



液液相分離により形成される薬物濃縮相物性が 薬物膜透過性に及ぼす影響の μ FLUX を用いた解析

千葉大学大学院 薬学研究院製剤工学研究室 助教 / 博士(薬科学) 植田 圭祐先生

【研究背景と目的】

薬物の溶解特性を改善する目的で、固体分散体制剤をはじめとした過飽和製剤が広く活用されている。消化管における薬物過飽和形成は、受動拡散による薬物吸収量を増加させ、難水溶性薬物の消化管吸収性改善に寄与する。一方、バルク水相において到達可能な薬物の最大過飽和度には熱力学的な限界値があり、この値を超えると薬物はバルクの水中に均一に溶解することができず、水相から薬物濃縮相として相分離する。これは、液-液相分離(LLPS)またはガラス-液相分離(GLPS)と呼ばれ、LLPS 及び GLPS が起こる濃度は薬物の非晶質溶解度を反映する。LLPS により形成された薬物濃縮相は、バルクの水中に溶解した薬物とは異なり受動拡散により膜を透過できないため、薬物の受動拡散改善は、薬物の非晶質溶解度で頭打ちになると推測される。しかし、動物実験による過飽和製剤の経口投与試験から、薬物濃縮相の形成は薬物吸収性を更に改善することが示されており、薬物濃縮相はバルクの水中における過飽和形成以外の機構で吸収改善に寄与すると考えられる。

薬物濃縮相形成による薬物吸収性改善のメカニズムについては、様々な議論がなされている。その一つとして、薬物濃縮相のリザーバー効果が挙げられる。薬物濃縮相が存在することで、溶解薬物が膜を介して吸収された際、薬物濃縮相から薬物が供給され、バルク中の薬物濃度が非晶質溶解度で維持され、吸収改善に寄与する。加えて、薬

物濃縮相液滴の非攪拌水相(UWL)中の拡散も吸収性改善に寄与することが報告されている。UWL は消化管上皮細胞近傍に存在する流動性の低い微小環境を指し、特に消化管壁での薬物吸収速度が極めて速い疎水性薬物は、UWL 中の拡散が吸収の律速段階となる。薬物濃縮相が UWL 中を拡散することで UWL 中の薬物濃度を上昇させ、吸収性改善に寄与すると考えられている。

一方、薬物濃縮相物性がこれら薬物吸収性改善能に及ぼす影響については未だ不明瞭な点が多く、十分な評価が行われていない。そこで本研究では、薬物の過飽和溶解量及び薬物濃縮相物性が消化管吸収性に及ぼす影響を解明する目的で、粒子物性が異なる薬物濃縮相を形成した過飽和製剤からの吸収性を Pion 社の μ Flux により評価した。

【実験】

難水溶性モデル薬物として cilnidipine (CND)、製剤添加剤として Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate (HPMC-AS) の AS-HF 及び AS-LF グレードを用いた。AS-LF 及び AS-HF を 3 mg/mL で緩衝液中に溶解させ、各 HPMC-AS 溶液を調製した。CND を methanol に溶解させた CND stock 溶液を各 HPMC-AS 溶液に加え、CND 過飽和溶液を得た。

【結果・考察】

表 1 に各 HPMC-AS 溶液中における CND 非晶質溶解度を示す。CND 非晶質溶解度の



値は HPMC-AS を含まない溶液中において約 1.1 $\mu\text{g/mL}$ となり、AS-LF 共存時にも同等の値を示した。一方、AS-HF 溶液中における CND 非晶質溶解度の値は 0.56 $\mu\text{g/mL}$ となり、HPMC-AS を含まない溶液と比較して約半分の値まで低下した。過去の報告において、薬物濃縮相中に HPMC-AS などのポリマーが分配することで薬物濃縮相中の薬物の化学ポテンシャルが低下し、平衡状態にあるバルクの水中における薬物濃度、すなわち非晶質溶解度が低下することが示されている。以上の結果から、AS-HF が水相から CND 濃縮相中に分配し、CND 非晶質溶解度が低下したことが示唆された。

図 1 には仕込み CND 濃度 1000 $\mu\text{g/mL}$ で調製した各 CND 過飽和溶液の外観写真を示す。すべての溶液で白濁した外観が観察され、各 CND 過飽和溶液中において粒子の形成が認められた。AS-HF 溶液中で調製した CND 過飽和溶液は青みがかかった色を示し、より小さなサイズの粒子形成が示唆された。動的光散乱法を用いた粒子径分布測定を行った結果、HPMC-AS を含まない溶液中においては μm オーダーの粒子の形成が認められた一方、AS-LF 溶液中では約 450 nm、AS-HF 溶液中では約 90 nm のナノ粒子

