

表1 世界で市販されている長期徐放性注射製剤

製品名	有効成分	投与経路	適応	製造販売	国/地域
マイクロスフェア製剤	Risperdal Consta リスパダールコンスタ	Risperidone 筋肉内投与	2週間 統合失調症	Janssen	US, Japan
	Lupron Depot リューブリン	Leuprolide acetate 筋肉内投与	1 もしくは 3 カ月 進行性前立腺がん	Abbott/Takeda GE : ニプロ, あすか製薬	US, Japan
	Sandostatin LAR Depot サンドスタチンLAR	Octreotide acetate 筋肉内投与	4週間 末端肥大症	Novartis	US, Japan
	Nutropin Depot	Somatropin (rDNA origin) 皮下投与	1 or 2 months ホルモン療法	Genentech	US
	Trelstar	Triptorelin pamoate 筋肉内投与	1 or 6 months 進行性前立腺がん	Watson Pharma	US
	Vivitrol	Naltrexone 筋肉内投与	1 month アルコール依存症	Alkermes	US
	Somatuline LA	Lanreotide acetate 筋肉内投与	1 month 末端肥大症	Ipsen	Europe
	Suprecur スプレキュア	Buserelin acetate 皮下投与	1 month 進行性前立腺がん	Sanofi-Aventis	UK, Japan
	Zoladex	Goserelin acetate 皮下投与	1 or 3 month 進行性前立腺がん	AstraZeneca	US, Japan
インプラント製剤	Viadur	Leuprolide acetate 皮下投与	12 month 進行性前立腺がん	Bayer/ALZA	US, UK

表2 トリプトレリンパモ酸封入マイクロスフェア製剤の生物学的同等性試験に推奨されている試験

有効成分	トリプトレリンパモ酸
剤形/投与経路	注射剤/筋肉内投与
推奨試験	3試験
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与、パラレル、in vivo薬物動態学的エンドポイント
	含量 3.75 mg/バイアル
	被験者 進行前立腺がん男性患者
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与、パラレル、in vivo薬物動態学的エンドポイント
	含量 11.5 mg/バイアル
	被験者 進行前立腺がん男性患者
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与、パラレル、in vivo薬物動態学的エンドポイント
	含量 22.5 mg/バイアル
	被験者 進行前立腺がん男性患者
21CFR § 314.94により、提案された非経口製剤は全ての有効成分含量(22.5, 11.25, 3.75 mg/vial)について標準製剤と質的(Q1)および量的(Q2)に同等であること	
分析対象	血清中トリプロレリン
90%信頼区間に基づく 生物学的同等性	トリプトレリン 以下の薬物動態パラメーターの90%信頼区間は許容域(80.00-125.00)を満たすこと 対数変換したAUC <sub>7-t</sub> , AUC <sub>t</sub> , AUC <sub>0-∞</sub> , およびC <sub>max</sub> AUC <sub>7-t</sub> : 7日目から最終サンプリング時間までの血中濃度-時間曲線下面積 AUC <sub>t</sub> : 0から最終サンプリング時間までの曲線下面積 AUC <sub>0-∞</sub> : 0から無限大時間までの曲線下面積 C <sub>max</sub> : 最高血中濃度
in vivo試験の免除要請	適用外

表3 リュープロライド酢酸塩(リュープロレリン酢酸塩)封入マイクロスフェア製剤の生物学的同等性試験に推奨されている試験

有効成分	酢酸リュープロライド
剤形/投与経路	注射剤
推奨試験	1試験
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与 無作為化 パラレル in vivo
	含量 7.5mg/バイアル
	被験者 初期治療を受けている前立腺がん患者
	追加事項 試験および標準製剤のグループは患者の疾患進行や治療歴を考慮して釣り合いをとる。 さらに、試験中の治療計画は試験および標準製剤のグループで同じにする。
分析対象	血清中リュープロライド
90%信頼区間に基づく 生物学的同等性	リュープロライド 以下の薬物動態パラメーターの90%信頼区間は許容域(80.00-125.00)を満たすこと 対数変換したAUC <sub>7-t</sub> , AUC <sub>t</sub> , AUC <sub>0-∞</sub> , およびC <sub>max</sub> AUC <sub>7-t</sub> : 7日目から最終サンプリング時間までの血中濃度-時間曲線下面積 AUC <sub>t</sub> : 0から最終サンプリング時間までの曲線下面積 AUC <sub>0-∞</sub> : 0から無限大時間までの曲線下面積 C <sub>max</sub> : 最高血中濃度
in vivo試験の免除申請	3.75 mg/vial, 11.25 mg/vial-1month, 15 mg/vialについて (i) 7.5 mg/vialにおける生物学的同等性試験 (ii) すべての含量のin vitro溶出試験 (iii) それぞれ比較対象となる含量の製剤に対して質的(Q1)および量的(Q2)に同等

表4 リュープロライド酢酸塩(リュープロレリン酢酸塩)封入マイクロスフェア製剤の生物学的同等性試験に推奨されている試験

有効成分	酢酸リュープロライド
剤形/投与経路	注射剤
推奨試験	2試験
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与 無作為化 パラレル in vivo
	含量 30 mg/バイアル
	被験者 初期治療を受けている前立腺がん患者
	追加コメント 試験および標準製剤のグループは患者の疾患進行や治療歴を考慮して釣り合いをとる。 さらに、試験中の治療計画は試験および標準製剤のグループで同じにする。
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与 無作為化 パラレル in vivo
	含量 45 mg/バイアル
	被験者 初期治療を受けている前立腺がん患者
	追加コメント 試験および標準製剤のグループは患者の疾患進行や治療歴を考慮して釣り合いをとる。 さらに、試験中の治療計画は試験および標準製剤のグループで同じにする。
分析対象	血清中リュープロライド
90%信頼区間に基づく 生物学的同等性	リュープロライド 以下の薬物動態パラメーターの90%信頼区間は許容域(80.00-125.00)を満たすこと 対数変換したAUC <sub>7-t</sub> , AUC <sub>t</sub> , AUC <sub>0-∞</sub> , およびC <sub>max</sub> AUC <sub>7-t</sub> : 7日目から最終サンプリング時間までの血中濃度-時間曲線下面積 AUC <sub>t</sub> : 0から最終サンプリング時間までの曲線下面積 AUC <sub>0-∞</sub> : 0から無限大時間までの曲線下面積 C <sub>max</sub> : 最高血中濃度
in vivo試験の免除要請	11.25 mg/vial-3 month, 22.5 mg/vial ついて (i) 30 mg/vialにおける生物学的同等性試験 (ii) すべての含量のin vitro溶出試験 (iii) それぞれ比較対象となる含量の製剤に対して質的(Q1)および量的(Q2)に同等

表5 リスペリドン封入マイクロスフェア製剤の生物学的同等性試験に推奨されている試験

有効成分	リスペリドン
剤形/投与経路	注射剤/筋肉内投与
推奨試験	2試験: In vitroおよびIn vivo
試験1	
試験の種類	In vitro 薬物放出
有効成分含量	25 mg/バイアル
試験液	pH7.4の水200mLを37℃と45℃の恒温槽に設置
試験液量	400mL (各200mL)
温度	37℃と45℃
サンプリング時間	37℃の1日目と21日目 T50%: 放出率50%となる時間、45℃で得られる2点の線形補間から算出 45℃の8日目  標準製剤および試験製剤について12個試験し、各サンプリング時間の標準製剤に対する試験製剤の比を計算する。T50%の試験製剤/標準製剤の比の90%信頼区間は80%から125%である。これらのデータはDissolution Methods Databaseに規定された方法に追加して実施し、規定された方法は安定性および品質管理試験に用いる。
試験2	
試験の種類	In vivo 定常状態 絶食
試験計画	クロスオーバー
有効成分含量	25mg/バイアル
被験者	既に一定期間、長期徐放性リスペリドンを筋肉内投与されている患者 2週間ごと25mgのリスペリドンを投与されており、維持用量を続けることで試験への参加が適格と思われる患者
追加コメント	健康成人や他の抗精神病薬の治療を受けている患者は推奨しない
21CFR § 314.94により、提案された非経口製剤は全ての有効成分含量(12.5, 25, 37.5, 50 mg/vial)について標準製剤と質的(Q1)および量的(Q2)に同等であること	
分析対象	血漿中リスペリドン
90%信頼区間に基づく生物学的同等性	<p>1、溶出試験における各サンプリング時間での試験/標準製剤の比</p> <p>2、反復投与の生物学的同等性評価において、下記の体内動態データを提出する</p> <ul style="list-style-type: none"><li>・定常状態到達後の投与間隔における個々および平均血中薬物濃度</li><li>・個々および平均トラフ値(<math>C_{min}</math> SS)</li><li>・個々および平均ピーク値(<math>C_{max}</math> SS)</li><li>・定常状態における個々および平均AUC<sub>interdose</sub> (定常状態の投与と投与の間のAUC)</li><li>・個々および平均変動率<math>[=100*(C_{max}SS-C_{min}SS)/C_{average} SS]</math></li><li>・個々および平均最高血漿中濃度到達時間</li></ul> <p>対数変換したAUCや<math>C_{max}</math>は分散分析による統計解析を行う。薬物動態パラメーター(AUCおよび<math>C_{max}</math>)の幾何平均の比の90%信頼区間は80-125%となる。試験製剤の変動率は標準製剤の変動率と類似もしくは同等と評価される。薬物動態試料を採取する前に定常状態に到達していることを証明するためにトラフ値の統計解析を実施する。</p> <p>・第Ⅱ期(患者が標準製剤から試験製剤、もしくはその逆に切り替わった時)では、3回目の投与間隔(28-42日)の個々もしくは平均薬物濃度を報告する。正確にトラフ値およびピーク値における変動を検出するため、特にこの期間に集中して試料採取を実施する。この情報はラグタイムが違ってもCminに違いは生じないことを裏付けするための生物学的同等性のサポートデータとなる。</p>
in vivo試験の免除要請	12.5 mg/vial, 37.5 mg/vial, 50 mg/vialについて以下に基づく (i) 25 mg/vialにおけるin vitroおよびin vivo生物学的同等性試験 (ii) すべての含量にわたって製剤の構成比が類似 (iii) すべての含量のin vitro溶出試験

