エレクトロスプレー法を利用した 難水溶性薬物のナノ粒子製剤化

Application of Electrospray Deposition for Preparing Nanoparticulate Formulation of Poorly Soluble Drugs

川上 亘作, 張 紹玲, 飯野 京子

Kohsaku Kawakami, Shaoling Zhang, Kyoko Iino

Received 1 September 2010; Accepted 16 November 2010

Many formulation technologies have been developed to overcome low-solubility problem of drug candidates. Herein introduced is the application of the electrospray technology as a new option. This method can produce solid amorphous nanoparticles in one-step. Moreover, it can be operated under ambient condition. In the first part of this paper, effect of solution and operation parameters on the particle formation was extensively investigated using chitosan/ acetic acid aqueous solutions. Solution viscosity and conductivity were the most important parameters to affect particle size and even the availability of the formulation. The scaled-up study was performed using 8-nozzle manifold, by which prednisolone formulation was prepared with poly(vinyl pyrrolidone) K90. Although the solution of low concentration was preferred to obtain small particles, that of high concentration was favored for effective amorphization. The coaxial nozzle was used to control the surface characteristic of the particle. Dissolution rate of griseofulvin was significantly enhanced by coating the surface by Eudragit L-100.

Keywords: Electrospray, Poorly soluble drug, Amorphous, Nanoparticle

1. 緒 言

難水溶性薬物の製剤化手段として、可溶化^{1, 2)}、非晶化^{3, 4)}、ナノ分散化^{5, 6)}など様々な特殊技術が実用化されている。とくに、非晶質製剤とナノ分散製剤は、固形製剤でありながら高い吸収改善効果が得られる可能性があり、今後の普及に対する期待が大きい。しかしながら、その製造手段や物理安定性の確保にはまだまだ問題点が多く、広い普及の障害となっている^{2, 3)}。

エレクトロスプレー法は、質量分析のイオン化手段として^{7, 8)}、また、ナノファイバーの調製手段とし

て^{9, 10)}（この場合はエレクトロスピンニング法と呼ばれる）注目されているが、本研究においては、ナノ粒子化と非晶化を同時に達成する製剤化手段^{11, 12)}として利用した。とくに本手法は、通常は湿式で調製した製剤を乾燥することによって得られるナノ分散固体^{5, 6)}を、1ステップで調製できること、さらには、非晶質の調製には通常温度ストレス等が必要となるが、極めてマイルドな常温・常圧条件下で調製できることが大きな特長と言える。本研究においては、まず、小スケールの装置で溶液条件・操作条件が粒子調製に与える影響を精査したのち、スケールアップ装置による薬物粒子の調製、および、同軸二重ノズルを用いた粒子の高機能化を行った。

2. 実 験

2.1 試 料

高分子基剤として、キトサン（和光純薬）、オイド

物質・材料研究機構 生体材料センター 国際ナノアーキテクニクス研究拠点

(〒305-0044 茨城県つくば市並木1-1) TEL 029-860-4424
Biomaterials Center and International Center for Materials
Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science
(1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan)

Fig. 1 Schematic representation of the electrospray apparatus

ラギット L-100 (Degussa), ポリビニルピロリドン K 90 (PVP, 和光純薬), モデル薬物としてプレドニゾン (PDN, 和光純薬) とグリセオフルビン (GF, Sigma-Aldrich) を用いた。なお, キトサンの分子量は, プルランを分子量標準としたゲル濾過クロマトグラフィーによると, 約 120 kDa であった。

