

難水溶性薬物ナノ粒子の  
*in vitro* 評価法構築と  
吸収性向上効果に関する研究

2020 年

鑄物 将明

## 目次

緒論	1
第1章 食品中の難水溶性混合物ならびに難水溶性薬物の 溶解性及び吸収性向上を目的としたナノ粒子化検討	
第1節 緒言	5
第2節 糖転移化合物を用いたナノ粒子化プロポリスの調製と評価	
第1項 調製時の粒子径と調製粒子中の有効成分含量	7
第2項 調製粒子の <i>in vitro</i> 溶出挙動評価	9
第3項 調製粒子の <i>in vivo</i> 経口吸収性評価	11
第3節 糖転移化合物と難水溶性薬物の混合粉砕物の調製と評価	
第1項 ボールミル処理時間が粒子径に与える影響	15
第2項 混合粉砕物の物性評価	17
第3項 混合粉砕物の <i>in vitro</i> 薬物溶出挙動評価	18
第4項 混合粉砕物の <i>in vivo</i> 薬理効果評価	20
第4節 小括	22
第2章 難水溶性薬物ナノ粒子の新規溶出試験法に関する検討	
第1節 緒言	23
第2節 調製懸濁液の物性評価	25
第3節 2次微分UVによる検量線作成	27
第4節 調製懸濁液の <i>in vitro</i> 溶出挙動評価	30

第5節	小括	34
第3章	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 <i>in vitro</i> 評価系に関 する検討	
第1節	緒言	35
第2節	調製懸濁液の物性評価	37
第3節	調製懸濁液の溶出-膜透過評価	41
第4節	ナノ粒子化による膜透過性向上機構の解明	
第1項	ナノスフェア標準粒子の溶出-膜透過試験	43
第2項	酢酸メゲストロール溶液の溶出-膜透過試験	44
第5節	調製懸濁液の <i>in vivo</i> 経口吸収性評価	
第1項	経口投与後の血漿中濃度評価	51
第2項	経口投与後の消化管からの吸収速度評価	55
第3項	<i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> 相関性の検証	57
第6節	小括	58
第4章	総括	59
	実験の部	63
	謝辞	85

略語	87
参考文献	89
論文目録	99

## 緒論

近年、ハイスループットスクリーニングやハイスループット合成などの創薬技術の向上により、標的分子と高い親和性を示す複雑な化学構造を持つ低分子化合物が数多く創製されている。その結果、医薬品候補化合物の約 90%が、**Biopharmaceutical Classification** において難水溶性とされる **Class II** もしくは **IV** へ分類されることが知られている<sup>1,2</sup>。また、医療費抑制や予防医療の観点から重要性が増大している健康食品においても、食品中の生理活性物質の中にはテルペノイドやフラボノイドなど難水溶性を示すものも多く存在する。

経口投与された化合物が効果を発現するためには、消化管液に溶解した後に、消化管膜を透過して吸収され、作用部位に送達される過程を経る必要がある。難水溶性薬物は消化管液への溶解性が低いために経口吸収性が低下することに加え、溶解挙動が不安定であるために個体間変動が大きいことが医薬品開発上の大きな課題となっている。これらの課題を解決するために、塩及び共結晶化、乳化、固体分散体化、微細化などの溶解性改善技術が開発されており、臨床製剤への実用例も数多く存在する<sup>3,4</sup>。中でも微細化は少量の添加剤で実施可能な古典的な手法ではあるが、サブミクロン領域まで微細化した場合に経口吸収性が飛躍的に向上することが報告され、また、個体間変動の抑制、食事の影響の低減が期待されることから、近年注目が高まっている<sup>5-7</sup>。

難水溶性薬物の微細化手法は **Build-up** 法と **Break-down** 法の 2 つに大別される。**Break-down** 法は乾式又は湿式粉碎により薬物粒子を微細化する方法であり、簡便でコストが低いことが利点である。しかし、過度な粉碎により粒子が再凝集するため到達可能な粒子径に下限があり、化合物の特性によっては微細な粒子を得ら

れないことが課題である。一方 **Build-up** 法は薬物を一度溶解させた後に析出させて微粒子を得る方法であり、**Break-down** 法に比較して微細な粒子が得やすいことが利点であるが、結晶多形の制御や有機溶媒の残留が課題となる。

また、医薬品の品質を保証するために規制当局に用いられる溶出試験は、経口吸収性の予測の目的でも研究が進められており<sup>8,9</sup>、一部医薬品では、*in vitro* 溶出試験のみで生物学的同等性が保証可能であることが ICH M9 で最終合意されている。しかしながら、サブミクロンサイズまで微細化された粒子（ナノ粒子）は、溶出試験で一般に用いられる細孔径 0.2~0.8  $\mu\text{m}$  のフィルターを通過するため、溶出量及び溶解速度を正確に測定することは困難で、溶出試験を適切に実施できないことが課題である<sup>10,11</sup>。

溶出挙動の評価が困難であることに加え、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<sup>7,11-13</sup>。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<sup>14,15</sup>。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。

一般に医薬品単独の粉碎ではサブミクロンサイズまでの微細化は困難であるため、粉碎助剤などを加えた粉碎が一般的であり、糖類との混合粉碎でもナノ粒子

化は観察される場合がある<sup>16,17</sup>。本研究では、難水溶性薬物の固体分散体基剤としての有用性が報告されている機能性食品添加剤である糖転移ステビア及び糖転移ヘスペリジンを用い<sup>18</sup>、ナノ粒子化添加剤としての適用を検討した。難水溶性モデル混合物として健康食品であるプロポリスを用いた。プロポリスは種々の有益な生理活性が報告されている難水溶性の樹脂製混合物で<sup>19-22</sup>、高い粘度、付着性により取り扱いが困難であるため、水・有機溶媒混合溶液に一旦溶解させる Build-up 法によりナノ粒子を調製した。また、難水溶性薬物であるグリベンクラミド (GCM) に対し、Break-down 法の一つである乾式粉碎によりナノ粒子を調製した。調製したナノ粒子について、溶解性及び吸収性向上効果について検討した。

#### (第 1 章)

ナノ粒子は粒子径に依存した UV スペクトルを示すため、溶出試験では溶解した薬物とナノ粒子を分離して定量する必要があるが、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、溶解速度を測定できない<sup>10</sup>。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、医薬品合剤の評価や農業分野で報告されている<sup>23,24</sup>。湿式粉碎で調製したメフェナム酸 (MFA) 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。(第 2 章)

ナノ粒子の経口吸収性を予測するために、2 種類の薬物それぞれに対して、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、溶解性と膜透過性を同時に評価する *in vitro* 試験法と、ラットを用いた *in vivo* 吸収性試験との結果の相関性を検証した。また、溶解速度の影響を排除した検証によりナノ粒子化による膜透過性向上効果を測定し、経口吸収性向上機構の解明を試みた。(第 3 章)

以下各章にわたって詳述する。





## 第1章

### 食品中の難水溶性混合物ならびに難水溶性薬物の 溶解性及び吸収性向上を目的としたナノ粒子化検討

#### 第1節 緒言

難水溶性の薬物及び食品中有効成分は、経口吸収性が低いため十分な効果が得られないことが1つの課題として挙げられる。これまで溶解性向上の手法として、塩や共結晶など原薬形態の改変や、固体分散体や自己乳化型製剤など添加剤を利用した製剤化などが研究されてきた<sup>25,26</sup>。中でも、サブミクロン領域までの微細化（ナノ粒子化）は、少量の添加剤かつ簡便な手法で実施可能であることから、近年注目が高まっている<sup>12,27,28</sup>。

ナノ粒子化の手法として、Build-up 法及び Break-down 法が知られており、目的に応じて適切な手法を使い分けることが重要である。本研究では、新規添加剤である糖転移化合物を用いて、難水溶性食品中有効成分及び薬物のナノ粒子を Build-up 法及び Break-down 法により調製し、溶解性及び経口吸収性に与える影響を評価した。

難水溶性食品中有効成分の混合物として、プロポリスを用いた。プロポリスは、植物の樹脂と蜂の分泌液、蜜蝋、花粉などを練り合わせて作られる膠状の粘着物質で、ミツバチの巣から採取される。ポリフェノール類やテルペノイド、アミノ酸など様々な化合物を含み、200種類以上の成分の混合物である。古くから各地で伝承療法として広く使用されており、抗腫瘍作用<sup>20</sup>、抗酸化作用<sup>19</sup>、抗炎症作用<sup>29</sup>、抗菌作用<sup>30-33</sup>、抗真菌作用<sup>34</sup>及び肝保護作用<sup>35</sup>などの有益な生理活性がこ

れまでに報告されている。プロポリス成分は有益な生理活性を示す一方で、水への分散性及び溶解性が低いために、経口吸収性が低いことが課題であり、溶解性改善技術が求められている<sup>36,37</sup>。プロポリスは樹脂状で取り扱いが困難であるため、溶媒中でナノ粒子化添加剤と複合粒子を形成させた後に、粉末化を行う **Build-up** 法によりナノ粒子を調製した。ナノ粒子化添加剤として、機能性食品添加剤の一種であり、高い溶解性と甘味を有する糖転移ステビア (**Stevia-G**) を用いた<sup>38</sup>。プロポリス中の主な活性成分であるアルテピリン C 及びドゥルパニン<sup>39-41</sup>に着目し、難水溶性混合物のナノ粒子化による溶解性及び吸収性向上効果を評価した。

## (第2節)

**Break-down** 法の一つである乾式粉碎は、簡便な粉碎手法であり、水や有機溶媒の使用を回避できる利点を有する<sup>42-44</sup>。粉碎中の凝集により 1  $\mu\text{m}$  以下の粒子を得ることは一般に困難であるが、粉碎助剤の添加により粉碎が進行する場合も報告されている<sup>17</sup>。本研究では、難水溶性モデル薬物としてグリベンクラミドを、添加剤として糖転移ヘスペリジン (**Hsp-G**) を用い、乾式粉碎の一つであるボールミルによるナノ粒子調製を試みた。得られた粒子の粒子径、結晶性、溶解性及び薬理効果を測定し、ナノ粒子化による経口吸収性効果を評価した。(第3節)

## 第2節 糖転移化合物を用いたナノ粒子化プロポリスの調製と評価

ナノ粒子の調製法には、Build-up 法と Break-down 法があるが、プロポリスは粘度及び付着性が高いため、Build-up 法によるナノ粒子化を試みた。難水溶性混合物のモデルとしてプロポリスのエタノール抽出物 (EEP) を、添加剤として糖転移ステビア (Stevia-G) を用いた。エタノール/水混液中で混合後に溶媒を留去することで、EEP と Stevia-G の複合粒子を調製した。その後、水中に再分散させてナノ粒子懸濁液を調製した後、凍結乾燥により粉末化した。得られた粒子中の有効成分の含量、溶解性、吸収性を評価した。

### 第1項 調製時の粒子径と調製粒子中の有効成分含量

Table 1-1 に、溶媒留去前 (エタノール/水混液中) 及び凍結乾燥前後 (水中) の粒子径測定結果を示す。動的光散乱法による粒子径測定では、Z 平均粒子径と多分散性指数 PDI が得られる。プロポリス成分は、Stevia-G 存在下でエタノール/水混液中で Z 平均粒子径 256 nm, PDI 0.09 を示す均一なナノ粒子を形成した。エタノールを除去し、水中に再分散した後もナノ粒子を維持しており、凍結乾燥による粒子径の増大は認められなかった。

**Table 1-1 The particle size and polydispersityindex in preparing propolis/Stevia-G particle.**

	Z-average (nm)	PdI
before evaporation	256	0.09
before freeze-drying	347	0.17
after freeze-drying	311	0.21

Table 1-2 に、EEP 及び調製粒子中のアルテピリン C 及びドゥルパニン含有量の実測値及び理論値を示す。EEP 及び調製粒子中の仕込みプロポリス固形分量はそれぞれ 55%及び 9.09%であることから、調製粒子中の有効成分の理論値を算出した。測定された有効成分含量はいずれも理論値に類似した値を示したため、粒子調製時のプロポリス成分の不均一な析出や溶媒留去及び凍結乾燥過程工程により含量の減少は無いと考えられた。

**Table 1-2 The content of artepillin C and drupanin in EEP and Propolis/Stevia-G.**

	EEP	Propolis/Stevia-G	
	Measured	Measured	Theoretical
Artepillin C	425.0	74.5	70.2
Drupanin	58.3	10.1	9.6

(mg/g)

## 第2項 調製粒子の *in vitro* 溶出挙動評価

本項では、前項で調製したプロポリスエタノール抽出エキスである EEP と Stevia-G との均一なナノ粒子及び対照品の溶解性を評価した。EEP はエタノールを多量に含む粘調液で経口投与に適さないため、粉末状態の対照品として、EEP にマルトデキストリンを添加して噴霧乾燥することで粉末化した EEP-SD を用いた。

事前に、プロポリス中の難水溶性有効成分であるアルテピリン C 及びドゥルパニンの 37 °C における蒸留水への溶解度を測定した結果、それぞれ 1 µg/mL 以下及び約 40 µg/mL であった。Figure 1-1 はアルテピリン C 及びドゥルパニンの、EEP, EEP-SD 及び調製粒子からの蒸留水における溶出プロファイルを示した。いずれの有効成分においても、調製粒子は EEP 及び EEP-SD に比較して、溶解速度及びみかけの溶解度が大幅に向上した。特に脂溶性が高く水溶性が低いアルテピリン C では、試験開始 180 分後の EEP 及び EEP-SD からの溶出量は HPLC の定量限界 (0.28 µg/mL) 以下の値であった。一方で、調製粒子からのアルテピリン C の溶出量は試験開始 180 分後で 80 µg/mL 以上を示し、さらに試験開始 1 週間後においても 75 µg/mL であった。ドゥルパニンについても同様に、溶解速度及びみかけの溶解度の向上が認められ、試験開始 180 分後のみかけの溶解度は約 120 µg/mL であり、EEP 及び EEP-SD に比較して約 2.8 及び 3.8 倍の値を示した。

Stevia-G は、水中でミセル様の構造を形成し、難水溶性薬物の溶解性を改善させることがこれまで報告されている<sup>18,45,46</sup>。今回認められたプロポリス中難水溶性成分のナノ粒子化及びみかけの溶解度の向上は、Stevia-G の界面活性能に起因すると推察され、Stevia-G は複数の難水溶性成分が同時に存在する系についても有効な手法である可能性が示された。

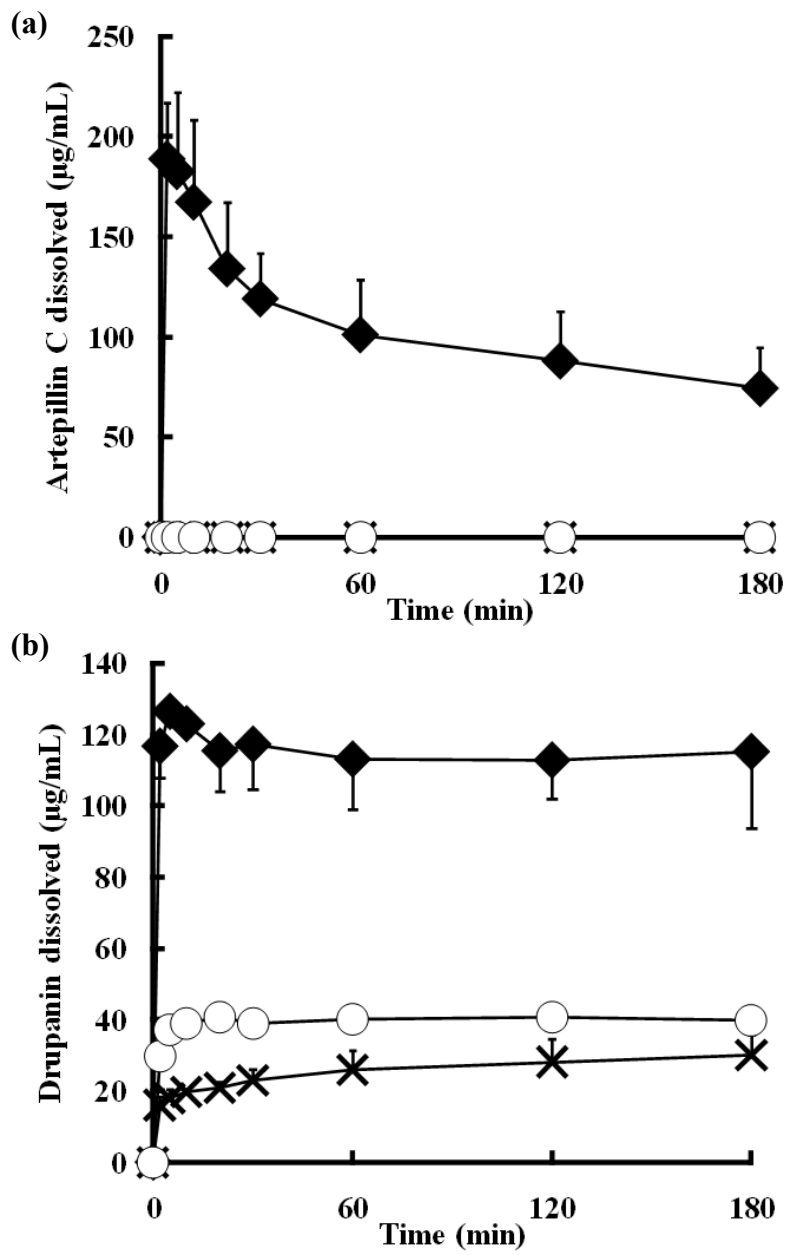


Figure 1-1 Dissolution profiles of (a) artepillin C and (b) drupanin:  $\times$ ; EEP,  $\circ$ ; EEP-SD and  $\square$ ; Propolis/Stevia-G. (mean  $\pm$  S.D., n=3)

### 第3項 調製粒子の *in vivo* 経口吸収性評価

前項までに、調製したナノ粒子はプロポリス中難水溶性有効成分の溶解性を顕著に改善させることが示されたため、消化管内での溶解性及び吸収性向上が期待される。本項では調製粒子をラットに経口投与した後の血漿中濃度を経時的に定量することで、ナノ粒子化がプロポリス中有効成分の吸収性に与える影響について検討した。なお、評価に用いたプロポリス中難水溶性有効成分は吸収過程において代謝を受けて抱合体へと変化する事が報告されているため<sup>47</sup>、血漿中の有効成分定量時にはグルクロニダーゼ及びサルファターゼによる処理を行った。

Figure 1-2 には、EEP-SD、EEP-SD と Stevia-G の物理混合物、及び調製粒子をラットに経口投与した後のアルテピリン C 及びドゥルパニンの血漿中濃度推移を示した。アルテピリン C について、EEP-SD 投与群は、試験開始 20 分後に最高血漿中濃度  $C_{max}$  に達し、 $0.40 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$  を示した。また、物理混合物投与群もほぼ同程度の血漿中濃度推移を示し、 $C_{max}$  は  $0.45 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$  であり、Stevia-G の直接添加による吸収性向上は認められなかった。一方、調製粒子投与群では吸収性の大幅な向上が認められ、試験開始 10 分後の  $C_{max}$  は  $1.64 \pm 0.63 \mu\text{g/mL}$  であり、EEP-SD 及び物理混合物投与群に比較して、顕著な増大が認められた。ドゥルパニンについても同様に、ナノ粒子化による血漿中濃度の顕著な増大が認められた。

また、吸収性の指標である血漿中濃度-時間曲線下面積 AUC を試験開始から 240 分後の間で算出した結果を Table 1-3 に示す。調製粒子投与群の AUC は EEP-SD 及び物理混合物投与群に比較してアルテピリン C で 6.4 倍、ドゥルパニンで 4.5 倍高く、Stevia-G を用いたナノ粒子化により各成分の吸収性が劇的に向上した。アルテピリン C は濃度勾配により管腔側から基底膜側へと輸送され、ヒト結腸癌由来の細胞株である Caco-2 単層膜に対して良好な透過性を有することが過去に報告されていることから<sup>48,49</sup>、消化管からの吸収の律速段階は溶解過程であると

推察される。Figure 1-1 において示されたように調製粒子は EEP-SD に比較して、アルテピリン C の溶解速度及びみかけの溶解度を顕著に向上させたため、消化管内においてもアルテピリン C の溶解性が向上し、それゆえ血中濃度の大幅な増大が認められたと考えられた。ドゥルパニンの膜透過性はこれまで報告されていないが、アルテピリン C と同様に大幅な経口吸収性の向上が認められ、*in vitro* 溶出試験と *in vivo* 吸収性試験において良好な相関が認められた。

Stevia-G を用いたナノ粒子化は、200 種類以上もの成分の混合物であるプロポリス中の複数の有効成分の吸収性を同時に向上させたことから、他の難水溶性成分に対しても有効な吸収性向上手法であると期待される。



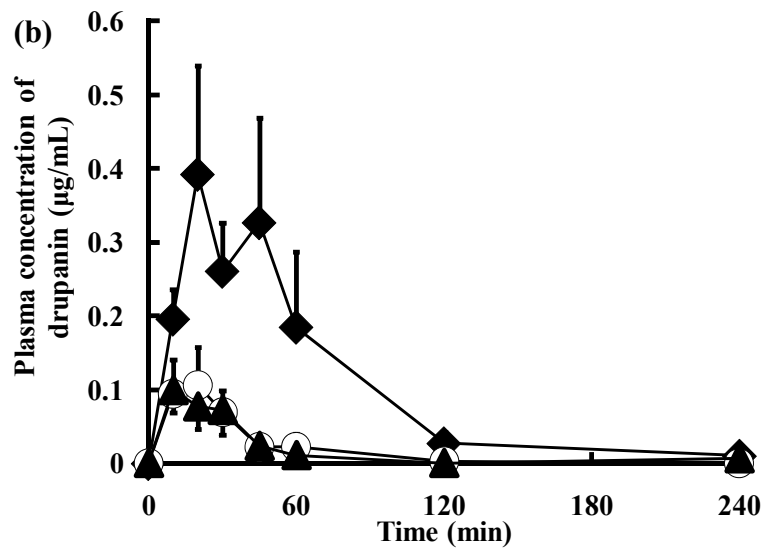
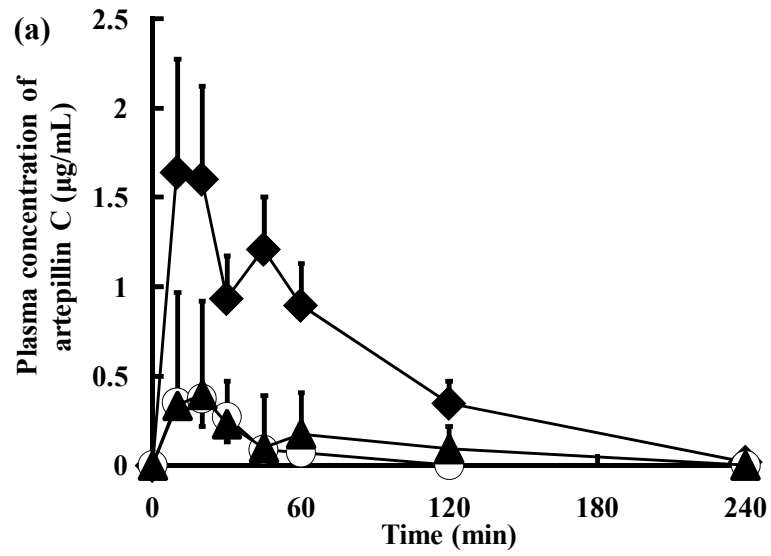


