

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06592

研究課題名(和文) 超難水溶性薬物の製剤化を実現する薬物非晶質ナノ懸濁液の創製

研究課題名(英文) Design of drug amorphous nanosuspension to achieve a pharmaceutical formulation of poorly water-soluble drug

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：難水溶性薬物の溶解性を劇的に改善する手法として非晶質ナノ懸濁液が注目されている。しかし非晶質ナノ懸濁液の調製そのものが困難であることに加えて、その構造・分子状態をダイレクトに評価する分析法は確立されていない。本研究では、貧溶媒法、湿式粉碎法、非晶質固体分散化を用いて3種類の非晶質ナノ懸濁液の調製に成功した。さらに顕微鏡法及び分光法の応用測定を適用することで、得られた非晶質ナノ懸濁液の構造及び分子状態を評価し、その形成・安定化メカニズムを精密に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年開発されている医薬品候補化合物の70～90%は難水溶性であり、溶解性を改善する製剤技術が切望されている。本研究で得られた知見は、溶解性改善手法として期待されている非晶質ナノ懸濁液の形成・安定化メカニズムに新しい知見を与えるものである。今後益々求められていく非晶質ナノ懸濁液製剤の開発において本研究が新しい指針となり、高品質の医薬品製剤の創生に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Amorphous nanoparticles attract much attentions as a method for dramatically improving the solubility of poorly water-soluble drugs. However, amorphous nanosuspensions are not easy to prepare and the analytical methods to evaluate their structure and molecular state has not been established. In this study, we succeeded in preparing three types of amorphous nanosuspensions using the anti-solvent method, the wet grinding method, and the amorphous solid dispersion. Furthermore, by applying the advanced microscopy and spectroscopy techniques, the structure and molecular state of the obtained amorphous nanosuspensions were evaluated, and the formation and stabilization mechanism was analyzed precisely.

研究分野：製剤学

キーワード：非晶質ナノ粒子 Cryo-TEM suspended-state NMR 溶解性改善 非晶質固体分散体 固液界面

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超難水溶性薬物の溶解性を劇的に改善する画期的手法として「非晶質ナノ粒子化」が注目されている。一方、非晶質ナノ粒子を水に分散した「非晶質ナノ懸濁液」の調製はまだまだトライ&エラーの状況である。これは非晶質ナノ懸濁液の調製そのものが困難であることに加えて、その構造・分子状態をダイレクトに評価する分析法が確立していないためである。

2. 研究の目的

本研究では、顕微鏡法及び分光法の応用測定を適用し、非晶質ナノ懸濁液の形成・安定化メカニズムの分子レベルの解析を行う。本研究が新しい指針となることで、超難水溶性薬物の溶解性・吸収性を顕著に改善する高品質の非晶質ナノ懸濁液製剤創製の効率化・最適化を実現する。さらに非晶質ナノ懸濁液製剤のみならず、いまだ確立されていないナノ懸濁液製剤の分子レベルの品質評価・保証に有用な分析法を提案する。本研究期間内では、3種類の非晶質ナノ懸濁液 (i) 貧溶媒法により調製したグリベンクラミド (GLB) 非晶質ナノ懸濁液、(ii) 湿式粉碎により調製したシクロスポリン A (CyA) 非晶質ナノ懸濁液、(iii) 非晶質固体分散体 (ASD) より調製したプロブコール (PBC) 非晶質ナノ懸濁液について検討した。

3. 研究の方法

(1) 貧溶媒法により2種の方法で GLB 非晶質ナノ粒子を調製した。調製法 A では、GLB を溶解させた DMSO 溶液をヒプロメロース (HPMC) 水溶液に対して注入し、nano-A 懸濁液を得た。調製法 B では GLB 及び HPMC を共に溶解させた DMSO 溶液を蒸留水に対して注入し、nano-B 懸濁液を得た。Nano-A 及び nano-B 懸濁液を超遠心処理後、得られた沈殿を凍結乾燥処理することで nano-A 及び nano-B を調製した。各種顕微鏡測定により、懸濁液中及び凍結乾燥後のナノ粒子の形態を評価し、貧溶媒法によるナノ粒子形成メカニズムを評価した。

(2) 非晶質 CyA をポロキサマー-407 (P407) 溶液に分散させ、ビーズミル粉碎することにより CyA 非晶質ナノ懸濁液を調製した。Suspended-state NMR 測定により、保存中の CyA 非晶質ナノ懸濁液を経時的に評価し、その安定化メカニズムについて検討した。

