

博士論文

レバミピドナノ結晶粒子製剤の開発に関する研究

2017年

徳島大学大学院 薬科学教育部  
創薬科学専攻

松田 貴邦

# 目次

|   |    |
|---|----|
| 略語一覧  | 1  |
| 第1章 序論  | 2  |
| 第2章 透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液の開発                     | 6  |
| 第1節 緒言  | 6  |
| 第2節 実験材料及び方法                                  | 10 |
| 第1項 実験材料                                      | 11 |
| (1) 試薬  |    |
| (2) 機器  |    |
| (3) 動物  |    |
| 第2項 実験方法                                      | 12 |
| (1) レバミピドナノ粒子懸濁液の製造方法開発                       |    |
| (2) レバミピドナノ粒子懸濁液の評価                           |    |
| (3) レバミピドナノ粒子点眼液をウサギに点眼後の角膜及び結膜内濃度推移          |    |
| (4) レバミピドナノ粒子点眼液のウサギ結膜ムチン様物質産生促進作用            |    |
| 第3節 実験結果                                      | 17 |
| 第1項 レバミピドナノ粒子懸濁液の製造方法開発                       | 17 |
| 第2項 レバミピドナノ粒子懸濁液の結晶形及び形態の評価                   | 29 |
| 第3項 レバミピドナノ粒子点眼液の外観と安定性評価                     | 34 |
| 第4項 レバミピドナノ粒子点眼液をウサギに点眼後の角膜及び結膜内濃度推移          | 36 |
| 第5項 レバミピドナノ粒子点眼液のウサギ結膜ムチン様物質産生促進作用            | 38 |
| 第4節 考察  | 40 |
| 第5節 小括  | 46 |
| 第3章 レバミピドナノ粒子液剤の口腔粘膜組織移行性及びラット口腔内潰瘍に対する治癒促進効果 | 47 |
| 第1節 緒言  | 47 |
| 第2節 実験材料及び方法                                  | 49 |
| 第1項 実験材料                                      | 50 |
| (1) 試薬  |    |
| (2) 機器  |    |
| (3) 動物  |    |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 第2項 | 実験方法                                      | 51 |
| (1) | 蛍光を用いたレバミピドの視覚的な舌組織中の分布評価                 |    |
| (2) | レバミピドナノ粒子液剤のラット口腔粘膜組織内濃度推移                |    |
| (3) | 焼灼によるラット口腔粘膜炎症モデルにおけるレバミピドナノ粒子液剤の潰瘍面積抑制効果 |    |
| 第3節 | 実験結果                                      | 56 |
| 第1項 | 蛍光を用いたレバミピドの視覚的な舌組織中の分布評価                 | 56 |
| 第2項 | レバミピドナノ粒子液剤のラット口腔粘膜組織内濃度推移                | 66 |
| 第3項 | 焼灼によるラット口腔粘膜炎症モデルにおけるレバミピドナノ粒子液剤の潰瘍面積抑制効果 | 68 |
| 第4節 | 考察  | 71 |
| 第5節 | 小括  | 74 |
| 第4章 | 総括  | 75 |
|     | 謝辞  | 78 |
|     | 引用文献                                      | 79 |

## 略語一覧

|                    |   |
|--------------------|---|
| ANOVA :            | Analysis of variance (分散分析)                               |
| AUC :              | Area under the concentration-time curve<br>(血中濃度－時間曲線下面積) |
| AUCt:              | 投与直後から t 時間までの血中濃度－時間曲線下面積                                |
| C <sub>max</sub> : | Maximum drug concentration                                |
| CMCNa:             | Carboxymethylcellulose sodium                             |
| HEC:               | Hydroxyethylcellulose                                     |
| HPC:               | Hydroxypropylcellulose                                    |
| HPMC:              | Hydroxypropylmethylcellulose                              |
| MC:                | Methylcellulose   |
| MRT :              | Mean residence time                                       |
| PVP:               | Polyvinylpyrrolidone                                      |
| QOL:               | Quality of life   |
| SD:                | Sprague-Dawley  |
| T <sub>1/2</sub> : | Half-life period  |
| T <sub>max</sub> : | Maximum drug concentration time                           |

## 第1章 序論

レバミピド（化学名(±)-2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl] propionic acid）は、大塚製薬株式会社で合成されたキノリノン誘導体であり（図1-1）、1990年に胃潰瘍治療薬としてムコスタ<sup>®</sup>錠を商品名として販売され、1994年には胃炎の効能が追加され、本邦及びアジア諸国において多くの患者に処方されている<sup>1,2)</sup>。胃粘膜障害は、酸やペプシン等の攻撃系因子と防御系因子のバランスの破綻により起きると考えられている。攻撃系因子を抑制する酸分泌抑制作用薬として、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体阻害薬、プロトンポンプ阻害薬（PPI）、近年ではカリウムイオン競合型アシッドブロッカーが開発・上市されており、高い治癒率で胃潰瘍治療に貢献している。しかしながら、酸分泌抑制剤は、投与中止による胃潰瘍の再発が問題とされる。レバミピドは潰瘍再発からの離脱を目標に、慢性胃潰瘍モデルである酢酸潰瘍モデルによってスクリーニングされ、開発された防御因子増強薬である<sup>1,2)</sup>。レバミピドは、日本における消化性潰瘍治療薬の分野において最も処方されている医薬品であり、ムコスタ<sup>®</sup>錠が約10億錠、後発品の上位品目も含めると約20億錠が2014年4月～2015年3月間に処方されている<sup>3)</sup>。

レバミピドの主な薬理作用として、胃粘膜プロスタグランジンE<sub>2</sub>含量増加作用により胃粘膜障害が抑制されることが知られている<sup>4,5,6)</sup>。また、本薬にはフリーラジカル抑制作用<sup>7,8,9)</sup>、好中球活性化の抑制作用<sup>10,11,12)</sup>、炎症性サイトカイン産生抑制作用<sup>13,14,15)</sup>、胃粘膜での粘液（ムチン様物質）分泌増加作用<sup>16)</sup>等、種々の炎症抑制的な薬理作用を有することが知られている<sup>17)</sup>（図1-2）。このような多彩な薬理作用から、レバミピドは既承認以外の種々の疾患に対する治療薬としての可能性が研究されている。その中で、レバミピドの胃粘膜での粘液（ムチン様物質）分泌増加作用<sup>16)</sup>に着目し、レバミピド点眼液のドライアイに対する開発が行われた。ドライアイは、様々な要因による涙液及び角結膜上皮の慢性疾患であり、眼不快感や視機能異常を伴う疾患と定義されている<sup>18)</sup>。ドライアイは涙液層と表層上皮の相互作用の慢性的な障害であり、涙液層の安定性の低下がその特徴とされる<sup>19,20)</sup>。涙液層の不安定化の要因の一つとしてムチンの低下が挙げられる。基礎研究において、レバミピドはムチンを産生する結膜ゴブレット細胞数の増加作用<sup>21)</sup>、角膜及び結膜ムチンの増加作用<sup>22)</sup>を有することが知ら

れている。また、臨床試験においても角膜上皮障害改善効果、結膜上皮障害改善効果とともに自覚症状改善効果が示された<sup>23,24)</sup>ため、2012年から日本においてムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%が「ドライアイ」を効能・効果として上市された。

ドライアイの患者数は、コンピューター作業の増加等、様々な要因により近年増加している。ドライアイは眼不快感等の多様な自覚症状を呈する疾患であり定期的な治療が必要とされる。しかし、実際には、自覚症状はあるがドライアイの認識がなく治療を受けていない患者も多い。日本だけでも約800~2,200万人の患者がいると推定されており<sup>25)</sup>、潜在的患者も含めると約3000万人のドライアイ患者数を推定している報告もある<sup>26)</sup>。従来ドライアイ治療は人工涙液による水分の補給やヒアルロン酸点眼液(ヒアレイン<sup>®</sup>点眼液)による保水性の維持が主であったが、近年、涙液層の安定性改善が期待できるムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%とP2Y<sub>2</sub>受容体作動剤である3%ジクアホソルナトリウム点眼液(ジクアス<sup>®</sup>点眼液 3%)の上市に伴い、ドライアイなどに伴う角結膜疾患治療剤の市場規模は、464億円(2016年3月期)と増大している<sup>27)</sup>。その内訳は、ヒアレイン<sup>®</sup>点眼液の売上が145億円、ジクアス<sup>®</sup>点眼液が89億円(2015年4月~2016年3月)<sup>27)</sup>、ムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%が45億円(2015年1月~12月)であり、新薬であるジクアス<sup>®</sup>点眼液とムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%の売上が伸長している。しかし、ヒアレイン<sup>®</sup>点眼液とジクアス<sup>®</sup>点眼液は透明な溶液製剤であるが、ムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%は、粒子径約1 μmの結晶を水中に懸濁させた白色の懸濁製剤<sup>28)</sup>であり、点眼時の一時的な霧視、沈降した粒子の再分散、ろ過滅菌ができないなどの問題が残されている。従って、これらの問題を克服することで、患者のアドヒアランスや利便性を向上させることを目的としたレバミピド新点眼液の開発は喫近の課題である。

がん放射線治療及び化学療法に伴う口腔粘膜炎は、患者の生活の質(QOL)に影響する重大な有害事象である<sup>29)</sup>。口腔粘膜炎は、強い疼痛が持続するだけにとどまらず、イライラや不眠など精神的な苦痛により、QOLを低下させる。口腔粘膜炎が悪化すると、飲水・食事ができなくなり、患者の栄養状態が低下することがある。患者の栄養状態の低下は、口腔粘膜炎のさらなる悪化を招くことになり、がん治療の継続に悪影響を及ぼすこともある。そのため、胃瘻や経鼻から栄養を補給する必要があり、患者のQOLが低下する。がん治療によって免疫が低下した患者にとって、口腔粘膜炎における細菌感染は、敗血症等重篤な感染症の危険因子になりうる。また、重症の口腔粘膜炎による強い疼痛をコント

ロールするために、麻薬系鎮痛薬の使用が必要になる場合もある<sup>30)</sup>が、麻薬系鎮痛薬の使用に伴う嘔吐や便秘の副作用も患者の QOL を低下させる。口腔粘膜炎の発生頻度はがん治療において様々であるが、一般的な抗がん剤治療で約 30～40%、頭頸部がんの化学放射線療法では、ほぼ 100%と報告されており<sup>31)</sup>、放射線療法及びがん化学療法により口腔粘膜炎を発症する患者は、全世界で約 60 万人、我が国では約 10 万人いると推定されている<sup>32)</sup>。がん治療に伴う口腔粘膜炎治療薬としては、米国において **Palifermin** (keratinocyte growth factor: KGF) のみが造血幹細胞移植患者の口腔粘膜炎で承認されている。しかし、**Palifermin** は高薬価な注射剤であり、扁平上皮がんでは KGF によるがん細胞の増殖が危惧されるため、米国においても血液がんでしか承認されていない。我が国においては、**Palifermin** は未承認であり、ハチアズレ水等による含嗽や口腔ケアによる予防および症状に応じた対処療法で対応しているのが現状である<sup>33)</sup>。口腔ケアは口腔内の清浄及び保湿を目的に行われているが、口腔ケアによる口腔粘膜炎の発症予防効果は限定的であると報告されている<sup>34)</sup>。このように口腔粘膜炎は頻度の高い副作用であるにも関わらず、未だ有効な予防・治療法が確立されておらず、有効な予防・治療法の開発が望まれている。レバミピドはフリーラジカル抑制作用、炎症性サイトカイン産生抑制作用等の様々な薬理作用を有するため、レバミピドのがん治療に伴う口腔粘膜炎に対する効果が検討されており、小規模臨床試験において、レバミピドを含む含嗽液を含嗽することにより、がん治療に伴う口腔粘膜炎の予防に効果があることが報告されている<sup>35, 36, 37, 38, 39)</sup>。しかしながら、ほとんどの研究はレバミピドの錠剤を用いて調製した院内製剤を使用して実施されていることから、レバミピドの口腔粘膜への分布が良好なレバミピド液剤の開発が望まれていた。

近年、難溶解性薬剤の溶解速度の向上のために、平均粒子径が 100～300 nm をターゲットとした薬物のナノ結晶粒子（以下ナノ粒子）化がさかんに研究されている<sup>40, 41, 42)</sup>。ナノ粒子化の最大の利点として、ナノ粒子化により粒子の比表面積が増大することから、粒子の比表面積の増大に比例して溶解速度が向上することが挙げられる<sup>43)</sup>。また、300 nm 以下の粒子はブラウン運動により沈降しないため、長期保管においても粒子の沈降のない懸濁液が調製可能である<sup>40)</sup>。経口剤では生物学的利用率の向上<sup>44)</sup>、吸収に対する食事の影響の軽減<sup>45, 46)</sup>等、注射剤では静脈内投与可能な懸濁液<sup>47, 48)</sup>や難溶性薬剤の持続性注射剤<sup>49, 50)</sup>等を目的に種々の化合物についてナノ粒子化の検討が行なわれている。

筆者らは、レバミピドをナノ粒子化することで、透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液を開発した。レバミピドをナノ粒子化するために、中和晶析法を採用し、様々な工夫を積み重ねることで独自の製造方法を確立した。第2章では、この製造方法の開発及びこの方法を用いたレバミピドナノ粒子点眼液の開発で得られた知見を論述する。ついで、この製造方法を用いて調製したナノ粒子懸濁液に粘性を付与することで口腔粘膜への分布が良好なレバミピドナノ粒子液剤の開発を試みた。第3章では、そこで得られた知見を論述する。

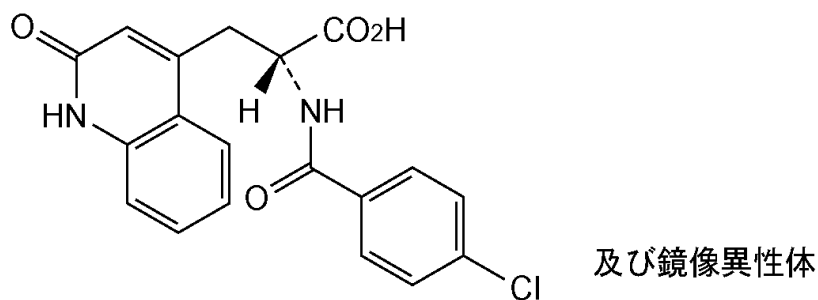


図 1-1 レバミピドの化学構造式

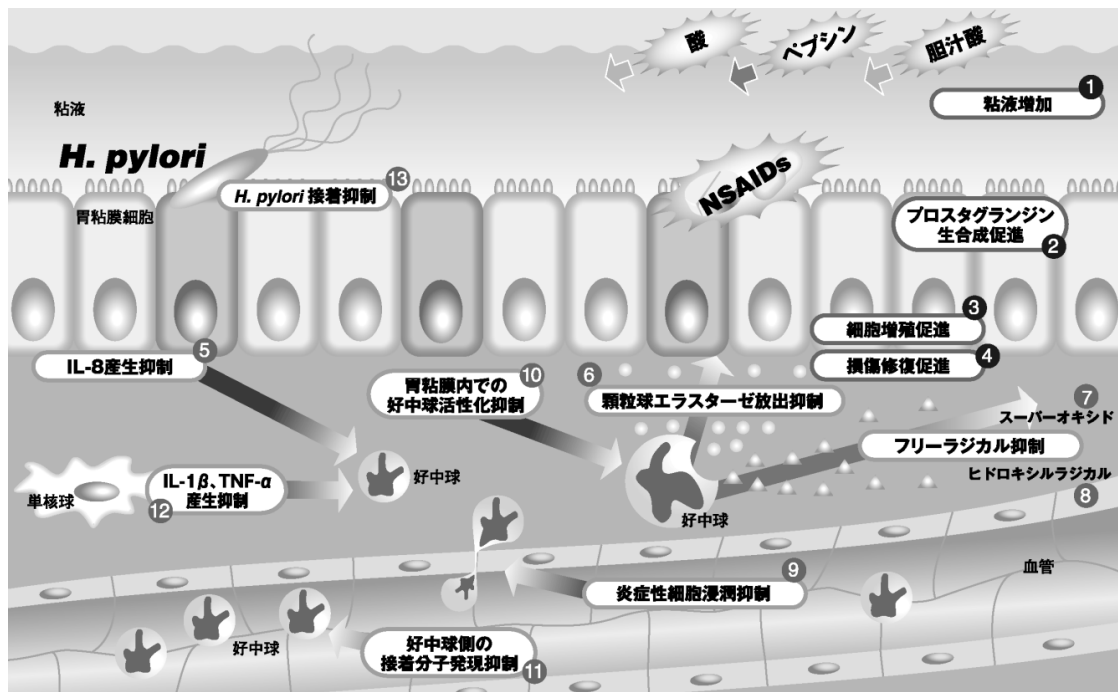


図 1-2 レバミピドの胃潰瘍及び胃炎に対する作用機序（文献 28 から引用）



## 第2章 透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液の開発

### 第1節 緒言

ドライアイは、涙液量の減少あるいは涙液の質の異常によって角結膜上皮障害が生じ、眼乾燥感だけでなく、異物感、目の痛み、まぶしさ、目の疲れなど多様な自覚症状を呈する疾患である<sup>18,19,20)</sup>。近年、コンピューター作業の増加、コンタクトレンズ装用者の増加、老年化の進行等によって患者数が増えており、日本では約800～2,200万人の患者がいると推定されている<sup>25)</sup>。症状の程度は幅広く、重症になると日常生活に支障が生じ、重篤な角結膜障害に陥る場合もある。

ドライアイは、涙の量が減ってしまう「量的な異常」と、涙の性質や涙を保持する能力が変化する「質的な異常」によって生じ、涙液層の安定性が低下して引き起こされる。眼表面は、涙液層と表層上皮からなり、涙液層の各層や表層上皮に異常が起きると涙液層の安定性が低下する<sup>51,52)</sup>。眼表面の涙液は油層、水層からなる。油層はマイボーム腺から分泌される油からなり、涙液の外側を覆うことで、涙が蒸発するのを防ぐ役割を果たしている。水層は水分だけでなく、角結膜に必要なタンパク質など様々な成分を含んでいる。また、眼表面のゴブレット細胞から分泌される分泌型ムチンが含まれており、分泌型ムチンが液層の水分をゲル状に保つことで、涙液の安定性に重要な役割を果たしている。角膜表層上皮には、膜型ムチンを含む糖衣層が存在し、涙液の主成分である水分を角膜に均等に定着させる役目を担っている。このように分泌型ムチンや膜型ムチンは涙液を眼表面に均一に被覆し安定化させることに重要な役割を果たしている<sup>19,20,52)</sup>。従来のドライアイ治療は人工涙液やヒアルロン酸点眼液による水分の補給及び保持が主であったが、分泌型ムチン量が低下している、あるいは、膜型ムチンが破壊されている場合には、いくら水分を補給しても眼表面の水層は不安定で均一に維持されないことから、その治療効果は限定的であった。一方、胃炎・胃潰瘍治療であるレバミピドは、薬理作用として胃粘液（ムチン）増加作用<sup>16)</sup>が知られており、眼ムチンに対しても、ムチンを産生する結膜ゴブレット細胞数の増加作用<sup>21)</sup>、角膜及び結膜ムチンの増加作用<sup>22)</sup>が報告されている。臨床試験においても、角膜上皮障害改善効果、結膜上皮障害改善効果とともに自覚症状改善効果が示された<sup>23,24)</sup>ことから、涙液中ムチンを増加させるこ

とにより涙液の安定化を図るといふ新しいコンセプトの点眼液として、ムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%が 2012 年から「ドライアイ」治療薬として販売されている<sup>53)</sup>。

レバミピドは構造式中にカルボン酸を含む酸性化合物 (図 1-1) であり、酸性から中性では水に対する溶解性が低く、弱塩基性から塩基性で水中の溶解性が増大する。ドライアイの患者には弱酸性～中性の点眼液が好ましいため、市販製剤 (ムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%) は、平均粒子径が 1 μm 弱のレバミピド原薬 (図 2-1) をポリビニルアルコール (部分けん化物) 水溶液中に懸濁させた pH 5.5～6.5 の白色の 2%懸濁点眼剤である (図 2-2)<sup>28)</sup>。ドライアイの患者には保存剤の添加は好ましくないため、ユニットドーズ (1 回使用タイプ) の製剤として製品化されている<sup>54)</sup>。しかしながら、市販製剤の課題として、長時間放置しておくことと粒子の沈積層が形成されることから、点眼前に振とうし再分散する必要があり、加えて、白色の懸濁点眼液であることから、点眼直後の一時的な霧視がある。又、製造面では、市販されている点眼液は、無菌ろ過、即ち 0.2 μm のフィルターでろ過できないため、無菌操作による製造が必要とされる。そこで、筆者らは、これらの課題を解決するために、レバミピド結晶のナノ粒子化を試みた。

薬物結晶の微細化の手法は、ブレイクダウン方式とビルトアップ方式が知られている<sup>33, 34)</sup>が、医薬品の製造においては、ブレイクダウン方式が用いられることが多い<sup>55, 56)</sup>。ブレイクダウン方式は、乾式混合粉碎<sup>57)</sup>の報告もあるが、一般的には湿式ビーズミル<sup>58)</sup>や湿式高圧ホモジナイザー<sup>59)</sup>等の湿式粉碎が多く用いられている。湿式粉碎の場合、薬物結晶を物理的な力で粉碎するため、発熱により結晶の凝集又は再成長を招く。従って、一般的に 100～200 nm 付近に粉碎限界があり、それよりもサイズの小さいナノ粒子を作ることは困難である<sup>48)</sup>。また、粉碎時に生じる摩耗も問題である<sup>35)</sup>。このような問題点が残されているものの、湿式粉碎は既に生産用湿式粉碎装置が開発されていることから、最も実用的な方法とされている。これまで上市されたナノ結晶製剤として、Elan 社 (現 Alkermes 社) の Nanocrystal 技術 (ポリマービーズを用いた湿式ビーズミル技術) によって開発された Rapamun<sup>®</sup>錠 (免疫抑制剤)、Emend<sup>®</sup>カプセル (鎮吐剤)、TiCor<sup>®</sup>錠 (高コレステロール剤)、Megaces<sup>®</sup> ES 懸濁液 (摂食改善剤)、Invega<sup>®</sup> Sustenna<sup>®</sup> 筋注 (持続性抗精神病薬) が、Skyepharma 社の IDD-P 技術 (高圧ホモジナイザー技術) によって開発された Triglide<sup>®</sup>錠 (高コレステロール剤) が挙げられるが、ほとんどが湿式粉碎技術を使用したものである<sup>42)</sup>。一

方、ビルトアップ方式としては、超臨界流体法<sup>60)</sup>、噴霧乾燥法<sup>61)</sup>や溶液中での晶析法<sup>62)</sup>等、ナノ粒子を分子から作製する技術や装置の開発が行なわれている。しかしながら、ビルトアップ方式は、無機物質のような工業材料のために開発されたものが多く、医薬品のような有機物質に応用された例は少ない。その中でも、医薬品の晶析に関して、平川らは、オキシリン酸をモデル化合物として、オキシリン酸を塩基で溶解し、それを高分子化合物および/または界面活性剤の存在下、酸で中和して微細な結晶粒子を得る方法を報告している<sup>63)</sup>。しかし、平川らの続報において報告されたフェニトインとフェノバルビタールが中和晶析法によって平均粒子径3~4 μmまでしか微細化できなかった例<sup>64)</sup>に示されるように、晶析法による微粒子化度は化合物固有の物理化学的性質に依存し、その程度を予測することは困難である。しかしながら、中和晶析法はシンプルな製造方法であるため、スケールアップが可能で工業化が容易であること、金属等の摩耗の混入の心配がない利点が挙げられる。筆者らは、この中和晶析法に着目し、様々の改良を積み重ねることで透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液の開発に成功したので、本章ではその知見を論述する。さらに、本章で開発したレバミピドナノ粒子点眼液の薬物動態学的評価として、レバミピドナノ粒子点眼液をウサギに点眼し、レバミピドの作用部位である角膜内および結膜内のレバミピド濃度を測定し、その結果をマイクロ粒子点眼液と比較した。加えて、レバミピドナノ粒子点眼液の薬理学的評価として、レバミピドナノ粒子点眼液を点眼後の正常ウサギの結膜ムチン様物質産生量を評価した。

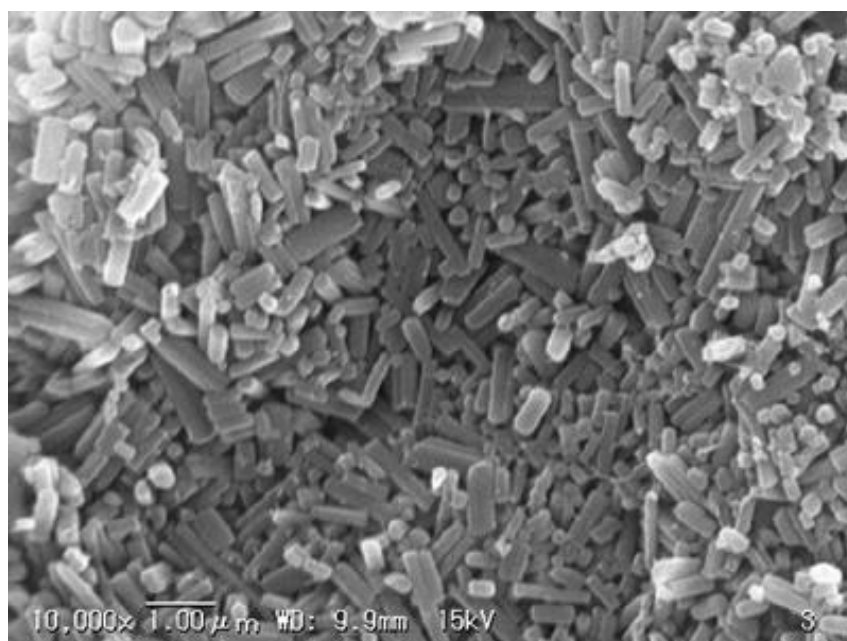


図 2-1 レバミピド原薬の電子顕微鏡写真



図 2-2 ムコスタ®点眼液 UD2%の外観

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 実験材料

#### (1) 試薬

使用した主な試薬を表2-1に示した。

表2-1 試薬

| 試薬名  | 製造元                                   |
|--|---------------------------------------|
| レバミピド  | 大塚製薬(株) (東京、日本)                       |
| ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)<br>グレード(低分子量グレード) :TC-5<br>グレード(中分子量グレード) :60SH50 | 信越化学工業(株) (東京、日本)                     |
| ポリビニルピロリドン (PVP)<br>グレード(低分子量グレード) :PVP K25<br>グレード(高分子量グレード) :PVP K90     | B A S F<br>(Land Rheinland-Pfalz、ドイツ) |
| ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)<br>グレード:HPC-L   | 日本曹達(株) (東京、日本)                       |
| カルボキシメチルセルロースナトリウム<br>(CMCNa) グレード:セロゲン F7-A                               | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |
| ポリソルベート 80<br>商品名 TO-10M   | 日光ケミカルズ(株) (東京、日本)                    |
| マクロゴール 4000  | 日油(株) (大阪、日本)                         |
| ポリオキシエチレン[160]ポリオキシプロピレン[30]グリコール:プルロニック F68                               | B A S F<br>(Land Rheinland-Pfalz、ドイツ) |
| キトサン (水溶性) 植物組織培養用   | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |
| ヒドロキシエチルセルロース (HEC)<br>グレード:CF-G   | 富士ケミカル(株) (大阪、日本)                     |
| メチルセルロース (MC)<br>グレード:SM-15  | 信越化学工業(株) (東京、日本)                     |
| 塩酸   | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |
| 水酸化ナトリウム   | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |

2%レバミピドマイクロ粒子点眼液は、ムコスタ<sup>®</sup>点眼液 UD2%と同等品を大塚製薬株式会社で製造して使用した。結果の第2項で使用したレバミピド湿式ビーズミル粉碎品は、Elan (現 Alkermes) で調製されたサンプルを使用した。

