

学位論文（博士）

難水溶性化合物の Non-Sink 条件下における膜透
過性機構に関する研究

Mechanistic study of permeation for poorly soluble
drugs under non-sink conditions

2023 年 3 月

星薬科大学大学院 薬学研究科

総合薬学科専攻

薬品物理化学

杉田和也

Kazuya Sugita

目次

論文リスト	1
略号リスト	2
序論	3
【理論】本研究で用いる膜透過モデルに関する説明	10
【第1章】Non-Sink 条件下における投与量に依存した膜透過性向上に関する研究	17
【1-1】緒言	17
【1-2】結果および考察	21
【1-2-1】Griseofulvin の Flux 量	21
【1-2-2】Triamcinolone の Flux 量	26
【1-2-3】透過膜および非攪拌水層の膜透過性	29
【1-2-4】Non-Sink 条件下における膜透過メカニズム	31
【1-2-5】Non-Sink 条件下における非攪拌水層の見かけの厚さ	33
【1-2-6】Non-Sink 条件下における Dose 量に依存した膜透過性の向上効果	34
【1-3】小括	37
【第2章】Non-Sink 条件下における界面活性剤による Solubility-Permeability Interplay に関する研究	38
【緒言】	38
【2-2】結果および考察	39
【2-2-1】Griseofulvin 及び Triamcinolone の溶解度	39
【2-2-2】Griseofulvin の Flux 量	41
【2-2-3】Triamcinolone の Flux 量	44
【2-2-4】pH6.5 緩衝液+0.05% SLS における透過膜の透過性及び非攪拌水層の膜透過性	47
【2-2-5】Sink 条件下における見かけの溶解度と膜透過性の関係	49
【2-2-6】Non-Sink 条件下における見かけの溶解度と膜透過性の関係	51
【2-3】小括	52
【第3章】Non-Sink 条件下におけるナノ粒子化が膜透過性向上をもたらす機構に関する研究	54
【3-1】緒言	54
【3-2】結果および考察	58
【3-2-1】マイクロ粒子とナノサスペンションの調製	58
【3-2-2】マイクロ粒子とナノサスペンションの粒度分布およびモフォロギ	59
【3-2-3】粉碎による結晶形の変化	63
【3-2-4】Griseofulvin の膜透過性	65
【3-2-5】Hydrocortisone の膜透過性	69
【3-2-6】透過膜および非攪拌水層の膜透過性	72
【3-2-7】Non-Sink 条件下における非攪拌水層の見かけの厚さ	74
【3-2-8】ナノ粒子化による膜透過性の向上効果	76
【3-2-9】Non-Sink 条件下におけるナノ粒子製剤の膜透過機構	79
【3-3】小括	81

総括	83
謝辞	87
実験の部	88
【第1章】 試料および実験方法	88
【1-1】 試料	88
【1-2】 膜透過性および Flux の評価	88
【1-3】 UHPLC による試料濃度の測定方法	89
【第2章】 試料および実験方法	91
【2-1】 試料	91
【2-2】 膜透過性および Flux の評価	91
【2-3】 UHPLC による試料濃度の測定方法	92
【第3章】 試料および実験方法	93
【3-1】 試料	93
【3-2】 X 線回折測定	93
【3-3】 粒度分布測定およびモフォロギ測定	93
【3-4】 膜透過性および Flux の評価	94
【3-5】 UHPLC による試料濃度の測定方法	96
参考文献	98

図の目次

Figure 1 in vitro tools for poorly soluble drugs	5
Figure 2 in vitro tools for permeability	6
Figure 3 Overview of solubility-permeability interplay	7
Figure 4 Drug molecules in donor chambers	11
Figure 5 Process of drug permeation	13
Figure 6 Drug diffusion from solid compound surface	18
Figure 7 The molecular structure of Griseofulvin (a) and Triamcinolone (b)	19
Figure 8 MicroFlux™	21
Figure 9 Griseofulvin concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.	24
Figure 10 Calculated flux of Griseofulvin	25
Figure 11 Triamcinolone concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.	27
Figure 12 Calculated flux of Triamcinolone	28
Figure 13 Proposed drug absorption mechanism under sink conditions and non-sink conditions for Griseofulvin (A) and Triamcinolone (B)	32
Figure 14 Calculated apparent UWL thickness ($h_{UWL (app)}$) of Griseofulvin for each permeability measurement	33

Figure 15	Calculated relationship between apparent permeability /flux and apparent UWL thickness for model compounds with $P_{m(U)}$ of 0.001 cm/min – 1 cm/min.	36
Figure 16	Griseofulvin concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.	42
Figure 17	Calculated flux of Griseofulvin.	43
Figure 18	Triamcinolone concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.	45
Figure 19	Calculated flux of Triamcinolone.	46
Figure 20	Calculated relationship between flux/apparent permeability and apparent solubility under sink conditions for griseofulvin.	50
Figure 21	Calculated flux-apparent solubility relationship under sink conditions for Griseofulvin.	52
Figure 22	Calculated flux of Griseofulvin for 50 – 100 μ m apparent UWL thickness.	52
Figure 23	The molecular structure of griseofulvin (a) and hydrocortisone (b).	57
Figure 24	PSD of griseofulvin samples (a) and hydrocortisone samples (b).	60
Figure 25	SEM image of griseofulvin samples (a-c) and hydrocortisone samples (d-e).	62
Figure 26	X-ray powder diffraction pattern of griseofulvin samples (a) and hydrocortisone samples (b).	64
Figure 27	Griseofulvin concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.	67
Figure 28	Calculated apparent permeability (P_{app}) of Griseofulvin.	68
Figure 29	Comparison of P_{app} of nanosuspension griseofulvin under non-sink conditions and sink conditions.	68
Figure 30	Hydrocortisone concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.	70
Figure 31	Calculated apparent permeability (P_{app}) of Hydrocortisone.	71
Figure 32	Calculated unstirred water layer (UWL) thickness under sink and non-sink conditions for micro-particle samples and for nanosuspensions.	75
Figure 33	Calculated permeability improvement effect for microparticle and nanoparticle compounds under non-sink conditions.	78
Figure 34	Proposed mechanism of permeability improvement by nanoparticle formulations.	80

表の目次

Table 1	List of parameters for permeability	12
Table 2	Physicochemical properties of Griseofulvin and Triamcinolone.	20
Table 3	Samples in donor chambers for permeability measurements	22
Table 4	Measured and calculated permeability in pH6.5 buffer	30
Table 5	Solubility and UFD amount of Griseofulvin and Triamcinolone at 37°C in each test media	40

Table 6	Measured and calculated permeability in pH6.5 buffer+0.05%SLS	48
Table 7	PSD parameters of griseofulvin and hydrocortisone samples	61
Table 8	Calculated permeability of griseofulvin	72
Table 9	Calculated permeability of hydrocortisone.....	73
Table 10	Test conditions for permeability measurements	88
Table 11	Test conditions for UHPLC measurements	89
Table 12	Samples in donor chambers for permeability measurements	92
Table 13	Test conditions for X-ray powder diffraction measurements	93
Table 14	Test conditions for permeability measurements	94
Table 15	Samples in donor chambers for permeability measurements	95
Table 16	Test conditions for UHPLC measurements	96

論文リスト

論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

第1章 Non-Sink 条件下における投与量に依存した膜透過性向上に関する研究

第2章 Non-Sink 条件下における界面活性剤による Solubility-Permeability Interplay に関する研究

Kazuya Sugita, Noriyuki Takata, and Etsuo Yonemochi. Dose-Dependent Solubility-Permeability Interplay for Poorly Soluble Drugs under Non-Sink Conditions.

Pharmaceutics 2021, 13, 323

第3章 Non-Sink 条件下におけるナノ粒子化が膜透過性向上をもたらす機構に関する研究

Kazuya Sugita, Noriyuki Takata, and Etsuo Yonemochi. Non-Effective Improvement of Absorption for Some Nanoparticle Formulations Explained by Permeability under Non-Sink Conditions. *Pharmaceutics* 2022, 14, 816

略号リスト

本論文では以下の略語を用いた。

AOT:	Dioctyl sulfosuccinate
ASB:	Acceptor sink buffer
DLS:	Dynamic light scattering
DMA:	<i>N,N</i> -Dimethylacetamide
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
MeCN:	Acetonitrile
MeOH:	Methanol
NaCl:	Sodium chloride
NaH ₂ PO ₄ :	Sodium dihydrogen phosphate
NaOH:	Sodium hydroxide
PSD:	Particle size distribution
PTFE:	Polytetrafluoroethylene
PVDF:	Polyvinylidenefluoride
PVP K30:	Polyvinylpyrrolidone K30
SEM:	Scanning electron microscopy
SLS:	Sodium lauryl sulfate
TFA:	Trifluoroacetic acid
UHPLC:	Ultra high performance liquid chromatography
UV:	Ultraviolet
UWL:	Unstirred water layer

序論

医薬品開発においては、より高い薬効の実現と適応疾患領域の広範囲化が重要な課題である。この課題を解決するために、近年、医薬品候補化合物の分子構造はより複雑化、高分子量化している¹⁾。その結果、多くの医薬品候補化合物は Biopharmaceutical Classification System (BCS) Class II もしくは IV にカテゴライズされる難水溶性化合物となり、難吸収性（低吸収性）という課題を持つ¹⁻³⁾。これら難水溶性化合物の吸収性に関する課題を改善するために、様々な可溶化製剤技術が開発されてきた。例えば、シクロデキストリンや界面活性剤などの可溶化添加剤の利用、Amorphous Solid Dispersions (ASDs)、ナノ粒子製剤である⁴⁻⁶⁾。可溶化製剤技術は多くの医薬品候補化合物の吸収性改善に成功しており、可溶化製剤技術を利用した複数の医薬品が既に医薬品として承認され、市場で販売されている。

経口医薬品において、化合物の吸収量はその溶解度と膜透過性に比例する。このことから、医薬品開発において、化合物の吸収性は溶出試験と膜透過性評価の *in vitro* 評価技術（以下 *in vitro* tool）によって評価されている。*in vitro* tool は医薬品開発のあらゆる段階で重要な役割を果たしている。前臨床段階における処方や可溶化製剤技術の選択^{3,7-9)}、臨床開発段階における商用生産に向けた製法の最適化及び製造スケールアップ⁹⁾、商用段階における品質管理や後発医薬品の生物学的同等性評価に用いられる¹⁰⁻¹⁶⁾。しかしながら、多くの研究において、難水溶性化合物における *in vitro* tool の評価結果と *in vivo* の吸収性が合致しないことが報告されてきた¹⁶⁻²¹⁾。この *in vitro* tool と *in vivo* の不一致は医薬品開発において決定的な課題をもたらすことになる。例えば、臨床試験において開発した医薬品が期待された薬効を示さない、商用に向けた製造スケールアップ後に医薬品の吸収量に変化する（場合によっては薬効が変化する）、後発医薬品の生物学的同等性が成立しない、といった課

題である。これらの課題は、医薬品開発期間の長期化、後発医薬品が開発されないことで医薬品価格の高価格化に繋がりをうる。難水溶性化合物の経口医薬品開発は、より有効な医薬品が開発される可能性がある一方、開発を成功させることが難しい、医薬品産業で長年続く課題の一つとなっている。

難水溶性化合物における *in vitro* tool の評価結果と *in vivo* の吸収性の不一致は、次の2点が主な原因と考えられている。

- ・ 可溶化製剤技術を用いることで、消化管内における薬物化合物の分子状態が複雑化する。この複雑化が、溶出性と膜透過性に影響するが、*in vitro* tool では反映されない。
- ・ *in vitro* tool と生体の消化管内構造が異なる。例えば、*in vitro* tool で使用する試液（緩衝液）と消化液の組成の違い、*in vitro* tool と生体の消化管の動きの違いなどである。

溶出試験においては、この2つの課題を解決するために、消化管内の機構を模擬した様々な試験法（以下 Biorelevant 溶出試験法）が開発されてきた。例えば、「生体模擬液を用いた溶出試験法」「胃から小腸への移行を評価する pH-Transfer モデル」などである。（Figure 1）Biorelevant 溶出試験法は、多くのアカデミア、医薬品企業の研究者によって研究されてきた。欧州の大学と製薬企業によって形成されたコンソーシアム、OrBiTo (Oral biopharmaceutics tools)はその代表である。その結果、試験条件、解析手順ともに開発され、多くの難水溶性化合物の *in vivo* の吸収性予測を成功させてきた。既に多くの医薬品会社において、Biorelevant 溶出試験法の利用は一般的なものになりつつある。Biorelevant 溶出試験法の開発によって、難水溶性化合物の *in vivo* の吸収性予測は大きく進歩したが、未だに多くの難水溶性化合物の研究において、*in vitro* tool の結果と *in vivo* の吸収性の不一致が報告されている。

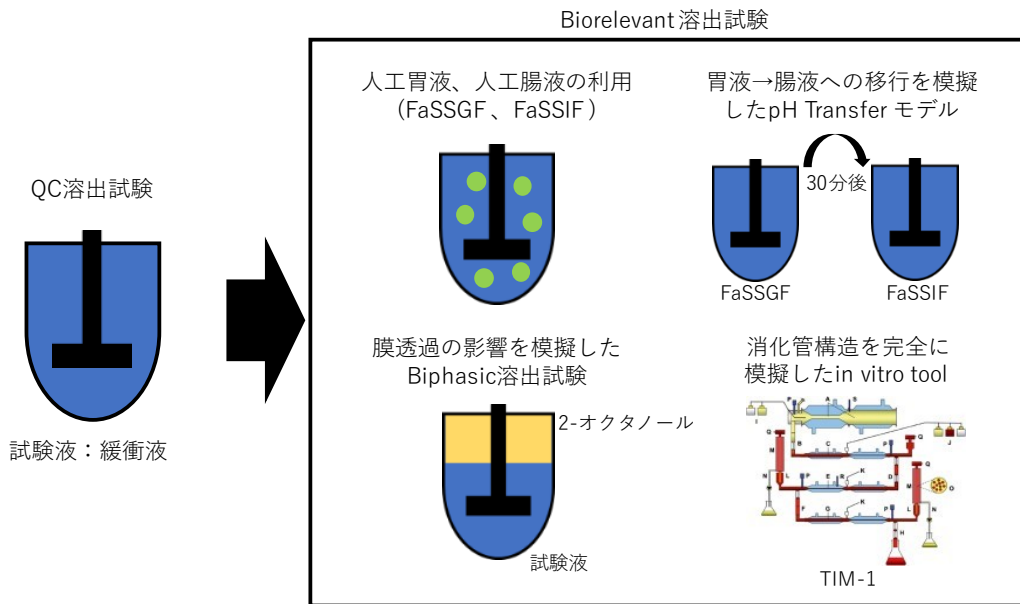


Figure 1 in vitro tools for poorly soluble drugs

医薬品開発において化合物の膜透過性の評価は、人工膜を利用した Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) と細胞膜を利用した Coco-2 細胞によって行われる²²⁻²³⁾。(Figure 2) 長年、PAMPA や Caco-2 細胞から求められた膜透過性は化合物の固有値として取り扱われてきた。しかしながら、可溶化製剤を用いた難水溶性化合物において、消化管内における化合物の分子状態の複雑化が膜透過性に影響することが近年の研究で報告されている。このことが、難水溶性化合物の in vitro tool の結果と in vivo の吸収性の不一致を引き起こす主要な原因になり得る。

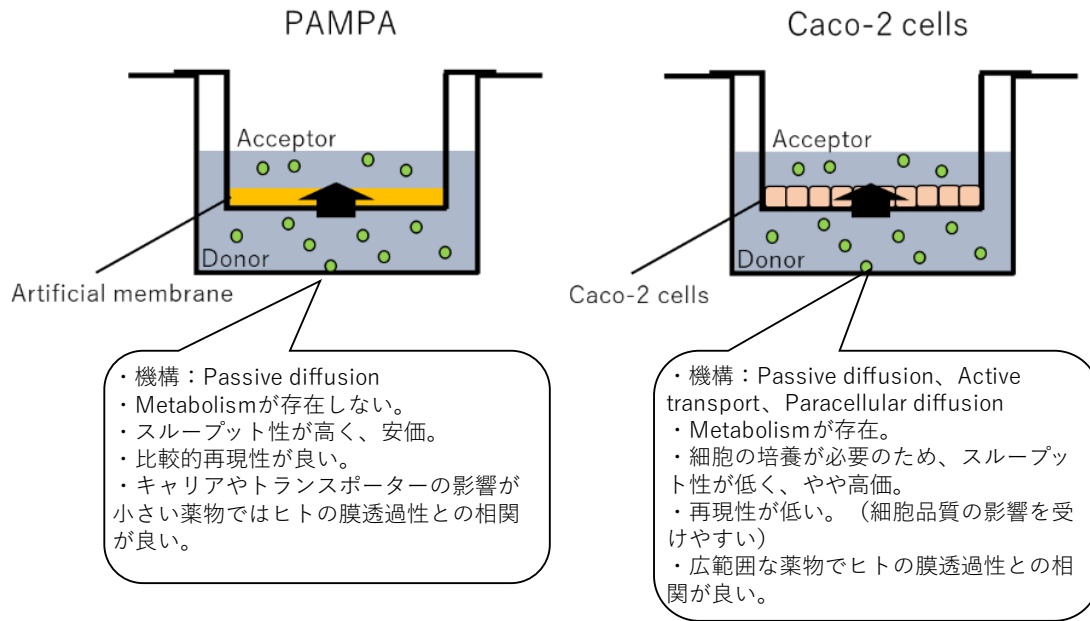


Figure 2 in vitro tools for permeability

可溶化製剤が膜透過性に影響する重要な事象として Solubility-Permeability Interplay がある。界面活性剤やシクロデキストリンなどの可溶化添加剤は化合物の見かけの溶解度を向上する一方、見かけの膜透過性が低下する。界面活性剤やシクロデキストリンにおいては、化合物と複合体を形成することで、見かけの溶解度を向上する。しかしながら、この複合体は生体膜を透過しない（もしくは極めて遅く透過する）ため、化合物の見かけの膜透過性が低下する。この現象を消化管内レベルで図示すると Figure 3 となる。経口投与された薬物化合物は、消化管内で複数の分子状態を形成する。イオン化した状態、ミセル内に取り込まれた状態、別の分子と複合体を形成した状態、Liquid-Liquid Phase Separation (LLPS) などである。このうち、イオン化していないフリー状態の分子（分子型状態の分子、以下 Un-ionized Free Drugs (UFDs))のみが生体膜を透過することができ、膜透過性に寄与する。脂質から形成される生体膜を透過するには、この脂質に化合物が分配される必要がある。UFDs 以外の分子状態は親水性が高く、殆ど分配しない。従って、可溶化製剤

技術を用いた場合、溶出試験から得られる結果のみからは in vivo の吸収性を予測することは困難になることがしばしば引き起こる。既に複数の in vitro と in vivo の研究で、Solubility-Permeability Interplay が吸収性に影響することが報告されている。Beig の研究では、シクロデキストリンが引き起こす Solubility-Permeability Interplay と吸収性に対する影響を in vitro の評価法で報告している²⁴⁻²⁶。Miller の研究では、同様の現象を界面活性剤 Sodium lauryl sulfate (SLS)で確認している²⁷。Hens の研究では、消化管内の Bile ミセルによる Solubility-Permeability Interplay が Fenofibrate の吸収量に影響することを、健常人に対する臨床試験結果を用いて報告している²⁸。

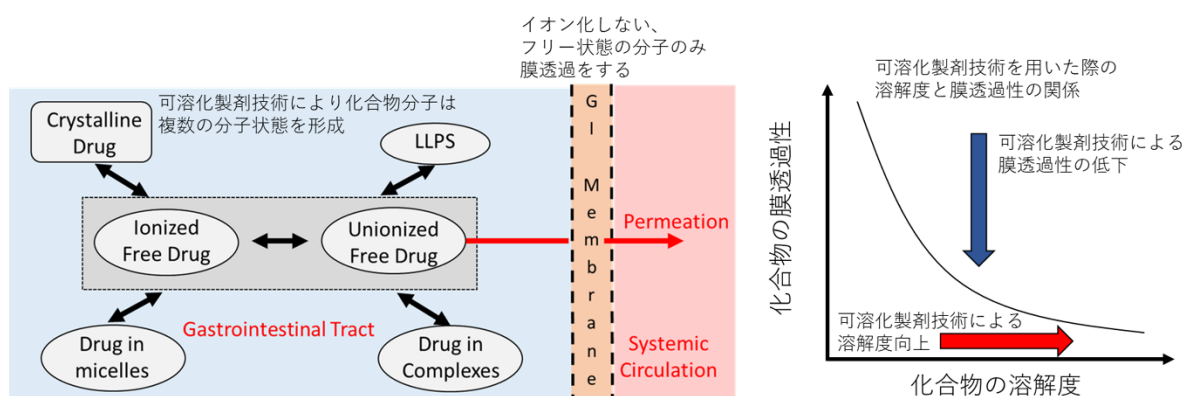


Figure 3 Overview of solubility-permeability interplay

上述の分子状態だけでなく、溶解していない固体薬物成分も膜透過速度に寄与することが近年の研究で示唆されている²⁹⁻³¹。これらの研究においては、化合物が完全に溶解していない Non Sink 条件では、化合物が完全に溶解している Sink 条件よりも膜透過性が高くなることが報告されている。既存の PAMPA や Caco-2 細胞を用いた膜透過性の評価は、化合物が全て溶解した Sink 条件で評価されている。また、難水溶性化合物の多くは消化管内で完全に溶解せずに Non Sink 条件にある。従って、難水溶性化合物の膜透過性は既存の評価技術では低く見積もられている可能性

がある。Solubility-Permeability Interplay 及び Non-Sink 条件下の膜透過性は近年の研究から吸収性への影響が示されているものの、そのメカニズムや吸収性への定量的な影響は明らかにされていない。いずれの事象も多くの難水溶性化合物で起こる可能性が高いことから、これらの課題を解決することは、難水溶性化合物の吸収性のより正確な予測へと繋がる。

本研究の目的は、難水溶性化合物で可溶化製剤技術を用いた時の正確な膜透過性を求めることにある。そのために、様々な Non-Sink 条件下で膜透過性の評価を実施することで、Non-Sink 条件下及び可溶化製剤技術によって膜透過性が変化するメカニズムを明らかにし、Non-Sink 条件が膜透過性に与える定量的な影響を評価することを試みた。更に、臨床現場での投与条件を反映した、Non Sink 条件かつ可溶化添加剤存在条件における、見かけの溶解度、UFDs の濃度、見かけの膜透過性の関係性を明らかにすることを試みた。本研究は以下の 3 章から構成される。各章の概要を以下に記載する。

第 1 章では、Non-Sink 条件下での化合物の膜透過メカニズムを明らかにするために、溶解しない固体薬物が膜透過性に与える影響を研究した。固体薬物が非攪拌水層の膜透過性に影響するメカニズムを考え、非攪拌水層の膜透過性の影響が異なる 2 つのモデル化合物を用いて、膜透過性の評価を実施した。固体薬物の影響を評価するために、固体薬物の量（以下 Dose 量）を変えて膜透過性の評価を実施した。得られた結果から、一般的な化合物において、Non Sink 条件が膜透過性及び吸収性に与える影響について定量的な考察を実施した。

第 2 章では、Non Sink 条件下における Solubility-Permeability Interplay を評価するために、第 1 章の条件に界面活性剤である SLS を添加し、見かけの溶解度と膜透過性を Non Sink 条件下で評価した。得られた結果から、SLS を添加した際の、Non

Sink 条件下の見かけの溶解度、UFDs の量、見かけの膜透過性、吸収量の関係を解析した。

第 3 章では、固体薬物の粒子径が膜透過性に与える影響を明らかにするために、薬物化合物のナノ粒子化が膜透過性に与える影響を評価した。膜透過性の評価は、第 1 章、第 2 章と同じく Non Sink 条件で実施した。親油性の異なる 2 つのモデル化合物をそれぞれ湿式ナノ粉碎し、粉碎前後の膜透過性を Non Sink 条件下で実施した。得られた結果から、ナノ粒子化による膜透過性の改善効果が、薬物化合物の親油性に依存することを確認した。さらに得られた知見を一般化するために、親油性の異なる薬物化合物がナノ粒子化によって膜透過性がどの程度改善されるか、定量的な考察を実施した。

