

DDS製剤の開発を目指した、 W/Oエマルジョン脱水法によるS/O/Wエマルジョンの調製*

清水 正高*¹・中島 忠夫*²

Preparation of S/O/W Emulsion by Dehydrating W/O Emulsion
to Develop DDS Medicine

Masataka SHIMIZU and Tadao NAKASHIMA

これまで膜乳化により微細W/O/Wエマルジョンの調製を試みてきたが、実用的な方法でW/O粒子の大きさを500nm以下に制御することは困難であった。静注用DDS製剤の場合、安定性に優れ、薬物封入量が多く、粒径が500nm以下の薬物キャリアが求められる。そこで、こうした要求を満たす剤形として新たにS/O/Wエマルジョンを検討した。本研究の結果、W/Oエマルジョンを脱水して薬物を濃縮することにより油相中に薬物のナノ粒子が安定分散したS/Oサスペンションを生成し、これを分散相にして膜乳化を行って500nm以下に粒径制御されたS/O/Wエマルジョンを調製できることが明らかになった。また、界面張力が低いエマルジョン組成のものほど粒径を制御しやすいことも明らかになった。

キーワード：膜乳化法、DDS、S/O/Wエマルジョン、W/Oエマルジョン、薬物キャリア

1 はじめに

筆者らは、現在、抗癌剤の塩酸イリノテカン capsulized 新たなDDS製剤の開発に取り組んでいる。塩酸イリノテカンは高い抗腫瘍性があり、多種類の腫瘍に有効な多様性を有しているが、副作用が強いことでも知られている。その副作用を低減し、薬効を効果的に発現できる形態に製剤化した場合、癌治療に大きな貢献ができると期待されている。本研究では、塩酸イリノテカンの製剤化に適していると予想されるエマルジョン製剤の開発を実施した。この研究は、図1に示す実用化を想定したステップの第1段階にすぎないが、今後の方向を決定する上で重要である。

一方、これまで筆者らは、膜乳化法によるW/O/Wエマルジョンの粒子設計技術¹⁾を応用し、ドラッグデリバリーシステム (DDS) における薬物キャリアの開発を行ってきた。しかしながら、

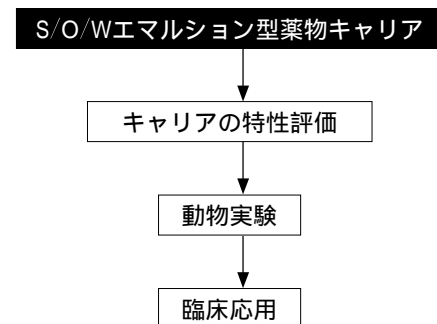


図1 DDS開発プロジェクトにおける本研究の位置付け

現在の膜乳化技術では、W/O粒子径500nm以下のW/O/Wエマルジョン型液体カプセルを調製することが難しく、このことがDDS製剤、特に静注製剤²⁾の開発を遅らせる要因となっていた。静注製剤として500nm以下の粒径は必須の条件であり、その調製には、あらかじめ水滴を100~200nm以下の大きさにしておく必要がある。もし、これより水滴径が大きい場合、SPG膜で水滴が過されたり、あるいは細孔内で解乳化して薬物の封入率は極めて低くなる。しかし、こうした微細領域の水滴径制御は技術的に難しく、実現性に乏

* 乳化型DDS製剤の製造技術に関する研究
(第8報)

* 1 材料開発部

* 2 工業技術センター所長

しいと考えられてきた。

そこで本研究では、水溶性薬物をナノ粒子にして油相に分散させ、これを分散相とする粒径500 nm以下、望ましくは静注製剤として十分使用可能な200nm以下に制御した図2のS/O/Wエマルションを検討した。数10nm以下のナノ粒子であればSPG膜をスムーズに透過し、膜乳化により微細なエマルションが容易に生成すると予想された。しかし、薬物の粉末を油相の中で強制的に分散してもナノ粒子にはならない。本研究では、あらかじめ調製したW/Oエマルションを脱水することにより水滴中の薬物を濃縮し、ナノ粒子を生成した。膜乳化は予備乳化/膜透過併用法で行い、粒径500nm以下のS/O/Wエマルションを調製する最適条件について検討した。その結果、本法は、塩酸イリノテカンの製剤化が可能な製法であることが明らかになったので報告する。

