薬物ナノ結晶を基盤とした眼内薬物送達システム

長井紀章

Ocular Drug Delivery System-based on Solid Nanoparticles

Noriaki Nagai

Faculty of Pharmacy, Kindai University; 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan.

(Received August 16, 2020)

The use of eye drops is a well-established practice in the treatment of ophthalmic diseases, although the bioavailability of traditional eye drops, which are either solutions or suspensions, is insufficient, as the corneal barrier and dilution by lacrimation prevent the transcorneal penetration of drugs. Additionally, frequent instillation may cause undesirable systemic side effects and local corneal toxicity. To overcome these problems, micro- and nanoparticles, hydrogels, and viscous solutions have been tested, and solid nanoparticles are also expected to be applied. This review examines the usefulness of ophthalmic formulations based on solid nanoparticles, by using the specific example of indomethacin (IMC). Ophthalmic formulations based on solid IMC nanoparticles (IMC-NP dispersions) have been prepared using various additives (benzalkonium chloride, mannitol, methylcellulose, and cyclodextrin) and a rotation/revolution pulverizer (NP-100), to produce particles of 50–220 nm in size. The solubility of IMC in IMC-NP dispersions was 4.18-fold higher than that in the suspensions containing IMC microparticles (IMC-MP suspensions), and IMC-NP dispersions were better tolerated than commercially available NSAIDs eye drops, such as IMC, pranoprofen, diclofenac, bromfenac, and nepafenac eyedrops, in human corneal epithelial cells. Moreover, the corneal penetration in IMC-NP dispersions was higher than that in commercially available IMC and IMC-MP suspensions, and three energy-dependent endocytosis pathways (clathrin-dependent endocytosis, caveolae-dependent endocytosis, and macropinocytosis) were related to the high ophthalmic bioavailability of IMC-NP dispersions. This information can be used to support future studies aimed at designing novel ophthalmic formulations.

Key words—nanoparticle; drug delivery; ophthalmic formulation; indomethacin; endocytosis

1. はじめに

点眼薬は安全性や利便性の面から現在臨床にて広く受け入れられており、眼疾患治療の第一選択とされている。一方、点眼された薬物は涙液により希釈され、鼻涙管を通じて短時間（10分以内）で眼表面から洗い流される。また、点眼薬が眼内組織（毛様体や水晶体など）で薬効を発現するためには、薬物が薬物透過に対するバリアとして機能している角膜を透過し眼房水中に移行する必要がある。このため眼内組織を標的とした薬物治療には、点眼後の薬物滞留性向上や角膜の薬物通過性を高め、眼内への効果的な薬物供給を可能とする工夫が必要である。

これら課題を解決すべく、粘性ポリマー溶液、ハイドロゲル、リポソームやナノパーティクルなど様々な技術が研究されており、今後これら剤形の適用により、既存の点眼薬の効能が十分に引き出されることが期待される。筆者もこれら点眼薬の機能向上に向け、ナノ結晶を基盤とした製剤設計について研究を進めてきた。¹⁻³⁾ その結果、懸濁分散液中の薬物粒子サイズを数十ナノ～数百ナノの間で制御することで、薬物の角膜や結膜への付着・滞留性が変化することを見い出した。⁴⁾ また、薬物超微粒子（100 nm 以下）を点眼した際には、角膜上でエネルギー依存的な膜透過機構が働き、従来の溶液型や懸濁型点眼薬と比較し、高い薬物眼内移行が得られることを示してきた。⁴⁾ 本稿では、近年、製剤の品質と機能の向上に著しく貢献することが期待されているナノ技術（ナノテクノロジー）を基盤とした新しい点眼システム「ナノ結晶点眼製剤」の調製法について

近畿大学薬学部（〒577-8502 大阪府東大阪市小若江 3-4-1）

e-mail: nagai_n@phar.kindai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 140 年会シンポジウム S02 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Drug Behavior after the Instillation on the Ocular Surface

紹介するとともに、これらナノ結晶点眼製剤の眼内移行メカニズムについて概説する。

2. 点眼薬点眼後の薬物体内分布

眼球表面（結膜嚢）における涙液保持用量は動物種の違いにより異なるが、人の場合は約 $30\ \mu\text{L}$ とされている。このため、点眼量を高めても、 $30\ \mu\text{L}$ （最大保持用量）以上の薬液は眼外へあふれる。眼表面で保持された点眼液は、次の3つの経路（pathway 1-3）を介し体内・眼内へ移行する（Fig. 1）。⁵⁻⁷⁾

