

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月6日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08190

研究課題名(和文) AFMを用いた液中計測によるナノ医薬品製剤の精密構造解析及び力学特性評価

研究課題名(英文) Refined structural analysis and mechanical property of drug nano-formulation by AFM in aqueous media

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム製剤の調製と物性評価：ドキソルビシン(DOX)封入リポソームの形態に及ぼす封入条件(封入量・温度・封入時間など)をAFMおよびcryoTEM検討した結果、DOXの封入量が増加することで、球形に加えてprolate、oblate及びconcaveリポソームが観察された。AFMフォースカーブ測定により、溶液中での形態に加えて力学特性の違いも評価できた。

薬物ナノ製剤の調製と物性評価：薬物の構造、結晶形や添加剤中への分散状態がナノ粒子形成に影響することをAFM測定を含む物性評価によりとらえることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ医薬品製剤の物性評価方法は、動的光散乱測定による平均粒子径・粒子径分布計測、SEMやTEMといった電子顕微鏡による形態観察が殆どである。後者は測定試料調製の際の乾燥や凍結により形態が変化しないナノ製剤には適用可能であるが、形態が変化したり崩壊したりする粒子も存在する。AFMによるナノ粒子の液中計測はリポソームが大半である。多くの場合、医薬品は未封入で構造や力学特性の評価も十分とはいえない。AFMを用いた液中計測による精密構造解析及び力学特性評価を各種ナノ医薬品製剤に展開することで、各種ナノ製剤毎の品質を確保する上で考慮すべき因子が明らかになる。

研究成果の概要(英文)：Preparation of liposome formulation and characterization: Effect of drug-loading conditions (amount/temperature/time) on morphology of doxorubicin (DOX)-loaded liposomes was characterized by AFM and cryoTEM. Not only spherical but also prolate, oblate, and concave liposomes were formed with the enhanced DOX concentration. Not only liposomal morphologies in solution but also the difference of the mechanical properties were also evaluated by AFM force curve analysis

Preparation of drug nano-formulation and characterization: Effects of drug structure, crystal form, and the dispersed states in excipients on the drug nanoparticle formation were evaluated by using atomic force microscopy as well as the other physicochemical evaluation techniques.

研究分野：製剤学

キーワード：原子間力顕微鏡 (AFM) ナノ粒子 力学特性 構造評価 透過型電子顕微鏡 (TEM)

## 1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジー(超微細加工技術)の医療への応用が推進されて以降、多くのナノ医薬品が開発されてきた。ナノ医薬品製剤に特有な物理化学的性質を評価し品質を確保するためには、製剤の物性を評価する技術、とくに溶液中での構造と物性を評価する技術が求められる。従来のナノ医薬品製剤の物性評価方法としては、動的光散乱(DLS)測定による平均粒子径・粒子径分布計測、電子顕微鏡(走査型:SEM、透過型:TEM)による形状・形態観察、ゼータ電位計測などが汎用されてきた。DLS測定やゼータ電位測定は懸濁状態のまま測定が可能だが、形態や成分間の相互作用・力学特性に関する情報は得られない。SEMやTEM観察では形態評価は可能だが、懸濁状態での測定は困難であり、乾燥あるいは凍結したのちに測定を行う必要がある。報告者はこれまで、ナノ医薬品製剤の懸濁状態の物性評価方法として、ラマン測定による相互作用評価、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に関する検討を行ってきた。ナノ結晶懸濁製剤にこれら測定技術を用いることで、ナノ医薬品や各種添加剤成分の分子状態を懸濁状態のまま評価することに成功した。一方で、ナノ懸濁粒子の力学特性は評価できなかった。近年、原子間力顕微鏡(AFM)を用いた液中計測によりナノ構造や力学的特性を精度よく観察・評価できるようになった。これまでの検討で、固体分散体を水に分散後ナノ粒子が形成し凝集していく過程を、AFMを用いた液中計測により評価できることを明らかにし、凝集過程の薬物ナノ粒子の力学特性の変化をフォースカーブ測定により明らかにした。粒子径の変化は従来の測定技術で評価できるが、ナノ粒子の構造や力学特性はAFMを用いないと評価できない。このようにAFMによる液中計測は、ナノ医薬品製剤の懸濁状態での物理化学的性質を明らかにし、ナノ医薬品の品質を評価する上で必須の技術である。

## 2. 研究の目的

本研究では、AFMを用いた液中計測により各種ナノ医薬品製剤の精密構造解析及び力学特性評価を行う。他の物性測定法の結果と照らし合わせることで、AFMにより何の物性が評価できたのかを明らかにする。ナノ製剤としては、薬物を封入したリポソームやナノ結晶、各種調製法で調製した3成分固体分散体を用い、一般的な評価、ナノ医薬品製剤のサイズ・電荷・形態観察、ナノ医薬品製剤の各成分の状態評価に加えて、AFMを用いた液中計測によるナノ構造及び力学特性評価を行う。ナノ粒子の形態および物理化学的性質が、薬物の溶出や体内動態に影響する。本研究により、各種ナノ医薬品製剤の品質を確保する上で考慮すべき因子が明らかになり、製品の品質管理に寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

### Doxorubicin (DOX)封入リポソーム製剤の調製と物性評価:

リン脂質として 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)及び cholesterol を用い、薄膜水およびエクストルージョン法によりリポソームを調製した。リポソーム内水相と外水相の間にイオン勾配を形成した後、脂質に対する DOX 量が 10%から 40% (mol/mol)となるよう DOX 溶液をリポソーム溶液に添加し、DOX 封入リポソームを調製した。得られた DOX 封入リポソームについて AFM 測定及び急速凍結透過型電子顕微鏡(cryo-TEM)測定を行い、リポソーム及び内水相の DOX 沈殿の形態を評価した。

### 薬物ナノ製剤の調製と物性評価:

I. 初期の薬物結晶形の違いがナノ粒子の形態や物性に及ぼす影響: インドメタシン(IMC)の多形、非晶質を、Poloxamer 溶液に分散し、物理的混合物(PM)懸濁液を調製した。PM 懸濁液を遊星型ボールミルにより粉碎し、混合粉碎物(GM)懸濁液を得た。得られた GM 懸濁液を各種物性測定により評価した。

II. 調製法の違いがナノ粒子の形態および力学的特性に及ぼす影響: プロブコール (PBC(I)、(II))、ヒプロメロース (HPMC)、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) の固体分散体を噴霧乾燥法 (SPD) と粉碎法 (GM(I)、GM(II)) で調製し、水に分散後の凝集挙動を観察した。

### 原子間力顕微鏡 (AFM) 測定: MFP-3D (Oxford Instruments)により測定を行った。Fig. 1 に

AFM 試料の調製法を示す。試料を固定する基板として、劈開した mica 表面に (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES)を修飾した、正電荷かつ疎水性の AP-mica を用いた。試料溶液を AP-mica 基板表面に滴下し、室温で一定時間インキュベーションを行った。続いて、固定されていない過剰の粒子を洗い流し、測定試料とした。測定は AC モードで行い、image pixel を 512 × 512、scanning speed

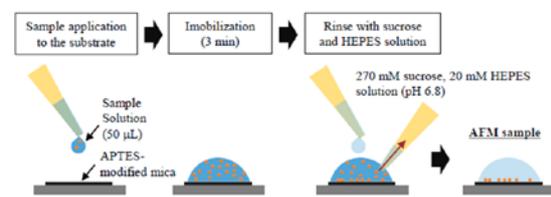


Fig. 1 Preparation method of AFM sample

を 0.50 Hz に設定した。カンチレバーは AC40TS (Olympus)を用いた。

#### 4. 研究成果

**DOX 封入リポソーム製剤の調製と物性評価：**  
DOX 封入量が異なるリポソームの DLS により求めた体積平均径は約 110 nm であり、粒子径分布は単峰性であった。DOX の封入は DLS により得られる体積平均径及び粒子径分布に影響を及ぼさないことが明らかになった。

##### 1) 封入量の影響：

Cryo-TEM 測定の結果、DOX 未封入のリポソームでは直径 60-140 nm の球状の粒子像が、20%DOX 封入リポソームでは内水相に直線状の薬物沈殿が観察された(Fig. 2)。40% DOX 封入リポソームでは直線状の薬物沈殿に加えて粒子円周に湾曲した沈殿が観察された。AFM 測定の結果、DOX 封入量 20%以下のリポソームでは球形のリポソームのみが観察された一方、40% DOX 封入リポソームでは伸長した球状の(prolate)リポソームが観察された(Fig. 3)。リポソーム内水相に形成した沈殿が直線的に成長することで、リポソームの形態が prolate 状に変化したと推察した。また、40%DOX 封入リポソームの AFM 像において、中心が陥没した粒子も観察された。湾曲した薬物沈殿を内封する潰れた球状の(oblate)リポソームが AFM の基板に吸着し、中心が陥没した粒子に変形したと考察した。DOX 封入量が最も高い40%のリポソームにおいて観察された形態の割合は、球形>prolate>oblate であった。DOX 封入量の変化に伴う一連の形態変化を Fig. 4 に示す。以上、AFM 及び cryo-TEM の結果により、DOX 封入量の増加に伴うリポソームの形態変化を評価することができた。Cryo-TEM では、リポソームの形態変化に加えてリポソーム内水相に形成した DOX 沈殿の形状を評価できる。AFM ではリポソームの3次元像が得られるため、形態変化を定量的に評価することが可能であった。Cryo-TEM に

