

・略語

AA	Acrylic acid
AUC	Area under the plasma concentration – time curve
Beads	Zirconia beads
BCS	Biopharmaceutics classification system
C _{max}	Maximum concentration
CoQ ₁₀	Coenzyme Q ₁₀
DAD	Diode array detector
DMSO	Dimethylsulfoxide
DSC	Differential Scanning Calorimetry
FEN	Fenofibrate
FLU	Flurbiprofen
GF	Griseofulvin
HBSS	Hanks balanced salt solution
HPC	Hydroxypropyl cellulose-SSL
HPLC	High-performance liquid chromatography
MAN	D-mannitol
MC	Methylcellulose SM-4000
MMA	Methyl methacrylate
PAA	Polyacrylic acid
PHE	Phenytoin
Povacoat [®]	Copolymer of polyvinyl alcohol, acrylic acid and methyl methacrylate
POVA	Povacoat [®]
PRO	Probucol
PVA	Polyvinylalcohol
PVP	Polyvinylpyrrolidone K30
PXRD	Powder X-Ray diffraction
SD rat	Sprague-Dawley rat
S.D.	Standard deviation
SDS	Sodium lauryl sulfate
T _{max}	Time to reach maximum concentration
UV	Ultraviolet

目次

総論の部

諸言	1
第1章 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術の開発	6
1-1. 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化法の確立	6
1-1-1. 序論	6
1-1-2. 自転公転ミキサーの機構	6
1-1-3. 衝突エネルギー	8
1-1-4. Phenytoin のナノ粒子化に及ぼす粉砕パラメータの影響	9
1-1-5. 最適化した粉砕パラメータを用いて調製した PHE ナノ粒子の物性評価	12
1-1-6. PHE の経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子化の影響	13
1-1-7. 難水溶性化合物のナノ粒子化に最適化した粉砕パラメータの適用	15
1-2. 自転公転ナノ粉砕機を用いた低融点化合物のナノ粒子化	15
1-2-1. 序論	15
1-2-2. Standard milling condition を用いた FEN、FLU、PRO のナノ粒子化	16
1-2-3. Mild milling condition を用いた FEN、FLU、PRO のナノ粒子化	18
1-2-4. NP-100 用いた coenzyme Q10 および beeswax のナノ粒子化	21
1-3. 第1章の結論	23
第2章 難水溶性化合物の経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響	25
2-1. 序論	25
2-2. 化合物ナノ粒子の分散剤に POVA を適用できる可能性の検証	26
2-3. GF ナノ粒子の分散性に及ぼす polymer 水溶液の濃度の影響	26
2-4. POVA の GF ナノ粒子に対する分散効果の考察	28
2-5. GF ナノ粒子粉末の再分散性に関する検討	31
2-6. 各 polymer を用いた GF ナノ粒子粉末の粒度分布および結晶性の評価	32
2-7. 溶解性に及ぼす GF/Povacoat/MAN ナノ粒子粉末の崩壊性の影響	34
2-8. GF の溶解性および経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響	35
2-9. 第2章の結論	37

第3章	難水溶性化合物のナノ粒子化による吸収性改善効果の要因解析	39
3-1.	序論	39
3-2.	Maximum absorbable dose (MAD)を用いた GF の吸収律速過程の予測	39
3-3.	GF 微粉末およびナノ粒子粉末の粒度分布と結晶性の評価	41
3-4.	半透膜に対する GF 膜透過速度を利用した GF の溶解濃度の推定	43
3-5.	ラットを用いた GF 微粉末およびナノ粒子粉末の経口吸収性の比較	44
3-6.	第3章の結論	46
第4章	自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化のスケールアップに関する検討	47
4-1.	序論	47
4-2.	自転公転ミキサーのスケールアップファクターの調査	48
4-3.	PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす懸濁液濃度の影響	48
4-4.	PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす公転 G の影響	53
4-5.	粉碎処理量のスケールアップに関する検討	55
4-6.	第4章の結論	58
総括		59
謝辞		61
実験の部		62
第1章		62
第2章		66
第3章		69
第4章		71
引用文献		73

総論の部

緒言

医薬品は様々な経路から生体に投与されるが、利便性、安全性が高いため、経口投与が一般的に広く用いられている。また、製剤化コストが安価という理由もあり、医薬品開発において、経口剤の開発に重点が置かれている。経口投与後、化合物は消化管内で溶解した後、消化管粘膜を透過し、全身循環系に移行する。そのため、治療上有効な血中濃度を得るためには、経口投与された化合物が消化管内溶液に対し、優れた溶解性を示すことが必要である。しかしながら、近年、医薬品開発において、コンビナトリアルケミストリーとハイスループットスクリーニングの技術導入により、高い薬理活性を示す新規化合物を効率よく見出すことができる反面、合成された化合物の約 60%が難水溶性を示すことが報告されている¹⁾。その結果、新規化合物の経口吸収性が低く、その開発がドロップアウトするケースが多く、化合物の難水溶性は経口剤の開発の障害になっている²⁾。難水溶性化合物を経口投与した場合、消化管内における溶解過程が化合物の吸収の律速となるが、**dissolution rate-limited absorption** (溶解速度律速) および **solubility-limited absorption** (溶解度律速) の2つの過程が知られている^{3,4)}。溶解速度律速とは、消化管内において、化合物粒子からの溶解速度が化合物分子の小腸膜透過速度よりも遅く、経口吸収性が低いことである。また、溶解度律速とは、化合物粒子の溶解速度が膜透過速度より速いにも関わらず、消化管内溶液に対する化合物の溶解度が低く、経口吸収性が低いことである。吸収が溶解速度律速である場合には、微粉化などにより溶解速度を向上させることで、化合物の吸収性を改善できるのに対し、吸収が溶解度律速である場合には、化合物自身の溶解度を高める必要があり、塩形成^{5,7)}、固体分散体⁸⁾、エマルション⁹⁾、自己乳化型製剤¹⁰⁾、シクロデキストリンによる包接化¹¹⁾などの可溶化技術が適用されている。

最近のナノテクノロジー技術の革新に伴い、化合物のナノ粒子化は溶解性を改善する手法の一つとして、医薬品開発においても注目されている。これまで化合物をナノ粒子化することにより、化合物の経口吸収性が改善された報告は数多くあり¹²⁻¹⁴⁾、Table 1 に示すように、米国では5品目の経口剤が上市されている。化合物のナノ粒子化による経口吸収性の改善機構として、2つの要因が考えられている。

Table 1 Nanocrystal drugs on the market

Brand name	Generic name	Dosage form	Manufacturer
Rapamune®	Sirolimus	Oral tablet	Pfizer, Inc.
Emend®	Aprepitant	Oral capsule	Merck & Co., Inc.
Tricol®	Fenofibrate	Oral tablet	Abbott laboratories, Inc.
Megace ES®	Megestrol acetate	Oral suspension	Par Pharmaceutical, Inc.
Triglide®	Fenofibrate	Oral Tablet	Sciele, Shionogi Pharma, Inc.
Zyprexa Relprevv®	Olanzapine pamoate monohydrate	Depot injection	Eli Lilly and Company
Invega Sustenna®	Paliperidone palmitate	Depot injection	Janssen Pharmaceutica, Inc.

1 つ目の要因は、化合物の溶解度および溶解速度の向上に伴う血中濃度の向上および最高血中濃度到達時間 (T_{max}) の短縮である。Nernst-Noeys-Whitney 式に示されるように、化合物粒子の溶解速度 (dC/dt) は粒子の表面積 (A) に比例する (Eq. 1)。

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD}{Vh} (C_s - C) \quad \text{Eq. 1}$$

Eq. 1 において、 D は化合物の拡散定数、 V は溶媒の体積、 h は拡散層の厚さ、 C_s は溶媒に対する化合物の飽和溶解度、 C は時間 t における溶液中の化合物濃度を示す。化合物の粒子径が小さくなるに従い、水と接する表面積が増大し、溶解速度が向上する。Wu らは、粒子径が $5.5 \mu\text{m}$ の MK-0869 (aprepitant) を 120 nm のナノ粒子まで粉砕することにより、その表面積は 41.5 倍に増え、その結果、aprepitant の経口吸収性が改善したことを報告している¹⁵⁾。さらに、Prandtl の式から、粒子の微細化により、粒子の曲面角度が大きくなるため拡散層の厚さが減少し、拡散速度が速くなると報告されている¹⁶⁾。化合物の溶解度に関しては、Ostwald-Freundlich 式に示されるように (Eq. 2)、粒子径 (r) が小さくなるに従い、また、結晶と溶媒間の界面張力 (γ) が大きくなるに従い、化合物の溶解度は上昇する。

$$S = S_{\infty} \times \exp\left(\frac{2\gamma M}{r\rho RT}\right) \quad \text{Eq. 2}$$

Eq. 2 において、 S と S_{∞} は粒子半径がそれぞれ、 r および無限大となるときの化合物の飽和溶解度を示す。また、 M は分子量、 ρ は化合物の密度、 R は気体定数、 T は絶対温度を示す。Eq. 2 に基づき、 ρ が 1 g/mL、 γ が 15 - 20 mN/m、数 μm の粒子径からなる分子量 500 の化合物を 100 nm まで粉砕した場合、化合物の溶解度は理論上 10 - 15% 増加する¹⁷⁾。また、Kipps らは Fig. 1 に示すように化合物の飽和溶解度に及ぼす粒子径と界面張力の影響を Eq. 2 を用いて計算した結果を示しており、溶解度を顕著に向上させるためには、100 nm 以下まで粉砕する必要があると考えられている¹⁸⁾。しかし、実際にはより顕著に溶解度が増加する場合があります、Müller と Peters らによると難水溶性の抗生物質の粒子径を 2.4 μm から 300 - 800 nm に粉砕することにより、その溶解度が 50% 増加したことを報告している¹⁹⁾。その結果、ナノ粒子化された化合物の溶解速度は、溶解度の増加に加えて表面積の増大、拡散層の厚みの減少による影響を受けるため、マイクロサイズの粒子から予想される以上の高い値を示すことがある。

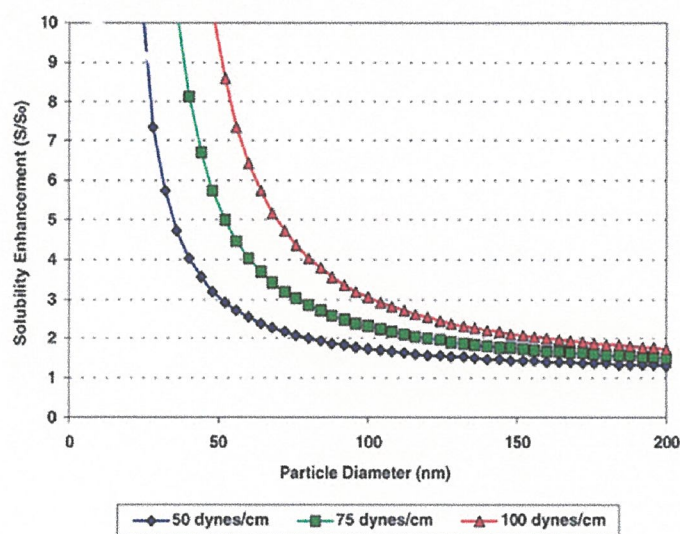


Fig. 1 Effect of solid particle diameter on solubility for hypothetical example¹⁸⁾

2 つ目の要因は、ナノ粒子化した化合物の消化管壁における高い粘膜付着性による経口吸収性の改善である²⁰⁾。ナノ粒子の粘膜付着性に関しては、粒子表面と粘膜間の静電的引力による付着、粒子表面と粘膜間の水素結合および van der Waals 力による吸着、粘膜のたんぱく質と高分子鎖の相互貫入や物理的な巻き込み、不均一な粘膜表面層の絨毛部位へのナノ粒子の拡散などが報告されている²¹⁻²³⁾。ナノ粒子化した化合物の粘膜付着は保持時間を延長するだけでなく、吸収部位において高い濃度勾配を促し、吸収性の増加をもたらす可能性が考えられている²⁴⁾。

また、ナノ粒子化により、化合物の消化管吸収に及ぼす食事の影響の軽減に関する報告がある。ヒトで cilostazol を高脂肪食食後に経口投与すると吸収速度、吸収量ともに増加し、食事の影響を大きく受ける事が報告されている²⁵⁾。Jinno らは、ナノ粒子化した cilostazol 懸濁液 (220 nm) をビーグ

ル犬に投与した時、 C_{max} 、AUC、 t_{max} などの薬物動態パラメータに食事の影響が現れなかったことを報告している²⁶⁾。さらに、Hanafy および Sauron らは、空腹時に fenofibrate の錠剤をヒトに投与した場合、30 - 50%の吸収率のバラツキがあり、食後に投与した場合、60 - 90%の吸収率のバラツキがあったのに対し²⁷⁾、ナノ粒子化した fenofibrate の錠剤を投与すると食事の影響がなくなり、吸収率のバラツキも軽減されたことを報告している²⁸⁾。このように、難水溶性化合物のナノ粒子化は、消化管からの吸収の早い立ち上がり、食事の影響および個体間変動の減少など、難水溶性化合物の経口剤の開発に大きな利点をもたらしている。

難水溶性化合物のナノ粒子化技術は、bottom up 方式と top down 方式に大別される²⁹⁻³²⁾。Bottom up 方式は難水溶性化合物を有機溶媒に一度完全に溶解させ、その後、化合物が溶解した有機溶媒を貧溶媒に添加し、化合物を析出させる方法である。Bottom up 方式では粒度分布幅の狭い化合物ナノ粒子を得られるが、必ずしも最安定形結晶として析出するとは限らず、準安定形や非晶質として析出した場合、物理化学的安定性に問題が残る³³⁾。さらに、ナノ粒子調製時の有機溶媒の残留や本法を適用できる化合物に制限があるなどの問題から、医薬品開発において、bottom up 方式はあまり採用されていない³⁴⁾。一方、top down 方式は化合物結晶を粉碎してナノ粒子を調製する手法であり、これまで Elan 社の Nanocrystal[®]技術や SkyPharma 社の Insouble Drug Deleivery (IDD) 技術などが確立されている^{31,35)}。Nanocrystal[®]技術は wet beads milling の一種であり、これまで上市された Rapamune[®] や Emend[®] など半数以上のナノ粒子製剤の製造に使われているが、そのナノ粒子化には非常に長い粉碎時間を要する¹⁷⁾。また、IDD 技術は high pressure homogenization の一種であり、Table 1 に示す Triglide[®]の製造に使用されている。High pressure homogenization は wet beads milling に比べ、短い時間でナノ粒子を調製できるが、製造コストが高く、その操作に豊富な経験や技能を要するため、導入事例は少ない^{36,37)}。さらに、これらのナノ粒子化技術の最終到達粒子径は約 400 nm 程度である³⁸⁾。ナノ粒子の場合、数百 nm と数十 nm の粒子には大きな物理化学的な差があり、ナノ粒子化技術の改善の余地はまだ残されている。

本研究では、従来のナノ粒子化技術より優れた新規ナノ粒子化技術の開発を目的とし、第 1 章において、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術の開発について検討した。Top down 方式によるナノ粒子化では、懸濁液としてナノ粒子粉碎物が得られるが、粉碎時に発生する衝突・摩擦によりナノ粒子の凝集が生じる傾向にある。ナノ粒子の凝集は、粉碎粒子としての均一性に影響し、経口吸収性の低下およびバラツキに影響する。第 2 章では、ナノ粒子の凝集に対して、分散剤として汎用されている水溶性高分子の中から化合物ナノ粒子の凝集、結晶成長を抑制する水溶性高分子を絞り込み、ナノ粒子懸濁液の分散性の改善について検討し、さらに、化合物の溶解性や経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響についても検討した。化合物をナノ粒子化することにより、化合物の溶解速度および溶解度が向上するため、吸収が溶解速度律速および溶解度律速となる化合物の経口吸収性の改善が期待できる。そこで、第 3 章において、化合物の溶解速度および

溶解度に及ぼすナノ粒子化の効果を *in vitro*、*in vivo* において検証し、その経口吸収改善効果の要因について考察した。第 4 章では医薬品開発における探索研究段階から製造段階まで、本技術を適用させることを目的とし、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術のスケールアップに関する検討した。以下、得られた結果を 4 章にわたり論述する。

第1章 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術の開発

1-1. 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化法の確立

1-1-1. 序論

難水溶性化合物の経口吸収性を改善するため、wet beads milling を用いた化合物のナノ粒子化が検討されており、これまで stirred media milling や planetary media milling などの装置を用いた wet beads milling が報告されている^{31,39-41)}。自転公転ミキサーは、遊星型ミキサーの一種であり、容器を自転、公転させることにより大きな攪拌力を発生させることができ、これまでエポキシ樹脂、シリコン樹脂、軟膏などの高粘性物質を混合する用途に使われていた。自転公転ミキサーは従来の遊星型ミキサーと異なり、容器の自転軸が公転軸側に約45°に傾斜しているため、公転の遠心力による押圧力が傾斜した容器内壁に作用し、押圧力の分力が容器内壁の下方へと作用する。したがって、容器の自転による作用力との相乗効果により、化合物の攪拌および脱泡が促進される⁴²⁾。本法はその高い混合能力を化合物の粉碎に応用した。しかしながら、当初の自転公転ミキサーでは、自転・公転回転数が低く、ナノ粒子化した化合物を得ることはできなかった⁴³⁾。

そこで、本章では自転公転ミキサーを用いた新規ナノ粒子化技術の開発を目的として、自転公転ミキサーの自転と公転の回転数比（自転：公転比）の最適化を行い、難水溶性化合物のナノ粒子化について検討した。また、ナノ粒子を調製する際には、自転公転回転数、beads 添加量など様々な粉碎パラメータが関与する。そのため、粉碎処理量（100 mg）に対する各粉碎パラメータの最適化を行った。

1-1-2. 自転公転ミキサーの機構

容器内における粉碎時の zirconia beads (beads) の挙動を Fig. 2 に示す。容器の自転により、beads は位置 A から位置 D まで容器壁面に沿って持ちあげられ、公転の遠心力により加重落下し、衝突により化合物を粉碎する。容器内で beads の位置がより高くなると、落下する距離が長くなり、速度が増して衝突エネルギーが増大する。

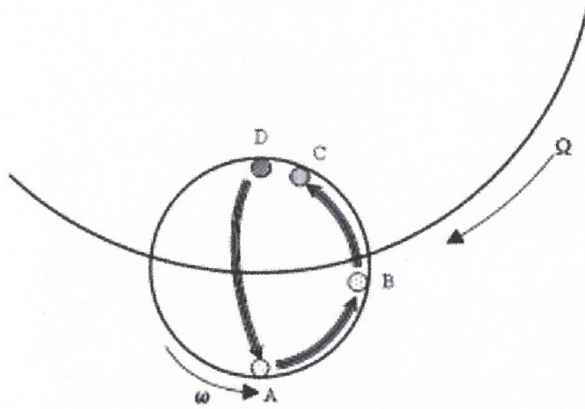


Fig. 2 Movement of a Bead in the Vessel

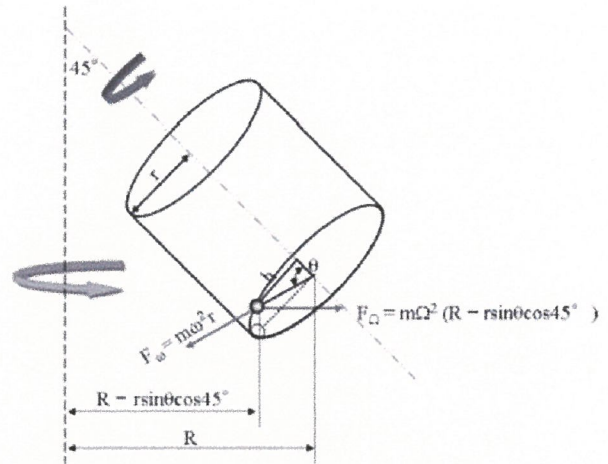


Fig. 3 Relation between Potential Energy and Rotation/Revolution Speed

Fig. 3 に示すように、beads が落下する時点における力のつり合いを Eq. 3 で表すことができる。

$$F_{\Omega} \cos 45^{\circ} = F_{\omega} \quad \text{Eq. 3}$$

ここで、 F_{Ω} は公転の遠心力、 F_{ω} は自転の遠心力を表す。それぞれの遠心力は Eq. 4 に表わされ、Eq. 3 に代入すると Eq. 5 が得られる。

$$F_{\Omega} = m\Omega^2(R - r \sin \theta \cos 45^{\circ}), \quad F_{\omega} = m\omega^2 r \quad \text{Eq. 4}$$

$$\frac{1}{\sqrt{2}} m\Omega^2 \left(R - \frac{r}{\sqrt{2}} \sin \theta \right) \sin \theta = m\omega^2 r \quad \text{Eq. 5}$$

Eq. 4 中の m は 1 粒当たりの beads の質量、 ω は自転の角速度、 r は自転の回転半径 (容器の半径)、 Ω は公転の角速度、 R は公転の回転半径を示す。Fig. 3 に示すように、容器の中心から beads の水平距離を h とすると、Eq. 5 から Eq. 6 が得られる。

$$\sin \theta = \frac{h}{r}, \quad h = \frac{R}{\sqrt{2}} - \sqrt{\frac{R^2}{2} - \frac{\omega^2}{\Omega^2} \times 2r^2} \quad \text{Eq. 6}$$

h が長いほど beads がより加速され、 h が容器の半径に等しくなった時に最も大きい衝突エネルギーが得られる。したがって、Eq. 6 において $h=r$ とすると、Eq. 7 が得られる。

$$h = r = \frac{R}{\sqrt{2}} - \sqrt{\frac{R^2}{2} - \frac{\omega^2}{\Omega^2} \times 2r^2} \Rightarrow \frac{\omega}{\Omega} = \sqrt{\frac{1}{\sqrt{2}} \times \frac{R}{r} - \frac{1}{2}} \quad \text{Eq. 7}$$

自転公転ミキサーの R は 95 mm、 r が 35 mm であるので、最も効果的に粉砕できるのは、自転：公転比が 1.2 : 1.0 となる。しかしながら、回転モーターの性能のため、自転公転ミキサーの自転：公転比を 1:1 に設定した。自転：公転比が 1:1 に設定された自転公転ミキサーを自転公転ナノ粉砕機 (NP-100) として開発した。

1-1-3. 衝突エネルギー

Beads は公転の遠心力により加速され、化合物と衝突し、化合物を粉砕する。そこで、beads が公転の遠心力により、等加速度運動すると仮定した場合、beads が化合物と衝突するときの平均衝突速度 (\bar{v}) は Eq. 8 のように示される。

$$\bar{v} = Ggt, r + h = \frac{1}{2}Ggt^2 \Rightarrow \bar{v} = \sqrt{2Gg(r + h)} \quad \text{Eq. 8}$$

ここで、 G は公転の相対遠心加速度 (公転 G)、 g は重力加速度 (9.8 m/s²)、 t は beads が $r + h$ の距離を移動するのに要する時間とする。また、公転 G は Eq. 9 で表される⁴⁴⁾。

$$G = 1118 \times 10^{-8} \times R \times N^2 \quad \text{Eq. 9}$$

Eq. 9 式中の N は 1 分間当たりの公転の回転数を示す。遊星ボールミルで無機化合物を粉砕した場合、粒子の微細化速度と beads の衝突エネルギーの間に相関性があることが報告されている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。自転公転ミキサーでも同様の扱いを行うと、粉砕中の beads の衝突エネルギー (E_i) は Eq. 10 で表すことができる⁵⁰⁾。

$$E_i = \frac{1}{2} \bar{n} m \bar{v}^2 \quad \text{Eq. 10}$$

Eq. 10 において、 \bar{n} は化合物と beads の 1 秒間当たりの平均衝突回数、 m は 1 粒当たりの beads の質量を示す。また、Kano らは、乾式粉砕において化合物の単位質量当たりの beads の衝突エネルギー (E_w) を Eq. 11 で表している⁴⁵⁾。

$$E_w = \frac{E_i}{w} = \frac{1}{2w} \bar{n} m \bar{v}^2 \quad \text{Eq. 11}$$

Eq. 11 において、 w は化合物の質量を示す。化合物の粉碎には乾式粉碎技術が利用されていたが、乾式粉碎は通常、 $1 \mu\text{m}$ までの粉碎が限界であり、また、粉碎中に化合物粒子が静電気を帯び再凝集しやすい傾向がある⁴⁸⁻⁵¹。一方、湿式粉碎では、溶媒（主に水）を添加して粉碎するため、熱の発生が抑えられ、また、微粒子は水中で静電気を帯びにくく、ナノサイズ領域への粉碎が可能である。そのため、自転公転ミキサーを用いたナノ粒子化では湿式粉碎法を採用した。湿式粉碎において、beads は化合物懸濁液中を移動するため、beads の衝突エネルギーは化合物濃度（粘性）の影響を受ける。そのため、化合物の単位質量当たりの beads の衝突エネルギーを化合物の単位濃度当たりの beads の衝突エネルギー (E_c) で表すことができる。そこで、化合物濃度 (C (g/mL)) を単位体積当たりの化合物の質量として表現し、Eq. 10 から Eq. 11 の式の展開を参考にすると、 E_c は Eq. 12 となる。

$$E_c = \frac{E_i}{C} = \frac{1}{2C} \bar{n} m \bar{v}^2 \quad \text{Eq. 12}$$

Eq. 12 に Eq. 8 を代入すると、

$$E_c = \frac{\bar{n}}{C} m G g (r + h) \quad \text{Eq. 13}$$

Eq. 13 となり、化合物粒子に衝突する beads の衝突エネルギーは公転 G に比例することになる。公転 G は、Eq. 9 から公転半径、公転回転数で制御できるパラメータである。また、化合物懸濁液の濃度（粘性）は beads の流動性に影響し、結果として beads の衝突エネルギーに影響すると考えられる。

1-1-4. Phenytoin のナノ粒子化に及ぼす粉碎パラメータの影響

NP-100 を用いて、難水溶性化合物のナノ粒子を調製する際には、自転・公転回転数や粉碎メディアである beads の添加量、粉碎時に添加する溶媒の添加量など様々なパラメータが関与する。そこで、難水溶性を示す phenytoin (PHE) (100 mg) を用い、PHE のナノ粒子化に及ぼす粉碎パラメータの影響を検討した。第 1 章では、ナノ粒子の凝集の影響を除くため、超音波処理した後に化合物の粉碎後粒度分布を測定した。また、粒度分布の指標として、累積体積がそれぞれ 50%、90%における粒子径である D50 値、D90 値を用いた。

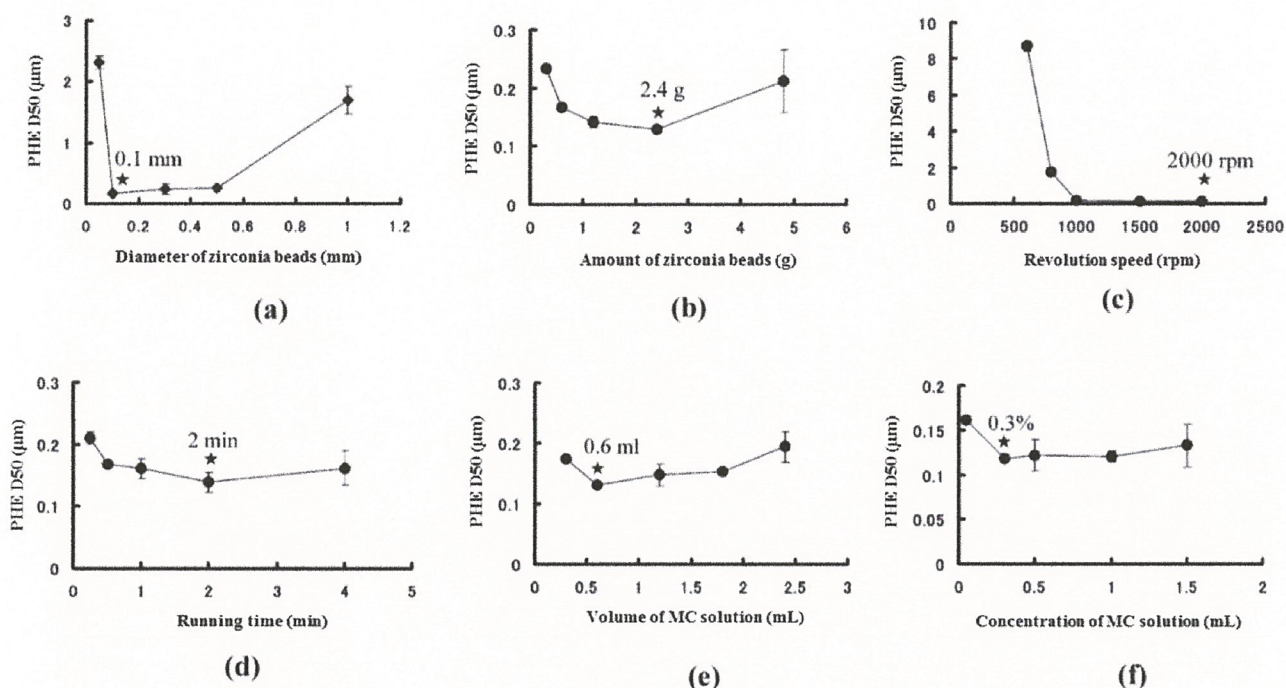


Fig. 4 Examination of the Conditions of NP-100 : (a) Diameter of zirconia beads, (b) Amount of zirconia beads, (c) Revolution speed, (d) Milling time, (e) Volume of methyl cellulose (MC) solution and (f) Concentration of MC solution.

