

[ノ ー ト]

新規インスリンカートリッジ製剤の含量均一性についてのバリデーション

駒田富佐夫^{a, b}, 大道 るみ^a, 畑中 久勝^c, 谷川原祐介^{a, d}, 奥村 勝彦^a

神戸大学医学部附属病院薬剤部^a, 兵庫県立衛生研究所食品薬品部^c,
現: 城西大学薬学部医薬品情報学教室^b, 慶應義塾大学医学部附属病院薬剤部^d

Validation for Drug Content of New Insulin Cartridge

FUSAO KOMADA,^{a, b} RUMI OHMACHI,^a HISAKATU HATANAKA,^c YUSUKE TANIGAWARA,^{a, d}
and KATSUHIKO OKUMURA^a

*Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Kobe University,^a Kusunoki-cho,
Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan, and Division of Food and Drug, Hyogo Prefectural
Institute of Public Health,^c Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

*Present addresses: Department of Drug Informatics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai
University^b, Sakado, Saitama 350-0290, Japan and Department of Hospital Pharmacy, Keio
University Hospital,^d Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan*

(Received 11 May 1998; Accepted 6 July 1998)

Summary: We studied the validation for drug content of a new insulin cartridge (Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®]). The concentrations of total insulin, Zn, m-cresol, and phenol in the Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®] were consistent with the levels described in the interview form. To study the relationship between the mixing (0, 5, and 10 times) and the uniformity of the insulin suspension, a Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®] was set into the insulin delivery device specifically designed for this cartridge (Autopen[®]). The total insulin concentrations of this preparation through Autopen[®] varied from 30 to 150 U/ml without mixing, so mixing more than 10 times was necessary to make the suspension uniform. The total insulin concentrations through Autopen[®] decreased with increased standing times after thorough mixing; thus the Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®] must be injected as soon as possible after mixing. The dimeric-hexameric insulin concentration in the Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®] was 10 times higher than the monomeric insulin concentration. Furthermore, the insulin concentration through Autopen[®] with a 31-gauge needle was the same as the insulin concentration using a 30-gauge needle. These results indicate that the characteristics of a Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®] are equivalent to that of a Humacart 3/7, 1.5 ml cartridge[®].

Keywords: validation; isophane insulin suspension; Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge[®]; mixing

は じ め に

速効型の水溶性ヒトインスリンと中間型のヒトイソフェンインスリンを混合し、二相性の吸収を示すヒト二相性イソフェンインスリン水性懸濁製剤は現在糖尿病の治療に繁用されている¹⁾。このうち速効型の水溶性インスリンと中間型のイソフェンインスリンが3対7の同比率の混合比を有するイン

スリン水性懸濁製剤であるヒューマカート3/7注[®]は、従来1.5 mlのカートリッジ入り製剤であったが、最近より容量の大きな3.0 mlのカートリッジ製剤が発売された。この製剤の使用により、カートリッジ交換の回数が半分になるため、旅行等長期外出時における交換の心配、さらに廃棄物ならびに交換時のロス減少など、患者のQOLにとって有用である²⁾。3.0 mlのカートリッジ製剤専用の自動注入方式のインスリン注入器（オートペン[®]）が新規に開発され、高齢者や神経障害等のある患者に有用であるとの報告がなされている³⁾。この際、注射針も従来よりもより細い31ゲージ針（G）も使用されている。そこで、今回、このヒューマカート3/7、3.0 ml注[®]の含量均一化についてのバリデーションを検討した。またこの製剤を用いる際には混和の行い方に差がある場合、速効型インスリンと中間型インスリンの比率が異なるため、有効性に差が認められる可能性がある⁴⁾。そこでこれら製剤の混和回数による懸濁の均一化についても検討を行った。さらに31Gの注射針の使用に対する影響についても検討を加えた。

実 験

1. 試 料

新規インスリンカートリッジ製剤（ヒューマカート3/7注、3.0 ml[®]、日本イーライリリー株式会社、使用ロット：FF6X23B, FF6V23B, FF6Z79A, FF7B50B, FF7D92B, FF7E61B）を購入して使用した。標準インスリンは粉末のBiosynthetic human insulin（Eli Lilly, USA, 使用ロット：615-7U7-208）を用いた。注射針としてはマイクロファインプラス[®]31G×8 mm ならびに30G×8 mm（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を使用した。