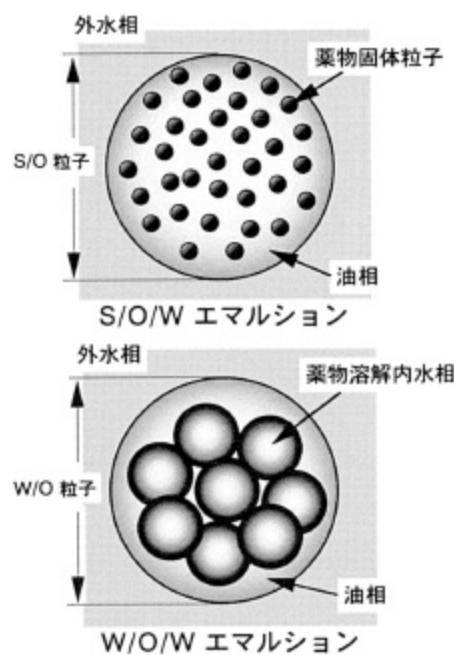


図2 S/O/WエマルションとW/O/Wエマルションの概念図

2 実験方法

2-1 S/Oサスペンションの調製実験

実験条件および界面活性剤などの物質一覧を表1に示す。ここでは塩酸イリノテカンの代替物質としてメチレンブルー、油性界面活性剤にはテトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステルTGCR（阪本薬品工業、CR-310）とショ糖エルカ酸エステル（三菱化学フーズ、ER-290）を用い、実験操作は図3に従って行った。すなわちメチレンブルー水溶液と油相のW/Oエマルションを調製し、これをエバポレーターにより窒素ガス雰囲気下で2～3時間かけて脱水した。油性界面活性剤にTGCRあるいはER-290を使用する表1の条件で

は、ホモミキサーにより比較的水滴径の揃ったW/Oエマルションが生成した。ただし、 $1\mu\text{m}$ を超える水滴が確認された場合には、細孔径 $D_m = 1\mu\text{m}$ のSPG膜を透過し、水滴径をサブミクロン領域に調節した。得られたS/Oサスペンションはレーザー回折/散乱式粒度分布計（島津製作所、SALD-2000）により粒子径分布、紫外可視吸光度計（島津製作所、Multi Spec-1500）により油相への封入量を測定した。封入量を上げたい場合は、S/Oサスペンションに再度メチレンブルー水溶液を添加してW/Oエマルションを調製し、上記操作を繰り返した。

表1 S/Oサスペンションの調製条件

| | | |
|-----|--------------------------|---|
| 溶 質 | メチレンブルー | 濃度 $C_s = 2.7 \sim 53\text{mmol/l}$ 飽和溶解度の浸透圧 $= 67\text{kPa}$ |
| 油 相 | 大豆油 + 油性界面活性剤 油性界面活性剤 | テトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステル TGCR ショ糖エルカ酸エステル ER-290 濃度 5～25wt% |
| 乳 化 | ホモミキサー | 24000rpm, 1分間 |
| 脱 水 | エバポレーター | 45℃, 20kPa, N_2 ガス雰囲気 |

2 - 2 S/O/Wエマルジョンの調製実験

S/Oサスペンションを分散相とする粗なS/O/Wエマルジョンを予備乳化して調製し、これをSPG膜に透過する膜乳化法によって微細なS/O/Wエマルジョンを生成した。実験フローを図3、実験条件を表2に示す。予備乳化はスターラーで行った。水性界面活性剤にはポロクサマー-188（Green Cross）、コール酸ナトリウム（和光純薬工業）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（日光ケミカルズ、HCO-60）を用いた。メチレンブルー水溶液および外水相の浸透圧は浸透圧計（Hermann Boebling Messtechnik）により測定した。

