

|  |   |                                |         |         |      |
|--|---|--------------------------------|---------|---------|------|
| Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, and M. Misawa   | in the Airways of Mice with Allergic Bronchial Asthma   |                                |         | 85      |      |
| Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani                      | Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors                              | <i>J. Control. Release</i>     | 136     | 30-37   | 2009 |
| Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani | The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice                               | <i>Biol. Pharm. Bull.</i>      | 32(4)   | 755-759 | 2009 |
| M. Furuhata, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani                        | Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG                              | <i>Int J Pharm.</i>            | 37(1-2) | 40-46   | 2009 |
| Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai  | PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations | <i>Nanotechnology</i>          | 20(5)   | 55106   | 2009 |
| W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani                              | Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung                      | <i>Biol. Pharm. Bull.</i>      | 32(2)   | 311-315 | 2009 |
| K. Kawano, E. Onose, Y. Hattori, Y. Maitani  | Higher liposomal membrane fluidity enhances the in vitro anti-tumor activity of folate-targeted liposomal mitoxantrone          | <i>Molecular Pharmaceutics</i> | 6(1)    | 98-104  | 2009 |
| W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani  | Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween 80   | <i>Chem. Pharm. Bull.</i>      | 57(2)   | 138-143 | 2009 |
| T. Fujita, M. Furuhata, Y.   | Calcium enhanced  | <i>Int J</i>                   | 368     | 186-1   | 2009 |

|   |   |                              |          |           |      |
|---|---|------------------------------|----------|-----------|------|
| Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani   | delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes,   | <i>Pharm.</i>                |          | 92        |      |
| Yoshioka, S., Aso, Y., Kawanishi, T   | Wide-Ranging Molecular Mobilities of Water in Active Pharmaceutical Ingredient (API) Hydrates as Determined by NMR Relaxation Times | <i>J Pharm. Sci.</i>         | 97       | 4258-4268 | 2008 |
| W. Ding, Y. Hattori, K. Higashiyama, Y. Maitani   | Hydroxyethylated cationic cholesterol derivatives in liposome vectors promote gene expression in the lung                           | <i>Int. J. Pharm</i>         | 354(1-2) | 196-203   | 2008 |
| M. Furuhata, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y.Hattori, Y. Maitani. | Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency                          | <i>J Nanosci Nanotechnol</i> | 8 (5)    | 2308-315  | 2008 |
| Y. Maitani , Y. Aso , A. Yamada, S. Yoshioka.   | Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome /DNA complexes with high transfection efficiency                      | <i>Int. J. Pharm</i>         | 356      | 69-75     | 2008 |
| Y. Maitani, S. Katayama, K. Kawano, A. Hayama, K. Toma                                      | Artificial Lipids Stabilized Camptothecin Incorporated into Liposomes   | <i>Biol. Pharm. Bull.</i>    | 31(5)    | 990-993   | 2008 |
| M. Watanabe, K. Kawano, K.Toma, Y. Hattori, Y. Maitani                                      | In vivo antitumor activity of camptothecin incorporated in liposomes formulated with an artificial lipid and human serum albumin    | <i>J. Control. Release</i>   | 127      | 231-238   | 2008 |
| T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani                        | High gene delivery in tumor by intratumoral injection of tetraarginine-PEG lipid-coated protamine/DNA                               | <i>J. Control. Release</i>   | 129(2)   | 124-127   | 2008 |
| Y. Ohguchi, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani   | Selective delivery of folate-PEG-linked nanoemulsion-loaded aclacinomycin A to KB   | <i>J. Drug Targeting</i>     | 16(9)    | 660-667   | 2008 |

|   |   |   |       |           |      |
|---|---|---|-------|-----------|------|
|   | nasopharyngeal cells and xenograft: Effect of chain length and amount of folate-PEG linker  |   |       |           |      |
| T. Yoshizawa, Y. Hattori, M. Hakoshima, K. Koga and Y. Maitani,                                 | Folate-linked lipid-based nanoparticles for synthetic siRNA delivery in KB tumor xenografts   | <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> | 70    | 718-725   | 2008 |
| Y. Hattori, T. Yoshizawa, K. Koga, Y. Maitani   | NaCl induced high cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated synthetic siRNA transfer into prostate carcinoma PC-3 cells | <i>Biol. Pharm. Bull.</i>                                     | 31    | 2294-2301 | 2008 |
| T. Fujita, M. Furuhata, Y. Hattori, H. Kawakami, K. Toma, Y. Maitani                            | Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes   | <i>Int J Pharm</i>  | 368,  | 186-192   | 2009 |
| W. Ding, T. Izumisawa, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani                               | Non-ionic surfactant modified cationic liposomes mediated gene transfection in vitro and in the mouse lung                                      | <i>Biol. Pharm. Bull.</i>                                     | 32(2) | 311-315   | 2009 |
| W. Ding, Y. Hattori, X. Qi, D. Kitamoto, Y. Maitani   | Surface properties of lipoplexes modified with MEL-A and Tween80  | <i>Chem. Pharm. Bull.</i>                                     | 57(2) | 138-143   | 2009 |
| Y. Hattori, L. Shi, W. Ding, K. Koga, K. Kawano, M. Hakoshima, Y. Maitani                       | Novel irinotecan-loaded liposome using phytic acid with high therapeutic efficacy for colon tumors  | <i>J. Control. Release</i>                                    |       | in press  | 2009 |
| Y. Hattori, K. Koga, T. Izumisawa, M. Yamasaki, R. Narishima, S. Yoshida, T. Fukui, Y. Maitani, | The distribution of mRNA expression and protein after hydrodynamic injection of transgene in mice, <i>Biol. Pharm. Bull.</i> in press.          | <i>Int J Pharm.</i>   |       | in press. | 2009 |
| M. Furuhata, T. Izumisawa, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani,                        | Decaarginine-PEG-liposome Enhanced Transfection Efficiency and Function of Arginine Length and PEG  | <i>Int J Pharm.</i>   |       | in press. | 2009 |