Figure 1-2 Plasma concentration of (a) artepillin C and (b) drupanin after intragastric administration: ○; EEP-SD, ▲; Physical mixture of EEP-SD/Stevia-G (1/10), and □; Propolis/Stevia-G. (mean ± S.E., n=6)

**Table 1-3 Area under the plasma concentration-time curve (AUC) values of EEP-SD, physical mixture of EEP-SD/Stevia-G, and Propolis/Stevia-G in 240 min after oral administration in rats. (mean  $\pm$  S.E., n=6)**

**\*, P<0.05, significantly different from EEP-SD; #, P<0.05, significantly different from physical mixture; \*\*\*, P<0.001, significantly different from EEP-SD; ###, P<0.001, significantly different from physical mixture.**

	EEP-SD		Physical mixture of EEP-SD/Stevia-G		Propolis/Stevia-G	
Artepillin C	26.14 $\pm$	12.99	19.18 $\pm$	12.60	168.03 $\pm$	94.46 *** ###
Drupanin	5.97 $\pm$	5.30	6.05 $\pm$	3.81	26.83 $\pm$	18.90 * #

( $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ )

### 第3節 糖転移化合物と難水溶性薬物の混合粉碎物の調製と評価

ナノ粒子の調製法は、Build-up 法と Break-down 法の2つに大別され、前節では Build-up 法による複数の難水溶性成分のナノ粒子化を検討した。Build-up 法は微細な粒子の調製が可能である一方で、難水溶性成分を溶解させるための有機溶媒の残留や、結晶形の制御がしばしば問題となる。特に、エタノールやアセトンなどの揮発性溶媒に対する溶解性が低いグリベンクラミドのような薬物の場合は、DMSO などの難揮発性の有機溶媒を使用する必要があるため、Build-up 法の適用は困難である。

そこで本節では、Break-down 法の一つである乾式粉碎により、グリベンクラミドのナノ粒子化を検討した。乾式粉碎は有機溶媒を使用する必要が無く容易に粉末試料を調製できることやスケールアップも可能なことから製剤プロセスとしてはより好ましい手法である。ナノ粒子化添加剤として、固体分散体基剤としての有用性が報告されている糖転移ヘスペリジン (Hsp-G) を用いた<sup>50-52</sup>。ボールミルを用いた乾式粉碎により、グリベンクラミドと Hsp-G との混合粉碎物を調製し、粉碎時間が粒子径に与える影響、調製粒子の溶解性及び動物における薬理効果を評価した。

#### 第1項 ボールミル処理時間が粒子径に与える影響

一般に乾式粉碎においては粉碎過程の経過に伴い粒子径の減少が認められるが、微細化に伴い比表面積が増大するため粒子同士の凝集が起これ、粒子径は増加する可能性がある。本項ではボールミル処理中の粒子径を経時的に観察することで、

ボールミル処理時間が粒子径に与える影響について検討した。

Figure 1-3 には異なるボールミル処理時間で調製した混合粉碎物の水中分散時の粒子径及び粒子径分布をそれぞれ示した。粒子径は動的光散乱法により測定された平均値を示し、粒子径分布は細孔径 0.8  $\mu\text{m}$  及び 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターを通したろ液中の薬物量をそれぞれ差し引くことで、懸濁液全体に占める各粒子径画分の割合として算出した。粉碎時間の増大に伴い平均粒子径の減少, 200 nm 及び 800 nm 以下のナノ粒子画分割合の増加が認められた。平均粒子径は 30 分後に約 300 nm で平衡に達した。60 分間粉碎後では、過半数の薬物が 800 nm 以下のナノ粒子として存在していた。過剰な粉碎による粒子の再凝集が認められず、調製粒子が水中で高い分散性を示したことから、Hsp-G の粉碎助剤としての有用性が示された。

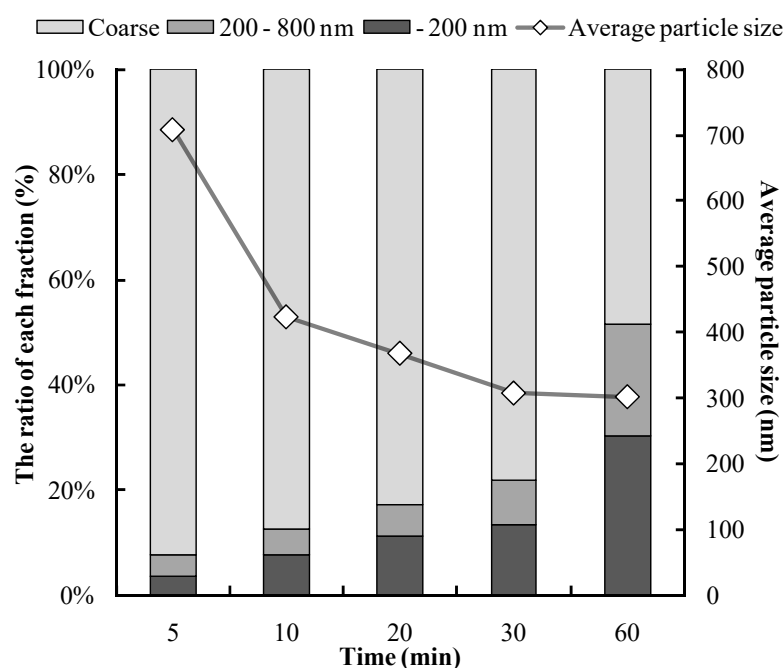
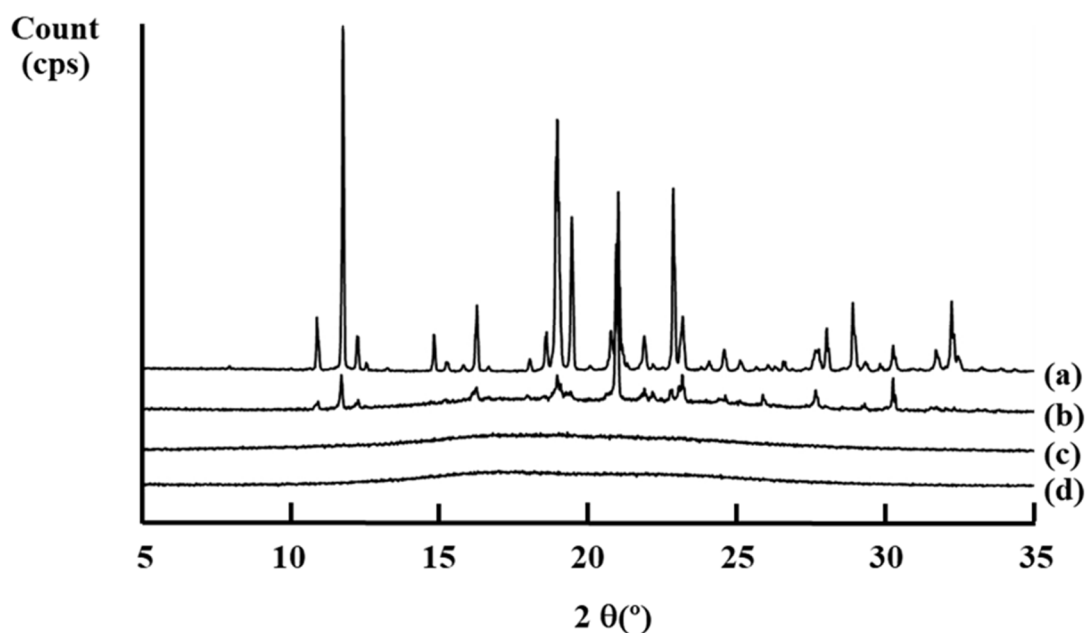


Figure 1-3 The effect of ball-mill time on particle size and distribution of ground mixture of GCM/Hsp-G.

## 第2項 混合粉砕物の物性評価

本項では調製粒子の結晶性に関する評価を行った。Figure 1-4 にグリベンクラミド原末、グリベンクラミドと Hsp-G の物理混合物、混合粉砕物及び Hsp-G の粉末 X 線回折測定の結果を示す。混合粉砕物ではグリベンクラミド結晶由来の回折ピークが減弱したことから、粉砕による結晶性の低下又は非晶質への転移が示唆された。また、グリベンクラミドは2種類の結晶多型の存在が報告されているが<sup>53</sup>、新規ピークの出現は認められなかったことから、異なる結晶形への転移は惹起されなかったと推察された。なお、25°Cで3カ月保管後も X 線回折パターンに変化は認められなかった。また、グリベンクラミド単独粉砕品においても、結晶性の低下が同様に認められた。



**Figure 1-4 Powder X-ray diffraction patterns of: (a) untreated GCM, (b) physical mixture of GCM/Hsp-G (c) ground mixture of GCM/Hsp-G, and (d) Hsp-G.**

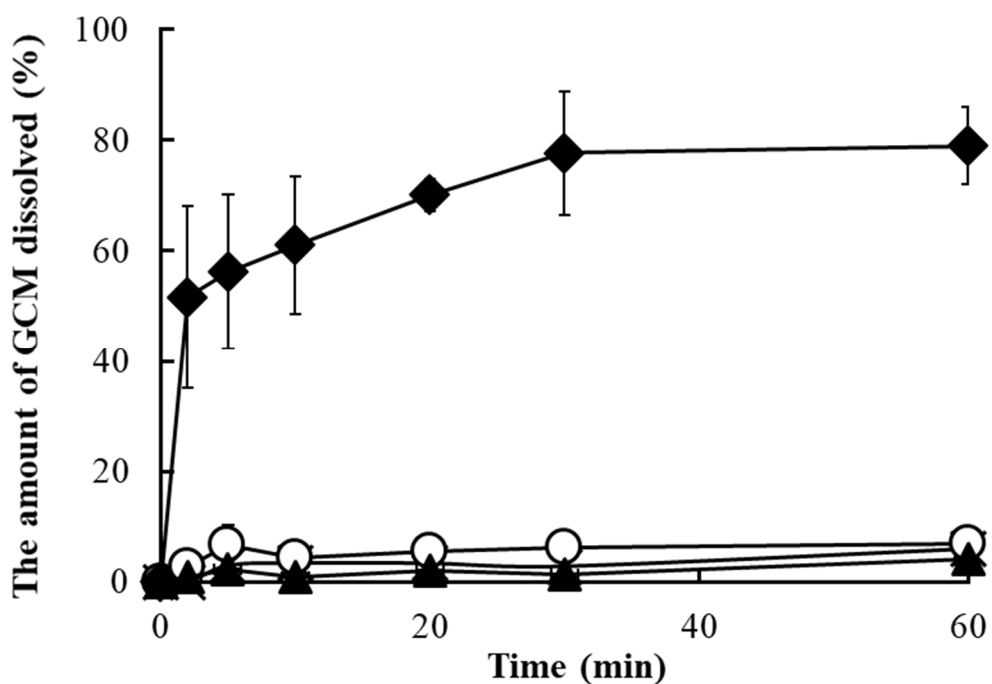
### 第3項 混合粉砕物の *in vitro* 薬物溶出挙動評価

前節までの検討で、グリベンクラミドと Hsp-G をボールミルにより混合粉砕することで、サブミクロン粒子への微細化が可能であるという知見が得られた。本節では薬物微細化が溶解速度に与える影響を評価するために、日本薬局方一般試験法溶出試験法 パドル法により、混合粉砕物からのグリベンクラミドの溶出挙動を評価した。主な薬物吸収部位である小腸上部での溶解性を評価するため、溶出試験液として第十七改正日本薬局方溶出試験第2液 (pH 6.8) を用いた。また、薬物微細化が溶解速度に与える影響について検討するために、薬物仕込み量は溶解度以下の 2 µg/mL に設定した。

Figure 1-5 に、グリベンクラミド原末、グリベンクラミド単独粉砕品、グリベンクラミドと Hsp-G の物理混合物及び混合粉砕物の溶出試験第2液における溶出プロファイルを示した。グリベンクラミドは溶解性が非常に低く、試験開始 60 分後の仕込み量に対する溶出率は、原末、単独粉砕品及び物理混合物においてそれぞれ 6.0%、4.1%及び 7.0%であった。一方 Hsp-G との混合粉砕物は試験開始直後に急速な溶出が認められ、試験開始 2 分以内に 50%以上、60 分後に 79.0%が溶出した。原末、物理混合物及び混合粉砕物からの 24 時間後の溶出率は、それぞれ約 65%、70%及び 80%で、仕込み量のほとんどが溶解したことから、混合粉砕により、グリベンクラミドの溶解速度が劇的に向上したと考えられた。前項において単独粉砕品中のグリベンクラミドの結晶性低下が認められたが、薬物原末及び物理混合物に比較して溶解性の向上が認められなかった。混合粉砕物で認められた溶解性の劇的な向上は、結晶性の低下ではなく Hsp-G との混合粉砕に起因すると推察され、グリベンクラミドナノ粒子の水中での再凝集を抑制することにより、溶解速度を向上させた可能性が示唆された。

グリベンクラミドは水やエタノールに対する溶解性が非常に低く Build-up 法に

よる機能性粒子の調製は困難であるが、Hsp-Gを用いたボールミルによる乾式混合粉碎という簡便な操作でグリベンクラミドの溶解速度を向上することができた。グリベンクラミドは消化管内での溶解性が著しく低いため、経口吸収性が低いと推察されるが、Hsp-Gを用いた混合粉碎物はグリベンクラミドの体内での溶解性を高めることにより、吸収性及び薬効の増大が期待された。



**Figure 1-5** Dissolution profiles of GCM in JPXV second fluid (pH 6.8) containing 0.001 % tween 80: ×; untreated GCM ▲; ball-milled GCM, ○; physical mixture of GCM/Hsp-G, ◇; ground mixture of GCM/Hsp-G. (mean ± S.D., n=3)

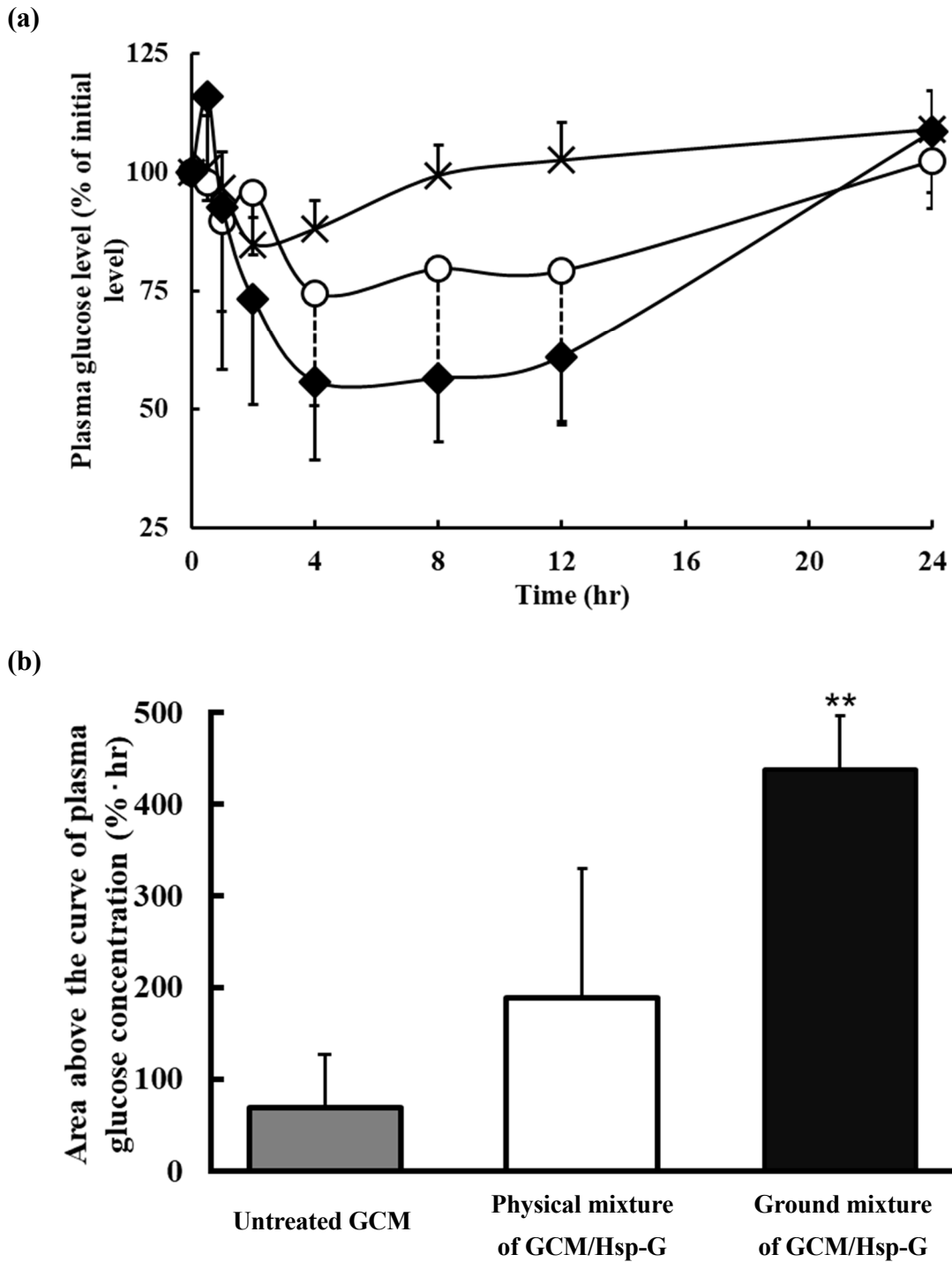
#### 第4項 混合粉砕物の *in vivo* 薬理効果評価

前項までの検討で、Hsp-G を用いた混合粉砕によりグリベンクラミドの微細化及び溶解性の向上が示されたため、*in vivo* 試験においても消化管内での溶解性が向上し、吸収性及び薬効の増大が期待される。そこで本項では、Hsp-G を用いた混合粉砕が *in vivo* 試験において薬理効果に与える影響について検討した。

Figure 1-6 (a) にはグリベンクラミド原末、Hsp-G との物理混合物及び混合粉砕物をラットに経口投与した後の血漿中グルコース濃度の経時変化を示す。血糖降下作用を示すグリベンクラミドの薬理効果を測定するため、各個体における投与開始直前の血漿中グルコース濃度を 100%とした。原末及び物理混合物投与群では試験開始 4 時間後の血漿中グルコース濃度は 88%及び 75%に低下し、Hsp-G 併用による薬理効果の有意な増強は認められなかった。一方、混合粉砕物では血糖降下作用が大きく認められ、試験開始 4 時間後の血漿中グルコース濃度は 56%にまで低下した。なお、試験開始 12 時間後より給餌を開始したため、試験開始 24 時間後において全てのサンプル投与群について血中濃度が元の水準に回復することが確認された。

Figure 1-6 (b) には試験開始 12 時間後まで算出した血漿中濃度-時間曲線下面積 (AAC) を示す。混合粉砕物投与群の AAC は、原末及び物理混合物投与群に比較して、6 倍及び 2 倍以上の値を示し、ナノ粒子化による薬理効果の増強が認められた。ナノ粒子化による経口吸収性の向上はこれまで多数報告されているが<sup>5,7,54,55</sup>、生体中での吸収過程には種々の因子が関与するため、詳細な機構は未だ解明されておらず、薬物ナノ粒子が消化管膜上の非攪拌水相へ到達することによる膜透過性の向上も提唱されている<sup>15</sup>。溶解速度の向上に加え、グリベンクラミドの過半数がナノ粒子として存在したために、薬物の吸収性が向上し、薬理効果が増強したと推察された。





**Figure 1-6 Changes of (a) plasma glucose level after intragastric administration of obtained GCM particle and (b) area above the plasma concentration time curve values (AAC) during 12 hours after oral administration into rats: ×; untreated GCM, ○; physical mixture of GCM/Hsp-G, ◆; ground mixture of GCM/Hsp-G. (mean ± S.E., n=4)  
**\*\***, P<0.01: Significantly different from untreated GCM**

## 第4節 小括

本章では、難水溶性食品中有効成分及び薬物のナノ粒子を **Build-up** 法及び **Break-down** 法により調製し、溶解性及び経口吸収性に与える影響を評価した。プロポリスは粘性が高く **Break-down** 法の適用が困難であるが、**Build-up** 法によりプロポリスのナノ粒子粉末を得ることができた。Stevia-G を用いたナノ粒子化により、水へのみかけの溶解度はアルテピリン C では 100 倍以上、ドゥルパニンでは 3 倍以上に向上した。またラット経口投与後の血漿中濃度の  $C_{max}$  及び AUC はアルテピリン C で 3 倍及び 6 倍、ドゥルパニンでは 4 倍及び 4.5 倍の値を示した。Stevia-G を用いた **Build-up** 法により調製したナノ粒子は、プロポリス中の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ることができた。また、**Build-up** 法の適用が困難な薬物であるグリベンクラミドについて、**Break-down** 法の一つである乾式粉碎を検討した。Hsp-G を用いた混合粉碎により、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の有意に低下させ、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は、難水溶性薬物の溶解性を向上させ、薬理効果も増大させた。

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への適用が期待できる。

## 第2章

### 難水溶性薬物ナノ粒子の新規溶出試験法に関する検討

#### 第1節 緒言

医薬品の生物薬剤学的な品質を担保するための試験として、各当局により溶出試験が規定されており<sup>56</sup>、経口吸収性予測を目的とした溶出試験に関する研究は数多く報告されている<sup>8,57</sup>。目的に応じた試験系の改変も研究されており<sup>58</sup>、溶出試験と膜透過試験を組み合わせた試験系（溶出-膜透過試験）は、難水溶性薬物の経口吸収性予測における有用であることが報告されている<sup>59,60</sup>。

サブミクロン領域までの微細化（ナノ粒子化）は、難水溶性薬物の粒子径を減少させ、表面積を増大させることにより、溶解速度及び溶解性を向上させ、経口吸収性を増大させることが知られている<sup>11,61</sup>。ナノ粒子化による溶解速度向上が経口吸収性向上の予測に重要であることが示唆されているが<sup>62</sup>、微細なナノ粒子がフィルターを通過してしまうため、ナノ粒子の溶出挙動の評価は一般に困難である。ナノ粒子は粒子径に依存したUVスペクトルを示すため<sup>10</sup>、溶解した薬物のみを測定するためにはナノ粒子を分離する必要がある。溶出試験で未溶解の粒子をフィルター等で除去する際に、一般に用いられるフィルターの細孔径は0.22  $\mu\text{m}$  または0.45  $\mu\text{m}$  であるため、フィルターを通過したナノ粒子の影響により、溶出量を過大評価してしまう恐れがある。細孔径0.02  $\mu\text{m}$  の特殊なフィルターや、超遠心によりナノ粒子を分離できることが報告されているが<sup>63,64</sup>、これらの操作には数分から数十分を要するため、溶出初期に起こるナノ粒子からの急速な溶出挙動を評価できない。透析膜を用いた溶出試験も検討されているが、ナノ粒子の溶出ではなく膜透過が律速となる場合が多く、溶解速度を評価することは困難で

ある<sup>65</sup>.

