

博士論文

タクロリムス含有PLGA・PLAマイクロスフェアの  
薬剤放出機構と免疫抑制作用に関する研究

Release Mechanisms and Immunosuppressive Effects of  
Tacrolimus-Loaded PLGA and PLA Microspheres

2015年9月

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 博士後期課程  
薬食生命科学専攻 医薬生命化学講座

小嶋 竜

タクロリムス含有PLGA・PLAマイクロスフェアの  
薬剤放出機構と免疫抑制作用に関する研究

Release Mechanisms and Immunosuppressive Effects of  
Tacrolimus-Loaded PLGA and PLA Microspheres

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

2015年9月

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 博士後期課程  
薬食生命科学専攻 医薬生命化学講座

小嶋 竜

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 緒論 .....                                | 1  |
| 1. マイクロスフェア製剤の調製と薬物放出特性 .....           | 5  |
| 1.1. 序論.....                            | 5  |
| 1.2. 実験材料および実験方法.....                   | 6  |
| 1.2.1. 実験材料 .....                       | 6  |
| 1.2.2. マイクロスフェアの調製法 .....               | 6  |
| 1.2.3. タクロリムス含有量の定量 .....               | 7  |
| 1.2.4. 粒子径測定 .....                      | 8  |
| 1.2.5. DSC .....                        | 8  |
| 1.2.6. SEM.....                         | 8  |
| 1.2.7. 薬物放出試験 .....                     | 8  |
| 1.2.8. マイクロスフェアの分解挙動 .....              | 9  |
| 1.3. 結果.....                            | 10 |
| 1.3.1. 薬物封入率・粒子径 .....                  | 10 |
| 1.3.2. DSC .....                        | 12 |
| 1.3.3. 薬物放出挙動（PLGA 分子量の影響） .....        | 13 |
| 1.3.4. 薬物放出挙動（L/G 比の影響） .....           | 16 |
| 1.3.5. マイクロスフェアの分解挙動 .....              | 19 |
| 1.4. 考察.....                            | 21 |
| 2. マイクロスフェア製剤の薬物動態評価 .....              | 24 |
| 2.1. 序論.....                            | 24 |
| 2.2. 実験材料および実験方法.....                   | 25 |
| 2.2.1. 実験材料および動物 .....                  | 25 |
| 2.2.2. ラット薬物動態試験 .....                  | 25 |
| 2.2.3. サル薬物動態試験 .....                   | 26 |
| 2.2.4. ウサギ薬物動態試験 .....                  | 26 |
| 2.2.5. 血中薬物濃度の定量法 .....                 | 27 |
| 2.3. 結果.....                            | 29 |
| 2.3.1. ラットの薬物動態に及ぼすマイクロスフェア製剤化の影響 ..... | 29 |
| 2.3.2. ラットの薬物動態に及ぼす投与経路の影響 .....        | 30 |
| 2.3.3. ラットの薬物動態に及ぼす投与量の影響 .....         | 31 |
| 2.3.4. 長期間におけるラットの薬物動態 .....            | 36 |
| 2.3.5. サルにおける薬物動態 .....                 | 38 |

|        |                                     |    |
|--------|-------------------------------------|----|
| 2.3.6. | ウサギにおける薬物動態 .....                   | 41 |
| 2.3.7. | 動物種差の影響 .....                       | 42 |
| 2.4.   | 考察 .....                            | 44 |
| 3.     | マイクロスフェア製剤の免疫抑制作用評価 .....           | 47 |
| 3.1.   | 序論 .....                            | 47 |
| 3.2.   | 実験材料および実験方法 .....                   | 48 |
| 3.2.1. | 実験材料および動物 .....                     | 48 |
| 3.2.2. | ラット心移植モデル投与用マイクロスフェア製剤の薬物動態試験 ..... | 48 |
| 3.2.3. | ラット心移植モデルにおける免疫抑制作用評価 .....         | 48 |
| 3.3.   | 結果 .....                            | 50 |
| 3.3.1. | ラット心移植モデル投与用マイクロスフェア製剤の薬物動態 .....   | 50 |
| 3.3.2. | ラット心移植モデルにおける免疫抑制作用 .....           | 51 |
| 3.4.   | 考察 .....                            | 53 |
| 4.     | 総括 .....                            | 54 |
| 5.     | 謝辞 .....                            | 56 |
| 6.     | 参考文献 .....                          | 57 |

## 付表

本論文で用いた略語を以下に記す。

|                  |  |
|------------------|--|
| AAALAC           | The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care<br>(国際実験動物ケア評価認証協会) |
| AUC              | Area under the blood concentration time curve (血中濃度-時間曲線下面積)                                   |
| C <sub>max</sub> | Maximum blood concentration (最高血中濃度)   |
| DSC              | Differential scanning calorimetry (示差走査熱量測定)   |
| FKBP             | FK506 binding protein (FK506 結合タンパク質)  |
| L/G              | Lactic acid/glycolic acid (乳酸/グリコール酸)  |
| NF-AT            | Nuclear factor of activated T-cells (活性化 T 細胞核因子)  |
| o/w              | Oil-in-water (水中油型)  |
| PLA              | Poly(lactic acid) (ポリ乳酸)   |
| PLGA             | Poly(lactic acid-co-glycolic acid) (乳酸-グリコール酸共重合体)   |
| PVA              | Polyvinyl alcohol (ポリビニルアルコール)   |
| SEM              | Scanning electron microscopy (走査型電子顕微鏡法)   |
| TDM              | Therapeutic drug monitoring (治療薬物モニタリング)   |
| T <sub>g</sub>   | Glass transition temperature (ガラス転移温度)   |
| T <sub>max</sub> | Time to reach C <sub>max</sub> (最高濃度到達時間)  |

## 緒論

タクロリムス (FK506) は、1984 年に *Streptomyces tsukubaensis* の代謝産物として発見されたマクロライド化合物であり、図 1 の構造式で示される[1]。タクロリムスの作用機序は図 2 のようになり、細胞内の FK506 binding protein (FKBP) と複合体を形成し、この複合体が calcineurin を阻害することで、nuclear factor of activated T-cells (NF-AT) の脱リン酸化・核内移行を抑制する[2]。その結果、interleukin-2 などのサイトカインの産生が阻害され、免疫抑制作用を示すことが知られている。日本国内においては、骨髄移植における移植片対宿主病や肝移植・腎移植・骨髄移植・心移植・肺移植・脾移植・小腸移植における拒絶反応の抑制、重症筋無力症、関節リウマチ、ループス腎炎、潰瘍性大腸炎、間質性肺炎、アトピー性皮膚炎など、様々な疾患の治療に用いられている[1, 3, 4]。このように様々な免疫系疾患に有効なタクロリムスであるが、その課題の一つとして血中濃度の大きいバラツキが指摘されている[5, 6]。タクロリムスの薬効は、報告例によって傾向は異なるものの血中トラフ濃度と相関すると考えられており、病状などによって異なるが、およそ 5-20 ng/mL 程度のトラフ濃度が目標とされている[7-11]。一方で、血中濃度依存的に腎障害が認められることも報告されている[12]。そのため、タクロリムスの血中濃度は適切な治療濃度域内となるよう正確に制御することが必要である。しかし、肝機能・ヘマトクリット値・アルブミン量の個体差や食事などの影響で、タクロリムスの血中濃度は個体差・個体内差の大きいことが知られており、投与量を調整する際には血中濃度を測定する therapeutic drug monitoring (TDM) を行うことが推奨されている[13-16]。さらに、タクロリムスの副作用の一つである耐糖能異常は、タクロリムス血中濃度の maximum blood concentration (C<sub>max</sub>) に依存することも報告されているため、血中濃度バラツキを抑えた製剤や C<sub>max</sub> を制御した製剤は、薬効維持と副作用軽減の観点で有用だと考えられる[17-19]。また、タクロリムスのもう一つの課題として、服薬アドヒアランスの問題が挙げられる。一般的に、移植患者に対する免疫抑制剤のノンアドヒアランスは 20-50%程度と言われている[20]。タクロリムスは 1 日 2 回経口剤と 1 日 1 回経口剤が上市されており、1 日 1 回経口剤によってアドヒアランスは改善すると報告されているが、そのアドヒアランスも決して十分ではない[21-23]。例えば、腎移植患者を対象にした調査では、6 か月服薬継続率は 1 日 2 回経口剤が 71.9% であるのに対し、1 日 1 回経口剤は 81.5%である[21]。免疫抑制剤のアドヒアランス不良は死亡や移植臓器機能廃絶のリスクを増加させることも報告されているため、更にアドヒアランスを高める製剤の登場が望まれる[24-28]。

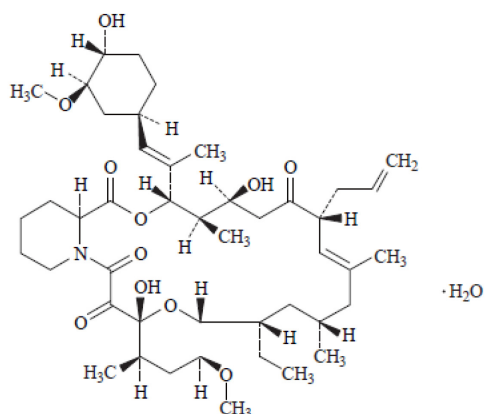


図1 タクロリムス (FK506) の構造式

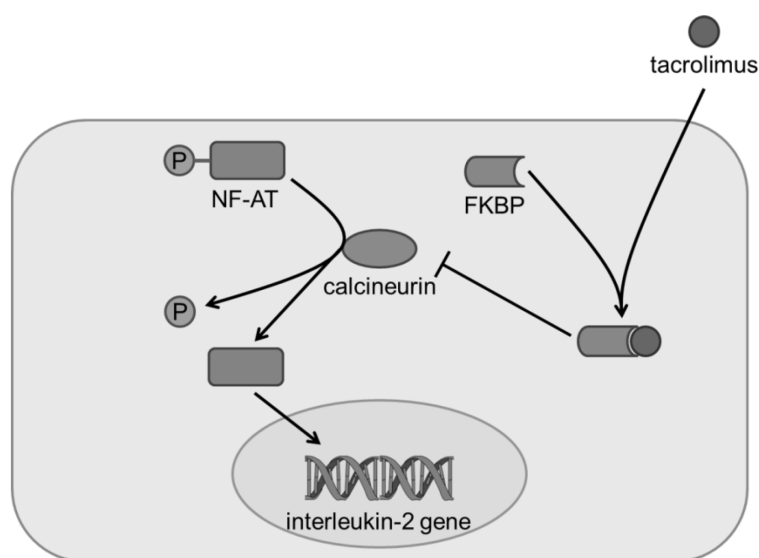


図2 タクロリムスの作用機序

これらの課題解決のために、本研究では長期徐放性注射剤に着目した。長期徐放性注射剤とは、皮下や筋肉内への単回投与で数週間から数年にわたって薬効を持続する注射剤であり、マイクロスフェア製剤やインプラント型デバイス、インジェクタブルゲル等が挙げられる[29, 30]。実際に多くの製品が上市されており、leuporelin acetate のマイクロスフェア製剤や *in situ* インプラント製剤, goserelin のインプラント製剤, risperidone のマイクロスフェア製剤, naltrexone のマイクロスフェア製剤, exenatide のマイクロスフェア製剤などの製品例がある[31-37]。長期徐放性注射剤のなかでも生分解性マイクロスフェア製剤は、生分解性基剤から成る  $\mu\text{m}$  オーダーの粒子状製剤であり、①低分子やタンパク質などの様々な薬物を封入できること、②通常のシリンジを用いて投与できるため低侵襲性であること、③生体適合性が高いこと、④長期間の徐放が可能であることから、盛んに研究されている[29]。生分解性の基材としては、乳酸の重合体である poly(lactic acid) (PLA) や乳酸とグリコール酸の共重合体である poly (lactic acid-co-glycolic-acid) (PLGA) が良く知られている。

その構造式は図3のようになっており、ポリマー組成等を変化させることで分解速度や薬物放出速度を制御することが可能である[38]。

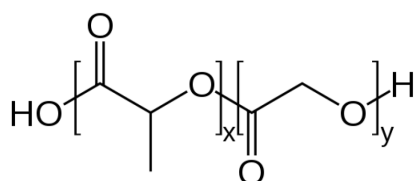


図3 PLA および PLGA の構造式：

x は乳酸の重合度を、y はグリコール酸の重合度を示す。

タクロリムスへ PLGA・PLA マイクロスフェア技術を適応することによって、2つの効果が期待される。一つは、血中濃度バラツキの低減や副作用の軽減である。経口投与から長期徐放性注射剤の皮下投与や筋肉内投与へ切り替えることによって、肝初回通過効果や食事の影響を回避することに伴う生物学的利用能の改善や血中濃度バラツキの低減が期待できる。加えて、精密な薬物放出制御によってフラットな血中濃度プロファイルを実現できれば、C<sub>max</sub> を制御することにより副作用を軽減できる可能性がある。もう一つの期待効果は、服薬アドヒアランスの改善である。前述の通り、免疫抑制剤のアドヒアランスは、薬効と相関するにも関わらずあまり高くないと報告されている。一方で、アドヒアランスは経口剤よりも長期徐放性注射剤の方が高いという報告例があり、例えば risperidone の 24 か月治療継続率は、経口剤が 63.4%に対し長期徐放性注射剤は 81.8%と有意に高いことが報告されている[39]。このように、長期徐放性注射剤化することによってアドヒアランスの改善とそれに伴う薬効向上が期待される[39-42]。

タクロリムス含有 PLGA・PLA 製剤については、リンパ節デリバリーや肝臓デリバリーを意図したマイクロ粒子製剤やナノ粒子製剤、炎症性腸疾患治療のための経口ナノ粒子製剤、角膜移植時の拒絶反応抑制を意図したナノサスペンション点眼剤、ブドウ膜炎治療のための硝子体内インプラント製剤、術後肺血栓塞栓症の予防用ナノファイバー製剤、新生内膜肥厚を抑制するための薬剤溶出ステントなどが報告されている[43-53]。例えば、Miyamoto らや Wang らによって、タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアを投与すると、肝移植モデルラットの生存日数や脾臓移植モデルマウスの移植片生着日数が延長すると報告されている[43, 44]。また Shin らは、タクロリムスを PLGA や (polyethylene glycol)-*block*-PLGA のナノ粒子へ封入すると、ラットへ静脈内投与した際の腸間膜リンパ節移行性が高まることを報告している[45]。同様に Affifi らは、タクロリムス封入 PLA ナノ粒子をラットへ静脈内投与すると、肝移行性が向上することを報告している[46]。経口製剤については Xu らから、タクロリムスを (polyethylene glycol)-*block*-PLA ナノ粒子へ封入すると、現行のカプセル製剤と比較して徐放性の放出プロファイルを示し、ラット肝同所移植モデルにおける生存日数を延長することが報告されている[47]。以上のように、タクロリムス含有 PLGA・PLA 製剤につ



いてはいくつか報告例があるものの、その薬物放出機構に関する報告や、1 か月や2 か月といった長期の放出制御を実現した研究例はほとんどない。また、タクロリムス長期徐放性注射剤の薬物動態と免疫抑制作用との相関についても、依然として不明なところが多いのが現状である。

これまでに述べたような背景から、本研究では、タクロリムスの長期にわたる放出制御を実現すること、およびタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの薬物放出機構や薬物動態-免疫抑制作用の関係性を明らかにすることを目的とした。第1章では、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを調製し、その封入メカニズムについて考察した。また、種々のマイクロスフェアについて *in vitro* における薬物放出を評価し、薬物放出速度の制御を試みた。第2章では、ラットへマイクロスフェアを投与した際の薬物動態を評価し、*in vitro* の結果と合わせてマイクロスフェアからの薬物放出機構について論考した。さらに、サルやウサギにおける薬物動態試験も実施し、長期の薬物動態を評価するとともに、*in vitro* と *in vivo* の差や動物種差がマイクロスフェアからの薬物吸収速度へ与える影響も検討した。第3章では、ラット心移植モデルを用い、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの免疫抑制作用を評価し、薬物動態と免疫抑制作用の関係について考察した。

# 1. マイクロスフェア製剤の調製と薬物放出特性

## 1.1. 序論

PLGA・PLA マイクロスフェアへの薬物封入については、薬物の特性によって適応できる調製法が異なるため、薬物物性に応じて適切な調製法を選択することが重要である。マイクロスフェアの調製法に関しては、oil-in-water (o/w) エマルション法などの溶媒留去法や、界面重合法、押出成形法、スプレードライ法、コアセルベート法などが知られている[29]。タクロリムスは疎水性の高い薬物であり、水と混和しないジクロロメタン等の有機溶媒へ溶解することから、薬物と PLGA・PLA を有機溶媒へ溶解させた後に水中へ分散させる o/w エマルション法でマイクロスフェアを調製することとした。また、得られたタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアについて、PLGA や PLA の物性が薬物封入効率に与える影響を、薬物と PLGA・PLA との相互作用の観点から考察した。

マイクロスフェアへの薬物封入のみならずマイクロスフェアからの薬物放出特性も、薬物の物性や PLGA・PLA の物性によって変化することが知られており、特に PLGA・PLA の lactic acid/glycolic acid (L/G) 比や分子量は、ポリマーの分解速度やマイクロスフェアからの薬物放出速度に影響を与えることが報告されている[29, 38]。具体的には、PLGA の L/G 比が 50/50 から 100/0 と増加するにつれて、また PLGA や PLA の分子量が増加するにつれて、これらのポリマーの分解速度は低下する。そこで、L/G 比や分子量が異なる各種 PLGA・PLA を用いてタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを調製し、マイクロスフェアからの薬物放出を *in vitro* で評価した。これらの薬物放出試験から、どのような PLGA・PLA を用いると薬物放出速度を制御できるか検証した。さらに、薬物放出試験中のマイクロスフェアを継時的にサンプリングし、重量変化や形状変化を評価することで、マイクロスフェアからの薬物放出機構についても考察を行った。

## 1.2. 実験材料および実験方法

### 1.2.1. 実験材料

タクロリムスは、アステラス製薬において調製されたものを用いた。PLGA（商品名：RG502H, RG503H, RG504H, RG752H）と PLA（商品名：R202H）は、ベーリンガーインゲルハイムより購入した。各ポリマーの分子量や L/G 比を表 1 に示す。Polyvinyl alcohol (PVA) は、日本合成化学工業から入手したゴーセノール™ EG-05 を用いた。アミノアルキルメタクリレートコポリマー E（商品名：Eudragit® E）は、エボニックジャパンに提供していただいた。リン酸緩衝液 pH7.4（商品名：DPBS）は、インビトロジェンより購入した。その他の試薬は、特記しない限り特級品を用いた。

表 1 PLGA (RG502H, RG503H, RG504H, RG752H) と PLA (R202H) の分子量と L/G 比

|           | RG502H | RG503H | RG504H | RG752H | R202H |
|-----------|--------|--------|--------|--------|-------|
| Mw*       | 16100  | 46000  | 59300  | 13600  | 18800 |
| L/G ratio | 50/50  | 50/50  | 50/50  | 75/25  | 100/0 |

\*重量平均分子量

### 1.2.2. マイクロスフェアの調製法

過去の報告例を参考に、o/w エマルション法でタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを調製した[54, 55]。マイクロスフェア製剤の調製手順を図 4 に示す。まず、タクロリムス 215 mg と PLGA および PLA 500 mg をジクロロメタン 20 mL に溶解させた。この溶液を 0.5 w/v% PVA 水溶液 300 mL 中にシリンジを用いて徐々に添加し、攪拌機 (MAZELA Z-2100, EYELA) を用いて 1000 rpm で室温下一晩（約 16 時間）攪拌した。ジクロロメタンの蒸発に伴い生成されたマイクロスフェアを、遠心分離 (1870 g, 10 min) 後の上清を取り除くことで回収し、超純水を用いて再分散させた。この分散液をフィルターで濾過し、超純水で洗浄した。最後に、フィルター上の残渣を凍結乾燥することにより、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを白色の粉末として回収した。

PLGA・PLA の分子量・L/G 比や混合比の異なる計 11 種のマイクロスフェア製剤を調製した。さらに、プラセボマイクロスフェアについても、タクロリムスを用いずに同様の手順で調製した。

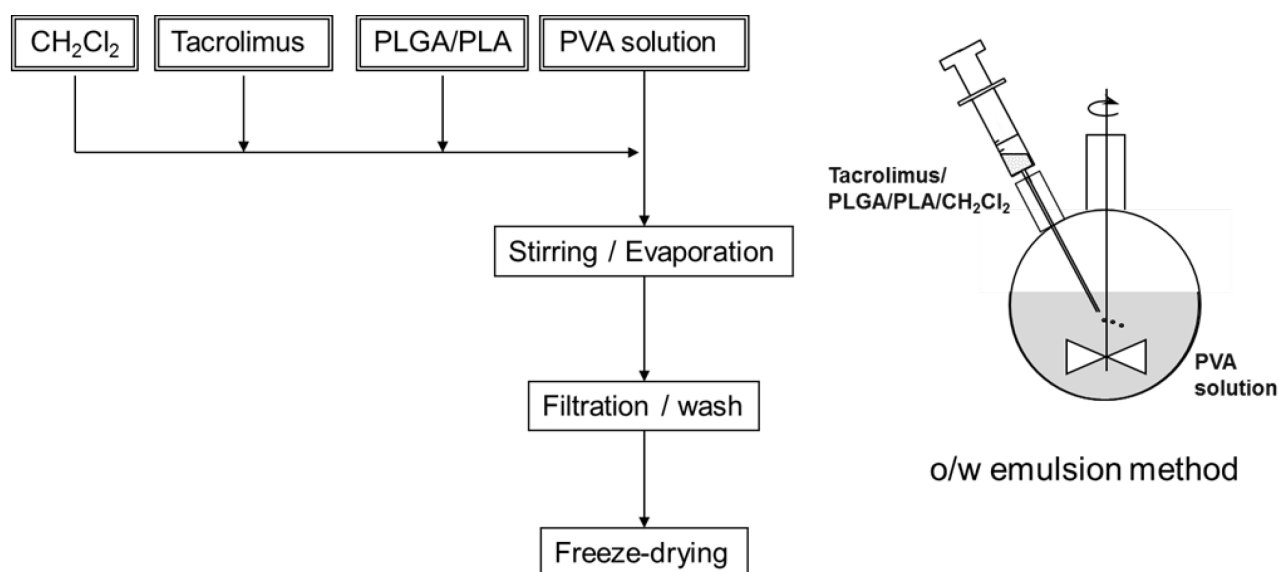


図4 タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの調製法

### 1.2.3. タクロリムス含有量の定量

タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェア 10 mg を、25 mL のアセトニトリルへ溶解させた。続いて、本溶液 5 mL を 20%アセトニトリル 15 mL で希釈した。得られた溶液中のタクロリムスを、HPLC (2695 Separation module, Waters) を用いて定量した。測定条件を以下に示す。

