



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1653号
学位記番号	第336号
氏名	野田 剛弘
授与年月日	平成29年3月31日
学位論文の題名	関節腔内投与徐放性製剤の開発と局所薬物動態の評価
論文審査担当者	主査： 平嶋 尚英 副査： 尾関 哲也, 湯浅 博昭, 奥菌 透

名古屋市立大学学位論文

関節腔内投与徐放性製剤の開発と局所薬物動態の評価

平成 28 年度 (2017 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

医療機能薬学専攻 薬物送達学分野

野田 剛弘

1. 本論文は、2017年3月 名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 平嶋 尚英 教授

副査 湯浅 博昭 教授

尾関 哲也 教授

奥菌 透 准教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Takehiro Noda, Tomoyuki Okuda, Kousuke Ban, Ryota Mizuno, Tatsuaki Tagami,

Tetsuya Ozeki, Hirokazu Okamoto

Development of Intra-knee Joint Sustained-release Gel Formulation and Evaluation of its Pharmacological Efficiency in Rats.

Biol. Pharm. Bull. **40**, 830-836 (2016)

Takehiro Noda, Tomoyuki Okuda, Ryota Mizuno, Tetsuya Ozeki, Hirokazu Okamoto

Two-step sustained-release PLGA/hyaluronic acid gel formulation for intra-articular administration.

Biol. Pharm. Bull. In accept

本論文の基礎となる研究は、尾関哲也 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物送達学分野、名城大学薬学部薬物動態制御学講座において行われた。

略語一覽

CMC	Carboxymethylcellulose
HA	Hyaluronic acid
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPMC	Hydroxypropyl Methylcellulose
ICG	indocyanine green
MC	Methyl cellulose
PLGA	Poly-Lactic-co-GlycolicAcid
PLGA/HA	Poly-Lactic-co-GlycolicAcid/ hyaluronic acid
QOL	Quality Of Life
SEM	Scanning Electron Microscope

目次

序論

背景 — 関節の概要と関節疾患 —	1
目的	4

本論

第一章 関節腔内投与後の薬物動態の確認	7
1.1. 緒言	7
1.2. 実験方法	8
1.2.1. 試薬、実験動物及び実験機器	8
1.2.2. ラット膝関節腔内投与手技の確立と投与許容量の確認	9
1.2.3. ICG 最適濃度の検討試験	10
1.2.4. ICG 水溶液の動態確認試験	10
1.3. 結果	11
1.3.1. ラット膝関節腔内投与手技の確立と投与許容量の確認	11
1.3.2. ICG 最適濃度の確認試験	12
1.3.3. ICG 水溶液の薬物動態確認試験	13
1.4. 考察及び小括	15
第二章 マトリックス型徐放性ゲル製剤の調製及び徐放性の確認	16
2.1. 緒言	16
2.2. 実験方法	17
2.2.1. 試薬、実験動物及び実験機器	17
2.2.2. ICG 含有徐放性 MC 製剤の調製方法	17
2.2.3. ICG 含有徐放性 HA 酸製剤の調製方法	17
2.2.4. ICG 徐放性ゲル製剤の蛍光強度測定による膝滞留性確認試験	18
2.2.5. ICG 徐放性ゲル製剤の薬物抽出定量法による膝関節腔内滞留確認試験	18
2.3. 結果	19
2.3.1. 減圧下におけるマトリックス型徐放性ゲル製剤の調製	19
2.3.2. ICG 含有徐放性 MC 製剤の膝滞留性確認	20

2.3.3.	ICG 含有徐放性 HA 製剤の膝滞留性確認	22
2.3.4.	ICG 蛍光強度による製剤間徐放性比較	24
2.3.5.	ICG 徐放性ゲル製剤の薬物抽出定量法による膝関節腔内滞留確認試験	25
4.	考察及び小括	26
第三章	PLGA/HA ゲル併用 2 段階徐放製剤の調製及び徐放性の検証	27
3.1.	緒言	27
3.2.	実験方法	28
3.2.1.	試薬、実験動物及び実験機器	28
3.2.2.	PLGA 粒子製剤の調製方法	29
3.2.3.	SEM を用いた粒子表面の確認と粒子径の測定	29
3.2.4.	PLGA 粒子の ICG 薬物含有量の測定	29
3.2.5.	PLGA/HA 2 段階徐放製剤の調製方法	30
3.2.6.	PLGA/HA 2 段階徐放製剤の初期バースト抑制確認	30
3.2.7.	シンク型拡散セルを用いた溶出試験	31
3.2.8.	PLGA 微粒子製剤と PLGA/HA 2 段階徐放製剤の ICG 蛍光強度測定による製剤間の徐放性比較	32
3.2.9.	製剤投与一ヶ月後の膝断面の ICG 蛍光分布の比較	32
3.3.	結果	33
3.3.1.	SEM を用いた粒子表面の確認と粒子径の測定, ICG 薬物含有量の測定	33
3.3.2.	PLGA/HA 2 段階徐放製剤の初期バースト抑制確認	33
3.3.3.	シンク型拡散セルを用いた溶出試験	35
3.3.4.	PLGA 微粒子製剤と PLGA/HA 2 段階徐放製剤の ICG 蛍光強度による製剤間の徐放性比較	36
3.3.5.	製剤投与一ヶ月後の膝断面の ICG 蛍光分布の比較	39
3.4.	考察及び小括	40
	総括	42
	謝辞	44
	引用文献	45

背景 — 関節の概要と関節疾患 —

人体を形成する骨の連結は、その連結部が動かない不動結合と、連結部において繋がっている骨が可動できる可動結合がある。関節とは内骨格においての骨同士の可動結合部位であり、肩や肘、股や膝、足首、指など運動性の大きな可動結合部位は人体内に 68 箇所存在している¹⁾。その接合面—関節面は関節軟骨と呼ばれる硝子軟骨に覆われており、連結部全体は骨膜に続く関節包にて覆われている。関節包は緊張または弛緩することができ、関節体の軟骨におおわれた面の近くに固着している。連結部全体は骨膜に続く関節包によって包まれて関節腔が形成されている。関節包は外層の線維膜（線維層）と内層の滑膜（滑膜層）の2層とからなる。また、関節包内や関節軟骨表面には滑液があり、潤滑油として潤っていて摩擦を軽減している²⁾ (Fig. 1)。

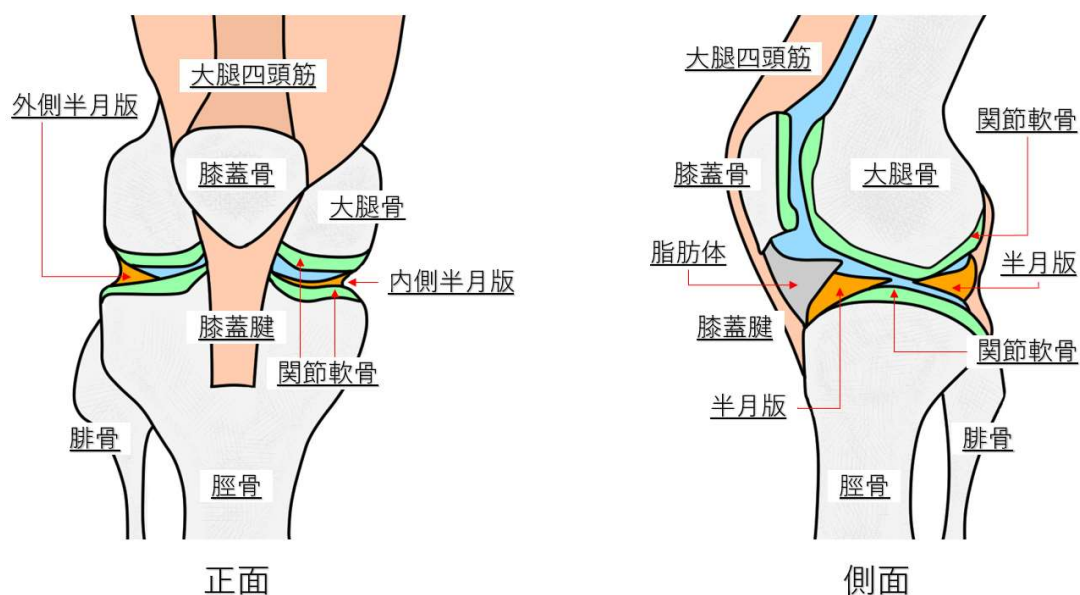


Fig. 1. Structure of the knee joint.

関節が存在することによって人は様々な動きをすることが可能であるが、可動部位であるために、自重や多方面からの負荷、また加齢により、様々な疾患が起こりうる。

関節疾患の病態や要因は様々であり、日常の行動やスポーツなど外傷的な事から起こる靭帯損傷や関節脱臼は、年齢層に関係なく起こりうる関節疾患である³⁾。また体重を支えている膝関節は疲労や負荷が蓄積しており、老化と共に発症する変形性膝関節痛及び慢性関節リウマチに伴う関節痛は避けては通れない病気となっている。

変形性膝関節症は、膝や股関節の衝撃を吸収する関節の軟骨が、加齢や肥満、筋力の低下や集中的な運動によって変形し、半月板のかみ合わせが緩んだり、変形や断絶を起きたりする事で、炎症や痛みを引き起こした症状である⁴⁾。症状が進行すると軟骨が摩耗し骨が互いに衝突、さらなる痛みを引き起こす。膝関節のクッションの役目を果たす膝軟骨や半月板が、長期間に少しずつすり減り変形することで起こる一次性変形性膝関節症と、関節リウマチや膝のケガなどの他の原因によって引き起こされる二次性変形性膝関節症の2種類がある。変形性膝関節症という病気はありふれた疾患であり、日本国内に限っても患者数が約700万人いるとされ、特に60代女性の約40%、70代女性の約70%がかかっているとされる⁵⁾。

関節リウマチは、多発性関節炎を主体とし、自己免疫機構が主に関節や軟骨を攻撃して、これにより炎症や痛みを引き起こす代表的な膠原病である。発症には遺伝的要因と、環境要因が関わっているとされる。特に滑膜に侵食し増殖、滑膜炎を起こし、増殖した滑膜が骨を破壊する。関節リウマチの患者数は世界的に7,000万人と推定されている⁶⁾。また日本の厚生労働省リウマチ学研究グループでは、関節リウマチ単独患者数は70万人、日本では1年に15,000件の新たな症例がある⁷⁾。

関節痛を引き起こす原因や疾患は様々あるが、関節痛は関節内に炎症が生じているためであることは確認されている。しかしながら、発症要因の解明は進んでいるが、関節痛そのもののメカニズムは、まだ明確には解明されていない。そのため、明確な治療法もいまだ確立されてはいない。

関節炎症を抑制するためには、メトトレキサートのような経口製剤、およびアダリムマブのような皮下注射を全身的薬物療法として臨床的に使用される。メトトレキサートは、ジヒドロ葉酸レダクターゼを阻害することによって核酸合成を阻害し、免疫系の活性化によって関節痛を軽減する^{8,9)}。アダリムマブは関節内に豊富に放出され、炎症を誘発するTNF- α に結合する。そしてTNF- α の受容体への結合および炎症性シグナルの伝達を阻害する。さらにアダリムマブはTNF- α を産生する細胞に結合し、細胞死を引き起こす^{10,11)}。全身的薬物療法は、疾患の進行を遅延させる可能性はあるが、骨髄抑制や重度の感染などの副作用が問題となっている^{12,13)}。

また疼痛緩和として、ファルネシル酸プレドニゾロンのようなステロイドの局所投与による炎症の軽減、及びヒアルロン酸(HA)の関節内注射もまた行われる。ステロイドは強い抗炎症作用があり、古くから治療に用いられてきた。開発された当初はその優れた炎症の抑制力から関節リウマチの特効薬として利用された。しかし、関節リウマチに対する効果は

限定的であり、またさまざまな副作用があるために、その使用はあくまで補助的なものとなっている^{14,15)}。

HA はもともと関節腔に存在する物質であり、関節液に富み関節運動を円滑にする。関節軟骨および半月板の成分でもあり、関節への影響を軽減する働きがある¹⁶⁻¹⁸⁾。HA を使用する関節疼痛緩和剤の例には、Synvisc®、Artz®、および Suvenyl®などがある。しかしこれらHA 製剤は、潤滑剤として疼痛の緩和はできるが、根本的な治癒には至っていない。

現在原因の究明と並行し、真の寛解に繋がる医薬品の開発が行われているが、効果的な薬物ベースの治療を行うため、そして全身的な副作用を抑制するためには、関節腔内局所に直接薬物を注射投与することが有効であると考えられる。

目的

現在製薬会社などで寛解に繋がる医薬品の開発が進められている。その中で、全身性の副作用が懸念されているため、関節腔内投与を行い疼痛治療や炎症抑制が試みられているものもある。しかし、動物における関節腔内注射製剤では、関節炎に対する薬物効果があまり確認されないことが問題になっている。

この原因として、関節液の関節腔外への循環が速く、また薬物の漏出が速いため、投与した薬物が関節腔内に留まらず、外部へ流出してしまっていると想定される。その結果、関節局所における薬物の有効濃度が十分な時間維持されなかったと考えられる。直接関節へ薬物を注射する製剤は現在無く、また関節腔内に投与した薬物の動態をモニタリングしたデータも少ない。

そこで我々は、薬物の関節腔内投与後の薬物循環をモニタリングする条件を検討し、関節腔内徐放性製剤開発に適用することを考えた。

我々は吸入剤開発研究等において、**real time in-vivo imaging system (IVIS)** を用いた蛍光イメージングによる薬物動態のモニタリングを行っている¹⁹⁻²⁰⁾。この IVIS を用いて、まず関節腔内投与後の薬物動態を検証することとした。モデル薬物には、蛍光物質として薬物動態研究で使用実績があり、水溶性の高く関節外への流出が速いと想定される、インドシアニングリーン (ICG) を用いることとした。ICG は分子量が 775 の蛍光分子で、肝循環機能検査薬や蛍光血管造影剤として用いられており、蛍光イメージングで薬物動態を確認するのに適した薬物である^{16,17)}。我々は ICG 含有製剤を調製し、ラット関節腔内投与後の ICG 薬物動態を検証することとした。

そしてモニタリングされたデータを基に、薬物の関節外への流出を抑制し、関節内に徐放をする製剤の開発を行うことにした。

徐放性製剤として、アーリーステージの化合物の薬理効果に用いることの出来る簡便な製剤と、将来の製品薬剤としても用いることのできる長期徐放製剤の開発を目指すこととした。そして簡便な徐放性剤として、マトリックス型徐放性ゲル製剤の開発を、長期徐放製剤として、乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) 粒子製剤を試みた (Fig. 2)。



Fig. 2. Image model of formulation.

