

タイトル：薬剤の低溶解性の克服

著者： Mitali Kakran, Lin Li, Rainer H. Müller
(Pharmaceutical Engineering, 2012, vol 32, No4, 1-7)

翻訳：堀部 智久 (Tomohisa HORIBE)

問題点

近年の医薬品候補の発見は、低水溶性の性質を持ち、そしてこの性質のために特に経口剤においてバイオアベイラビリティ（薬剤の生体内における利用性）の低い新たな薬剤の数を増加させる結果になっている¹。このような性質を持つ薬剤候補の数は非常に増えてきており、新たな薬剤候補の実に70%が低水溶性であることが最近判明している²。人体の約65%は水で構成されているために、薬剤はある程度の水溶性とバイオアベイラビリティを持つ必要がある。低水溶性の薬剤は、十分に分解する前に胃腸管から排除され、循環血液に吸収される傾向がある。このため、低いバイオアベイラビリティにより用量比例性が低くなるという結果になり、このことは薬剤の臨床応用の妨げとなる³。このような場合、薬剤の用量の増加が、その薬剤の血中における治療上有効な濃度の範囲を維持するために必要になるであろう。経口投与後、この増量によって胃腸管における局所毒性を引き起こすこともあり、このような毒性は、患者の薬剤コンプライアンスを下げる結果になる⁴。一方で多量の原因（API）を消費することは、医薬品の開発や製造にかかるコストを増大させることになるだろう。要するに、このような低水溶性の薬剤は、患者間でのばらつき、高額な患者コスト、不十分な治療、そしてより重要なこととして、毒性のリスクの上昇や死亡する可能性をも含む数多くのネガティブな臨床上的影響を与える。

新薬発見の段階において、数多くの *in vitro* におけるアッセイが効果、膜透過性や遺伝毒性といった生物学的性質を評価するために行われる。このような低水溶性の新薬候補の性質は、*in vitro* における細胞培養のアッセイ系でも影響をうけるであろう。というのも、これら薬剤のテスト培地における溶解性の制限あるいは、沈殿を起こすことが薬剤の性質に関する不正確なデータを得ることにつながるからである。前臨床の開発において、*in vivo* における毒性評価のデータの質も下げることになる。これは、毒性学的評価においては、その安全性を保証するために、薬理的あるいは薬物動態学的評価よりも通常さらに高濃度での暴露を必要とするからである。概して、薬剤における低いバイオアベイラビリティは臨床上的可能性を限定するという結果になり、それにより、不十分な臨床アウトカムにつながる。それゆえ、多くの薬剤において低水溶性は、きわめて可能性の高い医薬品開発を行う際の主要な障害の一つとなる。

可能な解決策

新たな薬剤を完全に開発することとは対照的に、その剤形を改良、改善することは、開発において投資される資本、時間、リスクをかなり軽減する。薬剤それ自体と特定部位の構築、その両方に対して改良を行うことを含む数多くのアプローチが、溶解速度だけでなく、低水溶性薬剤のバイオアベイラビリティを向上させるために開発されている。物理的改良は、しばしば表面積、溶解性、そして、薬剤粒子の湿潤性を向上させる狙いで行われ、特に、粒子サイズを減らすこと^{5,6}あるいは、アモルファス状の粒子状態^{7,8}を生み出すことが中心となる。

ナノ粒子の薬剤

低溶解性の薬剤に対する古典的な調製のアプローチとしては、ナノ粒子化する、つまり、平均粒子サイズが $1\mu\text{m}$ 以下のナノ粒子の薬剤を生み出すことである。原理としては、薬剤粉末の表面積を増やすことで溶解速度を上げることである。Noyes-Whitney の式を考察することで、低溶解性化合物の溶解速度をいかに改善できるかという見通しがつく。

