

博士論文

薬物の生物薬剤学的特性の改善を指向した新規マルチユニット製剤技術
UniORV[®] の開発

2020年9月

静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府
博士後期課程 薬食生命科学専攻 薬剤学講座
平澤 互

博士論文

薬物の生物薬剤学的特性の改善を指向した新規マルチユニット製剤技術
UniORV[®] の開発

Development of multi-unit formulation technology “UniORV[®]”
for improvement on biopharmaceutical properties of drugs.

本論文は静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府
博士論文である

2020 年 9 月
September 2020

平澤 亙
Wataru HIRASAWA

略語表

本論文では以下の略語を用いた.

AUC	Area under drug concentration-time curve
CsA	Cyclosporine A
C_{\max}	Maximum concentration
CV	Coefficient of variation
CYP	Cytochrome P450
DLS	Dynamic light scattering
DSC	Differential scanning calorimetry
FIH	First in human
FT-IR	Fourier transform-infrared spectrometer
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose
HPLC	High-performance liquid chromatography
IS	Internal standard
k_{el}	Elimination rate constant
MK	Montelukast
MRT	Mean residence time
LLPS	Liquid-liquid phase separation
PK	Pharmacokinetics
QOL	Quality of life
SE	Standard error
SEM	Scanning electron microscope
SEDDS	Self-emulsifying drug delivery systems
SMEDDS	Self-micro emulsifying drug delivery systems
$t_{1/2}$	Half-life time
TAC	Tacrolimus
TEC	Triethyl citrate
TEM	Transmission electron microscope
T_{\max}	Time to maximum concentration
UniORV	Universal Orbicular Vehicle
UPLC/ESI-MS	Ultra-performance liquid chromatography equipped with electrospray tandem mass spectrometry

UWL	Unstirred water layer
XPRD	X-ray powder diffraction

目次

序論.....	1
第 1 章 Tacrolimus の UniORV® 製剤の調製と評価.....	6
第 1 節 緒言.....	6
第 2 節 実験材料および実験方法.....	7
1-2-1 実験材料.....	7
1-2-2 滴下溶液の調製.....	7
1-2-3 製剤の調製.....	9
1-2-4 製剤の硬度測定.....	9
1-2-5 Tacrolimus 含量の定量.....	9
1-2-6 安定性評価.....	10
1-2-7 Tacrolimus 結晶観察.....	10
1-2-8 製剤中の成分分布の観察.....	10
1-2-9 溶出性の評価.....	11
1-2-10 溶出液中のナノ粒子の観察.....	11
1-2-11 ラットにおける経口投与後の血中濃度測定.....	11
1-2-12 ヒトにおける経口投与後の血中濃度測定.....	12
1-2-13 統計解析.....	13
第 3 節 結果ならびに考察.....	14
1-3-1 TAC UniORV® 製剤の調製.....	14
1-3-2 安定性評価.....	18
1-3-3 ラマンマッピングによる粒子内部の観察.....	21
1-3-4 薬物溶出挙動の観察.....	24
1-3-5 体内動態の評価.....	27
第 4 節 小括.....	32
第 2 章 Cyclosporine A の UniORV® 製剤の調製と評価.....	33
第 1 節 緒言.....	33
第 2 節 実験材料および実験方法.....	34
2-2-1 実験材料.....	34

2-2-2 装置条件の最適化	34
2-2-3 UniORV [®] 製剤の調製	34
2-2-4 Cyclosporine A 含量の測定	35
2-2-5 Cyclosporine A 原薬およびその製剤の融点挙動の観察	35
2-2-6 Cyclosporine A 原薬およびその製剤の結晶性の観察	35
2-2-7 溶出液中のナノ粒子の観察	35
2-2-8 製剤の形態観察	36
2-2-9 溶出性の評価	36
2-2-10 ラットにおける経口投与後の血中濃度測定	36
2-2-11 ラットにおける Cyclosporine A に起因する腎毒性評価	37
2-2-12 統計解析	37
第 3 節 結果ならびに考察	38
2-3-1 CsA UniORV [®] 製剤の調製	38
2-3-2 外観観察	40
2-3-3 物理化学的特性	41
2-3-4 薬物溶出挙動	42
2-3-5 体内動態の評価	43
2-3-6 腎毒性を指標とした安全性評価	46
第 4 節 小括	48
第 3 章 Montelukast の UniORV [®] 製剤の調製と評価	49
第 1 節 緒言	49
第 2 節 実験材料および実験方法	50
3-2-1 実験材料	50
3-2-2 製剤の調製	50
3-2-3 滴下溶液の物理物性の評価	51
3-2-4 安定性評価	51
3-2-5 製剤中 Montelukast 含量の測定	51
3-2-6 Montelukast とゼラチンとの相互作用の観察	52
3-2-7 溶出性の評価	52
3-2-8 ナノ粒子の観察 (凍結乾燥レプリカ法)	53
3-2-9 ヒトにおける経口投与後の血中濃度測定	53

3-2-10 統計解析	54
第 3 節 結果ならびに考察	55
3-3-1 Montelukast UniORV® 製剤の調製	55
3-3-2 安定性評価	56
3-3-3 ゼラチンとの相互作用	60
3-3-4 薬物溶出挙動	62
3-3-5 ヒト血中濃度	64
第 4 節 小括	67
総括	68
謝辞	70
参考文献	71

序論

医療は人間の健康の維持, 予防, 治療, 延命および Quality of Life (QOL; 生活の質) の向上を目標としている。治療は手術や, 心理療法のほか, 医薬品を患者に投与する薬物治療が一般的である。医薬品には, 疾病に寄与する酵素などに親和的であるようデザインされ化学的に合成された有効成分を含むもののほか, 遺伝子組換え技術や細胞培養技術を用いて製造したタンパク質, 核酸または細胞を有効成分とするバイオ医薬品もある。しかし有効成分単体のままでは一回服用量を調節するのが困難である場合や保管期間中に品質が変化する場合などがあり, 患者が日常的に服用し均質な治療効果を得るには不都合が生じる。そこで, 有効成分の治療特性を損なわずに, 流通および保管期間中に品質が劣化せず, かつ患者が取り扱いやすい形態を作り出すための加工技術が必要になる。これらの目的を達成するために採用される加工形態が「製剤」である。

医薬品の製剤設計は, 大別すると剤形選択と製剤化技術の 2 つから成り立つ。医薬品の経口投与に適した剤形には錠剤, カプセル剤, 顆粒剤 (散剤), 液剤などが挙げられる [1]。これらはおもに有効成分の物理化学的特性を踏まえ, さらに, その作用部位, 体内動態特性 (生体における安定性, 各組織および臓器への分布, および代謝性), 適用対象年齢, 医療現場または生活環境における保管安定性などに即して選択される [2]。有効成分に臭気や苦味など服用を妨げる特徴がある場合にはカプセル剤が選択されるケースが多く, 主に顆粒状の有効成分を充てんする硬カプセル剤と, 油状またはペースト状の有効成分を充てんする軟カプセル剤がある。2020 年現在, 日本で医療用医薬品として販売されている軟カプセル剤には 32 製品があり, これらには以下の 3 点の特徴がみられる (Table 1); (1) 有効成分の一回投与量が 1 mg 未満であり含量均一性の確保に困難が伴うもの, (2) 有効成分の一回投与量が 1 g 以上と大量であり服用しにくいもの, または (3) 有効成分の融点が 100°C 未満と低いため造粒工程または打錠工程で溶融する恐れがあるもの, または熱に対して不安定であるものの 3 点である。このように, 剤形として軟カプセル剤を選択する背景には, まず有効成分の用量および服用性への配慮をもとに検討される傾向があるが, 有効成分の物理化学的特性については, 特に融点と熱安定性の観点から検討されているに過ぎない。

近年創製された薬物候補化合物には, その物理化学的特性, 特に水への溶解度および溶解速度が十分でないために消化管における吸収性が低く, 有効性を示せずに医薬品上市が断念されたものが多数報告されている [3]。また, 開発に成功し上市された医

Table 1. Classification of commercial Rx drugs with softgel dosage form in Japan (2020).

Characteristic of drugs	Drug names (excerpt)
Difficulty in content uniformity	Alfacalcidol, Eldecalcitol, Dutasteride, Nalfurafine hydrochloride, Picosulfate Na hydrate, Rubiprostone.
Low drug compliance due to high dose	Ethyl icosapentate, Enzalutamide, Omega-3 fatty acid ethyl ester, Tretinoin, Ethanesulfonate, Vanniprevir, Ritonavir.
Low melting point	Indomethacin fernesil, Gefarnate, Cyclosporine, Tocopherol acetate, Tocopherol nicotinic acid ester, Tribenoside, Polyene phosphatidylcholine, Menatetrenone, Mepithiostane, Jubidekalenon

薬品のなかでも、吸収性や安定性が依然として不安定であるために、患者における代謝や吸収の個人差が影響して均質な有効性を示さない場合や、特定の背景をもった患者でのみ副作用が発現しやすいものがある [4]. 種々の製剤化技術は、製剤中の有効成分がどの患者においても十分に吸収されるよう物理化学的特性の改善を図るために活用される。製剤設計には、医薬品開発に要するスケジュール、市場性、レギュレーション、薬価制度などの医療政策、そして患者の QOL への影響を勘案したうえで、どの製剤化技術をどの剤形に適用するか決定ことが求められる。

薬物の溶解度または溶解速度を改善することで経口吸収性を高める製剤化技術には、代表的なものとしてナノ結晶、共結晶、または非晶質化（アモルファス）が報告されている [5]. アモルファス化の工程は薬物と共存する機能性添加剤との均一化の段階を経ることが必須とされ、この均一化を油性液体基剤中で実施するときは Lipid based, 有機溶媒中であれば Solvent based, 高温高圧下で熔融した固形添加剤中であれば Fusion

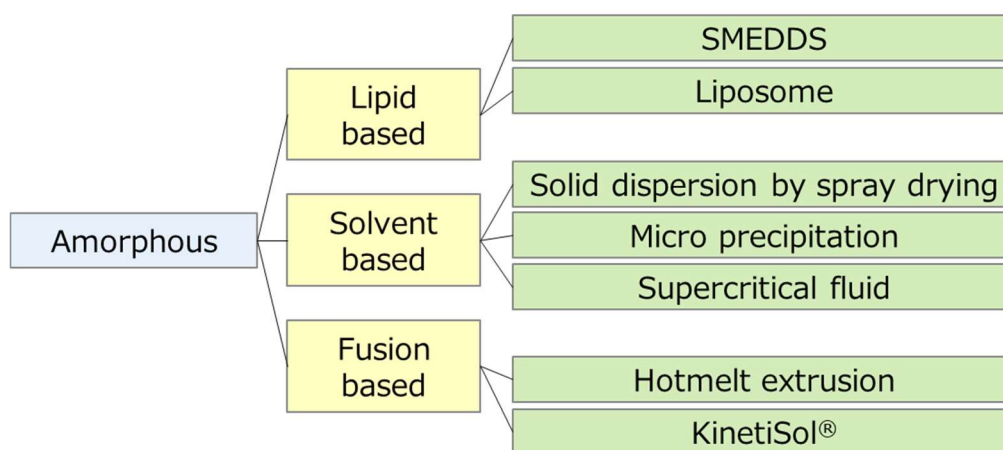


Fig. 1 Classification of preformulation technology of amorphization for improvement of oral bioavailability. SMEDDS, Self-microemulsifying drug delivery system. Draw by the author based on Zhang *et al.* (2018) and Thakkar *et al.* (2016) [6–7].

based の 3 種に便宜的に分類できる (Fig.1) [6-7].

このうちの Lipid based に属する Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) および Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS; 自己微小乳化薬物送達システム) アプローチは、外観が液体であるため、内用液剤または液体を封入できる軟カプセル剤が経口投与剤形として選択される。SMEDDS の適用によって難水溶性薬物の溶解度ならびに経口吸収性が改善されたと報告したものには、Yang ら (Paclitaxel) [8], Patel ら (Fenofibrate) [9], Sun ら (Rapamycin) [10] または Weerapol ら (Nifedipine) [11]などを挙げることができるが、SMEDDS として上市された医薬品の例は少ない。SEDDS として上市された SANDIMMUN® (サンディミュン, 薬物は Cyclosporine A ; CsA, ノバルティスファーマ株式会社, 2020 年現在販売中止) は難水溶性化合物である CsA のダイロール型軟カプセル剤であり, CsA を エタノール, PEG 化エステルおよびトウモロコシ油に澄明に溶解させた液体が封入されている。この液体は水または消化管内にて自己乳化分散されるため, 消化管における CsA の見かけの溶解度を高めることになり, 結果, ヒトにおいて CsA の吸収性に高めることが報告されている [12]。臓器や術後時期によって差はあるものの CsA の副作用発現濃度は最小有効濃度に近いため血中濃度トラフ値が 150-200 ng/mL になるよう厳密な用量調整が必要とされている [13]。CsA を含め免疫抑制剤を服用する患者は, 嚥下能力が低下している高齢者に多く, 更に臓器移植手術前後の放射線療法により重度の口腔内障害を併発し, 摂食と嚥下に困難を抱えている場合がある [14]。したがって, 薬物の経口吸収性を改善し日間変動を低減し, 患者それぞれに個別化した用法・用量を設定しやすく, かつ服薬アドヒアランスが高い製剤であれば, 患者の QOL を低下させずに薬剤治療効果を高めることが期待される。

軟カプセルの一種であるシームレスカプセルは, 流動性のある皮膜液と内容液を二重ノズルから滴下しながら, 皮膜液と相溶性のない不活性溶媒中で真球状に成型した, 直径 2-6 mm の大きさの, 繋ぎ目のない小型軟カプセルである [15]。2020 年現在, 日本国内で販売されている医療用医薬品のうちシームレスカプセルが選択されたものには, Ethyl icosapentate, Omega-3 fatty acid ethyl ester, Eldecalcitol および Nalfurafine hydrochloride の 4 種があるのみで, 広く普及しているとは言い難い。Ethyl icosapentate および Omega-3 fatty acid ethyl ester は用量が 300 mg から 900 mg および 2 g であるため, 小型軟カプセル 15 粒から 80 粒を一製剤単位に包装したマルチユニット製剤である。このように, シームレスカプセルは小型で, 用量を分割しやすいため, 患者にとって飲みやすさが向上することが期待できる。これらのことから, シームレスカプセルに薬物の溶解度または溶解速度を改善することで経口吸収性を高める製剤化技術を適

用できれば、患者の QOL を低下させない製剤設計に関する上述の 3 点の課題を達成できることが期待されてきたが、製剤技術上の困難が伴うため実現されてこなかった。まず、シームレスカプセルの製造原理は不活性溶媒、皮膜液およびカプセル内容液の三者の間の界面張力の釣り合いによってカプセル成型させる仕組みであるため、界面張力を低下させることで微細な乳化液滴を生成する SMEDDS を適用することは容易ではなかった。また、難水溶性薬物の多くは水相よりもオクタノール相に分配されるため、油性基剤に溶解または分散懸濁させたカプセル内容液をシームレスカプセルに封入したものは、消化管内でカプセルが崩壊しカプセル内容液が消化管内で拡散しても、難水溶性薬物がカプセル内容液から消化管液に分配されず消化管内壁近傍の薬物フリー体濃度を高められないことから、むしろ吸収性を低下させる恐れがある。さらに、シームレスカプセルの製造原理である界面張力は固体の共存によって低下するため、粉末形態となるナノ結晶、共結晶、包摂体およびアモルファス化などの製剤化技術は、シームレスカプセルに適用することは容易ではなかった。このように、シームレスカプセルのような小型マルチユニット製剤に経口吸収性を高める製剤化技術を適用することは長く困難だった。

シームレスカプセル以外の小型マルチユニット製剤における経口吸収性改善には、ポリ酢酸ビニルを固体分散担体とした Celecoxib のビーズ状の徐放性製剤 [16]、Lornoxicam を含有させキトサンとアルギン酸で成型したビーズに徐放性基剤アミノアルキルメタクリレートコポリマー RS をコーティングしたものなど、徐放性製剤の報告が多い [17]。これは、ビーズ状の形状そのものが占める体積および表面浸食の速度を利用して製剤の崩壊性を調節できるためとされている [18]。油性基剤を用いた小型マルチユニット製剤としては、Cinnarizine を硬化油、Gelucire 50/13 (ステアロイルマクロゴール-32 グリセリド) および Pluronic F-127 (ポリオキシエチレン・ポリプロピレン共重合非イオン性界面活性剤) に懸濁して球状に冷却固化させたビーズ状製剤が、胃内滞留時間を延長することで標準製剤である錠剤よりヒト健常者において AUC_{0-24h} を約 4.2 倍改善したことが報告されている [19]。これらの報告に特徴的なのは、常温でゲル化ないし固形化する高分子の微粒子をマルチユニット製剤の担体として使用した点である。これらの高分子微粒子を担体として利用しつつ、担持させた薬物の溶解度または溶解速度を改善して経口吸収性を高められれば、患者の QOL を低下させない新規製剤とすることが期待できる。しかし、経験的な私見ではあるが、流動層造粒機の二流体ノズルやシームレスカプセル製造装置の二重ノズルでは、このような高分子微粒子を成型することは従来から困難だった。二流体ノズルまたは二重ノズルは気液界面および液-

液界面に生じる界面張力を成型力に利用するため、均一な大きさのビーズコアの成型が実用的な単位時間内に完了するように液粘度を十分低くまたは曳糸性（糸引き性）を低くする必要があり、かつ、ビーズコアとなる液のゲル強度ないし固化硬度が実用的な範囲で十分高くなければならない。しかしゲル強度ないし固化硬度が十分に高い添加剤は溶融時の液粘性が高く、しかもゲル強度等と液粘性はトレードオフの関係にあるため、当該装置で高分子ビーズコアを固化成型することは困難だったためである。前者は高分子の材料物性として固有のものであるから処方や組成比を検証することで解決でき、後者は新規の製造方法や装置の開発によって解決できる。高分子微粒子担体を固化成型するため製造方法の研究は例があるものの [20]、それらがもたらす経口吸収性改善や作用の長期持続等の生物薬剤学的な付加価値についてはまだ情報量が充分ではなく、当該領域の更なる進展のために詳細な実証研究が求められているのである。

そこで本論では、経口吸収性が改善された新規小型マルチュユニット製剤の原理、その製法および装置を開発するための研究を展開した。本論を通して開発した新規小型マルチュユニット製剤を Universal ORbicular Vehicle (UniORV[®]) と名付けた [21]。UniORV[®] とは、微粒子を構成する高分子溶液を相溶性のない媒体（液体ないし粉体）中で球状に成型したマルチュユニット製剤である。UniORV[®] の生物薬剤学的な有用性を評価すべく、UniORV[®] に含有する薬物には、BCS class II で溶解度律速であるために経口吸収性に問題があり、血中濃度の個体内および個体間変動の低減が求められる Tacrolimus (TAC) および Cyclosporine A (CsA) を選定し、また、胃内安定性が不良であるために経口吸収性が不良であるものとして Montelukast (MK) を選定した。第 1 章では難水溶性薬物 TAC を対象に、ゲル化する高分子としてゼラチンを用いてシームレスカプセルの製造装置を使用して直径約 3 mm のビーズ状製剤を製造し、製剤の物理化学的特徴とラットおよびヒトにおける経口吸収性を観察することで、新規ビーズ状製剤の製法および有用性を評価した。第 2 章においては、難水溶性薬物 CsA を対象とし、新規開発した連続微量液滴吐出装置を使用して直径約 0.3 mm のビーズ状製剤を製造し、ラットにおける経口吸収性と血中濃度依存的な毒性発現を観察することで、新規ビーズ状製剤の設計の自由度および安全性を評価した。第 3 章においては、酸に不安定な、比較的水溶性の薬物 MK を対象とし、シームレスカプセルの製造装置を使用して直径約 3 mm のビーズ状製剤を製造し、ヒトにおける経口吸収性を観察することで、腸溶性コーティングを使用せずに溶出性を制御した新規ビーズ状製剤の有用性を評価した。

第1章 Tacrolimus の UniORV[®] 製剤の調製と評価

第1節 緒言

免疫抑制剤である TAC は臓器移植や骨髄移植，喘息，炎症性疾患，高増殖性皮膚疾患など多くの疾患の治療に有効な薬物である [22–23]。TAC の水への溶解度は低く 2–3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ である。そのため溶解度律速で経口吸収性が制限され，経口投与では個人間および個体内で大きな薬物動態のばらつきを示すことが報告されている [24]。

上市された TAC 製剤（アステラス製薬株式会社，プログラフ[®]カプセル 0.5 mg, 1 mg および 5 mg, プログラフ[®]顆粒 0.2 mg および 1 mg）は速溶性の顆粒および硬カプセル剤であり，溶解度を高め経口吸収性を向上させるために Hydroxypropyl methyl cellulose（HPMC）を担体とした固体分散が採用されている。Kim らはジェネリック TAC 2 mg 錠とプログラフ[®]カプセル 1 mg とを用いてヒトにおいて生物学的同等性試験を実施した結果，それらが生物学的に同等であり，かつ TAC ジェネリック錠のほうが $\text{AUC}_{0-9\text{h}}$ の個体間ばらつきを約 28% 低減させたことを報告した [25]。TAC の血中濃度のばらつきを抑制することはより予測可能かつ良好な臨床成績に寄与する可能性があるため，薬物動態学的変動を低減する TAC 製剤は依然として重要である。

ペレット，ミニビーズまたはミニカプセルのようなマルチユニット製剤は，薬物血中濃度の個体内および個体間ばらつきをシングルユニット製剤よりも減少させると報告されている [26–27]。その理由としては，複数の薬物保持ユニットが消化管に広く分布することでシングルユニットよりも胃消化運動や胃排出時間の影響を受けにくくなること，また消化管内の薬物濃度が局所高濃度にならないため粘膜障害のような副作用が起こりにくくなることなどが挙げられている [27]。このように，難水溶性薬物を含むマルチユニット製剤による溶解性の改善および薬物動態の改善を示唆する報告はあるものの，直接的に明らかにするエビデンスは少ない。

本章においては，シームレスカプセルの製造方法を用いて TAC を含有するマルチユニット製剤を製造し，マルチユニット製剤が TAC の溶解性とヒト経口吸収性を改善するか検証した。溶出性と安定性に優れた処方構成を最適化し，妥当な生産性をもたらす製造方法を確立した。製剤内部の TAC 局在を製剤の溶出性との関連から理解するために，製剤内部の微細構造をラマンマッピングで特定することを試みた。ミニビーズ製剤および標準製剤の経口投与後の TAC の薬物動態をラット及びヒトで比較検討し，経口吸収性とその変動を評価した。

第2節 実験材料および実験方法

1-2-1 実験材料

薬物は TAC (結晶, Biocon Ltd., Bangalore, India) を用いた. 標準製剤にはプログラフ® 5 mg カプセル (アステラス製薬株式会社, 東京) を, 対照製剤にはタクロリムス錠 5 mg 「日医工」を用いた. 担体高分子としてローカストビーンガム (RL-200J, 食品添加物, ただし医療用医薬品に使用前例あり, 三晶株式会社, 東京), カラギーナン (JP-126, 医薬品添加物規格 2018, 三晶株式会社, 東京), ブタ由来ゼラチン (AP-270, 第 17 改正日本薬局方, 株式会社ニッピ, 東京) を用いた. 溶解補助剤および冷却油として中鎖脂肪酸トリグリセリド (ココナード MT, 医薬品添加物規格 2018, 花王株式会社, 東京, またはサラコス HG-8, 医薬品添加物規格 2018, 日清オイリオグループ株式会社, 東京), クエン酸トリエチル (シトロフレックス 2, 医薬品添加物規格 2018, 森村商事株式会社, 東京), プロピレングリコール (第 17 改正日本薬局方, ADEKA 株式会社, 東京) を用いた. 可塑剤としてグリセリン (濃グリセリン, 第 17 改正日本薬局方, 阪本薬品工業株式会社, 東京), 還元水アメ (PO40 : 70% シロップ, 医薬品添加物規格 2018, 三菱商事ライフサイエンス株式会社, 東京), 還元麦芽糖水アメ (アマルティ MR-50, 医薬品添加物規格 2018, 三菱商事ライフサイエンス株式会社, 東京) を用いた.

