

## 《若手研究者紹介》



## 製剤研究における核磁気共鳴法 (NMR) の応用

植 田 圭 祐\* Keisuke Ueda

千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室

## 1. はじめに

筆者は千葉大学薬学部4年次に、現在も教員として研究を続けている製剤工学研究室に配属され製剤の研究を始めた。研究室配属前にいくつかの研究室を見学した際に、当時の製剤工学研究室の教授である山本恵司先生とお話をさせていただく機会があり、製剤分野における理論物理の重要性を数学の重要性と共に熱く教えていただいた記憶がある。この際に、製剤工学研究室に興味を持ち配属先に選んで現在に至っている。研究室の配属当時は山本先生に加えて今の上司でもある森部久仁一先生と東顕二郎先生の体制で研究室の運営が行われていた。研究室では、それぞれ完全に独立した1テーマが与えられ、各自で考え実験計画を行い、先生方と相談の後実験を進める形で、自主性が尊重されていた。研究室に入って与えられた最初のテーマは固体分散体製剤の評価であった。研究を始めた時点で、固体分散体はすでに広く知られた技術であり、特に新しい話ではなかったが、固体分散体による溶解性改善機構や消化管における薬物吸収改善機構などに関しては現象論的な解釈に留まっており、詳細に評価が行われていなかった。そのため、固体分散体による難水溶性薬物の溶解性及び吸収性改善について、核磁気共鳴法 (NMR) を中心とした詳細なメカニズム評価を行

\*2011年千葉大学薬学部卒業。2013年千葉大学大学院医学薬学府総合薬品科学専攻修士課程修了。2015年千葉大学大学院医学薬学府先端創薬科学専攻博士課程修了。同年千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室助教。好きな言葉：失敗したところでやめてしまうから失敗になる。成功するところまで続ければそれは成功になる。連絡先：〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1  
E-mail: keisuke@chiba-u.jp

うことを目的として研究を始めた。その後も、NMRを中心とした研究が多く、難水溶性薬物の溶解性を改善する非晶質製剤やナノ微粒子製剤について固相、液相両面から物性評価を行っている。

## 2. 薬物可溶化と過飽和溶解

固体分散体の溶解による薬物過飽和溶液の形成に関する研究では、フィルター濾過や遠心分離後の薬物濃度定量により薬物過飽和形成を確認することが多く、薬物の溶解状態についてはあまり詳細な評価が行われていない。固体分散体に用いられるポリマーの一部は、溶液中においてミセル様の構造体を形成し、内部の疎水空間に難水溶性薬物を取り込むことで薬物を可溶化することが報告されている。ポリマーなどの比較的大きな構造体中に取り込まれた薬物は膜透過性や吸収性がバルクの水中に溶解した薬物と異なるため、固体分散体分散時の薬物過飽和形成による薬物吸収量予測には詳細な薬物溶解状態の理解が必要不可欠となる。しかし、数百 nm の細孔を有するフィルターを用いた濾過や遠心分離では溶解状態の薬物分子状態を区別し定量することは困難であるため、溶液 NMR を用いた直接的な分子状態評価を試みた。

可溶化作用を示す Poloxamer により薬物の溶解性が改善した溶液について溶液 NMR 測定を行うと、薬物単独溶液と比較して薬物ピークの高磁場側シフトが認められる。この結果より、Poloxamer の共存により薬物の分子環境が変化していることが示される (Fig. 1)。すなわち、薬物の溶解環境がバルクの水から変化しており、一部の薬物がポリマーの構造体中に含まれていることが溶液 NMR により示さ

