

Fig.1 Change of Dissolution Behavior with the Storage Conditions of 25°C/60%RH, 25°C/75%RH and 40°C/75%RH, Examined by 4 Different Test Solutions (Water, pH 1.2, pH 4.0 and pH 6.8)
 Product A (◆), Product B (△), Product C (×), Product D (○)

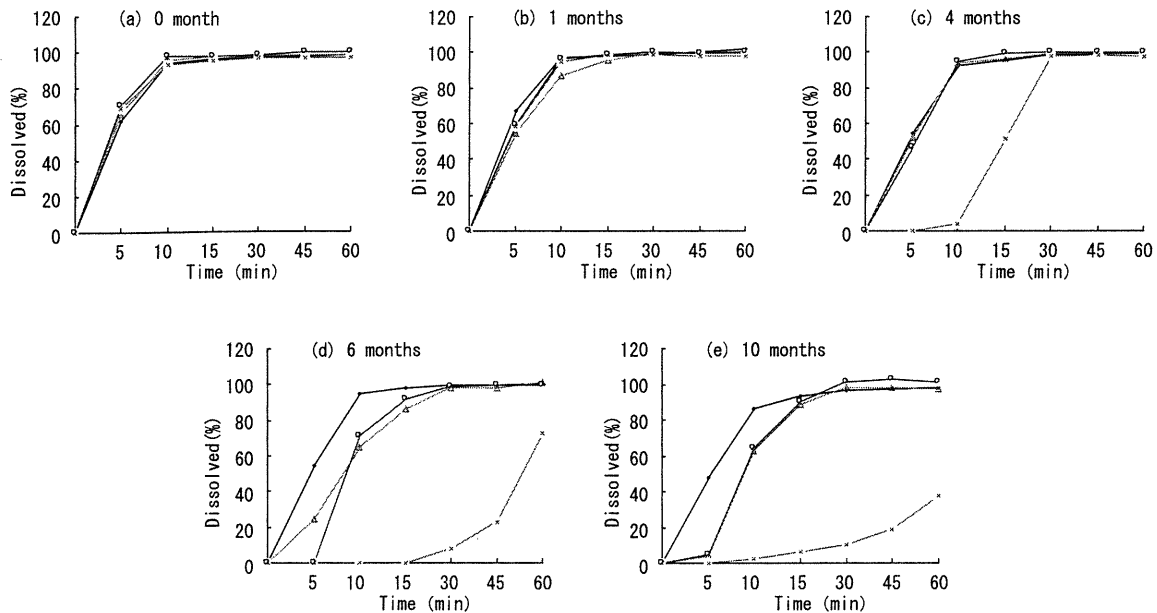


Fig. 2 Change of Dissolution Behavior with the Storage Conditions of 40°C/75%RH, Examined by Water Product A (◆), Product B (△), Product C (×), Product D (○)

程度であり、また、ベッセル間の溶出率にも大きなバラツキがあった (Fig. 2-(d)). 他の試験液では、このような溶出挙動の相違は認められておらず、日局の試験液である水は、製品の変化を適切に確認することができる試験液であった。なお、試験液に水を用いた場合の 25°C 75%RH の保存条件においても、溶出率の遅延が認められている (Fig. 1-(c)). 保存 6 箇月の時点で溶出率の遅延が既に認められており、温度だけではなく、湿度の影響も受けていることが示唆された。

2. カプセル内容物の溶出性

溶出率の低下や溶出挙動の遅延は、有効成分の含量低下等の変化に基づく場合がある。そこで、加速条件で 10 箇月間保存したカプセルを開封し、内容物の溶出挙動を比較した結果、製品による差は認められなかった (Fig. 3)。内容物は投入と同時に試験液中に拡散しており、有効成分の溶出が即時に行われていることが示された。このことから、加速試験条件の保存であっても、有効成分は即時に試験液に溶解すること、含量は低下していないことが示され、有効成分の変化に基づく溶出率の低下ではないことが示された。

また、製品 C は、25°C60%RH で保存した製剤の内容物も同様に試験を行ない、保存条件の違いによる内容物の溶出挙動の差を比較したが、保存条件による差は認められなかった。

3. 保存カプセルの純度試験

検討に用いた全ての製剤は、ゼラチンを原料とする硬

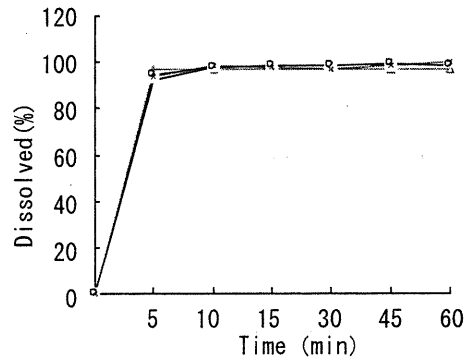


Fig. 3 Dissolution Behavior of Capsule Contents after Storage for 10 Months at 40°C/75%RH
A (◆), B (△), C (×), D (○)

カプセル剤である。ゼラチンカプセルの場合、主原料であるゼラチンは変性しやすく、変性した場合にはカプセルの溶解性が変化する^{10~12)}。

そこで、カプセルの変性の可能性を考慮し、医薬品各条の「カプセル」に規定されている純度試験に準じた試験を実施した⁷⁾。この結果、保存条件による差は特に認められず、日局「カプセル」に不適合となる変化は認められなかった (Table 1)。

4. 溶出挙動へ影響を与えたのはカプセル皮膜か、内容物か

4.1 製品 B 及び D の場合

新医薬品の申請時に必要な安定性試験において、「加速条件における溶出が判定基準を満たさない場合でも、その原因が架橋によることが明らかである場合には、安

Table 1 Dissolution Time and Solution pH; The result was tested according to the provisions given in the section of "purity" in the Capsules monographs specified in the Japanese Pharmacopoeia.

Capsule Shell	Storage Condition	Dissolution Time (min)	pH
Product A	25°C60%RH	5	5.72
	40°C75%RH	5	5.67
Product B	25°C60%RH	4	5.09
	40°C75%RH	5	5.07
Product C	25°C60%RH	4	5.72
	40°C75%RH	5	5.60
Product D	25°C60%RH	6	5.70
	40°C75%RH	8	5.66

定性試験ガイドラインで示された中間的条件（30°C65%RH）での評価が必要になる『明確な品質の変化』とは見なされない」とされている^{5,13)}。今回の検討は、紙箱から取り出した製品を用いており、承認審査時に要求される市販状態の製品を評価したものとは異なっているものの、溶出挙動の変化がカプセルに由来するか否かを確認することは重要である。

カプセル内容物を用いた検討により、有効成分に変化が認められない (Fig. 3)。そこで、25°C60%RH で10箇月保存した製品 A と、40°C75%RH で10箇月保存した製品 B, C, D を用い、以下の試験を行った。各製品の内容物を入れ替えた試料（各製剤を開封し、その内容物を取り出し、空にした製剤のカプセルに取り出した内容物を再充てんした試料）を作成し、試験液を水とし、溶出試験を実施した。

その結果、製品 A の内容物でも、カプセルが他製品の場合、溶出に明らかなラグ時間が生じた (Fig. 4)。また、製品 A のカプセルに製品 B 又は D の内容物を充てんした場合、保存試験開始時の製品と同様の溶出挙動を示し、溶出率の遅延は改善された (Fig. 5)。このことか

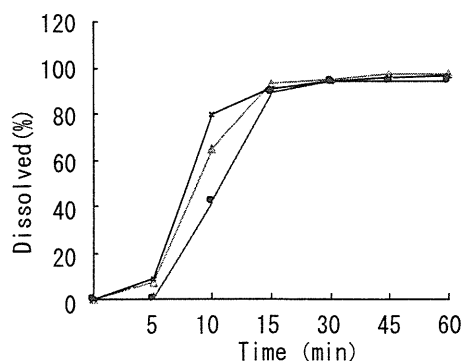


Fig. 4 Comparison of Dissolution Behavior of Content A in Different Capsule Shells after Storage for 10 Months at 40°C/75%RH
Capsule Shell B (Δ), Capsule Shell C (\times), Capsule Shell D (\bullet)

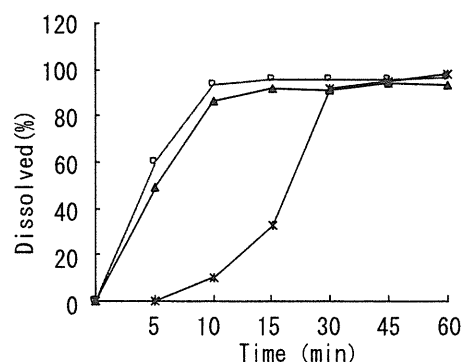


Fig. 5 Comparison of Dissolution Behavior of Capsule Shell A with Different Contents after Storage for 10 Months at 40°C/75%RH

Content B (\blacktriangle), Content C (\ast), Content D (\circ)

ら、製品 B 及び D で認められた溶出率の遅延は、カプセル皮膜が原因であると考えられた。一方、製品 A のカプセルに、製品 C の内容物を充てんした場合、溶出率の低下は改善されるものの、保存開始時の製品と比べて大幅な遅延が認められた (Fig. 5)。

TA は、今回検討した4種類の試験液に溶けやすく⁹⁾、試薬の TA を製品 A のカプセルに充てんした場合、製品 A と同様に速やかに溶出した (Fig. 6)。また、各製品の内容物を用いた場合も、溶出率は試験開始5分後で90%以上を示した (Fig. 3)。これらのことから内容物に含まれる TA 以外の添加物は、TA の溶解性に直接影響を与えることはない、と推定された。

4.2 製品 C の場合

次に、加速条件で保存した製品 C のカプセル皮膜に試薬の TA を充填し、溶出挙動を確認したところ、保存前の製剤の溶出挙動と比較して遅延が認められた (Fig. 7)。この結果からは、製品 C のカプセル皮膜に変化が認められることが示されたものの、保存後の製剤で認められた溶出率の遅延を説明するには不十分であった。

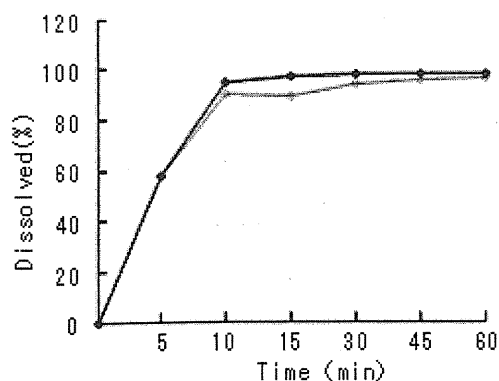


Fig. 6 Dissolution Behavior of Capsule Shell A after Storage for 10 Months at 25°C/60%RH
Content A (◆); after storage for 10 months at 25°C/60% RH, TA (◇)

