

【総説】

子供や高齢者に優しい医薬品剤形の開発研究（3） ——フィチン酸含有ゼラチン皮膜ソフトカプセル剤の非破壊品質管理——

大塚 誠

Musashino University Creating Happiness Incubation 研究員 武蔵野大学 薬学部 教授

服部 祐介

武蔵野大学 薬学研究所

芦澤 一英

Musashino University Creating Happiness Incubation 客員研究員 武蔵野大学 薬学研究所 客員教授

真名垣 聡

Musashino University Creating Happiness Incubation 研究員 武蔵野大学 工学部 准教授

下川 義之、早川 栄治

富士カプセル株式会社製剤研究所

要約

生体タンパク質の中で最も重要な成分にコラーゲンがある。主に脊椎動物の真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などを構成するタンパク質のひとつである。コラーゲンは分子量約10万のゼラチンが3本鎖としてよりあったもので、ゼラチンは生体成分の基本であるといえる。コラーゲンタンパク質のペプチド鎖を構成するアミノ酸は、グリシン-アミノ酸X-アミノ酸Yとなっており、グリシン残基が3残基ごとに繰り返す一次構造を有している。これらゼラチンやコラーゲンがどのようなメカニズムでその立体構造を維持しているか、生体の老化や酸化エージングによりこれらの構造がどのような変化を受けるかの研究は、子供や高齢者に優しい医薬品剤形の開発で大変重要なテーマである。

ソフトカプセル剤は、皮膜としてゼラチン系を用いる場合とデンプン等の植物系を用いる場合に大別される。ゼラチン系を用いる場合には、上記のゼラチン物性の研究が必須となる。ゼラチンは保存中に酸素の攻撃を受けて分子重合を引き起こし高分子化して硬化し水に不溶となる。高齢者の体が老化エージングにより硬くなる原因と言われている。ソフトカプセルの皮膜開発では、光や酸素による攻撃を受けても不溶化しない、しなやかではあるが強い物性の皮膜の研

究が必要となっており、生体タンパク質であるコラーゲンの物性研究にも貢献できる要素を持っている。

本研究(3)では、前報(2)に引き続きゼラチンのどの部位が分子重合の原因となっているか、それを抑制するにはどのようにしたら良いかを各種の試験方法によって解析した。また、実際のソフトカプセル製造に使うゼラチン皮膜に、近赤外分光光度法(near infrared / NIR)を適用し、得られた吸収スペクトルを多変量解析した。前報(2)では、ゼラチンと可塑剤であるグリセリン、水との相互作用を考察することができた。本報(3)では、フィチン酸がゼラチン-水-グリセリンで構築される水和構造の中にどのように配位して、ゼラチンの分子重合で重要な部位である ϵ アミノ基へのアルデヒドや過酸化物の攻撃を抑制しているかを解明した。また、検量モデルを実製造に応用することにより、ゼラチン皮膜の連続生産工程を非破壊で品質管理する方法の基礎データが得られた。

1. はじめに

ソフトカプセル製剤は高齢者でも飲み易く、超高齢化少子化社会を迎え、我々の「しあわせ」な生活の土台である「健康」を支える医療・介護の観点からも重要性は益々高まっている。子供から老人までの人生全般を安心して健やかな生活を過ごすことができる社会を実現するためには、様々な疾病や健康障害に対応する有効で安全な医薬品を迅速で安価に提供する必要がある。一方で、現在、新規に開発される化合物の多くは水に対して難溶解性であることから、ヒトへの薬物の吸収が極めて困難であり、新規医薬品の開発の大きな障害となっている。難溶性薬物の製剤形態として、油に溶かすか、或いはエマルジョンや自己乳化製剤として液体を充填できるソフトカプセルは溶解性や吸収性を改善した製剤としての有用性をもっている。また、速放性製剤や徐放性製剤など高齢者や子供などの消費者のニーズに応えた飲みやすい剤形の工夫も可能である。

アメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration ; FDA)は、有効で安全な、より良い品質の医薬品を製造工程管理するために Process analytical technology (PAT)という分析手法を提唱している。これまでは、製造途中の重要工程で製造物の一部をサンプリングし品質試験をすることが一般的であった。不適合の製造物は廃棄されており、これを一因として医薬品を起源とする化学

物質が河川や下水処理水等の水環境中で広範囲に存在することが報告されている。PATを導入することは、製造工程の設計、分析によって廃棄薬品が減り、最終製品の品質を保証することを可能とし、より効率的な製造工程の設計により、安全で安価な医薬品を実現することができる点からも注目を集めている。