表6 ナルトレキソン封入マイクロスフェア製剤の生物学的同等性試験に推奨されている試験

有効成分	ナルトレキソン		
剤形/投与経路	徐放性懸濁剤/筋肉内投与		
推奨試験	2試験:In vitroおよびIn vivo		
	試験1		
試験の種類	In vitro 薬物放出		
有効成分含量	380 mg/バイアル		
試験液	リン酸緩衝生理食塩水 0.02% Tween 20および0.02%アジ化ナトリウム、pH 7.4 ±0.05 (最終浸透圧270 ± 20 mOsm)		
試験液量	室温で600 ± 10 mgのマイクロスフェア(ナルトレキソン 203 mg)を入れた250 mLのHDPEプラスチックボトルに200 mLの試験液を加える		
温度	37 ± 0.3 ℃		
サンプリング時間	1, 7, 14, 28日目		
	試験製剤および標準製剤について12バイアル試験し、両製剤の放出プロファイルを比較するために以下の改変f2関数を用いる		
	$12(1 - 10^{-1}) \left\{ \left[ 11 \frac{1}{1} \frac{1}{11} \left( (1 - 10^{-1}) - (1 - 10^{-1}) \right) \right]^{11} - 100 \right\}$		
	ただしR <sub>i</sub> およびT <sub>i</sub> はそれぞれ標準製剤および試験製剤の薬物溶出率である。		
	1日目: X <sub>i</sub> = 0		
	1日目から7日目: X <sub>i</sub> = R <sub>Day1</sub> - T <sub>Day1</sub>		
	7日目から14日目: X <sub>i</sub> = R <sub>Day7</sub> - T <sub>Day7</sub>		
	14日目から28日目: X <sub>i</sub> = R <sub>Day14</sub> - T <sub>Day14</sub>		
	通常のf2関数と同様に、比較地点にはいずれかの試料が溶出率85%以上となる時点を含む。 これらのデータはDissolution Methods Databaseに規定された方法に追加して実施し、 規定された方法は安定性および品質管理試験に用いる。		
	試験2		
試験の種類	In vivo 単回投与 絶食		
試験計画	パラレル		
有効成分含量	380 mg/バイアル		
被験者	健康男性および非妊娠女性、一般集団		
21CFR § 314.94により、提案された非経口製剤は標準製剤と質的(Q1)および量的(Q2)に同等であること			
分析対象	血漿中ナルトレキソン		
90%信頼区間に基づく生物学的同等性	ナルトレキソン		
in vivo試験の免除要請	適用外		

表7 オクトレオチド酢酸塩封入マイクロスフェア製剤の生物学的同等性試験に推奨されている試験

有効成分	オクトレオチド酢酸塩
剤形/投与経路	注射剤
推奨試験	1試験
	試験の種類 絶食
	試験計画 単回投与、パラレル、in vivo
	含量 30 mg
	被験者 健康男性および非妊娠女性、一般集団
	追加事項 殿筋内に筋肉内投与する
分析対象	血漿中オクトレオチド
90%信頼区間に基づく 生物学的同等性	オクトレオチド酢酸塩 以下の薬物動態パラメーターの90%信頼区間は許容域(80.00-125.00)を満たすこと 対数変換したAUC <sub>0-28</sub> , AUC <sub>28-56</sub> , AUC <sub>t</sub> , AUC <sub>0-∞</sub> , およびC <sub>max</sub> AUC <sub>0-28</sub> : 0日目から28日目までの血中濃度-時間曲線下面積 AUC <sub>28-56</sub> : 28日目から56日目までの血中濃度-時間曲線下面積 AUC <sub>t</sub> : 0から最終サンプリング時間までの曲線下面積 AUC <sub>0-∞</sub> : 0から無限大時間までの曲線下面積 C <sub>max</sub> : 最高血中濃度
in vivo試験の免除要請	10 mg/vial, 20 mg/vial について (i) 30 mg/vialにおける生物学的同等性試験 (ii) すべての含量のin vitro溶出試験 (iii) それぞれ比較対象となる含量の製剤に対して質的(Q1)および量的(Q2)に同等
21CFR § 314.94により、提案された非経口製剤は全ての有効成分含量(22.5, 11.25, 3.75 mg/vial)について標準製剤と質的(Q1)および量的(Q2)に同等であること	

表8 FDAのDissolution Methods Databaseに記載されているマイクロスフェア製剤の溶出試験条件

Drug Name	Dosage Form	USP Apparatus	Speed (RPMs)	Medium	Volume (mL)	Recommended Sampling Times	Date Updated
Leuprolide Acetate	Injectable (Extended Release)			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			01/15/2010
Risperidone	Injectable			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			01/15/2010
Naltrexone	Injectable Suspension			Phosphate buffered saline with 0.02% Tween 20 and 0.02% Sodium azide, pH 7.4 (final osmolality should be 270 ± 20 mOsm), or any other appropriate medium, at 37°C. Develop an in vitro release method using USP IV (Flow-Through Cell), and, if applicable, Apparatus II (Paddle) or any other appropriate method, for comparative evaluation by the Agency			09/01/2011
Triptorelin Pamoate	Injectable Suspension	II (Paddle)	200	Water-Methanol (95:5); Reconstitute vial in 2 mL Water for Injection, add to 500 mL medium at 37°C	500	1, 6, 12, 24, 48 and 72 hours	07/14/2008
Octreotide Injection	Injectable (Extended Release)			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			12/23/2010

研究要旨 (1) マイクロスフェア製剤の in vitro 放出試験に関する学術論文を対象に、これまでに報告された方法, ”試料採取と分離法”, ”透析法”及び”連続フロー法”を中心に試験条件(試験温度や試験液, 水力学的要因など)を表にまとめた. (2) リスペリドン封入マイクロスフェア製剤を対象に, ”連続フロー法”において試験液中の界面活性剤の有無と流速が放出性に及ぼす影響を調査し, 流速の影響は殆ど無いこと, 使用するセルの種類によって界面活性剤の影響が異なることを示した.

#### (1) in vitro 放出性試験方法の文献調査

##### A. 研究目的

マイクロスフェア製剤など長期徐放性注射剤において薬物放出特性は最も重要な製剤機能の一つである. In vitro 放出試験は品質管理や製剤開発, 製造工程パラメーターの変動が生物学的利用能に及ぼす影響の評価などに有用である上, 公定書への記載が要求される場合もあることから, 試験法の標準化が望まれている.

薬局方に記載されている溶出試験装置は主に経口固形製剤を対象に設計されており(ただし USP や EP にはそれぞれ皮膚適用製剤や坐剤など経口固形製剤以外の溶出試験法が記載されている), そのまま長期徐放性注射剤に使用するのは難しい. 例えば, 回転バスケット法やパドル法では試験液量が大量に必要であること, 試験期間中に試験液が蒸発してしまうことが問題点として挙げられる. そのため, これまでに様々な方法で長期徐放性注射剤の in vitro 放出性が評価されており, 標準化には至っていない.

これまでに報告されているマイクロスフェア製剤の in vitro 放出性の試験方法及び条件を網羅することは, 最適な方法を設定するのに有用であると考えられる. この報告書では, 3つの代表的な方法, ”試料採取と分離法”, ”透析法”及び”連続フロー法”を中心に使用例と利点・欠点と共にそれぞれの特徴を概

説する.

##### B. 研究方法

PubMed で ”microsphere”, ”in vitro (drug) release”, ”testing”もしくは”method”をキーワードとして検索した論文のうち主に製剤分野のジャーナルの文献を対象とした. また, 経口投与を想定したマイクロスフェア製剤の in vitro 放出性評価は対象外とした. その他, in vitro release に関する総説[1]を参考にした.

##### C. 研究結果・考察

いずれの方法においても, まずは最適な試験液と試験温度を選択する必要がある. In vitro 放出試験の目的は医薬品の有効性・安全性を確保することであり, 試験条件は生体内に投与された際の生理的環境を反映しているべきであり, IVIVC が構築されることが望ましい. 最も汎用されている試験液はリン酸緩衝液, もしくはリン酸緩衝生理食塩水で, 試験温度は 37℃である. また, in vivo においてシンク条件は成立しないが, 適切に放出性を評価するためには, マイクロスフェアに封入した薬物の溶解性に基づくシンク条件の維持と, 試験期間中の薬物の安定性を考慮して, 試験液を選択すべきである.

