

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01339

研究課題名（和文）精密格子振動計測を利用した極微量不純物定性・定量技術の開発

研究課題名（英文）Qualitative and quantitative detection of trace impurities by precise lattice vibration measurement

研究代表者

佐々木 哲朗（Sasaki, Tetsuo）

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：20321630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、医薬品中の微量不純物検出に関し、世界最高性能を更新するという目標をクリアした。その上で更に極微量の検出まで実現する目標であったが、これは世界的な液体ヘリウム供給不足により想定通りは進まなかった。しかし、苦肉の策として高い温度での計測を進めることとしたことで、予想外に室温でも低温と同様に、周波数シフト法の適用が可能であることがわかったため、むしろ実用化に向けては非常に大きな成果となったと考えている。また、量子化学計算の支援を受けてこれらの医薬品結晶の分子振動解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この5年のうちに起きた世界的な薬害事件であるニトロソアミン問題は、高血圧治療薬の一種が保管中に自己分解して発がん性のあるニトロソアミン類を生成するというものである。この問題に対処する場合、ニトロソアミンの1日の許容摂取量がng程度なのでppmオーダーの不純物検出が求められる。本研究はまさにこのような極微量検出を実現する新規的な技術を目指しており、本研究によって世界最高性能を更新することができた。更に液体ヘリウムの世界的枯渇によってやむを得ず計画を変更した結果、常温でも適用可能であることを発見し、製造工程中モニタリングへの応用可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we met our goal of achieving the world's highest performance in the detection of trace impurities in pharmaceuticals. The goal was to achieve even higher detection of extremely small amounts of impurities, but this did not go as expected due to the global shortage of liquid helium. However, as a desperate measure, we decided to proceed with measurements at higher temperatures, and unexpectedly found that the frequency shift method could be applied at room temperature just like as at lower temperatures, which we consider to be a very significant achievement toward practical application. In addition, with the support of quantum chemical calculations, we have also advanced the assignments of molecular vibrations in these pharmaceutical crystals.

研究分野：テラヘルツ分光学

キーワード：微量検出 医薬品製造 共振センサ テラヘルツ 結晶成長 分子振動

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、新規的な医薬品中の微量不純物検出技術に関わる。意図しない不純物の混入は薬害事件に直結することがある。1960 年前後に世界的に問題となったいわゆる「サリドマイド事件」は鎮静作用のある R-サリドマイドに、催奇性のある光学異性体の S-サリドマイドが混入したことが原因と疑われた。また、1980 年代に米国で起こった「トリプトファン事件」は、必須アミノ酸の一種トリプトファンの摂取によって多くの人に好酸球増加筋肉痛症候群が発生した事例であり、当時は混入した微量不純物の影響であるとされた。これらの事件を契機として、世界的に混入不純物の深刻さが認識されるようになり、原薬・製剤共に厳格な国際基準のガイドラインが導入されることになった（但し、現在はこれらの事件の原因は不純物ではなかったとされている）。このような事例を受け、原薬に関して「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」(ICH-Q3)において、おおよそ 0.05% を閾値としてその不純物の報告が必要となることが記載されている。つまり、測定装置は微量不純物検出下限としては 0.05 % ( ~ 500 ppm) より優れた検出能が求められる。通常、この測定には液体クロマトグラフィ (LC) 法が標準的に用いられるが、高感度の測定には熟練を要する前処理が求められる。また、LC 法は医薬品主成分 (API) の類似化学種や近接分子量分子などは原理的に検出が苦手とされ、このような微量混入不純物も検出できる新しい測定技術が求められている。更に LC 法は必然的に破壊検査となるためにリアルタイム計測とはならないが、ここに分光測定を適用できれば非破壊でリアルタイムモニタリングを実現できる。赤外 (IR) や近赤外 (NIR) 分光測定は、前処理不要で非接触・非破壊の簡便な計測法と考えられるが、検出限界は一般的に 1/100 (= 10,000 ppm) 程度であり、十分な S/N 比が得られない。

より低い周波数帯域に相当するテラヘルツ周波数帯の分子振動は、分子あるいは結晶形に固有の特徴的なスペクトルを持つことから、指紋スペクトルとして物質の定量・識別ができることが知られており、テラヘルツ分光測定によって例えば医薬品製剤の成分定量や結晶形識別、更にその空間分布を得ることを目的とした研究開発が広く行われてきた。但し、テラヘルツ分光測定も基本的には上記の分光測定と同様、通常の吸収強度測定では検出限界はたかだか 1% 程度である。これらの分光学的手法では不純物が母結晶の中に独立して結晶状態で存在することが想定されるが、実際の極微量の不純物は分子レベルで母結晶中に混入するので検出できる状態にない。