|   |  |                                |     |           |      |
|---|--|--------------------------------|-----|-----------|------|
| Y. Li, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai,  | PEG-PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: in vitro and in vivo characterizations, | Nanotechnology,                |     | in press. | 2009 |
| 吉岡澄江、阿曾幸男、川西徹   | 水分吸着曲線の解析による局方収載添加剤の吸湿性に関する研究 II   | 医薬品研究                          | 39  | 51-56.    | 2008 |
| Yoshioka S., Miyazaki T., Aso Y., Kawanishi T   | Significance of Local Mobility in Aggregation of $\beta$ -Galactosidase Lyophilized with Trehalose, Sucrose or Stachyose         | <i>Pharm. Res.</i>             | 24  | 1660-1667 | 2007 |
| 吉岡澄江、阿曾幸男、川西徹   | 水分吸着曲線の解析による局方収載添加剤の吸湿性に関する研究 I  | 医薬品研究                          | 38  | 228-234   | 2007 |
| Yoshioka S., Aso Y.   | Correlations between Molecular Mobility and Chemical Stability During Storage of Amorphous Pharmaceuticals.                      | <i>J. Pharm. Sci.</i>          | 96  | 960-981   | 2007 |
| Miyazaki T., Yoshioka S., Aso, Y., Kawanishi T.   | Crystallization rate of amorphous nifedipine analogues unrelated to the glass transition temperature.                            | <i>Int. J. Pharm.</i>          | 336 | 191-195   | 2007 |
| Aso Y., Yoshioka S., Miyazaki T., Kawanishi T., Tanaka K., Kitamura S., Takakura A., Hayashi T., Muranushi N. | Miscibility of nifedipine and hydrophilic polymers as measured by $^1\text{H-NMR}$ spin-lattice relaxation.                      | <i>Chem. Pharm. Bull.</i>      | 55  | 1227-1231 | 2007 |
| A. Hayama, T. Yamamoto, M. Yokoyama, K. Kawano, Y. Hattori, Y. Maitani  | Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro.                             | <i>J. Nanosci. Nanotechnol</i> | 8   | 1-6       | 2007 |
| M. Furuhashi, R. Danev, K. Nagayama, Y. Yamada, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani.                 | Decaarginine-PEG-artificial lipid/DNA complex for gene delivery: nanostructure and transfection efficiency.                      | <i>J. Nanosci. Nanotechnol</i> | 8   | 1-8       | 2008 |
| N. Takahashi, Y. Watanabe, Y. Maitani, T. Yamauchi, K. Higashiyama, T. Ohba.                                  | p-odecylaminophenol derived from the synthetic retinoid, fenretinide: Antitumor efficacy in vitro and in vivo against            | <i>Int. J. Cancer</i>          | 122 | 689-698   | 2008 |

|   |   |                                  |     |           |      |
|---|---|----------------------------------|-----|-----------|------|
|   | human prostate cancer and mechanism of action.  |                                  |     |           |      |
| H.L. Ma, X.R. Qi, W.X. Ding, Y. Maitani, T. Nagai.  | Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles.                   | <i>J. Biomed. Mater. Res. A.</i> | 84  | 598-606   | 2007 |
| W. Ding, Y. Hattori, Y. Maitani.  | Hydroxyethylated cationic cholesterol derivatives in liposome vectors promote gene expression in the lung.  | <i>Int. J. Pharm.</i>            |     | in press  | 2008 |
| M. Fukushima, Y. Hattori, H. Tsukada, K. Koga, E. Kajiwara, K. Kawano, T. Kobayashi, K. Kamata, Y. Maitani. | Adiponectin gene therapy of streptozotocin-induced diabetic mice using hydrodynamic injection.  | <i>J. Gene Med.</i>              | 9   | 976-985   | 2007 |
| Y. Hattori, Y. Maitani.   | Low-molecular-weight polyethylenimine enhanced gene transfer by cationic cholesterol-based nanoparticle vector.   | <i>Biol. Pharm. Bull.</i>        | 30  | 1773-1778 | 2007 |
| Y. Maitani, S. Igarashi, M. Sato, Y. Hattori.   | Cationic liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression.                         | <i>Int. J. Pharm.</i>            | 342 | 33-39     | 2007 |
| Y. Hattori, W. Ding, Y. Maitani.  | Highly efficient cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated gene transfer in vivo and in vitro in prostate carcinoma PC-3 cells. | <i>J. Control. Release</i>       | 120 | 122-130   | 2007 |
| E. Kajiwara, K. Kawano, Y. Hattori, M. Fukushima, K. Hayashi, Y. Maitani.                                   | Long-circulating liposome-encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy.  | <i>J. Control. Release</i>       | 120 | 104-110   | 2007 |
| Y. Hattori, M. Fukushima  | Non-viral delivery of   | <i>Int.J.</i>                    | 30  | 1427-     | 2007 |

|  |  |  |     |         |      |
|--|--|--|-----|---------|------|
| and Y. Maitani.  | connexin 43 gene with histone deacetylase inhibitor to human nasopharyngeal tumor cells enhances gene expression and inhibits in vivo tumor growth, ,: | <i>Oncol.</i>                            |     | 1439    |      |
| Y. Zhang, X.R. Qi, Y. Gao, L. Wei. Y. Maitani, T. Nagai. | Mechanisms of co-modified liver-targeting liposomes as gene delivery carriers based on cellular uptake and antigens inhibition effect.                 | <i>J. Control. Release,</i>              | 117 | 281-290 | 2007 |
| Y. Hattori and Y. Maitani,                               | DNA/lipid complex incorporated with fibronectin to cell adhesion enhances transfection efficiency in prostate cancer cells and xenografts.             | <i>Biol. Pharm. Bull</i>                 | 30  | 603-607 | 2007 |
| M. Fukushima, Y. Hattori, T. Yoshizawa, Y. Maitani.      | Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice.                                  | <i>International Journal of Oncology</i> | 30  | 225-231 | 2007 |
|  |  |  |     |         |      |