1-2-2 滴下溶液の調製

滴下溶液の処方を Table 2 に示した. 滴下溶液は以下の手順で調製した. まず担体高分子を室温の精製水で 30 分間から 60 分間膨潤させ, ゼラチンは約 65°C の水浴上で, その他の高分子は約 85°C の水浴上で溶解させた. ここに可塑剤を加えてスパーテルを用いて攪拌するか, またはプロペラミキサー OS20-S (アズワン株式会社, 大阪) にて 200–300 rpm で攪拌し均一な高分子水溶液を得た. TAC を溶解補助剤に溶解させて TAC 溶液を得た. 50–60°C の水浴上で高分子水溶液を攪拌しながら TAC 溶液を少量ずつ加え, そのまま 5–10 分間攪拌を続けて, 滴下溶液を得た.

Table 2 Formulation of TAC solution.

Type		A				B					C					D				E	
Formulation number		1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	
API	TAC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.13	0.26	0.65	1.30	0.26	
Polymer consisting core	AP-270	20.0	—	—	—	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	18.8	
	JP-126	—	0.60	—	0.30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	RL-200J	—	—	0.60	0.30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Co-solvent	Coconard MT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.20	—	—	—	—	—	—	—	—	
	Citroflex-2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.70	—	—	1.85	3.70	9.25	18.5	3.70	
	propylene glycol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.70	—	—	—	—	—	—	
	glycerine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10.0	—	—	—	—	—	
Aggregate	Amalty MR-50	—	—	—	—	5.00	10.0	15.0	20.0	25.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	
	PO 40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	26.9	
Solvent	water	80.0	99.4	99.4	99.4	75.0	70.0	65.0	60.0	55.0	59.7	53.5	56.0	56.0	49.7	58.0	56.0	50.1	40.2	50.3	
total		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

AP-270, gelatin; JP-126, *t*-carrageenan; RL-200J, locust bean gum; Coconard MT, middle chain triglyceride; Citroflex-2, triethyl citrate; Amalty MR-50, reduced maltose starch; and PO 40, reduced starch syrup (70%).

1-2-3 製剤の調製

少量の成型の場合は以下の手順で作製した。100 mL のメスシリンダーにココナード MT を約 100 mL 注ぎ、60 分間以上氷冷した。50–60°C の水浴上で保温した滴下溶液を一滴ずつマイクロスポーテルで氷冷したココナード MT に滴下し、ココナード MT 中で球状にゲル化させた。5–10 分経過後、直径 50 mm の 18 メッシュふるいでココナード MT を篩過し、球状にゲル化した製剤をメッシュ上に回収した。この製剤を相対湿度 30–50% の室温下にて 16 時間以上風乾し、粒子状製剤 UniORV® を得た。

1 kg 以上を成型する場合は以下の手順で作製した。シームレスカプセル製造装置にて、冷却油としてサラコス HG-8 を 9–15°C に冷却して循環させ、皮膜液タンクに 4 kg の滴下溶液を仕込み 50–60°C に保温しながら、皮膜液側のノズルのみで、ポンプ回転数 30.7 rpm、振動数 15 Hz にて冷却油中に滴下し、直径約 4 mm、質量約 27 mg の未乾燥粒子状製剤 を 2.4 kg 回収した。これを室温下にて密閉小型タンブラー型乾燥機でドライエアを供給しながら約 10 時間乾燥させ、乾燥減量 9.2%、直径約 2.9 mm、質量約 18 mg の粒子状製剤 UniORV® を 1.6 kg 得た。シームレスカプセル製造装置に投入した TAC 質量に対する製剤収量は約 80% だった。

直径約 0.3 mm の粒子は以下の手順で作製した。50–60°C の水浴上で保温した滴下溶液 30 g を 200 mL の氷冷したココナード MT に注入し、スポーテルを用いて手で攪拌し、滴下溶液を微細粒子としてゲル化させた。5°C の冷蔵庫にて 60 分経過後、直径 50 mm の 300 メッシュふるいでココナード MT を篩過し、ゲル化した微細粒子をメッシュ上に回収した。この微細粒子を相対湿度 30–50% 室温下にて 16 時間以上風乾し、粒子状製剤 UniORV® を 5 g 得た。

1-2-4 製剤の硬度測定

製剤の硬度は錠剤用硬度計（モンサント型、大岩薬品機械株式会社、東京）を用いて 30–50% 室温下にて測定した。

1-2-5 Taclorimus 含量の定量

UniORV® 中の TAC 含量は、高速液体クロマトグラフ Prominence LC20（株式会社島津製作所、京都）を用いて測定した。5 mg の TAC に相当する約 1 g の UniORV® を 50 mL のメスフラスコに精密にはかり取り、精製水 15 mL を加えて 40–50°C で溶解させた。10 mL の内部標準溶液（IS）を加えたあと、エタノールを加えて正確に 50 mL

とした。IS は 15 mg の Heptyl 4-Hydroxybenzoate (富士フィルム和光純薬株式会社, 東京) を正確に 100 mL のエタノールで希釈して調製した。サンプル 100 μ L を 50°C に維持された YMC Triart C18 カラム (粒子径 : 5 μ m, カラムサイズ : 4.6 \times 150 mm, ワイエムシィ株式会社, 京都) に注入し, 水/2-プロパノール/テトラヒドロフラン (5/2/2) を含む移動相を用いて流速 0.7 mL/min で分離した。TAC と IS の保持時間はそれぞれ 9.5 分と 13.8 分であった。測定波長は 220 nm を使用した。

1-2-6 安定性評価

UniORV[®] 50 粒をアルミニウムラミネートポリエチレンフィルム (フィルム構成 : PET14/PE20/AL9/PE40, 岡田紙業株式会社, 大阪) で密封包装し安定性試験を行った。包装したサンプルを恒温恒湿槽 AE-205 (アドバンテック東洋株式会社, 東京) に保管し, 25 \pm 2°C/60 \pm 5% 相対湿度 (RH) で 3 ヶ月間, 40 \pm 2°C/75 \pm 5% RH で 4 ヶ月間, または 50 \pm 2°C で 8 週間保管した。未包装のサンプルは, 解放したシャーレに検体を静置し 40 \pm 2°C/75 \pm 5% RH で 4 週間保存した。光安定性試験は ICH-Q1B ガイドラインを参考に, 解放したシャーレに UniORV[®] を未包装または包装済みの状態で静置し室温下で白色蛍光灯 SQ890S (パナソニック株式会社, 大阪) を用いて 2,700 lx にて実施した。

保管安定性試験中の色調変化は測色計 BP-1 (日本電色工業株式会社, 東京都, 日本) を用いて CIE1976 $L^*a^*b^*$ 色空間値として算出した。

1-2-7 Tacrolimus 結晶観察

UniORV[®] の表面および断面を光学顕微鏡 MT5210L (メイジテクノ株式会社, 東京) で観察した。断面観察するサンプルは医療用メスを用いてサンプルを切断し断面を作成した。偏光顕微鏡像 (polarized light microscopy; PLM) は MT5210L 用の偏光フィルターを併用して観察した。

1-2-8 製剤中の成分分布の観察

UniORV[®] の断面における各成分の分布を識別するために, まず TAC 原薬, TAC を溶解したクエン酸トリエチルおよび還元水アメを含むゼラチン溶液の乾燥膜についてラマンスペクトルを測定し, 各成分に固有なラマンシフト波数として, 全成分は 2,800–3,050 cm^{-1} , ゼラチンは 3,150–3,400 cm^{-1} , クエン酸トリエチルは 1741 cm^{-1} , TAC は 3902 cm^{-1} を選定した。UniORV[®] の断面における各成分の分布は共焦点ラマ

ン顕微鏡 α 300R (WITec GmbH, Ulm, Germany) を用いて、励起波長 532 nm にて観察した。UniORV[®] の断面 $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ 大の領域を解像度 500 nm で走査して得られたスペクトルデータセットをソフトウェア WITec Project FOUR version 4.0 (WITec GmbH) を用いて変換した。

1-2-9 溶出性の評価

溶出試験器 NTR-6400A (富山産業株式会社, 大阪) を用いて溶出試験を行った。試験は第 17 改正日本薬局方記載の溶出試験パドル法手順に従った。パドル回転数として 50 回転, 試験液として 37°C の 900 mL の精製水を使用した。検体量は TAC として約 5 mg 相当量を用いた。15, 30, 60 および 120 分後にサンプリングし, 0.45 μm 孔径フィルター DISMIC 13HP045CN (アドバンテック東洋株式会社, 東京) を通した。

別の溶出試験は第 17 改正日本薬局方記載の溶出試験フロースルーセル法手順に従った。チューブポンプには SMP-23AS (アズワン株式会社, 大阪) を用いて, セルには内径 22.5 mm のポリプロピレン容器を用いた。セル底部には直径 5 mm のガラスビーズを置き, その上に直径 1 mm のガラスビーズを 10 g 入れ, その上に検体を静置した。ポンプ送液速度として 13.8 mL/min, 試験液として 3 L の精製水を使用した。試験液容器とセルを 37°C に調節された水浴中に静置した。得られたサンプルは「1-2-5 Taclorimus 含量の定量」と同様の条件にて測定した。

1-2-10 溶出液中のナノ粒子の観察

UniORV[®] の溶出液中の微小構造物を透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope; TEM) と動的光散乱法 (Dynamic light scattering; DLS) で観察した。UniORV[®] 300 mg を約 5 mL の水に懸濁して室温で 30 分静置し, その溶液 5 μL をカーボンコーティングされた Formvar 200 メッシュニッケルグリッド (日新 EM 株式会社, 東京) 上に乗せた。15–30 秒間静置後に余分な溶液を拭き取り, 1% (w/v) Ammonium molybdate tetrahydrate でネガティブ染色して乾燥させ, 80 kV に設定した H-7600 (株式会社日立製作所, 東京) で TEM 観察した。また, この溶液中の微小構造物の大きさを N5 サブミクロン粒子径測定器 (Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA) で測定した。平均直径は 25°C にて測定角度 90° で光散乱からの光子相関を用いて計算し, サイズ分布は散乱強度のヒストグラム分析を用いて算出した 10, 50 および 90% の累積値で評価した。

1-2-11 ラットにおける経口投与後の血中濃度測定

体重約 250±50 g の雄の Sprague-Dawley ラット (生後 7-9 週齢, 日本エスエルシー株式会社, 日本) をケージごとに 2 頭ずつ飼育し, 餌と水を自由に与え, 温度 (24±1°C) と湿度 (55±5%) が管理された部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した. 本実験は静岡県立大学動物管理倫理委員会の承認のもと, 同委員会の承認を受けたガイドラインおよび手順に従っておこなわれた.

ラットは経口投与の約 24 時間前から絶食させ, 3 mL の蒸留水に TAC として 10 mg/kg になるよう各製剤を懸濁し経口投与された. 経口投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 3, および 6 時間後に尾静脈から血液サンプル 400 µL を採取した. 各血液サンプルを 10,000×g で遠心分離し, 血清サンプルを調製し分析するまで -20°C 以下で凍結保存した. UPLC/ESI-MS を用いてサンプル中 TAC の濃度測定を行った. 本研究で使用した UPLC/ESI-MS システムは binary solvent manager, column compartment および Micromass SQ detector with Waters Masslynx v 4.1 を含む Acquity UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) から構成されており, カラムには Acquity UPLC™ BEH C18 (粒子径 : 1.7 µm, カラムサイズ : 2.1×50 mm, Waters) を用いた. カラム温度は 60°C に保った. IS (Tamoxifen) および各 TAC は 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (A) と 10 mM 酢酸アンモニウムを含む 2-プロパノール (B) からなるグラジエント移動相によって分離し, 保持時間は 3.04 min (TAC) および 3.48 min (Tamoxifen) であった. グラジエントは 0.5-3.5 min, B 30-75% とし流速は 0.25 mL/min とした. MS による検出においては化合物の [M+H]⁺ 特異的 *m/z* (TAC は 821 および 827, IS は 372) を用いた. TAC の薬物動態パラメータは GraphPad Prism 5 for Windows (version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて計算した.

1-2-12 ヒトにおける経口投与後の血中濃度測定

23-34 歳の健康な日本人男性を対象に, 無作為化非盲検, 単回投与, 2 期 2 群クロスオーバー試験を実施した. 被験者は喫煙歴および既往歴がなく, 過去 6 か月以内に他の治験に参加していない健常者を選定した. 対象となる 8 人の被験者を無作為に割り付け, 第 1 期に 5 mg の TAC を含む標準製剤または UniORV® を経口投与し, 投与日を含めた 7 日間の休薬期間後, 第 2 期にはその逆を投与した. すべての被験者は試験薬投与の前日に入院し, 投与前に少なくとも 10 時間の絶食を行った. 投与前, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 6, 12 および 24 時間後に 2 mL の血液を採取した. 忍容性は, 投与 24 時間前から投与後 72 時間の間バイタルサイン, 身体検査, 有害事象に基づいて評価された. 試験計画は, 医療法人社団芳栄会関野臨床薬理病院 (日本, 東京) の倫理審査

委員会で審査され承認された。すべての試験は、被験者の書面によるインフォームドコンセントを得た後に実施され、2013年に改正されたヘルシンキ宣言 (Brazil, Fortaleza) および GQP 省令に規定された原則に完全に従って実施された。各時点の血液 100 μ L に 100 μ L の精製水、20 μ L のメタノールおよび 50 μ L の IS 溶液 (Ascomycin, 100 ng/mL メタノール溶液) に加えて混合し、上清を固相カラム (Bond Elut C18, 3 mL/200 mg, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) に負荷した。メタノールで抽出し 40°C の窒素下で蒸発させて乾燥させた。メタノールで再溶解し 10 μ L を超高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 ACQUITY UPLC Xevo TQ (Waters) に導入した。カラムには Inertsil OSD-SP カラム (5 μ m, 2.1 \times 150 mm, ジーエルサイエンス株式会社, 東京) を用いた。TAC は $m/z = 821.6 \rightarrow 768.6$ の MRM 遷移でモニターし、IS は $m/z = 809.6 \rightarrow 756.6$ の MRM 遷移でモニターした。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウムとメタノール (15 : 85) の混合物を流量 0.2 mL/min で用いた。薬物動態パラメータは Phoenix[®] WinNonlin[®] (バージョン 6.2 ; Certara USA Inc. Princeton, NJ, USA) で算出した。

1-2-13 統計解析

統計的解析には、一元配置分散分析 (ANOVA) ならびにフィッシャーの最小有意差法を用いた。すべての検定は 5% の有意水準を使用した両側検定を用いた。

第3節 結果ならびに考察

1-3-1 TAC UniORV[®] 製剤の調製

1-3-1-1 成形性に対する添加剤の影響

上市されているシームレスカプセル製品の多くが直径 3.0 mm であることから服薬しやすい大きさを直径 3.0 mm と仮定し、乾燥後の製剤の直径が約 3.0 mm になるように調製した。本章で調製した滴下溶液から製剤を調製したときの結果を Table 3 に示す。Table 3 において、担体高分子のみを冷却油（ココナード MT）に滴下してゲル化した粒子状製剤が得られたのは、A-1（ゼラチン）および A-4（カラギーナンおよびローカストビーンガム）だった。A-1 および A-4 の高分子濃度は、約 60°C における粘度が約 150 mPa・s になるよう設定した。なぜならば、本製剤の製造に使用する予定の一般的なシームレスカプセル製造装置に適するカプセル皮膜液の粘度の上限は約 150 mPa・s であり、これ以上粘度が高いと皮膜液滴下時に界面張力の作用で真球状に変形するより先にゲル化してしまい、製造に適さなくなるためである。粒状に成型した A-1 および A-4 を乾燥したとき、ゼラチンを用いた A-1 のほうが変形（gel shrinkage）の度合いが小さかった。一般的に高分子溶液のゲル化の有無や度合はそれぞれの高分子に固有の臨界濃度（critical concentration）を反映していると考えられている [28]。一方で、ここで観察された粒状製剤の変形は、高分子ゲルが保持していた溶媒の乾燥に伴う変形であり、臨界濃度の要因のみで議論できるものではない。例えば Waje らは水分を保持したアクリルアミドゲルを材料に、ゲル内の水分の有効拡散係数とゲル変形の間関係を議論している [29]。これはゲル変形と自由水の間関係を示唆している。そこで、ゼラチンを用いた A-1 の自由水を減ずる目的で還元麦芽糖水アメであるアマルティ MR-50 を A-1 に添加し、B-1 から B-5 として粒子成型後の乾燥時の変形を観察したところ、粒子状製剤の乾燥後に変形が認められなかったのは B-4 および B-5 だった。乾燥後の B-4 および B-5 の残存水分を常圧乾燥乾熱法にて求めたところそれぞれ 11.4% および 12.0% だったため、B-4 を処方設計モデルとして設定した。すなわち、本論において、粒子状製剤とは、ゼラチンと還元麦芽糖を含む溶質濃度 40% 超の滴下溶液から製し、乾燥後に溶質濃度約 90% まで乾燥させたものとする。なお、B-4 は、未乾燥のとき直径約 4 mm で、乾燥後は直径約 3 mm、一粒あたり質量 18 mg の真球状の製剤を指す。この製剤を以降では UniORV[®] と呼ぶ。

1-3-1-2 溶出性に対する添加剤の影響

TAC は難水溶薬物であるため、B-4 に TAC を含有させる際に溶解補助剤の併用を

検討した。処方は Table 2 に示し、外観や変形などの検討結果を Table 3 に示した。溶解補助剤への TAC の溶解度を測定したところ、ココナード MT においては約 4.0%、クエン酸トリエチルにおいては約 7.0%、プロピレングリコールでは約 8.0% と推定された（具体的なデータは省略した）。TAC 7.0% を含むクエン酸トリエチル溶液を用いて、乾燥後の UniORV[®] 一粒あたりの TAC 含有量が 0.05 mg, 0.1 mg, 0.25 mg および 0.5 mg になるよう D-1 から D-5 を調製し、乾燥後の含量を求めたところ、D-1 および D-2 はそれぞれ 96% および 95% とほぼ設定値だったのに対し、D-3 および D-4 は 24% および 14% と設定値から大きく減少していた。冷却固化後のココナード MT 中の TAC 量を観察したところ、D-1 では 81 µg/g, D-4 では 420 µg/g であったため、滴下溶液におけるクエン酸トリエチルの量がおおむね 8.0% を超えると、冷却固化する際にココナード MT 中にクエン酸トリエチルごと TAC が漏出し、UniORV[®] に残存する TAC 量が減少するためと考えられた（具体的なデータは省略した）。したがって、滴下溶液におけるクエン酸トリエチルの量が 3.7%、すなわち、乾燥後の UniORV[®] 一粒あたりの TAC 含有量が 0.1 mg となるようクエン酸トリエチルの量を設定した。TAC を 0.1 mg 含むよう C-1 から C-4 を調製し、TAC として 5 mg に相当する UniORV[®] 50 粒と標準製剤の溶出性を比較した。クエン酸トリエチルを用いず TAC のみをミニビーズ中に分散させた C-1 は 15 分時点の溶出率は 0.2% であり、標準製剤では 22% だった。これに対し、クエン酸トリエチルを用いた C-3 およびプロピレングリコールを用いた C-4 は良好な溶出性を示し、15 分時点でそれぞれ 29% および 77% が溶出した。

1-3-1-3 製剤の硬度に対する添加剤の影響

C-3 および C-4 のモンサント硬度はそれぞれ 6.2 N および 3.5 N と低く、保管時または服薬時に誤って崩壊してしまう恐れがあったため、硬度が高くなる可塑剤を検討した。C-3 におけるアマルティ MR-50 を PO 40 に変更した E-1 を調製したところモンサント硬度 12.4 N が得られ、かつ溶出性は標準製剤と類似となった。これは、特許第 6019204 号（深澤ら、三生医薬株式会社、2016 年）で議論されているように、中程度の糖化度である還元水アメ PO 40 が、乾燥されたゼラチンと強く相互シマトリックス強度を高めるとともに、崩壊性を低下させる作用も持つためと考えられた。以上のようにして得られた 0.1 mg の TAC を含有する直径約 3 mm の UniORV[®] 製剤 E-1 を以降の評価に用いるため、シームレスカプセル製造装置にて 1.62 kg 相当を製造した。UniORV[®] 製剤 E-1 は乾燥前に直径 4.2 ± 0.1 mm および質量 27.3 ± 0.1 mg で、乾燥によ

ってそれぞれ 2.9 ± 0.0 mm および 18.3 ± 0.1 mg になった (平均 \pm 標準偏差, n=10).

Table 3 Description of each formulation.

	A				B					C					D				E
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1
Gelation	yes	no	no	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
Deformation after drying	yes	—	—	yes	yes	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
TAC leakage at process of gelation	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	moderate	moderate	severe	severe	moderate
Dissolved TAC (% at 15 min)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	0.4	29	77	0.3	—	—	—	—	33
Hardness (N)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.6	6.0	6.2	3.5	3.6	—	—	—	—	12.4

Deformation after drying was evaluated visually, and "no" was given to those that showed no indentations or wrinkles. TAC leakage at the process of gelation was measured by the method described in "1-2-8 Evaluation of dissolution", and those with a decrease of 10% or more from the theoretical content were marked as "severe", while those without were marked as "moderate". Dissolved TAC (% at 15 min) was also measured by the method described in "1-2-8 Evaluation of dissolution" (n=1). Hardness (N) was measured by the method described in "1-2-4 Measurement of hardness of formulations" (n=1). A horizontal bar (—) means that no measurement was made.

