

非晶質固体粒子が関与する難水溶性化合物の新規生体膜透過現象の発見

2019

木村 峻輔

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

1. **Shunsuke Kimura**, Sachih Kasatani, Megumi Tanaka, Kaeko Araki, Masakazu Enomura, Kei Moriyama, Daisuke Inoue, Tomoyuki Furubayashi, Akiko Tanaka, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Toshiyasu Sakane and Akira Yamamoto.
Importance of the direct contact of amorphous solid particles with the surface of monolayers for the transepithelial permeation of curcumin., *Mol. Pharm.*, **13**, 493-499 (2016).
2. **Shunsuke Kimura**, Akiko Kiriyama, Kaeko Araki, Mai Yoshizumi, Masakazu Enomura, Daisuke Inoue, Tomoyuki Furubayashi, Reiko Yutani, Reiko Teraoka, Akiko Tanaka, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto, Katsumi Iga and Toshiyasu Sakane.
Novel strategy for improving the bioavailability of curcumin based on a new membrane transport mechanism that directly involves solid particles., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **122**, 1-5 (2018).
3. **Shunsuke Kimura**, Akiko Kiriyama, Erika Nishimura, Shiori Sakata, Daisuke Inoue, Tomoyuki Furubayashi, Reiko Yutani, Akiko Tanaka, Kosuke Kusamori, Hidemasa Katsumi, Katsumi Iga, Akira Yamamoto and Toshiyasu Sakane.
Novel strategy for the systemic delivery of furosemide based on a new drug transport mechanism., *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1769-1777 (2018).

目次

略語一覧	1
要旨	2
序論	5
本論	
第 1 章 非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構： 培養細胞層を用いた <i>in vitro</i> 透過性評価	
1-1 緒言	10
1-2 実験方法	12
1-2-1 実験材料	
1-2-2 非晶質ナノ粒子クルクミン (ANC) の作製	
1-2-3 再分散非晶質ナノ粒子 (disp ANC) の作製	
1-2-4 非晶質ナノ粒子の各種物性の評価	
1-2-5 溶解度の経時変化の測定	
1-2-6 <i>In vitro</i> CUR 細胞層透過性	
1-2-7 CUR の定量分析	
1-3 実験結果	15
1-3-1 各種 CUR 製剤の物理化学的特性	
1-3-2 各種製剤からの CUR 溶出特性	
1-3-3 各種製剤懸濁液からの CUR の <i>in vitro</i> 細胞層透過性	
1-4 考察	23
1-5 小括	26
第 2 章 非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構： 動物実験による <i>in vivo</i> 吸収性評価	
2-1 緒言	28
2-2 実験方法	28
2-2-1 実験材料	
2-2-2 ANC の作製	
2-2-3 CUR の <i>in vivo</i> 吸収性	
2-2-4 薬物動態学的パラメータの算出	
2-2-5 血漿中 CUR の定量分析	
2-3 実験結果	31
2-3-1 持続静脈内投与による CUR 体内動態の評価	

2-3-2	CUR の消化管吸収性	
2-3-3	CUR の経肺吸収性	
2-4	考察	35
2-5	小括	37
第 3 章 新規生体膜透過機構により輸送される薬物例：フロセミドに関する検討		
3-1	緒言	40
3-2	実験方法	41
3-2-1	実験材料	
3-2-2	FUR 非晶質製剤 (FUR-K12) の調製	
3-2-3	各製剤の物性評価	
3-2-4	溶解度の経時変化の測定	
3-2-5	<i>In vitro</i> 細胞層透過性の評価	
3-2-6	<i>In vitro</i> 人工膜透過性の評価	
3-2-7	脂質人工膜表面に存在する水分量の定性的評価	
3-2-8	<i>In vivo</i> 吸収性の評価	
3-2-9	薬物動態学的パラメータの算出	
3-2-10	FUR の定量分析	
3-3	実験結果	44
3-3-1	各製剤の物性評価	
3-3-2	FUR の <i>in vitro</i> 膜透過性	
3-3-3	FUR の <i>in vivo</i> 吸収性	
3-4	考察	51
3-5	小括	54
総括		55
引用文献		57
謝辞		63

略語一覽

AA	Antibiotic-antimycotic solution
AIC	Air-interface condition
ANC	Amorphous nanoparticles of curcumin
ASD	Amorphous solid dispersion
ATR	Attenuated total reflection
AUC	Area under the plasma concentration vs. time curve
BA	Bioavailability
BCS	Biopharmaceutics classification system
CC	Crystalline curcumin
CBZ	Carbamazepine
CUR	Curcumin
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSC	Differential scanning calorimetry
DTT	Dithiothreitol
FBS	Fetal bovine serum
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
FUR	Furosemide
HBSS	Hank's balanced salt solution
HTS	High-throughput screening
HPLC	High performance liquid chromatography
LCC	Liquid-covered condition
MDCK	Madin-Darby canine kidney
α -MEM	α -Minimum essential medium
MRT	Mean residence time
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Polydispersity index
PM	Physical mixture
PS	Pulmonary surfactant
PVP	Polyvinylpyrrolidone
TEER	Transepithelial electrical resistance
TEM	Transmission electron microscopy
XRPD	X-ray powder diffraction

要旨

1. 緒言

一般に、受動輸送に基づく化合物の生体膜透過は溶解した薬物の濃度に依存し、難水溶性薬物の消化管吸収を確保するためには、溶解性の改善が必須と考えられている。近年の新規医薬品候補化合物の多くは難水溶性であるため、その消化管吸収性を確保するために、難水溶性化合物の溶解性を改善する研究が活発に行われている。本研究では、難水溶性モデル化合物として汎用される curcumin (CUR) の吸収性改善を目的として、微粒子化と非晶質化の両者を実現した製剤を調製した。それらの影響を評価するために、種々の検討を行ったところ、CUR の非晶質固体粒子が直接関与する新規生体膜透過機構が存在する可能性を見出した。本透過機構の詳細を明らかにするために、細胞層を用いた CUR の *in vitro* 生体膜透過、*in vivo* における CUR の消化管吸収に関する詳細な検討を行った。さらに、透過機構の一般性を確認するために、同様の機構で膜透過する薬物として furosemide (FUR) に注目し、同様の検討を行った。

2. 非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構：培養細胞層を用いた *in vitro* 透過性評価

CUR の吸収性改善を目的として、マイクロリアクターによる晶析を行うことで、非晶質で、微粒子化された CUR 製剤 (amorphous nanoparticles of curcumin, ANC) を調製した。ANC からの CUR の溶出を評価したところ、CUR の溶解度は結晶性 CUR (crystalline curcumin, CC) に比べて、約 300 倍改善されることが明らかとなった。MDCK 細胞単層膜を用いて *in vitro* 細胞層透過性を評価したところ、ANC 飽和溶液からの細胞層透過量は定量限界以下であったが、ANC 懸濁液からの透過は顕著に増大した。さらに、透過量の増大は懸濁液濃度すなわち未溶解固体量に依存することが明らかとなった。懸濁液中の溶解した CUR 濃度は一定と考えられるため、本知見は従来の膜透過に関する概念と明らかに矛盾する。未溶解固体量に比例した透過が観察されたことから、CUR の細胞層透過に懸濁液中の固体粒子が関与する可能性が示された。その後、種々の検討・考察を行ったところ、未溶解固体粒子と細胞層との接触が重要である可能性が推察された。そこで CUR の透過の方向性を検討した。一般的な実験の透過方向（細胞層の上部から下部への方向、固体粒子と細胞層が接触可能）の透過は良好であったが、逆方向（細胞層の下部から上部への方向、固体粒子と細胞層は接触不可能）の透過量は低いことが明らかとなった。さらに、より効率的に固体粒子が細胞層表面と接触可能な実験系として、細胞層表面を空気に接触させた air-interface condition (AIC) 条件下で透過を測定した。CC、ANC を細胞層表面に噴霧したところ、ANC において最も高い透過量が得られた。また、一部結晶化した非晶質製剤を用いたところ、非晶質の程度に応じた CUR の透過が観察された。以上の知見より、新規生体膜透過機構に基づく CUR の膜透過は固体粒子と生体膜との接触を通じて起こり、結晶性固体に比べて、非晶質固体からの透過が優位であることが明らかとなった。

3. 非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構：動物実験による *in vivo* 吸収性評価

In vitro で観察された新規透過機構を CUR の吸収改善に応用するためには、*in vivo* 吸収性の評価が重要である。消化管や気道粘膜（鼻腔、肺）などの薬物投与粘膜の表面には粘液層が存在する。この粘液層が固体粒子との接触を阻害し、吸収改善が望めない可能性が懸念される。そこで、まず消化管粘膜表面の粘液層の影響を評価するために、予め粘液溶解剤（10mMDTT）により粘液層を除去した条件で CUR 消化管吸収性を評価した。粘液層の有無に関わらず、ANC 懸濁液投与後の CUR の消化管吸収性に顕著な相違は観察されず、表面粘液層の影響はきわめて小さいことが明らかとなった。次に、CUR の消化管吸収を系統的に評価した。CC 懸濁液を十二指腸内に投与した後の生物学的利用率（BA）は約 0.4% であり、過去の報告と同程度の低い値であった。次に、濃度の異なる 3 種類の ANC 懸濁液を投与したところ、CUR の血中薬物濃度-時間曲線下面積（AUC）は、懸濁液濃度すなわち未溶解の固体量に依存して増大した。本知見は、*in vitro* 細胞層透過実験の結果と一致しており、CUR の *in vivo* 消化管吸収においても、新規生体膜透過機構が機能することが明らかとなった。次に、固体粒子がより効率よく吸収粘膜表面と接触可能な投与部位として、肺に注目した。製剤粉末を肺内に噴霧することによって、多くの固体粒子が粘膜表面に到達し、接触が可能である。ANC の肺内噴霧投与後の AUC は消化管吸収と同様、固体量依存的に増大し、BA は CC 懸濁液からの消化管吸収性と比べて、約 100 倍に改善された。*In vivo* 実験を通じて得られた CUR の消化管吸収、経肺吸収に関する知見は、すべての ANC 固体粒子と粘膜表面との接触の量および程度と相関しており、新規生体膜透過機構に基づいて、CUR が吸収されることを示唆する結果と考えられる。本透過機構を上手く利用することで、簡便で効率的な CUR 吸収性改善が期待できることが明らかとなった。

4. 新規生体膜透過機構により輸送される薬物例：フロセミドに関する検討

これまでの検討では、CUR をモデルとして検討を行い、種々の興味深い知見を得ることができた。しかし、新規生体膜透過機構が CUR 固有の機構である場合、本透過機構の応用の可能性は限定的である。すなわち、応用を考える上で、本透過機構が CUR 以外の薬物でも観察される一般的な透過機構であるか否かを確認することはきわめて重要である。そこで、水溶性・膜透過性ともに低い薬物を中心に、検索・予備検討を行ったところ、furosemide (FUR) が候補薬物であることが示唆された。そこで、FUR を用いて、CUR と同様の検討を行った。FUR の非晶質製剤 (FUR-K12) は、非晶質安定化剤として高分子ポリマー (PVP-K12) と FUR 原末を混合し、ボール粉碎することにより調製した。*In vitro* MDCK 細胞層透過性実験の結果、FUR 溶液からの透過に比べて、AIC 条件下、FUR-K12 からの細胞層透過量が顕著に増大した。しかし、CUR の場合とは異なり、結晶性 FUR からも高い透過が観察された。FUR の溶解度が中性 pH 付近で良好であることから、膜近傍で固体が溶解することで、細胞層透過が促進された可能性が考えられた。そこで、水分の影響を排除可能な脂質人工膜 (20 w/v% レシチン含有ドデカン溶液) を用いて、同様の検討を行ったところ、細胞層透過と同様の結果が得られた。次に、FUR の *in vivo* 吸収性を検討した。*In vivo* 経肺吸収に関しては、CUR と同様、FUR-K12 からの吸収が良好であり、吸収率はほぼ 100% であることが明らかとなった。FUR に関する *in vitro* 膜透過特性や *in vivo* 吸収特性は CUR ほどクリアではないが、溶解した薬物濃度で膜透過性、吸収性の増大を定量的に説明することは不可能であり、FUR が新規膜透過機構に基づいて膜透過・吸収される可能性が示唆された。すなわち、本透過機構は CUR のみで観察される特殊な透過機構ではなく、ある条件を満たす薬物で観察される一般的な現象である可能性が示された。

5. 総括

本研究では、固体粒子が直接関与する CUR、FUR に関する新規生体膜透過機構を見出した。未溶解の非晶質固体に焦点を当てることによって見出された本生体膜透過機構は、溶解した薬物のみが吸収・膜透過に関与するという従来の理論とは本質的に異なり、膜透過に関する概念を拡張するものと期待される。低い溶解性と膜透過性を示す一部の薬物の吸収改善にきわめて有用な方法論となる可能性がある。本研究で得られた知見は次世代の医薬品開発に向けた重要な基礎的情報と考えられる。

序論

序論

主要国で上市されている経口投与医薬品を水への溶解性で分類した場合、約 40% が難水溶性を示すと報告されている¹⁾。1995 年、Amidon らは薬物の溶解性と膜透過性を指標に、医薬品を 4 つのクラスに分類する BCS (Biopharmaceutical classification system) を提唱した²⁾ (図 1)。現在、開発中の医薬品候補化合物の約 75% は BCS クラス 2 あるいはクラス 4 に分類される³⁾。つまり、医薬品候補化合物の 3/4 は難水溶性である。一般に、経口投与された固形製剤は消化管上部で崩壊し、溶解した後に吸収される。このため、経口固形製剤を開発する上では、溶解性が消化管吸収性に影響を及ぼす非常に重要な因子である。難水溶性薬物の十分な吸収量を確保するために、溶解性の改善が必要であり、このような状況を背景に、溶解性改善に関する知見は多くの研究者の関心を集めている。

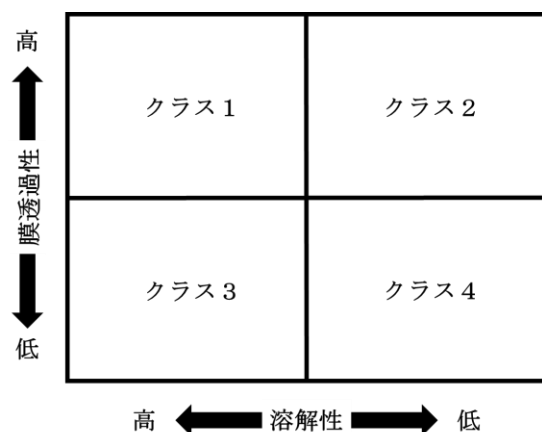


図 1 BCS について
溶解性と膜透過性を高低で 4 つのクラスに分類する考え方であり、経口吸収性を予測する上で現在の医薬品開発にも大きな影響を及ぼしている。

難水溶性の医薬品候補化合物が増加した理由の一つは、新規生理活性化合物をスクリーニングする創薬プロセスにあると推察される。現在の主流は、ハイスループットスクリーニング (HTS) である^{4,5)}。HTS は、膨大な化合物の収集保管に始まり、溶液ライブラリの作製、生化学的分析、結果解析を一連の流れとし、企業が保有する化合物ライブラリから、完全自動化されたプロセスによって、短時間で効率良く、薬理活性が強い化合物を探索することを可能にした。しかし、候補化合物がバーチャルに作製され、*in silico* 評価が行われていること、溶液ライブラリ作製時には保存性と溶解性を考慮して、有機溶媒 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) が汎用されていることから、薬理活性を評価する段階で高脂溶性化合物が選択されやすいことは必然である⁶⁾。つまり、医薬品開発の初期段階で、化合物の水への溶解性はほとんど考慮されていないのが現状である。

難水溶性の医薬品候補化合物は、製剤化プロセスにおいて、その溶解性の改善が検討される。難水溶性化合物に対する可溶化技術としては、可溶性塩の形成、結晶多形や共結晶などの晶癖の最適化、界面活性剤やシクロデキストリンなどの溶解補助剤、微粒子化、非晶質固体分散体、脂質複合体などの様々な方法が研究・開発されてきた⁷⁾。中でも、可溶性塩は、比較的合成が容易であること、コストが安いことなどの理由から、近年の医薬品開発において第一選択されるケースが目立っている。医薬品の多くが電解質であることから、対イオンを加えて、塩を形成させることで、溶解度もしくは溶出速度が改善される。原薬によって対イオンの種類は様々であり、酸性薬物に対しては、ナトリウム

やカリウム、塩基性薬物に対しては、塩酸やメタンサルホン酸（メシル酸）など、強酸、強塩基が対イオンとして、頻繁に選択される⁷⁾。一方、最近注目されている可溶化技術の一つとして、非晶質固体分散体（amorphous solid dispersion, ASD）が挙げられる⁸⁻¹⁰⁾。非晶質とは、分子配列が秩序を失った非平衡状態であり、熱力学的に不安定である。そのため、結晶よりも溶解時のエネルギー障壁が低く、飽和溶解度の増大が期待される。しかし、熱力学的に不安定で、結晶化が容易に起こるため、溶解度の増大は一過性である。過飽和状態を長く維持するために、固体分散体化が行われる。固体分散体とは、不活性な担体またはマトリックス中に活性成分を分散させたものである¹¹⁾。担体によっては、担体本来の役割に加えて、非晶質の安定化剤の役割も担うことから、非晶質状態の維持に有用であると考えられる¹²⁾。非晶質については、古くから知られていたものの、これまではその安定性に関する知見が乏しかったため、医薬品への応用は進展しなかった。しかし、分析技術の進歩によって、固体分散体の詳細な物理化学的評価が可能となり、近年、経口投与製剤へ応用されるケースが増加しつつある。Brough らの報告によると、2016 年以前に、米国で製造・承認された ASD 製剤は 24 種類あるが¹³⁾、臓器移植に不可欠な免疫抑制剤なども含まれており、可溶化技術が最先端医療にも大きく貢献している。

このような溶解性を改善する試みとは裏腹に、薬物の溶解性と膜透過性（吸収性）の関係については見直す動きがある。上述の 2 種類の可溶化技術（可溶性塩および ASD）に注目して、溶液中での分子の存在状態とその膜透過性について検討した報告がある。有機化合物の中には、両親媒性を示すものが数多く存在し、溶液中で分子同士が自己会合する場合があります。可溶性塩について幾つか報告がある¹⁴⁻¹⁶⁾。溶液中で自己会合した場合、見かけの分子量は増大すると考えられる。一般に、薬物の膜透過性が分子量に依存することはよく知られているが、自己会合による見かけの分子量の増大が膜透過性に及ぼす影響に関する報告はない。一方、ASD に関する研究では、溶液中の薬物分子の存在状態が膜透過性に影響を及ぼすことがすでに報告されている^{17, 18)}。Frank らは、ASD を用いた一連の研究を通じて、溶解度に関して 2 つの概念を提唱している。「見かけの溶解度」と「分子溶解度」である。膜透過速度と直接関係があるのは「分子溶解度」であり、「見かけの溶解度」の増大では、膜透過速度は改善されないことを明らかにした。また、Ueda らは、carbamazepine (CBZ) の ASD 製剤、溶解補助剤として界面活性剤を利用した溶液製剤を用いて、CBZ の膜透過性評価を行った。その結果、CBZ の溶解度と CBZ の膜透過性は相関せず、溶液中の CBZ 分子の存在状態がその膜透過性に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの報告は、難水溶性薬物の膜透過性を改善するためには、溶解度だけではなく、溶液中の薬物分子の存在状態も重要であることを示唆している（図 2）。

本研究では、難水溶性モデル薬物として curcumin (CUR) を選択し、その吸収改善を図ることを目的に、新規方法でその非晶質製剤を作製した。本製剤の有用性を *in vitro* 細胞層透過実験を用いて検証する過程で、水への溶解に依存しない CUR の未溶解非晶質固体粒子が関与するメカニズムが明らかとなった。*In vitro* 細胞層透過実験を中心に、その機構を明らかにした後、*in vivo* 動物実験においても、同様のメカニズムで CUR が吸収されることを確認した。さらに、本透過機構が CUR 特有の機構ではなく、furosemide (FUR) も本透過機構により、膜透過及び吸収される可能性を見出した。

以下、得られた知見を 3 章にわたり論述する。

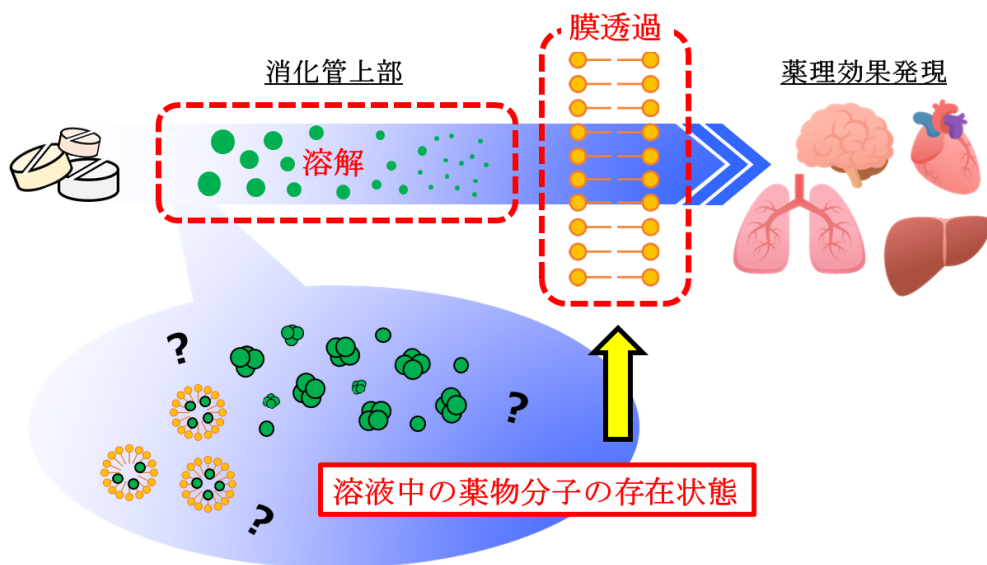


図2 経口医薬品の溶解性と吸収性の関係

難水溶医薬品の溶解性を改善しても、膜透過性が改善されない場合もあり、溶液中の薬物分子の存在状態により、膜透過性が影響を受ける可能性が示唆される。

第 1 章

非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構：

培養細胞層を用いた *in vitro* 透過性評価

第 1 章 非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構： 培養細胞層を用いた *in vitro* 透過性評価