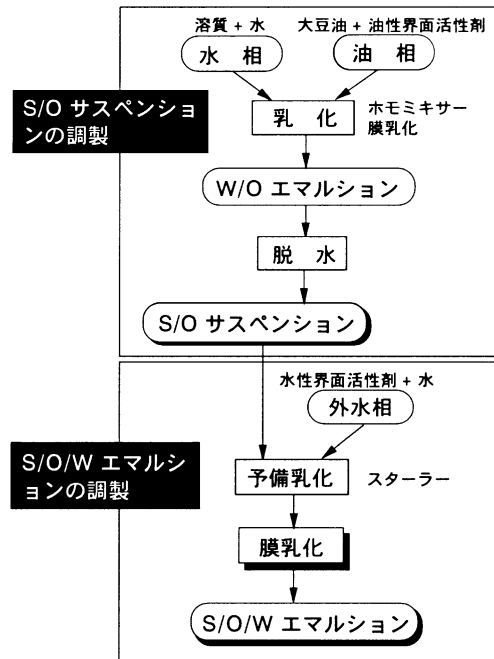


図3 実験フロー

3 結果及び考察

3 - 1 S/Oサスペンションの調製

初期平均水滴径 $D_w = 500\text{nm}$ のW/Oエマルジョンを脱水濃縮したS/Oサスペンションの粒径分布を図4に示す。水滴径分布がそのまま小さい方へシフトしてS/Oサスペンションの固体粒子径分布に移行することが明らかである。また、W/Oエマルジョン内水相のメチレンブルー初期濃度 C_s が低いものほど小さくなり、 2.7mmol/l の場合、固体平均粒子径 D_s はほぼ $1/10$ の 45nm になった。水滴は合一することなくナノ粒子を形成すると仮

定して求めた粒子径 D_s と初期水滴径 D_w の関係式は次のとおりである。

$$D_s = (M_s C_s / \rho)^{1/3} D_w \quad (1)$$

ここで M_s は溶質の分子量、 C_s は水滴中の溶質濃度、 ρ は溶質の密度である。図4で得られた D_s と C_s の関係を図5に示す。実測値は(1)式の計算値

表2 S/O/Wエマルジョンの調製条件

| | |
|-------------|--|
| 膜乳化 | SPG膜 細孔径 0.20, 0.36, 0.45, 1.70 μm 透過圧力 $\Delta P = 1 \sim 3 \text{MPa}$ |
| 油相 | 大豆油 + 油性界面活性剤 油性界面活性剤 テトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステル TGCR ショ糖エルカ酸エステル ER-290 濃度 5 ~ 25wt% |
| 水相 | 水性界面活性剤 ポロクサマー-188 + コール酸ナトリウム ポリオキシエチレン (60) 硬化ヒマシ油 HCO-60 濃度 1 wt% グルコース 5 wt% 浸透圧 = 760kPa |
| O/Wエマルジョン | a-O/Wエマルジョン : (大豆油 + ER-290)(ポロクサマー + コール酸 Na) b-O/Wエマルジョン : (大豆油 + TGCR)(ポロクサマー + コール酸 Na) c-O/Wエマルジョン : (大豆油 + TGCR)(HCO-60) |
| S/O/Wエマルジョン | b-S/O/Wエマルジョン : (溶質 + 大豆油 + TGCR)(ポロクサマー + コール酸 Na) c-S/O/Wエマルジョン : (溶質 + 大豆油 + TGCR)(HCO-60) |

