薬 剤 学, **78** (4), 163–169 (2018)

≪若手研究者紹介≫

難溶性物質の溶解性改善を目的とした脂質ナノ粒子製剤の調製とその応用

舟 越 由 香* Yuka Funakoshi
中外製薬株式会社 製薬本部 生産工学研究部

1. は じ め に

私は現在，中外製薬株式会社の製薬本部生産工学研究部に所属し，医療用医薬品の製剤開発に携わっている．私の研究経験は，学生として，静岡県立大学薬学部の創剤科学分野での3年間，その後進学した静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府の創剤工学研究室での4年間，また社会人になってからの2年間とまだ短いが，その中での経験と考えたことについて紹介させていただく．

2. 薬学との出会い・製剤との出会い

「軟膏を混ぜたい」，小学生の頃に調剤薬局で混合軟膏の調剤をする薬剤師の姿を見てこう感じたのが，私が薬に興味を持ち，薬学部を目指したきっかけだ．もともとは薬効ではなく，もの・物体として薬に興味を持ち，病気を治すために医療に携わりたい，研究により新たな発見をしたいという気持ちは少しも持たず，化学の勉強が好き，薬に触りたいという動機で薬学部を目指していた．

私は6年制，4年制の制度が薬学部に発足した初年度の2006年に薬学部を受験し，入学時には学科が分かれていなかった静岡県立大学に入学した．薬学部を目指した当初は薬剤師の仕事に興味を持っていたが，薬学部卒業後の進路は薬剤師のみではないことを知ると，製薬会社や化粧品会社といったメーカーで製品開発をしたいと思うようになり，入学時には進路を決めかねていたためである．4年生からの学科選択の際には，将来は製品開発の仕事をしたいので4年制を選択した方がいいのか，一方で薬学部でなければ経験できない病院薬剤部での実習を経験するために6年制を選択した方がいいのかと悩みながら，結局6年制を選択した．在学時は6年制のカリキュラムを辛く感じ悩むことが多かったが，製薬企業で開発した製品が臨床現場で実際にどのように扱われているのかを体感する貴重な機会であり，思い返すとよい経験ができたと考えている．特に無菌製剤の調剤方法の授業や実務実習での医薬品の取り扱いは，現在の業務にも深く関連している．研究室配属では，製剤は薬学部の研究室の中で，医薬品のみではなく，化粧品，日用品，化学製品などどんな製品にも最終製品の形としてかかわりがある分野であること，また，研究室紹介や配属の相談に行った際に感じた，教授の板井茂先生の学生一人一人の進路を考えてくれる人柄に惹かれ，創剤科学分野を希望した．研究室配属時のテーマを決める面談で，当時は化粧品開発がしたかった将来の希望から，私は脂質ナノ粒子製剤の研究と出会った．大学院への進学はもともと考えていなかったが，学部生の頃には授業や実習で研究に費やす時間が限られていたため，もう少し脂質ナノ粒子製剤の研究を続け，発表

*2016年静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士課程薬学専攻修了．同年中外製薬株式会社入社．現在，中外製薬株式会社製薬本部生産工学研究部（製剤技術担当）．注射剤の製剤開発に従事．2015年度，日本学術振興会特別研究員（DC2）「毛髪内部コルテックスのダメージ改善を目的とした脂質ナノ粒子のヘアケア分野への応用」．2017年第42回製剤・創剤セミナー Post-doctoral Presentation Award受賞．趣味：吹奏楽（サックス演奏），乗馬．連絡先：〒115–8543 東京都北区浮間5–5–1
E-mail: funakoshi.yuka91@chugai-pharm.co.jp

なども経験したいと考え，6年生の終わりごろに4年制の博士課程への進学を決めた．創剤科学分野・創剤工学研究室は，1人1テーマ，製造機1台というような環境で，7年間携わり，多くの実験や発表の経験を積むことができた脂質ナノ粒子製剤の研究内容について紹介する．

