

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位論文要旨

凍結乾燥製剤に適した新規添加剤の探索と製法の最適化

藤井 香穂梨

【序論】

タンパク質医薬品は溶液状態で不安定なものが多く、約半数は用時溶解型の凍結乾燥品として用いられている。凍結乾燥プロセスは凍結、氷を昇華する一次乾燥、固体を乾燥する二次乾燥の三段階で構成されている。凍結濃縮溶液中の氷を昇華により除去する一次乾燥はプロセスの大半を占め、試料の温度が高いほど氷の昇華は速くなるため一次乾燥時間は短縮されるものの、高温では凍結濃縮相の分子運動性も上昇するため、非晶質ではコラプス、結晶ではメルトバックと呼ばれる構造の変化を誘発しやすい。コラプスやメルトバックによる外観変化は製品として好ましくないだけでなく、品質にも様々な悪影響を及ぼすことから、臨界となる温度 (T_{cu} , T_g' , T_c) を的確にとらえることが重要である。凍結乾燥医薬品製剤に含まれる主薬や添加剤は、結晶または非晶質状態で存在する。多くの製剤で糖類やアミノ酸類が、安定化剤としてタンパク質の安定化を目的に、賦形剤として乾燥固体(ケーキ構造)の形成を目的に添加される。一般に低分子医薬品では、分子運動性が低く保存安定性に優れケーキ構造の構築が可能な結晶性の賦形剤が添加される。一方タンパク質は糖や高分子のような添加剤で構成されるガラス状態の非晶質固体に埋め込まれることで保存安定性が向上するため、非晶質状態の安定化剤を添加する。また、ほとんどの凍結乾燥医薬品は有効成分や添加剤を含んだ多成分系である。水溶液に含まれる複数の溶質は凍結により濃縮され、混合状態で存在する場合と、複数の相に分離する場合がある。そこで本研究では凍結乾燥製剤の添加剤(安定化剤、賦形剤)と相分離製剤の製法に関して以下の3章の検討を実施した。

【第1章 糖アルコール添加によるタンパク質の安定化検討】

1. 研究背景

現在、凍結乾燥の安定化剤として、非晶質固体を形成する sucrose や trehalose などの二糖類が汎用されている。しかしながら糖類はガラス転移温度が低く、輸送時や医療機関での高温暴露により固体の収縮やタンパク質の物理・化学変化を起こしやすく、sucrose は加水分解後に反応性が上昇する。また trehalose は高いガラス転移温度を持つ面で有利なもの、経時的な結晶化を起こしやすい他、知的所有権の関係で広範な利用が難しい事も課題となる。さらに適応疾患が糖尿病である場合は、糖類以外の添加剤が望ましい。以上のことから凍結乾燥製剤の安定化剤では、選択肢を揃えて主薬に合わせた製剤化が求められている。糖アルコールは同程度の分子量の糖類と類似した物理化学的性質を持つことからタンパク質の安定化作用が期待される。また、凍結乾燥固体を溶解後に複数回投与する点鼻スプレー等では、糖類と比較して微生物の栄養源となりにくい糖アルコールの使用により、溶解後の微生物増殖抑制が期待できる。そこで、長期保存可能な凍結乾燥製剤への応用を目的とし、糖アルコールによるタンパク質の安定化について添加剤の物性とタンパク質保護作用の両面から検討した。

2. 結果・考察

凍結乾燥固体の物性

糖アルコールを含む水溶液を凍結乾燥した結果、分子量の低い sorbitol, xylitol ではコラプスを起こし、mannitol は結晶性の固体が得られた。分子量の比較的高い maltitol, lactitol, maltotriitol はきれいなケーキ固体となった。

タンパク質安定化検討

乳酸脱水素酵素 (LDH) 酵素活性から凍結乾燥によるタンパク質の変化と添加剤による安定化作用を検討した (Fig. 1)。sucrose、trehalose、maltitol、lactitol、maltotriitol の添加では安定化作用を示したが、maltitol のガラス転移温度は 40.6°C であるため、50°C 7 日保管後の凍結乾燥固体に収縮が見られた。

FT-IR による二次構造の測定では、 α ヘリックス構造を示す 1656 cm^{-1} のバンド強度の低下が見られた maltotriitol は高次構造維持作用の低下が示唆された。lactitol, maltitol は高次構造維持作用を持つことが確認された。

3. 小括

分子量が比較的高い糖アルコール、特に lactitol は凍結乾燥によりガラス転移温度が高く安定なガラス固体を形成し、タンパク質の安定化作用が確認できたことから、安定化剤として活用できる可能性があることが明らかとなった。

