

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460225

研究課題名(和文) 院内製剤への応用を目指した新規リオトロピック液晶外用剤の開発

研究課題名(英文) novel topical formulation with lyotropic liquid crystalline for the application of in-hospital formulation

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) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：グリセリンモノオレイルエーテル(GME)を用いて、ヘキサゴナル液晶の水分散体であるヘキサソーム(HEX)を、フィタントリオールを用いて、キュービック液晶の水分散体であるキューボソームを調製した。これらの液晶にフルルビプロフェン(FLU)を封入し、in vitroの皮膚浸透性試験を行ったところ、FLU溶液と比べ両液晶製剤からのFLUの皮膚浸透性は有意に改善した。HEXの系における薬物皮膚浸透性改善のメカニズムについて放射光X線回折測定を用いて評価したところ、製剤適用による角層の長周期ラメラ構造の周期の乱れとHEXの構造変化が認められ、これらがFLU薬物の皮膚浸透性改善に寄与しているものと推察された。

研究成果の概要(英文)：In this study, two types lyotropic liquid crystalline nanoparticles using glyceryl monooleyl ether (GME) and phytantriol(PHT) were prepared. Hexosome (HEX), water dispersion of hexagonal liquid crystal, formed by the mixing of GME with 1,3-butylene glycol (BG) and water. On the other hand, mixing of PHT with BG and water resulted in the cubosome. 10 and 7.5 mg flurbiprofen (FLU) were loaded in the HEX and cubosome formulations, respectively. FLU permeation across the skin from the HEX and cubosome were remarkably increased for the comparison of FLU solution. From the results of synchrotron X-ray diffraction study, it was suggested that application of FLU loaded HEX induced the perturbation of long lamellar structure of intercellular lipid in stratum corneum and FLU release from the HEX on the stratum corneum.

研究分野：製剤学 医療薬学

キーワード：液晶 院内製剤 ナノ粒子 外用剤

1. 研究開始当初の背景

皮膚を薬物のデリバリールートと捉えた場合、非侵襲性の薬物ルートである点、肝臓での初回通過効果の回避可能な点、消化管の薬物の動態により薬効の持続が左右されない点などのさまざまなアドバンテージが存在するにもかかわらず、これまでに 10 程度の製剤しか上市されていない。これは、皮膚が侵入する刺激物質に対するバリア機能を有しているためであり、特に、皮膚の最外層に位置する角層はその最大のバリア機構を担っている。これまでに、この角層のバリア機能を効率的に突破するため、イオントフォoresis¹⁾、マイクロニードル²⁾などの物理的手法や、吸収促進剤の併用³⁾や輸送単体の利用⁴⁾などの化学的手法が確立されてきた。

近年、両親媒性物質からなる分子集合体のリオトロピック液晶が経皮吸収の輸送担体として注目されている⁵⁾。両親媒性物質としてモノオレイン酸グリセリンを用いたリオトロピック液晶は、混合される成分によって様々な形態の液晶を形成することが明らかとされており、中でも図 1 に示した逆キュービック液晶、逆ヘキサゴナル液晶が特に注目されている。これらの液晶は、熱力学的に安定であること、水溶液中では中間層の液晶ナノ粒子として存在するため製剤処方に分散させやすいこと、水溶性のコアと疎水性の領域を持っているため水溶性および脂溶性物質を封入できること、また表面積が大きいため皮膚表面への接触面積を大きく確保することなどの利点を有している⁶⁾。これまでに液晶製剤を用いたカルセイン⁷⁾などの水溶性物質、ビタミン K⁸⁾などの脂溶性物質、またシクロスポリンなどのペプチドの経皮吸収性の改善の報告があり⁹⁾、これらの経皮吸収改善効果は、リオトロピック液晶が角層細胞間脂質に対して高い親和性を持つためで

