

非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物および超難溶性薬物の製剤化とその評価

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・生産技術研究所 製剤研究部 高倉朝子、林 隆志、村主 教行、谷野 忠嗣
- (3) 藤沢薬品工業 物性研究所 田中和幸、我藤勝彦、山本克彦、田口雅弘、北村 智、北川輝幸

高い保存安定性および消化管吸収性を有する難溶性薬物の非晶質製剤の開発と評価を目指して、非晶質製剤中の難溶性薬物の分散状態、保存時の再結晶化現象および溶出過程における過飽和溶解状態の持続現象に及ぼす高分子添加剤や調製方法の影響を解析した。

1. 研究目的

ポストゲノム時代の製剤化技術として、バイテクを応用したタンパク質等の不安定な薬物を安定に製剤化する技術が早急に望まれている。一方では、ハイスループットの手法によって続々と創製される薬物の中で、非常に難溶性が高いために優れた生理活性を有しながら製剤化が断念された薬物が蓄積されている。本研究では、高エネルギー状態にある非晶質の特異性を利用することによって、不安定なバイテク薬物の製剤化や超難溶性薬物の製剤化を可能にする技術を確立することを最終目標として、高エネルギー状態であるがために複雑な挙動を示す非晶質の物理化学的特性を評価する方法を開発することを目的とする。また、現状では制御が困難である非晶質の物理的特性を積極的に制御し、エネルギー的に不安定であるにも関わらず、高い保存安定性を示す非晶質製剤の開発に役立つ基盤を構築することを目的とする。さらに、非晶質化することによって消化液中での溶解性改善を狙った非晶質製剤について、その溶出メカニズムを明らかにし、溶出過程を積極的に制御して難溶性医薬品の消化管吸収性を向上させる方法論を確立することを目的とする。

平成 13 および 14 年度には、①ポリビニルピロリドン (PVP) 等の水溶性高分子に分散させることによってニフェジピン等の難溶性薬物を非晶質化させた固体分散体について、製剤特性に重要な影響を与えると考えられる薬物と高分子の分散状態を、¹H-NMR によって測定されるスピン拡散による緩和時間の平均化を指標として解析した。さらに、固体分散体の保存中に見られる難溶性薬物の結晶化を速度論的に解析することによって、結晶化速度の温湿度依存性を明らかにし、その温湿度依存性を固体分散体の分子運動性の観点から考察した。さらに、②ニフェジピンより難溶性の高い超難溶性医薬品の 2 種類の非晶質をモデルとして、エンタルピー緩和時間を指標として非晶質の分子運動性を測定するとともに、保存中の結晶化の速度を微量熱量計および DSC によって測定し、結晶化に及ぼす高分子添加剤の影響を検討した。また、③ニフェジピンやフェニトイン等、数種の難溶性薬物について、ポリエチレングリコール 400 (PEG400)、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Tween80) 等の添加剤存在下における非晶質製剤からの薬物溶出メカニズムを考察し、消化管吸収性の向上に繋がると考えられる過飽和溶解状態の持続に及ぼす添加剤の影響を検討した。

2. 研究方法

①難溶性薬物の固体分散体における分散状態の解析、および結晶化速度の測定

結晶ニフェジピンと PVP(重量比 9:1)の混合粉末あるいは結晶フェノバルビタールと PVP(重量比 95:5)混合粉末約 5mg を示差走査熱量計(DSC)の試料パンはかり、DSC 中で約 190°Cに加熱し、40°C/min の速度で冷却することにより、固体分散体を調製した。得られた固体分散体が非晶質であることを偏光顕微鏡による観察により確認した。ニフェジピンについては、PVP の他に、水溶性高分子担体として HPMC、ポリヒドロキシエチルアスパラギン(PHEA)を用いて溶媒法によって調製した。

固体分散体のガラス転移温度 (T_g) は DSC により測定した(昇温速度 20°C/min)。また、固体分散体について、 $^1\text{H-NMR}$ スピン-格子緩和時間 T_1 および回転系におけるスピン-格子緩和時間 $T_{1\rho}$ を測定し、スピン拡散によって緩和時間が平均化されることを指標として、医薬品と高分子の分散状態を検討した。

