

ビーズ粉砕によるリボフラビン非水系ナノ懸濁液の調製
及び物性評価

2015 年

佐藤 貴 幸

目次

序論.....	1
第 1 章 ビーズ粉砕によるリボフラビンナノ粒子の調製.....	4
第 1 節 リボフラビンの物理化学的性質.....	4
第 2 節 非水系基剤の物理化学的性質.....	6
第 3 節 ビーズ粉砕条件の検討.....	7
第 4 節 ビーズ粉砕によるリボフラビンナノ懸濁液の評価.....	11
第 5 節 結論.....	15
第 2 章 リボフラビンの非水系分散媒の最適化.....	16
第 1 節 ナノ懸濁液の分散性に及ぼす非水系基剤の影響.....	16
第 2 節 ナノ懸濁液の皮膚透過性に及ぼす非水系基剤の影響.....	23
第 3 節 結論.....	24
第 3 章 OC-NS の物性評価.....	26
第 1 節 皮膚透過性に及ぼすリボフラビンのナノ粒子化の影響.....	26
第 2 節 リボフラビンナノ粒子の皮膚透過ルートの考察.....	29

第3節 結論.....	31
第4章 OC-NSの分散性向上検討	32
第1節 界面活性剤のOC-NSの分散性への影響	32
第2節 界面活性剤のOC-NSの皮膚透過性への影響	35
第3節 結論.....	35
結語.....	36
謝辞.....	37
実験の部.....	38
参考文献.....	44
論文目録.....	50
主査、副査名	51

序論

ヒト皮膚の表面には厚さ約 0.2 mm 程度の表皮が存在し、構成される角化細胞の成熟度により4つの層に分かれている。その最外層は角質層といい、死んだ角化細胞や角層間脂質などから成り、皮膚のバリア機能として存在し、水分の保持や侵入物を防ぐ重要な役割を果たす[1]。この脂溶性に富んだ角質層の存在により、親水性薬物の皮膚透過性は一般的に低く[2-3]、皮膚透過に適した分配係数 $\log K_{ow}$ は 2~3 である[4]。親水性薬物を含む皮膚透過性が低い薬物の透過性を改善するための方法がいくつか検討されている。化学的促進法として促進剤を配合する方法が知られている。皮膚への刺激は起こりにくいものの薬効発現に十分な皮膚透過量を得ることは容易ではない[5]。物理的促進法として、イオントフォーシス[6-7]やマイクロニードル[8-9]が知られている。どちらも皮膚のバリア機能を低下させ、薬物の透過性を向上させる手法であるが、高価なデバイスが必要なこと、長期投与時の安全性などが懸念されることから、これらに適した薬物は限定される。皮膚刺激性を最小限に抑えながらも、薬物透過性を向上させる促進法が望まれている。

近年、ナノ粒子を用いた薬物の皮膚透過性改善に関する報告がなされている。固体脂質を用いたナノ粒子である Solid lipid nanoparticle や Nanostructured lipid carrier は、皮膚に塗布した際に形成するナノ粒子被膜による皮膚の水和現象を利用し皮膚透過性を促進させる[10]。皮膚の密封により角質層のケラチンが水和することで角質層の親水性が高くなることが知られている[11]。PLGA (poly (lactic-co-glycolic acid))[12-13]及びキトサン[13-14]などのポリマーナノ粒子では、毛包への移行による皮膚透過性向上が報告されている。毛包の皮膚表面積に対する割合は約 0.1%程度と小さいため、高い皮膚透過性量は望めないものの、毛包の表面は角質層が存在しないことから[1]、皮膚透過は速やかであると考えられる [15]。ほとんど皮膚透過しない薬物や毛包への作用を期

待する薬物に対して有用な方法である。さらに、親油性界面活性剤を固体状態で被覆したナノ粒子を油性基剤に分散させた Solid in Oil (S/O) ナノ懸濁液の場合、薬物透過のバリアである角質層にナノ粒子が浸透することで、薬物の透過性が向上することが報告されており[16]、ラテックスナノ粒子についても角質層への浸透が確認されている[17]。以上のように、皮膚適用製剤にナノ粒子を用いることにより、皮膚透過性の低い薬物の透過性を向上できることが期待される。

ナノ粒子の調製方法としては、粒子径分布のシャープなナノ粒子が容易に調製可能なボトムアップ方法が汎用されている。薬物にポリマーや脂質、界面活性剤等を加えて乳化した後、溶媒の留去や温度変化などにより粒子を固化させ、遠心分離、沈殿及び乾燥によりナノ粒子が得られる。この段階ではナノ粒子は凝集体であり、その凝集力は強く、再分散させることが非常に難しい。ナノ粒子を皮膚適用製剤として応用するためには、得られたナノ粒子を再度均一に分散させる工程も必要になるため、ナノ粒子の調製は煩雑となる。

ナノ粒子は経口吸収製剤にも応用され、既に医薬品として市販化されている[18]。難水溶性薬物をナノ粒子化することにより、溶解速度や消化管での滞留性が向上し、消化管での吸収性が改善される[19-20]。この難水溶性薬物のナノ粒子化方法についても様々な方法が試みられているが、その中でもトップダウン法であるビーズ粉砕が注目されている。トップダウンによる粉砕方法には、乾式粉砕であるピンミルやジェットミル、湿式粉砕であるボールミルなどが以前より検討されてきているが、ナノ粒子化は困難である。湿式粉砕の一つであるビーズ粉砕は、塗料、セラミックス、カーボンブラックなどで粒子の解砕を目的に以前から用いられている。近年、ビーズの微小化やビーズの攪拌に適した装置の開発等により、ビーズ粉砕がナノ粒子化方法としても用いられるようになり、さらに薬物のナノ粒子化に対しても検討されはじめている[21-23]。ビーズ粉砕によるナノ粒子化のメリットとしては、薬物と界面活性剤等をビーズとともに液中で攪拌することにより

簡便に調製可能なことである。ビーズ粉砕を用いれば、高濃度懸濁液の調製やスケールアップが容易であり、さらに目的とするナノ懸濁液を一度に調製できるため、再分散の必要がないことが大きなメリットである。

ビーズ粉砕によるナノ粒子化は、非水系基剤を用いれば難水溶性薬物だけでなく水溶性薬物にも応用が可能であると予想される。ナノ粒子化することにより皮膚透過性の向上が期待される薬物は多数存在する。しかし、ビーズ粉砕による水溶性薬物のナノ粒子化に関する報告はされていないのが現状である。本研究の最終目的は、親水性薬物の皮膚透過性を改善するために、ナノ粒子技術を皮膚適用製剤に応用することである。親水性薬物のモデル薬物としてリボフラビンを選定した。リボフラビンはビタミン B2 とよばれ、その欠乏又は代謝障害が関与すると推定されたペラグラ、尋常性ざ瘡、日光皮膚炎などに有効であり、注射剤及び経口投与製剤が上市されている。また、海外ではリボフラビンと他のビタミン B 群とを同時に配合した外用化粧品があるが[24]、外用医薬品は存在しない。リボフラビンのオクタノール／水分配係数は-1.46[25]と親水性であり、奥田らにより角質層の透過性が低いことが報告されている[26]。リボフラビンは蛍光物質であるため、皮膚への浸透性(皮膚内動態)を視覚的に評価できることも本薬物を選択した理由である。リボフラビンのナノ粒子化については、難水溶性薬物の水中でのビーズ粉砕を応用し、親水性薬物であるリボフラビンを非水系基剤中でビーズ粉砕することを試みた。非水系基剤については、皮膚適用製剤に使用前例があるものの中から、粘度、密度及び官能基が異なる 8 種(流動パラフィン、ミスチン酸イソプロピル、ジカプリル酸プロピレングリコール、カプリル／カプリン酸トリグリセリド、オレイン酸、オレイルアルコール、トリアセチン及び炭酸プロピレン)を選定した。これら非水系基剤へのリボフラビンの溶解度、ビーズ粉砕にて調製した懸濁液中のリボフラビンの粒子径、分散性及び皮膚透過性を評価し、皮膚適用製剤への応用の可能性を検討した。

第 1 章 ビーズ粉砕によるリボフラビンナノ粒子の調製

本章では、リボフラビンのナノ粒子化を目的として、様々な非水系基剤中でのリボフラビンのビーズ粉砕を実施した。まず、非水系基剤のオレイン酸中で 3 種類のサイズのビーズ径を用いてビーズ粉砕を実施し、粉砕条件を決定した。決定した粉砕条件にて 8 種類の非水系基剤中でリボフラビンを粉砕し、その粒子径及び電子顕微鏡 (SEM) 観察を行い、ビーズ粉砕によるリボフラビンのナノ粒子化の可否を評価した。

第 1 節 リボフラビンの物理化学的性質

リボフラビンの化学構造式及び物理化学的性質を Fig. 1 に示す。リボフラビンの分子量は 376.4、オクタノール／水分配係数 ($\log K_{ow}$) は -1.46 である。 $\log K_{ow}$ については皮膚透過性が良好な指標である 2~3 よりも小さく、親水性薬物であるリボフラビンは皮膚を透過しにくいと予想され、奥田らにより角質層の透過性が低いことが報告されている[26]。リボフラビンを 75~150 μm に篩過した後の SEM 画像及び粉末 X 線回折測定結果を Fig. 2 及び Fig. 3 に示す。リボフラビンは結晶性の粒子であることが確認された。

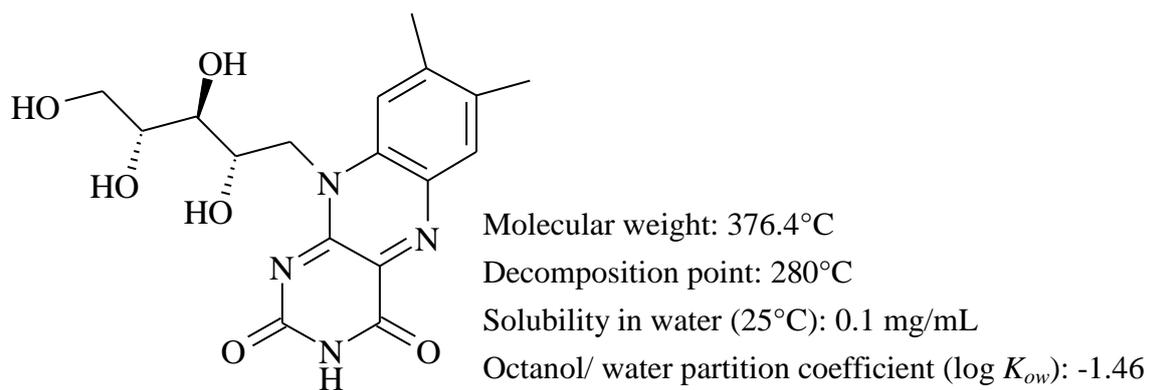


Fig. 1. Chemical Structure and Physicochemical Properties of Riboflavin [25]

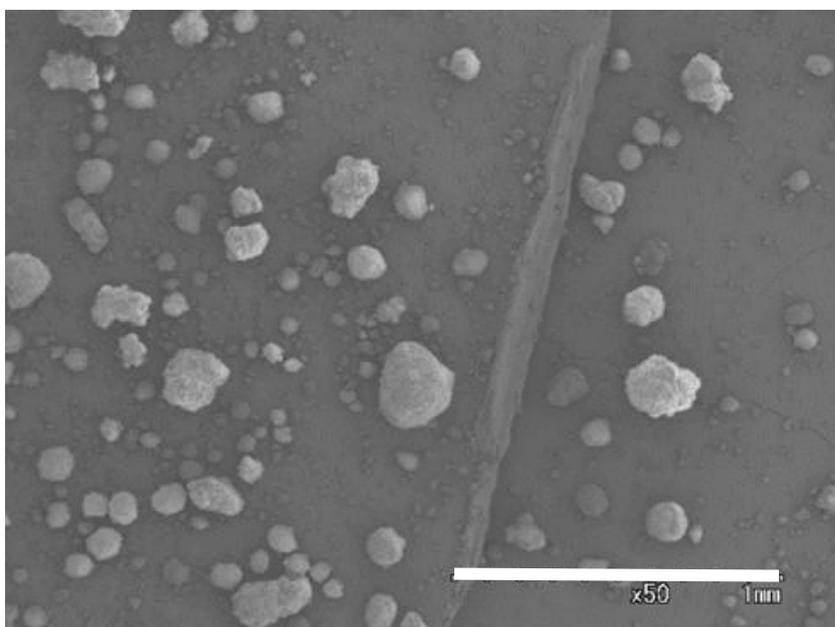


Fig. 2. SEM Image of Riboflavin

Riboflavin was sieved from 75 to 150 μm. The scale bar indicates 1000 μm.

