

博士論文

ビーズミルを用いたコンタミレスナノ粉砕技術の開発  
に関する研究

2024

薬剤学

田中 宏典

# 目次

緒言 .....	1
第1章 pH最適化によるコンタミレスナノ粉砕技術の開発 .....	6
第1節 序論 .....	6
1. ビーズミル法における粉砕メディア選定 .....	6
2. ジルコニアビーズの課題点 .....	7
第2節 結果及び考察 .....	8
1. 分散媒体処方最適化 .....	8
2. 高分子及び界面活性剤が分散媒体のpHに及ぼす影響 .....	9
3. ジルコニアビーズのpH依存的溶解度 .....	9
4. 懸濁液のpHが薬物の粉砕効率に及ぼす影響 .....	10
5. 懸濁液のpHが金属コンタミネーションに及ぼす影響 .....	11
6. pH最適化による金属コンタミネーション低減メカニズム .....	12
第3節 小括 .....	14
第2章 ビーズミルパラメーター最適化によるコンタミレスナノ粉砕技術の開発 ..	15
第1節 序論 .....	15
1. ビーズミルパラメーターの設定 .....	15
2. 先行技術 (NanoCrystal®) について .....	17
第2節 結果及び考察 .....	18
1. ジルコニアビーズ径と周速が粉砕時間に及ぼす影響 .....	18
2. 超低速運転による薬物のビーズミル処理 .....	19
3. ジルコニアビーズ径と周速が金属コンタミネーションに及ぼす影響 .....	20
4. ビーズ充填率が粉砕時間と金属コンタミネーションに及ぼす影響 .....	22
5. 薬物濃度が生産速度及び金属コンタミネーションに及ぼす影響 .....	23
第3節 小括 .....	26
第3章 ビーズミル最適化パラメーターの適用拡大の可能性検証 .....	27
第1節 序論 .....	27
1. 薬物の物理化学的特性とビーズミルパラメーターの関係 .....	27
2. モデル薬物の物理化学的特性 .....	28
第2節 結果及び考察 .....	29
1. ビーズミル最適化パラメーターの再現性 .....	29
2. ナノ結晶粒子製剤のキャラクタリゼーション .....	30

3. ビーズミル最適化パラメーターの適用拡大の可能性検証.....	32
第3節 小括 .....	37
総括 .....	38
謝辞 .....	40
実験の部 .....	41
引用文献 .....	47

## 略語表

略語	定義	
BCS	Biopharmaceutics Classification System	生物薬剤学分類
$C_{\max}$	Maximum drug concentration	最高血中濃度
DEM	Distinct element method	離散要素法
FNB	Fenofibrate	フェノフィブラート
HPC	Hydroxypropyl cellulose	ヒドロキシプロピルセルロース
HPMC	Hydroxypropyl methyl cellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	誘導結合プラズマ質量分析
ITZ	Itraconazole	イトラコナゾール
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone	<i>N</i> -メチル-2-ピロリドン
MFA	Mefenamic acid	メフェナム酸
PHT	Phenytoin	フェニトイン
PVP	Polyvinylpyrrolidone	ポリビニルピロリドン
SEM	Scanning electron microscope	走査電子顕微鏡
SDS	Sodium dodecyl sulfate	ラウリル硫酸ナトリウム
SMX	Sulfamethoxazole	スルファメトキサゾール
$T_{\max}$	Time to maximum concentration	最高血中濃度到達時間
XRPD	X-ray powder diffraction	粉末 X 線回折

## 緒言

医薬品分野においてはハイスループット技術の進歩に伴い、優れた薬理作用を有する新規医薬品候補化合物が創製されるようになった[1]。一方で、これらの候補化合物の40-70%が難溶解性を示すことが報告されている[2]。これらの難溶解性薬物は吸収性の指標であるバイオアベイラビリティが低いことに加えて吸収のバラツキが大きく、食事の影響を受けやすい傾向がある。これらの低減、回避のためには製剤化において粘膜作用などが強い添加剤が必要となるなど、医薬品開発において課題となるケースが多い[3]。

難溶解性薬物のバイオアベイラビリティの改善研究は盛んに進められており、特に溶解性改善技術は、毒性試験時における暴露改善などを目的として医薬品開発の初期段階から適用されている。また溶解性改善技術を用いて上市された医薬品例も数多く報告されている[4]。これまでに上市に至った医薬品に適用された溶解性改善技術の例として、自己乳化型製剤[5]、固体分散体[6]、およびナノ粒子化技術[7]などが代表的である。自己乳化型製剤や固体分散体は薬物自身の溶解度を向上させることが可能である。ナノ粒子化技術はこれら溶解性改善技術のひとつであり、原薬の比表面積を増大させることによる薬物の溶解速度の改善が期待できる[8]。これらの溶解性改善技術は、経口投与後の吸収性を改善させることが可能であり、食事の影響の回避や用量低減による製剤の小型化など、患者のコンプライアンス向上にも繋がりうる有用な技術である。

その中でもナノ粒子化技術は、医薬品産業を始め近年多くの産業分野において応用されている[9]。ナノ粒子化技術を適用することで、難溶解性薬物である Danazol のラット経口投与後の吸収性を改善した事例が報告されている[10]。また近年ではナノ粒子化技術は長期作用型の懸濁性注射製剤への適用が進んでおり、難溶解性薬物 Rilpivirine のイヌ皮下投与後の吸収性を改善した例が報告されている[11]。このように、ナノ粒子化技術は経口製剤のみならず、注射製剤をはじめとする非経口投与製剤にも適用されており、現在では精神疾患や HIV 疾患領域における患者のアドヒアランス向上に対して医薬品治療に革新をもたらしている[12]。

薬物をナノ結晶粒子として加工するナノ粒子化手法は、薬物の活性の向上や機能改善など種々の目的に合わせて適切な方式が選択される (Fig. 1)。一般に、ナノ粒子化技術により得られるナノ粒子は 200-600 nm 付近のサブミクロン領域の結晶微粒子を指すことが多い[13]。このようなサブミクロン領域への粉碎手法として、Break down 法であるビーズミル[14-16]または高圧ホモジナイザー[17-19]による粒子の微粉碎方法がある。その他のナノ結晶粒子を得る方法として、晶析条件のコントロールにより微粒子結晶を得る Build up 法に位置づけられる液相法である貧溶媒析出法[20]などが挙げられる。近年ではいずれかの手法、或いはこれらの組み合わせによる手法が主流である[21,22]。

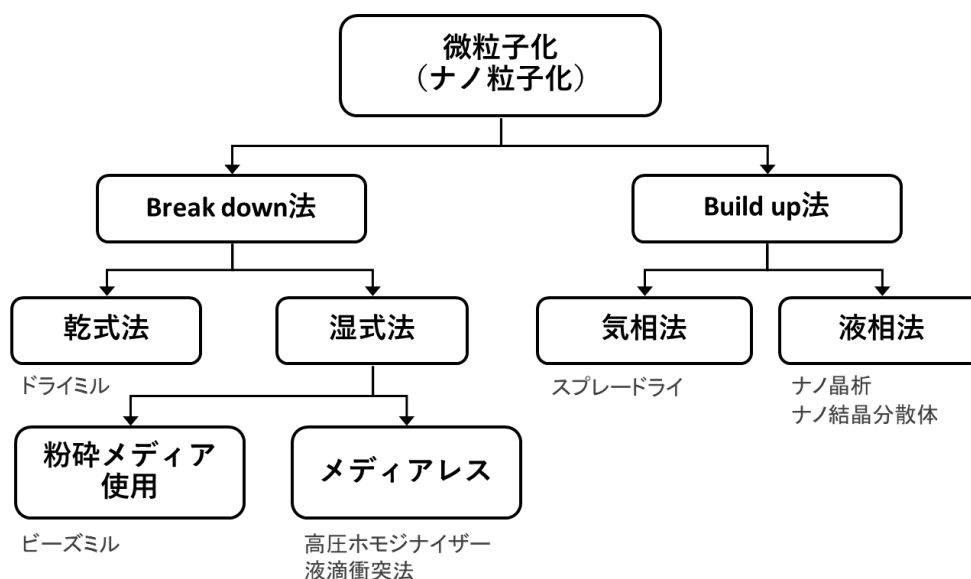


Fig. 1 Classification of technology to prepare drug nanocrystal

Break down 法の一つに位置づけられるビーズミル法は現在最も汎用されているナノ粉碎手法のひとつである[23]. ビーズミルは粉碎メディアとしてジルコニアビーズのような 0.1-1.0 mm 程度の直径を有するビーズを用いて、粉碎室内で攪拌させて生じるビーズ間の衝突力を応用して薬物を微粒化するメカノケミカルプロセスである[14,15] (Fig. 2). ビーズミル法は他の Break down 法に分類されるナノ粒子化の手法と比較して、生産性が高く、プロセス中での熱発生が少ないこと、またスケールアップ性に優れている[24].

一方で、ビーズミル法をはじめとした Break down 法によるナノ粉碎プロセスにはメカノケミカルストレス由来の金属コンタミネーションが生じ、製品中への汚染が懸念されている[25,26]. 医薬品分野におけるビーズミル法には、耐摩耗性に優れたジルコニアビーズなどの粉碎メディアが用いられることが一般的であるが、ジルコニアビーズを用いた場合でもビーズミル処理後に 100-150 nm 程度のジルコニウムの摩耗粒子が混入することが報告されている[27]. ジルコニウムの毒性は病理組織学的検討及び細胞学的評価により比較的小さいと考えられている[28]. 一方で、ジルコニウムは血液脳関門を通過する傾向があり、脳内に蓄積すること[28], 摩耗片によって引き起こされる消化管への物理的損傷のリスクなどが懸念されている[29]. 医薬品の分野においては、こういった製剤プロセス中に発生する不純物の混入は最小化し、管理する必要がある.

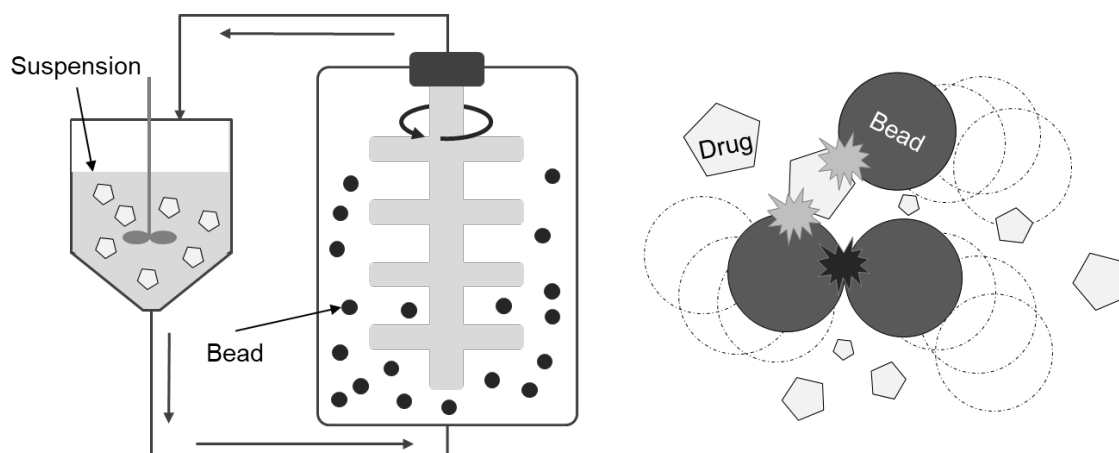


Fig. 2 Schematic diagrams of bead milling  
(left) structure of bead mill, (right) mechanism for bead milling

ビーズミル法は薬物の粉砕メカニズム上、粉砕メディアであるビーズ同士の接触あるいはビーズと装置間の接触を避けることができない。したがってビーズミルの薬物の粉砕性能と金属コンタミネーションの発生はトレードオフの関係にある。ビーズミルプロセスにおける金属コンタミネーションの発生要因について Fig.3 に示すように、プロセスパラメーター (ハード), 及びマテリアル (ソフト) の面から考察することができる。ビーズミルプロセスにおける薬物の粉砕性能は、ビーズの衝突エネルギー[30,31]と衝突頻度[32]によって決定される。したがって、プロセスパラメーターの観点から金属コンタミネーションに影響する要因を考察すると、粉砕メディアとしてのビーズの材質やサイズ、ビーズ径、およびビーズ充填率が挙げられる。特に、ビーズの繰り返し使用においては、ビーズ表面の摩耗が繰り返されることで金属コンタミネーションが増加するため、注意が必要である[33]。更に、粉砕時間が長いほど金属コンタミネーションが増加することが知られている[34]。その他、攪拌部のピンの形状など装置構造面もビーズの運動性に影響しうると考えられる。続いて、マテリアルの観点からは、粉砕対象の硬度が小さいほどビーズの摩耗が少なくなることが知られているが[35]、ビーズミルにおいてマテリアルが金属コンタミネーションに及ぼす影響に関して報告された事例は極めて少ない。しかしながら、製剤処方及び製剤特性や、薬物の物理化学的特性は、ビーズミル処理による薬物の粉砕効率に影響することが報告されており[36]、粉砕時間が金属コンタミネーションに影響することを鑑みると[35]、これらのマテリアルの側面が金属コンタミネーションに及ぼす影響も否定できない。このように、マテリアル及びプロセスパラメーターの観点から考察すると、ビーズミルより発生する金属コンタミネーションの発生要因は非常に多岐に渡ると考えられる。

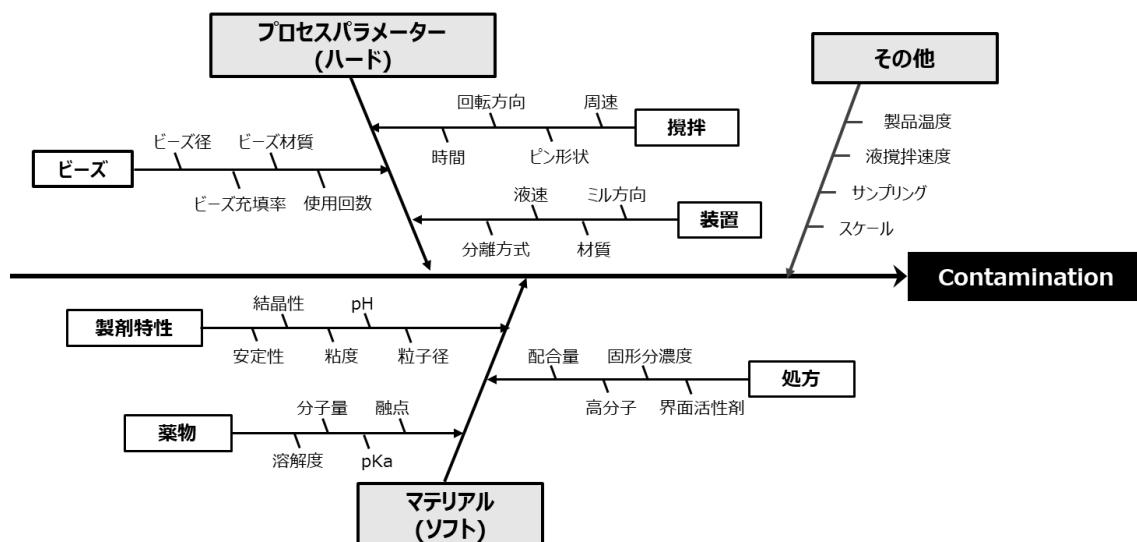


Fig. 3 Analysis diagram for metal contamination in the bead mill process

ビーズミルプロセスより発生する金属コンタミネーション低減に関する研究がいくつか報告されている[27,37]。しかしながら、従来のコンタミレス粉砕手法は、コンタミネーションを低減した一方で粉砕性能を損なうことが多く、実用性の観点から課題が残る。その中でも、Alkermes 社が保有する特許技術 NanoCrystal®は高架橋ポリスチレンビーズを粉砕メディアとしてビーズミルに適用することにより、金属コンタミネーションの低減に成功している[38]。Table 1 に示すように、現在上市されているナノ結晶医薬品の多数に NanoCrystal®技術が適用されている[25]。したがって、NanoCrystal®技術は world-leading なナノ粒子化技術として広く認知されている。NanoCrystal®技術は長年特許により保護されていた背景もあり、種々の代替技術の開発が進められてきたものの、医薬品製造に適用し、実用化に至った例は限りなく少ない[39,40]。一方で、NanoCrystal®技術は低比重とされる高架橋ポリスチレンビーズ (約 1.1 g/mL) を使用しているため、高比重のジルコニアビーズ (約 6.1 g/mL) と比較して粉砕性能の面で劣るとされている[41]。したがって、ビーズミル法の課題である金属コンタミネーションに関する研究においては未だ十分な解決策が得られておらず、医薬品の製造プロセスに適用することが困難であると考えられている。そこで本研究では、ビーズミル法の最大の課題である金属コンタミネーションを最小化した実用的なコンタミレスナノ粉砕技術を確立することを目的とした。



Table 1 Drug nanocrystal launched on the market

Brand Names	Company	Technologies	Indication	Delivery route	Launch (Year)
Rapamune	Wyeth	NanoCrystal®	Immunosuppressive	Oral	2001
Emend	Merck	NanoCrystal®	Anti-emetic	Oral	2003
TriCor	Abbott	NanoCrystal®	Hypercholesterolemia	Oral	2004
Megace ES	Par Pharmaceutical	NanoCrystal®	Appetite stimulant	Oral	2005
Triglide	Skye Pharma	IDD-P™*	Hypercholesterolemia	Oral	2005
Invega Sustenna	J & J	NanoCrystal®	Antidepressant	Parenteral	2009

\*Insoluble Drug Delivery-Microparticle (High pressure homogenization)

本博士論文は 3 章から構成される。第 1 章では、ビーズミルを用いたコンタミレスナノ粉砕技術の開発において、マテリアルからのアプローチとして製剤処方、特に薬物懸濁液の pH を最適化することで、ジルコニアビーズの溶解に起因する金属コンタミネーションの低減を試みた。第 2 章及び第 3 章では、プロセスパラメーターからのアプローチとして、ビーズミルパラメーターを最適化することで、金属コンタミネーションを最小化したコンタミレスナノ粉砕技術の開発を目指した。第 2 章では、ビーズミルパラメーターとして、周速、ビーズ径、ビーズ充填率、及び薬物濃度に着目し、生産性と金属コンタミネーションの低減を両立可能なパラメーターを設定した。第 3 章では、第 2 章で設定したビーズミル最適化パラメーターを種々のモデル薬物に適用し、本パラメーターの適用可能性を検証した。以下に得た知見を論述する。

# 第1章 pH最適化によるコンタミレスナノ粉砕技術の開発

## 第1節 序論

### 1. ビーズミル法における粉砕メディア選定

ビーズミルにおける粉砕メディアに使用されるビーズのサイズおよび形状は、使用用途によって異なるが、医薬品分野においては、均一な球形で、そのサイズは0.1-1.0 mm程度のビーズが使用される。ビーズの材質は、ガラス、プラスチック、セラミックス、金属(鉄鋼、ステンレスなど)が代表例であるが、その中でも、ジルコニアは高密度、高強度・高靱性の優れた耐摩耗性を示すことから、粉砕メディアの材質として選定されることが多い。代表的なジルコニアビーズとして、ニッカトー社製のイットリア安定化ジルコニアビーズを走査電子顕微鏡 (Scanning electron microscope, SEM) を用いて観察した結果をFig. 4に示す。このように、ジルコニアビーズは粒度分布がシャープであり、真球度が高いことを特徴としている。また、ビーズミル処理後に回収したジルコニアビーズについても SEM 観察上確認できる摩損所見もなく、耐摩耗性が高いことが確認できる。一方で、コンタミレスナノ粉砕技術として知られる NanoCrystal®技術は、粉砕メディアに高架橋ポリスチレンビーズを適用しているが[38,42]、それに対してジルコニアビーズは、高い耐摩耗性と粉砕性能を有しており、近年価格と供給面でも安定しており、比較的入手しやすいことから、医薬品分野のみならず、様々な業界でジルコニアビーズが使用されるようになってきている[9]。

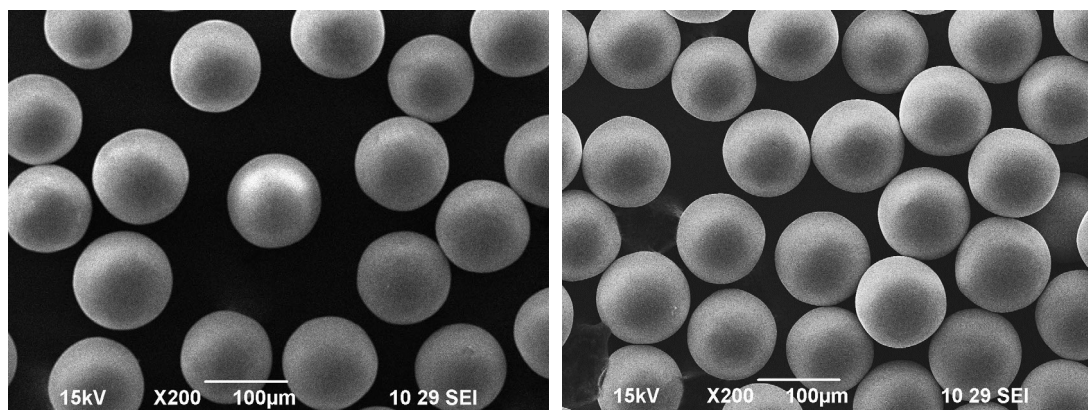


Fig. 4 SEM images of YTZ® zirconia bead (0.1 mm, Nikkato).