固体分散体における非晶質ニフェジピンおよびフェノバルビタールの結晶化速度を 25-80°Cの温度領域で測定した。ニフェジピン-PVP 固体分散体中のニフェジピンの結晶化速度に及ぼす水分の影響は、25°C、58 あるいは 75%相対湿度に 2 日間保存して水分含量を調整し、25-60°Cの一定温度に保存した試料で検討した。

②超難溶性医薬品の結晶化現象の微量熱量計および DSC による解析

超難溶性医薬品 A 及び B を融点+15°Cまで加熱し、完全に融解させた後、液体窒素により試料を急冷し非晶質を得た。また、B に PVP、TC-5R などの高分子を 2.5~10%の比率で混合し、DSC で完全に融解するまで過熱した後、急冷し、固体分散体を調製した。DSC によって再加熱した際の結晶化率並びに結晶化温度を測定した。さらに、等温微量熱量計 (CSC 社製) によって、35~60°Cにおける熱量変化を乾燥状態および 75%相対湿度下で測定した。

③非晶質製剤からの難溶性薬物の溶出メカニズムの解析

ニフェジピン、フェニトイン、フルルビプロフェン等の難溶性薬物について、PEG400、Tween80 およびそれらの水溶液 (0、0.1、0.5%) 中への溶解度を測定した。また、各薬物の PEG400 または Tween80 溶液製剤の溶出特性を調べるために、蒸留水を試験液としてパドル法あるいはビーカー法で溶出試験を行った。さらに、蛍光物質 Prodan の PEG400 または Tween80 水溶液(0%~0.5%)中、および Tween80 溶液製剤溶解後の溶出試験液中の蛍光スペクトルおよび蛍光偏光度を測定した。蛍光測定の励起波長は 362nm とした。

3. 研究成果

①-1. 難溶性薬物の固体分散体における分散状態

ニフェジピン-PVP 固体分散体の分散状態の解析を、 T_g を指標として行った結果、溶媒法および溶媒法で調製したニフェジピン-PVP 固体分散体は、いずれの比率の分散体においても 1 つの T_g が観測され、 T_g は PVP 含量の増加に従い高温へシフトした。 T_g の観測値は Gordon-Taylor 式によって予測される T_g 値とほぼ一致した。高分子として HPMC や PHEA を用いた固体分散体においても同様に、1 つの T_g が観測された。固体分散体の DSC において 1 つのガラス転移が観測されるのは、薬物のドメインが数十 nm より小さい場合であるといわれていることから、今回検討した固体分散体において、ニフェジピンと PVP などの高分子は数十 nm のスケールで均一に分散していると考えられる。

さらに $^1\text{H-NMR}$ 緩和時間を測定し、スピン拡散による緩和時間の平均化を指標とすることによって、固体分散体の分散状態を解析した結果、ニフェジピン-PHEA 固体分散体では、 T_1 緩和過程は 1 つの指数関数で表され、 T_1 の値はニフェジピンと PHEA の単独の T_1 を平均した値となった。しかし、 $T_{1\rho}$ 緩和は 2 つの指数関数の和で表され、緩和時間の平均化は起こらなかった。従って、ニフェジピ

ン-PHEA の固体分散体中でニフェジピンが数 nm～数十 nm の粒子として存在することが分かった。一方、ニフェジピンと PVP および HPMC の固体分散体では、 T_g 緩和過程についても一つの指数関数で表わすことができ、ニフェジピンと高分子は数 nm のスケールで均一に分散していることが明らかとなった。

①-2. 固体分散体における難溶性薬物の結晶化速度の温湿度依存性

ニフェジピン-PVP およびフェノバルピタール-PVP 固体分散体では、保存中にそれぞれニフェジピンおよびフェノバルピタールの結晶化が進行することが DSC の測定によって示された。DSC 測定中のニフェジピンの結晶化による発熱ピーク面積から算出した非晶質ニフェジピンの残存率は、図 1 に示すように、Avrami-Erofeev 式によって経時的な変化を表すことができた。 T_g における比熱の変化量から算出した非晶質フェノバルピタールの残存量の経時的な変化についても、同様に Avrami-Erofeev 式で表すことができた。

