

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860129

研究課題名(和文) ナノ化技術を用いた点眼による網膜療法の確立と緑内障治療への応用

研究課題名(英文) Ophthalmic formulation of solid nanoparticles permits the retinal therapy, and lead to the therapy in the glaucoma patient

研究代表者

長井 紀章 (NAGAI, Noriaki)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：90411579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは医薬品ナノ結晶の新規調製法の確立を目的とし、シロスタゾール(CLZ)を含む高品質のナノ粒子含有分散液(CLZナノ結晶点眼液)の調製に成功した。また、これらCLZナノ結晶点眼液点眼は、エンドセリン-1硝子体注射によるラット網膜血管収縮を抑制することを明らかとした。以上、シロスタゾールナノ結晶含有点眼液の調製方法を確立するとともに、本点眼液が緑内障治療に有用である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish a new method for preparing drug solid nanoparticles, and succeeded in preparing a high quality dispersion containing cilostazol (CLZ) nanoparticles. In addition, the instillation of the ophthalmic dispersions containing CLZ nanoparticles suppresses retinal vasoconstriction in endothelin-1-injected rats. It is possible that an ocular drug delivery system using drug nanoparticles may expand their usage as therapy in the glaucoma patient.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ナノ粒子 シロスタゾール 眼後部治療 網膜 緑内障 角膜透過 眼圧 DDS

1. 研究開始当初の背景

緑内障は眼圧上昇により網膜血管が圧迫され、その結果視神経障害が見られる眼疾患であり、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るが、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網膜及び視神経障害を抑制している。近年では、網膜循環改善や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)。しかし、眼後部療法には硝子体注入が必要となり、本注入法による合併症や刺激感が問題視されている。さらに眼圧降下と網膜・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が切望されている。一方、粒子サイズが 100 nm 以下の物質をナノ粒子とよび、反応性の増加や細胞への取り込み率が高いという特性が近年知られ、新たな技術革新及び材料や製品等の産業創出が期待されている。一方近年、薬物粒子径を 100 nm 程度にすることで、角膜透過性や結膜からの体内移行性が飛躍的に上昇することが知られており、これら薬物ナノ粒子を用いた点眼療法は、非侵襲的に眼後部薬物治療を可能にする DDS 製剤開発に有効と考えられている。

2. 研究の目的

上述の様に、申請者らは薬物粒子径を 100 nm 程度にすることで、角膜透過性や結膜からの体内移行性が飛躍的に上昇することを明らかとなっており、これら薬物ナノ粒子を用いた点眼療法は、非侵襲的に眼後部薬物治療を可能にするドラッグデリバリーシステム(DDS)製剤開発に有効と考えられている。また、シルスタゾール(CLZ)が眼圧降下作用と血管拡張作用を有することも見出しており(Okamoto et al, J OLeo Sci, 59, 423-430, 2010)、この CLZ 点眼により眼前部及び後部の両者への到達を可能にすれば、新規の緑内障療法に繋がるものと考えられる。したがって、CLZ を用いた「ナノ粒子含有点眼液の調製」と「眼圧降下と網膜・視神経障害保護を同時に有する新たな緑内障療法」の確立を主目的として本研究を企画した。

3. 研究の方法

(1)実験動物：実験動物は 7 週齢雄性 Wistar ラットを用いた。

(2)ナノ結晶点眼液の調製：CLZ と添加物メチルセルロース(MC)、ベンザルコニウム塩化物(BAC、点眼用保存剤)、マンニトールを、10 mm ジルコニアビーズとともにジルコニアカップ(45 mm、フリッチュ社製)に入れ、遊星型ボールミル(フリッチュ社製)にて乾式破碎した(400 rpm、24 時間)。さらに、これら乾式は最後の微細粉末を 2-ヒドロキシ

プロピル-β-シクロデキストリン(HP-CD)に加え、0.1 mm ジルコニアビーズ及びビーズ式破碎装置(和研薬社製)にて湿式破碎(5500 rpm、30 秒間、冷却下)30 回行うことで、2% CLZ ナノ粒子含有分散液(ナノ結晶点眼液)を調製した。比較対象とした CLZ マイクロ粒子含有点眼液(マイクロ結晶点眼液)は、粉末 CLZ 試料(マイクロ CLZ)と添加物(SD、MC、BAC 及び HP-CD)を混合することで調製した。粒子径測定には SALD-7100(島津製作所製)を用い、屈折率 $1.60 \pm 0.10i$ にて粒子の平均粒子径及び分布を調べた。