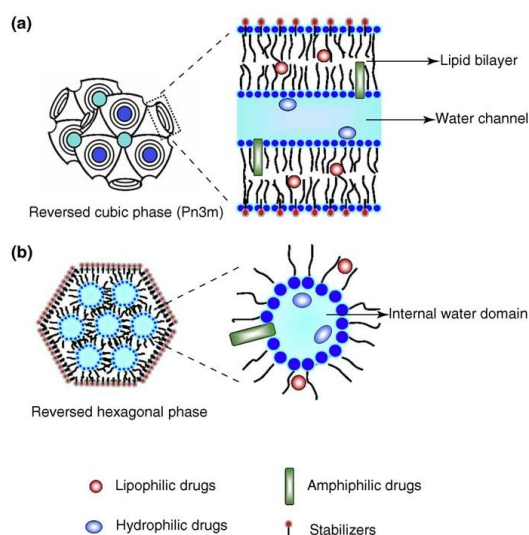


図 1 逆キュービック液晶(a)および逆ヘキサゴナル液晶(b)の模式図⁵⁾

あると言われている。さらに、これらのリオトロピック液晶製剤が他のリポソームなどの他の輸送担体と異なっているのは、局所適用の際の刺激性の低減⁸⁾や保湿効果¹⁰⁾についての機能性が報告されていることである。

一方、臨床現場に目を向けると、上市されている製剤では治療が困難な特殊症例に遭遇することがあり、このような場合、我々薬剤師は医師との協議のもとで院内特殊製剤を調製し、その製剤を医師が患者適用するケースが存在する。こうした患者の多くは皮膚のバリア能が健常人と比べて低いケースも想定されるため、基剤に目的薬物を溶解(または分散)させたシンプルな処方も多く、薬効成分を効率的に経皮吸収させていないものも数多く存在する。そのため、効果発現に時間を要するものも存在するため、安全性の高い添加剤を用いて有効成分を効率的に皮膚からデリバリーできるリオトロピック液晶外用剤を開発し、院内製剤に応用することが可能となれば、患者治療に非常に有益であると考えられ、本研究の着床に至った。

2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、本研究では、「院内製剤として臨床応用可能なリオトロピック液晶外用剤を開発すること」を最終的な目的とした。その最終目標に向け、本申請では 3 年という研究機関を設定し、そのための基礎的な知見を得ることを目的とした。初年度は、リオトロピック液晶外用剤の開発と評価にフォーカスを充てた。次年度以降は、リオトロピック液晶の経皮吸収のメカニズムについての検討を行った。具体的には、蛍光物質を用いた薬物や液晶成分の透過機構の可視化や放射光 X 線を用いてリオトロピック液晶(成分)が角層構造に与える影響の検討を検討した。

3. 研究の方法

3-1. 薬物封入液晶粒子の調製

液晶の構成成分にはグリセリルモノオレイルエーテル(GME)およびフィタントリオール(PHT)を使用した。あらかじめ調製した GME または PHT、モデル薬物のフルルビプロフェン(FLU)のエタノール溶液、及び水添レシチン(HL)のクロロホルム溶液を適切な重量比で混合した後、有機溶媒を完全に除去した。残った薄膜に適量の 1,3-ブチレングリコール(BG)、プルロニックを含む 50 mM クエン酸緩衝液(pH 3.0)を加え、GME または PHT / HL / 1,3-BG を重量比 8 / 1 / 15 となるように調整し懸濁化した。その懸濁液を 2 分間の超音波処理を行い、FLU 封入液晶製剤を調製した。

3-2. 薬物封入液晶の物性評価

3-1 で得られた薬物封入液晶は、粒子径測定、小角 X 線散乱(SAX)測定、¹H-および¹⁹F-NMR により評価した。

3-3. 薬物封入液晶の皮膚浸透性評価

FLU 封入液晶製剤からの FLU の皮膚浸透性は、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。皮膚にはヒトの皮膚構造に類似していると言われていたユカタンマイクロピッグ(YMP)皮膚をセルに装着後、ドナーコンパートメントに各試験薬剤 50μL を適応し、アクセプターコンパートメントには生理的リン酸緩衝液(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時間ずつ24時間まで行った。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。

