

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590038

研究課題名（和文） 全反射型テラヘルツ、NMR、熱及び粘度測定による薬物溶液構造の解明

研究課題名（英文） Structural evaluation of drug solution by ATR terahertz, NMR, DSC, and viscometry

研究代表者

森部 久仁一（MORIBE KUNIKAZU）

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：50266350

研究成果の概要（和文）：

難水溶性医薬品のナノ微粒子懸濁液及び製剤添加剤との混合粉碎などにより薬物を溶解した水溶液について、各種物性評価を行った。溶液中のナノ微粒子の分散状態、水中での薬物・添加剤の分子状態が明らかとなった。粉碎や溶媒留去により調製したナノ微粒子では、組成に依存したサイズのナノ微粒子が形成した。薬物がナノ微粒子として水中に安定に分散している場合は懸濁状態 NMR と溶液 NMR を組み合わせることでその状態を明らかにした。難溶性薬物の過飽和溶液や可溶化溶液については、NMR を用いることで構造を評価した。NMR は分子間相互作用や運動性を評価できることから、溶液構造評価に優れた方法であると結論できた。

研究成果の概要（英文）：

Physicochemical characterization of poorly water-soluble drug nanosuspension and the aqueous solution prepared by the cogrinding with pharmaceutical excipients was demonstrated. Dispersive state of drug nanoparticles as well as molecular state of drug and excipients in aqueous media was well demonstrated. Composition-dependent size changes were observed for drug nanoparticles prepared by cogrinding or solvent evaporation. Combined methods of suspended state NMR combined and liquid state NMR were useful to evaluate molecular states of stable drug nanosuspension. Drug supersaturated solution and drug solubilized solution were investigated by NMR measurements. We conclude that NMR techniques are the promising method to evaluate molecular interaction between drug and excipients as well as the mobility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：溶液構造、相互作用、NMR、原子間力顕微鏡、テラヘルツ

1. 研究開始当初の背景

今日開発されている医薬品の大半は難水溶性であり、これら難溶性薬物が候補化合物として臨床に適用できるか否かは製剤技術に依存するところが多い。とくに経口吸収製剤への応用において薬物の消化管吸収性が飛躍的に改善することが可能であれば、そのメリットは計り知れなく大きい。難溶性薬物を溶解する方法としては、界面活性剤や溶解補助剤による可溶化、固体分散体を用いた過飽和溶液の調製、ナノ微粒子化などがある。我々が検討している乾式混合粉碎によっても水に分散後薬物溶液を作成することが可能である。いずれの場合も水に分散後殆ど澄明な溶液の調製が可能であるが、溶液中で薬物や添加剤がどのような状態で存在しているのかに関する検討は殆ど行われていない。溶液が透明であれば薬物は溶解したとみなすのが普通で、溶解や可溶化した状態がどうなっているかなどそれ以上検討しないのが現状である。みかけは澄明な溶液でも、実際は薬物が微細なナノ微結晶として安定に分散しているケースも多く存在する。Probuco[®]、水溶性高分子のPVP K12、K17及び界面活性剤のSDSを混合粉碎した試料を水に分散した場合、粒子径約50nmの微粒子懸濁液得られ、薬物はナノ微結晶としてPVP/SDS複合体に被覆された構造をしている。そして、粒子径及び粒子の表面構造の違いが、薬物の経口吸収性に大きく影響することが明らかとなっている。薬物を可溶化した溶液や過飽和溶液いずれの場合においても、薬物の消化管からの吸収は液中での薬物の分子状態や添加剤との相互作用に依存すると予想される。従って、溶液中での薬物・添加剤の分子状態を明らかにすることが、吸収性改善メカニズムの解明、さらには消化管吸収を飛躍的に向上するための製剤設計に役に立つはずである。

2. 研究の目的

①-1：難溶性医薬品としてProbuco[®]、水溶性高分子としてPVP K17、界面活性剤として鎖長の異なるアルキル硫酸ナトリウムを用い、3成分混合粉碎によるナノ微粒子形成に及ぼす鎖長の影響を検討した。①-2：3成分混合粉碎法の応用として、異なる粉碎方法により様々な粒子径のピロキシカムナノ微粒子を調製し、粒子径の違いが薬物の皮膚透過性に与える影響について検討した。①-3：懸濁状態のナノ微粒子を評価するため、懸濁状態NMR測定を行った。①-4：3成分混合粉碎によるナノ微粒子調製以外の方法でナノ微粒子形成を検討するため、3成分を有機溶媒に溶解し

たのち、超臨界二酸化炭素中に噴霧することでナノ微粒子化を試みた。

②アスコルビン酸誘導体とPEG脂質誘導体からのナノ微粒子調製、及び形成される粒子径に及ぼす組成の影響・封入薬物の影響を検討した。

③非晶質薬物を水中に分散させた場合、結晶薬物の溶解度を上回る澄明な過飽和溶液を形成する場合がある。薬物単独で安定な非晶質を得るのは熱力学的観点から困難な場合が多く、ポリマーなどの担体中に薬物を分散させた固体分散体を調製する検討が行われている。しかし、固体分散体を水中に分散して得られた溶液でも安定性が悪く結晶化を起こすことが多いため、長時間過飽和状態を維持できた報告はほとんど見受けられない。そこで、長時間安定な過飽和溶液の調製及び液中安定化メカニズムの解明を目的として、薬物/ポリマーからなる二成分固体分散体を調製した。

3. 研究の方法

①-1：Probuco[®]とPVP K17を重量比1：3で混合し、これにアルキル硫酸ナトリウムを0～1の重量比で混合し、粉碎物を調製する。粉碎物中の3成分間の分子状態は固体NMR測定により評価した。各種組成で調製した粉碎物を水に分散して調製した懸濁液の粒子径を動的光散乱法で測定した。①-2：ピロキシカム (PXC)、PVP K12、SDSを重量比1:3:1で混合し、振動型ロッドミル、ボールミルで粉碎することにより混合粉碎物を調製した。具体的には、物理的混合物 (PM) を振動型ロッドミル (CMT社製 TI-200型) を用いて一定時間粉碎し、GM-Rを調製した。また、PMと直径10 mmのボール10個を容量50 mLの1級アルミナ製粉碎ジャーに入れ、遊星ボールミル (Retsch社製 PM100) により回転速度400 rpmで一定時間粉碎し、GM-B1を調製した。同様に、PMと直径20 mmのボール2個を容量50 mLの1級アルミナ製粉碎ジャーに入れ、ボールミルにより回転速度200 rpmで一定時間粉碎し、GM-B2を調製した。皮膚透過性試験は、ヘアレスマウス背部摘出皮膚をフランツセルのレセプター相とドナー相の間に装着した。レセプター相には、pH 7.4のPBSを使用し、ヘリックスの回転速度は650 rpm、実験温度は32°Cに保持した。あらかじめPBSで皮膚を1時間水和させ、薬物濃度として3 mg/mLとなるように試料を0.1M酢酸緩衝液 (pH4.5) に分散させ、10分間超音波処理をした懸濁液1.0 mLをドナー相に適用し、適用時点を0時間とした。適用直後、フランツセルのサンプリングポートから注射筒で試料溶

液を1.0 mL採取し、同時に同量のPBSを補充した。その後、同様に1、2、3、4、5、6、7、8、22及び24時間後にサンプリングを行った。採取した試料溶液は、HPLCを用いて定量し、薬物の皮膚透過量を求めた。①-3: Probuco、PVP K12、SDSを重量比1:3:1で混合し、振動型ロッドミルで粉碎することにより混合粉碎物を調製した。この懸濁試料について懸濁状態NMR測定を行った。①-4: プレドニゾロン (PSL) /PEG/SDSをメタノールに溶解させ、得られた溶液を超臨界二酸化炭素中に噴霧することにより、Aerosol Solvent Extraction System (ASES) 処理物を得た。さらに、PEGの分子量、試料溶液の組成及び各種装置パラメータを変化させ、実験条件が微粒子形成に与える影響について検討を行った。また、超臨界条件はすべての系において8.0MPa、35°Cの一定条件で行った。得られた試料は水中に分散させた後、レーザー回折法及び動的散乱法によりPSLの粒度分布測定を行った。

②薬物のアンホテリシンB (AmB)、アスコルビン酸誘導体とPEG脂質誘導体を混合し有機溶媒に溶解を溶媒を除去して薄膜を作成する。これを水で水和することでナノ微粒子を調製する。

