

2016年度 博士論文

医薬品の結晶析出抑制並びに皮膚移行性の向上を目指した
クリーム剤の製剤設計に関する研究

Formulation design of creams in order to suppress the crystallization of
pharmaceutical products and to improve the accumulation to the skin

高崎健康福祉大学大学院薬学研究科
後藤 則夫

目次

主論文目録	3
略 語	4
緒 言	5
第1章 20%尿素配合クリーム剤からの結晶析出速度と析出物の物性評価	8
第1節 小序	8
第2節 尿素配合モデル製剤からの結晶析出速度と析出状態観察	9
第3節 粉末 X 線回折測定 (PXRD)、示差走査熱量測定 (DSC)、粉末 X 線回折-示差 走査熱量同時測定 (PXRD-DSC) による析出結晶物の物性評価.....	11
第1項 粉末 X 線回折測定 (PXRD) による評価	11
第2項 析出結晶物の示差走査熱量測定(DSC)による評価	13
第3項 粉末 X 線回折-示差走査熱量同時測定(PXRD-DSC)による評価	13
第4節 LEC 製剤での尿素結晶に与える処方成分の影響	17
第5節 赤外吸収スペクトル(IR)測定による析出物の同定	18
第6節 考察	20
第7節 小括	22
第2章 テープストリップングと比色定量法を用いた角層中に貯留した尿素の新規評価法	23
第1節 小序	23
第2節 塗布面積(塗布量)と尿素移行量の測定	24
第3節 尿素含有量(10%、20%)の異なる製剤での尿素移行量	25
第4節 結晶析出速度の異なる尿素製剤から角層への経時的尿素移行量	27
第5節 考察	30
第6節 小括	31
第3章 ラマン分光分析法を用いた 20%尿素配合クリーム剤からの析出物と 析出現象の新規評価法	32
第1節 小序	32
第2節 各製剤成分とモデル製剤のラマン分光分析	33
第1項 各製剤成分のラマン分光分析	33
第2項 モデル製剤のラマン分光分析	34

第3節	AG-WRS法によるモデル製剤からの析出物の経時測定.....	35
第1項	AG-WRS法による経時的なラマン分光分析と偏光顕微鏡観察	35
第2項	NS (1012 cm ⁻¹) , LEC (1023 cm ⁻¹) , L20 (1012 cm ⁻¹) のスペクトル比較	38
第4節	粉末X線回折測定(PXRD)による析出物の同定.....	40
第5節	NS製剤とLEC製剤からの析出物の顕微レーザーラマン測定.....	41
第6節	考察	42
第7節	小括	43
第4章	総括	44
第5章	実験の部	46
	謝辞	55
	引用文献	56

主論文目録

本論文は以下の投稿論文を基礎とするものである。

(1) 第1章

Norio Goto, Yutaka Morita, and Katsuhide Terada:

Deposits from Creams Containing 20% (w/w) Urea and Suppression of Crystallization (Part 1):
Rate of Crystallization from Cream Containing 20% (w/w) Urea and Evaluation of the Properties of
the Deposit. Chem. Pharm. Bull. 64, 1084–1091 (2016)

(2) 第2章

Norio Goto, Yutaka Morita, and Katsuhide Terada:

Deposits from Creams Containing 20% (w/w) Urea and Suppression of Crystallization (Part 2):
Novel Analytical Methods of Urea Accumulated in the Stratum Corneum by Tape stripping and
Colorimetry. Chem.Pharm. Bull. 64, 1092–1098 (2016)

(3) 第3章

Norio Goto, Yutaka Morita, and Katsuhide Terada:

Deposits from Creams Containing 20% (w/w) Urea and Suppression of Crystallization (Part 3):
Novel Analytical Methods Based on Raman Spectroscopy for the Characterization of Deposits and
Deposition Phenomena of Creams Containing 20 % (w/w) Urea. Chem.Pharm. Bull. 64, 1099–1107
(2016)

略 語

PXRD	Powder X-Ray Diffraction 粉末 X 線回折測定
DSC	Differential Scanning Calorimetry 示差走査熱量測定
PXRD-DSC	Differential Scanning Calorimetry-Powder X-Ray Diffraction 粉末 X 線回折-示差走査熱量同時測定
IR	Infrared absorption spectrometry 赤外吸収分光法
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy フーリエ変換赤外分光分析
NS	Nonionic Surfactant 非イオン界面活性剤
LEC	Lecithin レシチン
L20	20%-Liquid 20%水溶液
CSA	Cetostearyl alcohol セトステアリルアルコール
HCO 50	Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil 50 ポリオキシエチレン硬化ひまし油
POE	Poly oxyethylene ポリオキシエチレン
T-C method	Tape stripping-Colorimetry method テープストリッピング・比色定量法
RI	Radioisotopes 放射性同位元素
WRS	Wide field Raman Scope 広視野ラマン스코ープ
AG-WRS	Application to Glass-Wide field Raman Scope ガラス面上単純塗布-広視野ラマン스코ープ法
Urease-GLDH	Urease-Glutamate Dehydrogenase ウレアーゼ-グルタミン酸脱水素酵素法
O/W	Oil in Water 水中油型

緒 言

近年、医師や患者さんのニーズの多様化、製剤技術の進歩、政府による後発医薬品の使用促進政策などにより、同一の主薬を含有した様々な外用剤（皮膚外用剤）が数多く上市されている。上市された外用剤は、剤形別に日本薬局方で分類されているが、ゲル剤やスプレー剤など新しい技術により生み出された剤形や医療現場での使用実績などの情報をもとに時代に合った見直しも図られている。軟膏剤とクリーム剤は、以前は同じ「軟膏剤」として一括りにされていたが、第十六改正日本薬局方以降、それぞれ独立して分類されるようになった。軟膏剤とクリーム剤のように「剤形」が異なると、同一の主薬を同じ濃度で含有していても、主薬の経皮吸収性が異なり、局所における薬物動態や臨床効果は必ずしも同じにはならない。さらには、一般用医薬品を中心に汎用されている水中油型（O/W型：Oil in Water）のクリーム剤でも、使用されている添加物とその濃度は多様であるため、同じ剤形でも異なった薬物動態や臨床効果を示すことが十分に考えられる。本論文では、昔から汎用されて現在では様々な剤形が存在する尿素製剤に注目し、基剤（外用剤から有効成分を除いたもの）の違いが皮膚移行性に与える影響を検討した。

1968年にSwanbeck¹⁾が角化症治療における尿素製剤の有効性を明らかにして以来、尿素は、肌荒れはもとより、尋常性魚鱗癬、老人性乾皮症、アトピー性皮膚炎、進行性指掌角皮症等の様々な皮膚疾患の治療に用いられてきた。尿素外用剤は、尿素濃度が高いほど角質軟化作用などの臨床効果が高いことから、より早い治癒効果を求めて高い濃度の製品が選ばれており、医薬品では尿素20%配合製剤が主流となっている。しかし、より高い治療効果を得ようとして尿素を高濃度に配合すると経時的に尿素の結晶が析出し、皮膚に塗布した際、ザラツキやツツパリ感などによる使用感の低下、さらには物理的刺激を誘発することがある。現在では、処方設計の技術が進み、尿素10%配合クリーム剤では、製剤中は勿論のこと、塗布後も結晶化しない製品が増えた。しかし、尿素を20%以上配合するクリーム剤では、水分を多く配合できるO/W型クリーム剤を選択しても、処方設計上、尿素の溶解性を保つための十分な水を添加することは難しい。そのため、尿素を20%以上配合する製剤中では結晶析出を抑制できても、皮膚へ塗布した後にすぐに結晶析出してしまい皮膚への移行性が低下するという課題がある。これまでも、水分含有量を増加する方法、乳酸やグリセリンなどの直鎖多価アルコールを添加する方法^{2~4)}など、尿素の結晶析出の防止に向けて多くの研究がなされてきた。本論文では、尿素20%配合尿素クリーム剤の臨床的有効性を最大限発揮させるため、塗布後少しでも長い時間結晶化させない製剤の研究に取り組んだ。

特に、尿素配合クリーム剤の対象疾患は、冬季（乾燥期）に発症、憎悪するため、使用される低湿度環境下を見据えた製剤設計が必要になる。我が国の気候は地域によって差があるが、日本海側や北日本を除けば冬に降水量が少なく、乾燥しているという特徴がある。同じ相対湿度であっても気温が低いとそこに含まれている絶対的な水分量は少なく（絶対

湿度が低く)、さらに冬季の室内環境では暖房が使用されるため、ますます湿度(相対湿度)が低下することになる。低湿度ではのどや鼻、皮膚などの乾燥を引き起こしやすくなるなどの健康影響が生じることが懸念される⁵⁾。我が国で定められている事務所衛生基準規則⁶⁾にあるように、一般的に快適な室内環境管理を、室温 17℃以上 28℃以下、相対湿度 40%以上 70%以下に定め、室内環境の目安にしている⁷⁾。本論文ではこの衛生基準規則を参考に、温度を 20~25℃、湿度を 40~50%に設定し、冬季の環境条件として研究を行った。

また、尿素は、古くから他の分子や原子と包接化合物を形成する多分子系のホスト化合物として知られており⁸⁾、製剤学的にも大変興味深い分子間相互作用を示す医薬品である。尿素は、様々な分子と複合体を形成するが、ゲスト分子のサイズや分子構造が尿素複合体の形成に大きく影響する^{9~11)}。これまで、尿素と包接化合物などの尿素付加体を形成するゲスト分子は、6 個以上の炭化水素を持ったパラフィン類^{12~17)} やその誘導體(例えば、アルコールやカルボン酸)などが挙げられる。改めて近年上市されている尿素配合クリーム剤を精査すると、6 個以上の炭化水素を持ったパラフィン類、ステアリン酸やセチルアルコールをはじめとする脂肪酸や高級アルコール^{18~20)}、さらには脂肪酸を基にした界面活性剤などを含む製品が多く存在する。そのため、処方成分を考えると、製剤から結晶が析出した際、尿素をホストとする包接化合物などの複合体を形成することが考えられ⁴⁾、処方の違いにより、結晶析出状態が異なることが十分予想される。

これらの背景のもと、尿素配合クリーム剤の製剤開発時に基剤の違いにより、塗布後の尿素の結晶析出速度や結晶形状に違いがあることを見出した。そして、この現象の違いがクリーム剤の結晶析出抑制、さらには皮膚への移行性の向上に繋がると考え、本研究に着手した。市販されている尿素配合クリーム剤の処方を参考に様々な処方を試作し、塗布後の結晶析出状態を検証した。その結果、乳化剤が結晶析出に影響する傾向があり、特に天然の乳化剤であるレシチン(LEC)を用いたクリーム剤で結晶析出が生じにくい知見を得た。そのため、本論文では、結晶析出速度に対する処方の影響を検証しやすいように、レシチン(LEC)を用いたクリーム剤と塗布後短時間に結晶が析出する非イオン界面活性剤(NS)を用いたクリーム剤を選択して研究した。非イオン界面活性剤には、外用剤に汎用されているポリオキシエチレン硬化ひまし油(HCO 50)を選択した。

本論文は、以下の一連の研究成果をまとめたものである。

第 1 章では、乳化剤が異なる 2 種類の 20%尿素配合製剤(NS 製剤:非イオン界面活性剤処方と LEC 製剤:レシチン処方)を用いて、塗布後の結晶析出速度と析出状態を比較し違いがあることを検証した。次にその析出速度の異なる製剤から得た析出物の物性を評価し、析出速度の違いを生む要因について研究した。

第 2 章では、第 1 章の結果をもとに代表的な O/W (oil in water) 型クリーム剤の中から、塗布後の結晶析出速度が大きく異なる 2 種類の製剤を選定し、各製剤からの尿素の皮膚移行性を評価した。本研究では角層に移行した尿素量を測定する方法として、放射性同位元

素 (Radioisotopes : RI) を使わずに簡便に測定する方法『テープストリッピング・比色定量法 : Tape stripping-Colorimetry method (T-C 法)』を見出し、その測定法の有用性を検証するとともに処方の違いによる皮膚移行性を検討した。

第3章では、塗布された製剤中の薬物の状態を前処理なく経時的に評価する方法として、ガラス面上単純塗布実験法²¹⁾と広視野ラマンスコープ (Wide field Raman Scope : WRS)²²⁾を組み合わせた新たな評価法『Application to Glass-Wide field Raman Scope (AG-WRS) 法』を見出した。この評価法では、ラマン分光分析とラマンイメージング分析を同時に行えるため、塗布後の製剤中に含まれる有効成分の状態を簡便に評価できる。本論文では、AG-WRS法で結晶析出速度が異なる製剤中の尿素の状態変化を検証し、結晶析出を抑制する要因を明らかにするとともに評価法としての有用性を明らかにした。

第 1 章 20%尿素配合クリーム剤からの結晶析出速度と析出物の物性評価

第 1 節 小序

尿素（分子量：60）²³⁾ は、Fig. 1-1 に示すような構造を持った薬物であり、無色無臭の結晶で、融点は 133～135℃である。尿素の外観は白色の固体であり、保湿クリームや肥料などとして広く使われている。水に容易に溶け、溶解度は 107.9 g/100 mL (20℃)である。また、尿素の結晶の構造には、小分子が入るのにちょうど良い大きさの空孔がある。そのため尿素は、パラフィン類やその誘導体などの化合物と安定な包接化合物などの尿素付加体を作ることが知られている。

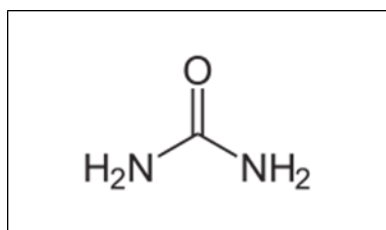


Fig.1-1 : Urea

本章では、尿素配合モデル製剤として、汎用性の高い水中油型（Oil in Water: O/W 型）クリーム剤を選択した。製剤は、非イオン界面活性剤（Nonionic Surfactant : NS）とレシチン（Lecithin: LEC）の性質の異なる乳化剤で作製した 2 つの 20%尿素配合クリームを用い、乳化剤の違いにより、塗布後に生じる結晶析出速度とその析出物を評価した。なお、対照とする製剤には 20%尿素水溶液を用いた。尿素は、溶解（非晶質）状態の方が角層に移行しやすく^{24,25)}、臨床的有効性を発揮すると考えられており、製剤中での結晶化を抑制することが図られてきた⁴⁾。さらに塗布後においても、長時間尿素の結晶化を抑え、皮膚吸収しやすい状態を維持させることは、より高い効果を発揮させるため、製剤上重要である。特に水溶性の尿素を 20%以上配合する尿素配合クリーム剤では、処方構成上、尿素の溶解性を確保するのに十分な水分を配合しにくくなるため、製剤設計にあたっては、尿素が再結晶化しないように留意しなければならない。

本章では、乳化剤が異なる 2 種類の 20%尿素配合製剤を用いて、塗布後の結晶析出状態と析出速度を比較検討した。また、各製剤から得られた析出物の物理化学的な性質を評価し、クリーム剤の基剤成分と塗布後の結晶抑制に関して新たに得られた知見について述べる。

第2節 尿素配合モデル製剤からの結晶析出速度と析出状態観察

本検討では、尿素配合モデル製剤として、乳化剤が異なる2種類の20%尿素配合製剤(NS製剤：非イオン界面活性剤処方とLEC製剤：レシチン処方)を用いて、塗布後の析出状態を比較した。

Table 1-1には、本章において検討に用いたモデル製剤(NS製剤とLEC製剤)の処方を示した。乳化剤の影響を比較するために、3種類の乳化剤を選択して、それらの総量を2.4%に調製した。また、製剤の安定性の確保や製剤物性への影響がないようにするなどを考慮し、試作検討をもとに最適な処方を選択した。NS製剤は、非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン硬化ひまし油(HCO 50)を中心にソルビタン脂肪酸エステル(Polyoxyethylene sorbitan monostearate, Sorbitan Monostearate)を組み合わせることで乳化した製剤とした。一方、LEC製剤は、代表的な天然の乳化剤であるレシチンを中心に非イオン界面活性剤のグリセリン脂肪酸エステル(Propylene Glycol Monostearate, Glycerol Monostearate)を組み合わせることで乳化した製剤とした。使用したレシチンは、主成分がホスファチジルコリンであり、分子構造はトリグリセリドの3つの脂肪酸の内の1つがリン酸化合物に入れ替わったものである。

Table 1-1：モデル製剤処方

component	amount		wt (%)
	NS formulation	LEC formulation	
Urea	20	20	
Oily Substances	15	15	
Cetostearyl Alcohol (CSA)	4	4	
Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil 50 (HCO 50)	1	0	
Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate	1	0	
Sorbitan Monostearate	0.4	0	
Purified Soybean Lecithin (Lecithin)	0	0.8	
Propylene Glycol Monostearate	0	0.8	
Glycerol Monostearate	0	0.8	
Glycerin	10	10	
Purified Water	48.6	48.6	
Total	100	100	

本検討では、ガラス面上単純塗布実験法²¹⁾に従い、製剤からの結晶の析出状態を顕微鏡で観察し、結晶状態とその成長速度について比較検討した。

顕微鏡観察は2時間行い、開始時(0分)、15分、60分、120分に観察を行った。

各試料の観察結果は、Fig. 1-2の通りであった。顕微鏡観察からNS製剤とLEC製剤は、結晶の形態(晶癖)が異なり、LEC製剤は小さな板状の結晶であるのに対し、NS製剤と20%尿素水溶液では針状結晶で晶癖が類似していた。

NS製剤は、15分後には針状結晶が観察でき、60分後には、針状結晶物質がスライドガラス全面を覆い、120分後も60分後と同様な状態であった。

一方、LEC 製剤からの析出物は板状結晶で、15 分後の結晶析出は少なく、60 分、120 分の時点においても NS 製剤に比べて偏光部の強度は弱く、結晶析出の進行が遅い傾向にあることが認められた。

以上の結果から、経時的に析出してくる結晶の量は、LEC 製剤が最も少なく、LEC 製剤 < NS 製剤 < 尿素水溶液の順に多くの結晶が析出することが観察でき、結晶析出速度が処方で異なることが認められた。