3. 脂質ナノ粒子製剤

難水溶性を示す医薬品候補物質は生物学的利用率が低く，その溶解性および吸収性改善を目的に，薬物の微細化，非晶質化，固体分散体の調製などの研究が行われている．その中でも，ナノサイズの製剤は，表面積増大による溶解速度上昇に加え，表面エネルギー増大により溶解度も上昇させ，近年，製剤学分野において注目を集めている．しかしながら，これらの製剤は過飽和状態の維持が困難であり，高い溶解性・吸収性の長期間の維持が難しいことが問題となる．ナノ粒子においても，微細な粒子は表面エネルギーの増大により凝集が進みやすく，分散安定性が非常に低い．このような背景に対し，ロール混合粉砕法と超高圧乳化分散法による湿式微細化を利用して，負電荷を持つリン脂質の静電気的反発力により粒子の分散安定性を向上させた脂質ナノ粒子製剤に関する研究を行ってきた．これまでに，電気的に中性な hydrogenated soybean phosphatidylcholine（HSPC）と負電荷を持つ dipalmitoylphosphatidylglycerol（DPPG）の2種類のリン脂質を薬物担体とし，ロール混合粉砕法と超高圧乳化分散法により湿式微細化することで，平均粒子径約 50 nm でシャープな粒度分布を示し，4か月間冷暗所で分散安定性を維持可能な脂質ナノ粒子製剤を調製できることが明らかになっていた．この製剤は生体適合性の高いリン脂質のみを薬物担体とし，環境や生体への負荷が懸念される界面活性剤や有機溶媒を使用せずに調製可能な，吸収性改善効果を期待できる製剤である．そこで私は，本脂質ナノ粒子のさらなる有用性確立のため，脂質ナノ粒子製剤の難溶性薬物の溶解性・吸収性改善効果の解明および長期安定性付与，さらに多用途へ応用することを目的として研究を遂行した．

脂質ナノ粒子製剤の調製方法を示す．難溶性物質 40 mg および中性リン脂質の phosphatidylcholine（PC）と負電荷を持つ phosphatidylcholine（PG）または正電荷を持つ octadecylamine の混合物（PC：PG または octadecylamine＝5：1, mol/mol）1,000 mg をそれぞれ秤量し，乳鉢に入れて5分間物理混合した．その後，物理混合物をロールミルで5分間混合粉砕した．このロール混合粉砕物を蒸留水 200 mL 中に分散し，タービン型乳化分散機 Speed Stabilizer を用いて回転数 9,000 rpm で 10 分間粗分散操作を行った．粗分散液を超高圧乳化分散機 Microfluidizer® M-110E/H に適用し，圧力 175 MPa で 100 回処理することで，脂質ナノ粒子懸濁液を調製した．調製後，孔径 200 nm のフィルターを通過した粒子を評価に用いた．脂質ナノ粒子懸濁液の物理化学的特性と経口吸収性を評価し，さらに長期安定化のため凍結乾燥操作を行った．

4. 脂質ナノ粒子製剤の物理化学的特性と経口吸収性

はじめに，難溶性薬物 nifedipine（NI）を脂質（HSPC：DPPG＝5：1, mol/mol）1,000 mg に封入した脂質ナノ粒子を調製し，*in vitro* 溶解性と *in vivo* 吸収性を評価した．超高圧乳化分散処理の処理回数（pass number）を 100 回まで行ったところ，動的光散乱法より処理前の粗分散液の平均粒子経が 1,069 nm であったのに対し，処理後では処理回数依存的な平均粒子径の減少が認められ，超高圧乳化分散処理 100 回により平均粒子径は約 48 nm まで減少した（Fig. 1A）．ゼータ電位の値は負電荷を持つ DPPG に依存し，その値は－50 mV から－60 mV と一定であり，処理回数による大きな変化は認められなかった．この値は，粒子の静電気的反発による分散安定性が高いことを示している．超高圧乳化分散未処理の懸濁液は脂質特有の乳白色を示したが，処理回数とともに懸濁液は澄明な状態に近づいていき，超高圧乳化分散処理を 100 回行った懸濁液は微細な粒子の分散により澄明な外観を示した（Fig. 1B）．また，調製した NI-脂質ナノ粒子懸濁液の NI 回収率は約 73%，そのうち，脂質ナノ粒子への NI 内封率は約 99% を示した．200 nm のフィルターを通過した粒子中の NI を溶解していると考えたとき，脂質ナノ粒子懸濁液中の NI の溶解度は 146 μg mL^{-1} であり，NI の溶解度は原末（19.5 μg mL^{-1}）と比較して約7倍に上昇した．