まず1つ目は「涙点から涙液とともに排出され、鼻腔や咽頭、消化管から吸収され全身循環へ移行する」経路（pathway 1）である。涙腺から分泌された涙液は、瞬きにより内眼角部（目頭）に集まり、その後上下にある涙点に入り、涙小管、涙嚢、鼻涙管を通して鼻腔から咽頭部、消化管へ流れる。点眼後の薬物もまた、同経路にて消化管へと流れる。このため、点眼液は消化管だけでなく鼻腔粘膜又は咽頭粘膜からも吸収され、全身循環入る。点眼後の全身への薬物吸収率は点眼薬物の1-35%といわれ、血清、血漿、副腎、胆嚢、胆汁、尿、腎臓、肝臓など全身に到達すると考えられている。多くの市販点眼液は約0.1-1%の濃度に調整されており、1回点眼後の血中濃度は ng/mL レベルである。⁵⁻⁷⁾

2つ目は「結膜や眼瞼の脈管系より全身循環へ移行する」経路（pathway 2）である。結膜上皮に吸収された薬物は、強膜の眼内側は血管に富んだぶどう膜により吸収され、大部分が血管を介して全身循環へ移行する。このため、この結膜経由経路により点眼投与された薬物が、眼内に到達することは少な

いと考えられている。⁵⁻⁷⁾

最後の3つ目は「角膜を通り、眼球内部から後部へ移行する」経路（pathway 3）である。角膜には血管が存在せず、角膜に吸収された薬物は前房部の虹彩や水晶体に到達する。また、前房部に到達した点眼液の一部はぶどう膜強膜流出により毛様体、脈絡膜、網膜（視神経乳頭部）にまで到達する。⁵⁻⁷⁾ この角膜経由ルートである pathway 3 が点眼薬点眼後の眼内移行の主たる経路であり、薬物の眼内移行量を決める重要な因子である。

Pathway 3 において、点眼液はもともと存在する涙液量と点眼による刺激で新たに分泌された涙液と混じり、眼表面ではもともとの濃度の約 $1/10$ まで希釈される。さらに希釈された点眼液が角膜を通過して眼内に移行する量はより少なく、もともとの $1/100$ 程度といわれている。

3. 薬物滞留性・眼内移行性の向上を目的とした臨床で用いられる製剤工夫

先に示した通り、点眼薬は局所だけで作用するのではなく、全身にも移行するため、薬理作用が強いものでは循環器系や呼吸器系など全身への影響（副作用）がみられる。このため、点眼薬のバイオアベイラビリティ（bioavailability; BA）を高めるためには、点眼液中の薬物含量を単に高めるといった副作用増大につながる方法ではなく、眼表面での薬物滞留性や薬物角膜透過性の向上を目的とした工夫が必要である。現在市販点眼薬にて最も一般的な工夫は増粘剤の使用である。主な眼科用増粘剤としては、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのような半合成高分子、カルボキシビニルポリマーのような合成高分子、アルギン酸、コンドロイチン硫酸ナトリウムのような天然高分子が用いられている。これら点眼製剤の粘性を高めることで、点眼後の外眼部滞留性が高まり、結果として徐放化と BA 向上につながるといった製剤工夫がなされている。なかでも可逆的ブルーゲルの相転移特性を有するメチルセルロースは、眼表面温度付近でゲル化することにより、持続性向上が得られる。これら *in situ* gelling system といわれる製剤工夫からなる代表的な点眼製剤としては市販リズモン®TG 点眼薬（熱応答ゲル製剤）が挙げられる。一方、これら増粘剤を用い

Fig. 2. Schematic Representation Showing Build-up and Break-down Methods to Prepare the Nanoparticles

た工夫は、点眼製剤の眼表面の滞留性を高めることを目的としており、眼内への薬物移行量の促進は二次的なものである。このため、薬物滞留性及び角膜透過性の両方を達成する製剤工夫の実現が近年期待されている。

4. ナノ結晶医薬品の特徴

ナノメートル単位の微細加工技術、原子や分子を1個ずつ操作する技術、微細な構造を計測する技術及びこれらの構造を形成する材料技術を用いて、ナノメートルサイズの構造を作るための技術の総称をナノテクノロジーという。ナノテクノロジーが注目される背景には粒子サイズにより体内での薬物動態挙動が異なることが挙げられ、一般にナノ粒子を注射したときには、 ≥ 100 nm で血管内皮細胞間を通過し、 ≥ 200 nm では脾臓にて処理される。また、 ≥ 300 – 400 nm ではマクロファージにより捕捉・排出され、 ≥ 2 μ m になると肝臓細胞に取り込まれるといった特性が知られている。^{8–10)} さらに、 200 – 300 nm 程度又はそれ以上の粒子のサイズでは溶解度の変化はほとんど期待できないが、超微細化により粒子径を 100 nm 以下にすることで、薬物溶解度の改善も期待できる。加えて、ナノ粒子は、細胞間隙に対し高い付着性を示し、薬物膜透過性や滞留性の亢進につながることから、眼科領域においても、ナノテクノロジーの特性を利用したドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) 製剤の開発が期待されている。