These experiments were conducted three times, and the average of D50 were calculated.

1-1-4-1. PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす beads の影響

Beads の粒子径および添加量が PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす影響について検討した。その結果、Fig. 4a に示すように、直径 (ϕ) 0.1 mm の beads を添加することで、最も粒子径が小さい PHE 粉碎物が得られた。一般に、使用する beads の粒子径が小さいほど粉碎後微粒子の最終到達粒子径は小さくなるということが報告されている⁵²⁾。この傾向は ϕ 0.1 mm 以上の beads を使用した場合に見られたが、 ϕ 0.05 mm の beads を使用した場合には D50 値が大きくなった。 ϕ 0.05 mm の beads を使用した場合、1 粒当たりの beads の体積は ϕ 0.1 mm の beads の 8 分の 1 となる。質量は beads の体積に比例するため、Eq. 13 中の m の値が小さくなった結果、PHE をナノ粒子化できる衝突エネルギーが得られなかったものと考えられる。そのため、PHE をナノ粒子化できる最も細かい beads 径である ϕ 0.1 mm を最適とした。

PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす beads 添加量の影響に関しては、Fig. 4b に示すように、Beads の添加量が少ない場合、Eq. 13 中の平均衝突回数 (\bar{n}) が小さくなるため、D50 値が大きくなったものと考えられる。一方、beads の添加量が多い場合、添加量全体に占める beads の表面積が大きくなり、容器と beads の接触面積が増加し、それにより発生する摩擦熱により溶媒が揮発し、D50 値が大き

なったものと考えられる。

1-1-4-2. PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす公転回転数の影響

Mio らは遊星ボールミルを用いて、公転速度が速いほど衝突エネルギーが大きくなることを報告している⁴⁶⁾。そこで、NP-100 で公転回転数を変化させたところ、Fig. 4c に示すように、公転回転数が高いほど D50 値が小さくなり、NP-100 の最大回転数である 2000 rpm において最も小さい粒子が得られた。Eq.11 より、公転回転数が高くなると公転 G が大きくなり、その結果、高い衝突エネルギーが得られる。1000 rpm 以下で粉碎後の D50 値が大きくなるのは回転数が低く、PHE をナノ粒子化できる必要な衝突エネルギーが得られなかったものと考えられる。

1-1-4-3. PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす粉碎時間の影響

PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす粉碎時間の影響について検討したところ、Fig. 4d に示すように、粉碎時間が長くなるに従い、D50 値は小さくなり、2 分以上の粉碎時間では D50 値に変化はなかった。粉碎時間が短い場合、Eq. 13 における \bar{n} が少ないため、D50 値が大きくなったものと考えられる。一方、粉碎時間を長くすると \bar{n} が多くなるため、D50 値が小さくなったと考えられる。よって、効率よく粉碎できる最適粉碎時間を 2 分とした。

1-1-4-4. PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす Methylcellulose 水溶液の添加量および濃度の影響

微粒子から構成されている粉体は、大きな表面自由エネルギーを持っているため、非常に凝集しやすい傾向にある。本法では、ナノ粒子の凝集を防ぐための分散剤として、Methylcellulose (MC) 水溶液を添加して粉碎した。そこで、ナノ粒子の凝集の軽減と粉碎効率の最適化における MC 水溶液の添加量、濃度の影響について検討した。0.3% (w/v) MC 水溶液の添加量を 0.3 から 2.4 mL の間で変化させたところ、MC 添加量が 0.6 mL の場合、D50 値は 131 nm を示し、最小となった (Fig. 4e)。MC 水溶液の添加量が増加すると、beads と化合物粒子の \bar{n} が減少するため、粉碎効率が悪くなり、D50 値が大きくなったものと考えられる。一方、MC 水溶液の添加量が 0.6 mL 以下では、化合物濃度が高くなり、化合物懸濁液の粘性が高くなる。その結果、懸濁液中の beads の流動性が悪くなり、D50 値が大きくなったと考えられる。次に、MC 水溶液濃度を 0.05 から 1.5% (w/v) の間で変化させ、粉碎効率に及ぼす MC 濃度の影響について検討した。その結果、MC 水溶液濃度が高くなるにつれて D50 値が小さくなり、0.3% (w/v) 以上の濃度では D50 値に変化はなかった (Fig. 4f)。MC 水溶液濃度が低い場合は、分散性が悪くナノ粒子が凝集し、D50 値が大きくなったものと考えられる。また、主薬含量の高い製剤が望ましく、より低濃度の MC 水溶液を用いたナノ粒子化が求められる。したがって、最適な MC 添加量と濃度をそれぞれ、0.6 mL、0.3% (w/v) とした。

1-1-5. 最適化した粉砕パラメータを用いて調製した PHE ナノ粒子の物性評価

最適化した粉砕パラメータを Table 2 に示す。この粉砕条件で 100 mg の PHE を粉砕した結果、Fig. 5a に示すように、粉砕後粒子の D50 値、D90 値は、それぞれ 129 nm、272 nm を示した。また、PHE ナノ粒子懸濁液を凍結乾燥し、得られたナノ粒子粉末を走査型電子顕微鏡 (SEM) で形態観察した結果、Fig. 5b に示すように視野観察範囲において、1 μm 以上の粒子は観察されなかった。

Table 2 Optimum milling conditions for 100 mg PHE

Parameter		
Speed of rotation and revolution (rpm)		2000
Milling time (min)		2
Volume of 0.3% MC aqueous solution (mL) ^{※1}		0.6
Zirconia beads	Diameter (mm)	0.1
	Mass (g)	2.4
Temperature during milling ($^{\circ}\text{C}$)		30

※1 0.1% (v/v) Tween 80 was added to MC solution.

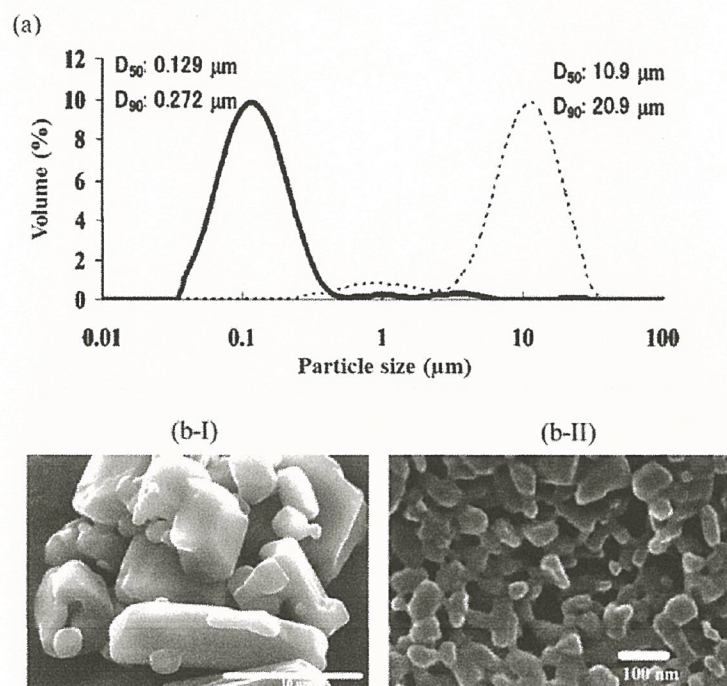


Fig. 5 Particle size distribution (a) of the original (dotted line) and the milled PHE (solid line), and SEM micrographs (b) of the original (b-I) and the milled PHE (b-II).

また、示差走査熱量測定（Differential Scanning Calorimetry : DSC）と粉末 X 線回折（Powder X-ray Diffraction : PXRD）により、NP-100 で調製した PHE ナノ粒子粉末の結晶性について評価した (Fig. 6)。DSC において、原末の融点は 298 °C であったのに対し、ナノ粒子粉末の融点は 284 °C であった。混合物の融点は純物質の融点に比べて低くなることが知られている。ナノ粒子粉末には分散剤である MC が含まれ、PHE と MC の混合物である。そのため、PHE と MC の混合物であるナノ粒子粉末の融点が PHE 原末に比べ低くなったと考えられる。また、PHE の非晶質固体分散体を DSC で昇温すると、約 140 - 170 °C 付近に非晶質の結晶化に起因する発熱ピークが生じることが報告されている⁵³⁾。しかし、ナノ粒子粉末の DSC 曲線には、発熱ピークは検出されなかった。PXRD において、ナノ粒子粉末の回折パターンにハローピークが認められず、その回折パターンは原末と一致した。DSC と PXRD の結果から、NP-100 を用いたナノ粒子化による非晶質の生成量は非常に少ないと考えられ、PHE ナノ粒子は結晶性を維持していることが明らかとなった。以上の結果より、最適な粉碎パラメータを用い、PHE を NP-100 で湿式粉碎することで、粒度分布幅が狭く、結晶性を維持した PHE ナノ粒子が調製できた。

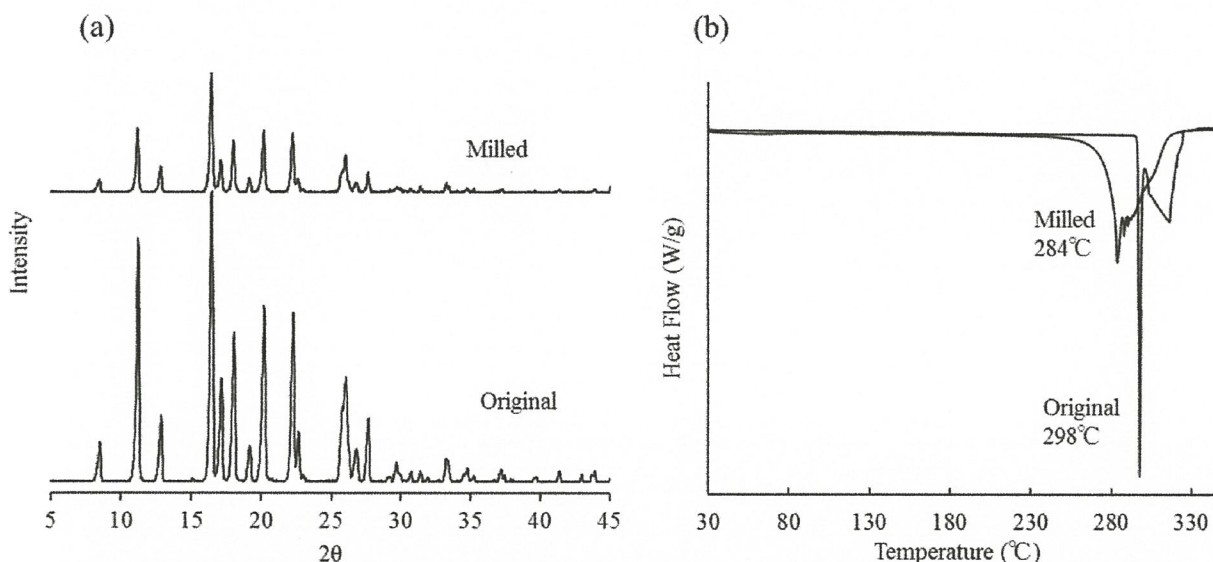


Fig. 6 PXRD patterns (a) and DSC thermograph (b) of the original and the milled PHE

1-1-6. PHE の経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子化の影響

Biopharmaceutics classification system (BCS) の理論⁵⁴⁾に基づくと、PHE は class II に分類される⁵⁵⁾。BCS class II に分類される化合物は、溶解性を改善することにより、経口吸収性が向上することが知られている⁵⁶⁾。Niwa らの報告によると、PHE をナノ粒子化することにより、その溶解性が向上することが報告されており⁵⁷⁾、PHE をナノ粒子化することで PHE の経口吸収性の改善が期待できる。そこで、PHE 原末とナノ粒子化した PHE を 10 mg PHE/kg でラットに経口投与し、投与後の血中濃

度推移を解析した (Fig. 7, Table 3)。ナノ粒子化した PHE を経口投与した場合の C_{\max} および AUC_{0-8} は、PHE 原末を経口投与した時に比べ、それぞれ、約 4.5 倍、約 2.0 倍増加し、PHE をナノ粒子化することにより、その経口吸収性が改善された。また、Fig. 7 より、PHE 原末とナノ粒子化した PHE 消失速度定数に違いが認められた。Wayne らは、PHE をラットに静脈内投与した際、PHE の血漿タンパク結合率に個体差があり、タンパク結合率の高いラットはタンパク結合率の低いラットに比べ、PHE を約 2 倍速く代謝することを報告している⁵⁸⁾。したがって、本研究において、消化管から吸収された PHE の血漿タンパク結合率に違いが生じ、同様な現象が生じたものと推察された。

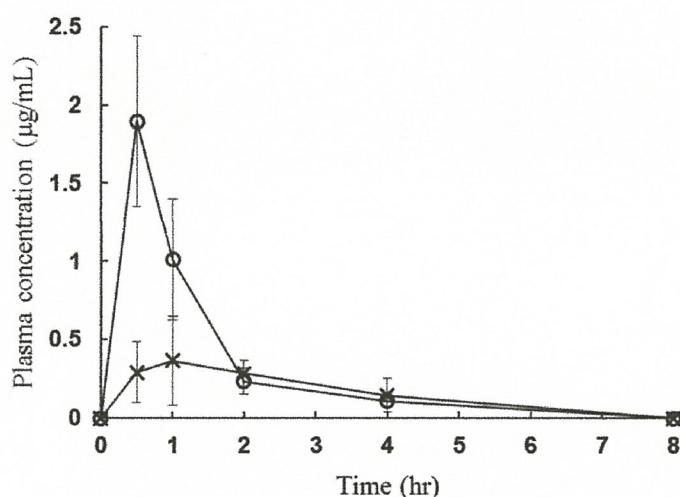


Fig. 7 Plasma concentrations of PHE after oral administration of the original (×) and the milled PHE (○) to rats. Data represent mean \pm SD of 3 independent experiments. Administration amount of PHE is 10 mg/kg.

Table 3 Pharmacokinetic parameters of PHE following oral administration to rats.

	AUC_{0-8} ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{\max} (hr)
Original	1.28 ± 0.34	0.43 ± 0.23	2.33 ± 1.53
Milled	$2.39 \pm 0.28^{**}$	$1.98 \pm 0.46^{**}$	0.75 ± 0.29

AUC_{0-8} : area under the curve of blood concentration vs. time from $t=0$ to $t=8$ hr after administration; C_{\max} : maximum concentration; T_{\max} : time to maximum concentration. Data represent mean \pm SD of 3 determinations.

******, $P < 0.01$ between the original and the milled PHE.

1-1-7. 難水溶性化合物のナノ粒子化に最適化した粉砕パラメータの適用

PHE で見出したナノ粒子化の最適条件 (Table 2) を用いて、naproxen (融点: 158 °C)、nifedipin (融点: 175 °C)、danazol (融点: 225 °C)、indomethacin (融点: 160 °C) を粉砕したところ、Fig. 8 に示すようにいずれの化合物においても、ナノ粒子の懸濁液が得られた。最適化した粉砕条件は融点が高い難水溶性化合物のナノ粒子化に適用できるものと考えられる。本研究において、Table 2 に示す最適条件を standard milling conditions とした。

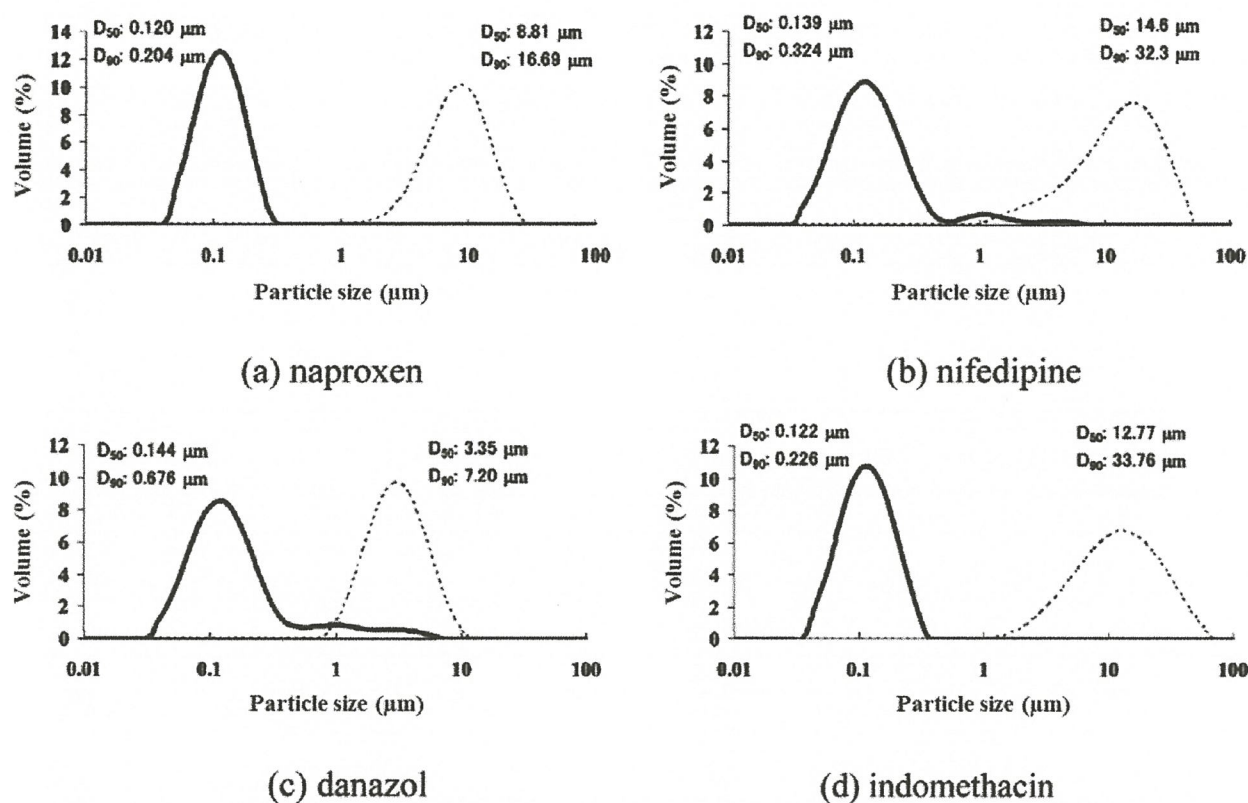


Fig. 8 Particle size distribution of original (dotted line) and milled (solid line) poorly water soluble compounds. naproxen (a), nifedipine (b), danazol (c), and indomethacin (d).

1-2. 自転公転ナノ粉砕機を用いた低融点化合物のナノ粒子化

1-2-1. 序論

1-1 では、NP-100 を用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術を開発した。融点が高い PHE (融点: 295 °C) を NP-100 で粉砕したところ、結晶性を維持したナノ粒子粉砕物が得られた。しかし、低融点化合物の場合、粉砕過程における物理的なエネルギー (beads 同士の衝突や摩擦) や発熱により、非晶質化や分解が生じる可能性がある⁵⁹⁾。非晶質化した化合物は結晶性を維持したものに比べ、優

れた溶解性を示す反面、温度や光などに対する安定性が低く、エネルギー準位の低い安定形に転移する。そのため、粉碎過程における非晶質化により、保存中に化合物の溶解性や経口吸収性の低下や品質に問題が生じる場合がある。また、近年、ペプチドやたんぱく質、などのバイオ医薬品の開発が盛んであり、その原料である biomaterial は熱に不安定なものが多い。そこで、本研究では NP-100 を用いたナノ粒子化技術を低融点化合物や biomaterial に適用させることを目的として、fenofibrate (融点: 80 °C)、flurbiprofen (融点: 110 °C)、probuocol (融点: 約 125 °C) などの低融点化合物のナノ粒子化の可能性について検討した。また、機能的食品の一種である coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀, 融点: 40 °C) さらに、蠟状物質である beeswax (融点: 60 °C) についても、NP-100 を用いたナノ粒子化方法を探索した。

1-2-2. Standard milling conditions を用いた FEN、FLU、PRO のナノ粒子化

予備検討として、FEN、FLU、PRO を Table 2 に示す standard milling conditions で粉碎した (Figs. 9、10)。Fig. 9 に示すように、FEN、FLU は PHE と同じ条件でナノ粒子化することができた。

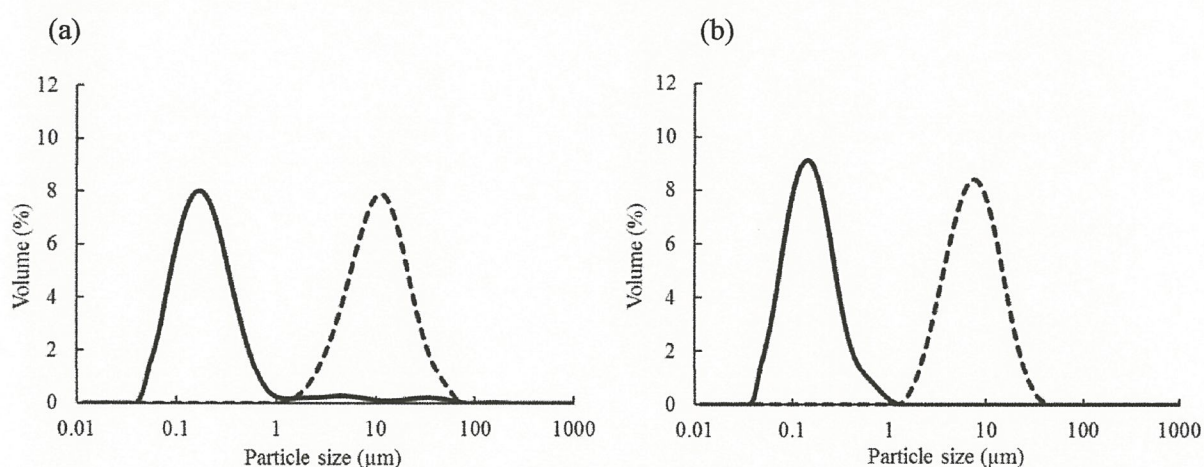


Fig. 9 Particle size distribution of original compounds (dashed line) and the milled compounds (solid line). The milled compounds were prepared by using the standard milling conditions for PHE. FEN (a), FLU (b)

一方、Fig. 10 の dotted line に示すように、PRO では、良好に分散したナノ粒子が得られなかった。Pongpeapat らや Moribe らは MC、polyvinylpyrrolidone K17、hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) などの polymer に sodium dodecyl sulfate (SDS) を加えることで、分散性に優れた PRO や tolbutamide のナノ粒子が調製できることを報告している^{60, 61}。そこで、1% (w/v) SDS を 0.3% (w/v) MC 水溶液に添加し、PRO のナノ粒子化を検討したところ、Fig. 10 の solid line に示すように、分散性に優れた PRO ナノ粒子を調製することができた。

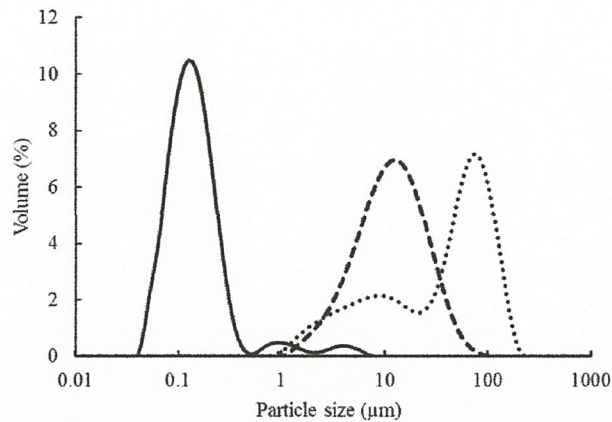


Fig. 10 Particle size distribution of the original PRO (dashed line), the milled PRO with 0.3%MC solution containing 0.1% (v/v) Tween 80 (dotted line), and the milled PRO with 0.3% MC solution containing 1% (w/v) SDS (solid line). PRO was milled by using the standard milling conditions for PHE.

また、standard milling conditions を用い、FEN、FLU、PRO をナノ粒子化、凍結乾燥し、得られたナノ粒子粉末を PXRD で測定した結果を Fig. 11 に示す。FEN、FLU において、化合物原末とナノ粒子粉末の回折パターンを比較したところ、ほぼ同じ回折パターンを示した。しかしながら、ナノ粒子粉末には、非晶質の存在を示す僅かなハローパターンが認められた。PRO に関しては、ナノ粒子粉末の回折パターンは原末のパターンと異なり、ハローピークも検出されたことから、PRO ナノ粒子粉末の一部には、非晶質や結晶多形が含まれていると推察された。

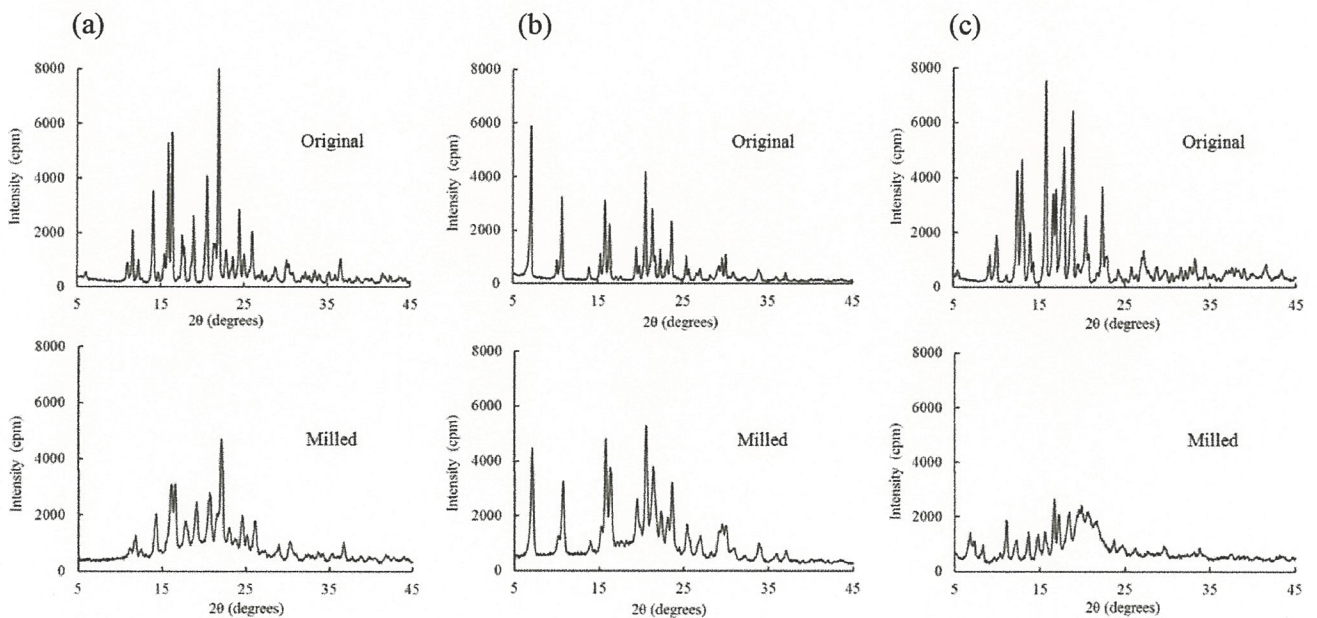


Fig. 11 PXRD patterns of the original (upper) and the milled FEN (a), FLU (b), and PRO (c) by using the standard milling conditions (bottom).

