

《若手研究者紹介》



自己微乳化・ミセル製剤の ハイスループット処方スクリーニングシステムの開発

酒 井 憲 一* Kenichi Sakai

中外製薬 製薬本部 生産工学研究部

1. はじめに

これまで筆者が研究してきた自己微乳化 (SMEDDS) 製剤およびミセル製剤について、検討事例を交えて紹介する。

SMEDDS 製剤は、油、親水性界面活性剤、親油性界面活性剤、溶剤から構成される多成分系システムであり、このうち油を含ませなければミセル製剤となる。これらの製剤は、処方内に薬物を溶解させ、水相にて安定かつ微細なマイクロエマルジョン (ME) およびミセルを形成し、難水溶性化合物を可溶化することで、経口吸収性を改善することが知られている。

エマルジョンやミセルの製剤物性 (粒子径, 相安定性, 可溶化能など) は各成分のバランスにより決まるため、如何に有望な処方を選出し最適化するか重要となる。しかしながら、各成分とも添加剤の種類が多く、それらの混合比および薬物濃度の水準数を考慮すると、検討の対象となる処方の数が、膨大になる。仮に油種を 1 つにし 10 種の親水性界面活性剤 (hydrophilic surfactant, HS) と 10 種の親油性界面活性剤 (lipophilic surfactant, LS) を用いて、HS/LS/油の各組み合わせの中で 25 処方を検討すると、組み合わせの数としては 10 種 × 10 種 × 1 種 × 25 処方 = 2,500 処方にもなる。事前に、添加剤間や薬物添加剤間の分子間相互作用を計算し製剤

物性を予測した上で、添加剤や処方を絞り込み、検討数を減らすことは困難である。

筆者が自己乳化型製剤に初めて出会ったのは 2003 年であったが、既に多くの論文が報告されており、弊社でも緒先輩方によりかなり多くの検討がなされていた。素人ながら、色々な添加剤があることは知っていたが、当時報告されていた文献事例を見ていると、限られた一部の添加剤が用いられているものが多く、なぜこれらの添加剤に絞られているのか、そしてなぜこの処方なのか、見えにくい状況にあった。エキスパートの経験からか、あるいは、プレリミナリーな検討によるものなのか判らなかったが、当時、不可解さと違和感を感じたのを覚えている。同じような時期に、当時とても驚いたのだが、プラセボのありとあらゆる処方を、人海戦術で調製し評価した結果をデータベース化することで、検討の初期処方を提示する技術があった。その技術を適用すると、開発化合物 (API) に対する初期検討処方を SMEDDS 処方・ミセル処方として提示されるのだが、プラセボ処方でも構成されるデータベースであったため、API への適用性や、初期処方の妥当性、最適処方の設定根拠を説明しようと思うと、結局はそれなりのボリュームで検討が必要になると感じていた。

SMEDDS/ミセル製剤への適用可能性を適切に評価し、API の潜在性を最大限に引き出した上でその開発可能性を見極めるためには、結局は考える処方を試し、なぜ適用できないのか、適用できるならばなぜできるのかを検証することが必要だと考えていた。

一方で、膨大な数の組み合わせを検討する場合に

*1998 年広島大学 (理学部物性学科) 卒業, 2000 年広島大学大学院理学研究科博士課程前期遺伝子科学専攻修了, 2000 年中外製薬株式会社に入社. 2013 年博士 (薬学) (東邦大学) 取得. 研究テーマ: 自己微乳化製剤などの迅速処方設計技術. 連絡先: 〒115-8543 東京都北区浮間 5-5-1 Email: sakaikni@chugai-pharm.co.jp

は、求められる時期に結果が間に合わないことが懸念される。マンパワーも不足する。また、創薬段階においては、製剤検討に利用できる化合物量に制約がある。開発段階が初期であればあるほど、これらスピードとリソースの懸念はより顕在化することになる。

