

気液界面制御による医薬候補化合物の結晶多形制御

大阪大学大学院工学研究科
電気電子情報工学専攻 量子電子デバイス工学コース
機能性材料創製領域 森研究室

池田 憲治

【研究背景・目的】

多くの有機化合物は結晶多形を有しており、特に医薬品業界において非常に重要である¹⁾。なぜなら同じ医薬品有効成分でも結晶多形が異なると、溶解度・バイオアベイラビリティ・経時安定性などが異なるためである²⁻⁵⁾。例えば、消炎鎮痛薬で非水溶性のインドメタシンの場合、準安定相は安定相に比べ約 1.3 倍の溶解度を有している。多くの場合、より高い溶解度はより高いバイオアベイラビリティに関連する⁶⁾。より高いバイオアベイラビリティを持つ α 形は投与量の削減や副作用の軽微化に可能性があり、最終的には Drug Repositioning (特定疾患に有効な治療薬から、別の疾患に有効な新たな薬効をみつけたこと)にまでも到達し得る。それ故、現在難溶性薬剤において、性質を改善するためにより不安定な多形を用いることに注目が集まっている⁷⁾。

インドメタシンの場合、 α 形 (準安定相) は、エタノールで溶解後、急冷により結晶化されてきた⁸⁾。しかし、得られた α 形結晶は約 18 時間で γ 形 (安定相) へと転移してしまう⁹⁾。また、アセトニトリルなど他の溶媒での実験も報告されているが、準安定相の核発生自体が起きていない¹⁰⁾。準安定相の核発生自体が困難であり、純度が極めて高い準安定相を形成しない限りは安定相へと簡単に転移してしまうことから、これまで準安定相の選択晶出は困難とされていた。そこで我々は、薬剤としてのメリットがある多形を結晶化する技術開発を目指した。

モデル材料として上述のインドメタシンを、溶媒としてアセトニトリルを用いた。十分に高い過飽和条件においては、準安定相が優先的に晶出し、安定相があとに続いて晶出することが知られている¹¹⁾。そこで、多形制御のキーパラメータとして、溶液の過飽和度に着目した。また、核発生を強制的に誘起する方法として、レーザー誘起結晶化技術を用いた¹²⁻¹⁷⁾。溶液中へのレーザー照射はキャビテーションバブル (気液界面) を生成する。これまでに、低過飽和溶液 (通常では均質核形成しない条件) に対してレーザーを照射すると、キャビテーションバブルが発生し、この発生した

バブルが膨張収縮を繰り返す過程において一時的かつ局所的に過飽和度が上昇し、タンパク質の結晶化が成功したと報告されている¹⁸⁻²¹⁾。そこで、本研究ではレーザー照射によるキャビテーションバブル (気液界面) を非水溶性インドメタシンの高過飽和溶液に対して導入することで、準安定相のみの核発生を試みた。なお、得られた結晶の経時安定性は粉末 X 線回折 (PXRD) 測定により継続して測定した。その結果、これまでの報告例⁹⁾ と比べて、経時安定性の高い準安定相の晶出に成功したので報告する。

【実験・考察】

インドメタシン (東京化成工業株式会社, 純度 :98%) を、それ以上の精製無しに使用した。この材料は粉末 X 線回折測定により γ 形であることを確認した。全ての実験において、溶媒としてアセトニトリル (和光純薬株式会社, 純度 :99.5%) を使用した。インドメタシン-アセトニトリル溶液 (濃度 25mg/ml, 飽和点 37°C) を 120ml テフロン容器内で調製し、定温乾燥機 (アズワン株式会社, DO-450A) 内で 70°C に保温し、テフロン製の磁気スターラー攪拌子を用いて 500rpm の攪拌速度で攪拌しながら 6 時間保持し、インドメタシンを完全に加熱溶解させた。その後溶液を 60°C まで降下させ、60°C ブロックインキュベーター (アステック株式会社, BI-516S) で温度を維持しながら、1ml ホウケイ酸ガラスバイアル瓶にレーザー照射用と攪拌用 (比較用) に 0.1ml ずつ分注した。その後、全バイアル瓶を 3°C/h の冷却速度で 0°C まで降下させ、0°C (過飽和度 $\sigma_\gamma=3.5$) で約 2 日間保持した。 γ 形インドメタシンの過飽和度 (σ_γ) は $\sigma = (C - C_e) / C_e$ から求めた。 C は γ 形インドメタシンの溶液濃度で、 C_e は溶解度である¹⁰⁾。