## 研究成果の刊行物・別刷

# 非晶質の緩和と結晶化

阿曾幸男<sup>\*1</sup>, 吉岡澄江<sup>\*2</sup>

\*1 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第二室長  
\*2 コネチカット大学 薬学部 Visiting Scholar

『難水溶性薬物の物性評価と製剤設計の新展開』  
2010年1月 シーエムシー出版刊 抜刷



## 2 非晶質の緩和と結晶化

阿曾幸男\*<sup>1</sup>, 吉岡澄江\*<sup>2</sup>

### 2.1 はじめに

水に溶けにくい医薬品の溶出特性を改善する目的で、非晶質化することが医薬品製剤開発の現場において盛んに行われている。非晶質固体は結晶において見られる三次元的な長距離秩序を有せず、分子同士の相対的な位置関係は液体のように無秩序である。また、結晶に比べ高エネルギー状態にあり、分子運動性が高い。このような物理化学的な特性により、非晶質は結晶に比べ溶出性が高く、bioavailabilityの改善につながるというpositiveな面を持つ半面、結晶に比べ化学的に不安定であり、また、結晶化する可能性があるという安定性に関する問題を考慮する必要がある<sup>1)</sup>。非晶質固体は後述するように熱力学的に非平衡状態にあり平衡状態へ緩和する。緩和するためには、分子の協同的な運動が必要であり、緩和速度は分子運動性の指標となる。緩和時間を指標とした分子運動性と非晶質製剤の化学的安定性との関連を指摘する報告があり<sup>2,3)</sup>、また、非晶質製剤の物理的な変化である結晶化も分子の拡散を必要とすることから、非晶質製剤の緩和現象を理解し、緩和時間によって表される分子運動性が非晶質の結晶化に及ぼす影響を理解することは安定な非晶質製剤を開発する上で、重要なことであると考えられる。本節においては、数多くの研究者によって研究が行われているニフェジピンをモデルにし、緩和現象に関する基礎的な解説を行い、結晶化と緩和時間の関連について述べるとともに、非晶質の緩和と結晶化に関する最近の話題について述べる。

### 2.2 非晶質の緩和

図1にエンタルピーの温度変化を模式的に示す。融点 ( $T_m$ ) 以上の液体を急冷すると融点を超えて冷却されても結晶化せずに過冷却液体となる。過冷却液体のエンタルピーの温度変化の傾きは液体と同じであるが、さらに低温に冷却されるとガラス転移温度 ( $T_g$ ) において傾きが変わり、非晶質固体 (ガラス) になる。過冷却液体と非晶質固体はともに結晶に比べ高いエネルギー状態にあるが、過冷却液体は熱力学的に平衡状態にあり、エネルギー的には準安定状態にある (一定の温度圧力下で、エンタルピーは時間的に変化しない)。それに対し、非晶質固体は非平衡状態にあり、非晶質固体のエンタルピーは時間とともに減少し、過冷却液体から外挿される平衡状態に到達するまで、減少し続ける (図1の矢印の過程)。この過程が構造緩和と呼ばれるもので、液体を急冷することによって得られた不安定状態の非晶質固体がエネルギー的に有利な構造

\* 1 Yukio Aso 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第二室長

\* 2 Sumie Yoshioka コネチカット大学 薬学部 Visiting Scholar

第5章 非晶化による難水溶性薬物の製剤化

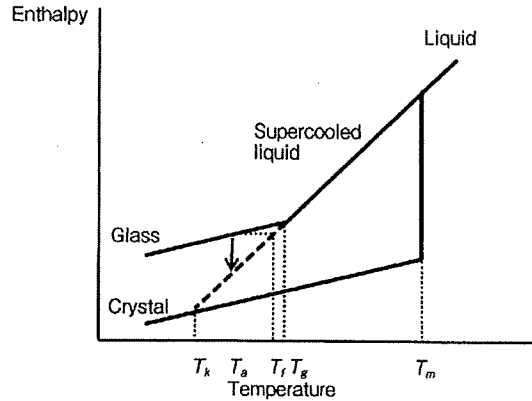


図1 エンタルピーの温度変化の模式図

へ変化する過程と考えることができる。構造緩和の過程はKohlrausch-Williams-Watts (KWW) 式 (式(1)) によって表され、緩和の進行に伴い緩和の進行速度が遅くなる傾向を有する。構造緩和の過程におけるエンタルピーやエントロピーの減少は、Configurational entropy theoryに従えば、構造緩和に伴い協同的な分子運動を行う領域のサイズが増大することを意味する。また、Free volume theoryに従えば構造緩和することにより体積は減少し、自由体積（一定温度・圧力下で、分子自身を持つ単位質量当たりの体積から、その分子の占有している体積を差し引いた残りの体積）が減少することになる。構造緩和が起こるためには、協同的な分子運動が必要であり、緩和が進行するに従い、協同的な分子運動を行う領域のサイズが大きくなることは、緩和の初期に比べ緩和の進行が遅くなることに対応する。これは、緩和時間が時間に依存すると考えることもでき、観測される緩和時間が試料の履歴の影響を受けることを意味する。

$$\varphi_t = \exp(-t/\tau)^\beta \quad (1)$$

ここで、 $\tau$ は構造緩和時間を表し、 $\beta$ は経験的に導入されたフィッティングパラメーターであり、緩和時間の分布を表す定数（ $0 < \beta \leq 1$ ）と考えられている。緩和時間に分布がないとき、すなわち全分子が同じ緩和時間を持つ場合には $\beta = 1$ であり、緩和時間の分布が広いほど小さな値をとる。