の形成が認められた。各 CND 過飽和溶液中にて形成された粒子について偏光顕微鏡観察を行った結果、結晶性を示さない非晶性液滴の形成が認められた。CND の非晶質溶解度はいずれの溶液中においても 1.1 $\mu\text{g/mL}$ 以下であり、仕込み CND 濃度である 1000 $\mu\text{g/mL}$ は十分に CND の非晶質溶解度を超えている。以上の結果より、CND 仕込み濃度 1000 $\mu\text{g/mL}$ で調製した各 CND 過飽和溶液では、LLPS により CND 濃縮相が形成されていることが示された。

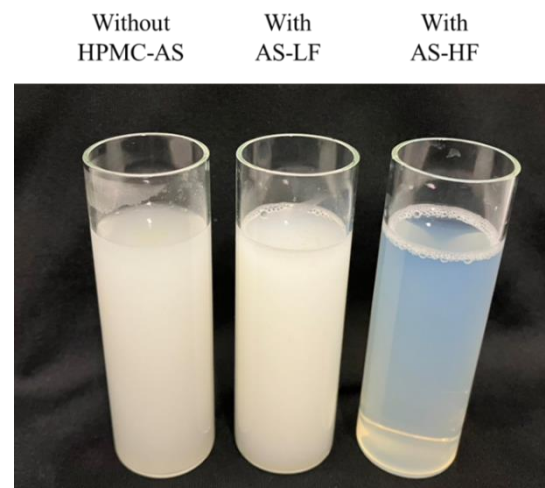


図 1. Appearance of CND-supersaturated solution without HPMC-AS, with AS-LF (3 mg/mL), and with AS-HF (3 mg/mL).

表 1. Amorphous solubilities of CND in non-polymer solution, AS-LF solution (3 mg/mL), and AS-HF solution (3 mg/mL) at 37°C (n = 3, mean \pm S.D.).

	Non-polymer solution	AS-LF solution (3 mg/mL)	AS-HF solution (3 mg/mL)
Amorphous solubility of CND ($\mu\text{g/mL}$)	1.08 \pm 0.03	1.06 \pm 0.01	0.56 \pm 0.01



各CND過飽和溶液からのCND膜透過性を評価する目的で、 μ FluxによるCND透過試験を行った。図2にはCND仕込み濃度1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各試料をドナー側に投入後、経過時間ごとにアクセプター側のCND濃度を測定した結果を示す。いずれの試料においても初期のラグタイムの後、直線的なCNDの透過が認められた。HPMC-ASを含まない溶液中と比較してHPMC-ASを添加した試料ではCND透過量の改善が認められ、特にAS-HF溶液中において顕著な透過量向上が認められた。

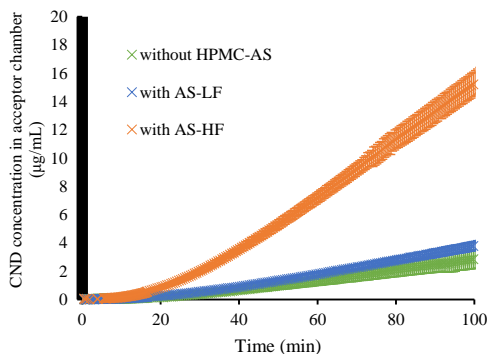


図2. CND concentration in acceptor solution after administration of CND-supersaturated solution without HPMC-AS, with AS-LF (3 mg/mL), and with AS-HF (3 mg/mL) (n = 3, mean \pm S.D.).

CND濃度依存的な膜透過速度変化を評価する目的で、各種CND仕込み濃度でCND過飽和溶液を調製し、 μ FluxによるCND透過試験を行い、CND膜透過速度(Flux)を算出した。各試験より得られたCNDのFluxをCND仕込み濃度に対してプロットした結果を図3に示す。CND仕込み濃度が低い領域(1.0–5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)においては、いずれの溶液においてもCND仕込み濃度に依存してFluxが直線的に増加した。また、HPMC-AS

を含まない溶液及びAS-LF溶液においてCNDは同程度のFluxを示した一方、AS-HF溶液中ではFluxが小さい値となった。CND仕込み濃度5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度領域では、HPMC-ASを含まない溶液中におけるCND仕込み濃度依存的なFluxの増加率が顕著に低下した。AS-LF溶液中においてもCND仕込み濃度の増加に伴うFlux増加率はCND高濃度領域で低下したものの、HPMC-ASを含まない溶液と比較してFluxの増加率は大きくなった。その結果、CND仕込み濃度5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度領域においてHPMC-ASを含まない溶液と比較してAS-LF溶液からのFluxがより大きい値となった。更に、AS-HF溶液中ではCND仕込み濃度5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度領域におけるFluxの増加率がHPMC-ASを含まない溶液及びAS-LF溶液と比較して顕著に大きくなった。その結果、CND高濃度領域においてAS-HF溶液からのCND透過量が有意に高い値を示した。