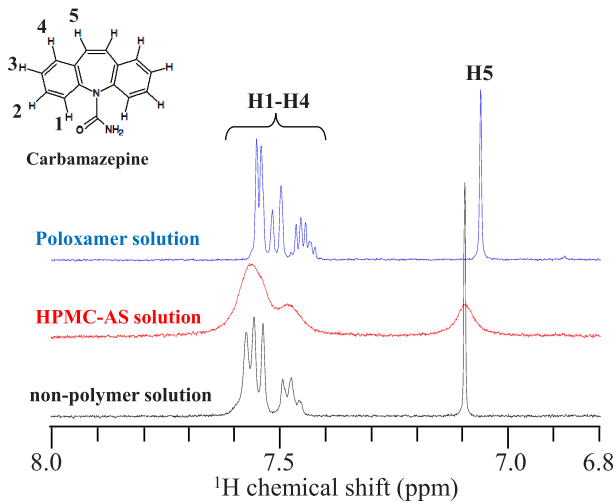


Fig. 1. Solution  $^1\text{H}$  NMR spectra of the poorly water-soluble drug of carbamazepine in each polymer solution.

れる。一方、HPMC-AS (Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate) との固体分散体により薬物の溶解性が改善した溶液では、薬物の分子運動性が強く抑制されているものの、薬物の溶解分子環境は単独溶解状態とほとんど変化していないことが認められる (Fig. 1)。この結果から、HPMC-AS を用いて薬物の溶解性を改善した溶液中では、飽和溶解度以上の薬物がバルクの水中に溶解しており、真の意味で薬物過飽和状態が形成されていることが示される。溶液 NMR を用いることにより、Poloxamer などによる可溶化による溶解性改善と HPMC-AS などの結晶化抑制作用により維持される過飽和溶解状態を区別することが可能となる。これらの溶解分子状態の違いは直接的に薬物の膜透過性の違いに結びつき、バルクの水中に溶解度以上の薬物が溶解している HPMC-AS 溶液中では薬物の溶解性改善が直接膜透過性改善に結びつく結果となる<sup>1)</sup>。

上記の物性評価はすべて緩衝液中で行ったものであるが、消化管溶液中では胆汁酸や脂質など界面活性作用を持つ物質が共存しており、薬物の溶解状態はより複雑になる。通常の緩衝液を用いた物性評価について学会やシンポジウムなどで発表した際にも「固体分散体の溶解分子状態について消化管溶液中でも同じことがいえるのか」、「消化管溶液中の胆汁酸や脂質は、固体分散体により形成された過飽和溶液中の薬物分子状態に影響を及ぼさないのか」等の質問をよく受けた。また、先に書いた研究の中で、Poloxamer が示すような薬物の可溶化と、HPMC-AS

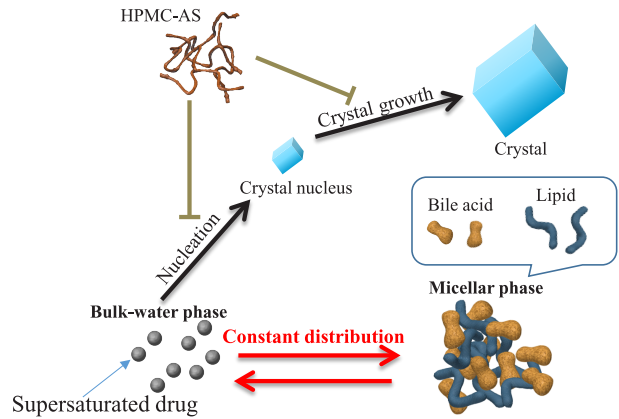


Fig. 2. Schematic illustration of the drug crystallization inhibition in gastrointestinal model fluid.