(3) CLZ 濃度の測定：CLZ の濃度測定には HPLC 法を用い、カラムは Inertsil ODS-3(2.1×50 mm、ジエールサイエンス株式会社)、移動相には $\text{CH}_3\text{CN} / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O} = 35 / 15 / 50$ (v/v/v) を用いた。移動相の流速は 0.25 mL/min、試料注入量 4 μL 、吸収波長 254 nm にて行った(解析時間：12 分、サンプル注入間隔：12.3 分)。

(4) ナノ結晶点眼液の分散性評価：各種添加物をそれぞれ除いた試験液を 5 ml 試験管に 3 ml ずつ調製した(その際、高さは約 4 cm であった)。その後、液面から約 5 mm の位置で 50 μL ずつ、一定時間ごとに 2 週間採取し、採取液の濃度を測定することで分散性を評価した。

(5) 保存効力試験法：試験菌株には独立行政法人製品評価技術機構から購入した大腸菌(*Escherichia coli* ATCC 8739)を用いた。この試験菌を 4%ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地(SCD 寒天培地)上に播種し、31 インキュベーター内で 18~24 時間培養した。この菌を 1×10^8 個となるように調製した菌液を、試験溶液 1 mL あたり 1×10^6 個の生菌数になるように混合し、これらの容器を遮光下で 22.5 ± 2.5 にて保存し、14 及び 28 日後の試験溶液中生菌数を測定した。生菌数測定は、日本薬局方記載「カンテン平板混濁法」に従い行った。

(6) CLZ 眼後部到達経路の検討：無麻酔下 2% CLZ ナノ結晶点眼液を Wistar 系雄性ラットの右目に点眼し、経時的にラット眼周辺部を含む組織(角膜、水晶体、硝子体、網膜、強膜、網膜後部、眼周肉内及び血液、図 1 参照)を採取し、メタノール 100 μL 中にてホモジナイズ後、組織中 CLZ 含量を測定することで表した。また、網膜での薬効は、 1×10^{-5} M エンドセリン-1(ペプチド研究所株式会社)20 μL を硝子体注射することで、網膜血管を収縮させ、点眼後の網膜血管径を測定することで評価した。また、網膜血管の撮影はマイクロスコープ(バイオメディカルサイエンス社製)にて行った。

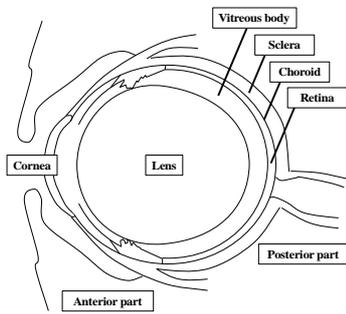


図1 本研究で用いたラット眼周辺部組織

4. 研究成果

(1) CLZ ナノ結晶点眼液の調製とその製剤評価

マイクロ結晶点眼液の平均粒子径は $12.0 \pm 0.59 \mu\text{m}$ であったのに対し、CLZ ナノ結晶点眼液では平均粒子径 $0.073 \pm 0.015 \mu\text{m}$ と各種添加剤及びビーズミル法を組み合わせることでCLZ結晶をナノサイズにすることが可能となった。これら添加剤の役割を検討したところ、MC非添加において乾式及び湿式破碎を行った際には、薬物がメレンゲ状となり十分な微細化（ナノ化）が行われなかった（Fig. 2F）。一方、BAC、マンニトールやHP CD非存在下における薬物粒子径に大きな差は見られず、MCを用いたビーズミル法がナノ結晶化において重要であることが確認できた（図2参照）。

