

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
吉岡澄江

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 阿曾幸男
- (2) 塩野義製薬株式会社 製剤研究所 井田泰夫、中村ひろ子、川上亘作、江川広明、小倉敏弘
- (3) 藤沢薬品工業株式会社 物性研究所 幸田繁孝、北村 智、田中和幸、西垣智裕

非晶質医薬品の結晶化速度、非晶質微粉末の凝集速度およびタンパク質凍結乾燥製剤の失活速度について、温度依存性を明らかにし、エンタルピー緩和時間、誘電緩和時間等で表される分子運動性との相関性を検討することによって、安定性予測の可能性を考察した。

1. 研究目的

凍結乾燥注射剤、微粉末製剤などの固形および半固形製剤において、その製剤機能は製剤を構成する各成分の相互に入り組んだ物理的状态によって担われている。したがって、製剤を構成する成分の物理的状态の経時的な変化は、重大な製剤機能の低下をもたらす。ところが、これらの製剤の物理的变化は、しばしば複雑なメカニズムによって引き起こされ、複雑な温度依存性を示すため、製剤の安定性試験として化学的な変化の評価に適用される加速試験によっては適切に予測することができない。これが安定な製剤機能を有する製剤を効率的に設計することや製剤機能の変化を見落とすことなく製剤の安定性を評価することの妨げになっている。

本研究は、製剤機能の変化を直接支配している製剤の物理的变化を、熱分析等の物理化学的手法を駆使して感度よく検出する方法を体系化するとともに、それらの方法を用いて製剤の物理的变化の温度依存性を、物性を指標として明らかにすることによって、通常の加速試験では評価できない製剤機能の安定性を評価する方法を確立することを目的とした。本年度は、①製剤機能に著しく影響を与えるにもかかわらず、加速試験による予測が一般的には困難と考えられている非晶質医薬品の結晶化の現象に関しては、前年度までに明らかにした非晶質ニフェジピンの結晶化速度に及ぼす分子運動性の影響について、ポリビニルピロリドン (PVP) との固体分散体に対象を広げて検討した。また、分子運動性の指標として、前年度までに測定したエンタルピー緩和時間および NMR 緩和時間に加えて、誘電緩和時間およびガラス転移温度(T_g)の昇温速度依存性に基づく構造緩和時間を測定し、結晶化速度を支配する分子の運動をより感度よく表せる指標としての有用性を比較検討した。②非晶質微粉末製剤の凝集現象については、分子運動性の指標として等温微量熱量計によってエンタルピー緩和時間を測定し、前年度に DSC によって測定したエンタルピー緩和時間およびレオロジー特性に基づく緩和時間と比較検討し、その温度依存性に基づいて経肺製剤の重要な製剤機能である肺への到達率の経時的安定性を予測する可能性を検討した。さらに、③加速試験による予測が困難であると考えられているタンパク質製剤の品質変化に関しては、インターロイキン 2 (IL2) の凍結乾燥製剤の失活速度および着色化速度の温度依存性について、NMR 緩和時間および T_g を指標とした分子運動性との関連性を検討し、タンパク質製剤の安定性予測の可能性を考察した。

2. 研究方法

非晶質ニフェジピン固体分散体の結晶化速度および構造緩和時間、誘電緩和時間の測定

ニフェジピンと PVP(重量比 9:1)をメタノールに溶解した後、ロータリーエバポレーターを用いてメタノールを減圧留去し、ニフェジピンと PVP の混合物を得た。この混合物約 5mg を DSC 装置

の中で加熱融解した後、 $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で -20°C まで急冷し、ニフェジピン-PVP 固体分散体を得た。固体分散体を 5 酸化リンの入った容器に入れ、一定温度に保存し、経時的に保存試料の DSC サーモグラムを測定した。 140°C 付近に観測される結晶化熱を測定し、結晶化熱の時間変化を 2 次元核成長モデル (1 式) に当てはめ、結晶化速度を算出した。1 式において $\Delta H_c(0)$ および $\Delta H_c(t)$ は保存前の試料および時間 t 保存した試料の結晶化熱を表す。

