

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡澄江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田幸広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美健彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里勝利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山行雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口照英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎ナナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 576

超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用 する技術とその評価法の確立

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
吉岡澄江

難溶性薬物を物理的安定性および消化管吸収性の優れた非晶質製剤に調製する普遍的な方法を確立することを旨として、ポリビニルピロリドンなどの高分子による安定化メカニズムおよび製剤からの薬物の溶出挙動の解析を行った。

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、宮崎玉樹

(2)塩野義製薬・CMC 開発研究所 製剤研究部

高倉朝子、一尾俊司、佐久間 聡、林 隆志、
村主 教行

(3)アステラス製薬 製剤研究所

水野真康、平倉 穰、田中和幸、北村 智

A. 研究目的

コンビナトリアルケミストリーの発展とハイスループットスクリーニングの技術革新は、有効な薬理作用を有する医薬品シードを効率よく生み出すことを可能にした。しかし、このような医薬品シードの中には、溶解性が極端に悪いために、医薬品としての開発を断念せざるを得ない例が多数見られる。これら難溶性薬物の溶解度や溶解速度を高め、溶出特性を改善する汎用的な技術が開発されれば、新医薬品の効率的開発を大いに促進するものと考えられる。難溶性薬物の溶出特性を改善する手法としては、(1)薬物を可溶性の塩やプロドラッグにすること、(2)油性の基剤や界面活性剤により可溶化すること、(3)微粒子化、微細化によって表面積を増大することなどがあるが、適用可能な薬物の化学構造や界面活性剤などが制限されるという問題がある。一方、難溶性薬物の非晶質化は、高いエネルギー状態という非晶質の特異性に基いて溶出特性を改善させる方法であり、薬物の構造に依らない普遍的で有用な手段である。しかし、非晶質は高いエネルギー状態にあるがゆえに、一般的に物理的状態が経時的に変化しやすいという特性を有することから、保存安定性に優

れた非晶質製剤の製剤化のための技術を開発することが緊急な課題となっている。本研究は、非晶質の特異性を決定する重要な要因であるダイナミックスの解析をとおして非晶質の物理的状態の詳細を明らかにするとともに、非晶質の特性を最適化する製剤技術を開発し、さらにその評価法を確立することによって、超難溶性薬物の効率的製剤化を実現することを目的とする。

具体的には、示差走査熱量計や微量熱量計等による熱分析法、NMR、誘電緩和スペクトル法など、非晶質製剤のダイナミックスの評価に有用な手法を用いて、非晶質の微視的および巨視的な物理的状態を解析するとともに、非晶質の経時的結晶化現象を速度論的および熱力学的に詳細に解析することによって、非晶質製剤の安定化の技術を開発する。特に、非晶質製剤の安定性が製剤の分子運動性によって強く支配されることが明らかになりつつあることを踏まえて、安定性を直接的に支配する分子運動を明らかにし、それを制御することによって非晶質製剤の安定化を図る手法を考察する。同時に、分子運動性のパラメータを用いて非晶質製剤の安定性を評価する方法を確立する。さらに、非晶質製剤からの薬物溶出挙動を詳細に解析して、優れた溶出性を生み出すべく非晶質の特性を最適化する技術の開発を目指す。

前年度は、①非晶質ニフェジピンやフェノバルビタールの結晶化が少量のポリビニルピロリドン(PVP)やヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)の添加によって抑制されること、PVPやHPMCの存在によって薬物炭素のスピン-格子緩和時間(T₁)で表される薬物のlocalな運動性が添加剤によって抑制されること、高分子添加剤による非

晶質医薬品の安定化は T_g やエンタルピー緩和時間で表されるマトリックス全体の運動性の抑制に加え、高分子添加剤による薬物の local な運動性の抑制が強く関連していることを明らかにした。②水難溶性薬物である FK783 をモデル化合物とし、HPMC 及び PVP を用いた固体分散体につき、非晶質製剤の物理的な安定性を評価するための手法について検討を行った。その結果、DSC などによる固体分散体全体の分子運動性に加え、赤外吸収スペクトル (FT-IR) などを用いた局所的な運動性、あるいは相互作用を評価することが系全体の安定性を評価する上で重要であることを明らかにした。③さらに、ニフェジピン及び PVP からなる固体分散体に少量の低分子の添加剤を加えることによって、薬物の溶出速度を高め、拡散層における非晶質薬物の結晶化を抑制できることを明らかにした。

本年度は、①非晶質医薬品の安定性を支配する要因をさらに検討するために、類似の構造を有するジヒドロピリジン系 Ca 拮抗剤 (ニフェジピン、ニルバジピンおよびニトレンジピン) について、誘電緩和時間から測定した local な分子運動性および Configurational heat capacity (C_p^{conf} , 非晶質医薬品と結晶医薬品との比熱の差) から算出した熱力学的な結晶化の駆動力を比較し、結晶化速度に及ぼす運動性と熱力学的因子の相対的な重要性を考察した。さらに、不斉炭素を有するニトレンジピンについて光学分割を行い、結晶化速度に及ぼす薬物の立体構造の影響について考察した。②また、FK783-HPMC 及び FK783-PVP 固体分散体中の FK783 分子の存在状態及び FK783 結晶の分子内あるいは分子間相互作用の有無を、X 線結晶構造解析及び FT-IR を用いて確認し、FK783 分子の存在状態と再結晶化のしやすさの関係を考察した。また、固体分散体の表面と内部、あるいは固体分散体の調製法の違いによる再結晶化のしやすさなどを検討し、固体分散体の再結晶化機構について検討を行った。③さらに、低分子の添加剤を加えたニフェジピンと PVP からなる固体分散体の経時的な溶出特性・物性変化を調べ、非晶質製剤の非晶質状態の安定性を予測する評価法の確立を目指した。

