

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659017  
 研究課題名（和文） 機能性脂質ナノチューブへの分子サイズの大きい難水溶性薬物の封入法の確立  
 研究課題名（英文） Encapsulation of a poorly water-soluble drug with large molecular size into organic nanotube  
 研究代表者  
 山本恵司（YAMAMOTO KEIJI）  
 千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
 研究者番号：50110341

## 研究成果の概要（和文）：

難水溶性薬物であるヒドロコルチゾン(HC)及びフェニトイン(PHE)を用いて、有機ナノチューブへの封入検討を行った。有機ナノチューブの構造が安定に保たれるアセトンにおいて、溶液 NMR 測定を用いて溶解度を検討した結果、有機ナノチューブの溶解度は約 0.015mg/mL と極めて難溶であることが確認された。薬物封入には、薬物及び有機ナノチューブをアセトンを用いて溶媒留去物(EVP)を調製した。EVP 中における薬物の分子状態を粉末 X 線回折(PXRD)測定及び固体  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR 測定を用いて検討した。PXRD 測定の結果、薬物及び有機ナノチューブの 3:7(w/w)EVP においてハローパターンを示し、薬物の非晶質化が認められた。また固体  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR の結果、HC 及び有機ナノチューブの 3:7(w/w)EVP においては HC 結晶に由来するピークのブロード化が認められ、HC 分子が非晶質化している事が確認され、これらの結果から薬物は ONT 内に封入されたと推察された。

## 研究成果の概要（英文）：

Hydrocortisone (HC) as a poorly water-soluble drug was encapsulated into organic nanotube (ONT), which was formed by self-assembly of N-{12-[(2- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosyl)carbamoyl]dodecanyl}-glycylglycylglycine acid. The solubility of ONT in acetone was determined as 0.015 mg/mL by solution state  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy, confirming that ONT was poorly-soluble in acetone. Evaporation using acetone was performed to prepare ONTs loaded with HC. Powder X-ray diffraction pattern of evaporated sample with weight ratio of HC/ONT=3/7 showed a halo pattern without remained peaks of crystalline HC.  $^{13}\text{C}$ -solid state NMR measurements demonstrated that HC peaks became broadened in a spectrum of evaporated sample, compared with those of HC crystal. These results indicated that HC was encapsulated in ONT as amorphous state.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：有機ナノチューブ、難水溶性薬物、経口製剤、溶解性改善、固体分散体、非晶質、刺激応答性、放出制御

## 1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブに代表されるナノチューブ構造をもつ物質についての研究が広く行われている。近年では、タンパク質、DNA、合成高分子などの有機分子から構成される多様な有機ナノチューブが多く見出されている。脂質ナノチューブ(LNT)は有機ナノチューブの一種であり、両親媒性脂質分子が主に水中で自己集合することで形成される。LNTの発見は1984年とその歴史は古いが、カーボンナノチューブと比較して発展が遅れてきた。その最大の理由は、チューブ構造を形成する両親媒性物質を大量に得る手法が確立されず、コスト面で従来の材料と競争できるまでに至らなかったためである。しかし、近年清水らのグループ(産業総合研究所)は安価な原料からLNTを大量に調製できる手法を開発した。さらに、官能基や側鎖の長さを変えた脂質を合成することで、様々な機能を有したサイズの異なるLNT(10-100nm)が形成されることを明らかとした。

現在、世界医薬品市場の7割の売り上げを固形経口投与製剤が占めており、コンプライアンスの観点から、今後も重要視される剤形の一つと考えられる。申請者らは、Molecular Pharmaceuticsの概念をもとに難水溶性薬物の溶解性・吸収性改善を目的として多用される固体複合体の調製及びその複合体形成メカニズムの検討を行ってきた。特に、シクロデキストリン、メソポーラスシリカ等のホスト化合物にゲスト薬物を封入した包接化合物や薬物封入担体を調製し、その分子レベルでの状態を評価し報告を行ってきた。しかし、上記のホスト化合物の空洞径は数nm程度が限界であり、近年開発される分子量の大きい薬物(高分子量薬物)を封入するのは困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究では難水溶性薬物の有機ナノチューブへの新規薬物封入方法として、有機溶媒を用いた溶媒留去法の検討を行った。初めに、各種有機溶媒中での有機ナノチューブの安定性を検討した。その後、有機ナノチューブの構造を安定に保持できる有機溶媒を用いて、溶媒留去法による薬物封入検討を行った。また、固体<sup>13</sup>C-NMR測定を用いて、有機ナノチューブ内部での薬物の分子状態の評価を行った。その後、溶出試験を用いて有機ナノチューブからの薬物の溶解性検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 試料

両親媒性分子(N-{12-[(2- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopyranosyl) carbamoyl]dodecanyl}-glycylglycylglycine acid)

