

エレクトロスピニング法を用いた医療用ナノファイバーの調製と
新規放出制御型薬物送達システムの開発

**Development of medical nano-fiber and new controlled-release
drug delivery systems using the solvent-based electrospinning method**

2016

羽森 真美

目次

緒論.....	4
第 I 章 ES 法を用いた MAC ナノファイバー調製条件の検討.....	7
第 1 節 MAC ナノファイバー化のための ES 装置の開発.....	8
第 2 節 MAC ナノファイバーの繊維径におよぼす ES 操作条件の影響.....	10
第 3 節 MAC 高分子溶液の条件検討.....	11
第 4 節 MAC ナノファイバーの繊維径におよぼす溶解溶媒の影響.....	14
第 5 節 MAC ナノファイバーの繊維径におよぼす非イオン性界面活性剤の影響.....	15
第 6 節 考察.....	17
第 II 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型カプセル剤の設計と評価.....	19
第 1 節 薬物含有 MAC ナノファイバーの調製と物理薬剤学的評価.....	20
第 2 節 薬物含有 MAC ナノファイバーカプセル剤の <i>in vitro</i> 溶出試験.....	23
第 3 節 薬物含有 MAC ナノファイバーカプセル剤のラット <i>in vivo</i> 十二指腸内投与試験.....	24
第 4 節 考察.....	27
第 III 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型錠剤の設計と評価.....	30
第 1 節 走査型電子顕微鏡 (SEM) による NFT 錠の形態観察.....	30
第 2 節 NFT の <i>in vitro</i> 薬物溶出プロファイルに及ぼす打錠圧の影響.....	32
第 3 節 NFT の <i>in vitro</i> 薬物溶出プロファイルに及ぼす pH の影響.....	34
第 4 節 NFT の <i>in vitro</i> 薬物溶出プロファイルに及ぼす薬物の配合形態の違いによる影響.....	36
第 5 節 ラット <i>in vivo</i> 十二指腸内投与後の NFT の腸管移動.....	38
第 6 節 NFT 調製における非イオン性界面活性剤の添加が <i>in vitro</i> 薬物溶出プロファイルに及ぼす影響.....	40
第 7 節 薬物含有 NFT のラット <i>in vivo</i> 十二指腸内投与試験.....	43
第 8 節 考察.....	44
第 IV 章 総括.....	47
第 I 章 ES 法を用いた MAC ナノファイバー調製の条件検討.....	47
第 II 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型カプセル剤の設計と評価.....	48
第 III 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型錠剤の設計と評価.....	49
実験の部.....	50
第 I 章.....	50
第 II 章.....	51
第 III 章.....	55
要旨.....	59

論文目録.....	62
受賞.....	63
謝辞.....	64
参考文献.....	65

本論文で用いた略号

ES ; electrospinning method

DDS ; drug delivery system

MAC ; methacrylic acid copolymer S (Eudragit®S100)

SEM ; scanning electron microscope

Tween 20 ; polyoxyethylenesorbitan monolaurate

Span 20 ; sorbitan laurate

UN ; fluorescein sodium, uranine

NP ; nifedipine

C_{\max} ; maximum plasma drug concentration

T_{\max} ; time to reach the maximum plasma drug concentration

AUC ; area under the plasma drug concentration v.s. time curve

CL/F ; apparent clearance

F ; bioavailability

CL_{tot} ; total body clearance

AAP ; acetaminophen

D_{\max} ; maximum dissolution concentration

MDT ; 50% elution time

BaSO_4 ; barium sulfate

RA ; relative bioavailability

MDZ ; midazolam

ZnSO_4 ; zinc sulfate

HPLC ; high performance liquid chromatography

LC-MS/MS ; liquid chromatography-tandem mass spectrometer

緒論

エレクトロスピニング (ES) 法は、キャピラリー先端に高電圧を印加し、高分子溶液を吐出させることで、溶媒を瞬時に蒸散させ、繊維径が数十～数百ナノメートルオーダーのナノファイバーを形成する技術である。古くから ES 法は繊維業界において繊維径がナノメートルサイズの不織布の製造方法として研究されてきた [1-4]。医学分野では、iPS 細胞の確立とも相まって、細胞工学や再生医療を行う際の細胞増殖の足場としての研究が盛んにおこなわれており、心臓や血管など様々な臓器の再生に応用できる技術であると期待されている [5, 6]。また、ナノファイバーをシート状 (あるいはマット状) に加工することにより、創傷治癒を目的としたプラスター剤への適応 [7-10] が検討されている。さらには、プロバイオティクスを主眼とした乳酸菌や酵素成分を含む機能性食品 [11, 12] への応用研究、セルロースナノファイバーを加工することによる未来の新素材の開発研究が隆盛となっている [13, 14]。このように、様々な分野で応用されている ES 法では、ナノファイバーのベースとなる高分子として、セルロース [15, 16]、生分解性合成高分子であるポリ(ϵ -カプロラクトン) [17]、乳清タンパク質 [18]、ポリカプロラクトン [19]、ゼラチン [20]、ポリ乳酸 [21]、キトサン/アルギン酸 [22]、ポリ乳酸-グリコール酸共重合体 [23] などが報告されているが、いずれの報告においても、高分子の物理化学的性質を考慮した ES 法の条件設定をする必要があることが示されており、このような高分子の種類に応じた ES 法の条件設定がナノファイバーを調製する上での律速となっている。

一方、1970 年代半ばから薬剤学の分野においてドラッグデリバリーシステム (DDS) の概念が導入され、親薬物の薬理活性を最適化する目的で、吸収促進、放出制御あるいは標的指向性などの機能を有する数多くの DDS 製剤の研究開発がなされてきた [24, 25]。これらの DDS 製剤のうち、医薬品として上市された製剤には吸収促進や放出制御の製剤設計を施したものが最も多く、それらは深刻な副作用の軽減や患者のノンコンプライアンスの改善に多大な寄与をした。また、標的指向性の DDS 製剤で上市されたものの中には、ポリエチレン鎖を親薬物に結合させることによる血中滞留性の持続化 [26]、薬物の脂肪乳剤化 [27, 28]、薬物のミセルあるいはリポソームへの封入 [29] など、薬物送達微粒子を使用した製剤設計を施すことにより、部位特異性、薬物の生体内滞留性の向上ならびに薬効の持続化に大きな成果をもたらした。さらに、1980 年代の後半に入ると、様々な分野でナノテクノロジーの概念が導入され、DDS の分野ではモノクローナル抗体 [30] などのナノ材料を製剤設計に応用し、より高度な標的指向化を行うというナノ DDS の概念へと発展を遂げた。このように、DDS 製剤の設計において使用されるナノ材料は、親薬物のみでは決して実現できない親薬物の生体内挙動を制御する先端技術であり [31-33]、ナノ DDS は今後の製剤設計において増々検討されていく分野と考えられている。

前述のように、高分子を材料に作製されるナノファイバーを新規の素材として様々

な分野で応用することにより、新たな技術革新へと波及することが期待されているが、ES法の適用では、高分子ごとに目的とするナノファイバーを得るための条件設定を行わなくてはならず、使用においては感電の危険性の回避、ナノファイバーシート成形の困難さ、製造量の制限、生物医学的な目的のための条件設定の困難さなど多くの解決すべき課題が存在する。ES法の基本的原理は、高分子溶液の表面張力を超え高分子ジェット形成を誘導するために最適な高電圧を印加することである [34] が、目的とするナノファイバーを調製するためには、印加電圧、高分子溶液の粘性と表面張力 [35]、高分子の分子量 [36]、分子構造 [37]、高分子を溶解する溶媒の誘電率 [38-41]、高分子溶液の吐出速度、電極間の距離、ニードルの形状やサイズ、捕集板の構造 [31-33]、加えて環境因子である室温、湿度、大気の滞留速度 [6] などの多くの要因がナノファイバーの形状やナノファイバーの径の大きさに影響する。それゆえ、均一なナノファイバーを調製するためには、適切な装置を構成し、用いる高分子に対応する最適なES法の条件設定を行う必要がある。加えて、DDSの分野におけるES法を用いての医薬品開発の検討についてはほとんど実施されていないのが現状で、医薬品製造に使用でき、かつ薬物の放出支持体となる機能的な医療用高分子のES法への適用についても見出されていない。

そこで本研究では、医薬品の製造過程において既に使用されている腸溶性コーティング剤であるメタクリル酸コ高分子 S (Eudragit® S100 ; MAC) を基にナノファイバーをES法により調製する手法を開発し、調製したナノファイバーを製剤中の薬物放出の支持媒体として利用する、新規の薬物放出制御型 DDS 製剤の開発を目指した。本研究ではまず、ES装置を構築し、ファイバーの連続相となる高分子を用いて MAC ナノファイバー調製時の条件設定について検討を行った。次に、脂溶性あるいは水溶性のモデル薬物を MAC 溶液に混合あるいは分散させることにより得られた薬物含有 MAC ナノファイバーを用いた経口製剤や MAC ナノファイバーに吸着させることで調製した経口製剤 (カプセル剤あるいは錠剤) を調製し、*in vitro* 溶出試験およびラット *in vivo* 十二指腸内投与試験を実施し、薬物の溶出挙動とラットにおける薬物の体内動態を評価した。

その結果、ES装置については、ES装置を構成するナノファイバーの捕集板の中央部に金属棒を取り付けることにより、ナノファイバーをより効率よく捕集でき、加えてナノファイバーをシート状での剥離を容易にした。また、高分子に MAC を用いた場合のES法の条件設定では、高分子を溶解する有機溶媒の種類と物性、高分子溶液の濃度あるいは粘性、高分子溶液の吐出速度、ニードルのゲージ、印加電圧、電極間の距離および MAC ナノファイバー中に含有させる薬物の物性など様々な要因に焦点を当て、それらが MAC ナノファイバーの繊維径にどのように影響を与えるかを調べ、薬物含有の MAC ナノファイバーを得るための至適なES法の条件を示した。また、脂溶性あるいは水溶性のモデル薬物を MAC ナノファイバー中に含有させた場合の薬物の結晶状態について X線構造回折法により明らかにした。さらに、薬物含有 MAC ナノファイバーを

用いた放出制御型製剤を設計するにあたり、薬物含有 MAC ナノファイバーの微粒子化や、非イオン性界面活性剤を添加した時の繊維径および薬物溶出挙動におよぼす影響について検討を加えた。放出制御型カプセル剤の設計では、薬物含有 MAC ナノファイバーをそのまま一定量をカプセルに充填したもの、薬物含有ナノファイバーを粉碎して微粒子化したものをカプセルに充填したカプセル剤を調製し、*in vitro* 溶出試験による薬物溶出挙動ならびにラット *in vivo* 十二指腸内投与試験による薬物体内動態を明らかにした。さらに、直接打錠法により薬物含有 MAC ナノファイバーあるいは薬物を含有しない MAC ナノファイバーに定量的に薬物を吸着させたものを用いて放出制御型錠剤を設計し、簡便な打錠操作を確認すると共に、*in vitro* 溶出試験による薬物溶出挙動ならびにラット *in vivo* 十二指腸内投与試験による薬物体内動態を明らかにした。加えて、MAC ナノファイバーで作製した錠剤の体内移動を X 線 CT 装置で追跡し、MAC ナノファイバーにより作製された錠剤が持続性に著しく優れた特徴を有する、超持続型特性を明確にした。以上の MAC ナノファイバーを用いた一連の薬剤学的検討は、放出制御型 DDS 製剤の設計において有用な知見を与えるものであり、ES 法により MAC ナノファイバーを調製して設計したカプセル剤および錠剤は、経口投与における薬物放出制御において有用であることを結論づけた。

以下、III 章にわたり、これらの結果について詳述する。

第 I 章 ES 法を用いた MAC ナノファイバー調製条件の検討

ES 法は、本来、繊維業界で不織布を製造する方法として 1930 年頃から研究されてきており [42]、高分子のナノファイバーを室温で調製でき、天然または人工高分子、タンパク質のような熱に弱い材料からもナノファイバーの製造を可能にすることから、様々な工業分野において新規の機能性素材や工業製品の創製に応用されている。近年では、ES 法により得たナノファイバーは、心筋梗塞の冠動脈を広げるためのステントの素材として利用されたり、再生医療や細胞工学などの分野において組織細胞を成長させるための足場 (スキャホールド) として用いられており、医学の分野においても様々な高分子に適応できるという観点から応用範囲が広がっている [43-45]。

ES 装置は、高圧電源装置、高分子溶液を吐出するためのシリンジポンプ、高分子溶液が入ったニードル付シリンジおよびナノファイバーを捕集するための金属製捕集板から構成され、高分子溶液が入ったシリンジをシリンジポンプにセットして、シリンジニードルと金属製の捕集板をそれぞれ陽極、陰極として高電圧を印加するという単純な装置である。現在までに様々な ES 装置が開発されているが、ナノファイバーを創製するための代表的なナノファイバーの捕集板として回転ドラム形状のもの [46]、金属プレート型のもの [47] などが用いられている。しかし、これらの捕集板上に捕集されたナノファイバーを容易に剥がし取ることは困難であり、使用する高分子の種類が変わっても、捕集板からのナノファイバーの取り剥がしが困難となる場合がある。本研究では、高分子として MAC を使用しているが、予備実験において従来の報告にある金属プレート型の捕集板を使用して ES をおこなったところ、金属プレートの表面に MAC ナノファイバーが凝集し、捕集されたナノファイバーを容易に剥がし取り出すことが予想通り困難であった。また、ES 法では、ナノファイバーの生成に多くの影響要因があることが報告されており、克服すべき課題が残されている。例えば、高分子溶液の粘性が低い状態や陽極と陰極間の距離が近すぎる場合には、金属プレートの捕集板上にはビーズと呼ばれる球状の塊が作製されてしまい、安定なナノファイバーが得られなくなってしまう [48, 49]。また、高分子溶液の吐出速度が小さい場合にはナノファイバーの収量が減少する。本研究では、臨床での使用が認められている腸溶性コーティング剤である MAC 溶液をナノファイバー化し、放出制御型 DDS 製剤の設計に利用しようとしたのが目的ではあるが、MAC 溶液を用いた ES 法の条件検討をした報告は見当たらなかった。そこで、第 I 章では、放出制御型の経口製剤の設計に MAC ナノファイバーを応用するため、ES 装置を構築し、MAC 溶液のみあるいは MAC 溶液に薬物を含有させたナノファイバーを ES 法で調製するための条件設定を検討することを目的とし、ナノファイバー生成における変動要因として、高分子 (MAC) 溶液を吐出するシリンジのニードル径、ニードルと金属捕集板間の電圧、ニードル先端からナノファイバー捕集板までの距離、高分子 (MAC) 溶液の吐出速度、高分子 (MAC) 溶液の濃度 (あるいは粘性) に着目し、

様々な動作条件下での MAC ナノファイバーの調製について検討した。

第 1 節 MAC ナノファイバー化のための ES 装置の開発

腸溶性コーティング剤，または固体分散体の連続相として使用されている MAC [50] についてのナノファイバー化，およびナノファイバー形成のための装置を構築し，適切な MAC ナノファイバーを得るための諸条件について検討した。Figure I-1a は，本研究の開始に先立ち，構築した ES 装置を示し，Fig. I-1 f には ES 法原理の模式図を示した。Figure I-1 に示すように，ES 装置は，シリンジポンプ，高分子溶液が入ったシリンジとニードル，高電圧供給装置および銅製の金属捕集板で構成されている。従来の ES 法に関する報告では，ナノファイバーを捕集するのに，平らな金属板やドラム式の捕集板を使用している例が多い [2, 46]。一方，捕集板上に生成した MAC ナノファイバーを医薬品に応用するには，シート状または，マット状のナノファイバーを収集する必要がある。しかし，従来のような平板の金属プレートに捕集された MAC ナノファイバーをシート状のまま剥がし取ることは困難であった。そこで，捕集板の表面を銅メッシュのプレートとし，その背面には八方放射状の銅製の骨組みを付け，その周囲を銅製のプレートで囲み，中央部には金属棒を取り付けた捕集板を作製した (Fig. I-1b, 1c)。その結果，中央に付けた金属棒は，効率的に電流を捕集板上に導くことができ，銅製の捕集板全体を覆い隠すようにナノファイバーシートが張り巡らされた (Fig. 1d, 1e)。この時，ナノファイバーシートは中央の金属棒を中心にテント状に捕集板上に張り巡らされるので，結果として，簡単に捕集板からナノファイバーシートを剥がし取ることが可能となった。暫定的な操作条件の固定値として，ニードル径は 16 G，高分子溶液の吐出速度は 10 mL/h とし，電極間の距離と電圧は，それぞれ 10 cm および 25 kV とした。また，高分子溶液には 10% (w/v) の MAC アセトン溶液を調製し使用した。陽極と陰極の間に所定の電圧を印加すると，まず，MAC ナノファイバーは，銅メッシュの表面に収集されはじめ，徐々に自己組織化して層状構造を形成し，銅メッシュ上を覆った。銅メッシュの表面にナノファイバーが張り巡らされると，次に金属棒を中心にテント状に膜を張るようになり，最終的には捕集板全体を取り囲むように MAC ナノファイバーの自己集積体が生成した。この最終的な集積体は層状となっているので，容易に捕集板から剥離することができた。さらに，開発した ES 装置では，MAC ナノファイバーが周囲に広がらず，繊維の損失を軽減することができるようになった。この要因として，捕集板の中央部に突出した金属棒を取り付けたことで，ニードルから捕集板へ向かう電流の流れが安定化し，銅メッシュの裏に付けた八方に広がる金属ガイドが効率よく捕集板上に MAC ナノファイバーを定着させたためと考えられた。中央部の金属棒を取り外して同様に ES を行った場合と比較して金属棒を取付けた場合のナノファイバーの収量は約 1.7 倍となった。

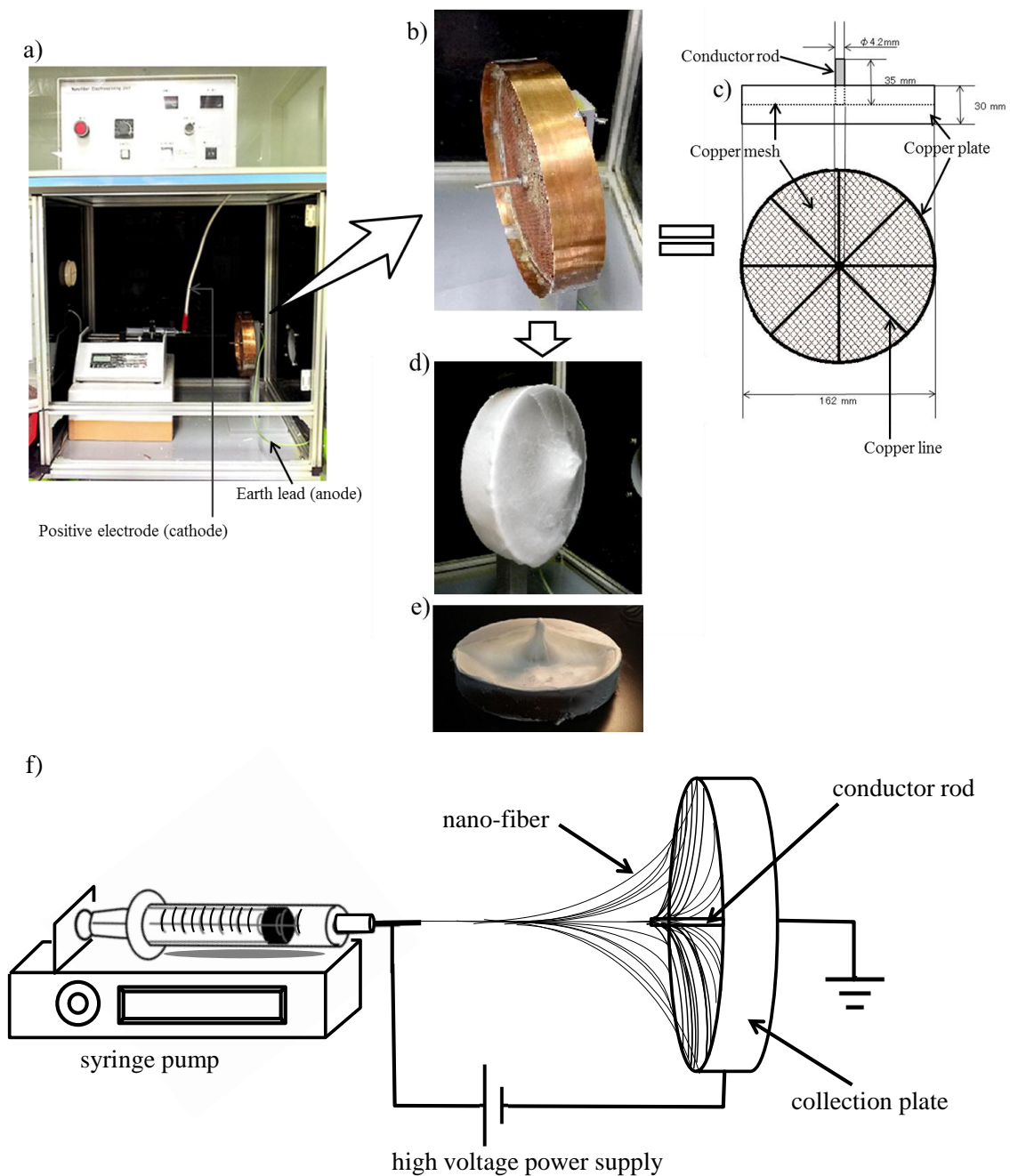


Fig. I-1 Device and Principle of the Electrospinning (ES) Method

The ES method applies high voltage to a capillary tip and allows a polymer solution to extrude and form nano-fibers. a) Overall structure of the device; b) nano-fiber-collection plate; c) composition of a standard nano-fiber-collection plate; d) nano-fibers after extrusion of 10% (w/v) methacrylic acid copolymer S acetone solution; e) cross-section view of d); f) view showing a frame format of a).