$$dm/dt = DA(C_s - C_{\text{bulk}})/h$$

この式において、 dm/dt は、薬剤の溶解速度、 D は、薬剤の拡散係数、 A は、薬剤の表面積、 C_s は、薬剤の飽和濃度、 C_{bulk} は、容積における薬剤の濃度、そして、 h は、速度境界層の厚さを示す。図 1 に示すように、薬剤のグラムあたりの表面積は、薬剤の粒子サイズがバルク単位からマイクロ単位、ナノ単位と減少するにつれて、増加する。小さな粒子サイズは、結果として大きな表面積(A)となり、このため、Noyes-Whitney の式に従って、溶解速度が上がるということになる。それゆえ、ナノメータサイズの範囲にある薬剤粒子は、従来の方法で調製されたものよりもより急速に溶解し、結果的に腸管内腔や血液に対する流動性を増加させることになる。

ナノ粒子は、その小さなサイズのためにいくつかの興味深い表面特性を示す。これらナノ粒子は、伝達手段として、原薬 (API) を数多くの生体バリア、例えば、血液脳関門 (BBB)、異なったタイプの粘膜や上皮、そして細胞膜に対して送りこむことができる。また、上皮腸管壁^{11,12}のような生体表面に対して、優れた付着能を示し、この生体付着は、図 2 に示すように、粒子サイズが小さくなるに従い増加する。生体膜あるいは、腸管壁⁹とのファンデルワールス相互作用の増加(これは、ナノスケールの粒子表面により、接触面積が増加するため)のためにナノ粒子の付着の性質は、透過性を促進するだけでなく、食効作用を減少させることにつながり、それゆえ、バイオアベイラビリティを向上させることになる¹³。さらに、濃縮した固体状態で利用することにより、薬剤を充填する際に容積に対して高用量を充填できるというもう一つの利点もある。このことは、高用量が必要となる際に非常に重要なことである。ナノ粒子の迅速な溶解により、吸収ウィンドウが極めて狭い API に対してもその使用が容易になる。これは、薬剤が迅速に溶解することにより API の吸収や安

定性に対する不適当な環境を避けることになるからである。その他の有用な因子としては、用量と患者関連因子があり、主に、用量の減少あるいは、増加が可能となる。つまり、用量比例性と再現性が改善され、この結果、用量の忍容性の向上やコンプライアンス、そして食効作用のための減少を向上し、これにより、薬剤の効果と安全性が改善される。しかしながら、ファンデルワールス力がナノスケールにおいて有意に働くので、ナノ粒子の薬剤に対して、凝集を引き起こすことになる。

固体分散

固体分散とは、分子内の一つあるいはそれ以上の活性成分の分散として定義され、アモルファスは、固相で内部にキャリアーあるいはマトリックスを形成する^{14,15}。キャリアーマトリックス内のナノ粒子薬剤を分散することで凝集を保護することができ、微細な分散は、そこから得られる表面を増加させ、その結果より迅速に浸潤して溶解を引き起こすことになる。溶解性やバイオアベイラビリティの向上を目的とした調製のためにしばしば、固体分散は、分子的に親水性ポリマー内で分散される、“固溶体”の形で得られる。比較的に高水溶性のキャリアー内で溶解させた、低水溶性薬剤の固溶体は、経口バイオアベイラビリティを改善する一手段として、特に興味深い。固溶体の状態においては、薬剤の溶解速度はキャリアーの溶解速度によって決定されるために、薬剤の粒子サイズは、その分子の大きさに対して最小限に減らす必要がある。また、親水性のキャリアーは、薬剤粒子に対してより広範囲に浸潤性を与えることにより、この結果、低水溶性の薬剤に対して、溶解性および溶解速度を上げることになる。さらにその上、薬剤をアモルファスキャリアーと組み合わせることで、薬剤の結晶度合いを変化させることができる。ほとんどの場合において、薬剤は結晶の状態ではないが、アモルファス状態において、このような異なった固体の形状は、溶解性、バイオアベイラビリティ、安定性その他の薬剤の特性に影響を与えることになる。アモルファスの形状は、それに応じた結晶の状態と比較しても薬剤のより高い溶解能と迅速な溶解性につながる、これは、その高い内部エネルギーと大きな分子流動性のためである。低水溶性の結晶状態の薬剤は、アモルファス状態の時により高い溶解性を示す傾向がある。これは、溶解の過程において、結晶の格子をこわすためにエネルギーを必要としないからである。しかしながら、アモルファスの段階が結晶の状態と比べて準安定状態であるために、相変換（例えば結晶化など）が保管、貯蔵によって生じ、その結果、その薬剤の投与フォームにおいて使用が制限されるといういくつかのリスクも存在する。薬剤の分散を改善するための的確なキャリアーの選択が安定したアモルファスの形成につながるのである。