は産業技術総合研究所で供与されたものを使用した。Hydrocortisone (HC)は和光純薬工業より購入し、そのまま使用した。Phenytoin (PHE)はナカライテスクより購入し、そのまま使用した。

### 3.2. 有機ナノチューブの調製

両親媒性分子を、乳棒・乳鉢で軽く粉碎後水へ濃度が1.0 mg/mLとなるように加え、3分間超音波処理して分散させた。この分散液をオイルバスを用いて攪拌しながら、10分間100 °Cで加熱還流を行い両親媒性分子を溶解させた。加熱終了後に室温まで空冷し、分散液として有機ナノチューブを得た。得られた分散液を凍結乾燥機(Freeze dryer FD-1000, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用いて凍結乾燥処理することで、有機ナノチューブを粉末として得た。

### 3.3. 物理的混合物(Physical mixture; PM)

薬物と有機ナノチューブを重量比5:5及び3:7の割合でバイアル瓶内に入れ、ボルテックスミキサーを用いて、1分間混合することにより調製した。

### 3.4. 溶媒留去物(Evaporated sample; EVP)

薬物をアセトン中に溶解させた溶液中に、薬物との重量比が5:5及び3:7となるように有機ナノチューブを分散させた。このとき有機ナノチューブの濃度が、1.0 mg/mLとなるように調製した。分散液を3分間超音波処理を行った後、30 °Cで1時間溶媒を留去し、6時間減圧乾燥処理を行うことにより調製した。

### 3.5. 粉末X線回折測定(PXRD測定)

理学電機株式会社製MiniFlex IIを用いて測定を行った。30 kV、15 mAのCu Ka線を用いて25 °Cで測定を行った。測定範囲は $2\theta=2-35^\circ$ 、走査速度は4 °/minとした。

### 3.6. 透過型電子顕微鏡測定

ブチラール支持膜付きグリッド(STEM Cu160, Oken Shoji Co. Ltd., Tokyo, Japan)及びコロジオン支持膜付きグリッド(Cu200, Nisshin EM Co. Ltd., Tokyo, Japan)のフィルム被膜側に有機ナノチューブ分散液を5分間吸着させた。過剰な溶液を濾紙で吸い取った後、水酸化ナトリウム水溶液によりpH7.0に調製した2%リンタングステン酸溶液をグリッドに1分間吸着させ、ネガティブ染色を行った。このグリッドをデシケーターで1日乾燥させ、TEM測定試料とした。このグリッドについてJEOL JEM-2100F(JEOL RESONANCE Co. Ltd., Tokyo, Japan)を用い、加速電圧:120 kVで測定を行った。

### 3.7. 溶液 <sup>1</sup>H-NMR 測定

アセトン中へ有機ナノチューブを濃度が 1.0 mg/mL となるように加え、3 分間超音波処理して分散させた。得られた有機ナノチューブ分散液について、JNM-LA500 (11.7T) (JEOL RESONANCE Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用い、積算回数: 32 回、緩和待ち時間: 60 s、温度: 25 °C、テトラメチルシランを内部標準に用いて (ピークを 0.0 ppm に設定) 測定を行った。得られた積分値から、有機ナノチューブのアセトンへの溶解度を求めた。

### 3.8. 固体 <sup>13</sup>C-NMR 測定

日本電子製 JNM-ECA600 (14.1 T) (JEOL RESONANCE Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。試料約 150 mg を窒化ケイ素製 4 mm 試料管に封入し室温で測定を行った。ヘキサメチルベンゼンを外部標準に用いて (高磁場側のピークを 17.3 ppm に設定) キャリブレーションを行った。本研究における固体 <sup>13</sup>C-NMR 測定には、交差分極 (Cross polarization; CP) とマジック角回転 (Magic angle spinning; MAS) を組み合わせた CP/MAS 法を使用した。測定条件; 回転数 15 kHz、コンタクト時間 5 ms、緩和待ち時間 4-7 s、サンプリングポイント 2048、積算回数 1000-10,000 scan

## 4. 研究成果

### 4.1. 有機ナノチューブの物理化学的特性の評価

有機ナノチューブのオリゴメチレン鎖の片端にカルボキシル基、もう一端にグルコース水酸基を有するくさび形分子 (N-{12-[(2- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopyranosyl) carbamoyl]dodecanyl}-glycylglycylglycine acid) が、水中で自己集合することにより形成する有機ナノチューブを用いた。TEM 画像から有機ナノチューブを 250 個を無作為に選び、それらの内径、外径及び膜厚を測定した。その結果、有機ナノチューブは外径  $14.4 \pm 1.7$  nm、内径  $7.3 \pm 0.9$  nm、膜厚  $3.4 \pm 0.7$  nm ( $n = 250$ , mean  $\pm$  SD) の均一な構造を形成しているのが確認された。