結晶化が起きてないサンプルに対し、まずはレーザーによる結晶化を試みた。レーザーはフェムト秒レーザー (サイバーレーザー株式会社, IFRIT, $\tau = 200\text{fs}$, $\lambda = 800\text{nm}$, 1 kHz) を用いた。レーザー照射は図 1 の模式図に示すような方法で行った。レーザーパルス (エネルギー 30 $\mu\text{J/pulse}$, パルス数 60,000pulses) は対物レンズ (オリンパ

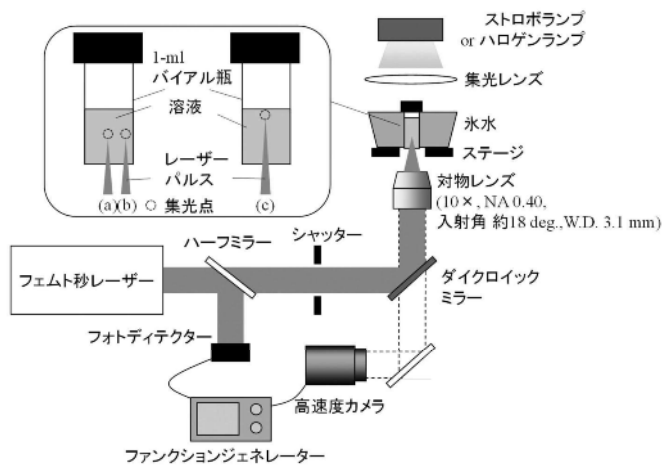


図1 フェムト秒レーザーと高速カメラの実験系

ス株式会社, 10×, NA 0.40, 入射角 約 18°, W.D. 3.1mm) を用いて 0-3℃環境下で溶液中へ照射した。レーザービーム径 (15mm) は対物レンズの開口 (14.5mm) を十分に満たすまで広げている。30μJ/pulse のレーザーパワーは 1ml バイアル瓶を用いた際にキャビテーション発生に必要なエネルギーであり, 60,000pulses はそのバブルを溶液内に残しておくために必要なパルス数である。レーザー集光点は, 容器底面から約 500μm の溶液中央 (図 1[a]), 容器底面から約 500μm かつバイアル瓶の壁面から約 100μm の側壁近傍 (図 1[b]), 容器底面から約 700μm かつ気液界面から約 100μm の気液界面 (図 1[c]) を選んだ。実効的な入射角と開口数から算出したところ, 側壁近傍 (図 1[b]) へのレーザー照射をする場合, レーザーの一部 (約 13%) は容器表面で欠けている。しかし, 本質はキャビテーションバブルが発生することであり, 図 1[b] の場合には, バイアル瓶壁面からキャビテーション発生位置までの距離が常に約 100μm になるようにマイクロメーターを用いて, 調整しているため, レーザーの欠けは問題ではない。レーザー照射時の温度は約 3℃程度まで冷却し, できるだけ温度上昇による過飽和度の低下が起きないようにした。次に, 溶液内にテフロンでコーティングされた攪拌子を入れて, 磁気スターラーで攪拌することによる結晶化を試みた。攪拌は 0℃インキュベータ (ヤマト科学株式会社, IN604) 内で行っており, 結晶化を確認後すぐに停止した。本実験で得られた結晶は濾紙により溶液から取り出し, 大気にて乾燥を行った。実験は各実験条件下でそれぞれ繰り返され, 結晶化確率は結晶化が起こったサンプル数をカウントすることにより見積もった。なお, 結晶化は目視にて観察を行っており, 多形同定には粉末 X 線回折 (PXRD) 測定 (株式会社リガク, SmartLab) および顕微鏡写真 (株式会社ニコン, Eclipse TS 100) により行った。得られた PXRD 測

