

崇城大学学位論文

温度応答性疎水化ヒドロキシプロピルメチル
セルロース/シクロデキストリンヒドロゲルの
構築と製剤への応用

平成 30 年度

大久保 尚徳

温度応答性疎水化ヒドロキシプロピルメチル
セルロース/シクロデキストリンヒドロゲルの
構築と製剤への応用

March 2019

大久保 尚徳

Development of thermoresponsive hydrophobically modified
hydroxypropylmethyl cellulose/cyclodextrin hydrogel for
pharmaceutical application

Masanori Okubo

Development of thermoresponsive hydrophobically modified hydroxypropylmethyl cellulose/cyclodextrin hydrogel for pharmaceutical application

Masanori Okubo

Hydrophobically modified hydroxypropylmethyl cellulose (HM-HPMC), which contains stearyl groups (C_{18}) at the hydroxypropyl end, has been used to control pharmaceutical properties of quasi-drugs and cosmetics as a thickener or a gelation agent. HM-HPMC hydrogel shows a high viscosity at low concentrations (~ 1 w/v%) because it forms three demntional networks via hydrophobic interaction between stearyl groups in water. Recently, stimuli-responsive hydrogels, which can change the viscosity in response to an external stimulus (temperature, pH, light, etc.), have attracted attention for use in phramceutical application. In this study, we developed a new thermoresponsive sol-gel transition system based on the interaction between cyclodextrin (CyD) and HM-HPMC. Furthermore, we evaluated the potency of the thermoresponsive HM-HPMC/CyD hydrogel for use in various pharmaceutical formulations.

1) Development of thermoresponsive sol-gel transition system using HM-HPMC and CyD ; Effect of CyD on the viscosity of HM-HPMC hydrogel

The viscosity of HM-HPMC hydrogel was markedly decreased by the addition of CyDs in a concentration-dependent manner. Especially, the decreasing effect of α -CyD was greater than those of β - and γ -CyDs. The transition from gel to sol was also confirmed by dynamic reology measurments and its apperances. The interaction between HM-HPMC and CyDs was evaluated by 1H -NMR measurements. α -CyD interacted strongly with stearyl moieties of HM-HPMC that involved in the reduction of the viscosity of HM-HPMC. The stability constant (K_c) of the stearyl moiety with CyDs was determined, using stearylamine as a model moiety, by the solubility method. α -CyD with small cavity diameter showed the highest K_c value compared with the corresponding value for the β - and γ -CyD, and the K_c value was temperature dependent. Thermodynamic parameters calculated from the K_c value and temperature confirmed that ΔH was the dominant contibuter for the interaction. In response to the temperature dpendency of K_c values, the viscosity of the HM-HPMC/CyD hydrogel increased with temperature. At low temperature, the elastic HM-HPMC turned into a low viscous sol, as the result of the interaction of CyDs with stearyl ends of the polymer. Heating the HM-HPMC/CyDs induced the dissociation of CyDs from the stearyl moieties, thus the viscosity of HM-HPMC/CyDs hydrogel increased with temperature. HM-HPMC/ α -CyD hydrogel showed reversible sol-gel transition in response to the temperature change. Thermoresponsive sol-gel transition sysytem was successfully developped, based on the host-guest interaction between HM-HPMC and CyDs.

2) Application of thermoresponsive HM-HPMC/CyD hydrogel in eye-drop formulation

Thermoresponsive HM-HPMC/ α -CyD hydrogel was used to increase the intraocular drug concentration in eye-drop formulation. HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) hydrogel was selected for the ocular absorption of diclofenac sodium (DCFNa), since the behavior of thermal gelation was similar to that of the commercial thermoresponsive eye-drop, LISMON[®] TG. The drug release from HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) hydrogel was slightly delayed compared with DCFNa solution. When the HM-HPMC/ α -CyD hydrogel containing DCFNa was administered on the eyes of rabbits, it gave significantly higher drug concentrations in the corneal and aqueous humor compared with the commercial eye-drop. The results suggested that the dissociation of α -CyD from the stearyl moiety occurred on the surface of the eye (33 ~ 36°C) and the sol quickly turned into a gel, thus prolonging the retention of the drug on the eye and improving amounts of the drug that passed through the cornea. Ocular irritation caused by irritative DCFNa was tested by the modified Draize test. Both formulations were not irritating to the cornea, the anterior chamber and iris and corneal epithelium. On the other hand, 2 out of 3 rabbits closed their eyes for 10 s immediately after instillation of the commercial product, which is an indicator of feeling pain, while such the tendency was not observed for the HM-HPMC/ α -CyD formulation. The results indicate that the HM-HPMC/ α -CyD is a low viscous sol at room temperature, which makes its administration easy, while it quickly forms a gel at physiological temperature, leading the improvement of the ocular bioavailability of the drug.

3) Application of thermoresponsive HM-HPMC/CyD hydrogel in formulation of injection

The thermoresponsive hydrogel was prepared using 90 L HM-HPMC with a higher viscosity than that of 60 L HM-HPMC for the purpose of the sustained release of protein after a subcutaneous administration. The viscosity of 90 L HM-HPMC was controlled by CyD concentration. The yield stress of 90 L HM-HPMC hydrogel decreased with CyD concentrations, indicating the hydrogel became injectable. α - and β -CyD significantly lowered the yield stress from low concentrations. 90L HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) hydrogel was selected for the formulation of injection, because it showed low viscosity (~ 1 Pa·s) at 20 °C, whereas it increased near body temperature (4 Pa·s at 37°C). Dynamic rheology measurement confirmed that 90L HM-HPMC turned into sol state at low temperature, whereas it was gel state near body temperature. When the 90L HM-HPMC/ β -CyD hydrogel containing indocyanine green (ICG) was administered subcutaneously to the dorsal skin of mice, the fluorescence of ICG was observed for 24 hours after the administration. The result suggested that the 90L HM-HPMC/ β -CyD hydrogel functioned as a sustained release carrier of drugs after injection. When the 90L HM-HPMC/ β -CyD hydrogel containing human insulin was subcutaneously administered to rats, the high plasma insulin concentration was observed after 2 hours of the administration. The MRT increased 1.6 times and the

apparent k_{el} became half, compared with those of the insulin alone solution. In addition, the 90L HM-HPMC/ β -CyD hydrogel formulation showed a prolonged hypoglycemic effect. HM-HPMC quickly turned into a gel after the administration, thus slowed down the release of the drug from the gel, which contributed to the prolonged efficacy of the drug. The thermoresponsive 90L HM-HPMC/CyD hydrogel is useful for sustained release of proteins when it was used in formulations for injection.

A physiological temperature-dependent reversible sol-gel transition system was successfully constructed by simply adding CyDs to HM-HPMC. The system which takes advantage of the interaction of CyD with hydrophobically modified polymers represents a new potentially useful strategy for producing thermoresponsive hydrogels and will find numerous applications in the area of drug delivery system.

本論文で使⽤した略語一覧

AUC	area under the blood concentration-time curve	血中濃度曲線下時間面積
CyD	cyclodextrin	シクロデキストリン
C_{\max}	maximum drug concentration	最高血中薬物濃度
DCF	diclofenac	ジクロフェナク
DCFNa	diclofenac sodium	ジクロフェナクナトリウム
HPMC	hydroxypropylmethyl cellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
HM-HPMC	hydrophobically modified hydroxypropylmethyl cellulose	疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロース
ICG	indocyanine green	インドシアニングリーン
MRT	mean residence time	平均滞留時間
PBS	phosphate buffer solution	リン酸緩衝液
PEO	poly (ethylene oxide)	ポリエチレンオキシド
PNIPAAM	poly (<i>N</i> -isopropyl acrylamide) copolymer	ポリ <i>N</i> -イソプロピルアクリルアミド共重合体
PPO	poly (propylene oxide)	ポリプロピレンオキシド
STE	stearylamine hydrochloride	ステアリルアミン塩酸塩
T_{\max}	time to reach a maximum drug concentration	最高血中薬物濃度到達時間

本論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) Hydrophobically modified polymer/ α -cyclodextrin thermoresponsive hydrogels for use in ocular drug delivery

Molecular Pharmaceutics, **14**, 2740-2748 (2017)

[‡]Daisuke Iohara, [‡]Masanori Okubo, Makoto Anraku, Shunji Uramatsu, Toshio Shimamoto, Kaneto Uekama and Fumitoshi Hirayama

目 次

緒言	3
第 1 章 CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御と温度応答性ゾル - ゲル変換シ ステムの構築	8
第 1 節 序	8
第 2 節 CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御	9
第 3 節 HM-HPMC ヒドロゲルと CyD の相互作用	14
第 4 節 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換能の評価	19
第 5 節 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換機構	24
第 6 節 小括	26
第 2 章 薬物眼内移行性向上を企図した温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼 剤への応用	28
第 1 節 序	28
第 2 節 薬物封入 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルからの薬物放出性の評価	28
第 3 節 薬物封入 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼投与試験	31
第 4 節 薬物封入 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの眼粘膜刺激性	36
第 5 節 小括	38

第 3 章 タンパク質性薬物の持続放出を企図した温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲル の注射剤への応用	40
第 1 節 序	40
第 2 節 注射剤への応用を目的とした温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの調製 ..	40
第 3 節 HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルからのタンパク質性薬物の持続放出性の評価	49
第 4 節 小括	55
第 4 章 総括	57
実験の部	61
参考文献	67
謝辞	72

緒 言

ヒドロゲルは水溶性高分子鎖同士が架橋により 3 次元の網目構造を形成した分子集合体であり、架橋点の構造の違いより化学ゲル（共有結合で架橋）と物理ゲル（疎水性、静電的、ホスト - ゲスト相互作用などの分子間相互作用で架橋）に大別される。化学ゲルは共有結合で架橋しているため安定なゲルであり、コンタクトレンズなどに応用されている。物理ゲルは架橋構造を分子設計することで温度、pH、光、グルコース、抗体などの外部刺激に応答して粘度変化することから、医薬分野では薬物担体としての応用が検討されている (Fig. 1)¹⁾。例えば、Kim らは、温度応答性ポリマーである Pluronic を用いて、温度変化によるゲルの膨潤と収縮を利用したタンパク質性薬物（ヒト成長ホルモン）の持続放出システムについて報告した²⁾。また、Chung らは、pH 応答性ポリマーである Poly (hydroxyethyl methacrylate-co-acrylic acid) にインドメタシンを封入し、体内での pH 変化によるゲルの膨潤を利用して、腸管へ薬物を効率的に送達可能なことを報告した³⁾。

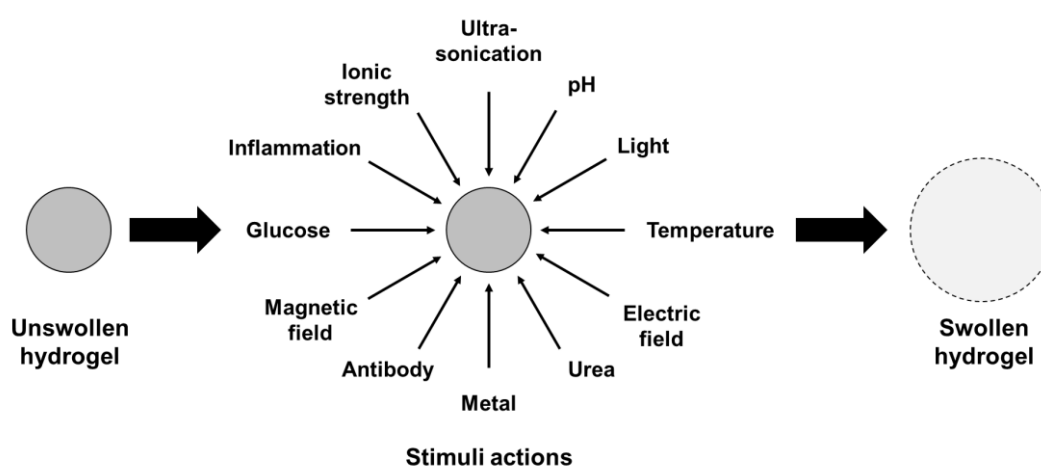


Fig. 1. Enabled external stimuli for swelling of hydrogels¹⁾.

これまでに様々な刺激応答性ゲルが開発されているが、医薬品製剤への応用に際し、体温による温度上昇はあらゆる投与部位で生じることから、最も汎用性の高い外部刺激である。しかし、実際に刺激応答性ゲルが使用された医薬品は、温度応答性ゲルを基剤に用いた緑内障治療点眼剤 リズモン TG[®] および抗菌薬であるオフロキサシンゲル点眼剤「わかもと」[®] に限定される。これら医薬品の温度応答性は、メチルセルロースの曇点現象を利用しており、分子量の異なるメチルセルロースを組み合わせ、さらにクエン酸ナトリウムを加えて pH を調節し、ゲル化温度を 32 ~ 34℃ に調整している⁴⁾。一般的な温度応答性ゲルとして、poly (ethylene oxide) (PEO) と poly (propylene oxide) (PPO) の共重合体 (PEO-PPO-PEO; Poloxamers) や poly (*N*-isopropyl acrylamide) 共重合体 (PNIPAAM) が知られている⁵⁾。しかし、PNIPAAM は、他モノマーと共重合化もしくは塩や界面活性剤を添加してゲル化温度を調整する必要があり^{5,6)}、Poloxamers は、ゲルを形成するのに 20 wt% 以上の添加量が必要となる⁵⁻⁸⁾。そのため、温度応答性ゲルの製剤への応用をさらに拡大するためには、調製が容易かつ少量でゲルを形成する新規温度応答性ゾル - ゲル変換システムの開発が望まれる。

疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロース (hydrophobically modified hydroxypropyl methylcellulose: HM-HPMC) は、HPMC のヒドロキシプロピル基にステアリル基 (C18) を導入した新しいセルロース誘導体である^{9, 10)}。Fig. 2 に示すように、HM-HPMC は水中でステアリル基間の疎水性相互作用を介して擬架橋構造を形成するため、低濃度 (~1%) で高い粘性を示す¹¹⁾。2009 年に米国の Drug Master Files に登録され、本邦においても 2012 年に医薬品添加物規格に収載されており、ゲル化剤・増粘剤として化粧品や医薬品外用剤に使用されている (商品名: サンジェロース[®])。医薬品分野では形態保持に優れた院内製剤として、乳癌の癌性皮膚潰瘍部悪臭軽減に対するゲル基剤としての有用性が報告されている¹²⁾。その他、手指消毒剤に代表される衛生関連製品や虫さされ時のかゆみ低減を目的としたゲル

製剤やクリーム製剤の基剤として実用化されている。

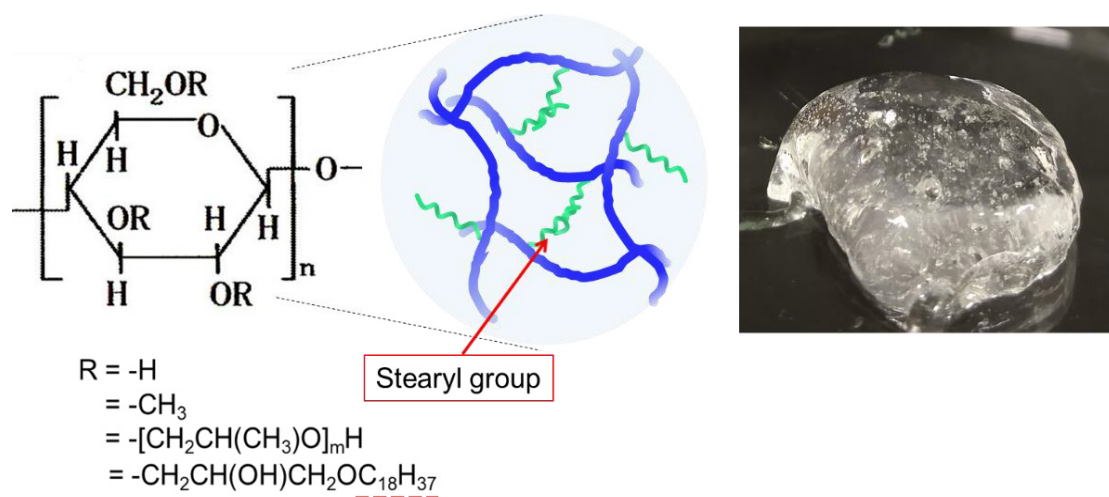


Fig. 2. Chemical structure ²⁾ and photograph of HM-HPMC hydrogel.

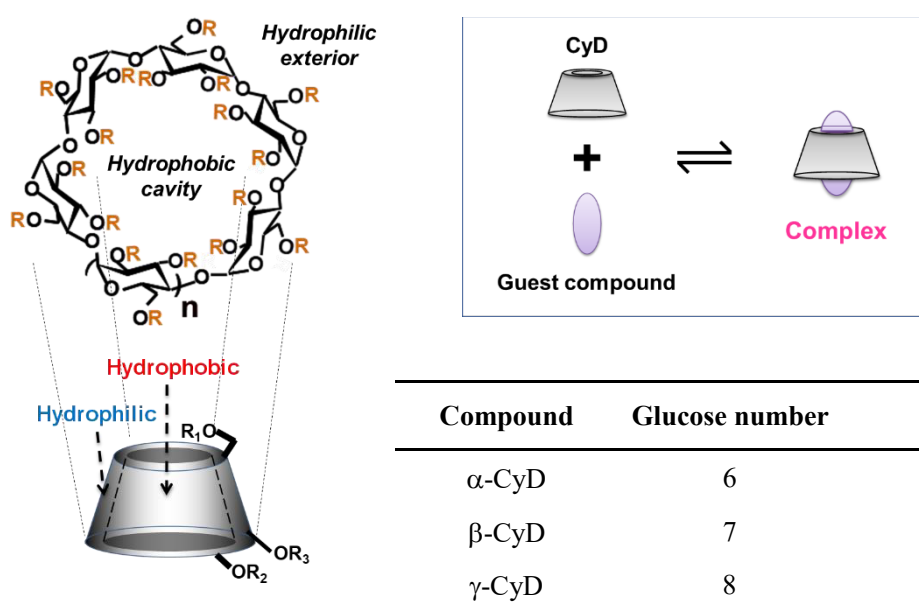


Fig. 3. Chemical structures of cyclodextrins (CyDs) used in this study.