本研究では分光スペクトルを物質に比例するピーク強度ではなく、ピーク周波数値シフト量によって評価する周波数シフト不純物検出法を採用した。簡単な原理を図 1 に示すが、従来法が不純物を直接計測しようとするのに対し、本手法では不純物が母結晶に与える影響として間接的に計測することで感度を高めることができる。この吸収ピークは分子振動と電磁波の周波数が一致するとき共鳴することで現れるのであるから、一種の共振センサとみなすことができる。共振センサは一般的には機械構造や電気回路等において共振周波数のずれを計測して高感度センシングするが、我々の手法は同じ原理ながら医薬品結晶そのものに手を加えることなく、そのまま共振センサとして用いていると言える。

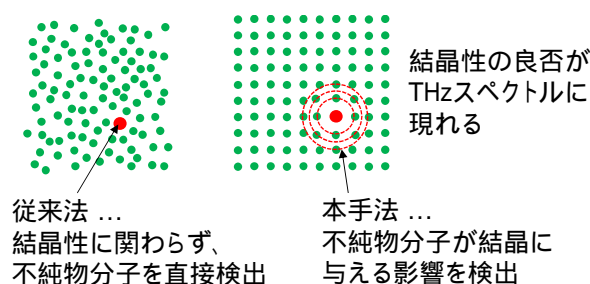


図 1 周波数シフトによる微量不純物検出の原理

### 2. 研究の目的

上記の手法は不純物が母結晶に分子レベルで固溶していることを利用する非破壊分光測定であり、定量分析で検出下限 50 ppm という医薬品分析に十分な感度が得られることを報告しているが、これは物質にも依存するので必ずしも最高性能を発揮しているとは考えられない。そこで、本研究ではこの最高性能を向上させることを目標のひとつとした。また、現状では事前に不純物の種類が特定されている必要があり、もしも更に不純物の分子種まで特定できれば、極微量定量かつ定性分析という更に画期的な検出技術が実現できる。これらを実現するには不純物分子が、母結晶の特定の分子振動を阻害するメカニズムを確かめる必要があり、本研究ではこの解明に挑んだ。

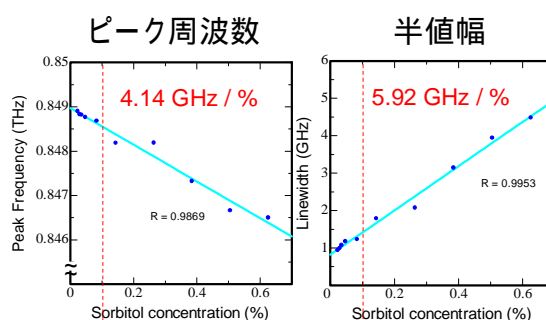
### 3. 研究の方法

(1) ひとつ目の目標である検出感度向上を目指し、測定対象として医薬品添加物として広く利用されている糖の一種である D-マンニトールを選定した。この選択は D-マンニトールが従来は考えられなかったような非常に鋭い吸収線 (線幅 1 GHz 以下) を示すことを見つけたことが理由であり、鋭い吸収線ではわずかな周波数シフトを検出するのに有利であると考えたからである。この対象に構造異性体である D-ソルビトールを故意に微量定量混入させて検出下限を評価し、特に D-ソルビトールを LC 法により定量評価した結果と比較して我々の手法の優位性を確かめた。

(2) ふたつ目の目標である定性分析実現を目指し、まず不純物が存在しない状態でのテラヘルツ周波数帯の分子振動を解明のため、こちらも D-マンニトールを対象として分子振動解明のために、 $\beta$ -form D-マンニトール単結晶成長を行い、これに対する偏光分光スペクトルを得て、量子化学計算の結果と比較照合した。

