

201235004B

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

平成22度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 四方田 千佳子

平成25 (2013年)3月

目 次

I. 総合研究報告

- 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
四方田千佳子 ----- 1

II. 分担総合研究報告書

1. 難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶化能に関する研究
岸本清子 ----- 13
2. 溶出試験に使用される界面活性剤の品質に関する研究
梶村計志 ----- 24
3. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究
柴田寛子 ----- 41
4. リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討
斎藤博幸 ----- 49
5. 経皮吸収型製剤等の放出試験法、坐剤の放出試験法の設定に関する研究
並びに経口固形製剤の溶出試験におけるマウント形成に関わる基礎検討
四方田千佳子 ----- 59

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
平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書
研究代表者 四方田千佳子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第一室長

研究要旨

生物学的同等性試験はその臨床効果の同等性を保証しうる試験として大きな役割を果たしているが、平成9年に発出後すでに12年を経ており、その間の様々な経験を通して、修正すべき点が認められるようになってきていた。そこで、生物学的同等性試験の適切な改訂を目指して議論を進め、溶出試験部分を中心に、2012年に部分改訂が行われた。

本研究の試験法の検討では、まず、経口固形製剤の生物学的同等性ガイドラインの改定を進めるに当たって検討すべきと思われた課題から、新たに溶出試験に用いることが認められた界面活性剤の使用時の問題点の検討、マウント形成時に適用が認められた回転バスケット法の試験条件の評価などを試みた。

また、非経口製剤に関しては、現行の生物学的同等性ガイドライン中ではあまり多くの記載がされておらず、種々の製剤が開発される中での対応が必要となってくると思われる。そこで、いくつかの製剤について問題点を明らかにするための検討を開始した。脂質分散系製剤から、リポソーム製剤に関するFDAガイドラインやEMAのリフレクションペーパーの詳細な検討、リポソーム製剤の放出試験に関するFDAの内包薬物の放出試験条件の検討、表面電位測定によるリポソーム表面固定水和層の厚さの評価、PEGリン脂質のリポソーム膜内外層間の分布や表面被覆率、リポソーム膜表面でのPEG鎖コンフォメーションなどに関する蛍光分光学的評価、脂質二重膜の相転移挙動の評価法、マイクロエマルジョン製剤の評価方法の検討を行った。さらに、分散系製剤としてマイクロスフェア製剤を取り上げ、試験液組成等の薬物放出挙動に与える影響を評価した。また、経皮吸収型製剤、局所皮膚適用製剤の放出試験法につき検討を行い、日局一般試験法原案を作成した。座薬に関しては、モデル製剤の放出性と製剤の熱的性質との関係を検討し、製剤の融点が放出性とある程度の相関があることを示した。

また、2012年2月に改訂された生物学的同等性ガイドラインの変更点を明らかにすると共に、国際的流通を目指して、Q&Aを含むすべての文書に対する英文翻訳版の作成を行った。

以上の研究結果は、それぞれの課題に対する有用な情報の蓄積を可能として、今後のガイドラインの改定に役立つものである。

キーワード： 生物学的同等性ガイドライン、リポソーム製剤、経皮吸収型製剤、マイクロスフェア、坐剤

分担研究者

齋藤博幸 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
岸本清子 東京都健康安全研究センター 医薬品部医薬品研究科
梶村計志 大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部 食品科学課（元薬事指導課）
柴田寛子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

A. 研究目的

我が国の後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインは、昭和 55 年 5 月に「生物学的同等性に関する試験基準」が出され、その後、平成 9 年に「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインについて」が出され、数回のマイナーチェンジを経て、現在のガイドラインとなっている。このガイドラインに続いて、含量が異なる経口固形製剤の生物学的同等性試験ガイドライン、経口固形製剤の処方変更の生物学的同等性試験ガイドライン、剤形が異なる製剤の追加

のための生物学的同等性試験ガイドラインが出されており、これらのガイドラインは後発医薬品に限らず、新薬における変更管理にも重要な役割を果たしてきた。

我が国の生物学的同等性ガイドラインでは、溶出試験を生物学的非同等性を防ぐための有効な試験法としており、溶出試験の試験条件に関して詳細な記述があり、試験条件に対する縛りが強くなっている傾向があった。平成9年以來の生物学的同等性試験の経験を基に、溶出試験の試験実施数の軽減、使用できる界面活性剤の制限の撤廃などの試験条件の緩和が望ましいという方向で改定作業が進められ、平成24年2月に改訂された。本研究では、改正ガイドラインに関しては、変更点をまとめると共に、海外への発信を目指して、各ガイドラインの英文版を作成した。また、これらの試験条件の緩和に関して、試験条件の変更が溶出試験結果に与える影響に関して引き続き検討した。

さらに、近年の種々の機能を付与した製剤の開発に伴う、評価方法の多様化に対応するため、リポソーム製剤、マクロスフィア製剤に関する基礎的検討を進めた。

経皮吸収製剤等における放出試験法を日局収載案として提案し、坐剤の放出試験法に関しては、DSCによる熱的性質や規格試験法に設定されている溶融温度試験の有用性を評価した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

特になし。

B-1. 難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶化能に関する研究

モデル製剤として、シロスタゾール錠、プラシカスト水和物錠、ソファルコンの錠を用い、界面活性剤としてポリソルベート80(PS)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、タウロコール酸ナトリウム(TC)を用いて、溶出試験を試みた。

B-2. 溶出試験に使用されるドデシル硫酸ナトリウム及びポリソルベート80の品質に関する研究

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を試験製剤とし、市販されている3種類のSDSを用いて、溶出試験結果を比較検討し、13種類の市販SDSの特性を解

析した。SDS試薬のpHの溶出挙動に対する影響について、溶出挙動にpH依存性が認められるピロミド酸錠、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検討した。

ポリソルベート80(PS80)の10種類の市販試薬について、理化学的な品質を評価し、ナブメトン酸400mg錠、リボフラビン酪酸40mg錠及びアリルエストレノール25mg錠を試験製剤として、溶出試験に及ぼす影響を評価した。

B-3. 経口固形製剤の溶出試験におけるマウン ト形成に関わる基礎検討

パドル法と回転バスケット法の試験条件が回転数によってどのように変化するかを検討するため、パーティクルイメージベロシメトリ(PIV)技術を利用した低レーザー反射式流体解析装置を使用し、溶出試験液の流れが、試験法によりどのように変化するか解析することを試みた。

B-4. リポソーム製剤のガイドライン試験法に 関する検討ーリポソーム製剤の各国ガイド ラインに関する検討-

FDAの”ドキシソルビシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス“を主に調査した。さらに、2002年にFDAより出されたリポソーム製剤に関するガイダンス、”リポソーム製剤：化学、製造及び品質管理；ヒト薬物動態と生物学的利用能；表示文書(案)”及び、このガイダンスに寄せられたパブリックコメントも一部対象とした。

さらに、EMAが提示したリフレクションペーパー(案)では後発品を開発する際に要求されるデータに関して、どのような考え方が提案されているのか調査し、設定目的・背景、各試験の要件などを概説した。

B-5. リポソーム製剤のガイドライン試験法に 関する検討ーPEGリポソーム製剤の物性評価 技術に関する検討

市販されているドキシソルビシン製剤と同等の脂質組成のリポソームを薄膜法により調製し、リポソームの粒子径とゼータ電位は、NICOMP社製NICOMP380ZLSを用いて測定した。測定には光路長1cmのプラスチックセルを用い、脂質濃度は0.5mMで行った。

B-6. リポソーム製剤のガイドライン試験法に 関する検討ーリポソーム脂質二重膜の相転移挙動 評価ー

多重層ベシクル (MLV) はバンガム法によって調製し、Prodan 標識したリポソームは、励起波長 361 nm、測定波長 380~600 nm の範囲で、Laurdan については、励起波長 350 nm、測定波長 370~600 nm で蛍光観察を行った。差走査熱量測定 (DSC) は、昇温速度 45°C/h、開始温度 20°C、終了温度 80°C とし、得られたデータは MicroCal ORIGIN を用いて解析した。

B-7. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—リポソーム製剤の薬物放出性に関する検討

製剤の品質を確保するために評価すべき重要な製剤特性の一つとして、*in vitro* 薬物放出性が挙げられている。FDA のドキシソルビシン (DXR) 封入 PEG リポソームの生物学的同等性試験に関するドラフトガイダンス試験条件のうち、pH、温度、超音波の DXR 放出挙動に与える影響を評価すると共に、緩衝液の種類や希釈率などの影響も評価した。