#### <測定条件>

|       |  |
|-------|--|
| 検出器   | 紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）                       |
| カラム   | Nucleosil®100-C8（4.6×150 mm, 5 μm）         |
| カラム温度 | 50°C                                       |
| 移動相   | アセトニトリル/水/メタノール/6%リン酸 = 460/360/180/1（体積比） |
| 流量    | 0.45 mL/min（タクロリムスの保持時間を約 14 分に調整）         |
| 注入量   | 100 μL                                     |

測定したマイクロスフェア中のタクロリムス重量から、以下の式を用いて薬物含率および封入効率を算出した。

$$\text{薬物含率} = \frac{\text{マイクロスフェア中のタクロリムス重量}}{\text{マイクロスフェア重量}} \times 100 (\%)$$

$$\text{封入効率} = \frac{\text{マイクロスフェア中のタクロリムス重量}}{\text{タクロリムスの仕込み重量}} \times 100 (\%)$$

#### 1.2.4. 粒子径測定

適量のマイクロスフェアを超純水に分散させ、10 秒ほど超音波を照射した後に、粒度分布測定を実施した。測定には、レーザー回折/散乱式粒度分布測定装置 LA-920（堀場製作所）を用い、メジアン径を算出した。

#### 1.2.5. DSC

タクロリムスと PLGA・PLA との相互作用を調べるために、differential scanning calorimetry (DSC) を実施した。L/G 比が相互作用に与える影響を評価する目的で、L/G 比の異なる PLGA・PLA から成るマイクロスフェアを測定サンプルとした。DSC8230 S-1199A（リガク）を用い、以下に示す条件で測定を行った。

<測定条件>

|        |           |
|--------|-----------|
| サンプル重量 | 3 mg      |
| 昇温速度   | 10 °C/min |
| 窒素フロー  | 50 mL/min |
| 測定範囲   | 室温～220°C  |

#### 1.2.6. SEM

マイクロスフェアの形状を観察するために、scanning electron microscopy (SEM) を実施した。S-800 形電界放射形走査電子顕微鏡 U-0095A（日立製作所）を用い、倍率 3000 倍で観察を行った。

#### 1.2.7. 薬物放出試験

タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェア 10 mg とリン酸緩衝液 (pH7.4) 20 mL を、50 mL のチューブへ加えた。タクロリムスの再析出を抑制するために、アミノアルキルメタクリレートコポリマーE 凍結乾燥品（アミノアルキルメタクリレートコポリマーE 11.0 w/v%と塩酸 0.8 w/v%の水溶液を凍結乾燥したもの）を、1 w/v%となるように事前にリン酸緩衝液へ添加した[56, 57]。恒温振盪機には Water bath shaker MM-10（タイテック）を用い、37°C 恒温中において 120 strokes/min でチューブを振盪した[58]。薬物放出試験開始 1, 3, 7, 14, 21, 28 日後にチューブを恒温振盪機から取り出し、遠心分離 (1870 g, 10 min) の後に上清を取り除いた。最後に、残存しているマイクロスフェア中のタクロリムスを定量することで、マイクロスフェアからの薬物放出率を算出した。タクロリムスの定量については、前述した手法で測定した。

#### 1.2.8. マイクロスフェアの分解挙動

上記の薬物放出試験と同様に試験を行い，試験開始 1, 3, 5, 7, 10 日後に残存しているマイクロスフェアを回収した。回収したマイクロスフェアを凍結乾燥し，重量を測定することで重量減少率を算出した。また，SEM を用いて凍結乾燥後のマイクロスフェアを測定することで，薬物放出試験後のマイクロスフェアの形状を観察した。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. 薬物封入率・粒子径

分子量や L/G 比の異なる各種の PLGA・PLA を用い、o/w エマルション法によってタクロリムス含有マイクロスフェアの調製を行った。PLGA および PLA は、1 種または 2 種を混合する処方とした。また、タクロリムスの仕込み量は 215 mg に、PLGA と PLA の仕込み量の合計は 500 mg に固定した。いずれの調製条件においても、濾過および凍結乾燥後、マイクロスフェアは白色の固体として回収された。

調製したマイクロスフェア製剤の処方と薬物含率・封入効率・粒子径を表 2 に示す。まず粒子径については、いずれの処方においても 12  $\mu\text{m}$  から 19  $\mu\text{m}$  程度となっており、処方の違いによる傾向は特に見られなかった。一方で封入効率は、いずれの処方も 80%以上と高いものの 80%程度の処方から 100%に近い処方もあった。特に、比較的分子量の低い PLGA (RG752H) や PLA (R202H) を用いた処方 (Form. 1, 2, 3, 4, 5) では 97-103%といずれも高い封入効率でマイクロスフェア製剤が得られたのに対し、分子量の異なる PLGA (RG502H, RG503H, RG504H) を用いた処方 (Form. 6, 7, 8, 9, 10, 11) では封入効率は 81-95%となっており、処方による差が認められた。このように、PLGA や PLA の分子量が封入効率へ影響を与えていることが考えられたので、調製した 11 処方 (計 15 ロット) のマイクロスフェア製剤について詳細に解析した。各製剤について、マイクロスフェアの調製に用いた PLGA と PLA それぞれの重量を分子量で除することで分子数を算出した。続いて、算出した PLGA・PLA の分子数の和に対して封入効率をプロットしたものが図 5 である。最小二乗法で線形回帰分析を行い、ピアソンの相関係数を算出した。このように、PLGA・PLA の分子数が増加するのに伴って封入効率は上昇し、分子数がおおよそ 30  $\mu\text{mol}$  以上になると封入効率が約 100%に達した。

表2 マイクロスフェア製剤の処方と薬物含率・封入効率・粒子径

| Form. | Tacrolimus<br>(mg) | RG502H<br>(mg) | RG503H<br>(mg) | RG504H<br>(mg) | RG752H<br>(mg) | R202H<br>(mg) | Drug-loading<br>ratio*<br>(%) | Entrapment<br>efficiency**<br>(%) | Median particle<br>diameter<br>( $\mu\text{m}$ ) |
|-------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|
| 1     | 215                | 0              | 0              | 0              | 500            | 0             | 29.3                          | 97.7                              | 16.3   |
| 2     | 215                | 0              | 0              | 0              | 375            | 125           | 29.2                          | 97.3                              | 15.9   |
| 3     | 215                | 0              | 0              | 0              | 250            | 250           | 29.0                          | 96.7                              | 12.1   |
| 4     | 215                | 0              | 0              | 0              | 125            | 375           | 29.2                          | 97.3                              | 16.9   |
| 5     | 215                | 0              | 0              | 0              | 0              | 500           | 29.0                          | 96.7                              | 15.0   |
| 6     | 215                | 500            | 0              | 0              | 0              | 0             | 28.4                          | 94.7                              | 16.5   |
| 7     | 215                | 0              | 500            | 0              | 0              | 0             | 25.0                          | 83.3                              | 19.0   |
| 8     | 215                | 0              | 0              | 500            | 0              | 0             | 24.2                          | 80.7                              | 18.1   |
| 9     | 215                | 375            | 125            | 0              | 0              | 0             | 27.4                          | 91.3                              | 17.2   |
| 10    | 215                | 250            | 250            | 0              | 0              | 0             | 26.7                          | 89.0                              | 14.7   |
| 11    | 215                | 125            | 375            | 0              | 0              | 0             | 26.4                          | 88.0                              | 17.0   |

\*Drug-loading ratio = マイクロスフェア中のタクロリムス重量/マイクロスフェア重量  $\times$  100 (%)

\*\*Entrapment efficiency = マイクロスフェア中のタクロリムス重量/タクロリムスの仕込み重量  $\times$  100 (%)



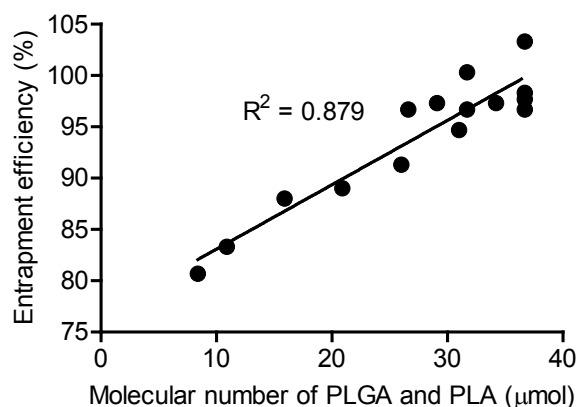


図5 PLGA・PLA 分子数の和と封入効率

### 1.3.2. DSC

マイクロスフェア製剤におけるタクロリムスと PLGA・PLA との相互作用について考察するため、DSC を行った。DSC から得られた glass transition temperature (Tg) を表 3 に示す。まず Placebo (タクロリムス非含有) について、Form. 6 (PLGA, L/G = 50/50), Form. 1 (PLGA, L/G = 75/25), Form. 5 (PLA, L/G = 100/0) を比較すると、L/G 比が増加するのに伴ってマイクロスフェアの Tg は上昇した。これは、PLGA や PLA のポリマー自身の Tg と一致する結果である[59]。Active (タクロリムス含有) についても、同様に L/G 比の増加に伴い Tg は上昇する傾向が認められた。次に各処方について Placebo と Active を比較すると、Form. 6・Form. 1・Form. 5 のいずれの処方においても、タクロリムスの添加によって 1-2°C 程度ではあるものの Tg は上昇する傾向が見られた。

またデータは示さないが、示差熱-熱重量同時測定においても、表 3 と同様の Tg が観測されることを確認した。

表 3 プラセボマイクロスフェアとタクロリムス含有マイクロスフェアの Tg

|                 | Form. 6            | Form. 1            | Form. 5           |
|-----------------|--------------------|--------------------|-------------------|
|                 | PLGA (L/G = 50/50) | PLGA (L/G = 75/25) | PLA (L/G = 100/0) |
| Placebo<br>(°C) | 47.9               | 50.9               | 55.2              |
| Active<br>(°C)  | 49.0               | 52.1               | 57.1              |

### 1.3.3. 薬物放出挙動（PLGA 分子量の影響）

まず「PLGA 分子量の影響①」として、PLGA の分子量がマイクロスフェアからのタクロリムス放出挙動へ与える影響を評価するために、それぞれ分子量の異なる PLGA を用いて 3 種類のマイクロスフェア製剤を調製した。PLGA には、RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), RG503H (L/G = 50/50, Mw = 46000), および RG504H (L/G = 50/50, Mw = 59300) を用いた。調製後の SEM 画像は図 6 のようになっており、いずれのマイクロスフェアも表面に凹凸を有するデンプル状の形状を示した。データは示さないが、同様の方法で調製したタクロリムス非含有のマイクロスフェアでは、このような形状は観察されず平滑な表面であった。また、これらのマイクロスフェアからのタクロリムス放出挙動を図 7 に示す。Form. 6 (RG502H), Form. 7 (RG503H), Form. 8 (RG504H) と PLGA の分子量が増加するのに伴い、薬物放出速度は低下する傾向が見られた。

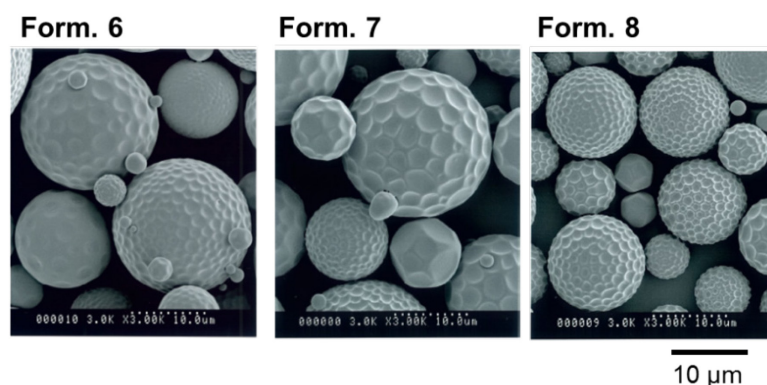


図 6 マイクロスフェアの SEM 画像（PLGA 分子量の影響①）：

Form. 6 : RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), Form. 7 : RG503H (L/G = 50/50, Mw = 46000), Form. 8 : RG504H (L/G = 50/50, Mw = 59300)。

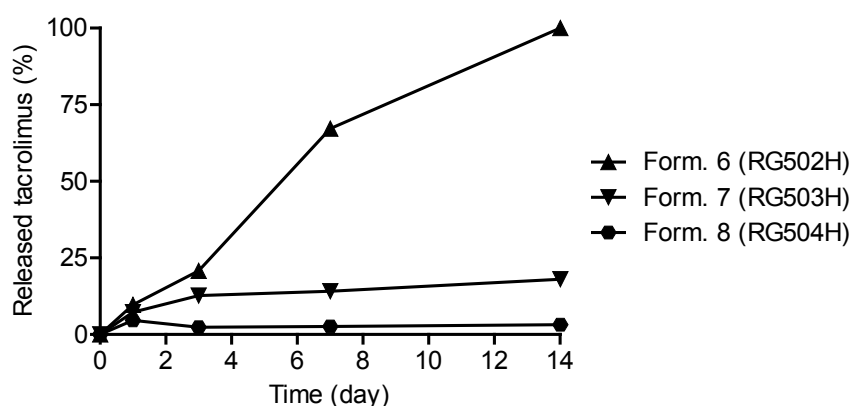


図 7 マイクロスフェアからのタクロリムス放出挙動（PLGA 分子量の影響①）：

マイクロスフェアからのタクロリムス放出率を示す。Form. 6 : RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), Form. 7 : RG503H (L/G = 50/50, Mw = 46000), Form. 8 : RG504H (L/G = 50/50, Mw = 59300)。

続いて「PLGA 分子量の影響②」として、分子量の異なる RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100) と RG503H (L/G = 50/50, Mw = 46000) を混合することで薬物放出速度が制御できるか検証した。RG502H/RG503H の仕込み重量比を 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 と変えながら、タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアを調製した。これらのマイクロスフェア製剤の SEM 画像を図 8 に示す。SEM 観察の結果、1 種の PLGA で調製した場合と同様に、いずれのマイクロスフェア製剤も表面にディンプル状の構造を有することが確認された。また、薬物放出試験の結果は図 9 のようになっており、分子量の大きい RG503H の比率が増加するにつれて、タクロリムスの放出速度は低下する傾向が見られた。このように、分子量の異なる PLGA を混合することによって一定の薬物放出制御は可能になることが示唆されたが、これらのマイクロスフェア製剤は薬物放出試験開始 3-7 日目までは薬物放出速度が低く、その後は高くなる 2 相性の薬物放出挙動を示した。このような薬物放出挙動の場合、動物へ投与した際は安定した血中タクロリムス濃度が得られないと予想される。そのため、より精密な薬物放出制御を目指し、PLGA の分子量だけでなく L/G 比がタクロリムス放出挙動へ与える影響も評価することとした。

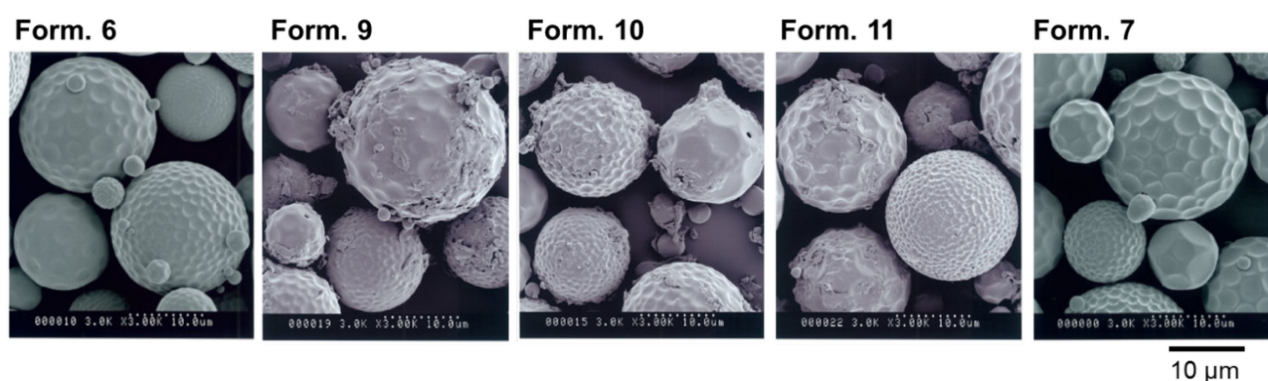


図 8 マイクロスフェアの SEM 画像 (PLGA 分子量の影響②) :

Form. 6 : RG502H/RG503H = 100/0 (w/w), Form. 9 : RG502H/RG503H = 75/25 (w/w), Form. 10 : RG502H/RG503H = 50/50 (w/w), Form. 11 : RG502H/RG503H = 25/75 (w/w), Form. 7 : RG502H/RG503H = 0/100 (w/w)。RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), RG503H (L/G = 50/50, Mw = 46000)。

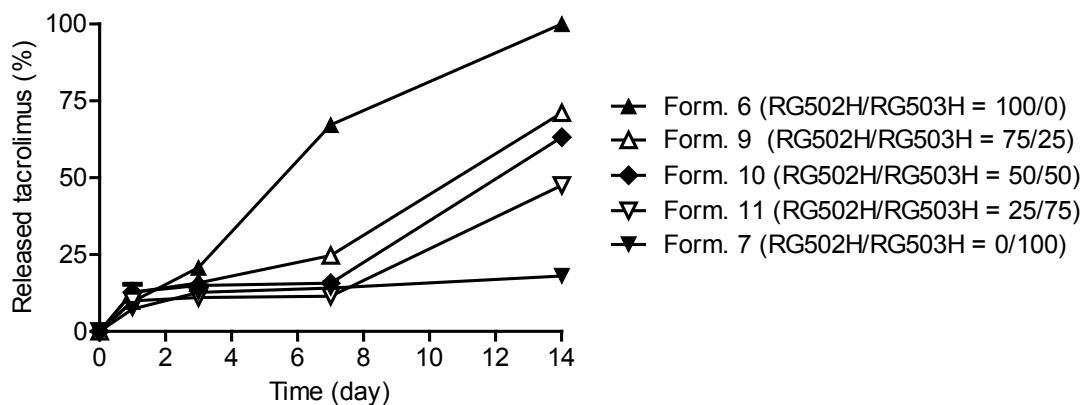


図9 マイクロスフェアからのタクロリムス放出挙動 (PLGA 分子量の影響②) :

マイクロスフェアからのタクロリムス放出率を平均値で示す。Form. 6 : RG502H/RG503H = 100/0 (w/w), Form. 9 : RG502H/RG503H = 75/25 (w/w), Form. 10 : RG502H/RG503H = 50/50 (w/w), Form. 11 : RG502H/RG503H = 25/75 (w/w), Form. 7 : RG502H/RG503H = 0/100 (w/w)。RG502H (L/G = 50/50,  $M_w$  = 16100), RG503H (L/G = 50/50,  $M_w$  = 46000)。

### 1.3.4. 薬物放出挙動 (L/G 比の影響)

前項に続いて「L/G 比の影響①」として、PLGA の L/G 比がマイクロスフェアからの薬物放出挙動へ与える影響を評価するために、RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), RG752H (L/G = 75/25, Mw = 13600), R202H (L/G = 100/0, Mw = 18800) を用いて 3 種類のマイクロスフェア製剤を調製・評価した。SEM 観察の結果は図 10 のようになっており、Form. 6 : RG502H, Form. 1 : RG752H, Form. 5 : R202H と L/G 比が増えるにつれて、マイクロスフェア表面のディンプル構造が消失する様子が見られた。また、薬物放出試験の結果を図 11 に示す。RG502H から成るマイクロスフェアと RG752H から成るマイクロスフェアの薬物放出挙動に大きな差は認められなかったが、R202H を用いたマイクロスフェアからの薬物放出速度は非常に低かった。

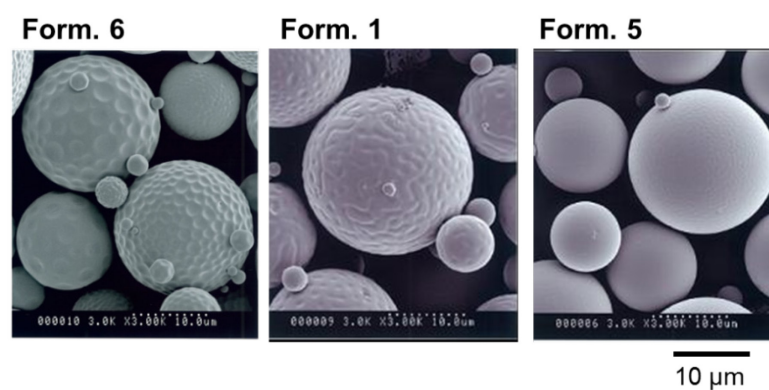


図 10 マイクロスフェアの SEM 画像 (L/G 比の影響①) :

Form. 6 : RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), Form. 1 : RG752H (L/G = 75/25, Mw = 13600), Form. 5 : R202H (L/G = 100/0, Mw = 18800)。

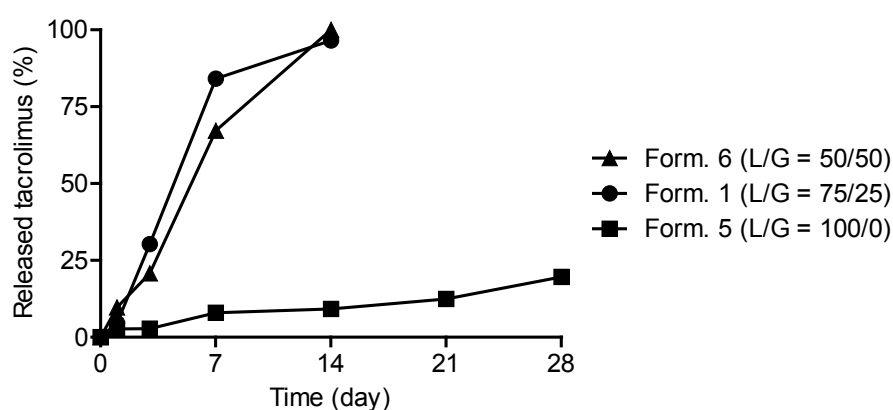


図 11 マイクロスフェアからのタクロリムス放出挙動 (L/G 比の影響①) :

マイクロスフェアからのタクロリムス放出率を平均値で示す。Form. 6 : RG502H (L/G = 50/50, Mw = 16100), Form. 1 : RG752H (L/G = 75/25, Mw = 13600), Form. 5 : R202H (L/G = 100/0, Mw = 18800)。

次に「L/G 比の影響②」として、L/G 比の異なる PLGA を混合することによる薬物放出速度の制御を目的に、PLGA : RG752H (L/G = 75/25, Mw = 13600) と PLA : R202H (L/G = 100/0, Mw = 18800) を混合してタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを調製した。Form. 1, 2, 3, 4, 5 の PLGA/PLA の仕込み重量比は、それぞれ 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 とした。得られたマイクロスフェア製剤の SEM 画像を図 12 に示す。本試験においても、PLA の比率が増加するにつれて、マイクロスフェア表面のディンプル構造が消失した。また、これらのマイクロスフェア製剤からのタクロリムス放出挙動は図 13 のようになった。PLGA/PLA が 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100 と変化するのに伴って薬物放出速度は減少し、薬物放出期間は 2 週間から 4 週間以上と変化した。さらに、分子量の異なる PLGA を混合したマイクロスフェア製剤の薬物放出試験の際に見られたような 2 相性の薬物放出挙動は、少なくとも本放出試験の期間内では認められなかった。特に、2 週間や 4 週間といった期間では安定したタクロリムス放出速度を維持する処方が見出された。そのため、第 2 章および第 3 章の *in vivo* 試験では、約 2 週間でタクロリムスを放出する Form. 1 (PLGA/PLA = 100/0) と約 4 週間で放出する Form. 3 (PLGA/PLA = 50/50) を用いることとした。

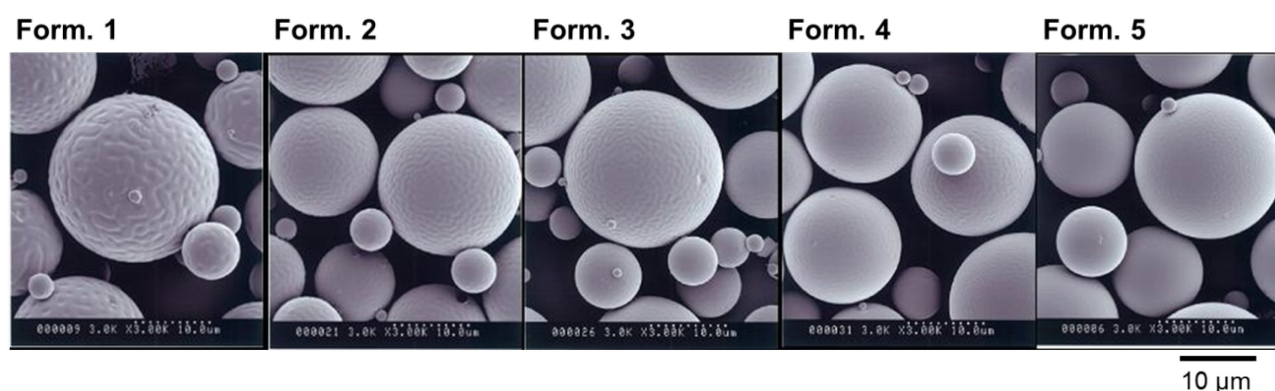


図 12 マイクロスフェアの SEM 画像 (L/G 比の影響②) :

Form. 1 : PLGA/PLA = 100/0 (w/w), Form. 2 : PLGA/PLA = 75/25 (w/w), Form. 3 : PLGA/PLA = 50/50 (w/w), Form. 4 : PLGA/PLA = 25/75 (w/w), Form. 5 : PLGA/PLA = 0/100 (w/w)。PLGA : RG752H (L/G = 75/25, Mw = 13600), PLA : R202H (L/G = 100/0, Mw = 18800)。

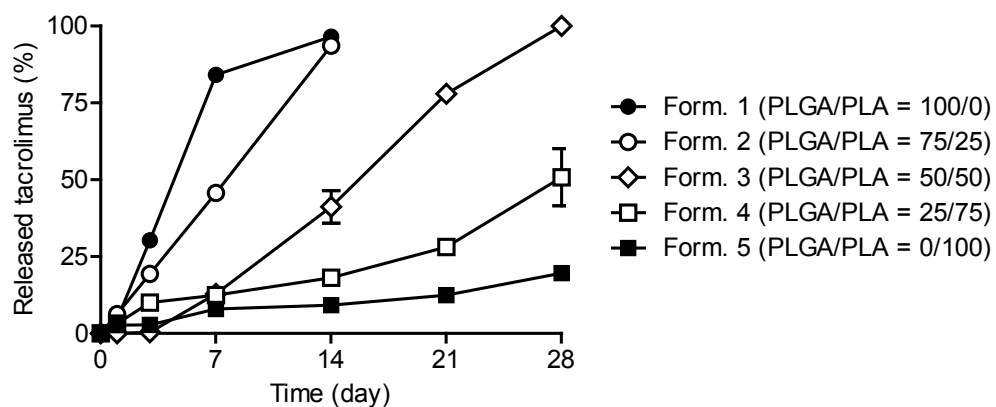


図 13 マイクロスフェアからのタクロリムス放出挙動 (L/G 比の影響②) :

マイクロスフェアからのタクロリムス放出率を平均  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ) で示す。Form. 1 : PLGA/PLA = 100/0 (w/w), Form. 2 : PLGA/PLA = 75/25 (w/w), Form. 3 : PLGA/PLA = 50/50 (w/w), Form. 4 : PLGA/PLA = 25/75 (w/w), Form. 5 : PLGA/PLA = 0/100 (w/w)。PLGA : RG752H (L/G = 75/25,  $M_w = 13600$ ), PLA : R202H (L/G = 100/0,  $M_w = 18800$ )。

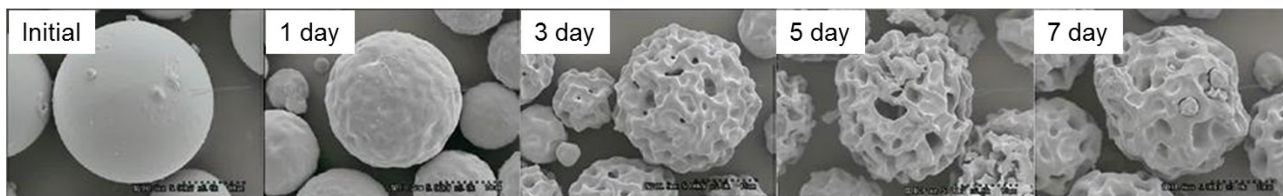


### 1.3.5. マイクロスフェアの分解挙動

マイクロスフェア製剤の薬物放出機構と分解挙動について考察するために、薬物放出試験後のマイクロスフェアを継時的にサンプリングし、凍結乾燥後のサンプルについて SEM 観察および重量測定を行った。サンプルには、Form. 1 (PLGA : L/G = 75/25, Mw = 13600) と Form. 5 (PLA : L/G = 100/0, Mw = 18800) を用いた。

図 14 に示すように、PLGA を用いたマイクロスフェアについては、Placebo (タクロリムス非含有) も Active (タクロリムス含有) も、継時的にマイクロスフェアが分解して多孔質構造になっていく様子が観察された。一方で、PLA を用いたマイクロスフェアでは、分解する様子はほとんど観察されなかった。また、これらのマイクロスフェアの重量減少率は図 15 のようになっており、いずれのマイクロスフェア製剤についても重量減少は薬物放出挙動と類似した時間推移を示した。

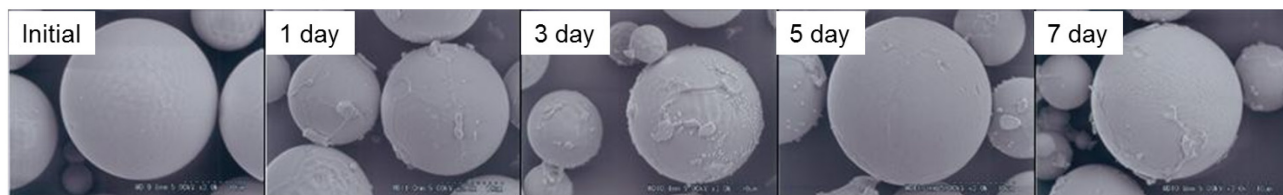
Form. 1 (Placebo, PLGA)



Form. 1 (Active, PLGA)



Form. 5 (Active, PLA)



10  $\mu$ m

図 14 薬物放出試験後のマイクロスフェアの SEM 画像：

Form. 1 : PLGA (L/G = 75/25, Mw = 13600), Form. 5 : PLA (L/G = 100/0, Mw = 18800)。



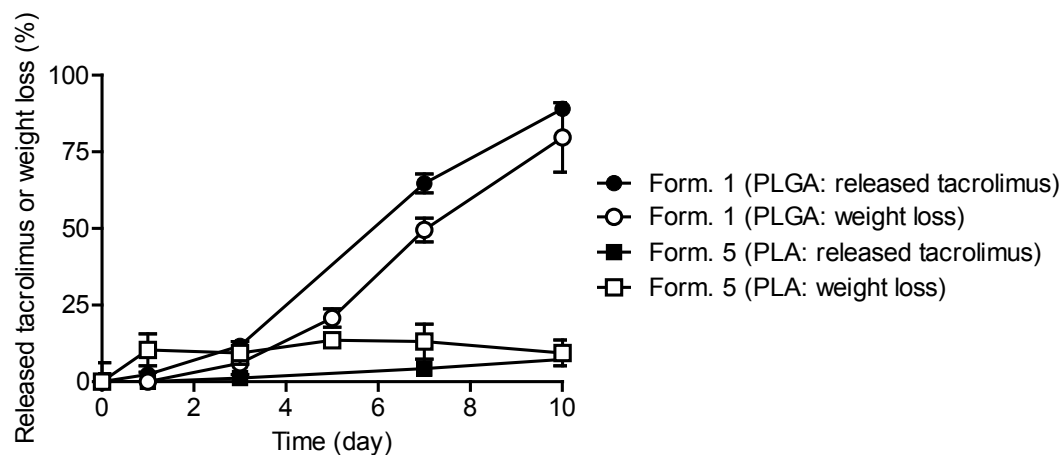


図 15 マイクロスフェアの薬物放出率と重量減少率：

マイクロスフェアからのタクロリムス放出率およびマイクロスフェアの重量減少率を平均  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) で示す。Form. 1 : PLGA (L/G = 75/25,  $M_w = 13600$ ), Form. 5 : PLA (L/G = 100/0,  $M_w = 18800$ )。

## 1.4. 考察

表 2 で示したように、o/w エマルション法を用いてタクロリムス含有マイクロスフェアを調製したところ、いずれの処方についても封入効率は 80%以上であった。タクロリムスはオクタノール/水分配係数 (logP) が 3 以上、水への溶解度が 100 µg/mL 以下の難溶性薬物である[1]。このタクロリムスの疎水性の高さが、2 つの要因で高い封入効率へ寄与していると考えられる。1 つは、タクロリムスがマイクロスフェア調製時に o 相から w 相へ移行しづらいという要因である[60]。o/w エマルション法では、o 相の有機溶媒の蒸発に伴って o 相に存在する薬物および PLGA・PLA が固化するため、水への溶解度が低いタクロリムスは調製時に w 相へ移行しづらく、高い効率でマイクロスフェア内へ封入されたものと推察される。もう 1 つは、疎水性相互作用の影響である[61]。PLGA や PLA は側鎖が疎水性であるため、疎水性の高いタクロリムスとの疎水性相互作用が高い封入効率に関与している可能性が考えられる。

また、分子量の高い PLGA を使用した際にはタクロリムスの封入効率は 80%程度であったが、分子量の低い PLGA や PLA を用いた場合には約 100%の封入効率でマイクロスフェア製剤を調製できた。そのため、図 5 で示したように、PLGA や PLA の分子数が増大するにつれて封入効率は高くなる傾向を示した。本研究で使用した PLGA および PLA は末端官能基が uncap されてカルボキシル基になっているものであり、PLGA や PLA の分子数はポリマー末端のカルボキシル基の数と等しい。よって、この末端カルボキシル基が封入効率の向上へ寄与している可能性が示唆された。末端の官能基を uncap すると、特に塩基性薬物については薬物と PLGA・PLA 末端カルボキシル基との相互作用が強まるため、封入効率は高まることが報告されている[62, 63]。一方で、PLGA や PLA の分子量が封入効率へ与える影響は、薬物の物性によって異なっている[62-64]。これは、ポリマー分子量の減少は、(封入効率の上昇に寄与する) 単位重量あたりの末端カルボキシル基数の増加だけでなく、(封入効率の低減に寄与する) マイクロスフェア調製時の o 相粘度の減少にも寄与するためであると考えられている。以上の結果と報告例より、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアについては、o 相の粘度よりも末端カルボキシル基が封入効率に強く影響しているものと考えられる。この末端カルボキシル基が封入効率へ与える影響についても、2 つの要因が推察される。1 つは、末端カルボキシル基の存在によって、PLGA や PLA のポリマー鎖の剛直性が増し、疎水性のポリマー側鎖とタクロリムスが疎水性相互作用しやすくなるという可能性である。末端カルボキシル基が他の官能基で cap されていると、官能基が可塑剤として作用するために PLGA・PLA の剛直性が低下するという報告があるため、末端カルボキシル基の増加によって PLGA・PLA-タクロリムス間の疎水性相互作用が強まるものと考えられる[65]。もう 1 つの要因は、末端カルボキシル基とタクロリムスとの水素結合の影響である。タクロリムスの構造を考慮すると、薬物と末端カルボキシル基とがイオン性相互作用する可能性は低いですが、水素結合によって封入効率が高まった可能性は考えられる。以上より、タクロリムスと PLGA・PLA との相互作用およびマイクロスフェアへのタクロリムスの封入という観点では、比較的分子量の低い PLGA や PLA を用いることが有効で

あることが示唆された。

表 3 のように、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアは、プラセボ PLGA・PLA マイクロスフェアよりも 1-2°C 高い T<sub>g</sub> を示した。一般的には、ポリマーマトリックス中に低分子を添加すると、低分子が可塑剤として作用するために T<sub>g</sub> は低下する[66]。しかし、薬物を PLGA・PLA マイクロスフェアへ封入したときの T<sub>g</sub> の変化は薬物やポリマーの物性によって異なっており、薬物と PLGA・PLA との間に相互作用が働く場合は、薬物の添加によってマイクロスフェアの T<sub>g</sub> が上昇する[67-69]。例えば、paclitaxel 封入 PLGA マイクロスフェアについては、薬物と PLGA との間に水素結合が生じると考えられており、paclitaxel 封入 PLGA マイクロスフェアはプラセボ PLGA マイクロスフェアよりも 0.3°C から 10.7°C 高い T<sub>g</sub> を示すことが報告されている[67]。タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアにおいても、薬物の添加によって僅かではあるものの T<sub>g</sub> が上昇したことから、タクロリムス-PLGA・PLA 間の相互作用が示唆された。以上の結果より、これらの相互作用などによって、タクロリムスは高い封入効率でマイクロスフェア内へ封入されたものと考えられた。

図 7 や図 11 で示したように、各種の PLGA・PLA を用いたマイクロスフェアからの薬物放出挙動を評価した結果、PLGA の分子量が増加するほど、また PLGA・PLA の L/G 比が増加するほど、マイクロスフェアからのタクロリムス放出速度は低下した。これは、PLGA・PLA 自身の分解速度と一致する傾向であった[29, 38]。また、分子量の異なる PLGA を混合した場合の薬物放出挙動は図 9 のようになり、放出試験開始 3-7 日以降に薬物放出速度は高くなる傾向があった。マイクロスフェア中の PLGA や PLA は、加水分解されて分子量の低いオリゴマーになった後にマイクロスフェアから放出されると考えられており、分子量の高い PLGA・PLA を用いた場合にはポリマーの加水分解が進行するまで薬物放出のラグタイムを生じたものと推察される[70]。一方で、比較的分子量の低い PLGA や PLA を用い、PLGA/PLA 比を変えて混合した場合はこのようなラグタイムは認められず、少なくとも薬物放出試験開始 4 週間の間は安定したタクロリムス放出速度を維持していた(図 13)。これらの結果から、比較的分子量の低い PLGA や PLA を用い、その PLGA/PLA 比によって薬物放出期間を制御するというアプローチは、マイクロスフェア製剤の封入効率を高めるという観点だけではなく、タクロリムスの放出を制御するという観点でも有用である可能性が示された。そのため、以降の *in vivo* 試験では、PLGA : RG752H (L/G = 75/25, Mw = 13600) と PLA : R202H (L/G = 100/0, Mw = 18800) を用い、薬物放出期間が比較的短い Form. 1 (PLGA/PLA = 100/0) と比較的長い Form. 3 (PLGA/PLA = 50/50) を用いることとした。

さらに、マイクロスフェアの分解挙動を SEM (図 14) および重量変化 (図 15) から評価した試験の結果より、PLGA の分解に伴ってタクロリムスはマイクロスフェアから放出されることが示唆された。一般的に、PLGA・PLA マイクロスフェアを用いた製剤は、3 相性の放出挙動を示すと言われている[71, 72]。最初に、マイクロスフェア表面に存在する薬物が初期バーストによって放出

される。次の第2相では、マイクロスフェアから薬物が拡散によって比較的低い速度で放出される。そして第3相では、ポリマーマトリックスの分解によって薬物放出速度が高くなると考えられている。タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアについては、いずれの処方においても薬物放出試験初期にタクロリムスが大量にバーストするような現象は認められなかった。さらに、薬物放出挙動はマイクロスフェアの重量減少の時間推移と連動していた。これらの結果より、PLGA・PLA マイクロスフェアからの主なタクロリムス放出機構は、初期バーストや薬物の拡散ではなく、PLGA の分解に伴うものであることが示唆された。

## 2. マイクロスフェア製剤の薬物動態評価

### 2.1. 序論

PLGA・PLA マイクロスフェア製剤を動物の皮下や筋肉内へ投与すると、マイクロスフェアから薬物が放出された後、薬物が全身循環血へ吸収される。そこで本章では、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの放出機構・吸収機構について、ラットにおける薬物動態評価と第1章で得られた知見とを合わせることで、論考を行った。

また、PLGA や PLA を用いた製剤の *in vitro* 薬物放出速度と *in vivo* 薬物吸収速度については、*in vitro-in vivo correlation* の構築を目的として様々な *in vitro* 試験条件が検討されているものの、*in vitro* から *in vivo* への外挿は一般的に困難である[73]。両者が異なる要因としては、溶媒量・局所 pH の違いや酵素・免疫反応の影響などが指摘されている[74, 75]。タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアにおいても、*in vitro* 薬物放出速度と *in vivo* 薬物吸収速度とに差が認められたため、その差異について考察を行った。特に投与量が多い条件では、投与量が少ないときと比較してタクロリムスの吸収速度が低下する吸収飽和現象が認められ、将来的にヒトを想定した投与量では薬物吸収速度が遅延する懸念もあったため、薬物吸収速度の改善についても検討を行うこととした。

続いて、マイクロスフェア製剤の長期にわたる薬物動態試験を実施した。アドヒアランス改善の観点では、より長期間の徐放によって投与頻度を低減することが望まれる。そこで、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアをラットやサルへ単回投与した後、6-9 週間にわたって薬物動態を解析することで、本マイクロスフェア製剤の長期徐放性注射剤としての可能性を評価した。

さらに、PLGA・PLA マイクロスフェア製剤の薬物動態を複数の動物種で検討した研究例は散見されるものの、動物種差が薬物吸収速度へどのような影響を与えるかという点についてはほとんど報告されていない[76-81]。そこで本章では、ラット・サル・ウサギへタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを投与した際の薬物吸収速度を比較し、動物種差がタクロリムスの吸収速度へ与える影響についても考察を行った。

## 2.2. 実験材料および実験方法

### 2.2.1. 実験材料および動物

マイクロスフェア製剤は、第1章で調製した Form. 1 (PLGA/PLA = 100/0, PLGA : L/G = 75/25, Mw = 13600) または Form. 3 (PLGA/PLA = 50/50, PLGA : L/G = 75/25, Mw = 13600, PLA : L/G = 100/0, Mw = 18800) を用いた。