2.2 エレクトロスプレー粒子の調製と評価

目的に応じて, 3 種類の装置を用いた。全ての調製は, 常温・窒素雰囲気下で行った。

各溶液・操作条件が粒子形成に及ぼす影響を精査するための, 小スケール装置の概略を Fig. 1 に示す。キトサン/酢酸水溶液をシリンジポンプで 23 G 注射針 (内径 0.65 mm) に最大 0.6 ml/h で供給し, 7 cm 離れたステンレスターゲットに -25 kV の電圧を印加することによって, 噴霧を行った。粒子はターゲット上に堆積したままの状態, 日立ハイテクノロジーズ社製走査型電子顕微鏡 (SEM) S-4800, もしくは日本電子社製 JSM-5600 によって観察した。粒子径は, 300 個の粒子を抽出して画像解析ソフト (MacView ver. 4, Mountech 社) を用いて Heywood 径を求め, 体積平均径で評価した。

スケールアップ実験は, 内径約 1 mm のノズルが 8 本並んだマニホールドに, 25 kV を印加して行った。15 cm 離れたターゲットに噴霧を用い, 流速は 5 ml/h とした (ノズル 1 本あたり 0.625 ml/h)。本実験には, PVP K 90 と PDN のエタノール溶液を用い, 粒子はターゲットから回収した。評価は SEM 観察に加え, 粉末 X 線回折 (理学電機 Rint-Ultima) と示差走査熱量測定 (DSC, メトラートレド 823 e) より行った。

さらに, 同軸二重ノズルを用いて 2 種類の溶液を同時に供給することにより (内外とも 0.36 ml/h), コアシェル型粒子を調製した。本実験には, GF のクロロ

ホルム溶液と, オイドラギット L-100 のエタノール溶液を用いた。コアシェル構造は, 偶発的に調製された比較的大きな粒子 (~5 μm) について, 共焦点顕微鏡観察 (Zeiss LSM 510) を行うことによって確認した。本観察のためには, ローダミンとクマリンを内外層に含有させた粒子を調製した。溶解性試験は, 常温条件下において, スターラー攪拌した 100 ml の JP-2 液 (pH 6.8 のリン酸緩衝液) に, GF 量として 3 mg の製剤を乳鉢粉碎後添加することにより評価した。一定時間経過後に抜き取った溶液は, HPLC により定量した (YMC-Pack Pro C 18, 150×2.0 mmID, 移動相: アセトニトリル/水=4/6, 流速: 0.2 ml/min, 検出波長: 291 nm)。

3. 結果と考察

3.1 溶液条件・操作条件の検討

エレクトロスプレー法において, 各溶液条件・操作条件が粒子径に与える影響は, 総説などで大まかにレビューされているものの¹⁰⁾, データの蓄積はいまだ十分とは言い難い。以下, 製剤原料を利用した粒子形成において, あらためて各因子の影響を精査した結果を示す。

液滴を乾燥して固体粒子を得る場合, 溶液濃度が高いほど粒子径は大きくなる。粒子が球形で単分散と仮定すると, 質量保存の観点から, 粒子径 d_p と液滴径 d_d の間には次式が成立する¹³⁾。

$$d_p = d_d \left(\frac{\rho_d}{\rho_p} C \right)^{1/3} \quad (1)$$

ここで, C は溶質濃度, ρ_d と ρ_p はそれぞれ液滴と粒子の密度である。つまり, 同一径の液滴から形成される粒子の大きさは, 密度変化が無視できるとすると溶液濃度の 1/3 乗に比例するはずであるが, Fig. 2 に示す通り, 濃度依存性はそれよりも大きいことが分かった。これは, 濃度の上昇に伴い, 溶液粘度が上昇するため, 液滴形成時の破断が困難となり, 液滴が大きくなるためと推測された。また, 酢酸濃度を下げることによって導電率を上昇させると, 粒子径は低下した。エレクトロスプレーによって形成される液滴の粒子径と, 流速 Q , 導電率 K の間には, 次式が成立する¹⁴⁾。

$$d_d \propto \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_r Q}{K} \right)^{-1/3} \quad (2)$$

ここで, ϵ_0 および ϵ_r は, 真空の誘電率および比誘電

Fig. 2 Effect of chitosan concentration on the particle diameter. Acetic acid concentration was 90 (v/v)%