第 2 節 MAC ナノファイバーの繊維径におよぼす ES 操作条件の影響

MAC を高分子とする ES 法の操作条件の検討については報告が無く、効率よく MAC ナノファイバーシートを得るための操作条件の探索を行った。ES 法を実施するにあたり、変動要因であると報告されているものとして、ニードル径、陽極と陰極間の電圧、ニードル先端からナノファイバーの捕集板までの距離、高分子溶液の吐出速度、高分子を溶解する溶媒、高分子溶液の濃度 (粘性) 等が挙げられる。本節ではまず、ニードル径、陽極と陰極間の電圧、ニードル先端からナノファイバーの捕集板までの距離、高分子溶液の吐出速度について、生成した MAC ナノファイバーの繊維径を計測することで評価を行った。MAC ナノファイバーの繊維径は、各種条件下で作製した MAC ナノファイバーの走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope ; SEM) 画像を利用し、無作為に 70-100 本の繊維を選択して計測した。Figure I-2 は、ニードル径、電極間の電圧、ニードル先端から捕集板までの距離、および高分子溶液の吐出速度の変化が MAC ナノファイバーの繊維径に及ぼす影響を示す。この検討では、暫定的に、10%(w/v) MAC アセトン溶液を使用した。また、基本的な条件については、ニードル径を 16 G、電極間の電圧を 25 kV、ニードル先端から捕集板までの距離を 10 cm、高分子溶液の吐出速度を 10mL/h とし各種条件を検討した。まず、ニードル径を 14 G (内径 1.64 mm)、16 G (内径 1.25 mm)、19 G (内径 0.72 mm) と変化させた時の MAC ナノファイバーの繊維径は、それぞれ 743 ± 233 , 585 ± 166 , 683 ± 251 nm であった。これらのニードル径の変化においては形成された MAC ナノファイバーの繊維径には有意な差は認められなかった。次に、陽極と陰極間の電圧を 15, 20, 25 kV と変化させて検討した結果、ナノファイバーの繊維径は、それぞれ 467 ± 179 , 443 ± 140 , 526 ± 182 nm となり、これらの電圧の変化においても生成された MAC ナノファイバーの繊維径に有意な差は認められなかった。続いて、ニードル先端から捕集板までの距離を 5, 10, 15 cm と変化させて検討を行ったところ、MAC ナノファイバーの繊維径は、それぞれ 302 ± 98 , 526 ± 182 , 271 ± 47 nm となった。また、高分子溶液の吐出速度を 5, 10, 15, 20 mL/h と変化させて検討した結果、MAC ナノファイバーの繊維径は、それぞれ 409 ± 203 , 414 ± 191 , 335 ± 88 , 382 ± 164 nm となった。したがって、今回、設定したニードル先端から捕集板までの距離、および高分子溶液の吐出速度においても、MAC ナノファイバーの繊維径に有意な差は認められなかった。以上より、本節で検討した 10%(w/v) MAC アセトン溶液からのナノファイバーの調製条件である、ニードル径、電極間の電圧、ニードル先端から捕集板までの距離、高分子溶液の吐出速度は、設定した条件範囲においていずれの場合も生成された MAC ナノファイバーの繊維径に有意な変化をもたらさなかった。この検討から、以降の検討におけるにおける ES 法の操作条件として、ニードル径を 16 G (内径 1.25 mm)、高分子溶液の吐出速度を 10 mL/h とし、電極間の距離と電圧は、それぞれ 10 cm および 25 kV とした。

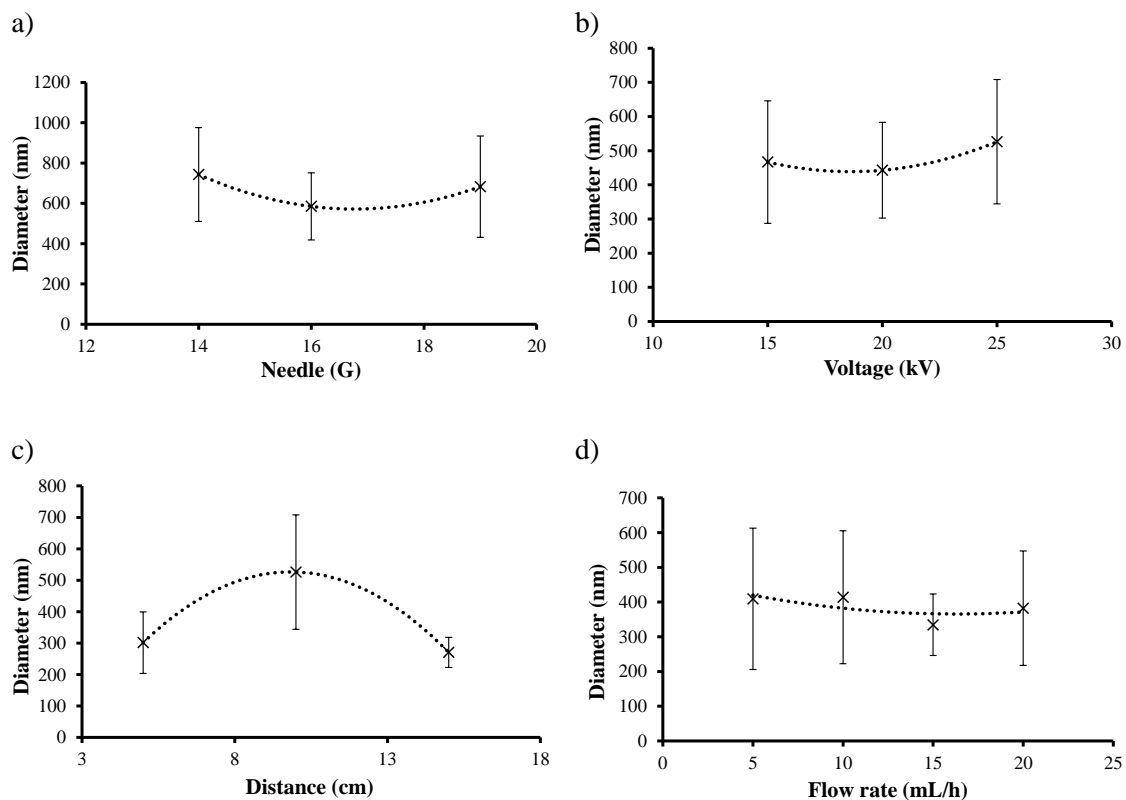


Fig. I-2 Effect of Electrospinning (ES) Conditions on the Diameter of nano-fibers; Needle Gauge (a), Voltage (b), Needle to Collection Plate Distance (c) and Flow Rate (d).

Methacrylic acid copolymer S (MAC) solution was dissolved with acetone at a final concentration of 10%(w/v). The conditions except for examination were fixed as follows: needle gauge; 16G, voltage; 25 kV, distance; 10cm, flow rate; 10 mL/h. Each symbol with bar represents mean \pm S. D. of 70-100 determinations.

第 3 節 MAC 高分子溶液の条件検討

第 2 節で設定した ES 法の操作条件を用い、本節では、使用する MAC 高分子溶液の濃度あるいは粘性が生成する MAC ナノファイバーの繊維径に及ぼす影響を検討した。Figure I-3 には、MAC アセトン溶液の濃度とナノファイバーの繊維径の関係 (a) および、MAC アセトン溶液の濃度と粘性の関係 (b) を示す。また、それぞれの濃度の MAC 溶液で作製した MAC ナノファイバーの SEM 画像を Fig. I-4 に示す。Figure I-3b に示すように、MAC 溶液の濃度の上昇は粘性の上昇を示し、MAC ナノファイバーの繊維径と MAC 溶液の濃度または粘性との間に正の相関性が認められた (Fig. I-3a)。MAC 溶液の濃度を 10, 12, 12.5, 13.75, 15%(w/v) とした場合の粘性は、それぞれ 7, 9.5, 13.4,

20.2, 31 MPaであった.そして、それに伴う MAC ナノファイバーの繊維径は、 526 ± 182 , 701 ± 207 , 904 ± 434 , 327 ± 575 , 1464 ± 714 nm となり、高分子溶液の濃度あるいは粘性が高いほど、生成するナノファイバーの繊維径が大きくなるものと考えられた.この原因として、高分子溶液の濃度が高くなるほど溶液中の高分子の密度が高くなることから、ニードルから吐出される溶液中の MAC の密度も高くなると考えられ、一定の条件電圧下においては有機溶媒の蒸散速度も一定であることから、最終的に生成された MAC ナノファイバーの繊維径が大きくなるものと考えられた.

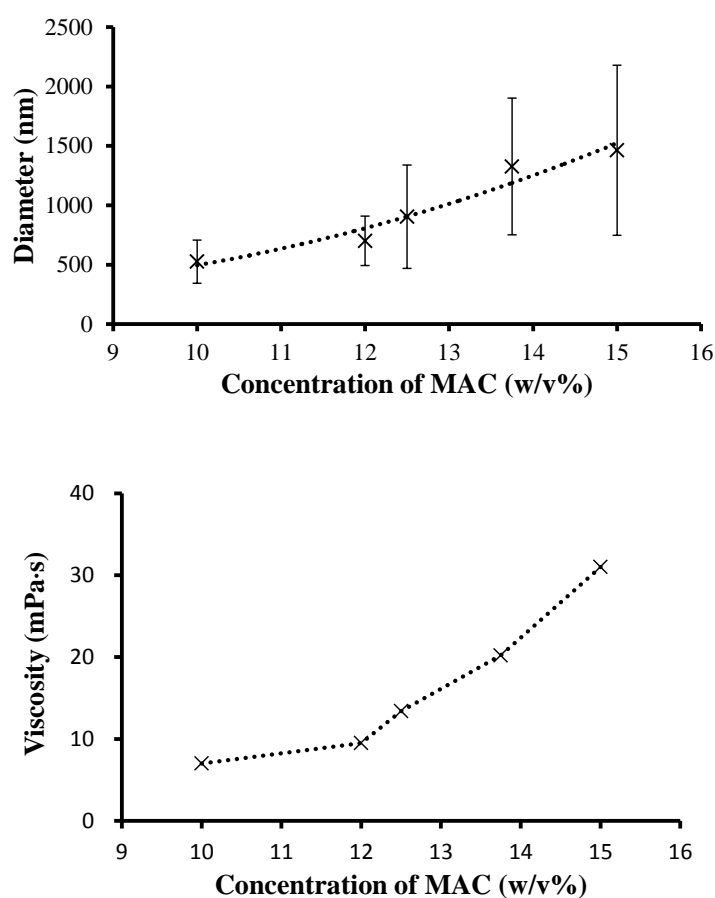
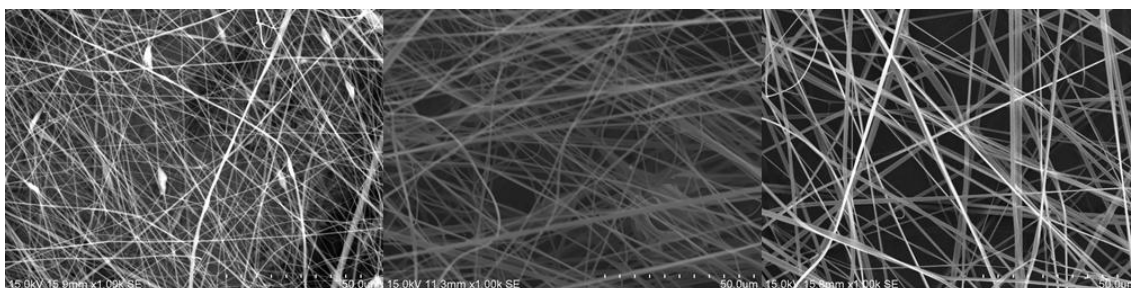


Fig. I-3 Relationships between Concentration of Methacrylic Acid Copolymer S (MAC) Polymer Solution and MAC Nano-fiber Diameter (a), and between MAC Concentration and Viscosity (b)

Where, needle gage, voltage, distance and flow rate were set to 16 G, 25 kV, 10 cm and 10mL/h, respectively. Each symbol with bar represents mean \pm S. D. of 70-100 determinations.

また, Fig. I-4a から明らかなように, MAC 溶液の濃度を 10%(w/v) にまで下げると, 生成する MAC ナノファイバーはビーズ状の塊を含むようになり, ビーズ状の塊を含まない均一な繊維を得るための ES 法による MAC ナノファイバーの調製には, もとの MAC 溶液として 12%(w/v) あるいは 9.5 mPa・s 以上の濃度あるいは粘性が必要であることが明らかとなった. 高分子としてポリビニルアルコールやゼラチン/ギ酸溶液を用いた検討では, ES 法を実施するにあたり, 印加電圧を下げることでより細い繊維が得られると報告されている [51, 52]. しかしながら, 今回の検討に用いた高分子である MAC の場合では, 検討した変動要因の中で高分子溶液の濃度あるいは粘性が変化した場合にのみ, その繊維径に有意な差が認められ, MAC 溶液の濃度あるいは粘性は, 調製する MAC ナノファイバーの繊維径に重要な影響因子であることが判った.

a) 7 mPa・s (10 w/v%) b) 9.5 mPa・s (12 w/v%) c) 13.4 mPa・s (12.5 w/v%)



d) 20.2 mPa・s (13.75 w/v%) e) 31 mPa・s (15 w/v%)

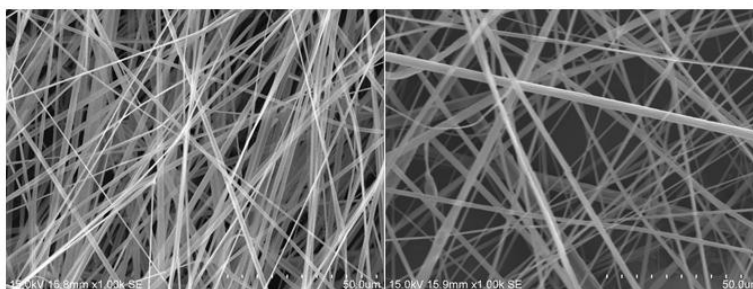


Fig. I-4 Scanning Electron Microscope Images of Nano-fiber Sheets Formed from Different Viscosities of Methacrylic Acid Copolymer S (MAC) Polymer Solution by Electrospinning

The viscosities of MAC polymer solution were 7.0 (a), 9.5(b), 13.4 (c), 20.2 (d) and 31.0 (e) mPa・s.

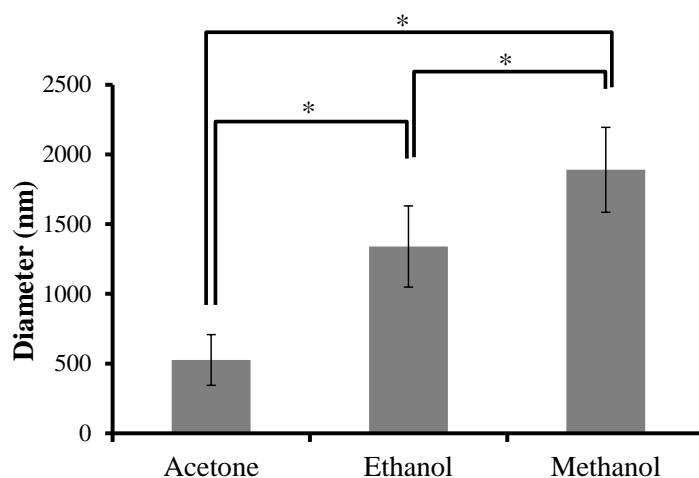
第 4 節 MAC ナノファイバーの繊維径におよぼす溶解溶媒の影響

第 3 節では、MAC ナノファイバーの繊維径に影響する要因の一つに、MAC 溶液の濃度 (粘性) があげられることを明確にした。しかし、高分子は低分子とは異なり、溶解させる溶媒の物理化学的特性の影響を受け、ランダムコイル状に溶解している高分子の立体構造が変化することが知られている。そこで、MAC を溶解する有機溶媒として、アセトン、エタノールおよびメタノールを選択し、有機溶媒および MAC 溶液の物理化学的計測値と、ES 法により作製した MAC ナノファイバーの繊維径との関係を検討した。Figure I-5 に、MAC 濃度を 10%(w/v) とし、各有機溶媒で調製した MAC ナノファイバーの繊維径と各有機溶媒の沸点、導電率、誘電率 [53] および各有機溶媒で調製した 10%(w/v) MAC 溶液の粘性を示す。アセトン、エタノールおよびメタノールを有機溶媒として使用した場合の MAC ナノファイバーの繊維径は、それぞれ 526 ± 182 , 1339 ± 290 および 1889 ± 304 nm であった。各有機溶媒の物理化学的要因と MAC ナノファイバーの繊維径を比較したところ、有機溶媒の誘電率との間に正の比例関係が認められた。すなわち、MAC を溶解する有機溶媒の誘電率が大きくなるほど、繊維径が大きくなった。

一般に、高分子に対し高い親和性をもつ溶媒中に高分子を溶解した場合、高分子鎖と溶媒間の相互作用が増加するため、20%(w/v) 以下の希薄な高分子溶液では、高分子鎖が形成しているランダムコイル構造の内部に侵入し、高分子鎖を押し広げる結果となり、同時に高分子溶液の固有粘度を増大させることが知られている [54]。このような溶媒は良溶媒と呼ばれるが、逆に、高分子に対して親和性の低い溶媒 (貧溶媒) の場合は、高分子鎖は溶液中で広がらない構造となり、結果として、高分子溶液の固有粘性も低下する。したがって、高分子の溶媒中での広がり理論を考慮すると、MAC の場合、高分子溶液の粘性が一番小さいアセトンは貧溶媒であり、その粘性が一番高いエタノールは良溶媒であると考えられる。しかし、MAC ナノファイバーの繊維径での比較は、有機溶媒の粘性での大小の序列に相関性は認められなかった。一方、ES 法では、ニードル先端から吐出された高分子溶液の溶媒は高電圧下で瞬時に蒸散し、乾燥した繊維が金属製の捕集板に蓄積される仕組みだが、Wannatong らは、溶媒の蒸散速度に関し、低い沸点の溶媒は高電圧下での蒸散速度は高い沸点の溶媒のそれよりも速くなるので、捕集板状に形成されるナノファイバーの繊維径は細くなると報告している [55]。Figure I-5 で示したように、溶媒の沸点とナノファイバーの繊維径の間には、明確な比例関係は認められなかったが、アセトンに比べて相対的に良溶媒であり、かつ、沸点が高いメタノールやエタノールで調製した MAC ナノファイバーの繊維径が大きくなっていることから、溶媒の沸点も、高分子ナノファイバーの繊維径に影響をおよぼす要因と考えられた。さらに、本節の検討から溶媒の誘電率も MAC ナノファイバーの繊維径に強く影響している要因であることが明らかとなった。そのメカニズムとして、誘電率が高い溶媒であるほど、負に帯電している MAC の電子を引き付ける作用が強くなり、溶媒との親

和性増大に寄与するためと考えられた。すなわち，MAC との親和性が強い溶媒であるほど，その溶媒は MAC にとっての良溶媒であり，MAC 溶液の粘性の増加につながり，繊維径が大きくなるものと考えられた。

以上の検討から，MAC ナノファイバーの繊維径を制御するための重要な因子は，MAC 溶液の濃度 (粘性)，MAC を溶解する溶媒の沸点および溶媒の誘電率であり，物理化学的要因として重要となるものは，溶媒の沸点と誘電率であることが判った。



Boiling point (°C)	56.5	78.4	64.7
Conductivity (S/m)	1.0×10^{-5}	1.1×10^{-5}	1.6×10^{-6}
Permittivity (F/m)	20.7	24.3	32.6
Viscosity (mPa·s)	7	23.4	13.3

Fig. I-5 The Average Diameter of Methacrylic Acid Copolymer S (MAC) Nano-fibers in Different Solvents

The MAC concentration in acetone, ethanol and methanol was set at 10%(w/v). Each bar represents mean \pm S. D. of 100 determinations. *) $p < 0.05$.

第 5 節 MAC ナノファイバーの繊維径におよぼす非イオン性界面活性剤の影響

本研究の最終目的は，MAC ナノファイバーを使用した新規の DDS 製剤を調製するところにある。そのため，様々な医薬品の製造過程において，様々な物理化学的性質を有する主成分の薬物を可溶化する必要がある。特に疎水性薬物や水溶性薬物を可溶化する

場合、それぞれの相対する相、すなわち水溶性の相や油溶性の相に可溶化する場合に界面活性剤を添加する必要がある。そこで、医薬品製造で用いられる代表的な非イオン性界面活性剤である、Tween 20 (Hydrophile-Lipophile Balance ; HLB=16.7) と Span 20 (HLB=8.6) を MAC アセトン溶液に濃度を変えて添加し、生成される MAC ナノファイバーの繊維径を測定し、どのように影響するかを調べた。ここでの検討では、MAC の溶媒にアセトンを使用して 10%(w/v) MAC 溶液をもとに、吐出速度 10 mL/h, 印加電圧 25 kV, ニードル 16 G, 電極間の距離 10 cm の条件下で MAC ナノファイバーを調製した。

Table I-1 Additional effects of surfactants, Tween 20 or Span 20 on the diameter of MAC nano-fibers

Active surfactants	Concentration (% (w/v))	Viscosity (mPa·s)	Diameter ± SD (nm)
No surfactant (MAC solution)	10	13.3	526 ± 182.1
Tween 20 (HLB=16.7)	1	12.5	329 ± 72.5*
	3	11.2	388 ± 87.2*
	4	10.8	332 ± 88.0*
Span 20 (HLB=8.6)	1	11.7	272 ± 67.7*
	2	11.4	309 ± 55.6*
	4	11.2	439 ± 115.3*

Values are expressed as the meas ± S. D. of 100 determinations. *) p<0.05 compared with 10%(w/v) MAC acetone solution. The final concentrations of Tween 20 and Span 20 in polymer solutions were 1%, 3%, 4% and 1%, 2%, 4%, respectively

Table I-1 には各界面活性剤を 1 ~ 4%(w/v) の濃度範囲で添加したときの MAC 溶液の粘性と生成された MAC ナノファイバーの繊維径を示す。Tween 20 あるいは Span 20 を添加した MAC ナノファイバーの繊維径は、界面活性剤を添加しない MAC ナノファイバーの繊維径と比較して、有意に細くなることが明らかとなった。しかし、Tween 20 の添加最小濃度 1%(w/v) と添加最高濃度 4%(w/v) との繊維径の間に有意な差は認めら

れず、対照的に Span 20 の添加最小濃度 1%(w/v) と添加最高濃度 4%(w/v) との繊維径の間には約 1.6 倍の違いが認められた。以上の結果は、MAC 溶液へ非イオン性界面活性剤を添加することでも MAC ナノファイバーの形成は可能であり、MAC に溶解しない様々な物性の化合物を溶かし込むことが出来ると考えられた。また、非イオン性界面活性剤の添加は、高分子溶液の表面張力の減少に寄与し、MAC ナノファイバーの繊維径に減少をもたらすものと考えられた。さらに、異なる HLB 値を持つ非イオン界面活性剤を適宜選択することにより、生成する MAC ナノファイバーの繊維径を制御できるものと考えられた。したがって、Span 20 は HLB が中等度の非イオン性界面活性剤であり湿潤剤あるいは w/o 型乳剤として使用でき、Tween 20 は HLB が大きい非イオン性界面活性剤で o/w 型の可溶化剤として使用できることから、これら非イオン性界面活性剤を適宜使用することで、薬物の物理化学的性質に関わらず、MAC ナノファイバー中に薬物を包埋させることが可能と考えられた。

第 6 節 考察

第 I 章では、MAC ナノファイバーを効率よく得るための ES 装置の開発とその条件設定を中心に検討を行った。銅製で円形状の MAC ナノファイバーの捕集板を作製し、その中央部に導電性の金属棒を取り付けることにより、MAC ナノファイバー形成時の広がりや損失を防ぎ、効率よくナノファイバーを収集することに成功した。これは、中央に取り付けた金属棒が陽極から流れる電流を効率的に陰極の捕集板の中心部へと誘導したことに起因するものと考えられた。

ES 法の装置あるいは方法論に関して研究がなされた既報によると、ナノファイバーの繊維径を細くするための条件として、高分子溶液の粘性を下げる、溶媒の沸点をあげる、印加電圧を上げる、高分子溶液の吐出速度を遅くする、とされている [56-58]。しかしながら、これらの報文にある 4 つの因子、すなわち高分子溶液の粘性、溶媒の沸点、印加電圧、吐出速度について MAC ナノファイバー生成への影響を調べたところ、MAC の場合、高分子溶液の濃度 (粘性) のみが、MAC ナノファイバーの繊維径に影響する変動要因であり、加えて、電極間の距離やニードル径なども生成する MAC ナノファイバーの繊維径に影響する因子ではなかった。この MAC 溶液の濃度が MAC ナノファイバーの繊維径に影響するというメカニズムとして、高分子溶液の濃度が高い場合、揮発する有機溶媒の体積あたりの MAC の固体分量が増加することによるものと考えられた。一方、高分子溶液を溶解する溶媒の違いにより MAC ナノファイバーの繊維径が変化することから、溶媒の誘電率が繊維径に影響因子となることが明らかとなった。メタノールを溶媒に使用した場合のナノファイバーの繊維径は、アセトンを使用した場合のナノファイバーの繊維径と比較して約 3.6 倍の大きさとなり、これには溶媒の誘電率に起因した MAC と溶媒との相互作用の結果、生じた親和性の増大に起因している

ものと考えられた。MAC はアニオン性高分子であり、誘電率の高い溶媒は電子を MAC から誘引することにより溶媒と MAC 間での相互作用がおこり、親和性が増大するため MAC 高分子の広がりにつながった [59] ことが、MAC ナノファイバーの繊維径を増大させたものと考えられた。さらに、非イオン性界面活性剤を MAC アセトン溶液に添加することにより、MAC 溶液の粘性の低下とニードルから吐出された直後の気-液表面張力を低下させたことが MAC ナノファイバーの繊維径を小さくしたメカニズムであると考えられた。

以上、MAC を用いた MAC ナノファイバーの調製において、研究材料としての均一な MAC ナノファイバーを調製する ES 装置を開発し、繊維径を制御するための検証を行った。MAC ナノファイバーの繊維径の制御は、誘電率や沸点の異なる溶媒を使用する、MAC 濃度 (あるいは粘性) を変える、非イオン性界面活性剤を添加するという手段を選択することにより行い得るものと結論づけた。

第 II 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型カプセル剤の設計と評価

高分子から作製されるナノファイバーを放出制御の支持体として薬物などの有効成分に応用することは、新規の DDS 製剤開発に向けての 1 つの基盤を提供できると考えられる [47]. 高分子からナノファイバーを作製する 1 つの方法が ES 法であるが、ポリビニルピロリドンで可溶化したニフェジピン (NP) の素錠に、ES 法で作製した生体分解性高分子 poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) のナノファイバーを錠剤表面にコーティングした放出制御型錠剤の *in vitro* 溶出性 [25] や、magnesium L-ascorbic acid (MAAP) や α -tocopherol acetate (α -TAC) を含む成分の核を ES 法で作製したポリアクリロニトリルのナノファイバーで被覆したコア・シェル型の製剤の *in vitro* 溶出性を評価した報告がある [4]. 以上の報告で示された結果は、ES 法で作製したナノファイバーを放出制御のフィルターとして応用した放出制御型製剤の有用性を示したものである. 一方で、薬物の薬理活性を最適化する目的で、多くの DDS の開発がなされてきた [24, 25]. これらの DDS の目的は、深刻な副作用を回避して薬の有効性を確保するとともに、患者のコンプライアンスの向上につなげることである.