Yonemochi らはウルソデオキシコール酸を振動ボールミルで粉碎することで、ウルソデオキシコール酸が非晶質化することを報告している⁶²⁾。これは、粉碎過程で生じる発熱や物理的なエネルギーにより結晶格子が破壊され、結晶が有する分子配列の規則性を失わせ、非晶質状態をもたらしたものと考えられる。融点の低い FEN、FLU、PRO は PHE に比べ、粉碎時の発熱の影響で結晶格子が壊れやすく、一部非晶質化したと考えられる。第 1 章で示した Eq. 13 において、公転 G を小さくすることで、衝突エネルギーは小さくすることができる。また、Eq. 9 に示すように、公転 G は公転回転数の 2 乗に比例する。そのため、公転回転数を 2000 rpm から 1000 rpm に低減することにより、衝突エネルギーを 4 分の 1 に抑えることができる。さらに、粉碎過程終了後の懸濁液温度の上昇を抑えるため、粉碎環境温度を 0 °C まで下げ、非晶質化しない低融点化合物のナノ粒子化条件を探索した。

1-2-3. Mild milling condition を用いた FEN、FLU、PRO のナノ粒子化

FEN、FLU、PRO を standard milling conditions で粉碎処理したところ、ナノ粒子化は可能であったが、非晶質、結晶多形が生成した。そこで、公転回転数を 2000 rpm から 1000 rpm に低減させた。さらに、粉碎環境温度を 0 °C に下げることにより、これら 3 種類の化合物のナノ粒子化を試みた。まず、公転回転数を低減させたことにより、2 分間の粉碎処理では、ナノ粒子化が不十分であったため、粉碎処理時間を 8 分まで延長し、FEN の粉碎後粒子径に及ぼす粉碎時間の影響について検討した。

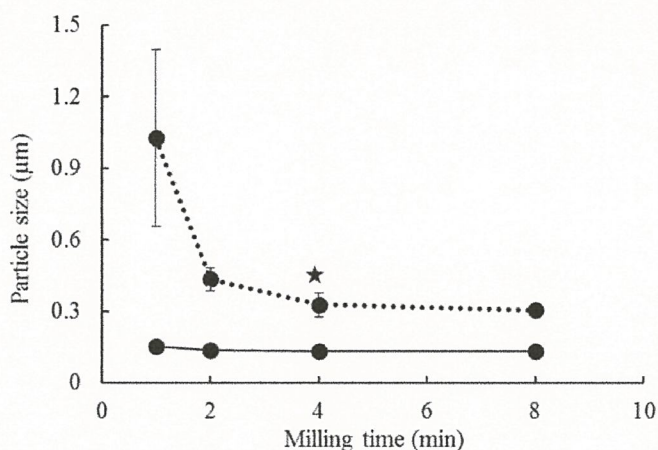


Fig. 12 Effect of milling time on D50 value (solid line) and D90 (dotted line) of milled FEN.

FEN was milled at 1000 rpm of rotation/revolution speed.

Fig. 12 に示すように、2 分から 4 分に時間を延ばすことにより、FEN の粉碎後 D90 値は小さくなったが、8 分まで延長しても、D90 値の減少は認められなかったため、粉碎処理時間を 4 分に設定した。その他の条件を Table 4 に示し、この条件を mild milling conditions とした。

Table 4 Mild milling conditions by the NP-100

Parameter		
Speed of rotation and revolution (rpm)	1000	
Milling time (min)	4	
Volume of 0.3% MC aqueous solution (mL)	0.5	
Zirconia beads	Diameter (mm)	0.1
	Mass (g)	2.5
Temperature during milling (°C)	5-10	

Mild milling conditions 条件下で FEN、FLU、PRO を粉砕処理した際の結果を Fig. 13 に示す。いずれの化合物においても、D90 値が約 315 nm 以下を示すナノ粒子懸濁液が調製できた。Mild milling conditions で粉砕処理した FEN、FLU、PRO を凍結乾燥し、得られたナノ粒子粉末の結晶性を PXRD と DSC で評価した (Figs. 14, 15)。Figs. 14a, 14b に示すように、FEN、FLU において、公転回転数の低減と粉砕環境温度を下げたことにより、ハローピークが小さくなり、非晶質の生成が抑えられた。また、DSC においても、非晶質の結晶化に起因する発熱ピークは認められなかった (Figs. 15a, 15b)。一方、PRO では、ナノ粒子粉末の PXRD パターンは原末とほぼ一致し、結晶多形の生成は認められなかったものの、ハローパターンが検出された (Fig. 14c)。また、Fig. 15c に示すように、122-123 °C において発熱ピークが認められたことから、PRO のナノ粒子粉末には一部非晶質が含まれており、mild milling conditions で PRO の非晶質化は防止できなかった。

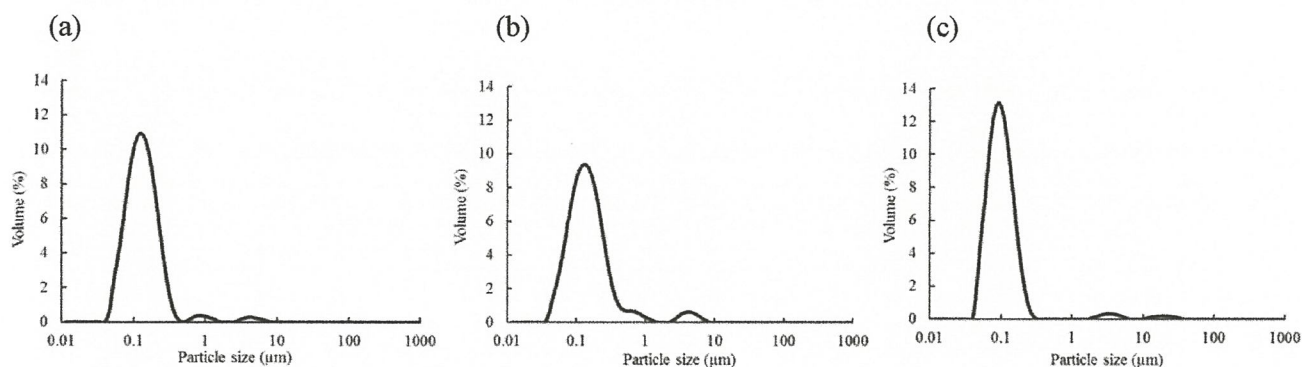


Fig. 13 Particle size distribution of the milled FEN (a), FLU (b), and PRO (c) by using the mild milling conditions.

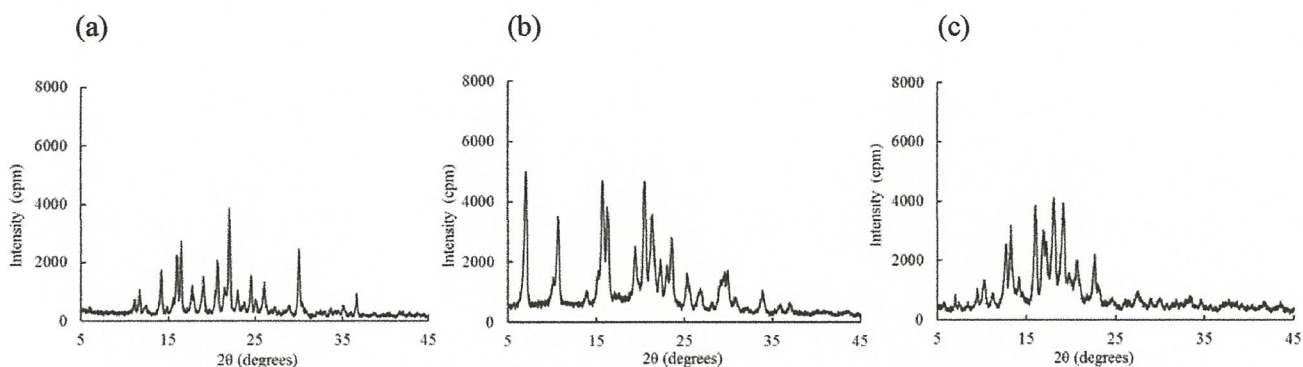


Fig. 14 PXRD patterns of the milled FEN (a), FLU (b), and PRO (c) by using the mild milling conditions.

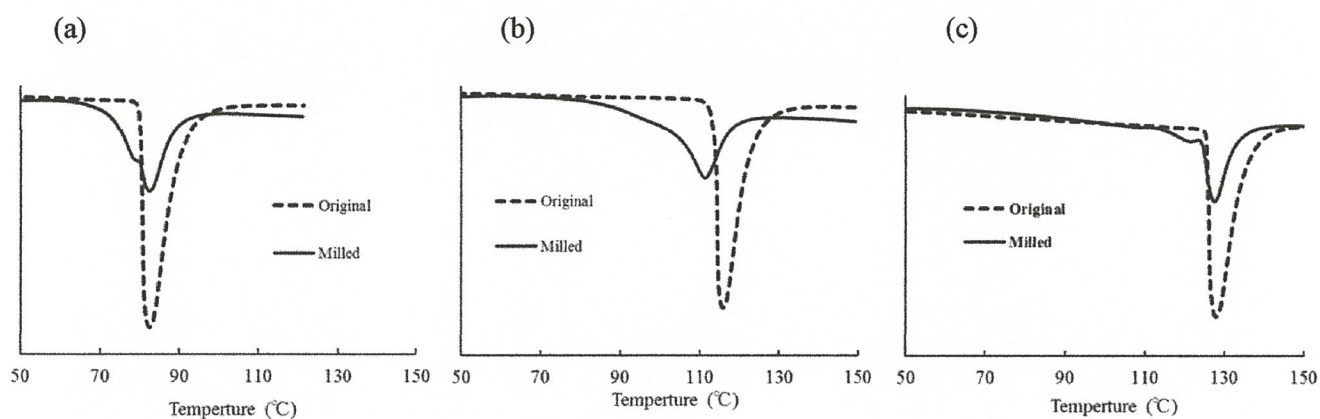


Fig. 15 DSC thermographs of the original (dashed line) and the milled compounds by using the mild milling conditions (solid line). (a) FEN, (b) FLU, and (c) PRO

いずれの化合物においても、mild milling conditions を適用することで非晶質や結晶多形の生成を抑制でき、standard milling conditions に比べ、mild milling conditions で調製した化合物ナノ粒子の粒度分布幅は小さかった。その考察として2点の要因が考えられる。1点目は、結晶性が維持された化合物ナノ粒子は非晶質や準安定形のナノ粒子に比べ、物理化学的に安定であるため、凝集しにくかったものと考えられる。2点目は小さい衝突エネルギーで粉碎したことにより、粉碎後の粒子表面の活性化が抑えられたためと考えた。Inkyo らは TiO_2 ナノ粒子の凝集解砕に及ぼす beads 径 ($\phi 15 \mu\text{m} \sim 100 \mu\text{m}$) の影響について検討しており、beads 径が小さいほど最終到達粒子径が小さいことを報告している⁶³⁾。この現象は細かい beads を使用し、小さい衝突エネルギーにより、ナノ粒子の凝集を解砕したことで、ナノ粒子表面の活性を抑えられたと考えられている。本研究では 2000 rpm から 1000 rpm に回転数を低減したことにより、ナノ粒子の表面活性が抑えられたものと考えしている。また、FEN や FLU のナノ粒子化には Tween 80 や SDS のような界面活性剤を添加する必要がなかったのに対し、PRO の場合、SDS の添加が必要であった。PRO の水への溶解度は数 ng/mL と報告され

ており⁶⁴⁾、FEN (2 µg/mL)⁶⁵⁾ や FLU (38 µg/mL)⁶⁶⁾ などに比べ非常に低い。そのため、SDS 無添加条件下では、PRO 粒子の MC 水溶液への濡れ性が悪いため、良好な粉碎ができなかったと推察された。

1-2-4. NP-100 を用いた coenzyme Q₁₀ と beeswax のナノ粒子化

Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) は、サプリメントや化粧品等で注目されている機能性物質の一つである。しかしながら、CoQ₁₀ は、約 48 °C の低融点化合物で分子量が大きく (863 Da)、水への溶解度が非常に低く (<4 ng/mL)、撥水性が高いため経口吸収性が悪い^{67,68)}。また、光不安定性の観点から結晶性を維持する必要がある⁶⁹⁾。CoQ₁₀ の融点は FEN に比べてさらに低いため粉碎環境温度を -10 °C に下げた。CoQ₁₀ の濡れ性の改善および懸濁液の凍結防止を改善するため、エタノールを用いた。これまでの場合、分散剤として MC を使用していたが、MC はエタノールに溶解しないため、エタノールに溶解するセルロース系高分子である hydroxypropylcellulose – SSL (HPC) を使用した。Mild milling conditions をもとに Table 5 のような粉碎条件を設定し、CoQ₁₀ を NP-100 で粉碎処理したところ、D50 値、D90 値が、それぞれ 126 nm、252 nm を示す CoQ₁₀ ナノ粒子を調製できた (CoQ₁₀/cold wet milling (CWM)) (Fig. 16a)。一方、粉碎環境温度が 5 °C 条件では大きい粒子径を示すピークがあり、凝集が生じているものと考えられる (CoQ₁₀/wet milling (WM))。また、Fig. 16b に示すように CoQ₁₀ ナノ粒子の回折パターンは CoQ₁₀ 原末と一致しており、ナノ粒子化後も CoQ₁₀ の結晶性は維持されていた。Onoue らは本法で調製した CoQ₁₀/CWM ナノ粒子をラットに経口投与したところ、CoQ₁₀ 原末に比べ、約 13 倍経口吸収性が改善したこと報告している⁷⁰⁾。さらに、結晶性を維持した CoQ₁₀/CWM と非晶質 CoQ₁₀ を含む自己乳化型製剤の光安定性を比較したところ、CoQ₁₀/CWM の光分解速度は自己乳化型製剤に比べ、4 倍遅く、光安定性が大きく改善したことを報告している⁷⁰⁾。

Table 5 Milling conditions for CoQ₁₀ by the NP-100

Parameter		
Speed of rotation and revolution (rpm)	1000	
Milling time (min)	5	
Volume of 1.0% (w/v) HPC ethanol solution (mL)	0.5	
Zirconia beads	Diameter (mm)	0.1
	Mass (g)	2.5
Temperature during milling (°C)	ca. -10	

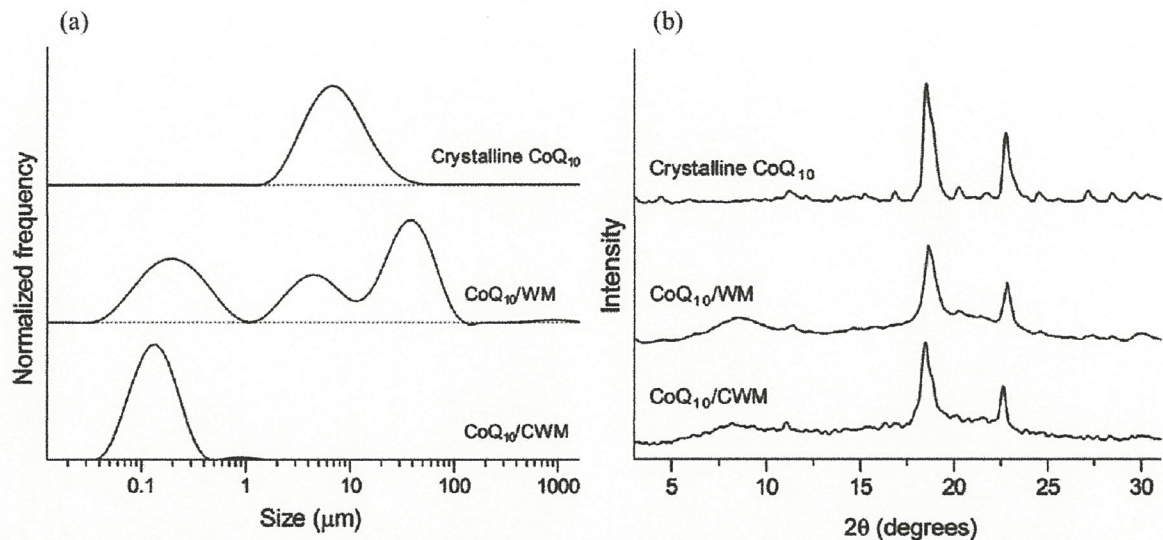


Fig. 16 Particle size distribution (a) and PXRD pattern (b) of CoQ₁₀ samples dispersed in distilled water as determined by laser diffraction analysis⁷⁰).

CoQ₁₀/WM : CoQ₁₀ was milled at 5 °C of temperature.

CoQ₁₀/CWM : CoQ₁₀ was milled at -10 °C of temperature.

Beeswax は 62 - 64 °C の融点を持つ高分子エステル混合物である。最初に、standard milling conditions を用い、NP-100 で beeswax を粉砕処理したが、beeswax の形は変わらず、beads の一部が beeswax の表面に付着していた。Beeswax は蠟状の物質であり、非常に柔らかいため、beeswax をナノ粒子化するためには、beeswax を冷却し、その硬度を高める必要があった。Beeswax は直径約 5 mm の粒状であったため、液体窒素で冷却しながら、乳鉢、乳棒で砕いたものを用いた。Beeswax のナノ粒子化を 3 段階 (乾式粉砕、湿式粉砕、および分散過程) で行った。まず、乳鉢、乳棒で砕いた beeswax の粒子径は不均一であり、その粒子径を均一にするために乾式粉砕を実施した。乾式粉砕過程には溶媒を添加せず、beeswax (100 mg)、分散剤である polyvinylpyrrolidone K30 (PVP) 粉末 (30 mg)、および φ 0.1 mm beads (5.0 g) を容器に添加し、beeswax を粉砕した。次に、乾式粉砕された beeswax の粒子径をナノサイズにするために湿式粉砕を実施した。湿式粉砕過程では、乾式粉砕後の beeswax、PVP および beads の混合物にエタノールを添加し、beeswax を粉砕した。液体窒素で冷却しながら乾式および湿式粉砕過程を実施した。最後に、分散過程において、両粉砕過程を経て、得られた beeswax ナノ粒子の凝集を解砕した。その結果、Fig. 17 に示すようなナノ粒子懸濁液 (D50 : 140 nm、D90 : 937 nm) を得ることができたが、凝集体とみられる粒子径の大きいピークは除くことができなかった。

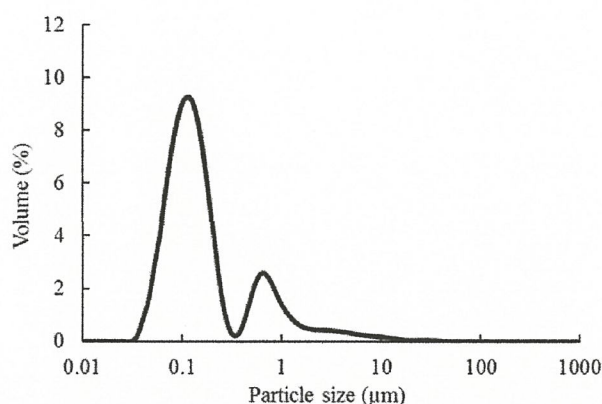


Fig. 17 Particle size distribution of beeswax milled by the rotation/revolution mixer.

1-3. 第1章の結論

本章では、これまで高粘性物質の攪拌、混合に使用されていた自転公転ミキサーを **wet bead milling** に応用し、難水溶性化合物の新規ナノ粒子化技術を確立した。1-1 では、種々の粉砕パラメータを最適化し、数分間の処理で、100 mg の PHE をナノ粒子化できることを見出した。得られた PHE ナノ粒子は非晶質を含まず、結晶性を維持していた。得られた PHE ナノ粒子をラットに経口投与したところ、PHE 原末に比べ、経口吸収性が改善した。これは、PHE の粒子径をナノサイズまで小さくすることにより、表面積増大に伴う PHE の溶解性が改善したこと起因したものと考えている。また、最適化した粉砕パラメータを数種の難水溶性化合物に適用したところ、いずれの化合物においてもナノ粒子化することができた。

1-2 では NP-100 を用いたナノ粒子化技術を低融点化合物に適用した。FEN、FLU、PRO をモデル化合物として用い、粉砕過程における公転回転数、温度の影響について検討した。その結果、公転回転数を下げ、温度上昇を防止することで、FEN、FLU において、非晶質の生成が抑えられたナノ粒子を調製することができた。さらに、FEN より融点が高い CoQ₁₀ に **mild milling conditions** を適用させ、CoQ₁₀ ナノ粒子の調製を検討した。その結果、化合物の融点と粉砕環境の温度差を広げることで、良好な粉砕ができることを見出された。また、結晶性を維持した CoQ₁₀/CWM は非晶質 CoQ₁₀ を含む自己乳化型製剤に比べ、光安定性に優れている報告⁷³⁾ から、物理化学的安定性の高いナノ粒子製剤を得るためには、結晶性を維持したナノ粒子を調製することが必要であることが証明された。また、モデル化合物に蠟状物質である beeswax を用いて、ナノ粒子化について検討したところ、液体窒素を用いて、beeswax の硬度を高めることでナノ粒子化に成功した。液体窒素を用いた粉砕技術は報告されているものの、得られた粉砕物の粒子径はほとんどがマイクロサイズを示している⁷¹⁾。一方、自転公転ミキサーを用いた液体窒素中における粉砕物は D90 値で 1 μm 以下を示し、これまで

報告されている手法より優れていることが分かった。

以上の結果より、NP-100 は粉碎条件、公転回転数、粉碎環境の温度を制御することにより、低融点化合物も良好にナノ粒子化できることが分かった。さらに、液体窒素を用いた低温粉碎法は、低分子化合物に限らず、ペプチド、たんぱく質などの **biomaterial** にも適用できると考えられ、将来、**biomaterial** のナノ粒子化に寄与できるものと考えられる。

第 2 章 難水溶性化合物の経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響

2-1. 序論

第 1 章では、自転公転ナノ粉砕機 (NP-100) を用いて、様々な物性の難水溶性化合物をナノ粒子化できることを報告した。一方、化合物をナノ粒子化することにより、ナノ粒子は高い表面自由エネルギーを有するため、凝集する傾向にある。そのため、湿式粉砕する際にナノ粒子の凝集を防ぐため、分散剤である Methylcellulose (MC)、Hydroxy propyl cellulose-SSL (HPC) などの水溶性高分子 (Polymer) が添加されている。しかしながら、化合物と polymer の組み合わせにより、化合物ナノ粒子の分散性は大きく異なる。また、分散剤として一般的に使用されている HPC、Polyvinyl alcohol (PVA)、Polyvinylpropyrdone K30 (PVP) (Fig. 18) などの polymer では分散できない化合物も存在し、分散剤として多くの化合物に適用できる polymer の開発が求められている。

Copolymer of polyvinyl alcohol, acrylic acid and methyl methacrylate (Povacoat[®]、大同化成工業株式会社) は医薬品のコーティング剤、結合剤、また固体分散体の基剤として使用されている polymer の一種である (Fig 18a)⁷²⁻⁷⁴。Povacoat[®] (POVA) は分子内に PVA、acrylic acid (AA)、methyl methacrylate (MMA) とそれぞれ単体で分散剤として報告されている分子が含まれているため⁷⁵⁻⁷⁷、化合物ナノ粒子に対する非常に強い分散効果が期待できるが、これまで POVA をナノ粒子の分散剤として使用した報告例はない。本研究では、POVA が難水溶性化合物ナノ粒子の分散剤として適用できる可能性について検討した。さらに、分散性の異なる化合物ナノ粒子を用い、溶解性や経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響について検討した。

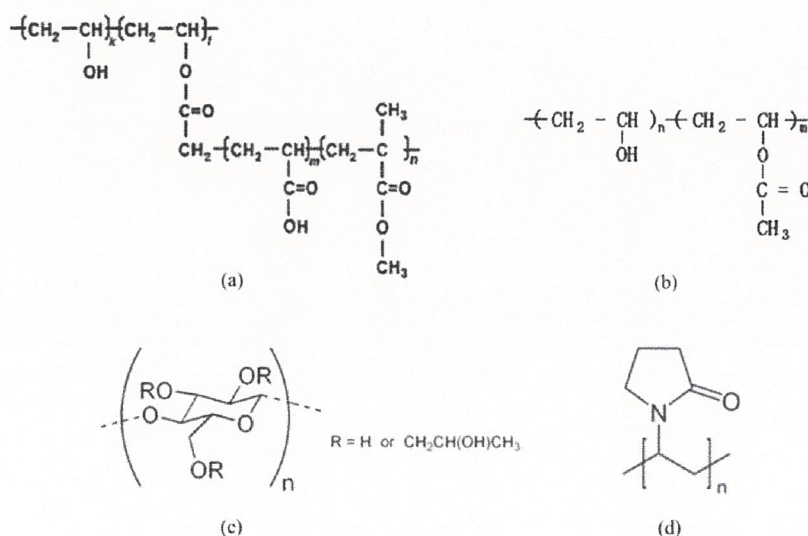


Fig. 18 Chemical structures of POVA (a), PVA (b), HPC (c), and PVP (d).

2-2. 化合物ナノ粒子の分散剤に POVA を適用できる可能性の検証

難水溶性を示す PHE、griseofulvin (GF、融点: 220 °C) を用いて、ナノ粒子の分散剤に POVA を適用できる可能性を検証した。また、POVA に加え、これまでナノ粒子の分散剤として、一般的に使用されている HPC と PVA を用い、PHE および GF のナノ粒子化に及ぼす分散剤の影響について検討した。PHE、GF のナノ粒子化条件として、第 1 章で最適化した粉碎パラメータ (Table 2) を用いた。0.3% (w/v) MC の代わりに、1% (w/v) polymer 水溶液を用いて、PHE、GF を湿式粉碎した結果を Fig. 19 に示す。第 2 章では、ナノ粒子の凝集に対する polymer の影響を検討するため、超音波処理せず、化合物の粉碎後粒度分布を測定した。POVA を用いて、PHE、GF を湿式粉碎したところ、いずれの化合物においても、ナノサイズを示す分布を示しており、POVA をナノ粒子の分散剤として適用できる可能性が認められた。PHE においては、HPC を用いた場合一部凝集が認められたものの、用いた polymer の種類により、PHE の粉碎後粒度分布に大きな差は認められなかった。一方、GF では、POVA を用いた場合と異なり、HPC や PVA を用いた場合、その粒度分布はマイクロサイズを示した。そのため、本章では、粉碎後粒度分布に及ぼす polymer の影響が顕著であった GF を用い、以降の検討を行った。

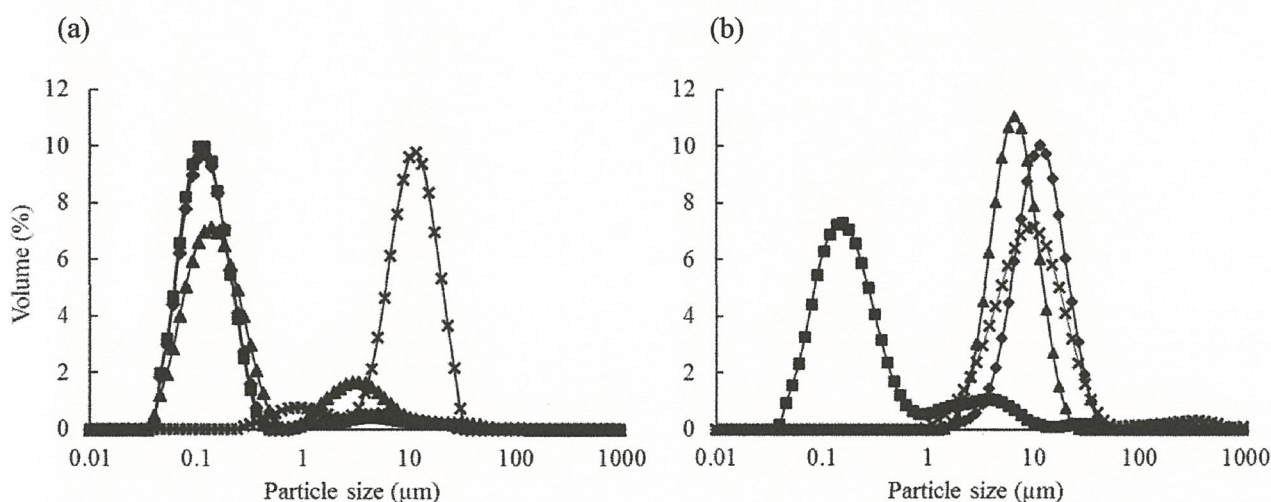


Fig. 19 Particle size distribution of the milled PHE (a) and GF (b) by using POVA (■), PVA (◆), HPC (▲), and Original (×).

