

結晶セルロース(MCC)中の 可視粒子検出の新基準

Gerald A. Hebbink, Alberto Berardi

DFE Pharma, Goch, Germany

要旨

医薬品添加剤中の可視粒子は、一般的に目視粒子計数法で検出される。人間の目による粒子の検出能力は非常に主観的であるため、検査員によるバイアスが生じやすく、可視粒子の存在を過小評価または過大評価する可能性がある。目視による検査ミスを解消するため、本研究では、自動計数システムにより、白色以外の粒子について、検出可能な色、コントラスト、サイズの閾値について比較して、可視粒子を偏りなく計数する自動粒子計数法を紹介する。また単に数えるだけでなく、検出される粒子を色、大きさ、形状で分類することも可能である。新たに開発された自動粒子計数法は、添加剤の技術的に不可避的な粒子（TUPs）と非典型可視粒子（AVPs）を容易に識別することができる。さらにこの方法は製造工程における逸脱を容易に検出し、製造工程の最適化を導くことが可能となる。

本研究では、自動計数システムを使用して、グローバルメーカー3社の結晶セルロース（MCC）に含有する可視粒子のレベルを比較した。その結果、自動粒子計数法で検出された可視粒子の数と種類は、MCCのブランドによって異なることが明らかになった。例えばあるブランドは、他の2社よりも多くの可視粒子を含んでおり、その大部分は50~100 μm の黒色粒子であった。可視粒子について、弊社の自動粒子計数法は、これまでになく高い信頼性と詳細な情報を提供する。

1. はじめに

添加剤組成の重要なポイントは、可視粒子が存在するか、しないかである^{1,2)}。可視粒子の定義は様々であるが、本文では人間の目で見える粒子を指す¹⁾。従って、サイズ（一般に50 µm 以上）が大きくて、白い粉体の中に黒色粒子があるように、大量製品（バルク）との色のコントラストがあるものである。多くの場合、可視粒子は技術的に避けられないもので、製造工程や原材料に由来するものである。添加剤の多くは天然由来で、MCCの原料である木材パルプや乳糖の原料である牛乳などの原材料は、可視粒子の発生源となり得る^{3,4)}。現在の製造工程は変色を最小限に抑えるよう設計されるが、着色した粒子の形成を完全に避けることはできない。例えば乾燥の際の高温で変色を引き起こす可能性がある。添加剤業界では、着色粒子の発生を低減するための施策に積極的に取り組んでおり、現在の添加剤は、着色粒子が少なく清潔であると見なすことができる。

国際医薬品添加剤協議会（IPEC）は、技術的に不可避的な添加剤中の粒子プロファイル（TUPP）¹を提供するためのイニシアチブを推進している²⁾。TUPPは、添加剤に予想される不可避的な粒子の可能性を記述するものである。TUPPの定義における重要な点は、例えばデジタル写真による、粒子の形態、およびサイズの特性評価である。IPECは、特性評価に加え、可視粒子の定量化により製造者の歴史的水準との一貫性を検証できるようにすることを提案している。最後に、添加剤開発の初期段階において、可視粒子の定量化は、潜在的な問題を特定し、可視粒子の数を減らすための製造工程の最適化に活用される。

可視粒子の定量化は、TUPPガイドラインで概説されるように重要であるが、実際に品質管理の検査員による目視確認などの主観的な方法に基づいて行われているのが現状である。適切なトレーニングが実施され、拡大鏡やランプなどのツールを使用しても、目視による計数にはバイアスが生じることが懸念される。視覚能力の個人差と、可視粒子発生が低頻度のため、目視粒子計数法の信頼性は低い。粉末添加剤における可視粒子の検出頻度がどれほど低いかを理解するため、以下に理論的な計算を共有する。MCCを例として、目視で検出される可視粒子の一般的な頻度は、100 gあたり1~10のオーダーである。100 gのMCCに目視計数された可視粒子が10~20個程度だと、頻度の変動幅内とみなされる。MCCのかさ密度が0.3 g/mLであることを考慮すると、100 g MCCの体積は約333 mLである。サイズが約100 µmの想定立方体の可視粒子は、 10^{-6} mLの体積を有する。従って10個の粒子は、100 g粉末の総体積の 10^{-7} - 10^{-8} しか占めていないことになる。錠剤の表面が体積の約10%を占めるとすると、着色粒子が錠剤の表面で見える確率は約10億分の1である。極めて少量の可視粒子を検出するためには、偏りのない自動粒子計数法の開発が必要である。

