

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 先端的機器分析技術を駆使する革新的な医薬品等の高度特性評価技術の開発に関する研究
Study of novel characterization and quality control techniques, through advanced instrumentation for innovative pharmaceuticals

研究開発実施期間：令和4年4月15日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名： 小出 達夫
Tatsuo Koide

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長
National Institute of Health Sciences, Division of Drugs, Chief

II 研究開発の概要

研究の背景

本研究では、製薬企業等の要望に基づき、品質評価法の開発を含む品質課題の解決が急務である 1) 近年増加しており重要度が高い難水溶性薬物等の固体制剤、2) 評価手法がまだ十分ではない脂質ナノ粒子を含む微粒子製剤、3) 品質管理の高度化が進む天然物医薬品、を主な対象として選択し、これらの医薬品の有効性や安全性に影響すると考えられていながらも、これまで未評価であった、または、今日の技術レベルで適切な評価法が開発或いは一般化していない非破壊分析が必要な製剤特性、製剤内部変化の高度評価法、ナノ粒子製剤の物理的・化学的特性の高度評価法等の評価法の開発を第一義としつつ、さらに、従来の標準的評価法とされている方法の性能を劇的に改善する新技術での医薬品の試験法の品質向上を目指した高度・迅速評価法の開発に取り組むこととした。

研究開発の成果およびその意義等

1) 物性最適化を行った難溶性化合物を用いた製剤の特性評価法の開発

1)-1 主成分が複合体を形成する製剤の非破壊特性評価法の検討

溶液中では複合体は解離してしまうことから、液体クロマトグラフィー等では定量が難しい製剤中の非晶質複合体の定量技術の開発を目的として、ラマン分光法によるインドメタシン/アミノ酸非晶質複合体の非破壊定量法を開発を行った。インドメタシン、トリプトファン及びインドメタシン/トリプトファン非晶質複合体の3化合物を用いてラマン分光法による最小2乗法回帰(PLSR)を用いた定量モデルの作成を行った。ラマンスペクトルの1100-1800 cm^{-1} をベースライン補正および標準化で前処理した非晶質複合体の検量モデルは、比較的良好な予測精度を示した。また、検量モデルのローディングベクトルはインドメタシン/トリプトファン非晶質複合体のスペクトルを反映しており、モデルの妥当性を示していた。次にマンニトールを賦形剤に用い

た製剤中の非晶質複合体の定量モデルの作成を同じように行った。500–1600 cm^{-1} における検量モデルでは精度の高い検量モデルが得られた。また、対照として行った溶出性の検討では溶解時に粘状になり溶解しなくなり適切な溶出条件が見つからなかった。そのような場合でも複合体を正確に定量できる技術であり、ラマン分光法による複合体の非破壊定量法は非常に有用な技術であることが示された。さらに類似した複合体である共結晶についても製剤中の定量モデルの作成を同じように行った。共結晶についてはインドメタシン/ニコチンアミド共結晶を用いた。その検量モデルでも精度の高い検量モデルが得られた。本研究は医薬品の候補となる難溶性化合物の物性改善、溶解技術となる非晶質、共結晶を始めとした複合体化した化合物の品質管理、特に定量や安定性を評価する手法の一つとなりうるとともに、現在でも日本ではガイドラインがないこれらの分野のガイドライン化にもつながると考える。

1)-2 製剤内部変化の X 線 CT による定量的評価

1)-2-1 多形等に起因する密度差の検出および識別に関する検討

製剤中の原薬の存在状態は、製剤の品質・特性・安定性に影響を及ぼすため、その評価の重要性や必要性は以前から認知されていた。しかし、非破壊での評価法は開発されておらず、今も医薬品の研究開発および品質管理における課題である。そこで、結晶形の異なる薬物や添加物など多成分からなるモデル試料について、X 線 CT 撮影条件の最適化に関する検討を行った。示差走査熱量計用のアルミパン中に調製した非晶質ニフェジピンの結晶化速度が、用いたアルミパンの形状により異なったことから、試料調製後のアルミパン内部を X 線 CT により非破壊で観察し、原因を調査したところ、熔融法によって調製した試料がアルミパン中で偏在すること、その様子がアルミパンの形状によって異なることが原因であることを明らかにした。電子密度が近接する 2 つの組成の識別に必要な X 線 CT 画像条件について、アセトアミノフェンを試料とし、検討を行った。空気、ポリプロピレンチューブ、アセトアミノフェン各組成のピークを正規分布曲線でフィッティングし、チューブと薬物ピークの分離度を求めた。露光時間が長くなるほど分離度は向上したが、次第に改善度は鈍った。投影枚数が同じ場合、測定時間は露光時間に比例して長くなるうえに、連続撮影中のわずかな被写体ブレが再構成三次元画像の不鮮明化を招く可能性がある。定量的な評価を行う場合、対象物の識別には約 1 のピーク分離度が目安になることを明らかにした。