非晶質固体の構造緩和の過程は様々な方法で観測可能であるが、DSCや等温マイクロ熱量計を用いた熱測定は測定が比較的簡便であり、試料の形状などの制限が少ないことから、液体を急冷して得られたガラスのみならず、凍結乾燥によって得られた非晶質固体など広範な試料に適用さ

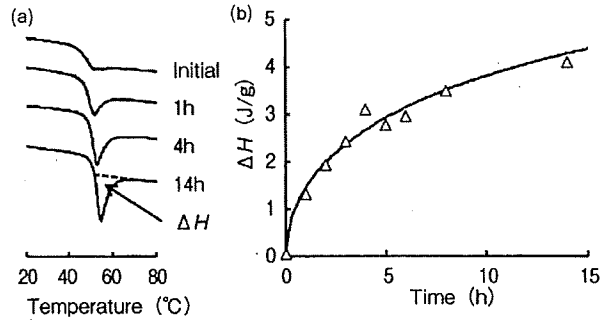


図2 25°Cにおける非晶質ニフェジピンのエンタルピー緩和

れている<sup>4-8)</sup>。熱測定によって観測される緩和過程はエンタルピーの変化をもとにしていることからエンタルピー緩和と呼ばれる。溶融急冷法によって得られた非晶質ニフェジピンのエンタルピー緩和の例を図2に示す<sup>8)</sup>。調製直後の非晶質ニフェジピンは $T_g$ 付近にガラス転移によるベースラインのシフトが見られるが、25°Cにおいて保存した試料ではベースラインのシフトに加え吸熱ピークが観測される(図2(a))。この吸熱ピーク( $\Delta H$ )は緩和により失われたエンタルピーがDSCの昇温過程において回復されるときに試料が吸収する熱量に相当するため、吸熱ピークの大きさと保存時間の関係から、式(1)~(3)に従いエンタルピー緩和過程を評価することができる。

$$\phi_t = 1 - \frac{\Delta H}{\Delta H_\infty} \tag{2}$$

$$\Delta H_\infty = \Delta C_p(T_g)(T_g - T) \tag{3}$$

ここで $\Delta C_p(T_g)$ は $T_g$ における比熱の変化を表す。

等温ミクロ熱量計によるエンタルピー測定は構造緩和過程をリアルタイムで観測できるため、DSCでは測定が難しい極めて初期の緩和挙動の解析が可能であり、DSCによるエンタルピー緩和測定の弱点を補う方法として、注目されている<sup>6,7)</sup>。

$T_g$ 以下の温度において測定されるエンタルピー緩和時間の温度依存性はConfigurational entropy theory から導かれるAdam-Gibbs-Vogel式に従うといわれている<sup>9,10)</sup>。

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left\{DT_0 / T(1 - T_0 / T_f)\right\} \tag{4}$$

## 第5章 非晶化による難水溶性薬物の製剤化

ここで、 $\tau_0$ は、極限の高温条件における緩和時間を表し、約 $10^{-14}$ sである。 $T_f$ はFictive温度と呼ばれるものであり、図1に示すように、非平衡状態にある非晶質固体と同じ値のエンタルピーを持つ仮想的な平衡状態の非晶質固体の温度を表す。 $T_g$ 以上の温度領域においては平衡が成り立っているため、 $T_f=T$ である。このとき式(3)は $T_g$ 以上の温度領域における緩和時間の温度依存性を表すVogel-Tamman-Fulcher (VTF) 式と同じ形になる。 $T_g$ 以下の温度における $T_f$ の値は、結晶および非晶質の比熱の値を用い次式によって計算できる<sup>9)</sup>。

$$\frac{1}{T_f} = \frac{\gamma_{CP}}{T_g} + \frac{1-\gamma_{CP}}{T} \quad (5)$$

$$\gamma_{CP} = \frac{C_p^l - C_p^g}{C_p^l - C_p^x} \quad (6)$$

ここで、 $C_p^l$ 、 $C_p^g$ 、 $C_p^x$ はそれぞれ、過冷却液体、ガラス、結晶の比熱を表す。

VTF式のパラメーターである $D$ および $T_0$ は $T_g$ における緩和時間の温度依存性を表すFragility ( $m$ ) の値から次式に従い算出され、 $m$ は $T_g$ の昇温速度依存性や $T_g$ の幅などによって見積もることができる<sup>11-13)</sup>。

$$m = \left. \frac{\partial \tau(T)}{\partial T} \right|_{T=T_g} \quad (7)$$

$$m_{\min} = \log(\tau(T_g)/\tau_0) \approx \log(100/10^{-14}) = 16 \quad (8)$$

$$D = 2.303(m_{\min})^2 / (m - m_{\min}) \quad (9)$$

$$T_0 = T_g(1 - m_{\min} / m) \quad (10)$$

図3に非晶質ニフェジピンのエンタルピー緩和時間とAGV式によって計算された緩和時間を示す。AGV式によって算出された緩和時間は $T_g$ において傾きが変化し、 $T_g$ 以下の温度においてはArrhenius型の温度依存性を示すように見える。ニフェジピンのエンタルピー緩和時間はAGV式から計算された緩和時間と同様の温度依存性を示した。

構造緩和は協同的な分子運動によって引き起こされるものであるが、結晶化に直接結びつく現象ではないと考えられている。すなわち、構造緩和によって、協同的な分子運動を行う領域のサイズが増大し(Configurational entropy theory)、自由体積が減少する(Free volume theory)が、協同的な分子運動を行う領域が結晶核に変化するのではなく、自由体積の減少もまた結晶核の

