

Figure 1 Chemical structures of model compounds: (a) sulfamethazine (SMT), (b) sulfadiazine (SDA), (c) sulfamerazine (SMR), (d) sulfamonomethoxine (SMM) and (e) sulfadimethoxine (SDM).

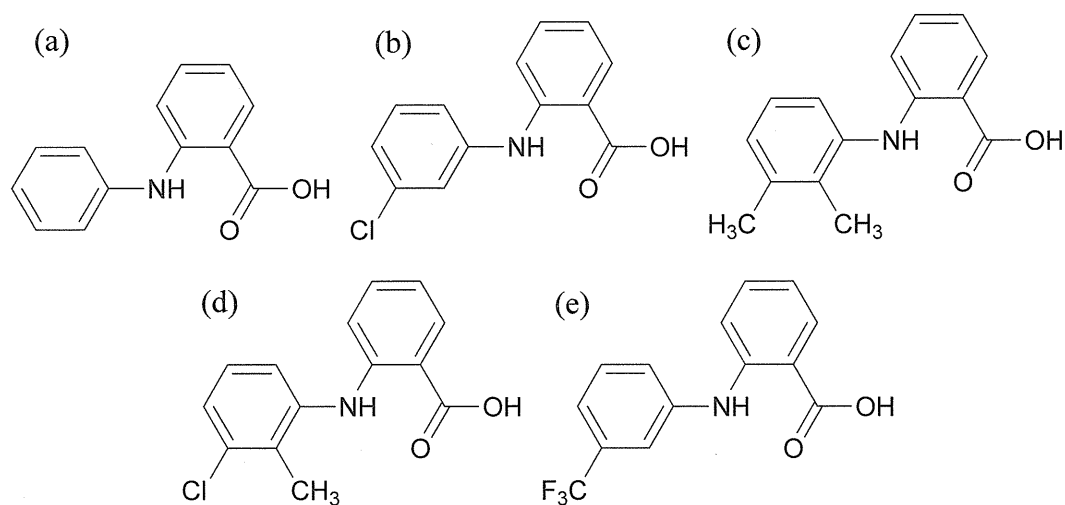


Figure 2 Chemical structures of model compounds: (a) n-phenylanthranilic acid, (b) 2-(3-chloroanilino)benzoic acid, (c) mefenamic acid, (d) tolfenamic acid and (e) flufenamic acid.

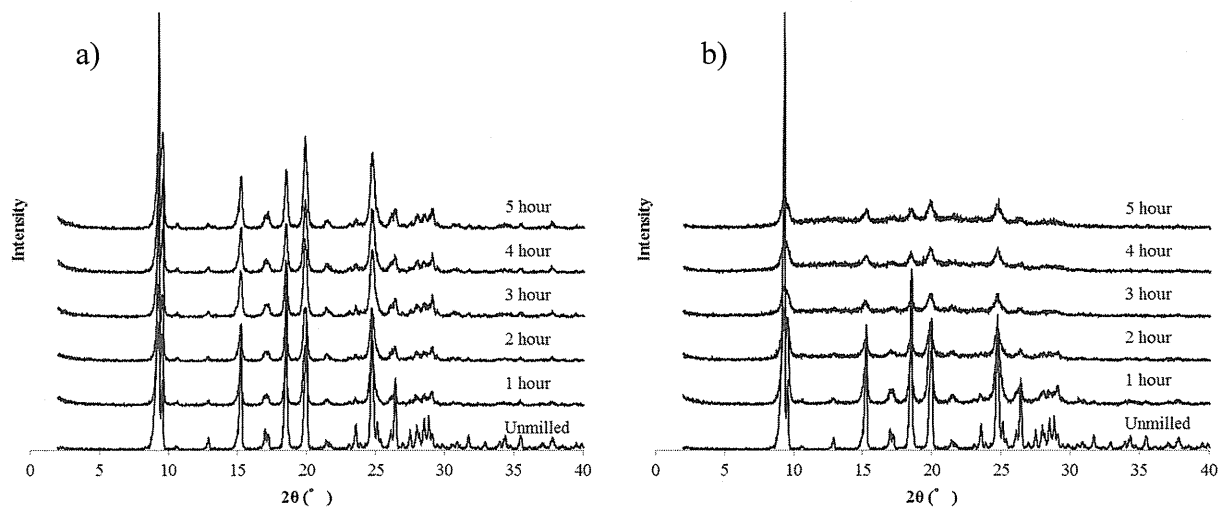


Figure 3 Powder X-ray diffraction patterns of sulfamethazine (a) without and (b) with 5% of sulfamerazine as an impurity

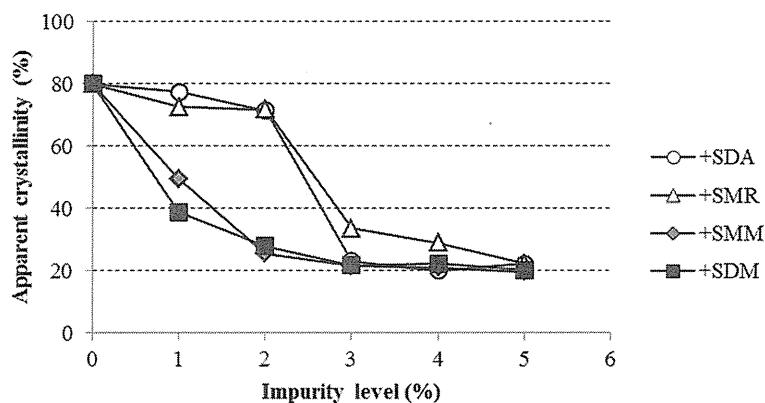


Figure 4 Apparent crystallinity of sulfamethazine after 5 hour milling against the impurity level

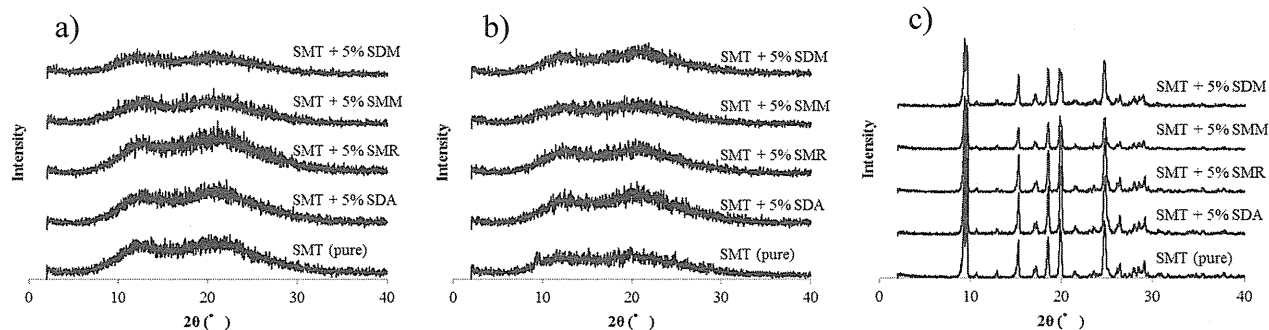


Figure 5 X-ray diffraction patterns of sulfamethazine with and without impurities, (a) initial, (b) 1 day at 40°C/dry and (c) 1 day at 40°C/75%RH

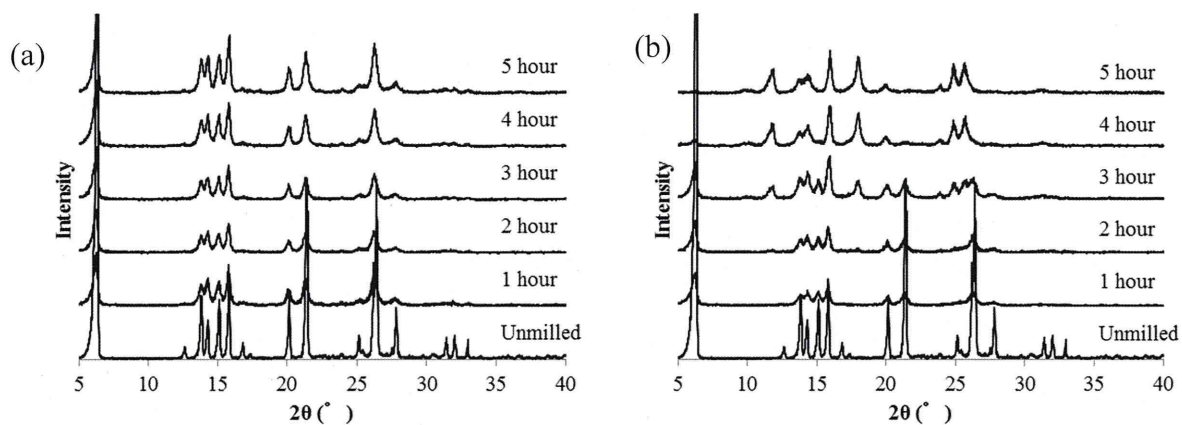


Figure 6 Powder X-ray diffraction patterns of mefenamic acid (a) without and (b) with 5% of N-phenylanthranilic acid as an impurity

Table 1 Crystal forms after 5 hour milling with and without impurities

Main compound	Impurity (5 wt.%)				
	PAA	CBA	TFA	MFA	FFA
N-Phenyanthranilic acid	n.c. ^{*1)}	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
2-(3-chloroanilino)benzoic acid	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Tolfenamic acid	II	I + II	I	I	II
Mefenamic acid	II	II	I	I	II
Flufenamic acid	I	I	I + III^{*2)}	I + III	I

*1) n.c.: Crystal form was not changed.

