Drug Delivery System
original article

ヒアルロン酸を用いたエリスロポエチン持続性製剤

猪狩康孝・石黒聖子・小川泰亮・山田　稔・戸口　始*

Sustained release preparation of erythropoietin using sodium hyaluronate

Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on erythropoietin administered alone or in combination with sodium hyaluronate were performed in rats to demonstrate the potential application of sodium hyaluronate to a sustained release formulation of erythropoietin (SRE). Following subcutaneonus administration, serum erythropoietin levels in the rats treated with SRE persisted longer than those in the rats treated with an erythropoietin solution. Administration of a bulk erythropoietin solution once a week yielded a remarkable effect on erythropoiesis. The time-course profiles of hematocrit and hemoglobin level, however, were rather fluctuating, indicating that adverse effects, such as hypertension, might be incurred. In contrast, weekly administration of SRE comprising sodium hyaluronate, erythropoietin, and serum albumin gave smoother time-course profiles of erythropoiesis. Serum albumin was found to play an important role in SRE. Since preparation of SRE requires neither organic solvent nor heating, possibility of losing biological activity of erythropoietin would be minizized. The viscous property of SRE would lead to the stabilization of erythropoietin against physical disturbance, which would be beneficial especially for self-administration dosage form. In addition, the fluidity of SRE allowed subcutaneous injection with a small gauge needle (e. g., 26 G). Considering that sodium hyaluronate is biocompatible and biodegradable, the SRE proposed in this study would be a promising candidate for weekly formulation of erythropoietin.

*Yasutaka Igari・Seiko Ishiguro・Minoru Yamada・Yasuaki Ogawa・Hajime Toguchi**

key words : hyaluronic acid, sustained release for a week, erythropoietin, pharmacokinetics, pharmacodynamics

エリスロポエチンは赤血球増殖に重要な役割を持つサイトカインの一種であり，重量の約30%を糖鎖が占める高糖含量の糖蛋白質である[1]．現在，臨床においてはアルファとベータの2種類のエリスロポエチンの製剤が腎不全患者の透析施行中の貧血改善の目的で使用され，いずれのエリスロポエチンも画期的な効果をあげている．

その用法は通常，成人には1回3,000国際単位を週3回，できるだけ緩徐に静脈内に投与し，貧血改善効果が得られたら，維持量として1回1,500国際単位を週2～3回，あるいは1回3,000国際単位を週2回投与するのが一般的である[2]．エリスロポエチンは造血幹細胞から分化成熟した後期赤芽球系前駆細胞(CFU-E)を中心とする赤血球系の前駆細胞に働き，エリスロポエチンを投与することにより骨髄 CFU-E，脾 CFU-E，網状赤血球数，そして赤血球数が順次増加すると報告されている[3]．エリスロポエチンは赤血球産生において mitogen であり，かつ survival factor であることが示唆されており[4]，比較的生体内の半減期がながいにもかかわらず，治療の場では長期間にわたり頻回投与されている．

エリスロポエチンの副作用としては血圧上昇，頭痛などがあげられ，高血圧脳症の報告例もある．これらはいずれも急速な造血あるいは必要以上の造血によるものとされ[2,5,6]，このため定期的にヘマトクリット値，あるいは血圧を測定しながら投与量，あるいは投与間隔を調整しなければならない．

投与経路としては静脈内投与のほかに皮下投与，腹腔内投与も検討されている．皮下投与時のバイオアベイラビリティーは20%～30%と低いにもかかわらず，造血効果は静注時とほぼ同程度であることが報告され，血液透析患者以外での投与経路として有用であることが示唆されている[2,3]．

* DDS Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division, Takeda Chemical Industries, Ltd.　武田薬品工業 DDS 研究所

エリスロポエチン製剤には上記のような頻回投与の煩雑さと投与量，投与間隔の調整という煩わしさがある．一方，皮下投与でも高い活性が得られる．そこで，患者の注射に伴う苦痛軽減，コンプライアンス向上を目的としてエリスロポエチンの持続性製剤の研究を行った．具体的には，投与回数の減少，より滑らかな造血を目標とし，投与経路は自己投与も可能な皮下投与，投与間隔は1週間に1回を目標とした．

