

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21560781

研究課題名（和文）溶液構造に着目した有機結晶の核発生制御とナノ結晶製造への展開

研究課題名（英文）Control of crystallization nucleation of organic compounds in recognizing of the importance of solution structure and its application for production of nano crystals

研究代表者

大嶋 寛 (OOSHIMA HIROSHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20112526

研究成果の概要（和文）： 医薬の化学構造は、複雑で溶解しにくくなってきている。薬の効き目をよくするためには、医薬の結晶を微小にして溶解性を上げる必要がある。そのためには、結晶化の初期過程である結晶核形成の制御が重要である。しかし、結晶核形成のメカニズムは充分には解明されていなかった。本研究によって、溶液中の医薬分子会合体の構造変化と拡散（溶液中で分子自らが移動すること）を制御することが重要であることが初めてわかった。また、それを応用するプロセスをいくつか検討した。

研究成果の概要（英文）： Chemical structure of pharmaceutical compounds evolves to become complex and hard to dissolve. To increase bioavailability of drugs, we must produce fine crystals of drugs by controlling the nucleation step of crystallization. However, the mechanism of nucleation has not been well understood. In the present study, we found for the first time that the control of the change of molecular associate structure and the control of diffusion of molecules are important to control nucleation. Furthermore, we attempted some processes to produce fine crystals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：(工学)

科研費の分科・細目：化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：晶析・結晶核形成メカニズム・粒径と粒径分布・ナノ結晶・有機化合物結晶・医薬結晶・マイクロ波照射

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ結晶製造に関する研究が活発に行われてきた。しかし、難溶性医薬のバイオアベイラビリティ（医薬の生体有効度）を上げるために期待される有機化合物ナノ結晶を製造する方法は提案できていない。その最大の理由は、有機結晶の核発生メカニズムが充分には解明できていないことにある。溶液における分子間相互作用の重要性は、様々な分野で取り扱われてきたが、結晶核発生との関係では国内外ともに検討されてこなかった。

申請者は、未飽和・過飽和溶液の構造と結晶核発生との関係について検討してきた。しかし、有機化合物のナノ結晶を製造するには至っていない。そこで、有機化合物の結晶核発生のメカニズム解明に関する研究をさらに進めることによって、現実に行っている核発生を正しく理解するとともに、微小な結晶製品を製造するための新しい発想を提供する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、核発生の不連続非平衡メカニズムの解明と、それに基づいた有機化合物ナノ結晶の製造法を提案する。

(1) 申請者は、溶液からの核発生が、結晶中の分子間相互作用に似た相互作用による不規則構造会合体の形成と、それが結晶と同じ構造に転移する規則構造会合体の形成（真の核発生）の2段階で進行することを見いだしている。さらに、核発生が溶液の履歴（溶質の溶解、結晶化、温度変化などの履歴）に依存することがわかっている。これは、溶液の構造変化に他ならない。そこで、未飽和から過飽和にかけての分子のコンフォメーション変化とその速度、不規則構造会合体の形成とその変化に着目した検討を行い、核発生制御につながる晶析操作因子を分子レベルで明

らかにする。

(2) また、今までに行った完全静置溶液における結晶核発生に関する実験から、核発生が溶液を通して伝搬することを示唆する結果を得ている。このような核発生のメカニズムは国内外ともに議論されたことは無い。これも溶液中に形成されている、おそらく溶質分子の巨大なネットワークと言えるような会合体が重要な役割を果たしている現象と考えられ、さらに詳細な検討を行う。

(3) さらに、過飽和溶液中の会合体破壊に着目して、会合体のサイズに影響を及ぼす晶析操作因子、例えば、溶媒の論理的選択、マイクロ波照射、溶質の分子間相互作用とくに水素結合形成に影響を及ぼす第三成分の添加について検討し、有機化合物のナノ結晶を製造する。

3. 研究の方法

(1) 過飽和溶液の構造と核発生 本研究では、アミノ酸誘導体、医薬化合物などの有機化合物を用いて、未飽和あるいは過飽和溶液中の会合体形成と核発生との関係について検討する。

