

平成 23 年度調査研究報告書

調査研究課題

薬物の溶解性・吸収性改善を目指した固体分散体の調製と物性評価及び評価系の構築

所属機関及び調査研究者名

主任研究者：千葉大学大学院薬学研究院 准教授 森部 久仁一

(〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 TEL043-226-2866)

分担研究者：千葉大学大学院薬学研究院 教授 山本 恵司

(〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 TEL043-226-2865)

分担研究者：千葉大学大学院薬学研究院 助教 東 颯二郎

(〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1 TEL043-226-2865)

要旨

非晶質は固体中で分子の三次元配列に一定の規則性を持たないものを指し、結晶よりもエネルギー的に高い状態にある。非晶質薬物を水に分散した場合、結晶状態の薬物の溶解度を上回る過飽和溶液が得られることから、薬物の非晶質化は難溶性薬物の溶解性を改善する有効な手法として利用されている。安定な非晶質を得るには、ポリマーなどの担体中に薬物を分散させた固体分散体を調製する必要がある。しかし、固体分散体自身の安定性の問題に加え、水に分散して得られた溶液中でも薬物が凝集を起こしてしまうことが多く、長時間澄明な過飽和状態を維持できたという報告は限られている。本研究では長時間安定な過飽和状態を維持する溶液の調製及びその形成メカニズムの解明を目的として検討を行った。難水溶性のモデル薬物として抗炎症薬であるメフェナム酸(MFA)を、ポリマー担体として Eudragit® EPO(EPO)を用いた。MFA を 18% (w/w)含有する混合試料を振動型ロッドミルにより 90 分間、 -180°C で粉碎を行い、低温粉碎物(cryo-GM)を調製した。得られた試料の物性は、粉末 X 線回折(PXRD)、固体 ^{13}C -NMR 及び過飽和溶液の溶液 ^1H -NMR 測定で評価した。MFA の非晶質化の有無を観察する目的で PXRD 測定を行ったところ、MFA 結晶由来のピークは消失し、非晶質特有のハロパターンが観測された。さらに、cryo-GM 中の MFA 分子状態を固体 ^{13}C -NMR 測定を用いて評価した結果、MFA 由来のピークが cryo-GM スペクトル中ではブロード化していることが確認された。以上の結果より、cryo-GM 中において MFA は EPO のマトリックス中に単分散した非晶質状態で存在していると考えられた。cryo-GM の溶解性を調べるために、0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.5, 37°C) に分散させたところ、MFA 濃度として 3mg/mL まで溶解するのが観察され、これは MFA の溶解度(2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)と比較して著しく高い値であった。cryo-GM 分散液中における MFA 分子状態を検討するために ^1H -NMR 測定を行ったところ、MFA 分子由来するピークが観察された。cryo-GM 分散液中では、MFA は単分子分散に近い状態で存在していると推察された。また、重クロロホルム中に溶解させた MFA 単独のピークと比較して

cryo-GM 分散液中の MFA のピークはブロードであることから、分散液中で MFA は EPO と相互作用しており、MFA 単独の溶解状態に比べ運動性が抑えられた状態で存在していると考えられた。

1. 調査研究目的

スイッチ OTC 薬は医療用医薬品と同等の薬効を示すことからセルフメディケーションで大きな役割を担っている。一方、スイッチ OTC 薬の開発では、薬物動態や製剤の物理化学的特性に関する情報が不十分な場合が多く、生物学的同等性を確保した製剤開発を困難にしている。とくに溶解性が低い薬物の場合、安定した薬物の溶出及び薬物吸収を確保する必要がある。薬物を溶解性 (high solubility / low solubility) 及び膜透過性 (high permeability / low permeability) によって 4 つの class に分類した Biopharmaceutics Classification System (BCS) の中で、class II に分類される薬物は high permeability, low solubility という性質を有し¹⁾、優れた膜透過性を持ちつつも低い溶解性のために本来の作用を発揮できていない。Class II 薬物の吸収性を上げる意味では、医薬品の製剤化における難水溶性薬物の溶解性改善は非常に重要なタスクの一つであり、固体分散体化²⁻⁴⁾、シクロデキストリン等との複合体形成⁵⁾、エマルションへの薬物封入⁶⁾、ナノ微粒化⁷⁾など、様々な研究が行われている。

難溶性医薬品は非晶質化することで薬物の溶出挙動を大きく変えることができる。非晶質は固体中で分子の三次元配列に一定の規則性を持たず、結晶よりもエネルギー的に高い状態にある。このため、非晶質薬物を水中に分散させた場合、結晶薬物の溶解度を上回る澄明な過飽和溶液を形成する場合がある。薬物単独で安定な非晶質を得るのは熱力学的観点から困難な場合が多く、ポリマーなどの担体中に薬物を分散させた固体分散体を調製する検討が行われている⁸⁻⁹⁾。しかし、固体分散体を水中に分散して得られた溶液でも安定性が悪く結晶化を起こすことが多いため、長時間過飽和状態を維持できたという報告は少ない¹⁰⁻¹¹⁾。本研究では薬物の吸収性改善を目的とした長時間安定な過飽和溶液の調製及び液中安定化メカニズムの解明を目的として、薬物/ポリマーからなる二成分固体分散体を調製し、各種物性評価法により分子状態を評価することで過飽和溶液安定化メカニズムの検討を行った。