1)-2-2 三次元イメージング画像の定量的評価法の開発

粒子形状およびサイズ、密度の異なる 24 の医薬品原末等の密度測定を試みた。これらの三次元画像について、グレイスケールを基に作成したヒストグラムから対象物に相当するグレイスケールを有するボクセル総数を求め、それに単位ボクセルあたりの体積を乗ずることで試料の体積を求めた。様々な条件下で測定を行い、得られた結果を乾式密度測定法による結果と比較したところ、良い相関が得られ、また再現性の高い測定法であることが分かった。また、非晶質薬物の結晶化挙動について、アセトアミノフェンをモデル薬物として検討を行った。非晶質と再結晶化部分の境界は位相回復処理を行うことでより明確になり、識別能が向上した。また、結晶化領域の近傍では空隙の形成が見られたため、形状変化からもおよその境界が推測できた。X 線 CT は、非晶質薬物の物理的安定性評価法の一つとして有用と考えられた。

1)-3 新技術での医薬品の試験法の品質向上を目指した高度・迅速評価法の検討

医薬品原薬の結晶多形を高感度に解析することは、医薬品の品質、特性の評価に重要である。結晶中の分子内・分子間相互作用を解析する方法として X 線結晶構造解析が有用であるものの、測定に必要な単結晶を得ることが難しい場合がある。そこで、高分解能固体 NMR を用いた医薬品の結晶多形等の適切な評価法の検討を行った。原薬（活性本体）のみの単一成分系として、結晶多形を有するラニチジン塩酸塩をモデル試料として、各結晶形（Form 1 および Form 2）について高分解能固体 NMR 測定を行った。まず、汎用プローブによる一次元 NMR (^{13}C -NMR 他) 及び超高速 MAS プローブによる二次元 NMR (^1H - ^{13}C Double-CP 他) により、各結晶形の NMR ケミカルシフトの既報の帰属との比較を行い、再帰属に成功した。さらに二次元 NMR (^1H - ^{14}N D-HMQC 他) デー

タから、 ^1H - ^{14}N の相関から分子内及び分子間の結晶形の相互作用を観測することができた。本法は単結晶を作製すること無く、粉末のまま分子内・分子間の結晶構造を迅速に評価する手法としての可能性が示された。次に、難溶性薬物の溶解度を改善する共結晶薬物について、インドメタシンとニコチンアミドとの共結晶薬物をモデル試料として、高分解能固体 NMR による測定を行い、共結晶薬物における結晶形態の特性評価法を検討した。まず、インドメタシン、ニコチンアミド、これらの混合物及びその共結晶薬物の 4 試料について、汎用プローブによる一次元固体 NMR (^{13}C -NMR) 測定を行い、各試料でのケミカルシフトを比較し、共結晶試料、原薬及びコフォーマー、これらの混合物が区別できることを確認した。次に、共結晶試料の分子内・分子間相関を観測するため、超高速 MAS プローブによる二次元 NMR (^1H - ^{14}N D-HMQC 他) 測定を行い、共結晶の結合形態の解析を行った。その結果、共結晶試料におけるインドメタシンとニコチンアミドとの分子内及び分子間の相互作用を観測することができた。従って本法は、共結晶薬物についても、単結晶を作製すること無く、結晶構造を迅速に評価する手法としての可能性が示された。

2) ナノ粒子の物理的・化学的特性評価法の高度化検討：粒子の密度を利用する粒度分布評価及び粒子表面の特性解析

ナノ粒子は、薬物の搭載や表面修飾により、その構成成分の含量や状態が粒子の物理化学的特性および生物学的特性を決定すると考えられる。この仮説を検証するために、粒子構成成分、粒子径および薬物封入量が異なるナノ粒子を調製し、非対称フィールドフローフラクショネーション (AF4) および遠心フィールドフローフラクショネーション CF3 を用いて評価した。AF4 では粒子径の高精度な評価が可能であることが確認され、CF3 では薬物封入量の異なるナノ粒子を識別できた。また、薬物濃度が一定で、ナノ粒子への薬物封入率がほぼ 100% の場合、ピーク面積は粒子径 (内水相の体積に依存した薬物封入量) と相関した。CF3 を用いる粒子特性のプロファイリング法の汎用性を確認するために、ドキソルビン (DOX) 封入リポソームであるドキシルとコロナワクチン (脂質ナノ粒子) を評価した。ドキシルの薬物放出時の際の粒子径の変化を評価した結果、薬物放出に伴い粒子径が小さくなることが判った。また、4 種のコロナワクチン製剤を分析したところ、これらの製剤の中には、多様なサイズや密度の粒子が含まれる可能性が示された。さらに、アムホテリシン B 担持リポソーム医薬品 (アムビゾーム®) のバッチ内およびバッチ間のばらつきを評価できたことから、本法がナノ粒子医薬品の創薬研究や品質管理等に適用可能な技術であることが確認された。

ナノ粒子への薬物の搭載や粒子の表面修飾等により、構成成分の含量や存在状態に基づいて、粒子の物理化学的特性や生物学的特性が決定されると考えられる。そこで、モノリスカラムクロマトグラフィーの技術に応用して、モノリスカラム表面を種々の親水性高分子で化学修飾したカラムを作製し、ポリリジン修飾モノリスカラムを見出した。本カラムが、リポソームに比して物理的に脆弱なコロナワクチン等の脂質ナノ粒子を崩壊させることなく、分離できることが明らかになった。これより、本法がナノ粒子医薬品の処方検討や品質管理等にて汎用できる技術であることが確認された。