第 I 章では、現在、上市されている医薬品の腸溶性コーティング剤として使用されている MAC で ES 法を用いてナノファイバー化することを目的とし、先ず、ES 装置の開発と目的とする繊維径のナノファイバーを得るための各種条件設定に関する検討を行った. ナノファイバー捕集板プレートの中央部には電流を誘導するための金属棒を付けた捕集板を作製し、各種 ES 法条件についてバリデーションをおこなった結果、MAC のナノファイバーをシートとして容易に得るための条件を設定することが出来た. ES 法により作製したナノファイバーは、繊維径がナノオーダーであるため、その自己組織化集合体はマイクロオーダーである場合よりも比表面積は大きくなり、空隙はより緻密となる. Park らの報告では、ナノファイバーを素錠や薬物コアの周りにコーティングすることにより薬物の放出制御をする DDS 製剤を報告している [25] が、ナノファイバー自体に薬物を溶解あるいはその粒子を包埋させることにより設計された DDS 製剤の *in vitro* および *in vivo* での薬剤学的検討はなされていない. そこで、第 II 章では、MAC ナノファイバー中に薬物を溶解あるいは包埋させることによる徐放制御型 DDS 製剤の設計を検討した. 含有させるモデル薬物として、水溶性のウラニン ($\text{Log}P_{ow}=0.10$, UN) と脂溶性のニフェジピン ($\text{Log}P_{ow}=3.23$, NP) を用い、第 I 章で示した ES 装置によりバリデーションで設定した操作条件のもと、薬物含有の MAC ナノファイバーを調製し、そのシートを用いて放出制御型カプセル剤を設計し、*in vitro* および *in vivo* での薬剤学的評価をおこなった. MAC ナノファイバーカプセル剤として調製した製剤は、一定量の薬物含有 MAC ナノファイバーを 5 号カプセルに充填した製剤 (NFPC)、一定量の薬物含有 MAC ナノファイバーを微粒子状に粉碎して 5 号カプセルに充填した製剤 (MPPC) であり、MAC と薬物の物理的混合物を 5 号カプセルに充填した製剤 (PMC) と

比較することで評価した。

第 1 節 薬物含有 MAC ナノファイバーの調製と物理薬剤学的評価

本章では、MAC ナノファイバー中に含有させるモデル薬物として、UN と NP を用いた。第 I 章でのバリデーションの結果、MAC ナノファイバーを得るための ES 法の操作条件は、ニードル径を 16 G (内径 1.25 mm)、陽極 (ニードル) と陰極 (捕集板) の電極間の電圧を 25 kV、ニードル先端から捕集板までの距離を 10 cm に固定し、MAC 溶液の吐出速度を UN 含有時には 2 mL/h、NP 含有時には 10 mL/h として薬物含有 MAC ナノファイバーを調製した。薬物含有 MAC 溶液は、薬物と MAC のいずれをも溶解させる有機溶媒を選択して調製した。UN の場合、薬物と MAC の重量比を 1:10 とし、メタノールで溶解させることができた。NP の場合、薬物と MAC の重量比を 1:1 とし、アセトンに溶解することができた。これらの薬物と MAC の混合溶液中の MAC 最終濃度は 10%(w/v) とした。Figure II-1 には、薬物非含有 MAC ナノファイバー (アセトンで調製) と薬物含有 MAC ナノファイバー、およびそれぞれを遊星ボールミル (Retsch® PM 100, Verder Scientific Co., Ltd., Germany) を用いて粉碎した粒子の SEM 画像を示す。また、Fig. II-2 および II-3 には、それぞれ UN と NP について、薬物含有および非含有 MAC ナノファイバーのシートあるいは粒子の X 線回折の結果を示す。薬物非含有 MAC ナノファイバーおよび NP 含有 MAC ナノファイバーの繊維径は、それぞれ 751 ± 67 および 703 ± 71 nm であった。これに対し、UN 含有 MAC ナノファイバーの繊維径は 2478 ± 206 nm と、アセトンを溶媒として作製した MAC ナノファイバーよりも約 1.3 倍太くなった (Fig. II-1a, b, c)。UN 含有 MAC ナノファイバーを調製する際に、UN をアセトンに溶解させることができなかつたので、メタノールを有機溶媒として調製した。第 I 章の第 4 節で示したように、MAC ナノファイバーを作製する場合にメタノールを溶媒として用いた場合、メタノールはアセトンよりも良溶媒なので溶液の粘性も高くなり、結果として ES 後のナノファイバーの繊維径が太くなるものと考えられた。さらに、これらの薬物含有 MAC ナノファイバーシートの一用量を遊星ボールミルにて微粒子化した場合、いずれのナノファイバーについても微粒子化され、UN 含有および NP 含有のナノファイバーから調製された微粒子の平均粒子径は 3465 ± 117 および 3209 ± 144 nm であり、それら粒子のゼータ電位は -65 ± 2.3 および -45 ± 1.4 mV であった (data not shown)。このように、MAC ナノファイバーを遊星ボールミルで微粒子化することにより、容易に微細粒子を得ることができた。一方、ナノファイバーシートあるいはそれらの微粒子について X 線回折を行った結果からは、UN あるいは NP の原薬粉末と MAC との物理的混合物では、原粉末の結晶構造に由来する特徴的な回折強度を示し、物理的混合物でのそれぞれの回折強度は MAC が存在することにより減弱した (Fig. II-2a, b, II-3a, b)。さらに、ES 法により得られた薬物含有ナノファイバーシートあるいはそれ

らの微粒子化したものについての回折強度には、薬物結晶特有のピークは認められず、MAC粉末と同様のハローパターンを示した (Fig. II-2c, d, e, f, II-3c, d, e, f). すなわち、ES法によってMACナノファイバー中に取り込まれた薬物は、結晶構造ではない状態である、アモルファス (非晶質) 状態として存在しており、ES法による薬物をMAC中への包埋することは、薬物をアモルファス状態にする有用な手段であることが示された。アモルファス状態の薬物は、結晶構造を示している状態と異なりエネルギー的に高い状態であり、そのような物質の反応性は高いと言われている。製剤設計においても薬物をアモルファス状態にすることは、薬物の消化管吸収促進や生物学的利用率の向上のための手段であることから、ES法により得られる薬物含有MACナノファイバーはこれらの目的にかなった製剤手法であると考えられた。また、薬物含有のMAC溶液を作製する場合、薬物およびMACの溶解性を考慮して溶媒を選択する必要があるが、適切な溶媒を選択することで薬物の物理化学的特性 (水溶性あるいは脂溶性) にかかわらず、MACナノファイバー中に薬物を包埋できることも明らかとなった。

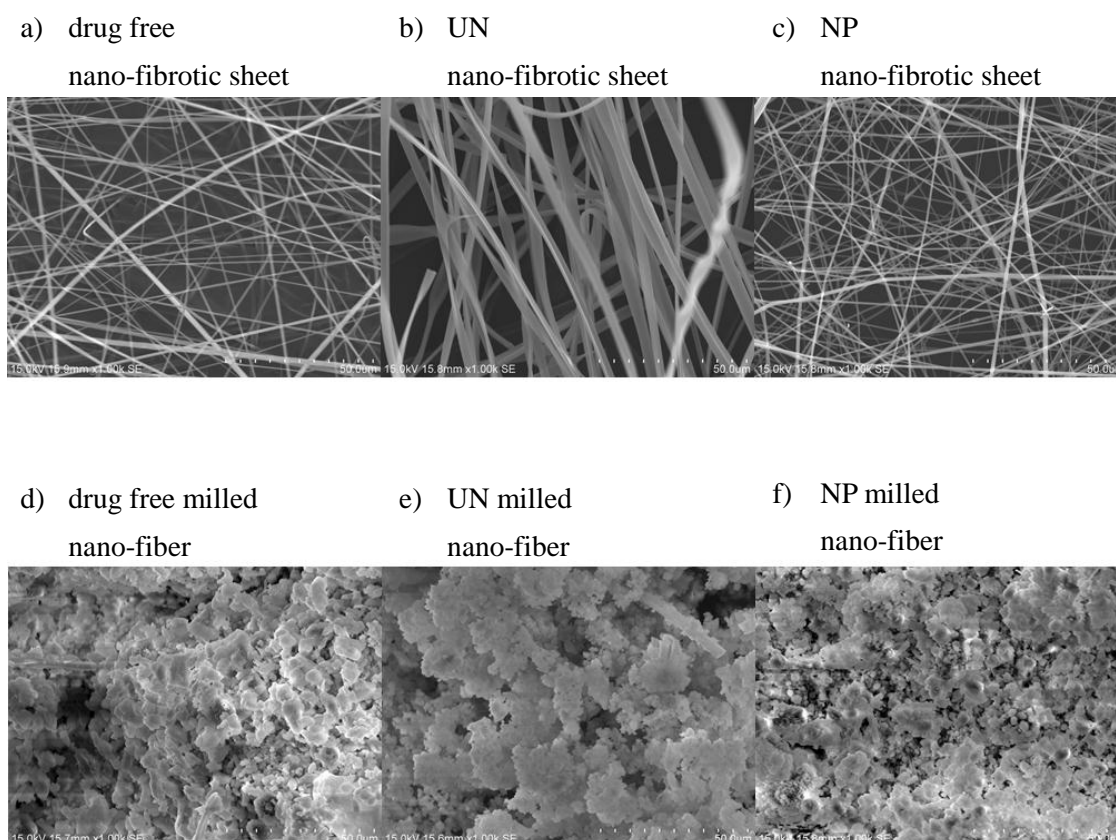


Fig. II-1 Scanning electron microscope (SEM) images of the nano-fiber sheet without drug (a), with UN (b) and with NP (c) by ES method.

Nano-fibrotic sheets were milled by the planetary mill into respective powders as shown in (d), (e) and (f).

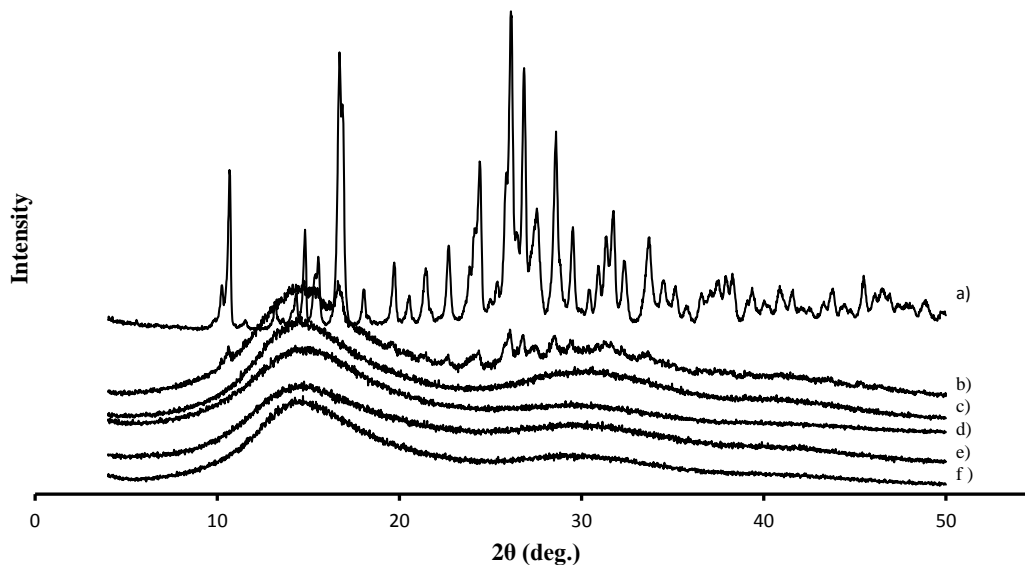


Fig. II-2 X-ray diffraction patterns of each nano-fibrotic sheet or powder for UN.

Each powder and nano-fibrotic sheet was analyzed by powder X-ray diffractometry. (a) UN bulk powder; (b) physical mixture of UN and MAC bulk powder; (c) MAC bulk powder; (d) UN nano-fibrotic sheet; (e) UN milled powder of nano-fibrotic sheet; (f) MAC nano-fibrotic sheet.

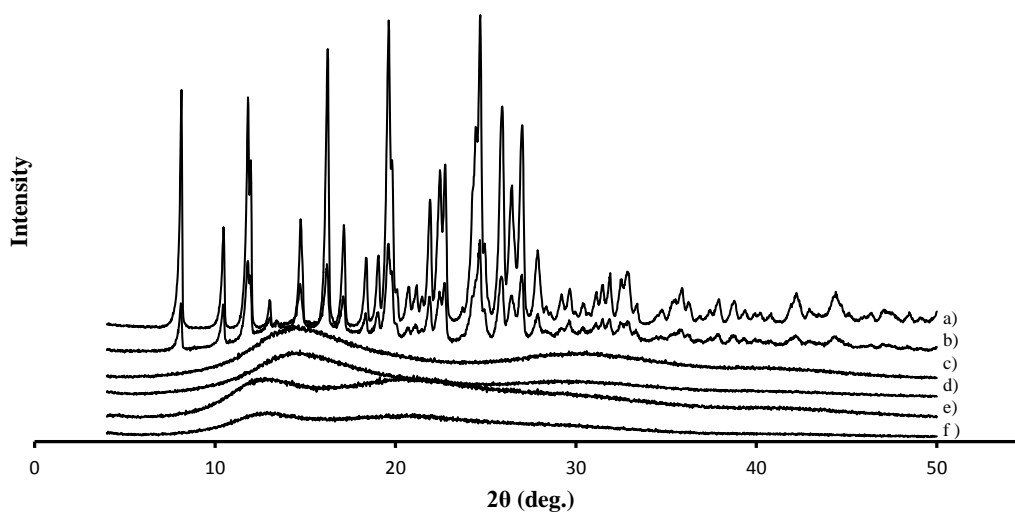


Fig. II-3 X-ray diffraction patterns of each nano-fibrotic sheet or powder for NP.

Each powder and nano-fibrotic sheet was analyzed by powder X-ray diffractometry. (a) NP bulk powder; (b) physical mixture of NP and MAC bulk powder; (c) MAC bulk powder; (d) MAC nano-fibrotic sheet; (e) NP milled powder of nano-fibrotic sheet; (f) NP nano-fibrotic sheet.

第 2 節 薬物含有 MAC ナノファイバーカプセル剤の *in vitro* 溶出試験

ES 法により調製した薬物含有ナノファイバーを利用してカプセル剤を調製し、その *in vitro* 薬物溶出挙動を調べた。NFPC, MPPC および PMC を被験カプセル剤とした。Figure II-4 および Fig. II-5 は UN, NP それぞれについての *in vitro* 溶出試験の結果を示す。溶出試験開始後 480 分までの UN の PMC, NFPC および MPPC からの最大溶出率は、それぞれ、80%、70%、55%であった。UN のナノファイバーを用いた製剤である NFPC あるいは MPPC の溶出は、PMC と比較して小さくなった。一方、溶出試験開始後 480 分までの NP の PMC, NFPC および MPPC からの最大溶出率は、それぞれ 80%、60%、81%であった。ナノファイバーを用いた製剤は、PMC と比較すると、初期の溶出速度はおさえられ、最大溶出率は比較的大きくなった。以上の結果は、MAC ナノファイバーが薬物の放出支持体となり薬物の徐放効果を付与しているものと考えられた。

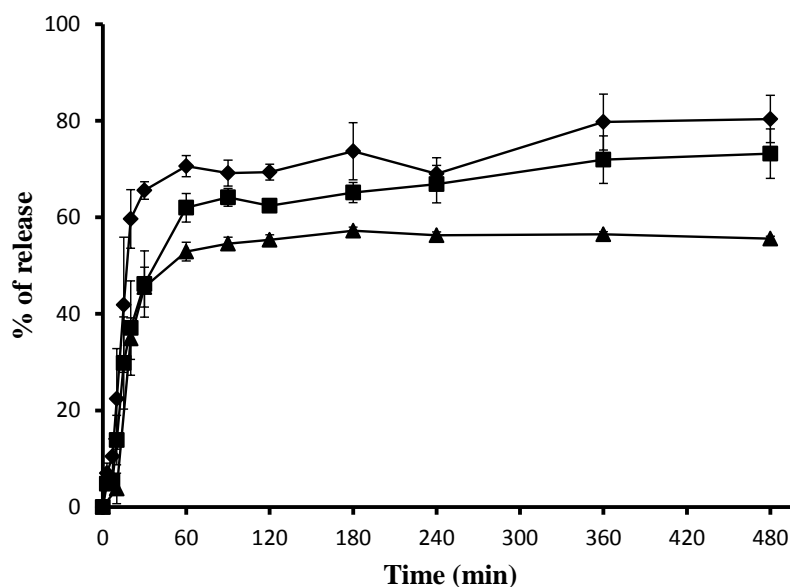


Fig. II-4 *In vitro* dissolution profiles of UN from three different capsules including UN. Symbols with a bar represent the mean \pm S. E. of 6 experiments. Key: \blacklozenge , PMC; \blacksquare , NFPC; \blacktriangle , MPPC.

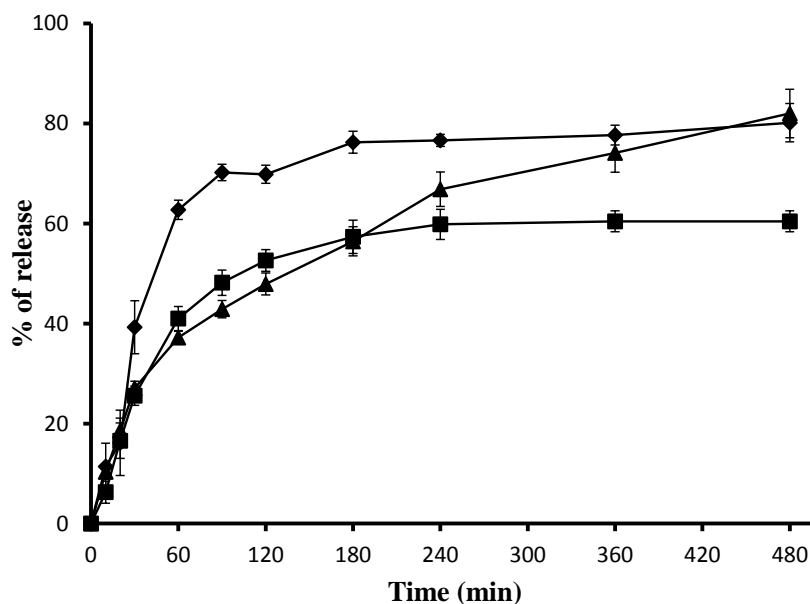


Fig. II-5 *In vitro* dissolution profiles of NP from three different capsules including NP. Symbols with a bar represent the mean \pm S. E. of 6 experiments. Key: \blacklozenge , PMC; \blacksquare , NFPC; \blacktriangle , MPPC.

第 3 節 薬物含有 MAC ナノファイバークプセル剤のラット *in vivo* 十二指腸内投与試験

次に、ES 法により調製した薬物含有ナノファイバークプセル剤である NFPC および MPPC について、ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験をおこない、PMC を対象に UN あるいは NP の体内動態を比較検討した。UN および NP それぞれのクプセル剤をラットの十二指腸内へ投与し、薬物の血漿中濃度推移を調べた。また、その薬物動態パラメータをモーメント解析法 [60] により算出した。Figure II-6 に、UN 含有 PMC, NFPC, MPPC のラット十二指腸内投与後の血漿中 UN 濃度-時間曲線を示す。また、Table II-1 に、モーメント解析法で得られた薬物動態パラメータを示す。UN について、NFPC あるいは MPPC 投与後の最高血漿中薬物濃度 (C_{max}) は PMC と比較して低値を示した。さらに、NFPC あるいは MPPC 投与後の UN の最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は、PMC のそれと比較して延長傾向を示した。十二指腸内投与後の生物学的利用率 (F) は概ね 100% を示した。加えて、 C_{max} と投与後以降の最低血漿中薬物濃度 (C_{min}) の差である $C_{max} - C_{min}$ を計算し評価したところ、MAC ナノファイバーを放出支持体とすることにより、水溶性薬物 UN の体内動態に C_{max} の抑制と T_{max} の延長をもたらすものと考えられた。

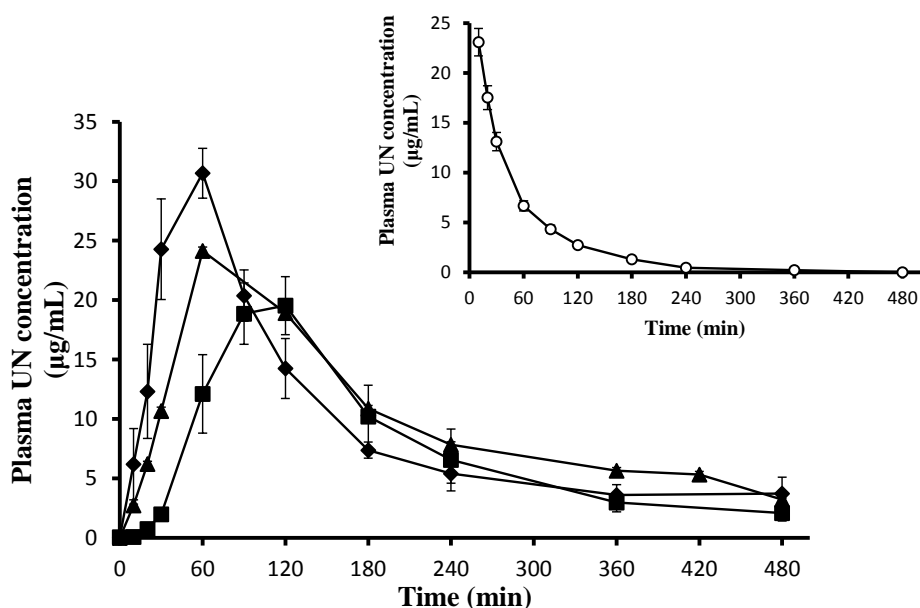


Fig. II-6 UN plasma levels-time curves after intraduodenal administration of capsules including UN.

Insert panel represents plasma level-time curve of UN after intravenous administration of UN (1.0mg/Kg). Symbols with a bar represent the mean \pm S. E. of 6 rats. Key: \blacklozenge , PMC; \blacksquare , NFPC; \blacktriangle , MPPC.