2. サンプル調製方法⁴⁾

ヒューマカート3/7、3 ml注[®]を臨床で用いるのと同様の条件にするため、3.0 mlのカートリッジ製剤専用の自動注入方式のインスリン注入器（オートペン[®]3 ml用）に装着し、各々0, 5, および10回混和後、30ゲージ（G）もしくは31Gの注射針を付け空打ちした後、1日1回一週間、オートペン[®]より0.3 mlを放出しサンプルとした。なおこの場合の混和は肘を中心にして一度振り下ろす、または上げる各々の運動を1回とし、1運動を約1秒で行った。静置実験では、10回混和し、0, 2.5, 5, 7.5, 10分後に検体をサンプリングした。全インスリン濃度測定用サンプルとして前述の検体30 μlを0.01 N HCl 270 μlで希釈し、そのうち10 μlをHPLCのサンプルとした。膜透過インスリン濃度の測定は、検体約120 μlを0.45 μmのpore sizeを有するフィルター（Gelman, GHP Acrodisc 13）を通過させ、通過したサンプルを上記と同様に処理した。

3. 測定条件

インスリン、フェノール、m-クレゾールの測定はHPLC法により行った^{4,5)}。この際、カラムはZORBAX BP-TMS（4.6 mm×25 cm）を用いた。また、亜鉛濃度は原子吸光光度法により定量した^{5,6)}。すなわち、ヒューマカート3/7、3 mlカートリッジ[®]製剤から2 mlを取り、硝酸（和光純薬工業、有害金属測定用）15 ml、硫酸（和光純薬工業、有害金属測定用）1.0 mlで湿式分解し、これに超純水を加えて25 mlとした。亜鉛標準溶液として和光純薬工業製原子吸光分析用を用いた。

4. 限外濾過による検討

限外濾過は各サンプル500 μlを用い、Microconcentrator 10（Amicon社）では20分間、Microconcentrator 50（Amicon社）では5分間、室温で7,000×gの遠心により行った⁴⁾。

5. 有意差検定としては、ANOVAもしくはt検定を用いた。

結 果 お よ び 考 察

1. 含量均一性の検討

新規インスリンカートリッジ製剤（ヒューマカート3/7, 3 ml 注[®]）のロット間における含量均一性を検討する目的で、これら製剤を10回混和後、その一部を0.01 N HClにて可溶化し、HPLC法により測定した。その結果、インスリンの分解物はほとんど観察されなかった。次にこの製剤におけるロット間、ならびに全インスリン濃度を測定したところ、全インスリン濃度は 100.4 ± 1.8 U/ml (mean \pm SE) であり各製剤のロット間で有意な差は観察されなかった (Table I)。さらに添加物について検討を行った結果、添加物の測定値は文献と一致した^{1,4)}。

2. 混和回数による懸濁均一化の検討

次に混和回数によるインスリン懸濁の均一化について検討した。その結果、全く混和を行わない場合には3.0 mlのカートリッジ製剤専用の自動注入方式のインスリン注入器（オートペン[®]）より放出された薬液中の全インスリン濃度は約30から150 U/mlまで大幅に変動した。しかしながら、5回以上混和すれば懸濁はほぼ均一化し、10回以上混和すれば十分であることが明らかとなった。この結果から、ヒューマカート3/7, 3.0 ml 注[®]は、ヒューマカート3/7, 1.5 ml 注[®]よりもやや混和しやすい製剤であることが明らかとなった⁴⁾。しかしながら、臨床上このインスリン製剤を投与する際には、投与量を一定化するために10回以上の混和が必要であることが明らかとなった (Fig. 1)。

3. 各インスリン製剤中の速効型インスリン濃度の検討

次に、混和回数におけるインスリン製剤中の速効型インスリン部分と中間型インスリン（イソフェンインスリン）部分の変動を知る目的で、各混和回数におけるサンプルを0.45 μ mのメンブランフィルターを通過させ、試料を調製し測定した。その結果、混和回数の違いによらず、メンブランフィルターを通過した速効型インスリン部分の濃度は8から10%とほぼ一定であり、これはヒューマカート3/7, 1.5 ml 注の結果とも等しく、またDavisら⁷⁾の結果とも一致するものであった。この製剤は、速効性インスリンとイソフェンインスリンを3:7で混和した製剤であるにも関わらず、製剤中のインスリン濃度は大部分結晶性インスリン部分に起因することが明らかとなった (Fig. 2)。