③メフェナム酸(MFA)を、ポリマー担体としてEUDRAGIT® EPO(EPO)を用いて、低温混合粉碎処理(-180°C)することにより固体分散体(低温混合粉碎物; cryo-GM)を調製した。これを0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に分散し、過飽和溶液を調製した。得られた固体分散体及び過飽和溶液の物性は粉末X線回折(PXRD)測定、溶出試験法及び核磁気共鳴(NMR)法を用いて評価した。

4. 研究成果

①-1: 鎖長の長い界面活性剤を用いることで少ない添加量で200nm以下のナノ微粒子形成が確認された。水に分散後の薬物ナノ微粒子形成には、溶液中でのProbucoとPVP間の相互作用に加えてPVPと界面活性剤の複合構造が大きく関与していることが今回の検討で明らかとなった。①-2: 異なる粉碎方法で調製したPXC微粒子の平均粒子径及び緩衝液中における安定性について検討したところ、GM-R、GM-B1、GM-B2の緩衝液中における平均粒子径はそれぞれ約23 nm、173 nm、2.1 µmであり、24時間保存後も粒子サイズに変化は認められなかった。皮膚透過性試験の結果、PMと比較し、GM-R、GM-B1、GM-B2の8時間後の皮膚透過量はいずれも有意に増加した。特に平均粒子径が約23 nmのGM-Rでは、他のサンプルと比較し初期段階における皮膚透過量の増加が認めら

れた。また皮膚透過速度(Flux)を算出したところ、PXC単独のFluxは0.25 µg/cm²/h、PMのFluxは0.58 µg/cm²/hであるのに対し、混合粉碎物のFluxは0.90-1.07 µg/cm²/hとPXC単独の約3.6倍、PMの約1.6倍以上のFluxの値を示した。この結果から、3成分混合粉碎処理により薬物のFluxは改善されることが示された。①-3: 調製した試料の緩衝液中における平均粒子径は、動的散乱法で評価したところ約150nmで、cryoSEM測定によって観察されたサイズに近い値であった。懸濁液の溶液NMR測定では、PVPとSDSの相互作用が観察されたものの、Probuco由来のピークは観察されなかった。懸濁状態NMR測定を行った結果、PBC結晶の存在が確認された。また、懸濁液を凍結乾燥した試料の固体NMR測定と再懸濁した試料の粒子径測定によりProbucoナノ結晶の存在が確認された。このように溶液状態、懸濁状態、固体状態のNMR測定を併用して評価することでナノ微粒子や溶解している成分の分子状態を評価可能であることが明らかになった。①-4: 有機溶媒と超臨界二酸化炭素を用いた3成分のナノ微粒子化でも、溶媒に対する各成分の溶解性が薬物のナノ微粒子化に影響することが明らかとなった。混合比0.5:3:1、試料溶液濃度0.5w/v%に調整した場合に平均粒子径230nmのPSLナノ微粒子が得られた。さらに、混合比0.5:3:1の系において試料溶液濃度を0.3-0.8w/v%に変化させてASES処理を行った結果、得られたPSLの粒子径は0.5w/v%の時に最小値を示した。このことから、試料溶液濃度はASES法による微粒子調製において重要なパラメータであることが示された。

②AmB 封入ナノ微粒子について粒度分布測定を行ったところ、5% AmB 封入ナノ微粒子(5%AmB 微粒子)及び 10%AmB 微粒子の平均粒子径は、それぞれ 124nm 及び 170nm であった。各微粒子とも水に分散後 24 時間安定に存在した。次に、液中AFM 及び Freeze Fracture-TEM を用いて各ナノ微粒子の構造を検討した結果、5% AmB 微粒子は扁平やシート状等の様々な形態が観察され軟らかい構造であったのに対し、10%AmB 微粒子は、ASC-DP/DSPE-PEG 複合体からなる堅いコアの集合体であった。これら各微粒子について、牛胎児血清(FBS)を含有する緩衝液中での安定性を評価した結果、5%AmB 微粒子においては分散直後に凝集を引き起こした一方、10%AmB 微粒子においては15 時間インキュベーション後においても、安定に存在するのが認められた。さらに、マウスを用いた in vivo における AmB の血