本研究(3)では(2)に引き続き、ソフトカプセル皮膜の各種物性を測定し、品質の高いソフトカプセルを製造することにより高齢者や小児に有効で安心安全な医薬品を迅速に安価で提供することを目的とする。

以下、これまでの研究成果2.において、ソフトカプセル製剤の開発における各種課題とこれまでの取り組みを記述した。次に3.にて、本論文のテーマである「フィチン酸含有ゼラチン皮膜ソフトカプセル剤の非破壊品質管理」の研究結果を記載した。

2. これまでの研究成果

2-1. ソフトカプセル製剤の処方、製造法、課題

ソフトカプセル剤は、内容溶液を皮膜に閉じ込めた製剤である。ソフトカプセルは、製造法の観点から、大きく分けてロータリー・ダイ式とシームレス式に分けられる。皮膜の材料の観点からは、動物性皮膜と植物性皮膜の2つに分けられる。動物性皮膜は主にゼラチンを用いる。ゼラチンを用いてソフトカプセルの皮膜を製造するには、高温でゼラチン、水、可塑剤としてのグリセリンを混合して溶解(ゾル状態)する。このゼラチン水溶液を冷却下で薄く展延し、乾燥・固化(ゲル状態)して皮膜状に製造する。皮膜の展延性試験法が報告されている^[1]。内容溶液を皮膜で保護し、長期の貯法期間、品質を維持するために皮膜の品質管理が重要である^[2]。しかし現状では製造工程中に一部をサンプリングして品質管理項目を測定し、作業員が機械の微調整を行って製造している。今後、これらの人的作業を非破壊的な連続生産管理に移行することが望まれている。

2-2. ソフトカプセル製剤の崩壊時間の延長問題と課題解決の方法

ソフトカプセルは製剤化工程が比較的短く短期間での製剤設計が可能などの利点から、開発スピードが要求される健康食品・サプリメントへの適用が増えており、種々の機能性素材が充填され製剤化されている。一方、基剤となるゼラチ

ンは熱や光、不純物中のアルデヒドや過酸化物等による経時的な溶解性の低下^[3]が報告されている。また、素材に含まれるアルデヒド類が図1に示すようなスキームでゼラチンを架橋させソフトカプセルを不溶化することが知られている^[4]。このような不溶化を防止するために、従来から種々の添加物が検討され、各種アミノ酸、ポリペプチド、レシチン、等に不溶化抑制効果が認められているが十分とはいえない状況であった。

