

厚生大臣 宮下創平 殿

住 所 〒100 東京都千代田区下井草3-20-3

フリガナ ヨシオカスミエ

申請者 氏 名 吉 岡 澄 江

(所属施設 国立医薬品食品衛生研究所)



平成 10 年度厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 分子運動性スケールの利用による効率的省資源型安定性試験法の確立  
(H10-医薬-043)

国庫補助金精算所要額 : 金 3,000,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)

4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Chem. Pharm. Bull., 46, Solid-state Rehydration-Induced Recovery of Bilirubin Oxidase Activity in Lyophilized Formulations Reduced during Freeze-Drying	1998年6月		Nakai, Y., Yoshioka, S., Aso, Y and Kojima, S
Chem. Pharm. Bull., 46, Determination of the Diffusion Coefficient of Insulin and Lysozyme in Crosslinked Dextran Hydrogels by Pulsed-Field-Gradient NMR,	1998年11月		Aso, Y., Yoshioka, S., and Kojima, S.
Pharm. Res., 16, The Effect of Excipients on the Molecular Mobility of Lyophilized Formulations, as Measured by Glass Transition Temperature and NMR Relaxation-Based Critical Mobility Temperature	1999年1月		Yoshioka, S., Aso, Y and Kojima, S.
製剤機械技術 研究会誌、7 凍結現象の物理と化学	1998年		村勢則郎
低温生物工学会誌、44 高分子ゲルビーズの吸・脱水及び凍結時の形状変化	1999年1月		村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原有子

<p>Cryo-Letters, 20, Changes in the bead structure of crosslinked polymer gels during drying and freezing</p>	<p>1999年2月</p>		<p>M. Ruike, S. Takada, N. Murase and T. Watanabe</p>
<p>Biosci. Biotechnol. Biochem., 63, Water sorption and drying behaviors of crosslinked dextran,</p>	<p>1999年2月</p>		<p>M. Ruike, T. Inoue, S. Takada, K. Horie and N. Murase</p>

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況  
なし

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生科学研究費

研究事業名=厚生科学特別研究事業

研究課題名=分子運動性スケールの利用による効率的省資源型安定性試験法の確立

国庫補助金精算所要額=3,000,000

研究期間(年度)=1998-2000

主任研究者名=吉岡澄江(国立医薬品食品衛生研究所)

分担研究者名=阿曾幸男(国立医薬品食品衛生研究所), 村勢則郎(東京電機大学)

研究目的=現在、医薬品製剤の有効期間の推定は、製剤を一定条件に長期にわたって保存し、その品質の経時的変化を実際に観察する保存安定性試験のデータを基にして行われている。試験を長期にわたって行なわなければならないことから、かなりの労力が必要であり、また大量の検体も必要とされる。地球の環境問題から資源の節約が叫ばれている現在において、医薬品を保存するという保存安定性試験の概念から全く離れ、保存することなく有効期間を推定できる方法が確立されれば、効率的省資源型安定性試験として、新世紀への画期的なステップとなると考えられる。本研究は、この目標に向かって、医薬品製剤中の分子の運動性を解析することによって保存試験を行わずに有効期間を推定する方法を確立するための基礎研究を行うことを目的とする。

研究方法=牛血清γグロブリン(BGG)をモデルタンパク質とする凍結乾燥製剤を、デキストラン、ポリアスパラギンのヒドロキシエチル体(PHEA)、ポリビニルピロリドン(PVP)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)およびメチルセルロース(MC)を高分子添加剤として用いて調製した。

製剤の水分含量を調節後、製剤中に存在するプロトンのスピン-スピン緩和時間( $T_2$ )を測定した。Free Induction Decay(FID)シグナルは、パルスNMRを用いてソリッドエコー法で測定した。製剤のガラス転移温度( $T_g$ )は5°C/minの昇温速度で測定した。水のDRSはtime domain reflectometry法で測定した。

DSCによるデキストラン水溶液の凍結挙動は分子量の異なったデキストラン(T-7, 10, 40, 70, 500, 2000)の含水率の異なる試料を用いて解析した。DSCは、5°C/minで20°Cから-50°C付近まで冷却し、その後5°C/minで20°Cまで昇温し、測定した。また、試料が完全に融解する直前で昇温を中断して再冷却し、その後の再昇温曲線も求めた。

結果と考察=(1) タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性

種々の高分子を添加した凍結乾燥製剤について測定したプロトンのFIDは、いずれの製剤も、ある温度以上で固体プロトンによるガウス型緩和に加えて、液体プロトンによるロレンツ型緩和を示すようになり、その温度をNMR緩和に基づく分子運動性の限界温度( $T_{mc}$ )として測定することができた。 $T_{mc}$ は水分含量の増大とともに低下した。PHEA、MCおよびHPMCを含有する製剤は、デキストランやCMC-Naを含有する製剤より低い水分含量において同等の $T_{mc}$ を示し、同一の水分含量ではより低い温度で運動性の高いプロトンが出

現することがわかった。

CMC-Na、HPMCおよびMCを含有する製剤について測定したDSCは、明瞭な比熱の変化は示さなかったが、PHEA、デキストランおよびPVPの製剤は、 $T_m$ より23~34°C高い温度に $T_g$ に相当する比熱変化を示した。これらの製剤では $T_g$ よりも低い温度ですでに、液体プロトンの存在で示されるような高い運動性をもつことが明らかになった。

各種添加剤を含有する製剤中の水分子の $T_2$ は、水分含量とともに増大した。PHEA、MCおよびHPMCを含有する製剤は、デキストランやCMC-Naを含有する製剤に比較して低い水分含量で $T_2$ の低下を示し、製剤中の水分子の運動性が高いことが示唆された。