なお、LEC 製剤は、初期の観察で小さく光るものが認められるが、乳化粒子の液晶であり、塗布後に水分を失うことで結晶へと変化したものではないと推察される。

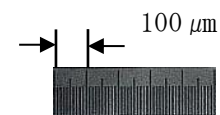
20%尿素水溶液は、NS 製剤に類似し、15 分後の時点で針状結晶が析出していたが、NS 製剤からの析出物に比べて大きい結晶であった。

Fig. 1-2 : モデル製剤からの結晶析出観察

(測定条件：湿度 40~50%, 温度 20~25°C)

Applied formulation	Time after application to slide glass (min.)			
	0	15	60	120
NS Formulation (20%)				
LEC Formulation (20%)				
Urea aqueous solution (20%)				

最小目盛：10 μm



上記の結果から、塗布後、LEC 製剤は、NS 製剤に比べ結晶析出時間が遅く、結晶が析出しにくいことが明らかとなった。

第3節 粉末X線回折測定 (PXRD)、示差走査熱量測定 (DSC)、粉末X線回折-示差走査熱量同時測定 (PXRD-DSC) による析出物の物性評価

「第1章 第1節」の結晶析出速度の検討結果もとに、結晶析出速度の異なるモデル製剤から得られた析出物の物理化学的な性質を PXRD 測定、DSC 測定、PXRD-DSC 測定を行って評価した。

第1項 粉末X線回折 (PXRD) 測定による評価

モデル製剤から得られた析出物と尿素 (尿素水溶液から得られた析出物) について、粉末X線回折 (PXRD) 測定を行い、その結果を Fig. 1-3 に示した。

測定の結果、尿素は角度 $2\theta=22.2^\circ$ にシャープな X 線回折ピークが認められた。NS 製剤と LEC 製剤から得られた結晶は、共に尿素より僅かに低角度側の $2\theta=21.5^\circ$ に主たる回折ピーク (★) を有し、尿素と異なる回折パターンを示した。また、NS 製剤と LEC 製剤の間にも、違いが認められた。NS 製剤の析出物は、 $2\theta=21.5^\circ$ の回折ピークに加え、その高角度側に、尿素による $2\theta=22.2^\circ$ に回折ピーク (☆) が認められた。一方、LEC 製剤の析出物には認められず、NS 製剤と異なることが明らかとなった。

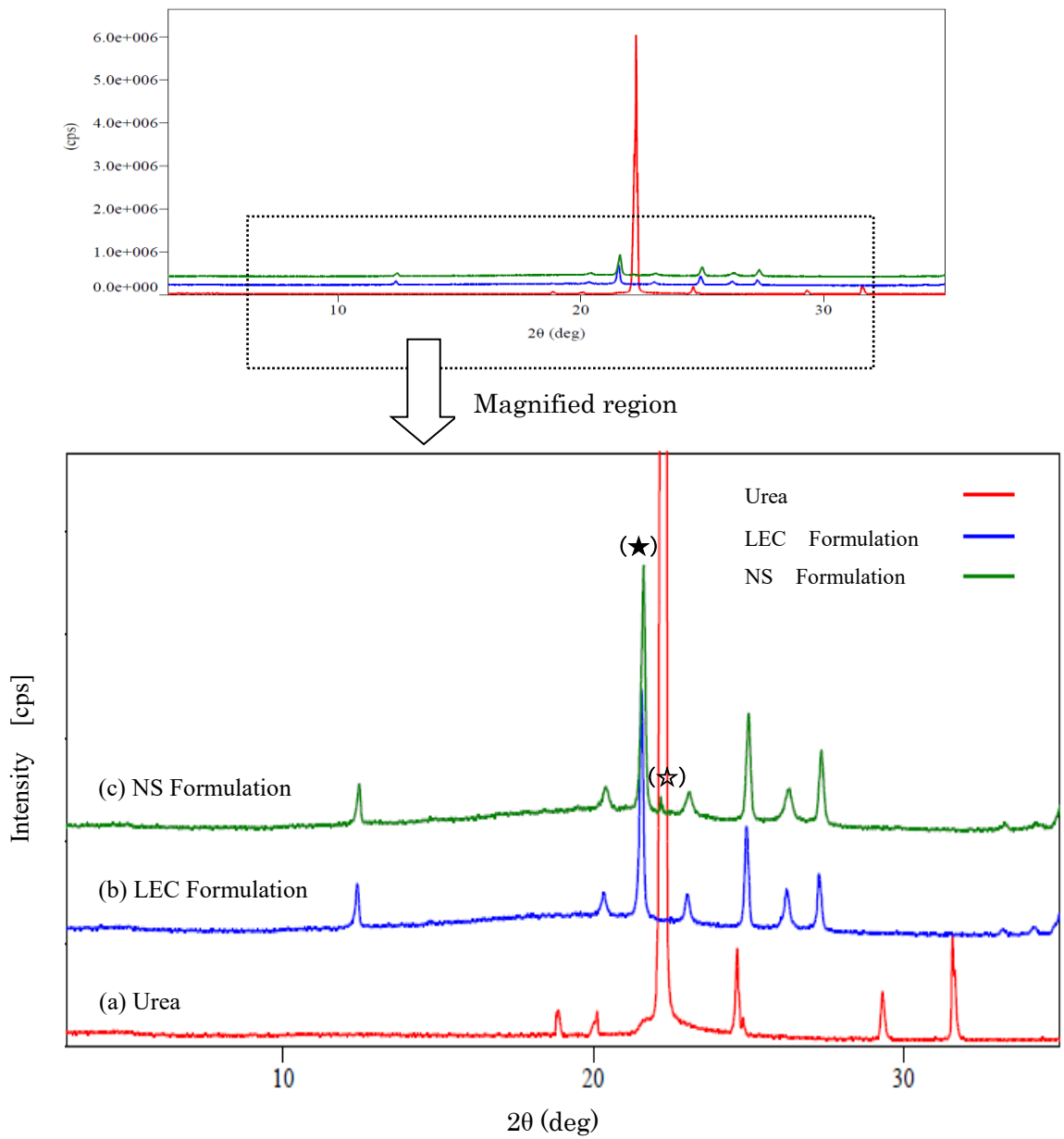


Fig. 1-3. : モデル製剤 (a, b, c) のPXRDパターン

(a) Urea (b) LEC-Formulation (c) NS-Formulation.

第2項 析出物の示差走査熱量測定 (DSC) による評価

NS 製剤と LEC 製剤から得られた析出物と尿素 (尿素水溶液から得られた析出物) について、DSC 測定を行い、その結果を Fig. 1-4 に示した。尿素有吸熱ピーク 135.8°C に対して、NS 製剤から得られた析出物は、110.8°C と 139.2°C に吸熱ピークが認められた。

一方、LEC 製剤の析出物は、140.0°C 付近に吸熱変化は認められず、112.3°C のみに吸熱ピークが認められた。この DSC の結果より、NS 製剤の析出物は、尿素複合体と尿素が共存していることが考えられ、LEC 製剤の析出物は、尿素複合体のみが存在していることが推察できた。

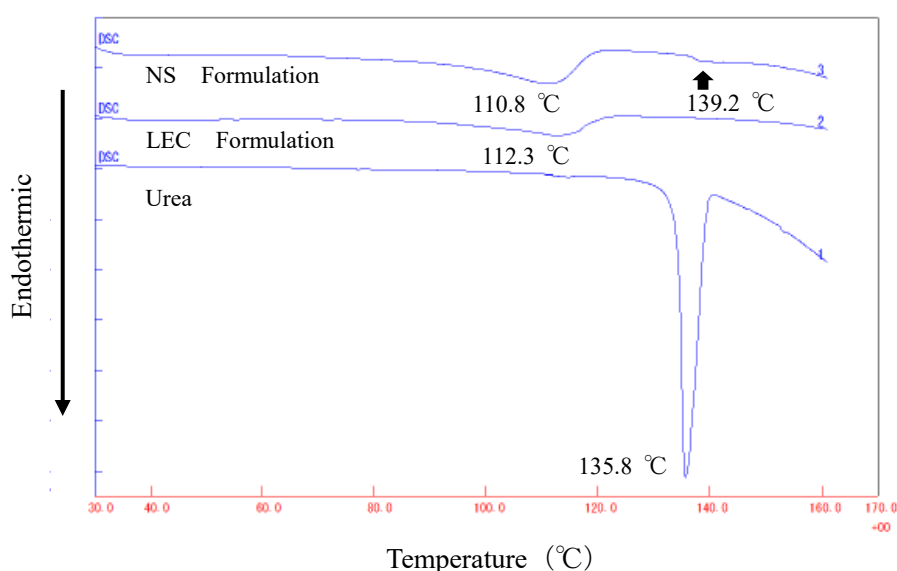


Fig. 1-4 : NS-Formulation, LEC-Formulation and Urea の DSC 曲線

(closed pan, heating rate 5.0°C/min)

第3項 粉末 X 線回折-示差走査熱量同時測定 (PXRD-DSC) による評価

NS 製剤と LEC 製剤から得られた析出物と尿素 (尿素水溶液から得られた析出物) について、PXRD-DSC による測定を実施した。その結果と主の吸熱ピーク温度前後の X 線回折パターンを、Fig. 1-5~Fig. 1-8 (Urea : Fig. 1-5, NS-Formulation : Fig. 1-6, 1-7, LEC-Formulation : Fig. 1-8) に示した。

尿素は、融解に伴う吸熱ピークが約 135°C に認められた。その後、融解により結晶由来の回折ピーク ($2\theta=22.2^\circ$) が消失し、非晶質由来のハローになることが確認された (Fig. 1-5)。

NS 製剤の析出物は、DSC プロファイルより、融解に伴う吸熱ピークが約 110°C と約 140°C に吸熱ピークが確認されたが、尿素由来の回折ピークは認められなかった (Fig. 1-6)。また、NS 製剤からの析出物は、室温時の回折パターンに、LEC 製剤では認められない、尿素由来の回折ピークが $2\theta=22.2^\circ$ に認められた。しかし、この回折ピークは、約 75°C まで確認された後、消失した。その後、主たる回折ピーク ($2\theta=21.5^\circ$) は約 110°C の融解により消失し、非晶質であるハローになることが確認された (Fig. 1-7)。

LEC 製剤の析出物は、NS 製剤と異なり、約 140°C に吸熱ピークはなく、DSC プロファイルより、析出物の融解に伴う吸熱ピークが約 110°C のみに認められた。その回折ピーク ($2\theta=21.5^\circ$) は、約 110°C の融解時に消失し、非晶質であるハローが確認された (Fig. 1-8)。

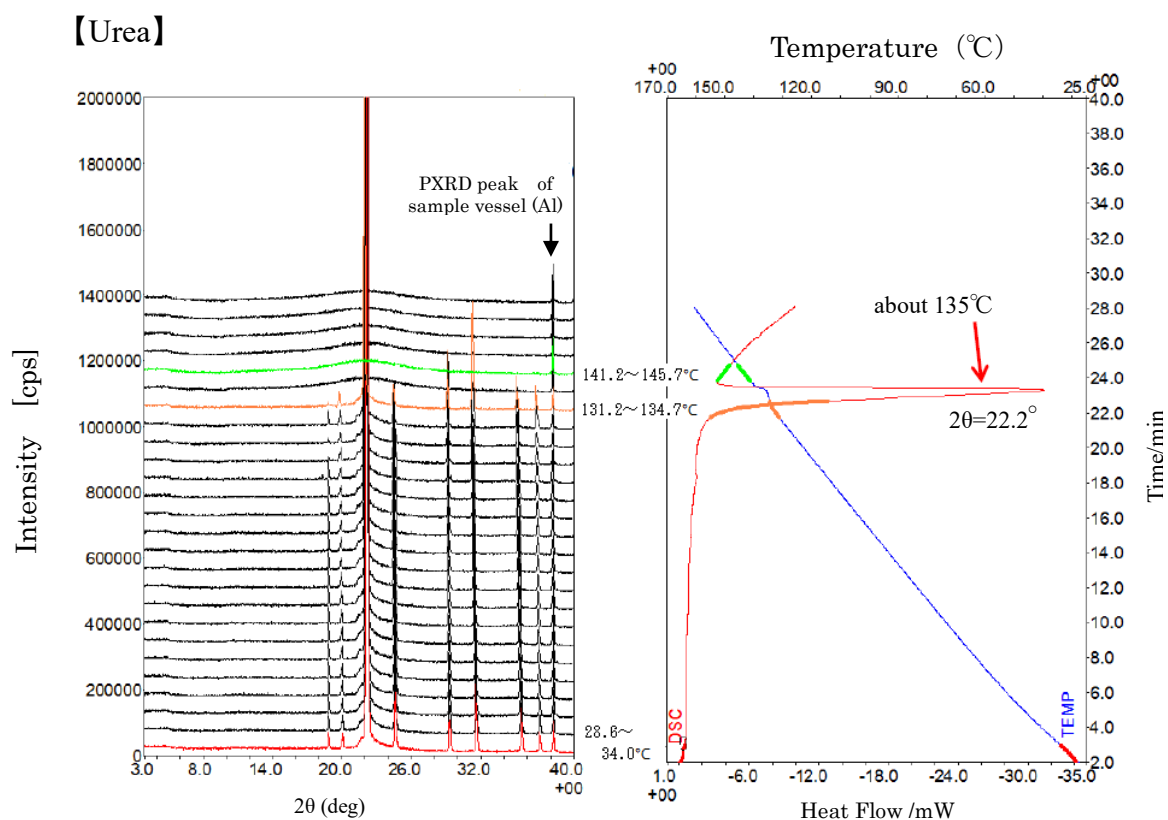


Fig. 1-5 : Urea の PXR-DSC 曲線

(open pan, heating rate 5.0°C/min)

【NS-Formulation】

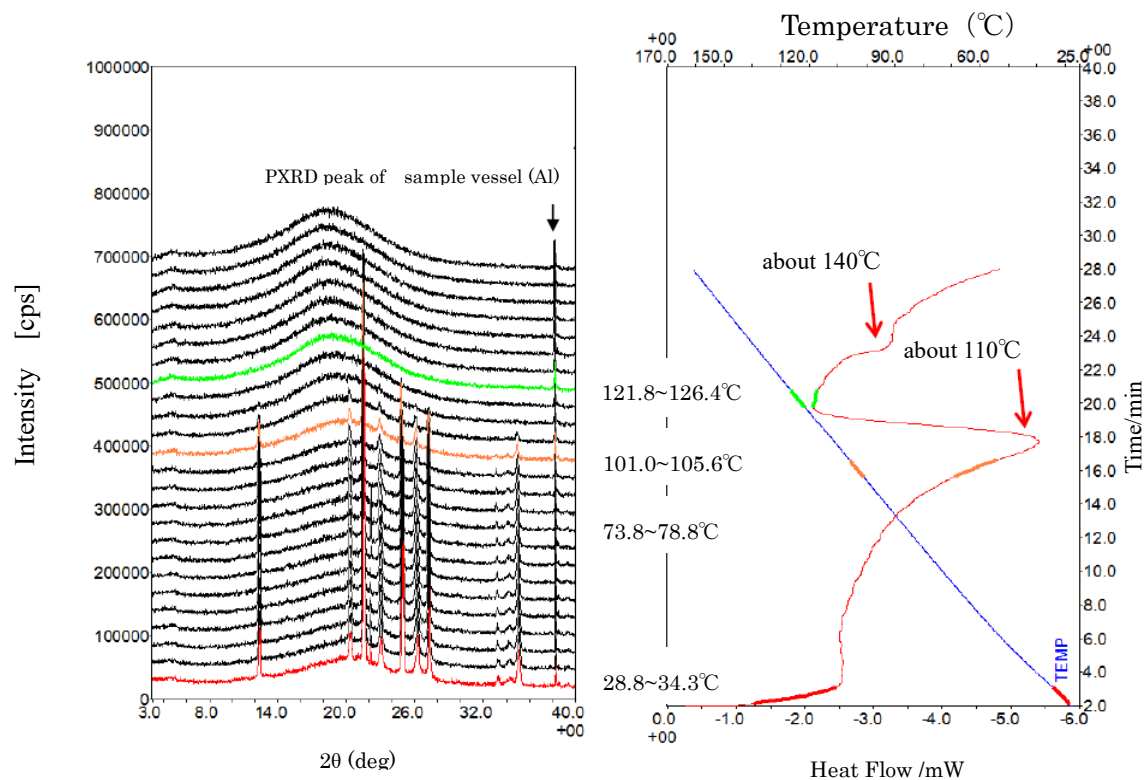


Fig. 1-6 : NS-Formulation の PXR-DSC 曲線 (open pan, heating rate 5.0°C/min)

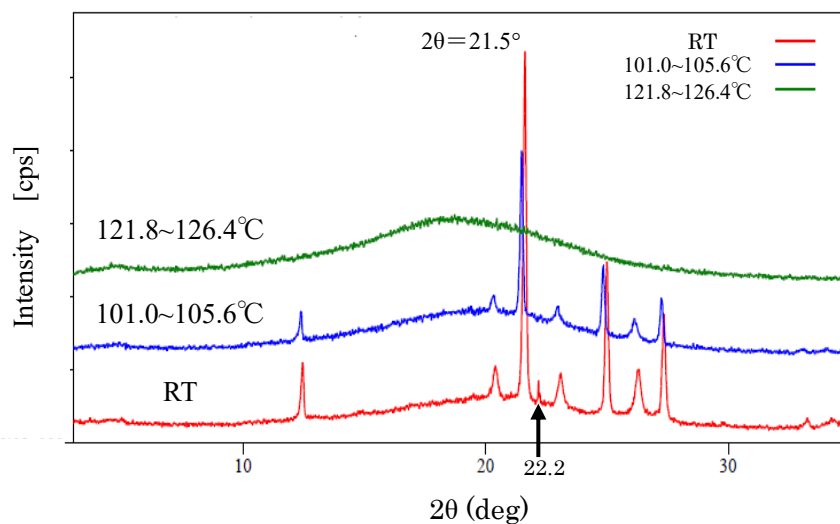


Fig. 1-7 : NS-Formulation の PXR パターンの昇温変化
(open pan, heating rate 5.0°C/min)

