

平成 2 7 年 6 月 1 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790163

研究課題名（和文）院内製剤化を目指した毛包脂腺系デリバリーのための新規ナノキャリアの開発

研究課題名（英文）Development of novel nanocarrier for follicular delivery

研究代表者

内野 智信（Uchino, Tomonobu）

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：40345228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ショ糖ラウリン酸エステルをベースに用いたベシクルを調製した。そのベシクルにモデル薬物を封入したところ、薬物溶液と比べて薬物の皮膚透過性は著しく増大することが明らかとなった。また蛍光物質であるクマリン-6を封入し、毛包への移行性を評価したところ、毛包への移行性が向上することが認められた。本ベシクルは医薬品添加物規格および化粧品種別配合成分規格を満たした添加剤を用いて調製したことから、院内製剤として適用可能なナノキャリアとして有用と考えられる。しかし、より毛包移行性の高いキャリアへの処方変更の検討やベシクルの皮膚刺激性など様々な検討が必要とされるため、更なる本研究の発展が望まれる。

研究成果の概要（英文）：In current study, sucrose laurate based vesicles were prepared. Drug loading into the vesicle resulted in the enhancement of drug skin permeation. By the application of coumarin-6 loaded in the vesicle on the skin, accumulation of coumarin-6 was observed into hair follicles. Our vesicle formulations are prepared using additives which is including the Japanese Pharmaceutical Excipients or Japanese Cosmetic Ingredients Codex. Therefore, it might be effective nanocarrier of transdermal delivery for the clinical application as hospital preparation. However, more investigation will be needed including formulation change for highly transitivity into the hair follicles and skin irritation test of vesicle formulations. It would be strongly expected for further development of this research.

研究分野：医療薬学

キーワード：ベシクル 毛包デリバリー

1. 研究開始当初の背景

薬物が経皮吸収される場合には、角質細胞ルート、細胞間隙ルート、付属器ルートの3種類が存在すると言われている¹⁾。そのうち、付属器ルートは汗腺や毛包脂腺系、エクリン汗腺などがあるが、皮膚表面積に占める割合が小さいため、これらのルートからの薬物の経皮吸収に関する寄与は少ないとされている。そのため、薬物の経皮吸収改善の方法には、これまでに細胞間隙ルートの利用を主としたイオントフォoresis²⁾、マイクロニードル³⁾などの物理的手法や、吸収促進剤の併用⁴⁾や輸送単体の利用⁵⁾などの化学的手法が確立されてきた。ところが、近年、リポソームや Copoly lactic acid/glycolic acid (PLGA) ナノパーティクルなどのナノキャリアに薬物を封入して毛包脂腺系へのデリバリーする報告がある。例えば、辻本らは PLGA を用いたナノキャリアにヒノキチオールを封入し、それらの粒子が未封入の製剤と比べて有意に毛包へ移行することを見出した⁶⁾。また、Verma らはシクロスポリン封入リポソームを円形脱毛症のモデルラット適用したところ、コントロール群と比べて有意に円形脱毛症が改善されたことを報告している⁷⁾。しかし、こうした報告のほとんどはナノキャリアの粒子径が薬物の毛包デリバリーに影響を与えているとされているが、最適な粒子径もナノキャリアの素材によって様々で、薬物含有ナノキャリアの毛包移行性についてあまりシステマティックな検討はなされていないのが現状である。また臨床に目を向けると、疾患ベースで皮膚付属器を考えた場合、付属器ルート、特に毛包脂腺系が治療のターゲットとなる疾患は尋常性ざ瘡や脱毛症など数多く存在しているが、こうした疾患を治療するために上市されている製剤は、主薬を基剤に分散させたものがほとんどであり、毛包脂腺系へのデリバリーを向上させた機能を付与した製剤が存在するといえるのが現状である。そこで、将来的に院内製剤として臨床適用可能な医薬品添加剤を用いた毛包デリバリーの系の構築が可能となれば、学術的にも、臨床的にも有意義であると考えらえる。