1-1 緒言

ウコンの根茎に含まれる CUR は、抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌作用、抗癌作用、抗糖尿病及び抗高血圧などの多様な薬理効果を示すことがすでに報告されており、医薬品候補化合物として様々な研究開発が行われている^{19,20}。しかし、現在に至るまで医薬品として承認されていない。経口投与製剤化する場合、低い bioavailability (BA) が最大の問題点であると考えられる²¹。CUR の BA が低い理由として、溶解性及び膜透過性が低いことが挙げられる。CUR の BA 改善に関連する研究では溶解性に着目しているケースが多い。CUR の溶解度に関しては、Tonnesen らが 11 ng/mL であることをすでに報告しているが²²、これほど低い溶解度を示す有機化合物も稀である。したがって、他の難水溶性薬物に対する戦略と同様、吸収性改善を目的とする多くの研究で、CUR の溶解性改善が検討されてきた。CUR の非晶質化に関連する研究はすでに多数報告されている。Onoue らは、高分子ヒプロメロース酢酸エステルコハク酸エステルを担体として、凍結乾燥法により ASD を作製した。その結果、結晶性 CUR と比較して、ASD で調製した CUR の溶解速度は約 5.9 倍、BA は約 11.9 倍増大することを明らかにした²³。また、Seo らは、界面活性剤の一種である Solutol® HS15 を担体として、溶媒溜去法により、ASD を作製した。緩衝液中での溶出率は 90% を超え、経口投与後の相対的 BA は約 5 倍増大した²⁴。また、別の担体を用いた検討も幾つか報告されているが、いずれも溶解改善により、吸収性が改善されたと結論付けている²⁵⁻²⁷。

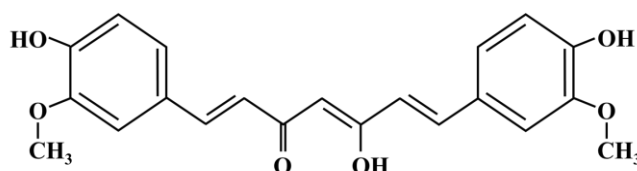


図 3 CUR の化学構造式

CUR は溶解性および膜透過性が低い BCS クラス 4 に分類される化合物である²⁸⁻³¹。同クラスに分類される薬物に関しては、本来、溶解性改善のみに着目しても、BA 改善は期待出来ない。しかし、CUR に関連する多くの研究では溶解性に着目した BA 改善が検討されており、溶解性改善による一定の効果が明らかとなっている。実際に、溶解度が極端に低く、膜透過性も低い薬物では、溶解度が吸収の律速になるケースも多い。しかし、溶解性改善のみでは限界があることは言うまでもなく、BA の改善には膜透過性の改善が必要である。CUR の膜透過性に関しては、Caco-2 細胞を用いた検討が報告されている。Wahlang らは、細胞障害性を惹起しない濃度のメタノールで可溶化した CUR 溶液を用いて、CUR の見かけの膜透過係数 (P_{app}) を測定し、 P_{app} が $2.9 \pm 0.9 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$ を示すことを報告している³⁰。膜透過性が低い理由として、中性緩衝液中での低い物理化学的安定性や細胞内蓄積によるものと考察されている。特に、緩衝液中での安定性に関しては、3 時間で約 65% が分解されることを明らかにした。また、Zeng らは、添加剤を含まない CUR 溶液を用いた検討において、

P_{app} が $1.1 \pm 0.1 (\times 10^{-6} \text{ cm/sec})$ であること、安定性が改善された CUR 誘導体との比較により、膜透過性が中性緩衝液中での安定性に影響されることを明らかにした³²⁾。しかし、安定性が同等である 2 種類の誘導体間で、膜透過性が異なったことから、安定性以外にも、膜透過性が低い理由があることが示唆される。一般に、 P_{app} が $1 (\text{cm/hr}) \doteq 2.8 \times 10^{-4} (\text{cm/sec})$ 以上の医薬品が良好な BA ($\geq 95\%$) を示すことから²⁾、単純な比較は出来ないが、CUR の膜透過性は非常に低く、溶解性改善による膜透過性改善は高くても数倍程度であると予想される。

本研究では、エム・テック社が開発した強制薄膜式マイクロリアクター (ULREA[®]) と貧溶媒添加法 (溶媒法) を組み合わせて、非晶質ナノ粒子製剤を作製した (図 4)。マイクロリアクターとは、マイクロまたはミリメートルサイズの反応場に連続流路を設けた装置であり、近年では有機反応、無機反応や晶析、微粒子生成など様々な用途に応用されている³³⁾。溶媒法とは、化合物試料を溶解度が高い溶媒 (良溶媒) に溶解させて、溶解度の低い溶媒 (貧溶媒) と混合することによって、瞬間的に粒子の生成が起こるボトムアップ式晶析方法の一つである³⁴⁾。同時に、非晶質製剤を作製する方法の一つとしても知られている。図 4B に示す通り、ULREA[®] 反応部では、2 枚のセラミック製ディスク間に厚みが $1 \sim 30 \mu\text{m}$ 程度の狭小空間が形成され、ディスク間の間隙は空気圧により制御される。この狭小空間で溶媒 A と溶媒 B (良溶媒と貧溶媒) が瞬時に混合されることによって、粒子の析出が起こる。2 枚のうちの一方のディスクを回転することによって、2 液が短時間で、より効率良く混合される。混合液はディスク外縁部から流出するため、連続運転が可能である。析出した微粒子を懸濁液として回収し、適切な乾燥工程を経て、目的の粉末を得る。

本章では、マイクロリアクターと溶媒法を組み合わせて作製した非晶質製剤を用いて、CUR の膜透過に関して様々な評価を行った。

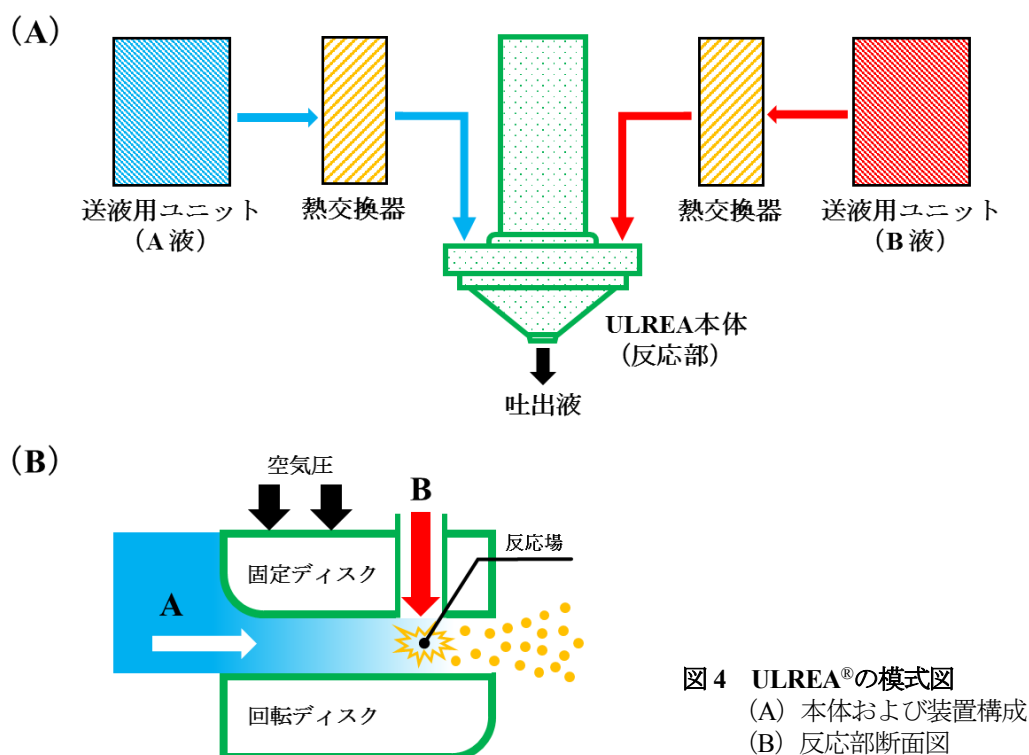


図 4 ULREA[®]の模式図
(A) 本体および装置構成
(B) 反応部断面図

1-2 実験方法

1-2-1 実験材料

Curcumin (CUR) 及び酢酸は和光純薬工業株式会社 (現: 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪) より購入した。なお、CUR 原末は、結晶性の固体であることを確認しており、CC と略記する。Polyvinylpyrrolidone (Kollidon® 12PF) は BASF 社 (Ludwigshafen, Germany) より購入した。MDCK 細胞 (ECACC85011435) は DS ファーマバイオメディカル株式会社 (大阪) より購入した。 α -MEM、Antibiotic-antimycotic solution (AA)、Trypsin / EDTA solution (try-EDTA)、Phosphate buffered saline (-) (PBS) 及び Hank's balanced salt solution (HBSS) はナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は Thermo Scientific 社 (東京) より購入した。細胞透過実験用 Transwell® は Corning 社 (NY, U.S.A.) より購入した。

1-2-2 非晶質ナノ粒子クルクミン (ANC) の作製

最終濃度が 0.5 w/v% となるように、CUR 及び Kollidon 12PF をエタノールに添加し、精密分散・乳化機 CLEARMIX® (M TECHNIQUE, 大阪) を用いて、30°C 及び 4,500 rpm で約 30 分間混合・溶解した。次に、エタノール溶液を強制薄膜式マイクロリアクター ULREA® (MTECHNIQUE, 大阪) を用いて、蒸留水 (貧溶媒) と混合することにより、CUR 微粒子を析出させた。微粒子を含む懸濁液は、遠心分離機 KUBOTA 7780 II (久保田製作所, 東京) を用いて、一定条件 (5°C, 10,800 g) で 5 分間遠心した。遠心後、上清を取り除き、蒸留水を加えた。沈殿している微粒子を超音波洗浄機で再分散させ、同じ条件で再度遠心分離を行った。この遠心分離・再分散工程を 3 回繰り返した。蒸留水にて超音波処理後の分散液を予備凍結し、凍結乾燥することにより粉末を回収した。

1-2-3 再分散非晶質ナノ粒子 (disp ANC) の作製

上記の方法で作製した ANC を HBSS (pH 6.5) 中に再分散し、ANC 懸濁液を作製した。その懸濁液を一定時間 (1, 6, 12, 24 hr) インキュベートした後、未溶解固体粒子を回収し、それぞれ真空乾燥した。

1-2-4 非晶質ナノ粒子の各種物性の評価

1-2-4-1 X 線粉末回折測定 (XRPD)

XRPD は、X 線回折装置 X'Pert PRO MPD diffractor (PANalytical Japan, 東京) を用いて行った。X 線源は Cu K α ($\lambda = 1.5404 \text{ \AA}$) を用い、管電圧及び管電流はそれぞれ 45 kV、40 mA にて測定した。データは走査角 (2θ) として 5-60° まで、0.016° 間隔、走査速度 6°/min にて取得した。測定試料は適量の各粉末試料を無反射試料ホルダーにのせて平に成形したものを測定した。

1-2-4-2 粒子径測定

粒子径は、Nanotracer UPA-UT151 (MicroBEL Corp., 大阪) を用いて、動的光散乱法 (DLS) によって測定した。懸濁液試料は粉末試料を 0.1 w/v% ドデシル硫酸ナトリウム溶液に分散させ、UP200S (Hielscher USA, Inc., Ringwood, NJ, U.S.A.) により超音波処理することにより作製した。780 nm ダイオードレーザーを光源に用いて、入射-散乱光の角度 180° の後方散乱検出によりデータを取得した。

1-2-4-3 示差走査熱量測定 (DSC)

DSC は、DSC-60 (島津製作所, 京都) を用いて行った。粉末試料約 5 mg をアルミニウムパンに封入し、30 mL/min の窒素パージ下、昇温速度 10°C/min で、30°C から 250°C まで測定した。

1-2-4-4 透過型電子顕微鏡 (TEM)

粒子形態の観察は、透過型電子顕微鏡 JEM-2100 (日本電子株式会社, 東京) を用いて行った。加速電圧は 80 kV で行った。測定試料として、粒子径測定用に作製した粒子懸濁液を利用し、適量をメッシュに滴下し、25°C で乾燥させたコロジオン膜を用いた。

1-2-4-5 赤外線分光分析 (FT-IR)

赤外吸収スペクトルは、赤外分光光度計 FT/IR-4100 (日本分光株式会社, 東京) を用い、全反射測定法 (ATR) 法により測定した。各サンプルを結晶窓上に置き、圧力クランプにより圧縮し、測定サンプルとした。各データは、分解能 4 cm⁻¹、積算回数 1280 回、測定範囲 400 - 4000 cm⁻¹ で取得した。

1-2-4-6 ラマン分光分析とイメージング

ラマンスペクトルの測定及びイメージングは、InVia Raman microscope system (Renishow plc, Gloucestershire, UK) を用いて行った。波長 785 nm (出力 300 mW) のダイオードレーザーを光源として、50 倍対物レンズを用いて、測定した。試料測定範囲は 200 µm × 200 µm (73 × 72) 刻みで計 5,296 ポイントを取得した。測定用サンプルは、各試料をガラス板上に薄く成形したものをを用いた。

1-2-5 溶解度の経時変化の測定

各試料 (CC または ANC) をガラス瓶に分取し、予め pH 6.5 に調整した HBSS 25 mL を添加した。各懸濁液は、37°C 恒温槽中で 800 rpm で攪拌した。各ガラス瓶から経時的にサンプリングを行い、10 分間遠心分離 (4°C, 14,000 g) した後、上清を分取して、再度同条件で遠心分離を行った。得られた上清中の CUR 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。

1-2-6 *In vitro* CUR 細胞層透過性

全ての実験は、MDCK 細胞 (passage #70 - #80) を用いて行った。

1-2-6-1 細胞培養

1-2-6-1-1 FBS の非働化

FBS を室温で解凍した後、56°C で 30 分間インキュベートした。

1-2-6-1-2 培地

α-MEM に AA 及び FBS を濃度 0.4 v/v%、10 v/v% で混合した。

1-2-6-1-3 細胞の継代

培地を除去した後、PBS で 2 回洗浄した。次に、培養フラスコに try-EDTA を 3 mL 添加して、37°C で約 10 分間インキュベートした後、培地 7 mL でピペッティングすることによって、細胞をフラスコ底面から剥離した。細胞懸濁液を遠沈管に回収し、4°C、365 g で 10 分間遠心分離した。上清を除去した後、培地 10 mL を加え、再懸濁した。懸濁液中の細胞数はトリパンブルー染色した後に血球計数盤を用いてカウントし、適量を新しい培養フラスコに播種した。播種した細胞数により約 4 ~ 7 日間隔で継代作業を繰り返した。

1-2-6-2 細胞層透過実験

CUR に関する種々の検討を行う上で、CUR の低い溶解性、化学的安定性は障害と考えられる。CUR の膜透過性を正しく評価する上で、それらの因子の影響をできる限り排除することが重要である。そこで、溶液中の物理化学的安定性を考慮した上で、一定の溶解度が維持されると考えられる懸濁剤を主として使用することとした。また、懸濁液中の非晶質固体は再結晶化が進行して、溶解度が変動する可能性もあることから、複数の懸濁液濃度を検討することとした。

細胞懸濁液 (2.0×10^5 cells/mL) 0.5 mL を Transwell® インサート支持膜上 (培養面積: 1.1 cm²) に播種し、インサート外側 (basal 側) に培地 1.5 mL を加えた。インサート播種後から実験を行うまで (およそ 10 日間) は、1 日おきに培地を交換し、実験前日には膜電気抵抗値測定システム Millicell-ERS® (Merck JGaA, Darmstadt, Germany) を用いて、膜抵抗値 (transepithelial electrical resistance, TEER) が 5,000 Ω/cm² 以上であることを確認した。37°C で 15 分間のプレインキュベーションを行い、その後、TEER 値に変化がないことを確認した。Apical 側から basal 側への透過実験の場合、各 CUR 懸濁液 0.5 mL (CC : 250 μg/mL, ANC : 125, 250, 500 μg/mL) を apical 側に添加し、basal 側に 5 w/v% BSA を含む HBSS 1.5 mL を添加した。Basal 側より経時的にサンプリングを行い、同体積の新しい BSA 溶液を加えた。また、細胞層透過実験で一般的な Liquid-covered condition (LCC) の他、図 5B に示す細胞層が空気に接触した AIC 条件で、各粉末製剤からの細胞層透過性を評価した。AIC の場合、apical 側にはメディウムを添加せず、basal 側にのみ 5 w/v% BSA 含む HBSS 3 mL を加え、各粉末 (CUR として 1 mg) を apical 側細胞層表面に噴霧した。その後、LCC と同様に、basal 側より経時的にサンプリングを行った。全てのサンプルにメタノール 1 mL を加えて、除タンパク処理を行った。混合後、15 分間氷冷し、14,000 g、10 分間遠心分離した。上清を試験管に移して、窒素ガス気流下、40°C にて溶媒を溜去した。残渣は HPLC 定量を行うまで -30°C で冷凍保存した。

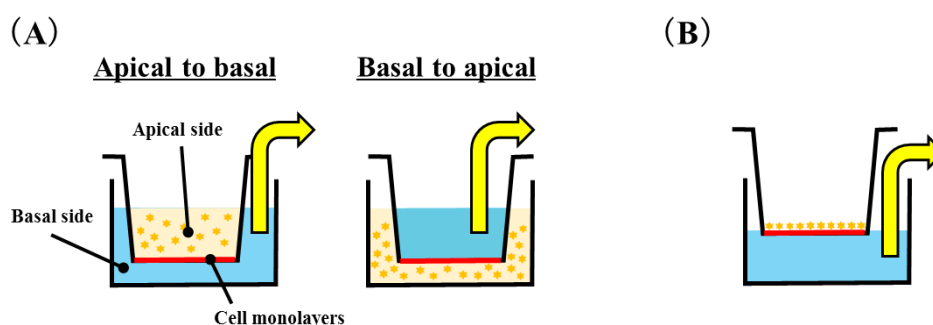


図 5 *In vitro* 細胞層透過実験の概要
(A) Liquid-covered condition (LCC) (B) Air-interface condition (AIC)

1-2-7 CUR の定量分析

各実験により得られたサンプル中の CUR 濃度は、HPLC 及び紫外可視吸光検出器 (LC-20A and SPD-20A, 島津製作所, 京都) を用いて行った。カラムは、ODS カラム (Inertsil ODS-3, particle size 5 μm , 4.6 mm \times 150 mm, GL サイエンス, 東京) を用いた。移動相として、メタノールと 5 v/v% 酢酸の混液 (68 : 32) を用い、流速を 1.0 mL/min、検出波長は 420 nm とした。

1-3 実験結果

1-3-1 各種 CUR 製剤の物理化学的特性

CC 及び ANC の XRPD プロファイルを図 6 に示す。CC では、鋭い回折ピークが観察されたが、ANC では同様のピークは観察されず、非晶質特有のハローパターンを示した。XRPD は、粉末試料中の結晶の同定や状態を分析する方法として、一般的に用いられており、医薬品関連分野においては、結晶状態を評価するために汎用されている。しかし、得られた結果は絶対的なものではないため、他の分析方法で得られる結果と組み合わせた総合的な評価が必要である。そこで、DSC の測定を行った。

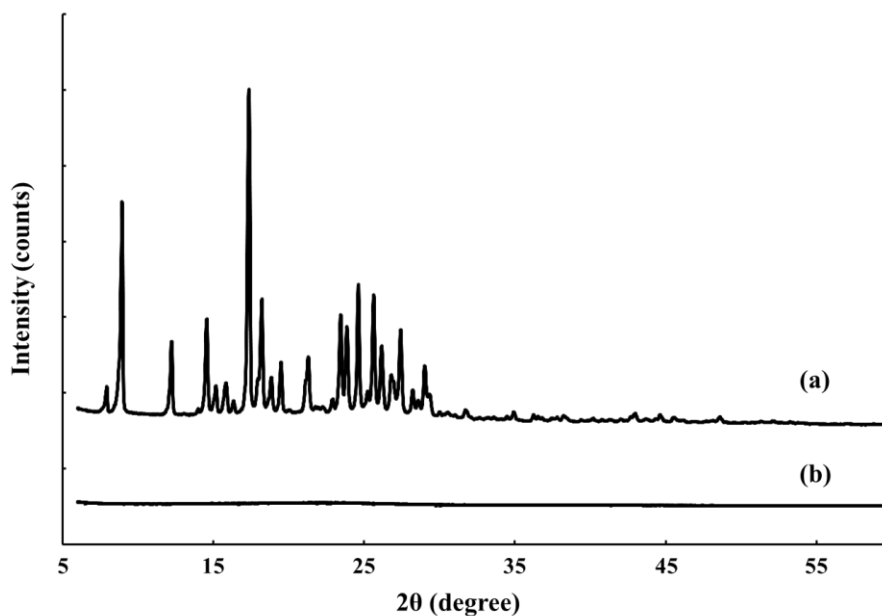


図6 製剤物性評価結果 その1- 各製剤の XRPD プロファイル
(a) CC (b) ANC

[*Mol.Pharm.*,13, 493-499 (2016). Figure 1A]

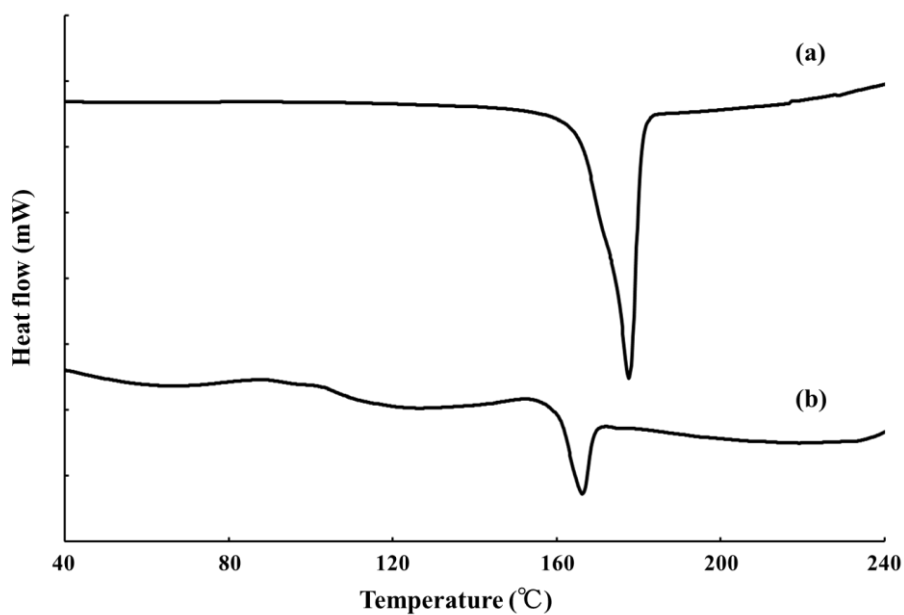


図7 製剤物性評価結果 その2- 各製剤の DSC プロファイル
 (a) CC (b) ANC
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 1B]