*2) Crystal forms of flufenamic acid converted by milling with TFA and MFA not identified.

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 コアモルファス製剤の保存安定性と製剤の熱力学的パラメーターの研究

研究分担者 池田 幸弘 武田薬品工業株式会社開発分析研究所 リサーチマネージャー

物性改善を目的とした crystal engineering および製剤化研究、
ならびに developability 評価法の確立

難溶性医薬品の物性改善として、分子間相互作用を利用したアプローチを進め、分子間相互作用の解析を行っている。モデル化合物とした itraconazole につき、cocrystal を形成できるカウンター分子との複合体非晶質、coamorphous を製品にも使用されている製剤技術である、スプレードライヤーでの調製を検討した。溶媒、濃度、ノズル孔径を検討し、coamorphous 噴霧乾燥品が得られた。本噴霧乾燥品は固体 NMR 測定によって cocrystal と同様の相互作用を有していることが判った。噴霧乾燥品の安定性は粉碎品と同様であり、ほぼ同質の coamorphous であることが示された。したがって、スプレードライヤーによる coamorphous のスケールアップ、治験薬および商用製剤への可能性が示された。

研究協力者

山本 克彦 武田薬品工業株式会社開発分析研究所 主任研究員

辛島 正俊 武田薬品工業株式会社開発分析研究所 主任研究員

小島 太郎 武田薬品工業株式会社開発分析研究所 研究員

薬品の効率的な開発のためには、難溶性医薬品の物性を改善する、画期的で商用応用も可能な技術の開発の必要性に直面している。

本研究では、cocrystal をはじめとする crystal engineering および固体分散体やナノクリスタルなどの製剤技術を駆使し、難溶性医薬品の物性を改善することにより、創薬に貢献することを目的とする。Cocrystal、固体分散体などの複成分系における医薬品原薬の存在状態は未だ不明な点が多く、医薬品として適切な物性を設計し、品質を確保するのはまだ困難な状況である。このため、複成分系における医薬品分子の分子間相互作用の解明を行い、医薬品として具備すべき性質の付与に繋がるかを見極める必要がある。

Cocrystal 研究においては、我々は効率的な cocrystal 調製法を確立し、cocrystal の機能性

A. 目的

近年、対象ターゲット分子の変化、また、分子生物学的手法を用いたハイスループットスクリーニングによる化合物創出によって、新規医薬品候補化合物の多くは優れた薬理作用を有しながらも、難水溶性であるために医薬品としての開発に膨大なコストや期間がかかり、場合によっては断念されたものも多く見受けられている。新規医

評価から、溶解性・安定性の改善を示すと共に、cocrystal に特異的な相互作用によってそれら改善がもたらされていることも示した。

cocrystal と同様に相互作用を有する複成分からなる原薬形態である複合体非晶質、coamorphous について、その安定性評価及び分子間相互作用の熱的解析を行った。難溶性化合物のモデルとしては経口抗真菌薬 itraconazole(ITZ) を用い、ITZ と cocrystal を形成できるカルボン酸 cocrystal former (CCF) との coamorphous を対象とした。

本年度は、上記 coamorphous を商用製造に用いられる製剤技術であるスプレードライヤーを用いて調製する検討を行い、調製された coamorphous の分光評価および安定性評価を実施した。調製法による coamorphous の物性特性を考察した。

B. 研究方法

(1) ITZcoamorphous の調製

ITZ と CCF の coamorphous は粉碎または凍結乾燥により調製した。ITZ と CCF の比率はモル比 ITZ/CCF=(2:1) とした。粉碎はレッチェ社製振動ボールミル MM301 を使用し、35 mL ステンレスジャーと 20 mm ステンレスボールによって、約 300 mg の原薬混合物を 25 回/秒で 15 分間粉碎することで行った。

(2) スプレードライヤーによる噴霧乾燥

Nano spray drier B-90 (BUCHI) を用いて温度 75°C にて噴霧乾燥を行った。

(3) 固体核磁気共鳴(NMR)測定

固体 NMR 測定はブルカー・バイオスピン社 NMR 装置 Avance 300WB、および JEOL RESONANCE 社 NMR 装置 JNM-ECX500 II を用い測定した。Cross polarization and magic angle spinning (CP-MAS) 法により、¹³C スペクトルを測定した。MAS

回転数は 10 kHz および 15 kHz とした。

(4) 安定性評価

各噴霧乾燥品を 1 号ビンに入れ、密栓にて 4°C、開栓にて 25°C58%RH、40°C75%RH に保存した。58%RH は臭化ナトリウム、75%RH は塩化ナトリウムの飽和塩にて調湿した。

(5) 粉末 X 線回折測定

Rigaku Ultima IV にて測定した。管電圧 40 kV、管電流 50 mA、測定角 2-35 ° 2θ、スキャンスピード 6 ° 2θ/min、取り込み間隔 0.02° の測定条件で行った。

(6) 面積百分率測定

Water 社製 HPLC Alliance2695 システムと 2996 フォトダイオードアレイ紫外可視検出器を用いて測定した。移動相は 0.05 mol/L 酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルを用い、グラジエントプログラムに基づいて送液した。カラムは資生堂製 Capcellpak MGII、粒子径 5 μm、内径 4.6 mm、長さ 75 mm を用いた。

<倫理面への配慮>

本研究において、動物試験および遺伝子組み換え試験は行っておらず、問題ないと判断された。

C. 結果

C.1. スプレードライヤーによる coamorphous 調製

ITZ 原薬、各有機酸 CCF とともにテトラヒドロフラン(THF)に良好な溶解度を示したため、ITZ/CCF = (2:1)、ITZ 15 mg/mL 相当で THF に溶解し、EtOH で等倍に希釈して孔径 5.5 μm のノズルより噴霧した。噴霧乾燥品の粉末 X 線パターンを図 1 に示す。全体として非晶質を示すハローパターンとなったが、15-20 ° 2θ 付近にやや結晶由来のピークが残存していた。

条件の最適化として、粘性を上げ、また、噴

霧量を減少させるため、THF に溶解後の希釈を 3 倍量とし、孔径 4.0 μm のノズルで噴霧したところ、図 2 に示すように、15-20° 2θ のピークが消失したほぼ非晶質の粉末 X 線パターンを持つ噴霧乾燥品を得た。

C. 2. 噴霧乾燥品の固体 NMR 測定

各噴霧乾燥品の固体 ^{13}C NMR スペクトルを図 3 から図 5 に示す。いずれの噴霧乾燥 (SPD) 品も ITZ 単体の非晶質とほぼ同様のスペクトルを示したが、CCF 由来のピークが、各単体の CCF の位置と異なり、各 cocrystal と同様の位置に観測された。一方、FA 及び SA との粉碎品は、CCF 由来のピークが二種類観測され、一方は CCF 単体、もう一方は CC と一致する位置であった。