一方、製剤中の水の運動性をDRSによって測定した結果、デキストラン、MCおよびPVP製剤は、添加剤との相互作用によって運動を束縛され $10^8\sim 10^9$ Hzに緩和を示す水および束縛されずに自由な動きを示す水 ( $10^9\sim 10^{10}$ Hz)が存在することがわかった。自由な動きを示す水の緩和時間はMC<デキストラン<PVPの順に高くなり、また束縛された水に対する自由な動きを示す水の比率はデキストラン<MC<PVPの順に大きくなった。MCを含有する製剤はデキストラン製剤に比べて、自由な動きを示す水の量が多く、さらにその運動性が高い（緩和時間が短い）ことが示された。それに対してPVPを含有する製剤は、デキストランやMCの製剤に比べて自由な動きを示す水の量が多いが、その運動性は低いことが明らかになった。

種々の高分子添加剤を含有する凍結乾燥製剤の $T_g$ は、Gordon-Taylor式にしたがって、添加剤の $T_g$ および比重、さらに水分含量に依存するが、添加剤と水の相互作用によっても影響される。水と強く結合し、水の可塑化作用を低下させるような添加剤は水分吸着による $T_g$ および $T_m$ の低下の度合いが小さいと考えられる。今回、水分含量による $T_g$ および $T_m$ の変化が添加剤によって異なる結果が得られたが、それは水と添加剤の相互作用の差異によって説明することができる。

水の見かけの $T_2$ が分子の運動性を表すと仮定すれば、PHEA、MCおよびHPMCを含有する製剤は、デキストランやCMC-Naを含有する製剤より、水分子の平均の運動性が高く、MC製剤はそのためにデキストラン製剤よりも低い $T_m$ を示すと考えられる。これは、MC製剤ではデキストラン製剤よりも自由な動きを示す水の量が多く、またその運動性が高いことがDRSによって示されたことと一致する。

## (2)凍結挙動からみた水分子の運動性

凍結したデキストラン水溶液のDSC昇温曲線は、-15~-20°Cから吸熱方向へ移行を開始し、小さなピークを示してから、通常の氷の融解による大きな吸熱ピークを示すようになる。吸熱方向への移行開始時に観測される小さな吸熱ピークはデキストランの分子量に依存し、分子量が大きくなるほど顕著となった。また、吸熱方向への移行開始温度は含水率が高くなると高温側に変化し、その傾向はやはり分子量が大きいほど顕著であったことから、吸熱ピークは小さな氷晶の融解によると考えられる。小さな氷晶は、水溶液中でほどけたデキストラン分子鎖の絡まり内に関じこめられた水分子集合に起因して生成すると考えられる。分子量の大きなデキストランほど水溶液中で分子の絡まりが起こりやすく、小さな氷晶もできやすいとして、DSC昇温曲線の分子量依存性は説明できる。また、含水率が高いほど高分子の分子鎖がほどけやすく、水分子が高分子内の空間に関じこめられやすいとして、含水率依存性も説明可能である。平衡凍結では、非平衡凍結に比べ氷晶が成長し易くサイズが大きくなるために融点が上昇し、吸熱ピークは高温にシフトすると考えられる。

結論=種々の添加剤を含有する凍結乾燥製剤は、 $T_m$ より23~34°C高い温度に $T_g$ に相当する比熱変化を、 $T_g$ よりも低い温度ですでに、液体プロトンの存在で示されるような高い運動性をもつことが明らかになった。また、凍結乾燥製剤の $T_g$ および $T_m$ は、添加剤との

相互作用による束縛を受けずに自由な動きを示す水の量が多く、その運動性が高いものほど低くなることが明らかになった。さらに、凍結・融解挙動のDSC測定により、同一高分子で水との化学的相互作用は同じでも、デキストランの分子量が異なると分子内空間に閉じこめられる水分子集合の形状や分子拡散性に違いが生じることが明らかになり、医薬品製剤中の分子の運動性を指標として製剤の安定性評価を行う可能性を考察するための基礎データを得ることができた。

## 分子運動性スケールの利用による効率的省資源型安定性試験法の確立に関する研究

主任研究者 吉岡澄江 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室室長

保存によって品質変化を起こしやすいタンパク質凍結乾燥製剤の保存安定性と分子運動性の関係を解析するために、種々の水溶性高分子を添加剤とする凍結乾燥製剤中の分子の運動性を、NMR緩和法や誘電緩和スペクトル法によって測定した。さらに、製剤中の水分子の運動性について詳細な知見を得るために、高分子添加剤の水溶液の凍結挙動を示差走査熱量測定による融解曲線に基づいて解析した。その結果、種々の添加剤を含有する凍結乾燥製剤は、NMR緩和に基づく分子運動性の限界温度( $T_{mc}$ )より23~34°C高い温度にガラス転移温度( $T_g$ )に相当する比熱変化を示し、 $T_g$ よりも低い温度ですでに、液体プロトンの存在で示されるような高い運動性をもつことが明らかになった。また凍結乾燥製剤の $T_g$ および $T_{mc}$ は、自由に動ける水の量が多く、その運動性が高いものほど低くなることが明らかになった。さらに、同一高分子で水との化学的相互作用は同じでも、デキストランの分子量が異なると分子内空間に閉じこめられる水分子集合の形状や分子拡散性に違いが生じることが明らかになった。

## 分担研究者

阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官  
村勢則郎 東京電機大学 理工学部教授

を得るために、高分子添加剤の水溶液の凍結挙動を示差走査熱量測定(DSC)によって得られる融解曲線に基づいて解析した。

## A. 研究目的

現在、医薬品製剤の有効期間の推定は、製剤を一定条件に長期にわたって保存し、その品質の経時的変化を実際に観察する保存安定性試験のデータを基に行われている。試験を長期にわたって行なわなければならないことから、かなりの労力が必要であり、また大量の検体も必要とされる。地球の環境問題から資源の節約が叫ばれている現在において、医薬品を保存するという保存安定性試験の概念から全く離れ、保存することなく有効期間を推定できる方法が確立されれば、効率的省資源型安定性試験として、新世紀への画期的なステップとなると考えられる。本研究は、この目標に向かって、医薬品製剤中の分子の運動性を解析することによって保存試験を行わずに有効期間を推定する方法を確立するための基礎研究を行うことを目的とする。

