

点眼剤の滅菌バリデーション

The sterilization validation for the ophthalmic preparations

戸島 洋一 定塚 豊
Youichi TOJIMA Yutaka JOUDUKA
宮本 与志博 黒崎 晴三
Yoshihiro MIYAMOTO Seizou KUROSAKI
日東メディック株式会社 技術保証本部
Nittomedic Co. Ltd Technology Assurance headquarters

1. はじめに

日東メディック株式会社は1985年より富山県の八尾町を拠点において5mL~420mLの点眼液、洗眼液などの点眼剤、眼軟膏剤等眼科用剤を主として製造している従業員数約120名の会社である。

眼科用剤はその適用部位の特殊性から、局方には外用剤としては唯一「無菌」、「異物」、「不溶性微粒子」などの規定がある製剤で、製造にあたり厳しく管理されねばならない製剤である。

特に、「無菌」については、点眼剤はガラス製容器に充填されている注射剤と異なり、多くは耐熱性に劣るプラスチック製容器、すなわちPETやPE、PPに充填されていることから、最終滅菌できない無菌製剤ということになる。従って、製造工程(滅菌工程)において「無菌」を担保し、製品の「無菌性を保証」する必要がある。このために日東メディックではそれぞれの製造工程の滅菌バリデーションを実施している。

このように厳しい製造管理を行わなければならない「点眼剤の無菌確保」について富山県産業振興課、富山県薬事研究所の指導を仰ぎながら取り組んで来た内容について報告する。

2. 滅菌工程のバリデーション

滅菌工程のバリデーションのためには、「製造環境」、製造に使用する全ての「原材料」、「設備装置」及び「器具・備品」についての管理が重要となる。

点眼剤でろ過滅菌を行う製品の製造フローの概略をFig.1に示す。原料の秤量、溶解、濾過滅菌を行ってその後、無菌操作エリアすなわちクラス100のエリアで充填閉塞を行う。

次に製品の中で濾過滅菌できない物の製造フローの概略をFig.2に示す。すなわち眼軟膏剤、懸濁点眼剤、粉末製剤だがこれらの製造では、秤量から充填閉塞まで広範囲に渡っての無菌の工程がある。

これらの理由から多岐に渡って滅菌バリデーションを実施する必要がある。

1) 器具の滅菌

製造に使用する器具の滅菌には、主に高圧蒸気滅菌による滅菌、オートクレーブを採用している。

これらの器具滅菌のバリデーションの実施項目として①庫内の温度分布測定(装置の大きさにもよるが、測定点を2~12点を実施している。)②品温の測定(熱浸透の劣るものとして重量のある部品や複雑な形状の部品を選んでその部分に熱電対を仕込んで品温が121℃になっているか、また20分以上滅菌温度を保っているかを確認する。)③再汚染防止のため、エアブレイクフィルターの滅菌や、完全性の確認等を実施している。

2) 製造装置の滅菌

点眼剤において製造装置はFig.3の様に液の調製のための攪拌タンクと送液配管、フィルター、貯液タンク及び充填機で構成されている。これらの製造装置は高圧蒸気によるSIP(定置滅菌)で滅菌している。バリデーションするときのポイントとしてまず①ドレンの排出があげられる。ドレン水の部分の温度は110~115℃程度までしか上がらない。装置のセンサーでは121℃以上になっていても局所的に滅菌温度に達していない場合がある。これにはスチームトラップの選定や、配管勾配をつける等に対応している。②エアだまりも重要なポイントになる。Fig.3のような長いラインでは2箇所以上のところから蒸気を供給しているが、この場合必ず、スチームの拮抗するポイントがエアだまりになり、その部分が局所的に滅菌温度に達しなくなる場合がある。そのような場合は配管のバルブとドレン

の位置を考慮したり、時間差を付けて滅菌する等している。それから③無菌濾過フィルター2次側の部分の温度が上がりにくい部分であり無菌性が一番必要な部分なので、センサーを取りつけ121℃以上20分以上を確認している。

3) 容器の滅菌

点眼剤で使用する点眼容器はほとんど委託滅菌しているが一部については自社で滅菌している。

滅菌方法として、委託滅菌の場合「EOG」、「電子線」、「過酸化水素」がある。

自社滅菌として「乾熱滅菌」、「EOG」などを利用している。これらの容器の「滅菌バリケーション」として主に①バイオロジカルインディケーター(BI)の死滅確認②使用ガス残留濃度(EOG)③材質劣化試験(EB)④コールドポイントの確認(乾熱滅菌)等を実施している。

4) 原料の滅菌

点眼剤で濾過滅菌できない製剤の場合原料の滅菌が必要になる。すなわち、用時溶解点眼液の粉末原料、懸濁点眼剤眼軟膏の原料、眼軟膏基剤である。これらの滅菌は乾熱滅菌により行っている。

乾熱滅菌による滅菌は、品目により熱浸透性が異なるため、実際の原料を使用して確認する必要がある。特に粉末原料ではその差が顕著に現れる。バリケーション項目としては、容器等の乾熱滅菌と同様に①コールドポイントの確認②BIの死滅確認などがあげられる。

Fig.4は2種類のプラセボ粉末を同時に加熱し、品温の昇温パターンを比較したものである。低い部分が酸化マグネシウムの温度で、高い部分が珪酸マグネシウムの品温と滅菌器の庫内雰囲気温度である。珪酸マグネシウムの品温は160℃に到達しているが、酸化マグネシウムは達していない。この昇温パターンの差はTable 1に示すように珪酸マグネシウムのほうが密度が高いこと、すなわち空隙率の差に起因している。

5) 薬液の滅菌

薬液滅菌については、懸濁液剤を除き0.2μmの無菌濾過フィルターによるろ過滅菌を採用している。そのバリケーション項目は①ろ過適性試験 これは薬液中に目詰まり成分が無いか確認して安定した無菌濾過ができるか確認するものである。さらに②バクテリアチャレンジテスト(BCT)③成分の吸着④完全性試験等を実施している。

6) 作業室の滅菌

無菌操作を行う区域(調製室及び充填室)は一定間隔でホルマリン蒸気が発生させ滅菌している。評価項目としては①BIによる確認(*Bacillus Subtilis* 10⁶)濃度によっては滅菌レベルまで達成可能。②ホルマリン濃度だが、日東メディックでは10mg/Lをひとつの目安として滅菌を実施している。なお、間仕切等でホルマリン蒸気の拡散が妨げられるのでできるだけ小分けして各部屋に発生装置を配置するようにしている。それから③薫蒸後の残留ホルマリン濃度管理や④薫蒸後の差圧調整も重要なポイントとしている。

3. 無菌操作工程のバリケーション

無菌操作工程のバリケーションとして実施しているのが培地充填試験である。培地充填試験は無菌製剤の製造工程の無菌性を担保する試験法として、13局の参考情報に記載されている。

点眼剤の場合では主に無菌ろ過後の工程について液体培地を点眼容器に充填して培地充填を実施している。

また眼軟膏においては調製工程のほとんどが無菌操作という場合が多いので調製工程の培地充填を実施している。まず予備調製工程の培地充填として、予備調製工程の操作をシュミレートして液体培地を調製するという培地充填試験を実施している。本調製工程においても120Lの調製槽で眼軟膏の調製量と同じ量の90kgの液体培地を調製するという培地充填も実施している。また充填閉塞工程の培地充填も実施しているが、これは液体培地を軟膏チューブ充填機で軟膏アルミチューブに充填する、という方法を採用している。

粉末充填においては容器に適当な粉末原料(タウリン等)を充填後、液体培地を充填する方法をとっている。

いずれの培地充填も環境モニタリングによる環境管理の評価や工程のバリケーションによる工程の安定や標準作業手順の習熟、無菌操作手順の習熟が大切であり、その総合的な評価を培地充填により確認していると考えている。

培地充填試験のポイントだが、まず①充填数量は主に4750本で実施している。それから②充填時間は工程のワーストケースを想定して設定。また③充填量はできるだけ現状に近づけているが、装置の都合や、大容量容器等の場合は少ない充填量で実施することもある。その場合は壁面全体に液が付着するように充填した容器を回転させる等している。

