

論文審査結果の要旨

本論文は、繰り返し直面する環境温度変化の急変に基づいて作られたストレス動物、SARTストレス負荷動物を用いて、不安やうつなどの気分障害とストレスの関係を神経行動薬理学的手法により探ろうとしたものである。論文内容は要旨に記した通りであるが、第1章では、強制水泳テスト法からこの動物は不安を伴ったうつ状態にあることを、第2章では寒冷や拘束などの他のストレス動物との類似点並びに異なる点を調べ、第3章では、高架式十字迷路テスト法からSARTストレス動物は明らかに不安状態にあり、また、この不安にはベンゾジアゼピン受容体及びセロトニン5-HT_{1A}受容体が関与することなどを認めた。さらに、第4章において、この不安様行動にはCRF(corticotropin-releasing factor)が関係しているが、これには視床下部—脳下垂体—副腎皮質系を介するCRFは関与せず、大脳辺縁系や海馬に投射するCRF神経系の活性化が関与していることを認めている。

このような4章からなる申請者の研究内容・論文は、SARTストレス動物は、うつを伴った不安状態の検索やそのような病態を緩解する薬物の探索に利用しうる良い実験モデル動物となり得るであろうことを示した。このように、SARTストレス動物というモデル動物を使用することにより、不安やうつといった気分障害とストレスの関係を一部明らかにしたという点においても優れた研究成果といえ、また、これらの疾病に物療法の可能性をも示したものであり、これらの疾病に関する医療の一端に貢献しうるものである。

なお、本研究の実験方法及びその結果の解釈も適切であると認められる。

以上の理由から、本論文は博士の学位論文として十分価値あるものと判断する。

氏名	安 枝 真 一
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬 第 5 5 号
学位授与の日付	平成 17 年 9 月 15 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	点眼剤の品質評価ならびにヒト涙液中ムチンの分析に関する研究
論文審査委員 (主査)	教授 掛 樋 一 晃
(副主査)	教授 岡 部 巨 雄
(副主査)	教授 岩 城 正 宏

論文内容の要旨

点眼剤による眼への薬物の局所投与は、経口投与や静脈内投与と比較して全身的な副作用を軽減でき、また薬物を必要とされる眼局所に送達するのに適している。貝殻の中で薬剤を溶かして点眼して使うというきわめて原始的な方法で始まった点眼剤は、明治大正時代にはガラス点眼ビンへと発展し、昭和 30 年代に現在のようなプラスチック容器へと姿を変えた。現在、抗緑内障剤、抗アレルギー剤、抗菌剤、抗白内障剤、抗炎症剤などさまざまな効能の点眼液が市販されているが、さらに新しい点眼剤の開発が精力的に行われている。

眼は外界の情報のうち光に関する情報を脳に伝える視覚器官であり、ヒトは外界からの情報の 80 %を目から取り込んでいるといわれる。眼は頭蓋骨のくぼみに納まり、外側はまぶたおよび涙液層によって守られ、わずかな異物も感じとることができる極めて敏感な器官である。従って、このデリケートな器官に直接投与される点眼剤の開発では、「有効性」「安全性」「安定性」を評価するとき、種々の製剤の中でも最も慎重な検討が必要である。

患者の使用に際し薬物の効果が安全かつ最大限に発揮されるための点眼剤処方検討される。点眼剤の剤形は患者のコンプライアンスや製品の品質保証、製造難易度などの点から、水性点眼剤が最も好ましい。しかし、対象となる薬物が水に易溶性であるとは限らない。近年、医薬品として開発される化合物は複雑な構造を有し、水に難溶性のものが増えている。水に溶解しない薬物を点眼剤とする場合は懸濁性点眼剤とされるが、懸濁された薬物粒子の凝集や再分散性が問題となっている。懸濁性点眼剤が凝集したり、再分散性が悪い場合、点眼時の薬物投与量がばらつき、過剰投与による安全性への問題や過少投与による有効性の低下が懸念される。点眼剤には刺激低減や微生物の二次汚染防止のために等張化剤、緩衝剤や保存剤などの添加剤が加えられる。また、懸濁性点眼剤の場合には懸濁粒子の分散化のために懸濁化剤が加えられるため、それらの添加剤が懸濁された薬物粒子の凝集や再分散性に及ぼす効果を評価して適切な添加剤の種類と量を決定しなければならない。しかし、現在まで、添加剤の種類や量と懸濁粒子の凝集や再分散性の関係を適切に評価する方法は確立されているとは言えない状況である。