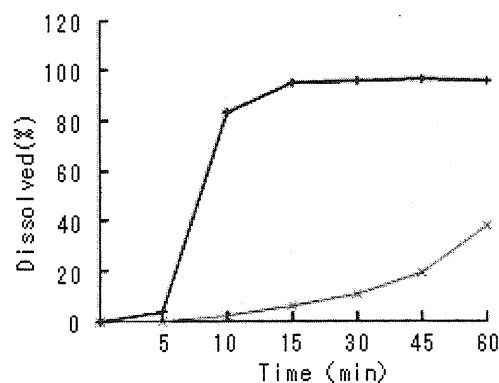


Fig. 7 Comparison of Dissolution Behavior of Capsule Shell C after Storage for 10 Months at 40°C/75%RH
Content C (×); after storage for 10 months at 40°C/75% RH, TA (+)

製剤中の有効成分には変化が認められていない (Fig. 3) ことを併せて考慮すると、製品Cは、カプセル皮膜とともに、有効成分以外の内容物についても変化が生じていると考えられた。

製品A, B, Dの崩壊過程を観察すると、製品投入後、カプセルの一部がくぼむように変形したり、穴が開いたり、短径側で二つに割れる等の過程を経てカプセルが崩壊した。空カプセルを用いて同様の条件で溶出試験を行い崩壊の様子を目視で観察した際にも、製品Cの空カプセルを含め、全ての空カプセルでこのような崩壊過程が観察され、崩壊開始時間や崩壊終了時間は、目視では大きな差は認められなかった。

一方、製品Cでは、シンカーが投入された後、カプセルが膨潤し、シンカー内に広がった後、一部分に穴が開き、崩壊が起こるが、加速試験条件の保存検体の試験終了時には、変形したカプセルが残留しており、カプセルの外側はゲル状になっていた。また、製品Cの溶出試験液では、顕著な濁りが認められ、溶出試験終了まで、濁りがなくなることはなかった。これは、製剤の添加物

に水を加えると、膨潤して懸濁液となるカルメロースカルシウム (CMC-Ca) が使用されていることに由来すると考えられる¹⁴⁾。

保存による影響がない製品Cのカプセル皮膜は、外側から試験液に溶けることで崩壊するとともに、添加物のCMC-Caが膨潤することにより、皮膜の内側からも物理的に崩壊すると推測される。CMC-Caを崩壊剤として使用した場合、特に湿度の影響によって、溶出速度が著しく遅れることがフェニトイン錠で報告されている¹⁵⁾。このことから、CMC-Caは湿度によって影響を受けていることが推測された。

以上のことから、製品Cの溶出率の低下には、1) 温度の影響を受けたカプセル皮膜は、外側からの崩壊が不十分であったこと、2) 湿度の影響を受けたCMC-Caを含む内容物が、内側からカプセル皮膜を物理的に崩壊させることが不十分であったこと、3) 崩壊した皮膜と内容物がゲル状の膜を形成したため、トラネキサム酸が試験液と接触することが妨げられたこと、の複数の原因が寄与していたことが推測された。

医薬品の有効期限は、適切な管理を行った状態の未開封の製品に対して定められたものであるが、患者が常に未開封の製品を入手することは不可能であり、更に薬局や患者の保管状態が万全であるとは限らない。このことから、保存の問題で生じる溶出性の問題を回避するためには、加速試験の結果や、保存ロットの結果の比較を十分に評価するなどのデータを示し、カプセル剤の高温保存を極力回避しなければならないことを、製造業者以外にも広く知らしめる必要がある。また、製剤の問題で生じる溶出性の問題を回避するためには、たとえばゼラチンカプセルで認められる不溶化の原因となる可能性のある添加物や、保存による影響を受ける添加物を極力使用しないような製剤設計を検討することが望ましいと考える。

結 論

各種条件による保存試験の結果、加速試験条件においては、溶出挙動に経時的な変化が認められた製剤があった。その原因は、有効成分の含量低下等に由来するものではなく、カプセル皮膜か、カプセル及び内容物の変化に起因することが示された。

今後は、保存による溶出性の変化を、加速試験や保存ロットを用いることで詳細に評価し、そのデータを蓄積する必要があると考えられる。

文 献

- 1) 医薬品医療機器情報提供ホームページ. <http://www.info.pmda.go.jp/kaisyuu/menu.html>. accessed 2011/3/25.
- 2) 川口正美, 梶村計志, 田口修三: 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**(2), 149-155 (2011).
- 3) H. Nyqvist: *Int. J. Pharm. Tech & Prod. Mfr*, **4**(2), 47-48 (1983).
- 4) JIS A 1475: 建築材料の平衡含水率測定方法, 2004.
- 5) 厚生労働省医薬局審査課長: 安定性試験ガイドラインの改定について, 医薬審発第 0603001 号, 平成 15 年 6 月 3 日.
- 6) (社)日本病院薬剤師会:錠剤・カプセル剤の無包装状態での安定性試験法について(答申), 平成 11 年 8 月 20 日.
- 7) 厚生労働省: 第十五改正日本薬局方 (2006).
- 8) 厚生労働省医薬食品局長: 日本薬局方外医薬品規格第三部の一部改正について, 薬食発第 012002 号, 平成 17 年 1 月 20 日.
- 9) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長: 医療用医薬品品質情報集について, 薬食審査発第 0221001 号, 平成 17 年 2 月 21 日.
- 10) Marvin C. Meyer, Arthur B. Straughn, Ramakant M. Mhatre, Ajaz Hussain, Vinod P. Shah, Carey B. Bottom, Ewart T. Cole, Larry L. Lesko, Henry Mallinowski, Roger L. Williams: *Pharm. Res.*, **17**(8), 962-966 (2000).
- 11) George. A. Digenis, Thomas. B. Gold, Vinod. P. Shah: *J. Pharm. Sci.*, **83**, 915-921 (1994).
- 12) 柴田俊之, 中村 任, 奥村勝彦, 栢尾信治, 長田俊治: 医療薬学, **28**(6), 594-598 (2002).
- 13) 厚生労働省医薬局審査課長: 安定性データの評価に関するガイドラインについて, 医薬審発第 0603004 号, 平成 15 年 6 月 3 日.
- 14) 医薬品添加物事典 2007: 薬事日報社, **67** (2007).
- 15) 古座谷 醇, 西村健一, 坪野 昇: 製薬工場, **4**(1), 28-31 (1984).

難水溶性製剤の溶出試験に界面活性剤として使用される
ラウリル硫酸ナトリウムの品質に関する研究 (第2報[†])梶村 計志^{*1, #}, 川口 正美^{*1}, 四方田 千佳子^{*2}

(受付:平成23年9月6日, 受理:平成23年12月8日)

Variation in Quality of Sodium Dodecyl Sulfate Used as a Surfactant
in the Dissolution Test for Poorly Water-Soluble Drugs (Part 2)Keiji KAJIMURA^{*1, #}, Masami KAWAGUCHI^{*1} and Chikako YOMOTA^{*2}

Summary

The quality of sodium dodecylsulfate (SDS) reagents used in the dissolution test for poorly water-soluble drugs was investigated. We examined the effect of the pH value of the aqueous test medium containing SDS on the dissolution behavior in this study.

The pH values of aqueous solutions prepared with several commercial SDS reagents (20 samples; 1.0 w/v%) were measured. Three kinds of SDS reagents whose aqueous solutions showed different pH values were selected for further studies. The pH values of aqueous solutions (1.0 w/v%) prepared with these SDS reagents were 5.61, 6.98 and 8.32, respectively. All these SDS reagents conformed to the specification of "Sodium Lauryl Sulfate" prescribed in the Japanese Pharmacopoeia sixteenth edition (purity, water and total alcohol content). The pH-buffering abilities of the dissolution test media except for water were unaffected by the difference of SDS reagents. Dissolution test was carried out using piromidic acid 250 mg tablet, teprenone 50 mg tablet and mefenamic acid 250 mg capsule as test samples, with water as the test medium. It was found that all the above formulations showed different dissolution behaviors dependent on the SDS reagents used. In particular, the dissolution behavior of mefenamic acid capsule was dependent on the pH value of the test medium.

Our findings show that aqueous test media prepared with commercial SDS reagents have different pH values, which may influence the dissolution behavior of the active ingredient..

Key words

Sodium dodecyl sulfate, pH value, Dissolution test, Piromidic acid tablet, Teprenone capsule, Mefenamic acid capsule

緒言

ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) は、陰イオン性の界面活性剤であり、溶出試験では、難水溶性の製剤に対して適用される。著者らは、溶出性に関する SDS 試薬の品質について検討を行っており、混在する SDS (C₁₂)

以外のアルキル硫酸ナトリウムが溶出挙動に影響を及ぼすことを報告している¹⁾。アネトールトリチオン錠、イプリフラボン錠及び酢酸コルチゾン錠について溶出試験を行ったところ、使用する SDS 試薬により溶出挙動が異なっていた。高い溶出率をもたらす SDS 試薬には、テトラデシル硫酸ナトリウム (STS; C₁₄) が約 25%程度

[†] 第1報 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42(7), 622~628 (2011).