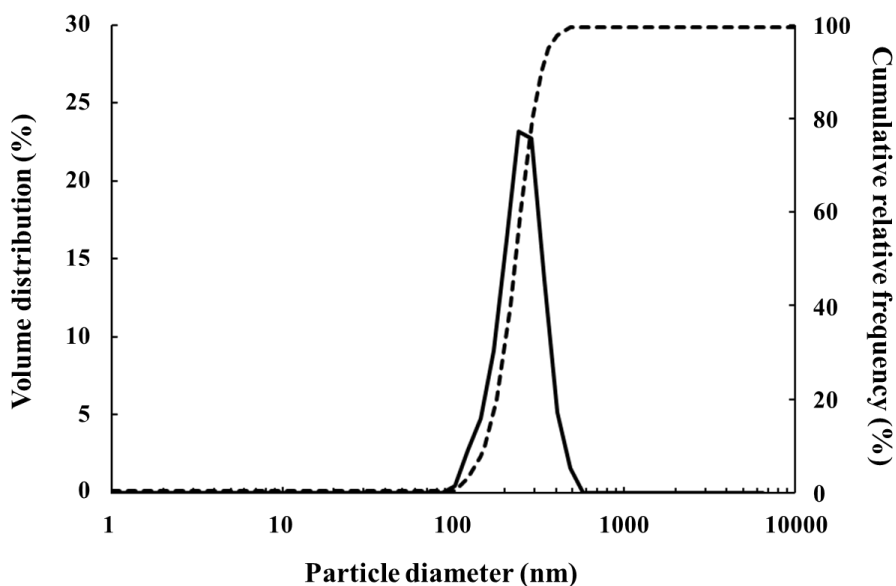


図8 製剤物性評価結果 その3- 動的光散乱法による ANC 粒子分布
 実線：頻度分布曲線、破線：積算分布曲線

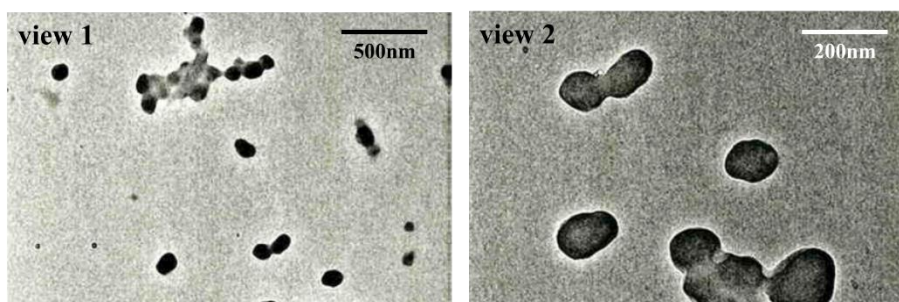


図9 製剤物性評価結果 その 4-ANC の粒子形状の観察
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 1D]

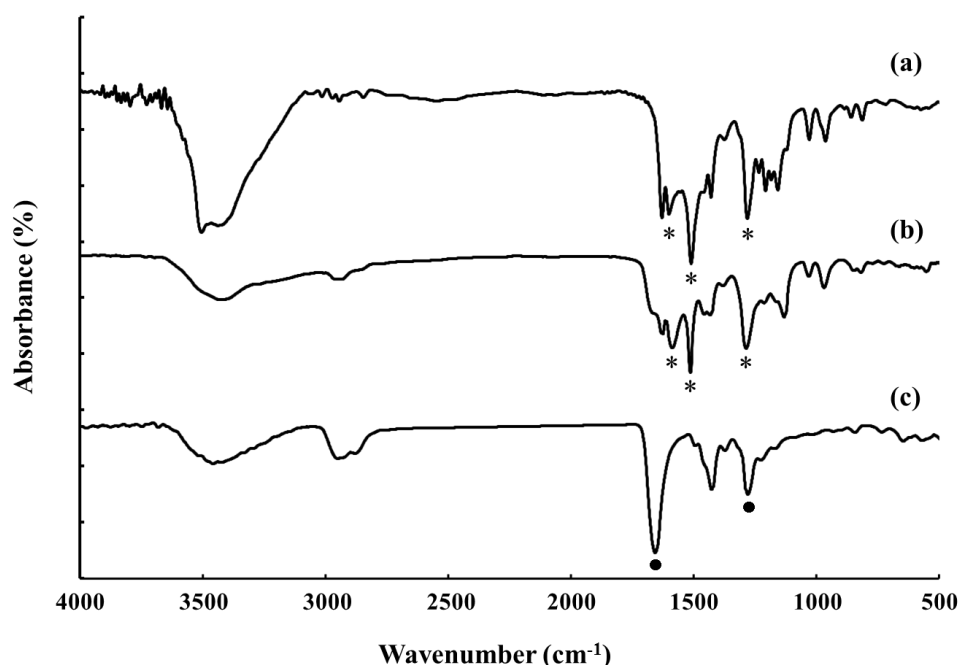


図10 製剤物性評価結果 その 5- 各製剤の IR スペクトル
 (a) CC (b) ANC (c) PVP

CC 及び ANC の DSC プロファイルを図 7 に示す。CC のプロファイルでは、180°C 付近に融解に伴う吸熱ピークのみが観察された。一方、ANC のプロファイルでは、60°C 付近及び 170°C 付近に吸熱ピーク、90°C 付近に発熱ピークが観察された。CC 及び ANC の融点はそれぞれ 170.99°C 及び 160.44°C であった。一般に、非晶質特有のガラス転移および結晶特有の融解による熱量変化は吸熱ピークとして、非晶質から結晶への変化は発熱ピークとして観察される。したがって、ANC が示す熱量変化は非晶質に特有と考えられ、XRPD の結果と合わせて、ANC は非晶質状態であることが示された。DLS による ANC の粒度分布を図 8 に示す。積算分布曲線における累積相対頻度 10% (d_{10})、50% (d_{50}) 及び 90% (d_{90}) はそれぞれ 152.1 nm、232.3 nm 及び 327.9 nm であり、ANC は

平均粒子径が約 230 nm のナノ粒子であることが確認された。また、粒子の均一性の指標となる多分散指数 (polydispersity index, PDI) は 0.757 であった。また、TEM による粒子の形状観察により、形状は球であることが確認された (図 9)。

ANC 中での CUR 分子の状態を評価するために、赤外吸収スペクトル (IR) を測定した。スペクトルを図 10 に示す。CUR に特徴的な IR スペクトルのピークは、 $1,280\text{ cm}^{-1}$ 付近の芳香環 C=CH の CH 曲げ運動及び C-CH 伸縮運動、 $1,500\text{ cm}^{-1}$ 付近の C=O 伸縮運動及び $1,600\text{ cm}^{-1}$ 付近の C=C 伸縮運動である (図 10a)³⁵。同様のピークは、ANC においても観察された (図 10b)。一方、ANC 作製時に粒子の凝集抑制のために用いた PVP に特徴的なピークは、 $1,640\text{ cm}^{-1}$ 及び $1,290\text{ cm}^{-1}$ 付近のアミドのカルボニル基の C-N 伸縮運動である (図 10c)³⁶。ANC のスペクトルに、PVP に特徴的なピーク、特に $1,640\text{ cm}^{-1}$ 付近の伸縮運動は観察されなかった。

次に、懸濁液中の非晶質固体の状態変化について、XRPD 及びラマンイメージングにより評価した。経時的に回収した disp ANC の XRPD プロファイルを図 11 に示す。緩衝液中に分散させた ANC では、分散時間に関わらず、結晶性のピークが観察されており、ANC の再結晶化が示唆された。しかし、観察された回折プロファイルは、図 6a で示された CC とは異なることが明らかとなった。

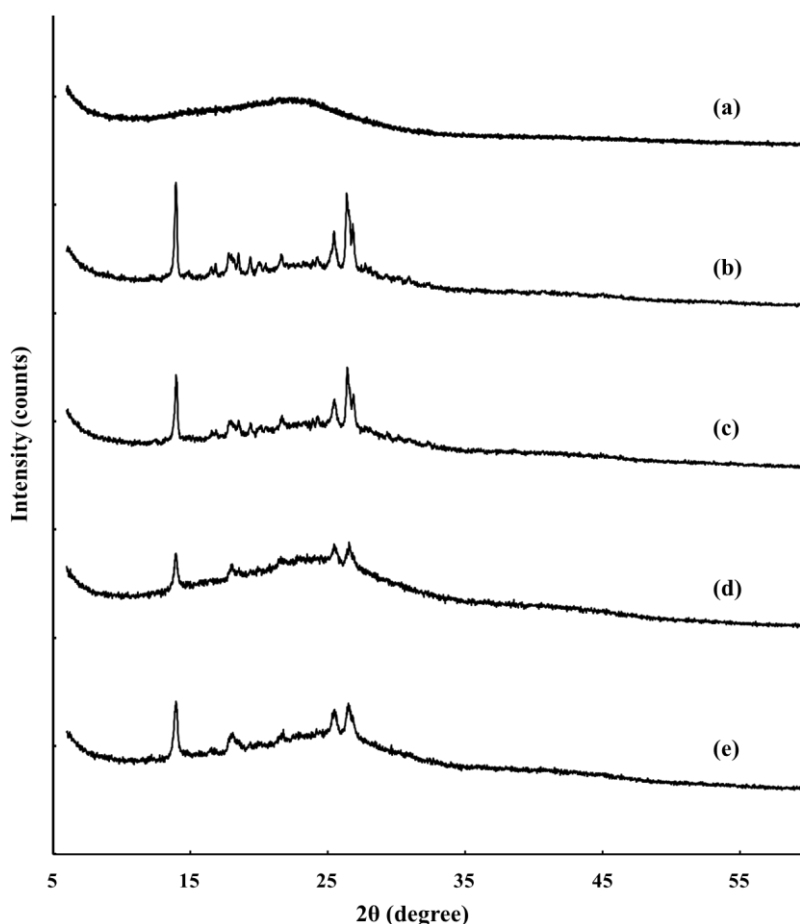


図 11 製剤物性評価結果 その 6- 緩衝液中に再分散させた ANC 固体の XRPD プロファイル
(a) ANC and disp ANC at (b) 1 hr, (c) 6 hr, (d) 12 hr, (e) 24 hr
[Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 2]

次に、再分散させた各 ANC 固体粒子の表面状態をラマンスペクトル及びイメージングにより評価した。CC、ANC 及び disp ANC のラマンスペクトルを図 12A に示す。1,150 cm^{-1} 、1,250 cm^{-1} 及び 1,600 cm^{-1} 付近の各ピークに関しては、図 10 で示した IR スペクトルと同様の分子運動に由来するものであり、1,310 cm^{-1} 及び 1,430 cm^{-1} 付近のピークはラマン散乱に特有であることが報告されている³⁵⁾。しかし、ANC のラマンスペクトルには、CC とは位置が異なるピークが観察され、disp ANC においても、CC 及び ANC と異なるピークが一部観察された。これらの異なるピークを基準に、固体状態を 3 種類に分類することにより、各固体の表面状態のイメージングを行った。結果を図 12B に示す。再分散時間に依存して、ANC には CC (赤) もしくは ANC (緑) とは異なる disp ANC (青) のエリアの割合が増大することが明らかとなった。

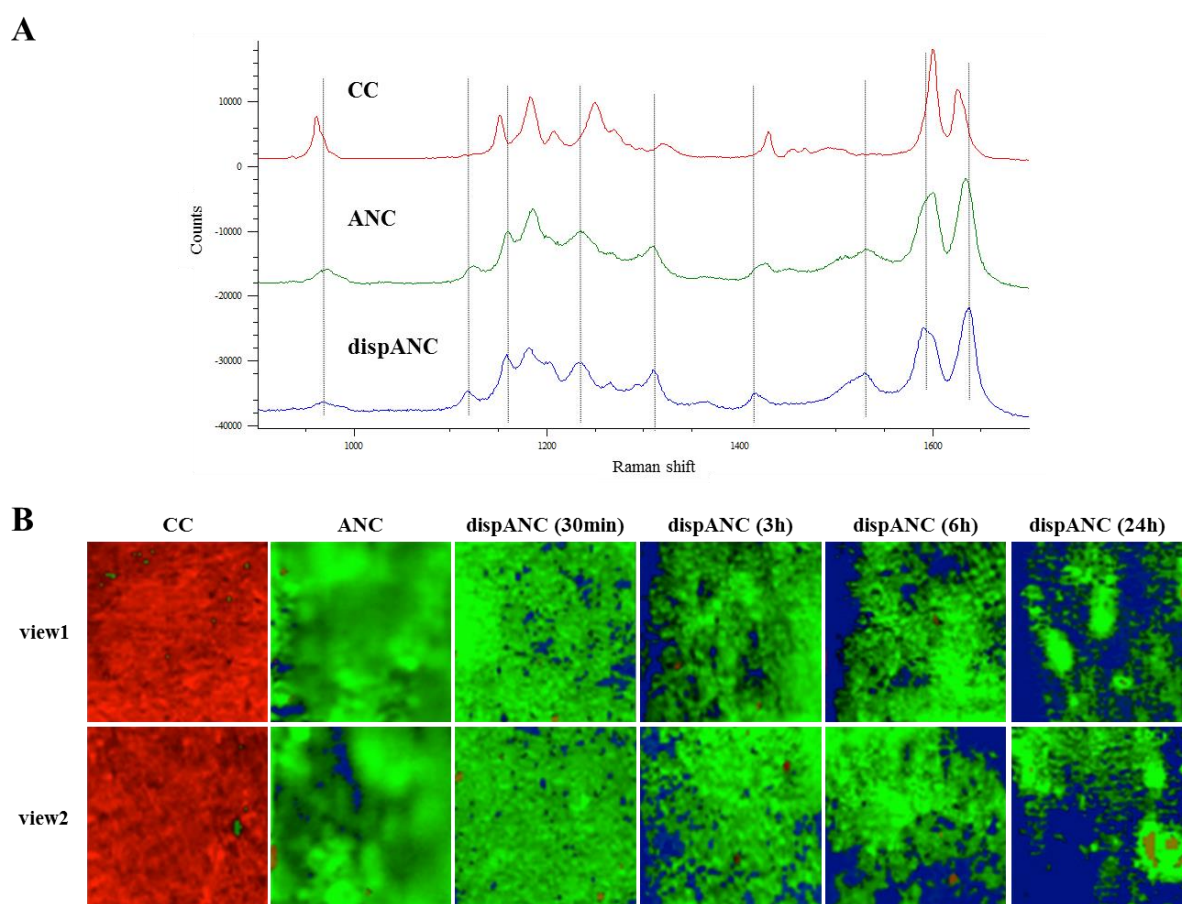


図 12 製剤物性評価結果 その 7- 緩衝液中に再分散させた ANC 固体の (A) ラマンスペクトル及び (B) イメージング
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 3]

1-3-2 各種製剤からの CUR 溶出特性

緩衝液中における CC 及び ANC から CUR の溶出性を評価した。結果を図 13 に示す。CC の場合、いずれの時間においても 10 ng/mL 以下の顕著に低い濃度を示した。一方、ANC に関しては、わずかな相違が観察されたが、未溶解固体粒子量に関係なく、実験開始 180 分後の濃度は同等であった。非晶質ナノ粒子化によって、CUR の溶解度は CC と比較すると最大で約 300 倍改善されることが明らかとなった。

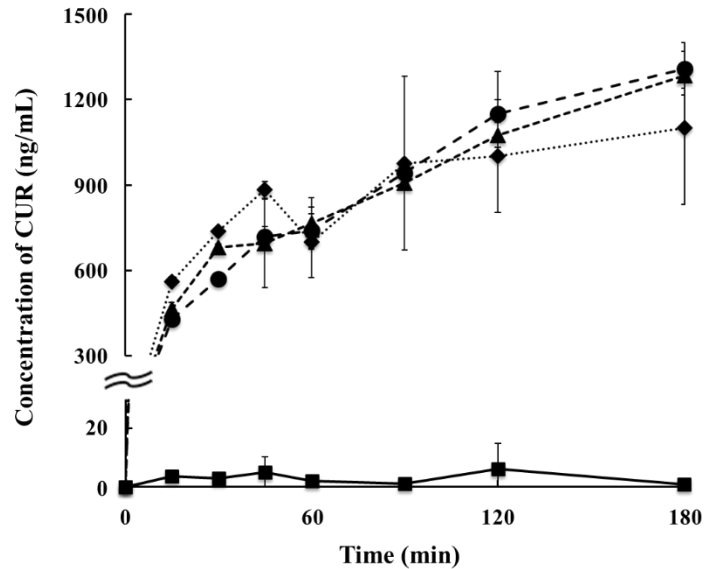


図 13 緩衝液中での CUR の溶出性
■ : CC 10 mg, ● : ANC 5 mg, ▲ : ANC 10 mg, ◆ : ANC 20 mg
データは mean ± S.D. として示した。(n = 3)
[Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 4]

1-3-3 各種製剤懸濁液からの CUR の *in vitro* 細胞層透過性

非晶質ナノ粒子化により、CUR の水への溶解度が顕著に改善されたことから、溶出試験と同様の 3 種類の濃度の ANC 懸濁液を用いて、*in vitro* 細胞層透過実験を行った。透過プロファイルを図 14 に示す。その結果、CUR の累積透過量は ANC 懸濁液濃度、すなわち懸濁液中に含まれる未溶解固体量に依存して、増大することが明らかとなった。一方、CC 懸濁液を用いた場合、累積透過量は検出限界以下であり、ANC 懸濁液の遠心上清、すなわち ANC 飽和溶液を用いた場合も、細胞層透過は観察されなかった。水溶液中での CUR の安定性を考慮すると、飽和溶液中での加水分解の進行に伴って、CUR 濃度が減少するため、結果として細胞層透過が観察されなかった可能性がある。一方、ANC の各懸濁液の場合、CUR 濃度が 24 時間後も維持されていることが確認された。つまり、apical 側の懸濁液中では濃度が一定に保たれているため、細胞層透過が観察されたと考えられる。しかし、異なる 3 種類の懸濁液中の溶解度に有意な差がないことから、懸濁液による溶解度の維持だけでは細胞透過量の増大は説明できない。そこで、懸濁液中に含まれる未溶解の ANC 固体に注目した。図

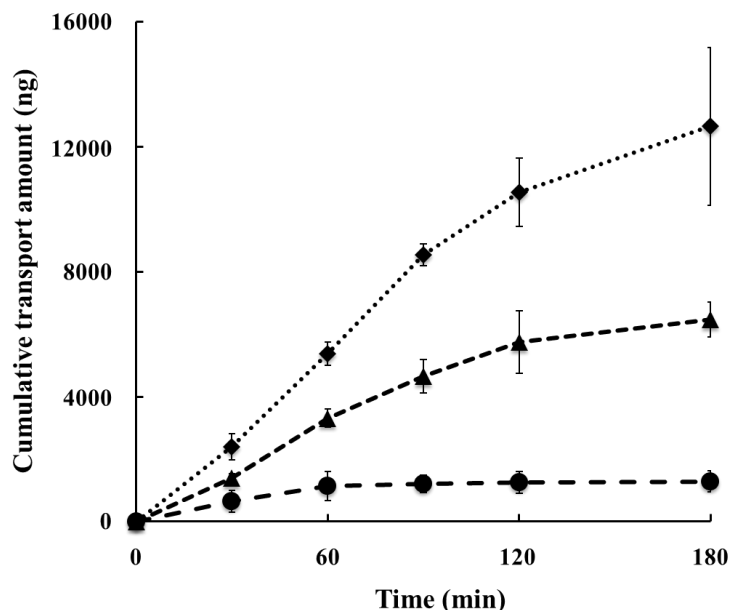


図 14 ANC 懸濁液からの細胞層透過性の濃度依存性
 ● : ANC 125 µg/mL, ▲ : 250 µg/mL, ◆ : ANC 500 µg/mL
 データは mean ± S.D. として示した。(n=4)
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 5]

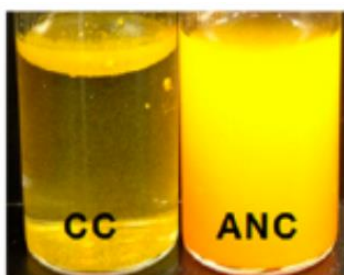


図 15 CC 及び ANC 懸濁液の外観
 CC 懸濁液は、粒子が油様に液面に浮遊した状態であるが、ANC 懸濁液では粒子分散性が非常に良好である。
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 4]

15 に示すように、本研究で用いた ANC は水溶液中での固体分散性が顕著に改善されているため、懸濁液を細胞層 apical 側に添加すると、固体粒子は重力により沈降し、細胞層に接触することができる。細胞層への固体粒子の接触が細胞層透過量の増大に何らかの影響を及ぼしているものと仮定し、透過の方向性を検討した。図 5A (第 2 節 実験方法) に示す通り、apical 側に懸濁液を添加した場合、固体は重力により沈降し、細胞層と接触することが可能であるが、basal 側に懸濁液を添加した場合、固体粒子は細胞層に接触できないはずである。

ANC 懸濁液を apical 側に添加した場合 (A to B 方向)、basal 側に添加した場合 (B to A 方向) の CUR の累積透過量の経時変化を図 16 に示す。その結果、B to A 方向の累積透過量は A to B 方向に対して顕著に低かった。Basal 側に懸濁液を添加した場合、basal 側の濃度は常に飽和溶解度が維持されることから、溶解した CUR が細胞層透過に関与すると仮定した場合、B to A の透過量は A to B と同程度になると予想される。したがって、ANC 懸濁液による CUR の細胞層透過量の増大は改善