本年度は、保存によって凝集等の品質変化を起こしやすいタンパク質の凍結乾燥製剤について、タンパク質の保存安定性と分子運動性の関係を解析するための基礎データを収集することを目的として、種々の水溶性高分子を添加剤とするタンパク質凍結乾燥製剤中の分子の運動性を、NMR緩和法や誘電緩和スペクトル法(DRS)を利用して検討した。さらに、製剤中の水分子の運動性について詳細な知見

## B. 研究方法

タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性の測定

牛血清γグロブリン(BGG)をモデルタンパク質とする凍結乾燥製剤は、重量比1:50のBGGと高分子添加剤の混合溶液を、液体窒素で凍結し、凍結乾燥装置(Freezevac C-1)で23.5時間、約5Paで凍結乾燥して調製した。高分子添加剤として、デキストラン、ポリアスパラギンのヒドロキシエチル体(PHEA)、ポリビニルピロリドン(PVP)、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)およびメチルセルロース(MC)を用いた。

製剤を種々の無機塩の飽和水溶液存在下に15°Cで24時間放置して0.006~0.2 g/g of solidの水分含量に調節後、製剤中に存在するプロトンのスピン-スピン緩和時間( $T_2$ )を測定した。Free Induction Decay(FID)シグナルは、パルスNMR(JNM-MU25)を用いてソリッドエコー法で測定した(2μsの90°パルス)。

製剤の $T_g$ は5°C/minの昇温速度で測定した(DSC2920、TAインスツルメント)。水のDRSはtime domain reflectometry法で $10^8$ ~ $10^{10}$ Hzで測定した。

DSCによるデキストラン水溶液の凍結挙動の測定

分子量の異なったデキストラン(T-7, 10, 40, 70, 500, 2000)を用いて、含水率の異なる試料を調製し、DSC

で凍結後の融解挙動を調べた。DSC測定では通常、5°C/minで20°Cから-50°C付近まで冷却し、その後5°C/minで20°Cまで昇温を行った(DSC-41、島津製作所およびDSC-061(セイコー・インスツルメント社製)。また、試料が完全に融解する直前(-3°C)で昇温を中断して再冷却し、その後の再昇温曲線も求めた。

## C. 研究結果

### タンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性

種々の高分子を添加した凍結乾燥製剤について測定したプロトンのFIDは、いずれの製剤も、ある温度以上で固体プロトンによるガウス型緩和に加えて、液体プロトンによるロレンツ型緩和を示すようになり、その温度をNMR緩和に基づく分子運動性の限界温度( $T_{nc}$ )として測定することができた。 $T_{nc}$ はFig.1に示すように、水分含量の増大とともに低下した。PHEA、MCおよびHPMCを含有する製剤は、デキストランやCMC-Naを含有する製剤より低い水分含量において同等の $T_{nc}$ を示し、同一の水分含量ではより低い温度で運動性の高いプロトンが出現することがわかった。

CMC-Na、HPMCおよびMCを含有する製剤について測定したDSCは、明瞭な比熱の変化は示さなかったが、PHEA、デキストランおよびPVPの製剤は、 $T_{nc}$ より23~34°C高い温度にガラス転移温度( $T_g$ )に相当する比熱変化を示した(Fig.2)。これらの製剤では $T_g$ よりも低い温度ですでに、液体プロトンの存在で示されるような高い運動性をもつことが明らかになった。

各種添加剤を含有する製剤中の水分子の $T_2$ はFig.3に示すように、水分含量とともに増大した。PHEA、MCおよびHPMCを含有する製剤は、デキストランやCMC-Naを含有する製剤に比較して低い水分含量で $T_2$ の低下を示し、製剤中の水分子の運動性が高いことが示唆された。

一方、製剤中の水の運動性をDRSによって測定した結果、デキストラン、MCおよびPVP製剤は、添加剤との相互作用によって運動を束縛され $10^8 \sim 10^9$ Hzに緩和を示す水および束縛されずに自由な動きを示す水( $10^9 \sim 10^{10}$ Hz)が存在することがわかった。自由な動きを示す水の緩和時間はMC<デキストラン<PVPの順に高くなり、また束縛された水に対する自由な動きを示す水の比率はデキストラン<MC<PVPの順に大きくなった。MCを含有する製剤はデキストラン製剤に比べて、自由な動きを示す水の量が多く、さらにその運動性が高い(緩和時間が長い)ことが示された。

それに対してPVPを含有する製剤は、デキストランやMCの製剤に比べて自由な動きを示す水の量が多

いが、その運動性は低いことが明らかになった。

### 凍結挙動からみた水分子の運動性

通常、氷の融解による吸熱ピークは0°C近辺に観測される。しかし、凍結したデキストラン水溶液のDSC昇温曲線は、その他に、0°Cより低温で融解開始時に複雑な変化を示した(Fig.4)。すなわち、昇温曲線は-15~-20°Cから吸熱方向へ移行を開始し、小さなピークを示してから、通常の氷の融解による大きな吸熱ピークを示すようになる。吸熱方向への移行開始時に観測される小さな吸熱ピークはデキストランの分子量に依存し、分子量が大きくなるほど顕著となった。また、吸熱方向への移行開始温度は含水率が高くなると高温側に变化し、その傾向はやはり分子量が大きいほど顕著であった(Fig.5、図の%はデキストラン濃度を示す)。

昇温曲線は室温から冷却した後の昇温曲線を意味し、融解に先行する凍結は充分に過冷却したあとの非平衡凍結である。一方、再昇温曲線は、試料中に残存する水が植氷して凍結が開始する、過冷却のみられない平衡凍結後の昇温曲線である。再昇温曲線では、吸熱方向への移行開始温度が高温側にシフトし、小さな吸熱ピークも高温側に数°Cシフトした(Fig.6)。