中滞留性を評価した結果においても、10%AmB微粒子は市販のAmB製剤であるFungizone®と比較し高い血中滞留性を示したが、5%AmB微粒子は、血中滞留性の低下が観察された。

③溶出試験の結果、MFA intact は試験開始後約30分でその溶解度(2.2 μ g/mL, 37.0 $^{\circ}$ C)に達し、PMは試験開始後から徐々に薬物放出が認められ、3時間後に160 μ g/mLの濃度となった。一方、cryo-GMは試験開始直後から急速な薬物放出が起こり、1時間後にほぼ100%の薬物が溶出し、MFAの溶解度の230倍近い澄明な過飽和溶液の形成が観察された。この過飽和溶液は室温で安定だった。以上の結果より、MFAはEPOとの固体分散体形成により溶解性が格段に改善され、得られる過飽和溶液は安定であることが示された。PXRD測定及び固体NMR測定の結果、MFAはcryo-GM中において、ポリマーマトリックス中に単分散に近い状態で存在していると考えられた。スピン-格子緩和時間(T_1)測定の結果、固体分散体中における $^{13}\text{C}-T_1$ は処理前と比較してMFAでは短く、EPOでは長くなることが観察された。また、過飽和溶液中における $^1\text{H}-T_1$ は単独で溶解した場合と比較して、MFAでは短く、EPOでは長くなることが観察された。一般に、スピン系のエネルギーは磁場格子との交換が起きる前にスピン拡散によって核間を伝搬するため、核同士が空間的に十分近接している場合、 T_1 は単一の値を示すとされている。 T_1 測定の結果から、固体状態及び溶液状態においてMFAはEPOと分子レベルの相互作用を形成していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件) <すべて査読有>

- (1) J. Zhang, K. Higashi, W. Limwikrant, K. Moribe, K. Yamamoto, Molecular-level characterization of probucol nanocrystal in water by in situ solid-state NMR spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 423, 571-576 (2012).
- (2) K. Moribe, W. Limwikrant, K. Higashi, K. Yamamoto, Structural evaluation of probucol nanoparticles in water by atomic force microscopy. *Int. J. Pharm.* 427, 365-371 (2012).
- (3) T. Kojima, K. Higashi, T. Suzuki, K. Tomono, K. Moribe, K. Yamamoto, Stabilization of a Supersaturated Solution of Mefenamic Acid from a Solid Dispersion with EUDRAGIT®

EPO. *Pharm. Res.* 2012 Jan 5. [Epub ahead of print]

- (4) K. Higashi, S. Ideura, H. Waraya, K. Moribe, K. Yamamoto, Structural evaluation of crystalline ternary γ -cyclodextrin complex. *J. Pharm. Sci.*, 100, 325-333 (2011).
- (5) K. Moribe, M. Masaki, R. Kinoshita, J. Zhang, W. Limwikrant, K. Higashi, Y. Tozuka, T. Oguchi, K. Yamamoto, Guest molecular size-dependent inclusion complexation of parabens with cholic acid by cogrinding. *Int. J. Pharm.* 420, 191-197 (2011).
- (6) J. Zhang, Y. Tozuka, H. Uchiyama, K. Higashi, K. Moribe, H. Takeuchi, K. Yamamoto, NMR investigation of a novel excipient, α -glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Sci.* 100, 4421-4431 (2011).
- (7) K. Moribe, S. Maruyama, Y. Inoue, T. Suzuki, T. Fukami, K. Tomono, K. Higashi, Y. Tozuka, K. Yamamoto, Ascorbyl dipalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs. *Int. J. Pharm.*, 387, 236-243 (2010).
- (8) K. Moribe, M. Shibata, T. Furuishi, K. Higashi, K. Tomono, K. Yamamoto, Effect of particle size on skin permeation and retention of piroxicam in aqueous suspension. *Chem. Pharm. Bull.*, 58, 1096-1099 (2010).
- (9) K. Higashi, S. Ideura, H. Waraya, W. Limwikrant, K. Moribe, K. Yamamoto, Simultaneous dissolution of naproxen and flurbiprofen from a novel ternary gamma-cyclodextrin complex. *Chem. Pharm. Bull.*, 58, 769-772 (2010).
- (10) K. Higashi, Y. Tozuka, K. Moribe, K. Yamamoto, alicyclic acid/ γ -cyclodextrin 2:1 and 4:1 complex formation by sealed-heating method. *J. Pharm. Sci.*, 99, 4192-4200 (2010).
- (11) C. Wanawongthai, A. Pongpeerapat, K. Higashi, Y. Tozuka, K. Moribe, K. Yamamoto: Nanoparticle formation from probucol/PVP/sodium alkyl sulfate co-ground mixture. *Int. J. Pharm.*, 376, 169-75 (2009).
- (12) K. Moribe, M. Fukino, Y. Tozuka, K. Higashi, K. Yamamoto: Prednisolone multicomponent nanoparticle preparation by aerosol solvent

- extraction system. *Int. J. Pharm.* 380, 201-205 (2009).
- (13) W. Limwikrant, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe: Characterization of ofloxacin-oxalic acid complex by PXRD, NMR, and THz spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 382, 50-55 (2009).

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 森部久仁一、溶液中での薬物及び添加剤の物性評価、日本薬剤学会 経口吸収フォーカスグループ第 2 回会宿討論会、京都、(2011/9/6).
- (2) K. Moribe, Physicochemical characterization of drug nanoparticles in solid and suspended states. *Particulate Processes in the Pharmaceutical Industry III*. 44, Goldcoast, Australia (2011/7/27).
- (3) K. Moribe, T. Kojima, K. Higashi, T. Suzuki, K. Tomono., K. Yamamoto. Structural investigation of supersaturated solution from solid dispersion of mefenamic acid and Eudragit EPO. *International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products*. P11, Kobe, Japan, (2011/7/1).
- (4) 森部久仁一、AFM 測定による製剤のナノ構造評価、日本薬剤学会第 26 年会、シンポジウム「界面化学で理解する経口吸収」、36、東京、(2011/5/29) .
- (5) K. Moribe, W. Limwikrant, K. Higashi, K. Yamamoto. Structural evaluation of probucol nano suspension by AFM. *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference 2011*. BO-005, Kyoto, Japan (2011/5/24).
- (6) 森部久仁一、くすりの溶解について、日本薬剤学会 経口吸収フォーカスグループ第 1 回会宿討論会、沼津、(2011/2/15) .
- (7) K. Moribe, A. Ogino, K. Higashi, K. Yamamoto: Evaluation of Drug Nanoparticles in Aqueous Solution by AFM Image and Force Curve Analysis. *FIP Pharmaceutical Sciences 2010 World Congress*, New Orleans, M1329, LA, USA, (2010/11/15).
- (8) 森部久仁一, 壬生総子, 齋藤謙悟, 東頭二郎, 白澤浩, 山本恵司、アスコルビン酸誘導体/DSPE-PEG ナノ微粒子の構造評価及び細胞障害性、第 26 回日本 DDS 学会 2-B-23、大阪、(2010/6/18) .

- (9) K. Moribe, S. Maruyama, K. Higashi, K. Yamamoto: Ascorbyl dipalmitate/DSPE-PEG nanoparticulate system as a novel drug delivery carrier. 2009 American Association Pharmaceutical Sciences Annual Meeting and Exposition, W4246, Los angles, California, USA, (2009/11/11).
- (10) K. Higashi, H. Waraya, K. Moribe, K. Yamamoto: A Novel Complex Formation of salicylic acid and γ -cyclodextrin-polypseudorotaxane. *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009*, 95 Fukuoka, Japan (2009/10/17).
- (11) K. Moribe, A. Ogino, K. Higashi, K. Yamamoto: Physicochemical characterization of phenytoin derivative nanoparticles prepared by cogrinding. *Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009*, 71, Fukuoka, Japan (2009/10/17).
- (12) S. Maruyama, K. Moribe, T. Suzuki, K. Tomono, K. Higashi, K. Yamamoto: Drug-loaded ascorbyl dipalmitate/DSPE-PEG nanoparticulate system, 11th International Symposium on Microencapsulation, 11, Naogyu, Japan (2009/9/30).

[その他]

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/seizai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森部 久仁一 (MORIBE KUNIKAZU)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：50266350

(2) 研究分担者

山本 恵司 (YAMAMOTO KEIJI)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：50110341

東 頭二郎 (HIGASHI KENJIROU)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：40451760