マトリックス型徐放性ゲル製剤は、膨潤溶解性添加剤を用いた製剤で、徐々に表面から水分が浸透し溶解していく。そしてゲル層を通じて薬物が拡散する。ゲルの粘弾性による関節疼痛緩和の機能も期待されると同時に、簡便な処方設計性と安価な基材であることもあり、開発段階の初期ステージの化合物スクリーニングには適していると考えられる。

マトリックス型徐放性ゲル製剤の基剤には、ヒアルロン酸とメチルセルロースを用いた。

ヒアルロン酸は N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の鎖状構造からなる。大変強い保水力を有しており、1 g で 6 L の水を保持すると言われている。また非常に高い粘性と弾性が特徴であり、粘性と弾性はヒアルロン酸の濃度や分子量によって異なる。関節腔内にもともと存在する物質で、関節液の中に多く含まれ、関節の動きをスムーズにしている。また関節軟骨や半月版の構成成分でもあり、関節への衝撃を和らげる働きもある。

メチルセルロースは、マトリックス徐放性製剤の親水性基剤として汎用されている。比較的安価であり我々も徐放研究で取り扱った実績があり、一般的なセルロース系ゲル基剤の代表として用いた。

PLGA を始めとした生分解性ポリマーは、組織工学や薬物送達学の分野で重要な材料として研究が進められている。PLGA は他のどの生分解性ポリマーよりも幅広く研究されており、体内でエステル主鎖の加水分解によって無害の化合物に分解される。市販製剤として皮下投与注射剤のリュープリン[®]がある。ドラッグデリバリーシステム (DDS) 製剤研究に多く用いられており、長期な徐放性が期待され、将来製品化を想定した製剤としても有用であると考えられる。

そして最終的にはそれぞれの特性を生かした、PLGA/HA 2 段階徐放製剤の開発を試みた。PLGA 粒子をゲル基材で包み込むことで、粒子からの初期薬物流出を押さえ込み、粒子からゲル、ゲルから膝関節とよりスローなリリースが出来ると考えた。また膝関節内の異物感の軽減に繋がり、クオリティ・オブ・ライフ（以下 QOL）の向上にも繋がると思案した。

本研究では、ICG を含有した上述の製剤を検討し、薬物動態のモニタリングを行った。また局所徐放性の確認を関節内薬物残存量で確認する事にした。関節内残存量は、ICG の蛍光強度と、物抽出の 2 つの方法で検討を行った。

第 1 章では、ラット膝関節腔内投与後の薬物動態の確認のための手技の確立、ICG を用いたモニタリング条件の検討、また ICG 薬物水溶液を用いた薬物動態のモニタリングを行った研究について述べた。

また第 2 章では、簡易調製できるマトリックス型徐放性ゲル製剤の調製及び徐放性の確認を行った研究について述べた。

さらに第 3 章では、長期徐放と製品製剤を想定した PLGA 粒子製剤の調製、及びマトリックス型徐放性ゲル製剤と併用した 2 段階徐放製剤の開発を行い、そして徐放性の確認を行った研究について述べた。

以上の研究成果をまとめ、総合的な関節内徐放性製剤の設計技術の獲得を目指した。

II. 本論

第一章 関節腔内投与後の薬物動態の確認

1.1 緒言

関節腔は滑液で満たされている。滑液は主に関節包の内側にある滑膜の B 型滑膜細胞から産生される、高濃度ヒアルロン酸を含む粘稠性のある関節内腔液である。関節液が存在する関節腔は外側を関節膜に覆われており、この関節膜を通して関節液は関節腔外の血管と循環している²²⁾。関節腔はどの部位もあまり広い空間ではなく、最も広い膝関節内に存在する関節液の量も、正常で約 3~5ml といわれている。

人間の膝関節への薬剤投与方法や投与量は HA 注射剤などで確立されているが、ラットの関節腔は非常に狭く投与が難しい。また適切な量を投与しなければ、関節外に溢れ出してしまい正確なモニタリングができない。そして適切な濃度の ICG 溶液を投与しないと、IVIS による蛍光確認ができない。

そこで本研究の初期検討として、麻酔下のラットの膝関節に確実に投与できるよう、投与実習を行うと共に、関節部目視確認による投与手技確認を試みた。

また異なる濃度の ICG 溶液を投与し、IVIS による蛍光強度の確認を行い、適切な ICG 投与濃度条件の検証を行った。更に関節腔周辺及び全身の蛍光強度の経時変化を追跡し、投与後の ICG 動態を確認した。

1.2 実験方法

1.2.1 試薬、実験動物及び実験機器

投与する蛍光物質として、インドシアニンググリーン (ICG) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。溶解液には注射用水を大塚製薬工場株式会社 (徳島) から購入した。麻酔薬にはイソフルラン を DS ファーマアニマルヘルス株式会社 (大阪) から購入した。

ラット関節腔内への薬剤投与には、26 G × 1/2 (内径 0.45 mm × 13 mm) の針をテルモ株式会社 (東京) から購入し、HAMILTON 社 (ネバダ州レノ、米国) のマイクロシリンジに装着し用いた。

実験動物として、日本エスエルシー株式会社 (静岡) より 8 週齢の SD 系雄性ラット (体重約 250 g) を購入し、2 週間内 (8~10 週齢) に実験に用いた。本検討で実施した動物実験は、École Nationale Vétérinaire d'Alfort (Maisons-Alfort, Val-de-Marne, France) の倫理規定に従って行った。

薬物投与、動態の確認には、住商ファーマインターナショナル株式会社 (東京) 製の real time In-Vivo Imaging System (IVIS) を用いて蛍光強度の確認を行った (Fig. 3)。ICG 由来の蛍光を検出するために、745nm の励起フィルターと 820nm の発光フィルターを用い、露光時間を 1 秒とした。

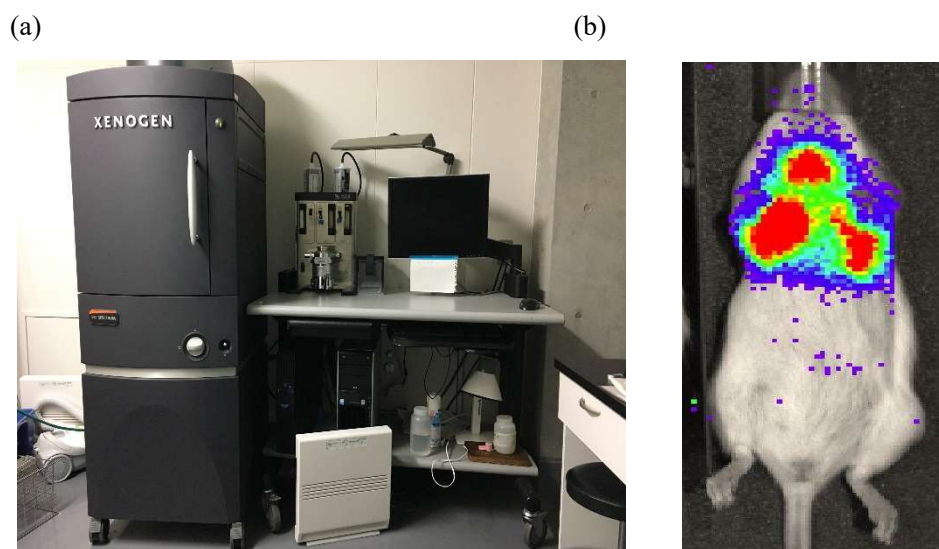


Fig. 3 (a) real time In-Vivo Imaging System (IVIS).

(b) Imaging pictures of pulmonary administration experiment by IVIS.

1.2.2 ラット膝関節腔内投与手技の確立と投与許容量の確認

ラット膝関節腔内への製剤の投与手技の確立と、関節腔内に投与できる薬剤の限界量の確認のための試験を行った。

投与薬剤として、ICG 1.0 mg を注射用水 1 mL に溶解させ、1.0 mg/mL の ICG 水溶液を調製し用いることとした。

最初に屠殺されたラットの膝関節を解剖し、ラットの膝関節の構造の確認を行った。そして注射位置である膝蓋腱の確認を行った(Fig. 4a)。また、注射針を実際に刺し、挿入角度、深度の確認も行った (Fig. 4b) 。次に気化させたイソフルランを吸引させ、麻酔下にした生きたラットの膝関節を触診し、膝蓋腱の位置を確認した。そして膝蓋腱に注射針を刺し、1.0 mg/mL の ICG 水溶液をそれぞれ、10、15、20、25、30 μ L、膝関節腔内に投与した。

投与後に再度気化させたイソフルランを吸引させ、麻酔下にしたラットを IVIS に装着し、膝関節腔内に ICG 溶液が入っているかイメージングによる確認を行った。また目視確認のため、ラットを屠殺し膝周りを切開、ICG 水溶液の注入状態を確認した。

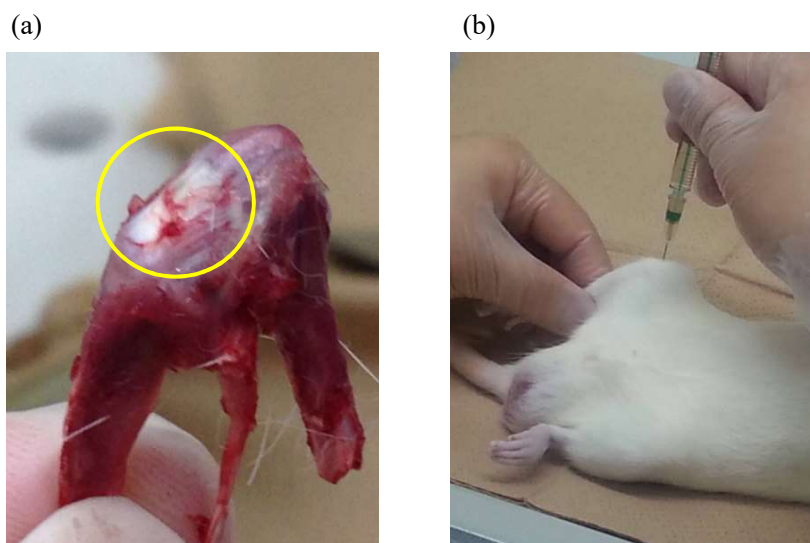


Fig. 4 (a) Dissected rat knee joint cavity and patellar tendon.

(b) Check the position of the patellar tendon of the knee joint cavity, and inject.

1.2.3 ICG 最適濃度の検討試験

ICG の蛍光による薬物動態を確認するための最適な濃度条件の検討として、0.5、1.0、2.0 mg/mL ICG 水溶液を調製し投与を行った。ICG を 0.5 mg、1.0 mg、2.0 mg 秤量し、それぞれを注射用水 1 mL に溶解させ、各濃度の ICG 水溶液を調製した。

気化させたイソフルランを吸引させ、麻酔下にした生きたラットの膝関節を触診し、膝蓋腱の位置を確認した。そして膝蓋腱に注射針を刺し、0.5 ~2.0 mg/mL ICG 水溶液をそれぞれ、2-2 の試験で確立した投与量を膝関節腔内に投与した。

投与後に、再度気化させたイソフルランを吸引させ麻酔下にしたラットを IVIS にセットし、イメージングによる薬物確認を行った。また投与後 1、3、6 時間後に再度イソフルランによる吸引麻酔をかけ IVIS にセットし、膝関節周辺を中心とした蛍光を確認した。

尚、IVIS の測定条件を Table.1.に示す。以降 IVIS での蛍光測定時にはこの条件を用いて実施している。

Table.1. Measurement conditions and analysis conditions of IVIS.

Measurement condition	Exposure time	1.00 sec
	binning	small
	F / stop	1
	Excitation filter	745
	Emission filter	820
Analysis conditions	Color scale Min	3.00×10^7
	Color scale Max	3.00×10^8

1.2.4 ICG 水溶液の動態確認試験

2-3 試験により確定した、蛍光測定の最適濃度の ICG 水溶液を、イソフルラン吸引麻酔下のラットの関節に投与した。そして再度吸引麻酔をかけ IVIS にセットし、イメージングによる目視確認、及び膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光を確認、蛍光強度を測定した。

また投与後 1、3、6 時間後に再度イソフルランによる吸引麻酔をかけ IVIS に装着し、膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光を確認、蛍光強度を測定した。

1.3 結果

1.3.1 膝関節腔内投与手技の確立と投与許容量の確認

ラット膝関節の構造確認及び手技の確立訓練を行った。反復訓練を行う事で、脱毛などを行わなくても膝関節の触診で膝蓋腱の位置を確認することができ、関節腔内に ICG 水溶液を注射することが出来るようになった (Fig. 5)。

同じ週齢でほぼ同じ体重でも、個体差により膝関節腔の形状や大きさやの差が見られ、また投与許容量の差が確認された。外観や体重が大きくても、25 μL 以上投与を行った場合、膝関節から漏れ出る個体も存在した。

複数のラットを用いて反復確認を行ったところ、投与量 20 μL までは殆どの固体の関節腔から薬液が漏れ出していないことが確認できた。そのため、以降の実験ではラット膝関節腔への投与量は 20 μL で実施することとした。

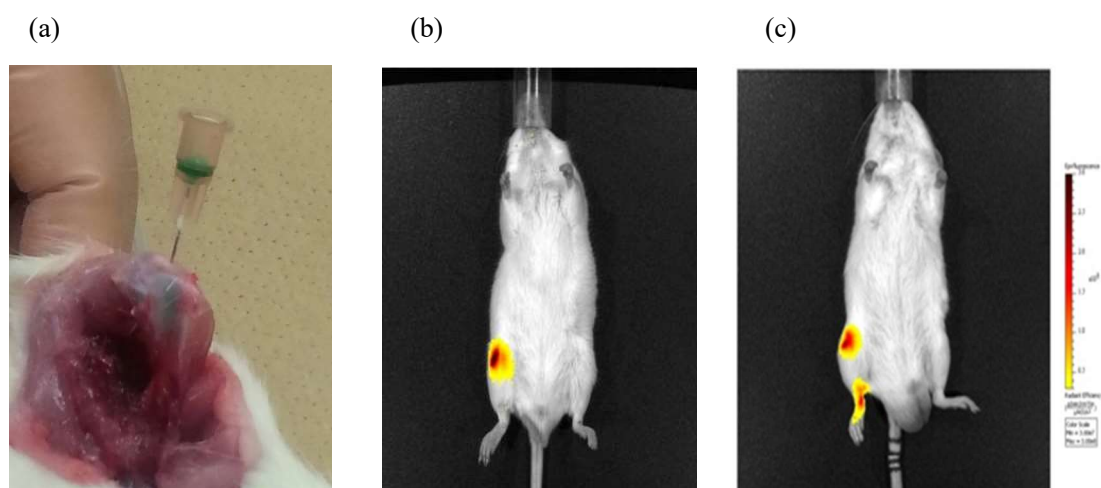


Fig. 5 (a) Anatomical photograph of knee part of rat after injection of ICG.
(b) Example of confirming the successful injection of joints by IVIS imaging.
(c) leaked out of the joint confirmed by IVIS imaging Example of injection failure.