近年は迅速かつ確実に薬物放出性を評価するために試験期間を短くする試みがなされている. 市販されているマイクロスフェア製剤では投与間隔が3か月や半年におよぶものもあり, 加速的な条件で試

験を実施すれば試験期間を数か月から数週間へ短くすることが可能である。よく使われる加速条件には、37℃よりも高い試験温度とpHの変更、界面活性剤の添加が挙げられる。以下の試験条件をまとめた表には加速条件が検討されている文献にはその条件も記載した。

#### 試料採取と分離法(図1, 表1[2-12])

最もよく使われている方法で、多くの場合、エッペンチューブや試験管、ボトルなどの容器にマイクロスフェアと試験液を入れ、攪拌器や恒温槽に設置し、継時的に上清もしくはマイクロスフェアを回収して放出された薬物量を測定する。

使用する容器のサイズや試験液量はシンク条件と定量方法の感度に依存し、1 mL 程度と少ないケースも見受けられるが、10-100 mL で実施されることが多い。マイクロスフェアが凝集すると放出速度が遅くなるが、攪拌することで凝集が抑えられるという報告があり[6]、攪拌の種類や程度、有無も設定する必要がある。試料採取の方法は概ねフィルターろ過か遠心分離が用いられている。測定対象は試験液が殆どであるが、マイクロスフェアを回収して放出せずに残っている薬物量を測定する方法も用いられている。また、シンク条件を維持するために、試料採取の際に試験液を交換する方法も用いられていた[8, 11]。

“試料採取と分離法”の利点は、直接的に *in vitro* 放出性を評価できること、他の方法と比較して特別な装置が必要ないこと(恒温槽や攪拌器のみ)、試料や試験液の設置が簡便であることが挙げられる。欠点としては、マイクロスフェアの凝集が第一の懸念事項で、凝集により放出率が低くなることがあるため、連続的もしくは断続的な攪拌や界面活性剤の利用を検討する必要がある。第二の懸念事項はサンプリング時のフィルターろ過操作である。フィルターを使用する際、特に薬物や試験液量が少ない場合は、フィルターへの薬物の吸着や液量のロスが問題となる。また、シンク条件の維持に試験液全てを交換する必要がある場合、粒子が分解するにつれて沈殿に要する時間が増え、遠心分離で全ての試験液を交換するのが難しくなる点が挙げられる。

#### 透析法(図2, 表2[6, 13-17])

マイクロスフェアを試験液と共に透析バックに入れ、封をしたバックを試験液の入ったビーカーなど適切な容器に浸し、ビーカー内を攪拌しながら加温する。マイクロスフェアが透析膜によって物理的に外側の試験液から隔離されており、一般的にはビーカー内(透析膜の外側)の試験液から放出率を測定する。

透析膜からの薬物の拡散はビーカー内の攪拌によって増加するため、適切な方法で攪拌する必要がある。攪拌方法には一般的に水平振とう器やマグネティックスターラーが用いられている。試験液の液量は“試料採取と分離法”と同様に、シンク条件と定量方法の感度に依存する。特に記載の無い報告が多いが、透析チューブの内側の液量に対して外側の液量が多いほど透析膜を介した濃度差が大きくなり、薬物を外側へ運ぶための十分な駆動力が確保される。マイクロスフェアを入れた透析チューブの内側の液量は、外側の液量の少なくとも 8-10 分の1で実施され、例えば、リユープロレリン封入マイクロスフェア製剤では製剤 50 mg と試験液 5 mL の入った透析チューブに対し、試験液(透析液)は 50 mL で実施されている。また、透析膜のカットオフ径は 6-8kDa から 300kDa まで様々であるが、封入薬物が拡散する律速要因にならないよう十分に大きなカットオフ径の膜を選ぶことが重要である。

“透析法”の利点は“試料採取と分離法”と同様に透析膜以外は特別な装置が必要ないこと、試料採取や試験液置換が容易であることが挙げられる。欠点としては、透析膜から拡散した薬物を測定するため、直接的に放出性を評価できないため、バーストのある製剤などの初期放出率を正確に測定することが困難な点が挙げられる。その他、透析チューブにマイクロスフェアを封入する操作が煩雑であること、透析膜の面積が小さいと外液と平衡に到達するのが遅くなることが挙げられる。これらの問題は市販の透析膜にサンプルを入れるねじ口がついた透析カセットなどを使えば操作性は改善可能である。ただし、透析膜に薬物が吸着する場合、この方法は使えない。

#### 連続フロー法(図3, 表3[3, 5, 16, 18-26])

使用する装置や方法が最もバリエーションに富む方法であり、フロースルーセル法溶出試験装置

(USP4)を使用する他、USP4 のフロースルーセルや空の HPLC カラムに封入したマイクロスフェアに、ポンプを使って試験液を送液する。試験期間中、フロースルーセルや試験液は恒温槽などで一定の温度になるよう制御される。

フロースルーセルや HPLC カラムの出口にはマイクロスフェアを保持するためにフィルターが設置され、市販の USP4 自動装置を使用する場合は、背圧が低く吸着の少ないガラスフィルターが使用される。ポンプの種類はペリスタポンプ、ピストンポンプやシリンジポンプが使用されている。試験液は循環するか(クローズドシステム、図 3a)、新しい試験液が常に流れる(オープンシステム、図 3b)方法のどちらかが使われる。クローズドシステムではピストンポンプで 8 mL/min から 33 mL/min までと速い流速で試験されるのに対し、オープンシステムではペリスタポンプかシリンジポンプで 1.4  $\mu$ L/min から 0.12 mL/min と遅い流速で試験される。これは、マイクロスフェア製剤の試験期間は数日から数か月と長く、オープンシステムで流速を速くすると大量の試験液が必要になることと、それぞれのポンプの性能が影響していると考えられる。

オープンシステムの場合は HPLC カラムやフロースルーセルから流れ出た試験液を回収して放出率を測定するのに対し、クローズドシステムでは、試験液が循環しているため、殆どの場合、試験液を入れた容器から継続的に試験液を回収して放出率を測定する。ただし、試験液を入れた容器に UV プロブを入れて、試験液を回収することなく放出率を測定する方法も提案されている[24]。また、クローズドシステムでシンク条件を維持するために、ある一定量薬物が放出された後に、試験液を半量ずつ定期的に交換する方法も用いられている[20]。

“連続フロー法”の利点は、連続的な試料の採取と試験液置換がしやすいことが挙げられる。“透析法”よりは直接的な *in vitro* 放出性の評価が可能である。また、12mm セルと USP4 を使った方法において、マイクロスフェア製剤はガラスビーズと混和してフロースルーセルに入れられており、これによりマイクロスフェア製剤の凝集を防ぐことができると考えられている。

不利な点は、他の方法と比較して特別な装置を必要とすることである。市販のフロースルーセル法の自動装置を用意するか、適切なポンプとフロースルーセル、もしくは空の HPLC カラムなどを用意する必要がある。その他の欠点としては、賦形剤によるフィルターの目詰まりによる流速の変動が挙げられる。試験期間中に一定の流速が確保されない、放出プロファイルや試験の再現性に影響する。フィルターの目詰まりが生じる場合は、フィルターの代わりにガラスウールやろ過面積の大きいチューブフィルターを使うことで問題を解決できる。また、クローズドシステムの場合、長い試験期間のうちにフィルターを通り抜けた製剤由来の物質がポンプの詰りを引き起こすことが問題となっていたが、近年、バルブレスのピストンポンプが開発され、問題が解消されつつある。

#### その他

1990 年代にパドル法を使った *in vitro* 放出性の評価も報告もされている[2, 3]。採取した試験液 5mL を遠心し、上清 4mL を分析に使い、残り 1mL に新しい試験液 4mL を加えてベッセルに戻す方法が用いられている[3]。より簡便に測定する方法として、パドル法に光ファイバーの UV プロブを用いる方法も提案されているが、マイクロスフェアの凝集と検出部への吸着によって安定した値が得られないようである[24]。上述したように、試験液の蒸発とマイクロスフェアの分離が課題となり、パドル法を使った注射用マイクロスフェア製剤の評価はこれ以降報告されていない。

#### 試験法の比較

試験方法の違いがマイクロスフェア製剤からの薬物放出挙動に与える影響は以前から調べられている。Conti らの報告では、“パドル法”や“試料採取と分離法”よりも、“連続フロー法”で放出速度が速く、マイクロスフェア製剤の *in vitro* 放出試験に最適であると考察されている[3]。Nastruzzi らの報告においても、“透析法”よりも“連続フロー法”の方が速い放出挙動を示し、再現性が高いことと、自動化により多サンプルの測定が可能となり正確な放出曲線が得られるという利点が述べられている[16]。一方、Delplace らは、4 つの薬物(イブプロフェン、リドカイン、プリロカイン及びデキサメタゾン)を封入したマイクロスフェアを調製



し、それぞれについて”試料採取と分離法”で攪拌の有/無しと,”連続フロー法”で2 mL/dと0.7 mL/d, など4種類以上の方法を比較している[5]. その結果, デキサメタゾン以外の薬物では, 試験条件が放出挙動に及ぼす影響は無視できるものかわずかなものであった. デキサメタゾン封入マイクロスフェアを”フロースルーセル法”で測定すると, 60 日程度で放出率100%に到達するのに対し,”試料採取と分離法”では攪拌有りでも120 日で放出率は60%程度であった. このような影響の差は, 詳細は不明であるが, 薬物の物性やマイクロスフェア製剤の調製方法, 放出メカニズムの違いが関係しているものと考察されている.