## D. 考察

種々の高分子添加剤を含有する凍結乾燥製剤の $T_g$ は、Gordon-Taylor式にしたがって、添加剤の $T_g$ および比重、さらに水分含量に依存するが、添加剤と水の相互作用によっても影響される。水と強く結合し、水の可塑性作用を低下させるような添加剤は水分吸着による $T_g$ および $T_{nc}$ の低下の度合いが小さいと考えられる。今回、水分含量による $T_g$ および $T_{nc}$ の変化が添加剤によって異なる結果が得られたが(Fig.1および2)、それは水と添加剤の相互作用の差異によって説明することができ

る。水の見かけの $T_2$ が分子の運動性を表すと仮定すれば、PHEA、MCおよびHPMCを含有する製剤は、デキストランやCMC-Naを含有する製剤より、水分子の平均の運動性が高く、MC製剤はそのためにデキストラン製剤よりも低い $T_{nc}$ を示すと考えられる。これは、MC製剤ではデキストラン製剤よりも自由な動きを示す水の量が多く、またその運動性が高いことがDRSによって示されたことと一致する。一方、PVP製剤では、 $T_2$ で示される水分子の平均の運動性が高いにもかかわらず、 $T_{nc}$ はそれほど低くない。これは自由な動きを示す水の量が多いが、その運動性は低いととらえられる。 $T_2$ は自由な動きを示す水と運動を束縛された水の平均の運動性を表すので、自由な動きを示す水の比率が高

いために、 $T_g$ は大きな値になる。しかし、自由な動きを示す水の運動性はMCやデキストランの製剤に比べて低いために、水分を吸着したときの $T_g$ および $T_{mc}$ の低下が小さくなると考えることができる。

今回、デキストラン水溶液の凍結挙動をDSCで解析した結果、同じデキストラン水溶液でも、デキストランの分子量が異なると、凍結挙動の異なることが明らかになった。融解開始時に低温で観測される小さな吸熱ピークは、ケルビン効果により凝固点降下した小さな氷晶の融解によると考えられた。すなわち、吸熱方向への移行がガラス転移、あるいはガラス転移に伴うエンタルピー緩和によるものと考え、含水率の上昇はガラス転移点を低下させるはずであるが、含水率依存性が逆になっていることから、小さな氷晶の融解と解釈できる。

小さな氷晶は、水溶液中でほどけたデキストラン分子鎖の絡まり内に閉じこめられた水分子集合に起因して生成すると考えられる。分子量の大きなデキストランほど水溶液中で分子の絡まりが起こりやすく、小さな氷晶もできやすいとして、DSC昇温曲線の分子量依存性は説明できる。また、含水率が高いほど高分子の分子鎖はほどけやすく、水分子が高分子内の空間に閉じこめられやすいとして、含水率依存性も説明可能である。平衡凍結では、非平衡凍結に比べ氷晶が成長し易くサイズが大きくなるために融点が上昇し、吸熱ピークは高温にシフトすると考えられる。

## E. 結論

種々の添加剤を含有する凍結乾燥製剤は、 $T_{mc}$ より23~34°C高い温度に $T_g$ に相当する比熱変化を、 $T_g$ よりも低い温度ですでに、液体プロトンの存在で示されるような高い運動性をもつことが明らかになった。

凍結乾燥製剤の $T_g$ および $T_{mc}$ は、添加剤との相互作用による束縛を受けずに自由な動きを示す水の量が多く、その運動性が高いものほど低くなることが明らかになった。

凍結・融解挙動のDSC測定により、同一高分子で水との化学的相互作用は同じでも、デキストランの分子量が異なると分子内空間に閉じこめられる水分子集合の形状や分子拡散性に違いが生じることが明らかになった。

医薬品製剤中の分子の運動性を指標として製剤の安定性評価を行う可能性を考察するための基礎データを得ることができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoshioka, S., Aso, Y and Kojima, S.:The Effect of Excipients on the Molecular Mobility of Lyophilized Formulations, as Measured by Glass Transition Temperature and NMR Relaxation-Based Critical Mobility Temperature, *Pharm.Res.*, 16, 135-140 (1999)

Aso, Y., Yoshioka, S., and Kojima, S.:Determination of the Diffusion Coefficient of Insulin and Lysozyme in Crosslinked Dextran Hydrogels by Pulsed-Field-Gradient NMR, *Chem.Pharm.Bull.*, 46, 1136-1839 (1998)

Nakai, Y., Yoshioka, S., Aso, Y and Kojima, S.:Solid-state Rehydration-Induced Recovery of Bilirubin Oxidase Activity in Lyophilized Formulations Reduced during Freeze-Drying *Chem.Pharm.Bull.*, 46, 1031-1033 (1998)

村勢則郎：凍結現象の物理と化学、製剤機械技術研究会誌、7(3)、25-31 (1998)

村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原 有子：高分子ゲルビーズの吸・脱水及び凍結時の形状変化、低温生物工学会誌、44(2)、54-56 (1998)

M.Ruiké, S.Takada, N.Murase and T.Watanabe : Changes in the bead structure of crosslinked polymer gels during drying and freezing, *Cryo-Letters*, 20(1),61-68 (1999)

M.Ruiké, T.Inoue, S.Takada, K.Horie and N. Murase: Water sorption and drying behaviors of crosslinked dextran, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,63(2), 271-275 (1999)

### 2. 学会発表

吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄：タンパク質凍結乾燥製剤のガラス転移温度と、NMRで測定される分子運動性との関係 第36回NMR討論会(1997.10)

阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄：パルス磁場勾配NMRによるハイドロゲル製剤中のインスリン分子拡散の測定と放出速度との関係:第36回NMR討論会(1997.10)

Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima, S.: Dependence of Protein Stability of Macromolecular Excipients in Freeze-Dried Formulations

American Association of Pharmaceutical Scientists, 11th Annual Meeting (1997.11)

吉岡澄江、阿曾幸男、小嶋茂雄：タンパク質凍結乾燥



製剤のガラス転移温度( $T_g$ )とNMR緩和による分子運動性の限界温度( $T_{nc}$ )に及ぼす高分子添加剤の影響: 日本薬剤学会第13年会(1998.3)

阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄: ハイドロゲルの放出特性の指標としてのNMRで測定した拡散係数の有用性: 日本薬剤学会第13年会(1998.3)

N.Murase, M.Ruike, K.Horie and T.Watanabe: Change in the network structure of polymer gels during drying, Proceedings of ISOPOW 7 (International Symposium on Properties of Water)(1998)

村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原有子: 高分子ゲルビーズの吸・脱水及び凍結時の形状変化、第44回低温生物工学会年会(1998)

村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原有子: 高分子ゲルビーズの凍結と乾燥挙動、第34回熱測定討論会(1998)

村勢則郎: 水の物理-凍結現象に焦点を合わせて、SCAN TECH '98(1998)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

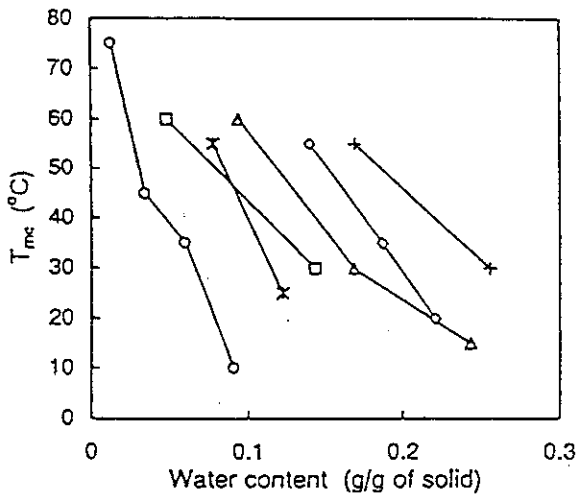


Fig.1.  $T_{nc}$  of lyophilized formulations containing PHEA (O), MC (\*), HPMC (□), PVP (Δ), dextran (◇) and CMC-Na (+) as a function of water content.

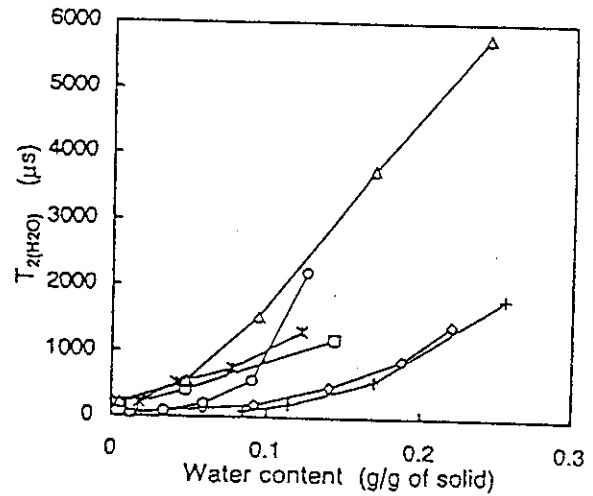


Fig.3.  $T_2$  of water in lyophilized formulations containing PHEA (O), MC (\*), HPMC (□), PVP (Δ), dextran (◇) and CMC-Na (+) as a function of water content. 40°C.

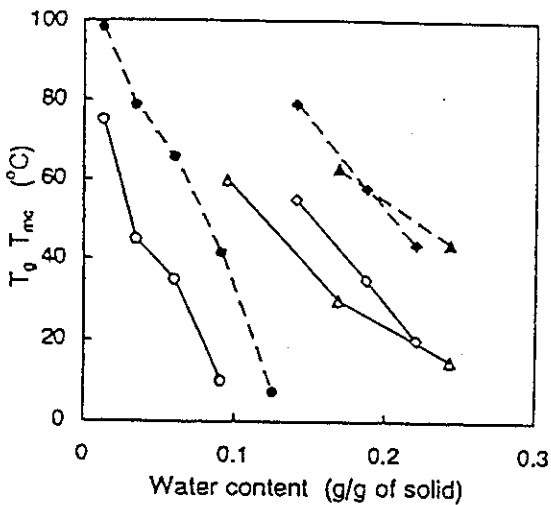


Fig.2.  $T_{nc}$  (O Δ ◇) and  $T_g$  (● ▲ ◆) of lyophilized formulations containing PHEA (O ●), PVP (Δ ▲), and dextran (◇ ◆).

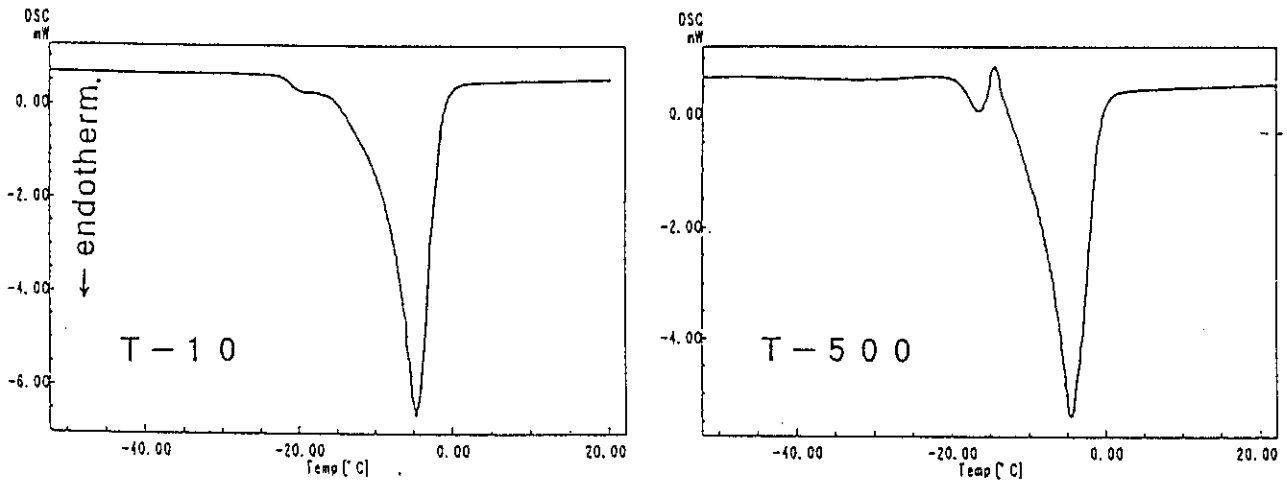


Fig.4. DSC thermogram of dextran (50%) solution. Heating rate: 5°C/min.