^{*1} 大阪府立公衆衛生研究所 大阪市東成区中道 1-3-69 (〒537-0025)

Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

^{*2} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

責任著者 Corresponding author

含まれており、混在する SDS (C₁₂) 以外のアルキル硫酸ナトリウムが溶出挙動に影響を及ぼすことが明らかとなった¹⁾。

本稿では、SDS 試薬を溶解したときの pH に着目した。溶出挙動に pH 依存性が認められる^{2~4)}、ピロミド酸錠、メフェナム酸カプセル及びテプレノンカプセルについて溶出試験を行い、使用する SDS 試薬の pH が溶出性に及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. 製剤

ピロミド酸 250 mg 錠 (パナシッド錠)、メフェナム酸 250 mg カプセル (ポンタールカプセル 250 mg) 及びテプレノン 50 mg カプセル (セルベックスカプセル 50 mg) を用いた。これらの製剤の有効成分の化学構造と pKa を Fig. 1 に示した。

2. SDS 試薬

市販されている 20 種類 (9 社) の SDS 試薬を使用した。

3. 標準物質

ピロミド酸は、MP Biomedicals 社製の試薬を使用した。メフェナム酸は、シグマ社製のものを、テプレノンは、和光純薬工業株式会社製の生化学用を使用した。

4. 試験液

以下の試験液を用いた。

pH 1.2 : 日局溶出試験第 1 液⁵⁾

pH 4.0 : 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液, 0.05 mol/L,
pH 4.0⁵⁾

pH 6.8 : リン酸水素二ナトリウム・クエン酸緩衝液,

pH 6.8³⁾

pH 8.0 : リン酸水素二ナトリウム・クエン酸緩衝液,
pH 8.0²⁾

5. 溶出試験

日本薬局方外医薬品規格第三部 (局外規第三部) に従い^{2~4)}、溶出試験を実施した。溶出挙動を検討する際の試験液採取は、品質再評価で定められた時間⁶⁾で行い、溶出率は全て n=6 の平均値とした。

なお、各製剤の試験で使用される SDS 試薬の濃度及び規格試験の試験液は、以下の通りである。

ピロミド酸錠 : 1.5 w/v%, 規格試験液 (pH 8.0)

メフェナム酸カプセル : 4.0 w/v%, 規格試験液 (pH 6.8)

テプレノンカプセル : 5.0 w/v%, 規格試験液 (pH 6.8)

6. 溶出試験装置

株式会社大日本精機社製の全自動溶出試験機 (RT-3std) を使用した。

7. SDS 試薬の品質評価

第十六改正日本薬局方 (日局) の医薬品各条「ラウリル硫酸ナトリウム」の規格に従い⁷⁾、純度試験、水分含量及び総アルコール量の測定を行った。

8. pH の測定

日局の pH 測定法に従い pH を測定した⁵⁾。pH 計は、株式会社堀場製作所製 HORIBA F-52 を使用した。

実験結果

1. SDS 試薬の pH

市販の SDS 試薬を用い 1.0 w/v% 水溶液を調製し、pH を測定した (Fig. 2)。SDS 試薬の違いにより、pH に差が認められた。SDS-C の pH は最も高く、SDS-B は最も低い値を示した。各 SDS 試薬の pH の平均値は、6.54 であった。

以下の検討には、これら SDS 試薬の内、SDS-B, SDS-C 及びその中間的な pH を示す、SDS-A を用いた。各 SDS 試薬の pH はそれぞれ、SDS-A (6.98)、SDS-B (5.61) 及び SDS-C (8.32) である。

2. SDS 試薬の品質評価

日局各条「ラウリル硫酸ナトリウム」の規格に従い、SDS-A, B, C の純度試験、水分含量及び総アルコール量の測定を行った (Table 1)。各 SDS 試薬の試験結果は

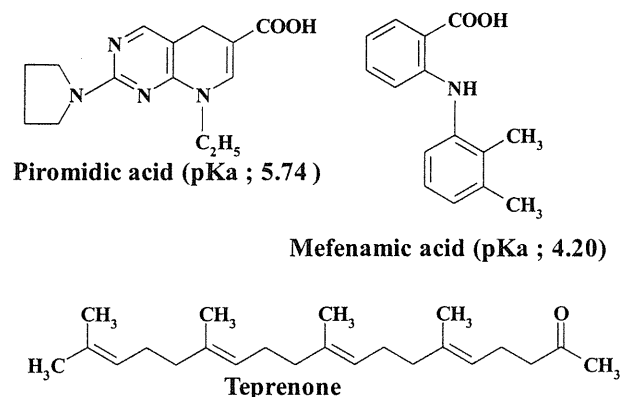


Fig. 1 Molecular Structures of Piromidic Acid, Mefenamic Acid and Teprenone

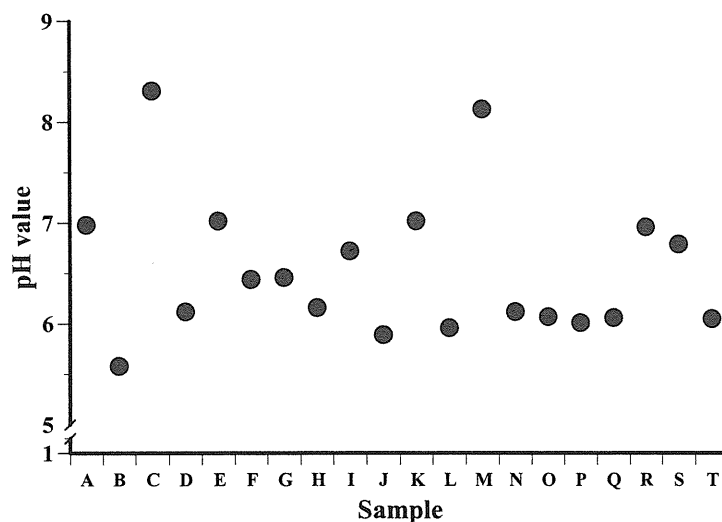


Fig. 2 pH Values of Aqueous Solution (1 w/v%) of Commercial SDS Reagents

Table 1 Test Results of SDS Reagents by the Methods of Prescribed in the Monograph of Sodium Lauryl Sulfate in the Japanese Pharmacopoeia

Specifications	Results		
	SDS-A	SDS-B	SDS-C
Purity			
(1)Alkalinity	Pass	Pass	Pass
(2)Sodium chloride(%)	0.04±0.01	0.15±0.02	0.07±0.02
(3)Sodium sulfate(%)	0.11±0.02	0.08±0.03	0.07±0.01
Combined content of (2) and (3)	0.15%	0.23%	0.14%
(4)Unsulfated alcohols(%)	0.06±0.02	0.22±0.04	0.30±0.04
Water(%)	0.42±0.01	0.88±0.03	0.91±0.05
Total alcohol content(%)	60.69±1.70	67.12±1.88	60.08±0.86

Mean±SD, N=3

全て、日局の規格に適合していた。

SDS-B 及び SDS-C は、SDS-A と比較し、純度試験の未反応アルコール含量が高かった。しかし、純度試験の結果は全て、日局の規格上限値を大きく下回っていた。

3. 溶出試験液の緩衝能に及ぼす SDS 試薬の影響

局外規第三部の溶出試験で使用される各種試験液（水、pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8, pH 8.0）に SDS-A, B, C を溶解し、pH の値に及ぼす影響について検討した（Fig. 3）。水以外の試験液では、5.0 w/v% 溶解した場合でも、pH はほとんど変化せず、各試験液の pH は一定に保たれていた。しかし、水に溶解した場合、SDS 試薬により pH に差が認められた。pH の差は、溶解する SDS 試薬の濃度が高くなる程広がった。5.0 w/v% 溶解した時の pH の値は、7.01 (SDS-A)、5.08 (SDS-B) 及び 9.45 (SDS-C) であった。

4. 水を試験液としたときの溶出挙動への SDS 試薬の影響

ピロミド酸 250 mg 錠、メフェナム酸 250 mg カプセル及びテプレノン 50 mg カプセルについて、水を試験液とし、SDS-A, B, C を使用する溶出試験を実施した。

これらの製剤は全て、水以外を規格試験の試験液とする。水を試験液とする検討の前に、局外規第三部に従い、各製剤の規格試験を実施した。いずれの SDS 試薬を用いた場合でも、全ての製剤が溶出規格に適合しており、SDS 試薬による溶出率の差も特に認められなかった（Table 2）。

しかし、水を試験液として溶出挙動を比較した場合、使用する SDS 試薬により溶出性に違いが認められた（Fig. 4）。ピロミド酸錠では、SDS-C を使用した時の溶出率が若干、高かった。メフェナム酸カプセルの場合、使用する SDS 試薬により、溶出挙動に明確な差違が認められた。テプレノンカプセルでは、SDS-B を使用した時の溶出率が、全般に低かった。

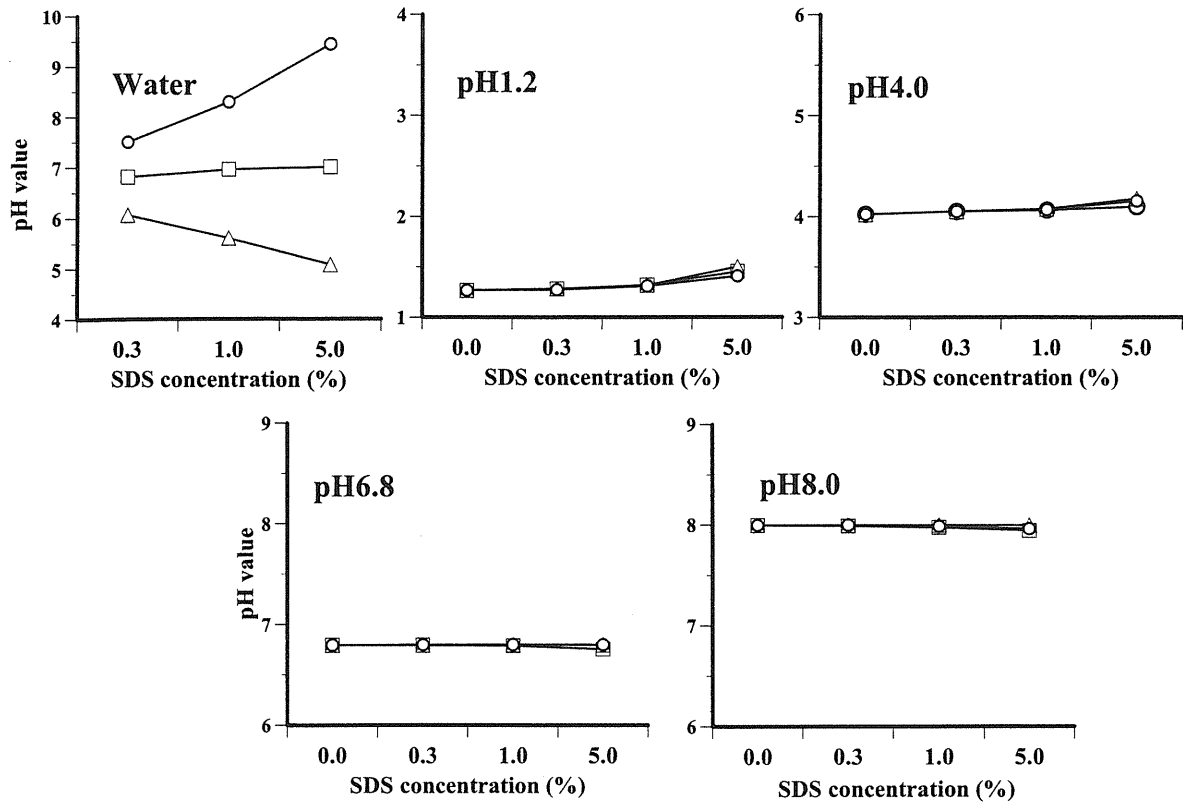


Fig. 3 Effects of SDS Concentration and Difference of SDS Reagent on the pH Buffering Ability of Test Media
□; SDS-A, △; SDS-B, ○; SDS-C