【LEC-Formulation】

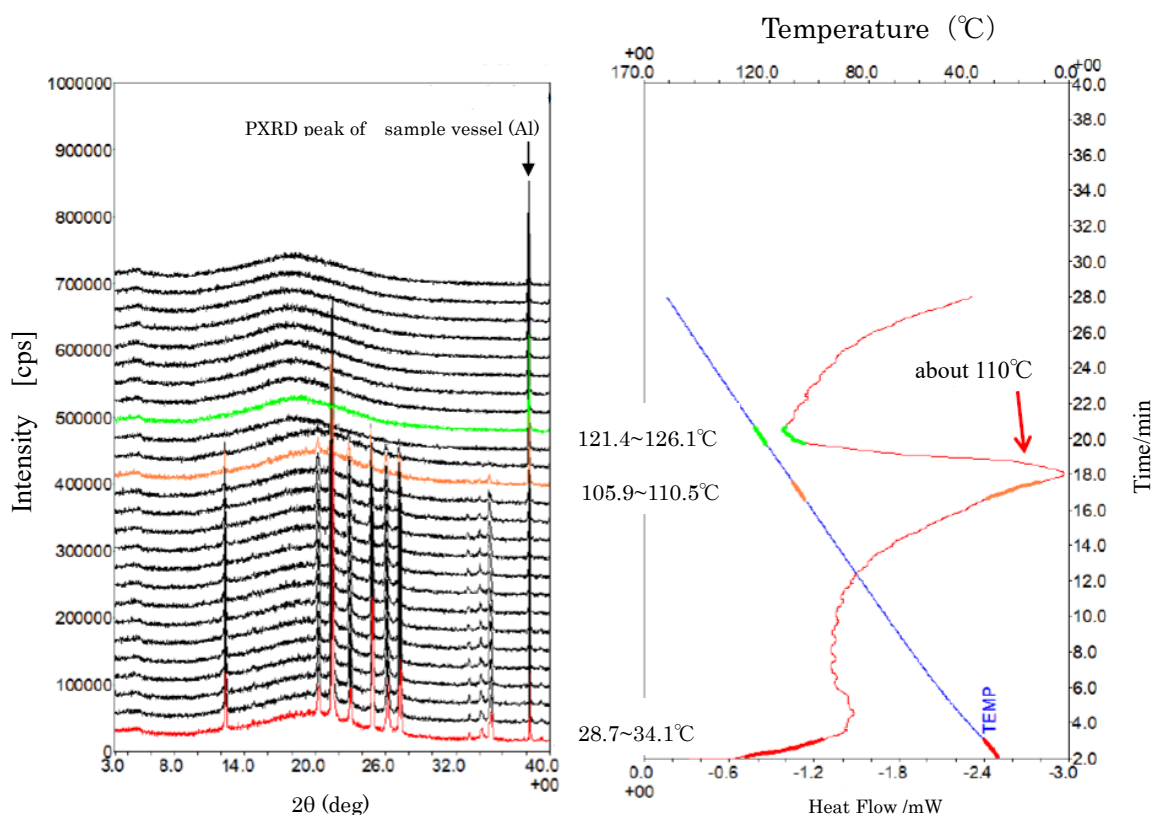


Fig. 1-8 : LEC-Formulation の PXR-DSC 曲線 (open pan, heating rate 5.0°C/min)

第4節 LEC 製剤での尿素結晶に与える処方成分の影響

LEC 製剤の処方成分をもとに、処方成分が尿素に与える影響を粉末 X 線回折測定で確認し、LEC 製剤の結晶析出速度が NS 製剤に比べて遅くなる要因を検証した。

その結果、Fig. 1-9 に示した通り、尿素にセトステアリルアルコール (Cetostearyl alcohol: CSA) を添加すると、尿素の回折ピークは変化し、尿素複合体^{12),19),20)}由来と考えられる新たな回折ピークが $2\theta=21.5^\circ$ に認められ、尿素の回折ピークと共存することが認められた。その系にレシチンを添加すると、尿素と CSA で発生した回折ピークと同一であったまま全体的に回折ピーク強度が減少した。さらにグリセリンを加えることで、尿素由来のピークはほとんど認められず、回折ピーク全体がハローとなり、非晶質となることが明らかとなった。このことから、高級アルコールのセトステアリルアルコールとレシチンの組み合わせが尿素の非晶質化に有効であり、さらにグリセリンを加えることで、尿素の結晶析出抑制に適切であることが示された。

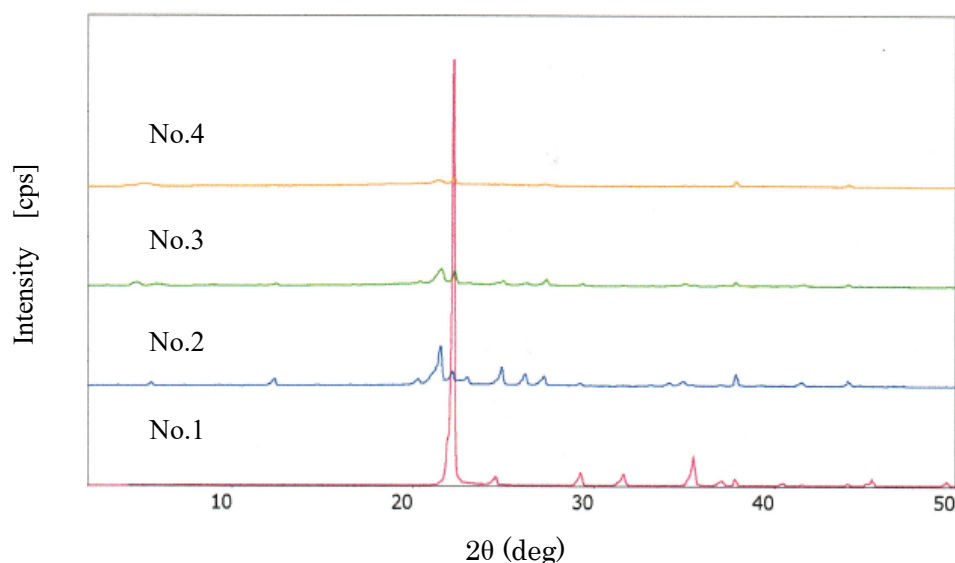


Fig. 1-9 : LEC 処方成分との組み合わせによる尿素の PXRD パターン変化

No.1: Urea

No.2: Urea+Cetostearyl alcohol (1 : 1)

No.3: Urea+Cetostearyl alcohol+Lecithin (1 : 1 : 1)

No.4: Urea+Cetostearyl alcohol+Lecithin +Glycerin (1 : 1 : 1 : 1)

第 5 節 赤外吸収スペクトル(IR)測定による析出物の同定

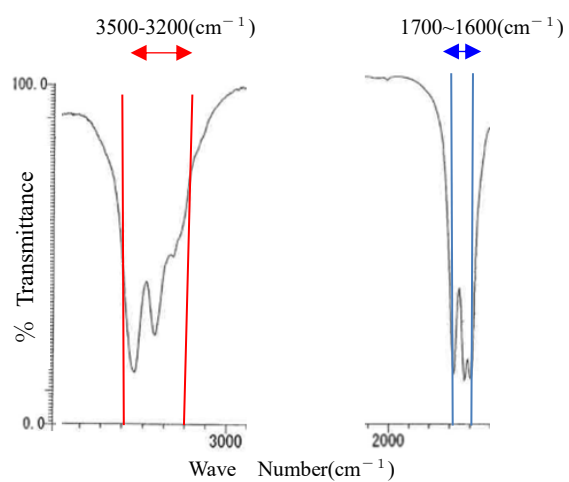
Fig. 1-10 に示した通り、尿素（尿素水溶液から得られた析出物）の IR 吸収波長は、3200~3500 cm^{-1} に N-H 伸縮振動に由来する 2 つのピーク（3444 cm^{-1} と 3347 cm^{-1} ）1600~1700 cm^{-1} 付近の C=O の伸縮振動に由来するピークが、特長的に観察された。

NS 製剤からの析出物は、尿素と同様に、N-H 伸縮振動に由来する 3200~3500 cm^{-1} に尿素と同様の 2 つのピークが認められた。2 つのピークは、尿素に比べ僅かにブロード化しており、尿素の N-H 基の状態に影響していることが推察された。また、1600~1700 cm^{-1} の C=O の伸縮振動は尿素と形状が異なり、尿素でみられる特徴的な 1700 cm^{-1} 付近のピークが複数に分裂することが認められた。これは、高級アルコールと尿素で形成する包接化合物の波長に類似していることから、NS 製剤においても、塗布後、乾燥する過程で包接化合物が形成してくるものと推察された。

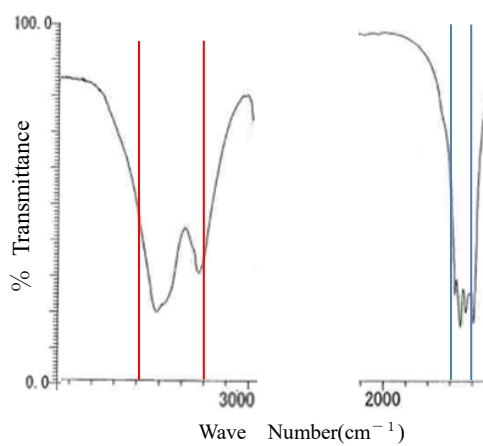
LEC 製剤からの析出物は、尿素と異なるピークが NS 製剤より多く認められた。尿素の特徴を示す 3200~3500 cm^{-1} の 2 つのピークは、1 つのブロードなピークとなり、N-H 基の状態が尿素や NS 製剤とは大きく異なることが明らかとなった。また、1600~1700 cm^{-1} の C=O の伸縮振動も尿素や NS 製剤と形状が異なり、2 つの波長ピークに変化した。このことから、LEC 製剤においては、尿素複合体の形成が推察されたが、高級アルコールと尿素で形成される包接化合物とは少し異なる状態で存在していることが示唆された。

本節の IR 測定の結果、NS 製剤と LEC 製剤からの析出物は、尿素と異なる波長ピークが認められ、尿素そのものとは異なっていることが示され、共に尿素複合体が形成されていることが推察された。また、NS 製剤と LEC 製剤からの析出物は、異なった状態の尿素複合体（包接化合物）が形成されていることが示唆された。

(a)



(b)



(c)

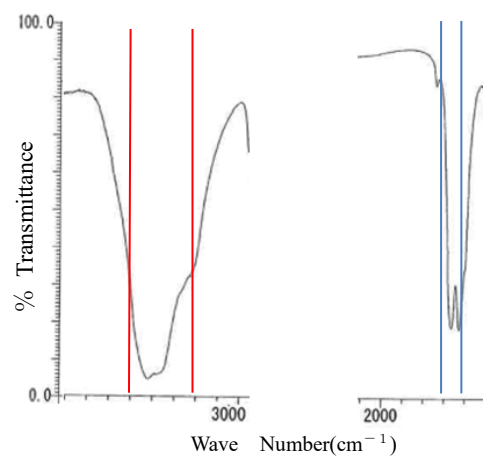


Fig. 1-10 : Urea、NS-Formulation、LEC-Formulation の赤外吸収スペクトル
(a) Urea (b) NS-Formulation (c) LEC-Formulation

第6節 考察

冬季を想定した低湿度環境下（湿度 40～50%、温度 20～25℃）では、LEC 製剤が NS 製剤や尿素水溶液に比べて、結晶析出速度が遅いことが確認できた。また、析出の時の晶癖も、LEC 製剤が小さな板状であるのに対し、NS 製剤と尿素水溶液は針状の結晶であり、析出物の物性もそれぞれ異なっていることが明らかになった。

ガラス面上単純塗布実験による偏光顕微鏡観察では、NS 製剤や尿素水溶液は、15 分後にすでに多くの針状結晶の析出が認められた。一方、LEC 製剤からの析出物は板状結晶で、15 分後の結晶析出は NS 製剤に比べて少なく、120 分時点においても NS 製剤に比べて偏光の強度は弱く、結晶析出の進行が遅かった。これらは、基剤中に含まれる乳化剤と尿素の共存によって、結晶各面の成長速度に差を生じ、晶癖の違いや偏光の強度の差に繋がったと考えられる⁴⁾。結晶成長が遅い場合、結晶界面が安定に保たれ正六面体等を形成し、結晶成長が速い場合は、結晶界面が不安定になり、樹枝状成長が起こることが知られている^{4),10)}。これらのことから推察すると、析出した結晶の形が小さな板状の LEC 製剤は、処方構成、特に乳化剤の違いにより、析出速度が抑制され、針状結晶が認められた NS 製剤や尿素水溶液からの結晶化と晶癖が異なり、析出量が少なくなったと考えられた。

尿素は、古くから多くの直鎖状炭化水素やその誘導体と尿素複合体（包接化合物を含む）を形成することが知られている。尿素の包接化合物においては、直鎖状炭化水素やその誘導体を中心に研究されている^{19,20,26,27)}。例えば、高級アルコールと尿素の包接化合物については、1979 年に尿素-セチルアルコール系が報告され、尿素-ステアリン酸系、尿素-パルミチン酸系の包接化合物については、1996,1997 年に報告されている^{19),20)}。これらの報告を参考に、DSC、PXRD、PXRD-DSC での測定結果を考察すると、NS 製剤や LEC 製剤においても、 $2\theta=21.5^\circ$ 付近に、高級アルコール (CSA) と尿素の包接化合物（尿素複合体）が形成されているものと考えられる。また、PXRD-DSC での測定から、NS 製剤の析出物には、尿素由来の吸熱ピークや回折ピークが認められ、尿素と尿素複合体が混在していることが明らかになった。しかし、LEC 製剤は、NS 製剤で認められた尿素由来の吸熱ピークや回折ピークは認められず、尿素複合体のみが確認された。IR による測定の結果では、NS 製剤と LEC 製剤からの析出物は、尿素と異なるピークが一部に認められ、尿素の存在状態が異なっていることが示唆された。共に尿素を主体とする構造であることが同定でき、尿素複合体の形成が推察された。NS 製剤では、高級アルコールと尿素で形成される包接化合物の波長ピークが認められたが、LEC 製剤からの析出物はピーク形状が異なり、違う構造を有する包接化合物の形成が示唆された。

本研究により LEC 製剤においては、処方成分のうち、主にレシチンとセトステアリルアルコール（高級アルコール）との組み合わせが尿素の結晶化を抑制し、長時間非晶質状態を維持することができ、その結果、結晶析出速度が遅くなったものと考えられた。

結晶析出観察、DSC や IR の測定結果から、NS 製剤に比べて、LEC 製剤の方が塗布後の

乾燥過程で、尿素包接化合物が形成しやすく、尿素単独の結晶析出を抑制し、結晶析出速度に影響したと推察された。尿素は、脂肪酸などの直鎖炭化水素を有するゲスト化合物と共存すると Fig.1-11 に示した通り、筒状の空洞 ($\phi=5.25 \text{ \AA}$) を有する六方晶系の構造をとり、包接化合物のホストとなって付加化合物を形成する。本研究に用いた非イオン性界面活性剤 (NS) は長いポリオキシエチレン鎖があり、筒状部に入りにくくなる。しかし、レシチン (LEC) はゲストとしてホストの筒部に入る適度な長さの脂肪酸鎖を有しており、尿素単独で結晶化する前に尿素の包接化合物を形成することから、結晶析出速度が遅くなったと考えられた。そのため、レシチンの比率を高くすれば、さらに結晶析出速度が遅くなることが期待できる。

その結果、LEC 製剤のような処方を選択することで、冬場の環境下でも、より長い時間尿素の結晶化を抑制し溶解状態を保つことができ、皮膚への尿素の移行のしやすさに繋がると考えられた。

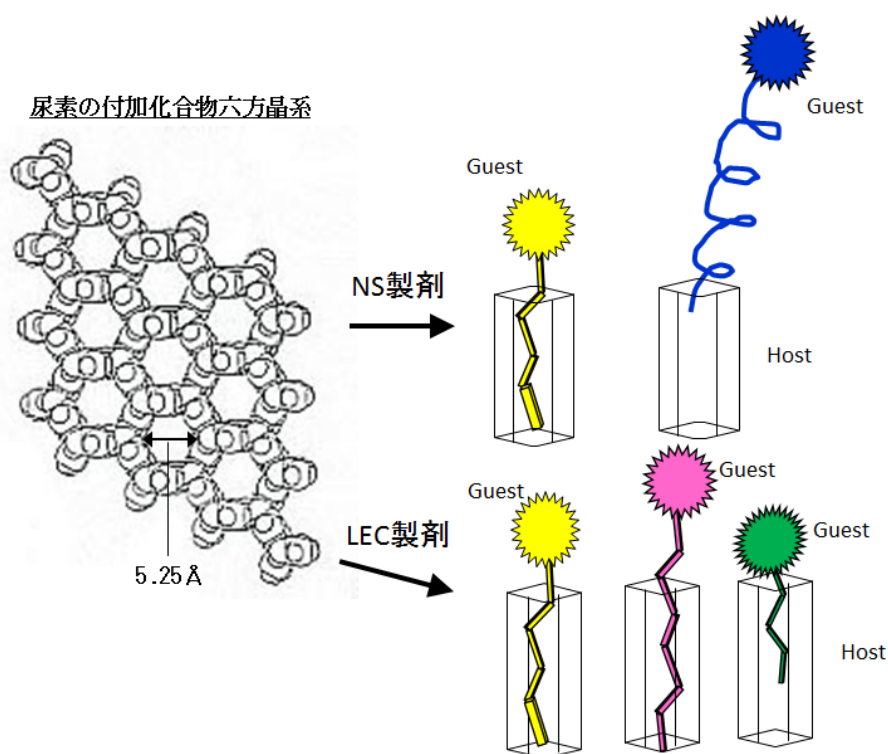


Fig.1-11 : NS 製剤と LEC 製剤から析出した尿素複合体 (包接化合物) のイメージ図

第7節 小括

本研究により LEC 製剤は、処方成分のうち、主にレシチンとセチルアルコール（高級アルコール）との組み合わせが、尿素複合体（包接化合物）の形成を容易にし皮膚塗布後の尿素の結晶化を抑制することが明らかになった。その結果、NS 製剤と比較して、尿素を長時間非晶質状態で維持することができ、結晶析出速度が遅くなったものと考えられた。