多成分の溶出試験において、UV スペクトルを 2 次微分した値 (2 次微分 UV) がしばしば用いられる<sup>23,66</sup>. 2 次微分 UV では、化合物の濃度に依存せずに常に 0 となる波長 (ZIM 波長) が存在するため、ある化合物の ZIM 波長では、その他の成分のみを測定可能である. 例えば、UV 吸収を示す添加剤であるアスコルビン酸を用いて形成したシンバスタチン錠剤の溶出試験では、オンライン UV プロブを用いてアスコルビン酸の ZIM 波長で測定することにより、シンバスタチンの溶出挙動を評価できることが報告されている<sup>24</sup>. ナノ粒子は粒子径に依存した UV スペクトルを示すことから<sup>10</sup>, 溶解した薬物と薬物ナノ粒子を別の成分とみなして 2 次微分 UV で測定することにより、ナノ粒子からの薬物の溶出挙動を測定できると考えられる.

本研究では、ナノ粒子の初期の溶出挙動を評価するために、UV プロブで測定した 2 次微分 UV による新規溶出性評価を試みた. モデル薬物としてメフェナム酸を用いてナノ及びマイクロ粒子懸濁液を調製した. 得られた懸濁液の粒子径、結晶性を測定し、2 次微分 UV により薬物の溶出挙動を評価した.

## 第2節 調製懸濁液の物性評価

本節では、調製したナノ及びマイクロ粒子懸濁液の粒子径及び結晶形に関する評価を行った。Table 2-1 に粒子径測定結果を示す。Z 平均粒子径  $198.2 \pm 0.2$  nm のナノ粒子懸濁液が調製され、室温 4 日後も粒子径に変化は認めなかった。マイクロ粒子懸濁液の粒子径の中央値は  $1.92 \pm 0.08$   $\mu\text{m}$  であり、ナノ粒子の約 10 倍の大きさであった。

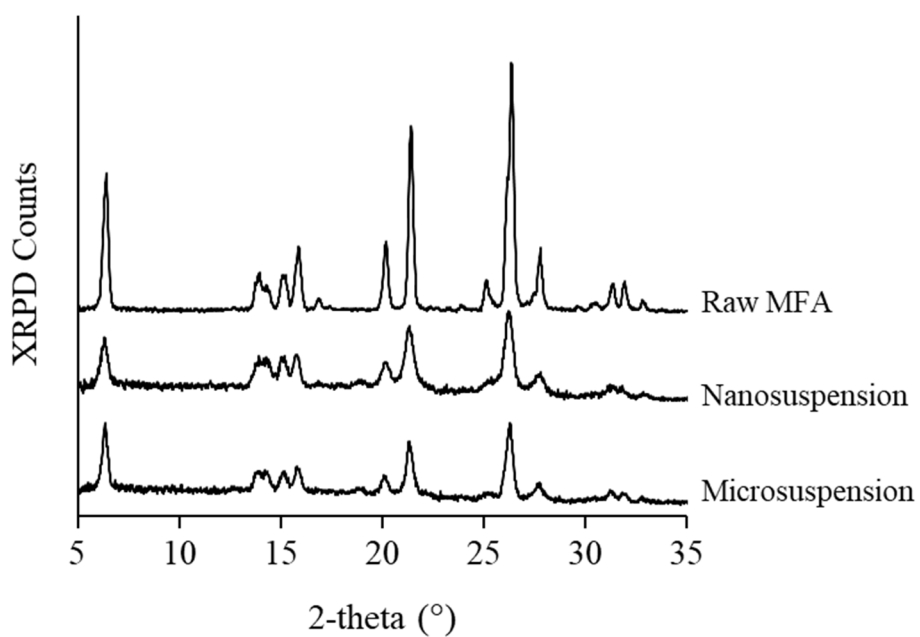
**Table 2-1 Particle size and zeta potential of obtained suspensions:  
(a) nanosuspension and (b) microsuspension.**

(a)	Z-average (nm)	PdI	Zeta potential (mV)
Nanosuspension	$198.2 \pm 0.2$	$0.17 \pm 0.00$	$-6.3 \pm 5.0$

(b)	D <sub>10</sub> ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>50</sub> ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>90</sub> ( $\mu\text{m}$ )
Microsuspension	$1.47 \pm 0.08$	$1.92 \pm 0.08$	$2.27 \pm 0.14$

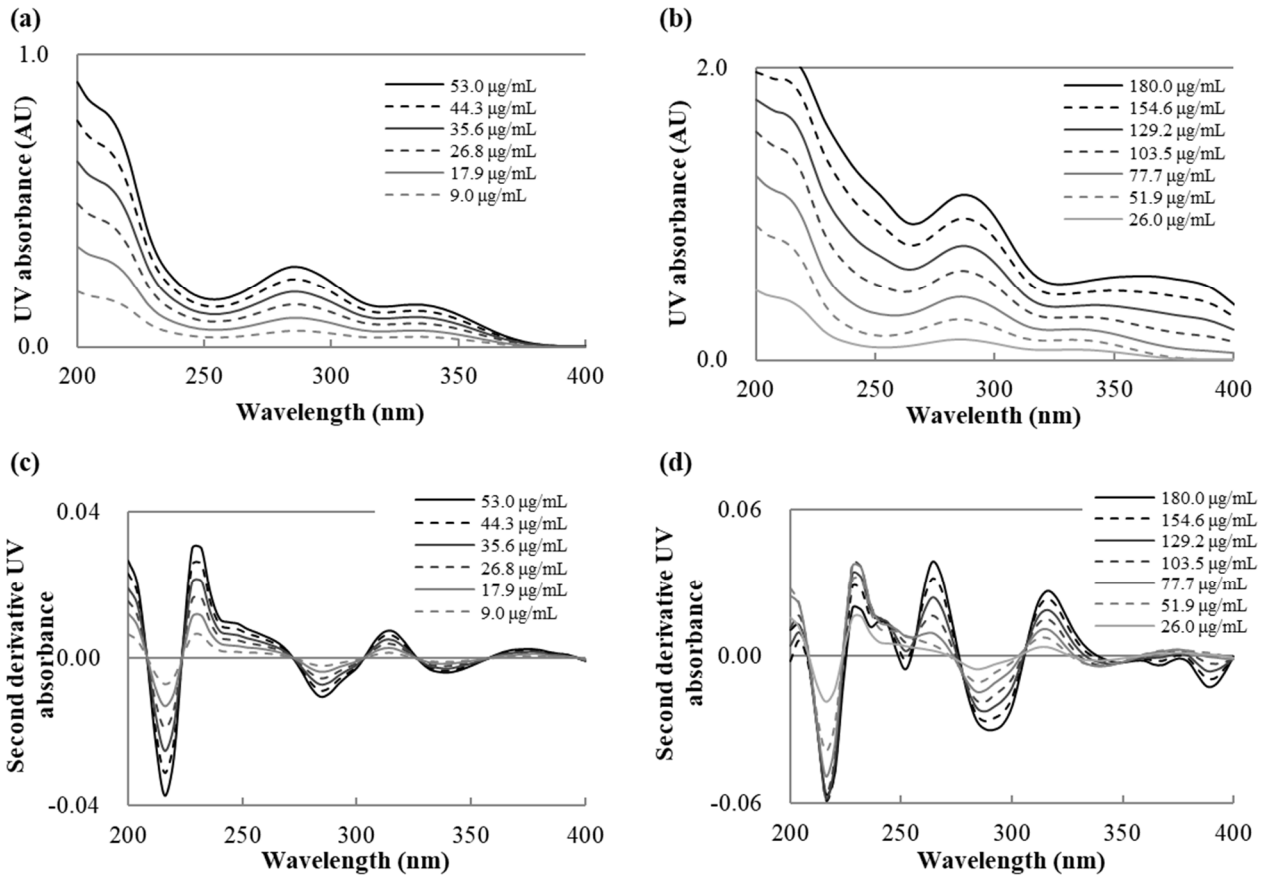
Figure 2-1 にメフェナム酸原末, 調製したナノ及びマイクロ粒子懸濁液の粉末 X 線回折測定の結果を示す. 両懸濁液とも, 原末同様の回折パターンを示したことから, 懸濁液調製後も結晶形は維持されていた. 結晶形の転移により溶解性が変化する可能性は無いと考えられた.



**Figure 2-1 Powder X-ray diffraction patterns of raw MFA and obtained suspensions.**

### 第3節 2次微分 UV による検量線作成

本節では，溶出試験時の濃度定量用に，2次微分 UV によるメフェナム酸溶液及びメフェナム酸ナノ粒子の検量線を作成した．溶出試験第2液中でのメフェナム酸溶液及びナノ粒子の UV スペクトルを Figure 2-2 (a) 及び (b) に示す．ナノ粒子は溶液と異なる UV スペクトルを示し，また，粉碎溶媒中の添加剤の UV スペクトルとも異なることから，Mie 理論に基づきナノ粒子が粒子径に依存して光を散乱及び吸収したためと考えられた<sup>10</sup>．Figure 2-2 (c) 及び (d) に，メフェナム酸溶液及びナノ粒子の2次微分 UV スペクトルを示す．濃度に依存せず常に2次微分 UV 値が0となる波長 (ZIM 波長) として，メフェナム酸溶液で 272, 303 及び 326 nm, メフェナム酸ナノ粒子で 257 nm が得られた．



**Figure 2-2 UV and second-derivative UV spectra of MFA in the dissolution medium: (a) UV spectra of dissolved MFA, (b) UV spectra of nano-suspended MFA, (c) second-derivative UV spectra of dissolved MFA, and (d) second-derivative UV spectra of nano-suspended MFA.**



Figure 2-3 に、ナノ粒子の ZIM 波長を用いて作成した溶液の検量線及び溶液の ZIM 波長を用いて作成した検量線を示す。ナノ粒子の検量線は、2 つのパートで構成される。メフェナム酸の溶解度である  $50 \mu\text{g/mL}$  以下では、添加されたメフェナム酸ナノ粒子は全て溶解するため、溶液と同じ UV スペクトルを示すと考えられる。  $50 \mu\text{g/mL}$  以上では、添加されたメフェナム酸はナノ粒子として存在し、溶液と異なるナノ粒子特有の UV を示すため、ナノ粒子の検量線が作成される。ナノ粒子の検量線の x 軸切片は、ナノ粒子の溶解度に等しいと考えられ、  $64 \mu\text{g/mL}$  であった。以上のことから、メフェナム酸の溶解度は、ナノ粒子化により 1.3 倍向上したと推察された。一般に報告されているナノ粒子の溶解度向上効果は 1.0 ~1.3 倍であり<sup>7,11</sup>、今回の結果とよく一致した。

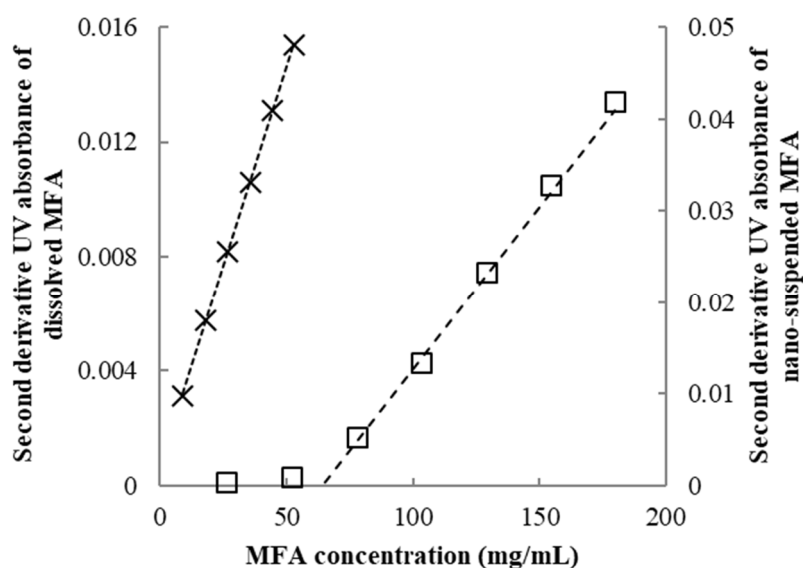


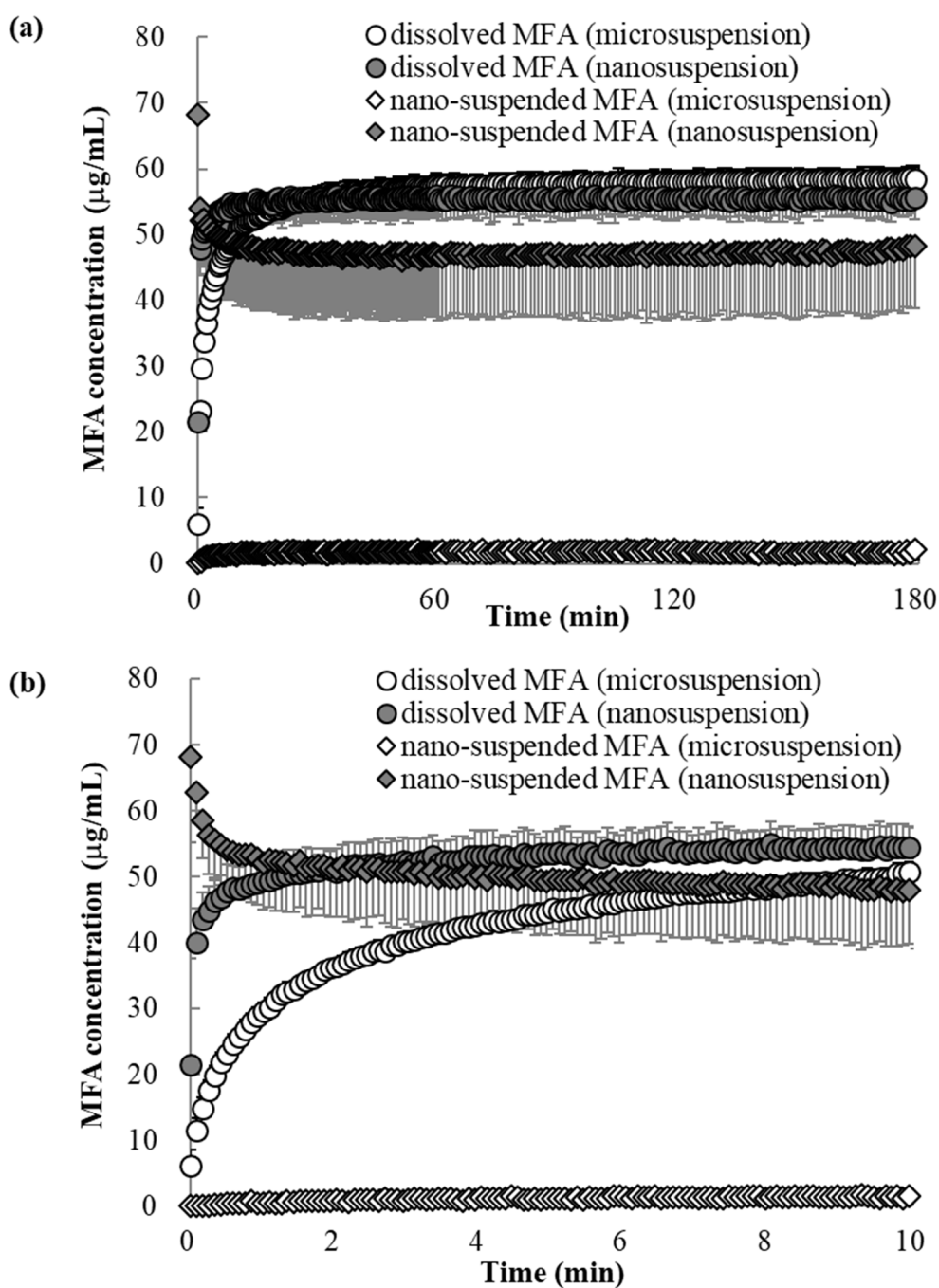
Figure 2-3 Calibration curves of ×: dissolved MFA and □: nano-suspended MFA

## 第4節 調製懸濁液の *in vitro* 溶出挙動評価

本節では、ナノ及びマイクロ粒子懸濁液からのメフェナム酸の溶出挙動を、前項で作成した検量線を用いて評価した。Figure 2-4 に、各懸濁液の溶出試験における溶解メフェナム酸及びメフェナム酸ナノ粒子濃度の時間推移を示した。2 次微分 UV による溶解メフェナム酸とナノ粒子メフェナム酸の同時定量が可能であり、また UV プローブにより 5 秒間隔で測定するため、試験開始直後の溶出挙動も評価可能であった。ナノ粒子懸濁液では、試験開始直後からメフェナム酸ナノ粒子量の急速な減少及び溶解量の急速な増大が認められ、ナノ粒子の溶解が示された。一方、マイクロ粒子懸濁液ではメフェナム酸溶解量が増大し、ナノ粒子は試験中を通じて検出されなかった。

Figure 2-4 (b) に、試験開始 10 分後までの結果を示す。メフェナム酸の溶解量が試験終了時の 80%に達するまでの時間は、ナノ及びマイクロ粒子懸濁液でそれぞれ 15 及び 400 秒であり、ナノ粒子化による溶解速度の向上が認められた。

後述のように、試験 180 分後の溶解した MFA 濃度は、0.02  $\mu\text{m}$  フィルターと HPLC による測定値とオンライン UV プローブによる測定値の間に差異が認められた。Figure 2-4 では、180 分後の差異により求めた補正係数を、UV プローブによる測定結果に乗じることで補正した結果を示した。



**Figure 2-4** Dissolution profile of obtained suspensions:  
 (a) 0-180 min and (b) 0-10 min. (mean  $\pm$  S.D., n=3)

2次微分 UV 法による測定値の妥当性を検証するため、試験終了後に 0.02  $\mu\text{m}$  フィルターと HPLC によりナノ及びマイクロ懸濁液の溶解度を測定した結果、それぞれ 49.6 及び 59.4  $\mu\text{g/mL}$  であった。UV プローブにより測定した試験 180 分後のナノ及びマイクロ粒子懸濁液の溶解度は、約 56 及び 59  $\mu\text{g/mL}$  であり、ナノ粒子懸濁液の溶解度は測定手法間で約 1.2 倍の乖離が認められた。この乖離の原因を検証するため、メフェナム酸の溶解量とナノ粒子量の和と仕込みメフェナム酸量の差異、溶出試験中の粒子径の変化及びフィルターをナノ粒子が通過した可能性について検証した。

メフェナム酸溶解量とナノ粒子量の和は、溶出試験中は 102~104  $\mu\text{g/mL}$  を保ち、仕込み量である 100  $\mu\text{g/mL}$  との乖離は 5%以下であったため、測定手法間差の主要因ではないと考えられた。

Table 2-2 に、溶出試験前後及び溶出試験後のフィルターろ過後 (HPLC 測定前) の試験液の粒子径測定結果を示した。溶出試験前後で粒子径は変化しなかった。また、溶出試験後のろ液においてもナノ粒子が検出された。しかし、粒子径と粒子濃度の関数である散乱光強度は、フィルターろ過前の 0.2%以下まで減弱したことから、ろ液中のメフェナム酸ナノ粒子量は 0.2  $\mu\text{g/mL}$  以下相当と推定され、ほとんど影響を与えないと判断した。また、ろ液中の粒子径及び PDI が、ろ過前に比較して増大した要因として、散乱光強度が測定下限付近であることに起因する測定上の誤差が考えられた。

**Table 2-2 Particle size and count rate of nanosuspension after dissolution study**

	MFA concentration (mg/mL)	Z-average (nm)	PdI	Derived Count Rate (kcps)
Nanosuspension	1.0	187.4	0.165	2160965
after dissolution study	0.1	194.8	0.131	159524
after dissolution study (0.02 $\mu\text{m}$ filterate)	0.1	248.7	0.243	269

以上の結果から、UV プローブ法と 0.02  $\mu\text{m}$  フィルターと HPLC を組み合わせた方法の間には、溶解度に 1.2 倍程度の差が生じ、UV プローブでは正確な溶出量を算出することが困難であると考えられた。しかしながら、UV プローブは超遠心やフィルターろ過に比較して測定時間が非常に早いため、リアルタイムで溶解速度を測定できる唯一の手法になる。そこで、試験終了時にナノ粒子を分離するフィルター処理をしたのち HPLC により溶解度を測定し、UV プローブの測定結果の補正をする手法を選択した。2 次微分 UV 法と試験終了後の HPLC 測定を組み合わせた溶出試験は、ナノ粒子の溶解速度と溶解度を正確に測定できる手法になり得ると考えられた。

## 第5節 小括

本章では、2次微分 UV 法によるナノ粒子の新規溶出性評価法について検討した。UV プローブを用いた 2 次微分 UV 測定により、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った。本手法では、従来の方法では測定不可能であったナノ粒子が示す高い溶解速度を測定可能であり、ナノ粒子化による溶解速度の向上を定量的に示すことができた。一方で、ナノ粒子の溶解度に関しては、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った。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。

