphere は硝子体内での薬剤徐放システムの基剤として有用であると考えられた。(日眼会誌 94: 508—513, 1990)

キーワード: マイクロスフェア, 生体内分解吸収性高分子, 増殖性硝子体網膜症, 硝子体内注入, 5-FU

Intravitreal Drug Delivery by Microspheres of Biodegradable Polymers

Takeshi Moritera*, Yuichiro Ogura*, Yoshihito Honda*

Ryoichi Wada**, Suong-Hyu Hyon** and Yoshito Ikada**

*Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

**Research center for Medical Polymers and Biomaterials, Kyoto University

Abstract

We evaluated the efficacy of microspheres of biodegradable polymers as a slow releasing drug delivery system in the vitreous body. Microspheres containing 5-FU were prepared with polymers of poly-(lactic acid) or copolymers of glycolic acid and lactic acid. The release of the drug was studied in vitro. Poly-(lactic acid) microspheres released 5-FU for 7 days. The intravitreal kinetics of the microspheres was studied in rabbits in vivo. The microspheres disappeared from the vitreous cavity of normal eyes by 48 ± 5 days after injection. Disappearance was accelerated from the vitreous cavity of vitrectomized rabbits (14 ± 2 days, $p < 10^{-6}$). No abnormality was found on electroretinographic or histological examinations after microspheres injection. These results suggested that microspheres of biodegradable polymers could be useful as a potential drug delivery system for sustained drug release in the vitreous body. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 94: 508—513, 1990)

Key words: Microsphere, Biodegradable polymer, Proliferative vitreoretinopathy, Intravitreal injection, 5-FU

別刷請求先: 606 京都市左京区聖護院川原町53 京都大学医学部眼科学教室 森寺 威之

(平成元年9月18日受付, 平成元年11月10日改訂受理)

Reprint requests to: Takeshi Moritera, M.D. Dept. of Ophthalmol., Faculty of Med., Kyoto Univ.
53 Shogoinkawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received September 18, 1989 and accepted in revised form November 10, 1989)

I 緒 言

増殖性硝子体網膜症や、眼内炎に対し、種々の薬剤の硝子体内への直接注入が試みられている^{1)~10)}。しかし、硝子体内では、薬剤は速やかに消失する¹¹⁾ため、薬剤の有効濃度を維持するためには頻回の注入が必要となり、実用的には種々の問題¹²⁾がある。1回の注入で持続的に薬剤を放出し、必要な期間、硝子体内で一定の濃度を保つシステムの開発が模索されている。また、薬剤の放出を制御することが出来れば、その薬剤の薬効を最大限に高め、副作用を最小限に抑えることが可能となる。近年、このような薬剤投与系(drug delivery system)として高分子を用いた研究が進められている^{13)~16)}。我々は、代表的な生体内分解吸収性高分子である乳酸等の重合体による高分子 microsphere を作成し、薬剤徐放システムとして用いることが可能であるか検討を加えた。

II 実験方法

1. 高分子 microsphere の作製

分子量4800の乳酸ポリマー (polylactic acid, PLA) を基剤とし、質量比10%の5-fluorouracil (FU) を含む microsphere を液中乾燥法¹⁴⁾¹⁷⁾にて作成した。同様に分子量4700のグリコール酸-乳酸ポリマー (PGLA, 質量比3:7) を基剤とし、質量比10%の5-FU を含む microsphere を作成した。以下、液中乾燥法の概要を述べる(図1)。ポリマー450mg と薬剤50mg とを、ジメチルホルムアミド (DMF) 5ml に溶解させ、その溶液を、さらにレシチンを含んだ、他の混ざり合わない有機溶媒(今回は脱水ヒマシ油を使用した)に混合し、攪拌することによって5-FU を含んだ oil in oil の

emulsion を作成した。この溶液を、常温、大気圧下において約24時間プロベラにて攪拌し、薬剤を含んだ溶媒, DMF を蒸発させた。その溶液を、ヘキサンにて洗浄し、48時間凍結乾燥し、microsphere を回収した。今回の研究では、増殖性硝子体網膜症に対する抑制作用の報告されている5-FU を含有薬剤として用いた。図2は、in vitro における microsphere の分解を示した走査電顕像である。生体中に注入されたポリ乳酸 microsphere は、乳酸に加水分解され(図3)、最終的には消失する。このような microsphere の分解に伴い、薬剤が徐放される。