【理論】 本研究で用いる膜透過モデルに関する説明

本章では、以降の研究で使用する膜透過モデルの説明を行う。本研究においては、化合物の膜透過プロセスのメカニズムを研究するために、以下の仮定を行っている。

- ・ 化合物は Passive diffusion によって膜透過性が決定する。(トランスポーターやキャリアは膜透過性に影響しない。)
- ・ 化合物は中性化合物であり、Donor 槽中でイオン化しない。

以降の研究における膜透過性の評価は、上記の条件が成立する化合物と試験条件で実施した。上記の条件で、可溶化添加剤（界面活性剤やシクロデキストリンなど）が Donor 槽に存在した場合、Donor 槽に存在する溶解した化合物の分子状態は UFDs もしくは可溶化添加剤との複合体になる。(Figure 4) 溶解度や膜透過性を考える際、これら複数の分子状態を一つにみなし、下付きの app を用いて、見かけの膜透過性(P_{app})、見かけの化合物濃度($C_{app(t)}$)、見かけの溶解度 (S_{app}) と記述する。

(Table 1) 一方、Donor 槽に可溶化添加剤が存在しない場合、Donor 槽に存在する溶解した化合物の分子状態は UFDs のみとなる。(Figure 4) この時、溶解度や膜透過性は化合物の固有値として、下付きの U を用いて、固有の膜透過性 (P_U)、固有の化合物濃度($C_{U(t)}$)、固有の溶解度 (S_U) と記述する。(Table 1) 以下、可溶化添加剤が Donor 槽に存在した条件における膜透過性と溶解度の関係について数学的な説明を行う。

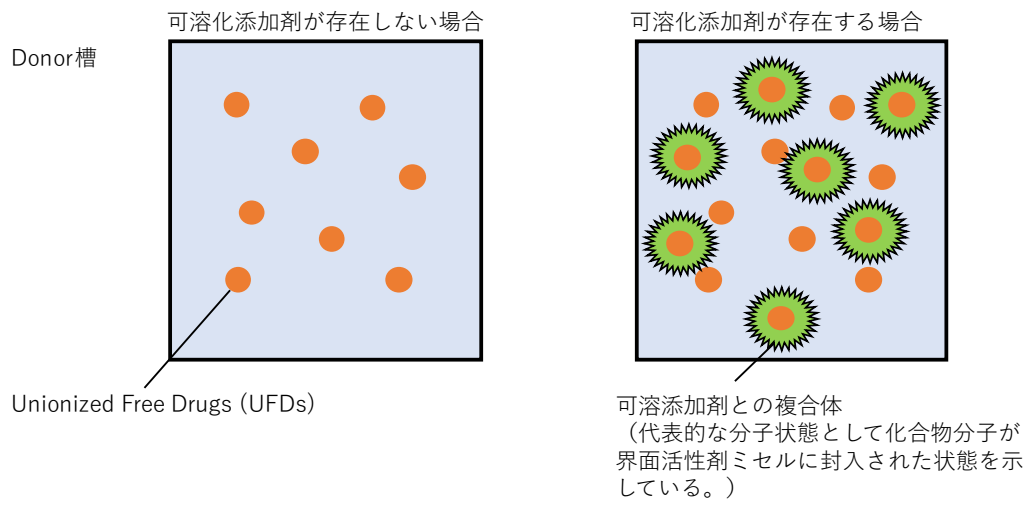


Figure 4 Drug molecules in donor chambers

Table 1 List of parameters for permeability

表記	説明
P_{app}	見かけの膜透過性
$P_{UWL(app)}$	UWL 中の見かけの膜透過性
$P_m(app)$	透過膜中の見かけの膜透過性
$C_{app(t)}$	見かけの化合物濃度
S	見かけの溶解度
$D_{aq(app)}$	見かけの水溶液中の化合物の拡散係数
$h_{UWL(app)}$	UWL の見かけの厚さ
P_U	UFDs による化合物固有の膜透過性
$P_{UWL(U)}$	UFDs による UWL 中の化合物固有の膜透過性
$P_m(U)$	UFDs による透過膜中の化合物固有の膜透過性
$C_{U(t)}$	固有の化合物濃度
S_U	可溶化添加剤が存在しない条件下の溶解度
F_U	溶液中の全分子状態における UFDs の割合
$D_{aq(app)}$	UFDs による水溶液中の化合物の拡散係数 (化合物固有値)
$h_{UWL(U)}$	UFDs に対する UWL の厚さ

Fick の第 1 則に基づくと、薬物化合物が膜透過する際の化合物の吸収速度を表す Flux ($J(t)$) は、 P_{app} と $C_{app}(t)$ を用いて、次式で表すことができる³²⁻³³。

$$J(t) = P_{app} C_{app}(t) \quad (1)$$

化合物の膜透過プロセスは UWL 中の薬物化合物の拡散、透過膜中の薬物化合物の拡散の 2 つの連続したプロセスに分けることができる。(Figure 5) UWL 中の見かけの膜透過性を $P_{UWL(app)}$ 、透過膜中の見かけの膜透過性を $P_{m(app)}$ とすると、 P_{app} は次式で表すことができる³³⁻³⁴。

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{m(app)}} + \frac{1}{P_{UWL(app)}} \quad (2)$$

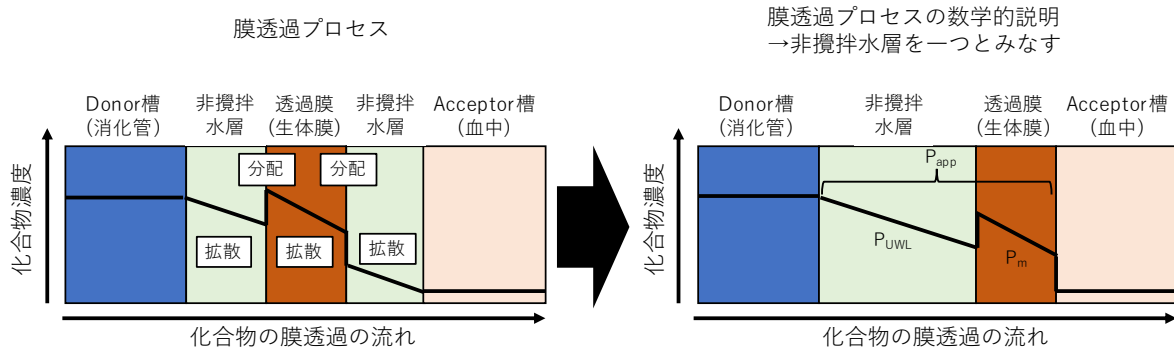


Figure 5 Process of drug permeation

ここで $P_{m(app)}$ について考える。Figure 3 で説明した通り、溶解した薬物化合物は溶液中で複数の分子状態を形成する。 $P_{m(app)}$ はこれら複数の分子状態を一つに見なした見かけのパラメーターである。一方、透過膜に分配し、透過膜中を拡散する分子状態は UFDs のみである。UFDs の透過膜の膜透過性は化合物固有値 ($P_{m(U)}$) になる。従って、溶液中で全分子状態における UFD の割合を F_U とすると、 $P_{m(app)}$ は次式で表すことができる³⁵⁾。

$$P_{m(app)} = F_U P_{m(U)} \quad (3)$$

ここで F_U は見かけの溶解度 S と可溶化成分が存在しない場合の溶解度 S_U で表すことができる。可溶化成分が存在しない場合、溶解している分子状態は UFDs のみである。

$$F_U = \frac{S_U}{S} \quad (4)$$

ここで $P_{UWL(app)}$ について考える。UWL は水溶液の相であることから、Fick の第 1 則に基づくと、 $P_{UWL(app)}$ は見かけの水溶液中の化合物の拡散係数 ($D_{aq(app)}$) を用いて次式で表すことができる。

$$P_{UWL(app)} = \frac{D_{aq(app)}}{h_{UWL(app)}} \quad (5)$$

ここで $h_{UWL(app)}$ は UWL の見かけの厚さである。ここで可溶化成分が存在しない場合、UWL 中を拡散するのは UFDs のみになる。この時の UWL 中の膜透過性は化合物固有値 ($P_{UWL(U)}$) となり、(5)式は次式となる。

$$P_{UWL(U)} = \frac{D_{aq(U)}}{h_{UWL(U)}} \quad (6)$$

ここで $h_{UWL(U)}$ 及び $D_{aq(U)}$ は、UFDs に対する UWL の厚さ、水溶液中の拡散係数で

あり、化合物固有値となる。

最後に膜透過性と溶解度の関係式を導く。膜透過試験における UWL の厚さは、化合物が膜透過するために受ける物理的なストレスに依存し、Donor 槽の攪拌条件や振とう条件で決定する³⁶⁻³⁷⁾。本研究で用いた膜透過試験ではスターラーによる攪拌が物理的ストレスとなる。膜透過速度を評価する際のスターラーの攪拌速度が一定値の時、UWL の厚さは可溶化成分の存在に依存しない、一定値と考えることができる。

$$h_{UWL(app)} = h_{UWL(U)} \quad (7)$$

式(5)における $h_{UWL(app)}$ 、式(6)における $h_{UWL(U)}$ を式(7)に代入すると、次式になる。

$$P_{UWL(app)} = P_{UWL(U)} \times \frac{D_{aq(app)}}{D_{aq(U)}} \quad (8)$$

$D_{aq(app)}$ は、各分子状態の水溶液中の拡散係数 (D_{aq}) の画分の和となる³²⁾。UFDs の割合は F_U であり、可溶化成分と結合した化合物の割合は $(1 - F_U)$ となる。可溶化成分と結合した薬物化合物の水溶液中の拡散係数を $D_{aq(B)}$ とすると、見かけの水溶液中の拡散係数 $D_{aq(app)}$ は次式で表すことができる。

$$D_{aq(app)} = F_U D_{aq(U)} + (1 - F_U) D_{aq(B)} \quad (9)$$

(6)式、(8)式、(9)式をまとめると、 $P_{UWL(app)}$ は次式で表すことができる。

$$P_{UWL(app)} = \frac{1}{h_{UWL(app)}} \{F_U D_{aq(U)} + (1 - F_U) D_{aq(B)}\} \quad (10)$$

F_U は溶解度から求められることから、(3)式は溶解度と $P_{m(app)}$ の関係式となり、(10)式は溶解度と $P_{UWL(app)}$ の関係式となる。(3)式と(10)式を(2)式に代入することで、 P_{app} と溶解度の関係式を導くことができる。また、各分子状態の水溶液中の拡散係数

(D_{aq})、膜透過試験の条件における UWL の厚さ ($h_{UWL(app)}$) が既知の場合、UFDs の膜透過性及び溶解度から各溶解状態における膜透過性を理論的に計算することができる。詳細な手順については第 2 章の研究において記載した。

【第 1 章】 Non-Sink 条件下における投与量に依存した膜透過性向上に関する研究

【1-1】 緒言

経口投与において、難水溶性化合物の多くは消化管内で完全に溶解せずに Non-Sink 条件にある。一方、既存の PAPMA 及び Caco-2 細胞における膜透過性の評価方法は、薬物が完全に溶解した Sink 条件で評価されてきた。これは、Sink 条件下を基に解析方法が開発されてきたためである。しかし、近年、溶解しない固体化合物が化合物の膜透過性の向上に寄与することを示唆することが *in vivo* と *in vitro* の評価法で報告されてきた²⁹⁻³¹⁾。これらの研究では、Non-Sink 条件の方が薬物化合物の膜透過性が速くなることを示唆されたが、研究事例が少なく、そのメカニズムの詳細については明らかにされていない。

Non-Sink 条件下における膜透過性向上のメカニズムについては、UWL における膜透過速度の向上によって、そのメカニズムを提案することができる。Figure 5 で説明した通り、化合物が膜透過において、化合物はまず UWL 中を拡散する。この拡散は濃度勾配によって起こるため、UWL 中は化合物濃度がその飽和濃度よりも低くなる。化合物が完全に溶解しない Non-Sink 条件においては、Donor 槽に固体化合物が存在する。この固体化合物の表面には飽和濃度相が形成され、バルク層に向けて溶質を拡散している³⁸⁾。(Figure 6)さらに固体化合物は UWL 中にも存在することが報告されている^{29,39-41)}。このことから、Non-Sink 条件下の UWL 中の拡散においては、Figure 5 における Donor 槽からの拡散に加えて、固体表面からの拡散の足し合わせとなる。この Non-Sink 条件の膜透過性への影響は、UWL の見かけの厚さ

の縮小化としてモデル化できる。式(5)より $h_{UWL(app)}$ が縮小化すると、 $P_{UWL(app)}$ が向上することになる。

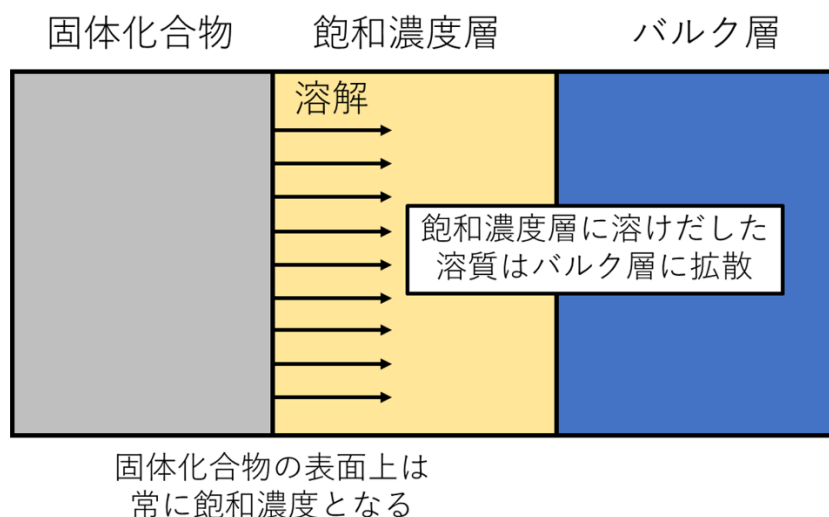
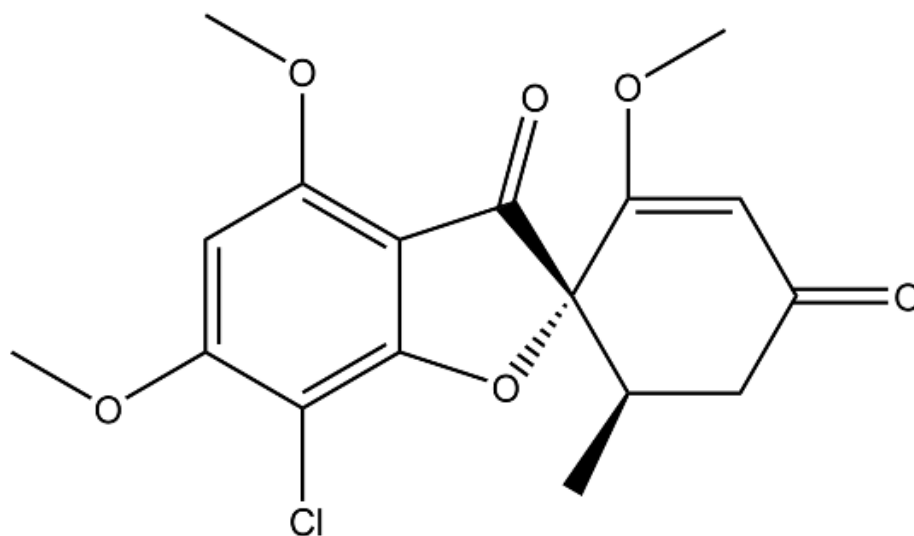


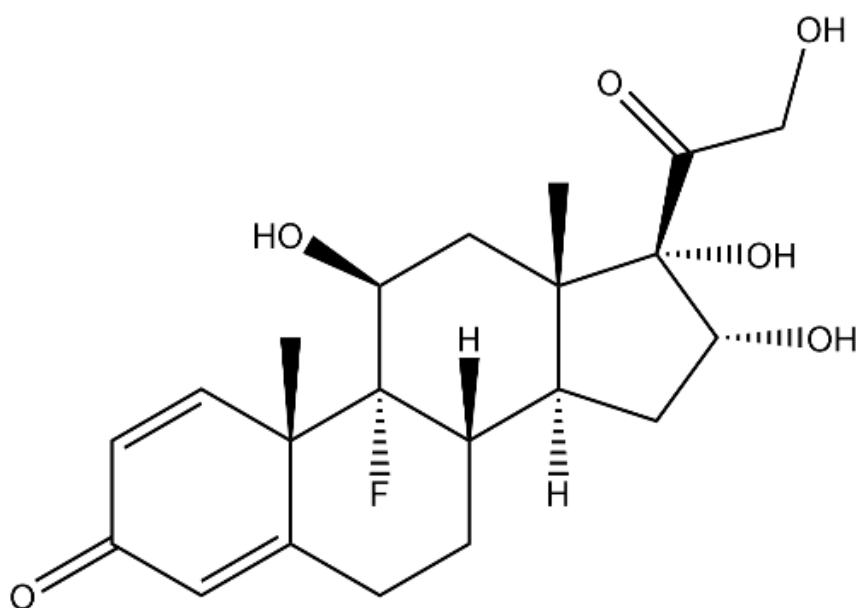
Figure 6 Drug diffusion from solid compound surface

本研究の目的は、上記のメカニズムを実験的に証明することである。実験には、親油性の高い Griseofulvin と親油性の低い Triamcinolone をモデル化合物として用いた。(Figure 7、Table 2) 各モデル化合物に対して、固体化合物の量 (Dose 量) を溶解度以上で増加させた際の膜透過性の向上効果を測定した。親油性の高い化合物は透過膜への分配が早く、膜透過における律速段階は UWL における拡散プロセスにある。従って、UWL の膜透過性が向上することで、膜透過性が向上すると考えられる。一方、親油性の低い化合物は透過膜への分配が遅く、膜透過における律速段階は透過膜における拡散プロセスにある。従って、UWL の膜透過性が向上しても膜透過性は殆ど変化しないと考えられる。つまり、親油性の異なる化合物における、固体化合物の膜透過性の向上効果の違いが、上記のメカニズムの証明となる。

加えて、本研究では固体化合物の量と膜透過性の関係性についても検証した。



(a) Griseofulvin



(b) Triamcinolone

Figure 7 The molecular structure of Griseofulvin (a) and Triamcinolone (b)

Table 2 Physicochemical properties of Griseofulvin and Triamcinolone

	Griseofulvin	Triamcinolone
Molecular weight (MW)	352.77	394.43
Ionization properties	Neutral	Neutral
Log P ¹	2.18 ^{42,43)}	1.03 ^{42,44)}
Aqueous solubility ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ²	29.9 ^{42,43)}	158 ^{42,44)}

¹ The partition coefficient is for partitioning between octanol and water.

² Aqueous solubility was measured at 37°C.

【1-2】 結果および考察

【1-2-1】 Griseofulvin の Flux 量

膜透過性及び吸収性を示す Flux 量の測定は Pion 製 MicroFlux™ で実施した。
(Figure 8) Griseofulvin 及び Triamcinolone について、Donor 槽の試料溶液を Table 3 の通り Dose 量を変化させ、Flux 量の測定を実施した。5 µg/mL dose の Griseofulvin 溶液及び 100 µg/mL dose の Triamcinolone 溶液は、化合物の溶解度以下の条件になり、Sink 条件となる。その他の試料溶液は、Dose 量が溶解度以上の条件になり、化合物が全て溶解しない Non-Sink 条件となる。Griseofulvin の Flux 量は本項、Triamcinolone の Flux 量は次項に結果を記載した。

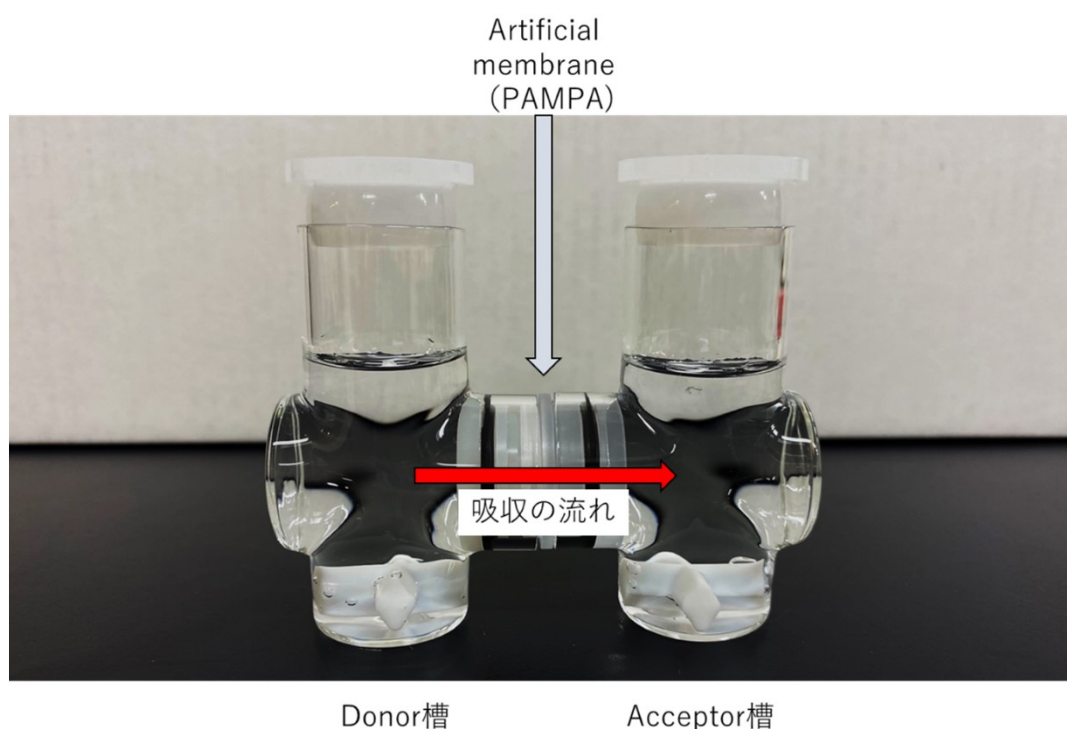


Figure 8 MicroFlux™

Table 3 Samples in donor chambers for permeability measurements

化合物	試験液	Dose 量 (µg/mL)
Griseofulvin	pH6.5 緩衝液	5, 50, 200 または 1000
Triamcinolone	pH6.5 緩衝液	100, 500, 2000 または 10000

Flux 量 ($J(t)$)は単位時間、単位面積における透過膜を通過する化合物量で定義される。従って、Flux 量は次式から Acceptor 槽の濃度時間プロファイルの結果を用いて計算した。

$$J(t) = \frac{1}{A} \cdot \frac{dm}{dt} = \frac{V}{A} \cdot \frac{dC(t)}{dt} \quad (11)$$

ここで dm/dt (µg/min)は単位時間に透過する化合物量であり、 A は透過膜の面積 (1.54 cm²)、 V は Acceptor 槽中の溶液体積 (20 mL)、 $dC(t)/dt$ (µg/(mL·min))は Acceptor 槽の時間濃度プロファイルの傾きとなる。

膜透過性 (P_{app})は Fick の第 1 則から次式で定義される。

$$J(t) = P_{app} C_D(t) \quad (12)$$

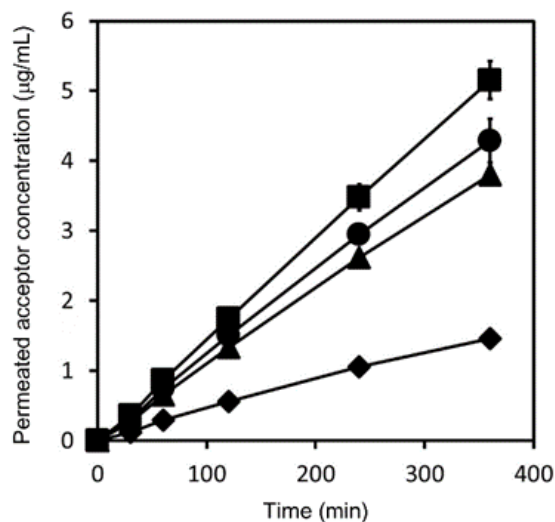
ここで $C_D(t)$ は Donor 槽の化合物濃度である。本研究では、時間濃度プロファイルにおける初期の立ち上がりを基に Flux 量を計算したため、 $t=0$ min における Donor 槽の化合物濃度 ($C_D(0)$)を P_{app} の計算には使用した。

Griseofulvin の膜透過試験における、Acceptor 槽及び Donor 槽の濃度時間プロファイルをそれぞれ Figure 9 に示す。算出した Flux 量を Figure 10 に示す。

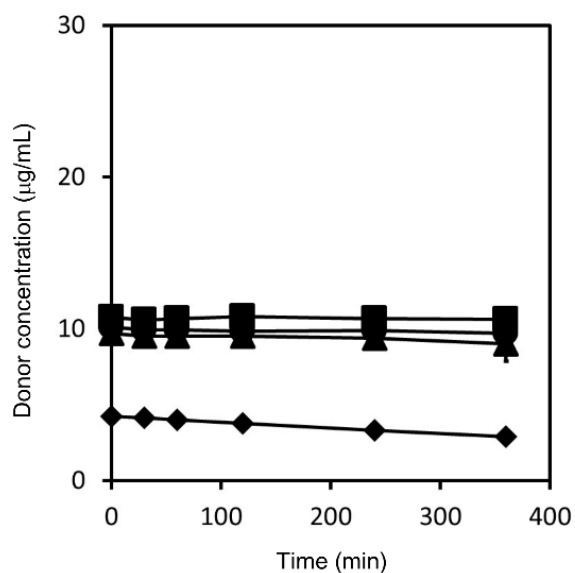
Donor 槽の Non-Sink 条件の試料溶液 (50, 200 または 1000 µg/mL dose)は平衡状態になるまで水浴上で攪拌後に試験に用いた。従って、これら Non-Sink 条件におけ

る 0 分ポイントの Donor 槽の試料濃度は溶解度となる。1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose の結果に基づくと、Griseofulvin の溶解度は $10.75 \pm 0.38 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。溶解度に基づくと、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose は Sink 条件、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose 及び 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose は Non-Sink 条件であったことが確認できる。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose において、Donor 槽の化合物濃度は溶解度よりも低く、試験中にも析出物の発生が見られなかった。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose 及び 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose においては、Donor 槽の化合物濃度は Dose 量によらず約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の一定値となり、Dose 量よりも低くなった。また、いずれの Donor 槽の試料溶液も試験中に懸濁状態であることが目視で確認できた。

Sink 条件における Flux 量は Non-Sink 条件よりも低くなった。これは、Figure 9 (b)に示したとおり Donor 槽の薬物濃度が Sink 条件の方が低くなったことに起因する。また、Non-Sink 条件における Flux 量は Dose 量の増加に依存して増加し、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose よりも約 30%増加した。



(a) Acceptor chamber



(b) Donor chamber

Figure 9 Griseofulvin concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.