Table II-1 Pharmacokinetic parameters of UN after intraduodenal administration of various capsules including UN by non-compartmental method.

		iv	PMC	NFPC	MPPC
T_{max}	min		52.5 \pm 7.5	105.0 \pm 8.7*	70.0 \pm 10.0
C_{max}	$\mu\text{g/mL}$		31.3 \pm 2.4	21.1 \pm 2.3	25.9 \pm 3.0
$C_{max}-C_{min}$	$\mu\text{g/mL}$		28.1 \pm 2.0	19.0 \pm 1.7	20.8 \pm 3.9
$AUC_{(0-480)}$	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$		4567.7 \pm 374.3	3539.8 \pm 641.5	4127.4 \pm 555.4
CL/F	mL/min		0.2 \pm 0.02	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.03
F			1.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2
CL_{tot}	mL/min	0.2 \pm 0.02			

Values are expressed as mean \pm S. E. of 6 rats in each group. PMC means a capsule of physical mixture, and was prepared by packing powders of UN and MAC. NFPC means a nano-fiber packed capsule prepared by packing UN nano-fibrotic sheet. MPPC means a nano-fiber milled powder packed capsule prepared by packing powder after crushing UN nano-fibrotic sheet.

*) $p < 0.05$ against PMC.

Figure II-7 に、NP 含有 PMC, NFPC, MPPC のラット十二指腸内投与後の血漿中 NP 濃度-時間曲線を示し、Table II-2 にモーメント解析法による薬物動態パラメータを示す。NP について、NFPC および MPPC の C_{max} は PMC のそれと比較して高値を示した。また、 T_{max} は、PMC 投与と比較して、NFPC あるいは MPPC 投与後において短縮傾向を示した。さらに、NFPC, MPPC あるいは PMC 投与後の $C_{max}-C_{min}$ を算出した。NFPC, MPPC の十二指腸内投与後の生物学的利用率は、PMC と比較して高値を示した。すなわち、MAC ナノファイバーを放出支持体とすることにより、脂溶性薬物 NP の体内動態に生物学的利用率の向上と血漿中 NP 濃度の持続化をもたらすものと考えられた。

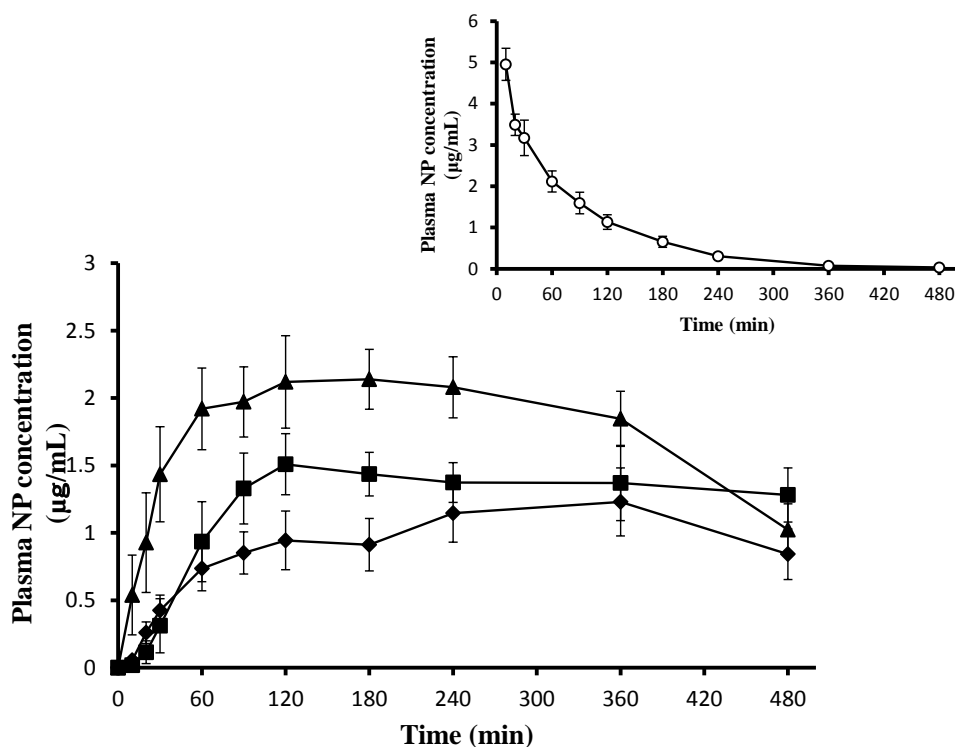


Fig. II-7 NP plasma levels-time curves after intraduodenal administration of capsules including NP.

Insert panel represents plasma level-time curve of NP after intravenous administration of NP (1.0mg/Kg). Symbols with a bar represent the mean \pm S. E. of 6 rats. Key: \blacklozenge , PMC; \blacksquare , NFPC; \blacktriangle , MPPC.

Table II-2 Pharmacokinetic parameters of NP after intraduodenal administration of various capsules including NP by non-compartmental method.

		iv	PMC	NFPC	MPPC
T_{max}	min		280.0±40.0	170.0±45.0	150.0±33.8
C_{max}	µg/mL		1.3±0.2	1.9±0.2	2.5±0.3*
$C_{max}-C_{min}$	µg/mL		0.7±0.1	0.5±0.2	1.6±0.2*
$AUC_{(0-480)}$	µg/mL·min		255.7±51.2	594.3±75.9	608.4±57.2*
CL/F	mL/min		9.2±1.4	3.7±0.5	3.4±0.3*
F			0.1±0.02	0.1±0.01	0.2±0.02*
CL_{tot}	mL/min	0.7±0.1			

Values are expressed as mean ± S. E. of 6 rats in each group. PMC means a capsule of physical mixture, and was prepared by packing powders of NP and MAC. NFPC means a nano-fiber packed capsule prepared by packing NP nano-fibrotic sheet. MPPC means a nano-fiber milled powder packed capsule prepared by packing powder after crushing NP nano-fibrotic sheet.

*) $p < 0.05$ against PMC.

第 4 節 考察

薬物を MAC ナノファイバーに包埋し、MAC ナノファイバーを放出支持体とするカプセル剤を調製し、薬物の溶出挙動と体内動態を検討する目的として、水溶性の UN と、脂溶性の NP をモデル薬物として用いた。UN は水溶性が極めて高く、消化管吸収では輸送担体などを介さない受動拡散を示す水溶性モデル薬物として汎用されている [61]。一方、NP は脂溶性が極めて高く、pH 分配仮説に従わない難溶性、かつ経口投与後の生物学的利用率が低いという特性を示すモデル薬物として知られている [62]。これら薬物を含有した MAC ナノファイバーについて X 線構造回折を行った結果、MAC ナノファイバー中の UN あるいは NP の結晶状態はアモルファス形態であることが示され、薬物の物理化学的特性にかかわらず、水溶性薬物であっても脂溶性薬物であっても MAC ナノファイバー中に包埋できることが明らかとなった。したがって、ES 法によって得られた薬物含有 MAC ナノファイバーシートはいわゆる固体分散体 [63] として製剤設計に応用できるものと考えられた。

In vitro 溶出試験では、NFPC あるいは MPPC からの UN あるいは NP の溶出率は、PMC のそれと比較してどちらも低くなり、MAC ナノファイバー化による薬物の放出制御が認められた。MAC は pH 7.0 以上の環境で溶解する腸溶性コーティング剤であり、本章

で実施した *in vitro* 溶出試験の溶出相の環境は pH 6.8 であるので、MAC の物理化学的特性を考慮すると、MAC 自体の pH6.8 での溶解性は制限されていると考えられる。それゆえ、MAC ナノファイバー自体が放出制御するマトリックスの役割を果たしているものと考えられた。すなわち、pH6.8 の溶出相中では、緩衝液の水分が MAC ナノファイバーの表面から浸潤し、MAC ナノファイバーと水の界面近傍に存在する薬物分子が徐々に溶け出して行くことにより放出制御が実現されるものと考えられた。また、pH 6.8 以下の環境下においては MAC ナノファイバーの水による浸潤速度が低下するので、MAC ナノファイバーからの徐放効果はさらに増強させるものであると考えられた。しかし、このような pH 感応性の MAC ナノファイバーの放出マトリックスとしての役割をさらに明確にするためには、pH 6.8 以外の環境下での溶出試験が必要と考えられた。

ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験での結果は、UN あるいは NP を MAC ナノファイバー中に包埋したとき、いずれの物性の薬物であっても、MAC ナノファイバー化は血漿中薬物濃度推移をコントロールできることが判った。UN のような水溶性薬物の場合、MAC ナノファイバー化することで血漿中薬物濃度の急激な上昇を抑え T_{max} の延長を可能にしたが、生物学的利用率にはほとんど変化を与えなかった。この理由として、UN は消化管内の低い環境 pH 内では分子形となっており、分子形 UN の吸収は pH が低い領域の消化管内で行われるため、PMC の十二指腸内投与後の C_{max} は MAC ナノファイバーを用いた NFPC や MPPC 投与後の C_{max} よりも高くなり、逆に、NFPC や MPPC では MAC 自体の pH 依存的な溶解特性により pH の低い消化管領域では MAC が溶解しないので、UN 分子形の吸収は、pH が高い、より下部の消化管領域で行われる結果となり、 C_{max} の低下と T_{max} の延長がもたらされたものと考えられた。したがって、水溶性薬物を MAC ナノファイバー化した場合、血漿中薬物濃度の急激な上昇を避け、 C_{max} への到達時間を延長させることができるものと考えられた。一方、NP のような脂溶性薬物の場合、MAC ナノファイバー化製剤である NFPC や MPPC の投与は PMC 時と比較して AUC_{0-480} および生物学的利用率の上昇をもたらした。MPPC 投与時の方が NFPC 投与時よりも生物学的利用率に約 2 倍の上昇を認めたことから、MAC ナノファイバーの粉碎による比表面積の増大が生物学的利用率の増大に関与しているものと考えられた。さらに、NFPC からの血漿中 NP 濃度推移はミカエリスメンテン様の曲線を示し、十二指腸内投与後 90 分以降における血漿中 NP 濃度はほぼ一定に維持された。このことは、NP の NFPC 製剤からの供給速度と個体からの消失速度が釣り合っている状態を示唆している。したがって、脂溶性薬物の MAC ナノファイバー化による製剤設計は、放出制御型徐放製剤の設計に適しているものと考えられた。

薬物を MAC ナノファイバー中に包埋する場合、MAC と薬物を同時に溶解できる溶媒を選択する必要がある。第 II 章で用いたモデル薬物の UN および NP は、それぞれ、薬剤学的検討において汎用される水溶性薬物および脂溶性薬物の代表的な薬物である。機能性食品の分野において、ES 法技術は、プロバイオティクスを主眼とした乳酸

菌や酵素成分を含む機能性食品を包埋する技術としても期待されている [11, 64] が、今回の検討では **MAC** ナノファイバーを用いた内服用新規 **DDS** 製剤を開発するという観点から、水溶性薬物および脂溶性薬物の代表的なモデル薬物を使用した製剤を設計して検討した。ES 法を用いての様々な物質のナノファイバーへの包埋例と合わせて考慮すると、高分子ナノファイバー中には様々な特性や機能を有する物質を包埋することが出来るものと考えられた。したがって、第 II 章で得られた結果は、**MAC** ナノファイバー中には、条件を設定することにより、水溶性薬物でも脂溶性薬物でも包埋し、それら薬物の放出制御を成し得るものと結論づけられた。

第 III 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型錠剤の設計と評価

第 II 章では、ES 法を利用して UN あるいは NP 含有の MAC ナノファイバーを調製し、そのシートあるいは粉砕物をカプセル化した放出制御型製剤を設計してその有用性を確認した。次に、第 III 章では、薬物含有 MAC ナノファイバーを調製し、そのファイバーシートを打錠することによる、放出制御型徐放錠の設計を行い、薬剤学的評価をおこなった。この章では、含有させるモデル薬物としてアセトアミノフェン ($\text{Log}P_{ow}=0.51$, AAP) を用い、ES 法で調製した MAC ナノファイバーシートの一定量を直接打錠法により錠剤に成型し、AAP 含有 MAC ナノファイバー錠を得た。なお、AAP の分配係数は物理化学的特性からいうと、その極性は UN よりも低く NP よりも高いものである。調製した錠剤は、1 錠あたりの AAP 含有量を 14 mg とし、全量を MAC ナノファイバー中に含有させ打錠した錠剤 (NFT), AAP 非含有 MAC ナノファイバーに含有量の全量の AAP を吸着させた後打錠した錠剤 (NFT_{ads}), AAP 含有量の半量で AAP 含有 MAC ナノファイバーを調製し、AAP の残り含有量半量を AAP 半量を含む MAC ナノファイバーに吸着させた後打錠した錠剤 (NFT_{half}) であり、薬物の物理的混合物を打錠した錠剤 (PMT) と比較することで評価した。また、AAP の錠剤からの放出制御の評価として、打錠圧を変えた場合、溶出試験の溶出相の pH を変えた場合の薬物溶出挙動を検討し、加えて MAC ナノファイバーに非イオン性界面活性剤を添加した場合についての NFT からの薬物溶出挙動を調べた。さらに、ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験では、NFT 投与後の体内動態を検討するとともに、X 線 CT により錠剤の消化管内移動を追跡することにより放出制御型製剤としての有用性を確認した。

第 1 節 走査型電子顕微鏡 (SEM) による NFT 錠の形態観察

AAP 含有 MAC ナノファイバーに基づく錠剤を 3 種類設計した。それら設計した錠剤の模式図を Fig. III-1 に示す。NFT は、12.5%(w/v) MAC アセトン溶液に 2%(w/v) の用量で AAP を溶解させた混合溶液を調製した後、ES 法によりナノファイバーを調製した (このとき AAP 含有量が 0.14 mg/mg ナノファイバーとなるように調製)。そのナノファイバーシート 100 mg を正確に量り取り、直接打錠法により成形した。NFT_{half} は、12.5%(w/v) MAC アセトン溶液に 1%(w/v) の用量で AAP を溶解させた混合溶液で ES 法によりナノファイバーを調製し、その後 93 mg のナノファイバーを取出し、そのナノファイバーに AAP 粉末 7 mg を吸着させた後、直接打錠法により成形した。NFT_{ads} は、12.5%(w/v) AAP 非含有 MAC アセトン溶液を用いて ES 法により AAP 非含有 MAC ナノファイバーを調製し、その後 86 mg のナノファイバーに AAP 粉末 14 mg を吸着させた後、直接打錠法により成形した。これら 3 種類の 1 錠あたりの重量を 100 mg とし、

AAP 含有量は 14 mg/tablet とした。

錠剤の模式図に示したように, NFT では, AAP は MAC ナノファイバー内にアモルファス状態で存在しており, NFT_{half} では, AAP の半量は MAC ナノファイバー中にアモルファス状態で存在し, 残りの半量は, MAC ナノファイバーの表面に吸着しているか, ナノファイバー相互間につくり出される隙間に埋め込まれている状態である. NFT_{adso} では, AAP 全量が AAP 非含有 MAC ナノファイバーの表面に吸着しているか, ナノファイバー相互間につくり出される隙間に埋め込まれている状態である. これらの被験製剤に対するコントロール製剤として, AAP (14mg), でんぷん (81mg), ステアリン酸マグネシウム (2mg), カルボキシメチルセルロース (3mg) を配合した物理的混合物の錠剤 (PMT) を同様に成形して実験に用いた. なお, MAC ナノファイバーを打錠する場合, 滑沢剤やその他の添加物なしに錠剤を形成することが可能であり, キャッピング, ラミネーション, ステッキング, バインディングなどの打錠障害は認められなかった. 錠剤のサイズは, 繊維径 7 mm で厚さは約 3 mm であった.

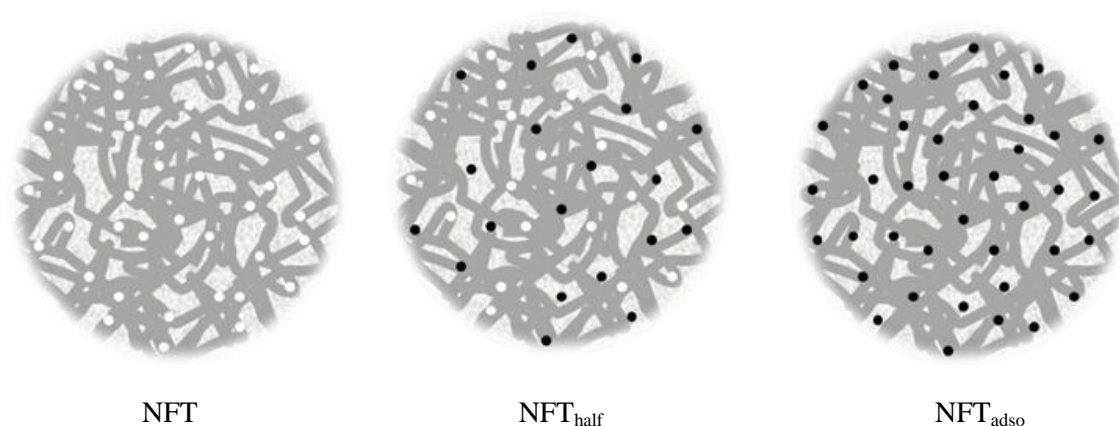


Fig. III-1 Overview images of acetaminophen tablets based on methacrylic acid copolymer S nano-fibers.

The gray matrix shows methacrylic acid copolymer S (MAC) nano-fibers. White circles represent acetaminophen (AAP) co-diluting with MAC in an amorphous form. Black circles represent AAP particles adsorbing on the surface of the MAC nano-fibers or embedding in the spaces between the nano-fibers.

Figure III-2 には, 打錠圧を 5 ~ 20 MPa で変化させたときの NFT 表面の SEM 画像を示す. SEM 画像からも明らかのように, NFT 表面には MAC ナノファイバー相互の絡み合いによる網目構造が観察された. 加えて, ナノファイバー間の隙間は打錠圧が増加

するにつれ、より緻密になることが観察された。これらの SEM 画像は表面だけを捉えたものであるが、錠剤の内部においても同様に MAC ナノファイバーが相互に絡み合い、3 次元的な網目構造を形成しているものと考えられた。また、ナノファイバー同士が形成する空隙はナノスペースとなっており、打錠圧が増加するほど、このナノスペースはより緻密になるものと考えられた。

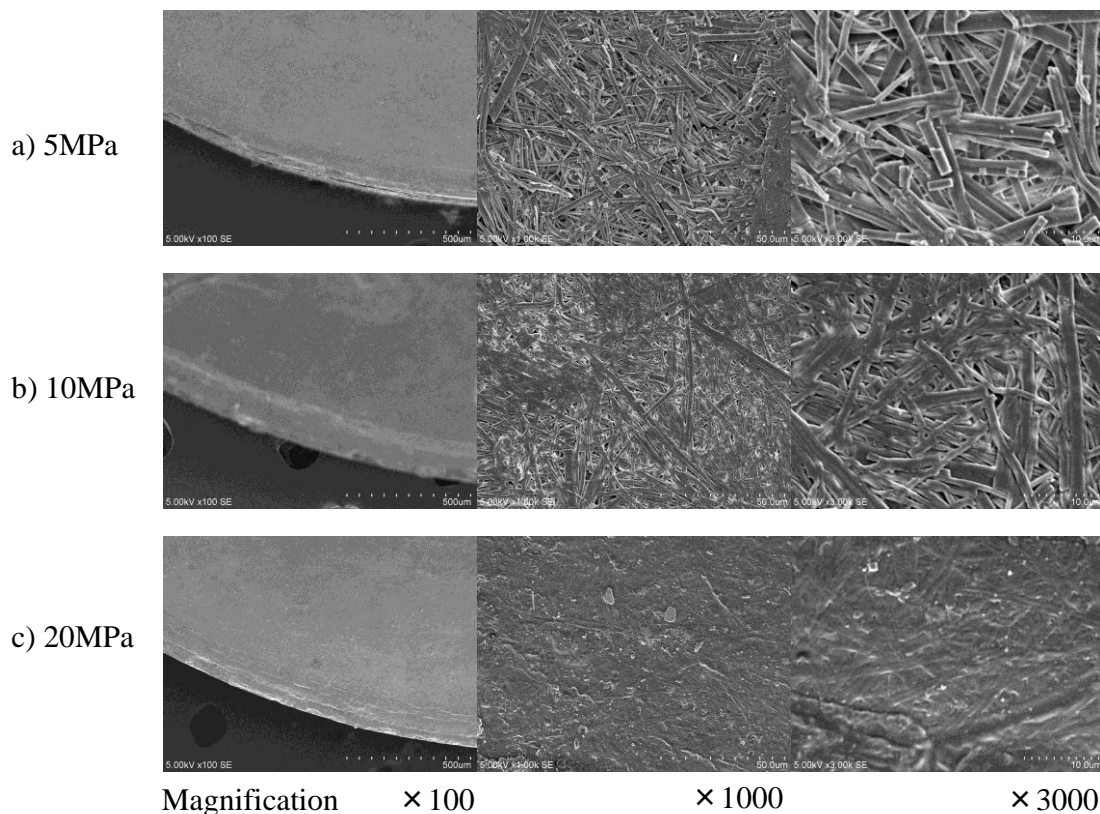


Fig. III-2 Scanning electron microscope images of methacrylic acid copolymer S nano-fiber tablets including acetaminophen at different tableting pressures.

All NFTs including 14mg of acetaminophen (AAP). a) 5MPa, b) 10MPa, c) 20MPa.

第 2 節 NFT の *in vitro* 薬物溶出プロファイルに及ぼす打錠圧の影響

NFT からの AAP の放出プロファイルに打錠圧が如何に影響を及ぼすかについて、pH 6.8 環境下での *in vitro* 溶出試験を行った。Figure III-3 に打錠圧を 5, 10, 20 MPa と変化させた場合の NFT からの AAP の溶出挙動を示す。また、これらの溶解速度論的パラメータを Table III-1 に示す。480 分後の NFT からの AAP の放出割合は 5, 10, 20 MPa でそれぞれ 65%, 48%, 40%であった。AAP の放出は打錠圧に依存しており、5 MPa の

溶解速度は、他のナノファイバー錠と比較して約 2 倍の高値を示した。溶出係数の B 値は、全てほぼ 1.0 に近い値を示し、NFT からの AAP の溶出には試験開始後のタイムラグは認められなかった。また、50%薬物溶出時間である MDT (50% elution time) 値からも、5 ~ 10 MPa の範囲で打錠した場合、AAP の溶出挙動は大きく変動することが明らかとなった。

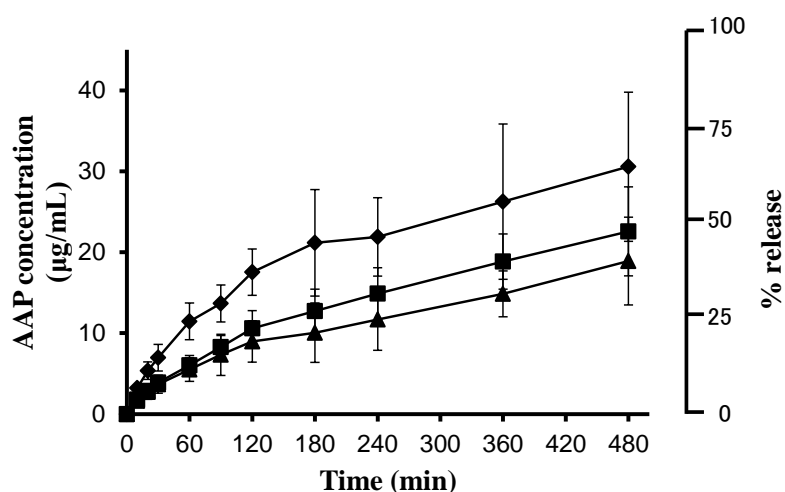


Fig. III-3 *In vitro* dissolution profiles of acetaminophen (AAP) from NFT at different tableting pressures.

Dissolution tests were carried out at pH 6.8, and the NFT includes 14mg of AAP. Dissolution parameters were determined by WinNonlin. Symbols with a bar represent the mean \pm S. D. of 6 experiments. Key: \blacklozenge , 5MPa; \blacksquare , 10MPa; \blacktriangle , 20MPa.

