

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08115

研究課題名(和文) NSAIDs 起因性消化管障害の制御に資する次世代型ナノ製剤の創製とその有用性評価

研究課題名(英文) Design of novel nanomedicine containing NSAIDs for improvement of drug-induced gastrointestinal lesions

研究代表者

長井 紀章 (NAGAI, Noriaki)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90411579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：臨床において、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)による消化管障害は重篤な問題である。我々は、このNSAIDs起因性消化管障害の制御を目指し、湿式ビーズミル法を用い、メロキシカム(MLX)ナノ結晶経口製剤を作製した(粒子径 48 ± 138 nm, 平均値 \pm 標準偏差)。本製剤は、従来の製剤と比較し、4.3倍バイオアベイラビリティが高まり、薬物投与量の減量を可能とした。さらに、これら製剤化に伴うNSAIDs投与量の減少が、薬剤の消化管粘膜直接刺激の低下を介し、障害誘発を軽減することを示した。本成果が安全なNSAIDs療法の確立に繋がることを期待する。

研究成果の概要(英文)：We designed new oral formulations containing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), such as meloxicam (MLX) solid nanoparticles, and investigate their usefulness by evaluating bioavailability and gastrointestinal lesions. The MLX solid nanoparticles were prepared using a bead mill method, and high quality dispersions containing MLX nanoparticles were prepared (MLXnano, particle size: 48 ± 138 nm, means \pm S.D.). The bioavailability in MLXnano was 4.3-fold higher in comparison with that in conventional MLX, and the MLX-induced gastrointestinal lesions in rats administered MLXnano, in consideration of bioavailability, were significantly less than for conventional MLX. An oral drug delivery system using drug nanoparticles may expand the usage of NSAIDs for therapy in the inflammatory field.

研究分野：医療薬学

キーワード：ナノ結晶製剤 口腔内崩壊錠 NSAIDs 消化管傷害 関節リウマチ バイオアベイラビリティ ビーズミル 湿式破碎

1. 研究開始当初の背景

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) は、シクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害剤であり、COX 依存に産生されるプロスタグランジン (PG、炎症増悪因子) を減少させることにより抗炎症作用を発揮する。この COX には、COX-1 と COX-2 が存在し、胃粘膜では COX-1 が、炎症部位では COX-2 が発現している。また、胃粘膜で PG は胃粘膜保護に関わることから、COX-1 及び COX-2 をともに阻害するインドメタシンやアスピリン (第一世代) は、胃粘膜における PG 低下に伴い、胃潰瘍を導くと考えられていた。このため、ロキソニンやボルタレンなど (第二世代) のように、NSAIDs のプロドラッグ化により胃粘膜障害の軽減が試みられたが、本製剤工夫では、胃潰瘍誘発副作用の問題を完全に解決するには至らなかった。これら試みに続き、胃粘膜で発現している COX-1 を阻害せず、炎症部分で発現する COX-2 のみを選択的に阻害するロフェコキシブ、セレコキシブ、メロキシカムといった COX-2 選択的 NSAIDs (第三世代) が開発され、NSAIDs の消化管障害の問題は解決したかに見えた。しかし、血液凝固調節系において、COX-1 によって合成されるトロンボキサン A2 が血液凝固を促進するのに対し、COX-2 により合成されるプロスタサイクリンは血液凝固を阻害するという性質を有していたことから、COX-2 を選択的に阻害した際は、血栓の誘発につながるという副作用が表れた。これら血栓により心筋梗塞のリスクが高まること、および長期投与では従来の NSAIDs と同程度の胃潰瘍誘発能がみられることが明らかとなり、現在、多くの COX-2 選択的 NSAIDs は市場から撤退しつつある。これら第三世代においては、COX-2 選択性が強いほど胃腸障害が少なく血管合併症が多いと思われるが、実際には COX-2 選択性よりも個々の薬剤の特性が強いかかわっている。この様な背景から、COX-2 選択阻害薬の中でも副作用の少ない医薬品を対象とし、製剤工夫により消化管障害を軽減する NSAIDs 製剤の開発が切望されている (図 1)。