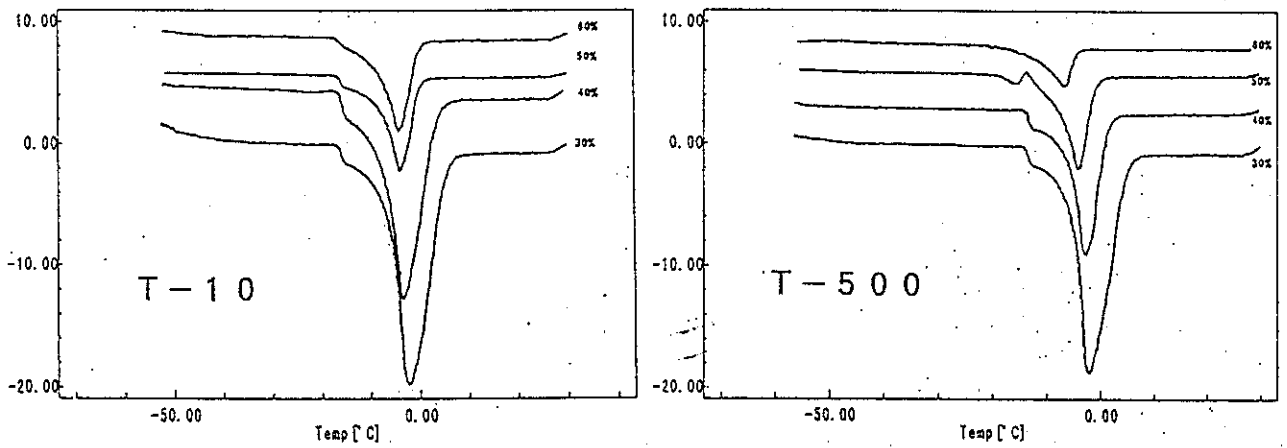


Fig.5. DSC thermogram of dextran solution as a function of dextran concentration.

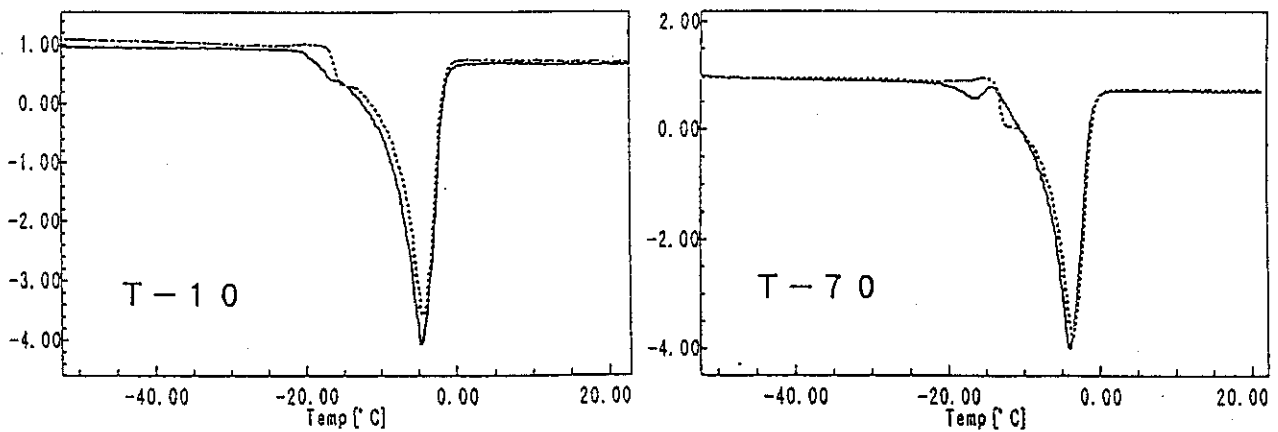


Fig.6. DSC thermogram of of dextran solution.

— first scan, ..... second scan.

## 製剤中の水分子の運動性の解析に関する研究

（分担） 研究者 村勢 則郎 東京電機大学工学部教授

デキストランを高分子添加剤の例として用い、その水溶液の凍結・融解挙動を熱測定で調べることにより、製剤中の水分子の運動性について解析を行った。その結果、溶液中において、デキストラン分子の絡まり内に閉じこめられた水分子は拡散運動が妨げられており、分子外のバルクの水とは異なった凍結・融解挙動を示すことが示唆された。すなわち、分子内空間に閉じこめられた水の凍結は0℃より低温で起こり、デキストランの分子量、含水率、凍結開始温度に依存して変化すると考えられる。

## A. 研究目的

水分子の運動性は、おかれた化学的、物理的環境に依存する。本研究の目的は、高分子添加剤の例としてデキストランを用い、その水溶液の凍結挙動をDSC（示差走査熱量測定）融解曲線で調べることにより、製剤中の水分子の運動性について知見を得ることにある。

## B. 研究方法

試料：グルコース重合度の異なったデキストラン（T-7, 10, 40, 70, 500, 2000; Amersham Pharmacia Biotech. 社; 数字の順に分子量は大きくなる）を使用した。水は蒸留水、または200ppmの水核活性タンパク質（スノーマックス; コダック社）を含んだ蒸留水用いて含水率の異なった試料を調製し、DSCで凍結後の融解挙動を調べた。