B-8. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—マイクロエマルジョン経口製剤に関する検討

市販マイクロエマルジョン製剤及びエマルジョン製剤を使用し、溶出試験は、溶出試験第 1 液及び第 2 液、疑似人工腸液を試験液として実施した。各製剤の粒子径の測定は動的光散乱法 (DLS) を採用し、レーザーは He-Ne、散乱角度は 90° で測定した。さらに、Accusizer (単一粒子光学検知法、SPOS) で粗大粒子数を測定した。ラットにおける経口投与後の体内動態解析では、胃ゾンデで経口投与し、血中濃度を LC-MS により測定し、体内動態パラメータ、AUC、Cmax 及び Tmax は WinNonlin (version 5.2, Pharsight Corporation, USA) を用いて計算した。

B-9. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—マイクロスフェア製剤の薬物放出性に関する検討

市販マイクロスフェア製剤 (リスパダールコンスタ) を対象に、試験液組成等の薬物放出挙動に与える影響を評価するとともに、2 種類の方法、”試料と分離方式” と ”連続フロー方式” を用いて、薬物放出性の評価を試みた。”試料と分離方式” は、試料をサンプル瓶に試験液と共

に入れ、試験液を経時的に採取して分析した。連続フロー方式” は、フローセル法溶出試験装置のクローズドシステムを使用し、通常セルと散剤・顆粒剤用のセルを用いた。

B-10. 経皮吸収型製剤等の放出試験法の設定に関する研究並びに坐剤の放出試験法に関する基礎検討 ツロブテロール製剤、ジクロフェナク製剤について承認上の規格試験法における問題点を比較検討し、経皮吸収型製剤等の放出試験法を作成し、日局収載原案として提案した。坐剤の放出試験法に関する基礎検討では、回転セル法による放出試験の結果を、溶融試験温度 (融点) と、示差走査熱量計 (DSC) による製剤の熱的性質とで比較検討した。

C. 研究結果

C-1. 難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶性に関する研究

シロスタゾール錠では、pH4.0 の試験液中では、PS 及び SDS では溶出性にほとんど差が見られず、0~2.0% の範囲で徐々に溶出率が増加した。TC 1% 添加では、ほとんど溶出の増加が認められなかった。pH6.8 では、PS では添加濃度が低いところから溶出率が高くなるが、SDS は 0.1% で急激な増加が見られた。これは SDS の臨界ミセル濃度付近であると考えられた。また、TC 添加では、0.1% と 0.2% 添加では溶出率はほとんど変化しなかった。試験液を水とした場合には、PS では、pH6.8 の場合と同様に低濃度から溶出率が高くなるが、SDS では 0.05% から 0.2% までの添加時には、溶出率がかえって低くなる傾向が見られ、0.25% 添加で急激な増加が見られた。また、TC 0.1% の添加では、溶出率の増加は見られなかった。

プラシルカスト水和物錠では、昨年度のソファルコン錠の場合と同様、PS と SDS の添加量と溶出挙動は比較的類似しており、両界面活性剤間で基本的には可溶性に大きな差はないと思われた。また、pH6.8 の試験液中での、0.05~0.2% SDS 添加における溶出挙動では、SDS の臨界ミセル濃度付近に相当して溶解状態が一定とならないため、溶出挙動がフィルターの有無で大きく変わるなど不安定であると考えられた。

シロスタゾール錠では、いずれの界面活性剤に

においても液性による可溶化能の顕著な差は見られなかった。シロスタゾール錠に関しては、これまでのソファルコン錠及びプラシカスト水和物錠と異なり、PS、TC 又は SDS 添加時の溶出挙動がいずれの液性においても明らかに異なり、界面活性剤間で可溶化能に大きな差が認められた。しかし、SDS の 0.3% 以下を除いて、液性による溶出率の差は小さかった。

C-2. 溶出試験に使用されるドデシル硫酸ナトリウム及びポリソルベート 80 の品質に関する研究

3 種類の SDS (SDS-A、B、C) の混在するアルキル硫酸ナトリウムの組成比を分析したところ、SDS-B では、SDS (C₁₂) 以外に、テトラデシル硫酸ナトリウム(STS : C₁₄)、ヘキサデシル硫酸ナトリウム(SHS : C₁₆)が確認され、その組成比はそれぞれ 26.31%、6.95%であった。SDS-A、SDS-C にも STS (C₁₄)に相当するピークが認められたが、SDS-B よりも小さかった。

そこで、STS(C₁₄)を用いた試験を実施したところ、各製剤とも、STS(C₁₄)を使用した方が SDS を用いた場合より、全般に高い溶出率を示した。各製剤とも、SDS-B を使用した時の溶出率が全体的に高い値を示した。

市販の 20 種類の SDS 試薬の 1.0w/v%水溶液の pH を測定したところ、pH は 5.5~8.5 程度の範囲にあり、溶出試験で使用される各種試験液(水、pH1.2、pH4.0、pH6.8、pH8.0)に SDS-A、B、C を溶解したところ、水以外の試験液では、5.0w/v%溶解した場合でも、pH は殆ど変化せず、各試験液の pH は一定に保たれていた。水に溶解した場合、SDS 試薬による pH の差は、溶解する SDS 試薬の濃度が高くなる程広がった。5.0w/v%水溶液の pH は、7.01 (SDS-A)、5.08 (SDS-B) 及び 9.45 (SDS-C) であった。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。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。

PS80 試薬の色調は全て、性状の項に記載された範囲内であったが、色合いは大きく異なっ

ていた。PS80 試薬の 5.0w/v%水溶液の pH は、5.73~6.73 の範囲であり、日局「ポリソルベート 80」の性状の項の液性 (pH5.5~pH7.5) を満たしていたが、PS80-F 及び PS80-I が若干低い値を示した。日局「ポリソルベート 80」の規格のうち、品質への影響が大きいと考えられる酸価、けん化価及びヨウ素価を測定したところ、PS80-F の酸価は、日局の規格上限値(2.0 以下)付近であり、PS80-A の約 5 倍の値を示した。精製度が高いと考えられる、ほぼ「無色」の PS80-F が最も高い値 (1.88) を示し、「だいたい黄色」に近い PS80-A が最も低い値 (0.38) を示した。3 種類の理化学的品質が異なる PS80 試薬を使用し、ナブメトン錠、酪酸リボフラビン錠、アリルエストレノール錠について溶出試験を行ったが、試薬による溶出性の差は認められなかった。

C-3. 経口固形製剤の溶出試験におけるマウン ト形成に関わる基礎検討

溶出試験液における PIV 測定で、パドル法、回転バスケット法いずれの場合も、円筒部分では、軸の上下向きに流れが生じ、ベッセル下部の半円球部分では、境界部分に渦を生じながら、周辺部に向かって下向きの渦を生じていた。パドル法では、ベッセル底部の方が流速は早いが、回転バスケット法 100 回転になると、よりバスケットに近い部分で流速が速い傾向が認められた。回転バスケット法の 50 回転では液の動きは遅く、回転バスケット 100 回転ではじめてパドル法に匹敵する試験液の動きが得られることが明らかとなった。

C-4. リポソーム製剤のガイドライン試験法に 関する検討—リポソーム製剤の各国ガイド ラインに関する検討

FDA の“ドキシソルピシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス”において、生物学的同等性を証明するために推奨されているのは、基本的に臨床試験と In vitro 試験の 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。臨床試験や In vitro 試験を行う前に、前提条件が設定されており、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、さらに様々なリポソーム特性が同等であること

を証明した後に、臨床試験（体内動態解析、AUC 及び Cmax の測定）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。

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、各特性を評価・測定する方法は9項目あり、2002年に FDA から出されたリポソーム製剤のガイダンスで推奨された“品質管理に重要な物理化学的特性”と類似しており、ドキシル特有の特性として、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。

臨床試験で特徴的なのは、卵巣癌患者を対象として、血中の遊離 DXR とリポソーム封入 DXR の両方を測定することが求められている。

EMA のリフレクションペーパーでは、リポソーム製剤は特有の細胞との相互作用や分布特性を示すことから、通常の生物学的同等性 (BE) 試験では検出できない有効性・安全性の大幅な変化が起きる可能性があるため、新規のリポソーム製剤の安全性と有効性を確保するために徹底的な薬物動態や組織分布の特性解析が重要であるとしており、全体を通して生物学的同等性 (Bioequivalence) ではなく、同等性・同質性 (Comparability) という言葉が多用されており、通常の生物学的同等性試験とは異なる位置づけであることが強調されている。製剤品質の項では、特に、PEG 化されたリポソーム製剤に対して、化学結合の詳細、PEG 化脂質の分子量とサイズ分布、PEG 化の安定性、リポソーム表面での PEG の分布などの項目が列挙されている。”In vitro 放出試験の満たすべき要件”が記載されている。開発製剤の質的・量的組成は、標準製剤と同一もしくは厳密に一致していることが必要である。非臨床試験に関しては、薬物動態、組織分布、毒性および薬力学試験における同等性/同質性評価が求められる。

