


 解説

凍結溶液の熱測定と凍結乾燥製剤の製剤設計

伊豆津健一

(受取日：2009年1月8日，受理日：2009年1月23日)

Characterization of Frozen Aqueous Solution for Formulation and Process Design of Freeze-dried Pharmaceuticals

Ken-ichi Izutsu

(Received January 8, 2009; Accepted January 23, 2009)

Freezing of aqueous solutions concentrates solutes into highly viscose phases surrounding ice crystals. Various solutes have different tendencies to crystallize or remain amorphous in the frozen solutions. Thermal analysis of the frozen solutions shows highest critical product temperatures (T_g' , T_c , T_{eu}) required to retain the products from physical collapse or melt-back phenomena during the primary drying process. Hydrogen-bondings and electrostatic interactions between multiple solutes affect the eutectic crystallization and the transition temperatures of frozen solutions. Application of the thermal analysis to formulation and process design of freeze-dried pharmaceuticals was discussed.

Keywords: freeze-drying; eutectic crystallization; glass transition

1. はじめに

凍結と凍結乾燥は食品や医薬品の保存に広く用いられており，熱測定は組成の最適化や保存・乾燥温度の決定に古くから活用されてきた。凍結乾燥の対象となる医薬品は生体高分子の医療応用や新規ドラッグデリバリーシステム(DDS)開発とともに多様化しており，製品に求められる品質水準も高くなっている。本稿では単一または複数の溶質を含む凍結溶液の熱測定で観察される各種の現象について解説するとともに，凍結乾燥医薬品の製剤設計や工程制御への応用を紹介する。

2. 凍結濃縮と非晶質固体の乾燥

2.1 水溶液の凍結と凍結濃縮

水溶液に含まれる溶質の多くは凍結により氷晶間に高度

に濃縮され，氷晶の成長は濃縮相が過冷却液体状態から，極めて高粘度で分子運動性の低いガラス状態の非晶質固体となるまで続く。ガラス化した糖類や多価アルコール類の凍結濃縮相には，配列の規則性が低い溶質分子と，約3割(質量)の水分子が含まれる。^{1,2)} 過冷却状態の凍結濃縮相は熱力学的に不安定なことから，一部の溶質は比較的容易に共晶(水和物結晶または溶質結晶と氷の混合物)を形成する。共晶形成の傾向は溶質により異なるとともに，共存物質や凍結溶液の熱履歴等の影響を受ける。一般に凍結乾燥製剤の最適化に向けた凍結溶液の熱測定には，工程の最低温度を考慮して試料を -50 ℃以下まで冷却可能な示差走査熱量計(DSC)または示差熱分析(DTA)が用いられ，試料溶液の冷却と昇温過程で水(氷)の結晶化や融解による発・吸熱とともに観察される溶質の共晶形成・融解や非晶質濃縮相の相転移は，製剤と工程の開発に重要な情報となる。

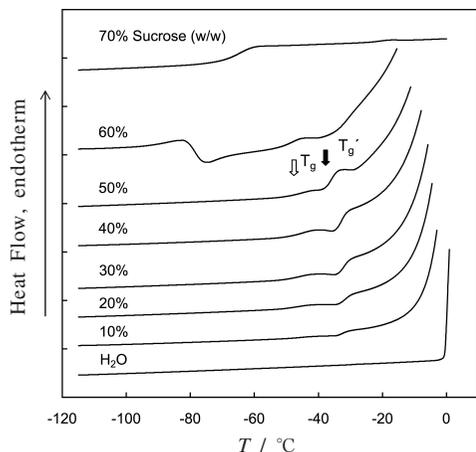


Fig.1 Thermograms of aqueous frozen sucrose solutions (0 ~ 70 %, w/w).

2.2 非晶質凍結濃縮相の相転移

氷晶間に濃縮された溶質が非晶質（アモルファス）状態を保持する凍結溶液の昇温測定では、溶質により異なる温度に濃縮相の相転移が観察される。この相転移により濃縮相の粘度は大きく低下（溶質運動性は上昇）することから、転移温度は凍結乾燥における添加剤選択や棚温度設定、および生体高分子等の凍結保存の条件設定に重要な指標となっている。^{3,4)}

0 ~ 70 % (w/w) ショ糖水溶液 (10 μ l) を 20 $^{\circ}$ C min⁻¹ で冷却・凍結した後に、-150 $^{\circ}$ C から 10 $^{\circ}$ C min⁻¹ で昇温測定した DSC 曲線を Fig.1 に示した。水は -20 ~ -30 $^{\circ}$ C で凍結し、昇温により 0 $^{\circ}$ C 付近で急速に融解した。不純物の除去等により理想条件に近づけると、水の過冷却は -40 $^{\circ}$ C 付近まで進むとされる。⁵⁾ 一般的な凍結乾燥の対象となる 10 ~ 50 % (w/w) のショ糖溶液を同様に冷却すると、濃度上昇とともに氷晶形成と融解ピークは縮小し、低温側にシフトした。この濃度域の溶液ではいずれもほぼ同じ温度に濃縮相由来の 2 つの転移が観察され、氷晶の成長により初期濃度に関係なく溶質が同程度まで凍結濃縮されることが確認された。低温側 (-45 $^{\circ}$ C 付近) の転移は、濃縮相がガラス状態から分子運動性の高いゴム状態に変化する（真の）ガラス転移 (T_g) と考えられている。一方で高温側 (-32 $^{\circ}$ C 付近) の比較的大きな変化は最大濃縮相ガラス転移 (T_g') と呼ばれ、低濃度溶液ではこの転移のみ観察される場合も多い。この転移は周囲の氷晶融解を伴い、 T_g' 以上では濃縮相の溶質分子の運動性が大きく上昇する。これらの現象の由来は古くから議論の対象となっており、両者の区別を明確にするため最大濃縮相ガラス転移温度に代えて濃縮相軟化（軟化温度： T_s ）と定義する文献も見られる。各種の溶