C. 3. 噴霧乾燥品の安定性

噴霧乾燥品の物理的安定性を示す結晶性、化学的安定性を示す面積百分率純度をそれぞれ表 1 および表 2 に示す。ITZ-FA についてはどの保存条件においても、噴霧乾燥品の結晶化は認められず、また、面積百分率の低下は認められなかった。ITZ-SA については、加速保存条件である 40°C 相対湿度 75%RH において 2W 後より cocrystal への結晶化が確認された。面積百分率純度の低下は認められなかった。ITZ-TA については、加速保存条件にて 4W 後、ITZ 単体への結晶化が認められた。また、加速条件にて 1% 以上の面積百分率の低下が確認された。

D. 考察

スプレードライヤーによる非晶質化、coamorphous 調製は、原薬濃度を下げ乾燥速度を緩和したこと、EtOH 量を増やして粘度を高め、またノズル孔径を小さくし、ノズルからの溶液の漏出を防いだことが、乾燥時の結晶化を妨げ、非晶質として乾燥させることが可能となったと考えられた。市販製剤の製造に用いられる技

術であるスプレードライヤーでの調製が可能となったことで、coamorphous のスケールアップ、商用製造が可能である可能性が示された。

各噴霧乾燥品の固体 ^{13}C NMR スペクトルにおいて、ITZ 分子由来のピークは、ほぼ ITZ 単体非晶質のものと一致し、ITZ 分子自体での相互作用は確認されなかった。一方、噴霧乾燥品内の各 CCF のピークは各 CCF 単体のピークと異なり、各 cocrystal と同様の位置へとシフトしており、各噴霧乾燥品内で、ITZ と各 CCF 分子は cocrystal と同様の相互作用をし、coamorphous を形成していると考えられた。しかし、FA および TA との粉碎品については、CCF 由来のピークが二種類観測され、相互作用の様式、強度に違いがある可能性が示された。

噴霧乾燥品の安定性については、粉碎品と同様の傾向を示し、FA との coamorphous は物理的および化学的に安定、SA との coamorphous は物理的に cocrystal に結晶化、化学的に安定、TA との coamorphous は物理的に ITZ 単体に結晶化、化学的には不安定という結果であった。スプレードライヤーにて粉碎品と同様の coamorphous が調製されていることを確認した。

調製法の違いについては、粉碎操作は、応力が与えられることで、相互作用が促進されていると考えられるが、一方、凍結乾燥では、相互作用が促進されず、得られた非晶質は相互作用が弱いために ITZ 単体への結晶化が確認された。噴霧乾燥は、凍結乾燥と同様の乾燥操作であるが、噴霧された液滴は熱および気流により、サイズが徐々に縮小し、ITZ と CCF が徐々に近接するために相互作用が可能となったと考えられた。しかし、固体 ^{13}C NMR 測定で確認されたように、粉碎と噴霧乾燥では相互作用が異なることが確認され、どちらが高機能、安定な coamorphous かは今後確認していく必要がある。

また、今回用いた ITZ 原薬のイニシャルの面積百分率純度は 99.7%であり、噴霧乾燥工程で 1.5%-2.0%の分解が生じていることが確認されたことから、溶媒、温度などの噴霧乾燥条件も最適化する必要があり、大量製造にはまだ課題があると示唆された。

E. 結論あるいは、まとめ

本研究により、治験薬および製品の製造に使用される製剤技術であるスプレードライヤーを用いて coamorphous を調製することが可能であることが示された。Coamorphous の製造性、開発可能性が高められ、新たな物性改善アプローチとしての feasibility を提示するものである。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表等

なし

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

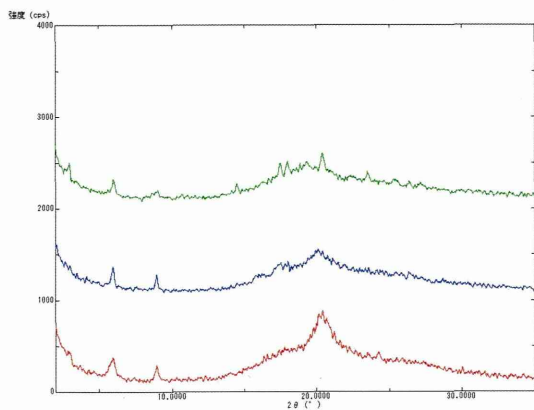


図 1. 噴霧乾燥品、最適化前の粉末 X 線回折パターン、上から ITZ-TA、ITZ-SA、ITZ-FA

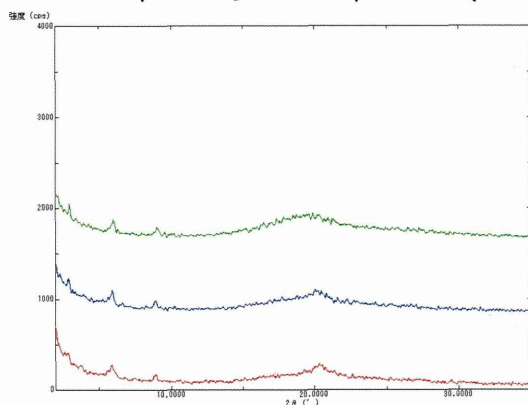


図 2. 噴霧乾燥品、最適化後の粉末 X 線回折パターン、上から ITZ-TA、ITZ-SA、ITZ-FA

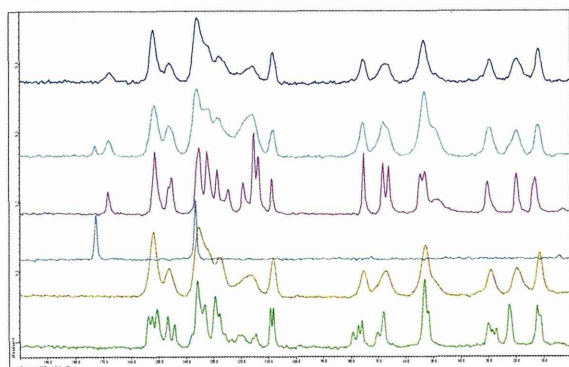


図 3. ITZ-FA の各固体 ¹³C NMR スペクトル、上から噴霧乾燥品、粉碎品、cocrystal、FA 単体、ITZ 単体非晶質、ITZ 単体結晶

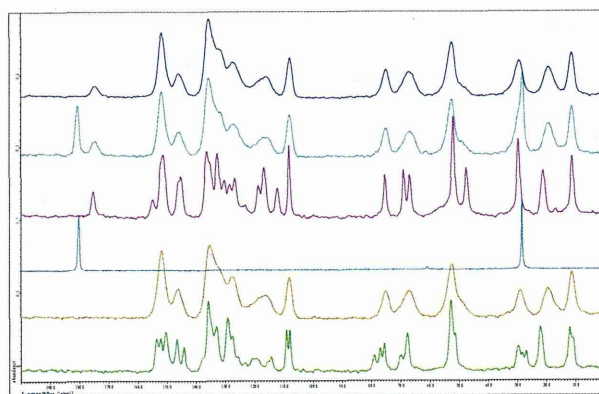


図 4. ITZ-SA の各固体 ¹³C NMR スペクトル、上から噴霧乾燥品、粉碎品、cocrystal、SA 単体、ITZ 単体非晶質、ITZ 単体結晶

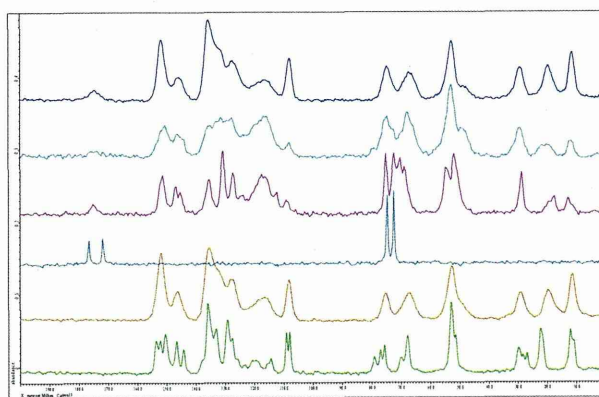


図 5. ITZ-TA の各固体 ¹³C NMR スペクトル、上から噴霧乾燥品、粉碎品、cocrystal、TA 単体、ITZ 単体非晶質、ITZ 単体結晶

表 1. 各噴霧乾燥品の物理的安定性、結晶性

SPD	Storage condition	Crystalline form			
		Initial	1W	2W	4W
ITZ-Fumaric acid	2-8°C (closed)	amor.	amor.	amor.	amor.
	25°C58%RH (open)	amor.	amor.	amor.	amor.
	40°C75%RH (open)	amor.	amor.	amor.	amor.
ITZ-Succinic acid	2-8°C (closed)	amor.	amor.	amor.	amor.
	25°C58%RH (open)	amor.	amor.	amor.	amor.
	40°C75%RH (open)	amor.	amor.	CC	CC
ITZ-L-tartaric acid	2-8°C (closed)	amor.	amor.	amor.	amor.
	25°C58%RH (open)	amor.	amor.	amor.	amor.
	40°C75%RH (open)	amor.	amor.	amor.	ITZ

