

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460045

研究課題名(和文) 顕微ラマン分光法を活用した医薬品Cocrystalのナノグラムオーダー探索

研究課題名(英文) Exploring pharmaceutical cocrystals in nanogram order by using microscopic Raman spectroscopy

研究代表者

深水 啓朗 (Fukami, Toshiro)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20366628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で検討した医薬品Cocrystal(コクリスタル, 共結晶)は, 原薬の化学構造を修飾することなく, その固体物性を改善することができる製剤技術である。本研究では, 新規な医薬品Cocrystalを微量の試料から探索することのできるスクリーニング手法の開発を目的として取り組んできた。平成26～27年度にかけて, 新規な当該手法の基盤技術を確立し, オートメーション化を含む実用性の検証においても有用な結果を得ることができた。平成28年度には英国化学会の学術誌に投稿した論文が掲載された。本法を検討する過程で, スクリーニング法やRaman分光法においても付随した技術改良を見出した。

研究成果の概要(英文)：Pharmaceutical cocrystals are promising technique to improve the solid physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients without modification of its chemical structure. In this study, a screening method for exploring novel cocrystals was developed, which required very small amount of samples. Fundamental technology was established and feasibility test was successfully demonstrated including installation of automatic system by 2015. This result was published in scientific journal of Royal Chemical Society in 2016. There were some additional improvement relating Raman spectroscopy and screening technique during these study.

研究分野：物理薬剤学

キーワード：共結晶 コクリスタル cocrystal 探索スクリーニング ラマン分光法

1. 研究開始当初の背景

(1) Cocrystal (共結晶) は、複数の成分から構成される分子結晶であり、医薬品の場合は coformer と呼ばれる添加物と原薬からなる複合体結晶を指すことが多い。その最たる特徴は、結晶格子内に導入された水溶性の coformer が、水中において速やかに脱離(溶解)することにより結晶の崩壊を促し、難水溶性薬物の溶出性改善ひいては経口投与時の生体吸収性を向上させることである。

(2) Cocrystal 自体は古くから存在が知られていたが、医薬品への応用が盛んに報告されるようになってから、まだ僅か 15 年程度である。しかしながら、米国 FDA や欧州 EMA より cocrystal の取扱いに関するガイドラインが相次いで公示されたことから、その発展は著しく、今まさに実用段階に到達しつつある技術である。

(3) 新たな cocrystal の探索に関しては、多数の coformer、溶媒および調製方法等からなる網羅的なスクリーニングが行われている。しかしながら、医薬品原薬への応用に関する本格的な研究は始まってから日が浅く、製薬企業での検討が中心となっていることから、その方法論はまだ公知されていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、疎水化したガラス基板上に微量の薬物および添加剤溶液を滴下し、ナノグラムスケールの微量スポットを形成させた後、顕微ラマンスペクトルの測定により薬物の分子状態を評価する。

(2) 先ず Cocrystal の探索スクリーニングに関する実証性試験を行った後、実用化を意図して、機械式のディスペンサーを用いた自動化ならびに精密化、ひいてはハイスループットな多検体処理について試行する。

(3) 本研究で用いるラマン分光法は様々な利点をもつ分析法であるが、近年 THz (超低波数) 領域におけるスペクトル測定や、表面増強ラマン (SERS) 効果による高感度化といったオプションが相次いで報告されていることから、本検討における検出法としての改良についても併行して検討する。

3. 研究の方法

(1) 疎水化したガラス基板上に微量の薬物および添加剤溶液をスポットし、ナノグラムオーダーの微細結晶を析出させた後、顕微ラマンスペクトルの測定により薬物の分子状態を評価する。本法の概念図を 図 1 に示す。

(2) ナノグラムオーダーの微細結晶化および顕微ラマン分光法による検出・評価の条件を検討する過程で操作条件を最適化し、最終的に自動化されたシステムを確立する。

的に自動化されたシステムを確立する。

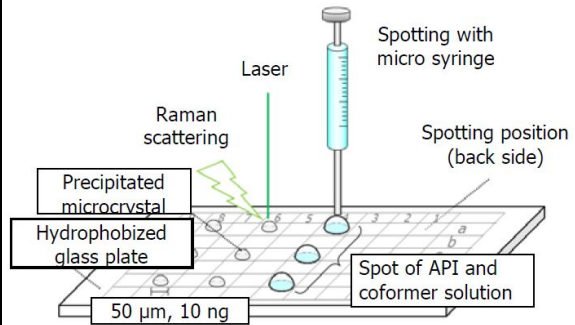


図 1 本研究で開発されたシステムの概念図

(3) 探索スクリーニングにおける超微量測定は、顕微ラマン分光法の採用によって初めて実現するため、ラマン測定におけるスペクトル変化の検出ならびに感度の向上について検討する。

