

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680054

研究課題名(和文)薬剤ナノ結晶点眼液による網膜疾患治療法の革新的研究開発

研究課題名(英文)Development of the drug nanocrystal eye drops for treatment retinal diseases

研究代表者

馬場 耕一 (Baba, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：00436172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,300,000円

研究成果の概要(和文)：点眼液は簡便で有効な治療手段であるが、眼には様々なバリア機能は発達しており、眼の中に効果的に薬剤を入れるためには様々な工夫が必要とされる。今回我々は凍結乾燥法を利用した新しい技術開発によりナノ結晶点眼液の作製に成功し、薬物の眼内への移行性を高めることに成功した。ナノ結晶という小さな薬剤形態によって、より効果的に眼の疾患を治療できる方法に成功したと考えている。将来的には網膜疾患を点眼で有効に治療できる技術につなげたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Eye drop treatment is one of the effective manner to cure ocular disease. However, because of the several barrier functions of eye, comparably low amount of the drug can penetrate into ocular globe. In this time, we succeeded in preparing drug nanocrystal eye drops using freeze-drying technology. The drug nanocrystal eye drops showed enhanced ocular penetration rate of eye drops. We want to extend this technique to cure retinal diseases in near future.

研究分野：有機ナノ材料化学

キーワード：ナノバイオ材料 点眼液 薬剤ナノ結晶

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本では、緑内障、加齢黄斑変性症、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症など後眼部の網膜疾患が急増し、有効な薬物療法が強く望まれている。点眼による薬物療法は侵襲性が低く有効であるが、眼球には様々なバリア機能(涙液による希釈やタイトジャンクションの発現)が働いており、薬物を後眼部まで届かせることは難しい。現在は主として硝子体内注射や薬物を内用したインプラント等侵襲的な手段が講じられており、改善策として、後眼部へ非侵襲的に薬物送達を行なう技術の開発は世界的にも極めて重要な研究課題となっている。

2. 研究の目的

現在の眼科学では侵襲性の高い網膜疾患治療に対し高度な改善と進展が期待できる低侵襲的な点眼薬物療法への研究開発に強い関心が寄せられている。一方、製剤化の側面から、約半数近くの薬剤が難水溶性である現在において、薬剤を点眼液として使用するためには、難水溶性の薬剤を水に安定分散化させる技術が必要である。現在薬剤の水分散化においてキャリアに薬剤を充填するキャリア型ナノ粒子技術の使用が主流だが、申請者らはキャリア毒性・製造コスト等に課題が多いリポソーム等を用いず、難水溶性薬剤を直接ナノ結晶化することでシンプルな水-薬剤ナノ結晶の二成分水分散系の作製に成功し、ガンの光線力学療法において優れた抗腫瘍効果を実証し、世界にさきがけ新法として報告した(K Baba, et al, Mol Pharmaceutics, 4, 289-97, 2007)。また同ナノ結晶技術を用いて作製した蛍光性ナノ粒子点眼液は眼の防御機構を速やかに通過し(5分以内)、極めて高い眼内移行性(従来の懸濁点眼より50倍高)を達成し、網膜への化合物送達にも成功した(K Baba et al, J Control Release, 153, 278-87, 2011)。本成果を薬剤へ応用することで、薬剤低充填量が問題なキャリア型ナノ粒子や水に可溶性分子製剤にはない、結晶故に可能な100%高密度パッキングナノ薬剤、ナノ結晶サイズ領域に特有な薬剤溶解性の向上および薬剤の高濃度な眼内浸透性が期待できる。

本研究ではこれまでの研究成果を基盤に、第一に薬剤ナノ結晶点眼液の作製に取り組み、第二に網膜疾患モデル動物による薬理効果の検証を行なう。未だ有効な治療法が確立されていない後眼部網膜疾患の点眼治療に対する革新的な薬剤ナノ結晶点眼液の研究開発を行うことを目的とする。現在困難とされる網膜疾患治療用の点眼液の開発に対し、申請者の研究基盤である有機ナノ結晶技術をもって薬剤ナノ結晶点眼液の研究開発に臨み、世界にさきがけ、眼科学の革新に繋がる画期的な研究課題に取り組む。