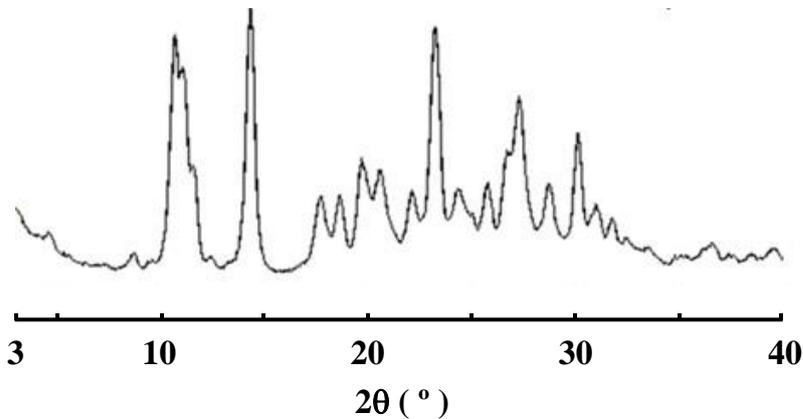


Fig. 3. Powder X-ray Diffraction Pattern of Riboflavin

第 2 節 非水系基剤の物理化学的性質

非水系基剤は、皮膚適用製剤に用いられている中から選択した。非極性基剤としては流動パラフィン(LP)を、極性基剤としては油性基剤として使用されるミリスチン酸イソプロピル(IM)、ジカプリル酸プロピレングリコール(PD)、カプリル/カプリン酸トリグリセリド(CT)、オレイルアルコール(OL)、オレイン酸(OC)を、難水溶性化合物の溶解剤としても使用されるトリアセチン(TA)および炭酸プロピレン(PC)を選定し、これらの粘度、密度及びこれら基剤に対するリボフラビンの溶解度を測定した結果を Table 1 に示す。これら非水系基剤の粘度は 3.2~100 mPa・s と大きな差があり、流動パラフィンが最も高く、炭酸プロピレンが最も低い結果を示した。密度は、トリアセチン及び炭酸プロピレンが他の基剤よりも高い値を示した。また、リボフラビンの非水系基剤に対する溶解度はいずれも低く、最大でも炭酸プロピレンの 13 µg/mL であり、次いでトリアセチンの順であった。水に対する溶解性は、トリアセチン及び炭酸プロピレンのみやや溶けやすく、それ以外の基剤はほとんど溶けない[27]。さらに、Table 2 に示す非水系基剤の水への溶解度から[28]、炭酸プロピレン及びトリアセチンとその他の非水系基剤では大きな差があることがわかる。以上の結果より、炭酸プロピレン及びトリアセチンは他の基剤よりも高い極性を

有していることが推察される。なお、カプリル／カプリン酸トリグリセリド及びトリアセチンは共にトリグリセリドであるが、トリアセチンは側鎖が酢酸であり、炭素鎖が短いためにより高い極性を示すと考察した。

Table 1. Viscosity of the Non-Aqueous Bases and Solubility of Riboflavin (25°C)

Non-aqueous bases		Viscosity (mPa·s)	Density (g/cm ³)	Solubility of riboflavin (µg/mL)
Liquid paraffin	(LP)	100	0.86	– ^{a)}
Isopropyl myristate	(IM)	4.4	0.85	– ^{a)}
Propylene glycol dicaprylate	(PD)	7.9	0.92	– ^{a)}
Caprylic/capric triglyceride	(CT)	25	0.94	– ^{a)}
Oleic acid	(OC)	25	0.89	0.14
Oleyl alcohol	(OL)	27	0.84	2.1
Triacetin	(TA)	19	1.15	3.0
Propylene carbonate	(PC)	3.2	1.20	13

Each value represents the mean (n = 3).

a) Less than the limit of quantitation (0.048 µg/mL)

Table 2. Solubility of the Non-Aqueous Bases in Water (25°C)[28]

Non-aqueous bases	Solubility of water (µg/mL)
IM	1.4×10^{-2}
OC	1.2×10^{-2}
OL	7.0×10^{-2}
TA	5.8×10^4
PC	1.8×10^5

第3節 ビーズ粉砕条件の検討

はじめに、非水系基剤のうちオレイン酸を用いたビーズ粉砕条件の検討を実施した。

Fig. 4 にビーズ粉砕中のリボフラビン懸濁液の写真を示す。本検討におけるビーズ粉砕

では、特別な装置ではなく、ジルコニアビーズ、攪拌機及び容器(ガラスビーカー)のみを使用して調製した。



Fig. 4. Photographic Image of Riboflavin Suspension during Bead Milling

Fig. 5 にリボフラビンの平均粒子径及び懸濁液の粘度に及ぼす粉砕時間とビーズ径の影響について検討した結果を示す。0.5 mm 及び 1.0 mm 径のビーズを使用した場合、粉砕時間の延長に伴いリボフラビンの平均粒子径の減少が認められ、粉砕開始 6 時間以降にリボフラビンの平均粒子径がほぼ一定となった。なお、懸濁液の粘度については、粉砕時間に関わらずほぼ一定であった。

一方、0.1 mm 径ビーズを用いて同様の粉砕検討を実施して得られた懸濁液では、直ちにリボフラビン粒子の沈降が認められ、分散状態の粒子がほとんどないことから動的光散乱法による粒子径の算出が出来なかった。以上の結果より、0.1 mm 径のビーズでは粉砕はほとんど進行しないことが明らかとなった。

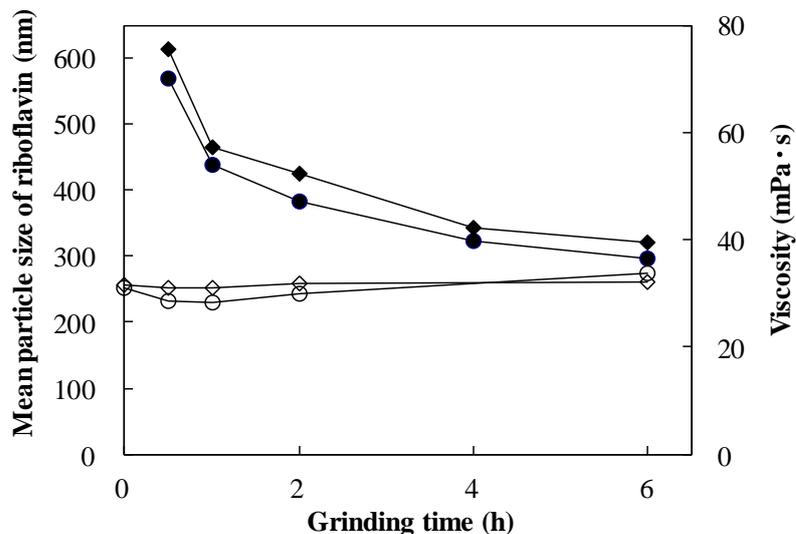


Fig. 5. Effect of Grinding Time and Bead Size on the Particle Size and Viscosity of Riboflavin Suspension in OC

Key: (●) particle size; ground with 0.5 mm beads, (◆) particle size; ground with 1.0 mm beads, (○) viscosity; ground with 0.5 mm beads, (◇) viscosity; ground with 1.0 mm beads

次に、1.0 mm 径のビーズを用いて 1 時間粉碎した後、0.1 mm 径のビーズに置き換えて粉碎した結果を Fig. 6 に示す。0.1 mm 径ビーズに置き換えて粉碎を再開してからわずか 1 時間後に平均粒子径が一定となり、1.0 mm または 0.5 mm 径のビーズ単独で粉碎するよりも高い粉碎効率が得られた。

顔料、セラミックス等の分野では、凝集した粒子の解砕・ナノ分散を目的としてビーズ粉碎が行われている。凝集力の強い粒子をナノ分散させるためにはビーズの大きさや速さが重要であり、小さいビーズほど衝突頻度が上昇し、高い分散効率が期待される[29]。粉碎とは、引張力、圧縮力、せん断力、曲げ、ねじり等の外力が固体にかかった際、固体の結合力を上回るときの破壊により生じる現象であり、そのための破砕エネルギーが必要となる[30]。攪拌中のビーズ速度がビーズ径によらず同じと考えた場合、運動エネルギーは質量に比例するため、0.1 mm 径

のビーズの運動エネルギーは 0.5 mm 径の 125 分の 1、1.0 mm 径に対しては僅か 1000 分の 1 となり大きな差が生じる。0.1 mm 径のビーズで粉碎が進行しなかった原因としては、ビーズの運動エネルギーが全てリボフラビン粒子の破碎に用いられると仮定すれば、粉碎開始時はリボフラビン粒子が大きいため、0.1 mm 径のビーズではリボフラビンの破碎エネルギーを超えるエネルギーが与えられなかったと考察した。一方、粉碎の進行に伴い粒子の凝集により形成される粉体層の割合が大きくなることで粉碎効率が減少する。微粉碎を実現させるためには、その粉体層形成を防ぐため粉碎媒体（ビーズ）と粒子の衝突頻度を上げることが重要であるとの報告がある[31]。1.0 mm 及び 0.1 mm 径のビーズの併用によって粉碎効率が向上した要因としては、まず 1.0 mm 径ビーズの粉碎により 0.1 mm 径のビーズでも破碎可能な程度までリボフラビンが微細化され、さらに 0.1 mm 径のビーズに置き換えることで衝突頻度が上昇し、粉体層の形成が抑制されることで高い粉碎効率が得られたと考察した（同じ質量で比較した場合、0.1 mm 径のビーズの個数は、0.5 mm 径及び 1.0 mm 径の 125 倍及び 1000 倍となる）。なお、1.0 mm 及び 0.1 mm 径のビーズを併用した場合、粉碎 2 時間後に粒子径は一定となったが、それ以上小さくならなかった。これは、粉碎により粒子が微小化するとメカノケミカル活性（結晶格子のひずみや無定形化、表面における格子欠陥や活性点の発生、高いポテンシャル場をもつ新鮮断面の生成）が発現することで凝集による粉体層形成が顕著になり、0.1 mm 径のビーズでも粉碎力が有効に伝達されにくくなり粉碎確率が低下したためと推察された[32-33]。以上の結果より、高い粉碎効率を目指した場合、粉碎初期には高い粉碎エネルギーが得られるように大きいビーズ径を使用し、ある程度粉碎された後は衝突頻度の上昇を目的に小さいビーズを使用することが重要である。ビーズ粉碎により薬物のナノ粒子を得るには用いる薬物粒子の強度や粉碎により生じる凝集の程度、使用する非水系基剤ごとに適切な粉碎

条件にて実施することが望ましい。

本研究では、いずれのビーズ径でも到達した平均粒子径は約 300~400 nm であったことから、以後の検討における粉碎条件としては、0.5 mm 径のビーズを用いて 6 時間粉碎することとした。なお、粉碎中は懸濁液の温度は 30°C 付近までしか上昇しなかったため、温度制御せずに実施することとした。

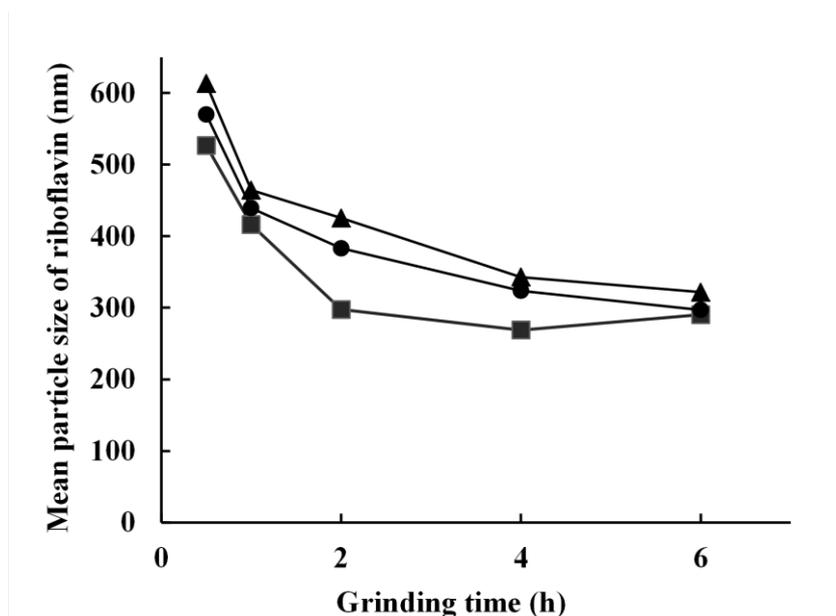


Fig. 6. Mean Particle Size of Riboflavin Suspension in OC Prepared by Using Different Sizes of Beads

Key: (▲) ground with 1.0 mm beads, (●) ground with 0.5 mm beads, (■) ground with 0.1 mm beads for 5 h after ground with 1.0 mm beads for 1 h.

