

noncrystalline concentrated solute mixture during the heat treatment. The second scans thus provided information on the physical changes during the postfreeze heat treatment. Some thermograms also showed smaller heat flow changes at lower temperatures (e.g., -60°C to -45°C). These transitions, often referred to as “real” glass transitions, were outside of the main topic in this study.⁵⁷

The transition temperatures (T_g 's) of aqueous frozen solutions containing various concentration ratios of *myo*-inositol and dextran 40,000 (total: 100 mg/mL) were obtained from heating scans before and after heat treatment at -5°C for 3, 30, and 480 min, or -20°C for 480 min (Fig. 2). The *myo*-inositol crystallization exotherm was not observed in the faster heating scans ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$).⁵⁴ The multisolute frozen solutions showed single or double T_g ' transitions at temperatures between those of the single-solute *myo*-inositol and dextran frozen solutions. Single T_g ' transitions were observed in the heating scans of the dextran rich to intermediate concentration ratio frozen solutions both before and after the heat treatments. A linear shift of the transition temperature that depended on the solute concentration ratios strongly suggested the mixing of freeze-concentrated solutes. Some frozen solutions containing higher mass ratio of inositol showed single broad transitions that suggest incomplete mixing of the solutes. A short heat treatment (-5°C , 3 min) of some inositol-rich frozen solutions induced two T_g ' transitions that suggested physical changes in the inositol-dominant (lower T_g ') and solute mixture (higher T_g ') freeze-concentrated noncrystalline phases, as reportedly observed for some disaccharide and dextran solutions.⁴⁵ Longer heat treatment (30 min) of these frozen solutions induced crystallization of *myo*-inositol, which resulted in an amorphous dextran in the remaining concentrated phase (T_g ': approximately -15°C). The transition temperature profiles suggest up to 1:1 mass ratio of *myo*-inositol and dextran in the amorphous mixture concentrated phase. *Myo*-inositol crystallization was observed at wider concentration ratios upon further heat treatment of the frozen solutions (-5°C , 480 min). Heat treatment of the inositol-rich frozen solution at a lower temperature also induced crystallization of *myo*-inositol (-20°C , 480 min).

The suggested solute phase separation and crystallization processes were further studied. Figure 3 shows derivative thermograms of the inositol-rich (100 mg/mL *myo*-inositol and 20 mg/mL dextran 40,000) and the dextran-rich (20 mg/mL *myo*-inositol and 100 mg/mL dextran 40,000) frozen solutions obtained in the first heating scan and second scans ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) after varied periods of heat treatments at -10°C or -5°C . The inositol-rich frozen solutions showed a broad peak that indicated heat flow changes at T_g ' (approximately -31°C) in the first scan and second scans after a short heat treatment (1 min). The T_g ' transition split in longer heat treatments (10 and 20 min). The absence of these peaks and the appearance of a small peak at the dextran T_g ' (-14°C) indicated crystallization of *myo*-inositol that left amorphous dextran upon further heat treatment (>30 min) of the frozen solutions. Heat treatment of the frozen solution at higher temperature (-5°C) also induced the T_g ' splitting (1–7 min) and *myo*-inositol crystallization (>10 min) (data not shown). The change clearly indicated phase separation of the solutes before the *myo*-inositol crystallization in the inositol-rich frozen solutions. Contrarily, the heat treatments did not apparently alter the single sharp transition of the dextran-rich frozen solutions.

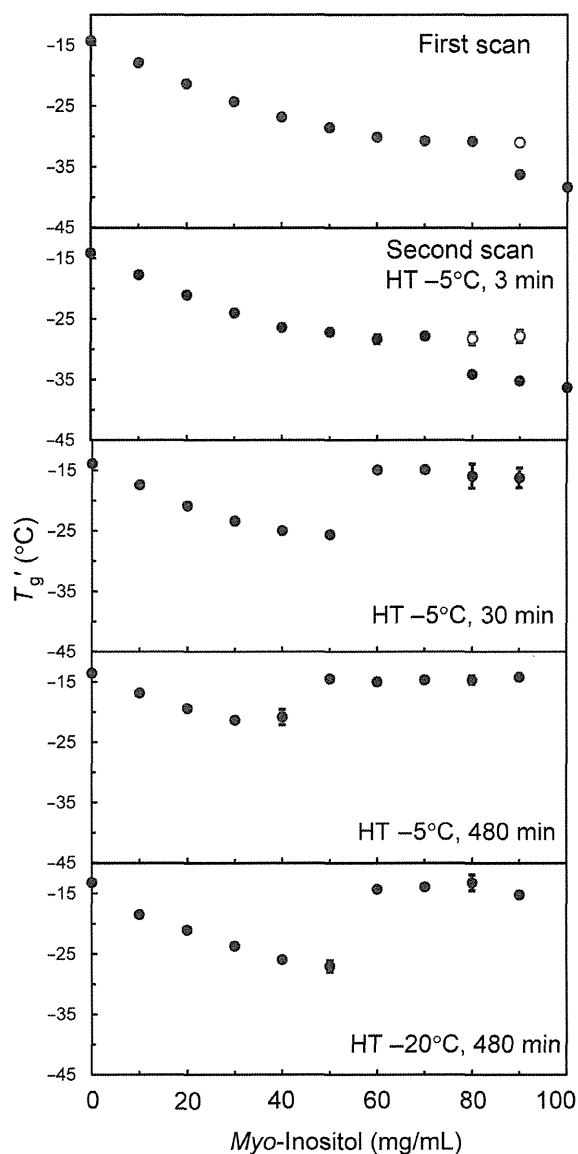


Figure 2. Transition temperature (T_g ') profiles of frozen solutions containing varied concentration ratios of *myo*-inositol and dextran 40,000 (total 100 mg/mL, 10 μL) obtained in the first or second heating scan after heat treatment at -5°C for 3, 30, and 480 min, or at -20°C for 480 min. Symbols indicate first (lower temperature, ●) and second (○) transitions ($n = 3$, average \pm SD).

Figure 4 shows the T_g 's of the frozen solutions containing lower total solute concentration *myo*-inositol and dextran mixtures (50 mg/mL). The transitions obtained before and after the heat treatments indicated phase separation (T_g ' splitting) and *myo*-inositol crystallization (large T_g ' shift) over the concentration ratio ranges similar to those of the higher total solute concentration solutions (100 mg/mL; Fig. 2). Some of these frozen solutions showed less clear T_g ' transitions because of the smaller heat flow changes. These results suggest larger contributions of the solute concentration ratio rather than the

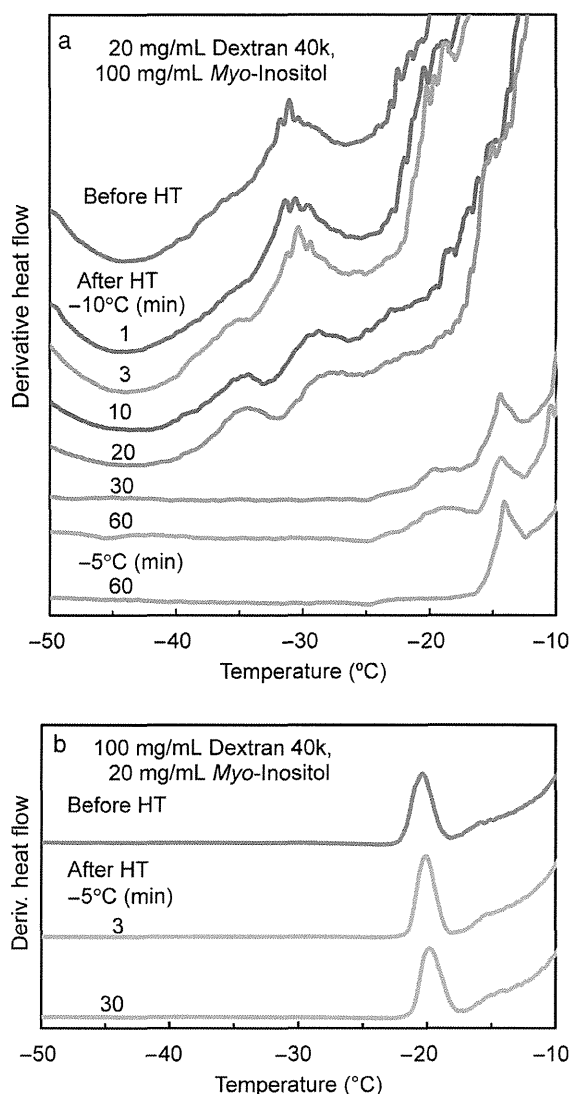


Figure 3. Derivative thermograms of frozen aqueous *myo*-inositol and dextran mixture solutions. Aliquots (10 μ L) of frozen solutions were scanned from -70°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with or without prior heat treatment at -10°C or -5°C .

concentration of *myo*-inositol in determining the occurrence of physical changes.

The effects of heat treatment on phase behavior and *myo*-inositol crystallization were also studied in the frozen *myo*-inositol solutions with glucose or rHA (Figs. 5 and 6). The frozen solutions containing various concentration ratios of *myo*-inositol and glucose showed linear T_g' shifts between those of the two components in the first heating scans, which suggested mixing of the freeze-concentrated amorphous solute molecules at the wide concentration ratio. Heat treatment of an inositol-dominant frozen solution (90 mg/mL *myo*-inositol and 10 mg/mL dextran 40,000) at -5°C induced a broad T_g' transition (3 min) and inositol crystallization (30 min). Other frozen solutions showed slight shift of the single transitions in the second scans.

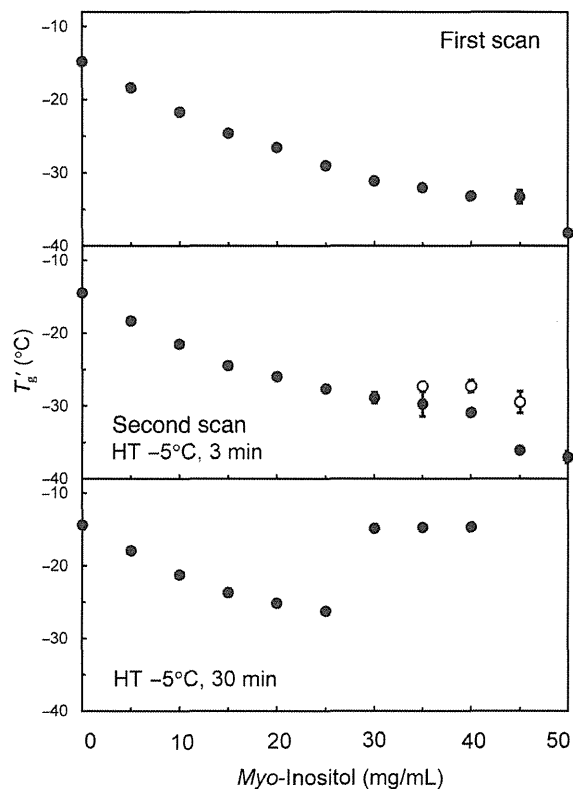


Figure 4. Transition temperature (T_g') profiles of frozen solutions containing varied concentration ratios of *myo*-inositol and dextran 40,000 (total 50 mg/mL, 10 μ L) obtained in the first or second heating scan after heat treatment at -5°C for 3 or 30 min. Symbols indicate first (lower temperature, ●) and second (○) transitions ($n = 3$, average \pm SD).

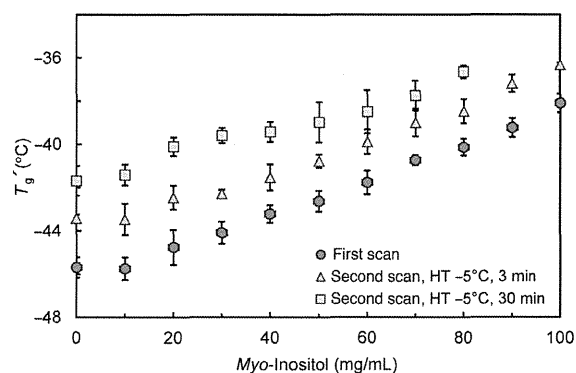


Figure 5. Transition temperature (T_g') profiles of frozen solutions containing varied concentration ratios of *myo*-inositol and glucose (total: 100 mg/mL, 10 μ L) obtained in heating scans ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ from -70°C) before or after heat treatment at -5°C for 3 or 30 min ($n = 3$, average \pm SD).