2-3. GF ナノ粒子の分散性に及ぼす polymer 水溶液の濃度の影響

2-2 の実験結果より、いずれの 1% (w/v) polymer 水溶液を用いた場合においても、D90 値が 1 μm 以下となる GF ナノ粒子が調製できなかった。GF の融点は 220 °C であり、第 1 章で最適化した粉碎パラメータ (Table 2) でナノ粒子化が可能であると考えられる。また、化合物に対する分散剤である

polymer の添加比を増大させることで、化合物のナノ粒子化に成功する確率が高くなることが報告されている⁷⁸⁾。そこで、polymer 水溶液の濃度を 1% から 10% (w/v) の間で変化させ、GF の粉碎後粒子径に及ぼす polymer 水溶液の濃度の影響について検討した。2-2 で使用した 3 種の polymer に加え、POVA や PVA と同じビニル系 polymer の PVP も用いた。各 polymer 水溶液を用い、GF を湿式粉碎した結果を Fig. 20 に示す。POVA を分散剤として用いた場合、POVA 濃度の増大とともに、D90 値は減少し、5% (w/v) の条件下で、D90 値は 224 nm を示した。一方、PVA、HPC、PVP を 1%~10% (w/v) の濃度で用いたところ、いずれの polymer、濃度においても D90 値は 10 μm 以上であり、GF ナノ粒子を調製できなかつた。また、PVA、HPC、PVP を用いたときの粉碎後 GF 粒子が未粉碎あるいはナノ粒子の凝集由来であるかを確認するため、5% (w/v) polymer 水溶液で GF を湿式粉碎、凍結乾燥を経て得られた GF 粉碎粉末を SEM により形態観察した。Fig. 21 に示すように、いずれの polymer を用いた場合においても、1 μm 以下のナノ粒子が観察された。したがって、PVA、HPC、PVP を分散剤として用いた場合、GF ナノ粒子の凝集を抑制できず、D90 値が 10 μm 以上になったと考えられる。以上の結果より、POVA はこれまで分散剤として使用されていた polymer に比べ、GF ナノ粒子に対し、強い分散効果を示した。

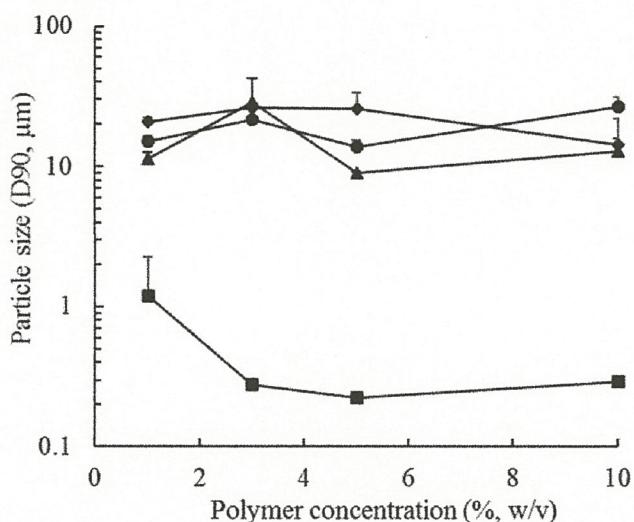


Fig. 20 Particle size distribution (D90 value) of the milled GF by using 1-10% (w/v) of each polymer solution; POVA (■), PVA (◆), HPC (▲), and PVP (●).

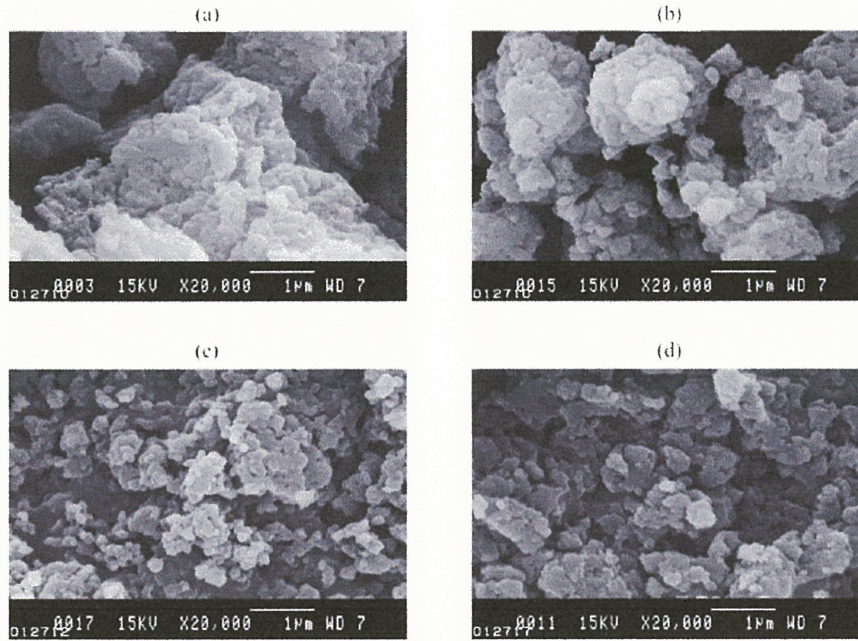


Fig. 21 SEM micrographs of milled GF: GF/POVA (a), GF/PVA (b), GF/HPC (c), and GF/PVP (d)

2-4. POVA の GF ナノ粒子に対する分散効果の考察

2-2 の検討により、これまで分散剤として汎用されていた HPC、PVA、PVP に比べ、POVA は GF ナノ粒子に対する分散効果が高いことが示された。そこで、POVA の GF ナノ粒子に対する分散効果を考察するため、POVA の側鎖をすべて AA に置換した PVA-AA (Fig. 22a) と側鎖をすべて MMA に置換した PVA-MMA (Fig. 22b)、および AA のポリマーである polyacrylic acid (PAA、Fig. 22c) を用いて、GF ナノ粒子に及ぼす POVA の構成分子の影響について検討した。

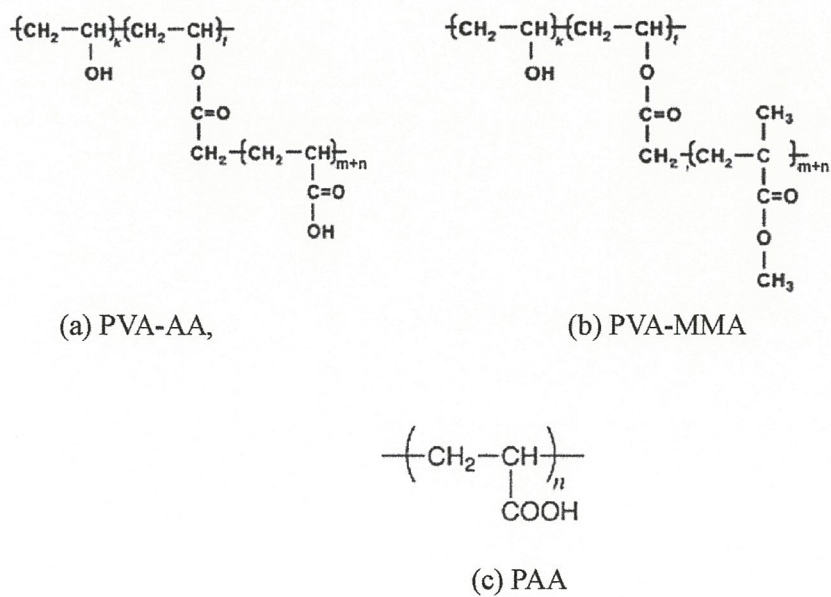


Fig. 22 Chemical structure of PVA-AA (a), PVA-MMA (b), and PAA (c)

その結果、Fig. 23 に示すように、PVA-AA を用いた場合において、POVA を用いた場合と同様に分散性に優れた GF ナノ粒子を調製できた。また、POVA のグラフト構造が GF ナノ粒子の分散効果に及ぼす影響について検討するため、5% (w/v) PVA に PAA を添加した溶液 (PVA+PAA) を調製した。添加した PAA の濃度は 5% (w/v) POVA 水溶液に含まれる AA の分子数と同等になるように、0.5% (w/v) とした。その結果、0.5% (w/v) PAA 水溶液を用いた場合、良好な分散性を示す GF ナノ粒子が得られなかったのに対し、PVA+PAA を用いた場合、分散性に優れた GF ナノ粒子を調製できた。また、添加する PAA の分子量の影響は認められなかった (Fig. 24)。

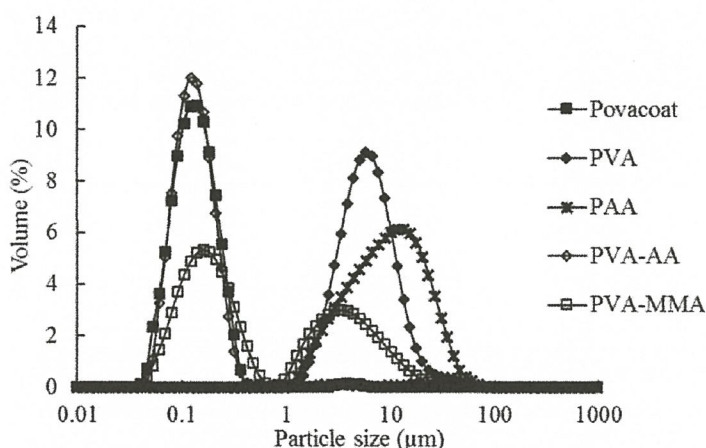


Fig. 23 Particle size distribution of the milled GF with POVA (\square , filled), PVA (\diamond , filled), PAA (*), PVA-AA (\diamond , opened), and PVA-MMA (\square , open). Cocentration of polymer aqueous solution was 5% (w/v).

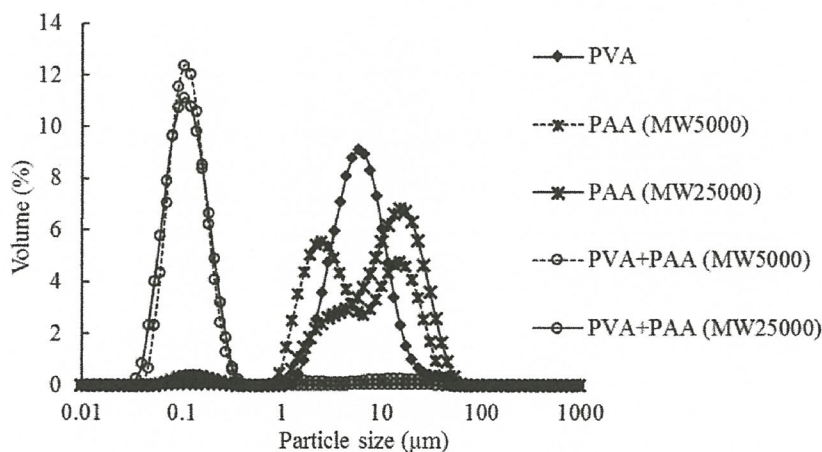


Fig. 24 Particle size distribution of the milled GF with PVA (\diamond), PAA (MW 25000) (*, solid line), PAA (MW 5000) (*, dotted line), PVA+PAA (MW 25000) (\circ , solid line), and PVA+PAA (MW 5000) (\circ , dotted line). Concentration of PVA and PAA was 5% (w/v) and 0.5% (w/v), respectively.

化合物ナノ粒子に対する polymer の分散機構は、まず、polymer が化合物粒子表面に吸着することで、化合物の水への濡れ性を改善し、次に、吸着した polymer による静電的反発力、あるいは水和層形成に伴う立体障害が生じることで粒子同士の接近を防ぎ、ナノ粒子を分散する³²⁾。Polymer や界面活性剤の添加により、水の表面張力を低下させることで、難水溶性化合物の水への濡れ性は、改善できることが知られている。5% (w/v) における PAA、PVA、および POVA 水溶液の表面張力はそれぞれ、58.8 mN/m、43.8 mN/m、47.7 mN/m であり、PAA の表面張力は PVA や POVA よりも高かった。そのため、PAA は PVA や POVA に比べ、GF 粒子表面への吸着性が低く、単独では GF ナノ粒子を分散できなかつたと考えた (Fig. 25a)。PVA 水溶液の表面張力は、POVA 水溶液に比べ低いのに関わらず、単独で GF ナノ粒子を分散できなかつた。これは、GF ナノ粒子に吸着した PVA による水和層が薄く、良好に分散できるほどの立体障害が生じなかつたものと考えられる (Fig. 25b)。一方、PAA は分子中にカルボキシル基 (COOH 基) を有しており、PVA に比べ、より多くの水分子を引き付けることができると考えられる。その理由を COOH 基の塩析力から考察した。クエン酸や酒石酸など、COOH 基を有する塩は Hofmeister 系列から塩析力が強いことが知られている。塩析とは非電解質水溶液に高濃度の塩を添加することで、非電解質が析出する現象であり、これは非電解質を水和させるための水分子が塩に引き付けられ、非電解質が水和できなくなるためである。つまり、塩析力の強い塩は水分子を引き付ける能力が高いと言える。また、Hofmeister 系列より、COOH 基を 1 つ有する酢酸塩より、COOH 基を 3 つ有するクエン酸塩は塩析効果が高いことから、PAA は多数の COOH 基を有するため、塩析力が強く、厚い水和層を形成できると考えられる。したがって、POVA や PVA と PAA を含む溶液では、PVA が GF 粒子に吸着し、PAA が厚い水和層を形成することで、GF ナノ粒子の分散に寄与していると考えられた (Fig. 25c)。

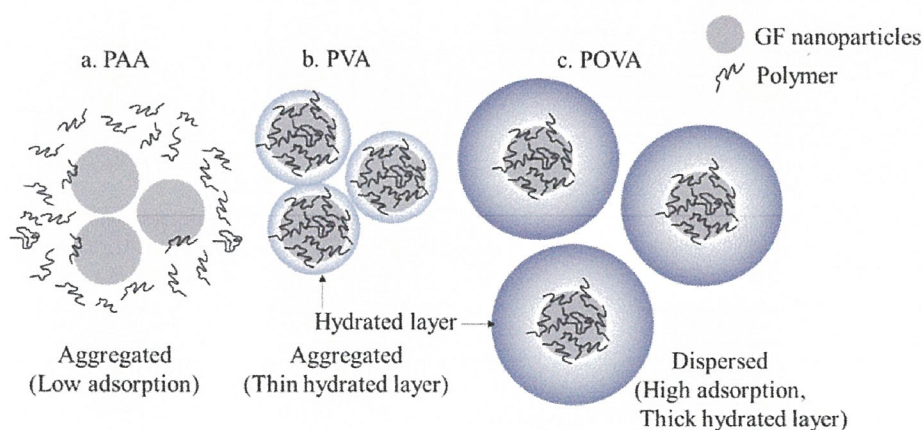


Fig. 25 Speculation of interaction between GF nanoparticles and polymer (PAA, PVA, and POVA).

2-5. GF ナノ粒子粉末の再分散性に関する検討

現在、臨床で使用されている経口剤の多くは錠剤やカプセル剤、散剤などの固形製剤である。そのため、ナノ粒子製剤を経口剤として開発するためには、調製したナノ粒子懸濁液を粉末にする必要がある。ナノ粒子懸濁液を粉末にする手法の一つとして、凍結乾燥が挙げられる^{79, 80)}。しかしながら、ナノ粒子は凍結乾燥過程で凝集しやすいことが報告されている⁸¹⁾。1 から 5% (w/v) の糖あるいは糖アルコールの添加が凍結乾燥による凝集を防ぎ、ナノ粒子粉末の再分散性を促すことが報告されている⁸²⁻⁸⁵⁾。その中でも D-mannitol (MAN) はナノ粒子粉末の再分散性に有効な添加剤として広く使われている^{86, 87)}。ここでは、5% (w/v) POVA を用いて調製した GF ナノ粒子懸濁液を凍結乾燥し、その再分散性に及ぼす MAN の影響について検討した。その結果、MAN を GF に対して質量比 2.5 以上で添加した場合、GF ナノ粒子粉末は 1 分間の混和で完全に崩壊、再懸濁した。一方、MAN の添加量が GF に対して質量比 1.0 以下の場合、GF ナノ粒子粉末の一部は 15 分間の混和においても完全に崩壊しなかった。また、GF ナノ粒子粉末を完全に再懸濁後の粒子径を Table 6 に示す。いずれの MAN 添加量においても、凍結乾燥前後で顕著な粒度分布の変化は認められず、GF ナノ粒子粉末の再分散性に及ぼす MAN の影響は認められなかった。以上の結果より、1 分間の攪拌で GF ナノ粒子粉末を完全に崩壊、再懸濁できる最少添加量である 2.5% (w/v) を MAN 至適添加量とした。

Table 6 Effect of MAN on the re-dispersion stability of the milled GF powder

Concentration of MAN (%, w/v)	Mass Ratio (GF : POVA : MAN) (w/w/w)	Before freeze drying		After freeze drying		
		Particles size (Mean ± SD) (nm)		Particles size (Mean ± SD) (nm)		Disintegration property (Disintegration time)
		D50	D90	D50	D90	
0	1 : 5 : 0	121 ± 4	224 ± 3	115 ± 1	196 ± 2	> 15 min
1.0	1 : 5 : 1	120 ± 2	225 ± 7	119 ± 2	217 ± 10	> 15 min
2.5	1 : 5 : 2.5	121 ± 3	222 ± 2	117 ± 1	200 ± 2	< 1 min
5.0	1 : 5 : 5	124 ± 5	258 ± 25	110 ± 3	188 ± 7	< 1 min

Data represent mean ± SD of 3 determinations.

また、2.5% (w/v) MAN を含む 5% (w/v) POVA 水溶液を分散剤として、難水溶性を示す acyclovir、indomethacin、dipyridamole、hydrochlorothiazide、naproxen、piroxicam、tolbutamide を湿式粉碎したところ、いずれの化合物においても、超音波処理を必要とせず、再分散性に優れた化合物ナノ粒子粉末が得られ、POVA は様々な難水溶性化合物ナノ粒子の分散剤として幅広く適用できた (Table 7)。

Table 7 Particle size (D50 and D90 values) of various poorly water soluble compounds milled with POVA.

Compound	Before freeze drying (Mean \pm SD) (nm)		After freeze drying (Mean \pm SD) (nm)	
	D50	D90	D50	D90
Acyclovir	121 \pm 1	257 \pm 5	119 \pm 3	231 \pm 51
Indomethacin	115 \pm 2	189 \pm 3	115 \pm 3	184 \pm 13
Dipyridamole	126 \pm 3	266 \pm 30	125 \pm 2	251 \pm 13
Hydrochlorothiazide	117 \pm 2	203 \pm 2	136 \pm 26	255 \pm 66
Naproxen	123 \pm 3	223 \pm 14	119 \pm 4	210 \pm 7
Piroxicam	107 \pm 5	172 \pm 18	112 \pm 4	199 \pm 10
Tolbutamide	125 \pm 2	243 \pm 5	133 \pm 7	291 \pm 49

2-6. 各 polymer を用いた GF ナノ粒子粉末の粒度分布および結晶性の評価

上記の検討により、2.5% (w/v) MAN を含む 5% (w/v) POVA 水溶液を用いることで分散性および再分散性に優れた GF ナノ粒子を調製できた。また、GF の溶解性や経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集を検討するため、2.5% (w/v) MAN を含む 5% (w/v) PVA、HPC、PVP 水溶液を用いて GF を湿式粉碎したところ、POVA を用いた GF ナノ粒子 (GF/POVA/MAN) 懸濁液の D90 値は 222 nm を示したのに対し、PVA、HPC、PVP を用いた GF ナノ粒子 (GF/PVA/MAN、GF/HPC/MAN、GF/PVP/MAN) 懸濁液の D90 値は、それぞれ 12.9 μ m、16.3 μ m、5.78 μ m とナノサイズを示さなかった (Fig. 26a)。また、GF/polymer/MAN 懸濁液を凍結乾燥し、得られた粉末の再分散性について検討したところ、いずれの GF ナノ粒子粉末においても、1 分間の混和で完全に分散し、凍結乾燥前と同等の粒子分布を示した (Fig. 26b)。

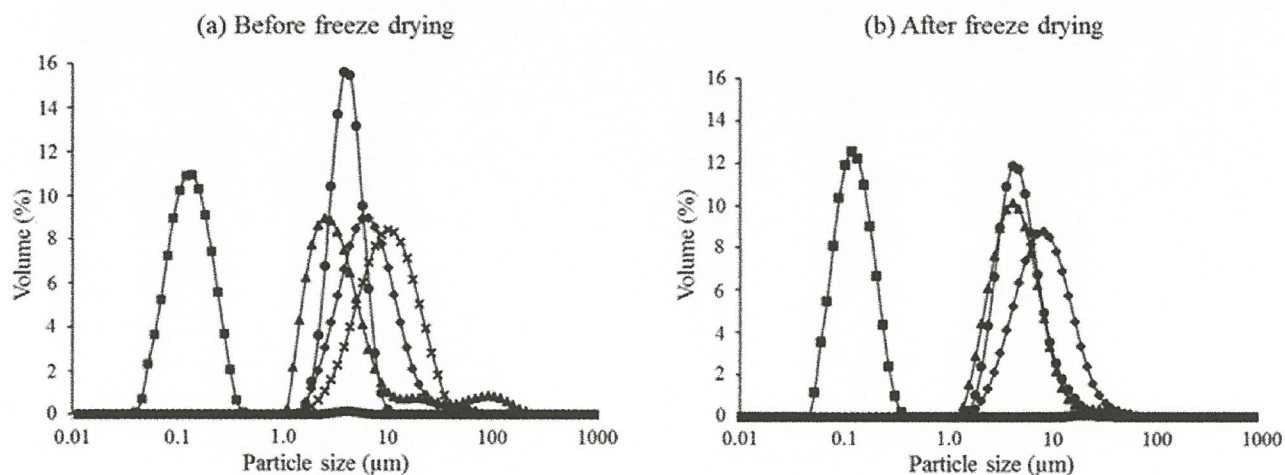


Fig. 26 Particle size distribution of the original GF and the milled GF suspension before (a) and after (b) freeze-drying. Original GF (×), GF/POVA/MAN (■), GF/PVA/MAN (◆), GF/HPC/MAN (▲), and GF/PVP/MAN (●).

次に、得られた GF/polymer/MAN の凍結乾燥粉末 (GF/Polymer/MAN ナノ粒子粉末) を用い、GF ナノ粒子の結晶性を評価した。Fig. 27a に GF 原末、MAN 原末、GF/POVA/MAN の物理的混合物 (PM)、GF/polymer/MAN ナノ粒子粉末の PXRD パターンを示す。PM の回折パターンは GF 原末と PM は異なった回折パターンを示し、わずかなハローパターンが認められた。PM のサンプルは GF 原末を 2.5% (w/v) MAN を含む 5% (w/v) POVA 水溶液に分散後、凍結乾燥することで調製した。そのため、GF 結晶が POVA や MAN 中に分散した状態になっており、POVA 由来のハローパターンが検出されていると考えられた。また、PM と GF/polymer/MAN ナノ粒子粉末の回折パターンは同様であり、GF と MAN 結晶由来の回折パターンが認められた。MAN は凍結乾燥製剤の結晶化賦形剤として知られており、MAN 水溶液を凍結乾燥すると、その凍結乾燥粉末は結晶状態を示すことが報告されている^{88), 89)}。そのため、本研究においても同様な現象が生じたものと考えられる。しかし、GF の回折パターンは MAN に比べ強度が弱く、GF の結晶性を評価できなかった。そこで、GF/polymer/MAN ナノ粒子粉末中の GF ナノ粒子の結晶性を詳細に解析するため、凍結乾燥前に GF/polymer/MAN 懸濁液を遠心処理 (12,100×g で 10 分間) した。遠心処理後の上清には GF ナノ粒子に吸着していない polymer や MAN が存在しており、これらを除去し、沈降した GF ナノ粒子の PXRD を測定した。その結果、GF 原末、PM および粉碎、遠心後 GF ナノ粒子の回折パターンは一致していた (Fig. 27b)。したがって、GF/Polymer/MAN ナノ粒子粉末中に含まれる GF ナノ粒子は結晶性を維持しているものと考えられる。

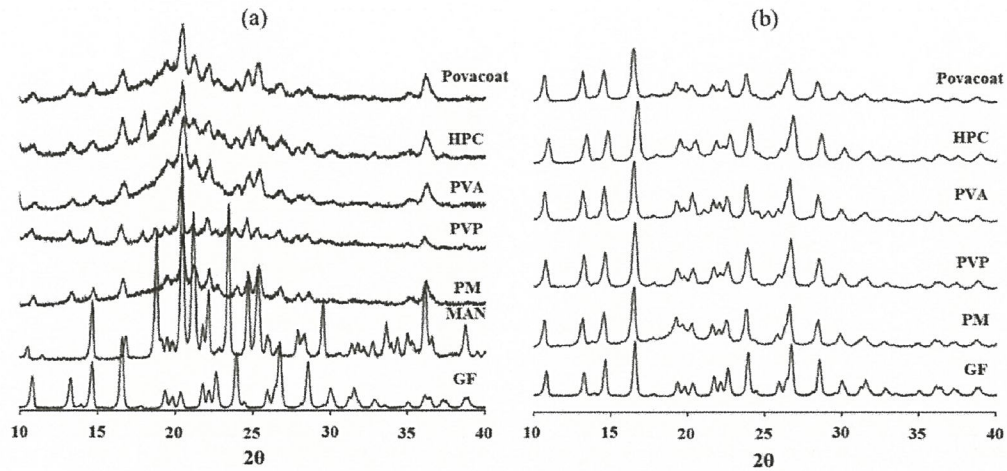


Fig. 27 PXR D patterns of the original and GF/ (a), and the milled GF after centrifugation (b).

2-7. 溶解性に及ぼす GF/POVA/MAN ナノ粒子粉末の崩壊性の影響

2-5 で MAN の添加量が、凍結乾燥粉末の崩壊性に影響することが認められた。固形製剤の崩壊性は製剤中の溶解速度に影響することが報告されている⁹⁰⁾。そこで、本研究において、GF/POVA/MAN ナノ粒子粉末および MAN 無添加の GF/POVA ナノ粒子粉末を用い、GF の溶解性改善に及ぼすナノ粒子粉末の崩壊性の影響について検討した。Fig. 28 に GF 原末、PM (GF/POVA/MAN) およびナノ粒子粉末 (GF/POVA/MAN、GF/POVA) の溶出試験第 2 液 (pH 6.8、JP2 液) における溶出試験結果を示す。本研究では、採取した試験液を 13400 rpm で 5 分の条件で遠心し、その上清に含まれる GF はすべて溶解しているものとした。GF 原末や PM に比べ、GF ナノ粒子を含むナノ粒子粉末は高い溶解性を示した。また、崩壊性の異なる GF ナノ粒子粉末の溶出性を比較したところ、1 分間の混和で完全に崩壊しない GF/POVA ナノ粒子粉末の溶解速度は、GF/POVA/MAN ナノ粒子粉末に比べ遅く、実験終了時点における溶出量も低かった (Fig. 28)。

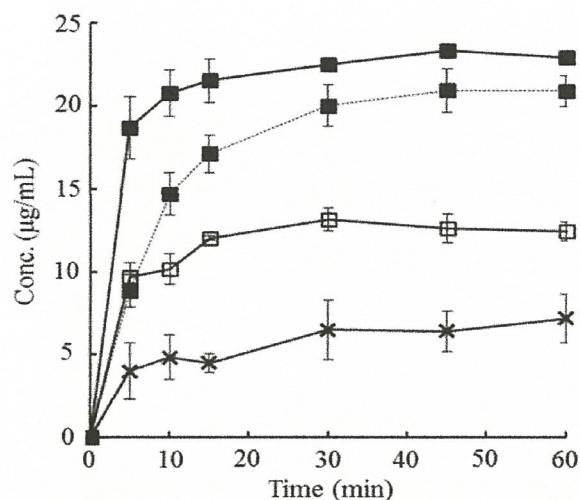


Fig. 28 Effect of the disintegration properties of the milled GF powder on the dissolution profiles of GF ; Original GF (×), Physical mixture of GF/POVA/MAN (□), GF/POVA/MAN powder (■, solid line) and GF/POVA powder (■, dotted line).

2-8. GF の溶解性および経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響

PVA、HPC、PVP などの既存の polymer では、GF ナノ粒子を良好に分散できなかった。一方、POVA を用いた場合、良好な分散性を示す GF ナノ粒子が調製できた。そこで、分散性の異なる GF/Polymer/MAN ナノ粒子粉末を用い、GF の溶解性および経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響について検討した。本研究では、採取した試験液を 13400 rpm で 5 分の条件で遠心し、その上清に含まれる GF はすべて溶解しているものとした。GF 原末、GF/polymer/MAN の PM、GF/polymer/MAN ナノ粒子粉末の溶出試験を JP2 液にて行い、その結果を Fig. 29 に示す。GF を粉砕処理することにより、GF の溶解性は顕著に改善した。特に、良好な分散性を示す GF/POVA/MAN ナノ粒子粉末からの GF の溶解性は最も優れており、GF 原末、GF/POVA/MAN の PM と比較してそれぞれ、約 3 倍、約 2 倍高い溶解量を示した。また、ナノ粒子が凝集した粉末と比較すると約 1.3 倍高かったことより、ナノ粒子の凝集は化合物の溶解性に影響することが認められた。

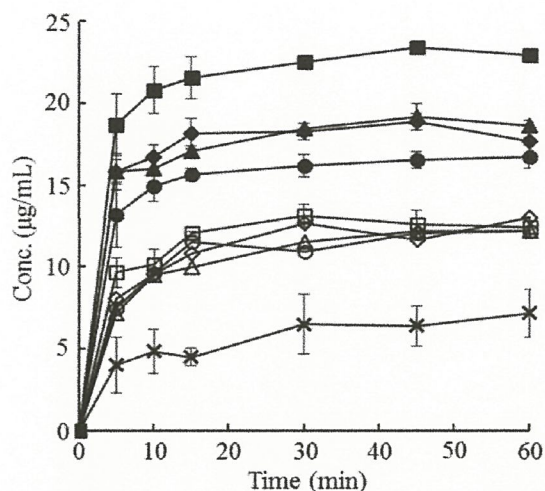


Fig. 29 Dissolution profiles of original GF (×), physical mixture of GF, polymer and MAN (open) and the milled GF (close); GF/POVA (□), GF/PVA (◇), GF/HPC (△), and GF/PVP (○).