B. 研究方法

①ジヒドロピリジン誘導体の結晶化速度と熱力学的因子および分子運動性の測定

ジヒドロピリジン誘導体の非晶質体は溶融法で調製した。結晶のジヒドロピリジン誘導体約 5mg を DSC のサンプルパンにはかり、結晶の融点より 20℃ 高温まで加熱し、その後 -40℃/min の冷却速度で T_g より 100℃ 低温まで冷却し、さらに 20℃/min の速度で保存温度に加熱した。得られた非晶質の T_g は、ニフェジピン:46℃、ニルバジピン:49℃ およびニトレンジピン:32℃ であった。非晶質を一定温度に保存したのち、DSC により T_g における比熱変化 (ΔC_p) を測定し、得られた ΔC_p の値から 1 式に従い残存する非晶質薬物の残存率 $X(t)$ を算出した。 $X(t)$ の時間変化から、 $X(t)$ が 0.9 になる時間 (t_{90}) を算出し、結晶化のしやすさの指標として用いた。

$$X(t) = \Delta C_p(t) / \Delta C_p(0) \quad (1)$$

非晶質医薬品と結晶医薬品の比熱の差である C_p^{conf} の値から 2~4 式に従い、結晶化の駆動力 ($\Delta G_c(T)$) を算出した。比熱は約 5mg の試料について得られた Heat flow の値から、空の試料パンについて測定した Heat flow の値を差し引くことによ

$$H_c(T) = \Delta H_m + \int_{T_m}^T C_p^{conf} dT \quad (2)$$

$$S_c(T) = \Delta S_m + \int_{T_m}^T \frac{C_p^{conf}}{T} dT \quad (3)$$

$$G_c(T) = H_c(T) - S_c(T) \times T \quad (4)$$

り算出した。比熱の校正はサファイアを用いて行った。

誘電緩和は、約 40mg の結晶医薬品を二枚の電極にはさみ、融点+20℃まで加熱した後、100℃~-60℃において、10℃間隔で測定した。

②FK783-PVP および HPMC 固体分散体の安定化とそのメカニズムの解析

FK783 と PVP(K30)、あるいは HPMC (TC-5R) をそれぞれ CHCl_3 、並びに $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{CHCl}_3$ 混液に溶解し、エバポレーターで濃縮乾固した後 195℃で加熱融解し、直ちに液体窒素中で急冷し、固体分散体を調製した。

更に、FK783 と HPMC との物理混合品 (9:1) をアルミニウム製 DSC パンに入れアルミニウム製クリンカバーでクリンプした試料、並びにクリンプしなかった試料を 195℃で加熱融解し、直ちに液体窒素で急冷し、それぞれ「表面をセルで覆

った固体分散体」、及び「表面を暴露した固体分散体」とした。

また、FK783 の単結晶を調製するにあたっては、酢酸エチル溶液から溶媒を穏やかに揮発させることにより単結晶を単離した。X 線結晶構造解析は、グラファイト単色光化した Cu-K α 放射光を用い四軸型 X 線構造解析装置により室温にて行い、構造解析は teXan プログラムを用い直接法とフーリエ法により行った。

③非晶質製剤からの薬物溶出挙動の解析

ニフェジピンと PVP K25 に、低分子の添加剤として尿素 (以下、Urea)、若しくはニコチン酸アミド (以下、NA) を加えてエタノールに溶解した後、スプレードライヤーを用い、出口温度 85 $^{\circ}$ C で噴霧乾燥して粉末状態とし、ニフェジピン-PVP (30/70)、ニフェジピン-PVP-Urea (30/63/7) 及びニフェジピン-PVP-NA (30/63/7) の固体分散体を調製した。

これらの固体分散体を密栓ガラス瓶に入れ、40 $^{\circ}$ C/1 箇月及び 3 箇月保存した。調製直後及び経時保存後の固体分散体試料について、粉末 X 線回折測定、回転ディスク法による溶出試験、IR スペクトル測定、DSC 測定、水の接触角測定を行った。DSC は、サンプル温度を 5 $^{\circ}$ C から 5 $^{\circ}$ C/min で昇温し 120 $^{\circ}$ C まで測定した。

溶出試験、接触角測定にはニフェジピン 100mg を含有する固体分散体を 20 kN の圧力で圧縮成型

し、直径 2cm のディスクとしたものを用いた。

溶出試験は、蒸留水(900mL、37 $^{\circ}$ C)を試験液とし、100 rpm の回転ディスク法で行った。試験液中のニフェジピン濃度を溶液モニター装置で 1 分毎に測定して、ニフェジピンの溶出プロファイルを観察した。接触角は、水滴下 100ms 後の表面状態を CCD カメラで撮影し、 $\theta/2$ 法を用いて求めた。

(倫理面への配慮)

本研究は化学実験のみ実施したので、倫理面の問題は無い。

C. 研究成果

①ジヒドロピリジン誘導体の結晶化速度と熱力学的因子および分子運動性の関連性

非晶質ニフェジピンおよび非晶質ニルバジピンは、検討した温度領域では保存によって準安定形に結晶化することが、調製直後に測定した DSC によって示された。非晶質ニトレンジピンは 50 および 60 $^{\circ}$ C における保存によって準安定形に結晶化するが、30 および 40 $^{\circ}$ C においては準安定形と安定形に結晶化することが示された。

各非晶質について、調製直後と保存後の T_g における比熱の変化量の比から非晶質医薬品の残存率を算出し、残存率が 90% になる時間(t_{90})を求めた。構造が類似しているにも関わらず、ニルバジピンの t_{90} は Fig. 1(A) に示すように、同一温度における