タクロリムス注射液 (プログラフ®注射液) は、アステラス製薬で調製されたものを用いた。カルボキシメチルセルロースナトリウムは五徳薬品から、スクロースは和光純薬工業から、注射用水は大塚製薬から、アロンアルファ A「三共」は第一三共から、それぞれ購入した。アスコマイシンは、和光純薬工業から入手した。その他の試薬は、特記しない限り特級品を用いた。

雄性 Lewis ラットは、6 週齢のものを日本エスエルシーから購入し、7 週齢になったラットを試験に使用した。また、雄性白色ウサギ (Kbt : NZW) および雄性カニクイザルは、新日本科学のものを使用した。

本章におけるすべての動物実験は、アステラス製薬の動物実験委員会で倫理的な基準に沿って審査・受理されたプロトコルを遵守して実施した。なお、使用した動物実験施設は、The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) に認証されている。

### 2.2.2. ラット薬物動態試験

タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアをラットへ投与する際には、分散剤としてカルボキシメチルセルロースナトリウム (0.5 w/v%)、等張化剤としてスクロース (10 w/v%) を注射用水に溶解させたものを分散液とした。固形分濃度がそれぞれ 1, 3, 6 w/v% となるようにマイクロスフェア製剤を分散液でメスアップし、転倒混和および超音波処理によって分散させた。また参照として、タクロリムス注射液を生理食塩水で 0.3 mg/mL へ希釈したものを投与サンプルに用いた。これらの投与サンプルを所定量シリンジに量り取り、7 週齢雄性 Lewis ラットの背部皮下へ単回投与した。一部の試験については、投与部位を大腿部の筋肉内もしくは背部皮下 2 か所とした。投与後、投与サンプルの漏れを防ぐために投与部位をアロンアルファで塞いだ。投与 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 時間後および 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42 日後に、イソフルラン吸入麻酔下でヘパリン処理シリンジを用いて心臓から採血した後、頸椎脱臼で安楽死させた。各時点 n = 3-6 で採血を行い、後述する定量法で血中薬物濃度の平均値  $\pm$  標準偏差を算出した。

投与部位周辺は、事前に電気バリカンで剃毛した。また、ラットは飽食・自由飲水下で飼育し、体重を投与前と採血時に測定した。長期間における試験でラットの体重変化が大きい場合は、参考として血中濃度の体重補正を行った。体重補正した血中濃度は、測定値に採血時の体重を乗じ、投与時の体重で除することで算出した。

薬物吸収率の時間推移は、デコンボリューション法 (point-area method) によって計算した。デコンボリューションの入力関数には、静脈内投与時の 2-コンパートメントモデルにおける血中薬物

濃度推移の式を、出力関数にはマイクロスフェア製剤投与時の血中薬物濃度推移の平均値を用いた。2-コンパートメントモデルの薬物動態パラメーターは、ラットにタクロリムス溶液（タクロリムスとして 0.1 mg/kg）を静脈内投与した際の血中濃度推移（n = 3）から、Winnonlin™を用いて算出した。

### 2.2.3. サル薬物動態試験

ラット薬物動態試験と同様に、カルボキシメチルセルロースナトリウム 0.5 w/v%およびスクロース 10 w/v%を注射用水に溶解させたものを分散液とした。固形分濃度 1 w/v%となるようにマイクロスフェア製剤を分散液でメスアップし、転倒混和および超音波処理によって分散させたものを投与サンプルとした。本投与サンプルを所定量シリンジに量り取り、38-45 月齢（2.9-3.2 kg）雄性カニクイザルの背部皮下へ単回投与した。投与後、投与サンプルの漏れを防ぐために投与部位をアロンアルファで塞いだ。投与 1, 2, 4, 8 時間後および 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63 日後に、ヘパリン処理シリンジを用いて大腿静脈から採血を行った。各時点 n = 3 で採血を行い、後述する定量法で血中薬物濃度の平均値 ± 標準偏差を算出した。

投与部位周辺は、事前に電気バリカンで剃毛した。また、サルは自由飲水下で飼育し、1 日 1 回固形飼料を与え、体重を投与前と採血時に測定した。

薬物吸収率推移は、ラットと同様にして計算した。2-コンパートメントモデルの薬物動態パラメーターは、サルにタクロリムス溶液（タクロリムスとして 0.3 mg/kg）を静脈内投与した際の血中濃度推移（n = 3）から、Winnonlin™を用いて算出した。

### 2.2.4. ウサギ薬物動態試験

ラットおよびサルにおける薬物動態試験と同様の分散液を用いた。固形分濃度が 6 w/v%となるようにマイクロスフェア製剤を分散液でメスアップし、転倒混和および超音波処理によって分散させたものを投与サンプルとした。本投与サンプルを所定量シリンジに量り取り、3-4 月齢（2.7-3.5 kg）雄性白色ウサギ（Kbt : NZW）の背部皮下へ単回投与した。投与 1, 2, 4, 8 時間後および 1, 3, 7 日後に、ヘパリン処理シリンジを用いて耳介静脈から採血を行った。すべての採血が終了した後、ペントバルビタールナトリウム水溶液（64.8 mg/mL, 0.7 mL/kg）の耳介静脈内投与による麻酔下で、放血安楽死させた。各時点 n = 3 で採血を行い、後述する定量法で血中薬物濃度の平均値 ± 標準偏差を算出した。

投与部位周辺は、事前に電気バリカンで剃毛した。また、ウサギは自由飲水下で飼育し、1 日 1 回固形飼料を与え、体重を投与前と採血時に測定した。

薬物吸収率推移は、ラットやサルと同様にして計算した。2-コンパートメントモデルの薬物動態パラメーターは、ウサギにタクロリムス溶液（タクロリムスとして 1.0 mg/kg）を静脈内投与した際の血中濃度推移（n = 3）から、Winnonlin™を用いて算出した。

### 2.2.5. 血中薬物濃度の定量法

血液中のタクロリムス濃度は、以下の手順で測定した。

まず、全血 0.5 mL に精製水 0.1 mL と内部標準(アスコマイシン 50 ng/mL) メタノール溶液 0.1 mL を加えた。続いて、除タンパク液として 8 w/v%硫酸亜鉛水溶液/メタノール/アセトニトリル = 20/12/8 (体積比) 3 mL を添加して混合した後、遠心分離 (1870 g, 15 min) を行った。上清を C18 カラム (Bond Elut C18, 100 mg/1 mL, アジレントテクノロジー) へ添加し、40%メタノール 1 mL とヘキサン 1 mL で洗浄した。さらに、メタノール 2 mL で抽出を行い、溶離液の溶媒を蒸発させた後、50%アセトニトリル 0.4 mL に溶解させて試料溶液とした。

タクロリムスの定量には、HPLC-MS として DGU-20A5, LC-20AD, SIL-20AC, CBM-20A, SPD-20A, CTO-20AC (島津製作所) および TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific) を用いた。測定条件を以下に示す。



<HPLC 条件>

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| カラム   | Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm)    |
| カラム温度 | 55°C                              |
| 移動相 A | 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液                  |
| 移動相 B | 1 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液              |
| 流量    | 0.2 mL/min (0-2.5 min, 100%B)     |
|       | 0.75 mL/min (2.5-4.0 min, 60% B)  |
|       | 0.75 mL/min (4.0-5.0 min, 100% B) |
|       | 0.2 mL/min (5.0-5.5 min, 100%B)   |
| 注入量   | 20 µL                             |

<MS 条件>

|           |                                  |
|-----------|----------------------------------|
| 測定時間      | 6.0 min                          |
| 切替時間      | 0.0 min: Inject/Waste            |
|           | 2.0 min: Load/Detector           |
|           | 4.0 min: Inject/Waste            |
| 内部標準      | 809.500(Parent), 756.645(Center) |
| タクロリムス    | 821.600(Parent), 768.611(Center) |
| イオン化法     | ESI (Positive)                   |
| シースガス圧    | 50 psi                           |
| オグジリアリガス圧 | 15 unit                          |
| キャピラリー温度  | 250°C                            |

## 2.3. 結果

### 2.3.1. ラットの薬物動態に及ぼすマイクロスフェア製剤化の影響

薬物動態評価を始めるにあたり、まずタクロリムス溶液およびタクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアをラット皮下へ単回投与した際の薬物動態を比較した。マイクロスフェア製剤には、*in vitro* で約 14 日間にわたって薬物を放出する Form. 1 を使用した。投与初期の血中濃度を比較するために、投与後 24 時間までの薬物動態を評価した。*in vivo* における薬物放出速度は不明であるが、1 日あたりの薬物放出量をおよそ揃えるために、タクロリムス溶液は 0.3 mg/kg で、マイクロスフェアはタクロリムスとして 5.0 mg/kg (14 日間の一定速度の放出を仮定すると、 $5.0/14 \approx 0.36$  mg/kg/day) で投与した。また、マイクロスフェア製剤の分散液は、固形分濃度を 1 w/v% とした。結果を図 16 に示す。タクロリムス溶液と比較して、マイクロスフェア製剤では投与後 1 時間から 24 時間にわたって安定した血中濃度を示した。さらに、マイクロスフェア製剤の方がタクロリムスとして高含量で投与したにも関わらず、初期バーストに起因するような投与初期の急激な血中濃度の立ち上がりは認められなかった。

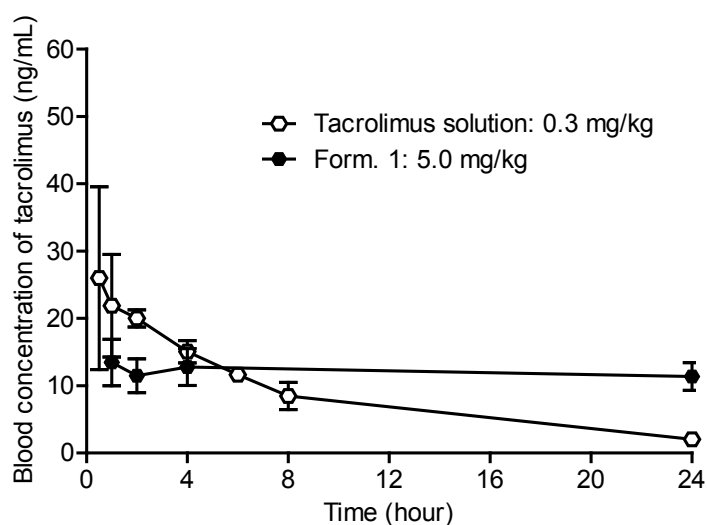


図 16 マイクロスフェア製剤化がラットの血中タクロリムス濃度推移に及ぼす影響

### 2.3.2. ラットの薬物動態に及ぼす投与経路の影響

次に投与経路の影響を評価するために、タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェア Form. 1 をラットの皮下および筋肉内へ単回投与した際の血中薬物濃度推移を、2 週間にわたって評価した。投与量は、タクロリムスとして 27.0 mg/kg とした。また、マイクロスフェア製剤の分散液は、固形分濃度 3 w/v% となるように調製した。一般的に皮下よりも筋肉内の方が、脂肪組織が少なく血管も密に分布しているため薬物の吸収速度は高いと言われているが、本マイクロスフェア製剤については図 17 に示すようにいずれの投与経路も類似した血中薬物濃度推移を示した[82]。また、いずれの投与経路においても、2 週間にわたって 20-30 ng/mL 程度の安定した血中濃度を持続していた。これ以降の *in vivo* 試験は、すべて皮下投与で実験を行った。

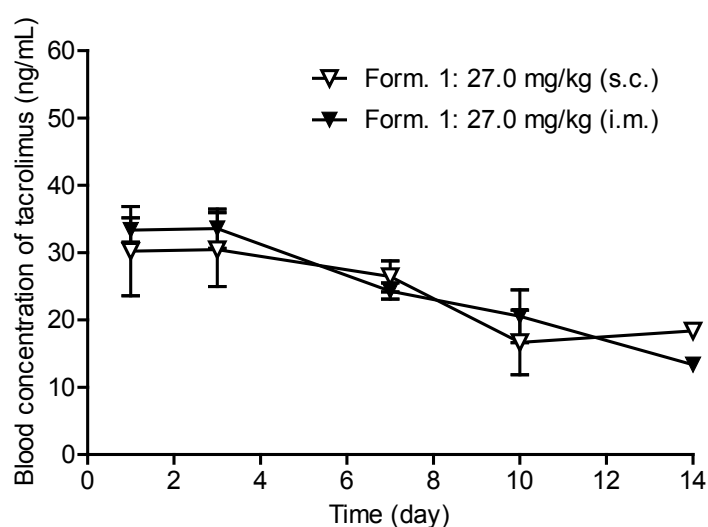


図 17 投与経路がラットの血中タクロリムス濃度推移に及ぼす影響：  
s.c. : 皮下投与, i.m. : 筋肉内投与。

### 2.3.3. ラットの薬物動態に及ぼす投与量の影響

投与条件が薬物動態へ与える影響を評価する目的で、タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェア Form. 1 を表 4 に示すような条件でラットへ単回皮下投与した。タクロリムスとしての投与量 (mg/kg) は 4 水準とし、固形分濃度 1, 3, 6 w/v% それぞれにおいて投与液量を変えながら実験を行った。

表 4 タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアのラットへの投与条件

| Dose       | Solid content |              |             |
|------------|---------------|--------------|-------------|
|            | 1 w/v%        | 3 w/v%       | 6 w/v%      |
| 6.75 mg/kg | 450 $\mu$ L   | 150 $\mu$ L  | 75 $\mu$ L  |
| 13.5 mg/kg | 900 $\mu$ L   | 300 $\mu$ L  | 150 $\mu$ L |
| 27.0 mg/kg | 1800 $\mu$ L  | 600 $\mu$ L  | 300 $\mu$ L |
| 54.0 mg/kg | -             | 1200 $\mu$ L | -           |

まず、固形分濃度 1 w/v% のマイクロスフェア分散液を投与液量 450, 900, 1800  $\mu$ L でラット皮下へ単回投与した。投与後 1 週間までの血中タクロリムス濃度推移を測定したところ、図 18 に示すように用量依存的に血中濃度が増加した。一方で、これらの投与条件における薬物吸収率推移は図 19 のようになった。投与液量が増加するにつれてタクロリムスの吸収速度はわずかに遅延する傾向が見られたが、いずれの条件においても *in vitro* の薬物放出速度と同様の速度で吸収された。

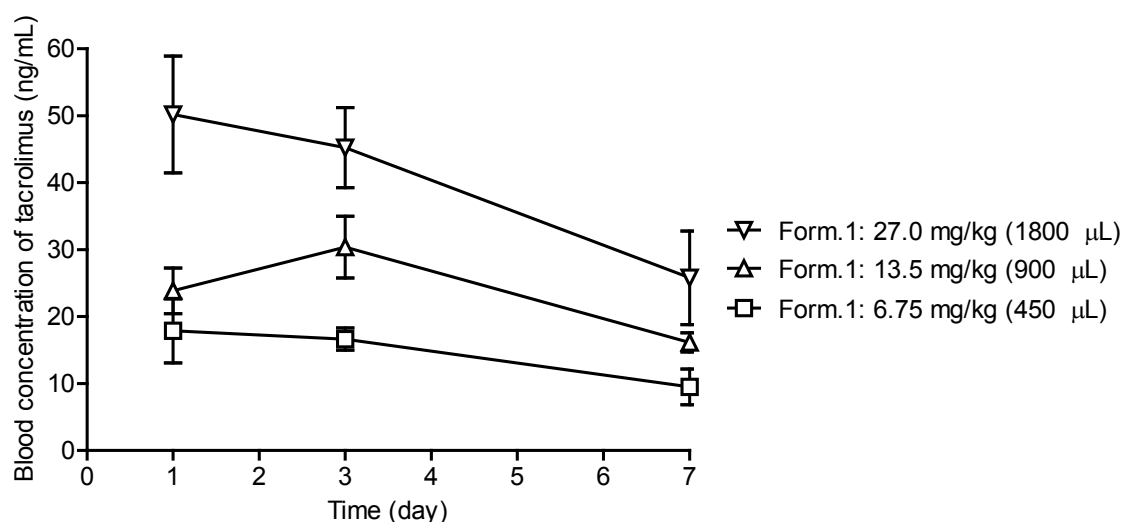


図 18 マイクロスフェアの投与量がラットの血中タクロリムス濃度推移に及ぼす影響 (固形分濃度 1 w/v%)

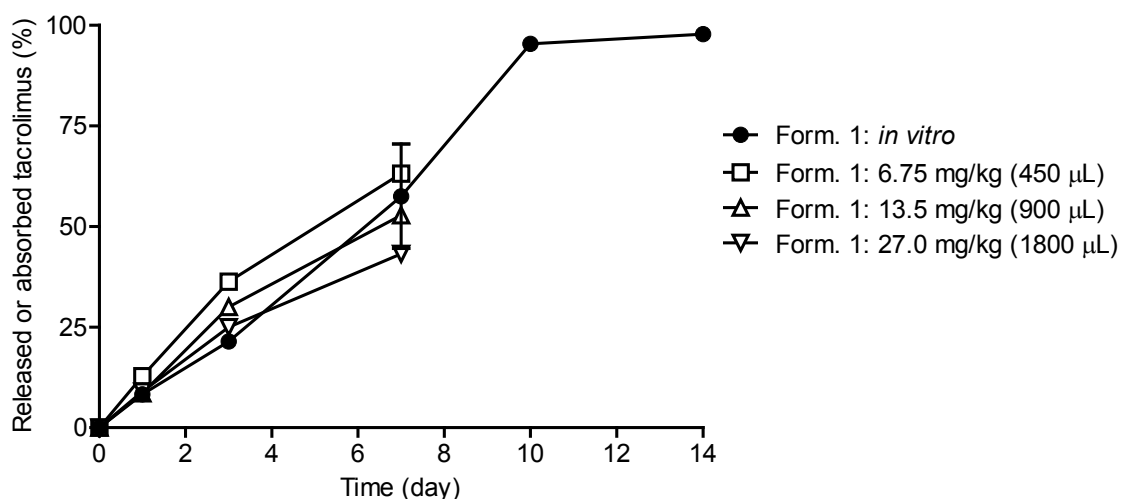


図 19 マイクロスフェアの投与量がラットの薬物吸収率推移に及ぼす影響 (固形分濃度 1 w/v%)

次に、固形分濃度 3 w/v%のマイクロスフェア分散液を投与液量 150, 300, 600, 1200  $\mu\text{L}$  でラット皮下へ単回投与した。本試験については、タクロリムスの投与量として 54.0 mg/kg (投与液量 1200  $\mu\text{L}$ ) についても評価を行い、さらに投与後 2 週間までの血中タクロリムス濃度推移を測定した。血中薬物濃度推移は図 20 のようになっており、固形分濃度 3 w/v%についても用量依存的な血中濃度の上昇が認められた。加えて、いずれの投与量においても 2 週間にわたってフラットな血中濃度を維持することが分かった。これらのマイクロスフェア製剤からの薬物吸収率推移は図 21 のようになり、固形分濃度 1 w/v%のときと同様に、投与液量の増加に伴ってタクロリムスの吸収速度は遅延することが確認された。一方で図 19 と図 21 を比較すると、固形分濃度 3 w/v%における薬物吸収速度は、1 w/v%のときよりも低い傾向にあり、特に投与量が多い場合は *in vitro* の薬物放出速度よりも明らかに低かった。

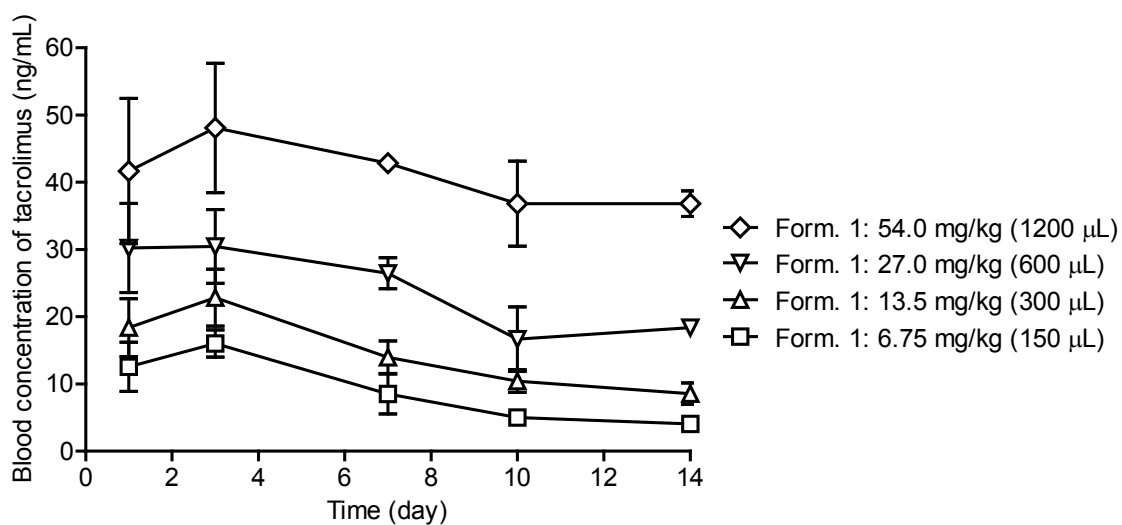


図 20 マイクロスフェアの投与量がラットの血中タクロリムス濃度推移に及ぼす影響 (固形分濃度 3 w/v%)

