

タナカ ヒロノリ

氏名(本籍)	田中 宏典 (愛媛県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第 57 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 5 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 1 項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主査 教授 坂根 稔康 副査 教授 大河原 賢一 副査 教授 田中 将史

論文内容の要旨

緒言

現在、医薬品開発においては、ハイスループットスクリーニング技術の進歩に伴い、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。一方、これらの候補化合物の多くは難水溶性を示すことが多く、低い経口吸収性が医薬品開発上の課題となることが多い¹⁾。

ナノ粒子化技術は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、薬物の溶解速度を大きくすることで、難水溶性薬物の経口吸収性を改善可能である²⁾。一般に、ナノ粒子を得るためには、薬物の活性向上や機能改善など種々の目的に合わせて適切な粉砕方式が選択される。現在、最も汎用されている粉砕方式として、ビーズミルによる粒子の粉砕が挙げられる³⁾。ビーズミルとは、粉砕メディアとして、0.1 ~ 1 mm 程度の直径を有するビーズを用いて、粉砕室内で攪拌させることで生じるビーズ間の衝突力を利用して、薬物を微粒化する装置であり、メカノケミカルプロセスの 1 つである⁴⁾ (Fig. 1)。ビーズミル法は、他のナノ粒子化技術と比較して、生産性が高く、プロセス中の熱の発生が少ないことがその長所として知られている⁵⁾。

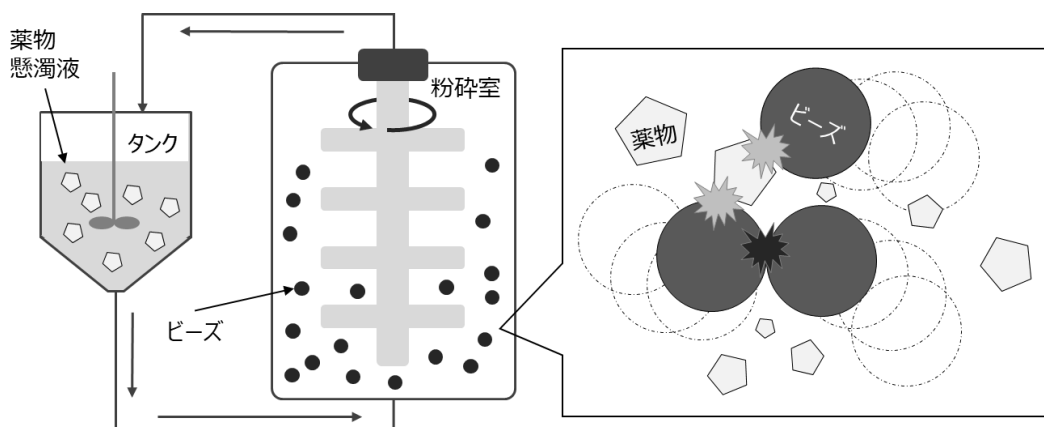


Fig. 1 ビーズミルの構造及び原理

一方で、ビーズミル法をはじめとしたトップダウンプロセスによるナノ粉砕プロセスに関しては、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による製品の汚染が懸念されている⁶⁾。ビーズミル法では、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ため、粉砕効率と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。コンタミネーション低減に関する研究は種々報告されているが^{7,8)}、従来のコンタミレス粉砕手法は、コンタミネーションの低減を実現する一方で、粉砕効率を損なうことが多く、実用化に至った例は限りなく少ない⁹⁾。したがって、今日においても、ビーズミル法の課題である金属コンタミネーションの低減に対して、十分な解決策が得られていないのが現状である。そこで本研究では、マテリアル（ソフト）及びプロセスパラメーター（ハード面）の両面からビーズミル法にアプローチし、粉砕効率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開発することを目的とした。

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

1. 背景

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。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、低 pH 条件下で、イットリア安定化酸化ジルコニウム粉末からイットリウムが溶解することが確認されている¹⁰⁾。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。

第1章では、上述したジルコニアビーズの課題に着目し、薬物の分散媒体処方特性として、特に pH に着目した。更に、分散媒体の pH がビーズミルプロセスにおける薬物の粉砕効率および金属コンタミネーションに及ぼす影響を系統的に検証することで、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。