$$\Delta H_c(t) = \Delta H_c(0) \exp\left\{- (kt)^2\right\} \quad (1)$$

さらに、ニフェジピン-PVP 固体分散体について、 T_g の昇温速度依存性に基づく構造緩和時間を Adam-Gibbs-Vogel 式 (AGV 式、2 式) に従って算出した。ここでパラメーター D および T_0 は 3~5 式に従って算出した。Fictive 温度 T_f の値として T_g 以上の温度では T を用い、 T_g 以下の温度では T_g を用いた。fragility (m) は $5\sim 40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の昇温速度 q で測定した T_g から 6 式によって算出した。

$$\tau = \tau_0 \exp\left\{\frac{DT_0}{T\left(1 - \frac{T_0}{T_f}\right)}\right\} \quad (2)$$

$$D = 2.303(m_{\min})^2 / (m - m_{\min}) \quad (3)$$

$$m_{\min} = \log(\tau_{T_g} / \tau) \cong \log(100 / 10^{-14}) = 16 \quad (4)$$

$$T_0 = T_g(1 - m_{\min} / m) \quad (5)$$

$$m \cong \frac{1}{2.303T_g} \frac{d(\ln|q|)}{d(1/T_g)} \quad (6)$$

ニフェジピン-PVP 固体分散体の誘電スペクトルを $0.01\sim 100000$ Hz の周波数領域において 0 から 100°C の温度で測定した。誘電率 (ϵ') および誘電損 (ϵ'') スペクトルは Cole-Cole 式 (7 式) にフィッティングし、誘電緩和時間 τ を算出した。7 式で ϵ_{∞} は誘電率の高周波極限值、 $\Delta\epsilon$ は緩和強度、 ω は角周波数、 β は緩和時間の分布を表す。

$$\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon'' = \epsilon_{\infty} + \sum_{i=1}^2 \frac{\Delta\epsilon_i}{1 + (i\omega\tau_i)^{\beta_i}} \quad (7)$$

非晶質 FK888 微粉末の凝集およびエンタルピー緩和速度の測定

非晶質 FK888 微粉末約 2 g を等温微量熱量計 (CSC 社製) に入れ、 40 、 50 、 55 、 60 および 65°C における熱量変化を測定した。同様に、 70°C で 3 日間加熱した試料についても熱量変化を測定した。観察された熱量変化を Jander 式 (8 式) に当てはめ、エンタルピー緩和速度定数 k を求めた。

$$kt = [1 - (1 - \alpha)^{1/3}]^2 \quad (8)$$

ここで α は 9 式に従って熱量変化 ΔH および初期薬物量 βD_0 から算出した。

$$P = dQ/dt = -\Delta H\beta D_0 (d\alpha/dt) \quad (9)$$

非晶質 FK888 微粉末の比表面積は、 $40\sim 70^{\circ}\text{C}$ で保存したジェットミル粉碎品につき、比表面積計 (Micromeritics 社製) を用いてガス吸着法により測定した。また、肺への微粒子到達率は、カスケードインパクターを用いて測定した。

タンパク質凍結乾燥製剤の品質変化の測定

IL2 の凍結乾燥製剤として、マルトースと人血清アルブミンを主な添加剤とする製剤（イムネース注 35）を用いて、25°C~60°Cに保存し、経時的に力価及び着色度を測定した。また、相対湿度 0%、11%、23%、33%のデシケーターに保存し、水分を 2.48%、3.74%、4.38%、7.38% に調整した凍結乾燥製剤については、15~60°C で保存し、経時的に力価及び着色度を測定した。

IL2 の力価は Cytoscreen イムノアッセイキット ヒト IL2 (BioSource International Inc.) を用いて測定し、着色度は IL2 凍結乾燥製剤 1 パリアルに蒸留水 10mL を加え溶解後、340nm における吸光度として測定した。

凍結乾燥製剤の T_g はアルミ製密封パンで昇温速度 5 および 10°C/min で測定した（セイコー電子工業製 DSC220CU）。さらに、パルス NMR（日本電子製 JNM-MU25）を用いて、凍結乾燥製剤中のプロトンのスピン-スピン緩和時間をソリッドエコー法で測定し、ロレンツ型緩和を示すプロトンの割合が急激に増大する温度 (T_{mc}) を求めた。