(Left) before bead milling, (right) after bead milling

ビーズ径の異なる複数のサプライヤーのジルコニアビーズを用いて、薬物結晶をビーズミル処理した場合に、100-500 µg/g drug のジルコニウムのコンタミネーションが確認されている[27]。このように、耐摩耗性に優れているジルコニアビーズを用いた場合でも、金属コンタミネーションを回避することはできない。そのため、粉砕メディアであるジル

コニアビーズの摩耗を軽減することを目的とした研究は複数報告されている。例えば、ジルコニアビーズの代替となる粉砕メディアとして、ドライアイス[29,43]、糖[39]、塩[40]など、最終製品にコンタミネーションしても品質に問題がないと考えられるマテリアルを用いた事例が検討されている。上記のアプローチは、ビーズミル工程で発生する金属コンタミネーションを低減、あるいは回避することが可能であるが、ジルコニアビーズより比重が著しく小さいため、粉砕効率すなわち生産性が著しく低下することが課題である。したがって、薬物の粉砕効率の維持と金属コンタミネーションの低減を両立しうるビーズミル法の開発は困難であった。

## 2. ジルコニアビーズの課題点

ジルコニアビーズはビーズミル法において一般的に使用されている粉砕メディアである。その主成分は酸化ジルコニウムであり、酸化イットリウムにより部分安定化され、焼結助剤として酸化アルミニウムが配合されたジルコニアセラミックスである[44,45]。このようなジルコニアセラミックスは、材料表面におけるマイクロクラックの原因とされる正方晶から単斜晶への相転移が、空気中よりも水中でより顕著に進行することが報告されている[46]。また、これらの酸化物は温度や pH によって腐食することが示唆されており[47,48]、低 pH 条件下ではイットリア安定化酸化ジルコニウム粉末からのイットリウムの溶解が確認されている[49]。したがって、湿式粉砕プロセスであるビーズミルプロセスにおいて、ジルコニアビーズは化学的な腐食等の影響を受けている可能性が考えられる。

そこで本研究では、上述したジルコニアビーズの課題点に着目し、薬物の分散媒体処方特性として、特に pH がジルコニアビーズに及ぼす影響に着目した。更に分散媒体処方の pH がビーズミルプロセスにおける薬物の粉砕性能、および金属コンタミネーションに及ぼす影響を検証することで、コンタミレスナノ粉砕技術を構築することを目的とした。

## 第2節 結果及び考察

### 1. 分散媒体処方最適化

実験に先立って、フェニトイン (PHT) を効率よく粉砕可能な懸濁液処方、すなわち PHT ナノ結晶懸濁液を安定に分散可能な分散媒体の処方を検討した。一般に、難溶解性薬物は水に対する濡れ性が悪いため、薬物の分散及び安定化には高分子及び界面活性剤を配合することが有効である[50]。本研究では経口投与実績のある添加剤を使用することとし、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC)、ポリビニルピロリドン (PVP) を高分子として選定した。更に界面活性剤としてラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を選定し、上述の高分子と組み合わせることで懸濁液の分散媒体処方とした。これらの分散媒体に PHT を分散させ、自転公転式ミキサーにてジルコニアビーズを用いてビーズミル処理を実施した。分散媒体処方が PHT の粒子径推移に及ぼす影響を Fig. 5 に示す。ビーズミル処理は PHT が粉砕平衡に達するまで実施した。その結果、粉砕平衡に達した PHT 粒子の粒子径は分散媒体の処方により異なっており、PVP 及び SDS を配合した場合に最も小さかった。PVP をベースとした分散媒体は他の研究グループからも報告されているが[51]、SDS と組み合わせることで、薬物粒子表面を静電作用により反発させ、ナノ粒子の凝集を抑制することが報告されている[52,53]。したがって、以後の検討では、PVP 及び SDS を配合した分散媒体を用いて検討を進めることとした。

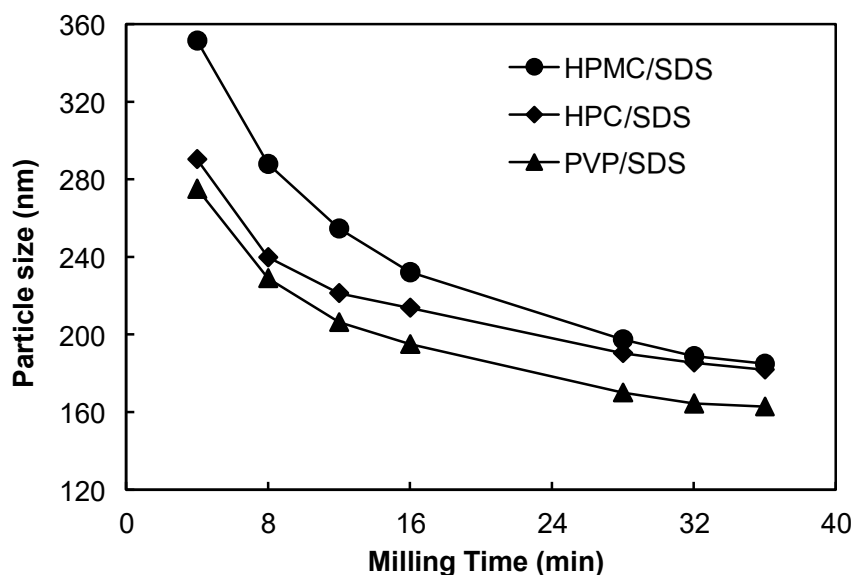


Fig. 5 Effect of polymer and surfactant on particle size of PHT

## 2. 高分子及び界面活性剤が分散媒体の pH に及ぼす影響

分散媒体の成分である各種添加剤が pH に及ぼす影響について評価した結果を Table 2 に示す。高分子は 3% (w/w), 界面活性剤は 0.25% (w/w) 配合した。精製水の pH が 6.15 であることに対して, 各種高分子を配合した場合, 分散媒体の pH は変動した。特に PVP を配合することにより, 分散媒体の pH は 3.81 となり比較的強い酸性となった。PVP は分子構造の末端にアルデヒド基を有しており[54], そのうちのいくつかは水中でカルボン酸に酸化され, 水溶液が酸性になったと考えられる。一方で, HPMC 及び HPC を加えた場合は, それぞれ若干アルカリ性及び酸性側にシフトしたが, その pH 変動幅は 1 以下であり, PVP の場合と比較して小さかった。また, 界面活性剤である SDS は分散媒体の pH に影響しなかった。したがって, PHT のビーズミル処理において最も粉碎効率がよいと考えられた分散媒体処方である PVP 及び SDS 配合処方は, その懸濁液の pH を大きく低下させ, 強い酸性となっていることが示された。

Table 2 Effect of additives on pH of the dispersion medium

Additives	- SDS	+ SDS
(-)	6.15	6.05
PVP	3.81	3.89
HPMC	6.72	6.94
HPC	5.41	5.48

## 3. ジルコニアビーズの pH 依存的溶解度

続いてジルコニアビーズの pH 依存的溶解度を評価した。ジルコニアビーズの主成分は酸化ジルコニウムであり, 酸化イットリウムにより部分安定化され, 焼結助剤として酸化アルミニウムが配合されている。各種 pH を示す試験液におけるジルコニアビーズ構成成分の溶解として, ジルコニウム, イットリウム, アルミニウム及びこれらの合計値に着目し, 誘導結合プラズマ質量分析 (Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) を用いてこれらの金属元素を定量評価した結果を Fig. 6 に示す。その結果, ジルコニアビーズを構成する主成分であるジルコニウムが最も大きい溶出を示すことが確認された。またその溶解度には pH 依存性があり, ジルコニアビーズの溶解は pH 6-8 の範囲で最小となった。酸化ジルコニウムは, 酸性及びアルカリ性条件下でその溶解性が増加することが報告されており[48], 本結果と一致するものであった。なお, イットリウム及びアルミニウムに関しても, ジルコニウムと同様の傾向を示し, その溶解は pH 6-8 の範囲で最小となった。本結果はジルコニアビーズの構成成分が媒体の pH に依存して溶解することを示しており, この溶解がビーズミル処理中に発生する金属コンタミネーションに影響しうる可能性が考えられた。更に, pH を最適な範囲として 6-8 に制御することで, ジルコニ

アビーズから発生する溶解を最小化することが可能であり、ビーズミル処理により発生する金属コンタミネーションを低減できる可能性を示唆するものであった。

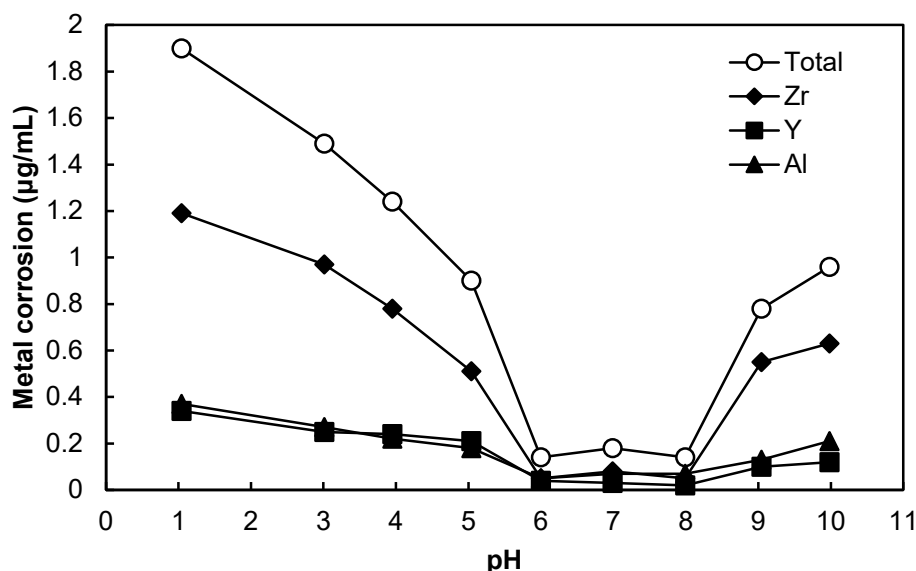


Fig. 6 pH-Dependent dissolution of zirconia beads

#### 4. 懸濁液の pH が薬物の粉碎効率に及ぼす影響

続いて、PHT 懸濁液の pH がビーズミル処理中の PHT の粒子径推移に及ぼす影響を検討した。ビーズミルとしてダイノミル (リサーチラボ型) を使用し、粉碎メディアとして 0.5 mm のジルコニアビーズを用いた。また、ビーズミル処理により発生する金属コンタミネーションを最小化する目的で、粉碎室内の攪拌器の周速は設定可能な最小値として 4 m/s に設定した。

NaOH を用いて各種 pH に調整した PHT 懸濁液をビーズミル処理し、PHT 粒子径の低下推移を評価した結果を Fig. 7 に示す。pH を調整しなかった PHT 懸濁液 (pH 3.88) を Control として、ジルコニアビーズの溶解を抑制可能な pH として、NaOH を用いて懸濁液を pH 6.67, 7.36, 8.14 に調製し検討に用いた。更に、ジルコニアビーズが溶解しうる Positive control として、PHT 懸濁液を強いアルカリ性を示す pH 10.37 に調整した。これらの pH の異なる PHT 懸濁液のビーズミル処理を行ったところ、Control (pH 3.88) と比較して、粉碎処理開始 0-30 分において若干ではあるが粒子径の低下推移に差を認めた。一方で、いずれも粉碎平衡に達したと考えられた 90 分処理後の PHT の粒子径は 0.23-0.26  $\mu\text{m}$  であり、懸濁液の pH が PHT の粒子径に及ぼす影響は認められなかった。したがって検討した pH 範囲においては、PHT 懸濁液の pH がビーズミル処理における PHT の粒度推移に及ぼす影響は非常に小さいと考えられた。

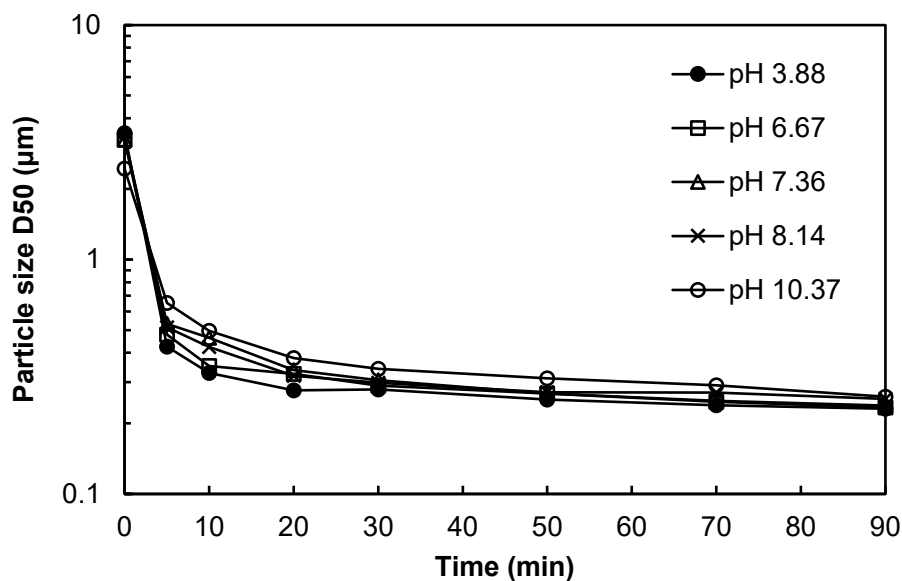


Fig. 7 Effect of pH on grinding efficiency of PHT

## 5. 懸濁液の pH が金属コンタミネーションに及ぼす影響

PHT 懸濁液の pH がビーズミル処理後の金属コンタミネーションに及ぼす影響を評価した結果を Fig. 8 に示す. 金属コンタミネーションの評価においては, 接薬部位として様々な金属元素が関与する中で, 使用したジルコニアビーズ及びビーズミル (ダイノームリサーチラボ) の粉碎室材質がジルコニアであることに着目し, 評価元素はジルコニウム, イットリウム及びアルミニウムに限定した. その結果, 金属コンタミネーションは, ジルコニウム, アルミニウム, イットリウムの順に大きく, その濃度は処理時間が長いほど大きくなる傾向にあることが確認された. 特に, 金属コンタミネーションが最も大きかったジルコニウムに着目すると, 非常に興味深いことに, Fig. 6 により示されたジルコニアビーズの溶解度が最小となる pH 範囲 (6-8) に概ね含まれる pH 6.67, 7.36 及び 8.14 に調整した場合, Control (pH 3.88) と比較して, ビーズミル処理中の金属コンタミネーションを約 3 分の 1 から 4 分の 1 程度抑制可能であった. 一方で, Positive control (pH 10.37) は Control (pH 3.88) と比較して金属コンタミネーションが約 2 倍増加した. pH 最適化により, アルミニウム及びイットリウムに関しても同様のコンタミネーション抑制効果が確認されている. したがって, Fig. 7 および Fig. 8 の結果より, pH 最適化はビーズミル処理において非常に簡便な手法でありながら, 粉碎効率を損なうことなく, 効果的に金属コンタミネーションを低減可能であることが示された.

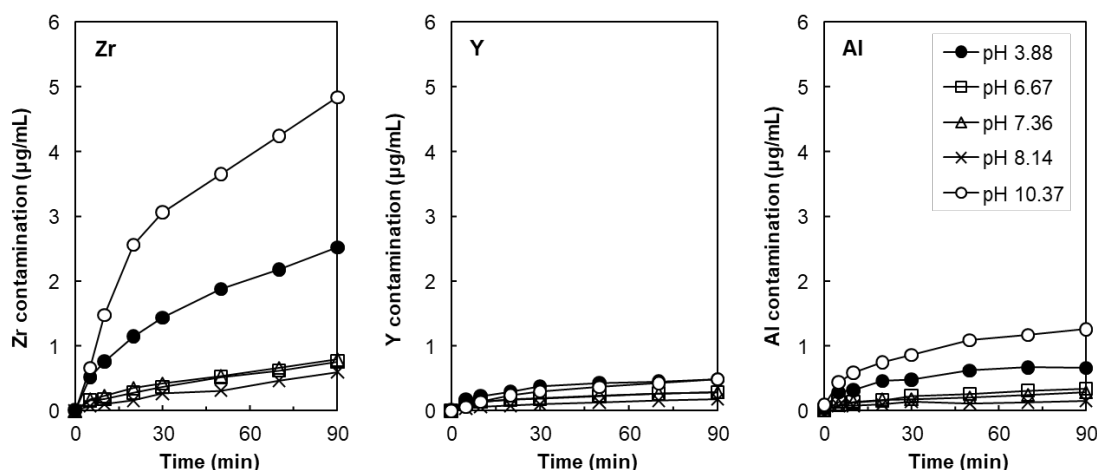


Fig. 8 Effect of pH optimization on the metal contamination in the grinding process

## 6. pH最適化による金属コンタミネーション低減メカニズム

pH最適化による金属コンタミネーション低減メカニズムを考察する上で、ビーズミルプロセスにおいて発生する金属コンタミネーションの要因として、大きく以下の二つに分類されると考えられる。

要因 (1) ジルコニアビーズおよび粉砕室部材から発生する金属溶出。

要因 (2) ビーズ間および粉砕室とビーズ間に生じる物理的衝突に起因した金属摩耗。

上記の可能性についてビーズミルを用いて検証した結果を Fig. 9 に示す。要因 (1) の可能性を検証する目的で、ビーズミルの周速は 0 m/s に設定し、ビーズ同士あるいはビーズと粉砕室の衝突が生じない条件での金属コンタミネーション (金属溶出) を評価した。要因 (2) の可能性を検証する目的で、周速を 4 m/s に設定し、金属溶出のみならずビーズ/装置摩耗の影響を加味した金属コンタミネーション (金属溶出及び金属摩耗) を評価した。

その結果、物理的衝突が発生しない条件 (周速 0 m/s) では、pH最適化により金属コンタミネーションは 0.2 μg/mL 低減した。一方で、溶解と物理的衝突を加味した場合 (周速 4 m/s), pH最適化により金属コンタミネーションは 2.3 μg/mL 低減した。つまり、ビーズミルの周速がビーズから発生する金属溶出に影響しないと仮定すると、要因 (1) に比して要因 (2) では pH最適化により約 10 倍の金属コンタミネーション低減効果が確認された。したがって、ビーズミルプロセスにおいて、pH最適化により金属元素の溶解を抑制するのみならず、ビーズの衝突に起因する摩耗により発生する金属コンタミネーションを低減可能であることが示唆された。



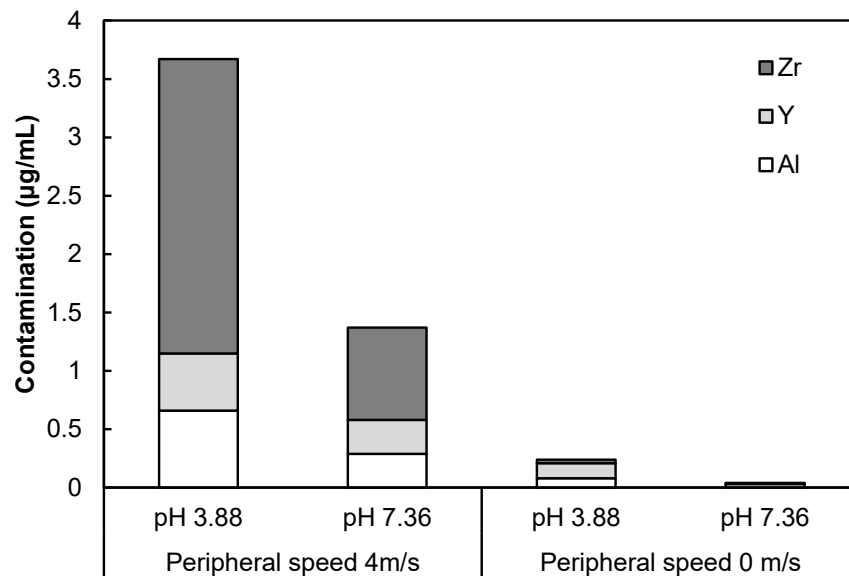


Fig. 9 Contamination reduction by pH optimization with or without physical contact among zirconia beads

酸化ジルコニウムの結合力は、配合される酸化イットリウムにより大きく変動することが報告されている[45]。また、ビーズ表面で正方晶から単方晶に相転移することでマイクロクラックが起こりうる[55]。加えて、損傷を受けたジルコニアビーズを繰り返し使用すると、その摩耗量が増加することが知られている[33]。これらの知見と、本研究により得られた結果から、金属コンタミネーションの発生メカニズムは Fig. 10 に示すように考えることができる。

まず、分散媒体中で pH などの媒体特性の影響を受けて、ジルコニアビーズの表面から金属成分が溶出する (Fig. 10 (a))。この溶出過程でビーズ表面の酸化ジルコニウムが不安定となり、かつ、マイクロクラックを生じる (Fig. 10 (b))。このように、不安定となったビーズ表面あるいはマイクロクラックを起点として、金属摩耗が発生する可能性があると考えられる (Fig. 10 (c))。したがって、pH 最適化による金属コンタミネーション低減メカニズムの一つとして、上記のようなビーズの表面溶解を起点として発生する金属コンタミネーションを pH 最適化により低減できた可能性が考えられる。

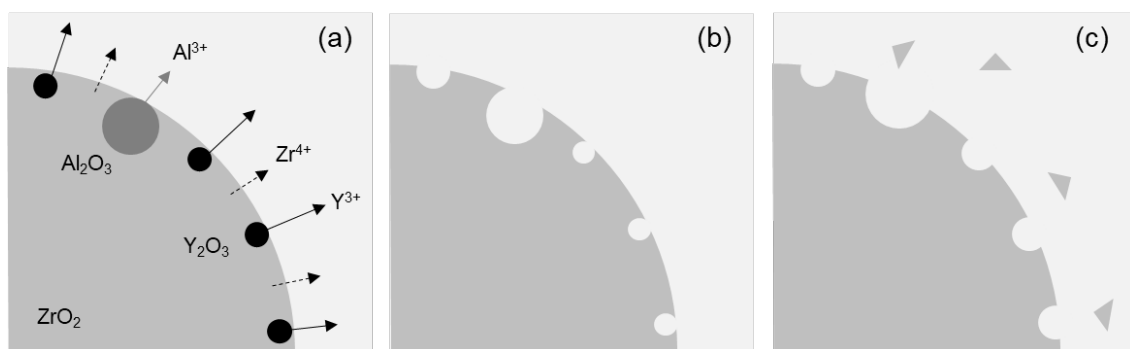


Fig. 10 Scheme of the proposed mechanism of metal contamination from zirconia beads during the bead milling process:

- (a) Dissolution of metal components of zirconia bead from the surface;
- (b) Microcracks generated on the surface, making the surface unstable;
- (c) Wear due to bead collision easily occurs as a result of the unstable surface of the zirconia bead.

### 第3節 小括

本研究では、ジルコニアビーズを用いたビーズミルプロセスにおいて発生する金属コンタミネーションを低減するために、ジルコニアビーズの pH 依存的溶解度に着目した。その結果、pH 最適化は極めて簡便な手法でありながら、ビーズミルプロセスにおいて金属コンタミネーションを非常に効果的に低減可能である上に、粉砕効率も損なわないことを見出した。また、pH 最適化による金属コンタミネーションの低減メカニズムに関して検証した結果、pH 最適化によるビーズの表面溶解の抑制が、その後に発生する金属コンタミネーションの低減に繋がった可能性を考察するに至った。本知見は、生産性の維持と金属コンタミネーションの低減を両立可能なコンタミレスナノ粉砕技術の開発において有益な情報となると考えられる。

## 第2章 ビーズミルパラメーター最適化によるコンタミレスナノ粉砕技術の開発

### 第1節 序論

#### 1. ビーズミルパラメーターの設定

本研究で使用したビーズミルであるアペックスマイル (AM-015 型) を Fig. 11 に、その内部構造を Fig. 12 に示す。ビーズミルは、ジャケット構造を有するステーター (円筒粉碎容器) の中に攪拌ローターを設置し、ビーズを分離して薬物懸濁液を装置内で循環させる目的で、ステーターの出口にビーズ分離装置 (フィルター及びスリットなど) を設置している。ステーター内部の攪拌空間を多く確保できるミル構造と強いビーズ速度勾配を形成するピン形状の攪拌ローター設計により、高効率で薬物の湿式粉砕が可能である。本装置ではビーズの分離方式として「コーンセパレータータイプ」を採用しており、ステーター底部の可動式コーン (セパレーター) が上下するスリット式ビーズ分離装置であり、ビーズを接触分離することが可能である (Fig. 13)。また、内部圧力検知システムにより、スリット詰り状態をモニタリングすることが可能であり、スリット詰りしづらく、安定したビーズミル処理が可能となっている。



Fig. 11 Apex mill (AM-015 type)

(株式会社広島メタル&マシナリー ケムテック事業部ホームページより引用)

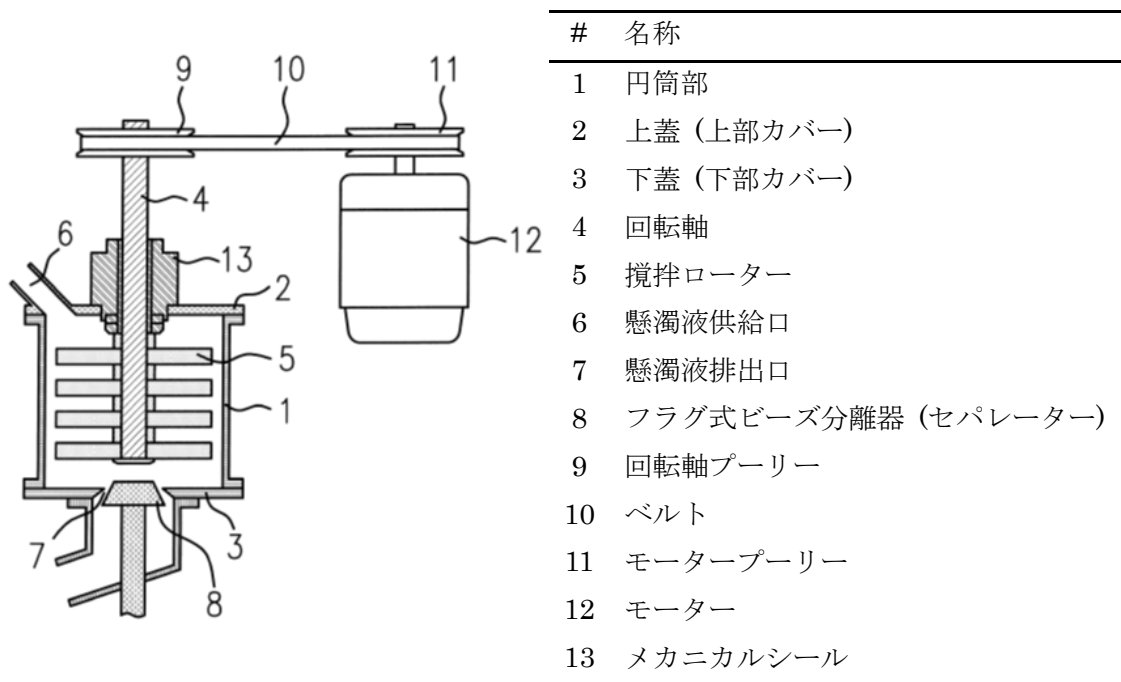


Fig. 12 Structure of AM-015 type bead mill system

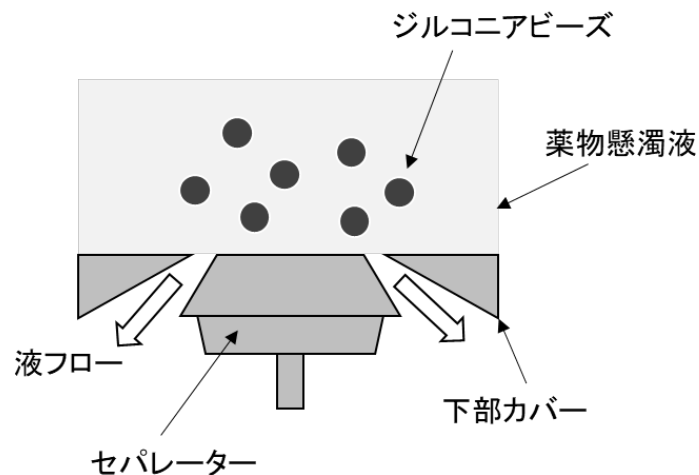


Fig. 13 Structure of beads separator for AM-015 type bead mill system

(株式会社広島メタル&マシナリー ケムテック事業部ホームページより引用改変)

ビーズミルの主な欠点は、容器内の激しい混合力によって粉砕メディアであるビーズが摩耗することである[56]。一般的に、ビーズミルにおいて発生する金属コンタミネーションに関連するプロセスパラメーターは Fig. 3 に示したように多岐に渡る。ビーズミルプロセスにおける粉砕効率は、ビーズの衝突エネルギー[30,31]と衝突頻度[32]によって決定されることから、ビーズ径、周速、ビーズ充填率を始めとしたビーズミルパラメーターは、装置条件を最適化する上で非常に重要となる[7]。特に、周速とビーズ径は粉砕プロセ

スより発生する金属コンタミネーションの発生量に大きく影響することが知られている[57]。例えば、ビーズ径が金属コンタミネーションに及ぼす影響の評価事例として、等しいビーズ充填率において、ジルコニアビーズ径を 100  $\mu\text{m}$  から 15  $\mu\text{m}$  に小さくすることで、ジルコニウムのコンタミネーションを 1400 ppm から 220 ppm まで低減可能であることが報告されている[58]。また、周速に関しては、14.7 m/s から 11.7 m/s に低下することで、ジルコニウムのコンタミネーションを低減可能であることが示されている[37]。以上のように、個々のビーズミルパラメーターが金属コンタミネーションに及ぼす影響について検証された例は存在するが、ビーズ自身が持つ衝突エネルギーと衝突頻度を加味すると、これらのパラメーターを個々に切り離して検証・考察する必要があるものの、これらを体系的に評価および報告された例はない。特に、これらの研究は主に生成されたナノ粒子の物理化学的安定性に着目してパラメーターの影響を検証しており[7]、金属コンタミネーションの低減を加味した体系的なパラメーター最適化研究は報告されていない。

## 2. 先行技術 (NanoCrystal®) について

現在、ビーズミル法を使用したナノ結晶医薬品がいくつか発売されているが、これらの製品に適用されている NanoCrystal®技術は、高架橋ポリスチレンビーズを粉砕メディアに適用したビーズミル技術として広く知られている[42]。本技術によると、粉砕機本体側から発生するとみられる重金属のコンタミネーションは薬物に対して 10  $\mu\text{g/g drug}$  以下であり、極めて高いレベルでの金属コンタミネーション抑制を可能としている[59]。このように特殊な粉砕メディアを用いた NanoCrystal®技術は特許により長年技術保護されており、代替技術が種々検討されているものの、未だ商用生産に適用された例はない。したがって、医薬品産業において NanoCrystal®技術は world-leading なビーズミル技術と位置付けられている。一方で本技術においては、樹脂由来のコンタミネーションが 1000  $\mu\text{g/g drug}$  以下であることが示されており、高架橋ポリスチレンビーズ由来と推察されるコンタミネーションの可能性が示唆される。特にナノプラスチックは海洋プラスチック汚染問題に代表されるように、生体蓄積性及び細胞毒性を示すことが報告されており[60–62]、安全性の面から懸念が残る。また、高架橋ポリスチレンビーズの価格やサプライヤーなど供給面を鑑みると、ジルコニアビーズと比較して安定しているとは言い難い状況である。

そこで本研究では、第 1 章と同様に粉砕メディアとしてジルコニアビーズを用いて、ビーズミルパラメーターが金属コンタミネーションに及ぼす影響について網羅的に検討した。「ハード面」から生産性の維持と金属コンタミネーションの低減を両立可能なパラメーターの最適解を模索し、先行技術である NanoCrystal®技術を上回るコンタミレスナノ粉砕技術の開発を目指した。

## 第2節 結果及び考察

### 1. ジルコニアビーズ径と周速が粉砕時間に及ぼす影響

本研究において、第1章と同様に分散媒体として、PVP 3% (w/w), SDS 0.25% (w/w) を配合し、モデル薬物 PHT を 5% (w/w) で懸濁して懸濁液を調製した。本研究において、PHT のビーズミル処理における目標到達粒子径は、イヌでの経口投与後の吸収改善効果が確認されている  $0.2 \mu\text{m}$  ( $D_{50}$  値) 以下とした[63]。ビーズミルパラメーターとしてジルコニアビーズの充填率を 75% (v/v) に固定し、ジルコニアビーズ径が PHT の目標粒子径に到達するまでに要する粉砕時間に及ぼす影響について各周速で評価した結果を Fig. 14 に示す。ジルコニアビーズ径が  $0.5 \text{ mm}$  の時、周速が大きいほど、PHT が  $0.2 \mu\text{m}$  ( $D_{50}$  値) 以下に到達するまでに必要な粉砕時間は短くなった。ビーズ径  $0.2 \text{ mm}$  及び  $0.3 \text{ mm}$  のジルコニアビーズを用いた場合にも同様の傾向が確認されており、周速を大きくするほど、粉砕時間を短縮可能であると考えられた。加えて、周速を  $4\text{--}8 \text{ m/s}$  としたとき、ジルコニアビーズ径が小さいほど、処理時間が短縮することが確認された。周速を  $2 \text{ m/s}$  に設定した際には、ビーズ径が  $0.2\text{--}1.0 \text{ mm}$  の範囲でビーズ径が小さくなると、処理時間が短縮する傾向が確認された。一方で、周速  $2 \text{ m/s}$  において  $0.1 \text{ mm}$  のジルコニアビーズを用いた場合、 $0.2 \text{ mm}$  の場合と比較して処理時間が延長する傾向を示した。これは、周速が非常に小さいことに加えて、ジルコニアビーズ 1 個当たりの質量が小さいために、ジルコニアビーズの衝突エネルギーが極端に小さくなったためと考えられる。

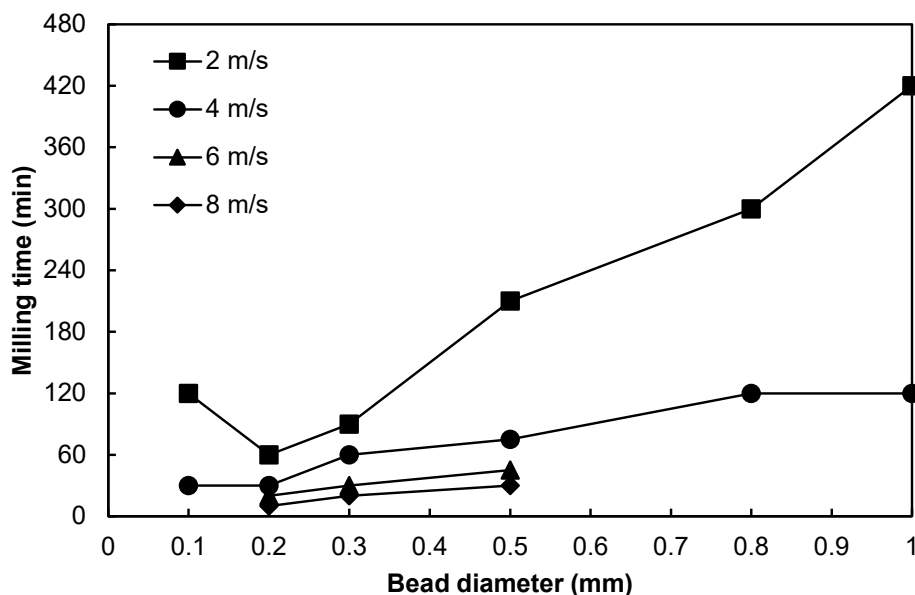


Fig. 14 Effect of bead diameter on milling time required for grinding to  $0.2 \mu\text{m}$  at each rotation speed in the grinding process. Drug concentration and bead filling rate were set to 5% (w/w) and 75% (v/v) in bead milling, respectively.

## 2. 超低速運転による薬物のビーズミル処理

本研究において、周速 4 m/s 以下の超低速運転にも関わらず、PHT を 0.2  $\mu\text{m}$  (D50 値) 以下まで粉碎可能であったことは特筆すべき点である。近年では、医薬品業界においては水平タイプのビーズミルは操作性が良いことに加えて、ビーズの偏りが少なく起動トルクが小さいため大型化にも対応しやすい利点があり、主流となっている[7]。また、一般的な周速は 5-15 m/s であることが知られている[64]。これは、水平タイプのビーズミルの場合、周速が小さいとジルコニアビーズにかかる自重により、粉碎室内でジルコニアビーズが偏り、均一に攪拌できないことで、薬物がビーズミル処理されずに粉碎室を通過するショートパスが起きうるためと考えられる。一方で、本研究で使用したアペックスミルは垂直方向のビーズミルである。そのため、ジルコニアビーズが自重によってベッセル下方で密の状態となっており、薬物の粉碎に必要なとされる粉碎エネルギーが維持でき、ショートパスも生じないと考えられる (Fig. 15)。

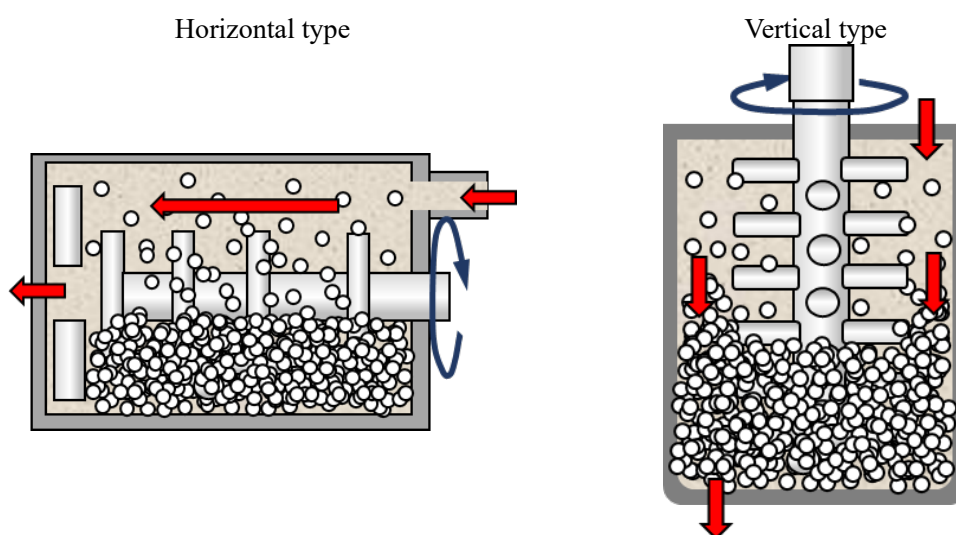


Fig. 15 Schematic diagram of the effect of bead mill direction on processing

アペックスミルの粉碎室内部を観察できるように粉碎室材質をアクリルとし、水を赤色に着色し、各周速にて運転した時の粉碎室内のジルコニアビーズの挙動を目視確認した結果を Fig. 16 に示す。その結果、0 m/s ではジルコニアビーズが全く流動していない様子が確認できる一方で、4 m/s 及び 8 m/s においては粉碎室内でジルコニアビーズが均一に流動している様子が確認された。また、2 m/s においては粉碎室内で均一性はないものの、ジルコニアビーズが自重によってベッセル下方で密の状態となっており、薬物の粉碎に必要なとされる粉碎エネルギーが維持できていると考えられる。したがって、垂直方向のビーズミルであるアペックスミルを用いたことで、周速 4 m/s 以下の超低速運転であっても PHT をナノ粉碎することが可能であったと考えられる。

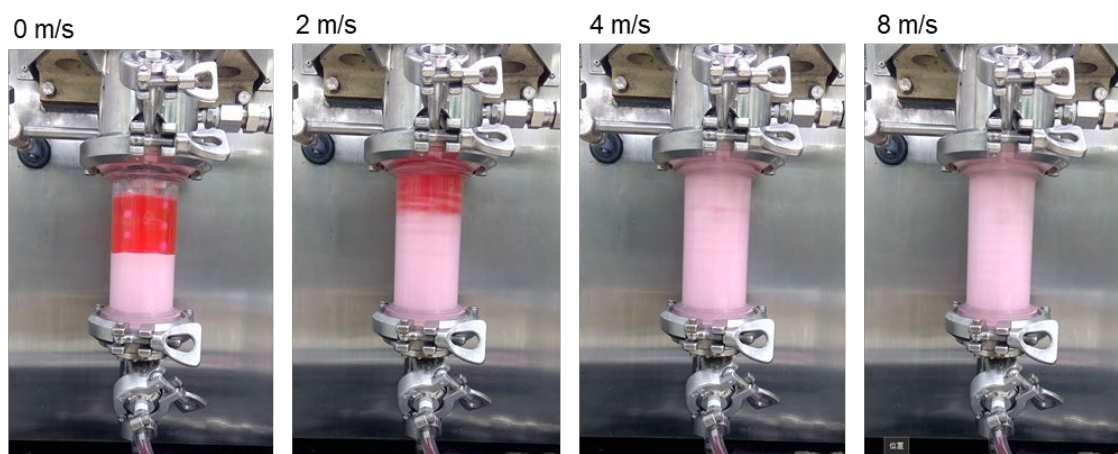


Fig. 16 Effect of rotation speed on zirconia beads behavior in milling chamber

また周速がビーズミル処理後の製品 (PHT 懸濁液) 温度に及ぼす影響を評価した結果を Fig. 17 に示す。その結果、周速が小さいほど、ビーズミル処理後の製品温度が低くなることが示された。特に、周速 2 m/s 以下の超低速運転の場合は製品温度を 10°C 以下に制御可能であった。このことから、超低速運転におけるビーズミル処理は従来困難と考えられていた低融点化合物のナノ粉砕が可能であると考えられた。

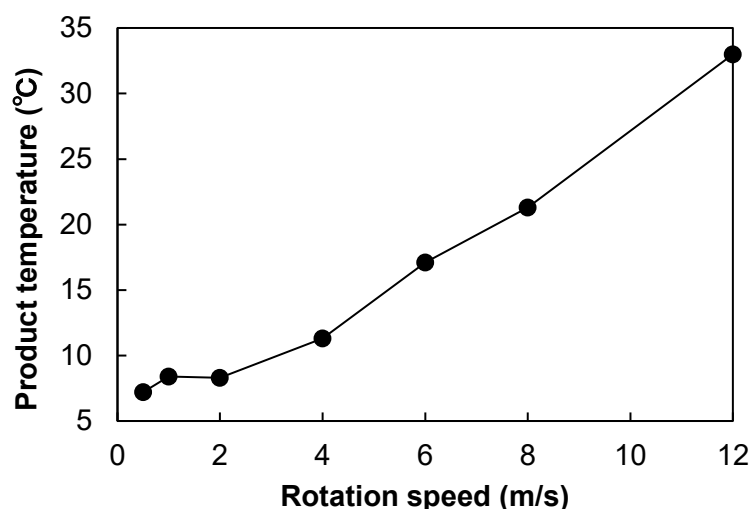


Fig. 17 Effect of rotation speed on product temperature in bead milling process. Drug concentration, bead diameter and bead filling rate were set to 5% (w/w), 0.3 mm and 75% (v/v) in bead milling, respectively.

### 3. ジルコニアビーズ径と周速が金属コンタミネーションに及ぼす影響

本研究で使用したアペックスミルの粉砕室内の円筒部材はジルコニア強化アルミナ (ZTA) であり、粉砕メディアとしてイットリア安定化ジルコニアビーズを使用している。したがって、金属コンタミネーションとして発生しうる金属元素として、ジルコニウム、



イットリウム、及びアルミニウムに着目した。ジルコニアビーズ径がこれらの金属コンタミネーションに及ぼす影響について、周速毎に検討した結果を Fig. 18 に示す。ビーズ径 0.5 mm においては、周速が 8 m/s の場合に、金属コンタミネーションは最大 46.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示し、周速が 2 m/s の場合に最小値 2.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示した。周速 2 m/s の時、0.1 mm を除くすべてのビーズ径において、金属コンタミネーションは最小化した。この結果は、周速が小さいほど金属コンタミネーションを低減可能であることを示唆するものであった。また、いずれの周速においても、ビーズ径が 0.3 mm の時に金属コンタミネーションが最小となっており、特に、周速 2 m/s、ビーズ径 0.3 mm の時に、検証した全ての試験条件の中で金属コンタミネーションが最小値を示した。

ビーズ径が 0.3 mm の時、金属コンタミネーションが最小となったことについては、Fig. 14 を加味すると以下のように考えることができる。ビーズ径が大きいとビーズの持つ衝突エネルギーが大きくなり、粉砕時間が短縮したものの、衝突エネルギーが大きすぎて金属コンタミネーションが増加したと考えられる。逆に、0.1 mm のようにビーズ径が小さいと衝突エネルギーが小さくなり、粉砕に要する時間が延長した結果、ビーズ同士の衝突機会が増加し、金属コンタミネーションが増加したと考えられる。すなわち、ジルコニアビーズ径がビーズの衝突エネルギーと衝突頻度のバランスに及ぼす影響が重要であると考えられる。これに加えて、ビーズ径は充填密度 (空隙率) 及びビーズの比表面積にも影響しうる。ビーズ径が 0.3 mm の時に金属コンタミネーションが最小となったメカニズムの解明においては、今後更なる研究が必要であるが、離散要素法 (Distinct Element Method, DEM[65,66]) 等による粒子シミュレーションなどを用いて解析して考察することが有効であると考えられる。

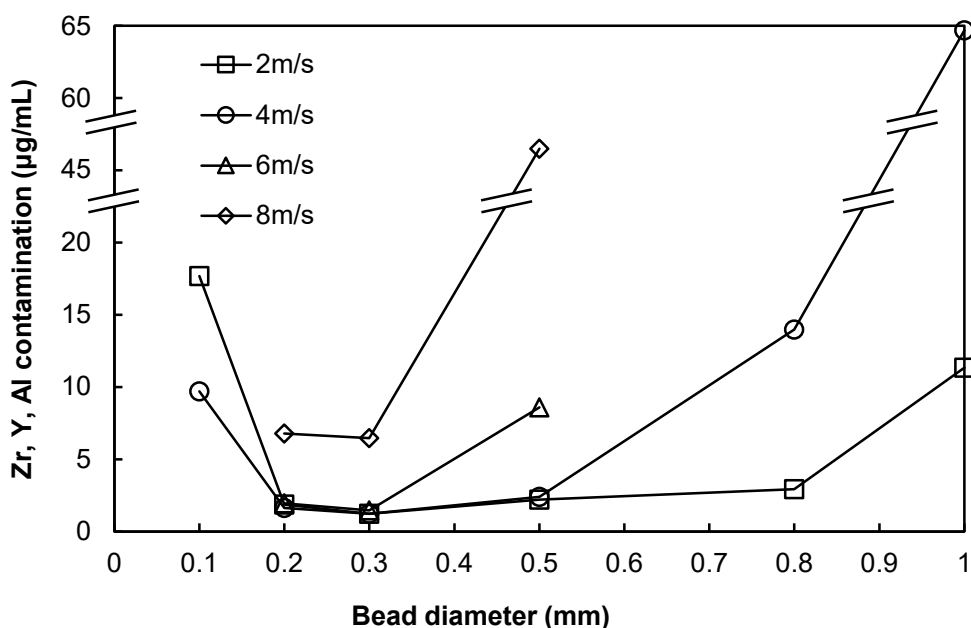


Fig. 18 Effect of bead diameter on the metal contamination at each rotation speed in the grinding process. Drug concentration and bead filling rate were set to 5% (w/w) and 75% (v/v) in bead milling, respectively.

#### 4. ビーズ充填率が粉砕時間と金属コンタミネーションに及ぼす影響

続いて、ビーズ径を 0.3 mm、周速を 2 m/s に固定し、ビーズ充填率が粉砕時間と金属コンタミネーションに及ぼす影響を評価した結果を Fig. 19 に示す。ビーズ充填率が 25% (v/v) の時、ジルコニウム、イットリウム、及びアルミニウムを合計した金属コンタミネーションは 0.66 µg/mL であり、検討したビーズ充填率の範囲で最小であったが、PHT 粒子が 0.2 µm (D50 値) に到達するまでの処理時間が最も長く 600 分を要した。一方で、ビーズ充填率が 90% (v/v) の時、処理時間が最も短い 90 分であったが、金属コンタミネーションは 2.08 µg/mL であり最大となった。実生産スケールでの処理時間を考慮し、目標とする粉砕時間を 120 分以内と想定すると、これを満足するビーズ充填率は 75% (v/v) 及び 90% (v/v) であった。この時の金属コンタミネーションはそれぞれ 1.24 及び 2.08 µg/mL であり、ビーズ充填率 75% (v/v) の方が 90% (v/v) の場合と比較して、金属コンタミネーションが 40.9%程度小さかった。

したがって、Fig. 18 および Fig. 19 の結果より、生産性と金属コンタミネーション低減を両立可能なビーズミル最適化パラメーターとして、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s、ビーズ充填率 75% (v/v) を見出した。

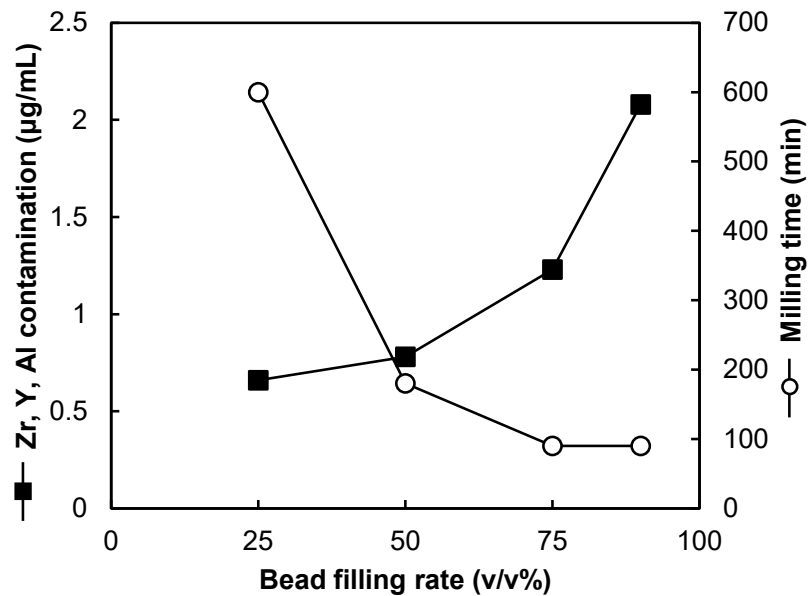


Fig. 19 Effect of bead filling rate on the metal contamination and milling time required for grinding to 0.2 µm in the grinding process. Drug concentration, rotation speed, and bead diameter were set to 5% (w/w), 2 m/s and 0.3 mm in bead milling, respectively.

## 5. 薬物濃度が生産速度及び金属コンタミネーションに及ぼす影響

ビーズミル最適化パラメーター (ビーズ径 0.3 mm, 周速 2 m/s, ビーズ充填率 75% (v/v)) 適用時に, 処理速度を改善するために懸濁液中の薬物配合量を増加させることを目的に, 薬物濃度が薬物の粒子径推移に及ぼす影響について検討した. その結果を Fig. 20 に示す. また, PHT 懸濁液の調製直後, 及びビーズミル処理後の PHT 懸濁液の粘度測定結果を Table 3 に示す. その結果, 5% (w/w) から 50% (w/w) の範囲で PHT 濃度を増加させても粉砕効率には大きく影響しないことが確認された (Fig. 20). PHT 懸濁液の粘度に関して, PHT 濃度を 50% (w/w) まで増加させても 89 mPa·s であったが, PHT 濃度を大きくすると, ビーズミル処理後の PHT 懸濁液の粘度が増加する傾向にあり, 特に PHT 濃度 50% (w/w) の場合, 懸濁液の粘度が 28800 mPa·s まで増加した (Table 3). その結果, 粉砕室圧力が著しく増大したことで装置を安定的に運転できなかつたため, 本検討処方において安定的にビーズミルを運転するための薬物濃度の上限は約 40% (w/w) 程度と推察された.