本研究

本研究では、かなり疎水的なクエルセチン (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)、これは、ポリフェノールフラボノイドであり、もっとも有名な食物性抗酸化物質の一つであるが、

この溶解速度を改善することに焦点を当てる。クエルセチンは、有用な化学的予防効果や抗増殖効果を有することも証明されており、乳癌、大腸癌、肺癌そして卵巣癌細胞の増殖を阻害することが示されている^{17,18}。この広い薬理学的特徴にも関わらず、医薬上の使用においては、その低水溶性のために限定されている。クエルセチンのバイオアベイラビリティは低いことが示され、その薬理学的な効果は、低溶解性と迅速な代謝のために制限されている。粒子サイズを減らすこと、ならびにアモルファスの状態を形成することにより、この問題を解決することができる。図 3a に示すように、我々の研究で使われたオリジナルのクエルセチンは、サイズや粒子において均一性がなく、30 から 35 μm の範囲であった。それゆえ、ナノ粒子化し、固体分散によってクエルセチンの溶解速度を向上させる必要があった。ナノ粒子を調製するために主に二つのアプローチが存在する。つまり、トップダウン（大きな粒子をナノスケールに壊すこと）とボトムアップ（ブロックを構成している分子スケールからナノ粒子を作ること）である。本研究において、ナノ粒子のクエルセチンは、ビーズミリング（ビーズを用いて細かく砕く）と高圧ホモジナイゼーションのトップダウン技術を用いて調製された。そして、ナノ懸濁液を蒸発させて沈殿物とするボトムアップ技術もまた、クエルセチンの固体分散を調製するために用いた。

ビーズミリング

ビーズミルは、部分的にビーズ（薄く、細かく破砕するメディア）で満たされ循環している容器から構成されている。ビーズと薬剤との激しい衝突のために生じる摩擦とせん断力がマイクロ粒子の薬剤をナノ粒子に破壊するのに十分なエネルギーを生み出す。クエルセチンの水溶性ナノ懸濁液は、サイズ 0.4 mm から 0.6mm の二酸化ジルコニウムのミリングビーズを固定化したイットリウムを用いて連続モードでビーズミル BühlerPML-2 (BühlerAG, Uzwil, スイス)を攪拌させることで調製した。Tween 80 (1% w/w)を用いて 60 分間安定化させた、5% (w/w) クエルセチンを含むクエルセチンの懸濁液をミリングした後得られたナノ粒子のクエルセチンのもっとも小さな平均粒子サイズは、図 3b に示すように 319nm であった¹⁹。理論に従い、ミル内のミリング溶媒のサイズを減らすことで、接触点の数が指数関数的に増え、その結果、摩擦や分散の作用が改善され、これにより小さな粒子となる。しかしながら、我々の研究においては、0.2mm と 0.4 mm から 0.6mm のサイズのミリングビーズを使って調製されたクエルセチンのナノ懸濁液の粒子サイズにおいて、大きな違いは見受けられなかった。0.4 mm から 0.6mm のサイズのミリングビーズを調製物から分離することは、0.2mm のサイズのものからよりも簡単であるために、0.4 mm から 0.6mm のサイズのミリングビーズは効率がよいことが判明した。ウェットミリングによるナノ粒子の薬剤の生産を行う技術を市場でリードしているのは、Elan 社の NanoCrystal[®]技術であり、これは、Liversidge らによって初めて開発された²⁰。2000 年に、米国 FDA は、溶解性を上げるために特にナノ技術を用いる最初の薬剤である Rapamune、ラパミューン (sirolimus、シロリムス)を承認した。

