

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590169
 研究課題名（和文） 患者に優しいスーパージェネリック製剤の開発におけるシクロデキストリンの有効利用

研究課題名（英文） Potential Use of Cyclodextrins in the Development of Patient-Friendly Super-Generic Preparations

研究代表者

上釜 兼人（UEKAMA KANETO）
 崇城大学・薬学部・教授
 研究者番号：90040328

研究成果の概要：生体適合性に優れる各種シクロデキストリン（CyDs）を用いてスーパージェネリック製剤の開発を企図した基礎研究を実施し、以下の知見を得た。①HP- β -CyD を用いて抗酸化物質フラレン（C₆₀）のナノ粒子粉末の調製法と凝集安定性に優れる懸濁製剤の処方構築した。②コエンザイム Q₁₀/ γ -CyD 系では pseudorotaxane 様の超分子複合体を形成し、親水軟膏からの CoQ₁₀ 放出が有意に増大した。③ γ -CyD を用いて PEG 化インスリンの製剤特性（安定性、バイオアベイラビリティ、徐放出など）を改善し、蛋白質性薬物の高品位化の新技术を開発した。④両親媒性 β -CyDs を用いてインドメタシンの非晶質化やアスピリンの晶癖を制御すると、製剤の品質向上が可能なことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：親水性シクロデキストリン、包接複合体、フラレン C60、ナノ粒子、PEG 化インスリン、Polypseudorotaxane、放出制御、結晶形態の制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近の医薬品製剤は、高齢者・小児・障害者の使用性や安全性などを意識して様々な改良・工夫が行われている。ところが、口腔内速崩壊錠やゼリー・ヨーグルト状製剤の品質、矯味・矯臭、小児向けの坐剤・軟膏剤・貼付剤からの薬物放出挙動・粘膜および皮膚刺激性、嚥下障害のある患者向けの経口投与製剤やエアゾール剤の安全性・使用性など解決すべき問題が山積している。そこで本研究では、医療現場のニーズを捉えた製剤処方改良、ライフサイクルマネジメント、医療費低減に資する高品位製剤の構築、剤形変更を施した新規スーパージェネリック製剤の開発などを目指して、機能性素材シクロデキストリン (CyD) の有効利用を企図した。

環状オリゴ糖である CyD は、1976 年にプロスタグランジン E 類の可溶化・安定化に実際使用されて以来、様々な薬物の製剤化に国内外で広く利用されている。最近我が国においても、水溶性で安全性に優れる 2-hydroxypropyl- β -CyD (HP- β -CyD) や sulfo butylether- β -CyD (BE- β -CyD) を含有する注射剤や経口液剤が認可されたことは、CyD 誘導体の有効利用が拡大するものと期待される。このような状況下、医薬品製剤への多様な要請に応えるため、我々はこれまでに CyD 誘導体を用いて大腸送達システムの構築、各種放出制御製剤の処方設計、ペプチド性薬物の標的指向化、2,6-di-*O*-methyl- β -CyD (DM- β -CyD) による難水溶性薬物の多形転移や結晶化度の制御に関する検討を行ってきた [K. Uekama et al., *Chem. Rev.*, **98**, 2045-2076 (1998); K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 900-915 (2004)]。これらの研究実績を基盤にして、本研究では生体適合性に優れる親水性 CyDs を用いて、新剤形開発や製剤処方の改善に関する基礎的検討に取り

組むこととした。

2. 研究の目的

(1) 親水性 CyDs による難水溶性薬物のナノ粒子化と最適処方の構築

HP- β -CyD を用いて、難水溶性の抗酸化物質であるフラベン (C₆₀) のナノ粒子粉体の調製、粒子サイズの精密制御、凝集抑制法に関する検討を行った。さらに、 γ -CyD を用いて脂溶性の抗酸化薬物コエンザイム Q₁₀ の水溶性複合体の調製条件を検討し、外用剤への応用を試みた。