環状マルトオリゴ糖であるシクロデキストリン (CyD) は、分子内に疎水性の空洞を有し、空洞径に応じて種々のゲスト分子を取り込んで包接複合体を形成し¹³⁻¹⁷、ゲスト分子の物理化学的性質を変化させることが知られており (Fig. 3)、医薬分野では薬物の安定化、溶解性の制御、油状物質の粉体化などに応用されている¹³⁻¹⁵。近年、CyD の包接特性を利用して、疎水化高分子溶液の粘度を制御する例が報告されている¹⁸⁻²⁰。Tomatsu らは、ドデシル基 (C12) 修飾ポリアクリル酸ヒドロゲルに α -CyD 溶液を添加することで、ゲル状態からゾル状態へ変化し、さらに糖修飾化 α -CyD を添加するとゾル状態からゲル状態へ戻る粘性制御システムを報告している¹⁸。Galant らは、オクチル基 (C8) 修飾アルギン酸に β -CyD 溶液を添加することで、粘度が減少することを報告している²⁰。これらの報告は CyD が高分子の疎水部を包接することで、高分子同士の会合が抑制され、溶液の粘度が低下する現象を利用している。さらに最近では、一方の高分子の側鎖上に共有結合を介して CyD を導入し、他方の高分子側鎖上には CyD 空洞にフィットする分子を導入し、高分子側鎖間のホスト - ゲスト分子間相互作用を増大した超分子ゲルの研究が行われている²¹。側鎖に機能性置換基を導入した高分子と、側鎖に CyD を導入した高分子との相互作用を利用して調製された超分子ゲルは pH^{22,23}、光^{24,25}、温度²⁶、酸化/還元剤^{27,28} などに対して刺激応答性を示す。例えば Choi らは、pH 応答性の poly (ϵ -lysine) β -CyD 結合体と 3-(trimethylsilyl) propionic acid を用いて pH および温度応答性の超分子ヒドロゲルを報告している²²。Zhao らは、デオキシコール酸修飾 β -CyD 誘導体とアゾベンゼン分岐鎖ポリアクリル酸共重合体を用いて、可視光照射でゲル化し、UV 照射でゾル化する光応答性超分子ゲルを報告している²⁴。このように、機能性高分子と CyD との相互作用を利用した様々な刺激応答性ゲルが報告されているが、製剤への応用を目的として調製されたヒドロゲルは少なく、実際に薬物を封入し、その有用性を評価した研究はほとんど行われていない。

このような背景のもと、本研究では少量で高粘性を示す HM-HPMC に注目し、CyD と HM-HPMC との相互作用に基づいた新規温度応答性ゾル - ゲル変換システムを構築し、各種製剤への応用を検討した。第 1 章では、CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御と温度応答性ゾル - ゲル変換能の評価および変換機構の詳細を明らかにした。第 2 章では、薬物の眼内移行性向上を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼剤への応用を企図した。第 3 章では、生体投与後のタンパク質性薬物の持続放出を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを注射剤へ応用した。

以下に本研究で得られた知見を詳述する。

第 1 章 CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御と温度応答性ゾル - ゲル変換

システムの構築

第 1 節 序

HM-HPMC は、疎水性基であるステアシル基間の疎水性相互作用を介した擬架橋構造を形成することで HM-HPMC 同士の絡み合いが増大し、高粘性のゲルとなる¹¹⁾。この HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加すると、CyD が HM-HPMC のステアシル基を包接することで、ステアシル基間の擬架橋構造が崩れ、溶液の粘度が低下することが予想される。CyD による包接現象は一般的にはエンタルピー駆動型であるため、温度の影響を受けやすく、低温では CyD によるゲスト分子の包接が生じるが、高温になると CyD がゲスト分子から解離しやすくなる²⁹⁻³²⁾。このような CyD の包接特性を HM-HPMC に適用すると、Fig. 4 に示すように、低温では粘度の低い状態（包接状態）であり、加温すると CyD が解離してステアシル基間の疎水性相互作用が回復し、粘度が増大する、温度応答性のゲル基剤を調製可能なことが期待される。そこで本章ではまず、HM-HPMC (サンジェローズ® 60L、M.W. 400,000、ステアシル基置換度 0.4 ~ 0.6 wt%) を用いて、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度に及ぼす CyD の影響を検討した。次に、CyD と HM-HPMC との相互作用を ¹H-NMR スペクトル法や溶解度法により検討し、さらに、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換能ならびにその変換機構の詳細を明らかにした。

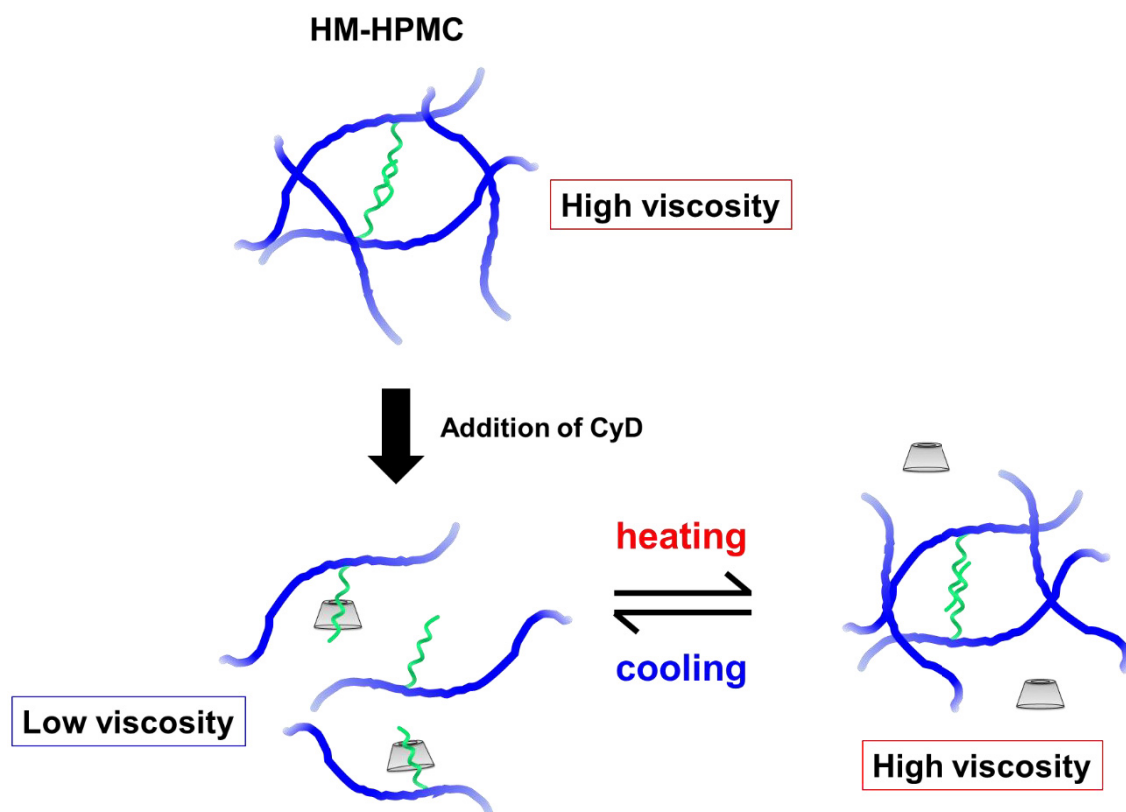


Fig. 4. Image of thermoresponsive sol-gel transition of HM-HPMC/CyD hydrogel.

第 2 節 CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御

本節では、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度に及ぼす各種 CyDs の影響について、レオメーターを用いて検討した。Fig. 5 は、せん断速度を変えながら粘度測定を行った結果を示す。0.5 w/v% HM-HPMC ヒドロゲルは、せん断速度 0.1 s^{-1} において、約 $34 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ と高い粘度を示し、その後、せん断速度の増大とともに次第に粘度が低下する擬塑性流動のパターンを示

した。一方、CyDs を添加した系では CyDs 間で差はあるものの、全てのせん断速度 ($0.1 \sim 100 \text{ s}^{-1}$) において粘度が減少した。特に α -CyD 添加系では、 0.01 w/v\% という低濃度で HM-HPMC ヒドロゲルの粘度が約 $7 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ まで減少した。Fig. 6 は、HM-HPMC ヒドロゲルのゼロせん断粘度に及ぼす各種 CyDs 濃度の影響について検討した結果を示す。ゼロせん断粘度は、せん断速度が非常に小さい領域で粘度が一定となるニュートン領域の粘度である。 0.5 w/v\% HM-HPMC ヒドロゲルのゼロせん断粘度は約 $40 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ であった。一方、各種 CyDs を添加すると、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は CyD 濃度依存的に低下した。特に α -CyD 添加により、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は顕著に低下し、 α -CyD を 0.06 w/v\% 添加すると溶液の粘度が約 10 分の 1 まで低下した。 γ -CyD の場合は、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度への影響は小さく、 0.15 w/v\% 添加しても高い粘度 (約 $10 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) を示した。これは空洞径の最も小さな α -CyD が HM-HPMC のステアリル基と最もフィットするためと推定された (HM-HPMC ヒドロゲルと CyD の相互作用については第 3 節で詳述する。)

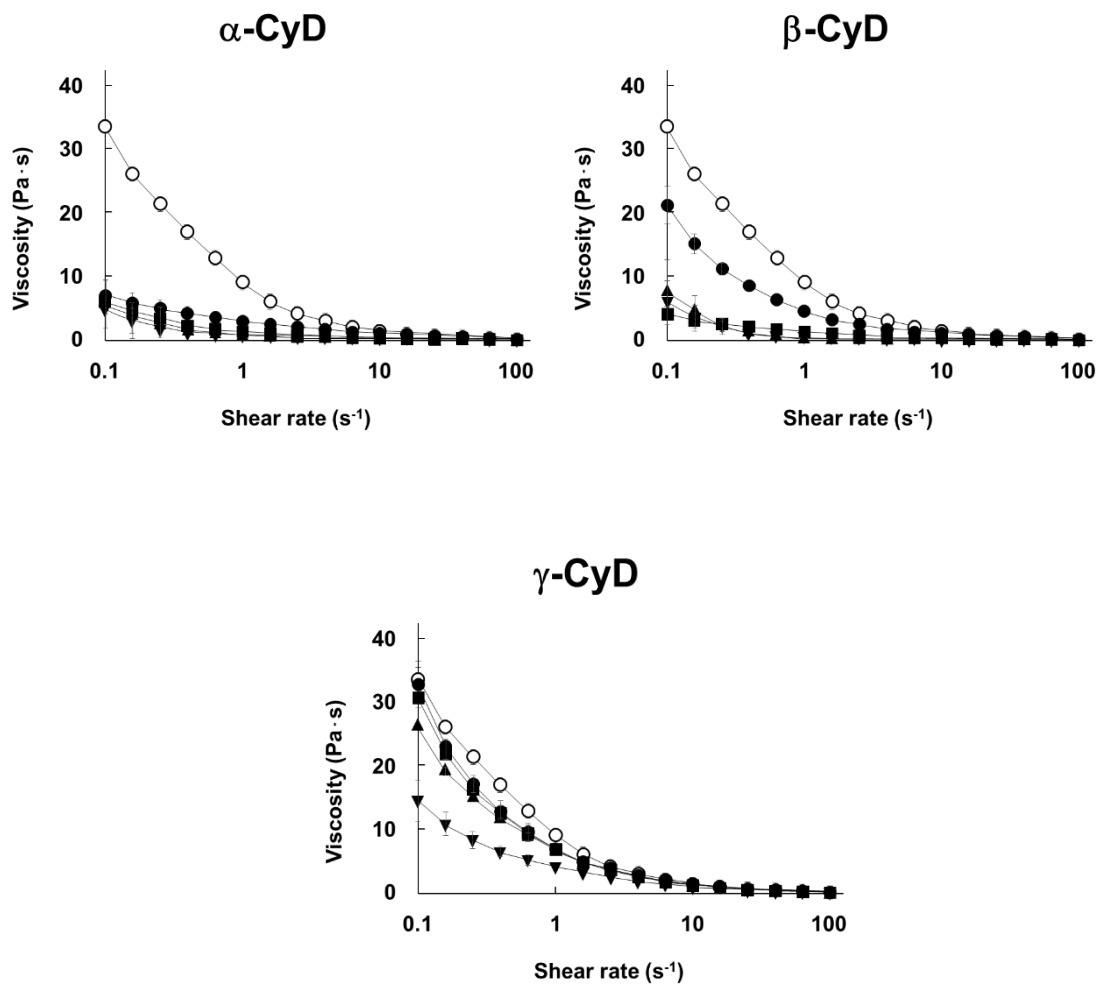


Fig. 5. Effect of CyDs on the viscosity of HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%). The viscosity was plotted as a function of shear rate.

○: HM-HPMC alone, ●: with 0.01 w/v% CyD, ■: with 0.04 w/v% CyD, ▲: with 0.1 w/v% CyD, ▼: with 0.2 w/v% CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

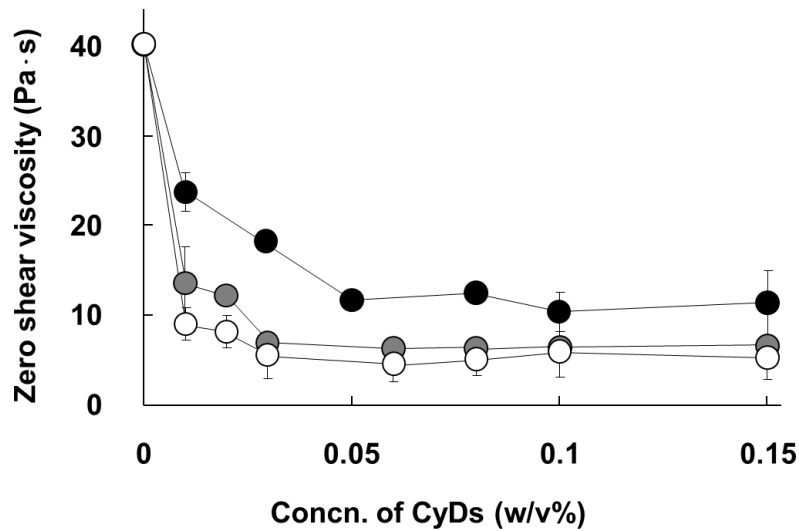


Fig. 6. Effect of CyDs on the viscosity of HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%). The zero shear viscosity was plotted as a function of CyD concentrations.

○: α-CyD, ●: β-CyD, ●: γ-CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

次に CyD 添加および非添加時の HM-HPMC ヒドロゲルの動的粘弾性測定を行った。

Fig. 7 は角周波数 (ω) に対して貯蔵弾性率 (G') および損失弾性率 (G'') をプロットした結果を示す。貯蔵弾性率 (G') はサンプルに歪みを加えた際の弾性応答成分を、損失弾性率 (G'') は粘性応答成分を示し、ゲル状態かゾル状態かを判断することができる。ここでは、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度を十分に低下させた 0.04 w/v% α-CyD 添加系を用いて検討した。0.5 w/v% HM-HPMC ヒドロゲルは、測定した角周波数範囲において G' が G'' を上回る、ゲルに特徴的なパターンを示した^{33,34)}。対照的に α-CyD 添加系では角周波数の増大とともに G'' が G' を上回る、ゾル状態に特徴的なパターンを示した。これらの結果は、CyD

添加により HM-HPMC ヒドロゲルがゲル状態からゾル状態に変化したことを示し、外観上でも HM-HPMC ヒドロゲルが流動性のゾル状態に変化したことが確認された (Fig. 7 挿入写真)。以上の結果より、HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加することでゲルの粘度が低下し、特に空洞径の小さな α -CyD が HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御に有用なことが明らかとなった。

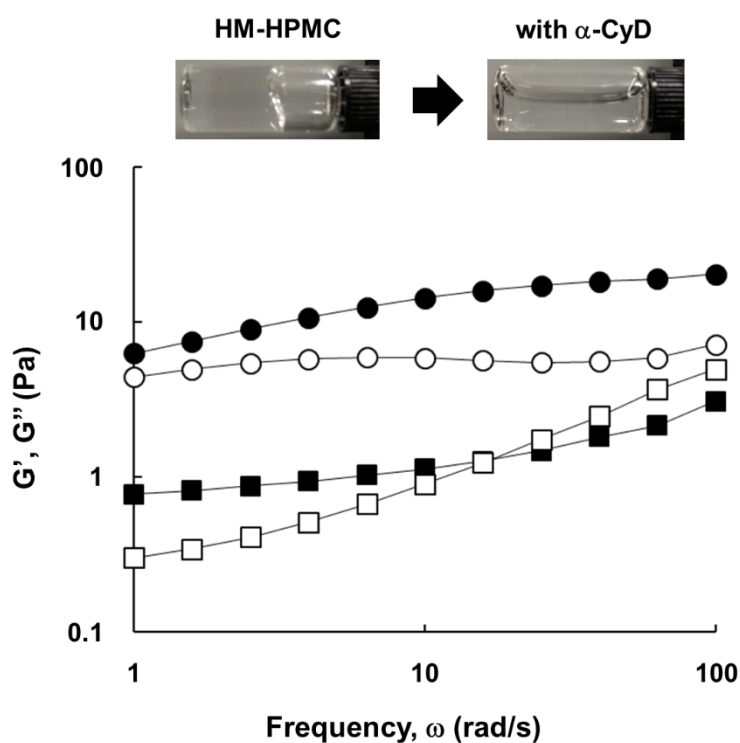


Fig. 7. Dynamic rheology of HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%) in the presence and absence of α -CyD (0.04 w/v%) at 25°C.

●: G' (HM-HPMC alone), ○: G'' (HM-HPMC alone), ■: G' (with α -CyD), □: G'' (with α -CyD).

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 3 節 HM-HPMC ヒドロゲルと CyD の相互作用

本節では、CyD 添加による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御機構に関する知見を得るために、HM-HPMC ヒドロゲルと各種 CyDs の相互作用を ^1H -NMR スペクトル法により検討した。Fig. 8 は各種 CyD 存在下あるいは非存在下で HM-HPMC ヒドロゲルの ^1H -NMR 測定結果を示す。HM-HPMC ヒドロゲル単独では 0.5 ～ 2 ppm 領域において、ヒドロキシプロピル基のメチル基部分 (1.1 ppm) に由来するピーク (Fig. 8 a のピーク) が観察された。一方、0.2 w/v% α -CyD および β -CyD 存在下では、メチル基部分のピークに加え、約 1.3 ppm 付近に小さなピーク (Fig. 8 b のピーク) が観察された。HM-HPMC ヒドロゲル単独では、ステアシル基同士は水中で会合しているため、その分子運動性は著しく制限されている。このゲルに CyD を添加すると、ステアシル基を優位に包接し、分子運動性が回復するため、NMR スペクトル上にステアシル基に由来する小さなピークが出現したものと推察された。一方、 γ -CyD の場合、本実験条件下において、そのようなピーク変化は観察されず、空洞径の大きな γ -CyD はステアシル基との相互作用が弱いことが示唆された。Fig. 9 は、ステアシル基を持たない HPMC に CyD を添加した際の ^1H -NMR スペクトルを示す。各種 CyDs 存在下においても、ヒドロキシプロピル基のメチル基部分 (1.1 ppm) に由来するピークのみが観察され、HM-HPMC ヒドロゲル単独で見られたようなピーク変化は生じなかった。また、0.5 w/v% HPMC ヒドロゲルに CyD を添加した際の粘度を測定すると (Fig. 9 右図)、0.1 w/v% CyD を添加しても HPMC ヒドロゲルの粘度は低下せず、約 0.3 Pa \cdot s であった。以上の結果より、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度制御には CyD によるステアシル基の包接が関与していることが強く示唆された。

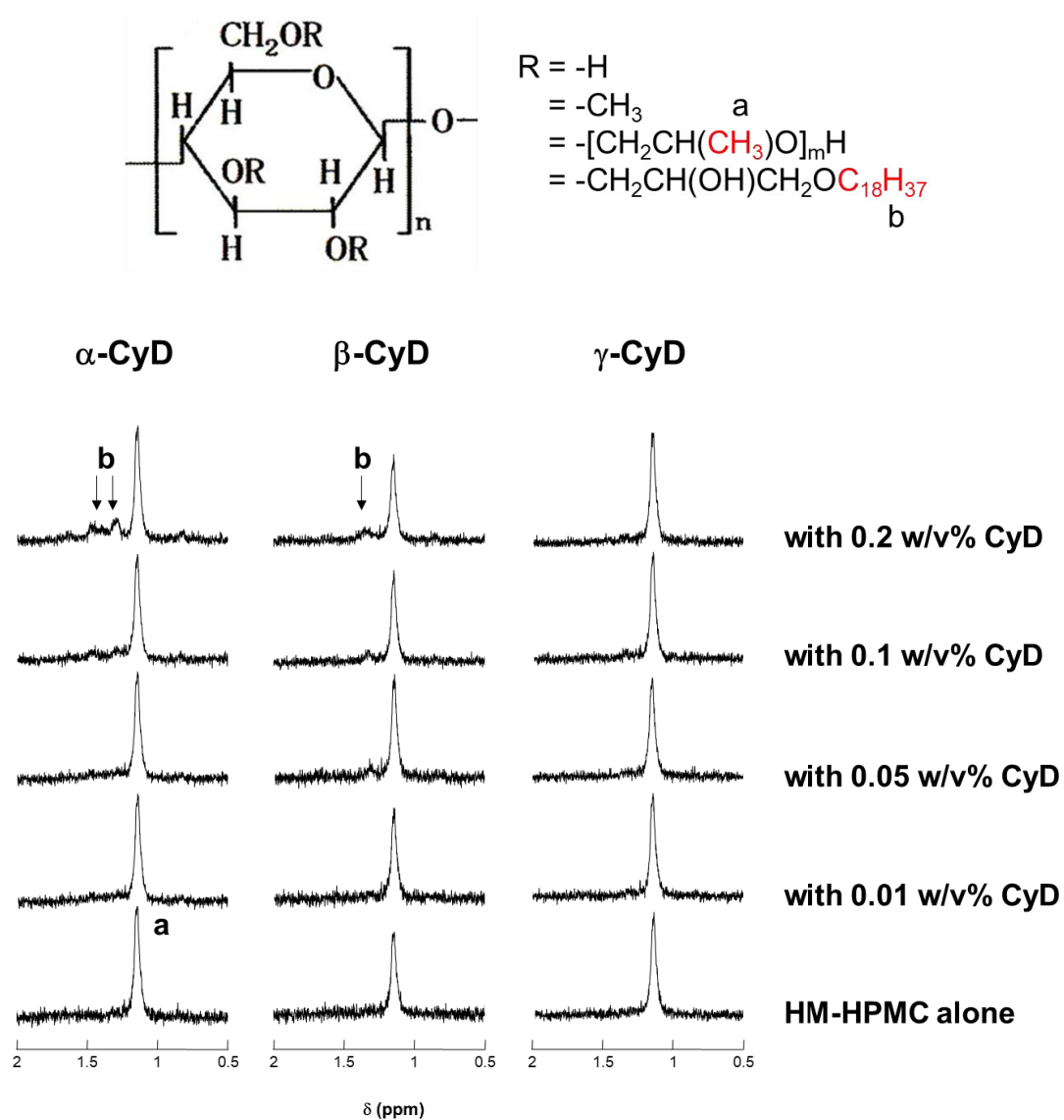


Fig. 8. ^1H -NMR spectra of HM-HPMC hydrogel (0.05% w/v) without or with CyDs (0.01-0.2% w/v) at 25°C.