Measurements in the pH6.5 buffer are represented by the closed symbols for the 5 µg/mL sample dose (◆), 50 µg/mL sample dose (▲), 200 µg/mL sample dose (●) and 1000 µg/mL sample dose (■).

Results represent average Griseofulvin concentration \pm SD (n=3).

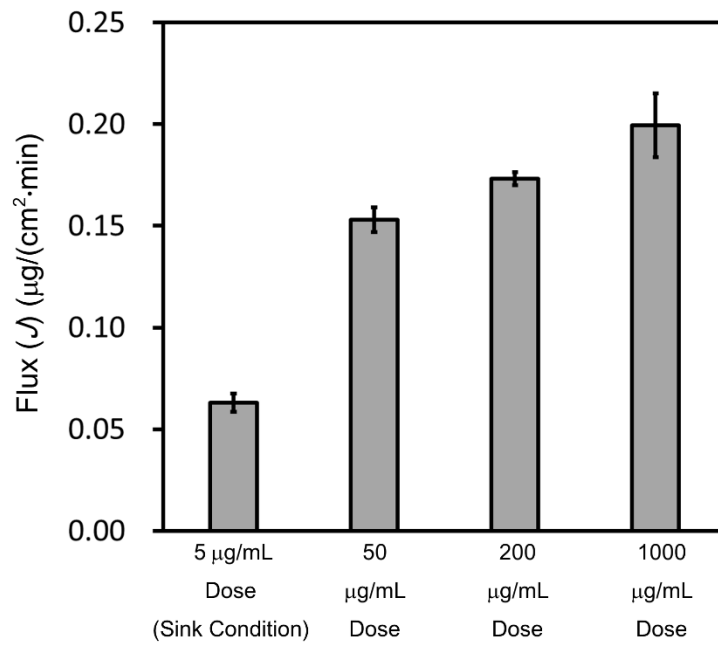


Figure 10 Calculated flux of Griseofulvin.

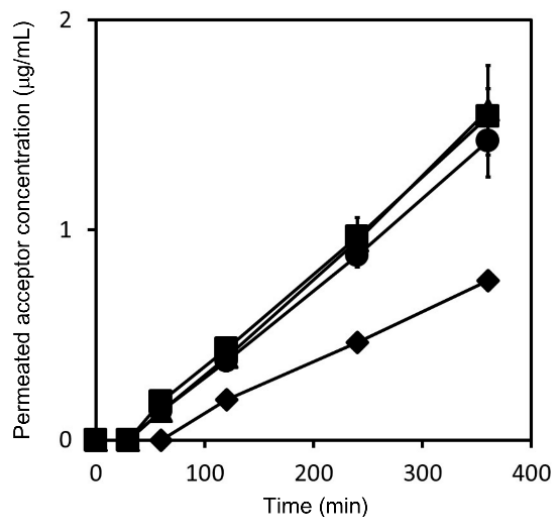
A time interval of 30 – 120 min was selected. Results represent average Griseofulvin flux \pm SD (n=3)

【1-2-2】 Triamcinolone の Flux 量

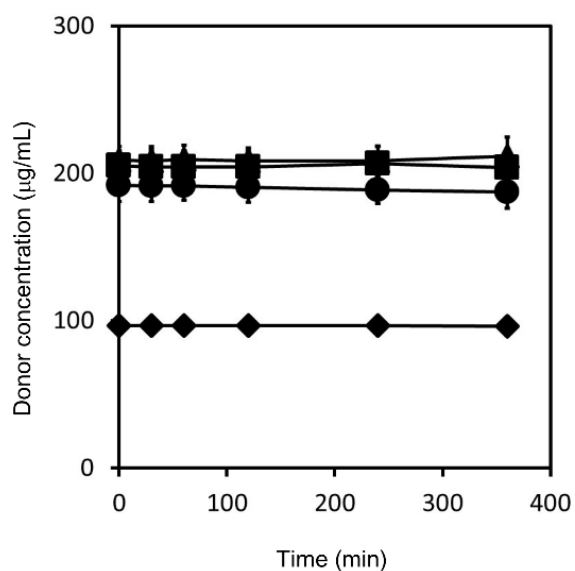
Triamcinolone の膜透過試験における、Acceptor 槽及び Donor 槽の濃度時間プロフィールをそれぞれ Figure 11 に示す。式(11)を用いて算出した Flux 量を Figure 12 に示す。

【1-2-1】における Griseofulvin と同様、Donor 槽の Non-Sink 条件の試料溶液 (500, 2000 または 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose) は平衡状態になるまで水浴上で攪拌後に試験に用いた。従って、Non-Sink 条件における 0 分ポイントの試料濃度は溶解度となる。10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose の結果に基づくと、Triamcinolone の溶解度は 205.04 ± 10.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。溶解度に基づくと、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose は Sink 条件、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose 及び 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose は Non-Sink 条件であったことが確認できる。また、Griseofulvin 同様、膜透過試験中において、Sink 条件では Donor 槽に析出物が発生しないこと、Non-Sink 条件では Donor 槽の試料溶液は懸濁状態であったことを目視で確認した。

Griseofulvin と同様に Sink 条件における Flux 量は Non-Sink 条件よりも低くなった。これは、Figure 11(b)に示したとおり Donor 槽の薬物濃度が Sink 条件の方が低くなったことに起因する。一方、Non-Sink 条件における Flux 量は Dose 量に依存せずに、ほぼ一定値であった。



(a) Accepter chamber



(b) Donor chamber

Figure 11 Triamcinolone concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.

Measurements in the pH6.5 buffer are represented by the closed symbols for the 100 µg/mL sample dose (◆), 500 µg/mL sample dose (▲), 2000 µg/mL sample dose (●) and 10000 µg/mL sample dose (■). Results represent average Triamcinolone concentration \pm SD (n=3).

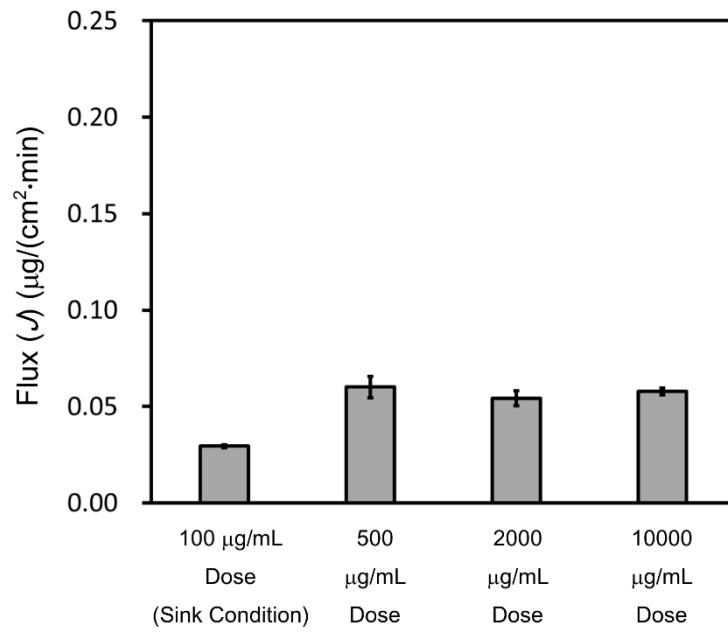


Figure 12 Calculated flux of Triamcinolone.

A time interval of 120 – 240 min was selected. Results represent average Triamcinolone flux \pm SD (n=3)

【1-2-3】透過膜および非攪拌水層の膜透過性

本項では、【理論】で説明した理論式を膜透過速度試験に適用し、各モデル化合物の透過膜及び非攪拌水層の膜透過性を計算した。(Table 4)

まず、各化合物の P_{app} を膜透過速度試験の結果から計算した。Griseofulvin 及び Triamcinolone は中性化合物であることから、本研究の Sink 条件において、Donor 槽の化合物はすべて UFDs である。したがって、(12)式より算出される P_{app} は化合物固有値の $P_{app(U)}$ となる。また、(12)式における、 $C_D(0)$ は Figure 9 及び Figure 11 の 0 min の Donor 槽の化合物濃度である。膜透過速度試験から求めた Flux 量を、式(12)に代入することで、各化合物の $P_{app(U)}$ を計算した。Griseofulvin の $P_{app(U)}$ は 0.0148 cm/min、Triamcinolone の $P_{app(U)}$ は 0.000304 cm/min となった。

次に非攪拌水層の膜透過性を計算した。非攪拌水層の膜透過性は式(6)より算出することができる。 $D_{aq(U)}$ は経験的に化合物の分子量 (MW) から次式で求めることができる⁴²⁾。

$$\text{Log } D_{aq(U)} = -4.131 - 0.4531 \text{Log } MW \quad (13)$$

各化合物の MW から $D_{aq(U)}$ を計算した。その結果、Griseofulvin の $D_{aq(U)}$ は 5.18×10^{-6} cm²/sec、Triamcinolone の $D_{aq(U)}$ は 4.93×10^{-6} cm²/sec となった。ここで、Tsinman の研究で本研究と同じ膜透過速度試験条件を用い、 $h_{UWL(app)}$ は約 100 μ m になることを報告している³³⁾。算出した $D_{aq(U)}$ と $h_{UWL(app)}$ の報告値を式(6)に代入し、 $P_{UWL(U)}$ を計算した。Griseofulvin の $P_{UWL(U)}$ は 0.0311 cm/min、Triamcinolone の $P_{UWL(U)}$ は 0.0296 cm/min となった。

さらに透過膜の膜透過性を計算した。(2)式に上記で求めた $P_{app(U)}$ 及び $P_{UWL(U)}$ を代入することで、 $P_{m(U)}$ を計算した。Griseofulvin の $P_{m(U)}$ は 0.0284 cm/min、

Triamcinolone の $P_{m(U)}$ は 0.000307 cm/min となった。Griseofulvin においては、 $P_{m(U)}$ と $P_{UWL(U)}$ に大きな差がなかった。従って、Griseofulvin においては、2つの膜透過プロセスがいずれも全体の膜透過性に影響することが確認できる。一方、Triamcinolone は $P_{m(U)}$ が $P_{UWL(U)}$ よりも極めて小さかった。従って、Triamcinolone においては、 $P_{m(U)}$ によって全体の膜透過性が決定することが確認できる。つまり、Triamcinolone においては、膜透過の律速段階が透過膜の膜透過プロセスにあり、非攪拌水層の膜透過性の変化が全体の膜透過性に影響しない。

Table 4 Measured and calculated permeability in pH6.5 buffer

Compound	Griseofulvin	Triamcinolone
MW	352.77	394.43
Measured $P_{app(U)}$ (cm/min) ¹	0.0148 ± 0.0007	0.000304 ± 0.000010
Calculated $D_{aq(U)}$ (cm ² /sec)	5.18 × 10 ⁻⁶	4.93 × 10 ⁻⁶
Calculated $P_{UWL(U)}$ (cm/min)	0.0311	0.0296
Calculated $P_m(U)$ (cm/min)	0.0284	0.000307
Calculated $P_{app(U)}$ (cm/min)	0.0148	0.000304

¹ Results represent average $P_{app(U)} \pm$ SD (n=3).

【1-2-4】 Non-Sink 条件下における膜透過メカニズム

Non-Sink 条件下の膜透過速度試験において、親油性の高い Griseofulvin は Dose 量の増加に伴って、Flux 量及び膜透過性が向上した。一方で、親油性の低い Triamcinolone は投与量が増加しても、Flux 量及び膜透過性はほぼ一定値であった。これらの結果から、Non-Sink 条件下における膜透過メカニズムとして Figure 13 を提案することができる。Sink 条件下においては、化合物分子は非攪拌水層中を拡散、透過膜に分配、透過膜中を拡散することで膜透過する。一方、Non-Sink 条件では、上記の化合物分子の拡散に加えて、非攪拌水層付近の固体薬物表面からは薬物化合物の拡散が起こる。(Figure 6) 序論で説明した通り、固体薬物の表面には高濃度の層が形成されており、この層から非攪拌水層→透過膜への化合物分子の拡散が起こる。この拡散により、非攪拌水層の厚さは見かけ上、縮小化すると考えることができる。この結果、非攪拌水層の膜透過性が向上する。固体薬物の表面積が大きくなるほど、非攪拌水層の厚さは見かけ縮小化し、固体表面からの拡散の影響は強くなると考えられる。従って、固体薬物量が多くなるほど、非攪拌水層の膜透過性が向上する。Griseofulvin において Dose 量に依存して膜透過性が向上したことは、Figure 13 のメカニズムと合致した結果である。また、Triamcinolone は親油性が低く、【1-2-3】で説明した通り、膜透過の律速段階が透過膜の拡散プロセスにある。従って、Non-Sink 条件において、Dose 量が増加し、非攪拌水層の膜透過性が向上しても、膜透過性全体は変化しないと考えることができる。

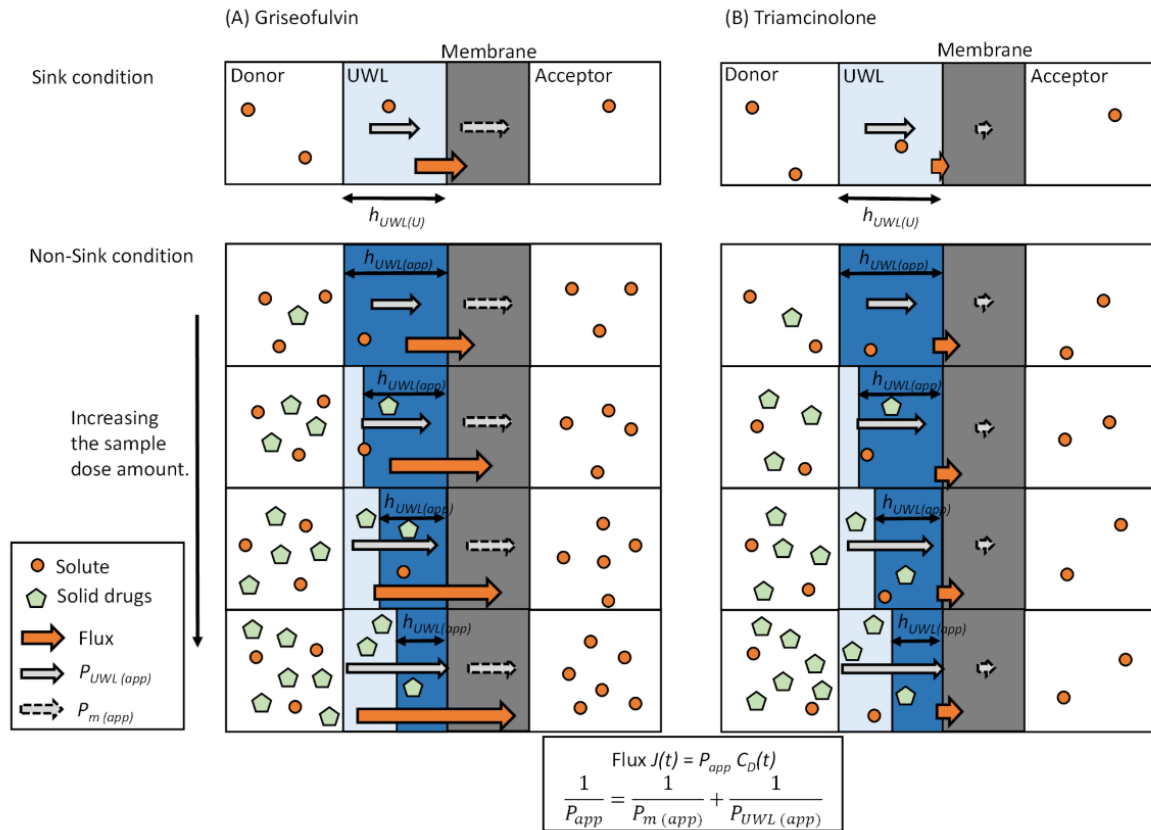


Figure 13 Proposed drug absorption mechanism under sink conditions and non-sink conditions for Griseofulvin (A) and Triamcinolone (B).

Longer arrows represent higher flux, $P_{UWL(app)}$, or $P_{m(app)}$.

【1-2-5】 Non-Sink 条件下における非攪拌水層の見かけの厚さ

Griseofulvin の Non-Sink 条件の膜透過速度試験の結果から、各 Dose 量における非攪拌水層の見かけの厚さ ($h_{UWL(app)}$) を計算した。式(2)及び式(6)から、 $h_{UWL(app)}$ は次の式で表すことができる。

$$h_{UWL(app)} = D_{aq(U)} \left(\frac{1}{P_{app}} - \frac{1}{P_{m(U)}} \right) \quad (14)$$

【1-3-3】で算出された、Griseofulvin の $D_{aq(U)}$ 及び $P_{m(U)}$ (Table 6) および 各 Dose 量における P_{app} の測定結果を上記の式に代入し、各 Dose 量における $h_{UWL(app)}$ を計算した。(Figure 14) Dose 量が 50 $\mu\text{g/mL}$ dose から 1000 $\mu\text{g/mL}$ dose に増加するにつれて、 $h_{UWL(app)}$ は 100 μm から約 60 μm まで縮小化した。

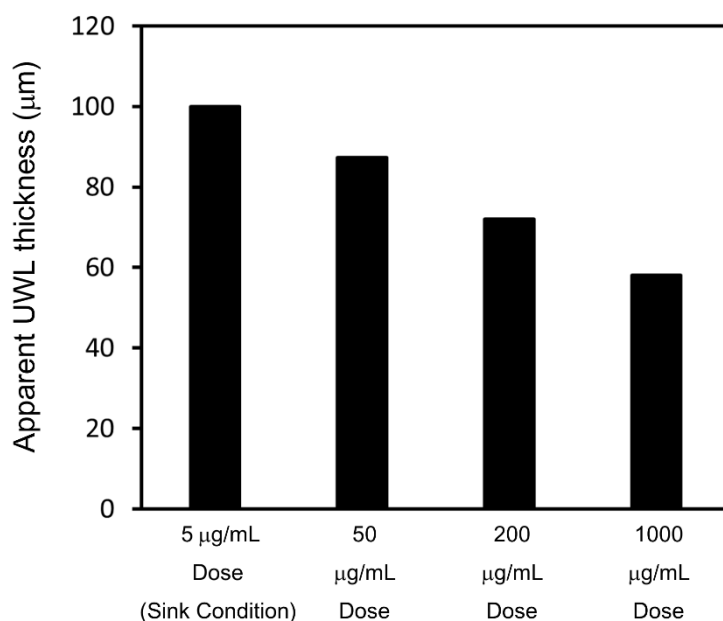


Figure 14 Calculated apparent UWL thickness ($h_{UWL(app)}$) of Griseofulvin for each permeability measurement.

【1-2-6】 Non-Sink 条件下における Dose 量に依存した膜透過性の向上効果

固体薬物における非攪拌水層の縮小化は、その機構からいずれの化合物でも発生していると考えられる。本項では、Griseofulvin における膜透過速度試験の結果を用いて、一般的な薬物化合物における、Non-Sink 条件下における Dose 量に依存した膜透過性の向上効果を見積もった。一般的な薬物化合物の分子量は 200~1000 である。式(6)および式(13)から、分子量に基づいて $P_{UWL(U)}$ を計算することができるが、化合物によって $P_{UWL(U)}$ は大きく変わらない。一方、本研究の Griseofulvin と Triamcinolone で確認したように、 $P_{m(U)}$ は化合物ごとに大きく異なる。Griseofulvin の $P_{m(U)}$ は、Triamcinolone の $P_{m(U)}$ よりも約 100 倍速い。分子量による膜透過性への影響は小さいため、本項の計算においては、薬物化合物の分子量を 400 と仮定した。ここで、 $h_{UWL(app)}$ と P_{app} の関係は式(14)を変形することで、以下の式で表すことができる。

$$P_{app} = \frac{1}{P_{m(U)}} - \frac{h_{UWL(app)}}{D_{aq(U)}} \quad (15)$$

式(15)から、 $P_{m(U)}=0.001 \sim 1 \text{ cm/min}$ の時、 $h_{UWL(app)}$ が固体化合物により $100 \mu\text{m}$ から $50 \mu\text{m}$ に縮小化した際の膜透過速度を計算した。(Figure 15)

Figure 15 に基づくと、Triamcinolone の $P_{m(U)}$ は 0.0003 cm/min であることから、非攪拌水層の見かけの厚さが縮小化しても、膜透過性は向上しないこととなる。これは本研究における膜透過速度試験の結果と合致している。序論で説明した通り、一般的に膜透過性の高い化合物は親油性が高い。Figure 15 に基づくと、親油性が高い化合物においては固体化合物による膜透過性の向上効果がより顕著に表れると推測できる。 $P_{m(U)}=1 \text{ cm/min}$ の化合物においては、非攪拌水層の見かけの厚さが固体化合物によって 50%縮小化すると、膜透過性は約 2 倍になると考えられる。

この向上効果の計算は本研究で使用した膜透過測定条件に限定される。in vivo でも同様に固体化合物によって膜透過性は向上すると考えられるが、その向上効果は Figure 15 とは異なると考えられる。これは、本研究の膜透過速度測定を行った MicroFlux 装置と生体内の消化管では、動きによるストレス、透過膜の表面積、Donor 槽の溶媒体積といった膜透過性に与える条件が異なるからである。本研究のモデル化合物である Griseofulvin において、Sugano によって臨床試験データを基に固体薬物の膜透過性の影響が研究され、500 mg dose において、膜透過性が約 2 倍となることが報告されている²⁹⁾。この研究に基づくと、in vivo における固体化合物の膜透過性の向上効果は、Figure 15 よりも顕著になると考えられる。Griseofulvin の $P_{m(U)}$ は 0.0284 cm/min であったが、 $P_{m(U)}$ は 0.005 cm/min 程度の膜透過速度の化合物でも、in vivo においては高 Dose 量の Non-Sink 条件においては、膜透過性が 20~30%程度向上すると予想することができた。

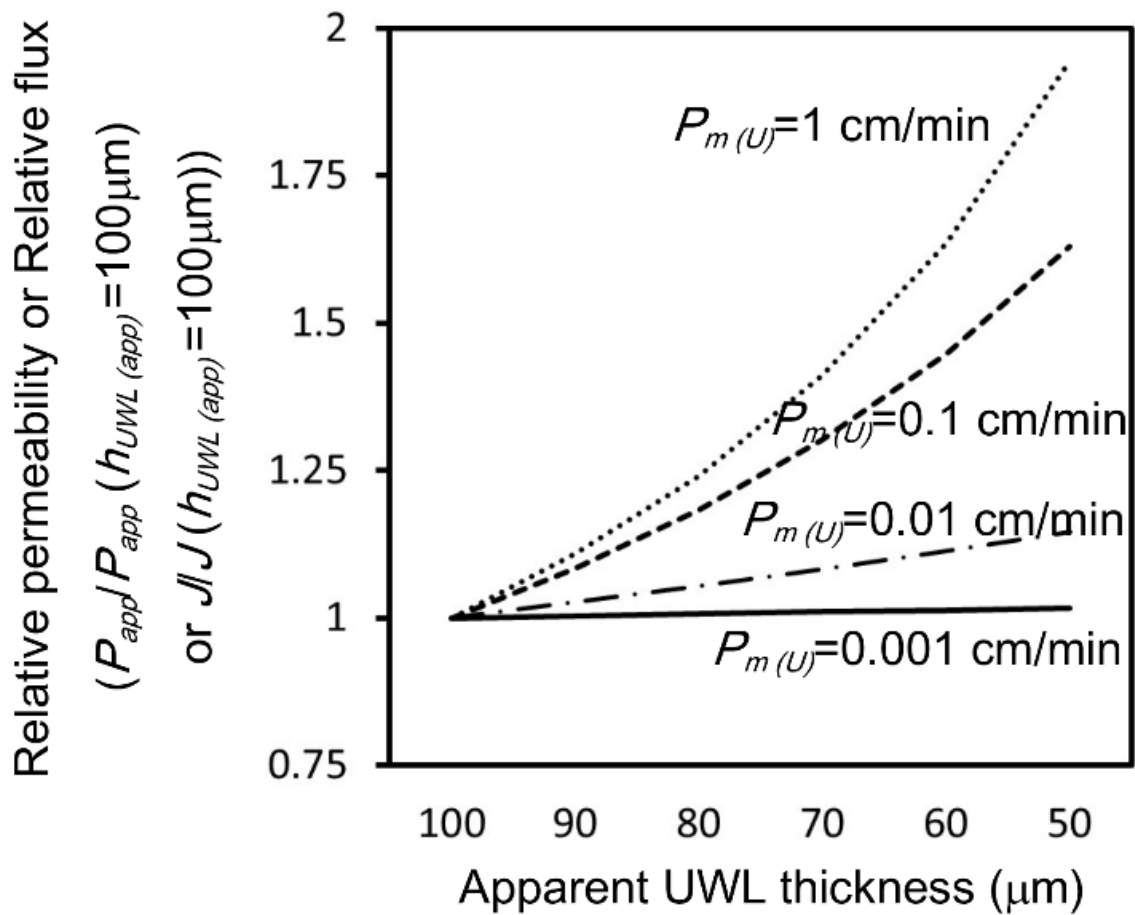


Figure 15 Calculated relationship between apparent permeability /flux and apparent UWL thickness for model compounds with $P_{m(U)}$ of 0.001 cm/min – 1 cm/min.

It was assumed that MW of model compounds was 400 Da.

【1-3】 小括

本章の研究において、化合物が完全に溶解しない Non-Sink 条件下で化合物の膜透過性が向上するメカニズムを実験的に証明することに成功した。既存の PAMPA、Caco-2 細胞による膜透過性の評価は Sink 条件で実施されることから、これまで Non-Sink 条件下の膜透過性については詳細を明らかにされることがなかった。本研究においては、固体薬物が非攪拌水層の膜透過性に対する影響を着目し、非攪拌水層の膜透過性の影響の異なる 2 つの化合物で、固体化合物の影響を検証した。更に、得られた結果から、より広範囲な化合物において、固体化合物の膜透過性への定量的な影響を計算することができた。親油性の高い化合物においては、Non-Sink 条件下で Dose 量の増加によって、2 倍近く膜透過性が向上する可能性が示すことができた。多くの難水溶性化合物は、消化管内で完全に溶解せずに Non-Sink 条件にある。従って、本研究で得られた知見は、難水溶性化合物の吸収性予測にとって有用なものとなることが期待される。

【第2章】 Non-Sink 条件下における界面活性剤による

Solubility-Permeability Interplay に関する研究

【緒言】

難水溶性化合物の製剤設計において、界面活性剤などの可溶化添加剤を処方することは、吸収性改善のための主要なアプローチの一つである。界面活性剤などの可溶化添加剤による可溶化は、見かけの溶解度を向上する一方で、見かけの膜透過性が低下する Solubility-Permeability Interplay を引き起こすことが知られている。²⁴⁻²⁸⁾ 従って、可溶化添加剤を使用した製剤設計においては、溶出性だけでなく膜透過性への影響も考慮することがその設計においては重要である。

第1章において、薬物化合物が完全に溶解しない Non-Sink 条件において、溶解しない固体化合物が化合物の膜透過性の向上に寄与することを明らかにした。第1章でも説明した通り、難水溶性化合物の多くは消化管内で完全に溶解せずに Non-Sink 条件にある。従って、可溶化添加剤を使用した製剤の吸収性を理解するためには、Non-Sink 条件下の見かけの溶解度と膜透過性の関係を理解することが重要となる。既にいくつかの研究において、Solubility-Permeability Interplay の機構が提案され、実験的に証明されてきた。しかしながら、いずれも薬物が完全に溶解した Sink 条件におけるものであった。既存の Caco-2 や PAMPA による膜透過性による評価が、Sink 条件で実施されてきたことから、Non-Sink 条件下における Solubility-Permeability Interplay については報告されていない。

そこで本研究では、Non-Sink 条件下における、界面活性剤存在下の見かけ溶解度と膜透過性ならびに吸収性の関係性を明らかにすることを目的とした。界面活性剤

としては、製剤処方として頻繁に用いられる SLS を使用した。第 1 章と同じく、親油性が異なる 2 つのモデル化合物、Griseofulvin と Triamcinolone を使用した。SLS が存在する時と存在しない時で、各化合物の溶解度と膜透過性を測定した。さらに Non-Sink 条件下での影響を評価するために、第 1 章と同じく Dose 量を変化させたときの膜透過性及び吸収性について評価した。

【2-2】 結果および考察

【2-2-1】 Griseofulvin 及び Triamcinolone の溶解度

膜透過試験は第 1 章と同様に実施した。膜透過試験における Donor 槽の試料は 37°C の水浴上で、平衡状態になるまで攪拌後、試験に用いた。従って、Non-Sink 条件の Dose 量条件において、0 分ポイントの Donor 槽の試料濃度は溶解度に相当する。第 1 章では試験液として pH6.5 緩衝液を使用し、本章では試験液として pH6.5 緩衝液+0.05% SLS を使用した。Griseofulvin と Triamcinolone の、各試験液における溶解度は Table 5 となった。Griseofulvin は 0.05%(w/w) の SLS の添加により、溶解度が約 2.5 倍となった。一方、Triamcinolone は 0.05%(w/w) の SLS の添加によって溶解度はほとんど変化しなかった。Griseofulvin は Triamcinolone と比較して、親油性が高く、SLS によって可溶化しやすかったと考えられる。

Griseofulvin と Triamcinolone は共に中性化合物であるため、pH6.5 の緩衝液中においてはイオン化しないと考えることができる。従って、試験液 (pH6.5 緩衝液+0.05% SLS) において存在する化合物の分子状態は、UFDs もしくは SLS との結合体と考えることができる。従って、UFDs の割合(f_U)は式(4)から計算することができる。その算出結果が Table 5 となった。

Table 5 Solubility and UFD amount of Griseofulvin and Triamcinolone at 37°C in each test media

Compound	Test media	Solubility ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ¹	UFDs amount ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fraction of UFDs (F_U)
Griseofulvin	pH6.5 buffer	10.75 \pm 0.38	10.75	1.00
	pH6.5 buffer+0.05%SLS	27.40 \pm 0.07	10.75	0.39
Triamcinolone	pH6.5 buffer	205.04 \pm 10.34	205.04	1.00
	pH6.5 buffer+0.05%SLS	210.07 \pm 6.54	205.04	0.98

¹ Results represent average solubility \pm Standard deviation (SD) (n=3).

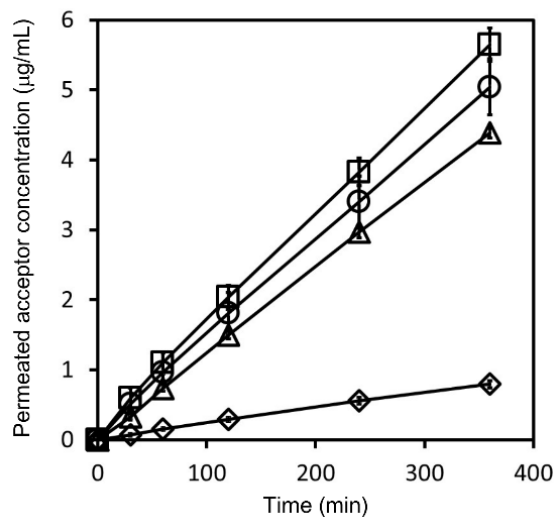
【2-2-2】 Griseofulvin の Flux 量

Griseofulvin 及び Triamcinolone の膜透過試験は、試験液以外第 1 章と同様の条件で実施した。本章では SLS の影響を評価するために、試験液は pH6.5 緩衝液 +0.05% SLS を使用した。

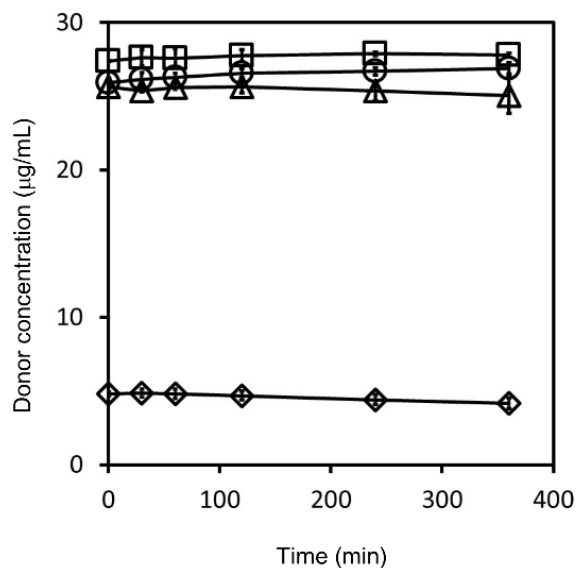
Griseofulvin の膜透過試験における、Acceptor 槽及び Donor 槽の濃度時間プロフィールをそれぞれ Figure16 に示す。式(11)を用いて算出した Flux 量を Figure 17 に示す。Figure 17 の Flux 量には SLS の影響を評価するために、第 1 章で測定した、試験液 (pH6.5 緩衝液) における Flux 量の測定結果を併記した。

第 1 章と同様に、Table 8 の溶解度に基づくと、5 µg/mL dose は Sink 条件、50 µg/mL dose、200 µg/mL dose 及び 1000 µg/mL dose は Non-Sink 条件であったことが確認できる。加えて、5 µg/mL dose においては試験中にも析出物の発生が発生しなかったこと、50 µg/mL dose、200 µg/mL dose 及び 1000 µg/mL dose においては Donor 槽の試料溶液は懸濁状態であることを目視で確認した。

5 µg/mL dose の Sink 条件においては、Donor 槽の薬物濃度は、試験液 (pH6.5 緩衝液) 及び試験液 (pH6.5 緩衝液+0.05% SLS) でほぼ同じであったが、Flux 量は概ね半分となった。Non-Sink 条件においては、試験液 (pH6.5 緩衝液+0.05% SLS) における Flux 量は同じ Dose 量において試験液 (pH6.5 緩衝液+0.05% SLS) よりわずかに高くなった。



(a) Acceptor chamber



(b) Donor chamber

Figure 16 Griseofulvin concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.

Measurements in the pH6.5 buffer+0.05%SLS are represented by the open symbols for the 5 µg/mL sample dose (◇), 50 µg/mL sample dose (△), 200 µg/mL sample dose (○) and 1000 µg/mL sample dose (□). Results represent average Griseofulvin concentration \pm SD (n=3).

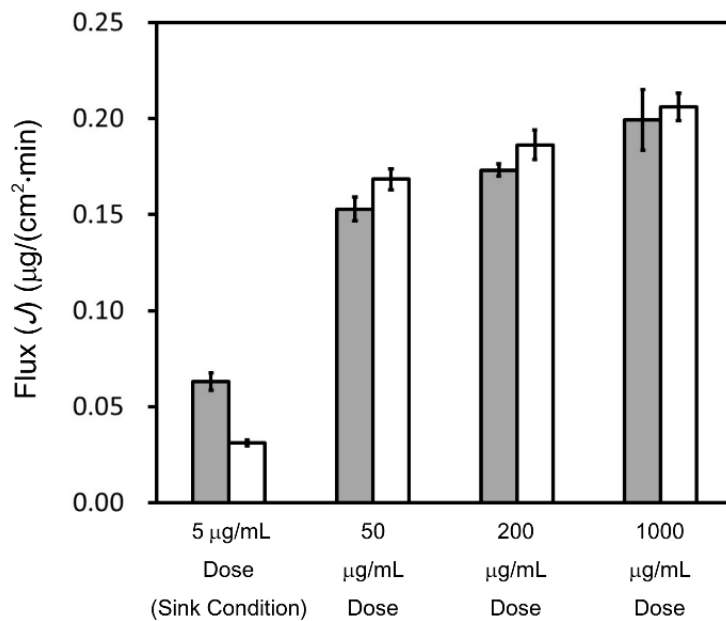


Figure 17 Calculated flux of Griseofulvin.

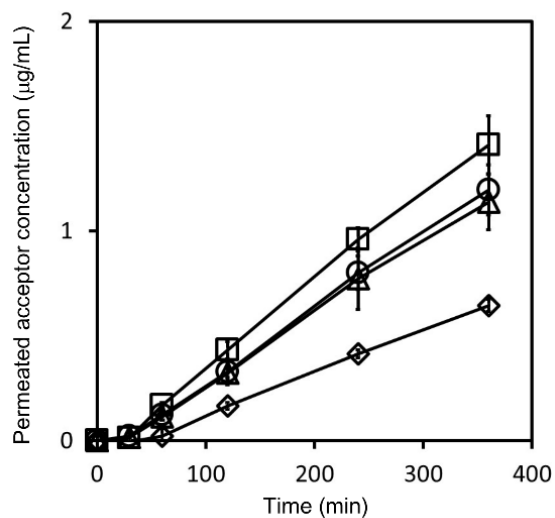
A time interval of 30 – 120 min was selected. The flux in pH6.5 buffer is represented by gray bars. The flux in pH6.5 buffer+0.05%SLS is represented by white bars. Results represent average Griseofulvin flux \pm SD (n=3).

【2-2-3】 Triamcinolone の Flux 量

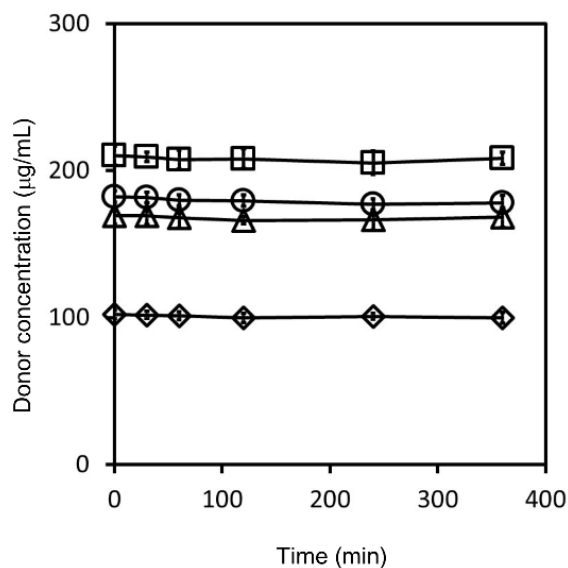
Triamcinolone の膜透過試験における、Acceptor 槽及び Donor 槽の濃度時間プロフィールをそれぞれ Figure 18 に示す。式(11)を用いて算出した Flux 量を Figure 19 に示す。Figure 19 の Flux 量には SLS の影響を評価するために、第 1 章で測定した、試験液 (pH6.5 緩衝液) における Flux 量の測定結果を併記した。

第 1 章と同様に、Table 8 の溶解度に基づくと、100 µg/mL dose は Sink 条件、500 µg/mL dose、2000 µg/mL dose 及び 10000 µg/mL dose は Non-Sink 条件であったことが確認できる。加えて、100 µg/mL dose においては試験中にも析出物の発生が発生しなかったこと、500 µg/mL dose、2000 µg/mL dose 及び 10000 µg/mL dose においては Donor 槽の試料溶液は懸濁状態であることを目視で確認した。

Griseofulvin と異なり、いずれの Dose 量においても、SLS の添加によって Flux 量は変化しなかった。Donor 槽の薬物濃度から、式(12)に基づいて膜透過性を計算しても、膜透過性は SLS の添加でほとんど影響受けないことが確認できた。



(a) Acceptor chamber



(b) Donor chamber

Figure 18 Triamcinolone concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.

Measurements in the pH6.5 buffer+0.05%SLS are represented by the open symbols for the 100 µg/mL sample dose (◇), 500 µg/mL sample dose (△), 2000 µg/mL sample dose (○) and 10000 µg/mL sample dose (□). Results represent average Triamcinolone concentration ± SD (n=3).

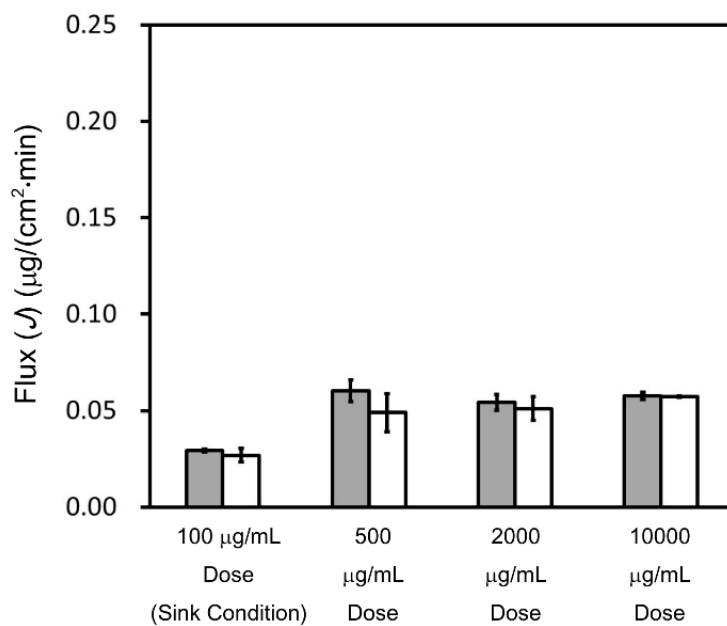


Figure 19 Calculated flux of Triamcinolone.

A time interval of 30 – 120 min was selected. The flux in pH6.5 buffer is represented by gray bars. The flux in pH6.5 buffer+0.05%SLS is represented by white bars. Results represent average Triamcinolone flux \pm SD (n=3).

【2-2-4】 pH6.5 緩衝液+0.05% SLS における透過膜の透過性及び非攪拌水層の膜透過性

本項では、試験液（pH6.5 緩衝液+0.05% SLS）における、各化合物の透過膜の及び非攪拌水層の膜透過性（ $P_{m(app)}$ および $P_{UWL(app)}$ ）を計算した。（Table 6）

Griseofulvin 及び Triamcinolone は中性化合物であることから、Sink 条件下において存在する分子状態は UFDs もしくは SLS との結合体と考えることができる。

P_{app} は Sink 条件下における膜透過試験の結果を式(12)に代入することで計算した。

$P_{m(app)}$ は式(3)より計算した。 $P_{m(U)}$ は第 1 章で算出した結果（Table 4）を用いた。 F_U は溶解度の項で求めた結果（Table 8）を用いた。 $P_{UWL(app)}$ は式(2)に上記で算出した P_{app} および $P_{m(app)}$ を代入することで算出した。

ここで SLS との結合体の影響が顕著な Griseofulvin において、見かけの水溶液中の拡散係数（ $D_{aq(app)}$ ）を計算した。式(5)に $h_{UWL(app)}=100 \mu\text{m}$ 及び算出した $P_{UWL(app)}$ を代入し、 $D_{aq(app)}$ を計算した。次に、式(9)に F_U 、 $D_{aq(app)}$ 、 $D_{aq(U)}$ を代入し、Griseofulvin と SLS の結合体の水溶液中の拡散係数（ $D_{aq(B)}$ ）を計算した。 $D_{aq(U)}$ は第 1 章で算出した結果（Table 4）を用いた。Griseofulvin と SLS の結合体に式(13)が適用できると仮定すると、Griseofulvin と SLS の結合体の分子量は約 20000Da と見積もることができる。SLS の水溶液中における凝集数は 62 と報告されていることから、SLS が形成するミセル体の大きさは約 18000 Da と考えることができる⁴³⁾。従って、算出した Griseofulvin と SLS との結合体の水溶液中の拡散係数は概ね報告値と合致した。

Table 6 Measured and calculated permeability in pH6.5 buffer+0.05%SLS

Compound	Griseofulvin	Triamcinolone
Measured P_{app} (cm/min) ¹	0.00648 ± 0.00026	0.000263 ± 0.000028
Calculated P_m (app) (cm/min)	0.0112	0.000300
Calculated P_{UWL} (app) (cm/min)	0.0153	0.0212
Calculated P_{app} (cm/min)	0.00648	0.000263
Calculated D_{aq} (app) (cm ² /sec)	2.56 × 10 ⁻⁶	3.54 × 10 ⁻⁷
Calculated D_{aq} (B) (cm ² /sec)	8.37 × 10 ⁻⁷	-

¹ Results represent average $P_{app} \pm$ SD (n=3).