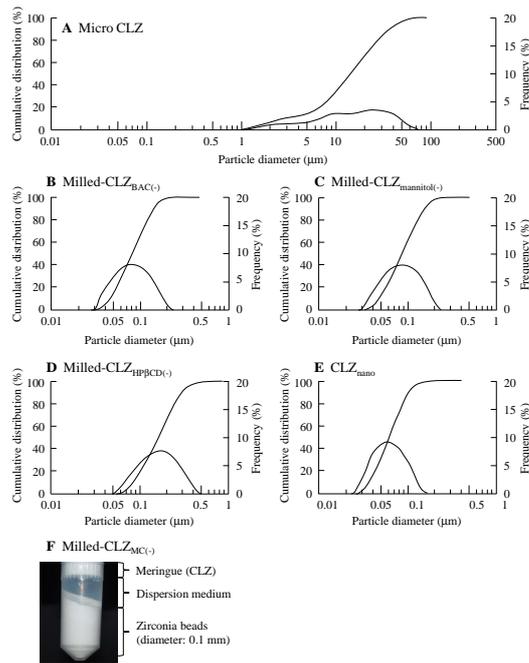
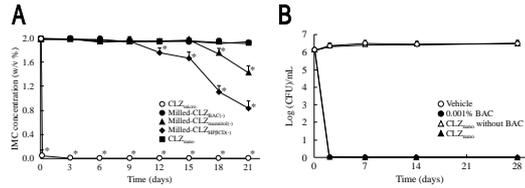


図2 本法にて調製したCLZ点眼液の粒度分布 [名称中カッコマイナスイ(-)は非添加の添加物を示す]

次いで、CLZ ナノ結晶点眼液の分散性及び抗菌効果について検討を行った。その結果、本法で調製したCLZナノ結晶点眼液は調製21

日後まで凝集は見られず、また高い抗菌力を維持していた。一方、BAC、マンニトールやHP CD非存在下では、粒子径は存在下と同程度であったが、凝集性が高く、HP CDはCLZナノ結晶点眼液の安定性向上に適した添加物であることが確認できた（図3参照）。



(2) CLZ ナノ結晶点眼液点眼による薬物網膜移行性及び網膜血管拡張作用

ラットへのCLZナノ結晶点眼液点眼後、眼後部の薬剤濃度は高まり、点眼10分後の網膜中CLZ濃度は、CLZマイクロ点眼液群のそれと比較し、約13.6倍高値であった。一方、血中におけるCLZ濃度はCLZマイクロ点眼液点眼群とナノ点眼液点眼群間では有意な差は認められず、非点眼の左眼組織中のCLZ濃度も両処方では差はなかった。さらに、CLZ眼後部到達経路の検討結果から、CLZナノ結晶点眼液点眼後CLZは、脈絡膜を透過し網膜血管まで到達する経路または結膜に存在する毛細血管から血管内に入り、網膜血管に到達する2つの経路により網膜への移行が高まっていることが示唆された（図4）。

ラットへのCLZナノ結晶点眼液点眼後、眼後部の薬剤濃度は高まり、点眼10分後の網膜中CLZ濃度は、CLZマイクロ点眼液群のそれと比較し、約13.6倍高値であった。

一方、血中におけるCLZ濃度はCLZマイクロ点眼液点眼群とナノ点眼液点眼群間では有意な差は認められず、非点眼の左眼組織中のCLZ濃度も両処方では差はなかった。さらに、CLZ眼後部到達経路の検討結果から、CLZナノ結晶点眼液点眼後CLZは、脈絡膜を透過し網膜血管まで到達する経路または結膜に存在する毛細血管から血管内に入り、網膜血管に到達する2つの経路により網膜への移行が高まっていることが示唆された（図4）。

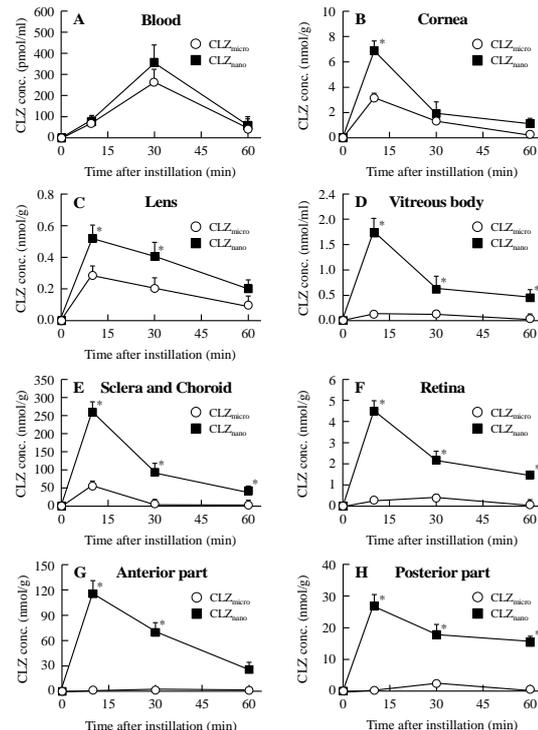


図4 CLZ ナノ結晶点眼液点眼後における眼組織中薬物濃度変化
 平均値 ± 標準誤差, n=6, *P < 0.05, vs. CLZ_{micro}.