2. in vitro での薬剤放出実験

5-FU を含んだ乳酸ポリマー、乳酸-グリコール酸ポリマーそれぞれ10mg を、1ml リン酸緩衝液に懸濁させ、37℃恒温槽にて5-FU を溶出させた。14日間、所定時間ごとに遠沈した上清を採取し、bioassay 法¹⁸⁾を用いて5-FU の濃度を測定し、徐放状態を調べた。また加水分解された乳酸の、溶液の pH に対する影響をみる為に、同様に14日間、上清中の pH の変化を測定した。

3. 家兎眼での硝子体内注入実験

今回、高分子 microsphere 自体の毒性を調べる為、

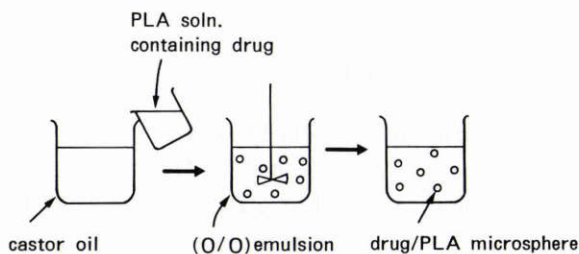


図1 液中乾燥法 oil in oil method

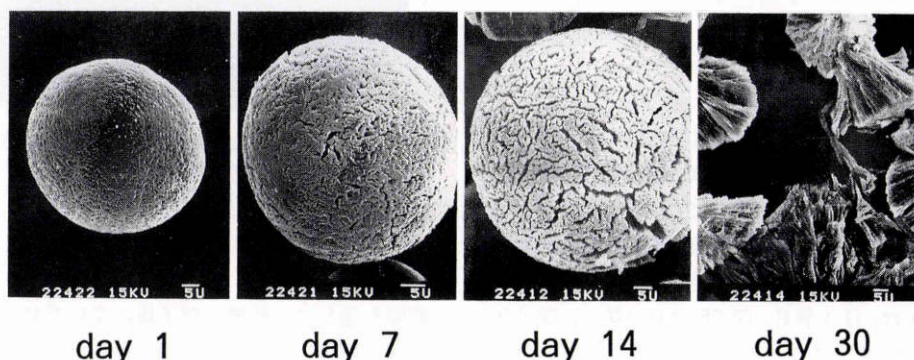


図2 ポリ乳酸 microsphere の加水分解の走査電顕像

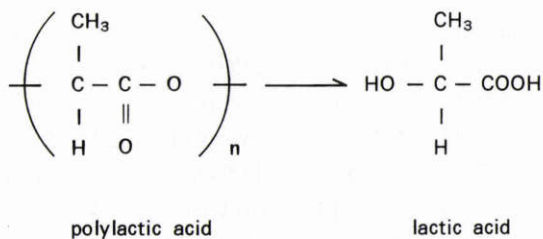


図3 ポリ乳酸の加水分解

薬剤を含まない microsphere を、実際に家兎眼硝子体中に注入し経過観察を行った。対象は体重1.5~2.0kgの有色家兎10羽10眼を用いた。トロピカミドと塩酸フェニレフェリンにて散眼後、塩酸オキシブプロカイン点眼麻酔、ペントバルビタールナトリウム (20mg/kg) 腹腔内注射を施行。5眼に対して前房穿刺を行い、0.1mlの房水を吸引し、薬剤を含まない乳酸ポリマーのみの、2%microsphere 懸濁液0.1mlを、角膜輪部より4mmの強膜部より、硝子体中央に、26G 針にて注入した。他の5眼に、pars plana より硝子体切除術を施行し、手術終了後、硝子体中央に、同様に、microsphere 懸濁液0.1mlを注入した。検眼鏡を用いて、白色塊として観察される microsphere を、消失するまで観察した。また ERG を用いて、注入した高分子 microsphere の網膜に対する影響を調べた。

III 結 果

1. Microsphere からの5-FU の放出

図4のように、グリコール酸-乳酸ポリマーによる microsphere では、5-FU は2日間で98%が放出された。乳酸ポリマーによる microsphere では5-FU は7日間で75%が放出された。このように基剤となる高分子の種類、重合比を変えることによって、薬剤の放出時間は変化した。加水分解の産物である乳酸やグリコール酸によって、溶媒であるリン酸緩衝液の pH の変動は起こらなかった。

2. 硝子体内動態

検眼鏡による観察において、硝子体内の高分子 microsphere の白色塊は、徐々に分解、縮小し、最終的には消失した。非硝子体切除眼に注入した高分子 microsphere は、平均 48 ± 5 日で消失した。硝子体切除眼では、平均 14 ± 2 日で、消失が促進されていた ($p < 10^{-6}$)。図5Aは、注入翌日、図5Bは14日後の、硝子体手術施行眼の眼底写真である。この症例では、白色塊は、16日後に消失した。細隙灯顕微鏡検査では、観察

