

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590208

研究課題名(和文) 眼圧降下と視神経保護を同時標的とした新しい緑内障治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of the effective ophthalmic formulations that simultaneously targeting intraocular pressure and optic nerve

研究代表者

伊藤 吉将 (ITO, Yoshimasa)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：50128633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円、(間接経費) 360,000円

研究成果の概要(和文)：L-ピログルタミン酸は一酸化窒素を抑制することで、眼房水産生及び眼圧低下作用を有すること、また、これらL-ピログルタミン酸は、視神経賦活効果も有していることを明らかとした。さらに、点眼製剤より高濃度の薬物供給が可能である眼瞼適用ゲルパッチを開発した。以上、L-ピログルタミン酸と眼瞼適用ゲルパッチを用いることで、眼圧降下と視神経保護を同時標的とした新しい緑内障治療薬の開発に繋がる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the treatment of L-pyroglutamic acid decreased the enhanced intraocular pressure, and enhanced the survival of retinal ganglion cells after optic nerve transection in the in vivo study. In addition, we tried to develop the transdermal drug delivery system for ophthalmic therapy. It is possible that the transdermal ophthalmic therapy by using L-pyroglutamic acid provide the effective therapy for glaucoma patient.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：ピログルタミン酸 緑内障 シクロデキストリン 眼圧 視神経 一酸化窒素 眼瞼適用ゲルパッチ  
網膜

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は視神経の障害による眼疾患であり、先進国において失明の第一要因である。この緑内障治療の第一選択は薬物療法であり、現在用いられている緑内障点眼薬は、眼圧を降下させることで間接的に神経障害を抑制している。近年では、視神経保護作用を有する NMDA 受容体拮抗薬のような薬物も発見され、緑内障患者間では緑内障治療の選択肢が広がると期待されている(研究段階、図1)。しかし、NMDA 受容体拮抗薬の投与には硝子体注入が必要となり、注入による合併症や刺激感が問題視されている。さらに眼圧降下と視神経保護を同時に行うことが可能な医薬品については未だ見つかっておらず、このような医薬品の発見及び投与方法の確立は患者の Quality of Life を大きく改善する新しい緑内障治療として切望されている。

申請者はこれまでの研究で、カイコ蛹からの抽出画分に血圧及び体温上昇作用を有するペプチド性の物質を数種検出しており、これらに眼圧降下作用及び視神経保護作用を認めている。なかでもピログルタミン酸は強い視神経保護作用を有していることを明らかとしていた (Cur. Eye Res., 2009; 34: 598-605)。

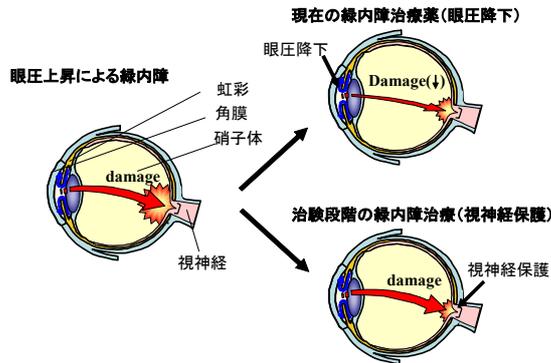


図1 眼圧または網膜(視神経)をターゲットとした緑内障治療薬

## 2. 研究の目的

上述の様に、カイコ蛹から抽出されたピログルタミン酸は強い視神経保護作用を有していることを明らかとしていた (Cur. Eye Res., 2009;34:598-605)。これらピログルタミン酸が点眼により網膜や視神経へ到達することができれば、新規の緑内障療法に繋がると考えた。また、カイコ蛹からの抽出画分において眼圧降下作用があったため、これらピログルタミン酸にも同様の効果を有する可能性は十分に考えられた。したがって、眼圧降下と視神経保護を同時標的とした新しい緑内障治療薬を開発することを主目的として本研究を企画した(図2)。本研究の中で

は L-ピログルタミン酸について検討を行った。

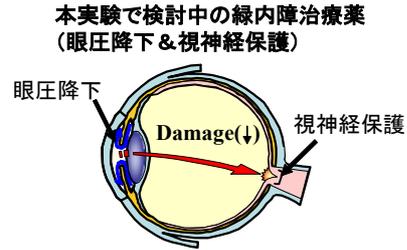


図2 本研究で検討した眼圧降下と視神経保護を同時標的とした新しい緑内障治療薬

## 3. 研究の方法

(1) 実験動物：実験動物は日本白色種家兔を用いた。ウサギは 25°C ± 3°C の飼育室でケージに入れ、十分な給水と餌(クレア CR-3)を与えたものを使用した。

(2) ピログルタミン酸点眼剤の調製：精製水 50 mL に L-ピログルタミン酸、塩化亜鉛、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを加え完全に溶解するまで攪拌した。さらに、1N 水酸化ナトリウムにより pH 5.8 に調整後、メンブランフィルター (Minsart CE, 0.2 μm) によって滅菌濾過したものをピログルタミン酸点眼液とした(表1)。

表1 今回作成したピログルタミン酸点眼液の組成

Eye drops	Content (%)		
	Pyroglutamic acid	HPCD	ZnCl <sub>2</sub>
PGA solution	0.5	0.0	0.0
PGA eye drops	0.5	0.0	0.5
PGA/HPCD <sub>5%</sub> eye drops	0.5	5.0	0.5
PGA/HPCD <sub>10%</sub> eye drops	0.5	10.0	0.5

(3) *In vitro* 薬物角膜透過性：家兎から角膜部分を摘出し、アクリル樹脂製角膜透過セルに装着した。リザーバー側(房水側)には等張の HEPES 緩衝液 (pH 7.4)、ドナー側(涙液側)には点眼液を 3.0 mL ずつ加え、35°C で加温し、一定間隔でリザーバー側からサンプルを採取した。サンプル中のピログルタミン酸量は HPLC 法により測定した。

(4) 家兎における高眼圧の誘発：家兎に 5% ブドウ糖を急速負荷 (15 ml/kg) することで高眼圧を誘発した。また、暗所にて 5 時間 (12:00-17:00) 飼育することで、日内変動による高眼圧に上昇を引き起こした。眼圧測定には電子眼圧計トノペン XL を用いた。

(5) 一酸化窒素 (NO) 産生量の測定: 眼内にエイコム社製マイクロダイアリスプローブ (A-1-20-05, 5 mm length) を挿入し、経時的に房水を採取した。さらに、得られた房水中 NO を酸化窒素分析システム ENA-20 (エイコム社製、京都、日本) にて測定した。本研究では NO<sub>2</sub> 量として表した。

(6) 家兔における網膜神経傷害の観察: 蛍光色素を両側の上丘に塗布し、予め網膜視神経細胞逆行性標識した。塗布 7 日後に左側視神経を挫滅、さらに挫滅 14 日後に網膜進展標本を作製し、標識された網膜神経細胞を撮影した。

(7) 眼瞼適用ゲルパッチの作成: 上記で作成したピログルタミン酸点眼製剤を水酸化アルミニウムゲルをはじめとする各種添加物とともに混和し、シート上にてゲル化させることで作成した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ピログルタミン酸点眼液の角膜透過性

点眼薬が薬効を示すためには眼内への移行が重要となる。このためピログルタミン酸の眼内移行性向上を目指した検討を行った。まず、ピログルタミン酸を溶解し点眼したところ、眼内への移行性はほとんど見られなかった。そこで、塩化亜鉛を用い、キレート製剤による透過性の改善効果を検討したところ、塩化亜鉛の添加によりピログルタミン酸の角膜透過が確認できた。さらに、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン加えることで、これら角膜透過性は顕著な増加が見られ、このピログルタミン酸眼内移行性向上は、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンの添加濃度に依存することを明らかとした (図 1)。

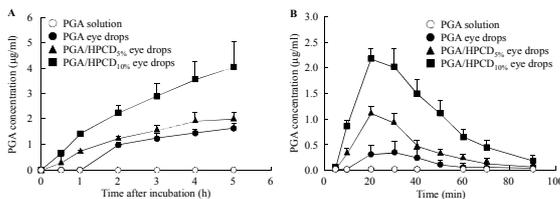


図 3 ピログルタミン酸点眼液の *in vitro* (A) 及び *in vivo* (B) 薬物角膜透過性

##### (2) ピログルタミン酸点眼液点眼による眼圧降下作用

眼圧降下は緑内障治療において有用であることが知られている。本研究で調製したピログルタミン酸点眼薬の眼圧降下作用を検討したところ、ブドウ糖負荷による高眼圧モデル及び日内変動を利用したモデル両方において高い眼圧降下作用が認められた。なか

でも、PGA/HPCD<sub>10%</sub> eye drops の眼圧降下作用は、市販緑内障治療薬であるチモプトール点眼液より高いことが分かった (図 2)。

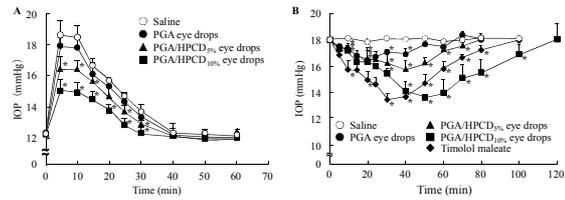


図 4 ピログルタミン酸点眼液の眼圧降下作用 (A ブドウ糖負荷高眼圧モデル、B 夜間高眼圧モデル)

##### (3) ピログルタミン酸による眼圧降下機構の解明

ピログルタミン酸の眼圧降下機構を明らかにすることは重要である。ブドウ糖負荷による高眼圧モデルの眼圧降下機構は、NO 上昇に伴う眼房水産生促進が知られている。そこで、ピログルタミン酸点眼液点眼後の NO 産生量を測定したところ、眼内のピログルタミン酸量が高いほど、NO 産生が抑制されていることが分かった。このことから、ピログルタミン酸による眼圧降下作用には NO 抑制を介した眼房水産生低下が関与することが示唆された (図 5)。一方、L-ピログルタミン酸には、これら高い眼圧降下作用が認められたが、R-ピログルタミン酸では眼圧降下作用及び NO 抑制効果は見られなかった。

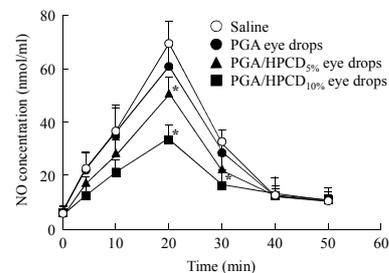


図 5 ブドウ糖負荷高眼圧モデルにおけるピログルタミン酸点眼液点眼が一酸化窒素産生へ与える影響

##### (4) L-ピログルタミン酸による視神経賦活効果

L-ピログルタミン酸でのみ眼圧降下作用が認められたことから、L-ピログルタミン酸硝子体注射による視神経賦活効果を検討した。その結果、L-ピログルタミン酸処理により視神経賦活効果が認められた (図 6)。したがって、これら L-ピログルタミン酸を用いることで、眼圧降下と視神経保護を同時標的とした新しい緑内障治療薬の開発が可能であることが示唆された。

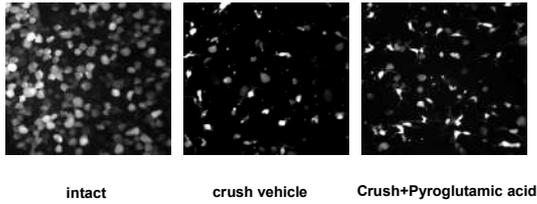


図6 家兎における網膜神経傷害とピログルタミン酸硝子体注射による視神経賦活効果

#### (5) 眼瞼適用ゲルパッチ「貼るめぐすり」の開発

L-ピログルタミン酸に眼圧降下と視神経保護効果が認められたが、今回調製したピログルタミン酸点眼液点眼では、網膜、視神経までピログルタミン酸を十分な濃度到達させることができなかつた。点眼製剤は点眼後鼻涙管を介してすみやかに排出される。このため網膜へ薬物を到達させるためには、眼内への薬物移行性増大または眼周辺部を介するなど、これまでと違ったアプローチが必要と考えられた。これらを踏まえて、眼瞼適用ゲルパッチ「貼るめぐすり」の開発について検討を行った。今回作成した眼瞼適用ゲルパッチは、形状を自由に設計できるとともに、刺激性が少ないことから瞼周辺に適用可能であるものと考えられた。



図7 眼瞼適用ゲルパッチ「貼るめぐすり」の写真

#### (6) 結論

上記の研究成果により、塩化亜鉛と2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリンを用いることで、L-ピログルタミン酸の眼内移行が可能であり、移行したL-ピログルタミン酸はNOを抑制することで、眼房水産生及び眼圧低下作用を有することを明らかとした。また、これらL-ピログルタミン酸は、視神経賦活効果も有していることを示し、眼圧降下と視神経保護を同時標的とした新しい緑内障治療薬の開発が可能であることが示唆された。さらに、点眼製剤より高濃度の薬物供給が可能である眼瞼適用ゲルパッチの開発を行った。L-ピログルタミン酸は日内変動による眼圧上昇にも効果的であるため、これら眼瞼適用ゲルパッチの就寝時の使用は、緑内障治療において有用と期待できる。今後、眼瞼適用ゲルパッチによる視神経保護効果を詳

細に検討する予定である。本研究結果は、より効果的な緑内障治療を実現する上で重要な知見であると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Ito Y., Nagai N., Okamoto N., Shimomura Y., Nakanishi K., Tanaka R. Reduction of Enhanced Rabbit Intraocular Pressure by Instillation of Pyroglutamic Acid Eye Drops. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 36, 1017-1023, 2013. (Highlighted paper selected by Editor-in-Chief)

[学会発表] (計1件)

吉岡千晶, 長井紀章, 伊藤吉將, 高橋秀也, 志水英二, 松井 誠, 守本英二. ナノ化技術を応用した眼瞼適用ゲルパッチ「貼るめぐすり」の開発とその有効性, 日本薬学会第134年会, 2014年3月27-30日, 熊本.

[その他]

ホームページ:

<http://www.phar.kindai.ac.jp/pharmtec/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 吉將 (ITO Yoshimasa)  
近畿大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 50128633

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

長井 紀章 (NAGAI Noriaki)  
近畿大学・薬学部・講師  
研究者番号: 90411579