C-5. リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討—PEG リポソーム製剤の物性評価技術に関する検討

リポソーム表面電位の指標となるゼータ電位の絶対値は、PEG 脂質の表面濃度に依存して小さくなり、NaCl 濃度を変えてゼータ電位を測定

することで、粒子表面からすべり面までの距離 x 、すなわち固定水和層の厚さ (FALT) を求めることができ、リポソームの表面 PEG 脂質濃度に依存して PEG 鎖が形成する固定水和層の厚さが増大していることが示された。

PEG 修飾リポソームの固定水和層の厚さ (FALT) の算出を試みたところ、PEG 修飾によって FALT が 1.4 nm から 3.8 nm に増加していることが示された。また、リポソームの PEG 修飾法に関わらず、FALT の増加は表面 PEG リン脂質濃度に依存していることが明確に示された。PEG 修飾率の増加に伴う固定水和層長の増大が、リポソーム膜面から PEG 鎖末端までの平均距離の増大、すなわち PEG 鎖コンフォメーションの変化と相関していることが明らかとなった。

C-6. リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討—リポソーム脂質二重膜の相転移挙動評価—

HSPC リポソームの prodan 蛍光スペクトルの温度変化から、ホスファチジルコリン (PC) 分子によって形成される二重膜の相状態は、温度上昇に伴い、疎水鎖が全てトランス型かつ膜面に対しておよそ 30°傾いたラメラゲル (L_{β}) 相から、 L_{β} 相の親水部のパッキングが変化し波型になったリップルゲル (P_{β}) 相を経て、疎水鎖が融解し流動性が増加した液晶 (L_{α}) 相へと変化する。この際、 $L_{\beta} \rightarrow P_{\beta}$ への相転移を前転移 (pretransition)、 $P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ への転移を主転移 (main transition) とよぶ。prodan 蛍光極大波長は、45~47°C 付近で 440 nm から 470 nm へ、50~53°C 付近で 470 nm から 490 nm へ、急激な変化が観察された。この変化は prodan 分子の脂質二重膜中での垂直分布の変化によるものと考えられ、それぞれの温度領域での脂質二重膜の相転移 (前転移と主転移) に伴う prodan 分子周辺の局所的な極性変化を反映していると考えられた。

コレステロール分率を変化させた HSPC リポソームにおける prodan 蛍光極大波長の温度依存性から、コレステロールを含有するリポソームでは prodan 蛍光極大波長の二段階変化が見られず、前転移は不明瞭であった。

HSPC-コレステロール混合二重膜の DSC 測定から、コレステロールを含まない HSPC リポソームでは 47.8°C と 53.6°C をそれぞれピークとする前転移と主転移が観察され、prodan 蛍光極

大波長の温度変化領域と一致した。

PEG修飾したHSPC-コレステロールリポソーム二重膜では、PEG鎖の有無による prodan 蛍光極大波長の温度依存性にほとんど違いが見られず、PEG修飾による影響はほとんどないものと考えられた。

C-7. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—リポソーム製剤の薬物放出性に関する検討

ヒト血漿50%溶液にDOXILを分散させ、37°Cで24時間インキュベートしたところ、顕著な薬物放出は観察されず、48時間インキュベートしてもDXR放出率は10~20%程度であった。

37°CにおけるpHの異なる緩衝液中(pH 5.5、6.5、7.5)のDXR放出挙動を観察したところ、どの試験液中でもDXR放出率は10%程度と低いことが判明した。各緩衝液について、温度上昇のDXR放出性に与える影響を評価したところ、緩衝液pH 5.5中では、McIlvaine緩衝液よりPBSで速いDXR放出が観察され、43、47、52、57°Cと温度上昇に伴い顕著に放出率が増加した。一方、pH 6.5や7.5では57°C以外では放出率が低く、温度上昇との相関性は認められなかった。

超音波照射では、照射強度の上昇に伴い、DXR放出率は大きくなったが、試験液のpHは、放出に影響せず、20分以内に放出率はほぼ100%に達した。

C-8. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—マイクロエマルジョン経口製剤に関する検討

カプセル内容物を各試験溶液で希釈した際の平均粒子径と粒子径分布をDLSで測定したところ、蒸留水中の平均粒子径は、先発品B 26.4 nmに対し、後発品4製剤はC 74.8、D 64.5、E 39.7、F 79.2 nmと大きい傾向が見られた。溶出試験第1液、2液でもほぼ同様の傾向が認められたが、1製剤では溶出試験第2液や人工腸液FaSSIFに懸濁すると粒子径が大きくなることが分かった。また、人工腸液FeSSIFに懸濁した後発品4製剤の平均粒子径(5倍・25倍希釈)は100~200 nmと顕著に大きくなり、外観の観察結果と一致した。カプセル内容物を蒸留水に懸濁し、0.5 µm以上の粒子径分布と粗大粒子数をSPOSにより測定したところ、後発品2製剤では、先発品の約5倍、後発品1製剤では、約

25倍の粗大粒子数が検出された。

ラットにおける体内動態の比較では、マイクロエマルジョン製剤では、後発製剤で、CmaxやAUCが高くなる傾向が認められ、Tmaxが遅い製剤も認められたが、CmaxとAUCに関しては、有意な差は認められなかった。また、代謝物のCmaxやAUCに関しても、明確な差は認められなかった。

C-9. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—マイクロスフェア製剤の薬物放出性に関する検討

“試料と分離方式”により、代表的な生理的緩衝液であるPBSとHBS、その他、生理食塩水と精製水におけるリスパダールコンスタからの薬物放出挙動を観察したところ、PBSポリソルベート20添加の場合、主な放出が始まるまでラグタイムがおおよそ25日あり、薬物放出相の後、40日後には放出率は90%以上となったPBSとHBSはよく似た放出挙動を示した。生理食塩水の場合、PBSやHBSとラグタイムは同じ25日くらいであるが、放出速度が遅く、40日経っても放出率は80%に満たなかった。精製水の場合、他の試験液とは全く異なる放出挙動が認められ、ラグタイムは殆ど無く、試験開始から徐々に薬物放出率が上昇し、25日過ぎには100%に達した。放出挙動の差には試験液の浸透圧やpHが影響しているものと考えられる。そこで浸透圧(塩濃度)とpHの異なる緩衝液で観察したところ、塩化ナトリウム濃度100 mMではラグタイムがおおよそ25日とPBS(塩化ナトリウム濃度150 mM)と同様の放出挙動が認められたが、濃度が低いほどラグタイムが短く、初期の段階から明確な薬物が観察された。pH 5.5および7.5のリン酸緩衝液とpH 10.5の炭酸緩衝液を比較したところ、pHが低いほど薬物放出が速くなる傾向が認められた。37°Cにおけるポリソルベート20添加PBSおよびHBSで観察されたin vitro累積放出率は、in vivo累積AUC率とある程度相関していると言える。

“試料と分離方式”で、試験温度を上げた加速放出試験法を試みたところ、ポリソルベート20 0.01%添加PBSにおいて、37°Cではラグタイム約25日、50%放出点は約31日であったのに対し、45°Cではラグタイム約5日、50%放出点は約6日と、試験温度を上げることで、薬物放出速度がおおよそ5倍となった。

“連続フロー方式”による放出性評価では、通常の

直径 12mm のセルにリスパダールコンスタをガラスビーズと混合して入れ、ポリソルベート 20 0.01% 添加 PBS 中で放出挙動を観察したところ、”試料と分離方式”で観察された放出挙動と殆ど同じであり、50%放出点も 5.51 日であることから、試験方法の違いによる放出挙動の差は無いものと考えられた。次に、散剤・顆粒剤用のセルの適用を試みた。散剤・顆粒剤用のセルはフィルター/メッシュで仕切られた空間に製剤を入れ、さらに製剤の上にドーム型の網を置くことで製剤が固まることなく試験液中に均一に分散するよう設計されている。その結果、全てのセルで誤差の小さい放出挙動が得られた。