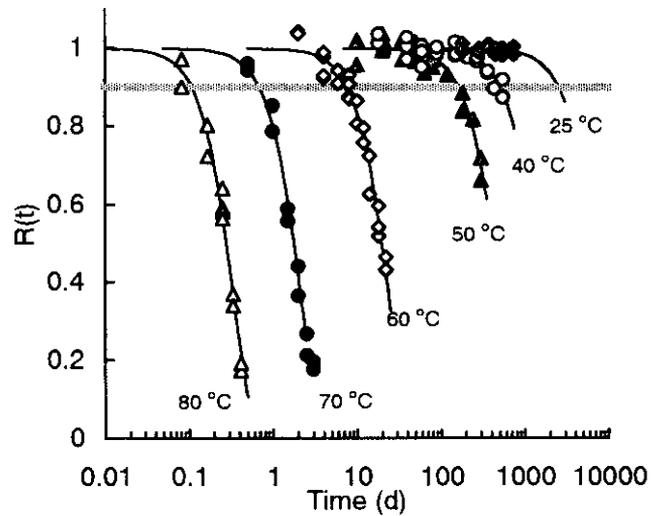


図 1 ニフェジピン-PVP 固体分散体中の非晶質ニフェジピンの残存率の時間変化

Avrami-Erofeev 式へのフィッティングによって速度定数 k を算出し、それに基づいて非晶質薬物が 10%結晶化するのに要する時間(t_{90}) を算出した結果、いずれの固体分散体の t_{90} も T_g 付近で変化する温度依存性を示し、高温の条件で得られた結晶化速度のデータをもとに、Arrhenius 式による

外挿によって室温での結晶化速度を予測することは大きな誤差をもたらすことが示唆された(図 2)。固体分散体におけるニフェジピンおよびフェノバルピタールの結晶化の $1/t_{90}$ は薬物単独の場合に比べ 2～3 桁小さな値となり、PVP の添加によって、非晶質ニフェジピンおよびフェノバルピタールの結晶化が大きく抑制されることが明らかとなった(図 2)。少量の PVP の添加による非晶質医薬品の安定化はインドメタシンやシヨ糖の結晶化において報告されており、PVP の添加による T_g の上昇および PVP と薬物との間の水素結合による相互作用が安定化に寄与していると報告されている。ニフェジピン-PVP 固体分散体およびフェノバルピタール-PVP 固体分散体の T_g は薬物単独の T_g に比べ、約 2°C 上昇した。ニフェジ

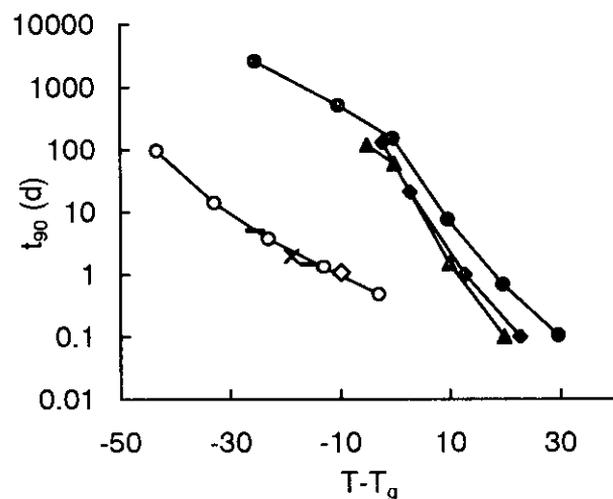


図 2. ニフェジピン結晶化速度の温度依存性
ニフェジピン-PVP 固体分散体(● 0%RH, ◆ 58%RH, ▲ 75%RH)
ニフェジピン(○ 0%RH, × 33%RH, - 43%RH, ◇ 58%RH)

ピンのジヒドロピリジン環の NH 基やフェノバルビタールの NH 基は PVP のピロリドン環のカルボニル基と水素結合する可能性がある。T_g の上昇と水素結合による相互作用がニフェジピンやフェノバルビタールの安定化に寄与しているものと考えられる。

ニフェジピン・PVP 固体分散体を一定湿度下に保存することによって、水分含量を調整し、T_g を変化させた試料について算出した t₉₀ は、T-T_g に対してプロットすると一つの曲線上にほぼ集まることが分かり、水の可塑化作用が結晶化を促進する主な要因であることが示唆された(図 2)。また、T-T_g の値が同じであっても水分含量の高い試料のほうが t₉₀ が小さかったことから、水が PVP とニフェジピンとの水素結合に競合することによって、PVP とニフェジピンとの相互作用を阻害することも結晶化の促進に寄与しているものと考えられる。