表 2. 各噴霧乾燥品の化学的安定性、面積百分率純度

SPD	Storage condition	Purity (%)			
		Initial	1W	2W	4W
ITZ-Fumaric acid	2-8°C (closed)	97.5	97.8	97.7	97.3
	25°C58%RH (open)	97.5	97.8	97.6	97.6
	40°C75%RH (open)	97.5	97.5	97.5	97.4
	40°C75%RH (open)	97.5	97.5	97.5	97.4
ITZ-Succinic acid	2-8°C (closed)	98.2	98.1	97.8	97.8
	25°C58%RH (open)	98.2	98.2	97.9	98.1
	40°C75%RH (open)	98.2	97.9	97.6	98.0
	40°C75%RH (open)	98.2	97.9	97.6	98.0
ITZ-L-tartaric acid	2-8°C (closed)	98.0	97.6	97.6	97.5
	25°C58%RH (open)	98.0	97.3	97.5	97.1
	40°C75%RH (open)	98.0	96.5	96.7	96.3
	40°C75%RH (open)	98.0	96.5	96.7	96.3

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 生体内環境を反映した製剤機能の評価法と
製剤技術に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 室長 伊豆津 健一

医薬品の投与経路における生体内環境を反映した製剤の *in vitro* 機能特性評価法の構築を目的に、消化管内、血管内および呼吸器系をモデルとしたシステムについて検討した。フロースルー型溶出試験装置を用いた徐放性製剤の評価について、試験室間の再現性を確認するとともに、ビーズ粒子径など結果の変動要因に関する知見が得られた。医薬品の消化管内における吸収モデルとして、簡易型の 2 画分システムの活用について検討した。吸入剤の評価において、吸入流量が高い試験条件で、空気力学的粒子径の測定値に装置間の差が認められた。

研究協力者

山梨繁行（アステラス製薬）

立木秀尚（東和薬品）

松原健（東亜薬品）

柴田寛子（国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官）

吉田寛幸（国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官）

A. 目的

多様な疾患に対する薬物治療の最適化を目的として、新規投与方法の活用や、薬物送達・放出機能の付与など新規製剤技術の開発が進んでいる。機能性素材や投与デバイスと組み合わせた検討も多い。これらの製剤が有効かつ安全に用いられるには、目的部位への到達や薬物放出などの設計が、生体内で機能することが不可欠となる。一方で製剤の機能評価法は、製品の多様化への対応が遅れており、一般的な製剤試験法の準用や、物性情報に頼る事も少なくな

い。本研究では新技術を生かした製剤の投与部位の生体内環境を反映する薬物到達や溶出・析出の評価法の構築による、製剤開発の促進と承認審査での妥当性評価への活用を目的とする。

放出制御製剤の消化管内における薬物溶出を評価し、製剤の最適化や *in vivo* 挙動との相関 (IVIVC) 構築における有効性が報告される、フロースルーセル (FTC) 法溶出試験装置 (日局、装置 3) の活用を検討した。FTC 装置は、継続的な試験液流によりシンク条件を満たしやすいため、2) 人工腸液への段階的な置換など消化管内を模した試験液条件を設定できる、などの利点がある。一方で、装置が複雑であるとともに、パドル法等に比べて使用事例が圧倒的に少ないため、試験結果に影響を及ぼす装置や試験条件に関する知見は限られる。生体内環境を反映した FTC 法の設定や変動要因の把握を目的として、今年度は、同じ試験装置を有する 3 機関で同ロットの製剤を試験し、研究機関・装置間差の評価を試みた。

BCS クラス 2, 4 に分類される難溶性医薬品の経口固形製剤では、非晶質化や微粒子化、共結晶などの方法で、主薬を結晶からの溶解度より高濃度で溶解（過飽和化）させる溶解促進技術が広く用いられている。一方で過飽和状態は熱力学的に不安定であるため、時間の経過や食事など共存物質の影響と、消化管内の移動による中性領域への pH 上昇に伴い、主薬が結晶または非晶質状態で析出し、吸収量の大幅な低下を引き起こすリスクが指摘されている。

これまでに溶出試験装置を用いた複数の *in vitro* 実験で、過飽和溶液からの医薬品析出・沈殿が報告されているが、*in vivo* では腸から吸収が速やかに進むため、主薬析出の可能性は無視できる程度とするグループもある。吸収と結晶析出の関係を評価するためのシステムとして、有機溶媒を用いた 2 相系や、片岡らが開発した Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 経口吸収性評価システムの有効性が報告されているが、スループットの課題から広範な活用には至っていない。そこで、消化管内での再析出リスク把握を目的とした簡易型の 2 画分システムについて検討する。

呼吸器疾患治療に汎用される吸入剤では、投与デバイスの機構と内部に充填される粒子特性が、薬物の肺内における沈着部位・沈着量を変動させ、製剤間の有効性・安全性に大きく影響することが知られている。そのため製剤評価では、吸入時の流体中における粒子サイズ（空気力学的粒子径）が重要な指標となる。

空気力学的粒子径の評価は、一般に多段インパクターを用いて行われており、欧州薬局方 (EP)・米国薬局方 (USP) には複数の装置が収載されている。本研究では、デバイスと製剤粒子の特性に対応した、試験装置の選択と条件設定を目的に、現在汎用されているアンダーセンカ

スケードインパクター (ACI) と次世代型インパクター (NGI) における装置間差を明らかにするとともに、装置間差に与える粒子特性の影響を検討する。ACI は海外の局方で規定された 28.3L/min 以外にも、メーカーによりバリデートされた 60L/min 用、90L/min 用の組み換え装置も販売されていることから、これらの装置の妥当性についても検討する。

B. 研究方法

B. 1.

フロースルーセル法溶出試験装置は、検討に参加した全ての研究機関で SOTAX 社製の CE7smart を使用した。検討に用いるモデル製剤として、非崩壊型の溶出を示し、先行研究の報告がある USP サリチル酸錠 300mg と、UPS 各条において唯一 FTC 法を用いた溶出性の規格が設定されているイノベロン錠を選択した。対象製剤と標準品、HPLC のイオンペア試薬は同一ロット品を使用した。なお試験開始はポンプ作動時とした。

USP サリチル酸錠 300mg の試験は、フロースルーセル 22.6mm に試料 (Lot No. CTQ0829) 1 個を入れ、円錐部を満たした 1mm ガラスビーズの上に置き、0.7 μm のガラスフィルターを装着した。試験液には加温脱気した 0.05 M リン酸緩衝液 pH 7.4 (サリチル酸錠の証明書に記載) 900mL を用い、流速は 16mL/min、試験温度は 37°C とした。各測定時間 (15, 30, 60, 120, 180, 240 分) にメディアリザーバーから試験液を 10mL 回収し、試験溶液とした。別に 37°C に温めておいた試験液 10mL を追加した。標準溶液はサリチル酸を試験液で 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調製した。メンブランフィルター (孔径 0.45 μm 以下) でろ過した試験溶液を試験液で 10 倍希釈し、吸光度 (296 nm) を測定した。n=6 の試験を 3 回繰

り返し、平均溶出率、標準偏差等を算出した。

ルフィナミド錠 200mg の試験方法は、USP37NF32 に記載されているルフィナミド錠の溶出試験に従って実施した。試験にはルフィナミド錠（イノベロン錠 Lot No. 41A15M）を使用した。各条ではサンプリング用量を 50mL とし、スプリット機能のあるフラクションコレクターを使用するのが前提となっているが、今回の検討ではフロースルーセルを通過した試験液は全量回収し、その一部を HPLC で分析した。