3-4. 薬物封入液晶の皮膚浸透性メカニズムの評価

3-4-1. 蛍光標識ヘキサソーム(HEX)による薬物皮膚浸透性評価

蛍光標識 HEX の組成は、3-1 に示した FLU 封入 HEX の組成に、封入薬物モデルとして緑色蛍光のクマリン 6 を液晶成分の 0.05 w/w%)、 HEX の脂質鎖モデルとして 赤色蛍光の Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine (Rh-PE) を HL の 1 w/w% となるように添加した。調製後の蛍光標識 HEX は、ヘアレスマウス皮膚切片を装着したフランチ拡散セル (有効拡散面積：0.38 cm²)に適用し、適用から 0.5、2 時間後の皮膚切片を摘出した後、凍結切片を作成した。調製した切片中のクマリン 6 及び Rh-PE の観察は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

3-4-2. 放射光 X 線回折測定を用いた角層作用過程における FLU 封入 HEX と角層の相互作用評価

装置は Spring-8 の 40B2 を使用した。八田らが開発した「溶液セル」にヘアレスマウス角層を装着し、セル内に FLU 封入 HEX を適用した。薬剤適用後 3 分おきに 120 分まで X 線を照射し、得られた回折ピークから角層のラメラ構造および HEX 由来のピーク位置を解析した。

4. 研究成果

4-1. 薬物封入液晶粒子の調製および物性評価

表 1 に示したように、得られた FLU 封入液晶の粒子径は 169.6 ± 30.4 ~ 171.7 ± 20.4nm で粒子の分散性を示す指標の PDI 値も 0.201 ± 0.07 ~ 0.215 ± 0.07 と低値であったことから、本ナノ粒子系の水に対する分散性は良好なものと推察された。得られた薬剤の SAX 測定の結果から、GME/HL/1,3-BG および PHT/HL/1,3-BG はそれぞれヘキサゴナルおよびキュービック構造由来の回折ピークを示

していた。よって、GME を用いた薬剤はヘキサゴナル液晶の水分散体である HEX、PHT を用いた系はキュービック液晶の水分散体であるキューボソームであることが示された。また、この HEX およびキューボソームにはそれぞれ 10.0 および 7.5 mg の FLU の封入が可能であった。

次に、得られた薬剤中の FLU の分子状態を検討するために、¹H-および ¹⁹F-NMR の測定を行ったところ、FLU の芳香環のプロトンに由来するシグナルは FLU 溶液と比べてブロード化していたことから、薬剤中で FLU は各ナノ粒子の脂質鎖に封入された状態で存在しているものと推察された。

4-2. 薬物封入液晶の皮膚浸透性評価

YMP 皮膚の FLU の皮膚浸透性について検討したところ、FLU のクエン酸緩衝液では 24 時間後の FLU の累積等過量は 2.9 ± 1.8 μg/cm²(mean ± SE, n = 5)であったが、HEX およびキューボソームからの FLU の YMP の皮膚透過量は 62.9 ± 12.1, 60.9 ± 4.5 μg/cm² (mean ± SE, n = 5)と有意に増加した。よって FLU を液晶内に封入することによって、飽和溶液と比べて FLU の皮膚浸透性を有意に増加させることが明らかとなった。

4-3. 薬物封入液晶の皮膚浸透性メカニズムの評価

液晶薬剤のうち、HEX に注目し、薬物皮膚浸透性のメカニズムについて検討した。図 2 に蛍光標識 HEX をヘアレスマウス皮膚に適用してから 0.5 および 2 時間後の皮膚切片の画像を示した。適用から 0.5 時間後の皮膚切片においてはクマリン 6 由来の緑色蛍光と、HEX 構成成分由来の Rh-PE は角層内で観察された。しかし、適用から 2 時間後ではクマリン 6 由来の緑色蛍光のみが真皮や毛包部分まで浸透していた。そのため、封入薬物は適用後 HEX から放出されるものと示唆された。

