

外用剤の内部構造を評価するケミカルイメージング手法の開発

Development of Chemical Imaging Technique for Evaluating Inner Structure of
External Formulations

令和元年度

論文博士申請者

藤井 美佳 (Fujii, Yoshimura, Mika)

指導教員

深水 啓朗

本文中の略語

AFVo	Anflavate® ointment 0.05%
ANTo	Antebate® ointment 0.05%
ATR	Attenuated total reflection
BA	Benzyl alcohol
BBPo	Betamethasone butyrate propionate ointment
BJGo	Betamethasone butyrate propionate ointment 0.05% 「JG」
BW	Bees wax
DBT	Dibutyltin
GC/MS	Gas chromatography/mass spectrometry
HPoc	Heparinoid oil based cream 0.3% 「Nichiiko」
IR	Infrared
Iwaki-After	Tacrolimus ointment 0.1 % 「Iwaki」 (処方変更後)
Iwaki-Before	Tacrolimus ointment 0.1 % 「Iwaki」 (処方変更前)
LP	Liquid paraffin
MB	Methylene blue
NIR	Near infrared
NP-After	Tacrolimus ointment 0.1 % 「NP」 (処方変更後)

NP-Before	Tacrolimus ointment 0.1 % 「NP」 (処方変更前)
PC	Propylene Carbonate
PG	Propylene glycol
PM	Polarized microscopy
POE40	Polyoxyethylene hydrogenated castor oil 40
PP	Tacrolimus ointment 0.1 % 「PP」
Protopic	Protopic® ointment 0.1%
SLXo	Salex® ointment 0.05%
TA	Triacetin
Takata	Tacrolimus ointment 0.1 % 「Takata」
TCR	Tacrolimus hydrate
WBW	White bees wax
WP	White petrolatum

目次

緒言	5
第一章：皮膚外用剤の内部構造解析手法の確立	10
第1節 医薬品の品質評価におけるイメージング	10
第2節 Almeta®軟膏のイメージング	12
第3節 TCR 軟膏のイメージング	16
第4節 TCR 軟膏の製剤学的特性評価	25
第5節 小括	29
第二章：混合調剤による皮膚外用剤の物理的安定性	30
第1節 BBP _o のイメージング	30
第2節 混合製剤の物理的安定性評価	33
第3節 添加剤が混合製剤の物理的安定性に及ぼす影響	38
第4節 混合製剤の分離過程のモニタリング	41
第5節 小括	43
総括	44
実験の部	45
掲載論文	51
引用文献	52
謝辞	56

緒言

近年、医薬品設計や品質管理の分野において、特性 X 線、赤外 (IR)、近赤外 (NIR)、テラヘルツおよびラマン等様々な分光技術を用いた顕微イメージングシステムが非常に有用な分析ツールとなっている¹⁾²⁾。これらの手法は、製剤中の主薬や添加剤の混合均一性および分散状態を明確に可視化できることから、錠剤を始めとした固形製剤の評価に用いられてきている³⁻⁷⁾。しかしながら、軟膏やクリーム剤等の皮膚外用剤に本手法を応用した例は極めて少なく、半固形製剤の品質および物性の評価ツールとして応用できる、イメージング手法の開発が求められている。我々は、顕微全反射 (ATR) -IR 分光法により、液滴分散型軟膏であるアルクロメタゾンプロピオン酸エステル軟膏のイメージング測定を行った⁸⁾。その結果、主薬や添加剤の分散状態が先発品と後発品では異なることを明らかとし、顕微 ATR-IR 分光法が半固形製剤にも応用できることを報告している。また、クロベタゾン酪酸エステル軟膏について、顕微 ATR-IR 分光法に加えて、レオロジー特性および基剤である白色ワセリン (WP) の品質評価を行い、WP の球状結晶が軟膏中に分散していることを明らかとした⁹⁾¹⁰⁾。顕微 ATR-IR 分光法は、顕微 IR 分光法に ATR クリスタルを組み合わせた測定技術である。ダイヤモンドやゲルマニウム等を用いた高屈折率の ATR クリスタルに対して、臨界角以上の角度で IR ビームを照射すると、試料と ATR クリスタルの間で全反射が生じる。このとき、ATR クリスタルの屈折率と比較して、試料の屈折率が低いとき、試料内部に潜りこむ光 (エバネッ

セント波)が生じる (Fig. 1) . エバネッセント波は, 試料内部に浸透し, 試料が赤外光を吸収するスペクトル領域において減衰するため, ATR クリスタル表面の試料情報を得ることができる. しかし顕微 ATR-IR 分光法では, 測定部である ATR クリスタル表面に製剤を密着させて測定するため, 軟膏やクリーム剤等の半固形製剤中に分散している液滴は, 変形および合一する可能性があり, 正確なサイズや形状を評価することが難しい.

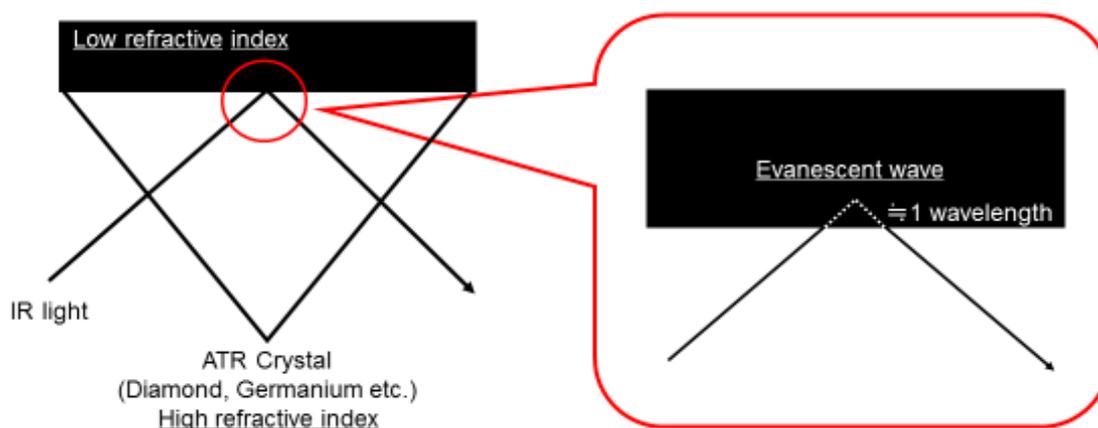


Fig. 1 ATR クリスタルの模式図 ¹¹⁾

近年, 共焦点ラマン分光法を用いることで, 三次元のイメージングが可能となり, 結晶やポリマーから構成される立体構造を可視化することが可能となった ¹²⁻¹⁴⁾. 共焦点ラマン分光法では, 焦点位置からの散乱光が, 狭いピンホールを通過して検出器に到達するように設計されているため, 深さ方向に分解能が生じる (Fig. 2). また, 焦点位置

以外からの散乱光は検出器に入り込まないため、迷光の侵入や蛍光の影響も削減され、高い空間分解能を得ることができる。X-Y平面の分解能 (Δx) は、レイリーの分解能の定義から $\Delta x = 0.61 \times \lambda / \text{N.A.}$ で示される¹⁵⁾。つまり、レーザー波長 (λ) が短く、レンズの開口数 (N.A.) が大きい条件において、より高い分解能を得ることができる。532 nm のレーザーを用いた場合、約 300 nm の分解能を得ることができ、微小構造のイメージングも可能である。さらに、検体を非破壊で測定できることから、製剤の品質評価における新しいツールとして期待されている。

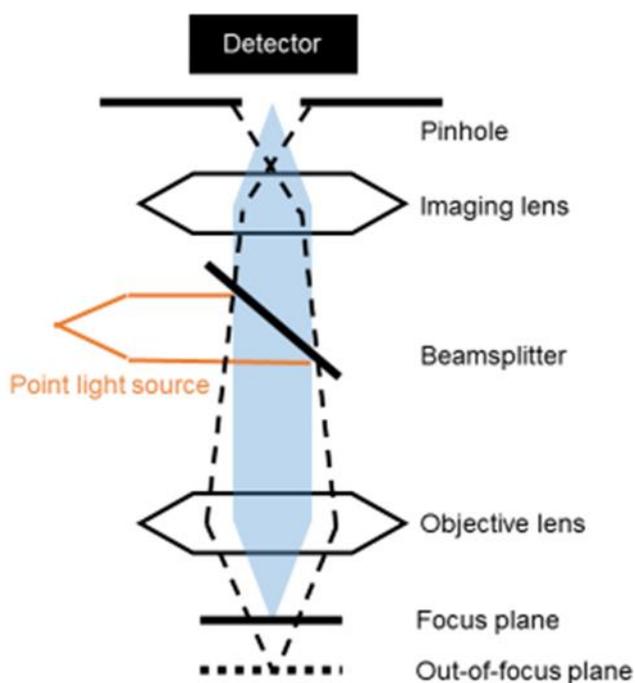


Fig. 2 共焦点顕微鏡の模式図¹⁶⁾

ステロイド軟膏は、アトピー性皮膚炎を始めとした皮膚疾患に用いられている。実際の医療現場では、ステロイド成分の希釈を目的として、ワセリンや保湿剤と混合されることが多い。特にアトピー性皮膚炎では、患部の保湿が重要となることから、保湿剤であるヘパリン類似物質油性クリームとの混合が汎用されている³⁷⁾。一方、ステロイド軟膏の添加剤および内部構造は、先発品と後発品の間で大きく異なることが知られている。例えば、クロベタゾンプロピオン酸エステルクリームに含まれるプロピレングリコール (PG) 濃度は、先発品と後発品間で 1.2~31.3%と差があることから¹⁷⁾、接触皮膚炎等の副作用の頻度^{18) 19)}、塗布時の使用感および他の製剤との混合時における物理的安定性に影響を及ぼすことが懸念される。

本研究では、まず液滴分散型軟膏である Almeta®軟膏、ベタメタゾン酪酸エステルプロピオン酸エステル軟膏 (BBPo) およびタクロリムス水和物 (TCR) 軟膏を用いて、顕微 ATR-IR 分光法による二次元のイメージングに加え、共焦点ラマン分光法を用いて半固形製剤の内部構造を評価する手法の構築を試みた。特に TCR 軟膏は、2014 年に後発品 2 種で、添加剤の変更が行われている。この変更は、「局所皮膚適用製剤の処方変更のための生物学的同等性試験ガイドライン」²⁰⁾ において C 水準に値し、“処方変更により、製剤特性が変化するおそれがあると考えられる処方変更”と定義されており、製剤の内部構造が大きく異なる可能性がある。そこで TCR 軟膏の先発品および処方変更前後の後発品において、各製剤の製剤学的特性に加えて、それらの内部構造を比較した。次に、臨床現場で汎用される 4 種類の BBPo およびヘパリン類似物質含有油性クリーム 0.3%「日医工」(HPoc) の混合製剤について、製剤中の成分が混合製剤の物理的安定性に及ぼす影響について検証した。

第一章：皮膚外用剤の内部構造解析手法の確立

第1節 医薬品の品質評価におけるイメージング

医薬品製剤の内部構造を解析するために用いられているケミカルイメージング手法の特徴を Table 1 に示す。IR や NIR 分光法によるケミカルイメージングは、コストパフォーマンスが良く、検体を非破壊で測定できることから、医薬品の品質評価に汎用されている手法である^{21) 22)}。同様に検体へのダメージが少ない手法として THz やラマン分光法が挙げられる²³⁾。THz 分光法では、結晶構造に特有のスペクトルを観察することが可能であり、化学構造が同一でも分子配列が異なる結晶多形が混在している場合には異なるピークが認められる。ラマン分光法は IR と相補的なスペクトルを観察できることに加え、水の影響を受けにくいことから、クリーム剤を含む半固形製剤の評価に応用が期待できる。しかしながら、これらの手法は製剤表面の分析を主としており、製剤内部のイメージングを行うことは難しい。本検討では、ラマン分光法に共焦点顕微鏡を組みあわせ、深さ方向の分析を可能とした共焦点ラマン分光法により、半固形製剤の内部構造評価を試みた。

Table 1 代表的なケミカルイメージング手法

手法	長所	短所
特性 X 線	元素によるマッピングが可能	検体へのダメージが大きい.
IR	検体を非破壊で測定可能 コストパフォーマンスが良い.	水の吸収が大きく, 水分含量の多い 検体は測定できない.
NIR	IR と比較して水の吸収が出にくい ため, 水を含む検体の測定も可能	IR と比較し, スペクトルの帰属が 不明確
THz	フォノン振動を検出するため, 結晶構造の 違いや結晶多形の識別が可能	スペクトルの解析が難しい. 解像度が低い.
ラマン	検体を非破壊で測定可能 IR と相補的なスペクトルが得られる.	測定機器のコストが高い.