1.3.2 ICG 最適濃度の確認試験

投与量が確定したので、次に薬物動態モニタリングに最適な濃度を検証する実験を行った。ICG の濃度が各 0.5、1.0、2.0 mg/mL の水溶液 20 μ L をそれぞれラット膝関節腔内に投与、IVIS によって蛍光による薬物動態を観察した (Fig. 6)。膝関節腔に注入された ICG は、投与後 1 時間程度で関節膜を通して関節腔外の血管へと移動した後肝臓へ移行し、胆汁排泄により小腸へと移行していることがイメージングによって確認された。

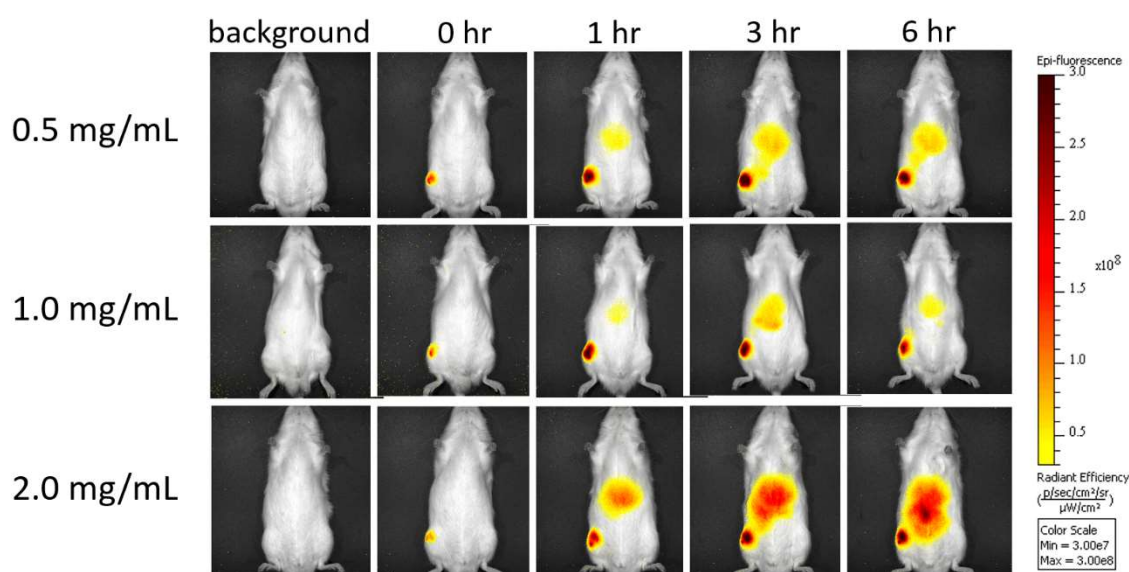


Fig. 6. Optical images of fluorescence derived from ICG intra-articularly administered in the rat knee joint as 0.5, 1.0, or 2.0-mg/mL solutions.

蛍光確認においては、2.0 mg/mL では濃度が高すぎるため蛍光強度が高く、広い範囲で蛍光が確認されてしまうため、肝臓移行後の動態確認が難しい事が考えられた。それに対し 0.5 mg/mL 及び 1.0 mg/mL では薬物動態の目視での観察が確認しやすく、また局所ごとの蛍光強度の測定が容易であると判断される結果が得られた。

ICG 濃度が 0.5 mg/mL と 1.0 mg/mL における試験結果の有意差は確認できなかったが、濃度が高い試験液の方が、製剤化した際に測定が行い易いと判断した為、以降の実験では、薬物含有量が高く、イメージングによる目視での動態観察、及び局所光量の測定に適していると判断された、1.0 mg/mL の濃度の製剤を調製し、検討を行うこととした。

1.3.3 ICG 水溶液の薬物動態確認試験

最適濃度と判断した 1 mg/mL の ICG 水溶液 20 μ L を麻酔下のラットの膝関節腔内に投与、IVIS を用いて、膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光強度を、投与直後、1、3、6、24、72、168 時間後に測定、イメージング写真による目視確認と蛍光強度を算出し、経時的な薬物動態を確認した(Figs. 7, 8)。

膝関節周辺の蛍光強度は投与後 1 時間でピークに達した。その後膝関節周辺の ICG の蛍光強度は経時的に弱くなり、24 時間でイメージングによる目視確認では、殆ど蛍光を観察できない状態となり、72 時間以内にほぼ消失した。蛍光強度測定においても、膝関節部の蛍光強度は 24 時間までに殆ど低下しており、168 時間後には消失している結果が得られた。

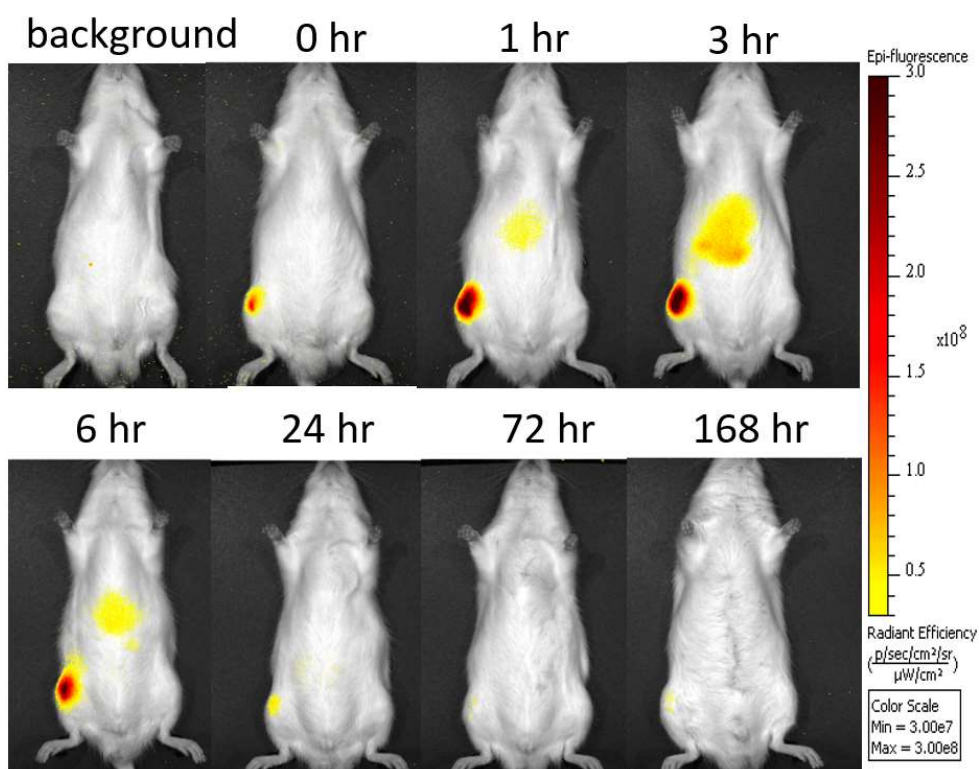


Fig. 7. Optical images of fluorescence derived from ICG intra-articularly administered in the rat knee joint as a 1.0-mg/mL solution.

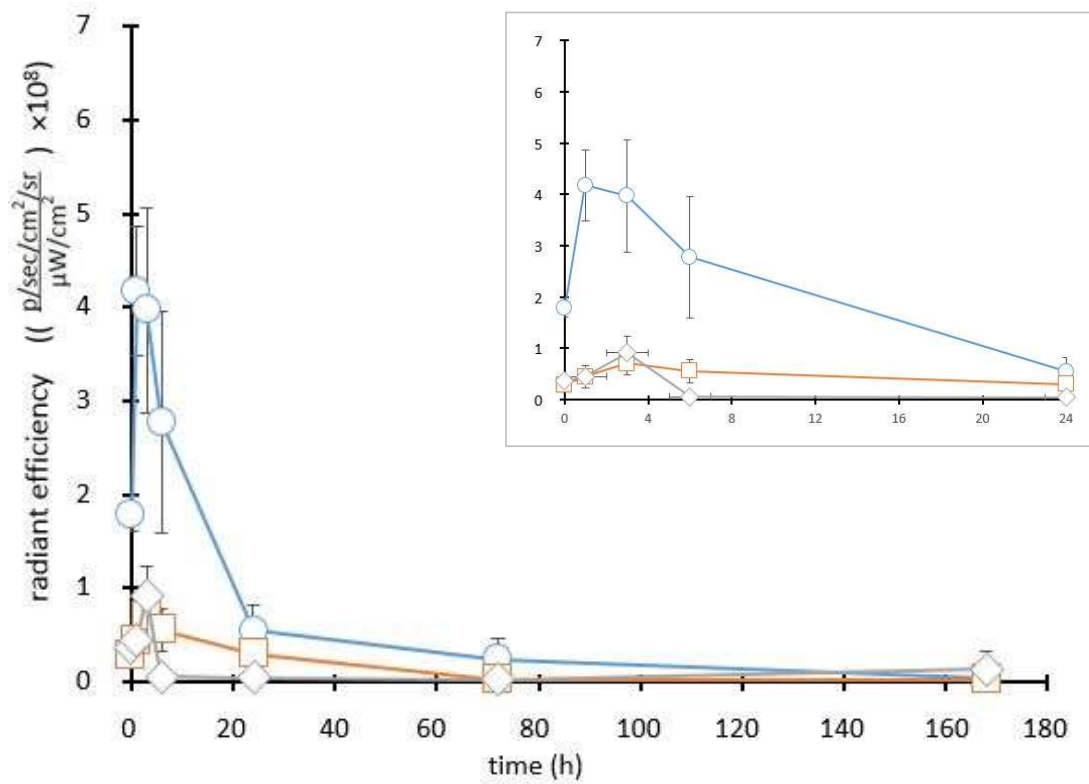


Fig. 8. Time-course of fluorescence intensity of ICG administered in the rat knee joint as a 1.0-mg/mL solution. Knee (○), liver (□), and intestine (◇). Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

1.4 考察及び小括

投与手技、および測定に適した測定条件の検討を実施したことで、ICG の経時的な薬物動態をイメージングによる目視確認、及び蛍光強度測定によってトレースできる試験体制が構築された。また、関節内に投与された薬物の体内挙動をモニタリングすることも成功した。

水溶液状態で膝関節に投与された ICG の蛍光強度は、投与後 1 時間でピークに達し、24 時間後には殆ど確認が出来なかった。この結果より、投与された ICG は膝関節腔からの漏出は速いこと、即ち関節空内滑液の外部との循環が非常に早いことが示唆された。滑液に分散した ICG の関節腔内滞留は 24 時間が限界であることが推察される。

ICG は分子量が 775 の非常に水溶性の高い薬物である。そのため滑液との親和性も高く、滑液の循環に乗って関節外へ流出するのは予測された結果であるが、ラットの滑液の循環が予想以上に早い事が確認されたため、水溶性が高い低分子化合物の水溶液は、膝関節外に流出することが同様に早いと想定される。勿論化合物の分子量や溶解性、特性によって流出速度は変化すると考えられるが、水溶液での関節腔内投与注射による薬物治療は、生体構造的に難しいと判断される。

水溶性の高い低分子薬物による有効な薬物治療のためには、関節内に長期的に留まる事ができる徐放性製剤の開発が必要であると、これらの結果で改めて示唆された。薬物を封入し徐々に崩壊できる基材や剤形は幾つかあるが、関節腔に収まりの良い剤形は限られてくる。将来の医薬品化を鑑みた検討を行うにあたり、生育や行動を阻害しない基材と剤形を模索する必要がある。その様な観点を基に、今回の初期実験で得られたデータを基に、ICG を長期的に徐放する事が出来る製剤の検討を行った。

第二章 マトリックス型徐放性ゲル製剤の調製及び徐放性の確認

2.1. 緒言

マトリックス型徐放性ゲル製剤は、膨潤溶解性添加剤を用いた製剤である。薬剤としては、主に徐放機能を持たせた経口製剤の徐放性基材として用いられている^{23,24)}。

日本薬局方に記載されているマトリックス素材としてはヒドロキシプロピルセルロース (HPC) やヒプロメロース (HPMC)、メチルセルロース (MC)、カルボキシメチルセルロース (CMC) などが用いられている。ポリマーによる徐放は主に経口投与剤として古くから実績があり、関節内製剤としての実績は殆ど無いが、放出挙動のコントロールは行いやすいと考えた。

また膝関節腔内の滑液の主成分であるヒアルロン酸ナトリウム (HA) も、高い保湿性を持つマトリックス機能を持つ物質である。主にヒアルロン酸注射剤として関節や皮下局所投与などが行われている^{25,26)}。ただ、これらはヒアルロン酸ゲルそのものの粘弾性によるクッション効果や膨潤性を狙ったものであり、薬物送達キャリアとして用いられることは少ない。しかし関節腔内であっても皮下であっても、長期滞留されているからこそ効果が発揮されているのであり、徐放性基剤として十分期待できると考えられる。またゲル製剤は、関節において物理的な疼痛緩和効果も期待されることから、本研究の目的に十分適したものであると考えた。

これら 2 種のマトリックス基材に薬物を封入したゲル製剤を調製、関節腔内投与し徐放する事を試みた。マトリックス基材で調製したゲル製剤は、分子量が高いほど製剤崩壊が遅く、徐放期間の長期化が期待できる。今回はポリマーの中でも、我々の研究室で徐放剤として使用実績のある、分子量約 140,000 のメチルセルロース 4000 cP グレードと、粉末で入手できた最高の分子量である、分子量約 2,000,000 (1,800,000~2,200,000) のヒアルロン酸ナトリウムを用いた製剤の検討を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬、実験動物及び実験機器

ゲル基剤として、メチルセルロース 4000 cP と、ヒアルロン酸 FCH-200 を用いた。メチルセルロース 4000 cP グレード (MC、分子量：約 140,000) は、和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。ヒアルロン酸 FCH-200 (HA、分子量：約 2,000,000) は、キッコーマンバイオケミファ株式会社 (東京) から購入した。

投与する蛍光物質として、インドシアニングリーン (ICG) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。溶解液には注射用水を大塚製薬工場株式会社 (徳島) から購入した。麻酔薬にはイソフルラン を DS ファーマアニマルヘルス株式会社 (大阪) から購入した。

ラット関節腔内への薬剤投与には、26 G × 1/2 (内径 0.45 mm × 13 mm) の針をテルモ株式会社 (東京) から購入し、HAMILTON 社 (ネバダ州レノ、米国) のマイクロシリンジに装着し用いた。

実験動物として、日本エスエルシー株式会社 (静岡) より 8 週齢の SD 系雄性ラット (体重約 250 g) を購入し、2 週間内 (8~10 週齢) に実験に用いた。本検討で実施した動物実験は、École Nationale Vétérinaire d'Alfort (Maisons-Alfort, Val-de-Marne, France) の倫理規定に従って行った。

薬物投与、動態の確認には、住商ファーマインターナショナル株式会社 (東京) 製の real time In-Vivo Imaging System (IVIS) を用いて蛍光強度の確認を行った (Fig. 3)。

2.2.2 ICG 含有徐放性 MC 製剤の調製方法

ICG 1.0 mg を注射用水 1 mL に溶解させ、1.0 mg/mL の ICG 水溶液を調製した。調製した 1 mg/mL の ICG 水溶液 1.0 mL に、メチルセルロース 4000 cP を 50 mg 攪拌しながら少量ずつ添加した。全量添加後に攪拌機をセットした減圧機の中に入れ減圧下で攪拌を行い、水溶液にメチルセルロースを完全に溶解させ、薬物含有ゲル製剤を得た。