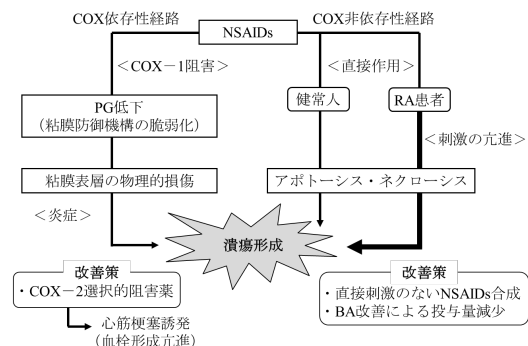


図 1 NSAIDs による消化管障害発生機序 (仮説) とその改善策

2. 研究の目的

NSAIDs による消化管障害は、PG 合成抑制を介した消化管粘膜防御機構の脆弱化に加え、薬剤自身による傷害性 (アポトーシス誘発等) の関与が知られている。申請者もまた、関節リウマチ (RA) 罹患時に炎症性サイトカインの感受性が高まり、NSAIDs 起因性消化管障害が起こりやすいことを報告してきた (Toxicology 2009;255:124-130)。一方、これら上昇は消化管粘膜で局所的にみられることから、食事の影響を受けず、安定した吸収性を有し、かつ投与量軽減を可能とする経口製剤を確立することで、薬物接刺激の低下及び血中濃度制御が容易となり、消化管障害の減弱が可能となるものと考えられた (図 2)。本実験ではこれら研究成果を基盤としナノ結晶化技術を用いた次世代型剤形 “口腔内崩壊型ナノ結晶製剤” を開発し、新たな関節リウマチ新治療法の確立について検討した。

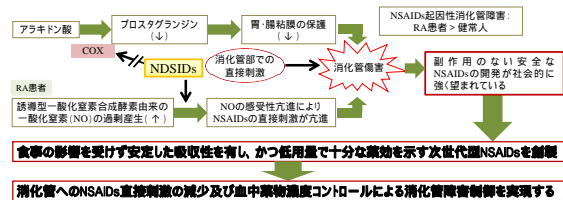


図 2 NSAIDs ナノ結晶医薬品による消化管障害の改善策

3. 研究の方法

(1) 実験動物：実験動物は Dark Agouti ラットを用いた。ウサギは 25 ± 3 の飼育室でケージに入れ、十分な給水と餌 (クレア CE-2) を与えたものを使用した。AA ラットはイソフルラン麻酔下、7 週齢 雄性 DA ラットの右後足及び尾部に滅菌死菌体 (Mycobacterium Butyricum) を投与することで作成した。

(2) メロキシカム口腔内崩壊錠製剤の作成：医薬品ナノ結晶経口製剤の標的薬剤として、COX-2 選択的阻害を有し、比較的安全である NSAIDs メロキシカム (MLX、和光純薬) を用いた。本研究では MLX (終濃度 1%) と添加物メチルセルロール (MC、終濃度 0.5%) の混合粉末を、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン (HP CD、終濃度 5%) に加え、0.1 mm ジルコニアビーズ及びビーズ式破碎装置 (和研薬社製) にて湿式破碎 (5、500 rpm、30 秒 × 30 回、冷却下) することで MLX ナノ粒子含有分散液を調製した (MLXnano)。比較対象とした MLX マイクロ粒子含有分散液 (MLXmicro) は、和光純薬から購入した粉末試料 (マイクロ MLX) と添加物 (MC 及び HP CD) を混合することで調製した。アラビアゴム 20 g を精製水 100 mL に加えて加熱溶解したのち、ポリビニルピロリジノン (PVP) 1 g を加えて同じく加熱溶解させ、D-マンニ

トール 4 g を加えて溶解したのち一日静置して添加剤液を調製する。次に 10% (w/w) HP CD 溶液及び MLXnano 含有粉体を用いて分散液を調製した。添加剤液と MLXnano 分散液を混和し、PTP シートに分注させて冷凍庫 (-80) にて一日静置、凍結乾燥機 EYELA FD-1000REC (東京理科器械株式会社) にて凍結乾燥を 3 日行い MLX 口腔内崩壊錠 (25 mg/錠) を調製した。粒子径測定には SALD-7100 (島津製作所製) を用い、屈折率 $1.45 \pm 0.10i$ にて粒子の平均粒子径及び分布を調べた。