Figure 6 shows T_g' profiles of frozen solutions containing various concentration ratios of *myo*-inositol and rHA obtained in the first heating scan and second scans after heat treatment at -5°C (3 min) or -20°C (480 min, total 100 mg/mL). The apparent T_g' transition was not observed in the thermograms of the

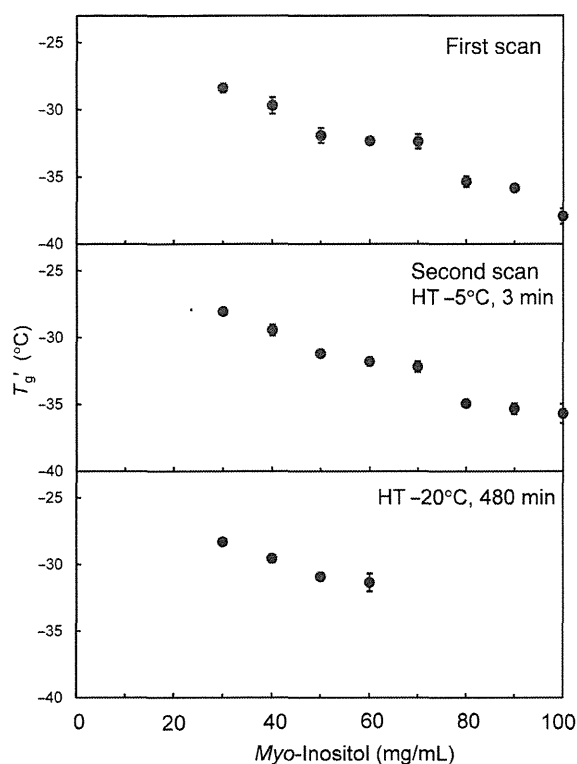


Figure 6. Transition temperature (T_g') profiles of frozen solutions containing varied concentration ratios of *myo*-inositol and rHA (total: 100 mg/mL, 10 μ L) obtained in the heating scans (5°C/min from -70°C) before or after heat treatment at -5°C for 3 min or at -20°C for 480 min ($n = 3$, average \pm SD).

single-solute rHA and some rHA-rich mixture frozen solutions.⁵ Gradual shift of the thermograms from approximately -25°C suggested noncrystalline states of the freeze-concentrated solutes. Some inositol-rich mixture with rHA showed single broad T_g' transitions that covered approximately -40°C to -30°C after a short heat treatment at -5°C (3 min, data not shown), suggesting overlapping transitions of the inositol-dominant and solute mixture phases. The T_g' transition disappeared upon longer heat treatments of some inositol-dominant frozen solutions, presumably because of the *myo*-inositol crystallization before the second heating scan.

The effect of *myo*-inositol crystallization was also studied in more complex solute systems. Figure 7 shows T_g' 's profiles of frozen solutions containing varied concentration ratios of sucrose and dextran 40,000 (total 20 mg/mL) with or without a fixed concentration of *myo*-inositol (80 mg/mL) obtained before (a) and after heat treatment at -5°C for 30 min (b). The sucrose and dextran mixture frozen solutions showed single transitions at temperatures that shift depending on their concentration ratios both before and after heat treatments. Larger T_g' deviations in some heat-treated sucrose-rich frozen mixture solutions suggested overlapping transitions of coexisting freeze-concentrated sucrose-dominant and solute mixture phases.⁴⁵ The addition of *myo*-inositol to the dextran and sucrose system apparently lowered the transition temperatures obtained in the first heating scan. Heat treatment of the ternary-solute frozen solutions apparently altered their physical properties.

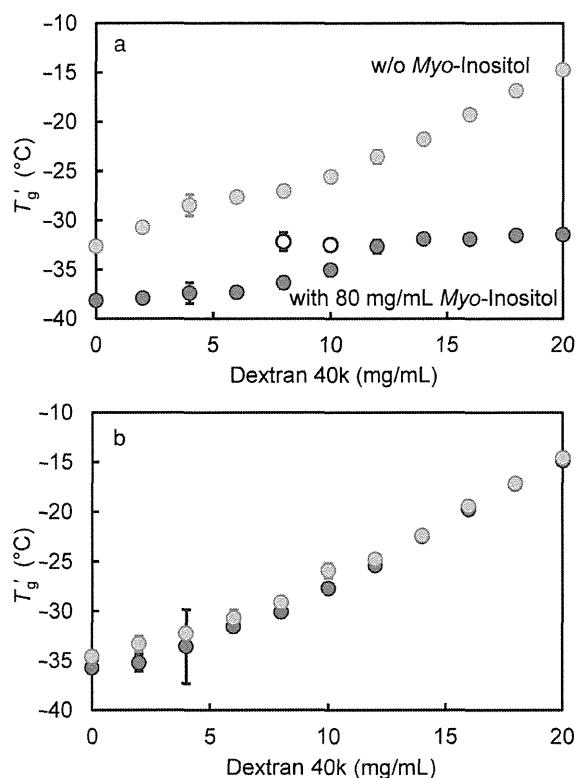


Figure 7. Transition temperature (T_g') profiles of frozen solutions containing varied concentrations of dextran and trehalose (total: 20 mg/mL, 10 μ L) with (blue) or without (orange) *myo*-inositol (80 mg/mL) obtained in heating scans (5°C/min from -70°C) before (a) and after (b) freeze heat treatment at -5°C for 30 min. Symbols indicate first (lower temperature, ●) and second (○) transitions ($n = 3$, average \pm SD).

The resulting T_g' observed close to those of the sucrose and dextran mixture frozen solutions suggested highly crystallized *myo*-inositol, leaving other solutes in the remaining amorphous phase.

DISCUSSION

This study showed the relevance of solute miscibility on solute crystallization in frozen solutions. Postfreeze heat treatment induced amorphous–amorphous phase separation of a concentrated *myo*-inositol and dextran 40,000 mixture into the inositol-dominant (lower T_g') and solute mixture (higher T_g') phases as well as subsequent crystallization of *myo*-inositol in the inositol-rich frozen solutions. The observed phase separation was similar to those in some disaccharide and polymer systems.⁴⁵ Some dextran-rich frozen solutions, in contrast, retained amorphous mixtures during the heat treatment.

The solute mixing states should affect nucleation process of the *myo*-inositol crystallization. Freezing the aqueous solutions in aluminum DSC cells rapidly concentrate the multiple solutes into supercooled solutions surrounding ice crystals.¹¹ *Myo*-inositol and dextran molecules are concentrated in the amorphous mixture phase at wide concentration ratio ranges, whereas some frozen solutions suggested their incomplete mixing in the first heating scans. The solute molecules are

kinetically frozen in the highly viscous solution at a temperature below the T_g' . The increasing molecular mobility during the heat treatment separates the inositol-rich freeze concentrate into the inositol-dominant and solute mixture phases.^{45,46} The significantly reduced heteromolecular interactions in the inositol-dominant phase should allow spatially ordered assembly of the *myo*-inositol molecules (nucleation). Subsequent crystal growth should involve molecules in the solute mixture phase because of the large driving force toward a thermodynamically stable state. In contrast, the heterocomponent interactions (e.g., hydrogen bonding), reduced molecular mobility, and steric hindrance in the solute mixture phase should perturb the *myo*-inositol nucleation. The observed high crystallinity of *myo*-inositol after heat treatment suggests a limited effect of the heteromolecular interaction for prevention of crystal growth.

The relevance of solute miscibility on the *myo*-inositol crystallization was also indicated in the systems containing other cosolutes or lower total concentration dextran and *myo*-inositol. The greater miscibility of *myo*-inositol with glucose, a constituent unit of dextran, and their molecular interactions therein should explain its preventive effect on *myo*-inositol crystallization at wide concentration ratios. The low T_g 's of the *myo*-inositol and glucose mixture system suggested a limited contribution of molecular mobility to prevent crystallization of *myo*-inositol during heat treatment. The significance of solute miscibility on component crystallization in frozen solutions was reported in some binary polymer systems that separate during the freezing process.³⁷ Only certain polymer combinations, including PEG and polysaccharides, show the freeze-concentration-induced phase separation because the concomitantly increasing viscosity significantly reduces the solute mobility at lower temperatures. Larger numbers of formulation ingredients would experience amorphous–amorphous phase separation upon postfreeze heat treatment because of their already highly concentrated mixtures.

Observation of both the amorphous–amorphous solute phase separation and crystallization in a single system should be attributed to the moderate crystallization propensity of *myo*-inositol. Many other systems show no or only one of these phenomena in practical time scales for analysis because the solutes crystallize too fast or too slowly. Some solutes (e.g., mannitol) should crystallize during the ice growth and/or simultaneously with the phase separation rather than after the apparent amorphous–amorphous phase separation because of their nucleation from smaller clusters. Some disaccharide (e.g., trehalose) and polymer systems show clear phase separation during freeze concentration but take much longer to crystallize in readily detectable levels.²¹ The heat treatment temperature should also affect the balance of phase separation, nucleation, and crystal growth speeds. Various factors, including the protein structure, local pH, compositions of other solutes, and thermal history would also affect the miscibility of ingredients and their crystallization in frozen solutions.

Information on the miscibility of freeze-concentrated solutes should be useful for the design of formulations with amorphous (e.g., trehalose and lactose) or crystalline (e.g., mannitol) ingredients in freeze-dried solids. Stabilization of proteins and liposomes against lyophilization-induced stresses requires their mixing in the same amorphous phase that provides stabilizing interactions (water substitution) and reduced molecular mobility (glass embedding).^{8,9,11,18,20} The suggested amorphous–amorphous phase separation may not directly damage nor

deprive the disaccharides of the stabilizing effect from this aspect. However, excess stabilizer above the critical mixing concentration ratios should increase the risk of their crystallization and resulting loss of the stabilizing effects. Miscibility information would be particularly valuable for improving the physical stability of amorphous mixture systems containing some slowly crystallizing APIs and excipients (e.g., trehalose and lactose). Optimizing formulations to avoid very slow crystallization events by performing experiments over long time scales is not practical in product development. Improving methods for detection of solute miscibility, particularly in protein-containing frozen solutions, should increase the significance of the information obtained from experiments. How amorphous–amorphous phase separation in frozen solutions affects the physical properties of freeze-dried solids should be an intriguing topic for further study.

Some bulking agents (e.g., mannitol and glycine) and APIs are freeze dried in their crystalline states to achieve faster ice sublimation at higher product temperatures and to obtain physically stable formulations. Formulation design and process optimization that induce complete crystallization of the particular ingredients should increase the robustness of their formulations. In addition to formulation optimization, appropriate process design for control of product temperatures during freeze-drying and storage should ensure that the targeted component miscibility and crystallization profiles of the formulations are achieved.

CONCLUSION

This study showed the large contribution of solute miscibility on crystallization of components in pharmaceutically relevant multisolute frozen solutions. Heat treatment of frozen solutions containing dextran 40,000 and larger mass ratios of *myo*-inositol induced crystallization of *myo*-inositol after amorphous–amorphous phase separation of the concentrated solutes. Mixing of dextran-rich freeze-concentrated solutes maintains them in amorphous states even at higher temperatures. Information on solute miscibility should assist in control of solute crystallization through formulation and process design.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by Japan Health and Labor Science Research Grants.

REFERENCES

1. Nail SL, Jiang S, Chongprasert S, Knopp SA. 2002. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm Biotechnol* 14:281–360.
2. Chen C, Han D, Cai C, Tang X. 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Control Release* 142:299–311.
3. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. 2010. Stability of protein pharmaceuticals: An update. *Pharm Res* 27:544–575.
4. Akers MJ, Milton N, Byrn SR, Nail SL. 1995. Glycine crystallization during freezing: The effects of salt form, pH, and ionic strength. *Pharm Res* 12:1457–1461.
5. Chang BS, Randall CS. 1992. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* 29:632–656.