今後の課題

- ① バクテリアチャレンジ試験でのグルーピング
- ② 点眼剤への電子線滅菌の応用

を検討している。

バクテリアチャレンジ試験でのグルーピングはフィルターメーカーと共同で既許可品目についてグループ化することを検討している。また点眼剤への電子線滅菌の応用では、まず原料の電子線滅菌について検討し、その後製品等の最終滅菌としての応用を検討したいと考えている。

5. まとめ ～日東メディックの考える無菌性保証とは～

無菌製剤の無菌性を保証するためには無菌試験のような精度の低い試験では保証できない。培地充填試験も 10^{-3} と言われる。日東メディックの求める無菌性保証とは製品を試験して保証するのではなく、滅菌工程における要素や、因子などを管理し、また無菌操作工程においては無菌性を損なう原因について管理し、製造工程で無菌性を作り上げるものと考えている。

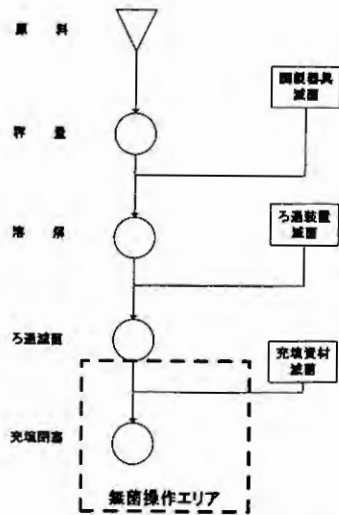


Fig.1 点眼液の製造フロー(ろ過滅菌工程有り)

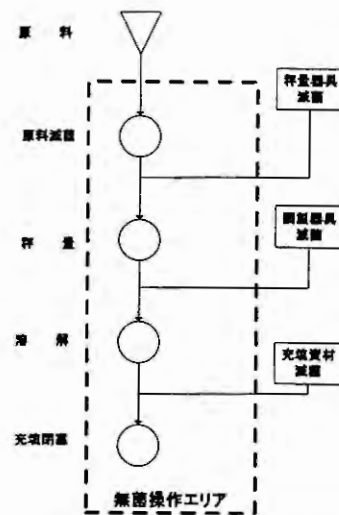


Fig.2 点眼液の製造フロー(ろ過滅菌工程無し)

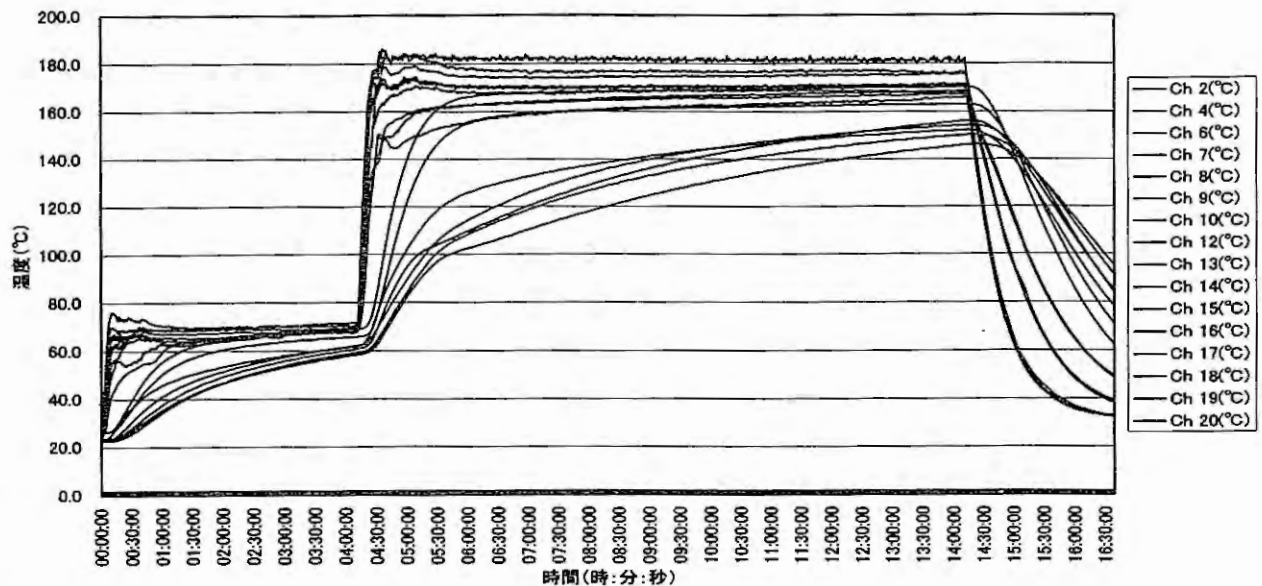


Fig.4 粉末原料滅菌時の昇温パターンの比較

Table 1 かさ密度の比較

サンプル名	採取量(g)	タッピング前(mL)	タッピング後(mL)	ゆるみ(g/mL)	かため(g/mL)	圧縮度
酸化マグネシウム	10	78	68	0.128	0.147	12.8
ケイ酸マグネシウム	10	23.5	18	0.425	0.555	23.4

第二工場棟/7号機ライン

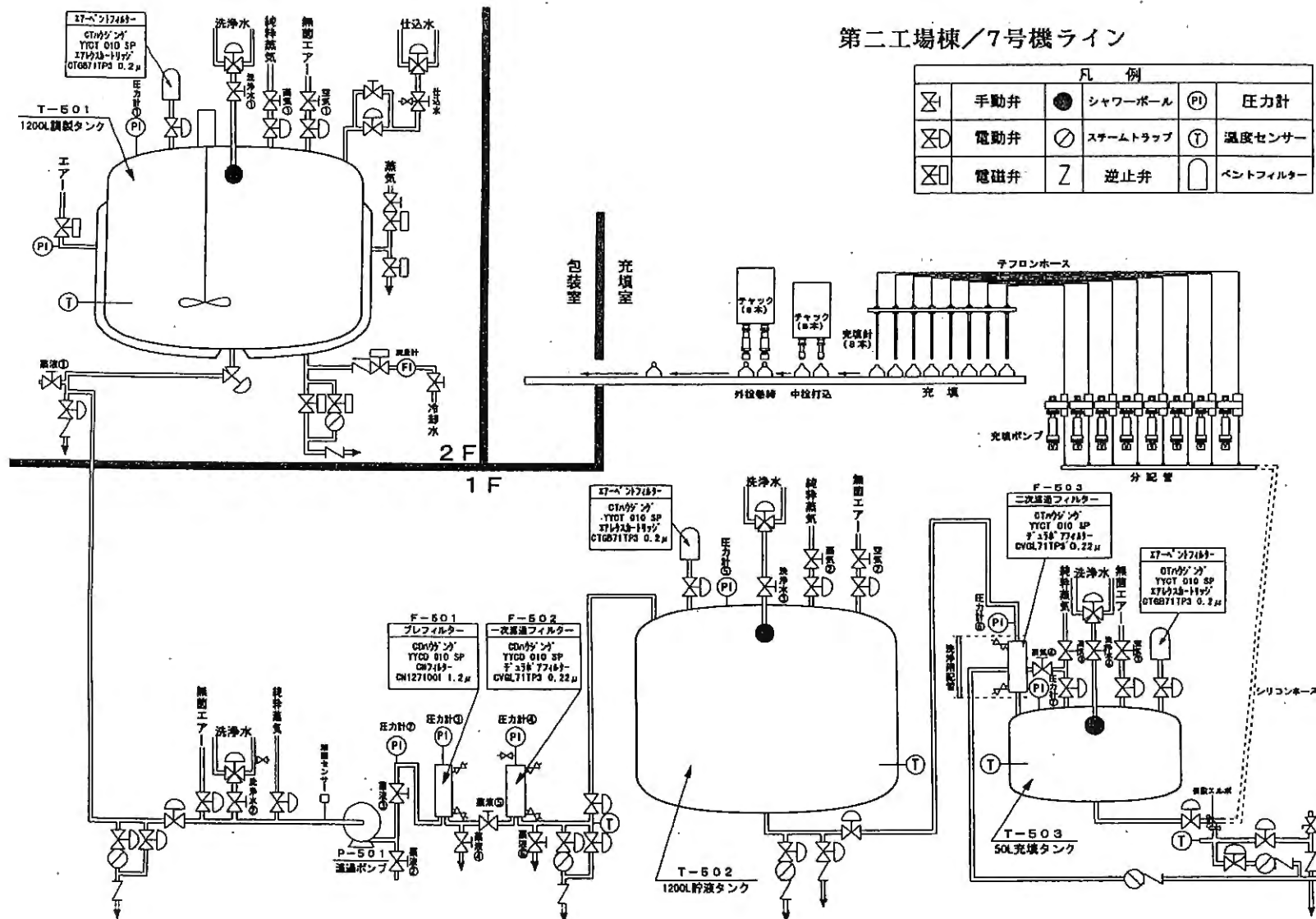


Fig.3 点眼液の配管フロー

深層水の飲用及びスキンケアへの適用

Application to the drink and skin care of the deep sea water.