NI-脂質ナノ粒子懸濁液（Nano：NI 1 mg kg^{-1}）

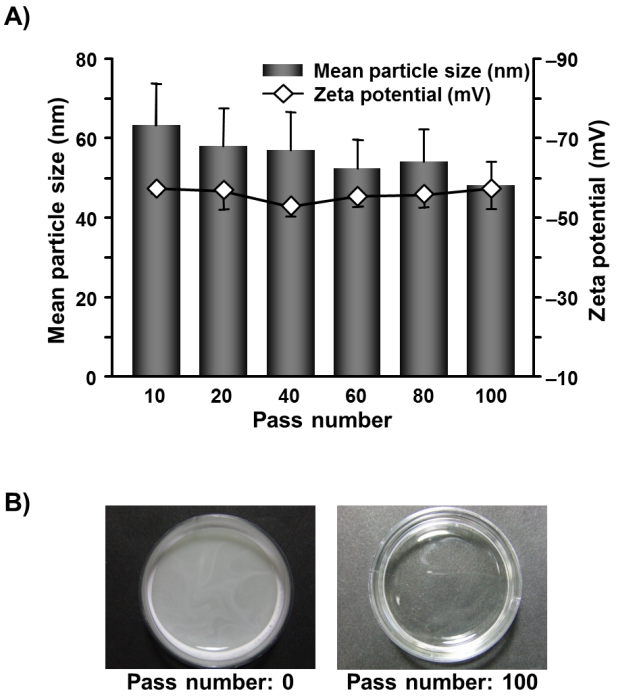

Fig. 1. The physicochemical properties of the NI-lipid nanoparticle suspensions (A) and (B). Pass number is the application frequency of the high pressure homogenization process. (A) Influence of pass number of the high pressure homogenization on the particle size and zeta potential. Each column and point represent the mean particle size and zeta potential, respectively ($n = 3$, mean ± S.D.). (B) Left and right photograph represent the suspensions applied to 0 and 100 times of high-pressure homogenization.

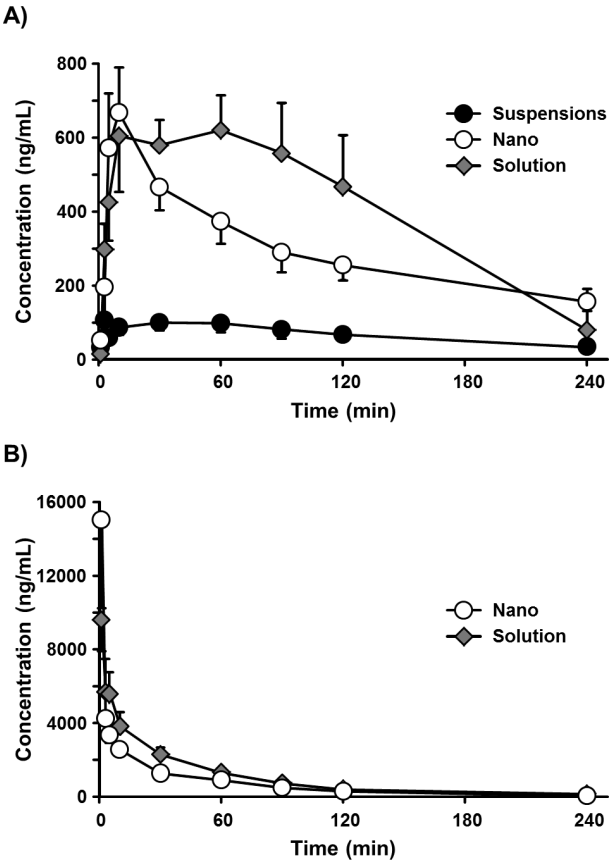

Fig. 2. Plasma concentration-time profiles of NI in rats. (A) Oral administration, and (B) intravenous administration. Each point represents the NI suspensions (closed circles), NI-lipid nanoparticle suspensions (open circles) and NI solution (closed squares), respectively (NI 1 mg kg^{-1}). $n = 6$, mean ± S.E.