1-3-2 安定性評価

UniORV[®] 製剤 E-1 の安定性評価結果を Table 4 に示す。外観変化および外観は Figure 2 に示す。着色は保存期間および温度に依存し、試験前との色差 (ΔE) は、40°C/75% RH で 24 週間保存した場合 (Fig. 2C) で 4.6, 50°C で 8 週間保存した場合 (Fig. 2E) で 10.6 であった。また、50°C で 8 週間保存した検体でのみ製剤同士が癒合しブロッキングした様子が観察された。25°C/60% RH で 12 週間保存した検体では ΔE のわずかな増加が観察された (Fig. 2B)。Figure 3 は TAC 原薬および E-1 の断面を顕微鏡 (明視野および PLM) で観察した結果を示している。Figure 3B に示す通り、E-1 の断面には直径約 5 μm の球のような形態が分散している様子が観察され、これらは気泡またはクエン酸トリエチルが分散したものと推察された。

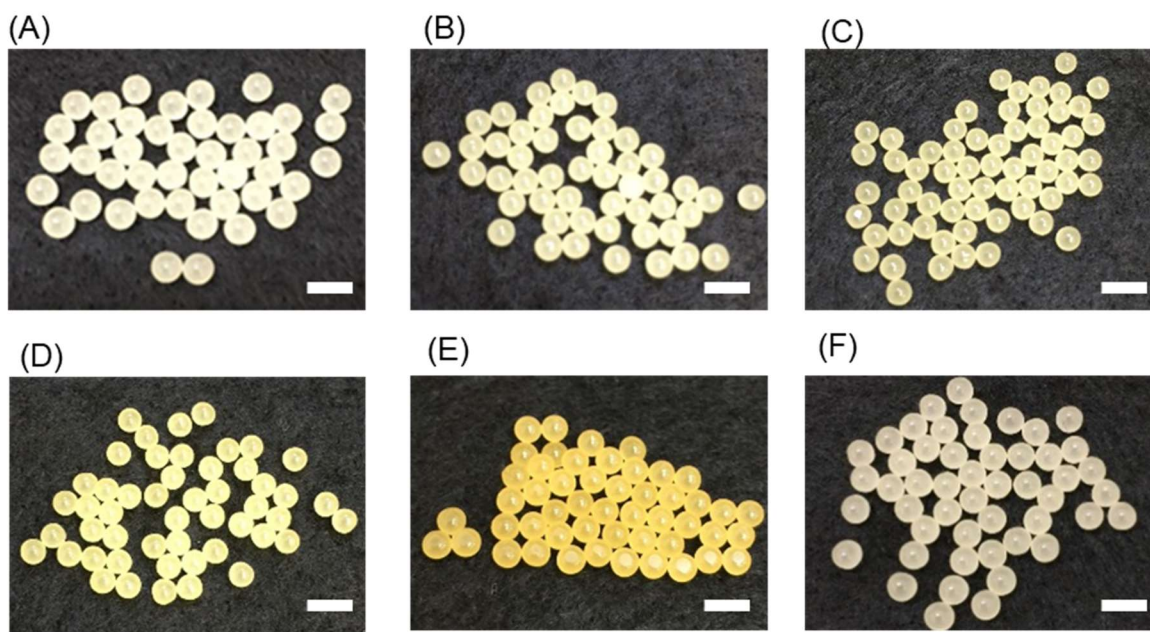


Fig. 2 Appearance of E-1 after storage period. (A) Before stability testing. (B) After storage for 12 weeks at 25°C and 60% RH. (C) After storage for 4 weeks at 40°C and 75% RH without package. (D) After storage for 24 weeks at 40°C and 75% RH. (E) After storage for 8 weeks at 50°C. (F) After storage for corresponding to the cumulative illuminance of 1.2 million lux without package. Scale bar indicates 5 mm.

Table 4 Stability of E-1.

	initial	Accelerated conditions			25°C, 1.2 million lux. (open)
		40°C/75% RH (open)	40°C/75% RH	50°C	
Storage period	–	4 weeks	24 weeks	8 weeks	5 days
Weight (mg/sphere)	18.3±0.1	18.6±0.2	18.2±0.2	18.1±0.2	18.3±0.2
Assay (%)	96.0±0.2	95.2±0.5	93.4±0.5	91.3±0.5	75.7±4.1
Loss on drying (%)	9.2±0.2	10.2±0.0	8.6±0.2	7.8±0.1	7.7±0.3
Crystalline behavior	No birefringent	No birefringent	No birefringent	No birefringent	No birefringent
CIE $L^*a^*b^*$	44.0, -2.1, 15.5	42.4, -1.9, 15.2	43.4, -1.9, 20.1	34.7, 1.7, 19.0	45.8, -2.7, 13.1
ΔE	–	1.6	4.6	10.6	3.1
Dissolved TAC (% at 60 min)	86.0±3.1	–	80.0±0.8	87.2±3.6	63.8±6.0

The weight is the mean and standard deviation of 10 grains, and the assay is the mean and standard deviation of three replicates according to "1-2-5 Determination of Tavlorimus content". CIE $L^*a^*b^*$ was measured only once. Dissolved TAC (% at 60 min) is the mean value and standard deviation of three replicates according to "1-2-8 Evaluation of dissolution". Dissolved TAC (% at 60 min) is the mean and standard deviation of three repetitions according to "1-2-8 Evaluation of dissolution".

UniORV[®] 製剤 E-1 の調製手順から考えると TAC はクエン酸トリエチルに溶解したまま存在していると考えられる. Figure 3D に示す通り, TAC 結晶は PLM で明確な複屈折 (birefringent) を与えたが, Figure 3E ではクエン酸トリエチルの液滴中にもゼラチン基剤中にも TAC の結晶化を示す複屈折は観察されなかった. また, Figure 3C および Figure 3F に示すとおり, 50°C で 8 週間保存した E-1 においても, クエン酸トリエチルの液滴の分散状態と複屈折の有無には変化が認められなかった. このことから, E-1 における TAC の再結晶化は無視できる程度と推察された.

Table 4 に示したように E-1 中の TAC 量は, 40°C/75% RH で 24 週間保管後は 2.7% の減少を示し, 50°C で 8 週間保管後では 4.7% の減少を示したなお, Table 4 には示していないが, 25°C/60% RH で 12 週間保管後は 2.6% 減少していた. これらのことから, 40°C/75% RH 保管後における 2.7% の減少は顕著なものではないと考えられた. 40°C/75% RH で 4 週間保管した未包装検体では TAC の量は 0.83% 減少し, 2.2% の重量増加し, クエン酸トリエチルの液滴の分散状態と複屈折の有無には変化が認められなかった. このことから, UniORV[®] 製剤 E-1 の外観および TAC の再結晶化は

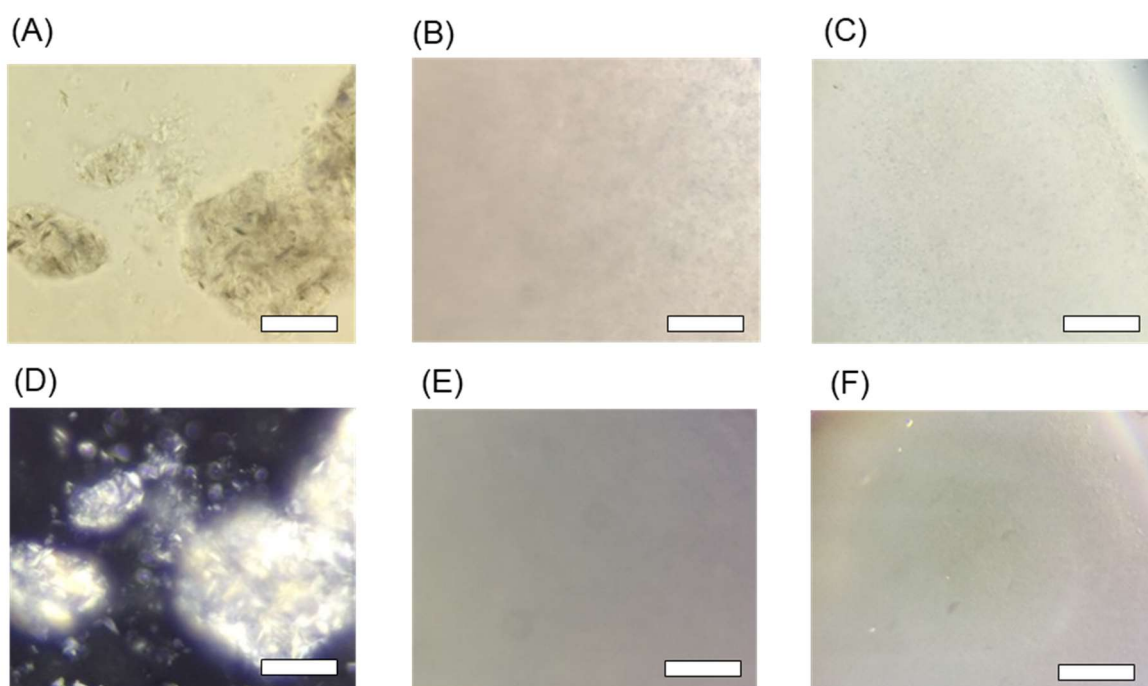


Fig. 3 Morphological observations of solubilized TAC in sliced E-1 samples. (A and D) Optical microscopy and polarized light microscopy of crystalline TAC. (B and E) E-1 before storage. (C and F) E-1 after storage for 8 weeks at 50°C. The scale bar indicates 50 μ m.

温湿度の影響を受けにくいことがわかった。120 万 lux・hr に曝露した検体ではわずかに着色を認めたのみであり、なおかつ再結晶化も認めなかったが (Fig. 2F), 約 21% の含量低下が認められた。

50°C で 8 週間保管した検体 (Fig. 2E) には顕著な変色が認められ、保管前および 40°C 保管後より強い黄味を示した。賦形剤として使用した PO-40 (還元水アメ) は還元糖ではないため、ゼラチンとメイラード反応を起こすとは考えにくく、この変色はメイラード反応による変色とは考えにくい。この着色はゼラチン単独による温度依存的な着色と考えられ、このようなゼラチン単独の着色には、ゼラチン分子同士の架橋および不溶化が伴うと報告されている [30]。そこで、UniORV® 製剤 E-1 におけるゼラチンの着色と溶出性の関係を明らかにするために、これらのサンプルにおける TAC の溶出性を比較した (Table 4)。保管前の E-1 の 60 分間における TAC の溶出性は $86.0 \pm 3.1\%$ (平均 \pm 標準偏差, $n=3$) であり、50°C で 8 週間保管した検体では $87.2 \pm 3.6\%$ と有意差はなかったため、温度依存的な着色にもかかわらず、無視できる程度しかゼラチンの不溶化が生じていないと推察された。このように、UniORV® 製剤 E-1 は、光曝露を除くいずれの保管条件でも安定した溶出性を示した。以上から、UniORV® 製剤 E-1 の処方構成は、適切に遮光がなされているときに TAC に高い保管安定性および高い溶出性をもたらすことが分かった。

1-3-3 ラマンマッピングによる粒子内部の観察

E-1 の内部において TAC がアモルファスまたは溶解状態で存在していることが分かったが、TAC がクエン酸トリエチルの液滴に溶解したままなのか、クエン酸トリエチルからゼラチンゲルに移行しているのか不明だった。これを調べるために、E-1 を構成する各成分に特徴的なラマンシフト波数に基づいてラマン分光マッピングを行った。各成分のラマンシフト波数を Figure 4 に示す。この結果から、全成分には $2,800\text{--}3,050\text{ cm}^{-1}$ 、ゼラチンには $3,150\text{--}3,400\text{ cm}^{-1}$ 、クエン酸トリエチルには $1,741\text{ cm}^{-1}$ 、TAC には $3,092\text{ cm}^{-1}$ を選定し、それぞれの成分の分布をマッピングした。E-1 の同一断面を光学顕微鏡およびラマン共焦点顕微鏡で観察した結果を Figure 5 に示す。光学明視野で観察した E-1 の断面には、直径 1–5 μm 大の円形状の像を認めた (Fig. 5A, 黒矢尻)。Figure 5B に示すように、全成分を表すラマンスペクトルではこれらの円形状の像と同じ位置に、何も成分が存在していないことを示す黒い空白領域が認められたため、これらは気泡だと推察された。気泡に隣接して位置する他の円形状の像 (Fig. 5B, 白矢尻)

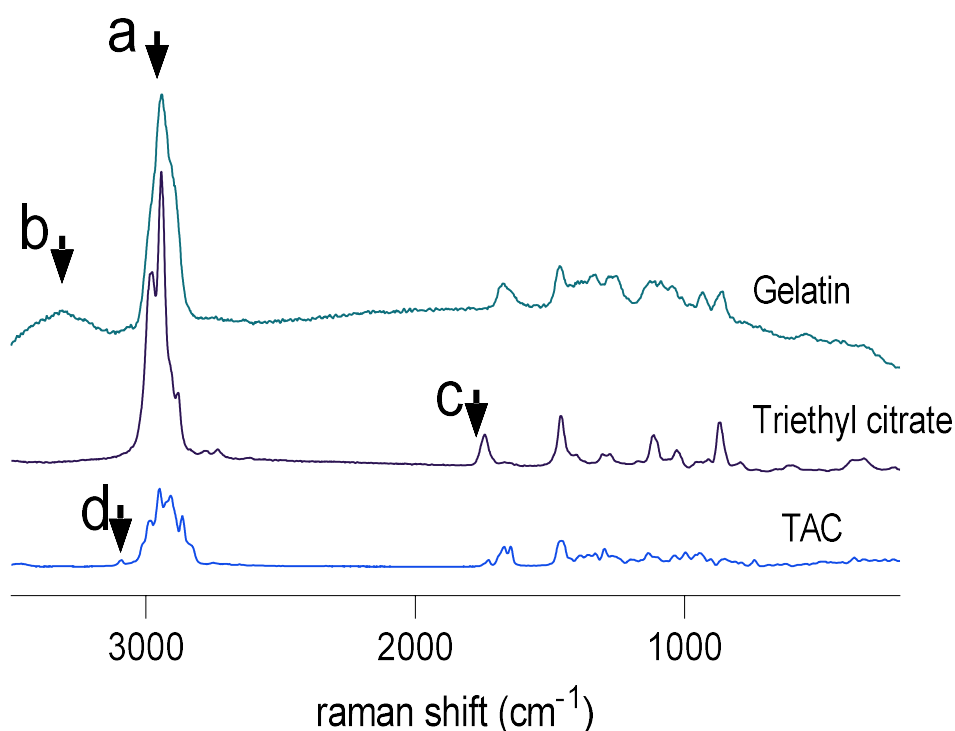


Fig. 4 Specific Raman shift of each component used in E-1. The used shifts for mapping as follows; a, all components ($2,800\text{--}3,050\text{ cm}^{-1}$); b, gelatin ($3,150\text{--}3,400\text{ cm}^{-1}$); c, triethyl citrate ($1,741\text{ cm}^{-1}$); and d, TAC ($3,092\text{ cm}^{-1}$).

は、クエン酸トリエチルをマッピングした像 (Fig. 5C, 白矢尻) と同位置だったため、これらはクエン酸トリエチルだと同定された。また、ゼラチンのマッピングを観察した Figure 5D では、これらの気泡やクエン酸トリエチル液滴の位置に、ゼラチンが存在しないことを示す黒い空白領域が認められたため、クエン酸トリエチル、気泡およびゼラチンは適切にマッピングできていると判断した。Table 2 のとおり、UniORV[®] 製剤 E-1 は、3.7% のクエン酸トリエチルに 0.26% の TAC を溶解させてから作製しているため、TAC がクエン酸トリエチル液滴中に残存していた場合、約 7.0% の TAC クエン酸トリエチル溶液として局在していることになる。この約 7.0% の TAC 濃度はラマン分光のシグナルを検出するのに十分な濃度だった (結果は省略した)。一方、UniORV[®] 製剤 E-1 の断面には、TAC の局在を表すラマンスペクトルには微弱なシグナルしか検出されなかった (Fig. 5E)。このことは、UniORV[®] 製剤 E-1 において、TAC はクエン

酸トリエチルの液滴中に残存しているのではなく、ゼラチン基剤にも移行し、クエン酸トリエチルのおよびゼラチンを含む製剤全体にほぼ均一に分布していたことを示唆する。

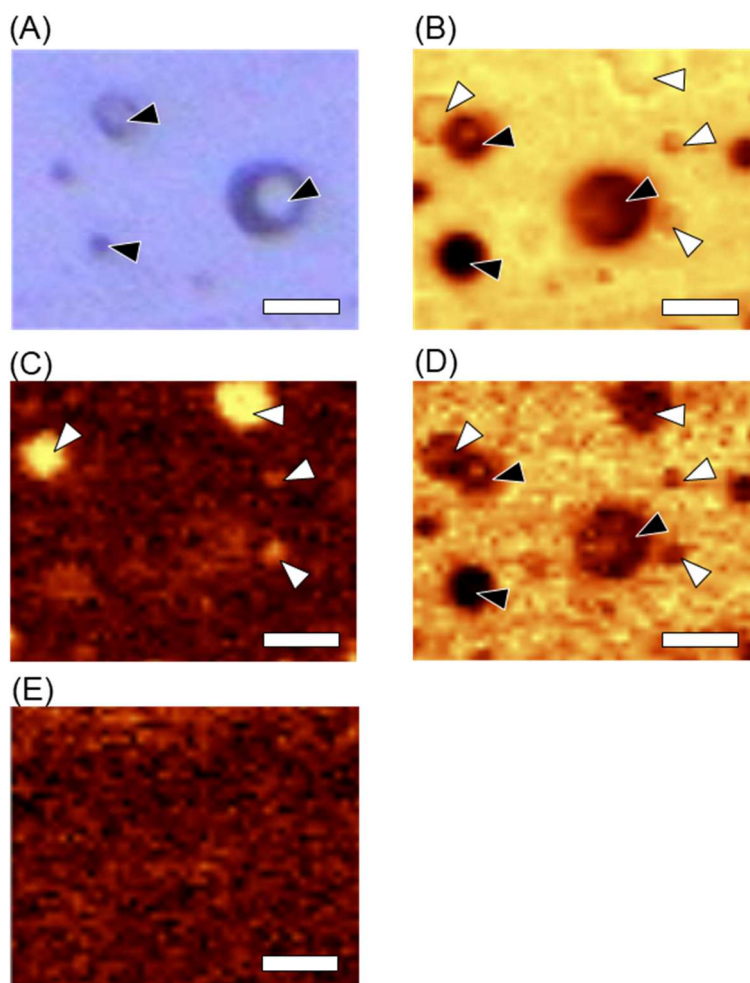


Fig.5 Morphological observations of solubilized TAC in sliced E-1 samples. (A) Raman mapping area ($25 \times 20 \mu\text{m}$), (B) all components, (C) triethyl citrate, (D) gelatin, and (E) TAC. Black arrows indicate droplets of triethyl citrate, and white arrows show air bubbles. The scale bar indicates $5 \mu\text{m}$.

1-3-4 薬物溶出挙動の観察

UniORV[®] 製剤 E-1 の安定性評価にて観察された溶出性を詳述するために、TAC 原薬（結晶）およびその固体分散製剤である標準製剤の溶出性をパドル法にて比較した。結果を Figure 6 に示す。TAC 原薬の 60 分後の溶出性は投入された原薬量に対し 5%（0.3 μg/mL）であった。標準製剤および UniORV[®] 製剤 E-1 は、60 分後において、標準製剤では投入された原薬量に対し 85.5%（4.5 μg/mL）、UniORV[®] 製剤 E-1 では 86.0%（4.8 μg/mL）と観察され、UniORV[®] 製剤 E-1 は TAC 原薬の約 16 倍の溶出性を示した。溶出試験における UniORV[®] 製剤 E-1 の外観は、膨潤後に表面侵食によって崩壊する挙動を示した。溶出試験開始後 5 分後には、溶出試験液中で製剤が膨潤して相互に癒合し、房状の凝集体となってベッセル底部に接着した。接着した凝集体は表面浸食によって徐々に崩壊し、溶出試験開始後 30 分後には完全に消失した。溶出試験液には少なくとも試験開始後 120 分間沈殿ないし析出物は観察されなかった。TAC の溶解度は 2–3 μg/mL とされている [31–32]。UniORV[®] 製剤 E-1 の溶出性は約 4.8 μg/mL で少なくとも 120 分間維持されたため、UniORV[®] 製剤 E-1 を TAC の過飽和溶解度を示す製剤として位置付けた。

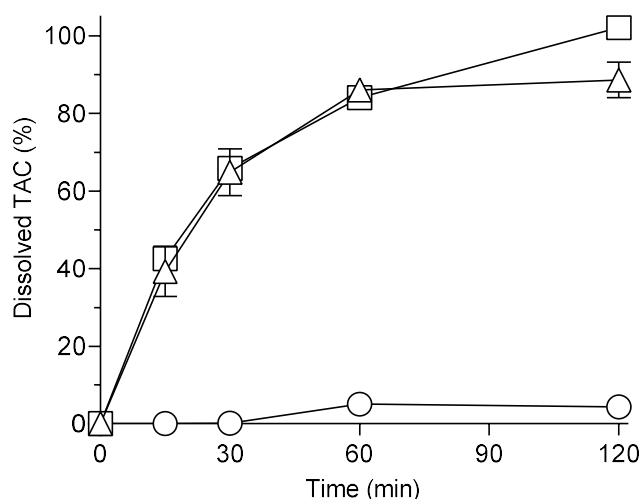


Fig. 6 Dissolution properties of TAC samples with paddle method. (A) Dissolution profiles of crystalline TAC, Reference formulation (RF), and E-1 in 900 mL distilled water. ○, Crystalline TAC 5 mg; □, RF 5 mg; and △, E-1 5mg. Each result was represented mean±SE of each triplicate.

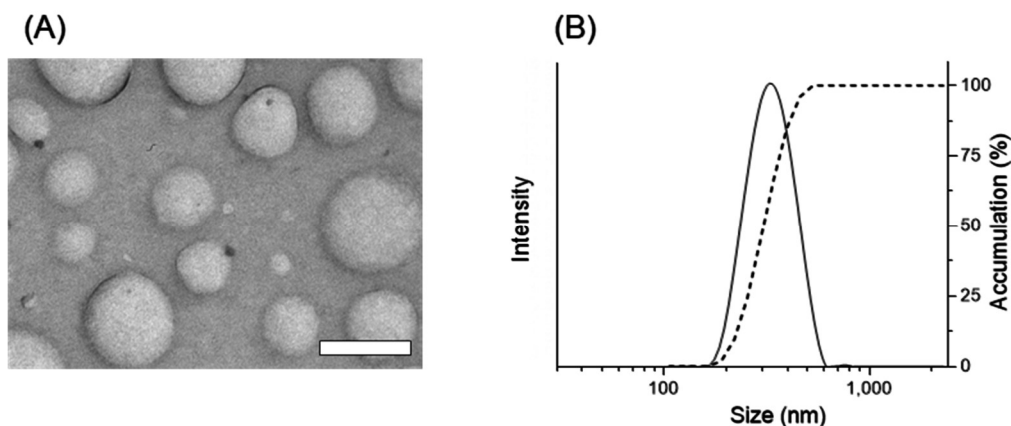


Fig. 7 Particles in dissolution media of E-1. (A) TEM image of E-1 dispersed in distilled water. The bar represents 200 nm. (B) Particle size distribution of E-1 dispersed in distilled water as assessed by a DLS analysis.