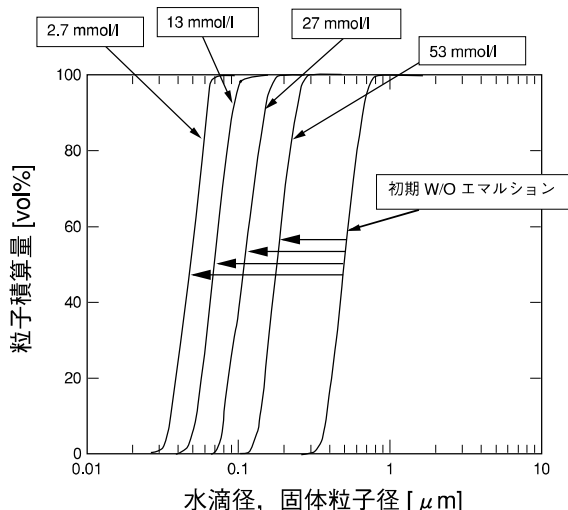


図4 S/Oサスペンションの固体粒子径分布

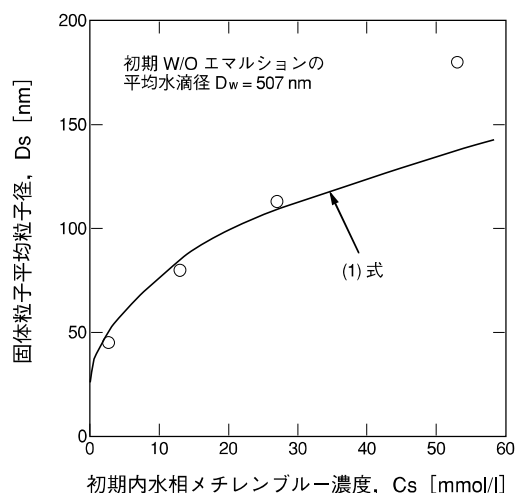


図5 固体粒子平均径の測定値と計算値の比較

とほぼ一致しており、先の仮定が成立し、ナノ粒子の粒径制御は C_s と D_w によって可能であると考えられる。また、得られたS/Oサスペンション中のナノ粒子は極めて安定で凝集はほとんど見られなかった。一方、初期水滴径が大きく、数 $10\mu\text{m}$ の粒子が形成された場合、あるいはメチレンブルー粉末を油相の中で強制的に分散した場合には、粒子の凝集および沈降が起こった。粒子の分散安定性には粒子径とその分布が深く関与していると推測される。従って、安定なS/Oサスペンション調製には、大きな水滴が混在しない均一で小さな水滴径分布のW/Oエマルションを先に調製しておく必要があると考えられる。また、油性界面活性剤にER-290を使用した場合も上記と同様の結果

が得られた。

3 - 2 微細O/Wエマルションの調製

S/O/Wエマルション調製を試みる前に、予備乳化/膜透過併用法により粒径 500nm 以下のO/Wエマルション調製に必要な乳化条件を検討した。外水相の水性界面活性剤にポロクサマー188とコール酸ナトリウムを用いた場合 (aとb-O/Wエマルション) およびHCO-60を用いた場合 (c-O/Wエマルション) の結果を図6に示す。ここでは予備乳化した粗なO/Wエマルションを細孔径 $D_m = 1.70\mu\text{m}$ のSPG膜に4回透過し、その後 $D_m = 0.36\mu\text{m}$ の膜に4回透過して透過流速 J 、油滴径と膜細孔径の関係 D_o/D_m 、粒径分散係数の変化を調べた。いずれも膜の透過回数にかかわらず単分散O/Wエマルションであったが、油性界面活性剤がER-290のa-O/WエマルションとTGCRのb-O/Wエマルションでは細孔径より小さな油滴が生成し、膜透過を繰り返すことによってより小さくなった。