による薬物の過飽和維持作用は共存するのについても疑問を持っていた。これらの理由から、可溶化作用を持つ胆汁酸や脂質が溶解した消化管モデル溶液中での HPMC-AS による薬物過飽和維持能や過飽和維持メカニズムの詳細な評価を行った。

消化管溶液中では、一部の薬物は胆汁酸や脂質が形成するミセルに可溶化される。また、可溶化された薬物とバルクの水中に溶解している薬物の分配は胆汁酸や脂質の量に依存して変化する。一方、ミセルへの薬物分配比は薬物濃度には依存せず一定であり、飽和溶解度以下において常に一定の割合の薬物が可溶化されている。溶液 NMR スペクトル上で認められる薬物ピークは薬物のミセルへの分配比に比例して変化するため、薬物のケミカルシフト値は薬物可溶化割合の指標となる。消化管モデル溶液中において、HPMC-AS の結晶化抑制作用により安定化された過飽和薬物に関して溶液 NMR 測定を行うと、薬物のケミカルシフト値は HPMC-AS の共存や過飽和形成に依存せず一定の値を示す。すなわち、HPMC-AS による結晶化抑制作用や薬物過飽和形成は、胆汁酸及び脂質が形成するミセル中に可溶化される薬物の分配比率に影響を及ぼさない。HPMC-AS はバルクの水中からの薬物の結晶核形成及び結晶成長を抑制することで薬物過飽和状態を維持しており、溶液中に存在する胆汁酸や脂質による薬物可溶化作用とは干渉しあうことなく共存して働くことが認められている (Fig. 2)<sup>2)</sup>。

このように、溶液 NMR による薬物溶解状態の直接評価は薬物の真の過飽和溶解を確かめるうえで強力な手法となる。実験を始めた当初は NMR の測定

法から解釈まで手探りの状況でスタートしたため、なかなか順調に結果が出ず苦労した記憶がある。NMR メーカーが主催するユーザズミーティングに足を運んだり、NMRに関する書物を読んだりと悪戦苦闘していた。NMRの基本は量子力学であるが、実際の測定に際しては古典力学における電磁気の解釈も重要となる。基本的な物理化学に立ち戻った知識も必要になるため、研究を始めた当初は、薬学部の授業では使わなかったような物理学関連の書籍を多数購入した。しかし、それでも自学には限界を感じ、NMRに精通した千葉大学の分析センター（現共用機器センター）の今成司先生を何度も訪ねた。今成先生には、NMRの測定原理の解釈から測定条件の確認まで多くの質問をさせていただき、NMRの実験が行き詰った際に幾度となく助けていただいた。NMRの実験に並行して、細胞を用いた薬物膜透過実験を行っていたのだが、筆者が4年次だった当時は製剤工学研究室では細胞を用いた実験を行っていなかったため、千葉大学の生物薬剤学研究室にご協力いただき実験を行わせていただいた。当時の教授である堀江利治先生や関根修一先生に、細胞培養の基本から教えていただいた。それまでNMRを用いた物性評価や製剤の溶出挙動などについての評価を行っていたため、細胞を用いた実験は手技の違いに戸惑った記憶がある。実験手技から実験結果の解釈までお世話になり、NMRによる物性評価と膜透過実験の結果を結びつけて、論文をまとめることができた。また、薬物過飽和溶液中における薬物分子状態評価や薬物膜透過性評価には刻々と変化する溶液の分子状態の変化をリアルタイムで評価することが必要不可欠であった。溶液中の薬物の分子状態の変化をリアルタイムでとらえることについてはNMRを応用することで解決できたが、経時的に変化する溶液からの薬物の膜透過性や吸収性の正確な評価については課題が残されていた。そのため、摂南大学の山下伸二先生の研究室に協力をいただき dissolution/permeation system を用いた実験を行わせていただいた。特に同研究室の片岡誠先生には大変お世話になり、実験の協力だけではなく、何度もディスカッションを行わせていただいた。多くの先生方のご協力のもと、経時的に変化する薬物過飽和溶液からの薬物膜透過性を定量的に評価でき、NMRにより明らかとなった薬物の分子状態と