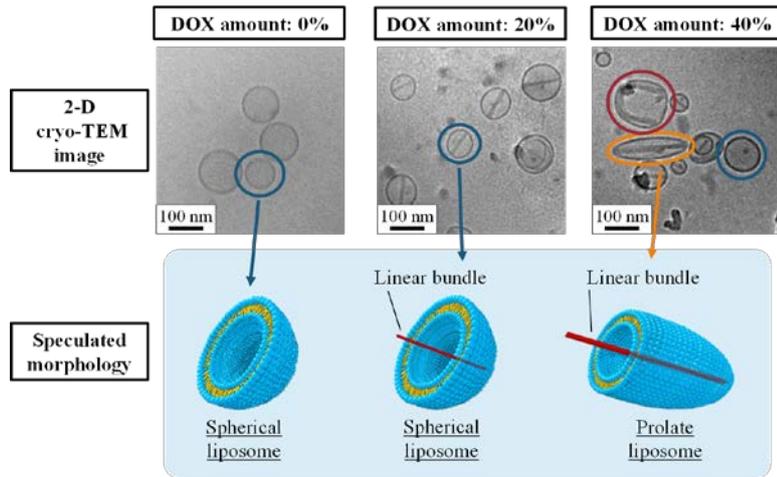


Fig. 2 Cryo-TEM images of DOX-loaded liposomes

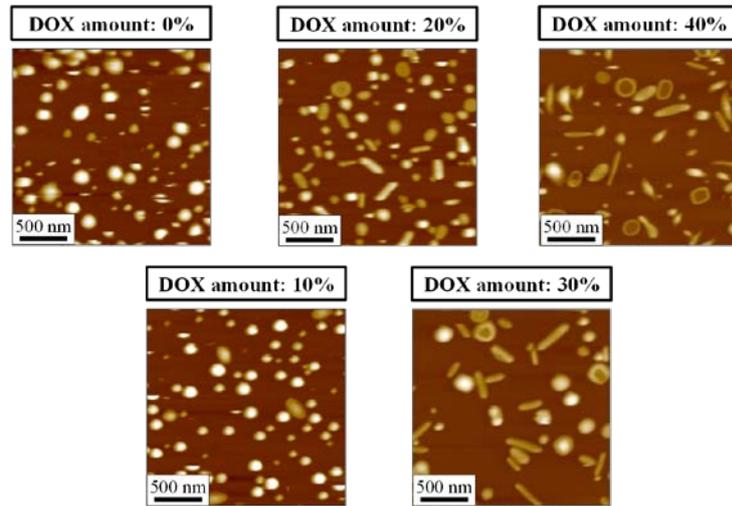


Fig. 3 AFM images of DOX-loaded liposomes

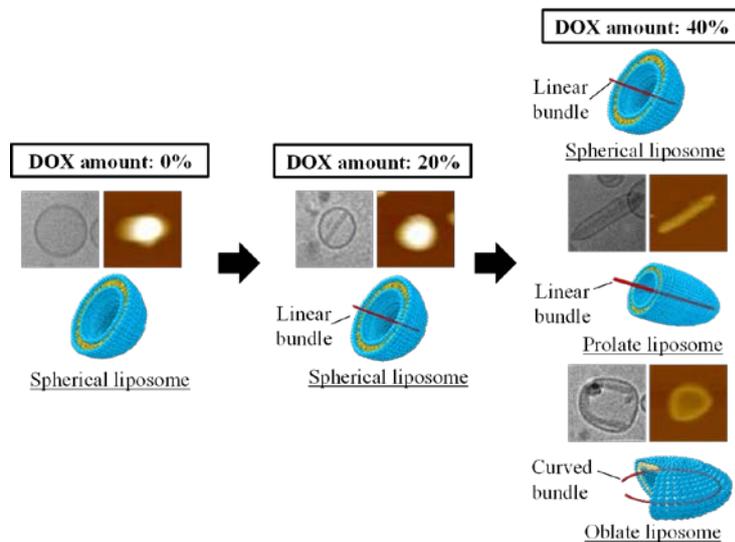


Fig. 4 Morphological changes of liposomes with increased DOX-loading amount

より得られる像は2次元的な投影像であるため、粒子の3次元形態を正確に評価することが難しく、また凍結処理がリポソームの形態に影響を及ぼす可能性がある。一方、AFMでは基板への固定により、リポソームが扁平化するという欠点を持つ。本研究で示したように、cryo-TEM及びAFMの両アプローチにより非球形粒子の形態を正確に把握することができた。

2) 保存期間の影響： 4°Cで2週間保存した40% DOX封入リポソームのAFM測定を行った結果、調製直後と比較してprolateリポソームの割合が減少し、中心が陥没したリポソームの割合が増加した。時間経過に伴い、脂質二重膜の曲率が高くエネルギー的に不安定なprolateリポソームが、脂質二重膜の曲率が低く安定なoblateリポソームに形態変化したと推察した。この形態変化に伴い、リポソーム内の沈殿の形状が直線状から湾曲した形状に変化したと推察される。

3) 浸透圧の影響： 40% DOX封入リポソームの外水相を270 mM sucrose, 20 mM HEPES溶液から精製水に置換した。その結果、cryo-TEM像及びAFM像において湾曲した沈殿を内封する球状のリポソームが観察された(Fig. 5)。リポソーム内水相に水が浸透、リポソームが膨張することで球形に変形したと考察した。