をラットに経口投与した結果，対照としたNI原末を蒸留水に分散させたNI懸濁液（Suspensions；NI 1 mg kg^{-1}）と比較し，速やかにNI血漿中濃度が上昇し，$AUC_{0-\infty}$は108 min μg mL^{-1}と約4倍に上昇した．さらに，Tween®80を1.0%添加しNIを完全に溶解させたNI溶液（Solution；NI 1 mg kg^{-1}）を同様の方法でラットに経口投与した結果，Solutionの血漿中濃度推移はNanoと同様に速やかな吸収を示したが，比較的ゆっくりと消失し，$AUC_{0-\infty}$の値は類似していた（Fig. 2）．これらの結果から，本脂質ナノ粒子を用いることで粒子径の減少またはリン脂質の存在により，難溶性薬物の溶解性，吸収性を改善できることが示唆された[1]．

次に，凍結乾燥脂質ナノ粒子製剤の物性に対する糖の影響について検討した．その結果，脂質ナノ粒子は，糖無添加で凍結乾燥を行うと凝集による粒子径の増大が認められたが，糖添加により再水和後，良好な再分散性を示した．また，単糖類（glucose, galactose）よりも二糖類（sucrose, maltose, trehalose）を用いたほうが再分散性は速く，凍結乾燥前の約50 nmの粒子径を維持できた．形態の差異を検討した結果，走査型電子顕微鏡（SEM）画像より，二糖類は凍結乾燥により丸みをおびた形状に変化していた．また，粉末X線回折および示差走査熱量測定の結果から，単糖類は凍結乾燥後，本来の結晶状態を保持するのに対し，二糖類は非晶質化していた．さらに，フーリエ変換赤外分光光度計の測定結果より，二糖類は脂質ナノ粒子との間で水素結合を形成し，強く相互作用することが明らかとなった．以上より，凍結乾燥により長期安定性の付与が可能であり，再分散性の差異は糖自身の結晶形と糖と脂質ナノ粒子との相互作用に起因する可能性が示唆された[2]．

また，脂質ナノ粒子の物理化学的特性に対するリン脂質の構造の影響を検討した．アルキル鎖の長さや飽和，不飽和等の構造が異なるPCとPGを幾通りか組み合わせ調製したNI封入脂質ナノ粒子は，平均粒子径100 nm以下を示した．これらの脂質ナノ粒子は90%以上の薬物内封率を示し，原末と比較して溶解度は4〜5倍に増加した．アルキル鎖長の差異に着目すると，その増加に伴い平均粒子径は増大する傾向が認められた．これらの粒子は冷暗所で1か月間は100 nm以下の粒子径を維持し，特に炭素鎖の長い脂質を用いることで粒子安定性は向上することが示唆された．炭素鎖に含まれる二重結合は粒子の特性に影響を及ぼさなかった．したがって，脂質ナノ粒子はアルキル鎖の炭素数や飽和/不飽和など構造が異なる種々のリン脂質を担体として調製できた[3]．

さらに，多くの難溶性化合物に適応できるナノ粒子製剤の確立をめざし，構造や分子量，融点，溶解度等の性質が異なる種々の難溶性化合物を封入した脂質ナノ粒子を調製し，封入薬物の影響を検討した．HSPC, DPPGを担体に用い，cinnarizine, griseofulvin, ibuprofen, indomethacin, nalidixic acid, naproxen, phenytoin, reserpine封入粒子を調製した結果，平均粒子径約40〜120 nmの脂質ナノ粒子が調製でき，その粒子径は冷暗所で保存時，2か月間維持された．また，調製した脂質ナノ粒子に凍結乾燥操作を行うことで，さらに長期間の保存安定性を付与できる可能性が示唆された．また，用いた9種類の薬物において分子量が増大すると薬物の溶解度は低下する傾向にあるものの，原末の溶解度に依存せずに同程度まで溶解性が改善でき，本法の有用性が示唆された．

次に，HSPC, DPPGを担体とした薬物未封入またはNI封入脂質ナノ粒子の構造特性について評価を行った．X線小角散乱プロファイルより，本脂質ナノ粒子は単層の脂質二重膜を有する可能性が示唆された．透過型電子顕微鏡（TEM）および原子間力顕微鏡（AFM）による画像から，直径50〜100 nmの円形粒子の存在が確認できた．AFM force curve測定より，試料の力学的特性を反映するbreakthrough forceは薬物未封入のナノ粒子では12 nN, NI封入粒子では9 nNを示し，NI封入によるわずかな低下は，脂質同士のパッキング力の低下による脂質膜の乱れに起因する可能性が考えられた．プロトン核磁気共鳴（NMR）測定の結果，脂質ナノ粒子懸濁液には薬物由来のケミカルシフトが検出されず，懸濁液中に溶解する薬物量は極めて低く，ほとんどが脂質中に存在することが明らかとなった．また，昇温による薬物漏出や粒子の崩壊はないことが確認できた．