固体分散剤の過飽和溶解度は、一般的には、製剤中の賦形剤である高分子が薬物の析出を阻害することによって維持されている [33]。溶出試験中に過飽和溶解度を長時間維持するには、個々の薬物に即した高分子の組み合わせやその濃度比を決定することが重要である。UniORV[®] 製剤 E-1 に配合したクエン酸トリエチルはクエン酸とエタノールのトリエステルで、高分子ではない。その水への溶解度は一般に約 7% といわれている。TAC 5 mg に相当する UniORV[®] 製剤 E-1 の質量 1 g にはクエン酸トリエチルが約 80 mg 含まれており、溶出試験液である水 900 mL は、80 mg のクエン酸トリエチルを溶解させるのに十分な量である。このように、クエン酸トリエチルは水への TAC 溶解補助剤または析出阻害剤としても作用している可能性があるため、溶出試験液中のクエン酸トリエチル液滴の挙動を把握することは、UniORV[®] 製剤 E-1 による過飽和様式をより詳細に調べるために重要である。そこで、300 mg の UniORV[®] 製剤 E-1 を約 5 mL の水に懸濁溶解した際の溶液中の粒子径を評価した。結果を Figure 7 に示す。UniORV[®] 製剤 E-1 の懸濁溶解液中には、TEM で観察可能なナノ粒子が検出された (Fig. 7A)。ナノ粒子は均一な球状液滴の外観を示しており、TAC 結晶は観察されなかった。DLS で観察するとナノ粒子の平均粒子径は約 300 nm であり、均質な粒子径を備えていることが分かった (Fig. 7B)。固体分散のような過飽和製剤では、薬物が溶解したまま高濃度で球状構造物を構成することがあり、近年これらの現象は液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation, LLPS) の観点から説明されている [33-36]。一般に、

LLPS とは、難水溶性薬物の過飽和溶出液中に 100–500 nm の大きさを持つ薬物に富んだ液滴が生成され、この液滴が遊離薬物分子の貯留槽 (reservoir) として作用することで薬物の吸収性が向上する現象を指すが、多くは飽和溶解度の 20 倍以上の過飽和溶液で観察されている。したがって、本章で観察されたナノ粒子は LLPS における液滴ではなく、おもにクエン酸トリエチルおよびゼラチンで形成された乳化液滴と推察した。

溶出試験液が一定量であるパドル法の溶出試験は一般に sink 条件と呼ばれ、近年では、難水溶性薬物の過飽和製剤の溶出性評価においては、実際の生体内の溶出挙動を反映しない恐れがある [37]。一方で、フロースルーセル法の溶出試験は non-sink 条件と呼ばれ、sink 条件よりも生体内の溶出挙動を予測できる可能性が高いとされている [37–38]。そこで、標準製剤および UniORV[®] 製剤 E-1 に加え、臨床で使用されている市販製剤 (タクロリムス錠 5 mg 「日医工」) を用いて溶出性をフロースルーセル法にて比較した。結果を Figure 8 に示す。標準製剤と生物学的に同等である市販製剤は標準製剤と同様に 180 分時点で 41% の溶出率だったのに対し、UniORV[®] 製剤 E-1 はこれらを上回る溶出性を示し、60 分時点で 46%、180 分時点で 70% の溶出性を示した。以上のように、UniORV[®] 製剤 E-1 は標準製剤より良好な溶出性を示すことから、標準

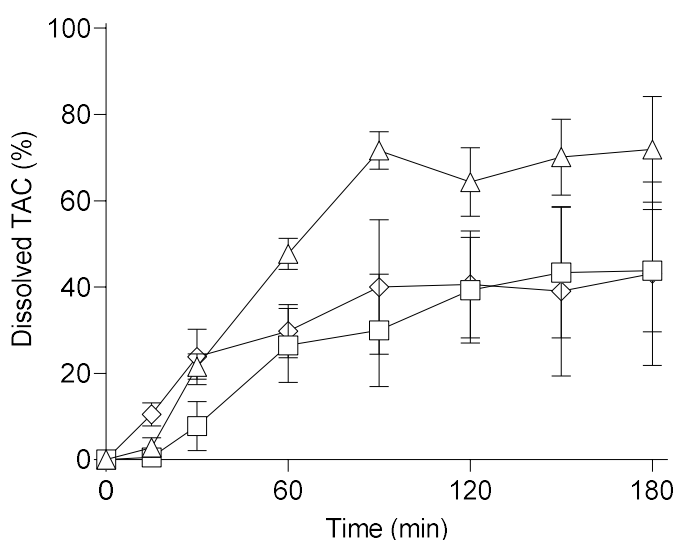


Fig. 8 Dissolution properties of Reference formulation (RF), its marketed generic tablets and E-1 in distilled water with flow-through method flowed at 13.8 mL/min. ◇, generic TAC tablet 5 mg (Tacrolimus tablet 5mg “Nichi-ikou”) ; □, RF 5 mg; and △, E-1 5 mg. Each result was represented mean±SE of each triplicate.

製剤より良好な経口吸収性を示すことが期待された。

1-3-5 体内動態の評価

1-3-5-1 ラットにおける評価

UniORV[®] 製剤 E-1 において標準製剤を上回る TAC の溶出性の改善が観察されたことから TAC の経口吸収性の向上が期待されたため、UniORV[®] 製剤 E-1 と同組成の直径 0.3 mm の微小粒状製剤を調製し、10 mg-TAC/kg の用量でラット経口投与したときの TAC 血中濃度推移を評価した。結果を Figure 9 に示し、薬物動態パラメータ (C_{max} , T_{max} , および AUC_{0-6h}) を Table 5 に示す。TAC 原薬および脱カプセルした標準製剤を経口投与した場合、血中 TAC 濃度は非常に低く、 C_{max} 及び AUC_{0-6h} 値はそれぞれ 7.4 ± 2.1 ng/mL 及び 27.1 ± 10.8 ng.h/mL, 52.7 ± 15.0 ng/mL 及び 188.6 ± 45.1 ng.h/mL であった。一方、UniORV[®] 製剤 E-1 を経口投与すると C_{max} は 448.4 ± 64.1 ng/mL まで上昇し、 AUC_{0-6h} 値は 820.4 ± 105.9 ng.h/mL であった。Khan らは、TAC の SMEDDS 製剤をラットに投与した場合、TAC 原薬を投与した場合と比較して約 19 倍の高い経口吸収性が観察されたことを報告した [39]。UniORV[®] アプローチである E-1 では、固体分散が用いられた標準製剤に対し、 C_{max} 及び AUC_{0-6h} はそれぞれ約 8.5 倍及び 4.3 倍の向

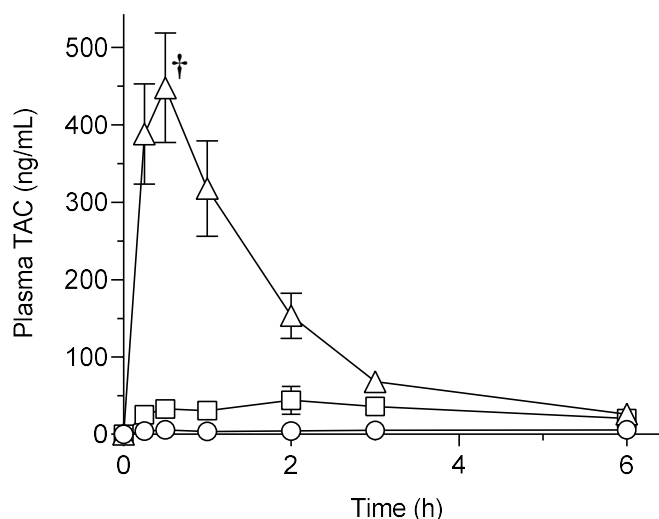


Fig. 9 Plasma TAC concentrations after the oral administration of TAC samples in rats (10 mg/kg body weight of rat, *p.o.*) ○, Crystalline TAC; □, RF; and △, E-1. Each result represents the arithmetic mean \pm SE of 4 experiments. †, $p = 0.00024$ with respect to RF group (t-test).

上が認められた ($p=0.0036$; AUC_{0-6h}). さらに, UniORV[®] 製剤 E-1 の AUC_{0-6h} の変動係数 (coefficient of variation, CV%; 標準偏差を算術平均で除したもの) は, TAC 原薬 (CV: 39.9%) と比較して約 67% 減少した (CV: 12.7%). このことは, UniORV[®] アプローチは経口吸収性を高めるのみならず, 個体間の吸収性のばらつきを軽減したことを示唆する.

腸管粘膜における非攪拌水層 (unstirred water layer, UWL) は, 分配係数が高く膜透過性が高い TAC のような難水溶性薬物が腸管上皮細胞へ取り込まれるのを制限するものとして知られている [40]. SMEDDS 製剤によって生成されたナノエマルジョンまたはサブミクロンオーダーの薬物液滴粒子は, 難水溶性薬物が UWL を透過し腸管上皮細胞に到達する上で重要な役割を果たすことが報告されている [41]. UniORV[®] 製剤 E-1 がラット経口吸収性を改善した要因の一つとして, 消化管液中に放出された TAC のナノ粒子が UWL を透過したことで, TAC 原薬および標準製剤の場合より多くの TAC 分子が腸管上皮細胞に到達したためと推察された. また, TAC を基質とする腸内代謝酵素 CYP3A2 は, 大過剰量の基質の存在下で容易に飽和することが報告されている [42]. 消化管液中に放出された TAC のナノ粒子が CYP3A2 を飽和させていた場合, TAC 原薬および標準製剤の場合より多くの TAC 分子が腸管上皮細胞を透過し, 結果的に血中濃度を高めた可能性がある.

Table 5 Pharmacokinetic parameters of tacrolimus 10 mg/kg in rat serum after its oral administration.

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{0-6h} (ng.h/mL)
E-1	448.4 ± 64.1 [CV: 14.3%]	0.5 ± 0.0	820.4 ± 105.9 * [CV: 12.9%]
RF	52.7 ± 15.0 [CV: 28.5%]	1.5 ± 0.5	188.6 ± 45.1 [CV: 23.9%]
Crystalline TAC	7.4 ± 2.1 [CV: 28.4%]	2.2 ± 0.9	27.1 ± 10.8 [CV: 39.9%]

C_{max} : maximum concentration; T_{max} : time to maximum concentration; and AUC_{0-6h} : area under the curve of plasma concentration vs. time from $t=0$ to $t=6$. Each result represents the arithmetic mean±SE of 4 experiments. * indicates $p < 0.005$ (One-way ANOVA).

1-3-5-2 ヒトにおける評価

前述したように既存の TAC 製剤では吸収のばらつきが臨床上の問題となっている。UniORV[®] 製剤 E-1 を経口投与されたラットにおいて観察された AUC_{0-6h} 及びその CV の著しい改善が、ヒトにおいても同様に観察されるか評価するため、ヒトにおける標準製剤と UniORV[®] 製剤 E-1 の薬物動態を評価した。結果を Figure 10 および Table 6 に示す。UniORV[®] 製剤 E-1 は標準製剤より速く吸収され、TAC 血中濃度は C_{max} として 51.8±12.8 ng/mL まで急速に上昇し、AUC_{0-24h} は 194±38.0 ng h/mL と算出された。UniORV[®] 製剤 E-1 は標準製剤と比較して C_{max} は約 1.9 倍、AUC_{0-24h} は約 1.4 倍に有意に改善した ($p=0.048$; AUC_{0-24h})。また AUC の CV は、標準製剤 (29.7%) に比べて約 34% 減少した (19.6%)。ラットにおける結果と同様に、UniORV[®] アプローチは経口投与された TAC の吸収を効果的に高め、薬物動態の変動を減少させたことが分かった。

一方で、標準製剤に対する経口吸収性の改善の度合は、ラットで観察された AUC 約 4.3 倍に比べ、ヒトでは AUC_{0-24h} は約 1.4 倍とラットに比べ小さかった。薬物の吸収には種差が存在することが知られ、その要因として消化管液の量、消化管内での滞

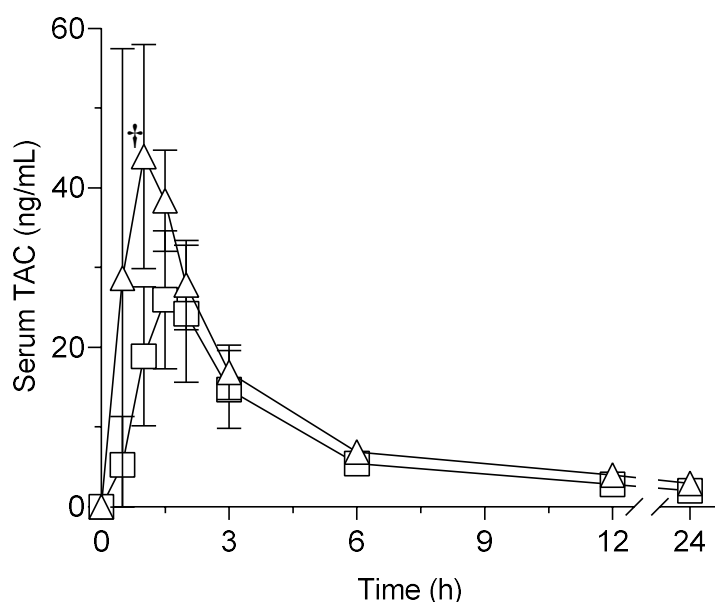


Fig. 10 Plasma TAC concentrations after the oral administration of TAC samples in humans (5 mg). □, RF; and △, E-1. Each result represents the arithmetic mean ± SE of 8 individuals. †, $p = 0.0008$ (t-test)

留時間，小腸上皮細胞における代謝やトランスポーターの種差などが挙げられている [43–44]。184 種類の薬剤の吸収性を小動物からヒトまで比較した OrBiTo プロジェクトでは，速溶性製剤の場合では薬物の溶出性と経口吸収 F （消化管から吸収された薬物量の割合 F_{abs} ，小腸上皮細胞における代謝から逃れた薬物の割合 F_G ，および初回通過効果を免れた薬物の割合 F_H の和）間に弱い相関関係があると報告された [45]。また，難水溶性薬物は小腸上皮細胞における CYP3A4 や P 糖タンパクによる細胞外排出の基質である場合が多く，これらの発現量に影響されることが報告されている [46–47]。また，Jones らによると，TAC の経口吸収性 $F_a \times F_G$ には種差が認められ，TAC の $F_a \times F_G$ 値はヒトではラットよりも有意に低かったと報告されている [48]。本章の知見はこれらの既報と矛盾がなく，UniORV[®] 製剤 E-1 の経口吸収性がラットとヒトとで異なるのは，代謝酵素 CYP3A4 の発現量と，小腸における薬物吸収率の種差が影響しているかもしれない。

このように，UniORV[®] 製剤 E-1 によって，ラットおよびヒトのいずれでも TAC の経口吸収性の改善が観察された。以上から，難水溶性薬物 TAC をモデル薬物として作製した新規マルチユニット製剤技術 UniORV[®] は TAC の生物薬剤学的特性の改善が確認された。

Table 6 Pharmacokinetic parameters of tacrolimus (5 mg) in human serum after oral administration.

	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-24h} (ng.h/mL)	$AUC_{0-inf.}$ (ng.h/mL)	MRT (h)	k_{el} (h^{-1})
E-1	51.5 ± 12.8 [CV : 24.9%]	1.06 ± 0.496	14.7 ± 3.93	194 ± 38.0 * [CV : 19.6%]	258 ± 60.4	16.0 ± 3.51	0.0522 ± 0.0233
RF	27.7 ± 9.02 [CV : 32.6%]	1.50 ± 0.267	12.2 ± 3.22	135 ± 40.1 * [CV : 29.7%]	171 ± 58.6	13.9 ± 2.22	0.0616 ± 0.0210

C_{\max} : maximum concentration; T_{\max} : time to maximum concentration; $t_{1/2}$: half-life time; AUC_{0-24h} : area under the curve of plasma concentration vs. time from t=0 to t=24; $AUC_{0-inf.}$: area under the curve of plasma concentration vs. time from t=0 to time infinity; MRT: mean residence time; and k_{el} : elimination rate constant. Each result represents the arithmetic mean±SE of 8 individuals. * indicates $p < 0.05$ (t-test).

第4節 小括

本章では、溶解度律速で経口吸収性に変動が認められる薬物として TAC を選定し、シームレスカプセル製造装置を利用して粒子状の製剤を製造し、構成する高分子、賦形剤および溶解補助剤を、ミニビーズ成形性および溶出性の観点から選定した。本章で作製した、ゼラチンと還元麦芽糖などを含む溶質濃度 40% 超の滴下溶液から製し、乾燥後に溶質濃度約 90% まで乾燥させた粒子状製剤を UniORV[®] と名付けた。UniORV[®] 製剤はシームレスカプセルと同様に球形だが内部構造が異なる。PLM およびラマンマッピングによる観察によって、内部はクエン酸トリエチルの数 μm の液滴が分散されたゼラチンゲルとなっており、TAC は非晶質のままクエン酸トリエチルおよびゼラチンの両方に分布していることが示唆された。TAC を 0.1 mg/粒の濃度で含有する UniORV[®] 製剤の溶出性をパドル法で評価したところ固体分散の標準製剤と同等であることが確認された。一方、フロースルーセル法で評価したところ、標準製剤およびそのジェネリック製剤より高い溶出性が示された。この溶出試験液に直径約 300 nm のナノ粒子が認められたことから、UniORV[®] 製剤から放出されたナノ粒子が溶解性改善を与えるものと推察された。同一組成で粒子径が異なるミニビーズ製剤 2 種を用意し、それぞれラットおよびヒトに経口投与したところ、固体分散の標準製剤より高い血中濃度推移がいずれも認められ、さらに、個体間の吸収の変動（ばらつき）が少なくなった。これは、難水溶性薬物である TAC の生物薬剤学的特性の改善に粒子状マルチユニット製剤が有効であることを明らかにした数少ない事例である。この UniORV[®] 製剤は一粒に 0.1 mg の TAC を含む直径約 3 mm の球状製剤であるため、服用時の粒数で用量調整でき、シームレスカプセルと同様に嚥下しやすいものと思われる。以上より、溶解度律速薬物 TAC をモデル薬物として、経口吸収性に個人差がある薬物のばらつき改善に適した、服用アドヒアランスが高く、患者それぞれに個別化した用量を設定しやすい粒子状マルチユニット製剤— UniORV[®] 製剤の基本的な処方構成を確立することができた。

第2章 Cyclosporine A の UniORV[®] 製剤の調製と評価

第1節 緒言

近年、製剤成型の原理に他産業の要素技術が用いられるケースが増えている。例えば、印刷機用のピエゾ式インクジェットヘッドを用いて CsA の溶媒水溶液を吐出し、スプレードライヤーの回収サイクロンと同様の原理で乾燥粉末を回収することで吸入剤に適したシングルマイクロ粒子を得た報告や [49], 3D プリンティングと同様の原理で静置された粉末層中にバインダー液を重層して錠剤を成型した報告がある [50]。しかしインクジェットヘッドの吐出液粘度は 高々数 10 mPa・s 程度の低粘度に制限されているためゼラチン水溶液の吐出に向かない [51]。また、仮に吐出できたとしても微細な球状ゼラチンゲルを油脂から回収して流動層乾燥機などで乾燥するのは生産性が高い工程とは言えないため、これらをそのまま本研究に応用することは困難であった。

本章では、他産業の要素技術を応用することで、UniORV[®] の製剤処方を拡大できるか検証した。具体的には、広範な液粘性ないし曳糸性の吐出液でも適用できる製造原理、装置および処方の開発を指向した。検証した作業仮説は以下の 3 点である。(1) メカニカルディスペンサーであれば高粘度溶液の液滴吐出に適用可能か、(2) ゼラチン水溶液と不相溶な MCT の代替媒体として粉体を使用できるか、(3) 粉体中で吐出成形すれば乾燥工程なく粒子回収できるか、の 3 点である。特に (3) に関連して、古典的なグミ製菓の手法である「スターチモールド」を参考に検証した [52]。スターチモールドとは、離型作用に優れた粒子径 10 μ m 程度のデンプン押し固めて型枠を作り、型枠に糖類とゼラチンを含む水溶液を流し込んで冷却したあとデンプン型枠を破壊して、ゼリー状に固化した溶融したゼラチン溶液（グミ）を得る製法である。本章では、薬物を含むゼラチン水溶液をディスペンサーにて微細粒子化し、デンプン転動槽中に吐出し、微細粒子を冷却固化するとともに吸水乾燥する工程を検討した。モデル薬物として前章の TAC と同様に溶解度律速で吸収性が不良である免疫抑制剤 CsA を選定し、上記の工程によって粒子直径 1 mm 以下の UniORV[®] 製剤を調製し、経口投与後の CsA の薬物動態をラットで SMEDDS アプローチで調製された標準製剤と UniORV[®] 製剤とで比較検討した。さらに CsA 血中濃度依存的な毒性発現を観察し、UniORV[®] 製剤による副作用抑制の可能性について検証した。

第2節 実験材料および実験方法

2-2-1 実験材料

薬物は CsA (アモルファス, 東京化成工業株式会社, 東京) を用いた。標準製剤にはネオーラル 10mg カプセル (ノバルティスファーマ株式会社, 東京) を用いた。UniORV® 製剤の材料としてゼラチン (AP-270), クエン酸トリエチル (シトロフレックス 2) およびトウモロコシデンプン (日局松谷乾燥コーンスターチ, 第 17 改正日本薬局方, 松谷化学工業株式会社, 兵庫) を用いた。

2-2-2 装置条件の最適化

微量液滴吐出装置は model DOT-01 (三生医薬株式会社, 静岡) を用いた。吐出ノズルは針長 3 mm の 30 G ノズル (外径 0.31 mm, 内径 0.12 mm) を用いた。シリンジ背圧は 0.5 MPa, ヘッド吐出圧は 0.4 MPa, 出口 ON time は 2.0 msec, 出口 OFF time は 4.0 msec に設定した。配管温度は 65°C に設定した。デンプン流動床は, パン型造粒機 PZ-01R (アズワン株式会社, 大阪) を用いてトウモロコシデンプンを室温下で 90 rpm で回転させて用意した。

2-2-3 UniORV® 製剤の調製

CsA を含有する滴下溶液の処方を Table 7 に示した。ゼラチンを室温下にて精製水で膨潤させたのち約 65°C にてスパーテルを用いて攪拌し均一な高分子水溶液を得た。CsA をエタノールおよびクエン酸トリエチルに溶解させたのち 50–60°C の水浴上でゼラチン水溶液に少量ずつ加えそのまま 5–10 分間スパーテルを用いて攪拌し滴下溶液を得た。トウモロコシデンプン約 60 g をパン型造粒機にいれて流動床とし, その約 50 cm 上部から滴下溶液を約 20 分間で吐出して, 微粒子化された滴下溶液をデンプン流動床中にて冷却固化させた。トウモロコシデンプンの粒子径は 10–20 μm に分布し, 微粒子化された滴下溶液の粒子表面にトウモロコシデンプンが付着した粒子状製剤の直径は約 300 μm であったため, 吐出後にトウモロコシデンプン流動床を 140 メッシュ (目開き 105 μm) で篩過しメッシュ上に残った粒子状製剤を回収した。この直径約 0.3 mm の粒子状の UniORV® 製剤を UO/CsA とした。

Table 7 Formulation of CsA solution.

	Weight of solution(g)	%
CsA	0.38	2.9
Ethanol	0.21	1.6
Gelatin	3.37	25.5
Triethyl citrate	1.15	8.7
Water	8.10	61.3
Total	13.20	100.0

2-2-4 Cyclosporine A 含量の測定

Binary solvent manager, column compartment および Micromass SQ detector with Waters Masslynx v 4.1 を含む Acquity UPLC™ system (Waters) から構成された UPLC/ESI-MS システムを用いて定量した。カラムには Acquity UPLC™ BEH C18 (粒子径 : 1.7 μm, カラムサイズ : 2.1 × 50 mm, Waters) を用いた。カラム温度は 65°C に維持した。5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (A) とアセトニトリル (B) のグラジエント移動相を用いて、0–1.0 min : (B) 50%, 1.0–2.5 min : (B) 70%, 2.5–3.0 min : (B) 84%, および 3.0–3.5 min : (B) 95% とし、流量は 0.25 mL/min とした。CsA は Waters Masslynx v 4.1 に接続された Micromass SQ 検出器を用いて検出した。

2-2-5 Cyclosporine A 原薬およびその製剤の融点挙動の観察

検体をアルミニウムパンに密閉し、DSC Q 1000 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) を用いて昇温 5°C/min , 窒素パージ流量 70 mL/min にて測定した。

2-2-6 Cyclosporine A 原薬およびその製剤の結晶性の観察

D8 ADVANCE (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany) を用いて観察した。Cu Kα 線源は 30 kV および 45 mA にて発生させ、回折データ (2θ) を 3° から 40° の範囲で 2°/min で走査して得た。

2-2-7 溶出液中のナノ粒子の観察

UO/CsA 約 100 mg を約 30 mL の水に懸濁して溶液 5 μL をカーボンコーティングされた Formvar 200 メッシュニッケルグリッド (日新 EM 株式会社, 東京) 上に乗せ

た. 15–30 秒間静置後に余分な溶液を拭き取り, 1% (w/v) ヘキサアンモニウムヘプタモリブデン酸四水和物でネガティブ染色して乾燥させ, 80 kV に設定した H-7700 (株式会社日立製作所, 東京) で TEM 観察した. UO/CsA 約 1 mg を 10 mL の水に懸濁した溶液中の微小構造物の大きさをゼータサイザーナノ ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK) で測定した.