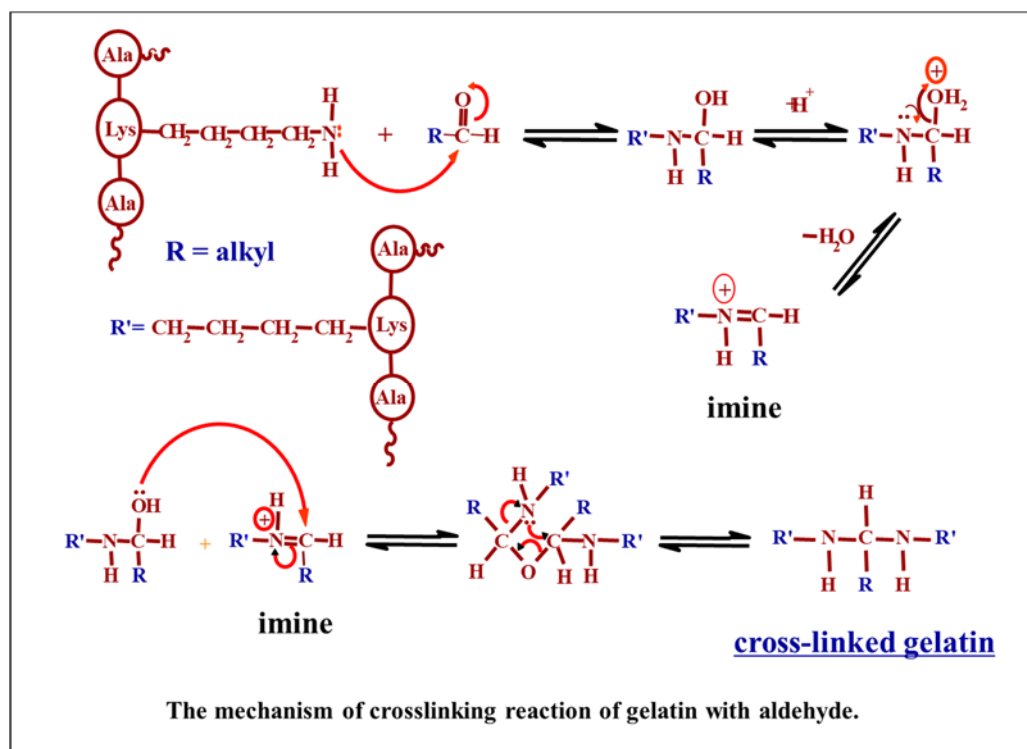


図1. アルデヒドによるゼラチンの重合の化学機構

我々のこれまでの研究の結果、特に植物や動物など天然由来の抽出エキスに比較的多く含有される成分にゼラチンの不溶化とソフトカプセルの崩壊遅延を引き起こすことが知見された。崩壊遅延を引き起こす成分に DHA 油があった。DHA 油は、各種脂肪酸が主にトリグリセライドとして存在しているが、遊離した不飽和脂肪酸がラジカル等による自動酸化を経て、アルデヒドおよびケトン類を生じ、ゼラチンを架橋して不溶化することが考察された。他に、茸エキスにゼラチンの著しい不溶化反応が認められた。茸エキスにもアルデヒド類の存在が確認された。更に近年、これらの知見を基に、フィチン酸（イノシトール6リン酸）をゼラチン皮膜に添加することで不溶化が顕著に抑制されることを見出

した。この技術は、現在多くのソフトカプセル製剤に応用されている^[5,6]。フィチン酸は生体物質の一種で、種子など多くの植物組織に存在する主要なリンの貯蔵形態である^[7]。なお本研究では、ポリエチレングリコール (PEG) は酸素がある状態で加熱されるとラジカル等による自動酸化を経て、アルデヒドおよび過酸化物類を生じることが報告^[8,9]されていることから、PEG400 にゼラチン皮膜シートを浸漬後 60 °C に加温して崩壊時間の測定をした。また、その皮膜シートを経時的にサンプリングして NIR を測定した。

3. ゼラチン皮膜ソフトカプセル剤の非破壊品質管理：フィチン酸含有ソフトカプセル製剤に用いるゼラチン皮膜の管理のための NIR 分光法による物性解析

ゼラチン皮膜の製造工程中で、ゼラチンは水に溶けたランダムコイル状態から螺旋状の α ヘリックスになり、さらに 3 分子が重なったコラーゲン様のゲル構造をとって皮膜強度を保持している。可塑剤であるグリセリンはゼラチンと水の水和構造の中に入り込み、ゼラチン分子が近づき過ぎて水から析出することを防止している。つまり、安定なゼラチン-水-グリセリンのハイドロゲル構造構成に寄与している。工場でのソフトカプセル剤の製造においては、皮膜物性の制御は手動によることが大きく、今後、連続生産に向けて自動制御の技術が求められている。皮膜物性の制御因子には、水分やグリセリンの濃度、温度分布、冷却速度、厚みの均一性、乾燥速度などがある。ゼラチン皮膜の崩壊延長現象と分子構造変化を研究するために、ゼラチンとコハク化ゼラチンを常法に従って皮膜形状に成形した。可塑剤であるグリセリンはゼラチン或いはコハク化ゼラチンに対して 30 重量% を添加した。フィチン酸を含有する皮膜は 50% 水溶液を添加して形成したが、フィチン酸濃度は乾燥物換算で表記した。得られた皮膜サンプルを静止した状態で NIR スペクトル^[10]を測定する場合を静的 NIR とし、その模式図を図 2 に示した。

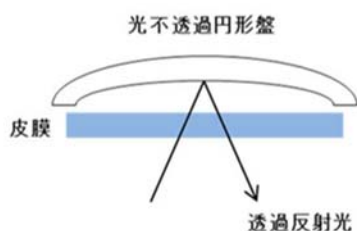


図 2. ゼラチンシートの NIR 測定方法

コハク化ゼラチンは、ゼラチンのリジン残基やヒドロキシリジン残基に由来する ϵ アミノ基が酸アミド結合して反応性の低下したものである。NIR スペクトルは皮膜切片 (Sample film) に対する NIR の透過反射光を測定した。

30%グリセリンを含有するゼラチンシート或いはコハク化ゼラチンシートに種々濃度のフィチン酸を添加して PEG400 に浸漬し、60°Cで保存した場合の崩壊時間の延長挙動を図3に示した。図3(左)はゼラチンシートの場合で、図3(右)はコハク化ゼラチンシートの場合である。ゼラチンシートの結果から、崩壊時間延長は浸漬後2時間以内と速く進行することが分かった。フィチン酸はこの減少を濃度依存的に抑制した。フィチン酸を3~4%添加すると、崩壊時間を十分に抑制することが示された。一方、この崩壊時間延長現象はコハク化ゼラチンシートでは観察されなかった。以上のことより、ゼラチン分子のアミノ基が崩壊時間の延長に関与していること、PEG400 から発生したアルデヒドとアミノ基との反応でゼラチン分子間の架橋形成と不溶化が起きることが推測された。

