

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15970

研究課題名（和文）「NMR緩和」二次元マップの作成による薬物ナノ分散液不安定化のメカニズム解明

研究課題名（英文）Nondestructive Investigation of the Agglomeration and Sedimentation Process for Nanosuspensions via NMR Relaxation of Water Molecules

研究代表者

岡田 康太郎 (Okada, Kotaro)

富山大学・薬学部・客員助教

研究者番号：70842962

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本申請研究では、薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子の物理化学的な安定性評価に注力し、含まれる薬物粒子の凝集および沈降挙動のモニタリングを試みた。検討では低磁場型の核磁気共鳴（NMR）装置を活用し、薬物ナノ懸濁液に含まれる水のT2緩和時間を測定した。その結果、保存時において、経時的なT2緩和時間の延長が観測され、薬物粒子の凝集および沈降をモニタリングできることが明らかとなった。本手法は水分子のT2緩和を観測対象とするため、薬物や安定化剤の種類に依存しない、汎用的な凝集および沈降の評価方法であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、固体状態である薬物粒子の物理化学的な安定性を評価する際に、薬物粒子を直接評価せず、媒体である水のT2緩和測定を通じて、薬物粒子の安定性を間接的に評価した点にある。水分子のT2緩和を観測対象とすることで、薬物の種類に依存しない、汎用的な薬物粒子の凝集および沈降の評価方法となる。

また、低磁場型のNMR装置を用いて、薬物ナノ懸濁液の安定性評価におけるT2緩和測定の有用性を示した点に、社会的意義がある。低磁場型のNMR装置は、永久磁石を有するベンチトップ型であるため、医薬品の製造プロセスにおける品質評価への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）： This study investigated an agglomeration and sedimentation of nanoparticles in a suspension using nuclear magnetic resonance (NMR) relaxation. The nanosuspension was prepared by wet bead milling using indomethacin and polyvinylpyrrolidone.

In this study, we focused on the water molecules, not nanoparticles, and obtained the T2 relaxation time (T2) of the water molecules using the low-field NMR instrument. During the storage period at 25 °C from 0 to 24 h, the T2 value rapidly increased at the beginning of the storage. After that, the rapid increase in T2 values slowed down at ca. 4 hours.

In a suspension system, because the T2 value of water molecules is known to reflect the surface area of the particle, the observed rapid increase in T2 value indicated an agglomeration of nanoparticles. Therefore, it was shown that the measurement of T2 relaxation of a nanosuspension could evaluate the agglomeration and sedimentation process.

研究分野：物理薬剤学

キーワード：NMR T2緩和時間 医薬品 ナノ粒子 凝集 沈降 懸濁液 低磁場NMR

1. 研究開始当初の背景

薬物ナノ懸濁液は、薬物粒子をナノメートルサイズまで微細化した医薬製剤であり、薬物の溶解性・吸収性を著しく向上させるため、次世代の製剤として期待されている。懸濁液は熱力学的に不安定であり、含まれるナノサイズの薬物粒子が凝集・沈降する挙動を迅速・非破壊に評価する手法が求められている。

永久磁石を有する低磁場核磁気共鳴 (NMR) 装置は、高磁場 NMR 装置のように化学構造の詳細な評価はできないが、ベンチトップ型である特徴を活かし、医薬品の製造における品質評価ツールとしての応用が期待されている。申請者はこれまでに低磁場 NMR 装置を用い、 T_1 および T_2 緩和時間の評価により固形製剤の結晶性を評価してきた (Okada et al., *J. Pharm. Sci.*, 108, 451-456 (2019) 他)。一方、液体製剤の評価について、メリーランド大学の Yu らにより、液中に含まれるタンパク質の凝集を T_2 緩和で評価できることが示されてきた (Taraban et al., *J. Pharm. Sci.*, 104, 4132-4141 (2015) 他)。しかしながら、 T_2 緩和の評価が、薬物ナノ懸濁液に適応できるかは明らかにされてこなかった。薬物ナノ懸濁液において、含まれる薬物粒子は固体状態で液中に分散しており、凝集・沈降といった物理化学的な安定性だけでなく、薬物粒子の結晶性も評価する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、低磁場 NMR 装置を用いた NMR 緩和の測定により、薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子が不安定化する挙動についてモニタリングすることを目的とした。当初、薬物ナノ懸濁液の NMR 緩和を測定することで、薬物粒子の不安定化挙動および結晶性の両方の評価を目指していたが、製造ロットによって薬物粒子の結晶性がばらつき、NMR 緩和の評価に供する十分な品質の試料を作成することができなかった。そのため、本研究では、薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子の物理化学的な安定性評価に注力し、凝集および沈降挙動のモニタリングを主目的とした。

3. 研究の方法

モデル薬物として非晶質インドメタシン (IMC) を 1% (w/w)、安定化剤としてポリビニルピロリドン (PVP) もしくはポロキサマー407 を 1% (w/w) 用い、それらを含む薬物ナノ懸濁液を、ジルコニアビーズ (0.5 mmφ) を用いた湿式ビーズミル粉碎にて作成した (Fig. 1)。非晶質 IMC は溶融急冷法にて作成され、媒体は水とした。

作成した薬物ナノ懸濁液の特性評価として、透過型電子顕微鏡法 (TEM) を用いた形態評価、動的光散乱法 (DLS) を用いた粒子径評価、さらに、薬物ナノ懸濁液を凍結乾燥した粉末について、粉末 X 線回折法 (PXRD) およびフーリエ変換赤外分光法 (FTIR) を用いた薬物粒子の結晶性評価を行った。

NMR の測定については、低磁場 NMR 装置 (minispec mq20 ; Bruker) を用い、作成した薬物ナノ懸濁液に含まれる水の ^1H T_2 緩和を、標準的な Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) パルスシーケンスにて測定した。得られた T_2 緩和の減衰について、式 1 へのフィッティングを行い、 T_2 緩和時間を算出した。

$$M(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (1)$$

併せて、薬物ナノ懸濁液における 870 nm の透過光強度について、溶液安定性評価装置 (スタビリティテスター-ST-1 ; 英弘精機) を用いて評価した。

4. 研究成果

研究成果は以下の二つに分けられる。 T_2 緩和時間の測定による薬物粒子の (1) 凝集評価および (2) 沈降評価である。(1) では、薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子の凝集を評価する目的で、作成した懸濁液を作成直後から 6 時間まで 25 °C で保存し、経時的に薬物ナノ懸濁液の T_2 緩和を測定した。その結果、 T_2 緩和時間は経時的に延長し、薬物ナノ懸濁液の T_2 緩和時間を測定することで、薬物粒子の凝集を評価できることを示した。(2) では、試験時間を (1) より長くし、作成直後から 24 時間まで、経時的に T_2 緩和を測定した。その結果、 T_2 緩和時間の延長の様子は、約 4 時間保存時を境に異なり、薬物ナノ粒子の凝集のみならず、沈降もモニタリングできることが示された。

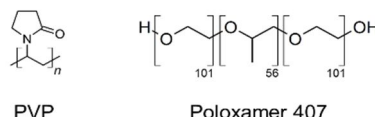
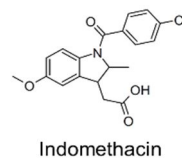


Figure 1. Chemical structures of drug and stabilizer.

研究成果 (1) T_2 緩和時間の測定による薬物粒子の凝集評価

最初に、各薬物ナノ懸濁液の特性評価を行った。TEM、DLS、PXRD および FTIR により薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子を評価したところ、安定化剤として PVP を用いた IMC-PVP ナノ懸濁液は、非晶質 IMC リッチな棒状粒子を含むことが判明した。また、安定化剤としてポロキサマー-407 を用いた IMC-ポロキサマー-407 ナノ懸濁液は、ガンマ型 IMC リッチな球形粒子を含むことが判明した。

次に、作成した各薬物ナノ懸濁液について、作成直後から 6 時間まで 25°C で保存し、水分子の T_2 緩和を経時的に測定した。得られた T_2 緩和の減衰は、式 1 に良好にフィットし、 T_2 緩和時間を算出した。解析の結果、IMC-PVP ナノ懸濁液は、経時的な T_2 緩和時間の延長を示し、3 時間後にプラトーに達した。一方、IMC-ポロキサマー-407 ナノ懸濁液は、 T_2 緩和時間の変化を示さなかった (Fig. 2)。また、両ナノ懸濁液は、保存の前後で粒子径の変化を示さなかった。

一般に、懸濁液中に含まれる粒子表面の溶媒分子は、その動きが束縛されており、バルクの溶媒分子と比べてその運動性は低下する。また、粒子表面およびバルクの溶媒分子の交換速度は、NMR の観測時間スケールよりも速く、式 2 のように平均化された T_2 緩和時間が観測される。

$$\frac{1}{T_2} = \frac{(1 - p_b)}{T_{2f}} + \frac{p_b}{T_{2b}} \quad (2)$$

ここで、 T_{2f} および T_{2b} は、それぞれ粒子表面およびバルクの溶媒分子の T_2 緩和時間、 p_b は粒子表面の溶媒分子の存在比率を示す。

最後に、IMC-PVP ナノ懸濁液において、 T_2 緩和時間が延長した原因を明らかにするため、透過光強度の測定を行った。透過光強度の測定は、沈降、凝集などの懸濁液の安定性を評価できる。解析の結果、IMC-PVP ナノ懸濁液において、試料の場所によらない様な透過光の増加が観測され、薬物粒子の凝集が示された (Fig. 3a and b)。一方、IMC-ポロキサマー-407 ナノ懸濁液において、透過光強度の変化は観測されず、薬物粒子の凝集は示されなかった (Fig. 3c and d)。

一般に、粒子が凝集した場合、粒子表面における溶媒分子の存在比率は低下し、 T_2 緩和時間は延長する。IMC-PVP ナノ懸濁液において、薬物粒子の凝集が示されたことを考慮すると (Figure 3a および b)、Figure 2 において観測された経時的な T_2 緩和時間の延長は、薬物粒子の凝集に由来すると考えられる。本手法は水分子の T_2 緩和を観測対象とするため、薬物や安定化剤の種類に依存しない、汎用的な凝集の評価方法であると考えられる。

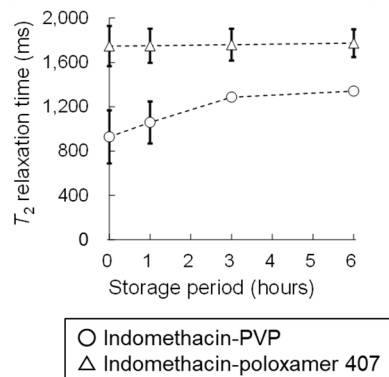


Figure 2. The ^1H T_2 relaxation time of indomethacin-PVP and indomethacin-poloxamer 407 nanosuspensions as a function of storage period at 25 °C. The T_2 relaxation was measured without dilution of nanosuspensions. Each plot represents the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

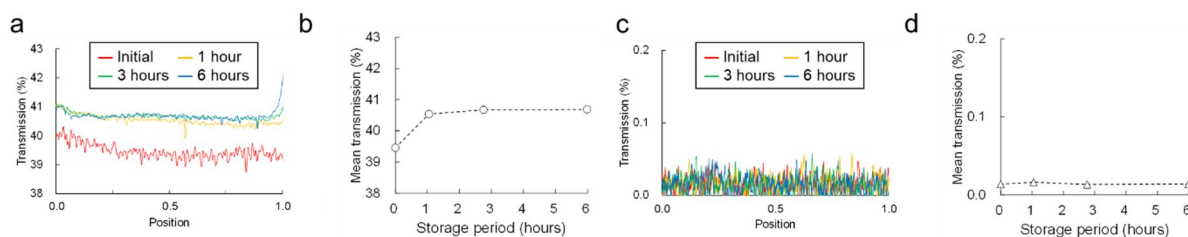


Figure 3. (a and c) Transmission profiles of (a) indomethacin-PVP and (c) indomethacin-poloxamer 407 nanosuspensions during storage at 25 °C. The x-axis represents the vertical position of the sample bottle: positions “0” and “1” correspond to the bottom and top of the suspension, respectively. The y-axis expresses the transmission signals. (b and d) Mean transmission values as a function of storage period at 25 °C for (b) indomethacin-PVP and (d) indomethacin-poloxamer 407 nanosuspensions. The nanosuspensions were prepared by 12 h of wet bead milling and the transmission profiles were measured without dilution of nanosuspensions.

研究成果(2) T_2 緩和時間の測定による薬物粒子の沈降評価

研究成果(1)では、IMCをモデル薬物として含む薬物ナノ懸濁液について、 T_2 緩和時間の測定を行い、保存時に発生するIMC粒子の凝集について作成から6時間後まで評価した。しかし、研究成果(1)では、 T_2 緩和の測定ポイントは数点と少なく、なおかつ、6時間以降の不安定化挙動について、明らかにされなかった。そこで、薬物ナノ懸濁液の入ったNMR試料管を、低磁場NMR装置にセットしたまま、 T_2 緩和を一定時間ごとに測定することで、作成直後から6時間までの凝集挙動の詳細に評価し、かつ6時間以降の不安定化挙動を評価することとした。

測定の結果、25℃で保存した場合、作成直後から約4時間までは急激に T_2 緩和時間が延長し、約4時間から24時間までは緩徐に T_2 緩和時間が延長した。 T_2 緩和時間が延長した原因を明らかにするため、 T_2 緩和測定に用いた薬物ナノ懸濁液と同一試料について、溶液安定性評価装置を用い、25℃保存時における、作成直後から24時間までの透過光強度を測定した。その結果、作成直後から約4時間までは、以前の研究と同様に、試料位置によらない透過光強度の変化が観測され、その変化はIMC粒子の凝集に対応する。一方、約4時間から24時間までは、透過光強度は試料下部で減少し、かつ試料上部で増大した。これらの変化は、粒子の沈降を示すため、約4時間から24時間までは、IMC粒子の沈降が示された。すなわち、約4時間から24時間までに観測された、緩徐な T_2 緩和時間の延長は、IMC粒子の沈降に由来すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kotaro Okada, Yoshihiro Hayashi, Shungo Kumada, Yoshinori Onuki	4. 巻 164
2. 論文標題 Nondestructive Investigation of the Agglomeration Process for Nanosuspensions via NMR Relaxation of Water Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 105908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2021.105908	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田康太郎, 林 祥弘, 熊田俊吾, 大貫義則
2. 発表標題 水のT2緩和測定による非破壊・リアルタイムな薬物ナノ懸濁液の粒子径評価
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 岡田康太郎, 大貫義則
2. 発表標題 薬物ナノ懸濁液に含まれる薬物粒子の凝集評価を目的とした時間領域NMR法の応用
3. 学会等名 第59回NMR討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田康太郎, 林 祥弘, 熊田俊吾, 大貫義則
2. 発表標題 水のT2緩和測定を用いたナノ懸濁液におけるインドメタシン凝集挙動のモニタリング
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 土屋恵、岡田康太郎、林 祥弘、熊田俊吾、大貫 義則
2. 発表標題 T2緩和を用いたインドメタシンナノ懸濁液における凝集・沈降挙動の非破壊的評価
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋恵、岡田康太郎、林 祥弘、熊田俊吾、大貫 義則
2. 発表標題 低磁場NMRによるT2緩和測定を利用したインドメタシンナノ懸濁液における凝集・沈降のモニタリング
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本梨花、岡田康太郎、林 祥弘、熊田俊吾、大貫 義則
2. 発表標題 応答曲面法を用いた非晶質インドメタシンナノ粒子分散液における調製条件とナノ粒子分散状態の関係
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------