【第 2 章 凍結乾燥製剤に適した結晶性賦形剤の探索】

1. 研究背景

ケーキ構造構築を目的とした賦形剤としては、物理的な強度が高く、低い分子運動性で保存安定性が優れることから非晶質よりも結晶性賦形剤の添加が好まれる。現在結晶性の賦形剤として広く用いられる mannitol や glycine は一般に物理安定性に優れるが、凍結乾燥の工程条件により水和物結晶を含む結晶多形を生じ、保存安定性など製品品質のばらつきの原因となるなど、課題が残されている。一例としてメシル酸ガベキサート製剤では添加剤で mannitol を用いた製剤では不純物の増加が報告されている。結晶性の賦形剤を用いる製剤は多岐にわたるため、その制御は企業間で共通した課題として研究対象となっている。本研究では安定化剤と同様、賦形剤も主薬に合わせた製剤化を可能にする選択肢が求められていることから、凍結乾燥製剤の新規賦形剤探索を目的として、食品分野で汎用されて安全性が比較的高いと考えられる糖及び糖アルコールの中から結晶性の高いもののスクリーニングを行った。

2. 結果・考察

糖及び糖アルコールの結晶化傾向

糖及び糖アルコールの結晶化傾向の評価は、試薬及び凍結溶液の熱測定により実施した。その結果、結晶性の賦形剤として用いられている D-mannitol の他に、*meso*-erythritol で試薬及び凍結溶液双方の結晶化ピークが確認された。

meso-erythritol 凍結溶液の物性評価

凍結溶液中での *meso*-erythritol の結晶化を、XRD-DSC 同時測定装置を用いて観察した。*meso*-erythritol と水からなる共晶の結晶化と考えられる回折ピークは-40°C 保持後 1 時間程度で出現し、その後ピーク数及び強度が増加した。昇温時に-8°C 付近で共晶のピークが消失した。熱測定でもピークが見られたことから共晶の融解と考えられた。以上のことから-40°C での結晶化が示唆された。

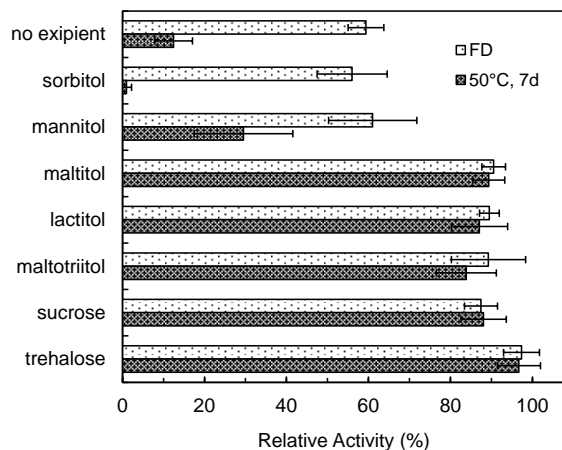


Figure 1 LDH の酵素活性

meso-erythritol 凍結乾燥固体の評価

meso-erythritol の水溶液を、二種類の凍結方法（凍結乾燥機の棚上及び液体窒素）で凍結した凍結乾燥固体を作製した。液体窒素凍結の固体は均質なケーキ構造であったのに対し、凍結乾燥棚で凍結するとウロコ状の模様が入った固体が得られた (Fig. 2)。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察では、液体窒素凍結の固体は小さく鋭い表面を持つ多数の粒子が観察されたのに対し、凍結乾燥棚凍結の固体は丸みを帯びた塊状の粒子であった (Fig. 3)。凍結乾燥に用いた試薬と凍結乾燥固体 (液体窒素凍結及び凍結乾燥棚凍結) を粉末 X 線回折測定した結果、結晶多形は見られなかった。

3. 小括

meso-erythritol は凍結乾燥により結晶性の固体を形成し、賦形剤として活用可能である事が明らかとなった。結晶多形の存在は知られているが、一般的な温度プログラムで作製した凍結乾燥固体が結晶多形を示さない点は D-mannitol と比較して長所と考えられる。一方で凍結方法により結晶化挙動に差が見られたことから、適切な工程条件の設定が重要であると考えられた。