さらに、5.0 μ mのメンブランフィルターを通過するごく微細なインスリン結晶を含む分画について検討した結果、ヒューマカート3/7, 3 ml 注[®]のそれは $13.1 \pm 0.5\%$ (mean \pm SE) であり、これは1.5 ml 注のそれ ($14.1 \pm 0.4\%$) との間に有意の差は認められなかった。したがって0.45から5.0 μ mの大きさのごく微細なインスリン結晶を含む画分については両製剤間で差のないことが明らかとなった。

4. 注射針の影響

最近では、注射時の患者の痛みを改善する目的で、注射針も従来よりもより細い31G注射針が臨床使用され、この注射針を用いることによりかなりの痛みの軽減が報告されている⁸⁾。これは31G注射

TABLE I. Contents of Humacart 3/7, 1.5 ml and 3 ml Cartridges

| | 3 ml cartridge | 1.5 ml cartridge ^{a)} |
|------------------|-----------------|--------------------------------|
| Insulin (U/ml) | 100.4 ± 1.8 | 101.2 ± 2.6 |
| Zn (μ g/ml) | 26.0 ± 1.8 | 28.9 ± 0.0 |
| Phenol (mg/ml) | 0.65 ± 0.01 | 0.68 ± 0.01 |
| m-Cresol (mg/ml) | 1.67 ± 0.04 | 1.60 ± 0.02 |

a) Data from reference No. 4. Mean \pm SE (n=3-8).

針の外径が0.254 mmであり、従来の30G (0.3048 mm) よりも約2割細くなっていること、ならびにその先端のカットの差によるものと考えられる。また、内径については31G注射針が0.127 mmであり、30G注射針では0.157 mmである。このため結晶インスリンが注射針を通過する際に抵抗性が増加し、放出量に変化する可能性が考えられる。しかしながら、10回混和後における31G注射針を取り付けたオートペンから放出される薬液中のインスリン濃度は、Fig. 3に示すごとく用いた注射針31Gの影響は認められなかった。従って、注射時の痛みの軽減のため31G注射針の使用に際しては問題の無いことが明らかとなった。

5. 懸濁後の安定性

この製剤を使用する際に、患者によっては、懸濁後、注射部位の消毒などを行っている場合があり、その際には事前に懸濁した製剤を一時放置しているものと考えられる。そこで一度懸濁した製剤がどれぐらいの時間その均一性を保つのかについて検討を行った。その結果、10回混和後において、オートペンにセットされたヒューマカート3/7、3.0 ml注[®]は2.5分以内までほぼ完全に均一な懸濁状態が保たれていた。しかしながら、5分以上放置させた場合には、若干の全インスリン濃度の低下が観察されたが、この製剤は、ヒューマカート3/7、1.5 ml注[®]と比較して、より懸濁状態が持続することが明らかとなった (Fig. 4)。しかしながら、臨床上このインスリン製剤を投与する際には、懸濁後2.5分以内に使用することが望ましく、またそれ以上の時間静置した際には再懸濁後に使用することが必要であると考えられる。

6. 限外濾過膜による検討

インスリンは中性pH領域では一部6量体として存在することが知られている⁹⁾。そこで、この製剤の水溶液中におけるインスリン分子の存在様式を検討するために限外濾過膜を用いて検討した。すなわち、分子量1万カットの限外濾過膜では、インスリン単量体のみ膜を通過することができ、また、5万カットの膜では、6量体まで通過することができる。この方法を用いて検討した結果、ヒューマカート3/7、3.0 ml注[®]では単量体の存在が極めて低く、2から6量体の存在比は単量体のそれと比較して、10倍以上多いことが明らかとなった (Fig. 5)。この結果は、ヒューマカート3/7、1.5 ml注[®]の

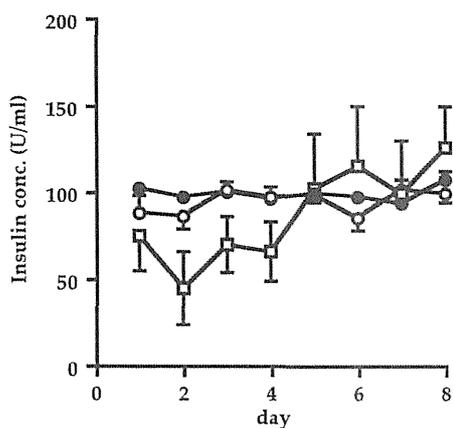


Fig. 1. Effect of Mixing on Total Insulin Concentration in Humacart 3/7
□, no shake; ○, 5 shakes; ●, 10 shakes. Mean \pm SE ($n=4$). 30G needles.