#### 4. 研究成果

(1) D-マンニトールを水溶液中の温度差法によって結晶成長を行ったが、この時多種の結晶多形が得られることがわかった。結晶多形の存在は不純物と考えられるために完全に制御される必要があるため、温度条件をパラメータにして得られた結晶試料に対して粉末 XRD 測定を適用したところ、90 °C以上の温度から自然冷却すると  $\alpha$ -Form D-マンニトールが成長すること、80 °Cの温度から冷却すると  $\alpha$ -Form と  $\gamma$ -Form D-マンニトールが混在すること、70 °C以下では  $\beta$ -form D-マンニトール多結晶が成長することを見出した。不純物混入実験には、最も安定で、最も鋭い吸収線が得られる  $\beta$ -Form D-マンニトールを選択し、これを安定的に成長する条件を確立した。次に、この条件での結晶成長時の水溶液に、D-マンニトールの構造異性体である D-ソルビトールを故意に不純物として添加して成長することで、結晶内部に不純物濃度の異なる  $\beta$ -Form D-マンニトール結晶試料を作成した。これらの試料それぞれに対し、テラヘルツレーザー分光スペクトル測定と高性能液体クロマトグラフィ (HP-LC) を適用したところ、0.85 THz 付近に観測される吸収ピークが不純物量に応じて低周波数側にシフトすることを確認し、その値から微量検出感度 4.14 GHz/%を得た。更にこの周波数シフトだけでなく、吸収線線幅も不純物量に対して線形の関係を持つことを見出し、より高い感度 5.92 GHz/%を示すことがわかった (図 2)。これは従来法よりも 30 %程度高い感度となっており、世界最高性能更新を示す成果となった。我々のテラヘルツレーザー分光測定装置が 3 MHz の周波数精度を持つことから、単純な計算では 5 ppm の検出限界が得られる。但し、温度安定性の影響が大きいので、実際は 50 ppm 程度になる。それでも LC 法の検出限界は 0.1 % = 1000 ppm であるので、これを大きく超える性能が得られていることは特筆すべき成果と考えられ、従来にはない新規的な医薬品中微量不純物検出手法としての実用展開に大いに期待が持てる結果である。



液体クロマトグラフィの検出下限

図 2 D-マンニトール中の微量不純物検出感度

これらの成果を別の母結晶や不純物に適用することで更なる世界記録更新を目指す予定であったが、世界的な液体ヘリウムの供給不足という事態に遭い、低温測定ができなかったためにこれ以上進めることができなかつたのは残念であった。しかしながら、この影響で液体窒素温度以上の高い温度においてこの原理を適用する研究を進めた。一つにはより低い周波数での測定を実現する為に、テラヘルツ光源となる非線形光学結晶のガリウムリン (GaP) 結晶サイズや、テラヘルツ透過性窓材をより高い透過率材料のものに置き換えるなどの見直しを含めた最適化検討を行い、適切な分光測定装置へ改良した。また、試料を高濃度化して温度依存性分光スペクトル測定を実施した。この条件で 40 種類以上のスペクトルを取得し、それらは医薬品テラヘルツスペクトルデータベース (<https://www.rie.shizuoka.ac.jp/~thz/database/>) に掲載している。この中で物質 A (未公開。マンニトールではない。) は室温でも鋭い吸収線を示すことがわかり、粉末 XRD 測定により結晶形を確かめた上で DFT を用いた量子化学計算による構造最適化と赤外吸収強度計算を進め、これらと比較照合することで、分子振動の帰属解明を実現した。更に不純物としてこの物質 A の光学異性体及び派生物を故意に添加してその効果を確認した。(後日発表予定) 室温試料の計測で周波数シフト法が適用できることは、もともと想定していなかつた医薬品製造工程における不純物混入のリアルタイムモニタリング実現の可能性を示すものであり、怪我が功ながら本研究開発の実用分野を大きく広げる成果と考えられる。

(2) 分子振動解明に向けて、D-マンニトールを上記に示した  $\beta$ -Form 成長条件の中で、単結晶成長させた。但し、テラヘルツ分光測定では縦横方向にはミリメートルオーダーの結晶サイズが求められるのに対し、奥行方向にはマイクロメートルの厚さという極めて扁平な形状が求められる。有機物のような柔らかい結晶ではこのようなサイズを研磨等の機械加工で作成することは至難であるので、特別なフローセル結晶成長装置を自作し、単結晶成長を行った。この単結晶表面が (100) や (010) のようなシンプルな面が現れれば計測も容易であったが、XRD 極点図測定を適用して確かめたところ、予想に反して (012) 面という複雑な面が表面に現れることがわかった。それでも、この結晶をテラヘルツ波入射方向から傾けて得た偏光分光スペクトル (図 3) を分解解析することで、 $\langle 100 \rangle$ 、 $\langle 010 \rangle$ 、 $\langle 001 \rangle$  の 3 方向それぞれの吸収を得ることができた。量子化学計算結果は絶対零度でのスペクトルが表示されるので、室温測定データとは周波数は完全