2. 調査研究方法

2-1. 試薬

難水溶性モデル薬物としてメフェナム酸 (MFA) を、ポリマー担体として EUDRAGIT® EPO (EPO) を用いた。構造式を Fig. 1 に示す。その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。

2-2. 固体分散体の調製

MFA を 18% (w/w) 含有する EPO との物理的混合物 (PM) を低温混合粉碎処理 (-180°C) することにより固体分散体 (低温混合粉碎物; cryo-GM) を調製した。これを 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.5) に分散し、過飽和溶液を調製した。

2-2. 固体分散体及び過飽和溶液の物性評価

固体分散体及び過飽和溶液の物性は、粉末 X 線回折(PXRD)測定、溶出試験法及び核磁気共鳴(NMR)法を用いて評価した。

2-3. in vivo MFA 経口吸収性の評価

MFA (PM 及び cryo-GM) の投与溶液は MFA 濃度として 10 mg/mL となるように 0.1 M 酢酸緩衝液(pH 5.0)に分散させ、調製した。ただし、MFA intact は上記緩衝液に対しては分散性に劣るため、0.5% CMC 水溶液に分散させた。ペントバルビタール (40 mg/kg) による腹腔麻酔下、MFA 溶液を 20 mg/kg の投与量で経口ゾンデを用いて胃内投与した。MFA intact と PM は懸濁液として、また cryo-GM は水溶液として、それぞれ投与した。

3. 調査研究結果

3-1. MFA 非晶質化に及ぼすポリマーの影響

ポリマー置換基が MFA の非晶質化に及ぼす影響を検討する目的で、置換基及び置換度の異なる 2 種の EUDRAGIT® (L100 及び EPO)を用いて低温混合粉碎法を行った(MFA/polymer = 26/74 (w/w))。L100 はメタクリル酸及びメチルメタクリレートを含む酸性ポリマーであり、EPO は側鎖にアミノアルキル基を含む塩基性ポリマーである。各試料に対する PXRD 測定の結果を Fig. 2 に示す。Unprocessed MFA には結晶 MFA に由来する回折ピークが観察された。L100 及び EPO においてはハローパターンが観察され、それぞれの PM の回折パターンは unprocessed MFA とポリマーの重ね合わせとなった。MFA/L100 Cryo-GM においては MFA 結晶由来の回折パターンが観察され、完全な非晶質化は認められなかった。一方、MFA/EPO Cryo-GM においては MFA 結晶由来の回折ピークは消失し、ハローパターンが観察され、MFA の非晶質化が認められた。この EPO Cryo-GM について 25 °C、75 %RH にて保存安定性の検討を行ったところ、10 ヶ月の保存に対しても MFA は再結晶化を起こすことがなく、ハローパターンを示し、これらの Cryo-GM は非常に安定であると考えられた。以上の結果から、MFA は EPO との低温混合粉碎処理により非晶質化し、得られた固体分散体は極めて高い安定性を有することが明らかとなった。今回モデル薬物として用いた MFA は酸性薬物であり、EPO はその構造中にアミノアルキル基を有する塩基性ポリマーである。この酸-塩基の組み合わせが相互作用形成を促進し、MFA の非晶質化及びその後の再結晶化抑制に有利に働いたと考えられた。一方、L100 はメタクリル酸を含む酸性ポリマーであるため、MFA との間に相互作用は形成されず、非晶質化は起こらなかったと考えられた。従って、MFA の非晶質化においては EPO 中のジメチルアミノアルキル基の存在が重要であると考えられた。

3-2. 溶出性の評価

MFA/EPO Cryo-GM の溶出性を評価する目的で溶出試験を行った。Unprocessed MFA、MFA/EPO PM、及び MFA/EPO Cryo-GM の 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.5)中における溶出プロファイル

イルを Fig. 3 に示す。Unprocessed MFA は試験開始後 30 分でその溶解度 (2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に達した。MFA/EPO PM は試験開始後から徐々に MFA の溶出が認められ、3 時間後に 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となった。MFA/EPO PM においても原薬の溶解度を大きく上回る過飽和溶液が形成されたことは、先に EPO が試験液に溶解することにより、液中で MFA と EPO の相互作用が形成されたためであると考えられた。しかし、水溶液中では完全に相互作用が形成されなかったため、大部分の MFA は結晶状態で存在しており、試験液は懸濁したと考えられた。一方で、MFA/EPO Cryo-GM は試験開始直後から急速な MFA の溶出が起り、およそ 1 時間で全ての MFA が溶出し、MFA 原薬の溶解度の約 230 倍の濃度の澄明な過飽和溶液の形成が認められた。そして、この過飽和状態はその後 3 時間にわたり安定に保たれた。また、この溶液は室温における保存に対しても少なくとも一週間以上澄明な状態を保った。