定データは, 過去の結果と比較した^{9,22)}。最終的に, 300μl のα形, γ形それぞれの飽和溶液を蒸発させ, 残った結晶重量を測定することで, インドメタシンアセトニトリルの溶解度曲線を決定した。

レーザー照射および攪拌を行わなかった場合, 0℃まで降下した約 2 日後には過飽和状態 ($\sigma_\gamma=3.5$) でも核発生が起きなかった。さらに, 0℃到達から少なくとも 1 ヶ月間は自然核形成が起きないことを確認した。レーザー照射の場合は集光位置に依存して, 異なる結果を示した。容器中央 (図 1[a]) へとレーザーを照射した時, 24 時間以内に核形成が起き, 結晶化が確認されてから 24 時間以内には, 全ての結晶が 500-600μm の平板状結晶になっていることが確認された (図 2[1])。壁面近傍または気液界面 (図 1[b], 1[c]) へのレーザー照射の場合, 24 時間以内に核形成が起きた。ここでレーザー照射から 24 時間後に得られた結晶は針状で 1mm 程度の結晶であった (図 2[2], 2[3])。図 3[2], 3[3] に針状結晶の PXRD プロファイルを示す。図 3[2] は先行研究で示されているα形に関するデータと一致する^{9,22)}。図 3[3] は大部分でα形と一致するが, 幾つかのγ形特有のピーク (13.56, 21.76, 26.52 [deg]) も存在する。攪拌を行った場合には核形成は 1 時間以内に起こり, 針状で 100-200μm の大きさの結晶が得られた (図 2[4])。しかしながら, これらの結晶のすべては結晶化から

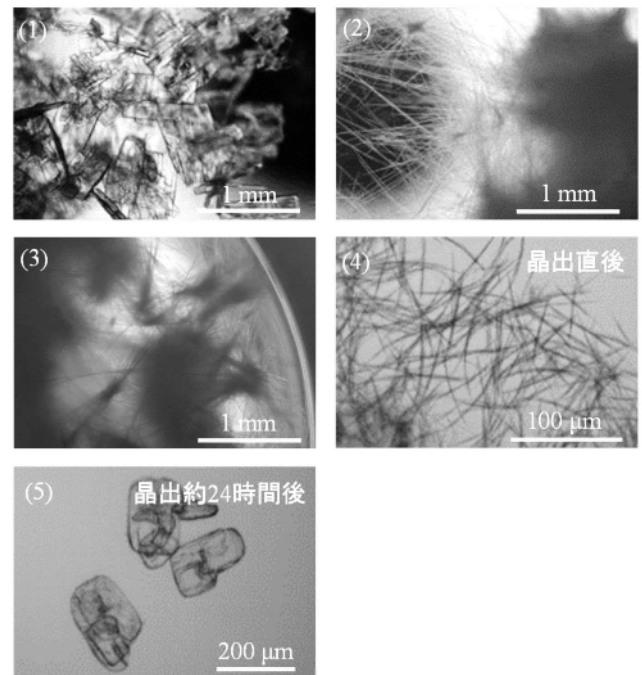


図2 インドメタシン多形の結晶写真

- (1) 溶液中央へのレーザー照射によって得られた平板状結晶
 - (2) 側壁近傍へのレーザー照射によって得られた針状結晶
 - (3) 気液界面付近へのレーザー照射によって得られた針状結晶
 - (4) 攪拌直後に得られた針状結晶
 - (5) 攪拌約 24 時間後に得られた平板状結晶
- (1) - (5) は経時的に安定していた