6. MacKenzie AP. 1977. The physico-chemical basis for the freeze-drying process. *Dev Biol Stand* 36:51–67.
7. Kasper JC, Friess W. 2011. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 78:248–263.
8. Izutsu K, Yoshioka S, Terao T. 1993. Decreased protein-stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization. *Pharm Res* 10:1232–1237.
9. Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF. 2001. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 46:307–326.
10. Cleland JL, Lam X, Kendrick B, Yang J, Yang TH, Overcashier D, Brooks D, Hsu C, Carpenter JF. 2001. A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *J Pharm Sci* 90:310–321.
11. Franks F. 1992. Freeze-drying: From empiricism to predictability. The significance of glass transitions. *Dev Biol Stand* 74:9–18.
12. Sundaramurthi P, Burcusa MR, Suryanarayanan R. 2012. Physical characterization of pentamidine isethionate during freeze-drying—relevance to development of stable lyophilized product. *J Pharm Sci* 101:1732–1743.
13. Cao W, Xie Y, Krishnan S, Lin H, Ricci M. 2013. Influence of process conditions on the crystallization and transition of metastable mannitol forms in protein formulations during lyophilization. *Pharm Res* 30:131–139.
14. Haikala R, Eerola R, Tanninen VP, Yliruusi J. 1997. Polymorphic changes of mannitol during freeze-drying: Effect of surface-active agents. *PDA J Pharm Sci Technol* 51:96–101.
15. Steele G. 1990. An observation of polymorphism in pentamidine isethionate. *J Pharm Pharmacol* 42:121–122.
16. Chongprasert S, Griesser UJ, Böttorff AT, Williams NA, Byrn SR, Nail SL. 1998. Effects of freeze-dry processing conditions on the crystallization of pentamidine isethionate. *J Pharm Sci* 87:1155–1160.
17. Pikal MJ. 1999. Impact of polymorphism on the quality of lyophilized products. In *Polymorphism in pharmaceutical solids*; Brittain HG, ed. New York: Informa Healthcare USA, pp 395–419.
18. Bhatnagar BS, Bogner RH, Pikal MJ. 2007. Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm Dev Technol* 12:505–523.
19. Chatterjee K, Shalaev EY, Suryanarayanan R. 2005. Raffinose crystallization during freeze-drying and its impact on recovery of protein activity. *Pharm Res* 22:303–309.
20. Carpenter JF, Hand SC, Crowe LM, Crowe JH. 1986. Cryoprotection of phosphofructokinase with organic solutes: Characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Arch Biochem Biophys* 250:505–512.
21. Sundaramurthi P, Patapoff TW, Suryanarayanan R. 2010. Crystallization of trehalose in frozen solutions and its phase behavior during drying. *Pharm Res* 27:2374–2383.
22. Singh SK, Kolhe P, Mehta AP, Chico SC, Lary AL, Huang M. 2011. Frozen state storage instability of a monoclonal antibody: Aggregation as a consequence of trehalose crystallization and protein unfolding. *Pharm Res* 28:873–885.
23. Levine H, Slade L. 1988. Thermomechanical properties of small carbohydrate-water glasses and ‘rubbers’: Kinetically stable systems at subzero temperatures. *J Chem Soc, Faraday Transl* 84:2619–2633.
24. Ragoonanan V, Suryanarayanan R. 2014. Ultrasonication as a potential tool to predict solute crystallization in freeze-concentrates. *Pharm Res* 31:1512–1524. [Epub ahead of print]
25. Liao X, Krishnamurthy R, Suryanarayanan R. 2005. Influence of the active pharmaceutical ingredient concentration on the physical state of mannitol—Implications in freeze-drying. *Pharm Res* 22:1978–1985.
26. Korey DJ, Schwartz JB. 1989. Effects of excipients on the crystallization of pharmaceutical compounds during lyophilization. *J Parenter Sci Technol* 43:80–83.
27. Suzuki T, Franks F. 1993. Solid–liquid phase transitions and amorphous states in ternary sucrose–glycine–water systems. *J Chem Soc, Faraday Trans* 89:3283–3288.
28. Shamblin SL, Huand EY, Zografi G. 1996. The effects of co-lyophilized polymeric additives on the glass transition temperature and crystallization of amorphous sucrose. *J Therm Anal* 47:1567–1579.
29. Pyne A, Suryanarayanan R. 2003. The effect of additives on the crystallization of cefazolin sodium during freeze-drying. *Pharm Res* 20:283–291.
30. Telang C, Suryanarayanan R, Yu L. 2003. Crystallization of D-mannitol in binary mixtures with NaCl: Phase diagram and polymorphism. *Pharm Res* 20:1939–1945.
31. Wang W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 203:1–60.
32. Awotwe-Otoo D, Agarabi C, Wu GK, Casey E, Read E, Lute S, Brorson KA, Khan MA, Shah RB. 2012. Quality by design: Impact of formulation variables and their interactions on quality attributes of a lyophilized monoclonal antibody. *J Pharm* 438:167–175.
33. Kasper JC, Pikal MJ, Friess W. 2013. Investigations on polyplex stability during the freezing step of lyophilization using controlled ice nucleation—The importance of residence time in the low-viscosity fluid state. *J Pharm Sci* 102:929–946.
34. Al-Hussein A, Gieseler H. 2012. The effect of mannitol crystallization in mannitol-sucrose systems on LDH stability during freeze-drying. *J Pharm Sci* 101:2534–2544.
35. Randolph TW. 1997. Phase separation of excipients during lyophilization: Effects on protein stability. *J Pharm Sci* 86:1198–1203.
36. Heller MC, Carpenter JF, Randolph TW. 1996. Effects of phase separating systems on lyophilized hemoglobin. *J Pharm Sci* 85:1358–1362.
37. Izutsu K, Yoshioka S, Kojima S, Randolph TW, Carpenter JF. 1996. Effects of sugars and polymers on crystallization of poly(ethylene glycol) in frozen solutions: Phase separation between incompatible polymers. *Pharm Res* 13:1393–1400.
38. Heller MC, Carpenter JF, Randolph TW. 1999. Application of a thermodynamic model to the prediction of phase separations in freeze-concentrated formulations for protein lyophilization. *Arch Biochem Biophys* 363:191–201.
39. Van Eerdenbrugh B, Taylor LS. 2012. Molecular weight effects on the miscibility behavior of dextran and maltodextrin with poly(vinylpyrrolidone). *Pharm Res* 29:2754–2765.
40. Izutsu K, Aoyagi N, Kojima S. 2005. Effect of polymer size and cosolutes on phase separation of poly(vinylpyrrolidone) (PVP) and dextran in frozen solutions. *J Pharm Sci* 94:709–717.
41. Izutsu K, Heller M, Randolph TW, Carpenter JF. 1998. Effect of salts and sugars on phase separation of polyvinylpyrrolidone–dextran solutions induced by freeze-concentration. *J Chem Soc, Faraday Trans* 94:411–418.
42. Her LM, Deras M, Nail SL. 1995. Electrolyte-induced changes in glass transition temperatures of freeze-concentrated solutes. *Pharm Res* 12:768–772.
43. Newman A, Engers D, Bates S, Ivanisevic I, Kelly RC, Zografi G. 2008. Characterization of amorphous API:Polymer mixtures using X-ray powder diffraction. *J Pharm Sci* 97:4840–4856.
44. Padilla AM, Ivanisevic I, Yang Y, Engers D, Bogner RH, Pikal MJ. 2011. The study of phase separation in amorphous freeze-dried systems. Part I: Raman mapping and computational analysis of XRPD data in model polymer systems. *J Pharm Sci* 100:206–222.
45. Izutsu K, Yomota C, Kawanishi T. 2011. Impact of heat treatment on the physical properties of noncrystalline multisolite systems concentrated in frozen aqueous solutions. *J Pharm Sci* 100:5244–5253.
46. Izutsu K, Yomota C, Okuda H, Kawanishi T, Randolph TW, Carpenter JF. 2013. Impact of heat treatment on miscibility of proteins and disaccharides in frozen solutions. *Eur J Pharm Biopharm* 85:177–183.
47. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW. 2001. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T_g' in pharmaceutical lyophilization. *J Pharm Sci* 90:872–887.

48. Katayama DS, Carpenter JF, Menard KP, Manning MC, Randolph TW. 2009. Mixing properties of lyophilized protein systems: A spectroscopic and calorimetric study. *J Pharm Sci* 98:2954–2969.
49. Padilla AM, Pikal MJ. 2011. The study of phase separation in amorphous freeze-dried systems, part 2: Investigation of Raman mapping as a tool for studying amorphous phase separation in freeze-dried protein formulations. *J Pharm Sci* 100:1467–1474.
50. Jovanović N, Gerich A, Bouchard A, Jiskoot W. 2006. Near-infrared imaging for studying homogeneity of protein-sugar mixtures. *Pharm Res* 23:2002–2013.
51. Bhatnagar BS, Martin SM, Teagarden DL, Shalaev EY, Suryanarayanan R. 2010. Investigation of PEG crystallization in frozen PEG–sucrose–water solutions. I. Characterization of the nonequilibrium behavior during freeze–thawing. *J Pharm Sci* 99:2609–2619.
52. Chieng N, Trnka H, Boetker J, Pikal M, Rantanen J, Grohganz H. 2013. Detecting phase separation of freeze-dried binary amorphous systems using pair-wise distribution function and multivariate data analysis. *Int J Pharm* 454:167–173.
53. Gekko K, Morikawa T. 1981. Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol–water mixtures. *J Biochem* 90:39–50.
54. Izutsu K-i, Yomota C, Okuda H, Kawanishi T, Yamaki T, Ohdate R, Yu Z, Yonemochi E, Terada K. 2014. Effects of formulation and process factors on the crystal structure of freeze-dried *myo*-inositol. Submitted.
55. Bonnet A, Jones W, Motherwell WDS. 2006. *Myo*-inositol dihydrate: A redetermination. *Acta Crystallogr E* 62:o2902–o2904.
56. Lomer TR, Miller A, Beevers CA. 1963. The crystal structure of *myo*-inositol dihydrate. *Acta Cryst* 16:264–268.
57. Sacha GA, Nail SL. 2009. Thermal analysis of frozen solutions: Multiple glass transitions in amorphous systems. *J Pharm Sci* 98:3397–3405.

リザーバー式吸入粉末剤における 振とう操作と薬物放出量に関する検討

吉田寛幸*, 伊豆津健一, 柴田寛子, 桑名明美, 合田幸広
国立医薬品食品衛生研究所薬品部

Effect of Shaking on the Emitted Dose of Reservoir Dry Powder Inhaler

Hiroyuki Yoshida*, Ken-ichi Izutsu, Hiroko Shibata, Akemi Kuwana and Yukihiko Goda
Division of Drugs, National Institute of Health Sciences

{ Received July 29, 2014
Accepted November 6, 2014 }

The emitted dose and mass median aerodynamic diameter of active ingredients from dry powder inhaler (DPI) are reported to be affected by the type of device, procedure and the inhalation flow rate of the patients. The purpose of this study was to clarify the effect of device shaking on the emitted dose of active ingredient from reservoir DPI by using Dosage Unite Sampling Apparatus (DUSA). A procaterol hydrochloride (PH) -containing DPI, Meptin[®] Clickhaler[®], was used as a model DPI requiring shaking before use. After shaking by 7 test collaborators following the patient instructions, the amount of PH emitted into the DUSA using a vacuum pump was determined by high-performance liquid chromatography. Without device shaking, the emitted dose of PH was markedly low and varied widely, and the result suggested that device shaking was prerequisite for the efficient emission of active ingredient from DPI. The amount of PH emitted after shaking of the device varied largely between 7 test collaborators, while their averages were more than 80% of the labeled amount. In one collaborator, the ratio of emitted dose varied up to 30% among 4 experiences. Tapping the device before use also enabled the efficient emission of PH. Smaller particles were observed in Meptin[®] Clickhaler[®] compared to those in other reservoir DPIs that do not require shaking may explain the importance of shaking before use. These results confirmed the relevance of advice including the shaking methods by health-care personnel for appropriate use of the DPI formulations.