第 2 節 Almeta®軟膏のイメージング

Almeta®軟膏はアルクロメタゾンプロピオン酸エステルを主薬とするステロイド軟膏であり、アトピー性皮膚炎を始めとした皮膚疾患に用いられている。顕微 ATR-IR 分光法のイメージングから、Almeta®軟膏では基剤中に、PG およびベンジルアルコール (BA) からなる液滴が分散しており、その液滴中に主薬および界面活性剤が溶解していることが明らかとなっている⁸⁾。本検討では、共焦点ラマン分光法により得られたラマンスペクトルを主成分分析により分離し、各スペクトルによるイメージング画像を得た。インタビューフォームに掲載されている Almeta®軟膏の添加剤を Table 2 に示す。また添加剤として配合される WP, PG および BA の標準ラマンスペクトルを Fig. 3 に示す。

Table 2 Almeta®軟膏の主薬および添加剤

API	Excipients
アルクロメタゾンプロピオン酸エステル	WP, PG, BA, Sorbitan fatty acid ester, LP

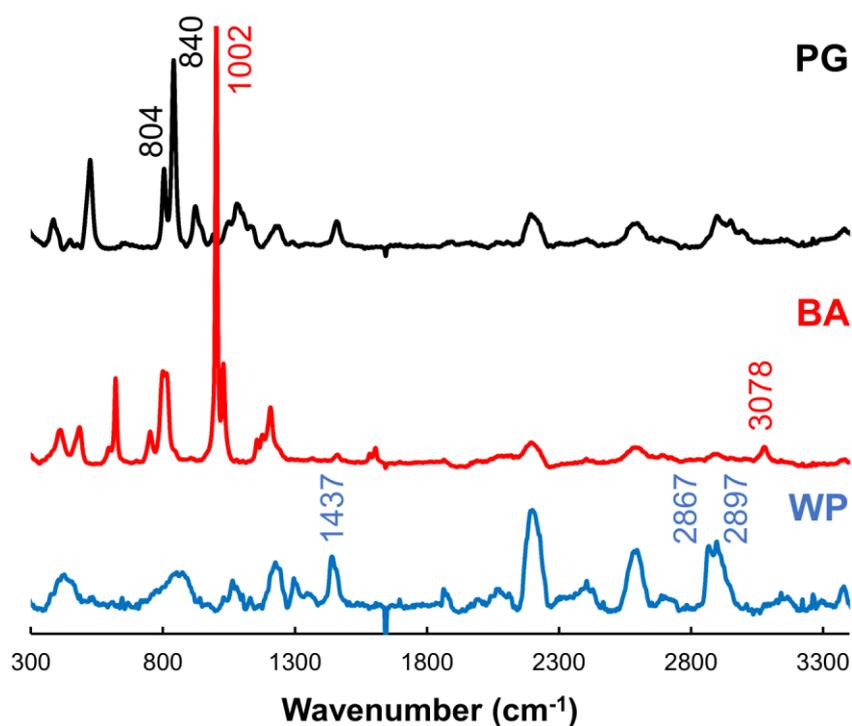


Fig. 3 各種添加剤の標準ラマンスペクトル

Fig. 3 より、溶剤である PG では 804 および 840 cm^{-1} 、BA では 1002 および 3078 cm^{-1} にそれぞれ特有のピークが認められた。また、基剤である WP では 1437, 2867 および 2897 cm^{-1} に特有のピークが観察された。共焦点ラマン分光法による Almeta®軟膏の X-Y 走査イメージングの結果を Fig. 4 に示す。Component 1 および Component 3 は、WP 特有の 1437, 2867 および 2897 cm^{-1} 付近のピークが認められたことから、炭化水素鎖に起因するドメインを表していると考えられた。2 つのドメインの分布パターンにおける差は、WP の結晶性の違いによると推察され、それぞれ WP と流動パラフィン (LP) が、異なるドメインとして検出されたと考えられた。Component 2 では、PG に特有の 804 および 840 cm^{-1} 、BA に特有の 1002 cm^{-1} および 3070 cm^{-1} 付近のピーク

が認められた。つまり、PG と BA は相溶し、炭化水素鎖の基剤中で液滴を形成していると推察された。また、Component 2 には 1606 cm^{-1} に微小なピークが認められた。これはカルボニル基のピークに帰属されることから²⁴⁾、アルクロメタゾンプロピオン酸エステルまたはソルビタン脂肪酸エステルが液滴中に共存していることが示唆された。

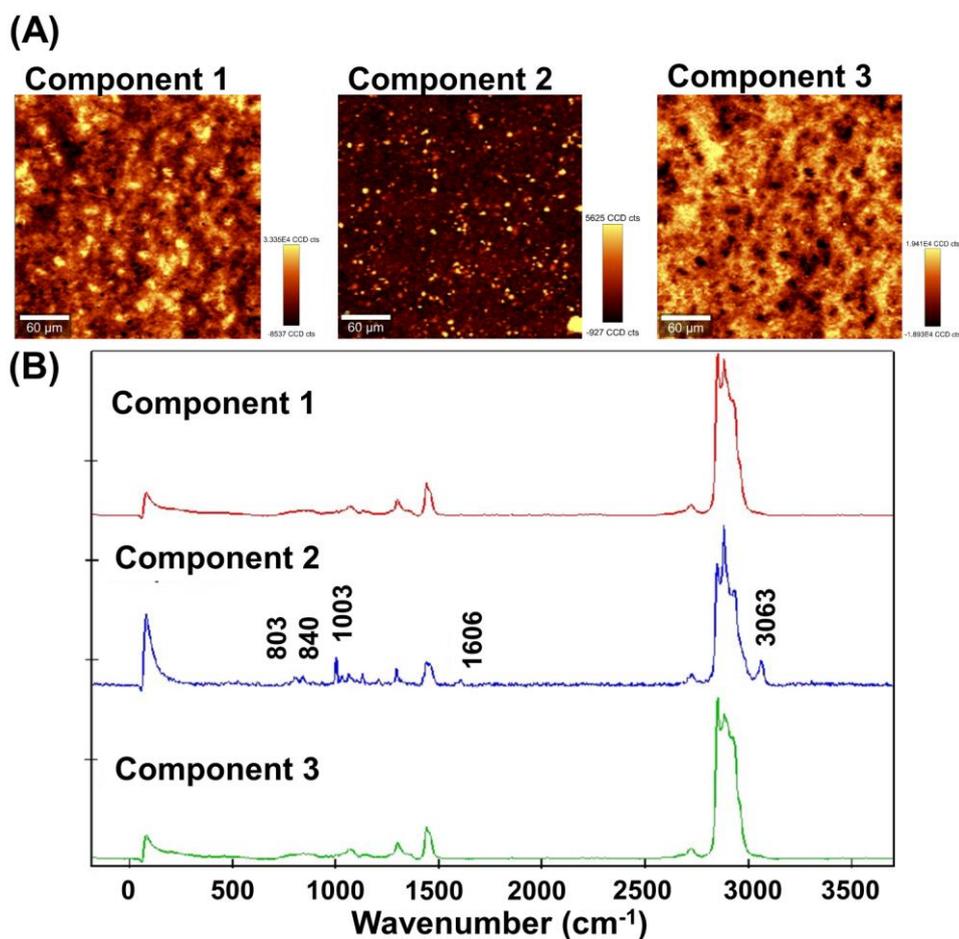


Fig. 4 (A) 共焦点ラマン分光法による Almeta®軟膏の X-Y 走査イメージング ($300\text{ }\mu\text{m} \times 300\text{ }\mu\text{m}$), (B) 主成分分析で分離した各成分のラマンスペクトル

次に、Almeta®軟膏の Component 2 について、深さ方向の分析を実施した結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 (A) で示した黄線上を、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 深部までイメージングを行った (Fig.

5 (B)) . 深さ分析の結果から、軟膏の深部に存在する PG および BA からなる液滴も観察できることが明らかとなった。Almeta®軟膏中の PG および BA の含有量は、1.1 (w/w) %および 1.9 (w/w) %であり⁸⁾、共焦点ラマン分光法は、微量な添加剤のイメージングも可能であることが明らかとなった。また、共焦点ラマン分光法で得られたイメージングの結果は、顕微 ATR-IR 分光法で得られた結果と一致することから、共焦点ラマン分光法によるケミカルイメージングは、半固形製剤の内部構造の評価手法として有用であると考えられた。

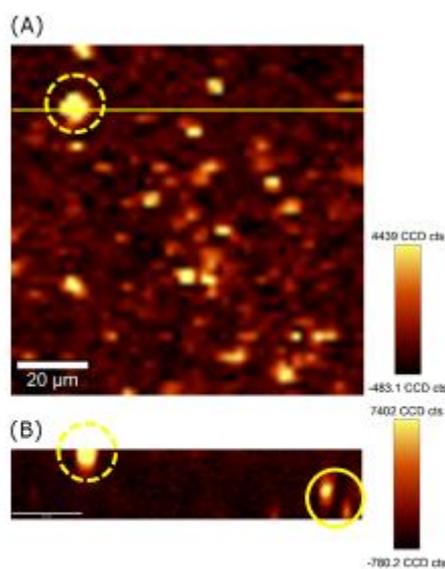


Fig. 5 共焦点ラマン分光法による Almeta®軟膏のイメージング (A) X-Y 走査 (100 μm × 100 μm), (B) Depth analysis (100 μm × 20 μm)

第3節 TCR 軟膏のイメージング

TCR 軟膏は、Almeta[®]軟膏と同じ液滴分散型軟膏である。アトピー性皮膚炎の治療に汎用されており、長期間にわたって皮膚創傷面に投与されることから、先発品および後発品の内部構造および製剤学的特性の差が治療効果に影響を与えることが懸念される。本検討では、TCR 軟膏の先発品および処方変更前後の後発品において、製剤学的特性の評価に加えて、顕微 ATR-IR 分光法および共焦点ラマン分光法によるケミカルイメージングを実施し、製剤間の内部構造の違いを解析した。インタビューフォームに掲載されている各 TCR 軟膏の添加剤を Table 3 に示す。Table 3 に示した各種添加剤の標準 IR およびラマンスペクトルを Fig. 6 および Fig. 7 にそれぞれ示す。また、各製剤中の溶剤濃度をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定した結果、炭酸プロピレン (PC) およびトリアセチン (TA) 量は 4.3~5.3 %であり、製剤間で大きな差がないことが分かった。

Table 3 各 TCR 軟膏に配合されている添加剤

Excipients	Medicine Products						
	Protopi c	Iwaki- Before	Iwaki- After	NP- Before	NP- After	PP	Takata
PC	+		+		+		
TA						+	+
WBW	+		+		+		
BW						+	+
LP	+	+	+	+	+		
Paraffin	+		+		+		
WP	+	+	+	+	+	+	+
DBT		+		+			
Others		3		3			