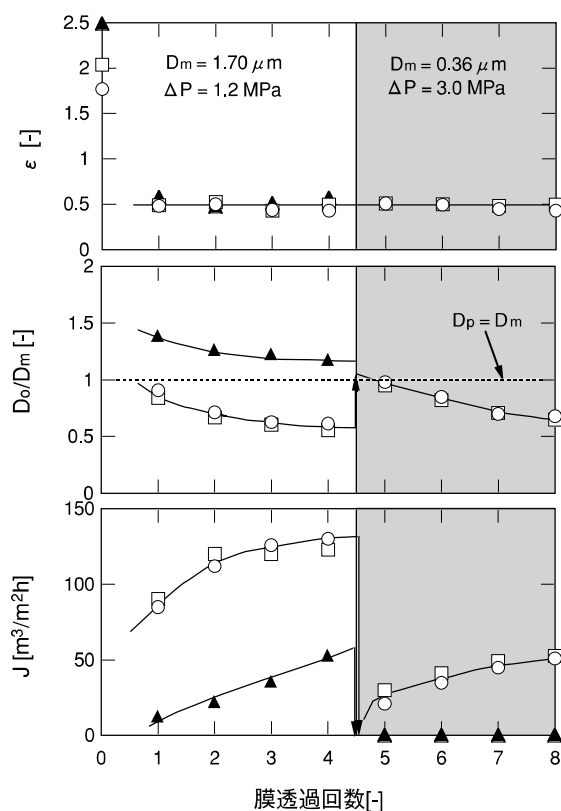


図6 膜乳化に及ぼすO/Wエマルション組成の影響

○ : a-O/Wエマルション、 △ : b-O/Wエマルション
□ : c-O/Wエマルション

そのため膜抵抗が低下してJは上昇した。一方、c-O/Wエマルションでは細孔径より大きな油滴が形成され、またJは低く、 $D_m = 0.36\mu\text{m}$ の膜に代えると透過圧力 $\Delta P = 3.0\text{MPa}$ では膜を透過しなかった。aとb-O/Wエマルションの界面張力が 1.9mN/m 、c-O/Wエマルションが 5.5mN/m であることから、この界面張力が油滴の分裂機構に影響を及ぼしていると考えられる。こうしたO/Wエマルション生成の概念を図7に示す。

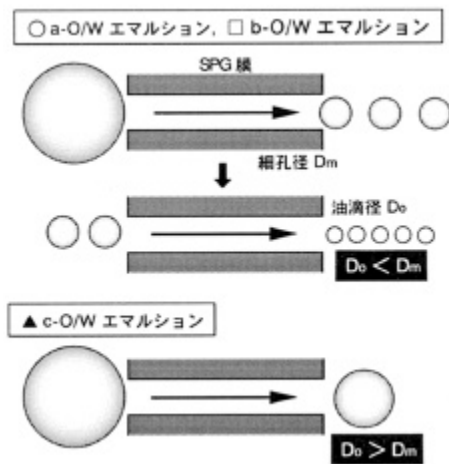


図7 O/Wエマルション生成の概念図

3-3 S/O/Wエマルションの調製

3-2の結果を踏まえてS/O平均粒子径 $D_{s/o}$ が 200nm 程度になるようなS/O/Wエマルションの調製を試みた。あらかじめスターラーを用いる第1段予備乳化によって固体平均粒子径 $D_s = 95\text{nm}$ のメチレンブルー粒子を油滴に封入した粗な多分散S/O/Wエマルションをつくった。次に、膜乳化による粒径変化を正確に調べるため、粗S/O/Wエマルションを $D_m = 0.45\mu\text{m}$ のSPG膜に透過して単分散化する第2段予備乳化を行った。ただし、b-S/O/WエマルションはS/O平均粒子径が $D_{s/o} = 300\text{nm}$ 、c-S/O/Wエマルションでは 530nm になった。

本来ならこれら第2段予備乳化エマルションの $D_{s/o}$ を同じ大きさにすることが望ましいが、上記の理由でc-S/O/WエマルションのS/O粒子は D_m より小さくならないことから、 $D_{s/o}$ を 300nm に近づけることが困難であった。一方、b-S/O/Wエマルションの $D_{s/o}$ を 530nm にすることも、 200nm

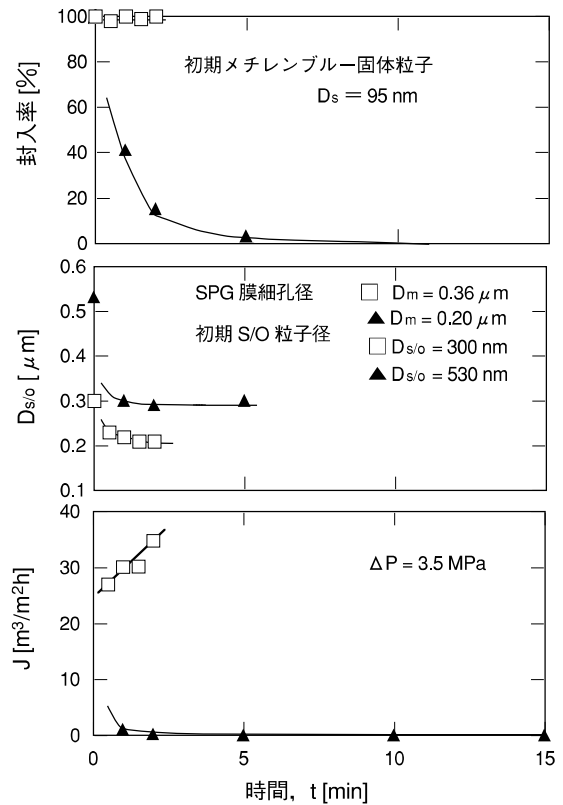


図8 膜乳化に及ぼすS/O/Wエマルション組成の影響とS/O粒子径と膜細孔径の関係
□ b-S/O/Wエマルション、
▲ c-S/O/Wエマルション

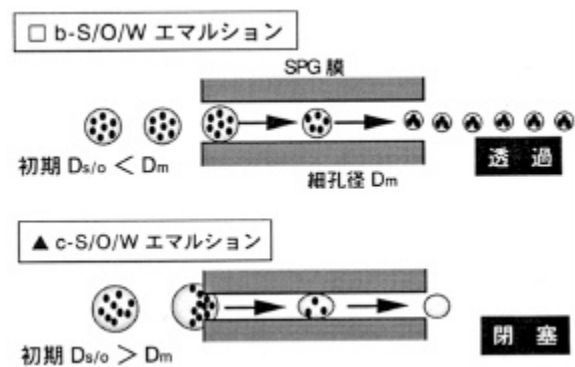


図9 S/O/Wエマルション生成の概念図

まで微細化する本研究目的にそぐわないと判断されたため、第2段の予備乳化エマルションをそのまま膜乳化に使用した。

b-S/O/Wエマルションでは、膜乳化によって D_m より小さな $D_{s/o}$ にすることができ、c-S/O/Wエマルションでは D_m より若干大きな $D_{s/o}$ になると予想される。そこで、 200nm のS/O粒子生成を狙った本実験では、b-S/O/Wエマルションにおいて

$D_m = 0.36\mu\text{m}$ のSPG膜、c-S/O/Wエマルションにおいて $0.20\mu\text{m}$ の膜を用い、膜乳化を継続しながら封入率、 $D_{s,o}$ および透過流束 J の経時変化を測定した。得られた結果を図8示す。b-S/O/Wエマルションでは D_m より小さな $D_{s,o}$ のS/O粒子が膜を透過するため、メチレンブルー粒子の目詰まりが生じることなく高い封入率と J を確保できた。一方、c-S/O/Wエマルションでは、封入率と J が急激に低下した。 D_m より大きなS/O粒子が細孔内を透過する際に、油滴中のメチレンブルー固体粒子と細孔壁が接触し、目詰まりを起こしたためと考えられる。こうしたS/O/Wエマルション生成の概念を図9に示す。

以上のことから、界面張力が低いaあるいはb-S/O/Wエマルションでは、高い封入率を維持したまま $D_{s,o}$ を200nm以下に制御することが可能であり、本法は静注用マイクロキャリアの製法として利用できる可能性があると考えられる。

4 まとめ

塩酸イリノテカン封入DDS製剤を開発するための第1ステップとして、S/O/Wエマルション型の新たなマイクロキャリアを検討した。その結果、あらかじめ調製したW/Oエマルションを脱水すると水滴中の薬物が濃縮され、安定した薬物のナノ粒子を生成することが明らかになった。次に、界面張力が低いエマルション組成を選ぶと、予備乳化/膜透過併用の膜乳化法により微細なO/Wエマルションが容易に調製できることを見出した。これらの結果に基づき調製したS/O/Wエマルションは、薬物の高い封入率を保持したまま粒径を500nm以下に制御でき、本法によって、塩酸イリノテカンの製剤化が可能であることが明らかになった。

5 参考文献

- 1) 中島忠夫, 清水正高, 久木崎雅人, 膜, 24, 278 (1999)
- 2) 清水正高, 中島忠夫, 第34回SPG国際フォーラム講演要旨集, 54 (2000)