Table III-1 *In vitro* dissolution parameters of acetaminophen (AAP) by non-linear least-squares analysis from NFT at three different tableting pressures

		Tableting pressure (MPa)		
		5	10	20
D_{max}	$\mu\text{g/mL}$	56.5 ± 29.9	60.2 ± 16.9	51.3 ± 20.6
MDT	min	366.8 ± 256.6	1162.6 ± 706.1	1150.9 ± 477.9
B		0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.03

Dissolution was performed at pH 6.8. Values are expressed as the mean \pm S. D. of 6 experiments. D_{max} and MDT represent the maximum dissolution concentration ($\mu\text{g/mL}$) and 50% elution time (min.), respectively.

第 3 節 NFT の *in vitro* 薬物溶出プロファイルに及ぼす pH の影響

MAC は本来医薬品の製造において、腸溶性コーティング剤として用いられている。本章で検討している MAC ナノファイバー錠は、経口投与後、時間の経過とともに消化管内を胃から直腸まで移動し、約 pH 1.0 ~ pH 8.0 までの環境下で薬物を溶出することになる。そこで、NFT からの AAP の放出プロファイルに環境 pH が如何に影響を及ぼすかについて明らかにするために、溶出相の pH を変化させることによる *in vitro* 溶出試験を行った。Figure III-4 に溶出相の pH を 1.0, 3.0, 6.8, 8.0 と変化させた場合の NFT からの AAP の溶出挙動を示す。また、これらの溶解速度論的パラメータを Table III-2 に示す。pH 1.0, 3.0, 6.8, 8.0 における NFT からの AAP の溶出率は、それぞれ 1%, 24%, 37%, 90%であった。pH 8.0 での溶出率が、他の pH 条件下と比較して最も大きく、環境 pH に依存的に AAP の溶出率が大きくなることが明らかとなった。また、B 値は、全てほぼ 1.0 に近い値を示し、薬物の溶出にタイムラグが無いことが示された。さらに、MDT 値より、pH 3.0 の溶出相において、平均溶出時間が最も長くなった。

次に、*in vitro* 溶出試験中の錠剤の形態を観察するために、薬物非含有 MAC ナノファイバー (100mg) を打錠した錠剤 (NFT_{free}) を調製し溶出試験を行った。試験開始後、経時的に錠剤を取り出して形態観察を行い、湿重量と乾燥重量の変化を 48 時間にわたり追跡した。その結果を Fig. III-5 に示す。pH 1.0 または pH 3.0 における錠剤の湿重量は試験前の重量と比較して 21 ~ 25%増加し、試験開始後 48 時間まで、それらの湿重量には変化は認められず (Fig. III-5a)、乾燥重量においても試験開始前の重量に比べてほとんど変化が認められなかった (Fig. III-5b)。一方、pH 6.8 の場合、溶出試験開始後 2 時間までは湿重量に約 20%の増加が認められたが、その後は減少していき、試験開始後 48 時間には湿重量および乾燥重量は試験開始前の錠剤に対し、それぞれ 80%および 60%となった。一方、pH 8.0 においては、錠剤の湿重量は上昇することなく、試験開始後 6 時間までには全て溶解し消失した。以上の結果は、pH 感応性高分子である MAC が、pH 1.0 ~ 3.0 という環境においてはほとんど溶解しない特性を持ち、同時に水分の侵入により膨潤するという高分子の特徴を有しており、環境 pH が低い場合、薬物含有 MAC ナノファイバーは、MAC の水分による膨潤に依存した薬物の水相への溶出が起こるものと考えられた。一方、MAC が溶解し始める pH 以上の環境下では、MAC 自体の溶解が始まり、水で膨潤していたとき以上の薬物の放出が起こるものと考えられた。したがって、以上の *in vitro* 溶出試験の考察から、薬物含有の NFT が実際に経口投与された場合を想定すると、まず、pH 1.0 ~ 2.0 の環境下にある胃の中で 2 時間程度滞留し、膨潤を受けながら、小腸上部から下部へと進んでゆくことになる。この間、環境 pH は、pH 2.0 から pH 8.0 まで変化すると考えられるが、消化管下部へ下がるにしたがって MAC 自体の溶解が水分による膨潤よりも優位になり、膨潤して滞留している状態よりもさらに大量の薬物が錠剤から放出されるものと考えられた。また同時に、pH が

最も高い消化管領域に到達するまでには、NTF は溶解が進行して完全に消失するものと考えられた。

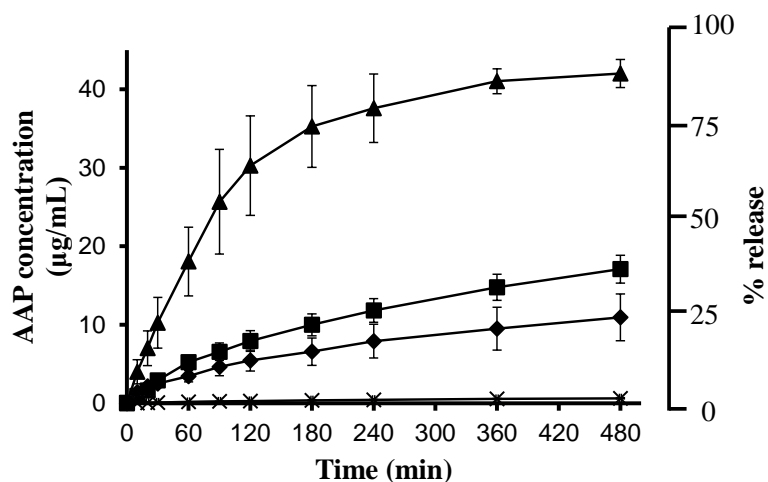


Fig. III-4 *In vitro* dissolution profiles on acetaminophen (AAP) from NFT in different pH conditons.

NFT includes 14mg of AAP, and tablets were prepared at tableting pressure of 10 MPa. Dissolution parameters were determined by WinNonlin. Symbols with a bar represent the mean \pm S. D. of 6 experiments. Key: \times , pH 1.0; \blacklozenge , pH 3.0; \blacksquare , pH 6.8; \blacktriangle , pH 8.0.

Table III-2 *In vitro* dissolution parameters of acetaminophen by non-linear least-squares analysis from NFT at three different pH conditions

		pH value in dissolution phase			
		1	3	6.8	8
D_{\max}	$\mu\text{g/mL}$	1.2 ± 0.3	$27.8 \pm 12.5^*$	$34.3 \pm 9.8^*$	$48.2 \pm 6.8^*$
MDT	min	412.6 ± 107.9	1008.9 ± 576.5	532.3 ± 334.1	96.6 ± 73.5
B		0.9 ± 0.05	$0.69 \pm 0.1^*$	0.9 ± 0.1	$1.4 \pm 0.1^*$

Tableting pressure for each tablet was 10MPa. Values are expressed as the mean \pm S. D. of 6 experiments. D_{\max} and MDT represent the maximum dissolution concentration ($\mu\text{g/mL}$) and 50% elution time (min.), respectively. *) $p < 0.05$ versus pH 1.0.

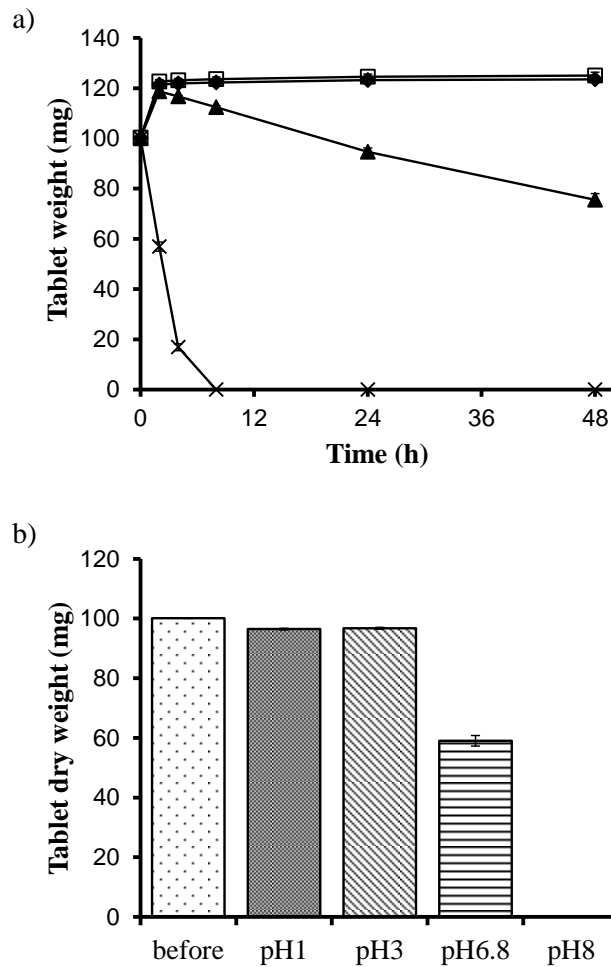


Fig. III-5 Temporal changes in weight of the NFT_{free} tablets in various pH conditions.

Symbols with a bar represent the mean \pm S. D. of 6 experiments. Key: \blacklozenge , pH 1.0; \square , pH 3.0; \blacktriangle , pH 6.8; \times , pH 8.0.

第 4 節 NFT の *in vitro* 薬物溶出プロファイルに及ぼす薬物の配合形態の違いによる影響

MAC ナノファイバーより作製した NFT, NFT_{adso}, NFT_{half} および物理的混合物 PMT について, AAP の溶出挙動を pH 6.8 の条件下で測定した. その結果を Fig. III-6 に, また, その溶解速度論的パラメータを Table III-3 に示す. 試験開始 480 分後の NFT, NFT_{half}, NFT_{adso}, PMT の AAP の溶出率は, それぞれ約 37%, 78%, 50%, 82% であった. 初期溶出速度は, ナノファイバーを用いた製剤は, PMT と比較して遅くなる結果となった. B 値は, 全てほぼ 1.0 に近い値を示し, 溶出におけるタイムラグはほぼないものと考えら

れた。一方、MDT 値は、 NFT_{half} で最も大きな値となった。本節の検討では、AAP の添加形態が錠剤からの溶出挙動に如何に影響を及ぼすかについて調べたが、これらの結果は、薬物を MAC ナノファイバーに吸着させた方が、MAC ナノファイバー内部へ包埋する場合よりも薬物の放出は優位になることを示した。さらに、MAC ナノファイバーを薬物の放出支持体とし、ナノファイバーへ薬物を吸着させるかあるいは包埋させるかを適宜選択検討することにより、至適な薬物の放出特性を有する錠剤の設計が可能となることを示した。

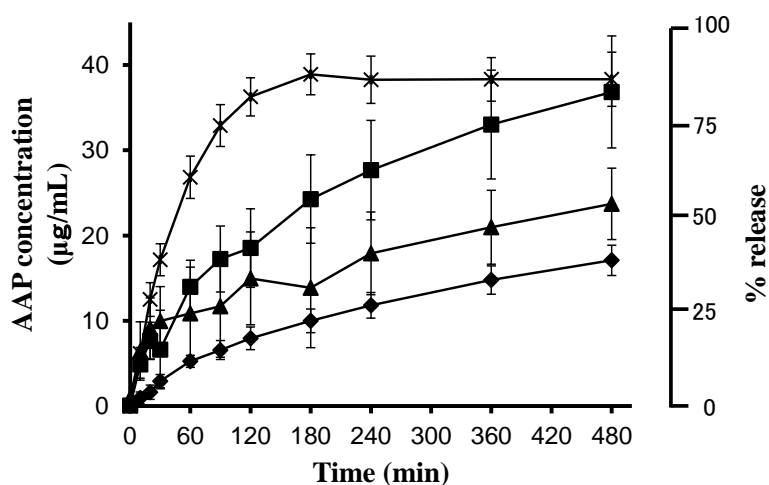


Fig. III-6 *In vitro* dissolution profiles of acetaminophen (AAP) from four different tablets including AAP.

Tableting pressure for each tablet was 10 MPa, and dissolution parameters were determined by WinNonlin. Symbols with a bar represent the mean \pm S. D. of 6 experiments. Key: \blacklozenge , NFT; \blacksquare , $NFT_{adsorbed}$; \blacktriangle , NFT_{half} ; \times , PMT.

Table III-3 *In vitro* dissolution parameters of acetaminophen (AAP) by non-linear least squares analysis from the NFT, NFT_{adso}, NFT_{half} and PMT at pH 6.8.

		Tablets tested			
		NFT	NFT _{adso}	NFT _{half}	PMT
D _{max}	µg/mL	34.3±9.8	79.7±23.9*	44.2±9.3	40.6±4.0
MDT	min	532.3±334.1	629.6±369.2*	635.0±422.1*	36.3±10.2
B		0.9±0.1	0.7±0.08*	0.6±0.08*	1.6±0.2

Tableting pressure for each tablet was 10MPa, and dissolution was performed at pH 6.8. Values are expressed as the mean ± S. D. of 6 experiments. NFT is a methacrylic acid copolymer S (MAC) nano-fiber tablet including acetaminophen (AAP) within the nano-fibers. NFT_{adso} in AAP adsorbed MAC nano-fiber tablet. NFT_{half} is a half amount of AAP adsorbed MAC nano-fiber tablet including a half amount of AAP. *) p<0.05 versus PMT.

第 5 節 ラット *in vivo* 十二指腸内投与後の NFT の腸管移動

第 3 節では、MAC で調製された MAC ナノファイバー錠 (NFT) は、pH が低い領域ではその形状がほとんど変化せず、pH が高い領域では MAC が徐々に溶解して消失することを明らかにした。実際の生体に、NFT が経口投与された場合、胃から直腸にかけて pH が 1.0 ~ 8.0 の範囲で変化する消化管内環境を NFT は通過することになる。そこで、NFT が消化管内でどのようにその形態を変化させていくかを調べるために、造影剤を包埋させた NFT を調製し、ラット *in vivo* 十二指腸内投与後の錠剤の形態を観察した。Figure III-7 は、BaSO₄ 含有 NFT のラット十二指腸内投与後の腸管造影画像の結果を示す。Figure III-7a は投与前、Fig. III-7b, c, d は、それぞれ十二指腸内投与直後、8 時間後、12 時間後であり、Fig. III-7e は投与後 24 時間の結果である。錠剤の陰影の軌跡から、十二指腸内投与後、NFT 錠剤は崩壊することなく、腸管下部へ移動している様子が示されている。さらに、消化管内での NFT の形態変化を観察するために、別のラット十二指腸内に NFT を投与した後、空腸、回腸および盲腸から投与後の錠剤を取出し、錠剤表面を SEM 画像で観察した。Figure III-8 に投与後一定時間に消化管内から摘出した錠剤の SEM 画像を示す。投与前の NFT 錠の直径は 7 mm であるのに対し、空腸、回腸、盲腸で取出した錠剤の直径は、それぞれ 6.9, 6.7, 6.4 mm であり、錠剤の直径は盲腸に到達した時点では約 10% 小さくなっていたが、錠剤の円形は保たれたままであった (data not shown)。また、投与 24 時間後において、NFT は消化管内から完全に消失した。また、空腸から取り出した NFT の表面には、第 I 節の Fig. I-1 で示したような、

ナノファイバー同士が密に絡みあっている状態が観察されたが、順次回腸、盲腸へと移行するにしたがって、表面の網目構造が溶解している様子が観察された。以上の結果から、NFTは投与後消化管内で崩壊することなく錠剤の形態を保ったまま消化管下部へと移動し、pHが高くなるにつれて錠剤が溶け出し、pHが最も高くなる領域においては錠剤が完全に溶解して消失するという特性を持つことが判った。

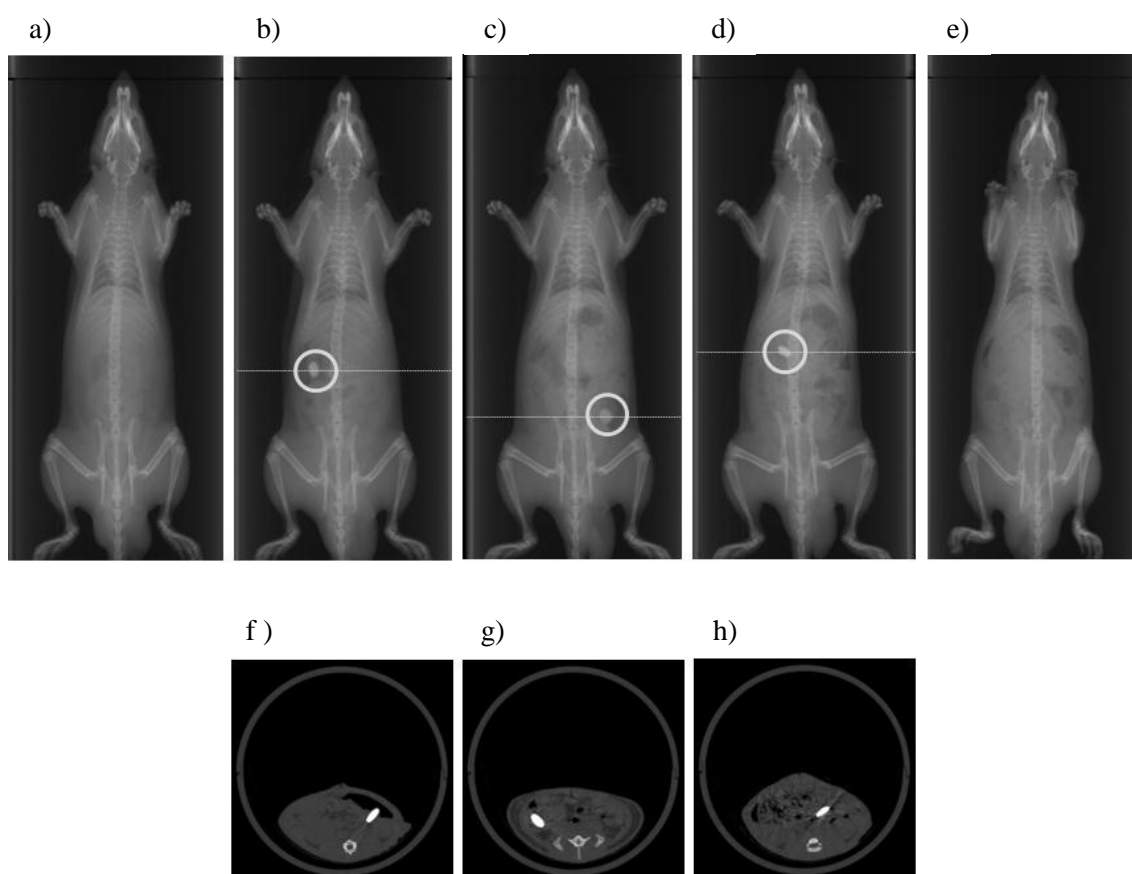


Fig. III-7 Contrast examination test by X-ray irradiation after intraduodenal administration of methacrylic acid copolymer S nano-fiber tablets.

a) before intraduodenal administration, b) immediately after administration (0min.), c) 8 h, d) 12 h and e) 24 h after administration, f), g) and h) sectional views seen from the head side of rats corresponding to the dashed line in of c), d) and e), respectively. NFT included BaSO_4 as a radio-contrast agent.

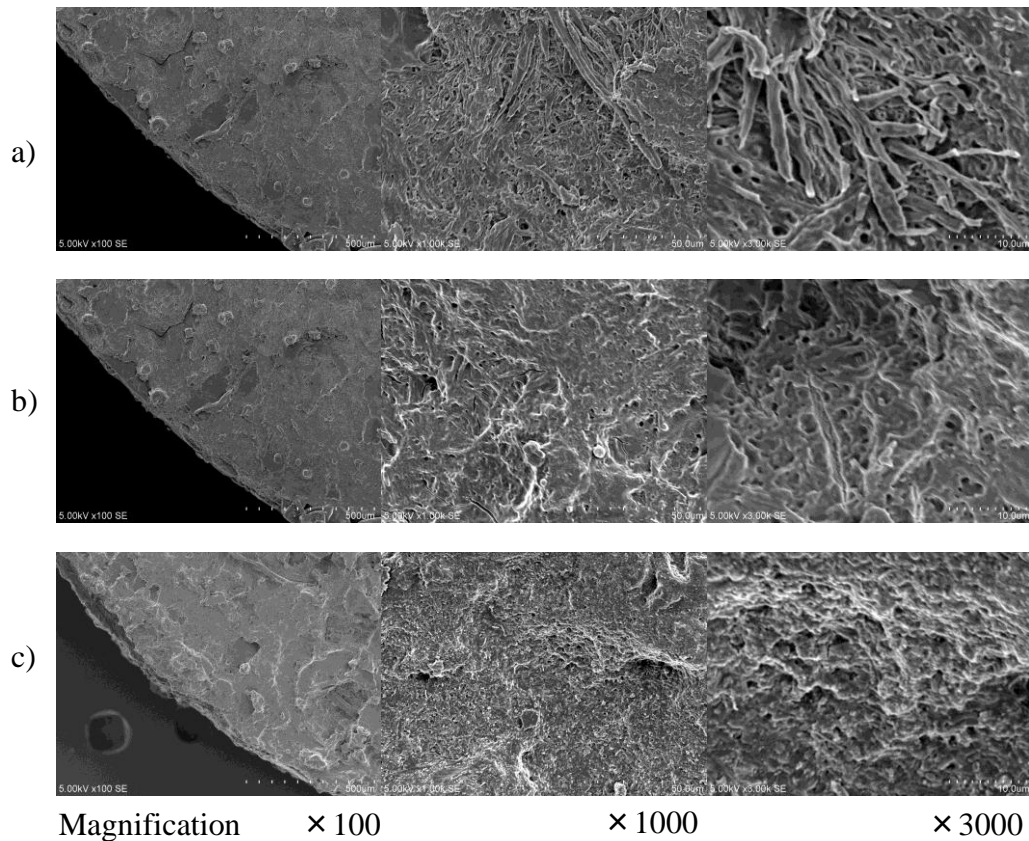


Fig. III-8 Scanning electron microscope images of NFT including acetaminophen (AAP) after intraduodenal administration to rats.

Three rats received NFT including AAP *via* an intraduodenal route, and tablets were subsequently harvested from the intestine in the a) jejunum, b) ileum and c) cecum. NFT including AAP was prepared at a tableting pressure of 10 MPa.

第 6 節 NFT 調製における非イオン性界面活性剤の添加が *in vitro* 薬物溶出プロファイルに及ぼす影響

第 I 章 第 5 節において、非イオン性界面活性剤の添加は MAC ナノファイバーの繊維径を制御する上で有用な手段であることを論じた。そこで、本節では、薬物含有 MAC ナノファイバーに非イオン性界面活性剤を添加して錠剤を調製した場合、薬物の *in vitro* 溶出挙動がどのように影響されるかについて検討した。モデル薬物には水溶性薬物の UN および脂溶性薬物の NP を用い、薬物含有 MAC 溶液に、非イオン性界面活性剤の濃度を変えて添加し、ES 法で調製したナノファイバーを打錠し成形した。これらの錠

剤について、pH 6.8において *in vitro* 溶出試験を実施し、それぞれの薬物の溶出挙動を調べた。水溶性モデル薬物として UN を用いた場合の非イオン性界面活性剤添加時の溶出挙動を Fig. III-9 に示す。非イオン性界面活性剤を添加しない場合、試験開始後 480 分の薬物溶出率は、約 80%を示し、Tween 20 を添加した場合、添加濃度が 1%時に薬物溶出率は約 92%、2%および 4%時には約 100%の UN の溶出を確認した。一方、Span 20 の場合、添加の有無に関わらず、UN の放出に大差はみられなかった。

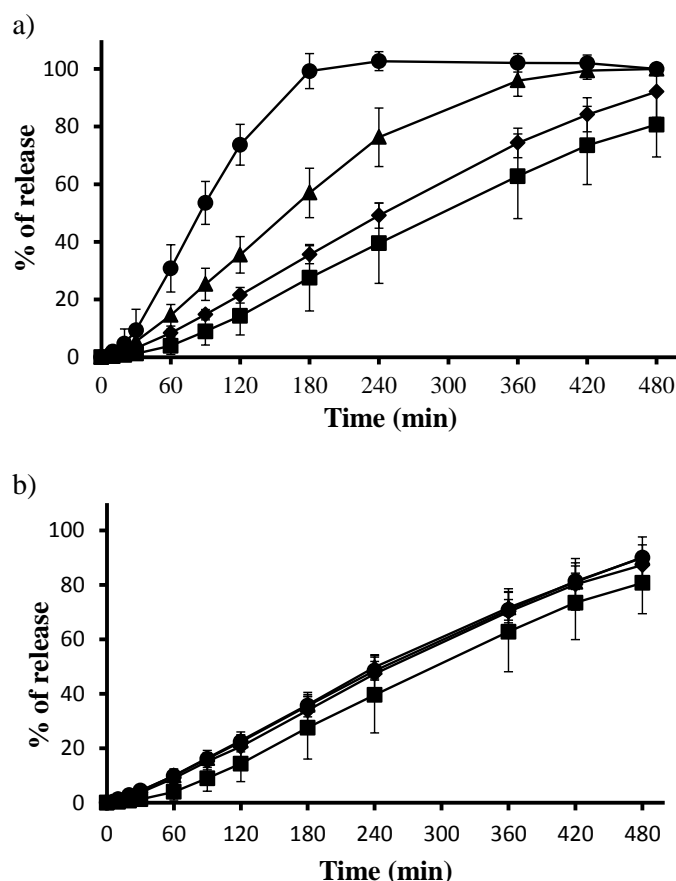


Fig. III-9 *In vitro* Dissolution Profiles of UN from MAC tablets including a) Tween 20 and b) Span 20.