【第 3 章 混合性の異なる溶液からの凍結乾燥製剤とその物性】

1. 研究背景

凍結乾燥製剤は主薬の他に種々の添加剤を含む多成分系である。凍結により混合状態で濃縮される場合と相分離を起こす組み合わせがあることが知られている。タンパク質と添加剤が相分離を起こすとタンパク質安定性に影響を及ぼす可能性がある。また、凍結乾燥工程のうち特に一次乾燥は高エネルギー消費プロセスであることから、効率的な製法が求められている。これまでは凍結溶液の T_g' 以下の温度で一次乾燥を行う理論に基づいた一般的な製造がおこなわれてきたが、乾燥時間を短縮することを目的としたアグレッシブな凍結乾燥法が近年盛んに研究されている。しかしながらアグレッシブな凍結乾燥法は根拠となる情報が不足しており、高額なタンパク質医薬品の製造工程への適用には十分な科学的根拠が必要となる。そこで、多成分系での凍結乾燥挙動の検討を目的とし、タンパク質に比べ凍結溶液における混合性の情報が得やすい PVP と dextran をモデルとして相分離を起こす複雑な製剤の合理的なプロセス構築の為に物性を評価した。

2. 結果・考察

熱測定及び凍結乾燥

PVP と dextran を各濃度比含む溶液について、熱測定で得られる T_g' (最大濃縮相ガラス転移温度) と、 -32°C から -12°C の棚温度で一次乾燥した固体の外観の関係を Fig. 4 に示した。PVP 10,000 と dextran 1,060 は単一の転移が各高分子の中間付近に観察され、溶質が混合状態で凍結濃縮されたことを示した (Fig. 4-上)。一次乾燥の棚温度が T_g' より低いとケーキ構造の固体が得られたのに対し、 T_g' 以上ではコラプスが起こり、 T_g' の上下で違いが示された。一方 PVP 29,000 と dextran 35,000 を含む

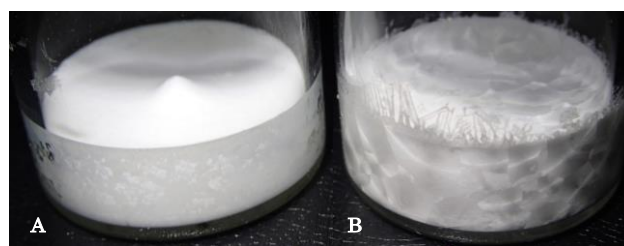


Figure 2 凍結乾燥固体 A: 液体窒素 B: 凍結乾燥棚

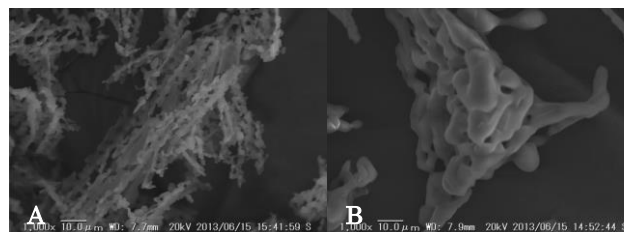


Figure 3 SEM 画像 A: 液体窒素 B: 凍結乾燥棚

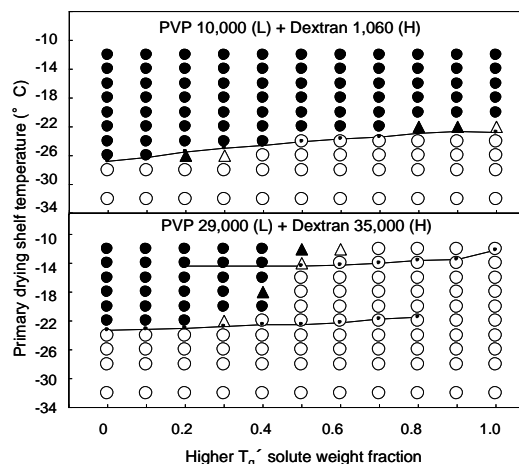


Figure 4 T_g' と乾燥固体の外観

(●: コラプス ○: ケーキ構造 ▲, △: 収縮ケーキ)

凍結溶液では2つの転移が各高分子の T_g' と近い温度に観察され、個々の高分子を主とする相に分離して凍結濃縮されていることが示された (Fig. 4-下)。双方の T_g' 以下での乾燥によりケーキ構造の固体が得られたが、2つの T_g' の間で一次乾燥を行うと、dextran の濃度比が高い溶液はケーキ構造を保つのにに対し、PVP の濃度比が高い溶液では乾燥工程中に構造の崩壊を示すことから、濃度比の高い高分子の特性に乾燥固体の構造が依存することが明らかとなった。

凍結乾燥固体の評価

Fig. 5 に PVP 29,000 と dextran 35,000 を単独または両方含む凍結溶液を -16°C 及び -32°C で一次乾燥した固体の SEM 画像を示した。一次乾燥を T_g' 以下 (-32°C) で行なうとケーキ構造の固体が得られ、鋭い輪郭を持つきめの細かい構造が観察された。dextran 35,000 のみを含む凍結溶液を T_g' 以下である -16°C で乾燥すると、 -32°C 乾燥固体と類似した形状であった。それに対して両高分子を含む溶液をその2つの T_g' 間である -16°C で乾燥した固