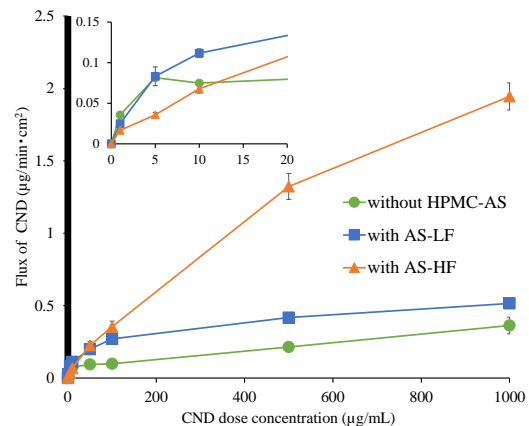


図3. Mass flow rate of CND across PAMPA membrane with each CND-supersaturated solution prepared with various CND dose concentration at 37°C (n = 3, mean \pm S.D.). Enlarged profiles at the lower CND dose concentration range are represented in figure.



PAMPA において、薬物の Flux は脂質膜のドナー及びアクセプター溶液に存在する UWL 中の拡散性並びに脂質膜への分配特性によって変化することが知られている。CND は疎水性が高く PAMPA 膜への親和性が高いため、膜近傍における CND 移行速度は極めて速い。そのため、UWL 中における CND の拡散性が吸収の律速段階となると推察される。図 4 には μ Flux より得られた結果をもとに考察したドナー溶液における UWL 中の CND 濃度分布の模式図を示す。上述したように CND のような疎水性薬物では、薬物膜移行速度が UWL 中の CND の拡散速度よりも十分に早いため、UWL 中において CND の濃度勾配が生じ、バルクの水中に溶解した CND 濃度と比較して膜近傍の CND 濃度は低下する。ドナー側の溶液に薬物濃縮相が分散している場合、薬物濃縮相は UWL 中を拡散することで UWL 中の濃度勾配を減少させ、PAMPA における薬物の Flux を向上させる。一方、溶解状態の薬物と比較して、コロイド状の薬物濃縮相の拡散性は低いため、薬物仕込み濃度が非晶質溶解度に近い領域、すなわち溶解薬物濃度に対する薬物濃縮相の量が比較的少ない環境では、PAMPA の膜透過性は溶解薬物量により強く依存すると考えられる。本研究においても CND 仕込み濃度 1.0-5.0 $\mu\text{g/mL}$ では、AS-HF 溶液からの CND の Flux の値が、HPMC-AS を含まない溶液及び AS-LF 溶液と比較して半分程度の値を示した。AS-HF 溶液中では他二つの試料と比較して CND 非晶質溶解度が半分程度であることノサイズ化された CND 濃縮相が UWL 中を効果的に拡散し、PAMPA 膜近傍の CND 濃

が示されている(表 1)。その結果、PAMPA 膜近傍において溶解した CND 濃度が低下し、CND の Flux が AS-HF 溶液中で減少したと考察した(図 4 左)。

CND の非晶質溶解度以上の CND 仕込み濃度領域では、CND 仕込み濃度を増加させてもバルクの水中に溶解した CND 濃度は CND 非晶質溶解度で頭打ちになる。一方、CND 結晶化が起こらない限りは、CND 仕込み濃度の増加に伴い CND 濃縮相の量が増加する。CND 濃縮相の量が増大することで、CND 濃縮相の膜透過への寄与が大きくなると考えられる。 μ Flux 試験の結果より、CND 仕込み濃度 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度領域における CND の Flux の増加率は、特に AS-HF 溶液中において大きいことが認められている。その結果、CND 仕込み濃度が高い領域では、Flux の序列は AS-HF 溶液 > AS-LF 溶液 > HPMC-AS を含まない溶液となった。一般的にコロイド粒子の拡散性は粒子径が小さくなるほど大きくなる。各 CND 過飽和溶液中において形成される CND 濃縮相の大きさは HPMC-AS の共存によりナノサイズで維持されることが認められており、特に AS-HF 溶液中では数十 nm の CND 濃縮相形成が認められている。各溶液における CND 濃縮相のサイズより、UWL 中の CND 濃縮相の拡散性は HPMC-AS を含まない溶液 < AS-LF 溶液 < AS-HF 溶液の順に大きくなると考えられる。CND 仕込み濃度が高い領域において、HPMC-AS を含まない溶液と比較して AS-LF 溶液中において Flux が上昇した結果は、AS-LF 溶液中においてナ度を上昇させたことが原因であると考えられた(図 4 右)。加えて、CND 濃縮相の UWL