(3) 薬物濃度の測定: MLX の濃度測定には HPLC 法を用い、カラムは Inertsil ODS-3 (2.1 × 50 mm、ジューエルサイエンス株式会社) 移動相にはリン酸二水素カリウム/メタノール/アセトニトリル (63/27/10 v/v/v) を用いた。移動相の流速は 0.25 mL/min、試料注入量 4 μL、吸収波長 364 nm にて行った。

(4) Caco-2 を用いた薬物透過実験: Transwell 上に 3.5×10^5 cells/well となる様細胞を播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で約 20 日間培養した。21 日目に膜抵抗がプレートに達したところで、透過実験に使用した。細胞を 37 °C で加温した透過実験用メディウムで 3 回洗浄し、30 分間インキュベーター内でプレインキュベーション後、膜抵抗を測定した。その後ドナー側を 0.01% (w/v) 薬物溶液 1.5 mL で満たし、インキュベーターを行った。経時的にリザーバー側の溶液を 50 μL 採取し、液中の薬物量を測定した。

(5) 経口投与後の血中濃度測定: 薬物血中動態は MLX 治療濃度である 0.2 mg/kg MLX を経口投与し、得られた結果を 1 次吸収の 2-コンパートメントモデル式にあてはめることで解析した。また、血液-時間曲線化面積 (AUC)、平均滞留時間 (MRT)、バイオアベイラビリティ (BA) を計算式から算出した。

(6) NSAIDs 誘発消化管傷害の評価: 前日より絶食させた AA ラットに MLXmicro 及び MLXnano 60 mg/kg をそれぞれ経口投与して胃粘膜傷害を惹起し、6 時間後胃部を摘出し生理食塩水で十分に洗浄後、切開部画像をデジタルカメラにて撮影した。この画像を画像解析ソフト Image J を用い傷害部位を面積として表した。面積は胃粘膜における傷害面積を胃粘膜総面積で除した比率を胃粘膜傷害面積とした。腸障害の惹起では非絶食の AA ラットに MLXmicro 及び MLXnano 60 mg/kg を経口投与し、24 時間後小腸を摘出し生理食塩水で十分に洗浄後、空腸 (小腸全体の上部 40%) と回腸 (小腸全体の下部 60%) に分け、小腸内面の画像をデジタルカメラにて撮影した。この画像を Image J を用い傷害部面積を算出し、腸粘膜における傷害面積を腸粘膜総面積で除した比率を腸粘膜傷害率として表した。

4. 研究成果

(1) MLX 口腔内崩壊錠剤の開発

MLXmicro の平均粒子径は $5.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ であったのに対し、MLXnano では平均粒子径 $48 \pm 138 \text{ nm}$ と各種添加剤及びビーズミル法を組み合わせることで MLX をナノサイズにすることが可能となった (図 3)。これら添加剤の役割を検討したところ、MC 非添加において湿式破碎を行った際には、薬物がメレンゲ状となり十分な微細化 (ナノ化) が行われなかった。また、HP CD 非存在下にて破碎を行った場合には、HP CD 存在下と比較し粗粒子となった。さらに HP CD 非存在下では凝集性が高くなるという結果が得られた。これら結果から、MC はミル法による薬物破碎を効果的に行う上で必須であり、HP CD は MLX ナノ結晶分散液の安定性向上に適した添加物であることを明らかとした。

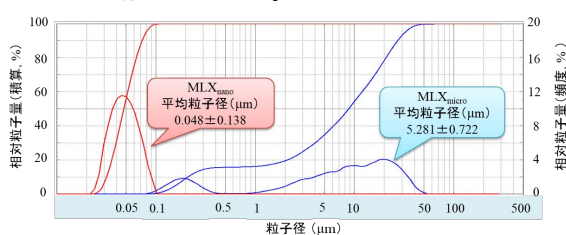


図 3 MLXnano 中薬物粒度分布

(2) MLXnano の Caco-2 細胞透過性の評価 (in vitro 実験)

図 4 は MLXmicro、MLXnano の Caco-2 膜の薬物透過量を示す。MLXnano 分散液では MLXmicro 分散液と比較し、高い薬物膜透過性が確認できた。