②微量熱量計および DSC によって解析した超難溶性薬物の再結晶化現象

超難溶性薬物 A の非晶質は 60°C で保存したときは図 3 に示すように、直ちに発熱し、また、保存温度が低くなるにしたがって発熱ピークの出現が遅くなることが判明した。熱量曲線の初期段階における傾きから見かけの速度定数 (k) を求め、それらを Arrhenius 式に代入した結果、良好な直線性を示すことが確かめられたことから、25°C における k を算出し、10% 結晶化するのに要する期間を 13 日と予測することができた。一方、超難溶性薬物 B の非晶質は図 4 に示すように、60°C では直ちに発熱を示したが、40°C あるいは 35°C では発熱ピークを示すまでラグタイムのあることが明らかとなり、試料 A 及び B の再結晶化のメカニズムが異なることが示唆された。

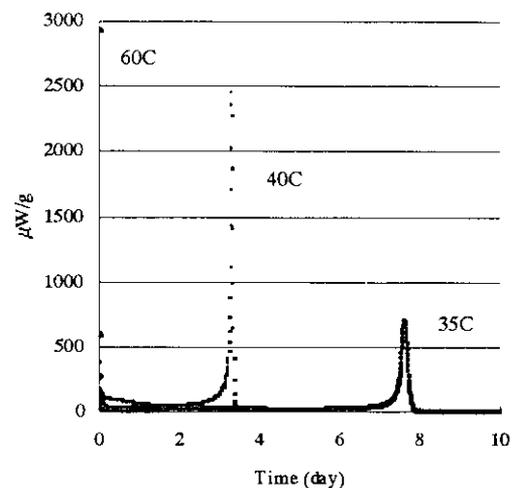
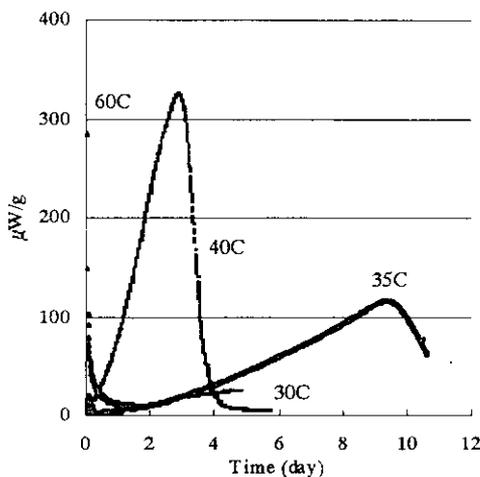


図 3. 非晶質 A の再結晶化に基づく熱流曲線

図 4. 非晶質 B の再結晶化に基づく熱流曲線

非晶質 B に種々の高分子を 2.5~10% の比率で混合して調製した固体分散体につき、結晶化に基づく発熱ピークを DSC により測定した結果、TC-5R を添加した固体分散体において、結晶化温度が最も高く、また、結晶化による吸熱量が小さいことが示され、TC-5R が結晶化抑制作用をもつことが分かった。そこで、TC-5R を添加した固体分散体からの再結晶化に及ぼす熱あるいは湿度の影響を確認するため、TC-R を微量熱量計を用いて 40°C に保存し、熱量変化を測定した結果、図 5 に示すように、乾燥状態では変化は全く認められないのに対して、75% の相対湿度下では結晶化に基づくと考えられる発熱ピークが検出された(図 6)。更に、TC-5R の添加量が多くなるに従い、発熱ピークを検出するまでのラグタイムが長くなり、結晶化が抑制されることが分かった。