## 第3章

### 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* 評価系に関する検討

#### 第1節 緒言

薬物毎に最適な製剤処方を設定する過程では、通常は *in vitro* 評価で有望処方を選抜した後、*in vivo* 評価による高次評価が行われる。最適なナノ粒子処方を設定するためには、ナノ粒子化による経口吸収性向上機構の解明と、経口吸収性を支配する因子を測定可能な *in vitro* 評価系が必要である。ナノ粒子は、難水溶性薬物の溶解性向上手法として広く用いられており、ナノ粒子化による経口吸収性の大幅な増大が数多く報告されている<sup>5,13,67</sup>。これまでに報告されているナノ粒子化による影響は、経口吸収量の向上が最大16倍である一方で、溶解度の向上は最大で1.3倍にすぎない<sup>7,11-13</sup>。このことから、ナノ粒子化による経口吸収性の増大には、溶解度以外の因子が関与していることが示唆されている。この因子として、溶解速度の向上や、消化管粘膜へのナノ粒子の滞留の寄与が提唱されているが<sup>14,15,62</sup>、ナノ粒子化による経口吸収性の向上を予測できる *in vitro* 評価系は未だ確立されていない。また、ナノ粒子の粒子径が経口吸収性に及ぼす影響を、*in vitro* 評価により予測することも困難である<sup>68</sup>。

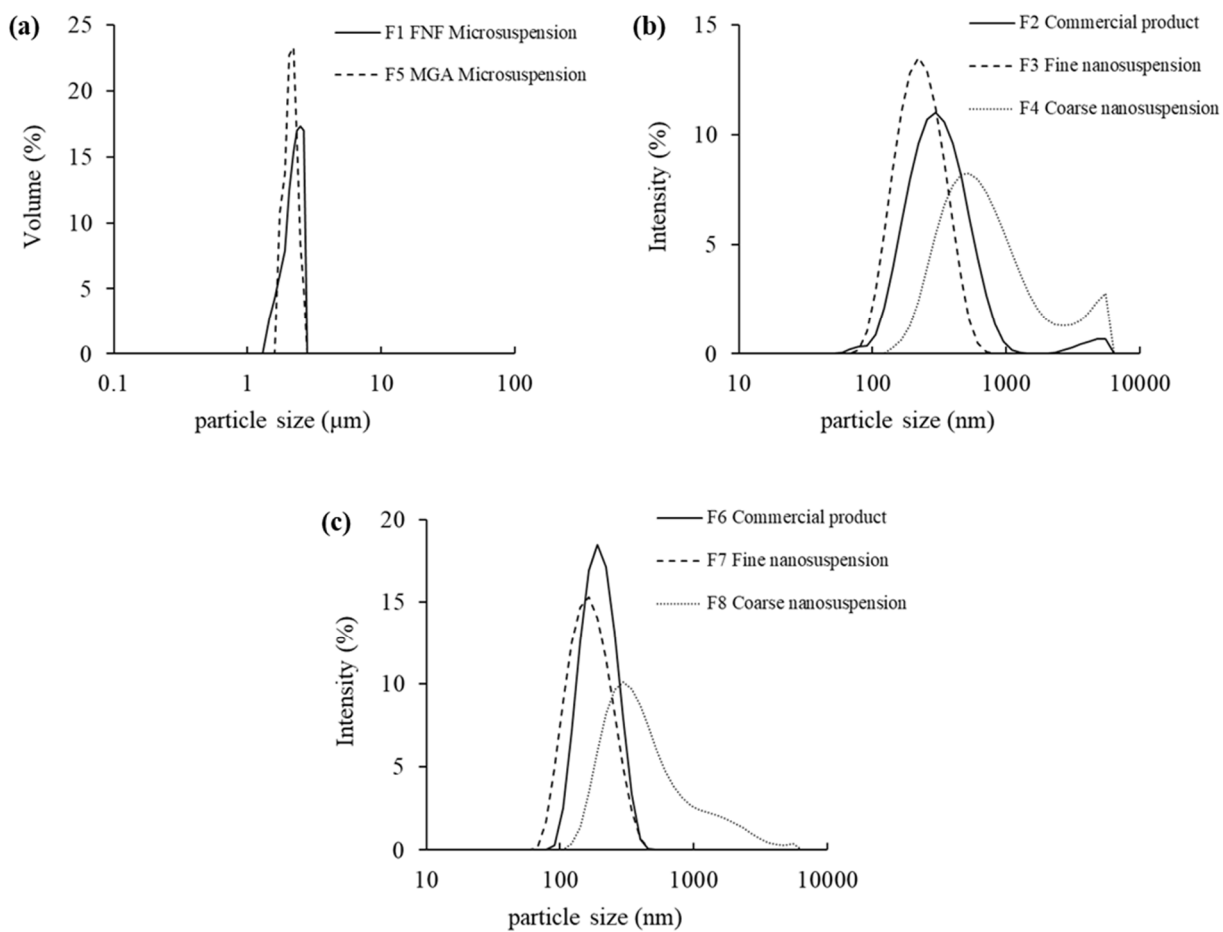
上記の課題を解決するため、本研究では異なる粒子径を持つナノ粒子懸濁液について *in vitro* 及び *in vivo* 評価を行い、相関関係を検証した。モデル薬物として、ナノ粒子製剤が市販されているフェノフィブラート (FNF) 及び酢酸メゲストロール (MGA) を用いた<sup>69,70</sup>。各薬物について、市販製剤を含めて3種の異なる粒

子径のナノ粒子懸濁液とマイクロ粒子懸濁液を調製した。得られた 8 種の懸濁液について、溶出試験と膜透過試験を組み合わせた *in vitro* 試験 (溶出-膜透過試験) とラット経口吸収性を評価した。また、ナノ粒子化による経口吸収性向上機構の解明として、酢酸メゲストロール溶液の溶出-膜透過試験も実施した。



## 第2節 調製懸濁液の物性評価

ナノ粒子の粒子径が溶解性, 膜透過性及び吸収性に与える影響を検討するため, 粉碎エネルギー及び時間を調節することで, 異なる粒子径のナノ粒子懸濁液の調製を試みた. 2000 rpm, 6分間または500 rpm, 2分間の湿式粉碎により調製したナノ粒子懸濁液を, それぞれ微細なナノ粒子または粗大なナノ粒子懸濁液とした. 市販のナノ粒子製剤を粉碎溶媒 (0.1% SDS/0.5% HPMC 水溶液) に懸濁または水で希釈することにより得られた懸濁液を, 市販のナノ粒子懸濁液とした. 本節では, 調製したマイクロ及びナノ粒子懸濁液の粒子径及び結晶形を評価した. Figure 3-1 及び Table 3-1 に粒子径測定結果を示す. マイクロ粒子懸濁液の粒子径の中央値は, フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールにおいて, それぞれ  $2.13 \pm 0.00$  及び  $1.93 \pm 0.09 \mu\text{m}$  であった. 市販のナノ粒子, 調製した微細なナノ粒子及び粗大なナノ粒子懸濁液の粒子径は, フェノフィブラートにおいて  $281.9 \pm 3.5$ ,  $206.9 \pm 3.5$  及び  $609.8 \pm 31.9 \text{ nm}$ , 酢酸メゲストロールにおいて  $185.5 \pm 2.2$ ,  $157.0 \pm 1.8$  及び  $364.8 \pm 9.9 \text{ nm}$  であった. いずれの薬物においても, 粒子径はマイクロ粒子, 粗大なナノ粒子, 市販のナノ粒子, 微細なナノ粒子懸濁液の順で大きく, 粉碎力の調節により作り分けた2つのナノ粒子懸濁液の粒子径範囲は, 市販のナノ粒子懸濁液を包含していた.

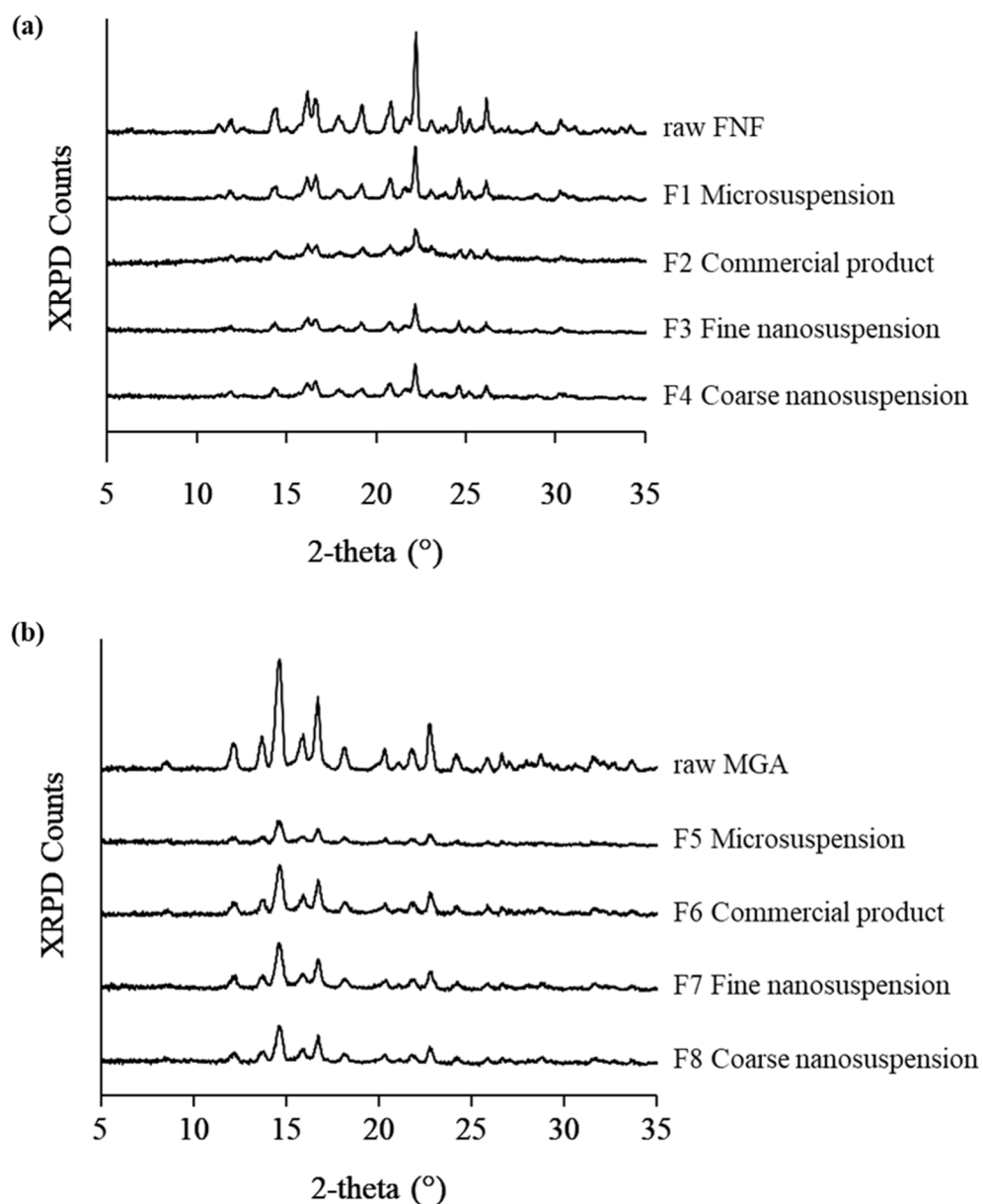


**Figure 3-1 Particle size distribution of the obtained suspensions: (a) F1 and F5 (FNF and MGA microsuspensions), (b) F2-F4 (FNF nanosuspensions), and (c) F6-F8 (MGA nanosuspensions).**

**Table 3-1 Particle size of the obtained suspensions of FNF and MGA.**

<b>Name</b>	<b>Drug</b>	<b>Formulation</b>	<b>Z-average (nm)</b>	<b>PdI</b>	<b>D50 (<math>\mu</math>m)</b>
F1	FNF	Microsuspension	-	-	2.13 $\pm$ 0.00
F2	FNF	Commercial product	281.9 $\pm$ 3.5	0.22 $\pm$ 0.02	-
F3	FNF	Fine nanosuspension	206.9 $\pm$ 3.5	0.14 $\pm$ 0.02	-
F4	FNF	Coarse nanosuspension	609.8 $\pm$ 31.9	0.40 $\pm$ 0.01	-
F5	MGA	Microsuspension	-	-	1.93 $\pm$ 0.09
F6	MGA	Commercial product	185.5 $\pm$ 2.2	0.06 $\pm$ 0.01	-
F7	MGA	Fine nanosuspension	157.0 $\pm$ 1.8	0.12 $\pm$ 0.02	-
F8	MGA	Coarse nanosuspension	364.8 $\pm$ 9.9	0.28 $\pm$ 0.06	-
Solution	MGA	methanol solution	-	-	-

Figure 3-2 に、薬物原末及び調製懸濁液の粉末 X 線回折測定結果を示す。薬物原末はいずれも結晶であり、懸濁液調製後も同じ結晶形を維持していた。したがって、結晶形の転移により溶解性が変化する可能性は無いと考えられた。



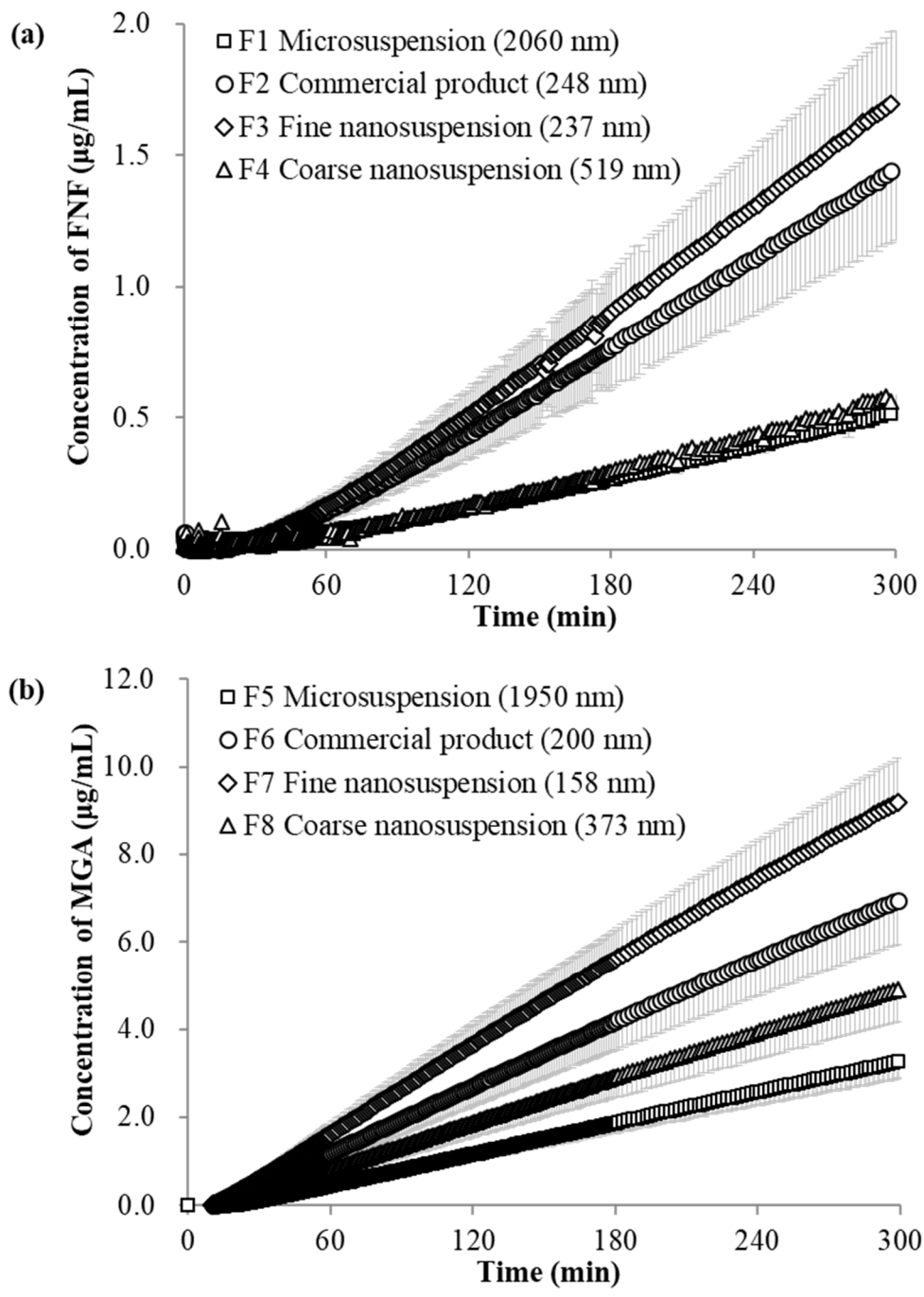
**Figure 3-2 Powder X-ray diffraction patterns of the obtained suspensions:  
(a) FNF and (b) MGA.**

### 第3節 調製懸濁液の溶出-膜透過評価

本節では、異なる粒子径のナノ及びマイクロ粒子懸濁液からの、薬物の溶出-膜透過性を評価した。Figure 3-3 (a) 及び (b) に、溶出-膜透過試験のアクセプター相中のフェノフィブラート及び酢酸メゲストロールの濃度推移を示す。

アクセプター相中のフェノフィブラート濃度は、30~40 分間の膜透過のラグタイムの後に、直線的に上昇した。縦軸はドナー相からアクセプター相に移行した薬物濃度を示しており、粒子径の減少に伴い、アクセプター相への移行量は大幅に増加した。直線部分の傾きは薬物の膜透過速度を示しており、60~300 分の間で算出した値は、マイクロ、市販のナノ粒子、調製した微細なナノ粒子及び粗大なナノ粒子懸濁液においてそれぞれ 1.98, 5.48, 6.61 及び 2.44 ng/mL·min であった。薬物の膜透過量に換算した場合、それぞれ 2.37, 6.57, 7.93 及び 2.92 µg/h であった。

酢酸メゲストロールの場合も同様に、アクセプター相中の濃度は 10~20 分間の膜透過のラグタイムの後、直線的に上昇した。60~300 分の間で算出した薬物の膜透過速度は、マイクロ、市販のナノ粒子、調製した微細なナノ粒子及び粗大なナノ粒子懸濁液においてそれぞれ 14.2, 29.0, 38.1 及び 20.6 µg/h であった。いずれの薬物においても、アクセプター相への薬物透過量は、粒子径の減少に伴い増大し、市販のナノ粒子、調製した微細なナノ粒子、調製した粗大なナノ粒子、マイクロ粒子懸濁液の順であった。調製した微細なナノ粒子懸濁液の膜透過量は、マイクロ粒子懸濁液に比較して、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールでそれぞれ 3.3 及び 2.7 倍であった。一方、調製した微細なナノ粒子懸濁液のドナー相の溶解度は、マイクロ粒子懸濁液に比較して、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールでそれぞれ 1.3 及び 1.4 倍であった。



**Figure 3-3 Concentration-time profiles in the acceptor chamber determined by ultraviolet probes of: (a) FNF and (b) MGA. (mean ± S.D., n=3)**

## 第4節 ナノ粒子化による膜透過性向上機構の解明

前節では、ナノ粒子化によりドナー相溶解度のわずかな向上と、アクセプター相への膜透過量の顕著な向上が認められ、膜透過性の向上が示唆された。本節では、ナノ粒子自体の膜透過性及び溶解過程の影響を検証するため、ナノスフェア標準粒子及び酢酸メゲストロールのメタノール溶液の溶出-膜透過試験を実施し、ナノ粒子化が膜透過性に与える影響を考察した。

### 第1項 ナノスフェア標準粒子の溶出-膜透過試験

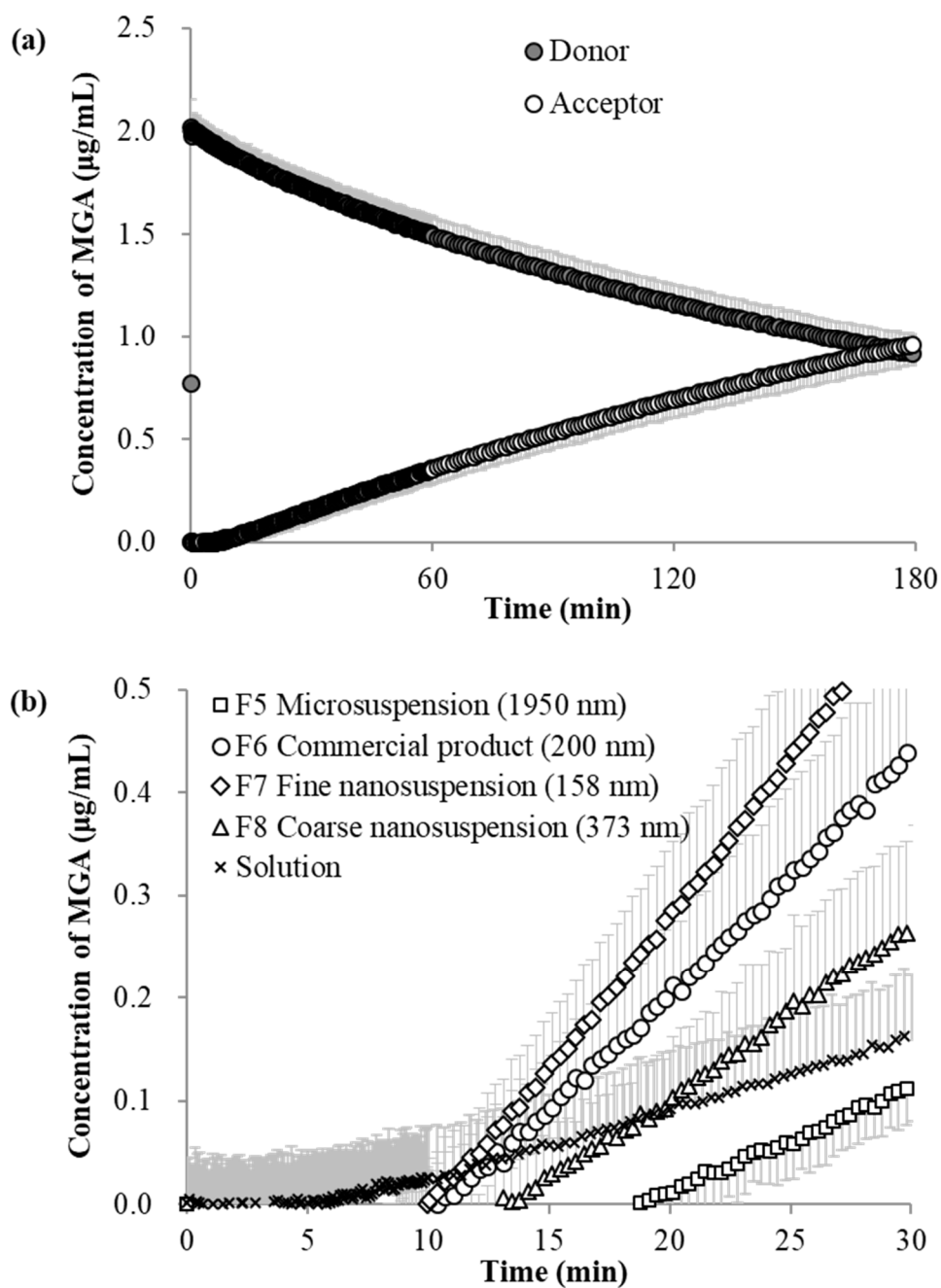
ナノ粒子懸濁液による膜透過性向上の要因として、ナノ粒子が形態を維持したまま膜を透過した可能性を検討するため、ナノスフェア標準粒子の溶出-膜透過試験を実施した。ナノスフェア標準粒子は、60 nm の平均粒子径を示す不溶性のポリスチレンのナノ粒子である。HPLC では不溶性の粒子を測定できないため、動的光散乱法によりドナー相及びアクセプター相中のナノスフェアの濃度を測定した。粒子径が等しい場合、動的光散乱法で測定された散乱光強度は粒子濃度に比例する。試験終了時に、ASB で 10000 倍希釈したドナー相、未希釈のアクセプター相及び ASB 中の散乱光強度を測定した結果、それぞれ 1362, 509 及び 315 kcps であった。アクセプター相の散乱光強度は、ナノスフェア標準粒子の添加により 194 kcps 増加し、ドナー相への添加量の 0.02% に相当すると推定され、薬物量に換算した場合は 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に過ぎなかった。さらに、薬物ナノ粒子の粒子径は 150 nm 以上であるため、ナノ粒子自体の膜透過性は、60 nm のナノスフェア標準粒子に比較して低いと推定される。以上のことから、溶出-膜透過試験におけるナノ粒