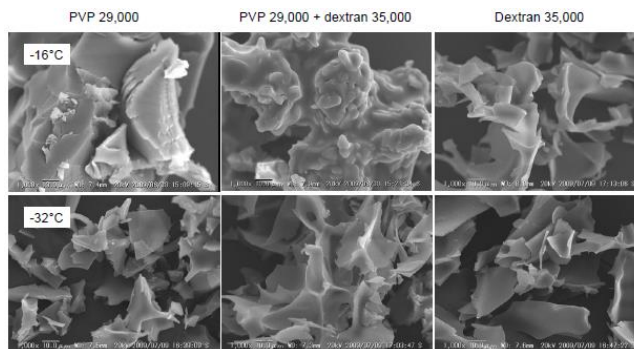


Figure 5 凍結乾燥固体の SEM 画像

体はケーキ構造にも関わらず、明確なコラプスを起こした PVP 29,000 と同様に丸みを帯びた比較的大きな塊状の微細構造を示した。このことから、2つの T_g' 間で乾燥した PVP 29,000 と dextran 35,000 の混合物は、外観はケーキ構造を保ち内部はコラプス固体に近いマイクロコラプス構造になっていると考えられた。

3. 小括

マイクロコラプスを実際の製品として用いるには、安定性などを個々に検討する必要があるが、工程制御が可能となればタンパク質製剤で非晶質状態を保ったまま一次乾燥時間を短縮するためのアグレッシブなアプローチになると考えられた。

【総括】

本研究において、凍結乾燥製剤の新規添加剤の探索として、安定化剤として糖アルコール(特に lactitol)、賦形剤として *meso*-erythritol を見出した。凍結乾燥製剤の設計には目的にあった添加剤を選択することが重要であることから新たな選択肢に加えるための情報が提供できた。製法の最適化では、凍結乾燥工程によっては外観では判明できないマイクロコラプス現象が生じる可能性があることが明らかとなった。見た目では判断できないことから注意喚起が必要であると同時に、課題が生じている製法の原因究明に繋がる可能性もあると考えられ、プロセス構築の重要性を示した。

【対象論文】

- I) Kahori Fujii, Ken-ichi Izutsu, Migiwa Kume, Takeshi Yoshino, Yasuo Yoshihashi, Kiyohiko Sugano, Katsuhide Terada
Physical Characterization of *meso*-Erythritol as a Crystalline Bulking Agent for Freeze-Dried Formulations
Chem. Pharm. Bull. 63, 1-7 (2015)
- II) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada
Effects of Solute Miscibility on the Micro- and Macroscopic Structural Integrity of Freeze-Dried Solids
J Pharm Sci. 99, 4710-4719 (2010)
- III) Saori Kadoya, Kahori Fujii, Ken-ichi Izutsu, Etsuo Yonemochi, Katsuhide Terada, Chikako Yomota, Toru Kawanishi
Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols *Int J Pharm.* 389, 107-13 (2010)

論文題目：凍結乾燥製剤に適した新規添加剤の探索と製法の最適化

論文提出者：藤井 香穂梨

凍結乾燥製剤は、凍結、一次乾燥、二次乾燥の3段階を経て製造が行われる。その中で、一次乾燥は最も重要な工程で凍結相から氷を昇華させて乾燥試料を得る過程であり、温度が高いほど昇華速度は速いが、凍結濃縮相中の薬物の分子運動性も大きくなるため非晶質ではコラプス、結晶ではメルトバックという現象が誘発され、良好な凍結乾燥製剤を得ることができない。すなわち、最大濃縮相ガラス転移温度(T_g')、コラプス温度(T_c)を適確に捉え、その温度以下で乾燥することが重要となる。また、保存安定性にはガラス転移温度も重要な因子である。一般に低分子医薬品では分子運動性が低く保存安定性に優れたケーキ構造が可能な結晶性の賦形剤が用いられる。一方、タンパク質はガラス状態の非晶質固体が添加剤と分子間相互作用を形成して分散することで保存安定性が保たれる。すなわち医薬品の特性に合わせた添加剤の選択が重要であるが、現実には、これまでの使用実績や経験により選ばれており、科学的根拠に基づいた添加剤の選択はあまり行われていない。