高圧ホモジナイゼーション

安定剤として Tween80 (1% w/w) を含む Milli-Q 水中のクエルセチン (5% w/w) のナノ懸濁液は、高圧ピストンギャップホモジナイザーを用いて、LAB40 (APV Deutschland GmbH, Unna, ドイツ) により調製された。1500 バール (20 サイクル) での高圧ホモジナイゼーションの前に、粒子の粗いクエルセチン懸濁液は、ホモジナイゼーションのギャップをふさぐことを避けるために特に大きな粒子を減らす目的で圧力を増加させ (300 バールで 2 サイクル、500 バールで 2 サイクル、1000 バールで 1 サイクル) プレミリング処理を行った。APVLAB40 内において、薬剤の懸濁液は、直径約 3cm のシリンダー内に入っており、高圧下 (1000 から 2000 バール) において、幅 25 μ m のホモジナイザー内のかかなり小さなホモジナイゼーションギャップを通り抜けることになるが、これはかなりの高流速となる。ベルヌーイの法則に従い、密閉されたシステムにおいて断面に対して液体の流量は一定であり、このことは、直径の減少が動圧力 (例えば、流入速度においても) におけるかなりの増加を、そして同時に懸濁液がホモジナイザーのギャップ内にあるとき、静圧力における減少を招くことを意味している。静圧力が水の蒸気圧を下回るとき、室温で沸騰が始まり、気泡の形成が始まる。そして、このことが、懸濁液がギャップに残り、再び通常の圧力下になる (空洞化現象) と内部破裂を引き起こすことになる。気泡の形成と内部破裂は、ショック波を引き起こし、その巨大な力は、乱流やせん断力を伴い、懸濁液中の粒子の減少を引き起こす⁹。クエルセチンの粒子サイズは、ホモジナイゼーションのサイクル数の増加と共に減少する。必要とされるホモジナイゼーションのサイクル数は、薬剤の硬度、出発物質の精製度、そして投与経路あるいは最終的な用量に関する要求度によって大きく影響を受ける。ナノ粒子のクエルセチンにおいては、20 サイクルが最適であると判明し、図 3c に示すように得られたもっとも小さな平均サイズは、338nm であった¹⁹。純粋中での粒子の高圧ピストンギャップホモジナイゼーションに関する技術は、Müller ら²¹ によって開発され、後に、SkyePharma 社によって確立され、DissoCubes™ の商標名をもつ。しかしながら、現在、この技術を基にした市場での製品は存在しない。

ナノ懸濁液の蒸発沈殿法 (EPN)

クエルセチンは、溶媒 (エタノール) に溶かし、ナノ懸濁液は、即座に貧溶媒 (ヘキサン) を加えることで調製した。ナノ懸濁液中のナノ粒子の薬剤は、循環式エバポレーターを用い、続いて、真空乾燥することによって迅速に溶媒と貧溶媒を蒸発させることで得られた。貧溶媒のタイプ、薬剤の濃度、そして、貧溶媒に対する溶媒の比率は、もっとも小さな粒子を得るために最適化された。粒子の形態やサイズは、使用する貧溶媒のタイプによって変化した。貧溶媒として水を用いると、粒子は大きく不規則な薄片のタイプとなった²²。しかしながら、ヘキサンを用いることで、粒子の形態は、より小さな粒子サイズでニードル状の鋭いものとなった。貧溶媒に対する溶媒の比率を上げ、溶媒中の薬剤の濃度を