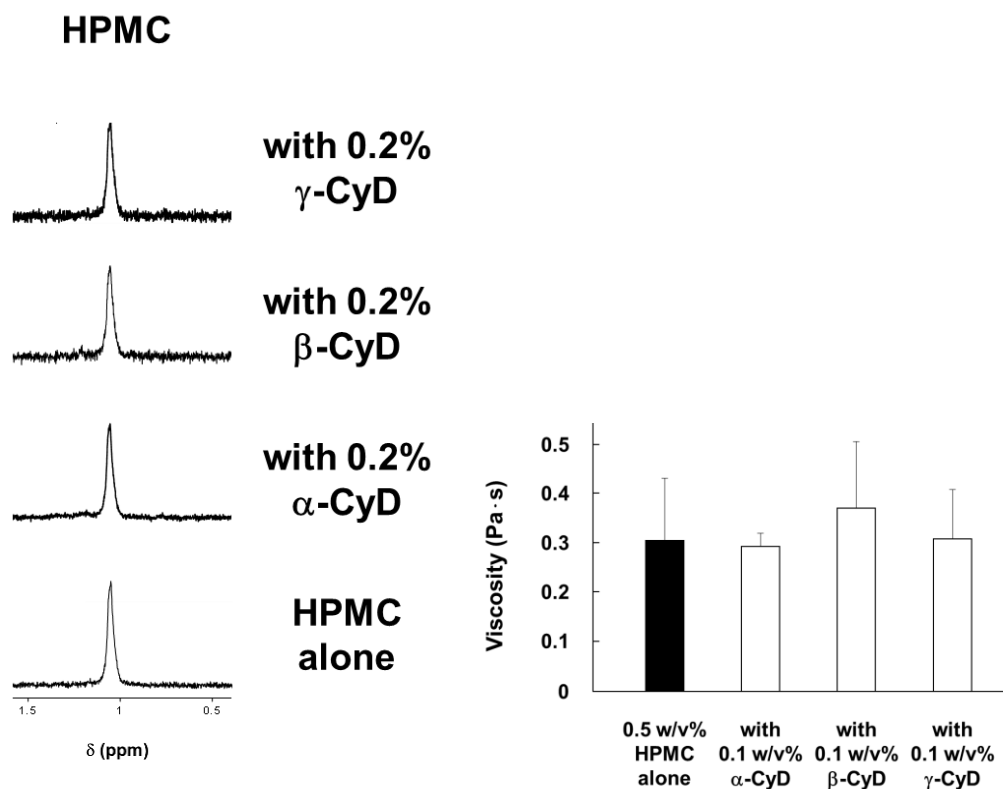


Fig. 9. ^1H -NMR spectra of HPMC hydrogel in the presence and absence of CyDs at 25°C (left). Concentration of HPMC hydrogel was set for 0.05 w/v% for ^1H -NMR measurements. Viscosity of HPMC hydrogel in the presence and absence of CyDs at 25°C (right). The viscosity was measured at a shear rate of 1.0 s^{-1} .

Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

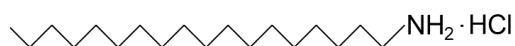
^1H -NMR スペクトル測定より、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度制御には CyD によるステアリル基の包接が関与することが示唆された。そこで次に、ステアリル基と各種 CyDs の相互作用の強さを溶解度法を用いて検討した。なお、HM-HPMC ヒドロゲルは粘性が高く、HM-HPMC 中のステアリル基と CyDs との相互作用の強さを直接測定することは困難であった。そのため、ここでは HM-HPMC の代わりにステアリン酸誘導体であるステアリルアミン塩酸塩 (stearylamine hydrochloride: STE) を用いて検討した。Fig. 10 は 20°C 、 30°C および 40°C

の条件下における STE に対する各種 CyDs の溶解度相図を示す。20°C において、 γ -CyD 系は CyD 添加濃度の増加に伴い、STE の溶解度が直線的に増大する A_L 型の溶解度相図を示した。一方、 α -CyD と β -CyD は CyD 濃度の上昇とともに、STE 濃度が直線から外れて上向きに上昇する A_p 型の溶解度相図を示し、高濃度 CyD 存在下において、高次複合体を形成することが示唆された。一方、30°C および 40°C 条件下では、すべての CyDs が A_L 型の溶解度相図を示した。溶解度相図の初期直線の傾きと切片の値から、式 (1) を用いて STE と CyDs が 1:1 複合体を形成すると仮定した場合の安定度定数 (K_c) を算出した (Table 1)。その結果、空洞径の小さな α -CyD が最も高い K_c 値を示し ($7.94 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 20°C)、次に β -CyD ($6.14 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 20°C)、 γ -CyD ($2.27 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 20°C) の順であった。これは、 α -CyD はステアリル基のような分子サイズが小さい直鎖状の分子を優位に包接することを示し、一方、空洞サイズの大きな γ -CyD はステロイドのような嵩高い分子を優位に包接するため、ステアリル基との相互作用は α -CyD に比べて小さいことを示す。また、温度を 20°C、30°C、40°C と変化させるとすべての CyDs において K_c 値は減少した。この K_c 値を温度に対してプロットし (Fig. 10)、熱力学パラメーターを van't Hoff 式 (2) より算出した。各 CyDs のエンタルピー (ΔH) およびエントロピー (ΔS) を比較すると、 ΔH の寄与が大きいことから (α -CyD の場合、 $\Delta H = -141 \text{ kJ/mol}$ 、 $\Delta S = -0.39 \text{ kJ/mol}\cdot\text{K}$)、ステアリル基と CyD の相互作用は ΔH 駆動型であることが示唆された。これらの結果から、ステアリル基と CyD の相互作用は温度依存性を示し、 α -CyD がステアリル基と最も強く相互作用することが明らかとなった。

$$K = \text{slope/intercept (1-slope)} \cdots \cdots (1)$$

van't Hoff 式

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \cdots \cdots \cdots (2)$$



Chemical structure of STE

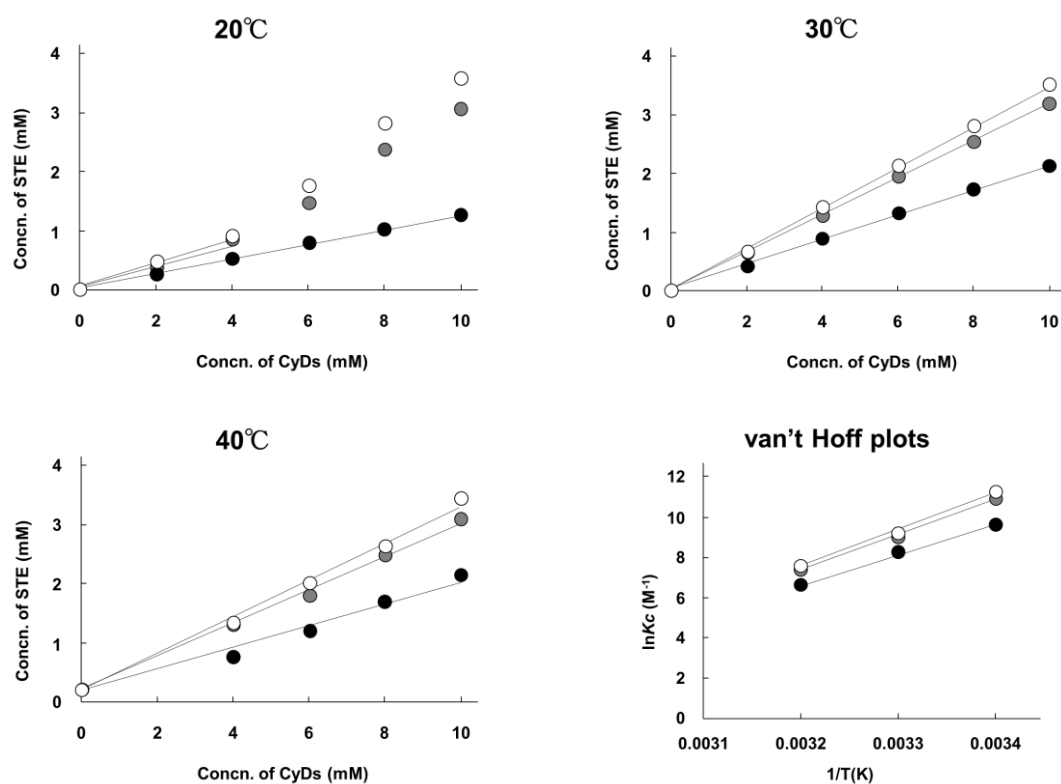


Fig. 10. Phase solubility diagrams of STE/CyD systems at 20°C, 30°C and 40°C, and van't Hoff plots for the K_c values.

○: α -CyD, ●: β -CyD, ●: γ -CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

Table 1. Apparent 1:1 stability constants (K_c) in water at different temperatures and thermodynamic parameters for STE/CyD complex formation^a

Complex	$K_c \times 10^4 (\text{M}^{-1})$			$\Delta H (\text{kJ/mol})$	$\Delta S (\text{kJ/mol}\cdot\text{K})$
	20°C	30°C	40°C		
α -CyD	7.94 ± 0.09	1.01 ± 0.01	0.20 ± 0.00	-141	-0.39
β -CyD	6.14 ± 0.07	0.88 ± 0.01	0.17 ± 0.00	-136	-0.37
γ -CyD	2.27 ± 0.02	0.52 ± 0.00	0.10 ± 0.00	-120	-0.32

^a Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 4 節 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換能の評価

ステアシル基と CyD の相互作用は温度依存性を示したので、本節では、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性を評価した。Fig. 11 は各種 CyDs 存在下および非存在下での HM-HPMC ヒドロゲルの粘度の温度分散測定の結果を示す。通常、疎水性高分子溶液を加温すると、温度上昇とともに分子の運動性が高まり、疎水基同士の会合が抑制され、溶液の粘度は低下する。0.5 w/v% HM-HPMC ヒドロゲルも、20°C では高粘度状態 (約 8 Pa·s) であるが、温度の上昇に伴い次第に低下した。一方、HM-HPMC ヒドロゲルに α -CyD を添加すると、20°C では粘度が低く ($\sim 2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$)、温度の上昇に伴い次第に増加し、HM-HPMC ヒドロゲルと同じ粘度まで上昇後、低下した。すなわち、ピークトップを示した後、粘度が低下するパターンを示した。先述したように、CyD とステアシル基の相互作用は ΔH 駆動型であるため、温度上昇とともに相互作用が低下する。その結果、ステアシル基の包接が外れ、ステアシル基同士の擬架橋構造が再形成され、粘度が上昇したものと推察される。すなわち、このピークトッ

プは HM-HPMC から CyD が解離した状態を示す。ピークトップの値は、CyD 濃度依存的に高温側へシフトし、0.01 w/v% α -CyD 添加で 33°C、0.04 w/v% で 43°C、0.1 w/v% で 46°C、0.2 w/v% で 49°C であった。 β -CyD 添加時も温度上昇とともに粘度が増加しピークトップを示したが、その値は α -CyD よりも低く、0.01 w/v% β -CyD 添加で 27°C、0.04 w/v% で 35°C、0.1 w/v% で 42°C、0.2 w/v% で 47°C であった。 γ -CyD では 0.2 w/v% 添加時のみ、明確なピークトップがみられた。これはステアシル基との K_c 値が小さい β -CyD および γ -CyD は、加温時に α -CyD よりも包接が外れやすいことを示しており、CyDs 間の相互作用の強さの違いを反映して粘度ピークに差が生じたものと推察された。

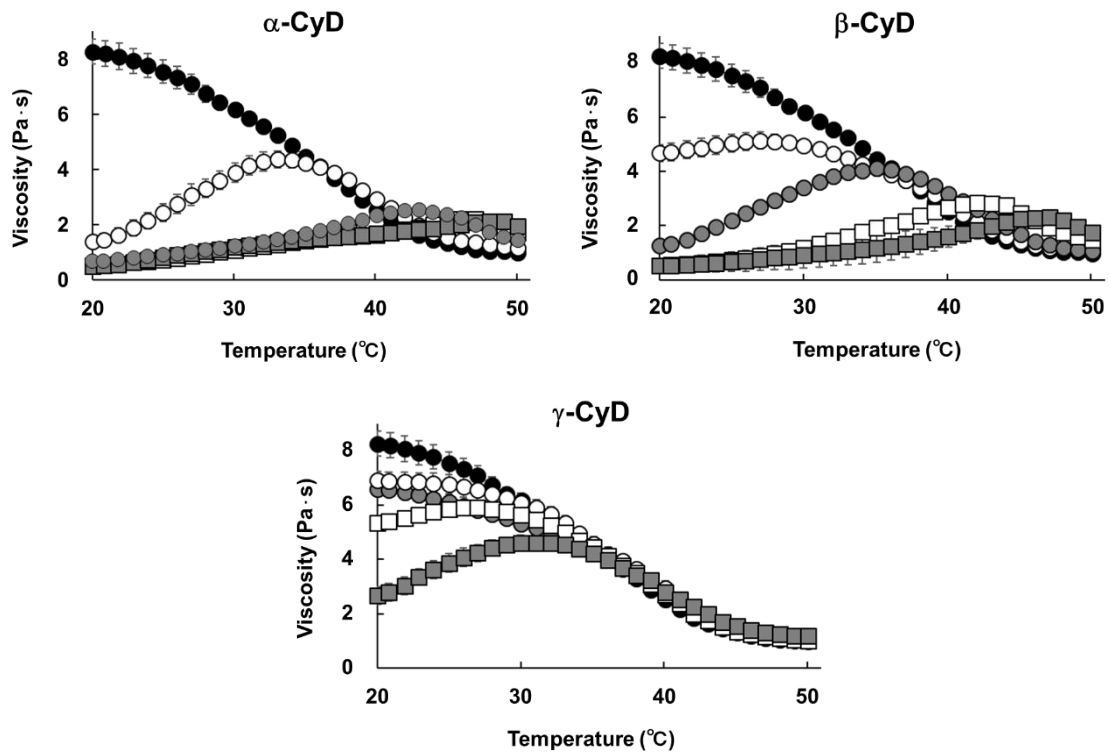


Fig. 11. Temperature-dependent viscosity changes of HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%) with or without CyDs, measured at a shear rate of 1.0 s^{-1} .

●: HM-HPMC alone, ○: with 0.01% w/v CyD, ●: with 0.04% w/v CyD, □: with 0.1% w/v CyD, ■: with 0.2% w/v CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

次に、20℃、30℃ および 40℃ 条件下での CyD 添加および非添加時の HM-HPMC ヒドロゲルの動的粘弾性測定を行った。ここでは、0.04 w/v% α -CyD 添加系を用いて検討を行った。Fig. 12 は角周波数 (ω) に対して、 G'' を G' で除した値である損失正接 ($\tan \delta$) をプロットした結果を示す。HM-HPMC ヒドロゲルは、測定した角周波数範囲において、20℃、30℃ および 40℃ で $\tan \delta < 1$ であり、ゲル状態であることが示された。一方、 α -CyD 添加時では、 $\omega > 10 \text{ rad/s}$ の範囲において、20℃ では $\tan \delta > 1$ であり、30℃、40℃ と温度が上昇すると、測定した角周波数範囲において $\tan \delta < 1$ となった。これは、20℃ ではゾル状態、30℃ 以上ではゲル状態であることを示し、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルは、低温ではゾル状態、高温ではゲル状態に変化することが動的粘弾性測定の結果からも支持された。

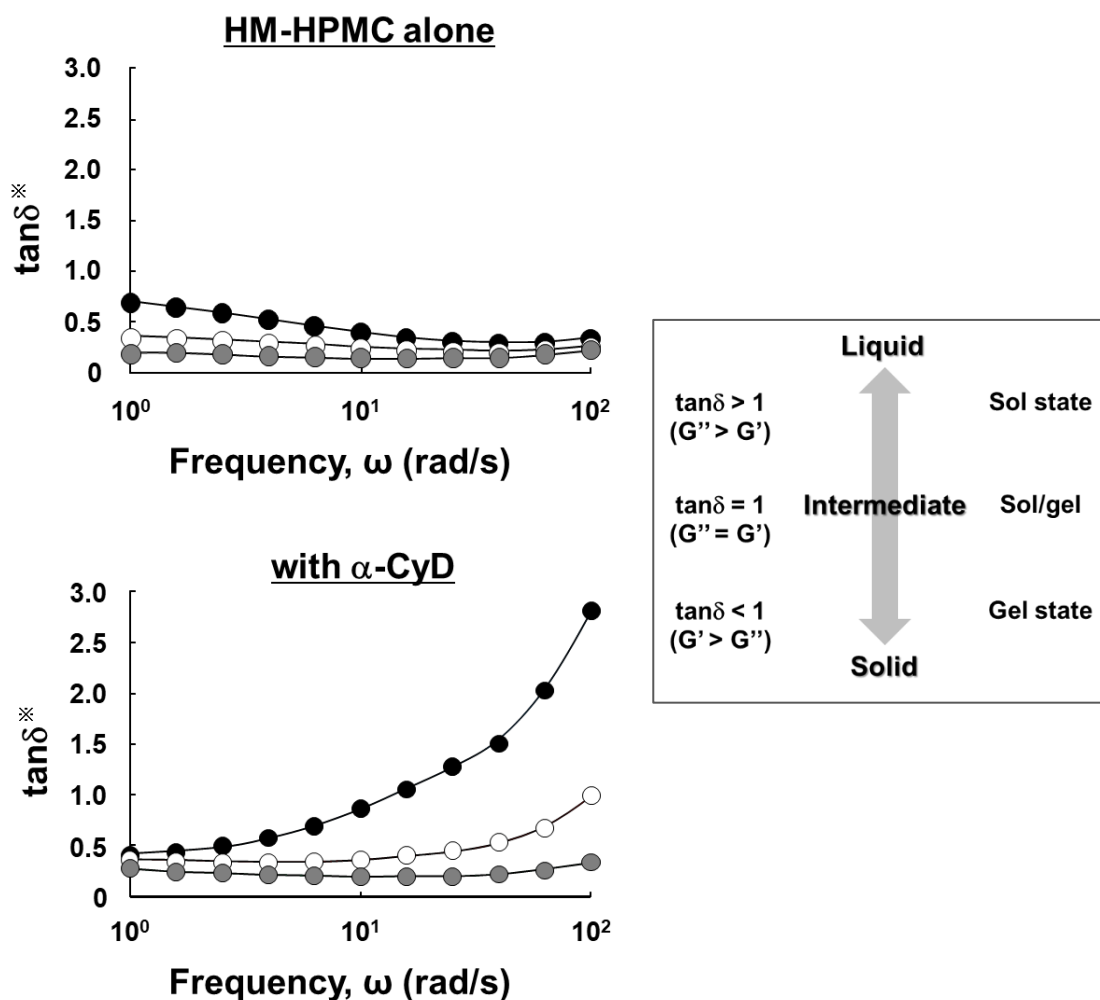


Fig. 12. Loss tangents ($\tan \delta$) of HM-HPMC (0.5 w/v%) and HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) hydrogel at 20, 30 and 40°C.