荒井 哲也 五洲薬品株式会社

Tetsuya ARAI Goshu Pharmaceutical Co., Ltd.

1. 緒言

深層水は水深200m以深から得られる海水であり、富山県では平成7年に取水設備が完成し、利用研究がスタートしている。富山県の深層水取水施設は滑川沖2600m、水深321mから取水されており、日量3000m³が汲み上げられている。このうち昨年3月から、1割に当たる300m³が商業利用可能となっている。また、深層水の有効利用、幅広い分野への利用研究、地域の活性化を目的として、6月に深層水協議会が設立されている。

海水をその深度から分類すると0m~20mの降雨、河川、家庭用排水等の影響により常に変化している水域。20m~200mの気象の影響は大きく受けなが、日光、海流による影響を受けている水域。200m以深の日光が届かず、気象、海流の影響を受けず安定した水域(深層水)に分類され、深層水は表層水に比較して、以下の3点の特徴を有する。

1. 低温性：低水温を保っている。
2. 清浄性：生命活動が抑制され雑菌の繁殖が少ない。
3. 富栄養：栄養塩がよく保存されている。

このような特徴を持つ深層水はその性質及びその応用分野への研究は、未知な部分が多く残されている。そこで、今日までの深層水製品開発の状況等を報告する。

2. 飲用(飲料)への応用

深層水を飲用に適用する際には1)深層水に含まれる豊富な微量元素による栄養改善。2)生菌数の少ないことによる清浄性。3)汚染物質を含んでいないこと。等が長所として挙げられる。これに対し、短所は、1)含まれるナトリウム塩による、味覚への影響。2)ナトリウムの過剰摂取。3)採水地からの輸送。等が挙げられる。この中で、短所3)については利用する目的に応じて、二次汚染等に対して充分な対策を行わなくてはならないが、1)、2)に関して我々は多段式電気透析法を採用し解決を行っている。

深層水を飲料に加工した際には含まれる多種類のイオン成分が特徴となる。単なる脱塩では選択性なくイオン成分を除去してしまうため、その効果が薄れてしまう。そこで、多段式電気透析法(Fig.1)を採用し、多元素を効率よく濃縮しその応用分野を広げることを可能にした。各分離水の特徴は以下のようになる。

深層水ED脱塩水：希薄ながら、多種類のミネラル分を含んだ脱塩水。

深層水ED多元素水：深層水中に含まれる塩分を除きその他の成分を更に濃縮した多元素水。

深層水ED濃縮塩水：海水中に含まれる多種類の元素を塩分も含め濃縮された濃縮海水。

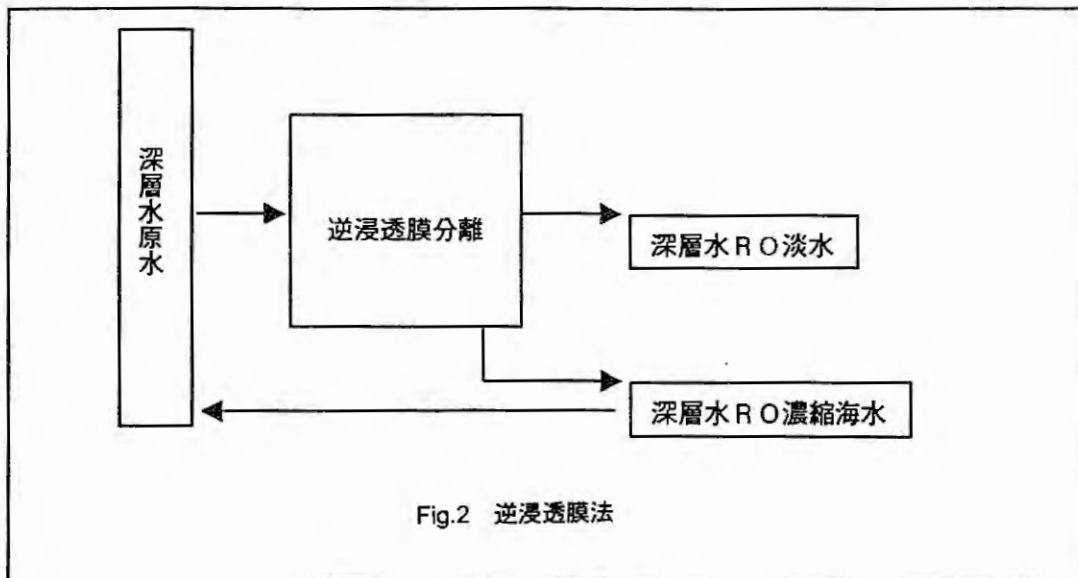
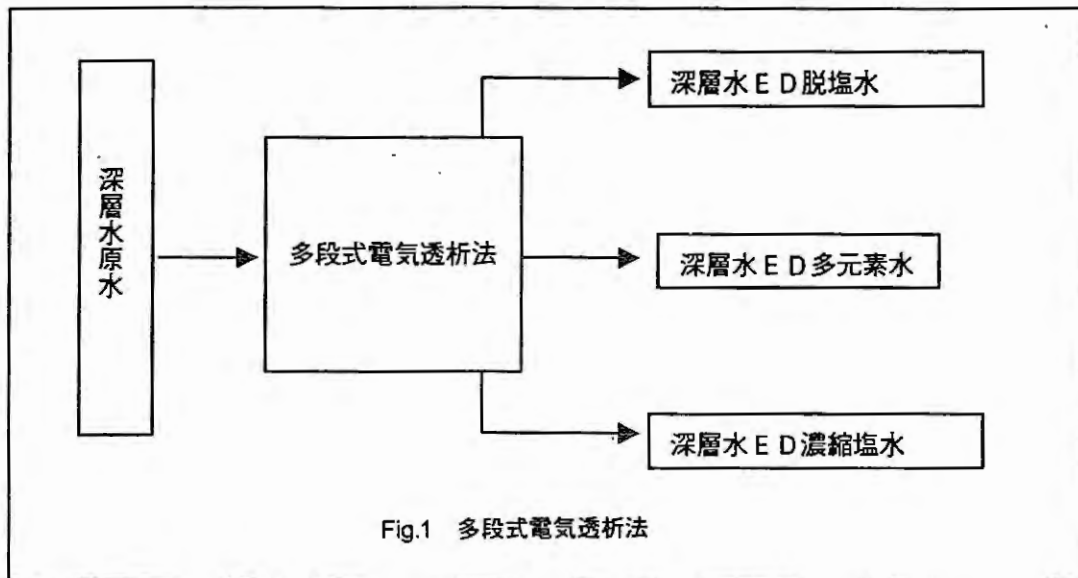
これら分離水の応用として、深層水ミネラルウォーターの開発を行い多種類の元素を効率よく摂取できるよう、深層水ED多元素水を上質の鉱泉水にて希釈しミネラルウォーターとして製品化した。本製品には分析値として、極微量のものも含めると、30種類以上の無機イオンが安定して含まれていることが確認されている。