## (2) 機器

使用した主な機器を表 2-2 に示した。

表 2-2 使用機器

| 機器名               | 型番                   | 製造元                            |
|-------------------|----------------------|--------------------------------|
| 高速回転式ホモジナイザー      | ロボミックス               | プライミクス (株) (大阪、日本)             |
| 超高速液-液せん断式ホモジナイザー | クレアミックスダブルモーション      | エム・テクニク (株)<br>(大阪、日本)         |
| 透析装置              | ペリコン 2 ミニ            | メルクミリポア<br>(Massachusetts、米国)  |
| インライン式回転式ホモジナイザー  | クレアミックスシングルモーション     | エム・テクニク (株)<br>(大阪、日本)         |
| 分光光度計             | UV-240               | 島津製作所 (株) (京都、日本)              |
| ビーズミル             | ダイノームル<br>KDL-A 型    | (株) シンマルエンタープライゼス (堺、日本)       |
| 高圧ホモジナイザー         | エマルジフッレクス            | Avestin (Ottawa、カナダ)           |
| 薄膜旋回型高速攪拌機        | フィルミックス              | プライミクス (株) (大阪、日本)             |
| 分光光度計             | UV-240               | 島津製作所 (株) (京都、日本)              |
| 透過型電子顕微鏡          | JEM-1200EX           | 日本電子 (株) (東京、日本)               |
| レーザー回折粒度分布測定機     | SALD-3000J           | 島津製作所 (株) (京都、日本)              |
| X 線回折装置           | D8 ADVANCE           | BRUKER (Massachusetts、米国)      |
| 動的光散乱粒度分布計        | Nano-ZS              | Malvern (Worcestershire、英国)    |
| 動的光散乱粒度分布計        | ELS8000              | 大塚電子 (株) (大阪、日本)               |
| 動的光散乱粒度分布計        | Microtrac UPA        | 日機装 (株) (東京、日本)                |
| 組織懸濁用ホモジナイザー      | Polytron (PT-MR2100) | Kinematica AG (Luzern、Schweiz) |

## (3) 動物

ウサギは、健康な New Zealand White (北山ラベス、伊那、日本) の雄ウサギ (NZW、Kbs) を使用した。飼育条件に関しては、温度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$ 、照明は 12 時間毎に照明と消灯を行った。餌は LRC4 (オリエンタル酵母、東京、日本) を、水は水道水を自由摂取とした。本試験に使用される動物は、「大塚製薬株式会社 動物実験指針」に従って取り扱われた。

## 第2項 実験方法

### (1) レバミピドナノ粒子懸濁液の製造方法開発

2%レバミピドの晶析液を以下の方法で1L調製した。

添加剤-塩酸溶液とレバミピド-水酸化ナトリウム溶液の調製をそれぞれ行った (Step-1:調製)。10 N 塩酸 12 mL (14.2 g, 0.12 mol) と精製水 68 mL と表 2-3 に示す各種添加剤 (懸濁液調製後の添加剤濃度の5倍量) 水溶液 200mL を混和して、添加剤-塩酸溶液を 280 mL 調製した。水酸化ナトリウム 4.4 g (0.11 mol) に精製水を加えて調製した水酸化ナトリウム水溶液に、レバミピド 20 g (0.054 mol) を 40°C に加温溶解し、700 mL のレバミピド-水酸化ナトリウム溶液を調製した。

約 40°C に維持したレバミピド-水酸化ナトリウム溶液を、添加剤-塩酸溶液中に徐々に添加し、レバミピド結晶を析出させた (Step-2:晶析)。晶析終了後の溶液の pH は約 1.5 であった。5 N 水酸化ナトリウム溶液を添加し、晶析液の pH を 6.0-6.5 の間に調整した。精製水を添加し、液容量を 1 L に調整することで、添加剤を含む 2%レバミピド晶析液 (中間体-1) を調製した。この懸濁液には、塩酸と水酸化ナトリウムの中和反応の結果、塩化ナトリウムが約 0.7% (約 0.12 mol) 含まれる。

このようにして得られた 2%レバミピド晶析液 (中間体-1) を各種分散機で分散した (Step-3:分散)。分散条件は第 3 節に記載した。第 3 節 (3) 以降の実験は、2%レバミピド晶析液 (中間体-1) を、超高速液-液せん断式ホモジナイザー (クレアミックスダブルモーション) を用いて、ローターを 18,000 rpm、スクリーンを 16,000 rpm で 1L 当り 40 分間分散を行い、2%レバミピド分散液 (中間体-2) を得た。この 2%レバミピド分散液 (中間体-2) を透析装置 (ペリコン) で濃縮脱塩を行った (Step-4:透析)。濃縮脱塩を行ったサンプルを精製水で希釈し、2%レバミピドナノ粒子懸濁液を調製した。

レバミピドナノ粒子点眼液は、晶析 (Step-2) をインライン方式の分散機 (クレアミックスシングルモーション) 中で行った。即ち、約 10°C に冷却した塩酸-HPMC (TC-5) 溶液を、分散機が組み込まれたベッセル容器中にインライン方式で循環させた。クレアミックスシングルモーションのローターを 10,000 rpm で回転させながら、40-50°C に維持した水酸化ナトリウム-レバミピド溶液をベッセル容器中に徐々に注入し、レバミピド結晶を析出させた。その後、前述の方法で分散 (Step-3) 及び透析 (Step-4) を行い、透析後の液にグリセリンを 2.35%

加え、精製水で希釈した。この懸濁液を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、無菌の 2% レバミピドナノ粒子点眼液を調製した。

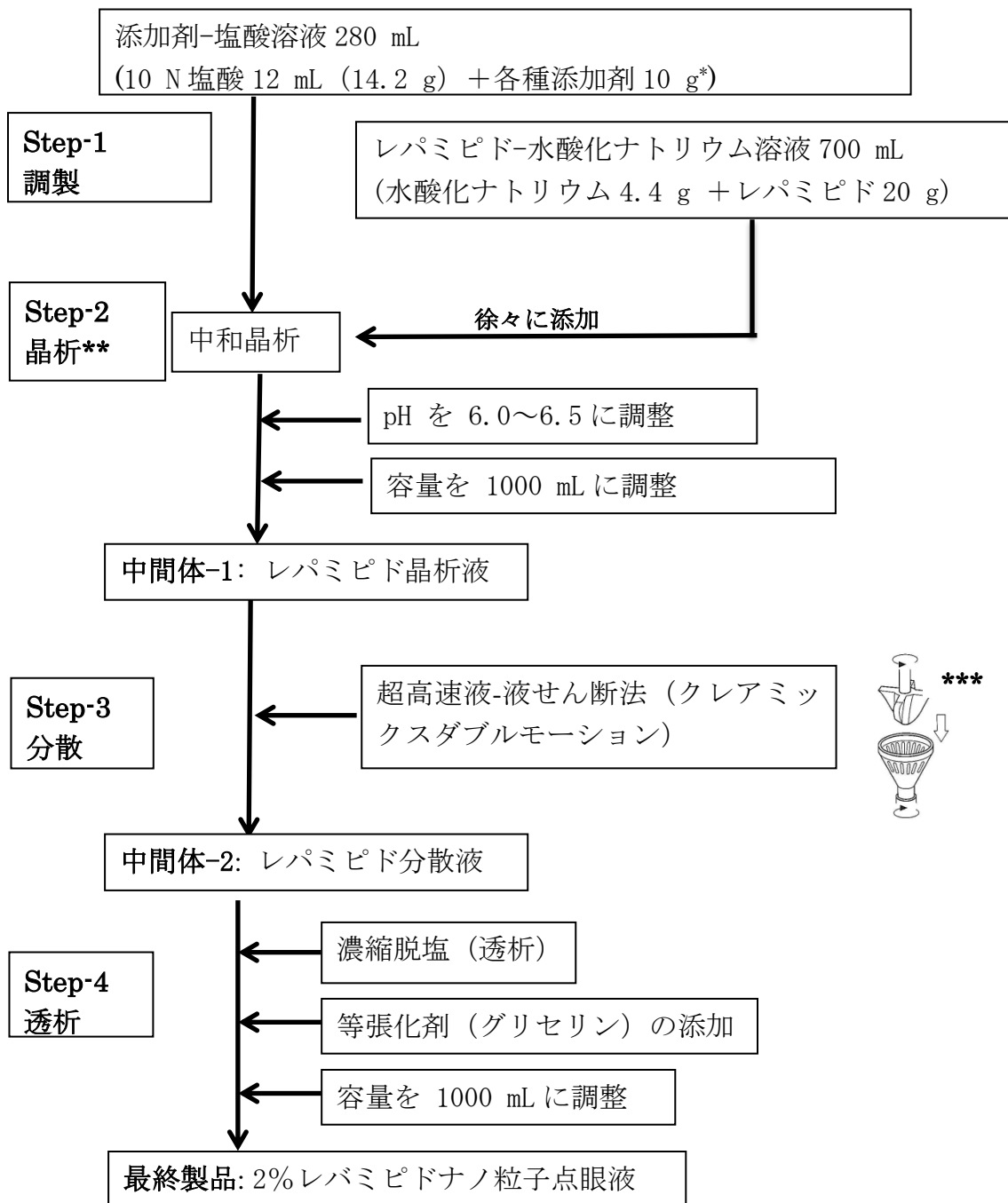


図 2-3 レバミピドナノ粒子懸濁液の調製フロー (1L スケール)

\*添加剤濃度 1% の場合、 \*\*最終点眼液の調製時は、晶析 (Step-2) をインライン方式の分散機 (クレアミックスシングルモーション) 中に行った。 \*\*\* 超高速液-液せん断法の分散機構



## (2) レバミピドナノ粒子懸濁液の評価

### (a) 粒子径

2%レバミピド晶析液、回転式ホモジナイザー又はビーズミルにより分散した懸濁液は、レーザー回折粒度分布測定機 (SALD3000J) によって、粒子径を測定した。粒子径は、超音波を照射し 0.2%HPC-SL 溶液(分散媒)中、循環セルで測定した粒子径を一次粒子径、超音波を照射せず精製水溶液(分散媒)中で、回分セルで測定した粒子径を二次粒子径と称して測定を行った。

その他の分散後の懸濁液及び透析後のナノ粒子懸濁液の平均粒子径は、動的光散乱粒度分布測定機である Nano-ZS (Malvern) 又は Microtrac UPA (日機装) 又は ELS8000 (大塚電子) で測定した。

### (b) 透過率

2%レバミピド晶析液の透明性を評価するために、精製水で 2%懸濁液を 10 倍希釈し、分光光度計 (UV-240) を用いて 640 nm における 0.2%懸濁液 (10 倍希釈液) の透過率を測定した。2%レバミピド分散液 (中間体-2) 以降のサンプルは、分光光度計 (UV-240) を用いて 640 nm における 2%懸濁液 (原液) の透過率を測定した。

### (c) 透過型電子顕微観察

透析後の 2%レバミピドナノ粒子懸濁液を等量の 4%酢酸ウラン溶液と混合し、乾燥させ、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX) で観察を行った。

### (d) X線回折スペクトル

透析後の 2%レバミピドナノ粒子懸濁液を超遠心分離 (50,000 rpm、60 分間、10℃) し、微粒子を沈殿させた。精製水で洗浄し、もう一度同様の操作を行った。上澄み液を除去し、沈殿物を 40℃ 4 日間風乾し、微粒子乾燥物の X線回折スペクトルを測定した。

(3) レバミピドナノ粒子点眼液をウサギに点眼後の角膜及び結膜内濃度推移

11~12 週齢の雄ウサギの両眼に、2%レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販製品同等品）または2%レバミピドナノ粒子点眼液を1眼当り50 $\mu$ L単回点眼した。投与後0.25、1、2、4、8 および24 時間後に、耳静脈内に過量のペントバルビタールナトリウム溶液（50mg/mL）を投与して、ウサギを安楽死させた。眼球と眼瞼の両方を切除し、冷却した0.9%生理食塩水（大塚製薬工場、日本、鳴門市）を入れた容器で1回洗浄した。結膜（球結膜と眼瞼結膜）および角膜を回収し、冷却した0.9%生理食塩水でさらに2回洗浄した。各試料は液体窒素で凍結させ、評価するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。凍結保存された角膜および結膜の試料は、眼科用はさみで細かく切断し、ポリプロピレンチューブに入れた。これらの試料は、冷却した0.9%生理食塩水を加え Polytron（PT-MR2100）でホモジナイズした。角膜および結膜サンプルのレバミピド濃度は、積水メディカル株式会社（茨城、日本）の LC-ESI-MS /MS を用いて測定した<sup>65)</sup>。得られたデータは平均 $\pm$ 標準偏差（S. D.）で示した。

#### (4) レバミピドナノ粒子点眼液のウサギ結膜ムチン様物質産生促進作用

11~12 週齢の雄ウサギの両眼に、2%レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販製品同等品）またはレバミピドナノ粒子点眼液（0、0.1、0.3、1 または 2%）を 1 眼当り 50  $\mu$ L の容量で 1 日 6 回 14 日間および 15 日目に 1 回点眼した。最終投与後、ペントバルビタールナトリウム溶液（50 mg/mL）を過量静脈内に投与することによりウサギを安楽死させた後、各ウサギから結膜を採取し、結膜ムチン様物質を Alcian-blue 結合法を用いて測定した<sup>21)</sup>。採取した結膜は重量を測定し、冷却した 0.25 M ショ糖溶液（10 mL）中に一時保管した。次いで、結膜を 0.1% Alcian blue 緩衝液（0.15 M ショ糖と 0.05 M 酢酸ナトリウムを含む pH 5.8 の緩衝液）（10 mL）中で 1.5 時間インキュベートした（室温）。その後、結膜は 0.25 M ショ糖溶液（10 mL）で 2 回洗浄し、0.5 M MgCl<sub>2</sub> 溶液（10 mL）中で 2 時間インキュベートして（室温）、結膜のムチン層に結合した色素を抽出した。得られた抽出物は 10 mL のジエチルエーテルと混合し、抽出物を含む水層の光学濃度（Optical Density: O.D.）を 605 nm で測定した。ムチン様物質と結合した Alcian-blue 色素量は、結膜組織重量あたりの光学濃度（O.D. units/g of conjunctival tissue）で表した。得られたデータは平均±標準誤差（S.E.）で示した。

統計学的処理は、線形回帰分析において、レバミピドの対数濃度に対して、レバミピドナノ粒子点眼液の結膜上のムチン様物質が単調増加を示さなかったことを確認したため、0%群に対してレバミピドナノ粒子点眼液の各群について Dunnett 検定（両側）を行った。統計解析は SAS ソフトウェア（リリース 9.1、SAS Institute Japan）を用いて行った。p 値が 0.05 未満を有意とした。2%レバミピドナノ粒子点眼液群および 2%レバミピドマイクロ粒子点眼液群の同等性の検討は、両群の結膜ムチン様物質値を用いて、一元配置分散分析（ANOVA）を行い、共通分散（common variance）を求めた。続いて、2 群間の結膜ムチン様物質値の平均値の差に対する 90%信頼区間を求めた。薬効における同等性の許容範囲は、2%レバミピドマイクロ粒子点眼液群の結膜ムチン様物質値に対する 2 群間の平均値差の 90%信頼区間の比が±20%の範囲内と設定した。

## 第3節 実験結果

### 第1項 レバミピドナノ粒子懸濁液の製造方法開発

#### (1) 各種添加剤共存化で晶析したレバミピド 晶析液

45℃に維持したレバミピド-水酸化ナトリウム水溶液（良溶媒）に塩酸水溶液（貧溶媒）を添加する方法で、レバミピド結晶を析出させた。その結果、光学顕微鏡観察下で長径 10-20 μm、短径 1-2 μm の針状晶が観察され、微細な結晶は得られなかった（データ未掲載）。そこで、添加方法を逆にして、塩酸溶液（貧溶媒）にレバミピド-水酸化ナトリウム水溶液（良溶媒）を添加する方法でレバミピド結晶を析出させた。得られたレバミピド懸濁液は、結晶が凝集した白濁した懸濁液であり、一次粒子径は 1.0 μm、二次粒子径は 6.7 μm であった。そこで、結晶の凝集抑制及び成長抑制を目的に、表 2-3 に示す 12 種類の高分子又は界面活性剤を溶解させた塩酸溶液に、同様にレバミピド-水酸化ナトリウム水溶液（良溶媒）を添加することで中和晶析を行い、各種レバミピド晶析液を得た。晶析液の一次粒子径、二次粒子径、及び、0.2%懸濁液（10 倍希釈液）の 640 nm の透過率の結果を表 2-3 に示す。

添加剤の種類によって、得られた晶析後の懸濁液（晶析液）の性状は異なった。HPMC(TC-5)又は PVP K25 では、無添加と比較して、一次粒子径と二次粒子径が共に大きい晶析液が得られたが、0.2%懸濁液の透過性がやや高い事が確認された。プルロニック F68 又は CMCNa は、0.2 μm 以下の一次粒子径と 0.4 μm 以下の一次粒子径の晶析液が得られ、晶析のみで分散性の良いナノ粒子懸濁液が得られることが判明した。プルロニック F68 の 0.2%懸濁液の透過性はやや高いが、その 2%懸濁液（原液）は白濁しており透明性は不十分であった。ポリソルベート 80 とマクロゴール 4000 では、0.4 μm 以下の一次粒子径が得られたが、二次粒子径は大きく、粒子が凝集した懸濁であることが示唆され、0.2%懸濁液の透過性も低かった。HPMC の中分子量グレード(60-SH50)、PVP の高分子量グレード (K90)、HPC-L、キトサン、MC、又は HEC をそれぞれ添加剤として用いた場合、無添加と比較して、粒子径が大きく、0.2%懸濁液の透過性も低い懸濁液が得られた。従って、これらの添加剤はレバミピドの晶析時の添加剤として好ましくないと考えられた。

表 2-3 各種添加剤共存化で晶析した 2%レバミピド晶析液の一次粒子径と二次粒子径及び 10 倍希釈した 0.2%レバミピド懸濁液の 640 nm の透過率

| 添加剤*           | 晶析液                          |                             |                       |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
|                | 一次粒子径**<br>( $\mu\text{m}$ ) | 二次粒子径†<br>( $\mu\text{m}$ ) | 0.2%懸濁液の<br>透過率†† (%) |
| なし             | 1.0                          | 6.7                         | 0.1                   |
| HPMC (TC-5)    | 8.7                          | 20.3                        | 5.1                   |
| PVP K25        | 3.8                          | 45.8                        | 25.5                  |
| プルロニック F68     | 0.17                         | 0.39                        | 23.8                  |
| CMCNa          | 0.15                         | 0.35                        | 4.3                   |
| ポリソルベート 80     | 0.32                         | 4.2                         | 2.3                   |
| マクロゴール 4000    | 0.20                         | 7.5                         | 0.5                   |
| HPMC (60-SH50) | 12.1                         | 20.2                        | 0.5                   |
| PVP K90        | 12.7                         | 20.1                        | 0.3                   |
| HPC-L          | 5.6                          | 10.6                        | 0.7                   |
| MC             | 11.9                         | 27.7                        | 1.0                   |
| HEC            | 9.1                          | 21.8                        | 0.2                   |
| キトサン           | 2.6                          | 8.0                         | 0.1                   |

\* キトサン、HEC、HPMC (60-SH50)を除き、晶析後濃度で 1%添加。キトサン、HEC、HPMC (60-SH50)は 0.5%。

\*\* 超音波を照射し 0.2%HPC-SL 溶液(分散媒)中、循環セルで測定した。

† 超音波を照射せず精製水溶液(分散媒)中で、回分セルで測定した。

†† 2%懸濁液を精製水で 10 倍希釈した 0.2%懸濁液の 640 nm の透過率を測定した。

## (2) 各種分散機を用いたレバミピド 晶析液の分散

一部の晶析液において、二次粒子径は大きいが一粒子径が小さいことが明らかとなったため、これらの晶析液は粒子が凝集した懸濁であることが示唆された。そこで、各種分散機（高速回転式ホモジナイザー、ビーズミル、高圧ホモジナイザー、薄膜旋回型高速攪拌機、超高速液-液せん断ホモジナイザー）を用いて、これらの晶析液の分散を行った。

### (A) 高速回転式ホモジナイザーによる分散

高速回転式ホモジナイザーを用いて 10,000 rpm、10 分間、2%レバミピド晶析液（中間体-1）を分散した。分散後の懸濁液の一次粒子径、二次粒子径、及び、0.2%懸濁液（10 倍希釈液）の 640 nm の透過率の結果を表 2-4 に示す。

添加剤無添加の晶析液に、HPMC (TC-5) を 1% 添加し、高速回転式ホモジナイザーで分散すると一次粒子径が 0.3  $\mu\text{m}$ 、二次粒子径が 0.6  $\mu\text{m}$  と粒子径が低下した。しかし、0.2%懸濁液の透過率は向上しなかった。

高速回転式ホモジナイザーによる分散により、HPMC (TC-5) と PVP K25 では、一次粒子径の低下と透過性の向上が認められた。しかしながら、TC-5 処方二次粒子径の低下は認められず、TC-5 を含む晶析液は回転式ホモジナイザーを用いた分散では不十分であった。プルロニック F68、CMCNa、ポリソルベート 80、又はマクロゴール 4000 をそれぞれ添加剤として用いた晶析液は、粒子径の低下も 0.2%懸濁液の透過性の向上も認められなかった。また、粒子径が大きく、0.2%懸濁液の透過性も低い晶析液が得られた HPMC の中分子量グレード (60-SH50) と PVP の高分子量グレード (K90)、HPC-L、キトサン、MC、HEC においても、高速回転式ホモジナイザーによる分散により、粒子径の低下と 0.2%懸濁液の透過性の向上は認められなかった。

TC-5 と PVP K25 を用いた晶析液が高速回転式ホモジナイザーによる分散によって、粒子径の低下と透明性の向上が認められたことから、より効率の良い分散工程を加えることで、さらに粒子径の低下と透明性の向上が得られる可能性が考えられた。従って、以下の検討を行った。

## (B) 湿式ビーズミルによる分散

湿式ビーズミルは、粉碎室と呼ばれる容器の中でジルコニアビーズと懸濁液を攪拌し、ビーズを衝突させることによって懸濁液中の粒子を微粉碎・分散する装置であり、ナノ粒子の製造に頻用されている<sup>49, 51)</sup> (図2-4)。

添加剤無添加の晶析後溶液に、HPMC(TC-5)を1%後添加し、ダイノームルを用いた湿式ビーズミルを行うと一次粒子径が0.2 μmで、二次粒子径が0.45 μmのナノ粒子懸濁液が得られた。しかし、HPMC(TC-5)を含む晶析液の分散液と比較すると、0.2%懸濁液の透過率は向上しなかった。

HPMC(TC-5)、PVP K25を含む晶析液を湿式ビーズミルで粉碎すると、粒子径の低下と透過性の増大が認められたが、高速回転式ホモジナイザーの分散(10,000 rpm、10分間)と同レベルに過ぎなかった。また、二次粒子径は大きく、湿式ビーズミルでは凝集物の解砕が不十分と判断した。

プルロニック F68、ポリソルベート 80、又はマクロゴール 4000を含む晶析液を湿式ビーズミルで粉碎しても、粒子径の低下と透明性の向上は認められなかった。HPC-Lを含む晶析液を湿式ビーズミルで粉碎すると、一次粒子径が0.23 μmと低下し、10倍希釈液の透過率も向上したが、二次粒子径は3 μmと大きく、凝集物の解砕は不十分であった。

以上の結果から、レバミピド晶析液の分散方法として、湿式ビーズミル粉碎は不十分であると判断した。

シリンダー内でのビーズの動き

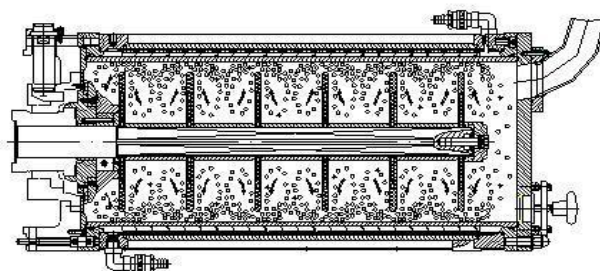


図2-4 湿式ビーズミル(ダイノームル)の模式図

(シンマルエンタープライゼスのホームページから引用：

[http://www.shinmaru-e.com/dynomill\\_detail.php?eid=00007](http://www.shinmaru-e.com/dynomill_detail.php?eid=00007))

表 2-4 2%レバミピド晶析液を回転式ホモジナイザー又はビーズミル処理後の一次粒子径と二次粒子径及び 10 倍希釈した 0.2%レバミピド懸濁液の透過率

| 添加剤*           | 晶析後の懸濁液                            |                                    |                            | 回転式ホモジナイザー<br>分散後の懸濁液              |                                    |                            | 湿式ビーズミル後<br>の懸濁液                   |                                    |                            |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
|                | 一次<br>粒子<br>径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 二次<br>粒子<br>径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 0.2%懸<br>濁液の<br>透過率<br>(%) | 一次<br>粒子<br>径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 二次<br>粒子<br>径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 0.2%懸<br>濁液の<br>透過率<br>(%) | 一次<br>粒子<br>径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 二次<br>粒子<br>径<br>( $\mu\text{m}$ ) | 0.2%懸<br>濁液の<br>透過率<br>(%) |
| なし**           | 1.0                                | 6.7                                | 0.1                        | 0.34                               | 0.62                               | 0.1                        | 0.20                               | 0.45                               | 2.8                        |
| HPMC (TC-5)    | 8.7                                | 20.3                               | 5.1                        | 0.20                               | 29.0                               | 63.9                       | 0.13                               | 20.6                               | 70.1                       |
| PVP K25        | 3.8                                | 45.8                               | 25.5                       | 0.21                               | 0.86                               | 34.4                       | 0.25                               | 1.4                                | 39.3                       |
| CMCNa          | 0.35                               | 0.15                               | 4.3                        | 0.16                               | 0.16                               | 5.7                        | NT                                 | NT                                 | NT                         |
| プルロニック<br>F68  | 0.17                               | 0.39                               | 23.8                       | 0.19                               | 0.37                               | 24.3                       | 0.20                               | 0.20                               | 35.1                       |
| ポリソルベート<br>80  | 0.32                               | 4.2                                | 2.3                        | 0.34                               | 6.3                                | 1.3                        | 0.24                               | 4.8                                | 5.3                        |
| マクロゴール<br>4000 | 0.20                               | 7.5                                | 0.5                        | 0.24                               | 7.0                                | 0.4                        | 0.62                               | 5.1                                | 0.1                        |
| HPMC (60-SH50) | 12.1                               | 20.2                               | 0.5                        | 7.6                                | 9.2                                | 0.5                        | NT                                 | NT                                 | NT                         |
| PVP K90        | 12.7                               | 20.1                               | 0.3                        | 11.2                               | 11.7                               | 0.4                        | NT                                 | NT                                 | NT                         |
| HPC-L          | 5.6                                | 10.6                               | 0.7                        | 6.0                                | 6.3                                | 1.2                        | 0.23                               | 3.3                                | 63.0                       |
| MC             | 11.9                               | 27.7                               | 1.0                        | 8.2                                | 11.7                               | 2.2                        | NT                                 | NT                                 | NT                         |
| HEC            | 9.1                                | 21.8                               | 0.2                        | 9.0                                | 9.6                                | 0.2                        | NT                                 | NT                                 | NT                         |
| キトサン           | 2.6                                | 8.0                                | 0.1                        | 1.8                                | 4.3                                | 0.1                        | 0.74                               | 5.3                                | 0.1                        |