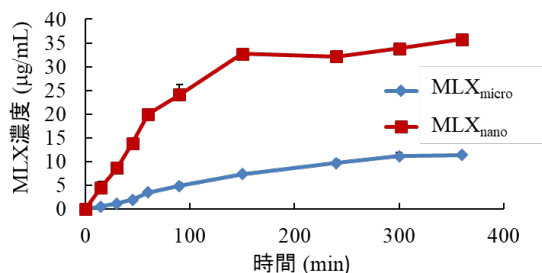


図 4 MLXnano の腸間膜透過性

(3) MLXnano 経口投与後の血中動態評価 (in vivo 実験)

図 5 は MLXmicro 及び MLXnano 経口投与時の血中 MLX 濃度の経時変化を示す。MLXnano 投与群の血中 MLX 濃度は、MLXmicro 投与群と比較し、有意に高値を示した。表 1 には MLX 血中濃度の速度論的パラメーターを示す。MLXnano 投与群では MLXmicro 粒子分散液と比較し、BA が 4.3 倍高値であり、吸収性に優れた製剤であることが確認できた。

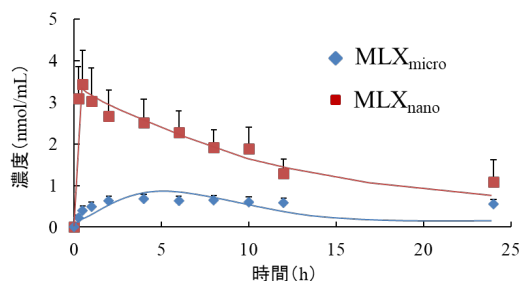


図5 MLX 口腔内崩壊錠経口投与時における血中薬物濃度変化

表1 MLX 口腔内崩壊錠経口投与時における速度論的パラメーター

	AUC (nmol·h/mL)	AUMC (nmol·h ² /mL)	MRT (h)	BA (%)
MLX _{micro}	9.56 ± 2.09	122 ± 29.2	12.4 ± 0.94	22.3 ± 4.88
MLX _{nano}	41.0 ± 12.3	392 ± 145	9.03 ± 1.11	95.9 ± 24.9

(4) 薬物ナノ結晶含有製剤の胃、小腸粘膜傷害性評価

図6はMLX口腔内崩壊錠の過剰投与時における胃及、空腸、回腸の傷害度を示す。胃及び小腸において60 mg/kg MLX_{nano}投与群では60 mg/kg MLX_{micro}投与群と比較し、消化管傷害性は高値を示した(図7)。これらは、ナノ粒子化による高い血中移行性(投与後のBAの違い)が関与しているものと考えられた。そこで、先の*in vivo*実験で得られたBAの結果を基に、傷害惹起に用いたMLX投与量60 mg/kgを、1/4濃度である15 mg/kgに変更し、血中濃度を同等とした系にて消化管傷害性の比較を行った。その結果、MLX_{nano}投与群の胃傷害性はMLX_{micro}投与群の61.6%であり、空腸傷害性はMLX_{micro}投与群の8.96%であった。またMLX_{nano}投与後の回腸傷害性はMLX_{micro}投与群の57.7%であった。これらの結果は、本研究にて提案したMLXのナノ結晶を用いた経口投与システムは、その高いBAのためMLXの投与量の減量が可能であり、NSAIDsの副作用である消化管傷害の軽減が期待できることを示した。

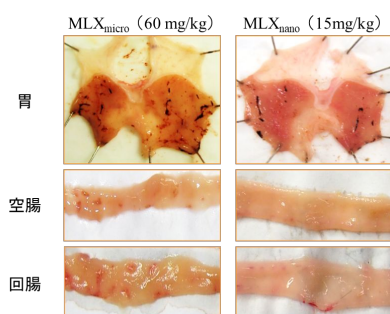


図6 MLX_{micro}及びMLX_{nano}投与時における胃、空腸及び回腸粘膜の代表的写真

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計10件)

Nagai N., Ogata F., Otake H., Kawasaki N., Nakazawa Y., Kanai K., Okamoto N., Shimomura Y. Co-instillation of nano-solid magnesium hydroxide enhances corneal permeability of dissolved timolol. *Exp Eye Res.*, 査読有, 165, 118-124, 2017. DOI: 10.1016/j.exer.2017.10.002.