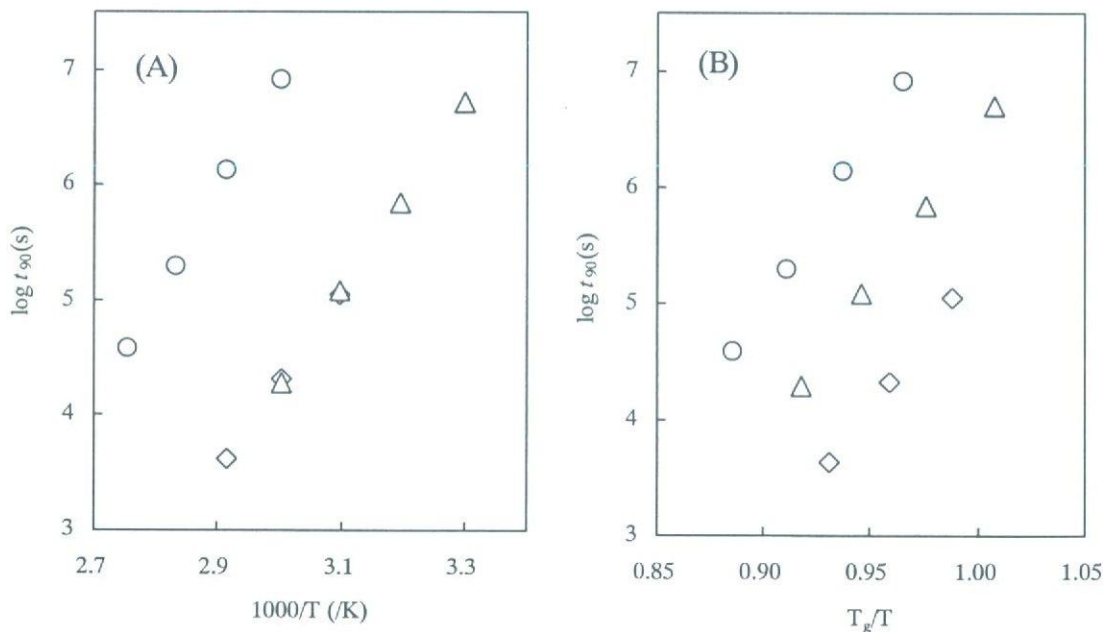


Fig.1. Temperature dependence of crystallization rate ○, NLV △, NTR ◇, NFD

ニトレンジピピンやニフェジピンに比べ著しく大きく、非晶質が安定であった。Fig.1(B)に示すように、同一の T_g/T においても t_{90} はニフェジピン>ニトレンジピピン>ニルバジピンの順となり、結晶化のしやすさは構造緩和時間で表される分子運動性すなわち薬物分子の並進運動や分子全体の回転運動の速度の違いのみでは説明できず、他の因子の影響を考察する必要があることが示された。

結晶化のしやすさに影響を及ぼす熱力学的因子として、結晶薬物の自由エネルギーと非晶質薬物の自由エネルギーの差すなわち結晶化の駆動力を C_p^{conf} の測定値から求めた。すなわち、 T_g 以上の温度における C_p^{conf} データを5式にフィッティングすることによって比例定数 K を算出し、2~4式を用いて25℃における結晶化の駆動力($\Delta G_c(T)$)を算出した。

$$C_p^{conf} = K/T \quad (5)$$

Table 1 に示すように、ニフェジピンとニルバジピンはエンタルピー項、エントロピー項ともに同様の値が得られ、結晶化の駆動力には大きな差は見られなかった。一方、ニトレンジピピンは他の薬物より大きなエンタルピー項を示し、結晶化に有利に作用すると考えられるが、エントロピー項も大きいため、結晶化の駆動力としては他の薬物と大きな差は見られなかった。ニトレンジピピンは T_g が低く構造緩和時間で表される分子運動性が高いにもかかわらず、同じ温度で比較したときにニフェジピンと同様の t_{90} を示すこと、さらに、ニルバジピンの T_g や結晶化の駆動力はニフェジピンと同様であるにもかかわらず、 t_{90} に大きな差が見られたことは、熱力学的な因子である結晶化の駆動力の他にも結晶化速度を支配する因子が存在することを示唆する。

非晶質ジヒドロピリジン誘導体のローカルな分子運動性を誘電緩和によって測定した。誘電緩和測定は電気的雙極子の回転運動を測定することが可能であり、ガラス転移にともなう構造緩和に加え、測定条件を制御することによりローカルな分子運動性を検出することが可能である。室温より高い温度条件において測定したニトレンジピピンの誘電損スペクトルの温度変化を Fig.2(A) に示す。誘電損の極大値に相当する周波数の逆数が誘電緩和時間であり、その時間スケールで電気的雙極子の運動が起こっていることが分かる。観測された誘電損の極大周波数は温度が10℃変化すると約2

Table 1 Enthalpy, entropy and free energy of crystallization of dihydropyridines.

	NFD	NLV	NTR
$\Delta H_{c25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	15.8	15.5	18.3
$\Delta S_{c25^\circ\text{C}}$ (J/mol/K)	24.1	23.1	32.6
$\Delta S_{c25^\circ\text{C}} \times 298$ (kJ/mol)	7.2	6.9	9.7
$\Delta G_{c25^\circ\text{C}}$ (kJ/mol)	8.6	8.6	8.5
$\Delta G_{c\text{Hoffman}25^\circ\text{C}}$ (KJ/mol)	8.4	8.6	8.3

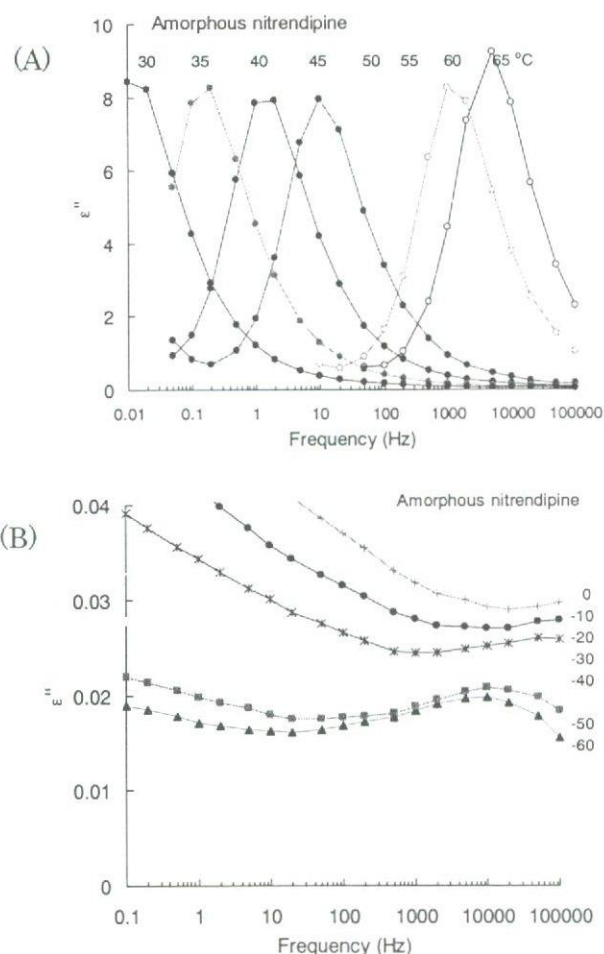


Fig.2. Effect of temperature on dielectric loss of amorphous nitrendipine.