本研究では、一連の糖及び糖アルコールの物性を調べ、科学的根拠に基づいた凍結乾燥に適した添加剤の探索を行なうとともに高分子を複数成分含む凍結乾燥製剤の混合状態が製品の品質に与える影響について研究した。

本論文は3部から成る。以下それぞれの内容について述べる。

1 糖アルコール添加によるタンパク質の安定化研究

長期保存安定性に優れた凍結乾燥製剤への応用を目的として、糖アルコールによるタンパク質の安定化について添加剤の物性とタンパク質保護作用から検討した。糖アルコールは、タンパク質の高次構造安定化作用を有し、分子量の大きな *maltitol*、*lactitol monohydrate*、*maltitoritol* は T_g が高く安定なガラス状の固体を形成し、タンパク質の安定化に有用なことが分かった。また、長期保存安定性に関しては、*maltitol* や *maltitoritol* よりもガラス転移温度が高く水分子との置換作用を有する *lactitol* が優れていることが示された。糖アルコールは、糖と比較してガラス転移温度は低いが、保存中の化学的安定性であるメイラード反応が起こりにくいという長所があり、添加剤としての活用が期待される。

2 凍結乾燥製剤に適した結晶性賦形剤の探索

タンパク質以外の低分子医薬品は、医薬品が結晶として存在した方が安定である。主薬が結晶化しにくい場合、結晶性賦形剤は主薬の結晶化を誘発し、ケーキ構造を保ち、高温での乾燥も可能となる。これまでは *mannitol* や *glycine* が汎用されているが、これらの添加剤は水和物結晶を含む結晶多形を生じるため保存安定性には注意が必要となる。そこで凍結乾燥で結晶となり易い糖アルコールを検討した。その結果、*meso-erythritol* は凍結乾燥により結晶性の固体を生じ、通常の凍結乾燥プログラムでは結晶多形を生じないため優れた添加剤である

ことが示された。ただし、凍結条件により結晶化する場合と非晶質で存在する場合があるため、適切な製法の条件が必要と考えられた。

3 混合性の異なる溶液からの凍結乾燥製剤とその物性

タンパク質凍結乾燥製剤は、タンパク質に種々の添加剤が含まれるため、タンパク質と添加剤の相分離を生じることがあり、製品品質に大きく影響するため詳細な検討を行うことは意義のあることと思われる。モデルとして用いた dextran と PVP の検討結果から、均一に混合した状態で凍結溶液が濃縮される時は 1 つの T_g' 、凍結濃縮されて相分離する場合は 2 つの T_g' が生じることが分かった。混合濃縮する場合、相分離する場合のいずれも T_g' よりも低温度で一次乾燥すると多孔質のケーキができることが分かった。 T_g' よりも高い温度での一次乾燥はコラプスを生じる。相分離した場合にはそれぞれの T_g' の間の温度で処理するとマイクロコラプス構造を生じることが分かった。この状態は見かけは良好なケーキ構造であるが、微視的には、多量に加えた成分が形成する非晶質の骨格に他の成分が溶けた状態の表面が滑らかな構造をしており、化学的安定性は予測できないことが分かった。

藤井氏は、凍結乾燥製剤の製品品質について、製造工程で起きる挙動を種々の分析手法で微視的に検討した。すなわち凍結乾燥製剤の製造工程である凍結、一次乾燥、二次乾燥工程で医薬品や添加剤のモルフォロジーや転移現象を検討し、低分子医薬品製剤あるいはタンパク製剤に相応しい添加剤の探索、さらには、その最適製法について検討した。その結果、maltitol、lactitol monohydrate、maltitoritol は T_g が高く安定な非晶質固体を形成し、タンパク質の安定化に有用なことが分かった。また、長期保存安定性に関しては T_g が高く水分子との間で置換が可能な lactitol が優れた添加剤であることを見出した。一方、結晶性の凍結乾燥製剤を得るには結晶多形転移を起こしにくい meso-erythritol が優れた添加剤であることを見出した。また、凍結乾燥タンパク製剤の製造工程で起きる相分離現象は、一次乾燥温度を 2 成分の T_g' よりも低い温度で処理すれば安定であり、それ以上の温度ではコラプスを生じることを示し、2 成分の T_g' の中間の温度での処理ではマイクロコラプス現象を起こすことを明らかにした。

藤井氏は低分子医薬品、タンパク質の凍結乾燥に相応しい新たな賦形剤を見出すと共に、凍結乾燥で起きる様々な現象を可視化すると同時に科学的に解明した。

本テーマに関係する論文を既に学術雑誌に 3 報公表しており、博士（薬学）に十分に値すると判断する。

2015 年 9 月 16 日

寺田勝英