C-10. 経皮吸収型製剤等の放出試験法の設定に関する研究並びに坐剤の放出試験法に関する基礎検討

皮膚適用製剤の放出試験では、放出試験法案を、パドルオーバーディスク法、回転シリンダー法及び拡散セル法の三測定法を取り込んだものとし、局方審議委員会へ提案し、日局収載へ向けた動きを開始した。

市販ジクロフェナクナトリウム坐剤 9 製剤を用い、回転セル法による 37℃における放出試験を試みたところ、2 製剤では他の製剤に較べて放出が遅かった。試験液を 36℃に設定したところ、放出曲線は製剤間で大きく異なった。DSC 測定により、各製剤の吸熱ピークを比較したところ、製剤間でピークトップの温度、融解終了点などが異なった。承認申請において、座剤の規格試験法には溶融温度試験が設定されており、各製剤の融点測定を試み、融点と放出性の関係を検討し、DSC 測定の結果と比較検討したところ、坐剤からの放出性と、DSC による吸熱ピークの位置には良好な相関が得られたが、融点測定と放出性にも良い相関が認められ、品質管理的な観点からは、融点測定も十分に機能を果たしていると思われた。

D. 考察

D-1. 難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶性能に関する研究

ソファルコン錠の場合には、PS と SDS の添加量と溶出挙動は比較的類似しており、両界面活性剤間で可溶性能に差はないと思われた。PS と比較して、SDS の可溶性能が高い事例が多い

と思われたが、医薬品によっては大きな差が無い場合があることが示唆された。また、ソファルコンは TC への取り込みが弱い医薬品であることが示唆された。

プラシラカスト水和物はその物理化学的性質から、pH1.2~5 程度では解離しにくく溶解度は低く、pH6.8 では 8 倍程度に増加する。低 pH ではほとんど無荷電のため、SDS 添加でも PS 添加でもあまり溶出率は上がらず、差はほとんど認められない。pH6.8 では、SDS の臨界ミセル濃度以上で急激に可溶化が起り、PS よりもやや溶解性が強くなったと思われる。活性剤濃度が低い部分では、ポリソルベートでは臨界ミセル濃度以上であるためポリソルベートの方が溶出率が高い傾向がある。

シロスタゾール錠について、水、pH6.8、pH4.0 及び pH1.2 の試験液に、界面活性剤として SDS、PS 又は TC の濃度を変えて添加し、溶出試験を実施した。その結果、いずれの試験液においても溶出率は SDS>>PS>TC の順であり、本製剤に関しては、界面活性剤によっていずれの試験液においても可溶性能に大きな差が認められた。一方、試験液の違いによる可溶性能について、PS 及び TC においては顕著な差は見られなかった。しかし、アニオン性界面活性剤である SDS の場合は試験液によって臨界ミセル濃度がシフトする傾向が観察され、臨界ミセル濃度付近の濃度においては製剤や試験条件によって溶出挙動が変動する可能性があることが明らかとなった。

D-2. 溶出試験に使用されるドデシル硫酸ナトリウム及びポリソルベート 80 の品質に関する研究

難水溶性の化合物を有効成分とする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検討を行ったところ、SDS の代わりに STS(C₁₄)を適用した場合、より高い溶出率をもたらすことが確認され、SDS のアルキル鎖の純度が溶出に影響を及ぼす可能性が示唆された。

SDS の pH の影響では、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。ピロミド酸錠は、SDS-C を適用した場合の開始時の pH が、8.16 であったが、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。pH6.98 の試験液中では、pH8.0 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、40%程度の溶出率となったと推測される。メフェナム酸カプセルは、pH が高い試験液程、速やかな溶出が認められるため、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。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。

PS80 では、市販試薬の物理化学的特性の差が、溶出試験結果に大きな影響は及ぼさず、SDS のような使用した試薬による溶出試験への影響は無視できる程度と考えられる。

D-3. 経口固形剤の溶出試験におけるマウント形成に関わる基礎検討

溶出試験液の PIV 測定では、パドル法では、撮影ごとに、ベクトルの向きも速さも刻一刻と変わり、全体として大きなうねりを生じていた。むしろこの流れの変動が製剤の崩壊等には有効に働くと思われ、速度の平均値ではこの変動を表すことができなかった。回転バスケット法の場合には、一枚ごとのベクトルの向きや、速さの変動は少なく、安定した液の流れを生じていることが示唆された。

D-4. リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討—リポソーム製剤の各国ガイドラインに関する検討—

FDA のガイドラインで推奨されている特性の中には必ずしも広く認められた定量・評価方法が無い特性も含まれており、さらなる検討が必要であると思われる。また、薬物動態では、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ついて、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、情報の蓄積と検討が必要と思われる。

EMA のリフレクションペーパーでは、FDA が提示した“ドキシソルビシン塩酸塩に関するドラフトガイダンス”と共通して試験製剤に求められているのは、先発リポソーム製剤と同一(も

しくは厳密に一致した) 組成で構成され、物理化学的特性における類似性を示し、ヒトにおける封入薬物と遊離薬物の体内動態の類似性を証明すること、である。今後、FDA や EMA のガイダンスを参考に、我が国で先発製剤を基準に開発されたリポソーム製剤に対してどのような方策が適切であるか、実験的検討も含めて、引き続き検討する必要がある。

D-5. リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討—PEG リポソーム製剤の物性評価技術に関する検討

PEG 修飾リポソームのゼータ電位測定が、リポソーム表面に形成される PEG 鎖水和層の厚さの評価として有用であることが確認できた。しかし、本法はあくまでも間接的な方法であり、PEG 修飾リポソームの表面膜水和状態や血漿タンパク質との相互作用の変化などを直接測定し、FALT との相関を検討する必要がある。また、リポソームの PEG 修飾法として post insertion 法への適用も今後の課題と思われる。

リポソームに組み込む PEG 脂質の分子量や添加量およびアンカーとして用いる脂質の物理化学的性質の違いによって、PEG 修飾リポソームの血中滞留性が変化することが知られている。PEG 修飾法として近年広く用いられている post-insertion 法において、PEG リン脂質添加量や調製温度による PEG 脂質挿入効率や FALT の変化を調べたところ、至適な添加量や調製温度が存在することが示された。さらに、PEG 修飾リポソームの PEG 鎖末端からリポソーム膜リン脂質頭部までの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を観測したところ、PEG リン脂質添加量の増大に伴うリポソーム表面固定水和層長の増大と膜面から PEG 鎖末端までの平均距離の増大との間により相関が認められた。これは、PEG 修飾リポソームの表面固定水和層長の増大が表面 PEG 鎖のコンフォメーション変化に起因することが明確に示唆された。

D-6. リポソーム製剤のガイドライン試験法に関する検討—リポソーム脂質二重膜の相転移挙動評価—

リポソーム脂質二重膜の相転移温度及び相状態は、リポソーム製剤の粒子安定性や薬物放出性を規定する物理化学的特性の一つとして重要

である。本研究では、DSC 測定に加えて環境感受性蛍光プローブである prodan の蛍光スペクトル測定を用いることで、HSPC-コレステロールリポソーム二重膜の相図を作成し、その熱的相転移挙動の俯瞰的解析を行った。DSC 測定とともに環境感受性蛍光プローブ測定の脂質二重膜相転移評価法としての有用性が示された。

また、PEG 修飾による脂質二重膜への影響について蛍光プローブを用いて検討したところ、液晶状態の脂質二重膜では PEG 鎖が二重膜中へ侵入していることが示唆された。一般に、ゲル状態の場合と比較して液晶状態の二重膜では内封薬物の漏れが大きいことが知られている。今回の蛍光プローブ測定結果と合わせて、PEG 鎖と液晶状態の脂質二重膜との疎水的相互作用によって、温度などの外部刺激に対する PEG 修飾リポソームからの薬物放出性が変化している可能性が示唆された。

D-7. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—リポソーム製剤の薬物放出性に関する検討

試験液の pH が低いほど、温度は高いほど DXR 放出率が高く、速く放出される傾向が認められた。また pH、温度、超音波の中では DXR 放出挙動に与える影響は超音波が一番強く、超音波照射によって短時間で放出率が 100% に達することが分かった。

