

氏名	いもの まさあき 鑄物 将明
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第80号
学位授与の日付	令和2年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	難水溶性薬物ナノ粒子の <i>in vitro</i> 評価法構築と 吸収性向上効果に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 光 暢 (副査) 教授 大 桃 善 朗 (副査) 教授 福 永 理 己 郎 (副査) 教授 谷 口 雅 彦 (副査) 教授 戸 塚 裕 一

論文内容の要旨

近年の創薬技術の発達に伴い、高活性の医薬品候補化合物が数多く創出されているが、その多くは難水溶性を示すため経口吸収性が低いことが課題である。難水溶性化合物の溶解性及び経口吸収性を改善させる種々の手法が開発されており、中でもサブミクロン領域まで微細化させるナノ粒子化は、経口吸収性の飛躍的な向上、食事の影響低減、少量での添加剤で実施可能などの利点を有することから、近年注目が高まっている。

溶出試験は経口吸収性の予測のために用いられるが、ナノ粒子は粒子径に依存したUVスペクトルを示すため、溶解した薬物とナノ粒子を分離して定量する必要があり、超遠心や微細なフィルターによる除去は時間を要するため、ナノ粒子の溶解挙動を測定できないことが課題である。また、ナノ粒子の経口吸収性を予測可能な *in vitro* の評価法が無いことも課題として挙げられる。ナノ粒子化による溶解度及び経口吸収性向上は種々の薬物で報告されているが、溶解度向上効果は 1.3 倍以内にとどまる一方、吸収量の向上は数倍から最大 16 倍と大きく乖離することが報告されている。そ

のため、ナノ粒子の経口吸収性向上には膜透過性などの他の因子の関与が示唆されているが、経口吸収性の向上機構は未だ解明されていない。その結果、*in vitro* 評価による経口吸収性向上の予測が困難であるため、ナノ粒子処方最適化検討において *in vivo* 経口吸収性試験が必要であり、動物実験の増加及び創薬期間の延長を招いている。上記の課題を解決するため、本研究では、新規添加剤を用いた **Break-down** 法及び **Build-up** 法による難水溶性化合物のナノ粒子化とその溶解性及び吸収性向上効果、ナノ粒子の新規溶出性評価法及びナノ粒子の経口吸収性を予測可能な *in vitro* 評価法について検討した。

食品中の難水溶性混合物であるプロポリスのナノ粒子を、糖転移化合物 **Stevia-G** を添加剤として用いた **Build-up** 法により調製した。その結果、ナノ粒子化によりプロポリス中各有効成分の水へのみかけの溶解度は 3~100 倍、経口投与後の最高血漿中濃度 C_{max} 及び血漿中濃度-時間曲線下面積 AUC は 3~4 倍及び 4~6 倍向上し、複数の難水溶性有効成分の溶解性及び吸収性を同時に向上させた。また、**Build-up** 法の適用が困難である難水溶性薬物グリベンクラミドについて、糖転移化合物 **Hsp-G** を添加剤として用い、**Break-down** 法の一つである乾式粉碎によりナノ粒子化を試みた。その結果、粉碎時間に伴う経時的な粒子径の減少及び微粒子画分量の増大が認められ、約 300 nm のナノ粒子化に成功した。粒子径の減少は、**Hsp-G** が粉碎過程において微細な薬物結晶の凝集を防ぎ、また水中での難水溶性薬物の分散性を高めたためと考えられた。**Hsp-G** との混合粉碎物は、薬物原末及び物理混合物と比較して溶解速度が顕著に向上しており、試験開始 2 分後に仕込みの 50%以上が溶出した。*in vivo* 薬理効果試験においても、混合粉碎物は原末に比較して血漿中グルコース濃度を有意に低下させ、血漿中濃度-時間曲線上面積 AAC は 6 倍以上の値を示した。**Hsp-G** を用いた **Break-down** 法により調製したナノ粒子化により、難水溶性薬物の溶解性及び薬理効果が増大した。以上のことから、**Build-up** 及び **Break-down** 法における **Stevia-G** 及び **Hsp-G** のナノ粒子化添加剤としての有用性が示され、種々の難水溶性成分及びその混合物への適用が期待される。