以上の溶出試験の結果をもとに、GF 原末 (50 mg/kg)、分散性に優れた GF/POVA/MAN 懸濁液、ナノ粒子の凝集体である GF/PVA/MAN 懸濁液をラットに (GF 換算投与量 50 mg/kg) 経口投与した結果を Fig. 30 に示した。GF 原末をラットに経口投与したところ、 C_{max} 、 AUC_{0-8} がそれぞれ $0.44 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.52 \pm 0.63 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ を示した (Table 8)。GF/POVA/MAN、GF/PVA/MAN をラットに経口投与した時の AUC_{0-8} は GF 原末に比べて、GF/POVA/MAN で 8 倍、GF/PVA/MAN で 4 倍、高い値を示し、GF の経口吸収性は GF のナノ粒子化により増大することが認められた。また、GF/POVA/MAN の C_{max} 、 AUC_{0-8} はそれぞれ、 $6.35 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ 、 $19.96 \pm 1.12 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ を示し、GF/PVA と比べ、 C_{max} 、 AUC_{0-8} は約 2 倍高く、ナノ粒子の凝集が GF の経口吸収性改善効果を低下させることが認められた。

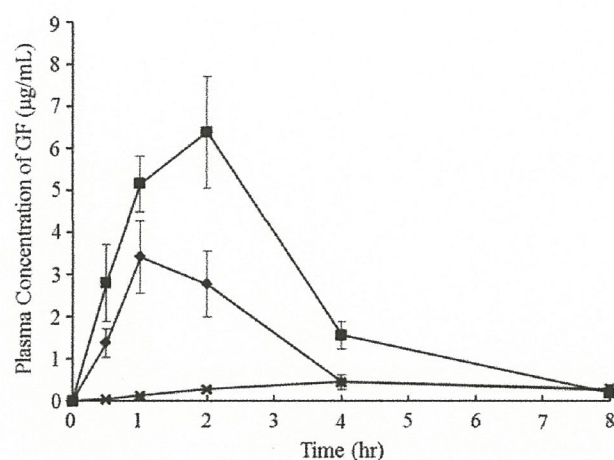


Fig. 30 Plasma concentration of GF after oral absorption of the original GF suspension (50 mg/kg) (×), GF/PVA suspension (50 mg GF/kg) (◆), and GF/POVA suspension (50 mg GF/kg) (■). Data represent mean \pm SD of three independent experiments.

Table 8 Pharmacokinetic parameters of GF following oral administration to rats.

	AUC ₀₋₈ (µg · h/mL)	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)
Original GF	2.52 \pm 0.63	0.44 \pm 0.12	5.05 \pm 1.99
GF/PVA (aggregated)	9.33 \pm 1.79	3.43 \pm 0.92	0.52 \pm 0.16
GF/POVA	19.96 \pm 1.12**	6.35 \pm 0.98**	1.03 \pm 0.11*

AUC₀₋₈: area under the curve of blood concentration vs. time from t=0 to t=8 after administration; C_{max}: maximum concentration; T_{max}: time to maximum concentration. Data represent mean \pm SD of 3 determinations.

*, P < 0.05 between the original GF and the milled GF with POVA.

**, P < 0.01 between the original GF and the milled GF with POVA.

2-9. 第2章の結論

本研究では、医薬品添加物として新たに認可された POVA を難水溶性化合物ナノ粒子の分散剤に適用し、POVA の GF ナノ粒子に対する分散効果について検討した。その結果、POVA は PHE や GF などの様々な難水溶性化合物ナノ粒子の分散剤として、有用であることが認められた。また、POVA 分子中の PVA 部位が GF ナノ粒子表面に吸着し、高い塩析力を示す COOH 基を有する AA 部位が厚い水和層を形成し、立体障害的に GF ナノ粒子を分散していると考えられた。これまで、Pongperapat らや Bilgili らは PVPK17 や HPC を分散剤として用いた場合、分散性に優れた GF ナノ粒子を調製できなかったのに対し、それらに SDS を加えることで、分散性に優れたナノ粒子が調製できることを

報告している^{91,92)}。SDSは分子内に硫酸基を有しており、また、硫酸塩は高い塩析力を示すことが報告されている⁹³⁾。したがって、分子中に高い塩析力を示す官能基を持ち、かつ、水の表面張力を下げる polymer が化合物ナノ粒子に対する高い分散効果を示す可能性がある。さらに、分散性の異なる GF/polymer/MAN 懸濁液やナノ粒子粉末を用い、GF の溶解性や経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響について検討したところ、ナノ粒子の凝集による溶解性や経口吸収性の改善効果の低下が認められた。本研究の成果は難水溶性化合物のナノ粒子化製剤の設計に有用な知見であると考えられる。

第3章 難水溶性化合物のナノ粒子化による経口吸収性改善効果の要因解析

3-1. 序論

難水溶性化合物の低い経口吸収性の要因として、*dissolution rate-limited absorption* (溶解速度律速) および *solubility-limited absorption* (溶解度律速) の2つの律速過程が知られている^{3,4)}。また、新薬開発の早期段階において、吸収の律速過程を予測できる手法として、*Maximum absorbable dose (MAD)* が利用されている^{94,95)}。MADは経口投与後の最大吸収量の指標であり、Eq. 14で表される。

$$MAD = C_s \times K_a \times V \times SITT \quad \text{Eq. 14}$$

Eq. 14において、 C_s は消化管における化合物の飽和溶解度、 K_a は1次の吸収速度定数、 V は消化管液量、 $SITT$ は消化管内滞留時間を示す。投与量がMAD以下の場合、化合物の吸収は溶解速度律速となるため、マイクロ粒子粉末(微粉末)やナノ粒子粉末などの化合物の微細化により経口吸収性が改善できる。また、投与量がMAD以上となる場合、化合物の吸収は溶解度律速となるため、化合物の溶解度の向上が認められない微粉末では、吸収改善効果は小さく、吸収量は頭打ちとなる。しかし、ナノ粒子粉末では溶解度の向上が期待でき、吸収量の頭打ちを改善できる可能性がある。化合物のナノ粒子化により、化合物の溶解度が上がることは報告されているが^{19,96)}、粒子の細かさから、遠心分離やフィルターで完全にナノ粒子を除去できず、ナノ粒子化された化合物の溶解度を正確に評価することは困難であるため、ナノ粒子化による溶解度向上効果には疑問が残されている。そこで、本章ではモデル化合物に *griseofulvin (GF)* を用い、半透膜に対するGFの膜透過速度を利用し、ナノ粒子のGFの溶解度について検討した。また、ラットにおけるGFのMADからGFの吸収律速過程を予測し、GFの吸収の律速過程が溶解度となる条件下において、微粉末とナノ粒子粉末の吸収改善効果を比較することで、ナノ粒子化による経口吸収性改善効果の可能性について検証した。

3-2. Maximum absorbable dose (MAD) を用いたGFの吸収律速過程の予測

MADはEq. 14によって表されるが、創薬研究の早期に各々の化合物について、ヒトの K_a を得ることは非常に難しい。そこで、 K_a と V の代わりに小腸壁における膜透過性(P_{eff})と小腸の有効表面積(SA)を用いることにより、MADをEq. 15として算出することができる。

$$MAD = C_s \times P_{eff} \times SA \times SITT \quad \text{Eq. 15}$$

難水溶性化合物は小腸において、胆汁酸ミセルに可溶化され吸収されるのに対し、大腸において、

水分量が少なく、胆汁酸濃度も低いので、化合物の溶解量、吸収量は少ない。したがって、難水溶性化合物は主に小腸から吸収されるため、小腸内に近い条件で MAD を評価することが重要と考えられる。Eq. 15 において、 C_s は絶食時ヒト小腸モデル液 (Fasted State Simulated Interstitial Fluid, FaSSIF) などの *biorelevant medium* を用いることにより、*In vivo* に近い条件下での評価が可能である⁹⁷⁾。 P_{eff} はヒト結腸癌由来である Caco-2 細胞を用いた *In vitro* 実験系から化合物の膜透過性を評価し、その値を変換することで、ヒト小腸における膜透過性を算出できる⁹⁸⁾。また、GF のような脂溶性の高い化合物の場合、消化管上皮細胞に対する透過性が高いため、吸収においては上皮細胞の近傍に存在する非攪拌水層 (Unstirred Water Layer (UWL)) への拡散が律速となる場合が多い。UWL への拡散が律速となる場合、 P_{eff} は UWL 中における化合物の拡散速度 (P_{UWL}) で近似できる。ヒトにおいて非攪拌水層の厚さは約 100 μm と報告されており⁹⁹⁾、Stokes-Einstein の式を変形することにより、化合物の分子量 (MW) から、100 μm の UWL を拡散する化合物の P_{UWL} を算出できると報告されている (Eq. 16)¹⁰⁰⁾。

$$P_{UWL} = 10 \times 10^{-4} \times \left(\frac{180}{MW}\right)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Eq. 16}$$

以上のように、 C_s や P_{eff} は *In vitro* の実験系や計算による近似値として得ることができる。SA に関しては、Yu らが報告した 800 cm^2 を default 値として使用することで¹⁰¹⁾、Takano らは様々な化合物の経口吸収性を定量的に予測できることを報告している¹⁰²⁾。また、小腸における溶液の平均滞留時間である 3-4 時間を *SITT* として、用いることができる^{103,104)}。Table 9 にヒトおよびラットにおける GF の各種物性と MAD の計算結果を示す。ヒトの FaSSIF 中の GF の溶解度は 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、GF の分子量を用い、Eq. 16 から P_{eff} を算出した。その結果、ヒトにおける MAD は 120 mg であった。Tanaka らはラットにおいて、消化管内の GF 濃度の推移や P_{eff} などについて報告している¹⁰⁵⁾。Tanaka らの報告によると、ラットにおいて、小腸上部 (*upper*) と下部 (*lower*) の消化管液に含まれる胆汁酸やリン脂質濃度に大きな差があり、そのため、GF の溶解濃度は *upper* と *lower* により大きな違いが生じている。また、*upper*、*lower* において、それぞれ、約 2.5 時間、3.0 時間、GF の溶解濃度は維持されることを報告している。Tanaka らの報告をもとに、Rat の MAD を算出したところ、その値は 4.5 mg であった。ラットの体重を 0.3 kg と想定すると、15 mg/kg 以下の投与量範囲では、GF の吸収は溶解速度律速となり、15 mg/kg 以上の投与量では溶解度律速となると予測された。

Table 9 Parameter to evaluate MAD of Griseofulvin in Human and Rat

	Human	Rat ¹⁰⁵⁾
Clinical Dose (mg)	250 (low dose) ¹⁰⁶⁾	5 mg/kg ^{※1}
	500 (high dose) ¹⁰⁷⁾	10 mg/kg ^{※1}
Solubility in FaSSIF ($\mu\text{g/mL}$)	13 ¹⁰⁸⁾	122 (upper)
		213 (lower)
SA (cm^2)	800	40.8 (upper)
		40.8 (lower)
P_{eff} (cm/s)	8.0×10^{-4} ^{※2}	3.4×10^{-5} (upper)
		3.2×10^{-5} (lower)
$SITT$ (h)	4	0-2.5 (upper)
		0-3 (lower)
MAD (mg)	120 / Human	4.5 / Rat

※1 Body weight in human is 50 kg.

※2 Calculated by Eq. 16

3-3. GF 微粉末およびナノ粒子粉末の粒度分布と結晶性の評価

GF 微粉末および GF ナノ粒子粉末は GF 原末を NP-100 で湿式粉碎後、凍結乾燥することで調製した (Fig. 31)。GF 原末、GF 微粉末、GF ナノ粒子粉末を水に再分散させ、超音波処理せずに粒度分布を測定したところ、D90 値はそれぞれ、24 μm 、5.5 μm 、207 nm を示した。また、GF 原末、GF 微粉末、GF ナノ粒子粉末の PXRD パターンを Fig. 32 に示す。第 2 章で示したように、POVA や MAN 含んだ乾燥粉末では、GF の結晶性は正確に評価できなかつたため、GF 微粉化懸濁液、GF ナノ粒子懸濁液を遠心分離し、沈降した粒子を凍結乾燥し、PXRD 測定のサンプルとした。その結果、GF 微粉末、GF ナノ粒子粉末ともに、GF 原末と同じ回折パターンを示し、また、ハローピークも認められなかつたことから、粉碎処理による GF の結晶性の変化は認められなかつた。

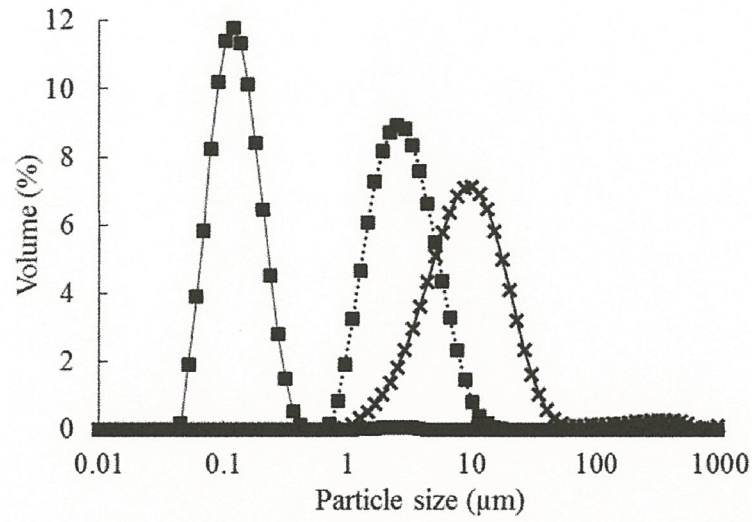


Fig. 31 Particle size distribution of the original (×, solid line), the microsized (■, dotted line), and the nanosized GF (■, solid line).

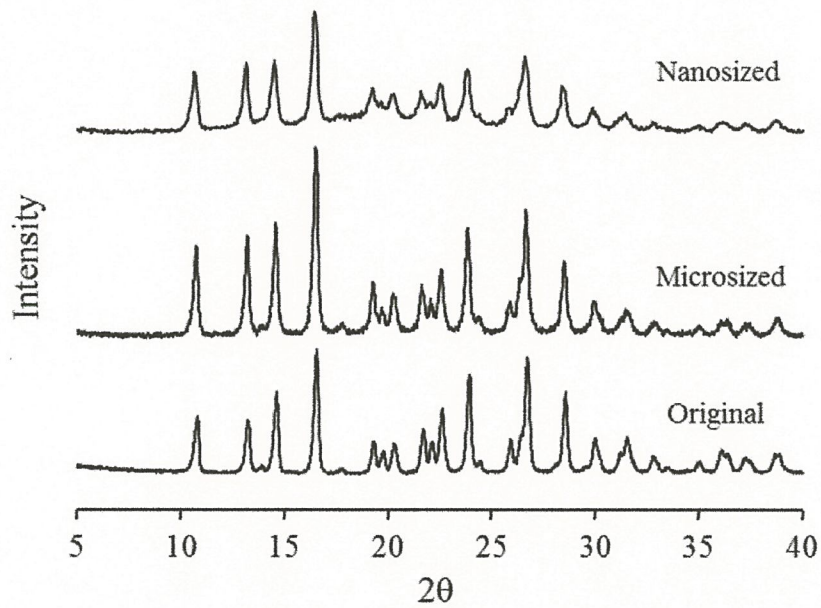


Fig. 32 PXRD patterns of the original (bottom), the microsized (middle), and nanosized GF (top).

3-4. 半透膜に対する GF 膜透過速度を利用した GF の溶解濃度の推定

化合物の溶解度に及ぼすナノ粒子化の影響を検討するため、コロイド粒子やミセルなどを透過させない半透膜 (カットオフ分子量 : 1000) を用い、半透膜に対する透過速度を利用した化合物の溶解濃度を推定した。半透膜に対するみかけの GF の膜透過性 (P_{app}) は、Eq. 17 から算出される。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0} \quad \text{Eq. 17}$$

Eq. 17 において、 dQ/dt は膜透過速度、 A は半透膜の有効透過面積、 C_0 は donor 側チャンバーにおける化合物の溶解度である。本実験の場合、donor 側チャンバーには、GF 微粉末、あるいは GF ナノ粒子粉末が pH 6.5 に調整した Transport medium (TM) に懸濁した液を用いるため、 C_0 は微粉末やナノ粒子粉末から溶出した GF の飽和溶解度となる。また、Eq. 17 を変形すると、Eq. 18 が得られる。

$$\frac{dQ}{dt} = P_{app} \times A \times C_0 \quad \text{Eq. 18}$$

ここで、 P_{app} の値は GF 分子固有の値であり、GF 粉碎粉末の粒子径の影響を受けない。また、有効透過面積も同じである。したがって、 C_0 の違いが GF の膜透過速度に影響する。そこで、半透膜に対する各 GF 粉碎粉末の膜透過性を評価し、その傾きから膜透過速度を算出した。Fig. 33 に示すように、いずれの GF 粉碎粉末の場合においても、receiver チャンバーにおける GF 濃度は直線的に増加した。また、2 時間後の donor 側チャンバーにおける GF 微粉末の溶解濃度は、試験液である TM に対する飽和溶解度と同等であった。これらの結果より、GF 分子の半透膜透過速度より、donor 側チャンバーにおける GF 粉碎粉末の溶解速度は速く、常に donor 側チャンバーの GF 濃度は常に飽和溶解度であるものと推察された。また、ナノ粒子粉末から溶出した GF 分子の膜透過速度は GF 微粉末に比べ、約 1.45 倍高い値を示したことから、ナノ粒子粉末から溶出した GF は微粉末より、1.45 倍高い濃度で溶解していると推察された。

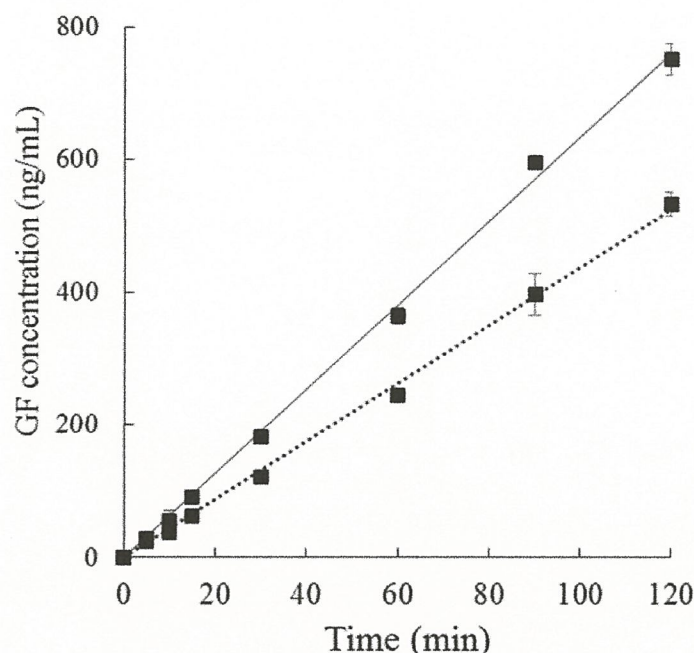


Fig. 33 Permeation profiles of the microsized (dotted line) and the nanosized GF (solid line) through the semipermeable membrane

3-5. ラットを用いた GF 微粉末およびナノ粒子粉末の経口吸収性の比較

GF のヒト臨床投与量 (low dose: 250 mg, high dose: 500 mg) を服用した時の体重当たり (50 kg) の投与量である 5 mg-GF/kg から 3-2 で予測された GF の MAD 以上となる 20 mg-GF/kg まで投与量を変化させ、GF 原末および各粉碎粉末の経口吸収性を評価した (Fig. 34)。Fig. 34a に示すように、5 mg/kg の投与量条件下では、GF 原末、微粉末およびナノ粒子粉末の AUC_{0-8} 値はほとんど変化せず、粒子径減少の効果は認められなかった。これは、ラットに GF を 4.17 mg/kg で投与した場合、GF の Fa は約 91% と報告されており、顕著な差が認められなかったものと考えられる¹⁰²⁾。10 mg/kg 以上の投与量では、GF 原末、GF 微粉末に比べ、GF ナノ粒子粉末が高い経口吸収性を示した (Figs. 34b, c, and d)。また、Fig. 35 に示すように、GF ナノ粒子粉末と GF 微粉末の吸収量 (AUC_{0-8}) を比較したところ、ラットの MAD と予測された 15 mg/kg 以下の投与量では、両粉碎粉末共に用量依存的な GF 吸収量の上昇が認められたものの、20 mg/kg では吸収量に明らかな頭打ちが認められ、GF の吸収が溶解度律速になったものと判断された。しかしながら、溶解度律速となる 20 mg/kg において、微粉末を投与した時の AUC_{0-8} は、 $2.11 \pm 0.031 \mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ であったのに対し、ナノ粒子粉末を投与した場合、 $3.43 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ と GF の吸収量は約 1.6 倍高い値を示した。この結果は、3-4 で示した半透膜に対する GF 膜透過性の試験の結果とほぼ一致しており、ナノ粒子粉末から溶出した GF は消化管内において、微粉末よりも高い濃度で溶解しているため、溶解度律速である条件下においても、高い経口吸収性を示したものと考えられる。

Fig. 35 Correlation between administration dose and oral absorption of GF. the original (×, solid line), the micronized (■, dotted line), and the nanosized GF (■, solid line).

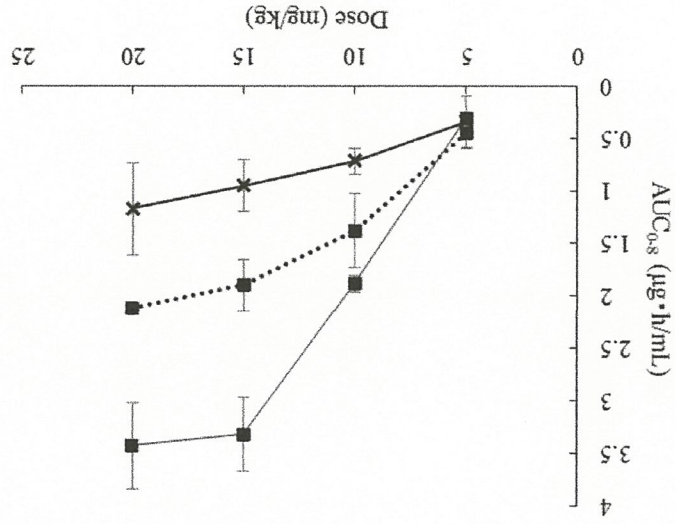
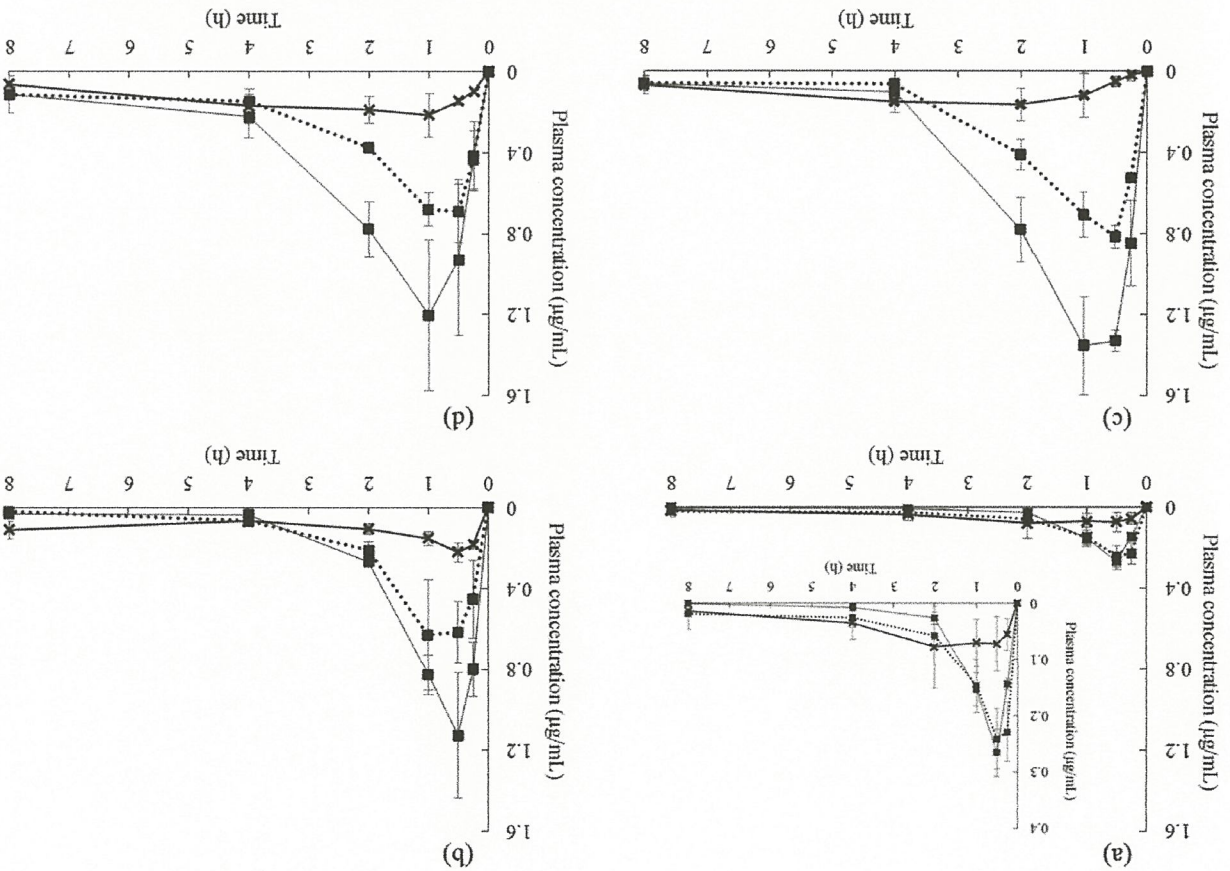


Fig. 34 Plasma concentration profile of the original (×, solid line), the micronized (■, dotted line), and the nanosized GF (■, solid line). 5 mg GF/kg (a), 10 mg GF/kg (b), 15 mg GF/kg (c), and 20 mg GF/kg (d).