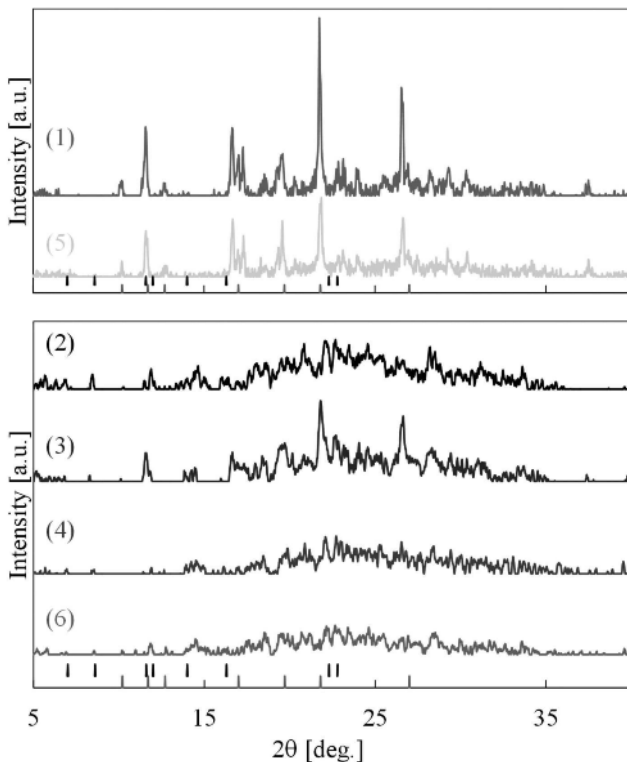


図3 インドメタシンの粉末 X 線回折パターン
 (1) 溶液中央へのレーザー照射で得られた平板状結晶
 (2) 側壁近傍へのレーザー照射で得られた針状結晶
 (3) 気液界面付近へのレーザー照射によって得られた針状結晶
 (4) 攪拌直後に得られた針状結晶
 (5) 攪拌約 24 時間後に得られた平板状結晶
 (6) 側壁近傍へのレーザー照射 ((2) の条件) から約 8 ヶ月後の結晶
 2つの結晶相 (α 形(上)と γ 形(下))のピーク位置は明らかになっている
 (1) - (5) は図 2 で示した図と対応している

約 24 時間には溶液中で平板状結晶へと転移していた (図 2[5]). 図 3[4], 3[5] に針状結晶と平板状結晶の PXRD プロファイルを示しており, これらのデータはそれぞれ α 形と γ 形と一致した^{9,22)}. 典型的な α 形と γ 形の PXRD プロファイルは過去の研究により示されている. 溶媒は異なるが, 著者は論文に報告されている短期間での α 形から γ 形への転移を確認した²²⁾.

本研究において壁面近傍へのレーザー照射により得られた α 形結晶は, 室温大気中 (図 3[6]) および 0C 溶液中で少なくとも 8 ヶ月の高い経時安定性を示している. 気液界面照射にて得られた α 形結晶の安定性については, 側壁近傍への照射で得られた α 形結晶の安定性よりも低い可能性が高い. これは PXRD プロファイルにて幾つかの γ 形ピークが確認されたからである. 著者らのグループで行っているアセトアミノフェンという物質を用いた多形制御の実験において, 安定相が存在する環境に準安定相の結晶をシーディングすると, わずか 1 日で全ての結晶が安定相に相転移することが確認されている²³⁾. このことから, γ 形の混入は α 形の γ 形への相転移を促進させると考えられるからである.

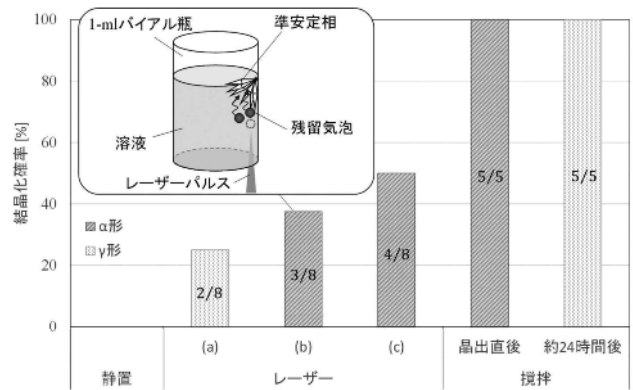


図4 各条件における結晶化確率: 強制的核発生技術なし (静置), レーザー照射 [溶液中央 (a), 側壁近傍 (b), 気液界面付近 (c)], 攪拌 (晶出直後と結晶化約 24 時間後) (a), (b), (c) は図 1 に示した位置と一致する