#### D. 結論

マイクロスフェア製剤の *in vitro* 放出試験を設定する際に, どの試験方法を選択するかは, 各方法の特徴や利点・欠点を踏まえた上で, 試験の目的と, 製剤の特性や封入薬物の溶解性によって決定される. 例えば, 製剤開発の初期の段階では, 最も簡便かつ直接的に *in vitro* 放出性を評価できる”試料採取と分離法”が採用され, ルーチンで実施する品質管理試験などは試料採取が容易な”連続フロー法”を使用する場合が考えられる. 最終的にどの方法が適切かは実際に試験法を比較し, 生体内挙動との関連性や許容できる試験期間, 妥当性確認の観点から判断され, 試験方法が構築されるものと考えられる.

#### E. 参考文献

[1] S.S. D'Souza, P.P. DeLuca, *Pharmaceutical research*, 23 (2006) 460-474.  
 [2] D.F. Bain, D.L. Munday, A. Smith, *Journal of microencapsulation*, 16 (1999) 369-385.  
 [3] B. Conti, I. Genta, P. Giunchedi, T. Modena, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21 (1995) 1223-1233.  
 [4] G.J. Dawes, L.E. Fratila-Apachitei, K. Mulia, I. Apachitei, G.J. Witkamp, J. Duszczek, *Journal of materials science. Materials in medicine*, 20 (2009) 1089-1094.  
 [5] C. Delplace, F. Kreye, D. Klose, F. Danede, M. Descamps, J. Siepmann, F. Siepmann, *International journal of pharmaceuticals*, 432

(2012) 11-22.

[6] S.S. D'Souza, P.P. DeLuca, *AAPS PharmSciTech*, 6 (2005) E323-328.  
 [7] D. Klose, F. Siepmann, K. Elkharraraz, S. Krenzlin, J. Siepmann, *International journal of pharmaceuticals*, 314 (2006) 198-206.  
 [8] S.B. Murty, J. Goodman, B.C. Thanoo, P.P. DeLuca, *AAPS PharmSciTech*, 4 (2003) E50.  
 [9] A. Schoubben, P. Blasi, P.P. DeLuca, *Journal of pharmaceutical sciences*, 101 (2012) 1212-1220.  
 [10] M. Shameem, H. Lee, P.P. DeLuca, *AAPS pharmSci*, 1 (1999) E7.  
 [11] N.K. Varde, D.W. Pack, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 124 (2007) 172-180.  
 [12] B.H. Woo, K.H. Na, B.A. Dani, G. Jiang, B.C. Thanoo, P.P. DeLuca, *Pharmaceutical research*, 19 (2002) 546-550.  
 [13] S. D'Souza, J.A. Faraj, R. Dorati, P.P. DeLuca, *AAPS PharmSciTech*, (2014).  
 [14] N. Faisant, J. Akiki, F. Siepmann, J.P. Benoit, J. Siepmann, *International journal of pharmaceuticals*, 314 (2006) 189-197.  
 [15] J.W. Kostanski, P.P. DeLuca, *AAPS PharmSciTech*, 1 (2000) E4.  
 [16] C. Nastruzzi, E. Esposito, R. Cortesi, R. Gambari, E. Menegatti, *Journal of microencapsulation*, 11 (1994) 565-574.  
 [17] S.S. D'Souza, J.A. Faraj, P.P. DeLuca, *AAPS PharmSciTech*, 6 (2005) E553-564.  
 [18] A. Aubert-Pouessel, D.C. Bibby, M.C. Venier-Julienne, F. Hindre, J.P. Benoit, *Pharmaceutical research*, 19 (2002) 1046-1051.  
 [19] U. Bhardwaj, R. Sura, F. Papadimitrakopoulos, D.J. Burgess, *Journal of diabetes science and technology*, 1 (2007) 8-17.  
 [20] A. Rawat, D.J. Burgess, *International journal of pharmaceuticals*, 394 (2010) 99-105.  
 [21] A. Rawat, E. Stippler, V.P. Shah, D.J. Burgess, *International journal of pharmaceuticals*,

420 (2011) 198-205.

[22] J. Shen, D.J. Burgess, International journal of pharmaceutics, 422 (2012) 341-348.

[23] M.A. Vandelli, F. Rivasi, P. Guerra, F. Forni, R. Arletti, International journal of pharmaceutics, 215 (2001) 175-184.

[24] J.M. Voisine, B.S. Zolnik, D.J. Burgess, International journal of pharmaceutics, 356 (2008) 206-211.

[25] B.S. Zolnik, D.J. Burgess, Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 122 (2007) 338-344.

[26] B.S. Zolnik, P.E. Leary, D.J. Burgess, Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 112 (2006) 293-300.