Symbols with a bar represent the mean \pm S. D. of 6 experiments. Key: ■, Free; ◆, 1%; ▲, 2%; ●, 4%.

次に、脂溶性モデル薬物として NP を用いた場合の非イオン性界面活性剤添加の薬物溶出挙動を Fig. III-10 に示す。非イオン性界面活性剤を添加しない場合、試験開始後 480 分の薬物溶出率は、約 24%であったのに対し、Tween 20 を添加した場合、1%、2%および 4%の添加時の薬物溶出率は、それぞれ 49%、91%および 99%の溶出を確認した。一方、Span 20 を添加した場合、薬物溶出率は 1%、2%および 4%の添加濃度で 36%、39%

おおよび 42%であった。非イオン性界面活性剤を添加しない場合と比較して、添加した錠剤の方が、溶出率は大きくなるが、Span 20 の添加の時より Tween 20 を添加した時の方が、明らかに放出制御されているという現象が確認された。この理由については現在のところ不明であるが、HBL 値が大きい Tween 20 は、Span 20 よりも可溶化能力が高いことに起因し、その添加により薬物分子がよりよく MAC ナノファイバー中に分散できるものと推察された。また、第 I 章 第 5 節の結果と合わせて考慮すると、これらの結果は MAC ナノファイバー中に非イオン性界面活性剤を添加して打錠することによって、錠剤からの薬物の放出制御を行う上での一つの手段になり得ることを示すものとなった。

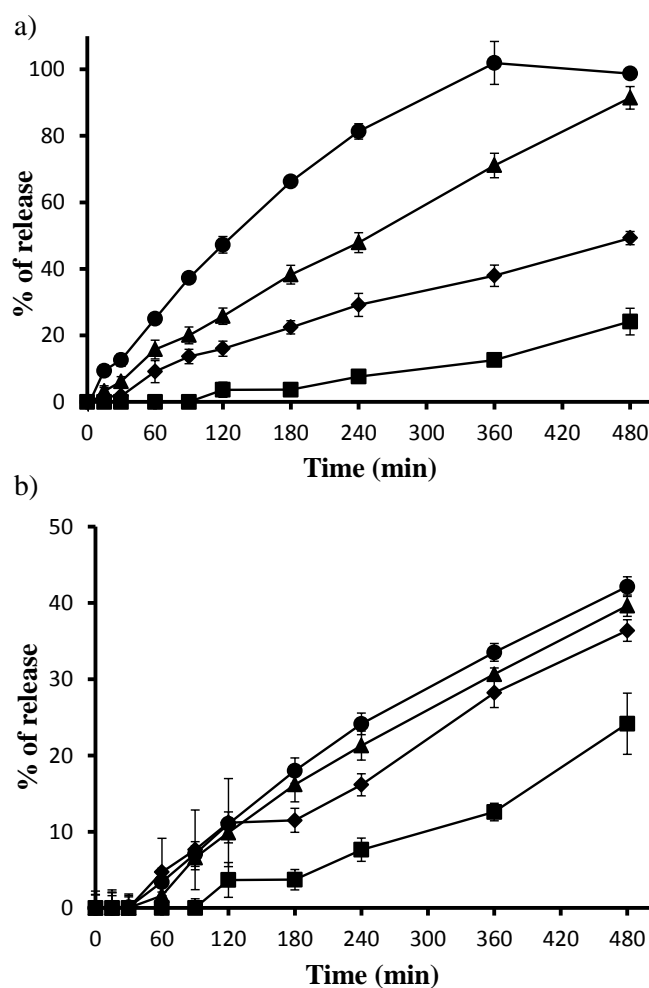


Fig. III-10 *In vitro* Dissolution Profiles of NP from MAC tablets including a) Tween 20 and b) Span 20.

Symbols with a bar represent the mean \pm S. D. of 6 experiments. Key: ■, Free; ◆, 1%; ▲, 2%; ●, 4%.

第 7 節 薬物含有 NFT のラット *in vivo* 十二指腸内投与試験

本節までの *in vitro* 試験および *in vivo* 試験の検討で、薬物含有 MAC ナノファイバーにより調製した NFT は、従来の崩壊型の錠剤ではなく、pH に感応して錠剤自体が膨潤あるいは溶解することにより薬物を放出する特性を持つ錠剤であることが判明した。

そこで、次に MAC ナノファイバーで作製した錠剤の薬物が生体内でどのような放出挙動を示すかを明らかにするため、NFT、NFT_{half} および NFT_{adso} について PMT を対象としたラット *in vivo* 十二指腸内投与試験を行い、薬物の血漿中濃度推移を調べた。Figure III-11 に調製した被験製剤をそれぞれラット *in vivo* 十二指腸内投与したときの血漿中薬物濃度-時間曲線を示す。また、その薬物動態パラメータを算出し Table III-4 に示す。

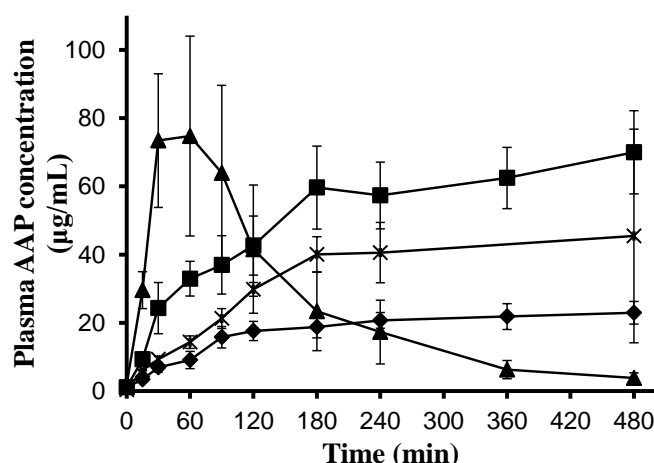


Fig. III-11 Plasma concentration-time curves of acetaminophen (AAP) after intraduodenal administration of methacrylic acid copolymer S (MAC) nano-fiber tablets including AAP. Symbols with a bar represent the mean \pm S. E. of 5-6 experiments. Key: ◆, NFT; ×, NFT_{half}; ■, NFT_{adso}; ▲, PMT

PMT, NFT_{adso}, NFT_{half} および NFT の C_{max} は、 $PMT > NFT_{adso} > NFT_{half} > NFT$ の順に抑えられたが、PMT 以外の錠剤については試験時間中での明確な血漿中薬物濃度のピーク値を捉えることはできなかった。PMT, NFT_{adso}, NFT_{half} および NFT の試験中での C_{max} に対する T_{max} は、 $PMT < NFT_{half} < NFT_{adso} < NFT$ の順に延長する結果となった。また、PMT, NFT_{adso}, NFT_{half} および NFT の十二指腸内投与後の AUC_{0-480} から算出した、PMT を基準製剤とした相対的バイオアベイラビリティ (RA) の値から判断すると、NFT の

場合、MAC ナノファイバーに薬物を吸着させると RA 値が増加することが結果からも明らかとなり、*in vivo*–*in vitro* の相関性が得られた。さらに、AAP の配合形態を変えた 3 種類の NFT の血漿中 AAP 濃度推移には明確なピーク値 (C_{max}) が試験時間内には認められなかった (Fig. III-11) が、この事実から、MAC ナノファイバーを連続相として調製した、3 種類の NFT、 NFT_{half} および NFT_{adso} は、PMT である素錠に比べて持続性に著しく優れた特徴を有する、超持続性の錠剤であることを明確とするものであった。

Table III-4 Pharmacokinetic parameters of acetaminophen after intraduodenal administration of methacrylic acid copolymer S nano-fiber tablets

		Tableted			
		NFT	NFT_{adso}	NFT_{half}	PMT
T_{max}	min	450±30*	400±60*	280±65*	450±34
C_{max}	µg/mL	24±35*	75±18	52±20	95±281
AUC_{0-480}	µg·min/mL	8748.7±1292.8	25143.9±4061.9	13932.9±3286.1	12090.3±4384.6
RA		0.7±0.1	2.1±0.3	1.2±0.3	1.0

Values are expressed as the mean ± S. E. of 5-6 rats in each group. NFT is a methacrylic acid copolymer S (MAC) nano-fiber tablet including acetaminophen (AAP) within the nano-fibers. NFT_{adso} is AAP adsorbed MAC nano-fiber tablet. NFT_{half} is a half amount of AAP adsorbed MAC nano-fiber tablet. The relative bioavailability (RA) values were calculated by dividing the area under the concentration-time curve from zero to 480 minutes (AUC_{0-480}) of each NFT tablet by the mean AUC_{0-480} of PMT. C_{max} is maximum plasma concentration of AAP and T_{max} is time to reach C_{max} of AAP. *) $p < 0.05$ versus PMT.

第 8 節 考察

第 III 章では、ES 法を利用して薬物を含有する MAC ナノファイバーを調製し、放出制御型の薬物含有 MAC ナノファイバー錠 (NFT) を調製して薬剤学的検討を行った。MAC ナノファイバーを打錠する際、一定量の MAC ナノファイバーシートを結合剤や滑滑剤を添加することなく容易に打錠することができ、打錠障害も認められなかった。Figure III-2 に示したように、NFT は MAC ナノファイバーが緻密に絡み合った網目状のマトリックス構造を示すので、薬物を MAC ナノファイバー中に存在させる、あるいはナノファイバー同士が絡み合って形成された網目構造内 (ナノスペース) に薬物粒子を封じこめるという方法により薬物含有の錠剤として製することができた。その際、打

錠圧を高くすると、圧力に押しつぶされ、ナノファイバーの絡みあう網目構造がより緻密となり、薬物の *in vitro* 溶出が抑制される結果となった。このことは、打錠圧が高くなるほどナノスペースが小さくなり、外界の水分に対するぬれが小さくなったことが原因であると考えられた。

MAC は pH 感応性の高分子であり、pH 7.0 以上の領域において容易に溶解する。一方、低い pH 領域では溶解性を示さないことから、MAC は代表的な腸溶性コーティング剤として医薬品の多くに使用されている [65-67]。MAC でコーティングした腸溶性錠剤やカプセル剤は、服用後 pH が 1.0 ~ 2.0 の胃中では崩壊することはなく、pH が 7.0 以上の消化管内領域において崩壊し、内容物を放出する。MAC ナノファイバーシートを打錠した NFT 製剤の場合、錠剤表面から内部に至るまで MAC ナノファイバーであるので、仮に経口投与をした場合、胃内の酸性 pH の環境では全く溶解せず、アルカリ性 pH に向かう小腸内では徐々に錠剤の表面から溶け出すという、環境 pH に応じた異なる製剤特性を NFT は有すると考えられた。したがって、第 3 節での溶出試験の結果は、異なる 2 つの製剤特性を有するという予測を裏付けるものとなった。すなわち、pH 1.0 及び pH 3.0 における NFT の湿重量が約 20% 増加し、かつ乾燥重量が不変であったにも関わらず、溶出試験 480 分後にはそれぞれ 1% および 13% の AAP の溶出率を示している。このことから、NFT は pH の極めて低い領域では水分による浸潤が原因となり NFT の表面から MAC が徐々に膨潤することにより MAC に包埋されている薬物が溶出するものと考えられた。一方、pH 7.0 以上の高い領域では、MAC 自体が溶解することから、NFT では錠剤の表面からの MAC の溶解に伴う薬物の放出が起こるものと考えられた。さらに、pH 3.0 以上 pH 7.0 以下の領域では、pH が 3.0 に近いほど MAC の膨潤に起因する薬物の溶出の占める割合が多くなり、また、pH が 7.0 に近くなるほど MAC の溶解に起因する薬物の放出の占める割合が高くなるものと考えられた。これらの考察は、Fig. III-8 の SEM 画像からも裏付けられる。すなわち、ラット *in vivo* 十二指腸内投与後、空腸領域 (pH 3.5 - 6.6)、回腸領域 (pH 6.5 - 7.4) または盲腸領域 (pH 7.9 - 8.0) に位置していた NFT の表面構造を比較すると、盲腸領域で得られた NFT は他の領域で得られた NFT と比較して明らかな溶解による表面構造の欠落が認められた。したがって、NFT は空腸領域を過ぎると、腸管内の環境 pH が徐々に酸性側からアルカリ性側へと移行するため、この領域では、MAC ナノファイバーの膨潤と pH に依存した溶解の双方が薬物の NFT からの放出に関与しているものと考えられた。さらに、これらの結果は、MAC ナノファイバーにより作製された錠剤は、従来の錠剤のように、消化管内で崩壊が起こらず、かつ消化管内に残留しないという特徴を持つ新規の錠剤であることを示した。

また、Fig. III-6 に示した溶出試験の結果より、NFT、NFT_{adso}、NFT_{half} の AAP 溶出挙動は、PMT に比較して相対的に低く、MDT 値は PMT の 14 ~ 17 倍を示した (Table III-3)。これらの結果は、NFT、NFT_{adso}、NFT_{half} が超持続型製剤であり、NFT への薬物の配合方

法を変更することでも薬物放出制御を達成することが可能であることを明確に示すことができた。例えば、「速く効いて長く効く」という特性が望まれる鎮痛薬の NFT を設計する場合、速く効かせるための分量を MAC ナノファイバーに吸着させ、長く効かせるための分量を MAC ナノファイバー中に包埋して打錠することにより、目的とする錠剤を設計することが可能であると考えられる。

さらに、NFT が超持続型製剤であるということは、ラット *in vivo* 十二指腸内投与実験からも明らかとなった。すなわち、PMT を投与したときの血漿中 AAP 濃度-時間曲線には、試験時間内においてピーク値と消失相が認められたのに対し、PMT を除くいずれの NFT においても、血漿中 AAP 濃度が徐々に増加して試験時間内ではピーク値を観察出来なかった。このことから、PMT の場合に比べ、NFT では相対的に徐放化し、その効果が長く持続しているものと判断できた。

その他の NFT の特徴として、MAC ナノファイバー同士の絡み合いにより形成されるナノスペースをもつということである。コーンスターチやハイドロゲルから形成される高分子マトリックスは、ナノまたはマイクロサイズのポアを有する微細な網目構造をもち、その網目構造に薬物を取り込ませることにより、疎水性や親油性薬物の腸管吸収や細胞浸透性を高めることが報告されている [68, 69]。また、電気工学の分野においては、ナノオーダーのスペースに詰め込まれた物質は、マイクロオーダーのスペースに詰め込まれた物質よりも電氣的、工学的、磁氣的に異なった、よりエネルギー的に活性化される状態となることが報告されている [70, 71]。今回、試験した NFT_{adso} は、他の錠剤に比べて大きな RA 値を示したが、この NFT_{adso} は、MAC ナノファイバー内に薬物としての AAP は全く含まれず、MAC ナノファイバーに吸着させたものである。NFT_{adso} の RA 値が大きくなった詳細な理由については明確ではないが、NFT が形成する緻密な網目構造、すなわちナノスペースに AAP が封入された結果、エネルギー的に活性化されたのかもしれない。この点についてはナノスペースを有する支持体を利用する薬物吸収について更なる検討を加える必要があると考えられた。

第 IV 章 総括

1970 年代半ばから薬剤学の分野においてドラッグデリバリーシステム (DDS) の概念が導入され、親薬物の薬理活性を最適化する目的で、吸収促進、放出制御あるいは標的指向性などの機能を有する数多くの DDS 製剤の研究開発がなされてきた。さらに、1980 年代の後半に入ると、様々な分野でナノテクノロジーの概念が導入され、DDS の分野ではナノ材料を製剤設計に応用し、より高度な標的指向化を行うというナノ DDS の概念へと発展を遂げた。このように、DDS 製剤の設計において使用されるナノ材料は、親薬物のみでは決して実現できない親薬物の生体内挙動を制御する先端技術であり、今後の製剤設計において増々検討されていく分野と考えられている。その中で、高分子を材料に作製されるナノファイバーを新規の素材として様々な分野で応用することにより、新たな技術革新へと波及することが期待されている。

そこで、古くから繊維業界において繊維径がナノメートルサイズの繊維による不織布の製造方法として研究されており、医学分野では、細胞工学や再生医療を行う際の細胞増殖の足場としての研究が盛んにおこなわれ、心臓や血管など様々な臓器の再生に応用できると技術であると期待されている ES 法に着目した。ES 法により、均一なナノファイバーを調製するためには、適切な装置を構成し、用いる高分子に対応する最適な ES 法の条件設定を行う必要がある。加えて、DDS の分野における ES 法を用いての医薬品開発の検討についてはほとんど実施されていないのが現状で、医薬品製造に使用でき、かつ薬物の放出支持体となる機能的な医療用高分子の ES 法への適用については検討されていない。したがって、医薬品の製造過程において既に使用されている腸溶性コーティング剤、メタクリル酸コ高分子 S (Eudragit[®] S100 ; MAC) を連続相の高分子としたナノファイバーを ES 法により調製する手法を開発し、調製したナノファイバーを製剤中の薬物放出の支持媒体として利用する、新規の薬物放出制御型 DDS 製剤の開発を目指した。第 I 章では、ES 法を用いた MAC ナノファイバー調製の条件検討、第 II 章では、MAC ナノファイバーを用いた放出制御型カプセル剤の設計と評価、第 III 章では、MAC ナノファイバーを用いた放出制御型錠剤の設計と評価を実施し、以下の結論を得た。

第 I 章 ES 法を用いた MAC ナノファイバー調製の条件検討

ES 法では、ナノファイバーの生成には多くの影響要因があることが報告されており、克服すべき課題が残されている。例えば、高分子溶液の粘性が低い状態や、陽極と陰極間の距離が近すぎる場合、金属プレートの捕集板にはビーズと呼ばれる球状の塊が作製されてしまい、安定なナノファイバーが得られなくなってしまう。また、高分子溶液の

吐出速度が小さい場合にはナノファイバーの収量が減少する。そこで、第 I 章では、放出制御型の経口製剤の設計に MAC ナノファイバーを応用するため、ES 装置を構築し、MAC のみあるいは MAC に薬物を含有させた MAC ナノファイバーを ES 法で調製するための条件設定を検討することを目的とし、ES 法における様々な動作条件下での MAC ナノファイバーの調製について検討した。

MAC ナノファイバーを効率よく得るための ES 装置の開発とその条件設定を中心に検討を加えた結果、銅製で円形状の MAC ナノファイバーの捕集板を作製し、その中央部に導電性の金属棒を取り付けることにより、MAC ナノファイバー形成時の広がりや損失を防ぎ、効率よくナノファイバーを収集することに成功した。

ES 法による MAC ナノファイバー調製時の条件検討の結果から、MAC の場合、高分子溶液の濃度 (粘性) のみが、MAC ナノファイバーの繊維径に影響する変動要因であることが明らかとなり、MAC ナノファイバーの繊維径の制御には、誘電率や沸点の異なる溶媒を使用する、MAC 濃度 (あるいは粘性) を変える、非イオン性界面活性剤を添加するという手段を選択することにより行い得るものと結論づけた。

第 II 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型カプセル剤の設計と評価

この章では、MAC ナノファイバー中に薬物を溶解あるいは包埋させることによる徐放制御型 DDS 製剤の設計を検討した。含有させるモデル薬物として、水溶性のウラニン (UN) と脂溶性のニフェジピン (NP) を用い、第 I 章で示した ES 装置によりバリデーションで設定した操作条件のもと、薬物含有の MAC ナノファイバーを調製し、そのナノファイバーシートを用いて放出制御型カプセル剤を設計し、*in vitro* および *in vivo* での薬剤学的評価をおこなった。

薬物を含有した MAC ナノファイバーの X 線構造回折の結果、MAC ナノファイバー中の UN あるいは NP の結晶状態はアモルファス形態であることが示され、薬物の物理化学的特性にかかわらず、水溶性薬物であっても脂溶性薬物であっても MAC ナノファイバー中に包埋できることが明らかとなった。*In vitro* 溶出試験では、MAC は pH 7.0 以上の環境で溶解する腸溶性コーティング剤であるので、溶出液 pH 6.8 での溶解性は制限されていると考えられ、MAC ナノファイバー自体が放出制御するマトリックスの役割を果たしているものと結論づけ、加えて、MAC ナノファイバーは pH 感応性による薬物放出特性を有するものであることが示された。ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験では、UN あるいは NP を MAC ナノファイバーに包埋したとき、いずれの物性の薬物であっても、MAC ナノファイバー化は血漿中薬物濃度推移を制御できることが明らかとなった。すなわち、UN のような水溶性薬物の場合、MAC によりナノファイバー化することで、血漿中薬物濃度の急激な上昇を抑え最高血漿中濃度到達時間の延長を可能

にし、NPのような脂溶性薬物の場合、MAC ナノファイバー化することで生物学的利用率の上昇をもたらした。よって、MAC ナノファイバー中には、条件を設定することにより、水溶性薬物でも脂溶性薬物でも包埋でき、それら薬物の放出制御を成し得るものと結論づけた。

第 III 章 MAC ナノファイバーを用いた放出制御型錠剤の設計と評価

この章では、薬物含有 MAC ナノファイバーを調製し、そのナノファイバーシートを打錠することによる、放出制御型徐放錠の設計を行い、薬剤学的評価をおこなった。含有させるモデル薬物としてアセトアミノフェン (AAP) を用い、ES 法で調製した MAC ナノファイバーシートの一定量を直接打錠法により錠剤に成形し、AAP 含有 MAC ナノファイバー錠を得た。また、AAP の錠剤からの放出制御の評価として、打錠圧を変えた場合、pH を変えた場合の薬物溶出挙動、さらに MAC ナノファイバーに非イオン性界面活性剤を添加した場合についての NFT からの薬物溶出挙動を調べた。さらに、ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験では、NFT 投与後の体内動態を検討するとともに、X 線 CT により錠剤の消化管内移動を追跡することにより放出制御型製剤としての有用性を確認した。

また、MAC ナノファイバーを打錠する際、一定量の MAC ナノファイバーシートを結合剤や滑沢剤を添加することなく容易に打錠することができ、打錠障害も認められない、薬物含有の錠剤として調製することができた。また、*in vitro* および *in vivo* 試験の結果から、MAC ナノファイバーにより作製された錠剤は、従来の錠剤のように、消化管内で崩壊が起こらず、かつ消化管内に残留しないという特徴を持つ新規の錠剤であると結論づけた。さらに、NFT への薬物の配合方法を変更することで薬物放出制御を達成することが可能であり、超持続型製剤であることも *in vivo* の試験結果から明らかとなった。加えて、非イオン性界面活性剤の添加によっても溶出挙動をコントロールできることが示された。

以上の結果から、ES 法により作製した MAC ナノファイバーは、放出制御型製剤の設計に有用であることが確認され、DDS 設計において幅広い応用性を提供するものであると考えられた。