点眼剤の開発において、対象となる薬物の水中における安定性は点眼剤の開発におけるもう一つの重要な問題である。点眼剤は製造されてから有効期限までの 2~3 年間、薬物が水溶液あるいは懸濁液中で安定でなければならない。従って、開発初期段階における水溶液あるいは懸濁液中での薬物の安定性の評価が点眼剤としての開発の可否を左右する。また、有機合成された薬物は、合成原料や中間体の残留や合成過程で生じる副生成物および保存時に生じる分解物が、製造時に点眼剤に直接混入する。そのため薬物の不純物および分解物の分析は、品質評価および安全性評価の観点から点眼剤の開発にとって極めて重要であり、薬物中の不純物および分解物を高感度で特異的に分析する方法の開発が要求される。また、開発された分析方法が目的とする不純物および分解物プロファイルを適切に評価できるかどうかを十分に検証しなければならない。

点眼された薬物が効果を発揮するには、眼組織中を移行して疾患部位に到達する必要があるため、点眼剤の開発において眼内移行性の評価は薬物の効果を評価する上で最も重要である。点眼剤では水性剤や懸濁性剤などの剤形の違いおよび添加剤の種類や添加量の違いが眼組織における薬物移行性に影響を及ぼすため、眼組織中の薬物およびその代謝物の濃度を経時的に測定しなければならない。しかし、眼組織の採取には動物を屠殺しなければならない。血液や尿のように一個体から複数回の採取を行うことができない。また、一個体から採取できる組織量も非常に少ない。さらに、眼組織中の薬物およびその代謝物の濃度測定では当然タンパク質などの生体由来成分による妨害が避けられない。従って、眼組織中の薬物およびその代謝物の測定には生体由来成分による妨害を避けて高感度で分析する技術が必要とされる。

点眼剤開発において有効性を評価するとき、眼疾患に関する標的物質あるいは現象を発見しなければならない。眼疾患マーカーとして発見された標的物質に対する点眼剤の作用や治療効果を見極めることで、スクリーニングや薬効評価が行われる。ドライアイは、涙液の分泌が減少したり涙液の安定性が悪いことから角膜が乾燥して角膜にキズがついたり、種々の不快な症状が生じる疾患である。日本国内のドライアイ患者数は 1600 万人-2200 万人と推定され、パソコン常用者、コンタクトレンズ使用者および女性に多い傾向があると報告されている。涙液層はその表面から油層、水層、ムコイド層の 3 層から形成され、眼表面を保護している。ムコイド層の主要成分はムチンであり、涙液の粘性を保ちながら涙液の安定性を維持する役割を担っている。また、一部のドライアイ患者では涙液中ムチンの減少が報告されている。ムチンはタンパク質のセリンあるいはスレオニン残基の水酸基を介して O-グリカンを高含量で有する糖タンパク質であり、糖鎖末端に結合したシアル酸をムチンのマーカーとして利用できる。

以上のような背景をもとに、著者は点眼剤の開発においてその品質評価および眼疾患に関与する生体内物質の分析についてこれまで研究を進めてきた。

第 1 章では、フルオロメトロン懸濁液およびインドメタシン懸濁液の表面張力と再分散性の関係を調べ、懸濁化剤として水溶性高分子を用いた場合、表面張力と再分散性の間に相関があることを発見した。水溶性高分子の最適な添加濃度の設定は、長時間放置後に凝集やケーキングを起こさない懸濁性点眼剤の製造に非常に重要であり、良好な再分散性を示す懸濁液に添加すべき水溶性高分子の濃度には至適な範囲があることを明らかにした。本法を応用すれば良好な再分散性を示す懸濁液の適切な水溶性高分子濃度を決定することができ、表面張力の測定が再分散性に優れた懸濁性点眼剤を製剤化するための有益な検証手段であることを示した。

第 2 章では、エタボン酸ロレプレドノール (LE) の純度および安定性評価のために、フェニルシリカカラムを用いる HPLC 法を開発した。開発された方法が、LE 中の不純物の分析に十分な精度を有していることを分析法バリデーション試験により確認した。本法は品質管理試験のような定型的業務や安定性試験にも使用できることが示された。固体状態での LE の安定性を評価した結果、点眼剤に製造するまで LE は密閉容器にて低湿度、遮光下で保存しなければならないことがわかった。懸濁液中での LE の安定性を評価した結果、LE を含有する点眼剤は中性から

論文審査結果の要旨

弱酸性懸濁液が良いと考えられた。また、点眼剤の市販容器は透明性プラスチック容器を用いるが、LEは光に不安定であるため、LEの点眼剤は遮光保存すべきであることが示された。