(3) PBC、HPMC 及びドデシル硫酸ナトリウム (SDS) からなる三成分 ASD を噴霧乾燥法により調製し、これを水溶液に分散させることで PBC 非晶質ナノ懸濁液を調製した。様々な組成の三成分 ASD を水に分散することで得られた非晶質ナノ粒子の形態をクライオ透過型電子顕微鏡 (cryo-TEM) 測定により評価し、ASD からの非晶質ナノ粒子形成メカニズムについて検討した。

4. 研究成果

(1) 貧溶媒法により調製した GLB 非晶質ナノ懸濁液

Cryo-TEM 測定による形態観察の結果、nano-A 及び nano-B ではそれぞれ球形の中実粒子と非球形の中実粒子が観察された。(Fig. 1) この結果から、HPMC の添加方法の違いによりナノ粒子のサイズ及び形態が変化することが示された。次に、凍結乾燥して得られた nano-A 及び nano-B について走査型電子顕微鏡 (SEM) 及び TEM 測定により形態観察を行った。両試料の SEM 像では約 100 nm 程度の一次粒子の集合体が観察

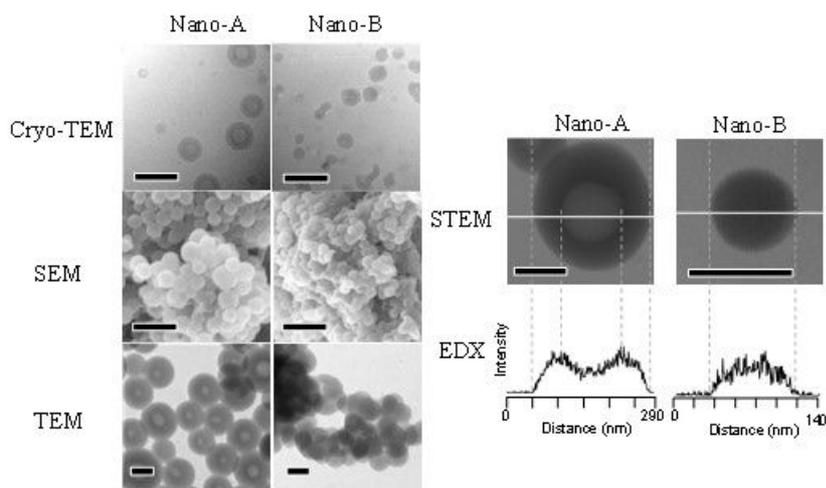


Fig. 1 Cryo-TEM, SEM, TEM, and STEM-EDX images of nano-A and nano-B. Each bar represents 200 nm in cryo-TEM, SEM and TEM images and 100 nm in STEM images. EDX spectrum was obtained by line scans for STEM images (Cl element detected).

され、ナノ粒子の表面は平滑であった。また、TEM で観察された各一次粒子のサイズ及び形状は cryo-TEM 像のものと同様であった。このことから、超遠心分離処理及び凍結乾燥処理を経た場合でも粒子の形態は維持されることが示された。次に、各ナノ粒子について走査透過型電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分析 (STEM-EDX) 測定を行った。Cl 元素は GLB のみに含まれる元素であるため、nano-A 及び nano-B はその大部分が GLB により構成されることが示された。また、nano-A では粒子中心部分の STEM 像のコントラスト及び Cl 元素スペクトル強度が低下し

ており、この結果は nano-A が中空構造を有することを強く支持するものであった。

Figure 2 に貧溶媒法による非晶質ナノ懸濁液形成メカニズムの模式図を示す。Nano-A の形成過程では、DMSO の水への拡散速度が薬物分子の液滴内部への拡散より速いため、先に粒子外側界面で固化が起こる。その後、DMSO の拡散と同時に水が浸入するため、中空粒子が形成されたと考えられた。一方、nano-B の形成過程では、DMSO 中に HPMC が存在するため DMSO の水への拡散が遅くなり薬物が粒子内部へ拡散する。その結果、粒子径の小さい非球形の中実粒子が形成されたと考察した。

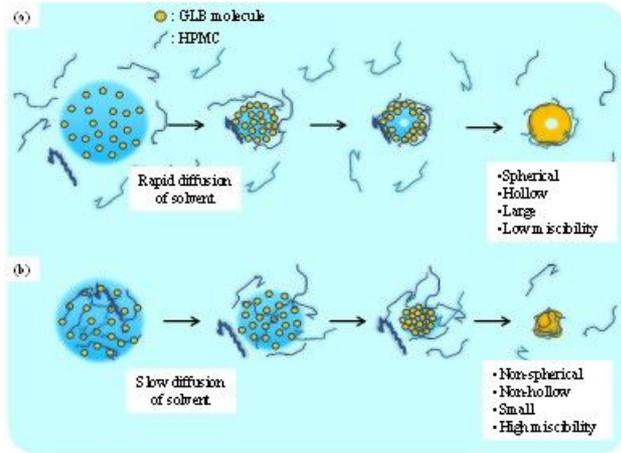


Fig. 2. Schematic representation of precipitation process and structure of (a) nano-A and (b) nano-B.

