ナノ粒子の調製及びその保存に関する物理化学的研究

神谷誠太郎

Preparation and Physicochemical Study of the Preservation of Nanoparticles

Seitaro Kamiya

Division of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University; 2825-7 Huis Ten Bosch, Sasebo, Nagasaki 859-3298, Japan.

(Received August 26, 2014)

The importance of nanoparticle formulation is increasingly recognized in supporting pharmaceutical development. Thus, maintaining nanoparticles in a constant state is a major issue. A method involving lyophilization with the addition of saccharides can be used to maintain the steady state of nanoparticles. In this study, trisaccharides, tetrasaccharides, and pentasaccharides were added to nanoparticle suspensions, followed by rehydration of the samples, which had been either dried normally or freeze-dried. The particle size after rehydration was measured. In addition, each powder was measured using a powder X-ray diffractometer and thermal analysis device to investigate the correlation between the nanoparticles' aggregation and the crystal form of saccharides. The diameter of the nanoparticles was maintained when it was freeze-dried, while particle aggregation occurred when normally dried samples were used. In addition, crystalline saccharide was not observed in the freeze-dried group, but did appear in the normally dried group.

Key words—nanoparticle; saccharide; freeze-drying; normal-drying; mechanism

1. はじめに

薬物のドラッグデリバリーシステム (drug delivery system; DDS) は、吸収障壁の克服、放出制御、標的部位指向と3つに大別される。吸収障壁の克服、放出制御においては、多くの研究がなされており数多くの医薬品が上市されている。標的部位指向は、薬物を必要な場所に送達させることが可能な空間制御技術であり、主作用と副作用との分離が可能となり、より安全で有効な薬剤を開発するのに有効な手段となる。標的部位指向は、モノクローナル抗体¹⁾を利用したものが開発されているほか、リポソームやリピッドマイクロスフェアなどのナノ粒子を用いた研究が、今後多く行われると考えられる。これまでに、新規のナノ粒子の調製方法及びナノ粒子の体内動態の研究は以前より行われてきた。²⁾ しかしながら、ナノ粒子の保存性についてはほとんど検討されていなかった。ナノ粒子はコロイド分散系

に属し、長期間水中で分散状態を維持していくことは、熱力学的に不安定³⁾であるため非常に困難であり、1ヵ月もたたずに凝集・沈降が生じる欠点を持つ。⁴⁾ そのため、ナノ粒子の保存について研究することは今後の技術の発展に非常に重要になると考えられる。そのような重要な研究にもかかわらずナノ粒子の保存に関する研究はこれまでほとんど行われておらず、その報告は凍結乾燥法に留まっている。凍結乾燥法は非常に優れた方法で、この手法を用いればほとんど問題が生じないため、凍結乾燥法に代替する方法はあまり研究されてこなかった。凍結乾燥は温度・気圧関連において三重点以下で起こる現象であるため、温度を下げたり、気圧をさげたりする必要がある。⁵⁾ そのことによりコスト高になる。また凍結乾燥後、大気中に放置すると水分を急激に吸収するためにバイアルなどを用いて保存する必要があるため、これもコスト高の要因となる。今後、ナノ粒子製剤が医薬品市場を占有すると予想されるために、ナノ粒子の保存方法を研究することは非常に意義があると考えられる。そのため、凍結乾燥又はその他の方法で乾燥し粉体状態とした糖類の再水和後のナノ粒子の状態を比較することは、重要であ

長崎国際大学薬学部 (〒859-3298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 2825-7)

e-mail: kamiya@niu.ac.jp

本総説は、平成25年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Images of Freeze-dried Trisaccharides Containing Nanoparticles

The trisaccharides/phospholipid weight ratio is 10. Normal drying: the nanoparticle suspension containing trisaccharides was dehydrated in a drying machine. Intact trisaccharides: original trisaccharides containing no phospholipid.