D-8. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究—マイクロエマルジョン経口製剤に関する検討

市販マイクロエマルジョン製剤では、水に分散させると、透明な溶液になるもの、白濁するもの、全体的に青白く濁るなど、視覚的に差が見られ、粒子径も若干異なることが確認された。これは、製剤間で添加剤が異なるためと思われる。製剤によっては、完全にマイクロエマルジョン状態にはならず、エマルジョンに近い状態、もしくはマイクロエマルジョンとの混合状態にあるためではないかと推察された。しかし、製剤間では、ラットによる AUC や Cmax に差が認められず、基本的には同じ種類の界面活性剤が使われていること、ある程度小さい粒子径の均一な分散溶液となっていることから、AUC や Cmax に影響するほど薬物吸収部位での挙動に違いが無かったものと考えられる。

D-9. 脂質分散系製剤の製剤評価法に関する研究

—マイクロスフェア製剤の薬物放出性に関する検討

試験液組成等の薬物放出挙動に与える影響を評価したところ、塩濃度が低いほど薬物放出の開始が速くなる現象が認められ、これは浸透圧が低いために製剤の水吸着/膨潤が進み、薬物の拡散が促進されたものと推測される。精製水において試験開始から薬物放出が認められたのは、浸透圧が低いことが影響しているものと考えられた。また pH は低いほど主な薬物放出の開始点が速くなる傾向が認められたが、pH が低いほど封入薬物であるリスペリドンの溶解度は高いことが知られており、各 pH における溶解度の差が影響したものと考えられる。浸透圧や pH が薬物放出性に影響を与える機序を明らかにするには、リスペリドンの溶解度や試験中の pH 変化、マイクロスフェアからの薬物放出メカニズムなどを調査する必要があり、今後の課題である。

”試料と分離方式”と”連続フロー方式”を比較したところ、両者に明確な差は認められなかった。

“連続フロー方式”の検討では、散剤・顆粒剤用のセルを使うことでセル間の放出挙動の差が解消され、有用な手段であることが示された。

D-10. 経皮吸収型製剤等の放出試験法の設定に関する研究並びに坐剤の放出試験法に関する基礎検討

皮膚適用製剤の試験法案をほぼ確立し、日本薬局方原案審議委員会製剤委員会の下に設置された製剤ワーキンググループに提案し、本研究班の検討を終了した。

基剤の熱的性質をコントロールすることで、放出の制御が可能であることが示唆された。基剤の特性は DSC 測定の方が放出率との相関性はやや高いものの、熔融温度ともかなり良好な相関が認められ、坐剤の熔融温度測定は、坐剤の品質管理に十分に有用であると思われた。

E. 結論

E-1. 難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶化能に関する研究

ソファルコン錠に関しては、PS と SDS ではいずれの試験液についても大きな差が見られず、活性剤濃度によっては PS の方が可溶化能は高いことが明らかとなった。また、TC については非常に可溶化能が低いことが示された。今後更に異なる特性の医薬品で情報を蓄積する必要

があると思われた。

E-2. 溶出試験に使用されるドデシル硫酸ナトリウム及びポリソルベート 80 の品質に関する研究

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用い、溶出試験の結果に影響を及ぼすドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の品質について検討を行ったところ、SDS に混在するテトラデシル硫酸ナトリウム (STS) が溶出挙動に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、市販 SDS の全てから STS 検出され、医薬品によっては SDS 純度に配慮すべきであると思われた。

E-3. 経口固形剤の溶出試験におけるマウン ト形成に関わる基礎検討

溶出試験液の PIV 測定では、パドル法と、回転バスケット法における試験液の流速を求めたところ、回転バスケット法の 50 回転では、試験液の流れは遅く、回転バスケット法の 100 回転では、パドル法の 100 回転よりは遅いものの、回転バスケットの 50 回転時の 3~10 倍の速度となった。

E-4. リポソーム剤のガイドライン試験法に 関する検討ーリポソーム剤の各国ガイド ラインに関する検討-

我が国においても、リポソーム剤など特殊な製剤に対しては、個別にガイダンスを提示するか、現行の BE ガイドラインへの追記をするか、製品ごとの対応が適切か、検討していく必要がある。

E-5. リポソーム剤のガイドライン試験法に 関する検討ーPEG リポソーム剤の物性評価 技術に関する検討

PEG 修飾リポソームのゼータ電位測定結果に、拡散電気二重層の厚さと電解質濃度との関係を表すグイ-チャップマンの理論を適用し、表面 PEG 脂質濃度に依存した固定水和層の厚さの増大が確認され、PEG 修飾リポソームの表面 PEG 層の評価方法としてゼータ電位測定の有用性が示された。

蛍光標識 PEG リン脂質を用いた蛍光分光測定により、pre-mixed 法と post-insertion 法における PEG リン脂質挿入効率やリポソーム膜内外層での PEG リン脂質の分布を評価することが

可能となった。さらに、修飾法の違いにかかわらず、PEG リポソームの表面物性が PEG 鎖の表面被覆率によって制御されていることが示された。

E-6. リポソーム剤のガイドライン試験法に 関する検討ーリポソーム脂質二重膜の相転移挙動 評価ー

環境感受性蛍光プローブ測定や DSC 測定が、脂質二重膜の相転移挙動を評価するうえで有用であることが示された。両手法を併用することで、リポソーム二重膜の包括的な相図作成が可能であり、温度や脂質組成の制御によるリポソーム剤の開発やその薬物放出性などの品質管理において、重要な指標となると考えられる。

E-7. 脂質分散系剤の製剤評価法に関する研 究ーリポソーム剤の薬物放出性に関する検討

種々の試験条件下で、DXR 放出挙動が観察された。また、温度依存的な放出率の増加を見るために用いる試験液の pH は 5.5 の方が適していることが明らかとなった。

E-8. 脂質分散系剤の製剤評価法に関する研 究ーマイクロエマルジョン経口剤に関する 検討

市販マイクロエマルジョン剤間では、外観や粒子径等の物理化学的性質に明らかな違いがあるものの、ラットの体内動態試験の結果では、は非同等性を示すものではなかった。

E-9. 脂質分散系剤の製剤評価法に関する研 究ーマイクロスフェア剤の薬物放出性に関する 検討

リスパダールコンスタを対象に試験液組成の薬物放出性に与える影響を検討し、生理的環境に近い浸透圧と pH の緩衝液であれば、in vivo における薬物放出とある程度相関した in vitro 薬物放出挙動を観察できることを確認した。同じ温度・試験液であれば 2 種類の手法、“試料と分離方式”と“連続フロー方式”で放出挙動に明確な差は無いことを示した。

E-10. 経皮吸収型剤等の放出試験法の設定に 関する研究並びに坐剤の放出試験法に関する基 礎検討

皮膚に適用する剤の放出試験法は拡散セル法を加えて局方への収載を進めることとした。

座剤基剤の熱的性質を狭くコントロールすることで、放出の制御が可能であることが示唆された。ま

た、36°Cで製剤間で放出製が大きく異なることが、有効性に影響を及ぼさないかどうか今後のさらなる検討課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川口正美、梶村計志、田口修三：トコフェロールニコチン酸エステルカプセルにおける溶出挙動の経時変化に関する検討、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、42、149-155(2011).
- 2) 四方田千佳子、ジェネリック医薬品を語るための知識(2)、ファーマテックジャパン、26、909-913(2010)
- 3) 四方田千佳子、後発医薬品の品質検証はどう行われているのか、月刊薬事、52、1457-1464(2010)
- 4) 四方田千佳子、柴田寛子、ジェネリック医薬品を語るための知識(3)、ファーマテックジャパン、26、1861-1867(2010)
- 5) 梶村計志、川口正美、四方田千佳子：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1報)、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、42、626-632(2011).
- 6) 川口正美、梶村計志、田口修三：トラネキサム酸カプセルにおける溶出挙動の経時変化に関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、42、836-842(2011).
- 7) 梶村計志、川口正美、四方田千佳子：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)、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、43、194-199(2012).
- 8) 柴田寛子、四方田千佳子：米国FDAのドキシソルビシン封入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、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、42(11)、990-998(2011)
- 9) 梶村計志、川口正美、四方田千佳子：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ポリソルベート80の品質に関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、43(7)、650-655(2012).

