

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460243

研究課題名(和文) ナノ化技術を用いた貼付型眼瞼透過性製剤“貼る目薬”の開発と眼感染症治療への応用

研究課題名(英文) Design of transdermal ophthalmic therapy using drug nanoparticle technology and application of it as eye infection treatment

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ化技術を用いた貼付型眼瞼透過性製剤“貼る目薬”を作成した。本“貼る目薬”は、刺激性が少なく、涙液中に安定した薬物放出を示した。また、ナノ結晶含有ゲルパッチの眼内移行ルートは、眼瞼表面から侵入した薬物が、マイボーム腺に移行し、マイバムとして眼表面に排出されることで、涙液に移行していることを見出した。本研究結果は、抗菌や抗炎症をはじめとする眼領域疾患に対し、より効果的な治療を実現する上で重要な知見であると思われる。

研究成果の概要(英文)：We developed the transdermal drug delivery system for ophthalmic therapy by using drug nanoparticle technology (transdermal ophthalmic therapy). The “transdermal ophthalmic therapy” show non-stimulate, and can provide stable drug supply to lacrimal fluid via meibomian glands. This preparation may lead to an expansion of their usefulness for therapy in the ophthalmologic field.

研究分野：製剤学

キーワード：貼付型眼瞼透過型製剤 抗菌薬 ナノ粒子 界面活性剤 マイボーム腺 レボフロキサシン アクリル酸ポリマー マイバム

## 1. 研究開始当初の背景

眼科で使用される製剤としては点眼薬や眼軟膏が知られている。これらは非常に有用な剤形であるが、患者によっては薬剤使用の煩雑性のためコンプライアンス低下や睡眠時の適用困難などがみられる（図1）。

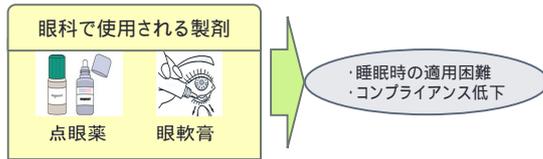


図1 眼科領域における従来製剤の問題点

一方、高度先進医療の発展に伴い、悪性腫瘍、臓器移植あるいは自己免疫疾患に生じる日和見感染が増加しつつある。このため抗微生物薬の果たす役割は眼科領域においてもますます重要となっている。しかし、点眼製剤または眼軟膏は、マイボーム腺など瞼裏には薬物到達または持続が困難なことから、一部の感染部に対し、十分な治療効果を示さず、持続的な使用は薬剤耐性の誘発につながる可能性がある。加えて、現在 PC の普及に伴いドライアイなどマイボーム腺の異常による眼障害も増加しつつあり、使い勝手がよく、マイボーム腺など瞼裏まで薬物到達が可能であり、かつ持続的な新たな製剤の開発が切望されている。

## 2. 研究の目的

一般に眼瞼の奥に位置する涙腺中の涙液は眼表面に放出され、涙点、鼻涙管を介して排出される（図2）。この際、眼表面上の涙液の揮発を防ぐ役割をもつ油分成分（マイバム）がマイボーム腺から分泌されている。これら構造から、涙腺口やマイボーム腺口に薬物を持続的に供給できれば、眼表面への安定かつ持続的な薬物供給が可能となる。また、このような製剤はマイボーム腺など瞼裏への治療効果にも期待できる。

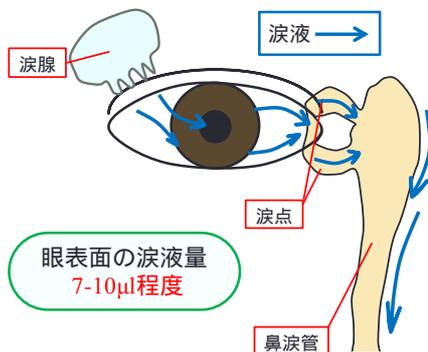


図2 涙液の分泌と排泄経路

申請者はこれまでの研究で、薬物ナノ結晶化技術を確認しており、ナノ結晶医薬品が高い皮膚透過及び滞留性を有することを見出している（Nagai and Ito, Biol. Pharm. Bull., 96-104, 2014）。これら研究成果を基盤とし、貼付により薬物を涙液中に放出することで、瞼裏への薬物送達と持続的な治療を可能とする、貼付型眼瞼透過性製剤“貼る目薬”の開発及び評価を行った。