20%以上の尿素を配合したクリーム剤は、処方構成上、十分量の水分が確保し難いことから、塗布後、時間の経過とともに皮膚上で結晶が析出し、物理的な刺激、使用感の低下、角層への尿素移行性の低下を引き起こしやすい²¹⁾。

そのため、20%以上の尿素配合製剤を設計する際、処方を工夫して塗布後の結晶析出を抑えることが、低湿度下の冬季において尿素の治癒効果を高める有用な方法の一つと考えられた。

第2章 テープストリッピングと比色定量法を用いた角層中に貯留した尿素の新規評価法

第1節 小序

尿素配合製剤において、尿素の角層への移行性は尿素的治療効果に繋がり、基剤や剤形の影響を受け易いことから、製剤開発上、移行量を知ることは重要である。従来から、角層に移行した尿素的の定量には、テープストリッピングの手法^{28~34)}が知られており、その定量には、放射性炭素 (^{14}C) を標識した尿素を用いるラベル化法が多く使われている³⁵⁾。しかし、放射性同位元素 (Radioisotopes: RI) を用いるラベル化法^{36~37)}は、法律で定められた施設内で行えず、多くの規則のもとでの実験となるため簡便な方法とは言えない。そこで、角層に移行した尿素的量を測定する方法として、角層を採取する方法として知られているテープストリッピングと血液検査で尿素窒素を測定する方法として使われている比色定量法 (Urease-Glutamate Dehydrogenase : Urease-GLDH 法)^{38~42)}を組み合わせ、放射性炭素を用いない新たな測定法 (テープストリッピング・比色定量法 : Tape stripping-Colorimetry (T-C) 法) を開発した (Fig. 2-1)。

本章では、この T-C 法に用いたクリーム剤の適正な塗布量を検証し、得られた条件を用いて、製剤中の尿素的配合量 (10%, 20%) と角層への尿素的移行量の関係を確認し、評価法としての有用性を確認した。また、「第1章 第1節」の結晶析出速度の検討結果をもとに、角層へ移行性に影響するとされる結晶析出速度^{43,44)}が異なる製剤 (非イオン界面活性剤処方 : NS 製剤、レシチン処方 : LEC 製剤) を用いて、経時的な角層への尿素的移行量を T-C 法で測定し、その検証結果を述べる。

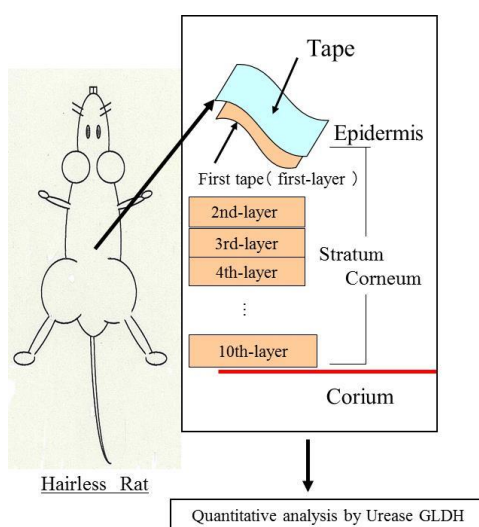


Fig. 2-1 : Tape stripping-Colorimetry (T-C) 法

第2節 塗布面積（塗布量）と尿素移行量の測定

ヘアレスラットを用いて、新たな測定法（テープストリッピング・比色定量法：Tape stripping-Colorimetry (T-C) 法) において、尿素的定量に必要な塗布量を検証した。試験は、放射性炭素 (^{14}C) を標識にした尿素を用いた深堀らの方法⁴⁵⁾ を参考に、単位面積当たりの塗布量を 28 mg/cm^2 と同様にするため 50 cm^2 に対し塗布量を 1.40 g に設定して測定した。塗布面積は、 12.5 cm^2 、 25 cm^2 と種々の検討を進めたが適正な結果が得られなかったため、ほぼ設定できる最大面積となる 50 cm^2 とした。測定は塗布5時間後に10回のテープストリッピングを行い、採取した角層に含まれる尿素量を比色定量法により定量した。

LEC 製剤で塗布できた量は、2例とも塗布した (1.40 g) の90%以上であり、動物番号 101 で、 1.26 g 、動物番号 102 で 1.30 g であった。5時間後の各角層へ移行した尿素量を測定し、その結果をもとに、角層に累積した尿素移行量を Fig. 2-2 に示した。1回目から10回目までのテープストリッピングにより測定できた尿素量は、動物番号 101 では、回数とともに少なくなったが、動物番号 102 では同様な減少傾向は認められなかった。生体由来の尿素量を測定した無塗布対照では、得られた尿素量に多少のバラツキがあったが、尿素量はほぼ一定の値が得られた。

50 cm^2 の面積における10回目までの総尿素量は、動物番号 101 及び 102 とも無塗布対照より高値を示し、尿素移行量の評価法として適した吸収挙動が捉えられた。なお、テープストリッピングに使用したテープ中には、尿素 ($0.09 \mu\text{g/cm}^2$) が混在していることを確認した。

検討結果より、塗布面積を 50 cm^2 ($5 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$)、塗布量を 1.40 g (約 28 mg/cm^2) とすることで、T-C 法で適切に測定できることが示された。

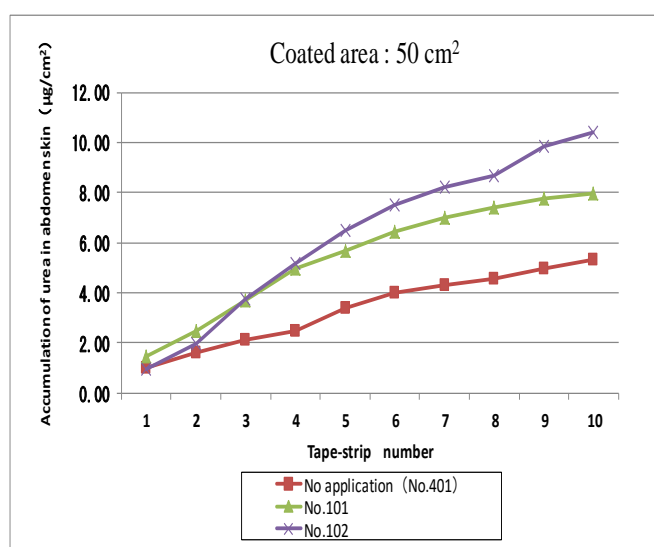


Fig. 2-2: 塗布面積 50 cm^2 での累積尿素移行量

第3節 尿素含有量 (10%, 20%) の異なる製剤での尿素移行量

本節では、尿素含有量の異なる製剤の皮膚への移行量を検証するため、ヘアレスラットを用いて、10%LEC製剤と20%LEC製剤の塗布後の角層に移行した尿素量を測定し比較した。

尿素含有量が10%と20%と異なる製剤からの尿素吸収量は、Fig. 2-3, 2-4, 2-5の通りであった。移行した尿素量を単位面積当りに換算 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) した結果、尿素量は、20%LEC製剤と10%LEC製剤の両方で動物毎にバラツキがみられたものの、テープストリッピング回数とともに測定できた尿素量は暫時少なくなった。6例の平均値では、20%LEC製剤がテープストリッピング回数の8回目を除いて10%LEC製剤より高値を示し、4~6 回目では、有意差が認められた。また、10回目までの合計量においても、20%LEC製剤 ($15.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) は、10%LEC製剤 ($11.95 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) より有意な高値を示した。(Fig. 2-5) なお、使用したテープ中にも尿素 ($0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$: n=2) が混在することを確認した。

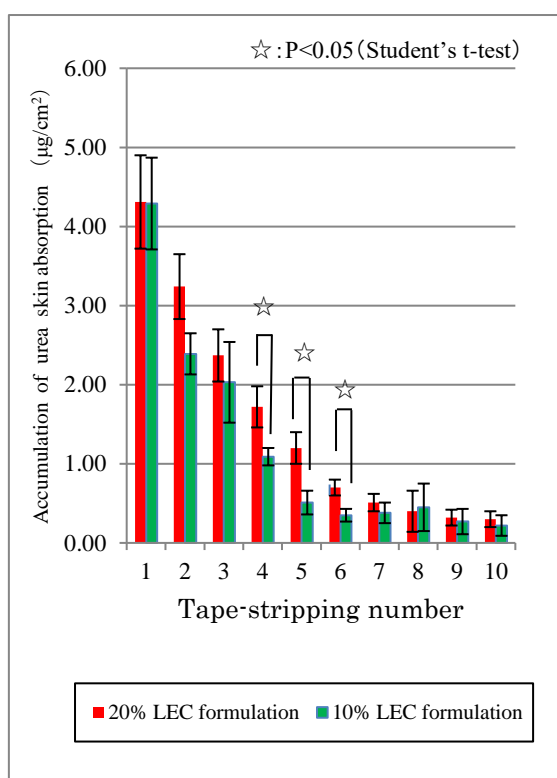


Fig. 2-3 : LEC製剤 (20% , 10%) での各角層の尿素移行量 (平均値 \pm S.E. (n=6))

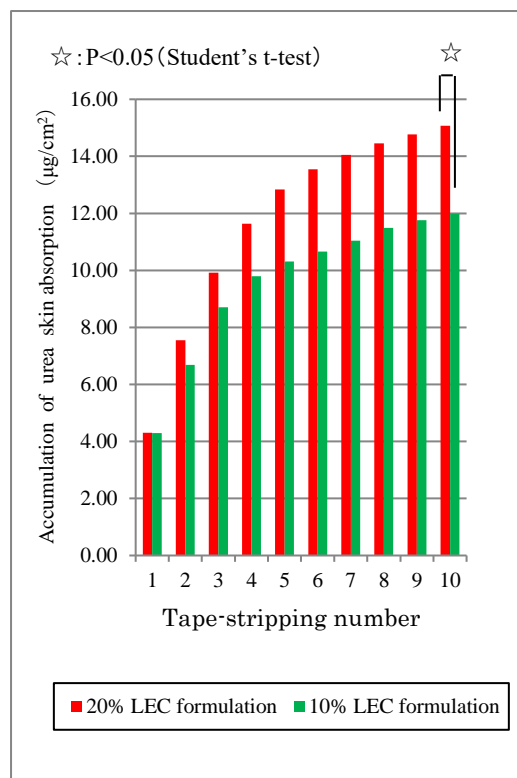


Fig. 2-4 : LEC製剤 (20% , 10%) による累積尿素移行量

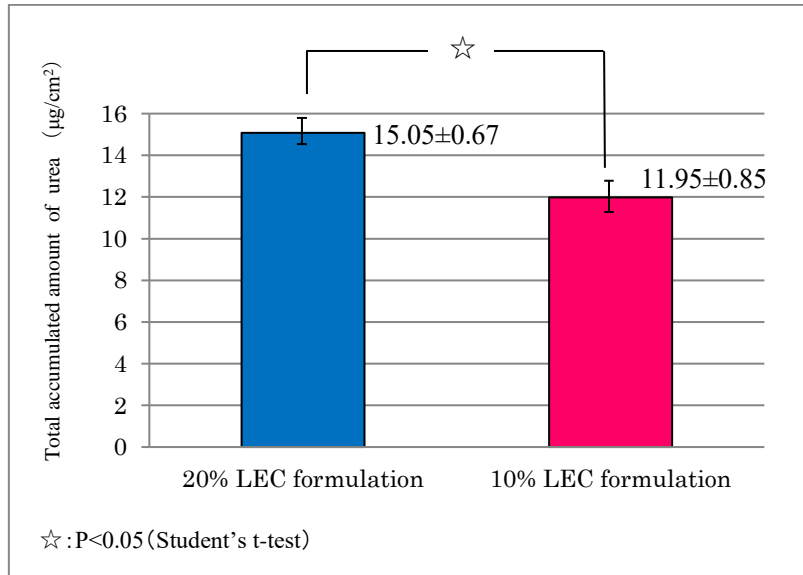


Fig. 2-5 : LEC 製剤 (20% , 10%) の総尿素移行量 (平均値 \pm S.E.(n=6))

第4節 結晶析出速度の異なる尿素製剤から角層への経時的尿素移行量

「第1章 第1節」の結晶析出速度の検討結果をもとに、塗布後の結晶析出速度が異なる製剤（20% NS 製剤と 20% LEC 製剤）を用い、角層への尿素移行量の経時変化を T-C 法で測定し比較した。2.5 時間後、5 時間後、10 時間後の各角層の尿素移行量と 10 層分の総尿素移行量の結果を、Fig. 2-6～Fig. 2-9 に示した。

テープストリッピング回数毎の尿素量において、1 回目から 10 回目までに測定できた尿素量は、両製剤とも動物毎にバラツキがみられたものの、塗布後、2.5 時間、5 時間および 10 時間ともテープストリッピング回数とともに、尿素量は少なくなった。なお、塗布後 2.5 時間では、LEC 製剤が 5 回目まで NS 製剤より高値を示したが、6 回目以降は逆に NS 製剤の方が高値を示した。しかし、全回数とも両製剤間に有意差は認められなかった。塗布後 5 時間では、1 回目、4 回目および 10 回目を除いて、LEC 製剤が NS 製剤より高値を示し、3 回目および 5 回目で有意差のある高値を示した。塗布後、10 時間では、5 回目、9 回目および 10 回目を除いて NS 製剤が、LEC 製剤より高値を示したが、全回数とも両尿素製剤間に有意差は認められなかった。なお、無塗布部位の各回数毎の尿素量においては、両製剤とも塗布後の各時間帯での大きな変動は認められなかった。

この結果から、Fig. 2-9 に示した通り、結晶析出速度の遅い LEC 製剤の方が、結晶析出速度の速い NS 製剤よりも早い時間帯に尿素が移行する傾向が示された。