本論文では、可視粒子検出のための革新的な自動粒子計数法の開発について紹介する。これまでの目視によるアプローチと比較して、新たに開発した自動粒子計数法は以下のメリットがある：可視粒子の標準的かつ客観的な粒子形状の特徴付けと定量化が可能である。それにより、TUPPの開発を容易にし、TUPPには報告されないAVPsに関する情報を提供することができる。

¹ <https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/tuppguide2015-1539615522.pdf>

2. 可視粒子の目視計数と自動計数

可視粒子検出の自動化の開発は、人間の目による粒子検出の再現性の低さに起因している。可視粒子をバルクから識別するため、周囲と比べて色やコントラストに一定の差が必要である。しかし肉眼では、可視粒子と背景色のコントラスト、色の両方における検出限界、すなわち閾値が異なるため、「可視」粒子の概念は定性的で恣意的なものになった。例えば、多くの人はある程度色盲であり、ある種の色を識別することができない⁵⁾。そのため、特定の粒子を見落とす可能性があり、計数の再現性に影響を与える。個人差により、同一の粉体においても可視粒子の観察結果、そして結論が異なる場合がある。画像解析に基づく自動計数方法には、上述の制限がない。すべての色とコントラストのパラメータを基準化し、検出閾値（感度）を固定することができる。また、色に加えて、目視による観察は、細かい粒子が検出できないため、粒子サイズからの影響を受けやすい。また、検出能力には、サイズ閾値の個人差もある。ランプや拡大鏡などのツールの使用により、色と粒径に対する検出能力を高めることができる。可視粒子の粒子径の閾値は、いくつかの方法で定義されている。米国薬局方（USP）では、可視と肉眼による不可視の境界を明確にせず、粒子径 50~150 μm の間に「可視のグレーゾーン」を設定している（USP<1788>、図1）⁶⁾。色のコントラストが著しく高い（例えば白い粉の中に黒色粒子の）場合、50 μm より小さい粒子であっても目で見える可能性があるが、自動化システムでは、固定レンズと固定されたデジタルカメラシステムにより、検出可能な粒子サイズを標準化し、再現することができる。

