

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07885

研究課題名(和文) Suspended-state NMR法による薬物ナノ懸濁液の分子状態評価

研究課題名(英文) Evaluation of molecular state of drug nanosuspensions by suspended-state NMR spectroscopy

研究代表者

東 顕二郎 (Higashi, Kenjiro)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：40451760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Suspended-state NMR測定により、湿式粉碎により調製した2種類の薬物ナノ懸濁液について評価した。その結果、懸濁液中の薬物ナノ粒子中の薬物及び安定化剤の分子状態をダイレクトに明らかとすることに成功した。本研究で得られた知見は、薬物ナノ懸濁液の形成・安定化メカニズムに新しい知見を与えるものである。また、本研究より、suspended-state NMR法が薬物ナノ懸濁液製剤の品質評価に役立つ有用な測定法であることを示すことができた。今後益々求められていく薬物ナノ懸濁液製剤の開発において本研究が新しい指針となり、高品質の新規薬物ナノ懸濁液製剤の創生に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Two species of drug nanosuspensions prepared by wet-milling were evaluated by suspended-state NMR spectroscopy. We succeeded in directly clarifying the molecular state of both drug and stabilizer of drug nanoparticle in suspended-state. The knowledge obtained in this study provides a new insight into the mechanism of formation and stabilization of drug nanosuspensions. This study also shows that suspended-state NMR spectroscopy is a useful analytical method for quality assessment of drug nanosuspension formulations. We expect that this study will become a new index in development for drug nanosuspension and will be a help to design a new drug nanosuspension formulations of high quality.

研究分野：物理薬剤学

キーワード：薬物ナノ懸濁液 NMR 固液界面 運動性 分子間相互作用 結晶多形 非晶質 湿式粉碎

1. 研究開始当初の背景

難水溶性薬物の溶解性・吸収性改善を目的として各種薬物ナノ懸濁液が開発されている。一方、これまで薬物ナノ懸濁液の評価については、粒度分布測定や顕微鏡観察による粒子サイズや形状の評価などの現象論的評価に止まるのみで、その分子状態を詳細に検討した報告はほとんど見受けられなかった。これは懸濁状態が液相と固相の2相からなるため、それぞれに用いられている分析法を適用するのが困難であり、ナノ懸濁液の分子状態を適切に評価する物性評価法が確立されていないためである。

Suspended-state NMR法 (Fig. 1)は、水の漏出がないように工夫された試料管に懸濁試料を封入し、試料管を外部磁場に対してマジック角(54.74°)に傾けて数~数十 kHz で高速回転させる magic-angle spinning (MAS)を行う。さらに、dipolar decoupling (DD) 法を併用することで、固体試料のスペクトルの広幅化の原因となっている化学シフト異方項及び¹H-¹³C双極子相互作用の両方を消去・軽減する。結果として、溶液 NMR では観察できない運動性の低い固体成分でも高分解能¹³C NMR スペクトルの取得が可能となる。これまでに suspended-state NMR法を用いて、水に分散中のタンパクの構造解析や薬物結晶化を解析した例が報告されている。一方、suspended-state NMR法は近年開発された新しい手法であり、専用のサンプル管が必要である、測定が難しい、長時間の測定時間を要する等の理由から、製剤研究に応用された報告は非常に限られていた。

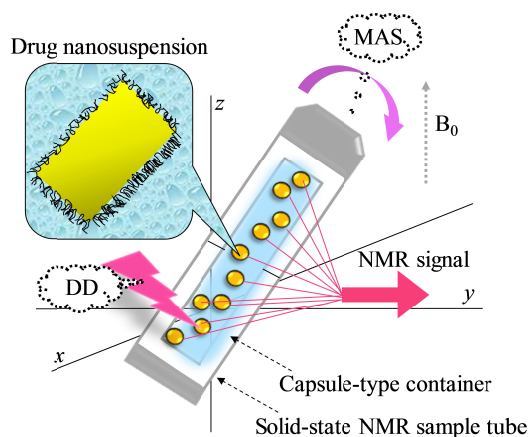


Fig. 1 A schematic representation of suspended-state NMR method

2. 研究の目的

本研究は、suspended-state NMR測定を用いて、薬物ナノ懸濁液中の薬物と安定化剤の構造・分子状態・分子間相互作用を詳細かつダイレクトに評価することを目的としている。得られた結果より、薬物ナノ懸濁液の形成・

安定化機構を分子レベルで明らかとする。そして、これまでトライ&エラーであったナノ粒子創生の効率化、最適化など処方設計に有用な指針を示す。本研究により得られる結果は、suspended-state NMR法がナノ懸濁液製剤の品質評価に役立つ有用な測定法であることを示し、suspended-state NMR法の有用性・ポテンシャルを広く示すトリガーとなる。さらに、今後益々求められていくナノ懸濁液製剤の開発において本研究が新しい指針となり、高品質の新規ナノ懸濁液製剤の創生に役立つものと期待される。本研究期間内では、suspended-state NMR法を用いて、湿式粉碎により調製した2種類の薬物ナノ懸濁液(インドメタシン(IMC)/ポロキサマー407(P407)及びピロキシカム(PXC)/P407)について評価した。

3. 研究の方法

(1) 試料

IMCには7つの結晶多形が報告されている。ここでは、最安定形の γ 形 IMCに加えて準安定形の α 形 IMC及び非晶質 IMCを使用した。PXCは β 形を用いた。安定化剤として用いた P407は、ポリエチレンオキシド(PEO)₁₀₁-ポリプロピレンオキシド(PPO)₅₆-PEO₁₀₁からなるトリブロックコポリマーである。

(2) 調製法

薬物(IMCとPXC)と安定化剤 P407がそれぞれ 100 mg/mL及び 50 mg/mLとなるように水に分散させて物理的混合物(PM)懸濁液を得た。その後、PM懸濁液を Retsch 製遊星ボールミル PM100により 24時間粉碎することで、混合粉碎物(GM)懸濁液を調製した。

(3) 評価法

粒度分布測定

MICROTRAC 9340-UPAを用いて動的光散乱法により、ナノ粒子の体積平均径(mv)を算出した。各試料を精製水にて 200倍希釈し、測定試料とした。

極低温透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) 測定 JEM-2100Fを用い、加速電圧 120 kVで cryo-TEM測定を行った。

Suspended-/solid-state NMR測定

JNM-ECA 600 (外部磁場強度: 14.01 T)を用い、suspended-及び solid-state¹³C NMR測定を行った。測定シーケンスには、cross polarization (CP)法及び pulse saturation transfer (PST)法を用いた。測定条件は以下の通りである。Contact time for CP: 5 ms; pulse delay time for CP法及び PST法: 5 s 及び 2 s; spinning rate: 5 kHz。

4. 研究成果

(1) IMC/P407 ナノ懸濁液 粒子径・形態評価

Fig. 2 左に 3 種の IMC より調製した GM 懸濁液の動的散光法による粒子径分布測定結果を示す。GM 懸濁液の mv は約 260 ~ 270 nm であり、その粒子径分布は単峰性であった。この GM 懸濁液は、25 °C 静置条件下 1 ヶ月の保存後も調製直後とほぼ同等の粒度分布を示し、長時間の安定性が認められた。一方、cryo-TEM 測定の結果(Fig. 2 右)、初期 IMC 結晶形に依存して得られるナノ粒子の形態は異なった。 γ 形 IMC を用いて調製した GM 懸濁液では、菱形板状の形態が観察された。これに対して、 α 形 IMC 及び非晶質 IMC を用いて調製した GM 懸濁液では、針状のナノ粒子が認められた。走査型電子顕微鏡測定の結果、 γ 形 IMC 結晶は菱形板状、 α 形 IMC 結晶は針状の形態を呈した(data not shown)。この結果より、 γ 形 IMC 及び α 形 IMC を用いて調製した場合、それぞれの初期結晶に特徴的な形態を保持したままナノ粒子化したと推察された。

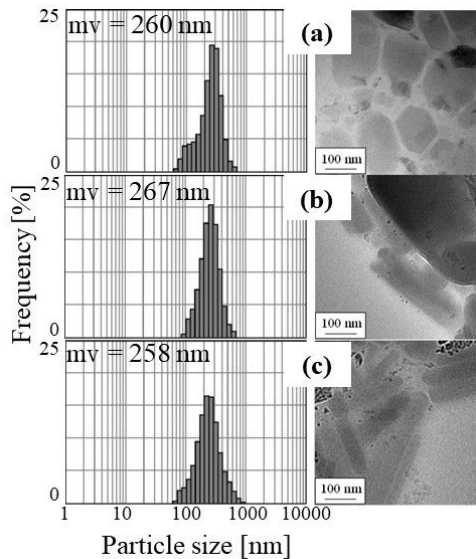


Fig. 2 (left) Particle size distribution patterns and (right) cryo-TEM images of a GM suspensions prepared with (a) γ form IMC, (b) α form IMC, and (c) amorphous IMC

Suspended-state NMR 測定

Fig. 3 には 3 種の GM 懸濁液について、CP 法を用いて測定した NMR スペクトルを示す。CP 法は双極子相互作用を介して ^1H 核から ^{13}C 核へ磁化を移動させる手法である。分子運動性の高い成分は双極子相互作用が平均化されるため CP スペクトルに反映されにくい。分子運動性の低い成分は CP スペクトルに強調されて観察される。すなわち、懸濁液では運動性の高い溶解成分は CP スペクトルに反映されにくい。運動性の低い粒子成分は強調して観察される。 γ 形 IMC 及び α 形 IMC を用いて調製した GM 懸濁液の IMC ピークは、それぞれ γ 形 IMC 及び α 形 IMC 結晶の化学シフト値と一致した。一方、非晶質 IMC を用いて調製した GM 懸濁液の IMC ピークは、 α 形 IMC 結晶と同様で

あった。すなわち、結晶性 IMC より調製した GM 懸濁液では粉碎過程で初期結晶形を維持したまま IMC がナノ粒子化した一方、非晶質 IMC を用いた GM 懸濁液ではナノ化する過程で α 形 IMC に結晶化したことが明らかとなった。また、本結果より Fig. 2 右の cryo-TEM 像で観察された IMC ナノ粒子の形態の相違が、ナノ粒子中の IMC 結晶形の違いに由来することを確認できた。

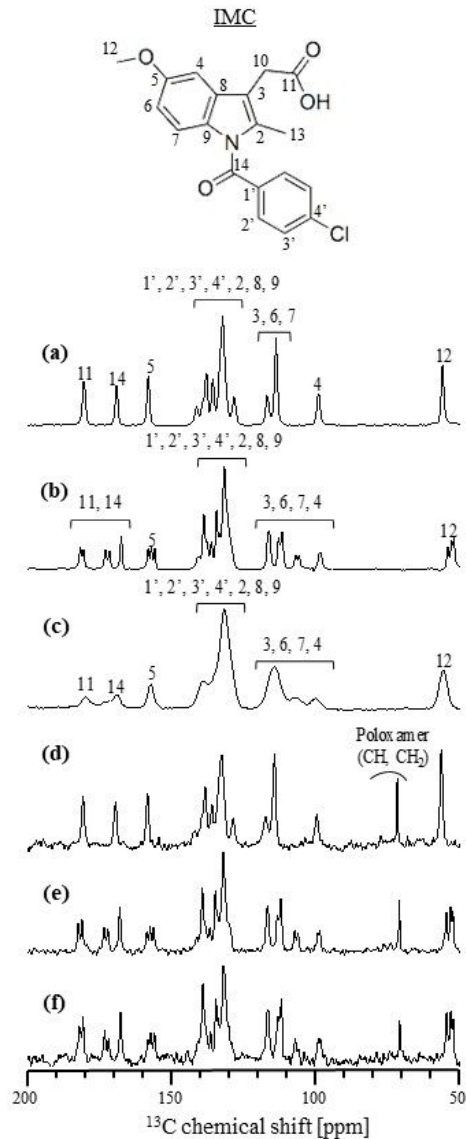


Fig. 3 ^{13}C suspended-state CP NMR spectra of (a) γ -form IMC, (b) α -form IMC, (c) amorphous IMC, and a GM suspension prepared with (d) γ form IMC, (e) α form IMC, and (f) amorphous IMC

さらに、GM 懸濁液の CP スペクトルにおいては、70 ppm 付近に P407 に由来するピークが認められた。GM 懸濁液中では、大部分の P407 は疎水性の PPO 鎖をコアに親水性の PEO 鎖をシェルにもつ 10 ~ 20 nm 程度の高分子ミセルを形成している。一方、一部の P407 は IMC ナノ結晶と水の固液界面に吸着しており、親水性の PEO 鎖を水相に疎水性の PPO 鎖を IMC 結晶に向けた U 字形構造を形成する。GM 懸濁液の P407 濃度は 50 mg/mL と臨

界ミセル濃度である 7 mg/mL (25 °C) より十分高い。このため、IMC 結晶界面で P407 は密度が高い状態で存在し、PEO 鎖が伸長したブラッシュ構造を形成する。CP 法は運動性の低い成分を強調して観察する手法であり、CP スペクトルで観察された P407 ピークは IMC ナノ結晶との界面に持続的に吸着している成分あるいは CP が生じる contact time の間に一時的に吸着した成分に由来すると考えられた。

GM 懸濁液中に存在する P407 の分子状態をより詳細に評価する目的で、PST 法による評価を行った。PST 法では、運動性の高い成分（溶解成分）及び低い成分（ナノ粒子成分）の両方がスペクトル上に観察される。

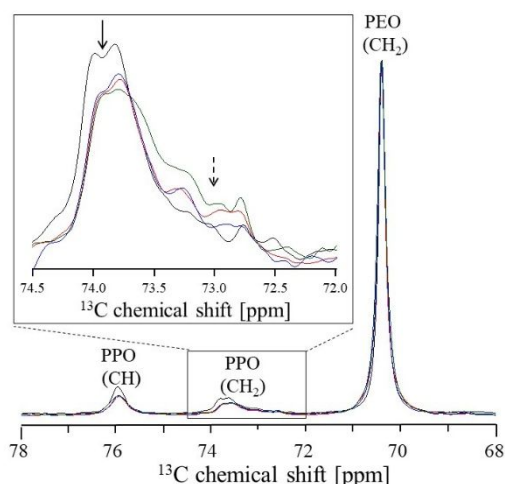


Fig. 4 ^{13}C suspended-state PST NMR spectra of a GM suspension prepared with γ form IMC (red line), α form IMC (blue line), and amorphous IMC (green line), and PM suspension prepared with γ form IMC (black line). Solid and dotted arrows indicate the P407 forming polymeric micelles, and immobilized on the interface of IMC nanocrystals, respectively.

Fig. 4 に、PM 懸濁液と 3 種類の GM 懸濁液のスペクトルを、70 ppm 付近の PEO のメチレンピークに対してノーマライズした結果を示す。PM 懸濁液のスペクトルでは、PEO 鎖と PPO 鎖のメチレンピークは共に先鋭であった。PM 懸濁液においては P407 はほぼすべてが高分子ミセルとして存在しており、その速い等方性回転（関連時間 10 μs ）のため、先鋭なピークが観察されたと考えられた。GM 懸濁液においては、PEO ピークの線幅と化学シフトは PM 懸濁液のものと同様であった。GM 懸濁液においては P407 は IMC ナノ結晶 (260 ~ 270 nm) 界面と高分子ミセル (10 ~ 20 nm) の両方に存在する。IMC ナノ結晶と高分子ミセルでは、そのサイズ及び拡散速度は大きく異なるにもかかわらず、PEO ピークの形状は同程度に先鋭であった。この理由として、IMC 結晶界面の PEO 鎖は水和層を形成しているため分子運動性が高く、高分子ミセルの PEO 鎖と同様の分子状態にあることが考えられる。これに対して、74 ppm 付近の GM 懸濁液中の PPO のメチレンピークでは、

低磁場側の高分子ミセルに由来するピーク（実線矢印）に加えて、高磁場側に IMC 結晶界面に吸着した P407 に由来する肩ピーク（破線矢印）が観察された。PPO 鎖のピークが低磁場側と高磁場側に分裂して観察された結果より、P407 の IMC ナノ結晶界面と高分子ミセル間の吸着・脱着は NMR のタイムスケールよりも遅いことが示された。溶液中における粒子への吸着は高分子と低分子の界面活性剤で大きく異なる。低分子界面活性剤では粒子界面とミセル間での吸着・脱着は極めて速い。一方、高分子界面活性剤では、多数あるモノマーが粒子界面でそれぞれ相互作用するため、高分子鎖の部分的な吸着・脱着は起きるものの高分子鎖全体の吸着・脱着は抑制される。特に、粒子がナノサイズの場合には、高分子鎖の脱着は顕著に抑制される。よって、本 GM 懸濁液においても、P407 の疎水部である PPO 鎖のモノマーがそれぞれ IMC ナノ結晶界面で多数の疎水性相互作用を形成しており、この疎水性相互作用が協同的に働く。そのため、IMC ナノ結晶界面に強く吸着した P407 の脱着は極めて抑制されていると推察された。

Fig. 5 に suspended-state NMR 測定より考察した IMC/P407 GM 懸濁液の模式図を示す。湿式粉碎により、 γ 形 IMC を用いた GM 懸濁液では γ 形 IMC ナノ結晶が、 γ 形 IMC 及び非晶質 IMC を用いた GM 懸濁液では α 形 IMC ナノ結晶が形成された。各 GM 懸濁液中においては、液相成分として P407 の高分子ミセル、固相成分として IMC ナノ結晶及びその結晶界面に吸着した P407 が存在している。IMC ナノ結晶界面に吸着した P407 は、疎水性の PPO 鎖の疎水性相互作用により IMC 結晶に強く相互作用する一方、親水性の PEO の水和層形成により IMC ナノ結晶の分散安定化に寄与していると考えられる。

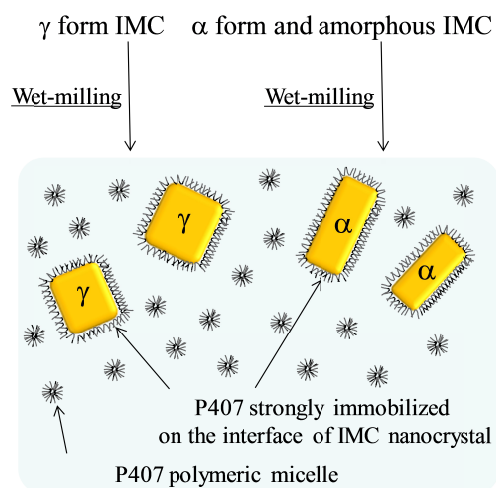


Fig. 5 A schematic representation of IMC/P407 GM suspension

(2) PXC/P407 ナノ懸濁液
粒子径・形態評価

PM 懸濁液は分散性に乏しく、時間経過に伴い沈殿が認められた。一方、GM 懸濁液は、良好な分散性が認められた(Fig. 6a)。GM 懸濁液について動的光散乱法により粒子径測定を行ったところ、 $mv = 232 \text{ nm}$ の単峰性の粒度分布が得られた(Fig. 6b)。また、GM 懸濁液の cryo-TEM 像では約 $100 \sim 200 \text{ nm}$ のナノ粒子が観察された(Fig. 6c)。さらに、IMC の系とは異なり、ナノ粒子の表面に P407 に由来すると考えられる厚い表面層が認められた。GM 懸濁液の色及び粒度分布は $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置条件下で 1 か月保存後も変化は認められず、高い安定性が確認された。

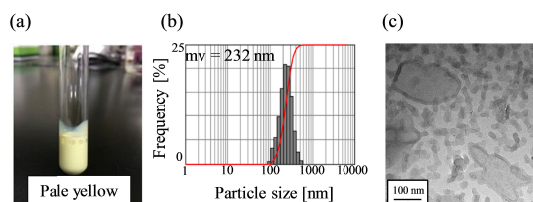


Fig. 6 (a) Appearance, (b) particle size distribution pattern, and (c) cryo-TEM image of PXC/P407 GM suspension

Suspended-state NMR 測定

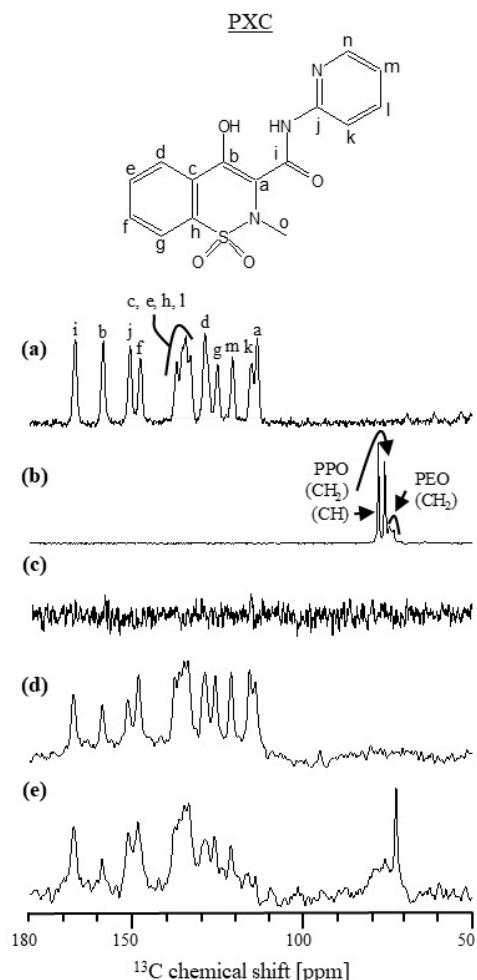


Fig. 7 ^{13}C suspended-state CP NMR spectra of (a) PXC crystal, (b) P407 (powder), (c) P407 (solution), (d) PM suspension, and (e) GM suspension

Fig. 7 には、CP 法により PM 懸濁液及び GM 懸濁液を評価したスペクトルを示す。PM 懸濁液のスペクトル(Fig. 7d)では、P407 に由来するピークはほとんど観察されず、PXC ピークのみが観察された。また観察された PXC のピーク形状および化学シフト値は PXC 結晶(Fig. 7a)のもの一致した。このことから、PM 懸濁液においては、PXC は結晶状態で、また P407 は主に溶解した状態で存在することが示された。これに対して、GM 懸濁液(Fig. 7e)においては、PXC に加えて 70 ppm 付近に P407 に由来するピークが観察された。このことから、IMC/P407 GM 懸濁液(Fig. 3d-f)と同様に PXC/P407 GM 懸濁液中にも運動性の抑制された P407 成分が存在することが明らかとなった。さらに P407 のピーク強度は PXC を用いた時の GM 懸濁液の方が、IMC を用いた時の GM 懸濁液よりも顕著に大きくなった。このことから、PXC/P407 GM 懸濁液では IMC/P407 GM 懸濁液と比較して、より多くの P407 がナノ粒子中に取り込まれていると考察した。また、GM 懸濁液のスペクトルでは、PXC ピークが PXC 結晶及び PM 懸濁液のものと比較して広幅化した。ここで観察された GM 懸濁液のスペクトル中の PXC ピーク広幅化は、PXC の非晶質化を示唆するものと考えられた。湿式粉碎により調製したナノ粒子中の薬物は通常結晶状態にあると考えられることから、ナノ粒子中の PXC 非晶質化は興味深い事象と言える。

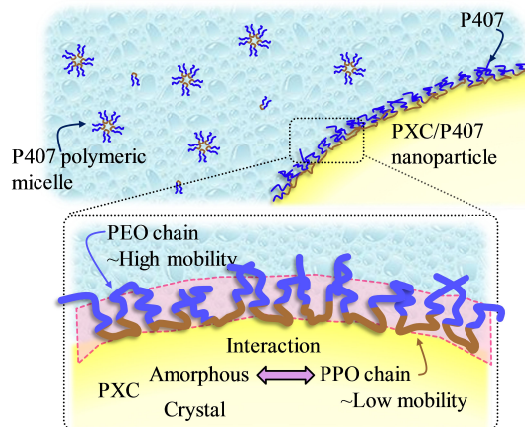


Fig. 8 A schematic representation of PXC/P407 GM suspension

Fig. 8 に suspended-state NMR 測定より予想された PXC/P407 GM 懸濁液の模式図を示す。GM 懸濁液は、液相成分である P407 高分子ミセル及び固相成分である PXC/P407 ナノ粒子からなる。固相の P407 はナノ粒子界面近傍に存在し、親水性の高い PEO 鎖を液相側に突き出し、また疎水性の高い PPO 鎖は粒子界面で固定された U 字型の構造を形成する。液相側に突き出した PEO 鎖は運動性が高く、立体反発によりナノ粒子分散安定性に寄与する。ナノ粒子中では PXC の結晶と非晶質が共存している。PXC の非晶質は非常に不安定であり、室温でも速やかに結晶化する。したがって、水溶液中で PXC 非晶質が単独で安定に存

在するのは困難で、P407 が PXC 非晶質形成に寄与していると予想される。ナノ粒子界面において、P407 の PPO 鎖が粒子内部を向いていることから、この PPO が PXC と相互作用を形成し、PXC 非晶質を安定化していると考察した。IMC よりも PXC の方が PPO 鎖との分子間相互作用が強い。そのため、より多くの P407 がナノ粒子に取り込まれ、ナノ粒子中の一部の PXC が非晶質化したと推察した。

結言

Suspended-state NMR 測定を用いて、湿式粉碎により調製した薬物ナノ懸濁液及びその固液界面の構造が直接評価可能であることを示した。Suspended-state NMR 法は、薬物ナノ懸濁液中の薬物と添加剤について核レベルの詳細な情報が得られる。一方、MAS による遠心力の影響を考慮する必要があり、また NMR の感度の低さから測定に時間を要し、適用が薬物濃度の高い薬物ナノ懸濁液のみに限られる。そのため、今後の suspended-state NMR 法の汎用的な応用については更なる発展が必須である。しかし、近年の NMR 技術の目覚ましい発展を背景に、将来的には薬物ナノ懸濁液の物性評価法として確立され、様々な薬物ナノ懸濁液の分子状態・界面構造評価に用いることができると見込んでいる。そして、効率的な高品質の薬物ナノ粒子製剤の処方設計及び精密な品質評価・管理に貢献するものと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Y. Kuroiwa, K. Higashi, K. Ueda, K. Yamamoto, K. Moribe. Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. *Int. J. Pharm.* 537 (1-2), 30-39 (2018).

DOI:10.1016/j.ijpharm.2017.12.028. **査読有り**

K. Egami, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe. Crystallization of probucol in nanoparticles revealed by AFM analysis in aqueous solution. *Mol. Pharm.* 12(8) 2972-2980 (2015).

DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00236.

査読有り

Y. Hasegawa, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe. Direct evaluation of molecular states of piroxicam/poloxamer nanosuspension by suspended-state NMR and Raman spectroscopies. *Mol. Pharm.* 12(5), 1564-1572 (2015).

DOI:10.1021/mp500872g. **査読有り**

〔学会発表〕(計 14 件)

東 顕二郎: ナノ医薬品開発における電子顕微鏡の応用、第 6 回大学連携研究設備ネットワーク研究成果報告会、2018 年

東 顕二郎: 分光法及び顕微鏡法を用いた薬物ナノ懸濁液の構造・分子状態の評価、日本薬学会第 137 年会、2017 年

東 顕二郎: 製剤開発における固体 NMR の利用: 基礎から応用まで、日本薬学会東海支部 特別講演会、2017 年

東 顕二郎: NMR 法を用いた医薬品ナノ懸濁液の構造解明、粉体工学会 2016 年度第 1 回粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会、2016 年

東 顕二郎: 医薬品開発に用いられる製剤化技術の現状と展望、エネルギー環境学域・JAXA 宇宙環境利用 WG 合同講演会、2016 年

東 顕二郎: NMR による特殊製剤の物性評価、日本薬剤学会 経口フォーカスグループ第 5 回合宿討論会、2015 年

東 顕二郎: 固体 NMR 法による難水溶性薬物の溶解性を改善する特殊製剤の評価事例、日本薬剤学会 前臨床開発フォーカスグループ第一回合宿討論会、2015 年

〔図書〕(計 1 件)

東 顕二郎、森部 久仁一(分担)、シーエムシー出版、*ナノ結晶化技術の基礎と医薬品開発の現状、難水溶性薬物の経口製剤化技術最前線*、2016、pp202-215

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 顕二郎 (HIGASHI KENJIROU)

千葉大学大学院・薬学研究院・准教授

研究者番号: 40451760

(2)研究分担者

森部 久仁一 (MORIBE KUNIKAZU)

千葉大学大学院・薬学研究院・教授

研究者番号: 50266350