本研究では、GLB 非晶質ナノ粒子の形態を各種顕微鏡法により評価することで、貧溶媒法による非晶質ナノ粒子懸濁液形成メカニズムを明らかとした。本成果は貧溶媒法による薬物非晶質ナノ粒子製剤の開発において有用な指針になると期待される。

(2) 湿式粉碎により調製した CyA 非晶質ナノ懸濁液

調製直後の懸濁液中の粒子サイズを動的光散乱法により評価した結果、体積平均径は約 370 nm であった。ナノ懸濁液を凍結乾燥した試料について粉末 X 線回折測定及び固体 ^{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、湿式粉碎により CyA 非晶質ナノ懸濁液が調製されたことが確認できた。

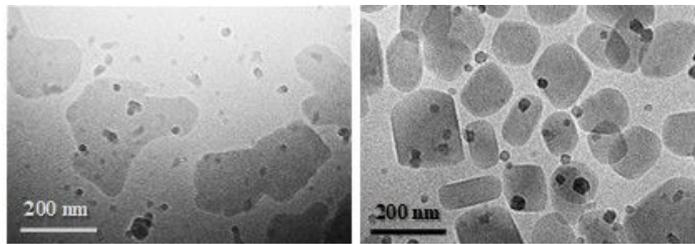


Fig. 3 Cryo-TEM images of (left) freshly prepared and (right) one month stored CyA amorphous nanosuspension.

次に、得られた CyA 非晶質ナノ懸濁液の保存安定性を評価した。興味深いことに、一ヵ月保存後の懸濁液では体積平均径が約 200 nm に減少した。保存に伴うナノ粒子の粒子径減少メカニズムを明らかにするために、調製直後及び 1 か月保存後のナノ懸濁液について cryo-TEM 測定を行った (Fig. 3)。調製直後の懸濁液中のナノ粒子形状は不定形であり、複数の粒子が凝集した 2 次粒子として観察された。一方、一ヵ月保存後の懸濁液の粒子は角張った一次粒子であった。このことから、保存に伴う粒子径の減少は二次粒子から一次粒子への変化によると考えられた。

二次粒子から一次粒子への変化したメカニズムを検討するために、CyA 非晶質ナノ懸濁液について *in-situ* suspended-state NMR 測定を行った (Fig. 4)。その結果、調製直後では非晶質性を反映し広幅化であった CyA ピークは保存時間経過毎に先鋭化し、CyA の経時的な結晶化が明らかとなった。すなわち、保存に伴う CyA 非晶質の結晶化が CyA ナノ粒子の二次粒子から一次粒子への変化を促すことが示唆された。固液界面のエネルギーは結晶と比べて非晶質の方が高いため、調製直後の懸濁液では非晶質状態にある CyA 粒子同士の凝集により二次粒子が形成される。しかし、一ヵ月保存後には CyA 結晶化に伴い界面エネルギーが低下したため、凝集力が低下し一次粒子として分散したと考察した。

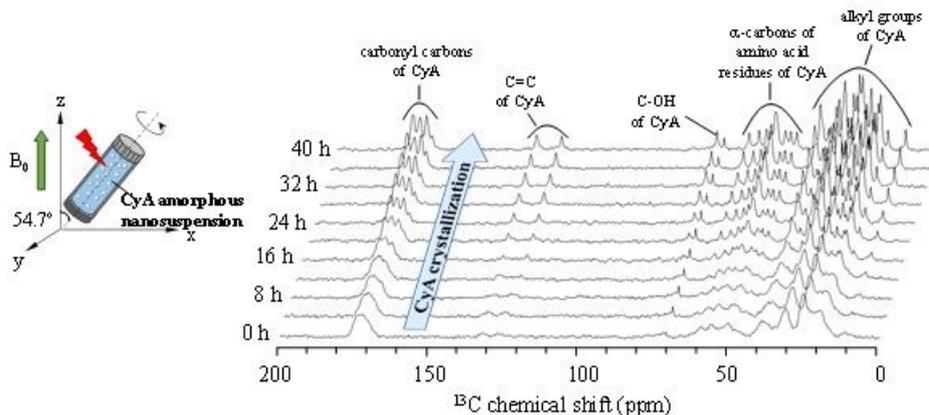


Fig. 4 *In-situ* suspended state ^{13}C NMR spectra of CyA amorphous nanosuspension

