

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460032

研究課題名(和文)非対称性ナノチューブ構造を形成する超分子複合体の創製及び放出制御担体への応用

研究課題名(英文) Design of supramolecular complexes to form asymmetry nanotube structure and the application for controlled release carrier

研究代表者

山本 恵司 (Yamamoto, Keiji)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：50110341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲスト薬物を各種ホスト担体(有機ナノチューブとシクロデキストリンポリシユードロタキサン)に封入した複合体中のゲスト薬物の分子状態と溶出性の関連性を明らかとした。そして、ホスト担体の性質に応じてゲスト薬物の分子状態を変化させることで、ゲスト薬物の封入率及び溶出性をコントロール出来ることが示された。本研究で得られた分子レベルの知見は、今後の各種ホスト担体の製剤分野への更なる応用を促進するための一助になると期待される。そして、治療薬や治療目的に合わせて使える新しい薬物放出制御担体の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, the relationships between molecular state and dissolution character of guest drug in host materials (organic nanotube and cyclodextrin-polypseudorotaxane) were clarified. The encapsulation ratio and dissolution of guest drug can be controlled by changing the character of host materials. The knowledge obtained in this study will be a help on promoting the application of host materials in pharmaceutical sciences. In the future, new controlled release carriers tailored to therapeutic drug and therapeutic purpose are expected to be developed.

研究分野：物理薬剤学

キーワード：分子製剤学 有機ナノチューブ シクロデキストリン 分子状態 薬物溶解性 放出制御 固体NMR 難水溶性薬物

1. 研究開始当初の背景

多孔性粉体やシクロデキストリン(CD)等のホスト担体を用いることによるゲスト薬物の溶解性改善や放出制御に関する研究は、これまでも数多く報告されていた。一方、封入された薬物の分子状態と溶解性とを関連づけた論文は数えるのみであった。特に、薬物が細孔の内部・外部のどちらに存在するかを示すのは困難であり、それぞれの薬物の封入状態や放出性の評価を行った例は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では、ナノチューブ構造を形成する超分子複合体の分子状態を評価し、その製剤的特性を明らかにすることを目的としている。本研究では、大きく分けて下記に示す2つの検討を行った。

(1) 非ステロイド性抗炎症薬であるイブプロフェン(ibu)を、細孔径が同じで内側及び外側の官能基が異なる2種類の有機ナノチューブ(ONT-1及びONT-2)に封入した。そして、ibu封入ONTの分子状態を固体NMR測定により評価した。そして、各ONTの特性が、ibu封入量及び溶解性に与える影響について検討を行った。

(2) ポリエチレングリコール(PEG)を γ -シクロデキストリン(γ -CD)空洞内に含有したポリシュードロタキサン(PPRX)に薬物を封入した薬物/(PEG/ γ -CD-PPRX)複合体を調製した。様々な特性を有する11種類の薬物を用いてスクリーニング検討し、(PEG/ γ -CD-PPRX)のホスト能を評価した。さらに、薬物/(PEG/ γ -CD-PPRX)複合体からの薬物溶出特性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 外側表面にグルコース水酸基(2-N-glucosamide)また内側表面にカルボキシル基を持つアニオン性のONT-1、及び外側表面にグルコース水酸基(1-N-glucosamide)また内側表面にアミノ基を持つカチオン性のONT-2を用いた。ibu及びONTを各質量比で混合し、有機溶媒に加えて溶媒留去することで溶媒留去物(EVP)を調製した。得られたibu/ONT-1 EVP及びibu/ONT-2 EVPについて、電界放出型透過電子顕微鏡(FE-TEM)測定、粉末X線回折(PXRD)測定、示差走査熱量(DSC)測定、固体NMR測定及び溶出試験を行った。特に固体NMR測定では、40 kHz回転下で ^{13}C cross polarization (CP)法及びsingle pulse (SP)法の2つの一次元パルスシーケンスを適用し、また2次元 ^1H - ^{13}C heteronuclear correlation (HETCOR) NMR測定も行った。

(2) 精製水に溶解させたPEG及び γ -CDを共沈させることによりPPRXを調製した。各種昇華性薬物(11種類)と得られたPEG/ γ -CD-PPRXの物理的混合物をアンプルに封入し、密封加熱処理