Key words — reservoir dry powder inhaler, shaking, emitted dose, procaterol hydrochloride

緒言

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患の治療を目的として使用される吸入剤は、微細化した薬物粒子を吸気により肺深部に送達することで、薬理作用を発揮する。第16改正日本薬局方において、吸入剤は気管支・肺に適用する製剤として新たに明記され、吸入粉末剤 (dry powder inhaler: DPI), 吸入液剤, そして吸入エアゾール剤 (metered-dose inhaler: MDI) の3剤形が収載されている。吸入剤が目的の治療効果を発揮するためには、(1) 製剤から一定量の薬物が測り取られること、(2)

デバイスから一定量の薬物が放出されること、そして(3) 放出された薬物が適切な粒子径を有し、目的の部位に到達するという、3つのステップが適切に達成されることが必要である。日本薬局方においても DPI と MDI について、上記(2)および(3)に関する製剤特性が医薬品の品質管理をするうえで重要とされている。¹⁾

DPI は、予め肺内への送達に適したサイズに微細化した薬物粒子を吸入用デバイス中に充填した製剤であり、吸入前にデバイス操作をすることで1吸入量を測り取るリザーバー式 DPI と、1吸入量ずつ分けて充填されているプレディスペンス式 DPI

* 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

の2種類がある。MDIと比較して、DPIは吸気と薬物放出操作を同期させる必要がないことや、フロンガスの問題がないこと、また粉末製剤であることから保存安定性に優れていることなど、多くのメリットを有する。一方で、服用時に患者の吸入操作で生じる乱気流により粒子同士が乖離することで目的の薬物送達が可能となることから、十分量の薬物量を吸入するためには一定量以上の流速で吸入する必要があり、また必要とされる吸入流速はデバイスにより異なるため、²⁾高齢者や小児への適用時には注意を要する。さらに、メーカー各社によりデバイスの操作方法が異なるため、製剤に応じた適切な使用方法について、医療従事者による患者への吸入指導が重要とされる。^{3,6)}

メプチン® クリックヘラー® は、プロカテロール塩酸塩水和物を主薬とするリザーバー式 DPI である。1吸入ごとに、一定量の薬物を薬物充填スペースへ充填するため、患者自身によるデバイスの振とうおよび押ボタン操作を要する。⁷⁾ 国内で販売されているリザーバー式 DPI は、ほかにアズマネックス® ツイストヘラー® (MSD(株), 東京) やバルミコート® タービュヘイラー® (アストラゼネカ(株), 大阪) などがあり、これらの製剤は吸入前の振とう操作を必要とせず、現在のところ振とう操作を要するリザーバー式 DPI は、メプチン® クリックヘラー® のみである。同じく使用前の振とう操作を要する吸入剤として懸濁液充填型の MDI があるが、これは噴射剤中に懸濁している薬物粒子を噴射前に分散させるために必要な操作であり、この振とう操作が薬物放出量に影響を与えることが報告されている。⁸⁾ 一方で、薬物充填のために使用時に振とう操作を要するリザーバー式 DPI において、振とう操作が薬物放出量に与える影響については十分に知られていないのが現状である。

そこで本研究では、DPI の適切使用を目的とし、振とう操作を要するリザーバー式 DPI について、振とう操作の薬物放出量への影響を検討した。

方 法

1. 試薬, 製剤

使用時に振とう操作を要するリザーバー式 DPI

のモデル製剤として、プロカテロール塩酸塩水和物を主薬とするメプチン® クリックヘラー® 10 µg (Lot#2F74CH2, 大塚製薬(株), 東京) を用いた。プロカテロール塩酸塩はシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社 (東京) より購入した。メプチン® クリックヘラー® の添付文書に記載の用法・用量は、プロカテロール塩酸塩水和物として、通常成人 1回 20 µg (2吸入) である。

2. デバイスの振とう操作

本剤の使用経験を持たない7名の試験協力者 (A-G) に対し、試験の目的の説明を行い、試験への協力を依頼、了承を得た。デバイスの振とう操作は、試験協力者に対して製品に添付された患者用使用説明書 (http://www.otsuka-elibrary.jp/di/prod/product/file/mph/mph_if.pdf, 平成 25 年 8 月 2 日参照) を提示し、記載に従い上下にデバイスを 3, 4 回振とうすることとした。1回の試行につき、振とうおよび放出の操作を 2 回繰り返す。1回用量 (20 µg) の薬物を回収した。メプチン® クリックヘラー® は、振とうすることで、ホッパー (薬物貯留スペース) の下部で上向きに開放された薬物充填スペースに薬物が充填され、振とう後の押しボタン操作で定量コーンが回転し、充填された薬物粒子の吸入が可能となるシステムを有する (図 1)。そこで、試験協力者による振とう操作との比較のため、下方向に偏るように振とうする群 (下向け振とう)、振とう操作に代えてデバイスを卓上で軽くタッピングする群 (卓上タッピング)、および全く振とうしない群を加えた。前群の試行

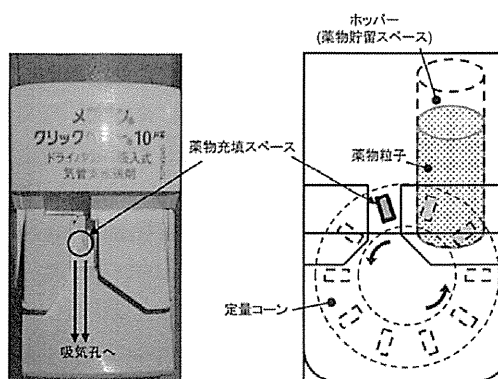


図1 メプチン® クリックヘラー® の簡易構造図

による薬物の偏りの影響を避けるため、リセット操作として各群の試行前にデバイスを横に倒し4回、逆さに倒し4回振とうした。なお、下向け振とう群、卓上タッピング群、振とうなし群およびリセット操作はいずれも、試験責任者が実施した。各試験協力者および各群につき4回の試行を実施し、試行の順番はランダムに割り付けた。

3. 薬物の放出およびサンプリング

吸入デバイスからの薬物放出量の検討には、米国薬局方に収載の Apparatus B である Dosage unit sampling apparatus for DPI (DUSA, Copley Scientific Ltd, Nottingham, England) を用いた。⁹⁾ 流量計は TPK2000 (Copley Scientific Ltd), 吸引ポンプは HCP5 (Copley Scientific Ltd) を用いて、薬物放出時の流速を制御した。また、デバイスと DUSA 間の気密性を保つため、シリコン製のマウスピースアダプター (Copley Scientific Ltd) を用いて、デバイスと DUSA を接続した (図 2)。ポンプ流量は、デバイス内の圧力損失が 4.0 kPa となる流量を予め測定し、53.6 L/min に設定した。

振とう操作後のデバイスを、振動に注意しながらマウスピースアダプターを用いて DUSA に接続した。デバイスのボタンを1回押し、薬物を吸入可能な状態でポンプ吸引を開始し、体積流量として 4 L となる時間 (4.5 秒間) 吸引することで1回吸入量の薬物を DUSA 内に放出した。デバイスを取り外し、再度振とうおよび放出操作を行った後、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) 用の移動相 (50 mM 1-オクタンスルホン酸 / 8% 酢酸 / アセトニトリル = 49 / 38 / 13 (v/v/v)) を用いて DUSA 内のプロカテロー

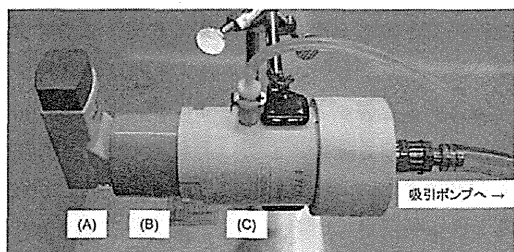


図 2 薬物放出試験に用いる装置の外観図
(A) 吸入デバイス (B) マウスピースアダプター (C) Dosage unit sampling apparatus

ール塩酸塩を洗い込み、PTFE 製 0.45 μm シリンジフィルター (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) でろ過したものを試料溶液とした。

本研究においては、振とう操作のみ試験協力者を替えて実施し、振とう操作を除く定量までの一連の過程を試験責任者が単独で実施することで、得られた薬物放出量の差異は、振とう操作の差異を反映するものとして考察した。

4. プロカテロール塩酸塩の定量

試料溶液中のプロカテロール塩酸塩量は、HPLC により定量し、Wright らの方法¹⁰⁾ を一部改変し、実施した。装置は Agilent1260 Infinity パイナリ LC システム (アジレント・テクノロジー(株), 東京) を使用した。カラムは Mightysil RP18 GP ODS column (75mm - 4.6 mm, 3 μm) (関東化学(株), 東京) を使用し、カラム温度は 30 $^{\circ}\text{C}$ とした。移動相に 50 mM 1-オクタンスルホン酸 / 8% 酢酸 / アセトニトリル = 49 / 38 / 13 (v/v/v) を用いて、流速を 1.0 mL/min とし、試料 100 μL を注入した際の波長 260 nm における吸光度を測定した。プロカテロール塩酸塩の保持時間は約 22 分であった。

5. 光学顕微鏡観察

デバイス内より薬物粒子を取り出し、少量をスライドガラスに載せ、明視野顕微鏡 (CKX41, オリンパス(株), 東京) および顕微鏡デジタルカメラ (DP12, オリンパス(株)) にて撮影した。

結 果

1. 試験協力者による振とう操作後の薬物放出量

7名の各試験協力者により振とうされたデバイスからの薬物放出量、および 20 μg (表示量 10 $\mu\text{g} \times 2$ 吸入) に対する薬物放出率の4回の試行の平均値を図3に示した。デバイスを振とうしない群においては、4回の試行のいずれにおいても薬物放出量が少なく、Test 1 と Test 3 で薬物放出量が 10 μg を下回り、また Test 2 と Test 4 における薬物放出量も低値を示した。一方、各試験協力者による振とう操作後のデバイスからの薬物放出率の平均値は、いずれにおいても 80% 以上と良好

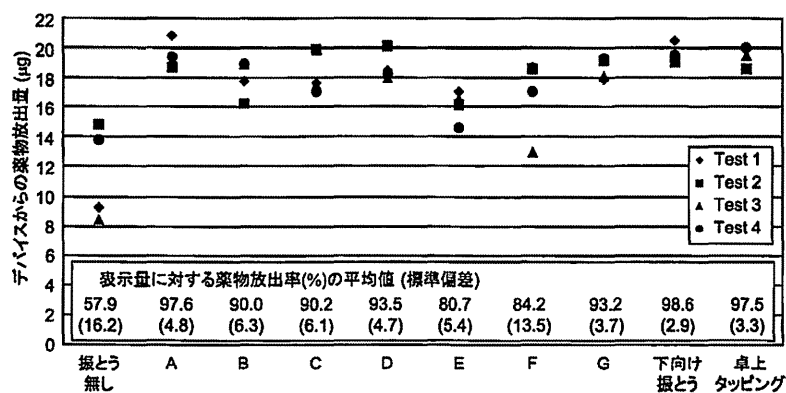


図3 試験協力者 (A-G) と各操作における薬物放出量と薬物放出率 (n=4)

な薬物放出を示した。このことから、振とう指示のあるメプチン® クリックヘラー® において、薬物放出における振とう操作の重要性が確認された。

試験協力者間の比較では、平均値で20%近い差が認められた。また、同じ試験協力者における個々の試行内においても表示量比で10~30%の差が確認され、特に、試験協力者FのTest 3においては、回収された薬物量が表示量比で65%程度と低値を示し、それぞれ同じように振とうしているにもかかわらず、薬物放出量にバラつきが生じることが明らかとなった。

2. デバイスの構造を考慮した操作によるデバイスからの薬物放出量

上向きに開放された薬物充填スペースへの効率的な薬物の充填のため、薬物を下方向へ押し固めるように振とう(下向け振とう)したところ、4回の試行において100%近い効率的な薬物放出が可能となった(図3)。さらに、より簡便かつ効率的に薬物を充填する方法として、デバイスを卓上で軽くタッピングする方法(卓上タッピング)を検討した。その結果、下向け振とう時と同様に表示量比で100%近い良好な薬物放出が可能であった(図3)。また、下向け振とう、卓上タッピングともに、標準偏差が小さく、試験協力者による振とう時よりもバラつきが少ないことが確認された。

3. デバイス内の薬物粒子の比較

今回、振とう時の薬物充填スペースへの薬物充

填量に差が生じた原因として、薬物粒子の流動性の低さが考えられたことから、メプチン® クリックヘラー® に充填されている薬物粒子を取り出し、顕微鏡下で観察したところ、おおよそ数十µm程度の粒子径を有する粒子の存在が確認された(図4A)。一方、同じクリザーバー式DPIであり、使用前の振とう操作を要しないアズマネックス® ツイストヘラー® やパルミコート® タービュヘイラー® に含有されている薬物粒子を、同様にデバイスより取り出し観察したところ、その粒子径は200~600µm程度とメプチン® クリックヘラー® 内の粒子と比較して明らかに巨大な粒子径を有していることが確認された(図4B, 4C)。

考 察

吸入剤は、経口固形製剤などのほかの剤形と異なり、薬物のデバイスへの残留や口腔内への付着のため、表示量と実際の服用量が必ずしも一致しない¹¹⁾。そのため、肺における局所作用を目的としたDPIにおいて十分な治療効果を発揮するためには、デバイスから一定以上の吸入流速で薬物粒子を吸入する必要がある。さらに、デバイスからの薬物放出の準備段階としての吸入前のデバイス操作もデバイスにより異なることから、患者に対する十分な吸入指導が望まれる。吸入前に必要となる操作として、デバイスをひねる、デバイスを振る、ボタンを押す、薬物の入った容器をセットする、それらに穴を開けるなどがあり、いずれも一定量