【2-2-5】 Sink 条件下における見かけの溶解度と膜透過性の関係

本項では、Griseofulvin の膜透過試験の結果を用いて、薬物が完全に溶解した Sink 条件下における見かけの溶解度と膜透過性の関係を計算した。

Sink 条件において、SLS が形成するミセルの大きさが一定であると仮定する。この時、式(10)より、見かけの溶解度から $P_{UWL(app)}$ が計算できる。式(3)より見かけの溶解度から $P_{m(app)}$ が計算できる。従って、式(2)より見かけの溶解度から P_{app} が計算でき、算出結果が Figure 20 となった。SLS の添加量の増加に伴って、見かけの溶解度は増加する。従って、Figure 20 の計算結果の通り、SLS の添加量が増加するにつれて、見かけの膜透過性は減少する。Sink 条件下で、投与量が一定の場合、Donor 槽の化合物濃度は一定値になるため、SLS の添加量が増加に伴って、同様に吸収量 (Flux) も減少する。見かけの溶解度が 5 倍、10 倍になる時、見かけの膜透過性はそれぞれ 1/4、1/7 と計算される。膜透過のプロセスにおいて UFDs しか寄与しない場合、上記のように見かけの溶解度が向上すると、見かけの膜透過性はそれぞれ 1/5、1/10 になると考えられる。しかしながら、式(10)で示される通り、Griseofulvin と SLS の結合体が非攪拌水層の膜透過性に影響するため、上記のように見かけの溶解度が向上しても、見かけの膜透過性は 1/5、1/10 とはならない。

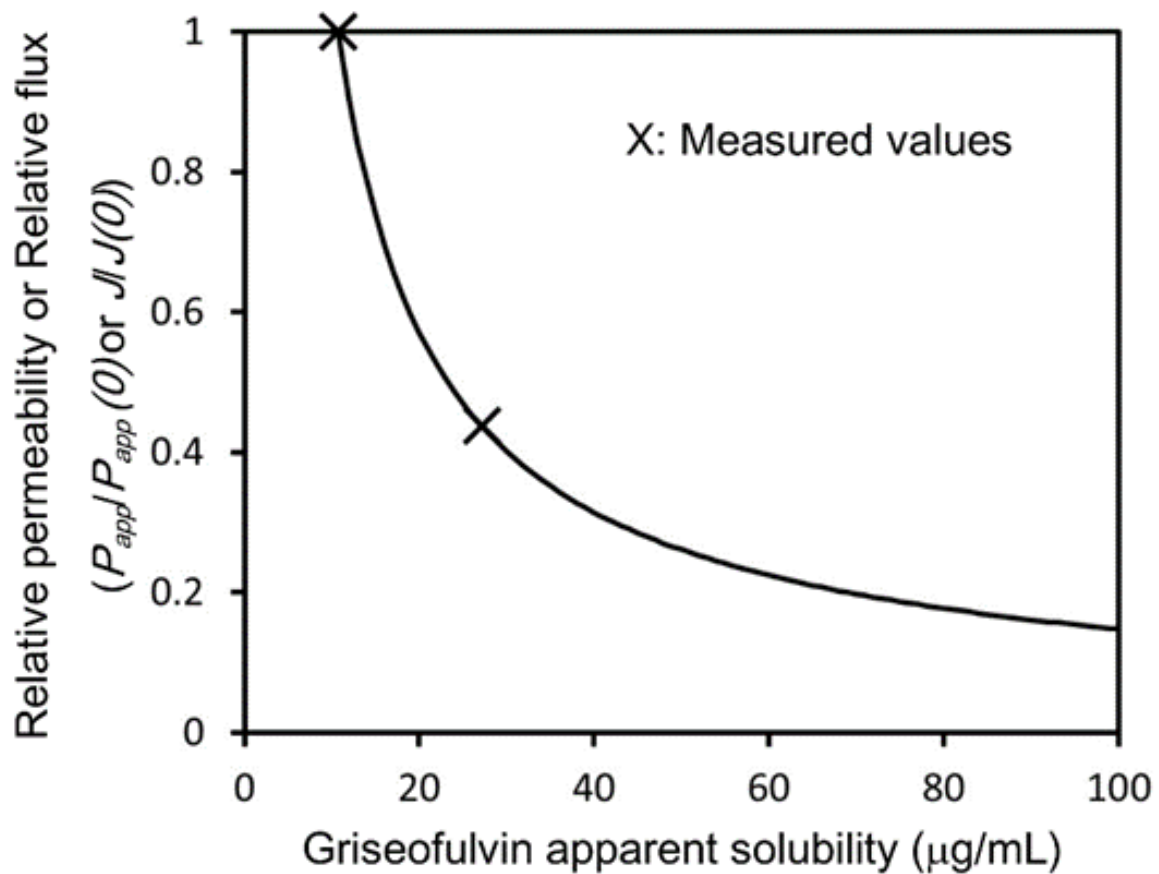


Figure 20 Calculated relationship between flux/apparent permeability and apparent solubility under sink conditions for griseofulvin.

It was assumed that the sample concentration in the donor chamber remained at 5 µg/mL during the measurements. $P_{app(0)}$ is the apparent permeability in the absence of solubilizer additives. $J(0)$ is the flux in the absence of solubilizer additives.

【2-2-6】 Non-Sink 条件下における見かけの溶解度と膜透過性の関係

本項では、Griseofulvin の膜透過試験の結果を用いて、薬物が完全に溶解しない Non-Sink 条件下における見かけの溶解度と吸収量の関係を計算した。

まず、SLS の影響を計算するため、第 1 章で議論した固体薬物の影響が出ない条件下で、計算を実施した。この時、【2-2-5】と同様の手順で、 P_{app} が計算できる。式(1)より Flux を計算できるが、Non-Sink 条件下では、Donor 槽の薬物濃度は見かけの溶解度となる。Griseofulvin において、SLS の添加によって見かけの溶解度が増加した時の Flux 量を計算した結果が Figure 21 となった。Non-Sink 条件下においては、見かけの溶解度の向上に伴って、Flux 量がわずかではあるが向上することが確認できた。これは、Griseofulvin の膜透過試験においては、同一 Dose 量において、SLS 添加した場合に Flux 量が高くなった結果と合致している。

次に、固体薬物の影響も含めて、薬物が完全に溶解しない Non-Sink 条件下における見かけの溶解度と吸収量の関係を計算した。式(2)、式(3)、式(9)から、 P_{app} は F_U と $h_{UWL(app)}$ を用いて次式のように表すことができる。

$$P_{app} = \frac{1}{F_U P_{m(U)}} - \frac{h_{UWL(app)}}{F_U D_{aq(U)} + (1 - F_U) D_{aq(B)}} \quad (16)$$

固体薬物が存在した時、投与量に増加に伴って $h_{UWL(app)}$ が縮小化することを第 1 章で確認した。第 1 章の結果を基に、 $h_{UWL(app)}$ が 100 μm から 50 μm まで縮小化したと仮定する。この時の、Griseofulvin の見かけの溶解度と吸収量を示す Flux の関係を式(16)より計算した。(Figure 22) Figure 22 からは、SLS の添加量の増加、Dose 量の増加が組み合わさることで、Non-Sink 条件で顕著に吸収量が増加すること確認された。

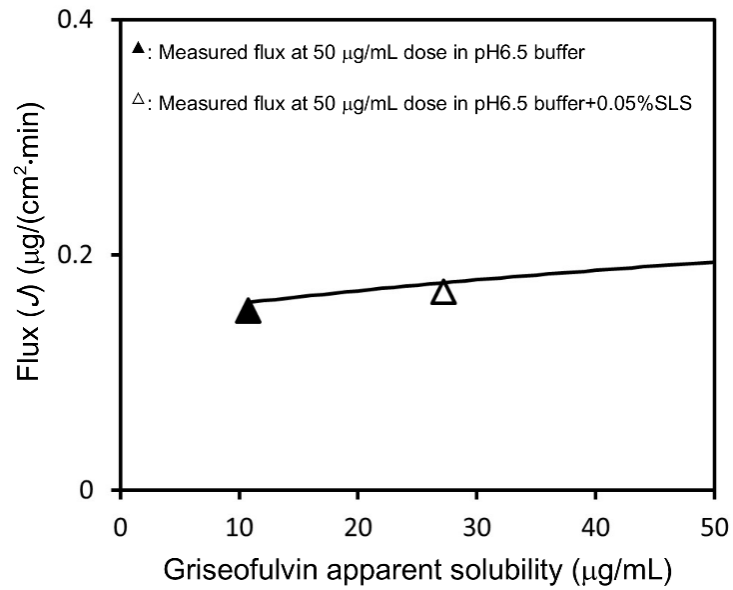


Figure 21 Calculated flux-apparent solubility relationship under sink conditions for Griseofulvin.

It is assumed that the UWL thickness remained constant. The results of flux measurement at 50 $\mu\text{g/mL}$ sample dose in pH6.5 buffer and pH6.5 buffer+0.05%SLS were plotted.

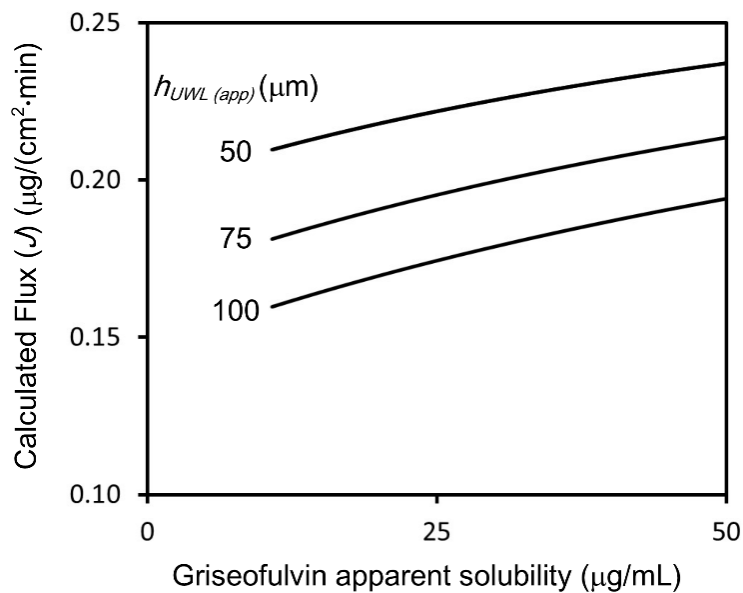


Figure 22 Calculated flux of Griseofulvin for 50 – 100 μm apparent UWL thickness.

【2-3】 小括

本章の研究において、化合物が完全に溶解しない Non-Sink 条件下における、界面活性剤存在下の見かけ溶解度と膜透過性ならびに吸収性の関係性を明らかにした。その結果、親油性の高い化合物において、界面活性剤によって見かけの溶解度が向上することで、わずかに吸収量が向上することを明らかにした。これは、界面活性剤と化合物の結合体が非攪拌水層の膜透過性に寄与するためである。一方、第1章同様に親油性の高い化合物においては、界面活性剤による可溶化効果も膜透過性への影響も確認されなかった。これまで、界面活性剤における Solubility-Permeability Interplay の研究は化合物が完全に溶解した Sink 条件で評価されてきた。しかしながら、多くの難水溶化合物は消化管内で Non-Sink 条件下にある。本研究で得られた知見は、難水溶化合物において、可溶化添加剤を処方する時に、有用な知見となる。さらに、見かけの溶解度、膜透過性の関係を定量的に確認することで、吸収量に対する影響を定量化することができる。本研究で用いた Griseofulvin よりも親油性、膜透過性が高い化合物が多くあり、界面活性剤の処方によって、より顕著に吸収性が向上する可能性がある。また、第1章同様に *in vivo* での界面活性剤の膜透過性や吸収性に関する定量的な影響についての報告が少ない。これらの知見が加わることで、界面活性剤が処方された難水溶性化合物のより正確な吸収性予測が可能になることが期待される。

【第3章】 Non-Sink 条件下におけるナノ粒子化が膜透過性向上をもたらす機構に関する研究

【3-1】 緒言

難水溶性化合物の経口医薬品開発において、ナノ粒子製剤は可溶化製剤と共に多く化合物の吸収性改善に成功してきた。Rapamune[®]、Emed[®]、Tricor[®]、MEGACE[®] など、既に複数のナノ粒子製剤技術を用いた医薬品として承認され、市場で販売されている。

ナノ粒子製剤の吸収性を溶出試験や膜透過性試験などの *in vitro* tools から予測することは困難な課題である⁴⁴⁾。ナノ粒子製剤技術は、Danazol などの難水溶性化合物の吸収性を 10 倍以上改善したことが報告されている。一方、いくつかの化合物においては殆ど吸収性が改善しなかったことが報告されている⁴⁵⁾。ナノ粒子製剤化による吸収性改善のメカニズムは、溶解度、溶出性及び膜透過性に分けて考えることができる⁴⁵⁻⁴⁷⁾。化合物の溶解度と粒子径の関係は、Ostwald–Freundlich 式によって定義づけられる。この式に基づくと、数 10 μm 程度のサイズの一般的な化合物が 100 nm まで粒子サイズが縮小した時に、溶解度は 10~15%程度向上すると計算される^{46,48)}。多くの化合物において、ナノ粒子製剤化は 2 倍以上の吸収性改善が確認されていることから、我々は溶解度がナノ粒子製剤化による吸収性改善に寄与していないと考えられる⁴⁵⁾。次に、化合物の溶出性と粒子径の関係は、Noyes–Whitney 式によって定義づけられる^{45,46)}。難水溶性化合物はその物理学的特性により、吸収の律速段階が溶出プロセスにあることが確認されている。Ritonavir や Fenofibrate で、ナノ粒子化による吸収性改善が、溶出性の改善によって実現していることが報

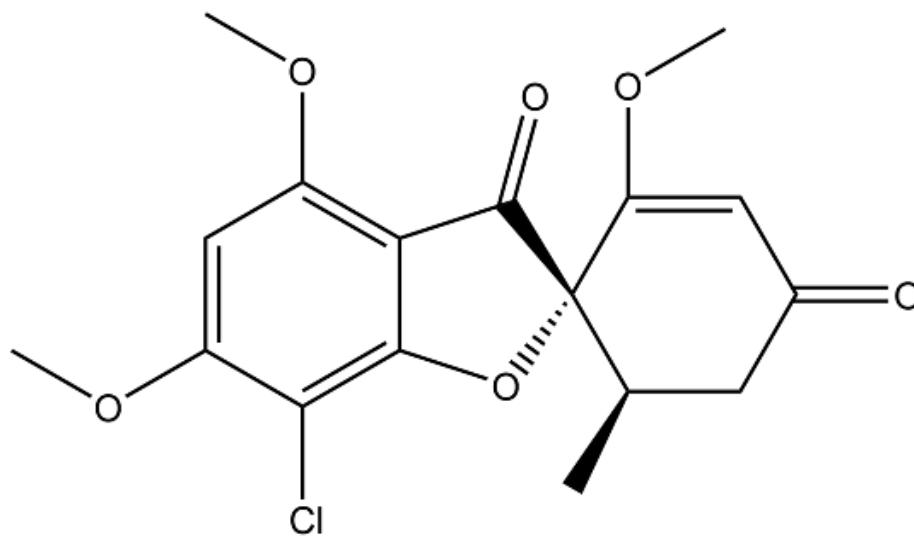
告されている^{49,50)}。近年、ナノ粒子製剤化が膜透過性の改善に寄与し、吸収性改善をもたらす事例が報告されている。Roos や Imono の研究において、Aprepitant や Fenofibrate の難水溶性化合物が、ナノ粒子化によって膜透過性が向上したことが *in vivo* と *in vitro* の両方で確認されている^{30,51)}。これらの研究は、非攪拌水層の見た目の膜透過性にナノ粒子化が寄与することが示唆したが、その詳細なメカニズムはこれまで明らかにされていない。

本研究で、我々は第1章で明らかにした固体薬物による膜透過性向上メカニズムを基に、ナノ粒子製剤のよる膜透過性向上メカニズムを提案する。化合物の膜透過プロセスは非攪拌水層中の拡散プロセスと透過膜中の拡散プロセスに分けることができる。透過膜の拡散プロセスにおいては、固体化合物の影響を受けないことから、ナノ粒子化は透過膜の膜透過性には影響しないと考えることができる。一方、非攪拌水層中の拡散プロセスにおいては、固体化合物の存在によって、見かけの非攪拌水層の厚さが縮小化し、非攪拌水層の膜透過性が向上する。(Figure 6) 第1章の研究において、我々はこの膜透過性への影響が Dose 量に依存することを示した。それは、Donor 槽中の固体化合物の表面積が非攪拌水層の厚さの縮小化効果に比例するためである。したがって、ナノ粒子化（粒子サイズの減少）によっても同様に非攪拌水層の膜透過性が向上し、全体の膜透過性が向上すると考えることができる。

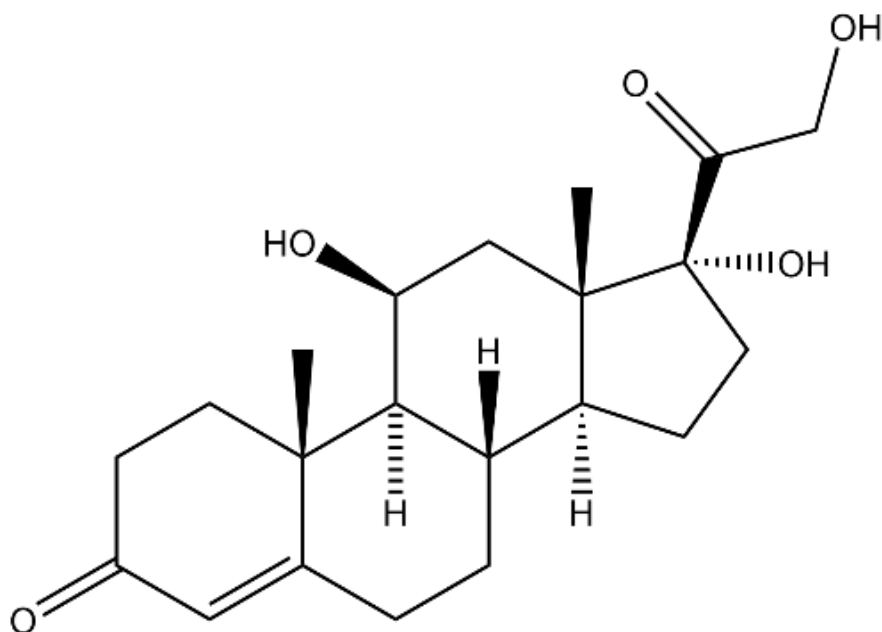
ナノ粒子化による膜透過性向上の効果は化合物の親油性に依存すると考えることができる。透過膜の膜透過性は化合物の親油性に依存することが知られている⁵²⁾。親油性の高い化合物においては、膜透過における律速段階が非攪拌水層中の拡散プロセスにある。一方、親油性の低い化合物においては、膜透過における律速段階が透過膜中の拡散プロセスにある。従って、ナノ粒子化による膜透過性の改善効果は

化合物の親油性に依存すると考えられ、親油性の高い化合物はナノ粒子化によって膜透過性が改善する一方、親油性の低い化合物はナノ粒子化によって膜透過性は殆ど改善しないと考えられる。

本研究の目的は、上記で提案した機構を実験的に証明することである。親油性の高い Griseofulvin (MW=352.77、Log P=2.18)と親油性の低い Hydrocortisone (MW=362.46、Log P=1.55)をモデル化合物として使用した^{53,54)}。(Figure 23) 各化合物をナノ粒子化した際の膜透過性の向上効果を測定した。測定においては、薬物が完全に溶解しない Non-Sink 条件で実施した。各化合物のナノ粒子化は湿式ナノ粉碎法で実施した。膜透過速度の測定には第1章、第2章と同様に MicroFlux[®]を使用した。これらの試験結果は、提案するナノ粒子化による膜透過性向上機構の証明となる。さらに、得られた試験結果から、ナノ粒子化による膜透過性向上効果と化合物の親油性の関係を検証した。



(a) Griseofulvin



(b) Hydrocortisone

Figure 23 The molecular structure of griseofulvin (a) and hydrocortisone (b).

【3-2】 結果および考察

【3-2-1】 マイクロ粒子とナノサスペンションの調製

以降において、マイクロサイズオーダーで調製した試料のマイクロ粒子、ナノサイズオーダーで調製した懸濁液をナノサスペンションと呼ぶ。

2種類のサイズの Griseofulvin のマイクロ粒子を調製した。購入した Griseofulvin を小サイズのマイクロ粒子（以下 S-microparticle griseofulvin）とした。大サイズのマイクロ粒子は購入した Griseofulvin の再結晶化によって調製した。購入した Griseofulvin を 70°C のメタノール中で溶解し、室温下に冷却することで結晶を析出させた。得られた結晶をろ過で分離し、真空乾燥した。得られた結晶を大サイズのマイクロ粒子（以下 L-microparticle griseofulvin）とした。

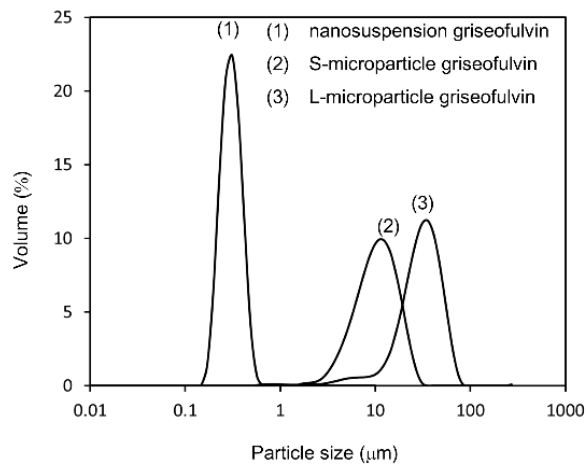
Griseofulvin のナノサスペンション（以下 Nanosuspension griseofulvin）は、過去に報告された Griseofulvin の湿式粉碎法によるナノ粒子の調製方法を基に調製した⁵⁵⁾。Griseofulvin 570 mg を 24 g のジルコニアビーズ（Nikkato 製、YTT 0.8）を用いて、5.1 mL の 1.33% PVP K30/0.066% AOT 溶液中で粉碎した。粉碎はマグネティックスターラーを用いて実施した。700 rpm に設定し、30 分間の攪拌を 4 回繰り返した。各攪拌操作の間は 15 分間静置した。粉碎後、ジルコニアビーズを 27 gauge のシリンジニードル針（テルモ製）で除いたものをナノサスペンションとした。ニードル針の内径はジルコニアビーズよりも小さくなるように選択した。

購入した Hydrocortisone をマイクロ粒子（以下 Microparticle hydrocortisone）とした。Hydrocortisone のナノサスペンション（以下 Nanosuspension griseofulvin）は、過去に報告された Hydrocortisone の湿式粉碎法によるナノ粒子の調製方法を基に調製した^{56,57)}。0.2% PVP K30/0.05% SLS 溶液を粉碎時の溶媒とし、その他条件は Griseofulvin と同じ条件で粉碎し、ナノサスペンションを得た。

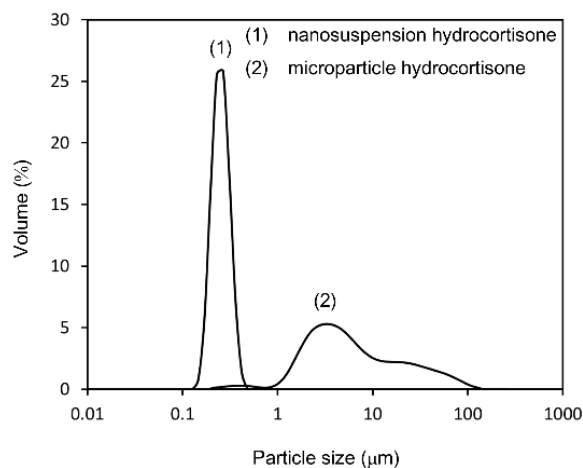
【3-2-2】 マイクロ粒子とナノサスペンションの粒度分布およびモフォロギ

ナノサスペンションの粒度分布は DLS で測定した。マイクロ粒子の粒度分布は Laser diffraction size analyzer で測定した。また、試料のモフォロギを SEM で測定した。Griseofulvin と Hydrocortisone のマイクロ粒子とナノサスペンションの粒度分布を Figure 24 に示す。粒度分布のパラメーターを Table 7 に示す。Griseofulvin においては、3 水準の粒子サイズの試料であることが確認できた。平均粒子径はそれぞれ、Nanosuspension griseofulvin は 0.30 μm 、S-microparticle griseofulvin は 13 μm 、L-microparticle griseofulvin は 30 μm であった。Hydrocortisone においては、2 水準の粒子サイズの試料であることが確認できた。平均粒子径はそれぞれ、Nanosuspension hydrocortisone は 0.25 μm 、Microparticle hydrocortisone は 6.1 μm であった。SEM 画像から確認したモフォロギは、粒度分布測定の結果と合致した。

(Figure 25)



(a) Griseofulvin



(b) Hydrocortisone

Figure 24 PSD of griseofulvin samples (a) and hydrocortisone samples (b).

The results were transformed to volume distribution. The PSD parameters for each sample were summarized in Table 1. The PSD of nanosuspensions was measured by DLS, where water was used as the solvent. The PSD of microparticle samples was measured by laser diffraction size analyzer, where the saturated heptane solution of the compound containing 0.2% sorbitan monooleate was used as the solvent.