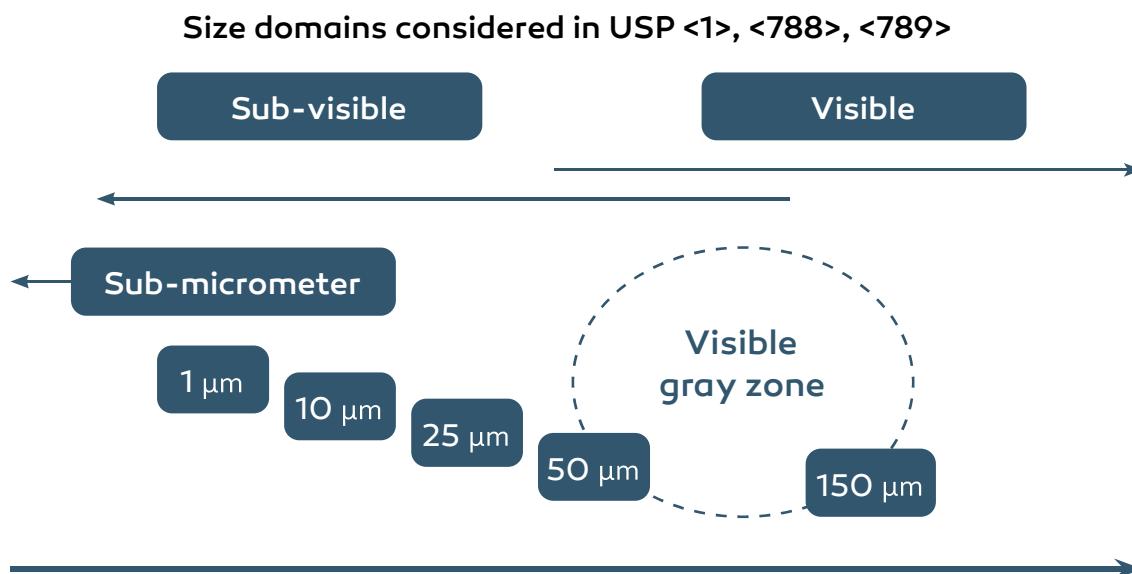


図1 USP<1788>による可視粒子の定義⁶⁾

要約すると、目視による可視粒子の計数は、人間の主観により非常に変わりやすいため、精度が低い。画像解析に基づく自動化システムは、サイズと色の閾値を基準化するため、人間の検出能力をはるかに超え、可視粒子検出の定量精度と信頼性を向上させることができる。

2.1. 目視計数

添加剤中の可視粒子を目視で数えるには様々な方法がある。一般的な方法は、30×30 cmの正方形に粉末を散布することによる計数方法である。すべてのコントラスト粒子を容易に検出するため、拡大鏡と照明も使用される。粒子検出の機会を増加させるため、ふるい分けを使用して、可視粒子がないとみられる大部分の細粒分を除去することで、大きな可視粒子を集中させることができる。目視計数は、粒子がバルクと異なるかどうかについての検査員の主観的な評価に基づいて行われる。特に微小・微弱な色の可視粒子に対して、判断は難しい。

2.2. 自動計数：粒子色の定義

自動粒子計数では、事前に粒子の色とサイズを順次定義する必要がある。最も便利な方法は、図2に示す3次元色空間を使用することである。1次元目は色相で、円形の値であり角度0°（360°）が赤に相当する。2次元目は色の強さを表す彩度であり、彩度が高いと鮮やかな色になり、彩度が低いと弱い、または薄い灰色がかった色になる。3次元目は明度で、明度が高いと明るい色を示し、明度が低いと色が無い、あるいは暗いことを示す。例えば、低明度と低彩度の組み合わせは黒である。画像解析ソフトウェアにより、デジタルカメラで撮影した画像の各ピクセルの3次元色空間の座標を分析し、背景色と異なるピクセルがあるかどうかを判断する。つまり、ある粒子の粉体層から、その粒子の色を基準に異色粒子を検出することである。本文では自動計数の粒子はプログラムされたソフトウェアにより検出された可視粒子で、目視計数の粒子は目で観察された可視粒子（バイアスの影響を受ける）と定義される。

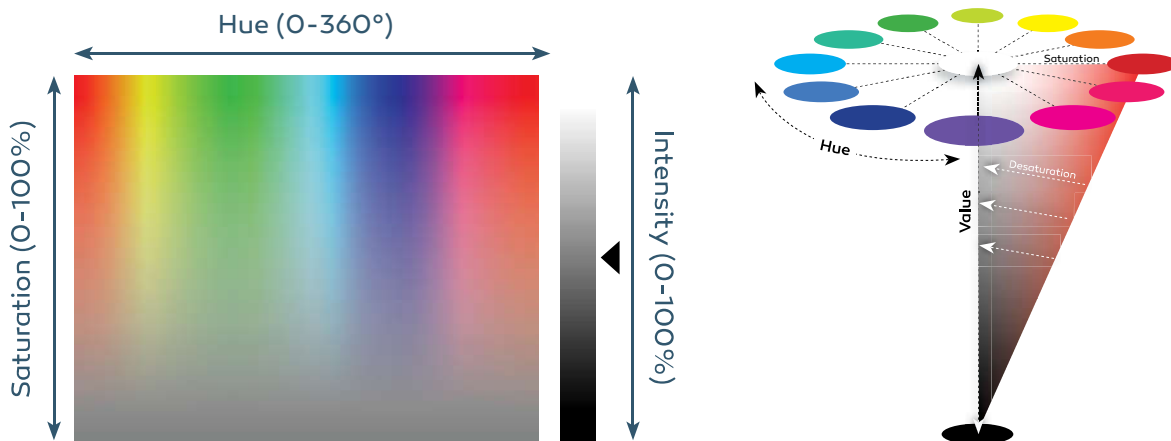


図2 3次元色空間表示（左側：平面図、右側：立体図） Hue (0-360°)：色相、Saturation：彩度、Intensity：明度

検出に関連する色を基準として、その3次元色空間の閾値の定義が必要である。まず粉体本来の色を背景色にして、その色の値を決定する。最も白い粉体は彩度が低く明度が高いが、粉の種類によって値が異なる。自動計数された粒子は、背景色の基準値と比較して、3次元色空間の明らかに異なるピクセルのクラスターである。自動計数粒子数の過大評価または過小評価のリスクを回避するため、検出限界は基準値に近すぎたり遠すぎたりしないよう設定される。粉体の自然な色のバラツキを考慮し、非典型的な色を識別する3次元色空間の境界を設定するために、適切なメソッドの開発が求められる。

