

博 士 論 文

NSAIDs の微粒子化と皮膚透過性および炎症性  
サイトカイン・NO 産生に及ぼす影響に関する  
研究

横 田 淳 子

平 成 三 十 一 年

博 士 論 文

NSAIDs の微粒子化と皮膚透過性および炎症性  
サイトカイン・NO 産生に及ぼす影響に関する  
研究

徳島文理大学大学院薬学研究科

薬学専攻 博士課程

横 田 淳 子

指導教授 京谷庄二郎

平成三十一年提出

## 目次

略語一覧 .....	1
緒 論 .....	2
第一章 微粒子化 NSAIDs の作製 .....	7
第一節 序論 .....	7
第二節 微粒子化 NSAIDs の粒子径の測定 .....	11
第三節 小 括 .....	16
第二章 マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞におけるリポポリ サッカライド (LPS) 誘発炎症のサイトカインおよび NO 産生に及ぼす NSAIDs の粒子径の影響 .....	17
第一節 序論 .....	17
第二節 NSAIDs ナノ粒子の RAW264.7 細胞生存率に与える影響 .....	20
第三節 RAW264.7 細胞の LPS 惹起炎症に対する NSAIDs 粒子径の 影響 .....	22
第四節 小 括 .....	26
第三章 NSAIDs の皮膚中への分配・拡散および皮膚透過性と抗炎症作用	

に及ぼす粒子径の影響 .....	29
第一節 序論 .....	29
第二節 NSAIDs の皮膚中への分配・拡散に及ぼす粒子径の影響 .....	35
第三節 NSAIDs の皮膚透過性に及ぼす粒子径の影響 .....	37
第四節 NSAIDs のカラゲニン足蹠炎症モデル（急性炎症）に及ぼす 粒子径の影響 .....	40
第五節 NSAIDs のアジュバント関節炎モデル（慢性炎症）に及ぼす 粒子径の影響 .....	46
第六節 小括 .....	52
総括 .....	56
実験の部 .....	59
参考文献 .....	67
発表論文 .....	79
謝辞 .....	80

## 略語一覧

ANOVA	分散分析 (Analysis of variance)
AUC	時間曲線下面積 (Area Under the Curve)
Bulk	原末 (Bulk Powder)
COX	シクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase)
DEX	デキサメタゾン (Dexamethasone)
DIC	ジクロフェナクナトリウム (Diclofenac Sodium)
ED <sub>50</sub>	50%効果濃度 (Half maximal (50%) Effective Dose)
HPLC	高速液体クロマトグラフィ (High Performance Liquid Chromatography)
I $\kappa$ B	$\kappa$ B 阻害因子 (inhibitor of kappa B)
IL	インターロイキン (Interleukin)
IMC	インドメタシン (Indomethacin)
INF- $\gamma$	インターフェロン- $\gamma$ (Interferon-gamma)
iNOS	誘導型一酸化窒素合成酵素 (Inducible Nitric oxide synthase)
KET	ケトプロフェン (Ketoprofen)
LPS	リポ多唐 (Lipopolysaccharide)
Nano	ナノ粒子 (Nanoparticles)
NF- $\kappa$ B	核内因子 $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B)
NO	一酸化窒素 (Nitric Oxide)
NSAIDs	非ステロイド性消炎鎮痛薬 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)
PGE <sub>2</sub>	プロスタグランジン E <sub>2</sub> (Prostaglandin E <sub>2</sub> )
PXC	ピロキシカム (Piroxicam)
TNF- $\alpha$	腫瘍壊死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor-alpha)

## 緒 論

皮膚に適用する医薬品には、皮膚局所に作用する局所作用型外用剤と全身循環系に移行して作用を発揮する経皮吸収型製剤がある。これらの剤形としては、ローションなどの液剤、軟膏、クリーム、ゲルなどの半固形製剤、パップやテープなどの貼付型製剤が<sup>1,2)</sup>ある。中でも、局所作用型外用剤は、局所における炎症性疾患、皮膚疾患治療に使用されている。これらの製剤を用いる利点としては、投与の簡便さ、患部への薬剤の送達などがあげられる<sup>3,4)</sup>。しかし、ほとんどの薬物の皮膚透過性は皮膚最外層にある角質層の高い透過バリア能に大きく依存することが知られている<sup>5-7)</sup>。皮膚は、ヒトにとって最大の組織である。この組織に医薬品が適応される。化学物質が皮膚に適応されると、有効成分の一部が皮膚バリアを介して皮内に移行し、局所作用型外用剤は、患部に到達する。一方、皮膚は、化学物質や細菌など様々な物質を体内に侵入させないためのバリア機能も有している<sup>6,7)</sup>。そのため、皮膚を介する物質の透過性は、他の組織に比べて極めて低い。皮膚は、角質層を含む表皮、真皮および皮下組織から構成され、汗腺などの付属器官が表皮から真皮を貫通している (Figure 1)。薬物の皮膚透過性を増加させる方法として、イオントフォレシス<sup>8)</sup>、マイクロニードル<sup>9)</sup>などの物理的手法や、吸収促進剤<sup>10)</sup>の併用やナノ<sup>11, 12)</sup>などの輸送単体の利用などの化学的手法が確立されてきている。

ナノ粒子は、皮膚適用することで薬物の皮膚透過を高めることが報告<sup>13)</sup>され、ナノ粒子を用いた局所薬物送達システムは、臨床応用が拡大される可能性<sup>12, 14-16)</sup>がある。しかしながら、ナノ粒子を用いる場合、粒子サイズの差異によっては、取り込みや付着および皮内での分解に影響を及ぼす<sup>17)</sup>。

皮膚局所における薬理効果は対象薬物の皮膚透過性や皮膚中濃度と密接に関係している。そのため、皮膚透過パラメータである薬物の外用基剤から皮膚への分配と皮膚中での拡散が重要となる<sup>18-20)</sup>。これら透過パラメータに影響を及ぼす要因として、薬物の外用基剤中の薬物の分散性が考えられる<sup>19, 20)</sup>。

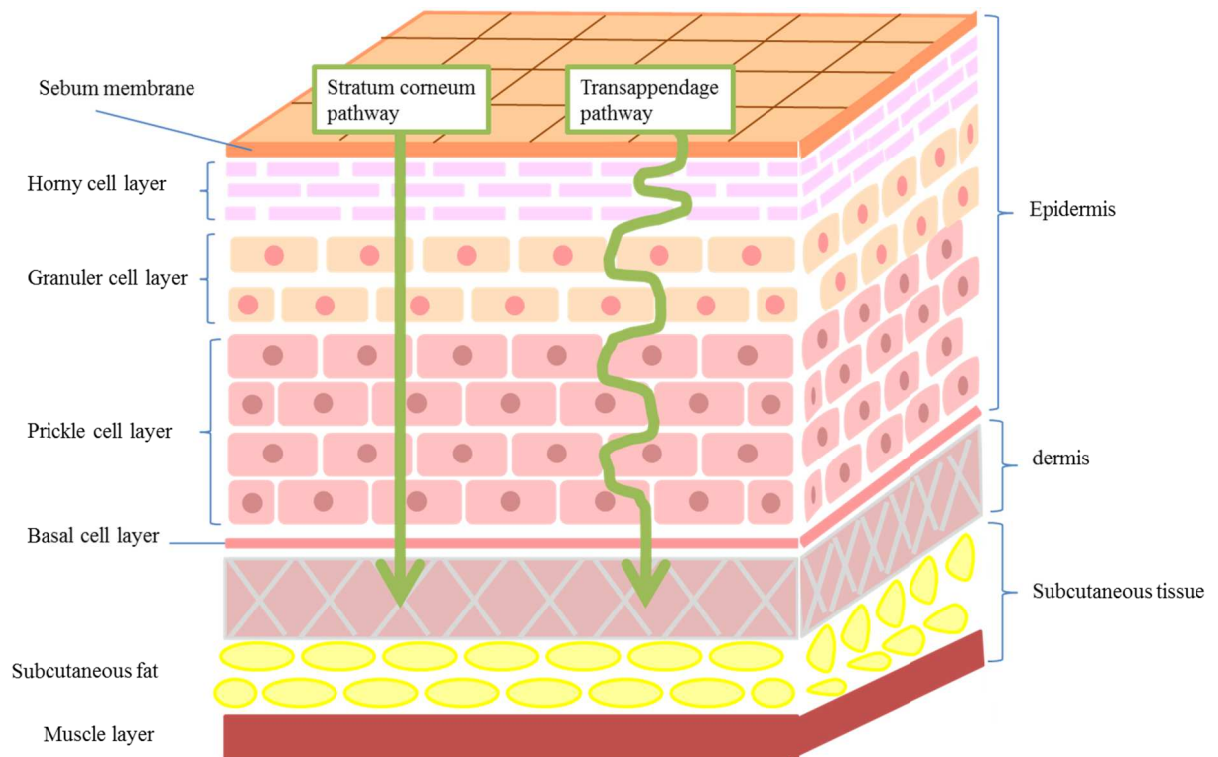


Figure 1 Skin structure and skin permeation pathway

皮膚は、大きく分けて 3 層構造になっており、一番上の層が「表皮」、その下が「真皮」、最下層が「皮下組織」となっている。表皮は、内側から「角質層 (Horny cell layer)」、「顆粒層 (Granuler cell layer)」、「有棘層 (Prickle cell layer)」、「基底層 (Basal cell layer)」の 4 層からなる。真皮は表皮の下にあり、「血管」「神経」や、「皮脂腺」「汗腺」などの付属器が存在する。皮下組織は皮膚の 3 層構造の最も下方にある組織で、表皮と真皮を支えている。皮下組織は多量の脂肪を含んだ組織で、血管・神経・汗腺などを保護している。薬物が経皮吸収される経路には、経表皮経路には角質細胞間隙を經由する「細胞間経路 (Transappendage pathway)」と角質細胞内を經由する「細胞内経路 (Stratum corneum pathway)」の 2 つがある。



局所作用型外用剤に用いられる基剤としては、油脂性基剤、乳剤性基剤、水溶性基剤があり、基剤からの薬物の放出性や皮膚透過性などに関する研究がある<sup>21-25)</sup>。しかし基剤中における薬物の分散および分散された薬物の基剤から皮膚への分配に及ぼす微粒子化の影響に関する詳細な研究は少なく、不明な点が多い。

一方、非ステロイド性消炎鎮痛剤 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs、NSAIDs) は、優れた抗炎症作用と鎮痛作用を有しており、慢性関節リウマチ等の炎症性疾患、腰痛や関節痛の運動器慢性疼痛、術後の鎮痛を目的に局所作用型外用剤として幅広く使用されている。そこで、ナノ粒子化された NSAIDs の局所炎症作用型外用剤の開発は、NSAIDs の皮膚への直接的な薬物送達が可能になると考えた。

本研究では、NSAIDs を微粒子化し、局所作用型外用剤を作製し、NSAIDs ナノ製剤の皮膚透過性に対する影響、*in vivo* および *in vitro* における抗炎症作用について検討した。

第一章では、微粒子化 NSAIDs の作製について検討した。第二章では、RAW264.7 細胞におけるリポポリサッカライド (LPS) 誘発炎症のサイトカインおよび NO 産生に及ぼす NSAIDs の粒子径の影響について検討した。第三章では NSAIDs の局所作用型外用剤を作製し、皮膚中への分配・拡散について皮膚中濃度を測定することにより評価した。皮膚透過性は表皮、真皮、皮下組織を通過する必要があるため、本研究で用いた皮膚組織の皮下組織までを透過した NSAIDs の濃度を皮膚透過量として評価した。また、

動物実験モデルを用いた抗炎症作用に及ぼす粒子径の影響について検討した。

# 第一章 微粒子化 NSAIDs の作製

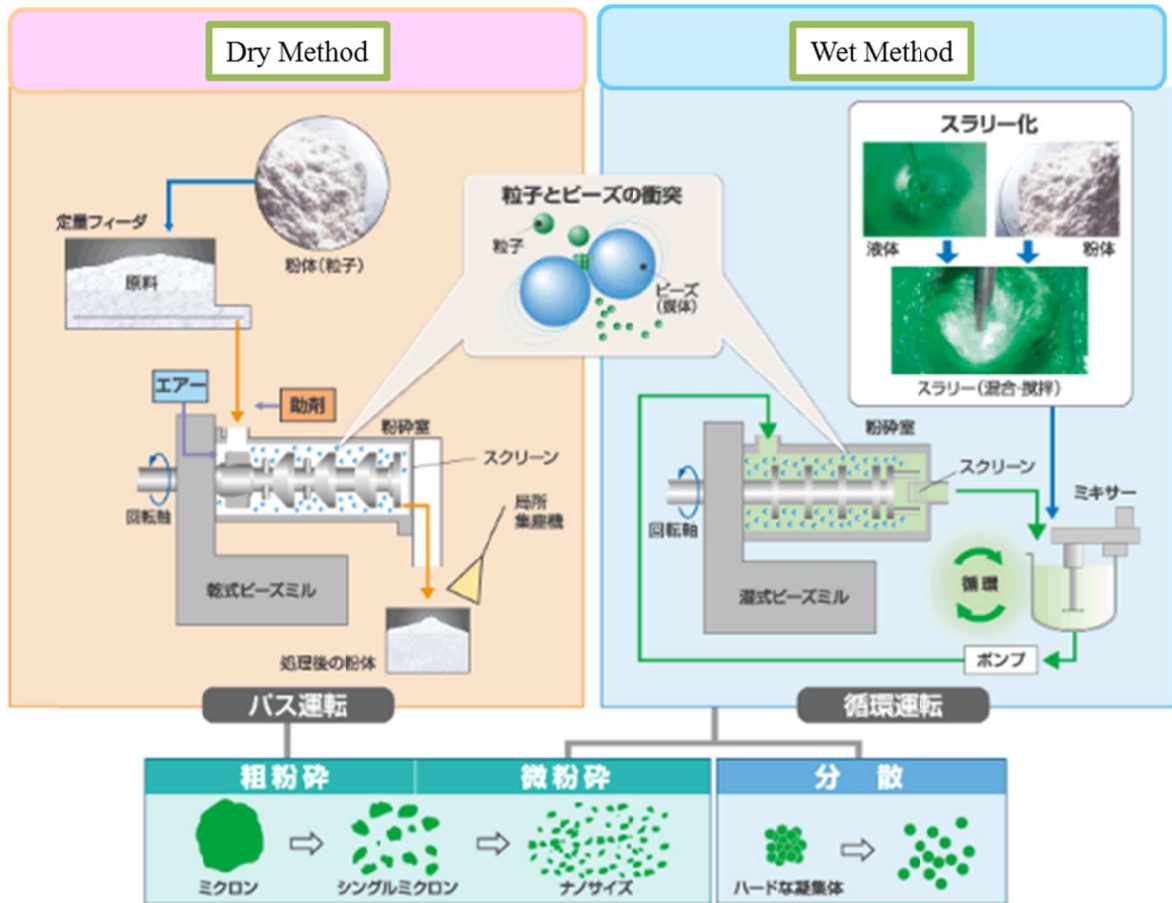
## 第一節 序論

ナノテクノロジーは、ナノメートルサイズで物質の構造・配列を制御することで新機能や優れた特性を持つ物質を作り出す技術とされ、その技術開発が活発に進められている<sup>26)</sup>。現在、ナノテクノロジーを利用して様々なナノマテリアルが製造され、医薬品、食品、化粧品、化成品など、様々な分野の商品が販売されている。ナノマテリアルとは少なくとも一次元の長さが約 1~100 nm のナノ物質またはナノスケールの内部構造を有する凝集体・塊を指し<sup>27, 28)</sup>。ウイルス<sup>29)</sup>、アレルゲン<sup>30)</sup> および微粒子<sup>31)</sup>が含まれる。ナノ粒子は薬物送達だけでなく、イメージング<sup>32)</sup> や診断<sup>33)</sup>・インプラント<sup>34)</sup>による治療にも応用されている。

ナノ粒子化の方法<sup>35-37)</sup>には、水分存在下で粉砕を行う湿式法 (Figure 2) と水を用いず混合粉末をそのまま粉砕する乾式法 (Figure 2) がある。湿式法は薬物懸濁液 (薬物、水、添加剤など) を粉砕装置で処理することによりナノ粒子を調製する。一方、乾式法は、水や溶媒を使用せずボールミルやロッドミルを用いてナノ粒子を調製する方法である。これらの方法は、粉砕量が多量に必要であり、多工程を経たうえに粉砕時間も長時間かかり、また粉砕時における試料の混入が問題となっている。そこで、

本研究においては、これらの問題を解決できる自転・公転ナノ粉碎機 NP-100（株式会社シンキー）を用いて、微粉化を行った。なお、自転・公転ナノ粉碎機は、衝突エネルギーを最大にするよう自転・公転比率を最適化した粉碎専用機であり、自転・公転時に発生する強力な遠心力により、容器内に入れた粉碎メディア（ジルコニアボール）に加速度を与え、材料の粉碎を行う<sup>38)</sup> (Figure 3)。この方法は、粉碎効率を大幅に向上させることで、微量粉碎、微小粉碎、粒子径のばらつきを少なくでき、短時間で粉碎が可能である。加えて冷却することで試料の混入を抑え、有機溶媒を使用せずに粉碎が可能となった。

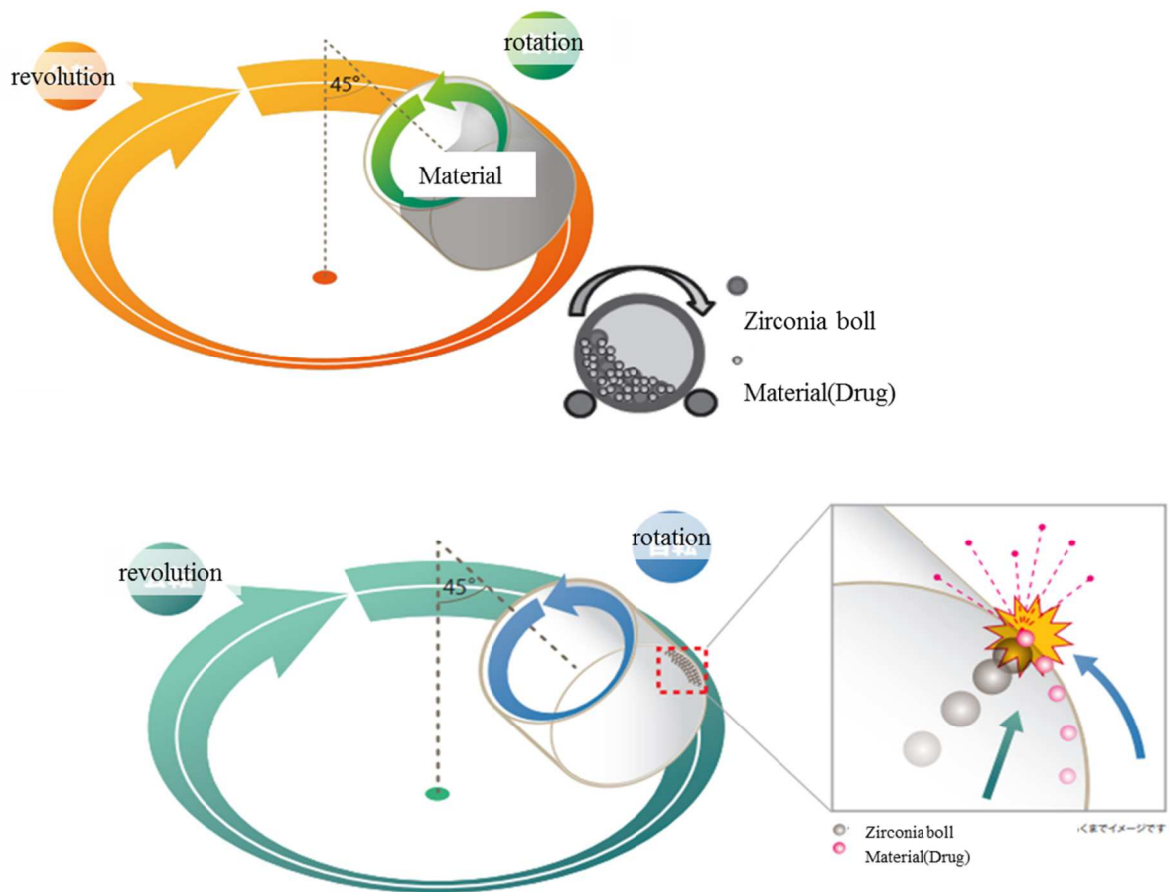
本章では、局所作用型外用剤として臨床で汎用される NSAIDs を用いて、自転・公転ナノ粉碎機を用いて、NSAIDs を微粒子化の検討を行った。



Excerpt from <https://www.ashizawa.com/guidance/01.html>

Figure 2 Nanoparticle preparation method (conventional method)

ナノ粒子の製法は、目的や材料に合わせて複数の方法が開発されている。物理法(粉碎法)と金属原子を生成させて作る化学法(凝集法)とに分けられ、化学法は反応させる場によってさらに区別され、液相の場合は湿式法、気相の場合は乾式法とされる。



Excerpt from [https://saas2.startialab.com/acti\\_books/1045178448/11696/print.pdf](https://saas2.startialab.com/acti_books/1045178448/11696/print.pdf)

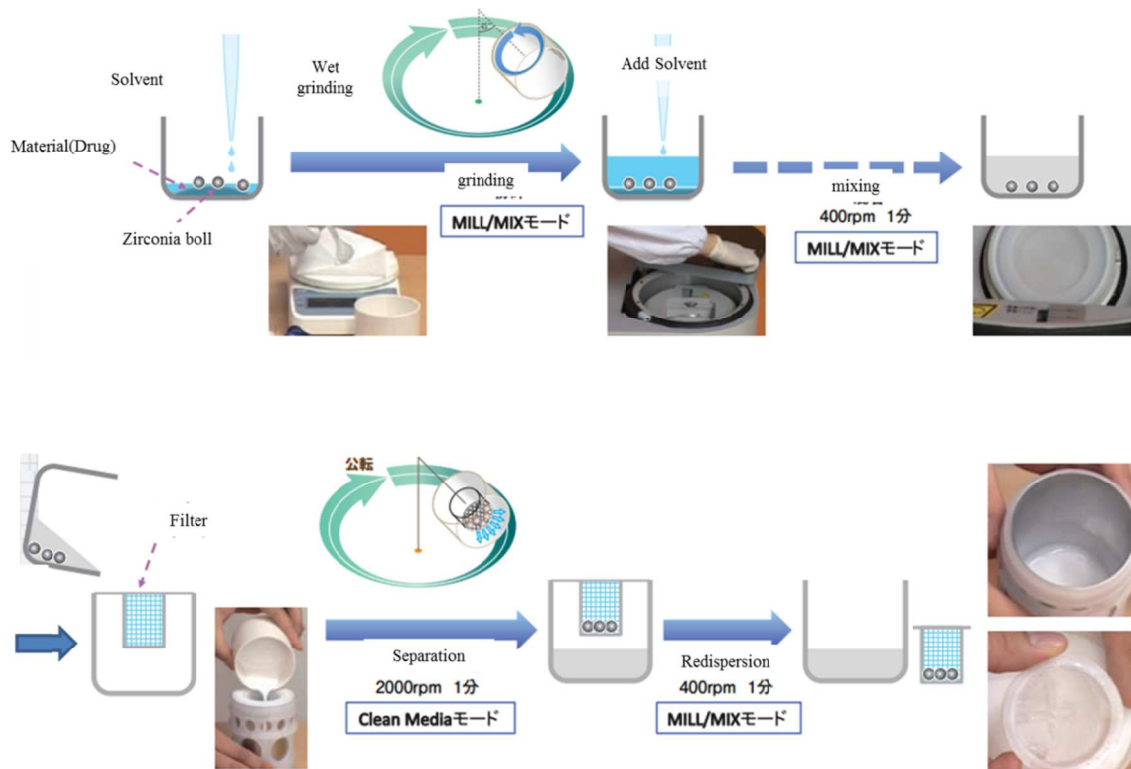
Figure 3 Principle of equipment used for preparation of nanoparticles

自転・公転方式とは、容器が静止軸を中心とし、ある半径をもって時計方向に公転しながら、その軌道上で容器自体が反時計方向に自転する機構のことである。その容器の中に耐摩耗性に優れたジルコニア製の粉砕メディアを入れ、高速で自転・公転をすることにより、メディアに遠心力が与えられ、遠心力を持った粉砕メディアが材料に衝突し、その衝突エネルギーにより材料が微細化される。

## 第二節 微粒子化 NSAIDs の粒子径の測定

自転・公転ナノ粉碎機 (NP-100) を用いた微粒子化は、Figure 4 の作製手順通りに行った。インドメタシン (IMC)、ケトプロフェン (KET)、ピロキシカム (PXC) は、微粒子化に成功した。しかし、ジクロフェナクナトリウム (DIC) は、懸濁溶媒に溶解し微粒子化ができなかった。微粒子化された NSAIDs の粒子径を Table 1 に、粒度分布を Figure 5 に示した。NSAIDs 原末 (以下、bulk) の平均粒子径は、 $IMC_{bulk}$ 、 $KET_{bulk}$ 、 $PXC_{bulk}$  でそれぞれ  $17.5 \pm 11.4$ 、 $16.2 \pm 10.3$ 、 $18.0 \pm 9.9 \mu m$  であった。ナノ粒子 (以下、nano) の平均粒子径は、 $IMC_{nano}$ 、 $KET_{nano}$ 、 $PXC_{nano}$  は、 $0.072 \pm 0.025$ 、 $0.068 \pm 0.017$ 、 $0.075 \pm 0.023 \mu m$  となり、粒子径は有意に小さくなった。そのサイズは、ナノ化合物とされている 1~100 nm の範囲内にあり、安定した粒子径のナノ粒子を得ることができた。Table 1 に粉碎後のナノ粒子の安定性を示す。粉碎後 14 日目に再度粒子径を測定したが、粉碎直後と比較して変化はなかった。

また、Figure 6 に微粒子化した NSAIDs の電子顕微鏡像を示す。電子顕微鏡像では、原末は形も大きさも不揃いであったが、微粒子化することにより、形、大きさともにそろっていた。



excerpt from [https://saas2.startialab.com/acti\\_books/1045178448/11696/print.pdf](https://saas2.startialab.com/acti_books/1045178448/11696/print.pdf)

Figure 4 Procedure for making micronized NSAIDs

粉砕する材料を水性ポリマー（ヒドロキシプロピルセルロース SSL [HPC]）溶液を含有した水溶液中に乳鉢を用いて混合、分散させ、自転・公転式ナノ粉砕機 NP-100（THINKY Corporation; -20°C）を用いて湿式粉砕を行った。材料を水性ポリマー溶液中に均一に懸濁させ、ジルコニア製の粉砕筒にジルコニアビーズとともに投入し、湿式粉砕を実施した。粉砕後に得られた懸濁液をジルコニアビーズと分離し、回収するために、遠心メッシュフィルターにて遠心分離し、懸濁液を回収し、ナノ粒子を得た。



Table 1 Changes in NSAIDs particle size in formulations of particle dispersions containing NSAIDs, 14 d after treatment

Material	Particle Size ( $\mu\text{m}$ )									
	Immediately					14d after				
	Bulk		Nano			Bulk		Nano		
IMC	17.5	$\pm$ 11.4	0.072	$\pm$ 0.025*		17.9	$\pm$ 12.8	0.078	$\pm$ 0.024*	
KET	16.2	$\pm$ 10.3	0.068	$\pm$ 0.017*		16.6	$\pm$ 11.5	0.074	$\pm$ 0.035*	
PXC	18.0	$\pm$ 9.9	0.075	$\pm$ 0.023*		18.5	$\pm$ 10.2	0.081	$\pm$ 0.026*	
DIC	ND		ND			ND		ND		

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. ND : None Data (n=3)

Differences in the efficacy of each particle size preparation between the two groups were tested using an unpaired Student's t-test. \* $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group.

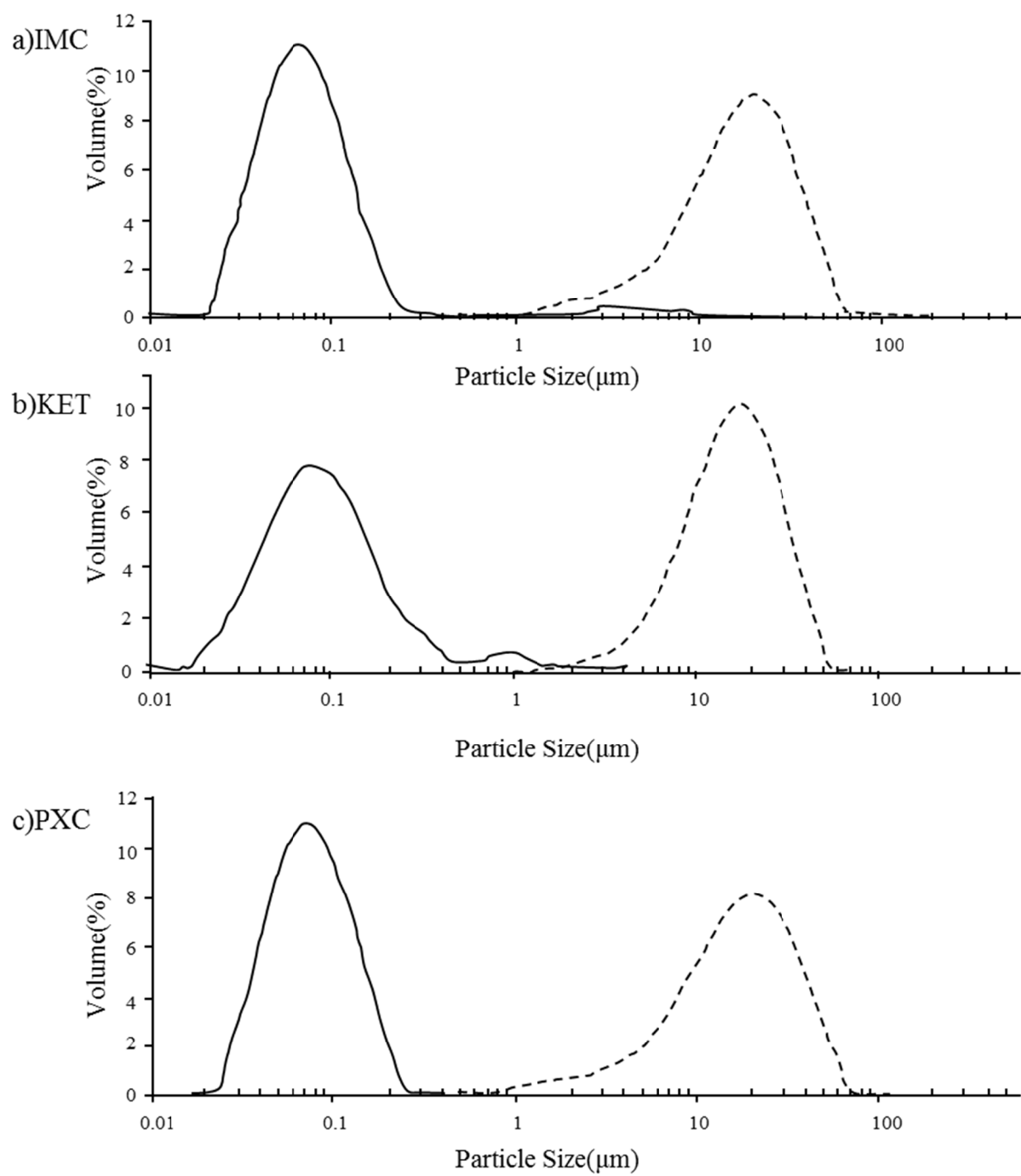
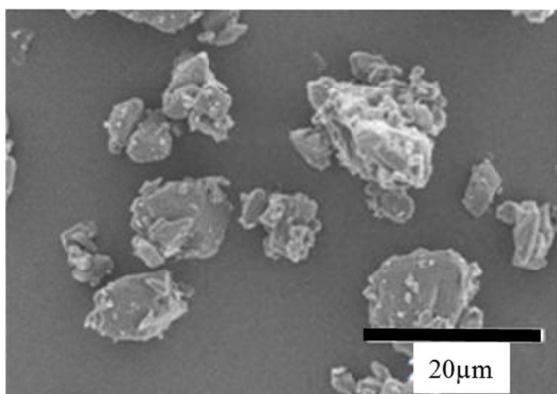


Figure 5 Particle size distribution and frequency in NSAIDs particles.

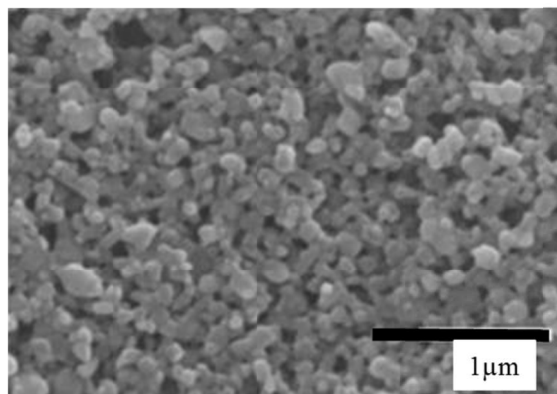
a) Particle size distribution and frequency for Indomethacin particles, b) Ketprofen particles and  
 c) Piroxicam particles. (n=3)      ······ is NSAIDs<sub>bulk</sub>, — is NSAIDs<sub>nano</sub>.

a) IMC

Bulk Powder

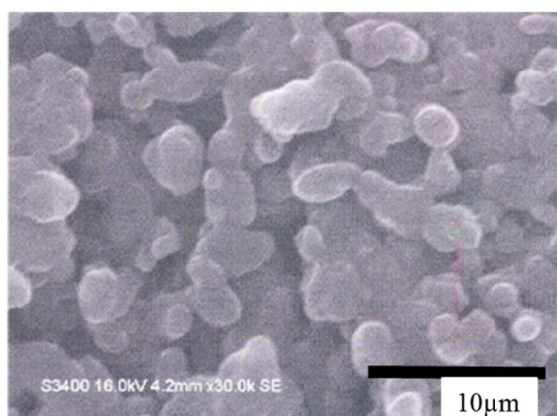


Nano Particles



b) KET

Bulk Powder



Nano Particles

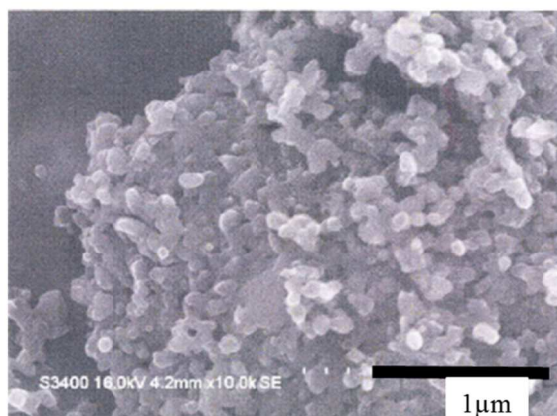


Figure 6 Electron Microscopic Images of NSAIDs

a) Electron Microscopic Images for Indomethacin, b) Electron Microscopic Images for Ketoprofen

### 第三節 小 括

本章では、局所作用型外用剤として臨床で汎用される IMC、KET、PXC、DIC を用いた。使用した 4 剤の NSAIDs のうち DIC は、粉碎のために使用した水溶性ポリマー溶液に溶解した。DIC は、他の 3 剤に比べ化学的性質として水に対する溶解度が高かったためと考えられる。IMC、KET、PXC の 3 剤については Table 1 に示した通り、68~75nm の粒子となり、ナノ粒子を作製することに成功した。ナノ粒子はコロイド分散系に属し、長期間水中で分散状態を維持していくことは、熱力学的に不安定であるため非常に困難であり、凝集・沈降が生じる欠点を持つ。そのため、ナノ粒子調製後 14 日目の安定性を確認した。作製したナノ粒子は、調製後 14 日目においても沈殿は観察されず、粒子径も作製時と差は認められなかった (Table 1)。また、安定した粒子径は Figure 5、6 からも確認され、安定した粒子径のナノ粒子を得ることができた。

## 第二章 マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞におけるリポポリサッカライド (LPS) 誘発炎症のサイトカインおよび NO 産生に及ぼす NSAIDs の粒子径の影響

### 第一節 序論

炎症反応は、生体に異物の浸入、感染、外傷などの際に起こる生体防御反応である<sup>39, 40)</sup>。炎症反応による痛みは生体にとっての危険信号を知らせる必要不可欠なものの一つではあるが、過剰に発現した場合は生体組織の損傷や機能低下など人体にとって悪影響を及ぼすため、抗炎症薬などによる治療が必要となってくる<sup>8)</sup>。炎症時にはマクロファージから種々のサイトカインが産生され、炎症反応が進行する。炎症惹起後放出されるケミカルメディエーター、炎症性サイトカインは痛みや浮腫、発赤や発熱を引き起こす。炎症時にはインターロイキン(IL)、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )、インターフェロン- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) などにより、誘導型 NO 合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOs) の発現が誘導され、炎症反応を促進させる<sup>41-43)</sup>。過剰に生成した NO は、スーパーオキシドと反応して DNA 障害性を有するペルオキシ亜硝酸を産生し、細胞や組織に障害を与え、炎症症状を増悪する。炎症を抑制するために、NSAIDs は、臨床で汎用されている。NSAIDs は、アラキドン酸からエイコサノイドへの変換において重要な役割を

果たすシクロオキシゲナーゼ (COX -1 および COX-2) を阻害<sup>44, 45)</sup> することで抗炎症作用を発揮する。

本章では、炎症性メディエーターの産生誘導因子としてグラム陰性菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド (LPS) を用いた。LPS はマウス由来マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞の LPS 受容体に結合すると、様々な経路を経て I kappa B キナーゼ  $\alpha$  ( $I\kappa K\alpha$ ) および  $I\kappa K\beta$  が活性化され、NF- $\kappa$ B に結合していた  $I\kappa B$  がリン酸化される<sup>46)</sup>。リン酸化された  $I\kappa B$  は NF- $\kappa$ B から離れ分解されるため、NF- $\kappa$ B は活性化し核内へ移行する<sup>47)</sup>。核内に移行した NF- $\kappa$ B は iNOS、IL、COX-2、TNF- $\alpha$  などをコードする遺伝子の発現が促進されることにより、NO、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  などが産生<sup>46-48)</sup> する (Figure 7)。そこで、LPS 刺激を行った RAW264.7 細胞の培養上清を用いて NO、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  などのサイトカインを測定し、炎症反応に及ぼす NSAIDs の粒子径の影響の検討を行った。また併せて RAW264.7 細胞の生存率に対する NSAIDs の粒子径の及ぼす影響について検討を行った。

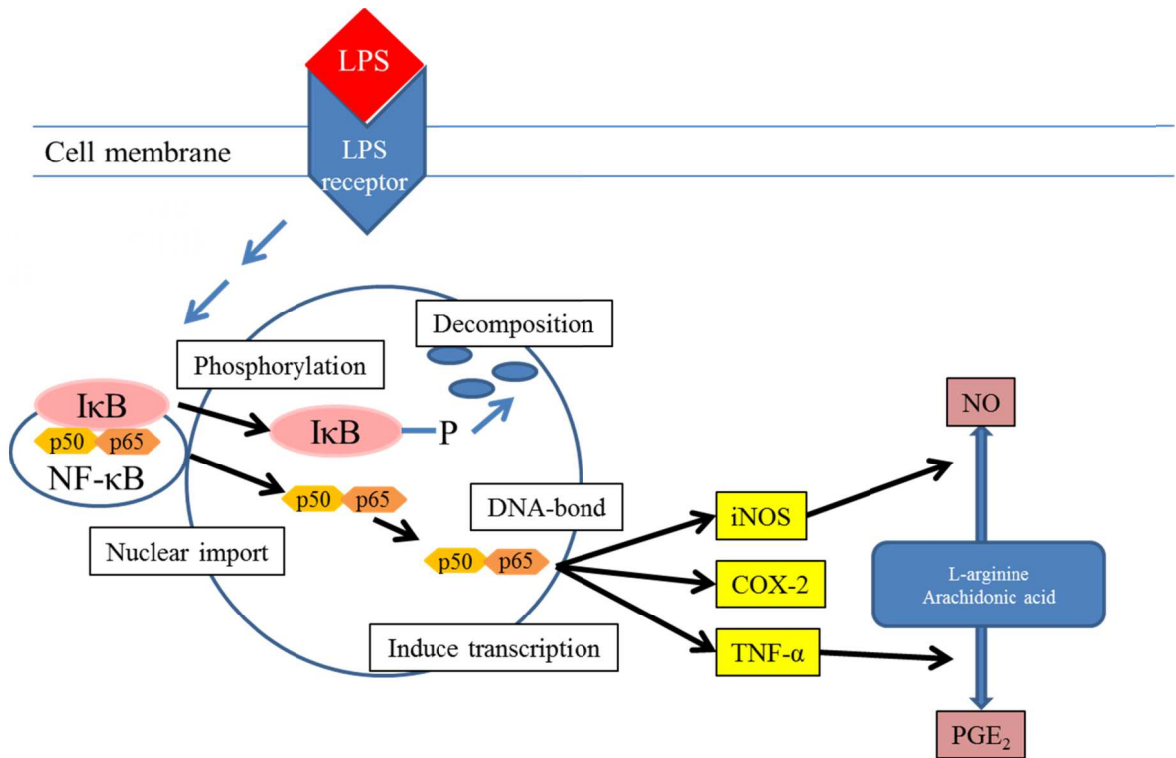


Figure 7 Cytokine production pathway by LPS stimulation in macrophages

LPS はマウス由来マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞の LPS 受容体に結合すると、様々な経路を経て I kappa B キナーゼ  $\alpha$  ( $I\kappa K\alpha$ ) および  $I\kappa K\beta$  が活性化され、NF- $\kappa B$  に結合していた I kappa B がリン酸化される。リン酸化された I kappa B は NF- $\kappa B$  から離れ分解されるため、NF- $\kappa B$  は活性化し核内へ移行する。核内に移行した NF- $\kappa B$  は iNOS、IL、COX-2、TNF- $\alpha$  などをコードする遺伝子の発現が促進されることにより、NO、PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  などが産生される。

LPS: Lipopolysaccharide、I kappa B : I kappa B、NF- $\kappa B$  : nuclear factor-kappa B、NO : Nitric Oxide、iNOS : inducible nitric oxide synthase、PGE<sub>2</sub> : Prostaglandin E<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor-alpha、COX-2 : Cyclooxygenase2

## 第二節 NSAIDs ナノ粒子の RAW264.7 細胞生存率に与える影響

RAW264.7 細胞における NSAIDs 粒子径の影響を Table 2 に示す。MTT 試験の結果、NSAIDs 添加群は、原末群、ナノ粒子群ともに、コントロール群と比較して 10、20  $\mu$  g/mL において有意な細胞生存率の低下は認められなかった。また、コントロール群と比較して NSAIDs 添加投与群は、50、100  $\mu$  g/mL においてナノ粒子群は、有意な細胞生存率の低下を認めた。同濃度の NSAIDs においてナノ粒子群、原末群を比較すると 10、20  $\mu$  g/mL では、細胞生存率に差は認められず、抗炎症作用の検討は、生存率において差が認められなかった 20  $\mu$  g/mL を用いて行うこととした。



Table 2 Cell viability of RAW cells after incubation with different NSAIDs

		Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cell viability (%)		
Control			100.0		
IMC	Bulk	10	110.0	$\pm$	1.9
		20	102.2	$\pm$	2.3
		50	97.9	$\pm$	2.7
		100	87.7	$\pm$	2.0 <sup>*,#</sup>
	Nano	10	102.9	$\pm$	1.5
		20	98.3	$\pm$	1.3
		50	89.7	$\pm$	1.1 <sup>*,#</sup>
		100	79.7	$\pm$	0.6 <sup>*,#</sup>
KET	Bulk	10	105.1	$\pm$	0.3
		20	99.7	$\pm$	2.3
		50	94.7	$\pm$	2.1 <sup>*</sup>
		100	87.2	$\pm$	0.2 <sup>*,#</sup>
	Nano	10	102.4	$\pm$	2.0
		20	95.7	$\pm$	3.1
		50	82.9	$\pm$	1.0 <sup>*,#</sup>
		100	77.8	$\pm$	1.4 <sup>*,#</sup>
PXC	Bulk	10	102.1	$\pm$	0.5
		20	98.5	$\pm$	2.1
		50	94.5	$\pm$	3.2 <sup>*,#</sup>
		100	86.1	$\pm$	0.7 <sup>*,#</sup>
	Nano	10	98.3	$\pm$	3.6
		20	94.2	$\pm$	3.0
		50	85.6	$\pm$	1.3 <sup>*,#</sup>
		100	69.2	$\pm$	1.6 <sup>*,#</sup>

Each value is expressed as mean  $\pm$  SE (n = 3). <sup>\*</sup>: Statistically significant differences were seen when compared to the control (non-treated group) ( $p < 0.05$ ). <sup>#</sup>: There were statistically significant differences when compared with the 20  $\mu\text{g/mL}$  group ( $p < 0.05$ ).

### 第三節 RAW264.7 細胞の LPS 惹起炎症に対する NSAIDs 粒子径の影響

LPS により炎症を誘導された RAW 264.7 細胞における炎症性サイトカインに対する NSAIDs の粒子径の影響について検討した。NO 産生抑制試験において IMC 添加群は、コントロール群と比較して有意な NO 産生抑制作用が認められた(Figure 8-a)。また、原末群に比べナノ粒子群は、有意な NO 産生抑制作用を示した(Figure 8-a)。IL-6 産生抑制試験において IMC 添加群は、コントロール群と比較して有意な IL-6 産生抑制作用が認められた(Figure 8-b)。原末群に比べナノ粒子群は、有意な IL-6 産生抑制作用を示した(Figure 8-b)、TNF- $\alpha$  産生抑制試験において IMC 添加群は、コントロール群と比較して有意な TNF- $\alpha$  産生抑制作用が認められた(Figure 8-c)。また、原末群に比べナノ粒子群は、有意な TNF- $\alpha$  産生抑制作用を示した(Figure 8-c)。PGE<sub>2</sub> 産生抑制試験において IMC 添加群は、コントロール群と比較して有意な PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用が認められた(Figure 8-d)。また、原末群に比べナノ粒子群は、有意な PGE<sub>2</sub> 産生抑制作用を示した(Figure 8-d)。これら炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響は KET(Figure 9)、PXC (Figure 10) においても同様の結果が得られた。

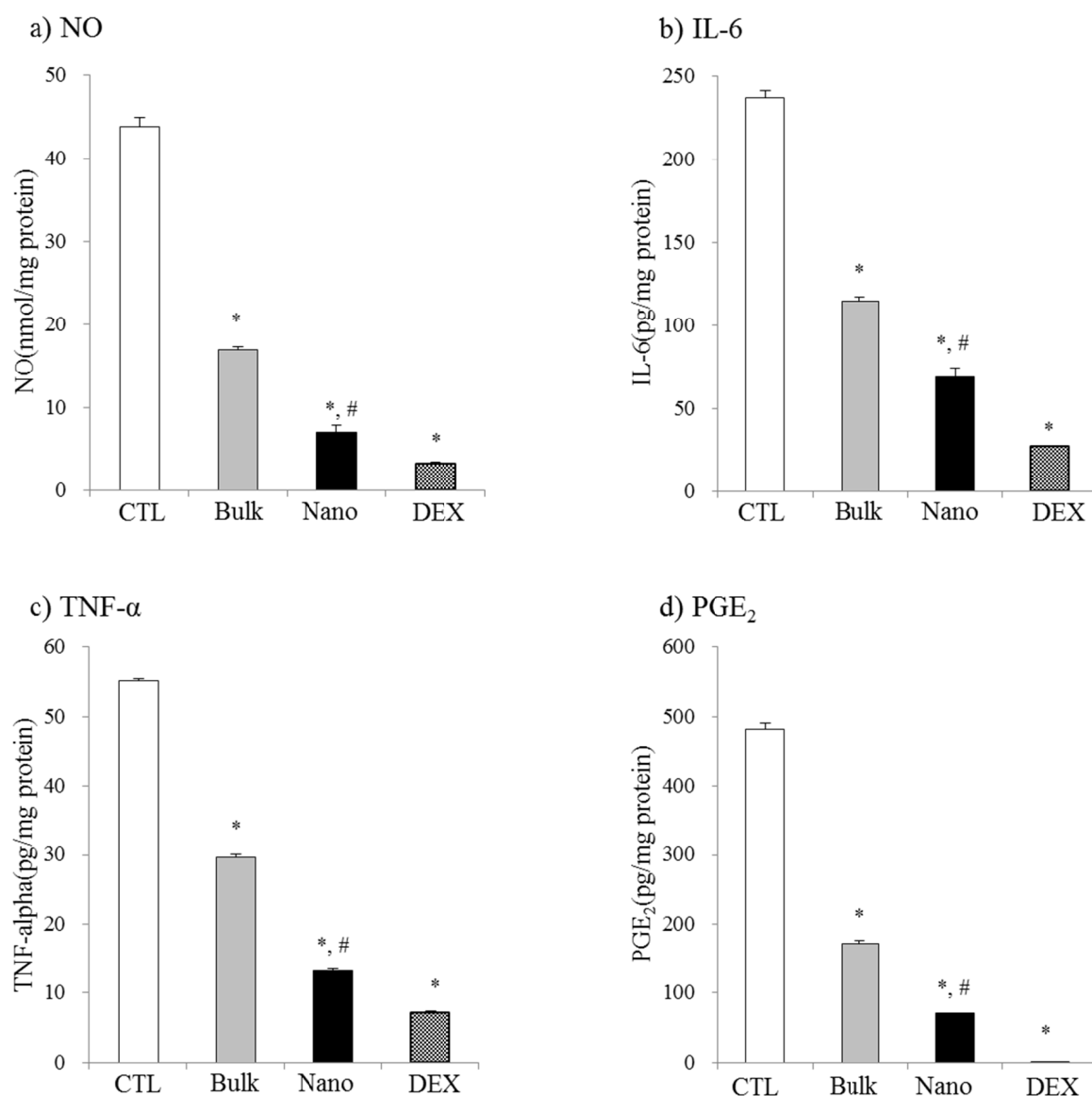


Figure 8 Effect of IMC particle size on the production of inflammatory cytokines during LPS induced inflammation in RAW 264.7 cells

a) NO levels in the RAW264.7 cells of LPS-induced NO production, b) IL-6 levels in the RAW264.7 cells of LPS-induced IL-6 production, c) TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 cells of LPS induced TNF- $\alpha$  production, d) PGE<sub>2</sub> in the RAW264.7 cells of LPS-induced PGE<sub>2</sub> production.

CTL : Non-treatment group, Bulk : Bulk powder group, Nano : Nanoparticles, DEX : Dexamethasone.

Test concentration of bulk, nano and DEX were 20 $\mu$ g/ml. Each value is expressed as mean  $\pm$  SE (n = 3).\*: There were statistically significant differences when compared with the CTL group ( $P < 0.05$ ).

#: Statistically significant differences were seen when compared to the each NSAID<sub>bulk</sub> ( $P < 0.05$ ).

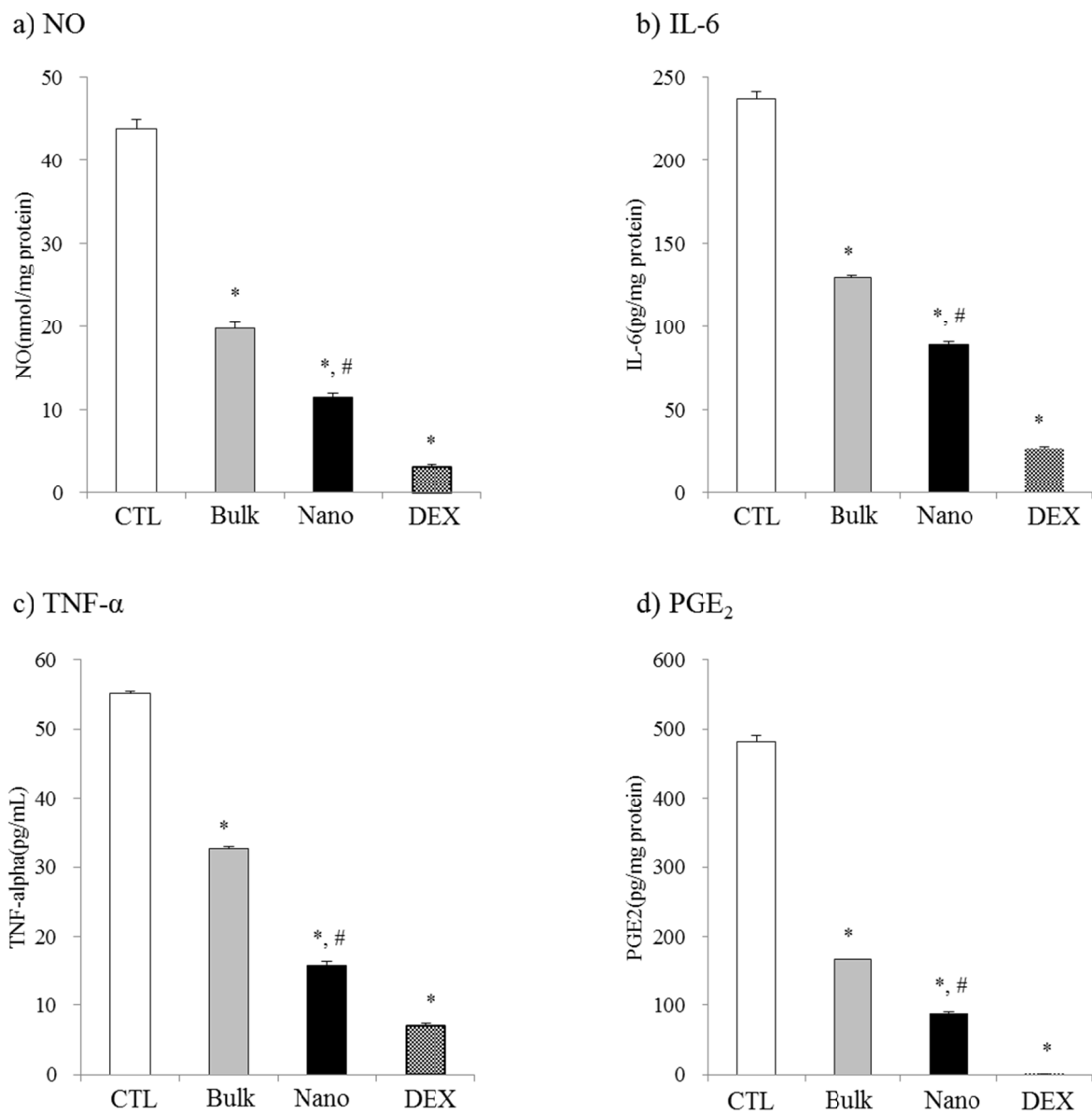


Figure 9 Effect of KET particle size on the production of inflammatory cytokines during LPS induced inflammation in RAW 264.7 cells

a) NO levels in the RAW264.7 cells of LPS-induced NO production, b) IL-6 levels in the RAW264.7 cells of LPS-induced IL-6 production, c) TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 cells of LPS-induced TNF- $\alpha$  production, d) PGE<sub>2</sub> in the RAW264.7 cells of LPS-induced PGE<sub>2</sub> production.

CTL : Non-treatment group, Bulk : Bulk powder group, Nano : Nanoparticles, DEX : Dexamethasone.

Test concentration of bulk, nano and DEX were 20 $\mu$ g/ml. Each value is expressed as mean  $\pm$  SE (n =

3).\*: There were statistically significant differences when compared with the CTL group ( $P < 0.05$ ). #:

Statistically significant differences were seen when compared to the each NSAID<sub>bulk</sub> ( $P < 0.05$ ).

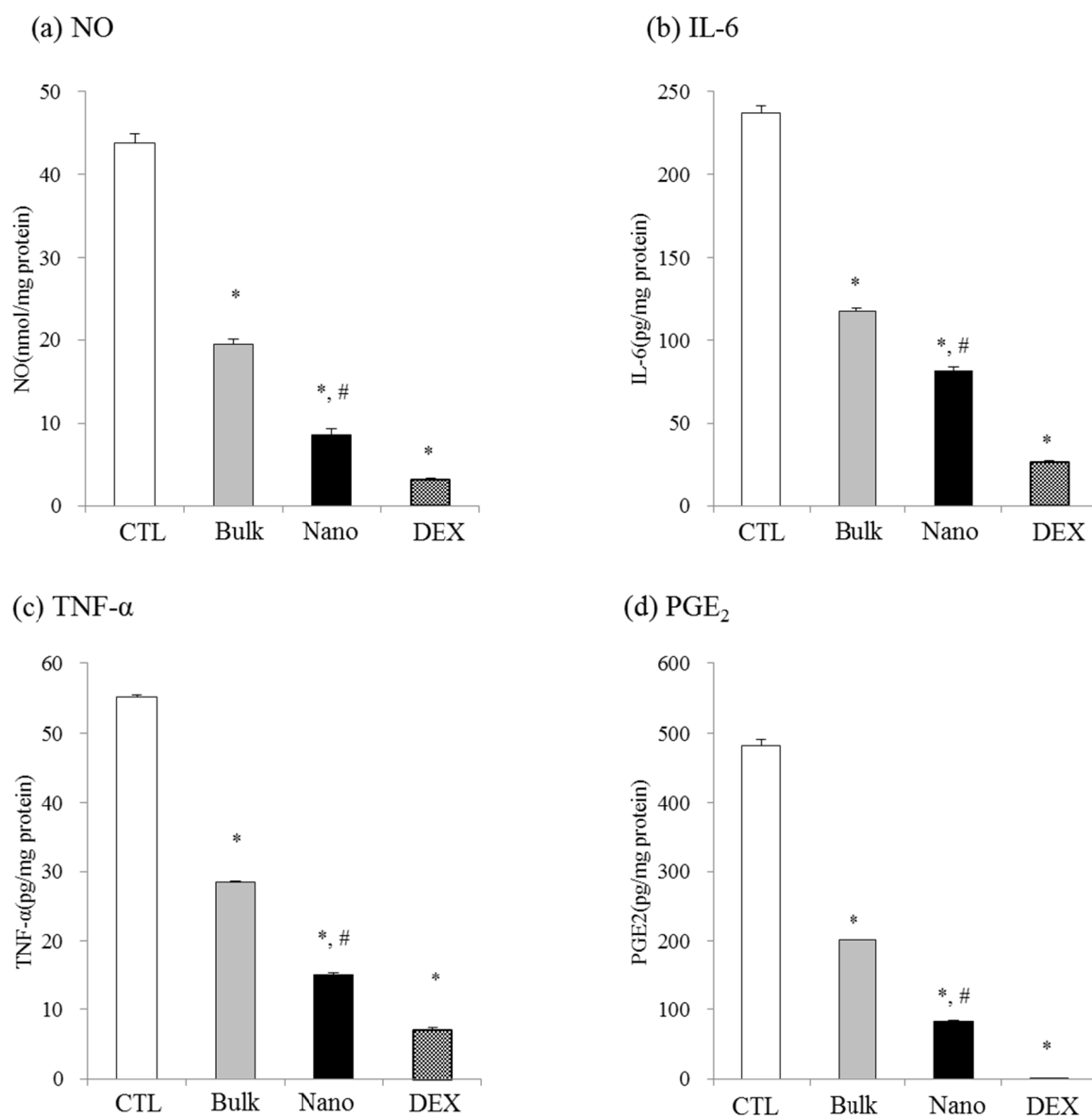


Figure 10 Effect of PXC particle size on the production of inflammatory cytokines during LPS induced inflammation in RAW 264.7 cells

a) NO levels in the RAW264.7 cells of LPS-induced NO production, b) IL-6 levels in the RAW264.7 cells of LPS-induced IL-6 production, c) TNF- $\alpha$  in the RAW264.7 cells of LPS-induced TNF- $\alpha$  production, d) PGE<sub>2</sub> in the RAW264.7 cells of LPS-induced PGE<sub>2</sub> production. CTL : Non-treatment group, Bulk : Bulk powder group, Nano : Nanoparticles, DEX : Dexamethasone. Test concentration of bulk, nano and DEX were 20 $\mu$ g/ml. Each value is expressed as mean  $\pm$  SE (n = 3).\*: There were statistically significant differences when compared with the CTL group ( $P < 0.05$ ). #: Statistically significant differences were seen when compared to the each NSAID<sub>bulk</sub> ( $P < 0.05$ ).

## 第四節 小 括

LPS などの刺激により炎症を惹起されたマクロファージでは、NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> などの様々な炎症性サイトカインが産生される。本章では、NSAIDs ナノ粒子の粒子径の差異が抗炎症作用に及ぼす影響についてマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いて検討を行った。

NSAIDs は、RAW 264.7 細胞に対し、原末群、ナノ粒子群ともに、コントロール群と比較して 10、20  $\mu$ g/mL において有意な細胞生存率の低下は認められなかった。また、コントロール群と比較して NSAIDs 添加群は、50、100  $\mu$ g/mL においてナノ粒子群は、有意な細胞生存率の低下を認めた。高濃度の NSAIDs ナノ粒子は、マクロファージ細胞内に多く取り込まれ細胞障害を引き起こし、生存率を低下させたと考えられる。その機序としては、マクロファージにおいて細胞表面に発現しているマクロファージ受容体 (macrophage receptor with collagenous structure) が様々な粒子の貪食に関与していることが報告<sup>49)</sup> され、ナノ粒子が細胞へ結合し、NSAIDs の取り込みが増加したものと考えられる。また、ナノ粒子は細胞への透過性を増大させることが知られている<sup>43,50)</sup>。さらに、細胞内においてナノ粒子はミトコンドリアに集積しやすいため、活性酸素の発生や抗酸化力の低下が、細胞障害を引き起こす<sup>51-54)</sup> とされている。これらのことから原末群に比べナノ粒子群は、RAW264.7 細胞内への取り込みが増大し、細胞障害を引

き起こし、細胞生存率を低下させたと考えられる (Table 2)。そこで、抗炎症作用の検討は、細胞生存率において差が認められず、細胞障害も認められなかった  $20 \mu\text{g/mL}$  を用いて行うこととした。

RAW264.7 細胞の LPS 惹起炎症に対する抗炎症作用では、IMC、KET、PXC ともにコントロール群に比べ NSAIDs 添加群が、炎症性サイトカインである NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> の有意な産生抑制効果を示した。また、原末群に比べナノ粒子群は、NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> の有意な産生抑制効果が認められた (Figure 8、9、10)。ナノ粒子は、原末に比べて炎症性サイトカインの産生を抑制することにより強力な抗炎症作用が期待できると考えられる。LPS により誘導される炎症では、前述したように NF- $\kappa$ B の核内移行を通じて iNOS、COX などをコードする遺伝子の発現が促進する<sup>55, 56)</sup> ことにより NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> などの炎症性サイトカインが産生される。生体内で生成された NO は、血管弛緩、神経伝達、感染・炎症反応の制御など多彩な生理活性<sup>57-59)</sup> を示す。一方で NO は DNA 損傷などの発がん<sup>60)</sup> への関与が報告され細胞障害の一因ともいわれている<sup>61)</sup>。その他、炎症性サイトカインは、炎症部位において、好中球や血管内皮細胞を活性化し、活性酸素などによる細胞障害を引き起こす。本章で用いた、NSAIDs ナノ粒子は、原末より炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、強い抗炎症作用を発現した。薬物キャリアがナノサイズ化されると生体との相互作用が発現<sup>62)</sup> し、ミクロンオーダーでは現れなかった粒子径依存性の機能が発現する<sup>63, 64)</sup> こ

とがあるため NSAIDs の粒子径の差異が抗炎症作用に差につながったものと推察した。



### 第三章 NSAIDs の皮膚中への分配・拡散および皮膚透過性 と抗炎症作用に及ぼす粒子径の影響

#### 第一節 序論

局所の炎症性疾患に対しては、局所作用型外用剤が多用され、医療用および一般用医薬品として数多くの薬剤が上市されている。しかし、その効果発現は、個人差が大きく、多くの医薬品から個人に適合するものを選択せざるを得ない。その原因として、局所作用型外用剤に含有する NSAIDs の多くは、数 10 $\mu$ m 単位の粒子が分散状態にあり、皮膚表面より角質層を通過し、真皮まで到達する割合は少ないとされている<sup>65, 66)</sup>。NSAIDs を含有した局所作用型外用剤を志向する際に NSAIDs の粒子径は薬物の皮膚透過性に影響を及ぼす可能性がある。

NSAIDs は、様々な剤形で幅広く臨床で使用され、局所の炎症性疾患に対しては、局所作用型外用剤が多用されている。局所作用型外用剤は、標的部位である皮膚より速やかに薬剤を送達できる特性を持つ。局所作用型外用剤の皮膚透過において、皮膚の外的から身を守るための防御機能は、皮膚最外層に位置する角質層が担っている<sup>67-73)</sup>。ため薬物をいかに効率よく角質層を通過させるかが鍵となる<sup>5-7)</sup>。皮膚透過性を促進させるためには、角質層への薬物の分配を増大させる必要がある<sup>21, 22)</sup>。角質層は疎水性

であるため水溶性薬物は、分配が抑制される。ペプチドやタンパク質等の高分子化合物も皮膚透過が困難である。一方、脂溶性薬物は、分子量が 500Da 以上の化合物でも皮膚透過が可能であるといわれている<sup>74)</sup>。ナノ粒子を皮膚適用することで薬物の皮膚透過を高めることが報告され<sup>13)</sup>、薬物の皮膚浸透を改善するための方策として期待されている。しかし、局所作用型外用剤として上市されているものはない。本章では、ヘアレスマウスの背部皮膚 Laboskin<sup>®</sup>を用いて皮膚内への薬物の分配・拡散、皮膚透過性を検討した。Laboskin<sup>®</sup>は Hos:HR-1 (ヘアレスマウス) の背中の皮膚を摘出したものであり、ヒト皮膚と薬物皮膚浸透性に良好な相関関係があるといわれている。Laboskin<sup>®</sup>は、表皮から真皮、皮下組織までの構造を有する厚さ 500~600 $\mu\text{m}$  の皮膚組織<sup>75-77)</sup>である。Figure 11 には、NSAIDs クリームの皮膚中への分配・拡散の評価方法を示した。Figure 12 では NSAIDs クリームの皮膚透過性の評価方法を示した。

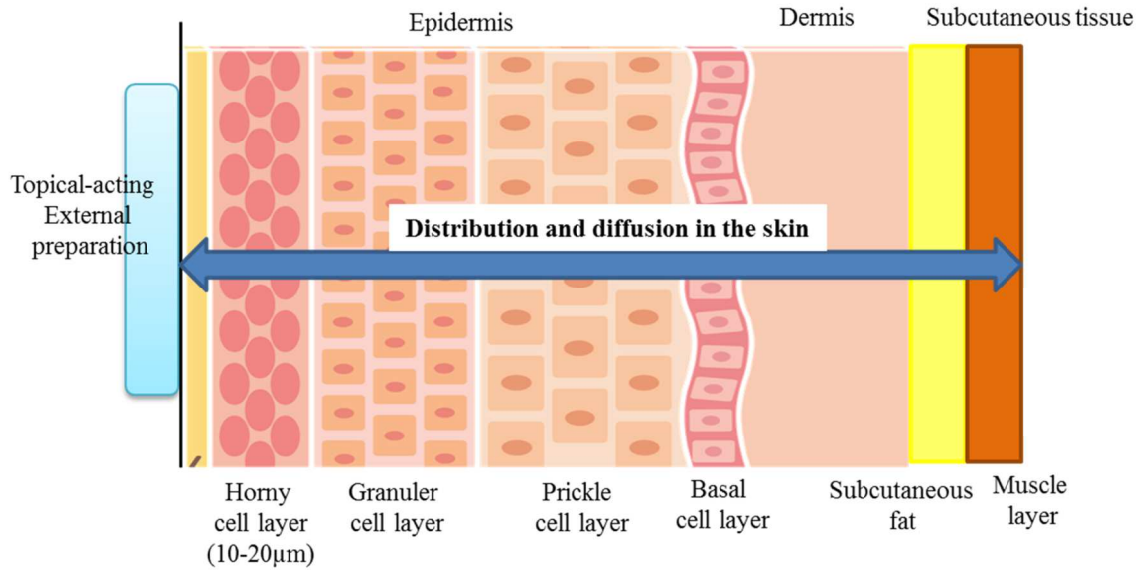
また、局所作用型外用剤として利用するためには最適な基剤の選択が必要となる<sup>78)</sup>。外用剤からの角質層への分配は、理論上、基剤中に薬剤が飽和していれば角質層中でも同じ濃度となる<sup>21, 79)</sup>。しかし、基剤や剤形によって薬物の飽和濃度が異なり、透過性に影響を与える<sup>22, 79)</sup> 場合がある。そのため同成分が同濃度含有されていても油脂性基剤と乳剤性基剤では、皮膚透過性が異なることが報告されている<sup>79)</sup>。微粒子化 NSAIDs 含有局所作用型外用剤を作製する際に外用剤の基剤として、白色ワセリン (油脂性基剤)、親水クリーム (O/W 型)、マクロゴール軟膏 (水溶性基剤) を用いて 1 w/w %

IMC<sub>nano</sub>外用剤を作製し、皮膚透過性を評価し、本章の評価に用いる基剤を決定した。

各基剤による皮膚透過性は、Figure 13 に示す通り、白色ワセリン、親水クリームを比較すると、親水クリームにおいて透過量が多い傾向にあった。マクロゴール軟膏は IMC をほとんど透過しなかった。このことより本研究では、外用基剤として親水クリームを用いることとした。

そこで本章では、まず、微粒子化 NSAIDs の皮膚中への分配・拡散および皮膚透過性について検討した。次に、このデータをもとに、急性炎症モデル（ラットカラゲニン足蹠炎症モデル）および慢性炎症モデル（ラットアジュバント関節炎モデル）を用いて炎症に対する抑制効果を検討した。

a) 局所作用型外用剤の皮膚中への分配・拡散評価部位



b) 局所作用型外用剤の皮膚中への分配・拡散 評価方法

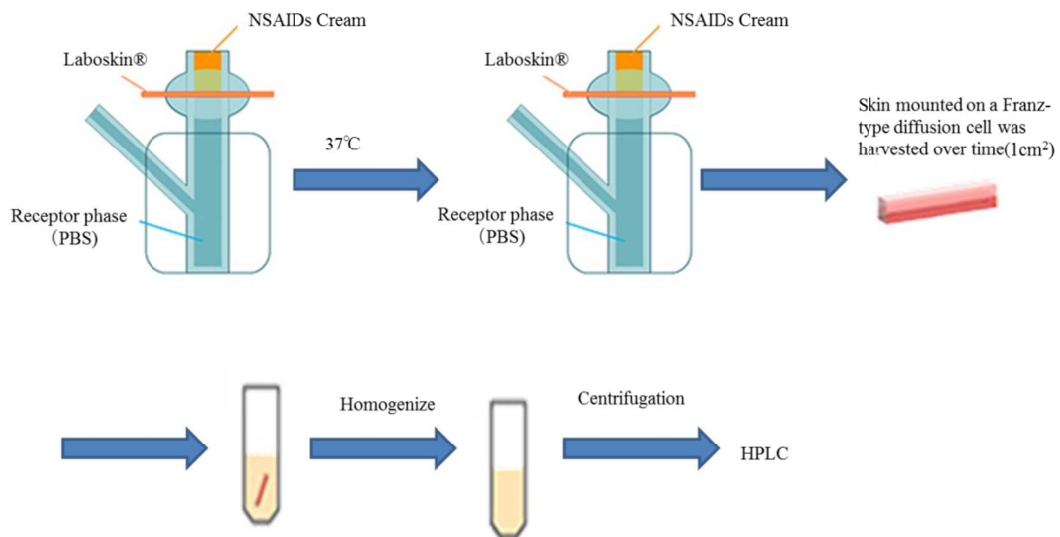
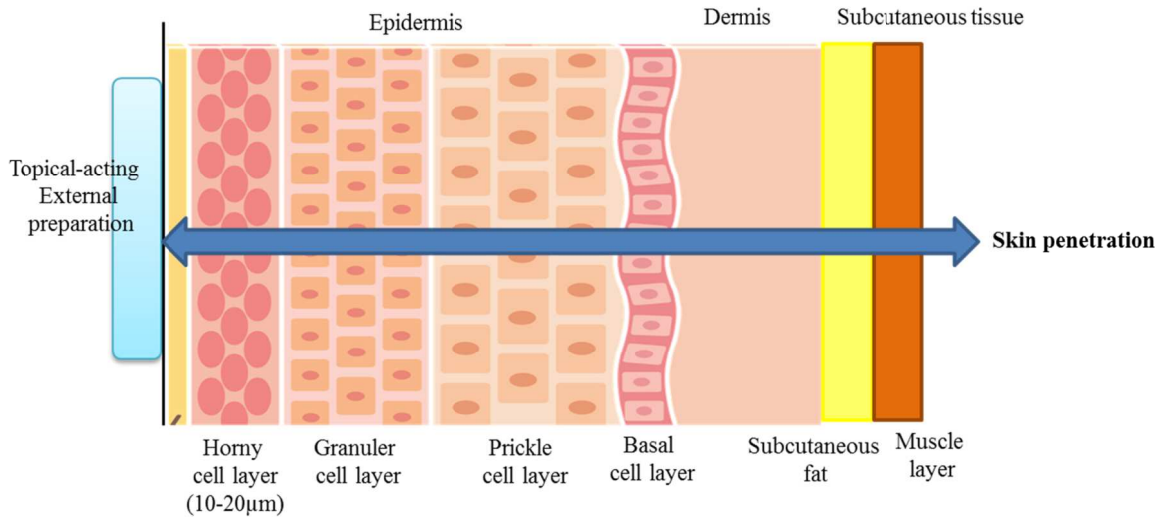


Figure 11 Evaluation method of distribution and diffusion of NSAIDs into the skin

a) 局所作用型外用剤の皮膚中への分配・拡散評価部位：局所作用型外用剤を表皮に添加し、皮膚内への分配・拡散を評価するために表皮から皮下組織までを採取した。b) 局所作用型外用剤の皮膚中への分配・拡散 評価方法（皮膚中濃度）：皮膚中濃度の測定は、ヘアレスマウス皮膚をフランツ縦形拡散セルに表皮側を上にして装着し、NSAIDs クリームを添加した。添加後、フランツ型縦型セルに装着した皮膚を経時的に採取する。採取した皮膚を細切し、メタノールを加え、皮膚をホモジネートし、遠心分離後、上清を試料とし、試料の濃度は、HPLC を用いて測定した。

a) 皮膚透過性の評価部位



b) 皮膚透過性評価方法

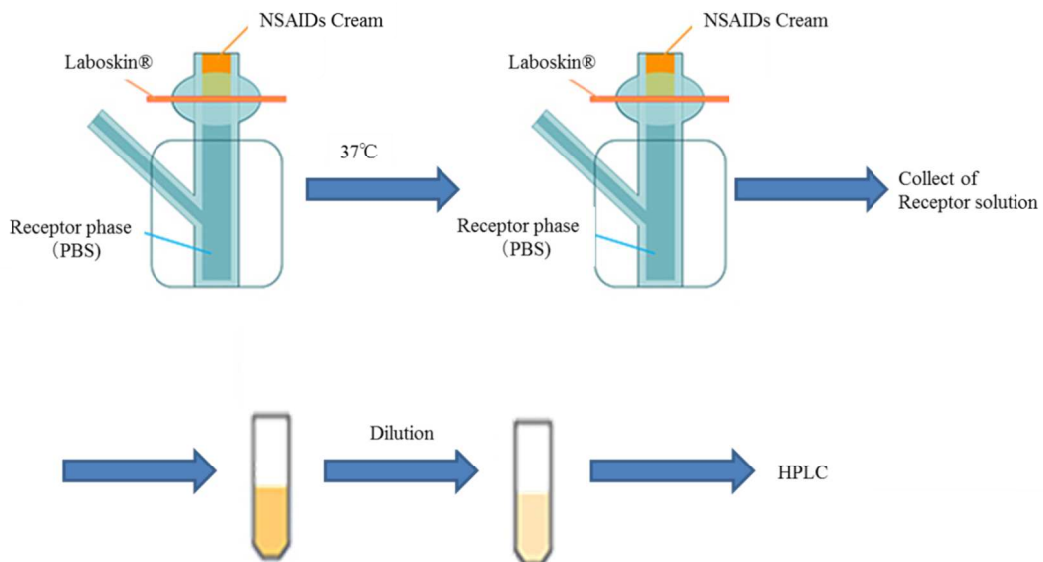


Figure 12 Evaluation of skin penetration

a) 皮膚透過性の評価部位：局所作用型外用剤を表皮に添加し、皮膚透過性を評価するために表皮、真皮、皮下組織を通過した NSAIDs の量を評価した。b) 皮膚透過性評価方法：皮膚透過量の測定は、ヘアレスマウス皮膚をフランツ縦形拡散セルに表皮側を上にして装着し、NSAIDs クリームを添加した。レセプター相には、PBS を添加し、37 °C に維持した。NSAIDs クリームを添加後、経時的にレセプター溶液を採取し、同容量の PBS を加え用量を一定に保った。採取した試料の濃度は、HPLC を用いて測定した。

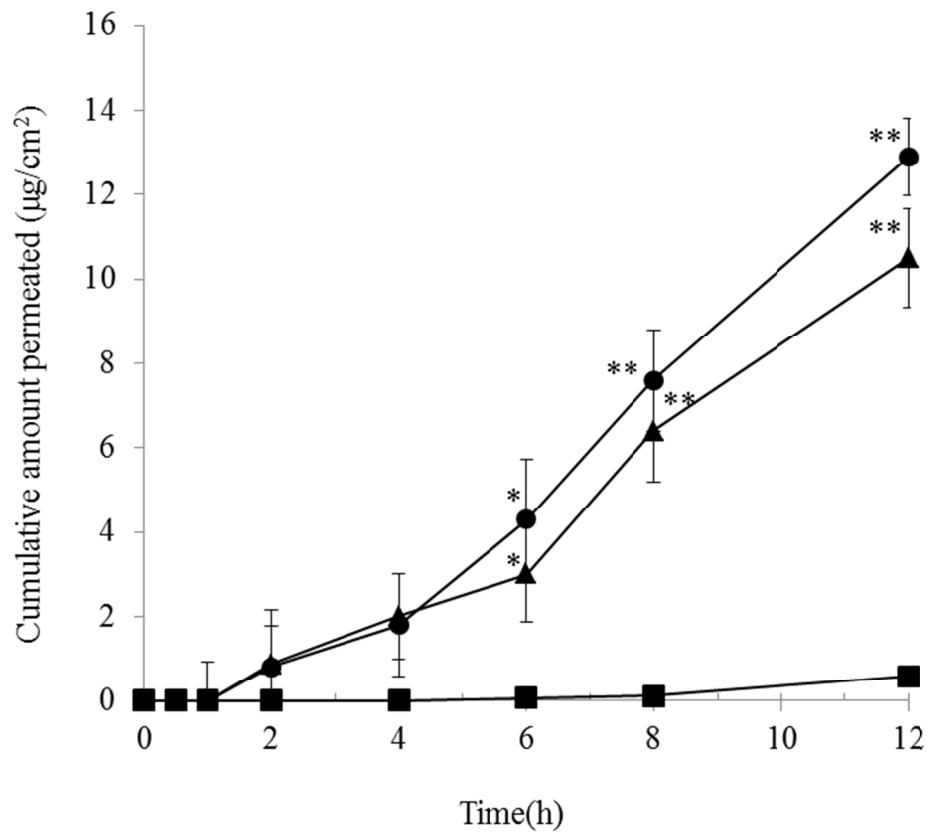


Figure 13 NSAIDs study of base for topically-acting external preparation

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Differences in the efficacy of each particle size preparation between the two groups were tested using an unpaired Student's t-test.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding Macrogol ointment group

● 1 % IMC Hydrophilic cream , ▲ 1 % IMC White petrolatum,

■ 1 % IMC Macrogol ointment

## 第二節 NSAIDs の皮膚中への分配・拡散に及ぼす粒子径の影響

Figure 11 に示すように経時的に採取したヘアレスマウスの皮膚中の NSAIDs 濃度を測定し、皮膚中への分配・拡散を評価した。NSAIDs の皮膚中濃度に及ぼす粒子径の影響を Figure 14 に示す。原末およびナノ粒子化製剤において、適用後 4-6 時間で定常状態に達した。すべての NSAIDs において原末に比べナノ粒子化した製剤においては、皮膚中濃度の増加が認められ、IMC では、4 時間後、KET では、2 時間後、PXC では、4 時間後より有意に皮膚中濃度が増大した。

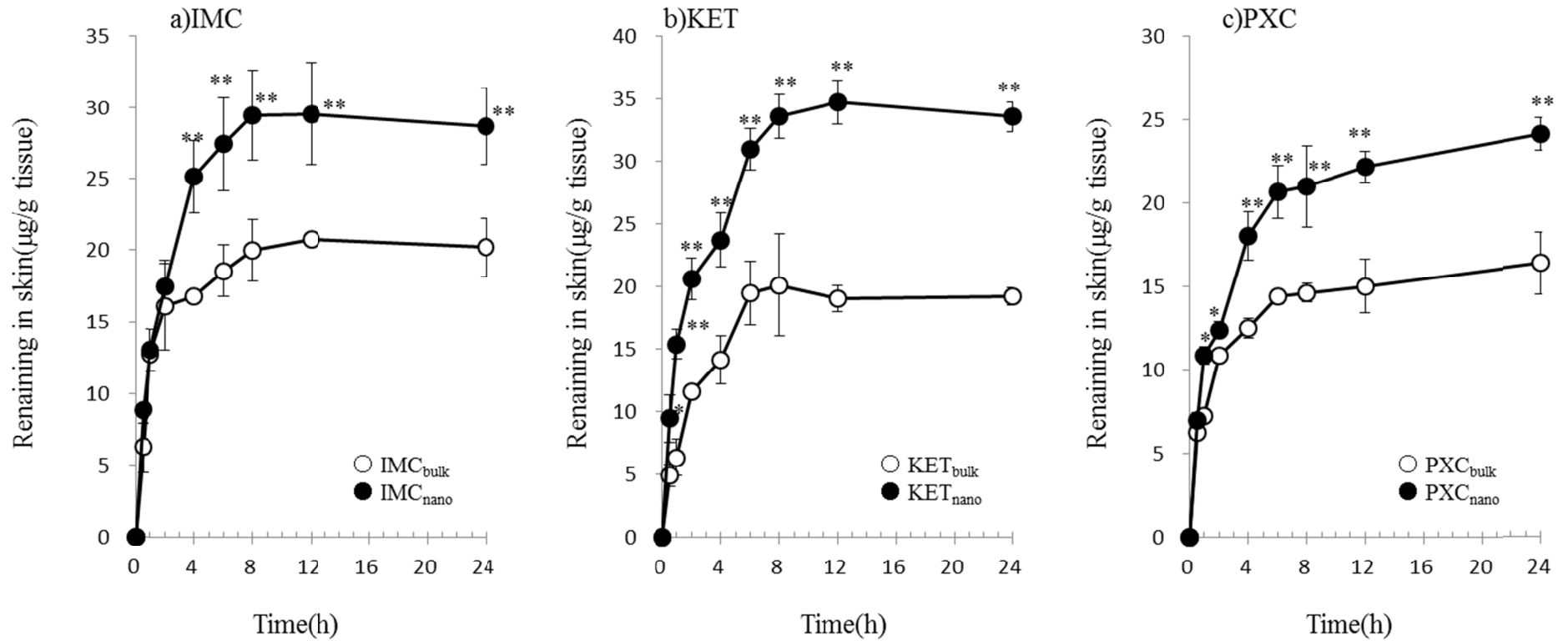


Figure 14 The influence of particle size on the concentration of each NSAID remaining in the skin.

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Differences in the efficacy of each particle size preparation between the two groups were tested using an unpaired Student's t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group.



### 第三節 NSAIDs の皮膚透過性に及ぼす粒子径の影響

Figure 12 に示すようにレセプター相の NSAIDs 濃度を測定し、皮膚透過性を評価した。NSAIDs の累積皮膚透過量に及ぼす粒子径の影響を Figure 15 に示す。すべての NSAIDs において、直線的に濃度は増大した。また、原末に比べナノ粒子では、透過促進が認められ、IMC では、4 時間後、KET では、2 時間後、PXC では、4 時間後より原末に比べナノ粒子では、有意に累積透過量が増大した。累積投与量一時間推移データより得られた皮膚透過パラメータを Table 3 に示す。IMC<sub>nano</sub> においては、透過速度 (Jc)、薬物透過係数 (Kp)、薬物拡散係数 (D)、軟膏から皮膚への分配係数 (Km)、累積投与量一時間曲線下面積 (AUC<sub>0-24</sub>) において IMC<sub>bulk</sub> よりも有意に高かった。また、透過のラグタイム (Tlag) は、有意に短縮した。KET、PXC においても同様の結果が得られた。

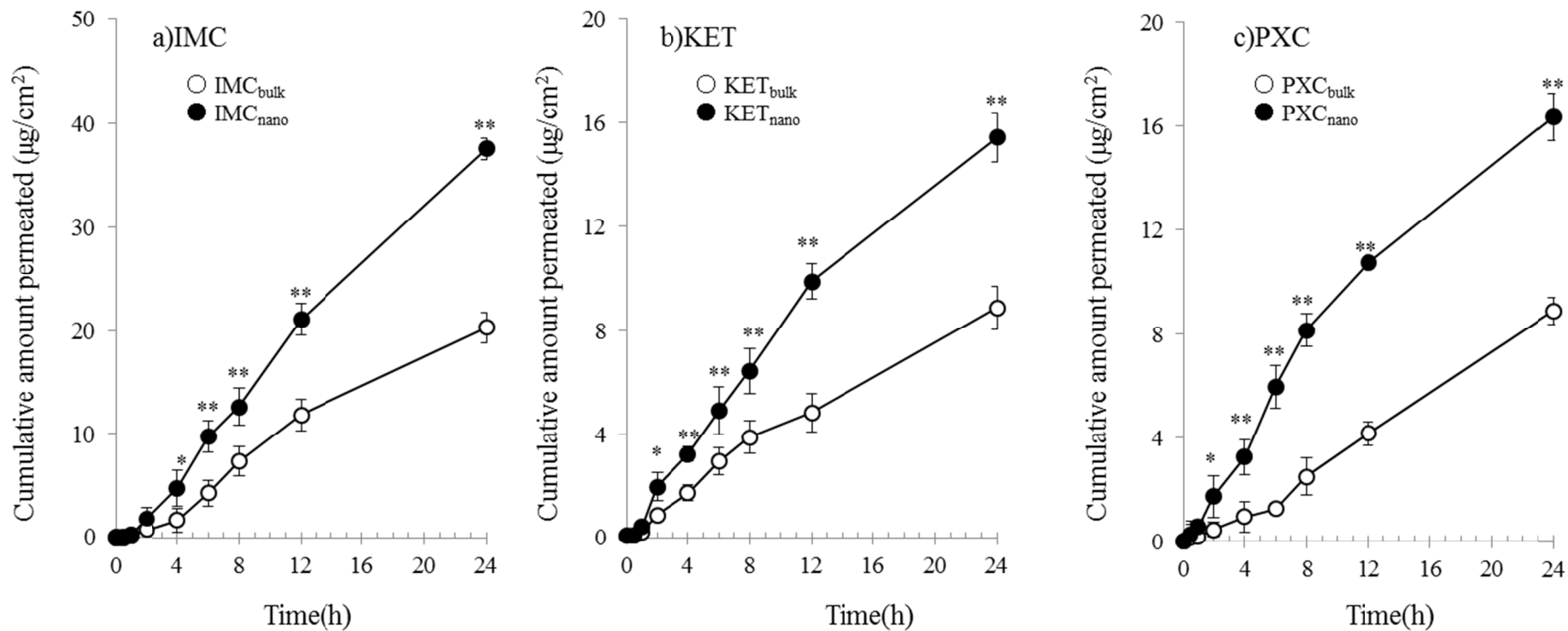


Figure 15 The influence of particle size on the cumulative skin penetration of each NSAIDs

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Differences in the efficacy of each particle size preparation between the two groups were tested using an unpaired Student's t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group.

Table 3 Pharmacokinetic parameters for the skin penetration of NSAIDs

Sample	Cumulative amount permeated for 24h( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Jc ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	Kp ( $\times 10^{-4}$ cm/h)	Km	D ( $\times 10^{-4}$ cm <sup>2</sup> /h)	Tlag (h)	AUC <sub>0→24</sub> ( $\text{h} \cdot \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
IMC <sub>bulk</sub> (1%)	20.3 ± 0.5	0.7 ± 0.1	5.6 ± 0.3	0.2 ± 0.03	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.2	252.7 ± 5.1
IMC <sub>nano</sub> (1%)	37.5 ± 1.0**	1.4 ± 0.1*	9.6 ± 0.5**	0.3 ± 0.1	3.6 ± 2.1	1.3 ± 0.6*	463.5 ± 20.4**
KET <sub>bulk</sub> (3%)	8.9 ± 0.8	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.04	0.2 ± 0.01	1.7 ± 0.9	2 ± 1.1	114.0 ± 6.9
KET <sub>nano</sub> (3%)	15.5 ± 1.0**	1.2 ± 0.3*	2.0 ± 0.4**	0.4 ± 0.03	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.2	222.6 ± 0.2**
PXC <sub>bulk</sub> (0.5%)	8.9 ± 0.5	0.4 ± 0.1	3.7 ± 0.6	0.1 ± 0.06	1.5 ± 0.5	2.1 ± 0.9	99.8 ± 4.1
PXC <sub>nano</sub> (0.5%)	16.4 ± 0.9**	0.9 ± 0.2*	9.0 ± 0.2**	0.2 ± 0.1	5.0 ± 3.8	1.3 ± 0.6	230.3 ± 29.4**

Results are expressed as mean ± SE of the data from six experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDsai group (analysis of variance followed by unpaired Student's t-test). Of the skin penetration parameters, the penetration rate per unit area (Jc), the drug penetration coefficient (Kp), the drug diffusion coefficient (D), the ointment-to-skin partition coefficient (Km), and the penetration lag-time (Tlag) were calculated using the following equations and the cumulative dose-time course data. Cs denotes the concentration in the ointment ( $\mu\text{g}$ ), and  $\delta$  indicates the skin thickness (mean, 0.368 mm). The J and Tlag were calculated from the linear part of the cumulative dose-time course data. In addition, the area under the cumulative dose-time curve (AUC) was calculated.

$$J_c = \frac{D \cdot K_m \cdot C_s}{\delta} = K_p \cdot C_s \quad T_{lag} = \frac{\delta^2}{6D}$$

#### 第四節 NSAIDs のカラゲニン足蹠炎症モデル（急性炎症）に及ぼす粒子径の影響

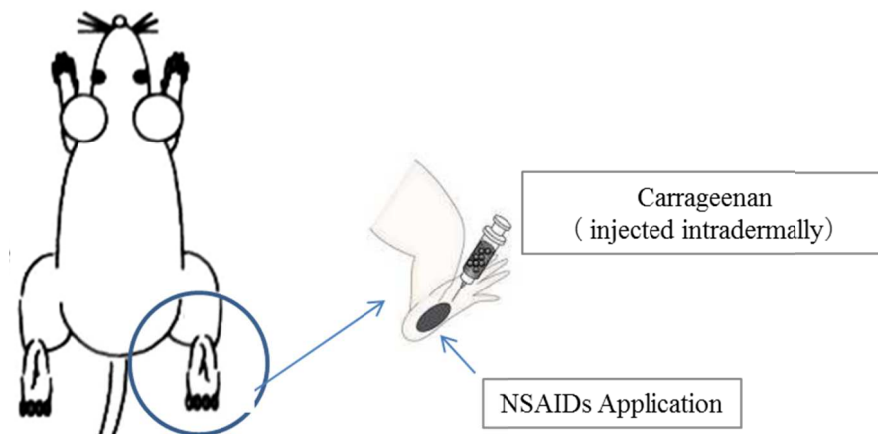
急性炎症に対する作用についてラットカラゲニン足蹠炎症モデルを用いて検討した。Figure 16 に起炎物質と NSAIDs の投与部位およびタイムスケジュールを示す。Figure 17 にカラゲニン投与 3 時間後のラットの浮腫像を示す。ラットの後肢は著明な浮腫像を示していた。ラット後肢足容積における足容積から算出した浮腫率を指標に抗炎症作用を検討した結果を Figure 18 に示す。

カラゲニンによる足蹠浮腫は、無処置群においてカラゲニン投与後 3 時間でピークに達し、浮腫率  $66.3 \pm 2.2$  (%) となった(Figure 18)。すべての NSAIDs 群においては、薬剤投与 1 時間後より原末およびナノ粒子について無処置群、基剤群に比べ有意な浮腫率の減少を示し、その作用は、投与後 6 時間まで持続した。NSAIDs の原末群とナノ粒子群を比較すると IMC (Figure 18-a) と PXC (Figure 18-c) は、被検薬物塗布後 2 時間よりナノ粒子において有意に浮腫率が低値し、浮腫抑制効果が認められた。KET (Figure 18-b) においては、被検薬物投与後 1 時間よりナノ粒子において有意に浮腫率が低値を示し、浮腫抑制効果が認められた。浮腫率一時間曲線下面積 (AUC) の AUC 値においてもすべての NSAIDs において原末群よりナノ粒子群が有意に低値を示した (Table 4)。

炎症のピークと考えられたカラゲニン投与後 3 時間の浮腫抑制率を Table 4 に示す。ナノ粒子群は原末群に比べ有意な浮腫抑制効果を示した。また、図示していないが、すべての NSAIDs 群 (原末群、ナノ粒子群) は、カラゲニン投与後 3 時間において濃

度依存的に浮腫抑制効果を示した。炎症ピーク時の浮腫を 50%抑制する濃度は、 $IMC_{bulk}$ 、 $KET_{bulk}$ 、 $PXC_{bulk}$  でそれぞれ 1.9%、2.9%、0.8%であった。 $IMC_{nano}$ 、 $KET_{nano}$ 、 $PXC_{nano}$  においては、0.5%、0.5%、0.1%以下となった (Data not shown)。

a) 起炎物質、NSAIDs クリーム投与部位



b) カラゲニン足蹠浮腫モデル実験タイムスケジュール

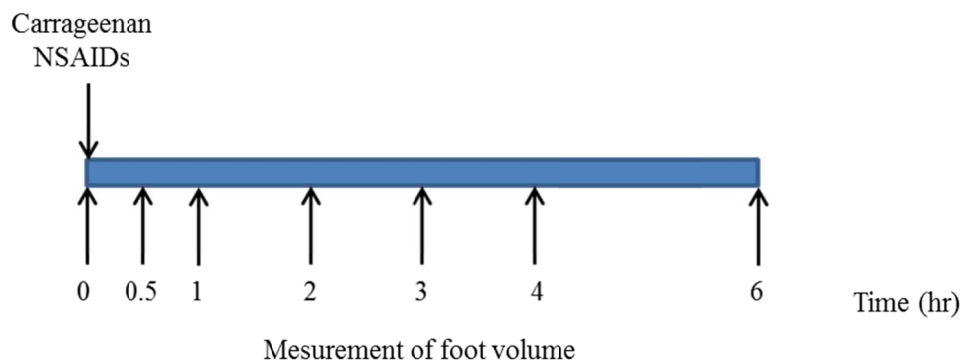


Figure 16 Carrageenan-induced footpad edema model administration site of carrageenan and NSAIDs, time schedule of study

a) 起炎物質、NSAIDs クリーム投与部位：起炎物質は、左後肢足蹠皮下に皮下注射した。NSAIDs クリームは、皮下注射部位を含む左後肢に塗布した。b) カラゲニン足蹠浮腫モデル実験タイムスケジュール：ラットの左後肢足蹠体積を測定後、0.5%カラゲニン溶液を左後肢足蹠皮下に皮下注射した。NSAIDs クリームは、皮下注射部位を含む左後肢に塗布した。NSAIDs クリーム塗布後経時的に足容積を測定した。



Figure 17 Hind limb edema image of carrageenan-induced footpad edema model

カラゲニン投与3時間後のラット後肢浮腫像。ラット後肢は著明な浮腫像を示した。

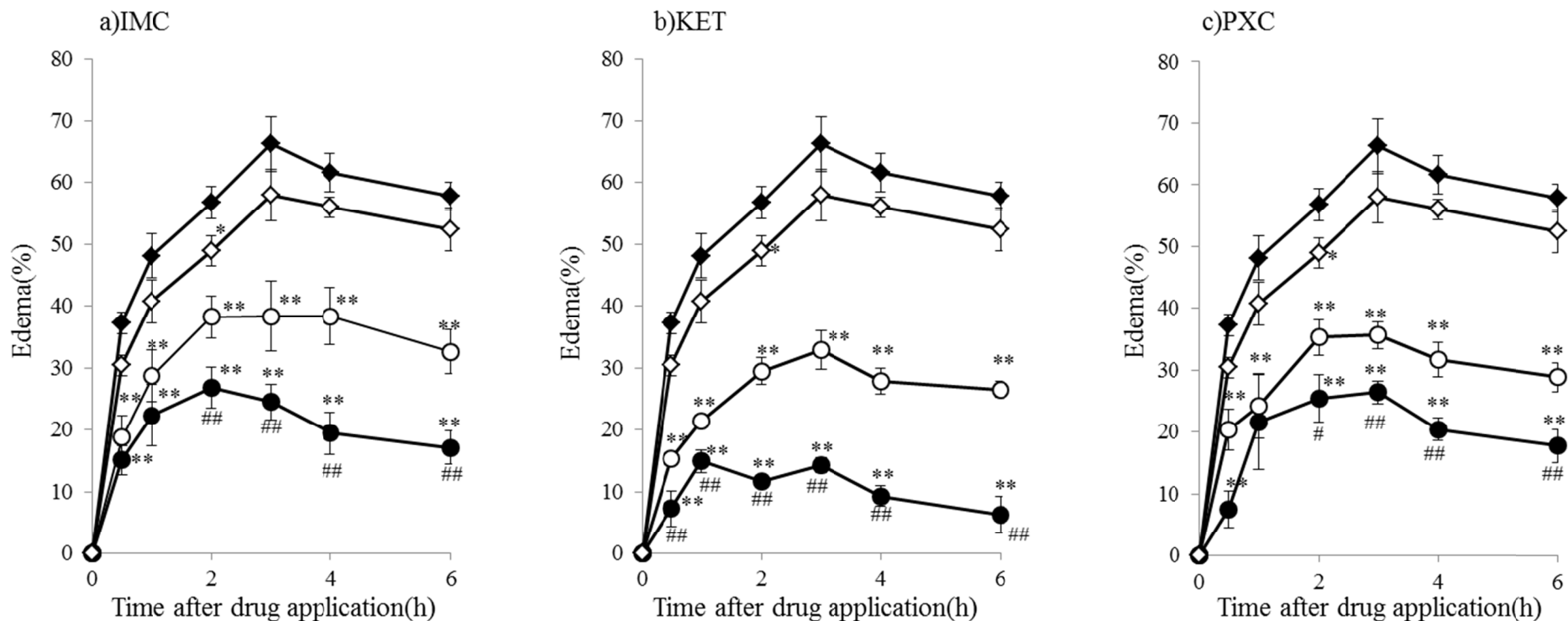


Figure 18 Time course of edema after topically applied NSAIDs in carrageenan-induced footpad inflammation in rats.

Results are expressed as mean  $\pm$  SE of the data from six animals.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding control group (analysis of variance followed by Dunnett's test).

# $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group (analysis of variance followed by unpaired Student's t-test).

◆ Control, ◇ Ointment base, ○ NSAIDs<sub>bulk</sub>, ● NSAIDs<sub>nano</sub>



Table 4 Effect of NSAIDs on carrageenan-induced footpad inflammation edema in rats.

Group	Inhibition (%)			AUC <sub>0→6</sub>		
	at 3h			(h · edema(%))		
Control	—			165.5	±	29.0
Ointment base	12.6 ± 3.2			117.0	±	3.0 <sup>*</sup>
IMC <sub>bulk</sub>	(1%)	42.1 ± 8.5		81.1	±	6.6 <sup>**</sup>
IMC <sub>nano</sub>	(1%)	63.1 ± 4.3 <sup>#</sup>		54.1	±	6.8 <sup>**, #</sup>
KET <sub>bulk</sub>	(3%)	50.4 ± 4.7		63.4	±	3.7 <sup>**</sup>
KET <sub>nano</sub>	(3%)	78.3 ± 1.8 <sup>#</sup>		28.8	±	1.8 <sup>**, ##</sup>
PXC <sub>bulk</sub>	(0.5%)	46.2 ± 3.7		73.6	±	2.4 <sup>**</sup>
PXC <sub>nano</sub>	(0.5%)	60.2 ± 3.9 <sup>#</sup>		50.7	±	2.7 <sup>**, ##</sup>

Results are expressed as mean ± SE of the data from six animals.

Differences in the efficacy of each particle size preparation between the two groups were tested using an unpaired Student's t-test. <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  compared with the corresponding control group (analysis of variance followed by Dunnett's test). <sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group (analysis of variance followed by an unpaired Student's t-test).

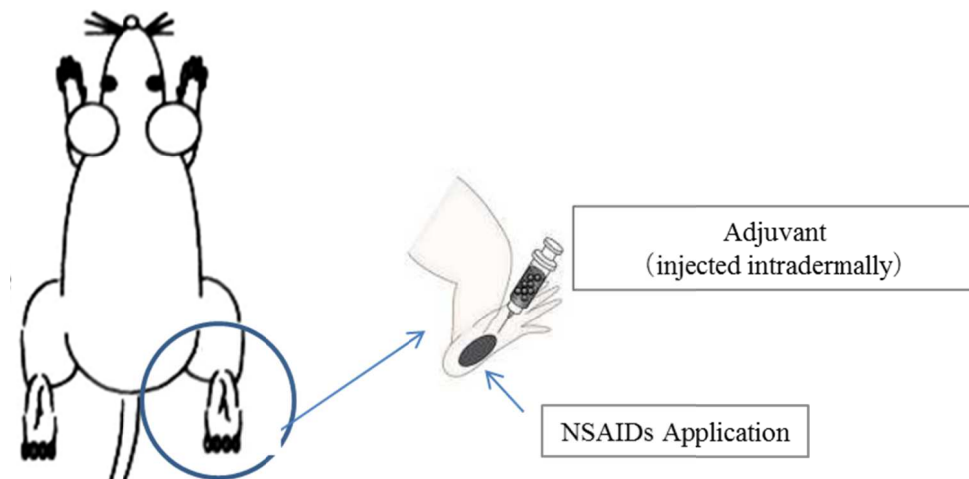
The ED<sub>50</sub> was calculated from the edema suppression rate (%) at 3 h after carrageenan treatment, and the edema suppression rate at each concentration. The concentration of NSAIDs cream was set as IMC and KET as 5%, 3%, 1%, 0.5%. PXC was set to 3%, 1%, 0.5%, 0.1%.

## 第五節 NSAIDs のアジュバント関節炎モデル（慢性炎症）に及ぼす粒子径の影響

慢性炎症に対する作用についてラットアジュバント関節炎モデルを用いて検討した。Figure 19 にアジュバントと NSAIDs の投与部位およびタイムスケジュールを示す。Figure 20 にアジュバント投与後 14 日のラットの後肢浮腫像を示す。ラットの後肢は著明な浮腫像を示していた。ラット後肢足容積における足容積を指標に検討した結果を Figure 21 に示す。関節炎惹起後、各 NSAIDs クリームを 7 日間反復塗布した結果、IMC 群は投与後 1 日目より無処置群、基剤群に比べ有意な足腫脹抑制効果を示した。投与後 5、7 日目において IMC<sub>nano</sub> 群が IMC<sub>bulk</sub> 群に比べ有意に足腫脹抑制効果を示した (Figure 21-a)。KET 群は、投与後 3 日目より無処置群、基剤群に比べ有意な足腫脹抑制効果を示した。投与後 7 日目において KET<sub>nano</sub> 群が KET<sub>bulk</sub> 群に比べ有意に足腫脹抑制効果を示した (Figure 21-b)。PXC 群は、投与後 1 日目より PXC<sub>nano</sub> が、投与後 5 日目より PXC<sub>bulk</sub> が無処置群、基剤群に比べ有意な足腫脹抑制効果を示した。投与後 3 日目より PCX<sub>nano</sub> 群が PCX<sub>bulk</sub> 群に比べ有意に足腫脹抑制効果を示した (Figure 21-c)。NSAIDs 塗布後 7 日目の治癒率を Table 5 に示す。治癒率は、IMC<sub>bulk</sub>、KET<sub>bulk</sub>、PXC<sub>bulk</sub> でそれぞれ 40.3%、43.0%、35.8%であった。IMC<sub>nano</sub>、KET<sub>nano</sub>、PXC<sub>nano</sub> においては、53.0%、57.4%、66.8%となり、原末群に比べナノ粒子群は有意な治癒率の増大を認めた。図示していないが、すべての NSAIDs 投与群（原末群、ナノ粒子群）は、NSAIDs 塗布後 7 日目に濃度依存的に足腫脹抑制効果を示した。NSAIDs 塗布後 7 日目の足腫脹を 50%抑制する濃度は、IMC<sub>bulk</sub>、KET<sub>bulk</sub>、PXC<sub>bulk</sub> でそれぞれ 1.9%、

4.1%、1.5%であった。IMC<sub>nano</sub>、KET<sub>nano</sub>、PXC<sub>nano</sub>においては、1.0%、2.2%、0.5%以下となった。

a) アジュバント、NSAIDs クリーム投与部位



b) アジュバント関節炎モデル実験タイムスケジュール

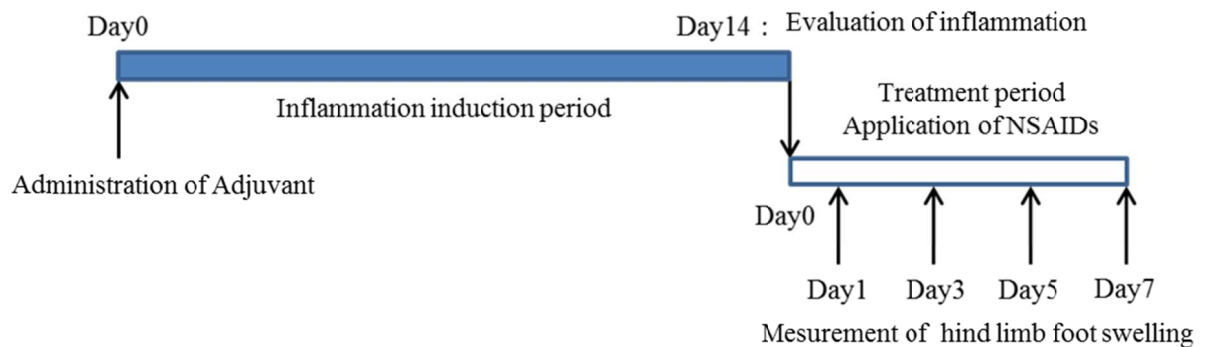


Figure 19 Adjuvant-induced arthritis model administration site of adjuvant and NSAIDs, time schedule of study

- a) アジュバント、NSAIDs クリーム投与部位：アジュバントは、左後肢足蹟皮下に皮下注射した。NSAIDs クリームは、炎症確立後、皮下注射部位を含む左後肢に塗布した。
- b) 実験タイムスケジュール：ラット後肢体積測定後、アジュバントを後肢足蹟皮下に皮下注射した。アジュバント接種後 14 日に関節炎確立を確認後、NSAIDs クリームを塗布した。NSAIDs クリーム塗布後経時的に後肢体積を測定した。

Adjuvant(-)

Adjuvant(+)



Figure 20 Hind limb foot swelling image of Adjuvant-induced arthritis model

アジュバント投与 14 日後のラット後肢浮腫像。ラット後肢は著明な浮腫像を示した。

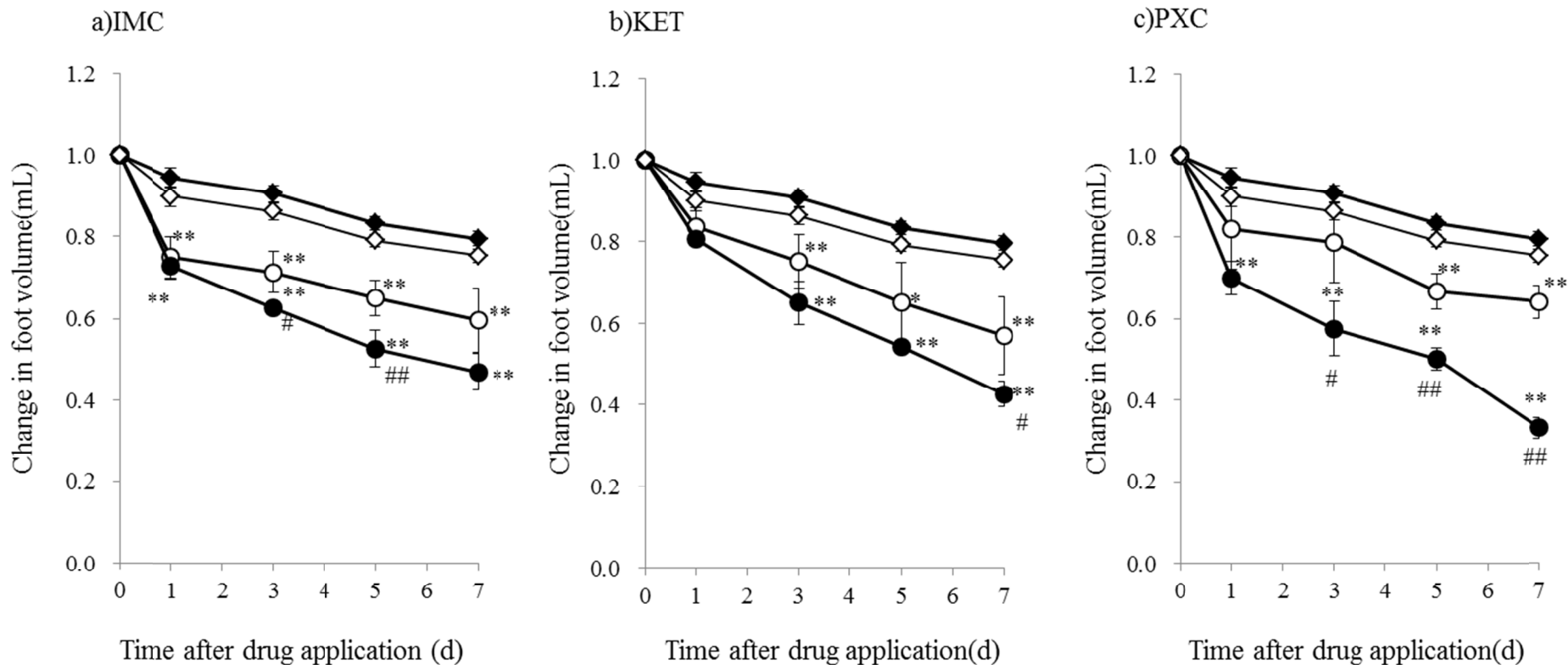


Figure 21 Time course of edema after topically applied NSAIDs in adjuvant-induced arthritis in rats.

Results are expressed as mean  $\pm$  SE of the data from six animals.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with the corresponding control group (analysis of variance followed by Dunnett's test).

#  $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group (analysis of variance followed by unpaired Student's t-test).

◆ Control, ◇ Ointment base, ○ NSAIDs<sub>bulk</sub>, ● NSAIDs<sub>nano</sub>

Table 5 Therapeutic effect of NSAIDs on adjuvant-induced arthritis in rats 7 d after treatment.

Group		Ratio of therapeutic effect (%)
Ointmant base		17.4 ± 0.6
IMC <sub>bulk</sub>	(1%)	40.3 ± 7.9
IMC <sub>nano</sub>	(1%)	53.0 ± 4.3 <sup>*</sup>
KET <sub>bulk</sub>	(3%)	43.0 ± 9.5
KET <sub>nano</sub>	(3%)	57.4 ± 3.2 <sup>*</sup>
PXC <sub>bulk</sub>	(0.5%)	35.8 ± 3.9
PXC <sub>nano</sub>	(0.5%)	66.8 ± 2.5 <sup>*</sup>

Results are expressed as mean ± SE of the data from six animals.

<sup>\*</sup>  $p < 0.05$  compared with the corresponding NSAIDs<sub>bulk</sub> group (analysis of variance followed by an unpaired Student's t-test).

The ED<sub>50</sub> (%) at each concentration was calculated from the healing rate (%) at each concentration level at 7 d after the start of the test drug treatment. The concentration of NSAIDs cream was set as IMC and KET as 5%, 3%, 1%, 0.5%. PXC was set to 3%, 1%, 0.5%, 0.1%.

## 第六節 小括

局所作用型外用剤として微粒子化した NSAIDs 含有クリームを作製し、皮膚透過試験を実施し、NSAIDs の皮膚への分配・拡散および皮膚透過性を検討した。局所作用型外用剤の NSAIDs 含有クリームの配合濃度は、本邦にて上市されている医薬品の濃度に準じ、1%IMC クリーム、3%KET クリーム、0.5%PXC クリームとした。基剤としては、最も透過性に優れていた親水クリームを用いた (Figure 13)。

薬物の皮膚透過は、「基剤と皮膚との親和性」、「基剤と薬物との親和性」、「基剤中の薬物の拡散性」や「基剤中の薬物の分散状態」など様々な要因が関与する。NSAIDs の皮膚透過性は、親水クリームが最も優れていた。その理由としては、親水クリームがナノ粒子の分散性に優れ、水相を含む水中油 (O/W) 型基剤であるため皮膚に適用した際に乳剤性基剤が有する界面活性作用により角質層との親和性が他の基剤に比べ優位性を示したと推察した。基剤決定後、親水クリームを用い NSAIDs 原末およびナノ粒子を含有する局所作用型外用剤を作製した。その際に、NSAIDs 原末およびナノ粒子による皮膚損傷が惹起されないことを確認するために作製した NSAIDs クリームについてウサギを用いた皮膚一次性試験を実施している (Data not shown)。原末およびナノ粒子ともに無処置の無傷および有傷皮膚では、観察期間を通して刺激反応は見られなかったため、今回作製した NSAIDs クリームによる皮膚損傷はないと考えられた。Laboskin®を用いて皮膚への分配・拡散および皮膚透過性を評価した。皮膚への分配・拡散を評価するために測定した皮膚内濃度については NSAIDsnano 群が、原末を塗布した濃度よりも有意に高かった (Figure 14)。皮膚透過試験の結果、NSAIDs



クリームの適用後 24 時間までいずれの NSAIDs クリームも累積透過量は直線的に増加した (Figure 15)。皮膚透過性の実験において NSAIDs<sub>nano</sub> 製剤は、透過速度 (Jc)、薬物透過係数 (Kp)、薬物拡散係数 (D)、皮膚への分配係数 (Km)、累積投与量一時間曲線下面積 (AUC<sub>0-24</sub>) において原末よりも有意に増大した。また、透過のラグタイム (Tlag) は、有意に短縮した (Table 3)。今回の結果より NSAIDs<sub>nano</sub> クリームからの皮膚への分配・拡散および皮膚透過は、NSAIDs<sub>bulk</sub> クリームよりも高かった。薬物が皮膚への分配・拡散および皮膚透過する場合は、皮膚透過最大のバリアである角質層へ薬物が拡散する必要がある。皮膚を通過する経路は、細胞内を通る経細胞ルートと細胞間隙を通る細胞ルートがある。経細胞ルートでは、角質層の特性として疎水性が高く水溶性物質は分配、通過しにくい。本研究で使用した NSAIDs は脂溶性であるため角質層に分散でき、皮膚内への分配・拡散させ、皮膚透過できたと考えられた。細胞間隙経由は、細胞間隙が 50-100nm であることより、ナノ粒子化した NSAIDs は、細胞間隙より粒子径が小さいため細胞内への拡散が増大することにより透過性が向上したと推察した。これらのことより、NSAIDs<sub>bulk</sub> より NSAIDs<sub>nano</sub> が基剤への分散性に優れ適用後の局所効果が大きいことを示唆している。

抗炎症作用については、急性炎症モデルであるラットカラゲニン足蹠炎症モデルと慢性炎症モデルであるラットアジュバント関節炎モデルを用いて評価を行った。ラットカラゲニン足蹠炎症モデルでは、カラゲニンによる足蹠浮腫は、カラゲニン投与後 3 時間でピークに達し、無処置群では、浮腫率  $66.25 \pm 2.2$  (%) (Figure 18) となった。すべての NSAIDs 投与群においては、薬剤塗布 1 時間後より原末およびナノ粒子について無処置群、基剤群に比べ有意な浮腫抑制効果を示し、その作用は、投与後 6 時間ま

で持続した (Figure 18)。浮腫抑制効果を原末とナノ粒子とで比較するとすべての NSAIDsにおいてナノ粒子で有意に浮腫率が低かった。カラゲニン足蹠炎症はラット後肢足蹠に起炎剤であるカラゲニンを皮下投与することで浮腫が現れる。カラゲニン足蹠浮腫に対する抑制効果は、臨床における抗炎症効果と相関性が高いとされている。このカラゲニンを起炎剤とする足蹠浮腫形成には、ヒスタミン、セロトニン、キニン類、プロスタグランジン類などケミカルメディエーターやサイトカインが関与<sup>80-82)</sup>している。カラゲニン足蹠炎症では、皮内および皮下組織において多核白血球の浸潤や皮膚血管の拡張により血管透過性が亢進し浮腫が誘発される。NSAIDsナノ粒子は、原末より急性炎症の初期および後期を効果的に抑制することが示唆された。

次に、慢性炎症モデルであるラットアジュバント関節炎モデルは、フロイント完全アジュバントを足蹠の皮内もしくは皮下に投与することにより、四肢に関節炎を誘発させるモデルであり 2つの炎症過程、一次および二次炎症を伴うことが知られている。原発性炎症は、アジュバントを右後足に注射した翌日から始まる。二次性炎症は、アジュバント注射後 7日目から観察され、アジュバント注射後、両足で最大に達するラットアジュバント関節炎モデルは、発症機序に免疫系が関与し、間接の滑膜増殖、パンプス形成および軟骨破壊などの病理像を呈する<sup>83)</sup>。アジュバント関節炎は T細胞依存的で末梢関節の腫脹を伴い、軟骨破壊、皮下および皮内、関節内へのリンパ球浸潤などにより足蹠腫脹等の炎症反応を引き起こす<sup>84)</sup>。アジュバント関節炎モデルの病態の形成過程や形成された病理組織所見がヒトの関節リウマチに類似していると考えられていることから、慢性炎症モデルとして汎用される<sup>85)</sup>。アジュバント関節炎惹起後、NSAIDs を 7日間反復塗布した結果、NSAIDs 群は投与後より無処置群、

基剤群に比べ有意な足腫脹抑制効果を示した (Figure 21)。NSAIDs<sub>bulk</sub> と NSAIDs<sub>nano</sub> ともに時間依存的に足腫脹抑制効果を示した。被検薬物投与後 7 日目の治癒率は、NSAIDs 原末およびナノ粒子を比較するとナノ粒子が有意に高値を示した (Table 5)。

以上、NSAIDs のナノ粒子化は、原末に比べ皮膚への分配・拡散および皮膚透過性を亢進させ、その結果が *in vivo* に見られた強い抗炎症作用に繋がったものと考えられる。

## 総 括

局所作用型外用剤には多様な剤形があり、軟膏剤やクリーム剤は炎症性疾患や皮膚疾患を対象に繁用されている。局所作用型外用剤の効果発現には対照薬物の皮膚透過性に密接に関係し、外用基剤中の分散、皮膚への分配、そして皮膚透過性が重要となる。薬物の皮膚透過性を増加させる方法として、これまでにイオントフォoresis<sup>8)</sup>、マイクロニードル<sup>9)</sup>などの物理的手法や、吸収促進剤<sup>10)</sup>の併用やナノ粒子<sup>11, 12)</sup>の輸送単体の利用などの化学的手法が確立されてきている。

本研究では、NSAIDs を微粒子化した局所作用型外用剤を開発し、NSAIDs ナノ製剤の皮膚透過性に対する影響および *in vivo*、*in vitro* における抗炎症作用について検討を行った。

第一章では、微粒子化 NSAIDs を作製する方法を考案し、そのナノ粒子の粒子径および安定性について検討した。NSAIDs を微粒子化するために特殊な機器を用いず、入手が容易で工程も簡便な自転・公転ナノ粉碎機(NP-100) を用いて行った。この方法は、有機溶媒や界面活性剤などの添加剤を用いず、粉碎効率を大幅に向上させることで、微量粉碎、微小粉碎、粒子径のばらつきを少なくでき、また、短時間で粉碎できる特徴を持つ。本研究では IMC、KET、PXC のナノ粒子化に成功し、68~75nm の粒子 (Table 1) となり、安定し、ばらつきの少ない粒子径のナノ粒子を得ることができた。

第二章では RAW264.7 細胞におけるリポポリサッカライド (LPS) 誘発性炎症のサイトカインおよび NO 産生に及ぼす NSAIDs の粒子径の影響について検討した。

RAW264.7 細胞に対し NSAIDs ナノ粒子は、原末群に比べ、RAW264.7 細胞内への取り込みが多く、高濃度において細胞生存率を低下させたと考えられる。そこで、抗炎症作用の検討は、細胞生存率において差が認められず、細胞障害も認められなかった  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  を用いて行った。RAW264.7 細胞の LPS 惹起性急性炎症に対する NSAIDs ナノ粒子の抗炎症作用では、IMC、KET、PXC とともにコントロール群に比べ NSAIDs 添加群が、炎症性サイトカインである NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> の有意な産生抑制効果を示した。また、原末群に比べナノ粒子群は、NO、IL-6、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> の有意な産生抑制効果が認められた。これらのことから、NSAIDs をナノ粒子化することにより、原末に比べて炎症性サイトカインの産生を抑制することにより強力な抗炎症作用を得ることが期待できると考えられた。

第三章では局所作用型外用剤である NSAIDs 含有クリームを作製し、皮膚への分配・拡散および皮膚透過性をヘアレスマウスの背部皮膚を用いて評価した。さらに、ラットカラゲニン足蹠炎症モデル（急性炎症）およびラットアジュバント関節炎モデル（慢性炎症）を用いた抗炎症作用に及ぼす粒子径の影響について検討した。

透過促進剤および溶解補助剤を使用せずに、NSAIDs の微粒子化のみにより、原末に比べ皮膚浸透性が向上した。NSAIDs の皮膚への分配・拡散および皮膚透過性は、角質細胞内を通る経細胞ルートと細胞間隙を通る細胞間細胞ルートより皮膚を効率的に通過する必要がある<sup>6,74)</sup>。角質層細胞透過では、角質層の特性として疎水性が高い。今回使用した NSAIDs は脂溶性であるため粒子の大きさに左右されず角質層に分散できたと考えられた。細胞間隙経由は、皮膚の細胞間隙が 50-100nm である<sup>6)</sup> ことより、ナノ粒子化した NSAIDs は、細胞間隙より粒子径が小さいため細胞内への拡散

が増大し、皮膚透過性が向上したと推察した。以上のことより、原末よりナノ粒子が基剤への分散性に優れ、さらに、皮膚透過性向上による適用後の局所効果が大きいことが示唆された。

この結果をもとに、急性および慢性炎症モデルに対する抗炎症効果について検討した。急性炎症においてナノ粒子が原末に比べ有意に浮腫抑制効果が高かった。NSAIDs ナノ粒子は、原末より急性炎症の初期および後期を効果的に抑制することが示唆された。また、慢性炎症に対してもアジュバント関節炎惹起後、NSAIDs 原末およびナノ粒子ともに時間依存的に足腫脹抑制効果を示した。被検薬物投与後 7 日目の治癒率は、NSAIDs 原末およびナノ粒子を比較するとナノ粒子が有意に足腫脹抑制効果を示し、有意に治癒率が高かったことより、NSAIDs のナノ粒子化は、皮膚への分配・拡散および皮膚透過性を亢進させ、原末に比べ強い抗炎症作用を発揮したと考えられた。それ故に、NSAIDs ナノ粒子は、有効性に優れた局所作用型外用剤の主薬となることが期待される。

以上、本研究で見出された結果は局所作用型外用剤の製剤設計や適正使用、さらに、新規適用方法に向けた有用な知見になると考えられる。

## 実験の部

### 1. 材料

インドメタシン (IMC)、ケトプロフェン (KET)、ピロキシカム (PXC)、ジクロフェナクナトリウム (DIC) は、いずれも試薬特級のを、アセトニトリル、メタノールは HPLC 用のものをナカライテスク株式会社より購入した。酢酸(試薬特級)、カラゲニン (生化学用) を富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。完全フロイントアジュバント (Composition : Special formulation of adjuvant containing paraffin oil, surfactant and heat-killed Mycobacterium butyricum。 Rockland-inc ) は、フナコシ株式会社より購入した。

### 2. NSAIDs のナノ粒子化の検討

IMC、KET、PXC、DIC のナノ製剤は、水性ポリマー (ヒドロキシプロピルセルロース SSL [HPC]) 溶液を含有した水溶液中に乳鉢を用いて混合、分散させ、自転・公転ナノ粉砕機 NP-100 (株式会社 シンキー、-20℃) を用いて湿式粉砕を行った。それぞれの原末を水性ポリマー溶液中に均一に懸濁させ、ジルコニア製の粉砕筒にジルコニアビーズ約 2.5 g とともに投入し、回転数 1,700 rpm で 10 分間湿式粉砕を実施した。粉砕中の粉砕室の温度は-20 °C に設定した。粉砕後に得られた懸濁液をジルコニアビーズと分離し、回収するために、遠心メッシュフィルターにて遠心分離し、懸濁液を回収した。得られた懸濁液中の薬物の粒子径は、レーザー回折粒度分布計 (MASTERSIZER2000、スペクトリス株式会社) を用いて測定した。また、HPLC 分

析による純度を測定した。保存安定性の確認のため 14 日後に同様に粒子径を測定した。以上の測定は、同一測定サンプルで 3 回繰返し測定後、その平均値を測定データとした。以降の実験には懸濁液を凍結乾燥し任意の濃度に調製後実験に供した。

### 3. NSAIDs の定量<sup>86)</sup>

HPLC システムは、ポンプ (LC-10ADvp、株式会社島津製作所)、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M10Avp、株式会社島津製作所)、カラムオーブン (CTO-10Avp、株式会社島津製作所) を用いた。IMC は、Column Inertsil ODS-2 (5  $\mu$  m、4.6  $\times$  150 mm、ジーエルサイエンス株式会社)、移動相 アセトニトリル/水/酢酸 (55 : 44 : 1、v/v)、カラム温度 35  $^{\circ}$ C、流速 0.8 mL/min、UV 波長 254 nm の条件下で、KET は、Column TSK-GEL ODS-80TM (5  $\mu$  m、4.6  $\times$  250 mm、東ソー株式会社)、移動相 メタノール/アセトニトリル/0.1%酢酸 (40 : 40 : 20、v/v)、カラム温度 40  $^{\circ}$ C、流速 1.0 mL/min、UV 波長 254 nm 条件下で、PXC は、Column Capcell Pak C18 type UG120 (5  $\mu$  m、4.6 $\times$ 150 mm、株式会社資生堂)、移動相 アセトニトリル/4%酢酸 (45 : 55、v/v)、カラム温度 40  $^{\circ}$ C、流速 1.0 mL/min。UV 波長 350 nm の条件下でそれぞれ測定した。

### 4. 細胞の培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いた。RAW264.7 細胞は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 培地 (10%FBS、2mmol/L) L-グルタミン、ペ



ニシリン (100U/mL)、ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/mL) 含有) を用いた。細胞は、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>) で維持した。

## 5. NSAIDs の RAW264.7 細胞生存率に与える影響の検討

96 穴プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well に調整した RAW264.7 細胞を播種し、24 時間前培養を行った。各細胞に最終濃度 100、50、20、10  $\mu$ g/mL にした NSAIDs を添加し 20 時間培養した。陰性コントロールとして  $1 \times 10^5$  cells/well の細胞浮遊液と培養液を混合したものをを用いた。培養後、MTT Cell Count Kit を用い、マイクロプレートリーダーにて 570nm で測定し、陰性コントロールに対する検体の OD 値を細胞生存率として算出した。

## 6. RAW264.7 細胞の LPS 惹起炎症に対する NSAIDs 粒子径の影響

RAW264 細胞を 96 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間前培養後、リポポリサッカライド (LPS) (100 ng/mL、Lipopolysaccharides from Escherichia coli O127:B8、Sigma USA) および各種 NSAIDs 添加した群を作成し、20 時間培養後、培養上清を測定サンプルとした。NSAIDs は、最終濃度 20、10  $\mu$ g/mL とした。NSAIDs を添加しコントロールには、NSAID の代わりに培養液を添加した。抗炎症作用の効果は、NO および炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- $\alpha$ )、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の測定を行い、評価した。NO の産生量の測定は、Griess 法により定量した。TNF- $\alpha$  と IL-6 は、ELISA kit (R & D Systems Inc.、USA) を用いて測定した。PGE<sub>2</sub> は、

ProstaglandinE<sub>2</sub> Assay Kit を用いて測定した。陽性対照としてデキサメタゾン (DEX) を使用した。

## 7. NSAIDs の皮膚透過試験および皮膚内濃度の測定

### 7-1 NSAIDs 含有クリーム の作製<sup>87)</sup>

IMC、KET、PXC の原末およびナノ粒子を無水エタノールに懸濁し、親水クリームに混合する。配合濃度は、原末およびナノ粒子ともに市販されている医薬品の濃度に準じ、1 w/w% IMC クリーム、3 w/w% KET クリーム、0.5 w/w% PXC クリームとした。

### 7-2. NSAIDs の皮膚中濃度の測定<sup>88)</sup>

ヘアレスマウス皮膚 Laboskin<sup>®</sup> (excised dorsal skin of hairless mice、Hos: HR-1 male、7 週齢、株式会社星野試験動物飼育所) を使用した。フランツ縦形拡散セル (拡散面積: 1.77cm<sup>2</sup> レセプター容量: 12mL) を用いた。フランツ縦型拡散セルのレシーバーチャンバーに Laboskin<sup>®</sup> の表皮側を上にして装着し、Laboskin<sup>®</sup> の表皮側に各被検薬物 0.2 g を添加した。添加後、フランツセル自動経皮吸収試験システム (キーストンサイエンティフィック株式会社) に装着し、レセプター相には、PBS を添加した。レセプター相を攪拌し、37 °C に維持した。フランツ型縦型セルに装着した Laboskin<sup>®</sup> を経時的に採取する (1cm<sup>2</sup>)。得られた皮膚を細切し、メタノールを加え、皮膚をホモジネートし、15,000rpm で 30 分間、4 °C で遠心分離後、上清を試料とし、試料の濃度は、HPLC を用いて測定した。

### 7-3 NSAIDs の皮膚透過量の測定<sup>88)</sup>

ヘアレスマウス皮膚 Laboskin<sup>®</sup>を使用した。フランツ縦形拡散セルを用いた。フランツ縦型拡散セルのレシーバーチャンバーに Laboskin<sup>®</sup>の表皮側を上にして装着し、Laboskin<sup>®</sup>の表皮側に各被検薬物 0.2g を添加した。添加後、フランツセル自動経皮吸収試験システムに装着し、レセプター相には、PBS を添加した。レセプター相を攪拌し、37 °C に維持した。被検薬物添加 0.5、1、2、4、6、8、12 および 24 時間後に 0.5 mL のレセプター溶液を採取し、同容量の PBS を加え用量を一定に保った。採取した試料の濃度は、HPLC を用いて測定した。皮膚透過パラメータ<sup>89、90)</sup>のうち、単位面積あたりの透過速度 (Jc)、薬物透過係数 (Kp)、薬物拡散係数 (D)、軟膏から皮膚への分配係数 (Km)、透過のラグタイム (Tlag) 累積投与量-時間推移データを用いて下記の式より算出した。Cs は軟膏中の濃度 (μg)、δ は皮膚の厚み (平均 0.368 mm) とした。なお、Jc および Tlag は、累積投与量-時間推移データの直線部分より算出した。また、累積投与量-時間曲線下面積 (AUC) を算出した。

$$Jc = \frac{D \cdot Km \cdot Cs}{\delta} = Kp \cdot Cs \qquad Tlag = \frac{\delta^2}{6D}$$

## 8. NSAIDs の抗炎症作用に及ぼす粒子径の影響<sup>91-93)</sup>

### 8-1 実験動物

Wistar 系雄性ラット (5 週齢) は、日本チャールス・リバー株式会社 (横浜、日本) より購入した。購入後、7 日間、室温 23 ± 2 °C で予備飼育した後、健常ラットを

用い各群 6 匹に分類した。動物実験は、高知大学動物実験委員会の承認を受け、高知大学医学部動物実験指針に準じて行った。

## 8-2 被検薬物

7-1 で作製した同様の方法を用いて 0.5 w/w%、1 w/w%、3 w/w% の IMC クリーム、KET クリーム、PXC クリームを作製し、用量反応試験を実施した。効力比較試験は、市販されている医薬品の濃度に準じ、1 w/w% IMC クリーム、3 w/w% KET クリーム、0.5 w/w% PXC クリームを用いた。

## 8-3 カラゲニン足蹠浮腫モデルに対する効果

ラットカラゲニン足蹠浮腫モデルは、5 週齢 Wistar 系雄性ラットの左後肢足蹠体積を足容積測定装置 (TK-101CMP、室町機械株) で測定した後、0.5%カラゲニン生理食塩水溶液 0.1mL を左後肢足蹠皮下に注入し、直後に、各 NSAIDs クリームをガーゼ (0.2g、6.25cm<sup>2</sup>) に塗布し、サージカルテープで固定した。各 NSAIDs クリーム塗布 0.5、1、2、3、4、6 時間後に足容積を測定し、起炎剤注入前の足蹠体積に対する増加率を求め、浮腫率と薬剤塗布 6 時間後までの浮腫率一時間曲線下面積 (AUC) を算出した。また、カラゲニン投与後 3 時間での浮腫抑制率 (%) および各濃度の浮腫抑制率 (%) より ED<sub>50</sub> 値 (%) を算出した。実験動物は、無処置群および基剤群、被検薬物各群 (原末群、ナノ粒子群) と分類し、すべて 6 匹で実験を行った。

#### 8-4 アジュバント関節炎に対する効果

アジュバント関節炎モデルは、ラットの右後肢体積を後肢足蹄浮腫容積測定装置で測定した後尾基部皮内にウシ型結核死菌の加熱死菌流動パラフィン懸濁液（6 mg/mL）を 0.1mL 注入した。アジュバント接種後 14 日に右後肢体積を測定して関節炎確立した動物（足腫脹率 80%以上）を右後肢腫脹が同程度になるよう群分けを行った。アジュバント接種後 14 日より右後肢関節部位に各 NSAIDs クリームをガーゼ（0.2g、6.25cm<sup>2</sup>）に塗布したものを 1 日 1 回、7 日間連続貼付した。NSAIDs クリーム塗布後 1、3、5 および 7 日に右後肢体積を測定した。右後肢体積変化量はアジュバント接種前の右後肢体積からの差より求めた。また、薬剤投与後 7 日の治癒率を算出した。また、被検薬物塗布後 7 日目の各濃度における各濃度の治癒率（%）より ED<sub>50</sub> 値（%）を算出した。実験動物は、無処置群および基剤群、被検薬物各群（原末群、ナノ粒子群）と分類し、すべて 6 匹で実験を行った。

$$\text{治癒率（\%）} = \frac{\text{（アジュバント接種後14日の右後肢体積 - 薬剤塗布後7日の右後肢体積）}}{\text{（アジュバント接種後14日の右後肢体積 - アジュバント接種前の右後肢体積）}} \times 100$$

#### 9. 統計解析

本研究で得られたデータは、平均値±標準誤差、または平均値±標準偏差で表した。得られたデータは、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いて得たデータは、一元配置分散分析法を用いて有意差検定を行った。各製剤の粒子径の差異は 2 群間で t 検定を行い、危険率 5 % 未満（p<0.05）を有意差ありとした。また、動物モデ

ルを用いた抗炎症作用の検討では無処置群あるいは基剤群と各被検薬物間の比較はダネットの多重比較検定法を用いて行い危険率5%未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありとした。

## 参考文献

- 1) Martin K., Ariëns E. J. Drug Design IV. Academic Press, New York and London, 1973, 93-148.
- 2) Buhse L., Kolinski R., Westenberger B., Wokovich A., Spencer J., Chen C. W., Turujman S., Gautam-Basak M., Kang G. J., Kibbe A., Heintzelman B., Wolfgang E. Topical drug classification, *Int J Pharm*, 2005, 295, 101-112.
- 3) 橋田 充. ドラッグデリバリーシステム. 化学同人, 東京, 1995, 23-38.
- 4) Cordero J. A., Alarcon L., Escrihano E., Obach R., Domenech J. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory of drugs. *J Pharm Sci*, 1997, 86, 503-508.
- 5) 永井 恒司. DDS の基礎と開発. シーエムシー出版, 東京, 2006, 227p.
- 6) Kimura E., Todo H., Sugibayashi K. Skin Penetration and Safety of Nanoparticles. *Yakugaku Zasshi*. 2012, 132, 319-324.
- 7) Wertz P. W., Downing D. T. "Transdermal Drug Delivery." Development Issues and Research Initiatives, Hadgraft J. J., Guy R. H. Eds. Marcel Dekker Inc, New York, 1989, 35, 1-2.
- 8) Fatouros D. G., Groenink H. W., de Graaff A. M., van Aelst A. C., Koerten H. K., Bouwstra J. A. Visualization studies of human skin in vitro/in vivo under the influence of an electrical field. *Eur J Pharm Sci*. 2006, 29(2), 160-170.
- 9) Verbaan F. J., Bal S. M., van den Berg D. J., Dijksman J. A., van Hecke M., Verpoorten

- H., van den Berg A., Luttge R., Bouwstra J. A. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method. *J Control Release*. 2008, 128(1), 80-88.
- 10) Chantasart D., Sa-Nguandeeikul P., Prakongpan S., Li S. K., Higuchi W. I. Comparison of the effects of chemical permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane and hairless mouse skin and the mechanism of enhancer action. *J Pharm Sci*. 2007, 96(9), 2310-2326.
- 11) Quinn P. J. The effect of tocopherol on the structure and permeability of phosphatidylcholine liposomes. *J Control Release*. 2012, 160(2), 158-63.
- 12) Uchino T., Miyazaki Y., Fujii A., Kagawa Y. Characterization and Evaluation of Skin Permeation of Tocopheryl Phosphoric Acid-loaded Phospholipid Nanoparticles. *Yakugaku Zasshi.*, 2017, 137(8), 979-986.
- 13) Gürola Z., Hekimoğlua S., Demirdamarb R., Şumnua M. Percutaneous absorption of ketoprofen. I. In vitro release and percutaneous absorption of ketoprofen from different ointment bases. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1996, 71(3), 205-212.
- 14) Okada N. From basic principles to clinical applications on transcutaneous vaccine. *Yakugaku Zasshi*. 2013, 133(12), 1363-1372.
- 15) Harashima H., Akita H., Sakai-Kato K., Ishii T., Matsumura Y., Kataoka K. The initiatives for regulatory science researches of nanomedicines. *Drug Delivery System*. 2014, 29(3), 217-225.
- 16) Sakurai Y., Kajimoto K., Hatakeyama H., Harashima H. Advances in an active and



- passive targeting to tumor and adipose tissue. *Exp Opin Drug Deliv*, 2015, 12(1), 41-52.
- 17) Tunoda S. Transdermal Penetration and Biodistribution of Nanomaterials and Their Acute Toxicity in Vivo. *Yakugaku Zasshi*. 2011, 131(2), 203-207.
- 18) Scheuplein R. J. Mechanism of percutaneous absorption I, *J Invest Dermatol*. 1965, 45, 334-346.
- 19) Scheuplein R. J. Mechanism of percutaneous absorption II, *J Invest Dermatol*. 1967, 48, 79-88.
- 20) Scheuplein R. J., Blank I. H., Brauner G. J., Macfarlane D. J., Percutaneous absorption of steroids. *J Invest Dermatol*, 1969, 52, 63-70.
- 21) Ohtani M., Matsumoto M., Yamamura Y., Uchino K., Etoh T. Evaluation of the Pharmaceutical Equivalency by Concentration of Steroid in Bases and the Permeability of Genuine and Generic Commercially Available Steroidal Formulations. *The Japanese Journal of Dermatology*. 2011, 121(11), 2257-2264.
- 22) Ohtani M., Matsumoto M., Yamamura Y., Sugiura M., Uchino K., Etoh T. Evaluation of the influence of bases, formulations and skin conditions of two preparations of commercially available drugs on permeability and adverse effects in hairless rat skin. *Jpn J Dermatol*. 2010, 120(1), 37-43.
- 23) Hatanaka T., Oguchi M., Sugibayashi K., Morimoto Y. Influence of isosorbide dinitrate concentration on its skin permeability from adhesive matrix devices. *Chem Pharm Bull*. 1991, 39(7), 1802-1805.
- 24) Müller-Goymann C. C., Alberg U. Modified water containing hydrophilic ointment with

- suspended hydrocortisone-21-acetate -the influence of the microstructure of the cream on the in vitro drug release and in vitro percutaneous penetration, *Eur J Pharm Biopharm.* 1999, 47, 139-143.
- 25) Higuchi T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments, *J Soc Cosmetic Chemists.* 1960, 11, 85-97.
- 26) Hirose A., Nishimura T., Kanno J. Research strategy for evaluation methods of the manufactured nanomaterials in NIHS and importance of the chronic health effects studies. *Bull Natl Inst Health Sci,* 2009, 127, 15-25.
- 27) Heinemann M., Schäfer H. G. Guidance for handling and use of nanomaterials at the workplace. *Hum Exp Toxicol,* 2009, 28(6-7), 407-411.
- 28) De Louise L. A. Applications of nanotechnology in dermatology. *J Invest Dermatol.* 2012, 132, 964–975.
- 29) Baker T. S., Newcomb W. W., Olson N. H., Cowser L. M., Olson C., Brown J. C. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal.* 1991, 60(6), 1445-1456.
- 30) Menetrez MY, Foarde KK, Ensor DS. An analytical method for the measurement of nonviable bioaerosols. *J Air Waste Manag Assoc,* 51,1436–1442(2001).
- 31) Buzea C., Pacheco I. I., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases.* 2007, 2, 17. Sugibayashi K. Margin of safety and exposure of nanomaterials used in cosmetics. *Fragrance Journal,* 2008, 36, 38-41.

- 32) Star A., Han T. R., Joshi V., Gabriel J. C. P., Grüner G. Nanoelectronic carbon dioxide sensors. *Adv Mater.* 2004, 16, 2049-2052.
- 33) Jordan A., Scholz R., Maier-Hauff K., Johannsen M., Wust P., Nadobny J., Schirra H., Schmidt H., Deger S., Loening S., Lanksch W., Felix R. Maier-Hauff K. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2001, 225, 118-126.
- 34) Chen H., Khemtong C., Yang X., Chang X., Gao J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discov Today.* 2011, 16, 354-360.
- 35) 米澤 徹. ナノ粒子の創製と応用. *表面技術.* 2008, 59(11), 712-717.
- 36) 奥山 喜久夫. ナノ粒子材料の合成・分散・機能化技術と実用化への課題. *粉碎.* 2008, 51, 15-23.
- 37) 森部久仁一. ナノ分散による難溶性薬物の製剤化. *Farumashia.* 2009, 45(12), 1217-1221.
- 38) 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(10), 1061-1067.
- 39) Kundu J. K., Surh Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2008, 659(1-2), 15-30.
- 40) Kang H. J., Jeong J. S., Park N. J., Go G. B., Kim S. O., Park C., Kim B. W., Hong S. H., Choi Y. H. An ethanol extract of *Aster yomena* (Kitam) Honda inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages.

*Bio Science Trends*. 2017, 11(1), 85-94.

- 41) Eguchi H., Fujiwara N., Ookawara T., Suzuki K., Taniguchi N, Oxidative stress and health. *J Anal Bio-Sci*, 2009, 32(4), 247-256.
- 42) Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980, 288, 373-376.
- 43) Singer I. I., Kawka D. W., Scott S. Weidner J. R., Mumford R. A., Riehl T. E., Stenson W. F. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1996, 111(4), 871-885.
- 44) Peng W., Ma Y. Y., Zhang K., Zhou A. Y., Zhang Y., Wang H., Du Z., Zhao D. G. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Resveratrol-NSAID Derivatives as Anti-inflammatory Agents. *Chem Pharm Bull*. 2016, 64(6), 609-615.
- 45) Chao S. H., Wu A. B., Lee C. J., Chen F. A., Wang C. C. Anti-inflammatory effects of indomethacin's methyl ester derivative and induction of apoptosis in HL-60 Cells. *Biol Pharm Bull*. 2005, 28(12), 2206-2210.
- 46) Park Y. K., Rasmussen H. E., Ehlers S. J., Blobaum K. R., Carr T. P., Lee J. Y. Repression of proinflammatory gene expression by lipid extract of *Nostoc commune var sphaeroides* Kuetzing, a blue-green alga, via inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages. *Nutrition Research*. 2008, 28, 83-91.
- 47) Lee I. A., Park Y. J., Yeo H. K., Han M. J., Kim D. H. Soyasaponin I Attenuates TNBS-Induced Colitis in Mice by Inhibiting NF- $\kappa$ B Pathway. *J Agric Food Chem*. 2010, 58, 10929-10934.

- 48) Abramson S. B, Attur M., Amin A. R., Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2001, 535-541.
- 49) Kobzik L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J Immunol*, 1995, 155(1), 367-376.
- 50) Kanno S., Furuyama A., Hirano S. A murine scavenger receptor MARCO recognizes polystyrene nanoparticles. *Toxicol Sci*, 2007, 97(2), 398-406.
- 51) Xia T., Korge P., Weiss J. N., Li N., Venkatesen M. I., Sioutas C., Nel A. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(14), 1347-1358.
- 52) Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003, 111(4), 455-460.
- 53) Foley S., Crowley C., Smaih M. Bonfils C., Erlanger B. F., Seta P., Larroque C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002, 294(1), 116-119.
- 54) Gopinath P. G., Gopinath G., Kumar T. C. A. Target site of intranasally sprayed substances and their transport across the nasal mucosa: A new insight into the intranasal route of drug delivery. *Curr Ther Res.* 1978, 596-607.
- 55) Yamaguchi K., Saito H., Oro S., Tatebe S., Ikeguchi M., Tsujitani S. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Is Significantly Correlated with Expression of Vascular

- Endothelial Growth Factor and Dendritic Cell Infiltration in Patients with Advanced Gastric Carcinoma. *Oncology*, 2005, 68, 471–478.
- 56) Osanai Y., Kanno S. Sasaki T., Hiratsuka M., Ishikawa M. Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase by Caffeic Acid Undecyl Ester in RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Tohoku Pharmaceutical university*, 2008, 55, 99-109.
- 57) Toda N., Okamura T. Neurotransmission and nitric oxide (NO). *Folia Pharmacol. Japon.* 1992, 100, 173-182.
- 58) Akaike T., NO in Host Defense and Microbial Pathogenesis. *Japanese journal of bacteriology.* 2001, 56(3), 503-511.
- 59) Akaike T. Host defense and oxidative stress signaling in bacterial infection. *Japanese journal of bacteriology*, 2015, 70, 339-349.
- 60) Ozawa K., Tsumoto H., Wei W., Tang C. H. Komatsubara A. T., Kawafune H., Shimizu K., Liu L., Tsujimoto G. Proteomic analysis of the role of S-nitrosoglutathione reductase in lipopolysaccharide-challenged mice. *Proteomics*, 2012, 12(12), 2024-2035.
- 61) Tazawa H., Kawaguchi T., Kobayashi T., Kuramitsu Y., Wada S., Satomi Y., Nishino H., Kobayashi M. Kanda Y., Osaki M., Kitagawa T., Hosokawa M., Okada F. Chronic inflammation-derived nitric oxide causes conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. *Experimental Cell Research.* 2013, 319(18), 2835-2844.
- 62) Prabha S., Zhou W. Z., Panyam J., Labhasetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J*

- Pharm.* 2002, 244(1-2), 105-115.
- 63) Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(3), 329-347.
- 64) Tahara K., Yamamoto H., Kawashima Y. Interaction of Biodegradable Polymeric Nanospheres with Cells: the Effect of Surface Properties. *J. Soc Powder Technol Japan*, 48, 173-179.
- 65) Otsuka N., Yataba I. Pharmacological action and clinical outcome of newly developed NSAIDs patch, "LOQOA tape". *Folia Pharmacologica Japonica*. 2018 151(5), 221-227.
- 66) 福村 正. 抗炎症剤 prodrug の外用剤に関する研究. *炎症*. 1993, 13(6), 561-568.
- 67) Sugibayashi K. Margin of safety and exposure of nanomaterials used in cosmetics. *Fragrance Journal*, 2008, 36, 38-41.
- 68) Sugibayashi K. Skin Morphology and Permeation Pathway Through the Skin. *Skin Permeation and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical Compounds*. 2017, 3-11.
- 69) Scheuplein R. J. Mechanism of percutaneous adsorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility. *J Invest Dermatol*, 45(5), 334-346.
- 70) Baroli B., Ennas M. G., Loffredo F., Isola M., Pinna R., López-Quintela M. A. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol*, 2007, 127, 1701-1712.
- 71) 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.

- 72) Martin A. N., Bustamante P. *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1993, 324-361.
- 73) Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol Today*, 2000, 3(9), 318-326.
- 74) Sugino M., Todo H., Sugibayashi K. Skin permeation and transdermal delivery systems of drugs: history to overcome barrier function in the stratum corneum. *Yakugaku Zasshi.*, 2009, 129(12), 1453-1458.
- 75) Denda M., Sato J., Masuda Y., Tsuchiya T. Koyama J., Kuramoto M., Elias P. M., Feingold K. R. Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol*, 1998, 111(5), 858-863.
- 76) Ezure T., Amano S. Increased subcutaneous adipose tissue impairs dermal function in diet-induced obese mice. *Exp Dermatol*. 2010, 19(10), 878-882.
- 77) Inomata S., Matsunaga Y., Amano S., Takada K., Kobayashi K., Tsunenaga M., Nishiyama T., Kohno Y., Fukuda M. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol*. 2003, 120(1)128-34.
- 78) Salon K. B., Koch S. A. M., SiverK. G., Flowers F. P, Use of solubility parameters of drug and vehicle to predict flux through skin. *J Invest Dermatol*. 1986, 87, 244-252.
- 79) 大谷道輝, 佐久間博文, 高山和郎, 小滝 一, 澤田康文, 伊賀立二. 市販軟膏およびクリーム剤の混合製剤の物理的安定性と配合薬物の *in vitro* での皮膚透過性の



検討. *病院薬学*. 1997, 23, 11-18.

- 80) Salvemini D., Wang Z. Q., Wyatt P. S., Bourdon D. M. , Marino M. H., Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 1996, 118(4), 829-838.
- 81) Akazaki N., Sasaki Y., Takeda H., Hosokawa T., Takeshita K., Kanamori M., Tsuboi M., Nagumo S. Anti-inflammatory Effects of Kumazasa Water Extract. *Pharmacometrics*, 2011, 80, 35-42.
- 82) Kato S., Takeuchi K. Alteration of gastric ulcerogenic and healing responses in rats with adjuvant-induced arthritis. *Jpn J Pharmacol*. 2002, 89, 1-6.
- 83) 坪井紀興. ラットⅡ型コラーゲン関節炎とアジュバントにおける炎症・活動性の検討と関節炎-血清シアル酸値・血小板数を指標として-. *東医大誌*. 1992, 50(4), 559-568.
- 84) Salvemini D., Wang Z. Q., Wyatt P. S., Bourdon D. M., Marino M. H., Manning P. T., Currie M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 1996, 118(4), 829-838.
- 85) Akazaki N., Sasaki Y., Takeda H., Hosokawa T., Takeshita K., Kanamori M., Tsuboi M., Nagumo S. Anti-inflammatory effects of kumazasa water extract. *Pharmacometrics*, 80, 35-42(2011).
- 86) 厚生労働省, 第16改正日本薬局方
- 87) Abdulkarim M. F., Abdullah G. Z., Chitneni M., Salman I. M., Ameer O. Z. , Yam M. F. ,

- Mahdi E. S., Sattar M. A., Basri M., Noor A. M. Formulation and characterization of palm oil esters based nano-cream for topical delivery of piroxicam. *International Journal of Drug Delivery*, 2010, 2(4), 915-924.
- 88) Franz T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol*, 1975, 64, 190–195.
- 89) Iwaki M., Yoshikawa M., Funatsu K., Matsuda H., Amemiya T., Kubo M. Enhancement effect of evodiae eructus on percutaneous aAbsorption of Indomethacin through Hairless Rat Skin. *Nat Med*, 2003, 57, 227-232.
- 90) Mitragotri S., Yoo J. W., Designing micro- and nano-particles for treating rheumatoid arthritis. *Archives of Pharmacal Research*, 2011, 34(11), 1887-1897.
- 91) Matsumoto K., Kohno T., Sugiyama T., Sakamoto Y., Shimada A., Kuroda Y., Terajima T., Maezawa K., Kizu J. Effects of ketoprofen tape products on carrageenan induced paw edema. *Iryoyakugaku*. 2014, 40, 672-676.
- 92) Hamamoto T., Takeuchi S., Sasakura M., Saito H. Anti-inflammatory and analgesic effects of hydrogel patches containing loxoprofen Sodium. *Rinshoiyaku*, 2006, 22, 179-186.
- 93) Tanida N., Sakurada S. Skin Permeability, Anti-inflammatory and analgesic Effects of ketoprofen-containing tape and loxoprofen sodium-containing Tape. *Jpn Pharmacol Ther*. 2008, 36, 1123-1129.

## 発表論文

1. Yokota J, Ishida S, Hamada A, Kyotani S, Effect of Particle Size of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation on RAW264.7 Cells. *Int J Drug Dev & Res*, 10(3), 20-24(2018).
2. Yokota J, Kyotani S, Influence of nanoparticle size on the skin penetration, skin retention and anti-inflammatory activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Chin Med Assoc*, 81(6), 511-519(2018).

## 謝辞

本研究は、著者が徳島文理大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程において同大学院 薬学研究科 京谷庄二郎教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻賜りました指導教官である京谷庄二郎教授に心より感謝致します。

学位論文審査におきまして、貴重なご指導、ご助言を頂きました徳島文理大学大学院薬学研究科 櫻井栄一教授、同 加藤善久教授、同 吉岡三郎教授、徳島大学大学院 土屋浩一郎教授 に深謝致します。

また、同大学院 博士課程への進学および研究全般にわたる多大なご支援、ご協力賜りました高知大学医学部、同 附属病院薬剤部 宮村充彦教授に深く感謝いたします。

多忙な職場環境の中、本研究に対し寛容な心でご理解、ご協力、ご指導、ご支援いただいた高知大学医学部附属病院薬剤部 スタッフ一同、エール薬局 濱田篤秀社長をはじめとするスタッフ一同に感謝致します。

研究を進めるにあたりご支援、ご協力をいただきながらここにお名前を記すことのできなかつた多くの方々に心より感謝致します。

大学院博士課程進学、本研究を行うにあたり、両親、弟、友人の多くの方々のご理解、ご支援により本研究を成し遂げることができたと感謝致しております。

最後に、これまで自分の志向する道を進むことに対し、理解し、常に健康管理を気遣い、温かく見守りそして生活全般を支え、惜しみない援助、激励をしてくださり平成三十年七月八日に他界した母 横田綾子に深い感謝の意を表して謝辞と致します。