図 4 にそれぞれの条件下における結晶化確率を示す. レーザー照射の場合, 容器中央, 壁面近傍, 気液界面への照射はそれぞれ照射開始から約 24 時間で γ 形が 25% (2/8 本), α 形が 37.5% (3/8 本), 50% (4/8 本) の確率で結晶化した. 一方, 攪拌の場合, 攪拌開始から 1 時間後には 100% (5/5 本) で α 形が結晶化していた. しかし, これら全ての結晶は約 24 時間後には γ 形へと転移していた. これらの結果はレーザー照射, 攪拌共に核形成を促進させる効果的な方法であることを示している. さらには, 固液界面へのレーザー照射は α 形を晶出するのに効果的であると考えられる. レーザー集光位置を制御することで, 結晶多形制御が可能であることが示された.

この実験において, レーザーパワーが十分に高いためレーザー照射時にキャビテーションバブルが発生した. ここで, 著者はキャビテーションバブルの挙動と結晶化した多形に着目した. 容器壁面近傍や気液界面へ照射した時 (α 形が結晶化), 著者はキャビテーションバブルが壁面および気液界面付近で不均一に収縮し, 最終的にそれらに向かって崩壊していく様子を確認した. その後, 多くの気泡が現れ, 容器壁面に沿って上昇していた. 最終的に気泡は溶液のメニスカス部分に到達した. α 形の核形成はこれらの残留気泡の位置より確認された^{16,24,25)}. これらの残留気泡は, 飽和溶液中に溶け込んでいる溶存気体もしくは, レーザー照射による熱的・化学的反応によって生み出されたガスであると考えられる. 溶液のメニスカス部に残留する気泡上では, 十分な蒸発が起こり, 局所的に高い過飽和度が実現されると考えられる. 安定相・準安定相両方にとって, 十分に高い過飽和度が実現されると, より低い界面エネルギーをもつ準安定相の方が優先的に結晶化し得る (オストワルドの段階則²⁶⁾). 結果として, 高純度の α 形結晶が得られたと考えられる. オストワルドの

段階則に従う多くの結果がこれまでに報告されている²⁷⁻²⁹⁾。しかしながら、気液界面照射の場合は溶液側から照射しているために、溶液がスプラッシュされて、多くの小さな液滴がバイアル瓶壁面に付着する。そしてその小さな液滴が蒸発して核発生のポイントとなり得る。溶媒蒸発法により得られるインドメタシンは γ 形であることがほとんどであるため、PXRD プロファイル (図 3[3]) に α 形と γ 形両方のピークが存在したと考えられる。溶液中央への照射の場合 (γ 形が晶出)、キャビテーションバブルは均一に膨張収縮を繰り返す。このキャビテーション挙動は既に報告されている挙動³⁰⁾と一致しており、やはり最終的にバブルが崩壊し気泡が生じる。この場合、気泡は気液界面に留まるが、気泡が液のメニスカス部に留まった場合に比べ、蒸発効率が低い。過飽和度の緩やかな変化は核形成された準安定相の成長を低速にさせる。安定相の核形成が可能な過飽和度が比較的長く維持されるため、準安定相の核形成に追従して安定相が核形成すると考えられる。ひとたび安定相が結晶化すると、安定相よりも高い溶解度を持つ準安定相が溶解する一方、安定相が急速に成長し、最終的に支配的な多形となる³¹⁾。攪拌の場合も、磁気攪拌子の周りから気泡は発生するが、長期間保持される残留気泡は側壁近傍へのレーザー照射に比べて少ない。それ故、 α 形の結晶化が効率良く行われず、結果として攪拌自体の衝撃により結晶化した γ 形が優先的に残ったと考えられる。