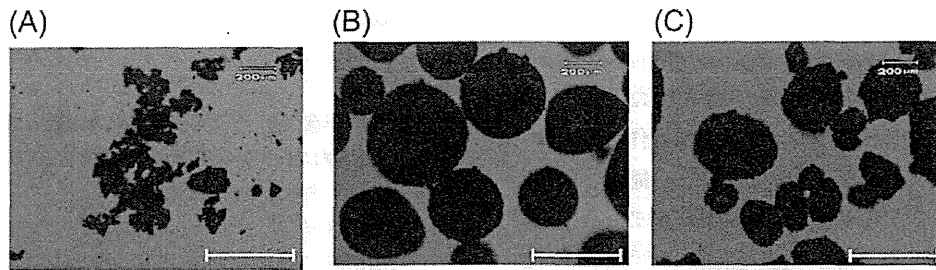


図4 リザーバー式 dry powder inhalers : DPI に含有される薬物粒子. スケールバーは約 500 μm を示す.
(A) メブチン[®] クリックヘラー[®] (B) アズマネックス[®] ツイストヘラー[®] (C) パルミコート[®] タービュヘイラー[®]

の薬物を放出するための操作として重要である。本研究では、リザーバー式 DPI の使用前におけるデバイスの振とう操作に着目し、デバイスからの薬物放出量との関係について検討を行った。本研究におけるデバイスからの薬物放出量の評価方法として、欧州薬局方や米国薬局方に記載されている試験法^{9,12)}を採用した。この送達量均一性試験は、本来、吸入デバイスの性能を評価するための方法であり、吸入デバイスから放出される薬物量が、一定の範囲に収まっていることを確認するものである。その試験条件は、デバイス内の圧力損失 (4 kPa) に基づく試験流量の設定や、体積流量 (4 L) に基づくポンプ吸引時間の設定など、実際のヒトによる吸入を考慮した試験条件が規定されており、吸入デバイスの構造や使用方法が与える影響の評価に適していると考えられた。

今回試験を実施した 7 名の試験協力者間において、振とう操作後にデバイスから DUSA 内に放出された薬物量は、一定の偏りを示したものの平均値として 80~100% に収まっていた。振とう時の様子を観察したところ、デバイスの振り幅は、試験協力者により異なり、おおよそ 15 cm から 40 cm 程度と様々であったが、薬物放出量との相関は認められなかった。薬物放出量が少なかった試験協力者 F における Test 3 の振とう操作は、真っ直ぐ上下方向ではなくやや斜め方向に振とうしており、振とう時のデバイスの振とうの向きも薬物放出量に影響する可能性が示唆された。メーカーのホームページには、動画にてデバイスの使用法も紹介されており、吸入指導を行う際、医療従事者によるデバイスを用いた操作の実演や映像等を使用することで、よりよい吸入指導が可能になると考えられた。

薬物充填スペースに一定量の薬物を充填するために、振とう操作とともに検討した卓上タッピング操作は、衝撃力による薬物の均一な充填により、効率的な薬物放出が可能であった。デバイスの特性を考慮した吸入方法として、横山らは、フルチカゾンプロピオン酸エステル DPI であるフルタイドロタディスクについて、1 回吸入後にデバイスをタッピングしてから再度吸入を行うことで、デバイスへの薬物の付着残存量を大きく低減できることを報告している。^{5,6)} デバイスの特性や操作の意味を理解し、吸入操作を行うことで、効率的なデバイスからの薬物放出が実現できると考えられた。

今回の検討により、メブチン[®] クリックヘラー[®] に充填されている粉末粒子は、数十 μm 程度の粒子径を有し、振とう操作を要しないほかのリザーバー式 DPI であるアズマネックス[®] ツイストヘラー[®] やパルミコート[®] タービュヘイラー[®] に充填されている粒子よりも細かい粒子径を有していることが確認された。一般に、粉末粒子の粒子サイズが小さくなるほど粒子同士の凝集性が高まり、流動性が低下することが知られている。粉末粒子の流動性改善を目的として、アズマネックス[®] ツイストヘラー[®] およびパルミコート[®] タービュヘイラー[®] は、肺深部への送達に適したサイズに微細粒子化した薬物を造粒し、2 次粒子を形成して充填している (アズマネックス[®] ツイストヘラー[®] 医薬品インタビューフォーム改訂第 5 版、パルミコート[®] タービュヘイラー[®] 医薬品インタビューフォーム改訂第 10 版、ともに平成 26 年 7 月 24 日参照)。一方、メブチン[®] クリックヘラー[®] は、微細粒子化した主薬粒子を比較的粒子径の大きい乳糖粒子と混合し付着させることで、製造時

のハンドリングを改善している。吸入剤の開発にあたっては、デバイスと薬物粒子特性の適切な組み合わせが、肝要であると考えられた。また、吸入時の薬物放出量のバラつきや誤操作などのリスク低減のため、個人差が生じにくい簡便な操作で吸入可能となるデバイスの開発が望まれる。同製剤については、押しボタン操作のみで吸入が可能となるDPIが新たに開発されており、誤操作や薬物放出量のバラつきの低減など、利便性と有効性・安全性の確保につながることを期待される。

吸入剤の有効性を左右する気管支・肺における薬物の沈着量は、デバイスから放出される薬物粒子の量と、その粒度分布に依存する。今回、検討の対象としたメブチン® クリックヘラー® では、振とう操作が吸入前の薬物の定量（量り取り）に影響することが確認された。振とう操作は、主薬および添加物の粒度分布とその混合状態を直接的に変化させる可能性は低いと考えられるものの、有効性・安全性に影響を与える重要なパラメータとして、デバイスから放出された後の粒度分布についても、今後の検討が必要と考えられる。

本研究により、振とう指示のあるリザーバー式DPIでも、懸濁液充填型のMDIと同様、振とう方法によって薬物放出量に差が生じることが示された。DPIの使用方法はデバイスにより様々であり、また使用患者の背景も千差万別であることから、必ずしも添付されている使用説明書だけで正確にデバイスを操作し、期待された量の薬物を吸入できるとは限らない。¹³⁾ 目的の治療効果を得るためには、デバイスの特性を十分に理解したうえで、デバイスに応じた患者への吸入指導を行う必要があると考えられた。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) 厚生労働省, 日本薬局方, 2011, 第16改正版, p15.
- 2) Lee SL, Adams WP, Li BV, Conner DP, Chowdhury BA, Yu LX, In vitro considerations to support bioequivalence of locally acting drugs in dry powder inhalers for lung diseases, *AAPS J*, 2009, 11, 414-423.
- 3) 松本一彦, 西川三喜男, 橋本久邦, 吸入ステロイド治療における薬剤師による吸入指導の意義, *アレルギー*, 1998, 47, 404-412.
- 4) 倉田洋子, 岸 里奈, 山田真之亮, 長谷川雅哉, 山田清文, 久米裕昭, 長谷川好規, 鍋島俊隆, 野田幸裕, 外来喘息教室における薬剤師の役割とその効果について, *医療薬学*, 2009, 35, 145-151.
- 5) 横山晴子, 高柳理早, 山村喜一, 大関健志, 山田安彦, 伊賀立二, プロピオン酸フルチカゾン・ディスクヘラー使用時のデバイスへの薬物残存に及ぼす因子の解析, *薬学雑誌*, 2006, 126, 1163-1169.
- 6) Yokoyama H, Yamamura Y, Abe T, Ohkawa S, Ozeki T, Iga T, Yamada Y, Relationship between amount of drug delivered to lungs and amount released from Diskhaler by inhalation with tapping, *Biol Pharm Bull*, 2007, 30, 1167-1170.
- 7) 五十里良信, 【製剤の工夫で患者ベネフィットを上げる 外用剤編】 注目の製剤技術 メブチン クリックヘラー, *薬事*, 2009, 51, 1293-1297.
- 8) Everard ML, Devadason SG, Summers QA, Le Souef PN, Factors affecting total and "respirable" dose delivered by a salbutamol metered dose inhaler, *Thorax*, 1995, 50, 746-749.
- 9) The United States Pharmacopeia and National Formulary USP37-NF32, The United States Convention, Inc, Rockville, MD, 2014, 273-295.
- 10) Wright DS, Pachla LA, Gibson DM, Jordan RA, Sensitive high-performance liquid chromatographic method for procaterol in human urine, *J Chromatogr*, 1987, 417, 223-228.
- 11) de Boer AH, Gjaltema D, Hagedoorn P, Inhalation characteristics and their effects on in vitro drug delivery from dry powder inhalers Part 2: Effect of peak flow rate (PIFR) and inspiration time on the in vitro drug release from three different types of commercial dry powder inhalers, *Int J Pharm*, 1996, 138, 45-56.
- 12) European Pharmacopoeia, 7th edition, European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare, Council of Europe, Strasbourg, France, 2011, 3825-3829.
- 13) 大林浩幸, 目でみるページ 吸入デバイス操作のビットホール 添付説明書だけで本当に的確な吸入ができるのか?, *喘息*, 2012, 25, 110-114.



次世代乾燥技術と創薬への応用(最終回)

Next Generation Drying Technology and its application to therapeutics

ファイザー バイオ医薬製剤研究所¹⁾

国立医薬品食品衛生研究所²⁾、東京大学大学院工学系研究科・医科学研究所³⁾

大竹聡敏¹⁾、伊豆津健一²⁾、津本浩平³⁾

SATOSHI OHTAKE¹⁾、KEN-ICHI IZUTSU²⁾、KOUHEI TSUMOTO³⁾

Pfizer, BioTherapeutics Pharmaceutical Sciences¹⁾, National Institute of Health Sciences²⁾,

The Institute of Medical Science and School of Engineering, The University of Tokyo³⁾

はじめに

ほとんどの生物材料は水分を多く含み、その量が80%w/wを超えるものも少なくない。そのため、乾燥プロセスを通じた水の除去は取り扱いを容易にするだけでなく、運送コストの低減、安定性の向上など数々の利点をもたらす。種々の乾燥技術には共通の目的(脱水和)があるものの、エネルギー効率や乾燥対象に与える影響が異なるため、特性に合わせた選択と最適化が必要となる。

太陽光を用いた乾燥による穀物や果物、野菜などの保存は数千年前にさかのぼる。これらの初歩的な乾燥技術では微生物汚染や品質低下が問題となることが多く、その回避が新しい乾燥技術の開発を促した。果物や野菜の乾燥には、凍結、真空、浸透圧、流体層、噴流層、通電加熱(オーミック)、マイクロ波などの乾燥法とその組み

合わせが用いられている(表1)。医薬品の乾燥では、これらの中から最適な技術が用いられる。

前2回の総説では、凍結乾燥とスプレードライの製剤への応用について解説した(本誌2014年2月号, 3月号)。凍結乾燥はバイオ医薬品やワクチンの長期安定性保持を目的として、広く用いられている¹⁾。スプレードライは技術研究が最も進んでおり、低分子医薬品の乾燥法として広く活用される他、インスリン吸入剤(Exubera[®])の製造にも用いられた²⁾。本総説では、次世代乾燥技術を用いたタンパク質医薬品やワクチンの乾燥に焦点をあてる。このうち泡乾燥(フォームドライ)と超臨界流体技術については、医薬品の乾燥技術として研究が進んでいる。また、食品や廃棄物処理などの他産業で汎用される新規の乾燥技術は、医薬品の品質向上や工程効率化に向けた活用が期待されている。

表1 主な代替乾燥技術と応用例

乾燥技術	応用例
対流乾燥	酵母 ⁵⁾ 、有用微生物 ⁶⁾ 、抗体 ³⁾ 、酵素 ⁹⁾ 、血小板 ⁷⁾ 、魚 ¹⁰⁾ 、果実 ¹²³⁾
真空乾燥	有用微生物 ^{14, 17)} 、食品 ^{15, 16)} 、酵素 ^{21, 22)}
泡乾燥 (フォームドライ)	ワクチン ^{23-25, 124, 125)} 、モノクローナル抗体 ³⁾
超臨界乾燥	タンパク質 ³¹⁻³³⁾ 、金属複合材料 ¹²⁶⁾ 、エアロゲル ¹²⁷⁾ 、高分子 ¹²⁸⁾
マイクロ波乾燥*	食品 ^{45, 46, 73, 81)} 、酵素 ⁴⁸⁾ 、酵母 ⁴⁷⁾ 、低分子医薬品 ^{50, 60)} 、バイオ医薬品 ⁵¹⁾ 、高分子 ¹²⁹⁾
音波乾燥	食品 ^{84-86, 97)} 、木材 ⁸⁷⁾ 、石炭 ⁸⁸⁾ 、廃棄物 ⁸⁹⁾
浸透圧乾燥	食品 ⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾
赤外乾燥	食品 ¹⁰¹⁻¹⁰³⁾ 、高分子フィルム ¹⁰⁴⁾
通電(オーミック)乾燥	食品 ^{99, 130-132)} 、廃棄物 ¹⁰⁵⁾
噴流層乾燥	食品 ^{120, 133)} 、血漿 ¹⁰⁶⁾ 、酵母 ¹⁰⁷⁾ 、医薬品粉体 ¹⁰⁸⁾ 、有用微生物 ¹⁰⁹⁾
流動層乾燥	酵母 ¹¹⁰⁾ 、食品 ¹¹¹⁾ 、汚泥 ¹¹²⁾ 、化学物質 ¹¹³⁾ 、錠剤 ¹¹⁴⁾