2.3. 自動計数：粒子径の定義

デジタルカメラによる画像化は、ある領域に対して、一定のピクセル数でチップに投影して得られるものである。倍率は、距離、レンズシステム、検出器の設定などハードウェアの設定により決定される。理論的には、1ピクセルのサイズで投影された粒子を識別することができるが、実際には、粒子とその周囲を区別するため、最低でも約5×5ピクセルが必要である（図3）。つまり、自動計数可能な最小の粒子を少なくとも5×5=25ピクセルで投影するカメラシステムが必要になる。ソフトウェアは、ある（平均的な）色、サイズ、形状により、ピクセルのクラスターを可視粒子として判断することができる。粒子1個あたりのピクセル数が多いほど、色、サイズ、形の判定は的確になる。

USPは、目に見える粒子の直径について50～150 μmの「グレーゾーン」を定義している。従って、代表的な自動粒子計数法は、少なくとも直径50 μmの粒子を検出できるため、自動計数システムの倍率は、1ピクセルが10 μm以下を表すことが望ましい。

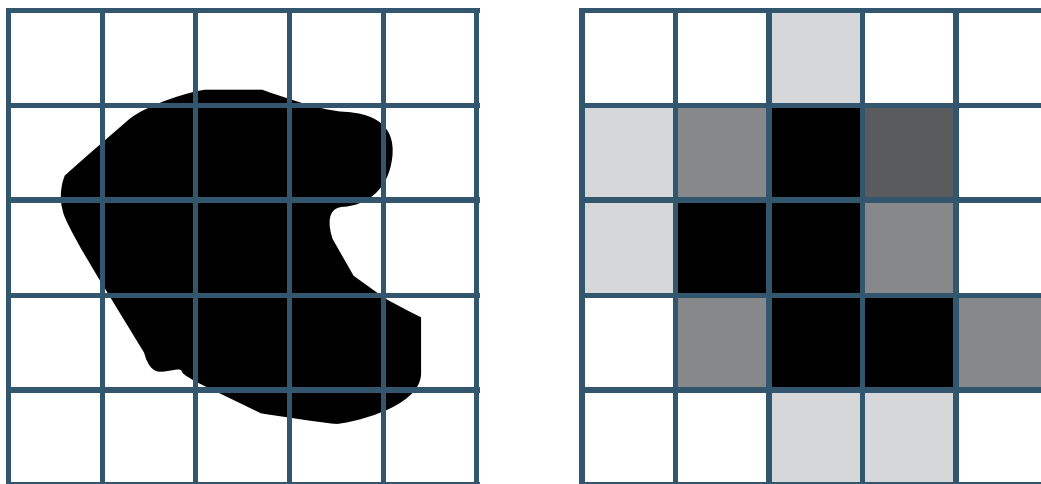


図3 5×5ピクセルで投影された仮想粒子の画像（左）とソフトウェアで解析された画像（右）
 粒子の画像は、15ピクセルが埋まり、4ピクセルが直径に相当し、平均明度は $5 \times 100\% + 1 \times 75\% + 4 \times 50\% + 5 \times 25\% = 60\%$ である

2.4. 自動計数システム

可視粒子の自動計数システムはいくつかある。最も簡単な方法は、顕微鏡を使って特定の表面を画像化し、その画像をImageJで解析する方法である⁷⁾。しかし、この方法で画像化できる表面は数cm²に限られており、可視粒子が高濃度で存在する場合にのみ有効である。可視粒子の非常に少ない（1 m²あたり数粒子程度の）添加剤の場合、適切に計数した再現性のあるデータを提供するため、数m²の粉体を分析する方法が必要になる。OCS-PT2C（OCS Optical Control Systems GmbH, Witten, Germany）は、市販の粉体分析システムで、粉体をホッパーからカメラシステムに沿って収集地点まで搬送する振動トランスポートを備えている。搬送中の粉体を連続的に撮影し、その画像をソフトウェアで解析する。上述のように可視粒子の特徴（色、サイズなど）をシステムに「教える」ことで、色、サイズ、形状などの特定のパラメータに基づいて可視粒子の計数・分類が自動的に行われる。