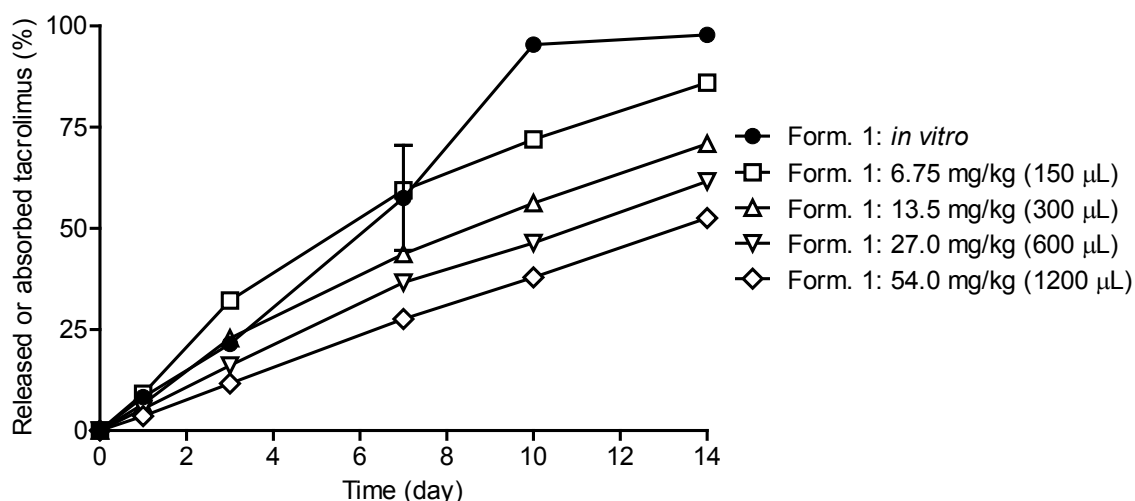


図 21 マイクロスフェアの投与量がラットの薬物吸収率推移に及ぼす影響 (固形分濃度 3 w/v%)

さらに、固形分濃度 6 w/v%のマイクロスフェア分散液についても、投与液量 75, 150, 300  $\mu$ L でラット皮下へ単回投与し、投与後 1 週間まで血中薬物濃度を測定した。血中薬物濃度推移を図 22 に、薬物吸収率推移を図 23 に示す。固形分濃度 1 w/v%や 3 w/v%のときと同様に、用量依存的に血中濃度が上昇すること、投与液量の増加によって薬物吸収速度は低下することが確認された。また、固形分濃度 1 w/v% (図 19)、固形分濃度 3 w/v% (図 21)、および固形分濃度 6 w/v% (図 23) の比較から、同じタクロリムスの投与量 (mg/kg) であっても、固形分濃度が高くなるにつれて薬物吸収速度は低下する傾向が見られた。

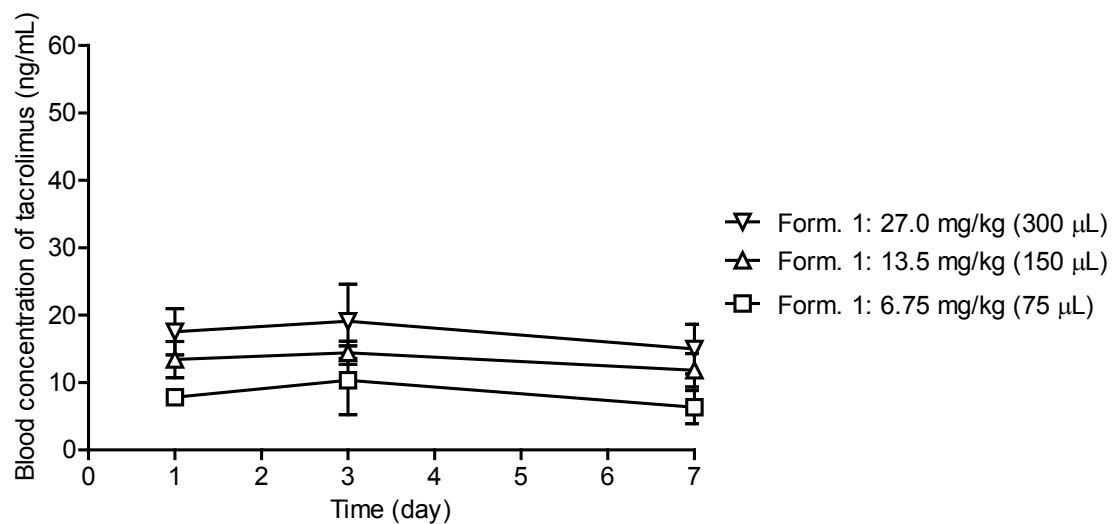


図 22 マイクロスフェアの投与量がラットの血中タクロリムス濃度推移に及ぼす影響 (固形分濃度 6 w/v%)

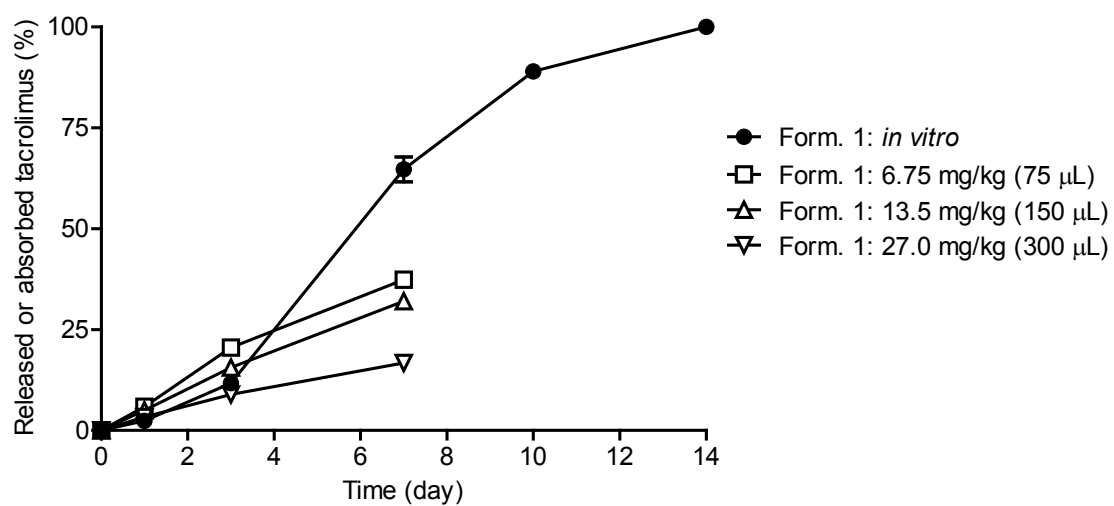


図 23 マイクロスフェアの投与量がラットの薬物吸収率推移に及ぼす影響 (固形分濃度 6 w/v%)

将来的に臨床用の製剤を目的としたとき、ラットとヒトの体重差を考慮するとヒトには多くのマイクロスフェア製剤を投与する必要がある。しかし、ヒトの皮下へ投与できる液量は限られているため、マイクロスフェアの固形分濃度をある程度増加させても吸収飽和させることなく全身循環血へ薬物を吸収させる必要がある。そこで、吸収速度の改善を目的として、皮下の複数箇所へマイクロスフェア製剤を投与した際の薬物動態を評価した。

固形分濃度 6 w/v%において、投与液量 150  $\mu$ L または 300  $\mu$ L のマイクロスフェア分散液を 1 か所に投与したときと半量ずつ 2 か所に分けて投与したときの血中薬物濃度推移を図 24 に示す。このように、1 か所よりも 2 か所に皮下投与した方が高い血中薬物濃度が得られた。本試験におけるタクロリムスの吸収率推移は図 25 のようになっており、*in vivo* における薬物吸収速度は、依然として *in vitro* より低い速度ではあるものの、複数箇所へ投与した方が高くなることが確認された。

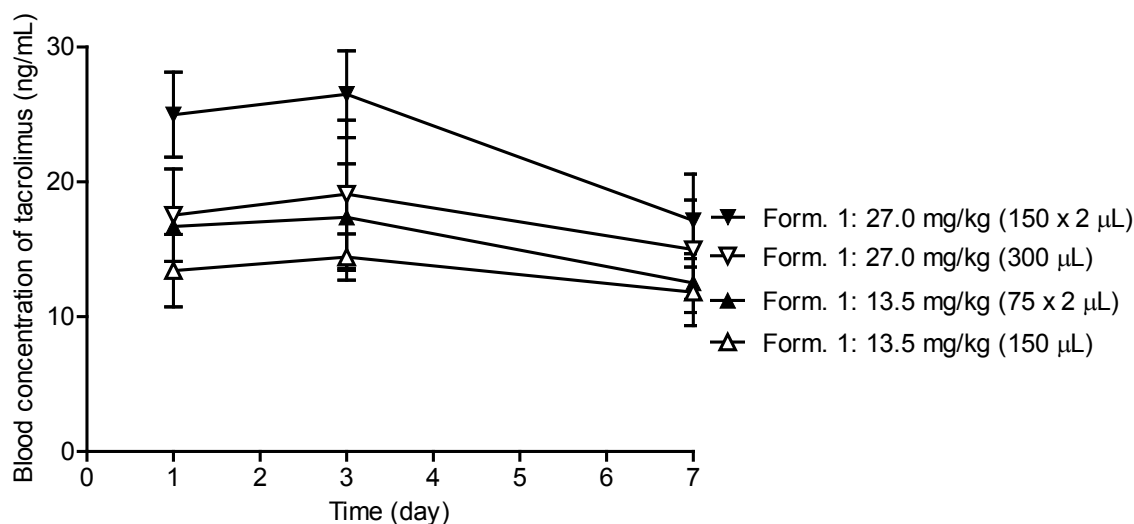


図 24 投与部位数がラットの血中タクロリムス濃度推移に及ぼす影響（固形分濃度 6 w/v%）

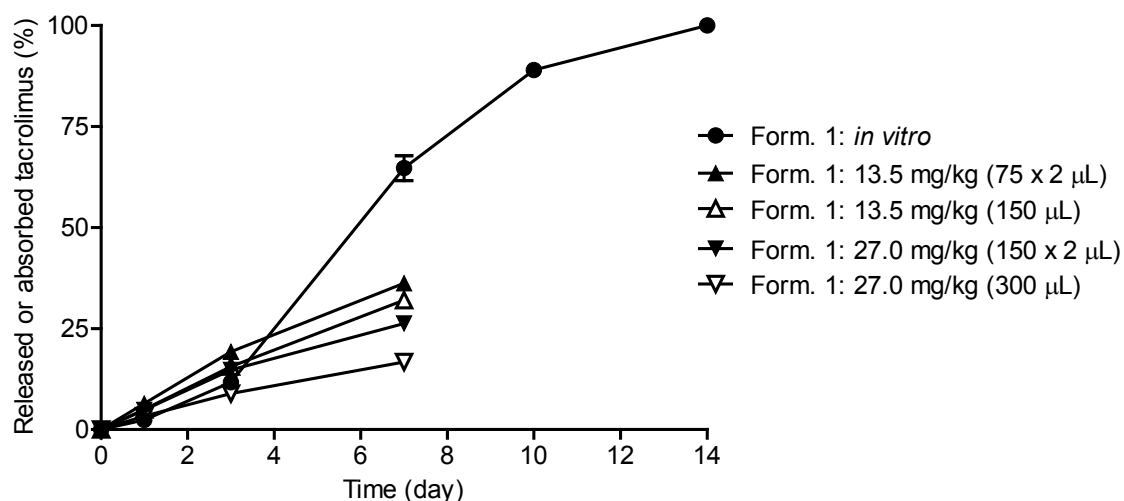


図 25 投与部位数がラットの薬物吸収率推移に及ぼす影響（固形分濃度 6 w/v%）



#### 2.3.4. 長期間におけるラットの薬物動態

これまでラットにおける薬物動態を投与後 1-2 週間の期間で評価してきたが、アドヒアランス向上の観点ではより長期にわたって薬物を徐放することが望ましい。そこで、6 週間にわたる血中濃度推移をラットで評価した。投与製剤には、*in vitro* でおよそ 4 週間にわたって薬物を放出する Form. 3 を用いた。投与量は、タクロリムスとして 7.5 mg/kg（固形分濃度 1 w/v%，投与液量 500  $\mu$ L）とした。

ラット皮下へ Form. 3 を単回投与した際の血中薬物濃度推移および薬物吸収率推移を、それぞれ図 26・図 27 に示す。まず血中濃度推移については、6 週間にわたり安定した血中濃度を維持していた。6 週間の間にラットの体重が平均で約 200 g から約 320 g へ増加したため、参考までに血中濃度を体重変化率で補正した値もプロットしているが、よりフラットな血中濃度を維持している様子が見られた。吸収率推移については、投与後 2 週間までは *in vitro* の薬物放出よりも高い速度で吸収されるのに対し、投与後 2 週間以降は *in vitro* よりも低い速度で吸収されることが分かった。そのため、*in vitro* での放出期間は約 4 週間であるのに対し、*in vivo* における薬物吸収は投与後 6 週間時点でも持続していた。

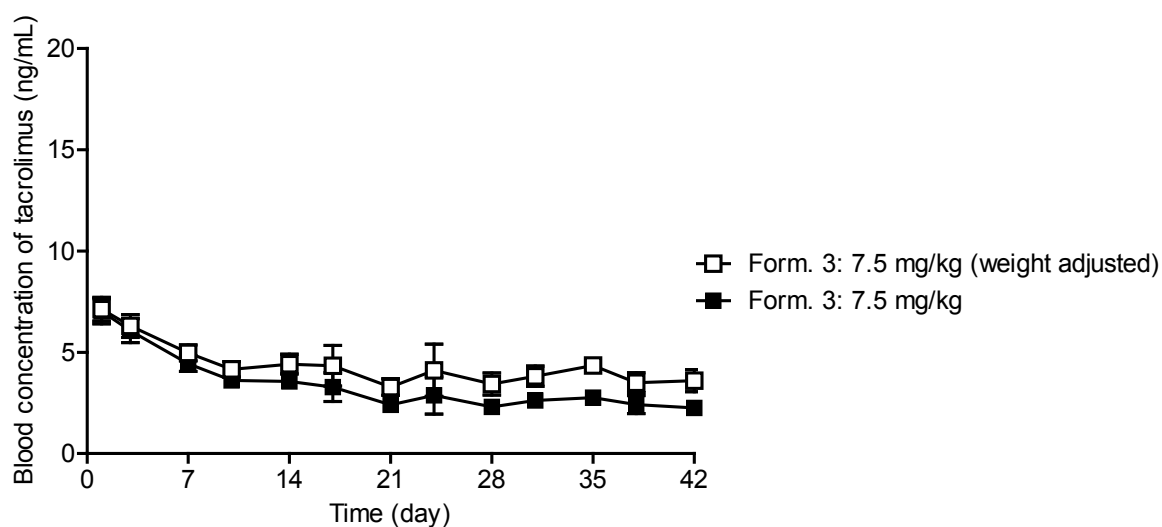


図 26 Form. 3 をラット皮下へ単回投与した際の長期における血中タクロリムス濃度推移

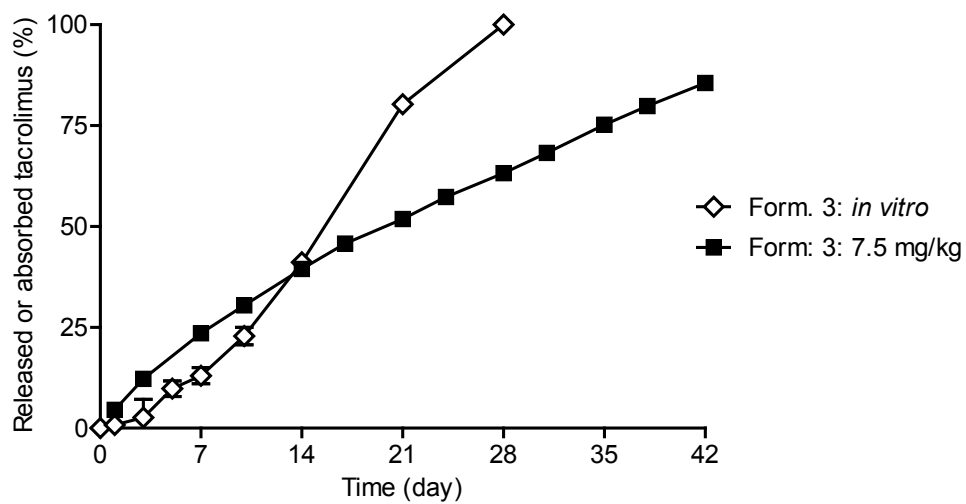


図 27 Form. 3 をラット皮下へ単回投与した際の長期における薬物吸収率推移

### 2.3.5. サルにおける薬物動態

長期の薬物動態試験に関して、ラットでは体重増加の影響が見られたため、体重変化の少ない系における血中濃度推移を評価する目的で、サルを用いた薬物動態試験を実施した。

投与製剤には、*in vitro* では約 2 週間で薬物放出する Form. 1 と約 4 週間で放出する Form. 3 を用いた。Form. 1 はタクロリムスとして 0.9 mg/kg（固形分濃度 1 w/v%，投与液量 900  $\mu$ L）を、Form. 3 は 0.9 mg/kg または 1.8 mg/kg（固形分濃度 1 w/v%，投与液量 900  $\mu$ L または 1800  $\mu$ L）を、それぞれサル皮下へ単回投与した。

投与直後（24 時間）と投与後 9 週間の血中タクロリムス濃度を、それぞれ図 28 と図 29 に示す。ラットとは異なり、投与直後において僅かなピーク濃度が見られたが、それ以降はフラットな血中濃度を持続し、Form. 1 はおよそ 5 週間で、Form. 3 はおよそ 9 週間で血中薬物が消失した。*in vivo* において長期放出後の血中薬物の消失まで測定できたので、time to reach Cmax (Tmax), Cmax, および area under the blood concentration time curve (AUC) を算出し、表 5 にまとめた。AUC は台形法を用いて計算した。まず、Tmax はいずれの投与条件においても 2 時間であった。その際の Cmax は、その後の血中濃度が安定した時期における血中濃度の 1.4 倍程度であった。また、Form. 1 を 0.9 mg/kg で投与したときと Form. 3 を 0.9 mg/kg で投与したときの AUC を比較するとその差は約 1.1 倍であり、マイクロスフェアの処方が異なっても同様の投与量においては同等の血中暴露が得られた。さらに、Form. 3 を 0.9 mg/kg および 1.8 mg/kg で投与した際の AUC を比べると、その差は約 1.7 倍であり、ある程度線形的な用量依存性が確認された。

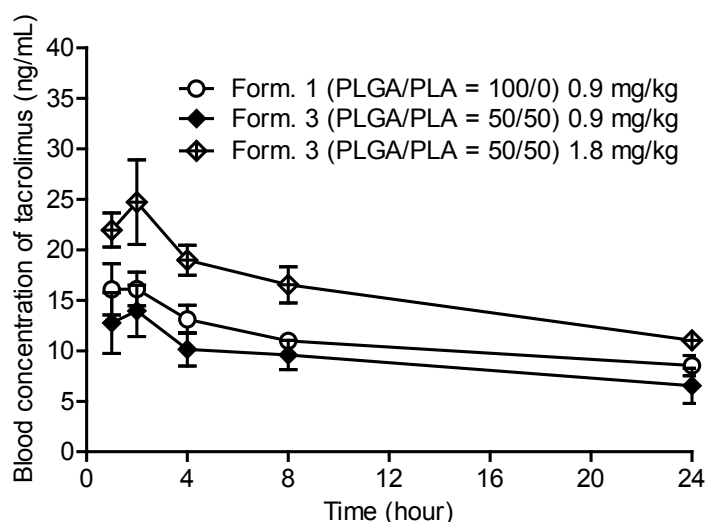


図 28 Form. 1 および Form. 3 をサル皮下へ単回投与した際の血中タクロリムス濃度推移（0-24 hour）

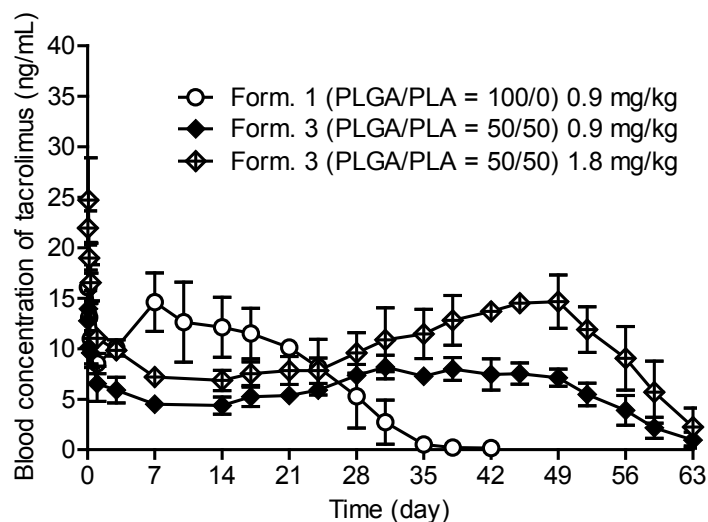


図 29 Form. 1 および Form. 3 をサル皮下へ単回投与した際の血中タクロリムス濃度推移 (0-63 day)

表 5 Form. 1 および Form. 3 をサル皮下へ単回投与した際の薬物動態パラメーター

| Formulation | Dose<br>(mg/kg) | Tmax<br>(hour) | Cmax<br>(ng/mL) | AUC <sub>0-T</sub><br>(ng-hour/mL) |
|-------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------------------|
| Form. 1     | 0.9             | 2              | 16.1            | 7744                               |
| Form. 3     | 0.9             | 2              | 14.0            | 8764                               |
| Form. 3     | 1.8             | 2              | 24.7            | 14776                              |

続いて, *in vitro* における薬物放出挙動とサルにおける薬物吸収率推移を, Form. 1 (図 30) と Form. 3 (図 31) についてそれぞれ比較した。いずれのマイクロスフェア製剤についても, *in vitro* 薬物放出速度よりも *in vivo* 薬物吸収速度の方が低かった。そのため, Form. 1 は *in vitro* における薬物放出期間が約 2 週間であるのに対して *in vivo* での薬物吸収期間は約 5 週間であり, Form. 3 は *in vitro* 薬物放出が約 4 週間で完了するのに対して *in vivo* における薬物吸収は約 9 週間まで持続していた。また, Form. 3 の *in vivo* における薬物吸収の時間推移は, 0.9 mg/kg と 1.8 mg/kg とで大きな差は認められなかった。