2-2-8 製剤の形態観察

SEM 観察には, カーボンテープに固定した UO/CsA を白金蒸着し TM3030 (株式会社日立製作所, 東京) を用いて観察した. マイクロ X 線 CT は nano3DX (Version 2.2.0.3, 株式会社リガク, 東京) を用いて観察した. 線源には Cu を用い, 電圧 40 kV, 30 mA で照射した. 製剤を含む 0.906 mm×0.680 mm の範囲をスキャンした.

2-2-9 溶出性の評価

マグネティックスターラー SST-66 (株式会社島津製作所, 京都) を用いて溶出試験を行った. スターラー回転数として 50 回転, 試験液として 37°C の 100 mL の精製水を使用した. 検体量は CsA として約 1.5 mg に相当する量を用いた. 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 および 120 分後に 1.5 mL エッペンドルフチューブにサンプリングし, 10,000×g で 5 分間遠心して上清をとりアセトニトリルで希釈した. 「2-2-4 粒子中の CsA 含量」と同様の手順で溶出 CsA 濃度を求めた.

2-2-10 ラットにおける経口投与後の血中濃度測定

体重約 200–350 g の雄の Sprague-Dawley ラット (生後 6–9 週齢, 日本エスエルシー株式会社, 日本) をケージごとに 2 頭ずつ飼育し, 餌と水を自由に与え, 温度 (24 ± 1°C) と湿度 (55 ± 1%) が管理された部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した. 本実験は静岡県立大学動物管理倫理委員会の承認のもと, 同委員会の承認を受けたガイドラインおよび手順に従っておこなわれた.

ラットは経口投与の約 24 時間前から絶食させ, 1 mL の蒸留水に CsA として 10 mg/kg になるよう各製剤を懸濁し経口投与された. 経口投与後 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 12, および 24 時間後に尾静脈から血液サンプル 400 μL を採取した. 各血液サンプルを 10,000×g で遠心分離し, 血清サンプルを調製し分析するまで -20°C 以下で凍結保存した. CsA 血漿中濃度は, UPLC/ESI-MS 法にもとづき Waters Acquity UPLC システム

(Waters) を用いて測定した。を用いた内部標準法により測定した。血漿サンプル 50 μ L に IS 溶液 150 μ L (Tamoxifen, 500 ng/mL メタノール溶液) を加え, 2,000 \times g で遠心分離した。上清を 0.20 μ m フィルター (Millex-LG, Millipore, Billerica, MA, USA) で濾過し「2-2-4 粒子中の CsA 含量」と同様の手順で血中 CsA 濃度を求めた。CsA の薬物動態パラメータは GraphPad Prism 5 for Windows (version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて計算した。

2-2-11 ラットにおける Cyclosporine A に起因する腎毒性評価

ラットに Indometacin (20 mg/kg) を腹腔内投与して腎障害を誘導した。CsA 経口投与後の T_{max} と, Indometacin 腹腔内投与による腎障害発現時間とが同時になるよう, UO/CsA は Indometacin 投与の 1.2 時間前に, Neoral[®] はその 1.7 時間後に 10 mg-CsA/kg の用量でラットに経口投与した。Indometacin 投与直後 (0 時間), 投与後 2, 4, 8 および 12 時間後に尾静脈から血液 400 μ L を採取し 10,000 \times g で 10 分間遠心分離し, 上清を分析まで -20 $^{\circ}$ C 以下で保存した。腎毒性の指標である血漿クレアチニンレベルを LabAssay クレアチニン (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) を用いて測定した。520 nm における吸光度は SAFIRE (TECAN, Männedorf, Switzerland) で測定した。

2-2-12 統計解析

統計的解析には, 一元配置分散分析 (ANOVA) ならびにフィッシャーの最小有意差法を用いた。すべての検定は 5% の有意水準を使用した両側検定を用いた。

第3節 結果ならびに考察

2-3-1 CsA UniORV[®] 製剤の調製

2-3-1-1 装置および製造原理の検討

製剤処方自由度を高めるには、より高粘度で曳糸性が高い溶液を用いても粒子成型できる仕組みを開発する必要がある。前章で調製した直径約 3 mm の UniORV[®] 製剤では、滴下液滴のゼラチン水溶液濃度は約 20% が上限であった。これは、粒子状製剤の成型に用いたシームレスカプセル製造装置で吐出できる液の粘度の上限が約 150 mP・s (約 60°C において) であり、ゼラチン水溶液ではその粘度になる濃度が約 20% だからである。この制限は粒子製造装置の吐出性を高めることによって解消できる。すなわち、溶液を吐出した際に形成される液柱を球状液滴に「切る力」を高めることである。混相流ないし流体力学の分野においては microcapillary co-flow device における液柱 (jetting) および液滴 (dropping) の挙動を振動形態 (beating regimes) から数理モデルとして記述しており、Nabavi らによると、球状液滴の成型を促す要因には流体間の表面張力、重力および流れによる動圧 (慣性力) の 3 つがあるとされている [53–54]。したがって、シームレスカプセル製造装置でニュートン流体層流として用いた冷却油脂ではなく大気を用いて溶液-流体間の表面張力をより大きくし、定量送液ポンプ (ギアポンプ) ではなく圧縮空気による加圧送液を用いて流れによる動圧を高めることで、粒子

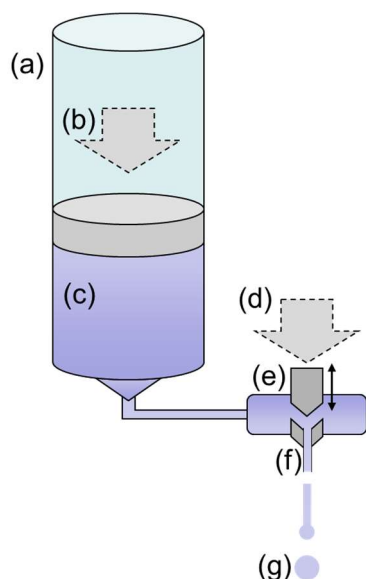


Fig. 11 Schematic diagram of a new spheroidizing mechanisms named model DOT-01. (a), pressure tank; (b), compressed air; (c), CsA solution; (d), compressed air; (e), outlet solenoid; (f), nozzle ; and (g), flying UniORV[®]. This schematic diagram was drawn by the author.

製造装置の吐出性を高めることができ、したがって粘性が高い溶液から液滴生成できるようになると考えた。また、液柱に与えられる振動形態の駆動源を強化するために、シームレスカプセル製造装置で採用されていたサイン波ファンクションジェネレータではなく、矩形波のように ON/OFF 動作する電磁弁（ポペット式）を採用した。これらの考えからシームレスカプセル製造装置を発展させた粒子成形装置 model DOT-01 の概略図を Figure 11 に示す。

2-3-1-2 CsA UniORV® 製剤中の水分の移行

粒子溶液は、ゼラチン濃度を前章より高い 25.5% とし、モデル薬物 CsA を溶解したクエン酸トリエチル(TEC)をゼラチン水溶液に乳化分散させた水溶液とした。また、粒子の乾燥にともなう変形を低減するため水溶液固形分を約 40% とした。UniORV® 製剤は 11.2 g 回収され、その乾燥減量は 10.0% であり、製剤中 CsA 含量は 3.4% だった。使用したトウモロコシデンプン（日局松谷乾燥コーンスターチ）は一般に「乾燥コンス」と呼ばれる低水分品で、吐出前の乾燥減量は 2.7% だったが、吐出後に篩過したものは 10.0% だった。以上のことから、DOT system model-01 を用いた粒子状製剤の成形におけるマテリアルバランスを Figure 12 に示す関係にあると推察した。すなわち、吐出後の液滴は落下しながらすみやか球形にゲル化し、ゲル化した液滴中の水分はトウ

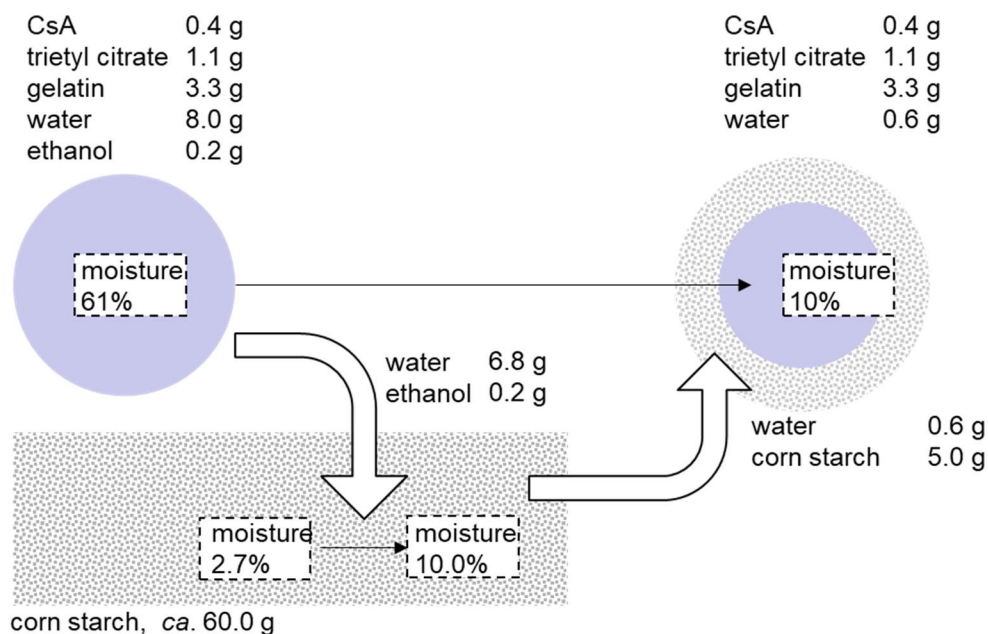


Fig. 12 Theoretical material balance in process of spheroidization.

モロコシデンプン相に吸水されると考えた。吐出した水溶液の水分約 8.0 g のうち約 6.8 g がトウモロコシデンプン相に吸水され、代わりに、液滴表面に約 5.0 g のトウモロコシデンプンが付着したと考えた。液滴から出た水分量と液滴に付着したトウモロコシデンプン量が同一でないのは、水分量のほかに液滴表面積の影響があるためと推察した。なお、一般的にあって、液滴直径はノズル内径と液柱長さから決定され、さらに液柱長さは送液速度と電磁弁 ON time の長さから決定される。

2-3-2 外観観察

滴下溶液をトウモロコシデンプンに吐出後、トウモロコシデンプンを 140 メッシュにて篩過し、メッシュ上の UniORV[®] 製剤と滴下溶液が付着しなかったトウモロコシデンプンとを分級した。UniORV[®] 製剤回収された CsA の UniORV[®] 製剤 (UO/CsA) の外観および断面写真を Figure 13 に示す。UO/CsA は直径約 300 μm の球状粒子で、表面に微細な凹凸が認められ、多くのものには中心部分に深くぼみを持つ、壺状 (vase-shaped) の形態を示した (Fig. 13A)。前章の UniORV[®] 製剤 E-1 の知見を踏まえ、滴下溶液の溶質濃度を 40% 以上にすることで乾燥に伴う粒子変形の影響を避けることを試みたにも関わらず変形していた。これは、液滴がデンプンに落下したあとの吸水乾燥時ではなく、高速で落下したためにデンプンに落下する前からすでに変形していた可能性が高く、model DOT-01 を用いた粒子状製剤の成形には microcapillary co-flow device における液柱一液滴形成の機構よりも複雑な現象が伴っていると考え

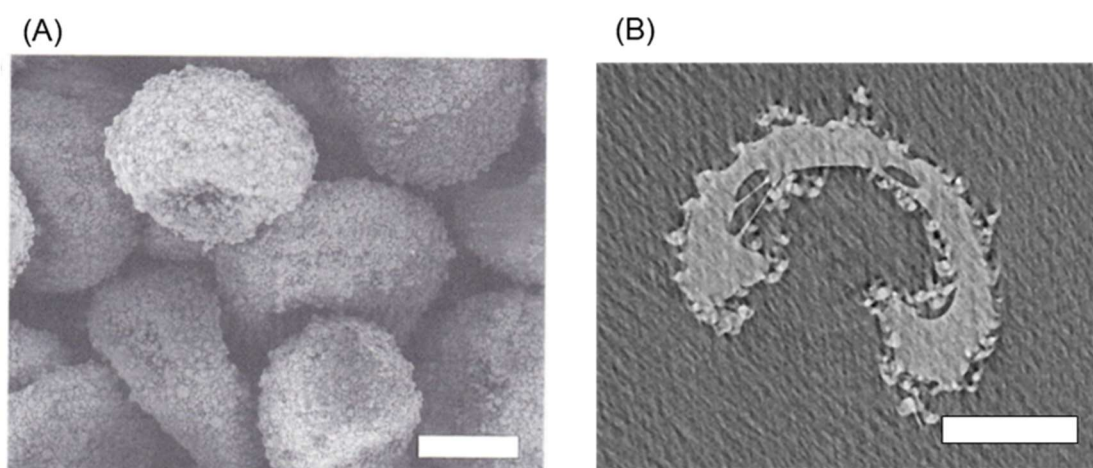


Fig. 13 Appearance of UO/CsA. (A) Surface morphology observed with SEM. (B) Cross sectional image observed with micro X-ray CT scanning. Bars represent 200 μm .

た。UO/CsA は、二層の構造を示していた。外周部にはトウモロコシデンプンと思われる微粉末が付着して形成された凹凸を認め、内部は滴下溶液のゲルと思われる壺状の核が観察された (Fig. 13B)。トウモロコシデンプンはどの外周部分でもほぼ単層で壺状の核に付着していた。また、これらの UO/CsA はどの粒子も凝集または接着しておらず、粒子同士が容易に流動した。UO/CsA が一次核となって他の粒子と接合や粒子成長した様子は観察されなかったことから、当該方法による UniORV[®] 製剤の製造は、攪拌造粒や流動層造粒の工程で観察される造粒ないし錬合のプロセスとは異なるものと推察した。トウモロコシデンプンは球形で離型作用に優れ、粒子径 10 μ m 程度の微粒子である。UO/CsA が、接着しやすいゼラチンを含むにも関わらず凝集または粒子同士の接着を示さなかったのは、このトウモロコシデンプンの離型作用の寄与と思われる。これは粉体としての取り扱い性を高めるため、外周部のトウモロコシデンプンを積極的に脱離させる工程はとらず、そのまま残すこととした。

2-3-3 物理化学的特性

UO/CsA は UniORV[®] 製剤 E-1 と同様に薬物をクエン酸トリエチルに溶解させてからこれをゼラチン水溶液に分散させて調製されたものであるため、UniORV[®] 製剤 E-1 と同様に粒子内部では薬物がアモルファスで存在していると期待されたが、外層のトウモロコシデンプンが複屈折を示すため偏光顕微鏡による結晶観察は困難だった。そのため、XPRD および DSC による結晶性評価を行った。結果を Figure 14 に示す。XPRD

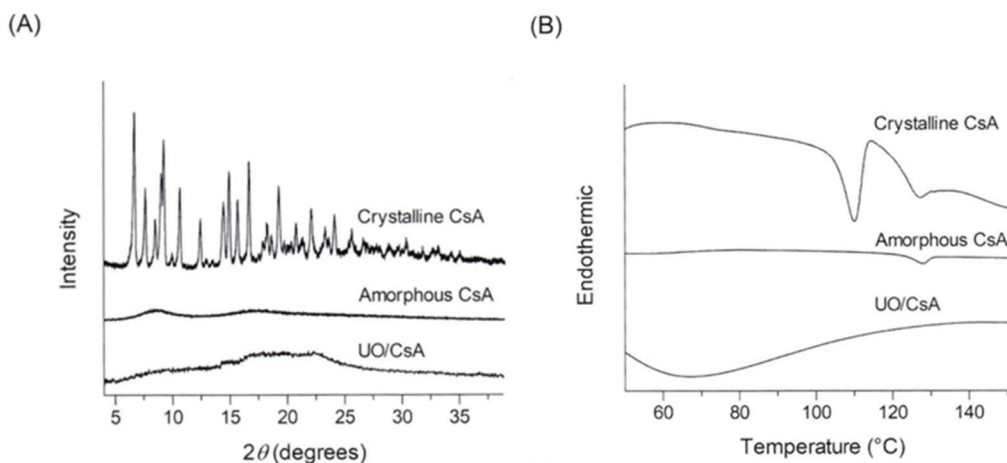


Fig. 14 Crystallinity of CsA within the UO/CsA. (A) XPRD and (B) DSC analysis of crystalline CsA, amorphous CsA and UO/CsA.

による観察では CsA 結晶には結晶質を示す複数のピークが観察されたが, CsA アモルファスおよび UO/CsA にはアモルファスであることを示唆するハローを認めた (Fig. 14A). UO/CsA における CsA 濃度は 2.9% であるため, もし UO/CsA に結晶 CsA が含有されていれば, 回折ピークとして容易に検出されたものと思われる. DSC による融点挙動観察において, CsA アモルファスには約 128°C 付近に液晶由来の吸熱ピークが観察されたが [55–56], UO/CsA には明確な吸熱ピークは認められなかった (Fig. 14B). これらのことは, UO/CsA において CsA が溶けた状態で安定的に存在することを示唆する.

2-3-4 薬物溶出挙動

UO/CsA において薬物がアモルファスで存在することから, 前章の UniORV® 製剤 E-1 と同様に難水溶性薬物 CsA の溶出性が高まることが期待されたため, 溶出性を評価した. 結果を Figure 15 に示す. Onoue らによると CsA の水への飽和溶解度は 20.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とされている [57]. アモルファス CsA は試験開始 120 分後においても高々 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶出率が観察されたのに対し, UO/CsA は試験開始 5 分後に 30.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の過飽和溶解を示し, 10 分後にはわずかに低下したものの約 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の飽和溶解度を少なくとも 120 分間維持した. 溶出試験液中に白色の微粒子が浮遊する様子が観察

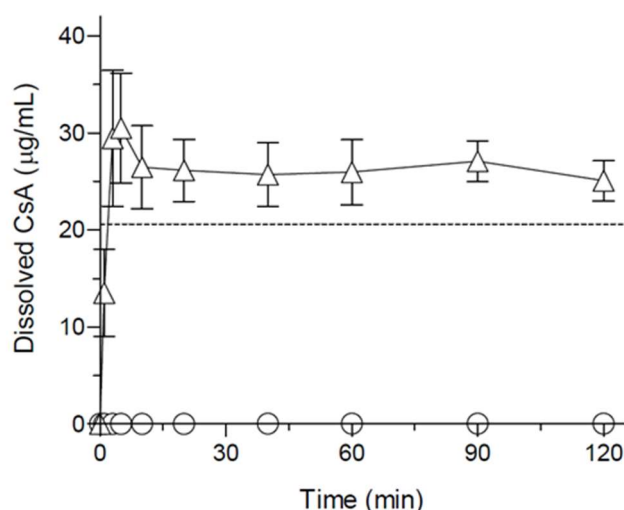


Fig. 15 Dissolution behaviors of CsA samples in distilled water. ○, amorphous CsA; and △, UO/CsA. Dotted line indicates equilibrium solubility of CsA in water. Each result was represented mean \pm SE of each triplicate.

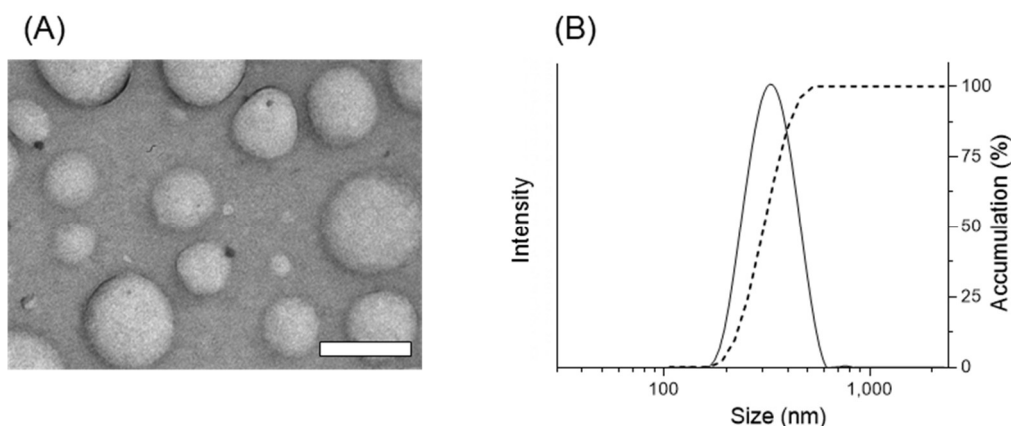


Fig.16 Morphology of droplets after re-dispersion of UO/CsA in distilled water. (A) Particle size distribution of droplets as determined by DLS analysis. (B) TEM image of droplets. Bar represents 500 nm.

されたが、これは、UO/CsAの外層に付着しているトウモロコシデンプンは約37°Cの水には不溶であるため、核のゼラチンが溶出するにつれてトウモロコシデンプンが脱離したためと考えられた。UO/CsAにおいても前章のUniORV[®]製剤E-1と同様にゼラチンとクエン酸トリエチルが使用されていることから、これらの添加剤による溶出性の寄与を評価するため、少量の水に懸濁溶解した際の溶液中の粒子径を評価した。結果をFigure 16に示す。UO/CsAの懸濁溶解液中には、TEMで観察可能なナノ粒子が検出された(Fig. 16A)。DLSで観察するとナノ粒子の平均粒子径は約50nmであり、均質な粒子径を備えていることが分かった。(Fig. 16B)。ナノ粒子は均一な球状液滴の外観を示しておりCsA結晶は観察されなかった。以上のように、UO/CsAはUniORV[®]製剤E-1と同様の処方組成であるため同様の機構によって溶出時にナノ粒子を生成し、良好な溶出性を示すものと推察された。

2-3-5 体内動態の評価

一般的に言ってSEDDSまたはSMEDDS製剤では、薬物を含む乳化液滴が薬物の見かけの溶解度を高めることによって溶出性を改善し、結果、薬物の生物薬剤学的特性を改善するとされている。UO/CsAの溶出液にもナノサイズの粒子が観察され、同時に、CsAの溶出性が改善されたことから、SEDDSまたはSMEDDS製剤と同様にCsAの生物薬剤学的特性を改善することが期待された。CsAのSEDDSまたはSMEDDS製

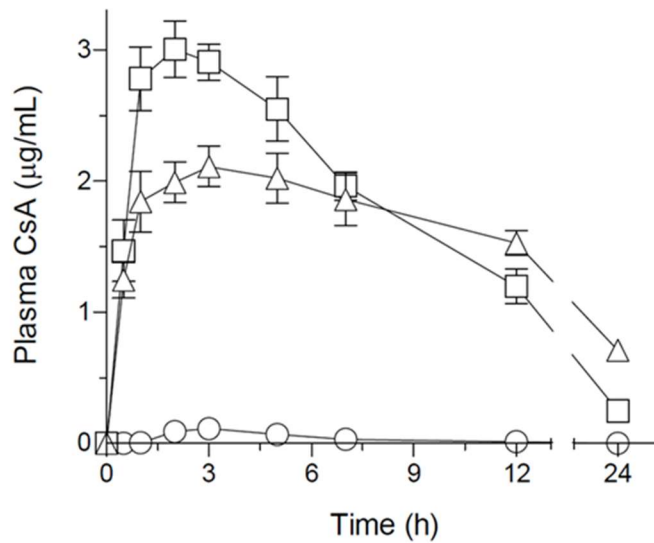


Fig. 17 Pharmacokinetic behavior of CsA after oral administration of CsA samples (10 mg-CsA/kg) in rats. ○, amorphous CsA; □, Neoral®; and △, UO/CsA. Data represent mean \pm SE of 5–6 experiments.