Table 2 Dissolution Test Results of Piromidic Acid Tablet, Mefenamic Acid Capsule and Teprenone Tablet by the Methods Prescribed in the Japanese Pharmaceutical Codex

	Specifications	pH of test medium	Dissolution rate(%)		
			SDS-A	SDS-B	SDS-C
Piromidic acid 250mg tablet	After 45min, not less than 75%	8.0	87.7±1.2	89.0±1.3	87.3±1.1
Mefenamic acid 250mg capsule	After 45min, not less than 75%	6.8	81.8±0.7	82.4±1.6	82.6±1.3
Teprenone 50mg capsule	After 60min, not less than 70%	6.8	94.9±3.8	95.3±4.8	96.1±5.2

Mean±SD, N=6

5. 試験終了時における試験液の pH

水を試験液とする溶出試験が終了した後、試験液の pH を測定し、試験開始時と比較した (Table 3)。

ピロミド酸錠では試験終了時に、全ての試験液の pH が、より酸性側に变化した。特に SDS-C を溶解した試験液では、pH の変化が顕著であった。メフェナム酸カプセルの場合、SDS-B を溶解した試験液以外は、終了時における pH がより酸性側に变化した。一方、テプレノンカプセルでは、SDS-C を溶解した試験液を除き、pH の変化がほとんど認められなかった。

考 察

SDS 試薬を水に溶解した時の pH の違いに着目し、溶出性に及ぼす影響について検討した。溶出挙動に pH 依存性がある 3 種類の製剤について、pH が異なる SDS 試薬を使用し溶出試験を実施したところ、SDS 試薬により溶出性が異なっていた。

著者らは先に、SDS 試薬に混在するアルキル硫酸ナトリウムが溶出挙動に影響を及ぼすことを報告している¹⁾。SDS 試薬に STS (C₁₈) が約 25% 程度混在していた場合、高い溶出率をもたらすことが示された¹⁾。しかし、本研究で用いられた SDS 試薬のアルキル鎖組成は全て、SDS (C₁₂) の割合が 99.8% 以上であり (SDS-A; 99.8%、

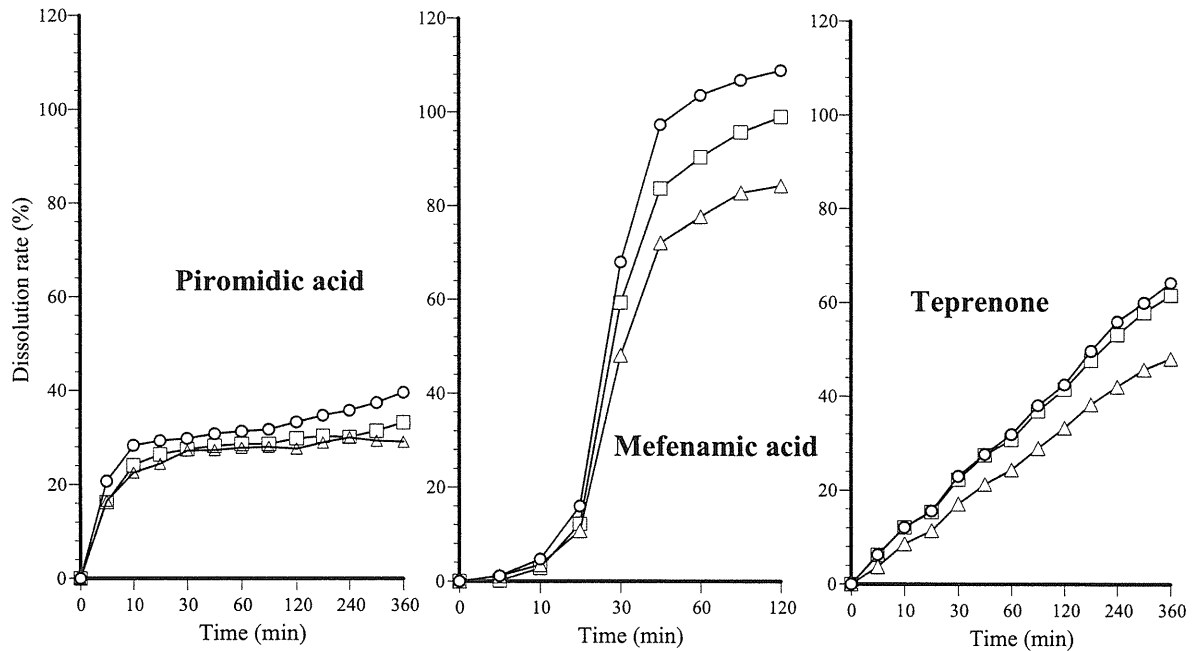


Fig. 4 Effects of difference of SDS Reagents on the Dissolution Behaviors of Piromidic Acid Tablet, Mefenamic Acid Capsule and Teprenone Tablet using Water as the Test Medium
□; SDS-A, △; SDS-B, ○; SDS-C

Table 3 pH Values of Test Media before and after the Dissolution Tests

	SDS	Test	pH value of test medium		
			SDS-A	SDS-B	SDS-C
Piromidic acid 250mg tablet	1.5%	Before	6.83	5.56	8.16
		After	6.56±0.04	5.32±0.02	6.98±0.03
Mefenamic acid 250mg capsule	4.0%	Before	6.98	5.04	9.12
		After	6.45±0.04	5.43±0.01	7.08±0.06
Teprenone 50mg capsule	5.0%	Before	7.00	4.94	9.27
		After	6.85±0.01	4.98±0.03	7.51±0.06

Mean±SD, N=3

SDS-B; 99.9%, SDS-C; 99.8%), 確認された溶出挙動の差は前報と異なる要因によるものである。

試験液の pH を試験前後で比較したところ、試験中における pH の変化が溶出性に影響を及ぼしていることが示唆された。ピロミド酸 250 mg 錠は、局外規第三部に水、pH 1.2, pH 6.8, pH 8.0 の溶出曲線が示されており²⁾, pH 8.0 以外は、速やかな溶出が認められていない。今回、SDS-C を適用した場合の開始時の pH が、速やかに溶出すると考えられる 8.16 であった。しかし、試験中に pH が変化し、終了時には試験液の pH が 6.98 になった。ピロミド酸の酸解離定数 (pKa) は 5.74 である²⁾。pH 6.98 の試験液中では、pH 8.0 と比較し、試験液に溶解しやすいと考えられる解離型の存在比が低くなることが予測され、この結果、SDS-C を適用した場合でも 40% 程度の溶出率に留まった可能性がある。

メフェナム酸 250 mg カプセルは、局外規第三部に水、pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8 の溶出曲線が示されており³⁾, pH が高い試験液程、速やかな溶出が認められている。今回

の検討では、使用する SDS 試薬により溶出挙動に明確な差が認められた。メフェナム酸の pKa は、4.20 である³⁾。Table 3 における結果から、全ての試験液中において、解離型の存在比が非解離型より高いことが推測された。確認された溶出性の相違は、試験液中における解離型の割合の差に起因すると考えられた。

テプレノン 50 mg カプセルは、局外規第三部に水、pH 1.2, pH 4.0, pH 6.8 の溶出曲線が示されており⁴⁾, pH 1.2 及び pH 6.8 の試験液で速やかな溶出が認められている。テプレノンは 18 個の炭素が直鎖状に連なったテルペノイド系の化合物である (Fig. 1), 局外規第三部では、最も難水溶性が高い製剤に適用される、SDS 試薬を 5 w/v % 使用した溶出試験が設定されている。SDS-A を適用した場合の試験前後における pH はいずれも、速やかに溶出すると考えられる 6.8 付近であった。しかし SDS-A を適用した場合でも溶出率は、6 時間で 60% 程度であった。局外規第三部では SDS 試薬を使用する場合、リン酸水素二ナトリウム・クエン酸緩衝液が pH 6.8 の試験液

として用いられる。テプレノンカプセルの場合、速やかな溶出を得るためには、試験液の pH に加え、リン酸水素二ナトリウム、クエン酸等の存在が必要なのかも知れない。

局外規第三部で使用される SDS 試薬には、日局各条「ラウリル硫酸ナトリウム」の規格が適用される。そこで、最も高い pH を示す SDS-C、最も低い pH の SDS-B 及びその中間的な値を示す SDS-A について、日局の規格試験を実施した。その結果、SDS 試薬により若干の差が認められたものの、試験結果は全て、日局の規格に適合していた。

日局の「ラウリル硫酸ナトリウム」には、pH の規格は定められていない。純度試験で 1 w/v% 水溶液の液性が中性付近の一定範囲内にあることが求められているが、今回試験に使用した SDS-A, B, C は全て、規格に適合していた。現行の日局の規格試験だけでは、溶出性に影響を及ぼす SDS 試薬の品質を見極めることは難しい。新たな試験法に関する検討が必要である。

SDS 試薬の pH には、混在する不純物が関与している可能性がある。本研究では、SDS-A, B, C について、日局の純度試験で規定されている⁷⁾ 塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム及び未反応アルコール含量の測定を行った。しかし、溶解時の pH との関係を示唆する結果は得られなかった。SDS は、ヤシ油の脂肪酸を原料とし、ラウリルアルコールを製した後、硫酸エステルとし、水酸化ナトリウムで中和し、生成される⁷⁾。最終過程で、遊離脂肪酸が不純物として混在していた場合、pH に影響を及ぼす可能性がある。すなわち、水酸化ナトリウムによる中和が完全でない場合、pH が酸性になる。一方、中和が十分に行われた場合には、遊離脂肪酸と水酸化ナトリウムが弱酸/強塩基の塩を形成し、加水分解により、pH がアルカリ性になる可能性がある。こうしたことから今後、SDS 試薬中の遊離脂肪酸含量を測定する必要があると考えられる。