NT:未試験

\* キトサン、HEC、HPMC (60-SH50)を除き、晶析後濃度 1%添加。キトサン、HEC、HPMC (60-SH50)は 0.5%。

\*\*添加剤無添加の懸濁液のみ、1%HPMC (TC5E)を後添加し、ロボミックス分散と湿式ビーズミル粉碎を行った。

一次粒子径:超音波を照射し 0.2%HPC-SL 溶液(分散媒)中、循環セルで測定した。

二次粒子径:超音波を照射せず精製水溶液(分散媒)中で、回分セルで測定した。

0.2%懸濁液の透過率:2%懸濁液を精製水で 10 倍希釈した 0.2%懸濁液の 640 nm の透過率を測定した。



### (C) 高圧ホモジナイザーによる分散

ゴーリン型の高圧ホモジナイザー（エマルジフレックス）は、処理前の懸濁液を高圧でホモバルブに衝突させ、ホモバルブとバルブシート間の狭い隙間へサンプル液が流れ出る際に速度が急激に増した後、圧力が急激に低下し排出されることで粒子が破碎・均質化する装置である<sup>59)</sup> (図2-5)。

1%HPMC (TC-5) 及び 1%PVP K25 を含む 2%レバミピド晶析液について、高圧ホモジナイザーを用いて圧力 100-150 MPa で 3 回分散処理を行った。その結果、透過性は高速回転式ホモジナイザーの分散 (10,000 rpm、10 分間) と同レベルで、平均粒子径は後述する超高速液-液せん断法による分散品と比較して大きかった (表2-5)。

以上の結果から、レバミピド晶析液の分散方法として、高圧ホモジナイザーは不十分であると判断した。

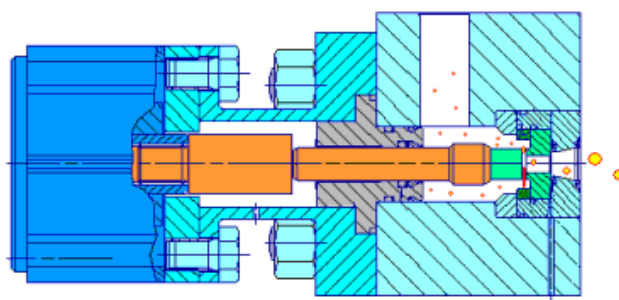


図2-5 高圧ホモジナイザーの模式図

(同栄商事のホームページから引用：<http://www.doyei.com/>)

表2-5 2%レバミピド晶析液を高圧ホモジナイザーで分散後の平均粒子径及び10倍希釈した0.2%レバミピド懸濁液の透過率

| 測定項目／添加剤                   | 1%HPMC (TC-5) | 1%PVP K25 |
|----------------------------|---------------|-----------|
| 平均粒子径 (nm)*                | 224           | 163       |
| 0.2%懸濁液の 640 nm の透過率 (%)** | 62.1          | 21.5      |

\*動的光散乱計 ELS8000 を用いて測定した キュメント粒子径

\*\*0.2%懸濁液の透過率：2%懸濁液を精製水で10倍希釈した0.2%懸濁液の640 nmの透過率を測定した。

#### (D) 薄膜巡回型高速攪拌機による分散

薄膜巡回型高速攪拌機（フィルミックス）は小型の粉砕室に内径すれすれの円形タービンを装備し、円形タービンを高速で回転させることにより、処理前の懸濁液を粉砕室内壁に走らせ薄膜化させ、分散・粉砕する装置である<sup>66)</sup> (図2-6)。

このフィルミックスを用いて、2%レバミピド晶析溶液をディスパーサー翼（周速 50m/s）により 1 分間分散したところ平均粒子径 100-200 nm の懸濁液が得られた（表2-6）。しかしながら、ディスパーサー翼で分散時間を長くしても粒子径の低下は認められず、スクリーン翼で分散時間を長くすると、粒子径が増大し、結晶成長又は再凝集が認められた（表2-7）。フィルミックスは高エネルギーによる分散が可能であるが、サンプルの冷却効率（冷却水との接触面積が小さい）が低いことから、温度上昇に伴う再凝集が生じたと考えられた。従って、100 nm 未満への粒子径への分散は困難と判断した。平均粒子径（表2-6）及び懸濁液の透明感（データ未掲載）は、後述する超高速液-液せん断法による分散品と比較して、フィルミックス分散品は劣っていた。

以上の結果から、レバミピド晶析液の分散方法として、フィルミックスは不十分であると判断した。

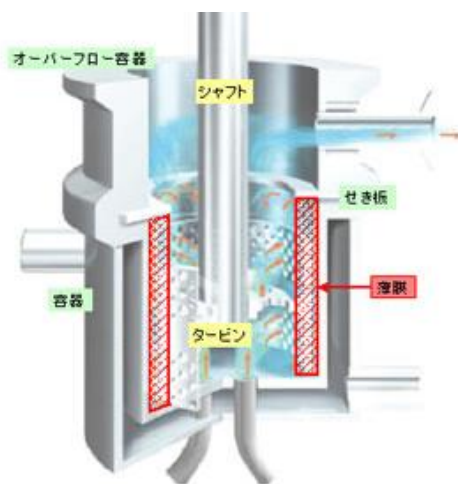


図2-6 薄膜巡回型高速攪拌機（フィルミックス）の模式図

(プライミックスのホームページから引用：[http://www.primix.jp/mixer\\_lecture/vol3/02.html](http://www.primix.jp/mixer_lecture/vol3/02.html))

表 2-6 2%レバミピド晶析液 (1%TC-5 又は 1%PVP K25 を含む) をフィルミックスで分散後の平均粒子径 (nm) (攪拌翼: ディスパーサー、周速 50m/s、1 分間分散)

| 測定項目/添加剤    | 1%HPMC<br>(TC-5) | 1%PVP K25 |
|-------------|------------------|-----------|
| 平均粒子径 (nm)* | 146              | 123       |

\*動的光散乱計 Microtrac (UPA) を用いて測定した 50%D(nm)

表 2-7 2%レバミピド晶析液 (1%TC-5 を含む) をフィルミックスで分散後の平均粒子径 (nm)\* (周速 50m/s)

| 攪拌翼           | 分散時間 (分) |     |     |     |     |
|---------------|----------|-----|-----|-----|-----|
|               | 0.5      | 1   | 1.5 | 2   | 3   |
| 攪拌翼 (スクリーン)   | 183      | 154 | 175 | 169 | 224 |
| 攪拌翼 (ディスパーサー) |          | 146 |     | 144 | 144 |

\*動的光散乱計 Microtrac (UPA) を用いて測定した 50%D(nm)

### (E) 超高速液-液せん断ホモジナイザーによる分散

クレアミックスダブルモーションは、スクリーンとローターが逆方向に回転することによって生じたジェット流（超高速液-液せん断）によって、乳化・分散を行う装置である<sup>67)</sup>（図2-7）。この分散方法の利点は、懸濁液が高速で逆回転しているスクリーンとローターの間を通過することで、非常に強いせん断力が与えられるため粒子の分散効率が良い事と、ビーズミルやゴーリン型の高圧ホモジナイザーで生じる摩耗の懸念が少ない事である。



図2-7 超高速液-液せん断（クレアミックスダブルモーション）の分散化機構（文献60から引用）

2%レバミピド晶析溶液 800mL を、クレアミックスWモーションを用いて、ローターを約 17,000 rpm 回転、スクリーンを約 16,000 rpm 回転で 30 分間分散後の平均粒子径 (nm) 及び 640 nm の透過率 (%) を表2-8に示した。その結果、クレアミックスダブルモーションを用いて分散を行うことで、他の分散方法（高速回転式ホモジナイザー、ビーズミル、高圧ホモジナイザー、薄膜旋回型高速攪拌機）と比較して、粒子径の低下と顕著な透過率の増大が認められた。又、分散後の懸濁液は 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターが通過可能となった。以上の結果から、レバミピド晶析液の分散工程として、クレアミックスダブルモーションは非常に有用であると考えられた。

表 2-8 2%レバミピド晶析液 (1%TC-5 又は 1%PVP K25 を含む) をクレアミックスダブルモーションで分散後の平均粒子径 (nm) 及び 640 nm の透過率 (%)

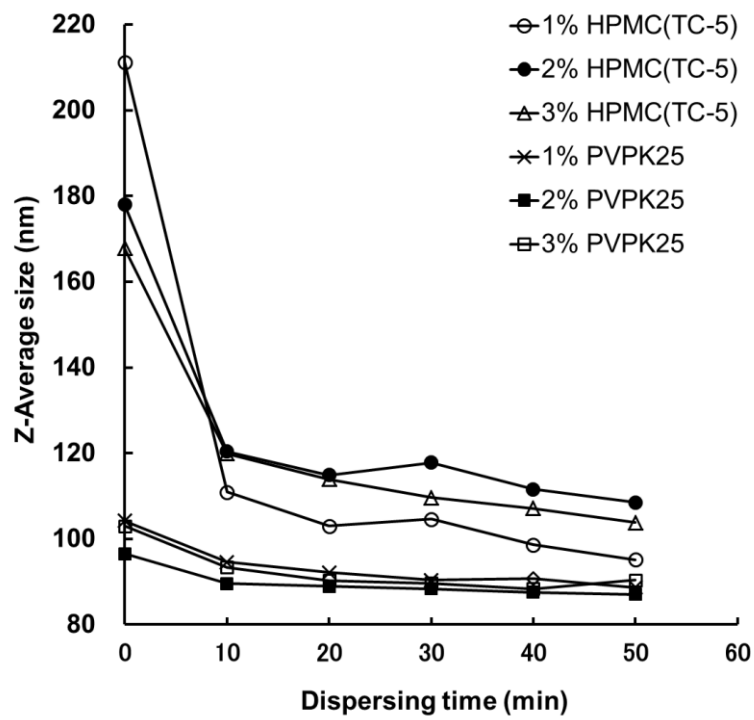
| 測定項目/添加剤  | 1%HPMC<br>(TC-5) | 1%PVP K25 |
|---|------------------|-----------|
| ELS8000 キュメント平均粒径 (nm)                          | 136              | 112       |
| Microtrac (UPA) の 50%D (nm)                     | 77               | 96        |
| 10 倍希釈液の 640 nm の透過率 (%)                        | 78.0             | 50.7      |
| 原液の 640 nm の透過率 (%)                             | 19.7             | 0.4       |
| 0.8/0.2 $\mu$ m 直径 32 mm<br>スポンア(PES) フィルターのろ過性 | 容易に通過            | 容易に通過     |

次に、添加剤の濃度及び分散時間による影響を検討した。1~3%の HPMC (TC-5) 及び 1~3%の PVP K25 を含む 2%レバミピド晶析液を超高速液-液せん断法で分散させた時の平均粒子径 (Z-Average size) と 2%レバミピド懸濁液の透過率を図 2-8 に示す。

TC-5 処方に関しては、超高速液-液せん断法による分散により、懸濁液の透明性が向上し、2%懸濁液 (原液) でも 15~35%まで透過率が增大した。TC-5 の添加濃度が 1~3%の範囲では、添加濃度が高いほど分散後の 2%レバミピド分散液 (原液) の透過率は増大した。平均粒子径 (Z-Average size) は 100~120 nm まで低下した。TC-5 の添加濃度が 1~3%の範囲では平均粒子径に顕著な差は認められなかった。分散時間は、1L 当たり 10 分間の分散で、平均粒子径の低下と透過率の増大はほぼ最大に達し、それ以上の分散では僅かな効果しか得られなかった。

PVP K25 処方に関しては、超高速液-液せん断法による分散により、平均粒子径は 90 nm まで低下したが、2%溶液 (原液) の透過率は 2~5%と低かった。PVP K25 の濃度が 1~3%の範囲では、粒子径、透過率に影響を与えないことが分かった。

(A)



(B)

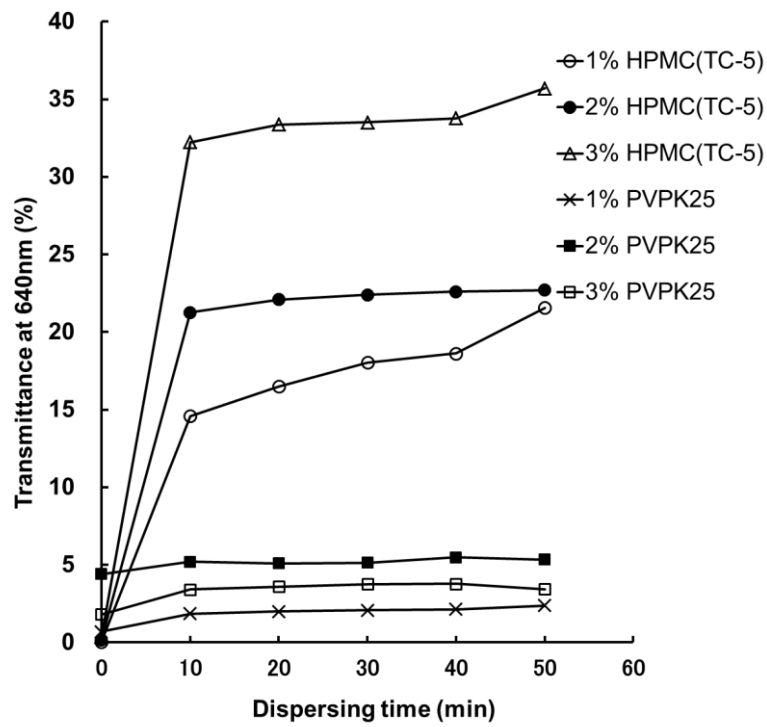


図 2-8 超高速液-液せん断法を用いた分散処理時間に対する (A) Z-Average size と (B) 640 nm の透過率 (2%懸濁液) の変化

(3) 透析によるレバミピド 分散液の凝集抑制効果

晶析・分散後の 1%HPMC (TC-5)を含む 2%レバミピド分散液 (中間体-2) を 60℃に保管すると、平均粒子径は増大し、粘性の高いゲル状態の性状を示した (表 2-9)。

粒子径の増大及びゲル化の原因として、晶析時に塩酸と水酸化ナトリウムの中和で生じた塩化ナトリウムが原因であると考えられたため、透析により塩化ナトリウムの除去を試みた。その結果、透析による脱塩により、粒子径が僅かに低下し、透過率が 45%に増大した (表 2-10)。

透析後の 2%レバミピドナノ粒子懸濁液は、60℃における平均粒子径の増大が小さく (表 2-9)、ゲルへの変化は生じなかった。一方、透析を行わなかったサンプルでは、平均粒子径の増大が認められた。

表 2-9 透析前の 1%HPMC (TC-5)を含む 2%レバミピド分散液 (中間体-2) 及び透析後のナノ粒子懸濁液を 60℃に保管後の Z-Average size と外観の変化

| 保管条件 | 透析 | Z-Average size (nm) |      |      | 2週間後の外観 |
|------|----|---------------------|------|------|---------|
|      |    | 開始時                 | 1週間後 | 2週間後 |         |
| 60℃  | なし | 158                 | 402  | 459  | ゲル化     |
|      | あり | 122                 | 186  | 213  | 変化なし    |

表 2-10 透析前の 1%HPMC (TC-5)を含む 2%レバミピド分散液 (中間体-2) と透析後のナノ粒子懸濁液の Z-Average size と 640 nm の透過率

|     | Z-Average size (nm) | 2%懸濁液の 640 nm の透過率 (%) |
|-----|---------------------|------------------------|
| 透析前 | 126                 | 16.2                   |
| 透析後 | 104                 | 45.0                   |

## 第2項 レバミピドナノ粒子懸濁液の結晶形及び形態の評価

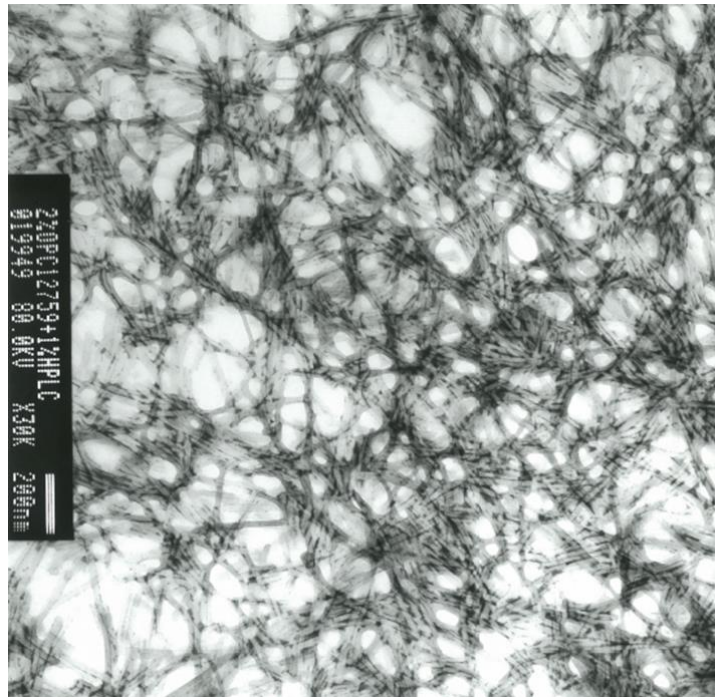
1%HPMC (TC-5) 又は1%PVP K25 を晶析時の添加剤として製造した2%レバミピドナノ粒子懸濁液、及び対照としてレバミピド湿式ビーズミル粉碎懸濁液を透過型電子顕微鏡で観察した写真を図2-9に示す。TC-5 処方では、長径 300 nm 以上 1000 nm 未満、短径約 15 nm の長径と短径の比が 20 を超える均一な超針状結晶が認められた。一方、PVP K25 処方では、長径約 200 nm、短径約 40 nm の針状結晶で、長径と短径の比が 5 程度の均一な針状結晶が得られた。また、比較対照の湿式粉碎により粉碎されたレバミピド懸濁液の粒子は、形状が不定形で、粉碎が不十分な粒子も残存しており均質でなかった。

上記2種類の晶析により調製した2%レバミピドナノ粒子懸濁液を超遠心分離し、沈殿物の X 線回折スペクトルを測定した。これら 2 種類のレバミピドナノ粒子のピークはブロードであるが、対照のレバミピド原薬と同様の位置にピークを認めた (図2-10)。従って、これら 2 種類の 2%レバミピド懸濁液のナノ粒子は、レバミピド原薬と同一結晶形であると考えられた。

また、これらの製剤の外観を図2-11に示す。市販製剤<湿式ビーズミル粉碎品<PVP(1,2%)を含むナノ粒子懸濁液<1%TC-5 を含むナノ粒子懸濁液<2%TC-5 を含むナノ粒子懸濁液の順で、透明性は良好であった。



(A) HPMC (TC-5) を用いて晶析したレバミピド粒子



(B) PVP を用いて晶析したレバミピド粒子



(C) 湿式粉碎により粉碎されたレバミピド粒子

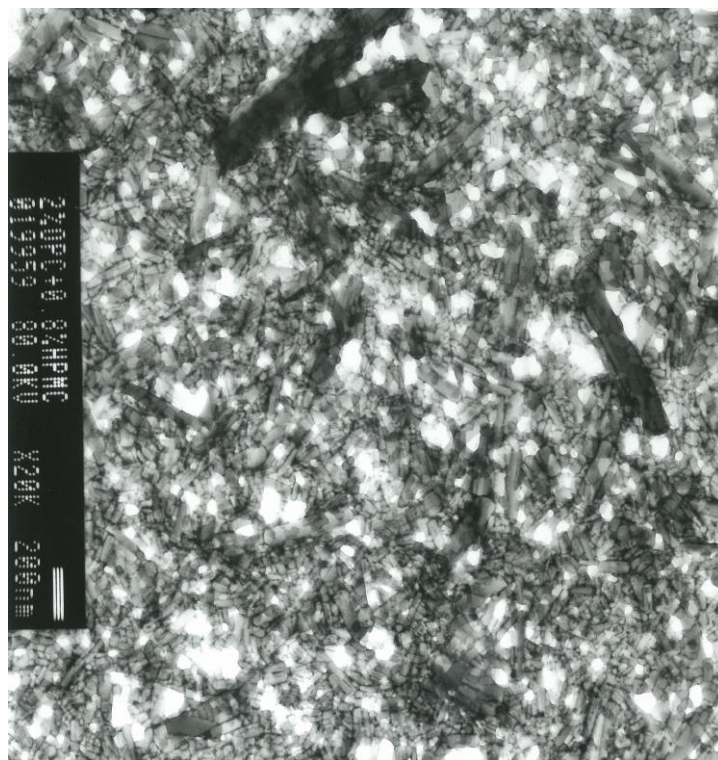
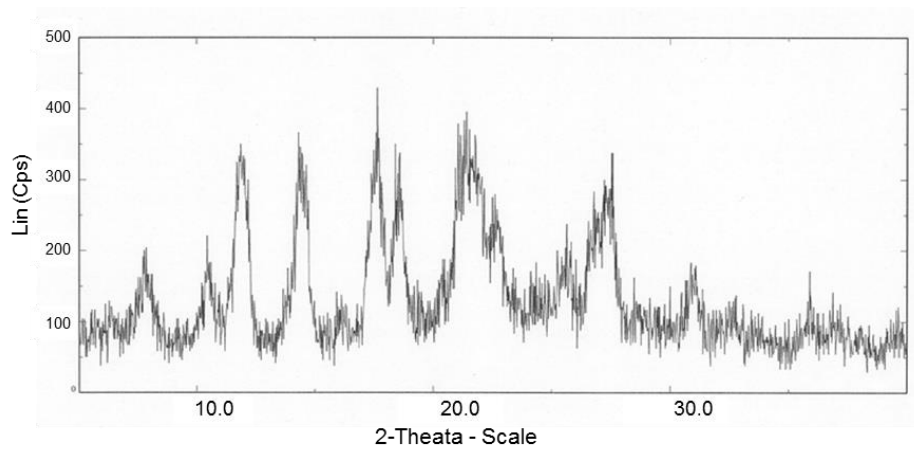
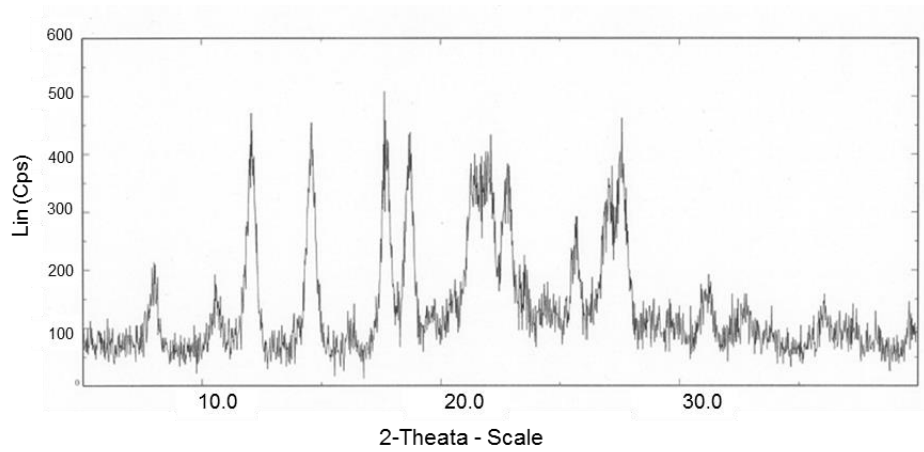


図 2-9 レバミピドナノ粒子結晶の電子顕微鏡写真

(A) HPMC (TC-5) を用いて晶析したレバミピドナノ結晶



(B) PVP を用いて晶析したレバミピドナノ結晶



(C) レバミピド原薬

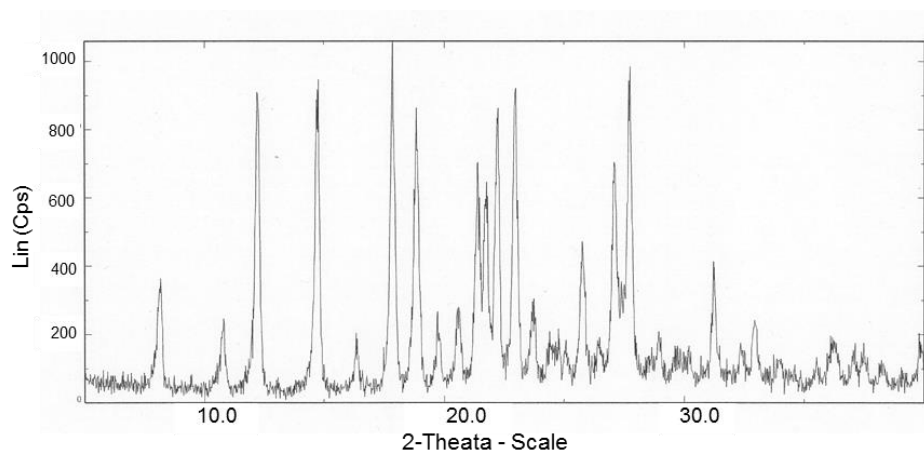


図 2-10 レバミピドナノ粒子結晶とレバミピド原薬の粉末 X 線回折スペクトル



図2-1 1 2%レバミピドナノ粒子懸濁液 (2%TC-5, 1%TC-5, 2%PVPK25, 1% PVPK25) 及び湿式ビーズミル粉碎懸濁液とレバミピドマイクロ粒子懸濁液 (市販同等品) の外観

### 第3項 レバミピドナノ粒子点眼液の外観と安定性評価

回転ホモジナイザー中で晶析を行い、分散/透析した1%HPMC(TC-5)とグリセリンを含む2%レバミピドナノ粒子点眼液を調製した。回転ホモジナイザー中での晶析条件を最適化することで、さらに高い透明性を有するレバミピドナノ粒子点眼液の調製が可能となった。Z-Average size (nm)は106 nmであり、2%液の透過率は59%であった。

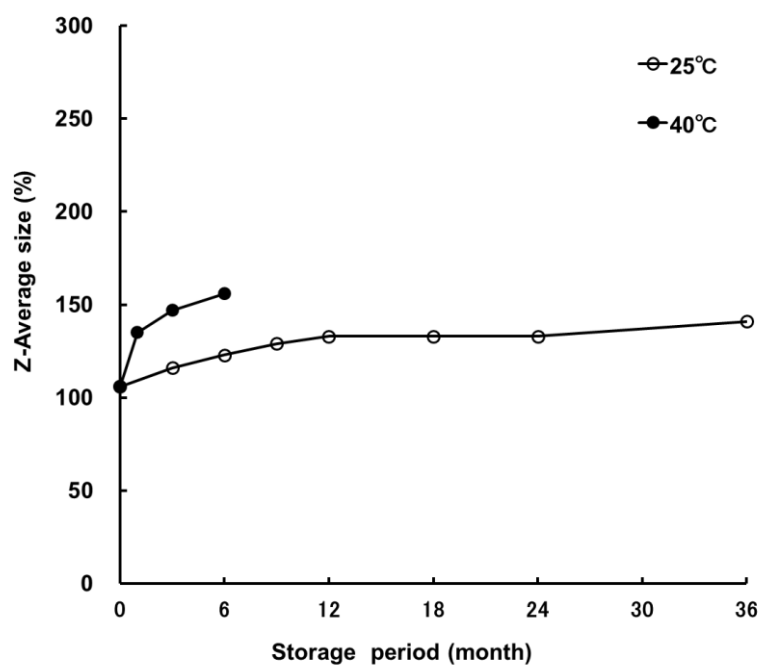
この2%レバミピドナノ粒子点眼液は0.2 μmのフィルターを通過することから、無菌ろ過が可能であった。ろ過前を100%とするところ過後の含量は99.0%であり、含量低下もほとんど認められなかった。無菌ろ過後、点眼用ユニットドーズ容器に充填し、外観を観察した写真を図2-12に示す。レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販同等品）と比較すると明らかに透明性が優れていた。

これらのサンプルを25℃及び、40℃に保管し、長期の安定性を評価した。40℃保管では僅かに粒子径の増大と透過率の低下が認められたが、粒子の沈降等の外観の変化は認められなかった。25℃保管では粒子径の増大と透過率の低下がほとんど認められず、外観の変化もなかった。従って、本剤は、25℃において粒子の凝集や透明性の変化が認められない安定な製剤であることが分かった（図2-13）。



図2-12 レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販同等品）（左）と2%レバミピドナノ粒子結晶点眼液（右）の外観

(A)



(B)