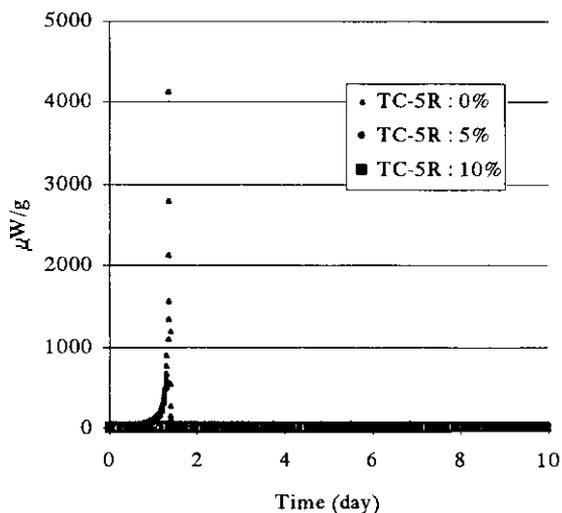


図5. 40°Cにおける熱流曲線

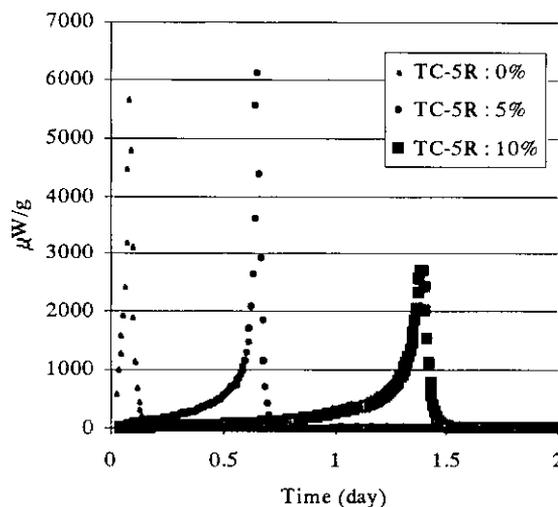


図6. 40°C 75%RHにおける熱流曲線

非晶質 B と高分子の固体分散体の分子運動性をエンタルピー緩和時間を指標として、DSC および微量熱量計で測定した結果、TC-5R を添加した固体分散体ではエンタルピー緩和現象は観察されなかったが、PVP を添加した固体分散体では、DSC および微量熱量計のいずれの方法でも 40°C においてエンタルピー緩和に基づく熱量変化が検出され、分子運動性を評価できる可能性が示唆された。

③非晶質製剤からの難溶性薬物の溶出メカニズム

ニフェジピン他 6 種類の $c\text{LogP}$ が 2.2~3.9 の範囲にある難溶性薬物の、PEG400 または Tween80 非晶質製剤からの溶出特性を調べた。PEG400 溶液製剤では、脂溶性の低い薬物 ($c\text{LogP} \leq 2.6$) のみ過飽和溶解現象が見られたものの、いずれも 3 時間までに薬物の析出がみられた。一方、PEG400 よりも大きな疎水性側鎖を有する Tween80 の溶液製剤では、6 つの薬物全てにおいて、3 時間以上過飽和溶解する溶出特性が見られた。また、薬物の PEG400、Tween80 およびそれらの水溶液中での溶解度の高さと過飽和の持続時間との関連は見られなかった。これらのことから、過飽和溶液からの薬物の析出速度には、過飽和度や溶液の粘度以外にも過飽和溶液の化学ポテンシャルの高さ（薬物と添加剤と水の極性の差に由来するエネルギーレベルの高さ）も関係しており、これを低下させる添加剤が存在する場合に、過飽和溶解時間が長くなる可能性が示唆された。

添加剤が過飽和溶液の化学ポテンシャルを低下させる現象を精査するために、蛍光波長が低極性（疎水性）環境下では短波長、高極性（親水性）環境下では長波長へと連続的に変化する特性を持つ蛍光物質 Prodan を用いて、製剤からの溶出特性と、製剤溶解後の高分子添加剤共存下における難溶性薬物の存在状態との関連を検討した。Prodan の PEG400 溶液製剤では過飽和溶解現象が見られず、Prodan の PEG400 水溶液の蛍光スペクトルおよび蛍光偏光度は、水中とほぼ同じであった。一方、Prodan の Tween80 溶液製剤では過飽和溶解現象が見られ、Prodan の Tween80 水溶液の蛍光スペクトルは、Tween80 濃度の増加（臨界ミセル濃度以下）とともに短波長側にシフトし、Prodan の存在する環境が大きく低極性（疎水性）方向に変化した。また、偏光度の値を用いて、それぞれの蛍光波長における蛍光を偏光性成分と非偏光性成分とに分けたところ、特性の異なる 2 つのスペクトルが得られた。このうち偏光成分（短波長側）は Tween80 の会合体（会合数の小さいミセル）内に存在する Prodan 分子、非偏光成分（長波長側）は Tween80 会合体の外部に存在する Prodan 分子に由来していることが考えられた（図 7）。疎水性の Prodan は疎水性の側鎖を持つ Tween80 と疎水