率である。**Fig. 3** は、粒子径の導電率依存性であるが、流速条件一定の場合、その傾きはおよそ $-1/3$ であり、Eq. (2) が成立している。これは、導電率の変化によって溶液内電子間の反発が影響を受け、電荷密度の許容量、すなわちレイリー限界が変わるためと解釈できる¹⁴⁾。**Fig. 4** は、溶液の導電率と粘度の、粒子形成への影響を同時に示したものである。溶液粘度を下げることによって、粒子が微細化していることが分かる。しかし、導電率の上昇と粘度低下によって噴霧挙動は次第に不安定となり、閾値を超えると微細な液滴の噴霧が不可能となり、粒子が得られなくなった。なお、溶液物性の中で、表面張力などはほとんど粒子径に影響を与えず、上記2因子が支配的要素となることが分かった。

操作パラメータの中では、Eq. (2) で表される通

Fig. 3 Effect of solution conductivity on the particle size. The solution conductivity was adjusted by changing the acetic acid concentration. Chitosan concentration was 25 g/l. Flow rate was 3.6 μ l/min ($\circ$), 6.8 μ l/min ($\square$), and 8.3 μ l/min ($\triangle$)

Fig. 4 Effect of solution viscosity and conductivity on the particle availability and the particle size. The line represents the threshold of availability of the electrospray particles. The open symbols exhibit solutions that could not be electrosprayed, and the numbers on the filled symbols indicate the particle size in nm.

り、送液速度が粒子径に大きく影響することが分かった。その依存性は、導電率が低く安定に噴霧が行える溶液については、 $-1/3$ 乗に比例することが確認された。印加電圧と噴霧距離は、いずれも電界の強さに影響を及ぼす因子であり、その条件設定が不適切な場合には粒子を得ることができないものの、粒子を得ることができる条件範囲内においては、粒子径などに大きな影響は及ぼさなかった。ノズル径も重要な因子とはならなかったが、エレクトロスプレー滴は溶液表面の歪み（テイラーコーンと呼ばれる）の先端が破断されて生じるものであるため、100 μ m オーダーのノズル径は十分に大きいために、影響因子とならなかったものと解釈できる。

3. 2 薬物を搭載した製剤の調製

エレクトロスプレー装置は、現状、噴霧乾燥法などと比較すると調製速度が大幅に遅く、それは実用化に向けて克服すべき課題の一つであるが、単純にノズル数を増やすことで調製効率を高めることができる¹⁵⁾。本研究においては、ノズル数を8本に増やしたスケールアップ装置を利用して製剤調製を行った。本装置は、薬物と添加物の合計濃度が4%の場合で200 mg/h程度の製剤調製が可能であるが、上記小スケール装置によって見出された濃度依存性、溶液供給速度依存性などは、そのまま成立することが分かった。なお、以下の実験ではエタノール溶液を用いており、溶液導電率はすべての検体において10 μ S/cm以下と非常に低いため、粒子径は μ mオーダーとなった。

Fig. 5 SEM images of the PVP/PDN particles prepared by (a) 2 % PVP K90 + 2 % PDN or (b) 4 % PVP K90 + 2 % PDN ethanol solutions. Solution viscosities were ca. 2 and 23 mPa · s, respectively.

Fig. 5 (a) に、PDN に PVP K90 を担体として添加して調製した粒子の SEM 画像を示す。一般に、高分子添加物を用いて微粒子調製を行うと、表面に陥没構造が観察される。これは、溶媒の蒸発過程において、液滴の収縮に分子拡散が追いつかないため、表面に高分子スキン層が形成されてから内部の溶媒留去が起こるためと説明される^{13, 16)}。なお、**Fig. 5 (b)** に示す通り、PVP 濃度が 4 % 以上になるとファイバー構造が出現した。

薬物の溶解性を改善するためには、微細化に加えて非晶化も行うことが望ましい。**Fig. 6** は、PVP/PDN 粒子の粉末 X 線回折パターンである。薬物の非晶化のためには薬物/担体混合比は低い方が望ましいが、ここでは全体濃度の非晶化能への影響が顕著に現れている。例えば、溶液濃度として 0.5% PVP + 1 % PDN および 1 % PVP + 2 % PDN とした場合は、粒子の組成は同様となるが、前者は PDN が結晶化しているのに対し、後者は完全に非晶化されている。溶液の PVP 濃度が 1 % 以上の場合、粉末 X 線回折で評価する限りは、常に PDN は非晶化されることが分かった。こ

Fig. 6 X-ray powder diffraction patterns of PVP/PDN particles. The solution condition was shown in the figure.

Fig. 7 DSC curves of PVP/PDN particles. The solution condition was shown in the figure.

れは、溶液粘度が高くなることによって薬物の拡散が遅くなり、核形成および結晶成長が阻害されるためと解釈できる。また、**Fig. 7** は、各粒子の DSC 曲線であるが、60℃ 付近の脱水ピークに続き、0.5% PVP + 2 % PDN および 1 % PVP + 3 % PDN については、結晶化による発熱ピークが見られ、融点も検出されている。1 % PVP + 2 % PDN についても、結晶化ピークは鮮明ではないものの明らかに融点が観察されており、これらは初期状態としては非晶質粒子が得られるものの、その後の保存安定性は低いことが示唆される。PVP 濃度が 2 % の場合は、PDN 濃度が 3 % でも全く結晶化の傾向は認められなかった。つまり薬物粒子を微細化するという観点からは、溶液濃度は低く設定することが有効であるが、効率的な非晶化および高い生産性のためには、高濃度溶液の利用が望ましいことが分かった。

3. 3 コア-シェル粒子の調製

同軸二重ノズルを利用して、GF とオイドラギット L-100 のコア-シェル粒子調製を試みたところ、GF を内相にした粒子は理想的なコア-シェル形状をとることが共焦点顕微鏡より確認されたが (**Fig. 8**)、GF を外相とした場合は鮮明な内外のコントラストが得られず、外相を高粘度にすることが重要と考えられた。**Fig. 9** は、各々の粒子について溶出試験を行った結果である。いずれも GF 原薬と比較して溶出性が改善されたが、とくに GF を内相にした粒子について改善効果が顕著であった。GF 原薬の平均粒子径は 2.5 μm であるが、電子顕微鏡観察では強く凝集していた。したがって、オイドラギットで被覆した製剤による溶出改善は、粒子径が 840 nm まで微細化されたのに加え、分散性が大きく改善され、さらに非晶化されたためと解釈できた。また、外相に GF とオイドラギットを共存させ、内相にオイドラギットを取り込ませた粒子

Fig. 8 Confocal image of the core-shell particles. The griseofulvin core was surrounded by the Eudragit L-100 shell. Visualization was done by adding fluorescent probe, coumarin (dark phase) and rhodamine (light phase), in each phase.

も、完全に非晶化し、さらなる溶出改善効果が認められた。同軸二重ノズルを用いた調製は粒子設計の自由度を高めることが可能であり、製剤設計手段として非常に有望である。

4. 結 言

難水溶性薬物の製剤化手段は様々なものが考案されているが、エレクトロスプレー法は非晶化とナノ粒子化を同時に行える画期的な調製法であることが分かった。本手法は、常温・常圧下で調製が行えることも大きな利点である。小スケール装置で各溶液・操作パラメータが粒子形成に及ぼす影響を検討したところ、粘

Fig. 9 Dissolution profiles of intact GF powder ($\diamond$) and electro spray formulations. ($\triangle$): GF for the outer phase and Eudragit for the inner phase, ($\square$) Eudragit for the outer phase and GF for the inner phase, ($\circ$): Eudragit/GF = 1/1 for the outer phase and Eudragit for the inner phase. GF/Eudragit ratio (G/E), the mean particle size (d), and crystallinity of the electro spray formulations were indicated in the figure.