質は異なる転移温度を持ち、糖類や多価アルコール類の T_g' は分子量の増加とともに上昇する。^{1,6)}

ショ糖凍結溶液の特性は 50 ~ 70 % (w/w) を境に大きく変化した。70 % ショ糖溶液は冷却時に氷晶の形成を経ずにガラス化し、昇温過程の -65 $^{\circ}$ C 付近でラバー状態へのガラス転移を示した。水は可塑剤として作用するため、氷晶が現れない濃度域の試料では水分量の減少とともにガラス転移温度 (T_g) は上昇し、乾燥後の非晶質ショ糖固体の T_g は 50 $^{\circ}$ C 以上となる。乾燥や冷却による糖類のガラス化は微小生物や植物の環境耐性機構として、氷晶形成や乾燥ストレスから生体膜や生体高分子の高次構造を保護する。このため多くの生物で環境変化に対応したトレハロースなどの蓄積が報告されている。また培養細胞等の超低温保存では、グリセロールや DMSO など細胞内に浸透可能な低分子物質が、ガラス化により凍結障害を防ぐ保護剤として広く用いられている。

両者の中間域となる 60 % (w/w) 付近のショ糖溶液は、氷晶形成による発熱ピークが冷却過程 (-85 $^{\circ}$ C 付近) とともに昇温過程 (-75 $^{\circ}$ C 付近) にも現れるなど複雑な熱挙動を示した。昇温過程の氷晶形成はデビトリフィケーション（脱ガラス化）と呼ばれる。低濃度溶液の凍結濃縮相では溶質と水和状態にある一定比率の水分子非晶質状態で保持されるが、高濃度溶液の冷却で氷晶成長が十分に進む前にガラス化すると、溶質との相互作用が弱いこの比率以上の水分子が、昇温による運動性上昇とともに結晶化すると考えられている。⁷⁾ この濃度域の溶液では、不純物や冷却速度など様々な要因が冷却過程における氷晶形成に影響を与える。急速冷却は氷晶形成を抑制することから、昇温時のデビトリフィケーションピークは現れやすくなる。

昇温測定の走査速度は T_g' の測定値に影響を与える。20 % (w/w) ショ糖凍結溶液を -70 $^{\circ}$ C から 0.5 ~ 20 $^{\circ}$ C min⁻¹ で昇温測定 (Fig.2) すると、昇温速度の上昇に伴い T_g' の上昇と転移の広幅化が観察された。低速昇温は狭い温度幅で転移が完了する点で優れるものの、長時間測定を要するとともに、熱流の変化が小さく低濃度溶液では転移が不明確となる。このため実際の測定では 2 ~ 5 $^{\circ}$ C min⁻¹ を中心に溶質濃度や機器感度、および目的に合わせて昇温速度を設定する。非晶質固体のガラス転移と同様に凍結溶液の T_g や T_g' 転移は温度幅を持つことから、測定値として変曲点、低温側のベースラインと変曲点の接線の交点（開始点）または中点が用いられる。この解説では複雑な DSC 曲線からの判別が比較的容易な変曲点の温度を用いた。文献値の比較にあたっては、昇温速度とともに、どの値を転移温度としているかの確認が必要となる。

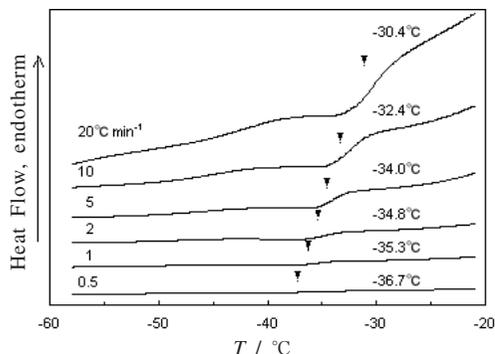


Fig.2 Effect of scanning speed (0.5~20 °C min⁻¹) on thermograms of frozen 20 % sucrose solutions. Arrows indicate T_g' .

2.3 非晶質固体の凍結乾燥

濃縮相が非晶質状態を保持する凍結溶液を適切に乾燥すると、多孔質の非晶質固体が得られる。非晶質固体は結晶に比べ優れた溶解性ととともに、生体高分子やDDS キャリアの凍結乾燥と保存における構造安定化作用を持つことから、高機能製剤での利用が増加している。^{8,9)} ショ糖やトレハロースは凍結乾燥過程とともに凍結溶液や乾燥固体の保存において、水素結合を介した高次構造保護（水分子置換作用）と分子運動低下に伴う化学反応の抑制（ガラス化作用）により、タンパク質を安定化する非還元糖として凍結乾燥製剤に広く用いられる。これに対し T_g' や T_g が低く適切な凍結乾燥が困難な単糖類や、乾燥固体の化学的安定性低下の原因となる還元糖の利用は限られる。

凍結乾燥は水溶液の凍結、氷晶を昇華させる一次乾燥、および固体部から水を除く二次乾燥の3段階からなる。工業的な凍結乾燥は温度制御可能な棚上と並べたバイアルを-25 から-40 °Cまで比較的緩やか（~0.5 °C min⁻¹程度）に冷却して溶液を凍結させた後に、減圧下で一次・二次乾燥を進める。一次乾燥は典型的な長時間の高エネルギー消費プロセスであるとともに、その条件は乾燥固体の品質を左右することから、主薬の特性に合わせた効率的な乾燥を可能とする添加剤選択や、凍結溶液の物性情報に基づく精密な工程制御が求められている。一例として-20 °C付近に T_g' を持つ凍結溶液を乾燥する際の、棚温度設定と品温挙動の模式図をFig.3に示した。