2.2.3 ICG 含有徐放性 HA 酸製剤の調製方法

ICG 1.0 mg を注射用水 1 mL に溶解させ、1.0 mg/mL の ICG 水溶液を調製した。調製した 1 mg/mL の ICG 水溶液 1.0 mL に、ヒアルロン酸 FCH-200 50 mg を攪拌しながら少量ずつ添加した。全量添加後に攪拌機をセットした減圧機の中に入れ減圧下で攪拌を行い、水溶液にヒアルロン酸を完全に溶解させ、薬物含有ゲル製剤を得た。

2.2.4 ICG 徐放性ゲル製剤の蛍光強度測定による膝滞留性確認試験

ICG 含有マトリックス型徐放性ゲル製剤を、イソフルラン吸引麻酔下のラットの膝関節に投与した。そして投与直後に再度吸引麻酔をかけ IVIS にセットし、イメージングによる目視確認を行うと同時に、膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光強度を測定した。また投与後 1、3、6、24、72、168 時間後に再度イソフルランによる吸引麻酔をかけ IVIS に装着し、膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光強度を測定した。

2.2.5 ICG 徐放性ゲル製剤の薬物抽出定量法による膝関節腔内滞留確認試験

ラットに各製剤を投与後、168 時間の蛍光強度確認が完了するまで飼育した。168 時間の蛍光強度確認終了後に、二酸化炭素中毒によりラットを屠殺、解剖し膝関節を摘出した。摘出した膝関節を、関節腔に沿って切り開きながら 50mL の試験管に入れ、MeOH 4mL で洗い流すように加えた。その後超音波を適時当てながら攪拌を 30 分程行った。硫酸ナトリウム飽和液 4mL で取り出した膝関節を攪拌洗浄しながら加え、更に MeOH 20 μ L と酢酸エチル 4mL を加え攪拌した。攪拌後、遠心分離機 (10000rpm、10 分) で抽出液を分離し、上澄み液上澄み液を回収した。これを 2 度繰り返した。回収した上澄み液 10mL を試験管にとり、ヒートブロックで加温しながら窒素気流下で乾燥させた。乾燥後の残渣に注射用水を 1mL 加え溶解し、紫外可視分光光度計を用いて、吸光波長 784nm の条件で測定を行った。

ベースラインとして、薬物未含有の注射用水をラットの膝関節に投与、薬物と同じように抽出し乾燥工程を行い、注射用水を 1mL 加え攪拌したものを紫外可視分光光度計で、吸光波長 784nm の条件で測定を実施し、得られた値を引くことで補正した。

またこのベースライン抽出液を分注し、濃度が 20 μ g/ml、4 μ g/ml、2 μ g/ml、0.4 μ g/ml、0.2 μ g/ml となるように ICG を溶解、これらを紫外可視分光光度計で、吸光波長 784nm の条件で測定を行い、得られた値から検量線を引いた。

この検量線よりサンプルの薬物含有量を算出、膝関節腔内の薬物残存量をグラフにプロットした。

2.3 結果

2.3.1 減圧下におけるマトリックス型徐放性ゲル製剤の調製

当初はゲル製剤を調製後に薬物溶液を溶解する手法で検討を行った。しかしゲル基材の粘度が高く攪拌が難しく、均一な製剤の調製が困難であった。また膨潤性が高いため、体積が大きくなるという問題も発生した。調製方法を検討した結果、先に薬液を調製し、薬液に基材を加えゲル化させることで、均一な薬剤を作ると共に、製剤体積の維持を確立した。

また、常圧下で脱気せずに ICG 水溶液にゲル基材を溶解した場合、細かい気泡が混入し、ゲル製剤全体が白濁した(Fig. 9a)。この状態では、製剤の一定体積内の薬物含有量が減少すると共に、生体内に気泡を入れてしまう事になる。検討を重ねる中で、減圧下で攪拌をする事で、気泡の除去を行いながら製剤を調製する事に成功した(Fig. 9b)。減圧下で攪拌をしたものは製剤内の気泡は存在しない透明な製剤となった。これらの製法によって調製されたゲル製剤は、体内投与製剤として適していると考えられるため、以降のゲル製剤調製時には、本手法を用いて調製する事にした。

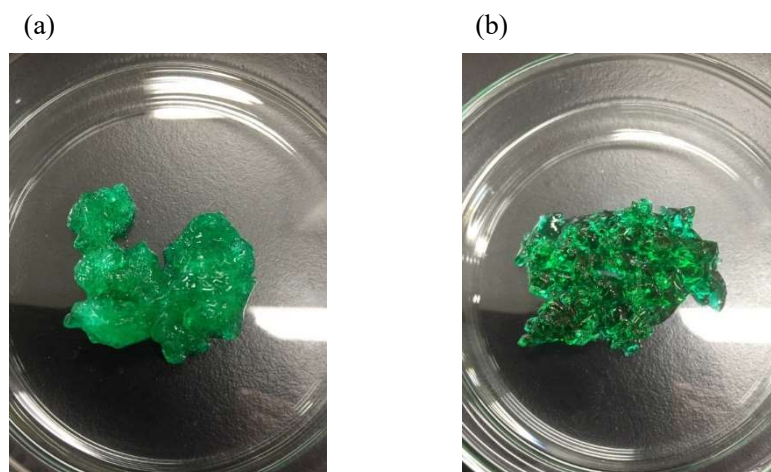


Fig.9. Appearance of gel formulation after preparation

(a) Gel formulation prepared under normal pressure without deaeration.

(b) Gel formulation prepared under reduced pressure with degassing.

2.3.2 ICG 含有徐放性 MC 製剤の膝滞留性確認

1 mg/mL の ICG 含有徐放性 MC 製剤 20 μ L を麻酔下のラットの膝関節腔内に投与し、膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光強度を、IVIS を用いて、投与直後、1、3、6、24、72、168 時間後に測定、イメージング写真による目視確認と蛍光強度を算出した(Figs. 10、11)。

膝関節周辺のイメージングによる目視蛍光確認は、投与後 1 時間で強い強度が確認された後、6 時間経過しても同様の状態が続いた。24 時間以降、経時的に蛍光は弱くなってはいるが、168 時間経過しても蛍光は確認された。

蛍光強度測定においては、投与後 6 時間で膝関節部に強い強度が確認された後、徐々に減少していったが、168 時間経過しても蛍光が確認された。また微弱ながら肝臓、小腸にも蛍光が確認されており、徐放により緩やかな ICG の移行が行われている事が示唆された。

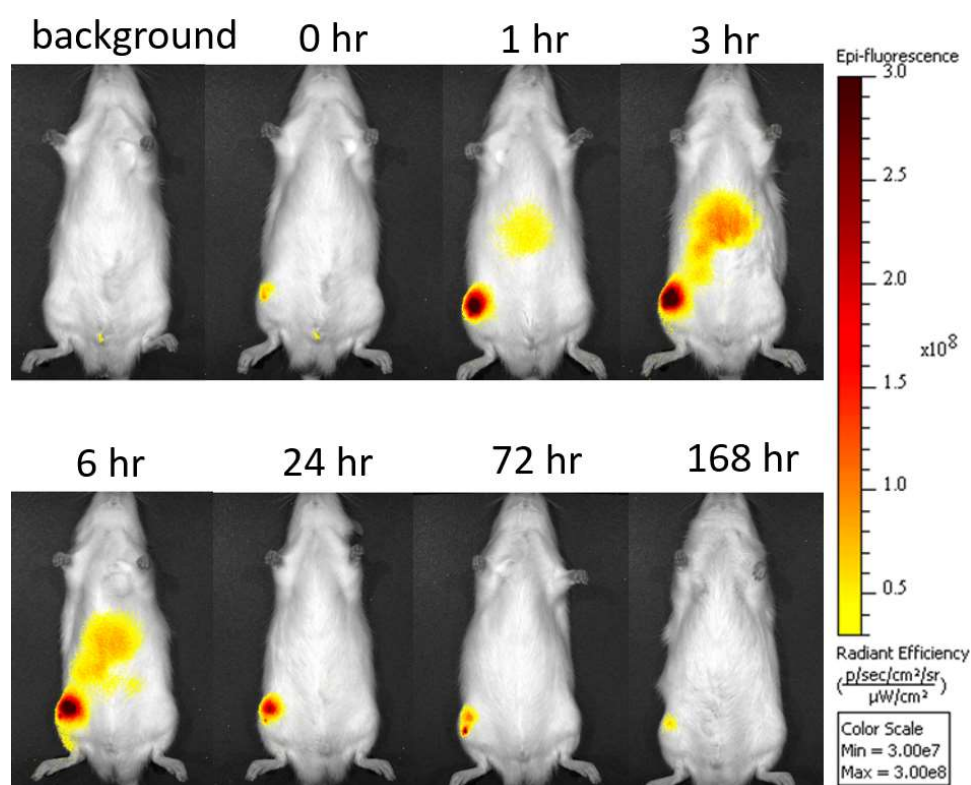


Fig. 10. Optical images of fluorescence derived from ICG intra-articularly administered in the rat knee joint as a 1.0-mg/mL MC gel formulation.

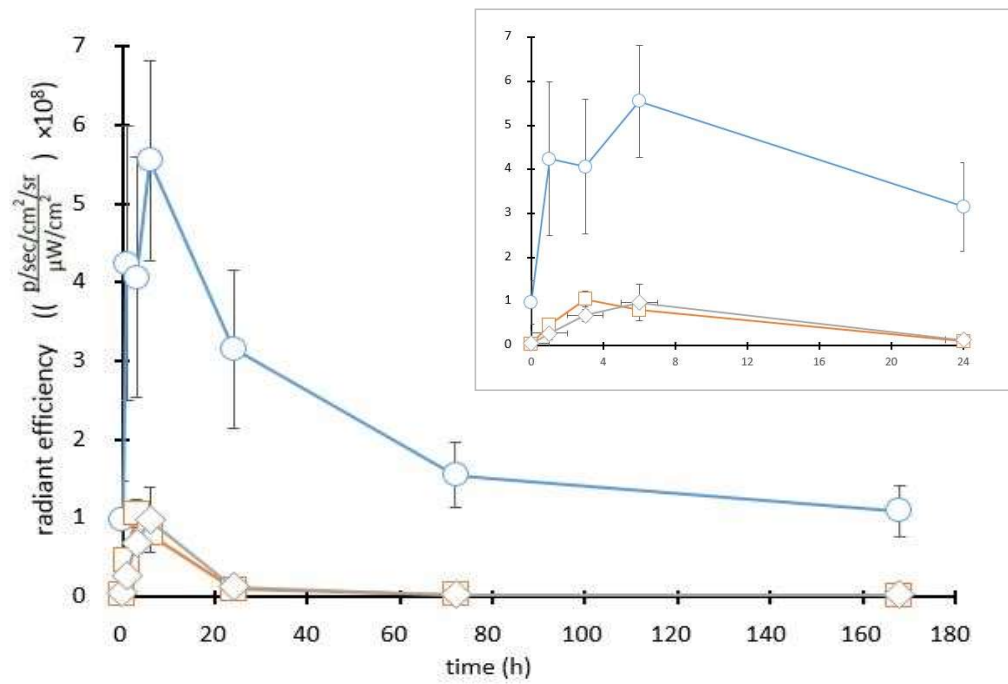


Fig. 11 Time-course of fluorescence intensity of ICG administered in the rat knee joint as a 1.0-mg/mL MC gel formulation. Knee (○), liver (□), and intestine (◇). Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

2.3.3 ICG 含有徐放性 HA 製剤の膝滞留性確認

1 mg/mL の ICG 含有徐放性 HA 製剤 20 μ L を麻酔下のラットの膝関節腔内に投与し、膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光強度を、IVIS を用いて、投与直後、1、3、6、24、72、168 時間後に測定、イメージング写真による目視確認と蛍光強度を算出した(Figs. 12、13)。

膝関節周辺のイメージングによる目視蛍光確認は、MC ゲル徐放性剤と同様に投与後 1 時間で強い強度が確認された後、6 時間経過しても同様の状態が続いた。この製剤も 24 時間以降経時的に蛍光は弱くなってはいるが、168 時間経過しても蛍光は確認された。

蛍光強度測定においても MC ゲル徐放性剤同様に、投与後 6 時間で膝関節部に強い強度が確認された後徐々に減少していったが、168 時間経過しても蛍光が確認された。またこの製剤も微弱ながら肝臓、小腸にも蛍光が確認されており、徐放により緩やかな ICG の移行が行われている事が示唆された。

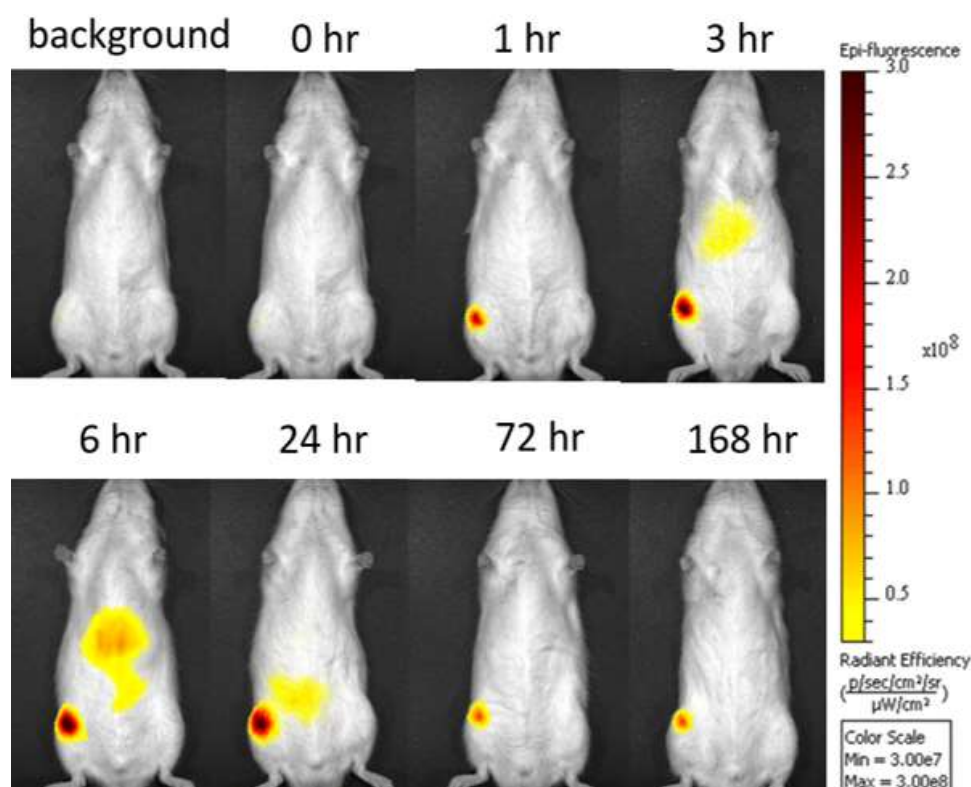


Fig. 12 Optical images of fluorescence derived from ICG intra-articularly administered in the rat knee joint as a 1.0-mg/mL HA gel formulation.