3-3. In vivo 経口吸収性の評価

溶出性の改善が認められた Cryo-GM 溶液中からの MFA の経口吸収性を評価する目的で、ラットを用いてその血漿中濃度の測定を行った。Fig. 4 に MFA (in 0.5% CMC)、MFA/EPO PM (in acetate buffer) 及び MFA/EPO Cryo-GM (in acetate buffer) 投与後の MFA 血漿中濃度-時間プロファイルを示す。MFA intact や MFA/EPO PM 懸濁液は投与後、MFA の血中濃度はほとんど上がらず、明確な C_{max} 及び T_{max} は観察されなかった。これは MFA が難水溶性であるため、経口吸収性が乏しかったと推察された。一方、MFA/EPO Cryo-GM 溶液は投与から 2 時間までの間に著しい血中濃度の上昇が認められ、MFA intact や MFA/EPO PM 懸濁液に比べ 5-7 倍以上の高い経口吸収性が観察された。24 時間までの AUC (Area Under the Curve) は MFA で $1510 \pm 510 \text{ ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$ 、MFA/EPO PM 懸濁液で $3465 \pm 592 \text{ ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$ 、MFA/EPO Cryo-GM 溶液で $11794 \pm 399 \text{ ng} \cdot \text{h}/\text{mL}$ となり、MFA/EPO Cryo-GM 溶液の AUC は MFA intact の 7.8 倍、MFA/EPO PM 懸濁液の 3.4 倍高い値を示した。MFA/EPO Cryo-GM 溶液の吸収挙動は MFA intact や MFA/EPO PM 懸濁液と比較して著しく異なった推移を示した。これは難水溶性薬物の溶解性向上による吸収性改善効果であると考えられた。MFA は BCS class II 分子であり、低溶解性、高膜透過性という性質を有することから、その吸収は腸管における薬物の溶解過程によって支配されている。MFA/EPO Cryo-GM 溶液中では全ての MFA が溶解状態で存在しており、MFA の吸収における律速段階である溶解過程が存在しない。このことから MFA/EPO Cryo-GM 溶液における MFA の吸収は膜透過過程に依存すると考えられ、MFA は本来の高い膜透過性に従って、高い吸収性を示したと考えられた。以上の結果から、EPO との固体分散体化は難水溶性薬物である MFA の経口吸収性改善に対し本質的に有用な手法であると考えられた。

3-4. 固体 ^{13}C -CP/MAS NMR 測定による固体分散体中 MFA 分子状態の評価

固体状態における MFA の分子状態を評価する目的で固体 ^{13}C -CP/MAS NMR 測定を行った。

MFA、EPO、MFA/EPO PM 及び MFA/EPO Cryo-GM の固体 ^{13}C -CP/MAS NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。また、MFA の ^{13}C -NMR ピークの帰属を構造式中の番号と対応させてスペクトル中に示す。MFA には 174.6 ppm にカルボニル炭素に由来するピークが、110-150 ppm に芳香環炭素に由来するピークが、14.4 及び 22.0 ppm にメチル炭素に由来するピークが観察される。EPO には 177.7 ppm にカルボニル炭素が、10-80 ppm にポリマー骨格及びアルキル側鎖に由来するピークが観察される。また、MFA/EPO PM の NMR スペクトルはこれらのピークの重ね合わせとして観察された。MFA と EPO でピークの重ならない 100-160 ppm 付近に注目して評価を行った。その結果、MFA/EPO PM ではシャープなピークは MFA/EPO Cryo-GM 中ではブロード化し、化学シフトが変化することが観察された。線幅のブロード化は、個々の分子の等方的化学シフトの分布の増大によって説明され、立体配置の分布や分子パッキングの不均一性といった薬物の非晶質性を示している。以上の結果から、MFA は Cryo-GM 中において、結晶状態に観察されるような規則的な配向性を持たず、分子分散に近い状態で EPO マトリックス中に分散していると考えられた。