オーダー変化し、温度依存性が大きいことから、観測された緩和はガラス転移にともなう運動、すなわち α 緩和によるものと考えられる。室温以下に冷却すると Fig.2(B) に示すように新たな誘電損の極大が観測された。誘電損の大きさが小さく、温度依存性も小さいことから、この緩和はローカルな分子運動に基づく β 緩和によるものと考えられる。

T_g/T に対してプロットした α 緩和時間および β

緩和時間を Fig.3 に示す。α緩和時間はいずれの薬物の緩和時間も1つの曲線上に集まり、構造緩和時間で表される運動性は薬物によって差がないことが分かった。それに対し、β緩和時間の T_g/T 依存性は薬物によって大きく異なった。ニルバジピンのβ緩和時間はニフェジピンより約2オーダー大きく、結晶化速度を測定した50℃においても大きな差があることが示された。これらの結果から、ニルバジピンがニフェジピンより約2オーダー大きい t_{90} を示すのは、β緩和時間が大きく local な分子運動性が低いことによるものと考えることができ、ローカルな分子運動性も結晶化速度を支配する因子として重要であることが薬物単独の系においても明らかとなった。

今回検討したニトレンジピピンやニルバジピンは不斉炭素を有するが、ニフェジピンは不斉炭素を有しない。結晶化速度に及ぼす立体構造の影響を検討するため、ニトレンジピピンの光学活性体とラセミ体の結晶化速度の比較を行った。調製直後に測定したラセミ体の非晶質ニトレンジピピンは30℃付近に T_g が観察されるが、光学分割した光学活性体においては T_g の他に100℃付近に昇温過程における結晶化に基づく発熱ピークがみられ、光学活性体はラセミ体にくらべ結晶化しやすいことが示唆された。40℃の等温条件における結晶化の測定からも、光学活性体はラセミ体にくらべ結晶化しやすいことが明らかとなった。化学的な安定性は光学活性体とラセミ体との間に差がないことが知られているが、結晶化は立体構造によっても影響を大きく受けることが明らかになった。

②FK783-PVP および HPMC 固体分散体の安定化とそのメカニズムの解析

昨年までの研究により、FK783-PVP 並びに FK783-HPMC 固体分散体中の FK783 に基づく C=O 基の伸縮振動は、FK783 原薬より高波数シフトすることが FT-IR により判明している。そこで、FK783 及び固体分散体の分子間相互作用の存在を検討するため、FK783 の X 線結晶構造解析を行い、C=O 基周辺の立体的な環境を決定した。その結果、Fig. 4 に示すように、酸素原子(C=O)と隣接するフェニル基の水素原子との距離は 2.35Å であり、水素原子と酸素原子のファンデルワールス半径の和 (2.72Å) よりも 0.37Å 短かく、また C-H...O の角度から、フェニル基は水素原子と酸素原子が水

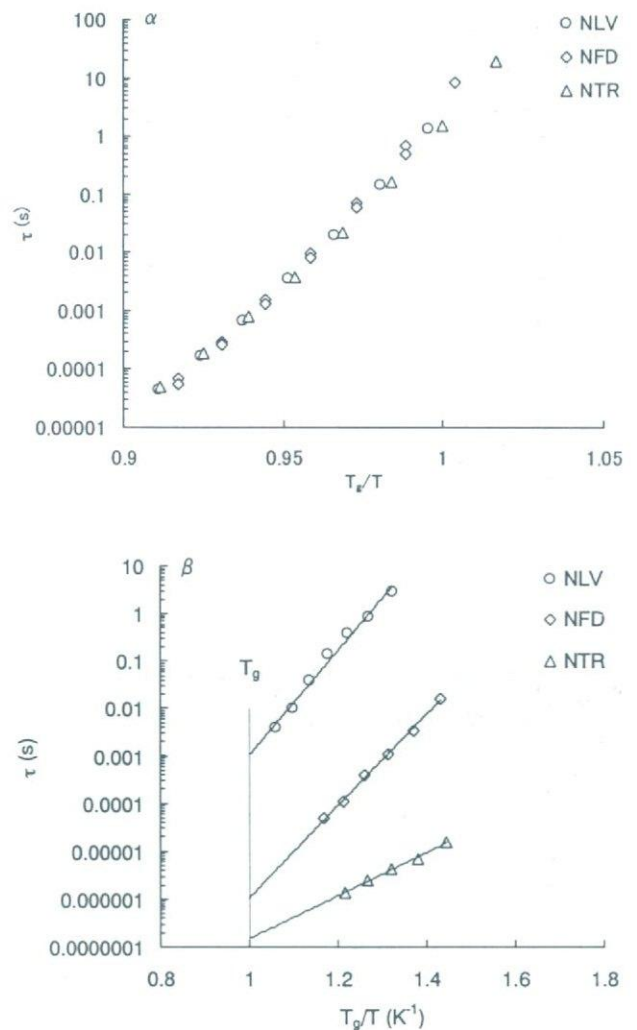


Fig. 3 Temperature dependence of α- and β-relaxation times.