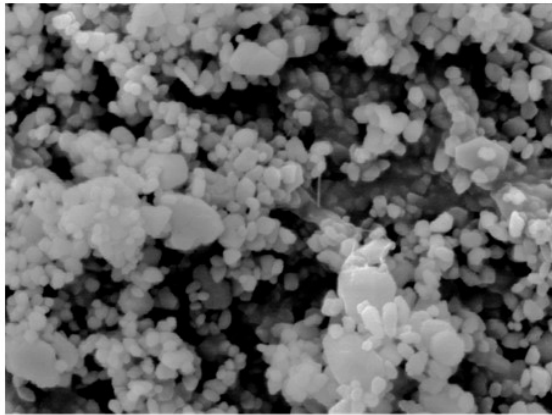
Table 7 PSD parameters of griseofulvin and hydrocortisone samples

Samples	Methods / Solvents	D10 (μm) ^{1,2}	D50 (μm) ^{1,2}	D90 (μm) ^{1,2}
Nanosuspension griseofulvin	DLS / water	0.22 ± 0.00	0.30 ± 0.00	0.43 ± 0.01
	laser diffraction size			
S-microparticle griseofulvin	analyzer / heptane containing 0.2% sorbitan monooleate ³	4.2 ± 1.1	13 ± 1	30 ± 9
	laser diffraction size			
L-microparticle griseofulvin	analyzer / heptane containing 0.2% sorbitan monooleate ³	16 ± 1	34 ± 2	60 ± 5
	laser diffraction size			
Nanosuspension hydrocortisone	DLS / water	0.19 ± 0.00	0.25 ± 0.01	0.33 ± 0.00
	laser diffraction size			
Microparticle hydrocortisone	analyzer / heptane containing 0.2% sorbitan monooleate ³	2.4 ± 0.5	6.1 ± 0.7	35 ± 3
	laser diffraction size			

¹ Results represent average value \pm Standard deviation (SD) ($n = 3$).

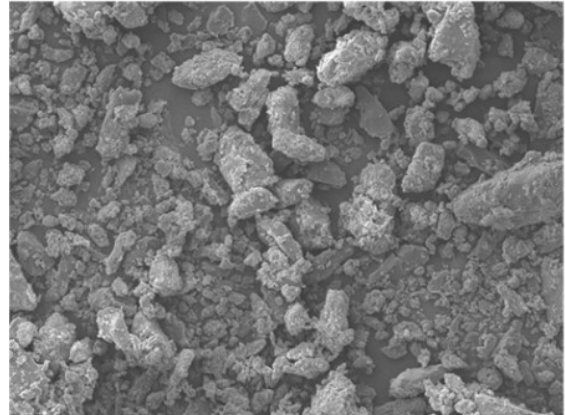
² D10, D50, and D90 describe the diameter of particles at which 10, 50 and 90% of the sample particles are smaller than these values based on a volume distribution, respectively.

³ The saturated heptane solution of the compound containing 0.2% sorbitan monooleate was used as the solvent.



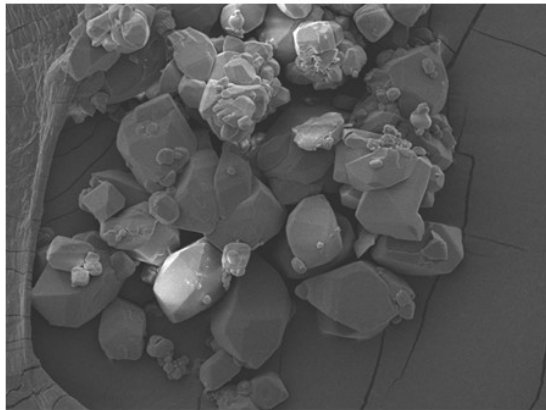
1 μm

(a) Nanosuspension griseofulvin



10 μm

(b) S-microparticle griseofulvin



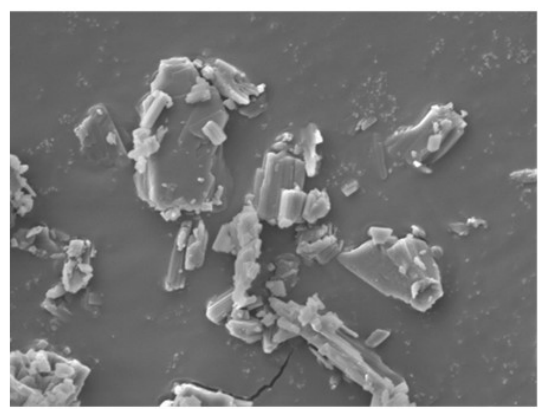
10 μm

(c) L-microparticle griseofulvin



1 μm

(d) Nanosuspension hydrocortisone



5 μm

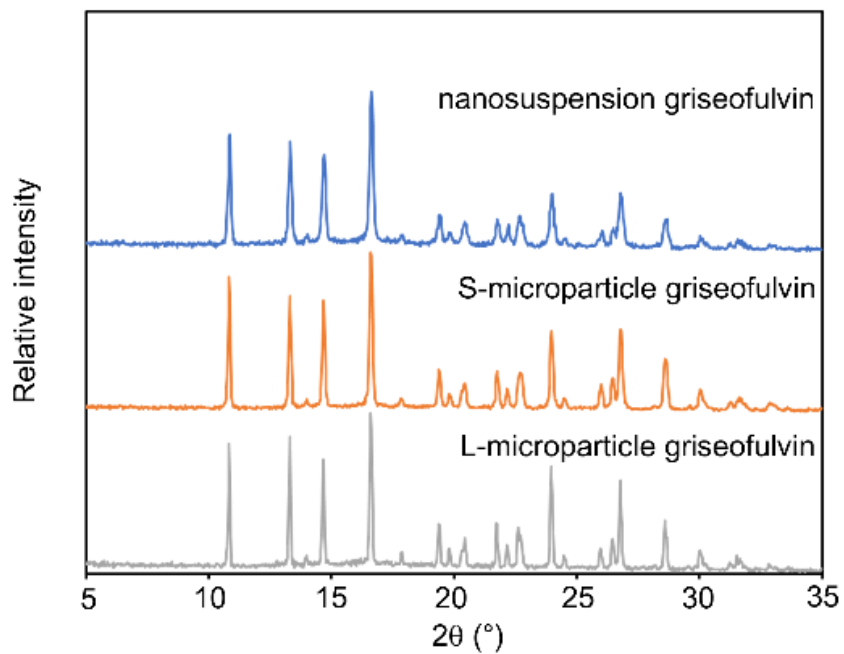
(e) Microparticle hydrocortisone

Figure 25 SEM image of griseofulvin samples (a-c) and hydrocortisone samples (d-

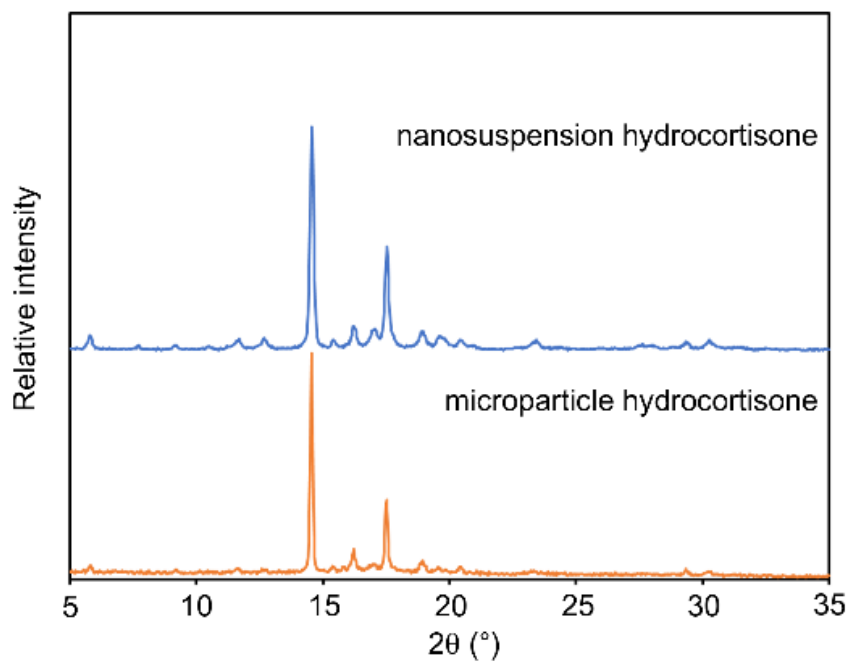
e).

【3-2-3】 粉碎による結晶形の変化

Griseofulvin 及び Hydrocortisone の各試料の粉末 X 線回折パターンを Figure 26 に示す。Griseofulvin 及び Hydrocortisone の両化合物において、マイクロ粒子とナノサスペンションは同一の回折パターンを示した。従って、ナノサスペンションを得るために湿式粉碎を行ったときに、結晶形の転移は起こらなかったことが確認できた。



(a) Griseofulvin



(b) Hydrocortisone

Figure 26 X-ray powder diffraction pattern of griseofulvin samples (a) and hydrocortisone samples (b).

【3-2-4】 Griseofulvin の膜透過性

【3-2-1】で調製した Griseofulvin の膜透過性及び吸収性を示す Flux 量の測定は Pion 製 MicroFlux™ で実施した。Donor 槽の試料溶液は薬物が完全に溶解しない Non-Sink 条件となるように、溶解度以上となる Dose 量を設定した。(Dose 量=200 µg/mL)

Griseofulvin の膜透過試験における、Acceptor 槽及び Donor 槽の濃度時間プロファイルをそれぞれ Figure 27 に示す。式(12)を用いて算出した P_{app} を Figure 28 に示す。

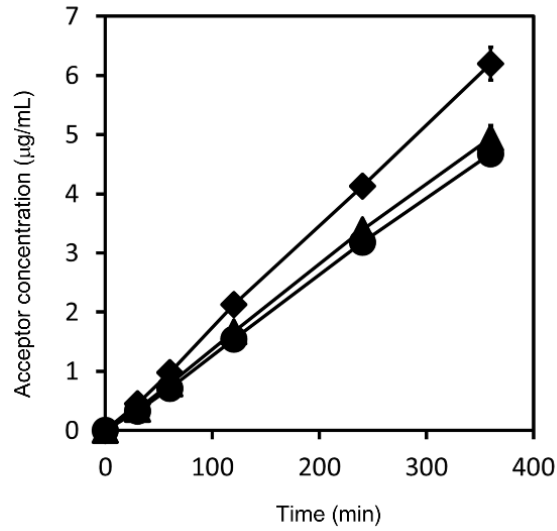
Donor 槽の試料溶液は試験中に化合物が完全に溶解せずに懸濁状態であることを目視で確認した。従って、Donor 槽の試料溶液は化合物が完全に溶解にしない Non-Sink 条件であったことを確認した。Donor 槽の試料は平衡状態になるまで水浴上で攪拌後に試験に用いた。従って、これらの試料における 0 分ポイントの Donor 槽の試料濃度は溶解度となる。各試料の 0 分ポイントの Donor 槽の試料濃度を確認し、試料の溶解度は粒子径に関わらず一定値であり、ナノ粒子化によって溶解度の向上が起こらなかったことを確認した。また、Donor 槽の化合物濃度はいずれの試料でも試験を通じて一定値であることから、Donor 槽の試料は試験を通じて飽和状態を維持したことを確認した。Nanosuspension griseofulvin について、試験中に粒子径を維持したことを DLS によって確認した。

P_{app} の計算結果より、Nanosuspension griseofulvin の P_{app} は S-microparticle griseofulvin より約 30%程度高かった。一方、マイクロ粒子のサイズ違いになる、S-microparticle griseofulvin と L-microparticle griseofulvin の P_{app} は殆ど同じであった。

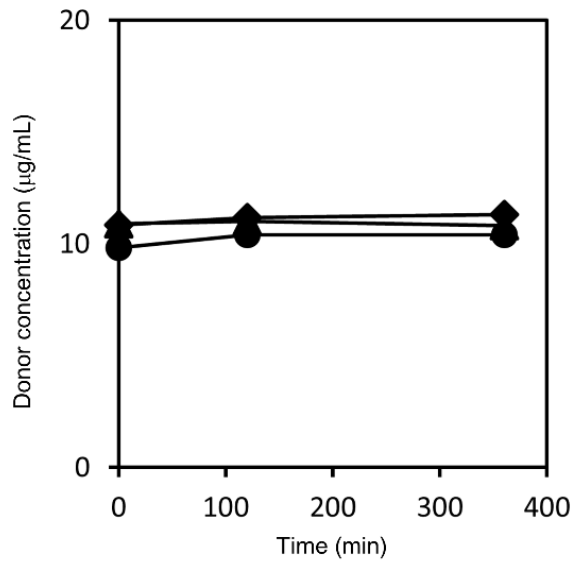
Non-Sink 条件の影響を確認するために、第 1 章で得た Sink 条件における P_{app} と

本章で得た Nanosuspension griseofulvin の P_{app} を計算すると Figure 29 となった。

Non-Sink 条件で測定したナノサスペンションは Sink 条件よりも約 50%膜透過性が向上していた。ナノサスペンションの膜透過性においては、Non-Sink 条件での評価が決定的な影響をもたらすことを確認した。



(a) Acceptor chamber



(b) Donor chamber

Figure 27 Griseofulvin concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.

The results represent the average griseofulvin concentration \pm SD ($n = 3$) for Nanosuspension griseofulvin (◆), S-microparticle griseofulvin (▲) and L-microparticle griseofulvin (●).

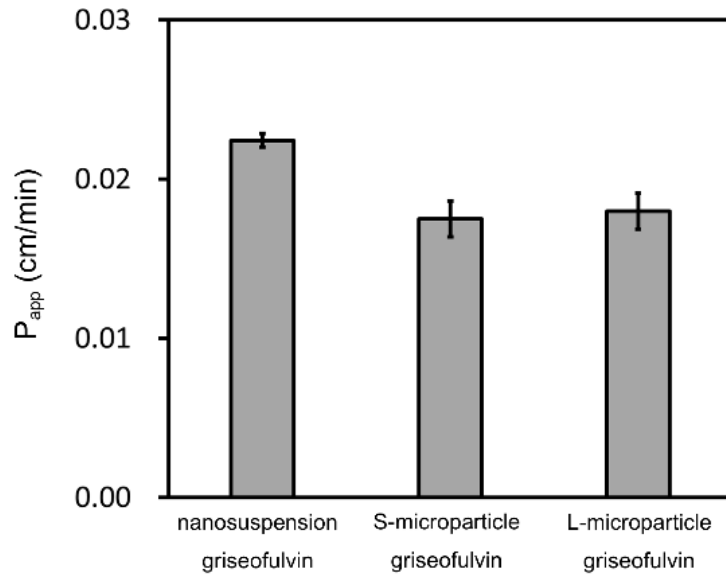


Figure 28 Calculated apparent permeability (P_{app}) of Griseofulvin.

The results represent the average $P_{app} \pm SD$ ($n = 3$).

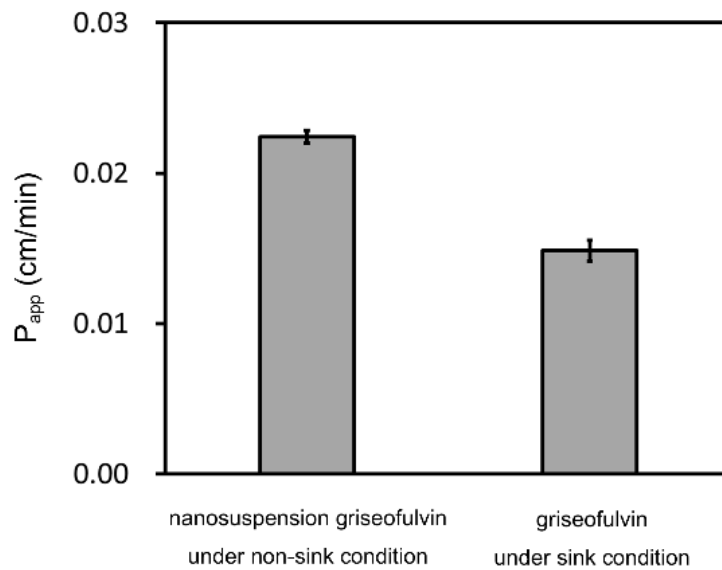


Figure 29 Comparison of P_{app} of nanosuspension griseofulvin under non-sink conditions and sink conditions.

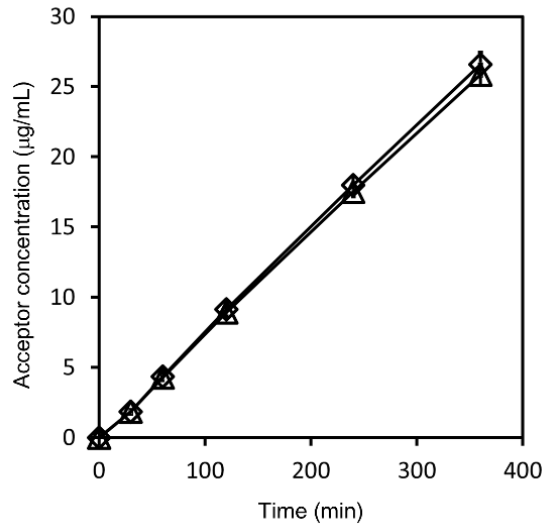
【3-2-5】 Hydrocortisone の膜透過性

【3-2-1】で調製した Hydrocortisone の膜透過性及び吸収性を示す Flux 量の測定は Pion 製 MicroFlux™ で実施した。Donor 槽の試料溶液は薬物が完全に溶解しない Non-Sink 条件となるように、溶解度以上となる Dose 量を設定した。(Dose 量 = 2000 µg/mL)

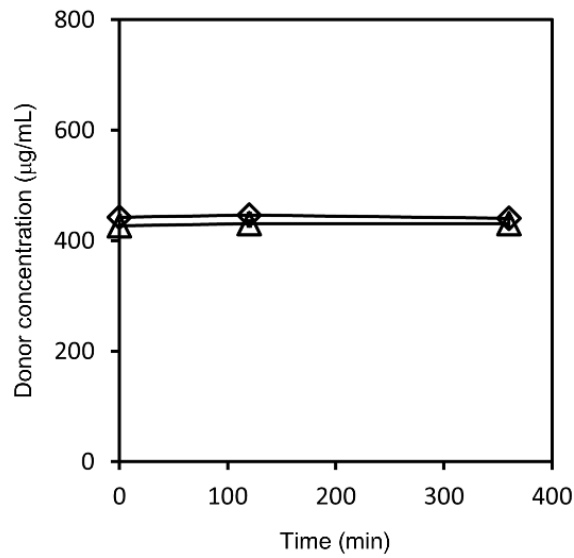
Hydrocortisone の膜透過試験における、Acceptor 槽及び Donor 槽の濃度時間プロフィールをそれぞれ Figure 30 に示す。式(12)を用いて算出した P_{app} を Figure 31 に示す。

Hydrocortisone の膜透過試験において、Griseofulvin 同様、Donor 槽の試料溶液が Non-Sink 条件下にあること、ナノサイズ化によって溶解度が向上しなかったこと、Donor 槽の試料溶液が飽和状態を維持したことを確認した。また、Nanosuspension hydrocortisone の粒子径が試験を通じて維持したことを DLS で確認した。

P_{app} の計算結果より、Griseofulvin と違い、Nanosuspension hydrocortisone と Microparticle hydrocortisone の P_{app} は殆ど差がなかった。つまり、Hydrocortisone においては、ナノ粒子化によって膜透過性の向上は起こらなかった。



(a) Acceptor chamber



(b) Donor chamber

Figure 30 Hydrocortisone concentration-time profile in the acceptor and donor compartments as determined by permeability measurements.

The results represent the average hydrocortisone concentration \pm SD ($n = 3$) for Nanosuspension hydrocortisone (\diamond) and Microparticle hydrocortisone (\triangle).

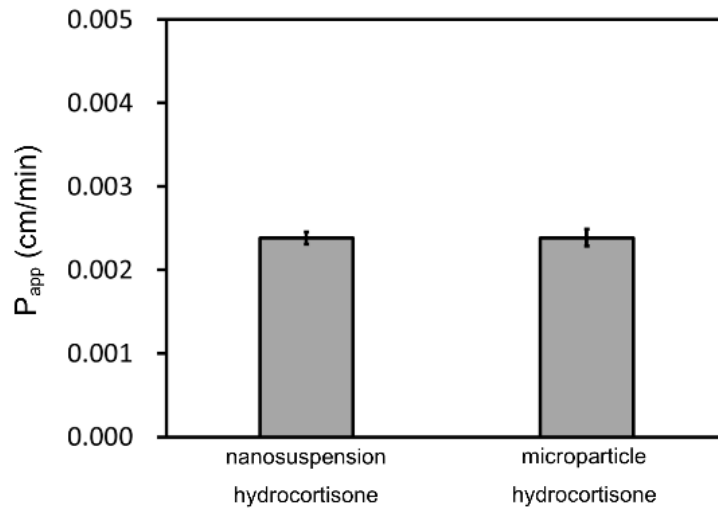


Figure 31 Calculated apparent permeability (P_{app}) of Hydrocortisone.

The results represent the average $P_{app} \pm SD$ ($n = 3$).