3. 結晶セルロース（MCC）

MCCは、木材パルプを精製したセルロースを原料として調製される。製造工程では、長いセルロース繊維を酸で加水分解し、重合度の低下した短い粒子を調製する。最終製品は、スプレードライにより得られる。MCCの着色粒子は、天然原料中にすでに存在するか、または製造工程中の加水分解反応および/または乾燥段階で形成される。クリーンな製品を得るため製造工程を最適化しているが、少量の着色粒子を完全に排除または回避することはできない。糖類（MCCなど）を高温で加熱すると、中～低の彩度と明度を持つ、黄/茶～暗色の粒子が発生する。従ってIPECの定義によると、MCCにおける可視粒子は、原料または工程から発生する技術的に不可避的な粒子（TUPs）である。IPECは可視粒子は技術的に不可避的な粒子（TUPs）と非典型可視粒子（AVPs）を総称として定義した。そのため、代表的な可視粒子数、または原料やプロセスの変動による予期せぬ逸脱に関する情報を提供する、信頼性の高い検出方法が重要である。

4. 結果および考察

OCS-PT2CシステムでMCCを測定し、Pharmacel® 101 50 g中の検出結果を一例として表1に示す。粒子サイズの下限は50 μmを設定し、これは目視で検出可能な粒子のサイズの下限と一致した。

表1 Pharmacel® 101 50 g中の可視粒子数。空のセルは、検出されなかったことを示す。自動計数の粒子数は合計値で、目視計数の粒子数は合計値からグレーセルの粒子数を引いて得られる。

| サイズ (μm) | 黒色 | 茶色 | 黄色 | その他 | 合計 |
|----------|----|----|----|-----|----|
| 50-100 | 1 | | 1 | | 2 |
| 100-150 | 2 | | | | 2 |
| 150-200 | 1 | 1 | | | 2 |
| 200-250 | | 3 | | | 3 |
| 250-300 | | 1 | | | 1 |
| 300-350 | | | | | 0 |
| 350-400 | 1 | | 1 | | 2 |
| 400-450 | | | | | 0 |
| 450-500 | | 1 | | | 1 |
| >500 | | | | | 0 |
| 合計 | 5 | 6 | 2 | 0 | 13 |

振動フィーダーを使用して、50 gの粉末を約 $1 \times 10^6 \text{ mm}^2$ （仮定：かさ密度=0.3 g/mL、層厚=0.2 mm）の面積に散布し自動検出を行った。その結果、可視粒子は合計13個であった。すべての可視粒子は、サイズと色に基づいて分類された。また、自動計数システムで粒子の画像を見ることができる（図4）。

