119　超難水溶性薬物を製剤化する非晶質ナノ懸濁液の開発	東　顕二郎

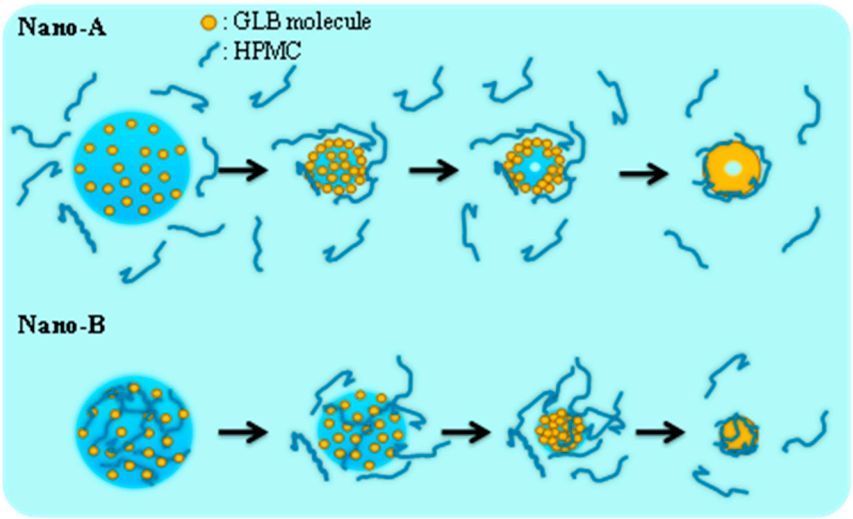
【目的】薬物非晶質ナノ粒子は比表面積の増大及び非晶質化による熱力学的なエネルギーの増大により、従来の製剤と比較して優れた薬物溶解性改善能を示す。本研究では、難水溶性薬物 glibenclamide（GLB）及び添加剤 hypromellose（HPMC）を用いて調製した非晶質ナノ粒子の形態及び分子状態の評価を行った。

【方法】Antisolvent 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 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注入し、nano-B 懸濁液を得た。

【結果】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空粒子と非球形の中実粒子が観察された。Nano-A 及び nano-B を超遠心処理して得られた沈殿の凍結乾燥試料について固体 ^{13}C NMR 測定を行った結果、GLB は非晶質状態であると認められた。溶液 ^{1}H NMR ピーク面積から算出した GLB/HPMC の組成比は、nano-A 及び nano-B でそれぞれ 90 : 10（w／w）及び 86 : 14（w／w）であった。DSC 測定及び保存安定性試験を行った結果、nano-A と比較し nano-B においてより強い GLB 結晶化抑制が認められ、これは nano-B 中の HPMC と GLB の混和性が高いためと推察された。

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。また、界面近傍において水溶液中の HPMC が GLB ナノ粒子形成時に取り込まれ、粒子表面近傍に HPMC を含有した GLB ナノ粒子が形成されたと考察した。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。また、DMSO 中に GLB と HPMC が共に溶解しているため、nano-A と比較して粒子全体に HPMC が分布した混和性の高いナノ粒子が形成されたと推察した。

安定化剤の添加様式が異なる antisolvent 法による GLB 非晶質ナノ粒子形成の模式図



119. 超難水溶性薬物を製剤化する非晶質ナノ懸濁液の開発

東　顕二郎

千葉大学 大学院薬学研究院 製剤工学研究室

Key words：非晶質ナノ粒子，相溶性，中空粒子，Cryo-TEM，物理的安定性

緒　言

近年開発される候補化合物の 70%以上は低い溶解性を示し、溶解性の改善が必要不可欠となるケースが多い［1］。そのため、難水溶性薬物の溶解性を向上させる製剤学的手法が様々開発されており、薬物非晶質ナノ粒子の調製は新しい手法として注目されている［2］。薬物非晶質ナノ粒子では、ナノ粒子化に伴う比表面積の増大により、溶出速度が向上する。さらに、薬物が非晶質状態で存在するため、水中に分散させた際に、薬物結晶の溶解度より高い薬物濃度を示す過飽和状態を形成する。これまでに、薬物非晶質ナノ粒子は薬物ナノ結晶及び薬物非晶質マイクロ粒子と比較して、経口・経肺投与時の薬物吸収性が顕著に増大することが報告されている［3］。