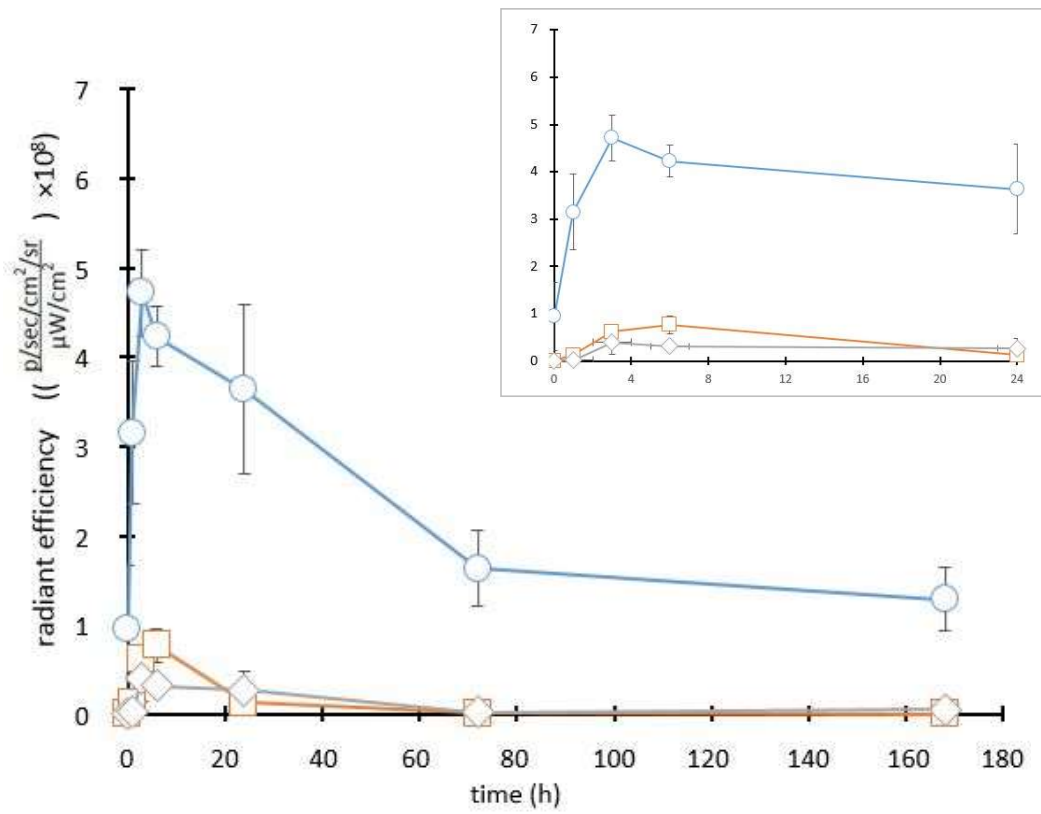


Fig. 13. Time-course of fluorescence intensity of ICG administered in the rat knee joint as a 1.0-mg/mL HA gel formulation. Knee (○), liver (□), and intestine (◇). Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

2.3.4 ICG 蛍光強度による製剤間徐放性比較

膝関節部の蛍光強度のグラフを一元化し、製剤間の膝関節腔内の薬物残存量の比較を行った (Fig. 14)。

ICG 水溶液は投与後 1 時間でピークに達した後、24 時間以内に薬物はほとんど膝関節外に漏出している結果となった。ピークが投与後より 1 時間後の蛍光値が高い理由は、投与直後よりも 1 時間後に膝関節内に薬物が行き渡り、蛍光が強く測定されたものと考えられる。それに対し、ICG 含有マトリックス型徐放性ゲル製剤は、HA、MC 共に投与後 6 時間経過した時の蛍光が最も高い値となった。これは投与後徐々に薬物が関節腔内に行き渡り、6 時間後が最も関節内に行き渡ったと考えられる。

これらの結果より、ICG 含有マトリックス型徐放性ゲル製剤は、HA、MC いずれも水溶液よりも膝関節腔における滞留性が良いことが示された。

しかし、今回の実験では 2 つのマトリックス型徐放性ゲル製剤間の滞留性には、有意差がほぼ確認できない結果となった。

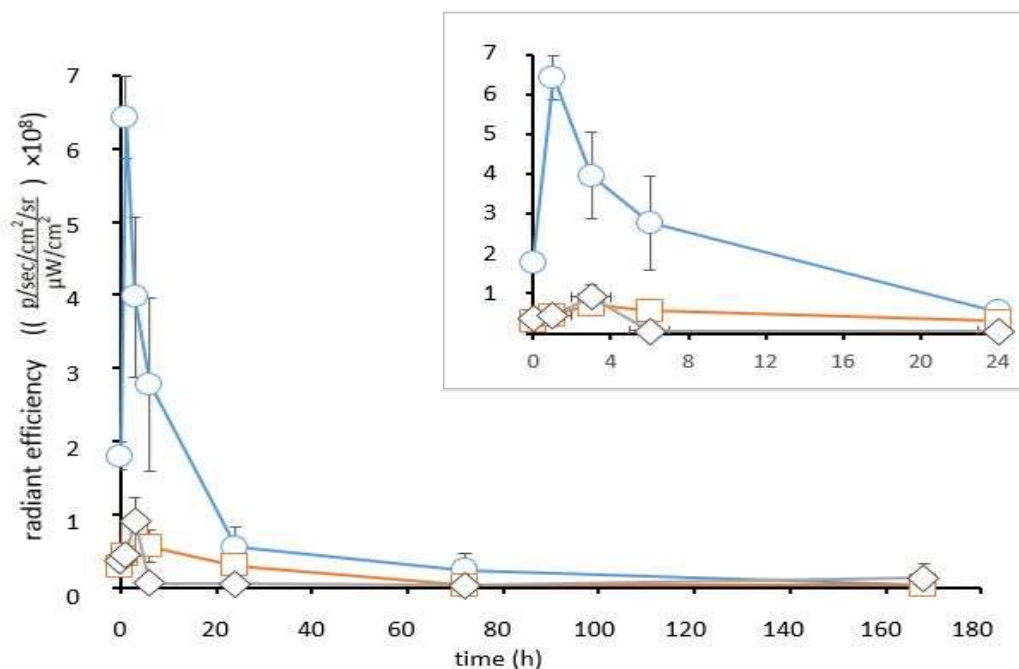


Fig. 14. Time-course of the fluorescence intensity of ICG administered in the rat knee joint as an aqueous solution (○), MC gel formulation (□), and HA gel formulation (◇). Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

2.3.5 ICG 徐放性ゲル製剤の薬物抽出定量法による膝関節腔内滞留確認試験

抽出した膝関節の薬物残存量を作成した検量線から算出し、グラフに一元化した(Fig. 15)。ICG 水溶液は、投与直後から急速に関節外に漏出し、24 時間後にはほとんど薬物が残留していないことが確認された。それに対し、HA ゲル製剤と MC ゲル製剤は共に、4 時間後にも薬物が確認され、微量ながら 1 週間後も薬物が残存していることが確認された。薬物残存量の比較試験においても、ゲル製剤中の ICG は水溶液中よりも膝関節に長時間留まり、徐々に関節外に流出されていることが確認された。

しかし抽出定量による実験においても、2つのマトリックス型徐放性ゲル製剤間の滞留性には、統計的な有意差が確認できない結果となった。

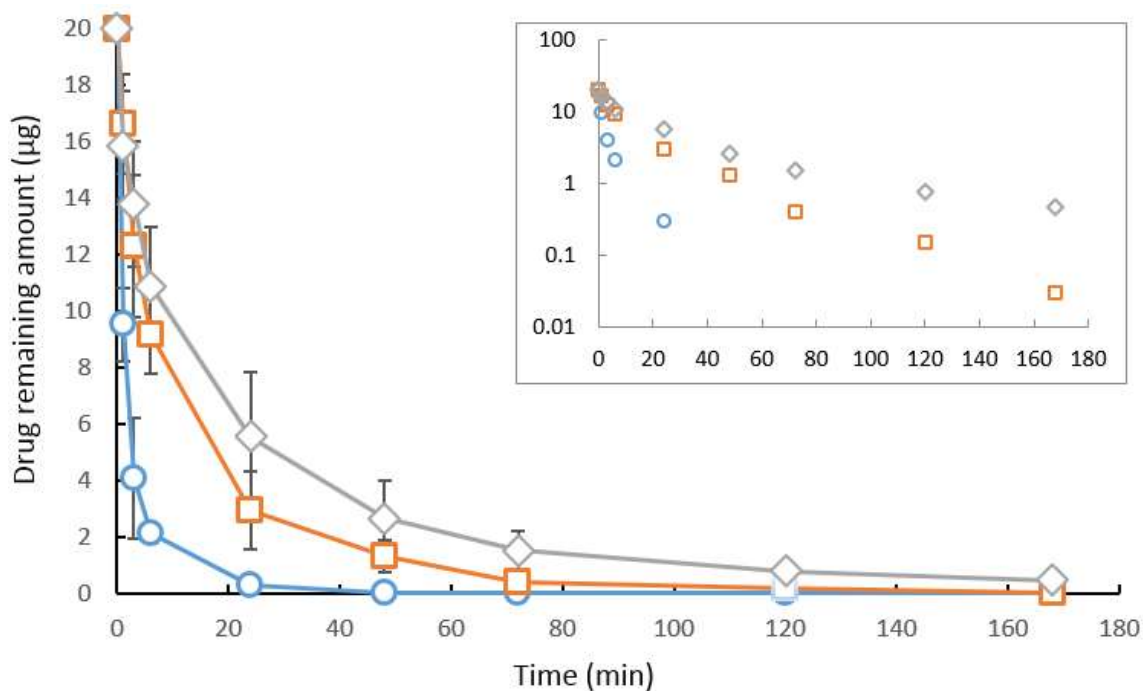


Fig. 15 Time-course of the remaining amount of ICG administered in the rat knee joint as an aqueous solution (○), MC gel formulation (□), and HA gel formulation (◇). Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

2.4 考察及び小括

ICG 含有マトリックス型徐放性ゲル製剤は、ICG 水溶液と比較し、関節局所蛍光測定法においても、薬物抽出定量法による膝関節腔内滞留確認試験においても、膝関節腔における滞留性が良く、また薬物の徐放、関節滞留が行なわれていることが示された。また 1 週間後に抽出処理のため、膝を切開した時においても、膝関節内に粘性の高いゲル製剤が残留していることも確認された。これらの結果から、マトリックス型徐放性ゲル製剤は関節内徐放に適した剤形であると考えられる。

今回の試験では、メチルセルロースを用いた製剤と、ヒアルロン酸ナトリウムを用いた製剤の徐放性の明確な差異は確認できなかった。関節局所蛍光測定では蛍光量の顕著な差異が測定できず、また抽出による残留薬物測定においては、HA ゲル製剤は MC ゲル製剤と比較し ICG を多く残留している傾向にはあったが、検出量が微量であるため大きな差異が確認できず、共に統計学的には有意な差は確認できなかった。

今回粘度は共に約 $50,000\text{mPa}\cdot\text{s}$ を超えており、正確な測定を行うことが出来なかったが、共に近似の粘度を持っている。しかし分子量、保湿性においては HA の方が高く、関節液の流出、及び外部血管との循環を考慮すると、HA の方が理論的にも加水分解は遅く、長期製剤保持が出来ると考える。

生体物質でもある HA ゲル製剤が関節腔内への注射剤として最適と考え、以降の検討にはヒアルロン酸ナトリウムを基材としたマトリックス型徐放性ゲル製剤を調製し用いることにした。

第三章 PLGA/HA 2 段階徐放製剤の調製及び徐放性の検証

3.1 緒言

これまで検討したゲル製剤は調製が簡便であり、ICG の膝関節腔内徐放効果が認められたが、将来の医薬品化を考慮するとより長期的な薬物放出が望まれる。

そこで長期徐放性製剤として、生分解性ポリマーであるポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) を用いた微粒子徐放製剤を検討した。PLGA 微粒子製剤は臨床使用されており²³⁾、DDS 研究においても多くの発表がなされている²⁴⁻³⁰⁾。

今回の投与部位である関節腔内では、粒子径が大きい場合、薬物含有量も多く長期徐放性の可能性が期待できる反面、屈伸等の膝関節の動作時に異物感を感じ、動きの制約が出てしまう可能性がある。一方粒子径を小さくしていくと、比表面積の増大により薬物放出速度が大きくなり、徐放性が低下する可能性がある。また関節膜を通過できるサイズとなり、徐放されることなく粒子のまま流出していく可能性も懸念される。

今回はラットの患部の違和感の軽減と徐放性を鑑み、メジアン径の D50 が 1 μm の粒子を目標として調製することにした。

また、先に検討した HA ゲル徐放性基剤中に PLGA 微粒子を分散させた併用製剤も検討した(Fig.16)。この製剤では、PLGA 微粒子製剤からの薬物放出を抑え、PLGA 微粒子から HA ゲル層、そしてゲル層から関節腔外への 2 段階の徐放が可能と考えられた。また微粒子製剤の関節腔内での異物感を緩和できる効果も期待できる。

それぞれの ICG 含有製剤を調製しラットの膝関節腔に投与、IVIS により薬物の動態及び関節腔内の薬物残留を観察した。

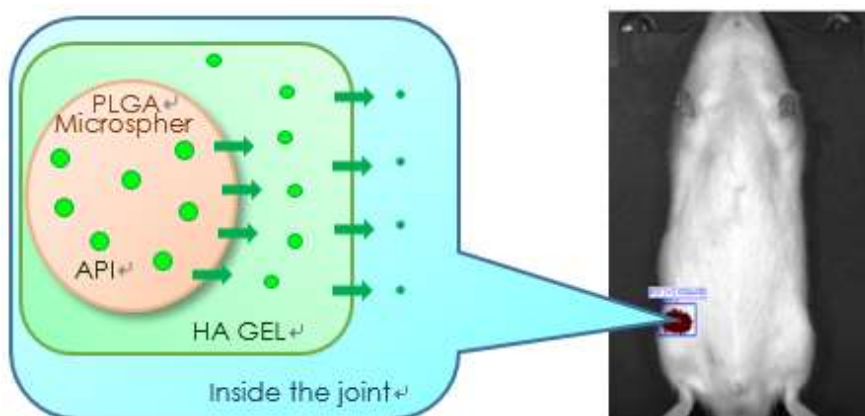


Fig. 16. Image model of PLGA /HA Gel formulation.