『具体的な目的』: 第一に薬剤ナノ結晶点眼液の作製を行い、第二に網膜疾患動物モデル

により薬剤ナノ結晶点眼液の薬理効果を検証する。

3. 研究の方法

概要) 網膜疾患治療用の薬剤ナノ結晶点眼液の研究開発を行うにあたり、第一に、安定な水分散性を有する薬剤ナノ結晶点眼液の作製を行った。第二に、網膜疾患モデル動物を用いて薬剤ナノ結晶点眼液の詳細な薬理効果の検証を行った。

平成24年度

(1) 水安定分散性に優れた薬剤ナノ結晶点眼液の作製と構造物性評価

(2) 小動物における薬剤ナノ結晶点眼液の眼内移行性評価

平成25-26年度

(1) 網膜疾患モデル動物における薬剤ナノ結晶点眼液の薬理効果の評価

(平成24年度)

(1) 水安定分散性に優れた薬剤ナノ結晶点眼液の作製と構造物性評価

【薬剤ナノ結晶点眼液の作製】

この度新しいナノ結晶点眼液の作製法に取り組んだ。凍結乾燥を利用した手段である。ナノ結晶化の対象化合物を有機溶媒に溶解し、分散安定剤等のポリマーを混入させた水溶液と混合させ、直ちに液体窒素で凍結させる。続いて凍結乾燥を用い、粉体化させた後、水へ分散させフィルターを用いることで凝集物を除去しナノ結晶を得た。

【構造物性評価】 薬剤ナノ結晶点眼液の粒子サイズ・構造物性・水分散安定性および光学特性は、電子顕微鏡(SEM)、粉末X線回折、粒子径・粒子表面電位測定装置により評価した。

(2) 網膜疾患モデル動物における薬剤ナノ結晶点眼液の眼内移行性評価

網膜変性症の良い疾患モデル動物に先天的・自然発症的に加齢に伴い網膜が変性する網膜変性マウスが挙げられる。また網膜変性の進行にカルパイン蛋白質の活動が強く関与することが報告されており、カルパイン阻害剤を内服投与することで網膜変性が抑えられる(10VS, 46, 3530-37, 2005; J Neurochem, 96, 802-14, 2006)。本研究では網膜変性マウスを用い、カルパイン阻害剤ナノ結晶点眼液による網膜変性症の治療効果を検証した。

またヒト内因性網膜ぶどう膜炎のモデルとして広く研究に利用されている実験的自己免疫性網膜ぶどう膜炎(EAU)を用いた。EAUではステロイド薬剤の有効性は実証済みで(10VS, 46, 4224-34, 2005等)、本研究課題ではステロイドナノ結晶点眼液に特有な抗炎症効果の有効性・優位性を検証した。

点眼処置および解析は論文等で確立された手法に基づき行った。薬物の投与方法として、

マウスの片眼に対し1日1 - 数回点眼を施す。もう片眼をコントロールとした。尚、動物実験は、大阪大学動物実験指針、大阪大学医学部動物実験ガイドラインおよび関係法令（動物の愛護および管理に関する法律）や基準（実験動物の飼養及び保管等に関する基準、動物の処分方法に関する指針）を遵守し、大阪大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

【眼内移行性評価】 点眼液の眼内への移行性をみるためにウサギに点眼を施した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い点眼液の眼内移行性を評価する。点眼液をウサギの片眼に点眼し所定の保持時間後(例: 30, 60, 120分)、ウサギに麻酔をかけ眼内の前房水を注射器で採取。HPLCにより薬物濃度を測定した。

(平成25年度)

(1) 網膜疾患モデル動物における薬剤ナノ粒子点眼液の薬理効果の評価：
点眼液の薬理効果を形態学的解析により評価する。

【眼底観察】ステロイド点眼液を点眼後、所定の経過日数を経たEAUマウスの眼に対し網膜組織を観察を行った。

【形態学的解析】カルパイン阻害剤についてはナノ粒子点眼液を点眼後、所定の経過日数を経たマウスを安楽死させ、眼に対し網膜組織を観察するためホルマリン固定を施し網膜切片を用いてヘマトキシリン・エオシン染色、免疫染色等の組織学的な評価を行った。