上記多段式電気透析法の他に逆浸透膜法 (Fig.2) による分離も検討した。逆浸透膜法より得られる分離水の特徴は以下のようなになる。

深層水RO淡水：深層水の有するイオンバランスを保持した脱塩水

深層水RO濃縮海水：深層水の有するイオンバランスを保持した濃縮水。

これらの分離水も今後目的によっては利用可能ではないかと考えられる。



3. スキンケアへの応用

次に深層水のスキンケアへの適用についての検討を紹介する。

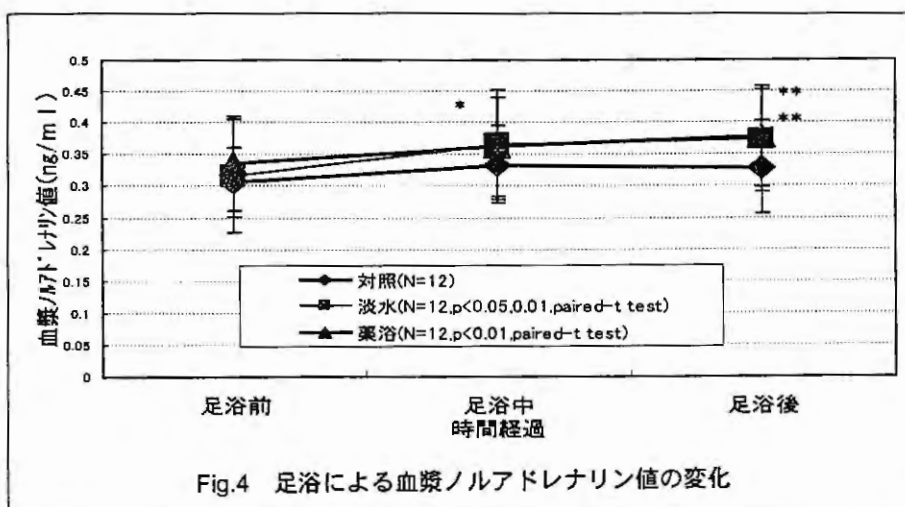
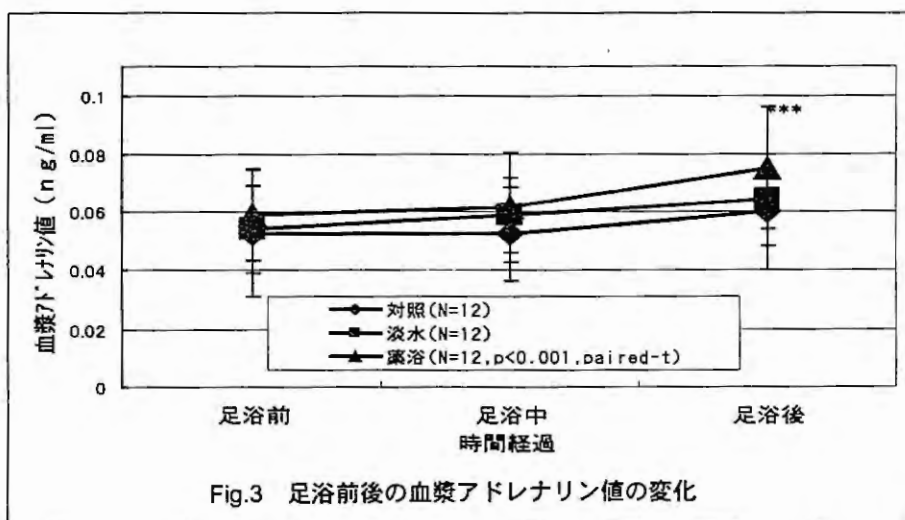
近年、無機塩類の皮膚皮膜形成による保温効果や、ある種のマグネシウム塩による、皮膚バリア機能の回復など、無機塩類イオン成分の肌への効果について報告がなされている。そこで多種類のイオン成分を含む深層水と古くから浴用に用いられている生薬を組み合わせた入浴剤及び足浴剤への応用を検討した内容を紹介します。

対象として、文書による同意の得られた22歳～58歳の健康成人男性12名に、実験群A：深層水+生薬による足浴、

実験群B：淡水を用いた足浴、対照群：体位変換のみを行う群にて検討を行った。生薬成分は実際に入浴剤に使用可能な、ショウキョウチンキ、カミツレエキス、ショウブ根エキス、トウキエキス、センキュウエキス、の各生薬を0.1vol%になるよう加え、40℃にて足浴を行った。

方法は足浴前30分間の安静時間をもうけ、足浴開始直前に第1回目の採血を行い、15分間の足浴後、再び採血を行った。足浴終了後、15分後に3度目の採血を行い、合わせて、頭部、右手、両足の皮膚温についてサーモグラフィーによる皮膚温の観察を行った。測定項目は血中の、血漿アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、コルチゾール値を測定し、深層水薬浴時、淡水浴時、対照実験群とで比較を行った。

足浴直前と15分間の足浴終了15分後の血漿アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、コルチゾール値を比較すると、薬浴実験時では、対照群で有意な変化をみとめない状況でありながら、有意に血漿アドレナリン値が増加した。(Fig.3) 同様に血漿ノルアドレナリン値も有意な増加を認めた。(Fig.4) 淡水浴では、ノルアドレナリン値だけ有意な増加を認めた。一方、血漿コルチゾール値は、実験群ではむしろ減少傾向を認めた。



サーモグラフィーによる観察の結果、淡水浴群よりも実験群A：深層水薬浴群の方が、足浴終了後の温度の低下が遅く、足浴終了後30分での足浴前との温度差が大きいものとなった。ただし、個人差等による影響が大きく、淡水浴群と薬浴群とで有意差としては認められなかった。

以上の結果、1)足浴両群ともコルチゾールの変化を伴わず、血漿アドレナリンやノルアドレナリン値が増加した。2)特に薬浴群でのみ、血漿アドレナリン値の増加が有意であった。

本研究は富山伝統医学センターとの共同研究として上馬場先生、許先生により行われた。

弊社にて生産する深層水関連製品は現在、ミネラルウォーター、入浴剤、化粧水等広範囲に及んでいる。この他にも様々な深層水関連製品が市場に存在し、各研究機関などにより、免疫系、循環器系への影響等、様々な側面から研究されている。しかし、その有効成分の検索といったような基礎的な研究は不十分であり、その効果についても未知な部分が多く、今後、更に広がることが予想される深層水の応用分野と、その効果を結びつけることが必要である。

難水溶性薬物の経口吸収改善を目的とした固体分散体化検討

Investigations on solid dispersion of insoluble medicine for improving oral absorption.

原 章	青木 貴彦	折橋 正浩
akira HARA	takahiko AOKI	masahiro ORIHASHI
坂口 真弓	木村 隆仁	勇 伊 実
mayumi SAKAGUCHI	takahito KIMURA	minoru YUUI

テイカ製薬株式会社 研究所
Research Laboratory, Teika Pharmaceutical Co. Ltd.

結 言

一部の難水溶性(以下、難溶性)の薬物は経口投与における生物学的利用率が低くなる場合がある。これは、消化管内における溶解速度が吸収の律速となることが原因と考えられている。これを改善するため、これまで種々の方法が研究されており、そのひとつに固体分散体化を行う手法がある¹⁾²⁾。この方法は薬物を高分子等の担体に分散させることで、薬物の結晶性を消失または低下させ、溶解性を向上させるものである。

今回、我々は抗アレルギー作用を持つ難溶性薬物(開発コード:MTT-255)について、その経口吸収性改善を行う目的から固体分散体化の方法を種々検討し、その効果について評価を行った。

実 験 の 部

1. 実験材料

1) 主薬

MTT-255はFig.1に示す構造でクエン酸塩であるが、水に溶け難い物質である。

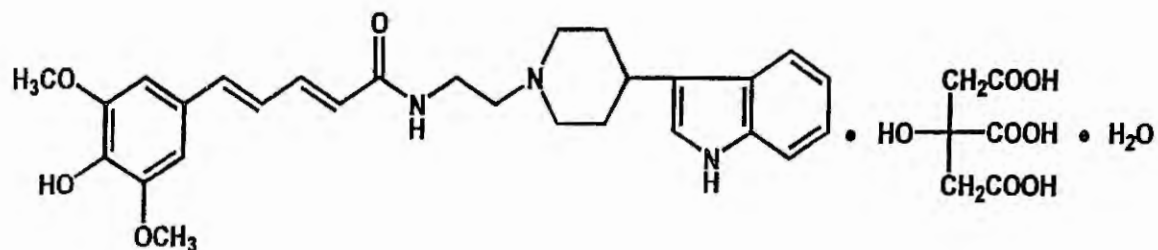


Fig.1 MTT-255構造式

2) 賦形剤(高分子担体)

ポビドン(Plasdone K-25:ISP)

3) 実験動物

Wistar系雄性ラット(6週齢)を用いた。動物は温度22~25℃、湿度40~60%及び照明時間12時間/日(6:00~18:00)に管理された飼育室で1週間馴化飼育した後、実験に供した。