5. 毛髪のダメージ改善を目的とした脂質ナノ粒子製剤のヘアケア分野への応用

これまでの難溶性薬物の経口吸収性改善を目的とした検討で経口液剤や凍結乾燥による用時溶解製剤を想定していたのに対し，私は脂質ナノ粒子をより実用性の高い用途へ応用したいと考え，学生時の最後の1年間で毛髪吸収への有用性評価を試みた．ナノ粒子材料は，機能性・使用性向上を目的に幅広く利用され，適用範囲の一つに毛髪がある．毛髪は生活環境下で紫外線や摩擦などによる物理的損傷や，パーマ，カラー，ブリーチ等の薬品による化学的損傷を受けるが，保湿性や柔軟性を高めると進行を抑制できる．これらの背景に対し，有効成分の微粒子化とリン脂質が有する水分保持力向上効果により，脂質ナノ粒子の毛髪改質の可能性が考えられる．そこで，保湿成分封入脂質ナノ粒子を調製し，損傷毛髪への効果を表面状態と水分量により評価した．これまでの検討[1〜3]では負電荷を持つ脂質ナノ粒子を調製してきたが，ナノ粒子に正電荷を持たせることで毛髪への吸着性が高まることが報告されていることから，正電荷の脂質ナノ粒子を合わせて調製し評価した．保湿成分ceramide 3を封入した負電荷脂質ナノ粒子（HSPC/DPPG）および正電荷脂質ナノ粒子（HSPC/octadecylamine）は平均粒子径約100 nm，ゼータ電位−56.6 mV，57.0 mVを示した．ブリーチ処理を施した損傷毛髪はSEMにより視覚的に顕著なダメージを観察でき（Fig. 3A, B），その水分量は未処理の13.7%と比較して10.1%に低下した（Fig. 4A）．この損傷毛髪を負電荷（Fig. 3D）または正電荷（Fig. 3E）ceramide 3封入脂質ナノ粒子懸濁液に60分間浸漬させ，室温で24時間風乾させた毛髪表面のキューティクルの状態は，脂質ナノ粒子懸濁液による処理をしていない損傷毛髪（Fig. 3B）および比較対照として蒸留水のみに浸漬させた損傷毛髪（Fig. 3C）と比較して，めくれ上がっている部分が滑らかになり，改善されている傾向がある

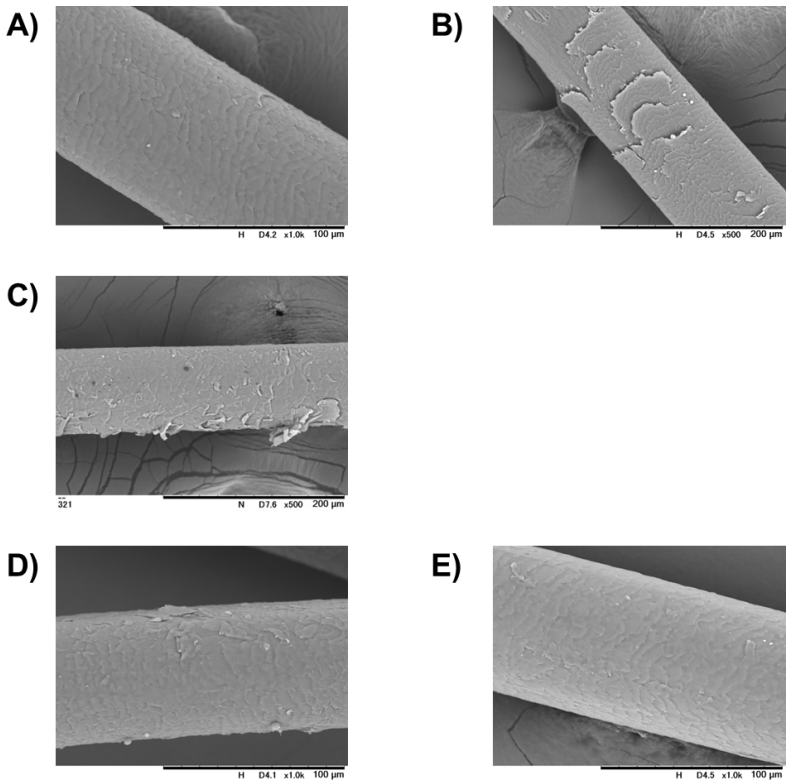

Fig. 3. SEM photographs of hair. (A) Untreated hair, (B) bleached hair, (C) water-treated bleached hair, (D) negative charged lipid nanoparticles-treated bleached hair and (E) positive charged lipid nanoparticles-treated bleached hair.