剤と UO/CsA とで経口吸収性を比較することは意義がある。そこで、臨床で使用されている SMEDDS 製剤 Neoral®, アモルファス CsA, および UO/CsA を 10 mg-CsA/kg の用量にてラットに経口投与した後、血漿中 CsA 濃度を求めて PK パラメータを算出した。血中濃度推移のグラフを Figure 17 に、PK パラメータを Table 8 に示す。経口投与されたアモルファス CsA において AUC_{0-inf} は $0.67 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ を示した一方で、UO/CsA の AUC_{0-inf} は $47.6 \pm 4.9 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であり、Neoral® の $36.2 \pm 4.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ より有意に高値だった ($p < 0.05$, t 検定)。一方で AUC_{0-inf} の比較では UO/CsA は $35.0 \pm 5.9 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ のところ Neoral® は $33.8 \pm 6.0 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であり、有意な差は認められなかった ($p = 0.74$, t 検定)。アモルファス CsA, Neoral® および UO/CsA のバイオアベイラビリティは、それぞれ 0.8, 44.7 および 58.9% であり、UO/CsA はアモルファス CsA と比較してバイオアベイラビリティが 71 倍に改善された。 C_{max} は、Neoral® の $3.0 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ に対し UO/CsA は 0.67 倍である $2.1 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、UO/CsA のほうが有意に低値だった ($p = 0.004$, t 検定)。また、本章における UO/CsA の T_{max} は 5.2 ± 2.2 時間であり Neoral® の 2.3 ± 0.8 時間よりも遅かったが、有意な差は認められなかった ($p = 0.36$, t 検定)。以上のように、UO/CsA は Neoral® と同等またはそれ以上の AUC を示しつつ低い C_{max} を示した。UO/CsA の血中濃度プロファイルが Neoral® より低い

C_{\max} を示したことは、本アプローチが CsA 血中濃度依存的な副作用の低減に寄与する可能性があるため、次項にて評価する。

Table 8 PK parameters after oral administration of CsA samples (10 mg-CsA/kg) in rats.

	C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{\max} (h)	MRT (h)	$\text{AUC}_{0-\text{inf.}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	$\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	BA (%)
Neoral [®]	3.2±0.5	2.3±0.8	7.8±0.7	36.2±4.1	33.8±6.0	44.7
UO/CsA	2.2±0.4 *	5.2±2.2	12.9±0.7	47.6±4.9 **	35.0±5.9	58.9
Amorphous CsA	0.1±0.1	3.6±0.3	4.7±6.0	0.7±0.5	0.5±0.7	0.8

C_{\max} : maximum concentration; T_{\max} : time to maximum concentration; MRT: mean residence time; $\text{AUC}_{0-\text{inf.}}$: area under curve of plasma concentration vs. time from $t = 0$ to $t = \infty$ after administration; CV: coefficient of variation in $\text{AUC}_{0-\text{inf.}}$; and BA: bioavailability. Each value represents mean±SE of 6 experiments. *, $p < 0.005$; **, $p < 0.05$ with respect to Neoral[®] group.

2-3-6 腎毒性を指標とした安全性評価

一般的に Neoral[®] のような SMEDDS 製剤は経口投与後に急速に吸収されるため血中濃度の急激な上昇による全身的な副作用が懸念されている [58]. UO/CsA が CsA 血中濃度依存的な副作用を低減するか検証するため、腎毒性モデルラットとして頻用される Indometacin 腹腔内投与ラットにおいて、ラットにプラセボマイクロビーズ製剤、Neoral[®] および UO/CsA を 10mg-CsA/kg の用量にて経口投与した後、血漿中クレアチニン濃度および腎臓中 CsA 濃度を観察し、製剤の差による副作用軽減の度合、すなわち安全性を評価した. 結果を Figure 18 に示す. いずれの群においても、Indometacin (20 mg/kg) の腹腔内投与 4 時間後に最大クレアチニン濃度が観察され、プラセボ投与群、Neoral[®] 投与群および UO/CsA 投与群の血漿クレアチニン濃度は、それぞれ 0.9, 1.3 および 1.1 mg/dL であった (Fig. 18A). プラセボ投与群と比較して、CsA 投与後の血漿クレアチニン濃度には有意な上昇が認められ、Neoral[®] 経口投与群の血漿クレアチニン濃度は UO/CsA 経口投与群の血漿クレアチニン濃度よりも 15% 高かった (Fig. 18B).

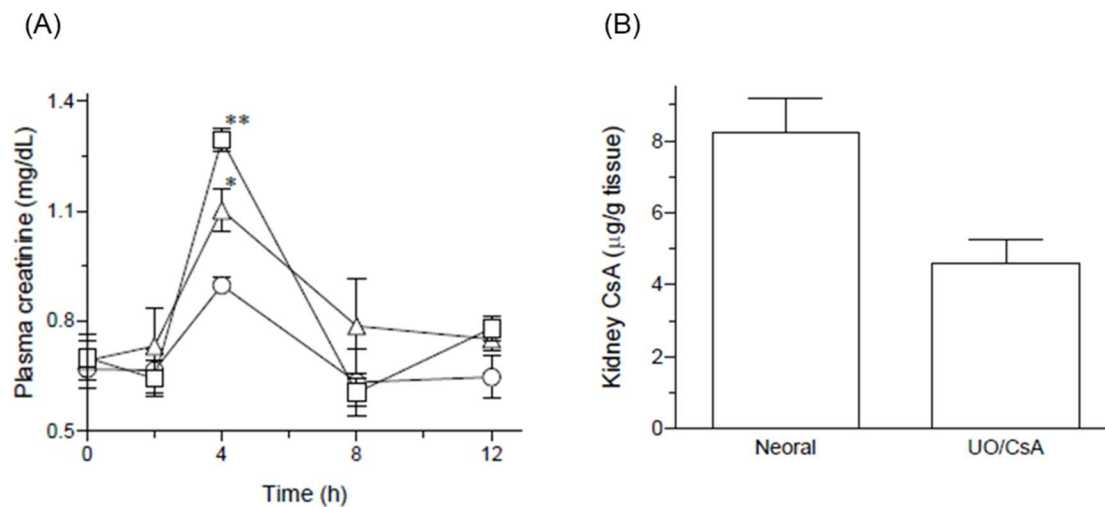


Fig. 18 Safety concern of CsA with respect to nephrotoxicity after oral administration of CsA samples (10 mg-CsA/kg) in rats. (A) Plasma creatinine concentration profiles after oral administration of CsA samples in rats treated with indomethacin (20 mg/kg, *i.p.*). ○, vehicle; □, Neoral[®]; and △, UO/CsA. Data represent mean \pm SE of 4–7 experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ with respect to vehicle group. (B) CsA concentration in kidney at T_{max} in plasma following oral administration of CsA samples. Data represent mean \pm SE of 4 experiments.

また、腎内の CsA 濃度を Neoral[®] および UO/CsA (10 mg-CsA/kg) の T_{max} に相当する経口投与後 2.3 時間後及び 5.2 時間後に測定したところ、腎内 CsA 濃度はそれぞれ 8.2 および 4.6 $\mu\text{g/g}$ であり、UO/CsA は Neoral[®] に比較して腎内 CsA 濃度を 44% 低下させたことが分かった。

一般に Indometacin はプロスタグランジン E_2 及び I_2 の生成を抑制し、腎血流を低下させることが知られている [59]。また、CsA 投与によって誘発される急性腎毒性の重要な危険因子として、求心性動脈の収縮が知られている [60]。虚血性腎障害は、CsA および Indometacin の両方によって誘発されるため、これらの薬剤の併用は重篤な腎障害を引き起こすと報告されている [61]。Neoral[®] 投与群に比較して UO/CsA の血漿中クレアチニン濃度は 15% 低く、また、腎臓中 CsA 濃度は 44% 低かった。以上より、UO/CsA は CsA 血中濃度依存的な全身性副作用を低減させたことが示された。

第4節 小括

本章では、粒子直径 1 mm 以下の UniORV[®] 製剤の製法を検討し、当製剤が CsA の溶解性および動態を改善するか評価した。高濃度で高粘度のゼラチン水溶液を吐出するために、広範な粘性および曳糸性に適用可能なメカニカルディスペンサーを使用し、毎分 10,000 回の速度で液滴吐出する条件を確立した。さらに、粒子状製剤の成形工程と乾燥工程を同時に行うことを目的に、粒子化および回収用の冷却媒体として MCT の代わりにトウモロコシデンプンを使用することを検討した。トウモロコシデンプンを使用することによって、粒子状製剤の乾燥工程が不要になり、ゼラチン水溶液を吐出した後のトウモロコシデンプンを 140 メッシュで篩過するのみで乾燥済み UniORV[®] 製剤を回収できる工程を確立した。UniORV[®] 製剤には、溶解された CsA が約 2.9%含有されており、溶出試験開始後速やかに製剤からナノ粒子が放出され、少なくとも 120 分間に渡って CsA が飽和溶解度を上回って溶出することが確かめられた。CsA UniORV[®] 製剤は比較対照として用いた Neoral[®] に比して低い C_{max} と持続的な血中濃度が維持され、Neoral[®] と同等かそれ以上の AUC を示した。腎毒性モデルラットでは、CsA 血中濃度依存的な副作用を Neoral[®] より軽減した。以上より、新たなマルチユニット製剤の成型原理としてメカニカルディスペンサーおよび粉体中成型を採用することで、滴下溶液が広範な液粘性ないし曳糸性を示しても適用できる製造方法と処方が確立された。この処方による CsA UniORV[®] 製剤は単に経口吸収性を改善するのみならず、CsA 血中濃度依存的な副作用リスクを軽減することが期待された。

第3章 Montelukast の UniORV[®] 製剤の調製と評価

第1節 緒言

サイズの異なる UniORV[®] 製剤 2 種を調製して物理化学的および生物薬剤学的特性を評価したが、モデル薬物はともに溶解度律速薬物である TAC および CsA であった。UniORV[®] の製剤設計の有用性を評価するには、どのようなタイプの薬物であれば薬物特性を改良でき有効な医薬品として製剤化できるか把握する必要があるため、溶解度律速ではない薬物を用いた実験計画を立案した。

Montelukast sodium (MK) は選択的ロイコトリエン受容体拮抗薬であり、慢性喘息や季節性アレルギー症状の治療に広く用いられている [62]。MK は BCS class III に該当し溶解度は約 30 mg/mL とされ、成人における経口バイオアベイラビリティは 61–73% と報告されており、改善の余地がある [63]。MK の溶解性自体は決して不良ではないが、溶液安定性の不良、特に胃内の酸性条件下での不安定性が認められる [64]。MK の溶液安定性を改善させることで経口吸収性を高める試みにおいて、シクロデキストリン包接を利用して安定化させた MK 経口液剤が報告されているものの、その経口吸収性の評価は十分ではない [65]。また、プロトンポンプ阻害薬は MK と同様に酸に不安定な薬物であり、その多くは乳糖などの不活性な球状担体に薬物層と耐酸性層を重層したコーティング技術によって製剤化されている [66]。これらの酸感受性薬物の経口吸収性評価は、長年議論されており、一般に腸溶性コーティングを施して胃内安定性を高めても経口吸収性が改善されるとは限らない。それらは主に、胃内 pH の日間および日内変動の影響や、プロトンポンプ阻害薬等の効果による胃内 pH の上昇の影響から、腸溶性コーティング膜が偶発的に胃内で崩壊することが原因とされている [67]。このように、酸感受性薬物の経口吸収性の改善手法には課題がある。UniORV[®] を構成する添加剤によって薬物の耐酸性向上ならびに生物薬剤学的特性の改善が実現されれば、腸溶性コーティング膜による崩壊性制御に代わる、より均質かつより有効な薬剤治療効果をもたらす製剤技術として活用できる。

本章においては、MK 耐酸性コーティングをせずに酸安定性を向上させた、直径約 3 mm の新しい即時放出型 UniORV[®] 製剤を製造した。前章および前々章と同様に溶出時のナノ粒子を評価し、ナノ粒子の生成をもって UniORV[®] の製剤特徴と位置付けられるか検討した。Sink 条件および non-sink 条件で溶出性を評価し、ヒトにおけるミニビーズ製剤および標準製剤の経口吸収性と関連付けて考察した。

第2節 実験材料および実験方法

3-2-1 実験材料

薬物は MK (結晶, Boryung Pharmaceutical Co., Ltd., Ansan-si, Korea) を用いた. 定量用モンテルカストジシクロヘキシルアミンは一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団標準品事業部から入手した. 標準製剤にはキプレス® 10 mg 錠(杏林製薬株式会社, 東京) を用いた. 担体高分子としてウシ由来ゼラチン (CLV, 第 17 改正日本薬局方, 新田ゼラチン株式会社, 東京) を用いた. 冷却油として中鎖脂肪酸トリグリセリド (サラコス HG-8, 医薬品添加物規格 2018, 日清オイリオグループ株式会社, 東京) を用いた. 可塑剤として還元水アメ (PO 40:70% シロップ) を用いた. pH 調製剤として L-アルギニン (日本薬局方 L-アルギニン, 第 17 改正日本薬局方, 協和発酵バイオ株式会社, 東京) を用いた.

3-2-2 製剤の調製

滴下溶液の処方を Table 9 に示した. 滴下溶液は以下の手順で調製した. まず L-アルギニンを精製水に室温下で溶解し, その後遮光して MK を溶解させた. ここに還元水アメを加えて均一に混合したのち, ゼラチンを加えて室温で 10–16 時間静置して, 遮光したまま約 65°C の水浴上でスパーテルを用いて攪拌するか, またはプロペラミキサー OS20-S (アズワン株式会社) にて 200–300 rpm で攪拌し溶解させた.

シームレスカプセル製造装置にて, 冷却油としてサラコス HG-8 を 9–15°C に冷却して循環させ, 皮膜液タンクに 9.64 kg の滴下溶液を仕込み 50–60°C に保温しながら, 皮膜液側のノズルのみで, ポンプ回転数 26.4 rpm, 振動数 15 Hz にて冷却油中に滴下し, 直径約 4.3 mm, 質量 48 mg の未乾燥 UniORV® 製剤を約 7 kg 回収した. これを室温下にて密閉小型タンブラー型乾燥機でドライエアを供給しながら約 66 時間乾燥させ, 乾燥減量 7.7%, 直径約 3.0 mm, 質量 21.2 mg の UniORV® 製剤を 3.1 kg 得た. シームレスカプセル製造装置に投入した MK 質量に対する製剤収量は 73% だった.

Table 9 Formulation of MK solution.

	Weight of solution (g)	%
MK	103.8	1.08
Gelatin (alkali-treated)	1,460	15.2
Reduced starch syrup	2,965	30.7
L-Arginine	60	0.62
Water	5,060	52.5
Total	9,640	100

3-2-3 滴下溶液の物理物性の評価

粘度はブルックフィールド型粘度計 Model LVDVE115 (AMETEK, Inc, Middleboro, MA, USA) を用いて 60°C にて測定した。

ゲル強度はレオメーター CR-3000EX (株式会社サン科学, 東京) を用いて測定し, RHEODATA ANALYZER PRO (株式会社サン科学, バージョン 1.0.0.1_ref.6.2a) を用いて解析した。試料は φ 35 mm, 高さ 50 mm のガラス製容器に 10 g の溶液を取り, 4°C で 2 時間冷却固化後に測定した。プランジャーは直径 φ 4.5 mm, 長さ 70 mm のものを用いて, 進入速度 60 mm/min, 進入距離 6 mm にて圧縮して測定した。

3-2-4 安定性評価

UniORV® 20 粒をアルミニウムラミネートポリエチレンフィルム (フィルム構成 : PET14/PE20/AL9/PE40, 岡田紙業株式会社) で密封包装し安定性試験を行った。包装したサンプルを恒温恒湿槽 AE-205 (アドバンテック東洋株式会社) に保管し, 25±2°C/60±5% RH で 3 ヶ月間, 40±2°C/75±5% RH で 4 ヶ月間, または 50±2°C で 8 週間保管した。未包装のサンプルは, 解放したシャーレに検体を静置し 40±2°C/75±5% RH で 4 週間保存した。光安定性試験は ICH-Q1B ガイドラインを参考に解放したシャーレに UniORV® を未包装または包装済みの状態で静置し室温下で白色蛍光灯 SQ890S (パナソニック株式会社, 大阪) を用いて 2,700 lx にて実施した。

3-2-5 製剤中 Montelukast 含量の測定

第 17 改正日本薬局方モンテルカスト Na 錠を参考に, いくつかの変更を加えて定

量した。高速液体クロマトグラフ Prominence LC20（株式会社島津製作所）を用いて測定した。10 mg の MK に相当する約 0.4 g の UniORV®を 50 mL のメスフラスコに精密にはかり取り、精製水：メタノール = 3 : 1 の混液で溶解させ、正確に 50 mL にした。別にモンテルカストジシクロヘキシルアミン 16.5 mg を 50 mL のメスフラスコに精密にはかり取り、精製水：メタノール = 3 : 1 の混液で溶解させ、正確に 50 mL にした。サンプル 10 μ L を 40°C に維持された ZORBAX SB-PHENYL カラム（粒子：1.8 μ m, カラムサイズ：4.6 \times 50 mm, Agilent Technologies, Inc）に注入し、グラジエント移動相を用いて流速 1.2 mL/min で分離した。移動相には、(A) 精製水：トリフルオロ酢酸 = 2000 : 3, (B) アセトニトリル：トリフルオロ酢酸 = 2000 : 3 の混液を用い、0–3 min : B 40%, 3–16 min : B 40–51%, 16–20 min : B 40% の条件で分離した。測定波長は 238 nm を使用した。

3-2-6 Montelukast とゼラチンとの相互作用の観察

フーリエ変換赤外分光光度計（Fourier transform infrared spectrometer ; FT-IR）を用いて KBr 錠剤法にもとづき FT/IR-6100（日本分光株式会社，東京）で観察し，Spectra Manager（日本分光株式会社，バージョン 2.02.09）で解析した。

3-2-7 溶出性の評価

溶出試験器 NTR-6400A（富山産業株式会社，大阪）を用いて溶出試験を行った。試験は第 17 改正日本薬局方記載の溶出試験パドル法手順に従った。パドル回転数として 50 回転，試験液として 37°C の精製水 900 mL を使用した。検体量は MK として約 10 mg に相当する量を用いた。5, 10, 15, 20, 30, 60 および 90 分後にサンプリングし，0.45 μ m 孔径フィルター DISMIC 13HP045CN（アドバンテック東洋株式会社，東京）を通した。別の溶出試験は第 17 改正日本薬局方記載の溶出試験フロースルーセル法手順に従った。チューブポンプには SMP-23AS（アズワン株式会社，大阪）を用いて，セルには内径 22.5 mm のポリプロピレン容器を用いた。セル底部には直径 5 mm のガラスビーズを置き，その上に直径 1 mm のガラスビーズを 10 g 入れ，その上に検体を静置した。ポンプ送液速度として 13.8 mL /min，試験液として pH 1.2 の日局溶出試験第 I 液を使用した。試験液容器とセルを 37°C に調節された水浴中に静置した。得られたサンプルは以下の条件にて測定した。サンプル 50 μ L を 50°C に維持された InertSustain Phenyl カラム（粒子径：5 μ m, カラムサイズ：3 \times 100 mm, ジーエルサイエ

ンス株式会社，東京）に注入し，以下の移動相 A : B = 1 : 1 を用いて流速 1.2 mL/min で分離した．移動相には (A) 精製水 : トリフルオロ酢酸 = 2000 : 3，(B) アセトニトリル : トリフルオロ酢酸 = 2000 : 3 の混液を用いた．測定波長は 389 nm を使用した．

3-2-8 ナノ粒子の観察（凍結乾燥レプリカ法）

製剤約 1 g を約 3 mL の水に懸濁して 50°C に加温して溶解させ，液体窒素で冷却された凍結切断レプリカ作製装置 JFD-V（日本電子株式会社）内の試料作製室に入れて凍結し，試料室内で冷却ナイフにて切断面を作製し，白金蒸着後，カーボンコートして切断レプリカを作製した．その後室温下でサンプル部分を精製水で洗い流し，100 kV に設定した JEM-1010（日本電子株式会社）で TEM 観察した．

3-2-9 ヒトにおける経口投与後の血中濃度測定

20-37 歳の健康な日本人男性を対象に，無作為化非盲検，単回投与，2 期 2 群クロスオーバー試験を実施した．被験者は喫煙歴および既往歴がなく，過去 6 か月以内に他の治験に参加していない健常者を選定した．対象となる 8 人の被験者を無作為に割り付け，第 1 期に 5 mg の MK を含む標準製剤または UniORV® を経口投与し，投与日を含めた 7 日間のウォッシュアウト後，第 2 期にはその逆を投与した．すべての被験者は試験薬投与の前日に入院し，投与前に少なくとも 10 時間の絶食を行った．投与前，1，2，3，4，6，8，12 および 24 時間後に 2 mL の血液を採取した．忍容性は，投与 24 時間前から投与後 72 時間のあいだのバイタルサイン，身体検査，有害事象に基づいて評価された．試験計画は，医療法人社団芳栄会関野臨床薬理病院（日本，東京）の倫理審査委員会で審査され承認された．すべての試験は，被験者の書面によるインフォームドコンセントを得た後に実施され，2013 年に改正されたヘルシンキ宣言（Brazil, Fortaleza）および GQP 省令に規定された原則に完全に従って実施された．

黄色灯下で，各時点の血液 50 μ L を茶褐色のポリエチレンチューブにとり，500 μ L のアセトニトリル : メタノール = 1 : 1 の混液，10 μ L の 50% アセトニトリル溶液および 500 μ L の IS 溶液（Montelukast-d6 sodium, 10 ng/mL 50% アセトニトリル溶液）に加えて混合し，-80°C の冷凍庫で 20 分間静置したのち，4°C 下にて，約 12,000 \times g で 10 分間遠心分離し，上清 100 μ L をとり，精製水 100 μ L を加えて試料とし，5 μ L を超高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 ACQUITY UPLC Xevo TQ（Waters）に導入した．カラムには ACQUITY UPLC HSS T3 カラム（1.8 μ m, 2.1 \times 100 mm, Waters）

を用いた。MK は $m/z = 586.43 \rightarrow 422.29$ の MRM 遷移でモニターし、IS は $m/z = 592.49 \rightarrow 427.32$ の MRM 遷移でモニターした。移動相は (A) 0.1% ギ酸水溶液および (B) 0.1% ギ酸アセトニトリルについて 2 : 8 の混液を流量 0.4 mL/min で用いた。薬物動態パラメータは Phoenix[®] WinNonlin[®] (バージョン 6.2; Certara USA Inc.) で算出した。

3-2-10 統計解析

統計的解析には、一元配置分散分析 (ANOVA) ならびにフィッシャーの最小有意差法を用いた。すべての検定は 5% の有意水準を使用した両側検定を用いた。

第3節 結果ならびに考察

3-3-1 Montelukast UniORV[®] 製剤の調製

pH 依存的な不安定性を呈する薬物の製剤化に用いられるアプローチとして *microenvironmental pH modulation* が知られている [68]. これは、顆粒またはミニペレット内部において原薬近傍に pH 調整剤を含有するドメインを配置することで、製剤中の pH を調節して保管安定性を高めるとともに、服用後の体内（特に胃中）での溶液安定性を高める手法である. MK を含有する UniORV[®] 製剤も *microenvironmental pH modulation* アプローチを検討した. MK 溶液は酸性から中性では黄色に変色して MK の析出および分解が認められた. L-アルギニン添加によって pH 8.5 以上に調整すれば 60°C にて 24 時間静置しても MK 溶液の黄変析出が認められなかったため、滴下溶液を pH 8.5 以上に調整することを検討した（結果は省略した）. pH 調整剤に L-アルギニンを選定したのはゼラチンを構成するアミノ酸であることから相溶性に優れると考えたためである. 一般的に、ゼラチンは pH 依存的なゲル化特性を有しており、等電点（pI）付近ではゲル化しない. 前章ならびに前々章で用いたゼラチン（AP270）はブタ由来の酸処理ゼラチンであり、pI は 7-9 とされている. したがって、pH 8.5 以上に調整した MK-ゼラチン（AP270）溶液はゲル化しないため、UniORV[®] 製剤の担体として利用できない. そこで pI が 4.8-5.2 とされているウシ由来アルカリ処理ゼラチン（CLV）を用いた. ゼラチン（CLV）溶液は pH 9 以上でゲル化しない. 上記で示した MK 溶液の安定性と併せて、MK-ゼラチン（CLV）溶液を pH 8.5-8.9 に調整することとした. 60°C に保管した MK-ゼラチン（CLV）溶液の pH、粘度および外観の L-アルギニン添加量ごとの時間経過による変化を Table 10 に示す. L-アルギニン添加量が 0.4-0.6% であれば滴下溶液を 60°C で 24 時間静置しても MK 溶液の黄変析出を防ぎ、かつ pH 9 以下に維持できることが判明したため、L-アルギニン添加量を 0.62% とした. 得られた UniORV[®] 製剤を UO/MK とし、最終的な処方方を Table 9 に示した.