- 10) Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H. : Alterations in the Detergent-Induced Membrane Permeability and Solubilization of Saturated Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes: Effects of Poly(ethylene glycol)-Conjugated Lipid. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2012;60(9):1105-11.
 - 11) Shibata H, Saito H, Kawanishi T, Okuda H, Yomota C. : Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2012;60(8):967-75.
 - 12) Shibata H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H. : Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions. Biol Pharm Bull 2012;35(11):2081-72.
 - 13) 北山裕貴、新村航、四方田千佳子、斎藤博幸：ポストインサーション法によって調整したPEG修飾リポソームの表面物性に関する研究。膜(MEMBRANE)、38(1)、50-56(2013)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 梶村計志、川口正美、四方田千佳子：溶出試験に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-混在するアルキル硫酸ナトリウムについて-、第48回全国衛生化学技術協議会年会(2011、長野)。
 - 2) 北山裕貴、四方田千佳子、斎藤博幸：PEGリン脂質によるリポソーム表面修飾法の最適化の検討。第50回日本薬学会中国四国支部学術大会(2011.11.12-13 高松)
 - 3) 柴田寛子、川西徹、四方田千佳子 ドキシソルビシン封入リポソームのin vitro薬物放出におけるpH、温度、超音波の影響 日本薬剤学会第26年会(2011.5)
 - 4) 柴田寛子、斎藤はる奈、川西徹、四方田千佳子：シクロスポリンマイクロエマルジョン製剤の製剤評価：粒子径及びラット体内動態の比較 ジェネリック医薬品学会第5回(2011.6)
 - 5) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Effect of pH, temperature, and ultrasound on drug-release from

doxorubicin-encapsulated liposome

AAPS (2011.10)

- 6) 柴田寛子、四方田千佳子、川西徹 逆相 HPLC-蒸発光散乱検出器を用いたリポソーム製剤中の脂質成分定量法の検討
日本薬学会第 132 年会 (2012.3)
- 7) 北山裕貴、新村航、四方田千佳子、齋藤博幸: リポソームの PEG 修飾法による表面物性の変化. 日本薬剤学会第 27 年会 (2012.5.24-26 神戸)
- 8) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Haruhiro Okuda: Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions
AAPS (2012.10)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

難溶性薬物の溶出試験における界面活性剤の可溶化能に関する研究

分担研究者 岸本清子 東京都健康安全研究センター

(研究要旨)我が国の生物学的同等性試験では、難溶性薬物において、ポリソルベート80のみの添加を認めてきたが、今後、一定条件の下にその他の界面活性剤の添加が容認されることとなった。そこで、難溶性薬物について、界面活性剤の種類と濃度が溶出性に及ぼす影響を再検討した。

日本薬局方外医薬品規格第三部に収載されている医薬品の中から、溶出性にpH依存性があるソファルコン錠及びプラシルカスト水和物錠、またpH依存性が認められないシロスタゾール錠について、pH1.2、pH4.0、pH6.8及び水等の試験液に、界面活性剤としてラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、ポリソルベート80(PS)及びタウロコール酸(TC)の濃度を変化させて添加し、溶出試験を実施した。

その結果、ソファルコン錠に関しては、液性による違いはあるもののSDSとPSで、溶出挙動に大きな差は認められなかった。プラシルカスト水和物錠についても、SDSの臨界ミセル濃度付近でSDSとPSの溶出率が逆転する現象はあるものの、可溶化能に大きな差は見られなかった。また、臨界ミセル濃度付近では安定した溶出挙動が得られなかった。シロスタゾール錠に関しては、液性による顕著な差は認められなかったが、SDSの臨界ミセル濃度付近を境にSDSとPS及びTCの溶出率が大きく異なり、可溶化能に差が認められた。また、SDSの場合は試験液によって臨界ミセル濃度が異なり、塩濃度の違いによると思われる低濃度側へのシフトが観察された。

以上のことから、これまでPSと比較してSDSの可溶化能が高い事例が多かったが、医薬品によっては大きな差が見られず、界面活性剤濃度によってはPSの方が可溶化能は高いということが明らかとなった。TCについては可溶化能が低いことが再確認された。また、SDSを使用する場合には臨界ミセル濃度付近の不安定な溶出挙動を考慮し、添加濃度を設定する必要があることが明らかとなった。

A.研究目的

我が国の後発医薬品が、より安心して消費者に受け入れられるためには、先発医薬品に対して、有効性・安全性が同等であるという保証が重要である。そのためには、同一性調査の基に、品質規格という理化学的な同等性、臨床的な効力の同等性(生物学的同等性)が担保されなくてはならない。

後発医薬品の申請時に添付すべき生物学的同等性の資料に関しては、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインについて」¹⁾(ガイドライン)が出されており、その中で溶出試験は生物学的非

同等性を防ぐための有効な試験法と位置付けられている。我が国のガイドラインでは溶出試験を大きく活用しており、後発医薬品の同等性を担保する上で、極めて重要であるため、そのさらなる適切な活用を目指して、産官学からなる溶出試験のワーキンググループで議論を繰り返し、生物学的同等性試験の改訂に向けた作業が進行中である²⁾。

近年の医薬品開発においては、難溶性薬物が多く見受けられる。難溶性薬物を投与した場合、低溶解性による吸収率の低下や、消化管内環境の影響を大きく受けて、治療効果のバラツキを生じること

が懸念されるため、様々な方法で可溶化して溶出性を改善した製剤が製造されており、これら多様な製剤の同等性確認に対処していかなければならない。

これまでのガイドラインでは、難溶性薬物には界面活性剤としてポリソルベート 80 (PS) のみの使用が認められてきており、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインに関する質疑応答集(Q&A) Q-52」には、「難溶性薬物の溶出試験に用いられる界面活性剤の種類は、ラウリル硫酸ナトリウムはリン酸緩衝液と相互作用を起こす恐れがあったため用いないこととし、PS のみとした。」と記載されている。しかし、試験液中の PS が製剤中の添加剤と相互作用して溶出挙動に影響するなど、PS を使用することが適切でない場合がある³⁾ことから、2012 年 2 月の改正⁴⁾において PS 以外の界面活性剤の使用が認められることとなった。しかし、処方変更ガイドラインや含量違いのガイドラインではヒトによる生物学的同等性試験を行わないことが認められる場合があるため、SDS のような可溶性の高い界面活性剤添加により溶出挙動の同等性を評価することには強い懸念があった。そこで、PS 以外の界面活性剤の添加量にあたっては、薬物の溶解度は PS 添加時よりも大きくなることを避けることという条件が付された。従って、ガイドライン改訂後は、界面活性剤の種類は限定されないが、各ガイドラインに規定さ

れている PS の許容添加濃度における薬物の溶解度を超えるような界面活性剤の添加は認められないこととなっている。

本研究では、図 1 に示した難溶性で溶出性に pH 依存性があるソファルコン錠⁵⁾、更に難溶性の高いプラシルカスト水和物⁶⁾錠及び、溶出性が pH に依存しないシロスタゾール錠⁷⁾について、溶出試験におけるラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、PS 及びタウロコール酸ナトリウム(TC)の添加効果について検討した。

B. 研究方法

1. 製剤

ソファルコン錠: ソロン錠 50

プラシルカスト水和物錠: プラシルカスト錠 112.5
「EK」

シロスタゾール錠: シロスタゾール錠 50mg「ファイザー」を試験製剤として用いた。

2. 界面活性剤

1) 紫外吸収スペクトル測定用

SDS は、市販の 3 種類の試薬を使用した。S1: ドデシル硫酸ナトリウム・生化学用(和光純薬工業)、S2: ドデシル硫酸ナトリウム・イオンペアクロマトグラフ用(和光純薬工業)、S3: ドデシル硫酸ナトリウム・ペレット、研究用(Serva Electrophoresis GmbH)