そこで筆者らは、これらの制約の中においても、SMEDDS 処方およびミセル処方を、迅速かつ効率的に設計することができる、ハイスループット処方スクリーニング (High-throughput formulation screening: HTFS) システムを開発してきた。以降で、本システムと、適用事例について紹介する。

2. HTFS システムの開発

HTFS を実際に実施するためには、多処方を少量で調製する技術と、エマルション物性を迅速に評価する技術が必要となる。多くの試料を少量で人手を介さず調製する場合に、創薬研究においては、しばしばロボット液体分注機が用いられている。しかしながら、ロボット液体分注機では、粘稠あるいは半固形の界面活性剤、および粉末状の候補化合物を分注することは困難であった。そこで、これらの物質をエタノールに溶解させ分注する方法を検討した。その結果、界面活性剤溶液 (50% エタノール) の 10 μL 分注時には %CV が 10.0% 以下、200 μL 分注時で 2.6% 以下の少量分注が可能となった。なお、用いたエタノールは、処方調製時に真空乾燥し、除去するようにした¹⁾。

迅速評価系としては、エマルションの粒子径と相安定性、処方中の薬物濃度を評価する方法を構築した。粒子径の評価には DLS (Dynamic Light Scattering, 動的散乱光式粒度計) や外観の目視観察法などが用いられるが、いずれもスループットが低かった (DLS: 5~10 分/処方, 目視観察法: 0.5~1 分/処方)。また目視観察法では、観察者間のバラツキが存在し、多処方間での定量的な比較が難しいといった難点があった。そこで我々は、SMEDDS/ミセル処方の外観上の特徴を利用することにした。150 nm 程度の微細な ME の外観は澄明であり、粗大な粒子径のものは白濁化していることから、濁度と粒子径の関係を調べることで、ME 処方を選出するための判定値が設定できると考えた。濁度は迅速測定が可能なマイクロプレート用吸光度計を用い、試料

量 200 μL 、波長 650 nm で求め、粒子径は DLS で求めた。その結果、粒度分布上の多峰性ピークのうち、最も大きなピーク (最大粒子径) が濁度と相関することを明らかにし、澄明な ME に相当する濁度判定値 (0.3) を設定した。判定値よりも低い濁度を示すものを微細な ME/ミセル処方として選出することが可能となった¹⁾。

相安定性は通常、外観の目視観察により評価される。上述したように、目視観察法はスループットが低く、観察者間でのバラツキが存在し、多処方間での定量的な比較が困難であった。不安定なエマルションやミセルを保存すると、エマルション/ミセルの粒子同士の凝集、合一、クリーミングなどが起こり、相分離が発生する。マイクロプレート用吸光度計の入射光は試料液面を垂直に通過するので、保存後に相分離した水溶液を入射光が通過すると、保存前とは異なる状態を通過するため、透過光量に変化し、濁度の変化として定量的に相分離を検出できると考えた。相安定性と濁度変化の関係を評価した結果、相分離を起こす不安定エマルションの濁度変化はいずれも 0.1 よりも大きいことが判明したため、濁度変化クライテリアを 0.1 に設定した。以上、濁度変化が判定値よりも低いものを、安定なエマルション/ミセル処方として選出することが可能となった¹⁾。