性相互作用をすることにより、PEG400 水溶液中よりも極性が低い環境下に存在し、熱力学的に安定な状態にあると考えられる。以上の Prodan で得られた結果から、製剤中の添加剤が溶解した後により疎水的な環境を作ることができる添加剤を加えると、難溶性薬物の過飽和溶液の化学ポテンシャルが低下し、過飽和状態が安定化されて過飽和持続時間が長くなると推察された。さらに、過飽和溶液と飽和溶液の蛍光スペクトルの差スペクトル（図8）が図7の非偏光成分の形状と一致したことから、Prodan の Tween80 溶液製剤の過飽和溶解には、Tween80 会合体外部の薬物濃度増大が寄与しており、Tween80 分子が会合体外部にも疎水的な環境をつくり出していることが過飽和溶液を安定化させている要因であると考えられた。

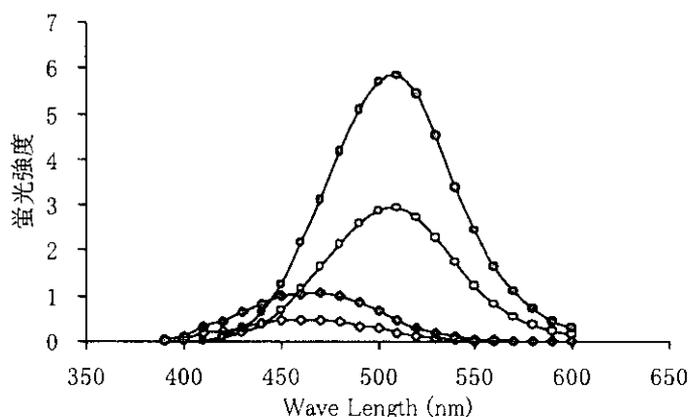


図7. 0.01% Tween80 水溶液中での Prodan の蛍光スペクトル

- ◆ : 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Prodan 水溶液の偏光成分, ● : 1.0 $\mu\text{g/mL}$ Prodan 水溶液の非偏光成分
- ◇ : 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Prodan 水溶液の偏光成分, ○ : 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Prodan 水溶液の非偏光成分

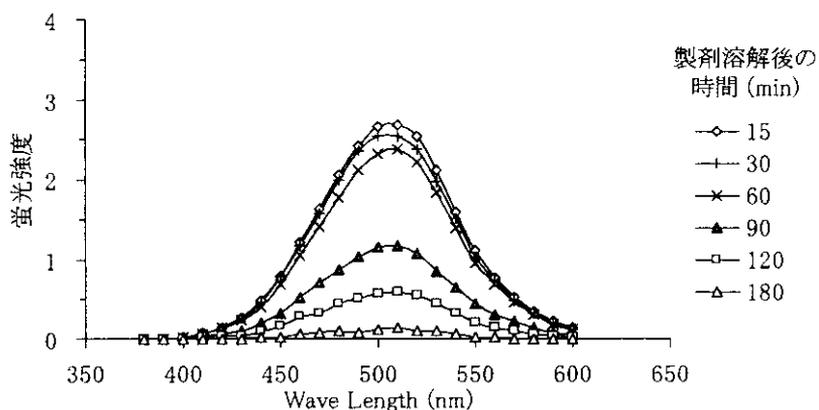


図8. Prodan の Tween80 溶液製剤溶解後の過飽和溶液 (Tween80 濃度 : 0.01%) と飽和溶液との差スペクトルの経時変化

4. 考察・まとめ

①水溶性高分子と固体分散体にすることによって非晶質化させた難溶性薬物の分散状態および保存による安定性を検討する目的で、ニフェジピン-PVP 固体分散体の分散状態を $^1\text{H-NMR}$ によって測定される T_1 および $T_{1\rho}$ の平均化を指標として解析した結果、ニフェジピンは PVP との固体分散体において数 nm のスケールで、均一に分散していることが明らかとなった。PVP との固体分散体中におけるニフェジピンおよびフェノバルビタールの結晶化速度は薬物単体の非晶質と比較して著しく減