濃縮相が非晶質状態を保持する凍結溶液の一次乾燥では、濃縮相を高粘度に保ちつつ氷晶の昇華を進めることが必要とされる。凍結溶液の温度（品温）を T_g' 以下に保持して一次乾燥を進めると、乾燥前と同様な形状の多孔質の（ケーキ状）非晶質固体が得られるのに対し、 T_g' 以上では凍結濃縮相の粘度が大きく低下するため固体構造の保持が困難と

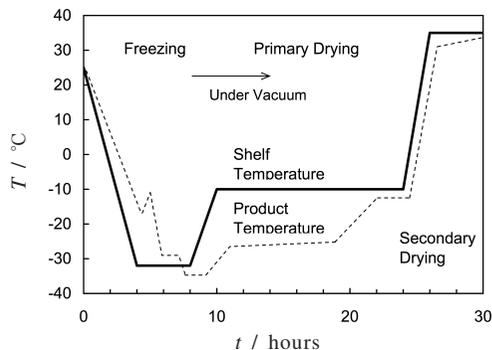


Fig.3 Shelf and product temperatures during freeze-drying.



Fig.4 Appearance of collapsed and cake-structure freeze-dried solids.

なり、濃縮相の乾燥界面から構造崩壊（コラプス現象）が起こる（Fig.4）。近年、減圧下における凍結溶液の乾燥界面を顕微鏡で観察する装置（凍結乾燥顕微鏡：FDM）の精度が高まり、コラプス現象の開始温度（コラプス温度（ T_c ））の直接的な測定が可能となっている。コラプス現象は溶質濃度などの影響も受けるため T_c は T_g' と同じか数℃程度高温側に観察されることが多い。¹⁰⁾

コラプスは乾燥固体の外観を劣化させるだけでなく、保存安定性や溶解速度など製剤機能にも様々な悪影響を及ぼすことから、可能な限り避けるべきと考えられている。一方で氷の昇華速度は品温が1 °C上昇する毎に10 %以上増加することから、効率的な一次乾燥には品温を T_c よりわずかに低い温度にコントロールすることが求められる。¹¹⁾

目的に応じた使い分けにより、 T_g' と T_c は共に凍結乾燥に有用な情報となる。 T_g' は汎用のDSC機器を用いて比較的容易に測定可能なことから、添加剤選択など製剤設計に有用であるとともに、 T_g' 以下の品温を確保することによりコラプスを確実に回避した凍結乾燥が可能となる。一方で T_c 測定を通した詳細なコントロールは、乾燥時間短縮によるメリットが大きい大規模工程を中心に威力を発揮する。

一次乾燥過程の品温は、輻射および棚からの熱供給と昇華により奪われる熱のバランスにより決まる。¹²⁾ 減圧開始後は昇華熱により品温が低下するため、棚温度を品温の目標値より高く制御することで、昇華熱に対応する熱をバイアルに供給する。工業的な凍結乾燥に用いられる大型機器では、各バイアルの庫内位置により棚の表面温度や輻射熱量が異なるため、氷晶の昇華にかかる時間に差が生じる。通常の凍結乾燥では氷晶の消失により品温が棚温度近くまで上昇した後に、棚温度を二次乾燥の設定値まで上昇させるが、昇華熱に比べて棚からの熱供給が多い場合や、氷晶が完全に昇華する前に棚を二次乾燥に向けて昇温した場合は品温が T_c を上回り、バイアル底部に部分的なコラプスが発生する。これまで工業的な凍結乾燥では真空度計や一部バイアル内への投げ込み型温度測定プローブ（熱電対、測温抵抗体）を用いた工程モニタリングを行うとともに、各段階の時間に大幅な余裕を持たせることで、乾燥速度ばらつきの影響を抑制する手法が用いられてきた。さらなる工程の効率化と製品品質の確保に向けて、非接触型の温度・水分量測定や気体流路の成分測定など新たなPAT（プロセスアナリティカルテクノロジー）技術を用いた高度な工程制御が進められている。

3. 共晶の形成と結晶固体の乾燥

3.1 凍結溶液中における溶質の共晶形成と融解

一部の溶質は凍結溶液の冷却または昇温過程で共晶を形成し、昇温過程の共晶形成温度（または結晶化温度： T_{cry} ）で発熱ピークが観察される。共晶の核形成と成長速度は溶質により異なり、分子等の再配列が比較的容易な溶質では、冷却過程の凍結からガラス化までの短時間に共晶形成が進む。これに対し溶質の結晶成長が緩やかな場合や溶液の急速冷却では、濃縮相に含まれる溶質の大部分が非晶状態を保持したまま運動性が低下し、共晶形成は主に昇温過程で起こる。更に昇温を進めると共晶の融解（共晶融解温度： T_{cu} ）による吸熱ピークが現れ、 T_{cu} の高い凍結溶液ではこのピークが氷晶融解と重複する場合も多い。一般に凍結溶液の熱測定では再現性の高い昇温過程の結果が重視されるが、共晶形成の把握には冷却過程の変化も重要な情報となる。また電解質の共晶形成と融解は電気抵抗の大きな変化をもたらすことから、凍結溶液の物性評価や工程モニタリング手段としてバイアル内の抵抗測定も古くから活用されてきた。

昇温過程における非晶質濃縮相からの水の結晶化（氷晶形成）とともに、溶質の共晶形成もデビトリフィケーションと呼ばれる。両者はともに発熱ピークを生じるが、昇温時の氷晶形成は主に高濃度溶液を急速凍結した試料で起こるのに対し、共晶形成は低濃度溶液でも観察されるなどの

