

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590045

研究課題名(和文) 運動性・拡散性を指標とした難溶性薬物の過飽和溶液構造の評価及び膜透過性との関連

研究課題名(英文) Structure of supersaturated solution of poorly water-soluble drug indexed by mobility and diffusibility and the correlation with membrane permeability

研究代表者

森部 久仁一 (Moribe, Kunikazu)

千葉大学・薬学研究科(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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：HPMC-ASによる薬物結晶化抑制作用はHPMC-ASのサクシノイル基の割合の減少に伴い強くなった。NMR測定により、薬物/HPMC-AS溶液中において薬物の分子運動性が抑制され、薬物及びHPMC-AS間で疎水性相互作用が形成していることが明らかとなった。Saturation transfer difference(STD)-NMR測定よりHPMC-ASの各種置換基との薬物の相互作用の強さは、アセチル基において最も強く、サクシノイル基では弱いことが示された。NMRから解析された薬物とHPMC-ASとの分子間相互作用は、HPMC-ASの薬物結晶化抑制作用との間で相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：The decrease of the substituent ratio of succinoyl group in HPMC-AS promoted the inhibition effect of drug crystallization. NMR measurements revealed that HPMC-AS suppressed the molecular mobility of drug and formed the hydrophobic interaction with drug. The molecular interaction between drug and HPMC-AS was strongest in acetyl group and weakest in succinoyl group of HPMC-AS, indicated by saturation transfer difference (STD)-NMR measurements. The molecular interaction between drug and HPMC-AS revealed by NMR measurement showed good correlation with the inhibitory effect of drug crystallization.

研究分野：製剤学

キーワード：固体分散体 過飽和

## 1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品開発において新規候補化合物の多くが難水溶性であり、経口投与製剤として用いるにはその溶解性を改善することが必要である。薬物の溶解性を改善する有効な手段として、薬物の非晶質化が注目されている。非晶質は結晶と異なり、分子の三次元配列に一定の規則性を持たず、結晶よりもエネルギー的に高い状態にあるため溶解性に優れている。しかし、非晶質薬物を用いて溶解度以上の高い薬物濃度を示す過飽和溶液が一時的に形成されたとしても、その後、過飽和溶液からの薬物の結晶化が起これば、非晶質薬物により形成された過飽和状態は短時間しか維持されない。そこで薬物をポリマーマトリクス中に非晶質状態で分散させた固体分散体が非晶質薬物の安定性を改善する手段として研究されており、hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)、polyvinylpyrrolidone (PVP)、methacrylate copolymer、hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMC-AS)などのポリマーが薬物過飽和状態の安定性を向上させることが報告されている。しかし、各種ポリマーによる薬物溶解性改善メカニズムや、ポリマー溶液中における薬物分子状態及びポリマーが薬物の膜透過性に及ぼす影響などに関しては不明な点が多く、十分な研究がなされていない。そのため、経口での薬物吸収性改善を目的とした固体分散体制剤設計はトライ&エラーの状況であり、分子レベルでの物性評価を通じた溶解性改善メカニズムや薬物分子状態の解明が求められている。

## 2. 研究の目的

(1) 溶解性改善機構が薬物の膜透過性に及ぼす影響について検討を行った。難水溶性モデル薬物と HPMC-AS を用いた固体分散体を調製し溶出試験によりその溶解性改善能を評価した。また、薬物過飽和溶液からの薬物の膜透過を、Caco-2 単層膜を用いて評価した。Caco-2 単層膜を形成する細胞へのポリマーの影響を考慮するため、Caco-2 膜透過実験に加えて、透析膜を用いた透過実験を行った。また、薬物の可溶化作用を示すことが報告されている Poloxamer 407 (Poloxamer)を用いて薬物/Poloxamer 可溶化溶液を調製し、比較検討を行った。これらの実験結果から、薬物の溶解性改善機構及び薬物膜透過性との関係性を考察した。

(2) ポリマーの官能基が薬物の過飽和状態形成に影響を及ぼすことが報告されており、本研究においても HPMC-AS に関して官能基の割合を変化させた際の各種物性評価を行った。ここでは HPMC-AS 中のアセチル基及びサクシノイル基の割合を変化させ、HPMC-AS による薬物結晶化抑制作用及び HPMC-AS との固体分散体からの薬物溶出速度を評価し

た。各種 HPMC-AS による薬物結晶化抑制能及び薬物/HPMC-AS 固体分散体からの薬物溶出速度の比較から、固体分散体制剤に用いる適切な HPMC-AS 選択について考察した。

(3) 過飽和溶液中からの薬物結晶化抑制に関わる薬物/HPMC-AS 間の分子間相互作用について検討した。分子状態の評価をしては、薬物及び HPMC-AS の濃度を变化させ、 $1D\text{-}^1\text{H}$  NMR スペクトルの比較を行った。さらに、薬物及び HPMC-AS 間の分子間相互作用を NOESY 測定や STD-NMR 測定により直接評価した。そして、薬物及び HPMC-AS 間の分子間相互作用の強さと薬物結晶化抑制作用の関連性について考察した。

## 3. 研究の方法

(1) 難水溶性薬物として Carbamazepine (CBZ) を用いて実験を行った。薬物及びポリマー担体を適当な質量比で、ポルテックスミキサーを用いて 3 分間ガラスバイアル内で混合することにより、物理的混合物(Physical mixture; PM)を調製した。PM を 3%(w/v)でジクロロメタンに溶解し、ヤマト科学株式会社製スプレードライヤ ADL311S を用いて 70 にて噴霧乾燥を行い、噴霧乾燥物 (Spray-dried powder; SPD)を得た。各種試料に関して MiniFlex II (リガク株式会社)を用いて粉末 X 線回折測定を行い薬物の結晶状態を評価した。第 16 改正日本薬局方一般試験法の溶出試験法(パドル法)に基づき、Hanks' balanced salt solution (HBSS, 10 mM HEPES 含有, pH7.4)中における薬物の溶出試験を行った。Caco-2 細胞をコラーゲンコーティングを行った Transwell<sup>®</sup> プレート(0.4  $\mu\text{m}$  polyester membranes)に細胞濃度 100,000 cells/cm<sup>2</sup> で撒き CO<sub>2</sub> 濃度 5%下で 25 日以上培養を行った。Caco-2 単層膜の膜抵抗値が 500 $\Omega$  以上となったことを確認し、透過実験に用いた。1.5 mL の HBSS を Basal 側に入れ、Apical 側には 0.5 mL の試料溶液を加え経過時間ごとの Basal 側への薬物膜透過量を評価した。また、低分子化合物である CBZ (M.W. 263)とポリマーである HPMC-AS (M.W. 18,000)及び Poloxamer (M.W. 12,500)を分離する目的で、分画分子量 3,500-5,000 Da の透析膜を用いて透析膜透過実験を行った。3 mL の試料溶液を直径 10 mm 長さ 100 mm の cellulose ester 透析膜チューブ(Spectrum Laboratories)に入れ、空気が入らないように両サイドを閉じた。試料溶液が入った透析チューブを、スクロースを用いて試料溶液と同じ浸透圧に調整した HBSS 900 mL が入った溶出試験用のベッセルに入れ、37 において薬物の膜透過速度を評価した。

(2) メチル基、ヒドロキシプロピル基、アセチル基、およびサクシノイル基の割合の異なる HPMC-AS を用いて各種物性評価を行った。グルコースユニット当たりの濃度で 3 mM 及び 12 mM となるように各 HPMC-AS をリン酸

塩緩衝液中(0.05 M、pH 5.6-8.0)に溶解させ、ポリマー溶液を調製した。各種薬物を 100 mg/mL で溶解させた DMSO 溶液をポリマー溶液中に添加し、薬物過飽和溶液を調製した。37 °C の湯浴にて各過飽和溶液を 150 rpm で 1 日間振とうし、0.45 μm メンブレンフィルター濾過後の薬物濃度を HPLC を用いて定量し、各種ポリマーによる薬物結晶化抑制能を比較評価した。また難水溶性薬物として Nifedipine (NIF) を用いて固体分散体からの薬物溶出性に与える HPMC-AS の置換基比率の影響を評価した。NIF 及び各ポリマーを質量比 1:3 でジクロロメタン/メタノール = 1/1 (v/v) に溶解させた。この溶液をヤマト科学株式会社製スプレードライヤ ADL311S を用いて噴霧乾燥を行い SPD を得た。各種 SPD からの NIF 溶出速度を回転 disk 法を用いて評価した。100 mg の試料粉末を 20 MPa にて 3 分間、臼杵を用いて圧縮し、錠剤を調製した。錠剤径は 13 mm、錠剤厚さはすべて 1 mm 以下にて調製した。その後錠剤を回転バスケット法溶出試験用の棒の底面に両面テープを用いて貼り付け、溶出試験を行った。