実験の部

第 I 章

I-1 試薬類

メタクリル酸コ高分子 S 100 (EUDRAGIT®S100; MAC) は、エボニック・デグサ・ジャパン株式会社 (Tokyo, Japan) より恵与されたものを用いた。ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20, HLB=16.7) およびソルビタンモノラウレート (Span 20, HLB=8.6) は、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。また、その他の試薬類は全て市販の特級品を用いた。

I-2 試験溶液の準備

MAC 溶液は、アセトン、メタノール、エタノールで溶解し、最終濃度を 10–15%(w/v) となるように準備した。また、MAC 溶液に非イオン性界面活性剤として Tween 20, Span 20 を最終濃度として 1–4%(w/v) になるよう添加したものを準備した。

I-3 エレクトロスピンニング (ES) 法

MAC ナノファイバーは ES 法によって調製した。ES 法の実験装置は、シリンジポンプ (YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan), ステンレス製のニードル (14–19 G), 高電圧供給装置から構成されており、カトーテック社製 (Kyoto, Japan) のものを使用した。高分子溶液は、ニードルを取付けたプラスチック製のシリンジに充填し、ES 装置のシリンジポンプに設置した。銅製のナノファイバー捕集板は、接地ワイヤーにより高電圧供給装置と接続した。MAC ナノファイバーをより容易に捕集するために、ナノファイバー捕集板の中央部にステンレス製の金属棒 (4.2 mm ϕ × 35 mm) を垂直に取付けた。その後、ニードルとナノファイバー捕集板との間に電圧 (15–25 kV) を印加した。ニードルは正に、ナノファイバー捕集板は負に、それぞれ荷電した。ニードル先端からナノファイバー捕集板までの距離は 5–15 cm とし、MAC 高分子溶液の速度を 5–20 mL/h で吐出させた。結果的に、高分子溶液の有機溶媒が蒸散し、ナノファイバー捕集板の金属棒を中心にテント状に MAC ナノファイバーが自己組織化し、MAC ナノファイバーをナノファイバーシートとして捕集した。

I-4 高分子溶液の粘性測定

調製した 10–15%(w/v) の MAC 溶液の粘性は、SV-10 viscometer (A&D Co. Ltd., Tokyo, Japan) により測定した。高分子溶液を 40 mL を直方体の専用器に移し、周囲温度 (22–24°C) において、粘性測定を実施した。粘性は、pendular-pulse 法により測定した。

I-5 走査電子顕微鏡画像

ES 法により調製したナノファイバーの形状と表面特性を走査電子顕微鏡 (SEM ; S-3400N, Hitachi, Tokyo, Japan) で観察した。ナノファイバーは, Au/Pd によるコーティングを施し, 0.5 kV 加速電圧のもと真空状態で観察した。観察したナノファイバー画像からランダムに 70-100 ヶ所選択し, ナノファイバーの繊維径を測定し, 平均繊維径を算出した。

第 II 章

II-1 試薬類と試験溶液の調製

MAC (EUDRAGIT®S100) は, エボニック・デグサ・ジャパン株式会社 (Tokyo, Japan) より恵与されたものを用いた。UN (uranine), NP (nifedipine) および MDZ (midazolam, 定量分析用内部標準物質) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より購入した。ゼラチン製カプセル (4 mm ϕ \times 10 mm, volume 150 μ L) は株式会社松屋 (Osaka, Japan) より購入した。また, その他の試薬類は全て市販の特級品を用いた。UN および NP の標準溶液は, それぞれ蒸留水およびメタノールで溶解し, 最終濃度を 500 μ g/mL として調製し, -20°C の暗所で保管した。検量線は, 標準溶液を希釈して調製した。UN の静脈内投与試験溶液は, 0.9%(w/v) 生理食塩水で溶解し, 最終濃度を 1.0 μ g/mL として調製した。NP の静脈内投与試験溶液は, エタノール: ポリエチレングリコール 400 : 0.9%(w/v) 生理食塩水=1:1:2 の溶液で溶解し, 最終濃度を 1.0 μ g/mL として調製した。薬物分析に用いる内部標準液として MDZ をメタノールで溶解し, 最終濃度を 1.0 μ g/mL として調製した。

II-2 ES 法による薬物含有 MAC ナノファイバーの調製

UN および NP を含有するナノファイバーは ES 法により調製した。UN および NP を MAC と共に, メタノールおよびアセトンで溶解混合させ調製した。それぞれの重量比は, UN は 1:10 とし, NP は 1:1 とし, UN と NP の最終濃度は, 1.0%(w/v) および 10.0%(w/v) になるよう調製した。薬物含有高分子溶液は, 16 G のニードルを取付けたシリンジに充填し, ES 装置のシリンジポンプに設置し, ES 法を行った。ES 法の条件は, ニードル先端からナノファイバー捕集板までの距離を 10 cm, 電圧を 25 kV, UN および NP 含有 MAC 溶液の吐出速度はそれぞれ 2 mL/h および 10 mL/h とし, MAC ナノファイバーを調製した。

II-3 薬物含有 MAC ナノファイバーを用いたカプセル剤の調製

被験剤として, 3 種類のカプセル剤を調製した。ナノファイバーを用いた製剤として, 5 号カプセルを準備し, 薬物含有ナノファイバーを一定量採取して充填したカプ

セル (nano-fiber packed capsule, NFPC) と、ナノファイバーを PM-100 遊星ボールミル (Retsch Co. Ltd., Germany) で 300 rpm, 3h の条件下で粉碎した微細粒子を充填したカプセル (milled-powder nano-fiber packed capsule, MPPC) を調製した。UN および NP の最終含有量は、0.91 mg/capsule および 2.0 mg/capsule とした。これらのカプセル製剤のコントロール製剤として、試験薬物と MAC の物理的混合物を準備し、同様にカプセルに充填したもの (physical mixture packed capsule, PMC) を調製した。

II-4 走査電子顕微鏡画像

I-5 の内容に準ずる。

II-5 X線構造回折

ES 法で調製した MAC ナノファイバーシート、MAC ナノファイバーシートを粉碎した微細粒子、薬物および MAC の原末を X 線構造回折装置 (XRD-7000, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて X 線回折を行った。XRD の実験条件を下記 Table II-1 に示す。

Table II-1 Condition for X-ray diffraction (XRD)

XRD		
2θ range		4.0 – 50.0°
Tube	current	30 mA
	voltage	40 kV
Target		Cu
Monochromatic		Graphite monochromator
Detector		Scintillation counter
Slit	receiving slit	0.3 mm
	divergence slit	1.0°
	scatter slit	1.0°
Scanning speed		0.6° / min

II-6 動物準備

Wistar 系雄性ラット (9–10 週齢, 体重平均約 300 g) を日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Japan) から購入し使用した。室温 22 ± 2°C, 12 時間の明暗サイクルにコントロールされた施設で、最低 1 週間馴化飼育し、実験に供した。馴化飼育中の餌および水は自由摂取とした。なお、動物の飼育および取扱いは同志社女子大学動物実験倫理規定を順守して行った。

II-7 *In vitro* 溶出試験

第 16 日本薬局方に基づいて実施した。UN および NP を含む製剤 PMC, NFPC, MPPC からの薬物の溶出性を評価した。試験液は、66.7 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用し、試験液量は 300 mL, 回転数 100 rpm, 温度 37°C, 試験時間は 8 時間とした。NP の溶出試験においては、溶解補助剤として、Tween 80 を 0.5%(w/v) 添加して試験した。サンプル採取は、1.0 mL とし、試験開始前 5 min (0 min) および、試験開始後 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min に経時的に行った。サンプル採取後、同時に同温度に保った pH 6.8 のリン酸緩衝液 1.0 mL を補充した。採取した溶出液は、フィルター (EMD Millipore Co., MA, USA) にて濾過し、得られた試験溶液中の薬物濃度は、II-9 の方法により直に測定した。

II-8 ラットにおける *in vivo* 十二指腸内投与実験

ラットは、実験前に水のみ自由に摂取できる状態で 16-18 時間絶食を行った。ラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 腹腔内投与麻酔下、手術台に仰臥位に固定した。実験台は白熱灯で体温を 37°C に保温した。ラット腹部正中線に沿って開腹後、胆管出口直上の十二指腸に小さな切れ込みをつくり、調製した被験製剤を投与した。傷口は縫合糸で縫い合わせ、外科手術用の接着剤を用いて塞ぎ出血していないことを確認した。採血は頸静脈から行い、血液はヘパリン処理した 1.5 mL のポリエチレン製の遠心チューブに採取した。サンプル採取は、投与前 5 min (0min) および、投与後 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min に実施した。得られた血液サンプルは、採取後すぐ 3000 × g, 4°C, 15 分の条件下で遠心分離を行い、50 μL の血漿サンプルを取り出した。得られた血漿サンプルは、分析まで -80 °C で凍結保存した。

II-9 薬物濃度測定

UN の溶出濃度は、DTX 800 multimode detector (Beckman Coulter, Inc., Tokyo, Japan) を用いて蛍光波長 485 nm, 励起波長 535 nm にて蛍光測定を行った。NP の溶出濃度は、分光光度計 (UV-160A, Shimadzu, Co., Kyoto, Japan) を用いて 340 nm における吸光度を測定した。UN の血漿サンプルは、サンプル試料 50 μL にメタノール 250 μL を加えタンパク除去を行い、30 秒間攪拌したのち、3000 × g, 4°C, 15 分の条件下で遠心分離を行った。得られた上澄みから 200 μL を採取し 96 穴マイクロプレートに分取し、蛍光プレートリーダー DTX 800 multimode detector (Beckman Coulter, Inc., Tokyo, Japan) を用いて蛍光波長 485 nm, 励起波長 535 nm にて蛍光測定を行った。なお、検量線は、薬物を含む血漿 50 μL に既知濃度の UN を 5 μL 添加し調製した。検量線は原点を通過する直線を示し、相関係数は 0.99 以上であった。NP の血漿サンプルは、サンプル試料 50 μL に内部標準として MDZ (1.0 μg/mL) を 5 μL 添加し、30 秒間攪拌した。その後、2.0%(w/v) の ZnSO₄ 50%(w/v) メタノール溶液を 100 μL 加え 10 分間攪拌しタンパク除

去を行い、 $3000 \times g$, 4°C , 15 分の条件下で遠心分離を行った。得られた上澄みを 1.5 mL のポリエチレン製の遠心チューブにデカンテーションし、1.0 mL のジエチルエーテルを加え抽出した。その後、再度 10 分間攪拌し $3000 \times g$, 4°C , 15 分の条件下で遠心分離を行った。上澄みをガラス製のスピッツ管にデカンテーションし、エバポレーターで減圧乾固 (45°C , 30 分) した。その残渣に高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) の移動相 1 mL を添加し再溶解後、うち 20 μL を分析サンプルとして用いた。血漿中 NP 濃度は MDZ ピーク面積に対する NFP の面積比をとることによる内部標準法により測定した。LC-MS/MS の分析条件を Table II-2 に示す。なお、検量線は、薬物を含有しない血漿 50 μL に既知濃度の NP を 5 μL 添加し調製した。検量線は原点を通過する直線を示し、相関係数は 0.99 以上であった。

II-10 薬物動態学的解析および薬力学的解析

ラット十二指腸内投与後の薬物血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-480}) は、モーメント解析により算出し、ノンパラメトリック法によって評価した。
濃度対時間曲線下面積 (AUC_{0-480}) は、線形台形公式によって算出した。また、最高血漿中濃度 (C_{max}) かつ最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) は十二指腸内投与後に得られた実際のデータから決定した。また、最小血漿中濃度 (C_{min}) についても実際のデータから決定した。 C_{max} および C_{min} の差 ($C_{\text{max}} - C_{\text{min}}$) は血漿中濃度変化の差異の評価に用いた。全身クリアランス (CL_{tot}) は静脈内投与量を AUC_{0-480} で割ることにより算出した。見かけのクリアランス (CL/F) は、十二指腸内投与量を AUC_{0-480} で割ることにより算出し、生物学的利用率 (F) は、 CL_{tot} を CL/F で割ることにより算出した。統計分析は StatView[®] 分析ソフトウェア (SAS Institute Inc., USA) を用いて行い、平均値の差の検定には、一元配置分散分析 (ANOVA) および Bonferroni-Dunn 法による多重比較を行い、P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

Table II-2 Condition for LC-MS/MS analysis of NP

HPLC	
Column	Chemcopak QUICKSORB 5 μm (φ 2.1 mm x 150 mm)
Temp	40°C
Mobil Phase	90% CH ₃ CN in 0.1% HCOOH
Flow rate	0.2 mL/min
Injection Volume	20 μL
Detection Time	5 min

MS/MS		4000 Q TRAP (AB Sciex)	
Ionization	ESI		
Mode	Positive		
Nebulizer gas	8 L/min		
Curtain gas	8 L/min		
Collision gas	2 L/min		
Voltage	5000 V		
Temp	300°C		
Declustering potential	20 V		
Focusing potential	200 V		
Entrance potential	-10V		
Collusion energy	30 V		
Collision cell exit potential	6V		
Scan Type	MRM		
m/z (Q1/Q3)	nifedipine	347/254	
	midaloram	326/291	
Retention Time	nifedipine	2.24 min	
	midazolam	1.78 min	
Software	Analyst ver.1.4.1.		

第 III 章

III-1 試薬類と試験溶液の調製

MAC (EUDRAGIT®S100) は、エボニック・デグサ・ジャパン株式会社 (Tokyo, Japan) より恵与されたものを用いた。AAP (acetaminophen) は、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。また、その他の試薬類は全て市販の特級品を用いた。AAP の標

準溶液は、アセトンで溶解し、最終濃度を 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として調製し、 -20°C の暗所で保管した。検量線は、標準溶液を希釈して調製した。

III-2 ES 法による AAP 含有および薬物非含有ナノファイバーの調製

ナノファイバーは ES 法により調製した。AAP 含有ナノファイバーを調製する高分子溶液は、2.0%(w/v) AAP と 12.5%(w/v) MAC をアセトンで溶解混合させた溶液、および 1.0%(w/v) AAP と 12.5%(w/v) MAC をアセトンで溶解混合させた溶液を調製した。また、薬物非含有ナノファイバーを調製する高分子溶液として、12.5%(w/v) MAC をアセトンで溶解したものを調製した。それぞれの高分子溶液は、16 G のニードルを取付けたシリンジに充填し、ES 装置のシリンジポンプに設置し、ES 法を行った。ES 法の条件は、ニードル先端からナノファイバー捕集板までの距離を 10 cm、電圧を 25 kV、吐出速度を 10 mL/h とし、ナノファイバーを調製した。

III-3 AAP 含有ナノファイバーを用いた錠剤の調製

被験製剤として、4 種類の錠剤を HANDTAB-100 (Ichihaseiki Co. Ltd., Kyoto, Japan) の打錠機を用い 5–20 MPa の打錠圧で直接打錠法により調製した。ナノファイバーを用いた製剤として、3 種類の錠剤を調製した。被験製剤の錠剤重量は、全て 100 mg となるように調製し、全ての被験製剤の AAP 含有量は 14 mg/tablet とした。ナノファイバーを用いた 3 種類の錠剤は、ES 法により調製した AAP 含有 MAC ナノファイバーから 100 mg 採取し打錠した打錠製剤 (NFT, nano-fiber tablet)、半量の 1.0%(w/v) AAP と 12.5%(w/v) MAC をアセトンで溶解混合させた溶液で調製したナノファイバー 93 mg に 7 mg の AAP 残量原末を吸着させ打錠した打錠製剤 (NFT_{half}) および、薬物非含有 MAC ナノファイバーに 14 mg の AAP 全量を吸着させ打錠した打錠製剤 (NFT_{adso}) を調製した。これらの錠剤のコントロール製剤として、14 mg の AAP 原末と製剤添加物として、でんぷん 81 mg、ステアリン酸マグネシウム 2 mg、カルボキシメチルセルロース 3 mg を用いた物理的混合物を打錠した打錠製剤 (PMT, physical mixture tablet) を調製した。また、溶解後の錠剤表面の形態変化を観察するために薬物非含有 MAC ナノファイバーを打錠した打錠製剤 (NFT_{free}, drug-free tablet based on MAC nano-fiber tablet) を同様の方法で調製した。

III-4 走査電子顕微鏡画像

I-5 の内容に準ずる。

III-5 動物準備

II-6 の内容に準ずる。

III-6 X線造影検査試験

造影検査試験用に 12.5 % (w/v) MAC アセトン溶液に BaSO₄ を懸濁させ、ES 法により BaSO₄ 含有ナノファイバーを調製した。その後、100 mg の BaSO₄ 含有ナノファイバーを 10 MPa の打錠圧にて直接打錠を行った。調製した被験製剤をラット十二指腸内投与投与し、経時的に LaTheta (Hitachi Aloka Medical, Ltd., Kyoto, Japan) により X 線照射することにより、腸管内の錠剤の位置を観察した。

III-7 *In vitro* 溶出試験

第 16 日本薬局方に基づいて実施した。AAP を含むナノファイバー製剤からの薬物の溶出性を評価した。試験液は、pH 1.0, pH 3.0, pH 6.8, pH 8.0 の緩衝液を使用し、試験液量は 300 mL, 回転数 100 rpm, 温度 37°C, 試験時間は 8 時間とした。サンプル採取は、1.0 mL とし、試験開始前 5 min (0 min) および、試験開始後 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min に経時的に行った。サンプル採取後、同時に同温度に保った同じ pH の緩衝液 1.0 mL を補充した。採取した溶出液は、フィルター (Millex[®]-LH : φ 0.45 μm, EMD Millipore Co., MA, USA) にて濾過し、得られた試験溶液中の薬物濃度は、直ちに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。HPLC の分析条件を Table III-1 に示す。また、NFT_{free} (重量 100 mg, φ3.0 mm x 7 mm) において同様に溶出試験を実施し 0, 2, 4, 8, 24, 48 時間後の重量を測定した。なお、0 時間は乾燥重量のみ、溶出試験 2, 4, 8, 24 時間後は湿重量のみ、溶出試験 48 時間後の錠剤については湿重量および乾燥重量をそれぞれ測定した。錠剤の乾燥は 50°C, 48 時間の条件下のもとインキュベータ内で実施した。

Table III-1 Condition for HPLC analysis of AAP

HPLC	
Constitution	LC 10A pump LC-UV detector SIL auto-sampler
Column	Intersil ODS-3 (φ 4.6 mm x 150 mm)
Temp	40°C
Mobil Phase	0.05N potassium dihydrogen phosphate:methanol=9:1
Flow rate	1.0 mL/min
Injection Volume	10 μL
Detection Time	30 min
Wavelength	243 nm

III-8 ラットにおける *in vivo* 十二指腸内投与実験

II-8 の内容に準ずる。なお、サンプル採取は、投与前 5 min (0min) および、投与後 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min に実施した。

III-9 血漿中 AAP 濃度の測定

AAP の血漿サンプルは、サンプル試料 50 μL に 2.0%(w/v) の ZnSO_4 50%(w/v) メタノール溶液を 100 μL 加え 10 分間攪拌しタンパク除去を行い、 $11,000 \times g$, 4°C , 3 分の条件下で遠心分離を行った。得られた上澄みから 100 μL を採取し、フィルター (Millex[®]-LH: ϕ 0.45 μm , EMD Millipore Co., MA, USA) にて濾過し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した (Table III-1)。なお、検量線は、薬物を含むしない血漿 50 μL に既知濃度の AAP を 5 μL 添加し調製した。検量線は原点を通過する直線を示し、相関係数は 0.99 以上であった。

III-10 薬物動態学的解析

In vitro 溶出試験のデータに非線形最小二乗分析を適応し、WinNonlin[®] (version 6.4, Pharsight Corporation, CA, USA) を用いて解析を実施した。次式のように、一般的なシグモイド型の方程式により定義される。

$$C = \frac{D_{\max} \times T^B}{MDT + T^B}$$

ここでの C および B は、累積 AAP 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) および溶解係数を表し、 D_{\max} および MDT は、それぞれ AAP 最大溶出濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) および 50% 溶出時間 (min) を表している。Gauss-Newton 法によって、これらのパラメータを算出し、Akaike's Information Criterion (AIC) [60] によって評価した。また、ラットにおける *in vivo* 十二指腸内投与実験の結果から、濃度対時間曲線下面積 (AUC_{0-480}) は、線形台形公式によって算出した。最高血漿中濃度 (C_{\max}) かつ最高血漿中濃度到達時間 (T_{\max}) は十二指腸内投与後に得られた実際のデータから決定した。また、最小血漿中濃度 (C_{\min}) についても実際のデータから決定した。相対的バイオアベイラビリティ (RA) は、PMT の AUC_{0-480} 平均値を各 NFT 錠剤の AUC_{0-480} 平均値で割ることにより算出した。統計分析は StatView[®] 分析ソフトウェア (SAS Institute Inc., USA) を用いて行い、平均値の差の検定には、一元配置分散分析 (ANOVA) および Bonferroni-Dunn 法による多重比較を行い、P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

要旨

【背景・目的】

エレクトロスピンニング (ES) 法は、キャピラリー先端に高電圧を印加し、高分子溶液を吐出させることで、溶媒を瞬時に蒸散させ、繊維直径が数十～数百ナノオーダーのナノファイバーを形成させる技術である。古くから ES 法は繊維業界において直径がナノメートルサイズの繊維による不織布の製造方法として研究されてきた。また、医学分野では、細胞工学や再生医療を行う際の細胞の足場として研究されており、iPS 細胞の確立とも相まって、様々な臓器の再生に応用できる技術であると期待されている。さらに、工学分野ではセルロースナノファイバーの調製と研究が隆盛となり、ES 法は様々な工業製品へ応用できる未来の新素材を創製する技術として注目を集めている。しかし、薬学分野、とりわけ医薬品製造分野における ES 法の応用はほとんどなく、ES 法に適用できる医療用高分子も見出されていない。一方、薬物送達システム (ドラッグデリバリーシステム ; DDS) の概念は 1970 年代には確立し、1980 年代にはナノテクノロジーの概念が確立したことから、21 世紀の初頭には、様々なナノ素材を用いたナノ DDS の概念が樹立した。DDS は、親薬物の薬理活性の最適化や理想的な体内動態に制御する技術であり、標的となる特定の臓器や組織に対する薬物の到達性と選択性の増強や薬物吸収性の改善により、薬効の増強や深刻な副作用の軽減、患者のノンコンプライアンスの改善にもつながる製剤技術である。そこで、本研究では以上のような背景を踏まえ、医薬品の製造過程において既に使用されている腸溶性コーティング剤であるメタクリル酸コ高分子 S をベースとしたナノファイバーを ES 法により調製する手法を開発し、調製したナノファイバーを製剤中の薬物放出の支持媒体として利用する、新規の薬物放出制御型 DDS 製剤の開発を行った。

【研究方法】

研究を開始するにあたりまず、ナノファイバーを効率的に捕集することができる ES 装置を開発した。適応する高分子には、経口固形製剤を製造する際に使用される腸溶性コーティング剤である、メタクリル酸コ高分子 S (EUDRAGIT®S100 ; MAC) を使用し、MAC を用いて各種ナノファイバーを効率的に得るための ES 法の各種条件を検討した。ナノファイバーの繊維径は電子顕微鏡法により測定した。モデル薬物として、ウラニン (UN, $\text{Log}P_{ow}=0.10$), アセトアミノフェン (AAP, $\text{Log}P_{ow}=0.49$) およびニフェジピン (NP, $\text{Log}P_{ow}=3.23$) を用い、それら薬物を含有させたナノファイバーを調製し、カプセル剤、顆粒剤および錠剤に応用した。調製した製剤について *in vitro* 薬物溶出試験およびラット *in vivo* 十二指腸内投与試験を行い、薬物の放出挙動およびラットにおける体内動態を比較検討した。被験製剤は以下の通りである。カプセル剤では、UN および NP をモデル薬物として使用し、NFPC (薬物含有ナノファイバーをカプセルに充填した製剤)、MPPC (薬物含有ナノファイバーを微粒子状に粉砕しカプセルに充填した製剤)、PMC