検討の結果、結晶析出速度が遅い LEC 製剤は、NS 製剤より速やかに角層へ移行し、そのピークは上層の 10 層の角層に限ると、5 時間後であることが示された。

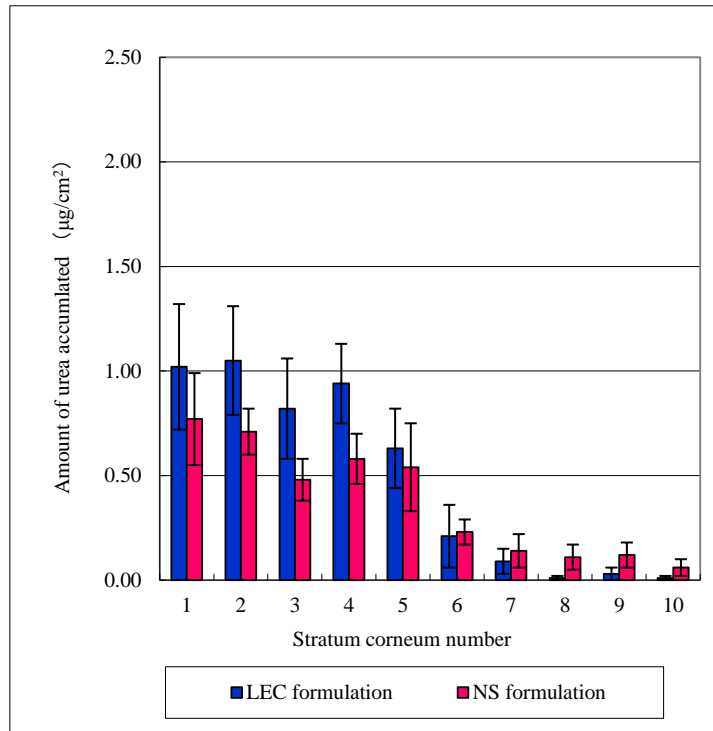


Fig. 2-6: NS 製剤と LEC 製剤から各角層の尿素移行量 (平均値±S.E.(n=6)) : 2.5 時間後

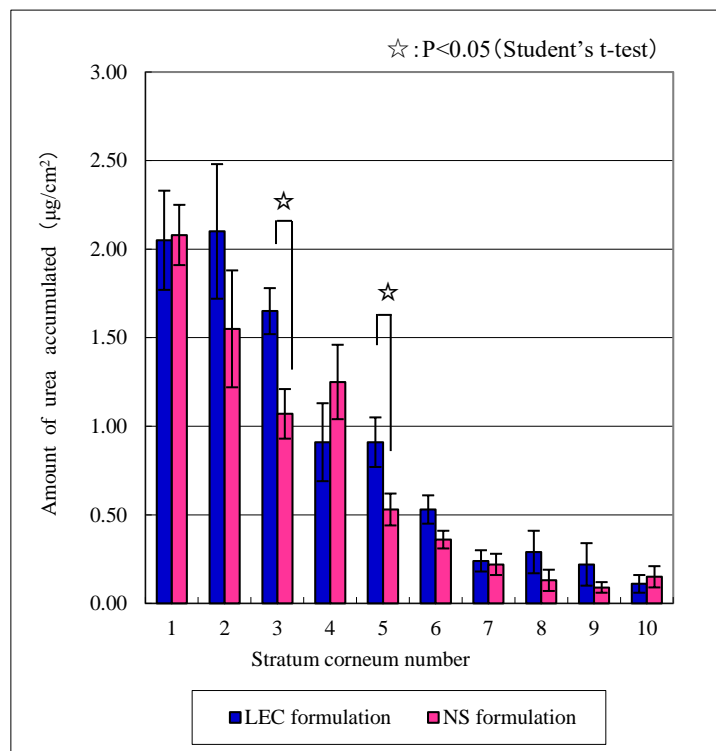


Fig. 2-7: NS 製剤と LEC 製剤から各角層の尿素移行量 (平均値±S.E.(n=6)) : 5 時間後

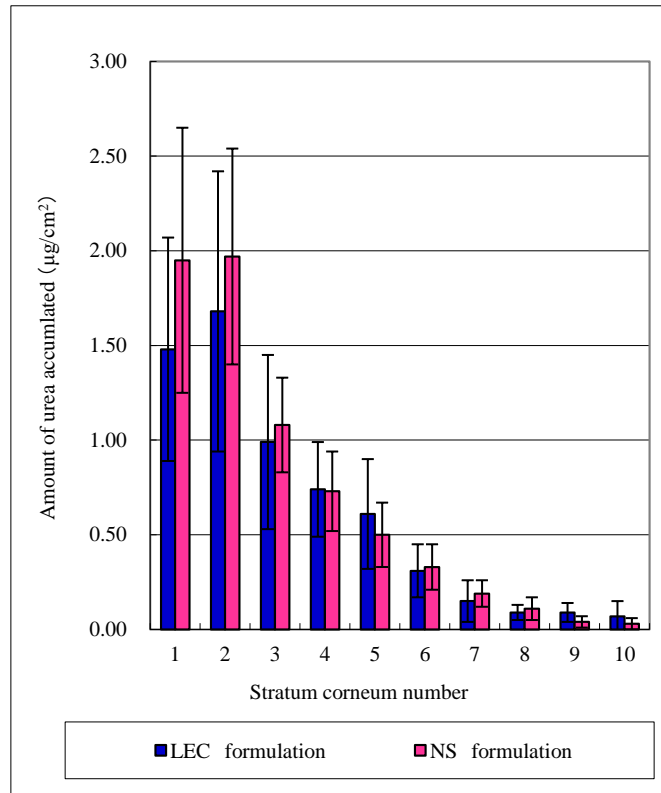


Fig. 2-8: NS 製剤と LEC 製剤から各角層の尿素移行量 (平均値±S.E.(n=6)) : 10 時間後

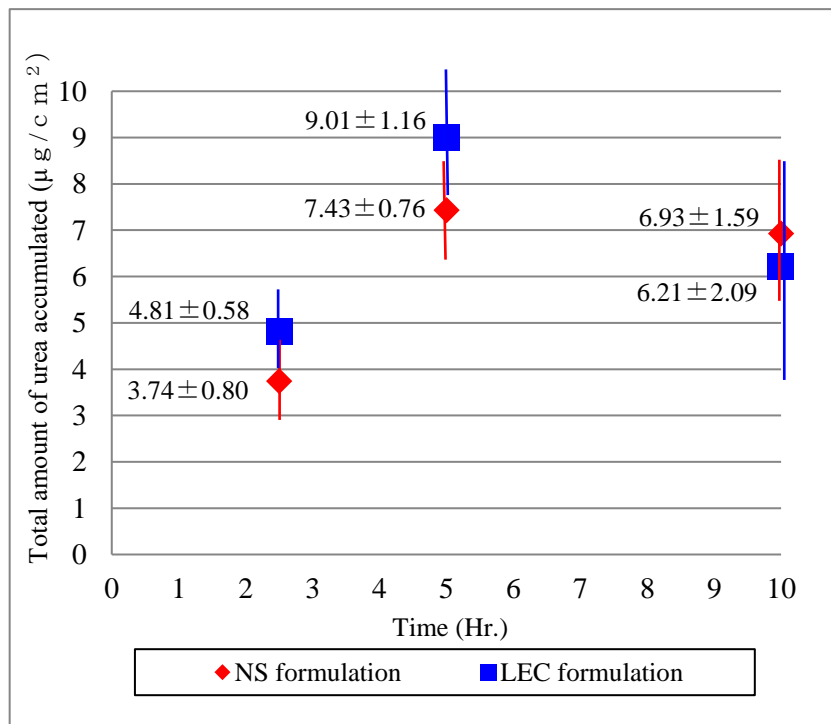


Fig. 2-9 : NS 製剤と LEC 製剤から経時的な総尿素移行量 (平均値±S.E.(n=6))

第5節 考察

本章では、角層に移行した尿素量を測定する方法として、テープストリッピングと比色定量法 (Urease-GLDH 法) を組み合わせた、新たな測定法 (T-C 法) を開発し、その有用性を確認することができた。この T-C 法を用いることで、放射性炭素 (^{14}C) などの法的な規制のある放射性同位元素 (RI) を用いず、簡便に角層中の尿素を測定できることを見出した。

本検討により、尿素 20% 配合の LEC 製剤において、T-C 法に必要となる塗布面積 (ヘアレスラット使用) は、塗布量 1400 mg に対し 50 cm^2 ($5\text{ cm} \times 10\text{ cm}$) が適切であることが示された。得られた T-C 法の試験条件 (塗布量: 1400 mg、塗布面積: 50 cm^2) を用いて、尿素配合量の異なる尿素製剤 (10%LEC 製剤, 20%LEC 製剤) の尿素移行量を確認した。その結果、10 回のテープストリッピングにより、1 回目から 7 回目まで、および 9 回目と 10 回目、さらに 10 回目の合計量において、20%LEC 製剤が 10%LEC 製剤より高値を示した。特に 4、5、6 回目のテープストリッピングでの尿素量および 10 回分の総尿素量で、有意差が認められた。一般に、溶解して存在する薬物の角層への移行速度は、薬物濃度及び薬物の皮膚/基剤間の分配係数に比例する⁴⁶⁾。したがって、この結果より、T-C 法を用いた測定においても、20%LEC 製剤が 10%LEC 製剤より多くの尿素が角層へ吸収されることが示された。実験は、同じ基剤同士の比較であることから、Fick の拡散則⁴⁷⁾ に示されている通り、製剤に含まれる尿素の濃度の差が角層への移行量の差に繋がったと考えられ^{45), 46)}、T-C 法の有用性を、確認することができた。

結晶析出速度が異なる尿素製剤 (20%LEC 製剤と 20%NS 製剤) の経時的な尿素の角層への移行量を測定した結果、20%LEC 製剤と 20%NS 製剤との間に有意差は認められなかった。しかし、塗布後 5 時間までは、NS 製剤に比べて LEC 製剤は高値を示し、塗布後 10 時間では逆に NS 製剤が LEC 製剤に比べて高値であることが示された。塗布後の各時間帯で得られた尿素量からみて、20%LEC 製剤は 20%NS 製剤より速やかに移行される傾向があると推察した。放射性炭素 (^{14}C) を標識にした尿素を用いて同様な測定を行った場合、20%尿素配合クリーム塗布後 6 時間値で $7.5\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (5 層までの合計) であることが確認されている⁴⁵⁾。本研究では、T-C 法の 5 時間値が $9.01 \pm 1.16\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (LEC 製剤塗布, 10 層までの合計) であり、 ^{14}C -尿素のラベル化法とほぼ同様の測定結果が得られる方法であることが確認できた。

本章により、適切な条件を選択することで、 ^{14}C -尿素のラベル化法に比べて法的規制が少なく、より安全で簡便な方法として T-C 法の利用が有用であることが示唆された。

第6節 小括

本研究により、適切な条件を選択することで、 ^{14}C -尿素ラベル化法に比べて法的規制が少なく、より安全で簡便な方法として T-C 法の利用が有用であることが明らかとなった。尿素配合製剤は、臨床現場において、角化症や老人性乾皮症など各種乾燥性皮膚疾患の治療に多く使用されている。尿素配合製剤において、尿素的基剤から角層への移行をいかに効率よくするかは、尿素的臨床的有効性を高める上で重要な点であり、尿素移行量を簡便に測定できる方法は、製剤設計上有用であると考えられる。その為、今後の尿素配合製剤の研究において、本研究で見出した測定法の精度がさらに向上し、多くの製剤評価に活用されることを期待する。

第3章 ラマン分光分析法を用いた20%尿素配合クリーム剤からの析出物と析出現象の新規評価法

第1節 小序

外用剤では、基剤中の薬物の状態の違いが、皮膚への薬物移行性に影響を与える。そのため、外用剤開発において、製剤中の薬物の状態を詳細に知ることは、薬効成分が適切に効果を示すかを確認する上で重要である。特に、結晶性薬物の場合、製剤中は勿論のこと、塗布後に非晶質が短時間で結晶化してしまうと角層への移行性が低下し、臨床的有効性が得られ難くなる^{25),48~49)}。

製剤中の原薬の結晶を定性的あるいは定量的に評価する方法として、近年、原薬の各結晶形に特徴的なピークが得やすいという側面から、ラマン分光⁵⁰⁾及びPXRDを用いた研究事例が多い^{51),52)}。特に、ラマン分光法の特徴の一つとして^{53),54)}、水に対するラマン散乱が弱いため、IRに比べてスペクトルが水分子の影響を受けにくく、水溶液系でのスペクトル測定が容易に行えるという特徴を有している⁵⁵⁾。そのため、ラマン分光法は、水を多く含む液体洗剤や食品^{56)~58)}などの分野でも活用が期待されており、ここでは水分を多く含むO/W型クリーム剤への活用を試みた。また、広視野ラマンスコープにおいては、簡便に広範囲を短時間で測定することができる上に、外用剤を塗布した際に生じる厚さのバラツキに影響されることなく、ラマンイメージングすることができるという特性を有する。

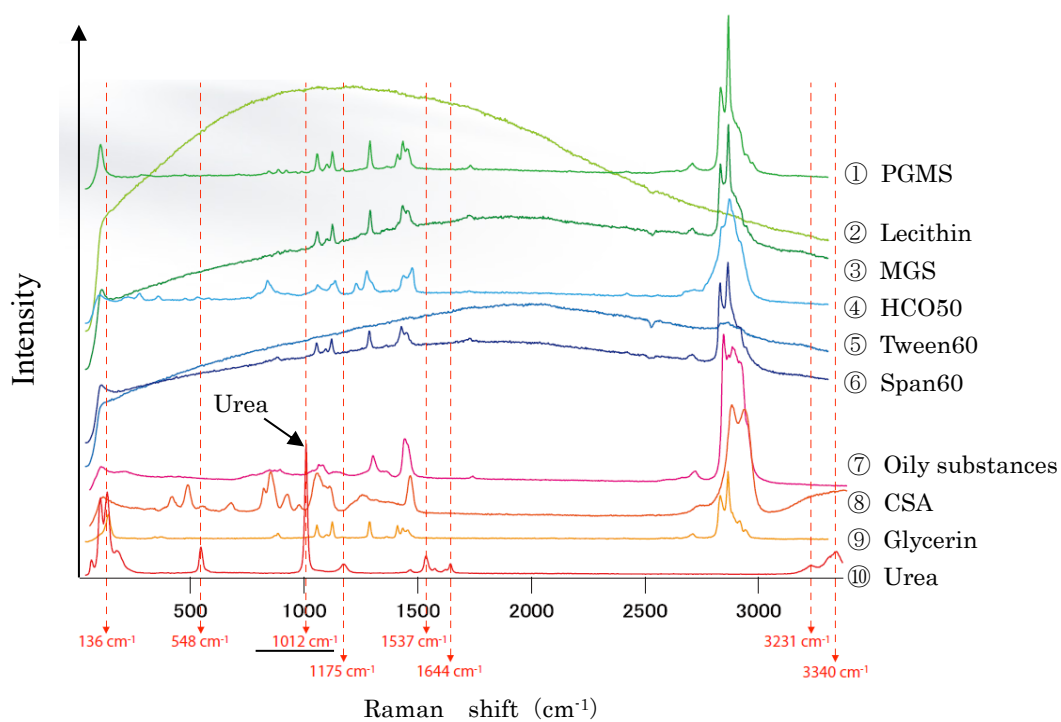
本章では、外用剤中の原薬の状態をより詳細に知る手段としてラマン分光分析に着目し、製剤をガラス面上に塗布する実験法(ガラス面上単純塗布実験法)と広視野ラマンスコープ(WRS: Wide field Raman Scope)²²⁾を組み合わせ、製剤中の薬物の状態を評価する新たな方法(Application to Glass-Wide field Raman Scope法: AG-WRS法)の有用性を見出した。さらに、「第1章 第1節」の結晶析出速度の検討結果をもとに、塗布後の結晶析出速度が異なる20%尿素配合クリーム剤(NS製剤、LEC製剤)を用い、塗布後の経時的な析出現象の違いをAG-WRS法にて検証した。その結果、AG-WRS法により、塗布後に処方異なる製剤から生成する析出物の組成が異なることが明確になった。さらに、ラマンイメージングにより、結晶析出過程におけるスペクトルの違いが可視化できるなど、従来の測定では得られなかった知見が認められた。

第2節 各製剤成分とモデル製剤のラマン分光分析

第1項 各製剤成分のラマン分光分析

広視野ラマンスコープを用いて、NS 製剤と LEC 製剤に配合した成分のラマンスペクトルを測定した。Fig. 3-1 に示した通り、尿素は、 1012cm^{-1} に鋭いピークが認められ、製剤中の他成分のスペクトルに影響されることなく容易に区別できることから、判別が可能である。そこで、両製剤 (NS と LEC) 中の尿素をラマン分光分析を行った。

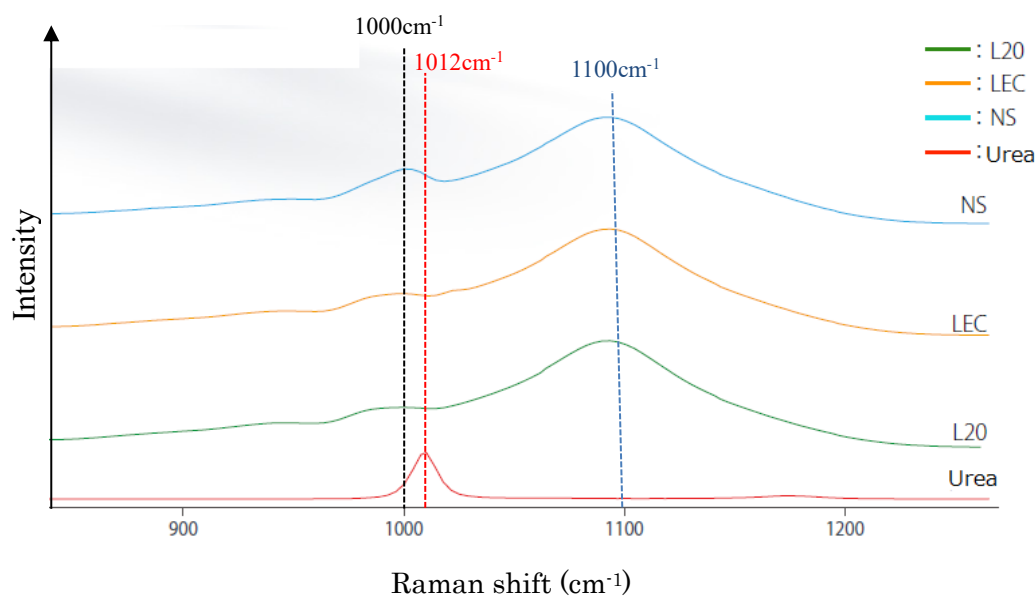
Fig. 3-1 モデル製剤の処方成分のラマンスペクトル



第2項 モデル製剤のラマンスペクトル測定

広視野ラマンスコープを用いて、NS 製剤(NS)、LEC 製剤(LEC)、20% 尿素水溶液(L20)、尿素的ラマンスペクトルを測定した。Fig. 3-2 に示した通り、尿素結晶で得られたスペクトルでは、 1012 cm^{-1} にシャープな尿素由来のピークが認められたのに対して、尿素的溶解液である L20 では、尿素的溶解状態のスペクトルと考えられる 1000 cm^{-1} 付近にブロードなピークが認められた。モデル製剤のスペクトルはいずれもブロードで、ピークは全て 1000 cm^{-1} 付近に認められた。このことから、いずれのモデル製剤においても尿素は溶解状態（非晶質）であると推察できた。なお、 1100 cm^{-1} のピークは、スライドガラス由来のピークである。

Fig. 3-2 モデル製剤のラマンスペクトル



第3節 AG-WRS 法によるモデル製剤からの析出物の経時測定

第1項 AG-WRS 法による経時的なラマン分光分析と偏光顕微鏡観察

NS 製剤 (NS)、LEC 製剤 (LEC) および 20%尿素水溶液(L20)をスライドガラスに塗布し、ラマン分光分析を開始時 (0 分)、15 分後、60 分後に行った。また、ラマンイメージング分析は、塗布後、開始時 (0 分)、15 分後、60 分後、120 分後に実施した。

Fig. 3-3 には経過時間ごとの各製剤のスペクトルを示した。また、製剤からの析出物から得られたスペクトルをもとに、マッピングしたイメージングを Fig. 3-4 に示した。イメージングのカラーコントラストは、 1000 cm^{-1} のスペクトルを紫色、 1012 cm^{-1} を赤色、 1023 cm^{-1} を緑色で示した。

塗布後の結晶析出速度が異なる NS と LEC を比較すると、Fig. 3-3 に示した通り、経時的に製剤から生成する析出物のスペクトルに差があることが確認できた。

NS は、15 分後に、L20 (尿素) と同じ 1012 cm^{-1} のピークを示し、その後はピーク位置に変化はなく、経時的にピーク強度が高まることが明らかになり、尿素の結晶成長が認められた。LEC は、開始時ではピークは認められず、15 分後から、 1023 cm^{-1} にピークが認められ、最初に尿素ではなく尿素複合体 (包接化合物) が形成されることが示唆された。その後は、ピーク位置に変化はなく尿素複合体のピークが強まることを確認した。L20 は、15 分後から約 1012 cm^{-1} にスペクトルピークが認められ、経時的にピーク強度の増加が認められた。

尿素原体の特徴的なピーク 1012 cm^{-1} 付近に着目して、各製剤からの析出物をマッピングした結果、Fig. 3-4 に示した通りであった。結晶析出速度が速い NS 製剤は、開始時に尿素の溶解状態のスペクトルピーク (1000 cm^{-1} : 紫色) が認められ、15 分後、紫色 (1000 cm^{-1}) に赤色 (1012 cm^{-1}) が混在し、時間とともに 1012 cm^{-1} (赤色) へピークがシフトすることが明らかとなった。その後、60 分後、120 分後においては、赤色 (1012 cm^{-1}) のスペクトルピークのみが示されることが確認できた。このことから、NS では尿素の結晶が 120 分の間に析出しはじめることが確認でき、尿素の結晶成長を捉えることができた。

NS の偏光顕微鏡観察では、15 分後に針状結晶が観察でき、60 分後以降は針状結晶がスライドガラス全面を覆った状態であった。

結晶析出速度が遅い LEC は、開始時、 1000 cm^{-1} (紫色)位置に弱いピークが認められ、イメージングは 15 分後には、ピークが 1023 cm^{-1} (緑色) に変化し、NS とスペクトルの変化の仕方が異なることが明らかになった。15 分後のイメージングは、紫色と緑色が混在しており、測定時間 (13 分 40 秒) の間に变化した経緯が観察できた。60 分後は、 1023 cm^{-1} (緑色) のみのピークが存在し、120 分後は、僅かに 1012 cm^{-1} (赤色) のスペクトルが 1023 cm^{-1} (緑色) のスペクトルに混在しはじめる様子が観察できた。このことから、LEC は、120