エリスロポエチンの持続性製剤の基剤として，筆者らは生体由来成分であるヒアルロン酸を用いることにした．ヒアルロン酸はグリコサミノグリカンの一種でN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖単位の繰り返し構造からなり，生体内に広く存在する多糖である[7]．分子量は非常に大きく，特有の粘弾性，保水性および潤滑作用を有することが知られている．これらの特性を利用して関節機能改善剤あるいは眼球内投与用の医薬品として利用されている．DDSへのヒアルロン酸の応用例としては，その粘性を利用したもの[8]あるいは医薬活性物質を共有結合させ[9]徐放化あるいは持続的な薬効を意図した研究がある．本実験ではヒアルロン酸の粘性を利用し容易に皮下投与でき，しかもエリスロポエチンの薬理効果を十二分に持続させうる可能性について検討を加えた．

方　法

（1）　材　料

エリスロポエチンは，遺伝子組換えエポエチンベータを含む市販の製剤(中外製薬)を用いた．ヒアルロン酸はナトリウム塩を使用した(ジェンザイム社製)．特に明記してなければヒアルロン酸の分子量は約140万である．その他の試薬はJIS特級以上のグレードのものを使用した．

（2）　使用動物

SPF条件下で飼育した雄性SD系ラット(8週齢)の首背部をバリカンで剃毛後，製剤を皮下投与し，尾部静脈より経時的に採血した．いずれの製剤も26Gの注射針を用いて投与した．採血時の抗凝固剤としてはEDTA-2Naを用いた．

（3）　薬理効果測定

採血した血液は常法に従い，ヘマトクリット値(遠心法)，およびヘモグロビン濃度(ヘモグロビン濃度測定キット：和光純薬)を測定した．また，血清中のエリスロポエチン濃度はELISA法(ベーリンガーマンハイム社製)で測定した．超生体染色およびライト染色を施した塗沫標本を検鏡することにより，網状赤血球をカウントした．

（4）　市販製剤からのエリスロポエチンの分離精製

弱陰イオン交換カラム(Mab カラム：JT Baker 社)を装着した HPLC(ウルトロクロムGTi：ファルマシアー LKB 社)を用いて市販エリスロポエチン製剤中のエリスロポエチンと血清アルブミンを分離し，フラクションコレクター(スーパーラック：ファルマシアー LKB 社)で分画した．得られた各フラクション中のエリスロポエチン濃度はELISA法により決定した．

（5）　ヒアルロン酸を用いた製剤の製造

ヒアルロン酸ナトリウム塩(以下，ヒアルロン酸と表記する)を秤量し，1.5%(w/v)になるように注射用生理食塩水を添加後，冷所で約2日間膨潤，溶解させた．必要により攪伴を加えた．得られた均一な粘性を持つ溶液の一定量を小型のガラス製バイアル瓶に入れ，さらに市販のエリスロポエチン製剤および必要に応じて生理食塩水を加えて所定のエリスロポエチン濃度，ヒアルロン酸濃度になるように製剤を調製した．特に明記がなければヒアルロン酸濃度は0.5%(w/v)である．ヒアルロン酸溶液とエリスロポエチン溶液との混合に際し，混合溶液が澄明均一になるまでの混合時間は混合液の量により異なるが，時間がながくなる場合には冷所で行った．

結　果

（1）　血清中エリスロポエチン濃度推移

エリスロポエチン(市販製剤)を単独またはヒアルロン酸と一緒にラットに皮下投与した場合のエリスロポエチン血清中濃度推移を図1に示す．エリスロポエチン単独投与群では投与後6時間で血清中濃度がピークに達し，その後徐々に減衰した．一方，ヒアルロン酸とエリスロポエチンを混合した製剤を投与した群では投与後6時間～8時間で血清中濃度がピークに達し，その後徐々に減衰したが，その減衰速度はエリスロポエチン単独投与群に比較して有意に遅く，ヒアルロン酸添加によ