2. 実験方法

1) 固体分散体調製方法の検討

今回の検討に用いた薬物MTT-255は種々の予備検討により、担体としてポビドンを用い、重量比を薬物：担体(1:4)で混合し、調製を行うことで固体分散体化することを見つけた。ここでは、MTT-255固体分散体の製品化に伴うスケールアップを考慮し、Table 1に示す4つの方法(調製機)で調製を行う検討を行った。また、得られた固体分散体が非晶質化(結晶性が消失している状態)していることをX線回折分析によって確認した。

X線回折分析条件

装置：Geigerflex (Rigaku)、MXP3(マックスサイエンス)

測定条件：走査軸 2θ 、スキャンスピード $2^\circ/\text{min}$

Table 1 固体分散体調製方法

調製法	調製機器	調製方法
溶媒蒸発法	ロータリーエバポレーター (ヤマト科学)	薬物及び担体を一定割合(重量比1:4)で混合し、混合末の2倍重量のエタノールを加えて加熱溶解し、エタノールを蒸発乾固した後、40℃で12時間乾燥する。これを粉砕し、75 μm 以下に篩過整粒する。
溶融混練法 ⁴⁾	2軸同方向回転エクストルーダー (栗本鐵工所)	同様に薬物及び担体を混合し、2軸同方向回転エクストルーダーに投入し、設定温度90℃、処理速度30g/minにてエタノールを毎分4.5mL添加しながら処理を行う。得られた処理物は粉砕し、75 μm 以下に篩過整粒する。
噴霧乾燥法 ⁵⁾	スプレードライヤー (ヤマト科学)	同様に薬物及び担体を混合し、混合末の5倍重量のエタノールに溶解する。この液をスプレードライヤーで噴霧温度85℃、処理速度500mL/hrの条件で噴霧乾燥する。
高速気流中衝撃法	ハイブリダイザー (奈良機械製作所)	同様に薬物及び担体を混合し、この混合末をハイブリダイザーで回転数1300rpm、処理速度5分間の条件で処理を行う。
通常製剤	パーチカルグラニューレーター (パウレック)	薬物、コーンスターチ、d-マンニトール及びヒドロキシプロピルセルロースを重量比(20:20:56:3)に混合し、水を加えてパーチカルグラニューレーターにて転動造粒する。これを335~1400 μm に整粒し、1%重量のステアリン酸マグネシウムを加え、混合する。

2) 溶出性の評価

1)で調製した固体分散体の溶出性を日本薬局方 一般試験法 55. 溶出試験法により評価した。溶出液中の薬物MTT-255の測定は吸光度測定法にて行った。固体分散体は薬物MTT-255として40mgとなる量を1号カプセルに充てんしたものを試料とし、また、ここでは固体分散体に対するコントロールとして賦形剤にコーンスターチ、d-マンニトール、ヒドロキシプロピルセルロース、ステアリン酸マグネシウムを用いて通常の製造方法で調製した顆粒製剤(通常の製剤)を同様に実験に用いた。

(1) 溶出試験条件

方法：日本薬局方 一般試験法 55. 溶出試験法 パドル法(50rpm)

溶出液：日本薬局方 一般試験法 47. 崩壊試験法 第II液

(2) 吸光度測定法条件

分光光度計：U-2001(日立製作所)

測定波長：354nm付近の極大吸収

3) ラット経口投与時の血漿中濃度測定

Wistar系雄性ラット(6週齢)を12時間絶食し、固体分散体を薬物MTT-255として10mg/kg相当量を小動物用カプセル(シオノギクオリカプス)に充てんしたものをゾンデを用いて10mL/kg相当量の蒸留水とともに投与し、投与後、0.5、1、2、4、6及び8時間にペントバルビタール30mg/kg麻醉下、腹大動脈より全血を採取した。これを遠心分離し、血漿を得た。得られた血漿から、高速液体クロマトグラフ法により、血漿中のMTT-255濃度測定を行った。

高速液体クロマトグラフ条件

装置：LC-10A (株島津製作所)

カラム：CAPCELL PAK C18 4.6φ×250mm (株資生堂)

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相：0.02mol/L酢酸塩緩衝液(pH3.2)/アセトニトリル混液(42:10)

検出器：蛍光検出器(Ex 330nm, Em 455nm)

注入量：50μL

実験結果

1. 固体分散体調製方法の検討

Table 1に示した溶媒蒸発法、溶融混練法、噴霧乾燥法及び高速気流中衝撃法の4つの方法にて得られた固体分散体はX線回折分析の結果、今回検討を行ったすべてのものについてMTT-255原体に見られる結晶面由来のピークが消失していることが確認されたため、非晶質化が確認された。ここでは、MTT-255原末及び溶媒蒸発法にて得られた固体分散体のX線回折分析チャートを示す。(Fig.2、Fig.3)

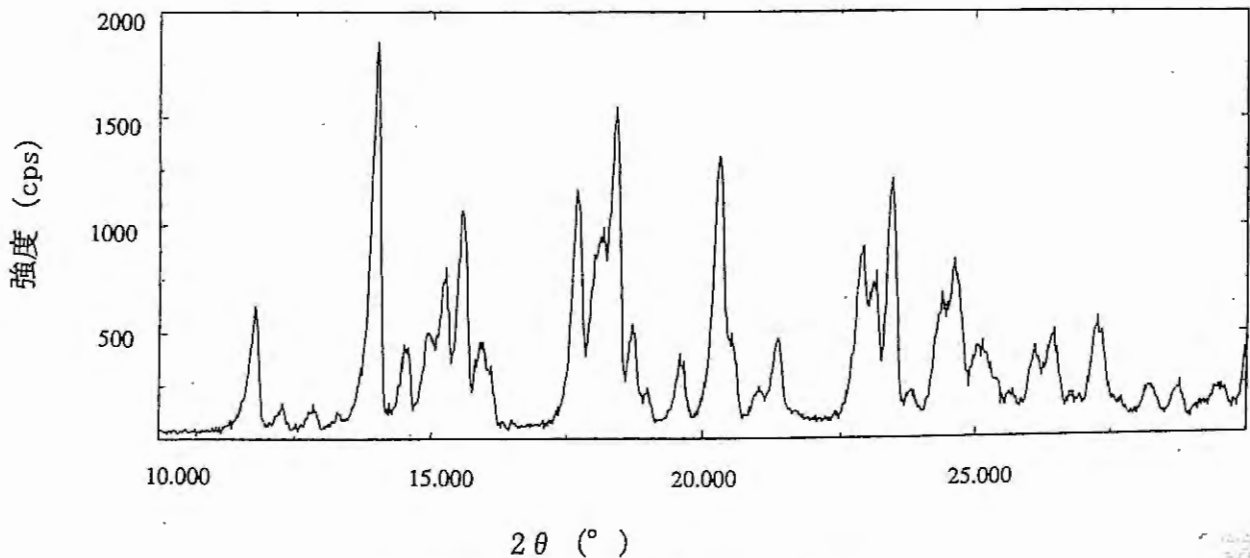


Fig.2 X線回折分析結果(MTT-255原末)

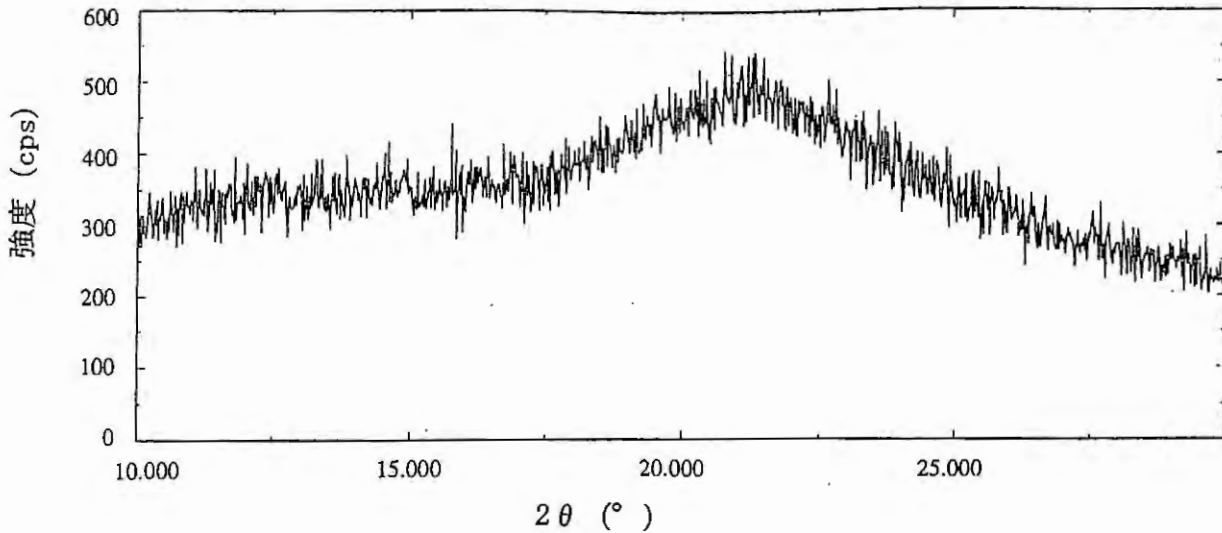


Fig.3 X線回折分析結果(固体分散体)

2. 溶出性の評価

今回の固体分散体の製品化に伴うスケールアップを考慮した調製方法の検討によって得られた各固体分散体について溶出試験法を用いて評価を行った。

結果はFig.4に示すようにコントロールとして用いた通常の製剤の溶出率が2時間で40%弱になっているのに対し、溶媒蒸発法、溶融混練法及び噴霧乾燥法を用いて調製した固体分散体は約80%の溶出率を示し、固体分散体化による溶出性の改善が確認された。しかし、高速気流中衝撃法を用いて調製したものについては溶出性の改善が確認されなかった。

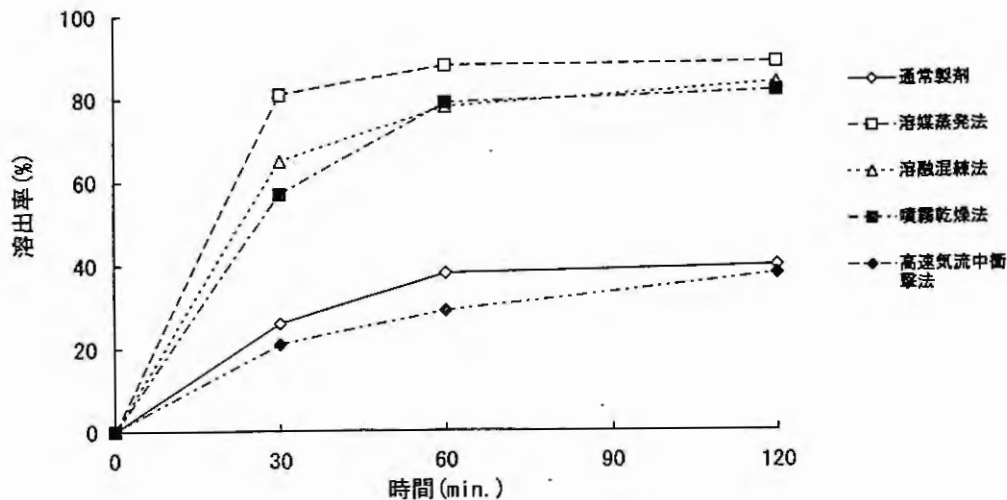


Fig.4 溶出試験法による評価

3. ラット経口投与時の血漿中濃度測定

溶出試験法による評価から溶媒蒸発法、溶融混練法及び噴霧乾燥法を用いて調製した固体分散体について溶出性の改善が確認されたことから、この3つの方法から噴霧乾燥法を代表として選択し、これについてラット経口投与時の血漿中濃度測定による評価を行った。結果、固体分散体は通常の製剤と比較して、Cmaxで約5倍、AUCで約6倍の血漿中濃度が認められ、明確に固体分散体化による経口吸収性の改善が認められた (Fig.5)。

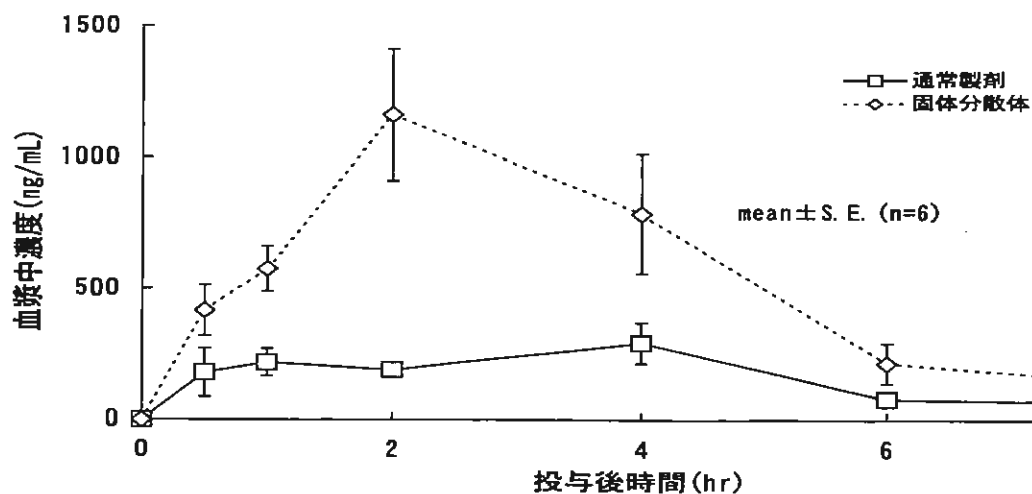


Fig.5 ラット経口投与時の血漿中濃度

考察とまとめ

今回、我々は難溶性薬物の溶解性改善を製剂的に実現するため、薬物の固体分散体化に取り組んだ。その中でも固体分散体製造のスケールアップを考慮したとき、どのような手法及び製造機を用いるかが問題となる。そこで先ず、4つの調製方法(製造機)を用いて非晶質化ならびに製造性の難易についての検討を行った。

その結果、製造性を考慮した場合、溶融混練法(2軸同方向回転エクストルーダー)、噴霧乾燥法(スプレードライヤー)及び高速気流中衝撃法(ハイブリダイザー)の3つの方法が有用であると確認できた。また、この3つの方法に溶媒蒸発法(ロータリーエバポレーター)を加えた4法によって得られた固体分散体はX線回折分析の結果、それぞれが正しく非晶質化していることが確認された。

X線回折分析から物理化学的に非晶質化が確認されたことから、これらについて実際の溶解性を評価するため溶出試験法による確認を行ったところ、溶媒蒸発法、溶融混練法及び噴霧乾燥法によって得られたものについては溶解性の改善が認められたが、高速気流中衝撃法によって得られたものについては溶解性の改善が認められなかった。これはX線回折分析の結果では、非晶質化が確認されていたものの、この方法で調製した固体分散体は他の調製法で得られたものと比べ、非晶質状態の安定性が低く、溶出試験中に再結晶化がなされたため、このような結果になったことが推測された。³⁾

製造性の検討及び溶出試験法による溶解性の評価を行った結果、溶融混練法及び噴霧乾燥法が有用な方法であると確認されたため、噴霧乾燥法にて得られた固体分散体についてラットを用いた実際の経口投与時の吸収性を血漿中濃度測定によって評価した。結果、明確な経口吸収性の改善が確認された。

以上の結果より、固体分散体化は薬物の溶解性の改善に有効な手法であり、同時に経口吸収性の改善にも有効であることが確認された。また、製造方法として溶媒蒸発法、溶融混練法、噴霧乾燥法及び高速気流中衝撃法の4つの方法について検討を行った結果、高速気流中衝撃法以外は溶出試験においても当初目的とした溶出性の改善が認められ、製剤化の有用な方法であることが確認できた。これらの調製方法はそれぞれに特性があり、工業化まで考慮すると簡単にどの方法がよいかという結論は得られなかったが、溶融混練法及び噴霧乾燥法は比較的実用的な製造方法であると思われる。

参考文献

1. 杉本 功他, Nifedipineの易吸収製剤化に関する研究, 医薬品研究, 12(4), 988-992 (1981)
2. 鈴木 幸子他, フェニトイン固体分散体の溶出挙動, 薬剤学, 50(3), 273-27 (1990)
3. 朽木 彰他, 湿度に対して安定な固体分散体制剤, 薬剤学, 44(1), 31-37 (1984)
4. 中道 孝一他, 2軸同方向回転エクストルーダーによる固体分散体の新規な製造法, PHARM TECH JAPAN, 12 (5), 715-729 (1996)
5. 竹内 洋分他, 噴霧乾燥法による製剤のための粒子設計, PHARM TECH JAPAN, 4(12), 1472-1479 (1988)

熊胆の消化管運動に対する作用

Activity of Bear Bile on Gastrointestinal Motility

富山県薬事研究会生物部会

Division of Pharmacological Evaluation, Toyama Pharmaceutical Research Association

田 保 慎 一 郎	株式会社 廣貴堂
Shinichiro TABO	Kokando Co., Ltd.
中 田 晶 子	
Akiko NAKATA	
岡 山 麻 弥	ジャパンメディック株式会社
Maya OKAYAMA	Japan Medec Co., Ltd.
南 桂 子	大協薬品工業株式会社
Keiko MINAMI	Taikyo Pharmaceutical Co., Ltd.
上 川 浩	ダイト株式会社
Hiroshi KAMIKAWA	Daito Corp.
増 田 香奈子	テイカ製薬株式会社
Kanako MASUDA	Teika Pharmaceutical Co., Ltd.
乗 安 浩 克	東洋ファルマー株式会社
Hirokatsu NORIYASU	Toyo Pharmar Co., Ltd.
平 川 真智子	
Machiko HIRAKAWA	
松 井 泰 治	松井製薬株式会社
Taiji MATSUI	Matsui Seiyaku Co., Ltd.
荒 木 美 穂	リードケミカル株式会社
Miho ARAKI	Lead Chemical Co., Ltd.
竹 内 充	
Mitsuru TAKEUCHI	
松 永 孝 之	富山県薬事研究所
Takayuki MATSUNAGA	Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

結 言

熊胆はヒグマ及びその他の近縁動物の胆汁を乾燥したものであり、胃腸薬などとして古くから重用されている。構成成分としては胆汁酸の他、コレステロール、リン脂質及びビリルビンなどが含まれるが、熊胆に特徴的な成分はタウリン抱合型胆汁酸であるタウロウルソデオキシコール酸(TUDC)である¹⁾。TUDCは熊胆の主要胆汁酸ではあるが、クマの種類や採取時期によって含有率が異なることが知られている²⁾。また、TUDCの含有率は個体差がかなりあるとされているが、近年中国で生産されている飼育クマより調製した熊胆(飼育熊胆)は、比較的含有率の変動の少ないことが報告されている³⁾。熊胆の薬理作用については、消化管における鎮痙作用⁴⁾及び肝機能改善作用⁵⁾が報告されているが、ウルソデオキシコール酸ほど多くは報告されていない。

我々は和漢薬の薬効評価試験として熊胆を取り上げ、飼育熊胆にも着目しながらこれまで利胆作用、肝障害抑制作用及び抗潰瘍作用について検討してきた。今回、熊胆の消化管運動に対する作用を検討した。

実験方法

1. 実験材料

1) 熊胆

本試験で用いた熊胆の天然品及び飼育品は各々中国産であり、胆汁酸含量は前者が80%、後者が68%であった。胆汁酸の組成は、天然熊胆ではTUDCが56%、タウロケノデオキシコール酸(TCDC)が20%、タウロコール酸(TCA)4%であり、また飼育熊胆ではTUDCが32%、TCDCが34%、TCAが2%であり、これらは標準的な組成を示す標品であった。熊胆は蒸留水に溶解後試験に供した。

2) 試薬類

本試験で用いた主な試薬類は、TUDC、TCDC及びTCA(以上カルピオケム)、硫酸アトロピン及び臭化ネオスチグミン(以上和光純薬)である。各試薬は蒸留水に溶解後試験に供した。

2. 実験動物

ddY系雄性マウス(6週令)を三協ラボサービス㈱より購入し、1週間以上の予備飼育の後に試験に供した。マウスは24時間後絶食後に試験に供した。

3. マウス消化管輸送能の測定

マウスに被検液を経口投与し、30分後に30%硫酸バリウム懸濁液(0.2mL/マウス)を経口投与した。更に、30分後(ネオスチグミン前投与時)または45分後(アトロピン前投与時)に頸椎脱臼により屠殺した後開腹して消化管を摘出した。この消化管における幽門部から硫酸バリウムの移動先端までの長さ(移動長)および幽門部から回盲部までの長さ(全長)を各々測定し、移行率(移動長/全長)を求めた。なお、アトロピンまたはネオスチグミンの前投与は、被検液投与の10分前に行った。

4. マウス胃内容物排出能の測定

マウスに被検液を経口投与し、30分後に色素含有試験食(コーンオイル0.4g、オリーブオイル1.5g、カルボキシメチルセルロース0.25g、カゼイン2.1gおよびキナルジンレッド5mgを蒸留水50mLに溶解・懸濁して調製、0.2mL/マウス)を経口投与した。更に、15分後(ネオスチグミン前投与時)または30分後(アトロピン前投与時)に頸椎脱臼により屠殺した後開腹し、胃の幽門部および噴門部を結紮して胃を摘出した。胃内に95%エタノール2mLを注入して色素を溶解後回収し、液量を3mLに調製後遠心分離して得た上清の吸光度(530nm)を測定した。対照は、試験食0.2mLに95%エタノール2.8mL加えて色素を抽出し、同様に吸光度を測定してこれを100%として胃内の色素残存率を求めた。なお、アトロピンまたはネオスチグミンの前投与は、被検液投与の10分前に行った。

5. 統計処理

測定値の有意差検定は、Studentのt-検定を用いて行なった。

実験結果

1. マウス消化管輸送に対する熊胆の効果

マウスの消化管輸送に対して、天然熊胆(0.3g/kg)は10%抑制する傾向を示した(表1)。一方、副交感神経興奮薬のネオスチグミン(1mg/kg)を前投与すると消化管輸送は15.9%促進されるが、天然熊胆の投与により12.9%と有意に抑制された。また、副交感神経抑制薬のアトロピン(50mg/kg)を前投与すると消化管輸送は14.6%抑制されるが、天然熊胆の投与により10.6%促進された。

表1 マウス消化管輸送能に対する天然熊胆の効果

	単独	天然熊胆 (0.3g/kg)
対照群	41.5±4.2	31.5±8.1
ネオスチグミン併用群	57.4±3.6*	44.5±3.4 ^a
対照群	53.8±2.5	44.0±2.3*
アトロピン併用群	39.2±3.5**	49.8±3.1 ^a

各値は、小腸移行率の平均±標準誤差を示す (n=10-11)。

*, **: p<0.05, 0.01 to control, a) : p<0.05 to neostigmine or atropin alone.

このように天然熊胆は正常時及び副交感神経作用時における消化管運動に影響を及ぼすことが示され、経口投与による併用薬の消化管輸送及び吸収に影響を及ぼすことも考えられる。そこで消化管輸送の影響を受けない腹腔内投与時の効果を検討した。その結果、表2に示すように天然熊胆によるアトロピン投与時の抑制された消化管輸送の亢進およびネオスチグミン投与時の亢進した消化管輸送の抑制作用は、各薬物の腹腔内投与後においても認められた。

表2 副交感神経作用薬前投与時のマウス消化管輸送能に対する天然熊胆の効果

適用量 (g/kg)	対照群	副交感神経作用薬投与群	
		経口投与	腹腔内投与
ネオスチグミン			
単独群	44.7±1.7	56.4±3.3**	57.9±2.7***
天然熊胆群 0.3	46.1±2.0	48.3±3.2	50.2±4.2
アトロピン			
単独群	56.6±2.4	33.4±3.5***	41.4±2.9**
天然熊胆群 0.3	45.9±2.4 ^b	54.6±1.7 ^c	51.9±1.4 ^a

各値は、小腸移行率の平均±標準誤差を示す (n=6-8)。

, * : p<0.01, 0.001 to control, a, b, c) : p<0.05, 0.01, 0.001 to control or atropin alone.