今回対象とした製剤はいずれも、水以外の試験液を規格試験で使用する。現在、製薬メーカーで行われている溶出試験による品質管理で、規格試験以外は特に要求され

ていない。しかし、厚生労働省により平成 19 年度に策定されたアクションプログラム⁸⁾ では、4 液性による溶出挙動を製剤の実生産規模において定期的に確認することが求められている。本研究における結果から、水を試験液とした場合、使用する SDS 試薬の pH の違いが溶出挙動に影響を及ぼす可能性があることが明らかとなった。

結 論

市販の SDS 試薬を水に溶解し、pH を測定したところ、試薬の間で大きな差が認められた。溶出試験に使用される水以外の試験液では、5.0 w/v% を添加した場合でも、pH の値はほとんど変化しなかった。

溶出挙動に pH 依存性がある 3 種類の製剤について、水を試験液として、溶出試験を実施したところ、使用する SDS 試薬により溶出性に差が認められた。

謝 辞

本研究は平成 23 年度厚生労働科学研究「後発医薬品の同等性ガイドラインにおける試験条件の最適化に関する研究」の助成を受けたものである。

文 献

- 1) 梶村計志, 川口正美, 四方田千佳子; 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**(9), 100-105 (2011).
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医療用医薬品品質情報集, 平成 16 年 10 月版, p. 108, p. 160.
- 3) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医療用医薬品品質情報集, 平成 19 年 1 月版, p. 125, p. 212.
- 4) 厚生労働省医薬食品局審査管理課, 医療用医薬品品質情報集, 平成 18 年 3 月版, p. 109, p. 161.
- 5) 第 15 改正日本薬局方解説書, 東京, 廣川書店, 2006, P. B-340-1039.
- 6) 厚生省医薬安全局審査管理課長: 医療用医薬品の品質に係る再評価の予試験について, 医薬審第 599 号, 平成 10 年 7 月 15 日.
- 7) 第 15 改正日本薬局方解説書, 東京, 廣川書店, 2006, P. C-4552-4555.
- 8) 厚生労働省: 後発医薬品の安心使用促進アクションプログラム, 平成 19 年 10 月 15 日.

米国 FDA のドキシルビシン封入 PEG リポソームに対する 生物学的同等性試験ガイドライン（案）について

柴田寛子*、#, 四方田千佳子*

（受付：平成 23 年 6 月 30 日，受理：平成 23 年 9 月 8 日）

Draft Guidance for Bioequivalence Study of PEGylated Liposomal Doxorubicin from U. S. FDA

Hiroko SHIBATA*、# and Chikako YOMOTA*

1. はじめに

放出制御や吸収性改善，標的指向化など高度な製剤技術を駆使して開発された機能性製剤が増えており，製剤の多様化が進んでいる。現在のところ，機能性製剤の機能や特性を評価するための公定法や規制当局による推奨方法が無い場合が多く，品質確保のための規格設定や試験方法の設定に関する指針の制定が望まれている。特に，リポソームやマイクロスフェアといった非経口機能性製剤の後発医薬品に関しては，我が国の現行の生物学的同等性試験ガイドラインでは十分な対応は難しく，検討課題となっている。通常の経口固形製剤に対しては推奨される試験方法が詳細に記載されているが，特殊な製剤に関する記述は少なく，特に非経口製剤（局所皮膚適用製剤以外）の生物学的同等性試験を設計するのに必要な情報は十分には提供されていない。そのため，既に後発医薬品が承認されているアルプロスタジルのリピッドマイクロスフェア製剤であるリプル及びパルクスなどは，先発医薬品と効果は同じなのか，品質に問題は無いかなど疑問視する声もあり，何かしらの対応が急務となっている。

米国 FDA 医薬品評価研究センターにある後発医薬品部では，数年前から特殊な製剤の後発医薬品に関して個

別に生物学的同等性試験の推奨事項を公表している¹⁾。生物学的同等性ガイダンスの対象製剤はほとんどが個別に記載すべき要件（バイオウエイパーの可・不可や対象とする被験者の限定条件など）のある経口製剤だが，インプラントや経皮吸収製剤なども対象となっており幅広く網羅されている。特に，後発医薬品はまだ承認されていないものの，マイクロスフェア製剤の Lupron（日本では Leuplin）やリポソーム製剤の Doxil に対するガイダンス^{2,3)}も提示されており，興味深い内容となっている。我が国においても，これら機能性製剤の後発医薬品が開発されることは十分に想定され，機能性製剤に対して適切な生物学的同等性試験のあり方を検討する上で，米国 FDA で講じられている方策を詳細に把握しておく必要がある。既に著者らは，最近の欧米における特殊な製剤の取扱に関して，EMA の生物学的同等性ガイダンス⁴⁾や米国 FDA のリポソーム製剤のドラフトガイダンス⁵⁾，Doxil に対するガイダンス³⁾を概説している⁶⁾。本稿では，上述したドキシルビシン封入 PEG リポソーム（PEGylated liposomal doxorubicin: PLD）である Doxil に対するガイダンス“ドキシルビシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス”³⁾（以下 PLD ドラフトガイダンスと略す）の詳細な内容を紹介する。また，その他，関連するガイダンスや総説論文⁷⁾を参照して，論理的解釈を試みる。

* 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
責任著者 Corresponding author

2. ドキソルビシン封入 PEG リポソーム (PLD) について

PLDは粒子径85~100nmの単層膜リポソームで、リポソーム内水相(膜内ではなく)にドキソルビシン塩酸塩(DOX)が含有されている⁹⁾(Fig.1)。脂質二重膜は水素添加大豆リン脂質、コレステロール、PEG脂質より構成され、PEG鎖はリポソーム表面と内部の両方にあると考えられている。このPEGが形成するリポソーム表面の水和層によって、体内に投与された後にPLDが細網内皮系に取り込まれることを回避し、血中滞留性が延長される⁹⁾。DOXは硫酸アンモニウム勾配を利用した能動的ローディング法によってリポソーム内に封入され、封入効率は90%以上で非常に高い¹⁰⁾。更に、リポソーム内のDOXは硫酸イオンとゲル状の不溶性沈殿を形成しており¹¹⁾、*in vivo*及び*in vitro*において極めて安定にDOXがリポソーム内に保持されることを可能にしてい

る。生体内におけるPLDの作用メカニズムとしては、長く血中に留まることでEPR(Enhanced Permeation and Retention)効果¹²⁾による腫瘍組織への集積が増加し、腫瘍細胞へDOXを放出することによって抗腫瘍効果を発揮すると考えられている¹³⁾。腫瘍組織でどのようにDOXが細胞に取り込まれるのか、詳細なメカニズムは解明されていないが、腫瘍組織の低pHやホスホリパーゼによって徐々に放出されるか、腫瘍関連マクロファージや腫瘍細胞に取り込まれると予想されている¹⁴⁾。したがって、1) DOXの安定封入、2) 血中滞留性の延長、3) EPR効果による腫瘍組織への集積、4) 腫瘍細胞へのDOX放出、がPLDの重要特性と考えられる。これら重要特性に影響すると考えられている要因を列挙すると(Table 1)、PLDの重要特性には製剤側の物理化学的要因が数多く影響することが分かる。PLDドラフトガイダンスは以上の背景に基づいて作成されている。

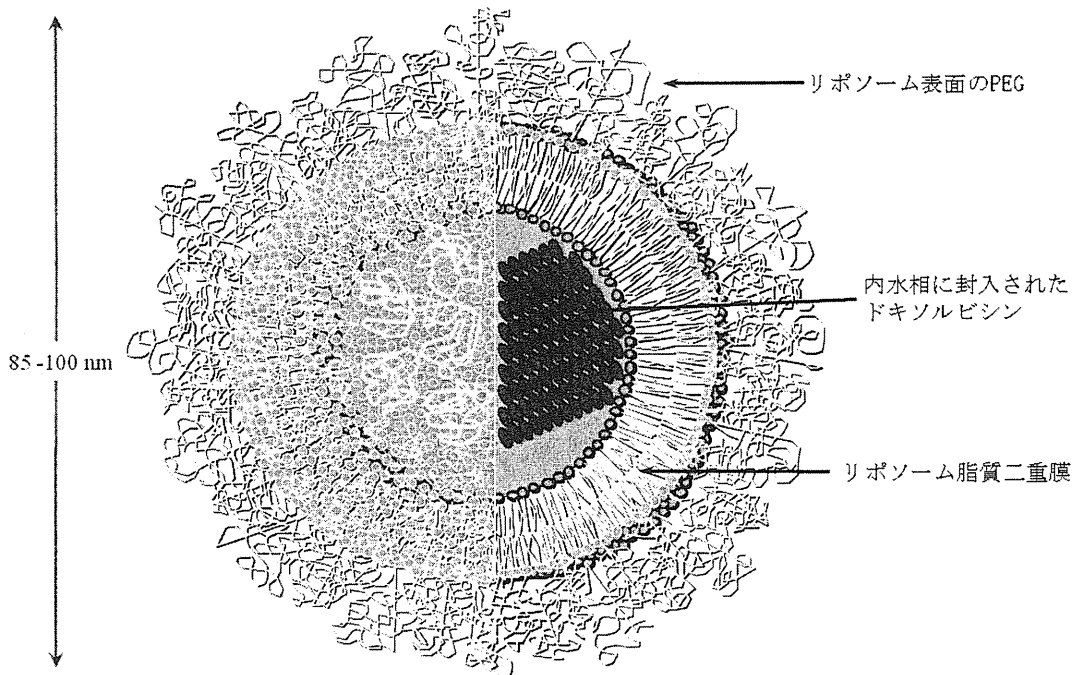


Fig. 1 ドキソルビシン封入 PEG リポソームの構造

Table 1 PLDの重要特性

重要特性	影響要因
ドキソルビシンの安定封入	薬物/脂質濃度比, 内部体積, 硫酸アンモニウム勾配 脂質二重膜の物理的状態
血中滞留性の延長	ドキソルビシンが安定にリポソーム内部に保持され漏出しにくいこと →脂質二重膜の状態, 封入薬物の状態(液体/ゲル), リポソーム内部環境 タンパク結合や細網内皮系による取込みが最小限に抑えられていること →脂質組成, 粒子径, 表面荷電, 脂質密度, 立体安定化
EPR効果による腫瘍組織への集積	粒子径(100nm以下が望ましい), 脂質組成 腫瘍の種類, 腫瘍微小環境
腫瘍細胞へのドキソルビシン放出	腫瘍組織内のpHやホスホリパーゼ, 炎症性細胞, 腫瘍関連マクロファージ その他, 製剤側の要因は薬物漏出への影響要因と同様