本研究では、*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詳細に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を調製するための重要な知見をもたらすものである。

(3) ASD より調製した PBC 非晶質ナノ懸濁液

Cryo-TEM 測定の結果、三成分 ASD 中の HPMC と SDS の質量比の違いにより PBC 非晶質ナノ粒子のサイズ及び形態が有意に異なることが明らかとなった (Fig. 5)。SDS の質量比が高い場合には PBC ナノ粒子はいずれも球形であり、PBC 粒子のサイズは HPMC の質量比の減少に伴い増加した。一方、SDS の質量比が低い場合には、HPMC 質量比

の変化により粒子サイズのみならず形態が大きく変化した。HPMC 質量比が高い場合には球形の粒子が観察されたが、HPMC 質量比の低下につれて合一した数百ナノメートルの不規則な構造が散見されるようになった。さらに、HPMC の質量比が低下すると針状の PBC ナノ結晶が観察された。この結果より、ASD 中の HPMC と SDS は、PBC 非晶質ナノ粒子のサイズ及び形態に大きく影響していることが示された。

PBC 非晶質ナノ粒子形成に HPMC および SDS が与える影響を以下のように考察した。HPMC は、ASD 中の PBC-rich 領域のサイズ減少に大きく寄与しており、HPMC の質量比が低い場合には PBC-rich 領域のサイズが大きくなる。ASD への水浸透過程において、HPMC は PBC-rich 領域のサイズ増加及び PBC 非晶質の再結晶化を阻害する。一方、ASD 中の SDS は、PBC-rich 領域の合一を効率的に抑制する。ASD の水分散後では、ほとんどの HPMC と SDS は水溶液に溶解した状態となる。PBC 非晶質ナノ粒子の固液界面を十分に被覆できる HPMC 及び SDS 量が溶解している場合には、粒子成長は抑制され、ASD 中の PBC-rich 領域のサイズを反映した球形の PBC 非晶質ナノ粒子が得られる。一方、HPMC と SDS の量が少ない場合には、PBC 非晶質ナノ粒子の粒子成長を十分に抑制できず、粒子成長あるいは合一した PBC 非晶質粒子及び PBC ナノ結晶が水分散後に生成される。

本研究により、三成分 ASD におけるポリマーと界面活性剤が水分散後に得られる非晶質ナノ粒子のサイズ・形態に与える影響を詳細に明らかとした。ASD 水分散後の凝集プロセスを観察した例はこれまでになく、本成果は三成分 ASD の処方設計に有用な知見を与えるものである。

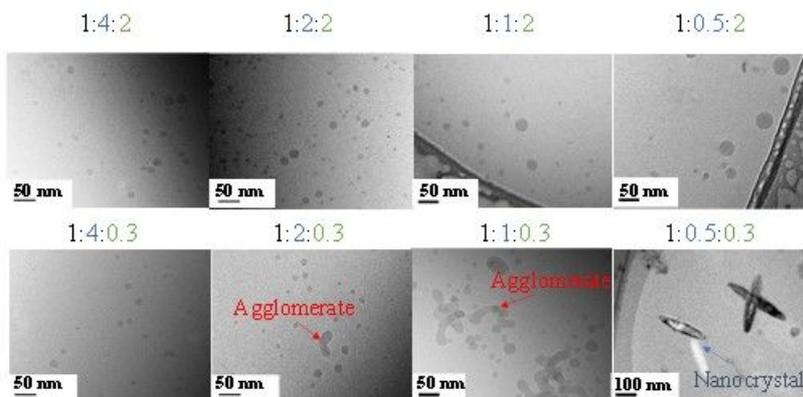


Fig. 5 Cryo-TEM images of the suspension obtained by dispersing the ASD into the aqueous media. 1:X:Y represents the weight ratio of PBC/HPMC/SDS

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Zhao, Z., Katai, H., Higashi, K., Ueda, K., Kawakami, K., Moribe, K.	4. 巻 16(5)
2. 論文標題 Cryo-TEM and AFM observation of the time-dependent evolution of amorphous probucol nanoparticles formed by the aqueous dispersion of ternary solid dispersions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2184-2198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00158	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 Yonashiro, H., Higashi, K., Morikawa, C., Ueda, K., Itoh, T., Ito, M., Masu, H., Noguchi, S., Moribe, K.	4. 巻 15(4)
2. 論文標題 Morphological and physicochemical evaluation of two distinct glibenclamide/hypromellose amorphous nanoparticles prepared by the antisolvent method.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1587-1597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01122	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13件（うち招待講演 6件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Zhao, Z., Ueda, K., Higashi, K., Moribe, K.
2. 発表標題 Effect of surfactant in ternary solid dispersion on the formation of amorphous probucol nanoparticles by aqueous dispersion
3. 学会等名 The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chen, Z., Ueda, K., Higashi, K., Moribe, K.
2. 発表標題 Preparation of amorphous nanoparticles for drugs with mid-molecular weight by wet bead milling and its characterization
3. 学会等名 The 3rd Workshop for Japan-Korea Young Scientists on Pharmaceutics（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhao, Z., Katai, H., Ueda, K., Higashi, K., Moribe, K.
2. 発表標題 Effect of molecular state of ternary solid dispersion on the physical property and stability of amorphous drug nanoparticles formed by aqueous dispersion
3. 学会等名 The 1st Pharmaceutial Sciences Asia Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashi, K.
2. 発表標題 Preformulation study to enhance the drug solubility based on solid state NMR methodology
3. 学会等名 2019 International Conference of the KSPST (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 顕二郎
2. 発表標題 医薬品ナノ粒子製剤の設計とその構造解析
3. 学会等名 第25回創剤フォーラム若手研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 顕二郎
2. 発表標題 固体NMRによる薬物溶解性改善製剤の分子状態評価
3. 学会等名 製剤機械技術学会第29回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東 顕二郎
2. 発表標題 NMRによる難水溶性薬物の溶解性を改善する特殊製剤の構造評価
3. 学会等名 高分子学会19-2 NMR研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishimoto, A., Ueda, K., Higashi, K., Sasako, H., Koyama, K., Moribe, K.
2. 発表標題 Preparation of cholesteryl oleate/g-cyclodextrin nanoparticles by solvent diffusion method
3. 学会等名 The 19th International Cyclodextrin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Higashi, K.
2. 発表標題 Formation mechanism of drug nanoparticles obtained by aqueous dispersion of amorphous solid dispersion.
3. 学会等名 The 2nd Workshop for Korea-Japan Young Scientists on Pharmaceutics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石本 有沙, 植田 圭祐, 笹子 浩史, 東 顕二郎, 神山 和夫, 森部 久仁一
2. 発表標題 コアシェル構造を有するオレイン酸コレステリル/g-シクロデキストリンナノ粒子の調製
3. 学会等名 第35回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zhijing Zhao, Hiroaki Katai, Keisuke Ueda, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe
2. 発表標題 Effect of preparation method of ternary solid dispersion on the evolution of amorphous probucol nanoparticles formed after aqueous dispersion
3. 学会等名 製剤機械技術学会第28回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ziqiao Chen, Keisuke Ueda, Kenjiro Higashi, Kunikazu Moribe
2. 発表標題 Molecular-level understanding of stabilization mechanism of amorphous cyclosporin A nanosuspension prepared by wet bead milling with Pluronic F127
3. 学会等名 第35回製剤と粒子設計シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東 顕二郎
2. 発表標題 医薬品製剤開発におけるNMRの応用 : 非晶質・ナノ製剤の評価を中心として
3. 学会等名 JEOL RESONANCE NMR ユーザーズミーティング (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 東 顕二郎、植田 圭祐、森部 久仁一 (分担)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 227
3. 書名 ナノ・マイクロ微粒子の分散評価技術 核磁気共鳴 (分担)	

1. 著者名 東頭二郎 分担執筆、日本薬剤学会物性FG 監修	4. 発行年 2018年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 413
3. 書名 固体医薬品の物性評価 第2版	

1. 著者名 東頭二郎、分担執筆、尾関哲也、井上勝央 編集	4. 発行年 2018年
2. 出版社 廣川書店	5. 総ページ数 527
3. 書名 最新製剤学 第11版	

1. 著者名 東頭二郎、植田圭祐、森部久仁一 分担執筆、内藤 牧男 監修	4. 発行年 2018年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 752
3. 書名 粉体の表面処理・複合化技術集大成	

〔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)	
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
---------	---------