第 4 節 ビーズ粉碎によるリボフラビンナノ懸濁液の評価

Fig. 7 に未粉碎のリボフラビンをオレイン酸にボルテックスミキサーを用いて分散させた物理混合懸濁液 (OC-S) 及びオレイン酸中で 0.5 mm 径ビーズで 6 時間粉碎して得られたナノ懸濁液 (OC-NS) をガラスバイアルに充填した直後の写真を示す。OC-S ではリボフラビン粒子が直ちに沈降したものの、OC-NS では沈降は直ぐには認められず、ビーズ粉

砕によりリボフラビンの分散性が明らかに向上した。

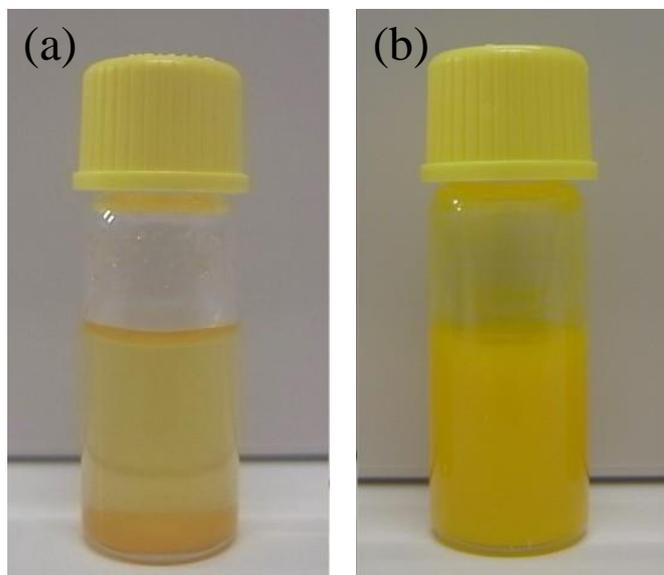


Fig. 7. Macroscopic Appearance of Riboflavin Suspensions Prepared by (a) Dispersing with Vortex Mixer (OC-S) and (b) Grinding with 0.5 mm Beads for 6 h (OC-NS)

OC-NS 中のリボフラビンの結晶性を評価した。Fig. 8 に OC-NS からオレイン酸を分離したリボフラビンの粉末 X 線回折測定結果を示す。ビーズ粉砕したリボフラビンの回折ピークは未粉砕と比較してほとんど変化は認められなかったことから、ビーズ粉砕中にリボフラビンの非晶質化はほとんど起こらないことが明らかとなった。ビーズ粉砕により粒子が非晶質化し、分散媒中への溶解が過飽和となった場合、保存期間中に粒子径の増大や粒子形状が変化する可能性がある。ビーズ粉砕による懸濁液は、物理的安定性面でも有利である。

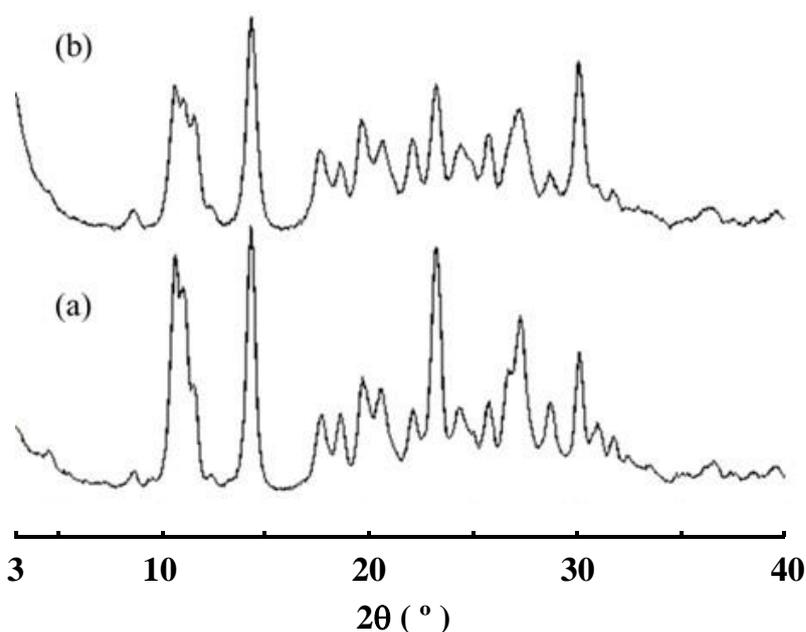


Fig. 8. Powder X-ray Diffraction Patterns of (a) Intact Riboflavin and (b) Ground Riboflavin Separated from the OC-NS
 OC-NS was prepared by grinding with 0.5 mm beads for 6 h.

8種類の非水系基剤 (XX) 中で 0.5 mm 径ビーズでリボフラビンを 6 時間粉碎して得られた懸濁液 (XX-NS) の粒子径を動的光散乱法により測定した結果を Table 3 に示す。平均粒子径は 206~469 nm を示し、基剤により大きな差は認められなかった。Fig. 9 にこれらのビーズ粉碎した懸濁液中のリボフラビンの SEM 画像を示す。いずれの基剤においても、一次粒子径が 500 nm 以下で表面が滑らかな粒子が凝集している様子が観察された。以上の結果から、様々な粘度や密度の非水基剤中でリボフラビンをナノ粒子化できることが明らかとなった。

Table 3. Particle Size of Riboflavin Prepared by Bead Milling for 6 h

Sample name	Particle size (nm)
OL-NS	206 ± 7
PC-NS	217 ± 21
TA-NS	219 ± 7
OC-NS	345 ± 17
IM-NS	347 ± 45
CT-NS	366 ± 12
PD-NS	420 ± 8
LP-NS	469 ± 32

Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

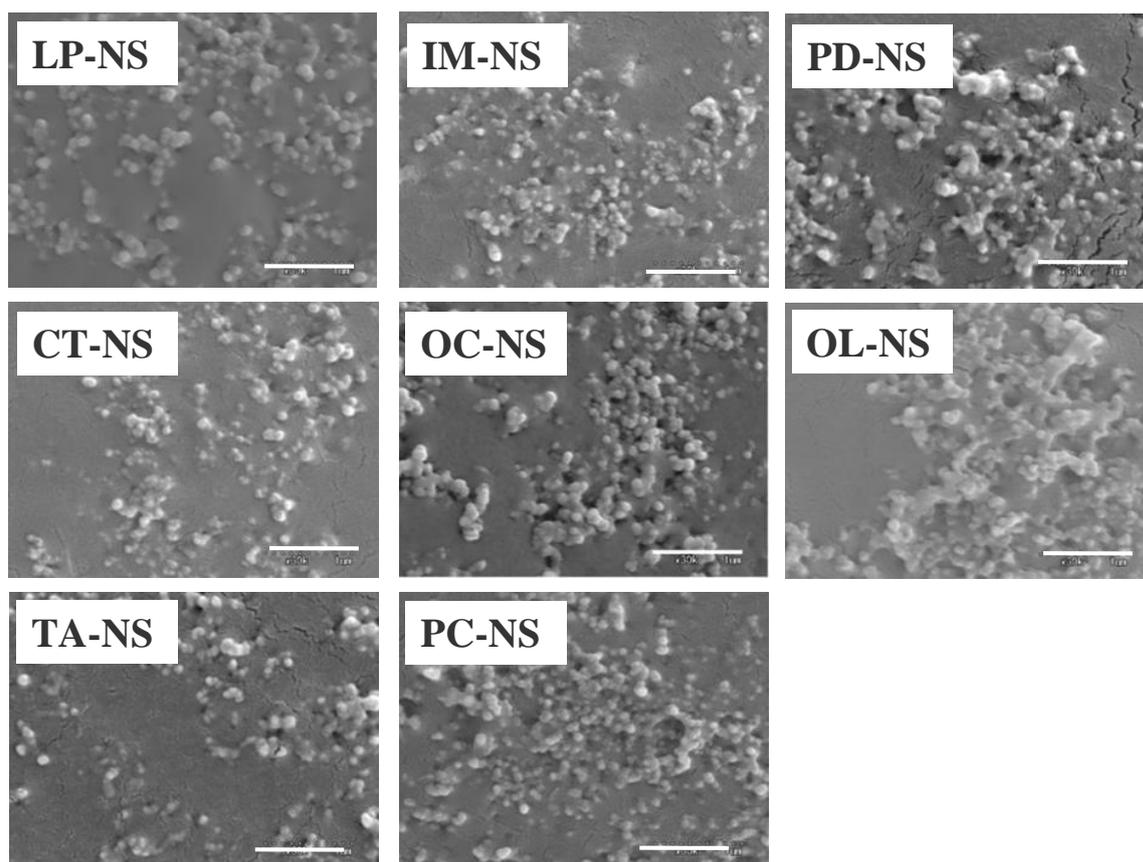


Fig. 9. SEM Images of Riboflavin Obtained from Riboflavin Suspensions
The scale bar indicates 1 μm .

第5節 結論

ビーズ粉砕によるリボフラビンのナノ粒子の調製について検討した結果、0.5 及び 1.0 mm 径ビーズではリボフラビンの粉砕が進行し、6 時間後に粒子径が一定に達した。リボフラビンはビーズ粉砕においても非晶質化せず、結晶性が保持された。8 種類の非水系基剤中でのビーズ粉砕により調製した懸濁液中のリボフラビンの動的光散乱による平均粒子径は 206～469 nm であり、SEM 画像からも 500 nm 以下の粒子が確認された。

以上の結果より、リボフラビンを非水系基剤中でビーズ粉砕することにより、リボフラビンナノ懸濁液の調製が可能であることが明らかとなった。

第2章 リボフラビンの非水系分散媒の最適化

本章では、リボフラビンナノ懸濁液の非水系基剤を選定するため、リボフラビンの分散性及び皮膚透過性による非水系基剤の比較を実施した。まず、ビーズ粉碎にて調製したリボフラビンナノ懸濁液の分散性を評価し、そこから選定した非水系基剤を用いて調製したナノ懸濁液の皮膚透過試験の結果から、最も良好な皮膚透過性が得られる非水系基剤をリボフラビンナノ懸濁液の分散媒として選定することとした。

第1節 ナノ懸濁液の分散性に及ぼす非水系基剤の影響

非水系基剤中で 0.5 mm 径のビーズを用いて 6 時間粉碎することにより調製した非水系リボフラビンナノ懸濁液の分散性の評価を実施した。各非水系リボフラビンナノ懸濁液を 25°C で 1 及び 2 週間静置保存した後の分散性を Fig. 10 に示す。1 週間及び 2 週間静置保存後の分散性は 40~99% 及び 35~98% であり、流動パラフィン及びミリスチン酸イソプロピル以外の非水系基剤に良好に分散した。

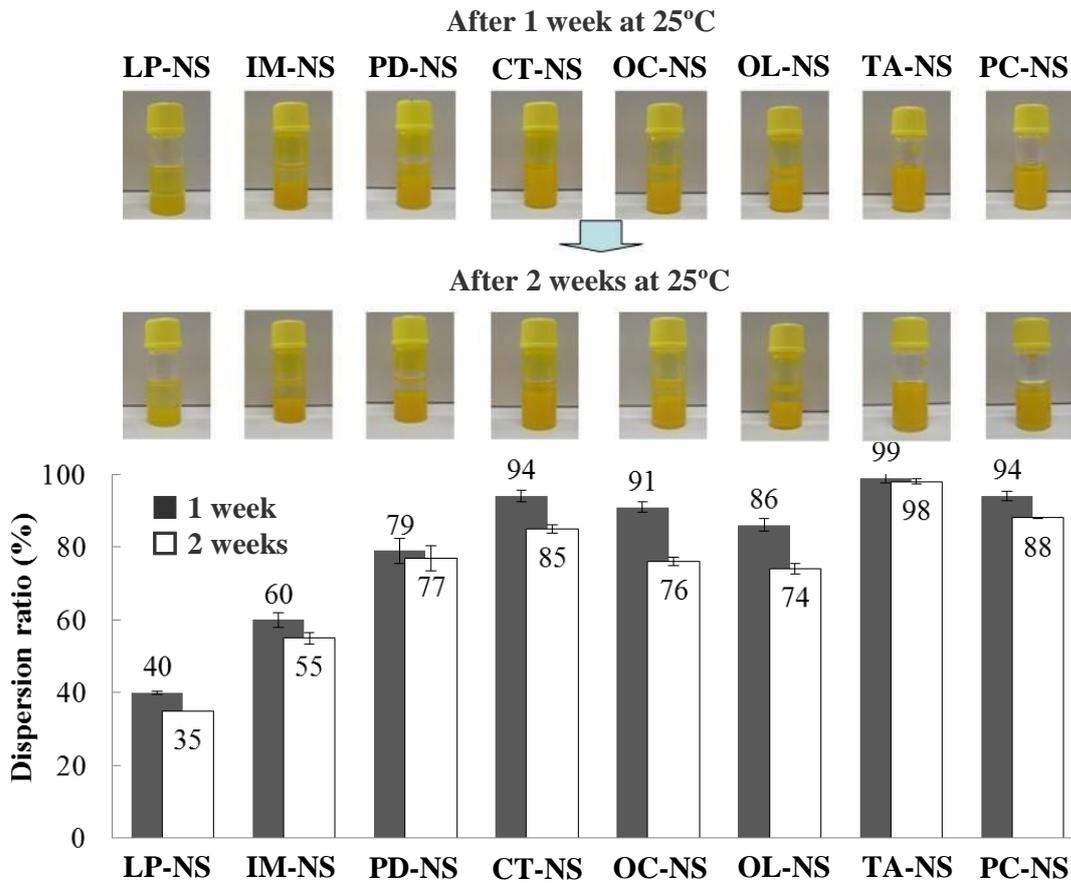


Fig. 10. Changes in the Appearance and Dispersion Ratio of Riboflavin Nanosuspensions after Storage at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 1 Week (■) and 2 Weeks (□)

Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

ここで、分散系での粒子の沈降速度は Stokes の式[34] (1)に従う。

$$W_s = D_s^2 g (\rho_s - \rho) / 18 \mu \quad (1)$$

分散粒子の沈降速度 W_s は、粒子と分散媒の密度差 ($\rho_s - \rho$)、粒子の直径 D_s の二乗に比例し、分散媒の粘度 μ に反比例する。リボフラビンの密度は ACD/Percepta Platform

(ver. 2012, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada)により 1.65 g/cm^3 と予測された。Stokes の式の沈降速度を用いて算出した分散性(計算値)を Table 4 に示す。非水系基剤の中で高い密度を有し、粘度も中程度であったトリアセチンのナノ懸濁液の分散性は最も良好であった。しかしながら、最も粘度が低い炭酸プロピレンは計算値よりも高い分散性を示し、粘度が最も高い流動パラフィンが予想よりも低い結果を示した。これらの結果から、分散性については Stokes の式からだけでは説明は不十分であり、他の要因が関係していると考察した。

Table 4. Calculated and Measured Dispersion Ratios of Riboflavin Nanosuspensions

			LP- NS	IM- NS	PD- NS	CT- NS	OC- NS	OL- NS	TA- NS	PC- NS
Dispersion ratio (%)	Storage for	Calculated	96	55	66	92	93	98	98	86
	1 week	Measured	40	60	79	94	91	86	99	94
	Storage for	Calculated	93	10	33	84	85	95	95	73
	2 weeks	Measured	35	55	77	85	76	74	98	88
Riboflavin	Mean particle size (nm)		469	347	420	366	345	206	219	217
Non-aqueous base	Base density (g/cm^3)		0.86	0.85	0.92	0.94	0.89	0.84	1.15	1.2
	Viscosity ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)		100	4.4	7.9	25	25	27	19	3.2

Fig. 10 に各種ナノ懸濁液を光学顕微鏡により観察した結果を示す。何れの懸濁液においてもリボフラビン粒子の凝集が確認されたが、その程度は非水系基剤の種類によって異なり、流動パラフィンで最も大きく炭酸プロピレン及びトリアセチンで小さい傾向を示した。ビーズ粉碎中には、機械的粉碎、分散媒への湿潤(濡れ)、分散安定化が複合的に生じ粉碎が進行すると考えられている。粉碎により粒子径が小さくなれば、表面積が増加することにより表面自由エネルギーが増大するため系は不安定となり、表面積が小さくなるよう凝集が生じる傾向にある。粒子の凝集により見かけの粒子が大きくなれば沈降速

度が大きくなり分散性が低下することから、凝集性もふまえて考察する必要がある。まず、粒子の分散媒への濡れを考えた場合、粒子と分散媒の相互作用にはファンデルワールス力(London 分散力)だけでなく、粒子表面の静電場と分散媒の双極子との間に働く相互作用も存在することから、粒子が親水性の場合は極性を有する分散媒の方が濡れ性が高い。トリアセチンや炭酸プロピレンは他の非水系基剤より高い極性を有するため、濡れ性の高さによりリボフラビン粒子の凝集が抑えられ、高い分散性が得られたと考察された。流動パラフィンは無極性を有する飽和炭化水素から成り立っている無極性基剤であることから、リボフラビンに対する濡れ性が低く、凝集によるみかけの粒子の粗大化により分散性が低くなったと考えられた。なお、ミリスチン酸イソプロピル、ジカプリル酸プロピレングリコール、カプリル／カプリン酸トリグリセリド、オレイン酸及びオレイルアルコールなどは官能基を有する極性油剤と呼ばれる基剤であるが、一般に極性油剤は誘電率が小さいことから[35-36]、濡れ性による凝集抑制は期待できない。

粒子の分散安定化については、電気二重層による反発力と分子間力による粒子間引力による安定化理論である DLVO 理論がよく知られている[37]。しかし、非水系では分散媒の解離度が小さくイオン数が水系に比べ極端に小さくなることから、ゼータ電位の減少により反発力が小さくなるため電荷による分散を期待することはできない。従って、非水系での分散安定化には界面活性剤や高分子の吸着による立体障害効果が重要である[38]。親水性吸着材の表面積を求める評価方法として高級脂肪酸が用いられることがあるが、これは高級脂肪酸末端のカルボキシル基が親水性吸着材の表面に吸着する現象を利用したものである[39]。また、Wu らはヘキサン中のコバルトナノ粒子表面にオレイン酸が化学吸着することにより分散性が向上することを報告している[40]。これらの結果をふまえて今回の結果を考察すると、ミリスチン酸イソプロピル、ジカプリル酸プロピレングリコール、カプリル／カプリン酸トリグリセリド、オレイン酸及びオレイルアルコールでは、それらの官能基がリボフラビン粒子表面に吸着することにより反発力が働き、流動パラフィ

ンよりも分散性が良好になったと考えられた。なお、白灯油中での酸化チタン粒子の分散に関する研究から、立体障害による分散作用は側鎖が長い方が大きいことがわかっており[38]、リボフラビンに吸着する分子数が同じであれば、これら極性油剤の方が炭酸プロピレンやトリアセチンよりも分散性がよくなると推察された。

以上の結果より、非水系基剤中での分散性は、リボフラビンの粒子径や非水系基剤の粘度及び密度だけでなく、非水系基剤のリボフラビンとの親和性(極性)や側鎖長を考慮することにより説明できた。

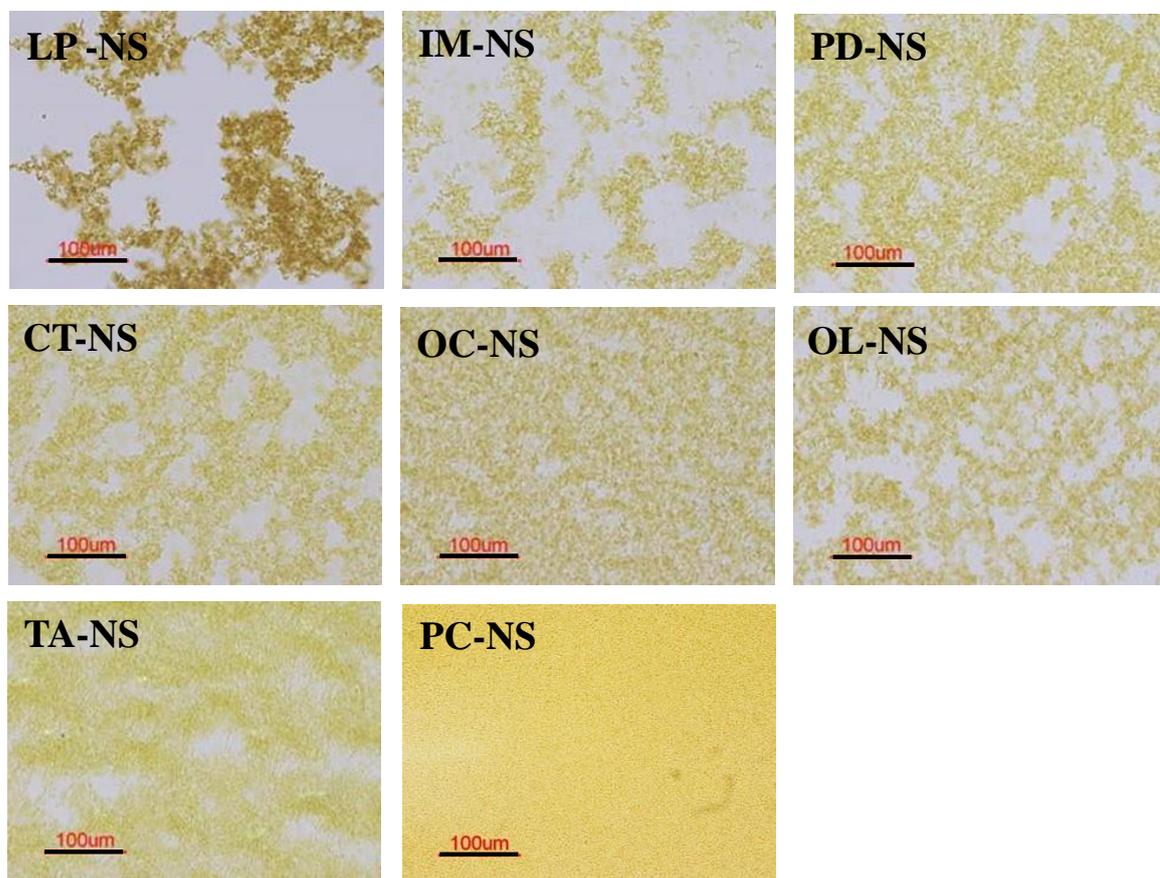


Fig. 10. Photomicrographic Images of Riboflavin Nanosuspensions

The scale bar indicates 100 μm .

なお、PD-NS は 1 週間保存後には分散性が 79%まで低下するものの 2 週間保存後も分散性は 77%とほとんど変わらず、OC-NS 及び OL-NS の分散性 76%及び 74%と同様の結果となった。分散媒中で粒子が凝集する場合、凝集の程度によって粒子径や密度および粒子濃度が変化し、沈降の挙動は複雑となる。凝集性懸濁液の沈降過程を Fig. 11 に示す[41]。まず、粒子が沈降する際に凝集粒子がからみあい濾過作用を果たして液が澄明となり(A 層)、沈降層との界面が生じる。沈降初期には沈降層はフロック層といわれる状態であり、初期の濃度にほぼ等しい(B 層)。沈降が進むと沈降層ではフロックが積み重さなり粒子が密になった層が生じ、分散媒は連続層でなくなる(C 層)。さらに沈降が進むと沈降速度はかなり遅い状態となる(D 層)。A 層/B 層の界面は直線的に低下するが、B 層が消失し、臨界点以降では沈降速度は遅くなる。

つまり、PD-NS は、ジカプリル酸プロピレングリコールは粘度が低くリボフラビン粒子の沈降がはやいことから、B 層の消失が OC-NS 及び OL-NS よりもはやかったと考えられた。沈降層が圧縮されれば再分散性も低下すると予想されることから、凝集の程度が同じであつてもより粘度の高い分散媒を用いることが望ましい。

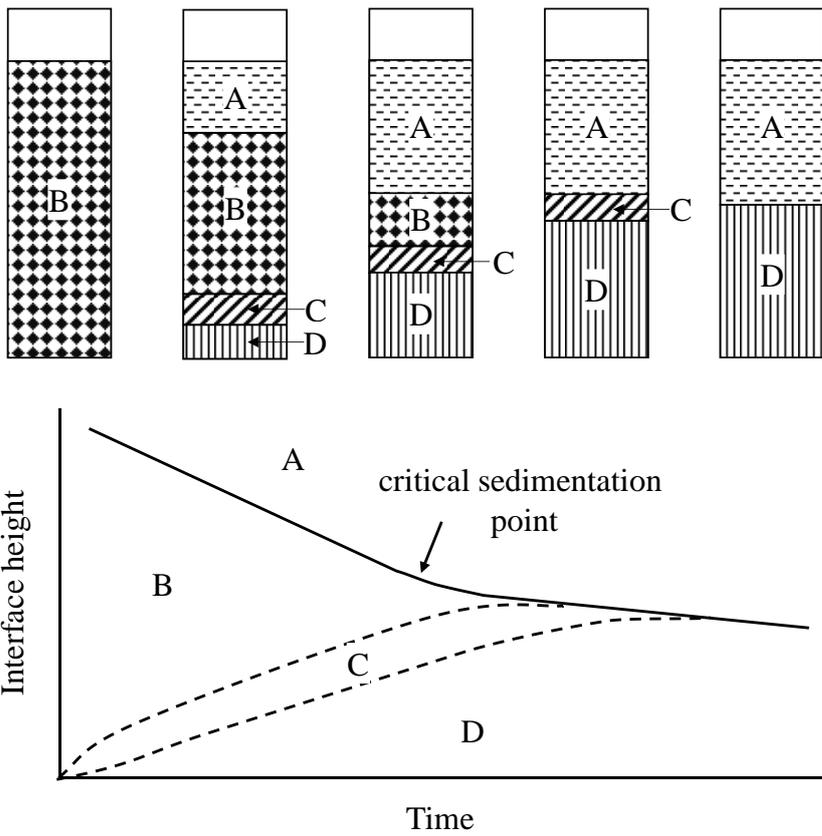


Fig. 11. Batch Settling Curve [41]

A, B, C, and D represent clear liquid, zone of collective subsidence, compression zone, and compaction zone, respectively.