された溶解度には依存しないことが明確に示された。図 14 の結果が示す通り、ANC 懸濁液濃度、すなわち未溶解固体量依存的に細胞層透過量が増大した事実からも、CUR の細胞層透過量が未溶解固体量に依存していることは明らかである。さらに、AIC 条件下 (第 2 節 実験方法 図 5B) で、各製剤粉末を直接細胞層に噴霧投与した場合の透過量を測定した。結果を図 17 に示す。ANC が最も高い透過量を示し、CC 及び dispANC では透過量は小さかった。特に、再結晶化が示唆される dispANC では透過量が減少したことから、固体状態が細胞層透過性に影響を与える可能性が示唆された。

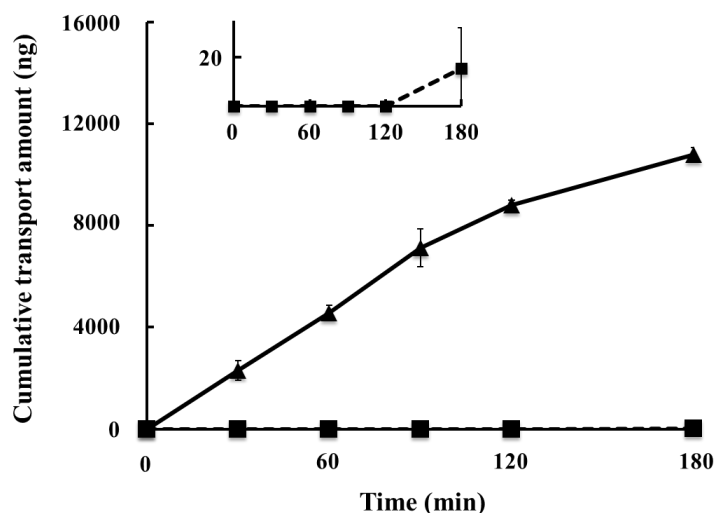


図 16 ANC 懸濁液 (250 µg/mL) からの細胞層透過方向の影響
 ▲ : A to B, ■ : B to A
 データは mean ± S.D. として示した。(n=4)
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 6]

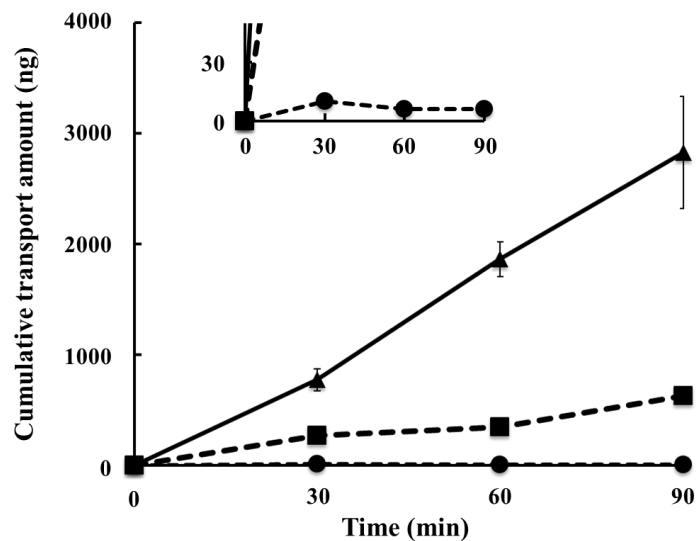


図 17 Air-interface condition における各粉末からの細胞層透過性
 ▲ : ANC, ■ : disp ANC for 24 h, ● : CC
 データは mean ± S.D. として示した。(n=4)
 [Mol.Pharm.,13, 493-499 (2016). Figure 7]

1-4 考察

粉末医薬品の微粒子化に関しては、高圧モホジナイゼーションや粉碎などの top-down 法と溶媒法や噴霧乾燥法などの bottom-up 法がある。特に、近年では top-down 法と bottom-up 法を組み合わせた微粒子化の研究が報告されており、微粒子化に対する両者の組合せの有用性が広く知られるようになった^{37,38)}。本研究では、化学合成反応場として利用されるマイクロリアクターと溶媒法を組み合わせることによって、ANC を調製した。ANC に対する各種物性評価の結果より、ANC が非晶質ナノ粒子であることを確認した。また、ULREA[®] により作製された ANC にはいくつかの特徴があることが明らかとなった。まず、図 7 の DSC の測定結果より、CC より ANC の融点が低かった。これはナノ粒子化と関係していることがすでに報告されている³⁹⁾。他にも、図 11 で示された ANC の再分散時に生成した結晶の結晶形が CC とは異なることから、結晶多形の影響が示唆される。トルブタミドの場合、4 種類の結晶多形のうちの Form II のみが他の 3 種類と比較して、融点が高いことが報告されている⁴⁰⁾。CUR の結晶多形に関しては、これまで 3 種類報告されているが⁴¹⁾、CC は Form I に近い XRPD プロファイルを示している。一方で、Form II と Form III に関しては、構造的に類似点はいくつかあり、Form I とは異なる。ANC の再結晶化によって得られた disp ANC は、少なくとも Form I ではないが、その結晶形の同定にはより詳細な評価が必要である。また、粒子径に関しては、約 230 nm のナノサイズであったものの、PDI が約 0.8 であり、広い粒度分布を示した。粒子径を制御するためには、ULREA[®] で混合する 2 種類の溶液（良溶媒と貧溶媒）の温度が重要である。本研究の ANC の作製は 20°C で行ったが、5°C で同様の操作を行った場合、より小さい粒子（20 - 100 nm）が生成することを確認している。

ANC の赤外吸収スペクトルのメインピークが CC とほぼ一致していることから、CUR 分子に対するマイクロリアクターによる晶析工程の影響は無視可能と考えられる（図 10）。また、ANC のスペクトルには晶析する際に混合した PVP のピークは観察されなかった。本知見は、ANC 中に PVP が含まれていないことを意味している。PVP に関しては、晶析操作中の粒子同士の凝集抑制を目的として用いたが、晶析後の蒸留水による洗浄過程で完全に除去されたものと推察される。しかし、粒度分布が若干広がったことから、PVP が除去されることによって、粒子同士が一部凝集している可能性が考えられる。経験的に、高分子などの添加物が非晶質状態の安定化に大きく影響を及ぼすことが知られている。ANC の場合にも同様の効果が期待されるが、高分子等の安定剤を含まずに、CUR の安定な非晶質が生成したことは、非常に興味深い結果と思われる。なお、ANC の非晶質状態の安定性に関しては、冷蔵保存（4°C）で少なくとも 6 ヶ月は問題ないことを確認している。

本研究では、最近注目されているラマン分光分析を用いて、固体の表面状態の分析を行った。ラマン分光分析は、サンプルに赤外線を照射して、分子の振動情報を得るという点では、赤外線分析と類似しているが、それぞれに長所・短所を持ち合わせており、相補的な情報が得られる。ラマン分光分析の特徴の一つは、微小領域の分析が可能であるため、イメージングが可能であることである。結晶と非晶質のような固体の状態を区別することにより、マッピング情報の取得が可能となる。分析の際には、サンプルに対する特別な前処理は必要なく、赤外線分析とは異なり、水分を多く含んだ状態でも測定することが可能である。非晶質製剤に関する分析事例についてもすでに報告されており、再結晶化や製剤中の添加物との相互作用などの評価に用いられる⁴²⁻⁴⁵⁾。本研究では、ラマンスペクトルを比較することにより、CC と ANC で、CUR に特徴的なピークの位置がわずかにずれることが明ら

かとなった。Disp ANC に関しては、ANC に近いスペクトルが得られていることから、個々の測定における誤差ではなく、固体状態の相違に基づくと考えられる。CC の場合、懸濁液中のほとんどの粒子が液面に浮遊して油状であるが、ANC は懸濁液中での分散性が非常に良好であり、固体表面のぬれが顕著に改善されていることが示唆される。また、物性評価の結果から、disp ANC は再結晶化していることが明らかとなったが、水中での固体粒子の分散性は維持されていることから、disp ANC の表面状態は CC とは明らかに異なることも示唆される。固体表面の状態変化の詳細については、現在、継続して検討中であるが、懸濁液中での固体粒子の分散性の改善が本研究では重要な因子であることが明らかとなった。

非晶質ナノ粒子化によって溶解度は顕著に改善された (図 13)。しかし、溶解度の経時変化を検討する上で大きな課題があると考えている、それは、「溶解」の定義である。一般に、「溶解」とは、溶質分子が単分子で溶媒中に均一に分散した状態を意味するが、分子間相互作用により溶質分子同士が集合体 (クラスター) を形成している場合もある。特に、難水溶性薬物の場合、熱力学的に集合体を形成しやすいと考えられる。このような集合体の場合、集合体を構成する分子の数も一定ではなく、分布を持つ可能性があり、どのような状態を「溶解」と定義するか、きわめて難題である。集合体のサイズはダイナミックに変動する平衡状態であると考えられ、個々の集合体の生体膜透過性は異なる可能性も高い。この集合体と数十 nm の未溶解ナノ粒子を区別することは容易ではない。一般に、薬物の溶解度を測定する場合、過剰量のサンプルを溶媒中に一定時間分散し、フィルターを通すことによって未溶解固体を分離する。入手可能なフィルターのポアサイズには限界があり、最も小さいものでも 0.1 μm 程度である。ANC の平均粒子径は約 230 nm であるが、個数基準の粒子径に換算した場合、平均粒子径は約 80 nm である。フィルターでの分離は不可能であった。本研究では遠心分離を採用し、14,000 g で 10 分間の遠心を 2 回繰り返すこととした。上清中に未溶解固体が含まれている可能性も完全には否定できないが、3 種類の異なる濃度の懸濁液を用いて同様の検討を行い、各上清中の CUR 濃度を測定したところ、60 分以降はほぼ同等の濃度を示した。60 分以降、顕著な差が観察されなかったことは、設定した遠心条件で、未溶解固体の分離が可能であることを示している。3 種類の濃度の懸濁液間で溶解度が一致したことは当然の結果であるが、細胞層透過性評価においては非常に重要な知見であると考えている。

3 種類の懸濁液を用いて行った細胞層透過性の評価で、従来の常識に反する結果が得られた。懸濁液濃度すなわち未溶解固体量依存的に累積透過量が増大することが明らかとなった。各懸濁液中の溶解度には顕著な差がなく、溶液中での化学的安定性を考慮すると、CUR 細胞層透過は溶解した CUR の濃度とは無関係である。実際に、図 16 に示す B to A 方向の透過量が極端に小さいことから、飽和濃度が維持されたとしても、溶解した CUR の膜透過性が非常に低いことは明らかである。これまで、薬物の膜透過には単分子にまで分散した分子が関与すると考えられてきたが、本章で得られた結果は、溶解度に依存しない新たな生体膜透過機構の存在を示唆している。溶解した CUR 以外に膜透過に関与する可能性があるのは、未溶解固体のみである。また、未溶解の固体濃度に依存して、透過量が増えるという実験事実は、固体粒子の関与を間接的に支持すると考えられる。また、本検討では、培養が比較的簡便で扱いやすい MDCK 細胞を用いて膜透過性評価を行った。MDCK 細胞に加えて、薬物の上皮細胞透過性評価に汎用されるヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を用いても検討を行ったが、同様の膜透過現象が確認された (data not shown)。

ANC の特徴として、CC と比較して、溶液中での固体粒子の分散性が良好である (図 15)。このため、懸濁液中の未溶解固体粒子は重力で沈降し、細胞層へ直接接触することが可能となる。一方、CC の場合、溶液中での固体粒子の分散性が不良であるため、懸濁液の状態では細胞層に接触することは不可能である。つまり、CUR の細胞層透過に対して、固体粒子と細胞層との接触が重要であることを示している。得られた結果を総合的に考察した結果、新たな膜透過機構として、「固体粒子が細胞層と直接接触し、CUR が脂質膜に直接分配されることで、膜透過が起こる」という仮説を立てた。この仮説をサポートするデータを得るために、AIC 条件下で細胞層透過性を検討した。AIC 条件の場合、apical 側に水分はほとんど存在しないため、CUR の溶解量は少なく、溶解した CUR の影響を最小限にとどめることができる。また、細胞層が直接空気に接触した状態であるため、分散性が悪い CC であっても、細胞層への直接噴霧により、細胞膜と接触することが可能である。検討の結果、ANC に関して、懸濁液と同様の高い透過量が観察された。本知見は、ANC からの高い細胞層透過量は CUR が固体から細胞膜脂質へ直接分配する可能性を示している。一方、disp ANC からの透過量は ANC よりも低く、CC からの透過量はわずかであった。Disp ANC では一部が再結晶化していることを考え合わせると、製剤中の非晶質固体の割合に応じて、透過量が変化することを示している。つまり、新規生体膜透過機構において、非晶質状態が重要であることを示す結果である。非晶質固体の溶解度は細胞膜脂質であっても、結晶固体よりも高いと考えられる。ANC との接触に伴う細胞内薬物濃度は CC に比べて高いと予想される。経細胞輸送経路を介した細胞層透過は細胞内薬物濃度に依存することは常識である。この点でも矛盾のない結果と考えられる。また、経細胞経路のうち能動的な輸送が阻害される低温状態 (4℃) においても検討を行ったが、透過速度は低下したものの、結果的に 37℃ で行った場合とほぼ同等の透過量が観察された (data not shown)。このことから、非晶質固体から膜への薬物分配は特異な輸送経路ではなく、受動輸送によるものと考えられる。

本章の検討は、すべて *in vitro* 実験系を用いて行った。2 章では、*in vivo* においても同様の現象が観察されるか否か確認するために、動物実験を基本に検討を行った。

1-5 小括

第 1 章では、マイクロリアクターを用いて ANC を調製し、各種物性及び *in vitro* 細胞層透過性の評価を行った。XRPD 及び DSC の結果より、ANC が非晶質状態であることを確認した。また、DLS 及び TEM の結果より、約 230nm の球形ナノ粒子であることも明らかとなった。ANC には、調製時に混合した高分子が製剤に含まれないこと、再結晶化した disp ANC が CC とは異なる結晶形であることが示された。中でも、最も重要な知見は、溶液中での固体粒子の分散性が CC と比較して顕著に改善されたことである。ANC の溶解度に関しては、CC と比較して約 300 倍改善され、非晶質ナノ粒子化の有用性が示された。*In vitro* 細胞層透過性評価では、CUR の膜透過には溶解した CUR ではなく、未溶解固体の直接的な関与が示唆された。種々の検討結果より、固体が細胞層へ直接接触すること、及び固体が非晶質であることの重要性が明らかとなり、溶解度に依存しない CUR の新規生体膜透過機構の存在が見出された。固体が直接関与する本メカニズムは、溶液中での安定性に問題のある CUR に対して非常に有用な膜透過性改善方法であり、溶解性改善にのみ着目した従来の戦略では限界がある一部の薬物に対する画期的な吸収性改善システムとなる可能性が示唆された。

本章で明らかとなった CUR 新規生体膜透過機構

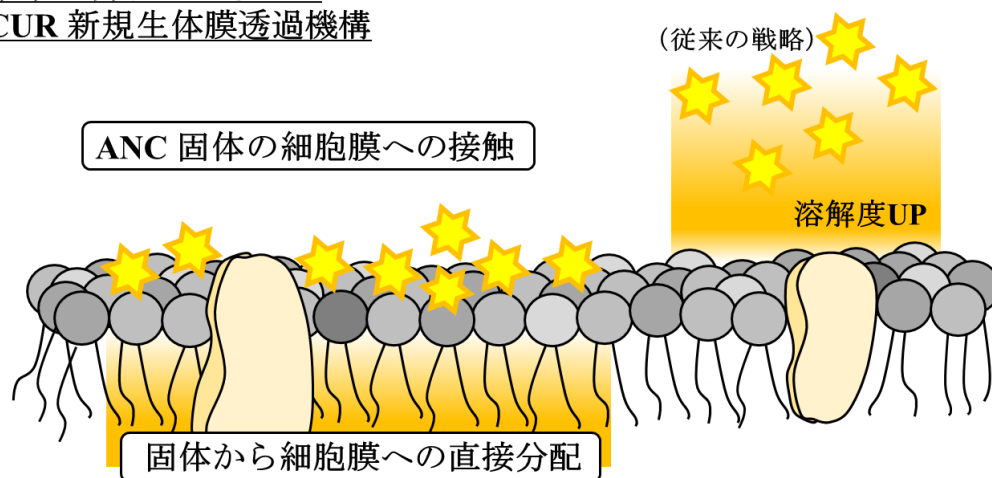


図 18 固体が直接関与する新規生体膜透過機構の概念図

第 2 章

非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構：

動物実験による *in vivo* 吸収性評価

第 2 章 非晶質ナノ粒子製剤化クルクミンに関する新規生体膜透過機構： 動物実験による *in vivo* 吸収性評価

2-1 緒言

第 1 章の検討で、固体粒子が関与する CUR の新規生体膜透過機構を見出した。本機構は固体粒子と生体膜の直接接触を前提とするが、実際に応用を考えた場合、投与部位である消化管、鼻腔、肺等の粘膜表面には粘液層が存在する。粘液層が固体粒子と細胞膜との接触を妨げる場合、新規生体膜透過機構が機能せず、その利点を活用することができない。本機構の有用性はひとえに表面粘液層の影響の有無が握っているといても過言ではない。

近年、経口投与に代わる非侵襲的な投与経路に関する様々な研究が行われているが、本研究では消化管に加えて、肺に注目した。経肺投与された薬物は肺胞から吸収されると考えられるが、肺胞上皮細胞表面は空気と接している。したがって、直接、吸収粘膜に固体粒子が送達可能で、投与した固体粒子は効率よく、粘膜表面と接触可能である。さらに、有効吸収表面積もきわめて広い。第 1 章の検討で、懸濁液中で ANC は再結晶化し、再結晶化は本機構にとって膜透過を低下させる要因であることが明らかとなった。この点、肺粘膜表面は消化管上皮粘膜表面に比べて水分が少ないため、再結晶化は起こりにくいと考えられる。すなわち、CUR の新規生体膜透過機構にとって、肺は理想的な投与部位である。

第 2 章の検討では、*in vivo* 動物実験を基本に、CUR の消化管、肺からの吸収特性を検討した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験材料

(±) -dithiothreitol (DTT)、urethane 及び heparin sodium は、それぞれ和光純薬工業株式会社（大阪）、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)、及びナカライテスク株式会社（京都）より購入した。ポリエチレンチューブ SP-31（内径 0.50 mm, 外径 0.80 mm）、SP-110（内径 1.50 mm, 外径 2.50 mm）及びビニルチューブ SV-45（内径 0.58 mm, 外径 0.96 mm）は、夏目製作所（東京）より購入した。Wistar/ST 雄性ラット（10 週齢, 280 - 340 g）は、清水実験材料株式会社（京都）より購入した。その他の材料は、第 1 章と同様のものを使用した。

2-2-2 ANC の作製

各実験に用いた ANC は、必要に応じて第 1 章で記載した方法と同様に作製し、各種物性評価により非晶質ナノ粒子であることを確認した。

2-2-3 CUR の *in vivo* 吸収性

本章で行ったすべての動物実験は、同志社女子大学動物実験委員会の承認（承認番号：Y17 - 012）のもとに、その取り扱い規程に準拠し、実験には十分に注意するとともに、実験動物の人的・倫理的扱いにも最大限配慮して行った。

2-2-3-1 消化管吸収性の評価

CC 及び ANC の懸濁液を用いた消化管吸収性評価は *in situ* closed loop 法により行った⁴⁶⁾。実験 18 時間以上前に Wistar/ST 雄性ラットに絶食処置 (自由飲水) を施し、その後、urethane の腹腔内投与 (50 w/v%, 1.0 g/kg) による麻酔下、固定板に背位固定した。血液凝固を防ぐために、heparin (1,000 IU/mL) で満たした採血用 PE チューブ (SP-31) を大腿動脈内に挿入し、縫合糸で固定した。腹部皮膚を切開し、正中線に沿って開腹した後、十二指腸上部を露出させ、シリコンチューブを十二指腸内に挿入した。縫合糸でチューブを固定する際に、胆管を同時に結紮した。回盲融合部より上部 2 cm 部分を露出させ、回腸の一部を切開した。上部チューブより、PBS 10 mL 及び空気 10 mL を交互に 2 回ずつ注入し、回腸内腔を洗浄した後、十二指腸同様にチューブを挿入・固定し、小腸ループを作製した。CC 及び ANC の懸濁液各 4 mL (CC: 10 mg/rat, ANC: 5, 10, 20 mg/rat) を上部チューブより注入した後、両側のチューブをペアンで閉塞固定した。その後、経時的 (15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 分) に、採血用 PE チューブより血液 (約 0.3 mL) を heparin 処理済みのサンプルチューブに採取した。採取した血液サンプルは、速やかに 4°C で遠心分離 (12,000 g, 10 min) した後、上清 0.1 mL を新しいサンプルチューブに分取した。得られた血漿に、アセトニトリル 1 mL を添加・混合した後、30 分間氷冷し、再度遠心分離 (上記と同条件) を行った。得られた上清を新しいサンプルチューブに分取し、一体型遠心濃縮システム SPD 1010 SpeedVac® System (Thermo Fisher Scientific, MA, U.S.A.) を用いて、減圧乾固した。残渣は HPLC 定量を行うまで -30°C で冷凍保存した。

小腸上皮細胞表面に存在する粘液層の影響を評価するため、懸濁液を投与する前に粘液溶解剤 DTT による前処理を行った。小腸ループを作製後、10 mM DTT 10 mL を小腸ループ内に注入し、上部及び下部チューブをペアンで閉塞固定し、回腸内腔内に 15 分間滞留させた。その後、小腸ループ内に空気 10 mL を 2 回注入し、DTT 溶液を除去した。DTT 処理後は、上記と同様に ANC 懸濁液 (10 mg/rat) を投与し、経時的に血液を採取した。