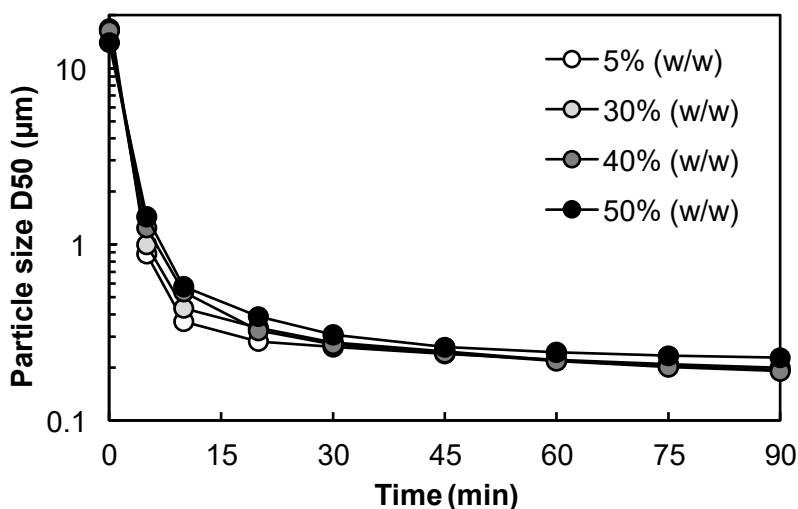


Fig. 20 Effect of drug concentration on grinding efficiency of PHT

Table 3 Effect of drug concentration on viscosity of PHT suspension

Drug conc. [% (w/w)]	Viscosity (mPa·s)	
	Before milling	After milling
5	7	7
30	27	24
40	68	208
50	89	28800

続いて、目標粒子径である  $0.2 \mu\text{m}$  (D50 値) 以下に到達するために必要な処理時間から PHT の処理速度を算出し、PHT 濃度が処理速度に及ぼす影響を検討した結果を Table 4 に示す。PHT 濃度 5-40% (w/w) の範囲において、 $0.2 \mu\text{m}$  (D50 値) 以下に到達するために必要な処理時間に差を認めず、いずれも 90 分であった。このことから、PHT の処理速度 (g/h) を算出すると、PHT 濃度が 5% (w/w) の時の処理速度 (g/h) は 17 g/h であった一方で、薬物濃度を 30-40% (w/w) に設定することで、処理速度 (g/h) はそれぞれ劇的に改善し、100, 133 g/h を示した。他のグループの研究において、生産スケール (1.5-3.0 kg) で 20% ナプロキセン懸濁液を処理した際の処理速度が 66-133 g/h であったことから[33]、本結果は生産スケールに適用可能な実用的な生産性を示すと考えられた。

Table 4 Effect of drug concentration on production rate

Drug conc. [% (w/w)]	Particle size distribution		Milling time (min)	Production rate (g/h)
	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )		
5	0.1998	0.2732	90	17
30	0.1941	0.2576	90	100
40	0.1907	0.2534	90	133

また、ビーズミル処理後の製剤中の金属コンタミネーションを評価した結果を Table 5 に示す。その結果、PHT 濃度を 5% (w/w) とした PHT 懸濁液のビーズミル処理後の製剤中の合計した金属コンタミネーションは 1.24  $\mu\text{g/mL}$  であり、PHT あたりの金属コンタミネーションに換算すると 24.31  $\mu\text{g/g drug}$  であった。PHT 濃度を 30% (w/w) 及び 40% (w/w) に増加させると、懸濁液あたりの金属コンタミネーションはそれぞれ 1.29  $\mu\text{g/mL}$  及び 1.38  $\mu\text{g/mL}$  であり、PHT 濃度 5% (w/w) の場合と比較して僅かに増加するに留まった。よって、PHT 濃度を 30% (w/w) 及び 40% (w/w) に設定した場合の、PHT 単位重量あたりに換算した金属コンタミネーションは、それぞれ 4.02  $\mu\text{g/g drug}$  および 3.14  $\mu\text{g/g drug}$  であった。これらの値は NanoCrystal<sup>®</sup>技術に関連する特許に記載されている管理参考値 (< 10  $\mu\text{g/g drug}$ ) を下回る金属コンタミネーションであった[59]。

Table 5 Effect of drug concentration on metal contamination during the grinding process.

Drug conc. [% (w/w)]	Contamination				
	Zr ( $\mu\text{g/mL}$ )	Y ( $\mu\text{g/mL}$ )	Al ( $\mu\text{g/mL}$ )	Total	
				( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/g drug}$ )
5	0.65	0.35	0.24	1.24	24.31
30	0.77	0.32	0.20	1.29	4.02
40	0.84	0.33	0.21	1.38	3.14

PHT 濃度を増加させても懸濁液中の金属コンタミネーションが増加しなかった理由としては以下が考えられる。一般に、ビーズの摩耗は粉砕対象の硬度が小さいほど少なくなる[35]。また、医薬品に用いられる主な有機化合物はジルコニアビーズの硬度と比較して約 10 倍小さい[67,68]。よって、ジルコニアビーズに対する PHT の硬度が小さいため、PHT 粒子の数が増加しても PHT 粒子から受ける摩耗の影響は軽微であったと考えられる。したがって、懸濁液中の PHT 濃度は金属コンタミネーションに影響しなかったと考えられ、結果として薬物当たりの金属コンタミネーションが劇的に小さくなったと推察され

る。本技術においては粉砕メディアとしてジルコニアビーズを用いているため、NanoCrystal®技術で利用される高架橋ポリスチレンビーズのような特殊なビーズを使用せず汎用性が高い。加えて、樹脂ビーズ由来のコンタミネーションも発生しないため、先行技術を上回るレベルでのコンタミネーション管理が可能であると考えられる。

### 第3節 小括

本研究では、粉砕メディアとしてジルコニアビーズを用いて、ビーズミル法の課題である金属コンタミネーションを低減させるために、ビーズミルの粉砕パラメーター（ビーズ径、周速、及び充填率）を最適化した。縦型のビーズミルを用いることで超低速運転での薬物のナノ粉砕を可能とし、金属コンタミネーションを最小化させる上では、ビーズミルの粉砕パラメーターのうち、ビーズ径に最適値があることを見出し、処理時間及び金属コンタミネーションに及ぼす影響を評価した上で粉砕パラメーターを最適化した（ビーズ径 0.3 mm, 周速 2 m/s, ビーズ充填率 75% (v/v)）。加えて懸濁液中の薬物濃度を検討した結果、薬物濃度によって薬物の処理時間及び金属コンタミネーションに及ぼす影響が小さいことを明らかとし、先行技術に匹敵する高い生産性と金属コンタミネーション低減を両立したコンタミレス粉砕技術を開発した。本知見はビーズミルを用いたコンタミレス粉砕技術の生産プロセスの開発において、プロセスパラメーターを設定、考察する上で重要な知見のひとつであると考えられる。

### 第3章 ビーズミル最適化パラメーターの適用拡大の可能性検証

#### 第1節 序論

##### 1. 薬物の物理化学的特性とビーズミルパラメーターの関係

ナノ粒子化技術により粒子径をサブミクロン領域まで微粉碎することで、溶解速度を改善することにより吸収性の改善が期待できる。これまでに様々な難溶性薬物に対して、基礎研究あるいは商用生産にてナノ粒子化技術が適用されている[69,70]。薬物は一般的に吸収性に大きく影響を及ぼす溶解性及び膜透過性に基づき、BCS (Biopharmaceutics Classification System) 分類がなされる (Fig. 21)。例えば、難溶性薬物として高膜透過性かつ難溶性として BCS class 2 に分類される PHT にナノ粒子化技術を適用することでラット経口投与後の  $C_{max}$  が約 4.6 倍上昇し、 $T_{max}$  は約 1/3 に短くなることが報告されている[63]。このように、ナノ粒子化は特に低溶解性に分類される BCS class 2 あるいは 4 の薬物に有効であるとされている。ナノ粒子化による吸収改善は、分配係数が大きく、融点が高く、高用量となるような薬物に有効である[71]。このことから、薬物の物理化学的特性を把握することはナノ粒子化による溶解改善アプローチにおいて重要となる。

第2章において、ビーズミルパラメーターとして、周速、ビーズ径、およびビーズ充填率に着目してビーズミルパラメーターの最適化を試みた結果、生産性と金属コンタミネーション低減を両立可能なビーズミル最適化パラメーターとして、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s、ビーズ充填率 75% (v/v) を設定した[72]。しかし、ナノ粒子化において薬物の物理化学的特性とビーズミルプロセスにおけるこれらの重要パラメーターとの関係は未だ体系的に解明されていない[73]。ビーズミル最適化パラメーターは、第2章にて PHT に対して最適化されたため、PHT 以外の難溶性薬物への適用可能性が不明であった。

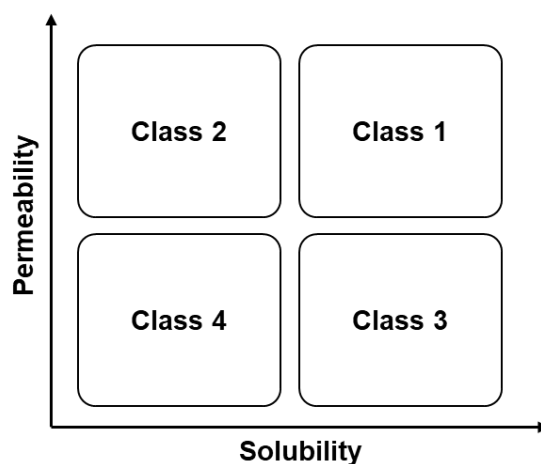


Fig. 21 BCS (Biopharmaceutics Classification System)

## 2. モデル薬物の物理化学的特性

本研究ではビーズミル最適化パラメーターの適用可能性を検証することを目的として、難溶解性モデル薬物として、メフェナム酸 (MFA)、イトラコナゾール (ITZ)、フェノフィブラート (FNB) 及びスルファメトキサゾール (SMX) を選定した。これらの難溶解性モデル薬物の化学構造を Fig. 22 に、物理化学的特性を Table 6 にまとめた。MFA, ITZ, 及び FNB は PHT 同様に BCS class 2 に分類される難溶解性薬物である[74,75]。特に, ITZ は食事の影響を受けることが報告されており, ナノ粒子化技術により食事の影響を回避する試みがなされている[76]。

特に, 分子量が大きく, 溶解度が小さく, 融点が高い薬物は, その化合物の表面エネルギーに応じた安定化剤を配合することで, ナノ結晶粒子として安定化可能であることが報告されている[77]。このことから, ナノ結晶粒子を得る上で, 分子量, 溶解度及び融点の影響が大きいと考える, これらの物理化学的特性について幅広い数値を示す薬物を選定した。また, 更なる物性把握のため, 薬物の粒子径及び薬物懸濁液の pH を評価した。特に FNB は低融点薬物 (融点: 83°C) であることから, ジルコニアビーズの衝突などにより発生する摩擦熱により一部プロセス中で融解あるいは分解するリスクがあると考えられている[78]。

そこで第 3 章では, これらのモデル薬物に対してビーズミル最適化パラメーターを適用し, 粒子径低下推移及び金属コンタミネーションを確認することで, ビーズミル最適化パラメーターの適用可能性を検証することとした。

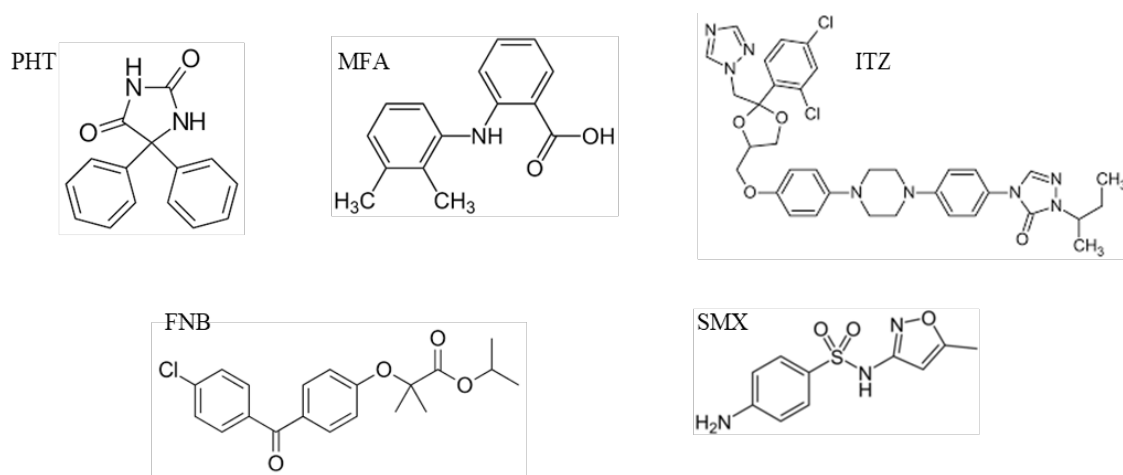


Fig. 22 Chemical structure of model drug compounds



Table 6 The physicochemical properties of poorly water-soluble drugs

Drug	MW (g/mol) <sup>1</sup>	Tm (°C) <sup>1</sup>	Cs (µg/mL) <sup>2</sup>	Intact particle size (µm) <sup>3</sup>		Suspension pH <sup>4</sup>
				D50	D90	
PHT	252.27	295	37.8	20.06	30.56	4.17
MFA	241.29	230	36.2	12.88	23.37	4.14
ITZ	705.65	168	0.00964	15.83	73.11	4.61
FNB	360.84	83	0.42	32.84	60.21	4.05
SMX	253.28	168	610	16.12	28.10	4.13

<sup>1</sup> The MW and Tm were obtained from the International Journal of Pharmaceutics 538 (2018) 243–249.

<sup>2</sup> The Cs (water solubility) was obtained from PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 第 2 節 結果及び考察

### 1. ビーズミル最適化パラメーターの再現性

第 2 章では、金属コンタミネーションを最小化可能なビーズミルパラメーターとして、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s、ビーズ充填率 75% (v/v) を設定した。適用可能性の検証に先立って、本最適化パラメーターの繰り返し再現性を確認する目的で、5% (w/w) の PHT 懸濁液に対して同一の操作を 3 回繰り返し、PHT の粒子径推移及び金属コンタミネーションを評価した結果を Fig. 23 及び Table 7 に示す。PHT の粒子径 (D50 及び D90) は処理完了 105 分まで経時的に小さくなり、粉砕平衡に達したと考えられた (Fig. 23)。ビーズミル処理による粒子径の低下推移及び目標粒子径である 0.2 µm (D50 値) 以下に到達した時点での粒子径は、3 回の試験間で非常に類似していた。ビーズミル処理完了後の D50 及び D90 の標準偏差はそれぞれ 0.0011 及び 0.0065 µm であり、ばらつきも小さかった。多分散指数として算出した Span 値は 0.57-0.62 であり、いずれもシャープな粒度分布を示していることが確認された。

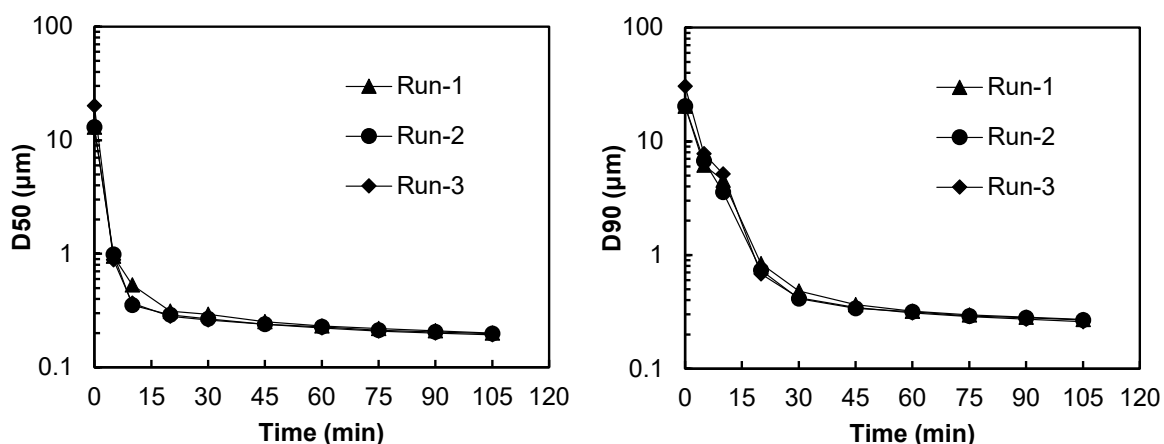


Fig. 23 The particle size transition of the PHT as a function of the bead-milling time (n = 3). D50 (left) and D90 (right). Bead milling was carried out for process validation.

更に、目標粒子径である  $0.2 \mu\text{m}$  (D50 値) 以下に到達した時点での PHT 懸濁液中の金属コンタミネーションを評価した (Table 7). 金属コンタミネーションは  $1.20\text{-}1.38 \mu\text{g/mL}$  であり、標準偏差が  $0.08 \mu\text{g/mL}$  であったことから、3 回の試験間で大きな差を認めなかった。一般的に、ビーズミルプロセスは再現性が高いことが知られており [42]、これらの結果により、最適化したビーズミルパラメーターは薬物粒子径の低下推移及び薬物懸濁液中の金属コンタミネーションについて再現性があることが示された。

Table 7 The particle size and metal contamination at the target particle size during the process validation using PHT (n = 3).

	Particle size distribution				Contaminant concentration			
	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )	Span	Zr ( $\mu\text{g/mL}$ )	Y ( $\mu\text{g/mL}$ )	Al ( $\mu\text{g/mL}$ )	Total ( $\mu\text{g/mL}$ )
Run-1	0.1451	0.1972	0.2575	0.57	0.86	0.39	0.13	1.38
Run-2	0.1453	0.1976	0.2680	0.62	0.69	0.31	0.20	1.20
Run-3	0.1491	0.1998	0.2732	0.62	0.64	0.35	0.24	1.23
Average	0.1465	0.1982	0.2662	0.60	0.73	0.35	0.19	1.27
SD	0.0018	0.0011	0.0065	0.02	0.09	0.03	0.05	0.08

## 2. ナノ結晶粒子製剤のキャラクタリゼーション

続いて、最適化したビーズミルパラメーターにより得られた 5% (w/w) の PHT ナノ結晶粒子の溶出性を確認する目的で、ビーズミル処理前後の PHT 懸濁液の溶出試験を実施した (Fig. 24A). 併せて、ビーズミル処理前後に得られた 5% (w/w) の PHT 懸濁液の粒度分布を Fig. 24B に示した。ビーズミル処理後の PHT 懸濁液 (D50 =  $0.1998 \mu\text{m}$ ) は処理前

(D50 = 20.06  $\mu\text{m}$ ) と比較して、試験開始 5 分時点での溶出率が約 2 倍大きい結果であり、その後試験終了まで維持した (Fig. 24A). この結果は、Baumgartner らの報告と同様の結果であった[79]. 更に、ビーズミル処理後の PHT 懸濁液を 5°C で 3 年間保管した後の粒度分布を確認した結果、粒度分布の著しい変化を認めなかった (Fig. 24B). したがって、最適化したビーズミルパラメーターにより得られた PHT 懸濁液は物理的に安定であり、かつ、溶出速度を改善可能であることが確認された. 以上の結果より、2 章で設定したビーズミル最適化パラメーター (ビーズ径 0.3 mm, 周速 2 m/s, ビーズ充填率 75% (v/v)) は、再現性が高く、粉碎後の PHT ナノ結晶懸濁液は溶出改善効果と高い物理的安定性を有することが示された.

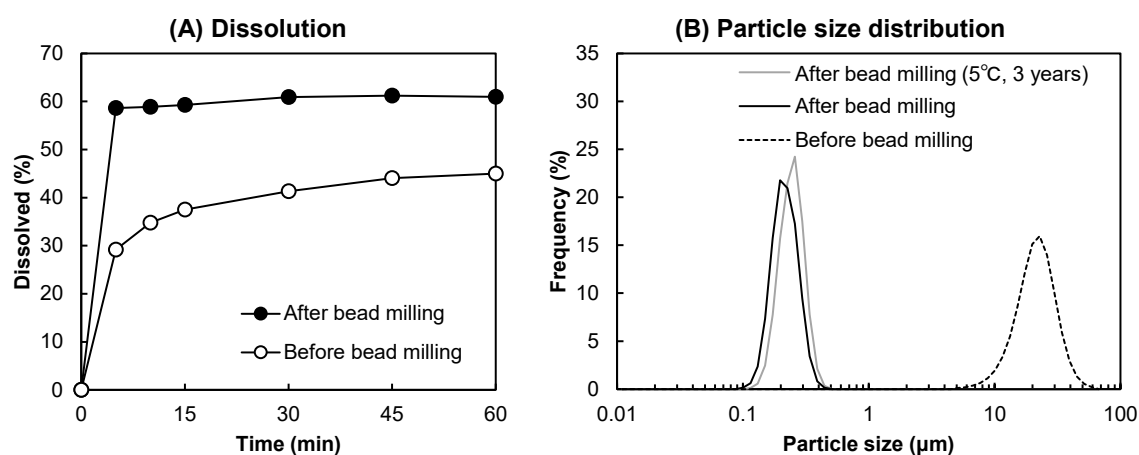


Fig. 24 Dissolution of the PHT suspension as a function of time (A) and the particle size distribution of the PHT suspension before and after bead milling (B).

続いて、5% (w/w) の PHT 懸濁液についてビーズミル処理前後での PHT の結晶形を確認した. 粉末 X 線回折 (X-ray powder diffraction, XRPD) を使用して薬物の結晶形を分析するため、PHT ナノ結晶懸濁液を乾燥させてサンプルとした. しかしながら、乾燥させたサンプル中には PHT に加えて、PVP や SDS などの高分子及び界面活性剤が約 40%含まれており、PHT の XRD スペクトルへの影響が大きいため正確な分析を実施できなかった. この知見はメチルセルロース懸濁液中の PHT を使用した Takatsuka らの研究結果と一致していた[80]. そこで PHT 濃度を 40% (w/w) まで増加させることで、PVP や SDS などの高分子及び界面活性剤の影響を低減して、懸濁液中の PHT の結晶形を確認することとした. 40% (w/w) の PHT 懸濁液のビーズミル処理前後の結晶形を XRPD により評価した結果を Fig. 25 に示す. その結果、PHT の結晶形はビーズミル処理の前後で大きく変化しないことが確認された.

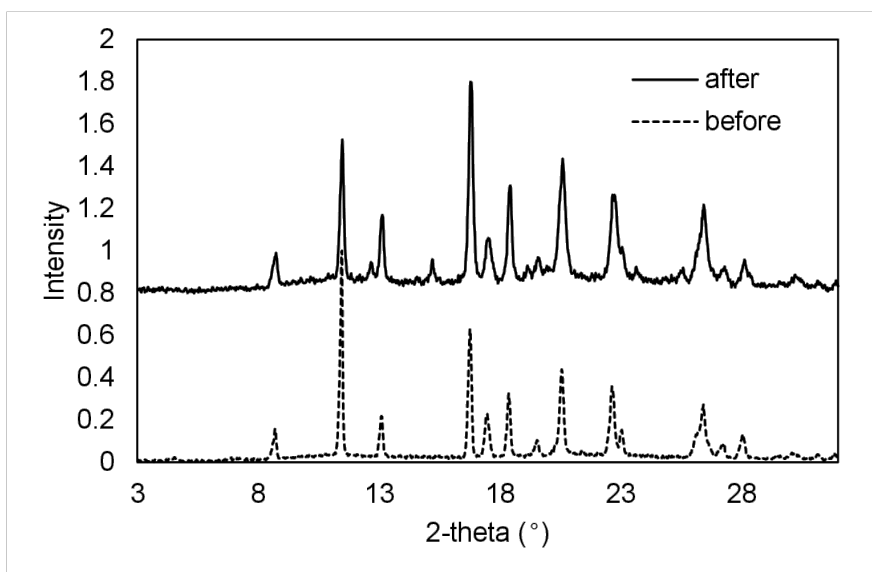


Fig. 25 XRPD of dried PHT suspension (40% (w/w)) before and after bead milling

### 3. ビーズミル最適化パラメーターの適用拡大の可能性検証

ビーズミル最適化パラメーターを種々のモデル薬物に適用し、粒子径低下推移を評価した結果を Fig. 26 に示す。それぞれの薬物濃度は 5% (w/w) として懸濁液を調製した。目標粒子径である 0.2  $\mu\text{m}$  (D50 値) 以下に到達した時点での粒子径及び、処理時間については Table 8 に示した。本実験においては、薬物間の差を確認する目的で 360 分までビーズミル処理を行うこととした。ビーズミル最適化パラメーターを適用した結果、いずれのモデル薬物においても処理開始 60 分以内に粒子径は大きく低下し、その後粉砕平衡に達する傾向が確認された (Fig. 26)。目標粒子径に到達するまでに必要とした処理時間は、PHT が 90 分、MFA が 90 分、ITZ が 150 分、FNB が 210 分、SMX が 270 分であり、薬物によって処理時間が異なった。多分散指数として算出した Span 値は 0.62-0.73 であり、最適化パラメーターにより調製されたいずれの薬物ナノ結晶もシャープな粒度分布を示していることが確認された (Table 8)。特に、低融点化合物である FNB をビーズミル処理によりナノ結晶粒子として得ることができており、これは、本最適化パラメーターは超低速運転を採用していることから、Fig. 17 に示した通り、製品温度の上昇が極めて小さかったためであると考えられる。

ビーズミル処理において、高分子と界面活性剤 SDS の組み合わせにより薬物粒子径を効果的に小さくできることが報告されている[81]。本検討では高分子 PVP に界面活性剤 SDS を組み合わせることで処方していることから、いずれの難溶解性薬物に対しても濡れ性を改善し、静電的なメカニズムを介してナノ結晶粒子を安定化できたことで、複数のモデル薬物に対してナノ粉砕可能であったと考えられる。

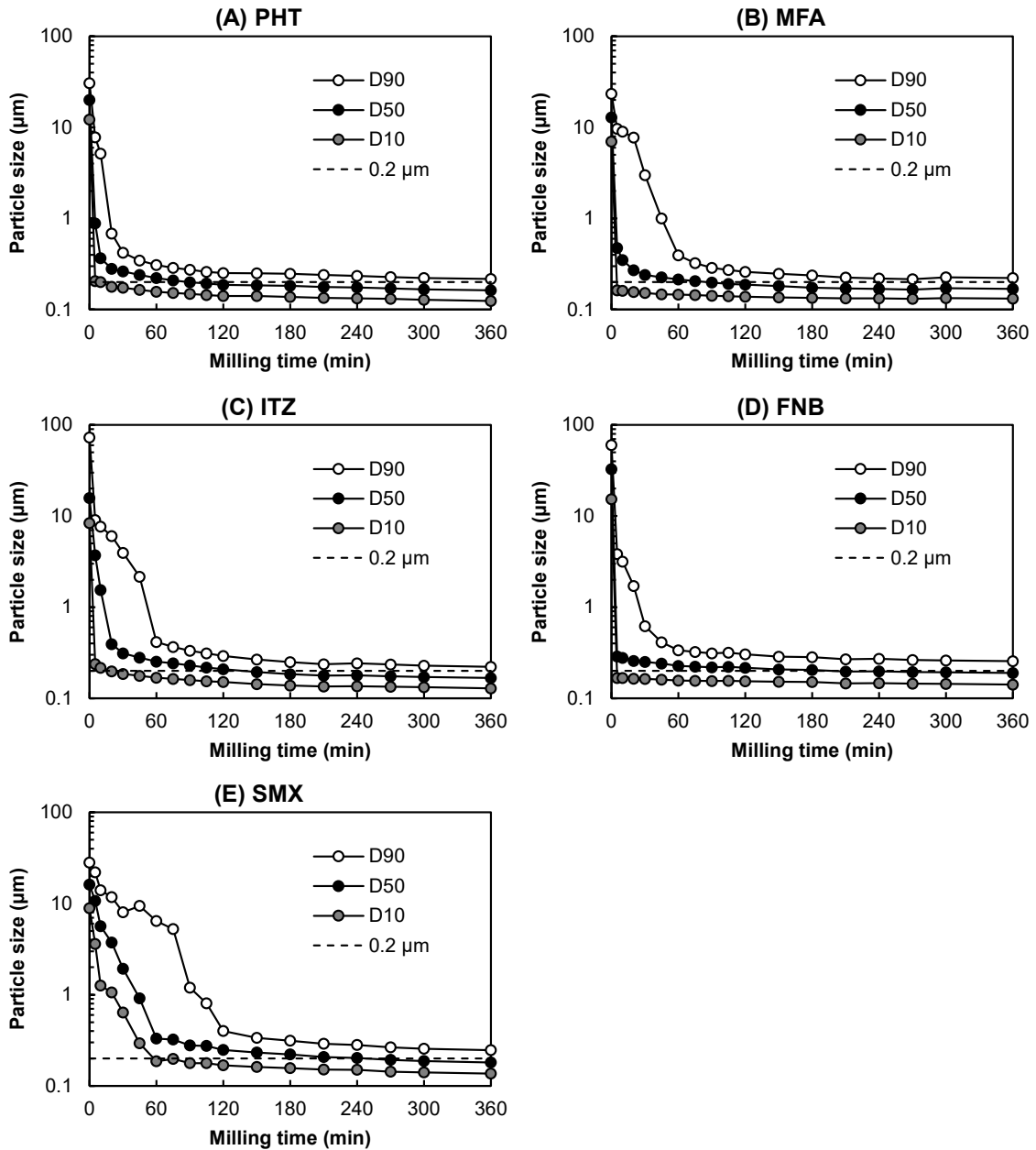


Fig. 26 The particle size transition of (A) PHT, (B) MFA, (C) ITZ, (D) FNB, and (E) SMX as a function of the bead-milling time.

また、各薬物が目標粒子径である  $0.2\ \mu\text{m}$  (D50 値) 以下に到達するまでに必要な時間と相関しうる物理化学的特性を考察したところ、薬物初期粒子径などは該当しないと考えられた一方で、融点の高い薬物ほど、目標粒子径に到達するまでに必要な時間が短い可能性が示唆された (Fig. 27). 薬物の融点が高いほど、ナノ結晶懸濁液としての安定性が良い可能性が示唆されていることを加味すると[83], 薬物の融点とナノ粉碎の進みやすさには関連がある可能性がある。SMX に関しては上記の傾向から外れていると推察されるが、薬物自身の大きな溶解度が、ビーズミル処理中あるいは湿式粒度分布測定時のナノ結晶

粒子の存在状態に影響した可能性が考えられる。薬物の融点とナノ粉碎の進みやすさの関係性を明らかにするためには、ヤング率やビッカース強度など、薬物の機械的特性も加味した評価結果と併せて考察する必要があるため、今後の検討課題であると考えられる。

Table 8 Particle size distribution and metal contamination after bead milling with the optimized parameters.

Time point	Milling parameters	Drug	Milling time (min)	Particle size distribution				Contaminant concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			
				D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )	Span	Zr	Y	Al	Total
Target particle size (<0.2 $\mu\text{m}$ )	Not optimized <sup>1</sup>	PHT	120	0.1504	0.1990	0.2693	0.60	10.17	0.87	2.93	13.97
		PHT	90	0.1491	0.1998	0.2732	0.62	0.64	0.35	0.24	1.23
	Optimized <sup>2</sup>	MFA	90	0.1419	0.1979	0.2864	0.73	0.71	0.29	0.26	1.26
		ITZ	150	0.1428	0.1932	0.2664	0.64	0.35	0.35	0.36	1.06
		FNB	210	0.1454	0.1955	0.2677	0.63	0.79	0.30	0.26	1.35
		SMX	270	0.1437	0.1931	0.2655	0.63	0.98	0.32	0.24	1.54
End of bead milling	Optimized <sup>2</sup>	PHT	360	0.1241	0.1627	0.2168	0.57	1.48	0.39	0.30	2.17
		MFA	360	0.1321	0.1686	0.2214	0.53	2.08	0.43	0.35	2.86
		ITZ	360	0.1283	0.1664	0.2208	0.56	0.64	0.42	0.41	1.47
		FNB	360	0.1415	0.1887	0.2553	0.60	1.20	0.35	0.34	1.89
		SMX	360	0.1369	0.1810	0.2463	0.60	1.12	0.32	0.24	1.68

<sup>1</sup> The rotation speed, bead-filling rate, and bead diameter were set to 4 m/s, 75% (v/v), and 0.8 mm, respectively.

<sup>2</sup> The rotation speed, bead-filling rate, and bead diameter were set to 2 m/s, 75% (v/v), and 0.3 mm, respectively.

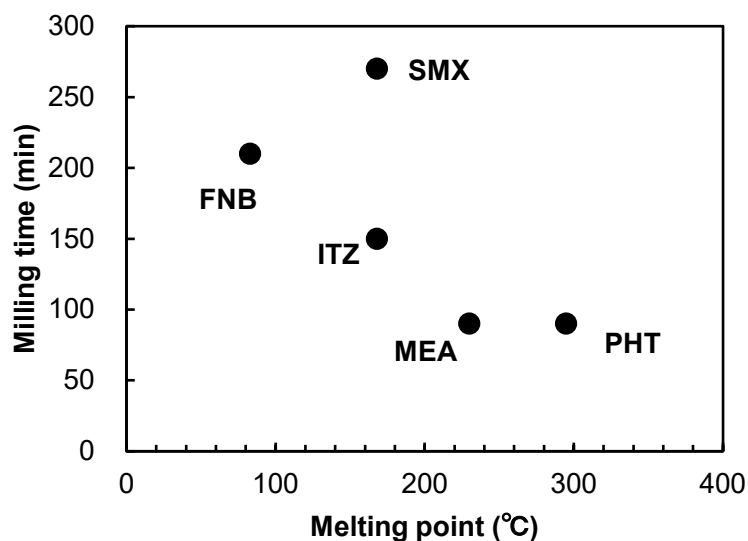


Fig. 27 Correlation between melting point and milling time

更に、最適化パラメーターを用いて得た  $0.2 \mu\text{m}$  (D50 値) の各種モデル薬物のナノ結晶懸濁液中の金属コンタミネーションを評価した結果を Table 8 に示す。評価した金属元素種の中でも最も金属コンタミネーションが多かった Zr に着目すると、パラメーターを最適化していない場合、PHT の目標粒子径到達後 (120 min) の金属コンタミネーションは  $10.17 \mu\text{g/mL}$  であった。一方で、粉碎パラメーターを最適化することにより、PHT 懸濁液 (90 min) 中の Zr の金属コンタミネーションは  $0.64 \mu\text{g/mL}$  まで低減可能であった。したがって、ビーズミルパラメーターを最適化することにより、金属コンタミネーションを約 10-20 倍程度抑制可能であることが示された。その他の薬物については、SMX (270 min) で最大  $0.98 \mu\text{g/mL}$ 、ITZ (150 min) で最小  $0.35 \mu\text{g/mL}$  を示した。樹脂ビーズを用いて同様の処理をした場合に発生する Zr のコンタミネーションが  $0.7 \mu\text{g/mL}$  であることが報告されていることを考慮すると[84]、本研究で最適化したパラメーターは、ジルコニアビーズを適用しているにも関わらず、金属コンタミネーションを極めて低いレベルで抑制可能であることが示された。更に、NanoCrystal®技術で用いられるような樹脂ビーズからの樹脂コンタミネーションも発生しない点は特筆すべき点である。

続いて、粉碎終点 (360 分) における PHT 懸濁液中の金属コンタミネーションは  $2.17 \mu\text{g/mL}$  であった。その他の薬物の場合は、ITZ が最小値  $1.47 \mu\text{g/mL}$  となり、MFA が最大値  $2.86 \mu\text{g/mL}$  を示した (Table 8)。したがって、ビーズミル処理時間が同一であるにも関わらず、薬物間で金属コンタミネーションに差を認めた。この結果は、薬物あるいは懸濁液の物理化学的特性がビーズミル処理後の金属コンタミネーションに影響しうることを示唆するものであった。第 1 章において、薬物懸濁液の pH が中性域に近い方がジルコニアビーズの溶解を抑制し、それに起因する金属コンタミネーションを低減可能であることを示した[85]。Table 6 に示した物理化学的特性と ITZ が弱塩基性薬物であることを加



味すると、検討した薬物の中で ITZ 懸濁液の pH は 4.61 を示しており、その他の薬物懸濁液 (4.05-4.17) よりも中性に近い pH であった。したがって、ITZ 懸濁液中でのジルコニアビーズからの金属溶出が他のモデル薬物を用いた場合よりも小さくなったと考えられ、その結果、ITZ 懸濁液のビーズミル処理後の金属コンタミネーションが最小になったと考えられる。

### 第 3 節 小括

本研究では、第 2 章にて最適化したビーズミルパラメーター (ビーズ径 0.3 mm, 周速 2 m/s, ビーズ充填率 75% (v/v)) を複数の難溶解性モデル薬物に適用した結果、幅広い物理化学的特性を示す難溶解性薬物への適用が可能であることが示された。また、モデル薬物の物理化学的特性と粉碎効率と金属コンタミネーションの関係性について一部示唆する結果を得たが、薬物の機械的特性を踏まえたより詳細な物性研究が必要であると考えられた。本研究により得られた知見は、ビーズミルにジルコニアビーズを粉碎メディアとして用いたコンタミレスナノ粉碎技術の生産プロセスの設計において、ビーズミルパラメーターを設定および考察する上で重要な知見のひとつであると考えられる。

## 総括

本研究は、ビーズミル法のマテリアル (ソフト) 及びプロセスパラメーター (ハード) の両面からアプローチし、生産性と金属コンタミネーションの低減を両立した実用性の高いコンタミレスナノ粉砕技術を見出した。

### 第1章

本研究では、ジルコニアビーズを用いたビーズミルプロセスにおいて発生する金属コンタミネーションを低減するために、ジルコニアビーズの pH 依存的溶解度に着目した。その結果、pH 最適化は極めて簡便な手法でありながら、ビーズミルプロセスにおいて金属コンタミネーションを非常に効果的に低減可能である上に、粉砕効率も損なわないことを見出した。また、pH 最適化による金属コンタミネーションの低減メカニズムに関して検証した結果、pH 最適化によるビーズの表面溶解の抑制が、その後に発生する金属コンタミネーションの低減に繋がった可能性を考察するに至った。