40% DOX封入リポソームの外水相を精製水から270 mM sucrose, 20 mM HEPES溶液に再度置換した結果、湾曲した薬物沈殿を内封するoblateリポソームに由来する粒子像が観察された。リポソーム内水相の水が外水相に浸透、リポソームが収縮し、oblateに変形したと推察される。40% DOX封入リポソームでは、薬物封入量の増加に伴うリポソーム内水相の浸透圧減少がprolate及びoblateリポソームが観察された理由と考察した。

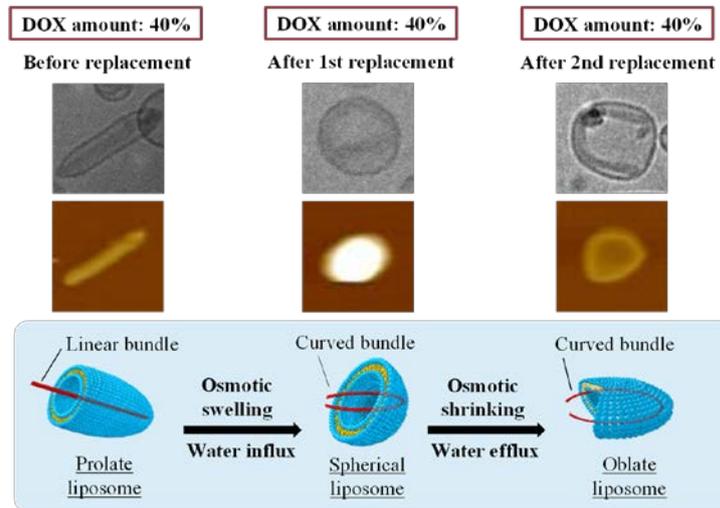


Fig. 5 Morphological changes of 40% DOX-loaded liposome induced by osmotic pressure

4) DOX封入量の増加に伴うリポソーム及び内水相のDOX沈殿の形態変化に関する考察： リポソーム内水相に封入されたDOX量が多いほど、リポソームは強く収縮する。そのため、湾曲したDOX沈殿が封入された球形リポソームは形成されなかった。また、粒子径の大きい球形リポソームは主にprolateに形態変化し、oblateリポソームが形成した割合は低かった。高温条件では曲げひずみエネルギーが低くなるため、リポソームが形態変化しやすくなると考えられる。また、DOX及び硫酸イオンで形成されたDOX沈殿は柔軟性が低く、直線状の形状であるという報告がある。そのため、湾曲したDOX沈殿が形成するには直線状のDOX沈殿に外力を加える必要があると予想される。以上の結果より、高温でDOXを封入する際にDOX沈殿が直線状に伸張りリポソームを内部から押し広げることで、エネルギー的に不利なprolateリポソームに形態変化したと考察した。調製後の冷却によりリポソームの曲げひずみエネルギーが向上し、一部のprolateリポソームがエネルギー的に有利なoblateリポソームに変形したと考えられた。この形態変

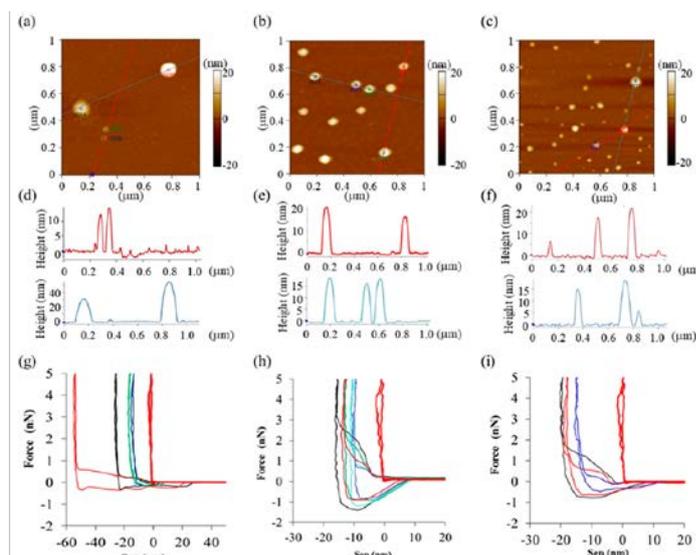


Fig. 6 AFM (a-c) images, (d-f) the height images, and (g-i) the force curve of (a) SPD, (b) GM(I), (c) GM(II) suspensions

化が直線状の DOX 沈殿の湾曲を引き起こしたと推察された。

#### 薬物ナノ製剤の調製と物性評価：

**I. 初期の薬物結晶形の違いがナノ粒子の形態や物性に及ぼす影響：** 3種 GM 懸濁液について cryo-TEM 測定を行ったところ、いずれも数百 nm の粒子が観察された。γ形 IMC を用いて調製した GM 懸濁液では菱形板状のナノ粒子が認められた。一方、α形及び非晶質 IMC を用いた GM 懸濁液では、針状のナノ粒子が観察された。これらの結果より、初期結晶形に依存して、得られるナノ粒子の形態は異なることが示された。懸濁状態ナノ粒子の AFM による形態観察を試みたが、Poloxamer を含む粒子は固定が困難でうまく評価できなかった。X 線回折測定の結果、γ形及びα形 IMC を用いた GM 懸濁液では、粉碎過程で初期結晶形を維持したまま IMC がナノ粒子化した。一方、非晶質 IMC を用いた GM 懸濁液では、ナノ粒子形成過程において、ほぼすべての非晶質 IMC が α形 IMC へと転移した。

**II. 調製法の違いがナノ粒子の形態および力学的特性に及ぼす影響：** PBC/HPMCSDS SPD、GM(I)、GM(II)を水に分散後、その粒子径および形態変化を DLS および cryoTEM で測定した。いずれの系でも水に分散直後は、30nm 以下の球形粒子が観察された。SPD の場合、粒子径は経時的に徐々に増加するものの、球形でナノサイズを維持していた。一方、GM(I)、GM(II)の場合、3種類の形態、経時的にサイズが増大する球形粒子、針状ナノ結晶およびマイクロサイズの様々な形態の結晶が観察された。凍結乾燥した懸濁液の粉末 X 線回折測定の結果、SPD 懸濁液中のナノ粒子では PBC が非晶質状態で存在したのに対し、GM(I)、GM(II)では一部結晶に由来する分画が観察され、経時的な結晶化の際にも最初の結晶形を維持していた。

水に分散直後に形成した球形粒子の AFM 形状像、断面プロファイル、フォースカーブを測定した結果を Fig.6 に示す。フォースカーブの結果より、GM(I)、GM(II)では PBC の結晶相の存在が確認された。SPD のフォースカーブでは、曲線に傾きがないまま探針が粒子サイズまで貫通しており、柔らかい構造の球形粒子と推察された。固体分散体中の PBC の分子状態は、調製法や PBC の結晶形に依存しており、SPD では完全な非晶質として、GM では不完全な非晶質として存在し、後者では微細な結晶核あるいは薬物リッチ相の存在が示唆された。これら水に分散後の凝集挙動の違いを Fig.7 に模式的に示した。

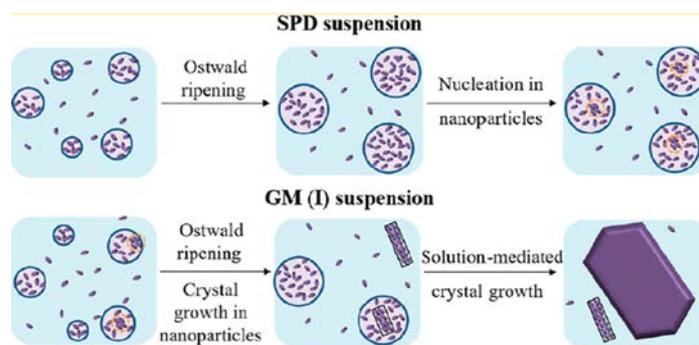


Fig. 7 Evolution of PBC nanoparticles

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kuroiwa Y., Higashi K., Ueda K., Yamamoto K., Moribe K. Nano-scale and molecular-level understanding of wet-milled indomethacin/poloxamer 407 nanosuspension with TEM, suspended-state NMR, and Raman measurements. *Int. J. Pharm.* 査読有, 537(2018)30-39. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.12.028.
- ② Takahashi N., Higashi K., Ueda K., Yamamoto K., Moribe K. Determination of nonspherical morphology of doxorubicin-loaded liposomes by atomic force microscopy. *J. Pharm. Sci.* 査読有, 107(2018)717-726. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.009.
- ③ Zhao Z., Katai H., Higashi K., Ueda K., Kawakami K., Moribe K. Cryo-TEM and AFM observation of the time-dependent evolution of amorphous probucol nanoparticles formed by the aqueous dispersion of ternary solid dispersions. *Mol. Pharm.* 査読有, 16(2019)2184-2198. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00158.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Moribe K. Nanoformulation for Oral Delivery. 3rd International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, Lisbon, Portugal (2018, 招待講演)
- ② Moribe K. Morphology and molecular states of drug in nanosuspension formulation: Crystalline and/or amorphous? 5rd ASPST, Hangzhou, China (2018, 招待講演)
- ③ 森部 久仁一, 分子製剤学の視点に基づく医薬品の構造及び機構解明, 第薬の未来を考える記念シンポジウム, 静岡 (2018, 招待講演)
- ④ Moribe K., Egami K., Takahashi N., Ueda K., Higashi K. Application of AFM for structural and morphological evaluation of drug-incorporated nanoparticles. Gordon Research Conference, VT, USA (2017)

- ⑤ 森部 久仁一, 機能的製剤の開発に貢献する添加剤, 第 16 回 医薬品添加剤セミナー, 東京 (2017, 招待講演)
- ⑥ 森部 久仁一, 固体分散体からの薬物溶出に影響を及ぼす因子, オレオナノサイエンス部会シンポジウム 2016, 東京 (2016, 招待講演)
- ⑦ 森部 久仁一, 高橋 尚希, 植田 圭祐, 東 颯二郎, 山本 恵司, AFM 及び cryo-TEM を用いたドキシソルビシン封入りポソームの形態評価, 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡 (2016)
- ⑧ 森部 久仁一, 機能的製剤の開発に貢献する添加剤, 第 43 回 日本毒性学会学術年会, 名古屋 (2016, 招待講演)
- ⑨ Moribe, K. Effect of solid properties on drug dissolution from the solid formulation. Asian Graduate Congress on Pharmaceutical Technology, Singapore, Singapore (2016, 招待講演)
- ⑩ Moribe, K. Supersaturation strategy for enhanced absorption of poorly water-soluble drugs. FAPA2016, Bangkok, Thailand (2016, 招待講演)
- ⑪ Moribe, K. Structural evaluation of solid formulation as solid and in aqueous media. 2nd Int. Seminar Pharm. Sci. Tech., Jatinangor, Indonesia (2016, 招待講演)

[図書] (計 2 件)

- ① 東 颯二郎, 植田 圭祐, 森部 久仁一, ファインケミカル, 湿式粉碎によるインドメタシンナノ結晶形成における初期結晶形の影響, 2018, 33-41
- ② 東 颯二郎, 森部久仁一, シーエムシー出版, ナノ結晶化技術の基礎と医薬品開発の現状, 難水溶性薬物の経口製剤化技術最前線, 2016, 202-215

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.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・教授

研究者番号: 5 0 2 6 6 3 5 0

### (2) 研究分担者

東 颯二郎 (HIGASHI KENJIROU)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 4 0 4 5 1 7 6 0

植田 圭祐 (UEDA KEISUKE)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 4 0 7 5 5 9 7 2