3. 研究成果

ニフェジピン-PVP 固体分散体における非晶質ニフェジピンの結晶化速度と分子運動性（国立衛研）

Fig.1 に 70°C に保存したニフェジピン-PVP 固体分散体の DSC サーモグラムを示す。保存前の試料では 50°C 付近にガラス転移に基づくベースラインの断絶がみられ、試料が非晶質であることが示された。 T_g の値は Gordon-Taylor 式によって予測された値と良く一致しており、均一な分散体が生成していると考えられた。120°C 付近に非晶質ニフェジピンの結晶化による発熱ピーク、170°C 付近には結晶の再融解に基づく吸熱ピークが見られた。70°C での保存によって、120°C 付近の結晶化ピークは経時的に小さくなり、非晶質ニフェジピンの結晶化が進行していることが示された。結晶化熱から算出した非晶質ニフェジピンの残存量は S 字型の減少パターンを示し、ニフェジピンは 2 次元核成長モデルに従って結晶化することが示された。PVP 固体分散体中のニフェジピンの結晶化速度は Fig.2 に示すように、保存温度に対して直線のアレニウスプロットを示さず、 T_g 以上と以下の温度領域で異なる温度依存性がみられた。このことは、アレニウス式を用いて T_g 以上の温度領域における結晶化速度を外挿することによって室温の結晶化速度を推定することは大きな誤差を生じることを示唆する。

ニフェジピン-PVP 固体分散体の誘電緩和とスペクトルは、2つの誘電損失ピークを示し、固体分散体には速度の異なる動きが少なくとも 2 種類以上存在することが示唆された。誘電損失のピーク周波数から算出した緩和時間は、Fig.3 に示すように、いずれも直線のアレニウスプロットを示したが、低周波側に見られた遅い動きに基づく緩和時間が結晶化速度と同様の温度依存性を示したことから、結晶化は遅い動きと密接に関連することが示唆された。

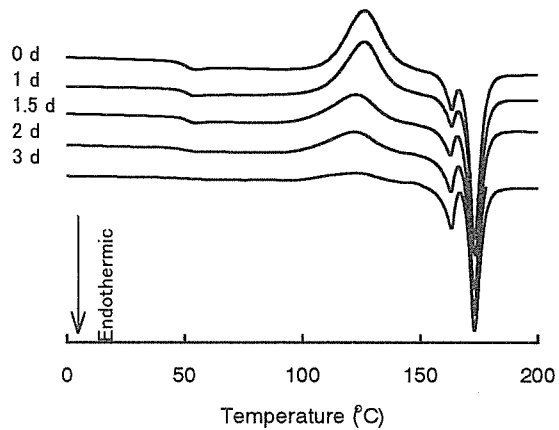


Fig. 1. Typical DSC traces of Nifedipine-PVP solid dispersions stored at 70°C

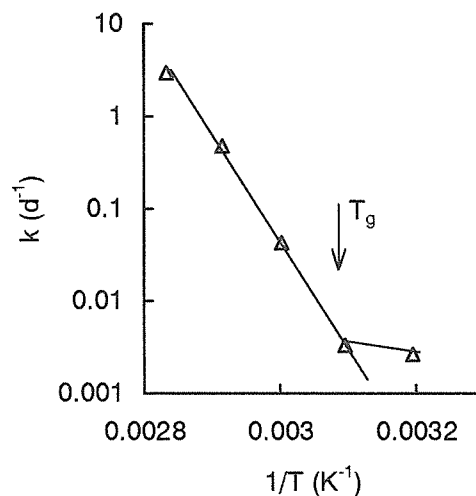


Fig.2. Arrhenius plot of nifedipine crystallization in PVP solid dispersion

ニフェジピン-PVP 固体分散体の T_g の逆数は昇温速度の対数に対して直線関係が見られ、その傾きから T_g の昇温速度依存性に基づく構造緩和時間を算出することができた。Fig.4 の実線で示すように、緩和時間は温度の低下とともに増大し、分子運動性が低下することが分かったが、その温度依存性は T_g で変化し、 T_g 以下では温度による変化が小さくなった。▲印で示される結晶化速度の実測値は緩和時間と拡散係数の coupling が不完全であると仮定したときの緩和時間 (図の+印) と同様の温度依存性を示した。これらの結果から、結晶化の律速過程が主に分子運動性に支配されており、 T_g 付近で測定した結晶化速度を分子運動性の温度依存性に従って外挿することによって、室温での結晶化速度を正確に予測できることが示唆された。

非晶質 FK888 微粉末の凝集速度と分子運動性 (藤沢薬工)