(MAC と薬物の物理的混合物をカプセルに充填した製剤) の 3 種類を調製した。錠剤では、AAP を使用し、NFP (薬物含有ナノファイバーを打錠した錠剤)、NFT_{adso} (薬物非含有ナノファイバーに薬物含有量の全量を吸着させた後、打錠した錠剤)、NFP_{half} (薬物含有量の半量分で薬物含有ナノファイバーを調製し、薬物含有量の残り半量分を調製した薬物含有ナノファイバーに吸着させた後、打錠した錠剤) と薬物の物理的混合物を打錠した錠剤 (PMT) を調製した。溶出試験および血漿中薬物濃度データは速度論的に解析を行った。

【結果・考察】

ES 法は単純な電気回路を利用した繊維作製法であるが、研究レベルにおいて安定したナノファイバーを得るための装置が必要であった。本研究で使用した ES 装置は、シリンジポンプ、ステンレスニードル、高電圧供給装置および銅製のナノファイバー捕集板で構成され、ナノファイバー捕集板の中央部に誘電性の金属棒を取り付けた捕集板を作製した。中央部の金属棒は、効率的に電流を誘導することができ、銅製の捕集板上に MAC ナノファイバーが効率よく集積された。また、金属棒を中心にテント状にナノファイバーが自己組織化し、ナノファイバーをナノファイバーシートとして簡単に剥離することが出来た。MAC を用いた ES 装置の条件検討では、MAC 溶液の濃度 (粘性) および溶媒の誘電率に依存して繊維径の変化が認められた。MAC 溶液の濃度 (粘性) が高い場合、ES 法の高電圧印加により溶媒が蒸散した際に含まれる MAC 含量が多いことにより繊維径が大きくなると考えられた。加えて、MAC はアニオン性合成高分子であるため、誘電率の高い溶媒では媒質の電子が誘引されることで高分子との親和性が増加し、高分子が広がることで繊維径が大きくなると考えられた。さらに、MAC を利用した ES 法ではモデル薬物の極性に関わらず、薬物を含有したナノファイバーを調製することができ、非イオン性界面活性剤の添加によりナノファイバーの繊維径および薬物の放出挙動をコントロールできることが判明した。

MAC ナノファイバーをカプセル製剤に応用した結果、NFPC および MPPC からの薬物放出挙動において、初期放出速度を調節することができ、薬物の放出制御が可能であった。X 線構造回折の結果、MAC ナノファイバー中での薬物結晶はアモルファス状態として存在しており、MAC ナノファイバー中での薬物は内部エネルギーの高い状態で存在しているものと考えられた。また、MAC は pH 7.0 以上で溶解するのでそれ以下の pH 領域では MAC からの薬物の放出挙動が制限されるものと考えられた。すなわち、MAC 中の薬物はエンタルピーが高い状態にあり、pH が低い領域では MAC の pH 感応性により、その放出性が制限されてしまうが、pH の高い領域では即溶性となることが判った。また、ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験の結果からは、水溶性薬物 UN を含有する NFPC および MPPC では、PMC と比較して、ナノファイバーを用いた製剤の最高血漿中濃度 (C_{max}) は抑えられ、最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}) が延長することを確認

した。一方、脂溶性薬物 NP では、MAC ナノファイバーを使用したカプセル製剤での AUC の上昇が観察された。また、NFPC からの薬物血漿中濃度推移が、ラット十二指腸内投与 120 分後以降は一定に保たれており、薬物の排泄速度と吸収速度が釣り合っていることも確認された。以上のことから、水溶性薬物のナノファイバー製剤化は、血漿中薬物濃度の急激な上昇の回避と効果の持続性に有効であり、脂溶性薬物においてナノファイバー製剤化は生物学的利用率の向上と効果の持続化に有用であると考えられた。直接打錠法によるナノファイバーの打錠では、滑沢剤を添加することなく一定量の MAC ナノファイバーを容易に打錠することができ、打錠障害も認められなかった。打錠圧が高いほど低い打錠圧の場合と比べ、ナノファイバーの網目構造がより緻密となった。このナノファイバー打錠時の空隙の緻密さは、錠剤からの薬物の放出速度に関連し、打錠圧がナノファイバー錠からの薬物放出を制御する因子の一つであることが判明した。さらに、NFT、 NFT_{ads} および NFT_{half} の *in vitro* 薬物溶出試験の結果から、薬物の添加形態を変えることで薬物の放出挙動を制御することが可能となった。また、NFT は低い pH 領域では、MAC が水で膨潤することにより半透膜の役割を果たして薬物を放出する一方、pH 7.0 以上で、NFT は自発的に溶解して、薬物を大量に放出するという特性を示した。すなわち、MAC に基づく NFT は pH 感応性をもつ錠剤であり、経口投与時には消化管内の pH に依存した薬物の放出制御が可能になるものと考えられた。ラット *in vivo* 十二指腸内投与試験の結果、ナノファイバーを用いた錠剤からの薬物体内動態には、MAC の pH 感応性に加えて、薬物の添加形態の影響が顕著に出現し、いずれの製剤においても超持続型製剤となることを明確にした。

【結論】

本研究で開発した ES 装置では、ナノファイバー捕集板の中央部に電流を誘導する金属棒を取り付けることにより、ナノファイバーを調製する際の散乱を抑えて、ナノファイバーの損失を少なくし、効率よく捕集することができた。ES 法により MAC ナノファイバーを調製し、設計したカプセル剤および錠剤は、経口投与における薬物放出制御に有用であり、超持続型製剤となることを結論づけた。また、ES 法により調製した MAC ナノファイバーは、水溶性薬物や脂溶性薬物のどちらにも応用でき、薬物の添加形態を変えることで、様々な医薬品の放出制御型 DDS 製剤に応用可能であることも明確にした。さらに、ナノファイバーを利用する製剤設計は、DDS 設計において幅広い応用性を提供するものと考えられた。

論文目録

主論文

本研究成果は、以下の学術雑誌に公表した。

[1] Mami Hamori, Shiori Yoshimatsu, Yuki Hukuchi, Yuki Shimizu, Keizo Fukushima, Nobuyuki Sugioka, Asako Nishimura and Nobuhito Shibata, Preparation and pharmaceutical evaluation of nano-fiber matrix supported drug delivery system using the solvent-based electrospinning method, *Int. J. Pharm.*, 464 (2014) 243-251. [第 2 章]

[2] Mami Hamori, Yuki Shimizu, Kaori Yoshida, Keizo Fukushima, Nobuyuki Sugioka, Asako Nishimura, Kazumasa Naruhashi and Nobuhito Shibata, Preparation of Methacrylic Acid Copolymer S Nano-fibers Using a Solvent-Based Electrospinning Method and Their Application in Pharmaceutical Formulations, *Chem. Pharm. Bull.*, 63 81-87 (2015). (学術論文表紙 採択論文) [第 1 章, 第 2 章]

[3] Mami Hamori, Kana Nagano, Sayaka Kakimoto, Kazumasa Naruhashi, Akiko Kiriya, Asako Nishimura and Nobuhito Shibata, Preparation and pharmaceutical evaluation of acetaminophen nano-fiber tablets: application of a solvent-based electrospinning method for tableting, *Biomed. Pharmacother.*, 78 (2016) 14-22. [第 3 章]

副論文

[1] Asako Nishimura, Kazumasa Naruhashi, Yu Yamamoto, Mami Hamori, Keiko Tabata, Keiko Seto and Nobuhito Shibata, Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a new sustained-release capsules using starch-sponge matrix (SSM) release system for nifedipine in rats, *Int. J. Drug Deliv.*, 3 (2011) 270-278.

[2] Asako Nishimura, Taro Hayakawa, Yu Yamamoto, Mami Hamori, Keiko Tabata, Keiko Seto and Nobuhito Shibata, Controlled release of insulin from self-assembling nanofiber hydrogel, PuraMatrix™: Application for the subcutaneous injection in rats, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45 (2012) 1-7.

[3] Keizo Fukushima, Akira Okada, Kosho Sasaki, Shuichi Kishimoto, Shoji Fukushima, Mami Hamori, Asako Nishimura, Nobuhito Shibata, Toshiharu Shirai, Ryu Terauchi, Toshikazu Kubo and Nobuyuki Sugioka, Population Pharmacokinetic-Toxicodynamic Modeling and Simulation of Cisplatin-Induced Acute Renal Injury in Rats: Effect of Dosing Rate on Nephrotoxicity, *J. Pharm. Sci.*, (2015) 1-9.

なお、本研究成果における学会発表は、以下のとおりである。

[1] 日本薬学会第 133 年会 エレクトロスピンニング法を用いたナノファイバーの創製と薬物の放出支持体としての製剤応用 (2013 年, 横浜)

[2] 第 63 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 エレクトロスピンニング法を用いたナノファイバーの創製と薬物の放出支持体としての製剤応用 (2013 年, 京都)

[3] 日本薬学会第 135 年会 徐放型薬物放出制御システム開発に向けたエレクトロスピンニング法の応用 (2015 年, 神戸)

[4] 1st European Conference on Pharmaceutics, Preparation and Pharmaceutical Evaluation of Nano-fiber Matrix Supported Drug Delivery System using the Solvent-Based Electrospinning Method (2015 年, France)

[5] 8th World Drug Delivery Summit, Preparation and Pharmaceutical Evaluation of Acetaminophen nano-fiber tablets : application of solvent-based electrospinning method for tableting (2015 年, USA) (ベストポスター賞受賞発表)

受賞

[1] 薬学会学術誌 Chemical & Pharmaceutical Bulletin 2015.Vol. 63 No. 2 の表紙に採用.

[2] アメリカ・ヒューストンで開催された 8th World Drug Delivery Summit において, ベストポスター賞を受賞.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました同志社女子大学大学院生物薬剤学研究室 芝田信人教授に深甚なる感謝の意を表します。芝田教授には、筆者の同志社女子大学在学中より、製剤学および薬物動態学に関して、親切な御指導と暖かいご支援をいただきました。また、学術論文や学位論文の執筆の際には、ご多忙にも関わらず、御配慮を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

学位論文審査において、終始有益なる御助言と御校閲を賜りました同志社女子大学大学院生命物理化学研究室 杉浦幸雄特任教授、ならびに臨床薬剤学研究室 森田邦彦教授に深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数々の有益なる御指導ならびに御助言を賜りました生物薬剤学研究室 成橋和正専任講師、西村亜佐子特任助教ならびに長友暁史学術研修員に深く感謝の意を表します。

本研究の解析をするにあたり、有益なる御協力ならびに御助言を賜りました薬物動態学研究室 喜里山 暁子特任助教に深く感謝の意を表します。

本研究における実験の実施にあたり、生物薬剤学研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] J. Doshi, D.H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *J. Electrostat.*, 35 (1995) 151-160.
- [2] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Compos. Sci. Technol.*, 63 (2003) 2223-2253.
- [3] D.Z. Yang, J. Zhang, J.F. Zhang, J. Nie, Preparation and characteristics of oriented superparamagnetic polymer nanofibres, *Plast. Rubber Compos.*, 39 (2010) 6-9.
- [4] X.M. Wu, C.J. Branford-White, D.G. Yu, N.P. Chatterton, L.M. Zhu, Preparation of core-shell PAN nanofibers encapsulated α -tocopherol acetate and ascorbic acid 2-phosphate for photoprotection, *Colloid. Surf. B Biointerfaces*, 82 (2011) 247-252.
- [5] S.N. Jayasinghe, Cell electrospinning: a novel tool for functionalising fibres, scaffolds and membranes with living cells and other advanced materials for regenerative biology and medicine, *The Analyst*, 138 (2013) 2215-2223.
- [6] A. Rogina, Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery, *Appl. Surf. Sci.*, 296 (2014) 221-230.
- [7] S. Gustaite, J. Kazlauskė, J. Bobokalonov, S. Perni, V. Dutschk, J. Liesiene, P. Prokopovich, Characterization of cellulose based sponges for wound dressings, *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 480 (2015) 336-342.
- [8] R. Zhao, X. Li, B. Sun, Y. Zhang, D. Zhang, Z. Tang, X. Chen, C. Wang, Electrospun chitosan/sericin composite nanofibers with antibacterial property as potential wound dressings, *Int. J. Biol. Macromol.*, 68 (2014) 92-97.
- [9] S. Agarwal, H.J. Wendorff, A. Greiner, Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polym.*, (2008) 5603-5621.
- [10] H.W. Kim, H.H. Lee, J.C. Knowles, Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration, *J. Biomed Mater. Res. A*, 79 (2006) 643-649.
- [11] B. Ghorani, N. Tucker, Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology, *Food Hydro.*, 51 (2015) 227-240.
- [12] T. Rojanarata, S. Plianwong, K. Su-uta, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, Electrospun cellulose acetate nanofibers as thin layer chromatographic media for eco-friendly screening of steroids adulterated in traditional medicine and nutraceutical products, *Talanta*, 115 (2013) 208-213.
- [13] R. Konwarh, N. Karak, M. Misra, Electrospun cellulose acetate nanofibers: the present

status and gamut of biotechnological applications, *Biotechnol. Adv.*, 31 (2013) 421-437.

[14] C.W. Kim, D.S. Kim, S.Y. Kang, M. Marquez, Y.L. Joo, Structural studies of electrospun cellulose nanofibers, *polym.*, 47 (2006) 5097-5107.

[15] A. Frenot, M.W. Henriksson, P. Walkenstrom, Electrospinning of cellulose-based nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 103 (2006) 1473-1482.

[16] Y.M. Lim, H.J. Gwon, J.P. Jeun, Y.C. Nho, Preparation of cellulose-based nanofibers using electrospinning, *Nanofibers*, (2010) 179-188.

[17] C.H. Park, M.Y. Chung, A.R. Unnithan, C.S. Kim, Creation of a functional graded nanobiomembrane using a new electrospinning system for drug release control and an in vitro validation of drug release behavior of the coating membrane, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 50 (2015) 133-140.

[18] S.T. Sullivan, C. Tang, A. Kennedy, S. Talwar, S.A. Khan, Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers, *Food Hydro.*, 35 (2014) 36-50.

[19] E. Kenawy, A. Abdal-hay, M.H. El-Newehy, G.E. Wnek, Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems, *Mater. Chem. Phys.*, 113 (2009) 296-302.

[20] N. Okutan, P. Terzi, F. Altay, Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers, *Food Hydro.*, 39 (2014) 19-26.

[21] A.P. Immich, M.L. Arias, N. Carreras, R.L. Boemo, J.A. Tornero, Drug delivery systems using sandwich configurations of electrospun poly(lactic acid) nanofiber membranes and ibuprofen, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 33 (2013) 4002-4008.

[22] S.V. Nista, J. Bettini, L.H. Mei, Coaxial nanofibers of chitosan-alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning, *Carbohydr. Polym.*, 127 (2015) 222-228.

[23] X. Hu, S. Liu, G. Zhou, Y. Huang, Z. Xie, X. Jing, Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications, *J. Control. Release*, 185 (2014) 12-21.

[24] H. Suzuki, D. Nakai, T. Seita, Y. Sugiyama, Design of a drug delivery system for targeting based on pharmacokinetic consideration, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, (1996) 335-357.

[25] C.G. Park, E. Kim, M. Park, J.H. Park, Y.B. Choy, A nanofibrous sheet-based system for linear delivery of nifedipine, *J. Control. Release*, 149 (2011) 250-257.

[26] K.A. Patri, J.I. Majoros, R.J. Baker Jr, Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, (2002) 466-471.

[27] C. Washington, Stability of lipid emulsions for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, (1996) 131-145.

[28] Y. Mizushima, Lipid microspheres as novel drug carriers, *Drugs. Exp. Clin. Res.*, 11 (1985) 595-600.

[29] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery. Design,

- characterization and biological significance, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64 (2012) 37-48.
- [30] V.V. Ranade, Drug delivery systems. 2. Site-specific drug delivery utilizing monoclonal antibodies, *J. Clin. Pharmacol.*, 29 (1989) 873-884.
- [31] A. Abdal-hay, A.S. Makhlof, P. Vanegas, A novel approach for facile synthesis of biocompatible PVA-coated PLA nanofibers as composite membrane scaffolds for enhanced osteoblast proliferation, *Handbook of Nanoceramic and Nanocomposite Coatings and Materials*, (2015) 87-111.
- [32] C. Huang, R. Chen, Q. Ke, Y. Morsi, K. Zhang, X. Mo, Electrospun collagen-chitosan-TPU nanofibrous scaffolds for tissue engineered tubular grafts, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 82 (2011) 307-315.
- [33] A. Sonseca, L. Peponi, O. Sahuquillo, J.M. Kenny, E. Gimenez, Electrospinning of biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanofibers: Study on the morphology, crystallinity structure and thermal stability, *Polym. Degrad. Stab.*, 97 (2012) 2052-2059.
- [34] A. Greiner, J.H. Wendorff, Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 46 (2007) 5670-5703.
- [35] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.*, 28 (2010) 325-347.
- [36] C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi, D.B. Chase, J.F. Racolt, Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers : Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process, *Macromol.*, 37 (2004) 573-578.
- [37] M.G. Mckee, G.L. Wilkes, R.H. Colby, T.E. Long, Correlations of solution rheology with electrospun fiber formation of linear and branched polyesters, *Macromol.*, 37 (2004) 1760-1767.
- [38] C. Kriegel, K.M. Kit, D.J. McClements, J. Weiss, Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions, *Polym.*, 50 (2009) 189-200.
- [39] K.H. Lee, H.Y. Kim, M.S. Khil, Y.M. Ra, D.R. Lee, Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polym.*, 44 (2003) 1287-1294.
- [40] Y. Liu, J. Chen, V. Misoska, G.G. Wallace, Preparation of novel ultrafine fibers based on DNA and poly(ethylene oxide) by electrospinning from aqueous solutions, *React. Funct. Polym.*, 67 (2007) 461-467.
- [41] P. Su, C. Wang, X. Yang, X. Chen, C. Gao, X. Feng, J. Chen, Z. Gou, Electrospinning of chitosan nanofibers: The favorable effect of metal ions, *Carbohydr. Polym.*, 84 (2011) 239-246.
- [42] C.J. Luo, S.D. Stoyanov, E. Stride, E. Pelan, M. Edirisinghe, Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence, *Chemical Society*

reviews, 41 (2012) 4708-4735.

[43] L. Buttafoco, N.G. Kolkman, P. Engbers-Buijtenhuijs, A.A. Poot, P.J. Dijkstra, I. Vermes, J. Feijen, Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications, *Biomater.*, 27 (2006) 724-734.

[44] H.W. Kim, H.H. Lee, J.C. Knowles, Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 79 (2006) 643-649.

[45] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polym.*, 49 (2008) 5603-5621.

[46] F. Ignatious, L. Sun, C.P. Lee, J. Baldoni, Electrospun nanofibers in oral drug delivery, *Pharm. Res.*, 27 (2010) 576-588.

[47] Z.K. Nagy, A. Balogh, G. Dravavolgyi, J. Ferguson, H. Pataki, B. Vajna, G. Marosi, Solvent-free melt electrospinning for preparation of fast dissolving drug delivery system and comparison with solvent-based electrospun and melt extruded systems, *J. Pharm. Sci.*, 102 (2013) 508-517.

[48] K. Ohkawa, D. Cha, H. Kim, A. Nishida, H. Yamamoto, Electrospinning of chitosan, *Macromol. Rapid Comm.*, 25 (2004) 1600-1605.

[49] K. Minato, K. Ohkawa, H. Yamamoto, Chain conformations of poly (g-benzyl-L-glutamate) pre and post an electrospinning process, *Macromol. Biosci.*, 6 (2006) 487-495.

[50] H.U. Petereit, W. Weisbrod, Formulation and process considerations affecting the stability of solid dosage forms formulated with methacrylate copolymers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 47 (1999) 15-25.

[51] C.S. Ki, D.H. Baek, K.D. Gang, K.H. Lee, I.C. Um, Y.H. Park, Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution, *Polym.*, 46 (2005) 5094-5102.

[52] C. Zhang, X. Yuan, L. Wu, Y. Han, J. Sheng, Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats, *Eur. Polym. J.*, 41 (2005) 423-.

[53] T. Kodama, Y. Tabata, Static electrification of dielectric liquids caused by agitation, *Research Reports of Resarch Institute of industrial Safety, RIIS-RR-89* (1989) 79-98.

[54] F. Odeh, *Polymer-surfactant interactions*, (2006).

[55] L. Wannatong, A. Sirivat, P. Supaphol, Effects of solvents on electrospun polymeric fiber, preliminary study on polystyrene, *Polym. Int.*, 53 (2004) 1851-1859.

[56] H. Homayonia, S.A.H. Ravandi, M. Valizadeh, Electrospinning of chitosan nanofibers: processing optimization, *Carbohydr. Polym.*, 77 (2009) 656-661.

[57] B. Cramariuc, R. Cramariuc, R. Scarlet, L.R. Manea, I.G. Lupu, O. Cramariuc, Fiber diameter in electrospinning process, *J. Electrostat.*, 71 (2013) 189-198.

- [58] J.Y. Park, I.H. Lee, G.N. Bea, Optimization of the electrospinning conditions for preparation of nanofibers from PVA in ethanol solvent, *J. Ind. Eng. Chem.*, 14 (2008) 707-713.
- [59] S.L. Shenoy, W.D. Bates, H.L. Frisch, G.E. Wnek, Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solution, good solvent, non specific polymer polymer interaction limit, *Polym.*, 46 (2005) 3372-3384.
- [60] K. Yamaoka, Development of evaluation methods and computer softwares for pharmacokinetic analysis, *Xenobio. Metabol. Dispos.*, 2 (2001) 92-103.
- [61] X.Y. Wang, R. Koller, M. Wirth, F. Gabor, Lectin-grafted PLGA microcarriers loaded with fluorescent model drugs: Characteristics, release profiles, and cytoadhesion studies, *Sci. Pharm.*, 82 (2014) 193-205.
- [62] L.H. Emara, R.M. Badr, A.A. Elbary, Improving the dissolution and bioavailability of nifedipine using solid dispersions and solubilizers, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28 (2002) 795-807.
- [63] G. Verreck, I. Chun, J. Peeters, J. Rosenblatt, E.M. Brewster, Preparation and characterization of nanofibers containing amorphous drug dispersions generated by electrostatic spinning, *Pharm. Res.*, 20 (2003) 810-817.
- [64] J.A. Bhushani, C. Anandharamakrishnan, Electrospinning and electrospraying techniques : Potential food based applications, *Food Sci. Techno.*, 38 (2014) 21-33.
- [65] A. Hasegawa, H. Nakagawa, I. Sugimoto, Application of solid dispersions if nifedipine with enteric coating agent to prepare a sustained-release dosage form, *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (1985) 1615-1619.
- [66] E.T. Cole, R.A. Scott, A.L. Connor, I.R. Wilding, H.U. Petereit, C. Schminke, T. Beckert, D. Cade, Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting, *Int. J. Pharm.*, 231 (2002) 83-95.
- [67] N. Huyghebaert, A. Vermeire, J.P. Remon, In vitro evaluation of coating polymers for enteric coating and human ileal targeting, *Int. J. Pharm.*, 298 (2005) 26-37.
- [68] F. Barzegar, A. Bello, M. Fabiane, S. Khamlich, D. momodu, F. Taghizadeh, J. Dangbegnon, N. Manyala, Preparation and characterization of poly(vinylalcohol)/graphene nanofibers synthesized by electrospinning, *J. Physics. Chem. Solids*, 77 (2015) 139-145.
- [69] A. Nishimura, T. Hayakawa, Y. Yamamoto, M. Hamori, K. Tabata, K. Seto, N. Shibata, Controlled release of insulin from self-assembling nanofiber hydrogel, *PuraMatrix: application for the subcutaneous injection in rats*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45 (2012) 1-7.
- [70] T. Ikemoto, T. Nakano, Y. Nozue, O. Terasaki, S. Qiu, Optical studies of nanoscale materials incorporated in the space of zeolite crystals, *Mater. Sci. Eng.*, B48 (1997) 116-121.
- [71] T. Ikemoto, T. Nakano, M. Kuno, Y. Nozue, T. Ikeda, Insulating phase of potassium

clusters arrayed in low-silica-type zeolite FAU, *J. Magn. Magn. Mater.*, 226-230 (2001)
229-232.