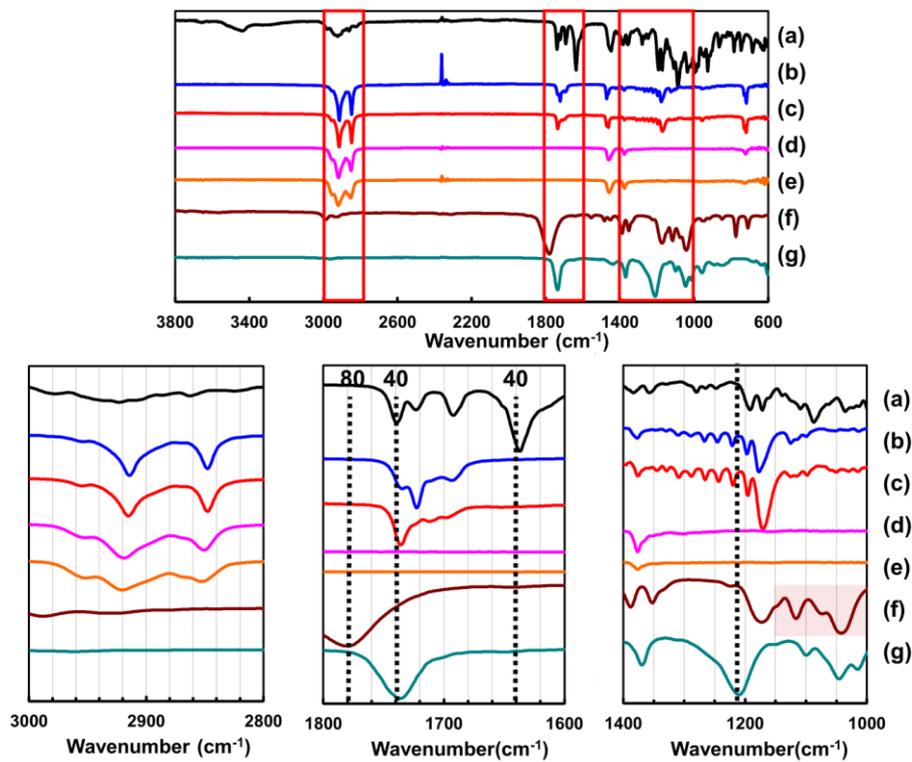


Fig. 6 各種添加剤の標準 IR スペクトル

a) TCR, b) WBW, c) BW, d) WP, e) LP, f) PC, g) TA

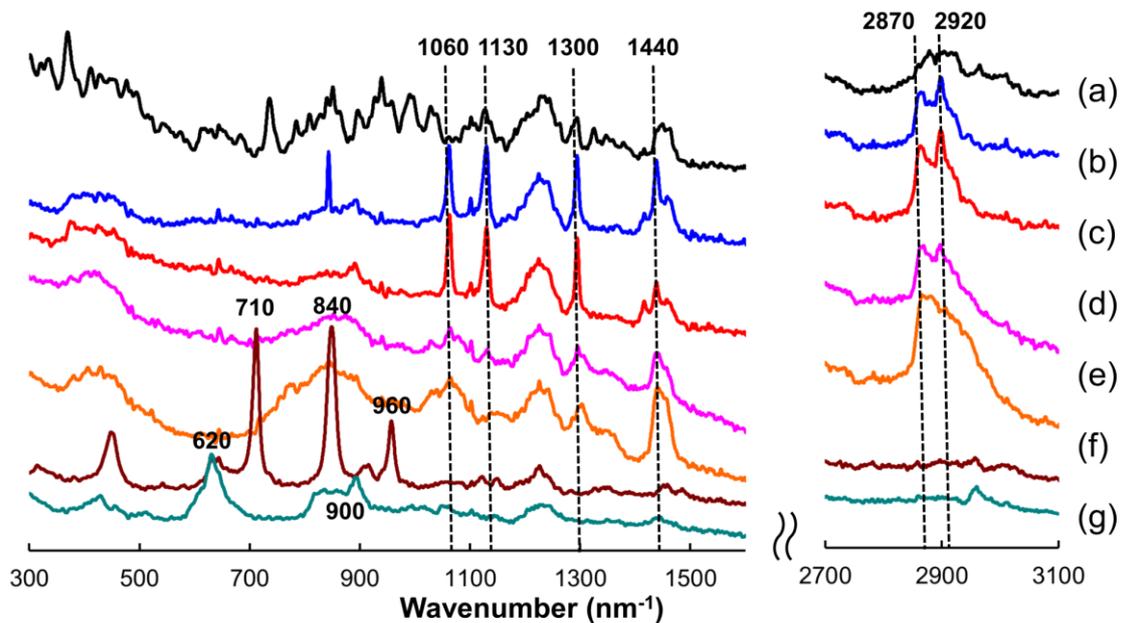


Fig. 7 各種添加剤の標準ラマンスペクトル
 a) TCR, b) WBW, c) BW, d) WP, e) LP, f) PC, g) TA

Fig. 6 より、TCR、PC および TA では特徴的な吸収ピークが、1640、1740 および 1780 cm^{-1} に認められた。また、PC では 1000~1080 cm^{-1} 付近に連続した吸収が認められ、TA では 1200 cm^{-1} 付近に強い吸収が認められた。これらの特異的なピークは、軟膏基剤であるサラシミツロウ (WBW)、ミツロウ (BW)、WP および LP では確認されなかった。ラマンスペクトル (Fig. 7) では、TCR において 700~1300 cm^{-1} 付近に複数のピークが認められ、さらに 1440 cm^{-1} 付近には緩慢なピークが認められた。ワックスである WBW および BW は 1060、1130、1300 および 1440 cm^{-1} に特異的なピークが認められた。炭化水素系油剤の WP および LP は、1440 cm^{-1} 付近に特異的なピークが

認められた。また高波数領域において、WP では 2870 および 2920 cm^{-1} にピークが検出されたが、LP では 2870 cm^{-1} にピークトップを有する緩慢なピークのみが認められた。PC では 710, 840 および 960 cm^{-1} , TA では 620 および 900 cm^{-1} に特異的なピークが認められた。これらの結果から、IR およびラマンスペクトルともに、各添加剤に由来するスペクトルの帰属が可能であることがわかった。そこで、顕微 ATR-IR 分光法および共焦点ラマン分光法を用いたケミカルイメージングを実施した。顕微 ATR-IR 分光法および偏光顕微鏡により得た各軟膏の画像を Fig. 8 に示す。上述した Almeta® では偏光顕微鏡による観察で液滴は認められなかったが、TCR 軟膏では全ての製剤で液滴が観察された。顕微 ATR-IR 分光法の結果から、プロトピック軟膏 0.1% (Protopic), タクロリムス軟膏 0.1 % 「イワキ」(処方変更後) (Iwaki-After) およびタクロリムス軟膏 0.1 % 「NP」(処方変更後) (NP-After) では、PC に特異的な 1780 cm^{-1} のピーク強度でイメージング画像を得ると、軟膏中に液滴のドメインが認められた。一方、その他の製剤では TA に特異的な 1740 cm^{-1} のピーク強度でイメージングすることで、液滴のドメインが観察された (Fig. 8)。これらの結果から、偏光顕微鏡で認められた液滴は、PC または TA であることが分かった。主薬である TCR は、配合量が 0.1 % と微量であることから、本検討では検出されなかったが、液滴中に溶解していると推察される。

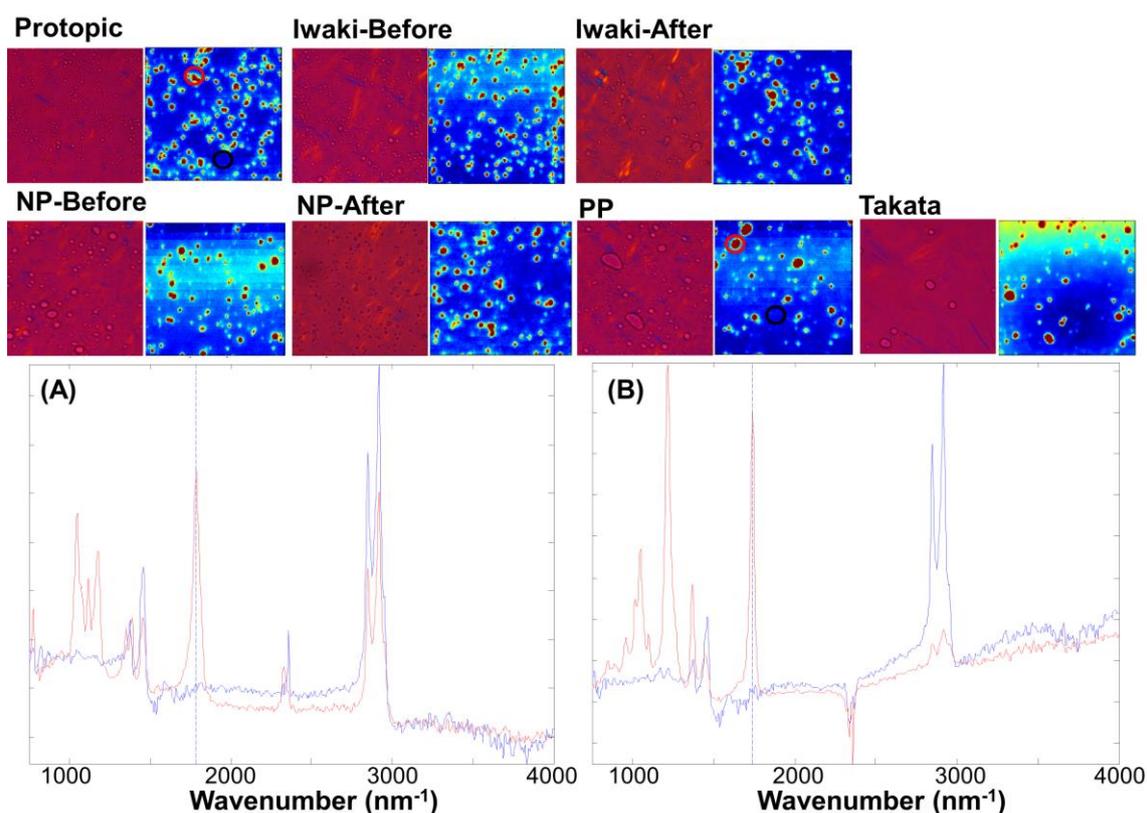


Fig. 8 偏光顕微鏡および顕微 ATR-IR によるイメージング (A) Protopic の Red circle および Black circle 領域のラマンスペクトル (B) PP の Red circle および Black circle 領域のラマンスペクトル

次に偏光顕微鏡および顕微 ATR-IR 分光法で得た、各製剤の液滴径を Mac-View により解析した (Table 4). 顕微 ATR-IR 分光法で観察された液滴の D50 (累積粒度分布の 50%値) は、多くの製剤で 7.5~7.8 μm であったが、タクロリムス軟膏 0.1 % 「PP」 (PP) のみ 14.1 μm と大きな値を示した. 一方、偏光顕微鏡観察では 3.9~11.7 μm と D50 にばらつきが見られ、顕微 ATR-IR 分光法と偏光顕微鏡観察で得られた D50 に相関は認められなかった. 先発品である Protopic と、偏光顕微鏡観察および顕微 ATR-IR 分光法による D50 値に大きな差が認められたタクロリムス軟膏 0.1 % 「タカタ」

(Takata) について、共焦点ラマン分光法によるイメージングを行った (Fig. 9). 主成分分析により、Protopic では、3 種類のスペクトルが認められた。Component 1 は 1290, 1440, 2870 および 2920 cm^{-1} に特異的なピークを有することから、WP および LP による炭化水素のドメインであることが示唆された。また、Component 2 は 710, 840 および 960 cm^{-1} に特異的なピークを有することから、PC による液滴のドメインと推察された。Component 3 は 1060, 1130, 1300 および 1440 cm^{-1} のピークが認められ、WBW によるワックスのドメインであると考えられた。一方、Takata において認められた Component 2 は 620 および 900 cm^{-1} に特異的なピークを有することから TA による液滴のドメインと考えられた。また Component 1 および Component 3 は Protopic の Component 1 および Component 3 と類似したスペクトルであり、WP からなる炭化水素系油剤と BW によるワックスのドメインと推察された。これらの結果から、TCR 軟膏では、PC あるいは TA の液滴が油性基剤中に分散しており、さらにワックスと炭化水素系油剤は別々のドメインを形成していることが示唆された。

Table 4 各軟膏中の液滴の D50 値

		Protopic	Iwaki- Before	Iwaki- After	NP- Before	NP- After	PP	Takata
D50	PM	4.0	3.9	5.6	8.8	6.1	10.1	11.7
(μm)	ATR	7.6	7.5	7.9	7.6	7.6	14.1	7.6