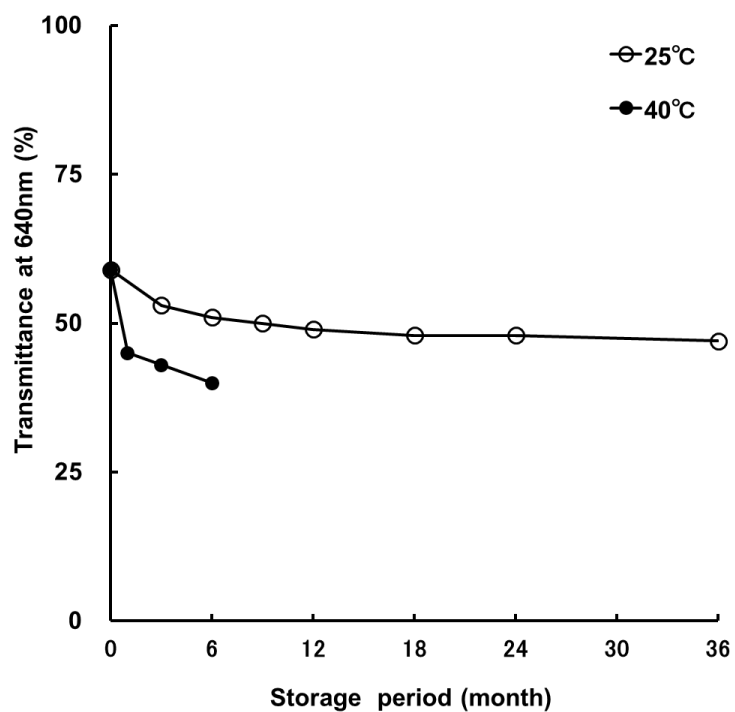


図 2-13 レバミピドナノ粒子点眼液の(A)Z-Average size と(B)640 nm の透過率 (2%懸濁液) の変化 (長期保管)

#### 第4項 レバミピドナノ粒子点眼液をウサギに点眼後の角膜及び結膜内濃度推移

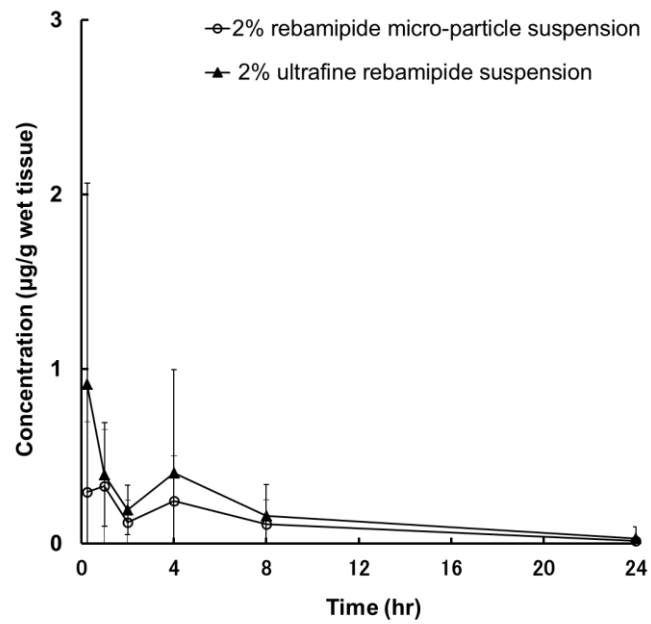
レバミピドの角膜および結膜組織内への分布を評価するために、2%レバミピドナノ粒子点眼液、及び対照として2%レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販同等品）をウサギに1眼当り50 $\mu$ Lの容量で単回点眼後の角膜及び結膜内濃度を測定した。2%レバミピドマイクロ粒子点眼液群の組織内レバミピド濃度は、角膜では1時間でC<sub>max</sub> (0.33  $\mu$ g/g)に、結膜では0.25時間でC<sub>max</sub> (1.13  $\mu$ g/g)に達した（図2-14）。角膜および結膜におけるAUC<sub>24hr</sub>の値は、それぞれ2.61  $\mu$ g $\cdot$ h/gおよび14.1  $\mu$ g $\cdot$ h/gであった（表2-11）。2%レバミピドナノ粒子点眼液群の組織内レバミピド濃度は、角膜では0.25時間でC<sub>max</sub> (0.91  $\mu$ g/g)に、結膜では0.25時間でC<sub>max</sub> (2.08  $\mu$ g/g)に達した。角膜および結膜におけるAUC<sub>24h</sub>の値は、それぞれ4.16  $\mu$ g $\cdot$ h/gおよび16.9  $\mu$ g $\cdot$ h/gであった。個々の値のバラツキは大きいものの、マイクロ粒子点眼液と比較してナノ粒子点眼液の角膜および結膜のC<sub>max</sub>は約2~3倍高く、AUC<sub>24h</sub>は約1.2~1.6倍高かった。

表2-11 2%レバミピドマイクロ粒子点眼液および2%レバミピドナノ粒子点眼液を50 $\mu$ L/眼の容量でウサギに点眼後の角膜および結膜内のレバミピド濃度推移の薬物動態パラメータ

| パラメータ   | 製剤        | 角膜              | 結膜              |
|---|-----------|-----------------|-----------------|
| C <sub>max</sub><br>( $\mu$ g/g)              | マイクロ粒子点眼液 | 0.33 $\pm$ 0.32 | 1.13 $\pm$ 0.75 |
|   | ナノ粒子点眼液   | 0.91 $\pm$ 1.15 | 2.08 $\pm$ 1.18 |
| t <sub>max</sub><br>(h)                       | マイクロ粒子点眼液 | 1               | 0.25            |
|   | ナノ粒子点眼液   | 0.25            | 0.25            |
| t <sub>1/2</sub><br>(h)                       | マイクロ粒子点眼液 | 5.38            | 8.19            |
|   | ナノ粒子点眼液   | 5.56            | 9.04            |
| AUC <sub>24hr</sub><br>( $\mu$ g $\cdot$ h/g) | マイクロ粒子点眼液 | 2.61            | 14.1            |
|   | ナノ粒子点眼液   | 4.16            | 16.9            |
| AUC <sub>inf</sub><br>( $\mu$ g $\cdot$ h/g)  | マイクロ粒子点眼液 | 2.74            | 15.5            |
|   | ナノ粒子点眼液   | 4.38            | 20.2            |

50 $\mu$ L/眼の容量で4匹のウサギの両眼に単回点眼後、各時点（0.25, 1, 2, 4, 8 および 24 時間）のレバミピドの角膜および結膜の濃度をLC-MS / MSにより測定した。薬物動態パラメータは、7~8眼（4匹）の組織濃度の平均値から計算した（n = 7 - 8 眼、4匹）。C<sub>max</sub>の値は平均 $\pm$ S.D.（n = 7-8 眼、4匹）で示した。

(A)



(B)

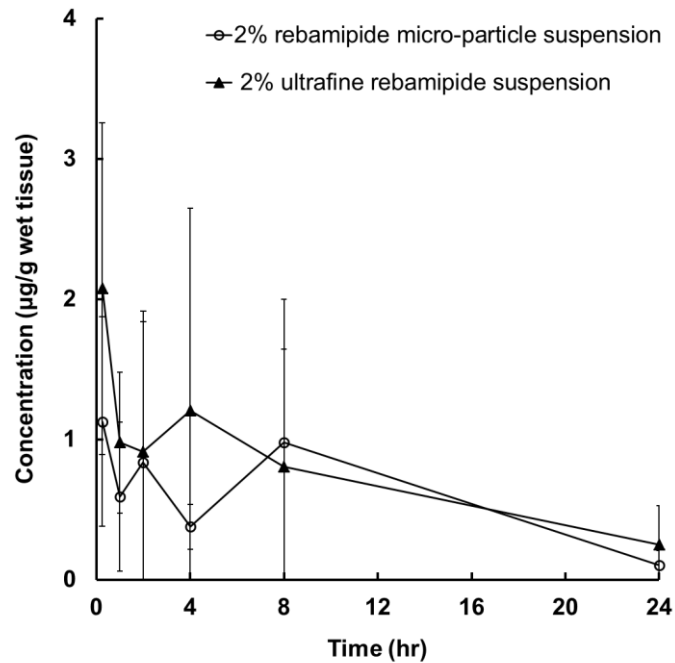


図 2-1 4 2%レバミピドマイクロ粒子点眼液および2%レバミピドナノ粒子点眼液を  $50 \mu\text{L}$ /眼の容量でウサギに点眼後の (A)角膜および(B)結膜内のレバミピド濃度推移 (平均  $\pm$  S.D.,  $n = 7 - 8$  眼)



## 第5項 レバミピドナノ粒子点眼液のウサギ結膜ムチン様物質産生促進作用

レバミピドナノ粒子点眼液のドライアイ治療に対する治療効果を評価するために、正常ウサギにおける結膜ムチン産生促進作用を検討した。レバミピドナノ粒子点眼液（0%、0.1%、0.3%、1%、2%）または2%レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販同等品）を1眼当り50 $\mu$ Lの容量で1日6回14日間さらに15日目に1回、正常ウサギに点眼し、結膜のムチン様物質はAlcian-blue色素結合法を用いて測定した<sup>21)</sup>。

レバミピドナノ粒子点眼液群は、対照の0%群（製剤用溶媒）と比較して、1%、2%群において結膜ムチン様物質の量を有意に増加させた（図2-15）。

ナノ粒子点眼液とマイクロ粒子点眼液の比較では、2%レバミピドマイクロ粒子点眼液（市販同等品）群における結膜ムチン様物質の量は $0.261 \pm 0.007$  O.D. units/gであり、2%レバミピドナノ粒子点眼液群における結膜ムチン様物質の量は $0.276 \pm 0.007$  O.D. units/gであった。2%レバミピドマイクロ粒子点眼液と2%レバミピドナノ粒子点眼液群の結膜ムチン様物質の平均の差に対する90%信頼区間は、 $-0.031 \sim 0.003$  O.D. units/gであった。2%レバミピドマイクロ粒子点眼液の平均値に対する平均値差の比の90%信頼区間は、 $-11.9\% \sim 1.0\%$ であったことから、2%ナノ粒子点眼液と2%マイクロ粒子点眼液の結膜ムチン増加作用は同等であると判断した。

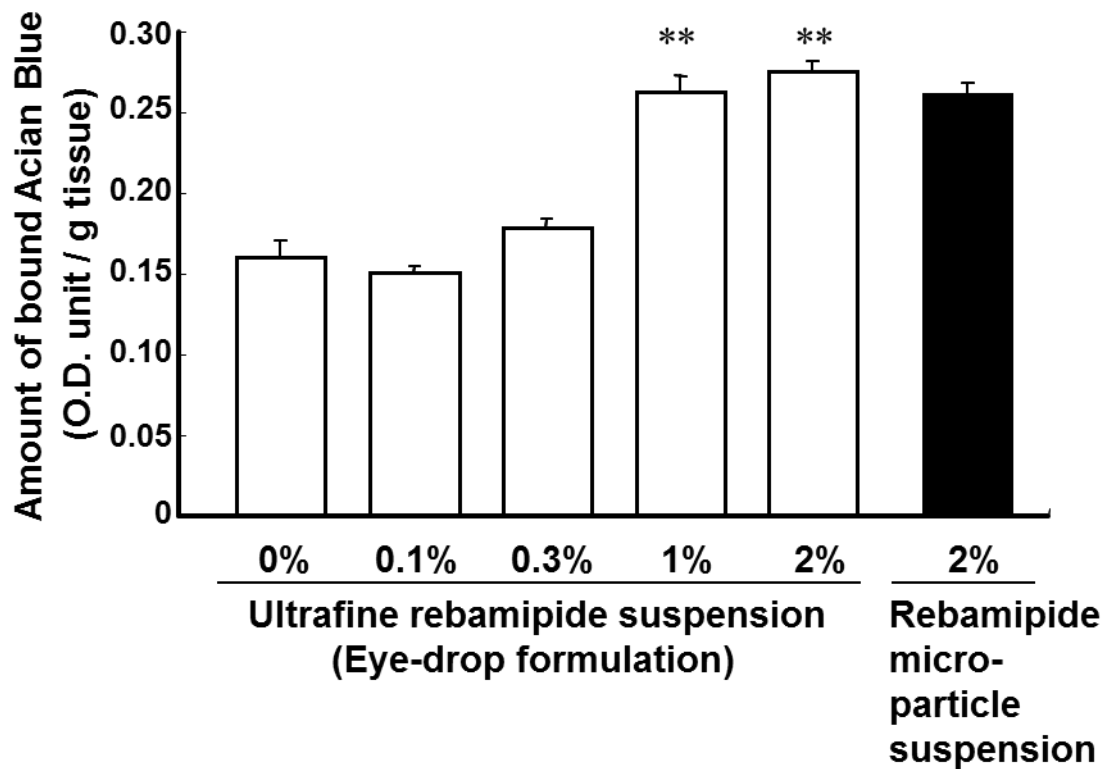


図 2-15 レバミピドナノ粒子点眼液 (0%、0.1%、0.3%、1%、2%) または 2%レバミピドマイクロ粒子点眼液の正常雄ウサギの結膜ムチン様物質産生促進作用

各製剤を、ウサギの両眼に1眼当り 50  $\mu$ L の容量で 1日6回14日間さらに15日目に1回 50  $\mu$ L の容量で両眼に点眼した。データは、平均  $\pm$  S.E. (n = 8) を示す。

\*\* p < 0.01 (0%ナノ粒子点眼液に対して。ダネット検定 (両側))

## 第4節 考察

レバミピドの白色の懸濁点眼液がドライアイの治療薬として販売されているが、粒子の沈降のため点眼前に振とうする必要があるため、点眼直後の霧視も報告されている。また、製造時に無菌ろ過ができないため、点眼液の製造にコストの高い無菌操作が必要である。筆者らは、中和晶析後に分散と透析を行う4ステップの新しいナノ粒子製造方法により、透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液を開発した。このレバミピドのナノ粒子点眼液は、その透明性(図2-12)から市販製剤で問題をされた点眼直後の霧視を防止することが期待される。また、点眼前の振とうのような面倒な作業が必要なく、3年間保管しても粒子の沈降もなく安定な製剤(図2-13)であるため、室温流通可能な製品であるといえる。従って、筆者らが開発したレバミピドナノ粒子点眼液は、患者の利便性とQOLの大幅な改善が期待できることから、服薬アドヒアランスやドライアイ治療の継続にとって好ましい製剤と考えられた。工業的製造の観点からは、大きな製造投資も必要なくスケールアップが容易であり、無菌ろ過可能であることから、高度な無菌保障が必要な無菌原薬を用いた無菌操作法が必要ないということも大きな利点である。加えて、2%レバミピドナノ粒子点眼液の点眼後のレバミピドの角膜および結膜の濃度は、マイクロ粒子点眼液(市販同等品)よりわずかに高く(図2-14)、結膜ムチン様物質の増加作用はマイクロ粒子点眼液と同等であった(図2-15)。従って、筆者らが開発したレバミピドナノ粒子点眼液は、市販のレバミピド点眼液と同等の有効性に加えて、患者の利便性とQOLの大幅な改善が期待できる。以下に本研究で得られた知見について考察する。

筆者らは、まず、一般的に用いられている湿式ビーズミルによる微細化を検討した。しかし、湿式ビーズミルでは、得られた微粒子懸濁液の平均粒子径が100~200 nmであり、懸濁液の性状は、白濁しており、透明性は市販品と大差なかった(図2-11)。透過型電子顕微鏡で観察した粉碎された結晶の形状は、不定形であり、均一でなく、未粉碎の大きな結晶も観察された(図2-9)。

一般的な湿式ビーズミル法では白濁した懸濁液しか得られなかったことから、レバミピド原薬がレバミピド塩の酸処理(中和晶析)により製造され、比較的微粒子の結晶が得られていること(図2-1)に着目して、レバミピドの中和晶析法によるナノ粒子調製の研究に着手した。まず、レバミピドの水酸化ナトリ

ウム溶液（良溶媒）に、塩酸溶液（貧溶媒）を加え、レバミピド水溶液の pH を徐々に中性～酸性にして懸濁液を得た。このようにして得られた懸濁液では、微細な結晶は得られず、長径 10-20  $\mu\text{m}$ 、短径 1-2  $\mu\text{m}$  の針状晶が観察された（データ未収載）。そこで、塩酸溶液（貧溶媒）にレバミピドを含む良溶媒を添加し、レバミピドを急激に pH の低い状態に存在させて晶析させる方法に変更したところ、一次粒子径が約 1  $\mu\text{m}$  の微細な一次粒子が生成した（表 2-3）。晶析時の結晶サイズは、結晶核の数と結晶成長速度に依存する<sup>40)</sup>。レバミピドを急激に pH の低い状態に存在させると、大きな過溶解度が得られることで、多数の結晶核が生成し、微細な一次粒子が生成できたものと考えられた。しかしながら、この方法で得られたレバミピド懸濁液は、粒子が凝集した白濁懸濁液であった。そこで、晶析時における結晶粒子の凝集抑制及び成長抑制を目的に、貧溶媒に高分子ポリマー又は界面活性剤を添加し、レバミピドを晶析した（中間体-1）。その結果、プルロニック F68、CMCNa は中和晶析のみで分散性の良いナノ粒子懸濁液が得られることが判明した（表 2-3）。しかしながら、その懸濁液は白濁しており、透明性は不良であった。一方、低分子量グレードの HPMC (TC-5) と低分子量グレードの PVP (K25) は、晶析後の結晶粒子は凝集するが、一次粒子は微細であり、分散により透明性の高い分散液が得られることが判明した（表 2-4）。一方、高分子量グレードの HPMC (60-SH50) と PVP の高分子グレード (K90) は、結晶成長及び凝集の促進効果が認められた。このように、同じ化学構造を有するポリマーでも、その分子量により、低分子グレードでは結晶成長の抑制が認められるが、高分子グレードでは結晶成長が促進されるということは興味深い現象である。プルロニック F68、CMCNa、HPMC [TC-5]、PVP K25 以外の添加剤は、レバミピド結晶の成長又は結晶の強い凝集が生じた。結晶の成長において、各添加剤は、固有の物理化学的性質や分子量に依存して、異なる作用を示すことが明らかとなった。一般に、結晶化は、溶解した物質を過飽和状態に存在させることで、結晶核が生成し、結晶核が成長することで微結晶が生成し、微結晶がさらに凝集や成長して一次結晶を生成すると言われている<sup>68)</sup>。一次結晶粒子はさらに凝集して二次粒子を生成することもある。本研究において、前述のように、溶解したレバミピドを急激に pH の低い状態に存在させると、大きな過溶解度が得られ、多数の結晶核が生成すると考えられる。微結晶が成長する際、プルロニック F68、CMCNa が存在すると微結晶表面にポリマーが吸着し、微結晶の成長及び凝集を抑制することで微細な一次結晶粒子を生成し、さ

らに二次粒子への凝集も抑制された分散性の良いナノ粒子懸濁液が得られたと考えられた。低分子量グレードの HPMC (TC-5) と PVP (K25) も微結晶に吸着することで結晶成長を抑制し微細な一次結晶粒子を生成するが、後述するように一次結晶粒子が針状又は超針状の粒子形状であったため、一次粒子が強く凝集し二次粒子を形成したと考えられた。一方、HPMC と PVP の高分子グレードでは、大きな一次粒子を生成したことから、多数の微結晶に 1 本の高分子が吸着することで微結晶の凝集や成長を促進した可能性が考えられた。その他の高分子に関しても、同様に微結晶の凝集促進作用、あるいは貧溶媒の粘性の増大による結晶核の生成抑制等により、一次結晶粒子が成長したものと考えられた。

前述のように、HPMC (TC-5) 又は PVP K25 を晶析時の添加剤として使用すると、粒子が凝集した白濁晶析液が得られるが、高速回転式ホモジナイザーによる分散により、粒子径の低下と透明性の向上が認められた。このことから、一次粒子は非常に小さいということが推測された。そこで、晶析液について、効率の高い分散方法を探索した。湿式ビーズミル、高圧ホモジナイザーや薄膜旋回型高速攪拌機による分散を検討したが、顕著な透明性の向上や粒子径の低下は認められなかった (表 2-4 ~ 7)。一方、超高速液-液せん断法を用いると、低分子量グレードの HPMC (TC-5) を用いて晶析した懸濁液は、平均粒子径の低下と顕著な透明性の向上が認められた (表 2-8)。超高速液-液せん断法は、高速で回転するローターによってエネルギーを与えられた祖懸濁液が逆回転するスクリーンのスリットを通過する際に生じるせん断力により、微細分散する方法である<sup>60)</sup> (図 2-7)。この強いせん断により、他の方法では分散されなかった後述する超針状結晶から形成される凝集粒子 (二次粒子) が一次粒子まで分散されたと考えられた。一方、湿式ビーズミル、高圧ホモジナイザーや薄膜旋回型高速攪拌機による分散では、高エネルギーによる液温の上昇等により、粒子の再凝集が生じ、分散に限界が生じたものと考えられた。特に、湿式ビーズミルは一次粒子を粉砕できる大きなエネルギーを与えることが出来るため、医薬品のナノ結晶粒子製造に頻用される分散・粉砕機であるが、粒子の再凝集や再成長も生じやすく、その結果 100~200 nm 付近に粉砕限界が存在する。従って、微細な一次粒子が凝集した二次粒子を分散させる目的のためには、ビーズミルよりも超高速液-液せん断法の方が好ましいと考えられた。

超高速液-液せん断法後のレバミピドナノ粒子分散液 (中間体-2) を高温及びサイクル条件に保管すると、平均粒子径が増大するとともに、透明性が低下

し、粘性の高いゲル状態の性状を示した。これは、中和晶析時に生成する塩化ナトリウムによる塩析効果により、後述する超針状結晶の再凝集が生じた結果、粒子が網目状構造を形成し、ゲル化したものと推定された。そこで、透析により塩化ナトリウムを除去すると、予想外に透析後の透明性が向上した。塩析効果がなくなったことから、ナノ粒子の分散性が向上したものと推定された。透析後のナノ粒子懸濁液は透明性が高く（図 2-1 1）、再凝集がほとんどない安定な懸濁液が得られた（図 2-1 3）。以上のように、中和晶析法にいくつかの改良を加えることで、透明性の高いレバミピドナノ粒子懸濁液を得ることが出来た。透明性の高いナノ粒子懸濁液を得るためのクリティカルな要因は、中和晶析時での添加剤の選択（ステップ 1）、中和晶析時のせん断力（ステップ 2）、分散工程の採用と分散方法（ステップ 3）、及び透析工程の採用（ステップ 4）であった。調製したナノ粒子懸濁液は常温で長期安定であったことから医薬品として室温で流通可能であると考えられた。

次に、得られたナノ粒子懸濁液の粒子形状と結晶形について評価した。1%HPMC (TC-5) を含む 2%レバミピドナノ粒子懸濁液の平均粒子径は約 110 nm まで分散し、その透過率は約 20%と高い値を示した（図 2-8）。一方、1%PVP K25 を含む 2%レバミピドナノ粒子懸濁液の平均粒子径は約 90 nm まで分散したが、その原液の透過率は低い値を示した。ナノ結晶製剤として研究されている医薬品の平均粒子径は通常 100~300 nm の範囲であるが<sup>42)</sup>、両処方共に約 100 nm のナノ粒子が得られているにも関わらず、透明性は著しく異なった。透過型電子顕微鏡での観察では、PVP K25 で晶析したレバミピド結晶の形状は、長径約 200 nm、短径約 40 nm の均一な針状結晶であった。一方、HPMC (TC-5) で晶析したレバミピド結晶の形状は、長径 300 nm 以上 1000 nm 未満、短径約 15 nm の長径と短径の比が 20 を超える特異な超針状結晶であった（図 2-9）。ナノ粒子懸濁液が透明であるためには、可視光に対する散乱が少ないことが条件とされる<sup>69)</sup>。可視光の波長（380~780 nm）よりさらに小さいナノ粒子による散乱は、レーリー散乱が主体となり、可視光波長の 1/4 以下の粒径で急激に散乱が小さくなり透明性を増すことが知られている<sup>70)</sup>。しかし、平均粒子径が約 100 nm であっても、粒度分布を考慮すると 200 nm 以上の粒子も含まれるため、高濃度懸濁液の透明性は一般的に高くない。実際に、湿式ビーズミルで得られたレバミピドナノ粒子懸濁液の平均粒子径は 100~200 nm であったが、その性状は白濁しており、透明性はマイクロ粒子懸濁液（市販品）と大差なかった。この原因として、可視

光に対して一部の粉碎不良の大粒子（図2-9）が散乱を生じるためだと考えられた。一方、本研究において、HPMC(TC-5)で晶析したレバミピド懸濁液の透明性は顕著に高かった。その原因として、レバミピドナノ粒子の形状が、長径と短径の比が20を超える超針状結晶であるため、可視光に対する散乱が抑えられたことが考えられた。一方、粉末X線回折のパターン（図2-10）から、両処方（TC-5又はPVP K25）のナノ粒子懸濁液ともにレバミピド原薬と同一結晶形が維持されていると示唆された。結晶形が同一にも関わらず、結晶の形状が晶析時に共存する高分子により異なるのは興味深い現象である。結晶が成長する際に、結晶の成長点に高分子が作用し、結晶の成長方向に影響を与えた可能性が考えられた。PVP K25によってレバミピド原薬（図2-1）と同様の形態の針状ナノ結晶が得られた原因として、PVP K25が微結晶全体に吸着することで、等方的に結晶成長を抑制したためと考えられた。一方、TC-5では、長径面にTC-5が選択的に吸着することにより、粒子が異方的に成長し、特異な超針状結晶が形成された可能性が考えられた。TC-5の濃度が高くなるほど、粒子径に差は認められないが透明性が向上した（図2-8, 11）。その原因としてTC-5の微結晶への吸着量が増加することで、結晶成長の異方性が高まり、透明性の高い結晶形状が得られた可能性が考えられた。また、晶析時に高速回転式ホモジナイザーでせん断力を加えることで、粒子径はほぼ同じであるが、高い透明性を示す懸濁液が得られた。この原因も、晶析時のせん断力により結晶成長の異方性が高まり透明性の高い結晶形状が得られた可能性が考えられた。ナノ粒子の粉末X線回折のパターンのピークがブロードであった原因としては、粒子サイズが約100 nmとナノ粒子であることと、結晶粒子にHPMC(TC-5)又はPVP K25が付着し除去できないためであると推定している。

Kassem MAらは、ナノ粒子懸濁点眼液が、マイクロ粒子懸濁点眼液と比較して、眼組織の吸収及び薬理活性を増強することを報告している<sup>71)</sup>。本研究におけるレバミピドナノ粒子点眼液もマイクロ粒子点眼液と比較して、レバミピドの角膜・結膜組織濃度がわずかに高かった。難溶性薬物の超微細化により、薬物の比表面積は増大し、溶解速度が高まることが知られている<sup>43)</sup>。従って、前眼部の表面上に残存しているナノ粒子はマイクロ粒子よりも溶解速度が速いと予想されることから、投与直後の角膜結膜組織中のレバミピド濃度は、マイクロ粒子点眼液よりもレバミピドナノ粒子点眼液が高くなったと考えられた（図2-14）。一方、2%レバミピドナノ粒子点眼液と2%レバミピドマイクロ粒子点眼

液の結膜のムチン様物質産生作用は同等であった（図 2-15）。ナノ粒子点眼液を点眼後のレバミピドの角膜・結膜組織濃度は、マイクロ粒子点眼液と比較して、わずかに高かったが、この程度の組織濃度の差は、結膜のムチン様物質産生作用に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。また、2%ナノ粒子点眼液と 2%マイクロ粒子点眼液のウサギの結膜ムチン様物質産生促進作用は共に最大作用に達していたため、両製剤の作用に差が認められなかった可能性も考えられた（図 2-15 及び文献 21 参照）。