素結合を形成するように配向していることが確かめられた。即ち、FK783 は分子間 C-H...O で水素結合を形成し安定化していると考えられた。一方、Fig. 5 に示すように FK783 原薬と FK783 非晶質の赤外吸収スペクトルを比較すると、C=O 基の吸収波数に差は認められず、FK783 非晶質は、C-H...O 水素結合を保持していることが示唆された。しかし、固体分散体の赤外吸収スペクトルの C=O 基の吸収波数から、固体分散体中では FK783 の C-H...O 水素結合は切断されること、PVP の方が HPMC よりも C-H...O 水素結合を切断する割合が高いことが示唆された。昨年度までの検討結果から、DSC と粉末 X 線回折の評価において、FK783-PVP 固体分散体の方が、FK783-HPMC 固体分散体よりも固体分散体全体の分子運動性は低いにもかかわらず再結晶化しやすいことが判明し

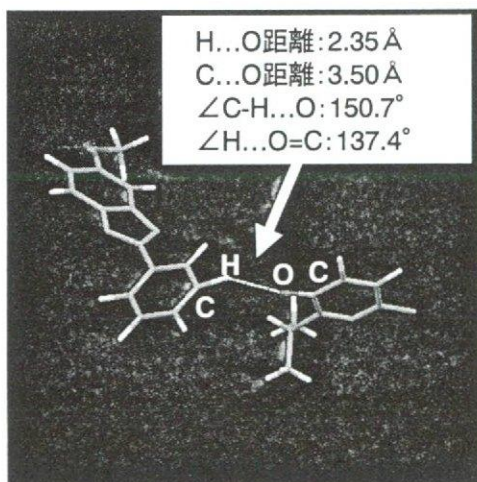


Fig. 4 Intermolecular C-H...O interaction of FK783. Some functional groups are omitted for clarity.

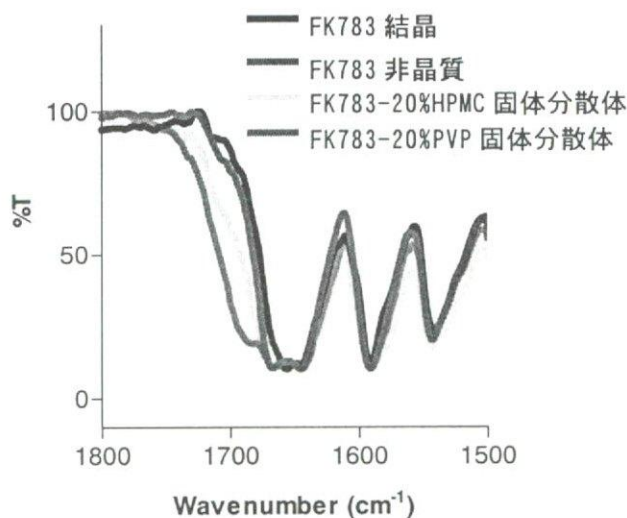


Fig. 5 FT-IR spectra of FK783 crystal, amorphous and the solid dispersions.

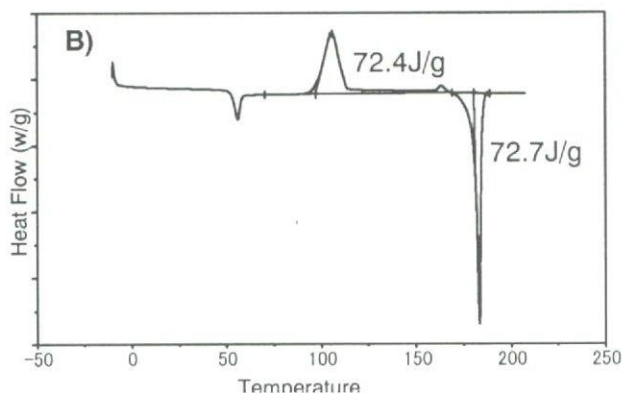
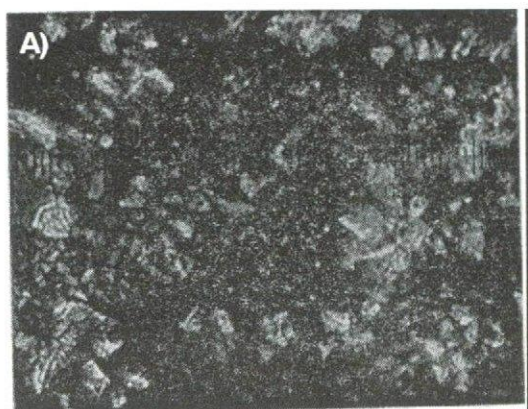


Fig. 6 FK783 · 10% HPMC solid dispersion stored at room temperature for 1.5 year. A) Polarized Light Micrometry. B) DSC Curve.

ている。したがって、これら 2 種の固体分散体で認められた再結晶化挙動の違いを考察する上で、上述した C-H...O 水素結合が切断される程度が重要な役割を果たしていると考えられた。即ち、FK783-PVP 固体分散体中の FK783 分子は、FK783-HPMC 固体分散体と比べ、その切断される割合が大きいため自由エネルギー的に不利であり、再結晶化に必要なポテンシャル ΔG^\ddagger が小さくなるものと推測された。以上の結果から、一般的な水素結合を形成する O-H 基や N-H 基を有していない FK783 のような化合物においても、その固体分散体における再結晶化挙動を評価するには C-H...O のような水素結合についても、その有無を確認し、局所的な相互作用が物理化学的な安定性に及ぼす影響を明らかとする必要があることを明らかとした。

また、非晶質医薬品の再結晶化のしやすさは、製造方法や製造条件の僅かな違いによっても異なることが報告されている。そこで、FK783-HPMC (9:1) 固体分散体につき、試料表面とその内部の再結晶化のしやすさを比較した。その結果、Fig. 6 に示す偏光顕微鏡観察の結果から、室温で 1.5 年間保存した試料の表面において結晶の析出が進んでいることが確かめられた。しかし、DSC を用いてその試料に存在する非晶質部分を算出したところ、析出した結晶は非常に少量であることが判明したことから、FK783-HPMC 固体分散体の室温保存品では、その表面でのみ結晶が析出しているものと考えられた。また Fig. 7 A)、B) に示すように、固体分散体の調製操作の異なる試料につき DSC 測定を行った結果、Al セルで表面が覆われていない試料の方が再結晶化しやすいことが判明したこと

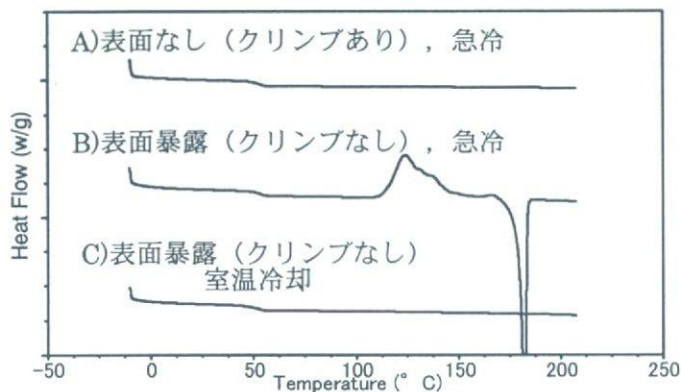


Fig. 7 DSC curves of FK783·10%HPMC solid dispersions.