## 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  $25 \pm 3$  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) 貼付型眼瞼透過性製剤の作成：薬物粉末（マイクロ粒子）を各種添加物含有液にて懸濁させ、直径 0.1 mm のジルコニアビーズにて湿式ビーズミル破砕（5,500 rpm, 30 sec, 4）を繰り返すことにより、ナノ粒子分散液を調製した。さらに、アクリル酸ポリマーまたはカルボポールを基剤とし、これらナノ粒子分散液の水溶性ゲル製剤（貼付型眼瞼透過性製剤）を調製した（トラニラストマイクロおよびナノ粒子含有製剤をそれぞれ  $TL_{micro}$ ,  $TL_{nano}$  とし示す）。

(3) 薬物濃度の測定：ジーエルサイエンス社製 マイクロ HPLC（送液ポンプ MP 710 及び UV 検出器 MU 701）及び MonoCap C18 Fast-flow モノリスカラム（カラム内径 0.2 mm, カラム長 250 mm）を組み合わせたナノ HPLC 法にて測定した。

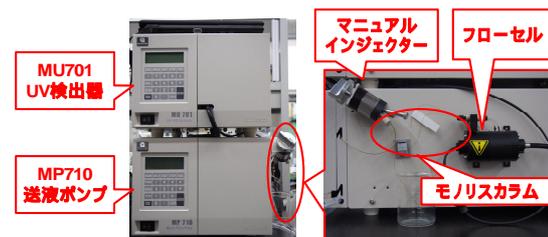


図3 ナノ HPLC 法の装置図

(4) *In vitro* 薬物家兔眼瞼透過性：家兔から眼瞼部分を摘出し、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）には点眼薬を 3.0 mL ずつ加え、35 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。サンプル中の薬物量は上記（3）の HPLC 法に従い測定した。

(5) *In vivo* 薬物涙液移行性試験：実験前処置として雄性日本白色種ウサギの眼瞼部周

辺の毛を電気バリカン（THRIVE社）及び除毛クリームにて除毛した。上下眼瞼部に経眼瞼適用剤を塗布し、ウサギ下眼瞼部に挿入した限外膜プローブとローラーポンプ（ERP-10、エイコム社）を用いて経時的に涙液を採取した（図4）。試料中の薬物量は上記（3）のHPLC法により測定した。

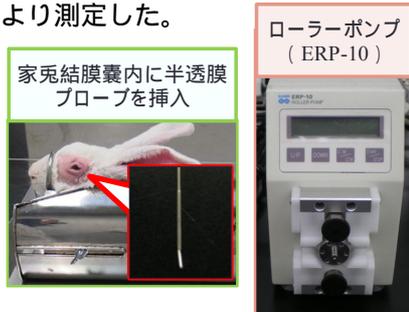


図4 家兎涙液の経時的採取法

(6) マイボーム腺分泌物（マイバム）中薬物量の測定：上記（5）と同様、実験前に家兎眼瞼部周辺部を除毛した。その後、開眼器を用いて家兎眼瞼縁のマイボーム腺開口部を眼球表面と解離させ、眼瞼部に薬剤を適用した。適用後、シルメル試験紙を用いて、マイボーム腺開口部からの分泌物（マイバム）と結膜囊部のマイバムを含まない涙液を採取した。シルメル試験紙中の薬物は、メタノールにて溶出し、上記（3）に示したHPLC法に従い測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 貼付型眼瞼透過性製剤の開発

界面活性剤（ソディウムドキュセートなど）、ベンザルコニウム塩化物、セルロース及びシクロデキストリンを添加剤として用い、ピーズミル法により湿式破碎を行うことで、安定な分散性及び粒子状態を有するレボフロキサシンおよびトラニラストナノ結晶分散液の調製方法を確立した。さらに、これら薬物ナノ結晶分散液は、薬物溶液と比較し分解性が低いことを明らかとした。また、アクリル酸ポリマーを基剤とすることで、レボフロキサシンナノ結晶を含む眼瞼適用ゲルパッチを作製した（図5）。これらゲルパッチは皮膚への傷害性が低く、長時間使用可能であった。