### 4.2. 有機ナノチューブの有機溶媒中での安定性検討

溶媒留去法による薬物封入を行う前検討として、分散後においても有機ナノチューブ構造が安定に保たれる有機溶媒のスクリーニング検討を行った。

有機ナノチューブを各種有機溶媒に濃度として 1.0 mg/mL となるように加え、3 分間超音波処理した分散液の外観を観察した。その結果、N,N-ジメチルホルムアミド及びジメチルスルホキシドを用いた場合では澄明な

溶液となり、有機ナノチューブが溶解したと考えられた。n-ヘキサン、シクロヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム及びジクロロメタンにおいては、有機ナノチューブが凝集している様子が観察された。一方、2-プロパノール、アセトン、エタノール、メタノール、アセトニトリル及び水では有機ナノチューブは凝集せず均一に分散した。

有機溶媒中へ分散後の有機ナノチューブの構造を、TEM 測定により観察した。n-ヘキサン、シクロヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム及びジクロロメタンについてはチューブ構造が確認されずテープ状の構造が観察された。一方で 2-プロパノール、アセトン、エタノール、メタノール、アセトニトリル及び水については分散前と同様にチューブ構造が確認された。

以降の検討には、溶媒留去後もチューブ構造が安定に保たれた有機溶媒の中から、最も沸点の低いアセトンを選択した。アセトン中への有機ナノチューブの溶解量を、溶液 <sup>1</sup>H-NMR 測定により評価した。アセトンに有機ナノチューブを 1.0 mg/mL となるように加え 3 分間超音波処理した分散液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル及び、比較としてジメチルスルホキシドに 1.0 mg/mL となるように加え、有機ナノチューブを溶解した溶液の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定した。ジメチルスルホキシドの場合では有機ナノチューブに由来するピークが明瞭に観察されたのに対し、アセトンでは有機ナノチューブに由来するピークはほとんど観察されなかった。ここで TMS のピーク (0.00 ppm) に対するオリゴメチレン鎖 (1.28 ppm) のピーク積分値を求めた。そして、TMS の仕込み濃度及び得られた積分値から、アセトン中に溶解している有機ナノチューブ濃度を算出した。その結果、有機ナノチューブのアセトン中への溶解度は  $0.015 \pm 0.002$  mg/mL を示した。有機ナノチューブは、仕込み濃度 (1.0 mg/mL) の 2 wt% 以下しかアセトンに溶解しておらず、有機ナノチューブはアセトンに難溶であることが確認された。

以上の結果より、本有機ナノチューブは極性の高い有機溶媒中においてチューブ構造を保ったまま均一に分散することが認められた。また、有機溶媒中で均一に分散した有機ナノチューブは、溶媒留去処理後もチューブ構造を安定に保つ事が示された。有機ナノチューブは、それら有機溶媒中で最も沸点の低いアセトンに極めて難溶であることが確認された。

### 4.3. 粉末 X 線回折 (PXRD) 測定

HC 及び PHE において、有機ナノチューブとの PM 及び EVP の粉末 X 線回折パターンを比較した。PM ではいずれの重量比においても HC 結晶由来の回折ピークが認められた。5:5

の EVP では、HC 由来の回折ピークの残存が認められた。一方、3:7 の EVP においては HC 由来の回折ピークは消失し、ハローパターンが観察された。このことから、3:7 の EVP 中では HC が非晶質化していると考えられた。同様に PHE においても PM ではいずれの重量比において、PHE 結晶由来の回折ピークが認められた。5:5 の EVP では、PHE 由来の回折ピークの残存が認められた。一方 3:7 の EVP においては PHE 由来の回折ピークは消失し、ハローパターンが観察された。このことから、3:7 の EVP 中では PHE が非晶質化していると考えられた。

#### 4.4. $^{13}\text{C}$ -固体 NMR 測定

EVP 中における薬物の分子状態を、 $^{13}\text{C}$ -固体 NMR 測定により評価した。モデル薬物として HC を用いた。HC、有機ナノチューブ及び HC と有機ナノチューブの重量比 3:7 の EVP の  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS NMR スペクトルを測定した。

HC では、200-220 ppm にカルボニル炭素に由来するピーク (C3, C20) が、120-180 ppm に C=C 二重結合の炭素に由来するピーク (C4, C5) が観察される。有機ナノチューブでは、170-180 ppm にアミド基及びカルボン酸のカルボニル炭素に由来するピークが観察される。その結果、HC ではシャープなピーク (C3, C4, C20) が EVP 中ではブロード化している様子が観察された。HC の C=C 二重結合の炭素に由来するピーク (C5) に関しては、有機ナノチューブのカルボニル炭素に由来するピークと重なり評価できなかつた。HC のピークのブロード化は有機ナノチューブとの溶媒留去処理により、HC が結晶から非晶質へ変化したためと考えられた。

HC 及び PHE の構造式及び三次元薬物分子模型を用いて考察すると、有機ナノチューブの内径 (7.3 ± 0.9 nm) は HC の分子サイズ (14.3 Å × 16.1 Å) に対して約 5 倍、PHE の分子サイズ (12.2 Å × 12.6 Å) に対して約 6 倍であった。これまでに Sliwiska-Bartkowiak らは、多孔性シリカへ封入される薬物の分子径がシリカ細孔径の 15 倍よりも小さい場合は、薬物が細孔内で非晶質化することを報告している。PXRD 及び  $^{13}\text{C}$ -固体 NMR 測定の結果より、HC 及び PHE は有機ナノチューブへ封入され、非晶質化したと考えられた。有機ナノチューブをアセトンに分散させて超音波処理した後の TEM 画像では、各チューブ同士が集まり重なり合う構造が形成されていた。Kameta らは有機ナノチューブではチューブ内部以外に、チューブ同士で形成された空間の存在を報告しており、その空間にも物質の封入が可能であると予想している。実際に、有機ナノチューブのチューブ内部の他にチューブ同士で形成される三次元空間にもタンパク質が封入されることが報告されてい

る。このことから、本研究で示した EVP においても、薬物はチューブ内及びチューブ同士で形成された空間内に封入され、非晶質化したと考えられた。

結論として、両親媒性分子である (N-{12-[(2- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucopyranosyl) carbonyl]dodecanyl}-glycylglycylglycine acid) を水へ分散させた後加熱還流することで、均一な構造を持つ有機ナノチューブが形成された。得られた有機ナノチューブの各種有機溶媒に対する安定性を検討した結果、極性の高い有機溶媒中において均一に分散しその構造を保持することが示された。さらにそれら有機溶媒の中で最も沸点の低いアセトンには、有機ナノチューブは極めて難溶であった。アセトンを用いた溶媒留去法により、難水溶性薬物である HC 及び PHE が非晶質状態で有機ナノチューブに封入されたと考えられた。

本研究では、有機溶媒を用いた溶媒留去法により難水溶性薬物を有機ナノチューブへ封入することに成功した。本手法は難水溶性薬物を短時間で、高い封入率で封入できる方法である。さらに溶媒の種類を選択することで幅広い薬物へ適用可能であり、封入法としての応用性が高い手法である。有機ナノチューブは構成する両親媒性分子の種類により、サイズや特性をコントロールでき、熱や pH の変化といった外部刺激による薬物放出制御も達成できる有用な DDS 担体である。本研究で見いだされた知見は、今後 DDS 担体としての有機ナノチューブのさらなる発展・実用化に貢献すると期待される。

#### 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 1 件) <査読有>

1. S. Tanabe, K. Higashi, M. Umino, W. Limwikanant, K. Yamamoto, K. Moribe: Yellow coloration phenomena of incorporated indomethacin into folded sheet mesoporous materials. *Int. J. Pharm.* **429**, 38-45 (2012).

[学会発表] (計 4 件)

1. 並木祥恵, Waree Limwikanant, 東頭二郎, 森部久仁一, 山本恵司: 混合粉碎による piroxicam の PEG/ $\beta$ -CD-polypseudorotaxane への封入、第 29 回シクロデキストリンシンポジウム、2012. 9. 6-7 (発表日 9. 6)、東京  
2. 並木祥恵, Waree Limwikanant, 東頭二郎, 森部久仁一, 山本恵司: 混合粉碎と加熱による CD-polypseudorotaxane 同士で形成される空間への薬物封入、日本薬剤学会第 27

年会 24-5-12、2012. 5. 24-26(発表日 5. 24)、  
兵庫

3. 牧島隆史、東 颯二郎、Waree Limwikrant、  
森部久仁一、丁武考、増田光俊、清水敏美、  
山本恵司：有機ナノチューブを用いたヒドロ  
コルチゾンの溶解性改善、日本薬学会第  
132 年会、2012. 3. 28-31(発表日 3. 30)、北海  
道

4. 東 颯二郎、田邊修一、Waree Limwikrant、  
森部久仁一、山本恵司：FSM 細孔内のイン  
ドメタシン着色メカニズムの検討、日本薬学  
会第 132 年会、2012. 3. 28-31(発表日 3. 30)、  
北海道

[その他]

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 恵司 (YAMAMOTO KEIJI)  
千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：50110341

### (2) 研究分担者

森部 久仁一 (MORIBE KUNIKAZU)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：50266350

東 颯二郎 (HIGASHI KENJIROU)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：40451760

リムウィ克蘭 ワリー (LIMWIKRANT WAREE)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：50595907