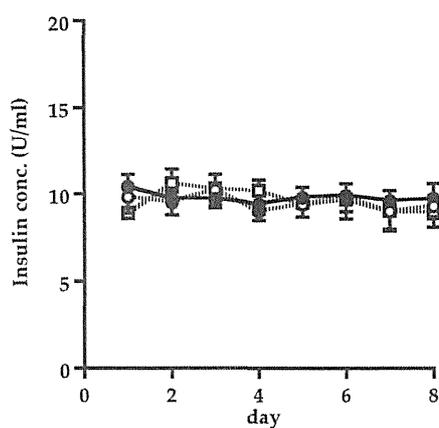


Fig. 2. Effect of Mixing on Insulin Concentration through 0.45 μ m Pore Size Membrane
□, no shake; ○, 5 shakes; ●, 10 shakes. Mean \pm SE ($n=4$). 30G needles.

それと同程度であり有意の差は認められなかった⁴⁾。しかしながら、Fig. 2に示した速効型インスリン部分は約10 U/mlの濃度であった。これは、インスリンモノマーの大きさは直径約2.5~3 nmであり6量体であっても約5 nmとされることから、速効型インスリン部分とした0.45 μm のフィルターを通過したインスリン中には、このフィルターを通過するようごく微細な結晶が多く含まれたためと考えられる¹⁰⁾。

実際のヒトによる皮下投与部位からの吸収では、単量体のみが吸収されるのではなく、6量体においてもその吸収速度は単量体の吸収速度の約3分の1と遅いものの、投与部位から吸収され、また2

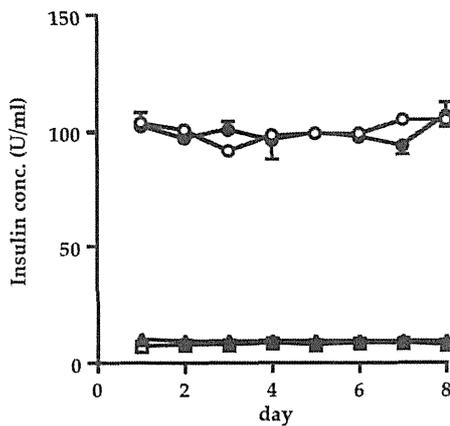


Fig. 3. Effect of Needle Size on Insulin Concentration in Humacart 3/7 Cartridges shaken 10 times. ○, total insulin concentration, 31G needles; □, insulin concentration through 0.45 μm pore size membrane, 31G needles; ●, total insulin concentration, 30G needles; and ▲, insulin concentration through 0.45 μm pore size membrane, 30G needles. Mean \pm SE ($n=3-4$)

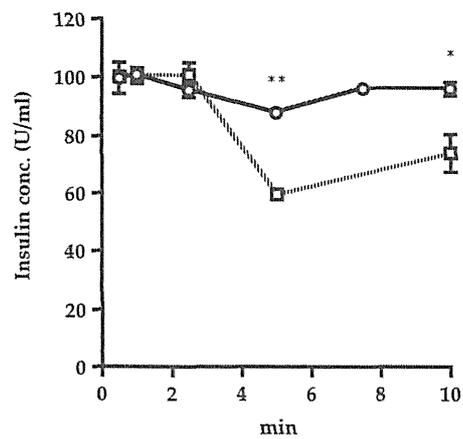


Fig. 4. Effect of Standing Time on Stability of Suspension after Mixing Mean \pm SE ($n=3$). 30G needles. ○, Humacart 3/7, 3.0 ml cartridge, and □, Humacart 3/7 and 1.5 ml cartridge (data from reference 4). *, $p<0.05$, and **, $p<0.001$.