*: マイクロ波乾燥、マイクロ波真空乾燥、マイクロ波凍結乾燥(大気圧と真空の両方)を含む

1. 代替乾燥技術

さまざまな乾燥技術について議論する前に、乾燥過程について簡単にまとめてみたい。溶液や懸濁液の乾燥には、伝導や対流、照射により加熱して蒸発を促進(水を除去)することが求められる(図1)。さらに、送風や真空は脱水を加速することができる。乾燥方法の選択は対象物の組成や構造、エネルギー源の種類、装置能力などさまざまな要因に強く依存する。各技術の評価には、工程のエネルギー消費と乾燥物の品質が重要なパラメーターとなる。工程によって乾燥対象に与えるストレスも異なり、安定性や乾燥物の特性にも影響を与える^{3,4)}。

医薬品の商業生産で用いられる乾燥技術は、生産コストや品質への影響を指標として限られた中から選択されてきた。一般に乾燥は高温ほど速く進むが、一方で、高温ほど製品の劣化を起すことも多い。このため、乾燥温度はプロセス速度と製品品質をともに左右する重要要因であり、至適な乾燥温度の設定は、乾燥プロセスの開発における共通した課題となっている。後述するように、乾燥に用いられるエネルギー源と装置構造にあわせて、他のパラメーターの最適化も必要となる。

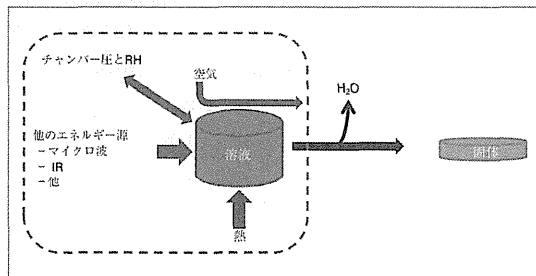


図1 汎用的な乾燥プロセス
エネルギーはさまざまな形態(熱、マイクロ波、IRなど)で溶液あるいは懸濁液へ供給され、他の環境条件(乾燥空気、対流、真空など)も乾燥プロセスを加速するために負荷される。

(1) 対流乾燥(空気乾燥)

溶液や懸濁液を湿度調整した室温または加熱した空気に曝露して乾燥させる対流乾燥(空気乾燥、循環乾燥)の機構はすべての乾燥技術の中でおそらく最も単純である。酵母⁵⁾や有用微生物⁶⁾、ヒト血小板⁷⁾、抗体⁸⁾、制限酵素⁹⁾など広範囲のバイオリジカル類、および魚¹⁰⁾の対流乾燥が報告されている。制御可能な各種の工程パラメーターの中で、乾燥速度は安定性に大きな影響を及ぼす要因と

される¹¹⁾。

Lemetaisら¹²⁾は、パン酵母*Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*)の空気乾燥ストレスに対する安定性を研究し、40%の生菌率を報告している。浸透圧に弱い細胞膜(PM)を持つ変異株の生菌率が低いことから、生体膜の構造変化が生菌率の低下の原因と考えられている。Brinkhousら⁷⁾はヒト血小板を23~25℃の気流に曝露することにより、乾燥に成功している。血小板凝集因子/von Willebrand因子(PAF/vWF)血小板受容体の完全性は、乾燥後も維持されていた。加えて、PFA/vWFの凝集速度からも血小板は調製時と同様であることが確認された。これらの結果は、凍結あるいは凍結乾燥された血小板と同等のものであった。Fellowesら⁸⁾は、口蹄疫(FMDV)ウイルスに対する中和抗体について、紙上での空気乾燥とバイアル中の凍結乾燥が与える影響を比較した。注目すべきことに、抗血清を23℃で30%RHに18時間曝露して乾燥した試料は37℃で28週まで貯蔵しても安定であり、凍結乾燥固体よりも安定であることがわかった。凍結乾燥は乳酸菌など各種の有用微生物の乾燥に最も一般的に用いられているが、長い乾燥時間とコストが課題となってきた。Champagneら⁶⁾は、*Lactobacillus rhamnosus*(*L. rhamnosus*)や*Lactobacillus plantarum*(*L. plantarum*)など各種の有用微生物について空気乾燥時の安定性を調べた。試料を脱湿気した空気(<5%RH)に90L/hrで曝露し、水活性を制御するために塩化リチウムの過飽和溶液の存在下、室温で24時間乾燥させた。*L. plantarum*と*L. rhamnosus*の最適な生存率はそれぞれ78%、70%であり、それは凍結乾燥時に観察された生存率の範囲内である¹³⁾。

(2) 真空乾燥

真空乾燥の特徴は低温で高速の乾燥過程にあり、高温に弱いバイオ医薬品などの品質変化を回避した乾燥が可能となっている。圧力を50~100mbar程度まで下げることにより、水分子は膨張して水蒸気となる。この減圧条件下では、高温に弱い物質の低温における乾燥が可能となる。一方で、蒸発冷却によって生じる凍結を回避するために品温のモニタリングや制御が必要となる。

真空乾燥は凍結乾燥よりも低コストなことから、近年さまざまな食品の乾燥に用いられている¹⁴⁻¹⁶⁾。Foerstら¹⁷⁾は15℃、15mbarで22時間の真空乾燥によって調製した*Lactobacillus paracasei*(*L. paracasei*)F19など、各種の有用微生物の貯蔵安定性を調べた。真空乾燥した*L. paracasei*は凍結乾燥での報告と同様に、4℃で3カ月

の保存中にほとんど不活化を示さず、高い安定性が確認された^{18, 19)}。同様に、真空乾燥によって乾燥した細胞の不活化の速度定数は、凍結乾燥によって乾燥した同じ株よりも低かった。Conradら²⁰⁾は*Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)の安定性に及ぼす真空乾燥の効果を調べた。*L. acidophilus*に安定化剤を加えずに室温、85mTorr下で4日間乾燥すると生菌率は19%であったが、トレハロースの添加によって38%まで上昇した。Rossiら²¹⁾は、さまざまな共存物質の存在下で真空乾燥した制限酵素EcoRIの安定化を報告している。注目すべきことに、トレハロース共存下では6℃で35日、45℃で12日間貯蔵しても失活がなかった。同様にUritaniら²²⁾は、トレハロース存在下での真空乾燥により、HindIII、EcoRI、BamHIといった制限酵素が安定化できることを報告している。

(3) 泡乾燥 (フォームドライ)

泡乾燥(フォームドライ)は、溶液を一段階で乾燥した泡に変換する乾燥プロセスである。その工程は、減圧下における溶液の沸騰または泡化と、それに続く迅速な蒸発(エバポレーション)プロセスからなり、凝固した泡に似た構造の固体が得られる(図2)。蒸発熱による凍結を避けるためには、注意深い温度制御が必要とされる。この工程はコラプス条件下の凍結乾燥と類似点が多い。スプレー乾燥や凍結乾燥と異なり、泡乾燥の過程では乾燥対象が室温付近(15~25℃)に保持されるため、高温や凍結およびせん断力によるストレスを受けにくいとされ、安定性の低いバイオ医薬品の乾燥への活用が期待されている^{3, 23)}。加えて、泡乾燥は水を中程度の速度で除くため、数時間から数日でプロセスは完了する。

泡乾燥プロセスの鍵は、低蒸気圧下における溶液の沸

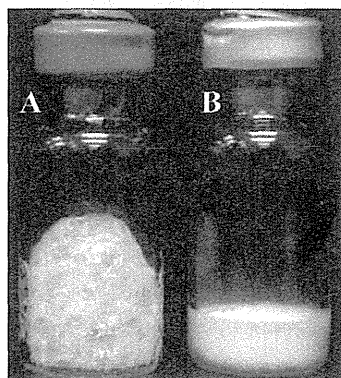


図2 泡乾燥(A)と凍結乾燥(B)で得られた固体の外観
試料は腸チフス弱毒生菌Ty21a株と25%ショ糖、25mMリン酸ナトリウムを含む(図はOhtakeら²⁵⁾による)。

騰や泡化と、それに続く迅速な蒸発乾燥にある^{24, 25)}。泡乾燥を適切に進めるには乾燥庫内圧の調整が重要であり、減圧が速すぎると容器からの吹きこぼれや凍結による泡の成長停止が発生しやすい。逆に減圧が遅すぎても泡形成は阻害され、溶液はスラリー状となってしまう。短い平衡時間を入れながらチャンバー圧を段階的に低下させることによって、プロセス効率の向上が可能とされる²⁵⁾。工程条件に加えて、製剤組成の最適化も、効率的な泡形成と乾燥後の保存におけるバイオ医薬品の安定性に大きな影響を与えることが報告されている。安定化作用を持つ添加剤は凍結乾燥製剤の場合と類似しており、糖やポリオール、ポリマーや界面活性剤などが有効とされる。

一方で、泡乾燥では対象物が空孔形成(キャビテーション)に伴う表面張力など、他のプロセスにない一連のストレスに曝露される。加えて泡乾燥では、凍結乾燥に比べて固体部の比表面積が小さいため、同じ製剤組成でも水の脱着に時間がかかると考えられている²³⁾。そのため、凍結乾燥で到達するのと同レベルまで残存含水量を低下させるには、長時間の二次乾燥プロセスが必要となりうる。泡乾燥されたバイオリジカル製品の保存安定性は比較的高いと考えられている。例として、パラインフルエンザウイルスの凍結乾燥やスプレー乾燥品を25℃で20週保存すると1 log/week^{0.5}以上のタイター減が起こるのに対し、泡乾燥では0.73 log/week^{0.5}のタイター減が報告されている²³⁾。また泡乾燥した*F. tularensis*(野兔病菌)では、25℃保存(12週)後のタイター減が1 log₁₀以下であり、冷蔵条件(2~8℃)では少なくとも12週間活性が失われないことが報告されている²¹⁾。それに対して、凍結乾燥された*F. tularensis* LVSは普通の条件下で12週間貯蔵すると、3 log₁₀かそれ以上の活性低下がみられた²⁶⁾。Vivotif™(凍結乾燥品、腸チフス商品ワクチン)は37℃、25℃でそれぞれ12時間、2週間であるのに対し、泡乾燥されたTy21aワクチンは37℃、25℃でそれぞれ4週以上、42週以上長い安定性を示すことが報告されている^{25, 27, 28)}。安定性向上の原因として、泡乾燥では固体部の比表面積が小さいことと、中間的な温度条件での乾燥による氷形成の回避が指摘されている^{23, 25)}。泡乾燥には商用生産に向けたスケールアップなど解決すべき課題も多いが、安定性確保に有用な乾燥法として注目されている。

(4) 超臨界流体乾燥

超臨界流体(SCF)技術は目的とする形状や特性を持った、高純度のミクロン長のタンパク質粒子の生産などを主な対象として研究されてきた。製剤プロセスでは低い臨界温度($T_c=31.1^\circ\text{C}$)と環境影響が少ないことから、超臨界二酸化炭素の活用が最も広く検討されている。超臨界二酸化炭素には入手の容易さや高い安全性、低コストといった多くの利点がある。また、温和な温度での操作が可能であり、室温条件で気相に戻るため、毒性のある残存物を生じないなどの特徴も有する。