3-6. 第3章の結論

本章では、難水溶性化合物のナノ粒子化による吸収性改善効果の要因の解析を行った。半透膜に対するGF膜透過速度を用いて、微粉末、ナノ粒子粉末から溶出したGFの溶解濃度を評価したところ、GFの粒子径を100 nm - 200 nmに微細化することで、GFの溶解濃度が1.45倍向上する結果が得られた。120分後のdonor側チャンバーにおけるGF微粉末の溶解度は約10.8 µg/mLであったことから、ナノ粒子粉末の溶解濃度は、約15.7 µg/mLと推定され、この結果は、Kippsらにより報告されたFig. 1のグラフから大きく外れたものではなく、理論値に近い値であった¹⁸⁾。一方、120分後のdonor側チャンバーにおけるGFナノ粒子粉末の溶解度は約40 µg/mLであり、膜透過速度から推定された濃度に比べ約4倍高かった。Fig. 31に示すように、ナノ粒子粉末には100 nm以下の粒子が存在しており、これらの粒子がフィルター(孔径: 100 nm)を透過したため、高い溶解度を示したものと考えられる。また、GF原末、微粉末およびナノ粒子粉末をラットに経口投与したところ、いずれの粉末においても、ラットのMAD以上である20 mg GF/kgの投与量において、GFの吸収に頭打ちが認められた。しかしながら、GFの吸収が溶解度律速となる投与量条件下にも関わらず、ナノ粒子粉末からのGFの吸収量は微粉末よりも約1.6倍高かったことから、消化管内において、ナノ粒子粉末から溶出したGFの溶解濃度は微粉末よりも高い可能性が示唆された。この結果は、半透膜に対するGFの膜透過実験と一致するものと考えられた。以上、難水溶性化合物のナノ粒子化により、化合物の溶解度自体の改善が可能であり、吸収が溶解速度律速となる化合物のみならず、溶解度律速となる化合物の吸収性向上にも有用と考えられる。

第4章 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化のスケールアップに関する検討

4-1. 序論

第1章から第3章では、NP-100を用いた数百mgの難水溶性化合物のナノ粒子化技術を確立し、ナノ粒子化の有用性を示した。しかしながら、NP-100はラボスケールの機器であり、前臨床試験や臨床試験および市場に化合物ナノ粒子を安定供給するためには、粉碎処理量のスケールアップが必要となる。また、製剤機器を取り扱う場合、ラボスケールから製造スケールまでのスケールアップを同じ機構の機器で製剤化を検討できれば、化合物の使用量が少ないラボスケールのデータから製造スケールの最適条件を効率よく設定することが可能である。Fig. 36およびTable 10にNP-100および中スケール、大スケールの自転公転ミキサーであるARV-3000Twin、ARV-10KTwinを示す。ARV-3000TwinやARV-10KTwinにおいても、粉碎容器の自転軸が公転軸側に約45°に傾斜しており、その動作機構はNP-100と同様である。本章では、自転公転ミキサーのスケールアップファクターを調べ、装置スケールの異なるNP-100、ARV-3000Twin、ARV-10KTwinを用い(Fig. 36、Table 10)、それらのナノ粒子粉碎物を比較することにより、自転公転ミキサーを用いたナノ粒子化技術のスケールアップの可能性について検討した。



Fig. 36 自転公転ナノ粉碎機 (NP-100) ならびに自転公転ミキサー (ARV-3000Twin, ARV-10KTwin)

Table 10 Specifications of the NP-100, ARV-3000Twin, and ARV-10KTwin

	R (mm)	r (mm)	ω/Ω	Volume / a vessel (L)
NP-100	95.0	35.0	1.00	0.20
ARV-3000Twin	248	81.3	0.88	3.10
ARV-10KTwin	483	109	0.77	12.7

4-2. 自転公転ミキサーのスケールアップファクターの調査

1-1-2 や 1-1-3 において、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物の粉碎原理を示した。さらに、乾式粉碎の衝突エネルギー式を理論展開し、湿式粉碎に応用することで Eq. 13 を得た。Eq. 13 中の h は Eq. 6 で表され、自転と公転の半径および自転公転比から得られるため、機器固有の値となる。また、本研究では、 $\phi 0.1$ mm の beads を使用しているため、Eq. 13 中の m は定数となる。また、 \bar{n} は様々な粉碎パラメータ (自転・公転回転数、化合物と beads の添加量比など) が複雑に影響するため、正確に制御することが困難である。一方、Eq. 9 に示すように装置の公転半径と公転の回転数から算出される公転 G および粉碎時の化合物濃度は装置のスケールや処理量が異なっても制御が可能である。そこで、本研究では自転公転ミキサーのスケールアップファクターとして、公転 G と粉碎時の化合物濃度 (懸濁液濃度) に焦点を当て、粉碎処理量のスケールアップを検討した。

4-3. PHE の粉碎後粒度分布に及ぼす懸濁液濃度の影響

Gibbsite や alumina のような無機化合物を湿式粉碎する場合において、懸濁液濃度が粉碎効率に影響することが報告されている¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾。また、Eq. 13 に示すように、 E_c は粉碎時の懸濁液濃度を含む様々な粉碎パラメータの影響を受ける。そこで、自転公転ミキサーを用いたナノ粒子化技術のスケールアップにおいて、粉碎時の懸濁液濃度に焦点を絞り、PHE の粉碎後粒度分布への影響について検討した。粉碎時の PHE 濃度を 0.05~0.4 g/mL の間で変化させ (Table 11)、NP-100 と ARV-3000Twin を用いて、PHE を粉碎した (Fig. 37)。

Table 11 Milling conditions in the optimum PHE concentration study.

	PHE concentration at milling (g/mL)	Bulk size /batch (g)	Volume of MC solution (mL)	Mass ratio of PHE to beads (w/w) (beads / PHE)	Revolution speed (rpm)	Time (min)
NP-100	0.05	0.25	5.0	10	2000	4
	0.1	0.5	5.0	10		
	0.2	1.0	5.0	10		
	0.3	1.5	5.0	10		
	0.4	2.0	5.0	10		
ARV-3000Twin	0.05	5 (2.5×2)	100 (50×2)	10	750	8
	0.1	10 (5.0×2)	100 (50×2)	10		
	0.2	20 (10×2)	100 (50×2)	10		
	0.3	30 (15×2)	100 (50×2)	10		
	0.4	40 (20×2)	100 (50×2)	10		

その結果、懸濁液濃度が 0.2 g/mL 前後の濃度範囲で最も小さい粒子径を示す PHE ナノ粒子が得られた。この結果は、装置スケールの異なる NP-100 と ARV-3000Twin を用いた場合においても、同様の結果が得られた。Eq. 13 式から考察すると、 C が高くなることで、 Ec の値が小さくなり、効率的に PHE を粉砕できなかったものと考えられる。粉砕時の懸濁液濃度が高くなるに伴い、懸濁液の粘度は高くなる。そのため、容器内における beads の流動性が低下し、PHE の粉砕効率が低下したと考えられる。粉砕時の懸濁液濃度が 0.2 g/mL 以上の範囲では、Eq. 13 から推察される通りの結果となった。一方、粉砕時の懸濁液濃度が 0.05 g/mL ~ 0.2 g/mL の範囲内においては、懸濁液濃度の減少に伴い、粉砕後 PHE の粒子径の増大が認められ、Eq. 13 の理論式と矛盾する。このような結果が得られたのは、懸濁液濃度の低下に伴い、化合物と beads の平均衝突回数 (Eq. 13 中の \bar{n}) が減少し、その結果、 Ec が小さくなり、粉砕効率が悪くなったと考えられる。

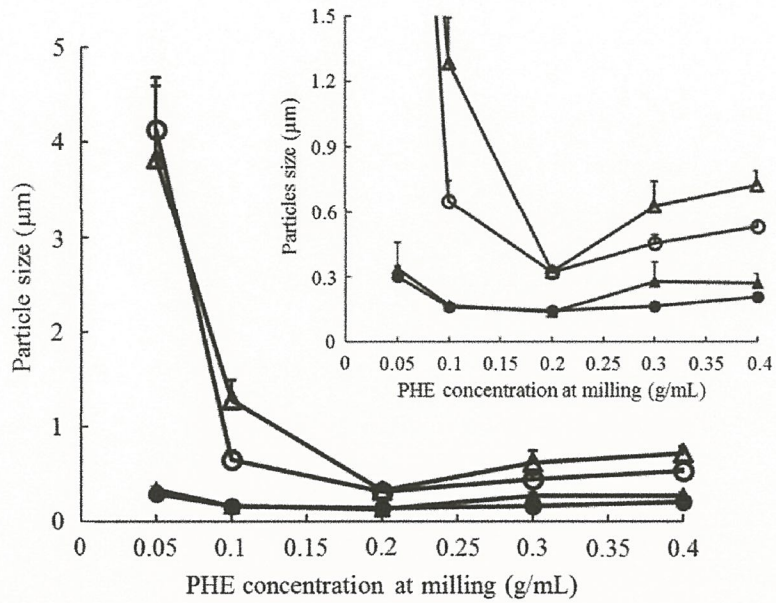


Fig. 37 Effect of PHE concentration on D50 (close) and D90 (open) values of the milled PHE by using NP-100 (○) and ARV-3000Twin (△). Inset is enlarged the area which the particles size of the milled PHE is less than 1.5 μm .

そこで、粉碎効率に及ぼす平均衝突回数の影響について検討した。平均衝突回数を増大する手法としては、beads 添加量の増加が挙げられる。PHE に対する beads の添加量比 (w/w、beads 添加比) を 10~80 の間で変化させ (Table 12)、PHE の粉碎後粒子径への影響について検討した。Fig. 38 に示すように、beads 添加比の増大に伴い、粒子径の減少は認められたものの、beads 添加比が 80 となる条件下においても、D90 値を 1 μm 以下にできなかった。

Table 12 Milling conditions for the study of the effect of average collision number between compound and beads on the particles size distribution of the milled PHE

	Bulk size /batch (g)	Mass ratio of PHE to beads (w/w) (beads / PHE)	Volume of MC solution (mL)	PHE concentration at milling (g/mL)	Revolution speed (rpm)	Time (min)
NP-100	0.25	10	5.0	0.05	2000	4
		20	5.0	0.05		
		40	5.0	0.05		
		80	5.0	0.05		
		10	2.5	0.1		
		10	1.25	0.2		
		10	0.833	0.3		
		10	0.625	0.4		

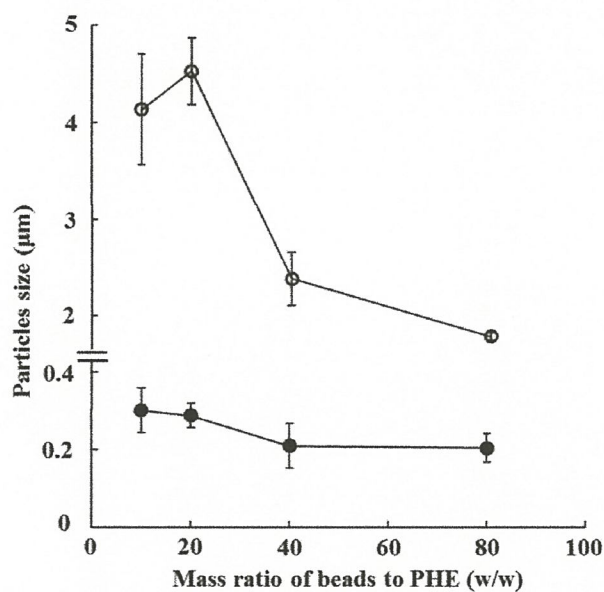


Fig. 38 Effect of the mass ratio of beads to PHE (from 10 to 80) on D50 (close) and D90 (open) value of the milled PHE (0.25 g) by using NP-100 at the 0.05 g/mL of PHE concentration.

一方、質量比 10 の条件下で、MC 水溶液の添加量を変化させ、PHE 濃度を変化させたところ、懸濁液濃度の上昇に伴い、顕著な粒子径の減少が認められた (Fig. 39)。また、0.05 g/mL の懸濁液濃度条件下で、0.25 g の PHE を D90 値が約 300 nm になるまで粉砕するためには、beads 添加比を 40 に設定し、12 分間の粉砕時間を要した (Fig. 40)。以上の結果から、自転公転ミキサーを用いた PHE のナノ粒子化において、PHE 濃度は重要なパラメータであることが認められた。また、本研究では効率良く、最も粒子径の小さい PHE が得られる 0.2 g/mL を最適濃度とした。

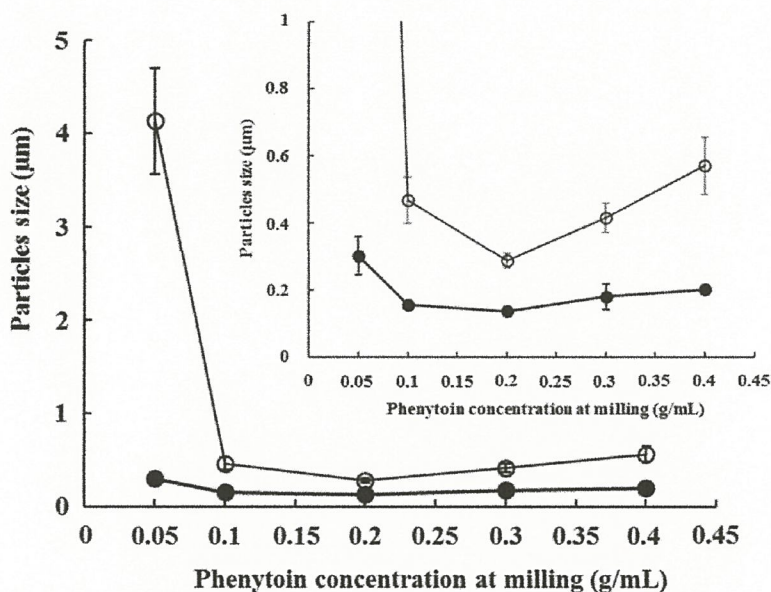


Fig. 39 Effect of the PHE concentration (from 0.05 to 0.4 g/mL) on D50 (filled) and D90 (open) value of the milled PHE (0.25 g) by using NP-100 at the 10 mass ratio of beads to PHE. Inset is enlarged the area which the particles size of the milled PHE is less than 1.0 μm .

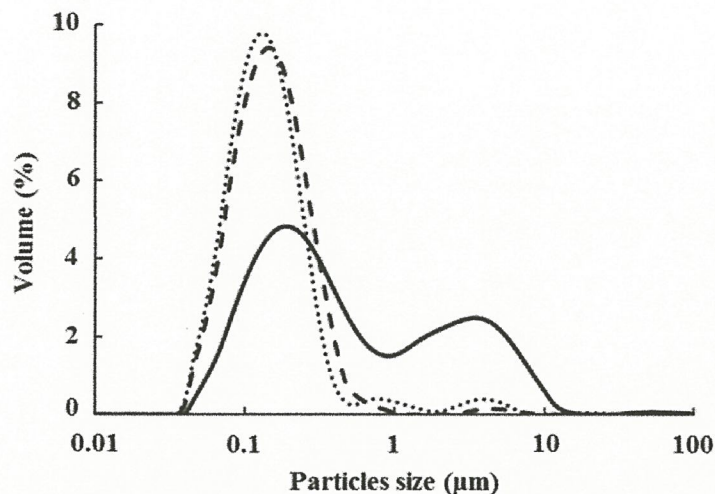


Fig. 40 Particle size distribution of the milled PHE (0.25 g) by using NP-100 under different milling conditions. PHE was milled for 4 min by using 10 mass ratio of beads to PHE and 0.05 g/mL phenyton concentration (solid line). PHE was milled for 4 min by using 10 mass ratio of beads to PHE and 0.2 g/mL PHE concentration (dashed line). PHE was milled for 12 min by using 40 mass ratio of beads to phenyton and 0.05 g/mL PHE concentration (dotted line).

4-4. PHE の粉砕後粒度分布に及ぼす公転 G の影響

自転公転ミキサーの粉砕原理より、beads は容器の公転により加速され、化合物と衝突し、化合物を粉砕する。ラボスケールの NP-100 は回転半径が小さいため、高い衝突エネルギーを得るためには高い回転数が必要である。一方、Table 10 に示すように、NP-100 よりも装置スケールの大きい ARV-3000Twin や ARV-10KTwin は回転半径が大きくなるため、NP-100 より低い回転数でも十分な衝突エネルギーを得ることが可能である。そこで、Eq. 9 に示すように、公転半径と公転回転数から算出される公転 G に着目し、装置スケールの異なる NP-100 と ARV-3000Twin を用いて、PHE の粉砕後粒度分布に及ぼす公転 G の影響について検討した。PHE 濃度を 0.2 g/mL、beads 添加比を 5 に設定し、NP-100 および ARV-3000Twin における公転 G が 107、145、185 G になるように Eq. 9 から求めた公転回転数を算出した (Table 13)。Table 13 に示すような粉砕条件で、NP-100 を用いた場合は 1 g/容器、ARV-3000Twin を用いた場合は 100 g/容器の PHE を粉砕した結果を Fig. 41 に示した。いずれの公転 G においても、NP-100 と ARV-3000Twin で粉砕処理後の粒度分布は一致しており、懸濁液濃度を最適な 0.2 g/mL、beads 添加比、公転 G を同じにすることで、ARV-3000Twin を用いた PHE の粉砕後粒度分布は NP-100 を用いた場合と同じになることが分かった。

Table 13 Milling conditions in the study of the correlation between NP-100 and ARV-3000Twin.

	Bulk size (g) /batch	Beads (g)	PHE concentration at milling (g/mL)	Revolution G (G) (Revolution speed)	Time (min)
NP-100	1.0	5.0	0.2	185 (1320 rpm)	20
	1.0	5.0	0.2	145 (1160 rpm)	20
	1.0	5.0	0.2	107 (1000 rpm)	20
ARV-3000Twin	200 (100×2)	1000 (500×2)	0.2	185 (850 rpm)	20
	200 (100×2)	1000 (500×2)	0.2	145 (750 rpm)	20
	200 (100×2)	1000 (500×2)	0.2	107 (650 rpm)	20
	200 (100×2)	1000 (500×2)	0.2	107 (650 rpm)	20

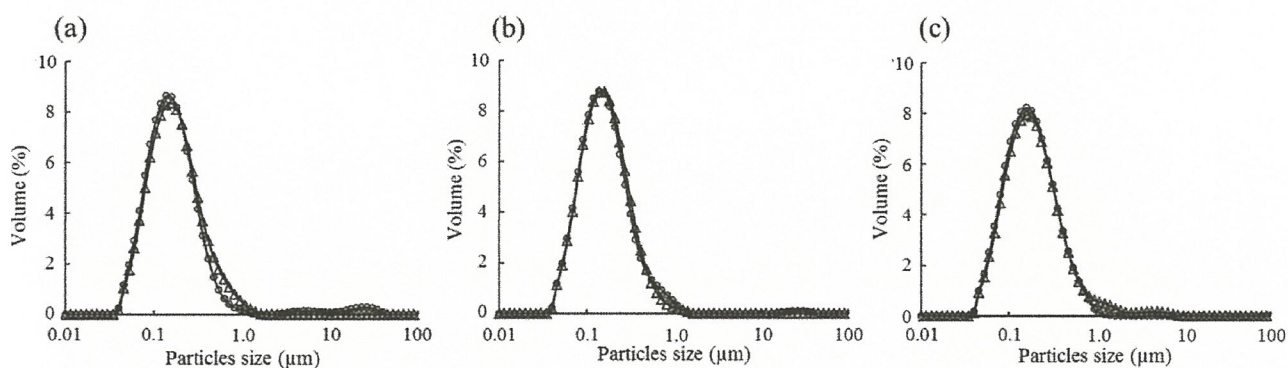


Fig. 41 Effect of the revolution G [185 G (a), 145 G (b), and 107 G (c)] on the particle size distribution of the milled PHE by NP-100 (○) and ARV-3000Twin (△).

4-5. 粉砕処理量のスケールアップに関する検討

公転 G と粉砕時の懸濁液濃度を制御することで、中スケールである ARV-3000Twin を用いても、NP-100 と同等の PHE ナノ粒子が得られることが示された。この実験結果をもとに、大スケールである ARV-10KTwin も加えた PHE の粉砕処理量のスケールアップについて検討した。公転 G を 145 G 、PHE 懸濁液濃度を 0.2 g/mL の条件下で、各粉砕機の容器容量に依存した PHE 量、また、回転モーターへの負荷を考慮して beads 添加比を調整し (Table 14)、ARV-3000Twin、ARV-10KTwin ではそれぞれ、5、3 に設定した。Beads 添加比が小さいほど、PHE のナノ粒子化に要する時間が長くなると考え、ARV-3000Twin では 5 - 35 分、ARV-10KTwin では 10 - 70 分の粉砕時間を設定した。

Table 14 Milling conditions for PHE using the ARV-3000Twin and the ARV-10KTwin

	Bulk size (g) /batch	ϕ 0.1 mm Beads (g)	PHE concentration at milling (g/mL)	Revolution G (G) (Revolution speed)	Time (min)
NP-100	0.1	2.5	0.2	145 (1160 rpm)	6
ARV-3000Twin	500 (250×2)	2,500 (1,250×2)	0.2	145 (750 rpm)	5-35
ARV-10KTwin	2,000 (1,000×2)	6,000 (3,000×2)	0.2	145 (520 rpm)	10-70

Fig. 42 に ARV-3000Twin および ARV-10KTwin を用いた粉砕後 PHE の粒度分布に及ぼす粉砕時間の影響を示す。粉砕時間が長くなるに従い、粉砕後 PHE の粒子径は減少し、ARV-3000Twin では約 30 分、ARV-10KTwin では約 60 分で粒子径はほぼ一定となり、beads 添加比の少ない場合の方が、ナノ粒子化に要する時間が長くなる傾向が認められた。また、ARV-3000Twin は 500 g (250 g/容器 × 2) の PHE を 30 分でナノ粒子化でき、その時の D90 値は 295 nm であり、ARV-10KTwin は 2.0 kg (1.0 kg/容器 × 2) の PHE を 60 分でナノ粒子化でき、その時の D90 値は 316 nm であった (Fig. 43a、Table 15)。SEM の結果からも、ARV-3000Twin、ARV-10KTwin を用いて調製された PHE 粒子はナノサイズを示していた (Fig. 43)。したがって、Fig. 43 や Table 15 に示すように、各機器で粉砕処理後に得られた PHE ナノ粒子はほぼ同等の粒度分布を示した。

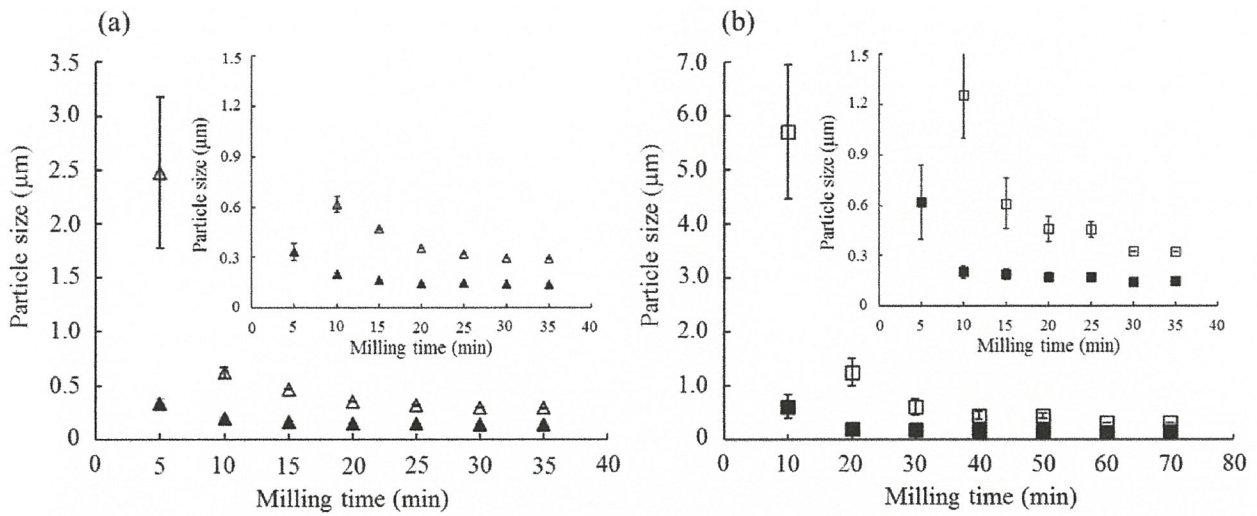


Fig. 42 Effect of the milling time on D50 (filled) and D90 (open) value of the milled PHE by using ARV-3000Twin (a) and ARV-10KTwin (b). Inset is enlarged the area which the particles size of the milled PHE is less than 1.5 μm .

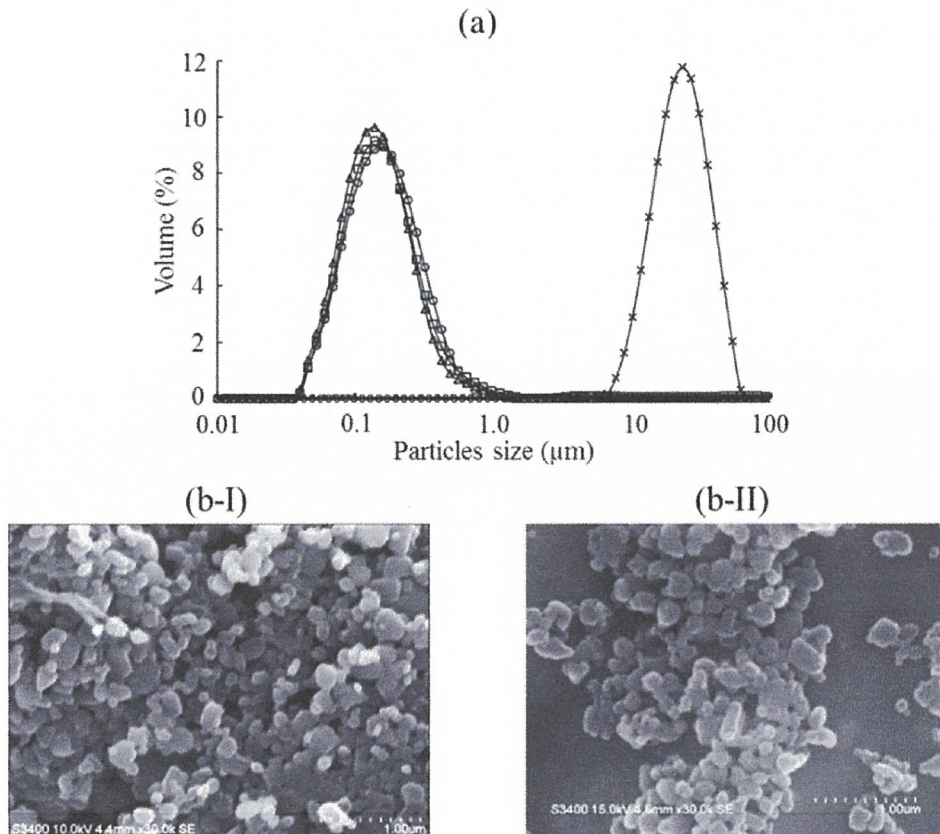


Fig. 43 Particle size distribution (a) of the original (\times), the milled PHE by using NP-100 (\circ), ARV-3000Twin (\triangle), and ARV-10KTwin (\square) and SEM micrographs (b) of the milled PHE by ARV-3000Twin (b-I) and ARV-10KTwin (b-II).

Table 15 Particle size distribution (D50 and D90 value) of the original and the milled PHE by NP-100, ARV-3000Twin, and ARV-10KTwin.

	D50 (nm)	D90 (nm)
Original PHE	20880 ± 140	36380 ± 343
Milled PHE		
NP-100 (100 mg)	144 ± 2	317 ± 3
ARV-3000Twin (250 g×2)	139 ± 1	295 ± 2
ARV-10KTwin (1,000 g×2)	143 ± 6	312 ± 9

さらに、ARV-3000Twin、ARV-10KTwin を用いて、得られた PHE ナノ粒子の結晶性を PXRD、DSC で評価した (Fig. 44)。ARV-3000Twin と ARV-10KTwin を用いて得られた PHE ナノ粒子粉末の PXRD パターンは PHE 原末のパターンと一致しており、また、非晶質由来のハローパターンは認められなかった (Fig. 44a)。DSC 測定において、ARV-3000Twin と ARV-10KTwin を用いて調製された PHE ナノ粒子粉末の DSC ピークに 140 °C - 170 °C 付近に生じると報告されている⁵³⁾ 非晶質 PHE の結晶化に起因する発熱ピークは観測されず、また融点もほぼ同等であった (Fig. 44b)。PXRD、DSC の結果より、ARV-3000Twin、ARV-10KTwin を用いて得られた PHE ナノ粒子も原末と同じ結晶性が維持できていることが分かった。以上の結果より、自転公転ミキサーは公転 G と懸濁液濃度を制御することにより、mg スケールから kg スケールまで粒度分布を示し、結晶性を維持した PHE ナノ粒子が調製できることが明らかとなった。

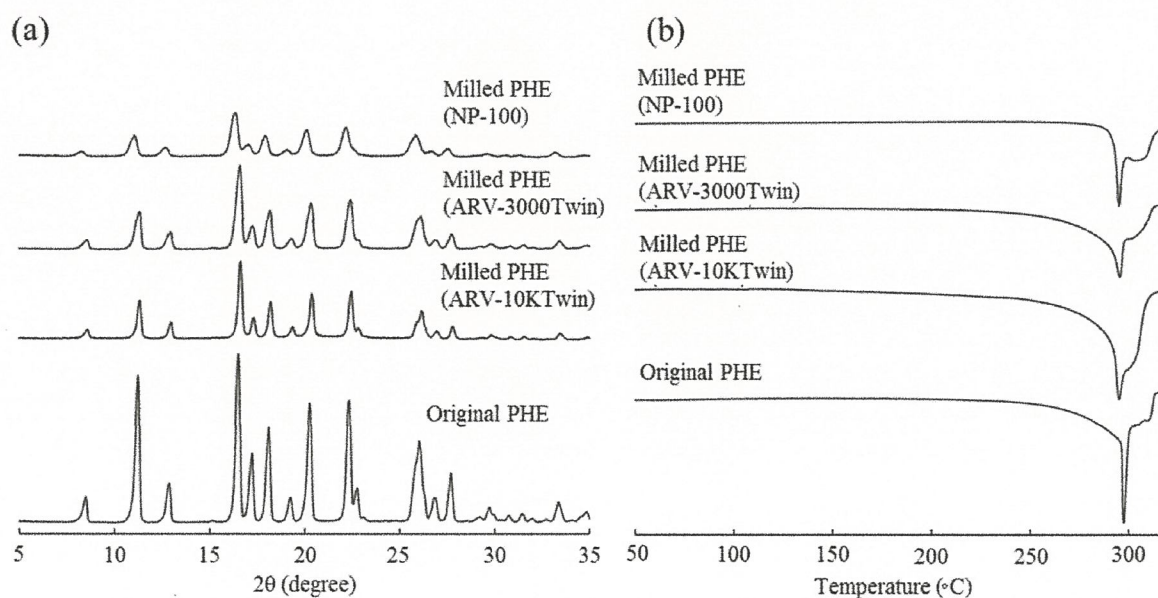


Fig. 44 PXRD patterns (a) and DSC thermographs (b) of the original and the milled PHE by using NP-100, ARV-3000Twin, and ARV-10KTwin.