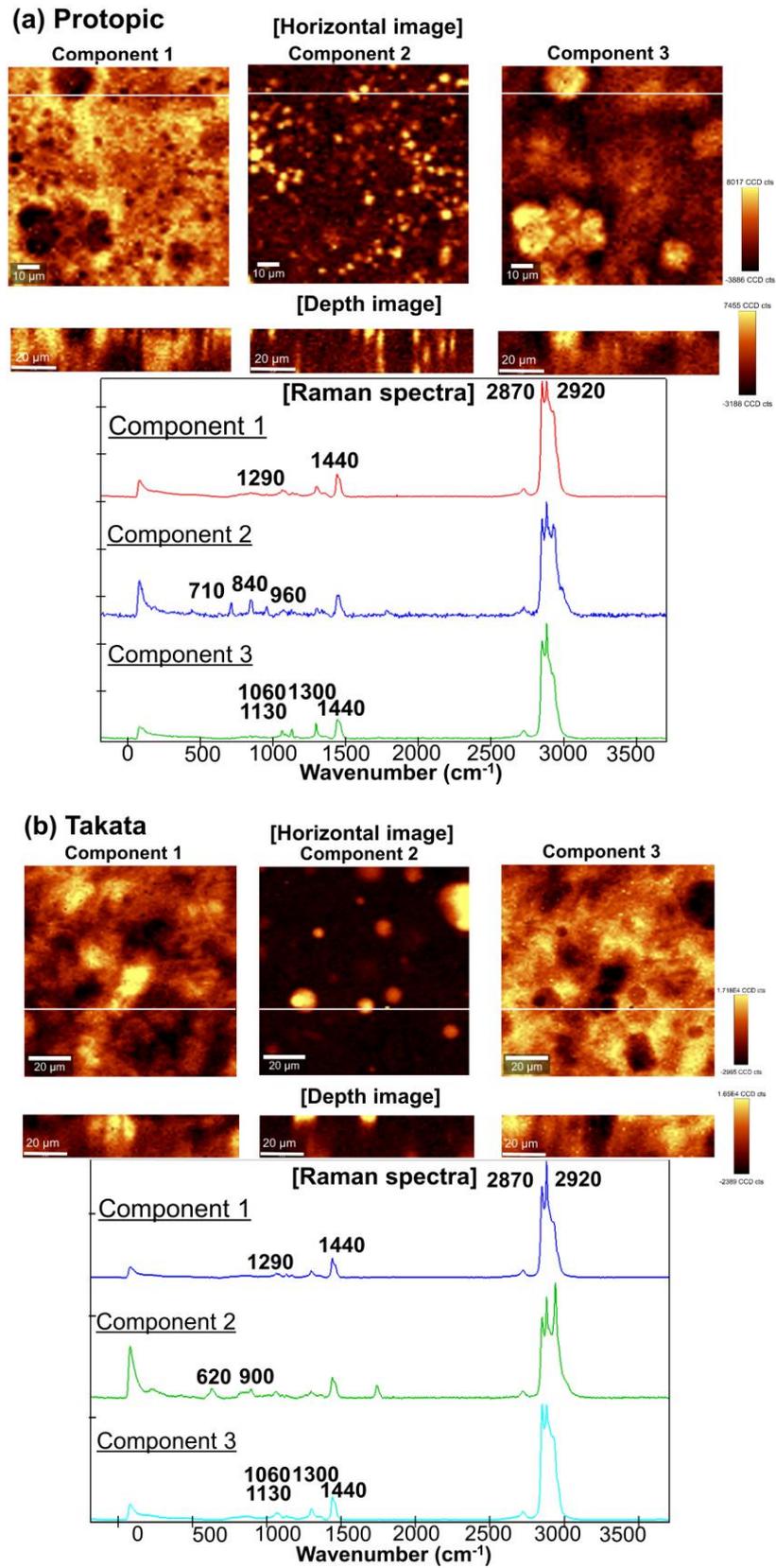


Fig. 9 共焦点ラマン分光法による (a) Protopic および (b) Takata のイメージング

各測定手法で得られた Protopic と Takata の D50 および D90 (累積粒度分布の 90% 値) を Mac-View により解析した結果を Table 5 に示す。共焦点ラマン分光法によるイメージングにより得られた液滴の D50 および D90 は、偏光顕微鏡観察で得られた液滴の D50 および D90 とおおよそ一致した。顕微 ATR-IR 分光法では測定部であるゲルマニウムやダイヤモンドのクリスタル表面に製剤を密着させて測定するため、液滴の合一や変形が起こったことに対して、共焦点ラマン分光法および偏光顕微鏡観察では軟膏の内部構造を正確に評価できたと考えられる。一方、偏光顕微鏡では、液滴と基剤の屈折率が近い場合には液滴が観察しにくく、各成分の同定も困難である。共焦点ラマン分光法は、半固形製剤の内部構造を評価する上で大変有益なツールであると考えられる。

Table 5 各 TCR 軟膏中液滴の D50 および D90

Sample	Polarized microscopy		ATR-IR		Confocal Raman	
	D50 (μm)	D90 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)	D50 (μm)	D90 (μm)
Protopic	4.0	6.0	7.5	10.6	3.6	5.0
Takata	11.7	15.6	7.6	14.6	13.0	15.9

半固形製剤中の液滴径は、製剤の安定性および主薬の経皮吸収性に影響することが知られている。液滴の沈降（浮上）速度 (v_s) は、下記の Stokes の式から算出できる。

$$v_s = d_p^2(\rho_p - \rho_f)g/18\eta$$

このとき、 d_p は粒子径 [m]、 ρ_p は粒子の密度 [kg/m³]、 ρ_f は流体の密度 [kg/m³]、 g は

重力加速度 $[m/s^2]$, η は流体の粘度 $[Pa \cdot s]$ をそれぞれ示している. Stokes の式から, 粒子径が増加すると沈降 (浮上) 速度が増加することがわかる. TCR 軟膏の後発品は先発品と比較して粒子径が大きいことが明らかとなり (Table 4 および Table 5), 液滴の合一および相分離が起りやすいと推察された. 主薬は液滴中に存在すると考えられるため, 相分離が生じた場合, 製剤中の主薬濃度に偏りが生じる. そのため TCR 軟膏では製剤間で安定性や薬効に差が生じる可能性に留意すべきであると考えられた.

第4節 TCR 軟膏の製剤学的特性評価

軟膏の展延性やレオロジー特性は、主薬の皮膚浸透性や軟膏の使用感に影響することが知られている²⁵⁻²⁷⁾。そこで、TCR 軟膏の先発品および後発品の伸び性およびレオロジー特性を比較した。スプレッドメーターによる伸び性の結果を Fig. 10 に、粘度測定の結果を Fig. 11 に示す。さらに Fig. 10 の結果から得られたレオロジーパラメーターおよび算出した降伏値を Table 6 に示す。降伏値 S_0 (dyne/cm²) は、下記の式から算出した。

$$S_0 = 48PVG/\pi^2 D_\infty^5$$

このとき、 D_∞ (cm) は 200 秒後の試料直径、 G は重力加速度 (980 cm/s²)、 π は円周率 (3.14)、 P はガラス板の重量 (g)、 V はサンプル容量 (cm³) をそれぞれ示している。

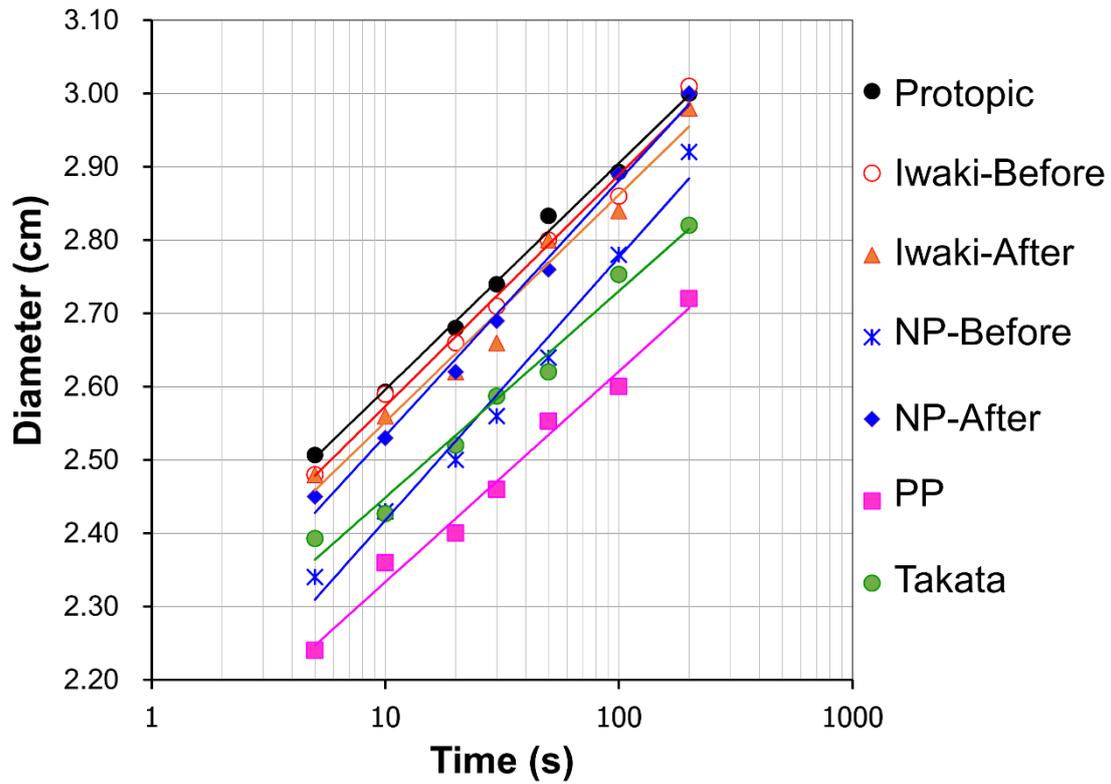


Fig. 10 スプレッドメーターによる TCR 軟膏の展延性評価

Table 6 各種 TCR 軟膏のレオロジーパラメーター

	R ²	Yield Value (dyne/cm ²)	Approximation
Protopic	0.996	1127.8	$y = 0.3086 \log(x) + 2.2870$
Iwaki-Before	0.988	1109.2	$y = 0.3155 \log(x) + 2.2577$
Iwaki-After	0.973	1166.2	$y = 0.3099 \log(x) + 2.2418$
NP-Before	0.981	1291.0	$y = 0.3588 \log(x) + 2.0588$
NP-After	0.993	1127.8	$y = 0.3482 \log(x) + 2.1845$
PP	0.986	1840.7	$y = 0.2874 \log(x) + 2.0461$
Takata	0.982	1536.7	$y = 0.2819 \log(x) + 2.1668$

Table 6 より、近似直線の傾きはいずれの製剤においても大きな差は認められなかったが、降伏値は PP および Takata で高値を示した。NP-Before, PP および Takata では、延び性測定初期の試料直径が小さいことに加え (Fig. 10), 25°Cにおける粘度値が大きいことが明らかとなった (Fig. 11)。これらの結果から、タクロリムス軟膏 0.1 % 「NP」(処方変更前)(NP-Before), PP および Takata は、塗布時に固さと延ばしにくさを感じる製剤であることが懸念される。またこれら製剤の D50 は、他の製剤と比較して大きいことが明らかとなっており (Table 4), 基剤の硬さが調製過程の攪拌効率に影響し、液滴径が大きくなったと推察された。Fig. 11 より、TCR 軟膏の粘度は全ての製剤において温度依存的に減少した。特に Takata は 37°Cにおける粘度が測定限界以下であり、25°Cの粘度値と大きく異なることが明らかとなった。Stokes の式で示されるように^{28) 29)}, TCR 軟膏の液滴は基剤の粘度の低下に伴い沈降または浮上し、合一が促進されると考えられる。そのため、長期の高温保存は溶剤と基剤が相分離したブリーディングを生じる可能性が高まる。特に 37°C条件下で粘度が顕著に低下する Takata では、臨床現場における保存温度にも留意すべきであると考えられた。

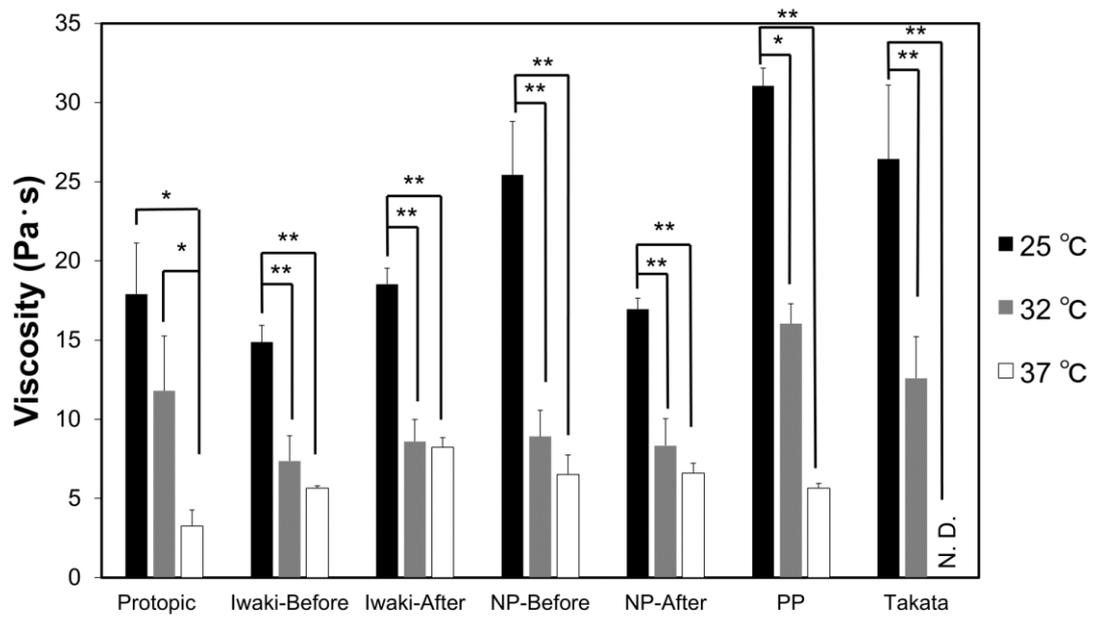


Fig. 11 各温度における TCR 軟膏の粘度値 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

第5節 小括

本検討では、共焦点ラマン分光法により半固形製剤の内部構造を評価する手法の構築を行った。共焦点ラマン分光法によるイメージングは、顕微 ATR-IR 分光法と比較して半固形製剤中の液滴の変形および合一が生じず、半固形製剤の内部構造を正確に評価することが可能であった。Almeta[®]軟膏および TCR 軟膏は共に液滴分散型軟膏であり、液滴径の大きさやばらつきがブリーディング等の製剤安定性に影響を及ぼすと推察される。主薬は液滴中に溶解していると考えられるため、ブリーディング後には製剤中の主薬濃度に勾配が生じることが懸念される。そのため、正確な液滴径を理解することは、各軟膏の安定性および効果を予測する上で大変重要と考えられる。共焦点ラマン分光法による深さ分析は、液滴分散型軟膏の液滴径および形状を非破壊で測定できることに加え、添加剤の分散状態も明確となり、半固形製剤の品質評価を行うツールとして有用であると考えられた。