## 第5節 小括

レバミピドを有効成分とした懸濁液がドライアイ治療薬として使用されているが、点眼直後の霧視等が問題視されている。本章において、レバミピド懸濁液の透明性の向上を目的に、レバミピドのナノ粒子点眼液の開発を行った。種々の添加剤を用いた中和晶析法を用いてレバミピドのナノ粒子懸濁液を調製したが、透明性に優れる懸濁液は得られなかった。そこで、添加剤の選択、晶析時のプロセスパラメーター、分散方法、および透析工程の追加などの中和晶析方法を改善することにより、非常に透明なレバミピドナノ粒子点眼液（640 nm の透過率：59%）を得ることが出来た。この透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液は、25℃で3年間保管しても、ほとんど変化が見られない安定な懸濁液であった。2%ナノ粒子点眼液を点眼後のレバミピドの角膜および結膜内の濃度は、マイクロ粒子点眼液（市販同等品）よりわずかに高かったが、2%ナノ粒子レバミピド点眼液の結膜ムチン様物質の増加作用は、マイクロ粒子点眼液と同等であった。筆者らが開発した透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液は、市販のムコスタ<sup>®</sup>点眼液と同等の有効性が期待されることに加えて、点眼直後の霧視を防止すること等によって患者のQOLを改善することが期待される。

### 第3章 レバミピドナノ粒子液剤の口腔粘膜組織移行性及びラッ

#### ト口腔内潰瘍に対する治癒促進効果

##### 第1節 緒言

がんの治療に伴う口腔粘膜炎は、発生頻度の比較的高い副作用である<sup>32)</sup>。口腔粘膜炎は、がん治療中の患者のクオリティ・オブ・ライフ (QOL) を著しく低下させる重要な有害事象であるにもかかわらず、未だ有効な予防・治療法が開発されていない<sup>29)</sup>。通常の抗がん剤使用時には30-40%、大量の抗がん剤が使用される造血幹細胞移植時には70-90%、抗がん剤と頭頸部への放射線治療が併用される頭頸部がんではほぼ全ての患者に、口腔粘膜炎が発症すると報告されている<sup>34)</sup>。口腔粘膜炎は疼痛を伴い、摂食障害や嚥下障害を引き起こし、その結果、患者の栄養状況が低下し、がん治療効果にも影響する可能性が高い。また、口腔粘膜炎により口腔内が不衛生となって細菌増殖が生じ、誤嚥性肺炎や敗血症等の致命的な合併症の原因にもなりうる。このように、がん治療に伴う口腔粘膜炎は、患者のQOLの低下のみならず、がん治療効果の低下にまで至る重要な問題となっている。従って、がん治療に伴う口腔粘膜炎に対する有効な治療法が望まれている。

レバミピドは、粘膜保護作用を有する薬剤であり、フリーラジカル抑制作用<sup>7-9)</sup>、炎症性サイトカイン産生抑制作用<sup>13-15)</sup>等の様々な薬理作用を有するため、がん治療に伴う口腔粘膜炎にも効果が期待されている。がん治療前にレバミピドを含む含嗽液で含嗽することにより、放射線療法による口腔粘膜炎の予防に効果があることが臨床の医師主導研究において報告されている<sup>35-39)</sup>。しかし、それらは探索的臨床研究に留まっており、明確な効果を臨床試験で統計学的に証明するためには、さらに有効性の高い製剤の開発が期待される。尚、これまで報告されているレバミピドを含む含嗽液は、レバミピドはいずれも錠剤又は原薬を懸濁させた院内製剤であり、通常のマクロ粒子の低濃度(0.1%又は0.2%)懸濁液である。レバミピドの様々な薬理作用として、胃粘膜の内因性プロスタグランジン増加作用<sup>4-6)</sup>、及び、フリーラジカル抑制作用<sup>7-9)</sup>、好中球活性化の抑制作用<sup>10-12)</sup>、単核球や胃粘膜、血管内皮細胞からの炎症性サイトカイン産生抑制作用<sup>13-15)</sup>等、が知られているが、in vitroにおいて、これらの作用を得るた

めには  $10^{-6}\text{M}$  ( $0.37 \mu\text{g/g}$ )  $\sim$   $10^{-4}\text{M}$  ( $37 \mu\text{g/g}$ ) の濃度が必要とされている<sup>3, 7, 12, 13, 17</sup>)。経口投与後レバミピドは胃粘膜に高濃度分布することが知られており、慢性胃炎患者にレバミピド 100 mg を単回投与後の平均胃粘膜内薬物濃度 (投与後 30 ~ 120 分) は  $60.0 \pm 109.8 \mu\text{g/g}$  であり、平均血清中薬物濃度 (投与後 30 ~ 120 分) が  $0.25 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$  であったことが報告されている<sup>72</sup>)。すなわち、胃粘膜内薬物濃度では *in vitro* における薬理作用が期待される濃度が分布するが、血清中薬物濃度では薬理作用が期待される濃度が得られないことから、胃炎・胃潰瘍に対するレバミピドの効果は胃粘膜中に直接分布するレバミピド濃度が重要であることが示唆されている<sup>72</sup>)。レバミピドの口腔粘膜炎に対する治療・予防効果に対しても、胃炎・胃潰瘍同様にレバミピドの口腔粘膜内への直接的な分布が重要であると考えられるが、前述のように、これまでの探索的臨床試験におけるレバミピド製剤は低濃度のマイクロ粒子懸濁液であり、レバミピドの口腔内への分布を高めることを企図した製剤ではなかった。そこで、口腔粘膜へのレバミピドの直接的な分布を高める製剤を開発すれば、レバミピドの口腔粘膜炎に対する有効性が向上する可能性が考えられた。

オートラジオグラフィーを用いた研究において、レバミピドは正常胃粘膜では表層上皮細胞、酢酸潰瘍作製後の胃粘膜では粘膜固有層に浸潤し、炎症性細胞への特異的な結合が報告されている<sup>73</sup>)。また、約 300 nm 以下の粒子径を有するナノ粒子は、大腸炎等において炎症部の粘膜への吸着及び浸透が報告されている<sup>74</sup>)。そこで、第 2 章で開発したレバミピドナノ粒子製剤を口腔内投与液剤に適用すれば、レバミピドの口腔粘膜への高い分布が実現できるのではないかと期待し、本章では、レバミピドナノ粒子液剤の口腔粘膜組織移行性及びラット口腔内潰瘍に対する治癒促進効果を評価した。

まず、口腔組織内における局所のレバミピドの分布を評価するために、レバミピドの蛍光を利用してレバミピドの口腔組織中の分布を視覚的に評価することを試みた。さらに、定量的な口腔組織移行性の評価として、レバミピドナノ粒子製剤とマイクロ粒子製剤をラット口腔内投与後の口腔粘膜内レバミピド濃度を測定した。最後に、焼灼により惹起したラット口腔内潰瘍モデルに対するレバミピドナノ粒子製剤とマイクロ粒子製剤の治癒促進効果を評価した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 第1項 実験材料

#### (1) 試薬

使用した主な試薬を表3-1に示した。

表3-1 試薬

| 試薬名   | 製造元                                   |
|---|---------------------------------------|
| レバミピド   | 大塚製薬(株) (東京、日本)                       |
| ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)<br>グレード(低分子量グレード) :TC-5                            | 信越化学工業(株) (東京、日本)                     |
| ポリビニルピロリドン (PVP)<br>グレード(低分子量グレード) :PVP K25, K30<br>グレード(高分子量グレード) :PVP K90 | B A S F<br>(Land Rheinland-Pfalz、ドイツ) |
| カルボキシメチルセルロースナトリウム<br>(CMCNa) グレード:7L2P                                     | Ashland (Kentucky、米国)                 |
| カルボキシメチルセルロースナトリウム<br>(CMCNa) グレード:PR-S                                     | 第一工業製薬(株) (京都、日本)                     |
| プルラン  | (株) 林原 (岡山、日本)                        |
| D-ソルビトール  | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |
| グリセリン   | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |
| 塩酸  | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |
| 水酸化ナトリウム  | 和光純薬工業(株) (大阪、日本)                     |

## (2) 機器

使用した主な機器を表 3-2 に示した。

表 3-2 使用機器

| 機器名               | 型番               | 製造元                           |
|-------------------|------------------|-------------------------------|
| 超高速液-液せん断式ホモジナイザー | クレアミックスダブルモーション  | エム・テクニク (株)<br>(大阪、日本)        |
| 透析装置              | ペリコン 2 ミニ        | メルクミリポア<br>(Massachusetts、米国) |
| インライン式回転式ホモジナイザー  | クレアミックスシングルモーション | エム・テクニク (株)<br>(大阪、日本)        |
| 蛍光顕微鏡             | BZ-9000          | (株) キーエンス<br>(大阪、日本)          |
| LC/MS/MS システム     | API 4000         | (株) エービー・サイエックス<br>(東京、日本)    |

## (3) 動物

ラットは、SD 系雄性ラット (SPF グレード、日本チャールズリバー、日野、日本) を使用した。飼育条件に関しては、温度は  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は  $60 \pm 10\%$ 、照明は 12 時間毎に照明と消灯を行った。餌は CRF-1 (オリエンタル酵母、東京、日本) を、水は水道水を自由摂取とした。本試験に使用される動物は、「大塚製薬株式会社 動物実験指針」に従って取り扱われた。

## 第2項 実験方法

### (1) 蛍光を用いたレバミピドの視覚的な舌組織中の分布評価

#### (A) 被験製剤

「正常ラット及び物理障害ラットの舌組織中の蛍光観察」に用いた被験製剤は、第2章第2項レバミピドナノ粒子懸濁液の調製方法に従い PVP K30 を分散剤として調製したレバミピドナノ粒子懸濁液に、増粘剤 (PVP K90 とプルラン)、甘味料、保存剤、等張化剤、及び香料を添加した 2%レバミピドナノ粒子液剤及びその製剤用溶媒 (レバミピドを除いた溶媒) である。

「異なった特性を有するレバミピド液剤投与後の正常ラットの舌組織中のレバミピドの蛍光観察」に用いた被験製剤の組成を表 3-3 に示す。PVP K30 を分散剤として、第2章第2項レバミピドナノ粒子懸濁液の調製方法に従い調製したレバミピドナノ粒子懸濁液に、等張化剤 (ソルビトール) を添加したものを 4%レバミピドナノ粒子液剤 (粘性なし)、等張化剤 (ソルビトール) 及び増粘剤 (PVP K90 とプルラン) を添加したものを 4%レバミピドナノ粒子液剤 (粘性あり) として調製し、使用した。又、表 3-3 に示したレバミピドを除いた溶液を調製し、その溶液にレバミピド原薬を添加し懸濁したものを 4%レバミピドマイクロ粒子液剤 (粘性なし) 及び 4%レバミピドマイクロ粒子液剤 (粘性あり) として調製し、使用した。「放射線障害ラットの舌組織中の蛍光観察」に用いた被験製剤は、4%レバミピドナノ粒子液剤 (粘性あり) を使用した。

表 3-3 レバミピドナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤 (粘性あり/粘性なし) 及び製剤用溶媒の組成

|         | 粘性あり液剤 |        |       | 粘性なし液剤 |        |       |
|---------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|
|         | ナノ粒子   | マイクロ粒子 | 製剤用溶媒 | ナノ粒子   | マイクロ粒子 | 製剤用溶媒 |
| レバミピド   | 4%     | 4%     | -     | 4%     | 4%     | -     |
| PVP K30 | 2%     | 2%     | 2%    | 2%     | 2%     | 2%    |
| PVP K90 | 1%     | 1%     | 1%    | -      | -      | -     |
| プルラン    | 2%     | 2%     | 2%    | -      | -      | -     |
| ソルビトール  | 3.8%   | 3.8%   | 3.8%  | 3.8%   | 3.8%   | 3.8%  |

## (B) 舌組織切片の作成

①「正常ラットの舌組織の蛍光観察」では、上記2%レバミピドナノ粒子液剤を塗布した後、舌を切除し、採取した組織を用いた。

②「物理障害ラットの舌組織の蛍光観察」では、ブラシにより舌表面を傷つけた後に上記2%レバミピドナノ粒子液剤と製剤用溶媒を塗布した後、舌を切除し、採取した組織を用いた。

③「放射線障害ラットの舌組織中の蛍光観察」では、以下のように放射線を照射後に採取した舌組織を用いた<sup>75)</sup>。すなわち、ペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg 腹腔内投与にて麻酔したラットを口吻部（眼から先の部位）のみ露出するよう専用鉛板（厚さ 0.5 mm）で2重に被覆し、X線照射装置を用いて口吻部に15 Gyの照射線量を単回照射した。照射7日後に、4%レバミピドナノ粒子液剤（粘性あり）と製剤用溶媒を0.5 mL/kgの用量でゆっくりと垂らすように口腔内に投与した。投与薬剤の組成は表3-3に示した。投与5分後にラットを放血致死させ舌組織を採取した。

④「異なった特性を有するレバミピド液剤投与後の正常ラットの舌組織中のレバミピドの蛍光観察」では、4%レバミピドナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤（粘性あり/粘性なし）及び製剤用溶媒を0.5 mL/kgの用量でゆっくりと垂らすようにラット口腔内に投与した。これらの投与薬剤の組成は表3-3に示した。各薬剤を投与5分後にラットを放血致死させ舌組織を採取した。摘出した舌はOptimal Cutting Temperature Compound (Tissue-Tek、SAKURA)に包埋、凍結させた。Cryostatを用いて-20°Cにおいて4 μmの凍結切片を作製した。

## (C) 舌組織中のレバミピドの蛍光観察

作成した切片をレバミピド蛍光検出用フィルターを装着した蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE 社)を用いて観察した。露光時間は、バックグラウンドが抑えられる条件として、倍率が200倍のとき、明視野露光時間として1/450 s、蛍光露光時間として1/20 sを設定し、観察を行った。

(2) レバミピドナノ粒子液剤のラット口腔粘膜組織内濃度推移

(A) 被験製剤

第2章第2項レバミピドナノ粒子懸濁液の調製方法に従い、添加剤を1%HPMC(TC-5)、1%PVP K25、又は1%CMCNa(7L2P)とし、3種類の2%ナノ粒子懸濁液を得た。得られた1%HPMC(TC-5)と1%PVP K25のナノ粒子懸濁液には粘性補助剤として3%PVP K90を添加した。1%CMCNa(7L2P)のナノ粒子懸濁液には粘性補助剤として3%CMCNa(PR-S)を添加した。また比較対照として、5%PVP K90と2.5%グリセリンを溶解した媒体溶液にレバミピド原末を懸濁し、2%レバミピドマイクロ粒子液剤を調製した。

表3-4 被験製剤（レバミピドナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤）の組成

| 製剤名   | ナノ粒子液剤<br>(HPMC) | ナノ粒子液剤<br>(PVP) | ナノ粒子液剤<br>(CMCNa) | マイクロ粒子<br>液剤 |
|-------|------------------|-----------------|-------------------|--------------|
| レバミピド | 2%               | 2%              | 2%                | 2%           |
| 分散剤   | 1% HPMC(TC-5)    | 1% PVP K25      | 1% CMCNa(7L2P)    | 5% PVP K90   |
| 増粘剤   | 3% PVP K90       | 3% PVP K90      | 3% CMCNa(PR-S)    |              |
| 等張化剤  | 4.7% ソルビトール      | 0.9% NaCl       | 0.9% NaCl         | 2.5% グリセリン   |

(B) 口腔内投与方法及び頬組織中のレバミピド濃度の測定

表3-4に示した3種類の2%レバミピドナノ粒子液剤と対照の2%レバミピドマイクロ粒子液剤をエーテル麻酔下にて、開口器を用いて口を大きく開いた状態で、9週齢のSD系雄性ラットの口腔内に0.5 mL/kgの容量にて経口投与ゾンデを用いて投与した（レバミピドとして10 mg/kg）。各薬剤を投与5、15、30、60、120分後にエーテル麻酔下にて、腹部大動静脈を切断して放血により安楽死させた後、頬粘膜組織を採取した。頬粘膜組織は上顎から下顎までの上皮から下織と筋層の一部までを採取した。生理食塩水で表面に付着した薬剤や血液などを洗浄後、ペーパータオルで表面に付着した水分を除き、組織懸濁液の作製まで-20℃以下にて凍結保存した。頬粘膜組織は湿重量を測定後、氷冷した蒸留水を9倍量(weight/volume)加え、ガラスホモジナイザーを用いて、約1500 rpmで組織片が認められなくなるまで氷冷下ホモジナイズした。調製した頬粘膜組織の10%懸濁液はレバミピド濃度測定まで-20℃以下にて凍結保存した。頬粘膜組織懸濁液中のレバミピド濃度は、LC/MS/MS法を用い測定した<sup>58)</sup>。無処置のラ



ットから採取した頬粘膜組織懸濁液を用いて検量線を作成し、検体中のレバミピド濃度を WinNonlin ver. 5.2. (Pharsight)を用い算出した。得られたデータは平均±標準誤差 (S. D.) で示した。2%レバミピドマイクロ粒子液剤に対する3種類の2%レバミピドナノ粒子液剤の口腔粘膜内濃度推移の比較は、二元配置分散分析 (ANOVA) を行った後、Dunnett 検定 (両側) を行った。統計解析は SAS ソフトウェア (リリース 9.1、SAS Institute Japan) を用いて行った。p 値が 0.05 未満を有意とした。

### (3) 焼灼によるラット口腔粘膜炎モデルにおけるレバミピドナノ粒子液剤の潰瘍面積抑制効果の検討

モノポーラーによる焼灼法によってラット口腔内潰瘍を惹起した<sup>76)</sup>。即ち、7週齢のSD系雄性ラットをイソフルラン吸入麻酔後、仰向けにし、開胸器を用いて上顎と下顎を開けて左側口腔粘膜の中央部に先端の直径が2 mmのモノポーラーを当て焼灼することにより口腔内潰瘍を惹起した。焼灼後は飼育ケージに戻し、自然覚醒させた。

口腔内潰瘍惹起日をDay 0とした。口腔内潰瘍惹起2日後 (Day 2) に、体重に基づいて層別無作為抽出法により群分けを行った。口腔内潰瘍を惹起した3日後 (Day 3) から、2%レバミピドナノ粒子液剤 (CMCNa) 又は対照の2%レバミピドマイクロ液剤 (CMCNa) とそれぞれの製剤用溶媒 (レバミピドを除いた溶媒) (表3-5) を0.5 mL/kgの用量で口腔内又は胃内に1日2回あるいは1日4回、5日間投与した。口腔内投与方法としては、イソフルラン吸入により麻酔したラットを左側臥位に寝かせ、ピンセットまたは開胸器を用いて口腔を開いた状態で固定し、潰瘍を作製した左頬に溶液を投与した。胃内投与は、経口投与用ゾンデを用い、0.5 mL/kgの用量で胃内に投与した。

Day 8における潰瘍面をデジタルカメラで撮影し、面積解析ソフト (WinROOF ver. 5.7.2、三谷商事、日本、東京) を用いて口腔内潰瘍面積を測定した。得られたデータは平均±標準誤差 (S. E.) で示した。口腔内潰瘍面積に関して、製剤用溶媒群と各レバミピド製剤群間の比較を、対応のない t 検定 (両側) で行った。統計解析はSASソフトウェア (リリース9.1、SAS Institute Japan) を用いて行った。p値が0.05未満を有意とした。

表3-5 被験製剤 (レバミピドナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤) の組成

| 製剤名   | ナノ粒子液剤<br>(CMCNa) | マイクロ粒子液剤<br>(CMCNa) |
|-------|-------------------|---------------------|
| レバミピド | 2%                | 2%                  |
| 分散剤   | 1% CMCNa (7L2P)   | 1% CMCNa (7L2P)     |
| 増粘剤   | 3% CMCNa (PR-S)   | 3% CMCNa (PR-S)     |
| 等張化剤  | 4% ソルビトール         | 4% ソルビトール           |

### 第3節 実験結果

#### 第1項 蛍光を用いたレバミピドの視覚的な舌組織中の分布評価

##### (1) レバミピドの蛍光の検出

レバミピドは化合物自身に弱い蛍光を持つことが知られており、それを利用することで、口腔粘膜組織中での分布を評価することを試みた。しかし、レバミピドの蛍光波長は極めて低波長領域(励起波長 330 nm、蛍光波長 370 nm)に存在するため、通常のフィルターセットでは顕微鏡下で蛍光を検出できなかった。そこで、レバミピド由来の蛍光を測定するために、新たに励起波長 330 nm、蛍光波長 400 nm のフィルター (図 3-1) を作成した。

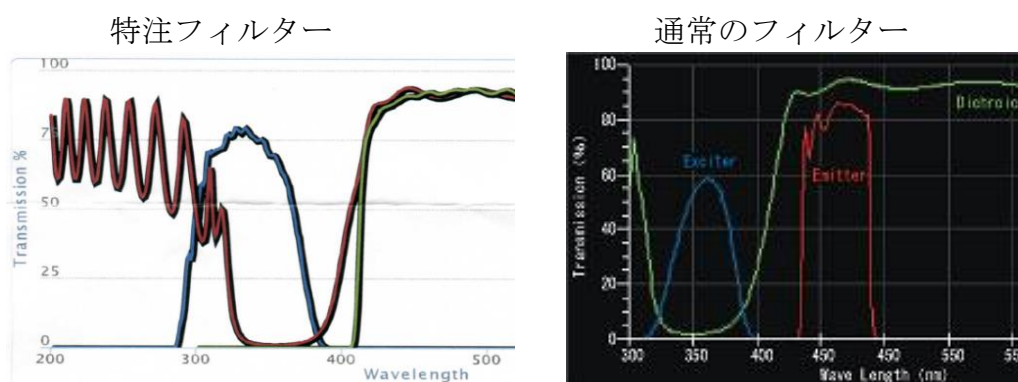


図 3-1 蛍光フィルターの励起波長(青)および蛍光波長(赤)

ディッシュに等量の精製水及びレバミピド液剤を加え、上記レバミピド蛍光検出用フィルターを装着した蛍光顕微鏡で直接観察した(図 3-2)。精製水よりもレバミピド液剤は蛍光が強く観察されたことから、レバミピド由来の蛍光が検出できていると判断した。

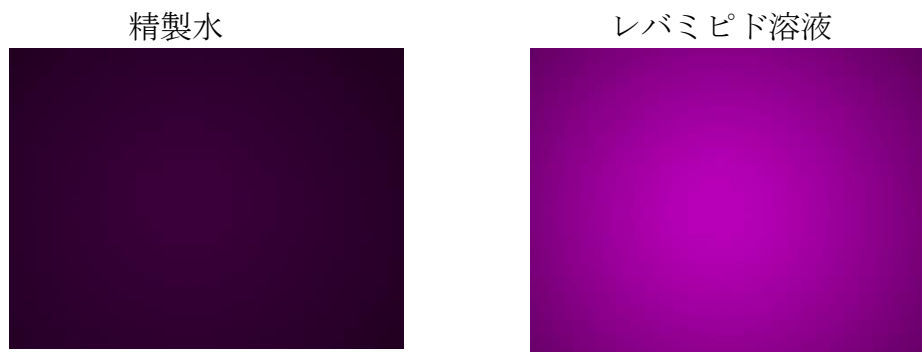


図 3-2 レバミピド溶液由来の蛍光の検出

(2) 正常ラット舌組織中のレバミピドの蛍光観察

無処置群で組織の自家蛍光（バックグラウンド）が抑えられる露光時間を設定したところ、倍率は 200 倍、明視野露光時間は 1/450 s、蛍光露光時間は 1/20 s が適切であることが分かった（図 3-3）。従って、蛍光観察は、この条件で実施した。

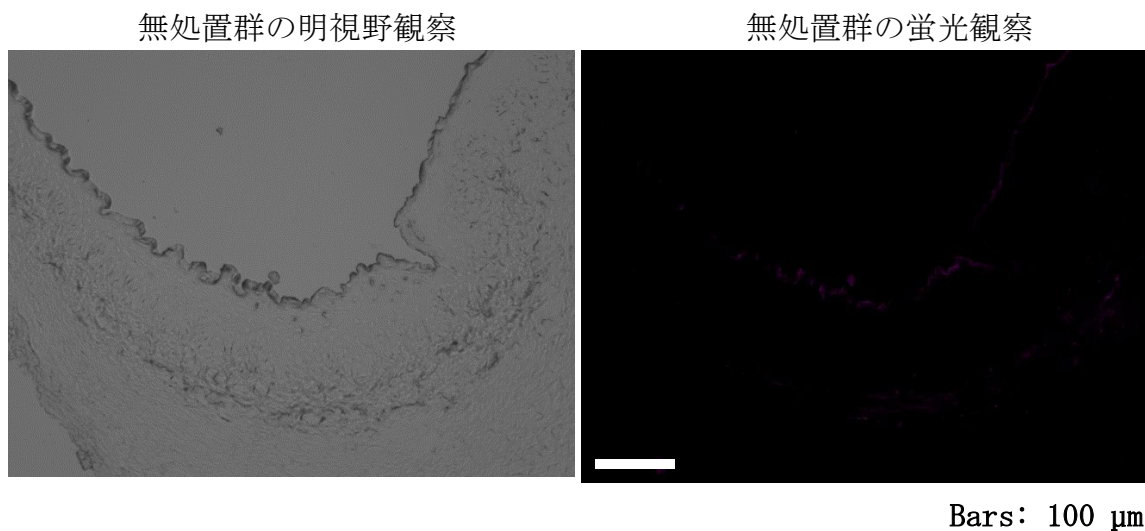


図 3-3 無処置群の舌組織における蛍光の検出

次に、レバミピドナノ粒子液剤を塗布した正常のラット舌について、先に決定した条件で観察を行った。その結果、正常な舌表面において、レバミピド由来の蛍光が観察された（図3-4）。このことから、レバミピドが正常な舌表面に分布することが確認された。

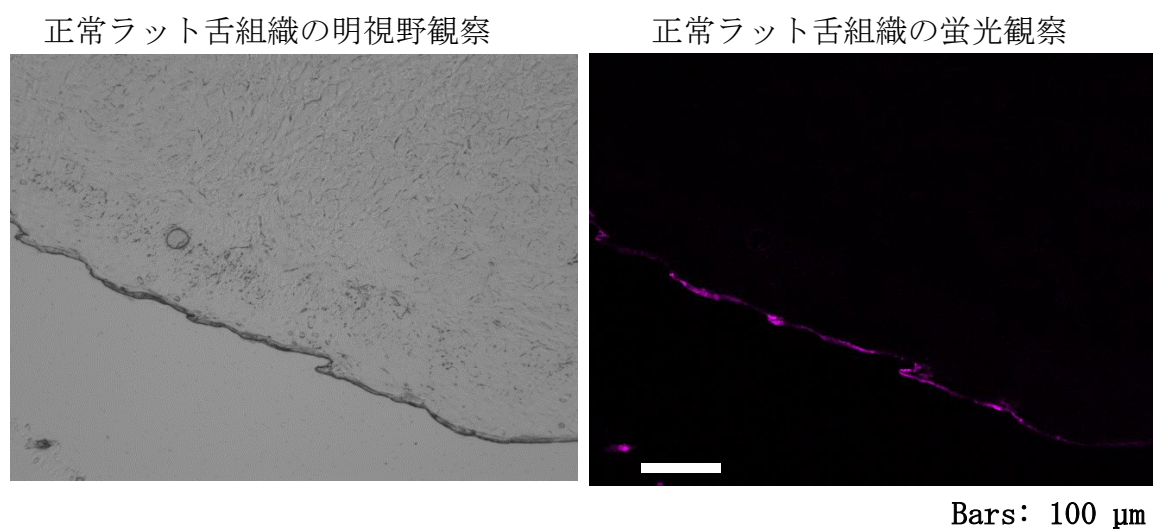


図3-4 レバミピド液剤を塗布後の正常ラット舌組織における蛍光の検出

### (3) 物理障害ラット舌組織中のレバミピドの蛍光観察 (予備試験)

障害部位に対するレバミピドの分布を評価するための予備的な試験として、ブラシによって物理的に傷をつけた舌にレバミピドナノ粒子液剤を塗布したサンプルについて、同様の条件で観察を行った (図3-5)。その結果、前述の正常ラット舌と比較して、傷を付けた部位は蛍光が多く検出され、レバミピドは傷を付けた部位により分布することが確認された。