●: 20°C, ●: 30°C, ○: 40°C.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

* $\tan \delta$ (loss tangent) = G'' (loss modulus) / G' (storage modulus)

CyD の包接現象は可逆的であるため、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換の可逆性について評価した。20°C と 35°C で温度変化を繰り返した場合の HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの粘度変化の結果を Fig. 13 に示す。0.5 w/v% HM-HPMC ヒドロゲル

ルは、20℃では約 8 Pa・s と高い粘度を示したが、35℃に加温すると、約 4 Pa・s と低い粘度を示した。一方、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルは、20℃ では約 2 Pa・s と低い粘度を示し、35℃ に加温すると、約 4 Pa・s に粘度が上昇した。つまり、CyD 添加時および非添加時で全く逆の温度応答性の粘度変化を示した。また、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの加温と冷却を繰り返しても、それぞれの温度においてほぼ同じ粘度を示した。このことから、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変化は可逆性を有することが明らかとなった。

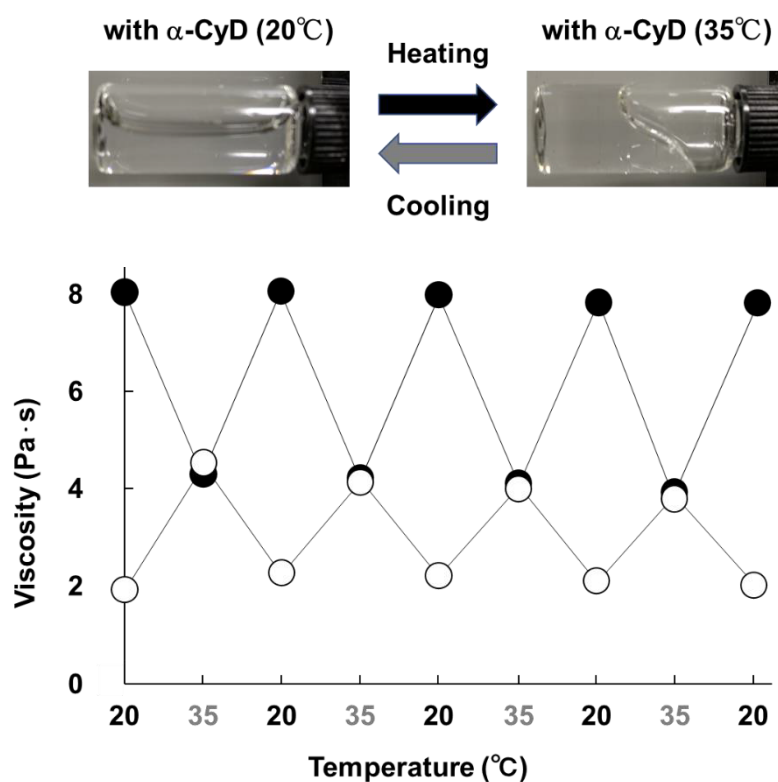


Fig. 13. Reversed viscosity change of HM-HPMC hydrogel and HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.01 w/v%) hydrogel upon heating and cooling cycles measured at a shear rate of 1.0 s⁻¹.

●: HM-HPMC alone, ○: with α -CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 5 節 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換機構

これまでに得られた結果に基づいて、CyD 存在下における HM-HPMC ヒドロゲルの粘度変化の詳細を Fig. 14 にまとめる。HM-HPMC ヒドロゲルは低濃度でも粘度が高いゲル状態である。この HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加すると、CyD が HM-HPMC のステアシル基を包接することで、ステアシル基間の擬架橋構造が崩れ、粘度が著しく低下したゾル状態へ変化する。各温度下における安定度定数の結果より、CyD とステアシル基の相互作用は ΔH 駆動型であるため、加温すると包接が外れやすくなり、ステアシル基間の擬架橋構造が再び回復し、粘度の高いゲル状態へ変化する。このゾル - ゲル変換現象は HM-HPMC のステアシル基と CyD の相互作用に基づくため、添加した CyD 濃度が上昇すると、包接に關与する CyD 量が増えるため、ゾルからゲルへ変換する温度が高温側へシフトする。また、 α -CyD と比較して、ステアシル基との相互作用が弱い β -CyD および γ -CyD 添加時は、包接が外れやすいため、加温時のゾルからゲルへの変換が低温で生じる。これらの結果は、CyD の種類・濃度を適切に設定することで、様々な温度でのゾル - ゲル変化能を有する温度応答性ヒドロゲルを調製可能なことを示唆する。さらに、CyD による包接現象は可逆的であるため、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換は可逆性を示した。以上の結果より、HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加することで、ホスト - ゲスト相互作用に基づいた温度応答性のゾル - ゲル変換システムを構築可能なことが明らかとなった。

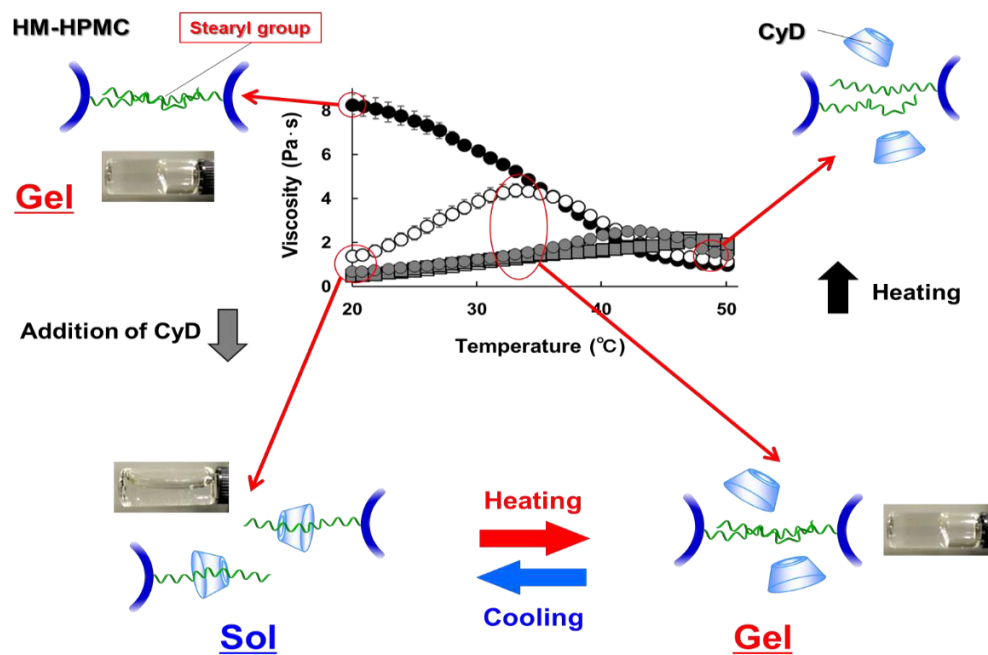


Fig. 14. Thermoresponsive reversible sol-gel transition of HM-HPMC/CyD hydrogel.

第 6 節 小括

本章では、CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御と温度応答性ゾル - ゲル変換能の評価および変換機構の詳細について検討した。まず、CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御について検討した。次に CyD と HM-HPMC ヒドロゲルの相互作用について検討を行った。さらに、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの温度応答性について評価した。以下に、得られた知見を要約する。

- 1) 各種 CyDs 添加による HM-HPMC ヒドロゲルの粘度に及ぼす影響について検討した結果、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は CyD 濃度依存的に低下した。特に空洞径の小さな α -CyD 添加により、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は顕著に低下したことから (0.06 w/v% 添加時、約 10 分の 1 まで低下)、HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御には α -CyD が有用であることが示唆された。
- 2) HM-HPMC ヒドロゲルの動的粘弾性に及ぼす α -CyD 添加の影響について検討した結果、HM-HPMC ヒドロゲル単独はゲル状態 ($G' > G''$) であるのに対し、 α -CyD を添加すると流動性のあるゾル状態 ($G'' > G'$) に変化した。
- 3) HM-HPMC ヒドロゲルと各種 CyDs の相互作用を $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで検討した結果、0.2 w/v% α -CyD および β -CyD 存在下では、ヒドロキシプロピル基のメチル基部分 (1.1 ppm) のピークに加え、約 1.3 ppm 付近にステアリル基に由来する小さなピークが観察され、ステアリル基と CyD の相互作用が示唆された。

- 4) 20°C、30°C および 40°C の条件下における STE と各種 CyDs の相互作用の強さを溶解度法を用いて検討した結果、空洞径の小さな α -CyD が最も高い K_c 値を示し ($7.94 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 20°C)、次に β -CyD ($6.14 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 20°C)、 γ -CyD ($2.27 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, 20°C) の順であった。 K_c 値と温度の関係から熱力学パラメーターを算出すると相互作用は ΔH 駆動型であり、 α -CyD が HM-HPMC のステアリル基と最も強く相互作用することが示唆された。
- 5) HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの粘度に対する温度分散測定を行った結果、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの粘度は、温度上昇に伴い増大した。また、20°C、30°C および 40°C 条件下で HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの動的粘弾性測定を行った結果、20°C ではゾル状態、30°C、40°C と温度が上昇するとゲル状態へ変化することが明らかとなった。
- 6) HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの加温 (35°C) と冷却 (20°C) を繰り返しても、加温時は粘度の高いゲル状態、冷却時は粘度の低いゾル状態を再現したことから、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換は可逆性を有することが示された。

以上の知見より、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルは、室温 (20°C 付近) ではゾル状態、体温付近 (30 - 40°C) ではゲル状態に変化する温度応答性のゲル基剤として機能することが明らかとなった。

第 2 章 薬物眼内移行性向上を企図した温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼剤への応用

第 1 節 序

点眼は投与が簡便で非侵襲的であるため、眼科疾患の治療に際し、最も簡便かつ有効な投与ルートである。しかし、角膜をはじめとした複雑なバリア機能により、点眼後の薬物は速やかに眼から排除されるため薬物の眼内移行性は非常に低く、角膜を通過して眼内組織に到達可能な薬物量は投与した薬物の 5% 以下であると言われている^{35,36)}。したがって、点眼薬の投与回数は一般的な経口投与に比べて多い傾向にあり、投与回数の減少ならびに効果的な眼疾患治療のためには薬物の眼内移行性を改善することが望まれる。これまでに、刺激応答性ゲル³⁷⁻³⁹⁾、マイクロ/ナノ粒子化⁴⁰⁻⁴²⁾、リポソームなどの脂質ナノキャリア⁴³⁾などが薬物の眼内移行性を改善するために検討されてきた。その中でも温度応答性ゲルは、医療用点眼剤に実際に使用された実績があり、温度応答性ゲルを点眼剤に応用すると、点眼時はゾル状態で点眼しやすく、点眼後は体温で温められゲル化し、結膜嚢での薬物の滞留性が向上し、薬物眼内移行性が改善することが期待される。そこで本章では、薬物眼内移行性向上を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを点眼剤へ応用し、その有用性について評価した。

第 2 節 薬物封入 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルからの薬物放出性の評価

温度応答性ヒドロゲルを点眼剤に応用する場合、ゲル粘度が高すぎると、点眼剤容器からの薬液の滴下が困難となり、点眼後の目の不快感にも繋がる。したがって、実際の使用を考えた場合、点眼する際は粘度が低く、点眼後は適度な粘度増大を示すヒドロゲルを調製する必要がある。そこで、点眼剤として使用するのに最適な HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの処方を検討した。本検討では、実際に温度応答性ゲル点眼剤として臨床使用されているリズモン[®] TG 点眼液⁴⁴⁾ を比較対象とした。リズモン[®] TG の粘度に対する温度分散測定の結果を Fig. 15 に示す。リズモン[®] TG は室温付近 (20℃) で粘度が約 $\sim 0.1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 以下と低値を示し、眼の表面温度付近 (約 33℃) まで加温すると、約 $2.0 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ まで粘度が増大した。HM-HPMC と CyD の種類・濃度を精査した結果、Fig. 15 に示すように HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) の処方が リズモン[®] TG に近い温度応答性の粘度変化を示したことから、以下の検討ではこの処方のヒドロゲルを用いた。

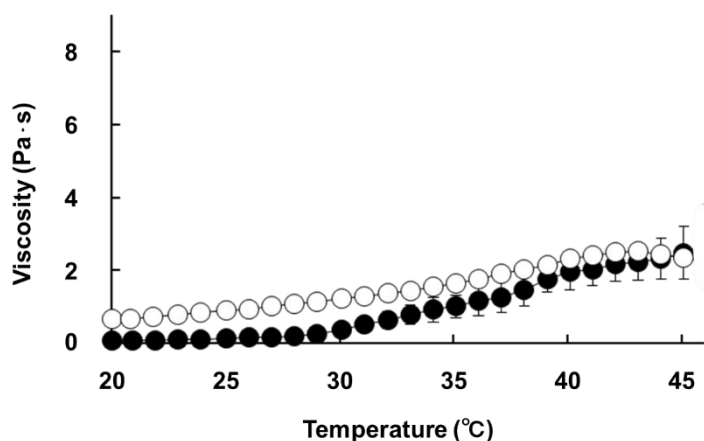


Fig. 15. Temperature-dependent viscosity changes of HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) hydrogel and RYSMON[®] TG, measured at a shear rate of 1.0 s^{-1} .

●: RYSMON[®] TG, ○: HM-HPMC/ α -CyD.

Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

Fig.16 はモデル薬物に抗炎症薬ジクロフェナクナトリウム (DCFNa) を用いて、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルからの薬物放出挙動を透析膜法により評価した結果を示す。DCFNa は、消失半減期が約 2 時間と短く、DCFNa 点眼剤 (ジクロード® 点眼液) は 1 日 4 回の投与が必要なることから、投与回数の減少が望まれる⁴⁵⁾。Fig. 16 に示すように DCFNa 単独溶液は 1 時間で約 50% の薬物が放出された。一方、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルからの薬物放出は遅延し、50% 薬物放出は 2 時間であった。これは 32℃ 条件下では、HM-HPMC のステアシル基が CyD から解離することで粘度が増大し、ゲルマトリックスからの薬物放出が遅延したためと推察された。HM-HPMC ヒドロゲルからの薬物放出も DCFNa 単独溶液と比較して遅くなり、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルと同じ放出挙動を示した。温度分散測定の結果 (Fig. 11) より、32℃ では、HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの粘度と比較して約 4 Pa・s も高いにもかかわらず、両者の薬物放出挙動はほぼ同程度であった。これは温度分散測定と薬物放出試験の実験条件が異なることが要因だと考えられる。温度分散測定ではサンプル内の α -CyD 濃度の変動はないが、薬物放出試験では薬物と同様に α -CyD (M.W. 972) も透析膜 (分子量カットオフ : 10000) からリリースされるため濃度が減少する。またサンプル容量 5 mL に対して溶媒は 500 mL であるため、 α -CyD は速やかに溶媒中に拡散される。したがって、試験開始後、加温により解離した α -CyD が速やかに透析膜から放出され、粘度が HM-HPMC ヒドロゲルと同程度まで増大し、両者の薬物放出挙動に差がみられなかったものと推察された。

また、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルに薬物を封入する場合、薬物と CyD との相互作用を考慮する必要がある。溶解度法を用いてジクロフェナク (DCF) と CyD の相互作用を検討した結果、 $K_c(\alpha\text{-CyD}) = 17 \pm 15 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_c(\beta\text{-CyD}) = 362 \pm 11 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_c(\gamma\text{-CyD}) = 228 \pm 26 \text{ M}^{-1}$ であった。この値は第 1 章で明らかにしたステアシル基と CyD の K_c 値と比較すると非常に

小さい。また、DCFNa 添加による HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの粘度の変化もみられなかったことから、DCFNa 添加による競合包接の影響は少ないものと考えられる。

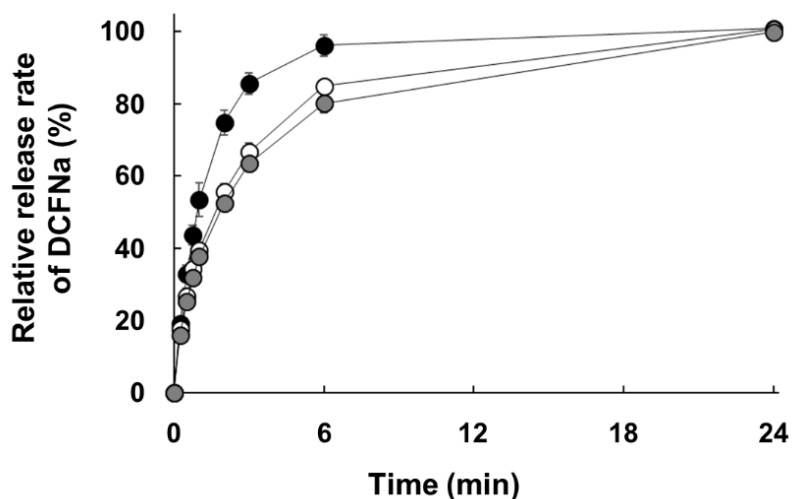


Fig. 16. Release profiles of DCFNa from the HM-HPMC-HPMC/α-CyD formulation in PBS at 32 °C . All formulations contain 0.1 w/v% DCFNa. All the symbols were overlapped at the point of 24 h.