4. 研究成果

(1) 顕微ラマンでの検出を容易にするためには、析出する結晶が凝集している必要があるため、ガラス表面のコーティング剤として、アルカン系及びフッ素系コーティング剤について検討した。

ガラスプレートの疎水化処理を行った後、滴下した液滴の外観を 図 2 に示す。DMSO は化合物をよく溶かす溶媒として優れているが、スポットした際に液滴が乾燥しないことから、選択肢から除外した。ここで、液滴が速やかに乾燥し、試料であるカフェイン (CAF) を溶解できる EtOH を選定し、その接触角が最大となる疎水化試薬としてフッ素系コート剤である Novec 1720 を選択した。

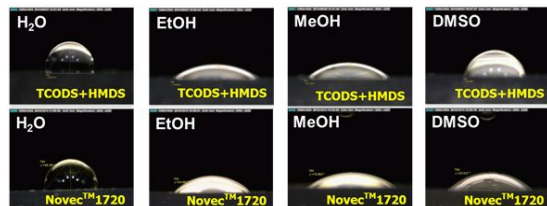


図 2 アルカン系およびフッ素系の疎水化試薬によって処理したプレート上の液滴

ラマンスペクトルが取得できる最小の試料量を見出すことを目的とした検討を行った。Novec 1720 を用いて疎水化処理を行ったガラスプレートに、マイクロシリンジを用いて CAF 及び coformer の各試料の 0.002 mg/mL (0.1 ng/50 nL), 0.02 mg/mL (1 ng/50 nL) および 0.2 mg/mL (10 ng/50 nL) EtOH 溶液を 50 nL 滴下し、室温環境下で静置して乾燥させたものを観察した。その結果、 図 3 に示す通りナノグラムオーダーでの結晶性試料を調製することができた。このうち、ラマンスペクトルが取得できた条件は理論値で 10 ng の原薬からなるスポットであったため、スポットする試料濃度を 0.2 mg/mL (10 ng/50 nL) に設定した。

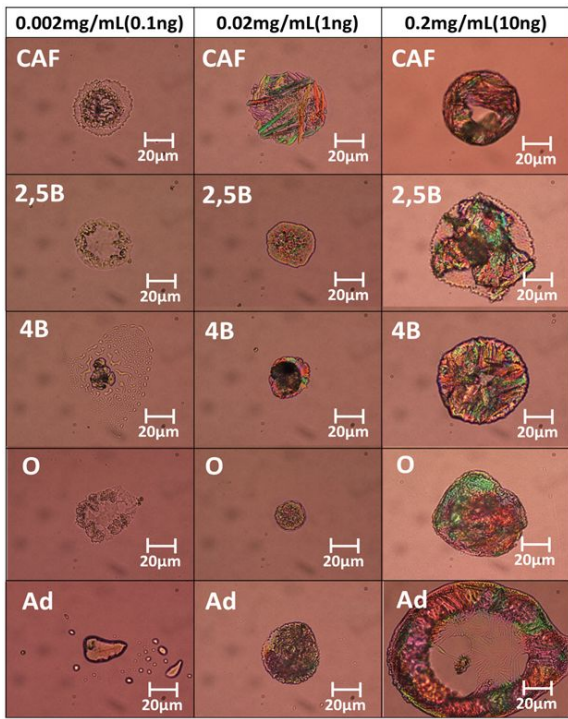


図3 フッ素系コート剤で処理したガラスプレート上におけるスポットの変化

ガラスプレート表面に外観の違いが生じているかを検証するため、AFM測定を行った。結果を図4に示す。TCODS+HMDS および Novec 1720 とともにコーティング処理を施したことにより、未処理のガラスプレート表面に存在する凸凹をマスクし、撥水性および撥油性が向上しているものと考えられた。TCODS+HMDS と Novec 1720 による処理を比較した際、roughness は TCODS+HMDS の方が小さかったものの、AFMによる観察上では突起のように表される構造の形成が認められたことから、Novec 1720 の方が平坦であることが示唆された。