### 第2章

本研究では、ジルコニアビーズを用いて、ビーズミル法の課題である金属コンタミネーションを低減させるために、ビーズミルの粉砕パラメーター (ビーズ径、周速、及び充填率) を最適化した。本研究では、縦型のビーズミルを用いることで超低速運転での薬物のナノ粉砕を可能とした。金属コンタミネーションを最小化させる上では、ビーズミルの粉砕パラメーターのうち、ビーズ径に最適値があることを見出し、処理時間及び金属コンタミネーションに及ぼす影響を評価した上で粉砕パラメーターを最適化した (ビーズ径 0.3 mm, 周速 2 m/s, ビーズ充填率 75% (v/v))。加えて懸濁液中の薬物濃度を検討した結果、薬物濃度によって薬物の処理時間及び金属コンタミネーションに及ぼす影響が小さいことを明らかとし、先行技術に匹敵する高い生産性と金属コンタミネーション低減を両立したコンタミレス粉砕技術を開発した。

### 第3章

本研究では、第2章にて最適化したビーズミルパラメーター (ビーズ径 0.3 mm, 周速 2 m/s, ビーズ充填率 75% (v/v)) を複数の難溶解性モデル薬物に適用した結果、幅広い物理化学的特性を示す難溶解性薬物への適用が可能であることが示された。また、モデル薬物の物理化学的特性と粉砕効率と金属コンタミネーションの関連について一部示唆する結果を得たが、薬物の機械的特性 (ヤング率、ビッカース強度など) を踏まえた、より詳細な物性研究が必要であると考えられた。

本研究で見出したビーズミルを用いたコンタミレスナノ粉砕技術は、経口投与後の経口吸収性の改善のみならず、品質管理がより厳しい非経口投与経路への適用が可能であ

る。特に近年ではナノ粒子化技術は懸濁性注射製剤への適用などが進められており、服薬アドヒアランスに革新をもたらしている。本研究で示した知見が今後ナノ結晶粒子を用いた医薬品開発において新たな付加価値を生み出し、患者や医療現場のニーズに貢献できれば幸いである。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に関して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました神戸薬科大学 薬剤学講座 大河原賢一教授に衷心より甚大なる謝意を表します。

本研究論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました神戸薬科大学 薬剤学講座 坂根稔康教授、機能性分子化学講座 田中将史教授に衷心より感謝いたします。

また、本研究に携わられた塩野義製薬株式会社 研究本部 製剤研究所及び株式会社広島メタル&マシナリー ケムテック事業部の研究員の皆様に厚く御礼申し上げます。

特に、本研究ならびに私の学位取得に際し、快く御支援頂きました塩野義製薬株式会社 研究本部 製剤研究所 創剤研究領域長 諸戸康志氏に深甚なる謝意を表します。諸戸康志氏には本共同研究に際してサイエンス面でも、それ以外の面でも一貫して的確な御指導、御鞭撻を頂き、未熟な私の進む道をいつも正して下さいました。

また、本研究の遂行にあたり、御懇篤なる御指導、御鞭撻ならびに有益なる御助言、御支援を賜りました塩野義製薬株式会社 研究本部 製剤研究所 創剤研究領域 創剤技術研究 1 サブグループ長 落井裕也氏に深甚なる謝意を表します。落井裕也氏には日頃からサイエンス面で活発な議論をして頂き、本研究のブレイクスルーとなった ICP-MS 分析法の設定をはじめ、分析面では特に多大な御指導を賜りました。

本研究の遂行にあたり、有益なるご助言と御指導を賜りました株式会社広島メタル&マシナリー ケムテック事業部 フェロー 茨城哲治氏及び次長 平田大介氏に心より感謝致します。茨城哲治氏には実験計画、実施から考察に渡り、力強くご支援頂き、特に知的財産に関して多大な御指導を賜りました。平田大介氏には、日頃から実験結果を通じて活発な議論をして頂き、装置条件を設定する上で特に多大な御指導を賜りました。

最後に、これまで著者を育て、支えてくれた父 敏勝、母 久美子に感謝するとともに、本研究に専念できるように終始支えてくれた妻 亜希子、娘 葉月に心から感謝致します。

## 実験の部

### 第1章

#### 【1】試薬・機器

難溶解性薬物 PHT は静岡カフェイン工業社から購入した。PVP (K-25) 及び SDS は BASF 社から購入した。HPMC (TC-5E) は信越化学工業社から購入した。HPC (SSL) は日本曹達社から購入した。ジルコニアビーズはニッカトー社より購入し、ビーズミル検討においては新品を都度使用した。

#### 【2】PHT 懸濁液の処方設計

PHT 懸濁液の調製は、1% (w/w) の各種高分子と 0.1% (w/w) の SDS を精製水に溶解させた分散媒体を用いて、PHT を 5% (w/w) の濃度で懸濁させた。調製した懸濁液を 2 mL, 500  $\mu\text{m}$  直径のジルコニアビーズを 4 g ジルコニア製容器に秤取した。これを、自転公転式粉碎機 (NP-100, シンキー社製) を用いて、回転数 2000 rpm, 4 分間, 5°C の温度設定条件下で粉碎処理を実施した。同条件を 9 回繰り返して、合計 36 分間の処理を行った。チャンバー内の温度が 4-7°C に維持されていることを確認した。粒度分布は Zetasizer Nano (Malvern Panalytical 社製) を用いて動的光散乱法により評価した。分析に際して、懸濁液は PHT の濃度が 0.4 mg/mL となるように希釈し、PHT 粒子の屈折率は 1.61, 測定溶媒として用いた精製水は 1.33 とした。

#### 【3】ジルコニアビーズの pH 依存的溶解度試験

pH 1 の試験液は 0.1N HCl を用いて調製した。pH 3-5 の緩衝液は 100 mM のクエン酸緩衝液を用いて調製した。pH 6-8 の緩衝液は 100 mM のリン酸緩衝液を用いて調製した。pH 9 及び 10 の緩衝液は 100 mM の炭酸緩衝液を用いて調製した。500  $\mu\text{m}$  直径のジルコニアビーズ 9.25g をメタルフリーチューブ (50 mL Metal Free Centrifuge Tubes, Labcon 社) に秤取し、各 pH の緩衝液を 5 mL 添加して 5 回転倒混和を行った後に、25°C の保管庫内で 24 時間静置した。更に 5 回転倒混和した後に、上清を採取し、サンプルとした。

#### 【4】pH を制御した湿式ビーズミル処理

PHT 懸濁液の調製は、3% (w/w) の PVP と 0.25% (w/w) の SDS を精製水に溶解させた分散媒体を用いて、PHT を 5% (w/w) の濃度で懸濁させ 150 g の懸濁液を調製した。pH 調整のために、1N NaOH を目標とする pH になるまで滴下した。pH 調整後は、90 分間スターラー攪拌した後に、100 g の懸濁液を湿式ビーズミル処理に用いた。湿式ビーズミルには、ダイノミルリサーチラボ (Willy A. Bachofen AG 社製) を使用し、粉碎室体積に対して、70% (v/v) の 500  $\mu\text{m}$  直径ジルコニアビーズを投入した。アクセレレーター (粉碎室内の攪拌羽根) の回転数は 4 m/s に設定し、90 分間処理を行った。粉碎処理はバッチ循環

方式にて実施した。また、粉碎チャンバーは、冷却装置 (BH-302, ヤマト科学社製) を接続し、冷却水を循環させることで、冷却を行った。粒度分布は UPA150(日機装社製) を用いて動的光散乱法により評価した。分析に際して、懸濁液は PHT の濃度が 0.4 mg/mL となるように希釈し、PHT 粒子の屈折率は 1.61、測定溶媒として用いた精製水は 1.33 とした。

#### 【5】懸濁液中の金属コンタミネーションの定量

誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 装置 (iCAPQ, サーモフィッシャー社) を用いて、サンプル中の各金属含有量を測定し、懸濁液又はモデル化合物に対する濃度 (重量 ppm) を評価した。なお、本定量において金属コンタミネーションは溶解と摩耗により発生した濃度として定量し、予めサンプリング位置の影響を受けないことを確認した上で試験法を設定した。本定量結果は、単位体積当たりの金属コンタミネーション量で示した。

標準溶液の調製：メタルフリー容器 (50 mL Metal Free Centrifuge Tubes, Labcon 社) に各元素標準液 100  $\mu$ L を正確に加え、*N*-メチル-2-ピロリドン (NMP)/HCl/HNO<sub>3</sub> (90:5:5) で 20 mL にメスアップして標準溶液原液とした。Co 標準液 100  $\mu$ L を正確に加え、NMP/HCl/HNO<sub>3</sub> (90:5:5) で 20 mL にメスアップして内標準物質原液とした。NMP/HCl/HNO<sub>3</sub> (90:5:5) 約 5 mL に、標準物質原液を 0, 50, 100, 150, 200  $\mu$ L ずつ正確に量り、内標準物質原液 100  $\mu$ L をそれぞれ正確に加えた。NMP/HCl/HNO<sub>3</sub> (90:5:5) で 10 mL にメスアップし、0, 25, 50, 75, 100 ng/mL 溶液とした。

試料溶液の調製：50 mL 容量のメタルフリー容器に試料約 500 mg を秤取し、内標準物質原液 100  $\mu$ L を正確に加えた。NMP/HCl/HNO<sub>3</sub> (2:1:1) を 2 mL 加えて、10 分間超音波照射した。更に NMP 7.5 mL を加えて (又は NMP で 10 mL にメスアップして) 10 分間超音波照射により溶解させ試料溶液とした。測定条件を次に示す。

## ICP-MS 測定条件

---

測定元素	:Zr (m/z =90), Y (m/z =89), Al (m/z =27), Co (m/z =59)*
ネブライザー	:同軸型ネブライザー
スプレーチャンバー	:サイクロン型
スプレーチャンバー温度	:3°C 付近の一定温度
インジェクター内径	:1.0 mm
サンプル導入方法	:自然吸引
高周波パワー	:1550 W
冷却ガス流量	:14 L/min
補助ガス流量	:0.8 L/min
測定モード	:KED
コリジョンガス	:ヘリウム
添加ガス	:酸素
ペリスタポンプ回転数	:20 rpm
積分時間	:0.1 秒
積算回数	:3 回

---

\* : 内標準物質

### 計算式

各元素の含量 (ppm) =  $(R - b) / a \times (1 / M) \times V$

R : 試料溶液における内標準物質 (IS) のイオンカウント数に対する各元素 (E) のイオンカウント数比 (E / IS)

a : 検量線の傾き

b : 検量線の y 切片

M : 試料の秤取量 (mg)

V : 試料溶液の最終液量 (mL)

## 第2章

### 【1】PHT懸濁液の調製

3% (w/w) の PVP と 0.25% (w/w) の SDS を精製水に溶解させた分散媒体は、250 rpm, 20 分間攪拌させて調製した。分散媒体を用いて、PHT を 5-50% (w/w) の濃度で懸濁させ、それぞれ 500 g の懸濁液を 500 rpm, 30 分間攪拌することで調製した。

### 【2】湿式ビーズミル処理

湿式ビーズミルとして、アペックスミル (AM-015 型, 広島メタル&マシナリー社製) を用いた。ビーズミル処理は周速 0.5-12 m/s の範囲で設定され、ジルコニアビーズの直径は 0.1-1.0 mm の範囲で設定した。ジルコニアビーズは新品を都度使用した。ビーズ充填率は粉砕室体積に対して、25-90% (v/v) の範囲となるように設定した。ビーズミル処理は循環バッチ方式で実施され、流速は 10 L/h に設定した。懸濁液を貯留するタンク内には攪拌機を設置し、処理中攪拌を行った。また、粉砕チャンバーは、冷却装置 (RKE7500A-V オリオン機械社製) を接続し、冷却水を循環させることで、冷却を行った。

### 【3】湿式粒度分布測定 (レーザー回折法)

粒度分布は LA-950 (堀場製作所社製) を用いてレーザー回折法により評価した。分析に際して、PHT 粒子の屈折率は 1.61, 測定溶媒として用いた精製水 (室温) は 1.33 とした。

### 【4】懸濁液中の金属コンタミネーションの定量

第1章【5】と同様に実施した。



### 第3章

#### 【1】 試薬

PHT は静岡カフェイン工業から購入した。MFA は Cheng Fong Chemical 社から購入した。ITZ は J&H Chemical 社から購入した。FNB は Combi-Blocks 社から購入した。SMX は Virchow Laboratories 社から購入した。

#### 【2】 PHT 懸濁液の調製

3% (w/w) の PVP と 0.25% (w/w) の SDS を精製水に溶解させた分散媒体は、250 rpm, 20 分間攪拌させて調製した。分散媒体を用いて、PHT を 5-50% (w/w) の濃度で懸濁させ、それぞれ 500 g の懸濁液を 500 rpm, 30 分間攪拌することで調製した。

#### 【3】 湿式ビーズミル処理

2.2 と同様に実施した。周速 2 m/s, ジルコニアビーズの直径は 0.3 mm, ビーズ充填率は粉碎室体積に対して 75% (v/v) に設定した。

#### 【4】 湿式粒度分布測定 (レーザー回折法)

2.3 と同様に実施した。薬物の屈折率として、ITZ は 1.68, FNB は 1.64, MFA は 1.64, SMX は 1.55 を用いた。

#### 【5】 溶出試験

溶出試験はパドル回転数 50 rpm の条件でパドル法により実施した。試験液は第 16 改正日本薬局方が規定する溶出試験第 2 液を用いた。試験温度は 37°C とし、900 mL の試験液を用いた。PHT が 50 mg 相当になるように、製剤を秤取し、試験液に投入した。試験開始後、5, 10, 15, 30, 45 及び 60 分に 5 mL サンプリングし、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した。別に試験液 5 mL を補液した。結果は 2 例の平均値で示した。サンプル中の PHT 濃度は HPLC により定量した。

HPLC 分析条件：

---

Column	: ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm
Column temp	: 35 $^{\circ}$ C
Mobile phase A	: 0.1% TFA
Mobile phase B	: MeCN
% MP B	: 40%
Flow rate	: 0.4 mL/min
Inj. vol.	: 4 $\mu$ L
Detect.	: 257 nm
Sample cooler	: 20 $^{\circ}$ C
Wash soln.	: 水/MeCN 1 : 1
Purge soln.	: 水/MeCN 7 : 3
Analytical time	: 4 min

---

標準溶液の調製：PHT 原薬 約 28 mg を精密に量って 20 mL メスフラスコに加え，アセトニトリルを加えて溶解させた．溶解を確認した後に 2 mL を正確にとり，アセトニトリル 8 mL とともに溶出試験液を加えて正確に 50 mL とした．(56  $\mu$ g/mL)

【6】懸濁液中の金属コンタミネーションの定量

第 1 章【5】と同様に実施した．

## 引用文献

1. Keserü, G.M.; Makara, G.M. The Influence of Lead Discovery Strategies on the Properties of Drug Candidates. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 203–212, doi:10.1038/nrd2796.
2. Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 1607–1621, doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01030.x.
3. Merisko-Liversidge, E.M.; Liversidge, G.G. Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds. *Toxicol Pathol* **2008**, *36*, 43–48, doi:10.1177/0192623307310946.
4. Müller, R.; Junghanns, J.-U. Nanocrystal Technology, Drug Delivery and Clinical Applications. *Int J Nanomedicine* **2008**, 295–309, doi:10.2147/IJN.S595.
5. Cherniakov, I.; Domb, A.J.; Hoffman, A. Self-Nano-Emulsifying Drug Delivery Systems: An Update of the Biopharmaceutical Aspects. *Expert Opin Drug Deliv* **2015**, *12*, 1121–1133, doi:10.1517/17425247.2015.999038.
6. Jackson, M.J.; Kestur, U.S.; Hussain, M.A.; Taylor, L.S. Dissolution of Danazol Amorphous Solid Dispersions: Supersaturation and Phase Behavior as a Function of Drug Loading and Polymer Type. *Mol Pharm* **2016**, *13*, 223–231, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00652.
7. Li, M.; Azad, M.; Davé, R.; Bilgili, E. Nanomilling of Drugs for Bioavailability Enhancement: A Holistic Formulation-Process Perspective. *Pharmaceutics* **2016**, *8*, 17, doi:10.3390/pharmaceutics8020017.
8. Singh, S.K.; Srinivasan, K.K.; Gowthamarajan, K.; Singare, D.S.; Prakash, D.; Gaikwad, N.B. Investigation of Preparation Parameters of Nanosuspension by Top-down Media Milling to Improve the Dissolution of Poorly Water-Soluble Glyburide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, *78*, 441–446, doi:10.1016/j.ejpb.2011.03.014.
9. Weber, U. The Effect of Grinding Media Performance on Milling a Water-Based Color Pigment. *Chem Eng Technol* **2010**, *33*, 1456–1463, doi:10.1002/ceat.201000064.
10. Kumar, S.; Jog, R.; Shen, J.; Zolnik, B.; Sadrieh, N.; Burgess, D.J. Formulation and Performance of Danazol Nano-Crystalline Suspensions and Spray Dried Powders. *Pharm Res* **2015**, *32*, 1694–1703, doi:10.1007/s11095-014-1567-0.
11. Baert, L.; van 't Klooster, G.; Dries, W.; François, M.; Wouters, A.; Basstanie, E.; Iterbeke, K.; Stappers, F.; Stevens, P.; Schueller, L.; et al. Development of a Long-Acting Injectable Formulation with Nanoparticles of Rilpivirine (TMC278) for HIV Treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *72*, 502–508, doi:10.1016/j.ejpb.2009.03.006.
12. Trezza, C.; Ford, S.L.; Spreen, W.; Pan, R.; Piscitelli, S. Formulation and Pharmacology of Long-Acting Cabotegravir. *Curr Opin HIV AIDS* **2015**, *10*, 239–245, doi:10.1097/COH.0000000000000168.
13. Geetha, G.; Poojitha, U.; Arshad, K.; Khan, A. Various Techniques for Preparation of Nanosuspension-A Review. *International Journal of Pharma Research & Review IJPRR* **2014**, *3*, 30–37.
14. Nakarani, M.; Misra, A.K.; Patel, J.K.; Vaghani, S.S. Itraconazole Nanosuspension for Oral Delivery: Formulation, Characterization and in Vitro Comparison with Marketed Formulation. *Daru* **2010**, *18*, 84–90.
15. Meruva, S.; Thool, P.; Shah, S.; Karki, S.; Bowen, W.; Ghosh, I.; Kumar, S. Formulation and Performance of Irbesartan Nanocrystalline Suspension and Granulated or Bead-Layered Dried Powders – Part I. *Int J Pharm* **2019**, *568*,