分の過程でまず最初に析出するのは、尿素ではなく尿素複合体（包接化合物）が析出し 120 分以降から尿素の結晶が僅かに析出し始めることが推察できた。

LEC の偏光顕微鏡では、析出物は板状結晶で、15 分後の結晶析出は少なく、60 分、120 分の時点においても NS に比べて偏光部の強度は弱く、結晶析出の進行が遅い傾向が認められた。（LEC 製剤の初期に見られる小さい光は、乳化粒子の液晶部である。）

L20 は、開始時、イメージングでは紫色を示し、15 分以降は赤色に変化し、Fig.2 から、L20 の析出物が 1012 cm^{-1} （赤色）のピークを示すことが明らかとなった。

L20 の偏光顕微鏡観察結果は NS に類似し、15 分後の時点で針状結晶が析出していたが、NS からの析出物に比べて大きいな結晶であった。

ラマン分光分析によるイメージングと偏光顕微鏡写真から、NS と LEC は結晶の成長状態（晶癖）が異なり、析出物の組成や分子構造も異なることが推察できた。一方、NS と L20 の晶癖は、いずれも針状で類似しており、尿素由来のスペクトルも同じ波長であることが認められた。

Fig. 3-3 時間毎のモデル製剤のラマンスペクトル比較

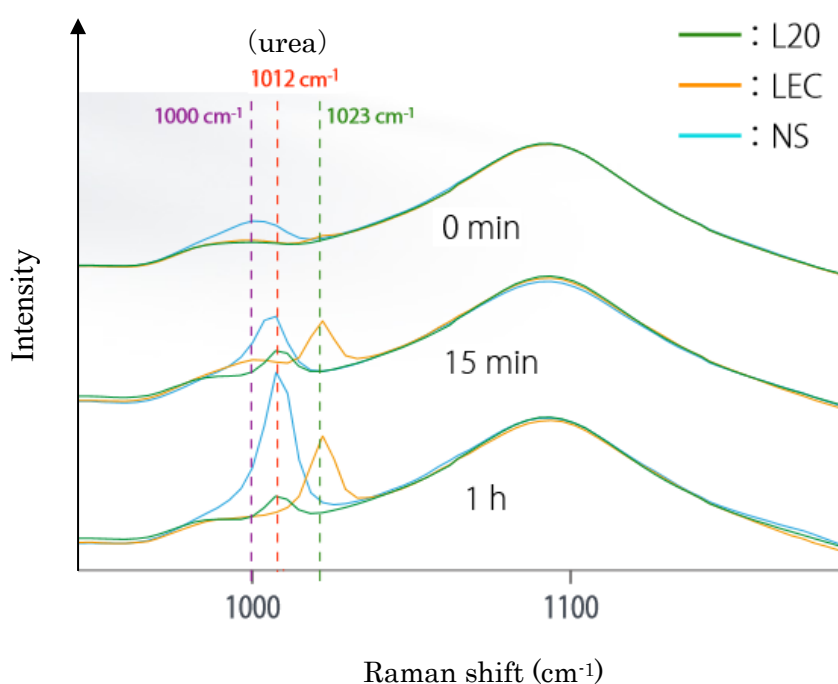


Fig. 3-4 AG-WRS 法による経時的なラマンイメージング分析と偏光顕微鏡観察
 (測定条件：湿度: 40~50%, 温度: 20~25°C)

Sample	Time after application to slide glass (min)			
	0	15	60	120
NS Raman Image				
NS photograph				
LEC Raman Image				
LEC photograph				
L20 Raman Image				
L20 photograph				
		: 1000cm ⁻¹ : 1012cm ⁻¹ : 1023cm ⁻¹		

第2項 NS (1012 cm⁻¹)、LEC (1023 cm⁻¹)、L20 (1012 cm⁻¹) のスペクトル比較

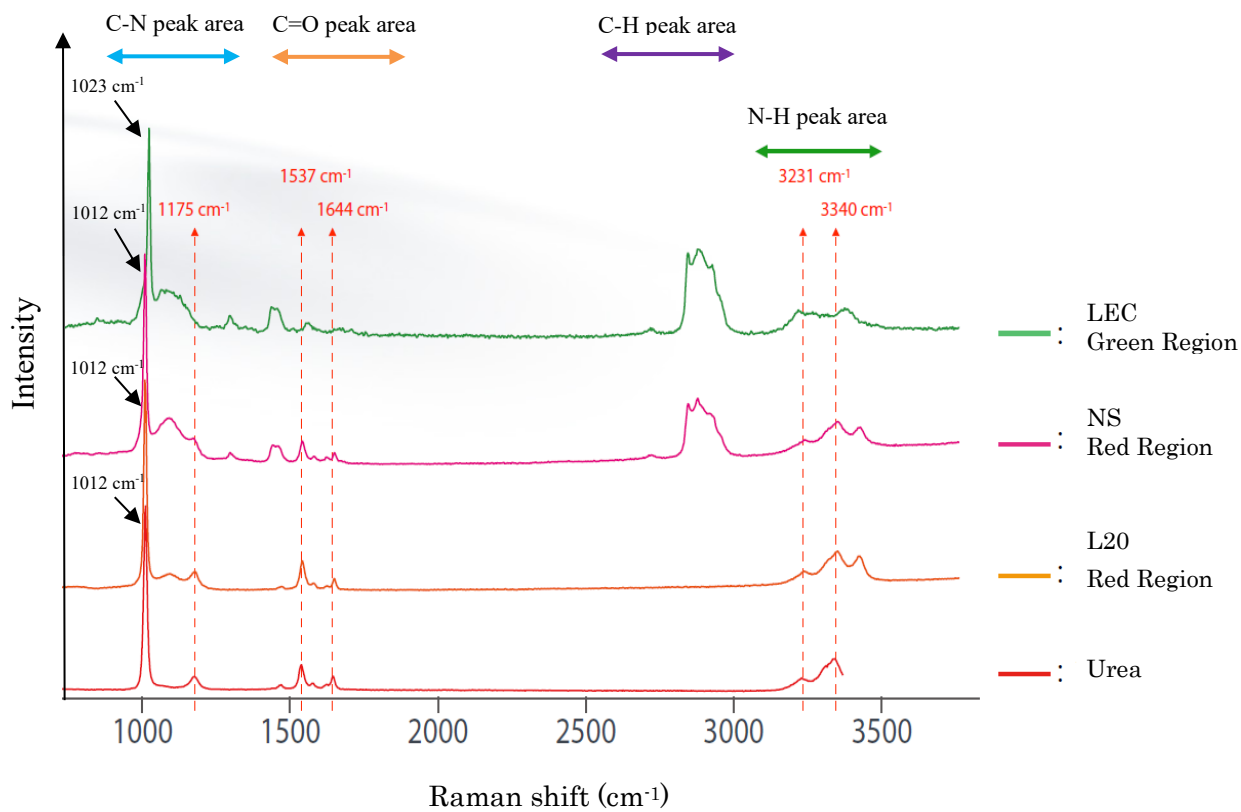
経時的なラマン分光分析によるイメージングで認められた、特徴的なNSの赤色、LECの緑色、L20の赤色の領域のスペクトルを比較した。Fig. 3-5に示す通り、NSの赤色の領域とLECの緑色の領域のスペクトルを比較した結果、共にアルキル基を含む高級アルコールや乳化剤に起因すると考えられるC-H基の振動スペクトル領域のピークが2800 cm⁻¹~3000 cm⁻¹に認められ、スペクトル形状が類似していた。

NSの赤色領域のC=O基(1500 cm⁻¹~1650 cm⁻¹)、N-H基(3100 cm⁻¹~3600 cm⁻¹)の振動スペクトル領域は尿素に似ている。一方、LECは、ピークがブロードとなり、NSや尿素と構造が異なっていることが推察された。

尿素由来の1000 cm⁻¹付近に認められる振動ピークは、尿素結晶が1012 cm⁻¹に現れるのに対し、LECで認められた緑色の領域では、1023 cm⁻¹に現れ、NSやL20で認められた赤色の領域では1012 cm⁻¹であり、違いが認められた。1000 cm⁻¹付近のスペクトルは、尿素の分子構造からC-N基の振動スペクトルと考えられ、乳化剤の違いが尿素のN-H基に影響したことが考えられた。

この結果より、NSとLECの析出物では、処方の違いにより、乾燥後にそれぞれ異なった集合構造の尿素複合体(包接化合物)が形成するため、その際に生じる水素結合の仕方の違いで振動スペクトルに差が生じたと推察された。

Fig. 3-5 LEC (緑色領域), NS (赤色領域), L20 (赤色領域) のラマンスペクトル

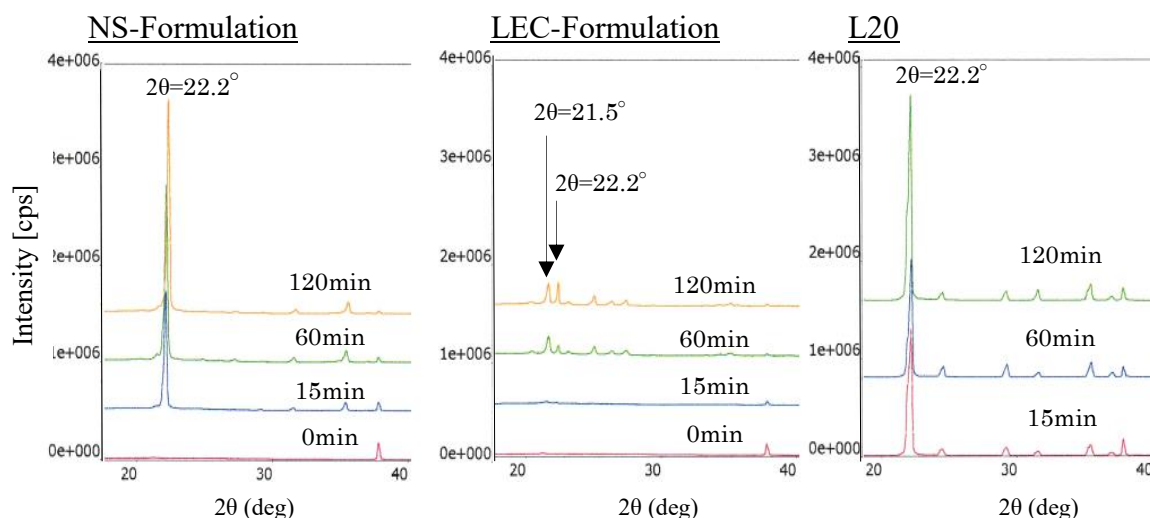


第4節 粉末X線回折(PXRD)による析出物の同定

NS 製剤、LEC 製剤、L20 をガラス板に塗布し、15 分、60 分、120 分後の析出物を含むサンプルを採取し、X線回折粉末装置を用いて測定した。Fig. 3-6 に示した通り、結晶析出が速い NS 製剤を塗布し経時的に PXRD 測定した結果、15 分後から尿素 (L20) と同じ $2\theta=22.2^\circ$ に顕著な回折ピークが認められ、時間の経過とともにそのピーク強度が強まった。結晶析出が遅い LEC 製剤を塗布し経時的に PXRD 測定した結果、NS 製剤とは異なる回折パターンが認められた。LEC 製剤の 15 分値は、非晶質の状態を示すブロードな回折パターンであったが、 $2\theta=21.5^\circ$ に僅かな回折ピークが認められ、60 分値にその強度が強まった。60 分値は、 $2\theta=21.5^\circ$ と $2\theta=22.2^\circ$ の角度に弱いピークが認められ、特徴的な回折ピークが 2 つ現れた。120 分値は、60 分値と同様に 2 つの回折ピークが認められたが、 $2\theta=22.2^\circ$ のピーク強度は、 $2\theta=21.5^\circ$ と同じ強度に変化した。

L20 を塗布後に経時的に PXRD 測定した結果、15 分値より $2\theta=22.2^\circ$ に鋭い回折ピークが認められ、60 分値、120 分値と経時的に同角度で強度が強くなることを確認した。NS、LEC、L20 からの析出物の X 線回折ピークは、ラマンスペクトルの結果と同様に各々異なることが検証できた。

Fig. 3-6 NS-Formulation、LEC-Formulation、L20 の経時的な PXRD パターン変化



第5節 NS 製剤と LEC 製剤からの析出物の顕微レーザーラマン測定

レーザーラマン顕微鏡を用いて、基剤の異なる NS 製剤と LEC 製剤の結晶析出過程を $0.8\text{ mm} \times 0.16\text{ mm}$ の範囲で微視的に観察し、イメージングにして検討した。観察は、各製剤の析出速度が異なる事から、析出物のスペクトルが変化が終了するまでとした。

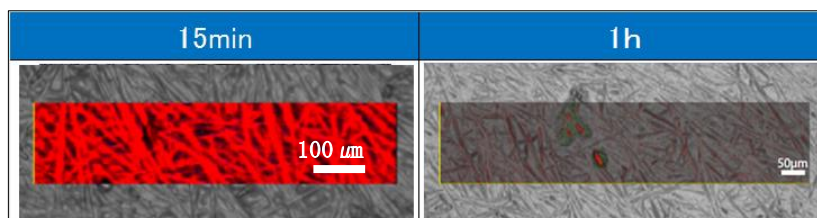
NS 製剤については、スペクトルが異なる結晶の析出が観察された塗布 15 分後と、1 時間後の結晶状態を観察した。LEC 製剤も同様にスペクトルが異なる結晶の析出が観察された、15 分後と 8 時間後の状態を観察した。

その結果、Fig. 3-7 に示した通り、結晶析出が速い NS 製剤は、15 分後の観察では、 1012 cm^{-1} (赤色) の針状結晶が認められ、1 時間後の観察では、針状結晶を取り巻くように 1023 cm^{-1} (緑色) の結晶の析出が認められた。

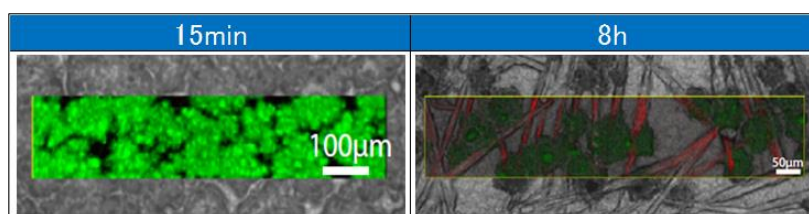
一方、結晶析出が遅い LEC 製剤では、15 分後に 1023 cm^{-1} (緑色) の粒状の結晶のみが観察され、8 時間後の観察でその粒状の結晶とは別に 1012 cm^{-1} (赤色) の針状結晶が発生し、混在する状態が確認できた。この結果から NS 製剤と LEC 製剤では、塗布後の乾燥において、製剤中で生じる結晶の形成過程が異なることが明らかとなった。

Fig. 3-7 NS 製剤と LEC 製剤からの析出結晶の顕微ラマンイメージング

①NS Formulation



②LEC Formulation



■ : 1012 cm^{-1} ■ : 1023 cm^{-1}

第6節 考察

本章では、ラマン分光法を用いてモデル製剤とした尿素配合クリーム剤の各成分を測定した結果、 1012 cm^{-1} に尿素固有のスペクトルピークを確認でき、さらに界面活性剤などの他の成分が尿素固有ピークに影響を及ぼさないことから、モデル製剤（尿素配合クリーム）中の尿素的定性分析にラマン分光法が活用できることが確認できた。

実体顕微鏡用対物レンズとレーザービーム走査システムを有する広視野ラマンスコープとガラス面上単純塗布法を組み合わせる方法（AG-WRS法）で、尿素製剤中で生じる結晶状態の経時変化を簡便にイメージング分析できることが確認できた。

AG-WRS法を用いて、結晶析出速度が異なる尿素20%配合クリーム剤（NS、LEC）とL20の結晶析出状態を経時的にラマン分光分析した結果、析出物の尿素由来のラマン波長のピークは、尿素が 1012 cm^{-1} であるのに対し、NSでは 1012 cm^{-1} 、LECでは 1023 cm^{-1} 、L20では 1012 cm^{-1} に認められた。 1000 cm^{-1} 付近のスペクトル領域は、尿素の分子構造からC-N基の振動スペクトル（ $700\text{ cm}^{-1}\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ ）と考えられ、尿素のアミノ基への影響が推察された。さらにスペクトルが変化する時間から、LECの結晶析出速度がNSに比べて遅いことが確認できた。イメージングからは、結晶析出速度が遅いLECのラマンスペクトルは、結晶析出速度が速いNSやL20とは尿素由来のスペクトルが異なり、析出物の組成や分子構造が違ふことが示唆された。

AG-WRS法によるイメージングと偏光顕微鏡写真は、ともに同様な変化を捉えることができたが、AG-WRS法によるマッピング測定を加えることで、結晶析出状態を見るだけでなく、写真で確認できない析出物の組成や分子構造の違いを非破壊で経時的に測定でき、有用な評価法であることが明らかとなった。

NS製剤からの析出物（赤色）とLEC製剤からの析出物（緑色）の比較では、スペクトル全体の形状は類似していたが、C-N基の振動スペクトル領域（ $700\text{ cm}^{-1}\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ ）、C=O基の振動スペクトル領域（ $1515\text{ cm}^{-1}\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ ）、N-H基の振動スペクトル領域（ $3100\text{ cm}^{-1}\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ ）のピーク形状に違いが認められた。特に、 1537 cm^{-1} のピークにおいては、NS製剤とLEC製剤に顕著に差が認められ、「第1章第5節：赤外吸収スペクトル（IR）測定による析出物の同定」の違いと一致することが確認できた。この結果から、NSとLECの析出物では、添加した乳化剤の違いで、尿素が有する官能基であるC-N基、C=O基、N-H基の状態が異なり、結晶析出速度の違いや結晶構造の違いに影響することが推察された。

すでに、尿素は直鎖状炭化水素やその誘導体と尿素複合体を形成することが知られている^{59~62}。LECやNSの処方成分には、分子中に直鎖状炭化水素の構造をもつ高級アルコールや乳化剤が配合されているため、両製剤中でも処方成分と尿素の複合体を形成する可能性が十分に考えられる。そのため、NSとLECの処方の違いにより、分子同士の相互作用に差が生じ、析出物のラマンスペクトルにも違いが生じることが推察された。

NS製剤、LEC製剤、L20のPXRDによる測定では、X線回折ピークが各製剤で異なり、

それぞれ析出物の構造が異なることが明らかとなった。特に、LEC 製剤からの析出物は、15 分後では、ほぼ非晶質の状態であったが、ラマン分光分析では、 1000 cm^{-1} から 1023 cm^{-1} へのスペクトルの変化が確認できた。PXRD の回折パターンを加味して考えると、LEC の 1023 cm^{-1} (緑色) のスペクトル成分は、NS の 1012 cm^{-1} (赤色) のスペクトル成分に比べて、結晶化しにくい構造の組成物であることが推察できた。

レーザーラマン顕微鏡による微視的観察から、結晶析出が速い NS 製剤は、最初に 1012 cm^{-1} (赤色) のスペクトルをもつ針状結晶が析出し、その後、 1023 cm^{-1} (緑色) のスペクトル成分が針状結晶の周りに集まる過程をとることを確認した。一方、結晶析出が遅い LEC 製剤は、先に 1023 cm^{-1} (緑色) のスペクトルをもつ粒状結晶が発生し、その後、 1012 cm^{-1} (赤色) のスペクトルをもつ針状結晶が析出してくることから、処方の違いにより尿素由来の析出物の発生順序が異なることが明らかとなった。

本章により、AG-WRS 法は、スペクトル分析やイメージング分析を同時に行えることで、外用剤表面を化学的、定性的かつ視覚的に評価できることが明らかとなった。さらに、測定サンプルは、前処理をすることなく、そのままの状態でも測定できることから、析出状態を経時的に評価する上で有用であった。

第7節 小括

本研究により、AG-WRS 法は、スペクトル分析やイメージング分析を同時に行えることで、外用剤を化学的、定性的かつ視覚的に評価できることが明らかとなった。さらに、測定サンプルは、前処理をすることなく、そのままの状態でも測定できることから、析出状態を経時的に評価する上で有用であった。しかし、より詳しく外用剤からの有効成分の結晶析出状態を評価するには、従来から用いられている PXRD や熱分析などから得られた情報を組み合わせることで、より詳細な考察が可能となる。

今後は、さらなる装置性能の発達により、より広い範囲を短時間で測定できるようになり、サンプル表面をより網羅的に評価できることを期待したい。また、AG-WRS 法は、塗布後の外用剤変化を迅速かつ簡便に評価できることから、外用剤の製剤設計への活用は勿論のこと、外用剤を混合する際に生じる配合変化の確認などで広く活用されることを期待する。

第4章 総括

結晶析出抑制による皮膚移行性の向上を目指したクリーム剤の製剤設計研究として、近年、皮膚角化症や老人性乾皮症などの乾燥性皮膚疾患に広く用いられている『尿素配合クリーム剤』に着目した。その中でも、処方構成上、尿素の溶解性を確保する十分な水分を配合しにくい 20%以上配合する尿素外用剤に取り組み、基剤の違いにより塗布後の尿素的結晶析出速度や結晶形状に違いがあることを発見した。その現象をもとに、析出物の物性評価、皮膚への移行性の違いを評価、さらには製剤中の原薬の状態を測定し、皮膚移行性との関係を検討した。

第1章の『20%尿素配合クリーム剤からの結晶析出速度と析出物の物性評価』では、LEC製剤はNS製剤に比べ結晶析出時間が遅く、塗布後、結晶が析出しにくいことが明らかとなった。PXRDとPXRD-DSCを実施した結果、NS製剤は尿素と尿素複合体の回折ピークが混在し、LEC製剤は尿素複合体の回折ピークのみで、両製剤ともに尿素的回折ピークと異なることが明らかになった。DSC測定では、尿素的融解ピークが135℃付近であるのに対し、両製剤からの析出物の融解ピークは、共に尿素に対して23～25℃低い結果であった。また、NS製剤のみに、140℃付近に融解ピークが認められ、尿素が結晶化する傾向が示唆された。FT-IRによる測定では、NS製剤とLEC製剤からの析出物は、共に尿素を主体の構造を有することが同定できた。また、析出速度が遅かったLEC製剤を用い、処方成分が尿素に与える影響を確認した結果、LEC製剤は、添加される処方成分の影響で、X線回折ピーク全体を弱め、非晶質化する傾向が示唆された。この結果から、レシチンとセトステアリルアルコール（高級アルコール）の組み合わせは、NS製剤に比べて尿素複合体(包接化合物)の形成しやすい処方構成であり、塗布後に生じる尿素的結晶化に大きく関与していることを明らかにすることができた。

第2章の『テープストリッピングと比色定量法を用いた角層中に貯留した尿素的の新規評価法』では、放射性同位元素(RI)を使わずに角層に移行した尿素的量を測定する簡便な方法として、T-C法を見出すことができた。

T-C法に必要な塗布量を、20%尿素配合製剤を用いて検討した結果、塗布面積50 cm²(5 cm×10 cm)に対し、1400 mgを塗布条件にすることで適切に尿素的移行量を測定できた。

得られたT-C法の試験条件を用いて、尿素的配合量の異なる尿素製剤の尿素的移行量を確認した結果、20%LEC製剤が10%LEC製剤より多くの尿素的が角層へ吸収されたことが検証できた。また、結晶析出速度が異なる尿素製剤を用いて、経時的な角層への尿素的移行量を比較した結果、有意差は認められなかったが、塗布後5時間まではNS製剤に比べてLEC製剤は高値を示し、20%LEC製剤が20%NS製剤より速やかに吸収される傾向が示された。

本研究で尿素的配合量が異なる製剤の角層への尿素的移行量と尿素的の結晶析出速度が異なる製剤の経時的な角層への尿素的移行量を評価できたことから、¹⁴Cなどの放射性炭素を用いな

い簡便な測定方法となる T-C 法の有用性を検証できた。

第 3 章の『ラマン分光分析法を用いた 20%尿素配合クリーム剤からの析出物と析出現象の新規評価法』では、広視野ラマンスコープを用いた新手法 AG-WRS 法を用いて、結晶析出速度が異なる 20%尿素配合クリーム剤 (NS、LEC) と 20%尿素水溶液 (L20) の結晶析出状態を経時的にラマン分光分析し、評価することができた。その結果、析出物の尿素由来のラマン波長のピークは、尿素が 1012 cm^{-1} に対し、NS : 1012 cm^{-1} 、LEC : 1023 cm^{-1} 、L20 : 1012 cm^{-1} と基剤によって異なることを検証できた。さらにスペクトルが変化する時間から、LEC の結晶析出速度が NS に比べて遅く、その違いは、NS 製剤が尿素の結晶から析出し始めるのに対し、LEC 製剤は尿素複合体 (包接化合物) が先に形成されてくることから、析出速度の違いに影響していることが示唆された。イメージングからも、結晶析出速度が遅い LEC のラマンスペクトルは、結晶析出速度が速い NS や L20 とは尿素由来のスペクトルが異なり、析出物の組成や分子構造が異なることが推察できた。AG-WRS 法によるイメージングと偏光顕微鏡写真は同様な変化を捉えたが、AG-WRS 法によるマッピング測定を加えることで、写真で確認できない析出物の組成や分子構造の違いを非破壊で同時に測定でき、有用な評価法になると考えられた。さらに、顕微レーザーラマン測定により、結晶析出速度の違う NS と LEC で、尿素由来の析出物の発生順序や発生の仕方に違いがあることを可視化して確認できた。

本研究により、処方構成を工夫することで、尿素をはじめとした結晶性薬物の析出を抑制でき、冬季を想定した環境下においても、塗布後の溶解 (非晶質) 状態を維持できる可能性を見出した。また、T-C 法の活用により、溶解状態 (非晶質) をより長い時間維持させることで、薬物の角層への移行性を高め臨床性効果の向上に繋がることを明らかにすることができた。加えて、AG-WRS 法を用いることで、塗布後のクリーム剤中の薬物状態を可視化することができ、物性変化を詳細かつ迅速に捉えられることを見出した。AG-WRS 法は、従来の PXRD や熱分析などの分析法と組み合わせることで、塗布後に生じるクリーム剤中の薬物状態の情報をより詳細かつ迅速に得られることができ、外用剤開発の検討において有用な分析手法となる。さらに AG-WRS 法の特徴から、製剤設計への活用は勿論のこと、院内調剤などで異なる外用剤を混合する際に生じる配合変化においても、薬物や賦形剤との相互作用を迅速に知る手段としても活用されることが期待できる。

今後、本研究で得られた成果や新たに見出した評価法が広く用いられることにより、処方技術が進展し、さらに高品質な外用剤の開発に発展することが考えられる。

第5章 実験の部

第1節 第1章の実験に関して

1) 試料

- ・モデル製剤（水中油型（Oil in Water: O/W 型）クリーム剤）
 - ①NS 製剤 ②LEC 製剤
- ・20%尿素水溶液

<モデル製剤処方>

component	suppliers	amount	
		NS formulation	LEC formulation
Urea	JUNSEI CHEMICAL CO.,LTD.,Tokyo,Japan	20.0	20.0
Oily Substances	various sources	15.0	15.0
Cetostearyl Alcohol (CSA)	KOKYU ALCOHOL KOGYO CO., LTD.,Chiba,Japan	4.0	4.0
Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil 50 (HCO 50)	NIKKO CHEMICALS CO.,LTD.,Tokyo,Japan	1.0	0.0
Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate	NIKKO CHEMICALS CO.,LTD.,Tokyo,Japan	1.0	0.0
Sorbitan Monostearate	NIKKO CHEMICALS CO.,LTD.,Tokyo,Japan	0.4	0.0
Purified Soybean Lecithin (Lecithin)	TSUJI OILMILLS CO.,LTD,Mie,Japan	0.0	0.8
Propylene Glycol Monostearate	Nihon Emulsion CO.,LTD.,Tokyo,Japan	0.0	0.8
Glyceryl Monostearate	NIKKO CHEMICALS CO.,LTD.,Tokyo,Japan	0.0	0.8
Glycerin	NOF CORPORATION, Tokyo,Japan	10.0	10.0
Purified Water	YOSHIDA PHARMACEUTICAL CO.,LTD.,Tokyo,Japan	48.6	48.6
Total		100.0	100.0

2) モデル製剤の調製方法

Water Phase		Oil Phase
Urea		Oily additives
Glycerin		Cetostearyl Alcohol
Purified Water		Surfactants
Heating · Mixture		Heating · Mixture
	Mixture	
	Homogenizer Mixture	
	Cooling	
	O/W emulsion	

モデル製剤処方にに基づき、3 kg の製造スケールで調製した。水相は、有効成分となる尿素とグリセリン、精製水とし、油相は、無極性油と極性油を含むオイル、乳化剤^(※)、セトステアリルアルコールとした。各相を 80°Cまで攪拌しながら加温溶解した。その後、油相に水相を添加し混合した。次に、真空乳化装置 (PVQ-5UN : みづほ工業製 (大阪, 日本)) を用いて、真空下(40 cm/Hg)でホモミキサー (homomixer: HM) の回転数を 3500 rpm (rotation per minute)、アンカーの回転数を 70 rpm で攪拌する。攪拌下で冷却を開始し、40°Cで HM 攪拌を止め、35°Cまで冷却してモデル製剤とした。

(※) 乳化剤

NS 製剤 : ポリオキシエチレン (50) 硬化ヒマシ油、モノステアリン酸ポリオキシエチレン (20) ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン

LEC 製剤 : 精製大豆レシチン、モノステアリン酸プロピレングリコール、グリセリンモノステアレート

3) 20%尿素水溶液の調製方法

80g の精製水に 20g の尿素を投入し、室温にてスターラーで 15 分攪拌溶解し、溶けたことを確認してサンプルとした。

4) 偏光顕微鏡観察によるガラス面上単純塗布実験法²¹⁾

ガラス面上単純塗布実験法は、まず被検試料を 60mm×26mm のスライドガラス上に約 20mg 採取する。マイクロスパーテルで薄く延ばし、スライドガラス全面に均一になる様、塗布する。塗布後、湿度 40~50% (温度 20~25°C) の低湿度環境下に開放放置し、結晶成長状態を顕微鏡で経時観察した。観察方法は、結晶を明確にさせる為、偏光顕微鏡 (偏光顕微鏡 BH 型、BX-50 型 オリンパス光学工業製 (東京, 日本) : 対物レンズ 100 倍) で観察した。

顕微鏡観察は 2 時間行い、0 分 (開始時)、15 分、60 分、120 分に写真撮影を行った。

5) 粉末 X 線回折測定 (PXRD)

ガラス面上単純塗布実験法を参考に、NS 製剤、LEC 製剤、20%尿素水溶液をガラス板に塗布し、被検サンプルとした。6 時間開放放置後 (室温 20~25°C、相対湿度 40~50%)、析出物を含むサンプルを採取し、X 線回折装置 (Mini Flex600 : Rigaku 社製 (東京, 日本)) にて粉末 X 線回折測定を行い比較した。塗布量は、3.2 mg/cm² の割合でガラス板に均一にのばしてサンプルとした。

測定条件は、次表とした。

< PXRD 測定条件 >

Parameter	Description
X-ray Source	CuK α
Scan Mode	Continuous
X-ray tube voltage-current	40kV-15mA
Scan axis	2 θ / θ
Scan range(2 θ)	2.0~50.0 deg
Scan speed	10.0 deg/min.
Samping interval	0.02 deg/step

6) 析出結晶物の示差走査熱量測定 (DSC)

ガラス板上に塗布量：3.2 mg/cm²の割合で、被験サンプルを均一に塗布した。その後、6時間開放放置し（室温 20~25℃、相対湿度 40~50%）、析出物を含むサンプルを採取し、熱分析装置（Thermo Plus DSC8230：Rigaku 社製（東京，日本））で、DSC を実施した。測定は窒素気流下（40 mL/min）で行い、その条件は、開始温度：20℃、終了温度：150℃、昇温速度は、5.0℃/min、容器：アルミニウム（Al）密閉パンとした。

7) 粉末 X 線回折-示差走査熱量同時測定 (PXRD-DSC)

ガラス面上単純塗布実験法を参考にし、NS 製剤、LEC 製剤、20%尿素水溶液を 3.2 mg/cm²の割合でガラス板に塗布し、均一に伸ばして被検サンプルとした。6時間開放放置後（室温 20~25℃、相対湿度 40~50%）、サンプルを採取し、全自動水平型 X 線回折装置 SmartLab / PXRD-DSC Manage（Rigaku 社製（東京，日本））にて、PXRD-DSC を実施し、比較した。測定条件は、下表とした。

< PXRD-DSC 測定条件 >

Parameter	Description
X-ray Source	CuK α
Scan Mode	Continuous
X-ray tube voltage-current	45 kV-200 mA
Scan axis	2 θ / θ
Scan range(2 θ)	3.0~40.0 deg
Scan speed	80 deg / min.
Samping interval	0.02 deg / step
Start temperature	Room temperature (r.t.)
End temperature	150 °C
Temperature rising speed	5.0 °C/min.
N ₂ flow rate	50 mL/min.
sample vessel	open pan (Al)
Detector	1D high-speed detector (D / teX Ultra250)

8) LEC 製剤での尿素結晶に与える処方成分の影響

LEC 製剤をもとに尿素に処方成分を順番 (No.1→2→3→4) に 1 g ずつ配合し、4 つのサンプルを作製した (下表参照)。サンプルは、るつぼに入れ、混合後 145°C まで加温し熔融させた後、自然放冷して製した。製した各々のサンプルは乳鉢中で軽く粉碎して、X 線回折測定で評価した。

<尿素と LEC 処方成分の組み合わせ (カッコ内は混合比率) >

No.	Sample (mix rate)
1	Urea
2	Urea+Cetostearyl alcohol (1:1)
3	Urea+Cetostearyl alcohol+Lecithin (1:1:1)
4	Urea+Cetostearyl alcohol+Lecithin+Glycerin (1:1:1:1)

9) 赤外吸収スペクトル(IR) 測定による析出物の同定

ガラス面上単純塗布実験法を参考に、NS 製剤、LEC 製剤をガラス板に塗布し、被検サンプルとした。6 時間開放放置後 (室温 20~25°C、相対湿度 40~50%)、被検サンプルを数 mg とり、メノウ乳鉢と乳棒で十分粉碎し、KBr を加えて更に均一になるまで、約 5 分混合粉碎した。錠剤成型器で円盤状に成形したサンプルを、FT-IR (フーリエ変換赤外線分光分析) 測定し、尿素と比較した。

測定装置は、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-210 型 : HORIBA (京都, 日本)) を使用した。

測定条件は、KBr 法に従い、測定波数範囲 : 400~4000 cm^{-1} 、Scan 回数 : 20 回、測定分解能 : 4 cm^{-1} とした。

第2節 第2章の実験に関して

1) テープストリッピング・比色定量法 (T-C 法)

T-C法では、一定の塗布面積に検体を均一に塗布し、冬季の乾燥環境を想定して、10～30分間冷風乾燥し、試験時間後にテープストリッピングを10回行い、各層での角層に含まれる尿素量と10回の合計尿素量を比色定量法 (Urease-GLDH法) で測定した。

塗布量の設定は、既知文献である深堀らの報告⁴⁵⁾で使用された¹⁴C-尿素クリーム剤の塗布量 (50 mg) と塗布面積 (1.77 cm²) の単位面積当たり量 (28.25 mg/cm²) から算出される概算量の約28 mg/cm²を参考に、単位面積当たり量に塗布面積をかけて算出した。

(1) 動物への検体塗布方法およびテープストリッピングによる角層剥離方法^{28~34)}

検体を塗布後、設定した試験時間が経過した後に40℃に加温した注射用蒸留水 (大塚製薬社製, 東京, 日本) を含ませた脱脂綿を用いて、残留した検体を除去する操作を4回行った。その後、ドライヤーで乾燥させた後、塗布面積に合わせて裁断したビニールテープ (日東電工社製) を検体の塗布部に貼付して剥離した。この操作を10回繰り返し、角層を10枚採取した。それ以外に、ブランク測定用として、テープストリッピングを行わない同じサイズのビニールテープ2枚を検体とした。

(2) テープストリッピングした角層中の尿素定量法

採取したビニールテープを15 mLのエタノールの入ったサンプル瓶に入れて浸漬し、密栓して1日放置した。放置後、強力振盪機 (レシプロシェーカーSR-II : タイテック株式会社製, 埼玉, 日本) を用いて、約30分間浸盪した。その後、15 mLから10 mLをガラス製試験管に分取し、窒素ガスによりエタノールを除去した。1 mLの注射用蒸留水を用いて内壁全てに接触するように残留物と混和させ、遠心操作 (3000 rpm, 15分) 後、得られた液部を用いて尿素を定量した。

尿素の測定は、Urease-GLDH法^{38~42)}により生化学自動分析装置 (AU400, オリンパス光学株式会社, 東京, 日本) を用いて、吸光度 (測定波長 : 340 nm) で測定し、得られた結果から塗布面積当たりの尿素量を算出した。また、比色定量にはUrease-GLDH用の測定試薬キット (LタイプワコーUN2, 和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本)) を使用した。尿素の測定範囲は0.81～428 mg/dLあり、「μg/cm²」の換算値は分析におけるサンプル分取量から算出し0.24～128 μg/cm²である。

2) 塗布面積（塗布量）と尿素移行量の測定

【試験検体】 20%LEC製剤

【試験系】

動物：9週齢の雄HWY/Slcヘアレスラット（3匹）

群構成：3匹/群

<塗布面積 (50 cm²) 及び塗布量>

Model formulation	Application area	Quantity	Number (animal No.)
20 % LEC Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site	2 (101~102)
No application	50 cm ² ×1 site	—	1 (401)

3) 尿素含量（10%, 20%）の異なる製剤での尿素移行量測定

【試験方法】

尿素含有量の異なる製剤の皮膚への移行量を検証するため、ヘアレスラットを用いて、10%LEC製剤と20%LEC製剤の塗布後の角層に移行した尿素量を測定し比較した。両製剤の塗布量は1400 mgとし、塗布面積は50 cm²（5 cm×10 cm）とした。塗布後に、冬季の乾燥環境を想定してドライヤーで30分間送風乾燥を行い、その後5時間目の移行量を測定した。測定はT-C法に従い、塗布部位の皮膚をテープによる10回のストリッピングを行った。剥離した角層に吸収された尿素量を定量化し、各層での吸収量と10回の合計尿素量を求めた。

【試験検体】 10%LEC製剤、20%LEC製剤

【試験系】

動物：9週齢の雄HWY/Slcヘアレスラット（12匹）

群構成：6匹/群 2群

<試験群、10% LEC と 20 % LECの塗布面積 (50 cm²) 及び塗布量>

Group	Model formulation	Application area	Quantity	Number (animal No.)
1	No application	50 cm ² ×1 site	—	6 (101~106)
	20 % LEC Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site	
2	No application	50 cm ² ×1 site	—	6 (201~206)
	10 % LEC Formulation	50cm ² ×1 site	1400 mg×1 site	

4) 結晶析出速度の異なる尿素製剤から角層への経時的移行量測定

【試験方法】

基剤の違いにより、塗布後の結晶析出速度が異なる製剤（20%NS製剤と20%LEC製剤）を用い、角層への尿素移行量の経時変化をT-C法で測定し比較検証した。両製剤とも、塗布量は、1400 mgとし、塗布面積は50 cm²（5 cm×10 cm）とした。

検体塗布後は、ドライヤーで10分間送風乾燥し、その後、2.5時間目、5時間目及び10時間目の尿素移行量を測定した。測定はT-C法に従い、塗布部位の皮膚をテープによる10回のストリップングを行い、剥離した角層に吸収された尿素量を定量化し、各層での吸収量と10回の合計尿素量を求めた。

【試験検体】 20 %NS 製剤、20 %LEC 製剤

【試験系】

動物：9週齢の雄HWY/Slcヘアレスラット（36匹）

群構成：6匹/群 6群

<試験群、20 % NS と 20 % LECの塗布面積（50 cm²）及び塗布量>

Group	Model formulation	Application area	Quantity	Time (hr)	Number (animal No.)
1	No application	50 cm ² ×1 site	—	2.5	6 (101~106)
	LEC Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site		
2	No application	50 cm ² ×1 site	—	5	6 (201~206)
	LEC Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site		
3	No application	50 cm ² ×1 site	—	10	6 (301~306)
	LEC Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site		
4	No application	50 cm ² ×1 site	—	2.5	6 (401~406)
	NS Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site		
5	No application	50 cm ² ×1 site	—	5	6 (501~506)
	NS Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site		
6	No application	50 cm ² ×1 site	—	10	6 (601~606)
	NS Formulation	50 cm ² ×1 site	1400 mg×1 site		

5) 統計学的方法

実験結果は、動物毎のテープストリップング回数毎および10回のテープストリップング回数の合計の尿素量（μg/cm²）とし、各群で平均値と標準誤差を算出した。群間比較は、テープストリップング回数毎の尿素量と10回のテープストリップング回数の合計量についてStudentのt検定を行った。有意水準は危険率5%未満（p<0.05）を有意とした。

なお、同一動物において、同じテープストリップング回数で無塗布部位の尿素量が検体塗布部位の尿素量より高値を示した時は、検体塗布部位の尿素量はゼロとして表示した。

第3節 第3章の実験に関して

1) 広視野ラマン分光分析²²⁾

測定装置：広視野ラマン스코ープ：RAMAN view (nano photon 社製、大阪,日本)

<広視野ラマン스코ープ 測定条件>

Parameter	Operating conditions
Excitation wavelength	532 nm
laser intensity	200 mW (L20: 51 mW)
Exposure time	0.3 s/point
Objective Lens	1×
Measurement area	5×5 mm
The number of the imaging pixels	50×50 pixel
Laser spot scanning interval	100 μm
Measurement time	13 min 40 s

2) AG-WRS 法によるモデル製剤からの析出物の経時測定

ガラス面上単純塗布実験法に従い、NS、LEC および L20 をスライドガラスに塗布し、開始時 (0 分)、15 分後、60 分後に広視野ラマン스코ープを用いたラマン分光分析を行った。また、同様にラマンイメージング (マッピング測定) を、塗布開始時 (0 分)、15 分後、60 分後、120 分後に行った。測定条件は、上表とした。

5 mm×5 mm の領域におけるマッピング測定を行った。マッピング測定は、装置 (RAMAN view) の光学系に搭載しているスキャニングミラーを活用し、対物レンズ下のレーザースポット照射位置を走査し、スキャニングした結果をイメージングして行った。

同様に、塗布後、ガラス面上単純塗布実験法に従い、結晶析出状態を偏光顕微鏡 (対物レンズ: 100 倍) で経時的に観察した。観察は 120 分まで行い、塗布開始時 (0 分)、15 分後、60 分後、120 分後に写真撮影をした。

測定装置：広視野ラマン스코ープ：RAMAN view (nano photon 社製、大阪、日本)

偏光顕微鏡：BH 型、BX-50 型 (オリンパス光学工業社製、東京、日本)

ガラス面上単純塗布実験法では、被検試料を 60 mm×26 mm のスライドガラス上に約 20 mg 採取し、スライドガラス全面に均一になるように軟膏ヘラで薄く延ばして塗布した。塗布後、湿度 40~50% (温度 20~25°C) の低湿度環境下に開放放置したものを被験サンプルとした。

3) NS 製剤と LEC 製剤からの析出物の顕微レーザーラマン測定

ガラス面上単純塗布実験法を参考に、基剤の異なる NS 製剤、LEC 製剤をスライドガラス (60 mm × 26 mm) 上に約 20 mg 塗布し、被検サンプルとした。

塗布後開放放置し (室温 20~25°C、相対湿度 40~50%)、レーザーラマン顕微鏡(10 倍)を用いて経時的に観察し、ラマンイメージング (マッピング測定) を行った。

0.8 mm × 0.16 mm の領域におけるマッピング測定を行った。マッピングは、対物レンズ下のレーザースポット照射位置をレーザービームで走査し、スキャンした結果をイメージングして行った。測定条件は、下表とした。

測定ポイントは、両製剤の結晶析出状態の変化が異なることから、NS 製剤については、スペクトルが異なる結晶の析出が観察された塗布後 15 分後と、1 時間後の結晶状態を観察した。また、LEC 製剤も同様に、スペクトルが異なる結晶の析出が観察された、15 分後と 8 時間後の状態を観察した。

測定装置：レーザーラマン顕微鏡 RAMAN touch (nano photon 社製, 大阪, 日本)

< 顕微レーザーラマンの測定条件 >

Parameter	Operating conditions
Excitation wavelength	532 nm
laser intensity	0.9 mW
Exposure time	20 s/line
Objective Lens	10×
Measurement area	0.8×0.16 mm
The number of the imaging pixels	400×40 pixel
Laser spot scanning interval	(x,y) = (2, 4 μm)
Measurement time	13 min 28 s

謝辞

本研究に際し、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました
高崎健康福祉大学 薬学部 薬学科 寺田 勝英 教授に謹んで感謝致します。

また、本研究の機会を与えられた、エーザイ株式会社 DI+ユニット CJ 技術部 大脇 孝行 部長、河村 政男 室長、CJ 部 内藤 えり子 部長、慶松 秀樹 課長 に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、絶えざる御助言とご協力をいただいた、千葉大学 山本 恵司 名誉教授、エルメットエーザイ株式会社 研究開発本部 森田 豊 部長、エーザイ株式会社 故安藤 英信 博士、エーザイ株式会社 旧製品研究部、旧製剤研究所 本庄研究室、旧 CJ 部 技術センター本庄研究室、旧薬粧事業部 の皆様に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の実験データの取得ならびに御助言を賜り、ご協力いただきました、株式会社リガク 小山 豊 様、株式会社日本バイオリサーチセンター 清水 雅良 様、ナノフォトン株式会社 内山 知也 様、日光ケミカルズ株式会社 伊藤 克晃 様 の皆様に深く感謝致します。

最後に、何年もの間、物心両面でいつも支援してくれた妻、息子、娘たち、両親に心より感謝致します。

引用文献

- 1) Swanbeck G: Acta Derm Venereol (stockh), 48, 123-127 (1968).
- 2) 特公昭47-47662.
- 3) 特開平8-259442.
- 4) Matumaru H., Tsuchiya S., Yamaguchi K., Sugiyama S., Yakuzai-gaku, 37, 57 (1977).
- 5) 齊藤宏之, 澤田晋一, 安田彰典他, 労働安全衛生総合研究所特別研究報告 JNIO SH-SRR-No.43(2013)157-163
- 6) 事務所衛生基準規則, 昭和47年9月30日労働省令第43号
- 7) 勝野二郎, H.B. リジナル, 菊池世欧啓, 2011年度日本建築学会 関東支部研究報告集 No.4028 (2012)
- 8) Takemoto K., Sonoda N., "Inclusion Compounds," Vol. 2, ed. by Atwood J. L., Davies J. E. D., MacNicol D. D., Academic Press, London, 1984, pp. 47-67
- 9) George A. R., Harris K. D. M., J. Mol. Graph., 13, 138-141, 190 (1995).
- 10) Harris K. D. M., J. Mol. Struct., 374, 241-250 (1996).
- 11) Harris K. D. M., Thomas J. M., J. Chem. Soc., Faraday Trans., 86, 2985-2996 (1990).
- 12) Knight H. B., Anal. Chem., 24, 1331 (1952).
- 13) McAdie H. G., Can. J. Chem., 40, 2195 (1962).
- 14) Marik K., Ph.D. Thesis, Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague, 1972
- 15) Marik K., Smolkova E., Chromatographia, 6, 420-426 (1973).
- 16) Marik K., Smolkova E., J. Chromatogr. A, 91, 303-312 (1974).
- 17) Smolková-Keulemansová E., Chromatographia, 11, 70-73 (1978).
- 18) Smolková E., Feltl L., Všeetečka J., Chromatographia, 12, 147-149 (1979).
- 19) Kuhnert-Brandstatter M., Burger A., J. Therm. Anal., 50, 559-567 (1997).
- 20) Kuhnert-Brandstatter M., Burger A., Pharmazie, 51, 288 (1996).
- 21) Ohno H., Iwahara R., Tagami H., Hifukakiyou, 85, 419-428 (1990).
- 22) Kobayashi M., Kubota N., Uchiyama T., Oota T., Wide-field scope with Deep Depth of Field and Long Working Distance, JSAP spring meeting proceeding, Vol. 60th ROMBUNNO 27P-D1-2 (2013).
- 23) 第十七改正日本薬局方 (平成28年3月7日厚生労働省告示64号), 1214-1215.
- 24) Allenby A. C., Creasen N. H., Edginton J. A. G., Fletcher J. A., Schock C, Br. J. Dermatol., 81 (Suppl. 4), 47-55 (1969).
- 25) Higuchi T., J. Pharm. Sci., 52, 1145-1149 (1963).
- 26) Schlenk W., Justus Liebigs Ann. Chem., 565, 204-240 (1949).
- 27) Schlenck W. Jr., "Organische Einschlußverbindungen in; Fortschritte der chemischen Forschung," Vol. 2, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1951, p. 92.

- 28) Lu N., Chandar P., Tempesta D., Vincent C., Bajor J., McGuinness H., *Int. J. Cosmet. Sci.*, 36, 167–174 (2014).
- 29) Lademann J., Weigmann H.-J., Schanzer S., Meinke M., Sterry W., Patzell A., *SOEFW J.*, 136, 2, 4–8 (2010).
- 30) Ali A., Maibach H. I., *Cosmet Toiletries*, 125, 40, 42–44, 46, 48–49 (2010).
- 31) Hongbo Z., Maibach H. I., *Cosmet Toiletries*, 124, 26, 28, 30 (2009).
- 32) Wu C., Chiu H.-H., *J. Occup. Environ. Hyg.*, 4, 952–958 (2007).
- 33) Pershing L. K., Lambert L. D., Shah V. P., Lam S. Y., *Int. J. Pharm.*, 86, 201–210 (1992).
- 34) Jui-Chen T., Cappel M. J., Weiner N. D., Flynn G. L., *Int. J. Pharm.*, 68, 127–133 (1991).
- 35) 相川一男 他 : 応用薬理, 13 (5) ,743-747 (1977)
- 36) Tuduki M., *Isot News*, 657, 12–13 (2009).
- 37) Nakanishi Tomoko M., *Application of Radiation and Radioisotopes in Life Science.*, Japan Atomic Energy Research Institute (JAERI)- Conf., 44–51 (2005).
- 38) Morishita Y., *Kensa and Gijyutu*, 29, 1235–1241 (2001).
- 39) Sato M., Yomoto T., Suzuki K., Watanabe N., Mashige F., Uchimura H., Okubo A. *Japanese, J. Clin. Lab. Autom.*, 17, 448 (1992).
- 40) Knorst M. T., Neubert R., Wohlrab W., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 1627–1632 (1997).
- 41) Hassan S. M., Salem F. B. ABD EL-Salam N., *J. Indian Chem. Soc.*, 72, 73–75 (1995).
- 42) Almy J., Ough C. S., *Urea Analysis for Wines*, 37, 968–970 (1989).
- 43) Higuchi T., *J. Pharm. Sci.*, 51, 1145 (1963).
- 44) Kurita H., Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc., WO2012057220 A1 (2012).
- 45) Fukahori M., Seki M., Akatsu S., Sakura H., *Yakuzaigaku*, 56, 23–31 (1996).
- 46) Higuchi T., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 11, 85–97 (1960).
- 47) Wesselingh J. A., *Controlling Diffusion*, 24, 47–60 (1993).
- 48) Allenby A. C., Creasen N. H., Edginton J. A. G., Fletcher J. A., Schock C. *Brit. J. Derm.*, 81 (Suppl. 4), 47–55 (1969).
- 49) Ohno H., Iwahara R., Tagami H., *Hifukakiyou*, 85, 419–428 (1990).
- 50) Ueno T., Urakami K., Higashi A., Umemoto K., Godo M., Kitamura K., *The Pharmaceutical Society of Japan*, 125, 807–814 (2005).
- 51) Stephenson G. A., Forbes R. A., Reutzel-Edens S. M., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 48, 67–90 (2001).
- 52) Terada K., *Pharm. Tech. Jpn.*, 21, 31–37 (2005).
- 53) “Analytical Applications of Raman Spectroscopy,” ed. by Pelltier M. J., Blackwell Science, Oxford, 1999.
- 54) “Handbook of Raman Spectroscopy,” ed. by Lewis I. R., Edwards H. G. M., Marcel Dekker Inc., New York, 2001.
- 55) Terashita K., *Pharm. Tech. Jpn.*, 31, 157–161 (2015).

- 56) Qin J., Chao K., Kim M. S., Cho B.-K., Peng Y., *Trans. ASABE*, 57, 1783–1792 (2014).
- 57) Hashimoto S., Yagyū F., Higuchi S., Tanaka S., *Bunseki Kagaku*, 26, 433–437 (1977).
- 58) Hashimoto S., Tanaka S., Yagyū F., Higuchi S., *Yukagaku*, 28, 417–420 (1979).
- 59) Emulsifiers of NS formulation consisted polyoxyethylene (POE) (50) hydrogenated castor oil, POE (20) sorbitan monostearate and sorbitan monostearate, and emulsifiers of LEC formulation consisted purified soybean lecithin, propylene glycol monostearate, glyceryl monostearate.
- 60) Takemoto K., Sonoda N., “Inclusion Compounds,” Vol. 2, ed. by Atwood J. L., Davies J. E. D., MacNicol D. D., Academic Press, London, 1984, pp. 47–67.
- 61) Fukahori M., Seki M., Akatsu S., Sakurai H., *Yakuzaigaku*, 56, 23–31 (1996).
- 62) Kuhnert-Brandstätter M., Burger A., *J. Therm. Anal.*, 50, 559–567 (1997).