DSC測定：通常、5℃/分で20℃から-50℃付近まで冷却し、その後5℃/分で20℃まで昇温を行った。また、試料が完全に融解する直前で昇温を中断して再冷却し、その後の再昇温曲線も求めた。振動モードで昇温を行って分子運動の緩和に関する情報を収集し、併せて解析も試みた。用いたDSCはDSC-41（島津製作所製）、及びDSC-061（セイコー・インスツルメント社製）である。

## C. 研究結果

通常、氷の融解による吸熱ピークは0℃近辺に観測される。しかし、凍結したデキストラン水溶液のDSC昇温曲線は、その他に、0℃より低温で融解開始時に複雑な変化を示した。（図1参照）すなわち、昇温曲線は-15～-20℃から吸熱方向へ移行を開始し、小さなピークを示してから、通常の氷の融解による大きな吸熱ピークを示すようになる。吸熱

方向への移行開始時に観測される小さな吸熱ピークはデキストランの分子量（T-ナンバー）に依存し、分子量が大きくなるほど顕著となり、小さな吸熱の後にはわずかな発熱現象が観測されることもあった。

吸熱方向への移行開始温度は含水率が高くなると高温側に変化し、その傾向はやはり分子量が大きいほど顕著であった。（図2参照；図の%はデキストラン濃度を示す）

昇温曲線は室温から冷却した後の昇温曲線を意味し、融解に先行する凍結は十分に過冷却したあとの非平衡凍結である。一方、再昇温曲線（B.研究方法の説明を参照）は、試料中に残存する氷が植氷して凍結が開始する、過冷却のみられない平衡凍結後の昇温曲線である。再昇温曲線では、吸熱方向への移行開始温度が高温側にシフトし、小さな吸熱ピークも高温側に数℃シフトした。（図3参照）

蒸留水に氷核活性タンパク質を添加しても凍結温度は上昇し、平衡凍結に近くなる。その結果、昇温曲線は再昇温曲線とほぼ一致した。

振動モードで昇温すると、ガラス転移に起因する比熱の変化や融解は振動に追従し、エンタルピー緩和や結晶化とは分離可能であるとされる。しかしながら、本実験では条件設定（昇温速度、周期、振幅強度）が難しく、振動モードを使用することによる新たな情報は得られなかった。

## D. 考察

同じデキストラン水溶液でも、デキストランの分子量が異なると、凍結挙動の異なることが融解過程のDSC測定で明らかになった。融解開始時に低温で観測される小さな吸熱ピークは、ケルビン効果により凝固点降下した小さな氷晶の融解によるものである可能性が考えられた。吸熱方向への移行をガラス転

移、あるいはガラス転移に伴うエンタルピー緩和によるものと考え、含水率の上昇はガラス転移点を低下させるはずである。含水率依存性が逆になっていることが、小さな氷晶の融解と解釈する根拠である。

小さな氷晶は、水溶液中でほどけたデキストラン分子鎖の絡まり内に閉じこめられた水分子集合に起因して生成するのだろう。分子量の大きなデキストランほど水溶液中で分子の絡まりが起こりやすく、小さな氷晶もできやすいとして、DSC昇温曲線の分子量依存性は説明できる。また、含水率が高いほど高分子はほどけやすく、水分子が高分子内の空間に閉じこめられやすいとして、含水率依存性も説明可能である。平衡凍結では、非平衡凍結に比べ氷晶が成長し易くサイズが大きくなるために融点が上昇し、吸熱ピークは高温にシフトすると考えられる。

同様な現象は、架橋デキストランゲル中の網目構造内に閉じこめられた水でも観測されている。

## E. 結論

凍結・融解挙動のDSC測定により分子運動を解析することができる。すなわち、分子運動が速ければ冷却により結晶化し発熱するが、化学的相互作用により分子運動が遅くなれば結晶化せずにガラス化することも起こりうる。

しかしながら、本研究により示唆されたように、同一高分子で水との化学的相互作用は同じでも、デキストランの分子量が異なると分子内空間に閉じこめられる水分子集合の形状や分子拡散性に違いが生じ、凍結・融解挙動が異なってくる可能性がある。凍結・融解が分子集合の概念であるから、DSC測定を利用して製剤の安定性試験法に関する知見を得るには、近距離の分子運動性（回転、並進）とともに、分子のおかれた物理的環境に基づくより長距離な拡散運動性も考慮に入れておく必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・N.Murase, M.Ruike, K.Horie and T.Watanabe: Change in the network structure of polymer gels during drying, Proceedings of ISOPOW 7 (International Symposium on Properties of Water), 185-187, 1998.
- ・村勢則郎：凍結現象の物理と化学、製剤機械技術研究会誌、7(3)、25-31(1998)
- ・村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原

有子：高分子ゲルビーズの吸・脱水及び凍結時の形状変化、低温生物工学会誌、44(2)、54-56(1998)

- ・M.Ruike, S.Takada, N.Murase and T.Watanabe: Changes in the bead structure of crosslinked polymer gels during drying and freezing, Cryo-Letters, 20(1), 61-68, (1999)
- ・M.Ruike, T.Inoue, S.Takada, K.Horie and N.Murase: Water sorption and drying behaviors of crosslinked dextran, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(2), 271-275, (1999)

### 2. 学会発表

- ・村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原有子：高分子ゲルビーズの吸・脱水及び凍結時の形状変化、第44回低温生物工学会年会、講演要旨集 p.19(1998)
- ・N.Murase, M.Ruike, K.Horie and T.Watanabe: Change in the network structure of polymer gels during drying, ISOPOW (International Symposium on Properties of Water) 7, Abstracts p.123
- ・村勢則郎、堀江勝廣、類家正稔、渡部徳子、桑原有子：高分子ゲルビーズの凍結と乾燥挙動、第34回熱測定討論会講演要旨集 pp.96-97(1998)
- ・村勢則郎：水の物理-凍結現象に焦点を合わせて、SCANTECH '98, 予稿集、pp.1-6(1998)