次に天然熊胆に含まれる相当量のTUDC及び飼育熊胆の消化管輸送に及ぼす影響を検討した。その結果、ネオスチグミン投与時の亢進した消化管輸送は天然熊胆の他、相当量のTUDC及び飼育熊胆によっても抑制される傾向を示した(表3)。また、アトロピン投与時の抑制された消化管輸送は天然熊胆の他、相当量のTUDC及び飼育熊胆によって亢進する傾向を示した。

表3 副交感神経作用薬前投与時のマウス消化管輸送能に対する熊胆の効果

	単独	天然熊胆 (0.3g/kg)	飼育熊胆 (0.3g/kg)	TUDC (0.17g/kg)
対照群	40.4±2.5	-	-	-
ネオスチグミン併用群	55.2±2.8***	48.9±1.9 ^{a)}	50.2±2.6	47.2±5.6
対照群	55.8±4.4	-	-	-
アトロピン併用群	32.1±5.8**	47.5±5.5	46.0±4.4	38.4±4.0

各値は、小腸移行率の平均±標準誤差を示す (n=6-13)。**、***: p<0.01, 0.001 to control, a) : p<0.05 to neostigmine alone.

2. マウス胃内容物排出能に対する熊胆の効果

次に熊胆の胃運動に及ぼす影響を検討するため、胃内容物排出能に対する作用を検討した。マウスの胃内容物排出能に対して、ネオスチグミン(1mg/kg)は若干の促進傾向を示したのに対し、アトロピン(50mg/kg)は有意に抑制した(表4)。また、天然熊胆及び飼育熊胆は胃内容物排出能を各々22.5%、31%と有意に抑制したが、天然熊胆に含まれる相当量のTUDCは抑制傾向を示すのみであった。

表4 マウス胃内容物排出能に対する熊胆の効果

	対照群	ネオスチグミン (1mg/kg)	アトロピン (50mg/kg)	天然熊胆 (0.3g/kg)	飼育熊胆 (0.3g/kg)	TUDC (0.17g/kg)
胃内残存率	22.1±4.3	16.6±3.2	60.3±4.2***	44.6±3.7**	53.1±3.5***	33.0±5.8

各値は、平均±標準誤差を示す (n=5-8)。**、***: p<0.01, 0.001 to control.

また、ネオスチグミン(1mg/kg)前投与により亢進した胃内容物排出能に対して、天然熊胆及び飼育熊胆(0.3g/kg)は有意に抑制したが、天然熊胆に含まれる相当量の3種胆汁酸は抑制傾向を示すのみであった(表5)。さらに、アトロピン(50mg/kg)を前投与すると胃内容物排出能は抑制されるが、この時、天然熊胆(0.3g/kg)あるいは相当量の胆汁酸を投与しても排出能に影響を及ぼすことはなかったが、飼育熊胆(0.3g/kg)は胃内容物排出能を若干抑制する傾向を示した。

表5 副交感神経作用薬前投与時のマウス胃内容物排出能に対する熊胆の効果

	単独	天然熊胆 (0.3g/kg)	飼育熊胆 (0.3g/kg)	3種胆汁酸 (0.238g/kg)
対照群	57.4±6.3	-	-	-
ネオスチグミン併用群	25.3±3.6*	39.1±4.9 ^{a)}	42.0±6.1 ^{a)}	37.8±6.5
対照群	25.9±2.1	-	-	-
アトロピン併用群	43.3±4.0**	44.1±5.0	50.2±3.2	42.5±4.4

各値は、胃内残存率の平均±標準誤差を示す (n=5-14)。3種胆汁酸:TUDC(0.167g/kg), TCDC(0.06g/kg), TCA(0.011g/kg)の混合物。

*,** : p<0.05, 0.01 to control, a) : p<0.05 to neostigmine alone.

考 察

熊胆の主要成分であるTUDCの遊離型胆汁酸であるウルソデオキシコール酸(UDC)は肝臓、胆嚢及び消化機能改善剤として汎用されており、各々の薬効に関する薬理作用の解析も多くなされている⁶⁾。一方、熊胆に関しては鎮痙作用⁴⁾、肝機能改善作用⁵⁾の他に抗炎症及び鎮痛作用⁷⁾を示すことが報告されているが、その薬効がUDCの作用で解釈できるとされてかそれほど多くはない。また、本シンポジウムの特別講演でも述べられたが天然熊胆の輸入量はここ十数年で激減しており、これに代わるものとして中国で生産されている飼育熊胆がある⁸⁾。そこで今回、マウスを用いて熊胆の消化管運動に対する作用に関して、飼育熊胆の効力にも着目しながら検討した。

消化管運動に対する熊胆の作用として、最初に消化管輸送に及ぼす影響を検討した。その結果、熊胆は消化管輸送を抑制することが明らかとなった。しかも、副交感神経刺激薬であるネオスチグミン前投与により消化管輸送能が亢進している時には、より顕著な抑制作用が認められた。この消化管輸送能は胃内に投与した硫酸バリウムの小腸への移行率で測定していることから、胃及び小腸の運動能を反映していることになる。そこで、胃運動に及ぼす熊胆の影響を検討するため、胃内容物排出能に対する効果を検討した。その結果、熊胆は正常時及びネオスチグミンにより亢進した状態の胃内容物排出能を顕著に抑制した。これらの結果は、熊胆が胃運動を含めた消化管運動を抑制することを示している。消化管運動に対しては、胆汁酸が胃内容物排出能と小腸の運動を抑制することが報告されている⁹⁾。また、牛胆汁が胃内容物排出能を抑制すること¹⁰⁾及び熊胆が摘出腸管に対してノバペリン様の鎮痙作用を示し、作用成分はTUDCであることが報告されている⁴⁾。これらの知見も考慮すると、熊胆に認められた消化管運動の抑制作用は消化管平滑筋に対する非特異的な弛緩作用に起因するものと考えられる。また、今回熊胆に含まれる相当量のTUDCのみでは消化管運動の抑制傾向しか認められなかったが、他2種の胆汁酸も含めた胆汁酸による作用と考えられる。

今回、副交感神経抑制薬であるアトロピンによる胃内容物排出能の抑制に対して熊胆は影響を及ぼさなかったが、アトロピンによる消化管輸送能の抑制に対しては拮抗的に作用した。この結果は、胆汁酸の有するノバペリン様の鎮痙作用とは矛盾するが、アトロピンによる消化管運動抑制時において熊胆が胃というより小腸の運動に影響を及ぼしていることを示唆しているように思える。高濃度のブタ胆汁を腹腔内投与した時は消化管輸送が抑制されるが、経口投与時は促進されることが報告されている¹¹⁾。この促進効果については、腸管内における水分や電解質などの吸収阻害に起因するとされ¹²⁾、実際、近位小腸では消化管輸送が抑制されるが、遠位小腸では消化管輸送が促進されることが報告されている⁹⁾。アトロピン投与時の熊胆の促進作用も同様の作用機序による反射的な消化管輸送能の亢進によると思われる。

近年、天然熊胆の入手が困難になってきていることから、中国では飼育しているクマから定期的に胆汁を採取し、乾燥して調製した飼育熊胆を使用している⁸⁾。その胆汁酸含量については天然熊胆に比べて安定していることが示されている。今回、天然熊胆に比べて胆汁酸含量及びTUDCの含有率の少ない飼育熊胆を用いて消化管運動に対する効果を検討したが、天然熊胆とほぼ同等の効果が示された。これまでの利胆作用、肝障害抑制作用及び抗潰瘍作用においても、飼育熊胆は天然熊胆とほぼ同等の効果を示したことから、飼育熊胆は同等な薬効を有するものと考えられる。

熊胆は主に配合剤として用いられることが多いことから、併用薬の吸収にも影響を及ぼすことも考えられ¹⁰⁾、その他の薬理作用と共に配合意義の点からも検討する必要があると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Kurozumi, K., et al. : Studies on bile acids in bear bile, *J. Biochem.*, 74, 489-495 (1973).
- 2) Jones, J. D. and Zollman, P. E. : Black bear (*Ursus americanus*) bile composition ; Seasonal changes, *Comp. Biochem. Physiol.*, 118, 387-390 (1997).
- 3) Kawahara, K., et al. : Report on quality and manufacturing of bear bile from living bear, *Natur. Med.*, 49, 158-163 (1995).
- 4) 木村正康他 : 和漢薬作用に関する薬学的基礎研究(第5報) ; 産地別熊胆の鎮痙作用における成分含有量と活性との相関について、*薬学雑誌*, 87, 801-806 (1967).
- 5) 松本仁幸 : 動物生薬「牛黄・熊胆」の肝機能改善効果に関する臨床的・基礎的研究、*京都府立医大誌*, 106, 963-975 (1997).
- 6) 藤原豊博 : ウルソデオキシコール酸の新たな展開、*Pharma Medica*, 16, 147-158 (1998).