平均粒子径 78 nm                      77 nm

図5 貼付型眼瞼透過性製剤の写真

##### (2) 貼付型眼瞼透過性製剤からの薬物放出性評価

貼付型眼瞼透過性製剤の皮膚透過性を確認するうえでゲルからの薬物放出量を検討することは重要である。そこでまず、トラニラストを検討薬物として選択し、家兎眼瞼皮膚を設置したフランツ型拡散セルを用い、眼瞼適用ゲルパッチからの薬物放出性を評価した（図6）。その結果、ナノ粒子含有製剤では、マイクロ粒子含有製剤に比べ高い放出性を示した。また、これらナノ粒子含有製剤は、220 nmおよび450 nmのポアサイズからなるメンブラン使用時の薬物透過量は同程度であったが、ポアサイズ25 nmのメンブランでは、220 nmおよび450 nmメンブラン使用群の薬物放出量に比べ顕著に低下した。このことから、ナノ粒子含有製剤の放出には、マイクロ粒子含有製剤に比べ、高い溶解性とナノ粒子自身のゲル中放出が関与しているものと示唆された。

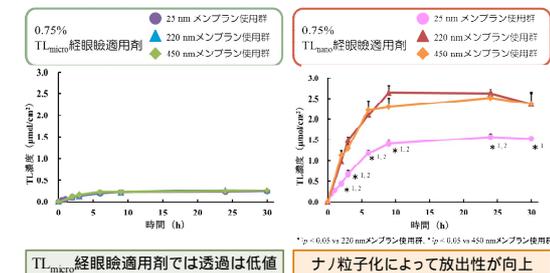


図6 *In vitro* トラニラスト放出性試験結果

##### (3) 薬物ナノ結晶含有製剤の涙液移行機構の解明

ナノ結晶製剤の涙液移行ルートを確認するため、比較的扱いやすい医薬品であるトラニラストを用いて調査を行った。その結果、家兎眼瞼への薬物適用後、涙液中にてトラニラストの検出が認められ、トラニラストナノ粒子含有製剤の眼瞼透過量はマイクロ粒子含有製剤のそれに比べ高かった（図7左）。また、適用6時間後の眼瞼内薬物量もナノ粒子含有製剤の方が高値を示した（図7右）。

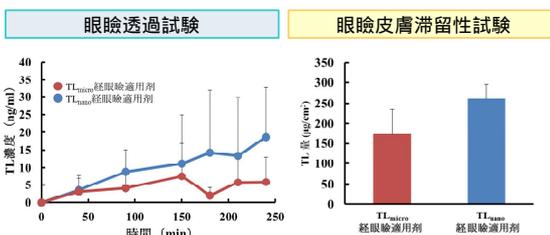


図7 *In vivo* トラニラスト眼瞼透過実験結果

##### (4) 薬物ナノ結晶含有製剤の涙液中薬物動態の解明

ナノ結晶製剤の涙液中薬物挙動を解明

するため、微小透析プローブによる涙液の採取と 10 nL の試料で測定可能なナノ HPLC による薬物濃度測定を行った（上記研究成果（2）,（3）同様、比較的解析が容易なトランラストをモデル薬物として選択した）。その結果、微小透析プローブを用いることで、非侵襲的かつ経時的に涙液の採取が可能となった。また、得られた試料は 1 $\mu$ L 程度であったが、ナノポンプとナノ HPLC を用いることで希釈することなしに涙液中の薬物濃度変化の測定が可能であった。本測定システムを用い、家兎眼瞼への貼付型眼瞼透過性製剤適用後の薬物濃度変化を検討したところ、貼付後 10 分後から涙液中で薬物が検出され、貼付後 25 分～3 時間まで、涙液中の薬物濃度は一定（プラトー）であった。しかし、0.75% トランラスト製剤を貼付した際のプラトー時の涙液中薬物濃度は、0.00007%とわずかであったため（図 8 左）、今後製剤中薬物含有量の増加が必要と考えられる。