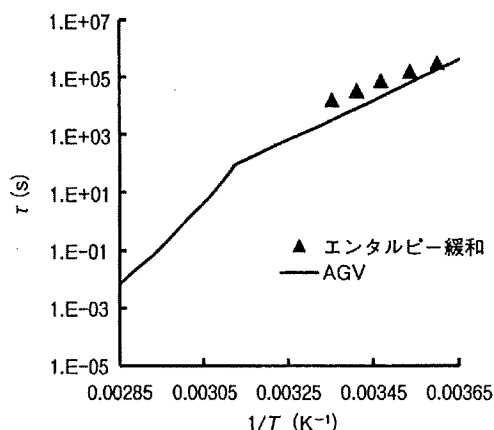


図3 非晶質ニフェジピンのエンタルピー緩和時間の温度依存性

生成や結晶成長を引き起こすものではないといわれている。後で述べるように、結晶核の生成や結晶成長には分子の拡散が必要であり、分子拡散には自由エネルギーのバリアーが存在するのに対し、構造緩和はエンタルピーとエントロピーの減少によって引き起こされる。したがって、構造緩和と結晶化は異なる現象であるとする考えもある。ただし、場合によっては構造緩和と結晶化が同時に観測されることもある。例えば凍結乾燥や急速な脱水操作および結晶の粉碎などによる非晶質ではある条件下において、構造緩和が核形成や結晶成長を引き起こすこともあり得る<sup>14)</sup>。

最近、構造緩和を引き起こすスケールの大きな協同的な分子運動に加え、分子内の局所的な運動によって引き起こされるβ緩和やJohari-Goldstein緩和と呼ばれるスケールの小さな分子運動が注目されている<sup>15)</sup>。このようなスケールの小さな分子運動は室温付近の温度における緩和時間が通常0.1s以下の速やかな運動であり、誘電緩和測定やNMR緩和測定など速い分子運動を測定ができる手法によって評価できる。図4に70℃において測定した非晶質ニフェジピンの誘電緩和測定の例を示す。誘電緩和測定は電極に挟んだ試料に交流電場を印加し、交流電場の周波数を変えて誘電率を測定するものであり、電気的雙極子の動きをもとに分子運動性を評価するものである。誘電緩和測定により誘電率と誘電損という2つのパラメーターについての周波数依存性を観測することができる。低周波領域においては、周波数に比べ試料分子の雙極子の運動が速いため、誘電率に寄与し、誘電率は一定の値を示すが、試料分子の雙極子の運動速度に相当する周波数においては、雙極子が電場の変動に追従できず誘電率が減少し、その周波数付近で誘電損の極大が観測される。極大値の周波数の逆数が緩和時間に相当する。誘電緩和において観測される運

動のスケールは温度によって異なり、高い温度から $\alpha$ 緩和、 $\beta$ 緩和と呼ばれる。図4はニフェジピンの $T_g$  (約43°C) 以上で測定した緩和であり、分子全体の速やかな回転運動による緩和すなわち $\alpha$ 緩和の例である。ニフェジピンの誘電緩和時間の温度依存性を図5に示す。 $T_g$ 以上の温度領域において観測される緩和時間の温度依存性は、Arrhenius型の温度依存性を示さず、VTF式によくフィットした。 $T_g$ 以下の温度領域においては、 $\beta$ 緩和が観測され、見かけ上Arrhenius型の温度依存性が観測された。

Johari-Goldstein緩和は分子全体の動きであるが、非協同的な分子運動であり、ガラス転移のprecursorであると考えられている。結晶化に及ぼす $\beta$ 緩和などのスケールの小さな動きの影響については、後述するが、凍結乾燥製剤中のタンパクの安定性と $\beta$ 緩和との関連が示唆されており<sup>15-19)</sup>、今後、非晶質製剤においては、構造緩和の評価に加え、 $\beta$ 緩和の評価が重要性を増すものと思われる。

### 2.3 非晶質の結晶化

水に溶けにくい医薬品を可溶化した非晶質製剤において、結晶化は非常に大きな問題となる。結晶化速度がどのような因子によって支配されているかを理解することは安定な非晶質製剤の開発にとって非常に大切なことである。結晶化は核生成と結晶成長の2つの過程によって進行し、いずれの過程においても、その速度の温度依存性は分子運動性と熱力学的因子の影響を受ける。以下に非晶質ガラスの核生成速度 ( $I$ ) の温度依存性を表す式を示す。