子自体の膜透過性の影響は無視できると推察された。

## 第2項 酢酸メゲストロール溶液の溶出-膜透過試験

Figure 3-4 (a) に酢酸メゲストロールのメタノール溶液の溶出-膜透過試験結果を示す。酢酸メゲストロールの析出を避けるため、酢酸メゲストロールの仕込み量はドナー相中の溶解度以下に設定した。フェノフィブラートのドナー相中の溶解度は、酢酸メゲストロールの1/5以下であり、UVプローブによる定量が困難であったため実施しなかった。酢酸メゲストロール濃度は時間経過に伴い、ドナー相で減少、アクセプター相で増大したことから、酢酸メゲストロールがアクセプター相へと移行していることが観察された。Figure 3-3 で示されたように、懸濁液の場合は未溶解の粒子が多数存在するため、ドナー相中では飽和溶解度が保たれ、膜透過速度は一定に保たれる。一方、酢酸メゲストロール溶液では、アクセプター相の濃度上昇の傾きは、時間の経過に伴い減少した。受動拡散の膜透過の駆動力は、フィックの第一法則に従いドナー相とアクセプター相間の濃度勾配であり<sup>71</sup>、アクセプター相への薬物移行に伴い減少する。酢酸メゲストロール溶液の膜透過速度は経時的に減少するため、膜透過開始直後の10～15分の間で膜透過速度を算出した結果、11.0 ng/mL·min 及び 13.2 µg/h であった。また、Figure 3-4 (b) には、酢酸メゲストロール懸濁液及び溶液の試験開始30分後までのアクセプター相中濃度推移を示した。粒子径の減少に伴い、膜透過のラグタイムが短縮し、アクセプター相中濃度の傾きが増大した。酢酸メゲストロール溶液のラグタイムが最も短く、溶解過程を経ないため膜透過の開始が早まったと考えられた。一方、酢酸メゲストロール溶液は各種懸濁液に比較して、アクセプター相中濃度の傾きが小さく、膜透過速度が低いことが示唆された。





**Figure 3-4 MGA concentration-time profiles in the dissolution-permeation study of MGA solution: (a) in the donor and acceptor chamber and (b) in the acceptor chamber at 0-30 min (compared to F5-F8). (mean  $\pm$  S.D., n=3)**

Table 3-2 に試験終了時のドナー及びアクセプター相の溶解した薬物濃度、アクセプター相の傾きより求めた膜透過速度及びみかけの膜透過係数を示す。ドナー及びアクセプター相の溶解した薬物濃度を、0.02 μm フィルターと HPLC により測定した結果、両薬物ともに粒子径の減少に伴い増大した。処方間の順列は両薬物ともに、調製した微細なナノ粒子、市販のナノ粒子、調製した粗大なナノ粒子及びマイクロ粒子懸濁液の順であった。粒子径減少による溶解した薬物濃度の増加率はドナー相とアクセプター相の間で差異が認められ、フェノフィブラートで調製した微細なナノ粒子懸濁液はマイクロ粒子懸濁液に比較して、ドナー相で 1.3 倍、アクセプター相で 3.3 倍であった。酢酸メゲストロールで調製した微細なナノ粒子懸濁液の溶解した薬物濃度は、マイクロ粒子懸濁液に比較して、ドナー相で 1.4 倍、アクセプター相で 2.8 倍であった。ナノ粒子化によるドナー相中の溶解した薬物濃度の向上は、一般に報告されているナノ粒子化による溶解度向上効果と同程度であった一方で<sup>7,11-13</sup>、アクセプター相への移行量及び膜透過速度は、溶解度向上効果に比較して顕著な増大が認められた。

膜透過性について考察するため、下記式により、各処方のみかけの膜透過速度  $P_{app}$  を算出した。

$$P_{app} = \frac{1}{[C]_{donor} \times S} \times \frac{dQ}{dt}$$

$[C]_{donor}$  はドナー相の溶解した薬物濃度、 $S$  は膜面積 (1.54 cm<sup>2</sup>) 及び  $dQ/dt$  はアクセプター相濃度の傾きをそれぞれ示す。 $P_{app}$  算出時の直線部分として、各懸濁液は 60~300 分の間を、酢酸メゲストロール溶液処方は 10~15 分の間を用いた。

いずれの薬物においても、調製した微細なナノ粒子懸濁液の  $P_{app}$  が最も高く、マイクロ粒子懸濁液に比較してフェノフィブラートで 2.5 倍、酢酸メゲストロールで 1.4 倍高値を示した。酢酸メゲストロール溶液の  $P_{app}$  はマイクロ粒子懸濁液と同程度であり、各種ナノ粒子懸濁液に比較して低値を示した。一般に  $P_{app}$  は薬

物に固有の値を示すが、本結果ではナノ粒子懸濁液により  $P_{app}$  が増大することが示された。

**Table 3-2 Drug concentration in each chamber determined by high performance liquid chromatography in the dissolution-permeation study after 300 min and  $P_{app}$  calculated by 60-300 min ((†) calculated by 10-15 min)**

Drug	Formulation	donor chamber ( $\mu\text{g/mL}$ )	acceptor chamber ( $\mu\text{g/mL}$ )	$P_{app}$ ( $10^{-3} \text{ cm/sec}$ )
FNF	F1	$0.25 \pm 0.05$	$0.57 \pm 0.02$	$1.72 \pm 0.40$
FNF	F2	$0.29 \pm 0.05$	$1.61 \pm 0.24$	$4.16 \pm 0.45$
FNF	F3	$0.33 \pm 0.04$	$1.89 \pm 0.15$	$4.30 \pm 1.13$
FNF	F4	$0.24 \pm 0.08$	$0.70 \pm 0.11$	$2.24 \pm 1.03$
MGA	F5	$2.04 \pm 0.09$	$3.26 \pm 0.25$	$1.26 \pm 0.18$
MGA	F6	$2.19 \pm 0.01$	$6.44 \pm 0.40$	$2.39 \pm 0.36$
MGA	F7	$2.86 \pm 0.07$	$9.03 \pm 0.24$	$2.40 \pm 0.27$
MGA	F8	$2.12 \pm 0.01$	$4.62 \pm 0.11$	$1.75 \pm 0.23$
MGA	Solution	$0.79 \pm 0.05$	$0.73 \pm 0.05$	$1.08 \pm 0.24$ (†)

ナノ粒子化の  $P_{app}$  への影響を考察するため、溶出-膜透過試験における溶出及び膜透過過程の関係を Figure 3-5 に示す。2つの矢印はそれぞれ溶解及び膜透過過程を示し、 $P_{app}$  は[アクセプター相中の溶解した薬物濃度の増加速度]/[ドナー相に溶解した薬物濃度] に比例する。溶出-膜透過試験におけるアクセプター相への薬物移行の律速段階が溶解過程である場合、溶解過程を経ない薬物溶液の  $P_{app}$  は、懸濁液に比較して高値を示す。しかし、本実験において観測された薬物溶液の  $P_{app}$  は懸濁液に比較して低いことから、酢酸メゲストロール懸濁液のアクセプター相への薬物移行における律速段階は、溶解ではなく膜透過過程であると考えられた。ナノ粒子懸濁液の  $P_{app}$  が溶液に比較して高い値を示した要因として、ナノ粒子化により律速段階である膜透過の促進が推察され、溶解した薬物の膜透過に加え、他の膜透過経路の存在が考えられた。

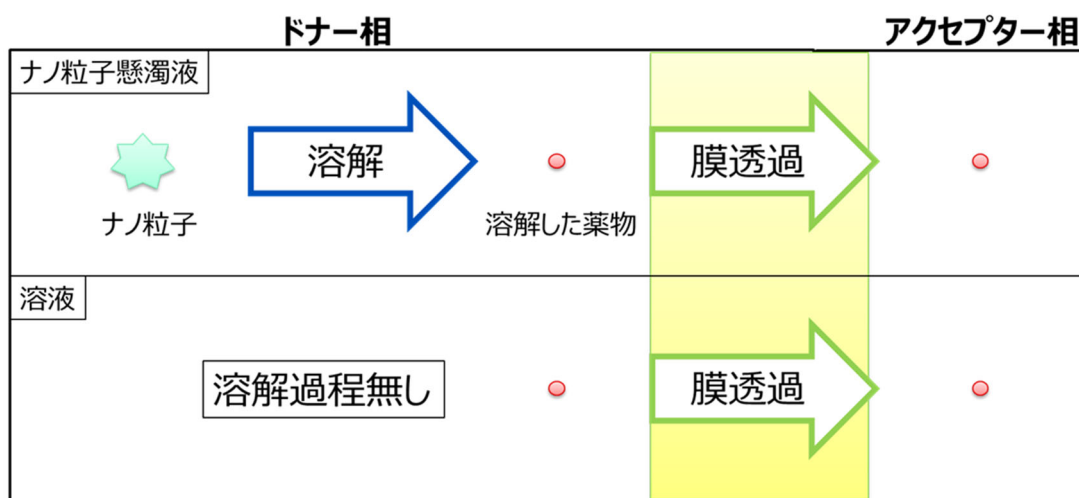
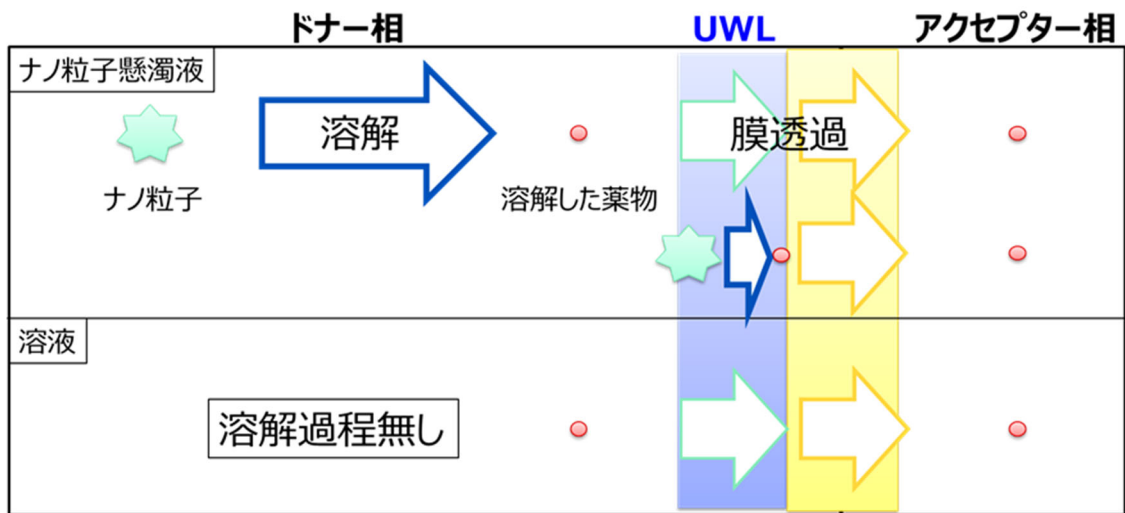


Figure 3-5 Scheme of membrane transportation in the dissolution/permeation study.

ナノ粒子化による  $P_{app}$  増大の要因として、膜深部にナノ粒子が到達することによる有効膜厚さの減少が考えられ、その模式図を Figure 3-6 に示す。経口投与された薬物が消化管の上皮細胞を透過して吸収される前には、消化管内液のバルク部分と上皮細胞の間に存在している非攪拌水相 (UWL) を通過する必要がある。UWL の両端では薬物の濃度勾配が形成され、上皮細胞又は膜近傍の薬物濃度は消化管内液又はドナー相のバルク部分に比較して低くなるため、薬物の UWL の通過が遅い場合は膜透過全体が制限される。溶解した薬物分子に加えて、ミセルのようなコロイド粒子も拡散により UWL に侵入し、その結果膜近傍の薬物濃度と膜透過性を向上させることが報告されている<sup>64,72</sup>。薬物ナノ粒子もコロイド粒子の一種であり、ミセルの場合と同様に UWL に侵入する可能性が考えられる。投与量と吸収量の関係性から計算した結果、ナノ粒子化による膜透過性の向上が示唆されており、その要因として、UWL に侵入したナノ粒子が溶解することで、膜近傍の薬物濃度を上昇させた結果、UWL の有効膜厚さを減少させた可能性が提唱されている<sup>15,64,72,73</sup>。本研究は、溶液とナノ粒子懸濁液の比較により、ナノ粒子による膜透過性向上を直接測定した初めての事例であり、これまで提唱されてきたナノ粒子の UWL への侵入による膜透過性の増大という仮説を裏付ける結果が得られた。



**Figure 3-6 Mechanism of the enhancement in drug permeability due to nanoparticle in the dissolution/permeation study.**

## 第5節 調製懸濁液の *in vivo* 経口吸収性評価

前節まで、得られた懸濁液の溶出性及び膜透過性に関する *in vitro* 評価を実施し、粒子径の減少に伴う膜透過性の向上が認められた。本節では、各懸濁液の *in vivo* 経口吸収性及び吸収速度を評価し、*in vitro* – *in vivo* の相関性を検証した。

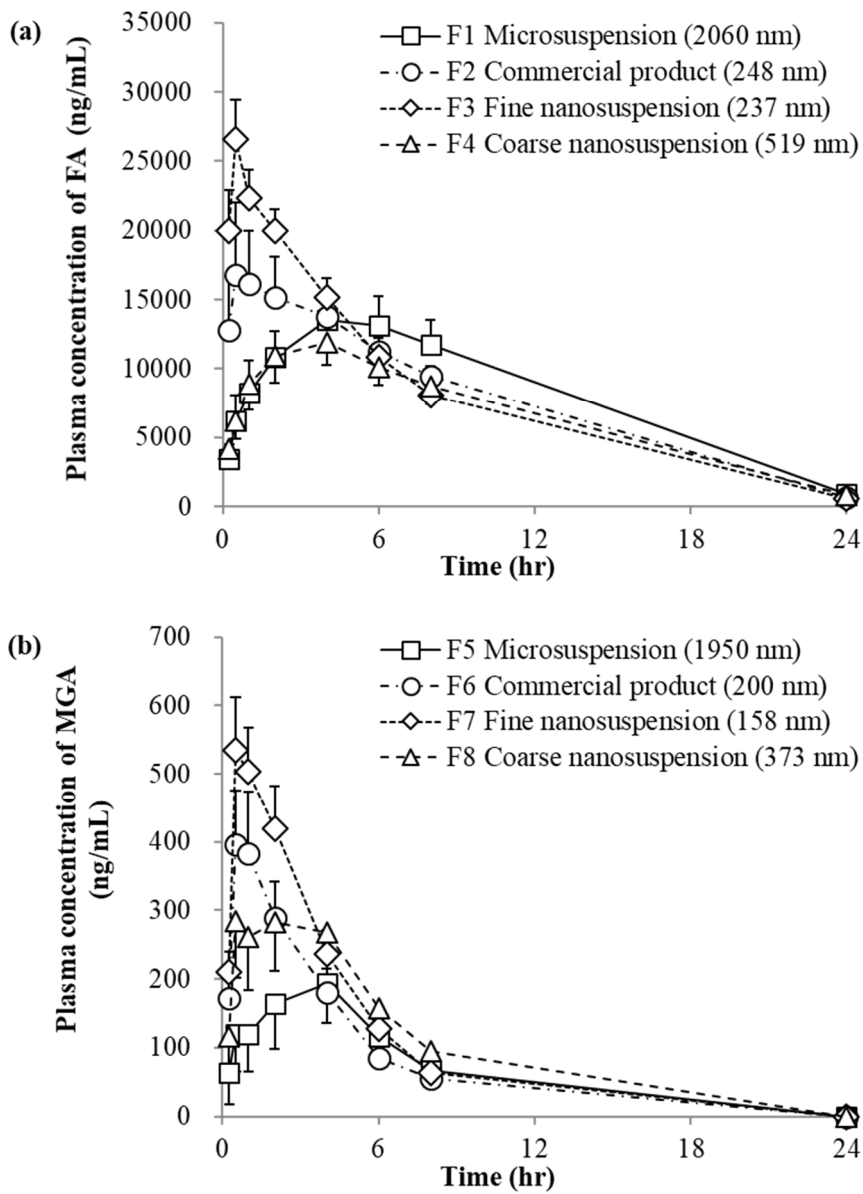
### 第1項 経口投与後の血漿中濃度評価

Figure 3-7(a) 及び (b) には、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールの各種懸濁液をラットに経口投与した後の血漿中薬物濃度の経時変化を、Table 3-3 には薬物動態パラメータをそれぞれ示す。なお、フェノフィブラートは小腸及び血漿中のエステラーゼによりフェノフィブリン酸 (FA) に速やかに代謝されることが報告されており<sup>74</sup>、いずれの時点においても血漿中にフェノフィブラートは検出されなかったため、フェノフィブラートの体内動態の考察には血漿中フェノフィブリン酸濃度を用いた。

いずれの薬物においても、粒子径の減少に伴い最高血漿中濃度  $C_{max}$  は増大し、最高血漿中濃度到達時間  $T_{max}$  は減少した。調製した微細なナノ粒子懸濁液の  $C_{max}$  は、マイクロ粒子懸濁液に比較して有意に高く、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールにおいて、それぞれ1.7倍 ( $P<0.05$ ) 及び 2.7倍 ( $P<0.01$ ) であった。調製した微細なナノ粒子懸濁液の  $T_{max}$  は、マイクロ粒子懸濁液に比較して有意に短く、両薬物において1/5倍に減少した ( $P<0.01$ )。吸収量の指標である薬物血漿中濃度-時間曲線下面積  $AUC_{inf}$  は、フェノフィブラートでは各種ナノ及びマイクロ粒子懸濁液の間で有意な差異は認められず、酢酸メゲストロールでは調製した

微細なナノ粒子懸濁液の  $AUC_{inf}$  は、マイクロ粒子懸濁液の 1.6 倍であった。フェノフィブラートの各懸濁液の経口投与後の絶対的バイオアベイラビリティ BA は 89~109% であることから、投与されたフェノフィブラートのほぼ全量が吸収されたため、処方間の差異が認められなかったと考えられた。一方で、調製した微細なナノ粒子懸濁液の経口投与後 2 時間までの間で算出した  $AUC_{0-2hr}$  は、マイクロ粒子懸濁液に比較して有意に高く、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールでそれぞれ 2.8 倍、3.6 倍 ( $P < 0.01$ ) であった。血漿中濃度半減期  $t_{1/2}$  は、いずれの薬物においても、各処方間で有意な差は認められなかった。以上のことから、ナノ粒子化による吸収速度の向上が示唆された。





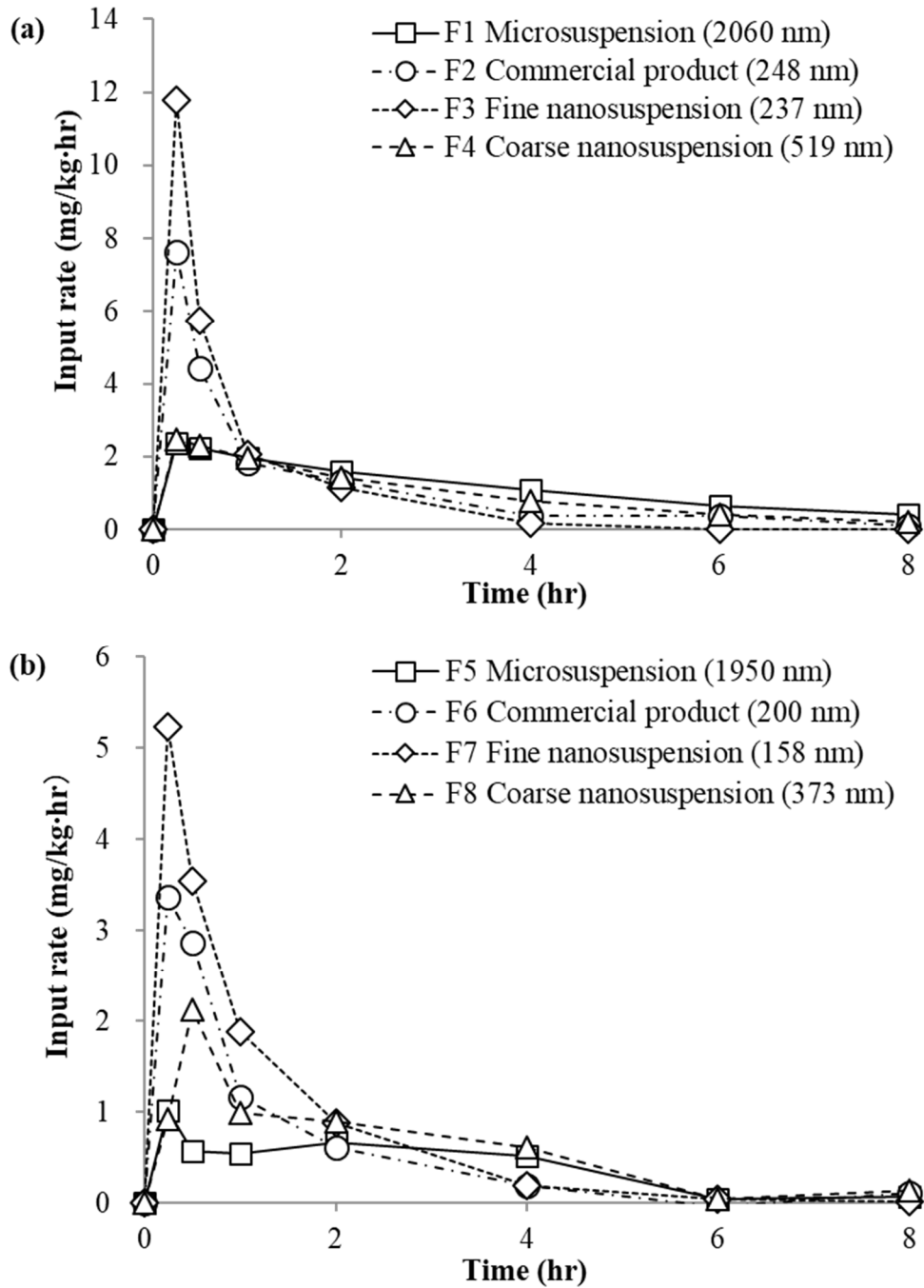
**Figure 3-7 Pharmacokinetics profiles after oral administration in rats at a dose corresponding to 10 mg/kg body weight of (a) FNF and (b) MGA. (mean  $\pm$  S.E., n=5)**