(3) HPMC-AS 溶液中における薬物の分子状態および薬物/HPMC-AS 間の相互作用を溶液 NMR により解析した。各 HPMC-AS 溶液(0.05 M リン酸塩緩衝液、pH 6.8)を H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9/1, v/v)を用いて調製した。CBZ を DMSO-d<sub>6</sub> 溶液中に CBZ 濃度 10, 20, 及び 40 mg/mL にて溶解させた。各種 DMSO 溶液を HPMC-AS 溶液中に DMSO 濃度 2% (v/v) で添加し、NMR 試料とした。各種溶液に関して 37 °C において JEOL Resonance 社製 ECX-400 (9.39 T) を用いて 1D-<sup>1</sup>H NMR 測定を行った。基準物質には Trimethylsilyl propionate、溶媒の軽水ピークの除去には WATERGATE W5 シークエンスを用いた。また薬物/HPMC-AS 間の分子間相互作用を Nuclear Overhauser effect correlated spectroscopy (NOESY) にて Mixing time を 0.1 秒から 2.0 秒まで変化させて評価した。さらに詳細な分子間相互作用解析には Saturation transfer difference (STD)-NMR 測定を用いた。On resonance として HPMC-AS ピークの 2.12、3.57 ppm、及び CBZ ピークの 7.56 ppm を選択励起し、選択励起パルス幅 64 ms (ガウス型)、励起回数 5-80 回にて測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 粉末 X 線回折測定により、CBZ/HPMC-AS SPD 中の CBZ 非晶質化が確認された。CBZ/HPMC-AS SPD からの薬物溶解性を溶出試験により評価した結果、CBZ の溶解度と比較して約 3 倍の薬物濃度改善が認められ、薬物過飽和状態が 24 時間維持された。これは、薬物可溶化作用を示すことが報告されている Poloxamer と CBZ の PM を用いた場合と同様の結果であった。一方、CBZ/HPMC-AS PM では CBZ 単独結晶と比較して CBZ 濃度に改善が認められず、HPMC-AS は Poloxamer が

示す可溶化作用とは異なるメカニズムにより薬物の溶解性を改善していることが示唆された。CBZ が非晶質状態で分散している CBZ/HPMC-AS SPD 試料においてのみ CBZ の過飽和溶液が得られたことから、HPMC-AS における薬物の溶解性改善には薬物の非晶質化により薬物自身の溶解性が改善していることが必要であると考察した。つまり、HPMC-AS は非晶質薬物の溶解により形成された過飽和状態を、自身の薬物結晶化抑制作用により長時間維持したと推察された。各種 CBZ 溶液からの CBZ 膜透過性を Caco-2 細胞単層膜および透析膜を用いて評価した結果、CBZ/HPMC-AS SPD 溶液中では、溶出試験で認められた CBZ の溶解性改善を反映して CBZ の膜透過量が向上し、HPMC-AS は溶液中において CBZ の膜透過性を減少させることなく高い CBZ 濃度を維持していることが示された。一方、Poloxamer 溶液では CBZ の溶解量改善が認められたにもかかわらず、CBZ の膜透過量が CBZ 単独溶液とほぼ同等の値を示した。Poloxamer の薬物可溶化作用による溶解性改善においては、CBZ 分子が Poloxamer の形成するミセル中に封入されることで見かけの薬物溶解度が改善している。直接 Caco-2 膜を透過できる CBZ の溶解量が CBZ 単独溶液とほぼ同じため、CBZ の膜透過量が改善しなかったと考察した。

(2) 置換基比率の異なる HPMC-AS 溶液中における、1 日インキュベーション後の薬物過飽和維持能を比較した結果、HPMC-AS 中のサクシノイル基の割合の減少とともに過飽和維持能が増加し、薬物結晶化抑制作用は強くなった。一方、HPMC-AS 中のアセチル基の割合と結晶化抑制作用には相関は認められず、HPMC-AS による薬物結晶化抑制作用はサクシノイル基の割合に大きく依存することが示された。サクシノイル基の増加により HPMC-AS の親水性が増加し、疎水性である難水溶性薬物との親和性が弱まったため、薬物結晶化抑制作用が减弱したと推察した。続いて、各種 HPMC-AS 及び難水溶性薬物である NIF の固体分散体からの NIF 溶出速度を比較した結果、HPMC-AS 中のサクシノイル基の割合の増加に伴い NIF 溶出速度が増加し、一定の値に達した。一方で、アセチル基の割合と NIF の溶出速度には相関が認められなかった。電離可能なサクシノイル基の量に依存して HPMC-AS の溶出速度が増加し、固体分散体からの NIF 溶出速度が改善したと考察した。これらの結果から、HPMC-AS 中のサクシノイル基の割合は薬物結晶化抑制作用及び固体分散体からの薬物溶出速度に大きな影響を及ぼし、薬物結晶化抑制作用の増強と薬物溶出速度の向上は両立できないことが示された。

(3) 二種の HPMC-AS (AS-LF 及び AS-HF グレード) 溶液中における CBZ ピークを比較した結果 AS-HF 溶液中における CBZ ピークは AS-LF および薬物単独溶液中と比較してプロ

ード化していることが認められた。この結果より、AS-HF 溶液中において薬物の分子運動性が強く抑制されていることが示唆された。CBZ/AS-HF 溶液中における NOESY スペクトルにおいて薬物及び AS-HF 間に相関ピークが認められ、溶液中において CBZ 及び AS-HF は近接しており、分子間相互作用を形成していることが示唆された。一方、AS-LF 溶液中では薬物及び HPMC-AS 間に NOESY 相関ピークが認められず、AS-LF と CBZ 間の分子間相互作用は AS-HF と比較して弱いと考察した。CBZ/AS-HF 溶液中で CBZ ピークを選択励起し、STD-NMR 測定を行った結果、HPMC-AS 中のアセチル基プロトンにおいて最も強い STD ピークが認められ、HPMC-AS 中のサクシノイル基の STD ピーク強度は極めて小さくなった。STD ピーク強度は励起した CBZ ピークとの相互作用の強さに比例して増加することから、溶液中において CBZ は HPMC-AS 中のアセチル基と特に強く相互作用を形成していると推察した。また、HPMC-AS 励起時の STD-NMR スペクトルにおいて CBZ の芳香環プロトンの STD ピークが認められたため、溶液中において HPMC-AS は主に HPMC-AS 中のアセチル基を介して CBZ と疎水性相互作用を形成していると考察した。AS-LF と比較してアセチル基の割合が多くサクシノイル基の割合が少ない AS-HF は、より強い薬物結晶化抑制能を有することが確認されており、NMR 測定により認められた各種置換基ごとの薬物との分子間相互作用の強度差が、HPMC-AS の薬物結晶化抑制能に影響を及ぼしていることが示された。

#### 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 5 件) <すべて査読有>

1. K. Ueda, K. Higashi, M. Kataoka, S. Yamashita, K. Yamamoto, K. Moribe. Inhibition mechanism of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug crystallization in gastrointestinal fluid and drug permeability from a supersaturated solution. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 62, 293-300 (2014).
2. K. Ueda, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe. The effect of HPMCAS functional groups on drug crystallization from the supersaturated state and dissolution improvement. *Int. J. Pharm.*, 464 (1), 205-213 (2014).
3. K. Ueda, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe. Inhibitory effect of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug recrystallization from a supersaturated solution assessed using nuclear magnetic resonance measurements. *Mol. Pharm.*, 10(10), 3801-3811 (2013).
4. Y. Tozuka, K. Higashi, T. Morita, M.

Nishikawa, H. Uchiyama, J. Zhang, K. Moribe, K. Nishikawa, H. Takeuchi, K. Yamamoto. Transglycosylated rutin-specific non-surface-active nanostructure affects absorption enhancement of flurbiprofen. *Eur J Pharm Biopharm.*, 82, 120-126 (2012).

5. K. Ueda, K. Higashi, W. Limwikanant, S. Sekine, T. Horie, K. Yamamoto, K. Moribe. Mechanistic differences in permeation behavior of supersaturated and solubilized solutions of carbamazepine revealed by nuclear magnetic resonance measurements. *Mol. Pharm.*, 9, 3023-3033 (2012).

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 植田 圭祐, 東 顕二郎, 片岡 誠, 山下 伸二, 山本 恵司, 森部 久仁二, HPMC-AS の薬物結晶化抑制作用に及ぼす胆汁酸及び脂質の影響, 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015/3/28) .

2. 大塚 直哉, 植田 圭祐, 清水 梢, 片川 和明, 熊本 卓也, 東 顕二郎, 山本 恵司, 森部 久仁二, HPMC 及び PVP の薬物結晶化抑制機構の違いが膜透過性に及ぼす影響, 製剤機械技術学会第 24 回大会, 愛知(2014/10/8) .

3. 林大基, 東 顕二郎, 森部久仁二, 山本恵司, Phenytoin/Eudragit S100 固体分散体の物性と溶出挙動との関連, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京 (2013/10/26) .

4. 大塚 直哉, 植田 圭祐, 清水 梢, 片川 和明, 熊本 卓也, 東 顕二郎, 森部久仁二, 山本恵司, Phenytoin 過飽和溶液の Caco-2 細胞透過改善メカニズムの解明, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京 (2013/10/26) .

5. 大塚 直哉, 植田 圭祐, 清水 梢, 片川 和明, 熊本 卓也, 東 顕二郎, 森部久仁二, 山本恵司, 過飽和溶液中における HPMC 及び PVP によるフェニトイン誘導体結晶化抑制メカニズムの解明, 第 30 回製剤と粒子設計シンポジウム, 岐阜 (2013/10/17) .

6. 植田圭祐, 東顕二郎, 森部久仁二, 山本恵司, 置換基比率の異なる HPMC-AS による結晶化抑制作用の比較, 第 30 回製剤と粒子設計シンポジウム, 岐阜 (2013/10/17) .

7. 植田圭祐, 東顕二郎, 森部久仁二, 山本恵司, 過飽和溶液中での HPMC-AS による製剤機械技術学会第 24 回大会, 愛知(2014/10/8) ., 製剤機械技術学会第 23 回大会, 東京 (2013/10/10) .

8. K. Ueda, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe. Solution NMR study of permeation mechanism of carbamazepine from supersaturated and solubilized solution, The 5th Asian Arden Conference, Nagoya (2013/8/5) .

9. 森部 久仁二, 非晶質製剤及びナノ結晶製剤を利用した難溶性薬物の溶解性改善, 第 8 回ナノ製剤技術研究会, 京都 (2012/11/2) .

10. 植田圭祐, 東顕二郎, 森部久仁二, 山本恵司, 過飽和溶液中での HPMC-AS による Carbamazepine 結晶化抑制メカニズムの解明,

第 29 回製剤と粒子設計シンポジウム, 豊橋 (2012/10/25) .

11. 植田圭祐, Waree Limwikrant, 東 顕二郎, 森部久仁一, 山本恵司, <sup>1</sup>H-NMR による Carbamazepine/HPMC-AS 過飽和溶液中の薬物分子状態の解明, 日本薬剤学会第 27 年会, 愛知(2012/5/24)

〔図書〕(計 1 件)

1. 植田 圭祐, 東 顕二郎, 森部 久仁一, 各種ポリマーによる難水溶性薬物の溶解性改善機構の解明と製剤化への応用, 医薬ジャーナル(特集 実用可能な新しい製剤技術の進歩と将来展望), 81-86 (2014).

〔その他〕

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

## 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・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・名誉教授

研究者番号：50110341

東 顕二郎 (HIGASHI KENJIROU)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：40451760