2. 研究の目的

上記のような背景を受け、本研究は、最終的に院内製剤として臨床応用可能な「効率的に薬物を毛包にデリバリーするための新規薬物含有ナノキャリアを開発すること」を目的とした。そのために、本申請期間内ではその第一段階のステップとして2年間という研究期間を設定し、その間、「毛包デリバリーのための薬物含有ナノキャリアの開発と評価(製剤・分子物性評価、毛包移行性および皮膚透過性評価)」に焦点を当て研究を遂行した。ナノキャリアは、申請者らの実績があるショ糖ラウリン酸エステル (L-595) を基盤としたベシクルを選定した^{8,9)}。

3. 研究の方法

3-1. 薬物封入ベシクルおよびリポソームの

調製

ショ糖ラウリン酸エステル (L-595)、ポリエチレングリコールモノラウレート (MYL-10)、ポリソルベート 20 (TL-10)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ソルビタンラウレート (SL-10) をベシクル構成成分として使用した。また、モデル薬剤としてフルルビプロフェン (FLU) およびノビレチンを使用した。各成分のアルコール溶液を適切なモル比で混合した後、有機溶媒を減圧留去した。生成した薄膜に 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.0) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS : pH 7.4) を加えて攪拌し界面活性剤を懸濁させた後、孔径 100 nm のポリカーボネートフィルターを装着したエクストルーダーで 10 回押し出す操作を行うことで、薬物封入ベシクルを調製した。全ての製剤における最終的な総界面活性剤濃度は 10% (w/w) とした。

3-2. 薬物封入ベシクルの評価

3-1 で得られたベシクルは、粒子径、ゼータ電位、薬物封入率、¹H-および¹⁹F-NMR により評価した。

3-3. ベシクルからの薬物の経皮吸収性評価

ベシクルの FLU 皮膚透過性は、ユカタンマイクロピッグ (YMP) を装着したフランツ拡散セル (有効拡散面積 : 0.38 cm²) を用いた *in vitro* 試験により評価した。ドナーコンパートメントに各試験製剤 50 μL を適用し、レシーバー溶液として PBS (pH 7.4) 5.0 mL を使用した。各製剤適用後、0~24 時間にサンプリングを行った。各サンプル中に含有される FLU は HPLC により定量した。検出器は UV 検出器を用い、波長 254nm で定量した。

一方、ノビレチンの系は YMP の皮膚を用い、フローディフュージョンセル (有効拡散面積 : 1.13 cm²) を用いて評価した。ドナーコンパートメントに各試験製剤 50 μL を適用し、アクセプターコンパートメントには 30% エタノールを含有した PBS (pH 7.4) を流速 1.3 mL/h の速度で 37 °C で送液した。サンプルポイントは 1.5 時間ずつ 24 時間まで行った。各サンプル中に含有されるノビレチンは HPLC により定量した。検出器は UV 検出器を用い、波長 254nm で定量した。

3-3. クマリン-6 を用いた薬物の毛包移行性評価

L-595 を用いたベシクルに緑色蛍光を持つクマリン-6 を封入したベシクルを Wistar 系雄性ラットの背部皮膚切片を装着したインラインセルに適用した。適用後、皮膚切片を作成し、その切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

4-1. 薬物封入ベシクルのキャラクタリゼーション¹⁰⁾

Table 1 にモデル薬物として FLU を用いた際の各ベシクル製剤の性質についてまとめた。得られたベシクルの平均粒子径は 97.8 ~

Table 1 Characterization of flurbiprofen loaded vesicle formulations

Vesicle formulations	Compositions	FLU concentration (mg/mL)	Z-Average (d nm ± SD)	PDI (± SD)	Zeta potential (mV ± SD)	EE% (± SD)
L-595/SDS/FLU	100/5/20	6.5	111.9 ± 1.1	0.053 ± 0.01	-21.1 ± 2.1	98.25 ± 0.15
L-595/SL-10/SDS/FLU	75/25/5/20	7.5	131.9 ± 2.5	0.10 ± 0.01	-23.0 ± 0.85	97.90 ± 0.34
L-595/MYL-10/SDS/FLU	75/25/5/20	7.8	102.9 ± 2.5	0.086 ± 0.03	-21.9 ± 0.93	97.65 ± 0.040
L-595/MYL-10/SDS/FLU	50/50/5/20	6.5	97.83 ± 5.0	0.088 ± 0.00	-23.5 ± 1.4	97.03 ± 0.087
L-595/TL-10/SDS/FLU	75/25/5/20	5.6	108.1 ± 2.0	0.10 ± 0.01	-13.6 ± 0.56	96.72 ± 1.5