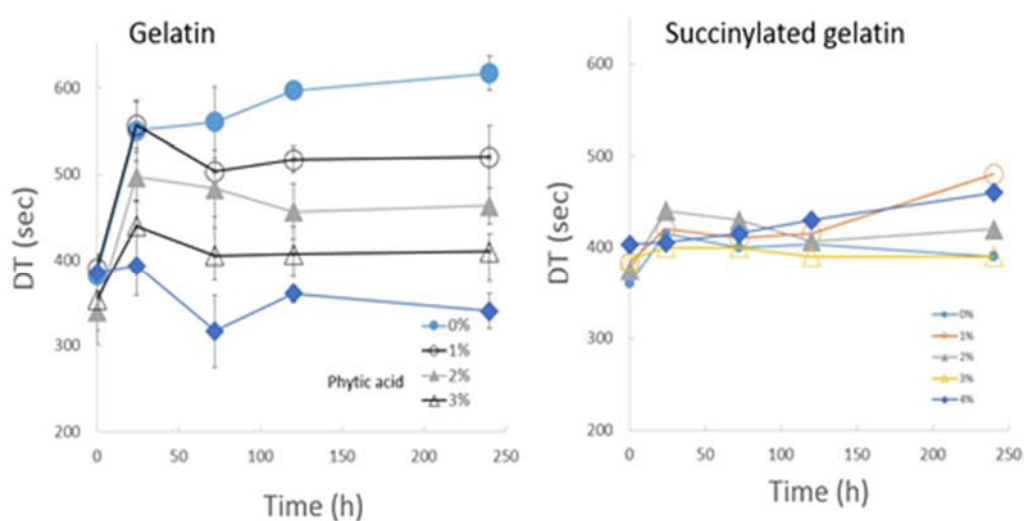


図3. 種々濃度のフィチン酸を含有するゼラチンシート或いはコハク化ゼラチンシートを PEG400 に浸漬して 60°Cで保存した場合の崩壊時間

図3(左) フィチン酸含有ゼラチンシート (0-240時間)

図3(右) フィチン酸含有コハク化ゼラチンシート

図4はゼラチンシート作成に使用された原料の NIR スペクトルを、図5は0～4%のフィチン酸を含有する全ゼラチンシートの NIR 再構築スペクトルを示している。フィチン酸に関して、約 $7168 - 7350 \text{ cm}^{-1}$ は C-H 伸縮振動と C-H 変角振動に起因し、約 5154 cm^{-1} は 50% 水溶液の O-H 伸縮振動と O-H 変角振動に起因する。