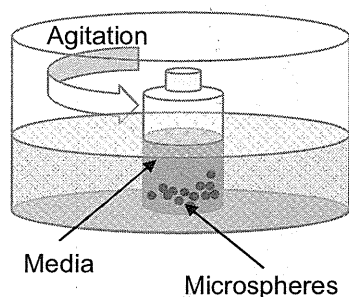


図 1 試料採取と分離法の 1 例

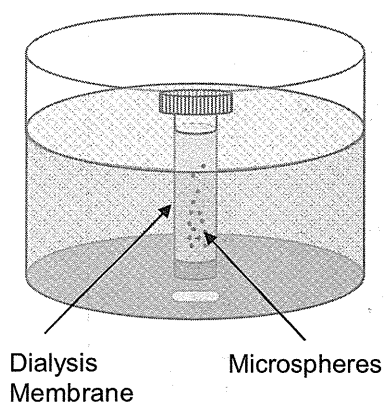


図 2 透析法の 1 例

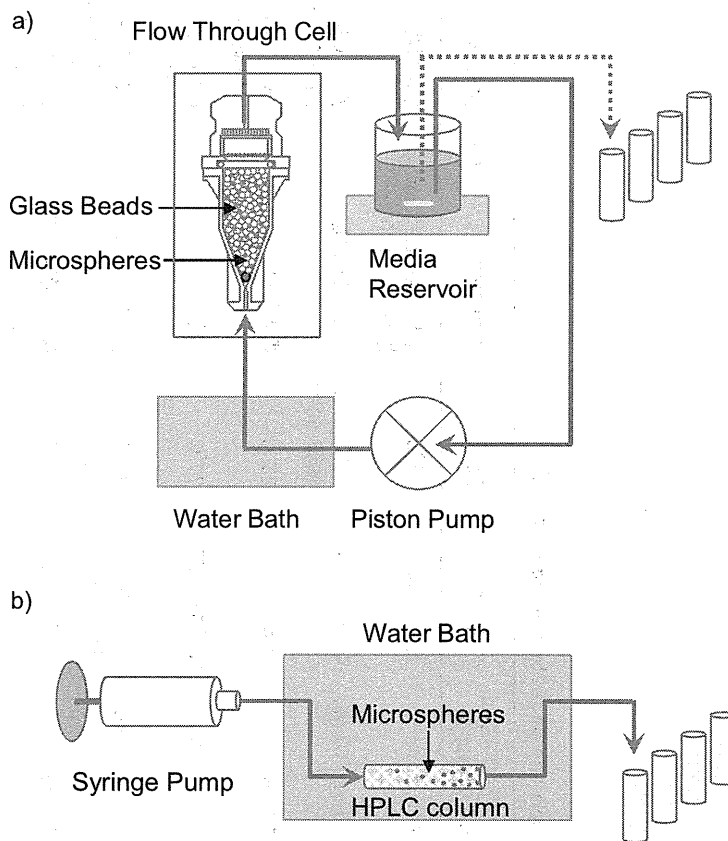


図 3 連続フロー法

a) クローズドシステムの 1 例

b) オープンシステムの 1 例

表1 試料と分離法 (Sample and Separate Method)の使用例

薬物/ポリマー	マイクロスフェア/試験液量	分析試料	温度	水力学的パラメーター	試験液	放出率/時間(代表例)	文献
Indomethacin/ PLA (16 kDa)	?/100 mL	上清 4 mL	37°C	ボトル回転(29 rpm) 攪拌(60-120 rpm)	リン酸緩衝液(pH 7.4)	60%/10日	Conti et al (1995)
Leuprolide/ PLGA (80.6, 25 kDa)	10 mg/10 mL	マイクロスフェア	長期 37°C 加速 50°C	振とう 2回/週	長期 0.033 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 加速 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)	長期試験 100%/28-40日、 加速試験 100%/25-40時間	Shameen et al (1999)
rifampicin/ PLA (2, 9 kDa)	10 mg/100 mL	上清	37°C	振とう (1.5 Hz)	sorensen緩衝液(pH 7.4) Tween 80 0.1%添加	20%/300時間	Bain et al (1999)
Leuprolide/ PLGA (18, 28 kDa)	10 mg/10 mL	マイクロスフェア	37°C	無し	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	100%/240日	Woo et al (2002)
Octreotide/ PLGA (13.6, 35.7 kDa)	20 mg/4 mL	4 mL/週 (液交換)	37°C	攪拌(360 rpm)	0.02 M PBS (pH 7.2), 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 4.0	100%/30-45日	Murty et al (2003)
Leuprolide/ PLGA (30 kDa)	50 mg/50 mL	上清 1 mL	37°C	攪拌 有り/無し	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	agitation 100% (28日) no-agitation 40 % (28日)	D'Souza et al (2005)
Lidocaine/ PLGA (50 : 50)	400 mg/40 mL	上清 1 mL	37°C	攪拌(80 rpm)	リン酸緩衝液 (pH 7.4, USP)	100% (30日)	Klose et al (2006)
Plasmid/ PLGA (50 : 50)	15mg/1.3 mL	上清 1.0 mL (液交換)	37°C	攪拌(6回転/分)	PBS (pH 7.4) Tween 80 0.05% 添加	初期放出 20%/4日 90%/90日	Varde et al (2007)
Dexamethasone/ PLGA	20mg/25 mL	上清 1.7 mL	37°C	攪拌(30 rpm)	PBS (pH 7.0)	初期放出 30%/12日 90%/22日	Dawes et al (2009)
Leuprolide/ PLGA	10 mg/10 mL	上清 1 mL	37°C	・持続的な攪拌 ・週に1度の攪拌	0.1M リン酸緩衝液 アジ化ナトリウム 0.02% 添加	90%/28日(持続的な攪拌) 60%/28日(週に1度の攪拌)	Schoubben et al (2012)
Ibuprofen, Lidocaine, Prilocaine or Dexamethasone/ PLGA	50mg/10mL 50mg/50mL	上清 1-2 mL	37°C	攪拌 有り(80 rpm)/無し	リン酸緩衝液 (pH 7.4, USP)	ibuprofen 100%/12日, lidocaine100%/12日, dexamethazone 60%/120日(攪拌有り), 40%/120 日(攪拌無し)	Delplace et al (2012)

表2 透析法 (Dialysis Method)

薬物/ポリマー	マイクロスフェア /試験液量	分析試料	温度	水力学的 パラメーター	透析膜	試験液	放出率/時間(代表例)	文献
bromocriptine/ PLGA	20-25 mg/ 100 mL	透析液	37°C	攪拌	MW 10-12 kDa	50 mM クエン酸緩衝液 (pH 3.5)	35%/18時間	Nastruzzi et al (1993)
LHRH/ PLGA (50 : 50, 28 kDa)	?/5 mL/40 mL	透析液 1mL	37°C	攪拌	MW 300 kDa	0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) アジ化ナトリウム 0.02% 添加	100%/40日	Kostanski et al (2000)
5-FU/ PLGA (50 : 50)	20mg/ 250 mL	透析液 1 mL	37°C (45, 53, 60, 65°C)	100 rpm	MW 6-8 kDa	・浸透圧: 280, 370, 560, 700, 740 mosm/L, 0.13M リン酸緩衝液 (pH 7.4) ・緩衝液濃度: 0.02, 0.13, 0.26 M リン酸 緩衝液 (pH 7.4) (700 mosm/L) ・pH: クエン酸緩衝液 (pH 1.3), リン酸緩 衝液 (pH 4.5), リン酸緩衝液 (pH 7.4), 炭酸緩衝液 (pH 10.8) (700 mosm/L)	100%/30日 (温度が高いほど 放出率は速い)	Faisant et al (2006)
leuprolide/ PLGA (50 : 50, 30 kDa)	50 mg/5 mL/50 mL	透析液 1 mL (液交換)	37°C	300 rpm	MW 25 kDa	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	100% (28日)	D'Souza et al (2005)
leuprolide/ PLGA (50 : 50, 32 kDa)	? /5 mL/55 mL	透析液 1 mL (液交換)	37, 50, 55, 60°C	攪拌	MW 25 kDa	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	37°C 100%/28日, 50°C 100%/5日, 55°C 100%/3.5日, 60°C 100%/3日	D'Souza et al (2005)
leuprolide/ PLGA (50 : 50, 30 kDa)	50 mg		55°C	magnetic stir	MW 25 kDa	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	100%/3.5-5日	D'Souza et al (2014)

表3 連続フロー法 (Continuous Flow Method)の使用例

薬物/ポリマー	装置構成	フロースルーセル	マイクロスフェア/試験液量	分析試料	温度	流速	試験液	放出率/時間(代表例)	文献
bromocriptine/ PLGA	ペリスタポンプ, オープン	グラスカラム (45 × 9 mm)	20 mg	試験液	37°C	0.12 mL/min	50 mM クエン酸緩衝液(pH 3.5)	30%/10時間	Nastruzzi et al (1993)
Indomethacin/ PLA (16 kDa)	ペリスタポンプ, クローズド	22.6 mmセル	? /1000 mL	試験液 (4 mL)	37°C	17mL/min, 33 mL/min	リン酸緩衝液(pH 7.4)	80%/10日	Conti et al (1995)
Clonidine/ Gelatin	USP4, ピストンポンプ, クローズド	-	100 mg/100 mL		37°C	25 mL/min	脱イオン水	40-80%/8時間	Vandelli et al (2001)
Lysozyme/ PLGA (21 kDa)	シリンジポンプ, オープン	HPLCカラム (4.6 × 50 mm)	20 mg	試験液	37°C	5 µL/min (7.2 mL/d)	0.084 M Tris緩衝液 0.1% BSA 0.09% NaCl添加	20%/60日	Aubert-Poëssel et al (2002)
dexamethasone/ PLGA (5 kDa)	USP4, ピストンポンプ, クローズド	12 mm セル	40 mg/250 mL	試験液 (1.0 mL)	37°C	20 mL/min	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	90%/6日	Bhardwaj et al (2007)
dexamethasone/ PLGA (25 kDa) PLGA (70 kDa)	USP4, ピストンポンプ, クローズド	12 mm セル	45 mg/250 mL	試験液 (1.3 mL)	37, 45, 53, 60, 70°C	4-35 mL/min	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) アジ化ナトリウム 0.1% 添加	45°C 40%/4日, 53°C 80%/4 日, 60°C 80%/2日, 70°C 80%/1日	Zolnik et al (2006)
dexamethasone/ PLGA (25 kDa) PLGA (70 kDa)	USP4, ピストンポンプ, クローズド	12 mm セル	45 mg/250 mL	試験液 (1.3 mL)	37°C	20 mL/min	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) アジ化ナトリウム 0.1% 添加	pH 2.4 100%/70日 pH 7.4 60%/80日	Zolnik et al (2007)
cefazolin/ PLGA	USP4, ピストンポンプ, クローズド	12 mm セル	50 mg/ 250 mL	fiber optic UV probes	37°C	16 mL/min	0.1 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4)	100%/25日	Voisine et al (2008)
dexamethasone/ PLGA	USP4, ピストンポンプ, クローズド	12 mm セル	40mg/250 mL	放出率10%まで 試験液1 mL, 10%到達後125 mLずつ交換	37°C	20 mL/min	0.1M リン酸緩衝生理食塩水 アジ化ナトリウム 0.1% 添加	初期放出 40% 放出90%/50日目	Rawat et al (2010)
dexamethasone/ PLGA(インプラント)	USP4, ピストンポンプ, クローズド	インプラント用 セル	1個/40 mL	試験液 (1.0 mL)	37°C 45°C 50°C 53°C 60°C	8 mL/min	0.1M リン酸緩衝生理食塩水 アジ化ナ トリウム0.1% 添加, 加速条件 (pH 2.0 and 10.0)	初期放出 35% 90%/35日	Shen et al (2011)
risperidone/ PLGA	USP4, ピストンポンプ, クローズド	12 mm セル	10 mg/250 mL	試験液 (1.0 mL)	37°C 45°C	8 mL/min	0.05 M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4)アジ化ナトリウム 0.1%添加	37°C 100% /40日 45°C 100%/8日	Rawat et al (2011)
Ibuprofen, Lidocaine, Prilocaine or Dexamethasone/ PLGA	シリンジポンプ, オープン	HPLCカラム (4.6 × 50 mm)	5, 50mg	試験液 (1 mL, 2 mL)	37°C	0.5 µL/min, 1.4 µL/min (0.7 mL/d, 2 mL/d)	リン酸緩衝液 (pH 7.4, USP)	ibuprofen 100%/12日, lidocaine100% /12日 , dexamethazone 100% /60日	Delplace et al (2012)

## (2) In vitro 放出性に影響を及ぼす要因の検討

### A. 研究目的

昨年度までの研究事業において、市販マイクロスフェア製剤であるリスパダールコンスタ(リスペリドン封入マイクロスフェア製剤)を対象に、試験液の浸透圧やpHが薬物放出に大きく影響すること、試験方法、“試料と分離法”と“連続フロー法”とで試験結果に大きな違いはないが、“連続フロー法”ではセルの種類によってセル間の放出挙動の差異が大きくなる可能性を示した。“連続フロー法”においては流速の変動が放出挙動に影響することが報告されている(ref)。また、“試料と分離法”における界面活性剤の影響は調査したが、“連続フロー法”では調査していない。そこで本年度は引き続きリスパダールコンスタを対象に、“連続フロー法”における流速と界面活性剤の影響を調査した。