2-2-3-2 経肺吸収性の評価

消化管吸収性評価と同様に、絶食処置した Wistar/ST 雄性ラットの大腿動脈内に採血用 PE チューブを留置した。経肺投与実験は、過去の報告を改良して行った⁴⁷⁾。ラット頸部を切開し気管を露出させ、気管内に 2 cm PE チューブ (SP-110) を肺方向に約 1 cm 挿入して、固定した。製剤を肺内に噴霧する簡易デバイスは、23 G 針先端部を削って平らにし、2 cm ビニルチューブ (SV-45) を装着したものを用いた。先端チューブ内に CC 粉末を 1 mg または ANC 粉末を 0.5 または 1 mg を充填し、1 mL シリンジ内に 0.1 mL の空気を入れた状態で針をセットした後、気管カニューレより吸気に合わせてシリンジ内の空気で押し出すことにより、粉末を肺内に噴霧した (投与量として CC: 1 mg/rat, ANC: 0.5 または 1 mg/rat)。以降の操作は、消化管内吸収性評価実験と同様である。

2-2-3-3 静脈内投与による CUR 体内動態評価

生物学的利用率 (BA) 算出のため、静脈内投与実験を行った。5 w/v% BSA を含む PBS に溶解させた ANC 溶液 1 mL (0.25 mg/rat) を頸静脈より 10 分間持続注入した。投与開始 2, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 45, 60, 90 分後に他の吸収性評価実験と同様に大腿動脈内に挿入した PE チューブより採血を行った。得られた血液サンプルは、同様の方法により処理を行った。

2-2-4 薬物動態学的パラメータの算出

各薬物動態学的パラメータは、各種実験により得られた血漿中 CUR 濃度より、WinNonlin® (Software Version 6.3, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, U.S.A.) を用いて、ノンコンパートメント解析に基づいて算出した。BA (%) は以下の式を用いて算出した。

$$BA (\%) = \frac{AUC_{\text{intestinal / pulmonary}} \times D_{\text{iv}}}{AUC_{\text{iv}} \times D_{\text{intestinal / pulmonary}}} \times 100$$

なお、AUC 及び D は血漿中濃度-時間曲線下面積及び投与量を表している。ただし、AUC は無限時間まで外挿し、算出した。

2-2-5 血漿中 CUR の定量分析

各実験により得られた血漿中 CUR 濃度の定量は過去の報告を一部変更して行った⁴⁸⁾。HPLC (LC-20A, 島津製作所, 京都) 及び蛍光検出器 (RF-10A, 島津製作所, 京都) を用いて行った。カラムは、ODS カラム (COSMOSIL 5C18-MS-II, 5 µm, 4.6 mm × 150 mm, ナカライテスク株式会社, 京都) を用いた。移動相には、5 v/v% 酢酸とアセトニトリルの混液 (50:50) を用い、流速は 1.0 mL/min で行った。励起波長及び蛍光波長はそれぞれ 420 nm 及び 530 nm とした。

2-3 実験結果

2-3-1 持続静脈内投与による CUR 体内動態の評価

まず、静脈内投与後の CUR の体内動態を評価した。図 19 に静脈内投与後の CUR 血漿中濃度プロファイルを示し、表 1 にノンコンパートメント解析に基づいて算出した各薬物速度論パラメータを示す。静脈内投与後の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は 2127.5 ± 237.7 (ng·min/mL) であった。また、分布容積 (V_d)、全身クリアランス (CL_{tot})、消失半減期 ($t_{1/2}$) 及び消失速度定数 (k_e) は、それぞれ 7261.1 ± 2608.3 (mL)、 118.7 ± 13.3 (mL/min)、 41.9 ± 11.9 (min) 及び 1.7 ± 0.4 ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) であった。

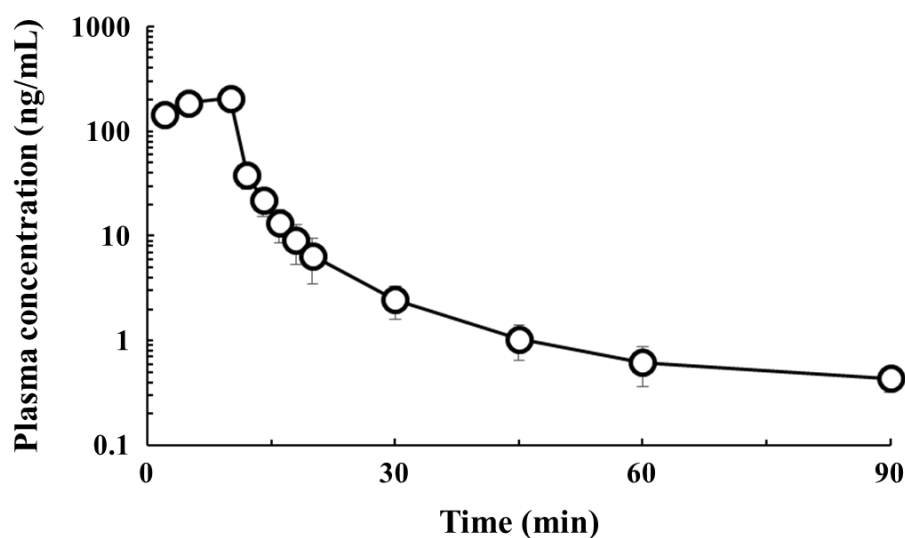


図 19 静脈内点滴持続投与後の血漿中 CUR 濃度プロファイル
データは mean \pm S.D. として示した。(n = 6)
[*Eur. J. Pharm. Biopharm.*,122, 1-5 (2018). Figure 1]

表 1 CUR の体内動態を示す薬物速度論パラメータ

Parameter		Curcumin 250 μ g/rat, i.v.
V_d	(mL)	7261.1 ± 2608.3
CL_{tot}	(mL/min)	118.7 ± 13.3
AUC	(min·ng/mL)	2127.5 ± 237.7
$t_{1/2}$	(min)	41.9 ± 11.9
k_e	(1/min) ($\times 10^{-2}$)	1.7 ± 0.4

データは mean \pm S.D. として示した。(n = 6)
[*Eur. J. Pharm. Biopharm.*,122, 1-5 (2018). Table 1]

2-3-2 CUR の消化管吸収性

まず、表面粘液層の影響を評価するために、粘液の溶解・除去剤である DTT を用いて、粘液層を除去した場合の吸収性の変化について検討をした。結果を図 20 に示す。10 mM DTT で前処置した場合、CUR の血漿中濃度に若干の低下が観察されたが、DTT 未処置群と顕著な差はなく、CUR の吸収は表面粘液層に影響されないことが明らかとなった。

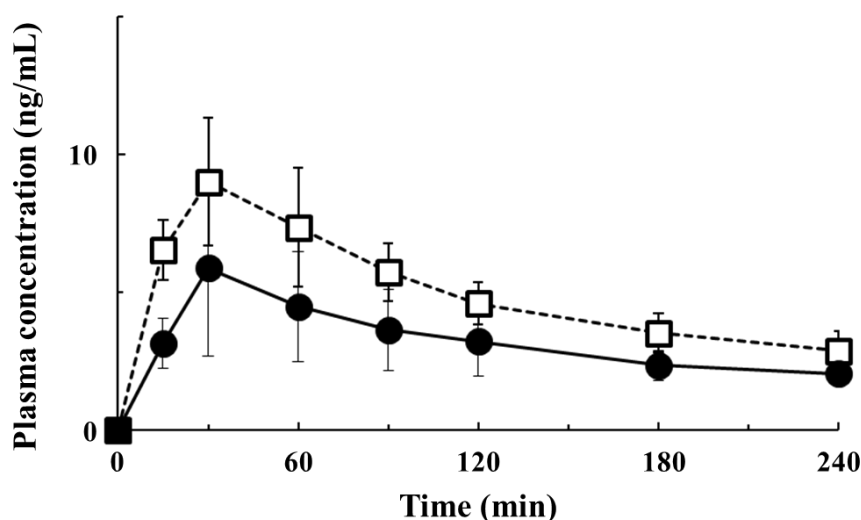


図 20 ANC 懸濁剤からの CUR の消化管吸収に対する表面粘液層の影響
Keys, □ : Control, ● : Treatment by 10 mM DTT
データは mean ± S.D. として示した。(n = 5)
[Eur. J. Pharm. Biopharm., 122, 1-5 (2018). Figure 3]

図 21 に各種懸濁液を十二指腸ループ内に投与した後の CUR の血漿中濃度プロファイル、表 2 に薬物速度論パラメータを示す。CC 懸濁液投与後の AUC 及び BA は、 310.9 ± 60.3 (ng·min/mL) および 0.4 (%) であった。一方、3 種類の ANC 懸濁液 (投与量 5, 10, 20 mg) 投与後の AUC (ng·min/mL) は、それぞれ 530.9 ± 146.4 、 1946.9 ± 531.6 及び 3708.0 ± 958.7 であり、懸濁液濃度すなわち未溶解固体量に依存して増大することが明らかとなった。また、BA (%) は、1.3 (投与量 5 mg)、2.3 (投与量 10 mg) 及び 2.2 (投与量 20 mg) であった。CC 懸濁液と比較した場合、ANC 懸濁液投与後の BA は 3 - 6 倍であった。増大の程度は *in vitro* 透過実験ほど顕著ではないが、*in vitro* 透過実験と同様の結果が得られた。

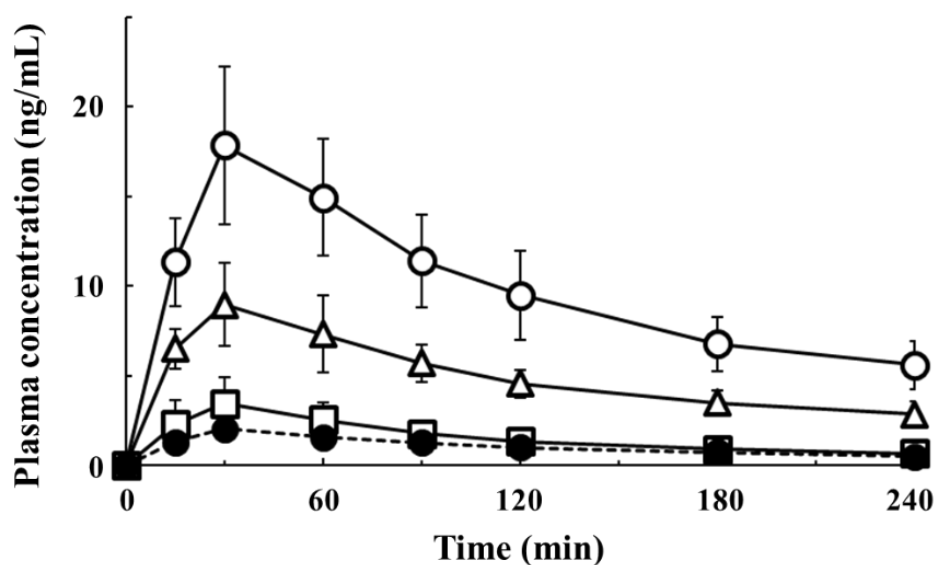


図 21 各種 CUR 懸濁液消化管内投与後の血漿中 CUR 濃度プロファイル
 Keys; ● : CC 10 mg, □ : ANC 5 mg, △ : ANC 10 mg, ○ : ANC 20 mg
 データは mean ± S.D. として示した。(n=6)
 [Eur. J. Pharm. Biopharm.,122, 1-5 (2018). Figure 2]

表 2 各種濃度の CUR 懸濁液投与後の薬物速度論パラメータ

Dose (mg)	Solid state	C _{max} (ng/mL)	AUC (min·ng/mL)	BA (%)
10	Crystal	1.8 ± 0.4	310.9 ± 60.3	0.4
5	Amorphous	3.5 ± 1.5	530.9 ± 146.4	1.3
10	Amorphous	9.0 ± 2.3	1946.9 ± 531.6	2.3
20	Amorphous	17.9 ± 4.4	3708.0 ± 958.7	2.2

データは mean ± S.D. として示した。(n=6)
 [Eur. J. Pharm. Biopharm.,122, 1-5 (2018). Table 2]

2-3-3 CUR の経肺吸収性

図 22 に、粉末製剤を経肺投与した後の血漿中 CUR 濃度プロファイルを示す。表 3 に薬物速度論パラメータを示す。CC 粉末投与後の AUC 及び BA は 167.5 ± 45.6 (ng·min/mL) 及び 2.0 (%) であった。CC 懸濁液からの消化管吸収と比較すると、BA は 5.4 倍高かった。一方、ANC 粉末投与後の AUC (ng·min/mL) は、 1310.9 ± 355.4 (投与量 0.5 mg)、 3170.9 ± 862.6 (投与量 1 mg) であった。AUC は消化管吸収と同様に未溶解固体量依存的に増大し、結晶性製剤に比べて、非晶質製剤投与時の吸収性が優れていることが示された。ANC 経肺投与後の BA は 30 (%) を超え、CC 懸濁液投与時の消化管吸収性と比較して、100 倍を超える高い BA を示すことが明らかとなった。

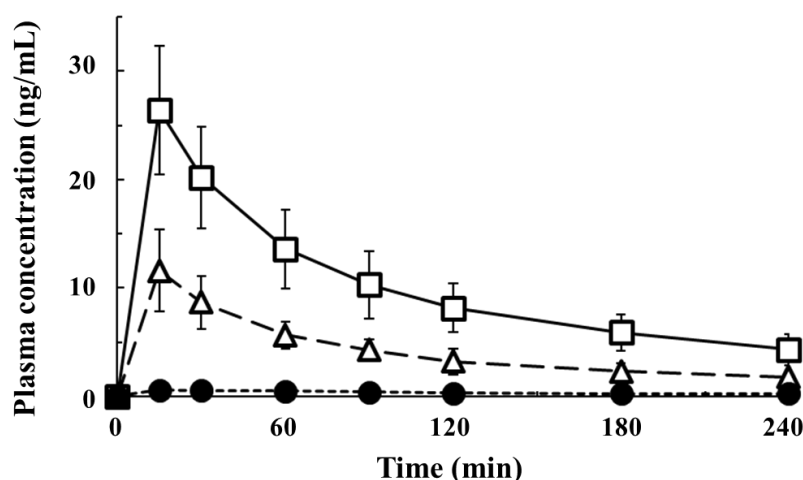


図 22 各種 CUR 粉末を肺内噴霧投与した後の血漿中 CUR 濃度プロファイル
 Keys, ● : CC 1 mg, △ : ANC 0.5 mg, □ : ANC 1 mg.
 データは mean ± S.D. として示した。(n = 6)
 [Eur. J. Pharm. Biopharm.,122, 1-5 (2018). Figure 4]

表 3 CUR 経肺投与後の各薬物速度論パラメータ

Dose (mg)	Solid state	C _{max} (ng/mL)	AUC (min·ng/mL)	BA (%)
1	Crystal	0.6 ± 0.3	167.5 ± 45.6	2.0
0.5	Amorphous	11.9 ± 3.9	1310.9 ± 355.4	30.8
1	Amorphous	26.4 ± 5.9	3170.9 ± 862.6	37.3

データは mean ± S.D. として示した。(n = 6)
 [Eur. J. Pharm. Biopharm.,122, 1-5 (2018). Table 3]

2-4 考察

CUR の吸収率を報告する論文はきわめて少なく、多くの論文が AUC の相違に基づいて、議論している。これは、CUR の体内動態（全身クリアランス、分布容積等）に関する知見が乏しいためである。CUR を静脈内投与する場合、溶解度が低いゆえに、投与量の確保が問題である。投与量は投与液の濃度と体積で決定されるが、有機溶媒や界面活性剤が併用されることで、投与液の濃度を改善することが一般的である。しかし、有機溶媒を用いた場合、血管内投与後、血液と混合することで、CUR の溶解度が大きく低下し、血中で CUR が析出するリスクが懸念される。また、界面活性剤を用いた場合、体内動態に対する界面活性剤の影響が考えられ、得られた体内動態のデータの信憑性に疑問が残る。本研究では、BSA を用いて CUR の溶解度を確保した。アルブミンは血液中に含まれているため、CUR の体内動態に関する影響はきわめて小さいと予想される。ANC を用いて、BSA を含む緩衝液中での CUR の溶解度を測定したところ、約 300 $\mu\text{g/mL}$ という高い溶解度を確認することができた。さらに、投与量を確保するためには投与体積を大きくする必要があるが、過剰な投与体積を瞬時投与すると、血液量が一過性に増大し、血圧等への影響があり、生理的に問題と考えられる。本研究ではこのような影響を小さくするために、持続点滴投与（0.1 mL/min, 10 min）を行うことで、投与体積を確保した。Yang らは、急速静脈内投与（10 mg/kg）直後の CUR の血中濃度が $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ であることを報告している⁴⁹⁾。本章で得られた血中濃度は $0.2 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$ （0.83 mg/kg）であった。投与量が大きく異なるが、投与方法の相違（急速静脈内投与と点滴静脈内投与）を考慮すると、Yang らの報告と大きく矛盾はしない結果と考えている。

CUR の全身クリアランスは 118.7 ± 12.3 (mL/min) であった。CUR の主要代謝臓器は肝臓であると考えられるが、ラットの肝クリアランスの報告値⁵⁰⁾（11.8 mL/min）と比較して、10 倍高い値である。本知見は肝代謝以外の消失機構の寄与が大きいことを示している。その消失機構としては、血中での加水分解が考えられる。消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は 41.7 ± 11.9 (min) であり、過去の報告よりも大きい値であった⁴⁹⁾。分布容積（ V_d ）は 7261.1 ± 2608.3 (mL) であり、ラットの実体積を大きく超える値を示していることから、特定の組織や臓器中に濃縮されている可能性が考えられる。静脈内投与により得られたこれらのパラメータは CUR の *in vivo* 吸収性を定量的に評価する上で、重要な知見と考えられる。

次に、消化管粘膜表面に存在する粘液層の影響をより明確に評価することを目的として、DTT による前処置を行った。DTT 処理群の血漿中濃度プロファイルに、未処置群との相違は観察されず、粘液層の影響は小さいことが明らかとなった。粘液層の主成分はムチンで、その実態は糖タンパク質である。ANC の粒子径がナノサイズで小さいため、ムチンがそのバリアー機能を発揮できなかったためと考えられる。

CC 及び ANC の懸濁液を十二指腸内に投与したところ、CC 懸濁液投与後の BA は 0.4 (%) であった。対照的に、ANC 懸濁液投与後に高い血漿中 CUR 濃度が観察され、BA は最大で約 6.2 倍改善された。結晶性固体では CUR の吸収性は改善されなかった。さらに、ANC 懸濁液からの消化管吸収に関しては、懸濁液濃度すなわち固体量依存的に増大することが明らかとなった。これらの知見は *in vitro* 透過実験で得られた結果と同様である。*In vivo* においても未溶解固体が直接関与する新規生体膜透過機構が機能し、CUR が吸収される可能性を示唆している。*In vitro* と *in vivo* の両実験系で得られた結果と比較すると、CC に対する ANC による増大の程度は小さい。この理由は CC 投

与後の消化管吸収性が比較的良好であったためと考えられる。経口投与後の CUR の BA は 1% 以下であることが報告されており^{22,49)}、この報告値と大きな矛盾はない。消化管吸収性が良好であった理由として、消化管内の胆汁酸による可溶化の可能性が挙げられるが、詳細は不明である。

次に、CUR の経肺吸収性を検討した。消化管投与と比較して、経肺投与後の血漿中 CUR 濃度は顕著に高かった。さらに、消化管吸収と同様、固体量依存的な AUC の増大が確認され、BA は 30% を超える値を示した。投与量依存的な AUC の増大は、肺胞上皮層表面に接触した固体量に依存した結果と考えられる。一方、CC 経肺投与後の BA は約 2% であり、ANC 懸濁液を十二指腸内投与した場合の BA の約 5 倍である。一般に、消化管吸収よりも、経肺吸収が迅速かつ良好と考えられているが、肝初回通過代謝の回避も寄与していると考えられる。消化管吸収の場合と同様、経肺吸収性に関しても、*in vivo*、*in vitro* 両実験系で、透過性・吸収性の増大の程度に相違が観察された。その理由は、肺胞上皮表面に存在する肺サーファクタント (pulmonary surfactant, PS) と考えている。PS は主としてリン脂質 (約 90%) から構成される界面活性物質であるが、II 型肺胞上皮細胞から分泌され、肺胞表面を覆うことによって、肺胞の保護に寄与している⁵⁰⁾。また、微生物やアレルゲン、汚染物質などの微粒子に対してバリアー機能の役割も担う。近年の報告では、リポソームやミセルなどの薬物キャリアとの相互作用に基づく薬物吸収性の改善の可能性も報告されている⁵¹⁾。CUR により見出された新規生体膜透過機構は、溶解過程を経ずに固体から脂質膜へ直接溶解することにより、膜透過が促進されると推察している。この場合、リン脂質は生体膜を構成する主要成分でもあることから、投与された固体が PS と接触することにより、新規機構に基づいた生体膜透過が促進された可能性が考えられる。

2-5 小括

第2章では、CURの*in vivo*吸収性の評価を行った。表面粘液を除去しても、CURの吸収性に変化は認められず、表面粘液層の影響は観察されなかった。次に、各ANC懸濁液を十二指腸内投与した場合、AUCは固体量依存的に増大した。また、これらの知見は、*in vitro*透過実験と関連する関係であり、*in vivo*においても新規生体膜透過機構が機能する可能性が示された。一方、十二指腸内投与と比較して、ANCの経肺投与時にBAが顕著に改善された。水分が乏しい肺内環境は投与された固体粒子と細胞との効率的な接触、再結晶化の抑制など、新規透過機構にとって有利な環境であり、経肺投与は新規機構の利点を活かすことは可能な投与経路であることが明らかとなった。