には一致しないが、これを補正して実測結果と比較・照合すると非常によく合うことから量子化学計算が正しいことが確認され、これによって各吸収に対応する分子振動が明確になり、その様子をアニメーションで示すことができるようになった。

上記、D-マンニトール及び物質 A をモデル化合物として混入不純物分子が母結晶の分子振動に与える影響のメカニズム解明を目指し、母結晶中の分子振動の帰属解明を進めた。既に量子化学計算用クラスターPC型ワークステーションを構築して利用していたが、ソフトウェアが2009年バージョンであり、このソフトウェアが古いという理由で投稿論文が拒絶されたこともあり、新規にクラスターPC型ワークステーションを構築し、2023年バージョンの量子化学計算ソフトウェアパッケージをインストールした。これらを用いて結晶構造最適化と赤外吸収を求め、実測の偏光分光スペクトルと比較・照合することで分子振動解明を進めた。更に、不純物が混入した場合の分子構造及び分子振動計算を進めた。現実にはあり得ない25%の不純物量では計算できるものの、周波数シフトの原因解明には至らず、より少ない不純物量 = 大きい規模での量子化学計算が求められることがわかった。計算コスト(計算機数×時間)の観点で現実的であると見積もることができ、今後の課題が明確化された。

本研究では、医薬品中の微量不純物検出に関し、世界最高性能を更新するという目標をクリアした。その上で更に極微量の検出まで実現する目標であったが、これは液体ヘリウム供給不足により想定通りには進まなかった。しかし、苦肉の策として高い温度での計測を進めることとしたことで、予想外に室温でも低温と同様に、周波数シフト法の適用が可能であることがわかったため、むしろ実用化に向けては非常に大きな成果となったと考えている。