3.2 実験方法

3.2.1 試薬、実験動物及び実験機器

ゲル基剤として、ヒアルロン酸 FCH-200 (HA、分子量：約 2,000,000)を、キッコーマンバイオケミファ株式会社（東京）から購入して使用した。PLGA には乳酸とグリコール酸比率が 50:50 のグレード を Sigma-Aldrich Japan 社（東京）から購入して使用した。

投与する蛍光物質として、インドシアニングリーン（ICG）は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。溶解液には注射用水を大塚製薬工場株式会社（徳島）から購入した。麻酔薬にはイソフルラン を DS ファーマアニマルヘルス株式会社（大阪）から購入した。ラット関節腔内への薬剤投与には、26 G × 1/2 (内径 0.45 mm×13 mm) の針をテルモ株式会社（東京）から購入し、HAMILTON 社（ネバダ州レノ、米国）のマイクロシリンジに装着し用いた。

実験動物として、日本エスエルシー株式会社（静岡）より 8 週齢の SD 系雄性ラット（体重約 250 g）を購入し、2 週間内（8～10 週齢）に実験に用いた。本検討で実施した動物実験は、École Nationale Vétérinaire d'Alfort (Maisons-Alfort, Val-de-Marne, France) の倫理規定に従って行った。

粒子調製のための攪拌には、OMNI International 社（東京）の OMNI TH を用いた。

凍結乾燥は、東京理化学器械株式会社（東京）の凍結乾燥機 FDU-2100 を用いて行った。

粒子の形状確認には、日本電子社（東京）の走査型電子顕微鏡 (SEM)JSM – 6060 を用いて行った。また粒子径の測定には、マルバーン社（マルバーン、英国）のゼータサイザーナノ ZS を用いて測定した。振とう器はヤマト科学製の MK201D を用いた。

薬物投与、動態の確認には、住商ファーマインターナショナル株式会社（東京）製の real time In-Vivo Imaging System (IVIS) を用いて蛍光強度の確認を行った。

薬物の定量には、島津製作所製の紫外可視分光光度、UV-1800 を用いて測定を行った。

3.2.2. PLGA 粒子製剤の調製方法

PLGA 微粒子製剤は水中エマルジョン溶媒拡散法にて調製した³¹⁻³²⁾。PLGA を 100 mg 秤量し、ジクロロメタンで溶解した。同時に ICG 100 mg を注射用水：エタノール = 4 : 1 の混合液 1 mL で溶解、PLGA 溶液と混和し、ICG/PLGA 溶液を調製した。粒子形成のための貧溶媒として、Milli-Q 水 100 mL にポリビニルアルコール (PVA) 10 g を、攪拌しながら加え溶解した。PVA 溶液を攪拌器で 10000 rpm で攪拌し、液中の攪拌器の先端に ICG/PLGA 溶液を注射筒でゆっくりと加えた。添加が終わった後に PVA 溶液をファルコンチューブに分取し、10000 rpm で遠心分離を行った。その後上澄み液を廃棄し、Milli-Q 水を加え攪拌分散、遠心分離を 3 回繰り返した。3 回目の遠心分離の後上澄み液を廃棄し、残渣に Milli-Q 水を 10 mL 加え冷凍庫 (-20°C) にて冷凍した後、凍結乾燥を行うことで PLGA 粒子を得た。

凍結乾燥は、凍結乾燥機 (FDU-2100; 東京理化工学株式会社) を用いて、最終真空度 5 Pa 未満、乾燥棚温度 -40°C、乾燥時間 24 時間に条件を設定し行った。

3.2.3. SEM を用いた粒子表面の確認と粒子径の測定

調製した ICG 含有 PLGA 粒子製剤を、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて粒子形状を確認した。各試料は黒色両面テープを貼付した試料台にマイクロスパーテルを用いて直接付着させた。その後プラチナコーティングを 30 mA にて 90 秒間行った。コーティングした粒子を SEM にて観察した。

また PLGA 粒子を注射用水に懸濁し、ゼータサイザーナノ ZS を用いて粒子径を測定した。

3.2.4. PLGA 粒子の ICG 薬物含有量の測定

ICG 含有 PLGA 微粒子を 10mg 秤量し、小型試験管内で微量のジクロロメタンに溶解させた。完全に溶解したことを確認した後、ヒートブロックで加温しながら窒素気流下で乾燥させた。乾燥した小型試験管に精製水を 1ml 加え溶解、その後遠心分離を行い、上澄み液を採取した。採取した上澄み液を、紫外可視分光光度計により吸光波長 784nm で測定を行った。

また、濃度が 20 µg/ml、4 µg/ml、2 µg/ml、0.4 µg/ml、0.2 µg/ml となるように ICG を精製水に溶解した検量線用サンプルを調製、これらを紫外可視分光光度計にて、吸光波長 784nm の条件で測定を行い、得られた値から検量線を引いた。この検量線よりサンプルの薬物含有量を算出した。

3.2.5. PLGA/HA 2 段階徐放製剤の調製方法

ICG 含有 PLGA 微粒子を注射用水溶液に分散し、20 mg/mL 分散液を調製した。次に分散液 1.0 mL に対し HA 粉末 10 mg を攪拌しながら少量ずつ添加した。全量添加後、減圧下で攪拌を行い、HA ゲルを形成させると共に、ゲルの中に PLGA 粒子を分散、内包させた。

3.2.6 PLGA/HA 2 段階徐放製剤の初期バースト抑制確認試験

精製水に分散した PLGA 微粒子製剤と PLGA/HA ゲル製剤をチューブの中に入れ、IVIS により写真撮影を行った。その後振とう器にて 3 時間、50rpm の速度で振とうを行った。1 時間及び 3 時間後に遠心分離を行い、PLGA 粒子を沈降させ、再度 IVIS により上澄み液の蛍光強度を確認する事で ICG の漏出度合いを確認した。

3.2.7 シンク型拡散セルを用いた溶出試験

特製のテフロン製のシンク型拡散セルを用いて、5mg/mL 懸濁液及び 0.75%HA ゲル中の ICG 含有 PLGA マイクロスフェアについて ICG 溶出試験を行った (Fig.17)。メンブレンフィルター (0.1 μ M、Omnipore (商標) Membrane Filters、Merck Millipore、Germany) をドナーセルボックスとレセプターセルボックスとの間に挟み、スターラーバーをレセプターセルボックスに入れた。次に 1mL の精製水を、シリンジを用いて受容レセプターセルボックスに注入した。その後サンプルをドナーセルに入れキャップをした。組み立てられたセルボックスを、37 $^{\circ}$ C の恒温水槽中に入れてスターラーバーを回転させ攪拌した。その後所定の感覚注射器を用いてレセプター細胞から所定の間隔でサンプルの全量を回収し、同量の精製水を注入した。回収したサンプルの 784nm の吸光度を分光光度計で測定し、ICG を定量した。サンプルは各 3 回試験を行い、グラフにプロットし比較をした。

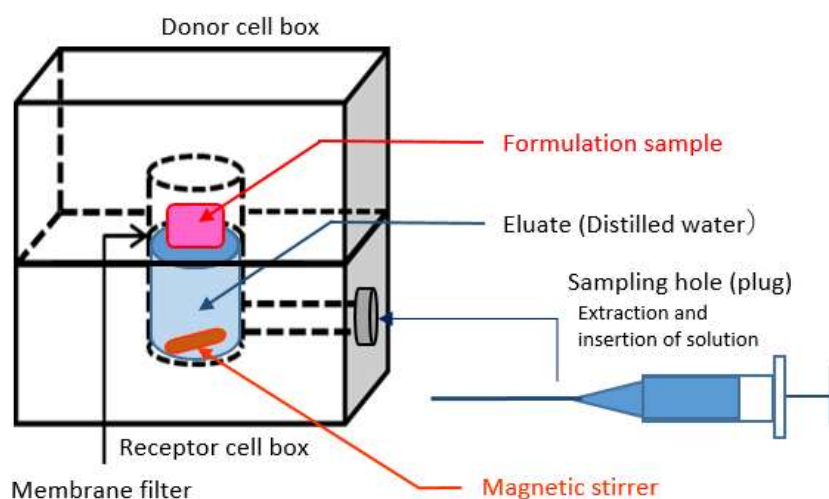


Fig.17. Simplified diagram of sink type diffusion cell dissolution tester.

3.2.8 PLGA 微粒子製剤と PLGA/HA 2 段階徐放製剤の ICG 蛍光強度測定による製剤間の徐放性比較

イソフルラン麻酔下のラット右膝関節腔に、PLGA 微粒子製剤及び PLGA/HA ゲル製剤を 20 μ L 注射し、投与直後、1、3、6、24、72、168 (1 週)、336 (2 週)、504 (3 週)、672 (4 週) 時間後に IVIS で膝関節周辺の蛍光を測定した。

調製した ICG 含有 PLGA 微粒子製剤と PLGA/HA ゲル製剤を、イソフルラン吸引麻酔下のラットの関節に投与した。そして再度吸引麻酔をかけ IVIS にセットし、イメージングによる目視確認、及び膝関節周囲の蛍光強度を測定した。

3.2.9. 製剤投与一ヶ月後の膝断面の ICG 蛍光分布の比較

製剤投与後 672 (4 週)時間経過したラットを屠殺、解剖し膝関節を摘出した。

摘出した膝関節の関節包を取り除き、常温にて乾燥を行った。乾燥後関節を両断、乾燥状態では ICG の発光が確認できないため、切断面を精製水で軽く濡らし IVIS にセット、膝関節断面の蛍光強度を測定した。

3.3 結果

3.3.1. SEM を用いた粒子表面の確認と粒子径の測定、ICG 薬物含有量の測定

凍結乾燥後、得られた PLGA 微粒子製剤の粒子形状及び粒子表面を SEM にて確認した。PLGA 微粒子製剤滑らかな球状粒子を形成していた (Fig. 18)。ゼータサイザーを用いて粒度分布を測定した結果、PLGA 微粒子製剤のメジアン径 D50 は、 $2.3 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ($n=3$ 、平均 \pm SD) であった。

また、紫外可視分光光度計で測定されたデータを、検量線よりサンプルの薬物含有量を算出したところ、PLGA 粒子に含まれる ICG の割合は 18.02w/w% であった。

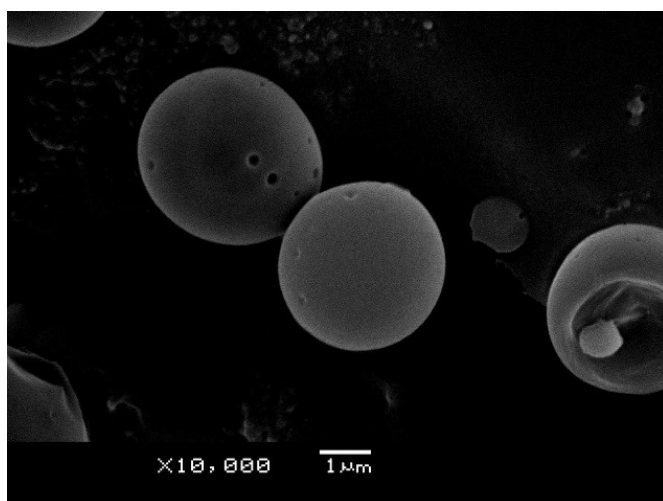


Fig.18. Observation of PLGA microspheres by SEM

3.3.2 PLGA/HA 2 段階徐放製剤の初期バースト抑制確認

PLGA 粒子製剤から注射用水及び HA ゲルへの ICG の初期薬物放出を、簡易的な *in vitro* 溶出試験で確認を行った (Fig.19)。PLGA 粒子製剤に水を加えた場合は、蛍光が直ちに確認された (Fig.19b)。振動が開始してから 1 時間後に水中で蛍光が確認され (Fig.19d)、3 時間後に強い蛍光が確認された (Fig.19f)。逆に、HA ゲルを添加した場合、最初の 1 時間は蛍光が確認できず (Fig.19a、c)、3 時間後にはゲル全体の弱い蛍光が確認された (Fig.19e)。これは、薬物の放出が HA ゲルによって持続されたことを示唆している。

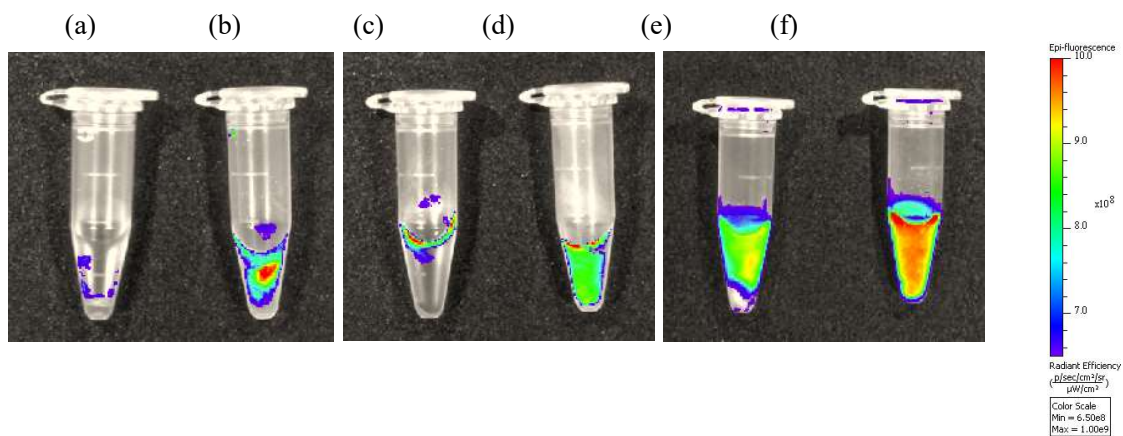


Fig. 19. Comparison of drug release into water and gel of PLGA formulation.

(a) PLGA / HA gel initial, (b) PLGA / water initial, (c) PLGA / HA gel, rocking 1 hr, (d) PLGA / water rocking 1 hr, (e) PLGA / HA gel, rocking 3 hr, and (f) PLGA / water, rocking 3 hr.