【3-2-6】透過膜および非攪拌水層の膜透過性

本項では、【理論】で説明した理論式を膜透過速度試験に適用し、各モデル化合物の透過膜及び非攪拌水層の膜透過性を計算した。Griseofulvin 及び Hydrocortisone は中性化合物であることから、本試験における Donor 槽における分子状態は UFDs もしくは固体化合物となる。この時、 $P_{m(app)}=P_{m(U)}$ となる。

Griseofulvin は、第 1 章で、 $P_{m(app)}=P_{m(U)}=0.0284$ cm/min であることを確認した。また、膜透過試験において P_{app} を求めた。したがって、式(2)に $P_{m(app)}$ と P_{app} を代入し、各試料の $P_{UWL(app)}$ を計算した。(Table 8) ナノサスペンションの $P_{UWL(app)}$ はマイクロ粒子の約 2 倍であることが確認できた。

Table 8 Calculated permeability of griseofulvin

Parameter	Nanosuspension	S-microparticle	L-microparticle
	griseofulvin	griseofulvin	griseofulvin
Measured P_{app} (cm/min)	0.0224	0.0175	0.0180
$P_{m(app)}$ (cm/min)		0.0284	
Calculated $P_{UWL(app)}$ (cm/min)	0.107	0.0456	0.0490

Hydrocortisone については、 $P_{m(app)}$ が報告されていない。そこで、第 1 章で求めた非攪拌水層の見かけの厚さ ($h_{UWL(app)}$)から $P_{UWL(app)}$ を理論的に見積もった。膜透過試験の結果から、Nanosuspension hydrocortisone 及び Microparticle hydrocortisone は共に $P_{app}=0.0239$ cm/min であった。(5)式から、 $P_{UWL(app)}$ は $h_{UWL(app)}$ と $D_{aq(app)}$ で表すことができる。ここで、(13)式から Hydrocortisone の $D_{aq(app)}$ を計算すると、 $D_{aq(app)}=5.12 \times 10^{-6}$ cm²/sec であった。 $h_{UWL(app)}$ は第 1 章の研究から、Non-Sink 条

件においては 100 μm 未満であると考えられる。 $h_{\text{UWL(app)}}$ が 1 μm から 100 μm の時、 Hydrocortisone の $P_{\text{UWL(app)}}$ は Table 9 の通り計算された。 また、 (2)式から $P_{\text{m(app)}}$ を計算した。 $h_{\text{UWL(app)}}$ が十分小さくても、 $P_{\text{m(app)}}$ は $P_{\text{UWL(app)}}$ よりも十分小さくなった。 従って、 Hydrocortisone の膜透過の律速段階が透過膜の拡散プロセスにあることが確認できた。

Table 9 Calculated permeability of hydrocortisone

Parameter				
Measured P_{app} (cm/min)	0.00239			
$h_{\text{UWL(app)}}$ (μm)	100	50	10	1
Calculated $P_{\text{UWL(app)}}$ (cm/min)	0.0307	0.0615	0.307	3.07
Calculated $P_{\text{m(app)}}$ (cm/min)	0.00259	0.00249	0.00241	0.00239

【3-2-7】 Non-Sink 条件下における非攪拌水層の見かけの厚さ

第1章と同様に、(14)式から Griseofulvin におけるナノサスペンション及びマイクロ粒子における見かけの非攪拌水層の厚さ ($h_{UWL(app)}$)を計算した。(Figure 32)比較のため、Sink 条件下における見かけの非攪拌水層の厚さを併記した。 $(h_{UWL(app)}=100 \mu\text{m})$ マイクロ粒子条件では $h_{UWL(app)}$ は約 $70 \mu\text{m}$ 、ナノサスペンション条件では $h_{UWL(app)}$ は約 $30 \mu\text{m}$ と計算された。従って、ナノ粒子化によって $h_{UWL(app)}$ は $1/3$ 以下まで縮小化されること確認した。

非攪拌水層の見かけの厚さの縮小化は、固体化合物の表面積に比例することから、マイクロ粒子領域においても、粒子サイズが異なれば同様に、非攪拌水層の見かけの厚さに違いが出ると考えられた。しかしながら、S-microparticle griseofulvin と L-microparticle griseofulvin の $h_{UWP(app)}$ は殆ど差がなかった。Xia の研究で、同様にマイクロ粒子領域では P_{app} がほとんど粒子サイズに依存しないが、ナノ粒子領域で向上することが報告されているが、そのメカニズムは明らかにされていない⁵⁸⁾。マイクロ粒子領域の粒子径と膜透過性の関係性を理解するには更なる研究が必要と考えられる。

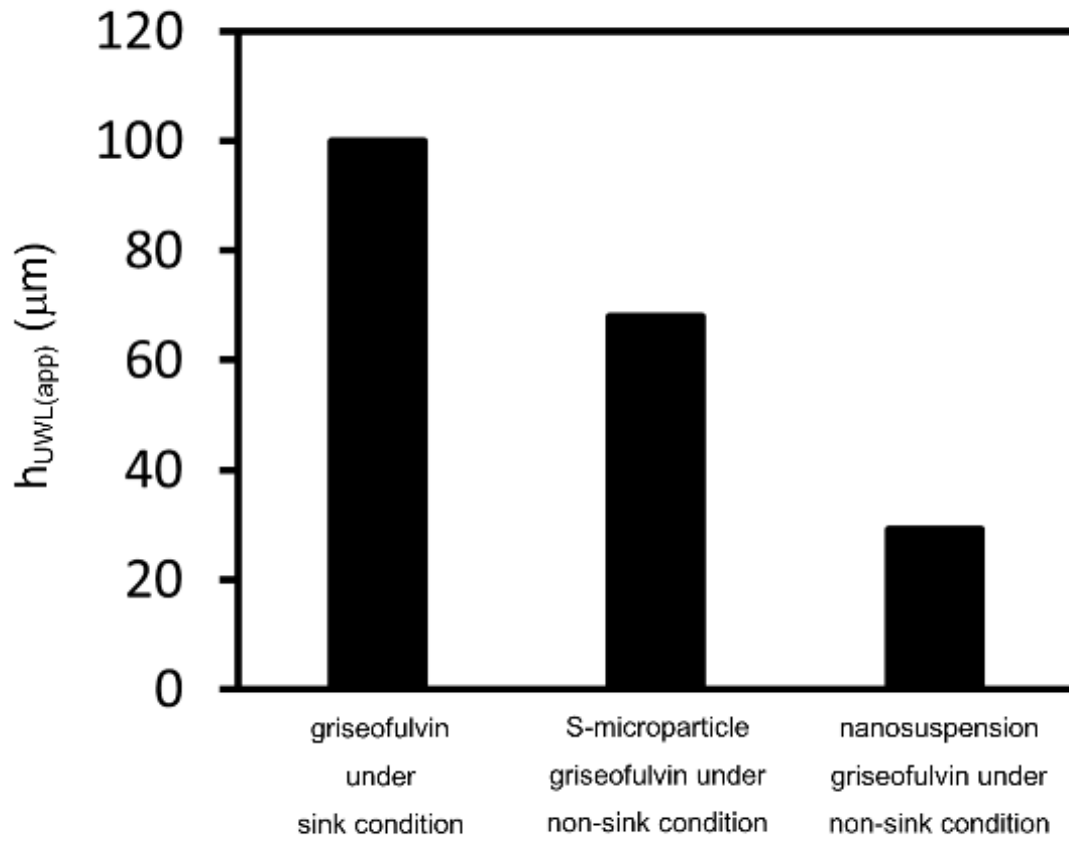


Figure 32 Calculated unstirred water layer (UWL) thickness under sink and non-sink conditions for micro-particle samples and for nanosuspensions.

【3-2-8】 ナノ粒子化による膜透過性の向上効果

本項では、薬物の親油性とナノ粒子化による膜透過性の向上効果の関係を検討した。そのため、膜透過性の異なる化合物において、ナノ粒子化による膜透過性の向上効果を Griseofulvin の膜透過試験の知見に基づいて計算した。

【3-2-7】の研究において、Griseofulvin の $h_{UWL(app)}$ はナノ粒子化合物では 30 μm 、マイクロ粒子化合物では 70 μm 、薬物が完全に溶解した Sink 条件では 100 μm となることを確認した。一般的な低分子化合物において、この非攪拌水層の厚さが適用できると仮定した。

条件 1: Sink 条件、 $h_{UWL(app)}=100 \mu\text{m}$

条件 2: Non-Sink 条件かつマイクロ粒子化合物、 $h_{UWL(app)}=70 \mu\text{m}$

条件 3: Non-Sink 条件かつナノ粒子化合物、 $h_{UWL(app)}=30 \mu\text{m}$

P_{app} の算出は、第 1 章の研究で導いた(15)式を使用し、実施した。計算を行う、 $P_{m(app)}$ の範囲は広範囲の化合物をカバーするために、 $P_{m(app)}=0.001 \text{ cm/min} \sim 1.0 \text{ cm/min}$ とした。また本項では、モデル化合物の分子量を 350 とし、式(13)から $D_{aq(app)}=5.20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ と計算された。式(5)を用いて条件 1-3 における $P_{UWL(app)}$ を計算し、 $P_{m(app)}=0.001 \text{ cm/min} \sim 1.0 \text{ cm/min}$ の範囲で P_{app} を計算した結果が Figure 33 となった。

Griseofulvin は、 $\text{Log}P=2.18$, $P_{m(app)}=0.0284 \text{ cm/min}$ である。Figure 33 に基づくと、ナノ粒子化によって Sink 条件よりも P_{app} が 50% 向上することが計算される。Hydrocortisone は、 $\text{Log}P=1.55$, $P_{m(app)}=0.00259/\text{min}$ である。Figure 33 に基づくと、ナノ粒子化によって P_{app} がほとんど向上しないことが計算される。これらの計算結果は、本研究の膜透過試験の結果と合致している。次に、より親油性の高い化合物のナノ粒子化の影響について計算した。中性化合物 Progesterone は $\text{Log}P=3.48$

である。Progesterone の P_{app} は、PAMPA による評価によって、Griseofulvin の 2~3 倍であることが報告されている⁵⁹⁾。Progesterone の Sink 条件下での P_{app} が Griseofulvin の 2 倍と仮定すると、Progesterone の $P_{m(app)}=1.0$ cm/min と計算できる。従って、Figure 33 に基づくと、Progesterone はナノ粒子化によって P_{app} が 3 倍になると計算される。ここで、親油性の高い複数の化合物について、ナノ粒子化による膜透過性向上効果が *in vivo* で評価されており、概ね 2~3 倍程度の P_{app} の向上が報告されている⁴⁷⁾。Figure 33 の計算結果はこの報告と概ね合致しており、妥当な結果であるといえる。

経口医薬品の吸収量は、ヒトの小腸内における化合物濃度と膜透過性に比例する。Figure 33 に基づくと、親油性の高い化合物はナノ粒子化によって、膜透過性を大きく向上し、その結果、吸収性を大きく改善すると考えられる。一方、親油性の低い化合物は、ナノ粒子化によって、殆ど膜透過性を向上しないと考えられる。ナノ粒子化は溶解度向上に殆ど寄与しないことから、ナノ粒子化は親油性の低い化合物の吸収性をほとんど改善しないと考えられる。この我々の知見は、ナノ粒子製剤化による吸収性改善効果が「なぜ化合物ごとに大きく異なるか？」を説明ことにつながる。Figure 33 の化合物の親油性と膜透過性の改善効果の関係は、難水溶性化合物の製剤設計において重要な知見になりうる。

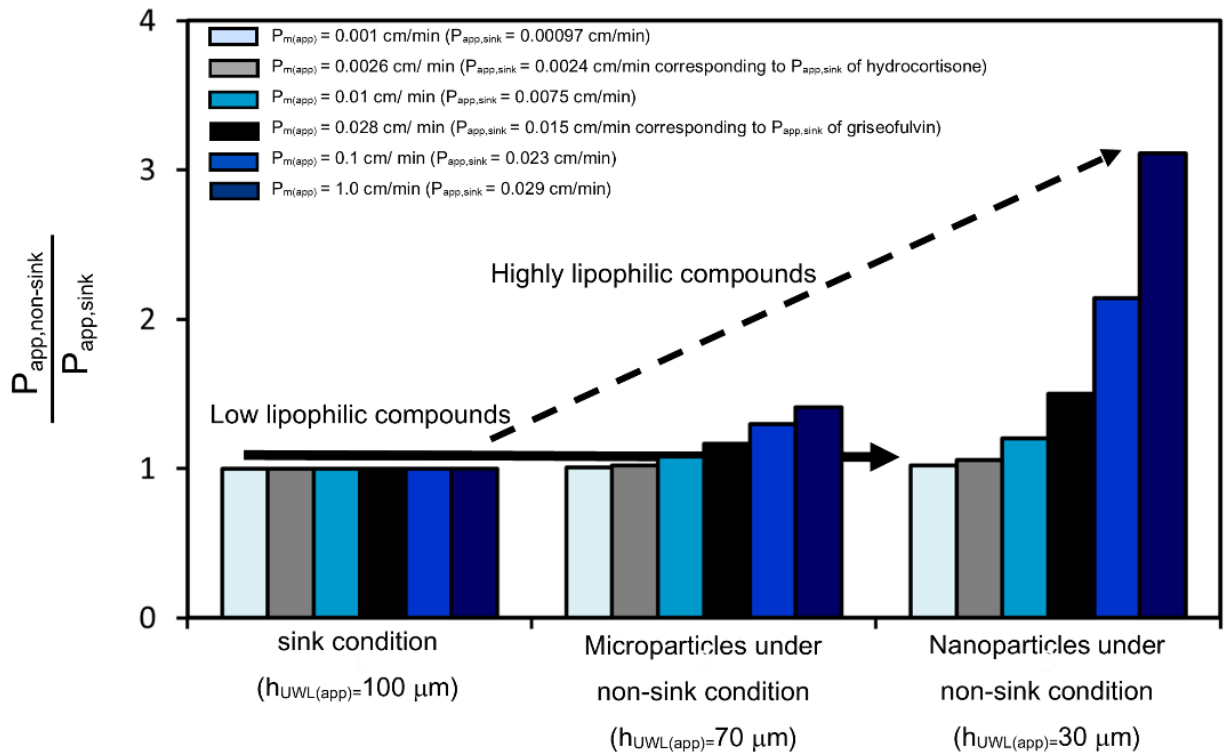


Figure 33 Calculated permeability improvement effect for microparticle and nanoparticle compounds under non-sink conditions.

The permeability of model compounds ranges from $P_{app,sink}=0.00097 \text{ cm/min}$ to $P_{app,sink}=0.029 \text{ cm/min}$.

$P_{app,sink}$ and $P_{app,non-sink}$ represent the Papp under sink conditions and under non-sink conditions, respectively.

【3-2-9】 Non-Sink 条件下におけるナノ粒子製剤の膜透過機構

本研究で検証したナノ粒子化による膜透過性向上のメカニズムを図示すると、Figure 34 となる。Figure 34 はナノ粒子化による膜透過改善が親油性の低い化合物では得られず、親油性の高い化合物で得られるかを説明する。Sink 条件下と比較し、 $h_{UWL(app)}$ は Non-Sink 条件下で縮小化し、固体薬物の粒子サイズが小さくなるほど、その縮小化の度合が大きくなる。ナノ粒子化によって $h_{UWL(app)}$ は大きく縮小化し、その結果 $P_{UWL(app)}$ は大きく改善する。親油性の高い化合物は $P_{m(app)}$ が $P_{UWL(app)}$ とほとんど変わらないか、大きい。したがって、 $P_{UWL(app)}$ が改善することで P_{app} が向上する。一方、親油性の低い化合物は $P_{m(app)}$ が $P_{UWL(app)}$ よりも極めて小さい。したがって、 $P_{UWL(app)}$ が改善しても P_{app} が向上しない。本研究の Griseofulvin と Hydrocortisone の膜透過試験の結果は Figure 34 と合致している。

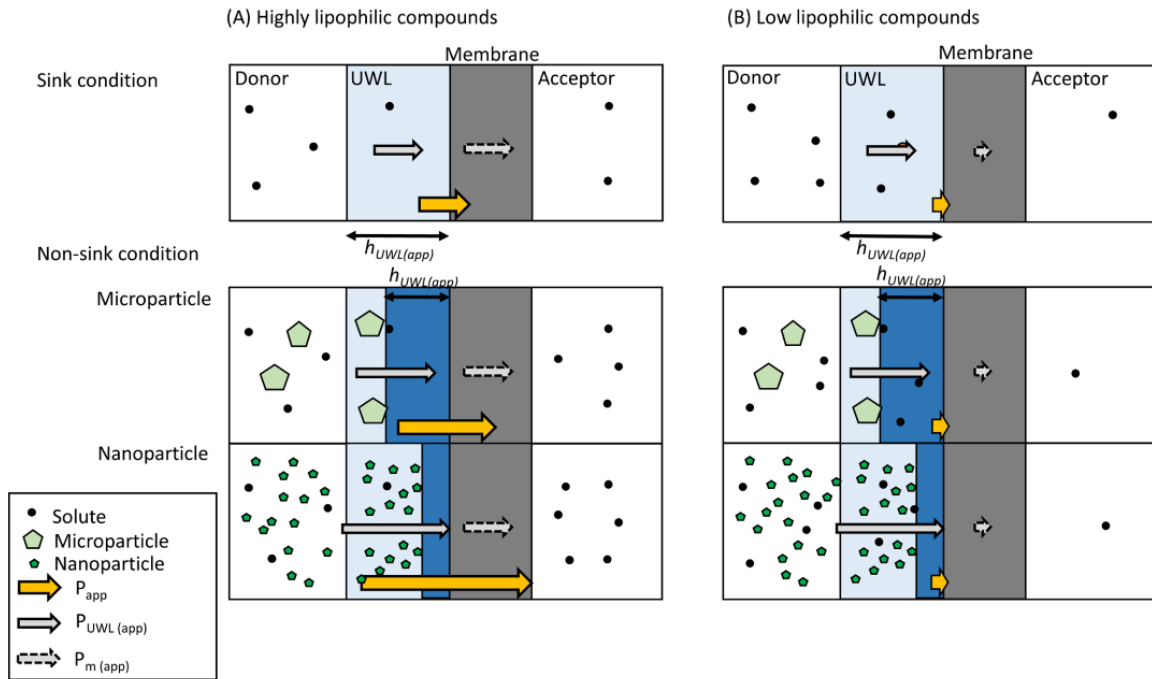


Figure 34 Proposed mechanism of permeability improvement by nanoparticle formulations

【3-3】 小括

本章の研究によって、ナノ粒子製剤の膜透過機構を実験的に証明することで、ナノ粒子化による膜透過性向上効果を定量的に評価することを可能にした。更に、ナノ粒子化による吸収性の改善効果が親油性の高い化合物で大きく、親油性の低い化合物では殆ど無いことを明らかにした。これまでナノ粒子化による膜透過性向上については報告されていたが、詳細の機構までは明らかにされていなかった。それは、既存の膜透過性の評価は化合物が完全に溶解した Sink 条件で実施するために、粒子径が膜透過性に与える影響を評価することが出来てなかったためであると考えられる。第 1 章で化合物が完全に溶解しない Non-Sink 条件下での膜透過機構を明らかにすることで、本章の研究でナノ粒子化による膜透過性の影響を明らかにすることが出来た。更に、ナノ粒子化による膜透過性向上機構から、化合物の親油性が高くなるほど、膜透過性が一層向上されることを発見した。本研究の知見に基づくと、 $\text{LogP} > 3.5$ の化合物は、ナノ粒子化によって 3 倍以上は吸収量が向上すると考えられる。一方で、 $\text{LogP} \leq 1.5$ の化合物は、ナノ粒子化によって殆ど吸収量が改善しないと考えられる。これらの知見は、難水溶性化合物の製剤設計を行う上で重要なものとなる。

また本章の研究によって、ナノ粒子製剤の吸収性評価において、溶出性だけでなく、Non-Sink 条件下での膜透過性の評価が重要であることが示された。これまで、ナノ粒子製剤の吸収性予測は主に溶出試験から行われていたが、正確な予測は困難であった。それは、ナノ粒子化の膜透過性への影響が評価できていなかったためである。本研究で用いた Non-Sink 条件下での膜透過性を加えて評価することは、より正確なナノ粒子製剤の吸収性予測へ繋がると考えられる。膜透過評価で用いた MicroFlux は、既に *in vivo* との相関が複数報告されており、これらの知見を組み合

わせることは有効なアプローチとなる。

総括

難水溶性化合物の吸収性予測は、溶出試験と膜透過評価から行われてきたが、正確な評価を行うことは医薬品開発における長年の課題になっている。溶出試験については、既に多くの研究によって発展し、生体内を反映した溶出試験法が開発されてきた。その結果、多くの難水溶性化合物について吸収性の予測精度が改善した。しかしながら、未だに難水溶性化合物の正確な吸収性予測が難しく、難水溶性化合物は難度の高い医薬品開発のターゲットにある。一方、膜透過性評価については、PAMPA 及び Caco-2 細胞などの代表的な評価方法が開発されて以降、溶出試験と比較すると評価技術に関する研究は少ない状況にあった。そこで、本研究ではより生体内の条件に近い条件下での膜透過性に着目した。難水溶性化合物の多くは、消化管内で完全に溶解せずに Non-Sink 条件にある。Non-Sink 条件下で膜透過試験を実施したところ、既存の膜透過試験で用いられる、化合物が完全に溶解した Sink 条件よりも、膜透過性が高くなることが確認された。この知見をより詳細に理解するために、Non-Sink 条件下の膜透過機構の解明を試み、実験的に証明することに成功した。Non-Sink 条件下の膜透過性の向上効果は、吸収性予測では無視できないほど大きく、親油性の高い化合物では 2~3 倍向上しうる。従って、難水溶性化合物のより正確な吸収性予測には、溶出試験だけでなく、Non-Sink 条件下での膜透過性評価が重要であると考えられる。更に、Dose 量、添加剤、原薬物性（粒子径）などの条件が臨床試験の状況を反映し、膜透過性を評価することが、より正確な吸収性予測に繋がる。以下に各章の研究で得られた知見の要点を記す。

第 1 章では、溶解度以上に Dose 量を増やした際の化合物の膜透過性を評価した。

親油性の高い Griseofulvin は Dose 量を増加していくと、溶解度が一定値のまま、膜透過性が 20~30%向上した。一方、親油性の低い Triamcinolone は Dose 量が増加しても、溶解度、膜透過性は一定値であった。これらの膜透過性評価の結果により、化合物が完全に溶解しない Non-Sink 条件下での膜透過性の機構を証明することに成功した。溶解しない固体化合物が非攪拌水層の見かけの厚さを縮小化させ、その結果、非攪拌水層の膜透過性を向上させる。親油性の高い化合物は膜透過の律速段階が非攪拌水層における化合物の拡散プロセスにあるが、親油性の低い化合物は膜透過の律速段階が透過膜における化合物の拡散プロセスにある。2つのモデル化合物はこの違いによって、Dose 量が増加した際の膜透過性の影響が異なった。更に、本研究の結果に基づき、親油性の高い化合物は Dose 量が増加することで、最大 2 倍程度膜透過性が向上することを示すことができた。既存の膜透過性評価法は化合物が完全に溶解した Sink 条件下で評価を行ってきた。しかしながら、難水溶性化合物の多くは消化管内で完全に溶解せずに Non-Sink 条件下にある。本章の研究は、難水溶性化合物の吸収性を正確に評価するために、Non-Sink 条件下での膜透過性評価が重要な役割を果たすことを示唆するものである。

第 2 章では、第 1 章の膜透過性評価条件に SLS を添加することで、Non-Sink 条件下における溶解度、膜透過性および吸収性の関係性を検証した。親油性の高い Griseofulvin は、SLS の添加によって、見かけの溶解度は向上した一方で、見かけの膜透過性は低下した。更に、吸収量はわずかに増加した。親油性の低い Triamcinolone は、SLS の添加によって、見かけの溶解度、見かけの膜透過性、吸収量に変化はなかった。これらの膜透過性評価の結果は、SLS と化合物の結合体が非攪拌水層の見かけの膜透過性に影響することで、Non-Sink 条件下では吸収量をわず

かに向上させることを示す。これまで界面化製剤を代表とする可溶化添加剤による膜透過抑制効果は化合物が完全に溶解する Sink 条件で評価されてきたため、吸収量への影響を直接評価することが出来ていなかった。本研究における、Non-Sink 条件下での膜透過性評価法は、溶解度の向上効果、膜透過性への影響を同時に評価するため、直接的に吸収量の影響を評価することを可能とした。本研究で使用した MicroFlux™ は溶出性と膜透過性を同時に評価することができ、Dose 量、試験液を臨床試験条件に合わせた条件下で実施することは、可溶化添加剤を用いた難水溶性化合物の正確な吸収性予測に繋がる可能性が示唆された。

第 3 章では、ナノ粒子製剤の膜透過性を Non-Sink 条件下で評価することで、化合物のナノ粒子化による膜透過性向上の機構を明らかにした。親油性の高い Griseofulvin は、ナノ粒子化によって溶解度は変化しなかったが、膜透過性が約 30% 向上した。一方、親油性の低い Hydrocortisone は、ナノ粒子化によって溶解度、膜透過性ともに変化しなかった。第 1 章の研究同様、ナノ粒子化は非攪拌水層の見かけの厚さを縮小化することで、非攪拌水層の膜透過性を向上させる。親油性の低い化合物は膜透過の律速段階が透過膜の拡散プロセスにあるため、非攪拌水層の膜透過性が向上しても、膜透過性全体は変化しなかった。更に、証明された機構から、化合物の親油性とナノ粒子化による膜透過性の改善効果が相関することが言える。LogP>3.5 の化合物では、ナノ粒子化によって 3 倍程度膜透過性が向上すると考えられる。一方、LogP≤1.5 の化合物は、ナノ粒子化によって殆ど膜透過性が改善しないと考えられる。これまでに、多くの化合物でナノ粒子化による吸収性改善が試みられたが、いくつかの化合物で吸収性が改善されなかった。本研究の知見に基づくと、親油性の低い化合物において、ナノ粒子化は吸収性改善が期待されないことから、他のア

プローチを選択すべきであることが明らかとなった。

謝辞

本学位論文に関わる研究を進めるにあたり、多くの方々にご支援をいただいたことを、ここに深く御礼申し上げます。

本研究の立ち上げから本学位論文をまとめるまで、絶えず温かいご指導をいただいた星薬科大学 米持悦生先生には心より感謝申し上げます。ご指導のおかげで、自らの研究に対して客観性を意識し、医薬品産業として有用になる研究を心掛けることが出来ました。

本学位論文に関わる全ての研究に共同研究者として協力いただき、実験から論文執筆までご支援いただいた中外製薬株式会社 高田則幸氏に深く感謝申し上げます。共に研究を進めることで、データに対する厳しい視点を持ち、自信を持ってこの研究を進めることが出来ました。