医薬品合剤の評価や農業分野では、UV スペクトルの 2 次微分により複数成分を同時に定量する手法が報告されている。そこで本研究では、湿式粉碎で調製したメフェナム酸のナノ粒子に対し、溶解した薬物とナノ粒子を別の成分とみなして UV スペクトルを 2 次微分することにより、ナノ粒子からの溶解速度を測定可能な新規溶出試験法を検討した。その結果、メフェナム酸ナノ粒子からの溶出量及びナノ粒子量を数秒間隔で測定することが可能であり、従来の方法では測定不可能であったナノ粒子の高

い溶解速度を測定できた。一方で、ナノ粒子の溶解度に関しては、微細なフィルターろ過と HPLC を組み合わせた手法がより適切である可能性が考えられた。2 次微分 UV とフィルターろ過を組み合わせた手法は、ナノ粒子の溶解速度及び溶解度を適切に評価できるため、ナノ粒子の特性評価に有用な *in vitro* 評価系となることが期待される。

ナノ粒子化による難水溶性薬物の経口吸収性向上機構の解明及び経口吸収性向上を予測可能な *in vitro* 評価系を設定するため、ナノ粒子製剤が市販されている難水溶性薬物フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールに対して、市販品を含む粒子径の異なる 3 種のナノ粒子とマイクロ粒子を調製した。調製した懸濁液及び薬物溶液について、*in vitro* 溶出-膜透過試験及び *in vivo* 経口吸収性試験を実施し、粒子径の影響及び *in vitro* *in vivo* 相関性を検証した。その結果、*in vitro* 試験では粒子径の減少に伴い、溶解度がわずかに向上した一方、膜透過速度は大幅に向上したことから、見かけの膜透過係数 P_{app} の向上が認められた。ナノ粒子懸濁液の P_{app} は、溶液に比較しても高い値を示したことから、ナノ粒子化による膜透過性の向上は、溶解度の向上に加え、ナノ粒子が消化管膜上の非攪拌水相 UWL に侵入した後に溶解することで膜近傍の濃度を向上させた結果、UWL の有効膜厚さを減少させたためと考えられた。*In vivo* 試験では、経口吸収速度の向上が認められ、*in vitro* 膜透過速度の向上と高い相関が認められた。以上のことから、ナノ粒子化による経口吸収性向上の主要因は膜透過性の向上であり、ナノ粒子懸濁液の膜透過性を測定可能な溶出-膜透過試験は有用な *in vitro* 評価になり得ると考えられた。

本研究では、ナノ粒子化による難水溶性成分の経口吸収性および、ナノ粒子化による溶出性改善をリアルタイムに評価可能な新規 *in vitro* 評価系を構築した。その結果、ナノ粒子化による難水溶性薬物の膜透過性向上が経口吸収性改善の主要因であり、構築された *in vitro* 試験によりナノ粒子の経口吸収性の予測ができる可能性が示された。本研究で得られた知見は、難水溶性薬物の経口吸収性向上手法としてのナノ粒子の有用性を高め、新規医薬品創出の成功確率向上に寄与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年の創薬技術の進歩により、難水溶性を示す医薬品候補化合物が増加しており、経口吸収性が低いことが課題となる。難水溶性化合物の溶解性および経口吸収性の改善を目的とした種々の手法が開発されており、なかでもナノ粒子化は経口吸収性向上効果、安定性および主薬含量の面から有用であると考えられる。しかしながら、ナノ粒子の迅速な分離は困難であるため溶出挙動を正確に評価できないことや、ナノ粒子化による経口吸収性向上機構が未だ解明されていないため、経口吸収性を予測可能な *in vitro* 評価法が無いことが課題である。