40~65°Cに保存した非晶質 FK888 微粉末について等温微量熱量計で測定した熱量変化を Fig.5 に示す。測定温度が高いほど発熱量が大きいこと、また、あらかじめ加熱保存してエンタルピー緩和した試料においては大きな熱量変化は観測されなかったことから、観察された熱量変化はエンタルピー緩和現象に基づくことが示唆され、各測定温度における分子運動性を反映するものと考えられた。熱量の経時変化から Jander 式を用いて算出した速度定数 (k) の温度依存性は、Fig.6 に示すように、直線的な Arrhenius プロットを示した。

非晶質 FK888 微粉末は 40~70°Cに保存すると、Fig.7 に示すように、経時的に比表面積の減少を示し、保存によって微粉末の凝集が引き起こされることが分かった。ここで、保存温度が高くなり、エンタルピー緩和が速くなるほど凝集の度合いは増大し、凝集速度と分子運動性が相関することが示唆された。

粉末吸入剤としての重要な機能である肺への微粒子到達率 (吸入量に対する肺への到達量の比率) を測定した結果、40°Cにおける 1 ヶ月の保存では肺への微粒子到達率はほとんど変化しないが、70°C、2 週間の保存では著しく低下し、製剤機能が凝集によって大きく影響されることが判明した。肺への微粒子到達率が凝集に依存すること、また凝集速度がエンタルピー緩和速度によって測定した分子運動性と相関することから、Fig.6 に示す分子運動性の温度依存性および 40°Cで得られたデータに基づいて 25°Cにおける微粒子到達率の変化を推定した結果、25°Cでは少なくとも 21 ヶ月間は微粒子到達率の変化が有意に起こらないことが予測された。このように、分子運動性の温度依存性及び加速試験の結果より、室温付近の物理的安定性を予測することが可能であることが明らかになった。

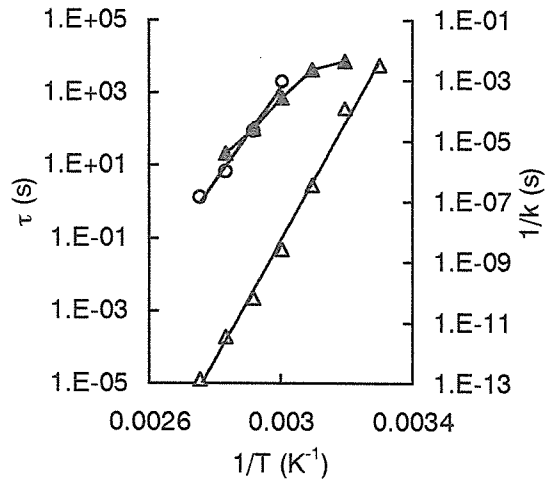


Fig.3. Temperature dependence of dielectric relaxation time (○△) and the reciprocal of crystallization rate(▲)

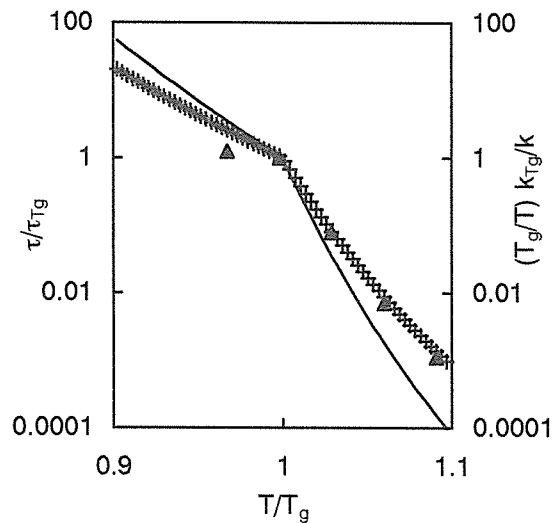


Fig.4 Comparison between the relaxation time calculated according to the AGV equation and crystallization rate