(2) γ -CyD を用いた PEG 化インスリンの Polypseudorotaxane 形成による持続放出システムの構築

モデル薬物インスリンをポリエチレングリコール (PEG) 化し、さらに、 γ -CyD を用いて polypseudorotaxane を調製して、in vitro および in vivo 放出挙動、酵素安定性、生理活性などを比較検討した。

(3) 両親媒性 β -CyDs による難水溶性薬物の結晶形態の制御と溶解性改善

DM- β -CyD、HP- β -CyD または HB- β -CyD を用いて薬物の結晶化度や晶癖などを制御し、薬物の溶解性や放出速度を精密に調節可能な製剤処方の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) ① HP- β -CyD による C₆₀ のナノ粒子化と凝集抑制

C₆₀ のナノ粒子は、マグネット付き電動メノウ乳鉢を用いて C₆₀ と各種 CyDs (モル比 = 1:2) を減圧下、4°C で 3 時間研和することにより調製した。粒子径は孔径 0.8 μ m のフィルターでろ過後、動的光散乱光度計 (DLS) により測定した。ナノ粒子の収率は、フィルター上に残った C₆₀ を総濃度から差し引くことにより算出した。

(1) ② CoQ₁₀/ γ -CyD 超分子複合体の調製と軟膏剤からの放出挙動の検討

CoQ₁₀/γ-CyD 複合体を溶解度法、混合粉碎法、混練法により調製し、溶出試験および各種軟膏基剤からの薬物放出挙動を Frantz 型拡散セルを用いて検討した。さらに、親水軟膏からの CoQ₁₀ の放出性を複合体、混練体および物理的混合物間で比較した。

(2) γ-CyD を用いた PEG 化インスリンの Polypseudorotaxane 形成による持続放出システムの構築

Mono-PEG 化インスリンの調製は、pH 10、室温にて succinimidyl-L-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine を反応させ、凍結乾燥後、HPLC を用いて精製した。これを γ-CyD 水溶液に添加し、4°C、12 時間静置して沈殿を形成させ、polypseudorotaxane を得た。安定性試験では、蛋白分解酵素トリプシンを用いて未分解のインスリン量を経時的に追跡した。In vivo 皮下投与実験にはラットを用い、血漿中インスリン濃度および血漿中グルコース濃度を測定した。

(3) ① DM-β-CyD によるインドメタシンの非晶質化と溶解性改善

水溶液からのインドメタシン (IMC) の結晶化に及ぼす各種 CyDs の影響を検討し、DM-β-CyD 水溶液から得た非晶質性 IMC と溶融急冷法により得た非晶質性 IMC の溶解速度を比較した。

② HB-β-CyDs および DM-β-CyD によるアスピリンの晶癖変化とその機構解明

水溶液からのアスピリンの結晶化に及ぼす CyDs の影響を検討した。次に、アスピリンの針状結晶を析出させた HB-β-CyD および DM-β-CyD 系について結晶の伸長方向の同定と経時的な形態変化を観察した。また、アスピリン単独溶液から得た板状結晶と HB-β-CyD および DM-β-CyD 添加溶液から得た針状結晶の溶解速度を比較検討した。

4. 研究成果

(1) ① HP-β-CyD による C₆₀ のナノ粒子化と凝集抑制

マグネット付き電動メノウ乳鉢を用いて HP-β-CyD、β-CyD または γ-CyD 系の C₆₀ ナノ粒子を調製した。C₆₀/HP-β-CyD 系のナノ粒子は水中において安定であり、50 nm の粒子径を 4 週間以上維持した。一方、C₆₀/γ-CyD 系のナノ粒子は漸次凝集し、4 週間後には約 700 nm 以上に増大した (Table 1)。

Table 1. Changes in Particle Size of the Nanosuspensions Containing C₆₀/HP-β-CyD, C₆₀/γ-CyD and C₆₀/β-CyD Systems as a Function of Storage Time at 25°C