ことが観察できた．Ceramide 3 封入脂質ナノ粒子懸濁液に浸漬させた損傷毛髪の水分量は，負電荷粒子，正電荷粒子に 60 分間浸漬するとそれぞれ 12.5%，12.4% を示し，損傷毛髪の水分量を有意に上昇させた．60 分間浸漬後に流水で洗浄した場合においても，負電荷粒子，正電荷粒子について水分量の上昇効果が保たれた（Fig. 4B）．浸漬時間を 5 分間に短縮した場合，さらに 5 分間浸漬し，洗浄した場合においても水分量を上昇させた（Fig. 4C）．比較対照として蒸留水のみに浸漬させた損傷毛髪の水分量は上昇せず，ceramide 3 封入脂質ナノ粒子の存在が損傷毛髪の水分量を上昇させる効果を確認できた．また，毛髪水分量に電荷による有意な差異は認められなかった．さらに，ceramide 3 のみを蒸留水に分散させた分散液または ceramide 3 未封入の脂質ナノ粒子懸濁液に浸漬させた損傷毛髪の水分量は上昇しなかった．これらの結果から，本脂質ナノ粒子は損傷毛髪の保湿による改質に効果を示すことが推察された[4]．

以上の結果より，ロール混合粉砕法と超高圧乳化分散法により，ナノサイズとしての特性を示す脂質ナノ粒子懸濁液を調製でき，難溶性物質の溶解性および経口吸収性の改善効果が明らかとなった．また，本脂質ナノ粒子は種々の難溶性化合物へ適用でき，さらに，損傷毛髪の改質に効果を示すことが明らかとなった．したがって，本法は難溶性物質の溶解性および吸収性改善に有用な手法であり，ヘアケア等の多用途へも応用できることが示唆された．

6. 大学から企業へ

大学院卒業後は現在所属している中外製薬に入社した．脂質ナノ粒子製剤について気になることはまだまだあったが，企業での製品開発をしたいという強い思いを持ち，納得いくまでたくさん就職活動をした．学生時代に経験した病院実習や学会聴講，就職活動等を通し，私は基礎研究よりも包装検討や製造機などを含めた最終製品を作るための検討に興味を持っていたことから，希望した部署に配属され，製剤技術を担当している．