第二章：混合調剤による皮膚外用剤の物理的安定性

第1節 BBPo のイメージング

本検討で用いた BBPo は、強度分類でベリーストロングに分類される、ステロイド軟膏である。そのため、ステロイド成分の希釈を目的に、保湿剤と混合調剤されることが多い製剤である。各 BBPo の組成および配合される溶剤濃度を Table 7 に示す。インタビューフォームより、アンフラベート®軟膏 0.05%軟膏 (AFVo) およびベタメタゾン酪酸エステルプロピオン酸エステル軟膏 0.05%「JG」(BJGo) には溶剤である PG が配合されており、液滴分散型軟膏であることが示唆された。

Table 7 BBPo の組成および溶剤濃度

製品	添加剤	PG 濃度 (wt%)
ANTo	スクワラン, ゲル化炭化水素, パラフィン, WP	
SLXo	パラフィン, LP, WP	
AFVo	POE40, PG, WP	6.2±0.1
BJGo	POE40, PG, WP	5.9±0.1

そこで、顕微 ATR-IR 分光法によるイメージングを行い、AFVo および BJGo の内部構造を評価した。その結果を Fig. 12 に示す。両製剤において 1044 cm^{-1} および 1728 cm^{-1} に吸収を持つドメインが認められた。既報⁸⁾より、 1040 cm^{-1} 付近には PG に由来

するピークが、 1700 cm^{-1} 付近にはステロイド骨格またはポリオキシエチレン硬化ひまし油 40 (POE40) 由来のカルボニル基に由来するピークが観察されることが明らかとなっている。これより、主薬および POE40 が PG と共存して存在することが示唆された。PG のドメインは、BJGo と比較して AFVo では顕著に大きく、歪であることが明らかとなった。

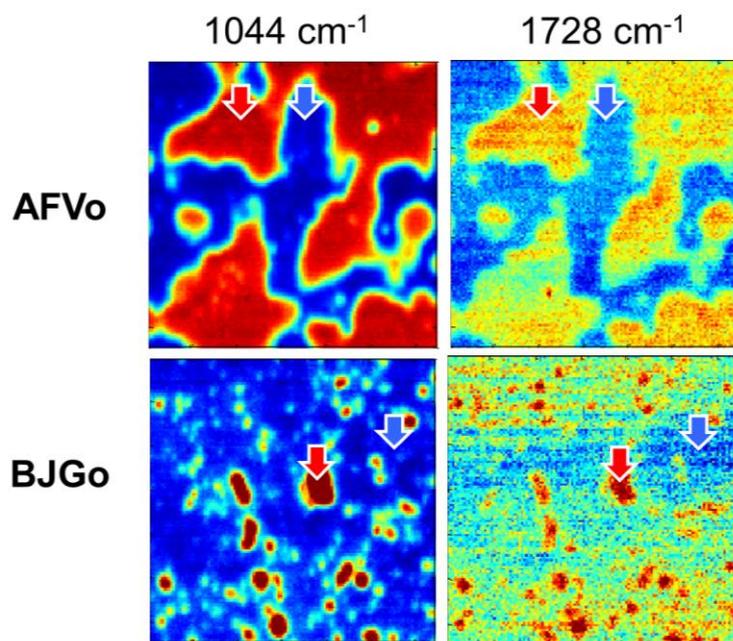


Fig. 12 AFV0 および BJGo の顕微 ATR-IR imaging ($200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m}$)
赤 : PG (1044 cm^{-1}) またはカルボニル基 (1728 cm^{-1}) 由来のドメイン, 青 :
油性基剤由来のドメイン

そこで、AFV0 について共焦点ラマン分光法によるイメージングを行った。AFV0 中 PG ドメインのイメージング結果を Fig. 13 に示す。領域 A では $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満の液滴が分

散する画像が得られたが、領域 B では、直径 60 μm 以上の巨大な凝集体が認められ、ATR-IR 分光法によるイメージング結果 (Fig. 12) と一致した。また、イメージング画像の深さ方向に着目すると、領域 A の水平画像では認められない位置の約 15 μm 深部において別の液滴像を確認することができた (Fig. 3 (b), 左)。さらに、領域 B の水平画像において認められる凝集体の分布を深さ方向で確認した結果、この画像の歪みを考慮しても凝集体の厚さは約 5 μm 以下であり、球状ではないことが明らかとなった (Fig. 3 (b), 右)。以上の結果から、AFVo 中の液滴は製剤中で不均一な状態で存在しており、かつ液滴径が大きいことから、製剤の安定性や製剤の効果にばらつきが生じることが懸念される。

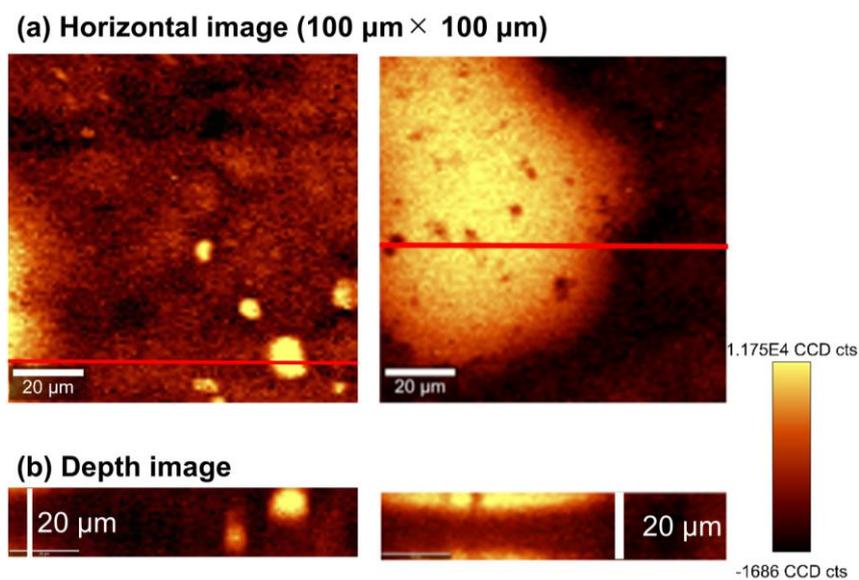


Fig. 13 AFVo 中液滴の共焦点ラマンイメージング (a) X-Y 平面および

(b) 深さ分析

第2節 混合製剤の物理的安定性評価

4種類のBBP_oとHPocを等量で量りとり、攪拌して混合製剤を調製した。混合製剤の物理的安定性を評価するために、遠心分離を行い、その外観を観察した。その結果をFig. 14に示す。遠心分離後には全ての混合製剤で分離が認められた。水溶性色素であるメチレンブルー(MB)は、分離の下層に局在し、油性色素であるSudanIIIは、上層および中層に局在することが明らかとなった。既報より、ベタメタゾン吉草酸エステル軟膏とHPocの混合製剤において、遠心分離後の相分離が報告されている³⁰⁾。BBP_oとHPocの混合製剤でも同様に、遠心分離後には水溶性成分と油溶性成分の相に分離が生じることが明らかとなった。

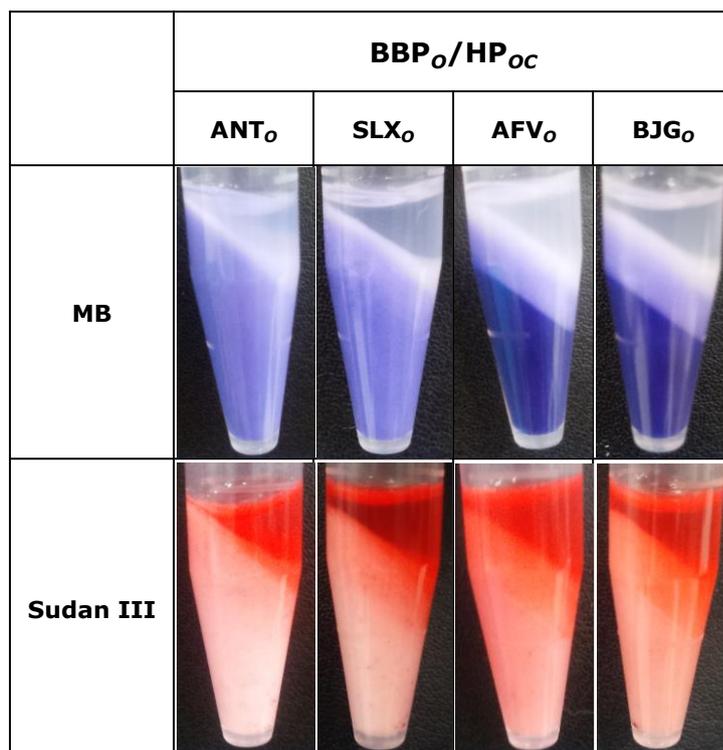


Fig. 14 遠心分離後の各種混合製剤の外観

次に、37°Cで保存した各混合製剤の外観観察結果を Fig. 15 に示す。アンテベート® 0.05%軟膏 (ANTo)/HPoc およびサレックス® 0.05%軟膏 (SLXo)/HPoc では保存 72 h 後においても、外観に大きな変化は認められなかった。一方、AFVo/HPoc および BJGo/HPoc では保存 3 h 後から半固形部（上層）と液体部（下層）に分離が生じた。このとき、油性色素である SudanⅢは上層に局在することが明らかとなり、水溶性成分と油溶性成分に分離が生じたことが示唆された。

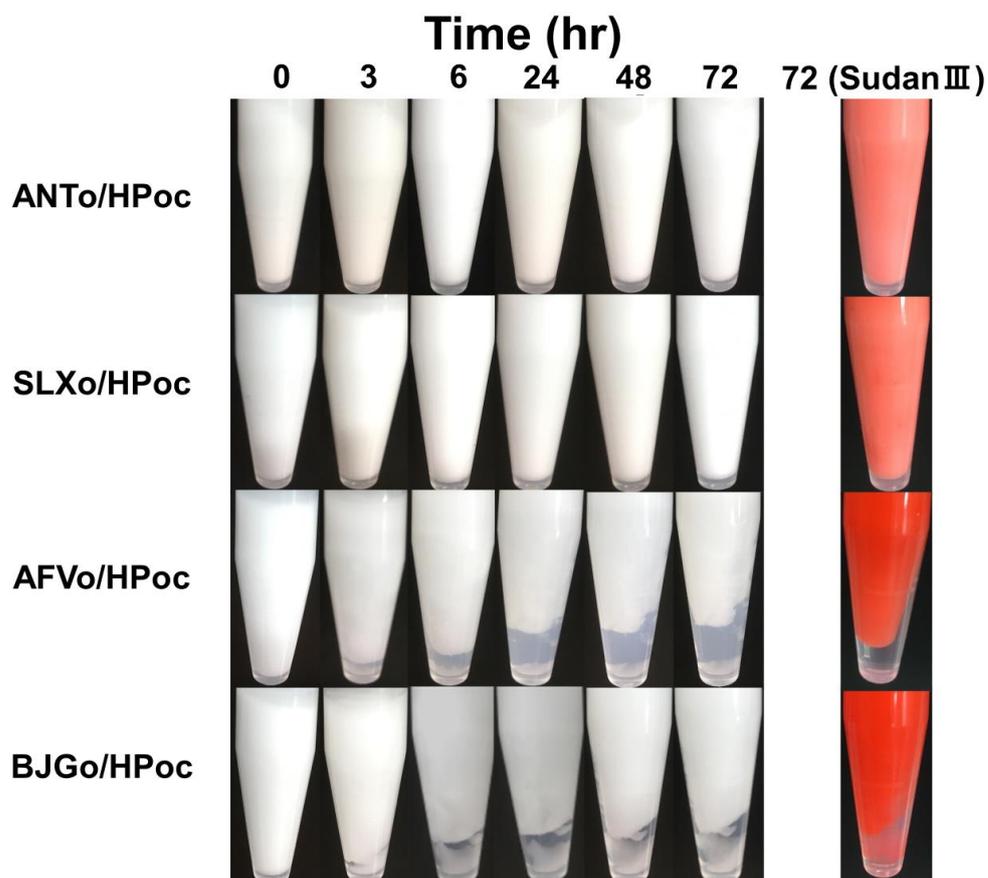


Fig. 15 37°Cで保存した各混合製剤の外観

混合製剤の分離状態をより詳細に検討するため、NIR 分光法により分離した各層を測定した。遠心分離を行った各混合製剤の測定結果を Fig. 16 に示す。混合前の BBPo および HPoc では、炭化水素の結合音および第一倍音に由来する 4300 cm^{-1} および 5700 cm^{-1} の吸収が認められた³¹⁾。また HPoc では、水酸基の結合音および第一倍音に由来する 5200 cm^{-1} および 6800 cm^{-1} の緩慢な吸収ピークが観察され³²⁾、製剤中に水が存在すると推察された。遠心分離後の各層を取り出して測定した結果、全ての混合製剤の分離下層において、 5200 cm^{-1} のピークが強いことが明らかとなり、高密度の水性成分が下層に沈降したことが示唆された。ANTo/HPoc および SLXo/HPoc では 5200 cm^{-1} のピークが中層からも検出されたが、AFVo/HPoc および BJGo/HPoc の中層からはほとんど認められず、AFVo/HPoc および BJGo/HPoc では分離がより明確に生じたと推察される。