本研究の主要な評価技術となった膜透過試験の立ち上げにご協力いただいた田端一敏氏、第3章のナノ粒子製剤のSEM評価にご協力いただいた匹田慎平氏に深く感謝申し上げます。限られた情報の中で試行錯誤を共にいただき、研究を優位に進めることが出来ました。

常にわたくしの研究に対してアドバイスし、ともに切磋琢磨していただける中外製薬株式会社 分析研究部、中外製薬工業株式会社 品質研究部の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、研究や論文作成に理解を示し、生活面、精神面ともに支えてくれた妻加奈子に親愛と感謝の意を表します。

実験の部

【第 1 章】 試料および実験方法

【1-1】 試料

Griseofulvin と Triamcinolone は東京化成から購入した。緩衝液調製用の試薬 (NaH₂PO₄、NaOH、NaCl)、MeCN、TFA、エチレングリコール、DMA、DMSO は富士フィルム和光純薬から購入した。Gastrointestinal tract (GIT) lipid、ASB は Pion より購入した。

【1-2】 膜透過性および Flux の評価

膜透過性及び吸収性を示す Flux 量の測定は Pion 製 MicroFlux™ で実施した。測定は以下の条件で実施した。

Table 10 Test conditions for permeability measurements

Conditions	Parameters
透過膜	PVDF メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm) に 25 μL GIT lipid を添加したもの
Donor 槽	20 mL 試料溶液
Acceptor 槽	20 mL ASB
Acceptor 槽/ Donor 槽の攪拌速度	150 rpm
Acceptor 槽/ Donor 槽の温度	37 °C
Acceptor 槽/ Donor 槽のサンプリング時間	試験開始後 0, 30, 60, 120, 240 及び 360 分

Donor 槽の試料溶液は Table 3 の条件を使用した。各モデル化合物に対して Dose

量を変化し、Flux 量の測定を実施した。5 µg/mL dose の Griseofulvin 溶液及び 100 µg/mL dose の Triamcinolone 溶液は、化合物の溶解度以下の条件になり、Sink 条件となる。5 µg/mL dose の Griseofulvin 溶液及び 100 µg/mL dose の Triamcinolone 溶液は、DMSO を溶解溶媒として調製した濃縮溶液 0.1 mL と pH6.5 緩衝液 19.9 mL を混和することで調製した。その他の試料溶液は、Dose 量が溶解度以上の条件になり、化合物が全て溶解しない Non-Sink 条件となる。規定量の Griseofulvin もしくは Triamcinolone を pH6.5 緩衝液に添加し、37°C で設定した水浴上で十分時間攪拌したものを Donor 槽の試料溶液として用いた。膜透過性の測定は N=3 で繰り返して実施した。

Donor 槽及び Acceptor 槽の濃度時間プロファイルの算出には、規定時間にサンプリングし、UHPLC で濃度決定をした結果を用いた。Acceptor 槽のサンプルは規定時間に 100 µL サンプリングしたものを溶媒で 2 倍希釈し、UHPLC で分析した。Donor 槽のサンプルは規定時間に 400 µL サンプリングし、サンプリング液全量を 0.22 µm 孔径の PTFE メンブレンフィルターでろ過した。ろ液を溶媒で 2 倍希釈し、UHPLC で分析した。

【1-3】 UHPLC による試料濃度の測定方法

UHPLC 測定は以下の条件で実施した。注入量及び UV 波長以外は、いずれのモデル化合物とも共通した条件で測定を実施した。

Table 11 Test conditions for UHPLC measurements

Conditions	Parameters
装置	Acquity UPLC H-Class system (Waters)

検出器	UV
カラム	Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7 μm, 2.1 × 50 mm
カラム温度	40 °C
流速	1.0 mL/min
移動相 A	Water /TFA (2000:1)
移動相 B	MeCN /TFA (2000:1)
移動相の Gradient 条件	5%B (0.0 min)→100%B (2.0 min), Linear gradient
注入量 (Griseofulvin)	5 μL
UV 波長 (Griseofulvin)	240 nm
注入量 (Triamcinolone)	1 μL
UV 波長 (Triamcinolone)	292 nm

【第2章】 試料および実験方法

【2-1】 試料

Griseofulvin と Triamcinolone は東京化成から購入した。緩衝液調製用の試薬 (NaH₂PO₄、NaOH、NaCl)、MeCN、TFA、エチレングリコール、DMA、DMSO は富士フィルム和光純薬から購入した。SLS は Sigma-Aldrich から購入した。GIT lipid、ASB は Pion より購入した。

【2-2】 膜透過性および Flux の評価

膜透過性及び吸収性を示す Flux 量の測定は Pion 製 MicroFlux™ で実施した。

(Figure 8) 測定は第1章と同じ条件で実施した。(Table 10)

Donor 槽の試料溶液は試験液が Table 12 の条件を使用した。SLS の添加量は、処方として添加可能な SLS 量から決定した。医薬品添加物規格において、投与可能な SLS の最大量は 300 mg であることが報告されている⁶⁰⁾。また、絶食条件下において、小腸内の溶媒体積は 50~300 mL 程度と報告されている^{61,62)}。従って、SLS を最大投与可能な最大量を処方した時、消化管内における SLS の濃度は 0.10~0.60%(w/w)と見積もることができる。SLS が可溶化剤添加剤として十分量処方された場合、消化管内における SLS 濃度は 0.05%(w/w)以上と考えることができることから、試験液中の SLS の添加量は 0.05%(w/w)とした。試験液への SLS 添加以外の試験条件は第1章と同じになる。5 µg/mL dose の Griseofulvin 溶液及び 100 µg/mL dose の Triamcinolone 溶液は、化合物の溶解度以下の条件になり、Sink 条件となる。5 µg/mL dose の griseofulvin 溶液及び 100 µg/mL dose の Triamcinolone 溶液は、DMSO を溶解溶媒として調製した濃縮溶液 0.1 mL と試験液を混和することで調製した。その他の試料溶液は、Dose 量が溶解度以上の条件になり、化合物が全

て溶解しない Non-Sink 条件となる。規定量の試料を試験液に混和した懸濁液を 37°Cで十分時間攪拌したものをを用いた。各膜透過速度測定は N=3 で繰り返して実施した。

Table 12 Samples in donor chambers for permeability measurements

化合物	試験液	Dose 量 (µg/mL)
Griseofulvin	pH6.5 緩衝液+0.05% SLS	5, 50, 200 または 1000
Triamcinolone	pH6.5 緩衝液+0.05% SLS	100, 500, 2000 または 10000

Donor 槽及び Acceptor 槽の濃度時間プロファイルの算出には、規定時間にサンプリングし、UHPLC で濃度決定をした結果を用いた。Acceptor 槽のサンプルは規定時間に 100 µL サンプリングしたものを溶媒で 2 倍希釈し、UHPLC で分析した。Donor 槽のサンプルは規定時間に 400 µL サンプリングし、サンプリング液全量を 0.22 µm 孔径の PTFE メンブレンフィルターでろ過した。ろ液を溶媒で 2 倍希釈し、UHPLC で分析した。

Flux 量 ($J(t)$)および膜透過性 (P_{app})は第 1 章と同様に、式(11)および式(12)を用いて、Acceptor 槽の濃度時間プロファイルの結果を基に計算した。

【2-3】 UHPLC による試料濃度の測定方法

UHPLC による試料溶液の測定は、第 1 章と同じ条件で実施した。(Table 11)

【第3章】試料および実験方法

【3-1】試料

Griseofulvin は東京化成から購入した。Hydrocortisone、MeOH、PVP K30、緩衝液調製用の試薬 (NaH₂PO₄、NaOH、NaCl)、ヘプタン、ソルビタンモノオレエート、MeCN、TFA、エチレングリコール、DMA、DMSO は富士フィルム和光純薬から購入した。AOT、SLS は Sigma-Aldrich より購入した。Gastrointestinal tract (GIT) lipid、ASB は Pion より購入した。

【3-2】X線回折測定

試料の X 線回折パターンを以下の条件で実施した。ナノサスペンションは遠心分離後の粉体を測定試料とした。マイクロ粒子は処理を行わず、そのまま測定試料とした。

Table 13 Test conditions for X-ray powder diffraction measurements

Conditions	Parameters
装置	Empyrean (Malvern Panalytical)
測定モード	透過型
X線	Cu K α 線
測定角	3° to 35° (2 θ)
Tube 電圧	45 kV
電流	40 mA

【3-3】粒度分布測定およびモフォロギ測定

ナノサスペンションの粒度分布は DLS で測定した。測定は Malvern 製 Zetasizer

Pro で実施した。測定試料は、多分散の影響を防ぐために、試料を適切な濃度まで水で希釈したものを使用した。測定は N=3 で実施した。

マイクロ粒子の粒度分布は Laser diffraction size analyzer で測定した。測定は Malvern 製 Mastersizer 3000 で実施した。測定前に、試料を 0.2%ソルビタンモノオレエート含有のヘプタン溶液中で懸濁した。0.2%ソルビタンモノオレエート含有のヘプタン溶液は、試料の溶解を防ぐために事前に化合物で飽和させたものを使用した。また、ソルビタンモノオレエートによる泡の発生を防ぐためにヘプタンを使用した。測定は N=3 で実施した。

試料のモフォロギを SEM で測定した。測定は JEOL 製 JSM-IT500HR で実施した。測定前に、試料を白金で蒸着した。測定ポイントにばらつきが出ないように、各測定試料につき、3 回以上測定ポイントを変更し、測定データに偏りが出ないことを確認した。

【3-4】膜透過性および Flux の評価

膜透過性及び吸収性を示す Flux 量の測定は Pion 製 MicroFlux™ で実施した。測定は以下の条件で実施した。

Table 14 Test conditions for permeability measurements

Conditions	Parameters
透過膜	PVDF メンブレンフィルター (孔径 0.45 μm) に 25 μL GIT lipid を添加したもの
Donor 槽	20 mL 試料溶液
Acceptor 槽	20 mL ASB
Acceptor 槽/ Donor 槽の	150 rpm

攪拌速度

Acceptor 槽/ Donor 槽の 37 °C

温度

Acceptor 槽のサンプリング時間 試験開始後 0, 30, 60, 120, 240 及び 360 分

時間

Donor 槽のサンプリング時間 試験開始後 0, 120 及び 360 分

時間

Donor 槽の試料溶液は Table 15 の条件を使用した。各モデル化合物ともに、薬物が完全に溶解しない Non-Sink 条件となるように、溶解度以上となる Dose 量を設定した。規定量の Griseofulvin もしくは Hydrocortisone を pH6.5 緩衝液に添加し、37°C で設定した水浴上で十分時間攪拌したものを Donor 槽の試料溶液として用いた。膜透過性の測定は N=3 で繰り返して実施した。

Table 15 Samples in donor chambers for permeability measurements

化合物	試験液	Dose 量 (µg/mL)
Griseofulvin	pH6.5 緩衝液	200
Hydrocortisone	pH6.5 緩衝液	2000

Donor 槽及び Acceptor 槽の濃度時間プロファイルの算出には、規定時間にサンプリングし、UHPLC で濃度決定をした結果を用いた。Acceptor 槽のサンプルは規定時間に 100 µL サンプリングしたものを 2 倍希釈し、UHPLC で分析した。Donor 槽のサンプルは規定時間に 1000 µL サンプリングした後、0.02 µm 孔径の Glass

microfiber メンブレンフィルターでろ過し、ろ液を 2 倍希釈し、UHPLC で分析した。

Flux 量 ($J(t)$)および膜透過性 (P_{app})は第 1 章と同様に、式(11)および式(12)を用いて、Acceptor 槽の濃度時間プロファイルの結果を基に計算した。

【3-5】UHPLC による試料濃度の測定方法

UHPLC 測定は以下の条件で実施した。注入量及び UV 波長以外は、いずれのモデル化合物とも共通した条件で測定を実施した。

Table 16 Test conditions for UHPLC measurements

Conditions	Parameters
装置	Acquity UPLC H-Class system (Waters)
検出器	UV
カラム	Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
流速	1.0 mL/min
移動相 A	Water /TFA (2000:1)
移動相 B	MeCN /TFA (2000:1)
移動相の Gradient 条件	5%B (0.0 min) \rightarrow 100%B (2.0 min), Linear gradient
注入量 (Griseofulvin)	5 μ L
UV 波長 (Griseofulvin)	240 nm
注入量 (Hydrocortisone)	1 μ L

UV 波長 (Hydrocortisone) 254 nm

参考文献

- 1) Doak, B.C.; Over, B.; Giordanetto, F.; Kihlberg, J. Oral druggable space beyond the rule of 5: insights from drugs and clinical candidates. *Chem. & Biol.* **2014**, *21*, 1115-1142.
- 2) Abrahamsson, B.; McAllister, M.; Augustijns, P.; Zane, P.; Butler, J.; Holm, R.; Langguth, P.; Lindahl, A.; Müllertz, A.; Pepin, X.; Rostami-Hodjegan, A.; Sjögren, E.; Berntsson, M.; Lennernäs, H. Six years of progress in the oral biopharmaceutics area – A summary from the IMI OrBiTo project. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2020**, *152*, 236-247.
- 3) Rosenberger, J.; Butler, J.; Muenster, U.; Dressman, J. Application of a Refined Developability Classification System. *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108*, 1090-1100.
- 4) Williams, H.D.; Trevaskis, N.L.; Charman, S.A.; Shanker, R.M.; Charman, W.N.; Pouton, C.W.; Porter, C.J. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 315-499.
- 5) Wais, U.; Jackson, A.W.; He, T.; Zhang H. Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale* **2016**, *8*, 1746-1769.
- 6) Lopalco, A.; Denora, N. Nanoformulations for Drug Delivery: Safety, Toxicity, and Efficacy. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1800*, 347-365.
- 7) Butler, J. M.; Dressman, J. B. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4940-4954.
- 8) Rosenberger, J.; Butler, J.; Dressman, J. A Refined Developability Classification System. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107*, 2020-2032.
- 9) Lennernäs, H.; et al. Oral biopharmaceutics tools – Time for a new initiative – An introduction to the IMI project OrBiTo. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *57*, 292-299.
- 10) F.D.A. Guidance for Industry. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls, *in Vitro* Dissolution

- Testing, and *in Vivo* Bioequivalence Documentation. **1995**.
- 11) M.H.L.W. Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products (Revision). **2012**.
 - 12) M.H.L.W. Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products for Different Strengths of Oral Solid Dosage Forms (Revision). **2012**.
 - 13) E.M.A. Guideline on the Investigation of Bioequivalence. **2010**.
 - 14) Kuribayashi, R.; Takishita, T.; Mikami, K. Regulatory Considerations of Bioequivalence Studies for Oral Solid Dosage Forms in Japan. *J. Pharm. Sci.* **2016**, 105, 8, 2270-2277.
 - 15) ICH Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances.
 - 16) Kostewicz, E. S.; et al. *In vitro* models for the prediction of *in vivo* performance of oral dosage forms. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, 57, 342-366
 - 17) Sun, D. D.; Wen, H.; Taylor, L. S. Non-Sink Dissolution Conditions for Predicting Product Quality and *In Vivo* Performance of Supersaturating Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.* **2016**, 105, 9, 2477-2488
 - 18) Sun, D. D.; Lee, P. I. Haste Makes Waste: The Interplay Between Dissolution and Precipitation of Supersaturating Formulations. *AAPS J.* **2015**, 17, 6, 1317-1326
 - 19) Philips, D. J.; Pygall, S. R.; Cooper, V. B.; Mann, J. C. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, 64, 11, 1549-1559
 - 20) Miyaji, Y.; et al. Advantage of the Dissolution/Permeation System for Estimating Oral Absorption of Drug Candidates in the Drug Discovery Stage. *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 5, 1564-1574
 - 21) Sun, D.; et al. Dissolution Failure of Solid Oral Drug Products in Field Alert Reports. *J. Pharm. Sci.* **2017**, 106, 5, 1302-1309
 - 22) Teksin, Z.S.; Seo, P.R.; Polli, J.E. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *AAPS J.* **2010** 12,

- 2, 238-41.
- 23) Sun, D.; Lennernas, H.; Welage, L.S.; Barnett, J.L.; Landowski, C.P.; Foster, D.; Fleisher, D.; Lee, K.D.; Amidon, G.L. Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequences tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm Res.* **2002**, 19, 10, 1400-16
 - 24) Beig, A.; Agbaria, R. M.; Dahan, A. Oral delivery of lipophilic drugs: the tradeoff between solubility increase and permeability decrease when using cyclodextrin-based formulations. *PLoS One.* **2013**, 8, 7, e68237
 - 25) Beig, A.; Miller, J. M.; Dahan, A. The interaction of nifedipine with selected cyclodextrins and the subsequent solubility-permeability trade-off. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, 85, 3, Part B, 1293-1299
 - 26) Beig, A.; Agbaria, R. M.; Dahan, A. The use of captisol (SBE7- β -CD) in oral solubility-enabling formulations: Comparison to HP β CD and the solubility-permeability interplay. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, 77, 73-78
 - 27) Miller, J. M.: et al. The solubility-permeability interplay: mechanistic modeling and predictive application of the impact of micellar solubilization on intestinal permeation. *Mol. Pharm.* **2011**, 8, 5, 1848-1856
 - 28) Hens, B.; Brouwers, J; Corsetti, M.; Augustijn, P. Gastrointestinal behavior of nano- and microsized fenofibrate: *In vivo* evaluation in man and *in vitro* simulation by assessment of the permeation potential. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, 77, 40-47
 - 29) Sugano, K. Possible reduction of effective thickness of intestinal unstirred water layer by particle drifting effect. *Int. J. Pharm.* **2010**, 387, 1-2, 103-109
 - 30) Imono, M.; et al. The elucidation of key factors for oral absorption enhancement of nanocrystal formulations: *In vitro*-*in vivo* correlation of nanocrystals. *Eur. J. Pharm. Bio.* **2020**, 146, 84-92
 - 31) Arce, F. A.; et al. Toward Developing Discriminating Dissolution Methods for Formulations

- Containing Nanoparticulates in Solution: The Impact of Particle Drift and Drug Activity in Solution. *Mol. Pharm.* **2020**, 17, 11, 4125-4140
- 32) Amidon, G. E.; Higuchi, W.; Ho, N. F. Theoretical and experimental studies of transport of micelle-solubilized solutes. *J. Pharm. Sci.* **1982**, 71, 1, 77-84
- 33) Tsinman, K.; et al. Ranking Itraconazole Formulations Based on the Flux through Artificial Lipophilic Membrane. *Pharm. Res.* **2018**, 35, 8, 161
- 34) Avdeef, A. Leakiness and Size Exclusion of Paracellular Channels in Cultured Epithelial Cell Monolayers–Interlaboratory Comparison. *Pharm. Res.* **2010**, 27, 3, 480-489
- 35) Dahan, A.; Miller, J. M.; Hoffman, A.; Amidon, G. E.; Amidon, G. L. The Solubility–Permeability Interplay in Using Cyclodextrins as Pharmaceutical Solubilizers: Mechanistic Modeling and Application to Progesterone. *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 6, 2739-2749
- 36) Sugano, K. Aqueous Boundary Layers Related to Oral Absorption of a Drug: From Dissolution of a Drug to Carrier Mediated Transport and Intestinal Wall Metabolism. *Mol. Pharm.* **2010**, 7, 5, 1362-1373
- 37) Korjamo, T.; Heikkinen, A. T.; Waltari, P.; Mönkkönen, J. The Asymmetry of the Unstirred Water Layer in Permeability Experiments. *Pharm. Res.* **2008**, 25, 1714
- 38) Chen, Y.; Wang, J.; Flanagan, D. R. Chapter 9. Fundamentals of Diffusion and Dissolution. In *Developing Solid Oral Dosage Forms*, 2nd ed. Qiu, Y.; Eds.; Academic Press, 2017, pp. 253-270
- 39) Limpanussorn, J.; Simon, L.; Dayan, A. D. Transepithelial transport of large particles in rat: a new model for the quantitative study of particle uptake. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 50, 7, 753-760
- 40) Norris, D. A.; Puri, N.; Sinko, P. J. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 34, 2-3, 135-154
- 41) Smyth, S. H.; Feldhaus, S.; Schumacher, U; Carr, K. E. Uptake of inert microparticles in normal and immune deficient mice. *Int. J. Pharm.* **2008**, 346, 1-2, 109-118

- 42) Avdeef, A. Chapter 7. Permeability - PAMPA. In *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc., **2012**, pp. 319-498
- 43) Turro, N. J.; Yekta, A. Luminescent probes for detergent solutions. A simple procedure for determination of the mean aggregation number of micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 18, 5951-5952
- 44) Gupta, R.; Chen, Y.; Xie, H. In vitro dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2021**, *13*, e1732
- 45) Shah, D.A.; Murdande, S.B.; Dave, R.H. A Review: Pharmaceutical and Pharmacokinetic Aspect of Nanocrystalline Suspensions. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 10-24
- 46) Kesisoglou, F.; Mitra, A. Crystalline nanosuspensions as potential toxicology and clinical oral formulations for BCS II/IV compounds. *AAPS J.* **2012**, *14*, 677-687
- 47) Dahlgren, D.; Sjögren, E.; Lennernäs, H. Intestinal absorption of BCS class II drugs administered as nanoparticles: A review based on in vivo data from intestinal perfusion models. *ADMET&DMPK.* **2020**, *8*, 375-390
- 48) Murdande, S.B.; Shah, D.A.; Dave, R.H. Impact of nanosizing on solubility and dissolution rate of poorly soluble pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 2094-2102
- 49) Juenemann, D.; Jantratid, E.; Wagner, C.; Reppas, C.; Vertzoni, M.; Dressman, J.B. Biorelevant in vitro dissolution testing of products containing micronized or nanosized fenofibrate with a view to predicting plasma profiles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *77*, 257-264
- 50) Karakucuk A.; Teksin Z.S.; Eroglu, H.; Celebi, N. Evaluation of improved oral bioavailability of ritonavir nanosuspension. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *131*, 153-158
- 51) Roos, C.; Dahlgren, D.; Sjögren, E.; Sjöblom, M.; Hedeland, M.; Lennernäs, H. Jejunal absorption of aprepitant from nanosuspensions: Role of particle size, prandial state and mucus layer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *132*, 222-230

- 52) Liu, X.; Testa, B.; Fahr, A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 962-977
- 53) Guo, J.; Elzinga, P.A.; Hageman, M.; Herron, J.N. Rapid throughput solubility screening method for BCS class II drugs in animal GI fluids and simulated human GI fluids using a 96-well format. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 1427–1442
- 54) Mithani, S.D.; Bakatselou, V.; TenHoor, C.N.; Dressman, J.B. Estimation of the increase in solubility of drugs as a function of bile salt concentration. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 163–167
- 55) Sigfridsson, K.; Xue, A.; Goodwin, K.; Fretland, A.J.; Arvidsson, T. Sustained release and improved bioavailability in mice after subcutaneous administration of griseofulvin as nano- and microcrystals. *Int. J. Pharm.* **2019**, *566*, 565–572
- 56) Ali, H.S.; York, P.; Blagden, N. Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *Int. J. Pharm.* **2009**, *375*, 107–113
- 57) Ali, H.S.; Khan, S.; York, P.; Shah, S.M.; Khan, J.; Hussain, Z.; Khan, B.A. A stable hydrocortisone nanosuspension for improved dissolution: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2017**, *30*, 1635–1643
- 58) Xia, D.; Cui, F.; Piao, H.; Cun, D.; Piao, H.; Jiang, Y.; Ouyang, M.; Quan, P. Effect of crystal size on the in vitro dissolution and oral absorption of nitrendipine in rats. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 1965-1976
- 59) Galinis-Luciani, D.; Nguyen, L.; Yazdanian, M. Is PAMPA a useful tool for discovery? *J. Pharm. Sci.* **2007**, *11*, 2886-2892
- 60) Safety Data in IPEC Japan.
<http://www.jppec.gr.jp/detail=normal&date=safetydata/ra/dara3.html>
- 61) Sciller, C.; et al. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2005**, *22*, 10, 971-979
- 62) Mudie, D. M.; et al. Quantification of Gastrointestinal Liquid Volumes and Distribution

Following a 240 mL Dose of Water in the Fasted State. *Mol. Pharm.* **2014**, 11, 9, 3039–3047