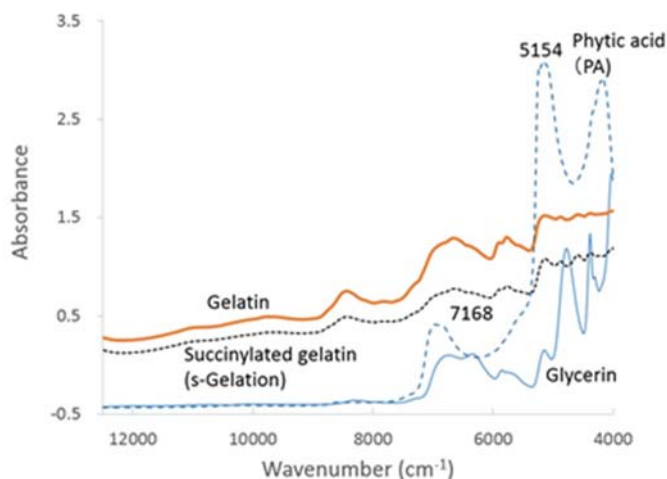


図4. ゼラチンシート作成に使用した原料の NIR スペクトル

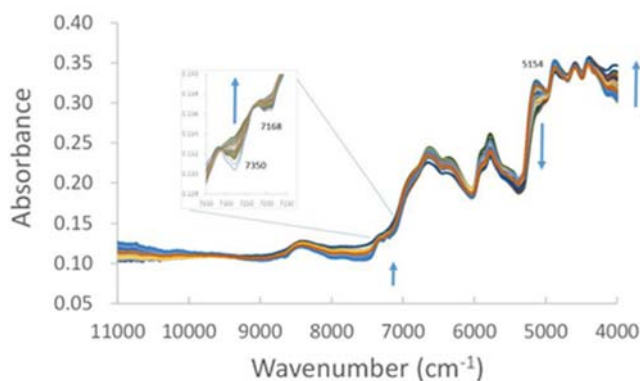


図5. フィチン酸を0～4%含有するゼラチンシートの NIR 再構築スペクトル

ゼラチンシートの静的 NIR スペクトルを部分最小自乗回帰法(PLSR)により多変量解析を行った^[11,12]。ゼラチンシートの崩壊時間を予測するために検量モデルを作成した。図6-1は、崩壊時間のフィチン酸無添加のゼラチンシートの崩壊時間の予測値と実測値の図である。図6-2は、フィチン酸添加と無添加を含めた全ゼラチンシートの崩壊時間の予測値と実測値の図である。図6-1と図6

— 2 とも、予測値と実測値の間で良い相関関係が得られた。

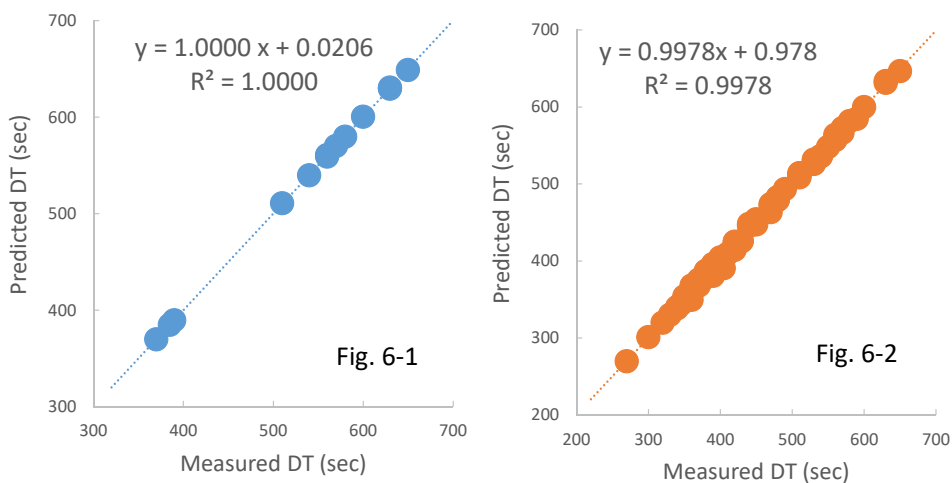


図 6. NIR により予測された崩壊時間の予測値と実測値の関係

図 6-1 フィチン酸無添加、図 6-2 フィチン酸含有と無添加

図 7 は、崩壊時間予測のための最適 PLS 検量モデルの回帰ベクトルである。実線はフィチン酸無添加のゼラチンシートの回帰ベクトルである。点線はフィチン酸含有のものである。この 2 つを比較する時、点線で示された C-H 伸縮振動と C-H 変角振動に起因する約 $7168 - 7350 \text{ cm}^{-1}$ のピークは実線とは異なる特徴的な正のピークを示した。