分子のコンフォメーション、会合体の生成と破壊、会合体構造と溶液の過飽和度、溶液の熱履歴などとの関係を明らかにする計画である。その際、既設のペルチェ素子を用いた晶析装置（規則正しく、かつ急激な温度スイングを可能にする装置）による晶析実験を継続して行い、溶液の構造と生成する結晶の関係について体系的に評価する。会合体のサイズについては、既設のシングルナノからの粒子サイズ測定装置、あるいは他機関に依頼して小角X線散乱を用いる計画であるが、その他の測定手段も検討しながら研究を進める。

(2) 核発生の伝搬

申請者の最近の研究で、静止溶液中での核発生は、結晶の極近傍というよりも、結晶表面から離れた場所で大量の核が発生していた。したがって、最初の結晶を中心に同心円状に結晶が生成していく。この現象は核発生の本質的な理解に関わるものであると考えており、慎重に検討する。実験方法としては、レーザー散乱を利用した微視的その場観察システムを構築し、既存結晶周辺の核発生挙動を観察する。

(3) 過飽和溶液中の会合体破壊に着目した有機化合物のナノ結晶を製造するための晶析操作検討

会合体のサイズに影響を及ぼす晶析操作因子を選択しナノ結晶の生成を図る。溶質の分子間相互作用とくに水素結合形成阻害に着目した溶媒および第三成分の選択、過飽和溶液へのマイクロ波照射、ナノ結晶製造のための新規装置開発などについて検討する。

4. 研究成果

(1) 過飽和溶液の構造と核発生

医薬化合物イブプロフェンの晶析を次のようなプロセスで行い、溶液構造と結晶核形成の関係について検討した。

晶析方法：1) 15°C飽和溶液を未飽和 (45°C) から5°Cまで冷却し、結晶が析出するまでの時間 (誘導期間) を測定した。2) 結晶析出後30 min経過後、17°Cまで昇温し、完全に再溶解した後に所定時間保持した。その後再び5°Cまで冷却し、結晶が析出するまでの時間 (誘導期間) を測定した。

この実験で得られた、17°Cで溶解保持した時間と結晶析出までに必要であった誘導期間との関係を図1に示した。40°C未飽和から冷却した場合 (17°C保持時間=0 min) の誘導期間は10 min~200 minに分布しており、核発生のタイミングに再現性がないこと

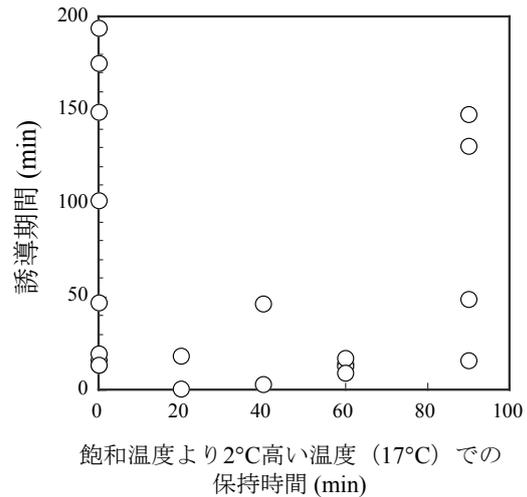


図 1 17°C で完全溶解保持した時間と 5°C で結晶が析出するまでに要した誘導期間との関係

がわかる。一旦析出した結晶を17°Cで20 min間溶解保持した場合には、誘導期間は短く、しかも再現性がよい。また、17°Cで90 min間溶解保持した場合には、再び誘導期間は長くなり、再現性も悪くなっている。これらの結果は、一旦結晶化した溶質は、溶解しても溶液の構造 (分子間相互作用) を記憶しており、結晶化しやすい状況にあること、およびその記憶は90 minで消失することを表している。溶液構造と核発生の関係で価値ある知見が得られた。

(2) 核発生の伝搬

既に溶液中に存在する結晶が、核発生にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。温度を $20 \pm 0.03^\circ\text{C}$ に制御したL-アラニンの静止過飽和溶液に、洗浄した種晶1個を60 $\mu\text{m/s}$ の速度で導入したところ、溶液は静止していたにもかかわらず、種晶から1 cmほど離れた場所で結晶核が発生した。この核形成は、種晶の成長のために溶質分子が、拡散移動したことが原因と考えられ、いままで全く知られていなかったことである。通常溶液中で溶質は会合体を形成しており、拡散により会合