**Table 3-3 Pharmacokinetic parameters for the obtained suspensions of FNF and MGA dosed at 10 mg/kg in rats. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01 (Dunnett test compared to F1), #, P<0.05; ##, P<0.01 (Dunnett test compared to F5)**

Formulation	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (hr)	AUC <sub>inf</sub> (ng*hr/mL)	BA (%)	AUC <sub>0-2h</sub> (ng*hr/mL)	T <sub>1/2</sub> (hr)
F1	15313 ± 3798	4.8 ± 2.3	197788 ± 54682	109 ± 30	14795 ± 8001	4.4 ± 0.6
F2	19571 ± 10489	1.6 ± 1.5 *	189207 ± 43831	104 ± 24	29224 ± 15466	4.3 ± 0.5
F3	26596 ± 6324 *	0.8 ± 0.7 **	194310 ± 35896	107 ± 20	41705 ± 8458 **	4.1 ± 0.4
F4	12708 ± 3487	3.4 ± 1.3	160607 ± 49977	89 ± 28	15465 ± 6189	4.4 ± 0.9
F5	203 ± 133	4.0 ± 1.4	1416 ± 963	33 ± 22	233 ± 231	3.3 ± 2.0
F6	408 ± 180	1.0 ± 0.6 ##	1714 ± 556	40 ± 13	624 ± 286	2.0 ± 0.5
F7	554 ± 158 ##	0.7 ± 0.3 ##	2257 ± 676	53 ± 16	841 ± 245 ##	2.1 ± 0.4
F8	336 ± 172	1.8 ± 1.4 #	2116 ± 1624	49 ± 38	474 ± 292	2.9 ± 1.1

## 第2項 経口投与後の消化管からの吸収速度評価

前項の検討で、ナノ粒子化による  $C_{\max}$  の増大、 $T_{\max}$  の減少、 $AUC_{0-2h}$  の有意な増大が認められ、経口投与後の吸収速度の向上が示唆されたため、本項では、デコンボリューション解析による吸収速度の評価を行った。デコンボリューション解析は、静脈投与後の血漿中濃度推移結果から得られる薬物の消失速度の影響を差し引くことで経口吸収速度を算出する方法であり<sup>75</sup>、各処方解析結果を Figure 3-8 に示す。いずれの薬物においても、粒子径の減少に伴い、吸収速度は増大した。フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールの調製した微細なナノ粒子懸濁液の吸収速度は 0.25 時間後に最大となり、マイクロ粒子懸濁液の最大吸収速度に比較して、それぞれ 5.0 及び 5.2 倍高値を示した。調製した微細なナノ粒子懸濁液の投与 2 時間後以降の吸収速度は、マイクロ粒子懸濁液に比較して低く、これは投与した薬物が速やかに吸収され、消化管内から消失したためと推察された。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、吸収速度の向上であると判断した。



**Figure 3-8 Deconvoluted input rate after oral administration in rats at a dose corresponding to 10 mg/kg body weight of (a) FNF and (b) MGA.**

### 第3項 *in vitro* – *in vivo* 相関性の検証

前項までの検討で、ナノ粒子化による経口吸収性の向上機構として、UWL への侵入により膜近傍の薬物濃度を高めることによる *in vitro* 膜透過性の向上が推察され、デコンボリューション解析から *in vivo* 経口吸収速度の向上が確認できた。本項では、*in vivo* 経口吸収性の増大を予測可能な *in vitro* パラメータの設定を目標として、*in vitro* 膜透過速度と *in vivo* 経口吸収速度の相関性を検証した。Figure 3-9に、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロール各懸濁液の *in vitro* 膜透過速度と *in vivo* 最大経口吸収速度の相関を示す。*In vitro* 膜透過速度は *in vivo* 吸収速度と同じ次元で算出可能であり、両者の間には強い相関関係が認められ、フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールの決定関数  $R^2$  値はそれぞれ 0.964, 0.997 であった。このことから、ナノ粒子懸濁液の経口吸収性向上の予測に重要なパラメータは *in vitro* 膜透過性であることが示唆された。よって、膜透過速度を評価可能な *in vitro* 溶出-膜透過試験は、ナノ粒子懸濁液の経口吸収性予測に適切な評価系であると考えられた。

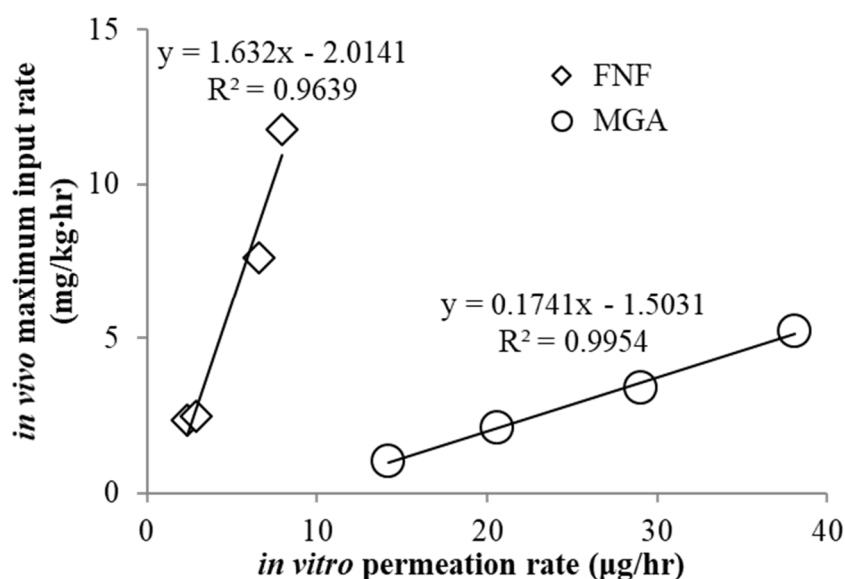


Figure 3-9 *In vitro* – *in vivo* correlation of FNF and MGA

## 第6節 小括

本章では、ナノ粒子化による経口吸収性向上機構の解明及び経口吸収性を予測可能な *in vitro* 評価系の設定を目的とし、異なる粒子径を持つ薬物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、膜透過性  $P_{app}$  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の 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本研究で使用した溶出-膜透過試験は有用な *in vitro* 評価になり得ると考えられた。

## 第4章

### 総括

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し、その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の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。しかし、ナノ粒子は微細でありフィルターを通過するため、通常の方法で溶出性を正しく評価できないことや、経口吸収性向上機構が不明であるため、*in vitro* 評価による経口吸収性予測が困難などの課題を有している。そこで本研究では、ナノ粒子化による難水溶性の食品中有効成分及び薬物の経口吸収性向上を評価し、医薬品ナノ粒子の新規溶出評価法の設定、ナノ粒子化による経口吸収性向上機構の解明及び経口吸収性を予測可能な *in vitro* 評価法設定について検討した。以下に得られた知見を要約する。

食品中の難水溶性混合物ならびに難水溶性薬物の溶解性及び吸収性向上を目的としたナノ粒子化検討

#### 1. 糖転移化合物を用いたナノ粒子化プロポリスの調製と評価

糖転移化合物 Stevia-G を用いた Build-up 法により、プロポリスのナノ粒子粉末を得ることができた。ナノ粒子化により、水へのみかけの溶解度はアルテピリン C では 100 倍、ドゥルパニンでは 3 倍以上に向上した。またラット経口投与後の血漿中濃度の  $C_{max}$  及び AUC はアルテピリン C で 3 倍及び 6 倍、ドゥルパニンで

は4倍及び4.5倍の値を示した。以上のことから、Stevia-Gを用いたBuild-up法により調製したナノ粒子は、プロポリス中の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ることができた。

## 2. 糖転移化合物と難水溶性薬物の混合粉碎物の調製と評価

Build-up法の適用が困難な薬物であるグリベンクラミドについて、糖転移化合物Hsp-Gを用いて混合粉碎した結果、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300nm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の有意に低下させ、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は、難水溶性薬物の溶解性を向上させ、薬理効果も増大させることができた。

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。

## 難水溶性薬物ナノ粒子の新規溶出試験法に関する検討

2次微分UV法によるナノ粒子の新規溶出性評価法について検討した。UVプローブを用いた2次微分UV測定により、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った。本手法では、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、ナノ粒子化による溶解速度の向上を定量的に示すことができた。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* 評価系に関する検討

ナノ粒子化による経口吸収性向上機構の解明及び経口吸収性を予測可能な *in vitro* 評価系の設定を目的とし、異なる粒子径を持つ薬物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、膜透過性  $P_{app}$  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の 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。

なお、本研究の第1章は、日本薬剤学会第25年会 (徳島, 2010), 第56回 日本薬学会東海支部総会・大会 (岐阜, 2010), 平成22年度中部談話会 研究・技術交流会 (愛知, 2010) 及び第1回岐阜薬科大学機能性健康食品 (蜂産品) 研究講演会 (岐阜, 2010) にて公表した。本研究の第2章及び第3章は、2017 AAPS Annual Meeting (San Diego, 2017), IAPC-7/PCF-J Symposium (大阪, 2018) 及びpION training seminar (大阪, 2019) にて公表した。

## 実験の部

### 第 1 章の実験

#### 1-1. 使用物質

難水溶性混合物のモデルとしてプロポリスエタノール抽出エキス及びその噴霧乾燥処理物 (EEP 及び EEP-SD, 共にアピ株式会社提供) を用いた。プロポリス中の有効成分の標品として, アルテピリン C 及びドウルパニン (共にアピ株式会社提供) を用いた。難水溶性モデル薬物としてグリベンクラミド (富士フィルム和光純薬製) を用いた。ナノ粒子調製用の添加剤として糖転移ステビア及び糖転移ヘスペリジン (Stevia-G 及び Hsp-G, 共に東洋製糖提供) を用いた。その他の試薬は特級グレードを用いた。

#### 1-2. 使用物質の物性

プロポリスエタノール抽出液エキス (ethanolic extract of propolis: EEP)

EEP 噴霧乾燥処理品 (EEP-SD)

アルテピリン C (artepillin C), ドウルパニン (drupanin, 全てアピ株式会社提供)

プロポリスはミツバチから得られる樹脂, 花粉, 蜂の分泌液から成る 200 種類以上の成分の混合物である。伝承医療として古くから用いられており, 抗腫瘍活性, 抗炎症作用, 抗酸化作用, 抗菌作用, 肝保護作用などを示すことが報告されている。産地及び抽出法によって含有成分が大きく異なることが知られており, 本研究ではブラジル Minas Gerais 産グリーンプロポリスのエタノール抽出エキス (EEP, 固形分含量 55 %) 及びその噴霧乾燥処理品 (EEP-SD, 同 50%) を用いた。

アルテピリン C 及びドウルパニンは EEP 中の主要な有効成分であり, 両化合

物の水への溶解度は、それぞれ 1 µg/mL 以下及び約 40 µg/mL である。両化合物の構造式及び EEP 中での含有量を Figure 1 及び Table1-2 にそれぞれ示す。

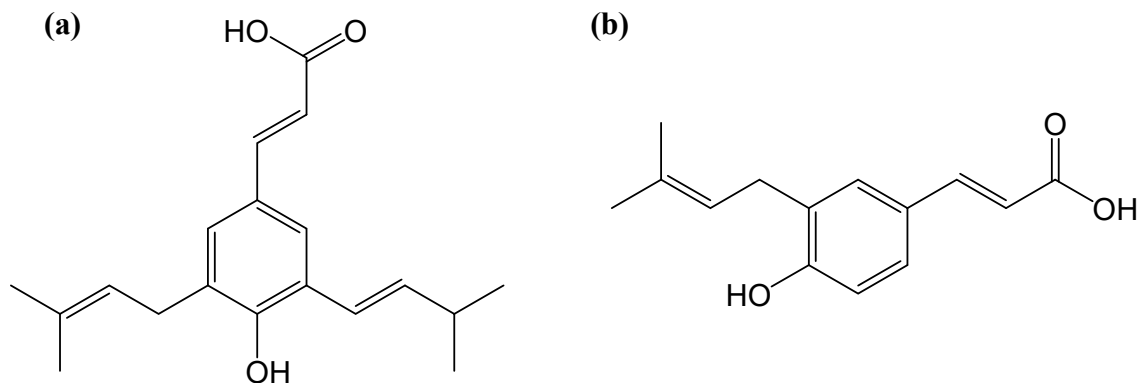


Figure 1 Structures of (a) artepillin C and (b) drupanin

#### グリベンクラミド (glibenclamide: GCM, 富士フィルム和光純薬製)

スルホニル尿素薬に分類される 2 型糖尿病治療薬。インスリン分泌を促進させることで、血糖降下作用を示し、インスリン製剤と異なり経口投与が可能である。

白色～微帯黄白色の結晶又は結晶性の粉末である。N,N-ジメチルホルムアミドに溶けやすく、クロロホルムにやや溶けにくく、メタノール又はエタノール (95) に溶けにくく、水にほとんど溶けない。

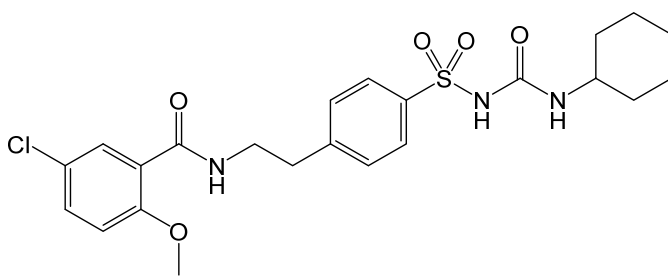


Figure 2 Structure of glibenclamide (GCM)

#### 糖転移ステビア (Stevia-G, 東洋製糖提供)

糖転移ステビア (Stevia-G) は天然甘味料であるステビア抽出物に、シクロデキストリン合成酵素処理することで α グリコシル化を施した食品添加剤である。ス

テビアは砂糖の代用品として糖尿病や心疾患，歯科領域などで 20 年以上前から広く用いられている甘味料であり，これまで有害性は報告されていない．Stevia-G は  $\alpha$  グリコシル化により水溶性及び甘味が増強されており，砂糖の 200 倍の甘味を示すため，苦味マスキング剤としての応用も期待されている．

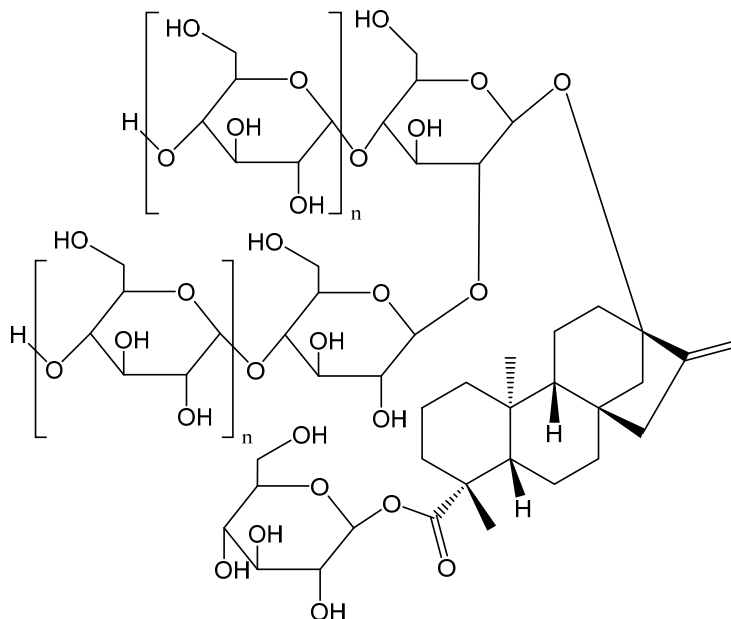


Figure 3 Structure of Stevia-G

**糖転移ヘスペリジン (Hsp-G, 東洋製糖提供)**

糖転移ヘスペリジン (Hsp-G) は，ビタミン P の一つであるヘスペリジンの OH 末端に酵素処理を施し  $\alpha$  グルコースを付加した食品添加物であり，小腸内の酵素によりヘスペリジンと  $\alpha$  グルコースに加水分解される．ヘスペリジンの水への溶解度が約 2 mg/100 mL で

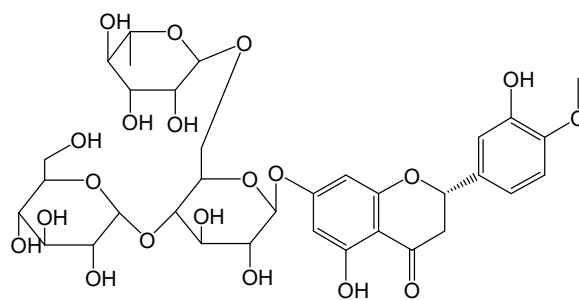


Figure 4 Structure of Hsp-G

ある一方，Hsp-G は約 20 g/100 mL と高い水溶性を示す．本研究では  $\alpha$  グルコースが 1 分子付加された  $\alpha$ G ヘスペリジン PA-T グレードを使用した．分子量が約 772 の淡黄褐色の粉末であり，においはない．

ヘスペリジンは，フラバノン骨格を有し，フラボノイド類に分類され，柑橘類，

特にミカンの皮に多く含有される。毛細血管の強化、血中コレステロール値の改善、血流の改善、抗アレルギー作用及び発癌抑制作用を示すことが報告されている。

### 1-3. ナノ粒子化プロポリス及び物理混合物の調製

727 mg の EEP (固形分量として 400 mg) をエタノール 18 mL に溶解させた後、4 g の Stevia-G を溶解させた 18 mL の蒸留水を混和し、1 分間ボルテックスで混合した。その後、ロータリーエバポレーター (EYELA 製) を用いて減圧し、溶媒を除去した。得られた残渣に 12 mL の蒸留水を加え、バス型超音波を 5 分間照射することにより、プロポリス懸濁液を調製した。得られた懸濁液を予備凍結した後、36 時間凍結乾燥 (FD-81TS, 東京理科機械製) することでナノ粒子化プロポリスを調製した。

また、0.2 g の EEP-SD と 1.0 g の Stevia-G をガラスバイアルに量り取り、3 分間ボルテックスで混合することにより、EEP-SD と Stevia-G の物理混合物を調製した。

### 1-4. 調製粒子の粒子径測定

1-3 のナノ粒子調製過程において、溶媒留去前及び予備凍結前の Z 平均粒子径及び多分散性指数 PDI をゼータサイザー Nano-ZS (Malvern 製) を用いた動的光散乱法により測定した。凍結乾燥後に得られた粉末 40 mg を蒸留水 1.2 mL に分散させた後、同様に粒子径を測定した。

### 1-5. 調製粒子中の各種有効成分含量の測定

EEP 及びナノ粒子化プロポリスをエタノール/蒸留水 (6/4, v/v) の混合溶液に完全に溶解させた後、有効成分濃度を HPLC で定量した。粒子中の有効成分は、重

量比での含有率 (mg/g) として評価した。

Table 1 に、HPLC 測定条件を示す。本条件でのアルテピリン C 及びドゥルパニンの保持時間はそれぞれ 38.8 分及び 30.1 分である。

**Table 1 HPLC condition of EEP**

Detector	UV
Wavelength	280 nm
Column	Shimpack CLC-ODS $\phi$ 6.0 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m
Column temperature	40 °C
Injection volume	20 $\mu$ L
Mobile phase	A: 2% acetic acid aq./B: Acetonitrile containing 2% acetic acid = 0-50 min: (0%- 100%B)
Flow rate	1.0 mL/min

#### 1-6. 調製粒子からの *in vitro* 薬物溶出試験 (n=3)

EEP, EEP-SD 及びナノ粒子化プロポリスを、プロポリス固形分量として 50 mg となるように 50 mL ポリプロピレンコニカルチューブ (Becton Dickson Labware, NJ, USA) に量りとり、蒸留水 25 mL を加え、37 °C, 60 rpm の条件で振盪攪拌した。所定の時間 (2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180 min) にて 1 mL シリンジを用いて試験液 1 mL を取り出し、0.2  $\mu$ m 親水性 PTFE フィルター (東洋ろ紙製) を用いてろ過を行った。得られたろ液 900  $\mu$ L にエタノール 600  $\mu$ L を加えて完全に溶解させた後、HPLC により各成分の溶出量を測定した。HPLC 条件は Table 1 に示した。

#### 1-7. 調製粒子の *in vivo* 経口吸収性試験 (n=6)

動物は雄性の Wistar 系 Clean ラット (9 週齢, 200-220 g) を使用し、試験開始 24 時間前より絶食を行った。投与開始前に EEP-SD, 1-3 にて調製したナノ粒子化プロポリス及び物理混合物を 50 %ポリプロピレングリコール溶液に懸濁させた (プロポリス固形分量として 10 mg/mL)。ジエチルエーテルで麻酔した後、胸部を

開き経口ゾンデを用いてサンプルを胃内投与 (プロポリス固形分量として 50 mg/kg) し, 経時的に頸静脈より血液 (600  $\mu$ L) を採取した. 採取した血液を 5 分間遠心処理 (10,000 rpm) し, 血漿を得た. 血漿 200  $\mu$ L を分取し, 40  $\mu$ L のサルファターゼ type H-5 溶液 ( $\beta$  グルクロニダーゼ: 25000 units, サルファターゼ: 250 units 活性以上) を加え, 37  $^{\circ}$ C にて 2 時間インキュベートした. その後, 760  $\mu$ L のエタノールを加え混合し, 5 分間遠心処理 (10,000 rpm) を行った. 上清 800  $\mu$ L を採取し減圧下乾燥させた後, 200  $\mu$ L のエタノールで再溶解させ, HPLC により血中薬物濃度を定量した. HPLC の条件は Table 1 に示した.