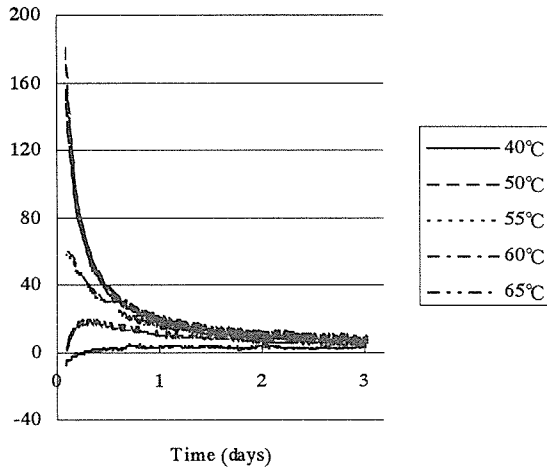


Fig.5. Isothermal calorimetric response for FK888

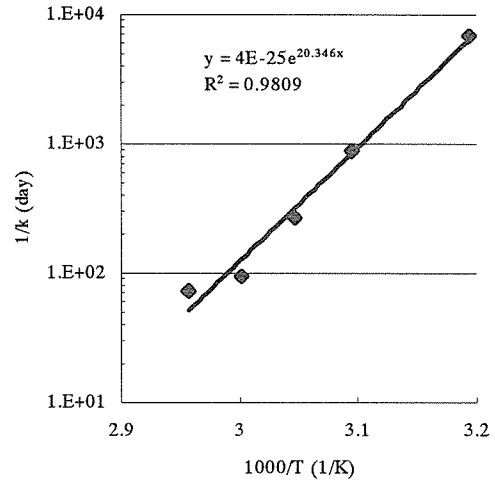


Fig.6. Arrhenius plot for relaxation time of FK888

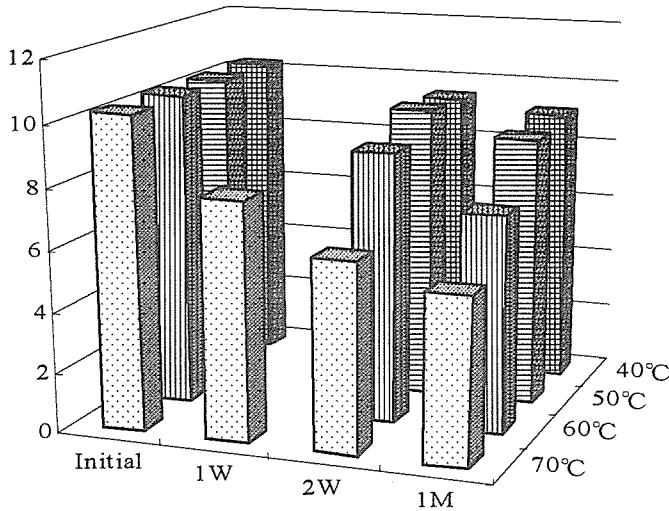


Fig.7. Changes in specific surface area of FK888

タンパク質凍結乾燥製剤の失活および着色速度と分子運動性 (塩野義製薬)

IL2 凍結乾燥製剤は粉末 X 線回折によって非晶質状態であることが確認され、 T_g は 65°C 、NMR 緩和においてロレンツ型緩和を示すプロトンの比率が急激に増大する T_{mc} は 55°C 付近に見られた。IL2 凍結乾燥製剤は Fig.8 に示すように、 $25\sim 60^\circ\text{C}$ における保存によって経時的に着色および力価の低下を示し、一次式を仮定して算出した失活および着色の速度定数の温度依存性は、Williams-Landel-Ferry 式 (WLF 式) によくフィットした (Fig.9)。ここで速度定数は Arrhenius 式にもフィットし、両式の適合性に有意な差はみとめられなかったが、低温領域では温度依存性が大きくなる傾向がみられることから、低温領域における安定性の予測には、WLF 式がより有用であることが示唆された。

水分含量の異なる製剤 (2.48%、3.74%、4.38%、7.38%) について測定した T_g は、水分含量の増加とともに Gordon-Taylor 式に従って低下した。また、製剤の T_{mc} はいずれの水分においても T_g よ