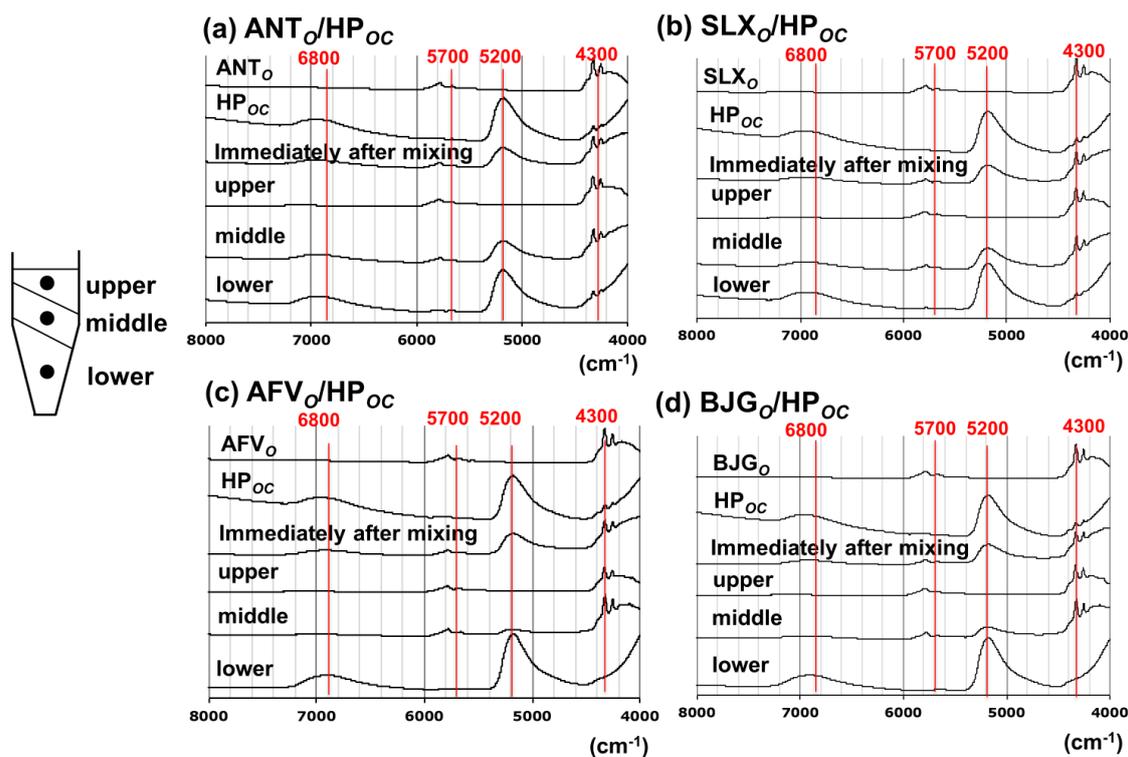


Fig. 16 遠心分離後の各混合製剤の NIR スペクトル

次に 37°C で 72 h 保存した混合製剤を NIR 分光法で測定した結果を Fig. 17 に示す。

NIR スペクトルの結果からも、ANTo/HPoc および SLXo/HPoc では上層から下層までスペクトルに変化が認められず、72 時間まで乳化が維持されていることが示唆された。また、37°C で 3 か月保存後にもスペクトルに変化は認められなかった。一方、AFVo/HPoc および BJGo/HPoc では、分離により生じた半固形部の上層から下層で、炭化水素に由来する 4300 cm^{-1} および 5800 cm^{-1} の吸収ピークが認められた。この層では水酸基に由来する 5200 cm^{-1} の吸収ピークは弱く、油性成分による層であると考えられた。一方、下層の液体部では、5200 cm^{-1} および 6800 cm^{-1} の吸収ピークのみが

認められ、水性成分により構成された層であることが明らかとなった。これらの結果は染色による外観観察結果と一致した (Fig. 15)。HPoc との混合製剤で分離が生じた AFVo および BJGo は、添加剤として POE40 および PG を含有している (Table 7 および Fig. 12)。これらの成分が、AFVo/HPoc または BJGo/HPoc の安定性を低下させる要因であることが懸念される。

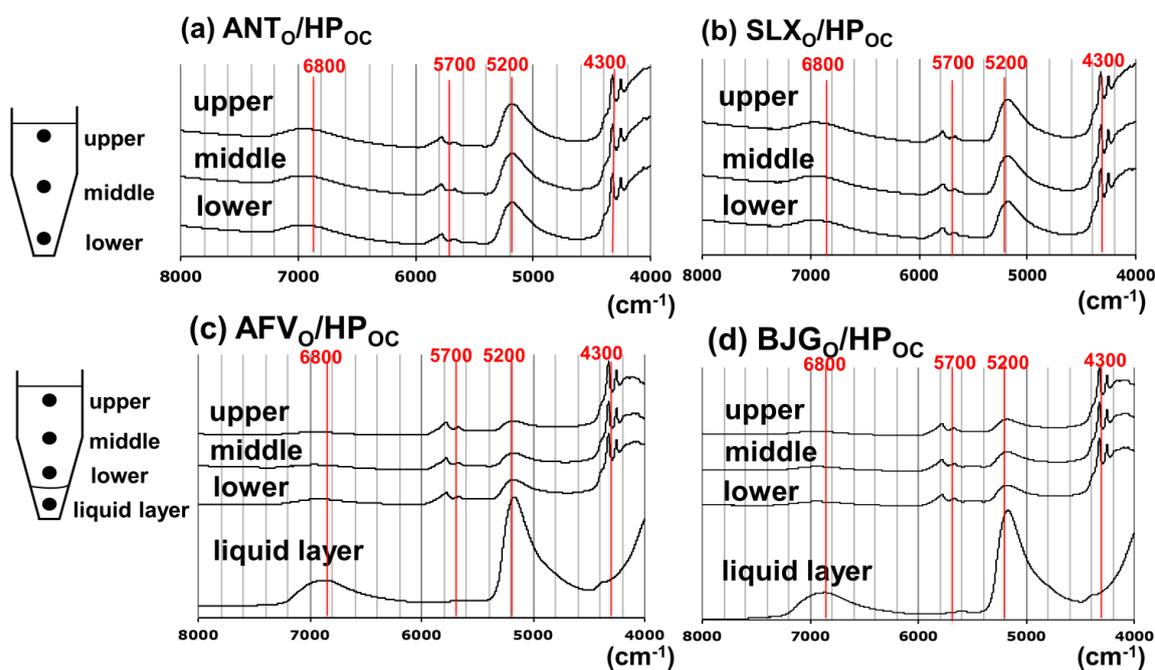


Fig. 17 37°Cで72時間保存した各混合製剤の NIR スペクトル

第 3 節 添加剤が混合製剤の物理的安定性に及ぼす影響

37°Cの経時保存下において、ANFo/HPoc および BJGo/HPoc で生じた分離の機構を明確にするため、WP に 4%の POE40 および 1~10%の PG を含有したモデル軟膏を調製した。各モデル軟膏の顕微鏡観察結果を Fig. 18 に示す。モデル軟膏では、液滴が観察され、AFVo および BJGo と類似した液滴分散型軟膏が調製できたことが示唆された。

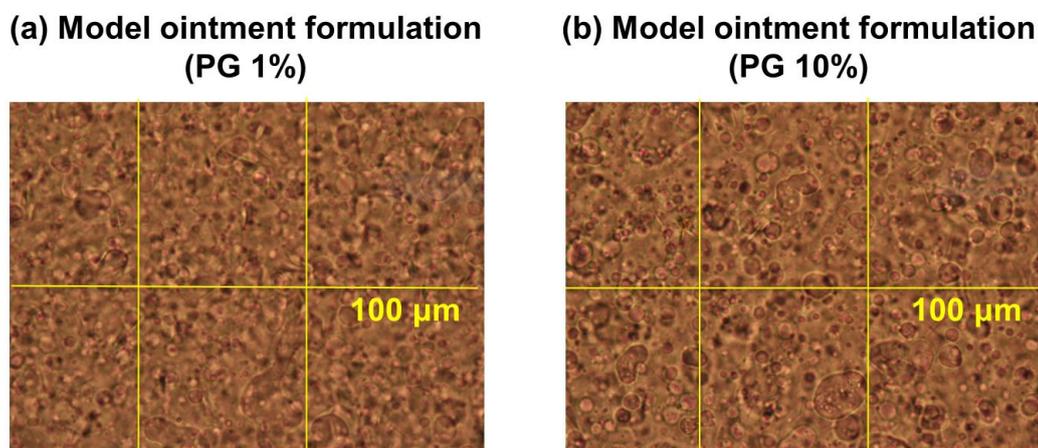


Fig. 18 モデル軟膏の偏光顕微鏡観察結果 (a) PG 1%, (b) PG 10%

37°Cで 72 h 保存したモデル軟膏/HPoc の外観観察および NIR 分光法の測定結果を Fig. 19 に示す。PG を含有したモデル軟膏では、HPoc と混合後 3 h で AFVo/HPoc や BJGo/HPoc と同様の分離が認められた。この分離は、PG 量に依存して増加するとから、PG の含有が混合製剤の分離に影響することが示唆された。

NIR 分光法の結果から、PG を含まないモデル軟膏/HPoc では、上層から下層までス

ペクトルに変化がなく、混合製剤が安定に存在することが示された。一方、PG を 5% または 10%含有するモデル軟膏/HPoc では、分離により生じた半固形部では炭化水素の結合音および第一倍音を示す 4300 cm^{-1} および 5800 cm^{-1} の吸収ピークが認められた。一方、下層の液体部では 5200 cm^{-1} および 6800 cm^{-1} の水酸基の結合音および第一倍音を示す吸収ピークのみが認められ、液体部が水溶性成分であることが示唆された。これらの結果は、AFVo/HPoc および BJGo/HPoc で生じた分離の結果と一致し、軟膏中の PG の存在が混合製剤の分離に影響することが示唆された。Kitagawa らは、様々なステロイド軟膏とヘパリン類似物質含有クリーム (O/W 型) を混合したとき、グリセリンモノステアレート (HLB<5) を界面活性剤として使用すると安定性が高いことに対して、POE 鎖を有するノニオン性界面活性剤 (HLB>10) では安定性が低下することを報告している³³⁾。HCO-40 は、HLB 値の高い O/W 型乳化剤であり、BBPo 中では液滴中に存在すると考えられる。W/O 型である HPoc と混合し、製剤中の水溶性成分が増えたことにより、W/O 型の乳化状態が維持できず、分離が生じる機構が考えられた。