本研究の目的は、種々の薬物に適用可能なナノ粒子調製法の検討、ナノ粒子の新規溶出挙動評価法ならびにナノ粒子の経口吸収性向上を予測可能な *in vitro* 評価系の構築である。本論文では、**Build-up** および **Break-down** 法により種々の難水溶性成分のナノ粒子を調製し、ナノ粒子化による溶解性および吸収性向上を確認している。また、ナノ粒子の溶解速度および膜透過速度を測定可能な新規 *in vitro* 評価系を構築し、*in vitro* 膜透過速度が *in vivo* 経口吸収速度と高い相関性を示すことを確認している。ナノ粒子化による難水溶性薬物の *in vivo* 吸収速度向上が経口吸収性改善の主要因であり、構築した *in vitro* 試験によりナノ粒子の経口吸収性の予測ができる可能性を示しており、本研究の目的は達成している。

第1章では、食品中の難水溶性混合物であるプロポリスについて、糖転移ステビアを添加剤として用いた **Build-up** 法によりナノ粒子を調製している。また、**Build-up** 法の適用が困難である難水溶性薬物グリベンクラミドについては、糖転移ヘスペリジン添加剤として用い、**Break-down** 法の一つである乾式粉碎によりナノ粒子を調製している。調製したナノ粒子はいずれも溶解速度および経口吸収性の大幅な向上を達成しており、対象化合物の物性に応じて調製法および添加剤を適切に選択することで、種々の難水溶性成分のナノ粒子を調製可能であることを示した点は評価に値する。

第2章では、メフェナム酸のナノ粒子に対し、溶解した薬物とナノ粒子を別の成分とみなして UV スペクトルを2次微分することにより、ナノ粒子からの溶解速度を数秒間隔で測定可能な新規溶出試験法を構築している。本手法は、従来の方法では測定不可能であったナノ粒子の高い溶解速度を測定可能であり、微細なフィルターろ過を組み合わせることで溶解度の測定精度も向上している。合剤の評価に用いられていた UV スペクトルの2次微分による解析をナノ粒子に適用し、ナノ粒子の溶解速度及び溶解度をリアルタイムに測定可能な試験法を構築したことは、評価に値する。

第3章では、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールを用い、マイクロ懸濁液と3種のナノ懸濁液を調製し、ナノ粒子化による難水溶性薬物の経口吸収性向上機構の解明及び経口吸収性向上を予測可能な *in vitro* 評価系の設定を検討している。粒子

径の減少に伴う溶解度と膜透過速度挙動から、みかけの膜透過係数 P_{app} の向上に着目した結果、ナノ懸濁液の P_{app} が溶液に比較しても高い値を示すことを見出している。先行研究において、ナノ粒子が消化管膜上の非攪拌水相に侵入した後に溶解することで膜近傍の濃度を向上させ、膜透過性が亢進する可能性が示唆されていたが、本研究はナノ粒子化による膜透過性向上を初めて直接測定した事例である。また、ナノ粒子化による初期の経口吸収速度の向上が、経口吸収性向上の主要因であり、*in vitro* 膜透過速度により経口吸収速度を予測できる可能性を示した点は評価に値する。

創薬技術の進歩に伴い、高活性の医薬品候補化合物が数多く創製される一方、複雑な構造に起因する難吸収性が医薬品開発の成功確率の低下の一因であり、製剤学的な工夫による吸収性向上が求められている。ナノ粒子化による経口吸収性向上効果は広く知られており、新薬創出を加速させるために、適切な *in vitro* 評価系の構築が求められていた。本研究では、ナノ粒子化が種々の化合物に適用できる可能性が示され、構築した溶出性および膜透過性の *in vitro* 評価系は、ナノ粒子処方最適化検討における有用性が示された。

本研究の成果は、難吸収性化合物の経口吸収性向上検討を加速させ、新規医薬品創出の成功確率向上に寄与すると考えられるため、申請者の論文は、本学博士論文として評価に値する。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。