非晶質ナノ粒子の調製、溶解性及び吸収性については数多くの報告がある。一方で、非晶質ナノ粒子の構造や形成・安定化メカニズムに関する報告は限られる。本研究は、モデル薬物としてスルホニルウレア系糖血糖降下薬の glibenclamide（GLB）を、安定化剤として HPMC を用い、antisolvent 法により薬物ナノ懸濁液を調製した。ここでは、異なる 2 種類の HPMC 添加方法を用いた。そして、得られた薬物非晶質ナノ粒子の形態及び分子状態を各種分析手法を用いて評価した。懸濁液中のナノ粒子の形態観察には cryo-TEM 測定を用いた。凍結乾燥ナノ粒子中の薬物及び添加剤の分子状態評価には、固体^{13}C NMR 測定及び溶液^{1}H NMR 測定を用いた。また、ナノ粒子中の GLB 非晶質の安定性を DSC 測定及び保存安定性試験により評価した。最後に、得られた薬物非晶質ナノ粒子の形態や分子状態から、ナノ非晶質粒子形成メカニズムについて考察した［4］。

方　法

1.　Nano-A 及び nano-B 懸濁液の調製

Antisolvent 法により 2 種の方法で nano-A 及び nano-B 懸濁液を調製した。調製法 A では、GLB を溶解させた DMSO 溶液を HPMC 水溶液に対して 5%（v/v）で注入し、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注入し、nano-B 懸濁液を得た。

2.　Nano-A 及び nano-B の調製

Nano-A 及び nano-B 懸濁液を凍結乾燥することで nano-A 及び nano-B を調製した。Nano-A 及び nano-B 懸濁液を 40 分間超遠心処理（150,000×g）した後、上清を取り除くことで溶解成分を除去した。沈殿物を凍結乾燥させ、nano-A 及び nano-B を得た。

結　果

1. Nano-A 及び nano-B 懸濁液の粒子径及び形状測定

Nano-A 及び nano-B 懸濁液の調製直後の体積平均粒子径はそれぞれ約 120 nm、及び約 110 nm であり、その粒度分布はいずれも単峰性であった。このことから、安定化剤として HPMC を用いて異なる 2 種 antisolvent 法により調製した懸濁液は、いずれもナノ懸濁液となることが明らかとなった。また、両懸濁液を 4ºC で 24 時間静置保存した場合においても、調製直後とほぼ同様の粒度分布が確認された。以上の結果より、両懸濁液は、いずれもナノサイズの粒子径を保持することが示された。調製直後の懸濁液について cryo-TEM 測定によるナノ粒子の形態観察を行った（図 1a、c)。観察された粒子の形状及びサイズは nano-A 懸濁液及び nano-B 懸濁液で異なっており、nano-A 懸濁液においては粒子径 80～140 nm の球形の粒子が観察された。また、粒子中心部のコントラストが低いことから、粒子中心の厚さが薄い、または内部に中空形状を有する粒子であると考察した。一方、nano-B 懸濁液においては均一なコントラストの非球形の粒子が観察された。nano-B 懸濁液の粒子径は nano-A 懸濁液と比較してやや小さく、50～110 nm であった。両懸濁液を 4ºC で 24 時間静置保存した場合においても、粒子の形状及びサイズは調製直後とほぼ同様であった（図 1b、d)。以上の結果より、両懸濁液中のナノ粒子の形態は安定化剤として用いた HPMC の添加方法により異なり、その形態は保存後も維持されることが明らかとなった。

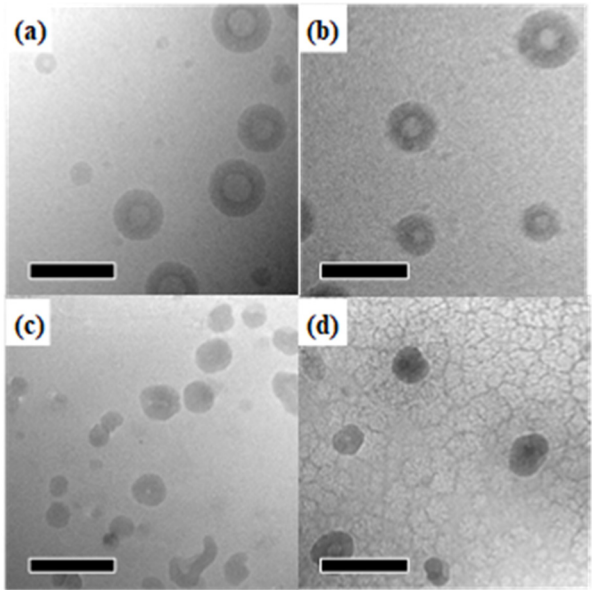


図 1.（a、b）Nano-A 及び（c、d）nano-B 懸濁液の Cryo-TEM 像
（a、c）はそれぞれ調製直後、（b、d）は 4 ℃・24 時間保存後の画像である。
スケールバーは 200 nm を示す。

2. Nano-A 及び nano-B の NMR 測定

図 2 に Nano-A 及び Nano-B の 65～175 ppm における固体 ^{13}C NMR スペクトルを示す。Nano-A 及び nano-B の GLB ピークはいずれも非晶質 GLB と同様ブロードなピークを示した。また、GLB のカルボニル基に由来するピークが結晶 GLB（167 ppm）と比較して nano-A（164 ppm）及び nano-B（164 ppm）では高磁場側へシフトした。ここで観察されたケミカルシフトの変化はアミド - イミド酸の互変異性を伴う GLB の非晶質化に由来するものである。これらの結果より、nano-A 及び nano-B の GLB は非晶質状態として存在することが示された。また、GLB 由来のピークに加えて 70～110 ppm 付近に HPMC に由来するピークが観察された（図 2 の拡大図)。Nano-A 及び nano-B は凍結乾燥処理前に 150,000×g の超遠心処理を行っているため、ここで観察された HPMC はナノ粒子表面に弱く吸着したものではないと推察される。Antisolvent 法においては、GLB が溶媒に溶解した状態から粒子の析出が起こる。GLB

が非晶質としてナノ粒子化する際に水溶液中もしくは有機溶媒中に溶解しているHPMCが粒子中に強く取り込まれたものと考察した。Nano-A及びnano-BをDMSO-d6に溶解し、溶液^{1}H NMR測定を行った。Nano-A及びnano-Bのスペクトルにおいては、GLB及びHPMCに由来するピークが両方観察された。GLBのピークに対するHPMCの相対ピーク強度はnano-Bの方がnano-Aと比較して大きく、nano-Bはより多くのHPMCを含有することが示唆された。さらに、内部標準物質ピークに対するGLBメトキシ基ピークの相対面積強度よりGLB溶解量を求めた。そしてGLB溶解量と仕込みの粉末量に基づいてナノ粒子中のGLB/HPMC質量比を算出した。得られたGLB/HPMCの質量比はnano-A及びnano-Bにおいてそれぞれ89.0：11.0 及び84.3：15.7であった。この結果より、nano-Bはnano-Aと比較してより多くのHPMCを含有していることが定量的に示された。

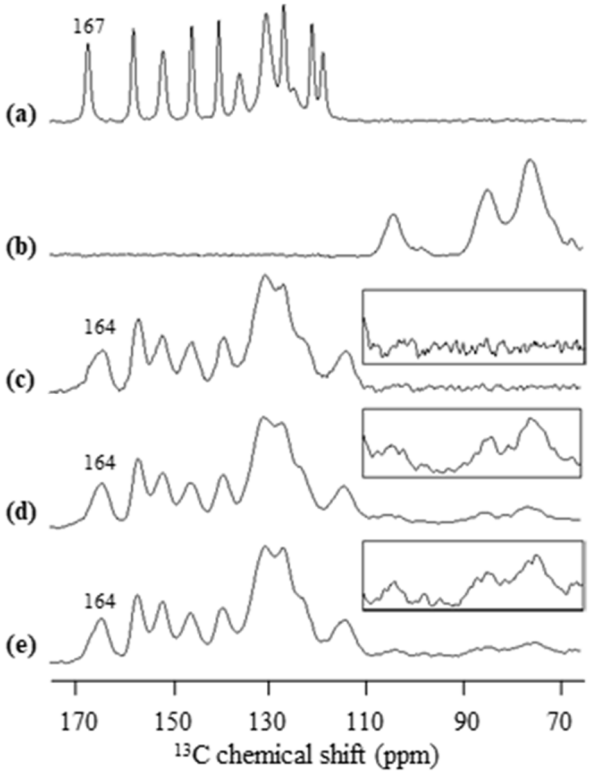


図2. (a) GLB結晶、(b) HPMC、(c) GLB非晶質、(d) nano-A、(e) nano-Bの固体^{13}C NMRスペクトル

3. Nano-A及びnano-Bの物理的安定性の評価

結晶GLBのDSC曲線では約170ºC付近に融解ピークが観察された（図3a)。非晶質GLBでは73ºC付近のガラス転移ピーク、130ºC付近の結晶化ピーク、170ºC付近のGLB結晶の融解ピークが観察された（図3c)。Nano-Aにおいては63ºC付近のガラス転移ピーク、130ºC付近の結晶化ピーク、170ºC付近のGLB結晶の融解ピークが観察された（図3d)。一方、nano-Bでは63ºC付近のガラス転移ピークは観察されたものの、結晶化ピーク及びGLB結晶の融解ピークは顕著に小さくなった（図3e)。非晶質GLB（72.8ºC）と比較してnano-A（62.5ºC）及びnano-B（63.0ºC）ではガラス転移温度（T_g）が低下した。ここで観察されたT_gの低下はナノ粒子化に伴う比表面積の増大によるものと考察した［5]。一方、nano-A及びnano-BではT_gの低下にも関わらず結晶化エンタルピー及び融解エンタルピーはいずれも非晶質GLB単独と比較して減少した。これは昇温過程における非晶質GLBの結晶化がnano-A及びnano-BではHPMCの混和により抑制されたためと考察した。Nano-A及びnano-Bを比較した結果、特にnano-Bにおいてより強いGLB結晶化抑制が認められた。一般に、薬物及びポリマー間の混和性が上昇すると非晶質薬物の結晶化が抑制されることが知られている。HPMC含有量はnano-Aでは11.0%であるのに対し、nano-Bでは15.7%と有意に多い。すなわちHPMC含有量の高いnano-BではGLBとHPMCの混和性が高くなり、これが昇温過程における非晶質GLBの安定性を向上させたと考察した。

Nano-A 及び nano-B を 25ºC、60%RH 及び 40ºC、75%RH 条件下で調湿保存し、非晶質 GLB の保存安定性を評価した。Nano-A では両条件下においても 7 日経過後に GLB の結晶化が認められ、4 週間経過後にはさらに GLB の結晶化が進行した。一方、nano-B では両条件下において 4 週間経過後も結晶化は認められず、GLB の非晶質状態が維持された。このことから、nano-B の方が nano-A よりも非晶質 GLB の保存安定性が高いことが示された。この結果は DSC 測定の昇温過程においても、nano-B の方が nano-A より非晶質 GLB の結晶化が抑制されている結果と一致した。

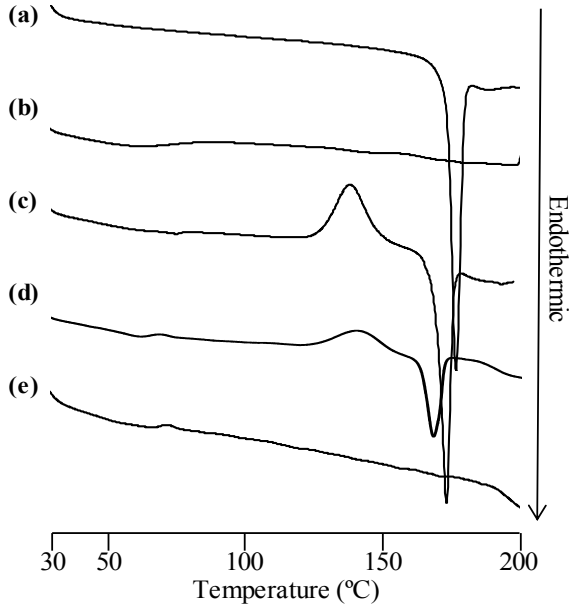


図 3. (a) GLB 結晶、(b) HPMC、(c) GLB 非晶質、(d) nano-A、(e) nano-B の DSC 曲線

考　察

各測定結果に基づき、GLB 非晶質ナノ粒子形成メカニズムを考察した（図 4）。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速度より速いため、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、中空粒子が形成したと推察された。粒子が形成される界面近傍においては、水溶液中の HPMC が GLB ナノ粒子形成時に取り込まれ、粒子表面近傍に HPMC を含有した GLB ナノ粒子が形成されたと考察した。一方、nano-B の形成過程では、DMSO 中に HPMC が存在するため DMSO の水への拡散速度が遅くなり、DMSO の拡散と共に薬物は粒子内部へ拡散する。その結果、nano-A より小さい粒子が形成されたと考察した。また、DMSO がゆっくりと拡散するにつれて液滴界面近傍で部分的に粒子化が起こるため粒子形状は非球形になったと考察した。加えて、DMSO 中に GLB と HPMC が共に溶解しているため、ナノ粒子表面に加えて粒子内部にも HPMC が分布した混和性の高いナノ粒子が形成したと推察された。

近年、薬物が水溶液中で非晶質溶解度を超えると、liquid-liquid phase separation（LLPS）あるいは glass-liquid phase separation（GLPS）が起き、ナノサイズの粒子が形成されることが報告されている［6］。DSC 測定により求めた nano-A 及び nano-B の T_gはそれぞれ 62.5ºC と 63.0ºC と比較的高い。そのため、水溶液中で水（T_g= −138ºC）の存在により T_gが低下したとしても、調製時の温度（20～25℃）よりも nano-A 及び nano-B の T_gは高いと考えられる。このことから、ナノ懸濁液中の nano-A 及び nano-B の形成は LLPS ではなく GLPS によるものと考察した。LLPS では流動性が高いため球形の粒子が形成されると推察されるのに対し、cryo-TEM により観察された粒子の形態は中空（nano-A）あるいは非球形（nano-B)と特徴的な形を示しており、この考察を支持するものであった。

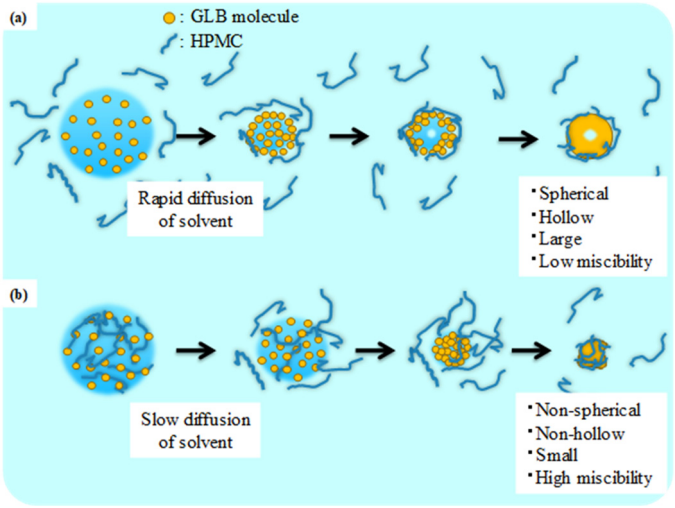


図 4. Antisolvent 法による（a）nano-A と（b）nano-B 形成の模式図

本研究では、GLB非晶質ナノ粒子の形態及び分子状態を各種分析手法により詳細に評価することで、antisolvent法による非晶質ナノ粒子形成メカニズムを明らかとした。非晶質ナノ粒子の形態評価にはcryo-TEM評価が、分子状態及び混和性評価にはNMR測定及びDSC測定が有用であることが示された。本研究で得られた知見は、未だトライ＆エラーの状況にあ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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室森部久仁一教授、植田圭祐助教である。

文　献

1) Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, Shanker RM, Charman WN, Pouton CW, et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. Pharmacol Rev. 2013;65(1):315-499. Epub 2013/02/07. PubMed PMID: 23383426.

2) Jog R, Burgess DJ. Pharmaceutical amorphous nanoparticles. J Pharm Sci. 2017;106(1):39-65. Epub 2016/11/07. PubMed PMID: 27816266. doi: 10.1016/j.xphs.2016.09.014.

3) Kumar S, Shen J, Burgess DJ. Nano-amorphous spray dried powder to improve oral bioavailability of itraconazole. J Control Release. 2014;192:95-102. Epub 2014/07/11. PubMed PMID: 25009979. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.059.

4) Yonashiro H, Higashi K, Morikawa C, Ueda K, Itoh T, Ito M, et al. Morphological and physicochemical evaluation of two distinct glibenclamide/hypromellose amorphous nanoparticles prepared by the antisolvent method. Mol Pharm. 2018;15(4):1587-97. Epub 2018/03/06. PubMed PMID: 29502422. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b01122.

5) Guo Y, Zhang C, Lai C, Priestley RD, D'Acunzi M, Fytas G. Structural relaxation of polymer nanospheres under soft and hard confinement: isobaric versus isochoric conditions. ACS Nano. 2011;5(7):5365-73. Epub 2011/07/02. PubMed PMID: 21718051. doi: 10.1021/nn201751m.

6) Mosquera-Giraldo LI, Taylor LS. Glass-liquid phase separation in highly supersaturated aqueous solutions of telaprevir. Mol Pharm. 2015;12(2):496-503. Epub 2014/12/30. PubMed PMID: 25541813. doi: 10.1021/mp500573z.