3-5. 溶液 ^1H -NMR 測定による過飽和溶液中分子状態の評価

Cryo-GM 溶液中における MFA の分子状態を評価する目的で溶液 ^1H -NMR 測定を行った。単分散 MFA (in CDCl_3)、EPO (in acetate buffer) 及び Cryo-GM (in acetate buffer) の ^1H -NMR スペクトルを Fig. 6 に示す。単分散 MFA は非常にシャープなピークが観察され、EPO は水溶液中では運動性が低く、ブロードなピークを示した。通常は溶解度の点から観測されることのない MFA のピークが Cryo-GM 溶液中には明確に観察された。溶液 ^1H -NMR 測定では比較的運動性の高い成分しか観察されず、結晶等の運動性が抑制された状態ではシグナルは観察されない。このことから、Cryo-GM 溶液中では MFA は微結晶としてではなく、分子レベルに近い状態（分子分散した状態）で存在していると考えられた。また、 CDCl_3 に溶解させた MFA 単独のピークと比較して、Cryo-GM 溶液中の MFA のピークはブロード化しているのが観察された。このことから、Cryo-GM 溶液中で MFA は EPO と分子間相互作用を形成しており、溶解した MFA 単独よりも運動性が低い状態で存在していると考えられた。固体 NMR 測定の結果から、低温混合粉砕物中では MFA と EPO の分子間相互作用が存在することが明らかとなっている。Cryo-GM の溶液 ^1H -NMR スペクトルは緩衝液に分散後も固体状態で形成された相互作用が保持された状態で存在することを示唆しており、この相互作用は過飽和溶液安定化に寄与していると考えられた。

3-6. 薬物/EPO 固体分散体の応用性検討

EPO の固体分散体基材としての応用性を評価する目的で、MFA 同様、抗炎症薬に分類される、Indomethacin (IMC) 及び Piroxicam (PXC) に対して低温混合粉砕法を行った。但し、薬物含量は 18% (w/w) とした。IMC/EPO 系及び PXC/EPO 系の PXRD 測定結果を Fig. 7 に示す。IMC 及び PXC の PM 中にはそれぞれの intact に特徴的な回折パターンが認め

られ、結晶が存在することが観察された。一方、EPO との Cryo-GM ではどちらも結晶由来の回折パターンは消失し、ハローパターンを示したことから、IMC 及び PXC は EPO との低温混合粉碎により非晶質化することが確認された。次に、各 Cryo-GM からの薬物の溶出性を評価する目的で溶出試験を行った。IMC/EPO 系及び PXC/EPO 系の溶出プロファイルを Fig. 8 に示す。どちらにおいても Cryo-GM からは試験開始後から急速な薬物溶出が観察され、1 時間程度で仕込み薬物全てが溶解し、澄明な過飽和溶液の形成が認められた。この過飽和溶液は 25 °C にて少なくとも 1 ヶ月の保存に対しても白濁することはなかった。以上の結果から、EPO は MFA 同様、IMC 及び PXC とも固体分散体を形成し、結晶薬物を非晶質化できることが明らかとなった。また、得られた固体分散体を緩衝液中に分散することにより長時間安定な過飽和溶液を形成することが可能であった。EPO は塩基性ポリマーであるため、酸性薬物と有利に相互作用を形成すると考えられ、その共通構造から主な相互作用部位はカルボニル基であることが推察された。このように EPO を用いた固体分散体には広範な薬物への応用性が示された。

4. まとめ

MFA と EPO を低温混合粉碎処理することによって得られた固体分散体は長期間の保存に対しても安定であり、緩衝液に分散することで得られた過飽和溶液は高い過飽和度及び安定性を示した。固体及び溶液 NMR 測定の結果、MFA と EPO は分子レベルでの相互作用を形成していることが明らかとなった。酸性非ステロイド性抗炎症薬である Indomethacin や Piroxicam においても MFA と同様、薬物の非晶質化や緩衝液中での過飽和溶液形成、安定化挙動が確認された。また、今回調製された MFA 過飽和溶液を *in vivo* においてラットに経口投与することにより、MFA の経口吸収性に増大が観察され、EPO を用いた固体分散体は難水溶性薬物の経口吸収性改善に有用であることが示された。

6. 調査研究発表

6-1. 口頭発表

K. Moribe, T. Kojima, K. Higashi, T. Suzuki, K. Tomono, K. Yamamoto. Structural investigation of supersaturated solution from solid dispersion of mefenamic acid and Eudragit EPO. International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products. P11, 2011. 6. 29-7. 1 (発表日: 6. 30)、Kobe, Hyogo

森部久仁一、溶液中での薬物及び添加剤の物性評価、日本薬剤学会 経口吸収フォーカスグループ第 2 回合宿討論会 2011. 9. 5-6 (発表日: 9. 6)、京都

6-2. 誌上発表

Kojima T, Higashi K, Suzuki T, Tomono K, Moribe K, Yamamoto K. Stabilization of

a Supersaturated Solution of Mefenamic Acid from a Solid Dispersion with EUDRAGIT® EPO. Pharm. Res. In press

Zhang J, Higashi K, Limwibrant W, Moribe K, Yamamoto K. Molecular-level characterization of probucol nanocrystal in water by in situ solid-state NMR spectroscopy. Int J Pharm. 2012 Feb 28;423(2):571-576.