体の構造変化が誘発されたものと推察される。これは、核発生メカニズムについて、全く新しい知見を与えるものであり、将来のさらなる検討課題としたい。

(3) 過飽和溶液中の会合体破壊に着目した有機化合物のナノ結晶を製造するための晶析操作検討

①マイクロ波照射を用いたイブプロフェン結晶の粒径制御

超音波やレーザー光の照射など、結晶核形成をコントロールするために様々な検討が行われている。本研究ではマイクロ波照射が極性分子を選択的に振動させる性質に注目し、有機化合物の結晶化に及ぼすマイクロ波の影響について検討した。モデル物質として難水溶性で極性基を有するイブプロフェン (IBP) を使い、マイクロ波照射が結晶化時間や結晶サイズに与える影響について検討した。

マイクロ波発生装置として、均一な電磁波を連続的に照射できる IDX 社製グリーンモーターを用いた。所定量の IBP をヘキサンに 40 °C で溶解させた後、溶液 7 mL をウォータージャケット付きサンプル管 (図 2) に入れ、500 rpm で攪拌しながら所定の温度まで冷却した。マイクロ波は、飽和度が 1.0 になった時点で照射した。析出した結晶は孔径 0.1 μm のメンブランフィルターで濾過して回収し、走査型電子顕微鏡 (SEM) による結晶形状の観察を行った。

図 3 はマイクロ波照射下および非照射下で冷却晶析を行った時の IBP 溶液温度の経時変化を示している。図中の矢印は、結晶の析出が観察された温度を示している。マイクロ波を照射しない場合は、30~35°C で結晶が析出したのに対し、マイクロ波を照射した実験では、1°C に達してからも長時間結晶が現れな

かった。これらの結果から、マイクロ波を照射しながら IBP の冷却を行うと、結晶核発生が抑制されることがわかった。また、マイクロ波を照射した実験では、温度が 1°C になった時点で、マイクロ波照射を止めたにもかかわらず、100 分以上結晶が析出しなかった。従って、マイクロ波照射の効果は、照射停止後もしばらく持続すると考えられる。

マイクロ波を照射すると飽和度 9.5 に達しても結晶化が抑制されたため、少量の種晶を添加して強制的に結晶化を開始させた。マイクロ波を照射して得られた結晶は照射していない場合に比べて小さなものが得られた。マイクロ波を用いると、通常では達成で