3.3.3. シンク型拡散セルを用いた溶出試験

特殊な溶出試験機で行われた ICG 溶出量を、グラフにまとめ比較した (Fig.20)。ICG 含有 PLGA マイクロスフェアの懸濁液は、ICG / HA 0.75%ゲル処方よりも、ICG はゆるやかに溶出した。さらに ICG 含有 PLGA マイクロスフェアの懸濁液に HA を添加して 0.75%ゲル製剤を製造することにより、溶解をさらに遅くすることができた。水溶液と比較して、PLGA 懸濁液および HA ゲル調製物は、ICG の持続放出を抑制することが示唆された。そしてそれらを併用した PLGA / HA ゲル製剤を用いる事で、更に溶出の抑制が可能であることが示唆された。

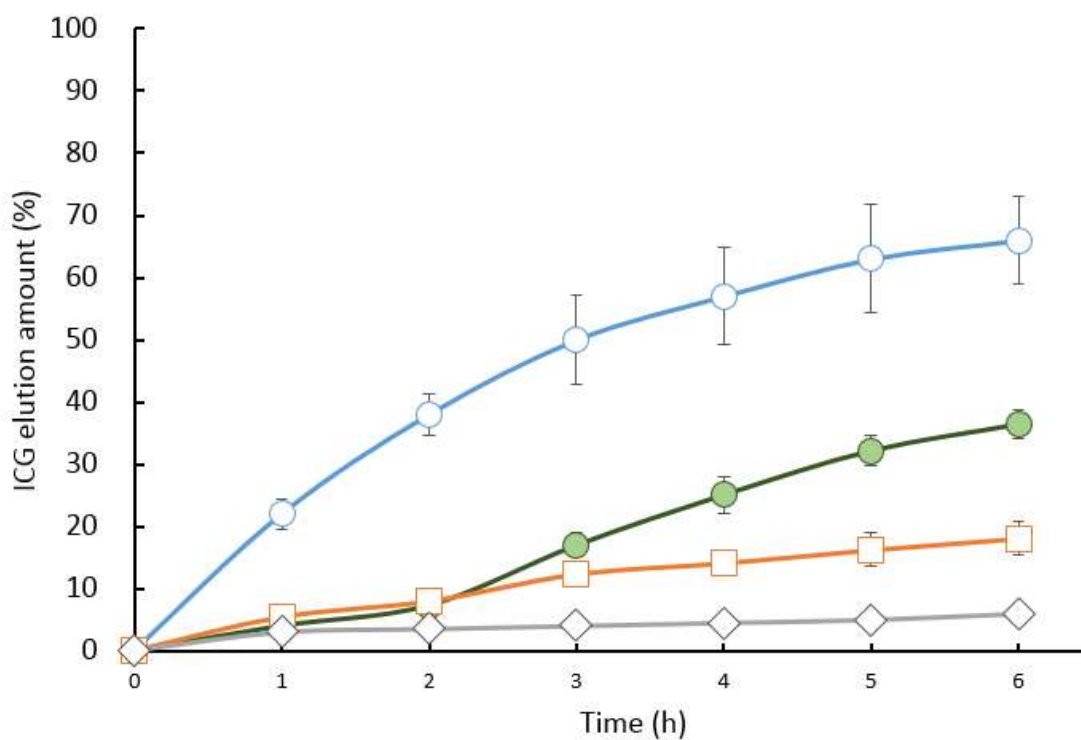


Fig.20. Amount of ICG eluted from an aqueous solution (○), 0.75% HA gel formulation (●), PLGA aqueous suspension (□), and PLGA / 0.75% HA gel formulation (◇). Each value represents the mean \pm SD (n = 3).

3.3.4 PLGA 微粒子製剤と PLGA/HA2 段階徐放製剤の、ICG 蛍光強度測定による製剤間の徐放性比較

PLGA 微粒子製剤及び PLGA/HA ゲル製剤をラット右膝関節腔に注射し、投与直後、1、3、6、24、72、168(1 週)、336(2 週)、504(3 週)、672(4 週) 時間後に、IVIS で膝関節周辺、肝臓、小腸の蛍光を観察した(Figs. 21,22)。PLGA に封入したことにより IVIS 画像による蛍光の観察は難しかったが、約 1 ヶ月間蛍光を観察することができた。このことから前章等で検討を行ってきた徐放性ゲル製剤よりも、より PLGA 製剤は長期間徐放化できることが示された。

PLGA/HA Gel 製剤は PLGA 製剤と比較し、より長期的な徐放をしているような傾向が確認されたが、統計的な有意差は確認できなかった。

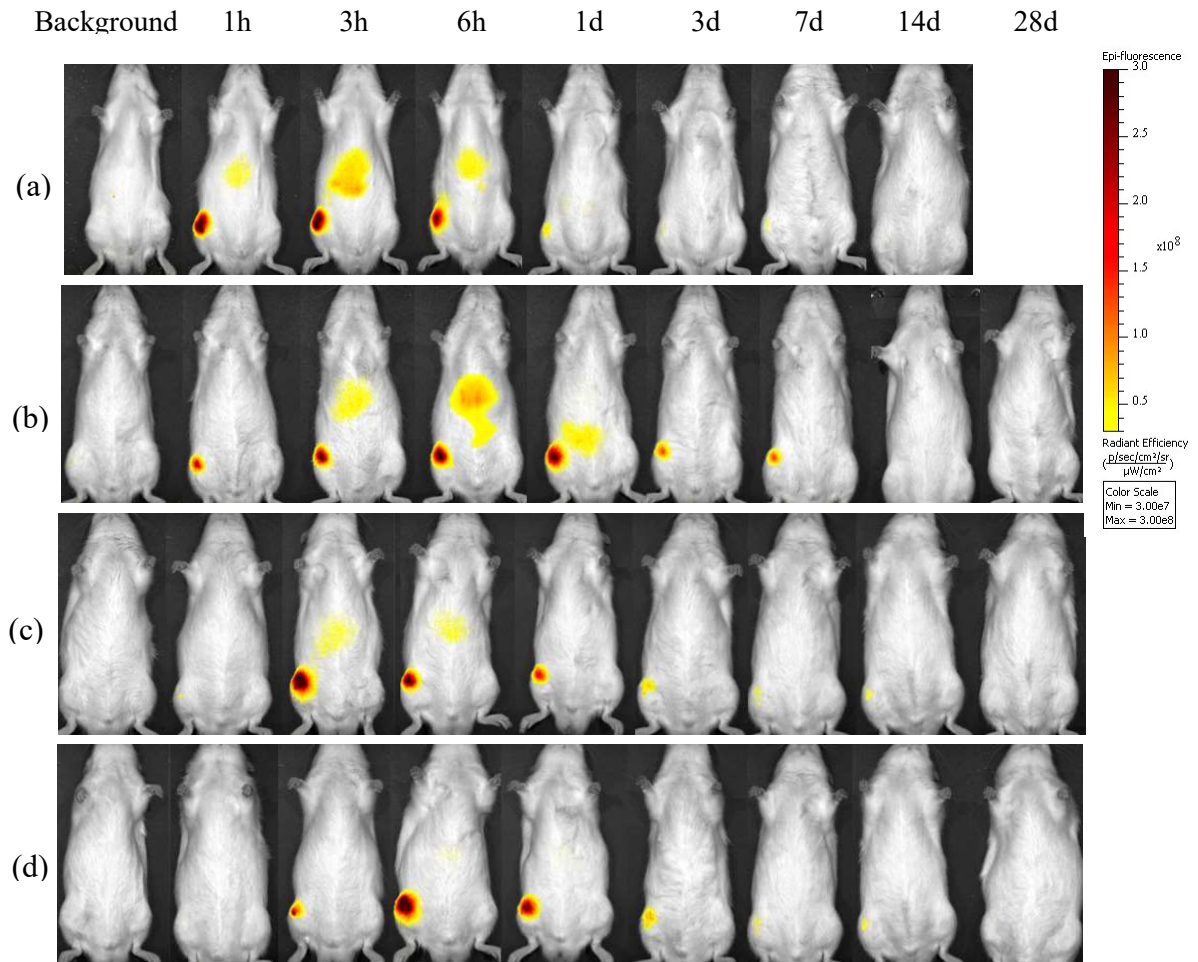


Fig.21 Optical images of fluorescence derived from ICG intra-articularly administered into the rat knee joint as a formulation. (a) ICG solution. (b) HA GEL formulation. (c) PLGA formulation. (d) PLGA / HA gel formulation. Observation was carried out for 1 week after administration except for ICG solution.

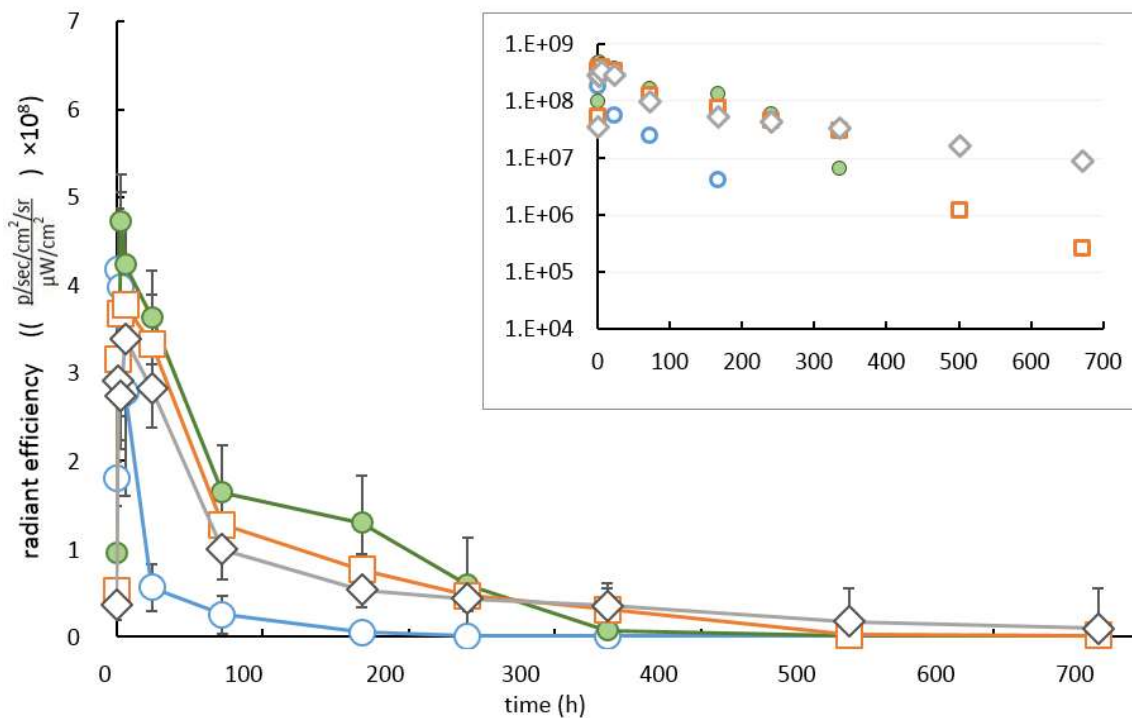


Fig.22. Time-course of the fluorescence intensity of ICG administered into the rat knee joint as an aqueous solution (○), HA Gel formulation (●), PLGA formulation (□), and PLGA / HA gel formulation (◇). Each value represents the mean \pm S.D. (n=3). The half-lives of ICG administered as the aqueous solution (3 hr and later), PLGA microsphere (24 hr and later), HA gel formulation (24 hr and later), and PLGA/HA gel formulation (24 hr and later) based on the semi-logarithm plot were 17 ± 3 , 61 ± 16 , 63 ± 3 , and 149 ± 15 hr respectively. Statistical differences of the half-lives were found between ○ and ●, ○ and □, ○ and ◇, ● and ◇, and □ and ◇.

3.3.5 製剤投与一ヶ月後の膝断面の ICG 蛍光分布の比較

製剤投与後 4 週間飼育したラットを屠殺、解剖し摘出した膝関節を乾燥させ両断、切断面を精製水で軽く濡らし IVIS にセット、膝関節断面の蛍光強度を測定した。

ICG 水溶液を投与した膝関節の断面はほぼ無色であり (Fig.23a)、IVIS 蛍光測定においても ICG の蛍光強度は確認することが出来なかった (Fig.23d)。それに対し PLGA 製剤、及び PLGA/HA Gel 製剤は、膝関節の断面に ICG の緑色の名残が確認でき (Fig.23b,c)、IVIS 蛍光測定においても蛍光強度が確認する事が出来た (Fig.23e,f)。特に PLGA/HA Gel 製剤は PLGA 製剤の蛍光強度と比較して強く、広範囲で蛍光が確認された。

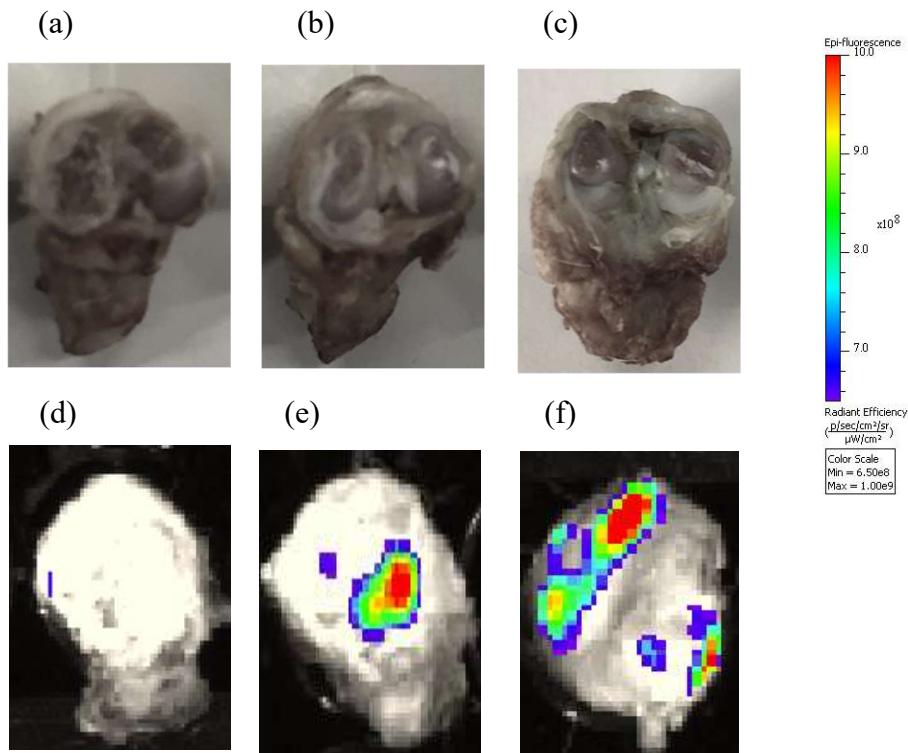


Fig. 23. The cross-section of the knee joint after 4 weeks, and optical images of fluorescence derived from ICG. (a) ICG solution. (b) PLGA formulation. (c) PLGA / HA gel formulation. (d) Fluorescence of ICG solution. (e) Fluorescence of PLGA formulation. (f) Fluorescence of PLGA / HA gel formulation.