B. 2

透析用のチューブまたはカセットとして、スペクトラポア社再生セルロースチューブ（MWC0 3,500, 8,000）と Thermo 社 Slide-A-Lyzer Dialysis Casette G2（3500MWC0）を用いた。透析用セル内に入れる吸着溶液として、polyvinylpyrrolidone（PVP 29k）と Pluronic F-127 の 10%（w/w）溶液を用いた。溶出試験は日本分光 DT-810 型を用い、試験液として日局の溶出試験第 2 液（900mL, 37°C）を用い、各時間に試験液を手動でサンプリングした。モデル薬品として、カルバマゼピンとプロプラノロールを用い、濃度は UV で評価した。

B. 3

モデル薬物として、ザナミビル水和物の DPI であるリレンザ（グラクソ・スミスクライン㈱、Lot#0946）を用いた。1 試験あたり 2 吸入分（10 mg）を噴霧した。

薬物の分粒に用いる多段インパクターとして ACI（Copley Scientific Ltd.）および NGI（Copley Scientific Ltd.）を使用した。吸入流量は 28.3 L/min（NGI は 30L/min）、60 L/min、90 L/min を選択し、ACI は吸入流量に応じて装置メーカーによりバリデートされているステージの組み換えを行ない、28.3 L/min 用 ACI（ACI28.3）、60 L/min 用 ACI（ACI60）、90 L/min

用 ACI（ACI90）とした。粒子の再飛散を防止するため、ACI の各ステージの捕集盤または NGI の捕集カップを 2 %Brij35/glycerol でコーティングした。プレセパレーターには、水 10 mL（ACI）または 15 mL（NGI）を加え、体積流量 4 L となる時間、ポンプ吸引した。流量に応じて ACI の各ステージを組み替えた際のカットオフ径は、装置メーカーによりバリデートされており、表 3 に示す。また、NGI において流量を変更した場合のカットオフ径は、EP・USP に記載の方法に従い算出した（表 4）。

薬物の定量は、捕集盤または捕集カップを水で洗い込みザナミビルを回収した後、HPLC を用いて行った。HPLC による分析条件を以下に示す。
装置：HPLC-LC10 シリーズ（㈱島津製作所）
カラム：Mightysil RP-18GP C18 column（5 μm, 250 mm x 4.6 mm）
カラム温度：30°C、注入量：10 μL
移動相：水/アセトニトリル=98：2（v/v）
流速：0.5 ml/min、検出波長：230nm

粒子の空気力学的粒度分布として、最上段から最下段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—累積質量曲線を元に、5 μm 以下の微粒子量（FPD）、空気力学的中位径（MMAD）、および幾何標準偏差（GSD）を算出した。最終的に、NGI で得られた結果と ACI で得られた結果を比較し考察した。

<倫理面への配慮> 該当無し

C. 結果

C. 1

サリチル酸錠を研究機関 1 で試験した結果を表 1 に示した。参考文献では 22.6mm セルで流速 16mL/min の場合、120 分で溶出率約 40%、240 分で約 75%と報告されており、およそ一致する

結果が得られた。3 回目の溶出率がやや低くなる傾向が見られたものの、標準偏差や相対標準偏差から値の併行精度や再現性はパドル法と同程度と考えられた。各研究機関の溶出プロファイルを図 1 (a-c) に示した。他の研究機関においても日間差は小さく、バラツキの程度も研究機関 1 と同様であった。ただし 3 回実施した試験の平均溶出率を比較した図 1d を見ると、研究機関 2 の溶出率は他機関よりも明らかに高く、240 分の溶出率で約 10%程度高い結果となった。

ルフィナミド錠を研究機関 1 で試験した結果を表 2 に示した。試験開始から 5 時間後には溶出率 80%以上となり、USP に記載された規格 (5 時間で 60%以上、12 時間で 80%以上) に全て適合していた。試験ごとのバラツキや日間差はサリチル酸錠と同様か小さい傾向が見られた。各研究機関の溶出プロファイルを図 2(a-c) に示した。他の研究機関においても全ての製剤が溶出規格に適合していた。3 回実施した試験の平均溶出率を比較した図 2d を見ると、サリチル酸錠とは異なり、明確な機関差 (装置間差) は認められず、どの研究機関においても、同等の溶出プロファイルが得られた。

C. 2

Pluronic F127 溶液 (分子量 約 12, 600, 15 mL) を入れた透析カートリッジを、カルバマゼピン (2 mg/mL) を含む試験液中で 6 時間まで攪拌保持することにより、カルバマゼピン濃度の低下と考えられる外液の吸光度 (254 nm) 低下が観察された (図 3)。溶出試験液を外液とした比較で、Pluronic の漏出による UV 吸収の変化は見られなかった。一方で PVP 溶液を用いた場合には、カルバマゼピン溶液の吸光度変化はみられなかった。パドルとの接触による透析チューブやカセットの破損が起こり、その数は回転数を

上げると増加した。

C. 3

各流量における FPD、MMAD および GSD を、それぞれ図 4-6 に示す。FPD は、吸入流量に依存して増大し、一方、MMAD は小さくなる傾向が認められた。これは、吸入流量が増大することで、粒子にかかる力が増大し、より小さな粒子へと解砕されるとともに、添加剤である乳糖水和物からの主薬の剥離が起こりやすくなったためと考えられた。また GSD については、NGI において約 1.8-1.9 と、吸入流量に依存せずほぼ一定の値を示すことが明らかとなった。

FPD について NGI を ACI と比較したとき、30 L/min および 60 L/min では装置間差が認められなかったのに対し、90 L/min では ACI で低くなる傾向が認められた。同様に MMAD についても、90 L/min で試験した場合において、NGI と ACI の差が大きくなる結果となった。GSD は、28.3 L/min および 60 L/min においては ACI が低く、90 L/min では ACI が高くなることが明らかとなった。

D. 考察

サリチル酸錠の溶出プロファイルにおいて研究機関 2 の溶出率が高くなった原因として、ガラスビーズの違いが考えられる。研究機関 1 と 3 は粒子径分布が 0.91-1.45mm と広く平均粒子径 1.2mm のガラスビーズを使用しているのに対し、研究機関 2 は粒子径分布が 1.01-1.15mm と狭く平均粒子径が 1.07mm のガラスビーズを使用している。ガラスビーズの粒子径が小さいほど溶出率が高くなるという報告があることから、粒子径の違いが一つの要因と考えられる。ただし、なぜ粒子径が小さいほど溶出率が高くなるのか不明であり、今後、フロースルーセル内の試験液の流れ (流速や動きなど) の流体力

学的な解析によって明らかになることが期待される。一方で、溶出速度の遅いルフィナミド錠では機関差（装置間差）は認められず、ガラスビーズの違いは試験結果に影響しなかったと言える。試験開始後に速やかに崩壊した後、顆粒からの溶解度に依存した薬物放出速度に水の流れの違いが影響しないためと推測される。原薬の溶解度等の特性と製剤の特性によってガラスビーズの影響が異なるものと考えられ、どのような場合に注意すべきか検討する必要がある。

非イオン性の高分子界面活性剤である Pluronic F127 を保持した透析モジュールを用いることにより、試験液から水溶性が比較的低い医薬品の移行が観察された。Pluronic はモジュール内で主薬分子を吸着またはミセルとして保持したと考えられる。この結果から透析膜を、難溶性医薬品の保持機能が異なる 2 相系の分画に使用可能な事が確認された。測定の容易さと試験液設定の自由度の高さは、既存の有機溶媒活用などに比した利点と考えられる。一方で、移行速度の低さや Pluronic 溶液の膜吸収モデルとしての妥当性など、解決すべき点も多い。薬物保持相としての脂質成分の活用や、固定化、より溶解性の低い医薬品をモデルとした検討が今後必要と考えられた。

D. 2

ACI は、NGI と比較してウォールロスが高いこと、捕集カーブの重複が大きいこと、また対数換算した際の各ステージのカットオフ径の間隔が一定でないことが報告されていることから、今回の差が生じたものと考えられた。これらの差が生じる要因について、異なる粒子特性を持つ製剤や圧力損失の異なるデバイスを用いて検討を行なう予定である。

E. まとめ

今回使用した FTC 法溶出試験装置は比較的精度良く測定でき、機関差・装置間差も小さいことが分かった。ただし、試験製剤によってはガラスビーズの違いなど FTC 法特有の要因が試験結果に影響する可能性があり、今後も変動要因に関して検討する必要がある。