●: DCFNa solution, ○: HM-HPMC/α-CyD, ●: HM-HPMC.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 3 節 薬物封入 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼投与試験

本節では、DCFNa 含有 HM-HPMC/α-CyD ヒドロゲルを用いて点眼投与試験を行った。比較対照として、臨床で使用されている DCFNa 含有点眼剤（ジクロード® 点眼液 0.1%）を用いた。Fig. 17 および Fig. 18 は DCFNa 含有 HM-HPMC/α-CyD ヒドロゲルをウサギ

に点眼投与後、角膜内および眼房水中の薬物濃度を経時的に測定した結果を示す。HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルでは、ジクロード® 点眼液と比較して、角膜および眼房水中において高い DCFNa 濃度を示した。角膜および眼房水における薬物動態学的パラメーターを Table 2、3 に示す。角膜において HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲル投与群は市販点眼剤よりも C_{\max} が約 3.3 倍 (HM-HPMC/ α -CyD = $20.40 \pm 4.48 \mu\text{g/g}$ 、市販点眼剤 = $6.13 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$)、AUC が約 2.9 倍 (HM-HPMC/ α -CyD = $57.77 \pm 12.18 \mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$ 、市販点眼剤 = $19.90 \pm 5.96 \mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$) 増大した。眼房水においても、 C_{\max} が約 4.0 倍 (HM-HPMC/ α -CyD = $1.20 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ 、市販点眼剤 = $0.30 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$)、AUC が約 2.7 倍 (HM-HPMC/ α -CyD = $3.88 \pm 0.88 \mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ 、市販点眼剤 = $1.44 \pm 0.34 \mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$) 増大した。なお、市販点眼剤は、DCFNa の角膜透過性を向上させるために酸性側 (pH = 6) に調製されている⁴⁶⁾。今回の HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの調製にはリン酸緩衝液 (pH = 7.4) を用いたにも関わらず、角膜および眼房水中の薬物濃度が増大した。これは HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルが点眼後、眼の表面温度で温められて結膜嚢内でゲル化し、薬物の滞留性が増加したことで、薬物の眼内移行性が向上したためと推察された。

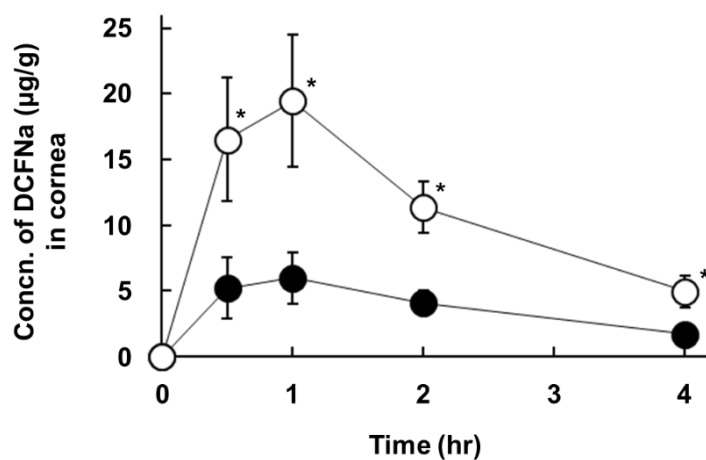


Fig. 17. Concentrations of DCFNa in rabbit cornea at various time points after administering a HM-HPMC/α-CyD formulation or a commercial product to the eyes of a rabbit. Both formulations contain 0.1 w/v% DCFNa.

●: Commercial product, ○: HM-HPMC/α-CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

*, $p < 0.05$ versus a commercial product.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of DCFNa in rabbit cornea after administration to the eyes of a rabbit^a

Sample	C_{\max}^b (µg/g)	T_{\max}^c (hr)	$AUC_{0-\infty}^d$ (µg·hr/g)	$MRT_{0-\infty}^e$ (hr)
Commercial product	6.13 ± 0.07	1.17 ± 0.54	19.90 ± 5.96	2.98 ± 0.79
HM-HPMC/α-CyD	$20.40 \pm 4.48^*$	0.83 ± 0.20	$57.77 \pm 12.18^*$	2.74 ± 0.47

^aEach value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. ^bMaximum drug concentration. ^cTime to reach a maximum drug concentration. ^dArea under the curve. ^eMean residence time.

* $p < 0.05$ versus a commercial product.

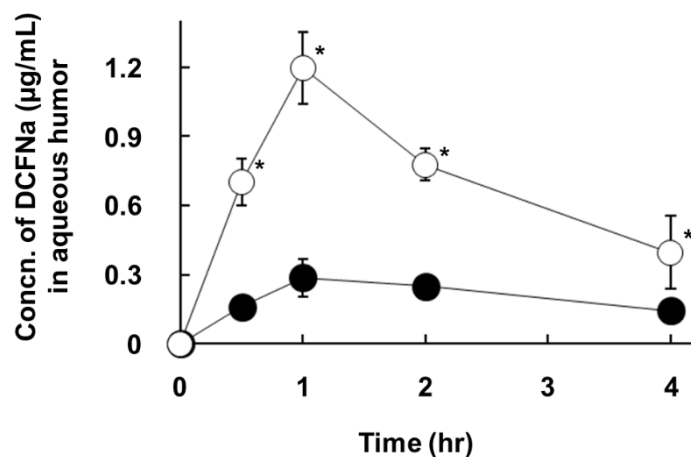


Fig. 18. Concentrations of DCFNa in rabbit aqueous humor at various time points after administering a HM-HPMC/α-CyD formulation or a commercial product to the eyes of a rabbit. Both formulations contain 0.1 w/v% DCFNa.

●: Commercial product, ○: HM-HPMC/α-CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

*, $p < 0.05$ versus a commercial product.

Table 3. Pharmacokinetic parameters of DCFNa in rabbit aqueous humor after administration to the eyes of a rabbit^a

Sample	C_{\max}^b (μg/mL)	T_{\max}^c (hr)	$AUC_{0-\infty}^d$ (μg·hr/mL)	$MRT_{0-\infty}^e$ (hr)
Commercial product	0.30 ± 0.15	1.0	1.44 ± 0.34	4.7 ± 2.33
HM-HPMC/α-CyD	$1.20 \pm 0.15^*$	1.0	$3.88 \pm 0.88^*$	3.14 ± 0.92

^aEach value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. ^bMaximum drug concentration. ^cTime to reach a maximum drug concentration. ^dArea under the curve. ^eMean residence time.

* $p < 0.05$ versus a commercial product

温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼剤への応用について Fig. 19 にまとめる。

HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは室温付近 (20°C) で粘度が低いゾル状態であるため (CyD が HM-HPMC のステアリル基を優位に包接した状態)、点眼操作が容易である。一方、点眼後は眼表面温度 (約 33°C) まで加温されて粘度が高いゲル状態に変化するため (包接が外れやすくなった状態)、結膜囊内の薬物滞留性が改善され、薬物の眼内移行性が向上し、角膜および眼房水中薬物濃度が増大したものと推察された。以上の結果より、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルはゾル状態で点眼し易く、点眼後は眼表面温度でゲル化することで、薬物の眼内移行性を改善する新規温度応答性ゲル基剤として有用なことが明らかとなった。

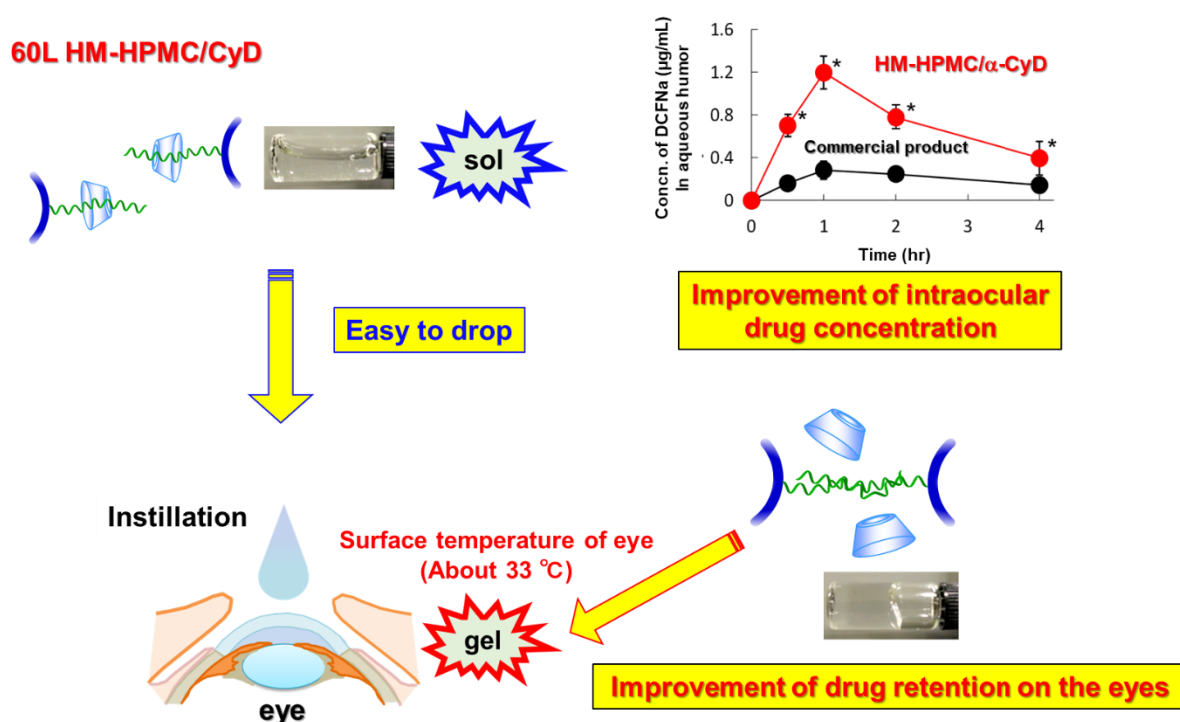


Fig. 19. Schematic image of thermoresponsive HM-HPMC/CyD hydrogel for use in eye drop.

第 4 節 薬物封入 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの眼粘膜刺激性

DCFNa の市販点眼剤は、一過性の炎症、刺痛、結膜充血などを含む眼刺激性を有する^{46,47)}。一方、HPMC は角膜保護効果や角膜治癒促成効果を示すことが報告されている⁴⁸⁾。HM-HPMC は HPMC の誘導体であることから HPMC と同様な保護効果が期待される。そこで本節では、DCFNa 含有 HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの眼刺激性についてジクロード[®]点眼液 0.1% と比較検討を行った。Table 4 は、サンプルをウサギに 10 回点眼し、1 時間経過後の眼の状態を改良 Draize 法を用いて評価した結果の一例を示す。改良ドレイズ法においてスコアが 0.5 以下は刺激性なし、1 以上は刺激性ありと判定される。市販点眼剤投与群は眼瞼結膜、球結膜および瞬膜に刺激性が認められた。一方、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲル投与群はすべての項目において刺激性は認められなかった。次にスリットランプ検査による角膜、前房、虹彩の観察およびフルオレセイン染色による角膜上皮の観察を行った結果、両剤ともに障害性は認められなかった。さらに刺激や痛みの指標となる閉目について点眼後に観察した結果、市販点眼剤投与群では 3 匹中 2 匹に 10 秒間の閉目が観察された。しかし、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲル投与群では観察されなかった。これらの結果は、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルについても、HPMC 同様に角膜保護効果を有していることを示唆する。以上のことから、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルは市販点眼剤と比較して、DCFNa の眼粘膜刺激性を軽減することが示唆された。

Table 4. Scores obtained from eye irritation test of commercial product or HM-HPMC/ α -CyD formulation in rabbits. Both formulations contain 0.1 w/v% DCFNa

Lesion	Score	
	Commercial product	HM-HPMC/ α -CyD formulation
Cornea		
Opacity	0	0
Area size	-	-
Conjunctiva		
Eyelid conjunctival redness	1	0
Eyelid conjunctival edema	0	0
Bulbar conjunctival redness	1	0
State of spasticity	1	0
Secretion	0	0

※ A score of 0.5 or less indicates no irritation, and 1 or more indicates irritating.

第 5 節 小括

本章では、薬物眼内移行性向上を目的として、温度応答性 HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルを点眼剤へ応用し、その有用性を評価した。モデル薬物として DCFNa を封入した HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルをウサギに点眼し、薬物の眼内移行性を評価した。さらに、DCFNa 含有 HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの眼刺激性について評価した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの粘度における温度分散測定の結果、HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは、臨床使用されている温度応答性ゲル点眼剤である リズモン[®] TG と類似した粘度挙動を示した (20℃ で約 0.5 Pa・s、約 33℃ で約 2.0 Pa・s)。
- 2) HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルからの薬物放出挙動は、DCFNa 溶液よりも僅かに遅延した (約 50% の薬物放出までの時間、DCFNa 溶液: 1 時間、HM-HPMC/ α -CyD: 2 時間)。これは、32℃ 条件下で粘度が増大したことでゲルマトリックスからの薬物放出が遅延したためと示唆された。
- 3) DCFNa 含有 HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルをウサギに点眼投与すると、市販点眼剤よりも薬物の角膜内および眼房水中濃度は有意に高値を示した (角膜内では C_{\max} が約 3.3 倍、AUC が約 2.9 倍、眼房水中では C_{\max} が約 4.0 倍、AUC が約 2.7 倍増加した)。これは HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルが点眼後、眼の表面温度で温められて結膜

囊内でゲル化し、薬物の滞留性が増大したためと推察された。

- 4) DCFNa 含有 HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの眼粘膜刺激性について検討した結果、市販点眼剤と比較して刺激性は認められなかった。また、スリットランプ検査およびフルオレセイン染色による観察においても障害性は認められなかった。さらに、刺激や痛みの指標となる閉目も観察されなかった。したがって、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルは、市販点眼剤と比較して、DCFNa の眼粘膜刺激性を軽減することが示唆された。

以上の知見より、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを点眼剤へ応用すると、点眼時はゾル状態で点眼しやすく、点眼後はゲル状態に変化することで結膜嚢内における薬物滞留性が改善し、薬物眼内移行性が向上することが明らかとなった。さらに、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルは DCFNa の眼粘膜刺激性を軽減することが示唆された。

第 3 章 タンパク質性薬物の持続放出を企図した温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの注射剤への応用

第 1 節 序

タンパク質性薬物は生理活性が高く、治療効果に優れるため、インスリン、成長ホルモン、インターフェロン、エリスロポエチン、抗体など多くのバイオ医薬品が上市されている。しかし、タンパク質性薬物は物理化学的に不安定であり、消失半減期が短いため、現在上市されているバイオ医薬品の多くが連日の頻回注射を必要とする^{3,49)}。特に悪性腫瘍、糖尿病、肝炎、白血病、関節リウマチなどの慢性疾患では、数週間、数年もしくは生涯に渡って投与が必要であり、患者のコンプライアンス低下を引き起こす可能性がある⁴⁹⁾。したがって、タンパク質性薬物のバイオアベイラビリティを改善し、投与回数を減らすことは非常に重要な課題であるが、持続的に有効成分を放出するバイオ医薬品製剤は未だ少ない。そこで本章では、タンパク質性薬物の持続放出を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを注射剤へ応用し、その有用性について評価した。

第 2 節 注射剤への応用を目的とした温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの調製

ヒドロゲルを持続放出担体として利用する場合、ゲル状態で高い粘度を示す方が薬物の持続放出に有効である。そこでまず、分子量およびステアリル基導入数の異なる 90L グレードの HM-HPMC (サンジェローズ® 90L、M.W. 650,000、ステアリル基置換度 0.4 ~ 0.6 wt%) の粘度に及ぼす CyD 濃度の影響について 60L グレードの HM-HPMC と比較検討した。

Fig. 20 は、せん断速度を 0.1 s^{-1} に固定し、60L および 90L HM-HPMC の粘度に及ぼす CyD 濃度の影響を検討した結果を示す。CyD 非添加時では、90L HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は約 $52 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ を示し、60L HM-HPMC ヒドロゲルの約 $34 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ よりも高値を示した。一方、CyD を添加すると、60L HM-HPMC の場合と同様に 90L HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は CyD 濃度依存的に低下し、特に α -CyD および β -CyD は、低濃度領域 ($\sim 0.1 \text{ w/v}\%$) でも 90L HM-HPMC ヒドロゲルの粘度制御に有用であった ($0.1 \text{ w/v}\%$ 添加で約 3 分の 1 まで低下)。一方、 γ -CyD の場合は、90L HM-HPMC ヒドロゲルの粘度への影響は小さく、 $0.1 \text{ w/v}\%$ 添加しても高い粘度 (約 $40 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) を示した。これらの結果は、90L HM-HPMC ヒドロゲルにおいても CyD を添加することで、その粘度を制御可能なことを示唆する。また、90L HM-HPMC ヒドロゲルは 60L HM-HPMC ヒドロゲルよりも高い粘度を有することから、注射剤への応用では 90L HM-HPMC ヒドロゲルを用いて検討を行った。

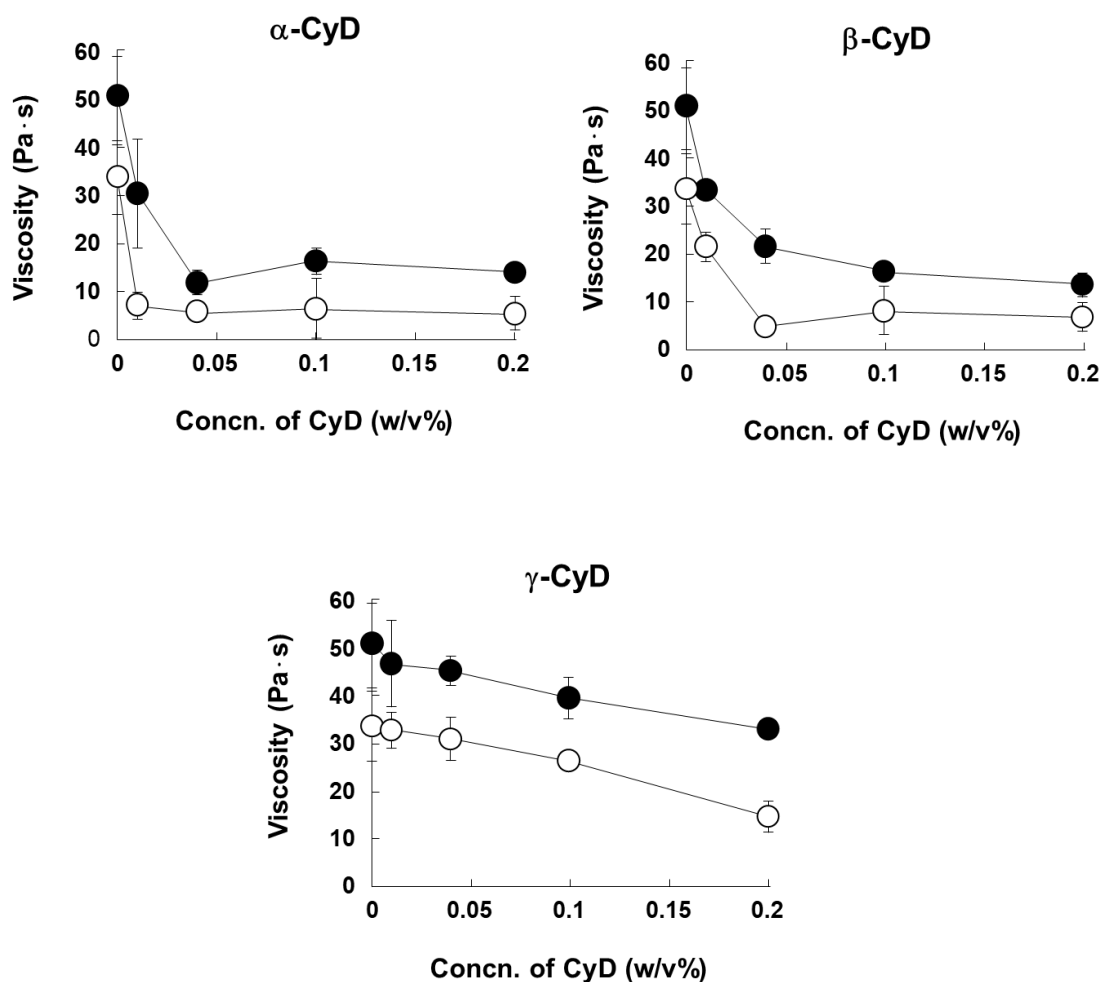


Fig. 20. Effect of CyDs on the viscosity of 60L HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%) and 90L HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%). The shear viscosity at 0.1 s^{-1} was plotted as a function of CyD concentrations.