- 118189, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.03.007.
16. Komasaaka, T.; Fujimura, H.; Tagawa, T.; Sugiyama, A.; Kitano, Y. Practical Method for Preparing Nanosuspension Formulations for Toxicology Studies in the Discovery Stage: Formulation Optimization and in Vitro/in Vivo Evaluation of Nanosized Poorly Water-Soluble Compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2014**, *62*, 1073–1082, doi:10.1248/cpb.c14-00232.
  17. Wang, Y.; Liu, Z.; Zhang, D.; Gao, X.; Zhang, X.; Duan, C.; Jia, L.; Feng, F.; Huang, Y.; Shen, Y.; et al. Development and in Vitro Evaluation of Deacety Mycoepoxydiene Nanosuspension. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2011**, *83*, 189–197, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.10.029.
  18. Zhang, Z.-L.; Le, Y.; Wang, J.-X.; Chen, J.-F. Preparation of Stable Micron-Sized Crystalline Irbesartan Particles for the Enhancement of Dissolution Rate. *Drug Dev Ind Pharm* **2011**, *37*, 1357–1364, doi:10.3109/03639045.2011.575379.
  19. Sharma, P.; Zujovic, Z.D.; Bowmaker, G.A.; Denny, W.A.; Garg, S. Evaluation of a Crystalline Nanosuspension: Polymorphism, Process Induced Transformation and in Vivo Studies. *Int J Pharm* **2011**, *408*, 138–151, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.032.
  20. Beck, C.; Dalvi, S. V.; Dave, R.N. Controlled Liquid Antisolvent Precipitation Using a Rapid Mixing Device. *Chem Eng Sci* **2010**, *65*, 5669–5675, doi:10.1016/j.ces.2010.04.001.
  21. Bhakay, A.; Rahman, M.; Dave, R.; Bilgili, E. Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs via Nanocomposites: Formulation–Processing Aspects and Challenges. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 86, doi:10.3390/pharmaceutics10030086.
  22. Patel, M.; Shah, A.; Patel, N.M.; Patel, M.R.; Patel, K.R. Nano Suspension : A Novel Approach for Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research* **2011**, *1*, 1–10.
  23. Bhakay, A.; Rahman, M.; Dave, R.; Bilgili, E. Bioavailability Enhancement of Poorly Water-Soluble Drugs via Nanocomposites: Formulation–Processing Aspects and Challenges. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 86, doi:10.3390/pharmaceutics10030086.
  24. Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G.G. Nanosizing for Oral and Parenteral Drug Delivery: A Perspective on Formulating Poorly-Water Soluble Compounds Using Wet Media Milling Technology. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 427–440, doi:10.1016/j.addr.2010.12.007.
  25. Rahman, Md.; Hussain, A.; Iqbal, Z.; Harwansh, R.; Singh, L.; Ahmad, S. Nanosuspension: A Potential Nanoformulation for Improved Delivery of Poorly Bioavailable Drug. *Micro and Nanosystems* **2013**, *5*, 273–287, doi:10.2174/187640290504131127121625.
  26. Agrawal, Y.; Patel, V. Nanosuspension: An Approach to Enhance Solubility of Drugs. *J Adv Pharm Technol Res* **2011**, *2*, 81, doi:10.4103/2231-4040.82950.
  27. Juhnke, M.; Märtin, D.; John, E. Generation of Wear during the Production of Drug Nanosuspensions by Wet Media Milling. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, *81*, 214–222, doi:10.1016/j.ejpb.2012.01.005.
  28. Ghosh, S.; Sharma, A.; Talukder, G. Zirconium. *Biol Trace Elem Res* **1992**, *35*, 247–271, doi:10.1007/BF02783770.
  29. Funahashi, I.; Kondo, K.; Ito, Y.; Yamada, M.; Niwa, T. Novel Contamination-Free Wet Milling Technique Using Ice Beads for Poorly Water-Soluble Compounds. *Int J Pharm* **2019**, *563*, 413–425, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.008.
  30. Kano, J.; Miyazaki, M.; Saito, F. Ball Mill Simulation and Powder Characteristics of Ground Talc in Various Types of Mill. *Advanced Powder*

- Technology* **2000**, *11*, 333–342, doi:10.1163/156855200750172204.
31. Yoden, H.; Itoh, N. Effect of Small Size Beads on Dispersion of Nanometer-Sized Silica Particle by Wet Beads Mill Process. *Journal of the Society of Powder Technology, Japan* **2004**, *41*, 457–464, doi:10.4164/sptj.41.457.
  32. Kwade, A. Determination of the Most Important Grinding Mechanism in Stirred Media Mills by Calculating Stress Intensity and Stress Number. *Powder Technol* **1999**, *105*, 382–388, doi:10.1016/S0032-5910(99)00162-X.
  33. Hagedorn, M.; Liebich, L.; Bögershausen, A.; Massing, U.; Hoffmann, S.; Mende, S.; Rischer, M. Rapid Development of API Nano-Formulations from Screening to Production Combining Dual Centrifugation and Wet Agitator Bead Milling. *Int J Pharm* **2019**, *565*, 187–198, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.082.
  34. Peltonen, L. Design Space and QbD Approach for Production of Drug Nanocrystals by Wet Media Milling Techniques. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 104, doi:10.3390/pharmaceutics10030104.
  35. Kwade, A. Prediction of Energy Effective Grinding Conditions. *Miner Eng* **2013**, *43–44*, 36–43, doi:10.1016/j.mineng.2012.07.015.
  36. Fujii, H.; Watano, S. Development of Universal Formulation with Superior Re-Dispersion Using Nanocrystal Approach with Simultaneous Identification of API Physicochemical Properties. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2019**, *67*, 1050–1060, doi:10.1248/cpb.c19-00092.
  37. Li, M.; Yaragudi, N.; Afolabi, A.; Dave, R.; Bilgili, E. Sub-100nm Drug Particle Suspensions Prepared via Wet Milling with Low Bead Contamination through Novel Process Intensification. *Chem Eng Sci* **2015**, *130*, 207–220, doi:10.1016/j.ces.2015.03.020.
  38. Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G.G.; Cooper, E.R. Nanosizing: A Formulation Approach for Poorly-Water-Soluble Compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *18*, 113–120, doi:10.1016/S0928-0987(02)00251-8.
  39. Uemoto, Y.; Kondo, K.; Niwa, T. Cryo-Milling Using a Spherical Sugar: Contamination-Free Media Milling Technology. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, *136*, 104934, doi:10.1016/j.ejps.2019.05.012.
  40. Mochalin, V.N.; Sagar, A.; Gour, S.; Gogotsi, Y. Manufacturing Nanosized Fenofibrate by Salt Assisted Milling. *Pharm Res* **2009**, *26*, 1365–1370, doi:10.1007/s11095-009-9846-x.
  41. Nakach, M.; Authelin, J.-R.; Perrin, M.-A.; Lakkireddy, H.R. Comparison of High Pressure Homogenization and Stirred Bead Milling for the Production of Nano-Crystalline Suspensions. *Int J Pharm* **2018**, *547*, 61–71, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.05.042.
  42. Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G.G. Nanosizing for Oral and Parenteral Drug Delivery: A Perspective on Formulating Poorly-Water Soluble Compounds Using Wet Media Milling Technology. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 427–440, doi:10.1016/j.addr.2010.12.007.
  43. Uemoto, Y.; Toda, S.; Adachi, A.; Kondo, K.; Niwa, T. Ultra Cryo-Milling with Liquid Nitrogen and Dry Ice Beads: Characterization of Dry Ice as Milling Beads for Application to Various Drug Compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2018**, *66*, 794–804, doi:10.1248/cpb.c18-00161.
  44. Masaki, T. Mechanical Properties of Y-PSZ after Aging at Low Temperature. *International Journal of High Technology Ceramics* **1986**, *2*, 85–98, doi:10.1016/0267-3762(86)90011-1.
  45. Tsukuma, K.; Ueda, K.; Shimada, M. Strength and Fracture Toughness of Isostatically Hot-Pressed Composites of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Partially-Stabilized ZrO<sub>2</sub>. *Journal of the American Ceramic Society* **1985**, *68*, C-4-C-5,

- doi:10.1111/j.1151-2916.1985.tb15251.x.
46. Sato, T.; Shimada, M. Transformation of Yttria-Doped Tetragonal ZrO<sub>2</sub> Polycrystals by Annealing in Water. *Journal of the American Ceramic Society* **1985**, *68*, 356–356, doi:10.1111/j.1151-2916.1985.tb15239.x.
  47. Jafari, N.H.; Stark, T.D.; Roper, R. Classification and Reactivity of Secondary Aluminum Production Waste. *J Hazard Toxic Radioact Waste* **2014**, *18*, 04014018, doi:10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000223.
  48. Lvov, S.N.; Zhou, X.Y.; Ulmer, G.C.; Barnes, H.L.; Macdonald, D.D.; Ulyanov, S.M.; Benning, L.G.; Grandstaff, D.E.; Manna, M.; Vicenzi, E. Progress on Yttria-Stabilized Zirconia Sensors for Hydrothermal PH Measurements. *Chem Geol* **2003**, *198*, 141–162, doi:10.1016/S0009-2541(03)00033-0.
  49. Greenwood, R.; Kendall, K. Acoustophoretic Studies of Aqueous Suspensions of Alumina and 8 Mol% Yttria Stabilised Zirconia Powders. *J Eur Ceram Soc* **2000**, *20*, 77–84, doi:10.1016/S0955-2219(99)00091-6.
  50. Van Eerdenbrugh, B.; Van den Mooter, G.; Augustijns, P. Top-down Production of Drug Nanocrystals: Nanosuspension Stabilization, Miniaturization and Transformation into Solid Products. *Int J Pharm* **2008**, *364*, 64–75, doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.023.
  51. Niwa, T.; Miura, S.; Danjo, K. Universal Wet-Milling Technique to Prepare Oral Nanosuspension Focused on Discovery and Preclinical Animal Studies – Development of Particle Design Method. *Int J Pharm* **2011**, *405*, 218–227, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.013.
  52. Pongpeerapat, A.; Wanawongthai, C.; Tozuka, Y.; Moribe, K.; Yamamoto, K. Formation Mechanism of Colloidal Nanoparticles Obtained from Probucol/PVP/SDS Ternary Ground Mixture. *Int J Pharm* **2008**, *352*, 309–316, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.052.
  53. Nakach, M.; Authelin, J.-R.; Tadros, T.; Galet, L.; Chamayou, A. Engineering of Nano-Crystalline Drug Suspensions: Employing a Physico-Chemistry Based Stabilizer Selection Methodology or Approach. *Int J Pharm* **2014**, *476*, 277–288, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.09.048.
  54. V. Bühler, “Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals”; Springer-Verlag, G. 2005 V. Bühler, “Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals”, Springer-Verlag, Germany 2005.
  55. Masaki, T. Mechanical Properties of Y-PSZ after Aging at Low Temperature. *International Journal of High Technology Ceramics* **1986**, *2*, 85–98, doi:10.1016/0267-3762(86)90011-1.
  56. Loh, Z.H.; Samanta, A.K.; Sia Heng, P.W. Overview of Milling Techniques for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *Asian J Pharm Sci* **2015**, *10*, 255–274, doi:10.1016/j.ajps.2014.12.006.
  57. Hennart, S.L.A.; Domingues, M.C.; Wildeboer, W.J.; van Hee, P.; Meesters, G.M.H. Study of the Process of Stirred Ball Milling of Poorly Water Soluble Organic Products Using Factorial Design. *Powder Technol* **2010**, *198*, 56–60, doi:10.1016/j.powtec.2009.10.014.
  58. Inkyo, M.; Tahara, T.; Iwaki, T.; Iskandar, F.; Hogan, C.J.; Okuyama, K. Experimental Investigation of Nanoparticle Dispersion by Beads Milling with Centrifugal Bead Separation. *J Colloid Interface Sci* **2006**, *304*, 535–540, doi:10.1016/j.jcis.2006.09.021.
  59. Czekai, D.A.; Reed, R.G. APPARATUS FOR SANITARY WET MILLING. *US patent 6,582,285 B2* **2003**.
  60. Hwang, J.; Choi, D.; Han, S.; Jung, S.Y.; Choi, J.; Hong, J. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Sci Rep* **2020**, *10*, 7391, doi:10.1038/s41598-020-64464-9.

61. Lee, W.S.; Cho, H.-J.; Kim, E.; Huh, Y.H.; Kim, H.-J.; Kim, B.; Kang, T.; Lee, J.-S.; Jeong, J. Bioaccumulation of Polystyrene Nanoplastics and Their Effect on the Toxicity of Au Ions in Zebrafish Embryos. *Nanoscale* **2019**, *11*, 3173–3185, doi:10.1039/C8NR09321K.
62. Yong, C.Q.Y.; Valiyaveetil, S.; Tang, B.L. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *Int J Environ Res Public Health* **2020**, *17*, 1509, doi:10.3390/ijerph17051509.
63. Yuminoki, K.; Tachibana, S.; Nishimura, Y.; Mori, H.; Takatsuka, T.; Hashimoto, N. Scaling up Nano-Milling of Poorly Water Soluble Compounds Using a Rotation/Revolution Pulverizer. *Pharmazie* **2016**, *71*, 56–64.
64. Kesisoglou, F.; Panmai, S.; Wu, Y. Nanosizing — Oral Formulation Development and Biopharmaceutical Evaluation. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59*, 631–644, doi:10.1016/j.addr.2007.05.003.
65. Hisatomi, S.; Fukui, S.; Matsuoka, M.; Tsunazawa, Y.; Tokoro, C.; Okuyama, K.; Iwamoto, M.; Sekine, Y. Design for Separating Performance of Grinding Media in Bead Mill by DEM Simulation. *Journal of the Society of Powder Technology, Japan* **2017**, *54*, 377–383, doi:10.4164/sptj.54.377.
66. Yamamoto, Y.; Soda, R.; Kano, J.; Saito, F. DEM Simulation of Bead Motion during Wet Bead Milling Using an Enlarged Particle Model. *Int J Miner Process* **2012**, *114–117*, 93–99, doi:10.1016/j.minpro.2012.10.001.
67. Cao, X.; Morganti, M.; Hancock, B.C.; Masterson, V.M. Correlating Particle Hardness with Powder Compaction Performance. *J Pharm Sci* **2010**, *99*, 4307–4316, doi:10.1002/jps.22130.
68. Shao, L.; Jiang, D.; Gong, J. Nanoindentation Characterization of the Hardness of Zirconia Dental Ceramics. *Adv Eng Mater* **2013**, *15*, 704–707, doi:10.1002/adem.201200367.
69. Patel, M.; Shah, A.; Patel, N.M.; Patel, M.R.; Patel, K.R. Nano Suspension : A Novel Approach for Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research* **2011**, *1*, 1–10.
70. Agrawal, Y.; Patel, V. Nanosuspension: An Approach to Enhance Solubility of Drugs. *J Adv Pharm Technol Res* **2011**, *2*, 81, doi:10.4103/2231-4040.82950.
71. Singh, V. Nanosuspension : Way to Enhance the Bioavailability of Poorly Soluble Drug Nanosuspension : Way to Enhance the Bioavailability of Poorly. *International Journal of Current Trends in Pharmaceutical Research* **2013**, *1*, 277–287.
72. Tanaka, H.; Ochii, Y.; Moroto, Y.; Hirata, D.; Ibaraki, T.; Ogawara, K. Optimization of Milling Parameters for Low Metal Contamination in Bead Milling Technology. *BPB Reports* **2022**, *5*, 45–49, doi:10.1248/bpbreports.5.3\_45.
73. Peltonen, L.; Hirvonen, J. Pharmaceutical Nanocrystals by Nanomilling: Critical Process Parameters, Particle Fracturing and Stabilization Methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 1569–1579, doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01022.x.
74. Konnerth, C.; Braig, V.; Ito, A.; Schmidt, J.; Lee, G.; Peukert, W. Formation of Mefenamic Acid Nanocrystals with Improved Dissolution Characteristics. *Chemie Ingenieur Technik* **2017**, *89*, 1060–1071, doi:10.1002/cite.201600190.
75. Azad, M.; Moreno, J.; Bilgili, E.; Davé, R. Fast Dissolution of Poorly Water Soluble Drugs from Fluidized Bed Coated Nanocomposites: Impact of Carrier Size. *Int J Pharm* **2016**, *513*, 319–331, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.046.
76. Nakarani, M.; Misra, A.K.; Patel, J.K.; Vaghani, S.S. Itraconazole Nanosuspension for Oral Delivery: Formulation, Characterization and in Vitro Comparison with Marketed Formulation. *Daru* **2010**, *18*, 84–90.
77. Lee, J.; Choi, J.-Y.; Park, C.H. Characteristics of Polymers Enabling Nano-

- Comminution of Water-Insoluble Drugs. *Int J Pharm* **2008**, *355*, 328–336, doi:10.1016/j.ijpharm.2007.12.032.
78. Funahashi, I.; Kondo, K.; Ito, Y.; Yamada, M.; Niwa, T. Novel Contamination-Free Wet Milling Technique Using Ice Beads for Poorly Water-Soluble Compounds. *Int J Pharm* **2019**, *563*, 413–425, doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.008.
  79. Baumgartner, R.; Teubl, B.J.; Tetyczka, C.; Roblegg, E. Rational Design and Characterization of a Nanosuspension for Intraoral Administration Considering Physiological Conditions. *J Pharm Sci* **2016**, *105*, 257–267, doi:10.1016/j.xphs.2015.10.021.
  80. Takatsuka, T.; Endo, T.; Jianguo, Y.; Yuminoki, K.; Hashimoto, N. Nanosizing of Poorly Water Soluble Compounds Using Rotation/Revolution Mixer. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2009**, *57*, 1061–1067, doi:10.1248/cpb.57.1061.
  81. Komasaaka, T.; Fujimura, H.; Tagawa, T.; Sugiyama, A.; Kitano, Y. Practical Method for Preparing Nanosuspension Formulations for Toxicology Studies in the Discovery Stage: Formulation Optimization and in Vitro/in Vivo Evaluation of Nanosized Poorly Water-Soluble Compounds. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2014**, *62*, 1073–1082, doi:10.1248/cpb.c14-00232.
  82. Li, M.; Azad, M.; Davé, R.; Bilgili, E. Nanomilling of Drugs for Bioavailability Enhancement: A Holistic Formulation-Process Perspective. *Pharmaceutics* **2016**, *8*, 17, doi:10.3390/pharmaceutics8020017.
  83. George, M.; Ghosh, I. European Journal of Pharmaceutical Sciences Identifying the Correlation between Drug / Stabilizer Properties and Critical Quality Attributes ( CQAs ) of Nanosuspension Formulation Prepared by Wet Media Milling Technology. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* **2013**, *48*, 142–152, doi:10.1016/j.ejps.2012.10.004.
  84. Bruno, J.A.; Doty, B.D.; Gustow, E.; Illig, K.J.; Rajagopalan, N.; Sarpotdar, P. METHOD OF GRINDING PHARMACEUTICAL SABSTANCES. *US patent 5,518,187* **1996**.
  85. Tanaka, H.; Ochii, Y.; Moroto, Y.; Ibaraki, T.; Ogawara, K. Development of Novel Bead Milling Technology with Less Metal Contamination by PH Optimization of the Suspension Medium. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2021**, *69*, 81–85, doi:10.1248/cpb.c20-00623.