3. PLD ドラフトガイダンス

生物学的同等性を証明するために推奨されているのは、基本的に臨床試験 (Table 2) と *in vitro* 試験 (Table 3) の2試験である。その他、溶出試験は適切な方法を設定して12製剤で試験を行い、標準製剤と試験製剤を比較する。注目すべき点は、臨床試験や *in vitro* 試験を行う前に、前提条件が設定されていることである (Table 4)。すなわち、1段階目として、標準製剤と医薬品組成が同じであること、同じ封入方法で製造されていること、更に様々なリポソーム特性が同等であることを証明した後、2段階目として臨床試験 (体内動態解析、AUC 及び Cmax の同等性) や *in vitro* 試験 (粒子径の測定) を行い、*in vivo* 及び *in vitro* において生物学的同等性を証明することが求められている。他の製剤に対する生物学的同等性ガイダンスの中で、前提条件が設定されている製剤は他に無く、極めて特殊な対応と言える。これには2009年に先発品メーカーのJ&Jより提出された、

Table 2 PLD ドラフトガイダンスで推奨されている臨床試験

試験タイプ	絶食
試験計画	単回投与、2剤2期クロスオーバー法
含量	50mg/vial
投与量	50mg/m ²
被験者	白金製剤を主体とした化学療法後の進行性及び再発卵巣ガン患者
測定分析物	遊離ドキシソルピシンとリポソーム封入ドキシソルピシン
90%信頼区間に基づく生物学的同等性	遊離ドキシソルピシンとリポソーム封入ドキシソルピシンのAUCとCmax

Table 3 PLD ドラフトガイダンスで推奨されている *in vitro* 試験

試験タイプ	リポソーム粒子径分布
試験計画	試験製剤と標準製剤の少なくとも3ロットについて <i>in vitro</i> 生物学的同等性試験を行う
測定パラメーター	D ₁₀ , D ₅₀ , D ₉₀
95%信頼区間に基づく生物学的同等性	D ₅₀ 値とスパン=(D ₉₀ -D ₁₀)/D ₅₀ 、又は多分散指数に基づく母集団生物学的同等性 (Population Bioequivalence)

Table 4 PLD ドラフトガイダンスで推奨されている試験を行う際の前提条件

PEG化リポソーム製剤である試験製剤と標準製剤が	
1.	同じ医薬品組成であること
2.	硫酸アンモニウム勾配を利用した能動のリポソームローディング法で製造されていること
3.	Table 5 に示すリポソームとしての特性が同等であること

Doxil の後発医薬品の生物学的同等性試験及び承認申請に関する市民請願¹⁵⁾がある程度影響しているものと推察される。

3.1 前提条件

前提条件には、医薬品組成が同じであること、標準製剤と同様に硫酸アンモニウム勾配を利用した方法で製造されていること、リポソーム特性が同等であることが推奨されている (Table 4)。上述したように、リポソームは脂質組成によって物理化学的性質や体内動態が異なること、封入方法によってDOXの封入状態・安定性が大きく異なることは明白であり、医薬品組成と封入方法が同じであることを求めるのは非常に合理的な提案だと思われる。医薬品組成に関しては、質的・量的に標準製剤と同等でなければならないが、緩衝剤や保存料・抗酸化物については、製剤の安全性や有効性に影響を及ぼさなければ異なってもよいと記載されている。脂質添加物に関しては、天然・合成の区分が同じものを使い、原薬と同じ高いレベルの品質管理が要求されている。また、医薬品組成の同等性と他の同等性試験に対処するため、硫酸アンモニウム勾配法によって調製されることが求められており、その製造方法に関しては、1) 硫酸アンモニウムを含有したリポソームを調製、2) リポソームの微細化、3) 硫酸アンモニウム勾配の形成、4) 薬物ローディング、という4段階の主要な製造工程から成ると記載されている。加えて、Quality by Designを適用して、重要特性や重要工程パラメーターを明らかにすることが提案されている。通常の注射剤と比較して製造工程が格段に多いことが予想されることから、工程パラメーターの変動がリポソーム特性にどれくらい影響するか評価し、標準製剤とその特性を比較することで最適な値を選択するよう推奨されている。

同等であることが求められているリポソーム特性と、その特性を設定した目的・概要、更に論文等を参考に各特性を評価・測定する方法例をTable 5にまとめた。これら9項目は、2002年にFDAから出されたリポソーム製剤のドラフトガイダンス⁵⁾で推奨された“品質管理に重要な物理化学的特性”と類似している。Table 6にその物理化学的特性を列挙し、関連企業10社から寄せられたパブリックコメントの抜粋も記載した¹⁶⁾。Table 5と6を比較すると、浸透圧特性と光散乱強度などは省かれているが、PLD特有の特性として、内部のイオン環境や薬物封入状態、リポソーム表面のPEGが追加されている。また、リポソームの組成と粒子径分布は前提条件の1及び *in vitro* 試験と内容が重複しており、PLDを評価する上で重要な特性であることが分かる (粒子径分布

Table 5 前提条件に記載された同等であることが求められているリポソーム特性

特性	目的・概要	評価・測定方法例
リポソームの組成	脂質組成、遊離薬物及び封入薬物、内部及び総硫酸とアンモニウム濃度、ヒスチジン濃度、シヨ糖濃度といったリポソームの組成を測定する。薬物/脂質含有比及び薬物封入率をリポソーム組成値から計算する。	PEG 脂質：ピクリン酸試薬発色法 3種類の脂質含量：蒸発光散乱検出器-HPLC 分析 内部硫酸イオン濃度：シリンジろ過とイオンクロマトグラフィーによるリポソーム外の遊離イオン濃度と総イオン濃度の測定から算出 内部アンモニウムイオン濃度：硫酸イオンと同様に、遊離イオン濃度と総イオン濃度から算出
薬物封入状態	DOXIL 中のドキシソルピシンは、大部分がリポソーム内でドキシソルピシン硫酸塩の状態に沈殿形成している。後発製剤はリポソーム内で同様のドキシソルピシンの沈殿を形成していなければならない。	吸光度変化 (470/550nm) や蛍光測定 X線回折 低温透過電子顕微鏡法
内部環境 (容積, pH, 硫酸及びアンモニウムイオン濃度)	容積や pH, 硫酸及びアンモニウム濃度といったリポソームの内部環境がドキシソルピシンの沈殿した状態を保持している。構成成分の総量と遊離濃度からリポソーム内部の濃度を推定してもよい。	各成分の総濃度と遊離濃度から内部濃度を算出
リポソームの形態・ラメラの枚数	薬物封入、薬物保持、更には薬物放出率はラメラ構造の程度に影響されやすいため、リポソームの形態やラメラ構造は測定すべきである。	透過電子顕微鏡法 ³¹ P-NMR X線小角散乱法 低温電子顕微鏡法 原子間力顕微鏡法
脂質二重膜の相転移	脂質二重膜の相転移の同等性は、脂質二重膜の流動性と均一性の証明に有効である。脂質添加物やリポソームの相転移プロファイルは標準製剤と類似であること。	示差走査熱量測定法
リポソームの粒子径分布	粒子径分布は受動ターゲティングの同等性を保証する上で重要である。標準製剤と試験製剤の粒径を比較するために適切な粒子径測定法を選択すべきである。測定するバイアル数は少なくとも各バッチ 10 バイアル、総数 30 バイアル以上で行うべきである。	動的光散乱法 (DLS) レーザー回折 動的光散乱法と流動場分離法 静的光散乱法と流動場分離法 サイズ排除クロマトグラフィー DLS とサイズ排除クロマトグラフィー X線小角散乱法 フローサイトメトリー 低温電子トモグラフィー
リポソーム表面の PEG	リポソーム表面を methoxypolyethylene glycol で覆うことで、単核食細胞系による食食から回避され、血中滞留時間が延長する。PEG 層の厚さは熱力学的に制限され、数ナノメートル程度であると推測されている。PEG 層の厚さを測定すべきである。	表面電位測定によるリポソームの表面固定水和層の評価 NMR 分光法による PEG 脂質の定量と局在解析
表面電位・電荷	表面電荷はクリアランス、組織分布、及び細胞取込みに影響を及ぼす。リポソームの表面電荷を測定すべきである。	電気泳動法
In vitro 漏出率	脂質二重膜や封入されたドキシソルピシンの物理的状态を明確にするための in vitro 薬物漏出試験は、様々な生理条件下において制御されない薬物漏出が無いこと、ガン細胞への薬物送達と同程度であることを裏付けるために実施する。試験条件例を Table 7 に示す。	放出試験液 (2 M 塩化アンモニウム, 0.2 M ヒスチジン, pH 6.5) と製剤を 3 : 1(v/v) で混合し、52°C で 3 時間インキュベート後、放出率を測定

の評価に関しては、“3.3 in vitro 試験”でコメントする)。その他の特性も重要と思われるが、Table 6 のコメントを見ると否定的な意見も見受けられる。例えば、表面電位・電荷は、電気泳動法によるゼータ電位の測定が一般的であるが、イオン強度に影響されやすい上、PLD のような表面荷電の弱いリポソームでは再現性が悪い；脂質

二重膜の相転移は主に DSC で測定されるが、特にコレステロール含量が多いリポソームの場合は明確な相転移は観察されない可能性が高く、測定意義は限られる；薬物封入状態やリポソームの形態・ラメラの枚数は、電子顕微鏡分析で評価可能であるが、観察できる視野に限りがある上、サンプル調製操作によってアーチファクトが