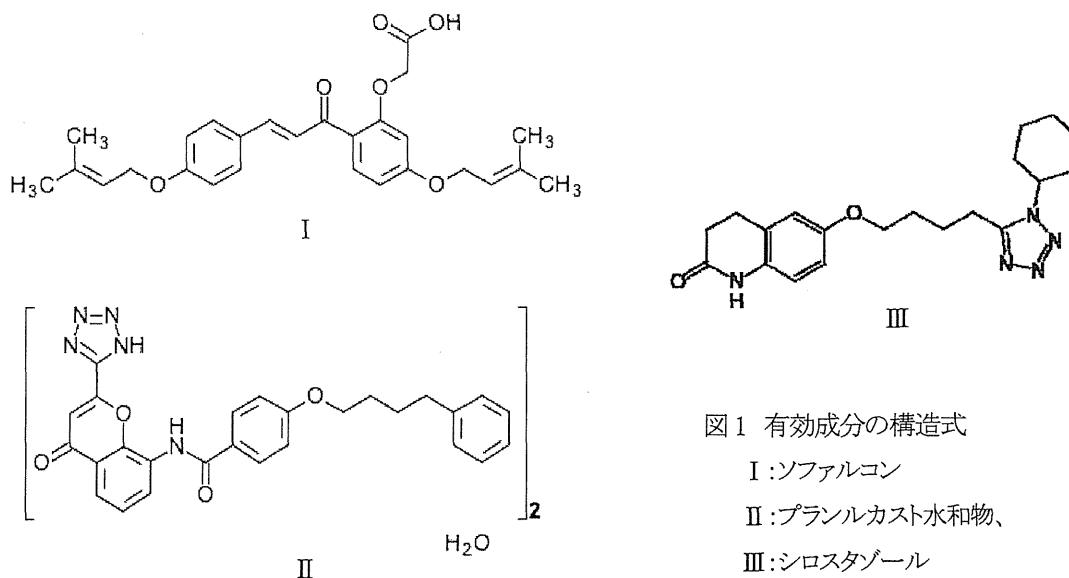


図 1 有効成分の構造式

I : ソファルコン

II : プラシルカスト水和物、

III : シロスタゾール

PS は、市販の 7 種類の試薬を使用した。P1 から P5 は和光純薬工業(株)製、P6 及び P7 は MP Biomedicals, Inc.製である。P1;ポリソルベート、植物由来・生化学用、P2; ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート・化学用、P3; ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート・分子生物学用、P4;ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート・無規格、P5;ポリソルベート 80「製造専用」・日本薬局方、P6;ツイーン 80、P7;ツイーン 80、細胞培養用。

2) 溶出試験用

SDS (S3):ドデシル硫酸ナトリウム・ペレット、研究用(Serva Electrophoresis GmbH)。

PS (P2):ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート・化学用、和光純薬工業株式会社製。

TC:タウロコール酸ナトリウム・和光特級、和光純薬工業株式会社製。

3. 試験液

溶出試験用の水は純水製造装置により製造した精製水(水)を用いた。溶出試験第 1 液 (pH1.2)、薄めた McIlvaine 緩衝液・pH4.0 (Mc4.0)、薄めた McIlvaine 緩衝液・pH6.8 (Mc6.8) 及び紫外吸収スペクトル測定用の溶出試験第 2 液は関東化学株式会社製の試薬を用いた。

4. 標準品

ソファルコンは和光純薬工業株式会社製の薬理研究用試薬、プラナルカスト水和物は高田製薬株式会社より提供された定量用標準品、シロスタゾールは和光純薬工業株式会社製・薬理研究用を使用した。

5. 溶出試験

ガイドラインに準じて、パドル法により溶出試験を実施した。試験液の採取は、ガイドラインで定められた間隔で行い、ソファルコン錠は水、Mc6.8 及び Mc4.0 について 3 時間、プラナルカスト水和物錠は水および Mc6.8 について 4 時間、シロスタゾール錠は水、Mc6.8、Mc4.0 及び pH1.2 について 3 時間までとした。また溶出率は、TC 使用時は n=3 又は n=6、その他は n=6 の平均値を用いた。

6. 装置

溶出試験装置:株式会社大日本精機製全自動溶出試験機 RT-3std

紫外可視分光光度計:株式会社島津製作所製 UV-1600、YV-3100PC

C. 研究結果

1. 界面活性剤溶液の紫外吸収スペクトル

本研究の対象 3 製剤は有効成分の定量に吸光度法を用いていることから、界面活性剤溶液の紫外吸収が試験法に影響するかを検討した。

溶出試験用試験液 4 種及び溶出試験第 2 液につき水を対照とし、波長 210nm から 350nm の範囲で吸収スペクトルを測定した。その結果、図 2 に示したように pH4.0、Mc4.0 及び Mc6.8 では低波長側で吸収が認められた。

水に各種の SDS 又は PS を 0.5%相当添加した溶液について測定した吸収スペクトルを図 3 に示した。SDS 3 種に関してはいずれも吸光度測定による分析に障害があると思われる吸収は認められなかった。一方、PS 7 種に関しては、P4(局方品)及び P5(無規格)を除いて 300nm 付近から低波長側にかけて大きな吸収が認められた。

2. ソファルコン錠の溶出性

水の試験液に、SDS を 0~0.5%、PS を 0~0.35%、TC を 0.1%添加して、ソファルコン錠 50mg について溶出試験を実施した。PS 及び SDS の添加濃度と 60 分後の溶出率の関係を図 4-I に示した。PS については、低濃度から溶出率が高くなるが、SDS では 0.05%から 0.2%までの添加時には、溶出率が 0%(水)の溶出率よりもかえって低くなる傾向が見られ、0.25%添加で急激な増加が見られた。また、TC の添加では無添加の場合と若干差が見られるもののほとんど溶出率の増加は見られなかった。

同様に、Mc6.8 の試験液に、SDS を 0~0.2%、PS を 0~0.35%、TC を 0~0.2%添加し溶出試験を実施した。添加濃度と 60 分後の溶出率を図 4-II に示した。

PSについては、水の場合と同様に添加濃度が低いところから溶出率が高くなるが、SDSは0.05%の溶出率が0%と変わらず、0.1%で急激な増加が見られた。これはSDSの臨界ミセル濃度付近であるためと考えられる。また、TC添加では、0.1%と0.2%で若干差が見られるものの無添加の場合とほとんど差がなく溶出率は低かった。

次いで、Mc4.0の試験液にSDS、PS又はTCの濃度を変化させて添加し、溶出試験を実施した。SDS、PS及びTCの添加濃度と60分後の溶出率を図4-IIIに示した。その結果、PS及びSDSでは溶出性にほとんど差が見られず、0~2.0%の範囲で徐々に溶出率が増加した。TCでは、1%添加溶液について同様の試験を実施したが、添加しない場合と比べてほとんど溶出率の増加が認められなかった。

2. プランルカスト水和物錠の溶出性

水の試験液にSDS又はPSを0~3.0%添加し、プランルカスト水和物錠について溶出試験を実施した。その結果、SDS、PSのいずれも3.0%添加による4時間後の溶出率は低く、50%未満であり、SDSとPSの間でほとんど差が認められなかった。SDS及びPSの添加濃度と90分後の溶出率の関係を図示した(図5-I)。PSでは0~3.0%の範囲で徐々に溶出率が増加し、SDSの臨界ミセル濃度(0.1%付近)を超えると、SDSとPSの溶出率が逆転する傾向が観察された。

同様に、Mc6.8の試験液にSDS又はPSの濃度を0~1.0%まで変化させて添加し、溶出試験を実施した。PS及びSDSの添加濃度と90分後の溶出率の比較においては、水の場合と同様、SDSは0.1%で溶出率の急激な上昇が見られ、PSとの逆転が観察された(図5-II)。

個々の溶出曲線に関しては、PSの場合、1%添加の場合でも4時間後の溶出率は85%に満たなかったが、添加濃度が低いところから濃度に応じて溶出率が高くなる傾向は水の場合と同様であった。しかし、SDSについては図6に示したように、0.05%から0.20%における溶出挙動が通常と異なり、2段階或いは

は頭打ちの様子が観察された。同製剤を用いて0.45 μm のフィルターによるろ過を行わず、インラインフィルターのみで試験を行ったところ、通常に近い溶出曲線が得られた。この濃度領域では溶解状態が不安定で、フィルターの有無によって溶出挙動が大きく変わることが観察された。

3. シロスタゾール錠の溶出性

シロスタゾール錠について、水、Mc6.8、Mc4.0、pH1.2の4種の試験液にSDSを0.0~0.5%、PSは0.0~1.0%、TCは0.0~0.3%(水の場合は1.5%)添加して溶出試験を実施した。

その結果、シロスタゾール錠については試験液による溶出挙動の差がほとんど見られず、SDSを添加した場合、いずれの試験液も0.3%溶液で溶出率が急激に上昇し、60分後には溶出率が90%を超えてプラトーに達した。

一方、PSについては可溶化能が低く、いずれの試験液においても添加濃度が低いところから濃度に応じて緩やかに溶出率が高くなるが、1.0%添加の場合でも3時間後の溶出率は60%に留まった。

更にTCの場合は、添加濃度に応じて溶出率は若干増加するものの、0.3%添加した場合の3時間後の溶出率はいずれの液も約20%、水に1.5%添加した場合でも3時間後の溶出率は40%であり、TCの可溶化能は他の界面活性剤に比べ低かった。

各界面活性剤の添加濃度と45分後の溶出率の関係を試験液ごとに図7に示した。PS及びTCの場合、いずれの試験液においても、溶出率は低いものの濃度に応じて徐々に増加する傾向が見られた。