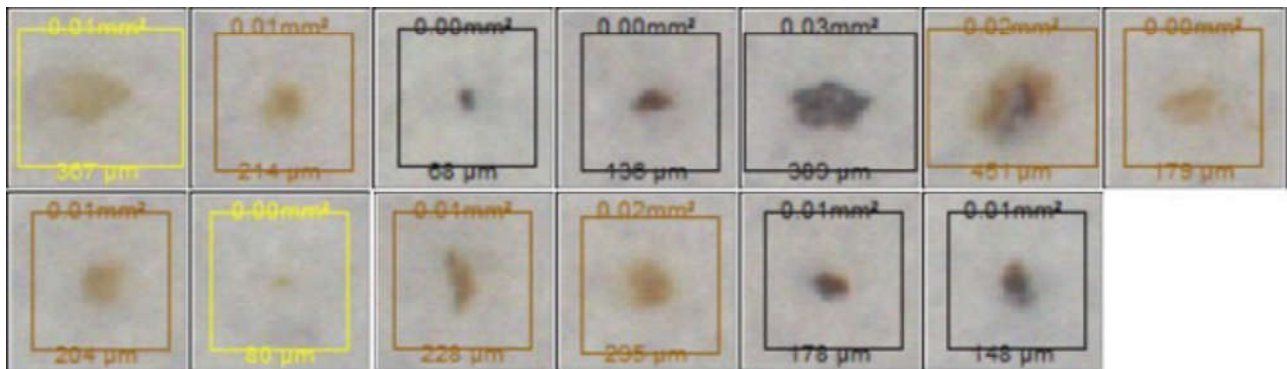


図4 Pharmacel® 101中の可視粒子の画像

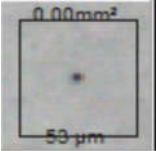
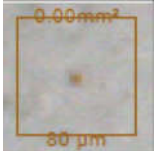

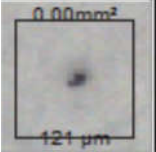
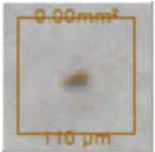
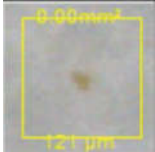
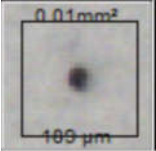




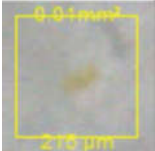
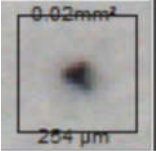
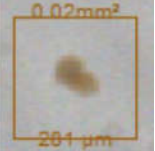

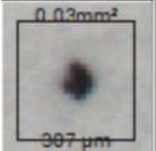

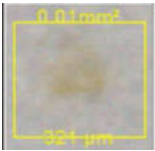



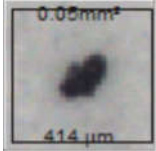

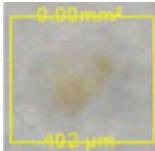

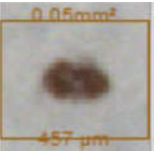



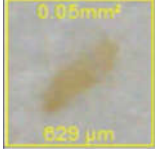
検出された粒子は典型的な黄色、茶色、黒色の粒子で、天然原料を使用した乾燥を必要とする製造工程由来のため、TUPsと見なすことができる。色や過大なサイズのAVPsではないと判断した。

標準化された自動計数が人間の目に見える数より多くなる可能性がある。まず、13個の粒子のうち、2個はサイズが100 µm未満であり、目視計数には見落とす可能性がある。また、黄色や茶色の小さな粒子は、白いバルクの背景との色のコントラストが限られているため、目に見えない可能性もある。そのため、検査員の検出感度により、13個のうち、4～11個のみが確認できると推測される。自動計数方法の使用により、完全に客観的な計数が可能になり、検査員バイアスを排除することができた。

自動計数の結果は目視計数より多いと想定し、自動計数システムを用いて目視計数の「平均」粒子数を予測するには複数の仮定が必要になる。最もコントラストの高い粒子（すなわち黒色の粒子）は検出のサイズ閾値が最も低い100 µmで、茶色の粒子は中程度の150 µmで、黄色の粒子は最も高い200 µmで設定された。閾値の設定は、表1にグレー色で表す。この設定により、13個のうち2個は閾値を下回ったため削除され、合計は11個に変更した。次のセクションでは、各サンプルの自動計数と目視計数の粒子数を示す。自動計数方法を用いてこれまでにない高い信頼性と精度で計数することで、可視粒子のバッチ内、バッチ間、グレード間、ブランド間の比較が実現可能になった。

表2に可視粒子のサイズと色を示す。複数のバッチから典型的な可視粒子の特徴が抽出された。そのうち、微小・微弱な色の粒子は、目に見えないと想定し目視計数に除外された。

表2 典型的な可視粒子のサイズと色

| サイズ (μm) | 黒色 | 茶色 | 黄色 |
|----------|---|--|---|
| 50-100 |  |  |  |
| 100-150 |  |  |  |
| 150-200 |  |  |  |
| 200-250 |  |  |  |
| 250-300 |  |  |  |
| 300-350 |  |  |  |
| 350-400 |  |  |  |
| 400-450 |  |  |  |
| 450-500 |  |  |  |
| >500 |  |  |  |