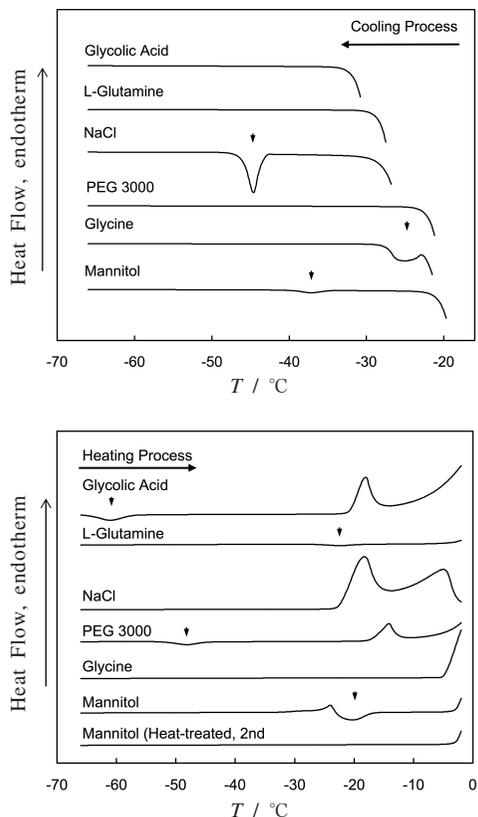


Fig.5 Thermograms of frozen solutions containing crystallizing excipients during cooling and heating scans ($5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Arrows indicate exotherm peaks.

違いがある。また昇温によるガラス状態からラバー状態への転移もデビトリフィケーションとして扱った文献も見られる。熱測定とともに粉末X線回折など各種評価法の併用は、凍結溶液で起こる諸現象解明に有用であり、共晶の多形変化など複雑な挙動を示す試料の物性把握に活用が広がっている。^{13,14)}

凍結溶液の熱測定で共晶の形成と融解が観察される例として、グリコール酸、L-グルタミン、NaCl、ポリエチレングリコール (PEG)、グリシン、およびマンニトール凍結水溶液 (10%, w/w, L-グルタミンのみ5%) を $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ で $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで冷却後に $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ で昇温測定した場合のDSC曲線をFig.5に示した。グリコール酸凍結水溶液の昇温測定では $-61\text{ }^{\circ}\text{C}$ に非晶質状態で濃縮された溶質の共晶形成による発熱ピーク (T_{cry}) が現れ、この共晶は $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ で融解 (T_{cu}) した。共晶融解後に見られるDSC曲線の吸熱側へのシフトは、 T_{cu} 以上で濃縮相周囲の氷晶が継続的に融解することを示唆した。L-グルタミンは冷却過程で非晶質状

態を保持し、凍結溶液の昇温測定では $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近に T_g が現れた後に $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近で比較的小さな共晶形成ピークが観察された。

NaClは注射剤の等張化目的に広く用いられ、凍結溶液の物性は古くから検討されてきた。NaCl水溶液は冷却過程で凍結後に発熱を伴って共晶 ($\text{NaCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を形成し ($-45\text{ }^{\circ}\text{C}$)、昇温過程では共晶融解 ($-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近) と水晶の融解ピーク ($-5\text{ }^{\circ}\text{C}$) が連続して現れた。PEG 3,000の凍結溶液は昇温過程の $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近で共晶を形成し、 $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近で共晶融解による発熱ピークが観察された。グリシン水溶液の冷却過程では凍結に続いて $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近に共晶形成による発熱ピークが現れ、昇温過程のDSC曲線は想定される β 形結晶の共晶融解 ($-3.4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 付近までは平坦となった。溶液を急速凍結するとグリシンは非晶質状態で凍結濃縮され、昇温過程で共晶の形成と多形変化を伴う複数のピークが現れることが報告されている。

マンニトール水溶液の冷却過程では、氷晶形成後の $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近に共晶の部分的な形成を示唆する小さな発熱ピークが現れた。また昇温測定では、 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近でDSC曲線が吸熱側にシフトした直後に共晶形成による発熱ピークが観察された。これらの吸発熱は水和物結晶を含む複数の結晶多形間の変化など複雑な挙動によることが、粉末X線回折の同時測定で明らかになっている。¹³⁾ 凍結溶液を $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで昇温して一定時間の保持により共晶を形成させた後に再度 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ から走査すると、氷の融解まで直線状のDSC曲線が得られた。同様な凍結溶液の熱処理による共晶形成と安定形への変化促進はアニリングと呼ばれる。

3.2 共晶を含む凍結溶液の乾燥

凍結溶液で共晶を形成する溶質は、適切な凍結乾燥により外観に優れた結晶性の多孔質固体を形成する。一般に結晶固体は非晶質固体に比べ物理・化学的な安定性が高く、その特性は結晶多形により異なる。凍結溶液の品温が一次乾燥過程で T_{cu} 以上になると、共晶の融解が濃縮相の粘度を大幅に低下させ、メルトバック現象と呼ばれるコラプスと同様な構造変化が起こる。また結晶固体中に存在する非晶質部分は高い吸湿性や分子運動性を持つことから、化学反応の起こりやすいホットスポットとして品質劣化の原因となる。このため凍結過程で目的とする多形の共晶を高率で形成させるとともに、一次乾燥過程で品温を共晶融解温度 (T_{cu}) よりわずかに低く保つことが品質確保と工程の効率化につながる。多くの共晶形成物質の T_{cu} は非晶質を保持する物質の T_g に比べて高いとともに、結晶性の既乾燥層は水蒸気移動の障害となりにくいことから、高温で短時間の一次乾燥が可能となる。

マンニトールやグリシンは凍結溶液中において T_{cu} の高い

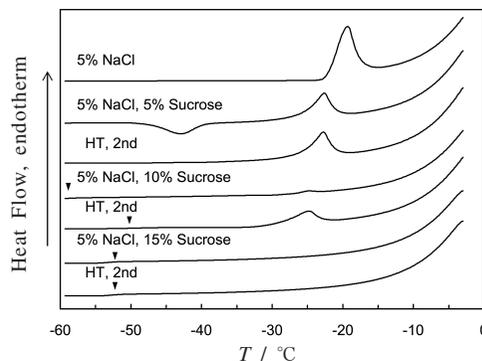


Fig.6 Effect of sucrose on eutectic crystallization of NaCl in frozen solutions. Some solutions were heat-treated for 5 min at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Arrows indicate T_g .

共晶を比較的容易に形成し、乾燥固体の物性と投与時の安全性に優れることから、一回投与量の少ない薬効成分を凍結乾燥注射剤とする際の賦形剤として用いられることが多い。一方で結晶の核形成や成長速度が遅い物質では、飽和溶液への微結晶添加や凍結溶液のアニリングが結晶化の促進に有効とされる。アニリングは各バイアルの熱履歴に由来する結晶性や多形のばらつきを抑制するとともに、結晶の大型化により固体内の水蒸気流路を増加させ、迅速な乾燥に寄与する。なお一部の溶質は高濃度溶液の冷却過程で凍結前に結晶が析出し、乾燥固体の特性に影響を与えることから、濃度設定や冷却速度の最適化により頑健性の高い製剤設計とプロセス構築が求められる。

4. 多成分凍結溶液の物性と凍結乾燥

4.1 混合による共晶形成の抑制

凍結乾燥の対象となる生体高分子製剤やDDS製剤には、主薬とともに安定化剤やpH調整剤など各種の添加剤が含まれる。このため熱測定による多成分凍結溶液の物性把握は製剤設計と工程の最適化に不可欠とされる。¹⁵⁾ 多成分凍結溶液では個々の溶質が持つ性質とともに、溶質の組合せや濃度比、凍結方法など様々な要因が共晶形成や転移温度などに影響を与える。ここでは多成分凍結溶液の物性について熱測定を用いた検討例を、異種分子間の相互作用別に紹介する。

水溶液中に含まれる多くの溶質は、凍結により氷晶間に混合状態で濃縮される。溶質の混合濃縮が与える最も明確な影響として、共晶形成の抑制があげられる。NaClと0~15%シヨ糖を含む凍結溶液を $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ で昇温測定した結果をFig.6に示した。5% NaCl水溶液の冷却過程で現れる共晶形成ピーク (Fig.5) は5%シヨ糖添加により昇温過程

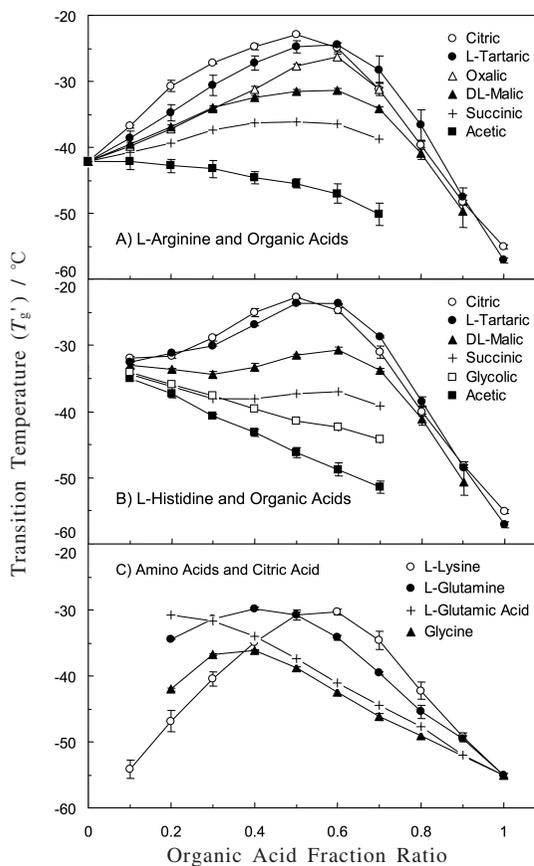


Fig.7 Glass transition temperatures of maximally freeze-concentrated solute (T_g') in frozen solutions containing an amino acid and an organic acid at varied concentration ratios (total 200 mM, average \pm SD, $n = 3$).

に移行し、昇温過程では共晶形成と融解の両ピークが観察された。これらのピークは15%シヨ糖添加により消失し、この凍結溶液の低い T_g' (-53 °C付近)も両溶質の混合濃縮を支持した。10%シヨ糖を添加した凍結溶液の昇温測定で観察される小さな共晶融解ピークは、昇温走査を -30 °Cで停止して5分間熱処理(アニリング)することにより、再冷却後の走査(HT)で明らかな拡大を示した。一方で5%シヨ糖を添加した溶液では、熱処理により共晶形成の発熱ピークの消失のみが観察され、15%シヨ糖を添加した凍結溶液では熱処理の影響は見られないことから、境界域となる凍結溶液の熱測定において共晶形成に対する速度要因の影響が大きいことが示唆された。シヨ糖やトレハロース添加による共晶形成の抑制はPEGやマンニトールなど多くの溶質で報告されており、タンパク質凍結乾燥製剤に添加さ

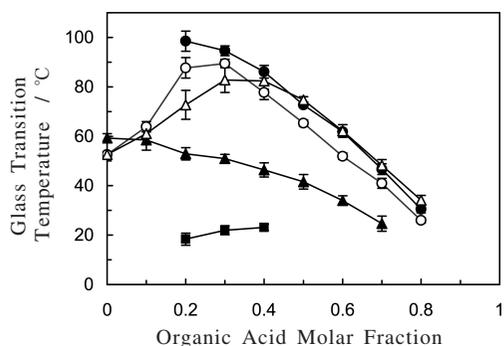


Fig.8 Glass transition temperatures of freeze-dried binary solids. Each symbol denotes transition of solids containing L-arginine and citric acid (\circ), L-arginine and tartaric acid (\triangle), L-histidine and citric acid (\bullet), L-glutamine and citric acid (\blacktriangle), or glycine and citric acid (\blacksquare) (total: 200 mM, average \pm SD, $n = 3$).

れる二糖類は高次構造保護作用とともに、共存する添加剤を非晶質状態に保持し、タンパク質周囲のpHなど環境変化を抑制する作用も持つと考えられる。

4.2 溶質間の相互作用と混合溶液の物性

分子間で特定の相互作用を持たない溶質の組合せでは、混合状態での凍結濃縮を示す単一の転移(T_g')が各溶質単独の凍結溶液の T_g' 間に現れる。溶質組成からの T_g' 推定には経験的に非晶質固体のガラス転移温度と同様にFox式等が用いられることが多い。凍結溶液の T_g' が低く一般的な凍結乾燥機を用いた乾燥が困難な溶質は、転移温度が比較的高い高分子類の添加によりコラプスを回避して効率的な乾燥が可能となる。一例としてグルコースなど単糖類に対し混合性の高い多糖類を添加して乾燥を進めることにより、ガラス転移温度の高い非晶質固体を得られる。

酸と塩基性物質など成分間で強い相互作用を形成する溶質の組合せでは、イオン結合や強い水素結合など静電相互作用が、凍結溶液と乾燥固体の物性に大きな影響を与える。アミノ酸類は古くから食品や生体高分子の凍結保存において安定化作用を示すことが知られてきた。アミノ酸類やその塩が持つ多様な物理・化学的特性は目的に合わせた高度な活用が期待される一方で、糖類に比べ製剤設計を難しくする原因にもなっている。そこで溶液中におけるタンパク質凝集抑制など様々な作用が知られるL-アルギニン等塩基性アミノ酸と各種の有機・無機酸の組合せをモデルとして、凍結溶液と乾燥固体の物性を検討した。¹⁶⁻¹⁸⁾

L-アルギニンとクエン酸凍結水溶液の熱分析では、非晶質濃縮相の転移(T_g')がそれぞれ -44 °Cと -55 °Cに観察さ

れた。¹⁶⁾ 両者を含む凍結溶液の T_g' はモル比1:1で-23℃付近まで上昇し (Fig.7), 凍結乾燥により最高90℃ (モル比7:3) にガラス転移を持つ非晶質固体を形成した (Fig.8)。同じ凍結乾燥により作製したL-アルギニンの T_g は53℃に、溶融体を急冷した非晶質クエン酸の T_g は9℃に現れ、異種分子間の相互作用がガラス固体の形成に寄与することが示唆された。またL-アルギニンとDL-酒石酸などヒドロキシジカルボン酸や2・3価の無機酸 (H_3PO_4 , H_2SO_4 など) の組合せ、および塩基性のアミノ酸であるL-リジンやL-ヒスチジンとクエン酸等の組合せも混合による凍結溶液の T_g' 上昇を示した。¹⁷⁾ これらの物質は医薬品添加剤としての使用例も多く、弱酸性から中性域での高い T_g' や T_g は、凍結乾燥注射剤への応用にも適すると考えられた。一方で1価の酢酸やHClなどの添加では転移温度の上昇は見られなかった。

溶質の構造と混合凍結溶液の T_g' の関係を検討する目的で、モデルとなる各種アミン類とカルボン酸の組合せについて同様の検討を行った。¹⁸⁾ 1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパンと各種カルボン酸を含む凍結溶液の T_g' は、クエン酸や酒石酸などヒドロキシジまたはトリカルボン酸との組合せで最高となり、高い転移温度を示す溶液を凍結乾燥するとガラス状態の非晶質固体が得られた。凍結溶液の T_g' や凍結乾燥固体の T_g 上昇には溶質の官能基 (アミノ基, カルボキシル基, 水酸基) 数の影響が大きく、立体構造等との直接的な関係は見られないことや、共存により官能基の環境が変化すること (IR, NIR 測定) から、異種溶質間のイオン間力や強い水素結合など静電相互作用のネットワークが濃縮相の分子運動性を低下させることが示唆された。また複雑な相互作用のトポロジーは、共晶形成に必要な再配列の抑制にも寄与すると考えられる。

非晶質固体の物性や分子レベルの構造は、一般に多価アルコールや糖類および非イオン性高分子をモデルとして検討されてきたことから、イオン性の非晶質固体についての情報は限られる。環境負荷の少ない溶媒として近年注目されるイオン液体の一部は、冷却によりガラス化することが知られ、凍結乾燥で得られたイオン性の固体と構造の類似点が多い。¹⁹⁾ イオン液体では溶媒に適した低粘度を確保するために必要な構成イオンの構造や組合せが解明されつつあり、逆に粘度上昇をもたらす要因の活用が、塩による安定なガラス固体の設計に寄与することが期待される。

共存物質による錯体形成やpH変化を介した相互作用強度の変化も、凍結濃縮相の分子運動性や共晶形成に影響を与える。トレハロースやマンニトール凍結溶液へのホウ酸や4ホウ酸ナトリウムの添加は、水素結合等の強化により濃縮相の分子運動を抑制 (T_g を上昇) し、マンニトールの共晶形成を抑制する。²⁰⁾ またアルカリ域のリン酸ナトリウム緩衝塩の添加により、トレハロース凍結溶液や乾燥固体

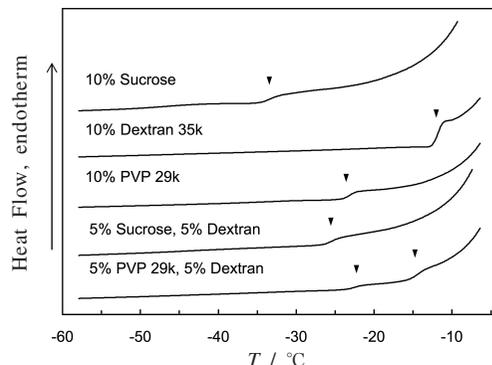


Fig.9 Thermograms of frozen solutions containing sucrose, PVP, and dextran. Arrows indicate T_g' .

の転移温度 (T_g' , T_g) が上昇することから、水素結合強化を介した物性への影響が示唆されている。²¹⁾

生体高分子の凍結乾燥や細胞等の凍結保存には、NaClの他にも緩衝液成分など各種の塩が用いられる。緩衝液を構成する塩の組合せのうち一方が凍結溶液中で共晶を形成すると、非晶質状態で残る塩の組成にあわせて濃縮相のpHは変動し、共存する生体高分子の安定性に影響を与える。代表的な例として中性付近のリン酸ナトリウム緩衝液では、凍結による2ナトリウム塩の結晶化にともない濃縮相のpHは4~5まで低下する。

4.3 凍結濃縮による相分離

これまで水溶液に含まれる各種の溶質は、共晶を形成する一部の例を除いて、混合状態で凍結濃縮されると考えられてきた。しかし分子間で熱力学的な相溶性が低い溶質の組合せでは、凍結による局所濃度の大幅な上昇により溶質が複数相に分離することが明らかとなっている。²²⁻²⁴⁾ 高濃度のポリビニルピロリドン (PVP) 29,000とデキストラン35,000を含む水溶液は室温で「水性二相分離」現象を示す代表的例として知られ、細胞や生体高分子の分離に用いられる。これらの高分子を低濃度 (各5%, w/w) 含む単相溶液を凍結して昇温測定すると、それぞれの高分子を主とする濃縮相への分離を示す2個の T_g が現れた (Fig.9)。この相分離は水性二相分離を抑制するNaSCNなど無機塩の添加により抑制される。²³⁾ 一方で水溶液での混合性が高いシヨ糖とデキストラン35,000の組合せでは、個々の溶質が持つ転移温度の中間に混合状態での凍結濃縮を示す単一の転移が現れた。同様に高濃度水溶液での混合性に優れたPVP10,000とデキストラン1,060の組合せでも単一の転移が観察された。タンパク質凍結溶液の T_g' は-10℃前後とされるが、熱測定では明確な転移が観察されない場合も多い。オ

ブアルブミンなど球形タンパク質とPVPやフィコールなど高分子添加剤の組合せを含む凍結溶液の熱測定から、両者の混合性が組成や緩衝塩など共存物質により異なることが明らかとなった。²⁴⁾

共晶形成傾向を持つ溶質を含む多成分溶液の凍結では、混合状態の凍結濃縮が共晶形成を抑制するのに対し、溶質毎に分離した濃縮相では単独溶液の場合と同様な共晶形成が観察される。例としてPEG 3,000と混合性の高いシヨ糖の添加は凍結溶液中におけるPEGの共晶形成を抑制するが、高濃度水溶液での2相分離が知られるデキストラン35,000の添加はPEGの共晶形成に影響を与えない。²⁵⁾ 熱測定で得られる転移温度や共晶形成・融解ピークを指標として、凍結溶液中の混合性の判別が可能な溶質の種類は限られる。しかし生体高分子や高分子添加剤をはじめとする様々な溶質の組合せが、高濃度溶液で二相分離を起こすことが報告されており、これらの溶質が低濃度溶液からの凍結濃縮においても相分離を起こす可能性は高い。²⁶⁾ また凍結乾燥では通常、凍結濃縮相の相分離状態を保持したまま乾燥が進むと考えられる。糖類による乾燥ストレスからのタンパク質高次構造保護には、水分子を代替する水素結合が寄与するなど、異種分子間の相互作用は製剤機能と密接に関係している。このため凍結濃縮による相分離は物性だけでなく製剤特性を左右する可能性がある。

各種添加剤の凍結溶液中における異なる物性挙動を複合的に活用した例として、グリシンやマンニトールとシヨ糖の混合乾燥による、結晶ケーキ固体へのタンパク質分散例が報告されている。²⁷⁾ 混合溶液をシヨ糖のコラプス温度以上で一次乾燥することにより、円柱状の外観を持つ多孔質のマンニトール結晶に、シヨ糖と高次構造を保持したタンパク質を含む非晶質相が微視的なコラプス状態で分散した安定な固体を、比較的短時間で得ることができる。

凍結乾燥の対象となる医薬品は、タンパク質や核酸など生体高分子および高機能製剤の開発とともに複雑化しており、品質変動要因の把握と工程制御に多成分凍結溶液の物性解明の重要性が高まっている。近年、リボソームを含むトレハロース凍結溶液の転移温度測定など、温度変調型DSCを用いた複合系の評価例が報告されており、同法の長所である原因別の吸熱熱分離により、凍結溶液の物性挙動解明がさらに進むことが期待されている。²⁸⁾

4.4 有機溶媒を用いた凍結乾燥

凍結乾燥の新たな方法として有機溶媒の活用が注目されている。水と t -ブチルアルコールの混液は比較的高温での固化が可能で、昇華により除去しやすいことから、凍結乾燥の溶媒として走査型電子顕微鏡 (SEM) 試料の作製に用いられてきた。この混液では疎水性物質の溶解性や凍結に

より形成する共晶の構造が水溶液と異なることから、難溶性医薬品の非晶質化や、新たな結晶多形や粒子特性を持つ製剤開発への活用も試みられている。²⁹⁾ 製剤の開発にあたっては、各成分が示す複雑な物性挙動について、熱測定や他の評価法を用いて理解を進めることが必要と考えられる。

5. おわりに

凍結溶液の熱測定では比較的容易に工程制御に有用な情報を得られる。また塩や錯体の形成など異種溶質間の相互作用によるガラス固体化は、凍結乾燥の対象となる医薬品の範囲を広げる可能性を持つ。水溶液の乾燥や凍結が関与する分野は広く、比較的シンプルな系である医薬品の凍結乾燥検討で得られた知見の各方面での活用が期待される。

追記

Fig.2と5は日本薬学会より承認を得てChemical & Pharmaceutical Bulletin, Vol.57, No.1 (2009)より転載した。

文献

- 1) F. Franks, *Cryo-Letters* **11**, 93 (1990).
- 2) J. L. Ford and P. Timmis, *Pharmaceutical Thermal Analysis*, Ellis Horwood, Chichester, UK (1989).
- 3) B. S. Chang and C. Randall, *Cryobiology* **29**, 632 (1992).
- 4) D. Q. Craig, P. G. Royall, V. L. Kett, and M. L. Hopton, *Int. J. Pharm.* **179**, 179 (1999).
- 5) S. F. Mathias, F. Franks, and R. H. M. Hatley, *Anal. Proceedings* **27**, 48 (1990).
- 6) H. Levine and L. Slade, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **4**, 2619 (1988).
- 7) N. Ekdawi-Sever, L. A. Goentoro, and J. J. De Pablo, *J. Food Sci.* **68**, 2504 (2003).
- 8) 川上亘作, *Netsu Sokutei* **35**, 185 (2008).
- 9) B. C. Hancock and G. Zografis, *J. Pharm. Sci.* **86**, 1 (1997).
- 10) E. Meister and H. Gieseler, *Eur. Pharm. Rev.* **5/08** (2008).
- 11) X. Tang and M. J. Pikal, *Pharm. Res.* **21**, 191 (2004).
- 12) S. Rambhatla and M. J. Pikal, in *Lyophilization of Biopharmaceuticals*, M. J. Pikal, H. R. Costantino (eds.) AAPS, Arlington, USA (2004).
- 13) A. Pyne, R. Surana, and R. Suryanarayanan, *Pharm. Res.* **19**, 901 (2002).
- 14) V. L. Kett, S. Fitzpatrick, B. Cooper, and D. Q. Craig, *J. Pharm. Sci.* **92**, 1919 (2003).
- 15) S. L. Nail, S. Jiang, S. Chongprasert, and S. A. Knopp, *Pharm. Biotechnol.* **14**, 281 (2002).

- 16) K. Izutsu, S. Kadoya, C. Yomota, T. Kawanishi, E. Yonemochi, and K. Terada, *Chem. Pharm. Bull.* **57**, 43 (2009).
- 17) K. Izutsu, Y. Fujimaki, A. Kuwabara, and N. Aoyagi, *Int. J. Pharm.* **301**, 161 (2005).
- 18) S. Kadoya, K. Izutsu, E. Yonemochi, K. Terada, C. Yomota, and T. Kawanishi, *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 821 (2008).
- 19) H. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **79**, 1665 (2006).
- 20) D. P. Miller, R. E. Anderson, and J. J. de Pablo, *Pharm. Res.* **15**, 1215 (1998).
- 21) S. Ohtake, C. Schebor, S. P. Palecek, and J. J. de Pablo, *Pharm. Res.* **21**, 1615 (2004).
- 22) T. W. Randolph, *J. Pharm. Sci.* **86**, 1198 (1997).
- 23) K. Izutsu, M. C. Heller, T. W. Randolph, and J. F. Carpenter, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **94**, 411(1998).
- 25) K. Izutsu, S. Yoshioka, S. Kojima, T. W. Randolph, and J. F. Carpenter, *Pharm. Res.* **13**, 1393 (1996).
- 24) K. Izutsu and S. Kojima, *Pharm. Res.* **17**, 1316 (2000).
- 26) V. B. Tolstoguzov, *Food Hydrocolloids* **2**, 195 (1988).
- 27) R. E. Johnson, C. F. Kirchhoff, and H. T. Gaud, *J. Pharm. Sci.* **91**, 914 (2002).

- 28) E. C. van Winden, H. Talsma, and D. J. Crommelin, *J. Pharm. Sci.* **87**, 231 (1998).
- 29) K. Kasraian and P. P. DeLuca, *Pharm. Res.* **12**, 484 (1995).

要 旨

熱測定を用いた凍結溶液の物性評価と、凍結乾燥医薬品の製剤設計や工程制御への活用について紹介した。水溶液中の溶質は凍結により氷晶間に高度に濃縮され、一部は共晶を形成する。凍結溶液の熱測定で観察される最大濃縮相ガラス転移や共晶融解の温度 (T_g' , T_{cu}) は、コラプスやメルトバック現象を回避して多孔質ケーキ構造の結晶または非晶質ガラス状態の乾燥固体を作製するための指標となる。複数の溶質を含む凍結溶液の物性は、個々の溶質が持つ特性とともに相互作用や混合性の影響を受けることから、物性評価に基づく適切な添加剤の選択は凍結乾燥製剤の品質向上や工程の効率化につながる。



伊豆津健一 Ken-ichi Izutsu
 国立医薬品食品衛生研究所, National
 Institute of Health Sciences, TEL. 03-
 3700-1141 (ext.229), FAX. 03-3707-
 6950, e-mail: izutsu@nihs.go.jp
 研究テーマ：医薬品の製剤設計と評価法
 開発
 趣味：マラソン, ケーキ作り