次に、図 3 に FLU 封入 HEX をヘアレスマウス角層に適用した後の放射光 X 線の時間変化

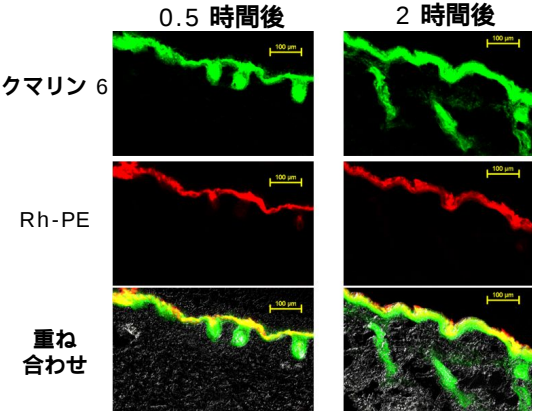


図 2 蛍光標識 FLU 封入 HEX 皮膚適用から 0.5 および 2 時間後の共焦点レーザー顕微鏡写真

表 1 FLU 封入液晶の粒子特性

Formulation	Composition	FLU amount (mg)	Z-average (d.nm±SD)	PDI (±SD)
GME/HL/1,3-BG	8/1/15	10	171.7±20.4	0.215±0.07
PHT/HL/1,3-BG	8/1/15	7.5	169.6±30.4	0.201±0.07

のチャートを示した。赤で示した製剤適用前の X 線回折パターンには、緑矢印で示した長周期ラメラ構造に由来する回折ピークが観察された。製剤適用後、これらの長周期ラメラ構造のピークが広角側にシフトした後、適用後経過時間の延長に伴いまた低角側にシフトした。このことから、FLU 封入 HEX は角層適用後に長周期ラメラ構造の周期を乱していることが推察された。また、赤矢印で示したヘキサゴナル構造由来の回折ピークを拡大したものを図 4 に示した。赤矢印で示した $S=0.19\text{nm}^{-1}$ 付近のピーク強度が適用後経過時間の延長に伴い強くなり、また適用から 40 分経過後には $S=0.19\text{nm}^{-1}$ のピークとともに、 $S=0.20\text{nm}^{-1}$ 付近に新たなピークが検出された。既報より、 $S=0.19$ および 0.20nm^{-1} 付近のピークはそれぞれ FLU 封入および未封入の HEX に由来するものと考えられる¹¹⁾。よって、共焦点レーザー顕微鏡の結果と合わせると、FLU 封入 HEX の皮膚浸透性改善のメカニズムとしては、以下のことが起こっているものと考えられた。