度と導電率がとくに重要な因子となることが分かった。また、ノズル数を増やすことによるスケールアップを行っても、小スケール装置で得られた知見はそのまま成立した。薬物の非晶化のためには、溶液の濃度を高めに設定する必要があることが示唆された。さらに同軸二重ノズルを利用すると粒子の表面物性が制御でき、モデル薬物のグリセオフルビンを用いた検討では顕著な溶出性改善が達成された。

〔謝辞〕 本研究の一部は、コスメトロジー研究振興財団の助成によって遂行され、ここに謝意を表します。また、文部科学省による世界トップレベル研究拠点プログラムによって行われた研究も一部含みます。

References

- 1) Lawrence, M. J. and G. D. Rees : "Microemulsion-based Media as Novel Drug Delivery Systems", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **45**, 89-121 (2000)
- 2) Kawakami, K., T. Yoshikawa, T. Hayashi, Y. Nishihara and K. Masuda : "Microemulsion Formulation for Enhanced Absorption of Poorly Soluble Drugs II. In vivo Study", *J. Control. Release*, **81**, 75-82 (2002)
- 3) Kawakami, K. : "Current Status of Amorphous Formulation and Other Special Dosage Forms as Formulations for Early Clinical Phases", *J. Pharm. Sci.*, **98**, 2875-2885 (2009)
- 4) Kawakami, K. : "Molecular Mobility of Glassy Pharmaceuticals", *Netsu Sokutei*, **35**, 185-191 (2008)
- 5) Merisko-Liversidge, E., G. G. Liversidge and E. R. Cooper : "Nanosizing : A Formulation Approach for Poorly-water-soluble Compounds", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **18**, 113-120 (2003)
- 6) Kesisoglou, F., S. Panmai and Y. Wu : "Nanosizing - Oral Formulation Development and Biopharmaceutical Evaluation", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **59**, 631-644 (2007)
- 7) Yamashita, M. and J. B. Fenn : "Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-jet Theme", *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451-4459 (1984)
- 8) Wong, S. F., C. K. Meng and J. B. Fenn : "Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(ethylene glycols)", *J. Phys. Chem.*, **92**, 546-550 (1988)
- 9) Huang, Z. M., Y. Z. Zhang, M. Kotaki and S. Ramakrishna :

- “A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites”, *Composites Sci. Technol.*, **63**, 2223-2253 (2003)
- 10) Agarwal, S., J. H. Wendorff and A. Greiner : “Use of Electrospinning Technique for Biomedical Applications”, *Polymer*, **49**, 5603-5621 (2008)
 - 11) Chakraborty, S., I-C. Liao, A. Adler and K. W. Leong : “Electrohydrodynamics : A Facile Technique to Fabricate Drug Delivery Systems”, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **61**, 1043-1054 (2009)
 - 12) Zhang, S. and K. Kawakami : “One-step Preparation of Chitosan Solid Nanoparticles by Electrospray Deposition”, *Int. J. Pharm.*, **397**, 211-217 (2010)
 - 13) Kawakami, K., C. Sumitani, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi and K. Terada : “Investigation of the Dynamic Process during Spray-drying to Improve Aerodynamic Performance of Inhalation Particles”, *Int. J. Pharm.*, **390**, 250-259 (2010)
 - 14) Hartman, R. P. A., D. J. Brunner, D. M. A. Camelot, J. C. M. Marijnissen and B. Scarlett : “Jet break-up in Electrohydrodynamic Atomization in the Cone-jet Mode”, *J. Aerosol. Sci.*, **31**, 65-95 (2000)
 - 15) Deng, C., C.M. Waits, B. Morgan and A. Gomez : “Compact Multiplexing of Monodisperse Electrosprays”, *J. Aerosol. Sci.*, **40**, 907-918 (2009)
 - 16) Yao, J., L. K. Lim, J. Xie, J. Hua, C. H. Wang : “Characterization of Electrospraying Process for Polymeric Particle Fabrication”, *J. Aerosol. Sci.*, **39**, 987-1002 (2008)