131.9 nm であり、全ての系において PDI は 0.2 以下の値であったため、均一な分散系として存在することが示された。また、調製した各ベシクル製剤のゼータ電位は -23.5 ~ -13.6 mV と高い負の値を示し、ベシクルの分散安定性に寄与していると推測された。各ベシクル製剤の FLU 飽和濃度は 5.6 ~ 7.8 mg/mL であった。FLU の水への飽和溶解度 (pH 3.0) は 0.007 mg/mL であることが報告されており¹⁵⁾、それと比較して 800 ~ 1114 倍の FLU 濃度を示したためこと、各ベシクル製剤の FLU の封入率は 96.7 ~ 98.3% であったことから、FLU はベシクルの二重層内に存在することにより、全ての系で高い封入率を示したと考えられた。

Fig.1 に FLU 封入ベシクルの芳香族領域の ¹H-NMR の結果を示した。

FLU 水溶液において、芳香族プロトンの化学シフトは、シャープなピークを示した (Fig. 2a,)。しかし、FLU 封入ベシクルのスペクトルでは、ブロード化している化学シフトが観

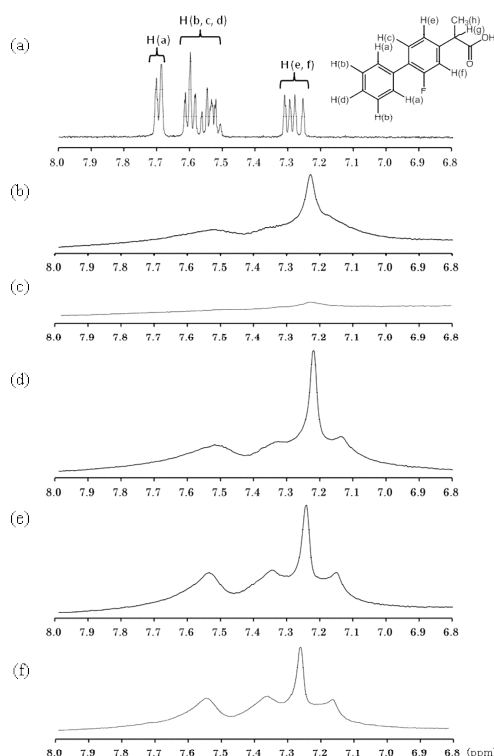


Fig. 1 ¹H-NMR spectra of aromatic region in the FLU loaded vesicle system. (a) FLU PBS solution (pH 7.4), (b) L-595/SDS/FLU (100/5/20), (c) L-595/SL-10/SDS/FLU (75/25/5/20), (d) L-595/MYL-10/SDS/FLU (75/25/5/20), (e) L-595/MYL-10/SDS/FLU (50/50/5/20), (f) L-595/TL-10/SDS/FLU (75/25/5/20). FLU concentration were 1.0, 6.5, 7.5, 7.8, 6.5 and 5.6 mg/mL, respectively.

察された (Fig. 2b ~ f)。なお、本図中には示さなかったが、¹⁹F-NMR の結果も同様の傾向を示した。我々は、これまでに、薬物がベシクルやリポソームの二重層内に封入されると、溶液状態の ¹H-NMR のケミカルシフトと比べてブロード化することを報告している^{8,9)}。よって、これらの結果から、FLU 分子はベシクルの二重層内に封入されていると推察され、FLU の芳香族プロトン及びフッ素原子の運動性は低下し、それらは二重層内でベシクル成分と相互作用していることが示唆された。

4-2. ベシクルからの薬物の経皮吸収性評価

Fig.2 に調製した各ベシクルからの FLU の YMP 皮膚累積透過曲線を示した。FLU 溶液においては、適用後 24 時間後においても透過はほとんど認められなかったが、FLU をベシクルに封入することにより、YMP の皮膚透過性は著しく改善した。また、今回用いた処方の中で SL-10 を処方に添加した系が、FLU の透過を最も促進させた。SL-10, MYL-10, TL-10 の親水性・親油性バランス (hydrophile-lipophile balance: HLB) は、それぞれ 8.6, 12.5, 16.9 であり、使用した edge activator の脂溶性が高いベシクル製剤ほど皮膚透過性が高いことが示された。これは、表皮・角質層の細胞間脂質の HLB 値は約 6 であるという報告があるため¹¹⁾、これに近い HLB 値をもつ edge activator を含有するベシクルは、皮膚構造内に取り込まれやすく、容易に皮膚角質層を透過できる可能性が示唆された。