3-3-2 安定性評価

UO/MK の安定性評価結果を Table 11 に、同条件でのキプレス®錠 10 mg の結果を Table 12 に示す。UO/MK の外観変化および着色は Figure 19 に示す。UO/MK は 40°C / 75% RH で 4 か月間保管した検体で製剤同士がブロッキングした様子が観察されたが、含量は開始時から 1.5% 低下した程度だった。製剤同士のブロッキングは 50°C で 1 か月間保管した検体でも観察された。また、光苛酷試験の検体で 60% 以上 MK 含量が低下した様子が認められた。キプレス®錠 10 mg は 40°C / 75% RH で 4 か月間保管した検体で、溶出率 (20 分時点) が 45% 低下して 44% と観察されたが、UO/MK は同条件で 10% 上昇し 94% となり、顕著な低下は認められなかった。以上から、UO/MK はアルミラミネートフィルムで適切に遮光すれば十分な含量安定性および溶出性を維持できると推察された。

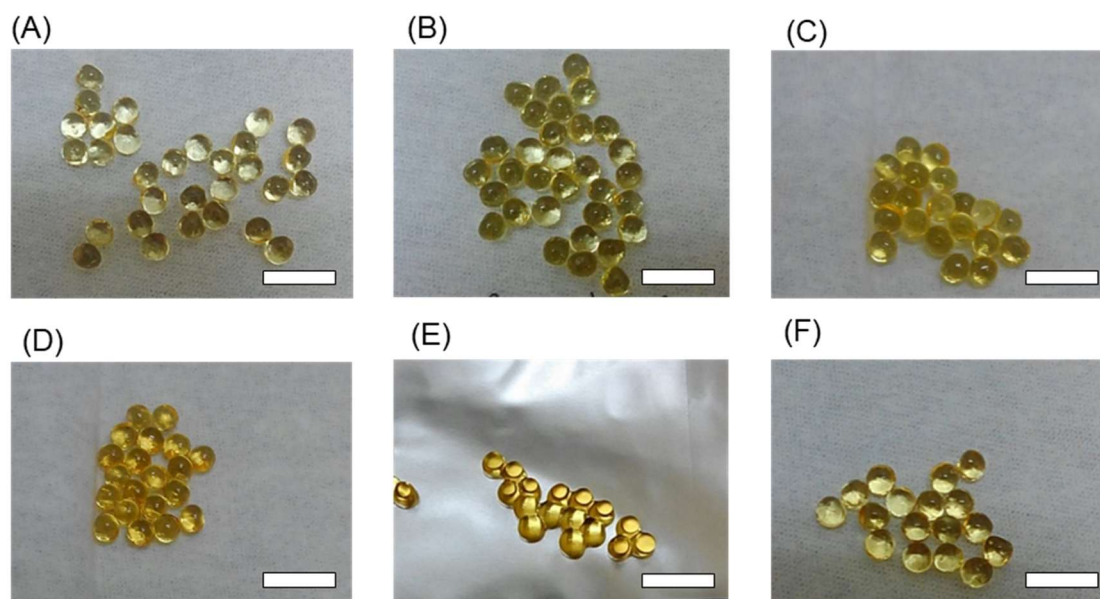


Fig.19 Changes in appearance and coloration packaged with aluminium-laminated film unless otherwise specified. (A) Before stability testing. (B) After storage for 4 months at 25°C and 60% RH. (C) After storage for 4 months at 40°C and 75% RH without package. (D) After storage for 4 months at 40°C and 75% RH. (E) After storage for a month at 50°C. (F) After storage for corresponding to the cumulative illuminance of 1.2 million lux without package. Scale bar indicates 10 mm.

Table 10 Relationship between pH and gel strength of MK-gelatin solution.

L-arginine (%)		1 h	3 h	7 h	24 h	Gell strength (N) at 24 h
0	pH	7.72	7.56	7.56	7.6	0.399
	Viscosity (mPa.s)	67	47	50	55	
	Appearance	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	
0.1	pH	7.81	8.12	8.50	8.51	0.290
	Viscosity (mPa.s)	130	67	47	42	
	Appearance	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	
0.2	pH	8.22	8.18	8.42	8.6	0.256
	Viscosity (mPa.s)	125	117	85	60	
	Appearance	Cloudy	Clear solution	Yellowish cloudy	Yellowish cloudy	
0.3	pH	8.49	8.59	8.53	8.53	0.201
	Viscosity (mPa.s)	102	87	82	75	
	Appearance	Clear solution	Clear solution	Cloudy	Cloudy	
0.4	pH	8.72	8.78	8.65	8.74	0.207
	Viscosity (mPa.s)	92	92	80	77	
	Appearance	Clear solution	Clear solution	Clear solution	Clear solution	
0.5	pH	8.93	8.86	8.88	8.87	0.177
	Viscosity (mPa.s)	95	80	67	65	
	Appearance	Clear solution	Clear solution	Clear solution	Clear solution	
0.6	pH	9.02	8.98	8.97	8.96	0.153
	Viscosity (mPa.s)	97	80	65	57	
	Appearance	Clear solution	Clear solution	Clear solution	Clear solution	
1.0	pH	9.28	9.24	9.20	9.17	0.092
	Viscosity (mPa.s)	85	70	42	35	
	Appearance	Clear solution	Clear solution	Clear solution	Clear solution	

(Continued from the Table 10 in previous page.)

L-arginine (%) was an amount added to a 15.2% gelatin solution. The time course shows the pH, viscosity and appearance of the MK-gelatin solution when kept at 60°C. Viscosity was measured at 60°C. Each result represents single measurement.

Table 11 Stability data on UO/MK.

	initial	Accelerated conditions			light 25°C, 1.2 million lux.hour (open). 17 days
		40°C/75% RH (open)	40°C/75% RH	50°C	
Storage period	-	1 months	4 months	1 month	
Assay (%)	97.2	94.1	95.7	94.7	37.9
Loss on drying (%)	6.8	10.8	7.1	5.5	6.2
Dissolved MK (% at 20 min)	84	91	94	81	39

Each result was represented mean of each triplicate.

Table 12 Stability data on Kipres® tablet 10mg.

	initial	Accelerated conditions			light
		40°C/75% RH (open)	40°C/75% RH (PTP)	50°C (PTP)	
Storage period	-	1 months	4 months	1 month	25°C, 1.2 million lux.hour (open). 17 days
Assay (%)	103.3	102.7	94.6	103.3	102.7
Loss on drying (%)	3.9	5.4	5.1	2.7	5.4
Dissolved MK (% at 20 min)	89	92	44	86	92

Each result was represented mean of each triplicate.

3-3-3 ゼラチンとの相互作用

FTIR は薬物と賦形剤との間に生じる分子間相互作用を予測するために用いられる。UO/MK 中の MK の安定性に高分子担体であるゼラチンが寄与しているとすれば、カルボキシル基を示す波数のシフトなどが観察されることが予想される。Barbosa らは、MK と γ -シクロデキストリンとの包接体の分子間相互作用を FT-IR で観察し、 $1,595\text{ cm}^{-1}$ に観察される波数が $1,600\text{ cm}^{-1}$ にシフトしたことをもって MK のキノリン環がシクロデキストリンの環にゲスト分子として包摂されたことを報告している [65]。UO/MK および物理混合物における IR スペクトルを比較した結果を Figure 20 に示す。MK、ゼラチン、L-アルギニンおよび還元水アメの物理的混合物で観察された約 $1,500$ から 500 cm^{-1} の種々のピークやバンドは、UO/MK では強度が低下した。物理混合物で観察された $1,595\text{ cm}^{-1}$ のバンドは、UO/MK では $1,660\text{ cm}^{-1}$ にシフトした。MK において、 $1,500\text{ cm}^{-1}$ 付近のバンドは C-N 伸縮（キノリン環）を示している [69]。一般的に、ゼラチンのゲルネットワークを形成しているランダムコイル部分は疎水性が高く、疎水性相互作用によって他の分子の疎水基と容易に相互作用する [70]。MK 分子の中央部分に存在する不飽和結合 (C=C) および近傍のキノリン環は疎水性が高く、UO/MK を構成するゼラチンのランダムコイルと相互作用し、バンドがシフトした可能性がある。MK 分子と高分子賦形剤との相互作用に関する FT-IR による観察は、Hadi らは HPMC などを用いた徐放錠において [71]、また、Shruthi らはカラヤガムを用いたチュアブル錠において報告しているが [72]、これらの既報では本章のような顕著なシフトは観察されていない。また、安定性評価において UO/MK の光に対する含量安定性が良好ではなく、むしろキプレス®錠 10mg より溶出性が維持されていたことを踏まえると、この MK-ゼラチンの分子間相互作用は MK の含量安定性よりむしろ溶出性など他の特性へ影響していると期待できる。

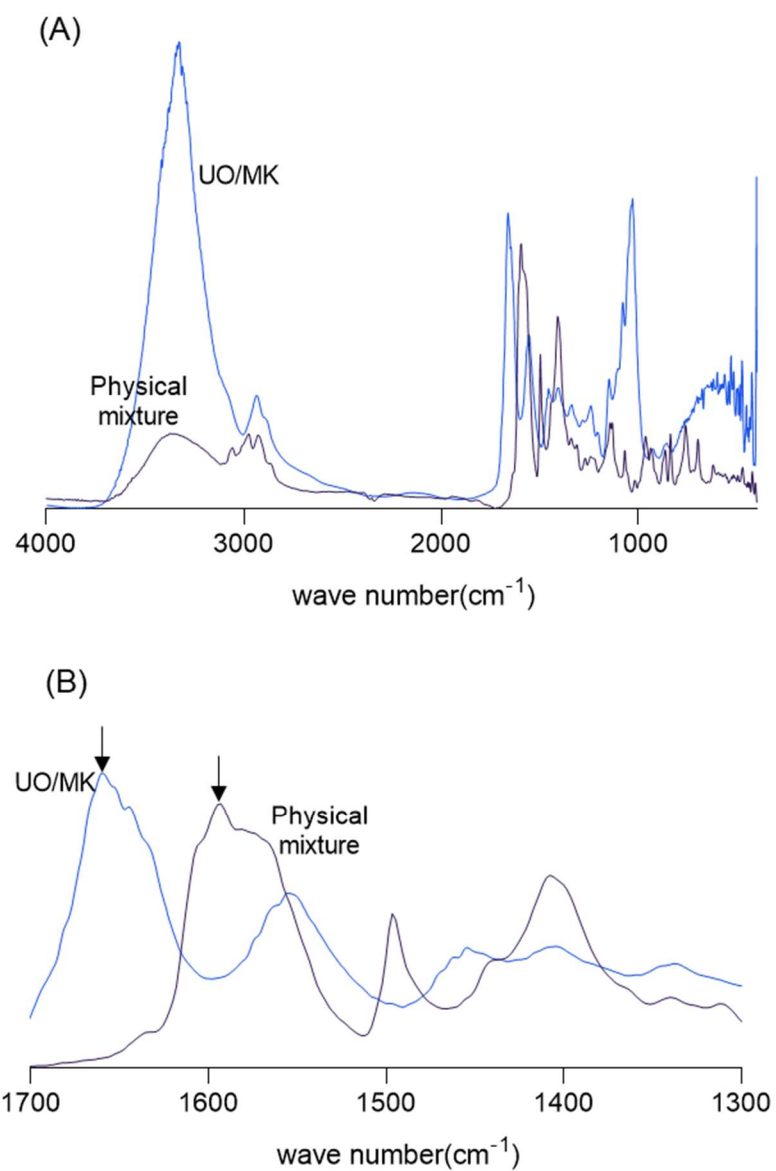


Fig. 20 Spectrum of MK sample plotted in Kubelka-Munk units. A, FT-IR spectrum of UO/MK and the physical mixture; B, Magnified view of the 1300 cm^{-1} to 1700 cm^{-1} range in A. Arrows indicate 1,595 cm^{-1} of Physical mixture, and 1,660 cm^{-1} of UO/MK .

3-3-4 薬物溶出挙動

MK の UniORV[®] 製剤 UO/MK の溶出性を詳述するために、フィルムコート錠である標準製剤および UO/MK の溶出性を比較した。結果を Figure 21 に示す。Sink 条件であるパドル法による溶出試験（精製水）では、UO/MK は前々章の UO/TAC と同様の溶出挙動を示した (Fig. 21A)。すなわち、溶出試験開始後 5 分後には、溶出試験液中で UniORV[®] 製剤が膨潤して相互に癒合しベッセル底部に接着した。接着した凝集体は表面浸食によって徐々に崩壊し、溶出試験開始後 30 分後には完全に消失した。標準製剤および UO/MK はともに試験開始 30 分後まで同等の溶出性を示し、30 分以降少なくとも 60 分まで約 90% の溶出率を維持した。90 分後に標準製剤ではわずかに低下して 88.6% , UO/MK ではわずかに上昇して 103.9% の溶出が観察された。

Non-sink 条件であるフローセル法では、胃過程における MK の安定性が表れやすい pH 1.2 の日局溶出試験第 I 液を用いた (Fig. 21B)。UO/MK は標準製剤より良好な溶出性を示し、試験開始 60 分後には標準製剤の約 32 倍である 44% を示し、少なくとも 240 分に渡って溶出率約 40% を維持した。一方、標準製剤の溶出性は低く、240 分時点でも 4.5% と観察された。製剤の崩壊性については、UO/MK は試験開始 30 分後には完全に崩壊していた一方で、標準製剤は 240 分後においても錠剤の形状が一部維持され崩壊していなかった。Okumu らは、pH1.2 の USP-SGF (USP の

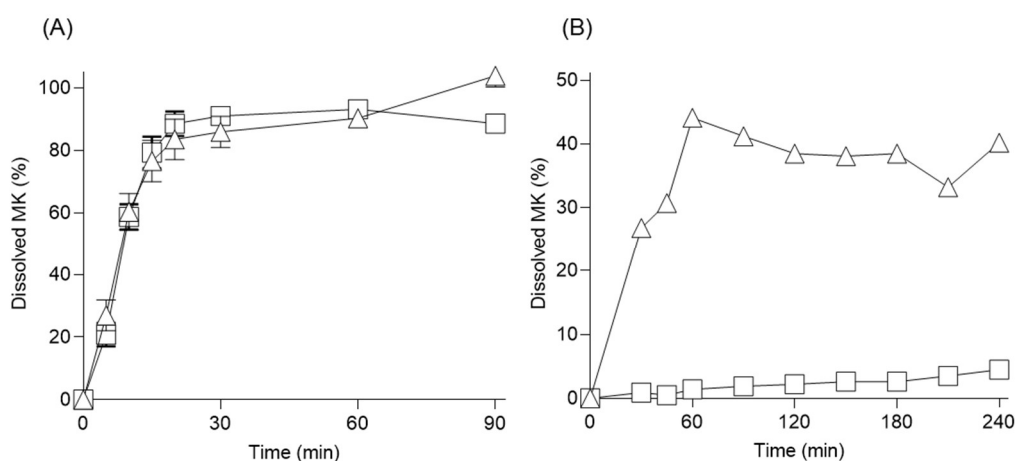


Fig. 21 Dissolution behaviors of MK samples in (A) distilled water with paddle method and (B) pH1.2 simulated gastric fluid with flow-through cell method. \triangle , UO/MK; and \square , RF. Data represent mean \pm SE of 3 experiments in (A), and data was obtained from single experiment in (B).

人口胃液)における MK の溶解度は 0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満だったが、0.25% ラウリル硫酸ナトリウムを含む pH2.0 の USP-SGF では 2.4 mg/mL に向上したことを報告している [73]. UO/MK にて観察された溶出性の向上は、ラウリル硫酸ナトリウムに類する界面活性剤の寄与によるものと推察した. UO/MK に含まれるゼラチンは、一般的に言って、水に溶けるとのコロイド作用を示すとされている. 溶出試験液中に溶解したゼラチンが MK と相互作用し、その溶解性向上に寄与した可能性がある. これらの結果は、MK が不溶かつ不安定である酸性条件下および胃内環境においても、UO/MK が良好な溶出性をもたらす可能性がある.

前々章および前章の TAC および CsA UniORV[®]製剤では、溶出の際にナノ粒子が形成されている様子が観察された. 本章における UO/MK においても同様のナノ粒子が観察されるか凍結乾燥レプリカ法にて評価した. 結果を Figure 22 に示す. UO/MK の溶出液にはナノ粒子は観察されなかった (Fig. 22A). これは TAC および CsA UniORV[®]製剤に使用されており UO/MK には使用されていないクエン酸トリエチルが、ナノ粒子の形成に大きく寄与したことを示唆する. なお、前章の TAC UniORV[®] 製剤を凍結乾燥レプリカ法にて再観察したところ、Fig. 22B のとおり Fig.8A と同様のナノ粒子が観察されたため、UO/MK の溶出液にナノ粒子が観察されなかったのは評価手法の違いによる影響ではないと判断した.

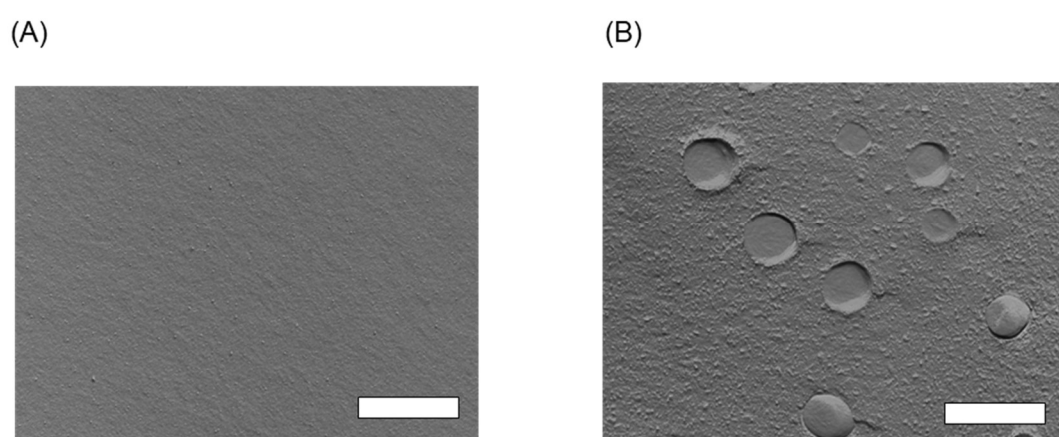


Fig. 22 Particles in dissolution media with TEM. A, UO/MK; and B, TAC-loaded E-1 dispersed in distilled water. The bar represents 500 nm.

3-3-5 ヒト血中濃度

UO/MK において溶出性の改善が観察されたことから MK の経口吸収性もまた改善されることが期待されたため、健康なヒト男性における標準製剤および UO/MK の経口吸収性の比較を実施した。両製剤を 10 mg の用量にて経口投与した血漿中 MK 濃度を求めて PK パラメータを算出した。血中濃度推移のグラフを Figure 23 に、PK パラメータを Table 13 に示す。UO/MK は標準製剤より有意に速く吸収され、 T_{max} は標準製剤 4.13 ± 1.73 h に対し UO/MK は 1.75 ± 0.463 h と約 2.5 時間短縮された ($p=0.007$, t 検定)。UO/MK 経口投与後の血中濃度は C_{max} として 759 ± 96.1 ng/mL まで急速に上昇し、 AUC_{0-24h} は $4,840 \pm 1,220$ ng.h/mL と計算された。これらの結果、UO/MK は MK の生物薬剤学的特性を標準製剤より C_{max} は約 1.6 倍 ($p=0.004$, t 検定)、 AUC_{0-24h} は約 1.3 倍有意に改善した ($p=0.0006$, t 検定)。また UO/MK の AUC_{0-24h} の変動係数は標準製剤 (CV: 39.5%) に比べて約 36% 減少した (CV: 25.2%)。これらは、UO/MK のフロースルー法による溶出試験結果が示したとおり、低 pH においても MK の溶出性が向上したことに主に起因していると考えられた。すなわち、製剤が低 pH である胃内で崩壊および溶出した後、より多くの MK 分子が吸収部位により早く到達したことで、 T_{max} が小さくなり、 C_{max} が高くなり、結果的に AUC_{0-24h} が向上したものと考えられた。

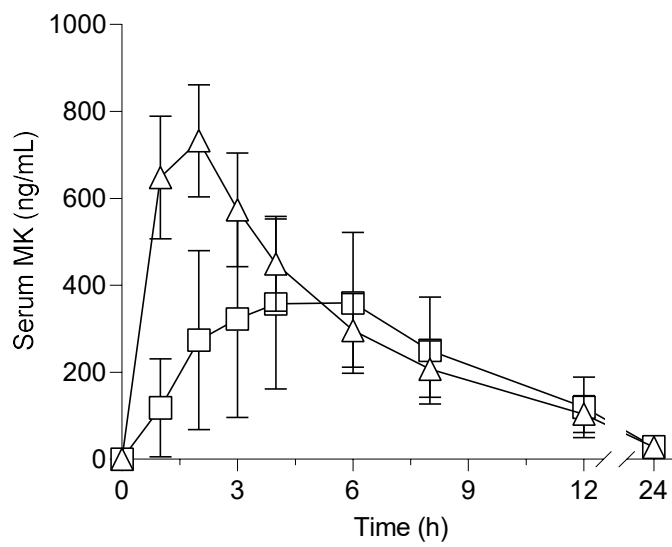


Fig. 23 Plasma MK concentrations after the oral administration of MK samples in humans (10 mg). □, RF; and △, UO/MK. Each result represents the arithmetic mean \pm SE of 8 individuals.