2. 結果及び考察

ビーズミル法を用いたナノ粉砕においては、難水溶性薬物を水などの媒体に安定かつ均一に懸濁させ、ジルコニアビーズなどの粉砕メディアとともに攪拌する必要がある。したがって、粉砕対象物である薬物は、水溶性高分子及び界面活性剤などの添加剤が配合された媒体中で懸濁される。処方検討の結果、モデル薬物フェニトインのビーズミル処理において、ポリビニルピロリドン及びラウリル硫酸ナトリウムを用いた場合に、最も粉砕効率が良好であり、以降の検討では本添加剤を使用することとした。本処方の懸濁液の pH は 3.88 であり、ポリビニルピロリドンの添加により、大きく酸性にシフトしていた。

続いて、ジルコニアビーズの pH 依存的溶解を評価する目的で、各 pH の緩衝液中にジルコニアビーズを浸漬し、ジルコニアビーズから溶出するジルコニウムを始めとする金属の濃度を評価した。その結果、各金属元素の溶解は、pH に依存して変化することが明らかとなった。金属溶解は 6~8 の pH 範囲で最小値を示し、特にジルコニウムは酸性及びアルカリ性条件下において、顕著に溶解が増加した。したがって、懸濁液 pH の最適化により、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を抑制できる可能性が示唆された。

次に、ビーズミル処理を施す際の薬物懸濁液 pH が金属コンタミネーションに及ぼす影響を評価した。ビーズミル処理中の pH が 6~8 となるようにフェニトイン懸濁液の pH を調整し、pH 3.88 (pH 未調整) および pH 10.37 に調整した場合と比較検討した。結果を Fig. 2 (左) に示す。pH を 6.67~8.14

に調整した場合、pH 3.88, pH 10.37 の場合と比較して、粉碎プロセス中に発生する金属コンタミネーションを大きく低減できることが示された。続いて、薬物懸濁液の pH がフェニトインの粉碎効率に及ぼす影響を評価した。結果を Fig. 2 (右) に示す。pH 未調整 (pH 3.88) の場合と比較して、pH 6.67 ~ 8.14 の範囲において、粉碎平衡に達したフェニトインの粒子径に相違は観察されなかった。したがって、ビーズミル法において、pH の最適化という極めて簡便な手法により、薬物の粉碎性能を低下させることなく、粉碎工程において発生する金属コンタミネーションを大幅に低減可能であることが明らかとなった。