7. 引用文献

- 1) Lawrence X. Yu, Gordon L. Amidon, James E. Polli, Hong Zhao, Mehul U. Mehta, Dale P. Conner, Vinod P. Shah, Lawrence J. Lesko, Mei-Ling Chen, Vincent H. L. Lee, and Ajaz S. Hussain. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. Pharm. Res. 19(7):921-925 (2002)
- 2) V. Tantishaiyakul a, N. Kaewnopparat, S. Ingkatawornwong. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone. Int. J. Pharm. 181:143-151 (1999)
- 3) Eun-Jung Kim, Myung-Kwan Chun, Jae-Sang Jang, In-Hwa Lee, Kyeo-Re Lee, Hoo-Kyun Choi. Preparation of a solid dispersion of felodipine using a solvent wetting method. Eur. J. Pharm. Biopharm. 64:200-205 (2006)
- 4) D. Law, S.L. Krill, E.A. Schmitt, J. J. Fort, Y. Qiu, W. Wang, W.R. Porter. Physicochemical considerations in the preparation of amorphous Ritonavir-Poly(ethylene glycol) 8000 solid dispersions. J. Pharm. Sci. 90:1015-1025 (2001)
- 5) V. J. Stella, V. M. Rao, E. A. Zannou, V. V. Zia. Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. Adv. Drug Deliver. Rev. 36:3-16 (1999)
- 6) P. P. Constantinides, A. Tustianb and D. R. Kessler. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. Adv. Drug. Deliver Rev. 56:1243-1255 (2004)
- 7) Y. Kawashima. Nanoparticulate systems for improved drug delivery. Adv. Drug Deliver. Rev. 47:1-2 (2001)
- 8) C. Leuner, J. Dressman. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:47-60 (2000)
- 9) T. Vasconcelos, B. Sarmiento, P. Costa. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug Discov. Today 12:1068-1075 (2007)
- 10) D. T. Friesen, R. Shanker, M. Crew, D. T. Smithey, W. J. Curatolo, J. A. Nightingale. Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-based spray-dried dispersions: An overview. Mol. Pharm. 5(6):1003-1019 (2008)

- 11) W. Curatolo, J. A. Nightingale, S. M. Herbig. Utility of hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) for initiation and maintenance of drug supersaturation in the GI milieu. Pharm. Res. 26(6):1419-1431 (2009)

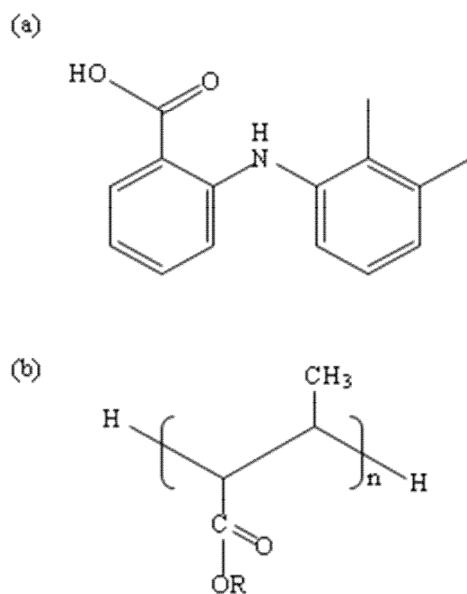


Figure 1. Molecular structures of (a) MFA, (b) EUDRAGIT[®] EPO (R = CH₃, C₄H₉, C₂H₄N(CH₃)₂) and L100 (R = H, CH₃).

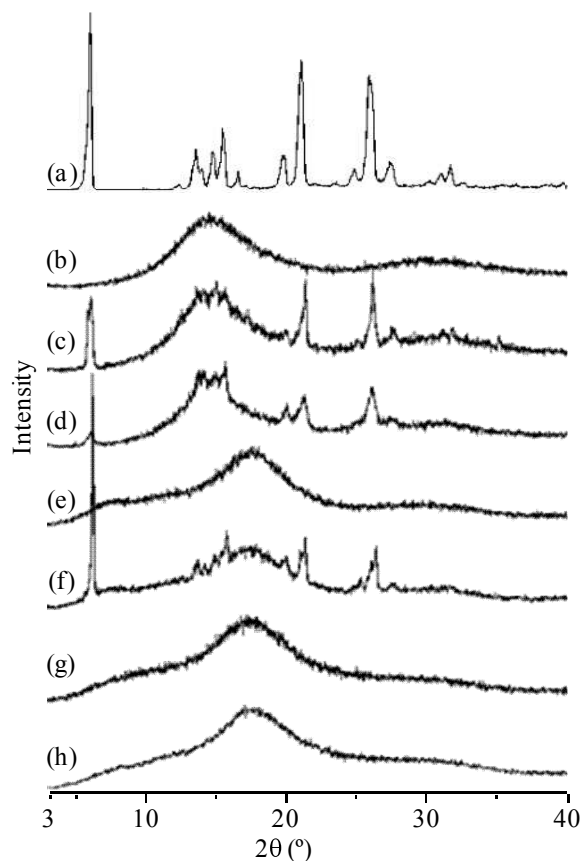


Figure 2. PXRD patterns of (a) MFA, (b) L100, (c) MFA/L100 PM, (d) MFA/L100 Cryo-GM, (e) EPO, (f) MFA/EPO PM (g) MFA/EPO Cryo-GM and (h) MFA/EPO Cryo-GM stored at 25 °C 75 %RH for 10 months. The weight ratios of the binary mixtures are 24/76.