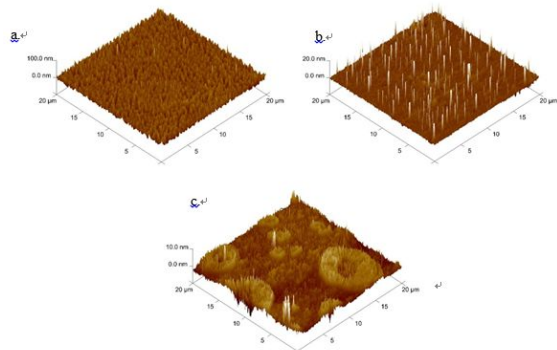


図4 AFMの結果 (a. Novec1720, b. TCODS+HMDS, c. 未処理)

(2) 試料をスポットする自動化に関する検討のため、自動デispenserである SPOT MASTER を使用して試料を滴下した。

手動および自動のスポット操作で得られた結晶の比較を図5に示す。自動スポットにおいても、マイクロシリンジを用いた手動のスポットと同等の液滴を形成し、同様の結晶、

例えば CAF 単体のスポットでは棒状結晶が集積した構造が認められた。SPOT MASTER の1回のスポットに要する時間は30秒程度であり、マイクロシリンジを用いて手動で行ったスポット操作と比較して、大幅な時間短縮が達成された。

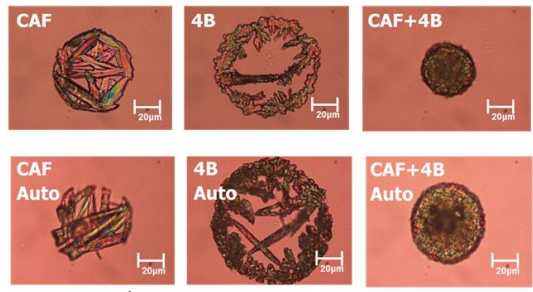


図5 スポット方法による結晶の比較 (上; マイクロシリンジによる手動スポット, 下; SPOT MASTER による自動スポット)

カルボン酸10種(2,5B, 1,2N, 2B, O, 4B, M1, M2, G, C, Ad)の0.2 mg/mL (10 ng/50 nL)のEtOH溶液を疎水化プレートに滴下したところ、試料の種類により形成される結晶の凝集性に違いが認められた。これについては、試料の clogP および分子量とスポット液滴との関係性より、予め出来上がる結晶の大きさを予測することができる可能性が示唆された。CAF と coformer 混液の検討では、それぞれの単体に比べて凝集性のよい結晶が形成される傾向が認められた。顕微ラマンスペクトルを測定した結晶および測定結果の代表例を図6~8に示す。