中の拡散による Flux 向上効果は、数十 nm の CND 濃縮相が形成された AS-HF 溶液中で特に強く、CND 非晶質溶解度の低下による膜透過量減少の影響を打ち消し、CND 高濃度領域において AS-HF 溶液からの Flux が顕著に改善したと考察した。

【結論】
μFlux を用いた薬物透過試験により LLPS により形成される薬物濃縮相のサイズが薬物の膜透過性へ与える影響を定量的に明らかとすることが可能であることが示された。本研究より、ナノサイズの薬物濃縮相を形成しうる過飽和製剤をより高濃度で投与することで、過飽和溶解量の向上による吸収性改善以上の薬物吸収改善が期待できることが示された。

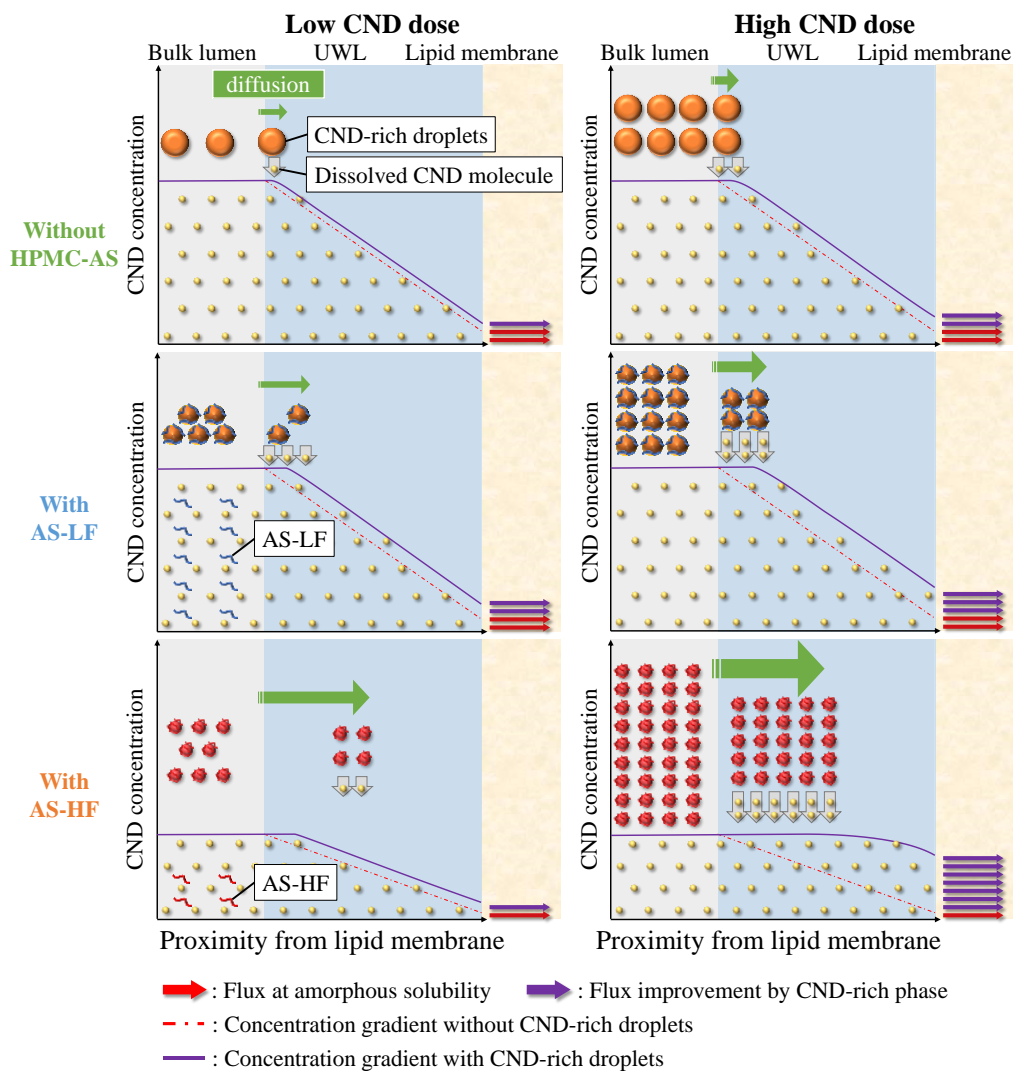


図 4. Speculated mechanism of flux improvement of CND by the formation of CND-rich phase in the bulk water phase.