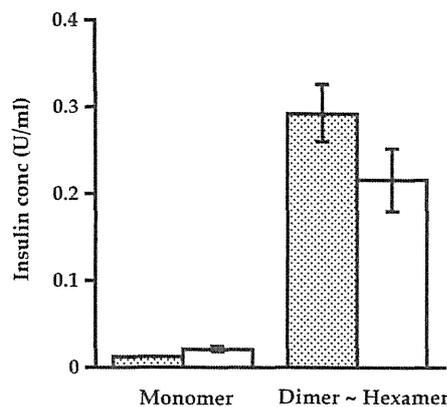


Fig. 5. Monomeric and Dimeric~Hexameric Insulin Concentrations in Humacart 3/7 3.0 ml and 1.5 ml Cartridges ▨, 3.0 ml cartridge; □, 1.5 ml cartridge. Mean \pm SE ($n=3$).

量体の吸収速度は単量体のその3分の2であったと報告されている¹¹⁾。従って、薬液中のインスリン単量体ならびに2から6量体の存在比が等しいヒューマカート3/7, 1.5 ml注と3.0 ml注[®]においては、初期における皮下投与部位からのインスリン吸収速度は変化しないものと予測される。

結 語

ヒト二相性インスリン水性懸濁製剤であるヒューマカート3/7, 3 ml注[®]において、その製剤間における全インスリン濃度には差は認められず、また10回以上混和すれば懸濁はほぼ均一化し、十分であることが認められた。その際、均一に懸濁したこれら製剤は出来るだけ速やかに使用すべきであり、5分以上の静置後には再懸濁を要することが明らかとなった。さらに速効性インスリン部分において、2から6量体インスリン存在率が単量体に比較して高いことが認められたが、ヒューマカート3/7, 1.5 ml注[®]のそれと存在比は等しかった。以上の結果から、ヒューマカート3/7, 3 ml注[®]の製剤としての特性は、ヒューマカート3/7, 1.5 ml注[®]と同等であることが明らかとなった。

引 用 文 献

- 1) インタビューフォーム (ヒューマカート3/7注), 日本イーライリリー株式会社 (1997).
- 2) 三村吾郎, 阿部信行, 橋口 純, 原口義邦, 石本祥二郎, 陣内富男, 梶原敬三, 栗林忠信, 三村和郎, 宮本雄一, 岡田 朗, 坂本安弘, 溝口由史, インスリンカートリッジ製剤 (3 mlヒューマカート) と専用オートペンの使用経験, プラクティス, **14**, 645-649 (1997).
- 3) 和田正彦, 目連晴哉, 菊池幹雄, 徳島裕子, Human Insulin (ヒューマカート) 3 ml製剤およびオートペン3 mlの臨床的使用経験, 新薬と臨床, **46**, 69-72 (1997).
- 4) 駒田富佐夫, 奥田祐子, 大保道子, 松林照久, 畑中久勝, 谷川原祐介, 奥村勝彦, ヒト二相性インスリン水性懸濁製剤の含量均一性についてのバリデーション, 薬剤学, **57**, 190-196 (1997).
- 5) 森本和滋, 日高哲郎, 本広繁徳, 七里寛江, 奥田秀毅, 坂口慶貴, 高橋 尊, 江島伸一, 長南義勝, 早川堯夫, 遺伝子組換えヒトインスリン製剤の品質管理のための定量法としての逆相高速液体クロマトグラフ法, 医薬品研究, **26**, 404-412 (1995).
- 6) 衛生試験法・注解, 日本薬学会編, 金原出版, 1990, pp. 560-570.
- 7) S. N. Davis, C. J. Thompson, M. D. Brown, P. D. Home, K. M. M. Alberti, A comparison of the pharmacokinetics and metabolic effect of human regular and NPH insulin mixtures, *Diabetes Res. Clin. Prac.*, **13**, 107-118 (1991).
- 8) 日本ベクトン・ディッキンソン社, 社内データ: CPEP-390.
- 9) Association of insulin, J. Brange, Galenics of Insulin, Springer, Berlin, 1987, pp. 20-22.
- 10) J. Brange, D. R. Owens, S. Kang, A. Vølund, Monomeric insulins and their experimental and clinical implications, *Diabetic Care*, **13**, 923-954 (1990).
- 11) S. Kang, J. Brange, A. Burch, A. Vølund, D. R. Owens, Subcutaneous insulin absorption explained by insulin's physicochemical properties. Evidence from absorption studies of soluble human insulin and insulin analogues in humans, *Diabetes Care*, **14**, 942-948 (1991).