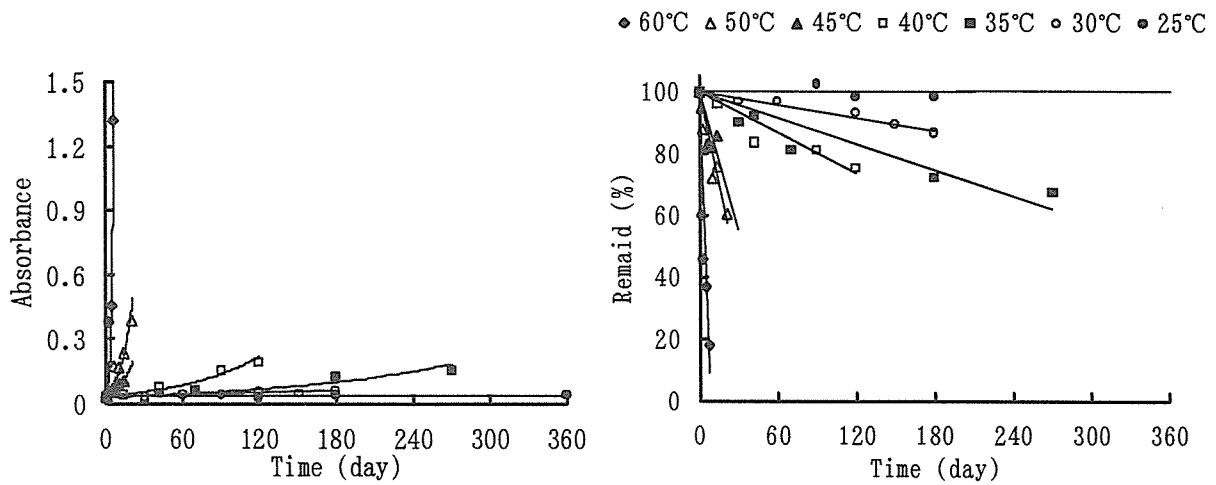
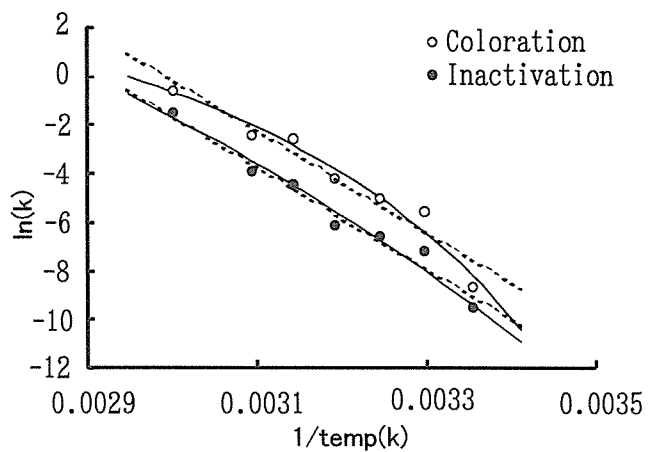


Fig.8. Stability of lyophilized IL2 formulations

り 5~10°C低い値を示した。水分含量の異なる製剤の失活速度は、Fig.10 に示すように、保存温度を T_g で規格化することによって、いずれの水分含量の製剤もほぼ一致する温度依存性を示したことから、 T_g で表される分子運動性が製剤の安定性を支配する主要な要因であることが示唆された。

4. 考察

①固体分散体における非晶質ニフェジピンの結晶化速度の温度依存性は、 T_g の昇温速度依存性に基づいて AGV 式に従って算出された構造緩和時間の温度依存性とよく一致し、結晶化の律速過程は分子運動性に支配されていることが示された。 T_g 付近での結晶化速度のデータと緩和時間の温度依存性のデータから室温における結晶化速度を予測できる可能性が示唆されたが、さらに、室温における結晶化速度を実測することによって確認する必要があると考えられる。また、本研究では乾燥状態における結晶化速度について検討したが、実際の医薬品製剤の系においては水分の混在は避けることができないため、水分が共存する系における結晶化速度と分子運動性との関連を明らかにすることも今後の検討課題と考えられる。さらに、添加剤と薬物の混合系における結晶化速度と分子運動性の関係をより詳細に検討するために、ミクロな混合状態を解析することも必要であると考えられる。