下げると、より小さな粒子サイズになることが判明した。図 3d に示すように、薬剤の濃度 5mg/ml、貧溶媒に対する溶媒の比率が 1:25 (v/v)の結果、もっとも小さな粒子サイズ、739nm となった²²。今回 EPN によって調製されたサンプル内の残留溶媒 (エタノールとヘキサン)の量が、FDA により患者の安全性に対して決定される医薬品中の残留溶媒の許容レベルを下回っていたということは特筆すべきである。ヘキサンは、クラス 2 の溶媒であり、その量は、290ppm に制限され、エタノールはクラス 3 の溶媒であり、毒性の可能性は低く、最少量は、5000ppm である¹⁸。今回 EPN によって調製されたサンプルにおいては、ガスクロマトグラフィーの測定によりヘキサンは 125ppm 以下であり、エタノールは 20ppm 以下であった。このため、FDA の基準を満たしている。沈殿させる技術は、現在のところ、工業的スケールにおいてはナノ粒子の薬剤を調製するのに用いられていない。しかしながら、ナノ懸濁液の蒸発沈殿法は、シンプルでコスト的にも効果的な方法であり、さらなるラージスケールの調製にも応用することができる。

クエルセチンの固体分散

ポリビニルピロリドン(PVP)およびプルロニック F127 (F127)中のクエルセチンの固体分散もナノ懸濁液の蒸発沈殿法により調製された。クエルセチンとキャリアーの両方は、エタノールに溶解し、その後一般的な貧溶媒 (ヘキサン) を加え、迅速に蒸発と真空乾燥を行った。クエルセチンとキャリアーの比率は、1:1 (w/w)で行われた。エタノール中の 5mg/ml のクエルセチン濃度のヘキサンに対する比率は、1:25 で行われた²²。固体分散における薬剤の性質を調べるために X 線回折(XRD)を用いた。その結果、薬剤の結晶状態を示す回折ピークは完全に見られなかったことから、薬剤は、もはや結晶の状態で存在せずに、アモルファスの状態で存在することが示された。図 4 に示すように、オリジナルのクエルセチンでは、いくつかの回折ピークが現れ、その結晶状態の特性を示している。PVP は、顕著なピークのない回折スペクトルで示されるようにアモルファス状態である。一方、F127 は、準結晶状態であり、図 4 に見られるように、 $2\theta = 19.12^\circ$ と 23.27° において、二つのシャープな回折ピークを示す。クエルセチンのピークは、PVP および F127 における分散によって、存在しないことがクリアに観察された²²。これらの結果から、薬剤がアモルファスの状態で存在しているということに加え、薬剤は、ポリマーのマトリックス内において分子レベルで分散していることが示唆される。ポリマーあるいは高分子添加材の存在により沈殿における阻害効果を有することが示され、それゆえ、結果的に薬剤の結晶化を減少させることが示された。

新たな固体分散およびそれに関連する調製工程についての研究では、過去数十年の間、文献で広く報告されている。今日、数多くの固体分散による以下の製品が市場で販売されている。Kaletra[®]および Norvir[®] (Abbott)、Nimotop[®] (Bayer)、Gris-PEG[®] (Pedinol)、Cesamet[®] (Meda Pharms)、Intelence[®] (Tibotec)、Certican[®]あるいは、Zortress[®] (Novartis)、Isoptin SR-E[®] (Abbott)、Crestor[®] (Astrazeneca)、Nivadil[®]および Prograf

® (Astellas Pharma, inc.)、Rezulin® (Pfizer)、Sporanox® (Janssen Pharmaceutic)、そして、Toramat®、Vociflon®、Montelukast®、Palibone®、Iasibon®、Razilan®、Ostiral® (これらはすべて Pharmathen S.A.から)などである。