FLU 封入 HEX を皮膚に適用した場合、角層の長周期ラメラ構造の変化が起こる。

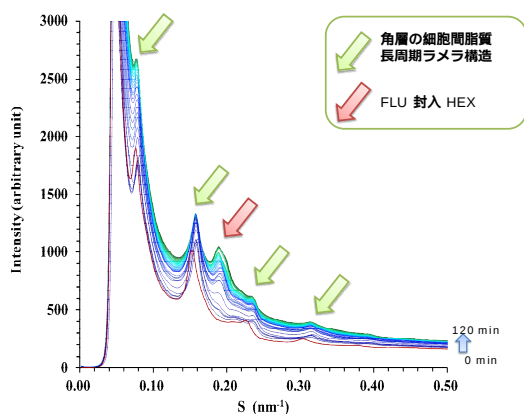


図 3 ヘアレスマウス角層に FLU 封入 HEX を 2 時間適用した際の小角 X 線領域の変化

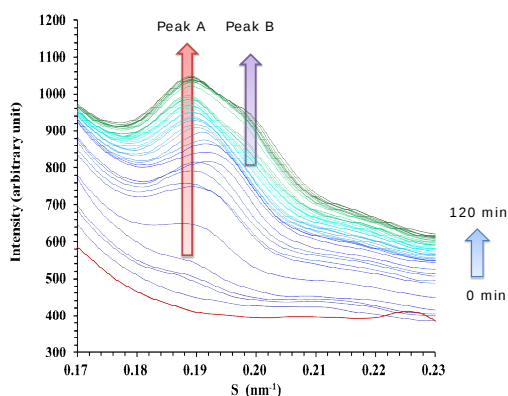


図 4 ヘアレスマウス角層に FLU 封入 HEX を 2 時間適用した際のヘキサゴナル構造由来の回折ピークの変化

角層表面に接触した FLU 封入 HEX から FLU が放出されることによって、 $S=0.19\text{nm}^{-1}$ のピークが観察される。

処方適用から時間が経過すると FLU が放出された HEX に FLU 封入が積層していく（そのことによって $S=0.19\text{nm}^{-1}$ のピークとともに、 $S=0.20\text{nm}^{-1}$ 付近に新たなピーク検出が検出される）。

以上一連の結果から、本申請期間で以下の成果が得られた。

GME および PHT を用いて HEX およびキューボソームの調製に成功した。

モデル薬物として FLU を用いたところ、FLU を液晶の脂質鎖と相互作用させることにより脂質鎖中に封入することを可能にした。また、FLU を液晶の脂質鎖に封入することにより、飽和溶液よりも皮膚浸透性を改善することを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡および放射光 X 線回折測定の結果から、FLU 封入 HEX の薬物皮膚浸透性改善は、製剤を角層に適用した後の角層の長周期ラメラ構造の周期の変化と、角層表面での HEX の構造変化に伴った FLU の放出が起こることに由来するものと推察された。

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）

1. Uchino T, Murata A, Miyazaki Y, Oka T, Kagawa Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 2015; **63**: 334-40. doi: 10.1248/cpb.c15-00029.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 村田 明子、内野 智信、宮寄 靖則、賀川 義之；リオトロピック液晶を用いた経皮吸収剤の開発：医療薬学フォーラム 第 22 回クリニカルファーマシンポジウム、2014 年 6 月 28 日～29 日、ビッグサイト TFT ホール（東京）
2. 加藤 彩、内野 智信、八田 一郎、宮寄 靖則、村田 明子、佐々木 康太、鈴木 誠規、岡 俊彦、賀川 義之；フルピプロフェン封入液晶のキャラクター化と皮膚透過性評価：日本薬剤学会第 31 年会、2016 年 5 月 19 日～21 日、長良川国際会議場（岐阜）
3. 内野 智信、加藤 彩、八田 一郎、宮寄 靖則、村田 明子、佐々木 康太、鈴木 誠規、賀川 義之；薬物封入ヘキサソームの皮膚浸透メカニズムの検討：日本薬剤学会第 32 年会、2017 年 5 月 11 日～13 日、大宮ソニックシティ（埼玉）

〔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〕

ホームページ等 特になし。

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

参考文献

1. Fatouros DG. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**, 160-170 (2006).
2. Verbaan FJ. *et al.*, *J. Control. Release*, **128**, 80-88 (2008).
3. Chantasart D., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2310-2326 (2007).
4. Cevc G. *et al.*, *J. Control. Release*, **141**, 277-99 (2010).
5. Guo C. *et al.*, *Drug Discovery Today*, **15**, 1032-11040, (2010).
6. Yuqin Q. *et al.*, *J. Control. Release*, **129**, 144-150 (2008).
7. Yariv, D. *et al.*, *Colloid Surf. B*, **78**, 185-192 (2010).
8. Lopes, L.B. *et al.*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **32**, 209-215 (2007)
9. Lopes, L.B. *et al.*, *Pharm. Res.*, **23**, 1332-1342 (2006).
10. Watababe K *et al.*, *J.Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **43**, 185-191 (2009).
11. Uchino T, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **63**, 334-40 (2015).