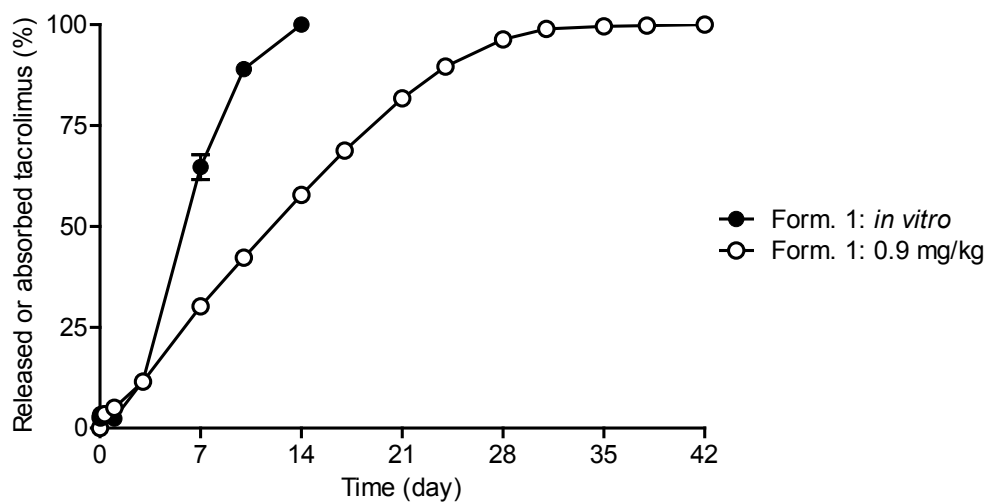


図 30 Form. 1 をサル皮下へ単回投与した際の薬物吸収率推移

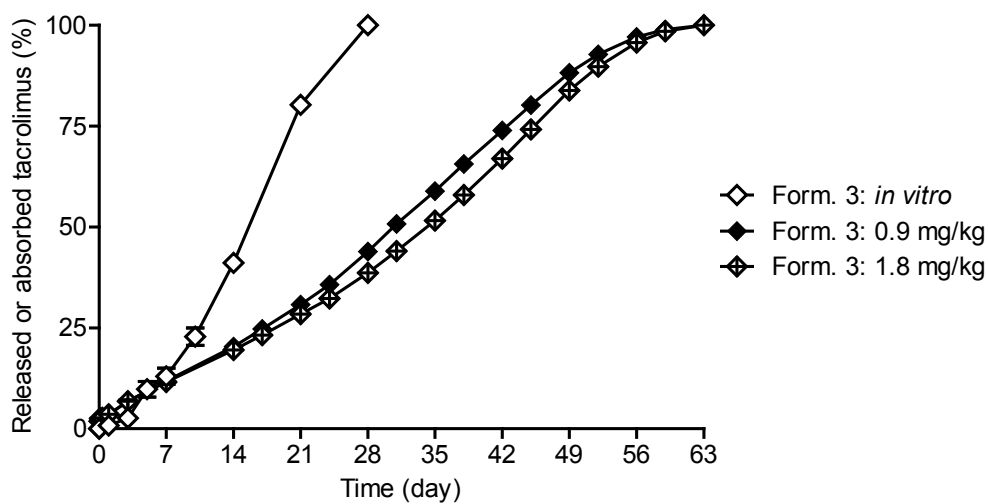


図 31 Form. 3 をサル皮下へ単回投与した際の薬物吸収率推移

### 2.3.6. ウサギにおける薬物動態

これまで薬物動態を評価してきたラットやサルに加えて、ウサギにおける薬物動態試験も実施した。*in vitro* では約2週間で薬物を放出する Form. 1 を投与製剤に用い、タクロリムスとして 0.9 mg/kg（固形分濃度 6 w/v%，投与液量 150  $\mu$ L）をウサギ皮下へ単回投与した。

血中濃度推移は図 32 のようになり、ウサギにおいても安定した血中濃度を少なくとも1週間持続することが確認された。また、サルで見られたような投与直後の血中濃度の立ち上がりは認められなかった。次に、ウサギにおけるマイクロスフェアからのタクロリムス吸収率推移を図 33 に示す。ラットやサルにおける薬物吸収速度は *in vitro* の薬物放出速度よりも（特に投与2週間以降で）低い傾向が見られたが、ウサギにおける薬物吸収速度は *in vitro* 薬物放出速度よりも高いという結果であった。

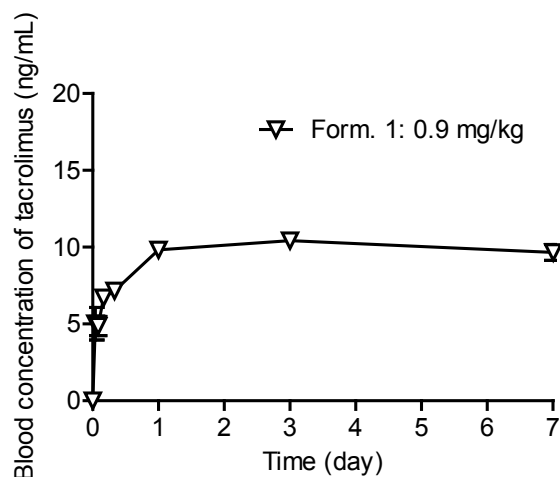


図 32 Form. 1 をウサギ皮下へ単回投与した際の血中タクロリムス濃度推移

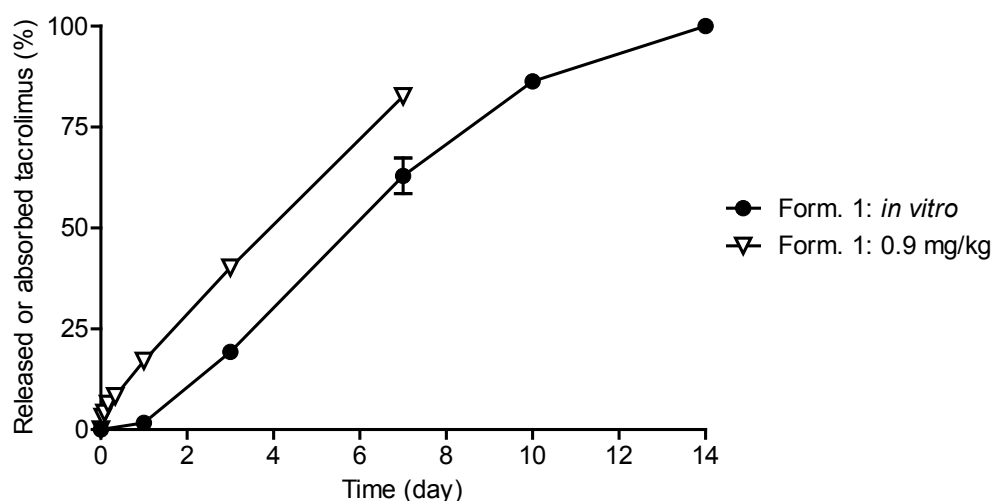


図 33 Form. 1 をウサギ皮下へ単回投与した際の薬物吸収率推移

### 2.3.7. 動物種差の影響

これまでに、ラット・サル・ウサギにおけるタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの薬物動態を評価してきたが、これらの動物種差がマイクロスフェアからの薬物吸収へ与える影響について考察するため、各動物種における薬物吸収率推移を比較した。データは示さないが、各動物種へ投与したマイクロスフェアは調製ロットが異なるものの、その薬物放出速度に大きな差は見られなかったため、直接比較を行った。

まず、固形分濃度 1 w/v%・投与液量 900  $\mu$ L の条件で Form. 1 をラットおよびサルへ単回投与した際の薬物吸収率推移を比較した (図 34)。その結果、ラットにおいては投与後 1 週間まで *in vitro* における薬物放出と類似した速度で薬物吸収が認められたのに対し、サルにおける薬物吸収速度は *in vitro* 薬物放出速度ならびにラットの薬物吸収速度よりも低かった。

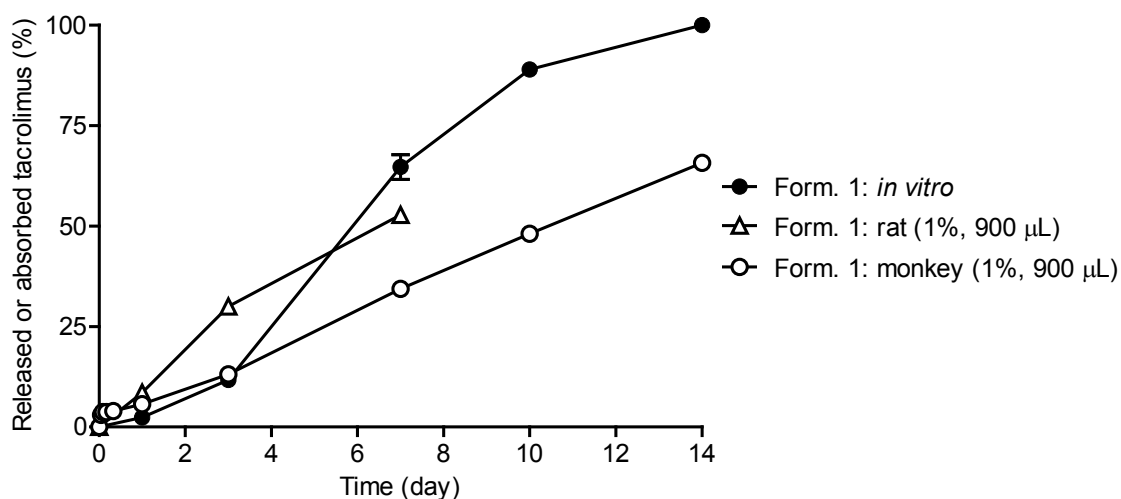


図 34 Form. 1 を単回皮下投与した際の薬物吸収率推移 (ラットとサルの比較)

次に、固形分濃度 6 w/v%・投与液量 150  $\mu$ L で Form. 1 をラットおよびウサギへ単回投与したときの薬物吸収率推移を図 35 に示す。前に述べた通り、本投与条件でのラットにおける薬物吸収速度は *in vitro* 薬物放出速度よりも低かった。一方でウサギにおけるタクロリムスの吸収速度は、*in vitro* 薬物放出速度やラットの薬物吸収速度よりも高いという結果であった。

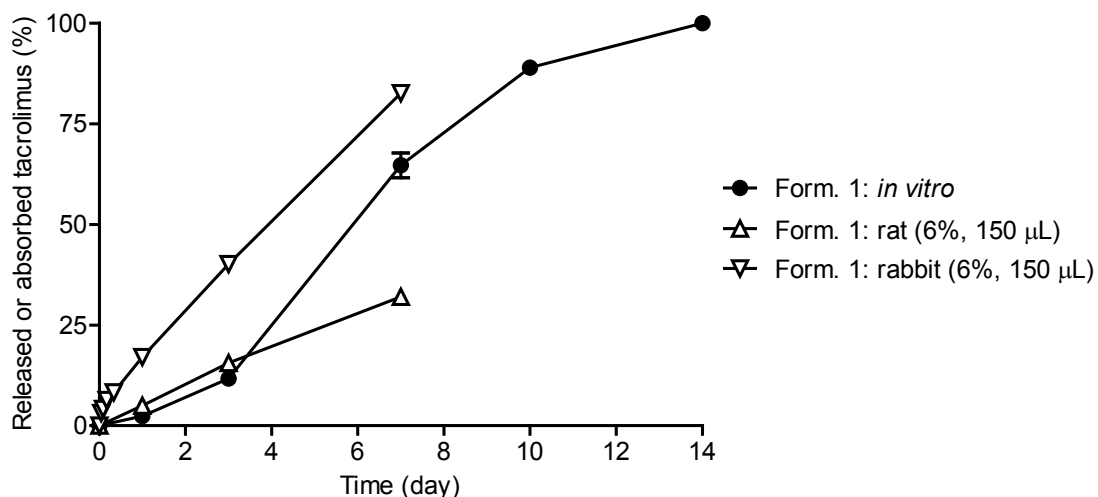


図 35 Form. 1 を単回皮下投与した際の薬物吸収率推移（ラットとウサギの比較）

さらに、固形分濃度 1 w/v%・投与液量 900 μL（サル）ならびに固形分濃度 6 w/v%・投与液量 150 μL（ウサギ）と異なる投与条件ではあるが、Form. 1 をサルおよびウサギへ単回投与した際の薬物吸収率推移の比較も行った。それぞれの薬物吸収率推移を、*in vitro* 薬物放出挙動とあわせて図 36 に示す。これまでの結果からは、固形分濃度が低く、投与液量が多いサルの投与条件の方が薬物吸収速度の観点では有利であると推察される。しかしながら、サルにおける薬物吸収速度はウサギにおける吸収速度よりも低いという結果であった。

以上の各動物種における薬物吸収速度の比較結果をまとめると、マイクロスフェアからのタクロリムス吸収速度は、図 34 ではラット>サル、図 35 ではウサギ>ラット、図 36 ではウサギ>サルの順となった。そのため、本製剤からの薬物吸収速度は、ウサギが最も高く、続いてラット、サルと続く順列になった。

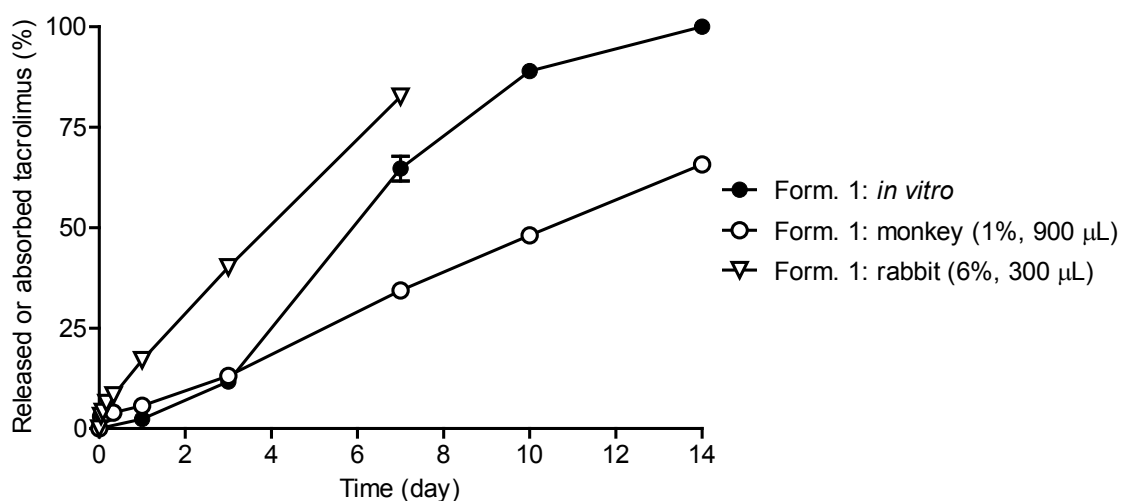


図 36 Form. 1 を単回皮下投与した際の薬物吸収率推移（サルとウサギの比較）



## 2.4. 考察

図17に示した通り, ラットにおける PLGA マイクロスフェアからのタクロリムスの吸収挙動は, 皮下投与時と筋肉内投与時とで差が認められなかった。一般的に筋肉内は脂肪組織が少なく血管も密に分布しているため, 皮下投与と比較して薬物の吸収速度は高いと言われている[82]。そのため, 皮下投与時と筋肉内投与時でタクロリムスの吸収挙動に差がなかったという結果は, 溶解した薬物の吸収過程よりもマイクロスフェアからの薬物放出過程が律速段階になっていることを示唆している。本結果と *in vitro* の結果とを併せて, タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアからの薬物放出・吸収機構を考察したものが図 37 である。まず, *in vitro* の薬物放出挙動およびマイクロスフェアの分解挙動から, 薬物の拡散よりもマイクロスフェアの分解に伴う薬物放出および薬物の溶解が主な放出過程であると考えられた。次に, *in vivo* 試験の結果から, 溶解した薬物の吸収は律速段階でないことが示唆された。以上より, PLGA/PLA 比などによってポリマーの分解速度を変化させることは, タクロリムス含有マイクロスフェアの薬物動態を制御する上で有効なアプローチであると考えられた。

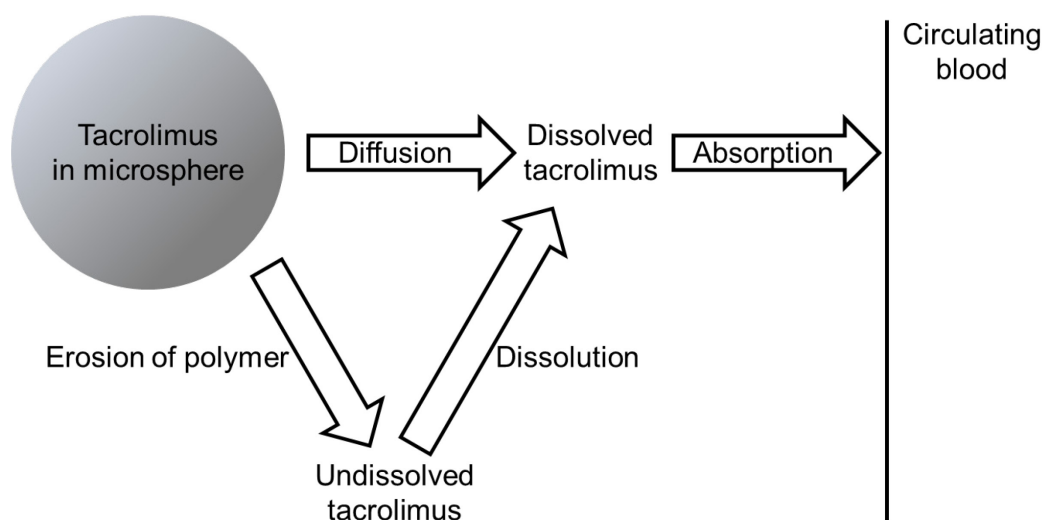


図 37 推定されるマイクロスフェアからの薬物放出機構

様々な投与条件でタクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアをラット皮下へ投与した際の薬物動態試験の結果から, 投与条件によって異なるもののラットにおける薬物吸収速度は, *in vitro* における薬物放出速度と同等あるいはそれ以下であった。特に, マイクロスフェア分散液の固形分濃度や投与液量が増加するにつれて, *in vivo* における薬物吸収速度は *in vitro* 薬物放出速度よりも遅延する傾向が認められた (図 19, 図 21, 図 23)。 *In vivo* 薬物吸収速度と *in vitro* 薬物放出速度に差異が生じる原因については, 序論で述べた通り溶媒量や局所 pH が異なること, また *in vivo* では酵素や免疫反応の影響を受けること等が指摘されている[74, 75]。しかしながら, 酵素の影響は報告例

によって傾向が異なっているため、議論の余地が残るところである[83-87]。一方で、溶媒量や局所 pH については、以下のような報告例がある。まず、PLA インプラントからの薬物放出は *in vitro* よりも *in vivo* の方が速いと報告されている[88]。また *in vitro* 薬物放出試験における比較ではあるが、分散状態にあるマイクロスフェアよりも凝集していた場合の方が、薬物の放出速度は高いという報告がある[89]。これらの現象は、水の透過経路が少ない環境の方が PLGA や PLA の自触媒作用

(PLGA や PLA の加水分解によって生じる乳酸・グリコール酸やそれらのオリゴマーによって pH が低下し、加水分解が進行しやすくなる) が強くなるためだと考えられている[90]。すなわち、溶媒量や局所 pH といった観点では、*in vitro* よりも *in vivo* の方が溶媒量は少なく、マイクロスフェアも凝集する傾向にあるため、局所 pH が低下することによって *in vivo* 薬物吸収速度の方が高くなるという傾向がある。しかしながら、本研究においても溶媒量 20 mL で実施した *in vitro* 薬物放出試験の方が動物の皮下よりも明らかに溶媒量が多いにも関わらず、タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアのラットにおける薬物吸収速度は *in vitro* 薬物放出速度よりも低いという結果であった。本マイクロスフェア製剤については、前に述べた通りマイクロスフェア分散液の固形分濃度が薬物動態に影響を与えている。特に高い固形分濃度で投与した際には、ラット皮下において白色の硬い凝集体および凝集体周辺に免疫反応によると思われる白色の嚢胞が解剖後に目視観察されている。そのため、この凝集体と嚢胞が低い *in vivo* 薬物吸収速度へ寄与したものと推察される。*In vitro* 薬物放出速度よりも *in vivo* 薬物吸収速度の方が低いという傾向は、特に投与時の固形分濃度が高い場合や投与後 1-2 週間以降の場合に顕著であった。これは、固形分濃度が高い場合や、投与後時間が経過してマイクロスフェア製剤の凝集体表面に線維化した嚢胞が形成された場合は、水の透過性が著しく低下するために、PLGA・PLA の自触媒作用よりも水の量が限定されることによるポリマーの加水分解速度の低下や難溶性のタクロリムスの溶解度低下が支配因子になったためと推察される。以上より、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの *in vitro* 薬物放出速度と *in vivo* 薬物吸収速度の差については、凝集体および嚢胞によって水分量が限定されることによるものと考えられた。

最終的にヒト用の製剤を目指したとき、その投与量の多さから固形分濃度が高い場合の吸収速度低下は課題になると予想される。しかし、図 24 や図 25 で示のように皮下 1 か所に投与したときよりも 2 か所へ投与したときの方が血中タクロリムス濃度および薬物吸収速度は高くなったことから、複数箇所に分割して投与する手法は吸収飽和回避の 1 つのアプローチになり得ることが示唆された。本現象については、複数箇所に投与したときの方がマイクロスフェア製剤の凝集体およびその周辺の嚢胞の表面積が増大するためだと考察している。

タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの *in vivo* 薬物吸収速度は動物種差の影響も受け、その順列はウサギ>ラット>サル の順列であった。興味深いことに、経皮と皮下とでは吸収経路が異なるために直接比較はできないが、この順列は一般的な経皮吸収速度であるウサギ>ラット (>ブタ) >サル (>ヒト) と同じ順列であった[91]。動物種差の影響については、PLGA マイクロ

ロスフェアを皮下投与した際に、ラットでは繊維芽細胞の遊走および活性化が起こるまでに投与後 14 日程度かかるのに対し、ブタでは投与 7 日からコラーゲンが沈着すると報告されており、このようにして生じた繊維性の嚢胞は物質の透過性を下げることが指摘されている[92-94]。実際に、*in vitro* における薬物放出期間が約 4 週間のタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアをラットへ皮下投与した際も、固形分濃度が 1 w/v%と低い投与条件であっても投与 14 日後頃から *in vivo* 吸収速度が *in vitro* 放出速度よりも遅延する現象が認められている（図 27）。以上より、動物種差がマイクロスフェアからのタクロリムス吸収速度へ与える影響については、皮下組織の違い、特に免疫反応（繊維性嚢胞の形成能）が関与している可能性が考えられた。

このような動物種差の影響については十分に考慮する必要があるものの、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアは、ラットにおいては 6 週間以上（図 26）、サルにおいては 5 週間から 9 週間にわたって安定した血中濃度を持続することができた（図 29）。この結果より、本マイクロスフェア製剤は投与頻度低減によるアドヒアランス向上に貢献できる製剤である可能性が示唆された。

### 3. マイクロスフェア製剤の免疫抑制作用評価

#### 3.1. 序論

タクロリムスの薬効は、報告例によって傾向は異なるものの血中タクロリムスのトラフ濃度が指標になると考えられており、トラフ濃度を治療濃度域内にコントロールするため臨床現場では TDM が行われている[7, 8]。しかしながら、薬効がトラフ濃度に依存するというのは、現在使用されている経口製剤の薬物動態プロファイルにおいてであり、本プロファイルを大きく変化させた際にどの薬物動態パラメーターが薬効に寄与するかという部分については明らかになっていない。また、タクロリムスの副作用の一種である耐糖能異常は、血中タクロリムス濃度の  $C_{max}$  に依存することも報告されている[17-19]。以上より、長期徐放性注射剤によって  $C_{max}$  を制御したフラットな血中濃度推移を実現し、比較的低い血中濃度の維持によって薬効が示されれば、薬効維持・副作用低減という観点で有用な製剤となる可能性がある。

本章では、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの薬理試験を行い、薬物動態と薬効との関係を論考した。薬理試験には、急性拒絶モデルの一種であるラット心移植モデルを用いた。まず、本モデルの目標血中濃度となるような低い濃度を、マイクロスフェア製剤で長期間維持できるかどうか検証した。その後、各投与量におけるタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの免疫抑制作用を評価することで、血中タクロリムス濃度と免疫抑制作用との関連性について考察を行った。

## 3.2. 実験材料および実験方法

### 3.2.1. 実験材料および動物

マイクロスフェア製剤は、第1章で調製した Form. 3 (PLGA/PLA = 50/50, PLGA : L/G = 75/25, Mw = 13600, PLA : L/G = 100/0, Mw = 18800) を用いた。

カルボキシメチルセルロースナトリウムは五徳薬品から、スクロースは和光純薬工業から、注射用水は大塚製薬から、アロンアルファ A「三共」は第一三共から、それぞれ購入した。アスコマイシンは、和光純薬工業から入手した。その他の試薬は、特記しない限り特級品を用いた。

薬物動態試験用の雄性 Lewis ラットは、6 週齢のものを日本エスエルシーから購入し、7 週齢になったラットを試験に使用した。また、ラット心移植モデル用の雄性 ACI ラットおよび雄性 Lewis ラットは、7 週齢のものをそれぞれ日本エスエルシーおよび日本チャールスリバーから購入し、8 週齢になったラットを移植試験に使用した。

本章におけるすべての動物実験は、アステラス製薬の動物実験委員会で倫理的な基準に沿って審査・受理されたプロトコルを遵守して実施した。なお、使用した動物実験施設は、AAALAC に認証されている。

### 3.2.2. ラット心移植モデル投与用マイクロスフェア製剤の薬物動態試験

前章と同様に、分散剤としてカルボキシメチルセルロースナトリウム (0.5 w/v%)、等張化剤としてスクロース (10 w/v%) を注射用水に溶解させたものを分散液とした。固形分濃度 1 w/v% となるようにマイクロスフェア製剤を分散液でメスアップし、転倒混和および超音波処理によって分散させた。本投与サンプルを所定量シリンジに量り取り、通常ラット (7 週齢雄性 Lewis ラット) の背部皮下へ単回投与した。投与後、投与サンプルの漏れを防ぐために投与部位をアロンアルファで塞いだ。投与 1, 7, 14 日後に、イソフルラン吸入麻酔下でヘパリン処理シリンジを用いて心臓から採血した後、頸椎脱臼で安楽死させた。各時点 n = 3-4 で採血を行い、前章と同様の定量法で血中薬物濃度の平均値 ± 標準偏差を算出した。

投与部位周辺は、事前に電気バリカンで剃毛した。また、ラットは飽食・自由飲水下で飼育し、体重を投与前と採血時に測定した。

### 3.2.3. ラット心移植モデルにおける免疫抑制作用評価

ラット心移植モデルは、8 週齢雄性 ACI ラット (RT1 av1) をドナーに、8 週齢雄性 Lewis ラット (RT11) をレシピエントに用い、過去の報告例を参考に作製した[95]。具体的には、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル®65 mg/mL 液) 0.77 mL/kg 腹腔内投与で麻酔を行い、ACI ラットの心臓を摘出し、心臓の大動脈をレシピエントの腹部大動脈の側面に、心臓の肺動脈をレシピエントの下大静脈の側面に、それぞれ端側吻合した。本移植を実施した日を 0 日目とした。移植直後

に，前項と同じ分散液を用い，固形分濃度 1 w/v%でタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアをラット心移植モデル皮下へ単回投与した。移植心の拍動は 1 日 1 回触診で確認し，14 日目まで記録した。移植心の拍動が認められた場合は生着，認められなかった場合は拒絶と判定した。また，移植 14 日後まで移植心の生着が認められた個体数の割合を生着率と定義し，各投与条件における生着率を算出した。移植後 3 日以内の移植心の拍動停止または死亡は，移植手技上の問題と解釈して解析から除外した。

移植 14 日後に，ヘパリン処理シリンジを用いて腹部大動脈から採血した後，安楽死を行った。血中タクロリムス濃度は，前章と同様の定量法で測定した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. ラット心移植モデル投与用マイクロスフェア製剤の薬物動態

薬理試験に先立ち、ラット心移植モデル投与用製剤の薬物動態を通常ラットで確認した。マイクロスフェア製剤には、*in vitro* では約 4 週間にわたってタクロリムスを放出する Form. 3 を用いた。目標血中濃度は、過去の報告例を参考に数 ng/mL オーダーの 3 水準として、固形分濃度 1 w/v%・投与液量 50, 200, 500  $\mu$ L（それぞれタクロリムスとして 0.75, 3.0, 7.5 mg/kg）で通常ラット皮下へ単回投与した[96-98]。本試験の結果を図 38 に示す。

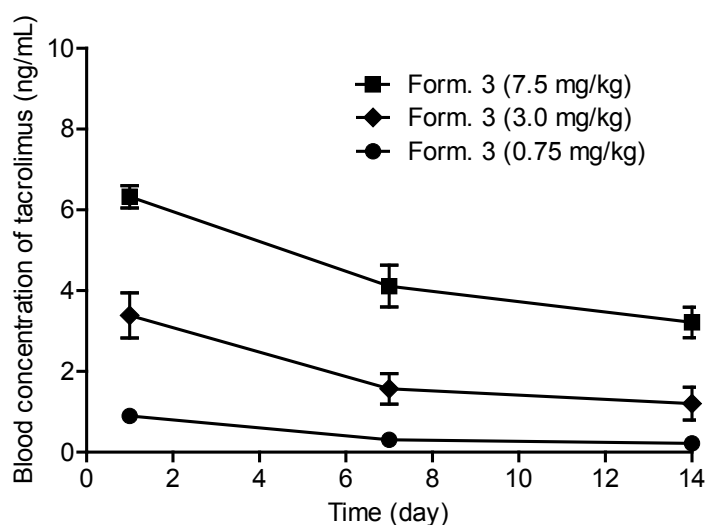


図 38 Form. 3 を通常ラット皮下へ単回投与した際の血中タクロリムス濃度推移

本試験の結果、投与量が 0.75, 3.0, 7.5 mg/kg と増加するにつれて血中薬物濃度は上昇し、これらの投与条件におけるタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの用量依存性が確認された。また、目標血中濃度が数 ng/mL という低い濃度にも関わらず、2 週間にわたる安定した血中薬物濃度が得られた。そこで本投与条件を用い、マイクロスフェア製剤のラット心移植モデルにおける免疫抑制作用を評価することとした。

### 3.3.2. ラット心移植モデルにおける免疫抑制作用

ラット心移植モデルを作製し、移植直後にタクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェア Form. 3 をタクロリムスとして 0.75, 3.0, 7.5 mg/kg で単回皮下投与した。投与条件は、前項と同様に固形分濃度は 1 w/v%, 投与液量はそれぞれ 50, 200, 500  $\mu$ L とした。移植 14 日後に解剖を行い、移植心の様子を観察した結果を図 39 に示す。このように、0.75 mg/kg 投与群では移植心の心筋梗塞様の変色が観察されたのに対し、7.5 mg/kg 投与群では移植心の変化は見られなかった。



0.75 mg/kg



7.5 mg/kg

図 39 Form. 3 をラット心移植モデルへ単回皮下投与した際の移植心：  
丸で囲まれた部分が移植心を示す。

各投与条件における移植心の生着日数と生着率を、表 6 に記載した。本モデルの無処置群における生着日数は 5-6 日であることが報告されている[99]。まず 0.75 mg/kg 投与群においては、生着日数は 6-7 日であり、生着日数の延長は認められなかった。一方で、3.0 mg/kg 投与群の生着日数は 9 日から 14 日以上、7.5 mg/kg 投与群の生着日数は全例 14 日以上であり、用量依存的に生着日数は延長する傾向が見られた。0.75, 3.0, 7.5 mg/kg 投与群における生着率はそれぞれ 0%, 57%, 100% であり、生着率についても同様に用量依存的な改善が認められた。



表 6 Form. 3 をラット心移植モデルへ単回皮下投与した際の移植心の生着日数と生着率

| Dose<br>(mg/kg) | N | Graft-survival time<br>(day)                           | Graft-survival rate<br>(%) |
|-----------------|---|--|----------------------------|
| 0.75            | 7 | 6, 6, 6, 6, 6, 6, 7                                    | 0                          |
| 3.0             | 7 | 9, 9, 9, $\geq 14$ , $\geq 14$ , $\geq 14$ , $\geq 14$ | 57                         |
| 7.5             | 4 | $\geq 14$ , $\geq 14$ , $\geq 14$ , $\geq 14$          | 100                        |

また、マイクロスフェア製剤の薬物動態と免疫抑制作用との関係を詳細に解析するために、移植 14 日後における血中タクロリムス濃度に対して移植心の生着日数を個別値でプロットした (図 40)。その結果、血中薬物濃度が増加するのに伴って生着日数は延長し、血中薬物濃度が約 2 ng/mL 以上になると生着日数は 14 日以上に達することが確認された。

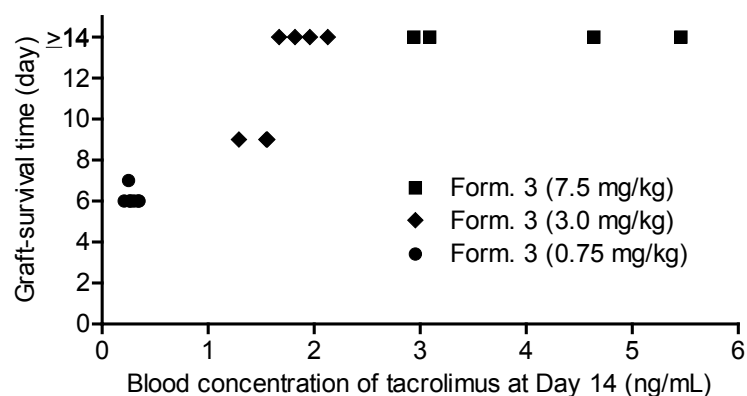


図 40 Form. 3 をラット心移植モデルへ単回皮下投与した際の移植 14 日後における血中タクロリムス濃度と移植心の生着日数：

生着日数が 14 日以上の場合は、縦軸「 $\geq 14$ 」へプロットしている。

### 3.4. 考察

現在臨床で使用されているタクロリムスの経口製剤については、血中薬物濃度の AUC が移植患者における臓器拒絶の発現と相関することが報告されている[100]。一般的に AUC は血中暴露の指標に最も適していると考えられているが、すべての移植患者に対して AUC を測定するのは現実的に困難であるため、臨床現場では AUC の代替としてトラフ濃度を TDM で管理するということが行われている[7]。トラフ濃度は、採血を行う時点や使用する血中薬物濃度定量法、患者の状態（薬物相互作用や遺伝薬理学的な要因）などによって値が異なるため、AUC がトラフ濃度と相関するかどうか、さらにはタクロリムスの薬効がトラフ濃度と相関するかどうかという部分は、報告例によって傾向が異なる[7-8]。そのためトラフ濃度は、タクロリムスの最適なマーカーであるとは厳密には言い難いが、タクロリムスの薬効・副作用の指標や用量調節の指針になると考えられている。

タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアについては、図 40 で示したように移植 14 日後の血中薬物濃度が上昇するにつれて、ラット心移植モデルにおける移植心の生着日数延長が認められた。そのため本マイクロスフェア製剤は、C<sub>max</sub> を制御したフラットな血中薬物濃度推移を示すとともに、経口製剤におけるトラフ濃度と同様に、有効血中濃度の維持が薬効の指標となり得る可能性が示された。これまで述べてきたように血中タクロリムス濃度の C<sub>max</sub> は副作用の一種である耐糖能異常と相関することが報告されているため、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアは、安定した血中薬物濃度推移によって免疫抑制作用を維持しつつ、C<sub>max</sub> 減少による副作用低減へ貢献できる製剤である可能性が示された[17-19]。

## 4. 総括

### 【マイクロスフェア製剤の調製と薬物放出特性】

o/w エマルション法を用いて、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアを調製したところ、粒子径 12-19  $\mu\text{m}$  程度の粒子が得られた。いずれの処方も封入効率は 80%以上と高く、タクロリムスの疎水性の高さが一因だと考えられた。さらに、封入効率は PLGA や PLA 分子数の増大に伴って向上し、ポリマー末端のカルボキシル基がタクロリムスと PLGA・PLA との相互作用に関与している可能性が示された。実際にタクロリムスの添加によってマイクロスフェアの Tg は上昇し、熱分析の観点からもタクロリムス-PLGA・PLA 間の相互作用が示唆された。

マイクロスフェア製剤の薬物放出挙動と重量減少は類似した時間推移を示し、タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアの主な薬物放出機構は、タクロリムスの初期バーストや拡散ではなく PLGA の分解に伴う薬物放出であることが示唆された。また、マイクロスフェア中の PLGA/PLA 比率を変えることで、*in vitro* における薬物放出期間を 2 週間程度から 4 週間以上と制御することができた。

以上より、比較的分子量の低い PLGA や PLA を用い、その比率によってタクロリムスの放出速度を制御するというアプローチは、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの薬物封入および薬物放出制御の観点で有用であると考えられた。

### 【マイクロスフェア製剤の薬物動態評価】

タクロリムス含有 PLGA マイクロスフェアを各投与経路でラットへ投与した際の薬物動態試験より、本製剤において溶解したタクロリムスの吸収過程は律速段階ではないことが示唆された。そのため、*in vitro* の放出試験の結果と併せて、PLGA の分解およびタクロリムスの溶解が本製剤の放出および吸収において重要であり、PLGA・PLA の分解速度を変化させて薬物の放出を制御するという手法は、*in vivo* においても有効であると考えられた。

マイクロスフェア製剤からの薬物吸収速度は動物種によって異なっており、その順列はウサギ>ラット>サルとなった。特にラットやサルにおいては、*in vitro* 放出速度よりも *in vivo* 吸収速度の方が低い傾向にあった。これは、動物種によって皮下組織の環境（特に線維化した囊胞の形成しやすさ）が異なることによるものと考えられた。

動物種差の影響はあるものの、ラットおよびサルにおいてマイクロスフェア製剤の長期の薬物動態を評価した結果、初期バーストによる高い血中ピーク濃度はほとんど認められず、5 週間から 9 週間にわたって安定した血中濃度を維持することが可能であった。

### 【マイクロスフェア製剤の免疫抑制作用評価】

ラット心移植モデルを用いて、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの免疫抑制能を評価したところ、用量依存的に移植心の生着日数が延長した。また、投与 14 日後の血中薬物濃度

が上昇するにつれて生着日数は延長し、特に約 2 ng/mL 以上の個体において十分な生着日数が認められた。これらの結果より、マイクロスフェア製剤は高いピーク濃度を示さないことに加えて、安定した有効血中濃度の維持によって免疫抑制能を示すことが示唆された。

結論として、タクロリムス含有 PLGA・PLA マイクロスフェアの薬物放出機構を明らかとし、その薬物放出速度を制御することに成功した。また、*in vivo* においても単回投与で長期間の安定した血中薬物濃度推移を実現した。さらに、本マイクロスフェア製剤によって血中ピーク濃度を減少させても免疫抑制能は維持されることを示した。以上の結果から、タクロリムスを PLGA・PLA マイクロスフェア製剤化することによって、アドヒアランスの改善や血中ピーク濃度減少に伴う副作用低減など、本研究の端緒であった課題を克服できる可能性が示された。

## 5. 謝辞

本論文の作成にあたり，丁寧なご指導，ご鞭撻を賜りました静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 薬食生命科学専攻 医薬生命化学講座の奥直人教授に心より感謝の意を表します。同講座の浅井知浩准教授，清水広介講師，小出裕之助教にも多くのご助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

また，同学府 薬科学専攻 創剤工学講座 板井茂教授，薬学専攻 臨床薬剤学講座 賀川義之教授，薬学専攻 実践薬学講座 内田信也准教授には丁寧なご指導を賜りました。ここに深謝いたします。

薬理試験の実施に際しては，アステラス製薬株式会社 リサーチポートフォリオ&サイエンス部 免疫科学研究ユニットの東康之元室長，前田雅志研究員に多大なるご協力を頂きました。心から感謝申し上げます。

最後に，本研究を行うに際して，的確なご指導を頂きましたアステラス製薬株式会社 製剤研究所の伊吹リン太元所長，横田祥士元所長，迫和博前所長，剤形研究室 渡辺俊典前室長，梅島啓之主管研究員，ならびに本研究を共同で進めてくださった吉田貴恒研究員，田崎弘朗元研究員に深く感謝いたします。

## 6. 参考文献

- 1) 医薬品インタビューフォーム 免疫抑制剤 プログラフ®カプセル 0.5mg・1mg・5mg プログラフ顆粒 0.2mg・1mg (改訂第34版) .
- 2) Schreiber, S.L., Crabtree, G.R., 1992. The mechanism of action of cyclosporine A and FK506. *Immunology Today* 13, 136-142.
- 3) Braun, F., Behrend, M., 2006. Basic immunosuppressive drugs outside solid organ transplantation. *Expert Opin. Investig. Drugs* 15, 267-291.
- 4) Simpson, D., Noble, S., 2005. Tacrolimus Ointment – A Review of its Use in Atopic Dermatitis and its Clinical Potential in Other Inflammatory Skin Conditions. *Drugs* 65, 827-858.
- 5) Scott, L.J., McKeage, K., Keam, S.J., Plosker, G.L., 2003. Tacrolimus A Further Update of its Use in the Management of Organ Transplantation. *Drugs* 63, 1247-1297.
- 6) Plosker, G.L., Foster, R.H., 2000. Tacrolimus A Further Update of its Pharmacology and Therapeutic Use in the Management of Organ Transplantation. *Drugs* 59, 323-389.
- 7) Wallemacq, P., Armstrong, V.W., Brunet, M., Haufrond, V., Holt, D.W., Johnston, A., Kuypers, D., Meur, Y.L., Marquet, P., Oellerich, M., Thervet, E., Toenshoff, B., Undre, N., Weber, L.T., Westley, I.S., Mourad, M., 2009. Opportunities to Optimize Tacrolimus Therapy in Solid Organ Transplantation: Report of the European Consensus Conference. *Therapeutic Drug Monitoring* 31, 139-152.
- 8) Staatz, C.E., Tett, S.E., 2004. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tacrolimus in Solid Organ Transplantation. *Clinical Pharmacokinetics* 43, 623-653.
- 9) 石橋 道男, 深尾 立, 高橋 公太, 幅 俊人, 打田 和治, 高原 史郎, 岩崎 洋治, 太田 和夫, 高木 弘, 園田 孝夫, 1994. 腎移植における FK506 (tacrolimus) の前期第Ⅱ相試験成績. *移植* 29, 294-313.
- 10) 平岡 諦, 武元 良整, 金丸 昭久, 垣下 榮三, 土肥 博雄, 正岡 徹, 1997. 骨髄移植における FK506 (tacrolimus) の前期第Ⅱ相試験—骨髄移植後の移植片対宿主病 (GVHD) に対する予防投与—. *今日の移植* 10, 593-604.
- 11) 金丸 昭久, 岡本 真一郎, 森山 美昭, 小寺 良尚, 土肥 博雄, 平岡 諦, 正岡 徹, 1998. 骨髄移植における FK506 (tacrolimus) の後期第Ⅱ相試験—骨髄移植後の移植片対宿主病 (GVHD) に対する予防投与—. *今日の移植* 11, 367-380.
- 12) Kershner, R.P., Fitzsimmons, W.E., 1996. Relationship of FK506 Whole Blood Concentrations and Efficacy and Toxicity after Liver and Kidney Transplantation. *Transplantation* 62, 920-926.
- 13) Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V., McMichael, J., Lever, J., Burckart, G., Starzl, T., 1995. Clinical Pharmacokinetics of Tacrolimus. *Clinical Pharmacokinetics* 29, 404-430.
- 14) Undre, N.A., Schafer, A., the European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group, 1998. Factors

- Affecting the Pharmacokinetics of Tacrolimus in the First Year After Renal Transplantation. Transplantation Proceedings 30, 1261-1263.
- 15) Dujnhoven, E., Christiaans, M., Undre, N., Stevenson, P., Hooff, J., 1998. The Effect of Breakfast on the Oral Bioavailability of Tacrolimus in Diabetic and Nondiabetic Patients Before Transplantation. Transplantation Proceedings 30, 1268-1270.
  - 16) Dressler, D., Bekersky, I., Lee, J., Tracewell, W.G., Kisicki, J., Mekki, Q., 1996. Effect of Meal Time on Tacrolimus (T) Bioavailability. Clinical Pharmacology & Therapeutics 59, PI-90.
  - 17) Ishibashi, M., Yoshida, K., Ozono, S., Hirao, Y., Takahashi, K., Kawamura, Y., Ohara, K., 2001. Experimental Study of Tacrolimus Immunosuppression on the Mode of Administration: Efficacy of Constant Intravenous Infusion Avoiding  $C_{max}$ . Transplantation Proceedings 33, 559-560.
  - 18) Mecule, A., Poli, L., Nofroni, I., Bachetoni, A., Tinti, F., Umbro, I., Barile, M., Berloco, P.B., Mitterhofer, A.P., 2010. Once Daily Tacrolimus Formulation: Monitoring of Plasma Levels, Graft Function, and Cardiovascular Risk Factors. Transplantation Proceedings 42, 1317-1319.
  - 19) Trunecka, P., Boillot, O., Seehofer, D., Pinna, A.D., Fischer, L., Ericzon, B.G., Troisi, R.I., Baccarani, U., Ortiz de Urbina, J., Wall, W., 2010. Once-Daily Prolonged-Release Tacrolimus (ADVAGRAF) Versus Twice-daily Tacrolimus (PROGRAF) in Liver Transplantation. American Journal of Transplantation 10, 2313-2323.
  - 20) Hofmann, K.L., Bunzel, B., 2000. Noncompliance in Organ Transplant Recipients: A Literature Review. General Hospital Psychiatry 22, 412-424.
  - 21) Kuypers, D.R.J., Peeters, P.C., Sennesael, J.J., Kianda, M.N., Vrijens, B., Kristanto P., Dobbels F., Vanrenterghem, Y., Kanaan, N., 2013. Improved Adherence to Tacrolimus Once-Daily Formulation in Renal Recipients: A Randomized Controlled Trial Using Electronic Monitoring. Transplantation 95, 333-340.
  - 22) Beckebaum, S., Lacob, S., Sweid, D., Sotiropoulos, G.C., Saner, F., Kaiser, G., Radtke, A., Klein, C.G., Erim, Y., Geest, S., Paul, A., Gerken, G., Cicinnati, V.R., 2011. Efficacy, safety, and immunosuppressant adherence in stable liver transplant patients converted from a twice-daily tacrolimus-based regimen to once-daily tacrolimus extended-release formulation. Transplant International 24, 666-675.
  - 23) Germani, G., Borella, V., Gnoato, F., Lazzaro, S., Senzolo, M., Russo, F.P., Martin, E.D., Gambato, M., Nadal, E., Cillo, U., Sturniolo, G.C., Burra, P., 2010. Does Once-Daily Tacrolimus (Advagraf) Increase Adherence to Immunosuppressive Therapy in Liver Transplanted Patients? Liver Transplantation 16, S230.
  - 24) O'Carroll, R.E., McGregor, L.M., Swanson, V., Masterton, G., Hayes, P.C., 2006. Adherence to Medication After Liver Transplantation in Scotland: A Pilot Study. Liver Transplantation 12, 1862-1868.
  - 25) Takemoto, S.K., Pinsky, B.W., Schnitzler, M.A., Lentine, K.L., Willoughby, L.M., Burroughs, T.E.,

- Bunnapradist, S., 2007. A Retrospective Analysis of Immunosuppression Compliance, Dose Reduction and Discontinuation in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 7, 2704-2711.
- 26) Vlamminck, H., Maes, B., Evers, G., Verbeke, G., Lerut, E., Damme, B.V., Vanrenterghem, Y., 2004. Prospective Study on Late Consequences of Subclinical Non-Compliance with Immunosuppressive Therapy in Renal Transplant Patients. *American Journal of Transplantation* 4, 1509-1513.
- 27) Dobbels, F., Geest, S.D., Cleemput, J.V., Droogne, W., Vanhaecke, J., 2004. Effect of Late Medication Non-compliance on Outcome After Heart Transplantation: A 5-Year Follow-up. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 23, 1245-1251.
- 28) 市丸 直嗣, 2008. タクロリムス徐放性製剤の国内臨床試験. 移植 43 巻総会臨時, 208.
- 29) Varde, N.K., Pack, D.W., 2004. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4, 35-51.
- 30) Sinha, V.R., Trehan, A., 2005. Biodegradable Microspheres for Parenteral Delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 22, 535-602.
- 31) Okada, H., 1997. One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 43-70.
- 32) Berges, R., Bello, U., 2006. Effect of a new leuporelin formulation on testosterone levels in patients with advanced prostate cancer. *Current Medical Research and Opinion* 22, 649-655.
- 33) Brogden, R.N., Faulds, D., 1995. A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in Prostate Cancer. *Drugs & Aging* 6, 324-343.
- 34) Park, E.J., Amatya, S., Kim, M.S., Park, J.H., Seol, E., Lee, H., Shin, Y.H., Na, D.H., 2013. Long-acting injectable formulations of antipsychotic drugs for the treatment of schizophrenia. *Archives of Pharmacal Research* 36, 651-659.
- 35) Knox, E.D., Stimmel, G.L., 2004. Clinical Review of a Long-Acting, Injectable Formulation of Risperidone. *Clinical Therapeutics* 26, 1994-2002.
- 36) Johnson, B.A., 2006. A synopsis of the pharmacological rationale, properties and therapeutic effects of depot preparations of naltrexone for treating alcohol dependence. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 7, 1065-1073.
- 37) Murphy, C.E., 2012. Review of the Safety and Efficacy of Exenatide Once Weekly for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Pharmacotherapy* 46, 812-821.
- 38) Miller, R.A., Brady, J.M., Cutright, D.E., 1977. Degradation Rates of Oral Resorbable Implants (Polylactates and Polyglycolates): Rate Modification with Changes in PLA/PGA Copolymer Ratios. *Journal of Biomedical Materials Research* 11, 711-719.
- 39) Olivares, J.M., Rodriguez-Morales, A., Diels, J., Povey, M., Jacobs, A., Zhao, Z., Lam, A., 2009.



- Long-term outcomes in patients with schizophrenia treated with risperidone long-acting injection or oral antipsychotics in Spain: Results from the electronic Schizophrenia Treatment Adherence Registry (e-STAR). *European Psychiatry* 24, 287-296.
- 40) Novick, D., Haro, J.M., Bertsch, J., Anand, H., Jemai, N., Haddad, P.M., 2012. Comparison of treatment discontinuation and hospitalization among nonadherence patients initiating depot or oral typical antipsychotic medications. *International Clinical Psychopharmacology* 27, 275-282.
  - 41) Zhu, B., Ascher-Svanum, H., Shi, L., Faries, D., Montgomery, W., Marder, S.R., 2008. Time to Discontinuation of Depot and Oral First-Generation Antipsychotics in the Usual Care of Schizophrenia. *Psychiatric Services* 59, 315-317.
  - 42) Kim, B., Lee, S.H., Choi, T.K., Suh, S., Kim, Y.W., Lee, E., Yook, K.H., 2008. Effectiveness of risperidone long-acting injection in first-episode schizophrenia: In naturalistic setting. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 32, 1231-1235.
  - 43) Miyamoto, Y., Uno, T., Yamamoto, H., Li, X.K., Sakamoto, Koh-ichi, Hashimoto, H., Takenaka, H., Kawashima, Y., Kawarasaki, H., 2004. Pharmacokinetic and Immunosuppressive Effects of Tacrolimus-Loaded Biodegradable Microspheres. *Liver Transplantation* 10, 392-396.
  - 44) Wang, Q., Uno, T., Miyamoto, Y., Hara, Y., Kitazawa, Y., Lu, F.Z., Funeshima, N., Fujino, M., Yamamoto, H., Takenaka, H., Kawashima, Y., Li, X.K., 2004. Biodegradable Microsphere-Loaded Tacrolimus Enhanced the Effect on Mice Islet Allograft and Reduced the Adverse Effect on Insulin Secretion. *American Journal of Transplantation* 4, 721-727.
  - 45) Shin, S.B., Cho, H.Y., Kim, D.D., Choi, H.G., Lee, Y.B., 2010. Preparation and evaluation of tacrolimus-loaded nanoparticles for lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74, 164-171.
  - 46) Affifi, N.N., Heikal, O.A., Hanafi, R.S., Tammam, S.N., 2011. Application of Biodegradable Nanoparticles in Liver Targeting of Tacrolimus. *AIP conference proceedings* 1326, 120-127.
  - 47) Xu, W., Ling, P., Zhang, T., 2014. Toward immunosuppressive effects on liver transplantation in rat model: Tacrolimus loaded poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) nanoparticle with longer survival time. *International Journal of Pharmaceutics* 460, 173-180.
  - 48) Meissner, Y., Pellequer Y., Lamprecht, A., 2006. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: Particle targeting versus pH-sensitive delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 316, 138-143.
  - 49) Fei, W.L., Chen, J.Q., Yuan, J., Quan, D.P., Zhou, S.Y., 2008. Preliminary Study of the Effect of FK506 Nanospheric-Suspension Eye Drops on Rejection of Penetrating Keratoplasty. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 24, 235-244.
  - 50) Souza, M.C.M., Fialho, S.L., Souza, P.A.F., Fulgencio, G.O., Silva, G.R.D., Cunha, A.S., 2014. Tacrolimus-Loaded PLGA Implants: *In Vivo* Release and Ocular Toxicity. *Current Eye Research* 39,

99-102.

- 51) Sakurai, E., Nozaki, M., Okabe, K., Kunou, N., Kimura, H., Ogura, Y., 2003. Scleral Plug of Biodegradable Polymers Containing Tacrolimus (FK506) for Experimental Uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 4845-4852.
- 52) Mutsuga, M., Narita, Y., Yamawaki, A., Satake, M., Kaneko, H., Usui, A., Ueda, Y., 2009. Development of novel drug-eluting biodegradable nano-fiber for prevention of postoperative pulmonary venous obstruction. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 8, 402-407.
- 53) Beusekom, H., Sorop, O., Weymaere, M., Duncker, D., Giessen, W., 2008. The neointimal response to stents eluting Tacrolimus from a degradable coating depends on the balance between polymer degradation and drug release. *EuroIntervention* 4, 139-147.
- 54) Elkharraz, K., Faisant, N., Guse, C., Siepmann, F., Arica-Yegin, B., Oger, J.M., Gust, R., Goepferich, A., Benoit, J.P., Siepmann, J., 2006. Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 314, 127-136.
- 55) Sansdrap, P., Moes, A.J., 1993. Influence of manufacturing parameters on the size characteristics and the release profiles of nifedipine from poly(*DL*-lactide-*co*-glycolide) microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 98, 157-164.
- 56) Yoshida, T., Kurimoto, I., Yoshihara, K., Umejima, H., Ito, N., Watanabe, S., Sako, K., Kikuchi, A., 2012. Aminoalkyl methacrylate copolymers for improving the solubility of tacrolimus. I: Evaluation of solid dispersion formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 428, 18-24.
- 57) Yoshida, T., Kurimoto, I., Yoshihara, K., Umejima, H., Ito, N., Watanabe, S., Sako, K., Kikuchi, A., 2013. Effect of aminoalkyl methacrylate copolymer E/HCl on *in vivo* absorption of poorly water-soluble drug. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 39, 1698-1705.
- 58) Kamijo, A., Kamei, S., Saikawa, A., Igari, Y., Ogawa, Y., 1996. *In vitro* release test system of (*D,L*-lactic-glycolic) acid copolymer microcapsules for sustained release of LHRH agonist (leuporelin). *Journal of Controlled Release* 40, 269-276.
- 59) Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H., 1994. Preparation of Three-Month Depot Injectable Microspheres of Leuporelin Acetate Using Biodegradable Polymers. *Pharmaceutical Research* 11, 1143-1147.
- 60) Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* 363, 26-39.
- 61) Ishihara, T., Mizushima, T., 2010. Techniques for efficient entrapment of pharmaceuticals in biodegradable solid micro/nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 565-575.
- 62) Su, Z., Sun, F., Shi, Y., Jiang, C., Meng, Q., Teng, L., Li, Y., 2009. Effects of Formulation Parameters on

- Encapsulation Efficiency and Release Behavior of Risperidone Poly(*D, L*-lactide-*co*-glycolide) Microsphere. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 57, 1251-1256.
- 63) Gao P., Ding, P., Xu, H., Yuan Z., Chen D., Wei J., Chen, D., 2006. *In Vitro* and *in Vivo* Characterization of Huperzine A Loaded Microspheres Made from End-Group Uncapped Poly(*d,l*-lactide acid) and Poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide acid). Chemical & Pharmaceutical Bulletin 54, 89-93.
  - 64) Makino, K., Nakajima, T., Shikamura, M., Ito, F., Ando, S., Kochi, C., Inagawa, H., Soma, G., Terada, H., 2004. Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 36, 35-42.
  - 65) Samadi, N., Abbadessa, A., Stefano, A. D., Nostrum, C. F., Vermonden, T., Rahimian, S., Teunissen, E. A., Steenbergen, M. J., Amidi, M., Hennink, W. E., 2013. The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(*D,L*-lactic-*co*-glycolic acid) particles. J. Control. Release 172, 436-443.
  - 66) Freed, K.F., 2011. The descent into glass formation in polymer fluids. Acc. Chem. Res. 44, 194-203.
  - 67) Achim, M., Tomuta, I., Vlase, L., Iuga, C., Moldovan, M., Leucuta, S.E., 2008. Paclitaxel-loaded poly(lactic-*co*-glycolic acid) microspheres: preparation and *in vitro* evaluation. Journal of Drug Delivery Science and Technology 18, 410-416.
  - 68) Presmanes, C., Miguel L., Espada, R., Alvarez, C., Morales, E., Torrado, J.J., 2011. Effect of PLGA hydrophilia on the drug release and the hypoglucemic activity of different insulin-loaded PLGA microspheres. Journal of Microencapsulation 28, 791-798.
  - 69) Sanchez, A., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., 1993. Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A. International Journal of Pharmaceutics 99, 263-273.
  - 70) Blanco, M.D., Sastre, R.L., Teijon, C., Olmo, R., Teijon, J.M., 2006. Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(*D,L*-lactide) and poly(*D,L*-lactide-*co*-glycolide) polymers. International Journal of Pharmaceutics 326, 139-147.
  - 71) O'Donnell, P.B., McGinity, J.W., 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. Advanced Drug Delivery Reviews 28, 25-42.
  - 72) Siepmann, J., Gopferich, A., 2001. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews 48, 229-247.
  - 73) D'Souza, S.S., DeLuca, P.P., 2006. Methods to Assess *in Vitro* Drug Release from Injectable Polymeric Particulate Systems. Pharmaceutical Research 23, 460-474.
  - 74) Zolnik, B.S., Burgess, D.J., 2008. Evaluation of *in vivo-in vitro* release of dexamethasone from PLGA microspheres. Journal of Controlled Release 127, 137-145.
  - 75) Kim, T., Burgess, D.J., 2002. Pharmacokinetic characterization of <sup>14</sup>C-vascular endothelial growth factor

- controlled release microspheres using a rat model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54, 897-905.
- 76) Ki, M., Lim, J., Ko, J., Park, S., Kim, J., Cho., H., Park, E., Kim, D., 2014. A new injectable liquid crystal system for one month delivery of leuprolide. *Journal of Controlled Release* 185, 62-70.
  - 77) Jordan, F., Naylor, A., Kelly, C.A., Howdle, S.M., Lewis, A., Illum, L., 2010. Sustained release hGH microsphere formulation produced by a novel supercritical fluid technology: *In vivo* studies. *Journal of Controlled Release* 141, 153-160.
  - 78) Takenaga, M., Yamaguchi, Y., Kitagawa, A., Ogawa, Y., Mizushima, Y., Igarashi, R., 2002. A novel insulin formulation can keep providing steady levels of insulin for much longer periods *in-vivo*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 54, 1189-1194.
  - 79) Johnson, O., Jaworowicz, W., Cleland, J.L., Bailey, L., Charnis, M., Duenas, E., Wu, C., Shepard, D., Magil, S., Last, T., Jones, A.J.S., Putney, S.D., 1997. The Stabilization and Encapsulation of Human Growth Hormone into Biodegradable Microspheres. *Pharmaceutical Research* 14, 730-735.
  - 80) Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H., 1994. Sustained Suppression of the Pituitary-Gonadal Axis by Leuporelin Three-Month Depot Microspheres in Rats and Dogs. *Pharmaceutical Research* 11, 1199-1203.
  - 81) Ogawa, Y., Okada, H., Heya, T., Shimamoto, T., 1989. Controlled Release of LHRH Agonist, Leuprolide Acetate, from Microcapsules: Serum Drug Level Profiles and Pharmacological Effects in Animals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 41, 439-444.
  - 82) Peters, S.A., 2012. Physiologically-Based Pharmacokinetics (PBPK) Modeling and Simulations. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
  - 83) Alexis, F., 2005. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-*co*-(glycolic acid)]. *Polymer International* 54, 36-46.
  - 84) Li, S., Girard, A., Garreau, H., Vert, M., 2001. Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant *D*-lactyl contents. *Polymer Degradation and Stability* 71, 61-67.
  - 85) Li, S., McCarthy, S., 1999. Influence of Crystallinity and Stereochemistry on the Enzymatic Degradation of Poly(lactide)s, *Macromolecules* 32, 4454-4456.
  - 86) Hooper, K.A., Macon, N.D., Kohn, J., 1998. Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly (L-lactic acid) as a function of polymer degradation. *Journal of biomedical materials research* 41, 443-454.
  - 87) Leenslag, J.W., Pennings, A.J., Bos, R.R.M., Rozema, F.R., Boering, G., 1987, Resorbable materials of poly(l-lactide): VII. *In vivo* and *in vitro* degradation. *Biomaterials* 8, 311-314.
  - 88) Okabe, J., Kimura, H., Kunou, N., Okabe, K., Kato, A., Ogura, Y., 2003. Biodegradable Intrasceral Implant for Sustained Intraocular Delivery of Betamethasone Phosphate. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44, 740-744.

- 89) Sansdrap, P., Moes, A.J., 1997. *In vitro* evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(*DL*-lactide-*co*-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release* 43, 47-58.
- 90) Li, L., Schwendeman, P., 2005. Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release* 101, 163-173.
- 91) 松岡理, 小林定喜, 1984, 動物種差と外挿, ソフトサイエンス社.
- 92) Kastellorizios, M., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2015. Prevention of foreign body reaction in a pre-clinical large animal model. *Journal of Controlled Release* 202, 101-107.
- 93) Patil, S.D., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J., 2007. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. *Journal of Controlled Release* 117, 68-79.
- 94) Vaddiraju, S., Wang, Y., Qiang, L., Burgess, D.J., Papadimitrakopoulos, F., 2012. Microsphere Erosion in Outer Hydrogel Membranes Creating Macroscopic Porosity to Counter Biofouling-Induced Sensor Degradation. *Analytical Chemistry* 84, 8837-8845.
- 95) Ono, K., Lindsey, E.S., 1969. Improved technique of heart transplantation in rats. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 57, 225-229.
- 96) Erickson, L.M., Pan, F., Ebbs, A., Kobayashi, M., Jiang, H., 2003. Microarray-Based Gene Expression Profiles of Allograft Rejection and Immunosuppression in the Rat Heart Transplantation Model. *Transplantation* 76, 582-588.
- 97) Jiang, H., Yang, X., Soriano R.N., Fujimura, T., Krishnan, K., Kobayashi, M., 2000. Distinct Patterns of Cytokine Gene Suppression by the Equivalent Effective Doses of Cyclosporine and Tacrolimus in Rat Heart Allografts. *Immunobiology* 202, 280-292.
- 98) Iwasaki, K., Shiraga, T., Matsuda, H., Teramura, Y., Kawamura, A., Hata, T., Ninomiya, S., Esumi, Y., 1998. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Tacrolimus (FK506) in the Rat. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 13, 259-265.
- 99) Nakanishi, T., Morokata, T., Kubo, K., Umeno, H., Eikyu, Y., Kozuki, Y., Seki, N., 2010. Effect of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitor BMS-566419 on rat cardiac allograft rejection. *Int. immunopharmacol.* 10, 91-97.
- 100) Undre, N.A., Hooff, J., Christiaans, M., Vanrenterghem, Y., Donck, J., Heeman, U., Kohnle, M., Zanker, B., Land, W., Morales, J.M., Andres, A., Schafer, A., Stevenson, P., 1999. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant. Proc.* 31, 296-298.