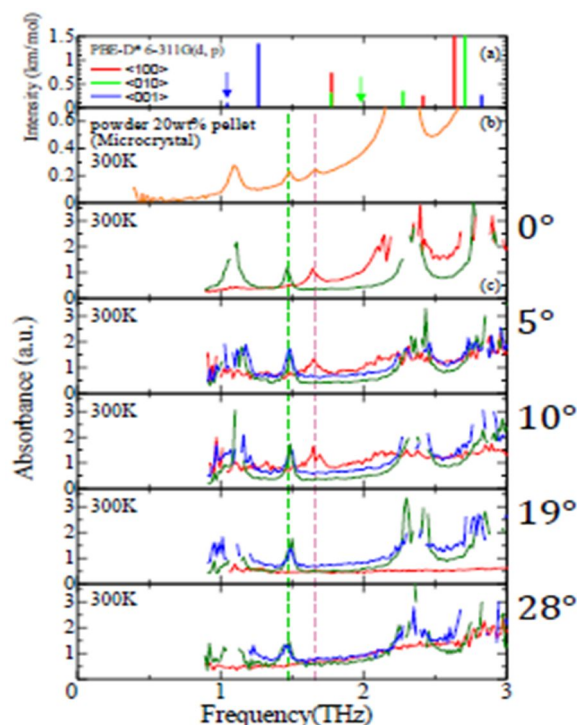


図 3 D-マンニトール量子化学計算結果 (a) と粉末のテラヘルツ吸収スペクトル (b)、単結晶に対する偏光分光スペクトル (c)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Makiko, Hattori Yusuke, Sasaki Tetsuo, Otsuka Makoto	4. 巻 71
2. 論文標題 Near-infrared spectroscopy-based nondestructive at-line analysis of physicochemical properties of atorvastatin calcium hydrate after grinding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 103266 ~ 103266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jddst.2022.103266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐々木哲朗、坂本知昭、大塚誠	4. 巻 50
2. 論文標題 高い周波数精度を持つ連続波GaPテラヘルツ分光スペクトル測定装置を利用した医薬品検査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 レーザー学会誌	6. 最初と最後の頁 167-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Makiko, Hattori Yusuke, Sasaki Tetsuo, Nishizawa Jun-ichi, Otsuka Makoto	4. 巻 630
2. 論文標題 Characteristic evaluation of the pseudo-polymorphism of amorphous atorvastatin calcium hydrates by terahertz spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 127551 ~ 127551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfa.2021.127551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 佐々木哲朗、坂本知昭、大塚誠	4. 巻 6
2. 論文標題 テラヘルツ分光による医薬品評価 テラヘルツレーザー分光スペクトル測定による微量不純物検出	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 検査技術	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Kippei Shoji, Makoto Otsuka, Tetsuo Sasaki
2. 発表標題 Observation of "blue-shift" using a CW GaP THz spectrometer
3. 学会等名 The Third International Symposium on Frontiers in THz Technology (FTT 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kippei Shoji, Tetsuo Sasaki
2. 発表標題 Evaluation of Lysozyme Crystal by Terahertz Spectroscopy
3. 学会等名 The 8th International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University (ISFAR-SU 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木哲朗
2. 発表標題 テラヘルツ分光測定装置の開発と医薬品検査への応用 ~テラヘルツレーザー分光の可能性~
3. 学会等名 一般社団法人製剤機械技術学会 PAT委員会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木哲朗
2. 発表標題 テラヘルツレーザー分光測定とその応用
3. 学会等名 鳥取大学工学部附属先進機械電子システム研究センター (AMES) 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土門里湖、佐々木哲朗
2. 発表標題 D-マンニトール単結晶の作製とテラヘルツ分光法を用いた分子振動モード解析
3. 学会等名 テラヘルツ科学の最先端X
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土門里湖、佐々木哲朗
2. 発表標題 テラヘルツ偏光分光測定を用いたD-マンニトール単結晶中の分子振動モード解析
3. 学会等名 日本赤外線学会第31回研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木野秀洸、佐々木哲朗
2. 発表標題 金属有機構造体(CPL-1)のテラヘルツ分光スペクトル
3. 学会等名 日本赤外線学会第31回研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 哲朗、大塚 誠、坂本 知昭、田邊 匡生、劉 庭秀、眞子 岳
2. 発表標題 テラヘルツレーザー分光による有機結晶中の欠陥評価
3. 学会等名 日本金属学会2022年秋期(第171回)講演大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木哲朗
2. 発表標題 テラヘルツ帯域における狭線幅吸収スペクトルの観測とその応用
3. 学会等名 テラヘルツ・光科学の最新トレンド2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kurumi Sano, Kippeï Shoji, Tetsuo Sasaki
2. 発表標題 Crystal growth of stevioside and evaluation by terahertz laser spectroscopy
3. 学会等名 The 26th Shizuoka forum on health and longevity (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Riko Domon, Tetsuo Sasaki
2. 発表標題 Vibrational Mode Assignment of D-Mannitol by Terahertz Polarization Spectroscopy
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunta Ando, Tetsuo Sasaki
2. 発表標題 Crystal growth and evaluation of liquid crystalline molecules for analysis of crystal defects by Terahertz Spectroscopy
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 T. Sasaki, R. Domon, T. Sakamoto, M. Otsuka
2. 発表標題 Quantitative Analysis Of Trace Isotope Impurity In Pharmaceutical Material By Terahertz Laser Spectrometer
3. 学会等名 The 46th International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves (IRMMW-THz2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sae Ishihara, Yusuke Hattori, Makoto Otsuka, Tetsuo Sasaki
2. 発表標題 Cocrystal Formation between Ibuprofen and Nicotinamide Revealed Using THz and IR Spectroscopy with Multivariate Analysis
3. 学会等名 11th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS 11) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 哲朗、坂本 知昭、大塚 誠
2. 発表標題 テラヘルツ分光測定によるL-ヒスチジン結晶中微量光学異性体不純物分子評価
3. 学会等名 第50回結晶成長国内会議 (JCCG-50)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木 哲朗、坂本 知昭、大塚 誠
2. 発表標題 D-マンニトール結晶中に現れるテラヘルツ帯狭線幅吸収線の観測と極微量不純物検出への応用
3. 学会等名 2021年度日本分光学会 年次講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Tetsuo Sasaki, Tomoaki, Sakamoto, and Makoto Otsuka	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Jenny Stanford Publishing	5. 総ページ数 380
3. 書名 Biomedical Engineering (1st Edition), Chapter 9	

1. 著者名 佐々木他55名	4. 発行年 2024年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 527
3. 書名 異物の分析技術と試料の前処理、結果の解釈	

〔産業財産権〕

〔その他〕

THz Spectral Database for Pharmaceuticals <a href="https://www.rie.shizuoka.ac.jp/~thz/database/">https://www.rie.shizuoka.ac.jp/~thz/database/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	坂本 知昭  (Sakamoto Tomoaki)  (40311386)	国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・室長    (82601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------