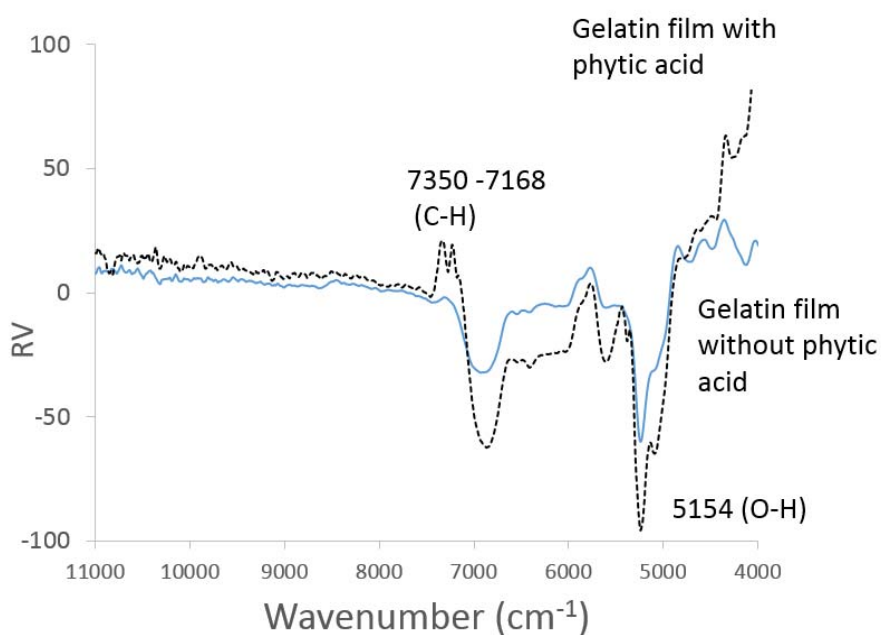


図 7. 崩壊時間予測のための最適 PLS 検量モデルの回帰ベクトル

これとは対照的に、O-H伸縮振動とO-H変角振動に起因する約 5154 cm^{-1} のピークは実線と点線とも負のピークを示した。このことは、フィチン酸の添加がゼラチンシートの崩壊時間延長に大変重要な影響を与えることを意味している。

図8は、フィチン酸無添加と4%含有のゼラチンシートについてPEG400中での浸漬保存前後のNIR再構築スペクトルである。図8(左)はフィチン酸無添加、図8(右)はフィチン酸4%含有皮膜のものである。実線は浸漬保存前、点線は浸漬保存後のものである。図7の結果と同じように、約 $7168-7350\text{ cm}^{-1}$ のピークはフィチン酸の添加と無添加のゼラチンシートで違いが認められた。約 5154 cm^{-1} のピークではほとんど同じ傾向であった。

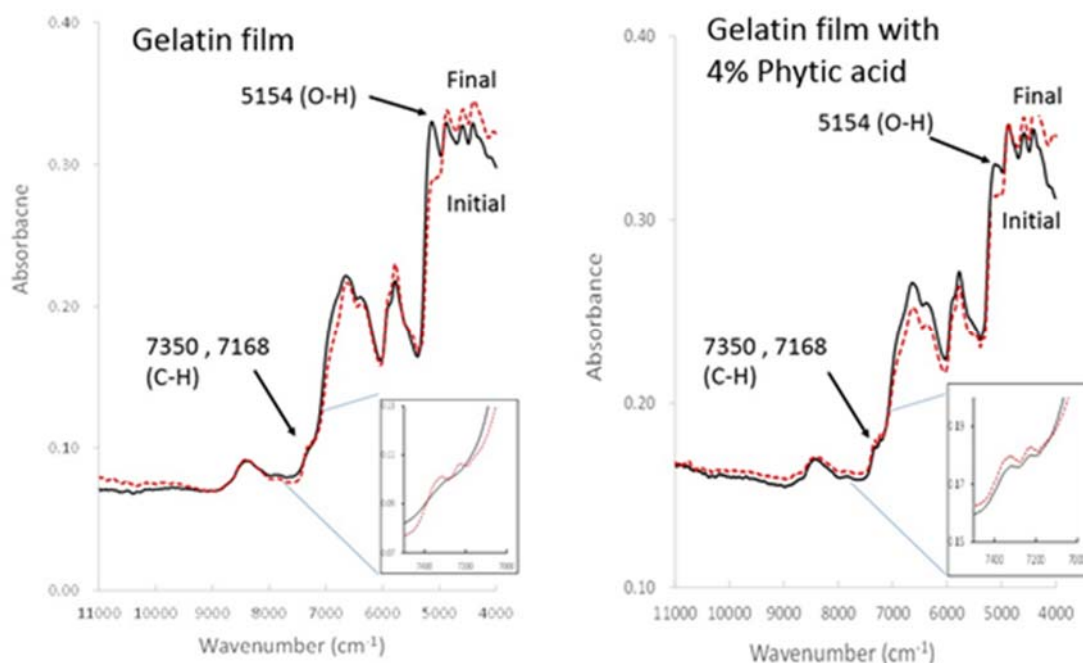


図8. フィチン酸無添加と4%含有のゼラチンシートについて保存前後のNIR再構築スペクトル

図8(左) フィチン酸無添加、図8(右) フィチン酸4%含有

図7と図8を考察する時に、ゼラチンシートの崩壊時間はフィチン酸の添加に起因するNIRスペクトルの変化に密接に関係していることが分かった。フィチン酸がゼラチンシートに添加されるとゼラチン分子の架橋が抑制され、結果的に崩壊時間の延長が抑制される。NIR解析から、フィチン酸の添加に応じてC

—H吸収に起因する約 $7168-7350\text{ cm}^{-1}$ のピークは増加し、O—H吸収に起因する約 5154 cm^{-1} のピークは減少することが示された。