	HP-β-CyD	β-CyD	γ-CyD
Initial	90.2±5.2	90.6±9.4	51.6±14
After 1 week	49.0±3.5	97.3±7.8	533.2±49
After 4 weeks	51.0±2.5	97.9±6.9	717.4±71

これらの知見より、HP-β-CyD は C₆₀ の分散性ならびに凝集安定性に優れるナノ粒子の調製に有用であると考えられる。

② CoQ₁₀/γ-CyD 超分子複合体の調製と軟膏基剤からの放出挙動の検討

5 分子の γ-CyD が CoQ₁₀ のイソプレノイド鎖を連なって包接した pseudorotaxane 様の超分子複合体形成を明らかにした。さらに、各種軟膏基剤からの薬物放出挙動を超分子複合体、混練体および物理的混合物間で比較し、以下の知見を得た。

1) CoQ₁₀/γ-CyD 超分子複合体を水に分散させると乳白色の懸濁液が得られ、孔径 0.8 μm のフィルターでろ過後の平均粒子径は 341 nm であった (Fig. 1)。

2) 各種軟膏基剤からの CoQ₁₀ の放出挙動を Frantz 型拡散セルを用いて検討した結果、CoQ₁₀ の放出速度は、プロピレングリコールを含有する親水軟膏で最も増大した。

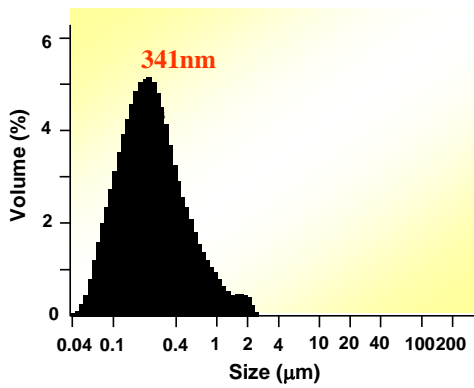


Fig. 1 Distribution Profiles of Particle Size for CoQ₁₀/CyD Kneading Product, Measured by Particle Size Analyzer (Coulter LS230) after Filtration through 0.8 μm Filter.

(2) γ-CyD を用いた PEG 化インスリンの Polypseudorotaxane 形成による持続放出システムの構築

インスリンを PEG 化し、さらに、γ-CyD を用いて polypseudorotaxane (Fig. 2) を調製して、各種インスリンの in vitro および in vivo 放出挙動並びに生理活性を比較検討した。ラット背部に皮下投与後の血漿中インスリン濃度や血糖降下作用は、polypseudorotaxane 系で有意に増大し、持続化効果も市販持続性インスリンよりも優れていた。

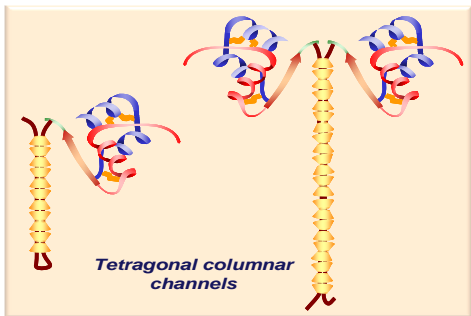


Fig.2 Proposed Structures of Pegylated Insulin/CyD Polypseudorotaxanes

これらの知見に基づいて、polypseudorotaxane の有用性は次のように考えられる：① 親水性 CyD を用いて水溶液から高収率かつ簡便に包接体を調製できる。② CyD の種類や添加濃度を変えることにより、PEG 化薬物の放出速度を制御できる。③ 様々な

PEG 化タンパク質や PEG 化低分子薬物の徐放化並びにバイオアベイラビリティ改善に応用できる。④ 持続放出システムとして、他の剤形（粉末吸入剤など）にも有効利用が期待される。

(3) 両親媒性 β-CyDs による難水溶性薬物の結晶形態の制御と溶解性改善

結晶多形や晶癖を有する難水溶性薬物のモデルに非ステロイド性抗炎症薬アスピリンとインドメタシンをそれぞれ選択し、DM-β-CyD または HB-β-CyD による結晶化度や晶癖の制御を行ない、以下の知見を得た。

① DM-β-CyD によるインドメタシンの非晶質化と溶解性改善

- 1) IMC は結晶化初期から Form V を析出したが、DM-β-CyD を添加すると Form V への結晶化は著しく抑制され、非晶質体を得られた。
- 2) DM-β-CyD 水溶液から調製した非晶質性 IMC の溶解速度は、熔融急冷体に比べて著しく速く (Fig. 3)、この溶解速度の差は表面物性や表面自由エネルギーの違いに起因するものと推定された。

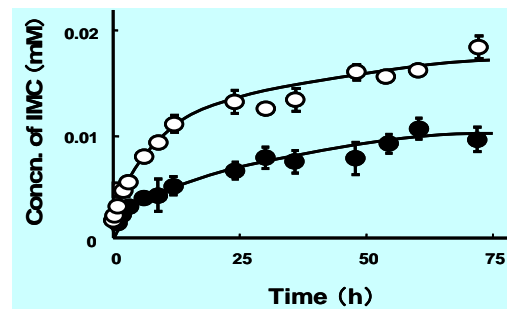


Fig. 3 Dissolution Profiles of Amorphous IMC (< 100 mesh) in Phosphate Buffer (pH 1.2) at 37°C, Measured by Dispersed Amount Method (100 rpm).

- : Amorphous form obtained from DM-β-CyD solution,
- : Amorphous form obtained by the quench-melt method.

② HB-β-CyD によるアスピリン結晶の晶癖変化とその機構解明

- 1) アスピリン単独、天然 CyDs および各種

CyDs 誘導体水溶液からは板状結晶が析出し、HB-β-CyD および DM-β-CyD 水液からは針状結晶が析出した (Fig. 4)。

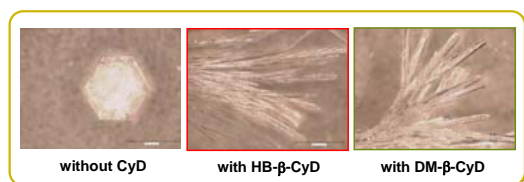


Fig. 4 Photographs of Aspirin Crystals Precipitated in the Absence and Presence of HB-β-CyD or DM-β-CyD (5 mM) in Sodium Phosphate/HCl Solution (pH 2.0), Stored for 1 Day at 4°C

- 2) HB-β-CyD および DM-β-CyD 水溶液の表面張力は他の CyDs に比べて小さいことから、晶癖変化には CyDs の界面活性作用が関与しているものと推定された。
- 3) 粉末 X 線回折の振動写真解析より、アスピリン針状結晶は *b* 軸方向へ伸長するものと推定された。
- 4) 結晶 X 線解析より、アスピリン/DM-β-CyD 複合体の結晶構造は、空間群 : P₂₁2₁2₁, 格子定数 : *a* = 14.305 Å, *b* = 19.256 Å, *c* = 28.634 Å であり、DM-β-CyD はアスピリンのフェニル基を 1 級水酸基側からモル比 1:1 で浅く包接するものと推定された。
- 5) アスピリンの溶解速度は HB-β-CyD 添加系 > DM-β-CyD 添加系 > 単独系の順であり、この相違は、結晶のぬれ性に起因するものと考えられた。

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 6 件)

- ① T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, K. Motoyama, H. Arima, K. Uekama, Slow Release System of Randomly-Pegylated Insulin by Polypseudorotaxane Formation

with Cyclodextrins., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 541-544 (2009). 査読あり

- ② T. Higashi, F. Hirayama, S. Misumi, H. Arima, K. Uekama, Design and Evaluation of Polypseudorotaxanes of Pegylated Insulin with Cyclodextrins as Sustained Release System., *Biomaterials.*, **29**, 3866-3871 (2008). 査読あり

- ③ K. Nishimura, T. Higashi, A. Yoshimatsu, F. Hirayama, K. Uekama, H. Arima, Pseudorotaxane-like Supramolecular Complex of Coenzyme Q₁₀ with γ-Cyclodextrin Formed by Solubility Method., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 701-706 (2008). 査読有り

- ④ T. Ishiguro, F. Hirayama, D. Iohara, K. Uekama, Prominent Inhibitory Effect of 2-Hydroxybutyl-β-cyclodextrin on Solution-mediated Polymorphic Transition of Chlorpropamide, *Chem. Lett.*, **37**, 816-817 (2008). 査読あり

- ⑤ D. Iohara, F. Hirayama, T. Ishiguro, H. Arima, K., Uekama, Preparation of Amorphous Indomethacin from Aqueous 6-Di-*O*-methyl-β-cyclodextrin Solution, *Int. J. Pharmaceut.*, **354**, 70-76 (2008). 査読あり

- ⑥ N. Sekiya, A. Nishiwaki, A. Nishiura, M. Yamamoto, K. Takeda, D. Iohara, F. Hirayama, H. Arima, K. Uekama, Improved Stability of OPALMON® Tablets under Humid Conditions IV : Formulation Development Study, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 7-11 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 吉田賢史, 平山文俊, 庵原大輔, 山口幸樹, 吉武康之, 原野一誠, 本山敬一,

有馬英俊, 上釜兼人, シクロデキストリン誘導体を用いたアスピリンの面選択的な結晶成長制御、日本薬学会第129年会、2009, 京都.

- ② D. Iohara, F. Hirayama, K. Uekama, Preparation of Water-Soluble C₆₀ Nanoparticles by Co-grinding with Hydrophilic Cyclodextrin Derivatives, 2008 American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition, Atlanta, U.S.A., 2008.
- ③ 庵原大輔, 平山文俊, 上釜兼人, ジメチル-β-シクロデキストリンを利用した水溶液からの非晶質性インドメタシンの調製とその溶解挙動、日本薬剤学会第23年会、札幌、2008.
- ④ K. Yoshida, F. Hirayama, D. Iohara, K. Yamaguchi, Y. Yoshitake, K. Harano, H. Arima, K. Uekama, Change in Crystal Habit of Aspirin by the Addition of Cyclodextrins in Aqueous Solution, 14th International Cyclodextrin Symposium, Kyoto, 2008.
- ⑤ T. Ishiguro, F. Hirayama, D. Iohara, K. Uekama, Effects of 2-Hydroxybutyl-β-cyclodextrin on Solution-mediated Transformation of Chlorpropamide, 14th International Cyclodextrin Symposium, Kyoto, 2008.

[図書] (計3件)

- ① K. Uekama and F. Hirayama, Improvement of Drug Properties by Cyclodextrins in "The Practice of Medicinal Chemistry (3rd Edition)", Ed. by C.G. Wermuth, Academic Press, London, UK, 2008, pp. 813-840.

② 上釜兼人, シクロデキストリンの応用技術—*Drug Delivery System*—, 小宮山 真, 寺尾啓二 (編), シーエムシー出版, 東京, 2008, pp. 159-170.

③ F. Hirayama and K. Uekama: Colonic Delivery in "Prodrugs: Challenges and Rewards", Ed. by V.J. Stella, R. Borchardt, Vol. 4 in AAPS Series Entitled "Biotechnology: Pharmaceutical Aspect," AAPS Press, New York, 2007, pp. 669-686.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.ph.sojo-u.ac.jp/~dio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上釜 兼人 (UEKAMA KANETO)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号: 90040328

(2) 研究分担者

平山 文俊 (HIRAYAMA FUMITOSHI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号: 90094036

松倉 誠 (MATSUKURA MAKOTO)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号: 70238997

瀬尾 量 (SEO HAKARU)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号: 20435142

鶴田 聡 (TSURUTA SATOSHI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号: 50412739