吸入剤の評価では、吸入流量が高い試験条件で、空気力学的粒子径の測定値に装置間の差が認められた。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Izutsu, K., Yonemochi, E., Yomota, C., Goda, Y., Okuda, H., Studying the Morphology of Lyophilized Protein Solids using X-Ray Micro CT: Effect of Post-freeze Annealing and Controlled Nucleation. AAPS PharmSciTech, 15, 1181-1188 (2014)
- 2) Shibata, H., Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Goda, Y. Investigation of factors affecting in vitro doxorubicin release from PEGylated liposomal doxorubicin for the development of in vitro release testing conditions. Drug Dev. Ind. Pharm. in Press
- 3) Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Yamaki, T., Ohdate, R., Yu, Z., Yonemochi, E., Terada, K. Effects of Formulation and Process Factors on the Crystal Structure of Freeze-dried Myo-Inositol, J. Pharm. Sci., 103, 2347-2355 (2014)
- 4) 吉田寛幸, 伊豆津健一, 柴田寛子, 桑名明美, 合田幸広, 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, 医療薬学, 41; 50-55 (2015)

- 5) 柴田寛子, 伊豆津健一: 直腸投与製剤の種類と用途, 薬局, 65: 2365-2369 (2014)
- 6) 吉田寛幸: 経肺吸収製剤の評価法に係る規制の現状について, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45: 891-897 (2014)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

学会発表等

- 1) 吉田寛幸, 伊豆津健一, 四方田千佳子, 柴田寛子, 合田幸広, GastroPlus を用いた吸入剤の薬物動態予測に関する検討, 日本薬剤学会第 29 年会, さいたま市 (2014.5).
- 2) 吉田寛幸, 経肺吸収製剤の評価法, 日本薬剤学会第 29 年会, さいたま市 (2014.5).
- 3) 柴田寛子, 四方田千佳子, 吉田寛幸, 伊豆津健一, 川西徹, 奥田晴宏, 合田幸広, リポソームと相互作用する生体分子の探索とその評価, 日本薬剤学会第 29 年会, さいたま市 (2014.5).
- 4) 天野陽平, 吉田拓史, 金光智行, リポ化製剤の血中薬物放出挙動の in vitro 評価, 日本薬剤学会第 29 年会, さいたま市 (2014.5).
- 5) Izutsu, K., Shibata, H., Yoshida, H., Goda, Y., Amorphous/amorphous phase separation of solutes in frozen solutions: implication for pharmaceutical lyophilization. Amorph 2014 Symposium, Cambridge (2014.7)
- 6) Yoshida, H., Shibata, H., Izutsu, K., Goda, Y., Evaluation of fluid flow profile in flow-through dissolution cells using particle image velocimetry, FIP BABE symposium, Seoul (2014.10).
- 7) Izutsu, K., Component Miscibility and Protein Stability in Freeze-Dried Formulations, AAPS Annual Meeting San Diego (2014.11)

報道発表等

なし

表1. サリチル酸錠300mgの試験結果(研究機関1)

測定時間(分)		溶出率(%)					
		15	30	60	120	180	240
1回目	平均	3.24	9.88	20.32	39.93	57.68	72.43
	平均-最小値	0.45	1.49	1.23	1.46	1.19	1.77
	最大値-平均	0.81	0.66	1.11	1.25	2.60	3.96
	標準偏差	0.46	0.78	0.81	0.90	1.36	2.06
2回目	平均	3.75	9.55	20.00	38.28	55.85	71.26
	平均-最小値	0.58	0.62	1.11	1.18	2.28	1.67
	最大値-平均	0.50	0.65	0.52	1.94	2.82	2.65
	標準偏差	0.48	0.50	0.64	1.18	1.77	1.55
3回目	平均	5.43	9.78	19.78	37.07	53.73	67.30
	平均-最小値	1.22	0.84	1.61	2.35	2.85	7.06
	最大値-平均	0.76	1.09	1.56	3.06	3.77	4.42
	標準偏差	0.70	0.79	1.51	2.39	2.93	4.15
まとめ	平均	4.14	9.74	20.04	38.43	55.76	70.33
	平均-最小値	1.35	1.35	1.87	3.71	4.88	10.09
	最大値-平均	2.05	1.13	1.40	2.76	4.53	6.06
	標準偏差	1.10	0.68	1.02	1.95	2.60	3.48
	相対標準偏差	26.53	6.95	5.08	5.07	4.66	4.95

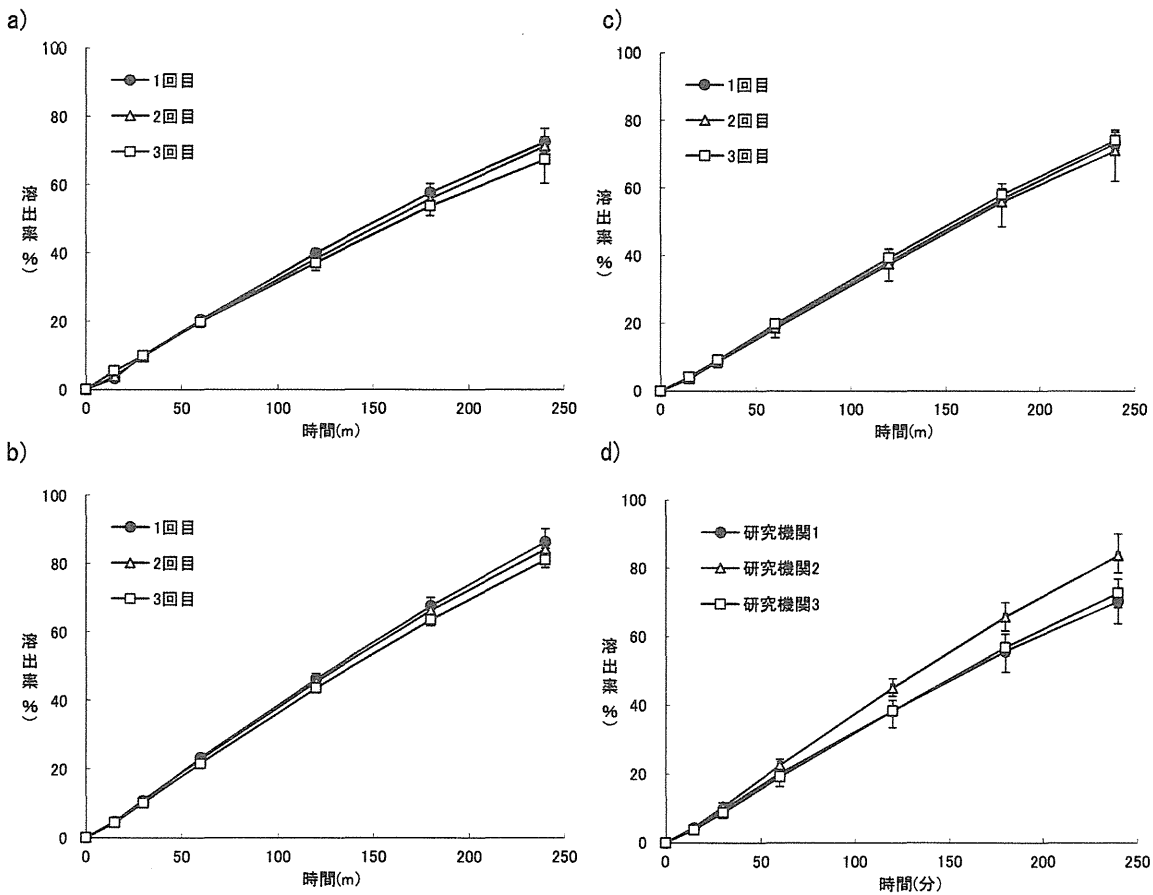


図1 FTC法によるサリチル酸錠の溶出試験結果

a) 研究機関1、b) 研究機関2、c) 研究機関3、d) 各機関の平均溶出率
データは平均値±[平均値-最大値/最小値]

表2. ルフィナミド錠200mgの結果(研究機関1)