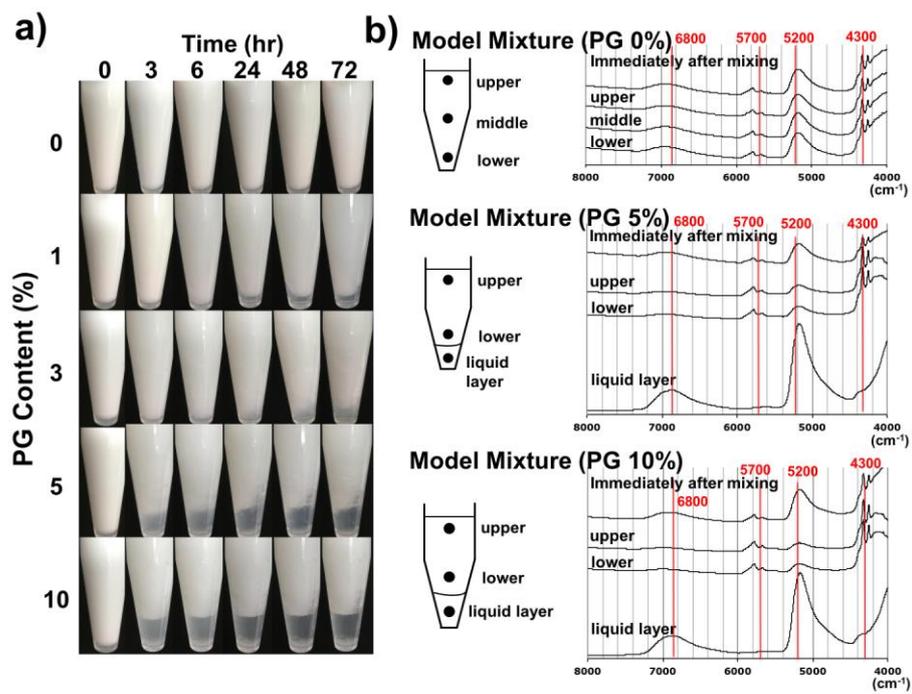


Fig. 19 a) 37°Cで保存したモデル軟膏/HPocの外観および b) NIR スペクトル

第 4 節 混合製剤の分離過程のモニタリング

Stability tester は透過および後方散乱を含む多重散乱の原理に基づいた装置であり、様々な乳化製剤の安定性評価に用いられている³⁴⁻³⁶⁾。Fig. 20 に BBPo/HPoc を 40°C 条件下で 48 h 連続的にモニタリングした結果を示す。ANTo/HPoc および SLXo/HPoc の後方散乱プロファイルは、48 h の間でほとんど変化しなかったが、時間に依存した散乱光の減少および増加がサンプル上部で認められた (Fig. 20 a, b)。これは、少量の油性成分が表面に分離してきたことが影響していると考えられる。AFVo/HPoc および BJGo/HPoc では、時間依存的に散乱光のベースラインの減少が観察された (Fig. 20 c, d)。この現象は約 12 h で完結した。水と油が乳化されている状態では、界面が大きく、レーザー光 (870 nm) は散乱されるが、相分離により油水界面が減少すると、散乱光の強度も減少する。ベースラインの減少はこの現象を捉えており、乳化物が不安定化していることを示唆された。また AFVo/HPoc および BJGo/HPoc では、下層における透過光の強度が、時間依存的に増加することがわかった (Fig. 20 e, f)。これは、水性成分が下層に沈降したことで、レーザー光の透過が明確になったためと考えられる。Stability tester による混合製剤の分離過程のモニタリングにより、AFVo/HPoc および BJGo/HPoc の分離は、40°Cにおいて約 12 h 以内に完結すると推察された。

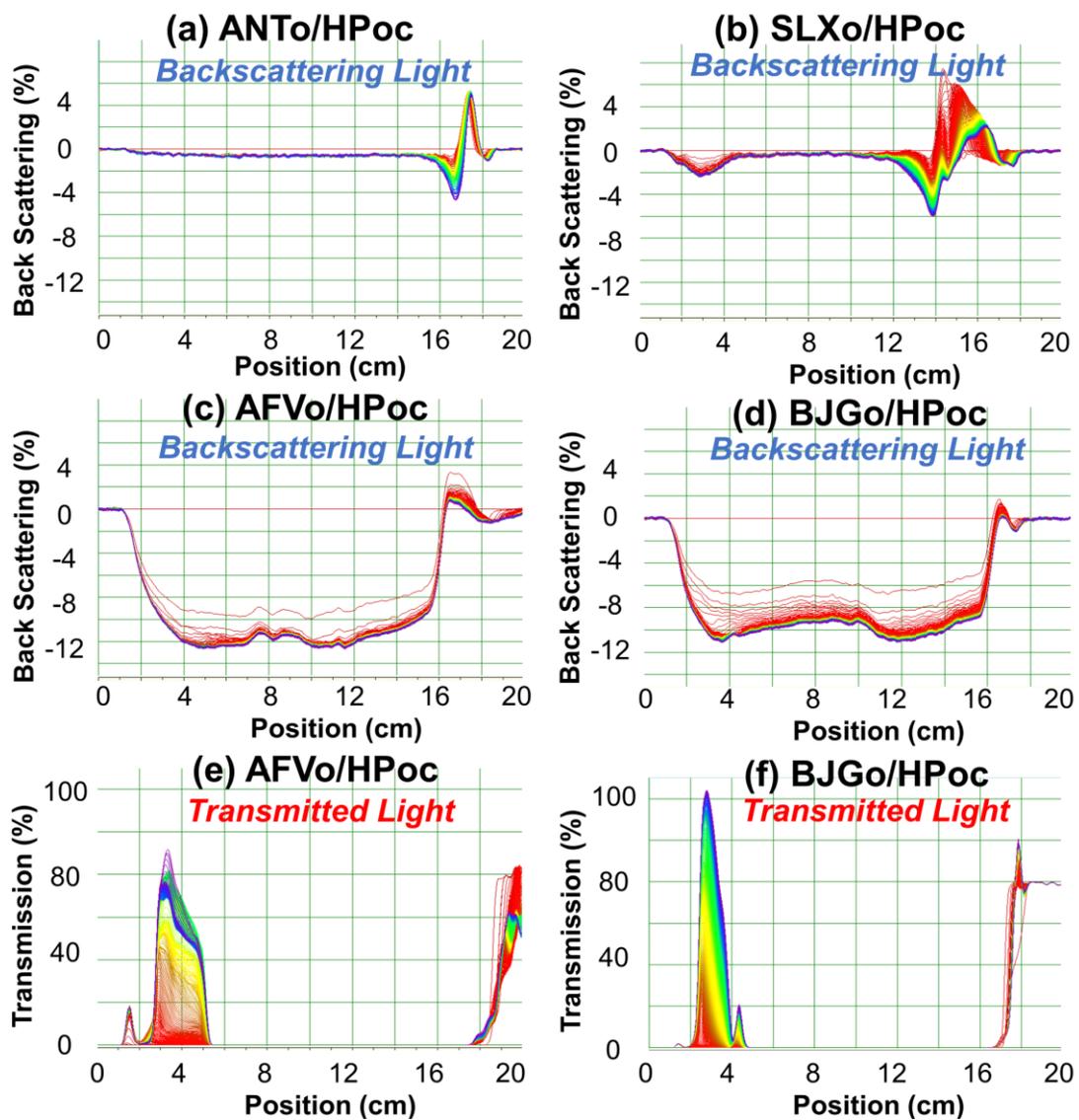


Fig. 20 Stability tester による BBPo/HPoc の分離過程モニタリング (40°C)

第5節 小括

ケミカルイメージングによる内部構造評価から、BBPo では後発品である AFVo および BJGo は、PG を溶剤とした液滴分散型軟膏であることが明らかとなった。これらの製剤は、W/O 型の乳化物である HPoc との混合により、混合製剤が不安定化した。主薬は液滴中に溶解していると考えられることから、混合製剤の分離は製剤の含量均一性を損なうことが懸念された。これらの結果から、HPoc との混合製剤を調製する際には、PG を含有しない ATVo または SLXo の選択が適していると考えられた。また、同様の分離が PG を含有している他の製剤でも生じる可能性があり、PG 配合製剤と HPoc の混合に留意する必要性が示唆された。

総括

本研究では、半固形製剤の内部構造を詳細かつ正確に評価する手法の構築を試み、この評価手法を活用して、様々な半固形製剤の内部構造を明らかとした。

第一章では、共焦点ラマン分光法により、軟膏の内部構造を正確に可視化できるイメージング手法を確立し、半固形製剤の先発品と後発品間で内部構造に加えて、製剤学的特性も大きく異なることを実証した。

第二章では、イメージングにより BBP_o の後発品 2 種類が液滴分散型軟膏であることを明らかとし、溶剤である PG の存在が保湿剤 (HPoc) との混合時に製剤の不安定化を引き起こす要因であることを見出した。

これらの成果は、皮膚外用剤の品質評価および製剤設計における新しい手法として活用できることに加え、医療現場における製剤の選択時に有益な情報を提供すると期待できる。

実験の部

材料

アルクロメタゾンプロピオン酸エステル軟膏は、Almeta® 0.1%軟膏 (Lot. 5930) を塩野義製薬から購入した。TCR 軟膏は先発品として、プロトピック軟膏 0.1% (アステラス製薬, Lot. 038760, Protopic®) を購入して用いた。後発品として、タクロリムス軟膏 0.1% 「イワキ」 (岩城製薬, 変更前: Lot. 47046, Iwaki-Before, 変更後: Lot. 51040, Iwaki-After), タクロリムス軟膏 0.1% 「NP」 (ニプロファーマ, 変更前: Lot. 13R01, NP-Before, 変更後: Lot. 14R05, NP-After), タクロリムス軟膏 0.1% 「PP」 (ポーラファルマ, Lot. L3003, PP), タクロリムス軟膏 0.1% 「タカタ」 (高田製薬, Lot. 13X02, Takata) をそれぞれ購入して使用した。ヘパリン類似物質含有油性クリーム 0.3% 「日医工」 (HPoc, Lot. FP08) は、日医工製薬から購入した。BBPo は、先発品としてアンテベート® 0.05%軟膏 (ANTo, Lot. AKI14N) を鳥居薬品から購入した。後発品は、サレックス® 0.05%軟膏 (SLXo, Lot. 67,073, 岩城製薬), アンフラベート® 0.05%軟膏 (AFVo, Lot. 2020 02, 日医工製薬), およびベタメタゾン酪酸エステルプロピオン酸エステル軟膏 0.05% 「JG」 (BJGo, Lot. 603,280, 日本ジェネリック) をそれぞれ購入して使用した。

試薬は、白色ワセリン (WP, 丸石製薬), プロピレングリコール (PG, 東京化成工業), ベンジルアルコール (BA, 富士フィルム和光純薬工業), 炭酸プロピレン (PC, 東京

化成工業)，トリアセチン (TA, 東京化成工業)，サラシミツロウ (WBW, 三木化学工業)，ミツロウ (BW, ナカライクテスク)，流動パラフィン (LP, 富士フィルム和光純薬) およびポリオキシエチレン硬化ひまし油 40 (POE40, 花王) をそれぞれ購入して使用した。

標準スペクトルの測定

各添加剤の標準 IR スペクトルを ATR ユニット (Dura-samplIR II, Smiths Detection Group Ltd.) を装着した赤外分光計 (FT-IR-4100, 日本分光) を用いて測定した。測定条件は、分解能 4 cm^{-1} 、積算回数 16 回、測定範囲 $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ とした。

各成分の標準ラマンスペクトルは、顕微ラマン分光装置 (Work Station TM, Kaiser Optical Systems Inc.) により測定した。測定条件は、反射モード、照射レーザー波長 785 nm 、倍率 $\times 100$ とした。TCR, BW, WBW, LP および WP は、露光時間 10 s 、積算回数 10 回で測定した。PG, BA, PC および TA は、露光時間 3 s 、積算回数 10 回で測定した。得られたスペクトルは、スムージング処理およびベースライン校正を行った。

各種イメージング手法による微視的観察

顕微 ATR-IR 分光法によるイメージングは、IR 顕微鏡と ATR 法を組み合わせた顕微 ATR 装置 (Spotlight 400, PerkinElmer Co. Ltd) を用いて、各軟膏の IR スペクトル

を測定した。測定条件は、分解能 8 cm^{-1} 、測定時間 約 30 分、測定範囲 $720\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 、ピクセルサイズ $1.56\times 1.56\text{ }\mu\text{m}$ 、面積 約 $200\times 200\text{ }\mu\text{m}$ とした。データの解析には、Isys chemical imaging software (version 5.0; Malvern Instruments Ltd.) を用いた。

共焦点ラマン分光法によるイメージングは、alpha 300R (WITec) を用いて測定した。測定条件は、スキャンスピード 13.372 s/line 、露光時間 0.13372 s 、レーザー波長 532.018 nm 、レーザーパワー 19.940 mW 、グレーティング G2: 600 g/mm および倍率 $\times 500$ とした。得られたスペクトルを主成分分析により分離し、各成分のスペクトルを得た。X-Y 走査によるイメージングはカバーガラス表面から $1\sim 2\text{ }\mu\text{m}$ 下部を測定した。Depth analysis によるイメージングは $20\text{ }\mu\text{m}$ 深部まで行った。