Table 6 リポソーム製剤のドラフトガイドランスで推奨された品質管理に重要な物理化学的性質

特性	企業からのパブリックコメント
リポソームの形態・ラメラ	電子顕微鏡分析では、観察できる視野に限りがある上、サンプル調製操作によってアーチファクトが生じやすい。現在のところ、適切にラメラ構造を量的に測定できる方法はなく、品質評価において信頼性のあるパラメーターではない。
正味荷電	正味荷電を直接測定することはできない。ゼータ電位と表面電荷密度との関連性を解釈するのは難しい。ゼータ電位の測定はイオン強度に大きく影響し、特に表面荷電の弱いリポソームでは、再現性が得られないうえに、血中では血漿タンパクと相互作用してアニオン性になる。品質評価において、測定する意義があまりない。
内包体積	重要な特性ではなく、信頼性も実用性もないパラメーターである。脂溶性薬物の場合は関連性がなく、重要な特性ではない。RIを使うことで封入体積を見積もることは技術的に可能であるが、医薬品ロットの封入体積を評価できる方法は無い。粒子径や薬物内封率から予測される内包体積よりも有益な情報は得られない。
粒子径(平均・分布)	平均粒子径は 1 μ m以下の粒子に対してはDLSによって、大きな粒子はレーザー回折によって測定される。両方の方法から粒子分布プロファイルの情報は得られるが、再現性はあまり良くない。流動場分離やキャピラリー流体力学的分画といった方法が研究段階にあり、リポソームの特性解析に有効な方法が提供されると期待される。しかし、今のところ、確実かつ再現性良く粒子径分布を測定できる品質管理の方法は構築されていない。
相転移温度	相転移温度はDSCによって再現性良く測定できるが、複合脂質混合物の場合、相転移温度は複雑で解釈が難しい。薬物が脂質二重膜と相互作用している場合、更に複雑になる。多くのリポソームに対して測定意義が限られている。
<i>in vitro</i> 薬物放出性	ロット間変動を見るのに有用であるが、識別性と再現性のある方法を設定するのは難しい。リポソームによっては、血清や生理的緩衝液中で加温しても、殆ど薬物が放出されない。更に <i>in vitro</i> 放出試験と <i>in vivo</i> の挙動との相関性を示すのは困難である。
分光分析データ	分光分析データから決定される物理化学的性質を具体的に示して欲しい。さらなる定義が必要である。
浸透圧特性	通常の浸透圧特性を意味しているのか、他の目的があるのか明確にする必要がある。リポソーム製剤の浸透圧特性ならば、関係する浸透圧環境(点滴溶液や血漿)における粒子径や放出性の評価に焦点を合わせるべきである。
光散乱指数	この測定は濁度の変化を示し、安定性試験中に時間とともに製剤がどのくらい変化するか評価するのに有効である。濁度の変化を正確に解釈するのは難しいが、長期保存中のリポソーム製剤において凝集・結晶化が起きていることを示す。日常的な検査に加えられるかもしれないし、リポソーム濃度と対応する場合、ロット間の一貫性を評価するのに有用かもしれない。

生じやすく、量的な評価には不向きな手法である；などが挙げられる。これらのコメントは、規格試験に設定した場合に想定される問題点が指摘されており、必ずしも同等性を証明する際の問題点とは一致しないが、製薬企業側がこれらの特性をどう考えているかが分かり参考になる。

推奨されている特性の中には、広く認められた定量・評価方法が無い特性も含まれ、特に *in vitro* 漏出率の評

価方法は十分に検討がされているとは言い難い。そのため *in vitro* 漏出率に関しては、PLD ドラフトガイドランスの中に試験条件例が提示されている (Table 7)。全部で4つ条件が例示されており、生理的環境に近い条件と物理的刺激を与えて薬物放出を促す条件の二つに分類できる。生理的環境に近いヒト血漿中や緩衝液中 37°Cでは明確な薬物漏出は観察されないものと予想され、どちらかと言うと PLD の安定性を評価する条件になっている。

Table 7 PLD ドラフトガイドランスに記載されている *in vitro* 薬物漏出試験条件例

<i>in vitro</i> 薬物漏出条件	試験の目的	条件設定の理由
50%ヒト血漿中で 37°C 24 時間	血液循環系におけるリポソームの安定性評価	血漿は最も血中の条件に近い
pH 5.5, 6.5, 7.5 緩衝液中で 37°C 24 時間	正常組織、ガン細胞周辺、ガン細胞内部の状態を模倣する	正常組織：pH 7.3；ガン組織：pH 6.6；ガン細胞内部（エンドソームとリソソーム）：pH 5-6（ガン細胞のエンドソームとリソソームはリポソームの取込みと薬物放出に関与していると考えられる）
pH 6.5 緩衝液中、温度範囲(43, 47, 52, 57°C)で 12 時間、あるいは完全に放出するまで	脂質二重膜の完全性評価	脂質の相転移温度(T _m)は脂質二重膜の強度、硬さ、化学組成で決定される。T _m 上下における放出の温度依存性は、脂質特性の小さな差を反映する
37°Cにおける低周波数超音波(20kHz)照射 2 時間、あるいは完全に放出するまで	リポソーム中に封入された薬物の状態を評価	低周波数超音波は一過性に穴のような欠陥を導入することで脂質二重膜を崩壊させ、リポソーム内部のゲルの溶解によって制御されたドキシソルピシン放出を促す

一方、超音波照射や加温（相転移温度前後）といった物理的刺激を与える条件では、「完全に放出するまで」と記載されていることから分かるように、明確な薬物漏出が観察されることを想定している。このように複数の条件が提示されているのは、前述したように *in vivo* における PLD からの薬物漏出には種々の要因が関与しており、1 条件だけで評価するのは不適切だと考えられているためである。この考え方は間違っていないと思われるが、実際に例示条件下の試験を実施するにあたり、リポソームと遊離薬物の分離方法や使用する装置、緩衝液の種類、製剤の希釈倍率など、試験製剤を評価する前に検討すべき点が多い。その他、リポソーム表面の PEG 層の厚さも、PLD の製剤機能を評価する上で非常に重要な特性の一つであるが、その測定方法に関しては報告が少なく、一般的な測定方法が無いのが現状である。また、後から述べる臨床試験や *in vitro* 試験のような信頼区間法による同等性解析までは求められないようであるが、各リポソーム特性を同等と見なす判断基準が設定されていない。各特性の測定方法や測定意義、判定基準の設定など、議論を重ねて検討する必要があると思われる。

3.2 臨床試験

臨床試験で特徴的なのは、卵巣ガン患者を対象として、*in vivo* 安定性を評価するために、血中の遊離 DOX とリポソームに封入された DOX の両方を測定することが求められている点である (Table 2)。PLD を静脈内投与した後、DOX はリポソームに封入された状態 A、リポソームには封入されていないが血漿タンパク質と結合した状態 B、遊離状態 C の 3 つの状態が存在している¹⁷⁾。PLD の血中からのクリアランスは、腫瘍組織や細網内皮系による A の取り込み、あるいは B や C が更に代謝・排泄されることによる¹⁷⁾。以上のことから、PLD の PK を理解するには、遊離 DOX (リポソームから遊離した DOX : B+C) とリポソーム封入 DOX (A) の両方を測定する必要があると考えられている。2002 年に FDA が提示したリポソーム製剤に関するガイダンス⁹⁾ の 1 節, “III. ヒト薬物動態と生物学的利用能 B. *in vivo* 完全性 (安定性) の考察” において、「遊離薬物と封入薬物を分離できるならば *in vivo* における安定性を測定すべき」と記載されており、PLD ドラフトガイダンスにも反映されている。「ただし *in vivo* でリポソームが『安定』であると考えられる場合は総薬物濃度で体内動態と生物学的利用能を評価してもよい」と記されており、この『安定』とする判断基準は「循環血中において薬物の大部分がリポソームに封入されていること」「遊離薬物とリポソーム封入薬物の割合が一定のままであること」と記載されて

いる。この記述の解釈としては、両方の条件を満たす場合のみ『安定』と判断されるようである (そもそもこの『安定』とする判断基準を疑問視する意見がいくつか寄せられている)。PLD の体内動態を解析した報告によると、血中総 DOX 濃度とリポソーム封入 DOX 濃度にはほとんど差が無く、遊離 DOX 濃度はリポソーム封入 DOX 濃度のおよそ 1000 分の 1 程度と、血中において大部分がリポソームに封入されているが、遊離 DOX とリポソーム封入 DOX の割合は一定とはならない。したがって、PLD は『安定』とは判断されないため、遊離 DOX とリポソーム封入 DOX の両方を測定することが求められているようである⁷⁾。これまでに遊離 DOX とリポソーム封入 DOX を分離して測定したデータが報告されていること¹⁸⁾、最近では前処理無しで測定できるような分析手法も開発されつつあることから¹⁹⁾、PLD の場合はガイダンスの要求に従うことは可能と考えられる。しかしながら、封入薬物や脂質組成などリポソーム組成が標準製剤と全く同一で、粒子径も同等、かつ同じ薬物封入方法で製造された試験製剤に対して、*in vivo* における生物学的同等性を評価する際に、遊離と封入薬物を分離して測定する意義がどれほどあるのか、標準製剤と総 DOX 濃度のパラメーターは同等なのに遊離薬物濃度が同等にならない場合が想定され得るのか、更なる情報の蓄積と検討が必要と思われる。

PLD ドラフトガイダンスの臨床試験で要求されているのは、あくまで薬物動態パラメーターの同等性であり、薬力学的な同等性は求められていない。しかし、J&J の市民請願や論文において、PLD の場合は通常の薬物動態パラメーターによる生物学的同等性試験では不適切であると主張されている。J&J の検討では、脂質組成や薬物封入方法、粒子径の異なる PLD をいくつか調製し、そのうちマウスにおける血中薬物動態パラメーター AUC や Cmax が同等の 4 製剤について抗腫瘍活性試験が行われている。更に、標準製剤よりも抗腫瘍活性の高かった製剤と標準製剤、標準製剤と同じ脂質組成・封入方法で粒子径の異なる 2 製剤、これら 4 製剤についてサルを使った毒性試験が実施されている。その結果から、体内動態パラメーターが同等の製剤であっても、抗腫瘍活性や毒性に違いが生じる可能性が指摘されている^{14, 20)}。また、中国のグループが、粒子径の異なる 2 種類の PLD について薬物動態や抗腫瘍効果・毒性を評価し、体内動態パラメーターを使った有効性や安全性の予測が可能かどうか検討しており、血漿や腫瘍中の薬物濃度からは効果や毒性を予測することは困難で、正常・腫瘍組織中の遊離薬物及びリポソーム封入薬物濃度を分離して時間経過に従って測定することができれば、抗腫瘍効果や毒性

を予測することが可能かもしれないと結論付けている²¹⁾。これらの報告は、AUCやCmaxが同等でも、抗腫瘍効果や毒性が異なる場合があることを示しているが、PLDドラフトガイダンスが要求している前提条件を満たした製剤で検討されていないので、ガイダンスの主旨を全面的に否定するには至っていない。しかし、このような報告を受けて、PLDドラフトガイダンスのようにリポソーム特性など製剤的な同等性と*in vivo*生物学的同等性を証明するアプローチの他、製剤上の同等性は求めずに非臨床及び臨床試験で、それぞれ動物を使ったPK/PD試験及びヒト生物学的同等性試験を実施して同等性を証明するアプローチを提案している研究者もあり²²⁾、後者のアプローチも一考の価値はあるかもしれない。