### B. 研究方法

#### (1) 試験液の調製

リン酸緩衝液については、0.5 mol/L のリン酸水素二ナトリウム①とリン酸二水素ナトリウム②を調製し、①/②= 8/2 となるよう混合し、pH を 7.4 に調整後、水を加えて 0.2 mol/L とした。各 pH の 0.2 mol/L リン酸緩衝液 100 mL と 0.5M 塩化ナトリウム溶液 600 mL に水を加えて 2000 mL とした。試験液に適宜ポリソルベート 20 を 0.01% となるよう添加し、さらに防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.01% となるよう添加したものを試験に用いた。なお、試験開始前に、試験液は 15 分超音波照射し、45℃で 2 時間加温することで脱気した。

#### (2) HPLC によるリスペリドン濃度の定量

分析装置は HPLC システム(L-700, 日立ハイテック)を用い、文献等を参考に以下の条件で定量分析を行った。カラムは C18 カラム(Inertsile-ODS3 4.0 × 100 mm, 5 μm)を用い、カラムオーブンは 40℃とした。65 mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液/アセトニトリル(7:3)を移動相とし、流速は 1.0 mL/min で分析を行った。分析試料 20 μL を注入し、UV 検出器(275 nm)でリスペリドンのピークを検出した。なお、EP より購入したリスペリドン標準品 18 mg を 100 mL の HBS で溶解したものをストック溶液とし(4℃で保存)、ストック溶液を HBS で希釈した溶液(36 μg/mL から 2 倍希釈で

5 点)を使って検量線を作成した。

#### (3) “連続フロー方式”による薬物放出性の評価

フロースルーセル法溶出試験装置は SOTAX 社の CE7Smart を用いた。装置構成は、本体、ポンプ、UV 検出器、メディアリザーバーとし、クローズドシステムとして使用した。UV 検出器で試験液とリスペリドンの標準液を測定後、システム全体を水で十分に洗浄後、水を抜き、脱気した試験液に置換した。試験温度は 45℃で実施した。試験液の流速は 4, 8 および 16 mL/min とした。直径 12 mm のセルの場合、直径約 1 mm のガラスビーズと量り取ったリスパダールコンスタ 20 mg を 3 回に分けて交互に入れ軽く混ぜた後、2.7μm と 0.7μm のガラスフィルターを取り付けた。散剤用セルの場合、製剤はガラスビーズと混ぜることなく、ドーム型メッシュの下にセットした。下のメッシュには 0.7μm、上のメッシュには 2.7μm と 0.7μm のガラスフィルターを取り付けた。なお、製剤とガラスビーズをセルに入れる前に、セルを徐電装置に当てておいた。設定したメソッドをスタートし、ガイドに従ってセルを入れたジャケットを装置本体にセット後、試験液がセルの中に入ったと同時に UV 検出器の測定もスタートさせた。

### C. 研究結果

#### 界面活性剤の放出挙動に与える影響

フロースルーセルへのマイクロスフェア製剤の設置方法は、12mm セルにガラスビーズと混ぜて入れる方法と、散剤用セルのドーム型メッシュの下に入れる方法の2種類を用いた。なお、放出プロファイルと比較するパラメーターとして、累積放出率 50%および 85%となる点を算出した。

12 mm セルの結果を図 4 に示した。50%および 85%放出点を比較すると、界面活性剤(ポリソルベート 20)を添加したほうがわずかに放出速度が速くなる傾向が認められるが、放出プロファイルに大きな影響は認められなかった。一方で、散剤用セルでは界面活性剤の有無で放出プロファイルが大きく異なることが判明した(図 5)。およそ5日目まではほぼ同様の放出プロファイルが観察されたが、その後、界面活性剤を添加してない方で放出速度が遅くなり、試験期間内に放出率が 100%に達しなかった。

”連続フロー法”において、12 mm セルにガラスビーズとマイクロスフェア製剤を混和して試験を実施する場合は界面活性剤の影響は殆どないが、散剤用セルで試験を実施する場合は界面活性剤の有無が放出挙動に大きく影響することが示された。

#### 放出挙動に与える流速の影響

12mm セルの結果を図 6 に、散剤用セルの結果を図 7 に示した。同じ条件で比較するため、1から3番に 12mm セル、4から6番に散剤用セルを設置して試験を行った。流速 4, 8 および 16 ml/min でリスペリドンの放出プロファイルと比較したところ、流速が速くなるほどセル間のバラツキが小さくなる傾向が見られたものの、流速の違いによる放出速度の変化はいずれのセルにおいても認められなかった。

#### D. 考察

昨年度の検討した”試料と分離法”において、界面活性剤は薬物の溶解性に影響するのではなく、製剤の凝集を抑制し分散性を良くすることで薬物放出を促すことを示した。今回検討した”連続フロー法”においては、12mm セルでは界面活性剤の影響は殆ど認められなかったが、散剤用セルでは界面活性剤を添加しないと放出速度が遅くなるなど放出プロファイルが変化した。これは、12mm セルでは製剤がガラスビーズと混ざり分散した状態であるのに対し、散剤用セルではドーム型メッシュで大きな固まりになるのは防がれているものの、試験液の流れの中で製剤同士がくっつき凝集が起こりやすいためと考えられる。

製剤をフロースルーセルに設置する操作は、特にルーチンで実施する試験の場合、煩雑でないことが望ましい。ガラスビーズと製剤を混和する作業が無いため散剤用セルの方がシンプルであり、セル間や試験間のバラツキも小さい傾向にあるが、界面活性剤を試験液に使用しない場合は注意が必要である。

今回検討したマイクロスフェア製剤では流速の変動が放出プロファイルに与える影響は殆ど認められなかった。これまでに、崩壊型製剤であるプレドニゾン錠など経口固形製剤をフロースルーセル法溶出試験装置で溶出挙動を評価すると、流速が速いほど溶出速度が速くなることが報告されている(ref)。薬物が溶出するまでに崩壊過程のある経口固形製剤では

流速の影響を受けやすいが、マイクロスフェア製剤は粒子状の製剤で、薬物放出過程に経口固形製剤のような崩壊過程が無いため、流速の影響は受けにくいものと考えられた。

#### E. 結論

”連続フロー法”を使ってマイクロスフェア製剤からの薬物放出性を評価する際の試験条件が放出挙動に及ぼす影響を調査し、試験液の流速は 4-16 mL/min の範囲では放出挙動に殆ど影響しないこと、散剤用セルを使用する場合は試験液への界面活性剤の有無が薬物放出プロファイルに大きく影響することを示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Shibata H, Yomota C, Okuda H. : Simultaneous determination of polyethylene glycol-conjugated liposome components by using reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV and evaporative light scattering detection. AAPS PharmSciTech. 2013 Jun;14(2):811-7.

##### 2. 学会発表

1) Hiroko Shibata, Ken-ichi Izutsu, Chikako Yomota, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda: Separation and quantification of polyethylene glycol-conjugated liposome components by reversed-phase HPLC analysis with UV and evaporative light scattering detection. AAPS (2013.11)

2) 柴田寛子, 四方田千佳子, 奥田晴宏 : マイクロスフェア型徐放性製剤の薬物放出性評価: フロースルーセル法溶出試験装置の利用  
日本薬剤学会第 28 年会 (2013.5)