SCFを用いたいくつかの乾燥技術が報告されている。SCF-支援型噴霧乾燥(SCF-assisted nebulization drying (SAND))では、タンパク質製剤はSCFでスプレー乾燥される。機器の構成は、典型的なスプレー乾燥プロセスで用いられるものと同様であるが、乾燥ガスの代わりにSCFが使われる。乾燥はドロプレット(微小液滴)中の溶質の沈殿により駆動され、それに伴って溶媒力は消失する。ドロプレット中の過飽和タンパク質溶液はSCFに抽出され、タンパク質を含むガラス状態のアモルファス固体が形成される。CO₂支援型噴霧(CO₂-assisted nebulization (CAN))には、超臨界の圧力(通常8~10MPa)と温度(通常20~50°Cの幅)でタンパク質溶液中にCO₂を混合して溶解するというプロセスが含まれる。その後、噴霧された溶液は、流量制限装置の通過後に大気圧へ移行する際に膨張し、濃厚なエアロゾルを生成する。噴霧の過程でCO₂が膨張する際に、ドロプレットはより細かくなり、その後、空素流によって迅速に乾燥されて、マイクロサイズの粒子が得られるのである。つまり、このプロセスではCO₂はタンパク質を沈殿するための抗溶媒として用いられるのではなく、むしろ、通常のスプレードライよりも低温での乾燥を可能とするためのエアロゾル化(拡散)補助剤として用いられる。そのため、この方法は熱的に不安定な材料を加工するのに有用である³⁹⁾。

別のプロセスである超臨界抗溶媒(supercritical anti-solvent (SAS))プロセスでは、タンパク質溶液を微粒化(アトマイゼーション)する前にSCFと混合し、その後、大気圧条件下で噴霧する³⁹⁾。この乾燥法でSCFは、タンパク質の沈殿を引き起こす抗溶媒として用いられる。インシュリン³¹⁾や α -キモトリプシンのナノあるいはマイクロ粒子作製の検討例において、工程条件により安定性が異なることが報告されている。SASプロセスは、有

機共溶媒からの生分解性プラスチックやタンパク質の共沈殿によるタンパク質含有微粒子の生産への活用も試みられている³³⁾。報告されている微粒子中のタンパク質のロード量は比較的少なく、活性やタンパク質放出に関する報告はない。SCFの特徴を利用したプロセスとして、他に、Solution Enhanced Dispersion Supercritical fluid (SEDS)³⁴⁾、超臨界流体急速膨張法(Rapid Expansion of Supercritical Solutions: RESS)³⁵⁾、ガス飽和・懸濁溶液法(Particle from Gas Saturated Solutions: PGSS)³⁶⁾やコーティング³⁷⁾がある。

SCF乾燥がタンパク質の構造と安定性に及ぼす影響についての研究報告はごく限られている。気液界面における吸着など他のプロセスにも共通するストレスとともに、高圧などSCF乾燥に特有のストレスも、タンパク質の安定性に影響を及ぼすことが想定される。加えて、溶液の緩衝液成分が適切に機能しないと、CO₂の溶解はタンパク質溶液のpHを低下させることになる。さらに、SCFにおいてタンパク質の溶解度を高めるために添加される有機溶媒は、凝集の形成を促進する可能性がある³⁸⁾。プロセスのスケールアップは、これらのSCFプロセスに共通する課題である。SCFを基盤とした技術に関する詳細は、Shethらの総説を参照されたい³⁹⁾。

(5) マイクロ波乾燥

マイクロ波を用いた乾燥の機構は、一般的な対流乾燥とは大きく異なる。高温の空気や真空下で通常の乾燥機を用いるとき、乾燥速度は水や溶媒が材料の内部から蒸発が起こる表面まで拡散する速度によって制限される。対流乾燥では、減圧や乾燥対象の加熱により表面からの水の蒸発は速くなり、乾燥時間は短縮される。それでも乾燥は内部の水が表面に拡散する速度によって制限される。また、乾燥が進むにつれて水の拡散経路が延び、移動が難しくなるため、乾燥は遅滞する(これは凍結乾燥でも観察される)。

マイクロ波それ自身は熱とは異なるが、乾燥対象の内部に吸収されたエネルギーが熱に変換される(図3)。マイクロ波のエネルギーは極性を持つ水分子やイオン成分に吸収され、加熱が達成される。このため、乾燥対象物の温度は主に熱伝導により徐々に上昇する。マイクロ波は電磁場スペクトルの一部であり、300MHzと300GHzの間にある。一般の乾燥プロセスには分子の振動に適すとともに、電波法で認められた周波数(2.45GHz)のマイクロ波が用いられる。

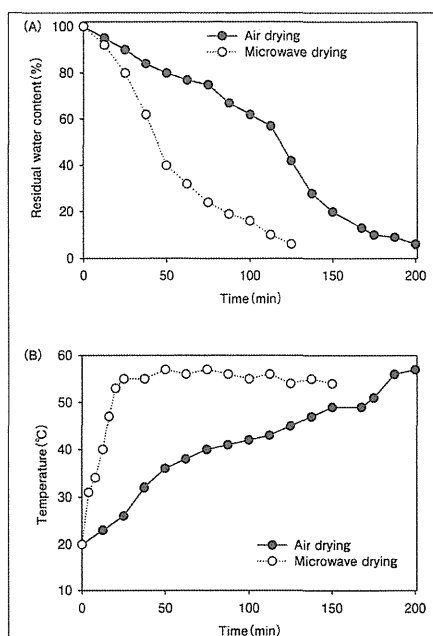


図3 空気乾燥とマイクロ波乾燥における固体の水分量(A)と試料温度(B)の変化例
LiとRamaswamyの報告⁴⁴⁾から

工業用マイクロ波乾燥機の例として、Linn High Therm GmbH⁴⁰⁾やThermex Thermatron⁴¹⁾、EnWave⁴²⁾、Industrial Microwave Systems⁴³⁾などがあげられる。各種のマイクロ波を用いた乾燥技術を用いて加工されている製品として、パスタ、乾燥牛乳、穀物、果物、コーヒー、エビがある⁴⁴⁾。マイクロ波の活用検討は国内でも盛んであり、冷却した空気と低出力マイクロ波の組み合わせによる鶏肉⁴⁵⁾やジャガイモ⁴⁶⁾の乾燥に関して興味深い結果が報告されている。乾燥された食品の品質と加水による再構成能は、凍結乾燥した製品とほぼ同等とされる。また、マイクロ波乾燥は酵母⁴⁷⁾、酵素⁴⁸⁾、低分子医薬品^{49, 50)}の他、さまざまなバイオ医薬品⁵¹⁾の乾燥への応用検討が報告されている。

マイクロ波乾燥の長所は乾燥時間の短縮にある。通常の加熱法を用いると数十分から数時間かかる乾燥工程が、数秒から数分で終了する。しかしながら、水分量が極めて多い食品の完全な乾燥に、マイクロ波加熱を用いることは経済的ではない。むしろ、プロセスの後半で乾燥度を高めるために、通常の加熱法と相補的に用いるべきである(ハイブリッド乾燥の項を参照のこと)。マイクロ波を用いた乾燥では、発生器のオンオフ動作と出力制御によって加熱度の調整が可能であり、早く、効率よく、そ

して正確なプロセス制御が可能である。マイクロ波を用いることにより理論的には均一な加熱が可能とされるが、実際にはマイクロ波場の分布は不均一となることが多く、乾燥対象内部の温度分布も不均一となる⁵²⁾。加えて、本手法は水分量が極めて低い物質の乾燥には適していない。そのため、単独での有用性は限られており、別の乾燥法との組み合わせが望ましい。

(6) ハイブリッド乾燥

各種の乾燥技術が持つ長所を活用する目的で、複数の手法を組み合わせたハイブリッド乾燥法が一般的になりつつある⁵³⁾。理論的に可能な多くの組み合わせのうち、乾燥技術の選択は序論で述べたように、対象物の特性とエネルギー効率を主な指標に行われる。

例えば、対流乾燥とマイクロ波乾燥、そして、赤外乾燥はエネルギーの供給方法が互いに異なる。対流乾燥においては、エネルギーは空気から固体部の表面を通して供給される。マイクロ波乾燥においては、双極子分子の高周波数分極によって容量的に供給される。赤外乾燥においては、エネルギーは表面輻射を通して物体に供給され、物体に吸収または反射、浸透される。これらの乾燥技術の各種組み合わせによる顆粒カオリンの乾燥時間を図4に示す⁵³⁾。このうち乾燥時間を最も短縮できたのは、マイクロ波と赤外輻射を対流乾燥を組み合わせた場合であった。一方、純粋な対流乾燥で同様の残存水量(0.6 kg/kg_{db})に到達するには3.8倍の5時間が必要となる。乾燥の初期段階でマイクロ波加熱を適用することの利点は多様な熱効果(孔内圧の上昇、熱拡散、高温における液粘性の低下など)により、多くの水分子が材料表面に押し出されることである。別の例として、GarciaとBueno

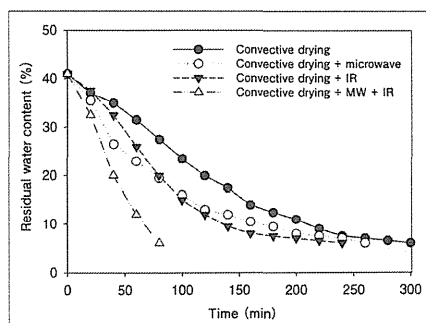


図4 顆粒カオリンの乾燥曲線
空気(対流)乾燥(●—), マイクロ波(MW)を用いて加速した空気乾燥(○---), 赤外照射(IR)を用いて加速した空気乾燥(▲---), MWとIRを併用した空気乾燥(△---)。KowalskiとRajewskiによる⁵³⁾

はテングサと寒天ゲルのマイクロ波対流乾燥について、各種条件で効率を調べている⁵⁴⁾。またGlouannecら⁵⁵⁾やSalagnacら⁵⁶⁾は、赤外とマイクロ波輻射を対流乾燥と組み合わせることにより達成される乾燥速度について報告している。

凍結乾燥の速度と乾燥物の品質を向上するためのハイブリッド技術についても、報告が増えている。Xuらは凍結乾燥前に枝豆を超音波処理し、短時間での微細な氷結晶の形成が可能であることを報告している⁵⁷⁾。WooとMujumdarは電場あるいは磁場の適用が、水の凍結特性に与える影響をまとめている⁵⁸⁾。また、Cuiらはニンジンやリングオの乾燥にマイクロ波-凍結乾燥システムを用いた例を報告している⁵⁹⁾。これらハイブリッド乾燥技術について、例をあげて以下に紹介する。

①マイクロ波真空乾燥

近年、食品や医薬品に求められる製品品質を確保するために、マイクロ波真空乾燥(MVD)が研究されている^{60, 61)}。マイクロ波真空乾燥では迅速な加熱、高効率、優れた制御などマイクロ波加熱の利点とともに、真空下での水の沸点低下によるプロセスのエネルギー効率改善が目的となる⁶²⁾。例えば、*Boesenbergia pandurata*のマイクロ波真空乾燥では60~70℃での高温気流乾燥と比較して、90%まで乾燥時間を短縮できることが報告されている⁶³⁾。MVDはスライスしたバナナ⁶¹⁾やポテト⁶²⁾の他、枝豆⁶³⁾などさまざまな食品生産のプロセスに使われている。また、パルスマイクロ波を用いた真空乾燥について、酵素やタンパク質など温度感受性が高い乾燥対象にも適用することが報告されている^{66, 67)}。

別の例として、①空気乾燥、②凍結乾燥、③空気とマイクロ波真空乾燥の組み合わせ、④マイクロ波真空乾燥を用いた枝豆の乾燥過程における水分量変化を図5に示す^{68, 69)}。MVDはいずれの時間においても、空気乾燥や凍結乾燥よりはるかに速い乾燥の進行を示した。MVDでは40分で目的の水分量に達したのに対して、空気乾燥では9時間、凍結乾燥では18時間と長時間を要している。MVDは微生物由来の α アミラーゼ(酵素)の乾燥にも用いられた⁴⁸⁾。水をほぼ完全に除くには高出力下で約120秒、その他の条件で200秒が必要であった。庫内の真空度を上昇させ、より高い圧力勾配をもたらすことで、低温下においても乾燥プロセスを加速することができる。最も良い結果は低出力(200W, 300W)のマイクロ波を用いた