測定時間(時)		溶出率(%)						
		1	3	5	6	8	10	12
1回目	平均	23.73	61.32	80.19	85.67	93.33	97.30	99.39
	平均-最小値	1.07	2.15	3.97	3.46	1.50	2.00	1.81
	最大値-平均	0.47	2.21	2.34	2.21	0.65	1.67	1.53
	標準偏差	0.55	1.76	2.17	1.90	0.80	1.21	1.21
2回目	平均	24.92	63.69	82.19	87.43	94.57	98.63	101.02
	平均-最小値	0.84	2.21	5.17	5.23	4.84	1.82	1.65
	最大値-平均	2.63	5.61	9.78	10.16	7.67	5.42	4.21
	標準偏差	1.32	2.93	5.12	5.33	4.16	2.75	2.16
3回目	平均	24.30	63.23	82.83	88.45	95.42	99.32	101.57
	平均-最小値	1.19	1.41	2.05	2.11	1.63	1.59	1.16
	最大値-平均	0.74	1.38	3.00	3.44	3.50	2.70	1.96
	標準偏差	0.68	1.13	1.80	2.02	1.98	1.56	1.09
まとめ	平均	24.32	62.75	81.74	87.18	94.44	98.42	100.66
	平均-最小値	1.66	3.58	5.52	4.99	4.71	3.12	3.08
	最大値-平均	3.24	6.55	10.24	10.40	7.80	5.63	4.57
	標準偏差	0.99	2.22	3.37	3.47	2.69	2.03	1.75
	相対標準偏差	4.09	3.54	4.13	3.98	2.84	2.06	1.74
規格	5時間で溶出率60%以上 12時間で溶出率80%以上							

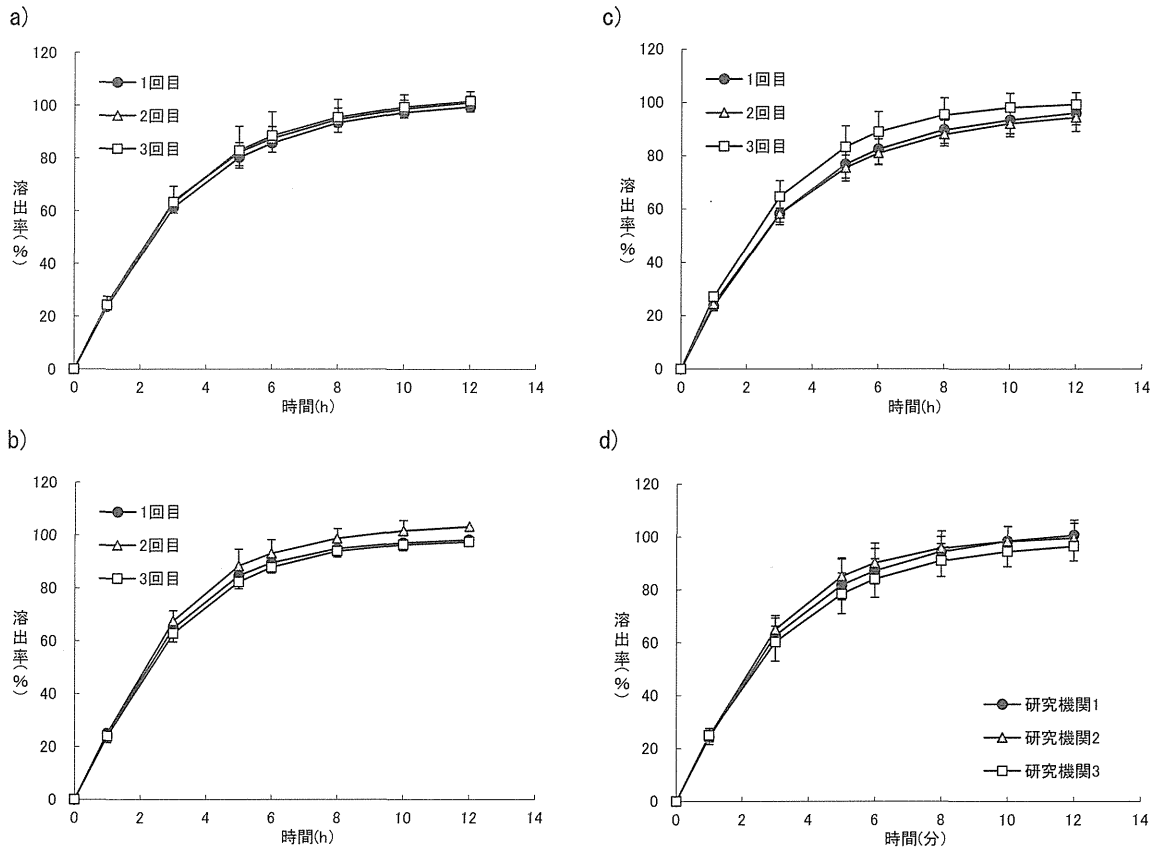


図2 FTC法によるルフィナミド錠の溶出試験結果

a) 研究機関1、b) 研究機関2、c) 研究機関3、d) 各機関の平均溶出率
データは平均値±[平均値-最大値/最小値]

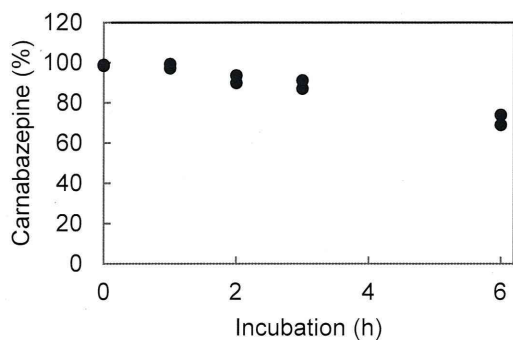


図3 Pluronicを含む透析モジュール共存下における試験液のカルバマゼピン濃度変化
2 mg/mLカルバマゼピン
溶出試験第2液, 37°C, 25 rpm

表3. Cutoff diameter in Andersen cascade impactor.

	28.3 L/min (ACI28.3)	60 L/min (ACI60)	90 L/min (ACI90)
PS	10	10	10
stage-2	-	-	9
stage-1	-	9	5.8
stage-0	-	5.8	4.7
stage0	9	-	-
stage1	5.8	4.7	3.3
stage2	4.7	3.3	2.1
stage3	3.3	2.1	1.1
stage4	2.1	1.1	0.7
stage5	1.1	0.7	0.4
stage6	0.7	0.4	-
stage7	0.4	-	-

表4. Cutoff diameter in Next generation impactor.

	30 L/min	60 L/min	90 L/min
PS	14.90	12.80	10.70
S1	11.72	8.06	6.48
S2	6.40	4.46	3.61
S3	3.99	2.82	2.30
S4	2.30	1.66	1.37
S5	1.36	0.94	0.76
S6	0.83	0.55	0.43
S7	0.54	0.34	0.26

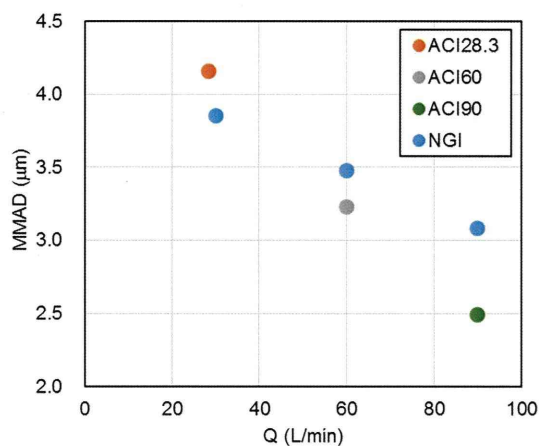
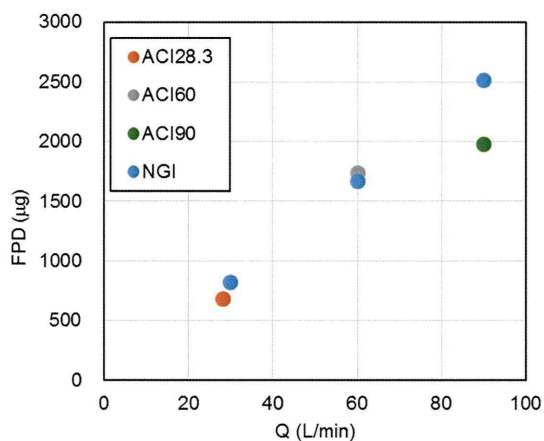