ると言える。

これまで、凍結乾燥の実験を行う際、凝集防止剤として二糖類が用いられていた。⁶⁻⁸⁾ また、単糖類を用いた場合、凍結乾燥した後に再水和したナノ粒子は、凝集すると報告されていた。われわれは、実験として多糖類を凝集防止剤として添加したところ、凍結乾燥後に再水和したナノ粒子は凝集を引き起こした。このとき、糖類をナノ粒子懸濁液に添加し凍結乾燥した種々の糖類に X 線を用いて物性を調べたところ単糖類では結晶ピークがあらわれ、二糖類及び多糖類では結晶ピークはあらわれなかった。結晶ピークがあらわれた場合に再水和後に凝集が生じると予想していたため、なぜこのように結果が異なるのか疑問が生じた。そのため、三糖類、四糖類、五糖類と糖類の種類を変えていき、最終的に何糖類の場合に変化が生じるかを調べることにした。そのために様々な種類の糖を検討すると同時に物理化学的性質を調査してそのメカニズムを検討することを目的とした。

2. 材料・方法

ナノ粒子懸濁液：水素添加大豆レシチン及びホスファチジルグリセロールを 4 : 1 で混合した試料を水中に分散し、超高压乳化分散機を用いて調製した。凍結乾燥：調製したナノ粒子懸濁液に種々の糖類を添加し、 -40°C にて凍結を 4 時間凍結した。

凍結した試料は凍結乾燥機を用いて 24 時間操作を行った。通常乾燥：調製したナノ粒子懸濁液に種々の糖類を添加し、 40°C の乾燥装置で 2-3 日かけて乾燥した。なお、物性評価に用いた装置はレーザー回折／散乱式粒度分布測定装置、粉末 X 線回折装置、示差走査熱量測定装置 (differential scanning calorimetry; DSC) 及び走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope; SEM) である。

3. ナノ粒子の凝集性及び糖類の結晶状態との関連性

Figure 1 はそれぞれ同じ重量の三糖類の外観を示した写真で、凍結乾燥 (freeze-drying) した三糖類、通常の乾燥機乾燥した (normal-drying) 三糖類、開封したばかりの市販品 (intact) の三糖類になる。この 3 つの中で、凍結乾燥品は他の 2 つと比べると体積が大きくなった。通常乾燥品と市販品はほとんど差異が認められなかった。Figure 2 は Fig. 1 の糖類の SEM 写真である。凍結乾燥品は扁平状の形状を示し、粉体の至る所に細孔が観察された。これは

神谷誠太郎

長崎国際大学薬学部講師、2001 年名城大学薬学部卒業、2003 年静岡県立大学薬学研究科博士前期課程修了、2006 年静岡県立大学薬学研究科博士後期課程修了 博士 (薬学)、2006 年長崎国際大学薬学部助手、助教を経て 2013 年より現職。

Fig. 2. SEM Micrographs of Freeze-dried and Normal-dried Trisaccharide Powders Containing Nanoparticles

Fig. 1 で観察されたようにこの細孔が粉体をかさ高くしている要因であると考えられた。通常乾燥品は針状の形状が多く観察された。市販品は丸みを帯びた粉体であった。Figure 3 はナノ粒子に三糖類を添加し、凍結乾燥又は、通常乾燥条件で乾燥し、再水和した後の粒子径を示している。Control は乾燥前のオリジナルの粒子径の大きさを示している。凍結乾燥した場合、粒子径は維持された。しかしながら、通常乾燥した場合の再水和後の粒子径は乾燥前のオリジナルの粒子径の 200 倍の値を示し、凝集が生じた。このときのそれぞれの乾燥品の粉末 X 線回折パターンを Fig. 4 に示した。凍結乾燥した場合はハローパターンを示し、結晶成分の存在は認められなかった。通常乾燥した場合は、ピーク強度の違いは存在したが、市販品の三糖類と同様の回折パターンを示し、同一の結晶であることが分かった。Figure 5 は、各試料の DSC 曲線を示している。凍結乾燥した場合、凍結乾燥した粉体に吸熱ピークは認められなかった。通常の乾燥をした場合は 84°C 付近になだらかな吸熱ピークが認められた。市販品の場合は 84°C 付近及び 92°C 辺りにピークが認められた。84°C 付近は三糖類の融点と近いため融点であると判断した。インタクトの 92°C 付近にピークが生じたのは市販品が五水和物であったために水和物中の水分が気化した際に熱を奪われたためであると考えられる。三糖類においては、通常乾燥では結

Fig. 3. Mean Particle Size of Nanoparticles after Rehydration of Freeze-dried or Normal-dried Nanoparticles Containing Trisaccharides

Control represents the mean particle size of nanoparticles immediately after preparation.