Deguchi S., Otake H., Nakazawa Y., Hiramatsu N., Yamamoto N., Nagai N. Ophthalmic Formulation Containing Nilvadipine Nanoparticles Prevents Retinal Dysfunction in Rats Injected with Streptozotocin. 査読有, *Int. J. Mol. Sci.*, 18, pii: E2720, 2017. DOI: 10.3390/ijms18122720.

長井紀章. NSAIDsのベネフィットとリスク. NSAIDs起因性消化管障害の制御を目指した製剤工夫. *BIO Clinica*, 査読有, 32, 1099-1101, 2017. <http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/bio.html>.

Nagai N., Deguchi S., Otake H., Hiramatsu N., Yamamoto N. Therapeutic Effect of Cilostazol Ophthalmic Nanodispersions on Retinal Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 18, pii: E1971, 2017. DOI: 10.3390/ijms18091971.

Ueno A., Yamaoka S., Ito Y., Kotake T., Nakazawa Y., Nagai N. Improvement of Dissolution Rate and Stability in a Pirenexine Ophthalmic Suspension by the Bead Mill Methods. *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 137, 635-641, 2017. DOI: 10.1248/yakushi.16-00267.

Nagai N., Nakazawa Y., Ito Y., Kanai K., Okamoto N., Shimomura Y. A Nanoparticle-Based Ophthalmic Formulation of Dexamethasone Enhances Corneal Permeability of the Drug and Prolongs Its Corneal Residence Time. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40, 1055-1062, 2017. DOI: 10.1248/bpb.b17-00137.

Nagai N., Ueno A., Tanino T., Oka M., Ito Y. Co-administration of Magnesium Ion Prevents Indomethacin-Induced Intestinal Ulcerogenic Lesions in Adjuvant-Induced Arthritis Rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 40, 910-915, 2017. DOI: 10.1248/bpb.b17-00151.

Nagai N., Iwamae A., Tanimoto S., Yoshioka C., Ito Y. Pharmacokinetics and Antiinflammatory Effect of a Novel Gel System Containing Ketoprofen Solid Nanoparticles. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 38, 1918-1924, 2015. DOI: 10.1248/bpb.b15-00567.

Nagai N., Tanino T., Ito Y. Excessive Interleukin 18 Relate the Aggravation of Indomethacin-Induced Intestinal Ulcerogenic Lesions in Adjuvant-Induced Arthritis Rat. Biol. Pharm. Bull., 査読有, 38, 1580-1590, 2015. DOI: 10.1248/bpb.b15-00375.

Nagai N., Yoshioka C., Ito Y. Topical Therapies for Rheumatoid Arthritis by Gel Ointments containing Indomethacin Nanoparticles in Adjuvant-Induced Arthritis Rat. J. Oleo Sci., 査読有, 64, 337-346, 2015. DOI: 10.5650/jos.ess14170.

〔学会発表〕(計 6 件)

中村 翼, 谷野令奈, 大竹裕子, 長井紀章. インドメタシンナノ結晶からなる口腔内崩壊錠の製造と小腸粘膜透過機構の解明, 第 67 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2017 年 10 月 14 日, 兵庫.

上田純也, 大竹裕子, 長井紀章. レバミピドナノ結晶製剤の開発とインドメタシン惹起消化管障害に対する治療効果, 第 67 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2017 年 10 月 14 日, 兵庫.

上田利香, 山岡大起, 真野裕, 長井紀章, 伊藤吉將. 湿式ビーズミルによる難溶解性薬物のナノ粒子化の検討: セルロース系添加物がビーズミル破碎効率に与える影響, 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年 10 月 15 日, 大阪.

真野裕, 山岡大起, 上田利香, 長井紀章, 伊藤吉將. ナノ化技術を用いたメロキシカム経口製剤の開発とその有用性評価, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, 横浜.

岩前亜弥, 長井紀章, 伊藤吉將, 松井誠, 森本英二. ケトプロフェン・ナノ結晶を用いた新規経皮適用製剤の設計とその有用性評価, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, 横浜.

真野裕, 山岡大起, 上田利香, 長井紀章, 伊藤吉將. メロキシカムナノ結晶を用いた新規経口製剤の創製 バイオアベイラビリティの向上と副作用軽減, 第 65 回日本

薬学会近畿支部総会・大会, 2015 年 10 月 17 日, 大阪.

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.phar.kindai.ac.jp/pharmtec/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 紀章 (NAGAI, Noriaki)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90411579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし