ウリナスタチン膣坐剤の製剤化およびその品質評価¹

上村慎子^{*2}, 植田敦子², 栗田浩幸², 小和田和宏², 石川雅章²,
渡邊正幸², 藤原厚子², 山本政利², 柏木美智子², 三輪憲永²,
南 智³, 岩崎剛士³, 鍋田いづみ³,
黒見真由³, 浮島美之³, 見崎芳枝³
静岡県環境衛生科学研究所²
静岡県立総合病院薬剤部³

Preparation of Ulinastatin Vaginal Suppositories
and Their Quality Control¹

Mitsuko Kamimura^{*2}, Atsuko Ueta², Hiroyuki Kurita², Kazuhiro Owada²
Masaaki Ishikawa², Masayuki Watanabe², Atsuko Fujiwara²,
Masatoshi Yamamoto², Michiko Kashiwagi², Norinaga Miwa², Sato Minami³,
Tsuyoshi Iwasaki³, Izumi Nabeta³, Mayu Kuromi³,
Yoshiyuki Ukishima³ and Yoshie Misaki³
Shizuoka Institute of Environment and Hygiene²
Shizuoka General Hospital³

[Received March 22, 2006]
[Accepted June 20, 2007]

Hospitals prepare ulinastatin vaginal suppositories for use in the treatment of threatened abortion. As it is important to ensure that suppositories are uniform, we developed an analytical procedure for ulinastatin in the suppository and examined the suitability of the preparation procedure.

We could successfully use the spectroscopical analysis procedure for ulinastatin described in JP XIV when the suppository base was removed from the mixture after the color reaction with trypsin, but not when it was removed before. The reproducibility and accuracy of our analytical procedure were very good. The preparation of the ulinastatin suppository from its injection was found to require careful control of the water loss from the mixture. When this was done, ulinastatin content in the suppository was the same as in the original injection, and the content uniformity was good. Testing for change in ulinastatin content and microbial growth during the storage of suppositories in a refrigerator for 3-months produced satisfactory results.

In conclusion, the method for the preparation of this drug from the injection and that for the analysis of the ulinastatin in the suppository that we developed should be useful to hospitals.

Key words ulinastatin vaginal suppository, suppository preparation method, stability, determination of assay, hospital preparation, quality control

緒 言

院内製剤は、医師の治療上必要との判断により作られるが、これらの中には有効成分の含量や安定性などの品質についての検証が十分でないものもある^{1,2)}。この製剤は、薬事法上の医薬品の製造管理および品質管理に関す

る基準(GMP)³⁾の対象とはならないが、その品質の確保は重要である^{1,2)}。

ところで、ウリナスタチンは水溶性タンパクで、種々のタンパク分解酵素に阻害作用を持つ膵炎治療薬であるが⁴⁾、経膣的に用いることにより切迫早産の治療に効果があるため⁵⁾、多くの病院で院内製剤ウリナスタチン膣坐剤が作られ、利用されている⁶⁾。その製剤方法の多く

¹ 本論文の内容の一部は第15回医療薬学会年会(岡山, 2005年10月)にて発表した。

^{*} 静岡市葵区北安東4丁目27-2; 4-27-2, Kita-Ando, Aoi-ku, Shizuoka-shi, 420-8637 Japan

は、ウリナスタチン注射用凍結乾燥製剤(以下、凍結乾燥製剤と略す)を原料として乳鉢で微粉化した後、加温した坐剤基剤を加えて混和するものであるが⁶⁾、この凍結乾燥製剤は吸湿して凝塊を起こしやすく、油脂性基剤中での均一な分散は困難である。一方、ウリナスタチン水性注射液(以下、水性注射液と略す)を原料とする場合としては、坐剤の1個ずつに注射液を封入する中空坐剤⁷⁾や封入型坐剤⁸⁾がこれまでに報告されている。この中空坐剤は、あらかじめ基剤のみで成型された中心部位に規定量の注射液を充填できる中空部分を有するものであるが、中空坐剤の調製には専用の成型器具が必要となる。また、封入型坐剤は、基剤をコンテナに入れ、固化し始めた時に基剤と混じり合わないよう内部に注射液を注入し、さらに基剤を追加後、固化させたものであるが、封入できる注射液の量が限られるなどの課題も多い。

そこで、著者らは水性注射液を原料とし、これと基剤とを混和、成型させる簡便な製剤方法を検討した。また、腔坐剤中ウリナスタチンの定量における基剤除去の前処理方法について検討したので、これらの結果を併せて報告する。

方 法

1. 試料および試薬

水性注射液および凍結乾燥製剤は持田製薬(株)製のミラクリッド®注射液(5万単位/mL)およびミラクリッド®(5万単位)を用いた。坐剤基剤のウイテブゾールSタイプは丸石製薬(株)製のホスコ®S 55を用いた。トリプシンは和光純薬工業(株)製のウシ膵臓製、生化学用を用いた。その他の試薬は特級品または99%以上のものを用いた。

2. 坐剤の調製

当病院の処方(Table 1)に従い、水性注射液3 mL(15万単位)および基剤60 gを用い、1個当たり5千単位のウリナスタチンを含む腔坐剤30個を調製した(Scheme 1)。

すなわち、基剤60 gを200 mL ビーカーに入れ、アルミホイルで蓋をし、50 ℃の水浴中で加温・融解した。これに攪拌しながら水性注射液3 mLを加えた。この時液は白濁した。次に、アルミホイルの蓋をはずし、50 ℃の水浴中で加温しながら約30分間攪拌し、液が透明に

Suppository base 60 g

Melt the base at 50℃
Add an injection of ulinastatin 3 mL
Stir the mixture while evaporating water
Cool down to 38-40℃
Put each of 2.0 g into container

30 pieces of ulinastatin vaginal suppository

Scheme 1. Preparation Procedure of Ulinastatin Vaginal Suppository.

なるまで、添加した水性注射液の水分を蒸発させた。次に、攪拌しながら水浴の温度を徐々に下げ、約30分間で38~40 ℃になるまで冷却した。この液の2.0 g相当量をエッペンドルフ(株)製のマイクロピペットを用いて速やかに坐剤コンテナに分注し、室温で放冷して固化した。これをヒートシールしたものを坐剤製剤とし、冷所に保存した。加温および冷却の際には、蒸発した水分量を把握するため、メトラー・トレド(株)製の電子上皿天秤PR 503(最小表示量0.001 g)を使用し、ピーカーごと基剤液の重量を測定した。

なお、坐剤コンテナは丸石製薬(株)製の2.25 cc用プラスチックタイプをあらかじめ常法によりプラズマ滅菌して使用し、また、ガラスピーカーおよびマイクロピペットチップはあらかじめ常法により高圧蒸気滅菌したものを使用した。

3. 定量

1)標準溶液の調製

水性注射液にpH 7.8のトリエタノールアミン緩衝液(以下、TEA緩衝液と略す)を加えて希釈し、0~200単位/mLの標準溶液を調製した。

2)基剤懸濁液の調製

基剤2 gにTEA緩衝液30 mLを加え、50 ℃の水浴中で15分間加温した後、水浴から取り出し、1,500 rpmで15分間振とうした。なお、振とう操作には東京理器(株)製の高速振とう機キュートミキサーCM 1000型を使用した。また、振とうの際の液温低下による分散性の低下防止のため、振とう後、再度50 ℃の水浴中で15分間加温して均一化し、基剤懸濁液を調製した。

3)試料溶液の調製

坐剤1個にTEA緩衝液30 mLを加え、50 ℃の水浴中で15分間加温した後、水浴から取り出し、基剤懸濁液の調製と同様の方法で15分間振とうした。再度50 ℃の水浴中で15分間加温して均一化し、試料溶液を調製した。

4)検量線の作成

試験管に標準溶液0.2 mLを採り、基剤懸濁液0.2 mLおよびTEA緩衝液3.0 mLを加えて軽く振り混ぜ、以

Table 1. Prescription of Ulinastatin Vaginal Suppositories.

ulinastatin	150,000 units
base	60 g
suppository	30 pieces (5,000 units, 2 g/piece)

下, 操作方法に従い, 0~200 単位/mL の範囲で検量線を作成した。

5) 操作方法

操作は, 日本薬局方(以下, 日局と略す)ウリナスタチン定量⁴⁾に準じ, 基剤除去のため反応停止後に氷冷・ろ過操作を加えた。また, 試料溶液, 試液等の採取容量をすべて2倍とした(Scheme 2)。

すなわち, 試験管に試料溶液 0.2 mL を採り, TEA 緩衝液 3.2 mL を加えて軽く振り混ぜて 25 ± 1 の恒温水槽中に入れ, これらに, あらかじめ氷冷したトリプシン試液 0.4 mL を加えて1分後, 基質溶液である *N*- γ -ベンゾイル-L-アルギニン-4-ニトロアニリド(以下, BAPA と略す)試液を 2 mL 加えた。さらに, 2分後, 酢酸(100) 0.2 mL を加え, 反応を停止させた。この液を氷冷後, 水系メンブランフィルター(孔径 0.22 μ m)でろ過し, 得られたろ液について, 水を対照として 405 nm における吸光度を測定し, 検量線から試料溶液のウリナスタチン濃度を求めた。なお, 吸光度の測定には, 日立製作所(株)製の分光光度計 U 3210(光路長 10 mm)を使用した。

4. 微生物試験

日局微生物限度試験法の生菌数試験法のうちカンテン平板混釈法⁹⁾に準じ, 細菌試験および真菌試験を行った。すなわち 0.7% ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート添加生理食塩水を用いて試料を溶解, 希釈し, これらの試験の試料溶液とした。

Scheme 2. Analytical Method for Ulinastatin in the Suppository.

*1 TEA buffer: Triethanolamine buffer (pH 7.8)

*2 BAPA: *N*- γ -benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide

細菌試験の培地には, 0.1% レシチン・0.7% ポリソルベート 80 添加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・カンテン培地を用いた。また, 真菌試験の培地には, 0.1% レシチン・0.7% ポリソルベート 80 添加ブドウ糖・ペプトン・カンテン培地を用いた。

なお, 細菌数および真菌数の検出下限を 100 個/g とした。

結果および考察

1. 定量方法の検討

1) 前処理法の検討

日局におけるウリナスタチン定量法⁴⁾は, ウリナスタチンが BAPA のトリプシン分解による呈色反応を阻害することを利用し, 吸光度測定により阻害強度を求める方法である。しかし, この方法は注射剤を対象としており, 坐剤へ適用したところ試料溶液中の坐剤基剤の影響を受け吸光度測定が困難であった。

そこで, 日局ウリナスタチン定量法を本坐剤に適用できるように, 吸光度測定時に妨害となる坐剤基剤の除去について検討した。まず, 試料溶液を氷冷, ろ過し, 呈色反応前に基剤を除去したところ, ろ液にはトリプシン分解反応に対する阻害作用が定量的に認められなかった。これは, ウリナスタチンが基剤に包含, またはフィルター等に吸着し, 除去された可能性が考えられた。

次に, 基剤が懸濁した状態の試料溶液を呈色反応させ, この反応液を冷却し, 基剤をろ過除去したところ, ろ液の吸光度はウリナスタチン量に依存し, トリプシン分解反応阻害⁴⁾が定量的であることを確認できた。また, 基剤添加物に由来する乳化現象の影響を受けることなく操作が可能であった。すなわち, 本定量に影響を及ぼす反応液中の基剤を, 冷却およびろ過の操作で除去できた。

以上のことから, 基剤除去の前処理は, 基剤を含んだままの試料溶液に試液を加えて呈色反応を行った後, 実施することとした。

2) 検量線の直線性

検量線は Fig. 1 に示したとおり 0~200 単位/mL の範囲で相関係数 - 0.9998 と良好な直線性を示した。また, 各濃度 6 回ずつの繰り返し試験において, 標準溶液から得られたろ液の吸光度の分散は 0.000013, 標準偏差は 0.0036 と精度も良好であった($n = 6$)。

なお, Fig. 1 に示したとおり, 標準溶液に基剤懸濁液を添加した場合と添加しない場合の検量線は, それぞれ良好な直線性を示したが, 異なる検量線が得られた。これは, 基剤の共存による影響を受けるためと考えられ, 本定量においては, これらの影響を避けるため, 基剤懸濁液を添加した標準溶液の検量線を使用することとした。

Fig.1. Calibration Curve for Determination of Ulinastatin in the Suppository.

: with the suppository base

: without the suppository base

3) 添加回収試験

試料溶液を調製する試験管に基剤 2 g を入れて融解し、水性注射液 0.1 mL (5 千単位) を加え、製剤方法の加温工程に従って 50 ℃ の水浴中で約 30 分間加温・混合した後、室温で放冷、固化し、個々に 5 千単位のウリナスタチンを含む添加試料を作製した。

この添加試料 3 ロットについてウリナスタチンの添加回収試験を行ったところ、その平均回収率は 95.1 ± 1.9 % であった (Table 2)。この結果は、院内製剤の現場で坐剤の含量およびばらつきの評価のためには十分に応用できるものと考えられるが、さらに回収率の向上が課題と考えている。

2. 坐剤の調製方法の検討

1) 原料の選択

基剤には、粘膜への薬物の分散性が高いため腔坐剤に使用でき、乳化性のある半合成油脂性基剤のウイテプゾール S タイプ^{10, 11)} を選定した。

主薬が水溶性薬物である坐剤を融解法により製剤する場合には、融解した基剤中に微細化した主薬を均一に分散する必要があるが、その主薬原料について検討した。

まず、凍結乾燥製剤を主薬原料とし、バイアル瓶から取り出した製剤を篩過後、乳鉢で微細化し、融解した基剤を加えて混和後分注したところ、バイアル瓶および乳鉢への残留が認められた。そこで、内容物を取り出した

後のバイアル瓶および乳鉢を TEA 緩衝液でそれぞれ洗浄し、これら洗液中のウリナスタチン量を定量法に従って測定した。その結果、これらの残留量は、バイアル瓶に 8%、また、乳鉢に 6% であった。さらには篩過時の凝塊の発生等も認められ、操作性が極めて悪いものであった。そのため、吸湿性を有する凍結乾燥製剤は本剤の原料として不適当であった。

次に、主薬原料として市販の水性注射液について検討した。水溶液は油脂性基剤に混合した場合、均一化できず、成型が困難となるため、一般には坐剤原料に用いない。しかし、水性注射液を主薬原料に用いることで、主薬をアンプルから定量的に容易に採取でき、しかも、主薬の微細化や篩過の工程が不要となる利点がある。さらに、水性注射液を融解した基剤の入った容器に直接添加し、マグネチックスターラーにより攪拌・混合が可能となるため、主薬原料として水性注射液を選定することにした。

2) 水分の除去

水性注射液と油脂性の基剤は攪拌しても均一化できず、また、固化する際に分離して、坐剤の成型が困難となる。

そこで、成型上の問題を改善するため、過剰な水分を除去する方法について検討した。

なお、加温する温度は、基剤製造業者が指定する基剤融解時の温度¹²⁾で、凍結乾燥製剤を原料とし乳鉢を用いて混和する方法⁶⁾でも採用される 50 ℃ とした。また、この条件下での含量低下は認められなかった。

通常、病院内において坐剤基剤の融解や混合を行う際に異物混入や微生物汚染を防ぐためアルミホイル等でピーカー上部を覆うが、ここでは水分除去のため、基剤に水性注射液を加えた後、開放のまま攪拌・混合、さらに冷却の操作を行うこととした。この場合、水性注射液を添加した時点では、過剰な水分のため基剤液の白濁が観察されたが、50 ℃ の加温下で約 30 分間の攪拌により水分は減少し、透明な液となった。このとき水性注射液を添加してから重量の減少は 1.83 ± 0.07 g で、添加した水分のうち 1.17 ± 0.07 g (基剤重量の 1.94 ± 0.11 %, $n = 3$) が残存していると考えられた。

その後、攪拌しながら水浴を 38 ~ 40 ℃ まで約 30 分間で徐々に冷却した後、コンテナに分注した。分注開始までの重量減少は 2.52 ± 0.09 g で、添加した水分のうち 0.48 ± 0.09 g (基剤重量の 0.80 ± 0.16 %, $n = 3$) が残存していると考えられた。この冷却の際、水浴の温度が 45 ℃ 付近になると基剤液は白濁したが、これは基剤の固化によるものと考えられた。

以上のことから、製剤時に水分量を把握し、また、白濁した基剤液の透明化の度合いを指標に水分の除去操作を行うことにより、水性注射液を原料とした坐剤の良好

Table 2. Recoveries of Ulinastatin from the Suppository by Proposed Method.

Recovery (%)	Average (%)	S.D. (%)
95.2		
93.1	95.07	1.90
96.9		

* Added; 5,000 units/2g of the suppository base

な成型が可能となった。

なお、攪拌・混合および冷却の操作をアルミホイル等でピーカー上部を覆ったまま行くと、成型時のひび割れや崩壊が半数以上に認められた。これは、固化する際に基剤と水性注射液中の過剰な水分が分離するためと考えられる。一方、アルミホイルの蓋をせずに攪拌・混合時間を2倍の約1時間とすると、分注開始までの重量減少は添加した水性注射液の全量に相当した。この場合、過度に水分が除去されるためウリナスタチンの溶解性減少によると考えられる固形物の析出が起こり、含量のばらつきも大きくなった。

3. 品質の評価

1) 含量の均一性

確立した製剤方法に基づいて標準作業書を作成し、これに従って2機関(研究所および総合病院薬剤部)の3名それぞれが坐剤を1ロットずつ試作した。各ロット10個ずつを採り、坐剤中のウリナスタチン含量を測定したところ、それぞれ平均98~107%で、また、相対標準偏差3~7%と均一性は良好であった。また、各坐剤の平均質量は1.9~2.0gで、相対標準偏差1.6~2.4%と均一であり、しかも成型状態も良好であった(Table 3)。

2) 微生物汚染

坐剤を無菌的に院内製剤化することは困難な状況である。しかし、ウリナスタチン膣坐剤の使用目的が切迫早産の治療であり、胎児への影響を最小とするために外用薬としての微生物汚染防止等の製剤時の衛生的管理が必要となる。この微生物による汚染原因として、基剤、器具、落下細菌等が考えられた。

そこで、基剤は汚染を受けないよう使用後密封して冷所保存し、また、落下細菌については、製剤時に作業室の空調機を送風停止とした。なお、水浴上で行う攪拌、冷却、充填の操作時には水浴の上昇気流により落下細菌等の汚染を防止できると考えられた。なお、製剤工程においては特に無菌的な操作は行わず、使用する器具および坐剤コンテナのみあらかじめ滅菌のうえ使用することとした。

以上のことを考慮して、製剤化した坐剤4個について

微生物試験を行ったところ、細菌数、真菌数とも検出下限(100個/g)以下の結果が得られ、これら微生物による汚染は認められなかった。

3) 安定性試験

坐剤製剤を冷蔵庫内(4℃)で3カ月間保存し、ウリナスタチン含量の測定および微生物試験を行い、その品質の経時的な安定性を評価した。

ウリナスタチン含量は、2週間ごとに3個の試料をそれぞれ3回ずつ測定した。その結果、測定の精度および試料の含量均一性によるばらつきはあるものの、3カ月間における坐剤中ウリナスタチンの含量減衰の傾向は認められず、安定した品質であった(Fig 2)。

また、1カ月ごとに4個の試料を採り、微生物試験を行った。その結果、製剤直後から3カ月間、いずれにおいても細菌数、真菌数ともに検出下限(100個/g)以下で、これら微生物の増殖は観察されず、微生物学的にも良好な品質であった。

これらの結果から、院内製剤ウリナスタチン膣坐剤は、冷所において3カ月間の保存が可能と判断された。

今回検討したウリナスタチン膣坐剤の製剤方法は、特別な器具を使用せずに、病院薬局において簡便に製剤できる方法であることが示唆され、本研究の成果は、院内製剤の品質向上および調剤業務の効率化に貢献できるものとする。

Fig 2. Effects of Storage Period on Content Change of Ulinastatin in the Suppository for Hospital Preparation at 4℃ in Refrigerator.

*mean ± S.D. (n = 3)

Table 3. Content Uniformity for Trial Ulinastatin Suppository.

Lot No.	Trial* ¹	Ulinastatin content		Weights	
		Content (%) ^{*2}	RSD (%)	Weight (g) ^{*2}	RSD (%)
1	A-1	98.0	3.2	1.93	2.4
2	B-1	106.7	6.7	2.02	1.6
3	B-2	96.8	6.1	1.98	1.7

*¹ A : Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, B : Shizuoka General Hospital

*² Average of ten determinations

謝辞 本研究にあたり，ご助言いただいた持田製薬(株)および小野薬品工業(株)に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 南武夫，院内製剤の有効性・安全性，品質の確保，月刊薬事，**37**, 2165-2171 (1995).
- 2) 後藤伸之，政田幹夫，院内製剤の役割と問題点，ファルマシア，**40**, 827-831 (2004).
- 3) 平成16年厚生労働省令第179号(平成16年12月24日)。
- 4) “第十四改正日本薬局方解説書”，日本薬局方解説書編集委員会編，廣川書店，東京，2001，pp.C 310-317.
- 5) 金山尚裕，トリプシンインヒビターと早産，産科と婦人科，**62**, 459-463 (1995).
- 6) “病院薬局製剤”，第5版，日本病院薬剤師会編，薬事日報社，2003，p.206.
- 7) 渡辺善照，勝山善彦，太田伸，全田浩，松本光雄，中空坐剤を用いた薬物送達システムの臨床応用，*Drug Delivery System*，**14**, 51-57 (1999).
- 8) 森田純央，山口崇臣，鳴戸充吉，上田善美，小林雅典，谷口喜好，堀内保直，八野芳巳，近藤正躬，木村順治，院内特殊製剤ウリナスタチン膣坐剤の使用経験，*医薬ジャーナル*，**37**, 1383-1390 (2001).
- 9) “第十四改正日本薬局方解説書”，日本薬局方解説書編集委員会編，廣川書店，2001，pp.B 513-550.
- 10) “調剤指針”，第十一改訂，日本薬剤師会編，薬事日報社，2001，pp.162-172.
- 11) 新谷洋三，坐剤の薬剤学的知識と処方集(13) 薬局，**33**, 967-972 (1982).
- 12) 坐剤基剤「ホスコ S 55」添付文書，丸石製薬(株)，(2005年4月改定)，