4-6. 第 4 章の結論

第 4 章では、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化のスケールアップに関する検討を行った。第 1 章において、乾式粉碎における衝突エネルギー式を理論展開し、容器の公転により加速された beads が化合物と衝突するときの平均衝突速度から湿式粉碎の衝突エネルギー式 (Eq. 13) を導いたところ、本技術のスケールアップファクターとして、公転の半径と回転数から算出される公転 G および粉碎時の懸濁液濃度が重要であることを見出した。さらに、この公転 G と粉碎時の化合物濃度を制御することにより、mg スケールから kg スケールまで、ほぼ同じ物性を示すナノ粒子を調製することに成功した。これまでの wet beads milling は 10 mL の化合物懸濁液をナノ粒子化するのに数時間、5 L~10 L の化合物懸濁液では 12 時間~2 日間を要することが報告されている¹⁷⁾。一方、本法では 10 mL スケールでは数分、10 L スケールでは 1 時間で化合物ナノ粒子を調製できることから、非常に効率的なナノ粒子化技術であると考えられる。その上、これまでの技術と異なり、mg スケールから kg スケールまで同じ機構で粉碎することが可能であり、少量の化合物量で製造スケールの条件を検討できる可能性も有している。したがって、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術は探索研究段階から製造段階まで幅広く適用でき、難水溶性化合物の製剤開発に有用であると考えられる。

総括

近年、新薬候補化合物の多くが難水溶性を示し、難水溶性化合物の溶解性改善は医薬品開発において、非常に重要な課題である。著者は4章にわたり、溶解性および経口吸収性改善を目的とした難水溶性化合物の新規ナノ粒子化技術の開発および化合物ナノ粒子の有用性を検討した。

第1章では、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物の新規ナノ粒子化技術の開発を行った。自転公転ミキサーの粉碎理論を展開し、最も高い衝突エネルギーが得られる自転公転比が1:1の自転公転ナノ粉碎機(NP-100)を開発した。また、化合物のナノ粒子化に重要となる粉碎パラメータ(粉碎媒体である Zirconia beads の直径や添加量、公転回転数、粉碎時間、分散剤である Methylcellulose 水溶液の濃度や添加量)を最適化し、PHE 100 mg を粉碎したところ、粒度分布幅が狭く、結晶性を維持した PHE ナノ粒子を調製できた。従来のナノ粒子化技術では、ナノサイズ領域まで粉碎に非常に長時間を要するのに対し、NP-100 は数百 mg の化合物を数分でより微細なナノ粒子にできるという利点を有している。また、NP-100 は粉碎条件、公転回転数、粉碎環境温度を制御することにより、FEN や Coenzyme Q₁₀、beeswax など低融点化合物のナノ粒子化にも有用であることを示した。NP-100 を用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術は低分子化合物に限らず、たんぱく質などの biomaterial のナノ粒子化にも適用できるものとする。

第2章では、新規医薬品添加物である POVA をナノ粒子の分散剤として適用したところ、分散剤として使用されている HPC、PVA、PVP を用いて、GF を湿式粉碎したところ、いずれの場合においても D₉₀ 値は 10 μm 以上であり、分散性に優れた GF ナノ粒子を調製できなかった。一方、POVA を分散剤として用いた場合、D₉₀ 値が 220 nm を示す分散性に優れた GF ナノ粒子が得られた。POVA の GF ナノ粒子に対する分散効果について考察したところ、POVA 分子中の PVA 部分が GF ナノ粒子表面に吸着し、AA 部分が多くの水分子を引き付けることで、厚い水和層を形成し、GF ナノ粒子の凝集を立体障害していると推察された。さらに、分散性の異なる GF ナノ粒子懸濁液および凍結乾燥粉末を用い、GF の溶出性や経口吸収性を評価した結果、ナノ粒子の凝集が溶解性や経口吸収性改善効果を低下させることを明らかにした。

第3章では、難水溶性化合物のナノ粒子化による経口吸収性改善効果の要因を考察した。NP-100 を用い、粒子径の異なる二種類の GF マイクロ粒子粉末(微粉末)と GF ナノ粒子粉末を調製できた。半透膜に対する GF 膜透過速度に及ぼす粒子径の影響を検討したところ、ナノ粒子粉末から溶出した GF は微粉末に比べ 1.45 倍高い値を示した。この結果より、GF の粒子径を 100 nm - 200 nm まで

微細化することで、GF の溶解濃度が 1.45 倍向上する結果が得られた。また、ラットを用いた GF の経口吸収性を評価したところ、ナノ粒子粉末は GF の吸収が溶解度律速となる 20 mg/kg の投与量においても、微粉末より 1.6 倍高い吸収性を示し、半透膜に対する GF 膜透過性の結果と相関するものであった。よって、難水溶性化合物のナノ粒子化は、化合物の溶解度を上げることができ、吸収が溶解速度律速の化合物のみならず、溶解度律速の化合物の吸収性改善が可能と考えられる。

第 4 章では、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化のスケールアップについて検討した。第 1 章において、粉碎過程における容器内の beads の運動機構、また、乾式粉碎における衝突エネルギー式を理論展開し、湿式粉碎の衝突エネルギー式 (Eq. 13) を導いたところ、公転の半径と回転数から算出される公転 G および粉碎時の懸濁液濃度がスケールアップファクターとなることを見出した。また、これらのスケールアップファクターを制御することで、数百 mg から数 kg の化合物をほぼ同じ粒度分布を有する結晶性ナノ粒子を調製でき、自転公転ミキサーを用いたナノ粒子化技術のスケールアップに成功した。したがって、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術は探索研究段階から製造段階まで幅広く適用でき、難水溶性化合物の製剤開発に有用であると考えられる。

以上、本研究の成果は、難水溶性化合物の経口吸収性改善に大きく寄与できるとともに、点眼、経皮、経肺、静脈内投与製剤など様々な投与経路に応用できると考えられる。さらに、自転公転ミキサーを用いたナノ粒子化技術は、医薬品開発のみならず、化粧品、健康食品などの開発に幅広く適用できると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、始終ご懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました摂南大学大学院薬学研究科 橋本直文教授に厚く感謝の意を表します。

本論文に関し、懇切丁寧な御指導と御助言を頂きました摂南大学大学院薬学研究科 山下伸二教授、佐久間信至教授、片岡誠講師に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、自転公転ミキサーの使用および一部実験に御協力戴きました、株式会社シンキー 高塚隆之様をはじめ応用技術課の皆様に深謝致します。

第1章の coenzyme Q₁₀ の実験に関しまして、種々の御指導、御協力を頂きました静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府 尾上誠良教授に深く感謝致します。

第2、3章に関しまして、Polyvinyl alcohol 誘導体 (Povacoat[®]、PVA-AA、PVA-MMA)を合成、供与頂きました大同化成工業株式会社 島本敏夫氏、浦松俊治氏に深く感謝致します。

第3章の実験に関しまして、種々の御指導、御協力を頂きました摂南大学大学院薬学研究科 東野晴輝助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験および論文作成に御協力頂きました、摂南大学薬学部薬品物性化学研究室の修了生、卒業生ならびに在校生に厚く御礼申し上げます。

最後に、影ながらいつも支えてくれた両親や兄弟をはじめ、親族、友人知人一同に心から感謝致します。

2016年8月

弓樹佳曜

実験の部

第1章 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化技術の開発

1-1. 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化法の確立

1-1-1. 実験材料

Phenytoin (PHE) を株式会社静岡カフェイン工業所より、danazol は新日本薬業株式会社より、indomethacin と nifedipine を和光純薬株式会社より購入した。分散剤として用いた methylcellulose SM-4000 (MC) を信越化学工業株式会社より、Tween 80 を和光純薬株式会社より購入した。直径 (ϕ) 0.05 mm、0.1 mm、0.3 mm、0.5 mm、1 mm の zirconia beads (YTZ-0.05、-0.1、-0.3、-0.5、-1.0) はニッカトー株式会社より購入した。

1-1-2. 自転公転ナノ粉碎機を用いた難水溶性化合物のナノ粒子懸濁液の調製

化合物のナノ粒子化には自転公転ナノ粉碎機 (NP-100、株式会社シンキー)を用いた。NP-100 の zirconia 製粉碎容器 (容器) に化合物 100 mg、zirconia beads (beads)、MC 水溶液を添加し、容器を高速で自転公転回転させ、数分間化合物を粉碎処理した。処理後、粉碎された化合物に MC 水溶液を適量添加し、自転公転回転数を 500 rpm に設定し、1 分間容器を回転させることにより、粉碎された化合物を MC 水溶液に分散させ、化合物ナノ粒子懸濁液を調製した。

1-1-3. 難水溶性化合物のナノ粒子粉末の調製

1-1-2 で調製した化合物ナノ粒子懸濁液を冷却したアセトン/ドライアイスで急速冷凍した後、凍結乾燥器 (FD-81、東京理化学工業株式会社)を用いて、約 48 時間凍結乾燥した。

1-1-4. 粒度分布測定

化合物原末および化合物ナノ粒子の粒度分布をレーザー回折型粒度分布計 (Mastersizer 2000 Hydro 2000 μ P、Malvern Instruments Ltd)で測定した。調製した化合物ナノ粒子懸濁液を 10 分間超音波処理した後、粒度分布を測定した。また、化合物原末の粒度分布は、化合物原末 20 mg を 2 mL の 0.3% (w/v) MC 水溶液に懸濁し、10 分間、超音波処理した後に測定した。粒度分布の指標として、累積体積がそれぞれ 50%および 90%における粒子径である D50、D90 値を用いた。

1-1-5. 走査型電子顕微鏡による難水溶性化合物ナノ粒子の形態観察

アルミニウムスタブ上にカーボンテープを貼り、その上にナノ粒子粉末を撒いた。さらに、金で

粒子表面をコーティングした後、走査型電子顕微鏡 (SU-1500、日立ハイテクノロジーズ株式会社) にて粒子表面を加速電圧 15 keV で観察した。

1-1-6. 粉末 X 線回折 (PXRD)

PHE 原末および PHE ナノ粒子粉末の PXRD パターンを粉末 X 線回折装置 (RotaFlex、株式会社リガク) で測定した。Cu K α 照射を 40 mA および 30 mA とし、5° から 45° (2 θ) の範囲を 2°/min のスキャンスピードで回折データを取得した。

1-1-7. 示差走査熱量分析 (DSC)

PHE 原末および PHE ナノ粒子粉末の熱挙動を DSC (DSC、TA instrument) により評価した。アルミニウムパンに約 5 mg の測定サンプルを封入し、50 °C ~ 350 °C の温度範囲を 5 °C/min で昇温し、PHE 原末と PHE ナノ粒子粉末の熱挙動を測定した。

1-1-8. 実験動物

雄性 SD ラット (Sprague-Dawley rats、281 ± 9.47 g in weight; 日本エスエルシー株式会社) を実験室で飼育し、試験前日までは自由飲食とした。動物実験に関わるすべての手順は摂南大学の動物実験倫理委員会に承認された内容で実施した。

1-1-9. 経口投与後の血漿中濃度測定

PHE サンプルを投与する雄性ラットは試験前日から絶食・自由飲水とした。1-1-2 で調製した PHE ナノ粒子懸濁液 (10 mg PHE /mL) を 1 mL/kg body weight をラットに経口投与した。対象サンプルとして、PHE 原末を 10 mg/mL となるように水に懸濁し、1 mL/kg body weight でラットに経口投与した。経口投与後、0.5、1、2、4 および 8 時間後に頸静脈から 200 μ L 採血した。得られた血液を 3500 rpm で 10 分間遠心分離し、血漿サンプルを得た。得られた血漿サンプル 75 μ L に等量のアセトニトリル (75 μ L) を添加し、12,100 \times g で 5 分間遠心分離を行い、得られた上清中の PHE 濃度を液体クロマトグラフィー (HPLC、L-7000 システム、日立ハイテクノロジーズ株式会社) により定量した。下記に HPLC 測定条件を示す。

分析カラム : ZORBAX XRB-C18 5 μ m I.D. 2.1 mm \times 50 mm (Agilent Technology Inc.)

移動相 : 20 mM リン酸二水素ナトリウム : アセトニトリル = 75 : 25

カラム温度 : 30 °C

流速 : 0.3 mL/min

検出波長 : 195 nm

1-1-10. 統計解析

二群間の比較は F 検定および t 検定により実施した。P 値が 0.05 よりも小さいとき統計学的に有意な差があると判断した。

1-2. 自転公転ミキサーを用いた低融点化合物のナノ粒子化

1-2-1. 実験材料

Fenofibrate (FEN), probucol (PRO) および beeswax を和光純薬工業株式会社から購入した。Flurbiprofen (FLU) を Shiguma-Aldrich 社より購入した。Methycellulose SM-4000 (MC) は信越化学工業株式会社より、polyvinylprorydone K30 (PVP)、hydroxypropylcellulose-SSL (HPC)、tween 80、および sodium lauryl sulfate (SDS) を和光純薬工業株式会社より購入した。また、直径 (ϕ) 0.03 mm、0.05 mm、0.1 mm の zirconia beads (beads) をニッカトー株式会社より購入した。その他試薬は市販特級グレードのものを購入した。

1-2-2. FEN、FLU、PRO のナノ粒子化

化合物のナノ粒子化には自転公転ナノ粉砕機 (NP-100、株式会社シンキー) を用いた。NP-100 の zirconia 製粉砕容器 (容器) に化合物 100 mg、 ϕ 0.1 mm beads (2.5 g)、MC 水溶液 (0.5 mL) を添加し、容器を高速で自転公転回転させ、数分間化合物を粉砕処理した (standard milling conditions を用いた場合は 2000 rpm で 2 分間、mild milling conditions を用いた場合、1000 rpm で 4 分間、化合物を粉砕処理した)。粉砕処理後、粉砕された化合物に MC 水溶液 (9.5 mL) を添加し、自転公転回転数を 500 rpm に設定し、1 分間容器を回転させることにより、粉砕された化合物を MC 水溶液に分散させ、化合物ナノ粒子懸濁液を調製した。さらに、10 mL の化合物ナノ粒子懸濁液から ϕ 0.1 mm beads を取り除いた後、2.5 g の ϕ 0.03 mm beads を添加し、2000 rpm で 3 分間容器を自転公転させ、化合物の凝集を解砕した。

1-2-3. Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) のナノ粒子化

1-2-2 の操作方法を基に、CoQ₁₀ のナノ粒子化を行った。具体的には、CoQ₁₀ (50 mg)、 ϕ 0.1 mm beads (2.5 g)、および 1% (w/v) HPC ethanol 溶液 (0.5 mL) を容器に添加し、容器を 1000 rpm で自転公転させ、5 分間湿式粉砕した。粉砕された CoQ₁₀ に 1% (w/v) HPC 水溶液 (9.5 mL) を添加し、自転公転回転数を 500 rpm に設定し、1 分間容器を回転させることにより、粉砕された CoQ₁₀ を 1% (w/v) HPC 水溶液に分散した。

1-2-4. Beeswax のナノ粒子化

Beeswax は直径約 5 mm のペレット状であったため、液体窒素で冷却しながら、乳鉢と乳棒で砕いたものを用いた。乳棒で砕いた beeswax (100 mg)、PVP K30 (30 mg)、および ϕ 0.1 mm beads (5.0 g) を容器に添加した後、以下、3 段階の処理過程を経て beeswax をナノ粒子化した。

- 1) 液体窒素を毎分約 40 mL 添加し、容器を 2000 rpm で 2 分間自転公転させた (乾式粉碎過程)。
- 2) Ethanol (1 mL)、液体窒素を毎分約 40 mL 添加し、容器を 2000 rpm で 4 分間自転公転させた (湿式粉碎過程)。
- 3) 乾式、湿式粉碎を経た beeswax に ethanol (9 mL) を添加し、容器を 500 rpm で 1 分間自転公転させ、粉碎された beeswax を ethanol に分散した。その後、beeswax 懸濁液から ϕ 0.1 mm zirconia beads を取り除いた後、 ϕ 0.05 mm beads (10 g) を添加して、容器を 1000 rpm で 10 分間自転公転させ、beeswax 粒子の凝集を解砕した (分散過程)。

1-2-5. 粒度分布測定

化合物原末および化合物ナノ粒子の粒度分布をレーザー回折型粒度分布計 (Mastersizer 2000 Hydro 2000 μ P、Malvern Instruments Ltd) で測定した。調製した化合物ナノ粒子懸濁液を 10 分間超音波処理した後、粒度分布を測定した。CoQ₁₀ に関しては超音波処理をせずに、粒度分布を測定した。また、化合物原末の粒度分布は、化合物原末 20 mg を 2 mL の 0.3% (w/v) MC 水溶液に懸濁し、10 分間の超音波処理後に測定した。粒度分布の指標として、累積体積がそれぞれ 50% および 90% における粒子径である D50、D90 値を用いた。

1-2-6. 難水溶性化合物のナノ粒子粉末の調製

1-2-2、1-2-3 で調製した化合物ナノ粒子懸濁液 (FEN、FLU、PRO、CoQ₁₀) を冷却したアセトン/ドライアイスで急速冷凍した後、凍結乾燥器 (FD-81、東京理化機械株式会社) を用いて、約 48 時間凍結乾燥した。

1-2-7. FEN、FLU、PRO および CoQ₁₀ の PXRD 測定

化合物原末および化合物ナノ粒子粉末の PXRD パターンを粉末 X 線回折装置 (RINT、株式会社リガク) で測定した。Cu K α 照射を 40 mA および 40 mA とし、3° から 50° (2θ) の範囲を 5°/min のスキャンスピードで回折データを取得した。

1-2-8. FEN、FLU、PRO の DSC 測定

化合物原末および化合物ナノ粒子粉末の熱挙動を DSC (DTG-60, 株式会社島津製作所) により評価した。アルミニウムパンに約 7 mg の測定サンプルを封入し、50 °C~150 °C の温度範囲を 5 °C/min で昇温し、化合物原末および化合物ナノ粒子粉末の熱挙動を測定した。また、測定中はサンプルの酸化防止のため窒素ガスを 50 mL/min の速度で流入させた。

第 2 章 難水溶性化合物の経口吸収性改善に及ぼすナノ粒子の凝集の影響

2-1. 実験材料

Griseofulvin (GF)、hydrochlorothiazide、tolbutamide、acycolovir、indomethacin、dipyridamole、naproxen、piroxicam は和光純薬工業株式会社から購入したものをを用いた。Copolymer of polyvinyl alcohol, acrylic acid and methyl methacrylate Type F (Povacoat[®], MW: 40000)は大同化成工業株式会社から供与したものをを用いた。Povacoat[®] (POVA)の側鎖をすべて acyclic acid に置換した PVA-AA および POVA の側鎖をすべて Methyl methacrylate に置換した PVA-MMA は大同化成工業株式会社に合成頂いた。Hydroxypropylcellulose-SSL (MW: 10,000-30,000) (HPC)、Polyvinylprorydone K30 (MW : 40000) (PVP)、Polyacrylic acid (PAA) (MW: 5000、MW: 25000) は和光純薬工業株式会社から購入したものをを用いた。Polyvinylalcohol (MW : 25000-30000) (PVA) はナカライテスク株式会社から購入したものをを用いた。また、直径 (φ) 0.1 mm、0.3 mm の zirconia beads (beads) をニッカトー株式会社より購入した。その他試薬は、市販特級グレードのものをを用いた。

2-2. 難水溶性化合物のナノ粒子懸濁液およびナノ粒子粉末の調製

難水溶性化合物のナノ粒子懸濁液は化合物原末を自転公転ナノ粉砕機 (NP-100、株式会社シンキー) で湿式粉砕することで調製した。具体的には、難水溶性化合物 (0.1 g)、φ 0.1 mm beads (2.5 g) および分散剤である polymer 水溶液 (0.5 mL) を zirconia 製粉砕容器に添加し、自転公転回転数共に、2000 rpm で容器を 2 分間回転させることで、化合物を粉砕した。粉砕後の化合物に粉砕処理前に加えた同じ Polymer 水溶液 (9.5 mL) 添加し、自転公転回転数共に 500 rpm で容器を 1 分間回転させることにより、化合物ナノ粒子懸濁液を調製した。Tolubutamide を除く化合物については上記に示した方法で化合物ナノ粒子懸濁液を調製した。一方、tolubutamide は原末の粒子径 (D90: 200 μm) が他の化合物 (GF では D90: 20 μm、hydrochlorothiazide では D90: 50 μm) よりも大きかったため、上記の処理方法でナノ粒子懸濁液を調製できなかったため、下記に示す方法で処理した。Tolubutamide (0.1 g)、φ 0.3 mm beads (2.5 g)、polymer 水溶液 (0.5 mL) を粉砕容器に添加し、自転公転回転数共に 2000 rpm で 5 分間粉砕処理を行った。処理後、再度 polymer 水溶液を 0.5 mL 添加し、同様に 2000 rpm で 5 分

間粉碎容器を自転公転させた。2度の粉碎過程終了後、粉碎後 tolobutamide に 9 mL の polymer 水溶液を添加し、500 rpm で 1 分間容器を自転公転させることで、tolobutamide ナノ粒子懸濁液を調製した。また、調製された化合物ナノ粒子懸濁液 (tolobutamide を含む) を液体窒素で急速冷凍した後、48 時間凍結乾燥 (FD-81、東京理化機械株式会社) することで化合物ナノ粒子粉末を調製した。

2-3. 化合物ナノ粒子粉末の再分散性の評価

20 mg の化合物を含むナノ粒子粉末に 2 mL の精製水を加え、回転型ミキサーを用い 25 rpm で 1 分間転倒混和することで再懸濁させた。その懸濁液の粒度分布を測定することで、化合物ナノ粒子粉末の再分散性を評価した。

2-4. 粒度分布測定

化合物ナノ粒子懸濁液の粒度分布をレーザー回折型粒度分布計 (Mastersizer 2000 HydroµP、Malvern Instruments Ltd、Worcestershire、UK) で測定した。本章では、化合物ナノ粒子懸濁液に超音波処理を行わず、粒度分布を測定した。粒度分布の指標として、体積累積がそれぞれ 50%、90% における粒子径である D50、D90 値を用いた。

2-5. GF ナノ粒子粉末の形態観察

各 polymer 水溶液中で湿式粉碎し、得られた GF ナノ粒子懸濁液を 13400 rpm で 10 分間遠心分離し、その沈降した GF ナノ粒子を凍結乾燥し、得られた粉末を測定サンプルとした。アルミニウムスタブ上にカーボンテープを貼り、その上に凍結乾燥した測定サンプルを撒いた。さらに、金で粒子表面をコーティングした後、走査型電子顕微鏡 (JSM-840、日本電子株式会社) にて粒子表面を加速電圧 15 keV で観察した。

2-6. POVA、PVA、PAA 水溶液の表面張力の測定

5% (w/v) の濃度における POVA、PVA、PAA 水溶液の表面張力を自動表面張力計 (CBVP-A3、協和界面科学株式会社) を用いて測定した。装置付属のシャーレに 10 mL の各 polymer 水溶液を添加し、その polymer 水溶液に白金プレートを浸し、その時の数値を測定した。純水を測定し、その時の測定値が 72.5 mN/m であり、文献値に近いことを確認した後、各 polymer 水溶液の表面張力を測定した。

2-7. GF の結晶性評価

2.5% (w/v) D-mannitol (MAN)を含んだ 5% (w/v) polymer 水溶液を用いて、湿式粉碎した GF ナノ粒子懸濁液を凍結乾燥し、得られた GF ナノ粒子粉末 (GF/polymer/MAN)を測定サンプルとした。また、PXRD パターンに及ぼす polymer や MAN の影響を除くため、GF ナノ粒子懸濁液を 13400 rpm で 10 分間遠心分離し、沈降した GF ナノ粒子を凍結乾燥した粉末も測定サンプルとした。PXRD パターンは RINT diffractometer (株式会社リガク、東京都) を用いて測定した。Cu K α 照射は 40 mA および 40 kV の条件とした。回折データは 5°から 40° (2 θ)の範囲をスキャンスピードは 5°/min で測定した。

2-8. 液体クロマトグラフィー (HPLC)

GF は high-performance liquid chromatography (HPLC) (LC-20A、株式会社島津製作所)を用いて検出し、絶対検量線法により GF 濃度を定量した。下記に HPLC 測定条件を示す。

分析カラム： ZORBAX XRB-C18 5 μ m I.D. 2.1 mm \times 50 mm (Agilent Technology Inc.)

移動相：20 mM リン酸二水素ナトリウム：アセトニトリル=70：30

カラム温度：30 °C

流速：0.5 mL/min

検出波長：293 nm

2-9. 溶出試験

溶出試験液は 900 mL の日本薬局方溶出試験第 2 液 (pH 6.8) を用いた。GF サンプルの溶出試験は回転バスケット法にて実施し、バスケット回転数を 100 rpm、温度は 37 °C とした (NTR-VS6、富山産業株式会社)。各 GF サンプルは溶出試験ベッセル内の GF 量が 25 mg となるように秤量した。サンプリング容量は 0.5 mL とし、溶出試験開始 5、10、15、30、60 分後にサンプリングした。本研究では、サンプリングした試験液を 13400 rpm で 5 分の条件で遠心し、その上清に含まれる GF はすべて溶解しているものとした。得られた上清 (100 μ L) を等量の移動相 (20 mM リン酸二水素ナトリウム：アセトニトリル=70：30) と混合後、HPLC で測定した (2-8 参照)。

2-10. 実験動物

雄性 SD ラット (Sprague-Dawley rats、体重; 265-340 g 日本エスエルシー株式会社、静岡)を実験室で飼育し、試験前日までは自由飲食とした。動物実験に関わるすべての手順は摂南大学の動物実験倫理委員会に承認された内容で実施した。

2-11. 経口投与後の血漿中濃度の測定

投与サンプルとして、GF 原末、GF/POVA/MAN、GF/PVA/MAN を用いた。GF サンプルを投与する雄性ラットは試験前日から絶食・自由飲水とした。50 mg-GF/kg body weight に相当する各 GF サンプルに懸濁液濃度が 50 mg-GF/mL となるように蒸留水を加え、各 GF サンプルを懸濁後、経口投与した。懸濁液の投与量は 1 mL/kg とした。経口投与後、0.5、1、2、4 および 8 時間時点で頸静脈から血漿サンプルを採血した。採取した血液サンプルを 3500 rpm で 10 分間遠心することで、血漿サンプルを得た。得られた血漿 80 μ L に等量のアセトニトリルを添加し、13,400 rpm で 5 分間遠心し、得られた上澄み液を HPLC で分析することで、血漿中 GF 濃度を測定した。(2-8 参照)

2-12. 統計解析

二群間の比較は F 検定および t 検定により実施した。P 値が 0.05 よりも小さいとき統計学的に有意な差があると判断した。

第 3 章 難水溶性化合物のナノ粒子化による経口吸収性改善効果の要因解析

3-1. 実験材料

Griseofulvin (GF)、D-mannitol (MAN) は和光純薬工業から購入した。Copolymer of polyvinyl alcohol, acrylic acid and methyl methacrylate Type F (Povacoat[®], MW: 40000) は大同化成工業株式会社から供与頂いた。Hanks balanced salt solution (HBSS) はコージンバイオ株式会社から購入した。直径 (ϕ) 0.1 mm、1.0 mm の zirconia beads (beads) をニッカトー株式会社より購入した。その他試薬は市販特級グレードのものを用いた。

3-2. GF ナノ粒子粉末および微粉末の調製

GF 原末 (0.1 g)、 ϕ 0.1 mm beads (2.5 g) および 5% (w/v) Povacoat[®] (POVA) 水溶液 (0.5 mL) を zirconia 製粉碎容器に添加し、自転公転回転数共に 2000 rpm で粉碎容器を 2 分間回転させることで GF をナノサイズまで粉碎した。粉碎後 GF に 5% POVA 水溶液を 9.5 mL 添加し、自転公転回転数共に 500 rpm で粉碎容器を 1 分間回転させ、GF ナノ粒子懸濁液を調製した。また、GF 原末 (0.2 g)、 ϕ 1.0 mm beads (2.5 g)、5% (w/v) POVA 水溶液 (2 mL) を zirconia 製粉碎容器に添加し、自転公転回転数共に 1000 rpm で粉碎容器を 2 分間回転させることで GF を微細化した。粉碎後 GF に 5% POVA 水溶液を 18 mL 添加し、自転公転回転数共に 500 rpm で粉碎容器を 1 分間回転させ、GF 微粉化懸濁液を調製した。GF ナノ粒子懸濁液、GF 微粉化懸濁液に MAN を 2% (w/v) になるように添加後、液体窒素で急速冷凍、凍結乾燥することで、GF ナノ粒子粉末および GF 微粉末を調製し

た。最終的な製剤組成は、GF ナノ粒子粉末、GF 微粉末ともに GF : POVA : MAN = 1 : 5 : 2 (w/w/w) であった。

3-3. 半透膜に対する GF 膜透過性の評価

GF の膜透過性を dissolution/permeation system (D/P system) を用いて行った。2 つのチャンバー (donor, receiver) を半透膜 (MWCO : 1000、スペクトラポア株式会社) で仕切り、両チャンバーとも非攪拌水層の影響を除くため、600 rpm で攪拌した。試験液には HBSS に NaHCO₃ (final 4.28 mM)、HEPES (final 10 mM)、glucose (final 19.4 mM) を添加し、pH 6.5 に調整した transport medium (TM) を用いた。Donor、receiver チャンバーに TM をそれぞれ 8 mL、5.5 mL 添加した。また、試験サンプルとして、GF 微粉末、GF ナノ粒子粉末を用い、donor チャンバーに試験サンプル (10 mg GF) を添加し、添加後 5、10、15、30、60、90、120 分後に receiver チャンバーから 100 μL ずつサンプリングし、HPLC で GF 濃度を測定した。また、120 分後のみ、donor チャンバーから 100 μL サンプリングし、フィルター (孔径: 0.1 μm) 処理後、HPLC にて GF 濃度を測定した。

3-4. 実験動物

雄性 SD ラット (Sprague-Dawley rats, 265-340 g; 日本エスエルシー株式会社、静岡) を実験室で飼育し、試験前日までは自由飲食とした。動物実験に関わるすべての手順は摂南大学の動物実験倫理委員会に承認された内容で実施した。

3-5. 経口投与後の血漿中濃度の測定

GF 製剤を投与する雄性ラットは試験前日から絶食・自由飲水とした。本章では投与量の影響を検討するため、5、10、15、20 mg-GF/kg body weight に相当する GF 原末および各 GF 粉碎粉末を蒸留水に懸濁し、経口投与した。懸濁液の投与量は 2 mL/kg とした。経口投与後、0.25、0.5、1、2、4 および 8 時間時点で頸静脈から血液サンプルを採血した。採取した血液サンプルを 3500 rpm で 10 分間遠心することで、血漿サンプルを得た。得られた血漿 80 μL に等量のアセトニトリルを添加し、13,400 rpm で 5 分間遠心し、得られた上澄み液を HPLC で分析することで、血漿中 GF 濃度を測定した。(3-6.参照)

3-6. 液体クロマトグラフィー (HPLC)

GF は液体クロマトグラフィーを用いて検出し、濃度は絶対検量線法により定量した。液体クロマトグラフィーは high-performance liquid chromatography (HPLC) (L-7000 システム、日立ハイテックノロジーズ株式会社) を使用した。下記に HPLC 測定条件を示す。

分析カラム： ZORBAX XRB-C18 5 μm I.D. 2.1 mm \times 50 mm (Agilent Technology Inc.)