5. ナノ結晶の製造法

一般に、薬学・医学領域におけるナノ粒子はサブ

ミクロン以下のサイズの粒子を指し、これらナノ粒子の作製手法として大きくビルドアップ法とブレイクダウン法の2つに分類できる (Fig. 2)。貧溶媒 (アンチソルベント) 法、晶析法、噴霧乾燥装置などを利用したナノ粒子の作製手法をビルドアップ法といい、分子レベルの原薬をナノサイズに至るまで成長させる方法を指す。一方、超臨界法や遊星型粉碎法といった粉碎報 (ビーズミルやボールミルなど) をブレイクダウン法といい、原薬をナノサイズまで粉碎する方法である。通常、ビルドアップ法と比較しブレイクダウン法にて得られた粒子の方が、安定性が高く、加工が容易で量産性に優れていることから、ブレイクダウン法が難溶解性化合物のナノ結晶化に用いられることが多い。しかし、ブレイクダウン法で製造できるナノ結晶のサイズは 200 – 300 nm 程度と、Ostwald-Freudlich 式から予想されるように溶解度改善が得られる 100 nm 以下のナノ結晶調製は困難とされている。これら課題を解決すべく、筆者はこれまで難溶解性薬物インドメタシンなどをモデル薬物として、ブレイクダウン法 (湿式破碎法) の破碎効率向上を可能とする新処方を模索してきた。^{11,12)} 一般にナノ結晶の調製に用いられてる添加物として、polyvinylpyrrolidone、水溶性ポリマー hydroxypropyl cellulose、イオン性界面活性剤 (sodium dodecyl sulfate, docusate sodium)、非イオン性界面活性剤 (poloxamer, tween80) が知られている。これら添加物はナノ結晶調製において非常に重要であるが、筆者は、湿式破碎法による薬物ナノ結晶粒子の作製にはシクロデキストリンとセルロース

Fig. 3. Preparation of Drug Nanoparticles by the Rotation/Revolution Pulverizer (NP-100)

A, Preparation procedures of ophthalmic dispersions containing IMC nanoparticles. B, Particle distribution of IMC-NPs by the NanoSight LM10. C, Solubility of IMC in IMC-NPs dispersions. The data represent the means $\pm$ S.E. of 5 experiments. * $p < 0.05$ vs. with ball mill (unpaired student's *t*-test).

誘導体（メチルセルロースなど）の添加が特に重要であることを明らかとした。¹²⁾ さらに本法においてシクロデキストリンを添加することで、シクロデキストリンが薬物粒子の表面に付着し、コーティングのように作用することでナノ粒子分散液の問題点ともいえる凝集性が飛躍的に抑制できることを示した。¹²⁾ また、メチルセルロース添加の役割は、破碎効率の向上であり、非添加にて湿式破碎を行った際には、難溶解性の薬物（疎水性）と溶媒が混じったメレンゲ様の状態となるが（流動性を有する分散液とはならない）、メチルセルロースなどセルロース誘導体を添加することで、効果的な薬物破碎につながり、平均粒子径 60–200 nm の良質な薬物ナノ結晶を含む分散液の調製が可能となる。本研究では代表的薬物として本法を用いて作製したインドメタシンナノ結晶(indomethacin nanoparticles; IMC-NPs)の粒度分布を示す。Figure 3(A)のように先に示した添加物を用い、シンキー社製 自転・公転ナノ粉碎機 NP-100（東京）にて IMC を湿式破碎処理することで、粒子径 50–220 nm のナノ結晶が調製できた [Fig. 3(B)]。これら IMC-NPs は湿式破碎前に比べて、溶解度が 4.18 倍高まっており [Fig. 3(C)]、この溶解度上昇にはシクロデキストリンによる包接能増加と 100 nm 以下の粒子サイズに伴う薬物自体の溶解度の上昇の両方が関わっていた。¹²⁾