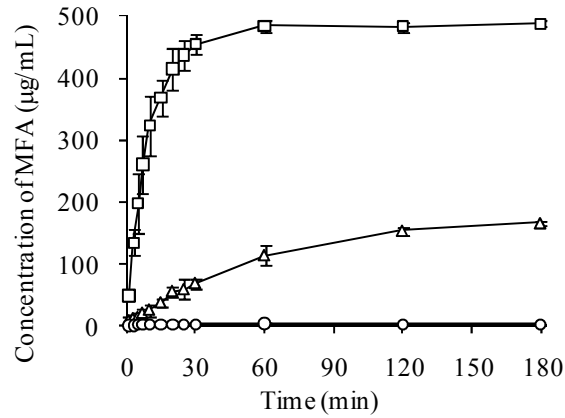


Figure 3. Dissolution profiles of (○) MFA, (Δ) MFA/EPO PM and (□) MFA/EPO Cryo-GM at pH5.5 (n=3, mean±S.D.).

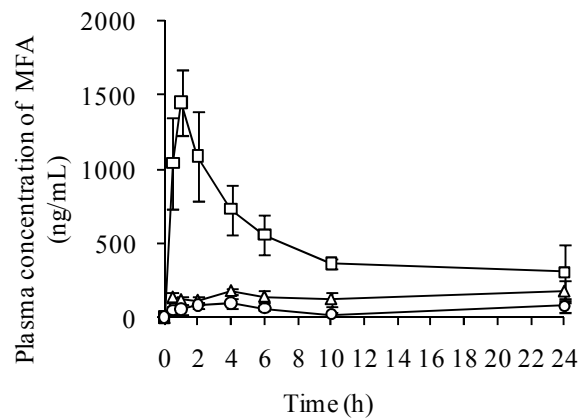


Figure 4. Plasma concentration-time profiles of MFA after a single oral administration of (○) MFA suspension, (Δ) PM suspension and (□) Cryo-GM solution. Mean AUC until 24 hours were 1510±510 ng·h/mL from MFA suspension, 3465±592 ng·h/mL from MFA/EPO PM suspension and 11794±399 ng·h/mL from MFA/EPO Cryo-GM solution (n=3-4, mean±S.E.).