Table 13 Pharmacokinetic parameters of MK 10 mg in human serum after its oral administration.

	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-24h} (ng.h/mL)	MRT (h)	k_{el} (h ⁻¹)
UO/MK	759 ± 96.1 *	1.75 ± 0.463 **	5.24 ± 0.807	4,840 ± 1,220 *	6.89 ± 1.20	0.135 ± 0.0217
	[CV: 12.7%]			[CV: 25.2%]		
RF	472 ± 149	4.13 ± 1.73	5.01 ± 0.614	3,850 ± 1,520	8.67 ± 1.67	0.140 ± 0.0175
	[CV: 31.6%]			[CV: 39.5%]		

C_{\max} , maximum concentration; T_{\max} , time to maximum concentration; $t_{1/2}$, half-life time; AUC_{0-24h} , area under the curve of plasma concentration vs. time from t=0 to t=24; AUC_{0-inf} , area under the curve of plasma concentration vs. time from t=0 to time infinity; MRT, mean residence time; and k_{el} , elimination rate constant. Data represent the mean±SE of 8 healthy individuals. *, $p < 0.005$; **, $p < 0.05$.

第4節 小括

本章では、溶解度以外の原因、特に pH 依存的な不安定性から経口吸収性が不良である薬物として MK を選定し、第一章と同様にシームレスカプセル製造装置を利用して UniORV[®] 製剤を製造した。その際、pH 依存的な不安定性を呈する薬物の製剤化に用いられるアプローチである *microenvironmental pH modulation* を処方構成に援用して、耐酸性コーティングをせずに酸安定性を向上させた新しい即時放出型 MK UniORV[®] 製剤として作製した。製剤の溶出性をフロースルーセル法で pH 1.2 の試験液で評価したところ、標準製剤より高い溶出性が観察された。精製水を用いた溶出試験液にはナノ粒子が認められなかったことから、ナノ粒子の生成は、第一章および第二章で使用され本章で用いられなかったクエン酸トリエチルの寄与が大きいことが推察された。にもかかわらず、即時放出型 MK UniORV[®] 製剤をヒトに経口投与したところ、標準製剤より高い C_{max} と早い T_{max} が示された。これは、UniORV[®] のアプローチによる溶出性の改善およびそれに伴う経口吸収性の改善には、クエン酸トリエチルによるナノ粒子の生成以外の寄与も大きいことを示している。この寄与はゼラチンによる MK 分子の包接である可能性がある。*in-vitro-in-vivo* 関連の観点からは、シングルユニット製剤だけでなく、本研究の UniORV[®] 製剤のようなマルチユニット製剤においても、フロースルーセル法による *non-sink* 条件の溶出試験と製剤ごとの経口吸収性の相対的順位とのあいだに一致が見られることが示された。以上より、溶解度律速薬物である TAC または CsA だけでなく、比較的水溶性の薬物 MK においても、ゼラチンを主要構成成分とするマルチユニット製剤技術 UniORV[®] によって、経口吸収性改善に適した製剤を製造できることが明らかとなった。

総括

多くの患者に均質で有効な薬剤治療を提供するため、製剤技術にはさらなる革新が必要である。溶出性、保管安定性および服用しやすさの観点で種々検討した結果、新規マルチユニット製剤である UniORV[®] を創出した。UniORV[®] は、非晶質状態の薬物を高分子担体に封入する製剤技術であり、幅広い薬物への適用が期待される。しかし UniORV[®] 製剤技術がどのような薬物の生物薬剤学的特性を改善可能か完全には検証できていなかった。本研究では、経口吸収性の変動が大きい薬物群や胃内安定性に課題のある薬物を対象に、製法、処方構成および生物薬剤学的特性について検討を行い、UniORV[®] の適用可能性を精査した。

第 1 章においては、溶解度律速薬物であり経口吸収性の変動が課題となっている Tacrolimus (TAC) をモデル薬物として選定し、シームレスカプセル製造装置を利用して直径 3 mm の UniORV[®] 製剤を試作した。製剤内部はクエン酸トリエチルが乳化分散されたゼラチン乾燥ゲルになっており、TAC は均一に分布し非晶質として存在していた。この UniORV[®] 製剤は sink 条件では TAC の飽和溶解度の約 3 倍まで溶解度を高め、non-sink 条件では比較用標準製剤である固体分散体制剤より高い溶出性を示した。この溶出試験液中にナノ粒子形成が認められたことから、UniORV[®] 製剤は自己乳化製剤と類似の機構による溶解性改善を与えると推察した。UniORV[®] 製剤をラットおよびヒトに経口投与したところ、固体分散剤より有意に高い血中曝露を認め、吸収の変動も改善した。以上、UniORV[®] 製剤技術を用いることで溶解度律速薬物である TAC の生物薬剤学的特性改善に適したマルチユニット製剤の処方構成を提示した。

第 2 章においては、適用可能な処方および薬物の更なる拡大を指向し、溶解度律速薬物であり経口吸収性の変動が問題となっている Cyclosporine A (CsA) をモデル薬物として選定した。新たな製法原理としてメカニカルディスペンサーおよび粉体中成型を採用し、製剤ゲル溶液が広範な液粘性ないし曳糸性を示しても適用できる製造方法と処方を検討した。直径 0.3 mm の UniORV[®] 製剤内部には CsA が固溶体として存在しており、溶出試験開始後速やかに製剤から CsA が飽和溶解度を上回って溶出することを確認した。溶出試験液中にナノ粒子形成が認め、すなわちこのナノ粒子形成が吸収性に寄与していると推定された。ラットに経口投与した CsA UniORV[®] 製剤は自己乳化製剤に比して低い最高血中濃度 (C_{max}) と大きい平均滞留時間 (MRT) を与えて持続的な血中濃度を示し、なおかつ、より高い血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-inf}) を示し、経口

吸収性の変動を低減した。腎毒性モデルラットに CsA UniORV[®] 製剤を経口投与したとき、腎中 CsA 濃度は比較対象として用いた自己乳化製剤より有意に低値であった。CsA に適用した UniORV[®] 処方単に経口吸収性を改善するのみならず、CsA 血中濃度依存的な副作用の軽減が期待できる。

第 3 章においては、消化管内での pH 依存的な分解によって経口吸収性が低下する薬物として Montelukast (MK) を選定し、即時放出型でありながら耐酸性コーティングをせずに酸安定性を向上させた UniORV[®] 製剤を試作した。この製剤の酸性条件下 (pH1.2) での溶出性をフロースルーセル法で評価したところ、比較用標準製剤として用いたフィルムコート錠より高い溶出性が観察された。本 UniORV[®] 製剤は他章記載の剤形のようにナノ粒子を生成しないが、分光学的解析によってゼラチンとの分子間相互作用を認め、それ故に溶出特性が改善していると推察した。即時放出型 MK UniORV[®] 製剤をヒトに経口投与したところ、フィルムコート錠より高い AUC_{0-24h} を認め、MK の生物薬剤学的特性が改善された。胃酸に対し不安定な他の薬剤についても本アプローチが有効であると期待できる。

以上から、本研究は UniORV[®] 製剤が、処方構成を種々検討することによって多様な薬物へ適用可能であることを明らかにした。薬物の生物薬剤学的特性を改善可能な、服用しやすい新規マルチユニット製剤技術 UniORV[®] が、多くの患者に有効な薬剤治療を提供すると期待する。

謝辞

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜り、かつ本稿をご校閲いただきました静岡県立大学薬学部 薬剤学分野 尾上誠良教授に深甚なる謝意を表します。

本研究をまとめるにあたり、協働して下さいました猪山陽輔氏、塚田遼太氏、森実主税氏、三生医薬株式会社の清俊介氏、遠藤紀真氏、峯田三寿々氏、岡山智一氏に深く感謝致します。

本論文作成にあたり、ご助言、ご校閲を賜りました静岡県立大学薬学部 臨床薬剤学分野 賀川義之教授、実践薬学分野 並木徳之教授、ならびに創剤科学分野 近藤啓教授に深謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、終始ご指導、ご助言いただきました三生医薬株式会社の又平芳春氏、深澤孝之氏に深く感謝いたします。

最後に、本研究の遂行中及び論文執筆中にお世話になった方々と、いつも自分を支えてくれた妻と子供たちに心より感謝いたします。

2020年9月

平澤 亙

参考文献

- 1., Gibson M. Chapter 11: Oral Solid Dosage Forms in *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*. in 367–431 (CRC Press, 2016).
- 2., Qiu Y., Chen Y., Zhang G G Z., Yu L., Mantri R V. Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Evaluations of Drug Molecules and Dosage Form in *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. 265–284 (Elsevier Science, 2016).
- 3., Kalepu S., Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 442–453 (2015).
- 4., Ashbee H R., Barnes R A., Johnson E M., Richardson M D., Gorton R., Hope W W. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1162–1176 (2013).
- 5., Pouton C W. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **29**, 278–287 (2006).
- 6., Zhang X., Xing H., Zhao Y., Ma Z. Pharmaceutical Dispersion Techniques for Dissolution and Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs. *Pharmaceutics* **10**, (2018).
- 7., Thakkar S., Sharma K., Khurana S., Bansal A K. Excipients and their Functionality for Enabling Technologies in Oral Dosage Forms. *Pharmaceutical Excipients* 97–143 (2016).
- 8., Yang S., Gursoy R N., Lambert G., Benita S. Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self-microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P-glycoprotein inhibitors. *Pharm. Res.* **21**, 261–270 (2004).
- 9., Patel A R., Vavia P R. Preparation and in vivo evaluation of SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) containing fenofibrate. *AAPS J.* **9**, E344–E352 (2007).
- 10., Sun M., Si L., Zhai X., Fan Z., Ma Y., Zhang R., Yang X. The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **37**, 986–994 (2011).
- 11., Weerapol Y., Limmatvapirat S., Kumpugdee-Vollrath M., Sriamornsak P. Spontaneous emulsification of nifedipine-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system. *AAPS PharmSciTech* **16**, 435–443 (2015).

- 12., Borel J F., Kis Z L., Beveridge T. The History of the Discovery and Development of Cyclosporine (Sandimmune®). in *The Search for Anti-Inflammatory Drugs: Case Histories from Concept to Clinic* (eds. Merluzzi, V. J. & Adams, J.) 27–63 (Birkhäuser Boston, 1995).
- 13., Burekart G J., Ptachcinski R J., Venkataramanan R., Iwatsuki S., Esquivel C., Van Thiel D H., Starzl T E. Cyclosporine trough concentration monitoring in liver transplant patients. *Transplant. Proc.* **18**, 188–193 (1986).
- 14., Philipone E., Yoon A J. Mucosal Manifestations of Immunosuppression. in *Oral Pathology in the Pediatric Patient: A Clinical Guide to the Diagnosis and Treatment of Mucosal Lesions* 125–128 (Springer International Publishing, 2017).
- 15., Taki K., Takayama F., Niwa T. Beneficial effects of Bifidobacteria in a gastroresistant seamless capsule on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.* **15**, 77–80 (2005).
- 16., Lugtu-Pe J A., Ghaffari A., Chen K., Kane A., Wu X Y. Development of controlled release amorphous solid dispersions (CRASD) using polyvinyl acetate-based release retarding materials: Effect of dosage form design. *Eur. J. Pharm. Sci.* **124**, 319–327 (2018).
- 17., Aburahma M H., Hamza Y E-S. Novel sustained-release fast-disintegrating multi-unit compressed tablets of lornoxicam containing Eudragit RS coated chitosan-alginate beads. *Pharm. Dev. Technol.* **16**, 316–330 (2011).
- 18., Tran P H L., Tran T T D. Dosage form designs for the controlled drug release of solid dispersions. *Int. J. Pharm.* **581**, 119274 (2020).
- 19., Abouelatta S., Aboelwafa A., Khalil R., ElGazayerly O. Floating lipid beads for the improvement of bioavailability of poorly soluble basic drugs: In-vitro optimization and in-vivo performance in humans. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **89**, (2014).
- 20., Yuuki T. Rikebeads; microsphere formulation for orally disintegration tablet. *PHARM TECH JAPAN* **28**, 286–287 (2012).
- 21., Hirasawa W., Sei S., Mineda M., Endo N., Matahira Y., Makino K., Tsukada R., Sato H., Onoue S. UniORV, a New Multi-Unit Dosage Platform for Formulating Poorly Soluble Drugs, Improved Oral Bioavailability and Reduced the Pharmacokinetic Variability of Tacrolimus in Rats and Humans. in *AAPS PharmSci 360* (2018).
- 22., Schreiber S L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science (80-)*. **251**, 283 LP – 287 (1991).
- 23., Dheer D., Jyoti., Gupta P N., Shankar R. Tacrolimus: An updated review on delivering strategies for multifarious diseases. *Eur. J. Pharm. Sci.* **114**, 217–227 (2018).

- 24., Johnston A. Equivalence and interchangeability of narrow therapeutic index drugs in organ transplantation. *Eur. J. Hosp. Pharm. Sci. Pract.* **20**, 302–307 (2013).
- 25., Kim Y K., Kim A., Park S J., Lee H. New tablet formulation of tacrolimus with smaller interindividual variability may become a better treatment option than the conventional capsule formulation in organ transplant patients. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 2861–2869 (2017).
- 26., Sherrington P., Oliver R. *Granulation*. (Heyden and Son Ltd, London, 1981).
- 27., Clarke G M., Newton J M., Short M B. Comparative gastrointestinal transit of pellet systems of varying density. *Int. J. Pharm.* **114**, 1–11 (1995).
- 28., Kumagai H., Fujii T., Inukai T., Yano T. Concentration Dependence of Mechanical Properties of Gelatin near the Sol-Gel Transition Point. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 532–535 (1993).
- 29., Waje S S., Meshram M W., Chaudhary V., Pandey R., Mahanawar P A., Thorat B N. Drying and shrinkage of polymer gels. *Brazilian J. Chem. Eng.* **22**, 209–216 (2005).
- 30., Johnson B F., Mcauley P V., Smith P M., French J A G. The effects of storage upon in vitro and in vivo characteristics of soft gelatin capsules containing digoxin. *J. Pharm. Pharmacol.* **29**, 576–578 (1977).
- 31., Honbo T., Kobayashi M., Hane K., Hata T., Ueda Y. The oral dosage form of FK-506. *Transplant. Proc.* **19**, 17–22 (1987).
- 32., Iwasaki K., Shiraga T., Nagase K., Hirano K., Nozaki K., Noda K. Pharmacokinetic study of FK 506 in the rat. *Transplant. Proc.* **23**, 2757–2759 (1991).
- 33., Jackson M J., Kestur U S., Hussain M A., Taylor L S. Characterization of Supersaturated Danazol Solutions - Impact of Polymers on Solution Properties and Phase Transitions. *Pharm. Res.* **33**, 1276–1288 (2016).
- 34., Tres F., Posada M M., Hall S D., Mohutsky M A., Taylor L S. Mechanistic understanding of the phase behavior of supersaturated solutions of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **543**, 29–37 (2018).
- 35., Tachibana T., Nakamura A. A method for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: Dispersion of β -carotene by polyvinylpyrrolidone. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polym.* **203**, 130–133 (1965).
- 36., Taylor L S., Zhang G G Z. Physical chemistry of supersaturated solutions and implications for oral absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **101**, 122–142 (2016).
- 37., Sun D D., Wen H., Taylor L S. Non-Sink Dissolution Conditions for Predicting Product Quality and In Vivo Performance of Supersaturating Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Sci.*

- 105**, 2477–2488 (2016).
- 38., Wen H., Park K. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*. (Wiley, 2011).
- 39., Khan S., Shaharyar M., Fazil M., Baboota S., Ali J. Tacrolimus-loaded nanostructured lipid carriers for oral delivery - Optimization of production and characterization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **108**, 277–288 (2016).
- 40., Chiou W L. Effect of ‘unstirred’ water layer in the intestine on the rate and extent of absorption after oral administration. *Biopharm. Drug Dispos.* **15**, 709–717 (1994).
- 41., Kipp J E. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **284**, 109–122 (2004).
- 42., Thummel K E. Gut instincts: CYP3A4 and intestinal drug metabolism. *J. Clin. Invest.* **117**, 3173–3176 (2007).
- 43., Groothuis G M M., de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875–894 (2006).
- 44., Levet-Trafit B., Gruyer M-S., Marjanovic M., Chou R C. Estimation of oral drug absorption in man based on intestine permeability in rats. *Life Sci.* **58**, PL359–PL363 (1996).
- 45., Musther H., Olivares-Morales A., Hatley O J D., Liu B., Rostami Hodjegan A. Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate? *Eur. J. Pharm. Sci.* **57**, 280–291 (2014).
- 46., Arima H., Yunomae K., Hirayama F., Uekama K. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 547–555 (2001).
- 47., Zhang D., Pan X., Wang S., Zhai Y., Guan J., Fu Q., Hao X., Qi W., Wang Y., Lian H., Liu X., Wang Y., Sun Y., He Z., Sun J. Multifunctional Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)-graft-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin Amphiphilic Copolymer as an Oral High-Performance Delivery Carrier of Tacrolimus. *Mol. Pharm.* **12**, 2337–2351 (2015).
- 48., Jones C R., Hatley O J D., Ungell A-L., Hilgendorf C., Peters S A., Rostami-Hodjegan A. Gut Wall Metabolism. Application of Pre-Clinical Models for the Prediction of Human Drug Absorption and First-Pass Elimination. *AAPS J.* **18**, 589–604 (2016).
- 49., Suzuki H., Moritani T., Morinaga T., Seto Y., Sato H., Onoue S. Amorphous solid dispersion of cyclosporine A prepared with fine droplet drying process: Physicochemical and pharmacokinetic characterization. *Int. J. Pharm.* **519**, 213–219 (2017).

- 50., Infanger S., Haemmerli A., Iliev S., Baier A., Stoyanov E., Quodbach J. Powder bed 3D-printing of highly loaded drug delivery devices with hydroxypropyl cellulose as solid binder. *Int. J. Pharm.* **555**, 198–206 (2019).
- 51., Zhou Z., Ruiz Cantu L., Chen X., Alexander M R., Roberts C J., Hague R., Tuck C., Irvine D., Wildman R. High-throughput characterization of fluid properties to predict droplet ejection for three-dimensional inkjet printing formulations. *Addit. Manuf.* **29**, 100792 (2019).
- 52., Ziegler G R., MacMillan B., Balcom B J. Moisture migration in starch molding operations as observed by magnetic resonance imaging. *Food Res. Int.* **36**, 331–340 (2003).
- 53., Wang J., Li Y., Wang X., Wang J., Tian H., Zhao P., Tian Y., Gu Y., Wang L., Wang C. Droplet Microfluidics for the Production of Microparticles and Nanoparticles. *Micromachines* **8**, 22 (2017).
- 54., Nabavi S A., Gu S., Vladisavljević G T., Ekanem E E. Dynamics of double emulsion break-up in three phase glass capillary microfluidic devices. *J. Colloid Interface Sci.* **450**, 279–287 (2015).
- 55., Sato H., Ogawa K., Kojo Y., Suzuki H., Mizumoto T., Onoue S. Physicochemical Stability Study on Cyclosporine A Loaded Dry-Emulsion Formulation with Enhanced Solubility. *Chem. Pharm. Bull.* **63**, 54–58 (2015).
- 56., Lechuga-Ballesteros D., Abdul-Fattah A., Stevenson C L., Bennett D B. Properties and stability of a liquid crystal form of cyclosporine-the first reported naturally occurring peptide that exists as a thermotropic liquid crystal. *J. Pharm. Sci.* **92**, 1821–1831 (2003).
- 57., Onoue S., Sato H., Ogawa K., Kawabata Y., Mizumoto T., Yuminoki K., Hashimoto N., Yamada S. Improved dissolution and pharmacokinetic behavior of cyclosporine A using high-energy amorphous solid dispersion approach. *Int. J. Pharm.* **399**, 94–101 (2010).
- 58., Kovarik J M., Mueller E A., van Bree J B., Tetzloff W., Kutz K. Reduced inter- and intraindividual variability in cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *J. Pharm. Sci.* **83**, 444–446 (1994).
- 59., Dunn M J., Scharschmidt L., Zambraski E. Mechanisms of the nephrotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Arch. Toxicol. Suppl.* **7**, 328–337 (1984).
- 60., El-Yazbi A F., Eid A H., El-Mas M M. Cardiovascular and renal interactions between cyclosporine and NSAIDs: Underlying mechanisms and clinical relevance. *Pharmacol. Res.* **129**, 251–261 (2018).
- 61., Helmy M W., El-Gowell H M., Ali R M., El-Mas M M. Endothelin ETA receptor/lipid peroxides/COX-2/TGF- β 1 signalling underlies aggravated nephrotoxicity caused by

- cyclosporine plus indomethacin in rats. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 4291–4302 (2015).
- 62., Reiss T F., Chervinsky P., Dockhorn R J., Shingo S., Seidenberg B., Edwards T B. Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, double-blind trial. Montelukast Clinical Research Study Group. *Arch. Intern. Med.* **158**, 1213–1220 (1998).
- 63., Cheng H., Leff J A., Amin R., Gertz B J., De Smet M., Noonan N., Rogers J D., Malbecq W., Meisner D., Somers G. Pharmacokinetics, bioavailability, and safety of montelukast sodium (MK-0476) in healthy males and females. *Pharm. Res.* **13**, 445–448 (1996).
- 64., Al Omari M M., Zoubi R M., Hasan E I., Khader T Z., Badwan A A. Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 465–471 (2007).
- 65., Barbosa J S., Nolasco M M., Ribeiro-Claro P., Almeida Paz F A., Braga S S. Preformulation Studies of the gamma-Cyclodextrin and Montelukast Inclusion Compound Prepared by Comilling. *J. Pharm. Sci.* **108**, 1837–1847 (2019).
- 66., Barmpalexis P., Grypioti A. Development of a new esomeprazole delayed release gastro-resistant pellet formulation with improved storage stability. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **44**, 942–952 (2018).
- 67., Patel D., Bertz R., Ren S., Boulton D W., Nagard M. A Systematic Review of Gastric Acid-Reducing Agent-Mediated Drug-Drug Interactions with Orally Administered Medications. *Clin. Pharmacokinet.* (2019).
- 68., Badawy S I F., Hussain M A. Microenvironmental pH modulation in solid dosage forms. *J. Pharm. Sci.* **96**, 948–959 (2007).
- 69., Singh B., Saini G., Vyas M., Verma S., Thakur S. Optimized chronomodulated dual release bilayer tablets of fexofenadine and montelukast: quality by design, development, and in vitro evaluation. *Futur. J. Pharm. Sci.* **5**, 5 (2019).
- 70., Roos Y H. *Water Management in the Design and Distribution Quality of Foods*. (Taylor & Francis, 1999).
- 71., Mohd A H., V. Lokeswara B., Narottam P., A. S R. Formulation and evaluation of sustained release matrix tablets of montelukast sodium. *Int. J. Pharm.* (2012).
- 72., Shruthi K., Archana C., Kishore C., Latha K., Tahera D. Preparation and evaluation of montelukast sodium chewable tablets using modified karaya gum. *Der Pharm. Sin.* **4**, 125–135 (2013).
- 73., Okumu A., DiMaso M., Lobenberg R. Dynamic dissolution testing to establish in vitro/in vivo correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm. Res.* **25**, 2778–

2785 (2008).