

後眼部への薬物送達を目的とした生体適合性ナノ粒子点眼製剤の開発

岐阜薬科大学 薬物送達学大講座 製剤学研究室

助教 田原 耕平

(共同研究者)

岐阜薬科大学 製剤学研究室 教授 竹内 洋文

岐阜薬科大学 製剤学研究室 准教授 戸塚 裕一

岐阜薬科大学 製剤学研究室 大学院生 廣中 耕平

はじめに

わが国では急速な高齢化社会と生活習慣病の進展に伴い糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症、緑内障等の後眼部疾患が増加しており（国内推定患者1,000万人）、失明原因の第一位となっている。現在、後眼部疾患の治療は眼内注射が唯一の手段であるが、眼部への注射は静脈注射等と比べ痛み、副作用が甚大である。そこで、扱いが容易で安全な点眼等の注射以外での製剤化が試みられてはいるが、眼組織は涙液層や房水排泄など侵入物質に対する巧妙な防御機構を備えており、現在まで、点眼により後眼部に薬剤を到達できる製剤は上市されていない。この現状を根本的に解決する事が可能となる、画期的なドラッグデリバリーシステム（DDS）技術により網膜疾患を治療できる点眼剤を開発することが望まれている。

我々は、微粒子DDS製剤の研究を展開する過程で、微粒子キャリアとして生体適合性の高い脂質二重膜から構成されるリポソームを用い、リポソーム粒子径をナノレベル（100nm）までに微細化することにより、リポソームが点眼により後眼部に到達することを見出した¹⁾。リポソームは脂質組成や荷電状態、粒子径、表面状態などを容易に制御できる特徴を有する。特に表面修飾により比較的容易に機能性が賦与できるため、機能性ポリマーを用いたリポソームの表面修飾に関する研究は盛んに展開されている。そこで、眼表面と相互作用すると考えられるポリマーでナノサイズのリポソームを表面修飾すれば、点眼後の眼表面におけるリポソーム滞留性を向上させることができ、後眼部への薬物移行量の増大が期待できると考えた。

目 的

本研究では、ナノサイズで安定性が高く、且つ粒子表面を機能性ポリマーで表面修飾したリポソームの設計と処方最適化を行い、リポソームによる後眼部への薬物移行量の増大を達成することを目的とした。

実験方法

リポソームを構成するリン脂質として、Egg phosphatidylcholine (EPC) を用いた。負の荷電物質としてDicetyl phosphate (DCP) を用いた。リポソームを標識する脂溶性の蛍光物質としてCoumarin-6を用いた。リポソーム懸濁液とポリマー溶液を攪拌下等量混合することで、リポソームの表面修飾を行った。リポソームの網膜への送達効率は、6-coumarinで蛍光標識したリポソームをマウスに点眼後、眼球の凍結切片を作成し、切片中の視神経から500 μ mの位置にある網膜を蛍光顕微鏡で観察した。また、網膜の内網状層 (IPL; Inner plexiform layer) の蛍光強度を数値化することで送達効率を評価した。ヒト結膜・角膜培養細胞における細胞毒性評価をMTS法により行った。

結果

ポリマー修飾リポソームの安定性評価

リポソームへの表面修飾に用いる機能性ポリマーは生体や細胞への付着性が報告されているポリ-L-リジン (PLL) を選択した。PLLは分子量の異なるグレードを用いた。PLLは PLL500 (MW; 500-2000)、PLL5000 (MW; 5000-15000)、PLL15000 (MW; 15000-30000)、PLL30000 (MW; 30000-70000) の4種類を用いた。今回調製したいずれのリポソームにおいても、粒子径は100から200 nmとなりサブミクロンサイズを示した。PLLのリポソームへの表面修飾により、粒子径の僅かな増大とゼータ電位の正方向へのシフトが認められた。これはリポソーム表面に修飾層が形成したことによるものと考えられた。今回調製したリポソームは、調製7日後においてもサブミクロンサイズを維持し、粒子の凝集は認められなかった。また、保存期間中を通じて顕著なゼータ電位のシフトは認められなかった。以上より、今回調製したリポソームが高い分散安定性と良好な保存安定性を有することが明らかとなった。

点眼投与後の網膜への送達効率に関する評価

PLLによるリポソームへの表面修飾及びその際のポリマーの分子量が、点眼後の網膜への送達効率に与える影響について評価した。結果を図1に示す。表面修飾することで未修飾のリポソームと比較し、網膜における蛍光強度が強くなる様子が観察された。これはポリマーによる表面修飾によりリポソームと眼表面の組織との相互作用が向上したためと推察された。また、ポリマーの分子量の増大に伴って蛍光強度は増大し、特にPLL15000を用いた場合に送達効率は最大となった。分子量の大きいPLL30000を用いた場合には蛍光強度は低下する傾向を示した。これらの結果から網膜への送達において、表面修飾に用いるポリマーの最適な分子量の存在が明らかとなった。

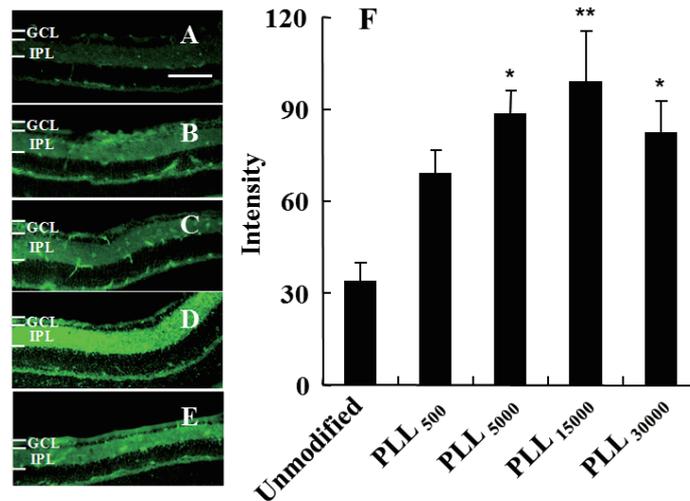


図1 The effect of PLL molecular weight on the efficiency of drug delivery by PLL-modified liposomes to the retina. Representative epifluorescence microscopy images of the retina 30 min after administration of eye drop preparations of (A) unmodified as well as (B) PLL500-, (C) PLL5000-, (D) PLL15000-, and (E) PLL30000-modified liposomes. The concentration of all PLLs was 0.005%. (F) Changes in median fluorescence intensity in IPL after administration of eye drop preparations of surface-modified liposomes. Data are shown as mean \pm SEM (n = 8). Comparisons were made with the unmodified liposome preparation; *p < 0.05, **p < 0.01. Scale bar, 50 μ m.

点眼投与後の網膜における蛍光強度の経時的変化

点眼後の網膜における送達効率の評価において、最も良好な送達効率を示した PLL15000 に関して蛍光強度の経時的変化を評価した。結果を図2に示す。点眼投与30分後において、PLL15000修飾リポソームは未修飾のリポソーム投与時に比べ高い蛍光強度を示した。また、その後も点眼投与90分後までは、いずれの時間においても未修飾リポソーム投与時に比べ、高い蛍光強度を示すことが明らかとなった。このことから、PLLによりリポソームを表面修飾することで、点眼による脂溶性化合物(蛍光標識物質として用いた6-coumarin)の網膜への送達効率を顕著に向上させる可能性が示唆された。

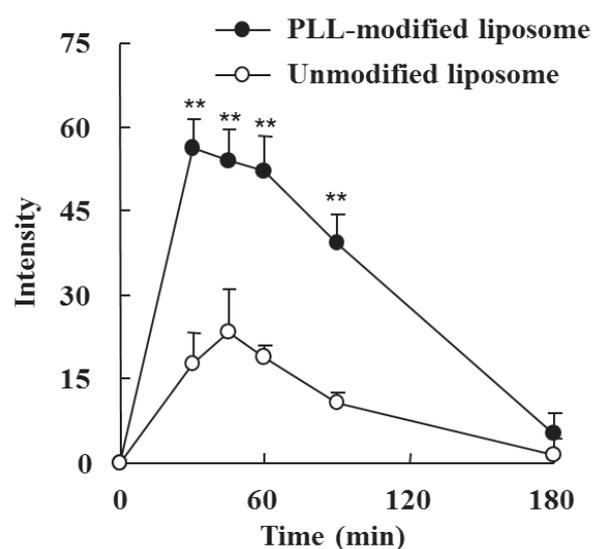


図2

図2 Time course of accumulated fluorescence intensity in IPL after administration of eye drop preparations of 0.005% PLL15000-modified liposomes (EPC:DCP:Cholesterol = 8:0.5:1). Data are shown as mean \pm SEM (n = 8). Comparisons were made with the unmodified liposome preparation; **p < 0.01.

結膜・角膜培養細胞を用いたPLL修飾リポソームの安全性評価

PLLで修飾したリポソームの安全性評価を結膜・角膜細胞を用いてMTS法により評価した。いずれの細胞においても、PLL溶液投与群で低い細胞生存率を示した。一方、PLLをリポソームに修飾させることにより、コントロール群と同程度の高い細胞生存率を示した。PLLのアミノ基がリポソーム膜への表面修飾に利用されたため、細胞に対して毒性を示すアミノ基の量が減少した結果、PLL修飾リポソームが高い細胞生存率を示したことが推察された。このことから、調製したPLL修飾リポソームが結膜、角膜のいずれの細胞に対しても高い安全性を有することが確認された。

要 約

分散性、保存安定性に優れたナノサイズのPLL表面修飾リポソームを調製することができた。さらにPLLを用いてリポソームを表面修飾することで、点眼後の網膜への送達効率が向上し、その送達効率は修飾に用いるPLLの分子量に依存することが明らかとなった。また、PLL修飾リポソームの安全性をMTS法により評価した結果、角膜、結膜細胞に対する高い安全性を確認した。以上よりPLLなどのポリペプチドを用いたリポソームの表面修飾により、点眼後の網膜への薬物送達効率が向上し、網膜への薬物送達を目指した点眼剤の設計に利用できることが明らかとなった²⁾。

文 献

1. Fujisawa T, Miyai H, Hironaka K, Tsukamoto T, Tahara K, Tozuka Y, Ito M, Takeuchi H. Liposomal diclofenac eye drop formulations targeting the retina: Formulation stability improvement using surface modification of liposomes. *Int J Pharm.* 436:564-567, 2012
2. Sasaki H, Karasawa K, Hironaka K, Tahara K, Tozuka Y, Takeuchi H. Retinal drug delivery using eyedrop preparations of poly-L-lysine modified liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* in press