以上の結果から、図9に模試した、フィチン酸添加前後でのゼラチン分子の水和構造の変化が考察された。ゼラチンの水溶液から皮膜シートを成形する冷却と乾燥の過程で、フィチン酸の—OH基がゼラチン分子の周囲に存在する水分子やグリセリン分子を排除してゼラチン分子の水素結合部位に配向する。フィチン酸によるゼラチン分子の水和構造の変化により、PEG400 から生成する過酸化物やアルデヒドがゼラチン分子の ϵ アミノ基への接近を妨害し、ゼラチン分子の架橋(図1に示す重合の化学機構)を抑制する。このことによりゼラチン分子の重合と高分子化、不溶化が抑制され崩壊遅延が防止される^[13]。

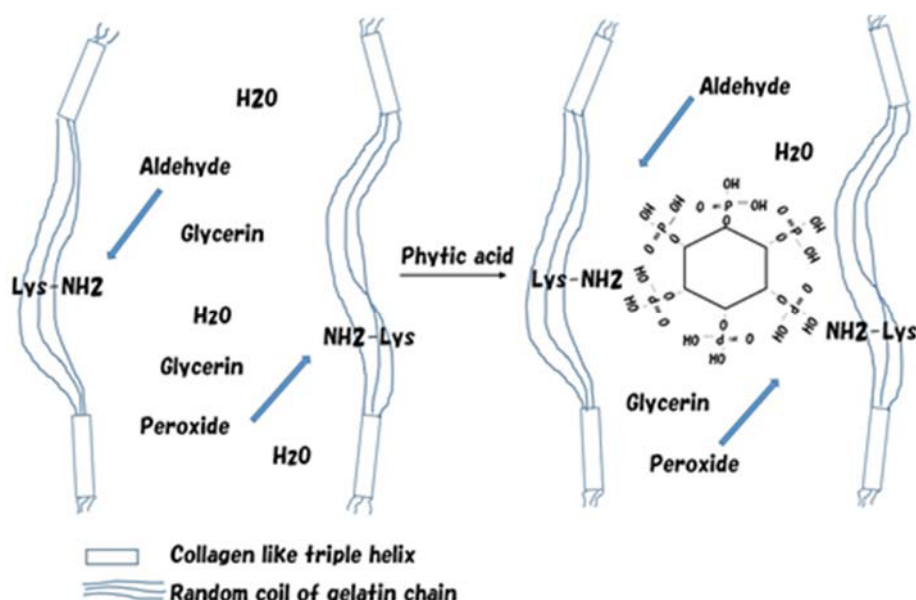


図9. フィチン酸添加前後でのゼラチン分子の水和構造変化

なお前報^[14]でゼラチンとグリセリンとの相互作用を NIR 解析で示したように、可塑剤であるグリセリンは隣り合うゼラチン分子間に入り込み、ゼラチン分子同士の重なり合いを抑制してゼラチンシートのゲル状態を安定化する。しかし、グリセリンにはアルデヒドが ϵ アミノ基を攻撃することを抑制するには有効ではないことが分かった。ゼラチンが架橋しないための有効性の観点からは、フィチン酸はコハク化ゼラチンと同様の効果があるが、架橋構造形成抑制のメカニズムは異なる。コハク化ゼラチンの場合には、ゼラチンの ϵ アミノ基を無

水コハク酸で酸アミド化することによりアルデヒドとの反応に寄与する自由な ϵ アミノ基を低減することにある。

4. 結論

これまでの研究成果として、ソフトカプセルの皮膜成分であるゼラチンは各種要因により不溶化することが知見されている。ソフトカプセル製剤の崩壊時間の延長や不溶化の起点となるゼラチンの ϵ アミノ基を保護し、架橋反応を遅らせるために、各種アミノ酸、ポリペプチド、サイクロデキストリン等をゼラチン皮膜へ添加する方法が検討されているが、必ずしも十分な効果が得られていなかった。我々は不溶化の原因となる生薬成分とゼラチンの相互作用の検討から、ゼラチン皮膜の不溶化機構を考察し、更に有効な不溶化防止技術を見出した。つまり、フィチン酸（イノシトール6リン酸）をゼラチン皮膜に添加することで不溶化が顕著に抑制されることを見出し、多くのソフトカプセル製剤に応用されている。しかし、その相互作用のメカニズムは必ずしも明らかにはされていなかった。

前報では、ゼラチンと水、グリセリンが形成する網目構造を吸湿性試験、静的 NIR スペクトル解析、引っ張り強度試験、及び、引っ張り強度試験中の皮膜について動的 NIR スペクトル法により検討した。ゼラチンの水和構造に水分子を排除して可塑剤であるグリセリンが配向することが知見された。コハク化ゼラチンとの比較試験より、ゼラチンではフリーな ϵ アミノ基が高次網目構造に重要な役割を果たしていることが示された。