実際に HTFS システムを用いて SMEDDS の処方設計を行い、処方検討への適用性を検証した²⁾。検討では、難水溶性モデル化合物としてニルバジピン

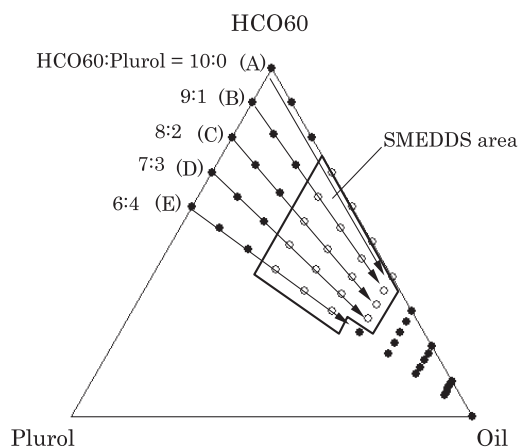


Fig. 1. Phase diagram of HCO60/Plurol system. Symbol: (○) SMEDDS formulation, (●) non-SMEDDS formulation. Oil was Sefsol-218. The region surrounded by a solid line shows the SMEDDS area. (A) HCO60 : Plurol = 10 : 0, (B) 9 : 1 (C) 8 : 2, (D) 7 : 3, and (E) 6 : 4.

(Nil) を用いた。油相には Sefsol-218 (Propylene glycol monocaprylic ester) を、界面活性剤には 11 種の HS と 10 種の LS を用いて、約 2,500 処方 を網羅的にスクリーニングした。SMEDDS 処方 を最も多く形成した HS は Polyoxy ethylene (60) hydrogenated castor oil (HCO60) であり (162 処方)、最も乳化力に優れた HS であった。HCO60 系の処方においては、Polyglyceryl (6) dioleic ester (Plurol) が最も多くの SMEDDS 処方 を形成した (相図上で最も大きな SMEDDS 領域を形成した) LS であった。よって、Plurol を HCO60 に至適な LS として選出した。HCO60/Plurol の各比における oil 含有率と濁度の関係から (Fig. 1 A~E)、最小の濁度を示す処方を、最適処方として選択した。いずれの最適処方も、相分離や薬物析出のない微細な ME (< 33.6 nm) を形成していた。HTFS システムを用いることにより、複数の因子 (添加剤種、比率) から組み合わせられた全ての可能性 (全処方) の網羅的スクリーニングが可能になることが判った。これにより、誤って、局所的な、最適解を選択することなく“真に”最適な組み合わせを選択することが可能になると期待された。また、開発検体の SEMDDS としての開発可能性の迅速評価も可能になると期待された。

3. 添加剤の物性および構造の影響

上述のような網羅的スクリーニングが可能になると、SMEDDS という技術を、俯瞰的に見るができるようになる。すなわち、どういった添加剤が、

どの程度、製剤機能に関わっているのかという Formulation profile を把握することができるようになる。ここでは、上述の検討で得られたデータを利用して、HS に着目した解析事例を紹介する。

製剤機能として、各 HS が形成した SMEDDS 処方の数 (SMEDDS 形成能) を用いた²⁾。一般に界面活性剤の特性を示す物性値として HLB が知られているが、SMEDDS 形成能への影響を Fig 2 (A) に示した。HLB と SMEDDS 処方数には相関性は見られず、HLB は SMEDDS 形成能に直接的には影響しないことが判った。

次に、HS のエチレングリコール付加モル数と SMEDDS 処方数を Fig 2 (B) にプロットした。その結果、ポリソルベート (PS) 40, PS80, TPGS, Gelcire を除いては、エチレングリコール付加モル数の増加に伴い SMEDDS 処方数が増加する傾向が見られた。Fig. 3 に例示したように、エチレングリコールのような親水基部分が大きくなると、親水基部分の厚み (H) が厚くなり ($H_2 \rightarrow H_1$)、中心角 (θ) も大きくなることが知られている ($\theta_2 \rightarrow \theta_1$)。親水基部分の厚み H が大きくなることで、エマルション同士の内部油相の接触が妨げられ、結果としてエマルションの凝集・合一が抑えられることになり、エマルションが安定化したと推察した。一方、中心角 θ が大きくなることで、エマルション形成時の界面活性剤膜の曲率が大きくなり、粒子径が微小化しやすくなったものと推察した。以上のメカニズムに基づき、エチレングリコール付加モル数が増加するに伴い、エマルションが安定化および微小化し、