第 2 節 ナノ懸濁液の皮膚透過性に及ぼす非水系基剤の影響

リボフラビンのナノ粒子化による皮膚透過性への影響を評価するためには、リボフラビンの溶解性が低く、リボフラビンが良好に分散する基剤を選択することが好ましい。そこで 8 種の非水系基剤の中から、ジカプリル酸プロピレングリコール、カプリン酸／カプリル酸トリグリセリド及びオレイン酸をリボフラビンナノ懸濁液の皮膚透過性の評価の基剤として選定した。これらの基剤を用いて調製した PD-NS、CT-NS 及び OC-NS を使用して *in vitro* ラット皮膚透過試験を実施した。Fig. 12 に各懸濁液適用 24 時間後のリボフラビンの皮膚累積透過量を示す。OC-NS の 24 時間皮膚累積透過量は、PD-NS 及び CT-NS と比較して約 3～6 倍の累積透過量を示した。角質層に存在する角質層間脂質は主にセラミド、コレステロール、遊離脂肪酸、硫酸コレステロールからなり、この遊離脂肪酸にはオレイン酸が含まれる[1, 42]。オレイン酸は角層間脂質の流動性を高めて拡散抵抗を低下させる、よく知られた吸収促進剤の一つであり[43-44]、エストラジオールの経皮吸収型製剤である Trial Sat[®]、Vivelle[®]などの製品で使用されている[45]。このオレイン酸の性質が、リボフラビンの皮膚透過性を高めた要因と推察された。

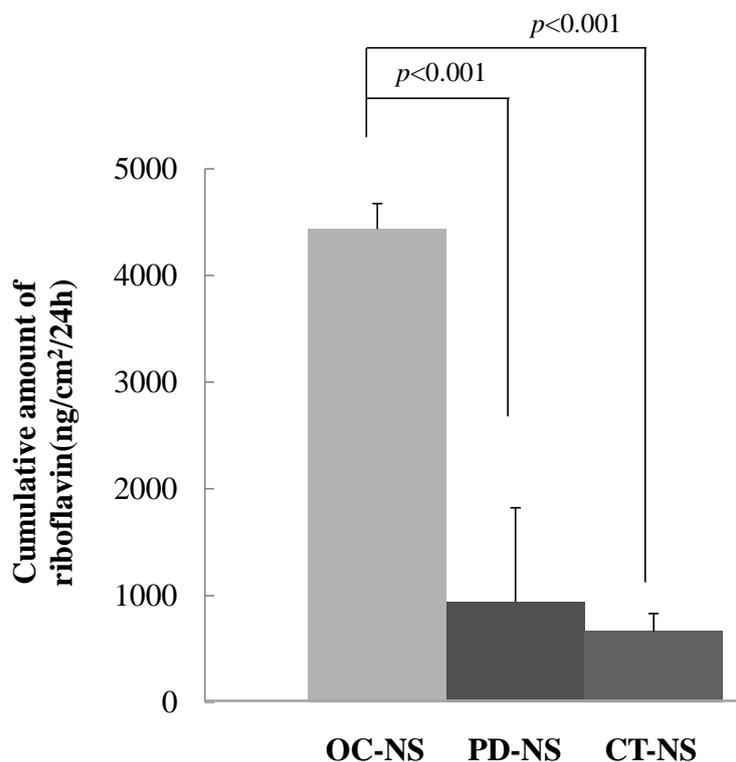


Fig. 12. Cumulative Amounts of Riboflavin Permeated through the Rat Skin after 24 h Topical Application of OC-NS, PD-NS, and CT-NS

Each value represents the mean + S.D. (n = 3).

p<0.001 was observed between OC-NS and PD-NS, and between OC-NS and CT-NS, no significant difference (p<0.05) was observed between PD-NS and CT-NS using parametric Dunnett tests.

第3節 結論

リボフラビンナノ懸濁液の分散媒選択にあたり、8つの非水系基剤を用いてリボフラビンナノ懸濁液を調製し、リボフラビンの分散性及び皮膚透過性を確認した。リボフラビンの分散性が良好であった非水系基剤のうち、リボフラビンの溶解度の低い基剤であるジカプリル酸プロピレングリコール、カプリン酸／カプリル酸トリグリセリド及びオレイン酸を

用いて調製したナノ懸濁液を用いて *in vitro* ラット皮膚透過試験を実施し、最も皮膚透過性が高い基剤であるオレイン酸をリボフラビンナノ懸濁液の基剤として選択した。

第3章 OC-NS の物性評価

本章では、リボフラビンのナノ粒子化が皮膚透過性に及ぼす影響を確認するため、未粉砕のリボフラビンをオレイン酸に物理混合させた懸濁液(OC-S)を対照として、OC-NSの *in vitro* ラット皮膚透過試験を実施した。皮膚透過性については、皮膚透過速度が一定になるまでの時間(Lag time)、累積皮膚透過量及び皮膚透過速度について評価した。また、*in vitro* ラット皮膚透過試験後に皮膚を蛍光顕微鏡観察し、リボフラビンの皮膚透過ルートについて考察した。

第1節 皮膚透過性に及ぼすリボフラビンのナノ粒子化の影響

リボフラビンのナノ粒子化による皮膚透過性への影響を確認するため、OC-S 及び OC-NS によるリボフラビンの *in vitro* ラット皮膚透過性を比較した結果を Fig. 13 及び Table 5 に示す。OC-S 及び OC-NS におけるリボフラビンの累積透過量は共に直線的に増加し、皮膚透過速度はそれぞれ 30.3 及び 89.1 ng/cm²/h、24 時間後の累積透過量はそれぞれ 843 及び 2345 ng/cm²を示した。OC-S に対して OC-NS の皮膚透過性は約 3 倍に向上したことから、リボフラビンをナノ粒子化することにより皮膚透過性を顕著に改善できることが示された。また、両懸濁液ともに Lag time は 0.0 または 0.3 h と非常に小さい値を示した。皮膚バリアの厚みを L 、皮膚中のリボフラビンの拡散係数を D とした時、Lag time は $L^2/6D$ となることから、オレイン酸を基剤とした場合のリボフラビンの拡散速度は非常に速いことが示された。定常状態の薬物の透過速度 J_{ss} 及び累積皮膚透過量 Q_{ss} は式(2)及び式(3)で表される[4]。

$$J_{ss} = KC_v D/L \quad (2)$$

$$Q_{ss} = KC_v D (t - L^2/6D)/L \quad (3)$$

ここで、 K は皮膚／基剤間分配係数、 C_v は基剤中の薬物濃度を示す。OC-NS の J_{ss} 及び Q_{ss} が約3倍となった要因としては、 K と C_v の寄与が挙げられる。しかしながら、リボフラビンのオレイン酸への溶解度は非常に低く (table 1)、適用した懸濁液に溶解しているリボフラビンは理論上 1.3 ng 程度と 24 時間累積皮膚透過量に対してわずかであるため、 C_v の寄与は大きくないと考えられる。角質層に浸透したリボフラビンナノ粒子が生きた表皮に存在する水分によって溶解することによって、皮膚中の濃度が上昇したことが一つの要因として推察された。

皮膚からの薬物吸収ルートは、角質層を透過する経角質ルート、毛包などの付属器官を介する経付属器官ルートに大別され、さらに角質層を通るルートは、経細胞ルートと細胞間隙を通る細胞間ルートに分類される。ナノ粒子が毛包に移行する例は数多く報告されており[46-48]、藤堂らは平均粒子径 500 nm のナノ粒子がブタ皮膚の毛包に移行することを報告している[49]。一方、ナノ粒子の角質層への浸透も報告されており、田原らは非水系基剤に分散させた平均粒子径 214~257 nm のナノ粒子がミニブタ皮膚の角質層を浸透することを報告している[16]。OC-NS の適用により皮膚透過性が向上した要因を考察すべく皮膚透過ルートを確認することとした。

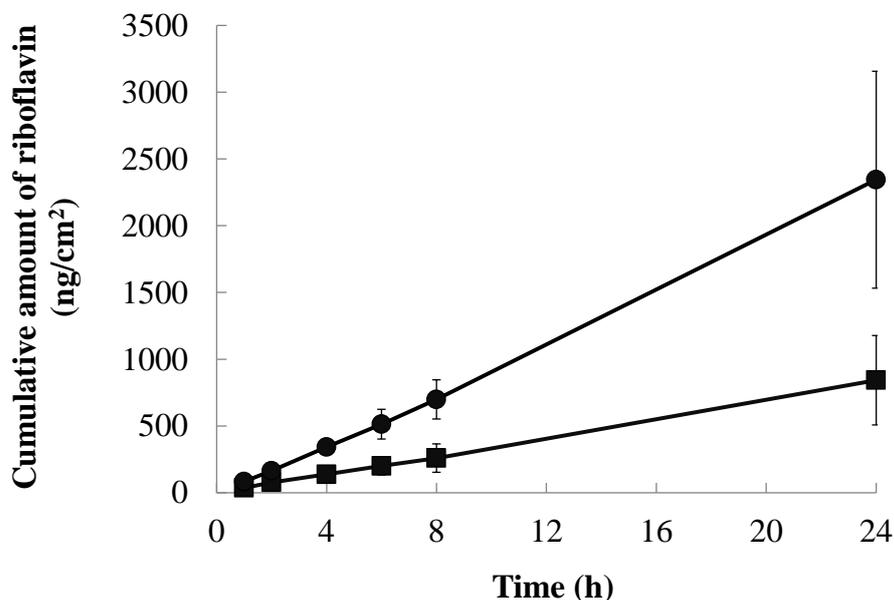


Fig. 13. Cumulative Amounts of Riboflavin through the Rat Skin after Topical Application of OC-S and OC-NS

Key: (■) OC-S, (●) OC-NS

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4).

Table 5 Lag Times, Permeation Rates, and Cumulative Amounts of Riboflavin Permeated through the Rat Skin after Topical Application of OC-S or OC-NS

Sample name	Lag time (h)	Permeation rate (ng/cm ² /h)	Cumulative amount (ng/cm ²)
OC-S	0.0 \pm 0.1	30.3 \pm 15.0	843 \pm 335
OC-NS	0.3 \pm 0.4	89.1 \pm 23.9**	2345 \pm 813*

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 4).

Statistical analysis was performed by Student's *t*-test.

*: Significant at $p < 0.05$ compared with OC-S

** : Significant at $p < 0.01$ compared with OC-S

第 2 節 リボフラビンナノ粒子の皮膚透過ルートの考察

リボフラビンナノ粒子の皮膚透過ルートを検討するため、形態学観察を実施した。Fig. 14に OC-S 及び OC-NS をラット皮膚に適用し、*in vitro* 皮膚透過試験終了後 (24 時間後) に蛍光顕微鏡にて観察した画像を示す。OC-NS 適用後のリボフラビン由来の表皮の蛍光強度は懸濁液よりも強い傾向が認められた。

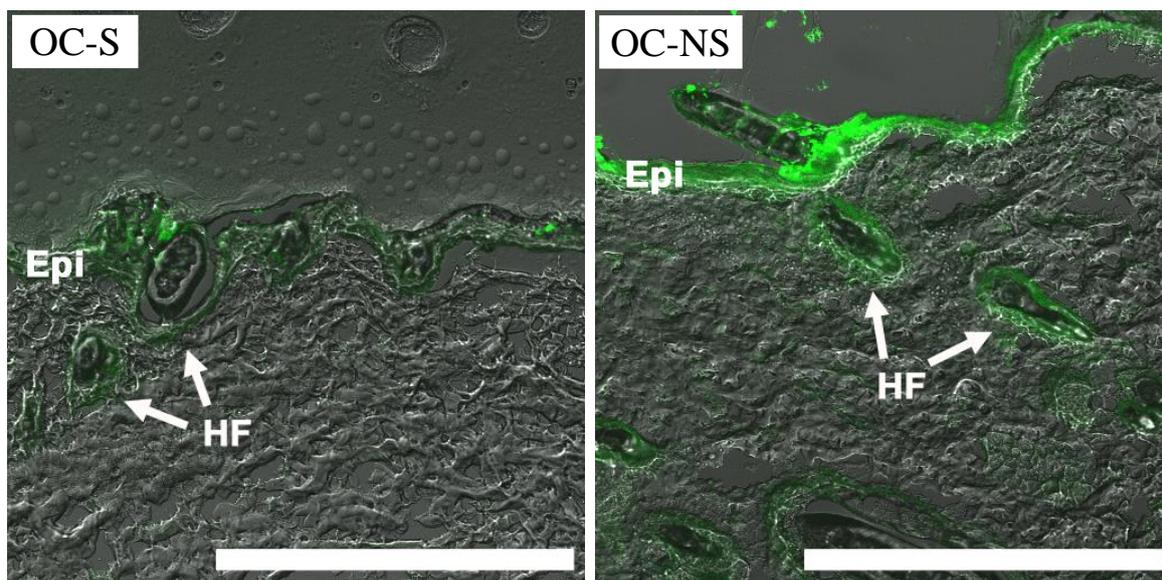


Fig. 14. Confocal Laser Scanning Microscopy Images of the Rat Skin Cross-sections after *in vitro* Skin Permeation Experiment of OC-S and OC-NS using Franz-type Diffusion Cells

Scale bar, Epi, and HF represent 250 μm , epidermis, and hair follicle, respectively.

Fig. 15 に、両懸濁液について表皮の蛍光強度を輝度分布にて比較した結果を示す。表皮領域の画素をそれぞれ 256 階調で表し、その領域の全画素数に対する頻度を輝度分布としてグラフ化した。輝度値が大きい方ほど蛍光強度が大きいことを示す。その結果、最大頻度の輝度値について OC-NS は 50 付近、OC-S は 15、OC-S では輝度値 50 以上の画素はほぼ認められなかった。また、50%累積頻度の輝度値については OC-S が 15

~16 に対し、OC-NS では 54~55 となり、OC-NS の方が明らかに輝度値が大きく、表皮での蛍光強度が高いことが示された。本試験では、毛包における蛍光強度について OC-S 及び OC-NS に明確な差が認められなかったことから、リボフラビンナノ粒子の皮膚透過ルートとして角質層を通るルートの重要性が示唆された。

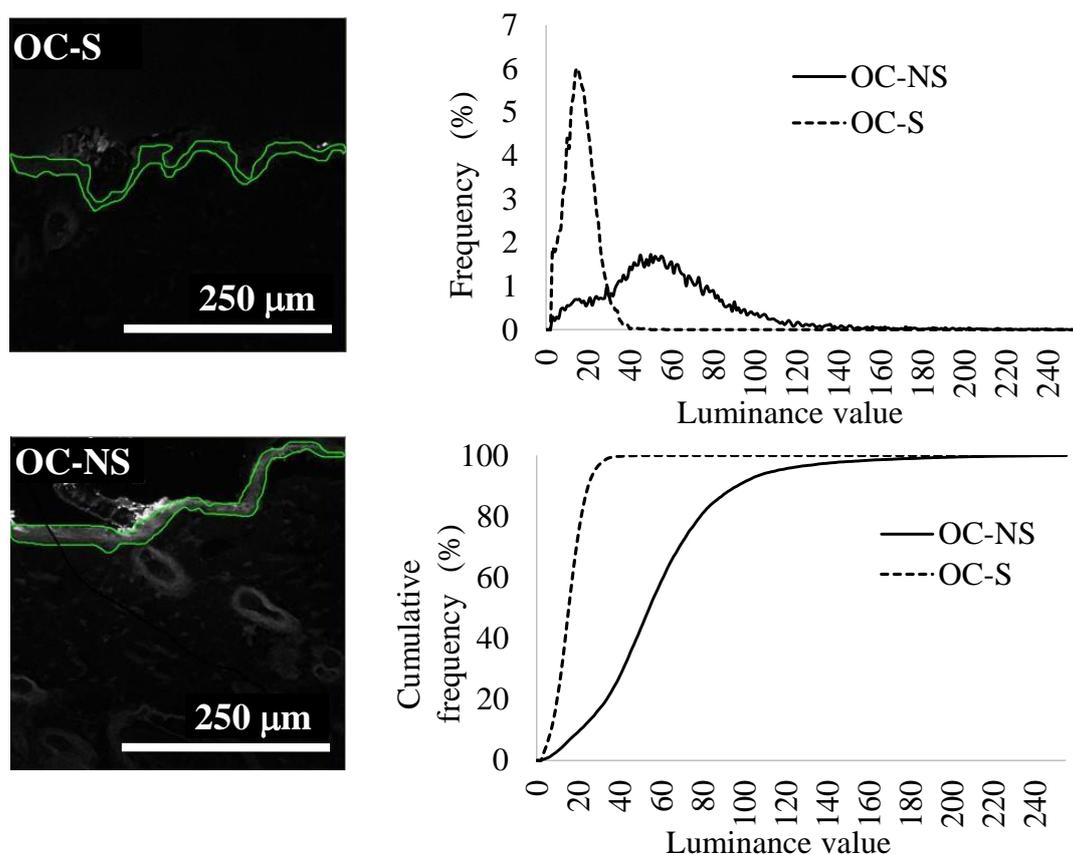


Fig. 15. Comparison of Riboflavin Fluorescence Intensity in the Epidermis after *in vitro* Skin Permeation Experiment of OC-S and OC-NS

ナノ粒子が角質層に浸透する経路として細胞間ルートが考えられるが、OC-NS の平均粒子径は 345 nm であり、細胞間隙のサイズ(数十 nm)[50-51]を考慮すると角質層へは浸透できない。しかしながら、SEM 観察から OC-NS には数十 nm のリボフラビン粒子が存在することが示唆され (Fig. 9)、さらに田原ら[16]及び Kohli ら[17]により数百 nm の

ナノ粒子が角質層に浸透することが報告されており、OC-NS 中のリボフラビンナノ粒子でも十分に角質層に浸透できる可能性がある。さらに、本試験にて用いたオレイン酸が角層間脂質を流動化し、角質層へのナノ粒子の浸透性を高めたと考察した。

第3節 結論

ナノ粒子化したリボフラビンをオレイン酸の懸濁液として皮膚に適用することにより、皮膚透過性が向上することが確認された。ビーズ粉碎は、親水性薬物を非水系基剤に分散させたナノ懸濁液を簡便に作製できる有用な調製方法であることが明らかとなった。

第4章 OC-NS の分散性向上検討

第1節 界面活性剤の OC-NS の分散性への影響

本研究の最終目的は非水系のナノ懸濁液をローション剤及び軟膏剤などの皮膚適用製剤に応用することである。この場合、親水性薬物の分散性は良好であることが望ましい。非水系溶媒中で粒子の分散性をさらに向上するためには、より大きな立体障害による反発力が期待される界面活性剤等の添加が有効である[52]。セラミックスなどの分野では、金属酸化物など親水性ナノ粒子を分散させる場合、ポリカルボン酸系やポリイミン系のイオン性の分散剤が繁用される[53]。一方、食品分野では、チョコレートやピーナツバターのような油系食品に不溶性微粉末を分散させる際に分散媒との親和性を上げるためにポリグリセリンポリシリノレートやシュガーエステルのような非イオン性界面活性剤が用いられる[54]。一般的に非イオン性界面活性剤の方がイオン性よりもの安全性が高い。そこで、W/O 乳化や油性基剤中で分散力に優れる非イオン性界面活性剤の中から、皮膚適用製剤や化粧品にも用いられているトリオレイン酸ソルビタン (ST)、ポリソルベート 65 (PS)、シヨ糖エルカ酸エステル (SE) 及びポリリシノレイン酸ヘキサグリセリル (PP) を選定し、リボフラビンの分散性への影響を検討した。

Fig. 16 に OC-NS に非イオン性界面活性剤を 5% 添加した懸濁液を光学顕微鏡にて観察した結果を示す。OC-NS に PP を添加した場合にのみ、凝集の程度が小さくなる傾向を示し、その他については OC-NS 単独との違いは認められなかった。

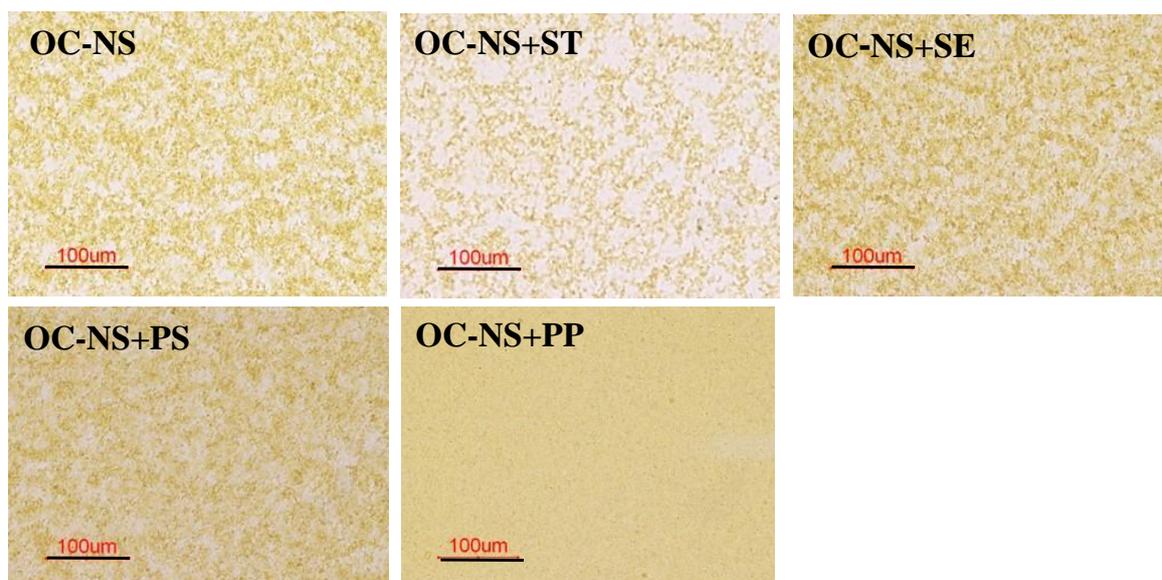


Fig. 16. Photomicrographic Images of OC-NS with and without Addition of Surfactant (Sorbitan trioleate (ST), Sucrose erucate (SE), Polysorbate 65 (PS), and Polyglyceryl-6 polyricinoleate (PP))

Fig. 17 に OC-NS に各非イオン性界面活性剤を 5% 添加した懸濁液を 25°C で 1 週間及び 2 週間保存した後の外観及び分散性を示す。PS または PP を添加した場合、2 週間後でも粒子の沈降はほとんど認められず、分散性に顕著な改善が認められた。一方、ST 及び SE を添加した場合、OC-NS の分散性にほとんど変化は認められなかった。ST 及び SE は、それぞれソルビタン及びショ糖にオレイン酸 (C18) 及びエルカ酸 (C22) がエステル化した構造を有しており、側鎖の長さとしては基剤であるオレイン酸と同程度である。一方、PS 及び PP の側鎖は、ポリオキシエチレン鎖が付加したステアリン酸 (C18) 及びリシノレイン酸 (C18) 同士がエステル化により縮合した縮合リシノレイン酸からなり、ST 及び SE よりも明らかに長い側鎖を有する。この長い側鎖の立体障害による反発力が大きくなり、分散性の向上に寄与したと考察した。なお、PS を添加した場合、分散性の顕著な改善は認められたものの、光学顕微鏡では変化は認められなかった。PS の側鎖である

ポリオキシエチレン鎖は親水性であるため、ソルビタン部分だけでなくポリオキシエチレン鎖もリボフラビンに吸着すると予想される。そのため、リボフラビン粒子同士の凝集は抑制するものの、ポリリシノレイン酸ヘキサグリセリルの場合よりも粒子同士が接近し、光学顕微鏡では OC-NS と同様に凝集しているように観察されたと推察した。

ビーズミルなどによりナノ粒子を分散させても再凝集が生じることから、一般には粒子の表面処理が必要と言われている [53]。しかし今回、適切な非水系基剤及び界面活性剤を選定することによって、リボフラビンを表面処理することなく良好な分散性を有する懸濁液を調製することができた。親水性薬物を非水系基剤に分散させるためには、親水性薬物と親和性の高い非水系基剤や界面活性剤の選択が重要となる。

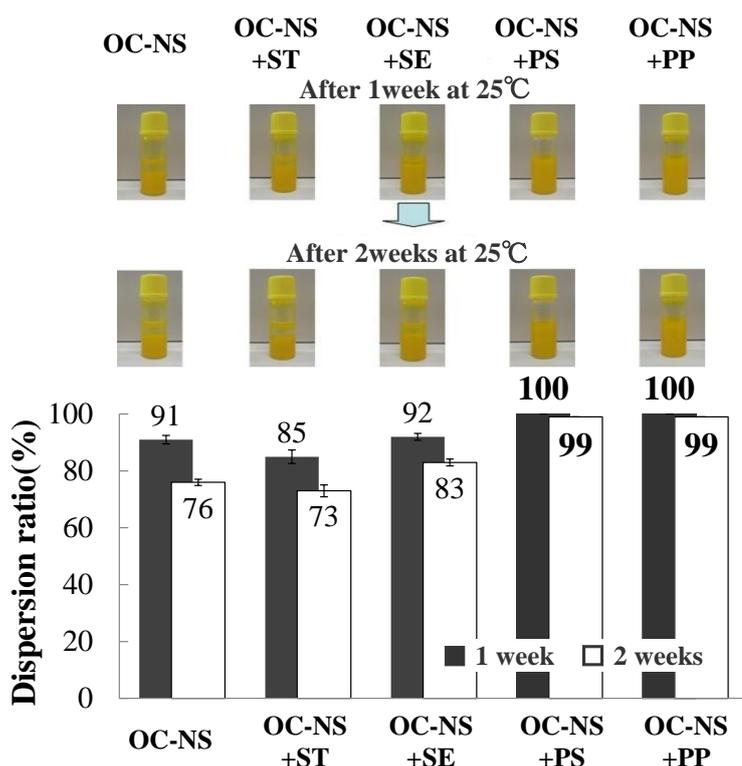


Fig. 17. Appearance and Dispersion Ratio of Riboflavin Nanosuspensions with and without Addition of Surfactant (ST, SE, PS, and PP) after the Storage at 25 ± 2 °C for 1 Week (■) and 2 Weeks (□)

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 3).

第2節 界面活性剤の OC-NS の皮膚透過性への影響

OC-NS に PS または PP を 5% 配合した懸濁液について、リボフラビンの *in vitro* ラット皮膚透過性を比較した。その結果、OC-NS、OC-NS+PS 及び OC-NS+PP の皮膚透過速度及び 24 時間累積透過量の比は、それぞれ 1: 0.90: 0.97 及び 1: 0.94: 1.02 であり、非イオン性界面活性剤を配合しても皮膚透過性には影響を及ぼさなかった。

第3節 結論

OC-NS の分散性向上を目的として非イオン性界面活性剤を添加したところ、PS および PP の添加により分散性が顕著に向上したことから、物理的安定性の面から実用性の高いナノ懸濁液の調製が可能であることが明らかとなった。

結語

本研究では、リボフラビンを親水性薬物のモデルとして使用し、非水系基剤中でのビーズ粉砕による懸濁液の調製及び物性評価を実施した。リボフラビンを非水系基剤中でビーズ粉砕した結果、適切な条件で粉砕することによりナノ粒子化が可能であることが明らかとなった。また、適切な非水系基剤を選択することにより、リボフラビンの分散性及び皮膚透過性の点で良好な結果が得られた。さらに、適切な界面活性剤の添加によりリボフラビンの分散性が顕著に向上した。以上の結果より、非水系基剤中でのビーズ粉砕は、親水性化合物の皮膚透過性を向上させる簡便な手法となり得ることが示された。適切な基剤及び界面活性剤の選択により物理的安定性の良好な懸濁液の調製が可能であり、皮膚適用製剤への応用が期待された。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院教授 森部久仁一先生に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数々の有益なる御指導ならびに御助言を賜りました千葉大学名誉教授 山本恵司先生に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に関し、終始御親切な御指導、御協力を賜りました千葉大学大学院薬学研究院講師 東頭二郎先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の機会を与えていただき、貴重な御支援を賜りました大正製薬株式会社 上原茂代表取締役社長、同 藤田憲一専務取締役、同 医薬研究本部 奥山茂本部長、同 医薬研究本部 ロドニー・スティーブンス副本部長、同 薬剤研究所 廣塚三晃所長に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究完成に至るまで、終始有益なる御指導ならびに御助言を賜りました同 薬剤研究室 三輪明生室長、同 薬剤研究室 西崎香 GM に心より厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するにあたり種々の御協力をいただきました武内博幸博士、大正製薬株式会社 安全性研究室 櫻井孝信博士、同 薬剤研究室 遠藤継良氏、同 薬剤研究室 田中健介氏、同 薬剤研究室 岡本尚毅氏、同 薬剤研究室 松木孝太氏に心から感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始御助言、御協力をいただきました大正製薬株式会社 薬剤研究室の諸氏ならびに千葉大学大学院 薬学研究院 製剤工学研究室の皆様心より感謝いたします。

実験の部

1. 試料

リボフラビン(Riboflavin High Flow 100)、は BASF より購入したものを 75~150 μm に篩分けしたものを使用した。非水系基剤であるオレイン酸及び炭酸プロピレンは和光純薬工業株式会社から、オレイルアルコール及びトリアセチンはシグマアルドリッチジャパン、ミリスチン酸イソプロピル、ジカプリル酸プロピレングリコール及びトリカプリル／カプリン酸グリセリルは日光ケミカルズ株式会社、流動パラフィンについてはカナダ株式会社から購入したものを使用した。非イオン性界面活性剤であるトリオレイン酸ソルビタン、ポリソルベート 65 及びポリリシノレイン酸ヘキサグリルは日光ケミカルズ株式会社株式会社から、ショ糖エルカ酸エステルについては三菱化学フーズ株式会社から購入したものを使用した。その他の化合物及び溶媒については、試薬グレードを用いた。

2. 試料の調製

2-1 物理混合懸濁液の調製

リボフラビン 0.01 g、非水系基剤 0.99 g を遠心チューブに入れ、ボルテックスミキサーを用いて 10 秒間攪拌した。

2-2 ビーズ粉砕

リボフラビン 0.25 g、非水系基剤 24.75 g 及びジルコニアビーズ(ビーズ直径:0.1 mm、0.5 mm、1.0 mm) 150 g を 200 mL ガラスビーカーに入れ、ヤマト科学株式会社製攪拌機を用いて 1,000 rpm で 15 分~6 時間遮光下で攪拌した。

3. 試験方法

3-1.非水系基剤の粘度測定

各非水系基剤の粘度は山一電機株式会社製振動粘度計 VM-100A にて測定した。
25±2°C でプローブを各非水系基剤に浸漬し、1 分後の数値を読み取った。

3-2.非水系基剤の密度測定

各非水系基剤の密度は、25±2°C で 10 mL のメスフラスコを用いて算出した。

3-3.非水系基剤へのリボフラビンの溶解度測定

リボフラビン 0.03 g および非水系基剤 2.97 g を遠沈管に入れ、25±2°C で 24 時間振とうした。この液を 0.45 μm フィルターでろ過したろ液を 15,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を採取した後、テトラヒドロフランで 40 倍希釈し、試料溶液とした。この試料溶液 5 μL について HPLC 測定し、非水系基剤へのリボフラビンの溶解度を求めた。

3-4. 粉末X線回折測定 (PXRD)

粉末 X 線回折測定は、株式会社リガク製 RINT2200UltimaIII を用い、40 kV/40 mA の Cu ターゲットの K α 線を用い、平行ビーム法を用いて、3°から 40°(2 θ)まで、4°/min の速度で測定した。

3-5. 粒子径測定

平均粒子径は、Particle Sizing Systems 社製 Nicomp 380 ZLS を用い、波長 632.8 nm の He-Ne を用い、動的光散乱法にて得られた Gaussian 分布における体積径として算出した。流動パラフィン、オレイルアルコール、オレイン酸、ミスチン酸イソプロピル、ジカプリル酸プロピレングリコール及びカプリル／カプリン酸トリグリセリドを用いて調製し

た懸濁液については0.05%セスキイソステアリン酸ソルビタン／ヘキサン溶液で100倍希釈し、4分間超音波処理したものを試料溶液とした。トリアセチン及び炭酸プロピレンについてはアセトンで100倍希釈し、4分間超音波処理したものを試料溶液とした。

3-6. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

SEM観察は、株式会社日立製作所製S-4300を使用した。日本製紙クレシア株式会社製キムタオル[®]に懸濁液を滴下し、最上層を試料台に固定し、パラジウム／白金蒸着後、加速電圧5.0 kV、エミッション電流20 μ Aにて観察した。

3-7. 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡観察は、株式会社ニコン製ECLIPSE LV100POLを使用した。スライドガラスに懸濁液を10 μ L滴下し、直ちにカバーガラスを被せ、1分後に観察した。

3-8. SDラット皮膚の調製

すべての動物飼育及び実験は大正製薬株式会社動物実験規定に従って行った。SD系雄性ラット(7週齢)は、日本チャールスリバー株式会社より購入し、*in vitro*皮膚透過試験に使用した。

SDラットをイソフルラン麻酔下にて安楽死させ、皮膚に傷をつけないように注意深く腹部の毛を剃った。皮膚の採取部位は、1匹のSDラットから直径約2.5 cmの円状皮膚を摘出した。摘出したラット皮膚の皮下脂肪を手術用ハサミで除去して調製し、アルミ箔に包みビニール袋で密閉して使用するまで-80°Cで保存した。

3-9. *In vitro* 皮膚透過試験

In vitro 皮膚透過試験は OECD (Organization for Economic Co-operation and

Development) のガイドライン[55]に従い実施した。フランチ型拡散セル[56]をもとにした縦型拡散セル(拡散面積: 0.95 cm²、直径: 1.1 cm)を使用した。

各懸濁液約 10 mg を皮膚の表皮側に適用した後、表皮側を上にして装着し、レシーバーチャンバー側に 32°C に加温した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 3 mL を添加した。拡散セルは 32°C の CO₂ インキュベーターに入れ、レシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。試験開始後 24 時間まで経時的に 500 μL のレシーバー溶液を採取し、同時に同容量 32°C に保温した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を補充した。

3-10. 共焦点レーザー顕微鏡による観察

In vitro 皮膚透過試験終了後の皮膚を切り出し、ME クライオ コンパウンドに包埋後、冷却して凍結ブロックとし、これをライカマイクロシステムズ社製クライオスタット CM3050 で凍結切片とした後、ライカマイクロシステムズ社製共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP-5 を用いて波長 488 nm アルゴンレーザーにて観察した。

3-11. リボフラビンの濃度測定

試料中のリボフラビン濃度は、島津製蛍光検出器が付属した島津製 HPLC を用いて測定した。経時的に採取したレシーバー溶液 500 μL にアセトニトリル/メタノール混液 (1/ 1, v/ v) 500 μL を加えて混合し、遠心分離 (15,000 rpm、10 分間) した。その上清 20 μL を島津製蛍光検出器付属の島津製 HPLC の測定試料とした。

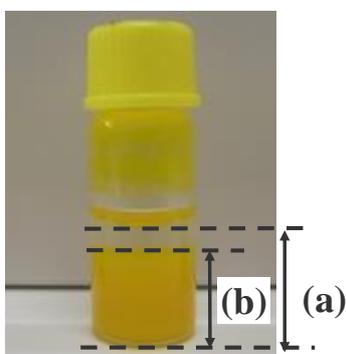
分析条件は、分析カラムとして YMC 社製 YMC trait (5 μm, 4.6 mm I.D.× 150 mm) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相として 0.01M NaH₂PO₄ (pH5.5)/ methanol (65/ 35, v/ v) を使用し、流速は 0.8 mL/min とした。蛍光波長は 445 nm (励起波長) 及び 530 nm (蛍光波長) とした。濃度測定の検量線範囲は 5~500 μg/mL であった。

4. データ解析

4-1. 分散性

リボフラビン懸濁液の分散性については、北原らの方法[57]をもとに変更して実施した。容量 1.5 mL、内径 12 mm、高さ 32 mm の Tomsic 社製スクリーガラスバイアルに懸濁液 1 mL を充てんし、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ で 1 及び 2 週間静置した後、以下の式 (1) を用いて分散性 (%) を算出した。

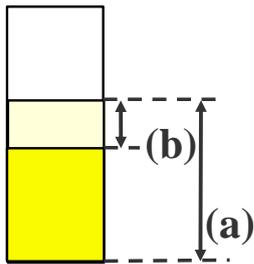
$$\text{分散性 (\%)} = \text{沈降界面の高さ (b)} / \text{系全体の高さ (a)} \times 100 \quad (1)$$



4-2. 分散性(計算値)

リボフラビン懸濁液の分散性(計算値)は以下の式(2)を用いて算出した。なお、沈降速度は、stokes の式(3)を用いて算出した。

$$\begin{aligned} & \text{分散性 (\%)} \\ & = (\text{系全体の高さ (a)} - \text{沈降速度} \times \text{時間 (b)}) / \text{系全体の高さ (a)} \times 100 \quad (2) \end{aligned}$$



$$W_s = D_s^2 g (\rho_s - \rho) / 18 \mu \quad (3)$$

W_s : 沈降速度

D_s : 粒子径

ρ_s : 粒子の密度

ρ : 分散媒の密度

μ : 分散媒の粘度

g : 重力加速度

4-3. 統計解析

In vitro 皮膚透過試験から得られたすべてのデータは、3~4 例の平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) により表記した。OC-NS 及び PD-NS 間、OC-NS 及び CT-NS 間、PD-NS 及び CT-NS 間の 24 時間累積透過量の統計解析は、パラメトリック Dunnett test、OC-S 及び OC-NS 間の Lag time、透過速度及び 24 時間累積透過量は Student's *t*-test を行った。統計的な有意差は $p < 0.05$ とした。統計解析は software program SAS (ver. 9.2; SAS Institute Japan Ltd.) を用いた。

参考文献

- [1] 清水宏. “あたらしい皮膚化学 第 2 版”. 北海道大学大学院医学研究科・医学部皮膚科. 2014-4-30. <http://www.derm-hokudai.jp/textbook/>, (参照 2014.12.28).
- [2] Morimoto, Y.; Hatanaka, T.; Sugibayashi, K.; Omiya H. Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1992, 44, 634-639.
- [3] Flynn, G. L.; Stewart, B. Percutaneous drug penetration: choosing candidates for transdermal development. *Drug Develop. Res.* 1988, 13, 169-185.
- [4] 杉林堅次. “皮膚適用外用剤と経皮吸収型製剤”. 非経口投与製剤の製剤設計と製造法. 日本薬剤学会 製剤技術伝承委員会編. 第 2 版, 株式会社 じほう, 2014. p. 207-221.
- [5] Desai, P.; Patlolla, R. R.; Singh, M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol. Membr. Biol.* 2010, 27, 247-259.
- [6] Liu, K. C.; Green, C. R.; Alany, R. G.; Rupenthal, I. D. Synergistic effect of chemical penetration enhancer and iontophoresis on transappendageal transport of oligodeoxynucleotides. *Int. J. Pharm.* 2013, 441, 687-692.
- [7] Gratieri, T.; Kalaria, D.; Kalia, Y. N. Non-invasive iontophoretic delivery of peptides and proteins across the skin. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011, 8, 645-663.
- [8] Matriano, J. A.; Cormier, M.; Johnson, J.; Young, W. A.; Buttery, M.; Nyam, K.; Daddona, P. E. Macroflux[®] microprojection array patch technology: a new and efficient approach for intracutaneous immunization. *Pharm. Res.* 2002, 19, 63-70.
- [9] Cormier, M.; Johnson, B.; Ameri, M.; Nyam, K.; Libiran, L.; Zhang, D. D.; Daddona, P. Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system. *J. Control. Release.* 2004, 97, 503-511.
- [10] Müller, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and

nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, S131-S155.

[11] Rougier, A.; Lotte, C.; Maibach, H. I. “*In vivo* における経皮吸収性と経表皮水分喪失 (TEWL) の相関性”. 化粧品・医薬品の経皮吸収. 吳学明, 羽田乃武子, 杉林堅次訳. 第1版, フレグランスジャーナル社, 2005, p. 119-132.

[12] Tsujimoto, H.; Hara, K.; Tsukada, Y.; Huang, C. C.; Kawashima, Y.; Arakaki, M.; Okayasu, H.; Mimura, H.; Miwa, N. Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 4771-4777.

[13] Raber, A. S.; Mittal, A.; Schäfer, J.; Bakowsky, U.; Reichrath, J.; Vogt, T.; Schaefer, U. F.; Hansen, S.; Lehr, C. M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *J. Control. Release.* 2014, 179, 25-32.

[14] Hasanovic, A.; Zehl, M.; Reznicek, G.; Valenta, C. Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009, 61, 1609-1616.

[15] 杉野雅浩, 藤堂浩明, 杉林堅次. 薬物の皮膚透過性と経皮吸収型製剤: 角層バリア克服の歴史. *薬学雑誌.* 2009, 129, 1453-1458.

[16] Tahara, Y.; Honda, S.; Kamiya, N.; Piao, H.; Hirata, A.; Hayakawa, E.; Fujii, T.; Goto, M. A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery. *J. Control. Release.* 2008, 131, 14-18.

[17] Kohli, A. K.; Alpar, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int. J. Pharm.* 2004, 275, 13-17.

[18] Hafner, A.; Lovrić, J.; Lakoš, G. P.; Pepić, I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int. J. Nanomedicine.* 2014, 9, 1005-1023.

[19] Kesisoglou, F.; Panmai, S.; Wu, Y. Nanosizing - oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 631-644.

- [20] 横山昌幸. DDS に用いられるナノサイズのキャリア. *Drug Delivery System*. 2006, 21, p. 615-622.
- [21] Kondo, N.; Iwao, T.; Masuda, H.; Yamanouchi, K.; Ishihara, Y.; Yamada, N.; Haga, T.; Ogawa, Y.; Yokoyama, K. Improved oral absorption of a poorly water-soluble drug HO-221, by wet-bead milling producing particles in submicron region. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, 41, 737-740.
- [22] Takatsuka, T.; Endo, T.; Jianguo, Y.; Yuminoki, K.; Hashimoto, N. Nanosizing of poorly water soluble compounds using rotation/revolution mixer. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, 1061-1067.
- [23] Niwa, T.; Miura, S.; Danjo, K. Universal wet-milling technique to prepare oral nanosuspension focused on discovery and preclinical animal studies - Development of particle design method. *Int. J. Pharm.* 2011, 405, 218-227.
- [24] Filipowicz, A.; Wołowicz, S. Solubility and in vitro transdermal diffusion of riboflavin assisted by PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 2011, 408, 152-156.
- [25] “ICSC: 1454: RIBOFLAVIN”. International Chemical Safety Cards (ICSC). U.S. National Version, 2002-10-10. National Institute for Occupational Safety and Health, Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng1454.html>, (cited 2014-03-31).
- [26] 奥田峰広, 吉池高志, 小川秀興. リボフラビンを用いた角層バリア機能評価法. *日皮膚学会誌*. 1999, 109, 2103-2109.
- [27] 日本医薬品添加剤協会編. 医薬品添加物事典 2007. 薬事日報社, 2007, p. 462.
- [28] ChemIDplus. U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, Health & Human Services, TOXINET, <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>, (cited 2014-12-01).
- [29] 谷本直樹, 岡崎祐一. “印刷インキにおける顔料分散”. ナノ粒子分散系の基礎と応用. 角田光雄 監修. 第1版, 株式会社 シーエムシー出版, 2011, p. 221-236.

- [30] 齋藤文良. “単一粒子の破壊”. 粉碎・分級と表面改質. 粉体工学会編. 第 1 版, (有)エヌジーティー, 2001, p. 19-23.
- [31] 神田良照, 八嶋三郎. 超微粉碎に対する破壊力学と単粒子破壊から一考察. 東北大學選鑛製錬研究所彙報. 1989, 45, 30-38.
- [32] 田中達夫. 限界値を考慮した粉碎機構の新しい考え方 摩擦力・衝撃力による粉碎の実験的研究. 化学工学. 1954, 18, 160-171.
- [33] 齋藤文良. “何故粉碎するのか”. 粉碎・分級と表面改質. 粉体工学会編. 第 1 版, (有)エヌジーティー, 2001, p. 3-5.
- [34] Le Roux, J. P. Grains in motion: A review. *Sediment. Geol.* 2005, 178, 285-313.
- [35] 本間茂継. 油中における粉体分散性研究. *フレグランスジャーナル*. 2009, 37, 40-45.
- [36] Ferreira de Sousa, F.; Moreira, S. G.; dos Santos da Silva, S. J.; Del Nero, J.; Alcantara Jr. P. Dielectric properties of oleic acid in liquid phase. *J. Bionanosci.* 2009, 3, 139-142.
- [37] Adamczyk, Z.; Weroński, P. Application of the DLVO theory for particle deposition problems. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1999, 83, 137-226.
- [38] 北原文雄, 古澤邦夫. “非水分散系の安定性”. 最新コロイド化学. 第 3 版, 株式会社 講談社, 1993, p. 110-127.
- [39] 近藤精一, 石川達雄, 安部郁夫. “吸着等温線の測定法”. 化学セミナー16 吸着の科学. 第 3 版, 株式会社 講談社, 1991, p. 145-166.
- [40] Wu, N.; Fu, L.; Su, M.; Aslam, M.; Wong, K. C.; David, V. P. *Nano Lett.* 2004, 4, 383-386.
- [41] 井伊谷鋼一, 三輪茂雄. “固液分離”. 改訂新版 化学工学通論Ⅱ. 第 19 版, 株式会社 朝倉書店, 1998, p. 145-170.

- [42] Bonté, F.; Saunois, A.; Pinguet, P.; Meybeck, A. Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch. Dermatol. Res.* 1997, 289, 78–82.
- [43] Naik, A.; Pechtold, L. A. R. M.; Potts, R. O.; Guy, R. H. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. *J. Control. Release.* 1995, 37, 299-306.
- [44] Rowat, A. C.; Kitson, N.; Thewalt, J. L. Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by ^2H NMR. *Int. J. Pharm.* 2006, 307, 225-231.
- [45] Richard, H. G.; Jonathan, H. “Feasibility assessment in topical and transdermal delivery: mathematical models and in vitro studies” . *Transdermal drug delivery*, 2nd ed., CRC Press, 2002, p. 1-23.
- [46] Lademann, J.; Richter, H.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Blume, P. U.; Luengo, J.; Weiß, B.; Schaefer, U. F.; Lehr, C. M.; Wepf, R.; Sterry, W. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007, 66, 159-164.
- [47] Shim, J.; Seok, K. H.; Park, W. S.; Han, S. H.; Kim, J.; Chang, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Control. Release.* 2004, 97, 477-484.
- [48] Patzelt, A.; Lademann, J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013, 10, 787-797.
- [49] Todo, H.; Kimura, E.; Yasuno, H.; Tokudome, Y.; Hashimoto, F.; Ikarashi, Y.; Sugibayashi, K. Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33, 1394-1399.
- [50] Baroli, B.; Ennas, M. G.; Loffredo, F.; Isola, M.; Pinna, R.; Lo´pez-Quintela, M. A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* 2007, 127, 1701-1712.

- [51] Van der Merwe, D.; Brooks, J. D.; Gehring, R.; Baynes, R. E.; Monteiro-Riviere, N. A.; Riviere, J. E. A physiologically based pharmacokinetic model of organophosphate dermal absorption. *Toxicol. Sci.* 2006, 89, 188–204.
- [52] Hadziioannou, G.; Patel, S.; Granick, S.; Tirrell, M. Forces between surfaces of block copolymers adsorbed on mica. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 2869-2876.
- [53] 神谷秀博, 飯島志行. ナノ粒子の分散挙動制御とその応用. 粉砕. 2012, 12-18.
- [54] 加藤友治. 食品分野における界面活性剤. オレオサイエンス. 2001, 1, 1013-1019.
- [55] OECD Test Guideline 428: 2004. Skin absorption: in vitro method.
- [56] Franz, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 1975, 64, 190-195.
- [57] Kitahara, A.; Tamura, T.; Matsumura, S. Effect of water on stability of carbon black dispersed in nonaqueous aerosol OT solutions. *Chem. Lett.* 1979, 8, 1127-1128.

論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

Sato Takayuki; Takeuchi Hiroyuki; Sakurai Takanobu; Tanaka Kensuke; Matsuki Kota; Higashi Kenjiro; Moribe Kunikazu; Yamamoto Keiji. Characterization of a riboflavin non-aqueous nanosuspension prepared by bead milling for cutaneous application. Chem. Pharm. Bull. 2015, 63, 88-94.

主査、副査名

本学位論文の審査は、千葉大学大学院医学薬学府で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院教授(薬学研究院)	薬学博士	根矢三郎
----	------------------	------	------

副査	千葉大学大学院教授(薬学研究院)	薬学博士	荒野 泰
----	------------------	------	------

副査	千葉大学大学院教授(薬学研究院)	薬学博士	伊藤 晃成
----	------------------	------	-------