Solid line:WLF, Dotted line:Arrhenius

Fig.9. Coloration and inactivation rate of lyophilized IL2 formulations

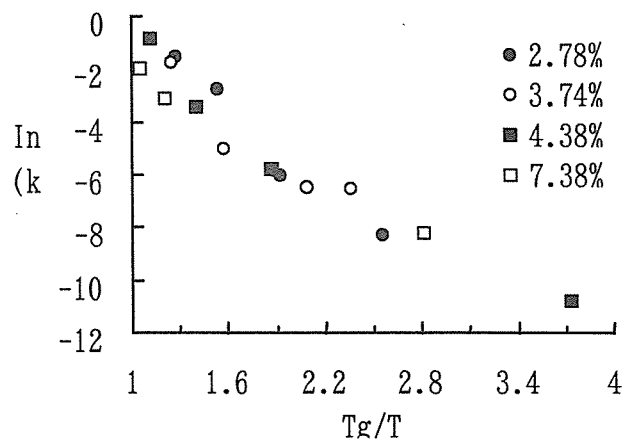


Fig.10. Effect of T_g on inactivation rate of lyophilized IL2 formulations

②非晶質 FK888 微粉末の微粒子到達率が凝集に依存すること、また凝集速度がエンタルピー緩和速度によって測定した分子運動性と相関することが明らかになったことから、分子運動性の温度依存性および加速試験の結果に基づいて室温付近の物理的安定性を予測することが可能であり、製造あるいは保存条件の設定に有用であると考えられる。今回、微量熱量計で測定されるエンタルピー緩和時間を分子運動性の指標として用いたが、第1年度に検討した DSC で測定されるエンタルピー緩和時間と同様に、第2年度に検討したレオロジー特性から求めた緩和時間よりも遅い動きの測定に有用であると考えられる。

③ IL2 凍結乾燥製剤の失活速度は WLF 式で表すことができ、それに基づいて安定性を予測できる可能性が示唆されたが、見かけ上、Arrhenius 式によって表すこともできたことから、さらに広範囲の温度領域において安定性を観察し、WLF 式への適合性を検証する必要があると考えられる。今回、水分含量の異なる製剤について安定性を検討した結果、失活速度は T_g での規格化によって、いずれの製剤もほぼ一致する温度依存性を示すことが分かり、分子運動性は製剤の安定性を支配する主要な要因であることを明らかにすることができたが、さらに他のタンパク質や添加剤による安定性への影響について検討する必要があると思われる。

5. 結論

①ニフェジピン-PVP 固体分散体について測定した誘電緩和時間および T_g の昇温速度依存性に基づく構造緩和時間は、非晶質ニフェジピンの結晶化速度と同様の温度依存性を示すことが明らかになり、 T_g 付近の高温の温度条件で得られた結晶化速度の観測値と緩和時間の温度依存性の情報を組み合わせることにより、室温における結晶化速度を予測できる可能性が示唆された。

②非晶質 FK888 微粉末について、粉末吸入剤としての重要な機能である肺への微粒子到達率が凝集に依存すること、また凝集速度がエンタルピー緩和速度によって測定した分子運動性と相関することが明らかになり、分子運動性の温度依存性および加速試験の結果に基づいて室温付近の物理的安定性を予測することが可能であることが示唆された。

③IL2 凍結乾燥製剤の経時的な失活および着色の現象は、分子運動性によって大きく影響されることが明らかになった。その速度の温度依存性はそれぞれ WLF 式で表すことができ、WLF 式に基づいて安定性を予測できる可能性が示唆された。

6. 研究発表

Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Explanation of the Crystallization Rate of Amorphous Nifedipine and Phenobarbital from Their Molecular Mobility as Measured by ^{13}C NMR Relaxation Time and the Relaxation Time Obtained from the Heating Rate Dependence of T_g , J. Pharm. Sci., (2001), in printing.

Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Feasibility of Using Isothermal Microcalorimetry to Evaluate the Physical Stability of Amorphous Nifedipine and Phenobarbital, Thermochemica Acta (2000), submitted.

Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Relationship between the Crystallization Rates of Amorphous Nifedipine, Phenobarbital and Flopropione, and their Molecular Mobility as Measured by their Enthalpy Relaxation and ^1H -NMR Relaxation Times, J. Pharm. Sci., 89, 408-416 (2000).

S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Temperature Dependence of Bimolecular Reactions Associated with Molecular Mobility in Lyophilized Formulations, Pharm.Res., 17, 925-929 (2000)

S.Yoshioka, Y.Aso, S.Kojima, T.Tanimoto, Effect of polymer excipients on the enzyme activity of lyophilized bilirubin oxidase and b-galactosidase formulations. Chem.Pharm.Bull., 48, 283-285 (2000)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社