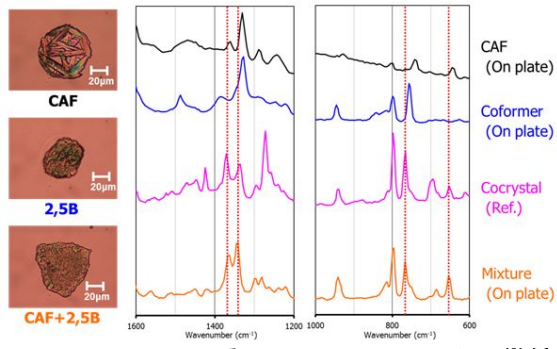


図6 CAF-2,5B系のRaman spectraと顕微鏡画像

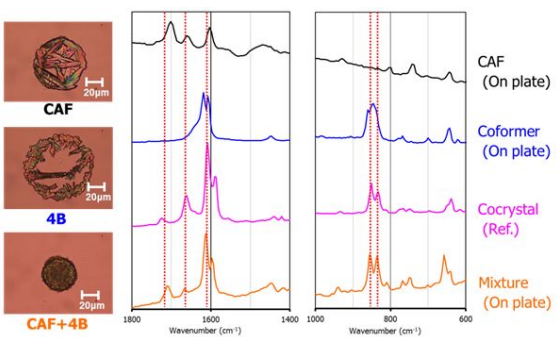


図7 CAF-4B系のRaman spectraと顕微鏡画像

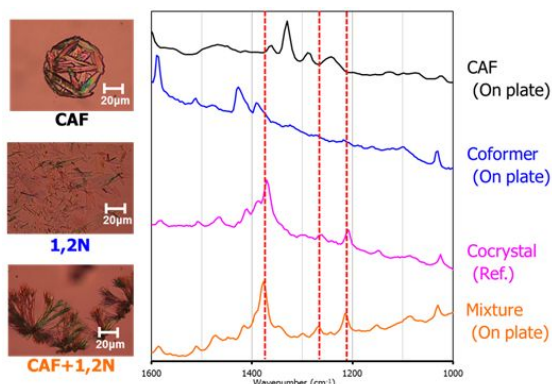


図8 CAF-1,2N系のRaman spectraと顕微鏡画像

CAFと2,5B 4Bおよび1,2Nの組合せでは、新規な吸収ピークの出現あるいはピークシフトが観察され、これらは各 cocystal の標準スペクトルと類似していたことから、超微量でスクリーニングを行える可能性が示唆された。但し図2の結果より、結晶化溶媒によって液滴の接触角が異なることから、スクリーニングを実施する溶媒に対して適切な疎水化試薬を用いて、ガラスプレートをコーティングする必要がある点は今後の課題である。

(3) ラマン分光法のオプションの1つである表面増強ラマン(SERS)効果による高感度化について検討した。結晶性の良いことが知られているカルバマゼピン(CBZ)をモデル薬物とした系において、金コロイドを添加した試料では、測定位置によってラマン信号の強度に差が認められ、最大で約3倍の増大が観察された(図9)。ただし現時点では、SERS効果の発現あるいはCBZの結晶性による差と判断がつかないことから、現在さらに結晶化およびラマン測定条件を検討中である。

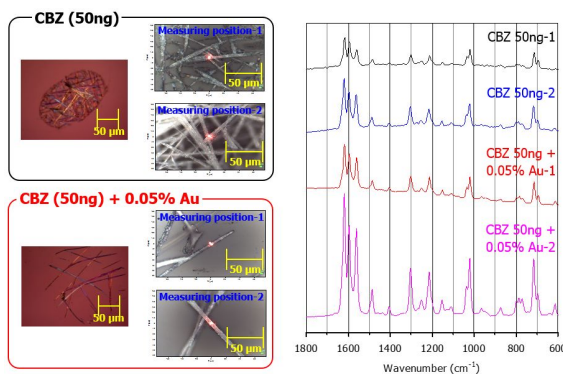


図9 CBZおよび金コロイド溶液の混液から析出した微結晶の顕微ラマンスペクトル

(4) 本スクリーニング法は、溶解度測定や薬理試験など別の試験で使用した残余の溶液であっても多条件のスクリーニングを行うことが可能である。本稿ではAPIとcoformerの混合溶液で実施した結果のみについて述べたが、自動化することによりスポット位置も正確に制御できるので、coformer溶液のみをスポットした場所に、後からAPI溶

液をスポットすることが可能である。以上の結果より、本手法は医薬品開発の探索～開発初期に実施する利点のあるスクリーニング法の一つとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Hiroshi Hisada, Motoki Inoue, Tatsuo Koide, James Carriere, Randy Heyler, Toshiro Fukami, Direct High-Resolution Imaging of Crystalline Components in Pharmaceutical Dosage Forms Using Low-Frequency Raman Spectroscopy, *Org. Process Res. Dev.*, 2015, **19**, 1796-1798

DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00329

Yusuke Maeno, Motoki Inoue, Toyofumi Suzuki, Kazuo Tomono, Toshiro Fukami, Microanalysis of pharmaceutical cocystals using a nano-spot method coupled with Raman spectroscopy, *Cryst. Eng. Comm.*, 2016, **18**, 8004-8009

DOI: 10.1039/c6ce00913a

Ken-ichi Izutsu, Tatsuo Koide, Noriyuki Takata, Yukihiko Ikeda, Makoto Ono, Motoki Inoue, Toshiro Fukami, Etsuo Yonemochi, Characterization and Quality Control of Pharmaceutical Cocystals, *Chem. Pharm. Bull.*, 2016, **64**, 1421-1430