から、露出した表面の方が再結晶化しやすいことが示唆された。即ち、粒子径が小さく表面積の大きな固体分散体は再結晶化しやすいものと考えられる。更に、固体分散体の調製条件が再結晶化に及ぼす影響を確認するため、調製時にAlセルで覆わずに調製した固体分散体を用い① T_g 温度以下でのエージングによる緩和処理、② T_g 以上の温度まで一旦加温することによる熱履歴の消去、③熔融状態からの冷却速度を変えたものにつき検討を行った。その結果、Fig. 7 B)、C)に示したように、熔融状態から室温まで自然放冷した方が、液体窒素で急冷した試料より再結晶化し難いことが判明した。即ち、冷却速度をコントロールすることにより、安定な表面を有する固体分散体を調製することが可能となり、安定性に優れた固体分散体を製造できることが示唆された。

③非晶質製剤からの薬物溶出挙動の解析

ニフェジピン-PVP、ニフェジピン-PVP-Urea、ニフェジピン-PVP-NAの3種の固体分散体を、40°C/3箇月保存して、経時的な溶出特性・物性変化を調べた。

Fig. 8に示すように、40°C/3箇月までいずれの固体分散体の溶出特性に大きな変化は見られなかった。また、粉末X線回折測定で、いずれの固体分散体とも、40°C/3箇月までハローパターンを示し、非晶質であることが推察された。

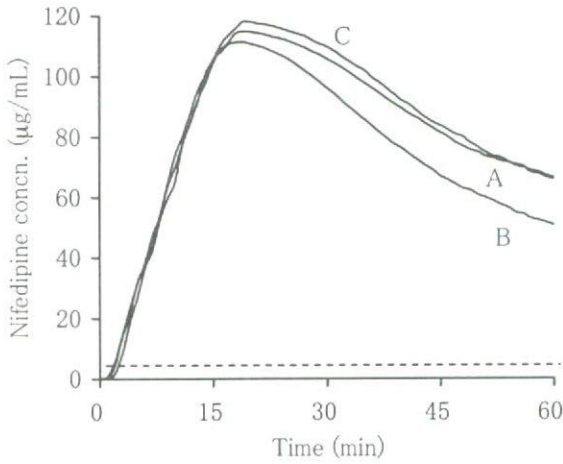
一方、IRスペクトル測定の結果 (Fig. 9)、ニフェジピン-PVP-Urea分散体のC=O伸縮振動吸収帯では、ニフェジピン原末における同吸収帯の位置

方向へ経時的に高波数シフトし、ニフェジピンと添加剤との相互作用が経時的に減少する傾向が見られたのに対し、ニフェジピン-PVP-NA分散体では経時的に低波数シフトし相互作用が経時的に増加する傾向が見られた。また、ニフェジピン-PVP固体分散体では、同吸収帯の位置に経時的な変化は見られず、ニフェジピン原末からの低波数シフト幅は小さかった。

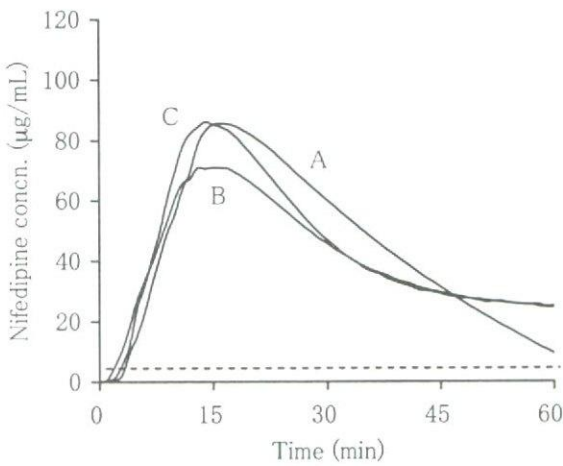
ニフェジピン-PVP-Urea及びニフェジピン-PVP-NA分散体では全ての保存条件において、DSC測定中にニフェジピン結晶化は認められなかった。一方、ニフェジピン-PVP固体分散体では、調製直後にはDSC測定中にニフェジピン結晶化が観察されなかったのに対し、40°C/1箇月及び3箇月保存後にDSC測定中にニフェジピンの結晶化ピークが観察された。これらの結果から、ニフェジピン-PVP固体分散体中のニフェジピンは、40°C保存後では調製直後よりも結晶化しやすい状態で存在することが示唆された。

固体分散体表面と水との接触角測定では、調製直後においては、ニフェジピン-PVP-Urea、ニフェジピン-PVP-NA分散体はニフェジピン-PVP分散体よりも接触角が小さく、UreaやNAのような溶解速度の速い添加剤を配合することで、固体分散体表面の撥水性を抑制できることが示唆された。しかしながら、ニフェジピン-PVP-NA及びニフェジピン-PVP分散体は40°C保存後にも経時的な接触角の変化は認められなかったのに対し、ニフェジピン-PVP-Urea分散体においては、40°C保存後に接触角が大きくなり、表面の撥水性が増大する

(A) Nifedipine/PVP(30/70)



(B) Nifedipine/PVP/Urea(30/63/7)



(C) Nifedipine/PVP/NA(30/63/7)