本実験により安定に得られた α 形 (準安定相) を用いてインドメタシン—アセトニトリル溶解度の測定を試みた。 α 形は γ 形 (安定相) に比べ約 1.5 倍の溶解度を示した (図 5)。また、今回の測定条件内 (0, 10, 20, 30, 40°C) では、 α 形と γ 形の溶解度曲線は交わらず、単変系であることが明らかになった。以上より、非水溶性インドメタシンに

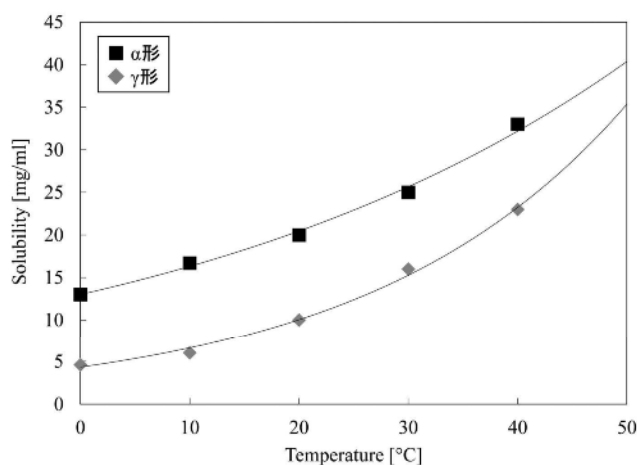


図 5 インドメタシン α , γ 形それぞれのアセトニトリルに対する溶解度 (0- 40°C) と近似曲線

ついて、レーザー集光位置の制御が経時的に安定な準安定相晶出の鍵となり得ることが示された。

【結論】

強制的核発生技術、すなわちレーザー照射と攪拌、を高過飽和インドメタシン溶液に導入することにより、 α 形 (準安定相) の選択晶出を試みた。両方の技術ともインドメタシンの核発生に有効であった。さらに、側壁近傍や気液界面付近へのレーザー照射は α 形晶出に有効であった。側壁近傍への照射で得られた α 形結晶は、室温溶液中および 0°C 大気中で少なくとも 8 ヶ月は継続して安定している。また、レーザー照射により得られた安定な α 形を用いて、 α 形溶解度の測定に成功した。その結果、0- 40°C の範囲で γ 形に比べ、1.5 倍の溶解度を有していた。最終的に、高過飽和条件と界面へのレーザー照射が高純度・高安定性の準安定相結晶化に有効であると結論づける。この技術は、原理的には他材料への展開も可能であり、今後 drug repositioning 実現のための重要な技術となり得る。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、ご協力頂きました大阪大学大学院工学研究科の森勇介教授、井上豪教授、吉村政志准教授、安達宏昭特任准教授、丸山美帆子特任助教、高橋義典特任研究員、森陽一郎さん、理学研究科の杉山成特任准教授、東京工業大学生命理工学研究科の村上聡教授、京都府立大学生命環境科学研究科の高野和文教授、立命館大学生命科学部の松村浩由教授、埼玉大学理学部の吉川洋史准教授、創晶株式会社の岡田詩乃さんに厚く御礼申し上げます。

〈参考文献〉

- 1) K. Sato, and S. Ueno, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 384 (2011).
- 2) J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals* (Clarendon, Oxford, 2002).
- 3) Brittain, H. G., *Polymorphism in Pharmaceutical Solids* (Marcel Dekker, New York, 1999).
- 4) J. Bernstein, and J.D. Dunitz, *Acc. Chem. Res.* 28, 193 (1995).
- 5) R. J. Davey, *Chem. Commun.* 1463 (2003).
- 6) N. Kaneniwa, M. Ostuka, and T. Hayashi, *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3447 (1985).
- 7) Florence, Alexander T, and Attwood, David,