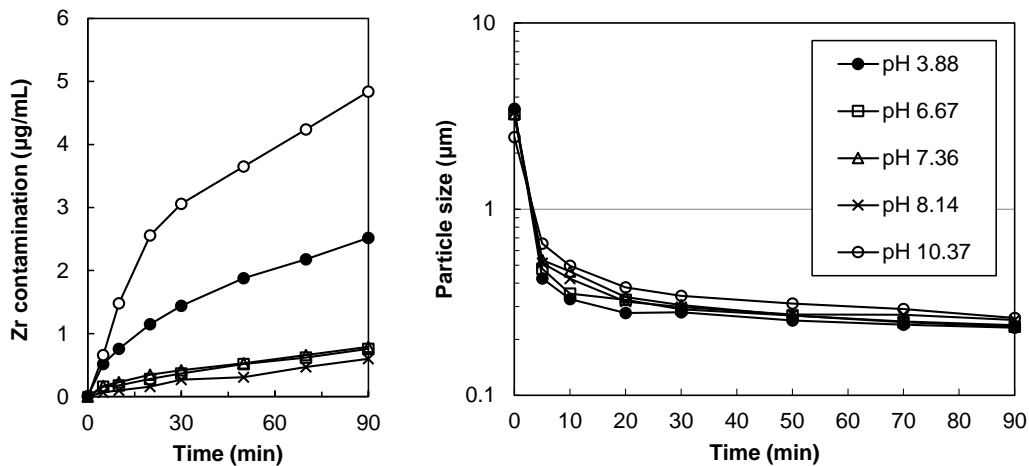


Fig. 2 pH 最適化が金属コンタミネーション (左) 及び粉碎効率 (右) に及ぼす影響

3. 小括

第 1 章では、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、薬物の分散媒体の pH に着目して検討を行った。その結果、ビーズからのジルコニウムの溶解に、pH 依存性が観察され、中性付近の pH で金属コンタミネーションが顕著に低下した。また、ビーズミルの粉碎効率は pH に依存せず、一定であった。つまり、pH の最適化という極めて簡便な方法により、ビーズミルの粉碎効率を低下させることなく、金属コンタミネーションを大幅に抑制したナノ粉碎が可能となった。以上の知見は、ビーズミル法を用いたコンタミレスナノ粉碎技術の開発において、きわめて有用と考えられる。

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碎技術の開発

1. 背景

現在、ビーズミル法により粉碎された原末医薬品を含む製剤がいくつか上市されている。これらの製剤の製造に利用されている NanoCrystal[®] 技術は、高架橋ポリスチレンビーズを粉碎メディアとして利用した金属コンタミレス粉碎技術として広く知られている⁵⁾。本技術が適用された場合、金属のコンタミネーションは、薬物質量に対して 10 ppm 以下であり、金属コンタミネーションを極めて低いレベルに抑制可能である¹¹⁾。このような特殊な粉碎メディアを用いた NanoCrystal[®] 技術は特許により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、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 なコンタミレス技術と位置付けられている。

ビーズミル処理に伴う金属コンタミネーション低減のためには、NanoCrystal[®] 技術の様な粉碎メディ

アの材質を変更する方法の他に、粉砕パラメーターを適切に設定する方法が挙げられる。また、粉砕パラメーターにより左右される金属コンタミネーションと粉砕性能は、トレードオフの関係にあることが知られている。粉砕パラメーターが金属コンタミネーションに及ぼす影響は種々報告されているものの、体系的なパラメーター最適化研究は報告されていない。そこで、第2章の研究では、先行技術である NanoCrystal® 技術を凌駕する金属コンタミレスナノ粉砕技術の開発を目指し、ビーズミルの粉砕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、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た。

2. 結果及び考察

第2章の研究においては、ビーズミルの粉砕パラメーターとして、ビーズ径、周速及び粉砕容器内のビーズ充填率に着目した。まず、薬物濃度 5 w/w% のフェニトイン懸濁液を用いて、ビーズ径及び周速が粉砕効率に及ぼす影響を検討した。その結果、ビーズ径が小さいほど、処理時間が短縮する傾向が確認された。また、周速が大きいほど、処理時間が短縮する傾向にあった。ビーズミル処理を実施する上で、一般的な周速は 5~15 m/s と報告されているが、本研究では、周速 4 m/s 以下の超低速運転においても、フェニトインを 0.2 µm 以下に微粉砕することが可能であった。これは、ビーズミルとして使用したアペックスミル® が重力方向に沿った縦型ミルであるため、超低速であっても粉砕室内でビーズが均一に流動しており、薬物粒子が粉砕室内で処理されずに、ビーズ層を通過（ショートパス）することなく処理できるためと考えられる。続いて、ビーズ径が金属コンタミネーションに及ぼす影響を周速毎に評価した (Fig. 3)。処理時間に関する検討結果より、ビーズ径と金属コンタミネーションは相関すると推定していたが、検証した全ての周速において、ビーズ径 0.3 mm で金属コンタミネーションが最小値を示すことが確認された。中でも、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s において、金属コンタミネーションが最小となった。さらに、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s の条件で、ビーズ充填率と粉砕効率、金属コンタミネーションとの関係を検討したところ、充填率の増大に伴い、粉砕効率の向上と金属コンタミネーションの増大が観察された。両者のバランスを考慮して、最適ビーズ充填率は 75 v/v % であると判断した。

以上、粉砕効率及びコンタミネーションに対する粉砕パラメーターの影響を検討した結果、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s、ビーズ充填率 75 v/v % が最適条件であることが明らかとなった。縦型のビーズミルを用いることで、周速 2 m/s という超低速運転が可能であることは特筆すべきと考えられる。