第3章では、セミマイクロ HPLC とカラムスイッチング法を用いて房水中のジフルブレドナート (DFBA) とその活性代謝物 (DFB, DFBA の脱アセチル体) の高感度分析法を開発した。最初に DFBA および DFB はビンカートンタイプカラムに吸着され、生体由来のタンパク質成分を除去した後、カラムスイッチングによりセミマイクロカラムで分析した。本法を 0.002% DFBA 乳濁性点眼液点眼 1 時間後のウサギ房水中濃度測定に応用したところ、DFBA は検出されず、DFB は 4.3 ± 3.1 ng/ml であった。DFBA は血液中で容易に DFB および HFB に加水分解される。しかし、DFBA はウサギ房水中で容易に脱アセチル体に変化するが、さらに加水分解は起こらないことが示された。DFBA 乳剤性点眼剤を使用するとき、活性代謝物である DFB が房水中で代謝されないことは、有効性および安全性評価の面から非常に重要な知見である。セミマイクロ HPLC とカラムスイッチング法の組み合わせは、眼内へ移行した薬物の新しい評価手段になることを示した。

第4章では、シアル酸を指標として涙液中のムチン量を HPLC により測定する方法を開発した。13名のボランティアから採取した涙液中には Neu5Ac のみが存在し、Neu5Gc と KDN は存在しなかった。コンタクトレンズ装着者の涙液中のシアル酸量が非装着者に比べて顕著に減少することを発見した。SDS-PAGE およびセルロースアセテート膜電気泳動を用いてシアル酸減少に起因するタンパク質の変化を精査した。涙液を SDS-PAGE で分析した結果、200kDa 以下のバンドではコンタクトレンズ装着によるタンパク質の種類ならびに量の変化は認められなかった。また各バンドのシアル酸量を求めた結果、回収率が非常に低かった (NW: 15.7%, CW: 32.8%)。回収できなかった約 70% のシアル酸を調査するため、セルロースアセテート膜電気泳動とレクチン染色を組み合わせることで涙液中の高分子量タンパク質を分析した。レクチンとしてムチンに多く含まれる O-結合型糖鎖中にある Tn 抗原に高い親和性を示す ABA を用いた。コンタクトレンズ装着者の涙液で ABA に染色され、かつシアル酸を多量に含むバンドが劇的に減少していることが明らかとなり、コンタクトレンズ装着者による Neu5Ac 量の減少はムチンの減少に起因することを示した。

著者は点眼剤の品質評価を目指し、(1) 表面張力を用いる懸濁性点眼剤の評価、(2) 点眼剤開発のためのステロイド性薬物ロテブレドノールエタボネートの純度および安定性評価、(3) セミマイクロ HPLC とカラムスイッチング法を用いる房水中のステロイド性薬物ジフルブレドナートおよびその活性代謝物 DFB の高感度分析ならびに眼疾患に関与する生体内物質の分析法の開発を目指して、(4) ヒト涙液中ムチンの分析に関する研究を実施した。これらの研究で得られた知見が、今後の新規点眼剤の開発に少しでも役立つことを希望する。

本論文は、点眼剤の開発において重要な品質評価に関する研究を実施し、さらに眼疾患に関与する生体内物質の分析を目的としている。

点眼剤の品質評価法として、3項目について研究を行い、以下の成果をあげた。① 懸濁性点眼剤の再分散性の評価のため、この分野ではこれまで利用されたことがない表面張力という新しいアプローチを用いて懸濁性点眼剤の物理的性質を評価する方法を開発した。② 点眼剤成分として使用されるステロイド性薬物ロテブレドノールエタボネートの純度および安定性評価のためにフェニルシリカカラムを用いる HPLC 法を開発した。この方法を用いた安定性評価の結果から、ロテブレドノールエタボネートを含有する点眼剤は中性から弱酸性懸濁液が良いと結論付けた。③ 微量の試料しか採取できないために分析が比較的難しい房水中のステロイド性薬物ジフルブレドナートおよびその活性代謝物 DFB を高感度で分析するため、セミマイクロ HPLC とカラムスイッチング法を用いる分析法を開発した。また、その過程でセミマイクロ HPLC とカラムスイッチング法の組み合わせが、眼内へ移行した薬物の新しい評価手段になることを示した。さらに、眼疾患に関与する生体内物質の分析法の開発を目指して、ヒト涙液中ムチンの分析に関する研究を行い、④ シアル酸を指標として涙液中のムチン量を HPLC により測定する方法を開発した。この方法を用いて涙液中シアル酸量に及ぼすコンタクトレンズ装着の影響を調査し、涙液中のシアル酸量がコンタクトレンズ装着者でコンタクトレンズ非装着者の 50% 以下であることを示した。さらに研究を進めた結果、コンタクトレンズ装着に伴うシアル酸量の減少は、涙液中のムチン型糖タンパク質の減少に起因することを明らかにした。

以上のように本論文で述べられた知見は、点眼剤の開発に際して有益な指標を与えるものであり、本論文は博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。