次に、Fig.3 に皮脂分泌排泄作用のあるノビレチン封入ベシクル

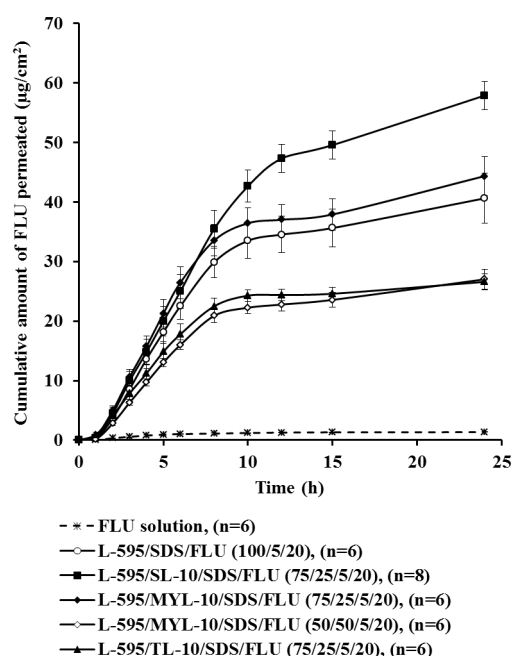


Fig. 2 *In vitro* cumulative permeated amount-time profiles of transdermal FLU delivery from vesicle formulations. Data represent the mean ± SE

(L-595/SDS/Nobiletin(100/5/2.5)) およびノビレチン懸濁液からのノビレチンの累積皮膚透過曲線を示した。FLU の系と同様に、ベシクルにノビレチンを封入することによりノビレチンの経皮吸収性を改善できることが示された。

以上の結果から、L-595 を用いたベシクルに薬物を封入することにより、薬物の経皮吸収性が改善できることが明らかとなった。

4-3. ベシクルを用いたクマリン-6 の毛包移行性評価

これまでの結果から、ベシクルに薬物を封入すると、薬物の皮膚透過性が溶液(懸濁液)と比べて優位に改善されることが示された。このことから、ベシクルに薬物を封入した場合に薬物が毛包にも移行することが期待される。

そこで、モデル薬剤として緑色蛍光物質であるクマリン-6 をベシクルに封入した際のクマリン-6 の毛包移行性について Wistar 系の雄性ラットの皮膚切片をインラインセル装着し、製剤を 24 時間適用した後のクマリン-6 の皮内の分布について検討した。Fig.5 にその結果を示した。懸濁液の系では、クマリン-6 由来の緑色蛍光は皮膚表面にしか認められなかったが(Fig.4-(a))、ベシクルに封入した系では角層深部や毛包へのクマリン-6 の集積が観察された(Fig. 4-(b))。よってベシクルに封入することにより、懸濁液と比べてクマリン-6 の毛包への移行性が増大するものと推察された。

以上の結果から、糖エステルを用いて調製したベシクルに薬物を封入することで、薬物の経皮吸収性だけでなく、毛包移行性を改善することを可能にした。また、本ベシクルはすべて医薬品添加物規格および化粧品種別配合成分規格を満たした添加剤を使用していることから、安全性の高い薬物輸送キャリアとして有用と考えられる。しかしながら、よ

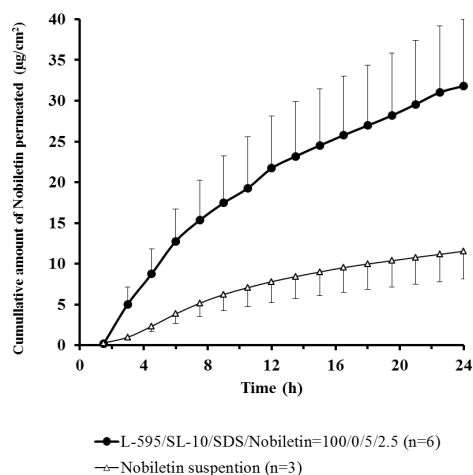


Fig. 3 *In vitro* cumulative permeated amount-time profiles of transdermal delivery from vesicle formulations. Data represent the mean $\pm$ SE