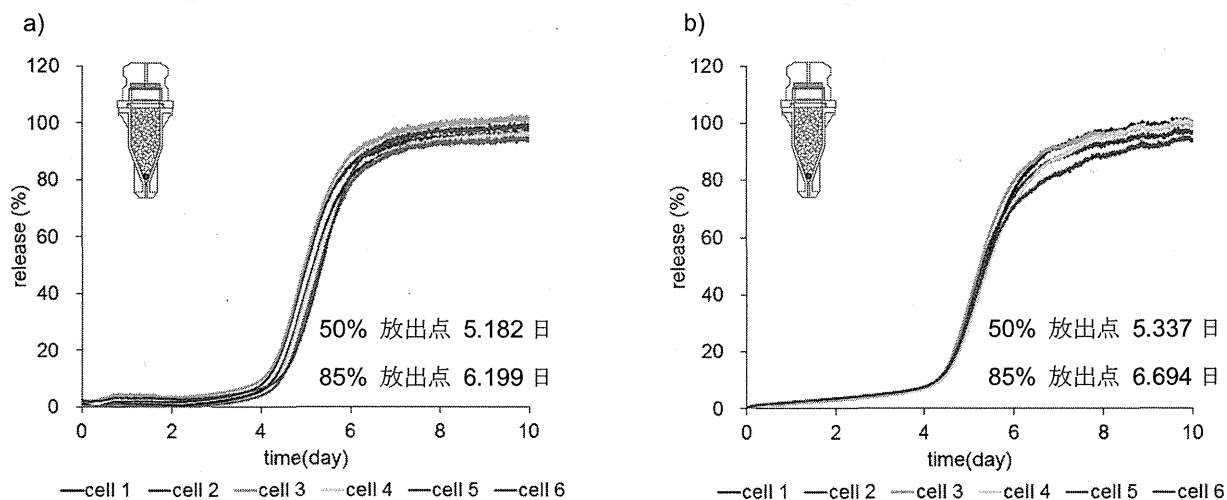


図 4 12 mm セルにおける界面活性剤の影響 a) 界面活性剤有り b) 界面活性剤無し

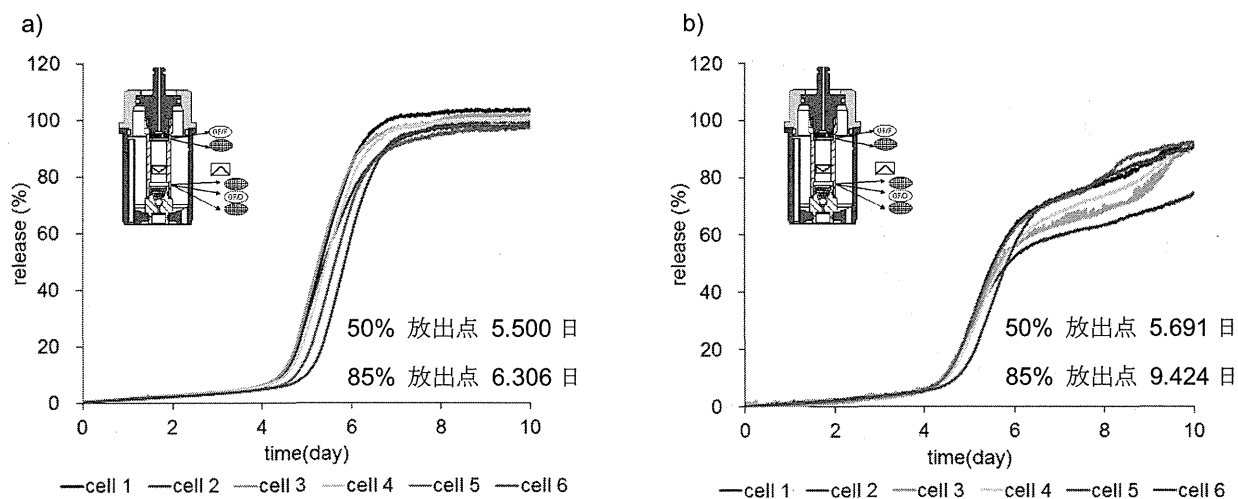


図 5 散剤用セルにおける界面活性剤の影響 a) 界面活性剤有り b) 界面活性剤無し



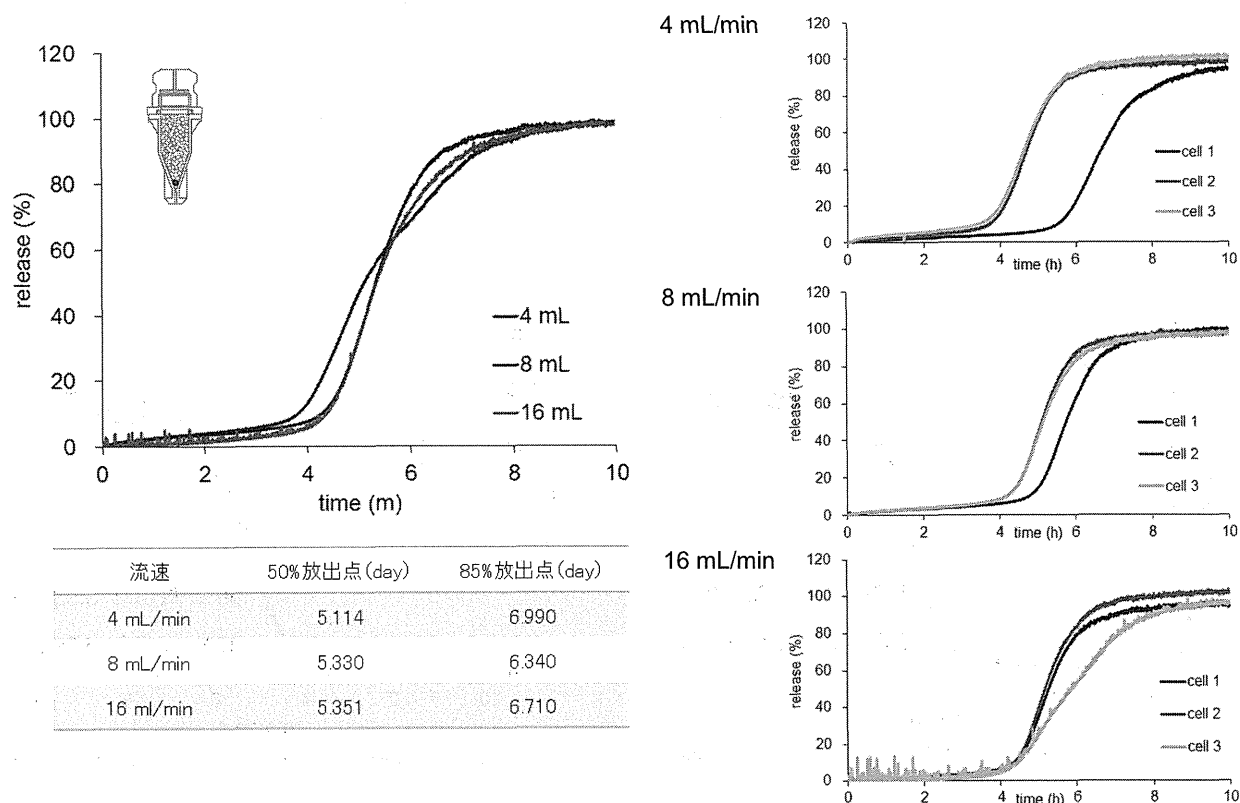


図 6 12mm セルにおける流速の影響

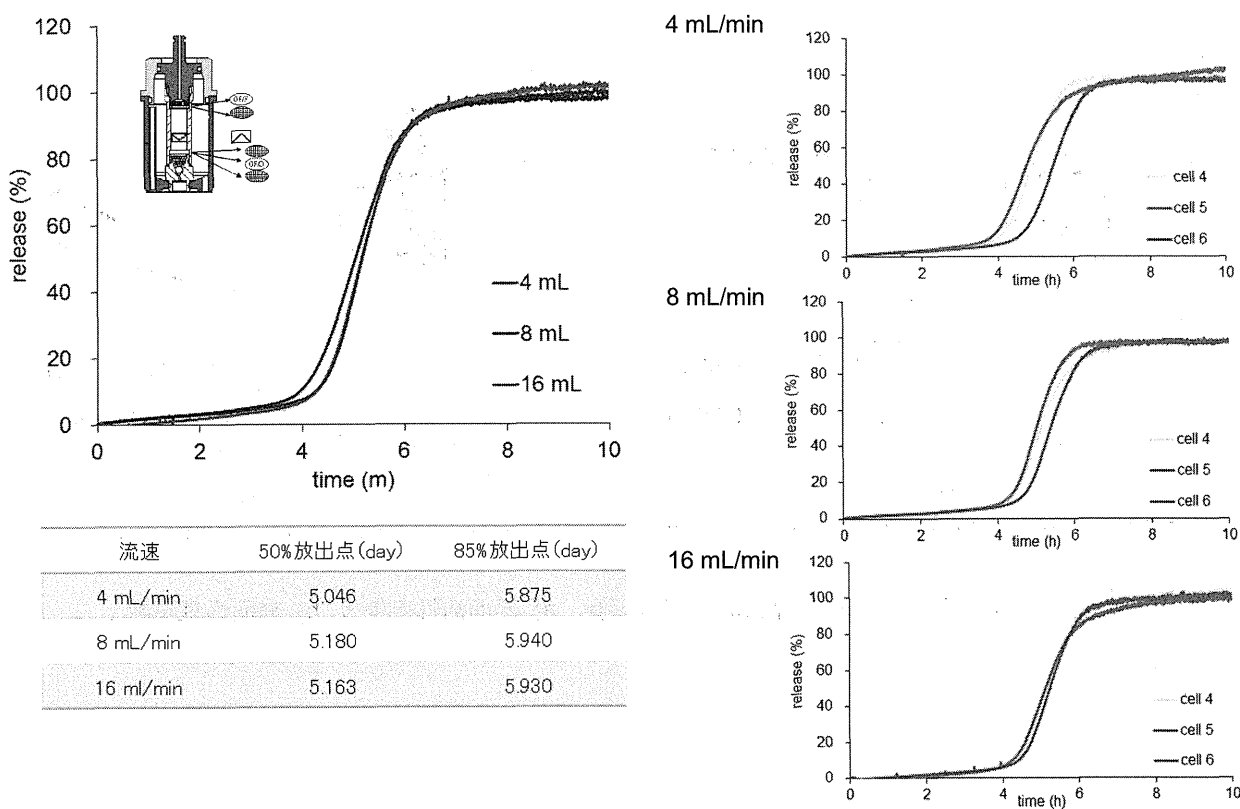


図 7 散剤用セルにおける流速の影響

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等レギュトリーサイエンス研究事業）

平成 25 年度 分研究分担報告書

後発医薬品の同等性ガイドラインにおける試験方法の改正に関する研究

吸入製剤の評価法に関する検討

分担研究者 吉田 寛幸 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 吸入粉末剤の空気力学的粒度分布試験に汎用されるアンダーセンカスケードインパクターについて、プレセパレーターに充填する溶液の種類が粒度分布試験結果へ与える影響について検討した。流量 28.3 l/min および 60 l/min において、プレセパレーターに精製水を入れ場合の各ステージの薬物回収量および 5  $\mu\text{m}$  以下の微粒子量は、メタノールを入れた場合と比較して小さくなる傾向が認められた。この現象には、溶液が持つ表面張力の関与が示唆され、10 % 以上のエタノール水溶液など表面張力が 50mN/m 以下の溶液では認められないことが示された。