3.3 *in vitro* 試験

測定するのは粒子径分布で、D10、D50、D90（10%、50%、90%の累積分布に一致している粒子径）の測定が要求されている（Table 3）。*in vitro*試験では、判定基準が記載されていないものの95%信頼区間法で評価することが求められている。前提条件の粒子径分布の項目では、最も適した方法で少なくとも各バッチ10バイアル、総数30バイアル以上で評価し、統計に基づく同等性試験は「*in vitro*試験」を参照すること、と記載されている。判定基準は恐らく $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ と思われるが、肝心の測定方法に関しては何も記載されておらず、測定方法の選定が必要である。粒子径の測定方法でUSPやJPに採用されているのは、Table 5にも列挙したレーザー回折法だけである。USP34は<429>“Light Diffraction Measurement of Particle Size”が記載され、JP16では参考情報に“レーザー回折による粒子径測定法”が載っている。USPとほぼ同じ内容となっており、測定結果は体積基準積算密度分布で記録されることが多く、汎用される指標はガイダンスと同じx10(d10)、x50(d50)、x90(d90)である。レーザー回折法の測定範囲は、一般的には0.1 μm ~3mmであるが、最新の装置では測定範囲が数nmまで広がっており、平均粒子径が85~100nmのPLDもレーザー回折によって測定可能であると思われる。その他、Table 5に示すように数多くの手法が検討されているが、リポソームの粒子径測定で最も汎用されている方法は動的光散乱法（DLS）である。概ねDLSによる粒子径測定でも問題は無いと思われるが、DLSは大きな粒子の混入に影響されやすいことが知られている²³⁾。そこで、企業からのパブリックコメントにあるように、流動場分離などを使った技術の確立が期待されており、DLSと分画手法（流動場分離やサイズクロマトグ

ラフィーなど）を組み合わせるほうが良いという意見もある¹³⁾。また、DLSでもレーザー回折でも多重散乱が影響するほか、用いる装置や解析方法によって粒子径・粒子径分布が異なる場合がある。したがって、粒子径分布の同等性を証明するには、いくつかの手法を組み合わせることで評価するのが妥当と思われる。

3.4 溶出試験

後発医薬品部では各製剤に対する溶出試験条件のデータベース化が進められている。PLDガイダンスには、具体的な試験方法はそのデータベースを参照するよう記載されているが、「*in vitro*放出特性を評価する方法を構築」と記載されているだけで、今のところ具体的な試験方法は掲載されていない。参考までに、特殊な注射剤に対して推奨されている溶出試験条件をTable 8にまとめた。例えば、Lupronなどマイクロスフェア製剤の溶出試験には、USP装置IVのフロースルーセル法溶出試験装置を使って溶出試験法を構築するか、妥当な場合はパドル法など他の適当な装置を使うこと、と記載されている。日本ではフロースルーセル法を規格試験に設定した製剤は無く、懸濁製剤の2製剤に対してフロースルーセル法を使った試験条件が具体的に記載されており大変興味深い。PLDの試験方法に関しても具体的なコメントの掲載が期待される。

4. おわりに

米国FDAのPLDドラフトガイダンスは、日本国内を始め、海外でも様々な講演や総説で取り上げられている。それだけDoxilの後発品開発や米国FDAの特殊な製剤に対するガイダンスの提示に関心が寄せられているということであろう。リポソーム製剤は、リポソーム化する目的、脂質組成や封入薬物、表面修飾の有無によって評価すべきリポソーム特性が大きく異なる。したがって、PLDドラフトガイダンスのように、製剤ごと個別に推奨事項を提示するのは最も合理的な方策の一つだと考えられる。しかし、上述してきたとおり、臨床試験の遊離薬物と封入薬物を分離して測定する意義、生物学的同等性試験だけでなく薬力学的試験も必要かどうか、更にはリポソーム特性のそれぞれの測定方法や同等性をいかにして証明すれば良いかなど、詳細な検討を要する点が多い。一方で、EMAから2010年に出された生物学的同等性試験に関するガイダンスでは⁹⁾、詳細な試験方法は提示されていないが、Appendix IIにおいて特殊な製剤への対応が記述されている。我が国においても、特殊な製剤に対して、個別にガイダンスを提示するか、現行の

Table 8 米国 FDA の溶出試験データベースに記載されている非経口製剤に対する溶出試験条件（一部抜粋）

Active Ingredient	Dosage Form	Route*1	Product Name	USP apparatus	Speed	Medium	Volume	Recommended Sampling Times
Azacitidine	Injectable	IV	Vidaza	—	—	Develop a dissolution method	—	—
Bethamethasone acetate, Betamethasone sodium phosphate	Suspension	IM	Celestone soluspan	IV(Flow-Through Cell)	8mL/min	0.05% SLS, pH 3.0 or *2	—	5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, and 360 minutes
Doxorubicin Hydrochloride	Liposome	IV	Doxil	—	—	Develop a method to characterize in vitro release	—	—
Leuprolide Acetate	Microsphere	IM	Lupron Depot	—	—	*2	—	—
Leuprolide Acetate	Implant	SC	Viadur	—	—	—	—	—
Methylprednisolone Acetate	Suspension	IM etc.	Depo-Medrol	IV(Flow-Through Cell Open-System)	—	0.5 % SDS	—	15, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes
Naltrexone	Microsphere	IM	Vivitrol	—	—	—	—	—
Octreotide Acetate	Microsphere	SC	Sandostatin LAR	—	—	*2	—	—
Phytonadione	Injectable	IV	Vitamin K1	—	—	—	—	—
Risperidone	Microsphere	IM	Risperdal Consta	—	—	*2	—	—
Triamcinolone Acetonide	Injectable	IL	Kenalog-10	—	—	*2	—	—
Triptorelin Pamoate	Microsphere	IM	Trelstar Depot	II (Paddle)	200	Water-Methanol (95:5); Reconstitute vial in 2 mL Water for Injection, add to 500 mL medium at 37°C	500 mL	1, 6, 12, 24, 48 and 72 hours
Goserelin Acetate	Implant	SC	Zoladex	Prior to sampling, the jar is removed from incubation and mechanically swirled with digital orbital shaker	Swirl orbit of 50 mm at 205 rpm for 6seconds	Each implant should be incubated in 50 mL of phosphate buffered saline, pH 7.4, at 39°C (warmed overnight before the implants are added), in a 120-mL Wheaton jar.	50 mL	3, 14, 35, 56 and 84 days (10.8 mg strength); 7, 14, 17, 21 and 28 days (3.6 mg strength)

*1 IV : Intravenous, IM : Intramuscular, SC : Subcutaneous, IL : Intralesional administration

*2 Develop a dissolution method using USP IV (Flow-Through Cell), and, if applicable, Apparatus II (Paddle) or any other appropriate method, for comparative evaluation by the Agency

「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」に追記をするか、議論を重ねて検討していく必要がある。

謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業：後発医薬品の同等性ガイドラインにおける試験条件の最適化に関する研究）により行われたもので、ここに感謝の意を記す。

文 献

- 1) Bioequivalence Recommendations for Specific Products. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072872.pdf>
- 2) Draft Guidance on Leuprolide Acetate. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM212614.pdf>
- 3) Draft Guidance on Doxorubicin Hydrochloride. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM199635.pdf>
- 4) Guideline on the investigation of bioequivalence. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf
- 5) Guidance for Industry: Liposome Drug Products, Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070570.pdf>
- 6) 四方田千佳子, 柴田寛子: *PHARMA TEC JAPAN*, **26**, 1861-1867 (2010).
- 7) Jiang, W., Lionberger, R., Yu, L. X.: *Bioanalysis*, **3**, 333-344 (2011).
- 8) Martin, F.: "Product evaluation and influence of formulation on pharmaceutical properties and pharmacology". Advisory Committee for Pharmaceutical Science Presentation (2001). www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/01/slides/3763s2_08_martin.ppt.
- 9) Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A., Barenholz, Y.: *Cancer Res.*, **54**, 987-992 (1994).
- 10) Haran, G., Cohen, R., Bar, L.K., Barenholz, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1151**, 201-215 (1993).
- 11) Lasic, D. D., Frederik, P. M., Stuart, M. C. A., Barenholz, Y. and Melntosh, T. J.: *FEBS Lett.*, **312**, 255-258 (1992).
- 12) Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. and Hori, K.: *J. Control. Release*, **65**(1-2), 271-284 (2000).
- 13) Gabizon, A.A., Shmeeda, H., Zalipsky, S.: *J. Liposome Res.*, **16**(3), 175-183 (2006).
- 14) Banciu, M., Schifflers, R. M., Storm, G.: *Pharm. Res.*, **25**, 1948-1955 (2008).
- 15) Citizen Petition FDA-2009-P-0216. Ortho-Biotech Products, L. P. 2009. www.regulations.gov/search/Regs/home.html#documentDetail?R=09000064809878d9
- 16) Re: Docket No. 02D-0337 www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Oct02/103002/02d-0337-c000001-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/110102/02d-0337-c000002-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/111402/02d-0337-c000003-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/111502/02d-0337-c000004-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/111802/02d-0337-c000005-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/112002/02d-0337-c000006-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/112002/02d-0337-c000007-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/112102/02d-0337-c000008-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/02/Nov02/112202/02d-0337-c000009-01-vol1.pdf; www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/03/May03/050103/02d-0337-c000010-01-vol1.pdf
- 17) Gabizon, A., Shiota, R., Parahadjopoulos, D.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 1484-1488 (1989).
- 18) Druckmann, S., Gabizon, A., Barenholz, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **980**, 381-384 (1989).
- 19) Kim, H. S., Wainer, I. W.: *Int. J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 372-376 (2010).
- 20) Mamidi, R. N., Weng, S., Stellar, S., Wang, C., Yu, N., Huang, T., Tonelli, A. P., Kelley, M. F., Angiuoli, A., Fung, M. C.: *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **66**(6), 1173-1184 (2010).
- 21) Cui, J., Li, C., Guo, W., Li, Y., Wang, C., Zhang, L., Zhang, L., Hao, Y., Wang, Y.: *J. Control. Release*, **118**(2), 204-215 (2007).
- 22) Blume, H. H., EUFEPS BABP Network Open Discussion Forum "Revision of BE requirements for Modified Release Products" (2011).
- 23) Hupfeld, S., Holsaeter, A. M., Skar, M., Frantzen, C. B., Brandl, M.: *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **6**(9-10), 3025-3031 (2006).