#### 1-8. グリベンクラミド粉砕処理品及び物理混合物の調製

グリベンクラミドと Hsp-G を重量比で 1/5 となるように, 全量として 900 mg を量りとり, 20 Hz で 60 分間振動ボールミル (type MM301, Retsch 製) で粉砕することによりグリベンクラミド粉砕処理品を調製した.

また, グリベンクラミドと Hsp-G を重量比で 1/5 となるようにガラスバイアルに量り取り, 3 分間ボルテックスで混合することにより, グリベンクラミドと Hsp-G の物理混合物を調製した.

#### 1-9. 粉砕処理品中のグリベンクラミド含量の測定

1-8 により調製した粉砕処理品を, DMSO/蒸留水 (6/4, v/v) の混合溶液に完全に溶解させ, HPLC により薬物濃度を定量した. HPLC 測定条件を Table 2 に示す.

**Table 2 HPLC condition of GCM**

Detector	UV
Wavelength	247 nm
Column	COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II $\phi$ 4.6 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Injection volume	20 $\mu$ L
Mobile phase	Acetonitrile/10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> aq. =50/50
Flow rate	1.0 mL/min



#### 1-10. 水中分散時の粒子径分布測定

1-8 により調製した粉碎処理品 30 mg を 50 mL ポリプロピレンコニカルチューブ (Becton Dickson Labware, NJ, USA) に量りとり，蒸留水 50 mL を加え超音波を 5 分間照射して水中に懸濁させた．得られた懸濁液中の粒子径を Microtrac 3300 ExII 及び極小容量循環器 USVR (共に日機装製) により測定した．

得られた懸濁液について，0.8  $\mu\text{m}$  及び 0.2  $\mu\text{m}$  セルロースアセテートフィルター (東洋ろ紙製) によりろ過を行った．また，0.2  $\mu\text{m}$  フィルター処理後のろ液 1.5 mL を超遠心処理 (100,000 rpm, 45 min) し，上澄み液を回収した．得られた各フィルターのろ液及び超遠心後の上澄み液中の薬物濃度を HPLC により測定した．HPLC 条件は Table 2 に示した．各フィルターろ過及び超遠心前後の薬物濃度をそれぞれ差し引くことで，800 nm 以上の粒子画分，200 nm から 800 nm の粒子画分，200nm 以下の粒子画分中の薬物量をそれぞれ算出し，溶出画分は超遠心後の上澄み液中の濃度を用いた．各粒子径画分中に含まれる薬物量は，ろ過前の薬物懸濁液中の薬物濃度を 100% とした際の割合で示した．

#### 1-11. 混合粉碎物中の薬物結晶性の測定

薬物原末，Hsp-G，1-8 により調製した粉碎処理品及び物理混合物中の結晶性を，粉末 X 線回折装置 (D8 Advance, Bruker AXL 製) を用いて  $2\theta = 5 \sim 30^\circ$  の範囲で測定した．

#### 1-12. グリベンクラミド粒子の *in vitro* 薬物溶出試験 (n=3)

溶出試験には日本薬局方に準じてパドル法を用いた．試料として薬物原末，1-8 により調製した粉碎処理品及び物理混合物を用い，薬物量として 2 mg を用いた．

溶出試験液には0.001% Tween 80を含むpH6.8のリン酸緩衝液 900 mLを用いた。水温 37°C、攪拌速度 100 rpm の条件下、所定の時間 (2, 5, 10, 20, 30, 60 min) にて 1 mL シリンジ (テルモ製) を用いて試験液 1 mL を取り出し、0.2  $\mu$ m セルロース アセテートフィルター (東洋ろ紙製) を用いてろ過を行った。得られたろ液 500  $\mu$ L に DMSO 500  $\mu$ L を加えて完全に溶解させた後、HPLC により溶解したグリベンクラミド量を定量した。HPLC の条件は Table 2 に示した。

### 1-13. グリベンクラミド粒子の *in vivo* 薬理効果試験 (n=4)

動物は雄性の Wistar 系 Clean ラット (9 週齢, 200-220 g) を使用し試験開始 24 時間前より絶食を行った。また、試験開始 12 時間後より給餌を再開した。投与開始前に、原末, 1-8 により調製した粉碎処理品及び物理混合物中を薬物量として 4 mg/kg となるように HPMC カプセル (クオリカプス製) に充填した。ジエチルエーテルで麻酔中に、採血用に胸部を切開した後、カプセル投与用ゾンデを用いてサンプルを胃内投与した。投与後、経時的に麻酔下で頸静脈より血液 (300  $\mu$ L) を採取した。採取した血液を 5 分間遠心処理 (10,000 rpm) し、得られた血漿について、グルコース C II-テストワコーを用い、分光光度計 (UV-166A, SHIMAZU 製) により血中グルコース濃度を測定した。薬理効果の指標として、投与前の血漿中グルコース濃度に対する投与後の血漿中グルコース濃度の減少率を用いた。グルコース C II-テストワコーの測定原理は以下にまとめた。

#### ・ グルコース C II-テストワコー (富士フイルム和光純薬製)

**測定原理:** 試料に発色試液を作用させると、試料中のグルコースは発色試液中に含まれるムタロターゼの作用により  $\alpha$  型から  $\beta$  型へすみやかに変換する。 $\beta$ -D-グルコースは、グルコースオキシダーゼの作用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じる。生成した過酸化水素は、共存するペル

オキシダーゼの作用により発色試液中のフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成する。この赤色の吸光度を測定することにより試料中のグルコース濃度を求めることができる。

## 第 2 章の実験

### 2-1. 使用物質

難水溶性モデル薬物としてメフェナム酸 (MFA, 富士フィルム和光純薬製), ナノ粒子調製用の添加剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 富士フィルム和光純薬製) 及びヒドロキシプロピルメチルセルロース TC-5E (HPMC, 信越化学工業製) を用いた. 溶出-膜透過試験の試薬として, GIT-0 lipid, Acceptor sink buffer (共に pION 製) を用いた. HPLC 用試薬として, トリフルオロ酢酸 (TFA, 富士フィルム和光純薬製) を用いた. 全ての試薬は特級グレードを用いた.

### 2-2. 使用物質の物性

メフェナム酸 (Mefenamic acid: MFA, 富士フィルム和光純薬製)

非ステロイド性抗炎症薬の一種.

COX-2 阻害作用によりプロスタグランジン合成を阻害することで薬効を発現する. 白色～淡黄色の結晶又は結晶性の粉末である. ジエチルエーテルにやや溶けにくく, メタノール, エタノール

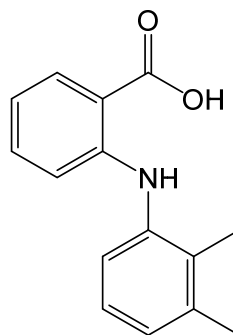


Figure 5 Structure of mefenamic acid (MFA)

(95)又はクロロホルムに溶けにくく, 水にほとんど溶けない. 水酸化ナトリウム試液に溶ける.

ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate: SDS, 富士フィルム和光純薬製)

陰イオン性界面活性剤の 1 つで, 12 個の炭素原子直鎖が硫酸塩に結合した構造を持つ. 白色の結晶性粉末である. 25°Cにおける純水中の臨界ミセル濃度は 約 8.2 mM (0.24 mg/mL)である.

**ヒドロキシプロピルメチルセルロース TC-5E** (Hydroxypropyl methylcellulose: HPMC, 信越化学工業製)

非イオン性の水溶性セルロースエーテルである。水溶液は高い界面活性を示し、乳化安定化剤、増粘剤として用いられる。白色または帯黄白色の繊維状粉末または粒である。本研究では、水溶性フィルムコーティング剤として市販されている TC-5E (20°Cにおける 2%水溶液の粘度が 3 mPa·s) を用いた。

**GIT-0 lipid** (pION 製)

膜透過性試験の人工膜に用いる試薬で、主に n-ドデカンで構成されている。

**Acceptor sink buffer** (ASB, pION 製)

膜透過性試験のアクセプター相に用いる溶媒で、界面活性剤の混合物と 2-クロロアセトアミドの水溶液である。

### 2-3. メフェナム酸のナノ及びマイクロ粒子懸濁液の調製

ナノ粒子懸濁液は、自転公転式粉碎機 (NP-100, シンキー製) を用いて調製した。100 mg のメフェナム酸、2.5 g のジルコニアビーズ (YTZ φ0.1 mm, ニッカト一製) をジルコニア容器に量り取り、0.5 mL の粉碎溶媒 (0.1% SDS/0.5% HPMC 水溶液) を加え、以下の 5 工程によりナノ粒子懸濁液を調製した。(1) 2000 rpm で 2 分間粉碎、(2) 0.5 mL の粉碎溶媒を加えた後、2000 rpm で 2 分間粉碎、(3) 0.5 mL の粉碎溶媒を加えた後、2000 rpm で 2 分間粉碎、(4) 4.0 mL の粉碎溶媒を追加し、400 rpm で 2 分間混合、(5) φ 0.08 mm メッシュフィルターユニットを用いて 2000 rpm で 1 分間遠心処理することにより、ジルコニアビーズを除去。

マイクロ粒子懸濁液は、乳棒乳鉢を用いて調製した。50 mg のメフェナム酸を

メノウ乳鉢に量り取り，2.5 mL の粉碎溶媒を少量ずつ添加しながらメノウ乳棒で練合した。

#### 2-4. 調製粒子の粒子径評価

2-3 により調製したナノ粒子懸濁液の Z 平均粒子径及び多分散性指数 PDI をゼータサイザー Nano-ZS (Malvern 製) で測定した。100  $\mu$ L の懸濁液に，900  $\mu$ L の粉碎溶媒を加えて測定し，解析時の粘度は 1.27 cP を用いた。

マイクロ粒子懸濁液の粒子径は，DIPA2000 (ドナーテクノロジー製) で測定した。200  $\mu$ L の懸濁液に，1800  $\mu$ L の粉碎溶媒を加えて希釈後，測定した。

#### 2-5. 調製粒子中の薬物結晶性の測定

薬物原末及び 2-3 により調製した懸濁液中の結晶性を，粉末 X 線回折装置 (D8 Discover, Bruker AXL 製) を用いて  $2\theta = 5\sim 35^\circ$  の範囲で測定した。各懸濁液は，減圧下一晩乾燥させた後に，測定に供した。

#### 2-6. 2 次微分 UV スペクトルによるメフェナム酸溶液及びナノ粒子の検量線作成

溶出試験時の検量線は， $\mu$ DISS Profiler 及び Au Pro ソフトウェア (共に pION 製) を用いて作成した。 $\mu$ DISS Profiler は，25 mL の溶出試験容器と十字型マグネチックスターラー，容器中心に配置されたロッドタイプのフォトダイオードアレイ検出器 (UV プローブ，温度制御用の金属製ジャケットで構成される。37°C，300 rpm で攪拌下，第十七改正日本薬局方に基づき調製した溶出試験第 2 液 (pH 6.8 リン酸緩衝液) 10 mL に対し，メフェナム酸のメタノール溶液 (3 mg/mL) を 30  $\mu$ L ずつ添加し，光路長 2 mm の UV プローブにより 200~400 nm の UV スペクトル測定を 5 回繰り返した。UV プローブ及び容器を洗浄後，同様の試験条件で，ナノ粒子懸濁液 (20 mg/mL) を 13  $\mu$ L ずつ添加し，溶解状態が平衡に達するまで攪拌

した後、UV スペクトル測定を7回繰り返した。

メフェナム酸溶液及びナノ粒子懸濁液の UV スペクトルを2次微分し、x 軸との交点の波長である ZIM 波長を設定した。一方の成分の ZIM 波長では、その成分の濃度に依存せず2次微分 UV 値は常に0を示すため、もう一方の成分のみを定量可能である。メフェナム酸溶液の ZIM 波長として 272, 303 及び 326 nm を用いて、ナノ粒子懸濁液の検量線を 26.0~180.0 µg/mL の範囲で作成した。同様に、ナノ粒子懸濁液の ZIM 波長として 257 nm を設定し、メフェナム酸溶液の検量線を、9.0~53.0 µg/mL の範囲で作成した。

#### 2-7. ナノ及びマイクロ粒子懸濁液の *in vitro* 薬物溶出挙動評価 (n=3)

2-3 により調製した懸濁液からの薬物溶出挙動は、µDISS Profiler 及び 2-6 で作成したメフェナム酸溶液及びナノ粒子の検量線を用いて評価した。37°C, 300 rpm で攪拌下、19.9 mL の溶出試験第2液に対し、100 µL のナノ又はマイクロ粒子懸濁液を添加し、光路長 2 mm の UV プロブで溶解したメフェナム酸及びメフェナム酸ナノ粒子濃度を経時的に測定した。UV 測定は、試験開始~10 分後は5秒毎、10.5~60 分後は30秒毎、61~180 分後は1分毎に実施した。溶出試験終了後、試験液を 1 mL 採取し、ゼータサイザーで粒子径を測定した。別途、試験液を 2 mL 採取し、0.02 µm フィルター (Whatman, GE ヘルスケア製) を用いてろ過を行った。得られたろ液 200 µL にメタノール 800 µL を加えて混合した後、HPLC により溶解したメフェナム酸量を HPLC により定量した。HPLC の条件は、Table 3 に示した。別途、ろ液をゼータサイザーで測定し、ろ液中のナノ粒子の有無を測定した。

**Table 3 HPLC condition of MFA**

Detector	PDA
Wavelength	228 nm
Column	Meteoric core C18 $\phi$ 2.1 $\times$ 30 mm, 2.7 $\mu$ m
Column temperature	60 °C
Injection volume	0.1 $\mu$ L
Mobile phase	A: 0.1%TFA aq./B: Acetonitrile =0-0.01 min (10%B), 0.01-0.75 min (10-90%B), 0.75-0.95 min (90%B), 0.95-0.96 min (90-10%B), 0.96-1.30 min (10%B)
Flow rate	1.9 mL/min



## 第3章の実験

### 3-1. 使用物質

難水溶性モデル薬物としてフェノフィブラート (FNF, シグマアルドリッチ製) 及び酢酸メゲストロール (MGA, MedChem Express 製) を用い, それぞれの市販ナノ粒子製剤として TriCor 145 mg錠 (Abbvie 製) 及び Megace ES 125 mg/mL 懸濁液 (Par Pharmaceutical 製) を用いた. フェノフィブラートの代謝物として, フェノフィブリン酸 (FA, 東京化成工業製) を用いた. ナノ粒子調製用の添加剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS, 富士フイルム和光純薬製) 及びヒドロキシプロピルメチルセルロース TC-5E (HPMC, 信越化学工業製) を用いた. 溶出-膜透過試験の試薬として, GIT-0 lipid, Prisma HT 及び Acceptor sink buffer (いずれも pION 製), ナノスフェア標準粒子 (Nanosphere SIZE STANDARD 60 nm, Duke Scientific 製) を用いた. HPLC 用試薬として, トリフルオロ酢酸 (TFA, 富士フイルム和光純薬製), *in vivo* 試験用試薬として *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) 及びプロピレングリコール (PG, いずれも富士フイルム和光純薬製) を用いた. 全ての試薬は特級グレードを用いた.

### 3-2. 使用物質の物性

フェノフィブラート (Fenofibrate: FNF, 東京化成工業製)

総コレステロール・トリグリセリド低下作用及び HDL-コレステロール上昇作用を示す高脂血症治療薬. プロドラッグであり, 血漿中のエステラーゼにより速やかに加水分解されること

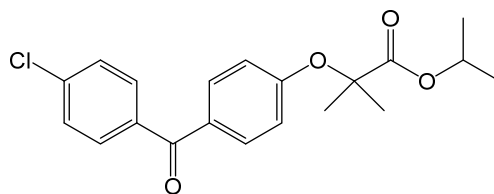


Figure 6 Structure of fenofibrate (FNF)

で, 活性代謝物のフェノフィブリン酸を生じる. 白色~微黄白色の結晶性の粉末

である。アセトニトリル，アセトン，酢酸エチル又はジエチルエーテルに溶けやすく，エタノール (95) にやや溶けやすく，ヘキサンにやや溶けにくく，水にほとんど溶けない。

**フェノフィブリン酸** (Fenofibric acid: FA, 東京化成工業製)

フェノフィブラートの主な活性代謝物である。白色の結晶性の粉末である。

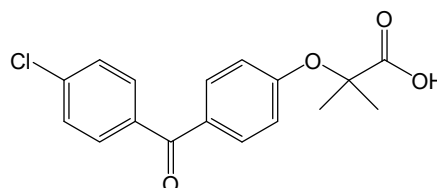


Figure 7 Structure of fenofibric acid

**酢酸メゲストロール** (Megestrol acetate: MGA, MedChem Express 製)

黄体ホルモン，プロゲステロン製剤の一種。日本では未発売であるが，がん患者の食欲不振の治療薬として用いられる。白色の結晶であり，水にほとんど溶けない。

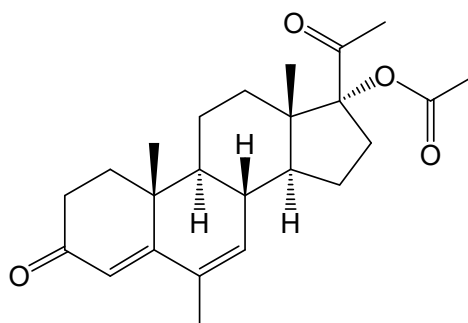


Figure 8 Structure of mefenamic acid

**ドデシル硫酸ナトリウム** (Sodium dodecyl sulfate: SDS, 富士フィルム和光純薬製)

2-2 と同様のものを使用した。

**ヒドロキシプロピルメチルセルロース TC-5E** (Hydroxypropyl methylcellulose:

HPMC, 信越化学工業製)

2-2 と同様のものを使用した。

### **GIT-0 lipid** (pION 製)

2-2 と同様のものを使用した。

### **Prisma HT** (pION 製)

タウリン, 2-クロロアセトアミド, 1 mol/L の塩酸が含まれる MES 水溶液である。25 mL の Prisma HT に蒸留水を加えて 1 L にメスアップした後, 1 mol/L の NaOH 水溶液を用いて pH 6.5 に調整することで, 溶出-膜透過試験に用いる Prisma HT 緩衝液を調製する。

### **Acceptor sink buffer** (ASB, pION 製)

2-2 と同様のものを使用した。

### **ナノスフェア標準粒子** (Nanosphere SIZE STANDARD 60 nm, Duke Scientific 製)

ポリスチレン製ナノ粒子の懸濁液で, 粒径の均一性が高く, 粒子径標準粒子として用いられる。本実験では, 平均粒子径 60 nm の製品を使用した。

## **3-3. 難水溶性薬物のナノ及びマイクロ粒子懸濁液の調製**

薬物毎に, マイクロ粒子懸濁液及び粒子径の異なる 3 種のナノ粒子懸濁液を調製し, 計 2 薬物, 計 8 処方 (F1~8) を調製した。

フェノフィブラートのマイクロ粒子懸濁液 (F1) 及び酢酸メゲストロールのマイクロ粒子懸濁液 (F5) は, 2-3 と同様に, 乳棒乳鉢を用いて 5 mg/mL 濃度となるように調製した。

フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールの市販製剤のナノ粒子懸濁液は, Tricor 及び Megace ES を用いて調製した。Tricor 2 錠を, 5.8 mL の粉碎溶媒 (0.1%

SDS/0.5% HPMC 水溶液) 中で、室温下 3 時間攪拌することで崩壊させ、50 mg/mL の懸濁液を得た。得られた懸濁液 1 mL に 9 mL の粉碎溶媒を加えて希釈し、5 mg/mL のナノ粒子懸濁液 (F2) を得た。不溶性の錠剤構成成分を除去するため、希釈には 1 分静置後の上清を用いた。1.6 mL の Megace ES に、2.4 mL の蒸留水を加えて希釈し、50 mg/mL 懸濁液を得た。得られた懸濁液 1 mL に、9 mL の蒸留水を加えて希釈することで、5 mg/mL のナノ粒子懸濁液 (F6) を得た。

フェノフィブラート及び酢酸メゲストロールの微細なナノ粒子懸濁液 (F3 及び F7)、粗大なナノ粒子懸濁液 (F4 及び F8) は、2-3 と同様に、自転公転式粉碎機を用いて調製した。微細なナノ粒子懸濁液は、200 mg の薬物、5 g のジルコニアビーズ、1 mL の粉碎溶媒を用い、以下の 6 工程で調製した。(1) 2000 rpm で 2 分間粉碎、(2) 0.2 mL の粉碎溶媒を加えた後、2000 rpm で 2 分間粉碎、(3) 0.2 mL の粉碎溶媒を加えた後、2000 rpm で 2 分間粉碎、(4) 2.6 mL の粉碎溶媒を追加し、400 rpm で 2 分間混合、(5)  $\phi$  0.08 mm メッシュフィルターユニットを用いて 2000 rpm で 1 分間遠心処理することにより、ジルコニアビーズを除去、(6) 得られた懸濁液 1 mL に、粉碎溶媒 9 mL を加えて希釈。粗大なナノ粒子懸濁液は、200 mg の薬物、4g のジルコニアビーズ、1 mL の粉碎溶媒を用い、以下の 5 工程で調製した。(1) 500 rpm で 2 分間粉碎、(2) 3 mL の粉碎溶媒を追加し、400 rpm で 2 分間粉碎、(3) 400 rpm で 2 分間混合、(4)  $\phi$  0.08 mm メッシュフィルターユニットを用いて 2000 rpm で 1 分間遠心処理することにより、ジルコニアビーズを除去、(5) 得られた懸濁液 1 mL に、粉碎溶媒 9 mL を加えて希釈。

#### 3-4. 調製粒子の粒子径評価

3-3 により調製したナノ粒子懸濁液 (F2~F4 及び F6~F8) の Z 平均粒子径及び多分散性指数 PDI をゼータサイザー Nano-ZS (Malvern 製) で測定した。200  $\mu$ L の懸濁液に、800  $\mu$ L の粉碎溶媒を加えて測定し、解析時の粘度は 1.27 cP を用いた。

マイクロ粒子懸濁液 (F1 及び F5) の粒子径は、DIPA2000(ドナーテクノロジー製) で測定した。400  $\mu\text{L}$  の懸濁液に、1600  $\mu\text{L}$  の粉碎溶媒を加えて希釈後、測定した。