3.4 考察及び小括

エマルジョン溶媒拡散法により調製された PLGA ナノスフェアを用いた研究は古くから行われており、膝関節に投与された報告はいくつか出ている³³⁾。しかし徐放データは多く発表はされているが、実際の薬物動態をモニタリングした報告はあまりない。我々は膝関節の実験に用いられた実績のある PLGA 粒子製剤に基づいた研究に着手、ICG をこの調製に含め、持続放出のモニタリングを行った³⁴⁾。

投与部位である関節腔に投与する PLGA 微粒子製剤は、粒径が大きいと薬物含量が高く徐放持続の可能性が期待できるが、膝関節曲げたり伸ばしたりする動作時に異物感が感じられ、運動能力の低下の可能性もある。一方、粒子径が小さくなると、比表面積の増加により薬物放出速度が増加し、徐放性が低下するおそれがある。また関節膜を通過できる粒子径になり、徐放することなく粒子として関節外に流出する可能性もある。患者の患部の不快感の減少及び徐放の観点から、我々は今回、平均粒子径が 1~5 μm の粒子を調製する事にした。

PLGA 粒子サイズおよび ICG 含量を調べた。ホモジナイザーの回転数等を調整することにより、メジアン径 D50 は 2.3 \pm 1.3 μm 、ICG 含有量が約 18.02w/w% の PLGA 粒子製剤を調製する事に成功した。また、これを先に検討した HA 徐放剤に分散させることにより、より緩やかな徐放を目指した製剤を調製した。HA ゲル製剤の研究の際に、HA 濃度を 5mg/mL で調製していたが、粘度が高すぎるため PLGA の分散が困難であり、また投与に支障をきたした。そのため、PLGA 分散用の HA ゲル製剤には、粘度が約 3.9 \times 102mPa²であり、PLGA の均一分散および投与に適した 1mg/mL の濃度で HA を溶解した。この条件下でも数日間の徐放性が確認されており、PLGA の放出を抑制するのに十分であると考えられた。

今回の実験により、あらためて PLGA 製剤は膝関節内に長期間にわたり持続放出が可能な製剤であることが確認された。投与の初期段階での強い蛍光は、表面層に分布した ICG 微粒子が破裂したときに現れる初期相に起因すると考えられる。

このような特性を有する PLGA 粒子製剤を HA ゲル中に分散させることにより、粒子表面のバーストをある程度まで低減することができた。微粒子からゲル、ゲルから関節と 2 段階の徐放性を持たせることで、徐放をよりゆっくりと行うことができると考えられる。薬物投与後 1 ヶ月経過した膝関節を摘出し切開した際も ICG の着色が目視で確認でき、切開面の蛍光強度から関節残存量が増加していることが確認できた。またラットの動きは、

PLGA 懸濁液を投与したときよりも異物を感じるような仕草をことなくスムーズに歩行していた。

PLGA 製剤は長期持続放出に適しており、さらにマトリックスとして HA ゲルを使用することにより、使い易い徐放性製剤が調製できることが示された。

総括

膝関節痛の研究は古くから行われており、徐放性製剤開発は報告されているが、薬物動態に着目しながら徐放性を検討している例は少ない。本研究において、ラット膝関節腔内に投与した溶液の滞留時間が極めて短いことが確認された。関節内の滑膜には有窓性血管が分布しており、水溶性の高い薬物は、滑液中に注入された後速やかに血中へ移行すると考えられる³⁵⁻³⁸⁾。

関節腔内投与される製剤に具備されるべき条件としては、製剤から放出された分子状の薬物の滑液中への放出速度が、滑液中からの薬物の消失速度に抗して上回る必要があることである。そのような状態であれば関節腔内薬物濃度の持続化が達成されることが考えられる。

本研究では、関節腔内に残存する薬物を蛍光イメージングにより可視化するとともに、その蛍光強度を測定することによって、一定期間(定常状態)に一定速度で消失していることが確認できた。

調製した HA ゲル製剤は、ラット膝関節腔内投与後、膝関節を取り出し切り開いた時に、投与後 7 日目でも関節腔内に残存していることが観察された。ゲルの膨潤状態が保持された結果、ICG 放出が制御され、投与後 1 週間まで薬物が放出されたと考えられる³⁹⁻⁴³⁾。ICG 含有 HA マトリックス型徐放性ゲル製剤は ICG 水溶液と比較し、関節局所蛍光測定法においても、薬物抽出定量法による膝関節腔内滞留確認試験においても、膝関節腔における滞留性が良く、また ICG 薬物の徐放を行っていることが示された。

本研究で検討された HA ゲル製剤調製技術は、簡便な調製法と安価な基材で行える手法であり、また関節構成成分で作られている親和性の高い製剤であるので、開発の初期ステージの化合物スクリーニング、及び初期臨床試験にも適している製剤であると考えられる。

また、PLGA 製剤はより長期的な徐放が可能な製剤である事が確認された。

製剤はエマルション溶媒拡散法で調製したが、ICG は水以外の溶媒には溶けにくい性質を持っているため、物理的混合物として調製されたため、ICG は分子状態で PLGA 中に分散しており、ICG 含有量が約 12%程度であった。また PLGA 微粒子表面に ICG 分子が存在していると考えられ、そのため PLGA 粒子製剤を投与した際に、表層に分布していた薬物微粒子がバーストしたことで初期相が現れたと考えられる。

このような特性を持つ PLGA 粒子製剤を、先に検討した HA ゲル製剤に分散した併用製剤とすることで、粒子表面のバーストを軽減させ、また微粒子からゲル、ゲルから関節腔への 2 段階徐放の性質を持たせることで、より長期的で緩慢な放出を行うことができると考

えられる結果が得られた。PLGA の異物感を軽減させ、かつ疼痛緩和を行う機能をもつ徐放製剤として、患者の quality of life の向上に寄与する剤形であると考ええる。

現時点では放出コントロールが完全にはできてはいない。ヒアルロン酸ナトリウムの粘度と、徐放性速度の相関を研究することで、より幅広い溶解性や分子量などを持つ化合物に適応する製剤に応用できると考える。

また PLGA に関しても、今回は乳酸: グリコール酸が 50: 50 のグレードを用いて検討した。PLGA は乳酸が多くなる程分解が遅くなるので、より長期徐放を行うには乳酸の比率を上げていくことも手段として考えられる。しかし長期徐放の反面、一定時間内の放出量が疾患の治療に必要な量より少なくなる可能性もあり、投与量と放出量の相関を掴んで検討することが必要である⁴⁴⁾。現在、PLGA / HA ゲル製剤の実際の製品化を目指した剤形や調製法、将来のプレフィルドシリンジ製剤化など機能性投薬剤形を目指した検討を継続している。

本研究では、PLGA マイクロスフェアと HA ゲルを組み合わせることにより、患者の膝の負担を軽減できる長期徐放性製剤を開発した。PLGA 製剤の研究範囲が広いため、HA ゲルとの組成比と配合比を最適化することにより、より効果的な膝関節徐放性製剤を開発できると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科薬学送達学分野 尾関哲也 教授 に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、格別の御配慮と御激励を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科薬学送達学分野 田上辰秋 講師 に謹んで感謝いたします。

本共同研究の総括者として細部にわたるご指導をいただきました、名城大学薬学部薬物動態制御学講座 岡本浩一 教授に深く感謝をいたします。

本論文作成にあたり、種々の有益な御助言と御校閲を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科生体超分子システム解析学分野 平嶋尚英教授、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 湯浅博昭 教授、ならびに名古屋市立大学大学院薬学研究科コロイド・高分子物性学分野 奥菌 透 准教授に深謝いたします。

また本研究のみならず、研究生活でも実に多くの方のお力添えをいただきました、名古屋市立大学大学院薬学研究科薬学送達学分野 福重香 助教及び研究室の皆様、名城大学薬学部 薬物動態制御学講座 奥田知将 助教及び研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。本当にありがとうございました。

最後に、これまで温かく見守って育ててくださった両親をはじめとする家族、そして本学に入学することで知り合うことができ、多くの理解とサポートをしてくれています妻に感謝いたします。これからもよろしくお願いします。

引用文献

1. Masao Itho. Medical Dictionary. Igaku-Shoin (2009)
2. Johnson and Johnson K.K. How the knee joint works.
<<http://www.jinkokansetsu.jp/patient/column2/jnt3a02.html>>
3. 曾我孝 膝前十字靭帯損傷症例における全身の関節柔軟性と膝関節弛緩性との関連性について。日本理学療法学会大会 2010(0), CbPI1323-CbPI1323(2011)
4. 変形性膝関節症の病態・診断・治療の最前線 石島旨章 著 (2013)
5. 変形性膝関節症-病態と保存療法 古賀良生 編集 (2008)
6. World Health Organization. “Chronic rheumatic conditions.”cited 31 October, (2016)
7. Rheumatism and Allergy Countermeasure Committee. “Rheumatism and Allergy Countermeasure Committee report 2011.” Ministry of Health, Labour and Welfare (2011).
8. Wada H. A Case of Bilateral Rheumatic Pleuritis Preceding Arthritis with Increased Adenosine Deaminase in Pleural Effusion. *The journal of the Japan Society for Bronchology*. **36**, 147-152 (2014).
9. メトトレキサート (MTX) の週 8mg を超えた使用の有効性と安全性に関する研究 日本リウマチ学会 情報研究所.
10. Clinical efficacy for RA treatment with Adalimumab. *The Japanese Society for Clinical Rheumatology and Related Research*. **23**, 311-317 (2011).
11. Kadono Y. Efficacy of Adalimumab on axial and peripheral spondyloarthritis Bone joint nerve : *BJN* **6**. 343-349 (2016).
12. Sonemoto E, Kono N, Ikeda R, Wada M, Ueki Y, Nakashima K. Practical determination of methotrexate in serum of rheumatic patients by LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.*, **26**, 1297-300 (2012).
13. Harada Y. Reconsideration of intraarticular corticosteroid injection in osteoarthritis of the knee. *J. Jap. Clin.l Orthopaedic A.*, **33**, 25-28 (2008).
14. Clinical evaluation of PNF-21 (prednisolone farnesyrate) on rheumatoid arthritis (RA). Well-controlled comparative study with Mobilat. The Japanese Society of Inflammation and Regeneration 169-185 (1993).
15. SAITO S, Tomatsu T. Effects of Intra-ArticularHyaluronan Injections on Knee Dysfunction due to Rheumatoid Arthrit. *Journal of Tokyo Women's Medical University*. **78**, 90-94 (2008).

16. Gomis A, Pawlak M, Balazs EA, Schmidt RF, Belmonte C., Effects of Different Molecular Weight Elastoviscous Hyaluronan Solutions on Articular Nociceptive Afferents. *Arthritis Rheum.* **50**, 314–326 (2004).
17. Kawasaki T, The Efficacy of Hylan G-F 20 (Synvisc®) with Osteoarthritis of the Knee. *Jap. J. Joint Diseases*, 3319-24 (2014).
18. Okamoto H. Development of Dry Gene Powders with High Inhalation Performance and Gene Expression. *Oleo Sci*, **16**, 293-301 (2016).
19. Kawaguchi Y. Evaluation of the Binding Affinity and RNA Interference of Low-molecular-weight Chitosan/siRNA Complexes Using an Imaging System. *Yakugakuzasshi.* **129**, 475-484 (2009).
20. Okuda T. Pulmonary delivery by novel sea-urchin like microparticles. *Drug delivery system.* **24**, 499-506 (2009)
21. MB Orthopaedics 28 卷 7 号 全日本病院出版会
22. Murata N. Leuplin (injectable microcapsules Dual Chamber pre-filled syringe, DDS) *Drug Deliv. Sys.* **28**, 56-62 (2013).
23. Nakashima A, Izumi T, Ohya K, Kondo K, Niwa T. Design of Highly Dispersible PLGA Microparticles in Aqueous Fluid for the Development of Long-Acting Release Injectables. *Chem. Pharm. Bull.*, **65**, 157-165 (2017).
24. Koga J, matoba T, Egashira K. Anti-inflammatory Nanoparticle for Prevention of Atherosclerotic Vascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.*, **23**, 757-765 (2016)
25. Hosokawa Micron Corporation. Funded Research for Developing Pharmaceutical Preparations and Medical Devices with Drug Delivery System (DDS) Technology Utilizing PLGA Nanospheres. *The Micromeritics*, **59**, 128-130 (2016).
26. Tsukada Y, Tsujimoto H, Watanabe H, Sugimoto T, Nakano O, Makino H, Yamamoto H, Morishita R. Development of Oral Formulation Technology for Nucleic Acid Drug by Using PLGA Nanoparticles as DDS Carriers. *J. Soc. Powder Technol. Jap.* **7**, 513-518 (2013).
27. Mohana M, Devasier B, Kim S. Self-assembled nanoparticles of PLGA-conjugated glucosamine as a sustained transdermal drug delivery vehicle. *Polym. J.*, **45**. 202-209 (2013).
28. Tsukada Y. Development of drug-eluting stent coated with PLGA nanoparticles as drug carriers. *KONA Powder and Particle Journal* **30**, 2-2 (2013).
29. Tahara K, Ymamoto H, kawashima Y. Interaction of Biodegradable Polymeric Nanospheres

- with Cells: the Effect of Surface Properties. *J. Soc. Powder Technol. Jap.*, **48**, 173-179 (2011).
30. Hara K. Development and commercialization of PLGA nanoparticles with DDS function. *J. Pharm. Sci. Technol. Jap.*, **71**, 326-331 (2011).
 31. Kawashima Y. Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion diffusion methods, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 41-48 (1998).
 32. E.Horisawa. 関節内疾患治療用PLGAナノスフェアの調製とその関節内挙動
Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Japan **61**, 168 (2001).
 33. Horisawa E, Kawashima Y. Development of Copoly(DL-lactic/Glycolic Acid) Nanospheres Coated with Chitosan to Optimize Intra-Articular Delivery System : Binding Enhancement to Synovial Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Yakuzaigaku*, **63**, 29-33, (2003).
 34. Mizuno T, Mohri K, Nasu S, danjo K, Okamoto H. Dual imaging of pulmonary delivery and gene expression of dry powder inhalant by fluorescence and bioluminescence. *J. Controlled Release*, **134**, 149-154 (2009).
 35. Ishizima M. The frontiers of the pathophysiology, diagnosis, and treatment of knee osteoarthritis. *Juntendo. M. J.*, **50**, 138-151 (2013).
 36. Sugawara T. *New product development and clinical needs for bone joint cartilage treatment*. Technical Information Institute Co.LTD. (2015).
 37. Wada H, Ozaki Y, Fujita T, Ueda K, Inoue S. A Case of Bilateral Rheumatic Pleuritis Preceding Arthritis with Increased Adenosine Deaminase in Pleural Effusion. *J. Jap. Soc. Bronchol.*, **36**, 147-152 (2014).
 38. Uwai Y, Suzuki R, Iwamoto K. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on pharmacokinetics of methotrexate: a meta-analysis. *Yakugaku Zasshi*, **131**, 853-861 (2011).
 39. Kikuchi H, Shimada W, Sohen S, Kamiya M, Nonaka T, Nishisaka F, Funauchi M, Ikoma S, Irimajiri S, Yamaguchi S. Clinical efficacy for RA treatment with Adalimumab. *Clin. Rheumatol. Relat. Res.*, **23**, 311-317 (2011).

40. Gotoh S, Miyazaki K, Onaya J, Sakamoto T, Tokuyasu K, Namiki O. Experimental knee pain model in rats and analgesic effect of sodium hyaluronate (SPH). *Yakurigaku Zasshi*, **92**, 17-27 (1988).
41. Yamashita I, Atsuta Y, Shimazaki S, Miyatsu M. Effects of prostaglandin E2 and sodium hyaluronate on bradykinin induced knee joint pain in rat. *J. Jap. Orthopaedic Surgic. Soci.*, **69**, 735-743 (1995).
42. Aihara S, Murakami N, Ishii R, kariya K, azuma Y, Hamada K, Umemoto J, Maeda S. Effect of sodium hyaluronate on experimental arthritic pain in rats. *Maeda Jap. Pharmacol. J.*, **100**, 359-365 (1992).
43. Tsuruhara Pharmaceutical Co., Ltd. Hikamilon Disposition Note 25 mg Interview Form created 1st edition (2015).
44. Reum Son A, Kim Y, Hun Park S, Yong Jang J, Kim K, Ju Kim B, Yun Yin X, Ho Kim J, Hyun Min B, Keun Han D, Suk Kim M. Direct chemotherapeutic dual drug delivery through intra-articular injection for synergistic enhancement of rheumatoid arthritis treatment. *Sci. Rep.*, **5**, 14713 (2015).