次にCLZ ナノ結晶点眼液点眼が網膜血管へ与える影響について検討を行った。まず、エンドセリン-1 硝子体注入後の網膜血管径について検討を行ったところ、 1×10^{-5} M エンドセリン-1 硝子体注入後直ちに網膜血管は収縮し始め、約 30 分後に最も細くなった。この注入 30 分後をピークに、徐々に拡張がみられ約 48 時間後にはほぼ正常な状態に戻った。エンドセリン-1 注入前の正常な血管径を 100% とすると、CLZ マイクロ結晶点眼液点眼群では 30 分後 $58 \pm 5.6\%$ 、4 時間後 $84 \pm 2.6\%$ であり、血管径が正常に戻った時間は、生理食塩水点眼群と同時間であったが、CLZ ナノ結晶点眼液点眼群では 30 分後 $70 \pm 4.3\%$ 、4 時間後では血管径は正常に戻った ($101 \pm 3.7\%$, 図5 参照)。

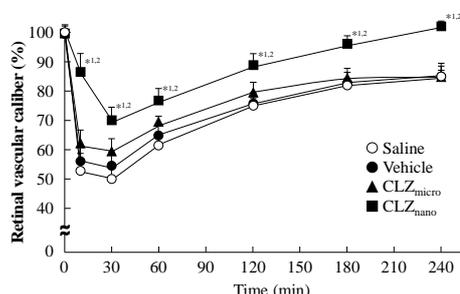


図5 CLZ ナノ結晶点眼液点眼による網膜血管拡張効果
 平均値 ± 標準誤差, n=6, *¹P < 0.05, vs. saline. *²P < 0.05, vs. CLZ_{micro}.

(3) 結論

添加物 (MC、BAC、マンニトール、HP CD) 及びビーズミル法を用いることで、平均粒子径が $0.073 \pm 0.015 \mu\text{m}$ のナノオーダーの粒子径を有する CLZ 結晶点眼液を調製する手法を確立した。また、上記の研究成果により、この CLZ ナノ結晶点眼液を適用した際に、非常に強力な網膜血管拡張作用を発揮することを明らかとした。今後、適切な分散剤を選択し、CLZ ナノ結晶点眼液の分散、安定性のさらなる向上が達成できれば、本医薬品ナノ結晶点眼液の実用化への道が大きく前進するものとする。これらの研究成果が、簡便性、安全性、有効性に優れた点眼による眼後部療法 (網膜疾患治療) の一日も早い実用化を達成し、失明のない安全、安心な社会の実現に貢献できることを期待する。

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 2 件)

Nagai N., Yoshioka C., Tanabe W., Tanino

T., Ito Y., Okamoto N., Shimomura Y. Effects of Ophthalmic Formulations containing Cilostazol Nanoparticles on Retinal Vasoconstriction in Rats Injected with Endothelin-1. *Pharmaceutica Analytica Acta.*, 査読有, 6:4, 2015. Open access. <http://dx.doi.org/10.4172/2153-2435.1000351>

Nagai N., Ono H., Hashino M., Ito Y., Okamoto N., Shimomura Y. Improved corneal toxicity and permeability of tranilast by the preparation of ophthalmic formulations containing its nanoparticles. *J Oleo Sci.*, 査読有, 63, 177-186, 2014.

[学会発表] (計 2 件)

長井紀章, 平田直奈, 田辺 航, 伊藤吉将. 眼圧降下と網膜症治療を同時標的とした次世代 緑内障治療薬 “医薬品ナノ結晶点眼液” の開発, 日本薬学会第 134 年会, 3 月 27-30 日, 2014. 熊本 (熊本大学). 一般学術発表ハイライトに選出

長井紀章, 伊藤 吉将, 岡本紀夫, 下村嘉一. 網膜疾患治療を目的とした医薬品ナノ結晶点眼液の開発, 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 10 月 12 日, 2013. 京都 (同志社女子大学).

[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

長井 紀章 (NAGAI Noriaki)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号: 90411579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし