

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06985

研究課題名(和文) ポリマーのナノ構造・運動性・相互作用評価に基づく薬物溶解メカニズムの解明

研究課題名(英文) Drug dissolution mechanism based on evaluation of polymer structure, mobility, and intermolecular interaction

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリマーのナノ構造・運動性・相互作用評価に基づく薬物溶解メカニズムの解明を目的として、初年度はEudragit EPO (EUD-E)とナリンゲニン、2年目はEUD-Eとフェロジピン、3年目はEUD-E及びアミノアルキル側鎖のホモポリマーであるPDEMとカルバマゼピンを用い、pH変化がポリマーの液中構造及び薬物可溶化作用に及ぼす影響を、小角X線散乱、原子間力顕微鏡及び核磁気共鳴法測定により評価した。その結果、それぞれポリマー構造と可溶化能、ポリマー構造と結晶化抑制能、プロトン化率とポリマー構造及び可溶化能との関連を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

pHの異なる溶液中におけるポリマー構造の違いを、薬物の有無の条件下、小角X線散乱、原子間力顕微鏡及び核磁気共鳴法測定により評価することで、薬物の可溶化メカニズムを解明した。また薬物結晶界面におけるポリマーの吸着状態や凝集構造の形成を原子間力顕微鏡により評価できた。さらにMDシミュレーションにより、側鎖のプロトン化率の低下に伴う回転半径及び溶媒露出面積の減少、ポリマー鎖の分子内凝集が明らかになった。本研究成果は複数の物性評価方法を適切に用いて評価することで得られた知見であり、過飽和・可溶化製剤の機構解明や品質評価手法に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Eudragit EPO (EUD-E) and naringenin in the first year, EUD-E and felodipine in the second year, and EUD or PDEM, which is homopolymers of -E and aminoalkyl side chains, and carbamazepine in the third year, were used to elucidate the drug dissolution mechanism based on evaluation of polymer nanostructure, motility, and interaction. Effect of pH change on the structure of the polymer in solution and drug solubilization was investigated by small-angle X-ray scattering, atomic force microscopy, and nuclear magnetic resonance. As a result, the relationships between polymer structure and solubilization ability, polymer structure and crystallization inhibition ability, and protonation rate, polymer structure and solubilization ability were clarified.

研究分野：製剤学

キーワード：溶解性改善 小角X線散乱 原子間力顕微鏡 NMR 相互作用 運動性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非晶質固体分散体の調製では、薬物の溶解性及び安定性改善の目的で添加剤として機能性ポリマーが用いられる。また、水へのぬれ性・分散性改善の目的で界面活性剤が少量添加される場合がある。製剤からの薬物の溶解では、固体における薬物・ポリマーの混和状態に基づく水溶液への溶出挙動が、薬物の溶解状態に影響する。一般にポリマーは水溶液中で均一に溶解すると考えられているが、機能性ポリマーの場合、構造中に親水・疎水分画が存在し、それが溶出時薬物の溶解に影響する可能性が高い。懸濁溶液の物性測定法として汎用されているのは、動的光散乱 (DLS) 測定による平均粒子径・粒子径分布、ゼータ電位測定による表面電荷である。加えて、溶液中で薬物の分子状態を評価する目的で、Raman 測定による薬物の相互作用、溶液及び懸濁状態 NMR 測定による分子運動性や成分間の相互作用の検討が可能である。また、測定用試料の調製に困難や制約を伴うものの、試料を極低温条件下で電子顕微鏡 (走査型: cryoSEM、透過型: cryoTEM) 観察すれば、溶液中での形状・形態の評価が可能である。さらに、原子間力顕微鏡 (AFM) による液中測定を行うことで、ナノ構造体及びその力学的特性を精度よく観察及び評価できる。高輝度光を利用した小角 X 線散乱 (SAXS) 測定も、希薄溶液中でのナノ構造決定に有効である。上述の測定法を用いることで、特殊製剤の溶液中での物性を詳細に評価できる。

2. 研究の目的

本研究では、機能性ポリマーの水溶液中ナノ構造評価に基づき、難溶性薬物の溶解メカニズムを解明する。極低温透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡及び小角 X 線散乱測定の結果から溶液中のポリマー構造を、ゼータ電位、NMR 及び Raman 測定の結果から運動性や分子内・分子間相互作用を評価する。構造・運動性・相互作用の 3 つ観点から、複数の測定結果を総合的に解釈することで、溶液中でのポリマー構造及び薬物-ポリマー構造の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

溶液 pH によるポリマー形態の変化及びポリマー形態が薬物可溶化作用に及ぼす影響

難水溶性薬物にはナリンゲニン (NAR) を、ポリマーには塩基性ポリマーであるアミノアルキルメタクリル酸コポリマー Eudragit EPO (EUD-E) を用いた。EUD-E を 20 mM 酢酸緩衝液に溶解させ、pH 4.0 及び pH 6.5 の EUD-E 溶液 (3.0 mg/mL) 及び EUD-E/SAC 溶液 (3.0 mg/1.5 mg/mL) を調製した。pH の変化が EUD-E の液中構造及び薬物可溶化作用に及ぼす影響を、放射光小角 X 線散乱 (SAXS)、原子間力顕微鏡 (AFM) 及び核磁気共鳴法 (NMR) 測定により評価した。

ポリマー形態が結晶化抑制作用に及ぼす影響

EUD-E を 40 mM 酢酸緩衝液に溶解させ、pH 4.5 及び pH 6.0 の EUD-E 溶液を調製した。難水溶性薬物として (FEL) を用い、FEL 過飽和溶液における EUD-E の薬物結晶成長抑制作用を評価した。また、放射光を用いた SAXS 測定により EUD-E 液中構造を、AFM 測定により、FEL 結晶界面における EUD-E 構造体の評価を行った。

EUD-E 及び PDEM の pH 依存的な薬物可溶化メカニズムの解明

難水溶性薬物としてカルバマゼピン (CBZ) を、ポリマーとして異なる 3 種類の側鎖で構成されたランダムコポリマーの EUD-E に加えて、EUD-E が有するアミノアルキル側鎖のホモポリマーである poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDEM) を用いた。EUD-E を 40 mM 酢酸緩衝液に溶解させ、pH 4.5~6.0 の 1 mg/mL EUD-E 溶液を調製した。また、PDEM を各種 pH 緩衝液 (pH 4.0, 6.0, 8.0, 10.0) に加え、1 mg/mL PDEM 溶液 (塩濃度: 40 mM) を調製した。EUD-E 及び PDEM 単独の水溶液中構造評価は、SAXS 測定と Kratky-plot により解析した。また各ポリマー分子の水溶液中分子動力学 (MD) シミュレーションを、ポリマー中アミノアルキル側鎖のプロトン化率 0, 50, または 100%, モノマー数 32 のポリマー単分子の水溶液モデルを用いて行い、回転半径 (Rg) 及び溶媒露出面積 (ASA) を評価した。EUD-E 及び PDEM の薬物可溶化作用評価は、各種 pH 緩衝液及びポリマー溶液に CBZ を過剰量加え、回転混和後遠心処理したものを HPLC により定量し、平衡溶解度とした。ポリマー-薬物間相互作用は、ポリマー単独の水溶液中構造評価に用いたポリマー単分子の水溶液モデルに対し、CBZ を 15 分子無作為に添加したモデルを用いて水中 MD シミュレーションを行うことで、ポリマー-薬物間相互作用数を評価した。

4. 研究成果

溶液 pH によるポリマー形態の変化及びポリマー形態が薬物可溶化作用に及ぼす影響

小角 X 線散乱 (SAXS) 原子間力顕微鏡 (AFM) 及び核磁気共鳴法 (NMR) 測定により、EUD-E ナノ構造及び分子状態は pH によって変化することが示された。EUD-E 溶液では pH 4.5 において random coil 構造、pH 6.5 において EUD-E 鎖が折りたたまれた globule 構造の形成が認められた (Fig.1)。このことから、EUD-E の構造は、pH の上昇により coil-to-globule 転移することが示された。EUD-E/SAC 溶液では、pH 6.5 では EUD-E 溶液と同様の globule 構造の形成が認められたが、pH 4.5 においては EUD-E 鎖が一部折りたたまれた構造の形成が認められた (Fig.1)。SAC の添加によって pH 変化に伴う EUD-E の構造変化が抑制されたと推察された。¹H NMR 測定の結果、EUD-E 及び EUD-E/SAC 溶液で pH の上昇に伴う EUD-E の構造変化に由来する EUD-E ピークの化学シフト及び線幅に変化が認められた (Fig.2)。また、EUD-E/SAC 溶液においては、EUD-E 溶液と比較して EUD-E 由来のピークの化学シフト変化及び先鋭化が認められ、EUD-E と SAC 間の相互作用形成及び EUD-E の運動性増加が示唆された (Fig.2)。EUD-E 溶液における NAR 溶解量は、EUD-E 未添加溶液と比較して pH 4.5 で 6.5 倍、pH 6.5 で

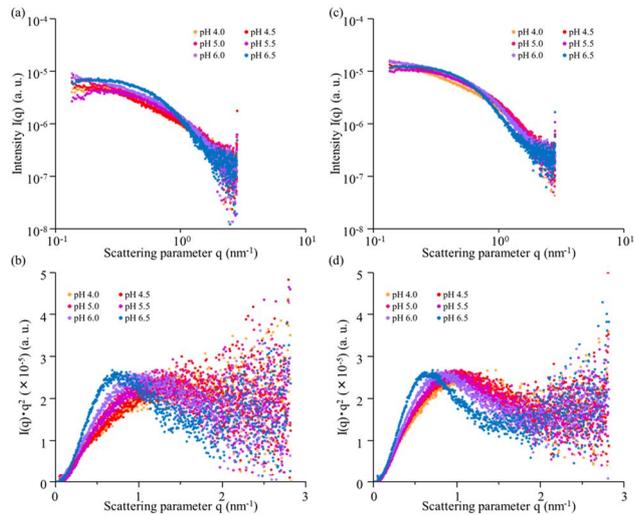


Figure 1 (a,c) Small angle X-ray scattering (SAXS) profile and (b,d) Kratky plot from SAXS profile of (a,b) EUD-E solution and (c,d) EUD-E/SAC solution at various pH.

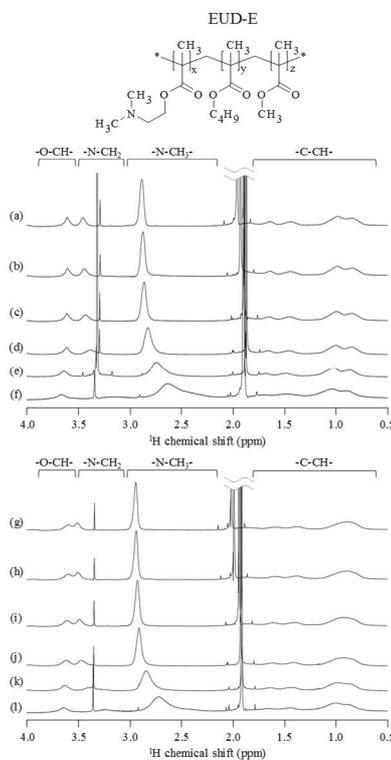


Figure 2. ¹H NMR spectra of EUD-E in (a-f) EUD-E solution and (g-l) EUD-E/SAC solution at (a, g) pH 4.0, (b, h) pH 4.5, (c, i) pH 5.0, (d, j) pH 5.5, (e, k) pH 6.0, and (f, l) pH 6.5.

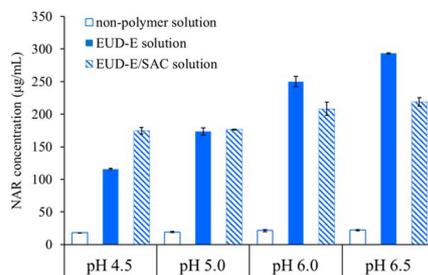


Figure 3. NAR solubility in EUD-E solution and EUD-E/SAC solution at different pH at 25°C (n=3, mean ± SD).

15.2 倍向上し、pH 6.5 においてより強い NAR 可溶化作用を示した (Fig.3)。また、EUD-E/SAC 溶液において NAR 溶解量は pH 4.5 で 9.8 倍、pH 6.5 で 11.4 倍向上し、SAC の共存によって EUD-E の NAR 可溶化作用の pH 依存性が減弱した (Fig.3)。¹H HR-MAS NMR 測定の結果、いずれの pH の EUD-E 溶液においても NAR 由来のピークが NAR 単独溶液と比較して広幅化

し、特に pH 6.5 ではピークが消失した (Fig.4)。EUD-E による NAR 運動性抑制は pH 4.5 と比較して pH 6.5 で強く、NAR が EUD-E 構造中により強固に内封されたと考察した。また、EUD-E/SAC 溶液において、pH 4.5 では SAC の添加による NAR 由来のピークの線幅は変化しなかった。以上の結果より、EUD-E の液中構造は溶液の pH 及び SAC の存在によって変化することが示された。また、EUD-E の薬物可溶性作用には EUD-E の液中構造及び分子状態が大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

ポリマー形態が結晶化抑制作用に及ぼす影響

EUD-E は、過飽和状態にある薬物の結晶化を効果的に抑制し、薬物過飽和状態を長時間維持する。EUD-E の液中構造が felodipine (FEL) の結晶成長抑制作用に及ぼす影響を評価した。pH 4.5 と比較して、pH 6.0 の EUD-E 溶液では長時間高い FEL 過飽和度が維持され、強い FEL 結晶成長抑制作用を示した (Fig.5)。pH 4.5 及び pH 6.0 EUD-E 溶液の SAXS プロファイル を Kratky plot により解析した結果、いずれの pH においても、EUD-E 鎖が水溶液中において folding していることが示された (Fig.6)。

また、pH 4.5 と比較して pH 6.0 において極大位置が低角側へシフトした。pH 4.5 と比較して pH 6.0 でポリマー鎖がより凝集した状態にあると考察した。また、EUD-E 濃度依存的な液変化は小さかった。EUD-E 溶液を添加した FEL 結晶界面の液中原子間力顕微鏡 (AFM) 測定を行った結果、ナノサイズの構造体が認められ、EUD-E 分子が FEL 結晶界面に吸着していた (Fig.7)。また、pH 4.5 と比較して pH 6.0 の EUD-E 溶液を滴下した FEL 結晶界面において、より大きな EUD-E 構造体が観察され、広範囲で FEL 結晶界面が EUD-E 構造体に

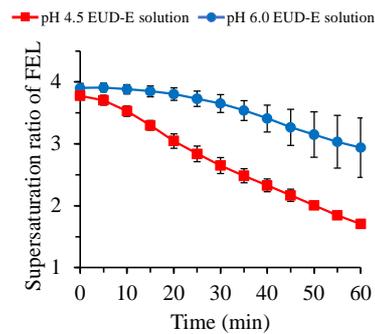


Figure 5 Profile of supersaturation ratio of FEL in EUD-E solution after adding FEL seed crystal (n = 3).

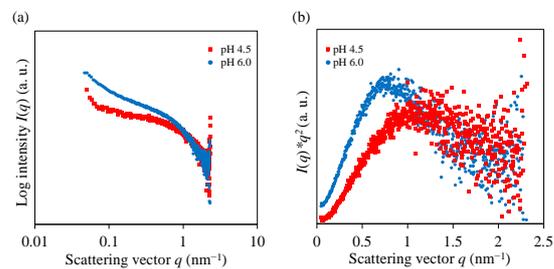


Figure 6 (a) Small-angle X-ray scattering (SAXS) profile and (b) Kratky plot obtained from the SAXS profile of 1.0 mg/mL EUD-E solution.

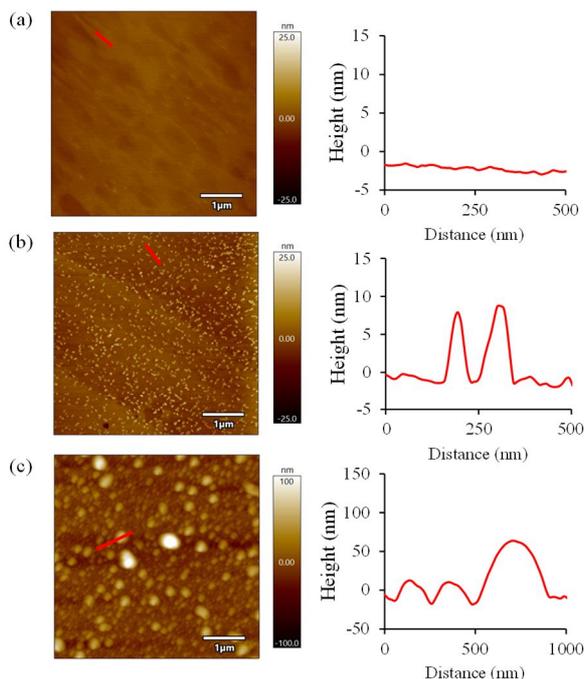


Figure 7 (Left) atomic force microscopy (AFM) topographical images and (right) cross-section profiles at each red line on topographical images of FEL crystal solid-liquid interface after dropping (a) buffer, (b) pH 4.5 EUD-E solution, and (c) pH 6.0 EUD-E solution. The EUD-E concentration was 1.0 mg/mL.

より被覆されることが示された。いずれの pH においても、EUDE 濃度増加に伴い FEL 結晶界面に吸着した EUD-E 構造体のサイズは増大したが、特に pH 6.0 では構造体のサイズの増加が顕著であった。FEL 結晶界面において、EUDE が疎水性のコア部分に FEL 分子を取り込むことで EUD-E 構造体の物性が変化し、疎水性相互作用を介した EUD-E 同士の凝集が引き起こされたと推察した。

EUD-E の薬物可溶化作用の pH 依存的変化のメカニズム解明

EUD-E の液中構造及び EUD-E-薬物間相互作用を実験的手法及び計算化学により評価した。EUD-E に加えてアミノアルキル側鎖のホモポリマーである PDEM を用いた。SAXS 測定の結果、低 pH 条件ではいずれ

のポリマー溶液においても Kratky-plot の線形上昇が認められ、ポリマー鎖は水溶液中においてロッド状またはランダムコイル様の立体構造をとることが示唆された(Fig.8)。一方、高 pH 条件においては Kratky-plot の概形にピークが認められ、pH の上昇に伴いポリマー鎖がより凝集した構造へと転移したと考察した。また MD シミュレーションの結果、両ポリマーにおいて側鎖のプロトン化率の低下に伴い回転半径(R_g)及び溶媒露出面積 (ASA) が減少し、ポリマー鎖の分子内凝集が示された。カルバ

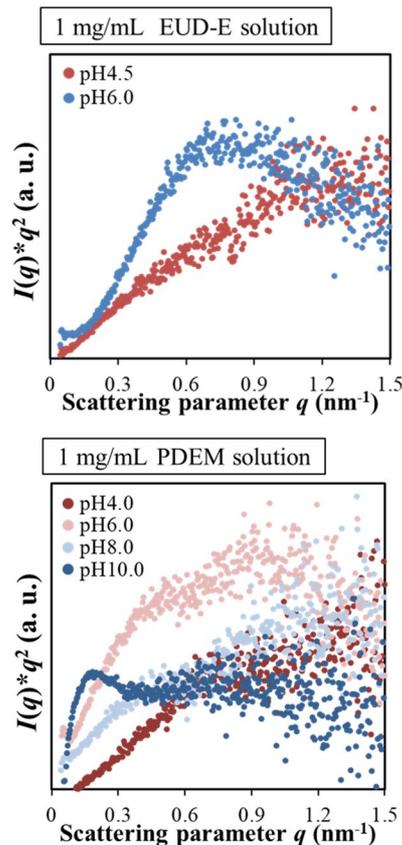


Figure 8 Kratky plot from SAXS profile of 1 mg/mL polymer solution at different pH.

マゼピン (CBZ) 平衡溶解度測定の結果、各種 pH 緩衝液と比較して全てのポリマー溶液において平衡溶解度が改善し、EUD-E 及び PDEM いずれも CBZ 可溶化作用が認められ、pH の上昇に伴い CBZ の溶解性改善度が上昇した(Fig.9)。

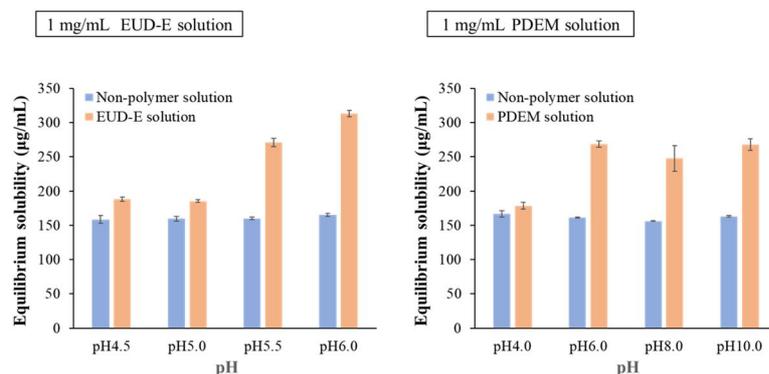


Figure 9 CBZ solubility at 25°C in polymer solution at different pH (n = 3, mean ± S.D.).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamoto, Y., Higashi, K., Morita, T., Ueda, K., Mukaide, S., Takeda, J., Karashima, M., Ikeda, Y., Moribe, K.	4. 巻 18
2. 論文標題 Nanostructure and molecular-level characterization of aminoalkyl methacrylate copolymer and the impact on drug solubilization ability.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Pharm.	6. 最初と最後の頁 4111-4121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00526	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosaka Mami, Higashi Kenjiro, Nishimura Misaki, Ueda Keisuke, Moribe Kunikazu	4. 巻 109
2. 論文標題 Clarification of the Dissolution Mechanism of an Indomethacin/Saccharin/Polyvinylpyrrolidone Ternary Solid Dispersion by NMR Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3617 ~ 3624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2020.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森部久仁一
2. 発表標題 難水溶性薬物の溶解性改善：過去から現在まで
3. 学会等名 国際医薬品開発 InnoPack カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 向出 彩華, 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一
2. 発表標題 Eudragit Eの液中構造がフェロジピンの結晶成長抑制作用に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向出 彩華, 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一
2. 発表標題 Eudragit E P0の液中構造がフェロジピンの結晶化抑制作用に及ぼす影響
3. 学会等名 第38回製剤と粒子設計シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向出 彩華, 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一
2. 発表標題 Eudragit E P0の構造がfelodipineの結晶化抑制作用に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kunikazu Moribe
2. 発表標題 Mechanistic and structural understanding of drug/excipients in the formulation to develop functional pharmaceutical product and to assure the quality
3. 学会等名 1st Bandung International Teleconference on Pharmacy (BITP) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向出 彩華, 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一
2. 発表標題 Eudragit E P0の液中構造が薬物の結晶化抑制作用に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向出 彩華, 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一
2. 発表標題 Eudragit E P0の液中構造が薬物の結晶成長抑制作用に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 根生, 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一
2. 発表標題 溶液NMR測定を用いたPVPによる薬物結晶核生成抑制メカニズムの評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森部久仁一
2. 発表標題 製剤の液中物性分析 現象を理解するための構造評価
3. 学会等名 創剤研究コンソーシアム 第6回オンライン創剤技術セミナー(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	東 顕二郎 (Higashi Kenjiro) (40451760)	千葉大学・大学院薬学研究院・准教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	植田 圭祐 (Ueda Keisuke) (40755972)	千葉大学・大学院薬学研究院・助教 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関