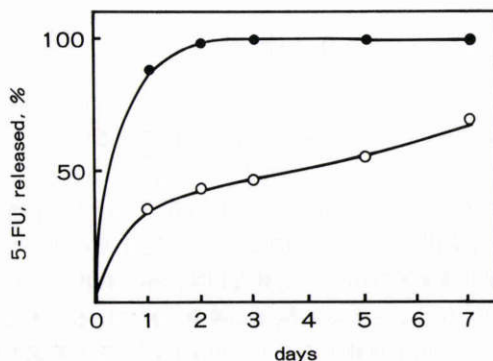


図4 microsphere からの5-FU の放出

(●) ポリグリコール酸-乳酸 microsphere, (○) ポリ乳酸 microsphere

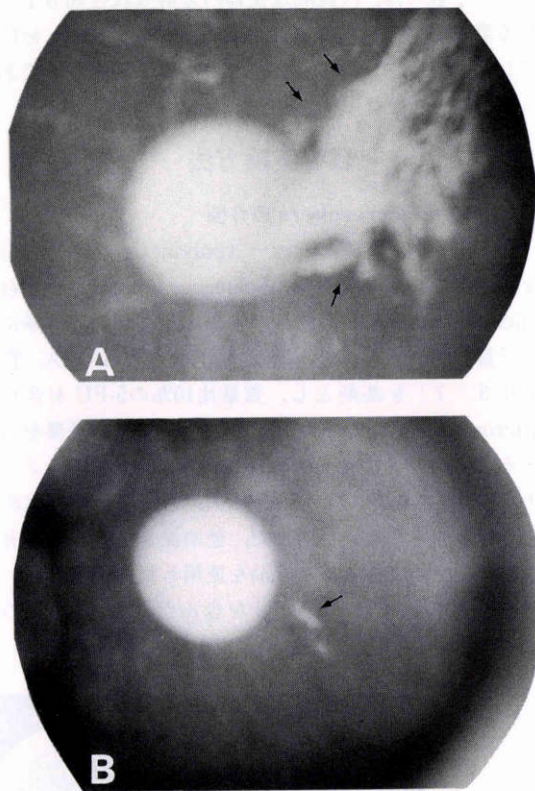


図5 microsphere 注入家兎眼の眼底写真

A, microsphere 注入翌日, microsphere は白色塊として認められる (矢印). B, microsphere 注入後14日, 分解して小片となった microsphere (矢印)

期間を通して、前房、硝子体に炎症所見を認めず、水晶体、網膜にも異常は認めなかった。

ERG では、microsphere 注入眼と非注入眼では b 波

の振幅、潜時に有意差を認めなかった。また、組織標本を作製し、光学顕微鏡にて形態学的検討を加えたが、網膜、水晶体、角膜には、非注入眼と比較して異常は認めなかった。

IV 考 按

近年、新薬の開発と並んで、薬剤自体でなく、既存の薬剤の薬効をより向上させる目的で、薬剤投与システムの研究が進んでいる¹⁹⁾²⁰⁾。他科の領域では、インスリン²¹⁾やホルモン¹⁷⁾の徐放投与、抗癌剤の徐放投与¹⁶⁾²²⁾やターゲティング²²⁾²³⁾についての研究が盛んである。眼科領域においては、オキユサートによるピロカルピンの徐放投与²⁴⁾が知られているが、この方面の研究はまだ進んでいない。しかし需要がないわけではなく、例えば、増殖性硝子体網膜症に対して、種々の抗癌剤の硝子体内注入が試みられている^{5)~10)25)~27)}が、いずれの薬剤も、正常組織に対する毒性という副作用が問題²⁸⁾²⁹⁾となっており、この抗癌剤の硝子体内注入の実用化には、副作用を軽減する、即ち、有効量以上で、かつ極量に達しない濃度を保つ新たな薬剤投与システムが必要不可欠である。また現在、緑内障に対するトラベクトミー施行後、線維芽細胞の増殖を抑制する為に、約2週間の、5-FUの結膜下注射が行われている^{30)~32)}。これは5-FUの結膜下注射後の消失が、非常に速い³³⁾為で、新たな薬剤徐放システムにより5-FUの眼組織内滞留時間が増加し、注射の期間並びに回数を減らすことができれば、患者の苦痛や、合併症を軽減できることは明かである。我々は、生体内分解吸収性高分子である乳酸等の重合体による高分子microsphereを作製し、そのような薬剤徐放システムとして用いることが可能であるか検討した。ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびこれらの共重合体は、生体内にて加水分解をうける¹⁴⁾。既に、臨床的にも外科用縫合糸として使用されており、生体内での安全性も確立されている¹⁴⁾³⁴⁾。また、外科領域では、アドリアマイシンを含むmicrosphereが動物実験に用いられ、マウスの癌性腹膜炎に対しての抑制効果が報告¹⁵⁾されており、その臨床応用は秒読み段階にある。我々は、乳酸ポリマー、グリコール酸-乳酸ポリマーを基剤とし、5-FUを含むmicrosphereを作製し、in vitroにおいて、5-FUの放出を調べた。その結果、5-FUの放出は、乳酸-グリコール酸ポリマーでは約2日間、乳酸ポリマーでは、約7日間持続した。即ち、microsphereの徐

放作用、並びに、基剤を変えることによって、薬剤の放出速度を変化させることが証明された。また、家兎眼硝子体内に注入したmicrosphereには、ERG検査、形態学的検討において毒性は認められなかった。

他の薬剤徐放システムの一つとして、リポソーム内に抗生剤³⁵⁾³⁶⁾や、抗真菌剤³⁷⁾、抗ウイルス剤³⁸⁾、抗腫瘍剤¹²⁾³⁹⁾を混入し、結膜下³³⁾、硝子体内に注入する試みが報告されている。高分子microsphereは、リポソームと比較して、高分子の種類、分子量、共重合の比率、を変えることによって、徐放状態を調節することが可能である。また、製剤として、作製後、安定しており、低温下にて長期保存が可能である。さらに、生体に対して安全であり、硝子体内薬物徐放システムとして有用であると思われる。また、硝子体に限らず、結膜下や、球後に投与することも可能で、薬剤も抗腫瘍剤をはじめ、抗生剤や、ステロイド、免疫抑制剤など幅広い応用が考えられる。さらに、in vivoの実験を重ね、検討していく予定である。

文 献

- 1) Wiedemann P: Die medikamentöse Behandlung der proliferativen Vitreoretinopathie. Stuttgart, Enke Copythek, 30-70, 1988.
- 2) 松井瑞夫: 増殖性硝子体網膜症の薬物治療の展望. 眼科 29: 31-37, 1987.
- 3) Tano Y, Sugita G, Abrams G, et al: Inhibition of intraocular proliferations with intravitreal corticosteroids. Am J Ophthalmol 89: 131-136, 1980.
- 4) Tano Y, Chandler D, Machemer R, et al: Treatment of intraocular proliferation with intravitreal injection of triamcinolone acetonide. Am J Ophthalmol 90: 810-816, 1980.
- 5) Blumenkranz MS, Ophir A, Clafin AJ, et al: Fluorouracil for the treatment of massive periretinal proliferation. Am J Ophthalmol 94: 458-467, 1982.
- 6) Stern WH, Lewis GP, Erickson PA, et al: Fluorouracil therapy for proliferative vitreoretinopathy after vitrectomy. Am J Ophthalmol 96: 33-42, 1983.
- 7) Binder S, Riss B, Scorpic CH, et al: Inhibition of experimental intraocular proliferation with intravitreal 5-fluorouracil. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 221: 126-129, 1983.
- 8) Blumenkranz MS, Hernandez E, Ophir A, et al: 5-fluorouracil: New applications in com-