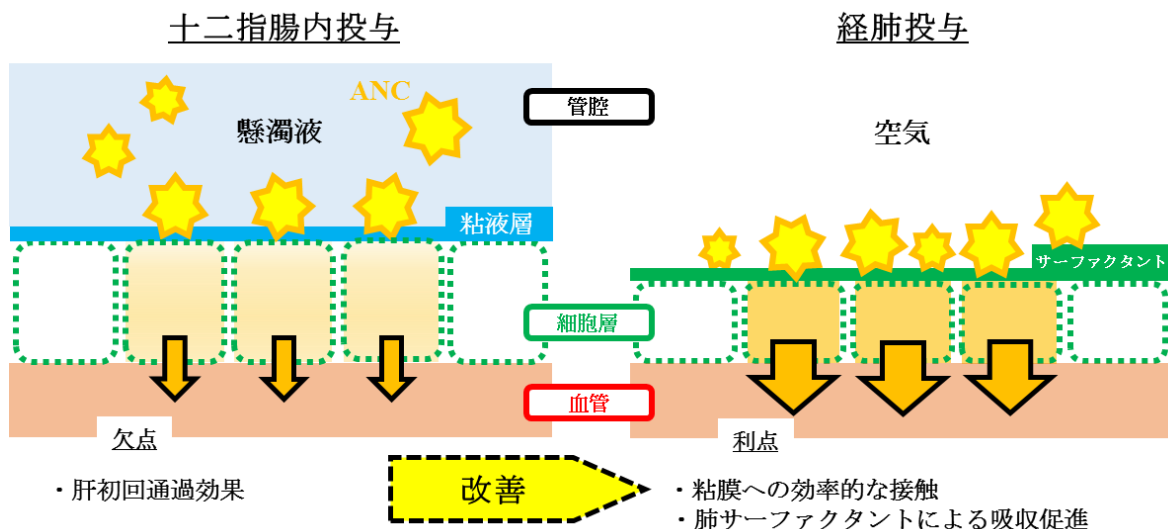


図23 新規生体膜透過機構に基づくCURの*in vivo*吸収性の改善

第 3 章

新規生体膜透過機構により輸送される薬物例：

フロセミドに関する検討

第 3 章 新規生体膜透過機構により輸送される薬物例：フロセミドに関する検討

3-1 緒言

第 2 章では、*in vitro* における CUR の消化管吸収、経肺吸収においても、*in vitro* で観察された透過現象が確認された。しかし、CUR のみの透過・吸収に本透過機構が観察される場合、本透過機構の応用の可能性は著しく狭まる。つまり、応用を考える上では、本透過機構により膜輸送される CUR 以外の化合物が存在するかどうかは非常に重要である。そこで、難水溶性薬物を対象に、論文検索及び予備実験を行ったところ、furosemide (FUR) が候補化合物である可能性が明らかとなった。

FUR は利尿作用を示す心疾患治療薬として、臨床で頻用されている。JP 17 によると、FUR は水にほとんど溶けない。水に対する溶解度は 0.1 mg/mL 未満である⁵²⁾。ただし、弱酸性薬物 (pKa = 3.9) であるため、pH の上昇に伴い、溶解度は増大する⁵³⁾。一方、膜透過性に関しては、Caco-2 細胞を用いた検討を通じて、非常に低いことが報告されている^{54,55)}。中性 pH では、溶解度は増大するものの、イオン形の割合が高く、膜透過性もかなり低いと予想される。溶解性、膜透過性の両者が低いことから、CUR 同様に BCS クラス 4 に分類されている⁵²⁾

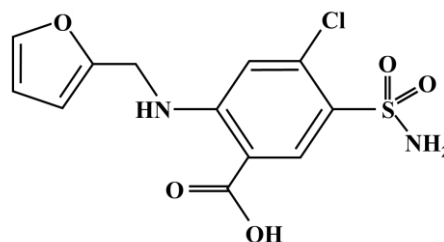


図 24 FUR の化学構造式

⁵⁶⁾。経口吸収率に関しては、個体間変動が大きいことが報告されている^{57,58)}。主な理由として、胃内での溶解性の低下や部位特異的な吸収が挙げられるが、詳細は明らかではない。経口吸収性の改善を目的とした溶解性改善に関する検討が報告されているが⁵⁹⁾、CUR 同様、FUR の物性を考慮すれば、溶解性改善のみでは十分な吸収改善は望めないと考えられる。さらに、FUR の場合、中性 pH での安定性が高く、比較的高い溶解度を示すことから、膜透過機構に対する溶解した薬物の影響を評価することも可能である。

第 1 章の検討では、AIC 条件で、*in vitro* 細胞層透過性を検討した。製剤粉末が細胞層表面と直接接触できる実験系として利用したが、細胞層表面に少量の水分が残存する可能性がある。少量であっても、水分が存在すれば、固体が溶解し、局所で高い濃度勾配が形成され、膜透過が亢進される可能性が考えられる。この問題を克服するため、本章の検討では、人工膜を用いた *in vitro* 膜透過実験を実施した。近年の医薬品のスクリーニング過程において、人工膜は膜透過性評価にも汎用されている。人工膜は完全に水分が存在しない条件で調製可能であり、AIC 条件下で水分の影響を無視できると考えられる。

本章では、FUR 非晶質製剤を作製し、種々の *in vitro* 及び *in vivo* 実験系を用いて、新規生体膜透過機構の観点から FUR の生体膜透過機構に関する総合的な評価を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 実験材料

FUR は、東京化成工業株式会社（東京）より購入した。Kollidon® 12 PF (K12) は、BASF 社 (Ludwigshafen, Germany) より無償提供を受けた。ドデカン、卵黄レシチン及び塩化コバルトは、和光純薬株式会社（大阪）より購入した。その他の試薬等は、第 1 章及び第 2 章と同様のものを使用した。

3-2-2 FUR 非晶質製剤 (FUR-K12) の調製

FUR-K12 は、過去の報告の方法を一部改変して作製した⁶⁰⁾。FUR 及び K12 (質量比 4:1) を 12 mm ステンレスボール 1 個と共に 25 mL 粉砕ジャーに入れた後、30 Hz で 90 分間混合粉砕した (Mixer mill MM400, Retch GmbH&Co., Hann, Germany)。また、FUR のみを同条件で粉砕したものと及びステンレスボールを入れずに混合したものをそれぞれ FUR 単独粉砕 (Milled FUR) 及び物理的混合物 (Physical mixture, PM) とした。

3-2-3 各製剤の物性評価

3-2-3-1 粉末 X 線回折測定 (XRPD)

X 線回折装置 MiniFlex 600 (Rigaku, 東京) を用いて、XRPD を実施した。X 線源は Cu K α 線源 ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$) を用い、管電圧及び管電流はそれぞれ 40 kV、15 mA にて測定した。データは走査角 (2θ) として 3-50°、間隔 0.02°、走査速度 0.33 min⁻¹ にて取得した。第 1 章 実験方法 1-2-4 に準じて、測定試料を調製した。

3-2-3-2 示差走査熱量測定 (DSC)

DSC 3500 (NETZSCH - Geratebau GmbH, Germany) を用いて DSC 測定を行った。粉末試料約 1 mg をアルミニウムパンに封入し、平衡化 (0°C, 5 分間) した後、30 mL/min の窒素パージ下にて、10°C /min の昇温温度で 30°C から 250°C まで測定した。

3-2-3-3 粒子径の測定

Zetasizer ZSP (Malvern Instruments Inc., Worcestershire, UK) を用いて、動的光散乱法により、粒子径を測定した。懸濁液試料は粉末試料を超純水中に分散させ、Bransonic® (Brason Ultrasonics, Emerson Japan, Ltd., 神奈川) により超音波処理することにより調製した。633 nm He-Ne レーザーを光源として用いて、入射-散乱光の角度 173° の後方散乱を検出することにより、データを取得した。

3-2-3-4 透過型電子顕微鏡 (TEM)

粒子形状の観察は第 1 章 実験方法 1-2-3-4 に準じて行った。

3-2-4 溶解度の経時変化の測定

溶解度の経時変化は、第 1 章の実験方法 1-2-4 を一部改良して測定した。各試料 (FUR または FUR-K12) 10 mg をガラス瓶に分取し、HBSS (pH 7.4) を 40 mL 加えた。各懸濁液を室温中 100 rpm

で攪拌した。各ガラス瓶より経時的にサンプリングを行い、10 分間遠心分離 (4°C, 14,000 g) した後、上清中の FUR 濃度を HPLC により定量した。

3-2-5 *In vitro* 細胞層透過性の評価

3-2-5-1 細胞培養

MDCK 細胞 (passage #80 - #90) を用いて、第 1 章 細胞培養 1-2-5-1 に準じた。

3-2-5-2 細胞層透過実験

第 1 章の細胞層透過実験 1-3-5-2 に準じて行った。透過実験では、濃度 1 mg/mL の FUR 溶液 (FUR として 0.5 mg) を用い、AIC 条件下で噴霧した FUR 量 及び FUR-K12 量はそれぞれ 0.5 mg 及び 0.7 mg (FUR として 0.5 mg) であった。

3-2-6 *In vitro* 人工膜透過性の評価

脂質人工膜の透過性は過去の報告を一部改良して評価した⁶¹⁾。20 w/v% レシチン含有ドデカン溶液 5 μ L を細胞層透過実験に用いたインサート支持膜上に滴下した後、脂質溶液が支持膜全体に拡がるまで 30 分間静置した。細胞膜同様、TEER 測定により脂質膜が形成されていることを確認した (TEER > 10 k Ω ·cm²)。以下、細胞層透過実験 3-2-5-2 に準じて、透過性を測定した。

3-2-7 脂質人工膜表面に存在する水分量の定性的評価

脂質人工膜の作製は、3-2-6 に準じて行った。対照として、支持膜に脂質溶液を滴下していないインサートを用いた。また、AIC 条件下、basal 側からの水分の移動の有無を確認するため、basal 側には膜透過実験で用いた 5 w/v% BSA 含有 HBSS を同体積加え、透過性の評価同様に 3 時間放置した。その後、各支持膜上に塩化コバルト粉末を適量噴霧し、粉末の状態変化 (色調、ぬれ) を比較観察した。

3-2-8 *In vivo* 吸収性の評価

3-2-8-1 静脈内投与実験

BA 算出のため、FUR の静脈内投与を行った。FUR 溶液 (0.25 mg/rat) を頸静脈より 5 分間持続注入した (0.2 mL/min)。投与後 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 及び 240 分に採血した (0.3 mL)。得られた血液サンプルは、直ちに遠心分離 (4°C, 12,000 g, 10 min) した後、血漿 0.1 mL を新しいサンプルチューブに分取した。得られた血漿にアセトニトリル 1 mL を添加し、30 分間氷冷した。再度、同条件で遠心分離を行い、上清 1 mL を新たなサンプルチューブに分取した後、減圧乾固を行った。残渣は HPLC で定量を行うまで、-30°C で冷凍保存した。

3-2-8-2 経肺投与実験

第 2 章 2-2-3-2 の方法に準じて処置を行った後、各粉末製剤 (0.7 mg/rat) を投与した。その後、15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 分に頸静脈より採血を行った。得られた血液サンプルは、静脈内投与実験と同様に処理を行った。

3-2-8-3 経口投与実験

ゾンデを用いて、FUR 溶液 (1 mg/rat) の胃内投与を行った。採血方法、時間及び除タンパク処理の方法は経肺投与実験に準じた。

3-2-9 薬物動態学的パラメータの算出

全ての薬物動態学的パラメータは Winnonlin[®] (Ver. 6.3, Pharsight Corporation, Mountain View, CA, U.S.A.) を用いて、ノンコンパートメント解析に基づいて算出した。経肺投与及び経口投与後の BA に関しては、第 2 章 2-2-4 に準じて算出した。

3-2-10 FUR の定量分析

各実験により得られた血漿試料中の FUR 濃度は、過去の報告の方法を一部改良して測定した⁶²⁾。HPLC (LC-20A, 島津製作所, 京都) 及び蛍光検出器 (RF-10A, 島津製作所, 京都) ODS カラム (COSMOIL 5C₁₈-MS-II, 5 µm, 4.6 × 1500 mm, ナカライテスク, 京都) を用いた。移動相は 20 mM KH₂PO₄ とアセトニトリルの混液 (65:35)、流速 1.0 mL/min、励起波長及び蛍光波長はそれぞれ 360 nm 及び 413 nm とした。

3-3 実験結果

3-3-1 各製剤の物性評価

図 25 に、各粉末製剤の XRPD プロファイルを示す。Bulk FUR (図 25-A) 及び PM (図 25-C) では、鋭い回折ピークが観察された。一方、FUR を単独粉砕した Milled FUR (図 25-D) 及び K12 と混合粉砕した FUR-K12 (図 25-E) では、Bulk FUR と比較して、回折ピークはいずれも縮小し、FUR-K12 のピークは特に小さかった。また、非晶質製剤作製のために用いた高分子 K12 (図 25-B) はブロードなハローパターンを示した。

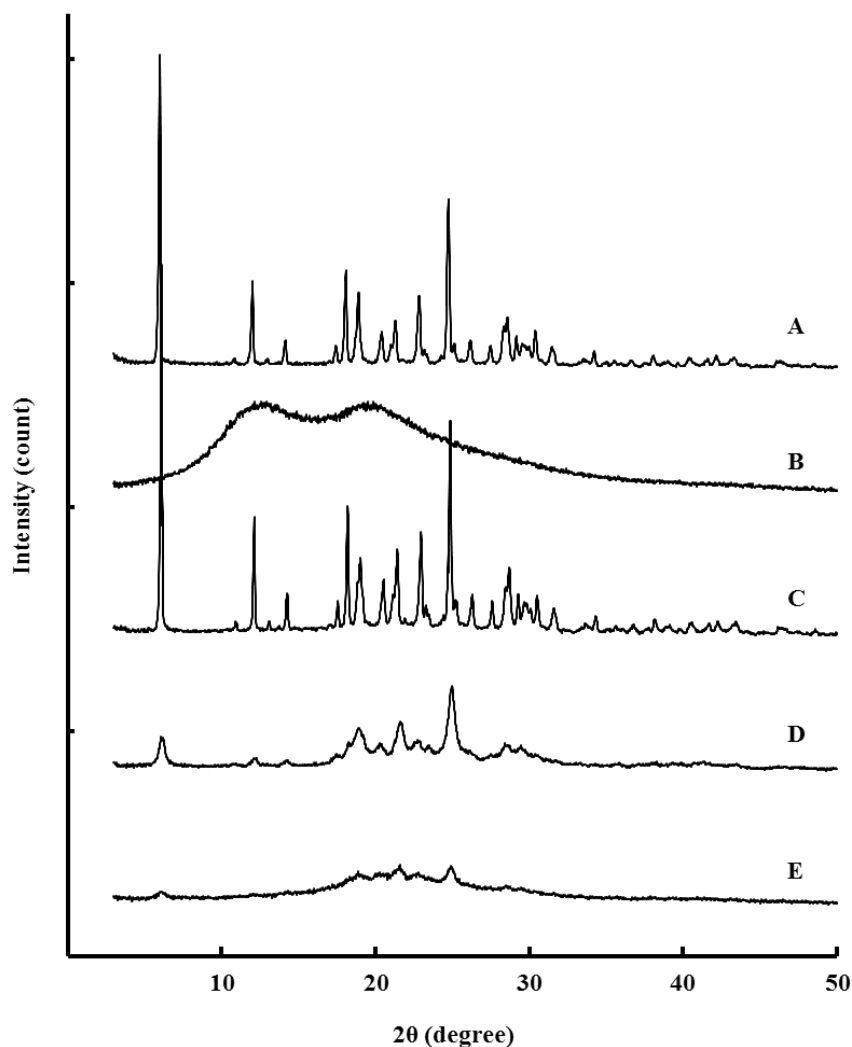


図 25 FUR 製剤の物性評価 その 1- 粉末 X 線回折
(A) Bulk FUR (B) K12 (C) PM (D) Milled FUR (E) FUR-K12
[*Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1769-1777 (2018). Figure 1]

図 26 に、DSC 測定の結果 (左 : 全体、右 : 部分拡大) を示す。Bulk FUR (図 26-A) では、熱分解に伴う発熱ピークの外に、135°C 及び 220°C 付近に吸熱ピークが観察された。PM (図 26-C) においても、同様の吸熱ピークが観察された。Milled FUR (図 26-D) では、ブロードで、きわめて小さい

吸熱ピークが 130°C 付近に観察された。一方、FUR-K12 (図 26-E) では、65°C 付近及び 120°C 付近にブロードな吸熱ピーク、発熱ピークが観察された。

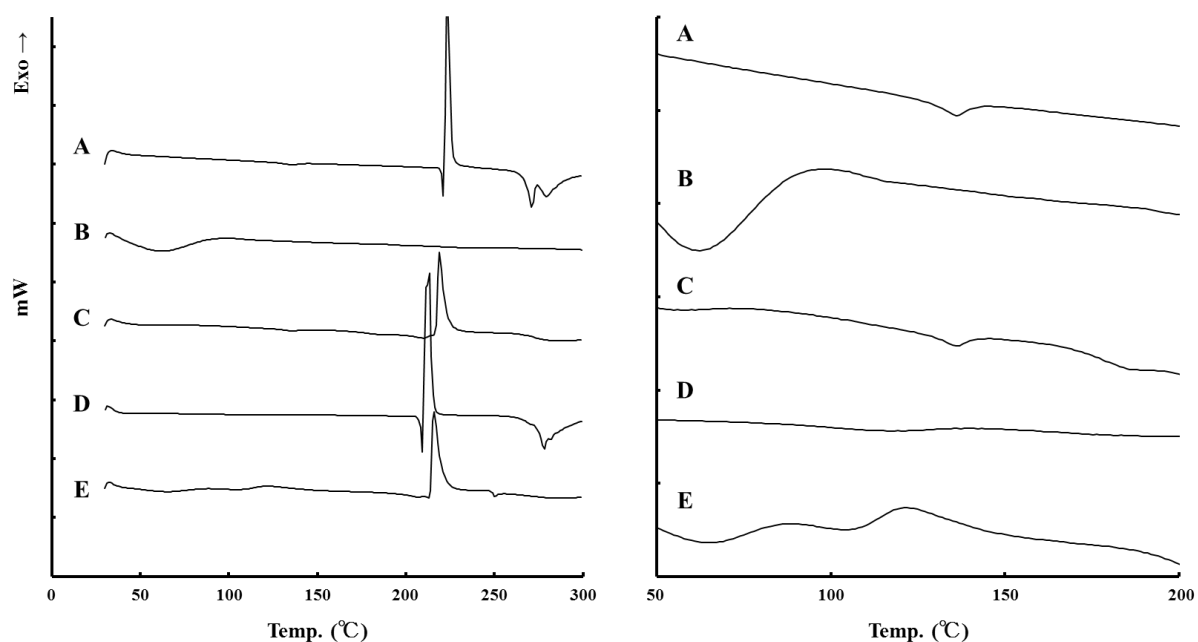


図 26 FUR 製剤の物性評価 その 2 - 示差走査熱量測定
 (左) 全体図 (右) 50-200°Cの拡大
 (A) Bulk FUR (B) K12 (C) PM (D) Milled FUR (E) FUR-K12
 [Biol. Pharm. Bull., 41, 1769-1777 (2018). Figure 2]

図 27 に、DLS により測定した FUR-K12 の粒子径分布を示す。FUR-K12 の平均粒子径及び PDI はそれぞれ 208.4 ± 10.7 (nm) 及び 0.397 であった。

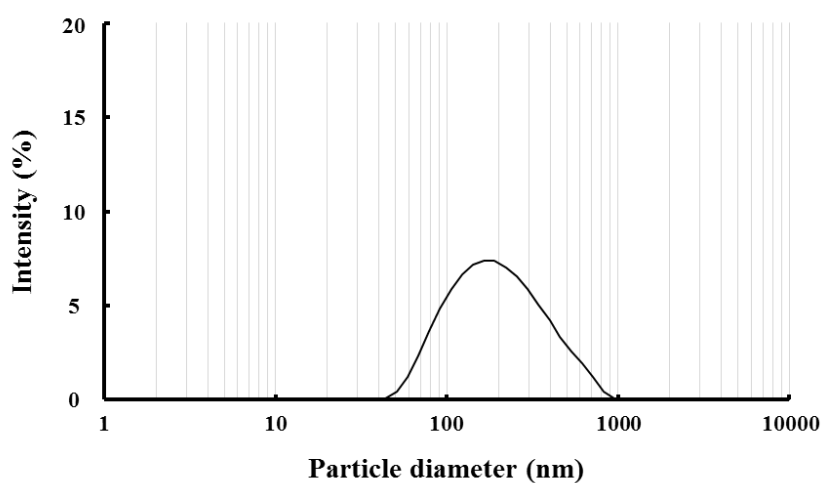


図 27 FUR 製剤の物性評価 その 3 - 動的光散乱法による粒子径測定
 [Biol. Pharm. Bull., 41, 1769-1777 (2018). Figure 3]

図 28 に、TEM を用いて各製剤に含まれる固体粒子の形態を観察した結果を示す。FUR-K12 の粒子の形状は長方形であり、一部の球状粒子は K12 と考えられる。一方、Bulk FUR に関しては、FUR-K12 と同様、粒子形状は長方形であるが、粉砕される前の粉体であるため、粒子サイズは大きいことが明らかとなった (図 28-A)。

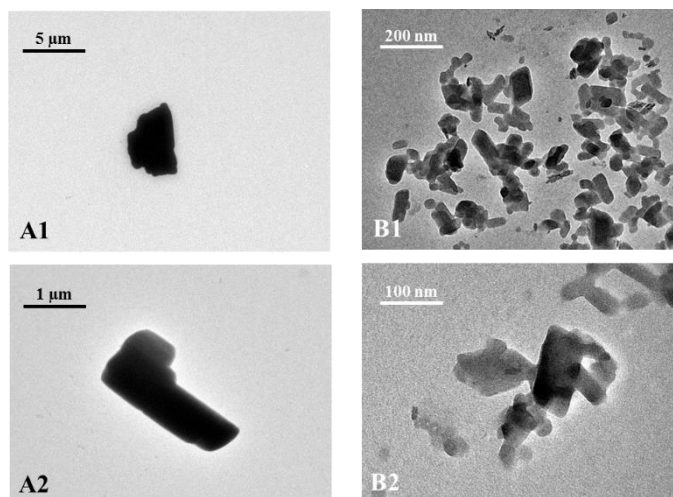


図 28 FUR 製剤の物性評価 その 4- 透過型電子顕微鏡による形態観察
(A) Bulk FUR (B) FUR-K12
[*Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1769-1777 (2018). Figure 4]

図 29 に、Bulk FUR 及び FUR-K12 からの溶出プロファイルを示す。Bulk FUR、FUR-K12 ともに、溶出率は実験開始後 10 分までは大きく増大し、20 分以降はほぼ一定の値を示した。実験終了後 (60 分後) における FUR-K12 からの溶出率 ($91.5 \pm 1.8\%$) は、Bulk FUR ($44.4 \pm 4.9\%$) と比較して、約 2 倍であった。