したものを密封加熱物(SH)とした。各SHのPXRD測定を行い、複合体形成の有無を観察した。さらに適切な溶媒で過剰な薬物を洗浄・除去し、得られた複合体について ^1H NMR測定を行い、化学量論比を決定した。そして、各薬物の3D分子モデルから算出した分子最大断面積及びオクタノール水係数(log P)と複合体の化学量論比を比較した。また、抗炎症薬ナプロキセン(NPX)の系について、固体NMR測定及び溶出試験を行い、複合体中の薬物の分子状態と溶出性の関係性について考察した。

4. 研究成果

(1) - ONTへのibuの封入性評価;PXRD及びDSC測定により、各ONTへのibuの封入量を定量的に評価した(Figure (1)-1)。ONT-1を用いたEVPでは約10%のibuが非晶質化したのに対し、ONT-2を用いたEVPにおいては約30%のibuが非晶質化した。この結果より、内側表面の官能基にカチオン性のアミノ基を有するONT-2は、アニオン性のカルボキシル基を有するONT-1と比較して約20%多くのibuが封入できることが明らかとなった。

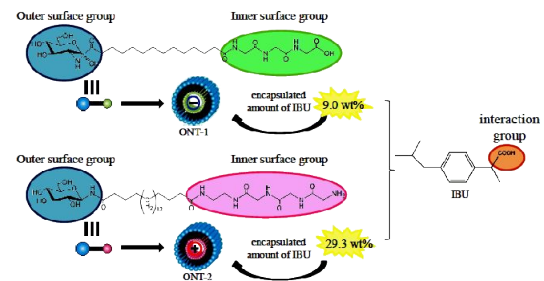


Figure (1)-1. Encapsulation of IBU into ONTs.

(1) - ONTに封入されたibuの分子状態評価;2種類のパルスシーケンス(CP法及びSP法)を用いてibu/ONT-1 EVP及びibu/ONT-2 EVPの ^{13}C NMR測定を行った。CP法では主にONTの外表面に存在する運動性が低いibuが観察されたのに対し、SP法ではONTの内側空間に存在する運動性が高いibu及びONTの外側表面に存在する運動性の低いibuが両方とも観察された。この結果より、いずれのEVP中においても、運動性の異なる2種類のibu分子がONTの内側空間および外側表面に存在することが明らかとなった。次にibuとONTの分子間相互作用を各 ^{13}C ピークのケミカルシフト値及びピーク形状から検討した。その結果ONTへのibu封入に伴い、ibuのカルボキシル基、ONTの外側表面にあるグルコース水酸基及び内側表面の官能基(カルボキシル基およびアミノ基)に隣接する ^{13}C ピークに特に大きな変化が観察された。この結果より、ibuとONT-1及びONT-2の内側及び外側表面の分子間相互作用部位を明らかとした。さらに2次元 ^1H - ^{13}C HETCOR測定により、ibuのカルボキシル基の ^{13}C とONT外側表面のグルコース水

酸基の ^1H の相関を検出した(Figure (1)-2)。この IBU と ONT 外側表面の分子間相互作用のダイレクト評価により、IBU が ONT の内側表面のみならず外側表面に存在することを証明できた。

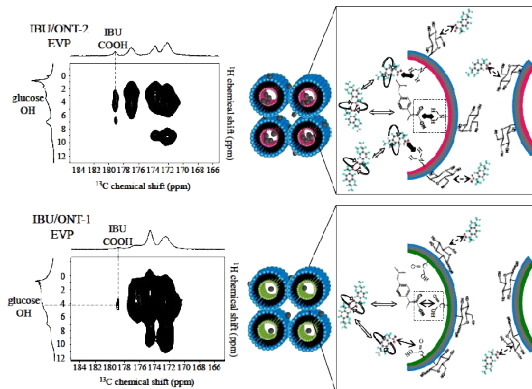


Figure (1)-2. 2D ^1H - ^{13}C HETCOR spectra and a schematic illustration of IBU/ONT-1 EVP and IBU/ONT-2 EVP.