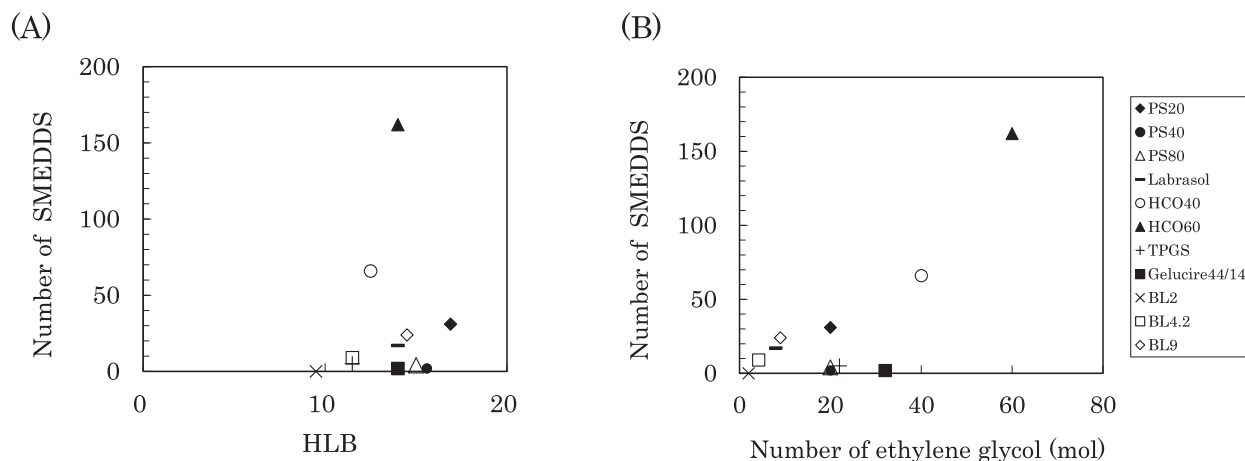


Fig. 2. (A) Relationship between HLB of HS and number of SMEDDS formulations. (B) Relationship between number of ethylene glycol of HS and number of SMEDDS formulations.

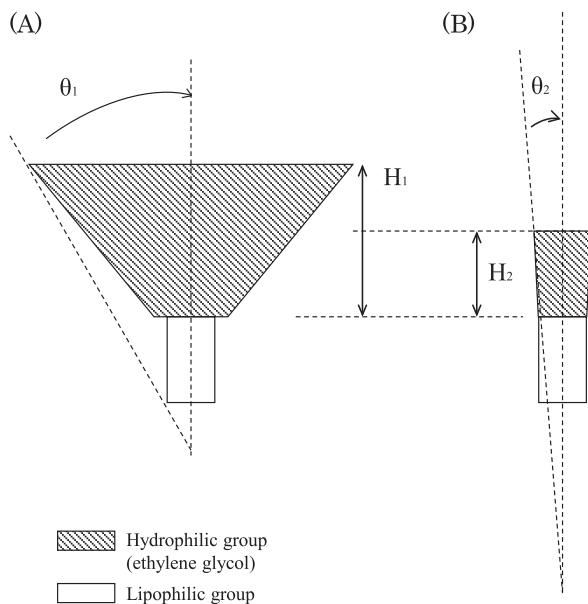


Fig. 3. Illustration of surfactant shape with (A) large mole number of added ethylene glycol (i.e. large hydrophilic group) and (B) small mole number of added ethylene glycol. θ : central angle, H: thickness of hydrophilic group (i.e. surfactant layer).