次にPharmacel® 101、102、112、それぞれの可視粒子数を測定し、他のグローバルメーカー2社と比較した。その結果を図5に示す。サンプル500 gを10分割で分析し、50 gあたり粒子数の平均値を報告した。注目点は、Pharmacel® 101、102、112 のサンプルは40ロット以上で、他社のサンプルは3ロットしかなかった。

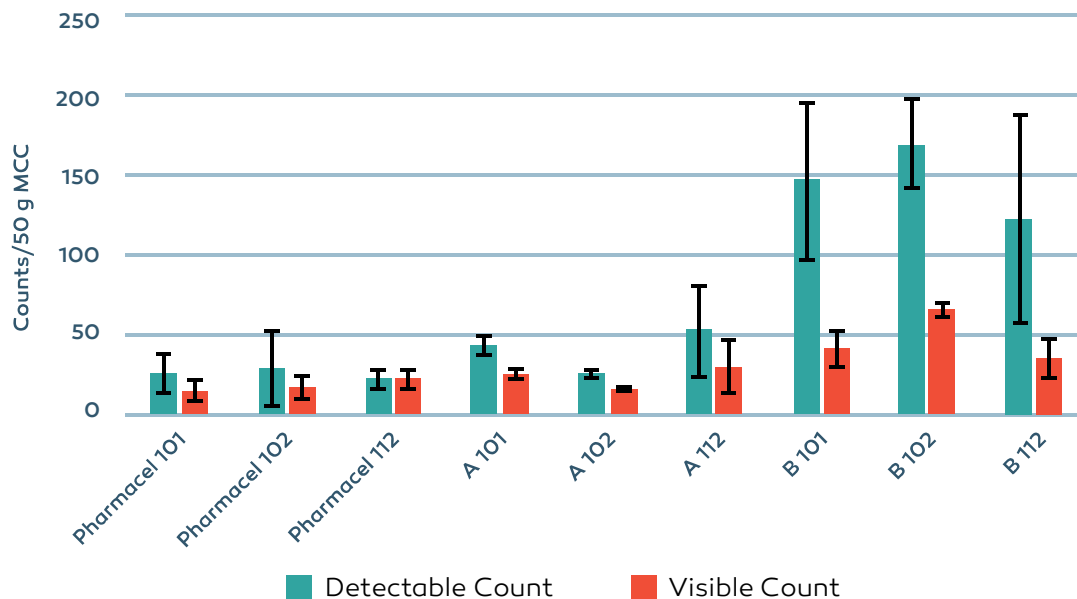


図5 DFE Pharmaおよび他のメーカー（AとB）のMCCの可視粒子数
自動計数された粒子（Detectable Count）は、サイズ 50 μmを超えるすべての着色粒子を含む。目視計数の粒子（Visible count）は、100 μm以上の黒色粒子、150 μm以上の茶色粒子、および200 μm以上の黄色粒子を指す

可視粒子について、各メーカー内にMCCグレード間の変動が認められなかったが、メーカー間の変動は大きかった。各MCCグレードにおいて、PharmacelとA社の製品は、B社より可視粒子の量が少ないことが確認された。自動計数と比べて、目視計数の結果は減少する傾向があった。またB社のMCCには、目視では確認できない、自動計数で検出可能な粒子が多いと示唆された。可視粒子の報告書により、100を超える多くの小さな黒い粒子が存在することが判明した。これは原材料に多く混在する黒色微粒子か、B社の製造工程で生成したものと推測される。閾値により、これらの粒子は目で見えないと想定したが、検出能力の個人差によって、判断は非常に主観的である（図1の「可視グレーゾーン」）。

上述のブランド間の比較結果により、自動粒子計数法の優位性が示された。2種の閾値設定（すなわち、自動計数と目視計数）により、それぞれの計数だけでなく、B社のように粒子数変動の原因を定性的に評価することもできた（例えば小さな黒い粒子）。従って、粉体中の可視粒子について、自動粒子計数法により、これまでにないレベルの信頼性、精度、および詳細な情報を提供することが可能になる。

5. 結論

MCCなどの粉末製品に含まれる可視粒子の目視計数は、本質的に偏りやすく、不正確な計数や信頼性の低い所見につながる可能性がある。画像解析を用いた自動計数により、計数の主観性が排除された。とはいえ、信頼性の高い計数を行うには、2つの前提条件を満たす必要がある。1点目、添加剤中の可視粒子の発生頻度が極めて低いことで、大量の粉体に対応する分析方法の確立が必要である。2点目、粒子の色、コントラスト、サイズの閾値を正しく設定・固定する必要がある。従って弊社では、添加剤中の可視粒子について、客観性の高い、詳細な情報を収集可能な自動粒子計数法を開発した。