移動相：20 mM リン酸二水素ナトリウム：アセトニトリル=68：32

カラム温度：30 $^{\circ}\text{C}$

流速：0.3mL/min

検出波長：293 nm

注入量：20 μL

3-7. 二群間の比較は F 検定および t 検定により実施した。P 値が 0.05 よりも小さいとき統計学的に有意な差があると判断した。

第 4 章 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化のスケールアップに関する検討

4-1. 実験材料

Phenytoin (PHE) を株式会社静岡カフェイン工業所より購入した。分散剤として用いた methylcellulose SM-4000 (MC) を信越化学工業株式会社より、tween 80 を和光純薬株式会社より購入した。直径 (ϕ) 0.1 mm zirconia beads をニッカトー株式会社より購入した。他試薬は市販特級グレードを購入し用いた。

4-2. 自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化

本研究では、自転公転ミキサーを用いた難水溶性化合物のナノ粒子化のスケールアップについて検討するため、小スケールの NP-100、中スケールの ARV-3000Twin、大スケールの ARV-10KTwin を用いて、モデル化合物である PHE を湿式粉碎した。具体的な操作方法は下記のとおりである。

- 1) 各粉碎機の容器に PHE、 ϕ 0.1 mm beads および 0.3% (w/v) MC 水溶液を添加し、容器を自転公転させ、PHE を湿式粉碎する (粉碎過程)
- 2) 粉碎された PHE に 0.3% (w/v) MC 水溶液を適量加え、容器を自転公転させ、粉碎された PHE を 0.3% (w/v) MC 水溶液に分散させることで PHE ナノ粒子懸濁液を調製した。(分散過程)

NP-100 を用いた場合、上記のように 2 step で PHE ナノ粒子懸濁液を調製した。一方、ARV-3000Twin や ARV-10KTwin を用いた場合、粉碎する PHE 量が多いため、NP-100 を用いた場合と同様に分散過程を行うと、大量の 0.3% (w/v) MC 水溶液が必要となる。また、NP-100、ARV-3000Twin、ARV-10KTwin いずれの粉碎機を用いた場合においても、粉碎過程終了時点で PHE はナノサイズに粉碎されており、分散過程は PHE 懸濁液濃度の調整が主な目的となる。そこで、本研究では、ARV-3000Twin や ARV-

10KTwin を用いて PHE を粉碎した場合、粉碎過程終了後の PHE 懸濁液を 1 mL 採取し、9 mL の 0.3% (w/v) MC 水溶液で希釈して得られた PHE ナノ粒子懸濁液の物性を評価した。

4-3. 粒度分布測定

PHE 原末および PHE ナノ粒子の粒度分布をレーザー回折型粒度分布計 (Mastersizer 2000 Hydro 2000 μ P、Malvern Instruments Ltd)で測定した。調製した PHE ナノ粒子懸濁液を 10 分間超音波処理した後、粒度分布を測定した。また、化合物原末の粒度分布は、化合物原末 20 mg を 2 mL の 0.3% (w/v) MC 水溶液に懸濁し、10 分間の超音波処理後に測定した。粒度分布の指標として、累積体積がそれぞれ 10%、50%および 90%における粒子径である D10、D50 および D90 値を用いた。

4-4. 難水溶性化合物ナノ粒子粉末の調製

4-2 で調製した PHE ナノ粒子懸濁液を液体窒素で急速冷凍した後、凍結乾燥器 (FD-81、東京理化学機械株式会社)を用いて、約 48 時間凍結乾燥した。

4-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による化合物ナノ粒子の形態観察

4-2 で調製した PHE ナノ粒子懸濁液を 13400 rpm で 10 分間遠心分離し、沈降した化合物ナノ粒子を凍結乾燥し、得られた粉末を測定サンプルとした。アルミニウムスタブ上にカーボンテープを貼り、得られた測定サンプルを撒いた。さらに、金で粒子表面をコーティングした後、走査型電子顕微鏡 (S-3400、日立ハイテクノロジーズ株式会社)にて粒子表面を加速電圧 10-15 keV で観察した。

4-6. 粉末 X 線回折 (PXRD)

PHE 原末および PHE ナノ粒子粉末の PXRD パターンを粉末 X 線回折装置 (RINT 株式会社リガク)で測定した。Cu K α 照射を 40 mA および 40 mA とし、5°から 35° (2 θ) の範囲を 2°/min のスキャンスピードで回折データを取得した。

4-7. 示差走査熱量分析 (DSC)

PHE 原末および PHE ナノ粒子粉末の熱挙動を DSC (DTG-60、島津製作所)により評価した。アルミニウムパンに約 8 mg の測定サンプルを封入し、50 °C~320 °C の温度範囲を 5 °C/min で昇温し、PHE 原末と PHE ナノ粒子粉末の熱挙動を測定した。また、測定中はサンプルの酸化防止のため窒素ガスを 50 mL/min の速度で流入させた。

引用文献

1. Lipinski C. Poor aqueous solubility – an industry wide problem in drug discovery. 2002. *Am Pharm Rev.* 5 (3), 82-85.
2. Cooper ER. 2010. Nanoparticles: A personal experience for formulating poorly water soluble drugs. *J Control Release.* 141(3), 300-2.
3. Yu LX. An integrated model for determining causes of poor oral drug absorption. 1999. *Pharm Res.* 16 (12), 1883-7.
4. Sugano K, Okazaki A, Sugimoto S, Tavornvipas S, Omura A, Mano T. 2007. *Drug Metab Pharmacokinet.* 22 (4), 225-54.
5. Galcera J, and Molins E. 2008. Effect of the counterion on the solubility of isostructural pharmaceutical lamotrigine salts. *Cryst Growth Des.* 9 (1), 327–334
6. Li S, Wong S, Sethia S, Almoazen H, Joshi YM, Serajuddin A.T.M. 2005. Investigation of solubility and dissolution of a free base and two different salt forms as a function of pH. *Pharm Res.* 22 (4), 628–635.
7. Serajuddin AT. 2007. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliver Rev.* 59, 603–616.
8. Leuner C, Dressman J. 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur J Pharm Biopharm.* 50, 47–60.
9. He CX, He ZG, Gao JQ. 2010. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 445–460.
10. Atef E, Belmonte AA. 2008. Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *Eur J Pharm Sci.* 35(4), 257-63.
11. Stella VJ, He Q. 2008. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol.* 36(1), 30-42.
12. Ochi M, Kawachi T, Toita E, Hashimoto I, Yuminoki K, Onoue S, Hashimoto N. 2014. Development of nanocrystal formulation of meloxicam with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors. *Int J Pharm.* 474(1-2), 151-156.
13. Onoue S, Takahashi H, Kawabata Y, Seto Y, Hatanaka J, Timmermann B, Yamada S. 2010. Formulation design and photochemical studies on nanocrystal solid dispersion of curcumin with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci.* 99(4), 1871-1881.
14. Rabinow BE. 2004. Nanosuspension drug delivery. *Nat. Rev. Drug Deliv.* 320, 785–796.
15. Wu Y, Loper A, Landis E, Hettrick L, Novak L, Lynn K, Chen C, Thompson K, Higgins R, Batra U, Shelukar S, Kwei G, Storey D. 2004. The role of biopharmaceutics in the development of a clinical nanoparticle formulation of MK-0869: a Beagle dog model predicts improved bioavailability and diminished food effect

- on absorption in human. *Int J Pharm.* 285 (1-2), 135-46.
16. Mosharraf M, Nystrom C. 1995. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. *Int J Pharm.* 122, 35-47.
 17. Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y. 2007. Nanosizing-oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv Drug Deliv Rev.* 59(7), 631-44.
 18. Kipp JE. 2004. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm.* 284, 109-22.
 19. Rainer H Müller, Katrin Peters. 1998. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm.* 160, 229–237.
 20. Kayser O. 2001. A new approach for targeting to *Cryptosporidium parvum* using mucoadhesive nanosuspensions: research and applications. *Int J Pharm.* 214(1-2), 83-85.
 21. Gilles P, Marie-Jeanne M, Assia D, Carlo D, Dominique D. 1997. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. *Eur J Pharm. Biopharm.* 44(1), 25-31.
 22. Dominique D, Gilles P. 1997. Bioadhesion of solid oral dosage forms, why and how?. *Eur J Pharm Biopharm.* 44(1), 15-23.
 23. Dodou D, Breedveld P, Wieringa PA. 2005. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 60(1), 1-16.
 24. Li X, Gu L, Xu Y, Wang Y. 2009. Preparation of fenofibrate nanosuspension and study of its pharmacokinetic behavior in rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 35(7), 827-33.
 25. Bramer SL, Forbes WP. 1999. Relative bioavailability and effects of a high fat meal on single dose cilostazol pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 37 (S2), 13-23.
 26. Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, Toguchi H, Liversidge GG, Higaki K, Kimura T. 2006. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release.* 111 (1-2), 56-64.
 27. Hanafy A, Spahn-Langguth H, Vergnault G, Grenier P, Tubic Grozdanic M, Lenhardt T, Langguth P. 2007. Pharmacokinetic evaluation of oral fenofibrate nanosuspensions and SLN in comparison to conventional suspensions of micronized drug. *Adv Drug Deliv Rev.* 59 (6), 419-26.
 28. Sauron R, Wilkins M, Jessent V, Dubois A, Maillot C, Weil A. 2006. Absence of a food effect with a 145 mg nanoparticle fenofibrate tablet formulation. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 44 (2), 64-70.
 29. Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. 2013. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm.* 453 (1), 126-141.
 30. D'Addio SM, Prud'homme RK. 2011. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Adv Drug Deliv Rev.* 63 (6), 417-426.

31. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER. 2003. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 18(2), 113-120.
32. Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P. 2008. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm.* 364 (1), 64-75.
33. Chin WW, Parmentier J, Widzinski M, Tan EH, Gokhale R. 2014. A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product. *J Pharm Sci.* 103 (10), 2980-2999.
34. Gao L, Zhang D, Chen M. 2008. Drug nanocrystals for the formulation of poorly water soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanopart Res* 10 (5), 845-862.
35. Keck CM1, Müller RH. 2006. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 62 (1), 3-16.
36. Möschwitzer JP. 2013. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm.* 453 (1), 142-156.
37. Junghanns JU, Müller RH. 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine.* 3 (3), 295-309.
38. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. 2011. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv Drug Deliv Rev.* 63 (6), 427-40.
39. Tanaka Y, Inkyo M, Yumoto R, Nagai J, Takano M, Nagata S. 2009. Nanoparticulation of poorly water soluble drugs using a wet-mill process and physicochemical properties of the nanopowders. *Chem. Pharm. Bull.* 57(10), 1050-1057.
40. Van Eerdenbrugh B, Stuyven B, Froyen L, Van Humbeeck J, Martens JA, Augustijns P, Van den Mooter G. 2009. Downscaling drug nanosuspension production: processing aspects and physicochemical characterization. *AAPS Pharm SciTech.* 10(1), 44-53.
41. Moribe K, Ueda K, Limwikrant W, Higashi K, Yamamoto K. 2013. Nano-sized crystalline drug production by milling technology. *Curr Pharm Des.* 19(35), 6246-6258.
42. 石井弘重, 混練装置、特開平 10-43566, 公開日 : 1998 年 2 月 17 日.
43. Niwa T, Hashimoto N. 2008. Novel technology to prepare oral formulations for preclinical safety studies. *Int J Pharm.* 350 (1-2), 70-8.
44. Tanaka Y, Ueyama H, Ogata M, Daikoku T, Morimoto M, Kitagawa A, Imajo Y, Tahara T, Inkyo M, Yamaguchi N, Nagata S. 2014. Evaluation of nanodispersion of iron oxides using various polymers. *Indian J Pharm Sci.* 76, 54-61.
45. Kano J, Mio H, Saito F. 1999. Correlation of size reduction rate of inorganic materials with impact energy

- of ball in planetary ball milling. *J Chem Engin Japan*. 32, 333-342.
46. Mio H, Kano J, Saito F. 2004. Scale-up method of planetary ball mill. *Chem Engin Sci* 59: 5909–5916.
 47. Mio H, Kano J, Saito F, Kaneko K. 2002. Effect of rotational direction and rotation-to-revolution speed ratio in planetary ball milling. *Materials Science and Engineering A332*: 75–80.
 48. Chikhalia V, Forbes RT, Storey RA, Ticehurst M. 2006. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. *Eur J Pharm Sci* 27, 19-26.
 49. Joshi V, Dwivedi S, Ward G. 2002. Increase in the specific surface area of budesonide during storage postmicronization. *Pharm Res*. 19, 7-12
 50. Lee CC, Chan LW, Heng P. 2003. Use of a fluidized bed hammer mill for size reduction and classification: effects of process variables and starting materials on the particle size distribution of milled lactose batches. *Pharmaceut Dev Tech* 8, 431-442.
 51. Saleki-Gerhardt A, Ahlneck C, Zografi G. 1994. Assessment of disorder in crystalline solids. *Int J Pharm*. 101, 237-247.
 52. Inkyo, M. and Tahara, T. 2004. Dispersion of Agglomerated Nanoparticles by Fine Beads Mill. *J. Soc. Powder Tech*. 41, 578-585.
 53. Yin L, Hillmyer MA. 2014. Preparation and performance of hydroxypropyl methylcellulose esters of substituted succinates for in vitro supersaturation of a crystalline hydrophobic drug. *Mol Pharm*. 11(1) :175-85.
 54. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. 1995. 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.
 55. Sarode A, Wang P, Cote C, Worthen DR. 2013. Low-viscosity hydroxypropylcellulose (HPC) grades SL and SSL: versatile pharmaceutical polymers for dissolution enhancement, controlled release, and pharmaceutical processing. *AAPS Pharm Sci Tech*. 14, 151–159.
 56. Lobenberg R, Amidon GL. 2000. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. *New scientific approaches to international regulatory standards*. *Eur J Pharm Biopharm* 50, 3–12.
 57. Niwa T, Miura S, Danjo K. 2011. Design of dry nanosuspension with highly spontaneous dispersible characteristics to develop solubilized formulation for poorly water-soluble drugs. *Pharm Res*. 28, 2339-2349.
 58. Wayne A, Colburn, Milo G. 1977. Plasma protein binding and metabolic clearance of phenytoin in the rat. *J Pharmacol. Exp. Ther*. 203: 500-506.
 59. Saleki-Gerhardt A, Ahlneck C, Zografi G. 1994. Assessment of disorder in crystalline solids. *Int J Pharm*.

101, 237–247.

60. Pongpeerapat A, Wanawongthai C, Tozuka Y, Moribe K, Yamamoto K. 2008. Formation mechanism of colloidal nanoparticles obtained from probucol/PVP/SDS ternary ground mixture. *Int J Pharm.* 352 (1-2), 309-316.
61. Moribe K, Pongpeerapat A, Tozuka Y, Yamamoto K. 2006. Drug nanoparticle formation from drug/HPMC/SDS ternary ground mixtures. *Pharmazie.* 61(2), 97-101.
62. Yonemochi E, Oda K, Saeki S, Oguchi T, Nakai Y, Yamamoto K. 1994. Physicochemical properties of amorphous ursocoxycholic acid obtained by grinding. *Chem. Pharm. Bull.* 42 (9), 1948-1950.
63. Inkyo M, Tahara T, Iwaki T, Iskandar F, Hogan CJ Jr, Okuyama K (2006) Experimental investigation of nanoparticle dispersion by beads milling with centrifugal bead separation. *J Colloid Interface Sci* 304: 535–540.
64. Kubo Y, Terashima Y, Yagi N, Nochi H, Tamoto K, Sekikawa H. (2009) Enhanced bioavailability of probucol following the administration of solid dispersion systems of probucol-polyvinylpyrrolidone in rabbits. *Biol Pharm Bull.* 11, 1880-4.
65. あすか製薬株式会社. 2012. 医薬品インタビューフォーム「リピディル錠 53.3 mg」「リピディル錠 80 mg」
66. Higashi K, Ideura S, Waraya H, Limwikrant W, Moribe K, Yamamoto K. 2010. Simultaneous dissolution of naproxen and flurbiprofen from a novel ternary gamma-cyclodextrin complex. *Chem Pharm Bull.* 58 (5), 769-772.
67. Bhagavan HN, Chopra RK. 2006. Coenzyme Q₁₀: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res.* 40, 445–453.
68. Wajda R, Zirkel J, Schaffer T. 2007. Increase of bioavailability of coenzyme Q(10) and vitamin E *J Med Food.* 10, 731–734.
69. Onoue S, Uchida A, Kuriyama K, Nakamura T, Seto Y, Kato M, Hatanaka J, Tanaka T, Miyoshi H, Yamada S. 2012. Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q(10) with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors. *Eur J Pharm Sci.* 46, 492–499.
70. Onoue S, Terasawa N, Nakamura T, Yuminoki K, Hashimoto N, Yamada S. 2014. Biopharmaceutical characterization of nanocrystalline solid dispersion of coenzyme Q₁₀ prepared with cold wet-milling system. *Eur J Pharm Sci* 53, 118-125.
71. Niwa T, Nakanishi Y, Danjo K. 2010. One-step preparation of pharmaceutical nanocrystals using ultra cryo-milling technique in liquid nitrogen. *Eur J Pharm Sci* 41, 78–85.
72. Uramatsu S, Shimamoto T, Kishi K, Akiyama S, Uemura T. 2010. PVA copolymer as a pharmaceutical excipient-Characteristics and its application. *J Japan Soc Pharm Mach Eng* 19, 60-66.

73. Xu M, Zhang C, Luo Y, Xu L, Tao X, Wang Y, He H, Tang X. 2014. Application and functional characterization of POVACOAT, a hydrophilic co-polymer poly(vinyl alcohol/acrylic acid/methyl methacrylate) as a hot-melt extrusion carrier. *Drug Dev Ind Pharm.* 40 (1), 126-135.
74. Ueda H, Aikawa S, Kashima Y, Kikuchi J, Ida Y, Tanino T, Kadota K, Tozuka Y. 2014. Anti-plasticizing effect of amorphous indomethacin induced by specific intermolecular interactions with PVA copolymer. *J Pharm Sci.* 103(9), 2829-2838.
75. Guo W, Geng M, Zhou L. 2012. Electrochemistry of metoclopramide at multi-walled carbon nanotube modified electrode and its voltammetric detection. *Anal Sci.* 28, 693-698.
76. Ikeda Y, Higashi K, Moribe K, Yamamoto K. 2012. Enhanced skin permeation of Piroxicam and pranoprofen induced from nanoparticles dispersed in propylene glycol aqueous solution. *J Drug Deliv Sci Technol* 22, 131-137.
77. Sugimoto S, Niwa T, Nakanishi Y, Danjo K., 2012. Novel ultra-cryo milling and co-grinding technique in liquid nitrogen to produce dissolution-enhanced nanoparticles for poorly water-soluble drugs. *Chem Pharm Bull*, 60(3), 325-33.
78. Van Eerdenbrugh B, Vermant J, Martens JA, Froyen L, Van Humbeeck J, Augustijns P, Van den Mooter G. 2009. A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals. *J Pharm Sci.* 98 : 2091-103.
79. Konan Y.N, Gurny R, Allémann E. 2002. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int J Pharm* 233: 239–252.
80. Ma YQ, Zhang ZZ, Li G, Zhang J, Xiao HY, Li XF, 2016. Solidification drug nanosuspensions into nanocrystals by freeze-drying: a case study with ursodeoxycholic acid. *Pharm Dev Technol.* 21(2), 180-8.
81. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 58(15), 1688-713.
82. Beirowski J, Inghelbrecht S, Arien A, Gieseler H. 2011. Freeze drying of nanosuspensions, 2: the role of the critical formulation temperature on stability of drug nanosuspensions and its practical implication on process design. *J Pharm Sci.* 100(10), 4471-81.
83. Ohshima H, Miyagishima A, Kurita T, Makino Y, Iwao Y, Sonobe T, Itai S. 2009. Freeze-dried nifedipine-lipid nanoparticles with long-term nano-dispersion stability after reconstitution. *Int. J. Pharm.*, 377, 180-184.
84. Kamiya S, Kurita T, Miyagishima A, Arakawa M. 2009. Preparation of griseofulvin nanoparticle suspension by high-pressure homogenization and preservation of the suspension with saccharides and sugar alcohols. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35, 1022-1028.
85. Cui Z, Hsu CH, Mumper RJ. 2003. Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated

- nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 29, 689-700.
86. Mandal B, Alexander KS, Riga AT. 2010. Sulfacetamide loaded Eudragit® RL100 nanosuspension with potential for ocular delivery. *J. Pharm Pharmaceut. Sci.*, 13(4), 510-523.
87. Sigfridsson K, Lundqvist A, Strimfors M. 2013. Evaluation of exposure properties after injection of nanosuspensions and microsuspensions into the intraperitoneal space in rats. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 39, 1832-1839.
88. Kim AI, Akers MJ, Nail SL. 1998. The physical state of mannitol after freeze-drying: effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *J Pharm Sci.* 87(8) : 931-935.
89. Telang C, Suryanarayanan R, Yu L. 2003. Crystallization of Dmannitol in binary mixtures with NaCl: Phase diagram and polymorphism. *Pharm Res.* 20:1939-1945.
90. Bhakay A, Azad M, Vizzotti E, Dave RN, Bilgili E. 2014. Enhanced recovery and dissolution of griseofulvin nanoparticles from surfactant-free nanocomposite microparticles incorporating wet-milled swellable dispersants. *Drug Dev Ind Pharm.* 40(11), 1509-22.
91. Pongnpeerapat A, Itoh K, Tozuka Y, Moribe K, Oguchi T, Yamamoto K. 2004. Formation and stability of drug nanoparticles obtained from drug/PVP/SDS ternary ground mixture. *J. Drug. Del. Sci. Tech.* 14 (6), 441-447.
92. Bilgili E, Afolabi A. 2012. A combined microhydrodynamics-polymer adsorption analysis for elucidation of the roles of stabilizers in wet stirred media milling. *Int J Pharm.* 439(1-2), 193-206
93. Nakano T, Yuasa H, Kanaya Y. 1999. Suppression of agglomeration in fluidized bed coating. III. Hofmeister series in suppression of particle agglomeration. *Pharm Res.* 16 (10), 1616-1620.
94. Curatolo W. 1998. Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *PSTT.* 1, 387-393.
95. Johnson KC, Swindell AC. 1996. Guidance in the setting of drug particle size specifications to minimize variability in absorption. *Pharm Res.* 13, 1795-1798.
96. Hasegawa Y, Higashi K, Yamamoto K, Moribe K. 2015. Direct evaluation of molecular States of piroxicam/poloxamer nanosuspension by suspended-state NMR and Raman spectroscopies. *Mol Pharm.* 12 (5), 1564-72.
97. Dressman JB, Vertzoni M, Goumas K, Reppas C. 2007. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 59, 591-602.
98. Sun D, Lennernas H, Welage LS, Barnett JL, Landowski CP, Foster D, Fleisher D, Lee KD, Amidon GL. 2002. Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm Res.* 19: 1400-1416.
99. Fagerholm U, Borgström L, Ahrenstedt O, Lennernas H. 1995. The lack of effect of induced net fluid

- absorption on the in vivo permeability of terbutaline in the human jejunum. *J Drug Target*. 3 (3), 191-200.
100. Ozaki S, Minamisono T, Yamashita T, Kato T, Kushida I. 2012. Supersaturation-nucleation behavior of poorly soluble drugs and its impact on the oral absorption of drugs in thermodynamically highenergy forms. *J Pharm Sci*. 101, 214–222.
101. Yu LX. 1999. An integrated model for determining causes of poor oral drug absorption. *Pharm Res*. 16, 1883–1887.
102. Takano R, Sugano K, Higashida A, Hayashi Y, Machida M, Aso Y, Yamashita S. 2006. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test. *Pharm Res*. 23: 1144–1156.
103. Dressman JB, Amidon GL, Reppas C, Shah VP. 1998. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res*. 15, 11–22.
104. Hirtz J. 1985. The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation. *Br J Clin Pharmacol*. 19 (S2), 77S–83S.
105. Tanaka Y, Baba T, Tagawa K, Waki R, Nagata S. 2014. Prediction of oral absorption of low-solubility drugs by using rat simulated gastrointestinal fluids: the importance of regional differences in membrane permeability and solubility. *J Pharm Pharm Sci*. 17(1), 106-120.
106. Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL. 2004. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm*. 1 (1), 85-96.
107. Chiou W. L. and Riegelman. S. 1971. Absorption characteristics of solid dispersed and micronized griseofulvin in man. *J Pharm Sci* 60, 1376-1380.
108. Tanaka Y, Hara T, Waki R, Nagata S. 2012. Regional differences in the components of luminal water from rat gastrointestinal tract and comparison with other species. *J Pharm Pharm Sci*. 15(4), 510-8.
109. Belaroui K, Pons MN, Vivier H, Meijer M. 1999. Wet grinding of gibbsite in a bead-milling. *Powder Technology*. 105, 396-405.
110. Bel Fadhel H, Frances C. 2001. Wet batch grinding of alumina hydrate in a stirred bead mill. *Powder Technology*. 119, 257–268.
111. He M, Wang Y, Forssberg E. 2004. Slurry rheology in wet ultrafine grinding of industrial minerals: a review. *Powder Technology*. 147: 94–112.