SMEDDS 処方数が増加したものと推察した。

一方、ポリソルベート (PS) 40, PS80, TPGS, Gelcire は、そのエチレングリコール付加モル数から期待されるほどの SMEDDS 形成能を有していなかった。ポリソルベート系の PS20, PS40, PS80 はエチレングリコール付加モル数がいずれも 20 モルであり、ソルビタン骨格にエステル化されている炭化水素鎖の鎖長により種類が分かれている。即ち、PS20 はラウリル酸 (C_{12})、PS40 はパルミチン酸 (C_{16})、PS80 はオレイン酸 (C_{18}) が付加されている。形成された SMEDDS 処方数はそれぞれ 31 処方、2 処方、4 処方であった。PS20 は炭化水素鎖の鎖長が短く、油として使用した Sefsol-218 (モノカプリル酸プロピレングリコール) のカプリル酸 (C_8) もしくはプロピレングリコールとの相性が良かったため、高い SMEDDS 形成能を示したものと考えた。一方、PS40, 80 の炭化水素鎖長は PS20 よりも長く、より親油性の高い炭化水素鎖が付加されているため Sefsol-218 との相性が悪くなり、SMEDDS 形成能が低下したものと考えた。TPGS (コハク酸 *d*- α -トコフェリル PEG1000, エチレングリコール付加モル数: 約 22 モル) は、ポリソルベート系の PS20, 40, 80 のエチレングリコール付加モル数 (20 モル)

とほぼ同等であるが、形成した SMEDDS 処方数は PS20 が 31 処方に対し TPGS は 5 処方のみであり、SMEDDS 処方数が 2 処方、4 処方であった PS40, 80 と同程度の SMEDDS 形成能であった。TPGS の親油基 (*d*- α -トコフェロール) が Sefsol-218 と相性が悪かったため、結果として SMEDDS 形成能が低くなったと推察した。Gelcire のエチレングリコール付加モル数は 32 モルと PS20 よりも高く、更に PS20 と同じラウリル酸が付加されているため、高い SMEDDS 形成能を示すことが期待されたが、実際の SMEDDS 処方数は 2 処方であり、SMEDDS 形成能は低かった。これは、Gelcire の構成成分であるラウリン酸をグリセリドやラウリン酸ポリエチレングリコール 32 が、Sefsol-218 と相性が悪かったため、SMEDDS 形成能が低くなったと推察した。

本稿では紹介できなかったが、LS についても同様に考察することは可能である。以上、HTFS を行い、様々な添加剤と組み合わせ (処方) を網羅的にスクリーニングすることで、添加剤の SMEDDS 形成能への影響を比較し考察できるようになることが判った。HTFS システムは、単に、スピードや効率性の向上のためだけでなく、添加剤機能の俯瞰的かつ深淵な理解のために有効なツールになることが期待された。

4. 高含量化処方の設計

製剤中の API 濃度を高めた高含量化処方の設計を求められるプロジェクトがしばしばある。中には API が添加剤に溶けにくい場合があり、処方設計の難度が高くなることがある。HTFS システムでは、そのような API であっても、様々な組み合わせを試すことが可能であるため、目的とするレベルの処方を見出せる可能性がある。

ここでは、筆者らが行った高含量化検討における 1 事例を紹介する³⁾。難水溶性化合物 CH5137291 (Drug-A) は抗癌剤として開発されており、その開発においては、高い臨床用量に対応し、かつ経口吸収性を改善する製剤が求められていた。ジェットミル製剤は、十分な吸収性が得られなかったため、開発候補製剤から除外された。固体分散体制剤も、安定な過飽和溶液を得られなかったため除外された。油製剤は、Drug-A の臨床用量 (>1,200 mg) に対し、油への溶解度が 100 mg/mL 未満と低かったた

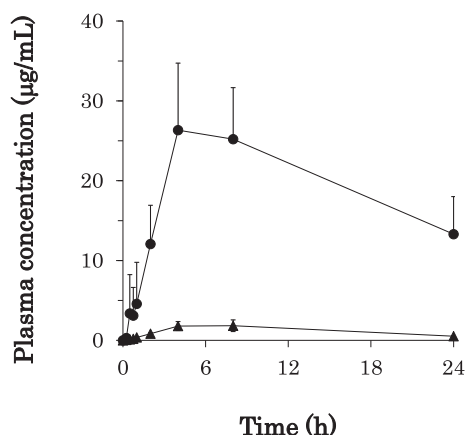


Fig. 4. Plasma concentration–time profiles of Drug-A in Beagle dogs after oral administration of the jet-milled (▲) and optimized formulations (●, 200 mg/mL) at a dose of 20 mg/kg. Each value represents the mean and SD (n = 3).