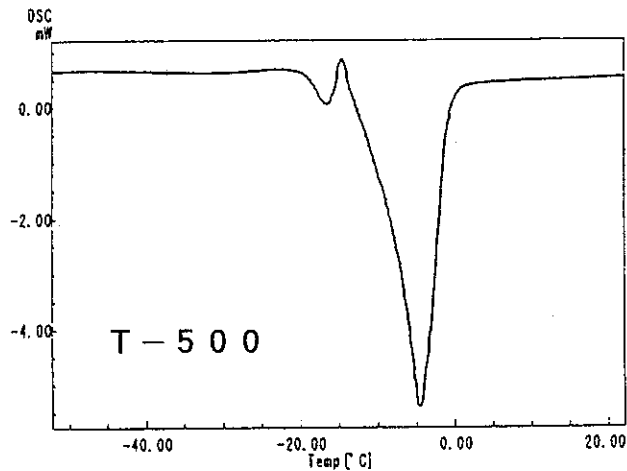
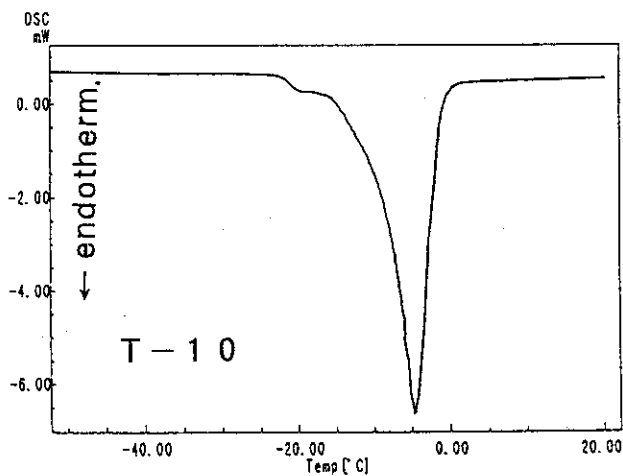


図1 デキストラン (50%) 水溶液のDSC昇温曲線。

冷却、昇温速度：5℃/分； 試料量：約10mg。

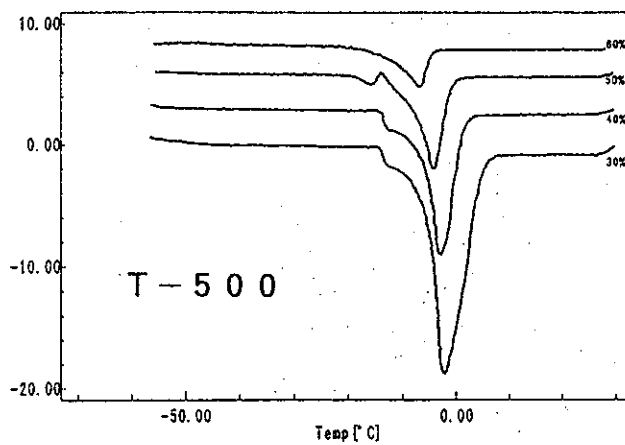
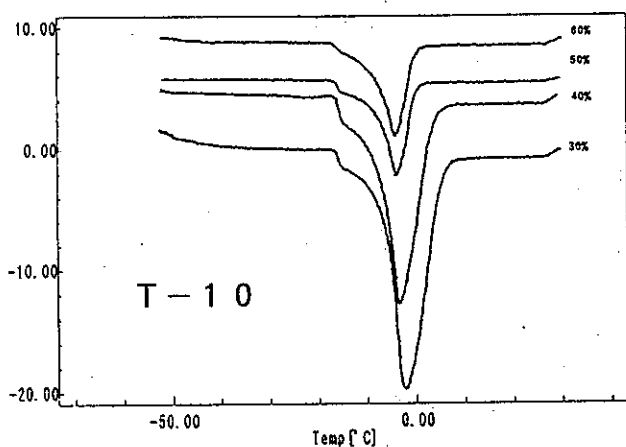


図2 DSC昇温曲線の含水率依存性。

図中の%はデキストラン濃度を示す。縦軸は相対値を示す。

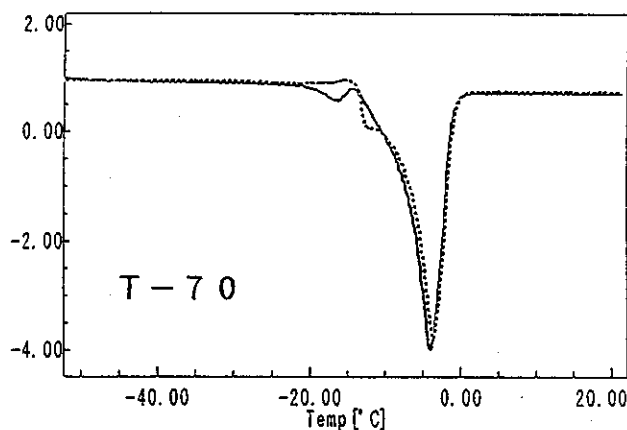
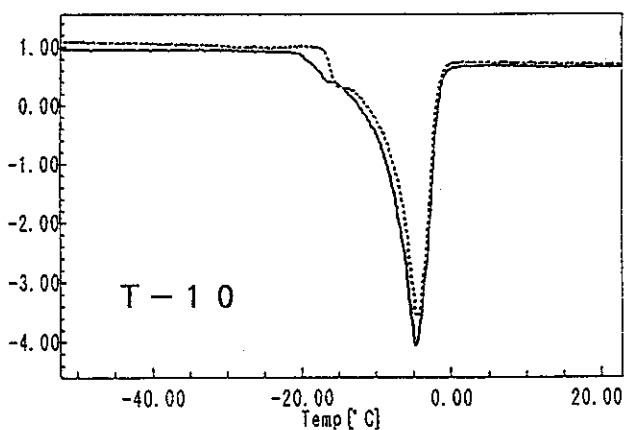


図3 DSC昇温曲線 (—) と再昇温曲線 (···)。

再昇温は-3℃で昇温を中断し、再冷却した後の昇温曲線。