

令和 6 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：2021～2023

課題番号：21K06509

研究課題名（和文）Suspended-state NMRによる薬物ナノ非晶質の固液界面構造評価

研究課題名（英文）Structural evaluation of solid-liquid interface of drug nanoamorphous by suspended-state NMR

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：環状ペプチドであるシクロスポリンA（CyA）と安定化剤であるポロキサマーP407（P407）からなる懸濁液中のCyA非晶質ナノ粒子の構造及び分子状態を各種分析法により評価した。そして、非晶質ナノ粒子と結晶ナノ粒子の固液界面に存在するP407の分子状態の違いをsuspended-state NMRにより評価可能であることを示した。また、非晶質ナノ粒子ではP407は固液界面のみならず粒子内部にも含まれていることを明らかとした。さらに、本非晶質ナノ粒子は非古典的結晶化理論であるoriented attachmentにより結晶ナノ懸濁液に変化することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、薬物非晶質ナノ粒子と薬物結晶ナノ粒子の固液界面に存在する界面活性剤の分子状態の違いをsuspended-state NMRにより評価可能であることを示した。また、本研究で観察されたoriented attachmentは、医薬品を問わず有機化合物で観察された報告は皆無であり、CyAなどの中分子薬物ではナノ非晶質の不安定化が従来の低分子薬物のものとは異なるメカニズムで起きる可能性を見出した。本研究から得られた知見は、薬物の製剤化技術として注目を集めているナノ非晶質懸濁液の処方設計効率化・最適化に向けた有用な指針になると期待される。

研究成果の概要（英文）：The structure and molecular state of CyA amorphous nanoparticles in a suspension consisting of a cyclic peptide cyclosporine A (CyA) and a stabilizer poloxamer P407 (P407) were investigated using various analytical methods. Suspended-state NMR could evaluate the difference in the molecular state of the P407 at the solid-liquid interface between amorphous and crystalline drug nanoparticles. It was revealed that P407 was incorporated not only at the solid-liquid interface but also inside the particle. Furthermore, it was found that the amorphous nanoparticles transformed into a crystalline nanoparticles through oriented attachment, which is a non-classical crystallization theory.

研究分野：物理薬剤学

キーワード：非晶質 ナノ粒子 吸収性 安定性 難水溶性薬物 NMR cryo-TEM

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、薬物を非晶質状態でナノレベルまで微細化する「薬物ナノ非晶質」が薬物経口吸収性を理論上最大化する新しい手法として注目されている。薬物ナノ非晶質の最終投与あるいは体内投与後の形態は、薬物ナノ非晶質が水に分散した「薬物ナノ非晶質懸濁液」である。懸濁液中の薬物ナノ粒子は、その固液界面が水分散安定化剤で被覆され、コア部は主に非晶質薬物相から形成されると提唱されている。しかし、懸濁液中の薬物ナノ非晶質の構造を実験的に評価した報告は数えるのみであり、特に界面構造を分子レベルで評価した報告は研究代表者らのものを含め数例に限られていた。

2. 研究の目的

薬物ナノ非晶質懸濁液の調製に成功した報告自体が少ないが、この理由の一つとして、良好な薬物ナノ非晶質の水分散安定性を実現する界面構造が見出せていないことが挙げられる。「どのような界面構造が薬物ナノ非晶質の水分散安定化に最適か？」という問いに対する答えが得られれば、薬物ナノ非晶質懸濁液調製の効率化・最適化に向けた処方指針が示せる。近年の分析技術の発展を背景に、懸濁液を直接評価できる様々な分析法(分光法、顕微鏡法、X線法、熱分析法)が開発されてきた。研究代表者らは suspended-state NMR 法を独自で製剤分野へ応用し、本手法が各種ナノ懸濁液を分子レベルで評価できる有用な手法であることを示してきた。本研究ではこの suspended-state NMR 法を中心とした各種分析法を用いて、懸濁液中の薬物ナノ非晶質と水の固液界面構造を分子レベルで評価し、薬物ナノ非晶質の水分散安定化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