これに対してSDSは、臨界ミセル濃度における溶出率の急激な上昇が観察された。試験液が水の場合0.2%、Mc6.8の場合は0.05%で、また、Mc4.0の場合は0.05%以上で溶出率は急激に上昇し、PSによる溶出率と逆転した。更にpH1.2の試験液においては、SDSの0.05%から溶出率が上昇し、PSの溶出率を上回った。

D. 考察

1. 界面活性剤溶液の紫外吸収スペクトル

SDS や PS は乳化剤や溶解補助剤として医薬品原料としても用いられ、多種類の規格の試薬が流通している。しかし、界面活性剤は高純度の製品が得られにくく、その品質が溶出性や分析結果に影響を与えることが懸念される。梶村らは、SDS に混在する他のアルキル硫酸ナトリウムが溶出性に影響を及ぼすことを報告している⁸⁾。

局方・ポリソルベート 80 (PS) は無色～だいたい黄色の粘稠性のある液体であるとされているが、無色の製品が入手しにくいことから、吸光度を利用した分析においては 260nm 付近の吸収が測定結果に影響を及ぼす可能性があることが明らかとなった。

品質再評価では、公的溶出試験(案)の作成に際しては、できるかぎり簡易な試験法を採用するとされ、定量法の第1選択枝として吸光度法が採用されている⁹⁾。局外規第三部においても界面活性剤として PS を使用し、且つ溶出率に低波長側の吸光度を測定している製剤がみられる。試薬選択の際には注意が必要である。

2. ソファルコン錠の溶出性

ソファルコンはその物理化学的性質から、pH4.0 での荷電状態が小さく溶解度は最も低いことから、pH4.0 では 1 オーダー高い濃度の界面活性剤が必要であった。

界面活性剤の臨界ミセル濃度は、図 8 に示すようにそれぞれ大きく異なっている。SDS は水では 0.23%、0.02MNaCl 中では 0.11%、0.1MNaCl 中では 0.04%へと減少する。ポリソルベートでは、イオン強度の増加によってそれほど大きな変化は無く、水中で 0.0013%、0.1NHCl 中で 0.00082%と報告されている¹⁰⁾。TC は、水中で 0.42%で、イオン性界面活性剤なのでイオン強度で若干低下すると考えられるがデータとしては見いだせなかった。

ソファルコン錠の場合には、SDS と PS の添加量と溶出挙動は比較的類似しており、両界面活性剤間で可溶化能に大きな差はないと思われた。

PS と比較して、SDS の可溶化能が高い事例が多い

^{11,12)}が、医薬品によっては大きな差が無い場合があることが示唆された。ただし、製剤処方中に PS が配合されていることもあり、今後、ソファルコンの可溶化能そのものの比較を試みることでより明確な結果を得る必要がある。

水の試験液に臨界ミセル濃度以下の濃度の SDS が添加された系では、かえって溶出率が減少する傾向が見られた。類似の報告が、メキタジンと相互作用を起こすことで報告されているが¹³⁾、酸性薬物のソファルコンとの相互作用は考えにくいことから、添加剤との相互作用を生じて、溶出が低下しているのではないかと思われた。

TC では、1%と CMC 以上の濃度を添加したにもかかわらず、いずれの試験液中でも溶出率の明らかな増加は認められなかった。TC の可溶化能は非常に低いことが報告されており¹⁴⁾、医薬品の種類によって、例えばインドメタジンとフェニルブタゾンでは、可溶化の状況が大きく変わることも報告されている¹⁵⁾。詳細については検討が必要であるが、ソファルコンは TC への取り込みが弱い医薬品であることが示唆された。

3. プランルカスト水和物錠の溶出性

プランルカスト水和物はその物理化学的性質から、解離定数 pKa:3.42 であるため、pH1.2~5 程度では解離しにくく、溶解度は低いが、pH6.8 では 8 倍程度増加する。低い pH では、ほとんど荷電のない状態のため、SDS 又は PS いずれの添加でもあまり溶出率は上がらず、界面活性剤による差はほとんど認められなかった。pH6.8 では、プランルカストは正荷電を有するため、SDS ミセルとの相互作用が臨界ミセル濃度以上で急激に起こり、可溶化能が PS よりもやや強くなったと思われる。界面活性剤濃度が低い部分では、ポリソルベートは臨界ミセル以上にあるためポリソルベートの方が溶出率が高い傾向があった。

プランルカスト水和物錠では、ソファルコン錠の場合と同様、PS と SDS の添加量と溶出挙動は比較的類似しており、両界面活性剤間で可溶化能に大きな差はないと思われた。

また、pH6.8 の 0.05~0.2%SDS 溶液における溶出挙動については、SDS の臨界ミセル濃度付近であるため、可溶化能が不安定であると考えられ、フィルターの有無が大きな影響を及ぼし変動要因となると思われた。ガイドラインでは界面活性剤の濃度を 1.0%以下で検討することとされているが、製剤の違いや室間差を考慮して溶出条件を設定する必要がある。

4. シロスタゾール錠の溶出性

シロスタゾール錠は局方収載製剤で、溶出性は試験液に 0.3%SDS 水溶液を用い、パドル法により、毎分 50 回転で試験を行っている。医療用医薬品品質情報集⁴⁾によると、シロスタゾールは解離基を持たず、製剤の溶出挙動は 0.3%SDS 添加の場合、4 液性による溶出性に差が見られない。今回使用した製剤の結果からも、いずれの界面活性剤においても液性による可溶化能の顕著な差は見られなかった。

一方、SDS、PS 及び TC の各添加濃度と 45 分後の溶出率の関係において、SDS は水に比べて他の液性で溶出率が急激に上昇する現象が低濃度側にシフトする現象が観察された。水はイオン強度が低く緩衝作用が弱いため原薬の性質や製剤の違いが溶出挙動に及ぼす影響が大きいこと、また SDS は臨界ミセル濃度が界面活性剤の使用濃度付近にあるため、試験液の塩濃度の違い等により低濃度側にシフトしているためと考えられた。

シロスタゾール錠に関しては、ソファルコン錠及びプラニルカスト水和物錠と違い、PS、TC 又は SDS 添加時の溶出率がいずれの液性においても明らかに異なり、界面活性剤間で可溶化能に大きな差が認められた。しかし、SDS の 0.3%以下を除いて、液性による溶出率の差は小さかった。

今回の結果から界面活性剤と医薬品の相互作用は、医薬品の種類によって大きく異なることが推測された。今後更に異なる医薬品で検討を加えると共に、SDS に関しても、医薬品添加剤との相互作用が示唆されていることを考慮すると^{16,17)}、原薬に対する可溶化との関連もあわせて検討する必要があると思われる。

る。

E. 結論

1. 各種の SDS 又は PS の水溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定した。その結果、PS の多くは 300nm 以下に吸収が認められ、吸光度測定法を用いる場合は試薬の選定に注意する必要があることが明らかとなった。

2. ソファルコン錠について、pH4.0、pH6.8 及び水の試験液に、界面活性剤として SDS、PS 及び TC の濃度を変えて添加し、溶出試験を実施した。その結果、これまで SDS の方が PS よりも一般的に可溶化能が高いと考えられていたが、ソファルコン錠に関しては、PS と SDS ではいずれの試験液についても大きな差が見られず、界面活性剤濃度によっては PS の方が可溶化能は高いということが明らかとなった。また、TC については非常に可溶化能が低いことが示された。今後更に異なる特性の医薬品で情報を蓄積する必要がある。

3. プラニルカスト水和物錠について、pH6.8 及び水の試験液に、界面活性剤として SDS 又は PS の濃度を変えて添加し、溶出試験を実施した。その結果、本製剤に関しては、PS と SDS ではいずれの試験液についても大きな差が見られず、活性剤濃度によっては PS の方が可溶化能は高かった。また、臨界ミセル濃度付近の濃度においては製剤や試験室間で溶出挙動が変化する可能性があることが明らかとなった。今後更に異なる特性の医薬品で情報を蓄積する必要がある。

4. シロスタゾール錠について、水、pH6.8、pH4.0 及び pH1.2 の試験液に、界面活性剤として SDS、PS 又は TC の濃度を変えて添加し、溶出試験を実施した。その結果、いずれの試験液においても溶出率は SDS>>PS>TC の順であり、本製剤に関しては、界面活性剤によっていずれの試験液においても可溶化能に大きな差が認められた。一方、液性の違いによる可溶化能について、PS 及び TC においては顕著な差は見られなかった。しかし、アニオン性界面活