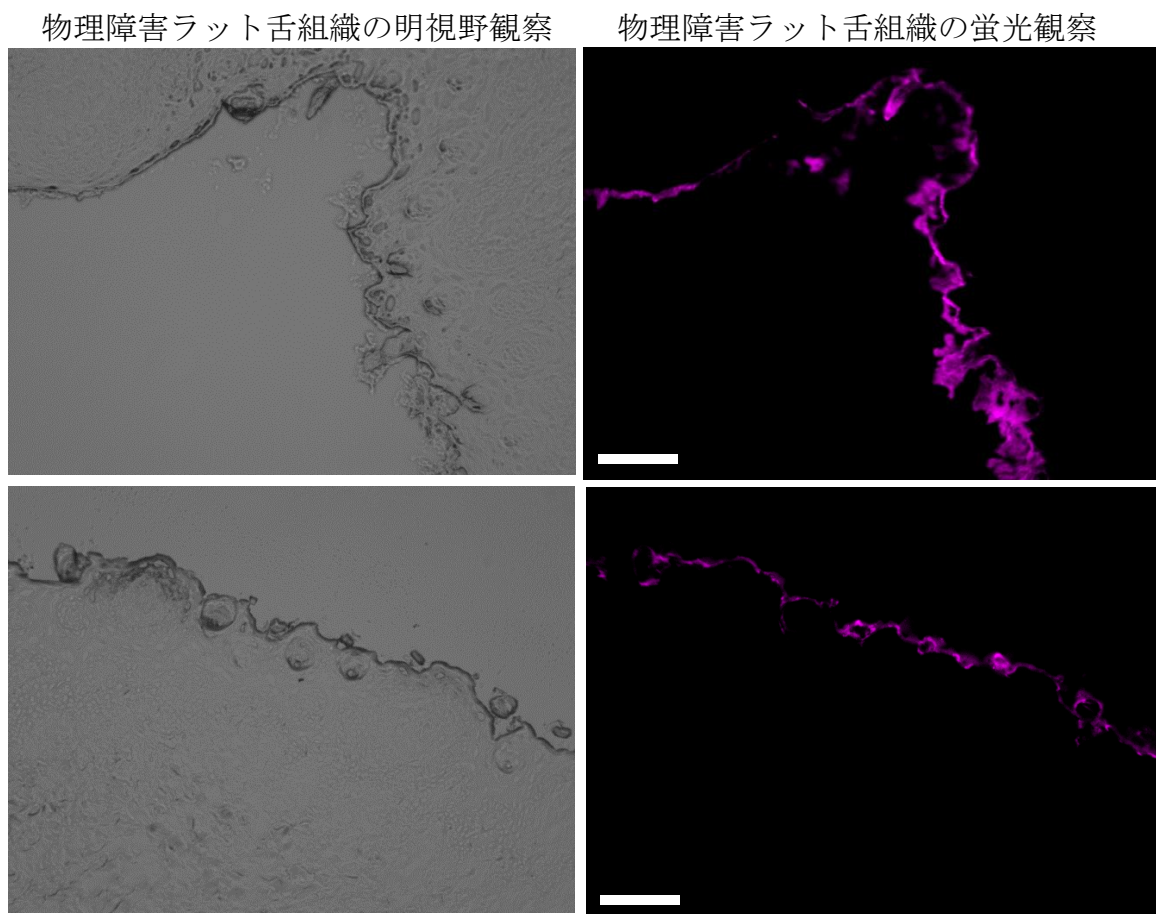


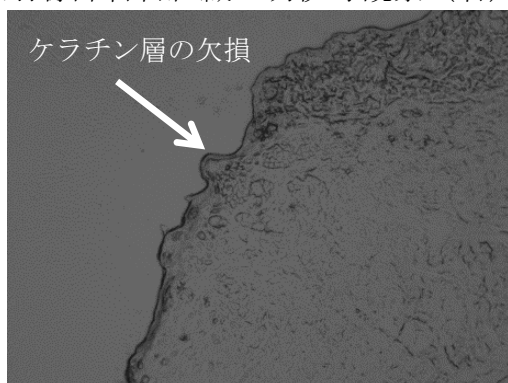
図3-5 レバミピド液剤を塗布後の物理障害ラット舌組織における蛍光の検出

#### (4) 放射線障害ラット舌組織中のレバミピドの蛍光観察

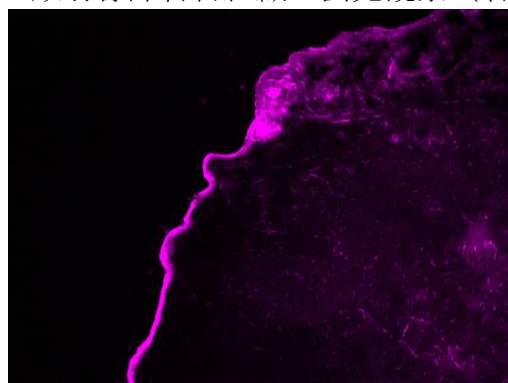
X線照射装置を用いて口吻部に15 Gyの照射線量を単回照射し、障害がピークとなる照射7日後に、4%レバミピドナノ粒子液剤（粘性あり）と製剤用溶媒を口腔内に投与し、投与5分後の舌組織を採取し蛍光観察を行った。

放射線障害舌の明視野観察において、舌の右側と左側で障害の程度が異なっており、舌の右側ではケラチン層が欠損していることから放射線による粘膜上皮の障害が認められたが、左側はケラチン層が残存していることから比較的障害が低いと考えられた（図3-6）。蛍光観察では、障害が認められた右側の舌では、舌組織内へのレバミピドの顕著な分布を示す像を得ることができたが、ケラチン層が残存していた左側の舌組織では、レバミピドの舌表面の分布は低い傾向にあった（図3-6）。従って、高い放射線障害を生じている部位において、レバミピドのナノ粒子が吸着し、顕著に分布しやすいことが確認された。

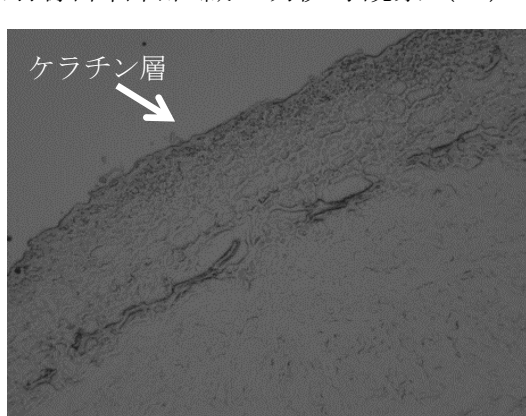
放射線障害舌組織の明視野観察（右）



放射線障害舌組織の蛍光観察（右）



放射線障害舌組織の明視野観察（左）



放射線障害舌組織の蛍光観察（左）

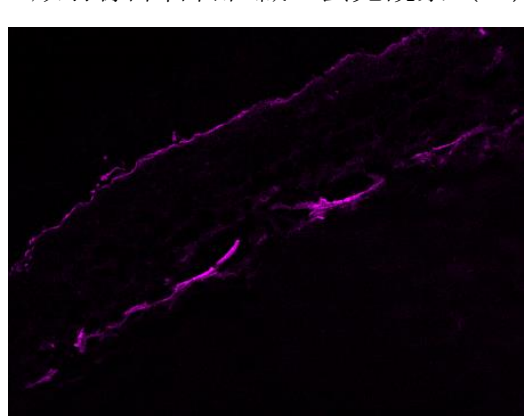
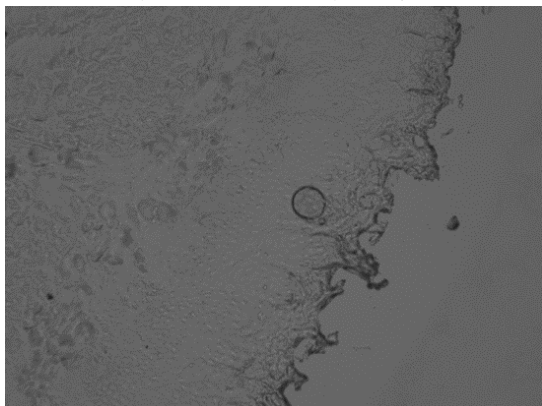


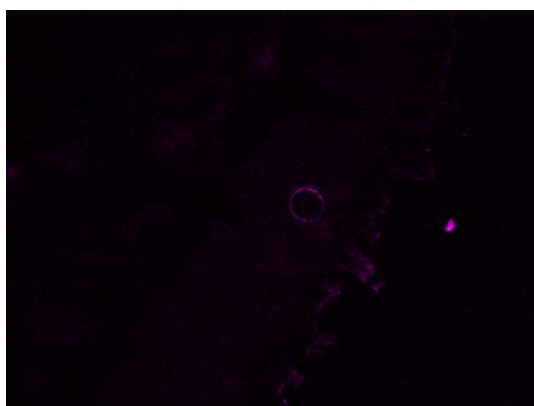
図3-6 レバミピド液剤を投与後の放射線障害ラット舌組織における蛍光の検出（右側舌：障害大、左側舌：障害小）

次に、図3-7に製剤用溶媒を投与後の放射線障害舌の結果を示した。製剤用溶媒を投与した時の放射線障害舌組織中の蛍光は微弱であったことから、舌組織中の自家蛍光は、レバミピド液剤を投与後のサンプル観察時に大きな影響を与えていないことを確認した。

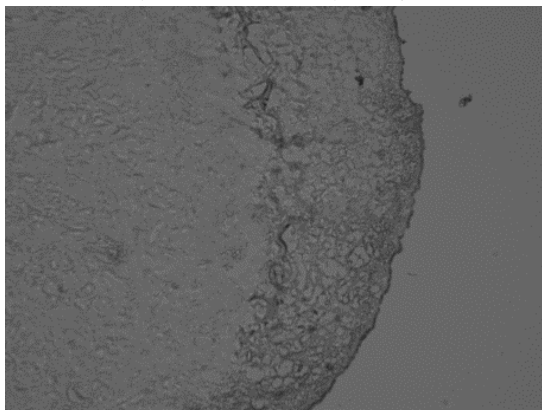
放射線障害舌組織の明視野観察（右）



放射線障害舌組織の蛍光観察（右）



放射線障害舌組織の明視野観察（左）



放射線障害舌組織の蛍光観察（左）

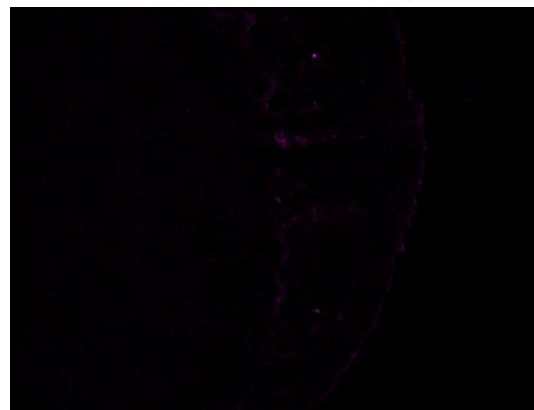


図3-7 レバミピド液剤の製剤用溶媒を投与後の放射線障害ラット舌組織における蛍光の検出（右側舌：障害大、左側舌：障害小）



(5) 異なった特性を有するレバミピド液剤投与後の正常ラット舌組織中のレバミピドの蛍光観察

4%レバミピドナノ粒子液剤（粘性あり、粘性なし）、4%レバミピドマイクロ粒子液剤（粘性あり、粘性なし）及び製剤用溶媒（粘性あり、粘性なし）を正常ラットの口腔内に投与し、投与5分後の舌組織を採取し蛍光観察を行った。

図3-9は粘性なしのナノ粒子液剤、図3-10は粘性なしのマイクロ粒子液剤での結果を示した。粘性なしのナノ粒子液剤と粘性なしのマイクロ粒子液剤共に正常ラットの舌表面にレバミピドの蛍光が観察された。浸潤という観点では、粘性無しのマイクロ粒子液剤の像（図3-10）は表面にとどまっているが、粘性なしのナノ粒子液剤の像（図3-10）は組織の深いところまで分布している傾向が見られ、粒子径が小さい利点が表れたものと考えられた。マイクロ粒子は粒子径が大きいことから、粒子の溶解速度が低く、組織中に分布できなかったものと考えられた。

図3-11は粘性ありのナノ粒子液剤、図3-12は粘性ありのマイクロ粒子液剤での結果を示した。蛍光観察により、粘性ありのナノ粒子液剤と粘性ありのマイクロ粒子液剤共にレバミピドの舌への高い吸着と組織内への分布を示す像が得られた。粘性を加えた事からレバミピドが舌組織内により分布している傾向が見られた。マイクロ粒子液剤はナノ粒子液剤よりも粒子径が大きいため、粘性により舌表面には吸着するものの、その後の組織への透過、浸潤はナノ粒子液剤よりも低いことが想定された。しかし、予想に反して、その舌への吸着および組織内への浸潤はナノ粒子液剤と同程度であった。

図3-13は粘性なし液剤の製剤用溶媒、図3-14は粘性あり液剤の製剤用溶媒での結果を示した。わずかに見える蛍光は製剤用溶媒中の化合物あるいは舌組織が有する自家蛍光であると考えられた。その蛍光は微弱であった事から、これらの自家蛍光は、レバミピド液剤のサンプル観察時に大きな影響を与えていないことが確認できた。

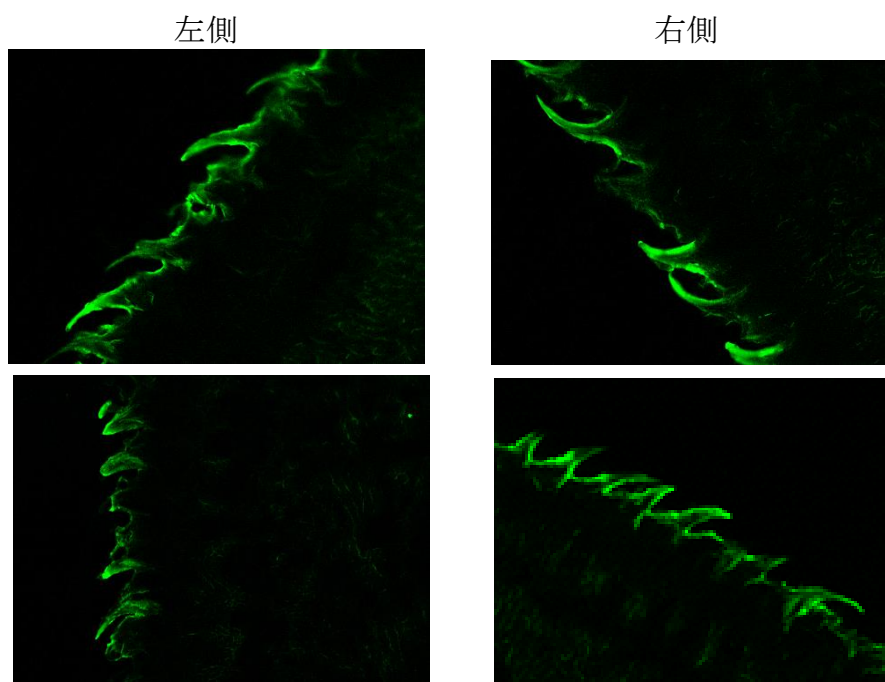


図 3-9 レバミピドナノ粒子製剤（粘性なし）を投与後の正常ラット舌組織における蛍光の検出（上段と下段は別個体）

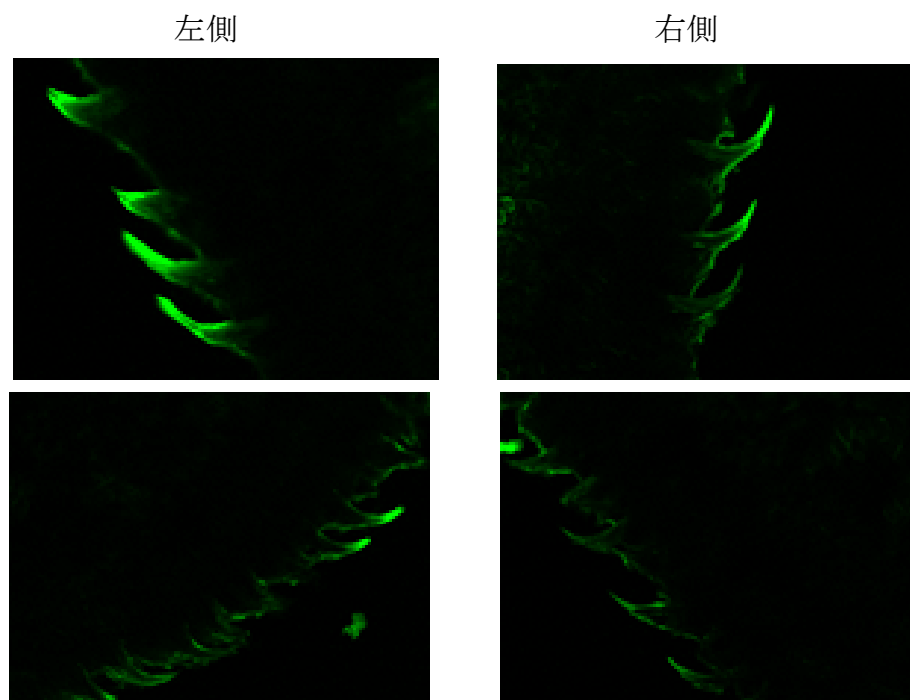


図 3-10 レバミピドマイクロ粒子製剤（粘性なし）を投与後の正常ラット舌組織における蛍光の検出（上段と下段は別個体）

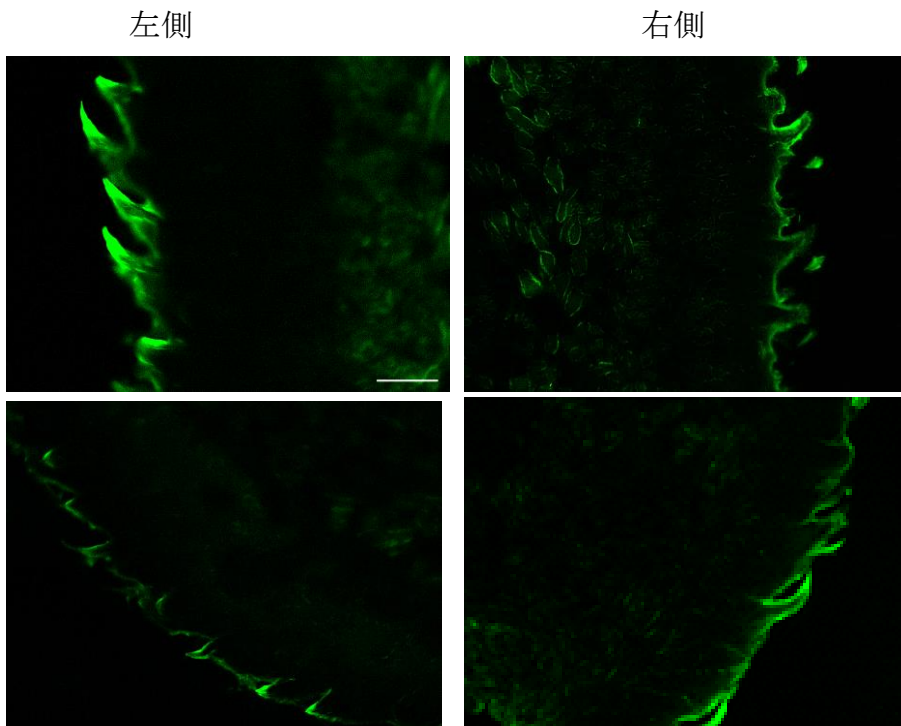


図 3-1 1 レバミピドナノ粒子製剤（粘性あり）を投与後の正常ラット舌組織における蛍光の検出（上段：左側、下段：右側）

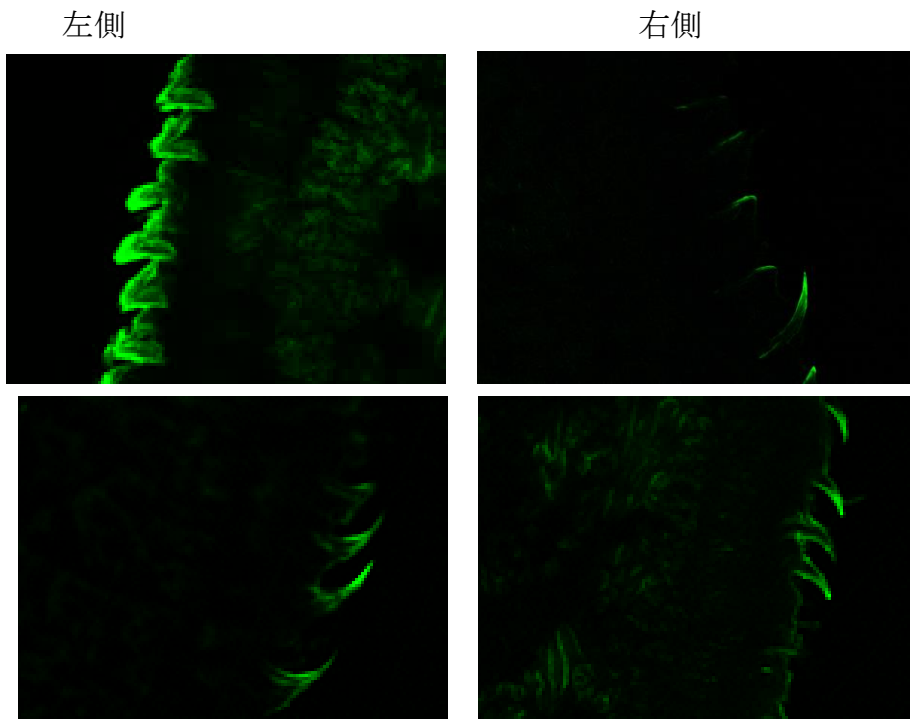
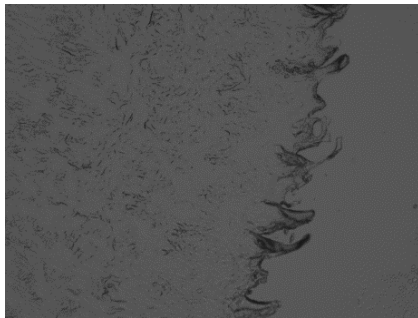


図 3-1 2 レバミピドマイクロ粒子製剤（粘性あり）を投与後の正常ラット舌組織における蛍光の検出（上段：左側、下段：右側）

明視野観察



製剤用溶媒の蛍光観察

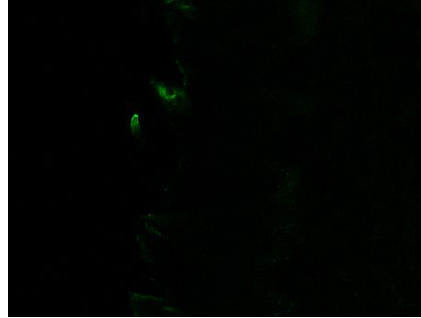
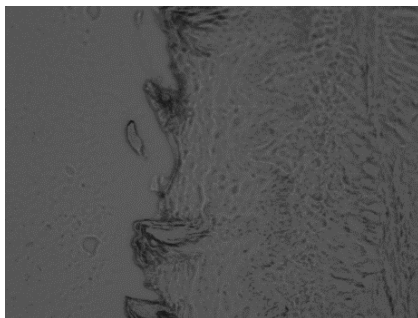
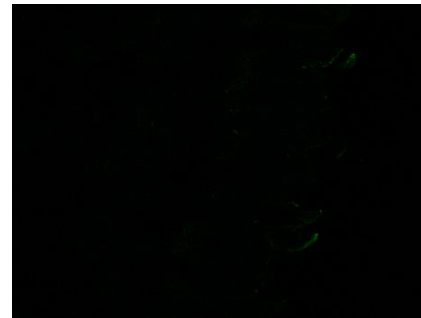
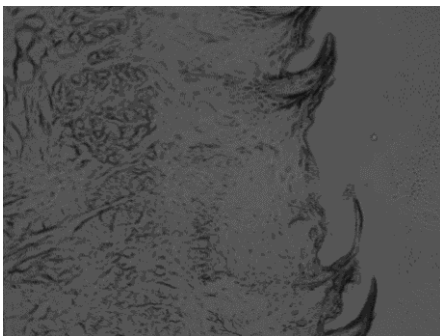


図 3-1 3 粘性なし製剤の製剤用溶媒を投与後の正常ラット舌組織における蛍光の検出（上段：左側、下段：右側）

明視野観察



製剤用溶媒の蛍光観察

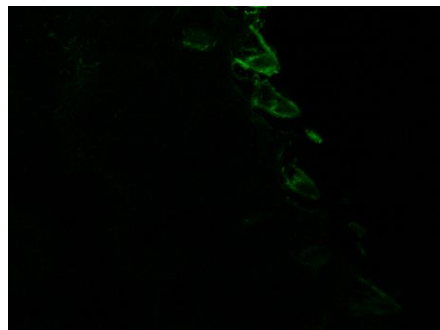
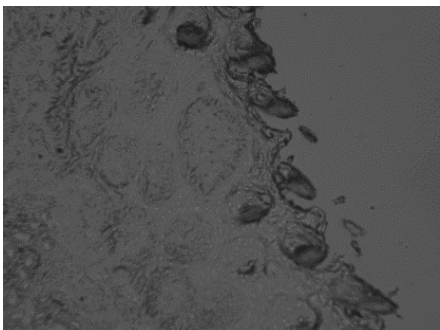
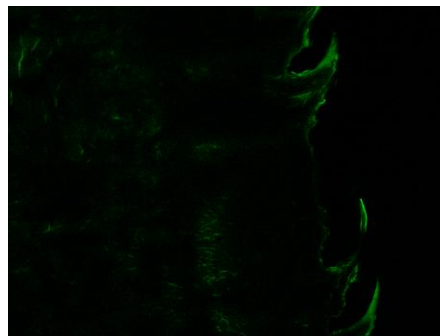


図 3-1 4 粘性あり製剤の製剤用溶媒を投与後の正常ラット舌組織における蛍光の検出（上段：左側、下段：右側）

## 第2項 レバミピドナノ粒子液剤のラット口腔粘膜組織内濃度推移

2%レバミピドナノ粒子を含む3種類の液剤を0.5 mL/kgの用量で麻酔下にてラット口腔内に投与した後、頬を摘出し、頬組織内のレバミピド濃度を測定した。同様に、2%レバミピドマイクロ粒子液剤を口腔内投後の頬組織内レバミピド濃度を測定した。レバミピドの口腔粘膜組織内濃度推移の結果を図3-15にPKパラメータを表3-6に示した。投与初期から1時間まで、レバミピドマイクロ懸濁液と比較して、3種類のナノ粒子懸濁液は頬組織内濃度が高い傾向を示し、CMCNaを含む処方頬組織内濃度推移はマイクロ粒子液剤と比較して有意であった ( $p < 0.05$ )。3種類のナノ粒子液剤の  $C_{max}$  と  $AUC_{2hr}$  は、レバミピドマイクロ液剤と比較して、約2~3倍高い値を示した。3種類のナノ粒子液剤間の比較では、CMCNaを含む処方がやや高い組織内濃度推移を示し、 $C_{max}$  と  $AUC_{2hr}$  の値もやや高い値を示した。いずれの製剤も投与されてから速やかに組織内濃度が低下し、MRTはレバミピドマイクロ液剤と3種類のナノ粒子液剤間で差は認められなかった。以上の結果から、レバミピドナノ粒子液剤は、レバミピドマイクロ粒子液剤と比較して口腔組織への分布が良好であることが示唆された。