6. ナノ結晶含有点眼液の角膜傷害性

薬剤性角膜症は眼局所における点眼薬の副作用の1つであり、これら点眼による角膜障害は、患者のアドヒアランスの低下につながる。そこで近年の眼科領域では、目に優しい点眼薬として、角膜傷害性の低い製剤処方や剤形の開発が試みられている。今回、ヒト角膜上皮細胞を用い、先の方法で調製した IMC-NPs と他の市販 NSAIDs 点眼液の角膜傷害性を比較評価したところ、IMC-NPs の角膜細胞傷害性は、従来型である溶液型 NSAIDs 点眼液と比較し、顕著に低値であった (Fig. 4)。この低毒性の理由には、ナノ結晶製剤は薬物を溶解する必要がないため、市販製剤のように界面活性剤の添加が不要であること（安全な溶媒の使用が可能）、さらに溶液状態の薬物と比較し、結晶状態では細胞表面に対する影響が少ないことなどが考えられる。¹²⁾

7. ナノ結晶含有点眼薬の角膜透過性

ウサギ摘出角膜を角膜透過セルに設置した *in vitro* 角膜透過実験にて IMC-NPs の角膜透過性について検討した。その結果、実験開始 6 時間後において、IMC-NPs はマイクロ粒子からなる IMC 分散液 (IMC microparticles; IMC-MPs) や従来の溶液型 IMC 点眼製剤 (CA-IMC) と比較し、それぞれ 2.24, 3.41 倍高い角膜透過量が得られた。¹²⁾ これらナノ粒子の高い膜透過機構を把握することは重要であり、ナノ粒子が生体膜に付着した際にはエンド

Fig. 4. Cell Viability in the Human Corneal Epithelial Cell (HCE-T) Treated with Ophthalmic Formulations for 120 s

Ophthalmic dispersions containing IMC microparticles and nanoparticles were presented as IMC-MPs and IMC-NPs, respectively, and the commercially available IMC (CA-IMC), pranoprofen, diclofenac, bromfenac, nepafenac were used. The data represent the means $\pm$ S.E. of 5–10 experiments. * $p < 0.05$ vs. IMC-NPs (Dunnett's multiple comparison).

Fig. 5. Effect of Endocytosis on the Transcorneal Penetration of IMC-NPs Using Isolated Rabbit Cornea

The experiments were performed for 6 h by using a methacrylate cell designed for transcorneal penetration studies. The energy dependent endocytosis was prevented under the 4°C condition, and each endocytosis pathway was inhibited by the treatment of 54 μ M nystatin, 40 μ M dynasore, 2 μ M rottlerin or 10 μ M cytochalasin D. The data represent the means $\pm$ S.E. of 5–8 experiments. * $p < 0.05$ vs. 4°C condition (Dunnett's multiple comparison). # $p < 0.05$ vs. Vehicle (Dunnett's multiple comparison).

Fig. 6. Schematic Illustration of the Transcorneal Penetration of IMC-NPs via Energy-dependent Endocytosis Pathways

サイトーシスのようなエネルギー依存性の能動的取り込みが働くことが知られている。^{13,14)} エネルギー依存性エンドサイトーシスは通常生体内で働く取り込み機構であり、大きくカベオラ依存性エンドサイトーシス、クラスリン依存性エンドサイトーシス、

マクロピノサイトーシスそしてファゴサイトーシスの4種類に分類できる。^{15,16)} これまでの研究により、4つのエンドサイトーシスは粒子サイズが異なる物質の取り込みに関与しており、カベオラ依存性エンドサイトーシスは80 nm以下のくぼみ(カベオラ)

に粒子が入り込んだ際に働き、クラスリン依存性エンドサイトーシスは 120 nm 以下の粒子が標的となることが報告されている。また、0.1–5 μm の粒子に働くマクロピノサイトーシスや、マクロファージなどで働く 0.5–10 μm の粒子の取り込みに係わるファゴサイトーシスが知られている。¹⁷⁾ そこで、本研究ではすべてのエネルギー依存性エンドサイトーシスが阻害できる低温 (4°C) 条件下¹⁸⁾ 及び各エンドサイトーシスの阻害剤である nystatin (カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤)、dynasore (クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤)、rottlerin (マクロピノサイトーシス阻害剤)、そして cytochalasin D (ファゴサイトーシス阻害剤) をそれぞれ用い、^{4,19)} ナノ結晶粒子の薬物透過とエンドサイトーシスの関連性について検討を行った。まず、エネルギーを介した細胞内取り込み機構をすべて抑えることができる低温 (4°C) 条件下において薬物透過性を確認したところ、顕著な薬物皮膚透過の低下が認められ [Fig. 5 (A)], IMC-NPs の薬物皮膚透過にエネルギー依存性エンドサイトーシスが関与していることが示唆された。次に、阻害剤にて各エンドサイトーシスの働きを抑制したところ、IMC-NPs では nystatin (カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤)、dynasore (クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤) 及び rottlerin (マクロピノサイトーシス阻害剤) 処理において有意な薬物透過の低下がみられた [Fig. 5 (B)]。今回用いた IMC-NPs の粒度分布は 50–220 nm であり、これらは 3 種のエンドサイトーシスの標的粒子サイズに適合する。したがって、表皮や表皮組織での IMC ナノ粒子サイズがエンドサイトーシスの誘発に関与し、これらエンドサイトーシスが IMC ナノ粒子の角膜透過 (細胞内取り込み) に関与しているものと考えられた (Fig. 6)。一方、これら疎水性の薬物分子の集団からなるナノ結晶薬物の取り込み (エンドサイトーシス) 機構についてはいまだ不明であり、更なる検討が必要である。

8. おわりに

筆者は、ビーズミル法 (ブレイクダウン法) と各種添加物を組み合わせることで、良質なナノ結晶粒子を含む分散液の調製法を確立した。また、筆者が提案したナノ結晶を用いた点眼システムは、従来の溶液型の製剤と比較し、目に優しく、高い角膜透過

性、持続性を有していることを明らかとした。今回紹介した“ナノ化技術を基盤とした点眼システム”を始めとする DDS 技術の進歩が点眼薬物療法の発展につながることを期待する。

謝辞 本研究は、近畿大学薬学部で行われた研究であり、実験を行った共同研究者を始め研究室に在籍した方々に心から感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Nagai N., Fukuoka Y., Sato K., Otake H., Taga A., Oka M., Hiramatsu N., Yamamoto N., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, pii: E1048 (2020).
- 2) Nagai N., Ishii M., Seiriki R., Ogata F., Otake H., Nakazawa Y., Okamoto N., Kanai K., Kawasaki N., *Pharmaceutics*, **12**, pii: E155 (2020).
- 3) Minami M., Seiriki R., Otake H., Nakazawa Y., Kanai K., Tanino T., Nagai N., *Materials (Basel)*, **13**, pii: E1675 (2020).
- 4) Nagai N., Ogata F., Otake H., Nakazawa Y., Kawasaki N., *Int. J. Nanomedicine*, **14**, 1213–1227 (2019).
- 5) Ohman L., Edqvist L. E., Johansson E. D., *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*, **60**, 106–112 (1982).
- 6) Janes R. G., Stiles J. F., *Am. J. Ophthalmol.*, **56**, 84–90 (1963).
- 7) Spiess B. M., Nyikos S., Stummer E., Sahin A., Naegeli H., *Am. J. Vet. Res.*, **60**, 571–576 (1999).
- 8) Dobrovolskaia M. A., Aggarwal P., Hall J. B., McNeil S. E., *Mol. Pharm.*, **5**, 487–495 (2008).
- 9) Toy R., Peiris P. M., Ghaghada K. B., Karathanasis E., *Nanomedicine (Lond.)*, **9**, 121–134 (2014).
- 10) Moribe K., Higashi K., *Drug Delivery System*, **30**, 92–99 (2015).
- 11) Nagai N., Iwai Y., Sakamoto A., Otake H., Oaku Y., Abe A., Nagahama T., *Int. J. Nanomedicine*, **14**, 7921–7931 (2019).
- 12) Nagai N., Ito Y., Okamoto N., Shimomura Y., *Toxicology*, **319**, 53–62 (2014).
- 13) Proulx S. T., Luciani P., Dieterich L. C.,

- Karaman S., Leroux J. C., Detmar M., *J. Control. Release*, **172**, 550–557 (2013).
- 14) Youm I., Bazzil J. D., Otto J. W., Caruso A. N., Murowchick J. B., Youan B. B., *AAPS J.*, **16**, 550–567 (2014).
- 15) Rappoport J. Z., *Biochem. J.*, **412**, 415–423 (2008).
- 16) Wang J., Byrne J. D., Napier M. E., Desimone J. M., *Small*, **7**, 1919–1931 (2011).
- 17) Zhang S., Li J., Lykotrafitis G., Bao G., Suresh S., *Adv. Mater.*, **21**, 419–424 (2009).
- 18) He Z., Liu K., Manaloto E., Casey A., Cribaro G. P., Byrne H. J., Tian F., Barcia C., Conway G. E., Cullen P. J., Curtin J. F., *Sci. Rep.*, **8**, 5298 (2018).
- 19) Ishii M., Fukuoka Y., Deguchi S., Otake H., Tanino T., Nagai N., *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, pii: E476 (2019).