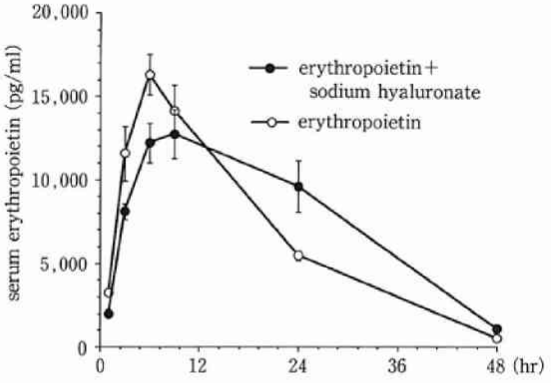


図 1　エリスロポエチン単独(市販製剤)またはエリスロポエチンとヒアルロン酸混合物を皮下投与後の血清中濃度時間推移

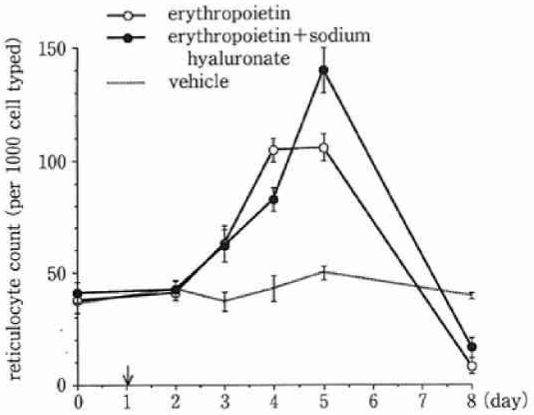


図 2　エリスロポエチン単独(市販製剤)またはエリスロポエチンとヒアルロン酸混合物を皮下投与後の網状赤血球数時間推移
矢印は製剤投与時点を示す．以下の図も同じ．

る徐放効果が得られた．

（2）　網状赤血球数(reticulocyte count)の変動

エリスロポエチン(市販製剤)を単独またはヒアルロン酸と一緒にラットに単回皮下投与した場合の網状赤血球数の変動を図2に示す．エリスロポエチン単独投与群では，投与後3日目から網状赤血球数は上昇しはじめ，4日目～5日目にピークに達したあと，投与後8日目には投与前よりも低下していた．

一方，ヒアルロン酸とエリスロポエチンを混合した製剤を投与した群では同様に投与後3日目から網状赤血球数が上昇しはじめ5日目により高い

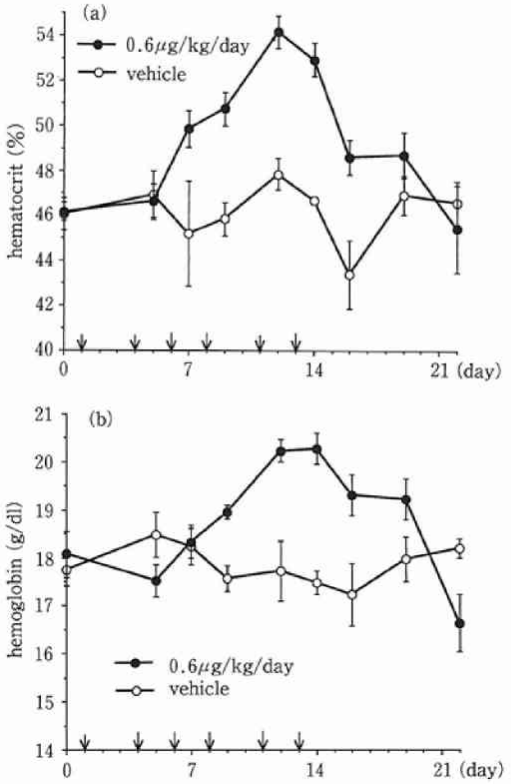


図 3　市販エリスロポエチン製剤を週3回皮下投与後のヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度の時間推移

ピークがみられたあと，8日目には投与前のレベルに低下していた．ヒアルロン酸を混合して投与することにより，網状赤血球数の増加が促進されることが判明した．エリスロポエチンの投与量としては同じであるが，血清中濃度が持続していることにより網状赤血球数の動態が異なることが示された．

（3）　週1回投与と週3回投与の比較

投与間隔による影響を調べるために市販エリスロポエチン製剤の水溶液を，週1回あるいは週3回の投与間隔でラットに皮下投与し，ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度の推移を調べた．週3回投与された群においてはヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度のいずれも速やかに上昇し，投与中止後はそれぞれ徐々に減少(図3)した．一方，生理食塩水を投与した対照群では実験期間中ほぼ一定の値であった．

薬理効果は新生した赤血球の寿命に依存するた

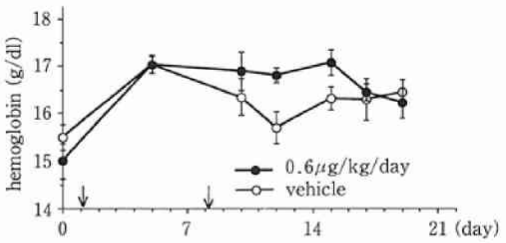


図 4　市販エリスロポエチン製剤を週1回皮下投与後のヘモグロビン濃度の時間推移

め，薬物の消失のはやさ(図1)にくらべてその持続時間はかなりながくなる．このことは投与間隔が短い場合には薬理効果の蓄積が起こることを示唆している．

図4に1週間の投与量を同じにして投与回数を1週間に1回に減らした場合のヘモグロビン濃度の結果を示す．総投与量が同じでも投与間隔が延びることにより薬理効果の発現効率が落ちていることがわかる．一方，1週間に1回の投与でも総投与量を約2倍に増やすと薬理効果の発現が顕著になることが図5に示されている．すなわち，投与間隔を1週間に1回に延ばしても投与量が増えれば薬理効果が発現するが，その薬理効果の振幅はかなり大きいことが判明した．

(4)　ヒアルロン酸の影響

エリスロポエチン(市販製剤)とヒアルロン酸を混合して1週間に1回皮下投与した場合，総投与量が図5の実験と同じにもかかわらず薬理効果の発現が滑らかであり，かつほぼ一定の値を保つことができた(図6)．これは投与量をさらに上げても同様な結果が得られた(結果は示さず)．ヒアルロン酸と混合することにより，血液中濃度が持続していることが主因と思われる．

(5)　血清アルブミンの影響

今回の実験に用いた市販のエリスロポエチン製剤には，血清アルブミンが予め添加されているが，ヒアルロン酸を用いた製剤での血清アルブミンの効果を調べるために，HPLC を用いて市販製剤中のエリスロポエチンを精製分取した．得られたエリスロポエチンあるいはこれにヒアルロン酸を混合したものあるいはさらに一定量の血清アルブミンを添加した製剤を作製しラットに皮下投与した．

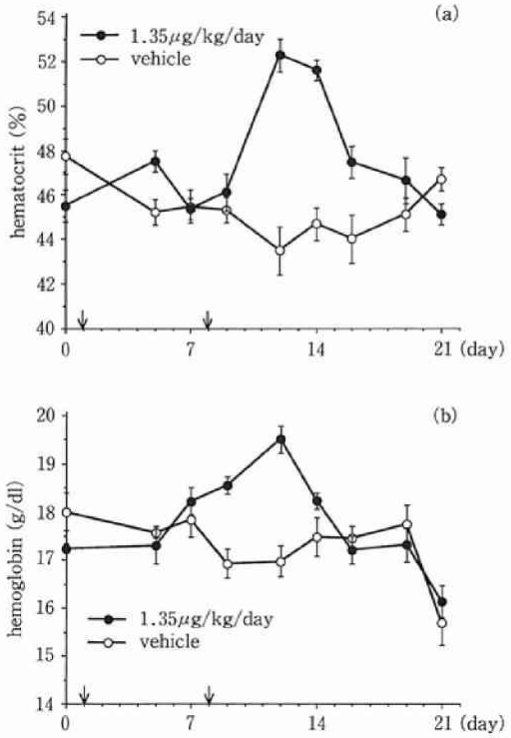


図 5　市販エリスロポエチン製剤を週1回皮下投与後のヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度の時間推移

図7に示すようにエリスロポエチンにヒアルロン酸と血清アルブミンを添加したものが，薬理効果が最も強く発現しており，ヒアルロン酸を用いた製剤における血清アルブミンの添加が効果の持続的発現に有効であることが示された．

考　察

腎性貧血に劇的に作用するエリスロポエチンは，その適応の拡大あるいは自己投与用などその応用の広がりとともに患者の負担を軽減するための製剤の開発が望まれている．1週間に2～3回の静脈内投与で長期間投与するかわりに，ヒアルロン酸を用いた1週間に1回の皮下投与型の放出制御 DDS は有用であると思われる．その利点としては，製造時に熱も有機溶媒も使用しないことと，ヒアルロン酸が適度な粘性を持つことから，物理的な刺激によるエリスロポエチンの変性の危険性が減ることなどがあげられる．これは特に自己投与用製剤などの，専門家以外による製剤の取