溶解性の研究

溶解性テストは、Pharmatest PTW SIII (Pharma Test、ドイツ)に USP II 回転パドル装置を伴い、DI 水 900ml 中で 37°C、100rpm のスピードで回転させながら行った。5mg のクエルセチンを含むクエルセチンサンプルは、溶出溶媒中で分散させた。ある時間ポイントでサンプルを溶出チャンバーから取り出して、フィルターを通し、高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。それぞれのサンプルに対する溶解性テストは 3 回行われ、溶解性のデータは、平均で示した。図 5 の溶解性プロファイルに示すように、オリジナルのクエルセチンは、約 8%のみが 60 分以内に溶解し、かなり溶解速度が遅いことを示している。一方、調製されたすべての薬剤は、溶解速度においてかなりの増加を示した。溶解速度におけるもっとも大きな増加は、固体分散のシステムによって示された。この理由として、分子レベルまで粒子サイズを小さくしたことあるいは、アモルファス状態を生み出したこと（上記、XRD の実験によって示すように）が考えられる。ナノ粒子のクエルセチンは、その粒子サイズの減少とともに、以下の順で溶解速度が増加した。つまり、ナノ懸濁液の蒸発沈殿法 < 高圧ホモジナイゼーション ≤ ビーズミリングの順であり、高圧ホモジナイゼーションとビーズミリングによって調製されたナノ粒子のクエルセチンの溶解プロファイルにおいては、有意な差はなかった。要するに、クエルセチンのナノサイズ化およびアモルファス化は、その溶解速度をかなり増加させるということである。結果として、調製されたナノ粒子のクエルセチンおよび固体分散は、オリジナルの薬剤粉末よりも良好なバイオアベイラビリティを示すことが予想される。

結論

平均粒子サイズを見ると、ビーズミリングは、もっとも小さな粒子サイズを生み出し、その次に、高圧ホモジナイゼーション、そして、ナノ懸濁液の蒸発沈殿法という順番になる。3 つの調製法を比較すると、それぞれの技術には、利点および、不利な点がある。ビーズミリングには、ナノ粒子の薬剤からミリングマテリアルを分離する手順に関わるコストおよび時間が増えるということ、さらに、ミリングマテリアルからの侵食が調製物にコンタミネーションを引き起こすことにつながるという不利な点がある。高圧ホモジナイゼーションは、強烈なエネルギーの工程が存在し、このような高圧の適用は、ラージスケールでの医薬品を調製する際に影響を与えることになる。さらに、懸濁液がこれら手法によって調製される際には、経口剤用の粉末形態を得るために、さらなる乾燥の工程が必要となる。しかしながら、これら手法には、水だけでなく有機溶剤に対しても低溶解性の薬剤が容易にナノ粒子化した懸濁液として調整できるという利点がある。一方、ナノ懸濁液の蒸

留沈殿法は、比較的コスト的にも効率がよく、低いエネルギーでシンプルな工程で、さらなる工程を必要としない。しかしながら、薬剤を有機溶媒に溶かす必要があり、貧溶媒と混合する必要もある。PVP および F127 におけるクエルセチンの固体分散もまた、ナノ懸濁液の蒸留沈殿法により調製された。固体分散は、もう一つの優れた手法であり、良好な結果を示しているが、調製物に対しての長期間の安定性に関する問題も存在する。

将来的に、ラージスケールでナノ粒子の薬剤を生産するためのボトムアップ沈殿技術の開発やミリングおよび、ホモジナイゼーションの技術におけるさらなる改良に対する数多くの可能性が存在する。固体分散は、確約されたアプローチであり、すでにかなり一般的におこなわれている。界面活性剤をキャリアマトリックスに加えることができ、このため、キャリア内において薬剤の良好な分散や優れた安定性のために、三次元の分散を行うことができるのである。

本文以上

<図表の説明>

図 1 粒子サイズを小さくすることは、表面積の指数関数的増加となる。

図 2 粒子サイズを小さくすることにより、生体表面により多く付着することになる。

図 3 各手法によりクエルセチンの粒子サイズが明瞭に小さくなる状態を示した電子顕微鏡写真。(a)オリジナルのクエルセチン、および、それぞれ(b)ビーズミリング、(c)高圧ホモジナイゼーション、(d)ナノ懸濁液の蒸発沈殿法により調製されたナノ粒子のクエルセチン。

図 4 オリジナルのクエルセチン、PVP、F127、1:1 の比率で分散させたクエルセチン-PVP およびクエルセチン-F127 の X 線回折の結果。

図 5 オリジナルのクエルセチン、ビーズミリング、高圧ホモジナイゼーション、そしてナノ懸濁液の蒸発沈殿法で調製されたナノ粒子のクエルセチン、そして、1:1 の比率で分散させたクエルセチン-PVP およびクエルセチン-F127 の溶解プロファイル。