標準化された客観的な方法論に加え、自動計数システムを構築することにより、可視粒子の画像をデータベースに保存・分類することが可能になった。このデータベースは、添加剤の技術的に不可欠な粒子プロファイル（TUPP）を構築するために使用され、医薬品メーカーや規制当局と共有することが可能である。最後に、自動粒子計数法は、製品生産中に可視粒子が予想外に増加した場合、早期警告を提供し、製造プロセスを最適化する目的で使用することもできる。また本研究でMCC製品では、メーカーによって可視粒子の含有量が異なることが示された。自動粒子計数法で測定した結果では、あるメーカーのMCCは他社製品と比較して可視粒子の量が3~8倍多かった。

6. 参考文献

- [1] J. Gross-Rother, M. Blech, E. Preis, U. Bakowsky, P. Garidel, *Particle detection and characterization for biopharmaceutical applications: Current principles of established and alternative techniques*, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics1211112>.
- [2] C.C. DeMerlis, A. Smith, D.R. Schoneker, *Regulatory Information for Excipients*, in: *Pharmaceutical Excipients*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2016: pp. 241–267. <https://doi.org/10.1002/9781118992432.ch6>.
- [3] S. Ardizzone, F. Dioguardi, T. Mussini, *Microcrystalline cellulose powders: structure, surface features and water sorption capability*, *Cellulose*. 6 (1999) 57–69. <https://doi.org/10.1023/A:1009204309120>.
- [4] G.A. Hebbink, B.H.J. Dickhoff, *Application of lactose in the pharmaceutical industry*, in: *Lactose*, Elsevier, 2019: pp. 175–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00005-2>.
- [5] N. Gordon, *Colour blindness*, *Public Health*. 112 (1998) 81–84. <https://doi.org/10.1038/SJ.PH.1900446>.
- [6] J. Rech, A. Fradkin, A. Krueger, C. Kraft, D. Paskiet, *Evaluation of Particle Techniques for the Characterization of Subvisible Particles From Elastomeric Closure Components*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 109 (2020) 1725–1735. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2020.01.026>.
- [7] T.J. Collins, *ImageJ for microscopy*, *Biotechniques*. 43 (2007) S25–S30. <https://doi.org/10.2144/OO0112517>.

DFE Pharma sales offices

Head Office

Klever Strasse 187
P.O. Box 20 21 20
47568 Goch
Germany
T. +49 2823 9288 770
F. +49 2823 9288 7799
pharma@dfepharma.com

Japan

Taiyo Seimei Bldg. 14F
2-16-2, Konan, Minato-ku, Tokyo
108-0075 Japan
T. +81 3 6260 0740
F. +81 3 6260 0754

Brazil

Rua Fradique Coutinho, 30 - sala 61
05416-000 São Paulo SP Brazil
T. +55 11 2395 1700

India

Plot No. 148
Prestige Featherlite Tech Park
2nd Phase, EPIP Zone
Whitefield, Bangalore 560066
India
T. +91 80 4925 6100
F. +91 80 4925 6150

North America

61 South Paramus Road
Suite 535
Paramus, NJ 07652
USA
T. +1 551 497 7355
F. +1 551 497 7358

Singapore

3 Temasek Avenue
#11-01 Centennial Tower
Singapore 039190
T. +65 6580 8100
F. +65 6580 8191

China

Room 302
No. 68 Bohang Road
Pudong Shanghai
China
T. +86 21 6134 5821
F. +86 21 6134 5800

dfepharma.com

To learn more about the DFE Pharma approach for the detection of visible particles in excipients, please contact: Dr. Gerald Hebbink- gerald.hebbink@dfepharma.com

DFE Pharma GmbH & Co. KG

The details given here are merely intended for information purposes and are in no way legally binding. Consequently we accept no responsibility in the broadest sense of the word for damage that may result from applications based upon this information. Furthermore, this information does not constitute permission to infringe patent and licence rights.