表3-6 3種類の2%レバミピドナノ粒子液剤及び2%マイクロ粒子液剤をラット口腔内投与後の口腔粘膜組織内レバミピドの薬物動態パラメータ

|                    | <b>AUC<sub>2hr</sub></b><br>( $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{g}$ ) | <b>C<sub>max</sub></b><br>( $\mu\text{g}/\text{g}$ ) | <b>T<sub>max</sub></b><br>(hr) | <b>MRT</b><br>(hr) |
|--------------------|--|--|--------------------------------|--------------------|
| レバミピドマイクロ粒子液剤      | <b>8.0</b>   | <b>42.3</b>  | <b>0.08</b>                    | <b>0.28</b>        |
| レバミピドナノ粒子液剤(HPMC)  | <b>15.8</b>  | <b>94.4</b>  | <b>0.08</b>                    | <b>0.23</b>        |
| レバミピドナノ粒子液剤(PVP)   | <b>16.4</b>  | <b>75.9</b>  | <b>0.08</b>                    | <b>0.30</b>        |
| レバミピドナノ粒子液剤(CMCNa) | <b>23.1</b>  | <b>122.0</b>   | <b>0.08</b>                    | <b>0.26</b>        |

投与容量：0.5 mL/kg。データは平均値で表した(n=3)。

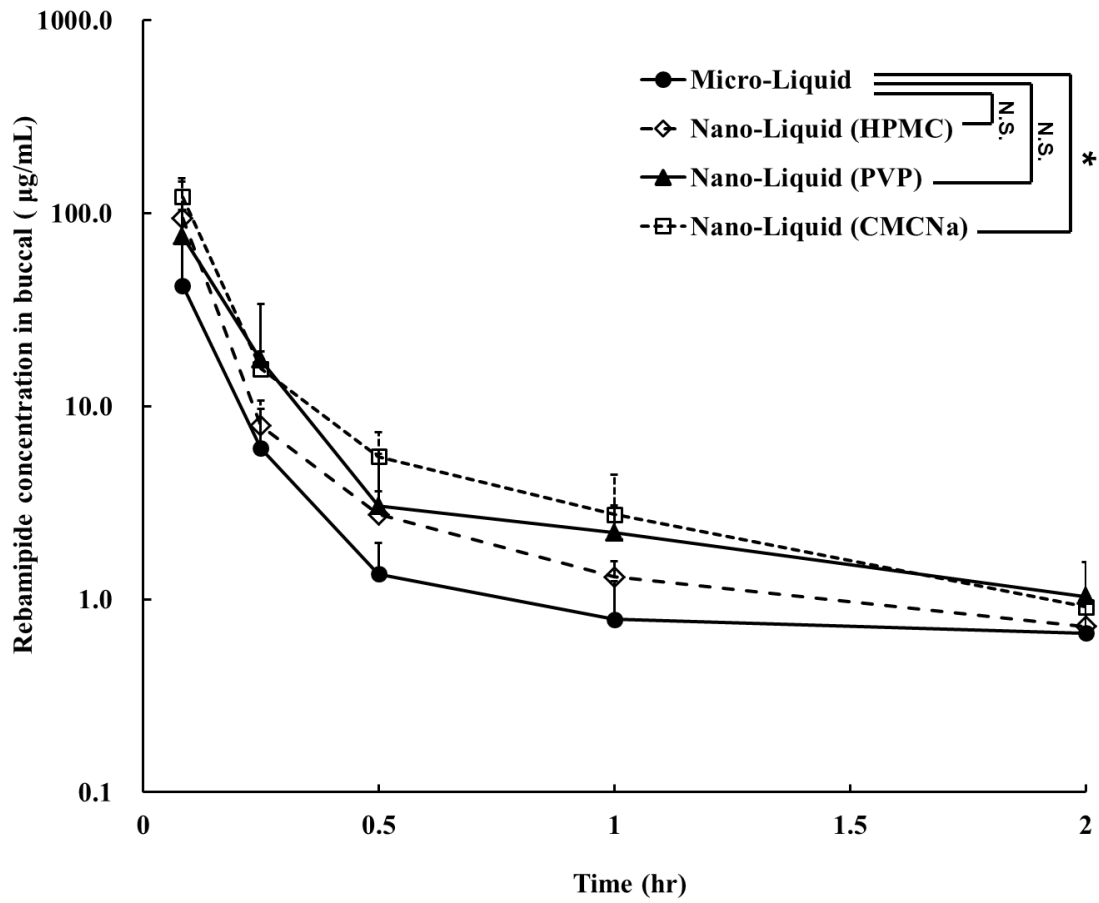


図3-15 3種類の2%レバミピドナノ粒子液剤 (Nano-Liquid) 及び2%マイクロ粒子液剤 (Micro-Liquid) をラット口腔内投与後の口腔粘膜組織内レバミピド濃度推移

投与容量：0.5 mL/kg。データは平均値±S.D. で表した (n=3)。2%マイクロ粒子液剤に対して Dunnett 検定 (両側) を行った。\* p < 0.05、N.S. : 有意差なし

### 第3項 焼灼によるラット口腔粘膜炎モデルにおけるレバミピドナノ粒子液剤の潰瘍面積抑制効果

(1) ラット口腔粘膜炎モデルにおけるレバミピドナノ粒子液剤の効果（投与回数・投与ルートの影響）

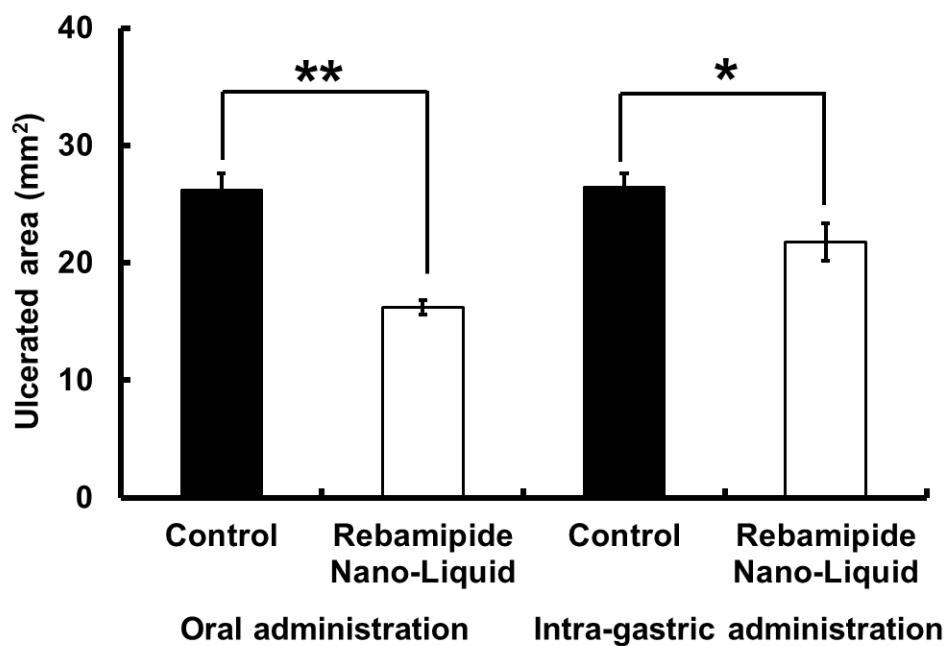
焼灼によるラット口腔粘膜炎モデルにおいて、レバミピドナノ粒子液剤の治癒促進効果を検討した。ラットに焼灼法により口腔内潰瘍を惹起した3日後より、2%レバミピドナノ粒子液剤を胃内又は口腔内に1日2回又は1日4回5日間投与することで、潰瘍治癒に対する作用を検討した。

潰瘍面積を図3-16に示した。1日4回口腔内投与では、溶媒投与群の潰瘍面積が $26.2 \pm 1.4 \text{ mm}^2$ であったのに対し、2%レバミピドナノ粒子液剤投与群では $16.2 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ であり有意な潰瘍面積抑制が認められた ( $p < 0.01$ )。1日4回胃内投与では、溶媒投与群の潰瘍面積が $26.5 \pm 1.1 \text{ mm}^2$ であったのに対し、2%レバミピドナノ粒子液剤投与群では $21.8 \pm 1.6 \text{ mm}^2$ であり、弱いながらも有意な潰瘍面積抑制が認められた ( $p < 0.05$ )。ナノ製剤口腔内投与による潰瘍面積の抑制率は38.2%であり、胃内投与の17.7%と比べて高い抑制率が認められた。

一方、1日2回口腔内投与では、溶媒投与群の潰瘍面積が $29.5 \pm 2.1 \text{ mm}^2$ であったのに対し、2%レバミピドナノ粒子液剤投与群では $27.7 \pm 3.2 \text{ mm}^2$ であり、有意な変化は認められなかった。同様に、1日2回胃内投与では、溶媒投与群の潰瘍面積が $35.0 \pm 3.2 \text{ mm}^2$ であったのに対し、2%レバミピドナノ粒子液剤投与群では $30.4 \pm 2.0 \text{ mm}^2$ であり、有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、ラット焼灼口腔内潰瘍モデルにおいて、レバミピドナノ粒子液剤は1日4回投与で潰瘍治癒促進作用を示すことが明らかとなった。その作用は胃内投与よりも口腔内投与の方が強く、潰瘍局所に薬剤を投与することの重要性が示唆された。また、1日2回投与では口腔内に投与しても潰瘍治癒に対する有意な作用は認められなかったことから、投与回数の重要性も示唆された。

(A) 1日4回投与



(B) 1日2回投与

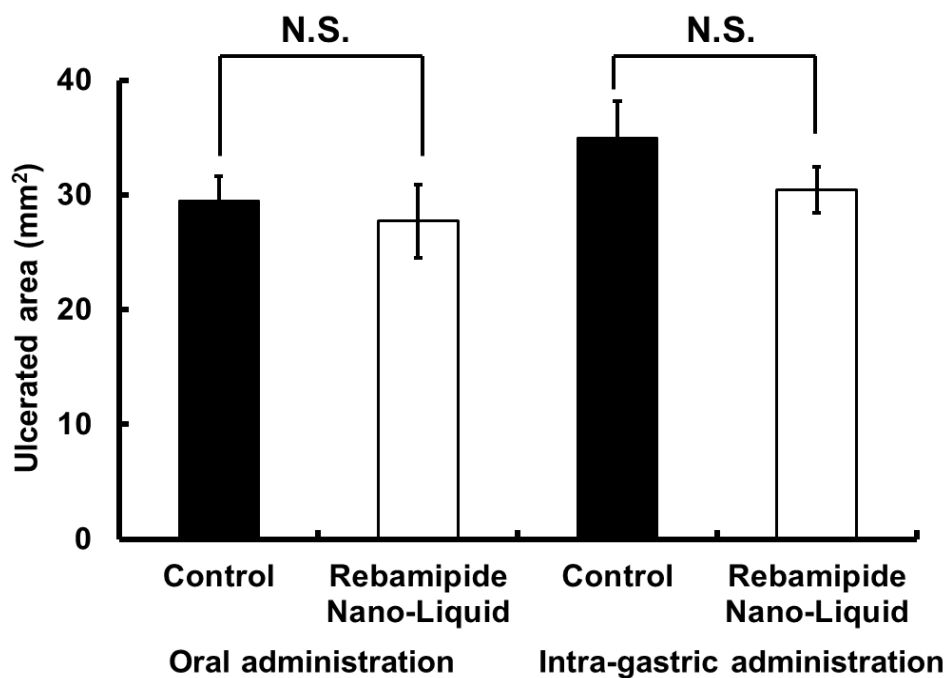


図3-16 ラット焼灼口腔内潰瘍にレバミピドナノ粒子液剤を口腔内または胃内投与したときの潰瘍治癒に対する作用

データは平均値± S.E. で示した (n=6)。A はナノ粒子液剤を1日4回、5日間投与した試験、B はナノ粒子液剤を1日2回投与した試験の結果を示す。有意差検定は溶媒対照群とレバミピド投与群間に対応のない t 検定 (両側) を行った。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01、N.S. : 有意差なし



(2) ラット口腔粘膜炎モデルにおけるレバミピドナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤の効果 (粒子径の影響)

焼灼によるラット口腔粘膜炎モデルにおいて、レバミピドマイクロ粒子液剤とレバミピドナノ粒子液剤の治癒促進効果を比較検討した。ラットに焼灼法により口腔内潰瘍を惹起した3日後より、2%レバミピドマイクロ粒子液剤と2%レバミピドナノ粒子液剤を口腔内に1日4回5日間投与することで、潰瘍治癒に対する作用を検討した。

レバミピドマイクロ粒子液剤とレバミピドナノ粒子液剤及びその製剤用溶媒を、焼灼法により口腔内潰瘍を惹起させたラットの口腔内に0.5 mL/kgの用量で1日4回5日間投与後の口腔内潰瘍面積を測定した。結果を図3-17に示した。溶媒投与群の潰瘍面積が $30.9 \pm 1.4 \text{ mm}^2$ であったのに対し、2%レバミピドナノ粒子液剤投与群では $24.7 \pm 1.0 \text{ mm}^2$ であり、溶媒投与群に対して2%レバミピドナノ粒子液剤投与群は、有意な口腔内潰瘍面積抑制が認められた ( $p < 0.01$ )。溶媒投与群の潰瘍面積に対する2%レバミピドナノ粒子液剤投与群の潰瘍面積の減少率は20.1%であった。一方、溶媒投与群の潰瘍面積が $31.2 \pm 2.2 \text{ mm}^2$ であったのに対し、2%レバミピドナノ粒子液剤投与群では $28.5 \pm 0.3 \text{ mm}^2$ であった。溶媒投与群に対して2%レバミピドマイクロ粒子液剤投与群の潰瘍面積の減少率は8.7%であり、有意な口腔内潰瘍面積抑制効果は認められなかった (N.S.)。

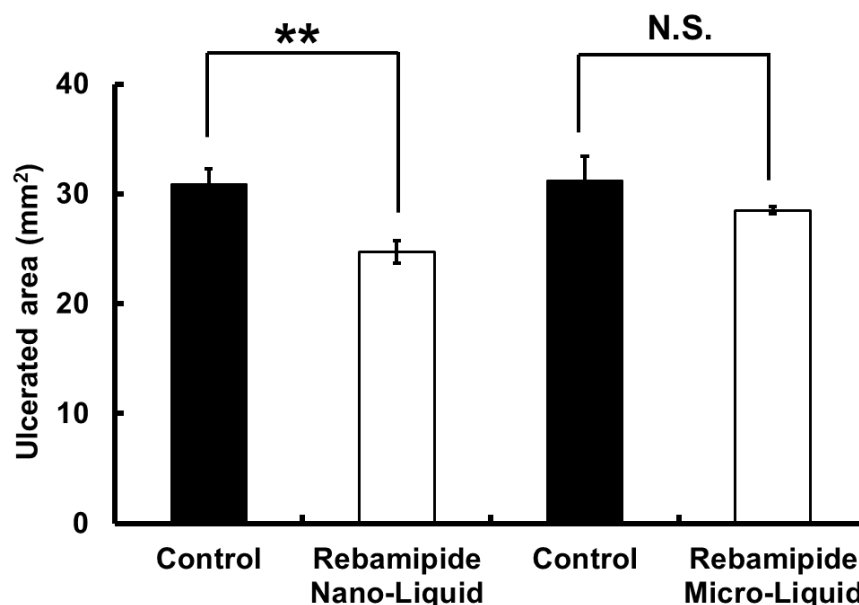


図3-17 ラット焼灼口腔内潰瘍にレバミピドナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤を口腔内投与したときの潰瘍治癒に対する作用

データは平均値±S.E.で示した(n=6)。ナノ粒子液剤及びマイクロ粒子液剤を1日4回、5日間投与した試験の結果を示す。有意差検定は溶媒対照群とレバミピド投与群間に対応のないt検定(両側)を行った。\*:  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、N.S. : 有意差なし

## 第4節 考察

がん放射線化学療法及びがん化学療法に伴う副作用の一つである口腔粘膜炎は患者のQOLに大きな影響を与えるが、その予防方法・治療方法はいまだ確立していない<sup>77,78)</sup>。近年、医師主導の自主研究において、がん放射線化学療法による口腔粘膜炎に対してレバミピドが有用であると報告されている<sup>35-39)</sup>。これらの研究においては、レバミピド錠剤を用いて調製された院内製剤が使用されているが、臨床家から口腔粘膜炎に対しさらなる強い効果を有するレバミピド液剤の開発が望まれている。一方、レバミピドの胃炎・胃潰瘍に対する効果は、胃粘膜に直接分布したレバミピドが効果を発揮していると考えられている<sup>72)</sup>。従って、レバミピド液剤の口腔粘膜炎に対する治療・予防効果に対しても、レバミピドの口腔粘膜内への直接的な分布が重要であると考えられる。そこで、本章では第2章で確立したレバミピドナノ粒子懸濁液の製造方法を応用して、口腔粘膜炎に対してより高い組織分布が期待されるレバミピドナノ粒子液剤を作成し、それらの口腔組織分布の評価及び動物モデルにおける口腔粘膜炎に対する治療効果を検討した。

前述のように、レバミピドの標的組織内分布が薬理効果に重要であると考えられているが、口腔粘膜上皮や炎症部位のレバミピドの局所動態は不明であった。そこで、レバミピド自体が有する蛍光を利用して、蛍光フィルターを工夫することにより、レバミピドの舌組織中の分布を視覚的に評価する方法を開発した。その結果、正常舌においては、レバミピドは舌表面へ吸着、あるいは粘膜上皮へ分布することが明らかとなった(図3-4)。次に、予備的な評価として、物理的な障害を与えた舌に2%レバミピドナノ粒子液剤を塗布したところ、障害部位にレバミピドがより分布することが明らかとなった(図3-5)。この分布の原因として、障害を受けた粘膜上皮のバリアが低下したことによりレバミピドナノ粒子が粘膜深部に浸潤した可能性、あるいは、障害を受けた粘膜上皮の透過性が高まり、浸潤した近傍で溶解したレバミピドの透過性が高まり高濃度に分布した可能性などが考えられた。さらに、放射線療法に伴う口腔粘膜炎を想定し、放射線障害を与えたラットに2%レバミピドナノ粒子液剤を口腔内投与したところ、放射線障害が顕著に確認された舌の炎症部位にはレバミピドが顕著に分布したが、障害度が低い舌の部分においてはレバミピドの分布は低いレベルに留まっていることが明らかとなった(図3-6, 7)。この原因として、物理的障害と同様に、障害組織のバリア能の低下によるナノ粒子の浸潤及びレバミピドの透過性の向上が考えられた。従って、放射線障害を生じている舌において、レバミピドのナノ粒子が浸潤し、顕著に分布することが示された。レバミピドの炎症治癒促進効果にとって、炎症部位のレバミピドの局所濃度が影響している可能性が考えられるため、

障害部位に比較的高い分布を示した本研究で開発したレバミピドナノ粒子液剤の特性は、口腔粘膜炎治療に好ましいと考えられた。

前述の蛍光観察法を用いて、異なった製剤特性（粘性と粒子径）を有する4%レバミピドの各種口腔粘膜炎用液剤を正常ラットに口腔内投与し、レバミピドの正常舌組織への吸着、浸透、拡散の様子を評価した。粘性の低いレバミピド液剤において、マイクロ粒子では舌組織表面に留まっていたが、ナノ粒子製剤は組織の深いところまで分布している様子が観察された（図3-9）。ナノ粒子は、マイクロ粒子と比較して粒子の比表面積が大きいいため溶解速度が速いと考えられる<sup>43)</sup>。従って、粘膜近傍に吸着したレバミピド粒子の溶解速度がナノ粒子では高まり、その結果として組織の深いところまで分布したものと考えられた。一方、粘性の高いレバミピド液剤は、低粘性液剤と比較して、レバミピドの高い吸着と組織内への高い分布を示す像が得られたが、粒子径による顕著な差は認められなかった（図3-11, 12）。製剤に粘性を加えたことから、口腔内の残存量が増加し、その結果、粒子径の差に関係なく舌組織内に高い分布を示したと考えられた。尚、本研究において、異なった製剤特性（粘性と粒子径）の評価は正常ラットの舌組織を用いて実施した。口腔粘膜炎発症の予防効果には正常な組織へのレバミピドの分布も重要と考えられるが、炎症発症後の治療効果に対しては炎症部位へのレバミピドの分布が重要と考えられた。炎症部の粘膜はバリア能が低く、大腸炎等において炎症粘膜へのナノ粒子の吸着及び浸透が報告されている<sup>73)</sup>。また、前述のように、本研究においてもレバミピドナノ粒子は潰瘍部など障害部位に比較的高い分布を示すことが明らかになっている。よって、炎症粘膜組織へのレバミピドの分布は粒子の大きさや製剤の粘性の影響をより受けやすい可能性が考えられた。従って、レバミピドナノ粒子液剤の治癒促進作用を考察するためには、製剤特性（粘性と粒子径）が及ぼす炎症粘膜へのレバミピド吸着及び分布への影響の評価を今後進める必要があると考えられた。

前述の蛍光観察法は定性的な評価方法であるため、組織内濃度のような定量的な評価と組み合わせることが必要と考えられた。そこで、3種類のナノ粒子液剤とマイクロ粒子液剤をラットの口腔内に投与し、その後の口腔組織内レバミピド濃度を測定した（図3-15）。その結果、レバミピドナノ粒子液剤は、レバミピドマイクロ粒子液剤と比較して口腔組織への分布が良好であることが明らかとなった。口腔内に投与したレバミピド粒子は食道へ排出されるが、一部口腔内に残存し、唾液等で希釈されながら徐々に口腔内から排出されると考えられる。マイクロ粒子液剤は溶解速度が遅いため、投与後口腔内に残存したマイクロ粒子が溶解しないままに口腔内から排出される割合が高いと推測される。一方、ナノ粒子液剤では溶解速度が速いために、口腔内に残存したレバミピドが口腔内で溶解する割合が高くなり、投与初期に高い口腔組織内濃度を示したものと考えられた。In vitro において、レバミピドが粘膜炎に対す

るさまざまな抗炎症作用を発揮するためには、 $10^{-6}\text{M}$  ( $0.37 \mu\text{g/g}$ )  $\sim 10^{-4}\text{M}$  ( $37 \mu\text{g/g}$ ) の濃度が必要とされている<sup>64)</sup>。3種類の2%ナノ粒子液剤を口腔内投与後約5分後に、 $10^{-4}\text{M}$ 以上(約 $80\sim 120 \mu\text{g/g}$ )の組織内濃度を示したことから、投与直後の短期間ではあるが、胃炎・胃潰瘍に対して知られているレバミピドの作用のうち、幾つかの作用を発揮できる組織内濃度に達していたものと考えられた。

最後に、レバミピドの口腔粘膜炎に対する治癒促進作用を検討するために、焼灼法によるラット口腔粘膜炎モデルを用いて、レバミピドの治癒促進効果を評価した。2%レバミピドナノ粒子液剤の口腔内投与又は胃内投与の治癒促進作用を検討したところ、1日4回の口腔内投与により潰瘍面積の有意な抑制(38.2%)が確認された(図3-16A)。また、胃内直接投与においても有意な潰瘍面積抑制が認められたが、潰瘍面積抑制率は17.7%であり、口腔内投与と比較して作用の減弱が認められた(図3-16A)。中島らは、レバミピド液剤の覚醒ラットの口腔内投与及び胃内投与時の口腔組織濃度を評価し、口腔内投与は胃内投与と比較して高い口腔組織濃度を示すことを報告している<sup>76)</sup>。口腔内投与は薬液と口腔粘膜が直接接触することによって、胃内投与と比較して高い口腔組織中レバミピド濃度を得ることができ、その結果、強い潰瘍面積抑制を示したと考えられた。従って、レバミピドが口腔粘膜炎に対して治療効果を発揮させるためには、潰瘍局所にナノ粒子液剤を投与する口腔内投与(直接経路)が重要であると考えられた。一方、1日2回投与では口腔内に投与しても潰瘍治癒に対する有意な作用は認められなかった(図3-16B)ことから、投与回数の重要性も示唆された。レバミピド液剤を投与直後には高い口腔組織中レバミピド濃度を示すが、その後速やかに組織内濃度が低下する。従って、レバミピドの薬効を発揮させるためには、1日4回以上投与することにより、口腔組織中レバミピド濃度を維持する必要があるのかもしれない。粒子径の影響に関しては、2%レバミピドナノ粒子液剤は有意な治癒促進効果が認められたが、2%レバミピドマイクロ粒子液剤の口腔内投与は有意な治癒促進効果が認められなかった(図3-17)。前述のように、レバミピドマイクロ粒子液剤は、ナノ粒子液剤よりも口腔組織内濃度が低いため、口腔内レバミピド組織濃度が薬効を発揮する濃度に達していない可能性が考えられた。

以上の検討結果から、第2章で確立したナノ粒子懸濁液の製造方法を用いてレバミピドをナノ粒子化し、さらに粘性を付与した液剤を調製することにより、口腔粘膜へのレバミピドの分布が高まり、その結果、ラット口腔粘膜炎モデルにおいてレバミピドが高い治癒を示すことが確認された。従って、本章で調製したレバミピドナノ粒子液剤は、レバミピド錠剤又は原薬を単純に懸濁したマイクロ粒子液剤よりも高い口腔粘膜組織分布と口腔粘膜炎に対する強い治癒促進効果が期待される。

## 第5節 小括

本章では、第2章で確立したナノ粒子懸濁液の製造方法を用いて調製したレバミピドナノ粒子液剤のがん治療に伴う口腔粘膜炎の治療薬としての可能性を評価することを目的として、ナノ粒子液剤の口腔組織分布の評価及びラットモデルにおける口腔粘膜炎に対する治療効果を検討した。レバミピドの蛍光を利用した視覚的評価において、レバミピドが障害部位に比較的高い分布を示すこと、及び、粒子のナノ化及び粘性の付与により粘膜深部へレバミピドが分布する傾向が認められた。定量的なレバミピド組織内濃度の評価においては、レバミピドナノ粒子液剤は、マイクロ粒子液剤と比較して、高い口腔組織内濃度推移を示した。さらに、マイクロ粒子液剤の口腔内投与はラット口腔内潰瘍に対する治癒促進効果は認められなかったが、ナノ粒子液剤はラット口腔内潰瘍に対する有意な治癒促進効果を示した。また、投与回数と投与方法（口腔内への直接投与）は、ラット口腔内潰瘍に対する治癒促進効果に影響を及ぼした。以上のことから、本章で評価したレバミピドナノ粒子液剤は比較的高い口腔組織内濃度と治癒促進効果が認められたことから、がん療法時に伴う口腔粘膜炎に対する治療薬としての応用が期待された。