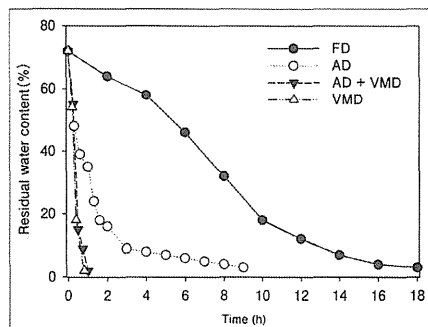


図5 凍結乾燥(FD)、空気乾燥(AD)、マイクロ波真空乾燥(VMD)、空気とマイクロ波真空乾燥(AD+VMD)させた枝豆の乾燥曲線 Zhangらによる⁶⁹⁾

プロセスで得られた。酵素活性の高レベルでの保持は、高出力のマイクロ波と低真空度を組み合わせた乾燥で観察された。一般に高真空下の乾燥は品質確保に有用なもの、装置と稼働コストが増すため、付加価値が低い製品の乾燥には向かない⁷⁰⁾。

②マイクロ波凍結乾燥

マイクロ波凍結乾燥(MFD)では、凍結乾燥プロセスにおいて昇華を可能とする熱源としてマイクロ波の場が用いられる⁷¹⁾。MFDは一般的な凍結乾燥に比べて乾燥時間が短く、エネルギー消費が少ない。このプロセスの利点として、乾燥時間の短縮、省エネルギー、製品の質の向上、さまざまな乾燥品製造への柔軟性があげられる⁷²⁾。MFDは多様な製品、例えば果物、野菜、固形スープに応用されている⁷³⁻⁷⁵⁾。乾燥対象の温度感受性が高い場合には、マイクロ波に曝露可能な時間が限られる。Duanらはマイクロ波の利用によりキャベツやリマコの凍結乾燥時間を、品質にそれほど影響を与えずに半分にできることを報告している⁷⁶⁾。WangらはMFDがジャガイモの微小構造と品質に及ぼす影響を研究し、プロセス過程での形状の変化を避けるための方法を報告した⁷⁷⁾。加えて、マイクロ波の適用では滅菌効果も生じるとされる⁷⁸⁾。

マイクロ波と対流乾燥の組み合わせが有効なことから⁷⁹⁾、大気圧凍結乾燥(AFD)へのマイクロ波の適用も可能と考えられている。AFDは製品の凝固点より低温での対流乾燥であり、乾燥は圧力勾配により駆動される水の昇華によって進む⁸⁰⁾。AFDでは通常、品温を凍結乾燥より高い-3~-10℃の間に保持して行われる。これは低温下で水蒸気除去能力が低下することによる。工程の効率と乾燥対象の品質を両立させるには、-10℃周

辺での乾燥が望ましいとされる。AFDの速度は熱輸送と大気圧下での蒸気拡散に対する内部抵抗によって制限を受けるため、工程には長時間を要する。そのため、マイクロ波照射は流動層と固定層の両方で昇華の促進につながる。例えば、グリーンピースの乾燥時間はマイクロ波の利用により、およそ50%短縮できた⁸¹⁾。乾燥空気を循環するヒートポンプを基盤とした最初の工業用AFDシステムは、2005年にハンガリーで製作された⁸²⁾。現在、数種類の工業用MFDユニットが多様な製品の製造に使用可能である^{42, 83)}。

③音波支援型乾燥

食品産業における音波の利用が徐々に広がりを見せている⁸⁴⁾。低温での乾燥促進を目的とした音波の活用は1970年代にさかのぼる。一般に音波乾燥とは、高温の空気と空気を伝搬する高強度超音波を組み合わせた、対象物からの水の除去を表す⁸⁴⁾。PatistとBatesはさまざまな食品の乾燥について、通常のプロセスのみを用いる場合に比べ、音波乾燥の併用が優れることを報告している⁸⁵⁾。例えば、円柱状ニンジン試料の乾燥速度は超音波によって上昇する⁸⁶⁾。加えて、低温での乾燥が可能なることも音波乾燥の長所とされる。音波乾燥は材木⁸⁷⁾、石炭⁸⁸⁾、そ

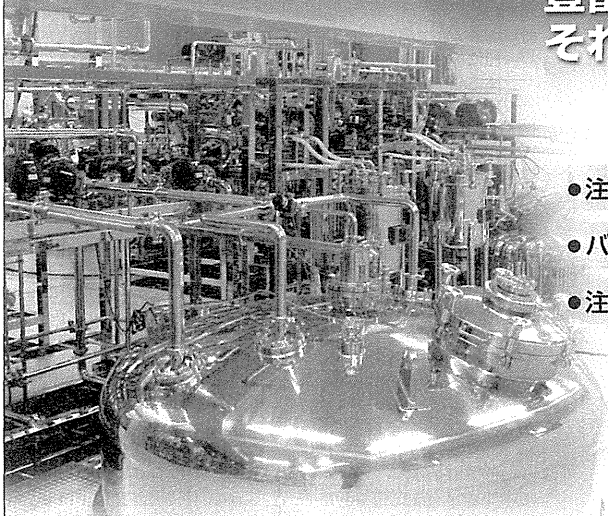
して、廃棄物処理⁸⁹⁾のプロセスにも用いられている。

音波支援型乾燥のメカニズムは、まだ完全には説明されていない。それは対象物の内外における水蒸気輸送に影響を与える複数の効果によると考えられている。音波攪拌が湿潤材料の表面付近の気相中における物質と熱の輸送抵抗を低下させることを、複数のグループが報告している^{84, 90)}。また、音波は素材の連続的な収縮と拡張を生み出すと考えられている。さらに、音波乾燥には空孔形成(キャビテーション)が寄与するとされる。乾燥対象となる固体中の空胞形成は、熱と物質輸送に対する抵抗の減少と同様に、固体部に強く結合している水分子の除去を可能とする⁸⁴⁾。超音波力の適用は乾燥中の固体と気固界面の両方に大きな力学的影響を与えることが報告されており、大量の熱エネルギーを用いることなしに水の除去を促進する可能性が指摘されている⁹¹⁾。このように、超音波の活用は低温乾燥での熱感受性材料の乾燥に大きな可能性を持つと思われる。さらに、MoyとDiMarcoは真空または非真空の凍結乾燥と超音波の組み合わせを試みている^{92, 93)}。

超音波を用いたニンジンの乾燥では、対流乾燥に比べて高い熱輸送定数とそれに対応する物質輸送定数が得られた⁸⁶⁾(表2)。表2に示すように、空気の移動速度、試

医薬品製造設備をオーダーメイドで提供します!


豊富な実績と経験、提案力、それがクリーンメカニカルです



注射剤調製装置

提供設備

- 注射剤調製設備
- 蒸留水製造設備
- バイオ関連調製設備
- ピュアスチーム発生設備
- 注射用水製造設備
- ユースポイント冷却器

 クリーンメカニカル株式会社

URL <http://www.clean-m.com/>

本社・工場 〒793-0046 愛媛県西条市港新地100-1
TEL 0897-58-3611 FAX 0897-58-3612
大阪営業所 〒532-0011 大阪市淀川区西中島4-9-28 TAIYOセンタービル3F
TEL 06-4805-6077 FAX 06-4805-6088
関東営業所 〒231-0032 横浜市中区不老町1-1-5 横浜東芝ビル6F
TEL 045-651-2610 FAX 045-228-7427

料の直径,そして熱輸送には半経験的モデルと同様の相関関係が確認される⁹⁴⁾。乾燥の促進は主にプロセス開始時で起こったことから,外部輸送が律速段階であるとき,超音波が外部熱と物質の輸送定数に顕著な上昇を与えることを示している。Garcia-Perezの仮説⁹⁵⁾では,この効果は音波によって促進され,材料-気相界面の境界層の厚みの減少に帰着される。また,超音波による乾燥促進の作用は対象物の空孔度の影響を受けにくいとされる。その例として,低(ニンジン),中(リンゴ),高(ナス)割合の空隙を持つ食品の乾燥では,いずれも乾燥時間が平均で65~70%程度に短縮された^{96,97)}。

④その他の技術

今まで述べてきた方法に加えて,製薬産業以外のさまざまな産業において,いくつかの他の乾燥技術が用いられている。例として,浸透圧乾燥⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾,赤外乾燥¹⁰¹⁻¹⁰⁴⁾,通電加熱(オーミック)乾燥^{105,112,104,105)},噴流乾燥^{116,117,106-109)},流動層乾燥¹¹⁰⁻¹¹⁴⁾,遠心乾燥¹¹⁵⁾,衝撃ジェット乾燥¹¹⁶⁾などがある(表1)。有用微生物(*Lactobacillus acidophilus*)の衝撃ジェット乾燥¹¹⁷⁾では,安定性を保持しつつ短時間(3時間)で残存水量の少ない(10%)固体が得られている。同品の凍結乾燥では19時間の工程で水分量が13%となった。Linらはサツマイモの凍結乾燥における遠赤外照射の影響を解析した¹¹⁸⁾。内部発熱により凍結乾燥のプロセス時間を短縮するための補助手段として,遠赤外照射が選ばれた。10mm長立方体としたサツマイモについて,4~50 μ m幅の波長で200Wを適用することで,乾燥時間を12時間超から5時間まで短縮した。別の例では,Phamらが牛血液の乾燥に噴流乾燥器を利用している¹¹⁹⁾。一方,FengとTangは角切りにしたリンゴの噴流乾燥とマイクロ波加熱の組み合わせを報告している¹²⁰⁾。Hashinagaらはリンゴ片の乾燥に電気流体力学(EHD)乾燥を用い¹²¹⁾,通常の空気乾燥に比べて乾燥速度を4~5倍上昇させている。この技術は電気風(コロナ風)を材料と空気間の物質移動に利用している。EHDはAsakawaが最初に報告しており¹²²⁾,12℃における水の減圧乾燥(エバポレーション)速度は40~50倍まで上昇した。

現在のところ,適用可能な乾燥技術が豊富にあるにもかかわらず,これらの技術の大多数はバイオ医薬品材料のプロセスには,直接は応用されていない。

表2 さまざまな厚さのニンジン片についての空気乾燥(h)と音波支援型空気乾燥(h_{ac})の熱輸送定数(表はAversaらによる⁹⁶⁾)

	空気速度(2.2m/s)			空気速度(2.8m/s)		
	d=0.5cm	d=1.0cm	d=1.5cm	d=0.5cm	d=1.0cm	d=1.5cm
h(J/s m ² K)	73.3	57.2	50.2	95.1	85.3	62.5
h _{ac} (J/s m ² K)	95.7	64.0	59.5	135.5	108.7	89.8

まとめ

生産工程で用いられる乾燥技術は,コストや高温による品質への影響により限定されてきた。バイオ医薬品の乾燥技術としては,現在も凍結乾燥が信頼性の高い標準法であるが,新しい技術の評価も進んでいる。検討例が多い技術として,スプレー乾燥やスプレー凍結乾燥,泡乾燥がある。さらに,マイクロ波,超音波,赤外照射などのエネルギー源を用いた乾燥技術も,食品や農業,繊維産業を中心に活用が進みつつある。医薬品の安定性は個々に異なることから,優れた乾燥技術も普遍的に応用可能というわけではない。乾燥技術の選択には,その機構や対象物へのストレスの理解が必要であり,ハイブリッド乾燥も有力な候補となる。加えて,技術を比較する上では最終水含量の考慮が重要である。また,生産工程での活用には,機器のスケールアップとGMP環境への適合も不可欠となる。

引用文献

- 1) Costantino HR. 2004. Excipients for use in lyophilized pharmaceutical peptide, protein and other bioproducts. In Costantino HR, Pikal MJ, editors. *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, ed. Arlington, VA: AAPS Press. pp139-228.
- 2) White S, Bennett DB, Cheu S, Conley PW, Guzek DB, Gray S, Howard J, Malcolmson R, Parker JM, Roberts P, Sadrzadeh N, Schumacher JD, Seshadri S, Sluggett GW, Stevenson CL, Harper NJ 2005. EXUBERA: pharmaceutical development of a novel product for pulmonary delivery of insulin. *Diabetes Technol. Ther.*, 7(6): 896-906.
- 3) Abdul-Fattah AM, Truong-Le V, Yee L, Nguyen L, Kalonia DS, Cicerone MT, Pikal MJ 2007. Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): stability of a monoclonal antibody. *J. Pharm. Sci.*, 96(8): 1983-2008.
- 4) Amorij JP, Huckriede A, Wilschut J, Frijlink HW, Hinrichs WL 2008. Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharm. Res.*, 25(6): 1256-1273.
- 5) Nakamura T, Mizukami-Murata S, Ando A, Murata Y, Takagi H, Shima J 2008. Changes in gene expression of commercial baker's yeast during an air-drying process that simulates dried yeast production. *J. Biosci. Bioeng.*, 106(4): 405-408.
- 6) Champagne CP, Raymond Y, Simon JP 2012. Effect of water activity and protective solutes on growth and subsequent survival to air-drying of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*