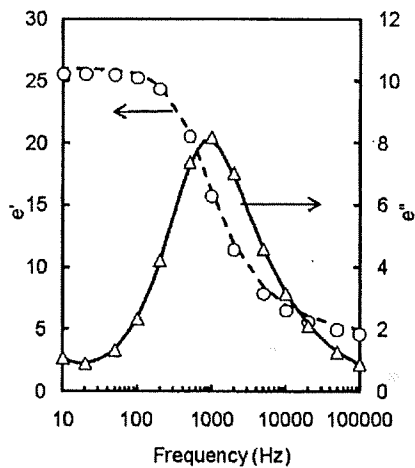


図4 70°Cにおける非晶質ニフェジピンの誘電緩和

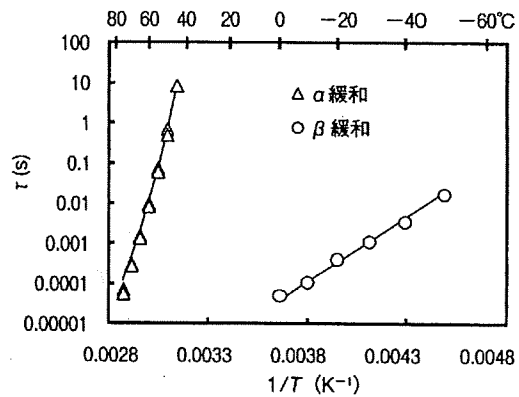


図5 非晶質ニフェジピンの誘電緩和時間の温度依存性

$$I = A \exp\left[-(\Delta G^* + \Delta G_a) / kT\right] \quad (11)$$

ここでAは定数であり、 $\Delta G^*$ はあるcriticalな大きさの結晶核が生成するときの自由エネルギー変化を表す熱力学的なファクターであり、新たに結晶表面が生成することによる自由エネルギー的な損失分 ( $\Delta G_p$ ) と結晶相の形成に伴い自由エネルギー的に得をする分 ( $\Delta G_v$ ) のバランスによって決まる。 $\Delta G_a$ は非晶質相から結晶相への分子が移動するための活性化エネルギー、すなわち、分子運動性のバリアーを表す。分子運動性のバリアーは低温になるほど結晶化を遅める方向に作用するのに対し、熱力学的な因子は低温ほど速度が速くなる方向に作用するため、ある温度で極大を示す。非晶質インドメタシンの核生成速度および核成長速度は図6に示すようにベル型の温度依存性を示し、核生成速度および核成長速度の極大値を示す温度も異なる<sup>20)</sup>。このような複雑な温度依存性が、加速条件でのデータを用いた非晶質の結晶化速度の予測を困難にしている。しかし、 $T_g$ 以下の低温領域においては速度に対する運動性のバリアーの寄与が熱力学的因子の寄与に比べ大きいと考えられるので、緩和時間で表される分子運動性と安定性との相関が期待される。結晶化は核生成と結晶成長の2つの過程によって進行するが、ここでは個々の過程の速度に分離せず、ニフェジピンのオーバーオール結晶化速度に対する温度、湿度、添加剤の影響ならびにニフェジピンと類似の構造を有するジドロピリジン系薬物の結晶速度について、分子運動性の観点から検討した結果をもとに解説したい<sup>8,10,21)</sup>。

図7に示すように、非晶質ニフェジピンの $T_g$ における比熱の変化 ( $\Delta C_p(T_g)$ ) は結晶化の進行に従い減少し、 $\Delta C_p(T_g)$  を非晶質ニフェジピンの残存率の指標として用いることができる。

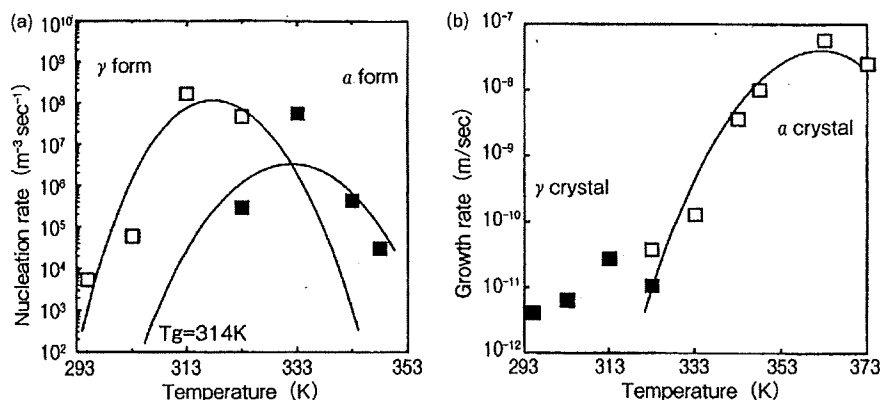


図6 インドメタシンの核生成速度(a), 結晶成長速度(b)の温度依存性

## 第5章 非晶化による難水溶性薬物の製剤化

残存率と保存時間のプロットをAvrami式に当てはめ、残存率が90%になる時間 $t_{90}$ を算出し、オーバーオール結晶化速度の指標すなわち、結晶化しやすさの指標とする。図8に $t_{90}$ に及ぼす温度、水分およびPVPの影響を示す。非晶質ニフェジピン単独の系において、25℃、33から75%の相対湿度に相当する水分を吸湿させることにより $t_{90}$ は短くなり、結晶化が促進されることがわかる。また、吸湿させた試料の $T_g$ は保存湿度が高いほど低下した。 $T_g$ の低下による分子運動性の上昇を補正するために、 $t_{90}$ のデータを $T-T_g$ に対してプロットすると、図9に示すようにプロットは1つの曲線上に集まり、その傾きはAGV式によって算出された構造緩和時間の温度依存性と類似している。Bhugraらはインドメタシン、ケトコナゾール、フロプロピオン、ニフェジピン、フェロジピンの結晶化のオンセット時間と緩和時間を温度を変えて測定し、両者が関連することを報告している<sup>22)</sup>。水の $T_g$ は非常に低く(Angellらの報告によると165 K)、非晶質固体に吸着されるとその $T_g$ を低下させ、その結果、分子運動性が高まる。薬物単独の系において、結晶化のしやすさと緩和時間(分子運動性)は関連し、水による結晶化の促進は運動性の上昇によって説明できると考えられる。

高分子添加剤を加えることにより、結晶化が抑制されることが多くの例で報告されている<sup>23-26)</sup>。その安定化作用の理由の1つとして、 $T_g$ の高い高分子は非晶質固体の $T_g$ を上昇させ、運動性が低下させることが考えられる。図8に示すように10%のPVPを添加した非晶質ニフェジピンは同じ温度で比較したときに、ニフェジピン単独の場合に比べ、 $t_{90}$ は2オーダー以上増大した。しかし、図9に示すように $T-T_g$ プロットにおいても大きな差が見られる。KonnoらはPVP、HPMC、HPMCASを添加したフェロジピンの非晶質固体分散体における核生成速度は固体分散体の $T_g$ や薬物-高分子水素結合相互作用と相関しないことを報告している。高分子は運動性のバリアーではなく、核生成のkineticバリアーを高めていると考えられている<sup>26)</sup>。PVPなどの高分子添加剤は $T_g$ を高めることにより運動性を低下させ、非晶質固体を安定化させるほかに、式(1)の $\Delta G^*$ 項も変化させ、安定化するものと考えられる。