次に、 ^{13}C スペクトルの波形分離により ONT の内側空間及び外側表面の IBU 封入率を定量的に評価した。その結果、内側空間/外側表面の IBU 封入率は ONT-1 では約 1:1、また ONT-2 では約 2:1 と算出された。ONT-1 および ONT-2 それぞれへの IBU 封入量を考慮すると、ONT-2 の内側空間に封入された IBU 量は、ONT-1 の約 4 倍、外側表面にある IBU 量は約 2 倍である。この結果より、ONT へ IBU を封入する溶媒留去の際に、カチオン性 ONT-2 は静電相互作用を介して多くの IBU を内側空間に保持したと考えられた。一方、アニオン性 ONT-1 では、静電反発により IBU が保持できず封入量が低くなったと考察した。

(1) - ONT に封入された IBU の溶解性評価；

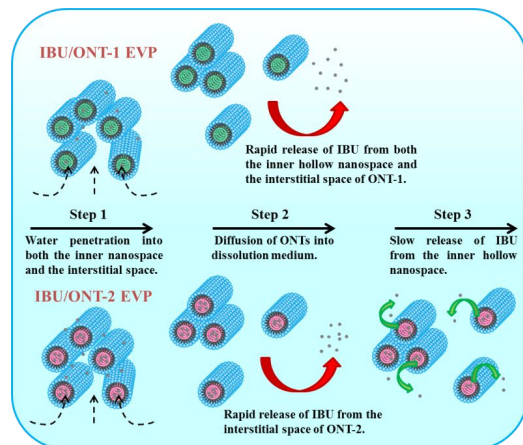


Figure (1)-3. A schematic illustration of IBU dissolution from ONT.

パドル法を用いた溶出試験の結果、IBU 結晶の溶出と比較して ONT-1 から IBU は速やかに溶解するのが観察された。一方、ONT-2 か

らの IBU 溶出は有意に抑制された。ここで認められた各 ONT 間での IBU の溶出性の相違は、ONT 内側表面の官能基と IBU との相互作用様式の違いに由来すると考えられた。Figure (1)-3 に固体 NMR 測定により明らかとした分子状態に基づき、各 ONT からの IBU 溶出を考察した模式図を示す。IBU/ONT EVP の溶出は下記 3 段階で生じると考えられる：I. ONT 内側空間及び ONT 同士で形成される外側空間への水の浸入、II. 溶出媒体への ONT 分散とそれに伴う外側空間からの IBU の溶出、III. ONT の内側空間に存在する IBU の放出。IBU/ONT-1 EVP においては、内側空間における IBU と ONT-1 の相互作用が弱いいため、II と III が同時に起こり、ほぼすべての IBU が速やかに放出されたと推察された。一方、IBU/ONT-2 EVP においては、IBU と ONT-2 は静電相互作用による強い相互作用を形成しているため、外側空間の IBU が放出された後に、内側にある IBU が徐々に放出されたと考えられた。

(1) - 結論；本研究により、難水溶性薬物 IBU を ONT に封入可能であることを明らかとした。そして、封入された IBU は ONT の内側空間だけでなく外側表面にも保持されることが示された。また、固体 NMR 測定により、IBU と ONT の内側表面及び外側表面と分子間相互作用部位を特定できた。さらに、固体 NMR より明らかとした IBU の分子状態に基づき、異なる ONT への IBU の封入性及び溶出性の相違を説明できた。本研究で示したように、ONT の表面に種々の官能基を導入することによって、薬物封入率及び溶出性をコントロールすることができる。ONT を用いた製剤処方設計においては、ホスト - ゲスト相互作用の理解が必要不可欠になると考えられることから、本研究で得られた分子レベルの知見は、今後の ONT の製剤分野への更なる応用を促進するための一助になると期待される。

(2) - 各種薬物/(PEG/CD-PPRX)複合体の調製；粉末 X 線回折測定の結果、いずれのゲスト薬物を用いた場合でも、 γ -CD の構造が hexagonal-columnar 形から monoclinic-columnar 形へ変化し、複合体が認められた (Figure (2)-1)。

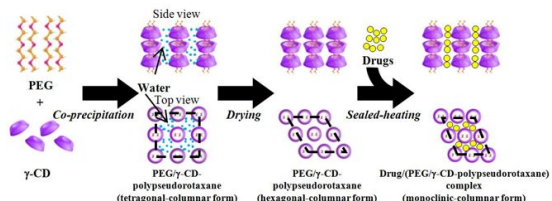


Figure (2)-1. A schematic illustration of the formation of drug/(PEG/ γ -CD-PPRX) complex by sealed-heating method.

溶液 ^1H NMR 測定による定量的結果、一つの

芳香環を有する分子サイズの小さい薬物 (benzoic acid, salicylamide, paracetamol, *p*-aminobenzoic acid) では薬物/ γ -CD の量論比は 2 : 1 と算出された。一方、芳香環を 2-4 有する分子サイズの大きい薬物 (2-naphthoic acid, NPX, anthracene, phenothiazine, pyrene) を用いた場合は、薬物/ γ -CD の量論比は 1 : 1 と算出された。この結果より、本複合体形成はゲスト薬物のサイズ依存的におきることが示された。これまでに γ -CD 空洞内には芳香環 2 つ程度を含有できることが報告されており、 γ -CD-PPRX 同士で形成される分子空間は γ -CD の空洞内と同程度であると考えられた。さらに、よりサイズの大きいゲスト薬物 (tetracene, triphenylene perylene) を用いた場合は、立体障害による影響が大きく複合体形成は認められたが、量論比に従う複合体形成は起きなかった。

(2) - ゲスト薬物の特性が複合体形成に及ぼす影響；薬物の分子サイズ及び log P が複合体に及ぼす影響を評価した。3D 分子モデルによる計算から、monoclinic-columnar 形における γ -CD 同士で形成される空間のサイズは 44.3 \AA^2 と算出された (Figure (2)-2)。

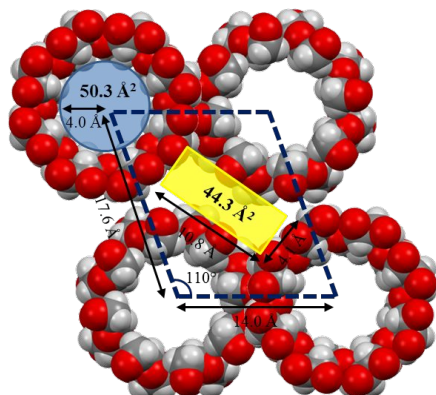


Figure (2)-2. A schematic representation of monoclinic-columnar form of γ -CD viewed along c-axis.

また、芳香環 1 及び 2 つを有する薬物の分子最大断面積は $40\text{-}55 \text{ \AA}^2$ と $60\text{-}75 \text{ \AA}^2$ と算出されたことから、分子最大断面積が形成される複合体の化学量論比に強く影響していることが示唆された。また、log P が低い薬物 (log P < 1, *p*-aminobenzoic acid 及び paracetamol) に加えて及び log P が高い薬物 (log P < 4, anthracene 及び phenothiazine) のいずれの場合にも量論的な複合体形成が認められた。このことから、 γ -CD 同士で形成される空間には親水性薬物及び疎水性薬物がともに封入可能であることが明らかとなった。CD が columnar 構造を形成する場合には、隣接する CD のヒドロキシル基同士が水素結合する。この際ヒドロキシル基同士が結合に用いられるため、CD 同士で形成される空間はより疎水性になる。このことから、log P が高い薬物についても、CD の外側表面と疎水性相互作用あるいは

van der Waals 力により相互作用が可能となり、複合体が得られたと推察された。

(2) - 複合体中の薬物分子状態及び溶出性評価；NPX/(PEG/ γ -CD-PPRX) 複合体について、 ^{13}C -固体 NMR 測定を行い、NPX の分子状態を評価した。SH のスペクトルにおいては、NPX 原薬のスペクトルと比較して、NPX のカルボニル炭素に由来するピークの高磁場シフト及びブロード化が認められた。これは、複合体形成により NPX の結晶構造が壊れ、単量体として新たに PEG/ γ -CD-PPRX と分子間相互作用を形成したためと考えられた。次に複合体からの NPX の溶出性を溶出試験により評価した (Figure (2)-3)。溶出試験は日本薬局方第 2 液 (pH=6.8) を用いてシンク条件にて行った。NPX 原薬においては 10 分間の NPX の溶出率が 60% 程度に留まった。一方、SH では、NPX 原薬と比較して優れた溶出性を示し、10 分間でほぼ 100% の NPX 溶出が認められた。このことから、NPX は PEG/ γ -CD-PPRX との複合体形成により溶出性が向上することが明らかとなった。これは固体 NMR 測定の結果から明らかとなったように、複合体において NPX が溶解しやすい単分子状態で存在するためと推察された。

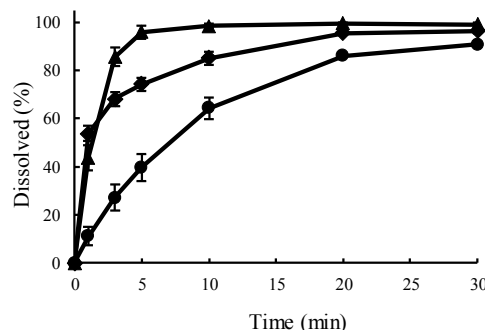


Figure (2)-3. Dissolution profiles of NPX from (○) NPX crystal, (●) NPX/(PEG/ γ -CD-PPRX) physical mixture (NPX/ γ -CD = 1:1), and (▲) NPX/(PEG/ γ -CD-PPRX) SH (NPX/ γ -CD = 1:1) in Japanese Pharmacopoeia XV second (JP 2nd) dissolution medium at pH=6.8, 37 °C. (n=3, mean \pm S.D.).

(2) - 結論；第一章

密封加熱により様々な昇華性薬物が PEG/ γ -CD-PPRX の column 同士で形成される空間に封入可能であることが示された。PEG/ γ -CD-PPRX との複合体形成により、難水溶性薬物の溶解特性が改善されることが明らかとなった。本研究において見出した薬物/(PEG/ γ -CD-PPRX) 複合体形成に関する知見は、polymer/CD-PPRX の医薬品分野への応用性を拡大するものである。薬物/(PEG/ γ -CD-PPRX) 複合体は、封入された薬物の溶解特性の改善や溶出性制御など有用な製剤特性を示している。今後、治療薬や治療目的に合わせた製剤設計を可能とする新しい薬物放出制御担体としての利用が期待さ

れる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Liu, N., Higashi, K., Kikuchi, J., Ando, S., Kameta, N., Ding, W., Masuda, M., Shimizu, T., Ueda, K., Yamamoto, K., Moribe, K.: Molecular-level understanding of the encapsulation and dissolution of poorly water-soluble ibuprofen by functionalized organic nanotubes using solid-state NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* 2015, in press. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b00939. 査読あり.
2. Higashi, K., Waraya, H., Lin, L.K., Namiki, S., Ogawa, M., Limwibrant, W., Yamamoto, K., Moribe, K.: Application of intermolecular spaces between polyethylene glycol/ γ -cyclodextrin-polypseudorotaxanes as a host for various guest drugs. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14, 2773-2781. DOI: 10.1021/cg401934v. 査読あり.
3. Moribe, K., Makishima, T., Higashi, K., Liu, N., Limwibrant, W., Ding, W., Masuda, M., Shimizu, T., Yamamoto, K.: Encapsulation of poorly water-soluble drugs into organic nanotubes for improving drug dissolution. *Int. J. Pharm.* 2014, 469, 190-196. DOI: 10.1016/j.ijpharm. 査読あり.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Higashi, K., Takamizawa, M., Katai, H., Yamamoto, K., Moribe, K.: Solid state NMR study of three polymorphs of SA/(PEG- γ -cyclodextrin) complex formation. *Joint Conference of 8th Asian Cyclodextrin Conference and 32nd Cyclodextrin Symposium*, 2015年5月14日~5月16日、くまもと県民交流館パレア(熊本・熊本市)
2. Yamamoto, K.: Challenges to molecular pharmaceuticals- Development and improvement of dosage forms. *Pharm Tech2014*, 2014年12月1日~12月2日、バンコク(タイランド)(招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

1. 山本 恵司(共著): 熱分析、薬剤学実験法必携マニュアル-物理薬剤学、南山堂、2014、38-43

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・名誉教授
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・教授
研究者番号: 50266350

(3)研究分担者

東 顕二郎 (HIGASHI, Kenjiro)
千葉大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号: 40451760