り毛包移行性の高いキャリアへの改善のための物理化学的性質の検討や実際の生体への刺激性の検討など様々な検討が必要と考えられ、今後も更なる研究の進展が望まれる。

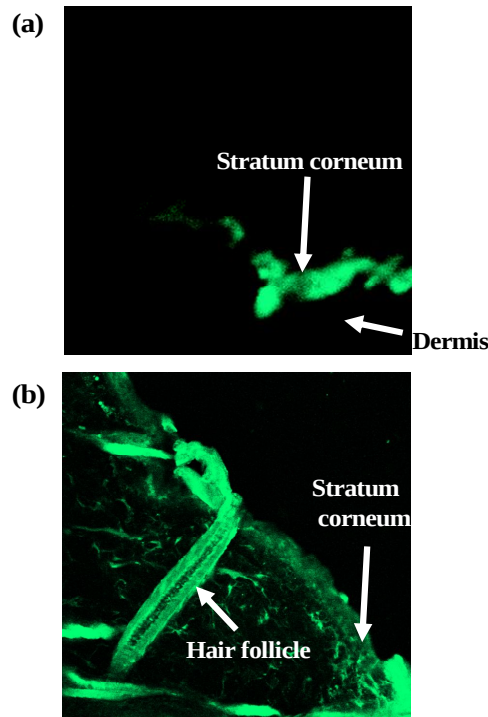


Fig. 4 Histological observation of wistar rat skin after 24 h application of coumarin-6 suspension (a) and coumarin-6 loaded surfactant-based vesicle (b).

・参考文献

1. 宮地良樹ら編著, 化粧品・外用薬研究者のための皮膚科学, 文光堂, 36-39, (2005).
2. Fatouros DG. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 29,160-170, (2006).
3. Verbaan FJ. *et al.*, *J. Control. Release*, 128, 80-88, (2008).
4. Chantasant D., *J. Pharm. Sci.*, 96, 2310-2326 (2007).
5. Yuqin Q. *et al.*, *J. Control. Release*, 129, 144-150, (2008).
6. Tsujimoto H. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 4771-4777, (2007).
7. Verma D. *et al.*, *Eur. J. Dermatol.*, 14, 332-338, (2004).
8. Uchino T. *et al.*, *Int. J. Pharm*, 412, 142-147, (2011).
9. Uchino T. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 86, 156-166, (2014).
10. Uchino T. *et al.*, *Int. J. Pharm*, 464, 75-84, (2014).
11. Gillet A., *et al.*, *Int. J. Pharm*, 411, 223-231, (2011).

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)

Uchino T, Matsumoto Y, Murata A, Oka T, Miyazaki Y, Kagawa Y., Transdermal delivery of flurbiprofen from surfactant-based vesicles: particle characterization and the effect of water on in vitro transport.

Int. J. Pharm., 2014, 464: 75-84.

doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.051.

〔学会発表〕(計 3 件)

Uchino T, Matsumoto Y, Murata A, Oka T, Miyazaki Y, Kagawa Y., Transdermal delivery of flurbiprofen from surfactant-based vesicles: particle characterization and the effect of water on in vitro transport.

5th FIP Pharmaceutical Sciences and World Congress, 2014 年 4 月 13 日-16 日、Melbourne, Australia.

佐々木彩乃、内野智信、宮寄靖則、賀川義之、尋常性ざ瘡治療を目的としたノビレチン外用剤の開発 –ノビレチン可溶化手法の検討–、第 23 回医療薬学会年会、2013 年 9 月 21 日～22 日、東北大学(仙台)

松本ゆい子、内野智信、宮寄靖則、賀川義之、フルルビプロフェン封入ベシクルの調製とキャラクター化、第 22 回医療薬学会年会、2013 年 10 月 27 日～28 日、ときめッセ(新潟)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

内野 智信 (UCHINO TOMONOBU)

静岡県立大学薬学部・講師

研究者番号: 40345228