め、開発可能性は低いと判断された。ポリエチレングリコール 400 (PEG400) 製剤は、溶解度が 200 ~ 250 mg/mL であり優れた薬物含有能を有していたため、開発剤形としての潜在性は油製剤よりも高いと評価した。しかし PEG 製剤は水相において過飽和溶液を形成するものの、薬物が即座に析出し過飽和状態が維持できなかった。そこで、Drug-A の高含量化 SMEDDS/ミセル製剤 (目標含量: 200 mg/mL) を、HTFS システムにより設計した。粒子径と相安定性の評価だけでなく、結晶状態の API の処方中の溶解度を迅速評価することで処方設計を行った。

最適処方として *d*- α -tocopheryl polyoxyethylene 1000 succinic ester (TPGS) : PEG400 = 8 : 2 の処方を選択した。本処方は目標含有能であった 200 mg/mL を達成していた。水相において過飽和状態を形成し、PEG400 製剤と比較してより高いレベルで維持していた。吸収性評価においては、最適処方は、ジェットミル処方の約 16.5 倍の AUC_{0-24h} を示した (Fig. 4)。以上、HTFS システムは、処方化が難しい API においても、吸収性改善能を有する高含量処方の設計を可能にする有用なツールであることが示された。

5. おわりに

HTFS システムを用いることで、様々な構造を有する添加剤および薬物から構成される SMEDDS/ミ

セル処方データベースが比較的短期間で構築できる。これにより、様々な API に対して、汎用的に可溶化力を示すような“標準処方”の設定が可能になる。標準処方は、創薬スクリーニングでの利用や、製剤開発の効率化に寄与することが期待される。弊社では既に設定しているものがあるが、対象とする化合物プロファイルに応じた標準処方の設定も可能と考えられる。

現行の HTFS システムには、吸収性を予測する評価系が組み込まれていない。より優れた吸収改善能を有する最適処方の設計のため、迅速性が高い *in vitro* 吸収性評価法を HTFS システムへ組み込もうと現在研究を進めている。これらの 2 テーマについては、今後報告していく予定である。

本稿でご紹介した研究内容により博士号を取得させていただきましたが、多大なるご指導ご鞭撻をいただきました東邦大学薬学部 寺田勝英教授に深く感謝申し上げます。また、研究の推進にあたり、実験や議論を通じてご協力いただいた中外製薬 小畑香樹研究員、高野隆介研究員、柴田応生研究員、吉川真由美研究員、北山明研究員、元中外製薬研究員 吉森孝行氏 (現: 京都大学) に深謝いたします。本研究成果をベースに更なる研究を続け、薬学研究所の発展にのみならず、医薬品開発のスピードアップ化に貢献し、病に苦しむ患者様に、優れた新薬を、より速く届けられるよう、切磋琢磨していく所存です。最後に、研究紹介の機会をいただいたことに、心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) K. Sakai, H. Maeda, T. Yoshimori, K. Obata, Y. Ogawa, High-throughput formulation screening system for self-microemulsifying drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **35**, 746–755 (2009).
- 2) K. Sakai, T. Yoshimori, K. Obata, H. Maeda, Design of self-microemulsifying drug delivery systems using a high-throughput formulation screening system, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **36**, 1245–1252 (2010).
- 3) K. Sakai, K. Obata, M. Yoshikawa, R. Takano, M. Shibata, H. Maeda, A. Mizutani, K. Terada, High drug loading self-microemulsifying/micelle formulation: design by high-throughput formulation screening system and *in vivo* evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **38**, 1254–1261 (2012).