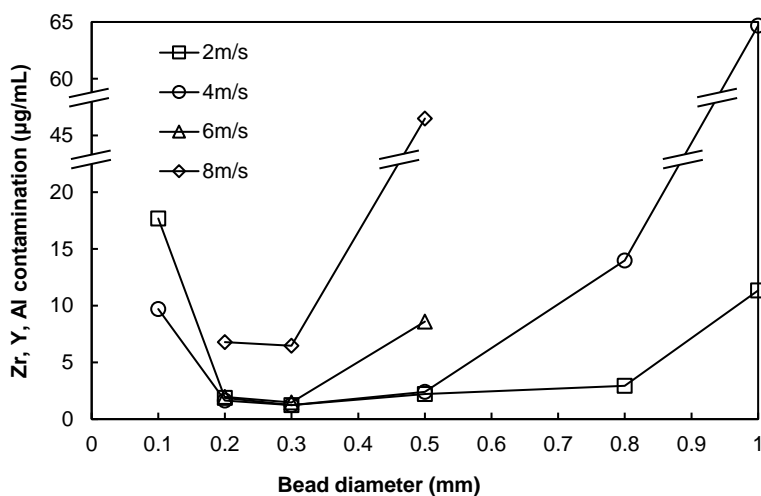


Fig. 3 周速及びビーズ径の金属コンタミネーションに対する影響

上記の検討で最適化した粉砕パラメーターを用いて、薬物濃度が処理時間に及ぼす影響を検証した。フェニトイン濃度を 30 w/w% 及び 40 w/w% に設定した場合、濃度 5% w/w と比較して、粉砕初期において、粒子径低下推移に若干の遅れを認めただものの、フェニトイン粒子を 0.2 μm 以下に粉砕するために必要な処理時間に大きな差を認めなかった。また、処理完了時の金属コンタミネーションに対する薬物濃度の影響を評価した。薬物濃度 30 w/w% 及び 40 w/w% における金属コンタミネーションは、濃度 5 w/w% に対して微増はしたものの、薬物濃度間において大きな差がないことを見出した。薬物濃度が高いほど、単位体積当たりの薬物固体粒子の個数が多いために、ビーズと薬物の接触頻度が増大し、コンタミネーションが微増した可能性が想定される。一方で、金属コンタミネーションの主たる発生要因であるビーズの衝突頻度自体に相違はないと考えられるため、コンタミネーションに差が認められなかったと推察される。フェニトイン単位重量当たりのコンタミネーションを算出したところ、薬物濃度を 30 ~ 40 w/w% とすることで、最適化した粉砕パラメーターにより、NanoCrystal[®] 技術と同程度に、金属コンタミネーションを制御可能であることを示した。更に、NanoCrystal[®] 技術で用いられる高架橋ポリスチレンのような樹脂材質の混入リスクもない点で、コンタミネーションリスクは極めて低いと考えられる。

3. 小括

第 2 章では、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、粉砕効率及び金属コンタミネーションに対するビーズミルの粉砕パラメーターの影響を評価し、粉砕パラメーターを最適化した。本検討を通じて、ビーズ径に最適値があることを見出し、さらに、周速及び充填率を最適化した。その結果、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することが可能であった。本研究により得られた知見は、医薬品生産プロセスにおいてビーズミルのパラメーターを設定し、考察する上で重要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

1. 背景

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砕すると、溶解速度が向上するために、経口吸収性の改善を期待できる。ナノ粒子化による吸収改善は脂溶性及び融点が高く、高用量が必要な薬物に有効であるとされている¹²⁾。第 2 章において、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、パラメーターの最適化を試みた。その結果、ビーズ径 0.3 mm、周速 2 m/s、ビーズ充填率 75 v/v% が最適であった。しかし、薬物の物理化学的特性とこれらのパラメーターとの関係は体系的に解明されていない¹³⁾。ビーズミル最適パラメーターは、フェニトインに対して得られたものであるため、フェニトイン以外の難水溶性薬物への適用可能性が不明である。そこで、第 3 章の研究においては、分子量、溶解度、融点などの物理化学的特性が異なる難水溶性薬物を用いて、最適化したビーズミルパラメーターの適用拡大の可能性を検証した。

2. 結果及び考察

薬物濃度 5 w/w% の各種モデル薬物懸濁液を用いて、最適パラメーターでビーズミル処理時の各種薬物の粉砕効率を評価した (Fig. 4)。その結果、いずれのモデル薬物においても、0.2 μm 以下に粉砕可能であることが示された。粉砕に要した時間は、フェニトイン、メフェナム酸、イトラコナゾール、フェノフィブラート、スルファメトキサゾールの順に長くなり、それぞれ 90 分、90 分、150 分、210 分、270 分であった。特に、低融点化合物であるフェノフィブラートについて、0.2 μm 以下に粉砕可

能であったことは特筆に値する。ビーズミルのような発熱を伴う粉碎方法を用いた場合、フェノフィブラートのような低融点化合物は、粉碎過程において発生する熱により、薬物の一部が融解しうるため、粉碎が困難である場合が多い。本研究で見出した最適パラメーターでは、超低速運転 (2 m/s) での粉碎が可能であり、プロセス中に発生する熱量が非常に小さいために、フェノフィブラートを融解させることなく、粉碎が可能であると考えられる。以上の結果より、最適化した粉碎パラメーターは、幅広い物理化学的特性を有する様々な化合物に適用可能であることが示された。

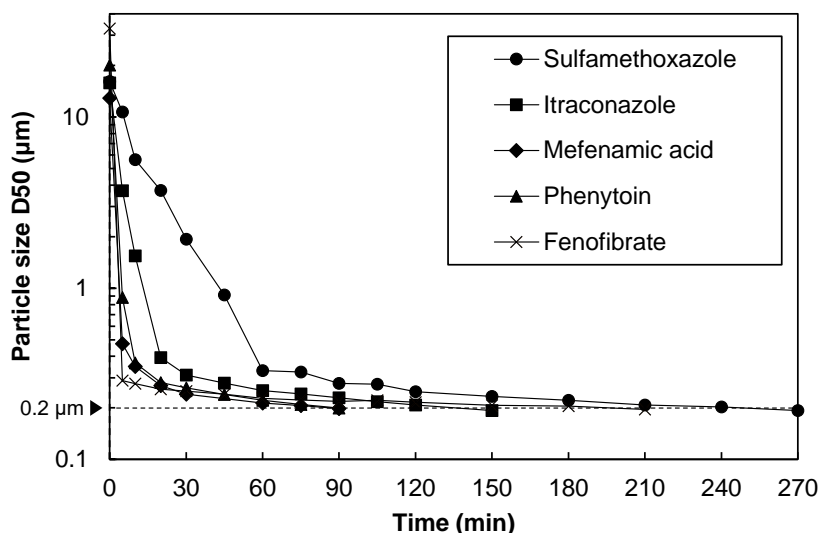


Fig. 4 最適パラメーターによる各薬物のビーズミル処理：粒子径の経時変化

次に、各種モデル薬物懸濁液をビーズミル処理し、0.2 μm 以下に到達した時点におけるジルコニウムのコンタミネーションを評価した。最適化されていない従来の粉碎パラメーターでフェニトインを処理した結果、ジルコニウムのコンタミネーションは 10.17 μg/mL であった。一方で、最適パラメーターで粉碎すると、フェニトインの場合、0.64 μg/mL と顕著に減少した。更に、他のいずれの薬物に関しても、最適化された粉碎パラメーターにより、従来法と比較して 10 分の 1 以下に金属コンタミネーションが大きく低減した。粉碎メディアとして、ポリカーボネートビーズを用いて、225 nm のナノ粒子材料を得る際に発生した装置由来のジルコニウムのコンタミネーションは、0.7 μg/mL であったことが報告されている¹⁴⁾。これを加味すると、ジルコニアビーズを用いているにも関わらず、本最適パラメーターにより、いずれのモデル薬物においても、ビーズミル処理後の金属コンタミネーションを商用利用が可能なレベルにまで低減することが可能と考えられる。

3. 小括

第 3 章では、最適化した粉碎パラメーターにより、様々な物性を有する複数の難水溶性薬物をナノ粉碎可能であることを示した。ビーズミル最適パラメーターで粉碎した場合、ジルコニアビーズを用いているにも関わらず、いずれの薬物に対しても、金属コンタミネーションを顕著に低減可能であった。本研究により得られた知見は、ビーズミルを用いたコンタミレス粉碎技術の生産プロセスの開発において、粉碎パラメーターを設定、考察する上で重要であると考えられる。