薬物-水2成分系における非晶質固体の結晶化速度に及ぼす水の影響は分子運動性の上昇によって説明できるが、高分子添加剤の共存する系では水は複雑な作用を示す。水は $T_g$ を低下させ系の運動性を上昇させるが、それ以上に結晶化を促進することが示された。図9に示すように10%PVPを添加した非晶質ニフェジピンの $t_{90}$ は $T-T_g$ プロットにおいて乾燥状態の試料のデータと吸湿試料のデータは重ならず、 $T_g$ の低下から予測されるよりも $t_{90}$ が短く不安定であることが示された。TaylorらはニフェジピンやフェロジピンとPVPとの固体分散体における核生成速度に及ぼす水分の影響を検討し、フェロジピンに比べニフェジピンの方が不安定化されることを示した。これは、水分は薬物に対してanti-solventとして作用し、薬物の高分子に対する過飽和度を高める。フェロジピンに比べニフェジピンはPVPとのmiscibilityが低く、吸湿量も多いため、



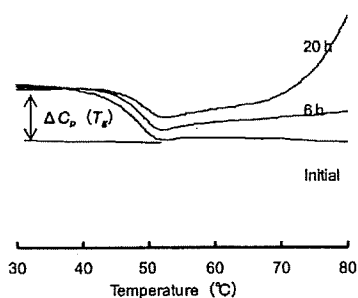


図7 結晶化によるニフェジピンの $\Delta C_p (T_g)$  の変化

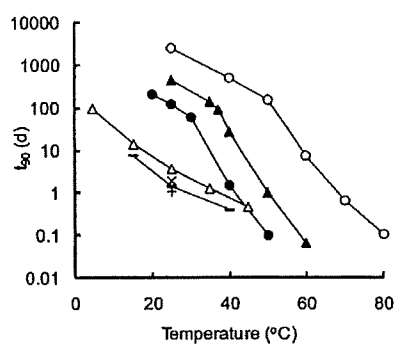


図8 ニフェジピンの結晶化速度 ( $t_{90}$ ) に及ぼす温度、湿度、添加剤の影響

- △: ニフェジピン単独 dry
- : ニフェジピン単独 58%RH
- ×: ニフェジピン単独 33%RH
- +: ニフェジピン単独 75%RH
- : ニフェジピン+10%PVP dry
- ▲: ニフェジピン+10%PVP 58%RH
- : ニフェジピン+10%PVP 75%RH

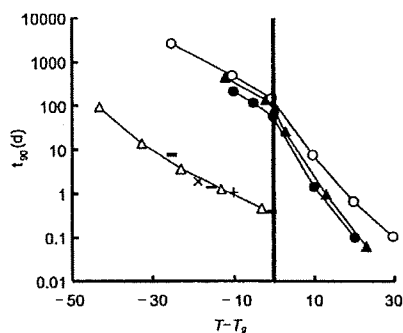


図9  $T-T_g$  に対してプロットしたニフェジピンの結晶化速度 ( $t_{90}$ )

- △: ニフェジピン単独 dry
- : ニフェジピン単独 56%RH
- ×: ニフェジピン単独 33%RH
- +: ニフェジピン単独 75%RH
- : ニフェジピン+10%PVP dry
- ▲: ニフェジピン+10%PVP 56%RH
- : ニフェジピン+10%PVP 75%RH

## 第5章 非晶化による難水溶性薬物の製剤化

フェロジピンよりも過飽和度が高くなり結晶核の生成が促進されると考えられている<sup>27-29)</sup>。非晶質製剤においては、一般的に高分子を添加して調製されるため、薬物と高分子の miscibility や miscibility に及ぼす水分の影響を明らかにすることも重要な評価項目であると考えられる。

非晶質薬物の結晶化速度は添加剤や水分の影響を大きく受けるが、化学構造の違いによっても非晶質薬物の結晶化速度は異なる。ニフェジピンに類似した構造を有するジヒドロピリジン系薬物の結晶化速度はニフェジピンと異なり、結晶化速度と  $T_g$  (分子運動性) との間には関連が見られない<sup>30)</sup>。ニフェジピンとニルバジピンの  $T_g$  はそれぞれ約43, 48℃であるが、結晶化のしやすさは大きく異なり、 $t_{90}$ の値で比較するとニルバジピンはニフェジピンの100倍以上の差がある。これは、式(1)の  $\Delta G^*$  が薬物によって異なるためと考えられる。 $\Delta G^*$  は  $\Delta G_v$  と  $\Delta G_s$  の関数であり、実験的に求めることができる  $\Delta G_v$  やそのエンタルピー項 ( $\Delta H_c$ ) やエントロピー項 ( $\Delta S_c$ ) を用いて結晶化のしやすさとの関連が検討されている。Zhouらは4種の薬物について、 $T_g$ , 融点およびDSC測定中の結晶化ピーク温度の値をもとに、結晶化のしやすさのランク付けを行い、安定性と  $\Delta S_c$  が最もよく関連することを示した<sup>31)</sup>。しかし、ニフェジピンとフェロジピンの核生成速度の差は  $\Delta S_c$  とは関連していない<sup>32)</sup>。これらの結果は化合物による構造の違いによる安定性の差を  $\Delta G_v$  と  $\Delta G_s$  のみによって説明することは困難であり、界面エネルギー  $\Delta G_s$  の評価が不可欠であることを示す結果と考えられる。しかし、その測定は実験的に非常に困難であるといわれている<sup>32)</sup>。