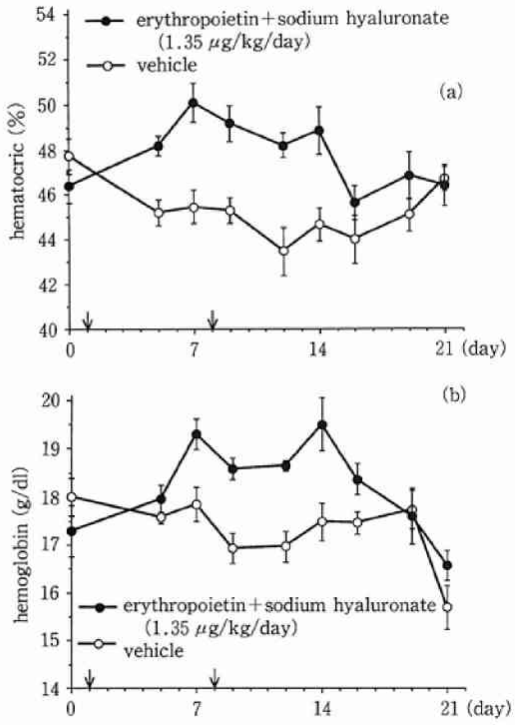


図 6　エリスロポエチンとヒアルロン酸混合物を週1回皮下投与後のヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度の時間推移

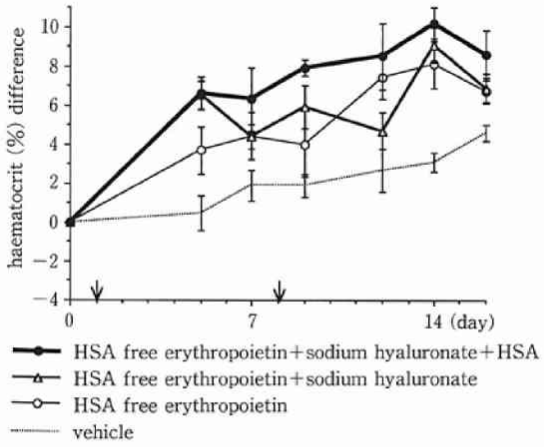


図 7　エリスロポエチン持続性製剤における血清アルブミンの添加効果

り扱いがある場合には重要な点である．

また，この系ではヒアルロン酸の濃度を低くし血清アルブミンを添加することにより，粘性を持つにもかかわらず細い注射針で投与することが可能であるため，患者に与える苦痛は少ない．

市販製剤でも1回の投与量を上げることにより投与間隔が広がることも考えられる．しかし，エリスロポエチンの投与と CFU-E, erythroblast, 網状赤血球，赤血球に至る erythroid lineage の完結の間にタイムラグが存在し，この一連の分化過程を停止させることはできずに副作用につながる危険があり，特に大量の単回投与では危険性が増すことが予想される．

皮下投与後のエリスロポエチンの吸収には時間がかかり，また，消失速度は遅くなる傾向があるが，ヒアルロン酸と混合した製剤ではこれがさらに遅延化された．本論文では触れなかったが，ヒアルロン酸の分子量，濃度なども本 DDS に大きな影響を持つことが判明している．持続性製剤の基剤としてヒアルロン酸をみた場合に，生体内分解性であること，安全性はほぼ確立されていることから臨床への応用を考えても大きい問題はないものと思われる．また，エリスロポエチンに限らず，G-CSF など他のポリペプチドへの応用も可能であり，今後の発展が期待される．

文　献

1) Krantz, S. B.：Blood　77：419-434, 1991.
2) Faulds, D., Sorkin, E. M.：Drugs　38：863-899, 1989.
3) 岩川精吾：医学のあゆみ　155：631-633, 1990.
4) Spivak, J. L., Pham, T., Isaacs, M., Hankins, W. D.：Blood　77：1228-1233, 1991.
5) 稲本　元：医学のあゆみ　155：639-642, 1990.
6) 丸茂文昭：医学のあゆみ　155：643-646, 1990.
7) Scott, J. E.：The Biology of Hyaluronan. Ciba Foundation Symposium　143. John Wiley & Sons, 1989, p6-20.
8) Larsen, N. E., Balazs, E. A.：Advanced Drug Delivery Reviews　7：279-293, 1991.
9) Drobnik, J.：ibid. 7：295-308, 1991.