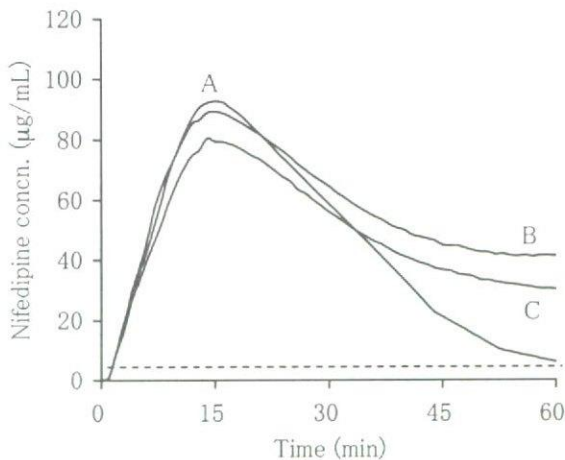


Fig.8. Dissolution profiles of solid dispersions of nifedipine.
A : Initial, B : 40°C/1M, C : 40°C/3M,
Dotted line : Solubility of crystal nifedipine.

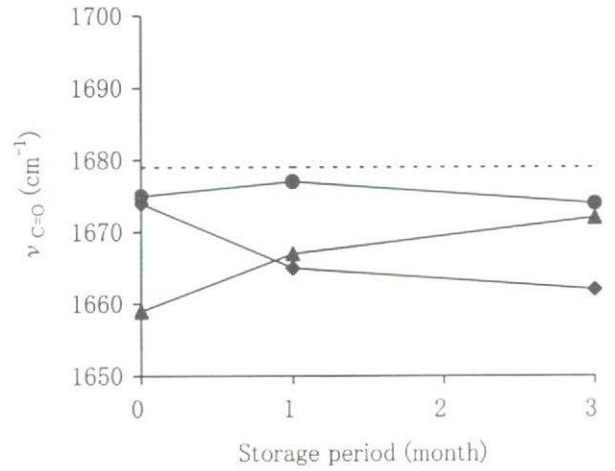


Fig.9. Changes of wave numbers of C=O stretching vibration of solid dispersions of nifedipine during storage at 40°C.
● : Nifedipine/PVP(30/70),
◆ : Nifedipine/PVP/NA(30/63/7),
▲ : Nifedipine/PVP/Urea(30/63/7),
Dotted line : Crystal nifedipine.

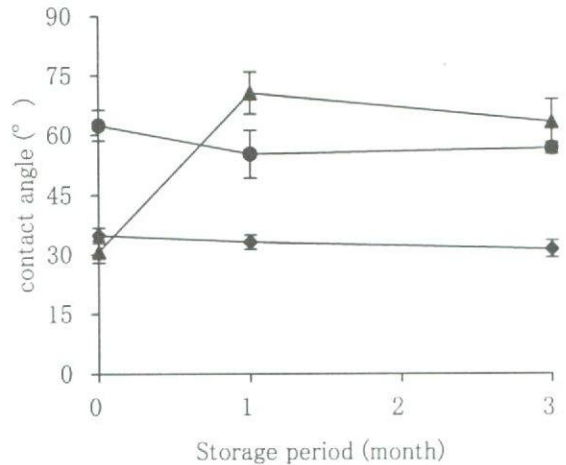


Fig.10. Changes of contact angles between the surface of solid dispersions of nifedipine and water during storage at 40°C (n=3).
● : Nifedipine/PVP(30/70),
◆ : Nifedipine/PVP/NA(30/63/7),
▲ : Nifedipine/PVP/Urea(30/63/7).

傾向が見られた(Fig. 10)。これらの結果から、40°C保存後のニフェジピン-PVP-Urea 固体分散体においては、固体分散体表面上でマイクロ相分離が進行したために、撥水性が増大したと推察された。

これらの結果から、ニフェジピン-PVP-Urea 及びニフェジピン-PVP 分散体中のニフェジピンは、非晶質状態ではあるものの、40°C保存後において調製直後よりも結晶化しやすい状態へと変化していることが示唆された。また、3種の固体分散体中では、ニフェジピン-PVP-NA 分散体が最も安定な

非晶質であることが示唆され、少量の低分子成分の添加によって、非晶質状態の安定性向上を図ることが期待できる。さらに、IR スペクトル、DSC、接触角の測定は、結晶化の前段階での固体分散体の状態変化を捉えることが可能であり、非晶質状態の安定性を予測する上で有用な評価法であることが明らかとなった。

D. 考察

非晶質医薬品の保存における結晶化速度は、マトリックス全体の運動性ばかりでなく、薬物の local な運動性にも大いに依存することが、類似の構造を有するジヒドロピリジン誘導体の結晶化においても明らかとなった。しかし、今回の β 緩和の観察は低温の温度領域に限られており、今後、 β 緩和時間に基づく安定性予測を可能にするためには、結晶化の観測される室温付近の温度領域における観察が必要であると考えられる。また、ニトレンジピンの光学活性体とラセミ体の間でみられた結晶化速度の差の因子として、分子運動性および熱力学的な結晶化駆動力の差を検討する必要があると考えられる。

また、非晶質はエネルギー的に準安定な状態であることから、弱い分子間相互作用であってもその再結晶化挙動に影響を及ぼす可能性があると考えられる。本研究に用いた FK783 においても、O-H 基、N-H 基などの一般的な水素結合を形成する置換基を有していないが、X 線構造解析で確認された C-H \cdots O 水素結合に基づく局所の運動性が物理的な安定性に大きな影響を及ぼすことが確かめられた。したがって、熱分析などによる系全体の運動性に加え、水素結合の有無などのような局所的な運動性を検討し、その安定性に及ぼす影響を評価することが重要であると考えられる。

一方、非晶質表面は内部よりも容易に再結晶化することを明らかとし、更に、熔融状態からの冷却速度を変えることにより安定な表面を有する固体分散体を調製できることが明らかになったことから、物理的に安定な固体分散体制剤の製造にあたっては、固体分散体の調製条件を最適化することが重要であると考えられる。