- Physicochemical Principles of Pharmacy, (2011)5th ed.
- 8) L. Borcka, *Acta Pharm. Suec.* 11, 295 (1974).
- 9) N. Kaneniwa, M. Otsuka, and T. Hayashi, *Pharm. Factory*, 5, 738 (1985).
- 10) S. Lohani, I. V. Nesmelova, R. Suryanarayanan, and D.J.W. Grant, *Cryst. Growth Des.* 11, 2368 (2011).
- 11) A. Getsoian, R.M. Lodaya, and A. C. Blackburn, *Int. J. Pharm.* 348, 3 (2008).
- 12) B. Garetz, J. Aber, N. Goddard, R. Young, and A. Myerson, *Phys. Rev. Lett.* 77, 3475 (1996).
- 13) B. Garetz, J. Zaccaro, J. Matic, and A. Myerson, *Cryst. Growth Des.* 1, 15 (2001).
- 14) B. Garetz, J. Matic, and A. Myerson, *Phys. Rev. Lett.* 89, 175501 (2002).
- 15) T. Sugiyama, T. Adachi, and H. Masuhara, *Chem. Lett.* 36, 1480 (2007).
- 16) T. Rungsimanon, K. Yuyama, T. Sugiyama, H. Masuhara, N. Tohnai, and M. Miyata, *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 599 (2010).
- 17) T.-H. Liu, T. Uwada, T. Sugiyama, A. Usman, Y. Hosokawa, H. Masuhara, T.-W. Chiang, and C.-J. Chen, *J. Cryst. Growth* 366, 101 (2013).
- 18) H. Adachi, K. Takano, Y. Hosokawa, T. Inoue, Y. Mori, H. Matsumura, M. Yoshimura, Y. Tsunaka, M. Morikawa, S. Kanaya, H. Masuhara, Y. Kai, and T. Sasaki, *Jpn. J. Appl. Phys.* 42, L798 (2003).
- 19) Y. Hosokawa, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, and H. Masuhara, *Cryst. Growth* 5, 861 (2005).
- 20) H.Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, and H. Masuhara, *Jpn. J. Appl. Phys.* 45, L23 (2006).
- 21) K. Nakamura, Y. Hosokawa, and H. Masuhara, *Cryst. Growth Des.* 7, 885 (2007).
- 22) M. Otsuka, F. Kato, and Y. Matsuda, *Analyst* 126, 1578 (2001).
- 23) Yo. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Ikeda, S. Fukukita, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura and Yu. Mori, *Appl. Phys. Express*, 8, 065501 (2015).
- 24) I. Weissbuch, F. Frolow, L. Addadi, M. Lahav, and L. Leiserowitz, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 7718 (1990).
- 25) M. Iwamoto, O.-Y. Zhong-can, and D. Waals, *Am. Phys. Soc.* 50, 614 (1994).
- 26) R. a. Van Santen, *J. Phys. Chem.* 88, 5768 (1984).
- 27) J. J. De Yoreo, and P. G. Vekilov, *Biom mineralization* (Mineral Soc. Am., Washington, DC, 2003) p.57.
- 28) J.R.I. Lee, T.Y. Han, T.M. Willey, D. Wang, R.W. Meulenberg, J. Nilsson, P.M. Dove, L.J. Terminello, T. Van Buuren, and J.J. De Yoreo, *J. Am. Chem. Soc.* 10370 (2007).
- 29) G. Nichols, and C. S. Frampton, *J. Pharm. Sci.* 87, 684 (1998).
- 30) R. Murai, H.Y. Yoshikawa, Y. Takahashi, M. Maruyama, S. Sugiyama, G. Sazaki, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, S. Murakami, T. Inoue, and Y. Mori, *Appl. Phys. Lett.* 96, 043702 (2010).
- 31) C. Gu, V. Young, and D. Grant, *J. Pharm.* 90, 1878 (2001).



(電気電子 平成25年卒 27年前期)
勤務先：ソニー株式会社
業務内容：内視鏡の次世代技術開発