4. 研究成果

(1) 水安定分散性に優れた薬剤ナノ結晶点眼液の作製と構造物性評価について：
凍結乾燥法を利用したナノ結晶点眼液の作製法をこの度開発することに成功した(PCT出願)。通常の沈澱法によるナノ結晶の作製では結晶サイズのコントロールが難しく数マイクロメートルにまで結晶が成長したが、今回開発した凍結乾燥法では、結晶成長が抑制されていた。おそらく凍結乾燥法で使用する液体窒素による急激な凍結効果が微結晶化に効果的であり、また使用した基剤がナノ結晶成長を効果的に抑制しているからと考える。またウサギを用いた点眼実験に、ナノ結晶点眼液は、従来のマイクロ結晶からなら点眼液も高い眼内移行性を示すことに成功した(現在投稿論文準備中のためデータ割愛)。

(2) EAUマウスにおいてはナノ結晶点眼液を用いた方が、マイクロ結晶点眼液を用いた場合より、炎症のスコアが抑制される効果が示唆された。そのためマウスのレベルでは後眼部の炎症の抑制に効果を示すことが示唆されたが、引き続き詳細な検討が必要であると考える。

一方、カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液を

用い、網膜変性マウスに点眼を施した系では、パラフィン固定もしくは凍結切片化した試料でヘマトキシリンエオジン染色により評価した。コントロール群と比較して評価したところ、網膜のナノ結晶点眼液とコントロール点眼液の間では、視細胞層の抑制効果に有意な差を見出すことが難しかった。カルパイン阻害剤ナノ粒子点眼液がマウスの後眼部に十分に到達していないか薬理効果の発現が十分に発揮されていない可能性が考えられる。現時で原因は不明であり、将来検証を続ける予定である。

また蛍光性ナノ粒子分散液の作製も行った。蛍光性ナノ粒子は、点眼における蛍光トレーサーの役割も果たすためナノ粒子点眼液の眼内移行性の解明に役立つことが期待できる。

抗炎症性剤であるステロイドについては眼内移行性を高めたナノ結晶点眼液に作製に成功しており、従来の点眼液よりも薬剤の眼内移行性が高いため、前眼部の抗炎症効果の増大や、これまで困難であった点眼による眼深遠部の炎症を点眼により治療できる可能性を見出すことに成功したと考える。今後さらに研究を発展させていく予定である。

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 3件)

(1) Koichi Baba, Kohji Nishida, Preparation of 1,4-bis(4-methylstyryl)benzene nanocrystals by a wet process and evaluation of their optical properties, Nanoscale Research Letters 2014, 9:16.

(2) Koichi Baba, Kohji Nishida, Calpain inhibitor nanocrystals prepared using Nano Spray Dryer B-90, Nanoscale Research Letters 2012, 7:436.

(3) Koichi Baba, Kohji Nishida, Steroid Nanocrystals Prepared Using the Nano Spray Dryer B-90, *Pharmaceutics*, 5, 107-114 (2013).

[学会発表](計 3件)

(1) 学会名・国際) 169th OMIC Group Conference, 4th International Conference and Exhibition on Pharmaceutics & Novel Drug Delivery Systems

タイトル) Nanoparticle eye drops demonstrate enhanced ocular penetration, 日時場所) March 24-26, 2014 Hilton, San Antonio Airport, San Antonio, USA

発表者) Koichi Baba

(2) 学会名・国際)2014 ARVO annual meeting
タイトル) Preparation and evaluation of
fluorometholone nanoparticle eye drops
日時場所) 2014, May 4-8, 2014, Orlando,
Florida, USA Antonio Airport, San Antonio,
USA
発表者) Koichi Baba, Noriyasu Hashida,
Koichi Baba

(3) 学会名・国際) 14th ICGP & JSNP Joint
Congress
タイトル) Introduction of drug nanocrystal
technology - for the potential tool to
treatment of neurodegenerative disorders
日時場所) Tsukuba International Congress
Center ,Tsukuba, Japan
発表者) Koichi Baba

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1 件)

名称: 薬剤ナノ粒子を分散した水分散液の製造
法およびその利用
発明者: 馬場耕一、西田幸二、橋田徳康
権利者: 国立大学法人大阪大学
種類: 特願
番号: PCT/JP2013/061819
出願年月日: 2013 年 4 月 23 日
国内外の別: PCT

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 耕一 (BABA, Koichi)
大阪大学・大学院・医学系研究科・視覚再
生医学寄附講座・寄附講座准教授
研究者番号: 00436172
研究者番号:

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: