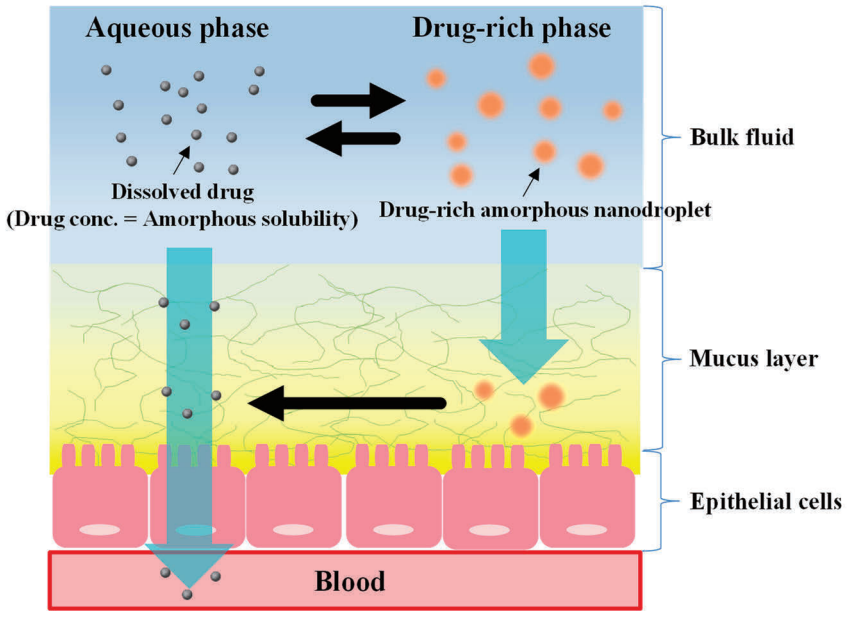
96　液ー液相分離現象を活用した超難溶性薬物の経口製剤化	植田　圭祐

【目的】難水溶性薬物の溶解性・吸収性改善を目的として過飽和溶解薬物の液ー液相分離（Liquid-liquid phase separation）を活用した過飽和製剤が検討されている。本研究では、液ー液相分離により形成される薬物濃縮相の製剤添加剤による安定化メカニズムの解明を目的として、溶液 NMR を含めた分子状態評価による検討を行った。加えて、薬物濃縮相が形成された溶液からの薬物経口吸収性改善能を比較評価した。

【方法】各種製剤添加剤ポリマー溶液中に非晶質溶解度以上の薬物を solvent-shift 法により添加し、薬物濃縮相を形成させた。薬物濃縮相が形成した各種溶液について溶液 NMR、Cryo-TEM 及び、ラットを用いた *in situ* 一回灌流法による消化管吸収試験を行った。

【結果】各種製剤添加剤ポリマーによる薬物濃縮相からの結晶化抑制作用を評価した結果、Hypromellose（HPMC）誘導体による顕著な結晶化抑制作用が認められた。溶液 NMR 測定による解析の結果、HPMC 誘導体が水相から薬物濃縮相に分配し、薬物濃縮相中の薬物分子運動性を抑制することが示された。更に、各種 HPMC 誘導体による結晶化抑制作用の強さの違いを比較評価した結果、薬物濃縮相へのポリマー分配量の増加に伴い、薬物結晶化がより強く抑制されることが示された。以上の結果より、薬物と親和性の高いポリマーを用いることで、より多くのポリマーが水相から薬物濃縮相液滴に分配し、薬物濃縮相からの結晶化を効果的に抑制することが示唆された。続いて薬物濃縮相の水分散安定性に及ぼす製剤添加剤ポリマーの影響を評価した結果、特に Hypromellose acetate succinate（HPMC-AS）溶液中において、薬物濃縮相液滴がナノサイズで維持された。薬物濃縮相液滴中への HPMC-AS の混合による Ostwald 熟成抑制および表面吸着した HPMC-AS による合一抑制作用が相乗的に働き、薬物濃縮相液滴がナノサイズに維持されたと考察した。ナノサイズの薬物濃縮相液滴が形成された溶液について、ラット小腸を用いた *in situ* 一回灌流法により薬物消化管吸収性を評価した結果、薬物濃縮相液滴サイズの減少に伴い、消化管吸収性が顕著に改善することが示された。薬物濃縮相のナノサイズ化は薬物濃縮相の拡散性を向上させ、より消化管近傍において薬物を供給し、薬物吸収性を効果的に改善したと考察した。以上の結果より、薬物と親和性の高く、粒子界面安定化作用の強い製剤添加剤ポリマーを用いることで薬物濃縮相液滴サイズをナノサイズで維持することが可能であり、難水溶薬物の経口吸収性を効果的に改善することが可能であることが示された。

ナノサイズの薬物濃縮相液滴形成による薬物吸収改善の模式図



96. 液－液相分離現象を活用した超難溶性薬物の経口製剤化

植田　圭祐

千葉大学 大学院薬学研究院 製剤工学研究室

Key words：液－液相分離，難溶性薬物，薬物濃縮相，NMR，経口吸収

緒　言

近年開発されている新薬候補化合物の多くは難水溶性であり、特に原薬の溶解度が数 ng/mL 以下の超難水溶性薬物は消化管吸収性が低く、経口投与製剤としての開発が断念されるケースがある。難水溶性薬物の経口吸収性改善を目的として、結晶溶解度以上に薬物が溶解した過飽和溶解状態を消化管において形成する非晶質固体分散体製剤などの過飽和製剤が広く検討されている。過飽和製剤は、従来の可溶化製剤と比較して、より効果的に難溶解性薬物の吸収性を改善することが報告されている一方、水相に過飽和溶解可能な薬物濃度には限界値（非晶質溶解度）が存在することが知られている。非晶質溶解度以上の濃度で溶解した薬物は、バルクの水中から液－液相分離（Liquid-liquid phase separation：LLPS）を起こし、薬物濃縮相を形成する［1］。そのため、水相中への過飽和溶解による薬物吸収改善は非晶質溶解度で頭打ちとなる。一方、薬物濃縮相が共存した溶液では、バルクの水中に溶解した薬物濃度が熱力学上最大の薬物溶解可能濃度である非晶質溶解度で維持される。また、薬物濃縮相はバルクの水中に溶解した薬物のリザーバーとして機能することで薬物の吸収性を劇的に改善することが報告されている［2］。加えて、水相に分散した薬物濃縮相をナノサイズ化することで更なる吸収改善が期待される。しかし、過飽和製剤の開発において、消化管における薬物の LLPS 現象は、これまで十分に考慮されておらず、難水溶性薬物の過飽和製剤設計はトライ&エラーの状況であった。そこで本研究では、溶液 NMR を含めた物性評価により製剤添加剤による薬物濃縮相安定化メカニズムを明らかとし、過飽和製剤に用いる最適な製剤添加剤選択指針を得ることを目的として検討を行った。加えて、得られた製剤設計指針に基づき、薬物濃縮型ナノコロイドが形成した薬物過飽和溶液を調製し、その経口吸収性改善能を評価した。

方　法

1. 薬物結晶化抑制作用試験

薬物濃縮相からのポリマーによる結晶化抑制作用を評価する目的で、各種製剤添加剤ポリマー溶液中に非晶質溶解度以上の薬物を solvent-shift 法により添加し、一定時間毎に水相に溶けた薬物濃度を定量し結晶化抑制作用を評価した。

2. 溶液 NMR 測定

各種薬物を非晶質溶解度以上の濃度で D_2O を用いて調製した各種水溶液中に添加し、^1H NMR 測定を行った。

3. 極低温透過型電子顕微鏡（Cryo-TEM）測定

各試料液をグリッドに吸着させ、液体エタン内で急速凍結させ測定試料とした。加速電圧 120 kV の条件で測定を行った。

4. ラットを用いた *in situ* 一回灌流法による消化管吸収試験

薬物濃縮相を含む各種薬物過飽和溶液について、ラット腸管を用いた *in situ* 一回灌流試験を行った。各種サンプルを 0.1 mL/min の流速で腸管に注入し、経過時間毎に大腿動脈カニューレから採血を行い、薬物血中濃度を測定した。

結果および考察

1. LLPS により形成される薬物濃縮相の結晶化に及ぼす製剤添加剤の影響

まず初めに、各種製剤添加剤ポリマーによる薬物濃縮相からの薬物結晶化抑制作用を、Ibuprofen（IBP）をモデル薬物に用いて評価した。IBP 非晶質溶解度以上の濃度（400 μg/mL）で IBP を有機溶媒から solvent-shift 法により添加し、IBP 濃縮相を形成させ、一定時間毎に水相に溶けた IBP 濃度を定量した。製剤添加剤を含まない溶液中では、IBP 濃縮相形成後 20 分後には溶解 IBP 濃度が IBP 非晶質溶解度以下まで低下し、IBP 結晶化が認められた。一方、Hypromellose（HPMC）を含む水溶液では IBP 濃度がより長時間非晶質溶解度で維持された。また、HPMC 濃度の上昇に伴い非晶質溶解度における IBP 過飽和維持時間も延長することが認められた。これらの結果より、HPMC の添加により IBP 濃縮相からの IBP 結晶化が効果的に抑制されることが示唆された。

HPMC による IBP 濃縮相からの結晶化抑制機構の解明を目的として、IBP を非晶質溶解度以上の濃度で各水溶液中に添加し、^{1}H NMR 測定を行った。図 1 には IBP の芳香環に由来する ^{1}H ピークを拡大した NMR スペクトルを示す。IBP 濃縮相液滴を含む溶液の NMR スペクトルにおいては、水相に溶解した IBP ピークが低磁場側に、高磁場側に IBP 濃縮相に由来する IBP ピークが観測される。ポリマーを含まない溶液中では水相に溶けた IBP および IBP 濃縮相中の IBP 共に先鋭な ^{1}H ピークを示し、IBP 濃縮相中の IBP も比較的高い運動性を有していることが示唆された。一方、HPMC の添加により、IBP ピークのブロード化が認められた。また、HPMC 濃度に依存して IBP 濃縮相中の IBP ピークは低磁場側にシフトし、IBP 濃縮相中の IBP 分子環境が HPMC の添加により変化していることが示された。水相に溶解した HPMC 濃度の定量結果から、一部の HPMC は IBP 濃縮相液滴へ分配していることが示されている。以上より、HPMC が IBP 濃縮相液滴に混合することにより IBP 濃縮相中の IBP 分子環境が親水性に変化し、同時に IBP 分子運動性が抑制されたと考察した。過去の報告において、過冷却液体状態の薬物にポリマーが混和すると、薬物の分子運動性が低下し、薬物結晶化が抑制されることが示されている［3］。HPMC の混合による IBP 濃縮相中の IBP 分子運動性抑制が IBP 結晶化抑制に寄与したと考えられた。

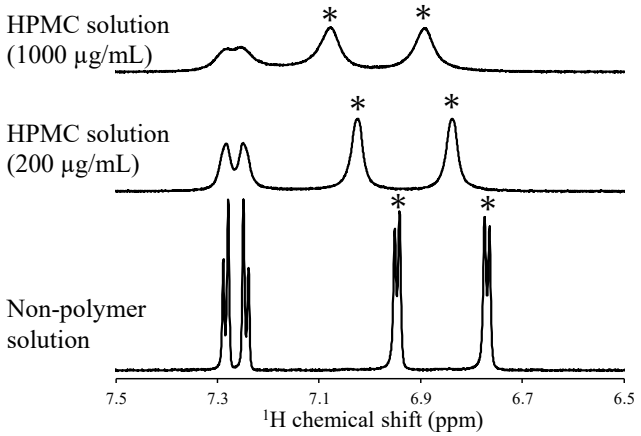


図 1. IBP 濃縮相液滴を含む水溶液中における IBP の芳香環 ^{1}H の NMR スペクトル
低磁場側に水相に溶解した IBP ピークが、高磁場側に IBP 濃縮相中の IBP ピークがそれぞれ観察されている。*は IBP 濃縮相由来のピーク。

続いて薬物濃縮相からの薬物結晶化抑制作用に及ぼすポリマー種の影響について検討を行った。HPMC および、HPMC acetate（HPMC-Ac）、HPMC acetate succinate（HPMC-AS）を用い、各種ポリマーによる Nifedipine（NIF）濃縮相からの NIF 結晶化抑制作用を比較評価した。Solvent-shift 法により NIF 非晶質溶解度以上の仕込み濃度（400 μg/mL）で NIF を各種ポリマー溶液に添加し、経過時間毎に水相に溶けた NIF 濃度を定量した結果、NIF 添加直後、水相に溶けた NIF 溶解量は各ポリマー溶液中における NIF 非晶質溶解度まで低下し、一定時間非晶質溶解度を維持した。その後、NIF 結晶化による NIF 濃度低下が認められ、HPMC、HPMC-AS、HPMC-Ac の順に薬物濃縮相

からの NIF 結晶化抑制作用が強くなることが示された。これら HPMC 誘導体は NIF 濃縮相液滴形成時、一部が水溶液中から NIF 濃縮相へ分配することが示されている。各ポリマーの NIF 濃縮相中への分配率はポリマーの疎水性に依存し、HPMC-Ac において NIF 濃縮相へのポリマー分配率が最大となり HPMC-AS、HPMC の順に分配率が低下した。ポリマーの NIF 濃縮相液滴への分配特性と NIF 結晶化抑制作用の強さは相関しており、NIF 濃縮相液滴に混合したポリマー量が増加することで NIF 濃縮相中の NIF 分子運動性が低下し、NIF 結晶化がより強く抑制されたと考察した。以上の結果より、薬物と親和性の高いポリマーを用いることで、より多くのポリマーが水相から薬物濃縮相液滴に分配し、薬物濃縮相からの結晶化を効果的に抑制することが示唆された。

2. LLPS により形成される薬物濃縮相の分散安定性に及ぼす製剤添加剤の影響

薬物濃縮相の水分散安定性に及ぼす製剤添加剤ポリマーの影響を評価した。図 2 は各種ポリマー溶液に非晶質溶解度以上の IBP を添加した際に形成される IBP 濃縮相のサイズを経過時間毎に動的光散乱法により評価した結果を示す。ポリマーを含まない溶液中では、IBP 添加直後より μm オーダーの液滴が形成され、30 分後には IBP 濃縮相が合一し水面に浮上した。一方、HPMC および Eudragit E （EUD-E）溶液中では、それぞれ約 350 nm および 800 nm の IBP 濃縮相液滴の形成が認められ、HPMC 溶液中では 3 時間経過後にも液滴サイズが nm オーダーで維持された。HPMC はエマルション表面に吸着した際に、立体反発によりエマルション粒子同士の合一を抑制することが報告されている［4］。また、上述したように HPMC は水相から IBP 濃縮相へ分配することが示されており、その結果水相における IBP 溶解量を低下させると考えられる。水相に溶解した IBP は IBP 濃縮相液滴の Ostwald 熟成の速度に影響を及ぼし、水相に溶けた IBP 量が少ないほど水相中の IBP 分子の拡散を介した IBP 濃縮相液滴の Ostwald 熟成が遅くなる。加えて、IBP と比較して分子量が大きく拡散が遅い HPMC が IBP 濃縮相液滴に混合することにより、濃縮相液滴の Ostwald 熟成速度が低下したと考えられた。HPMC の IBP 濃縮相への混合による Ostwald 熟成抑制および表面吸着した HPMC による液滴の合一抑制作用が相乗的に働き、HPMC 溶液中において IBP 濃縮相液滴のサイズが 350 nm 程度に維持されたと考察した。一方、EUD-E 溶液中において形成された IBP 濃縮相液滴のゼータ電位を測定した結果、濃縮相液滴が正に荷電していることが示された。これは、カチオン性のポリマーである EUD-E が IBP 濃縮相液滴の表面に吸着したためと考えられる。その結果、濃縮相液滴間に静電的反発力が働き、EUD-E 添加により IBP 濃縮相液滴の分散安定性が向上したと考察した。しかし、EUD-E は水相における可溶化作用により IBP の見かけの非晶質溶解度を上昇させることが知られており、IBP の可溶化による水相の IBP 濃度上昇は IBP 濃縮相液滴の Ostwald 熟成を促進する。その結果、HPMC 溶液と比較して、EUD-E 溶液中では IBP 濃縮相液滴のサイズが大きくなったと考察した。

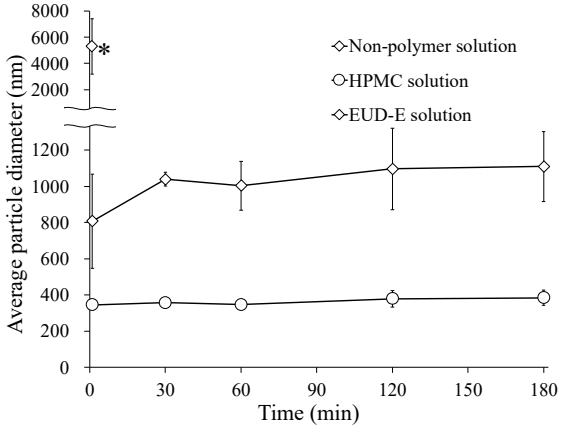


図 2. IBP 濃縮相液滴の経過時間毎の粒子径

ポリマーの添加により IBP 濃縮相の液滴サイズが nm オーダーに維持されている。*：ポリマーを含まない溶液中では 30 分後には IBP 濃縮相液滴の凝集により水面に液滴が浮上し、測定が行えなかった。データは mean±standard deviation（n=3）で示した。

続いて NIF 濃縮相液滴の分散安定性に及ぼす HPMC 誘導体の置換基の影響について評価した。図 3 には HPMC および HPMC 誘導体溶液中において形成された NIF 濃縮相液滴の Cryo-TEM 画像を示す。すべての溶液において、30 nm～150 nm のナノサイズの NIF 濃縮相液滴の形成が観察された。特に、HPMC-AS 溶液中では大部分の濃縮相液滴が数十 nm のサイズで分散していることが示された。上述したように、HPMC と比較して HPMC-Ac や HPMC-AS は水相中から NIF 濃縮相へより多く分配することが認められている。加えて、HPMC-AS は置換基にカルボン酸を有しており、負に荷電した HPMC-AS が NIF 濃縮相液滴表面に吸着することにより、NIF 濃縮相液滴間に静電的反発力が働き、液滴同士の合一を抑制すると考えられる。HPMC-AS の混合による Ostwald 熟成抑制および表面吸着した HPMC-AS による合一抑制作用が相乗的に働き、NIF 濃縮相液滴が数十 nm のサイズに維持されたと考察した。このように薬物濃縮相液滴のナノサイズ化や分散安定化には液滴表面に吸着したポリマーによる合一抑制作用に加えて、ポリマーの薬物濃縮相液滴への混合が重要であることが示唆された。

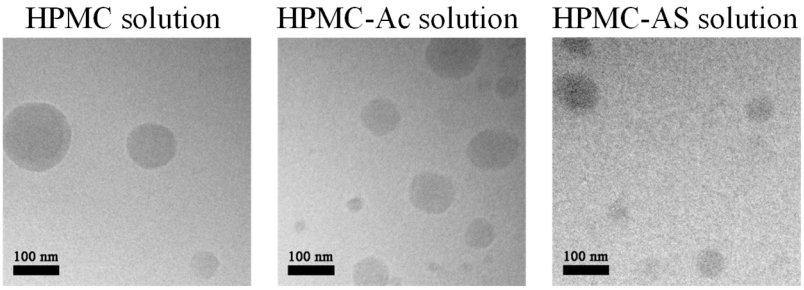


図 3. NIF 濃縮相液滴の cryo-TEM 画像
ナノサイズの NIF 濃縮相液滴の形成が認められる。スケールバー：100 nm。

3. 薬物濃縮相形成が消化管吸収性に及ぼす影響の評価

上記の検討をもとに各種 HPMC 誘導体の共存が薬物の消化管吸収性に及ぼす影響について検討を行った。モデル薬物として cilnidipine（CND）を用い、添加剤として HPMC-AS の LF グレード（AS-LF）及び HF グレード（AS-HF）を用いた。各 HPMC-AS 溶液中における CND 非晶質溶解度を評価した結果、HPMC-AS を含まない溶液及び AS-LF 溶液中では CND 非晶質溶解度は約 1.1 μg/mL 程度であった一方、AS-HF 溶液中では CND 非晶質溶解度が 0.56 μg/mL まで低下した。各種 CND 過飽和溶液中における HPMC-AS 溶解状態を溶液 NMR により評価した結果、一部の HPMC-AS が CND 濃縮相中に分配していることが示され、特に AS-HF は AS-LF と比較して多くの HPMC-AS が CND 濃縮相中へ分配した。以上の結果より、HPMC-AS 混合による CND 濃縮相中の活量低下が、CND 非晶質溶解度低下の要因であると考察した。また、CND 濃縮相の粒子径は、HPMC-AS を含まない溶液では μm オーダーであった一方、AS-LF 溶液及び AS-HF 溶液中においては、約 450 nm 及び約 90 nm となり、HPMC-AS の共存により CND 濃縮相がナノサイズで維持されることが示された。

これら CND 濃縮相が形成された溶液について、ラット小腸を用いた *in situ* 一回灌流法により CND 消化管吸収性を評価した。CND 消化管吸収性の序列は AS-HF 溶液＞AS-LF 溶液＞HPMC-AS を含まない溶液の順に小さくなり、HPMC-AS を含まない溶液と比較して、AS-LF 及び AS-HF 溶液中では、消化管吸収性が約 2.6 倍及び 6.3 倍それぞれ向上した。上述したように CND の非晶質溶解度、すなわちバルクの水中に溶解可能な最大 CND 濃度は AS-HF 共存時に低下する一方、AS-HF 溶液中では顕著な CND 吸収性改善が認められた。薬物濃縮相は薬物分子のリザーバーとして働くことが報告されており、消化管の非撹拌水槽（UWL）中を拡散し、UWL 中において薬物分子を供給することで、UWL 中の濃度勾配を減少させる。また、薬物濃縮相のナノサイズ化は濃縮相自体の拡散性を向上させ、より消化管近傍において薬物が供給可能となるため、効果的に UWL 中の濃度勾配を減少させると考えられる（図 4）。以上の結果より、HPMC-AS 溶液中の置ける CND 濃縮相のナノサイズ化による拡散性の向上により、CND 吸収性が改善したと考察した。特に AS-HF 溶液中では CND 濃縮相液滴サイズが数十 nm まで小さくなっており、より効果的に UWL 中の CND 濃度を上昇させ消化管吸収性を顕著に改善したことが示唆された。

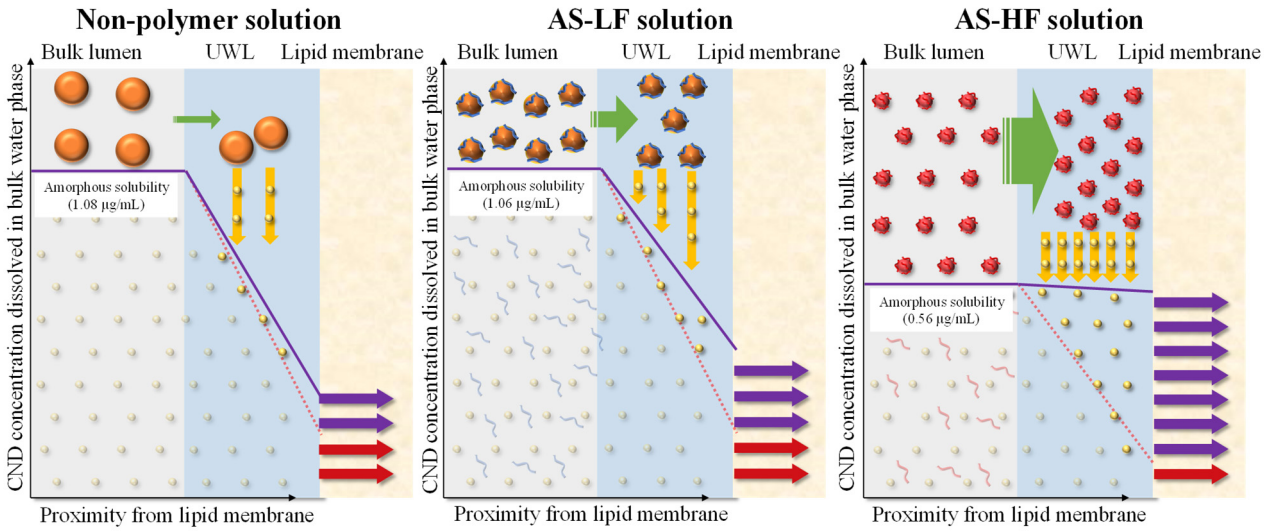


図 4. ナノサイズの CND 濃縮相液滴形成による薬物吸収改善機構
ナノサイズ化された薬物濃縮相は消化管近傍の UWL を効率的に拡散し、消化管近傍において溶解薬物のリザーバーとして働く。

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の森部久仁一教授、東顕二郎准教授である。

文　献

1) Ilevbare GA, Taylor LS. Liquid–liquid phase separation in highly supersaturated aqueous solutions of poorly water-soluble drugs: Implications for solubility enhancing formulations. Cryst Growth Des. 2013;13(4):1497-509. DOI: 10.1021/cg301679h.

2) Kesisoglou F, Wang M, Galipeau K, Harmon P, Okoh G, Xu W. Effect of amorphous nanoparticle size on bioavailability of anacetrapib in dogs. J Pharm Sci. 2019;108(9):2917-25. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30980857 DOI: 10.1016/j.xphs.2019.04.006.

3) Kestur US, Lee H, Santiago D, Rinaldi C, Won Y-Y, Taylor LS. Effects of the molecular weight and concentration of polymer additives, and temperature on the melt crystallization kinetics of a small drug molecule. Cryst Growth Des. 2010;10(8):3585-95. DOI: 10.1021/cg1004853.

4) Schulz MB, Daniels R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. Eur J Pharm Biopharm. 2000;49(3):231-6. Epub 2000/05/09. PMID: 10799814 DOI: 10.1016/s0939-6411(00)00069-2