少し、わずかな量の PVP の添加によって非晶質ニフェジピンおよびフェノバルビタールを安定化することができた。PVP は T_g を上昇させ、薬物の運動性を低下させることによって安定化するとともに、そのカルボニル基が薬物のアミノ基と水素結合を介して相互作用することによっても安定化すると考えられた。さらに、水は主に T_g を低下させ、薬物の運動性を上昇させることによってニフェジピンの結晶化を促進することが明らかとなった。また、薬物と添加剤との相互作用に対し水が競合することによって不安定化することも示唆された。今後はさらに、固体分散体の分子運動性を測定し、非晶質の分子運動性と結晶化速度との関係を明らかにすることが必要と考えられる。

②超難溶性薬物の単体および PVP 等との固体分散体における非晶質の再結晶化現象を微量熱量計および DSC によって検討した結果、いずれの方法も結晶化にともなう熱量変化を感度よく検出できることが示され、結晶化を抑制する高分子添加剤の効率的な選択などに有用であることが分かった。特に微量熱量計は、加熱条件下における再結晶化現象を連続的に測定できるばかりでなく、DSC 法では困難な加湿条件下における再結晶化現象を評価できることから、難溶性医薬品の製剤設計を行う上で、高分子の添加量や水分量の影響を詳細に検討するための有用な手法であることが明らかになった。さらに、分子運動性の指標になるエンタルピー緩和時間も微量熱量計によって測定できることが分かり、今後、さらに検討が必要と考えられる非晶質の結晶化速度と分子運動性との関係の解明に大いに役立つと考えられる。

③ニフェジピンやフェニトイン等の難溶性薬物について、PEG400、Tween80 等の添加剤存在下における非晶質製剤からの薬物溶出メカニズムを調べた結果、過飽和溶液からの薬物の析出速度には、過飽和度や溶液の粘度以外に過飽和溶液の化学ポテンシャルの高さ（薬物と添加剤と水の極性の差に由来するエネルギーレベルの高さ）も関係しており、これを低下させる添加剤が存在する場合に過飽和溶解時間が長くなる可能性が示唆された。また、蛍光試薬 Prodan をモデル薬物に用いて製剤溶解後の薬物の存在状態を検討したところ、過飽和状態が持続する製剤の溶出試験液中では、薬物は水中よりも疎水性の環境下に存在し、添加剤が共存することにより過飽和状態が熱力学的に安定化されていると考えられた。さらに、Prodan の Tween80 溶液製剤の過飽和溶解には、Tween80 会合体外部の薬物濃度増大が寄与していることが分かり、一般的な過飽和溶解機構の解明に役立つ知見が得られた。今後はさらに、固体分散体などの固形の非晶質製剤からの薬物の溶解に及ぼす添加剤の影響を調べ、過飽和溶解する時間が持続する添加剤の添加方法を検討し、過飽和溶解状態を安定化させる要因を明らかにすることが必要と考えられる。

5. 研究発表

誌上発表

- 1) Y. Aso, S. Yoshioka and S. Kojima, Molecular mobility-based prediction of the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital in PVP solid dispersions. *J. Pharm. Sci.*, submitted.
- 2) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Prediction of glass transition temperature of freeze-dried formulations by molecular dynamics simulation, *Pharm. Res.*, accepted (2003)
- 3) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, Different molecular motions in lyophilized protein formulations as determined by laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times. *J. Pharm. Sci.*, 91, 2203-2210 (2002).
- 4) Y. Aso, S. Yoshioka, J. Zhang and G. Zografu, Effect of water on the molecular mobility of sucrose and PVP in a lyophilized formulation as measured by ^{13}C -NMR relaxation time. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 822-826 (2002).

- 5) S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima and Nicholas F. Cappuccino, A comparison of the analysis of covariance (ANCOVA) and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products. *Chem. Pharm. Bull.*, 50881-883 (2002).
- 6) 阿曾幸男、吉岡澄江、小嶋茂雄, 凍結乾燥製剤の安定性に及ぼす水の影響, 低温生物工学会誌、48,42-46 (2002).

6. 知的所有権の取得状況 なし。