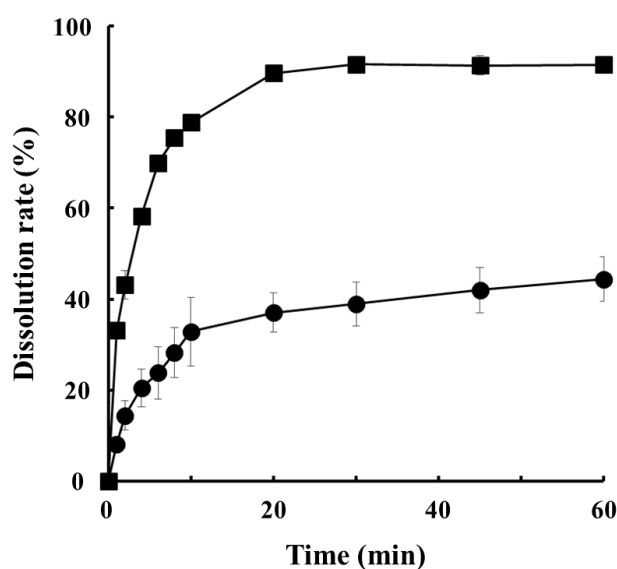


図 29 FUR 製剤の物性評価 その 5- 溶出性
Keys, ● : Bulk FUR, ■ : FUR-K12.
データは mean \pm S.D. として示した。(n = 3)
[*Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1769-1777 (2018). Figure 5]

3-3-2 FUR の *in vitro* 膜透過性

図 30 に、各製剤からの FUR の MDCK 細胞層透過プロファイルを示す。FUR 溶液からの透過よりも、AIC 条件下における Bulk FUR もしくは FUR-K12 粉末からの透過量が多いことが明らかとなった。実験開始 180 分後における FUR 溶液、Bulk FUR 及び FUR-K12 からの各累積透過量はそれぞれ 1.0 ± 0.1 、 32.8 ± 4.6 、 44.1 ± 8.5 (μg) であった。

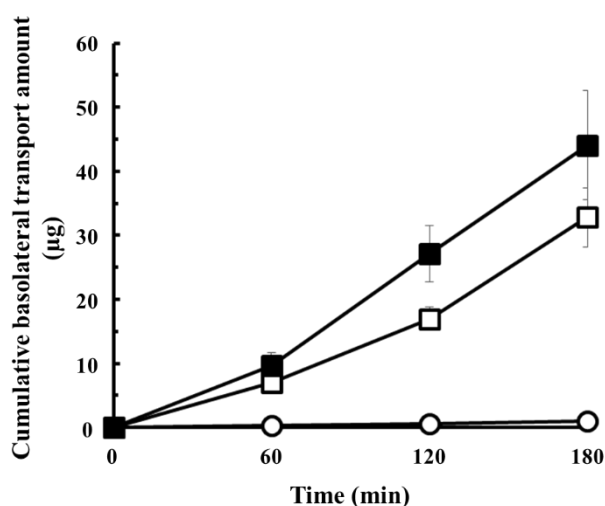


図 30 FUR の *in vitro* 膜透過性評価：MDCK 細胞膜
Keys, ○ : FUR solution under LCC, □ : Bulk FUR under AIC,
■ : FUR-K12 under AIC. データは mean \pm S.D. として示した。(n = 4)
[*Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1769-1777 (2018). Figure 6]

図 31 に、FUR の人工膜透過性プロファイルを示す。MDCK 細胞層透過と同様、FUR 溶液よりも両粉末製剤、特に FUR-K12 からの累積透過量が高値を示した。180 分後の累積透過量はそれぞれ 0.1 ± 0.0 、 3.2 ± 0.2 、 10.9 ± 0.6 (μg) であった。

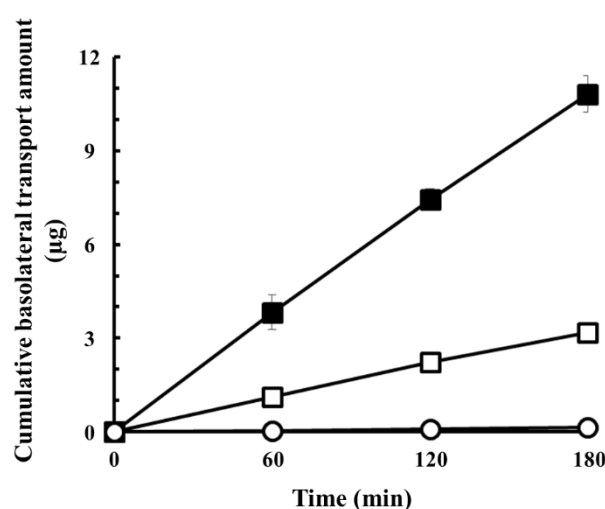


図 31 FUR の *in vitro* 膜透過性評価：脂質人工膜
Keys, ○ : FUR solution under LCC, □ : Bulk FUR under AIC,
■ : FUR-K12 under AIC. データは mean \pm S.D. として示した。(n = 4)
[*Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1769-1777 (2018). Figure 7]

人工膜上に存在する水分量に関して、無水塩化コバルト (CoCl_2) を用いて定性的な評価を行った。 CoCl_2 の結晶は青色、塩化コバルト・六水和物 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) の結晶は赤色である。少量の水分により、無水塩化コバルトが塩化コバルト水和物に変化すると、色調が変化するために、水分の検出に利用される。図 32 に結果を示す。3 種類の異なる条件を設定した。条件 (A) (図 32-A) は、脂質を滴下せず、basal 側に溶液を添加しない条件、条件 (B) (図 32-B) は脂質を滴下せず、basal 側に溶液を添加した条件、条件 (C) (図 32-C) が脂質を滴下し、basal 側に溶液を添加した条件である。無水塩化コバルトによる水分検出は非常に高感度であるため、条件 (A) は空気中の水蒸気の影響を評価するための比較対照である。条件 (B) では、明らかな色調変化 (青 → 赤紫) 及び湿潤状態が観察された。一方、条件 (A) 及び条件 (C) では、僅かな色調変化 (青 → 青紫) が観察されたものの、両条件で明らかな相違は観察されなかった。条件 (C) で観察された若干の変色は空気中の水蒸気に起因し、人工膜を介して、basal 側へ水分は移動しないことが明らかとなった。

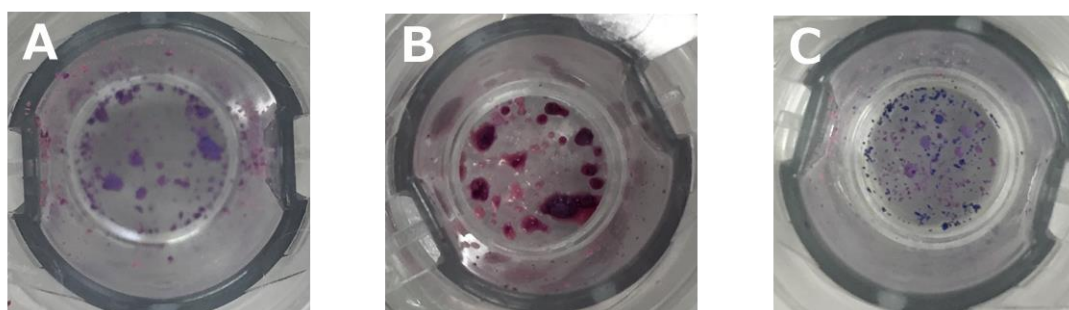


図 32 脂質人工膜上に存在する水分の定性的評価
(A) 膜無&液無, (B) 膜無&液有, (C) 膜有&液有

3-3-3 FUR の *in vivo* 吸収性

FUR 投与後の BA を算出するため、静脈内投与実験を行った。図 33 に、FUR 溶液を静脈内投与後の血漿中濃度プロファイルを示す。得られた血漿中濃度より算出された AUC は 201.5 ± 27.5 ($\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$) であった。また、全身クリアランス (CL_{tot}) 及び消失半減期 ($t_{1/2}$) は、それぞれ 1.3 ± 0.2 (mL/min) 及び 68.2 ± 14.8 (min) であった。

図 34 に、FUR 溶液の経口投与、BulkFUR あるいは FUR-K12 粉末の経肺投与後の血漿中濃度プロファイルを示す。FUR 溶液を経口投与した後の AUC 及び BA はそれぞれ 323.6 ± 129.3 ($\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$) 及び 40.1 (%) であった。一方、BulkFUR あるいは FUR-K12 の粉末を経肺投与後の AUC はそれぞれ 469.0 ± 88.7 , 591.4 ± 83.0 ($\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$) であった。また、BulkFUR 及び FUR-K12 投与後の BA はそれぞれ 89.5、95.3 (%) であり、溶液の経口投与と比較して、いずれも 2 倍以上の高値を示した。平均滞留時間 (MRT) は、FUR-K12 粉末の経肺投与後で、最も短く (87.7 ± 7.2 min)、FUR 溶液を用いた経口投与で最も長かった (264.9 ± 138.2 min)。

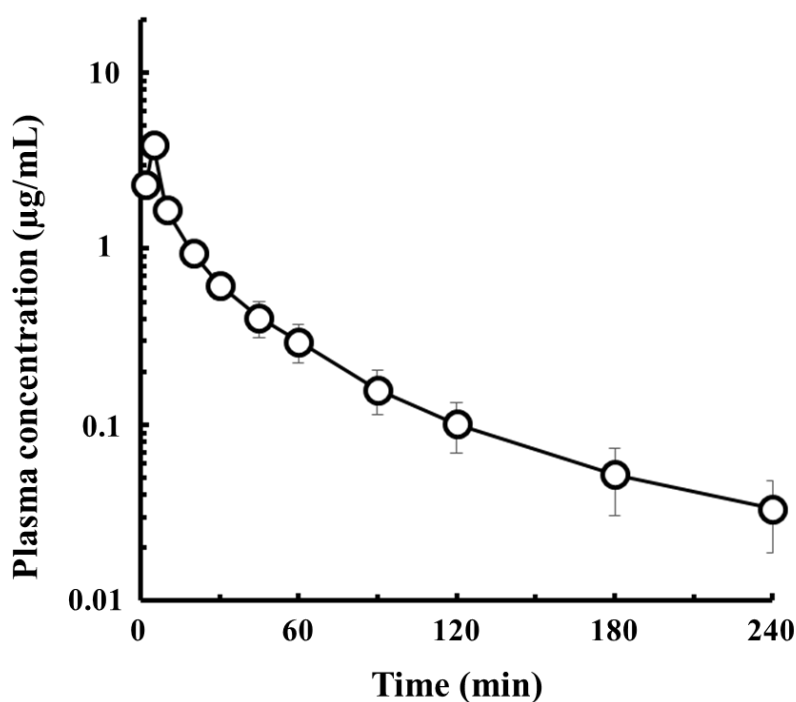


図 33 静脈内投与後の FUR 血漿中濃度プロファイル
データは $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ として示した。(n=5)
[*Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1769-1777 (2018). Figure 8]

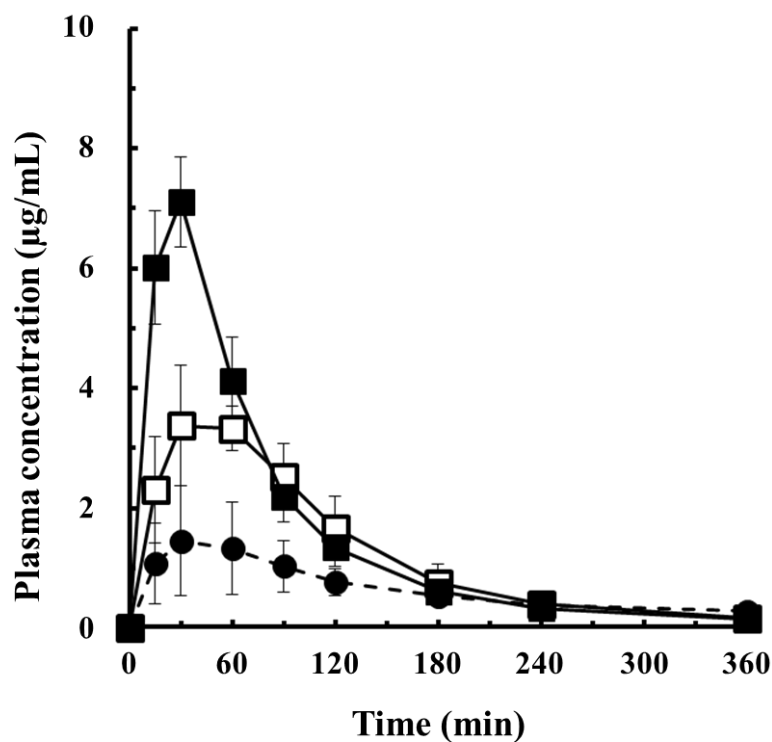


図 34 経口および経肺投与後の FUR 血漿中濃度プロファイル
 Keys, ● : FUR solution (intragastric), □ : Bulk FUR (intrapulmonary), ■ : FUR-K12 (intrapulmonary)
 データは mean ± S.D. として示した。(n = 5) .
 [Biol. Pharm. Bull., 41, 1769-1777 (2018). Figure 9]

表 4 血漿中濃度プロファイルより算出された薬物速度論パラメータ

Route	Form	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (min)	AUC (min · µg/mL)	MRT (min)	BA (%)
Intravenous	Solution	-	-	201.5 ± 27.5	50.0 ± 11.3	-
Intragastric	Solution	1.5 ± 0.9	55.0 ± 39.9	323.6 ± 129.3	264.9 ± 138.2	40.1
Intrapulmonary	Bulk FUR powder	3.7 ± 0.7	47.2 ± 16.0	469.0 ± 88.7	112.0 ± 29.0	89.5
Intrapulmonary	FUR-K12 powder	7.1 ± 0.8	30.0 ± 0.00	591.4 ± 83.0	87.7 ± 7.2	95.3

データは mean ± S.D. として示した。(n = 5)
 [Biol. Pharm. Bull., 41, 1769-1777 (2018). Table 1]

3-4 考察

Bulk FUR の XRPD プロファイル (図 25-A) では、明確な結晶性ピークが観察された。また、DSC プロファイル (図 26-A) には、135°C 及び 220°C 付近にいずれも吸熱ピークが観察された。FUR には、3 種類の結晶多形が存在することが報告されているが^{63,64}、それらの報告から、前者は I 型結晶に特徴的な高温安定形への相転移に伴うピーク⁶³、後者は FUR の融解に伴うピークと考えられる。したがって、本実験で用いた Bulk FUR は I 型結晶である可能性が高い。DSC における同様のシフトは、PM や Milled FUR においても観察されたことから、両製剤中の FUR は結晶状態が維持され、高分子との物理混合や FUR 単独でのボール粉砕では非晶質製剤の作製は困難であることが示された。一方、FUR-K12 では、XRPD プロファイルに小さな結晶性ピークが観察されたものの、Bulk FUR とは異なる 2 つの熱量変化 (65°C 及び 120°C 付近) が観察された。本知見と XRPD の結果を考えると、前者 (65°C 付近) がガラス転移に伴う吸熱シフト、後者 (120°C 付近) が再結晶化に伴う発熱シフトであると考えられる。また、I 型結晶に特徴的な 135°C 付近の吸熱シフトが明確に観察されなかったことから、FUR-K12 中の FUR は非晶質状態であることが明らかとなった。Bulk FUR の平均粒子径は FUR-K12 よりも数倍大きかったことから (data not shown)、非晶質化だけでなく、微細化に対しても高分子の添加が有用であることが明らかとなった。各製剤からの FUR の溶出性を検討したところ、非晶質ナノ粒子化により FUR の溶解性は顕著に改善された (図 29)。PM 製剤においても、FUR-K12 と同等の溶解性改善が確認された (data not shown)。K12 によって、FUR 固体表面のぬれが改善された結果と考えられる。本知見により、K12 は非晶質 FUR の安定化だけではなく、溶解性改善にも寄与している可能性が示唆された。

In vitro 細胞層透過性に関しては、FUR 溶液、Bulk FUR、FUR-K12 の順に累積透過量が増大した。この結果は、第 1 章の CUR に関する検討で得られた結果と定性的に一致する。しかし、CUR と比較すると、結晶固体 (Bulk FUR) と非晶質固体 (FUR-K12) に関する透過の相違が小さく、FUR の場合には、結晶性固体からの透過に関しても、新規生体膜透過機構が機能する可能性が示唆された。CUR の場合、溶液中での安定性が悪いため、溶解した薬物の膜透過性は明確ではなかった。FUR の場合、中性 pH で溶解性が顕著に増大するため、一定の濃度の溶液 (1 mg/mL) を調製することが可能である。FUR 溶液からの累積透過量から見かけの透過係数 (P_{app}) を算出したところ、 1.0 ± 0.1 ($\times 10^{-7}$ cm/sec) であり、Caco-2 細胞に対する P_{app} の報告値 ($1.2 \pm 0.1 \times 10^{-7}$ cm/sec) と一致し⁶⁵、溶解した FUR の膜透過性は低いことが示された。FUR 溶液と各固体粉末からの累積透過量の差は 50 倍以上あり、溶解した FUR の膜透過性が低いことから、累積透過量の増大が溶解した FUR に起因しないことは明らかである。FUR の膜透過性改善に関しては、自己乳化型エマルジョン製剤や多孔性シリカマイクロ粒子などを用いた報告がある⁶⁶⁻⁶⁸。それらの報告によると、対照溶液と比較して、最大 4.6 倍の P_{app} の改善に留まっている。FUR の膜透過性が低い理由の一つとして、排泄トランスポーターの関与も挙げられており、その阻害による透過性改善の可能性も示唆されたが、いずれの報告も膜透過性改善には溶解性改善が最も効果的であると結論付けている。しかし、溶解した FUR の膜透過性は顕著に低く、溶解性の改善がもたらす膜透過性改善への影響は限定的である。特に、溶解性を改善しても膜透過性が改善されない場合、溶液中の溶解した薬物が膜透過できない可能性があり、単に溶解させるだけではなく、溶解した薬物が膜透過できる状態であることが重要である。一方、*in vitro* 膜透過性評価では、溶解した薬物の影響を完全には無視できない。AIC 条件下においても、細

胞膜表面に微量の水分が存在するため、わずかな量の水分に固体が溶解することにより、局所に高濃度溶液が形成される。膜透過過程に受動拡散を仮定すると、局所の高濃度は膜透過の駆動力となり、結果として膜透過が促進される。ヒト気道上皮細胞 Calu-3 を用いた粉末製剤適用後の膜透過性評価に関する報告では、粉末が細胞表面上で溶解することによって、局所濃度が上昇し、膜透過量が増大する可能性が明らかとなっている⁶⁹⁾。そこで、本研究では、水分の影響が排除可能な人工膜を用いて検討を行った。脂質人工膜透過性評価システム (parallel artificial membrane permeation assay, PAMPA) は、医薬品開発において、細胞層に代わる膜透過性スクリーニング法として注目されている。作製した脂質膜の TEER 値 ($> 10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) は、MDCK 細胞膜 ($< 5 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) よりも高値を示したことから、インサート支持膜の全ての細孔が脂質により満たされた状態であり、薬物の透過障壁となる脂質膜が形成されたものと考えられる。水溶性の高い薬物の人工膜透過性を評価したが、透過は観察されなかった (data not shown)。したがって、作製した脂質人工膜は、膜透過性評価に問題ないことを確認した。図 31 より、LCC 条件下の FUR 溶液に比べて、AIC 条件下の各粉末製剤からの透過が良好であり、MDCK 細胞膜に対する透過と一致する結果が得られた。また、FUR 溶液からの透過に比べて、FUR-K12 からの累積透過量は 80 倍以上に増大した。FUR のカルボキシル基の pKa が 3.9 であることから⁵³⁾、pH7 リン酸緩衝液中で、溶解した FUR の 99.9% 以上がイオン形に電離していると考えられる。人工膜表面に水分が存在しないことや人工膜を介した basal 側からの水分の移動もないことが明らかとなったが (図 32)、ごく少量であるが、空気中の水蒸気に由来する水分が存在する。その僅かな水分に固体が溶解することにより、局所に高濃度溶液が形成される可能性も残る。しかし、FUR 溶液及び Bulk FUR からの累積透過量を比較すると、Bulk FUR からの透過が約 24 倍高い。受動拡散を前提に定量的な考察を行うと、Bulk FUR 適用後の表面局所の FUR 濃度は FUR 溶液 (1 mg/mL) よりも、少なくとも 24 倍高い必要がある。中性 pH における FUR の飽和溶解度が 2.7 mg/mL であることから⁷⁰⁾、濃度の相違は 3 倍程度と考えられる。さらに、図 29 に示すように、Bulk FUR からの溶出性が約 40% であることを考慮すると、新規生体膜透過機構に対する溶解した薬物の影響が小さいことは明らかである。つまり、AIC 条件における Bulk FUR 及び FUR-K12 からの膜透過の増大は固体が直接関与する新規生体膜透過機構によるものと推定される。

FUR の消化管吸収に関しては、個体間変動が大きいことが報告されている^{57,58)}。本章でも、AUC の相対標準偏差 (RSD) を比較すると、経肺投与後 (Bulk FUR : 0.19, FUR-K12 : 0.14) と比較して、胃内投与後 (0.40) の値が 2 倍以上高く、消化管吸収性の変動が大きい。消化管吸収性の変動する要因として、胃内の酸性 pH による溶解性の低下や部位特異的吸収が指摘されている。*In vitro* 膜透過性実験の結果が示す通り、膜透過性が低いにも関わらず、胃内投与後の BA は約 40% であり、投与後の血中濃度の立ち上がりも比較的速い。血中濃度の速い立ち上がりに関しては、部位特異的な吸収、すなわち胃からの吸収が示唆される。そこで、十二指腸部分を結紮することにより、小腸への薬物移行を阻止した。結紮の有無で、血漿中の FUR 濃度レベルに顕著な相違が観察されなかったことから、小腸だけではなく、胃からも吸収される可能性が示唆された (data not shown)。FUR の胃からの吸収に関しては、胃内酸性 pH によって、分子形の割合が増大するために、一過性の膜透過性増大が期待される。酸性条件で、FUR の溶解度が減少するため、胃内で析出することも予想される。固体が析出した場合、本研究で見出した新規生体膜透過機構が関与する可能性が示唆される。