DOI: 10.1248/cpb.c16-00233

Tatsuo Koide, Toshiro Fukami, Hiroshi Hisada, Motoki Inoue, James Carriere, Randy Heyler, Noriko Katori, Haruhiko Okuda, Yukihiko Goda, Identification of pseudo-polymorphism of magnesium stearate by using low-frequency Raman spectroscopy, *Org. Process Res. Dev.*, 2016, **20**, 1906-1910

DOI: 10.1021/acs.oprd.6b00199

Motoki Inoue, Hiroshi Hisada, Tatsuo Koide, Carriere James, Heyler Randy, Toshiro Fukami, In Situ Monitoring of Crystalline Transformation of Carbamazepine Using Probe-Type Low-Frequency Raman Spectroscopy, *Org. Process Res. Dev.*, 2017, **21**, 262-265

DOI: 10.1021/acs.oprd.6b00329

Motoyasu Yoshimura, Masateru Miyake, Tatsuya Kawato, Masahiko Bando, Masafumi Toda, Yusuke Kato, Toshiro Fukami, Tetsuya Ozeki, Impact of the Dissolution Profile of the Cilostazol Cocystal with Supersaturation on the Oral Bioavailability, *Cryst. Growth Des.*, 2017, **17**, 550-557

DOI: 10.1021/acs.cgd.6b01425

[学会発表](計10件)

Toshiro Fukami, Novel pharmaceutical cocystal consisting of paracetamol and trimethylglycine, a new promising cocystal former, AICHEM2015, IPNF2015, 2015/6, Frankfurt, Germany

Toshiro Fukami, Hiroshi Hisada, Motoki Inoue, Tatsuo Koide, Chemical Imaging of Crystalline Components in Pharmaceutical Dosage Forms by Using Low Frequency Raman Spectroscopy, The Great Scientific Exchange SCIX2015, 2015/9, Providence, Rhode Island, USA

Toshiro Fukami, Development of Useful Tools for Advancing Pharmaceutical Cocrystals, INCHEM TOKYO 2015 Germany-Japan Forum for Innovative Products and Technology, 2015/11, Tokyo, Japan

深水啓朗, 実用段階に到達した医薬品共結晶の基礎と最新動向, 第 33 回物性物理化学研究会, 2015/6, 京都

深水啓朗, 医薬品 Cocrystal の製剤開発における一考察, 日本薬剤学会 前臨床開発 FG 第 1 回 合宿討論会, 2015/12, 逗子

田邊佑太, 前野祐介, 井上元基, 久田浩史, 小出達夫, 深水啓朗, 医薬品コクリスタルの探索スクリーニング法に用いる Enhanced ナノスポット法の開発, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016/9, 東京

深水啓朗, 医薬品コクリスタル(共結晶)の超微量探索スクリーニング, 第 13 回アカデミックフォーラム, 2016/5, 東京

深水啓朗, 医薬品の開発を意識したコクリスタル(共結晶)の基礎, 第 11 回ナノ製剤技術研究会, 2017/1, 京都

田邊佑太, 前野祐介, 井上元基, 深水啓朗, 原薬結晶の微量探索を可能とするナノスポット法の改良, 日本薬学会第 137 年会, 2017/3, 仙台

田邊佑太, 前野祐介, 久田浩史, 井上元基, 深水啓朗, 改良型ナノスポット法による共結晶の微量探索スクリーニング, 日本薬剤学会 第 32 年会, 2017/5, 大宮

Ondax Inc.

Randy Heyler
Ondax Inc.

〔図書〕(計 1 件)

深水 啓朗 他, シーエムシー出版, 難水溶性薬物の経口製剤化技術最前線, 塩と共結晶の類似点, 相違点, 2016, 77-84

6. 研究組織

(1)研究代表者

深水 啓朗 (Fukami, Toshiro)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 2 0 3 6 6 6 2 8

(2)研究分担者

尾関 哲也 (Ozeki, Tetsuya)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 6 0 2 7 7 2 5 9

井上 元基 (Inoue, Motoki)

明治薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 9 0 7 2 2 9 5 0

(3)研究協力者

James Carriere