企業と大学での研究の進め方の違い，またこれま

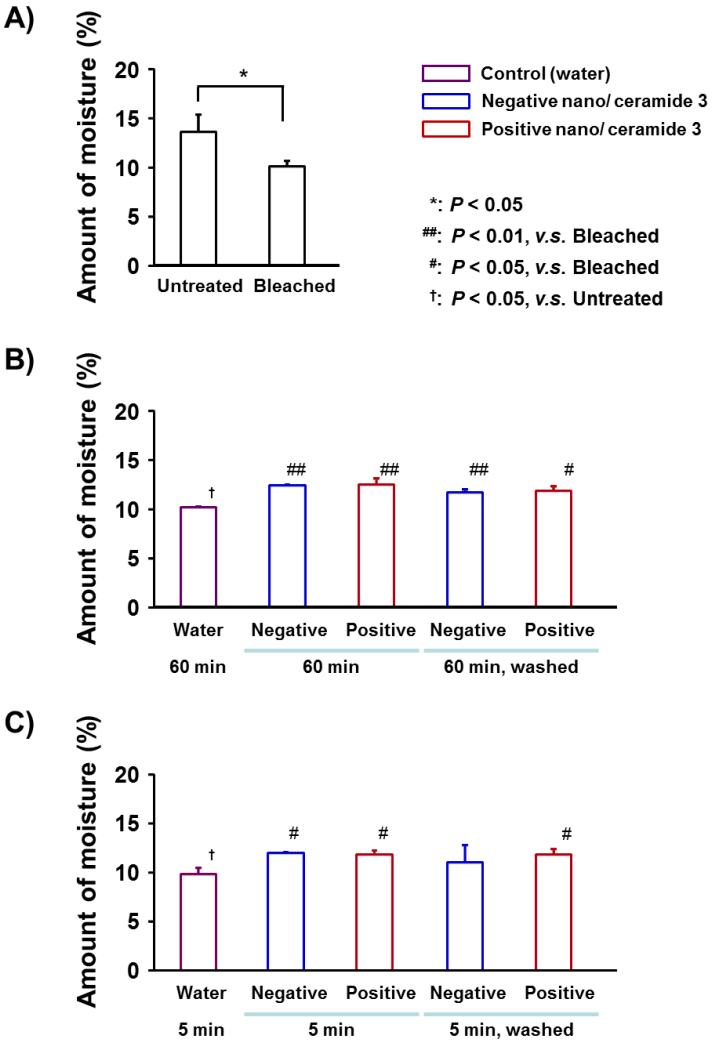

Fig. 4. Amount of moisture in hair samples. (A) Before and after bleached, (B) after soaking in negative or positive charged lipid nanoparticle suspensions for 60 min and (C) after soaking in negative or positive charged lipid nanoparticle suspensions for 5 min. $n = 3$, mean ± S.D.

でのテーマとの検討内容の違いに戸惑い，やっと少し慣れてきたと感じているところだ．初めに実感した研究の進め方の大きな違いは時間が限られていることだった．大学では自分のテーマについて，何をどこまでできるか，しなければいけないか，期限は自分で決め，夜中や休日も気にせず過ごしていた．それに対し，企業では限られた時間の中で必要な検討を進めることが大切であり，これは入社当初は難しいことだった．また，大学では自分の実験は一人で行っていたのに対し，複数の検討をグループのメンバーや他部署と協働で行うことにも戸惑った．さらに，試薬やデータの管理，機器の使用などについてより適切な遂行を意識するようになった．

検討内容に関しては，現在は注射剤の製剤開発を担当しており，その多くは抗体製剤である．大学では私自身も研究室内でも低分子の固形製剤を主に扱っていたため，大きな変化があった．製剤の分野であっても製造方法も評価項目も異なり，原薬が粉末ではなく添加剤が含まれる溶液状態であることに違和感があり，限外濾過膜を通過しない大きさの分子が溶けている状態であることは理解しがたかった．種々の検討を通してこの分野に触れることで慣れてきたが，疑問点は解消してから実施することを心掛けている．注射剤の製剤開発では，添加剤や組成，無菌製剤の製法，バイアルやシリンジ等の容器，投与デバイスなど，多くの検討項目がある．無菌製剤

の安定性としては微粒子や不溶性異物の評価，自己投与を想定したシリンジ製剤においては摺動性などの使用性の評価も行っている．その一つ一つが原薬を製品にすることにつながる検討であり，やりがいは非常に大きい．これらの環境の変化から，私は大学の研究室では自分のテーマの周りの狭いところを見ていたことを実感した．企業での製品開発を通してこれまで触れることのなかった新しいことを少しずつ経験できており，視野が広がり，製剤分野に対しても理解を深めたように感じている．今後も携わった開発品の使用者に求められる製品化を目指し，これまでの経験の中で感じてきたことを思い出しながら，製剤開発を続けていきたい．

本稿では，薬学や製剤研究を通してこれまでの経験から感じたこと，また脂質ナノ粒子製剤を軸とした種々の検討内容について紹介させていただいた．

寄稿の機会を与えてくださりました薬剤学編集委員の皆様方に御礼申し上げます．最後に，これまでご指導いただきました先生方，支えてくださった皆様に深く感謝申し上げます．

引　用　文　献

1) Y. Funakoshi, Y. Iwao, S. Noguchi, S. Itai, Lipid nanoparticles with no surfactant improve oral absorption rate of poorly water-soluble drug, *Int. J. Pharm*., **451**, 92–94 (2013).
2) R. K. Barman, Y. Iwao, Y. Funakoshi, A. H. Ranneh, S. Noguchi, M. I. I. Wahed, S. Itai, Development of highly stable nifedipine solid-lipid nanoparticles, *Chem. Pharm. Bull*., **62** (5), 399–406 (2014).
3) Y. Funakoshi, Y. Iwao, S. Noguchi, S. Itai, Effect of alkyl chain length and unsaturation of the phospholipid on the physicochemical properties of lipid nanoparticles, *Chem. Pharm. Bull*., **63** (9), 1–6 (2015).
4) 舟越由香, 板井　茂, 毛髪のダメージ改善を目的とした脂質ナノ粒子製剤のヘアケア分野への応用, *FRAGRANCE JOURNAL*, **44** (8), 14–20 (2016).