3) 天然物医薬品等の高度・迅速評価法の検討

3)-1 エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) を用いた生薬等の天然物医薬品 (天然物素材) における重金属試験法の検討

日本薬局方の重金属試験法は比色法であり、個別の重金属の測定はできないが、世界的にも個別重金属測定が求められている。本検討では、迅速かつ簡便な個別重金属測定を見据え、EDX を用いた新規手法 (EDX 法) 開発を試みた。まず、ゴオウ、カッセキ、ニンジンを検体とし、重金属 (クロム、銅、ヒ素、カドミウム、水銀、鉛) の定量分析を行ったところ、品目ごとに定量下限や元素の重なりが異なることが示唆された。そこで、EDX 法の応用可能性検討のため、使用部位の異なる様々な生薬 25 品目を検体とし、EDX 法と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS 法) の定量値を比較したところ、分析結果は概ね一致した。EDX 法は ICP-MS 法と比較して分析感度は劣るものの、前処理の簡便さ等の面で優れており、少なくともスクリーニング試験としては十

分に優れた手法であるといえる。

3)-2 X線CTスキャン装置を用いた天然物医薬品等の迅速かつ簡便な形態鑑別の新手法検討

従来法である鏡検による生薬の内部形態観察には、前処理等を含め熟練した技術が必要である。本検討では、非破壊かつ簡便に実施可能な試験法開発を見据え、X線CTスキャン装置を用いた新規手法（以下、本法）開発を試みた。まず、形態に関する報告が多く形態観察の手法評価に有用と思われる生薬のマオウを対象とし、本法と従来法とを比較することで本法の活用可能性を検討した。次に、微小生薬であり鏡検では前処理が困難なインチンコウ及び日本薬局方で対象となる粉末生薬を検体とし、同様に検討した。その結果、いずれの検体においても両手法においてほぼ同様の特徴が認められた。本法は非破壊測定であり測定時間も劇的に短縮されたことから、従来法と比較しても優れた手法であるといえる。

In this project, we developed an advanced and rapid method for evaluating the quality characteristics of the following pharmaceuticals, which have not been evaluated at the current technological level or for which appropriate evaluation methods have not been developed or widely used, based on requests from pharmaceutical companies,

1) Development of methods to evaluate the properties of formulations using poorly soluble compounds with optimized physical properties

We have developed a non-destructive quantitative method for co-amorphous using Raman spectroscopy to develop a quantitative technique for co-amorphous in formulations, which are difficult to quantify using liquid chromatography, because co-amorphous dissociate in solution. A highly accurate calibration models have been obtained for the drug substance and the formulation using partial least squares regression.

The physical state of the drug substance within a formulation affects its quality, characteristics, and stability, therefore the need for its evaluation has long been recognized. However, a non-destructive method for such evaluation has not yet been established, and it remains a challenge in pharmaceutical development. In this study, we investigated the use of X-ray Computed Tomography (XRCT) for various measurements and evaluations of the physical properties of samples and the internal structure of formulations. We identified the XRCT imaging conditions necessary to distinguish between two components with similar electron densities, and discussed the associated challenges. Furthermore, we demonstrated that XRCT is a useful method for assessing the density of drug substances, and the physical stability of the amorphous state.

It is often difficult to obtain single crystals required for X-ray crystal structure analysis. Therefore, we investigated an appropriate method for evaluating pharmaceutical polymorphism and cocrystals using high-resolution solid-state NMR. This method showed the possibility of rapidly evaluating intra- and intermolecular crystal structures in a powder without preparing single crystals.

2) Development of advanced methods for evaluating the properties of nanoparticles

The content and physical state of the constituent components of nanoparticles, depending on the loading of drugs and surface modification, determine the physicochemical and biological properties of the particles. Therefore, nanoparticles with different particle constituents, particle sizes, and drug loading amounts were prepared and evaluated using asymmetric field-flow fractionation (AF4) and centrifugal field-flow fractionation (CF3). It was confirmed that AF4 allows for highly accurate evaluation of particle sizes, and CF3 allowed for the identification of nanoparticles with different drug loading amounts. Also, it has been revealed that monolith column chromatography using poly-Lys-modified monolith column can separate nanoparticles without destroying them. These methodologies would be useful in development research and quality control of nanomedicines.

3) Development of advanced and rapid evaluation methods for natural product drugs

We studied heavy metal test for natural product drugs such as herbal medicines using an energy dispersive X-ray fluorescence analyzer (EDX), and showed that the EDX is an excellent method for rapid and simple heavy metal measurement. In addition, since observation of the internal morphology of herbal medicines by microscopic examination requires skilled techniques, including pretreatment, we attempted to develop a new method using an XRCT scanner that is non-destructive and easy to perform. This method gives almost the same outcomes of characteristic observations as microscopic examination, and is a non-destructive measurement that dramatically shortens the measurement time, demonstrating that it is an excellent method.