### 3-5. 調製粒子中の薬物結晶性の測定

薬物原末及び 3-3 により調製した懸濁液中の結晶性を、粉末 X 線回折装置 (D8 Discover, Bruker AXL 製) を用いて  $2\theta = 5\sim 35^\circ$  の範囲で測定した。各懸濁液は、減圧下一晩乾燥させた後に、測定に供した。

### 3-6. ナノ及びマイクロ粒子懸濁液の *in vitro* 薬物溶出-膜透過性評価 (n=3)

3-3 により調製した懸濁液の溶出-膜透過性は、2-8 と同様に、 $\mu\text{FLUX}$  (pION 製) で評価した。試験開始に先立ち、15 mL の ASB にフェノフィブラートのメタノール溶液 (1.03 mg/mL) 及び酢酸メゲストロールのアセトニトリル溶液 (1.43 mg/mL) を 10  $\mu\text{L}$  ずつ加えながら UV 測定することで、アクセプター相の検量線を作成した。光路長 10 mm の UV プロブを用い、溶液の乱流の影響を避けるため 2 次微分 UV 値を測定した。フェノフィブラートは 310-324 nm 及び 0.69~4.79  $\mu\text{g/mL}$ 、酢酸メゲストロールは 320-340 nm 及び 0.95~10.4  $\mu\text{g/mL}$  の波長及び濃度範囲で検量線を作成した。試験開始前に 20  $\mu\text{L}$  の GIT-0 Lipid を人工膜 (PVDF フィルター、 $\phi 0.45\mu\text{m}$ , 1.54  $\text{cm}^2$ ) 上に滴下した。ドナー相に 19.84 mL の Prisma HT 緩衝液、アクセプター相に 20 mL の ASB を加えた。37°C, 150 rpm 攪拌下、160  $\mu\text{L}$  の F1~F8 懸濁液をドナー相に添加し、ドナー相中の溶解した薬物、薬物ナノ粒子の濃度及びアクセプター相中の溶解した薬物量を経時的に UV プロブで測定した。UV 測定は、試験開始~10 分後は 5 秒毎、10.5~60 分後は 30 秒毎、61~180 分後は 1 分毎、182~300 分後は 2 分毎に実施した。溶出試験終了後、試験液を 2 mL 採取し、0.02  $\mu\text{m}$  フィルター (Whatman, GE ヘルスケア製) を用いてろ過

を行った。得られたろ液 200  $\mu$ L にメタノール 800  $\mu$ L を加えて混合した後、HPLC により溶解した薬物量を HPLC により定量した。両薬物の HPLC 条件は Table 4 に示した。

**Table 4 HPLC conditions of FNF and MGA**

Drug	Fenofibrate	Megestrol acetate
Detector	PDA	
Wavelength	285 nm	290 nm
Column	Meteoric core C18 $\phi$ 2.1 $\times$ 30 mm, 2.7 $\mu$ m	
Column temperature	60 $^{\circ}$ C	
Injection volume	1 $\mu$ L	
Mobile phase	A: 0.1%TFA aq./B: Acetonitrile =0-0.01 min (10%B), 0.01-0.75 min (10-90%B), 0.75-0.95 min (90%B), 0.95-0.96 min (90-10%B), 0.96-1.30 min (10%B)	
Flow rate	1.9 mL/min	

溶解した薬物の膜透過性を測定するため、酢酸メゲストロールのメタノール溶液の溶出-膜透過試験も実施した。19.99 mL の Prisma HT 緩衝液で満たされたドナー相に、4 mg/mL の酢酸メゲストロール溶液を 10  $\mu$ L 添加した。ドナー相の酢酸メゲストロール濃度は、緩衝液中の溶解度である 2  $\mu$ g/mL 以下に設定した。

ナノ粒子自体の膜透過性を測定するため、ナノスフェア標準粒子の溶出-膜透過試験も実施した。19.4 mL の Prisma HT 緩衝液で満たされたドナー相に、ナノスフェア標準粒子を 15 滴 (約 620  $\mu$ L) 添加した。300 分後に、ドナー相及びアクセプター相からの試験液を 200  $\mu$ L ずつ採取し、ドナー相の検体は ASB で 1000 倍希釈した。各検体の粒子径及び散乱光強度を、ゼータサイザーで測定し、測定位置はセル中央、減衰機は 11 に固定した。

### 3-7. ナノ及びマイクロ粒子懸濁液の *in vivo* 経口吸収性評価 (n=3~6)

動物は雄性の Sprague-Dawley ラット (8 週齢, 257-334 g) を使用し、試験開始 16 時間前より絶食を行った。F1~F8 の懸濁液を薬物量として 10 mg/kg (フェノフ

イブリン酸として 8.84 mg/mL) を胃内投与した。また、フェノフィブリン酸及び酢酸メゲストロールの 3 mg/mL DMA/PG (1/1, v/v) 溶液を薬物量として 10 mg/kg を静脈投与した。胃内投与 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後, または静脈投与後 0.02, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後に, 頸静脈より血液 (200  $\mu$ L) を採取した。採取した血液を 10 分間遠心処理 (4°C, 1880g) し, 血漿を得た。血漿をアセトニトリルを添加し, 混合後, 遠心操作により除タンパクした後, UPLC-MS/MS により薬物濃度を定量した。UPLC-MS/MS の条件は Table 5 に示した。

**Table 5 UPLC-MS/MS conditions of FNF, FA and MGA**

Drug	Fenofibrate	Fenofibric acid	Megestrol acetate
Detector		MS/MS, multiple reaction monitoring	
<i>m/z</i>	361.1 to 232.8	319.0 to 232.8	385.2 to 325.0
Column		L-column2 ODS $\phi$ 2.1 $\times$ 50 mm, 3 $\mu$ m	
Column temperature		40 °C	
Injection volume	1.0 $\mu$ L	0.1 $\mu$ L	1.0 $\mu$ L
Mobile phase	0.1% formic acid aq./Acetonitrile =0-0.50 min (50%B), 0.50-0.90 min (50-60%B), 0.90-1.30 min (95%B), 1.30-1.31 min (95-50%B), 1.31-1.70 min (50%B)		
Flow rate	0.75 mL/min		

個別のラットの薬物動態パラメータは, WinNonlin を用いたノンコンパートメント解析により算出した。各処方インプットレート, すなわち経口投与後の吸収速度は, WinNonlin を用いたデコンボリューション法により, 以下の式に基づき算出した。 $f(u)$ はインプットレート,  $C(t)$ はレスポンス,  $C_{\delta}(t)$ はユニットインパルスレスポンスをそれぞれ示す。スムージングファクターは自動を採用した。

$$C(t) = \int_0^t f(u)C_{\delta}(t-u)du$$





## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に関しまして終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました大阪薬科大学製剤設計学研究室 戸塚裕一教授に甚大なる謝意を表します。戸塚先生は常にデータに対して真摯に向き合い深く考察することに加え、研究者としてのあるべき姿勢についてもご指導くださいました。先生のご指導に恥じぬよう、今後も研究者として全力で精進していく所存です。研究の方向性や論文の執筆に関して、懇切丁寧にご指導いただきました大阪薬科大学製剤設計学研究室 門田和紀准教授に深甚なる謝意を表します。また、数々の議論や論文の執筆に関しましても、日夜休日問わずにご指導いただきました大阪薬科大学製剤設計学研究室 内山博雅助教に深甚なる謝意を表します。

本研究ならびに私の大阪薬科大学での学位取得に際し、御懇篤なる御指導御鞭撻ならびに強力なご支援、有益なご助言を賜りました岐阜薬科大学 竹内洋文名誉教授に深甚なる謝意を表します。

本研究ならびに私の大阪薬科大学での学位取得に際し、御懇篤なる御指導御鞭撻ならびに強力なご支援、有益なご助言を賜りました岐阜薬科大学製剤学研究室 田原耕平教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、快く御支援頂きました元塩野義製薬株式会社応用化学分析部門、現徳島大学産官学連携センター 馬場良泰氏に深謝いたします。本研究及び論文作成を後押しして頂き、また薬物動態学的見地からご助言頂きました塩野義製薬株式会社創薬開発研究所分析科学 1 グループ 佐藤準人氏に深謝いたします。入社以来、研究活動全般にわたりご指導頂き、常に進むべき道を示して頂き、研究及び論文作成を後押しして頂きました塩野義製薬株式会社創薬化学研究所物理化

学グループ 上田廣氏に深謝いたします。本研究に際し、御協力頂きました塩野義製薬株式会社創薬開発研究所薬物動態 1 グループ 吉田晋平氏，田村直美氏，塩野義製薬株式会社イノベーティブ医療研究所創薬基盤研究 3 グループ 櫻本昌士氏ならびにシオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 宮崎志朗氏，堤本英和氏，種田友美氏に感謝いたします。

また、本研究全般にわたり、御協力頂いた岐阜薬科大学製剤学研究室の諸氏，同教室出身者並びに研究生各位に感謝致します。本研究全般にわたり、御協力頂いた塩野義製薬株式会社応用化学分析部門物性製剤グループの諸氏に感謝致します。

糖転移ステビア，糖転移ヘスペリジンを提供して頂きました東洋製糖株式会社に感謝致します。プロポリスエタノール抽出エキス，EEP 噴霧乾燥処理品，アルテピリン C 及びドウルパニンを提供して頂きましたアピ株式会社に深謝致します。

最後に、研究や論文作成に理解を示し、生活面や精神面など全ての面で支えてくれた妻 愛に親愛と感謝の意を表します。私たち家族を支えてくれました義母に謝意を示します。私を育ててくれた父母に感謝いたします。

## 略語

AAC	area above the curve
ASB	acceptor sink buffer
AUC	area under the curve
AUC <sub>0-2h</sub>	area under the curve (time 0 to 2 hour)
AUC <sub>inf</sub>	area under the curve (time 0 to infinity)
BA	bioavailability
C <sub>max</sub>	maximum drug concentration
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EEP	ethanolic extract of propolis
EEP-SD	splay-dried ethanolic extract of propolis
FA	fenofibric acid
FNF	fenofibrate
GCM	glibenclamide
HPLC	high performance liquid chromatography
HPMC	hydroxypropyl methylcellulose
Hsp-G	transglycosylated hesperidin
ICH	international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use
MFA	mefenamic acid
MGA	megestrol acetate
<i>P<sub>app</sub></i>	apparent permeability
PDA	photodiode array detector
PdI	polydispersity index
PG	propylene glycol
PVDF	polyvinylidene fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
Stevia-G	transglycosylated stevia
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	elimination half-life
TFA	trifluoroacetic acid
Tmax	the time to reach the maximum drug concentration following drug administration
UPLC-MS/MS	ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer
UV	ultraviolet
UWL	unstirred water layer
ZIM	zero intercept method



## 参考文献

1. Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P. & Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **12**, 413–420 (1995).
2. Grohganz, H. *et al.* Refining stability and dissolution rate of amorphous drug formulations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 977–89 (2014).
3. Babu, N. J. & Nangia, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Cryst. Growth Des.* **11**, 2662–2679 (2011).
4. 川上 恒作. 難水溶性薬物の物性評価と製剤設計の新展開. シーエムシー出版 (2010).
5. Liversidge, G. G. & Cundy, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* **125**, 91–97 (1995).
6. Merisko-Liversidge, E. M. & Liversidge, G. G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. *Toxicol. Pathol.* **36**, 43–48 (2008).
7. Murdande, S. B., Shah, D. A. & Dave, R. H. Impact of nanosizing on solubility and dissolution rate of poorly soluble pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **104**, 2094–2102 (2015).
8. Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C. & Shah, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: Immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research* **15**, 11–22 (1998).
9. Fagerberg, J. H. *et al.* Dissolution rate and apparent solubility of poorly soluble

- drugs in biorelevant dissolution media. *Mol. Pharm.* **7**, 1419–1430 (2010).
10. Van Eerdenbrugh, B., Alonzo, D. E. & Taylor, L. S. Influence of particle size on the ultraviolet spectrum of particulate-containing solutions: Implications for in-situ concentration monitoring using UV/Vis fiber-optic probes. *Pharm. Res.* **28**, 1643–1652 (2011).
  11. Shah, D. A., Murdande, S. B. & Dave, R. H. A Review: Pharmaceutical and Pharmacokinetic Aspect of Nanocrystalline Suspensions. *J. Pharm. Sci.* **105**, 10–24 (2016).
  12. Van Eerdenbrugh, B. *et al.* Solubility increases associated with crystalline drug nanoparticles: Methodologies and significance. *Mol. Pharm.* **7**, 1858–1870 (2010).
  13. Huang, S. *et al.* Increased bioavailability of efonidipine hydrochloride nanosuspensions by the wet-milling method. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **130**, 108–114 (2018).
  14. Duchêne, D. & Ponchel, G. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how? in *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **44**, 15–23 (1997).
  15. Sugano, K. Possible reduction of effective thickness of intestinal unstirred water layer by particle drifting effect. *Int. J. Pharm.* **387**, 103–109 (2010).
  16. Wongmekiat, A., Tozuka, Y., Oguchi, T. & Yamamoto, K. Formation of fine drug particle by cogrinding with cyclodextrins: Part II. The influence of moisture condition during cogrinding process on fine particle formation. *Int. J. Pharm.* **265**, 85–93 (2003).
  17. 高畑英, 西岡由 & 大澤孝. 低分子量の水溶性物質との混合粉碎による難水溶性物質の微細化. *粉体と工業* **24**, 53–59 (1992).
  18. Uchiyama, H., Tozuka, Y., Imono, M. & Takeuchi, H. Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: Dramatic improvement in drug

- dissolution and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76**, 238–244 (2010).
19. Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L. & Narain, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Res. Int.* **101**, 129–138 (2017).
  20. Ahn, M. R. *et al.* Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett.* **252**, 235–43 (2007).
  21. Salatino, A., Teixeira, É. W., Negri, G. & Message, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2**, 33–38 (2005).
  22. Tazawa, S., Warashina, T. & Noro, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. II. *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1388–1392 (1999).
  23. Espinosa-Mansilla, A., Durán-Merás, I. & Salinas, F. Simultaneous determination of pteridines in multicomponent mixtures using derivative spectrophotometry and partial least-squares calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1325–1334 (1998).
  24. Wang, L. & Asgharnejad, M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 1243–1248 (2000).
  25. Lawrence, M. J. & Rees, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **45**, 89–121 (2000).
  26. Serajuddin, A. T. M. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: Early

- promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *J. Pharm. Sci.* **88**, 1058–1066 (1999).
27. Müller, R. H., Gohla, S. & Keck, C. M. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**, 1–9 (2011).
  28. Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 785–796 (2004).
  29. Paulino, N. *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* **587**, 296–301 (2008).
  30. Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M. & Nakajima, S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 945–946 (1994).
  31. Grange, J. M. & Davey, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* **83**, 159–160 (1990).
  32. Santos, F. A. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **80**, 1–7 (2002).
  33. Park, Y. K. *et al.* Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* **36**, 24–28 (1998).
  34. Kujumgiev, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 235–240 (1999).
  35. Banskota, A. H. *et al.* Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine* **8**, 16–23 (2001).
  36. Oršolić, N., Terzić, S., Mihaljević, Ž., Šver, L. & Bašić, I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1928–1933 (2005).



37. Hörter, D. & Dressman, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **25**, 3–14 (1997).
38. Uchiyama, H., Tozuka, Y., Imono, M. & Takeuchi, H. Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: Dramatic improvement in drug dissolution and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76**, 238–244 (2010).
39. Bhargava, P. *et al.* Anticancer activity of the supercritical extract of Brazilian green propolis and its active component, artepillin C: Bioinformatics and experimental analyses of its mechanisms of action. *Int. J. Oncol.* **52**, 925–932 (2018).
40. Kimoto, T. *et al.* Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. *Pathol. Int.* **50**, 679–689 (2000).
41. Kimoto, T. *et al.* Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. *Virchows Arch.* **438**, 259–270 (2001).
42. Krycer, I. & Hersey, J. A. Grinding and granulation in a vibratory ball mill. *Powder Technol.* **28**, 91–95 (1981).
43. Ho, T. & Hersey, J. A. Granulation using the agglomerative phase of comminution. *Powder Technol.* **23**, 191–195 (1979).
44. Mizoe, T., Beppu, S., Ozeki, T. & Okada, H. One-step preparation of drug-containing microparticles to enhance the dissolution and absorption of poorly water-soluble drugs using a 4-fluid nozzle spray drier. *J. Control. Release* **120**, 205–210 (2007).
45. Zhang, J. *et al.* Drug solubilization mechanism of  $\alpha$ -glucosyl stevia by NMR spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **465**, 255–261 (2014).

46. Fujimori, M. *et al.* Enhanced solubility of quercetin by forming composite particles with transglycosylated materials. *J. Food Eng.* **149**, 248–254 (2015).
47. Konishi, Y. Transepithelial transport of artemisinin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1713**, 138–444 (2005).
48. Shimizu, K., Ashida, H., Matsuura, Y. & Kanazawa, K. Antioxidative bioavailability of artemisinin in Brazilian propolis. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 181–188 (2004).
49. Konishi, Y., Hitomi, Y., Yoshida, M. & Yoshioka, E. Absorption and bioavailability of artemisinin in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 9928–9933 (2005).
50. Uchiyama, H., Tozuka, Y., Asamoto, F. & Takeuchi, H.  $\alpha$ -Glucosyl hesperidin induced an improvement in the bioavailability of pranlukast hemihydrate using high-pressure homogenization. *Int. J. Pharm.* **410**, 114–117 (2011).
51. Tozuka, Y., Kishi, J. & Takeuchi, H. Anomalous dissolution property enhancement of naringenin from spray-dried particles with  $\alpha$ -glucosylhesperidin. *Adv. Powder Technol.* **21**, 305–309 (2010).
52. Zhang, J. *et al.* NMR investigation of a novel excipient,  $\alpha$ -glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Sci.* **100**, 4421–4431 (2011).
53. Panagopoulou-Kaplani, A. & Malamataris, S. Preparation and characterisation of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide. *Int. J. Pharm.* **195**, 239–246 (2000).
54. Hecq, J. *et al.* Preparation and in vitro/in vivo evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **64**, 360–368 (2006).

55. Jinno, J. I. *et al.* Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J. Control. Release* **111**, 56–64 (2006).
56. FDA. Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. *FDA Guid.* 1–24 (2002). doi:10.1186/1477-7525-4-79
57. Dressman, J. B. & Reppas, C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. in *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **11**, 73–80 (2000).
58. Avdeef, A., Tsinman, K., Tsinman, O., Sun, N. & Voloboy, D. Miniaturization of powder dissolution measurement and estimation of particle size. *Chem. Biodivers.* **6**, 1796–1811 (2009).
59. Kataoka, M., Itsubata, S., Masaoka, Y., Sakuma, S. & Yamashita, S. In vitro dissolution/permeation system to predict the oral absorption of poorly water-soluble drugs: effect of food and dose strength on it. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 401–407 (2011).
60. Tsinman, K. *et al.* Ranking Itraconazole Formulations Based on the Flux through Artificial Lipophilic Membrane. *Pharm. Res.* **35**, 161 (2018).
61. Noyes, A. A. & Whitney, W. R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **19**, 930–934 (1897).
62. Kesisoglou, F., Panmai, S. & Wu, Y. Nanosizing - Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 631–644 (2007).
63. Juenemann, D. *et al.* Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77**, 257–264 (2011).

64. Stewart, A. M. *et al.* Impact of Drug-Rich Colloids of Itraconazole and HPMCAS on Membrane Flux in Vitro and Oral Bioavailability in Rats. *Mol. Pharm.* **14**, 2437–2449 (2017).
65. Heng, D., Cutler, D. J., Chan, H. K. H.-K. H. K., Yun, J. & Raper, J. A. What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? *Pharm. Res.* **25**, 1696–1701 (2008).
66. Kazemipour, M., Noroozian, E., Saber Tehrani, M. & Mahmoudian, M. A new second-derivative spectrophotometric method for the determination of permethrin in shampoo. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 1379–1384 (2002).
67. Xia, D. *et al.* Preparation of stable nitrendipine nanosuspensions using the precipitation-ultrasonication method for enhancement of dissolution and oral bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 325–334 (2010).
68. Sun, W., Mao, S., Shi, Y., Li, L. C. & Fang, L. Nanonization of itraconazole by high pressure homogenization: Stabilizer optimization and effect of particle size on oral absorption. *J. Pharm. Sci.* **100**, 3365–3373 (2011).
69. Sharma, P. & Garg, S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 491–502 (2010).
70. van Hoogevest, P., Liu, X. & Fahr, A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 1481–1500 (2011).
71. Ingels, F. *et al.* Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int. J. Pharm.* **232**, 183–192 (2002).
72. Roos, C. *et al.* In vivo mechanisms of intestinal drug absorption from aprepitant nanoformulations. **14**, 4233–4242 (2017).

73. Stewart, A. M. *et al.* Development of a Biorelevant, Material-Sparing Membrane Flux Test for Rapid Screening of Bioavailability-Enhancing Drug Product Formulations. *Mol. Pharm.* **14**, 2032–2046 (2017).
74. Hanafy, A. *et al.* Pharmacokinetic evaluation of oral fenofibrate nanosuspensions and SLN in comparison to conventional suspensions of micronized drug. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 419–426 (2007).
75. Veng-Pedersen, P. An algorithm and computer program for deconvolution in linear pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **8**, 463–481 (1980).

## 論文目録

1. Yuichi Tozuka, Masaaki Imono, Hiromasa Uchiyama, Hirofumi Takeuchi.  
A novel application of  $\alpha$ -glucosyl hesperidin for nanoparticle formation of active pharmaceutical ingredients by dry grinding  
*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.79 :559-565 (2011).
2. Yuichi Tozuka, Masaaki Imono, Hiromasa Uchiyama, Kohei Tahara, Shigemi Tazawa, Yoko Araki, Hirofumi Takeuchi.  
Dry powder formulation with  $\alpha$ -glycosyltransferase-treated stevia for the effective absorption of hydrophobic bioactive compounds in crude drugs  
*Powder Technology*.240:2-6 (2013).
3. Masaki Imono, Hiromasa Uchiyama, Hiroshi Ueda, Kazunori Kadota, Yuichi Tozuka  
In-situ dissolution and permeation studies of nanocrystal formulations with second-derivative UV spectroscopy.  
*International Journal of Pharmaceutics*. 558, 242–249 (2019).
4. Masaaki Imono, Hiromasa Uchiyama, Shinpei Yoshida, Shiro Miyazaki, Naomi Tamura, Hidekazu Tsutsumimoto, Kazunori Kadota, Yuichi Tozuka  
The elucidation of key factors for oral absorption enhancement of nanocrystal formulations: In vitro–in vivo correlation of nanocrystals  
*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 146, 84-92 (2020).