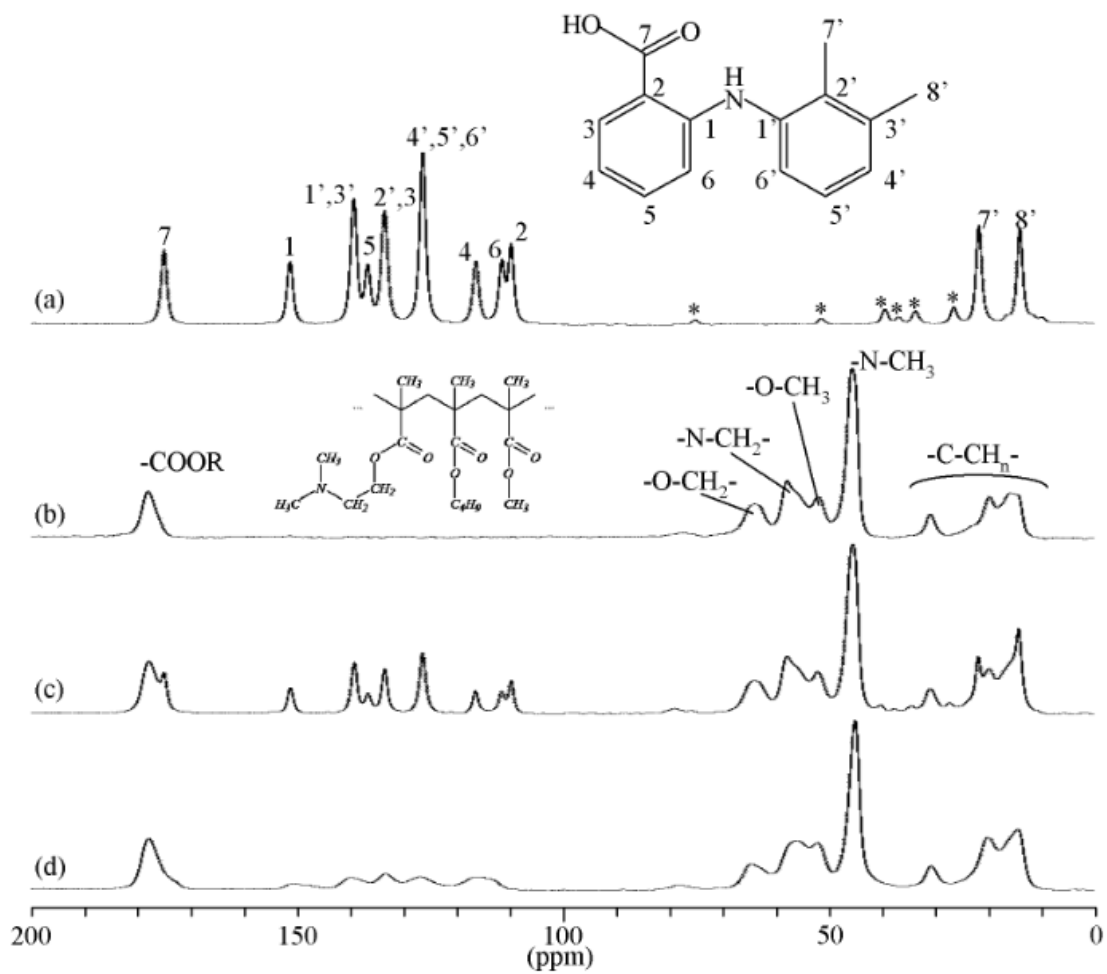


Figure 5. ^{13}C -CP/MAS NMR spectra of (a) MFA, (b) EPO, (c) MFA/EPO PM and (d) MFA/EPO Cryo-GM. Asterisk (*) shows the spinning side bands.

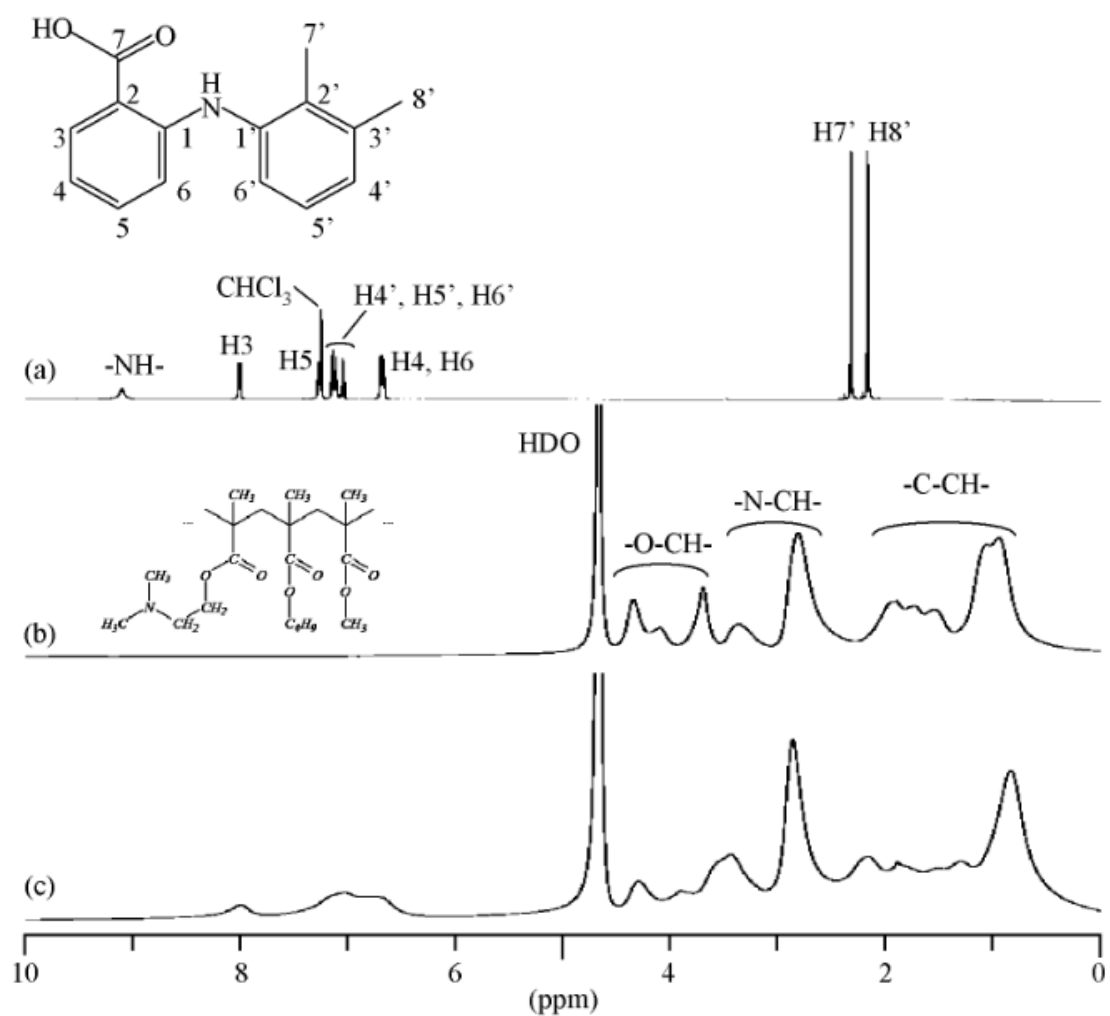


Figure 6. Solution state ¹H-NMR spectra of (a) MFA, (b) EPO and (c) MFA/EPO Cryo-GM. MFA was dissolved in CDCl₃, while EPO and MFA/EPO Cryo-GM were dissolved in 0.1M acetate buffer (pH 5.5) prepared from acetic acid-d₄, sodium acetate-d₃ and D₂O.

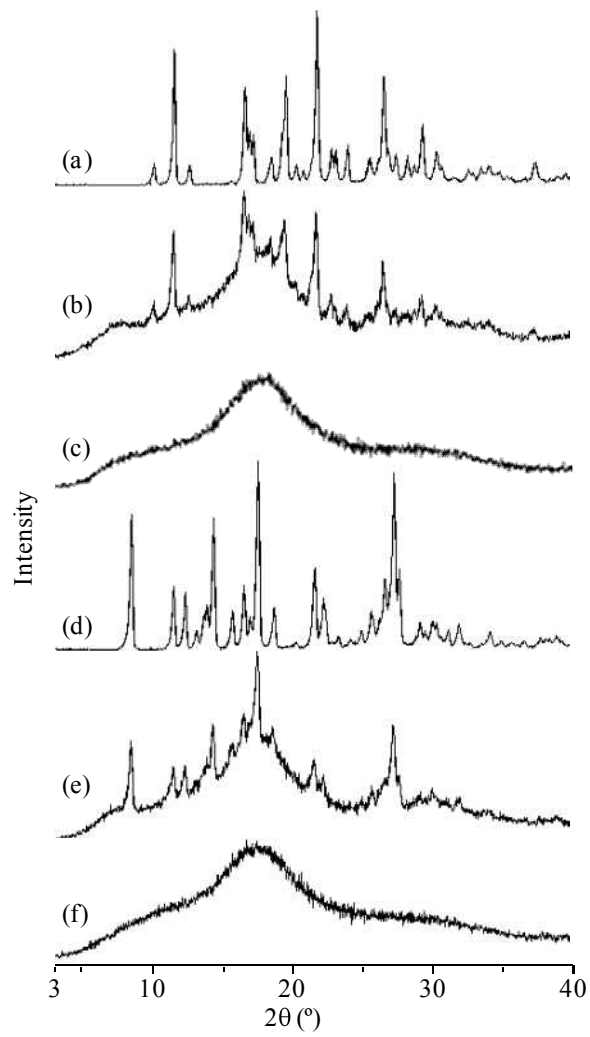


Figure 7. PXRD patterns of (a) IMC, (b) IMC/EPO PM, (c) IMC/EPO Cryo-GM, (d) PXC, (e) PXC/EPO PM and (f) PXC/EPO Cryo-GM.

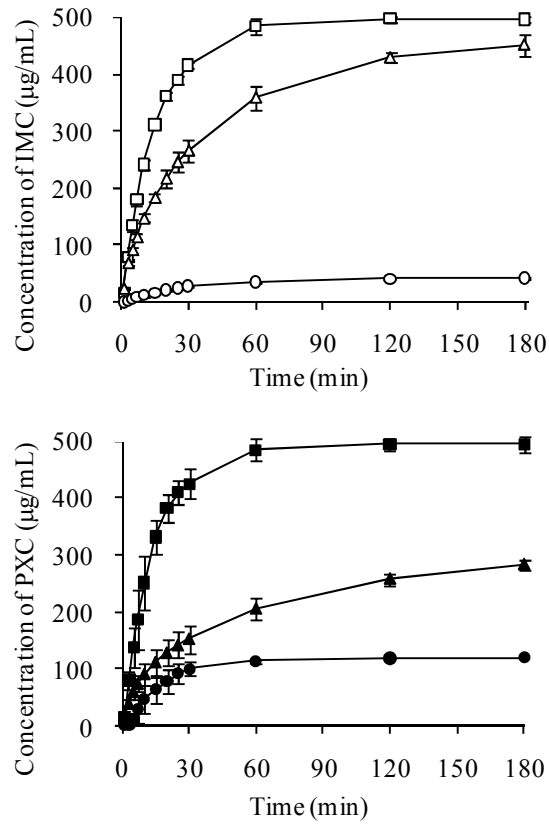


Figure 8. Dissolution profiles of IMC/EPO (top) and PXC/EPO systems (bottom) at 0.1M acetate buffer (pH 5.5) (n=3, mean±S.D.); (○) IMC, (Δ) IMC/EPO PM, (□) IMC/EPO Cryo-GM, (●) PXC, (▲) PXC/EPO PM and (■) PXC/EPO Cryo-GM.