図 4. 各試験流量におけるリレンザのFPD

図 5. 各試験流量におけるリレンザのMMAD

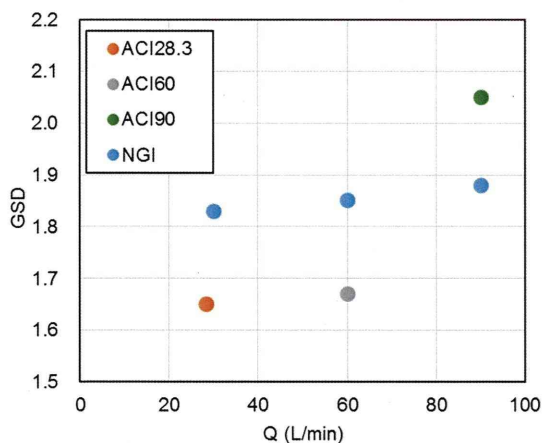


図 6. 各試験流量におけるリレンザのGSD

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 製剤の微小構造評価法と機能特性に関する研究

研究分担者 星薬科大学 教授 米持悦生

弱塩基性の抗がん薬ドキシソルビシンが負電荷高分子である poly-L-glutamic acid (PGA) と相互作用し凝集することを利用し、安定なドキシソルビシン封入りリポソームを調製し、組成最適化を行った。調製したリポソームは 100nm 程度となり、 ζ -電位は負電荷を示し、薬物封入率は 95%以上であった。PGA の分子量および濃度を変化させることでリポソームからの薬物放出を制御できることが明らかとなった。

研究協力者

服部喜之 星薬科大学 准教授

川野久美 星薬科大学 助教

弱塩基性の抗がん薬ドキシソルビシンが負電荷高分子である poly-L-glutamic acid (PGA) と相互作用して凝集することを利用し、安定なドキシソルビシン封入りリポソームを調製し、組成最適化を行った。

A. 目的 リポソームの形成時に薬物を封入する能動的封入法と、リポソームを形成した後に薬物を封入する能動的封入法がある。

微粒子型薬物キャリアであるリポソームへの薬物封入方法として、脂溶性の高い薬物を脂質膜内へ、あるいは膜透過性の低い薬物を内水相に封入する際に用いられる受動的封入法が挙げられるが、封入効率は低い。一方、より効率よく薬物を封入するために能動的封入法が開発されており、この方法はリポソーム形成後に添加した薬物が脂質膜を透過したのち、内水相環境下では膜不透過となることでリポソーム内に薬物を保持させる方法である。リポソーム内外に pH 勾配を作成することにより、弱電解質の薬物が膜透過しやすい分子型から内部でイオン型に変換されてリポソーム内部に留まる。さらにリポソーム内で不溶化や凝集して沈殿することで、安定に保持される。本研究では、

B. 研究方法

リポソームは、水素添加大豆レシチン (HSPC)、コレステロール、ポリエチレングリコール (分子量 2000) 結合ジステアロイルフォスファチジルコリンの重量比 3:1:1 から成り、薄膜法で調製した。内水相として、0.65 M トリエタノールアミン (TEA) 溶液を含む平均分子量 4,800、9,800、20,500 の PGA 溶液 (1-4 mg/mL) を用いた (表 1)。超音波照射により粒子径を約 100 nm に調整した後、セファデックス G-100 カラムによりゲルろ過し、未封入 PGA を分離・除去した。リポソーム画分にドキシソルビシンを添加し (HSPC: ドキシソルビシン=5:1、重量比)、60°C で 10 分間インキュベートすることによりドキシソルビシンをリポソームに内封した (図 1)。

薬物封入率は、得られたリポソームをセファ

デックス G-50 カラムにより未封入ドキシソルビシンを分離して算出した。封入安定性は、透析膜（分画分子量 3500）に入れたリポソームをリン酸緩衝生理食塩液（PBS、pH7.4）に対して透析し、PBS 中のドキシソルビシン濃度を経時的に測定することで評価した。

薬効の評価は、Lewis 肺がん細胞 (LLC 細胞) に薬物封入りポソームを添加し、48 時間後の細胞生存率を WST-8 試薬を用いて測定した。

<倫理面への配慮>

該当無し

C. 結果と考察

C.1. 調製したリポソームの薬物封入率

調製したリポソームの粒子径は PGA 4 mg/mL 溶液を用いたものを除きいずれも約 100nm となり、 ζ -電位はいずれも中性から負電荷を示した (表 1)。PGA の平均分子量がドキシソルビシンの封入効率に影響するかを、2 mg/mL の PGA 溶液を用いて検討した結果、平均分子量 4,800、9,800、20,500 のいずれにおいても 95%以上の高い薬物封入率を得ることができた (表 1)。また、封入率に対する PGA 濃度の影響を検討するために平均分子量 9,800 の PGA 1、2、4 mg/mL 溶液を用いてドキシソルビシンを封入したところ、いずれの濃度でも 95%以上の高い薬物封入率を得ることができた (表 1)。よって、本検討で用いた PGA 分子量と濃度範囲では高率でドキシソルビシンを封入できることが明らかとなった。

C.2. リポソーム製剤の薬物放出特性におよぼす PGA 濃度・分子量の影響

リポソームからの薬物放出性を透析法により比較することにより、封入安定性を評価した。

PGA を含まない 0.65 M TEA 溶液で調製したリポソームが最も高い放出率を示し、48 時間において 22%の放出が認められた (図 2)。平均分子量 9,800 の PGA を 1、2 mg/mL 含有したリポソームは PGA 不含のリポソームと同様の放出率であったが、4 mg/mL 溶液を用いることにより放出は抑制された (図 2)。また、平均分子量 4,800 の PGA を用いたリポソームでは 1、2、4 mg/mL のいずれの濃度でも PGA 不含のリポソームと同様の放出率を示した (データ非掲載)。よって、低濃度および低分子量の PGA は内水相でのドキシソルビシンの安定化にあまり寄与しないことが明らかになった。一方、2 mg/mL 溶液を用いて PGA の平均分子量の影響を比較すると、平均分子量 20,500 の PGA を含有したリポソームからのドキシソルビシンの放出は、PGA 不含のリポソームより抑制されることが明らかになった (図 3)。よって、高濃度および高分子量の PGA を用いることでリポソームからの薬物放出を抑制できることが明らかとなった。

C.3. LLC 細胞に対する増殖阻害作用におよぼすリポソーム製剤の効果

LLC 細胞に対するドキシソルビシンの細胞増殖阻害作用を評価したところ、高濃度および高分子量の PGA を用いたリポソームでは、ドキシソルビシンの作用が減弱した (図 4)。よって、ドキシソルビシンがリポソーム内に安定に封入されていることにより、放出が抑制され、作用が減弱したと考えられた。

以上の結果より、PGA の分子量あるいは濃度を変えることによって封入されたドキシソルビシンの放出性が異なり、高分子量あるいは高濃度の PGA を内水相に用いることにより、安定にドキシソルビシンを内包したリポソームが調製できることが明らかとなった。

E. 結論

負電荷高分子であるPGAを用いることで、抗がん薬ドキソルビシンをリポソームに安定に保持できることが明らかとなった。今後、動物実験により抗腫瘍効果を評価する予定である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表等

論文発表等

- 1) Hattori, Y., Nakamura, A., Arai, S., Nishigaki, M., Ohkura, H., Kawano, K., Maitani Y., and Yonemochi, E.: In vivo siRNA delivery system for targeting to the liver by poly-L-glutamic acid-coated lipoplex. *Results in Pharma Sciences*, 4:1-7 (2014).
- 2) Hattori, Y., Arai, S., Okamoto, R., Hamada, M., Kawano, K., and Yonemochi, E.: Sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA could effectively deliver siRNA to the liver. *Int. J. Pharm.*, 476: 289-298 (2014).
- 3) Hattori, Y., Hara, E., Shingu, Y., Minamiguchi, D., Nakamura, A., Arai, S., Ohno, H., Kawano, K., Fujii, N., Yonemochi, E.: siRNA delivery into tumor cells by cationic cholesterol derivative-based nanoparticles and liposomes. *Biol. Pharm. Bull.*, 38: 30-38 (2015).

学会発表等

- 1) Andang Miatmoko, 川野久美, 服部喜之, 米持悦生 :Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Delivery of Cisplatin.

第 30 回日本 DDS 学会学術集会(2014.7.30-31日,東京).

- 2) Andang Miatmoko, Kumi Kawano, Yoshiyuki Hattori, Etsuo Yonemochi: The preparation of Hybrid Nanoparticles Composed of Polyethylene Oxide-b-Polymethacrylic Acid (PEO-b-PMAA) for Loading Anticancer Drugs. 第 58 回日本薬学会関東支部大会(2014.10.4, 東京).

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし