

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007-2009

課題番号：19780102

研究課題名 (和文) 超音波凍結プロセス制御による凍結乾燥医薬の最適固体構造の創製

研究課題名 (英文) Optimization of solid structural properties of freeze-dried pharmaceuticals by freezing process control with ultrasound devices.

研究代表者 中川 究也 (NAKAGAWA Kyuya)

兵庫県立大学・工学研究科・助教

研究者番号：90433325

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、凍結乾燥製品 (医薬・機能性食品) の品質と製造工程とを相互に最適化するために、予備凍結物質中に形成する濃縮体の固体構造を精緻な凍結操作によって制御しようと試みるものである。凍結乾燥マンニトールに関する検討から得られた結果によれば、安定性の異なるマンニトール結晶が凍結条件に応じて凍結乾燥サンプル内に分布することが確認された。また、タンパク質を添加した場合のタンパク安定性に与える凍結条件の検討を行った結果、モデルとして使用した乳酸脱水素酵素 LDH の活性は冷却速度等の凍結条件に大きく依存することが確認され、これは凍結条件に応じてリオプロテクタントの固体構造の形成に起因するものであることが予測された。そこで凍結乾燥酵素の酵素活性を、プロセスの操作によって制御することを試みた。超音波装置の導入によって氷核形成温度を制御する試みは、凍結過程における温度履歴を制御するのに有効であることが分かったが (結晶性物質の結晶多形を変化させ得ることも確認できたが)、リオプロテクタントを含有させた系においてはさほど大きな影響を与えうるものと確認されなかった。むしろ、冷却過程においてリオプロテクタントが示す動的な構造変化が、含有するタンパク質の安定化には最重要因子であることを予見するに至った。冷却過程においてゲルを形成する物質を凍結保護物質とすることを試みたところ、「冷却速度」「ゲル化速度」との二つの動的因子が LDH 活性と強く結びついている結果を得た。凍結時の温度制御と平行に制御可能なゲル形成をタンパク質の安定化と結びつけることを見いだした本研究の成果により、凍結プロセス制御による乾燥製品の更なる安定化向上を図るための大きな指針が得られたと言えよう。

研究成果の概要 (英文)：

This research work on optimization of pharmaceutical freeze-drying process was to investigate solid structural properties that form in the cryo-concentrated phase during freezing. The results from mannitol freeze-drying test concluded that the crystalline structures (polymorphs) were heterogeneously distributed in the dried bulk dependent to its freezing condition. When we add a model protein (enzyme, lactic acid dehydrogenase was employed) in the starting formulation, the enzymatic activity in the freeze-dried bulk was also heterogeneously distributed. It was clearly suggested that the activity variances were due to the structural property variances of the lyoprotectant. We thus had an attempt to stabilize the freeze-dried enzyme activity simply by the process operation, that is, freezing process. It was found that the ultrasound device that can control the ice nucleation event was useful to control thermal history of the solution during freezing, and to control the solid structure of crystalline substances. However, it was not so much effective to control the solid structure in the solution with lyoprotectant. Nevertheless, kinetics of the structural change (such as sol-gel transition) of the lyoprotectant was supposed to be a crucial factor to stabilize protein. A substance that exhibits gelling feature was thus

employed as a lyoprotectant. As a matter of fact, we found that the cooling protocol and the sol-gel transition kinetics were strongly correlated to the protein activities. These results indicate that the stability (or activity) of freeze-dried protein pharmaceuticals is to be controlled simply by thermal protocols that controls structural characteristics of solid substances during freezing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2100000	0	2100000
2008年度	800000	240000	1040000
2009年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3400000	390000	3790000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：(1) 凍結乾燥、(2) 凍結、(3) 結晶多形、(4) 氷結晶、(5) マンニトール
(6) 超音波、(7) 乳酸脱水素酵素 (LDH)

1. 研究開始当初の背景

凍結操作時の氷結晶の成長速度と、系内の温度勾配が形成する氷結晶のサイズを決定することが経験的に知られている。ここで氷結晶成長の推進力は過冷却度に一次比例することから、凍結操作によって形成する氷結晶サイズは系内の伝熱過程によっておよそ決定される。氷結晶の形成に伴って濃縮層が形成されるわけであるから、濃縮体の構造は形成する氷結晶モルフォロジーにも影響されると考えられよう。凍結乾燥製薬の製造に関して、例えば薬液によるたんぱく質の安定化には濃縮体の非晶質構造が望ましいと考えられているが、すると非晶質構造を形成させるためには凍結速度を速くするべきとの経験的知見に至る。しかし、急速凍結によって形成する小さな氷結晶はたんぱく質の安定化には望ましくないと報告されている。一見矛盾する報告であるが、氷結晶とたんぱく質の相互作用に起因してたんぱく質がダメージを受けるためである。これらの研究は氷結晶の形成と濃縮体構造の双方をバランスよく制御する必要性を認識し、精緻な凍結操作を実現させることの重要性を間接的に示唆しているといえよう。

氷結晶成長過程はおよそ系内の伝熱過程により制御できると考えられるが、問題は核形成過程が自発的な現象であるために核形成を開始する温度を予測・制御できない点に

ある。従って既往の研究において凍結操作は主として予冷温度、凍結速度によって議論されてきた。

凍結乾燥製薬の製造に関して限定的に述べれば、プロセスの最適化（乾燥時間の短縮など）が製品品質の最適化（製薬の安定性）に必ずしも結びつかないケースが少なからず見受けられる。例えば研究代表者の先行研究は、凍結乾燥プロセスの最適化のために氷結晶サイズを制御し、乾燥時間の大幅な短縮を図るものであったが、凍結乾燥製薬としての安定性の保持を可能とする提案であったかどうかには疑問が残る。これは製品の機能と製造工程との両者を包含する観点が欠如していたからに他ならず、薬学分野と工学分野とを結ぶ統合的な観点が必要となると考えて妥当であった。

2. 研究の目的

本研究は、凍結乾燥製品（医薬・機能性食品）の品質と製造工程とを相互に最適化するために、予備凍結物質中に形成する濃縮体の固体構造を精緻な凍結操作によって制御しようとするものである。実際に酵素活性を持つタンパク質をモデルとして含有する凍結乾燥モデル医薬を作製し、酵素活性をプロセス制御によっていかに向上させられるかの検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

4ml のガラスチューブ（内径 13.5mm）をアルミニウム板状に設置し、内部に試料（10% マンニトール溶液）2ml を入れた。アルミニウム板は熱交換器（熱交換器内部には温度が制御された冷媒が流れている）の上部に固定しており、試料溶液は液底部における熱交換により内部温度を制御されている。溶液温度はバイアル外部に取り付けた熱伝対により、凍結乾燥時の温度履歴を測定した。容器底部のアルミプレートには超音波振動子を固定し、超音波振動によって氷核形成を誘起させ、凍結開始温度を制御した。溶液は一定の冷却速度（-0.5、-2°C/min）を保ちながら 5°C から -40°C まで冷却させ、溶液を完全固化させた。得られた凍結サンプルは -20°C、10Pa にて凍結乾燥させた。乾燥条件に拠る構造の変化を避けるため、圧力が制御された条件で真空乾燥を行った。得られた円柱上の乾燥サンプルをバイアルから慎重に取り出し、鉛直方向に対して四等分した。それぞれのサンプルを粉末 X 線回折によって構造分析し、氷結晶の成長方向に対するマンニトール結晶の構造の分布を同定した。

凍結操作因子と形成される濃縮体構造とのあいだに見いだされた相関関係をもとにして、凍結サンプル内部に形成している氷結晶構造と濃縮体構造との間に存在する因果関係を調査した。凍結の数式モデルを用いた有限要素計算によって内部温度履歴を推算し、本課題の考察に用いた。

また、モデルタンパク質として乳酸脱水素酵素 LDH を使い、LDH の活性が凍結乾燥時にどれだけ保持出来るか、またその活性が乾燥サンプル内でどのように分布するかについて調査した。LDH の活性評価は、NADH の脱水素反応を利用し、NAD⁺の生成に伴う NADH 濃度の減少速度を UV-Vis 分光光度計にて測定することで行った。

4. 研究成果

一般にマンニトールには α 、 β 、 δ 形の三種類の結晶多形が知られており、 $\beta > \alpha > \delta$ の順に安定性が異なる。さて、本研究より得られたマンニトール凍結乾燥サンプル内の結晶多形分布は、Fig. 1 に示す様に凍結時の冷却速度と氷核形成温度に依存性があると考えられた。この凍結過程におけるマンニトールの析出挙動を理解するために、凍結界面における晶析モデルを考案した (Fig. 2)。まず、マンニトール-水系の共晶点を測定したところ、約 -2.7°C であったため、過冷却解除後（統計的に過冷却解除は -2.7°C より低いことが多い）、氷結晶の形成と同時にマンニトール結晶も析出すると考えられる。又、凍結界面はこの温度に保たれたまま前進すると考えて妥当である。シミュレーションより

予測した温度分布を基にすれば、凍結界面の進行を図中 C 線で示すことが出来る。C 線上部は液相であるが、マンニトール溶液の飽和温度以下の領域は、過飽和領域と理解できる。その領域においては凍結界面に先んじて結晶成長が進行する可能性があり、結晶成長の進行に伴いその領域は変化する。また、マンニトール-水系のガラス転移点は -20°C 程度と報告されていることより、この温度までは溶媒媒介転移が起こりうると考えられる。従って Fig. 2 中、B-d 線の領域は界面近傍で析出したマンニトール準安定晶の溶媒媒介転移が可能な領域と考えられる。このモデルを実際の実験条件に当てはめる。Fig. 3-A は冷却速度 -2°C/min、凍結開始温度 -5.0°C とした場合の凍結サンプル内の温度履歴シミュレーション結果、Fig. 3-B は冷却速度 -0.5°C/min、凍結開始温度 -5.0°C とした場合である。これらの比較から分かる様に、冷却速度の変化によってサンプル内部に出来る温度分布が大きく異なり、凍結界面近傍における過飽和領域の変化、そして結晶転移の可能な時間領域に大きな変化をもたらしていることが確認できる。これらの変化が凍結過程における結晶の析出挙動を決定付けるのではないかと予測された。以上の結果はその詳細を発表論文 2 にて報告した。

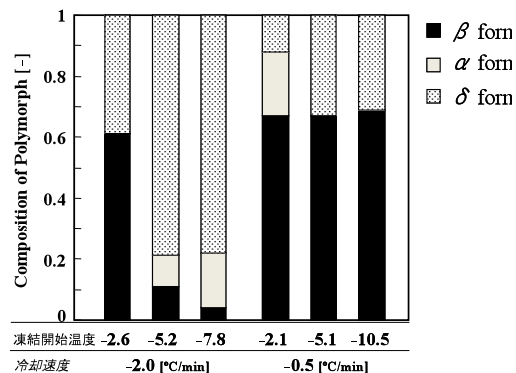


Fig. 1. 凍結乾燥マンニトールの結晶多形分布

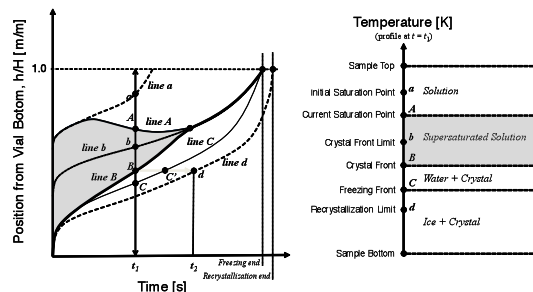


Fig. 2. 凍結界面における晶析の進行モデル

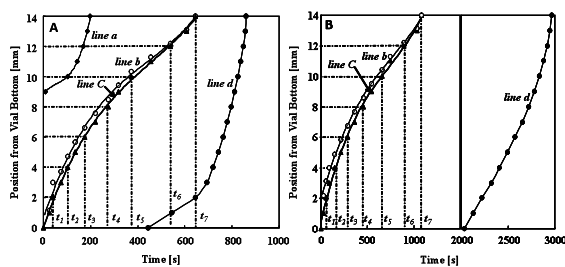


Fig. 3. 凍結界面近傍における温度変化 (シミュレーション)

上記結果より、凍結過程の温度履歴を制御することで、凍結時に溶液内部に形成する固体構造を理路整然と制御できる可能性が示唆されたと言える。そこで、これら溶液に酵素活性を有するたんぱく質を含有させ、その活性制御を試みた結果を以下に記す。まず、リオプロテクタントを含有させずにマンニトールとLDHのみを含む溶液から凍結乾燥物を作製した場合、Fig. 4に示すように活性の分布が試料内部に分布することが分かった。特に興味深いのはサンプル下部層 (B) においてはほぼすべてのLDH活性が失われていることであり、先に説明したマンニトールの結晶多形分布と相関しているように伺える。ただし、そもそもの活性自体が極めて低いことから、リオプロテクタントを添加することによって一定の活性を確保することで議論を進めたほうが意義深い。リオプロテクタントとしてカラギーナンを添加し、LDH活性に与える影響を調査した結果をFig. 5に示す。

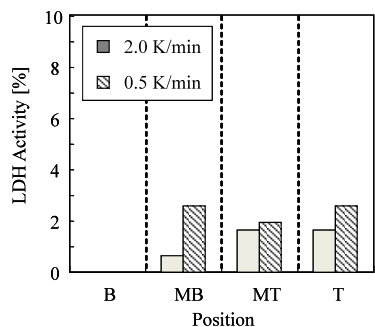


Fig. 4. LDH 活性 (マンニトール水溶液)

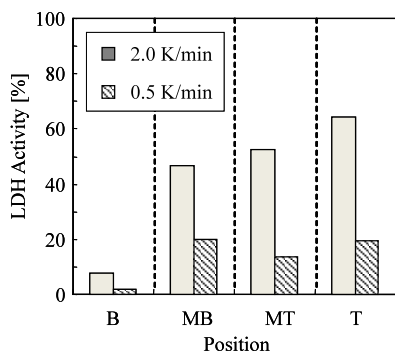


Fig. 5. LDH 活性 (マンニトール+0.1%カラギーナン)

凍結条件に依存して、LDH活性は凍結乾燥サンプル内部に分布することが確認された。なお、カラギーナン添加量に応じてLDH平均活性が変化していることも確認しており、0.1-0.2%程度の添加量が適当であることを実験的に見出している。特に急速冷却を実施した場合にはカラギーナン添加量が0.2wt%時に非常に高いLDH平均を示した。また、緩慢冷却に関してはカラギーナン添加量に比例してLDH平均活性も高くなっていくことがわかった。また、緩慢冷却にて最もLDH活性が高かった濃度条件について、乾燥温度を -10°C と上げて凍結乾燥を行ったところ、 -20°C の場合と比べてサンプル内のどの部位においても活性の低下がみられ、サンプル全体で平均活性は半減した。一方、急速冷却条件では乾燥温度のパラメータは酵素活性にほとんど影響が見られなかった。

凍結条件に依存した酵素活性の分布は、単純にその部位に形成した固体構造を反映するものとは言い切れない。酵素の失活を直接的に導く因子として、凍結時に形成する氷晶による凍結障害、乾燥時の脱水障害、また、保護物質の固体構造が適切に形成していないことによる失活が挙げられる。しかし、凍結過程において試料内部にたんぱく質の濃度分布が出来ていたとすれば、それは見かけの失活に結びつく。そこで、プロテインマーカーを用いた凍結乾燥試料内部のLDH濃度分布を測定した (Fig. 6)。すると興味深いことに、急速凍結を行った場合にはほぼ均一に分布していたLDHが、緩慢凍結の場合には下部層に濃縮されていることが分かった。その原因の解明は今後の研究を待たねばならないが、恐らく冷却過程において形成するゲルネットワーク内に自発的にたんぱく質が取り込まれ (吸着のような現象か) たためと考えられる。実際、カラギーナンを含有しない試料にて同様の検討をしたところ、急速凍結、緩慢凍結とも、内部に均一にタンパク質が分布していた。ゲル形成をするカラギーナンが一因であることはほぼ確実である。

この結果が興味深いのは、緩慢凍結の場合に乾燥製品の酵素活性が下がるのは、最も凍結障害を受けやすいと考えられる下部層にたんぱく質が集まっているためであり、実質的なタンパク質の含有量基準で考えれば、緩慢凍結時の試料上部層の活性は極めて高いものであったことが分かる。今後、ゲル形成を積極的に利用することで、プロセスの操作のみによって高い酵素活性を導く方法論を見出せるのではないかと。実際に、この結果を踏まえて凍結プロセスに工夫を加えることにより、容器下部層における失活を抑制し乾燥試料全体の活性向上にも成功しており、今後のさらなる検討によって方法論の確立を目指していきたい。

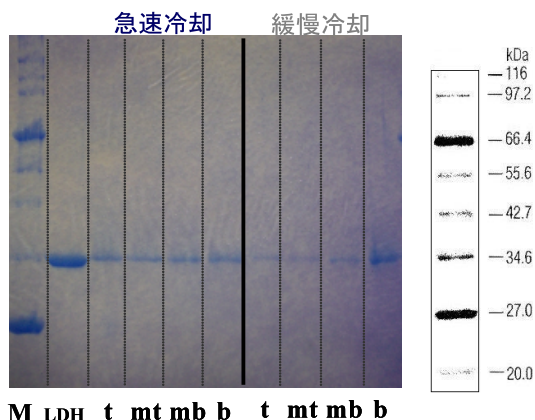


Fig. 6. 凍結乾燥試料 SDS-PAGE

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

1. K. Nakagawa, A. Hottot, S. Vessot and J. Andrieu. Modelling of Freezing Step during Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals. -Influence of Nucleation Temperature on Primary Drying Rate. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, in print (2010).
2. K. Nakagawa, W. Murakami, J. Andrieu and S. Vessot. Freezing Step Controls the Mannitol Phase Composition Heterogeneity. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(8):1017-1027 (2009)
3. A. Hottot, K. Nakagawa and J. Andrieu. Effect of ultrasound-controlled nucleation on structural and morphological properties of freeze-dried mannitol solutions. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(2):193-200 (2008).
4. K. Nakagawa, W. Murakami and J. Andrieu. Influence of Freeze-Drying Conditions on Crystalline Structure of Mannitol. *Proceedings of International Drying Conference 2008* (B.N. Thorat ed.) University of Mumbai Publisher, India, pp. 1794-1800 (2008)
5. K. Nakagawa, A. Hottot, S. Vessot and J. Andrieu. Modelling of Freezing Step During Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals. Influence of Nucleation Temperature. *The Proceedings of the 5th Asia-Pacific Drying Conference* (G. Chen ed.) World Scientific, HongKong, pp. 865-870 (2007)

[学会発表] (計11件)

1. K. Nakagawa, K. Matsusue, W. Murakami, MJ Choi, SG Min, S. Vessot and J. Andrieu.

Influence of Freeze-Drying Condition on Enzyme Activity in a Freeze-Dried Bulk. 6th Asia-Pacific Drying Conference, Bangkok, Thailand, 19-21 October, 2009. 口頭発表

2. 中川 究也, Severine Vessot, Julien Andrieu 「凍結進行過程からの凍結乾燥マンニトール結晶構造の予測」、日本食品工学会第10回年次大会、(金沢、2009年8月)
3. K. Nakagawa, K. Matsusue, W. Murakami, MJ Choi, SG Min, S. Vessot and J. Andrieu. Heterogeneity of Enzyme Activity in a Freeze-Dried Bulk. *European Drying Conference AFSIA2009*, Lyon, France, 14 - 15 May, 2009.
4. K. Nakagawa, S. Vessot and J. Andrieu Freezing Step Modelling for Vial Freeze-Drying. *European Drying Conference AFSIA2009*, Lyon, France, 14 - 15 May, 2009
5. 松末 一博・中川 究也 「凍結乾燥医薬のタンパク質活性に与える凍結条件の影響」、化学工学会学生発表会、(岡山、2009年3月)
6. K. Nakagawa, W. Murakami and J. Andrieu. Influence of Freeze-Drying Conditions on Crystalline Structure of Mannitol. *16th International Drying Symposium*, Hyderabad, India, 9-12 November, 2008. 口頭発表
7. 中川 究也・村上 航・北村 光孝 「凍結乾燥マンニトールの結晶構造と凍結進行過程の相関関係」化学工学会第40回秋季大会、(仙台、2008年9月) 口頭発表
8. 中川 究也・村上 航 「凍結乾燥マンニトールの結晶構造と凍結操作の関連性」日本食品工学会第9回年次大会、(東京、2008年8月) 口頭発表
9. 中川 究也・村上 航・北村 光孝 「凍結乾燥マンニトールの凍結操作による結晶構造制御」、化学工学会第73年会、(浜松、2008年3月) 口頭発表
10. 村上 航・中川 究也・北村 光孝 「凍結乾燥医薬の結晶構造に与える凍結条件の影響」第10回化学工学会学生発表会 (大阪、2008年3月) 口頭発表
11. K. Nakagawa, A. Hottot, S. Vessot and J. Andrieu. Modelling of Freezing Step During Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals. Influence of Nucleation Temperature. *The 5th*

Asia-Pacific Drying Conference, HongKong,
China, 13-15 August, 2007. 口頭発表

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 究也 (NAKAGAWA Kyuya)

研究者番号：90433325