モデル薬物として環状ペプチドであるシクロスポリン A (CyA)及び安定化剤としてポリエチレンオキシド(PEO) - ポリプロピレンオキシド(PPO)-PEO からなる ABA タイプのトリブロックコポリマーである poloxamer 407(P407)を用いた。P407 溶液(50 mg/mL)に非晶質の CyA を 100 mg/mL となるように分散させ、物理的混合物 (PM) 懸濁液を得た。この PM 懸濁液を湿式ビーズミル(アシザワファインテック社製 DVT15)で湿式粉碎することで、粉碎混合物 (GM) 懸濁液を得た。Suspended-state NMR は、JNM-ECX-400 NMR 分光計 (9.39 T; JEOL)を使用し、懸濁液を 4 mm 固体 NMR サンプル管に封入し、マジックアングルスピニング (MAS) 速度 5 kHz で実施した。

4. 研究成果

(1) CyA 非晶質ナノ粒子及び結晶性非晶質ナノ粒子の評価

はじめに、調製直後の GM 懸濁液について評価を行った (Fig. 1)。DLS により粒子径を評価したところ、平均粒子径約 370 nm を示す幅広い粒子径分布が認められた。Cryo-TEM 像では、不規則な形状を示すコントラストの低い粒子が観察された。AFM 像では、50 nm 程度の一次粒子が凝集して二次粒子を形成している様子が観察された。この GM 懸濁液を凍結乾燥した試料について粉末 X 線回折及び固体 ^{13}C NMR 測定を実施した結果、ナノ懸濁液中において CyA は非晶質で存在することが示された。以上の結果より、調製直後の GM 懸濁液では、CyA 非晶質ナノ粒子 (二次粒子) が形成されていることが示された。

次に、GM 懸濁液を 25 °C で 1 ヶ月保存した試料を評価した (Fig. 2)。DLS 測定の結果、平均粒子径約 200 nm を示す、狭い粒子径分布が認められた。Cryo-TEM 測定の結果、ナノ粒子形状は角張った一次粒子であり、そのコントラストは高かった。この GM 懸濁液を凍結乾燥した試料について粉末 X 線回折及び固体 ^{13}C NMR 測定を実施した結果、ナノ懸濁液中において CyA は非晶質で存在することが示された。報告されている CyA 結晶構造データに基づいて幾何学計算と 3D モデリングを行い、cryo-TEM で観察された粒子のフィッティング解析を行った。その結果、CyA ナノ結晶は、角切り斜方錐状双錐体の結晶形状を持つ単結晶であることが示唆された。

上記の結果より、CyA 非晶質ナノ懸濁液では 50 nm 程度の一次粒子が凝集した二次粒子(370 nm)を形成しており、この懸濁液を保存すると 200 nm 程度の CyA 単結晶へ変化することが示された。

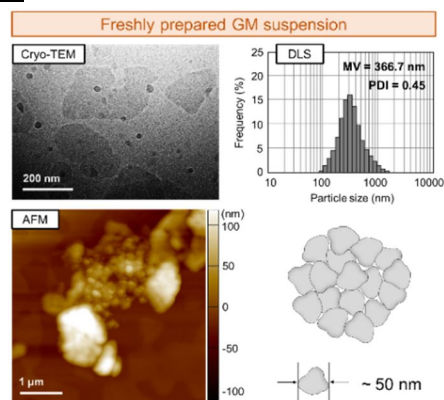


Figure 1. Cryo-TEM image, AFM image, and particle size distribution of the freshly prepared GM suspension.

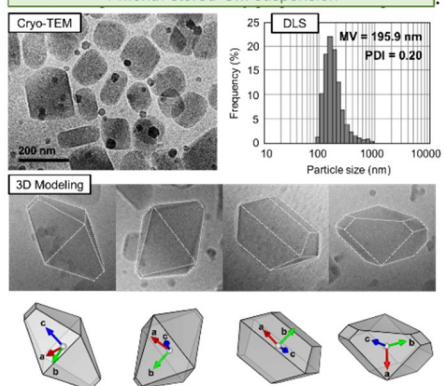


Figure 2. Cryo-TEM image and particle size distribution pattern of the 1 month-stored GM suspension. The particle morphology is illustrated by 3D modeling.

次に、調製直後の CyA 非晶質ナノ懸濁液と保存後の CyA 結晶ナノ懸濁液について、suspended-state NMR を用いてその分子状態評価を行った。Fig.3 には、運動性の低い成分が強調して観察される CP/MAS 測定の結果を示す。CyA 非晶質ナノ懸濁液及び CyA 結晶ナノ懸濁液中の CyA のピークは、それぞれ CyA 非晶質及び CyA 結晶のピークと一致し、それぞれの分子状態を反映した結果が得られた。P407 のピークは、両試料のスペクトルで観察され、これは固液界面に存在する P407 に由来すると考えられ、両ナノ粒子の分散安定化に寄与しているものと考察した。また、CyA 非晶質懸濁液では、CyA 結晶懸濁液では観察されなかったピークも認められた。各種検討の結果より、本ピークは CyA ナノ非晶質粒子内部の P407 であり、一次粒子の凝集によって P407 が取り込まれた結果と考察された。以上の結果より、suspended-state NMR 法を用いることで、薬物ナノ懸濁液中の薬物及び安定化剤の状態を分子レベルで評価可能であり、薬物ナノ非晶質懸濁液の構造評価法としての suspended-state NMR 法の有用性が示された。

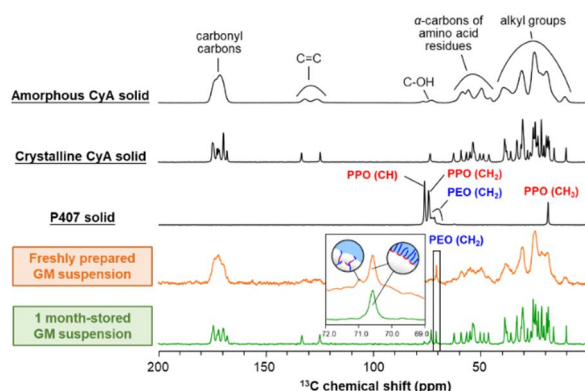


Figure 3. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of the freshly prepared and 1 month-stored GM suspension.

(2) 保存による懸濁液中の CyA 非晶質の結晶化評価

懸濁液中の非晶質 CyA ナノ粒子から結晶質 CyA ナノ粒子へのサイズ減少を伴う特異的な構造変化メカニズムを評価するために、各保存時間において cryo-TEM 測定を行った(Fig.4)。40 時間保存までは、保存前と同様の cryo-TEM 像が観察された。一方、48 時間保存後では、粒子内部にコントラストの高い菱形様の形状が認められ、非晶質ナノ粒子内部での部分的な CyA 結晶化が示された。52 時間保存すると、ほぼ全ての CyA が結晶化し、約 50 nm 前後の一次粒子を形成する様子が観察された。また、この CyA 結晶は一定の規則性を持って配列したメソ集合体を形成した。56 時間の保存時点では、一時粒子径約 100 nm のナノ結晶が集合したメソ集合体が観察され、保存による CyA 一次粒子サイズ増加が示された。60 時間保存後ではほぼすべての粒子が、1 ヶ月保存した GM 懸濁液で観察された 200 nm 程度の CyA 単結晶に変化した。興味深いことに、一部の粒子では 2 つのナノ結晶が融合している像が観察された。

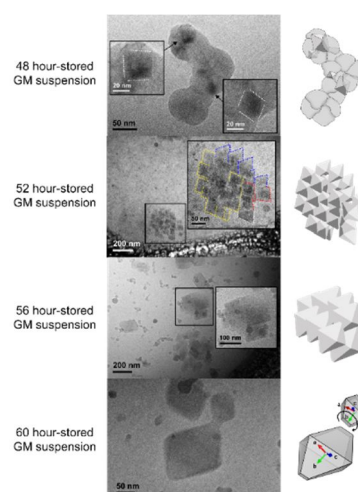


Figure 4. Time-resolved cryo-TEM measurements of the GM suspension upon storage at 25 °C.

過去の論文と照らし合わせた結果、上記で観察された事象は非古典的結晶学理論の一つである oriented attachment と一致することが示された。Oriented attachment は、複数のナノ結晶同士が近づく際に結晶格子に沿って向きを変えて整列し(配向: orientation) 接触して合体する(接合: attachment)ことで、より大きな結晶へと成長する結晶化経路である。CyA ナノ非晶質を保存した場合には、2 つの CyA ナノ結晶が近づいて、同じ結晶面が向くように向きを変えて、その後接触して合体することで、より大きな CyA 結晶になったと考えられた (Fig. 5)。そして、この一連のプロセスが繰り返されることによって、メソ結晶が単結晶になったと考察した。

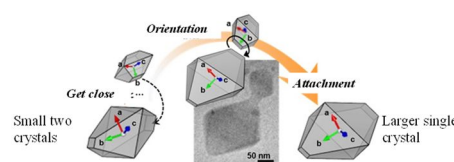


Figure 5. A schematic representation of oriented attachment observed in the CyA nanosuspension.

最後に、*in-situ* suspended-state NMR 測定により CyA 非晶質ナノ懸濁液の保存過程の変化を評価した。ここでは液相と固相を選択的に検出する PST/MAS 測定及び CP/MAS 測定をそれぞれ用いた。CP/MAS スペクトルでは、CyA のピークが主に観察された。保存前は CyA が非晶質として存在するが、16~24 時間の間に CyA の結晶化が進行し、40 時間経過後には CyA が結晶としてのみ存在することが示された。一方、PST/MAS スペクトルでは安定化剤である P407 のピークが主に観察された。16 時間付近からナノ粒子に吸着した P407 成分が減少し、溶液中で P407 ミセルを形成している P407 成分が増加した。これらの結果より、CyA 結晶化に伴い非晶質ナノ粒子に吸着していた P407 が水相に放出されたことが示唆された。上記で示したように、*in-situ* suspended-state NMR 測定により、懸濁ナノ粒子中の薬物結晶化挙動を分子レベルで観察することに成功した。これまでに非晶質ナノ粒子の水分散安定化メカニズムを検討した報告は数えるのみであり、本成果は安定な非晶質ナノ粒子製剤設計に重要な知見をもたらすと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Chen Ziqiao, Higashi Kenjiro, Ueda Keisuke, Moribe Kunikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Multistep Crystallization of Pharmaceutical Amorphous Nanoparticles via a Cognate Pathway of Oriented Attachment: Direct Evidence of Nonclassical Crystallization for Organic Molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 6841 ~ 6846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.2c01608	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 Liu Mengyao, Higashi Kenjiro, Ueda Keisuke, Moribe Kunikazu	4. 巻 637
2. 論文標題 Supersaturation maintenance of carvedilol and chlorthalidone by cyclodextrin derivatives: Pronounced crystallization inhibition ability of methylated cyclodextrin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 122876 ~ 122876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2023.122876	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 Ma Xiaohan, Higashi Kenjiro, Fukuzawa Kaori, Ueda Keisuke, Kadota Kazunori, Tozuka Yuichi, Yonemochi Etsuo, Moribe Kunikazu	4. 巻 615
2. 論文標題 Computational approach to elucidate the formation and stabilization mechanism of amorphous formulation using molecular dynamics simulation and fragment molecular orbital calculation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 121477 ~ 121477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2022.121477	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 Ziqiao Chen, Kenjiro Higashi, Keisuke Ueda, Kunikazu Moribe	4. 巻 19
2. 論文標題 Transition from Amorphous Cyclosporin A Nanoparticles to Size-Reduced Stable Nanocrystals in a Poloxamer 407 Solution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 188-199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00721	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 Zhijing Zhao, Kenjiro Higashi, Keisuke Ueda, Kunikazu Moribe	4. 巻 607
2. 論文標題 Revealing the mechanism of morphological variation of amorphous drug nanoparticles formed by aqueous dispersion of ternary solid dispersion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 120984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2021.120984	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 東 顕二郎
2. 発表標題 薬物の溶解性・吸収性を改善する医薬品製剤の評価
3. 学会等名 第69回固体NMR・材料フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 東 顕二郎 (共著)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 676
3. 書名 NMRによる有機材料分析とその試料前処理、データ解析	

〔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	植田 圭祐 (Ueda Keisuke) (40755972)	千葉大学・大学院薬学研究院・助教 (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	森部 久仁一 (Moribe Kunikazu) (50266350)	千葉大学・大学院薬学研究院・教授 (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