#### A. 研究目的

経肺投与製剤である吸入剤は、第 16 改正日本薬局方において初めて独立したものとして製剤各条に収載された。その製剤特性として、適切な有効成分の送達量の均一性を有すること、および空気力学的に適切な粒子径を有することが要求されている。一方で、それら製剤特性を評価するための一般試験法は未だ定まっておらず、適切な試験法の早期整備が望まれる。

欧州薬局方（EP）や米国薬局方（USP）には、吸入剤の空気力学的粒子径測定法としてアンダーセンカスケードインパクター（ACI）や次世代型インパクター（NGI）などの多段インパクターを用いた方法が収載されている。特に吸入粉末剤（DPI）の場合、乳糖添加物など 10 $\mu\text{m}$  を超える比較的大きな粒子径を持つ粒子が混在することから、それら巨大粒子の除去を目的として、捕集ステージのさらに上流にプレセパレーター（PS）を設置することが規定されている。その使用法として、薬

物の再飛散を防止するため、PS 内に適当な溶媒を入れることが明記されているものの、その溶液の種類については具体的な記載がない。実際には、PS 内に回収される薬物の定量法（液体クロマトグラフィーや紫外可視吸光度測定法など）や、対象となる薬物の溶解性をもとに、水系または有機系の溶媒が選択されることが考えられるが、これら溶液の種類が粒度分布評価に与える影響は明らかではない。

そこで今回、PS 内に入れる溶液の種類について、ACI による空気力学的粒度分布評価に与える影響を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 製剤

モデル薬物として、フルチカゾンプロピオン酸エステル（FP）の DPI である、フルタイドディスクス 200（グラクソ・スミスクライン㈱）を用いた。2dose 分（表示量として 400  $\mu\text{g}$ ）を 3 号セルロースカプセルに充填し、ハンディヘラーを使用して薬物の噴霧を行なっ

た。

## 2. 薬物の分粒

粒子の再飛散を防止するため、ACI (Copley Scientific Ltd.) の各ステージの捕集盤を 2 % Brij35/グリセロール溶液でコーティングした。PS に、精製水、メタノールまたは各種濃度のエタノール水溶液を 10 ml 加え、空気容量 4 L となる時間、ポンプ吸引した。流量に応じて各ステージを組み替えた際のカットオフ径を Table 1 に、また Taki ら<sup>1</sup>により報告されている換算式 (1) を元に、28.3 l/min 用の ACI を用いて  $Q = 60$  l/min で噴霧した際の各ステージのカットオフ径を Table 2 に示した。

$$D_{50,x} = D_{50,28.3} \cdot (28.3 / Q_x)^{1/2} \cdots \text{換算式(1)}$$

$$\left[ \begin{array}{l} D_{50,x} : \\ \text{cutoff diameter at a flow rate of } X \text{ l/min} \\ D_{50,28.3} : \\ \text{cutoff diameter at a flow rate of } 28.3 \text{ l/min} \end{array} \right]$$

## 3. 薬物の定量

内部標準物質としてベクロメタゾンプロピオン酸エステル (BDP) ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) を含むメタノール 8 ml で捕集盤を洗いこみ、FP を回収した。Brij35/グリセロール溶液を除去するため、固相抽出により精製後、減圧乾燥器で乾固し、LCMS 用移動相に溶解したものを試料溶液とした。LCMS を用いて FP および BDP を定量した。LCMS による分析は Wang らの方法に従った<sup>2</sup>。

装置 : LCMS-2010 シリーズ (株式会社島津製作所)  
カラム : Symmetry C18 column ( $3.5 \mu\text{m}$ ,  $50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ), Symmetry C18 guard column ( $3.5 \mu\text{m}$ ,  $10 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ )  
カラム温度 :  $30^\circ\text{C}$

注入量 :  $20 \mu\text{L}$

移動相 :  $33 \text{ mM}$  酢酸アンモニウム/ $0.33\%$ ギ

酸 : メタノール= $30 : 70$  (v/v)

流速 :  $0.2 \text{ ml/min}$

イオン化モード : ESI positive

電圧 :  $1.8 \text{ kV}$

ネブライザガス流量 :  $1.5 \text{ l/min}$

CDL 温度 :  $250^\circ\text{C}$

ヒートブロック温度 :  $200^\circ\text{C}$

モニターイオン :  $m/z$  501.2 (FP) ,  $m/z$  521.2 (BDP)

## 4. 空気力学的粒度分布評価

ステージ 0 (S0) から S7 の各ステージにおける薬物回収量より得られたカットオフ径一累積質量曲線を元に、空気力学的中位径 (MMAD)、幾何標準偏差 (GSD)、 $5 \mu\text{m}$  以下の微粒子量 (FPD) を算出した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 各流量における粒度分布の比較

EP や USP に記載の方法によると、DPI の空気力学的粒度分布試験は、デバイスの圧力損失  $\Delta P = 4 \text{ kPa}$  となる流量で試験を実施するよう規定されており、ハンディヘラーを使用する場合に  $\Delta P = 4 \text{ kPa}$  となる流量は  $43.5 \text{ l/min}$  であった。しかし、欧州医薬品庁の吸入剤後発品の同等性ガイドラインには、適用患者群の吸入流量を考慮した幅のある流量で試験を実施するよう記載があることから<sup>3</sup>、本試験における流量は  $28.3 \text{ l/min}$ 、 $60 \text{ l/min}$ 、 $90 \text{ l/min}$  を選択した。PS にメタノールまたは精製水を入れて、 $28.3 \text{ l/min}$  で FP-DPI を噴霧したところ、メタノールを入れた時と比較して、精製水を入れた時の S0 から S5 における FP の回収量が少なくなる傾向にあった

(Figure 1)。またこの時の MMAD、GSD に顕著な差は認められなかったものの、FPD も精製水使用時に小さくなる傾向が認められた (Table 3)。流量を 60 l/min にした場合、28.3 l/min 試験時と同様に、メタノール使用時よりも精製水を PS に入れた時、各ステージにおける FP の回収量 (Figure 2) および FPD (Table 4) が小さくなる傾向が認められた。このことから、PS 内に入れる溶液の種類によって、粒度分布試験結果に差が出る可能性が示唆された。一方、90 l/min で試験した場合、メタノールと精製水で各ステージの回収量及び各種パラメータに差は認められなかったことから (Figure 3, Table 5)、高流量での試験では差が出にくい現象であると推察された。

## 2. 各種溶液における粒度分布の比較

次に、PS に入れる溶液の液性と本現象との関係について検討するため、粘度および表面張力の異なる溶液を調整し試験を実施した。20 °C におけるエタノール水溶液は、エタノール濃度が増加するに従って、密度や表面張力は低下する一方で、粘度はエタノール濃度 = 40 % 付近で最大値を示す。また、メタノールはエタノールと比較して密度や表面張力はほぼ同程度であるのに対し、粘度は約半分であることが知られている (Table 6) <sup>4</sup>。そこでまず、溶液の粘度の影響を検討するため、80 %エタノール水溶液、99.5 %エタノール水溶液およびメタノールを PS に入れて検討したところ、各ステージにおける回収量および各パラメータに差は認められなかった (Figure 4, Table 7)。このことから、本現象への溶液の粘度の違いは影響しないと推察された。次に、溶液の表面張力の影響を検討するため、10 %エタノール水溶液、99.5 %エタ

ノール水溶液および精製水を使用して比較した。表面張力が約 73 mN/m と高い値を示す精製水では、各ステージの回収量および FPD の低下が認められたのに対し (Figure 5, Table 8)、表面張力が約 48 mN/m の 10 %エタノール水溶液では、回収量の低下は認められなかった。このことから、表面張力が高い溶液を入れた場合において、下流のステージに移行する薬物量が減少するものと推察された。PS に溶液を入れて一定の流量でポンプ吸引を行なった場合、PS 内の溶液表面には流量に依存した風の流れが発生し、溶液が波立つことが考えられる。日野らは、水面に発生する風波に関する検討において、水中に分散した油分が溶液の表面張力を低下させ、消波作用を有すること、またその消波作用は 55 mN/m 以下ではほぼ一定となることを報告している<sup>5</sup>。つまり、水面に発生した風力によって溶液表面に起こる風波が、55 mN/m 以下の表面張力を持つ液体上では発生しにくくなることを示している。これは、今回の検討において精製水では認められた現象が、それ以外のエタノール水溶液やメタノールでは認められなかったことと一致している。PS による巨大粒子の捕集原理は、下流の捕集プレートと同様、慣性力を利用したものであり、溶液の液面の乱れは PS による捕集効率に影響すると考えられる。このことから、精製水使用時はエタノール水溶液やメタノール使用時よりも波高の高い風波が発生し、PS 内で薬物が捕集されやすくなったものと考えられる。さらに日野らは、風速が早くなるにつれ表面張力による消波作用が減弱することを報告しており、今回の検討で 28.3 l/min および 60 l/min で認められた薬物の空気力学的粒度分布の差が、90 l/min では確認されなかったことと矛