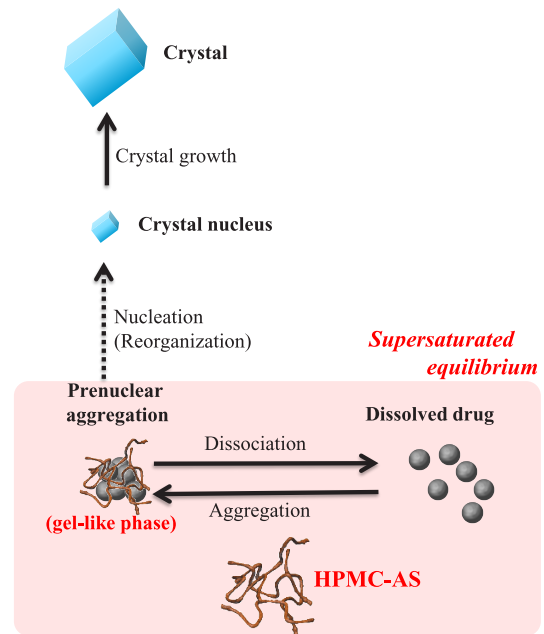


Fig. 3. Schematic illustration of prolonged drug supersaturation in HPMC-AS solution.

薬物膜透過性の関係性をより詳細に解析することが可能となった。

### 3. 結晶化抑制剤による薬物過飽和維持機構

HPMC-ASなどの結晶化抑制作用を有するポリマーは可溶化作用とは異なる機構により薬物の過飽和状態を維持しているが、実際にどのような機構で薬物過飽和状態が維持されているかについては不明な点が多い。HPMC-ASにより安定化された薬物過飽和溶液について溶液NMR測定を行うと、一部のHPMC-ASが過飽和状態の薬物と共にゲル様の構造体を形成することが認められる。このゲル様の構造体中に過飽和溶解状態の薬物を取り込まれることで、薬物の分子運動性が強く抑制され、薬物の核前駆体からの結晶核生成が妨げられる。この結果、結晶核前駆体から薬物が再溶解し、薬物が結晶化することなく長時間、過飽和状態を維持することが示されている (Fig. 3)<sup>3)</sup>。このような構造体形成には薬物及びポリマー間の親和性や分子間相互作用が重要となる。難水溶性薬物であるカルバマゼピンとHPMC-ASの溶液について核 Overhauser 効果を利用したNMR測定を行うと、薬物過飽和溶液中において薬物の疎水性官能基がHPMC-ASの各種置換基と相互作用を形成していることが認められる (Fig.

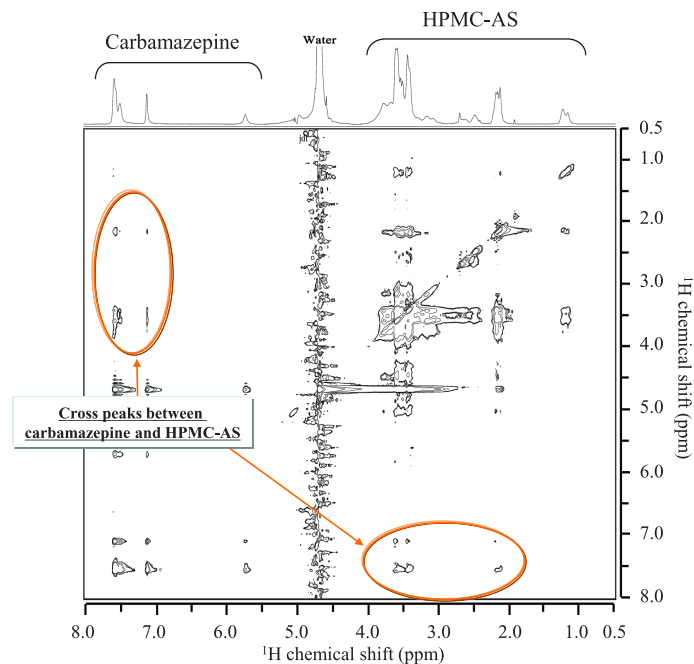


Fig. 4. NOESY spectrum of carbamazepine supersaturated solution stabilized by HPMC-AS.

4). この相互作用は置換基ごとに強さが異なり、HPMC-AS 中の、サクシノイル基、ヒドロキシプロピル基、アセチル基の順で薬物との相互作用が強くなる<sup>4)</sup>。置換基ごとの相互作用の違いが薬物結晶化抑制作用の強さの違いに寄与していると考え、続く研究では置換基比率が異なる HPMC-AS を用いて、薬物の結晶化抑制作用を評価した。先に書いたようにアセチル基と薬物の分子間相互作用が最も大きかったこともあり、アセチル基の比率に依存して HPMC-AS の結晶化抑制作用が強くなると期待して実験を行った。しかし、結果的には、薬物との分子間相互作用が最も弱かったサクシノイル基の比率が HPMC-AS の薬物結晶化抑制作用に重要な役割を果たしていた。電離性官能基でもあるサクシノイル基の含有率によって HPMC-AS の疎水性は大きく変化し、ポリマー全体の疎水性が上昇するほどに薬物結晶化抑制作用が強くなることが認められた。これらの結果から、疎水性である難水溶性薬物との親和性がポリマーによる薬物結晶化抑制作用に重要であることが示された<sup>5)</sup>。

修士、博士課程において参加した学会の発表の際には、固体分散体研究について製剤の添加剤メーカーの方々から質問を受け、アドバイスをいただく機会にも恵まれた。高分子の合成に関しては全くの素人であったため、添加剤メーカーの方々からは多く

の有益なアドバイスをいただき、特に HPMC-AS を提供いただいた信越化学工業株式会社の方々には大変お世話になった。物性評価による機構解明は、最終的に現象論的な実験結果との相関が必要不可欠であり、多くのご協力のもと固体分散体に用いる高分子担体の研究を行える環境には大変感謝している。

#### 4. おわりに

これまでの研究を振り返ってみると、すべての研究がメカニズムの解明や物性評価に焦点を当てている。新しい製剤を作り出したり、改良する研究というよりは、既存の製剤技術の背景にある機構解明を中心に研究を行ってきた。製剤の分野については今現在も新しい溶解性改善記述や放出制御技術の研究が行われているが、一方でメカニズムが曖昧なまま、話が進んでしまっている現象が多く存在していると感じている。これらのメカニズム解明には分析技術の進歩も必要不可欠であり、NMR は固体及び溶液両方の評価にとって今後も製剤分野での応用が期待される。もともと物理に興味があった筆者としては、このような基礎研究に従事できていることは大変ありがたいと思っている。これまでの研究では幸いにも多くの人に恵まれ、より深い研究へとつながっている。今後も製剤技術に加えて分析技術の発達による機構解明により、より迅速かつ最適な難水溶性薬物

の製剤設計が望まれる。

#### 引用文献

- 1) K. Ueda, K. Higashi, W. Limwikrant, S. Sekine, T. Horie, K. Yamamoto, K. Moribe, Mechanistic differences in permeation behavior of supersaturated and solubilized solutions of carbamazepine revealed by nuclear magnetic resonance measurements, *Mol. Pharm.*, **9** (11), 3023–3033 (2012).
- 2) K. Ueda, K. Higashi, M. Kataoka, S. Yamashita, K. Yamamoto, K. Moribe, Inhibition mechanism of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug crystallization in gastrointestinal fluid and drug permeability from a supersaturated solution, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **62**, 293–300 (2014).
- 3) K. Ueda, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe, Equilibrium state at supersaturated drug concentration achieved by hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate: Molecular characterization using  $^1\text{H}$  NMR technique, *Mol. Pharm.*, **12** (4), 1096–1104 (2015).
- 4) K. Ueda, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe, Inhibitory effect of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug recrystallization from a supersaturated solution assessed using nuclear magnetic resonance measurements, *Mol. Pharm.*, **10** (10), 3801–3811 (2013).
- 5) K. Ueda, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Moribe, The effect of HPMCAS functional groups on drug crystallization from the supersaturated state and dissolution improvement, *Int. J. Pharm.*, **464** (1–2), 205–213 (2014).