本論文では、ゼラチンとコハク化ゼラチンにより調製した皮膜シートにフィチン酸を添加して PEG400 に浸漬した後、皮膜シートの崩壊時間を測定し、更にこのシートの分子構造の変化を静的 NIR で検討した。ゼラチンでは高次網目構造に有効に働いたフリーな ϵ アミノ基であるが、このフリーな ϵ アミノ基は PEG400 から生成したアルデヒド類の攻撃により酸アミド反応が起き、ゼラチン分子間の架橋、クロスリンクによりゼラチンが重合・高分子化して不溶化した。ソフトカプセル皮膜にはグリセリンと水が添加されているが、これらには不溶化防止効果がない。フィチン酸が分子構造的にどのようなメカニズムで不溶化防止に寄与しているかが静的 NIR 研究によって解明された。ゼラチン-水-

グリセリン構造の中に、フィチン酸が潜り込んでゼラチンに強く配向しフリーεアミノ基をアルデヒドからの攻撃から防御していることが分かった。

結論として、ゼラチンと水分やグリセリン、フィチン酸との相互作用を解析する上で、NIRは極めて有用な分析手法であることが示された。これらの手法をソフトカプセル製剤の皮膜製造工程に適用することにより、品質が高く有効で安心安全な高齢者や小児用にやさしい医薬品を迅速で安価に提供できる技術が発展するものと考えられる。

5. 謝辞

本研究において技術支援を賜りました富士カプセル株式会社開発本部製剤研究所所員に感謝申し上げます。また、本研究の一部は2019年度しあわせ研究費（研究テーマ：子供や高齢者に優しい医薬品剤形の開発）の助成を受けたものです。

6. 文献

- [1] S. Kamiya, K. Nagae, K. Hayashi, N. Suzuki, E. Hayakawa, K. Kato, T. Sonobe, K. Nakashima, Development of a new evaluation method for gelatin film sheets, *Inter. J. Pharm.* 461 (2014) 30-33.
- [2] E. Hayakawa, Studies of soft capsules in view of the surface interaction, *Membrane* 36 (4) (2011) 177-182
- [3] Y. Wu, J. Levons, A.S. Narang, K. Raghavan, V.M. Rao, Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility, *AAPS PharmSciTech* 12 (4) (2011) 1248-1263
- [4] G. A. Digenis, T. B. Gold, V. S. Shah, Cross-Linking of Gelatin Capsules and Its Relevance to Their in Vitro-in Vivo Performance, *J. Pharm. Sci.* 83 (7) (1994) 915- 921
- [5] Y. Shimokawa, Improvement of disintegration behavior of soft capsule containing the herbal medicine, *Pharm. Tech. Japan* 20 (12) (2004) 59-69
- [6] Y. Shimokawa, S. Shiraishi, M. Mihara, Composition for capsule film and the method for producing the capsular preparation, 3790258 (2006) JP

Patented

- [7] H. Taniguchi, H. Hashimoto, A. Hosoda, T. Kometani, T. Tsuno, S. Adachi, Functionality of compounds contained in rice bran and their improvement, *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 59 (7) (2012) 301–318
- [8] S. Han, D. Kim, D. Kwon, Thermal/Oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol, *Polymer* 38 (2) (1997) 317–323
- [9] Oxidative degradation of polyethyleneglycol (PEG) studied by LC-IR, Spectra Analysis Inc, July 8, 2019 Application Note 016 (2008) (March) <https://spectra-analysis.com/wp-content/uploads/2019/06/AppNote016-Polyethyleneglycol-1.pdf>.
- [10] European Pharmacopoeia 8.0, Near-Infrared Spectrophotometry, (2013) 62-67
- [11] Y. Hattori, Y. Tajiri, M. Otsuka, Tablet characteristics prediction by powder blending process analysis based on near infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.* 21 (2013) 1-9
- [12] Y. Hattori, M. Otsuka, Modeling of feed-forward control using the partial least squares regression method in the tablet compression process, *Inter. J. Pharm.* 524 (2017) 407-413
- [13] Y. Shimokawa, E. Hayakawa, K. Takahashi, K. Okai, Y. Hattori, M. Otsuka, Pharmaceutical formulation analysis of a gelatin-based soft capsule film sheet containing phytic acid using near-infrared spectroscopy, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 53 (2019) 101126
- [14] Y. Shimokawa, E. Hayakawa, K. Takahashi, K. Okai, Y. Hattori, M. Otsuka, Pharmaceutical formulation analysis of gelatin-based soft capsule film sheets using near-infrared spectroscopy, *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 48 (2018) 174-182