薬物および高分子添加剤から成る固体分散体に少量の低分子成分を添加することによって、固体分散体の非晶質状態の安定性向上が図れる可能性を示した。さらに、非晶質が結晶化する前段階の

変化を評価する手法を示した。処方間の安定性の違いを短期間で判断できれば、より迅速な非晶質製剤の処方設計が可能となることが期待される。今後、さらに非晶質状態での変化の大きさと製剤的に安定な期間との関係を明らかにするとともに、保存による溶出挙動の変化に関する固体分散体の安定性評価の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

①類似の構造を有する非晶質ニフェジピン、ニトレンジピン、ニルバジピンの結晶化のしやすさはニフェジピン>ニトレンジピン>ニルバジピンの順であること、また、誘電緩和時間として測定した薬物分子の並進運動や回転運動に関連する α 緩和時間は薬物間に差がみられないのに対して β 緩和時間は薬物間に有意な差があること（ニルバジピンの β 緩和時間はニフェジピンに比べ約 2 オーダー大きい）などが明らかになり、非晶質の安定性と β 緩和を引き起こす local な運動性との関連性をさらに普遍的に確認することができた。

②非晶質医薬品の再結晶化挙動を評価するためには、非晶質全体の運動性に加え、FK783 で認められた C-H \cdots O のような比較的弱い水素結合も考慮することが重要であることを明らかとした。また、非晶質の表面の方が試料内部よりも再結晶化しやすく、固体分散体の調製時の条件の違いも再結晶化のしやすさに大きな影響を及ぼすことが判明した。したがって、固体分散体の調製条件の最適化により、安定な固体分散体の調製が可能であると思われる。

③ニフェジピン-PVP の固体分散体に、Urea や NA のような低分子の添加剤を加えることによって薬物の溶出速度を高め、拡散層における非晶質薬物の結晶化を抑制できた。ニフェジピン-PVP、ニフェジピン-PVP-Urea 及びニフェジピン-PVP-NA、の 3 種の固体分散体を、40℃で保存して経時的な溶出特性・物性変化を調べた結果、いずれの固体分散体の溶出特性に大きな変化は見られず、粉末 X 線回折測定では非晶質であることが示された。一方で、IR スペクトル、DSC、接触角の測定では、結晶化の前段階での固体分散体の状態変化を捉えることができ、ニフェジピン-PVP-NA 分散体が最も安定な非晶質であることが示された。難溶性薬物と高分子からなる固体分散体に、低分子の添加剤を加えることで、溶出安定性のみならず非晶質

状態の安定性にも優れた非晶質製剤にする製剤処方を見出すことができた。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, T. Kawanishi, Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelatd to the glass transition temperature. *Int. J. Pharm.* (2006) Accepted.
- 2) S.Yoshioka, Y.Aso, Correlations between molecular mobility and chemical stability during storage of amorphous pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, (2006) Accepted.
- 3) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso, Degradation rate of lyophilized insulin, exhibiting an apparent Arrhenius behavior around glass transition temperature regardless of significant contribution of molecular mobility. *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 2684-2691.
- 4) S.Yoshioka, T. Miyazaki, Y.Aso. β -relaxation of insulin molecule in lyophilized formulations containing trehalose or dextran as a determinant of chemical reactivity. *Pharm. Res.*, (2006) 23, 961-966.
- 5) T. Miyazaki, S. Yoshioka, Y. Aso, Physical stability of amorphous acetanilide derivatives improved by polymer excipients. *Chem. Pharm. Bull.*, (2006) 54, 1207-1210.
- 6) S.Yoshioka, Y.Aso, T. Miyazaki, Negligible contribution of molecular mobility to the degradation rate of insulin lyophilized with poly(vinylpyrrolidone). *J. Pharm. Sci.*, (2006) 95, 939-943.
- 7) Y. Aso, S. Yoshioka, Molecular mobility of nifedipine-PVP and phenobarbital-PVP solid dispersions as measured by ^{13}C -NMR spin-lattice relaxation time. *J.Pharm.Sci.*, (2006) 95, 318-325.

2. 学会発表

- 1) Yoshioka, S., Miyazaki, T., Aso, Y.: Relationship between storage stability and β -relaxation for lyophilized insulin and β -galactosidase formulations, American

Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2006.11)

- 2) Aso, Y.,Miyazaki,T., Yoshioka, S.: Determination of molecular mobility of phenobarbital in solid dispersions with PVP and HPMC by ^{13}C -NMR relaxation measurement in relation to phenobarbital crystallization, American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting (2006.11)
- 3) Yoshioka, S., Aso, Y.: The relative contribution of molecular mobility and chemical activation barrier to the chemical reactivity of lyophilized insulin formulations, Amorph 2006 - Molecular Basis of Stability in Pharmaceutical and Food Glasses (2006.7)
- 4) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男: ポリビニルピロリドンおよびポリアミノ酸等の高分子含有凍結乾燥製剤におけるインスリンの化学的分解速度の決定要因としての分子運動性の重要度. 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3) 講演ハイライト「タンパク質医薬品の品質変化は分子の動きで予測できる」p.35.
- 5) 阿曾幸男, 吉岡澄江: ポリビニルアルコールゲルに内包した β -ガラクトシダーゼの活性に及ぼす保存の影響. 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 6) 宮崎 玉樹, 吉岡 澄江, 阿曾 幸男: ニフェジピン類薬物の結晶化速度と分子運動性についての検討. 日本薬学会第 126 年会 (2006. 3)
- 7) 吉岡澄江, 宮崎玉樹, 阿曾幸男: 糖類および水溶性高分子含有凍結乾燥製剤中のインスリンの分解速度と固体 ^{13}C NMR で測定した β 緩和速度との関係. 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 8) 阿曾幸男, 吉岡澄江: ^{13}C -NMR による ニフェジピン・およびフェノバルビタール-HPMC 固体分散体の分子運動性の測定. 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)
- 9) 高倉朝子, 林隆志, 村主教行, 久米龍一, 固体分散体中の添加剤が製剤の溶出特性に与える影響, 日本薬剤学会第 21 年会 (2006. 3)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31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