## 第4章 総括

近年、新規医薬品の開発が非常に困難になりつつある。このため、安全性情報や体内動態情報が臨床で確認されている既存薬の作用を精査し、その既存薬を他の疾患治療薬として再生させるドラッグ・リポジショニング／リプロファイリングが注目されている<sup>79, 80, 81)</sup>。レバミピドは、胃潰瘍及び胃炎の胃粘膜病変の改善薬として錠剤及び顆粒剤が販売されているが、プロスタグランジン増加作用<sup>4-6)</sup>、フリーラジカル抑制作用<sup>7-9)</sup>、好中球活性化の抑制作用<sup>10-12)</sup>、炎症性サイトカイン産生抑制作用<sup>13-15)</sup>、ムチン様物質分泌増加作用<sup>16)</sup>等、種々の薬理作用を有する。このような多様な薬理作用を有するレバミピドのドラッグ・リプロファイリングを行うことで、既承認適応症である胃炎・胃潰瘍以外の口腔粘膜炎、口腔内乾燥症<sup>82, 83)</sup>、潰瘍性大腸炎<sup>84)</sup>、NSAIDによる小腸粘膜障害<sup>85)</sup>といった疾患に対する有効性について研究がされている。その中で、レバミピドの胃粘膜ムチンの増加作用に着目し、レバミピドをドライアイ治療薬として上市した例はドラッグ・リポジショニングの成功例の一つとして挙げられる<sup>86)</sup>。しかしながら、ドラッグ・リポジショニングにおける問題点の一つとして、既存薬剤が既存疾患をターゲットとした創薬スクリーニングを経て医薬品として開発されたため、新規疾患の標的部位及びその疾患に対する最適な剤型としては、必ずしも好ましい物理化学的性質や体内動態ではないことが挙げられる。レバミピドを例にすると、レバミピドは慢性胃潰瘍モデルであるラット酢酸潰瘍モデルでスクリーニングされてきた化合物であるため、標的部位である胃粘膜に高濃度分布し、経口投与後の尿中排泄率から見積もった利用率が10%と比較的低い<sup>87)</sup>ため、高い安全性が要求される胃炎・胃潰瘍治療薬として好ましい体内動態を有している。しかしながら、ドライアイ治療において最適な剤型は標的部位である角膜・結膜に直接投与する点眼液であるが、ドライアイ患者にとって好ましい弱酸性から中性の水溶液においてレバミピドの溶解度が低いため、既承認市販剤は水性懸濁液として処方化されている。そのため、市販剤には、白濁懸濁液の性状に伴う点眼直後の霧視、点眼前に振とうし再分散する必要があり、点眼液製造の常法である無菌ろ過法による製造が不可能であること等の問題点が残されている。一方、アンメット・メディカル・ニーズであるがん治療に伴う口腔粘膜炎治療において、最適な剤型は標的部位である口腔内に直接投与する液剤であるが、レバミピドは膜透過性が低い<sup>88)</sup>ため口腔粘膜移行性が低いと考えられること、非常に苦い薬剤であることが問題点として挙げられる。このように、ドラッグ・リポジショニングによる標的部位や剤型が既承認疾患のものと異なるために生じる問題点を解決するためには、既存薬剤を新しい標的部位や剤型へ適用させることを目的に、既存薬剤の可溶化・ナノ粒子化・非晶質化等の製剤工夫が不可欠である。本研究においては、ナノ粒子化に着目し、新規レバミピドナノ粒子製造方法の開発と

透明性の高いナノ粒子点眼液の開発及びナノ粒子液剤の口腔粘膜への移行性の評価を行ったので、以下に論述する。

第2章においては、既承認市販製剤では点眼直後の霧視等が問題視されているため、レバミピド懸濁液の透明性の向上を目的に、レバミピドのナノ粒子点眼液の開発を行った。ナノ粒子の調製方法として、ブレイクダウン方式とビルトアップ方式が知られているが、上市されているナノ粒子の医薬品は、湿式ビーズミルを用いたブレイクダウン方式がほとんどである<sup>42)</sup>。そこで、レバミピド懸濁液に対しても一般的に用いられている湿式ビーズミルによる微細化を検討した。しかし、得られた微粒子懸濁液の平均粒子径が100~200 nmに到達していたのにも関わらず、懸濁液の性状は白濁しており透明性は市販品と大差なかった(図2-11)。そこで、レバミピドを中和晶析により晶析した一次粒子が小さいことに着目し、レバミピドの中和晶析法を用いた微粒子化研究に着手した。種々の添加剤を用いた中和晶析法を用いてレバミピドのナノ粒子懸濁液を調製したが、中和晶析工程のみでは透明性に優れる懸濁液は得られなかった。そこで、中和晶析法の改良を試み、顕著に透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液を得ることが出来る4ステップ(Step-1:調製、Step-2:晶析、Step-3:分散、Step-4:透析)のレバミピドナノ粒子懸濁液調製方法を開発した。透明性の高いナノ粒子を得るための重要な改良点は、Step-1における添加剤の選択、Step-2における晶析時のプロセスパラメーターの最適化、Step-3(分散工程)の追加と分散方法の選択、およびStep-4(透析工程)の追加であった。この製造方法の利点として、低コストでスケールアップが容易であること、金属摩耗の混入の可能性が少ないこと、0.2 μmのフィルターでろ過できることから無菌ろ過法で製造可能なことである。実際に、実験室規模の装置を用いて、ナノ粒子点眼液では20Lスケール、ナノ粒子液剤では100Lスケールの製造実績が既に存在する。この透明性の高いレバミピドナノ粒子点眼液(図2-12)は、ユニットドーズ容器に無菌充填後、25°Cで3年間保管してもほとんど変化が見られない(図2-13)室温流通が可能な安定な懸濁液であった。さらに、ナノ粒子点眼液の薬物動態及び薬効評価を行った。レバミピドナノ粒子点眼液の眼投与後のレバミピドの角膜および結膜の濃度はマイクロ粒子点眼液(市販同等品)よりわずかに高かった(図2-14)。しかしながら、その結膜ムチン様物質の増加作用はマイクロ粒子点眼液(市販同等品)と同等であった(図2-15)。従って、第2章において開発したレバミピドナノ粒子点眼液は市販製剤と同等レベルの薬理効果が臨床においても期待でき、加えて、透明性が高く粒子の沈降がない安定な懸濁液であることから、点眼前の振とうが必要なく点眼直後の霧視がなくなることにより、患者のQOLを改善することが期待できた。

第3章においては、がん治療に伴う口腔粘膜炎へレバミピドを適用させるために、第2章で確立したナノ粒子懸濁液の製造方法を用いてレバミピドナノ粒子液剤を調

製した。まず、レバミピの口腔組織分布の評価のために、レバミピ自体の蛍光を利用した視覚的評価方法を確立した。その結果、レバミピが障害部位に比較的高い分布を示すこと（図3-5、6）、及び、粒子のナノ化及び粘性の付与により粘膜深部へレバミピが分布する傾向を確認した（図3-9～12）。このレバミピの蛍光を利用した視覚的評価方法は、放射線標識化合物を使用したオートラジオグラフィと比較して簡便であり、口腔粘膜への分布評価以外にも、レバミピのリポジショニングにおいて、今後、ドライアイに対するレバミピ点眼液の改良製剤の角膜・結膜移行性評価、小腸炎や大腸炎をターゲットとしたレバミピ新製剤の腸粘膜移行性評価等に応用できると考えられる。さらに、口腔内投与後のレバミピ組織内濃度の定量的な評価も行い、レバミピナノ粒子液剤は、マイクロ粒子液剤と比較して、高い口腔組織濃度推移を示すことを確認した（図3-15）。加えて、ラット口腔内潰瘍モデルにおいて、2%マイクロ粒子液剤は治癒促進効果が認められなかったにも関わらず、2%ナノ粒子液剤は1日4回の口腔内投与により有意な治癒促進効果を示した（図3-17）。第2章において、ナノ粒子点眼液化により角膜・結膜組織濃度は向上したが（図2-14）、ムチン増加作用ではマイクロ粒子点眼液と同等レベルであった（図2-15）。一方、口腔内用ナノ粒子液剤化では、口腔粘膜内濃度の上昇に伴い、口腔潰瘍に対する治癒促進効果も向上した。その理由として、レバミピナノ液剤の口腔潰瘍に対する治癒促進効果は1～4%の範囲で用量に対して線形性が認められているが<sup>68)</sup>、レバミピマイクロ粒子及びナノ粒子のムチン増加作用は、0.3%以下で効果が認められないが1%で最大効果に達しており、用量に対して線形性が認められていないこと<sup>21)</sup>（図2-15）が考えられる。レバミピナノ粒子液剤は、良好な口腔粘膜への分布のみならず、ラット口腔内潰瘍に対する有意な治癒促進効果を示したため、がん療法時に伴う口腔粘膜炎に対する治療薬として有用な製剤として期待される。また、本製剤は懸濁液であるため、完全に溶解した製剤と比較して、口腔内に服薬した際の苦みが抑制されていることも利点といえる。

以上、本研究において、新規レバミピナノ粒子製造方法並びに透明性の高いレバミピナノ粒子点眼液の開発、及び、この技術を適用した口腔内用ナノ粒子液剤の口腔粘膜への移行性の評価を行った。本研究で得られた知見は、今後のドラッグ・リポジショニングに対応した新規製剤の開発に有用であると考えられる。



## 謝辞

本研究及び本論文をまとめるに際して、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を頂きました徳島大学大学院薬科学教育部 石田竜弘教授に心より感謝申し上げます。また、ご指導を頂きました徳島大学大学院薬科学教育部 南川典昭教授に感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者である大塚製薬 平岡祥吾様、浦島博樹様、中島貴子様、佐古信朋様、鎌田直興様、小倉亜子様、櫻井一志様、徳島大学薬学部薬科学教育部 安藤英紀様、皆様のご協力を得たことを記すとともに、心より感謝申し上げます。博士課程への進学及び研究に対するご支援を賜りました大塚製薬製剤研究所 西林徹様に謝意を表します。

最後になりますが、ずっと支えてくれ応援してくれ、研究を継続できる環境を与えてくれた妻 中島貴子に心から感謝します。

## 引用文献

- 1) Uchida M, Tabusa F, Komatsu M, Morita S, Kanbe T, Nakagawa K, Studies on 2(1H)-quinolinone derivatives as gastric antiulcer active agents 2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl] propionic acid and related compounds, *Chem Pharm Bull*, **33**, 3775-3786 (1985)
- 2) ムコスタ錠100mg ムコスタ顆粒20%インタビューフォーム, 大塚製薬株式会社 (2013)
- 3) 厚生労働省: レセプト情報・特定健診等情報データベース (NDB) (2016年10月) <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000139390.html>
- 4) Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S, Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat, *Eur J Pharmacol*, **142**, 23-29 (1987)
- 5) Kleine A, Kluge S, Peskar BM, Stimulation of prostaglandin biosynthesis mediates gastroprotective effect of rebamipide in rats, *Dig Dis Sci*, **38**, 1441-1449 (1993)
- 6) Suetsugu H, Ishihara S, Moriyama N, Kazumori H, Adachi K, Fukuda R, et al., Effect of rebamipide on prostaglandin EP4 receptor gene expression in rat gastric mucosa, *J Lab Clin Med*, **136**, 50-57 (2000)
- 7) Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, Kondo M, Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent rebamipide studied by electron spin resonance, *Arzneimittelforschung*, **43**, 363-366 (1993)
- 8) Naito Y, Yoshikawa T, Tanigawa T, Sakurai K, Yamasaki K, Uchida M, et al., Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: electron paramagnetic resonance study, *Free Radic Biol Med*, **18**, 117-123 (1995)
- 9) Sakurai K, Sasabe H, Koga T, Konishi T, Mechanism of hydroxyl radical scavenging by rebamipide: identification of mono-hydroxylated rebamipide as a major reaction product, *Free Radical Res*, **38**, 487-494 (2004)
- 10) Kim CD, Hong KW, Preventive effect of rebamipide on gastric lesions induced by ischemia-reperfusion in the rat, *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 340-344 (1995)
- 11) Kobayashi T, Zinchuk VS, Garcia del Saz E, Jiang F, Yamasaki Y, Kataoka S, et al., Suppressive effect of rebamipide, an antiulcer agent, against activation of human neutrophils exposed to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, *Histol Histopathol*, **15**, 1067-1076 (2000).
- 12) Nagano C, Azuma A, Ishiyama H, Sekiguchi K, Imagawa K, Kikuchi M, Rebamipide suppresses formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced superoxide production by inhibiting fMLP-receptor binding in human neutrophils, *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 388-394 (2001)

- 13) Aihara M, Imagawa K, Funakoshi Y, Ohmoto Y, Kikuchi M, Effects of rebamipide on production of several cytokines by human peripheral blood mononuclear cells, *Dig Dis Sci*, **43**(9 Suppl) 160S-166S (1998)
- 14) Kim H, Seo JY, Kim KH, Inhibition of lipid peroxidation, NF-kappaB activation and IL-8 production by rebamipide in Helicobacter pylori-stimulate gastric epithelial cells, *Dig Dis Sci*, **45**, 621-628 (2000)
- 15) Choe JY, Park KY, Lee SJ, Park SH, Kim SK, Rebamipide inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 expression by suppressing the NF- $\kappa$ B signal pathway in human umbilical vein endothelial cells, *Inflamm Res*, **59**, 1019-1026 (2010)
- 16) Ishihara K1, Komuro Y, Nishiyama N, Yamasaki K, Hotta K, Effect of rebamipide on mucus secretion by endogenous prostaglandin-independent mechanism in rat gastric mucosa, *Arzneim.-Forsch.Drug Res.*, **42**(12), 1462-1466 (1992)
- 17) Arakawa T, Kobayashi K, Yoshikawa T, Tarnawski A, Rebamipide: Overview of its mechanisms of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing, *Dig Dis Sci*, **43**, 5S-13S (1998)
- 18) 島崎潤 (ドライアイ研究会), 2006年ドライアイ診断基準, *あたらしい眼科*, **24**, 181-184 (2007)
- 19) 横井則彦, ドライアイのコア・メカニズム - 涙液安定性仮説の考え方 -, *あたらしい眼科*, **29**, 291-297, (2012)
- 20) 横井則彦, 加藤弘明, ドライアイ診療のパラダイムシフト 眼表面の層別診断・層別治療, *京府医大誌*, **122**(8), 549 - 558 (2013)
- 21) Urashima H, Takeji Y, Okamoto T, Fujisawa S, Shinohara H, Rebamipide increases mucin-like substance contents and periodic acid Schiff reagent-positive cells density in normal rabbits. *J.Ocu.Pharmacol. Ther.* 28: 264-270 (2012)
- 22) Urashima H, Okamoto T, Takeji Y, Shinohara H, Fujisawa S, Rebamipide increases the amount of mucin-like substances on the conjunctiva and cornea in the N-acetylcysteine-treated in vivo model. *Cornea*, **23**, 613-619 (2004)
- 23) Kinoshita S, Awamura S, Oshiden K, Nakamichi N, Suzuki H, Yokoi N, Rebamipide Ophthalmic Suspension Phase II Study Group Rebamipide (REBAMIPIDE) in the treatment of dry eye: a randomized, double-masked, multicenter, placebo-controlled phase II study. *Ophthalmology*, **119**, 2471-2478 (2012)
- 24) Kinoshita S, Oshiden K, Awamura S, Suzuki H, Nakamichi N, Yokoi N, Rebamipide Ophthalmic Suspension Phase 3 Study Group A randomized, multicenter phase 3 study comparing 2% rebamipide (REBAMIPIDE) with 0.1% sodium hyaluronate in the treatment of dry eye. *Ophthalmology*, **120**, 1158-1165 (2013)
- 25) 日本眼科学会, [http://www.nichigan.or.jp/public/disease/hoka\\_dryeye.jsp](http://www.nichigan.or.jp/public/disease/hoka_dryeye.jsp)

- 26) 内野美樹, 内野裕一, 疫学から知り得たドライアイの本質: ドライアイってどれくらいいるの, *あたらしい眼科*, **29** (3), 305-308 (2012)
- 27) アニュアルレポート 2016, 参天製薬株式会社
- 28) ムコスタ点眼液UD2%インタビューフォーム, 大塚製薬株式会社, (2015)
- 29) Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al., Update clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis, *Cancer*, **109**, 820-831 (2007)
- 30) Zenda S, Matsuura K, Tachibana H, Homma A, Kirita T, Monden N, Iwae S, Ota Y, Akimoto T, Otsuru H, Tahara M, Kato K, Asai M., Multicenter phase II study of an opioid-based pain control program for head and neck cancer patients receiving chemoradiotherapy, *J Radiat Res*, **57**(3), 301-306 (2016)
- 31) Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, et al: Chemotherapy – induced and/or radiation therapy – induced oral mucositis. Complicating the treatment of cancer. *Neoplasia* **6**, 423-431(2004)
- 32) DATAMONITOR 社. Oral Mucositis 調査報告書 Reference Code BFHC0606. (2003)
- 33) 厚生労働省. 重篤有害事象疾患別対応マニュアル, 抗がん剤による口内炎 (2009)
- 34) Yokota T, Tachibana H, Konishi T, Yurikusa T, Hamauchi S, Sakai K, Nishikawa M, Suzuki M, Naganawa Y, Hagihara T, Tsumaki H, Kubo T, Sato M, Taguri M, Morita S, Eguchi T, Kubota K, Zenda S, Multicenter phase II study of an oral care program for patients with head and neck cancer receiving chemoradiotherapy, *Support Care Cancer*, **24**(7), 3029-3036 (2016)
- 35) Kawata K, Hanawa T, Hanawa K, Takamura T, Suzuki M, Nakajima S, Ito A, Unezaki S, Takahashi G, Sakayori S, Matsuzaki Z, Okamoto Y, Investigation of the Effect of the Rebamipide Mouthwash on the Crisis of the Stomatitis Induced by the Cancer Chemotherapy and/or Radiotherapy, *Journal of New Remedies & Clinics*, **50**, 273-280 (2001).
- 36) Yasuda T, Chiba H, Satomi T, Matsuo A, Kaneko T, Miyamatsu H, A pilot study of rebamipide-gargle for chemoradiotherapy-induced mucositis in oral cancer patients, *Gan To Kagaku Ryoho*, **35**(7), 1157-1161 (2008)
- 37) Yasuda T, Chiba H, Satomi T, Matsuo A, Kaneko T, Chikazu D, et al., Preventive effect of rebamipide gargle on chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral cancer: a pilot study, *J Oral Maxillofac Res*, **2**(4), 1-8 (2011)
- 38) Tosaka C, Tajima H, Inoue T, Moya M, Kobayashi M, Miura K, Tada Y, Masubuchi T, Hushimi C, Kamata S, Investigation of how to prevent mucositis induced by chemoradiotherapy, *Gan To Kagaku Ryoho*, **38**(10), 1647-1651 (2011)
- 39) 篠原章能, 中村将人, 鬼窪利英, 中村久美, がん化学療法による口腔粘膜炎に対するレバミピド含嗽液の効果, *薬学雑誌*, **135**( 8), 937-941 (2015)
- 40) Rabinow BE, Nanosuspensions in drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 785-796 (2004)

- 41) Gerrit Borchard, Drug Nanocrystals, Non-Biological Complex Drugs, 171-189, Springer (2015)
- 42) 森部久仁, 東頭二郎, 難溶性薬物のナノ結晶製剤, *Drug Delivery System*, **30**(2), 92-99 (2015)
- 43) J. Hu, K.P. Johnston, R.O. Williams III., Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **30**, 233–245 (2004)
- 44) Jia, L., Wong, J., Cerna, C. & Weitman, S, Effect of nanonization on absorption of 301029: ex vivo and in vivo pharmacokinetic correlations determined by liquid chromatography/mass spectrometry, *Pharm. Res.* **19**, 1091–1096 (2002).
- 45) R. Sauron, M. Wilkins, V. Jessent, A. Dubois, C. Maillot, A. Weil, Absence of food effect with a 145 mg nanoparticle fenofibrate tablet formulation, *Int. J. Clin. Pharm. Ther.*, **44**, 64–70 (2006)
- 46) J. Jinno, N. Kamada, M. Miyake, K. Yamada, T. Mukai, M. Odomi, H. Toguchi, G.G. Liversidge, K. Higaki, T. Kimura, Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorlywater-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs, *J. Control. Release*, **111**, 56–64 (2006)
- 47) Merisko-Liversidge, E, Formulation and antitumor activity evaluation of nanocrystalline suspensions of poorly soluble anticancer drugs, *Pharm. Res.* **13**, 272–278 (1996)
- 48) Kipp JE, The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs, *Int J Pharm*, **284**, 109–122. (2004)
- 49) Baert L, van't Klooster G, Dries W, Francois M, Wouters A, BasstanieE, Iterbeke K, Stappers F, Stevens P, Schueller L, Van Remoortere P, Kraus G, Wigerinck P, Rosier J, Development of a long-acting injectable formulation with nanoparticles of rilpivirine (TMC278) forHIV treatment. *Eur J Pharm Biopharm*, **72**(3): 502–508. (2009)
- 50) Darville, N., van Heerden, M., Vynckier, A., de Meulder, M., Sterkens, P., Annaert, P., van den Mooter, G., Intramuscular administration of paliperidone palmitate extended-release injectable microsuspension induces a subclinical inflammatory reaction modulating the pharmacokinetics in rats. *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2072–2087 (2014)
- 51) Tanioka H, Yokoi N, Komuro A, ShimamotoT, Kawasaki S, Matsuda A, Kinoshita S., Investigation of the corneal filament infilamentary keratitis., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**, 3696-3702. (2009)
- 52) 横井則彦, 坪田一男, ドライアイのコア・メカニズム—涙液安定性仮説の考え方—, *あたらしい眼科*, **29**, 291-297 (2012)
- 53) 横井則彦, 木下茂, 杯細胞増加とムチン産生作用をもつムコスタ点眼液, *あたらしい眼科*, **37**, 943-951 (2015)

- 54) 福田正道, 中嶋英雄, 春田淳平, 柴田伸亮, 柴田奈央子, 長田ひろみ, 関祐介, 三田哲大, 佐々木洋, レバミピド点眼液の角膜上皮に対する安全性に関する検討, *あたらしい眼科*, **30**, 1647-1471 (2013)
- 55) Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P, Topdown production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products, *Int J Pharm*, **364**(1), 64-75 (2008)
- 56) Moribe K, Ueda K, Limwikrant W, et al, Nano-sized crystalline drug production by milling technology. *Curr Pharm Des*, **19** 6246-6258 (2013)
- 57) Pongpeerapat A, Higash K, Tozuka Y, Moribe, K, Yamamoto K, Molecular interaction among probucol/PVP/SDS multicomponent system investigated by solid-state NMR, *Pharm. Res.*, **23**, 2566-2574 (2006)
- 58) Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G. G. & Cooper, E, Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm Sci.* **18**, 113-120 (2003)
- 59) Liedtke, S., Wissing, S., Muller, R. H. & Mader, K, Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics, *Int. J. Pharm.* **196**, 183-185 (2000)
- 60) Chan HK, Kwok PCL Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach., *Adv Drug Deliv Rev*, **63**, 406-416 (2011)
- 61) Vehring R, Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm Res*, **25**, 999-1022 (2008)
- 62) Gassmann P, List M, Schweitzer A, Sucker H, Hydrosols—alternatives for the parenteral application of poorly water soluble drugs, *Eur J Pharm Biopharm*, **40**, 64-72 (1994)
- 63) Hirakawa Y, Harada K, Development of methods of ultra-fine size reduction of slightly soluble medicinal crystals (2). Factors affecting the ultra-fine size reduction of oxolinic acid crystals. *Yakugaku Zasshi*, **103**, 690-695 (1983)
- 64) Hirakawa Y, Harada K, Studies on development of the ultrafine size reduction method of slightly soluble medicinal crystals. V. Size reduction of phenytoin and phenobarbital. *Yakugaku Zasshi*, **104**, 91-96 (1984)
- 65) Hasegawa S, Sekino H, Matsuoka O, Saito K, Sekino H, Morikawa A, Uchida K, Koike M, Azuma J, Bioequivalence of Rebamipide Granules and Tablets in Healthy Adult Male Volunteers. *Clin. Drug Invest.*, **23**(12), 771-779 (2003)
- 66) 永井康子, 麻彪, 石津敬司郎, 新しい攪拌方式による乳化粒子コントロール技術について, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **39** (1), 26-30 (2005)
- 67) 久光一誠, 萩原貴志, 超高速液-液せん断法によるナノエマルションの調製, *Fragrance Journal*, **8**, 69-73 (2003)

- 68) 平川 善行, 原田 清, 難溶性医薬品結晶の超微細化方法の開発に関する研究-3-オキソリン酸結晶の超微細化の成因の推論, *薬学雑誌*, **103**(11), 1215-1218 (1983)
- 69) H. C. van de Hulst : *Light Scattering by Small Particles*, Wiley, New York, NY (1957)
- 70) 斉藤光正, セラミックス超微粒子の特性と応用, *粉体と工業*, **30**(3), 35-40 (1998)
- 71) Kassem MA, Abdel Rahman AA, Ghorab MM, Ahmed MB, Khalil RM.,  
Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *Int J Pharm.*, **340**(1-2), 126-33 (2007)
- 72) Naito Y, Yoshikawa T, Inuma S, Miyazaki R, Yagi N, Yoshida N, Osumi T, Kondo M,  
Local gastric and serum rebamipide concentrations after oral application in human, *Arzneim-Forsch Drug Res*, **46**(II), 698-700 (1996)
- 73) Nakamura M, Akiba Y, Matsui H, Tsuchimoto K, Ishii H, Rebamipide binds to iNOS-positive cells in acetic acid-treated but not in ethanol-treated rat gastric mucosa, *Aliment Pharmacol Ther*, **18**(1), 76-81, 2003
- 74) Tahara K, Samura S, Tsuji K, Yamamoto H, Tsukada Y, Bando Y, Tsujimoto H, Morishita R, Kawashima Y, Oral nuclear factor- $\kappa$ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease, *Biomaterials*, **32**(3), 870-878 (2011)
- 75) Nakashima T, Uematsu N, Shibamori M, Sakurai K, Ishida T, Kiwada H, Establishment of an X-ray irradiation-induced glossitis model in rats: biphasic elevation of proinflammatory cytokines and chemokines mRNA expression and prevention of the tongue injuries by palifermin, *J Pharmacol Exp Ther*, **347**, 660-668 (2013)
- 76) Nakashima T, Sako N, Matsuda T, Uematsu N, Sakurai K, Ishida T, Novel submicronized rebamipide liquid with moderate viscosity: significant effects on oral mucositis in animal models, *Biol Pharm Bull*, **37**(4), 671-678 (2014)
- 77) Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P, Chemotherapy-induced and/or radiation therapy induced oral mucositis-- complicating the treatment of cancer, *Neoplasia*, **6**, 423-431 (2004)
- 78) Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al, Perspective on cancer therapy-induced mucosal injury, *Cancer*, **100**(9), 1995-2025 (2004)
- 79) Chong CR, Sullivan D, New uses for old drugs, *Nature*, **448**, 645-646 J (2007).
- 80) 沼田 稔, DR 研究 (既存薬再開発) への期待と課題- 米では “見捨てられた薬” の公式マッチングサイト -, *医薬ジャーナル*, **46** (5) 1337~1339 (2010)
- 81) 水島徹, ドラッグリポジショニング/ドラッグリプロファイリング (安全で安い薬を早く確実に患者へ届ける創薬戦略), *ファルマシア*, **49**(4), 310-314 (2013)
- 82) Sugai S, Takahashi H, Ohta S, Nishinarita M, Takei M, Sawada S, Yamaji K, Oka H, Umehara H, Koni I, Sugiyama E, Nishiyama S, Kawakami A, Efficacy and safety of rebamipide for the treatment of dry mouth symptoms in patients with Sjögren's syndrome: a double-blind placebo-controlled multicenter trial, *Mod Rheumatol*, **19**(2), 114-24 (2009)

- 83) Kohashi M, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y., Effective treatment with oral administration of rebamipide in a mouse model of Sjögren's syndrome, *Arthritis Rheum*, **58**(2),389-400 (2008)
- 84) Nakashima T, Maeda T, Nagamoto H, Kumakura T, Takai M, Mori T, Rebamipide enema is effective for treatment of experimental dextran sulfate sodium induced colitis in rats, *Dig Dis Sci*, 50 Suppl 1:S, 124-131 (2005)
- 85) Watanabe T, Takeuchi T, Handa O, Sakata Y, Tanigawa T, Shiba M, Naito Y, Higuchi K, Fujimoto K, Yoshikawa T, Arakawa T. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of high-dose rebamipide treatment for low-dose aspirin-induced moderate-to-severe small intestinal damage, *PLoS One*, **10**(4):e0122330 (2015)
- 86) 竹治康広, 中嶋英雄, 伊藤進策, 篠原久司, ドライアイ治療剤「ムコスタ®点眼液 UD2%」の開発, *医薬ジャーナル*, **52** (4) 1105~1109 (2016)
- 87) 岸誠一郎、小川暢也、抗潰瘍薬 Proamipide(OPC - 12759)の臨床第 I 相試験、*臨床成人病*, **19**(3) ページ、355-363 (1989)
- 88) 三宅正晃、向井正志、檜垣和孝、小腸における難吸収性薬物の吸収改善に関する検討、*薬剤学*, **74**(5), 361-365 (2014)