軟膏の微視的な性状は、偏光顕微鏡 (E-600-Pol, Nikon) を用いて測定した。試料をスライドガラスに少量採取し、カバーガラスで薄く広げた後、200 倍または 500 倍の倍率において透過光モードで観察した。

各手法で認められた液滴のサイズは、Mac-View v.4.0. (Mountech Co. Ltd) を用いて解析し、累積分布の 50%値 (D50) および 90%値 (D90) を算出した。

軟膏の伸び性および粘度測定

軟膏の伸び性はスプレッドメーター (離合社製) を用いて測定した。軟膏 0.5 cm^3 について、5-200 秒後の試料直径を目視により測定し、時間の対数値との関係をプロット

した。得られた近似曲線から傾きを算出して延び性を評価した。

軟膏の粘度は viscometer (TV-30; Toki Sangyo Co., Ltd.) を用いて測定した。基盤の温度は 25, 32 および 37°C とし, 1.5 rpm で 5 min 間測定した平均値を算出した。得られたデータは, Tukey 法により検定した。

GC/MS による軟膏中の溶剤含量測定

約 100 mg の軟膏を 3 mL のヘキサンに分散させ, アセトニトリルを 5 mL 添加後 10 min 振とうした。振とう後, 下層の溶媒を 1 mL 採取し, アセトニトリルで 20 mL にメスアップした。得られた溶液を, JMS-AM II15 mass spectrometer (JEOL Ltd.) を装着した 15HP 6890 ガスクロマトグラフィー (Agilent Technologies, Inc.) で定量した。

GC/MS の条件を下記に示す。

PC および TA の測定における GC の条件は, カラム HP-INNOWAX polar capillary column (30 m×0.32 mm i.d. ×0.25 μm film thickness, crosslinked polyethylene glycol); カラム温度 70°C (2 min) → (15°C/min) → 150°C (0 min) → (3°C/min) → 200°C (0 min) → (8°C/min) → 280°C (0 min) → (30°C/min) → 300°C (5 min); 注入部温度 250°C; 注入量 2.0 μL (splitless) および流速 1.2 mL/min (He, constant flow) で測定した。MS の設定は electric ionization (70 eV, 300 μA); 表面温度 280°C; イオン源温度 200°C; および分析モード SIM m/z 85 とした。

PG の測定における GC の条件は、カラム HP-INNOWAX polar capillary column (30m×0.32mm inner diameter×0.25 μm film thickness, crosslinked PG); カラム温度 60°C (2 min)→(15°C/min)→240°C (6 min); 注入部温度 220°C; 流速 1.0 mL/min (He, constant flow)とした。MS の条件は electric ionization (70 eV, 300 μA); 表面温度 240°C; イオン源温度 200°Cとした。

混合製剤の調製

当重量の BBPo と HPoc を軟膏壺に量りとり、自転公転ミキサー (NRJ-250, シンキ一) 2000 rpm で 30 s 混合した。得られた混合製剤に 1.0 w/v% の MB 水溶液およびスダンⅢの LP 溶液 50 μL を添加し、染色した。混合製剤を遠心分離処理 (16,500×g for 7 min at 25 °C) または 37°Cで保存し、それぞれの外観を観察した。

モデル軟膏の調製

モデル軟膏は、WP, POE40 (4%) および PG (0, 1, 3, 5, or 10%) を軟膏壺に全量 20 gで量りとり、温浴 75 °C で加温した。各成分の溶解を確認後、室温にてスターラーで再度軟膏が固化するまで攪拌した。得られたモデル軟膏と HPoc は、上記の手法で混合し、混合製剤を調製した。

NIR スペクトルの測定

HPoc と BBPo の混合製剤を少量サンプリングし，透過法にて NIR スペクトルを Omni Cell system (Specac) を装着した Spectrum One NTS spectrometer, PerkinElmer) を用いて測定した (optical path length: 0.2 mm) . 波数分解能 4 cm^{-1} , 積算回数 32 回, 測定範囲 $4000\text{-}8000\text{ cm}^{-1}$ とした.

Stability tester の測定

混合製剤 (8.0 g) をサンプルチューブに充填し, Stability Tester (ST-1, EKO Instruments) にセットした. 測定温度は 40°C , レーザー波長 870 nm とし, 透過光の強度を 10 min 間隔で 48 h 測定した.

掲載論文

Yamamoto Y., Hanai A., Onuki Y., Fujii M., Onishi Y., Fukami T., Metori K., Suzuki N., Suzuki T., Koide T., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **124**, 199-207 (2018).

Yamamoto Y., Fujii Y. M., Fukami T., Koide T., *J. Drug Deliv. Sci. Tech.*, **51**, 639-642 (2019).

Fujii Y. M., Yamamoto Y., Koide T., Hamaguchi M., Onuki Y., Suzuki N., Suzuki T., Fukami T., *Appl. Spectrosc.*, **73**, 1183-1192 (2019).

引用文献

- 1) Veronin A. M., Youan B. B., *Science*, **305**, 481 (2004).
- 2) Westenberger J. B., Ellison D. C., Fussner S. A., Jenney S., Kolinski E. R., Lipe G. T., Lyon C. R., Moore W. T., Revelle K. L., Smith P. A., Spencer A. J., Story D. K., Toler Y. D., Wokovich M. A., Buhse F. L., *Int. J. Pharm.*, **306**, 56-70 (2005).
- 3) Abhay G., Garnet P. E., Ronald M. W., Kenneth M. R., *J. Pharm. Sci.*, **93**, 1047–1053 (2004).
- 4) Bellamy J. L., Nordon A., Littlejohn D., *Int. J. Pharm.*, **361**, 87–91 (2008).
- 5) Li W., Woldu A., Kelly R., McCool J., Bruce R., Rasmussen H., Cunningham J., Winstead D., *Int. J. Pharm.*, **350**, 369–373 (2008).
- 6) Ma H., Anderson A. C., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 3305–3320 (2008).
- 7) Shi Z., Cogdill P. R., Short M. S., Anderson A. C., *J. Pharm. Biol. Anal.*, **47**, 738–745 (2008).
- 8) Yamamoto Y., Fukami T., Koide T., Suzuki T., Hiyama Y., Tomono K., *Int. J. Pharm.*, **426**, 54-60 (2012).
- 9) Yamamoto Y., Fukami T., Koide T., Onuki Y., Suzuki T., Metori K., Katori N., Hiyama Y., Tomono K., *Int. J. Pharm.*, **463**, 62-67 (2014).
- 10) Yamamoto Y., Iki S., Hirai Y., Yamamoto E., Ogura M., Fukami T., Suzuki T.,

- Tomono K., *J. Pharm. Sci.*, **4**, 54-61 (2012).
- 11) Barbes L., Rădulescu C., Stihl C., *Romanian Rep. Phys.*, **66**, 765-777 (2014).
- 12) Belu A., Mahoney C., Wormuth K., *J. Control. Release*, **126**, 111-121 (2008).
- 13) Agarwal P. U, Sabo R., Reiner S. R., Clemons M. C., Rudie W. A., *Appl. Spectrosc.*, **66**, 750-756 (2012).
- 14) Markwort L., Kip B., da Silva E., Roussel B., *Appl. Spectrosc.*, **49**, 1411-1430 (1995).
- 15) Rayleigh L., *Philos. Mag.* **14**, 184-186 (1882).
- 16) 共焦点ラマン顕微鏡ワークショップ, WITec, (2017).
- 17) Yamamoto Y., Fukami T., Onuki Y., Metori K., Suzuki T., Koide T., *Vib. Spectrosc.*, **93**, 17-22 (2017).
- 18) Jasser M. AMebuke N., de Gannes G., *Skin Therapy Lett.* **16**, 5-7 (2011).
- 19) Warshaw E. M., Botto N. C., Maibach H. J., Fowler J. F., Rieyschel R. I., Zug K. A., Belsito D. V., Taylor J. S., Deleo V. A., Pratt M. D., Sasseville D., Marks J. G., Mathias C. G., *Dermatitis*, **20**, 14-20 (2009).
- 20) 厚生労働省薬食審査発 1101 第 1 号 平成 22 年 11 月 1 日, 局所皮膚適用製剤 (半固形製剤及び貼付剤) の処方変更のための生物学的同等性試験ガイドラインについて (令和元年 10 月 7 日参照) <https://www.japal.org/wp->

content/uploads/mt/20101101_1101-1.pdf

- 21) Ricci C., Eliasson C., Macleod A. N., Newton N. P., Matousek P., Kazarian G. S.,
Anal. Bioanal. Chem., **389**, 1525-1532 (2007).
- 22) Brondi M. A., Terra A. L., Sabin P. G., Garcia S. J., Poppib J. R., and Trevisan G.
M., *J. Near Infrared Spectrosc.* **22**, 211–220 (2014).
- 23) Fitzgerald J. A., Cole E. B., Taday F. P., *J. Pharm. Sci.*, **94**, 177-183 (2005).
- 24) Larkin P., *Elsevier Inc., Waltham*, 73-115 (2011).
- 25) Dong L., Liu C., Cun D., Fang L., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **78**, 140-150 (2015).
- 26) Valenta C., Schultz K., *J. Control. Release*, **95**, 257-265 (2004).
- 27) Jin G. S., Yousaf M. A., Son W. M., Jang W. S., Kim W. D., Kim O. J., Yong S. C.,
Kim J. H., Choi G. H., *Arch. Pharmacol. Res.*, **38**, 216-222 (2015).
- 28) Adachi A., Imagi J., Mathuno R., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 495-498 (1992).
- 29) Miyagawa Y., Katsuki K., Matsuno R., Adachi S., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,
79, 1695-1697 (2015).
- 30) Yamamoto, Y., Kumetani, M., Onuki, Y., Koide, T., Suzuki, T., Fukami, T., *Chem.*
Pharm. Bull., **64**, 1047–1055 (2016).
- 31) Takeno, S., Bamba, T., Nakazawa, Y., Fukusaki, E., Okazawa, A., Kobayashi, A.,
J. Biosci. Bioeng. **106**, 537–540 (2008).

- 32) Diaz-Arnold, A.M., Arnold, M.A., Williams, V.D., *J. Dent. Res.*, **71**, 438–442 (1992).
- 33) Kitagawa, A., Yutani, R., Kodani, R., Teraoka, R., *Results Pharma. Sci.*, **6**, 7–14 (2016).
- 34) Bendjaballah, M., Canselier, J.P., Oumeddour, R., *J. Dispers. Sci. Technol.*, **31**, 1260–1272 (2010).
- 35) Lemarchand, C., Couvreur, P., Vauthier, C., Costantini, D., Gref, R., *Int. J. Pharm.* **254**, 77–82 (2003).
- 36) Roland, I., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B., *Int. J. Pharm.* **263**, 85–94 (2003).
- 37) Sugiyama, I., Takahashi, N., Sadzuka, Y., *YAKUGAKU ZASSHI*, **136**, 1391-1400 (2016).

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始熱心なご指導と的確なご助言を賜りました指導教官である明治薬科大学 分子製剤学研究室の深水啓朗 教授に深く感謝いたします。

明治薬科大学 分析化学研究室の小笠原裕樹 教授、ならびに医療製剤学研究室の下川健一 准教授には副査として多大なるご助言をいただくとともに本論文の細部にわたるご指導を賜り、深く感謝の意を表します。

本研究遂行にあたり、直接懇切なる御指導と御助言を賜りました帝京平成大学薬学部 山本佳久 准教授、国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫 博士、明治薬科大学 分子製剤学研究室 井上元基 助教及び大西優 助手、日本大学薬学部 鈴木豊史 教授および鈴木直人 助教、富山大学薬学部 大貫義則 教授に厚く御礼申し上げます。

共焦点ラマン分光法によるケミカルイメージングの技術的サポートをしていただいた、WITec 株式会社の中本圭一 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに際し、御理解と御鞭撻を賜った、株式会社ミロット 企画開発部長 武井雄二 氏および技術顧問 福田敏夫 氏に深く感謝いたします。

本研究の実施にあたり日常の業務を通じてさまざまなご支援を頂きました株式会社ミロット 企画開発部研究課、株式会社資生堂 インキュベーションセンター マテリアル開発グループの皆様にご礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました明治薬科大学 分子製剤学研究室 我藤勝彦 氏，小澤洋介 氏，久田浩史 氏および学生諸氏に感謝いたします。

末筆ながら，研究者としての礎を築いてくださった明治薬科大学 セルフメディケーション学研究室 石井文由 教授に謹んで感謝申し上げます。

最後に，これまで筆者を支えてくれた両親および弟妹に感謝するとともに，本研究に専心できるように温かく見守り，そして終始支えてくれた夫に感謝します。