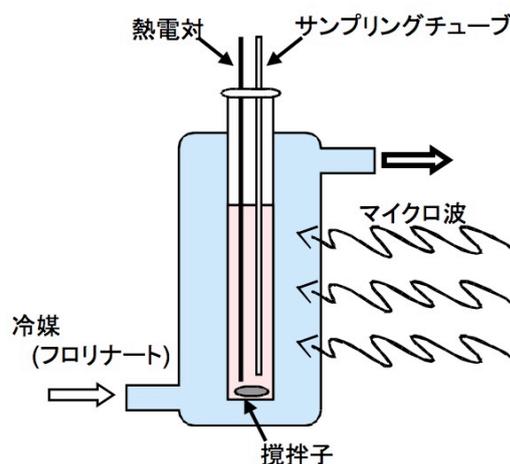


図 2 マイクロ波晶析実験用ガラス容器

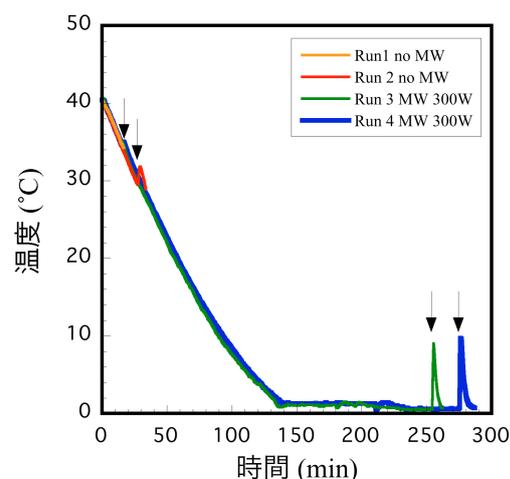


図 3 晶析中の溶液温度の経時変化

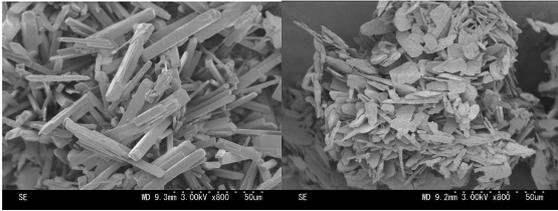


図 4 得られた IBP 結晶の SEM 写真

きない高過飽和状態から結晶化を行うことにより一度に大量の核が発生するため、均一な微結晶が得られたと考えられる (図 4)。

② mL スケール晶析装置を用いたアラニンの冷却晶析

現在、開発されている医薬化合物の約 4 割は難水溶性であるといわれており、その溶解性向上のため、結晶の微粒子化の研究が進められている。また、血中の薬物濃度を容易に制御するため、粒径分布を揃える事も同時に研究されている。我々は以前より、均一な微結晶を得ることを目的とし、高速攪拌機を搭載した容量が mL スケールの連続晶析装置を作製し、有機化合物の貧溶媒晶析について報告してきた。本研究では、同装置を用いて有機化合物の冷却晶析について検討した。

本研究で用いた晶析装置を図 5 に示した。装置の下部より目的物質の溶液と冷媒を供給し、高速攪拌機で瞬時に混合後、装置側面の出口から結晶スラリーを回収する。本研究では、モデル化合物として L-アラニンを、冷媒として水不溶性でフッ素系の不活性液体であるフロリナートを用いた。本品析装置と回分式で得られた結晶の粒子径を検討した。本品析装置では、容量 7.9 mL の晶析装置を用いて、装置出口が 6°C となるように、50°C、200 mg/mL の L-アラニン水溶液と -36°C に冷却したフロリナートをそれぞれ 4.8, 11.2 mL/min の流速で供給し、攪拌速度 13,500 rpm で晶析を行った。回分式では、容量 96 mL のジャケット付き晶析装置に 6°C の冷却水を流

し、装置内に 200 mg/mL の L-アラニン水溶液を注ぎ入れ、13,500 rpm で攪拌した。得られたスラリーの一部を回収し、ろ過、乾燥後、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

図 6 に mL 晶析装置を用いて得られた結晶の SEM 画像を、図 7 に SEM 画像から計測した L-アラニン結晶の粒径分布を示した。本品析装置を用いて得られた結晶は、回分式装置を用いて得られた結晶よりも粒子径が小さく、粒径分布も狭かった。L-アラニン溶液を冷却したフロリナートと攪拌し、瞬時に温度を下げることで、微粒子化が可能になったと考えられる。また、フロリナートは水と混ざり合わないため、装置内で液滴が形成され、フロリナート相に微粒子化した L-アラニン水溶液相が分散したことも考えられる。