晶状態が認められ、その状態の場合、ナノ粒子は凝集した。一方、凍結乾燥では結晶の存在が認められず、その状態の場合、ナノ粒子は粒子径を維持することができた。⁹⁾

次に四糖類とナノ粒子の関係を検討した。Figure 6 は四糖類をナノ粒子懸濁液に添加し、凍結乾燥又は通常乾燥した試料を再水和した結果である。四糖類を凍結乾燥した場合は 110 nm、三糖類の再水和後の粒子径は 136 nm とほとんど差が認められなかった。通常乾燥した場合は 220 nm を示し、わずかに凝集した。また、凍結乾燥と比べて 2 倍の大きさを

Fig. 4. Powder X-ray Diffraction Patterns of Freeze-dried and Normal-dried Trisaccharides Containing Nanoparticles
Intact trisaccharides: original trisaccharides containing no phospholipid.

Fig. 5. Differential Scanning Calorimetry Curves of Freeze-dried and Normal-dried Trisaccharides Containing Nanoparticles
Intact trisaccharides: original trisaccharides containing no phospholipid.

Fig. 6. Mean Particle Size of Nanoparticle after Rehydration of Freeze-dried and Normal-dried Nanoparticles Containing Tetrasaccharides
Control represents mean particle size of nanoparticles immediately after preparation.

Fig. 7. Powder X-ray Diffraction Patterns of Freeze-dried and Normal-dried Tetrasaccharides Containing Nanoparticles
Intact tetrasaccharides: original trisaccharides containing no phospholipid.

Fig. 8. Differential Scanning Calorimetry Curves of Freeze-dried and Normal-dried Tetrasaccharides Containing Nanoparticles
Intact tetrasaccharides: original trisaccharides containing no phospholipid.

示した。Figure 7は四糖類の粉末X線回折パターンを示している。凍結乾燥品及び通常乾燥品はハローパターンを示し、結晶成分の存在が認められなかったが、通常乾燥品は図に示した部分で微小なピークが認められた。市販品においても三糖類と比較して四糖類の結晶ピークのあらわれ方が小さくなっていることも記しておく。熱量分析では、四糖類の融点である170℃付近に吸熱ピークが生じると予想されたが、凍結乾燥品、通常乾燥品及び市販品すべてで吸熱ピークは認められなかった (Fig. 8)。通常乾燥品の粉末X線回折パターンより、わずかに残存した結晶が凝集を引き起こしたと考えられた。

五糖類では、凍結乾燥品の再水和後の粒子径は維持されたが、通常乾燥品の再水和後の粒子径は240 nmを示し、多少の凝集が認められた (Fig. 9)。凍

Fig. 9. Mean Particle Size of Nanoparticle after Rehydration of Freeze-dried and Normal-dried Nanoparticles Containing Pentasaccharides
Control represents mean particle size of nanoparticle immediately after preparation.

Fig. 10. Powder X-ray Diffraction Patterns of Freeze-dried and Normal-dried Tetrasaccharides Containing Nanoparticles
Intact pentasaccharides: original pentasaccharides containing no phospholipid.

結乾燥品や通常乾燥品の X 線回折パターンはハローパターンを示し非晶質化を示した一方、通常乾燥品は結晶ピークの残存が認められた (Fig. 10)。また、市販品は強い結晶ピークを示し、結晶状態で存在するのが認められた。凍結乾燥品の DSC 曲線では吸熱ピークが認められなかったが、通常乾燥品では弱い吸熱ピークが認められた (Fig. 11)。通常乾燥品が X 線回折パターンでわずかな結晶ピークを示したこと及び、DSC 曲線で結晶の融解に由来する吸熱ピークが認められたことから、通常乾燥品の一部が結晶状態で存在していると考えられた。

以上のことから 1 つの仮説が想定された。例えば三糖類において、通常乾燥品の場合、懸濁液状態から徐々に乾燥するまでは、ナノ粒子及び糖分子が自

Fig. 11. Differential Scanning Calorimetry Curves of Freeze-dried and Normal-dried Pentasaccharides Containing Nanoparticles
Intact pentasaccharides: original trisaccharides containing no phospholipid.

由に動くことが可能である。そこから水分が徐々に失われていく過程で糖分子が規則正しく配列されて結晶状態で析出するため、余分なスペースがなくなりナノ粒子は追い出される。追い出されて行き場のなくなったナノ粒子同士が互いに接近するために凝集が引き起こされたと考えられた。凍結乾燥の場合、懸濁液は一度予備凍結されるのが一般的であり、そのことでナノ粒子及び糖分子が固定され、自由に動き回ることが著しく制限される。その状態で水分のみが気化していくため、糖分子が自由に移動できないために規則正しく配列できずに、不規則な並びの非晶質状態で存在する。そのため糖分子間で十分なスペースが存在し、ナノ粒子は追い出されことなくその位置に留まることができるため、ナノ粒子状態を維持できると考えられた。⁸⁾

これらのメカニズムを支持する結果も得られている。二糖類であるスクロースを懸濁ナノ粒子に添加し、凍結乾燥を行う。得られたスクロース乾燥品を 25°C、相対湿度 40% の条件下で暴露した。経時変化を観察していると粉体が徐々に水分を吸収して、潮解性を示した。さらに観察すると水分が蒸発して 8 時間経過すると、完全な固形粉体に戻っていた。それぞれの粉体について粉末 X 線回折装置を用いて測定したところ、Fig. 12 に示すように最初の 2 時間までは非晶質状態で存在した。その後徐々に時間が経過するとともに結晶性が高くなった。8 時間後には、オリジナルのスクロースの結晶とほぼ同じ回折パターンを示した。Figure 13 はスクロースを

Fig. 12. Changes in Powder X-ray Diffraction Patterns of Sucrose Containing Nanoparticles with Time of Exposure

Fig. 13. Changes in Mean Particle Size of Nanoparticles with Time of Exposure

添加したナノ粒子懸濁液の凍結乾燥品を種々の時間毎相対湿度 40% の条件下に暴露し、再水和後の平均粒子径を示している。8 時間後に粒子径が上昇していることから、Fig. 12, 13 より、スクロースの結晶状態と粒子の凝集に相関関係があると言える。⁸⁾ 非晶質状態の試料ではナノ粒子の粒子径は維持され、スクロースが結晶化した状態ではナノ粒子は凝集した。これらのことから推定するに、非晶質状態から結晶状態に移行するまでに潮解過程を経たことは、空気中から吸収した水分が介在することでスクロース分子及びナノ粒子が自由に動けるようになり、その後水分が再び蒸発する過程で、スクロースが規則正しく分子配列するために、ナノ粒子が凝集したと考えられた。

4. おわりに

本研究では、保存時の糖が結晶状態で存在する場合、ナノ粒子は凝集した。また非晶質で存在する場合はナノ粒子の粒子径は維持された。これは「はじめに」に述べたように、通常乾燥しても非晶質の粉

体状態を示す糖類を用いることで、凍結乾燥に頼らないナノ粒子の保存が可能になることを意味していると考えられる。

本稿で述べた結果は、これで終了でなく、普遍性を持たせるために、今後多くの糖類で検討する必要がある、継続して研究を行っていく。今回示した保存時に生じるナノ粒子の凝集メカニズムが、のちに優れたナノ粒子の保存法を開発する一助になることを願っている。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、終始に渡りご指導とご鞭撻を賜りました長崎国際大学薬学部中島憲一郎教授、荒川正幸教授に感謝いたします。最後に、研究に貴重なご助言とご協力を頂きました高松宏行博士、山口典夫博士を始めとします共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Wang Y. J., Wang J., Zhang H. Y., He H. B., Tang X., *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**, 351–357 (2007).
- 2) Kamiya S., Yamada M., Kurita T., Miyagishima A., Arakawa M., Sonobe T., *Int. J. Pharm.*, **354**, 242–247 (2008).
- 3) Niederquell A., Kuentz M., *Int. J. Pharm.*, **446**, 70–80 (2013).
- 4) Kamiya S., Nozawa Y., Miyagishima A., Kurita T., Sadzuka Y., Sonobe T., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 181–184 (2006).
- 5) Kamiya S., Kurita T., Miyagishima A., Arakawa M., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **35**, 1022–1028 (2009).
- 6) Devi S., Williams D., *J. Pharm. Sci.*, **102**, 4246–4255 (2013).
- 7) Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesàro A., *Int. J. Pharm.*, **455**, 219–228 (2013).
- 8) Kamiya S., Kurita T., Miyagishima A., Itai S., Arakawa M., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **74**, 461–466 (2010).
- 9) Kamiya S., Takamatsu H., Sonobe T., Nakashima K., *Int. J. Pharm.*, **465**, 97–101 (2014).