一方、Bulk FUR および FUR-K12 を経肺投与した後の各 BA は FUR 溶液の胃内投与時と比較して、2 倍以上高く、中でも FUR-K12 投与時の吸収率はほぼ 100% を示した。また、Bulk FUR よりも FUR-K12 で、高い BA が得られたことから、CUR 同様に非晶質製剤の有用性も示された。Bulk FUR の場合、算出された MRT より求められる平均吸収時間は 60 分程度である。60 分後の溶出率が約 40%であることを考慮すると、溶解度に依存しない新規生体膜透過機構によるものであることは明らかである。同様に、FUR-K12 においては、20 分後の溶出率が 90% であることから、溶解性改善による吸収性改善の可能性も考えられる。しかし、PM 製剤と FUR-K12 の溶出プロファイルに顕著な相違が観察されないにもかかわらず、吸収プロファイルは大きく異なったことから (data not shown)、FUR-K12 の高い吸収性は、主として新規生体膜透過機構に起因すると考えられる。

本章では脂質人工膜を用いて、固体が直接関与する膜透過機構に関する詳細な評価を行った。人工膜を構成するリン脂質としてホスファチジルコリンを用いたが、同成分は生体膜のみならず、肺胞上皮細胞の表面を覆う PS の主要構成成分でもある。そのため、脂質人工膜による AIC 条件は、肺内環境に比較的近い状態と考えられ、実際に *in vivo* 経肺吸収性に相関する結果が得られたことから、本章で実現された FUR 吸収性改善が新規生体膜透過機構によるものであることを裏付けている。また、第 1 章で用いた ANC の脂質人工膜透過性の評価も行ったが、生体膜同様の結果が得られたため、CUR 吸収性改善も同機構によるものと結論付けることができる (data not shown)。さらに、PS といくつかの薬物送達キャリアとの相互作用については前述した通りであるが、非晶質固体に関連する報告はない。*In vitro* 透過実験の結果が示す通り、非晶質固体が脂質に溶解しやすいと考えられることから、リン脂質が豊富に含まれる PS が新規生体膜透過機構に対して促進的な役割を果たしている可能性が高い。したがって、粉末の経肺吸入による BA 改善は新規生体膜透過機構に加えて、PS による相乗効果も考えられる。

3-5 小括

第3章では、新規生体膜透過機構で膜透過する可能性がある新たなモデル薬物として FUR を選択し、CUR と同様の検討を行った。In vitro 細胞層透過性評価の結果、FUR に関しても、新規生体膜透過機構による膜透過性の改善が示唆された。膜透過に対する溶解した薬物の寄与に関して、CUR では明らかでなかったが、FUR による検討では、その寄与は非常に小さいことが示された。さらに、人工膜を用いた検討を行ったが、細胞層透過と同様の結果が得られた。特に、水分の影響を排除可能な人工膜で同様の結果が得られたことは、新規透過機構が溶解した薬物に依存しないことを明確に示している。CUR 及び FUR に関しては、溶解した後、生体膜脂質に分配した場合の膜内薬物濃度に比べて、生体膜に接触して、脂質に直接溶解した場合の膜内薬物濃度が高いことが示唆される。In vivo 吸収性評価では、FUR-K12 経肺投与後の吸収率がほぼ 100% を示したことから、FUR においても新規生体膜透過機構に基づく吸収性改善の有用性が示された。新規生体膜透過機構は、溶解度に依存しない従来とは異なる画期的な薬物吸収改善方法である。また、本機構は CUR 特異的ではなく、CUR や FUR のような溶解した薬物の膜透過が顕著に小さい薬物に対して、有用な吸収改善方法となる可能性が示唆された。

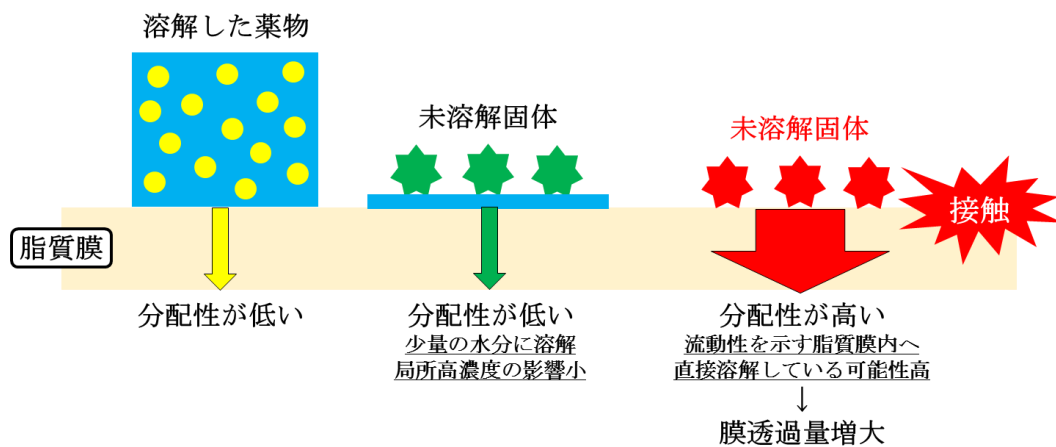


図 35 FUR の生体膜透過に対する新規生体膜透過機構の関与

総括

総括

本研究では、難水溶性薬物 CUR の非晶質ナノ粒子製剤を調製し、種々の検討を通じて、CUR の未溶解固体が直接関与する新規生体膜透過機構の存在を見出した。*In vivo* 吸収においても、同機構に基づく CUR の吸収が確認され、さらに、FUR に関しても同様の現象が観察された。

第 1 章では、非晶質ナノ粒子製剤の物性と *in vitro* で細胞層透過性の評価を行った。非晶質ナノ粒子化により、CUR の溶解度は結晶原末の約 300 倍に改善された。一方で、*in vitro* 細胞層透過性評価の結果、ANC 飽和溶液からの細胞層透過量が定量限界以下であったのに対し、ANC 懸濁液からの透過は懸濁液中に含まれる未溶解固体に依存して顕著に増大することが明らかとなった。種々の検討より、ANC による膜透過量の増大は、溶解した薬物濃度の増大に起因するものではなく、未溶解固体が細胞層に直接接触することにより吸収が促進されること、結晶よりも非晶質固体からの膜透過が良好であることが示された。

第 2 章では、CUR の *in vitro* 吸収性評価を行った。まず、消化管粘膜表面に存在する粘液層の影響は小さいことが明らかとなった。CUR の *in vivo* 消化管吸収においても、懸濁液濃度すなわち未溶解固体量に依存して AUC は増大した。固体粉末粒子の吸収粘膜への効率的な接触を期待できる *in vivo* 経肺吸収では、消化管吸収に比べて、CUR の吸収が約 100 倍改善された。

第 3 章では、CUR と類似した性質を示す FUR に対して、CUR 同様の検討を行った。CUR ほど明確な結果ではないが、FUR も新規膜透過機構により、膜透過する可能性が示唆された。水分の影響を排除可能な脂質人工膜を用いた検討より、溶解した薬物の関与は非常に小さく、固体から膜脂質成分に直接溶解して透過する可能性が示唆された。*In vivo* 経肺吸収性に関しては、CUR と同様、非晶質固体からの吸収が良好であった。したがって、固体粒子が直接関与する膜透過機構は、CUR に特有な機構ではなく、特定の条件を満たす薬物に対して一般的な現象である可能性が示唆された。

近年の医薬品開発でスクリーニングされる医薬品候補化合物は、難水溶性を示す場合が多い。経口投与製剤化する場合、当該化合物の吸収性を確保するためには、溶解性の改善が必要であり、溶解性改善が困難な化合物は必然的にスクリーニングの段階で、ドロップアウトすることになる。溶解性に着目した従来の観点では、CUR や FUR の様な溶解性及び膜透過性がともに低い薬物の吸収性を十分に改善することは難しい。しかし、新たに見出された膜透過機構は、従来よりも良好かつ安定な吸収性を確保できることから、同様の性質を示す薬物に対して有用な吸収改善システムとなる可能性がある。本研究で得られた知見は、従来の観点とは異なる画期的な方法論を示唆しており、次世代の医薬品開発に対する重要な基礎的情報と考えられる。

引用文献

引用文献

1. Williams H. D., Trevaskis N. L., Charman S. A., Shanker R. M., Charman W. N., Pouton C. W., Porter C. J. H., Strategies to address low drug solubility in discovery and development., *Pharmacol. Rev.*, **65**, 315-499 (2013).
2. Amidon G. L., Lennernas 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.*, **12**, 413-420 (1995).
3. Di L., Fish P. V., Mano T., Bridging solubility between drug discovery and development., *Drug Discov. Today*, **17**, 486-495 (2012).
4. Hann M., Hudson B., Lewell X., Lively R., Miller L., Ramsden N., Strategic pooling of compounds for high-throughput screening., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **39**, 897-902 (1999).
5. Kansy M., Senner F., Gubernator K., Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes., *J. Med. Chem.*, **41**, 1007-1010 (1998).
6. Andrews P. R., Craik D. J., Martin J. L., Functional group contributions to drug-receptor interactions., *J. Med. Chem.*, **27**, 1648-1657 (1984).
7. Serajuddin A. T., Salt formation to improve drug solubility., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 603-616 (2007).
8. Brough C., Williams R. O. 3rd., Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery., *Int. J. Pharm.*, **453**, 157-166 (2013).
9. Hancock B. C., Parks M., What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?, *Pharm. Res.*, **17**, 397-404 (2000).
10. Guy Van den Mooter, The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate., *Drug Discov. Today Technol.*, **9**, e79-e85 (2012).
11. Chiou W. L., Riegelman S., Pharmaceutical applications of solid dispersion systems., *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1281-1302 (1971).
12. Knopp M. M., Chourak N., Khan F., Wendelboe J., Langguth P., Rades T., Holm R., Effect of polymer type and drug dose on the *in vitro* and *in vivo* behavior of amorphous solid dispersions., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **105**, 106-114 (2016).
13. Jermain S. V., Brough C., Williams R. O. 3rd., Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery - An update., *Int. J. Pharm.*, **535**, 379-392 (2018).
14. Ding X., Stringfellow T. C., Robinson J. R., Self-association of cromolyn sodium in aqueous solution characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy., *J. Pharm. Sci.*, **93**, 151-158 (2004).
15. Hayakawa E., Furuya K., Ueno H., Kuroda T., Moriyama M., Kondo A., Visible absorption and proton nuclear magnetic resonance studies on the self-association of doxorubicin in aqueous solution., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1009-1012 (1991).

16. McIntosh M. P., Leong N., Katneni K., Morizzi J., Shackelford D. M., Pranker R. J., Impact of chlorpromazine self-association on its apparent binding constants with cyclodextrins: Effect of SBE(7)-beta-CD on the disposition of chlorpromazine in the rat., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 2999-3008 (2010).
17. Ueda K., Higashi K., Limwibrant W., Sekine S., Horie T., Yamamoto K., Moribe K., Mechanistic differences in permeation behavior of supersaturated and solubilized solutions of carbamazepine revealed by nuclear magnetic resonance measurements., *Mol. Pharm.*, **9**, 3023-3033 (2012).
18. Frank K. J., Rosenblatt K. M., Westedt U., Holig P., Rosenberg J., Magerlein M., Fricker G., Brandl M., Amorphous solid dispersion enhances permeation of poorly soluble ABT-102: true supersaturation vs. apparent solubility enhancement., *Int. J. Pharm.*, **437**, 288-293 (2012).
19. Nelson K. M., Dahlin J. L., Bisson J., Graham J., Pauli G. F., Walters M. A., The essential medicinal chemistry of curcumin., *J. Med. Chem.*, **60**, 1620-1637 (2017).
20. Shome S., Talukdar A. D., Choudhury M. D., Bhattacharya M. K., Upadhyaya H., Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective., *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 1481-1500 (2016).
21. Anand P., Kunnumakkara A. B., Newman R. A., Aggarwal B. B., Bioavailability of curcumin: problems and promises., *Mol. Pharm.*, **4**, 807-818 (2007).
22. Tonnesen H. H., Masson M., Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability., *Int. J. Pharm.*, **244**, 127-135 (2002).
23. Onoue S., Takahashi H., Kawabata Y., Seto Y., Hatanaka J., Timmermann B., Yamada S., Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 1871-1881 (2010).
24. Seo S. W., Han H. K., Chun M. K., Choi H. K., Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin solid dispersion using Solutol(R) HS15 as a carrier., *Int. J. Pharm.*, **424**, 18-25 (2012).
25. Hegge A. B., Vukicevic M., Bruzell E., Kristensen S., Tonnesen H. H., Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Studies on curcumin and curcuminoids L., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **83**, 95-105 (2013).
26. Wan S., Sun Y., Qi X., Tan F., Improved bioavailability of poorly water-soluble drug curcumin in cellulose acetate solid dispersion., *AAPS PharmSciTech.*, **13**, 159-166 (2012).
27. Chuah A. M., Jacob B., Jie Z., Ramesh S., Mandal S., Puthan J. K., Deshpande P., Vaidyanathan V. V., Gelling R. W., Patel G., Das T., Shreeram S., Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin., *Food Chem.*, **156**, 227-233 (2014).
28. Xie X., Tao Q., Zou Y., Zhang F., Guo M., Wang Y., Wang H., Zhou Q., Yu S., PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms., *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 9280-9289 (2011).
29. Wang Y., Wang C., Zhao J., Ding Y., Li L., A cost-effective method to prepare curcumin nanosuspensions with enhanced oral bioavailability., *J. Colloid Interface Sci.*, **485**, 91-98 (2017).
30. Wahlang B., Pawar Y. B., Bansal A. K., Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **77**, 275-282 (2011).

31. Rachmawati H., Safitri D., Pradana A. T., Adnyana I. K., TPGS-stabilized curcumin nanoparticles exhibit superior effect on carrageenan-induced inflammation in wistar rat., *Pharmaceutics*, **8**, 24 (2016).
32. Zeng Z., Shen Z. L., Zhai S., Xu J. L., Liang H., Shen Q., Li Q. Y., Transport of curcumin derivatives in Caco-2 cell monolayers., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **117**, 123-131 (2017).
33. Gutmann B., Cantillo D., Kappe C. O., Continuous-flow technology-a tool for the safe manufacturing of active pharmaceutical ingredients., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, 6688-6728 (2015).
34. Al-Kassas, R., Bansal, M., Shaw, J., Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs., *J. Control. Release*, **260**, 202-212 (2017).
35. Mangolim C. S., Moriwaki C., Nogueira A. C., Sato F., Baesso M. L., Neto A. M., Matioli G., Curcumin-beta-cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application., *Food Chem.*, **153**, 361-370 (2014).
36. Li J., Fan N., Wang X., Li C., Sun M., Wang J., Fu Q., He Z., Interfacial interaction track of amorphous solid dispersions established by water-soluble polymer and indometacin., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **106**, 244-253 (2017).
37. Salazar J., Ghanem A., Muller R. H., Moschwitzer J. P., Nanocrystals: comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **81**, 82-90 (2012).
38. Hu X., Chen X., Zhang L., Lin X., Zhang Y., Tang X., Wang Y., A combined bottom-up/top-down approach to prepare a sterile injectable nanosuspension., *Int. J. Pharm.*, **472**, 130-139 (2014).
39. Sovizi M. R., Hajimirsadeghi S. S., Naderizadeh B., Effect of particle size on thermal decomposition of nitrocellulose., *J. Hazard. Mater.*, **168**, 1134-1139 (2009).
40. Thirunahari S., Aitipamula S., Chow P. S., Tan R. B., Conformational polymorphism of tolbutamide: A structural, spectroscopic, and thermodynamic characterization of Burger's forms I-IV., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 2975-2990 (2010).
41. Sanphui P., Goud N. R., Khandavilli U. B., Bhanoth S., Nangia A., New polymorphs of curcumin., *Chem. Commun. (Camb)*, **47**, 5013-5015 (2011).
42. Savolainen M., Heinz A., Strachan C., Gordon K. C., Yliruusi J., Rades T., Sandler N., Screening for differences in the amorphous state of indomethacin using multivariate visualization., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **30**, 113-123 (2007).
43. Widjaja E., Kanaujia P., Lau G., Ng W. K., Garland M., Saal C., Hanefeld A., Fischbach M., Maio M., Tan R. B., Detection of trace crystallinity in an amorphous system using Raman microscopy and chemometric analysis., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **42**, 45-54 (2011).
44. Furuyama N., Hasegawa S., Hamaura T., Yada S., Nakagami H., Yonemochi E., Terada K., Evaluation of solid dispersions on a molecular level by the Raman mapping technique., *Int. J. Pharm.*, **361**, 12-18 (2008).
45. Keraticewanun S., Yoshihashi Y., Sutanthavibul N., Terada K., Chatchawalsaisin J., An investigation of nifedipine miscibility in solid dispersions using Raman spectroscopy., *Pharm. Res.*, **32**, 2458-2473 (2015).
46. Lin Y., Fujimori T., Kawaguchi N., Tsujimoto Y., Nishimi M., Dong Z., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Polyamidoamine dendrimers as novel potential absorption enhancers for improving the small intestinal absorption of poorly absorbable drugs in rats., *J. Control. Release*, **149**, 21-28 (2011).

47. Dong Z., Hamid K. A., Gao Y., Lin Y., Katsumi H., Sakane T., Yamamoto A., Polyamidoamine dendrimers can improve the pulmonary absorption of insulin and calcitonin in rats., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 1866-1878 (2011).
48. Pawar, Y. B., Shete G., Popat D., Bansal A. K., Phase behavior and oral bioavailability of amorphous curcumin., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **47**, 56-64 (2012).
49. Yang K. Y., Lin L. C., Tseng T. Y., Wang S. C., Tsai T. H., Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **853**, 183-189 (2007).
50. Bernareggi A., Rowland M., Physiologic modeling of cyclosporin kinetics in rat and man., *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **19**, 21-50 (1991).
51. Hidalgo A., Cruz A., Perez-Gil J., Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **95**, 117-127 (2015).
52. Nkansah P., Antipas A., Lu Y., Varma M., Rotter C., Rago B., El-Kattan A., Taylor G., Rubio M., Litchfield J., Development and evaluation of novel solid nanodispersion system for oral delivery of poorly water-soluble drugs., *J. Control. Release*, **169**, 150-161 (2013).
53. Clarysse S., Brouwers J., Tack J., Annaert P., Augustijns P., Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: comparison with solubility in human intestinal fluids., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **43**, 260-269 (2011).
54. Corti G., Maestrelli F., Cirri M., Zerrouk N., Mura P., Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **27**, 354-362 (2006).
55. Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H., Tokuda H., Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **10**, 195-204 (2000).
56. Fasinu P., Pillay V., Ndesendo V. M., du Toit L. C., Choonara Y. E., Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability., *Biopharm. Drug Dispos.*, **32**, 185-209 (2011).
57. Rabbie S. C., Flanagan T., Martin P. D., Basit A. W., Inter-subject variability in intestinal drug solubility., *Int. J. Pharm.*, **485**, 229-234 (2015).
58. Granero G. E., Longhi M. R., Mora M. J., Junginger H. E., Midha K. K., Shah V. P., Stavchansky S., Dressman J. B., Barends D. M., Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide., *J. Pharm. Sci.*, **99**, 2544-2556 (2010).
59. Nielsen L. H., Rades T., Mullertz A., Stabilisation of amorphous furosemide increases the oral drug bioavailability in rats., *Int. J. Pharm.*, **490**, 334-340 (2015).
60. Jensen K. T., Larsen F. H., Cornett C., Lobmann K., Grohgan H., Rades T., Formation mechanism of coamorphous drug-amino acid mixtures., *Mol. Pharm.*, **12**, 2484-2492 (2015).
61. Avdeef A., Strafford M., Block E., Balogh M. P., Chambliss W., Khan I., Drug absorption *in vitro* model: filter-immobilized artificial membranes. 2. Studies of the permeability properties of lactones in Piper methysticum Forst., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 271-280 (2001).

62. Derakhshandeh K., Karimi M., Azandaryani A. H., Bahrami G., Ghanbari K., Pharmacokinetic study of furosemide incorporated PLGA microspheres after oral administration to rat., *Iran. J. Basic Med. Sci.*, **19**, 1049-1055 (2016).
63. Matsuda Y, Tatsumi E., Physicochemical characterization of furosemide modifications., *Int. J. Pharm.*, **60**, 11-26 (1990).
64. Fioritto A. F., Bhattachar S. N., Wesley J. A., Solubility measurement of polymorphic compounds via the pH-metric titration technique., *Int. J. Pharm.*, **330**, 105-113 (2007).
65. Pade V., Stavchansky S., Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1604-1607 (1998).
66. Zvonar A., Berginc K., Kristl A., Gasperlin M., Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide., *Int. J. Pharm.*, **388**, 151-158 (2010).
67. Kaukonen A. M., Laitinen L., Salonen J., Tuura J., Heikkila T., Linnell T., Hirvonen J., Lehto V. P., Enhanced *in vitro* permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 348-356 (2007).
68. Rege B. D., Yu L. X., Hussain A. S., Polli J. E., Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1776-1786 (2001).
69. Asai A., Okuda T., Sonoda E., Yamauchi T., Kato S., Okamoto H., Drug permeation characterization of inhaled dry powder formulations in air-liquid interfaced cell layer using an improved, simple apparatus for dispersion., *Pharm. Res.*, **33**, 487-497 (2016).
70. 医療用医薬品品質情報集 No.17, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 (2003)

謝辭

謝辞

本論文は、京都薬科大学大学院 薬学専攻博士課程、及び同志社女子大学 薬学部における研究成果をまとめたものである。

本研究の実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始、御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、京都薬科大学 薬剤学分野 教授 山本 昌先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接の御指導と御鞭撻を賜りました、神戸薬科大学 製剤学研究室 教授 坂根 稔康先生に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、京都薬科大学 薬剤学分野 准教授 勝見 英正先生、ならびに東京理科大学 薬学部 生物薬剤学研究室 助教 草森 浩輔先生に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、非晶質ナノ粒子クルクミンを御供与頂き、有益なる御助言、御教示を賜りました、エム・テック株式会社 代表取締役会長 榎村 眞一博士、ならびに荒木 加永子氏、吉住 真衣氏に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、深いご理解と有益なる御助言、御教示を賜りました、同志社女子大学 薬学部 薬物動態学研究室 伊賀 勝美先生、ならびに喜里山 暁子先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力、御支援を頂きました、京都薬科大学 薬剤学分野及び同志社女子大学 薬学部 薬物動態学研究室の卒業生を含む皆様に心より感謝致します。

最後に、長年の学生生活を終始暖かく見守り、支え続けてくれた、父 則行、母 和子に心より感謝致します。