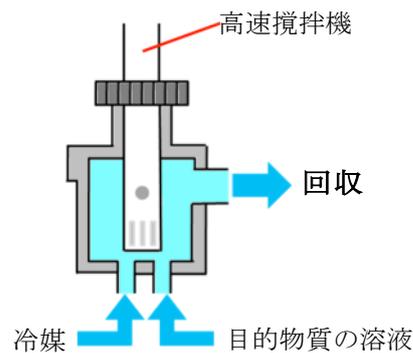


図 5 mL スケール連続晶析装置の概要

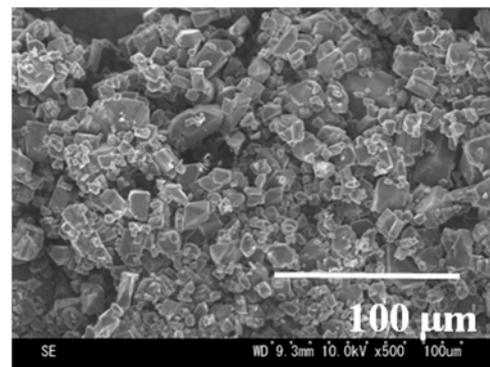


図 6 mL 晶析装置を用いて得られた L-アラニン結晶の SEM 画像

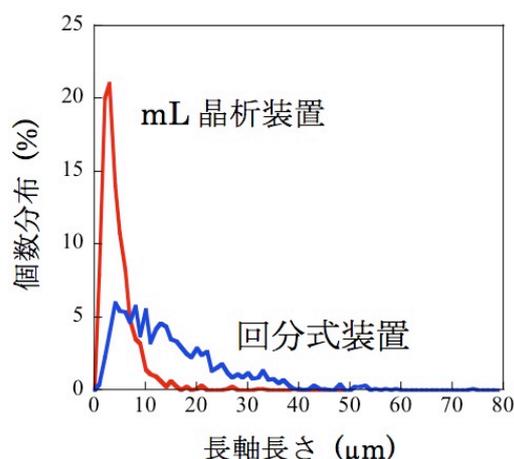


図7 L-アラニン結晶の粒径分布(長軸)

以上のように、高速攪拌機を搭載した容量が mL スケールの連続晶析装置を用いることにより、滞留時間を短く、装置内を均一にする事が可能であり、粒子径が小さく、均一な結晶を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Koichi Igarashi, Yasuhiro Yamanaka, Masayuki Azuma and *Hiroshi Ooshima, Control of Crystal Size Distribution Using a mL-Scale Continuous Crystallizer Equipped with a High Speed Agitator, *J. Chem. Eng. Japan*, Vol. 45, No. 1, pp. 28-33 (2012)

② Hirano, M., K. Igarashi, K. Machiya, R. Tamura, H. Tue and *H. Ooshima, Relationship between Crystal Polymorphism and Solution Structure of an Imidazopyridine Derivative as a Drug Substance for Osteoporosis, *J. Chem. Eng. Japan*, 42, 204-211 (2009)

③ Machiya, K., S. Ieda, M. Hirano and *H. Ooshima, Effects of Impurities on Crystal Polymorphism of an Imidazopyridine Derivative Developed as a Drug Substance for Osteoporosis, *J. Chem. Eng. Japan*, 42, 147-152 (2009)

[学会発表] (計 21 件)

① 【Invited lecture】 Hiroshi Ooshima, Effect of Solution Structure on Crystal Nucleation of Organic Compounds, The 20th Nisshin Engineering Particle Technology International Sem

inar (NEPTIS-20), Otsu, pp.11-16 (2011)

② 【Plenary lecture】 Hiroshi Ooshima, Crystalization of Pharmaceutical Compounds Depending on the Structure of Solution, ICMAT2011 GG:CGCT-5-Industrial Crystallization, Singapore, 2011・6

③ 【招待講演】 大嶋 寛, 有機化合物の結晶化挙動 -主として結晶多形の析出について-, 大阪大学タンパク質研究所セミナー「タンパク質異常凝集の原理と制御」、大阪大学タンパク質研究所 (2011・4)

④ 【基調講演】 大嶋 寛, 製薬への晶析工学の貢献と今後の課題, 化学工学会第 43 回秋季大会、名古屋工業大学 (名古屋) (2011・9)

⑤ 【基調講演】 大嶋 寛, 溶液構造から構築する晶析の論理, 化学工学会第 42 回秋季大会、同志社大学 (京都) (2010・9・7)

⑥ 【招待講演】 大嶋 寛; 有機化合物の結晶多形および擬多形出現のメカニズムと制御、日本プロセス化学会サマーシンポジウム2009 (2009. 7. 17)

[図書] (計 1 件)

大嶋 寛 (分担)、分離技術ハンドブック、分離技術会編、pp.422-427 (総頁数 1218) (2009)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 伝熱装置

発明者: 野田秀夫・大嶋 寛

権利者: 関西化学機械製作株式会社

種類: 特許

番号: 第 4886157 号

取得年月日: 平成 23 年 12 月 16 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 寛 (OOSHIMA HIROSHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 20112526

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

五十嵐 幸一 (IGARASHI KOICHI)

大阪市立大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 70315977