上記のように結晶化のしやすさと分子運動性は限られた状況においてのみ関連すると思われる。しかし、熱力学的バリアーを実験的に見積もることが困難な現状をふまえて、実用的な意味において、分子運動性に基づく安定性予測の可能性について考えたい。それは  $T_g$  付近の比較的高温の保存条件における安定性のデータを求め、安定性の温度依存性と分子運動性の温度依存性が同じと仮定し、室温での安定性を予測するものである。図10はニフェジピン単独、10% PVPを添加したニフェジピン(乾燥状態および吸湿させた系)の  $t_{90}$  を  $T_g$  における  $t_{90}$  の値で規格化し、プロットしたものである。図9においてニフェジピン単独の系とPVP添加系ではプロットが大きく離れるが、図10においてはプロットが1つの曲線上に集まる。 $T_g$  付近の温度や  $T_g$  以下の温度では、運動性のバリアーが結晶化のしやすさに対して支配的であることを意味するものと考えられる。 $\Delta G^*$  の寄与を無視することは理論的には問題があり、また、他の薬物による検討により普遍性を確認する必要があると思われるが、ここに述べたようなアプローチも実用的な評価としては意味があるのではないかとと思われる。

### 2.4 まとめ

非晶質の緩和と結晶化について解説してきたが、今後重要になるとと思われる知見を最後に述べ

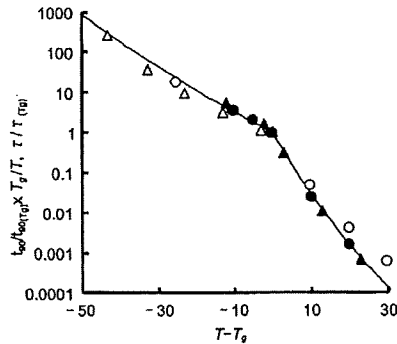


図10  $T-T_g$  に対してプロットしたニフェジピンの結晶化速度 ( $t_{90}$ )

$t_{90}$  :  $T_g$  における  $t_{90}$  によって規格化

△ : ニフェジピン単独 dry

○ : ニフェジピン+10%PVP dry

▲ : ニフェジピン+10%PVP 56%RH

● : ニフェジピン+10%PVP 75%RH

たい。たとえば、ニフェジピンやインドメタシンについて、非晶質固体の表面の結晶化は内部に比べ速いことが報告されている<sup>33,34)</sup>。このような不均一性が、全体の安定性にどのような影響を及ぼすのか、どのようにして安定性評価を行うべきか非常に興味深い。また、前項でも述べたとおり、Bhattacharyaは結晶化に関連する動きとして、スケールの小さな動きの重要性を報告している<sup>15)</sup>。結晶化とより密接に関連する分子運動性のスケールを明らかにすることは、より合理的な安定性予測を可能にするものと考えられる。非晶質固体の科学、結晶化の速度論に関する研究は日進月歩であり、新たな知見が得られ、合理的なアプローチによって非晶質製剤の安定性予測が可能になるものと期待する。

文 献

- 1) B. C. Hancock *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1 (1997)
- 2) S. Yoshioka *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 960 (2007)
- 3) S. L. Shamblin *et al.*, *Pharm. Res.*, **23**, 2254 (2006)
- 4) B. C. Hancock *et al.*, *Pharm. Res.*, **12**, 799 (1995)
- 5) S. L. Shamblin *et al.*, *Pharm. Res.*, **15**, 1828 (1998)
- 6) K. Kawakami *et al.*, *Pharm. Res.*, **20**, 1430 (2003)
- 7) K. Kawakami *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 948 (2005)
- 8) Y. Aso *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **89**, 408 (2000)
- 9) S. L. Shamblin *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 4113 (1999)
- 10) Y. Aso *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 798 (2001)
- 11) V. Andronis *et al.*, *Pharm. Res.*, **15**, 835 (1998)
- 12) P. Tong *et al.*, *Pharm. Res.*, **16**, 1186 (1999)
- 13) K. J. Crowley *et al.*, *Thermochimica Acta*, **380**, 79 (2001)
- 14) L. Gunawan, *et al.*, *Pharm. Res.*, **23**, 967 (2006)
- 15) S. Bhattacharya *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **98**, 2935 (2009)
- 16) S. Yoshioka *et al.*, *Pharm. Res.*, **23**, 961 (2006)
- 17) S. Yoshioka *et al.*, *Pharm. Res.*, **24**, 724 (2007)
- 18) M. T. Cicerone *et al.*, *BioProcess Int.*, **1**, 36 (2003)
- 19) M. T. Cicerone *et al.*, *Biophys. J.*, **86**, 8386 (2004)
- 20) V. Andronis *et al.*, *J Non-crystalline Solids*, **271**, 236 (2000)
- 21) Y. Aso *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 318 (2006)
- 22) C. Bhugra *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 455 (2008)
- 23) M. Yoshioka *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 983 (1995)
- 24) T. Matsumoto *et al.*, *Pharm. Res.*, **16**, 1722 (1999)
- 25) K. J. Crowley *et al.*, *Pharm. Res.*, **20**, 1417 (2003)
- 26) H. Konno *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2692 (2006)
- 27) P. J. Marsac *et al.*, *Pharm. Res.*, **25**, 647 (2008)
- 28) A. C. Rumondor *et al.*, *Pharm. Res.*, Published online: 6 October (2009)
- 29) P. J. Marsac *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, Published online: 2 June (2009)
- 30) T. Miyazaki *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **336**, 191 (2007)
- 31) D. Zhou *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1863 (2002)
- 32) P. J. Marsac *et al.*, *Pharm. Res.*, **23**, 2306 (2006)
- 33) T. Wu *et al.*, *Pharm. Res.*, **23**, 2350 (2006)
- 34) L. Zhu *et al.*, *Mol. Pharm.*, **5**, 921 (2008)