- plicated retinal detachment for an established antimetabolite. *Ophthalmology* 91: 122-130, 1984.
- 9) **Peyman GA, Schulman J**: Proliferative vitreoretinopathy and chemotherapeutic agents. *Surv Ophthalmol* 29: 434-442, 1985.
 - 10) **Sunalp M, Wiedemann P, Sorgente N, et al**: Effects of cytotoxic drugs on proliferative vitreoretinopathy in the rabbit cell injection model. *Cur Eye Res* 3: 619-623, 1984.
 - 11) **Jarus G, Blumenkranz M, Hernandez E, et al**: Clearance of intravitreal fluorouracil. Normal and aphakic vitrectomized eyes. *Ophthalmology* 92: 91-96, 1985.
 - 12) **Joondeph BC, Khoobehi B, Peyman GA, et al**: Liposome-encapsulated 5-fluorouracil in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic surg* 19: 252-256, 1988.
 - 13) 玄 丞然: 高分子を利用した新しい医薬製剤. 高分子加工 31: 439-446, 1982.
 - 14) 和田良一, 田畑泰彦, 玄 丞然, 他: ポリ乳酸マイクロカプセルからの抗癌剤の徐放. ポパール会記録 87: 1-10, 1986.
 - 15) **Wada R, Hyon S-H, Ikada Y, et al**: Lafctid acid oligomer microspheres containing an anticancer agent for selective lymphatic delivery: I. In vitro studies. *J Bioact Compatible Polimers* 3: 126-136, 1988.
 - 16) **Ike O, Watanabe S, Nakamura T, et al**: Release and degradation characteristics and antitumor effect of adriamycin-containing poly-L-lactic acid microspheres. *Implant Materials Biofunction* 8: 257-262, 1988.
 - 17) **Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, et al**: A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fert Steril* 31: 545-551, 1979.
 - 18) **Wright D, Matsen JM**: Bioassay of antibiotics in body fluids from patients receiving cancer chemotherapeutic agents. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 417-422, 1980.
 - 19) 瀬崎 仁: 生物薬剤学の進歩と DDS. 日本臨床 47: 1213-1217, 1989.
 - 20) 水島 裕: 臨床医学と DDS. 日本臨床 47: 1218-1222, 1989.
 - 21) **Pickup JC**: Continuous subcutaneous insulin infusion: An approach to achieving normoglycemia. *Br Med J* 1: 204-207, 1978.
 - 22) 塚越 茂: 癌化学療法. 日本臨床 47: 1295-1301, 1989.
 - 23) 矢口豊久, 山内晶司, 永田二郎: アドリアマイシン包埋リポソームを使用した消化器癌のターゲティング療法. 日本臨床 47: 1369-1372, 1989.
 - 24) **Shell JW, Baker RW**: Diffusional system for controlled release of drug to the eye. *Ann Ophthalmol* 6: 1037, 1974.
 - 25) **Barrada A, Peyman GA, Greenberg D, et al**: Toxicity of antineoplastic drugs in vitrectomy infusion fluids. *Ophthalmic Surg* 14: 845-847, 1983.
 - 26) **Peyman GA, Greenberg D, Fishman GA, et al**: Evaluation of toxicity of intravitreal antineoplastic drugs. *Ophthalmic Surg* 15: 411-413, 1984.
 - 27) **Barrada A, Fishman G, Peyman GA, et al**: Evaluation of intravitreal 5-Fluorouracil, Vincristine, VP16, Doxorubicin, and Tiotepa in primate eyes. *Ophthalmic Surg* 15: 767-769, 1984.
 - 28) 山川良治, 直井信久, 小泉京子, 他: 5-Fluorouracilの網膜に対する影響. 眼紀 35: 871-876, 1984.
 - 29) **Fiscella R, Elvart J, Peyman GA, et al**: In vitro evaluation of cellular inhibitory potential of various antineoplastic drugs and dexamethasone. *Ophthalmic Surg* 16: 247-249, 1985.
 - 30) **Heuer DK, Parrish RK II, Gressel MG, et al**: 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery: II. A pilot study. *Ophthalmology* 91: 384-394, 1984.
 - 31) **Heuer DK, Parrish RK II, Gressel MG, et al**: 5-fluorouracil and glaucoma filtering surgery: III. Intermediate follow-up of a pilot study. *Ophthalmology* 93: 1537-1546, 1986.
 - 32) 中野 豊, 新家 真, 白土城照, 他: 線維柱帯切除術の長期予後に対する 5-FU 85-fluorouracil)の効果. 眼科 30: 443-447, 1988.
 - 33) **Simmons ST, Sherwood MB, Nicholes DA, et al**: Pharmacokinetics of a 5-fluorouracil liposomal delivery system. *Br J Ophthalmol* 72: 688-691, 1988.
 - 34) **Visscher GE, Robinson RJ, Maulding JW, et al**: Biodegradation of and tissue reaction to 50 : poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules. *J Biomed Mater Res* 19: 349-365, 1985.
 - 35) **Fishman PH, Peyman GA, Lesar T**: Intravitreal liposome-encapsulated Gentamicin in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1103-1106, 1986.
 - 36) **Fiscella R, Peyman GA, Fishman PH**: Duration of therapeutic of intravitreally injected

- liposome-encapsulated clindamycin in the rabbit. *Can J Ophthalmol* 22: 307—309, 1987.
- 37) Tremblay C, Barza M, Szoka F, et al: Reduced toxicity of liposome-associated amphotericin B injected intravitreally in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 711—718, 1985.
- 38) Peyman GA, Khoobehi B, Tawakol M, et al: Intravitreal injection of liposome encapsulated ganciclovir in a rabbit model. *Retina* 7: 227—229, 1987.
-