一方、図 7（左）にて示した *in vitro* 系における眼瞼透過性に比べ、*in vivo* 系では高い涙液中薬物移行が認められた。本結果からナノ結晶製剤中の薬物は眼瞼を直接通過し涙液側に移行しているわけではないことが示唆された。そこで、眼瞼中に存在するマイボーム腺に着目し、*in vivo* 系にて家兎眼瞼への薬物適用 40 分後のマイボーム腺からの分泌液 マイバム中薬物濃度を測定したところ、涙液中に移行していた薬物の大部分が、マイバムを介していたことが分かった（図 8 右）。

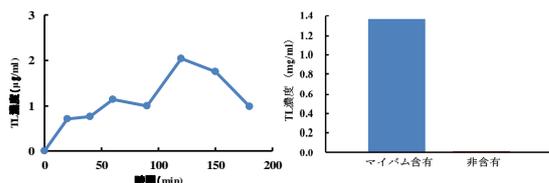


図 8 *In vivo* トランラスト眼瞼透過実験結果

#### (5) 結論

上記の研究成果により、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り、ナノ結晶含有ゲルパッチは高い薬物放出を示すことを明らかとした。また、ナノ結晶含有ゲルパッチの眼内移行ルートは、眼瞼表面から侵入した薬物が、マイボーム腺に移行し、マイバムとして眼表面に排出されることで、涙液に移行していることを見出した。

マイボーム腺の障害はオキュラーサーフェスの異常やドライアイ発症などにも密接に関わることが知られており、本剤形がこれらマイボーム腺をターゲットとした新規剤

形に繋がることを期待できる。さらに、レボフロキサシンナノ結晶含有ゲルパッチの作成法を確立しており、今後これらレボフロキサシンによる治療効果について詳細に検討する予定である。本研究結果は、抗菌や抗炎症をはじめとする眼領域疾患に対し、より効果的な治療を実現する上で重要な知見であると思われる。

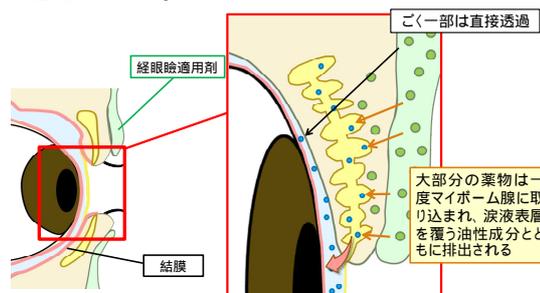


図 9 貼付型眼瞼透過性製剤の涙液移行経路

#### 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. *Pharm. Anal. Acta.*, 査読有, 6:4, 2015

Nagai N., Ito Y., Okamoto N., Shimomura Y. A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal permeability. *Toxicology*, 査読有, 319, 53-62, 2014

〔学会発表〕(計 5 件)

伊藤吉将, 上野祥奈, 石井美有, 長井紀章, 多賀淳, 松井誠, 守本英二. 高感度マイクろフィルタリング法を用いたマイボーム腺分泌型トランラストの涙液中薬物量の全自動測定法, 第 27 回 マイクロダイアリス研究会, 2016 年 12 月 17 日, 東京.

上野祥奈, 長井紀章, 伊藤吉将, 岡本紀夫, 下村嘉一. “経眼瞼適用製剤”の開発: マイボーム腺分泌産物(マイバム)を介した新たな薬物涙液送達メカニズムの解明, 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年 10 月 15 日, 大阪.

上野祥奈，長井紀章，伊藤吉將，岡本紀夫，下村嘉一．トラニラストナノ結晶を用いた新規経眼瞼適用製剤の設計とその涙液移行性評価，日本薬学会第136年会，2016年3月27-29日，横浜．

上野祥奈，長井紀章，伊藤吉將，岡本紀夫，下村嘉一．トラニラストナノ結晶を用いた眼軟膏剤の設計とその有用性，第65回日本薬学会近畿支部総会・大会，2015年10月17日，大阪．

伊藤吉將，吉岡千晶，長井紀章，松井誠，守本英二．マイクロダイアリシス0-P-型透析プローブを用いた涙液中薬物濃度の測定 - CLZ<sub>nano</sub>結晶を含む貼付型眼瞼透過性製剤の有用性評価 - ，第25回マイクロダイアリシス研究会，2014年12月20日，東京．

〔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