●: 90L HM-HPMC, ○: 60L HM-HPMC.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

通常、ヒドロゲルは粘度が高いため、注射シリンジによる注入は困難である。そこで、次に 90L HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの注入性について評価した。レオメーター測定において、せん断応力に対してひずみをプロットすると一定せん断応力で急激にひずみが増大する値、い

いわゆる降伏値（その際のせん断応力を降伏応力と呼ぶ。）を示す。降伏応力は、構造が崩れて流動し始めるのに必要な力を示しており、降伏応力の値を比較することで注射剤の注入性を評価することができる。Fig. 21 は 90L HM-HPMC ヒドロゲルの降伏応力に対する各種 CyD の影響を示す。0.5 w/v% HM-HPMC ヒドロゲルの降伏応力は約 16 Pa であった。一方、CyD を添加すると HM-HPMC ヒドロゲルの降伏応力は CyD 濃度依存的に減少し、0.2 w/v% 以上の CyD 添加でリン酸緩衝液 (PBS) に類似するパターンを示した。中でも α -CyD および β -CyD は低濃度から降伏応力が著しく減少し、0.02 w/v% α -CyD 添加で 1.6 Pa、0.05 w/v% β -CyD 添加で 1.6 Pa であった。 γ -CyD の場合は HM-HPMC の降伏応力への影響は小さく、降伏応力を 1.6 Pa まで減少させるには 0.5 w/v% 以上添加する必要があった。これは CyD が HM-HPMC のステアリル基を包接することでステアリル基同士の擬架橋構造が崩れた状態となり、外部応力による構造破壊が容易に生じるためと推察された。以上の結果より、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルは降伏応力が低く、注射時の注入性に優れることが明らかとなった。

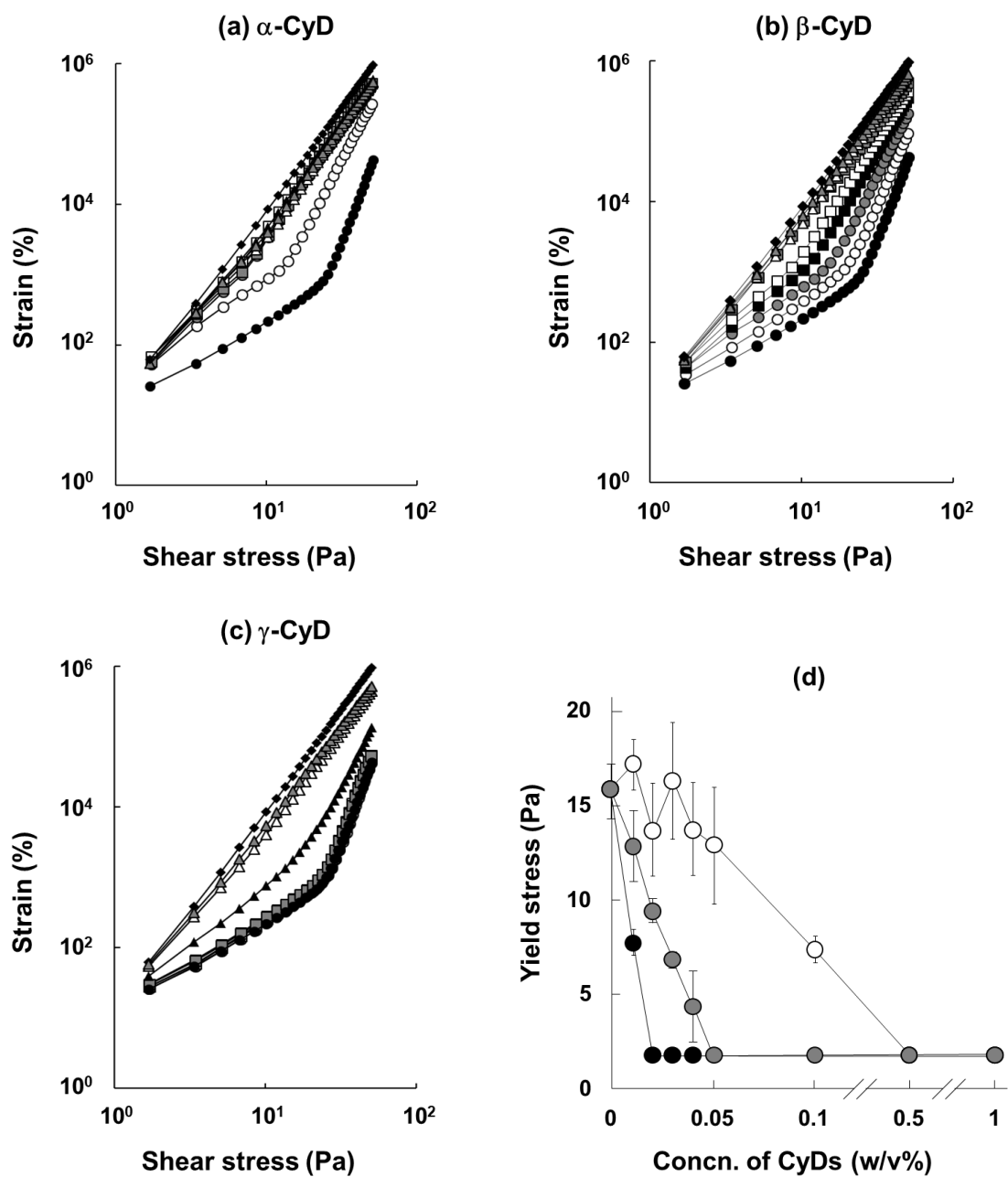


Fig. 21. Stress-strain curves of HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%) in the presence and absence of CyDs (a-c), and changes of yield stress as a function of CyD concentrations (d).

In Fig. (a-c), ●: HM-HPMC alone, ○: with 0.01 w/v% CyD, ●: with 0.02 w/v% CyD, ■: with 0.03 w/v% CyD, □: with 0.04 w/v% CyD, ■: with 0.05 w/v% CyD, ▲: with 0.1 w/v% CyD, △: with 0.2 w/v% CyD, ▲: with 0.5 w/v% CyD, ◆: PBS.

In Fig. (d), ●: α -CyD, ●: β -CyD, ○: γ -CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

Fig. 22 は、各種 CyDs 存在下および非存在下における 90L HM-HPMC ヒドロゲル粘度の温度分散測定の結果を示す。 α -CyD の場合、本 CyD 濃度条件下では温度上昇に伴う粘度の増大はほとんど見られなかった。これは、90L HM-HPMC の場合、CyD との相互作用に参与するステアシル基の数が 60L HM-HPMC よりも多いため、加温時の CyD の解離が抑制されたためと推察される。 β -CyD の場合は、20℃ で低い粘度を示したが ($\sim 1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$)、0.04 w/v% CyD 添加時は温度上昇とともに粘度が次第に増大し、42℃ でピークトップ (約 $4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) を示した。第 1 章で述べたように、 β -CyD は α -CyD よりもステアシル基との相互作用が弱いため、0.04 w/v% 添加時において体温付近で粘度が増大する温度応答性の粘度変化を示したものと推察される。ステアシル基との相互作用の弱い γ -CyD の場合は、20℃ 付近での粘度が高く、0.2 w/v% 添加時のみ体温付近での粘度増大を示した。以上の結果は、90L HM-HPMC/CyD ヒドロゲルにおいても、CyD の種類・濃度を適切に設定することで温度応答性ゾル - ゲル変換システムを構築可能なことを示唆する。以降の検討では、体温付近で粘度が増大した HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルを用いて実験を行った。

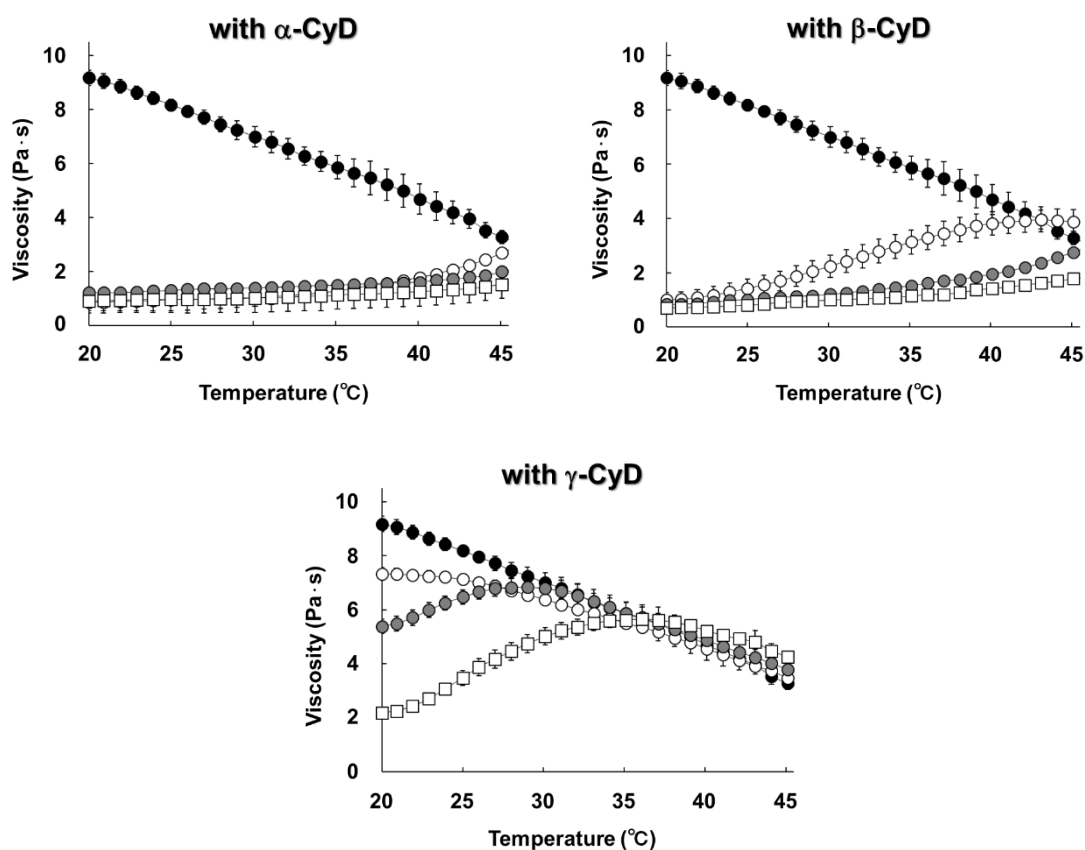


Fig. 22. Temperature-dependent viscosity changes of HM-HPMC hydrogel (0.5 w/v%) with or without CyDs, measured at a shear rate of 1 s^{-1} .

●: HM-HPMC alone, ○: with 0.04 w/v% CyD, ●: with 0.1 w/v% CyD, □: with 0.2 w/v% CyD.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

Fig. 23 は 10°C 、 20°C 、 30°C および 37°C 条件下での 90L HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルの動的粘弾性測定の結果を示す。 10°C では $\omega > 1 \text{ rad/s}$ の範囲において $\tan \delta > 1$ であり、ゾル状態であることが示された。一方、 20°C ではゾル - ゲル中間体、 30°C および 37°C では測定した角周波数範囲において $\tan \delta < 1$ となり、ゲル状態であった。

このことから、90L HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは、低温ではゾル状態、体温付近ではゲル状態に変化することが明らかとなった。

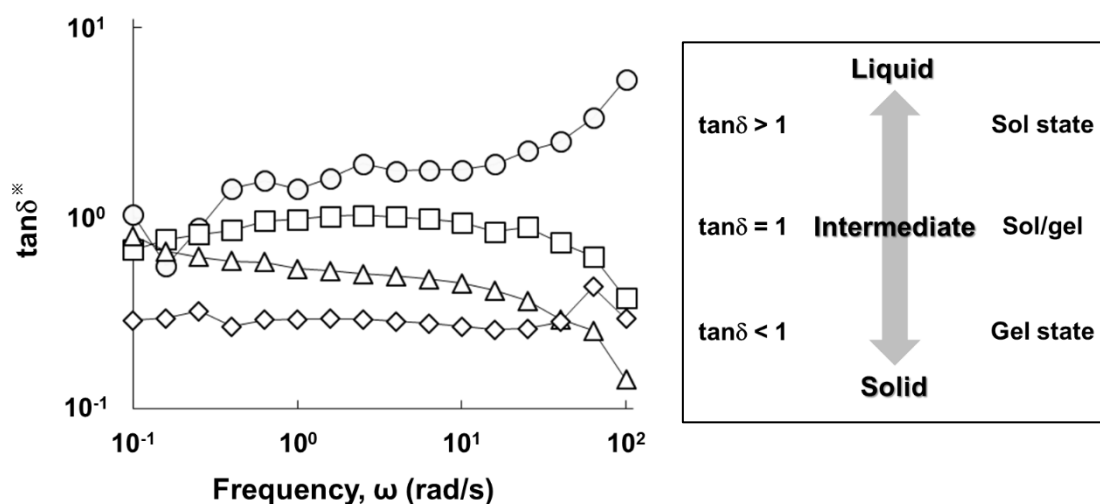


Fig. 23. Loss tangents ($\tan \delta$) of HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) hydrogel at 10, 20, 30 and 37°C.

○: 10°C, □: 20°C, △: 30°C, ◇: 37°C.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

* $\tan \delta$ (loss tangent) = G'' (loss modulus) / G' (storage modulus)

次に 90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換の可逆性について検討した。10°C と 37°C で温度変化を繰り返した場合の HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルの粘度変化の結果を Fig. 24 に示す。90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは、10°C では約 1 Pa·s と低い粘度を示し、37°C に加温すると、約 6 Pa·s に粘度が上昇した。前章で用いた 60L HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの結果と比較すると 90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは、温

度変化時の粘度差が大きく、注射時は注入しやすく、注射投与後に体温で高粘度のゲルとなり、薬物を持続放出する担体として適することが示唆された。また 90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルの加温と冷却を繰り返しても、各温度においてほぼ同じ粘度を示し、温度応答性ゾル - ゲル変化の可逆性が確認された。

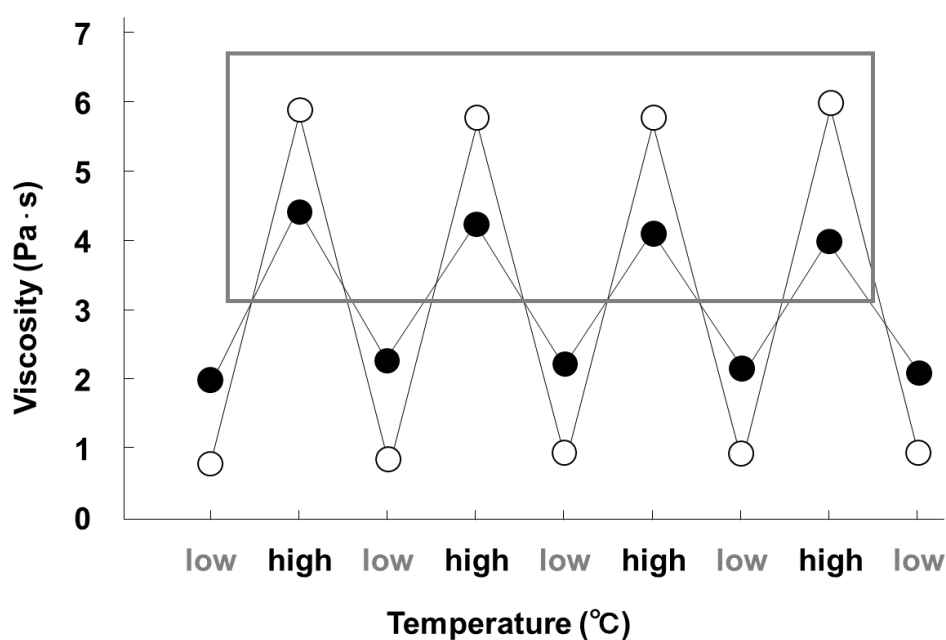


Fig. 24. Viscosity changes of 60L HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.01 w/v%) hydrogel and 90L HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) hydrogel upon heating and cooling cycles measured at a shear rate of 1.0 s^{-1} .

●: 60L HM-HPMC/ α -CyD hydrogel and ○: 90L HM-HPMC/ β -CyD hydrogel.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第 3 節 HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルからのタンパク質性薬物の持続放出性の評価

これまでの結果から、90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは温度応答性ゾル – ゲル変換能を有し、注入性に優れることが明らかとなった。そこで、蛍光色素を封入した 90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをマウスに皮下投与し、ゲル中に封入された化合物の持続放出性を評価した。Fig. 25 は蛍光色素であるインドシアニングリーン (ICG) を封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをマウスに皮下注射後、蛍光強度の経時変化を観察した結果を示す。ICG 単独溶液は投与後 12 時間で蛍光が大幅に減少し、24 時間でほぼ消失した。体温付近で温度上昇に伴う粘度増大を示さない HPMC ヒドロゲル⁵⁰⁾ の場合も、ICG 単独溶液と同様の傾向を示した。一方、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは投与後 12 時間でも強い蛍光がみられ、24 時間後においても蛍光が観察された。以上の結果より、注入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは、体温で温められて高粘度のゲルとなることで ICG の放出を抑制することが示された。

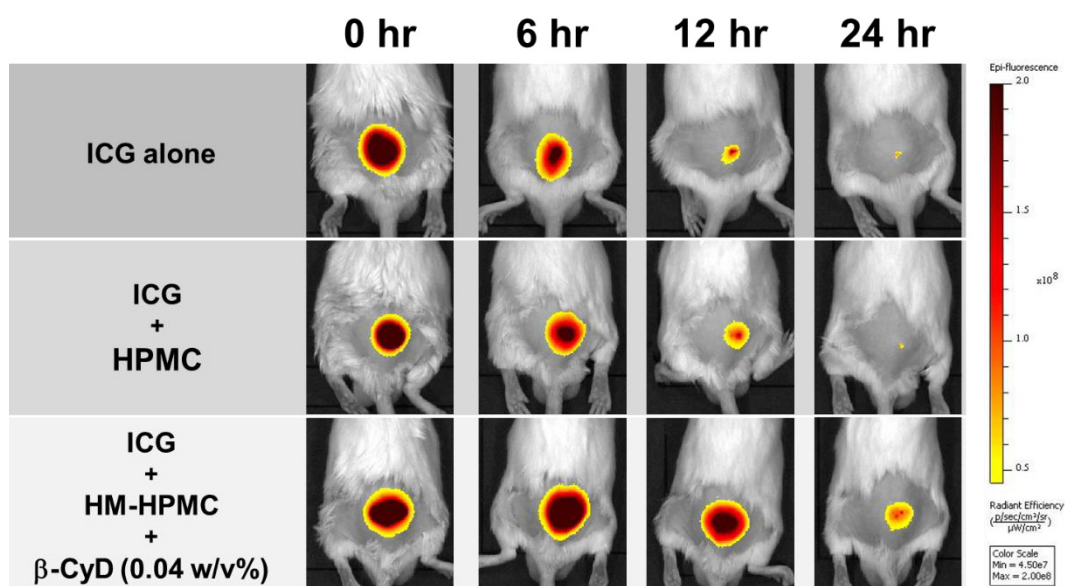


Fig. 25. *In vivo* fluorescence images after subcutaneous administration of indocyanine green (ICG), HPMC hydrogel (0.5 w/v%) containing ICG and HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD hydrogel containing ICG.

次に、モデルタンパク質としてヒトインスリンを封入した 90L HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをラットに皮下投与後、血漿インスリン濃度を測定した (Fig. 26)。インスリン単独溶液は投与後 1 時間以内に最高血中濃度 (C_{\max} : 42.8 ± 2.8 ng/mL) に達し、その後急速に低下した。一方、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは投与後 1 時間以内に最高血中濃度 (C_{\max} : 33.6 ± 1.7 ng/mL) に達した後、緩やかに低下し、投与後 2 時間以降の血漿インスリン濃度がインスリン単独溶液と比較して有意に高値を示した。さらに、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルはインスリン単独溶液と比較して、MRT が 約 1.6 倍に延長した (HM-HPMC/ β -CyD = 2.6 ± 0.2 hr、インスリン単独溶液 = 1.6 ± 0.1 hr) (Table 5)。Fig. 27 は、インスリンを封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをラットに皮下注射後、血漿グルコース濃度を測定した結果を示す。

インスリン単独溶液は投与 2 時間後に血糖値が約 40 mg/dL まで低下した。その後 4 時間までは緩やかに血糖値が上昇し、それ以降は急速に回復した（投与 6 時間後で約 80 mg/dL、8 時間後で約 90 mg/dL）。一方、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルを投与した場合、投与 4 時間後まで血糖値は低値を示した（約 35 mg/dL）。その後の血糖値の回復も緩やかであり、インスリン溶液単独投与と比較して有意に血糖降下作用が持続した（投与 6 時間後で約 40 mg/dL、8 時間後で約 60 mg/dL）。これは、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルが皮下投与後に体温で温められゲル化することで、ゲル内からインスリンを持続的に放出したためと推察された。

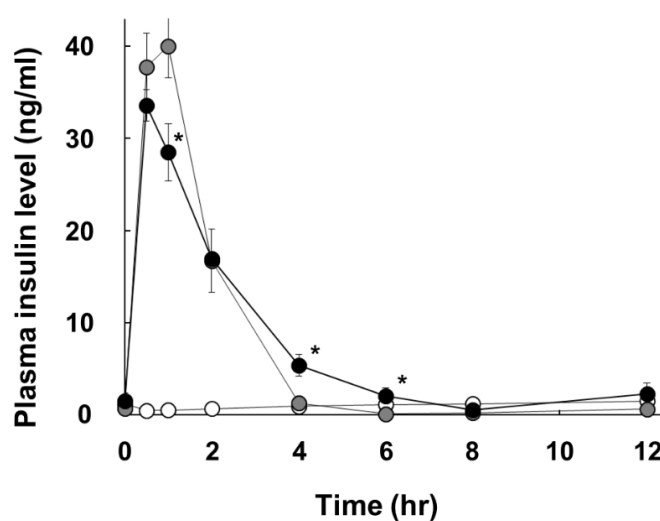


Fig. 26. Plasma levels of insulin after subcutaneous administrations of phosphate buffered solution, insulin (3 U/kg) and HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD hydrogel (0.04 w/v%) containing insulin (3 U/kg) to rats.

○: PBS, ●: insulin alone, ●: HM-HPMC/ β -CyD hydrogel.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin alone.

Table 5. *In vivo* pharmacokinetic parameters of insulin and HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) hydrogel containing insulin^a

Sample	C_{\max}^b (ng/mL)	T_{\max}^c (hr)	$AUC_{0-\infty}^d$ (ng/mL·hr)	$MRT_{0-\infty}^e$ (hr)
Insulin alone	42.8 \pm 2.8	0.8 \pm 0.2	79.0 \pm 6.2	1.6 \pm 0.1
Insulin/ HM-HPMC/ β -CyD	33.6 \pm 1.7*	0.5 \pm 0.0	85.2 \pm 3.5	2.6 \pm 0.2*

^aEach value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

^bMaximum drug concentration.

^cTime to reach a maximum drug concentration.

^dArea under the blood concentration time curve.

^eMean residence time.

* $p < 0.05$ versus insulin alone.

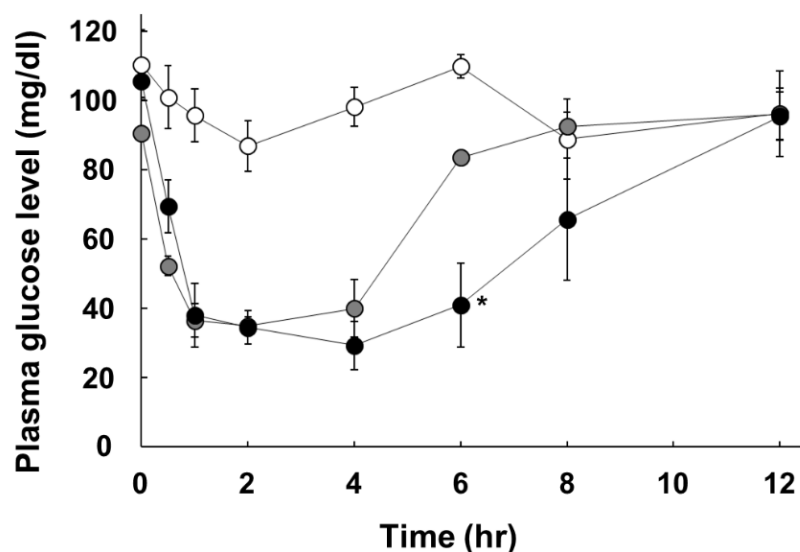


Fig. 27. Plasma glucose levels of after subcutaneous administrations of phosphate buffered solution, insulin (3 U/kg) and HM-HPMC (0.5 w/v%)/β-CyD hydrogel (0.04 w/v%) containing insulin (3 U/kg) to rats.

○: PBS, ●: insulin alone, ●: HM-HPMC/β-CyD hydrogel.

Each point represents the mean ± S.E. of 3 experiments.

*, $p < 0.05$ versus insulin alone.

これまでに得られた結果に基づいて、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの注射剤へ応用について Fig. 28 にまとめる。HM-HPMC (0.5 w/v%)/β-CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは、室温付近 (20℃) で粘度が低いゾル状態 (CyD が HM-HPMC のステアリル基を優位に包接した状態) であり、降伏応力も低下しているため、注射シリンジを用いた注入操作が容易となる。一方、注入後は HM-HPMC (0.5 w/v%)/β-CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルが体温付近 (約 37℃) まで加温され、粘度が高いゲル状態 (包接が外れた状態) に変化する。蛍光色素を用いた検討 (Fig. 25) から明らかなように、ゲル内からの薬物放出は緩やかであり、ゲル状

態の HM-HPMC からインスリンが持続的に放出されることにより、血糖降下作用が持続したものと考えられる。温度応答性 HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルを注射剤へ応用すると、タンパク質の持続放出システムとして有用なことが明らかとなった。

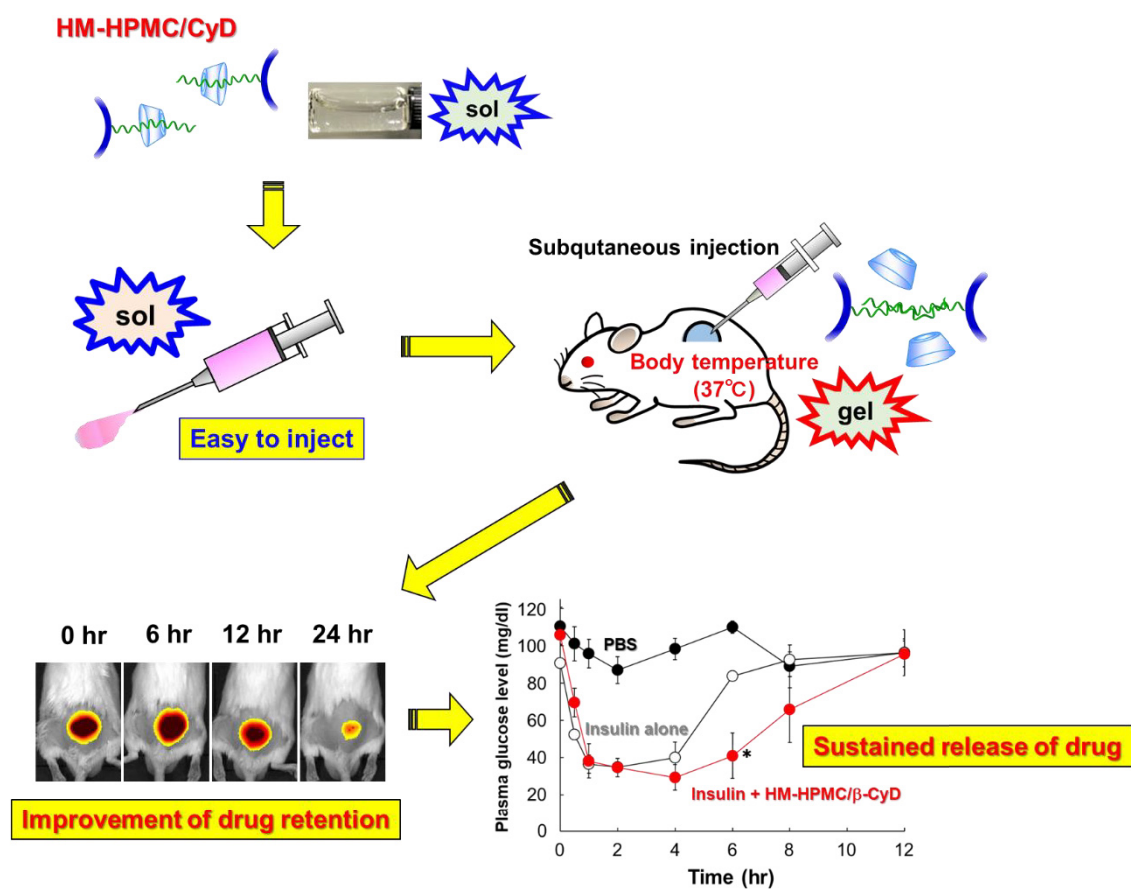


Fig. 28. Summary of thermoresponsive 90L HM-HPMC/CyD hydrogel for use in injection.

第 4 節 小括

本章では、タンパク質の持続放出を目的として 60L HM-HPMC ヒドロゲルより高い粘度を有する 90L HM-HPMC ヒドロゲルを用いて温度応答性ヒドロゲルを調製し、注射剤へ応用した。調製した 90L HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの注入性および温度応答性ゾル – ゲル変換能について評価した。さらに、モデルタンパク質としてヒトインスリンを封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをラットに皮下投与し、薬物の持続放出性を評価した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) 60L および 90L HM-HPMC ヒドロゲルの粘度に及ぼす CyD 濃度の影響について比較検討した結果、90L HM-HPMC は 60L HM-HPMC よりも粘度が高く、CyD 添加により粘度を制御可能なことが明らかとなった。
- 2) 90L HM-HPMC ヒドロゲルの降伏応力は CyD 濃度依存的に減少した。中でも α -CyD および β -CyD は低濃度から降伏応力を著しく低下させた (0.02 w/v% α -CyD および 0.05 w/v% β -CyD 添加で 1.6 Pa)。このことから、HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加することで、注入性に優れるヒドロゲルを調製可能なことが明らかとなった。
- 3) HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの粘度の温度分散測定の結果、HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは、20℃ では粘度が低く ($\sim 1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$)、体温付近で粘度が増大 (37℃ で約 $4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) することが示された。また、動的粘弾性測定の結果より、低温ではゾル状態、体温付近ではゲル状態に変化することが明らかとなった。

- 4) ICG を封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをマウスに皮下投与すると、投与 24 時間後においても ICG の蛍光が観察され、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは注入後、薬物を持続的に放出することが示唆された。
- 5) ヒトインスリンを封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをラットに皮下投与すると、投与 2 時間後の血漿インスリン濃度は高値を示し、インスリン単独溶液と比較して、MRT 値が約 1.6 倍に延長した。また、血糖降下作用も HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルでは有意に持続した。

以上の知見より、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを注射剤に応用すると、注射時はゾル状態で降伏応力が低く、注射シリンジからの注入操作が容易である。一方、注射後は体温でゲル状態に変化することで、薬物を持続的に放出する温度応答性ゲル基剤として機能することが明らかとなった。

第 4 章 総括

本研究では少量で高粘性を示す HM-HPMC に注目し、CyD と HM-HPMC との相互作用に基づいた新規温度応答性ゾル - ゲル変換システムを構築し、各種製剤への応用を検討した。第 1 章では、CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御と温度応答性ゾル - ゲル変換能の評価および変換機構の詳細を明らかにした。第 2 章では、薬物の眼内移行性向上を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼剤への応用を企図した。第 3 章では、生体投与後のタンパク質性薬物の持続放出を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを注射剤へ応用した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

第 1 章 CyD による HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御と温度応答性ゾル - ゲル変換システムの構築

HM-HPMC ヒドロゲルの粘度は CyD 濃度依存的に低下し、特に空洞径の小さな α -CyD 添加により、その粘度は顕著に低下し、HM-HPMC ヒドロゲルの粘性制御には α -CyD が有用であることが示唆された。HM-HPMC ヒドロゲルと各種 CyDs の相互作用を検討した結果、HM-HPMC のステアリル基と CyD の相互作用が示唆された。また、ステアリル基と CyD の相互作用は温度依存性を示し、 α -CyD がステアリル基と最も強く相互作用した。この相互作用の温度依存性を反映し、HM-HPMC/CyD ヒドロゲルは、温度上昇に伴い粘度が増大し、20℃ ではゾル状態、30℃、40℃ ではゲル状態へ変化した。さらに、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルの温度応答性ゾル - ゲル変換は可逆性を有した。CyD は HM-HPMC のステアリル基を包接することで、ステアリル基間の擬架橋構造に影響し、粘度を著しく低下させる。さら

に、CyD とステアシル基の相互作用は ΔH 駆動型であるため、加温すると包接が外れやすくなり、ステアシル基間の擬架橋構造が再び回復し、粘度の高いゲル状態へ変化するものと考えられた。HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加することで、ホスト - ゲスト相互作用に基づいた温度応答性のゾル - ゲル変換システムを構築可能なことが明らかとなった。

第 2 章 薬物眼内移行性向上を企図した温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの点眼剤への応用

薬物眼内移行性向上を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを点眼剤へ応用し、その有用性について評価した。HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは、臨床使用されている温度応答性ゲル点眼剤である リズモン® TG に類似した粘度挙動を示した。DCFNa 含有 HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルをウサギに点眼投与すると、薬物の角膜内および眼房水中濃度は、市販点眼剤よりも有意に高値を示した。これは HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルは点眼後、眼の表面温度で温められ結膜嚢内でゲル化し、薬物の滞留性が増大したためと推察された。また、HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルは、市販点眼剤と比較して、DCFNa の眼粘膜刺激性を軽減することが示唆された。温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを点眼剤として応用すると、点眼時はゾル状態で点眼しやすく、点眼後はゲル状態に変化して結膜嚢内における薬物滞留性を改善し、薬物眼内移行性を向上させるものと推定された。

第 3 章 タンパク質性薬物の持続放出を企図した温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの注射剤への応用

タンパク質性薬物の持続放出を目的として、温度応答性 HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを注射剤へ応用し、その有用性について評価した。60L および 90L HM-HPMC ヒドロゲルの粘度に及ぼす CyD 濃度の影響を比較検討した結果、90L HM-HPMC は 60L HM-HPMC よりも粘度が高く、CyD 添加により粘度を制御可能なことが明らかとなった。また、HM-HPMC ヒドロゲルに CyD を添加することで、注入性に優れるヒドロゲルを調製可能なことが明らかとなった。すなわち、HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルは、20℃ では粘度が低く ($\sim 1 \text{ Pa}\cdot\text{s}$)、体温付近で粘度が増大 (37℃ で約 $4 \text{ Pa}\cdot\text{s}$) した。ICG を封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをマウスに皮下投与した結果、投与 24 時間後においても ICG の蛍光が観察され、HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルは注入後、薬物を持続的に放出した。ヒトインスリンを封入した HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルをラットに皮下投与した結果、投与 2 時間後の血漿インスリン濃度は高値を示し、インスリン単独溶液と比較して、MRT 値が 約 1.6 倍に延長した。また、血糖降下作用も HM-HPMC/ β -CyD ヒドロゲルでは有意に持続した。HM-HPMC/CyD ヒドロゲルを注射剤に応用すると、注射時はゾル状態で降伏応力が低く、注射シリンジからの注入操作が容易である。一方、注射後は体温でゲル状態に変化するため、薬物を持続的に放出する温度応答性ゲル基剤として機能するものと推定された。

以上述べたように、HM-HPMC に CyD を添加することで、温度応答性ゾル - ゲル変換システムを構築可能なことが明らかとなった。本システムは CyD と HM-HPMC の種類・濃度を適切に設定することで、様々な温度でのゾル - ゲル変化能を有する温度応答性ヒドロゲルを調製可能である。例えば、投与時はゾル状態で投与しやすく、投与後は体温で温められてゲル化するため、薬物滞留性や薬物持続放出などの製剤特性の改善に有用なことが明らかとなった。近年、ポリアクリル酸などの合成高分子やキトサン、デキストリンなどの天然高分子に疎

水基を導入した疎水化高分子が開発されており、食品・塗料・医療など多くの分野で利用されている。CyD の包接現象を利用したゾル - ゲル変換システムは、HM-HPMC だけでなく、他の疎水化高分子に対しても、高分子自身と異なった温度応答性を付与することから、新規温度応答性ゲル基剤として医薬品製剤へのさらなる応用展開が期待される。

実験の部

1. 実験試料

ジクロフェナク、ジクロフェナクナトリウムは和光純薬工業（株）製を使用した。ヒトインスリンは SIGMA（株）製を使用した。インドシアニンググリーンは第一三共（株）製を使用した。天然 α -、 β -、および γ -CyD は日本食品化工（株）より恵与されたものを使用した。疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロース（60L および 90L HM-HPMC、商品名：サンジェローズ[®]）およびヒドロキシプロピルメチルセルロース（60SH および 90SH HPMC、商品名：メトローズ[®]）は大同化成工業（株）より恵与されたものを使用した。生理食塩水は大塚製薬（株）製を使用した。フルオレセインナトリウムは和光純薬工業（株）製を使用した。溶媒としての水はイオン交換水を 2 回蒸留して使用した。その他の試薬ならびに溶媒類はすべて市販特級品を使用した。

2. 統計解析

実験データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定については、分散分析（二元配置 ANOVA）後の多重比較のための Dunn's post hoc tests を用いて行った。危険値が 0.05 以下であるとき、統計学的に有意差があると評価した。

3. HM-HPMC ヒドロゲルおよび HM-HPMC/CyD ヒドロゲルの調製

HM-HPMC を加温した（70℃）リン酸緩衝液に少量ずつ添加し、攪拌しながら分散させた。その後、徐々に冷却しながら HM-HPMC を溶解した。HM-HPMC/CyD ヒドロゲルは

種々の濃度の α -, β - および γ -CyD 溶液を HM-HPMC ヒドロゲルに添加し、4℃ で 24 時間静置して調製した。

4. 粘性測定

粘性測定は MCR-101 レオメーター (Anton Paar Japan K. K., Tokyo, Japan) を用いて行った。コーンプレートは直径 25 mm、円錐角 0.998 を使用した。粘度のせん断速度依存性は、25℃ でせん断速度を $0.1 \sim 100 \text{ s}^{-1}$ に変えながら測定した。粘度の温度分散測定は、せん断速度 1 s^{-1} 、昇温速度 3℃/分で行った。動的粘弾性測定は、角周波数を $0.1 \sim 100 \text{ rad/s}$ に変えながら、10、20、25、30、35、37、40 $\pm 0.01^\circ\text{C}$ に制御して行った。

5. NMR 測定

^1H -NMR 測定は Jeol JNM-ECA 500 Delta spectrometer (Tokyo, Japan) を用いた (外部磁場: 500 MHz、5 mm 試料管、25℃)。ケミカルシフトはプロピオン酸トリメチルシリルナトリウムからの低磁場シフトを ppm で表した (^1H の精度: 約 $\pm 0.005 \text{ ppm}$)。HM-HPMC もしくは HPMC を CyDs 存在下 (0.05 \sim 0.2 w/v%) もしくは非存在下で D_2O に溶解して 0.05 w/v% に調製し、測定した (積算回数 72 回)。

6. 溶解度相図

一定過剰量 (5 mg) の STE をバイアル (1.5 mL) に入れ、種々の濃度の CyD 溶液を 1 mL 加えて密栓し、20、30、40℃ で 5 日間振盪した (250 rpm)。8000 rpm で 5 分間遠心後、上清 0.5 mL を分取した。0.2 μm フィルターにかけ、水で希釈した。STE の濃度は HPLC (CBM-20A、島津製作所製) を用いて以下の条件で測定した。

測定条件

検出器	: 日立製 RI Detector L-2490
ポンプ	: 島津製作所製 LC-20AD
カラムオーブン	: 島津製作所製 CTO-20AC、40°C
カラム	: YMC-Pack ODS-A (5 μ m、4.6 mm \times 15 cm)
移動相	: 0.1% トリフルオロ酢酸含有 80% アセトニトリル
注入量	: 25 μ L
流速	: 1.0 mL/min

7. *In vitro* 薬物放出

DCFNa 溶液を調製後、HM-HPMC ヒドロゲルもしくは HM-HPMC/ α -CyD ヒドロゲルに添加し (最終濃度: 0.5 w/v% HM-HPMC、0.04 w/v% α -CyD、0.1 w/v% DCFNa)、30 分間ボルテックスをかけ、4°C で 24 時間静置した。調製した試料 5 mL を透析膜 (分子量カットオフ: 10000) に配置し、500 mL PBS 中に浸した (32°C、50 rpm)。所定の時間に溶媒を 1 mL 採取し、等量の PBS を溶媒に添加した。DCFNa の濃度は UV 測定 (U-2800A Hitachi, Japan) にて定量した (測定波長: 275 nm)。

8. ウサギに点眼投与後の角膜および眼房水中の DCFNa 濃度の測定

DCFNa (0.1 w/v%) 含有 HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルもしくはジクロード® (0.1 w/v% DCFNa 含有) を日本白色ウサギ (8 週齢、雄) の結膜嚢下に 50 μ L 点眼した。所定の時間に (投与後 0.5、1、2、4 時間) ウサギを安楽死 (フェノバルビタール 約 2 mL/kg 投与) させ、眼球を取り出した後に、眼の表面を 10 mL の生理食塩水で洗浄し

た。1 mL シリンジを用いて (26 G 針) 眼房水を 100 μ L 採取した。その後、眼球を冷凍した。500 μ L のアセトニトリルに 50 μ L の眼房水を添加し、5 分間ボルテックスをかけた後に遠心した (15000 rpm、5 分間)。上清を減圧乾燥し、残渣を HPLC 移動相に溶解した。DCFNa 濃度は HPLC (Shimazu UHPLC system Tokyo, Japan) を用いて以下の条件で測定した。

測定条件

検出器	: 日立製 UV-VIS Detector L-2420
ポンプ	: 日立製 Pump L-2130
カラム	: YMC ODS-AM (5 μ m、4.6 mm \times 25 cm、Tokyo、Japan)
移動相	: 0.1% トリフルオロ酢酸含有 60% アセトニトリル
注入量	: 80 μ L
流速	: 1.0 mL/min
測定波長	: 275 nm

角膜は冷凍した眼球から切り取り、質量を測定した。2 mL PBS 中で角膜をホモジネートし、2 mL のアセトニトリルを添加し、ボルテックス後に遠心した (1000 g、15 分間)。上清を減圧乾燥後、残渣を HPLC 移動相に溶解し分析した。DCFNa 濃度は眼房水の場合と同じ条件で測定した。薬物動態学的パラメーターは Practical Pharmacokinetic Program (MULTI) を用いて最小二乗法にて算出した⁵¹⁾。

9. ウサギに点眼投与後の眼刺激性評価

DCFNa (0.1w/v%) 含有 HM-HPMC (0.5 w/v%)/ α -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルもしくはジクロード® (0.1 w/v% DCFNa 含有) を日本白色ウサギ (8 週齢、雄) の結膜嚢下に 1 日 10 回点眼した (50 μ L/回、30 分間隔)。検査は以下の項目を行った。

瞬目回数測定

第 1 回および第 10 回点眼時に、点眼直後から 1 分間の瞬目回数を測定した。閉目がみられた場合はその持続時間を測定した。

前眼部刺激症状の観察

点眼前日、最終点眼終了 1、3 および 5 時間後、ならびに 2 日後に、前眼部（角膜、虹彩および結膜）を肉眼的に観察し、改良 Draize 法による前眼部刺激症状の判定基準に従って採点した。

スリットランプ検査

点眼前日、最終点眼終了 1、3 および 5 時間後、ならびに 2 日後の前眼部刺激症状観察後にスリットランプ（SL-14、有限会社 幸田電子）を用いて前眼部（角膜、前房および虹彩）を観察した。

角膜上皮障害性の観察

最終点眼終了 5 時間後のスリットランプ検査終了後に、0.5% フルオレセイン溶液を角膜上に 1 滴点眼した。約 15 秒後に生理食塩液で前眼部を洗浄した。青色フィルター付スリットランプで角膜上皮の染色斑の有無を観察し、角膜のフルオレセイン染色状態判定基準に従って採点評価した。

10. 注入性評価

MCR-101 レオメーター (Anton Paar Japan K. K., Tokyo, Japan) を用いて行った。コーンプレートは直径 25 mm、円錐角 0.998 を使用し、せん断応力を 1 ~ 100 Pa に変えながら測定した。

11. 局所滞留性評価

ICG (最終調製濃度: 0.5 μ M) を封入した HPMC もしくは HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルをマウス (7 週齢、雄) の背部に皮下投与した (1 mL シリンジ、26 G)。投与直後、6、12、24 時間後に ICG の蛍光強度を蛍光イメージング装置 (IVIS Lumina XR, PerkinElmer Inc, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。

12. ラットに皮下注射後の血中インスリンおよびグルコース濃度の測定

ヒトインスリンを封入した HM-HPMC (0.5 w/v%)/ β -CyD (0.04 w/v%) ヒドロゲルをラット (7 週齢、雄) の背部にヒトインスリン量として 3 U/kg となるように皮下投与した (1 mL シリンジ、26 G)。投与 0.5、1、2、4、6、8、12 時間後に尾静脈から採血した。血漿インスリン濃度はレビスインスリン - ラット T (和光純薬工業株式会社製) を用いて、そのプロトコールに従い測定した。血漿グルコース濃度は グルコース CII - テストワコー (和光純薬工業株式会社製) を用いて、そのプロトコールに従い測定した。

参考文献

1. N. Sood, A. Bhardwaj, S. Mehta and A. Mehta, Stimuli-responsive hydrogels in drug delivery and tissue engineering, *Drug Delivery* **23**, 758–780 (2016).
2. S. Gorgieva and V. Kokol, Preparation, characterization, and *in vitro* enzymatic degradation of chitosan-gelatine hydrogel scaffolds as potential biomaterials, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **100 A**, 1655–1667 (2012).
3. H. J. Chung, Y. Lee and T. G. Park, Thermo-sensitive and biodegradable hydrogels based on stereocomplexed Pluronic multi-block copolymers for controlled protein delivery, *Journal of Controlled Release* **127**, 22–30 (2008).
4. M. Takeuchi, S. Kageyama, H. Suzuki, T. Wada, Y. Toyoda, T. Oguma, Y. Ezure, Y. Tsuruya, T. Kato and F. Ishii, Preparation and physicochemical properties of a reversible, thermo-setting, in situ gelling ophthalmic solution containing timolol maleate, *Material Technology* **17**, 445–452 (1999).
5. S. Kempe and K. Mäder, In situ forming implants - An attractive formulation principle for parenteral depot formulations, *Journal of Controlled Release* **161**, 668–679 (2012).
6. E. Ruel-Gariépy and J. C. Leroux, In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **58**, 409–426 (2004).
7. H. R. Lin, K. C. Sung and W. J. Vong, In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine, *Biomacromolecules* **5**, 2358–2365 (2004).
8. J. Li, H. Liu, L. Liu, C. Cai, H. Xin and W. Liu, Design and evaluation of a brinzolamide drug-resin in situ thermosensitive gelling system for sustained ophthalmic drug delivery, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **62**, 1000–1008 (2014).
9. 大同化成工業株式会社, サンジェローズ® 製品概要.
10. 齊藤 泉, 池田 かおり, 竹原 光教他, 疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたゲル剤の調製と評価, *薬剤学* **52**, 280–287 (1992).
11. 齊藤 泉, 池田 かおり, 竹原 光教他, 疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースの合成と粘性剤としての基礎物性, *薬剤学* **52**, 272–279 (1992).
12. K. Watanabe, S. Nakamura, T. Shimamoto, T. Uramatsu, H. Kishi, T. Uemura and H. Shinnike, 疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いた 新規メロニダゾールゲルの調製と製剤評価, *日本緩和医療薬学雑誌* **2**, 39–43 (2009).

13. T. Loftsson and M. E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrin 1. Drug solubilization and stabilization, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85**, 1017–1025 (2015).
14. R. A. Rajewski and V. J. Stella, Pharmaceutical applications of cyclodextrin. 2. *In vivo* drug delivery, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85**, 1142–1169 (1996).
15. K. Uekama, F. Hirayama and T. Irie, Cyclodextrin drug carrier systems, *Chemical Reviews* **98**, 2045–2076 (1998).
16. K. Uekama, Pharmaceutical application of cyclodextrins as multi-functional drug carriers, *YAKUGAKU ZASSHI* **124**, 909–935 (2004).
17. K. Uekama, Design and Evaluation of cyclodextrin-based drug formulation, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **52**, 900–915 (2004).
18. I. Tomatsu, A. Hashidzume and A. Harada, Gel-to-sol and sol-to-gel transitions utilizing the interaction of α -cyclodextrin with dodecyl side chains attached to a poly (acrylic acid) backbone, *Macromolecular Rapid Communications* **26**, 825–829 (2005).
19. M. Weickenmeier, G. Wenz and J. Huff, Association thickener by host guest interaction of a β -cyclodextrin polymer and a polymer with hydrophobic side-groups, *Macromolecular Rapid Communications* **18**, 1117–1123 (1997).
20. C. Galant, A. L. Kjøniksen, G. T. M. Nguyen, K. D. Knudsen and B. Nyström, Altering associations in aqueous solutions of a hydrophobically modified alginate in the presence of β -cyclodextrin monomers, *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 190–195 (2006).
21. A. Harada, Y. Takashima and M. Nakahata, Supramolecular polymeric materials via cyclodextrin – guest interactions, *ACCOUNTS of chemical research* **47**, 2128–2140 (2014).
22. H. S. Choi, K. M. Huh, T. Ooya and N. Yui, pH- and thermosensitive supramolecular assembling system: Rapidly responsive properties of β -cyclodextrin-conjugated poly(ϵ -lysine), *Journal of the American Chemical Society* **125**, 6350–6351 (2003).
23. Y. Zheng, A. Hashidzume and A. Harada, pH-responsive self-assembly by molecular recognition on a macroscopic scale, *Macromolecular Rapid Communications* **34**, 1062–1066 (2013).
24. Y. L. Zhao and J. Fraser Stoddart, Azobenzene-based light-responsive hydrogel system, *Langmuir* **25**, 8442–8446 (2009).
25. I. Tomatsu, A. Hashidzume and A. Harada, Contrast viscosity changes upon photoirradiation for mixtures of poly(acrylic acid)-based α -cyclodextrin and azobenzene polymers, *Journal of the American Chemical Society* **128**, 2226–2227 (2006).

26. Y. Zheng, A. Hashidzume, Y. Takashima, H. Yamaguchi and A. Harada, Temperature-sensitive macroscopic assembly based on molecular recognition, *ACS Macro Letters* **1**, 1083–1085 (2012).
27. M. Nakahata, Y. Takashima, H. Yamaguchi and A. Harada, Redox-responsive self-healing materials formed from host-guest polymers, *Nature Communications* **2**, 511–516 (2011).
28. C. Yuan, J. Guo, M. Guo, L. Qiu and F. Yan, Multistimuli responsive and electroactive supramolecular gels based on ionic liquid gemini guest, *ACS Macro Letters* **1**, 271–275 (2014).
29. E. M. M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses : A review, *Process Biochemistry* **39**, 1033–1046 (2004).
30. M. V. Rekharsky and Y. Inoue, Complexation thermodynamics of cyclodextrins, *Chemical Reviews* **98**, 1875–1917 (1998).
31. P. Brocos, N. Diaz-Vergara, X. Banquy, S. Perez-Casas, M. Costas and A. Pineiro, Similarities and differences between cyclodextrin - sodium dodecyl sulfate host - guest complexes of different stoichiometries : Molecular dynamics simulations at several temperatures, *The Journal of Physical Chemistry B* **114**, 12455–12467 (2010).
32. M. Rekharsky and Y. Inoue, Chiral recognition thermodynamics of cyclodextrin : The thermodynamic origin of enantioselectivity and the enthalpy - entropy compensation effect, *Journal of the American Chemical Society* **122**, 4418–4435 (2000).
33. V. Javvaji, M. B. Dowling, H. Oh, I. M. White and S. R. Raghavan, Reversible gelation of cells using self-assembling hydrophobically-modified biopolymers: towards self-assembly of tissue, *Biomaterials Science* **2**, 1016–1023 (2014).
34. J. Lee, J. P. Gustin, T. Chen, G. F. Payne and S. R. Raghavan, Vesicle - biopolymer gels : Networks of surfactant vesicles connected by associating biopolymers, *Langmuir* **21**, 26–33 (2005).
35. C. L. Boursais, L. Acar, H. Zia, P. A. Sado, T. Needham and R. Leverge, Ophthalmic drug delivery systems recent advances, *Progress in Retinal and Eye Research* **17**, 33–58 (1998).
36. K. Hosoya, V. H. L. Lee and K. Kim, Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery : A review of conjunctival transport mechanisms and their regulation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **60**, 227–240 (2005).
37. C. Wang, Y. Hwang, P. Chiang, C. Shen, W. Hong and G. Hsiue, Extended release of bevacizumab by thermosensitive biodegradable and biocompatible hydrogel,

- Biomacromolecules* **13**, 40–48 (2012).
38. M. J. Colthurst, R. L. Williams, P. S. Hiscott and I. Grierson, Biomaterials used in the posterior segment of the eye, *Biomaterials* **21**, 649–665 (2000).
 39. G. P. Misra, R. S. J. Singh, T. S. Aleman, S. G. Jacobson, T. W. Gardner and T. L. Lowe, Biomaterials subconjunctivally implantable hydrogels with degradable and thermoresponsive properties for sustained release of insulin to the retina, *Biomaterials* **30**, 6541–6547 (2009).
 40. L. Gan, Y. Gan, C. Zhu, X. Zhang and J. Zhu, Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A : *In vitro* and *in vivo* results, *International Journal of Pharmaceutics* **365**, 143–149 (2009).
 41. S. Liu, L. Jones and F. X. Gu, Nanomaterials for ocular drug delivery, *Macromolecular Bioscience* **12**, 608–620 (2012).
 42. T. Hagigit, M. Abdulrazik, F. Orucov, F. Valamanesh, M. Lambert, G. Lambert, F. B. Cohen and S. Benita, Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye, *Journal of Controlled Release* **145**, 297–305 (2010).
 43. L. Gan, J. Wang, M. Jiang, H. Bartlett, D. Ouyang, F. Eperjesi, J. Liu and Y. Gan, Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid-based nanocarriers, *Drug Discovery Today* **18**, 290–297 (2013).
 44. Y. Ohno, T. Iga, Y. Yamada, M. Nagahara, M. Araie and R. Takayanagi, Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of systemic effect of topically applied timolol maleate ophthalmic gelling vehicle (Rysmon® TG), *Current Eye Research* **30**, 319–328 (2005).
 45. R. Asasutjarit, S. Thanasanchokpibull, A. Fuongfuchat and S. Veeranondha, Optimization and evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic in situ gels, *International Journal of Pharmaceutics* **411**, 128–135 (2011).
 46. R. Schalnus, Topical nonsteroidal anti-inflammatory therapy in ophthalmology, *Ophthalmologica* **217**, 89–98 (2003).
 47. M. Ahuja, A. S. Dhake, S. K. Sharma and D. K. Majumdar, Topical ocular delivery of NSAIDs, *The AAPS Journal* **10**, 2 (2008).
 48. N. Okamoto, Y. Shimomura, N. Nagai and Y. Ito, An *in vitro* evaluation for corneal damages after instillation of eye drops using rat debrided corneal epithelium : Changes in corneal damage of benzalkonium chloride by addition of thickening agent, *YAKUGAKU ZASSHI* **132**, 837–843 (2012).

49. F. Wu and T. Jin, Polymer-based sustained-release dosage forms for protein drugs, challenges, and recent advances, *AAPS PharmSciTech* **9**, 1218–1229 (2009).
50. N. Sarkar, Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropyl methylcellulose, *Journal of Applied Polymer Science* **24**, 1073–1087 (1979).
51. K. Yamaoka, Y. Tanigawa, T. Nakagawa and T. Uno, A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer, *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **4**, 879–885 (1981).

謝 辞

本研究を行うに際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 製剤学研究室 平山 文俊 教授、上釜 兼人 元教授（熊本大学名誉教授）、安楽 誠 教授、庵原 大輔 講師に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました崇城大学薬学部 薬学科 下野 和実 教授、同 山崎 啓之 教授に心から感謝致します。

本研究を行うに際して、有益なる御助言と御協力を賜りました大同化成工業株式会社 島本 敏夫 様、同 浦松 俊治 様、熊本大学薬学部 製剤設計学研究室 東 大志 助教ならびに参天製薬株式会社 真野 英俊 様、塚本 俊平 様、畑 竜也 様に深く感謝の意を表します。

博士後期課程への就学の機会を賜り、ご配慮頂いた崇城大学薬学部 薬物動態学研究室 小田切 優樹 教授、同 分析化学研究室 竹下 啓蔵 教授、同 医療薬剤学研究室 瀬尾 量 教授、同 臨床薬学研究室 石黒 貴子 准教授ならびに株式会社ファーマダイワ 岡山 善郎 代表取締役社長に心から感謝致します。

本研究を行うに際し、多大なる御協力を頂きましたファンケル株式会社 田淵 良 博士、崇城大学薬学部 製剤学研究室 後藤 美和 修士ならびに崇城大学薬学部 製剤学研究室の諸氏に心から感謝致します。

最後にここまで温かく見守ってくれた家族、友人に心より感謝致します。

平成 31 年 3 月
大久保 尚徳