総括

本研究では、ソフト（薬物懸濁液の pH 最適化）及びハード（ビーズミルパラメーター最適化）の両面からアプローチすることにより、従来のビーズミル法を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粉砕技術に改良することに成功した。

本研究で改良したビーズミルを用いたナノ粉砕技術は、経口投与後の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。近年、ナノ粒子化技術は懸濁性注射剤の生産への応用が進められている。このような製剤は患者の服薬アドヒアランスに革新をもたらす可能性が期待される。本研究で示した知見がナノ結晶粒子を用いた将来の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。

参考文献

- 1) Loftsson, T. and Brewster, M. E., *J. Pharm. Pharmacol.*, 62, 1607–1621 (2010).
- 2) Müller, R. and Junghanns, J.-U., *Int. J. Nanomed.*, 3, 295–309 (2008).
- 3) Bhakay, A., Rahman, M., Dave, R. and Bilgili, E., *Pharmaceutics*, 10, 86 (2018).
- 4) Meruva, S., Thool P., Shah S., Karki S., Bowen W., Ghosh, I. and Kumar, S., *Int. J. Pharm.*, 568, 118189 (2019).
- 5) Merisko-Liversidge, E. and Liversidge, G. G., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63, 427–440 (2011).
- 6) Rahman, Md., Hussain, A., Iqbal, Z., Harwansh, R., Singh, L. and Ahmad, S., *Micro and Nanosystems*, 5, 273–287 (2013).
- 7) Li, M., Yaragudi, N., Afolabi, A., Dave, R. and Bilgili, E., *Chem. Eng. Sci.*, 130, 207–220 (2015).
- 8) Juhnke, M., Märtin, D. and John E., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81, 214–222 (2012).
- 9) Agrawal, Y. and Patel V., *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 2, 81 (2011).
- 10) Greenwood, R. and Kendall, K., *J. Eur. Ceram. Soc.*, 20, 77–84 (2000).
- 11) Czekai, D. A. and Reed, R. G., US patent 6, 582, 285 B2 (2003).
- 12) Singh, V., *Int. J. Current Trends in Pharm. Res.*, 1, 277–287 (2013).
- 13) Peltonen, L. and Hirvonen, J., *J. Pharm. Pharmacol.*, 62, 1569–1579 (2010).
- 14) Bruno, J. A., Doty, B. D., Gustow, E., Illig, K. J., Rajagopalan, N., Sarpotdar, P., US patent 5, 518, 187 (1996).

論文審査の結果の要旨

ナノ粒子化技術は、難水溶性薬物の経口吸収性改善のための有用な手段の一つである。ビーズミル法は、現在、主流のナノ粉碎手法であるが、生産性が高い一方で、プロセス由来の金属コンタミネーションが大きな課題である。本学位論文では、ビーズミル法のマテリアル及びプロセスパラメーター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ナノ粉碎技術を目指した。

マテリアルからのアプローチとして、粉碎メディアであるジルコニアビーズの pH 依存的溶解度に着目して、検討を行った。その結果、pH を最適化するという極めて簡便な方法により、ビーズミルの粉碎性能を低下させることなく、金属コンタミネーションを大幅に抑制可能であることを見出した。一方、プロセスパラメーターの観点からは、ビーズミルの各種パラメーター（ビーズ径、周速及び充填率）の最適化を試みた。種々の検討を通じて最適化されたパラメーターは、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。更に、複数の難水溶性薬物をモデルとして、最適パラメーターの適用可能性を検証した結果、幅広い物理化学特性を有する薬物に対して、適用可能であることを示した。

以上、本研究で示したコンタミレスナノ粉碎技術は、経口投与製剤のみならず、懸濁性注射製剤などの品質管理がさらに厳しい剤型への適用が期待できる。本粉碎技術は、ナノ結晶粒子を用いた将来の医薬品開発に大きく貢献する技術と評価される。

以上、上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。