

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460054

研究課題名(和文) シクロデキストリン包接を利用した結晶多形転移ならびに結晶モルホロジーの制御

研究課題名(英文) Control of Crystal Polymorph Transition and Morphology Utilizing Cyclodextrin Complexation

研究代表者

平山 文俊 (HIRAYAMA, Fumitoshi)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：90094036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非晶質性プロスタグランジン E1/ -あるいは -シクロデキストリン包接化合物からの薬物の結晶化挙動、 -と -シクロデキストリン併用による薬物結晶化の抑制、化学的安定性の改善を企図した。また、シクロデキストリン包接化合物の多形転移挙動を解明するための予備的検討として、イソソルビド/ -シクロデキストリン複合体結晶のX線構造解析を行った。さらに、ゲル相中での薬物の結晶化を検討するため、ポリアクリル酸に -シクロデキストリンを化学結合した高分子を合成した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we conducted the crystallization of prostaglandin E1 from its amorphous - and -cyclodextrin inclusion compounds and the stabilizations of their amorphous state of the drug and the chemical stability of the drug by a combination of - and -cyclodextrins. Further, X-ray structure analyses of crystals of the isosorbide/ -cyclodextrin complex was conducted to gain insight into polymorphism for cyclodextrin inclusion complexes. The -CyD-appended polyacrylic acids were prepared to gain insight into crystallization of drugs in polymeric gels containing -cyclodextrin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：シクロデキストリン 結晶多形 包接複合体

1. 研究開始当初の背景

有機化合物の半数以上は2種あるいはそれ以上の結晶多形を有し、特に、化学構造が複雑な医薬品の場合、結晶多形の出現率は高い。結晶形の違いは、融点、溶解度、溶解速度などの物理化学的性質、化学的安定性、経口投与時のバイオアベイラビリティなどに大きく影響する。例えば、結晶多形による溶出性の変化は経口吸収性へ著しく影響するため、日本薬局方ではトルブタミド錠、プレドニゾン錠、インドメタシンカプセルの溶出試験が規定されている。また、結晶の外形(モルホロジー、晶癖)も薬物の溶解速度、ひいては *in vivo* 吸収速度に大きく影響するため、難水溶性薬物の製剤化においては経口吸収性を改善するため、溶解性に優れた結晶形やモルホロジーが選択される。したがって、結晶多形の存在、転移挙動、モルホロジーを制御することは、固形薬品の製剤設計や品質確保において極めて重要である。また、結晶多形は新規の別物質とみなされるため、新多形の発見は医薬品開発のみならず、知的財産権の拡大・維持においても重要である。

環状オリゴ糖であるシクロデキストリン(CyDs)は機能性素材として古くから注目され、その疎水空洞内に様々なゲスト分子を立体選択的に取り込むことから、難水溶性薬物の可溶化や安定性の改善、放出制御、バイオアベイラビリティの改善、苦味・悪臭および局所刺激性の軽減などに利用されている。

我々は、これまでに、 β -CyDの水溶性誘導体である2-ヒドロキシプロピル- β -CyD(HP- β -CyD)は降圧剤ニフェジピンや経口糖尿病治療薬トルブタミドなどの難水溶性の結晶性薬物と非晶質性複合体を形成し、溶解性やバイオアベイラビリティを改善すること、さらに、保存時の結晶化を著しく抑制することを報告した(*Chem. Rev.*, 98, 2045-2076 (1998))。さらに、トルブタミドを水溶液から再結晶する際、CyDsを添加するとトルブタミドの結晶化経路が変化することを見出した。即ち、トルブタミド単独溶液では安定形 Form I に結晶化するが、メチル化 β -CyD を添加すると準安定形 Form IV へ選択的に結晶化することを報告した(*Chem. Commun.*, 517-519 (2006), *Crystal Growth & Design*, 6, 1181-1185 (2006))。また、クロルプロパミドは、メチル化 β -CyD 濃度に依存して、高濃度では最も不

安定な準安定形 Form II として結晶化し、一方、低濃度では次に不安定な準安定形 Form III として結晶化することを明らかにした(*Chem. Lett.*, 37, 816-817 (2008), *Eur. J. Pharm. Sci.*, 39, 248-255 (2010))。また、抗炎症薬インドメタシンをメチル化 β -CyD 溶液から再結晶すると、非晶質体として析出することを報告した(*Int. J. Pharm.*, 354, 70-76 (2008))。一方、アセチルサリチル酸(アスピリン)を CyD 溶液から再結晶すると、結晶多形の生成は観察されなかったが、晶癖(結晶の外形)が著しく変化し、結晶は板状晶から針状晶へ変化することを見出した(*Crystal Growth & Design*, 12, 1985-1991 (2012))。

2. 研究の目的

上述したような背景のもと、本研究では以下の3項目について検討した。

(1) α - / β -CyD / 薬物三成分複合体からの薬物結晶化挙動

閉鎖性血栓血管炎に伴う潰瘍や疼痛などの虚血性症状の改善に臨床使用されているプロスタグランジン E₁ (PGE₁) は、その溶解性や安定性を改善するため、 α -CyD 複合体の凍結乾燥製剤として製剤化されるとともに、PTP 包装により市場へ提供されている。しかしながら、最近では服用性を向上し、飲み忘れや飲み誤りを防止するため、複数の内服用固形製剤が処方された場合、それらの一包化が広く行われている。PGE₁ の一包化を企図する場合、その安定性を更に向上させる必要がある。固体状態における PGE₁/CyD 複合体の安定性は、薬物あるいは CyD の結晶化が大きく影響することが考えられる。そこで本研究では、 α - あるいは β -CyD 複合体、さらに α -CyD と β -CyD を併用した場合の PGE₁ の安定性と CyD の結晶化挙動を追跡し、安定性と結晶化の関係を明らかにする。

(2) CyD 包接化合物の結晶多形の調製

CyD の包接機能を利用した各種製剤特性(溶解性、安定性、苦みの軽減、油性薬物の固化など)の改善が活発に行われており、国内外で既に十数種類以上の CyD 含有製剤が上市されている。しかしながら、薬物/CyD 包接化合物の結晶化、それらの多形転移挙動の詳細はほとんど解明されていない。そこで、

CyD包接化合物の結晶化ならびにそれらの多形転移挙動の解明を企図する。具体的には、イソソルビド誘導體（脳腫瘍時の脳圧降下、緑内障の眼圧低下、腎・尿管結石時の利尿などに用いられるイソソルビド、狭心症治療薬として臨床使用されているモノあるいはジ硝酸イソソルビド）を対象として検討する。

（3）結晶多形転移の制御に有用なゲルの調製

最近、ゲル相中での薬物の結晶化が注目を集めている。溶液状態と異なり、ゲル相中では薬物の拡散速度が著しく制御されているため、異なる結晶多形や晶癖（モルホロジー）を有する結晶が生成することが報告されている。そこで、ポリアクリル酸に β -CyDを化学結合した β -CyD/ポリアクリル酸高分子を合成し、薬物結晶化への影響を検討する。

3. 研究の方法

（1）プロスタグランジン E_1 と α -あるいは β -CyDの質量比を1:1、あるいはプロスタグランジン E_1 / α -CyD / β -CyDの質量比を1:1:1として、注射用蒸留水を用いて溶解後、凍結乾燥した。凍結乾燥体を開封状態で30°C、75%R.H.下に保存し、経時的に結晶化を粉末X線回折法を用いて追跡した。また、外観変化は肉眼、走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。

（2）イソソルビドと β -CyDをモル比1:1で温水に溶解後、冷蔵庫に放置して複合体結晶を作成した。複合体結晶の構造は直接法で解析した。

（3）グルクロニル-グルコシル- β -CyD（GUG- β -CyD）に縮合剤（WSC）を用いてエチレンジアミンを結合させ、一方のアミノ基にポリアクリル酸（MW 5,000, 25,000）をアミド結合させた。

4. 研究成果

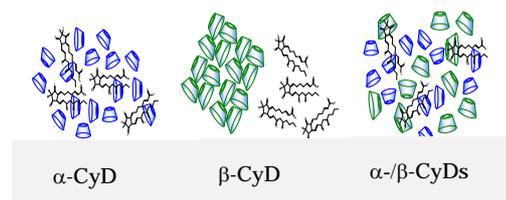
（1）プロスタグランジン E_1 （ PGE_1 ）/CyD固体複合体中の薬物の安定性、さらに α -CyDと β -CyDを併用した際の PGE_1 の安定性とホスト分子の結晶化挙動の関係を明らかにすることを目的として検討し、以下の結果を得た。

α -CyD固体複合体中の PGE_1 の化学的

安定性は、 β -CyD複合体に比べて大きかった（安定性： α -CyD複合体 > β -CyD複合体）、 α -CyDと β -CyDを併用すると、 PGE_1 の安定性は、CyD単独使用の場合に比べて、著しく増大した（安定性： α -/ β -CyD複合体 > α -CyD複合体 > β -CyD複合体）

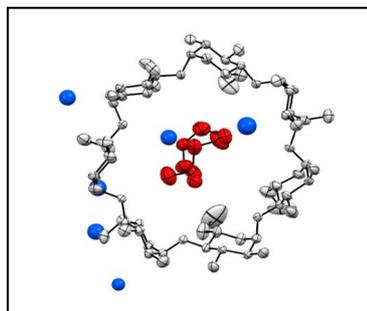
固体NMRスペクトルやラマンスペクトル測定の結果、 α -/ β -CyD併用系では、 α -CyDが PGE_1 の ω -鎖、 β -CyDが5員環部分を包接した3成分複合体形成が示唆された。

CyD固体複合体中の PGE_1 およびCyDの結晶化挙動を追跡した結果、CyDの結晶化速度は β -CyD > α -CyD > α -/ β -CyDの順に低下した。 β -CyD複合体中の PGE_1 の不安定性は、ホスト分子の速やかな結晶化に起因するものと推定された。一方、 PGE_1 / α -CyD / β -CyD 3成分複合体は極めて安定な非晶質複合体を形成し、複合体の解離が抑制されたため、 PGE_1 は安定化されたものと推定された。以上に結果より、複数のCyDを併用すると各CyDの結晶化が抑制され、薬物の安定化が可能となることが示唆された。



（2）シクロデキストリン包接化合物の結晶多形に関する予備的知見を得るため、イソソルビドならびにそのニトロ誘導體とCyDsとの包接複合体形成に関する検討を行った。これらイソソルビドならびにニトロ誘導體と α -、 β -、 γ -CyDsとの相互作用を溶解度法で検討した結果、全てのCyDs系において溶解度相図は B_s あるいは B_t 型を示し、CyD高濃度において固体複合体の沈澱が観察された。イソソルビド/ β -CyD等モル含有水溶液から単結晶を作製し、構造解析を行った。結晶データ：空間群 $P2_1$, $a=15.200 \text{ \AA}$, $b=10.109 \text{ \AA}$, $c=21.227 \text{ \AA}$, $\beta=111.13^\circ$, $V=3042.4 \text{ \AA}^3$ 。非対称単位にイソソルビドおよび β -CyD分子がそれぞれ1個、水分子が6個存在した。イソソルビドは β -CyD空洞のほぼ中央に位置し、水酸基が空洞外部に配向するように包接されていた。 β -CyDは b -軸に沿って堆積し、空洞の両端は隣接する β -CyDにより塞がれた、典型的なカゴ型構造

を示した。



(3) β -CyD 含有ポリアクリル酸高分子の調製し、その包接機能を調べた。具体的には、 β -CyD の1級水酸基末端にカルボン酸基を有するグルクロニル-グルコシル- β -CyD (GUG- β -CyD) に縮合剤 (WSC) を用いてエチレンジアミンを結合させ、一方のアミノ基にポリアクリル酸 (MW 5,000, 25,000) をアミド結合させた。ポリアクリル酸とエチレンジアミン化 GUG- β -CyD のモル比を変化させ様々な置換度の β -CyD 含有ポリアクリル酸高分子を調製した。 β -CyD 含有ポリアクリル酸高分子中の GUG- β -CyD の置換度は NMR およびマスペクトル、アンスロン/硫酸法により算出した。GUG- β -CyD の置換度が 2% および 5% の β -CyD 含有ポリアクリル酸高分子を用いて、各種薬物 (ピフェニル酢酸、プレドニゾロン、ジクロフェナック、アセトヘキサミドなど) に対する包接機能を溶解度法により検討した結果、ピフェニル酢酸などの比較的細長い分子構造を有する薬物に対して高い包接能を示した。今後、高分子量のポリアクリル酸 (MW 50,000 および 100,000、既に合成済) に GUG- β -CyD を導入した高分子を調製し、これらの包接機能を明らかにする。さらに、これらの β -CyD 含有ポリアクリル酸高分子の溶液あるいはゲル中に各種薬物を添加し、結晶化速度、多形転移挙動、形態変化を観察するとともに、その機構について検討する予定である。

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 12 件)

1. Y. Inoue, D. Iohara, N. Sekiya, M. Yamamoto, H. Ishida, Y. Sakiyama, F. Hirayama, H. Arima and K. Uekama, Ternary Inclusion Complex Formation and Stabilization of

Limaprost, a Prostaglandin E₁ Derivative, in the Presence of α - and β -Cyclodextrins in the Solid State. *Int. J. Pharm.*, **509**, 338-347 (2016). 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.018>

2. T. Higashi, J. Li, X. Song, J. Zhu, M. Taniyoshi, F. Hirayama, D. Iohara, K. Motoyama and H. Arima, Thermoresponsive Formation of Dimethyl Cyclodextrin Polypseudorotaxanes and Subsequent One-pot Synthesis of Polyrotaxanes. *ACS Macro Lett.*, **5**, 158-162 (2016). 査読有
DOI: 10.1021/acsmacrolett.5b00927
3. R. Tabuchi, K. Azuma, R. Izumi, T. Tanou, Y. Okamoto, N. Tomone, D. Iohara, K. Uekama, M. Otagiri, F. Hirayama, S. Ifuku and M. Anraku, Biomaterials Based on Freeze-dried Surface-deacetylated Chitin Nanofibers Reinforced with Sulfobutyl Ether β -cyclodextrin Gel in Wound Dressing Applications. *Int. J. Pharm.*, **511**, 1080-1087 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.019>
4. K. Igami, M. Ozawa, S. Inoue, D. Iohara, T. Miyazaki, M. Shinoda, M. Anraku, F. Hirayama and K. Uekama, The Formation of an Inclusion Complex between a Metabolite of Ginsenoside, Compound K and γ -Cyclodextrin and Its Dissolution Characteristics. *J. Pharm. Pharmacol.*, **68**, 646-654 (2016). 査読有
DOI: 10.1111/jphp.12468
5. D. Iohara, Y. Umezaki, M. Anraku, K. Uekama and F. Hirayama, In Vitro and In Vivo Evaluation of Hydrophilic C₆₀OH₁₀/2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles as an Antioxidant. *J. Pharm. Sci.*, **105**, 2959-2965 (2016). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.033>
6. Y. Umezaki, D. Iohara, M. Anraku, Y. Ishitsuka, T. Irie, K. Uekama and F. Hirayama, Preparation of Hydrophilic C₆₀(OH)₁₀/2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles for the Treatment of a Liver Injury Induced by an Overdose of Acetaminophen. *Biomaterials*, **45**, 115-123 (2015). 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.12.032>
7. M. Anraku, D. Iohara, A. Hiraga, K. Uekama, S. Ifuku, J.D. Pipkin and F. Hirayama, Formation of Elastic Gels from Deacetylated Chitin Nanofibers Reinforced with Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin. *Chem. Lett.*, **44**, 285-287 (2015). 査読有
DOI: 10.1246/cl.141004.
8. Y. Inoue, N. Sekiya, M. Yamamoto, D. Iohara, F. Hirayama and K. Uekama Formation of the Ternary Inclusion Complex of Limaprost with

α - and β -Cyclodextrins in Aqueous Solution. *Chem. Pharm. Bull.*, **63**, 318-325 (2015). 査読有

<http://doi.org/10.1248/cpb.c14-00733>

9. Y. Inoue, N. Sekiya, K. Katayama, S. Narutaki, M. Yamamoto, D. Iohara, F. Hirayama and K. Uekama, Stabilizing Effect of β -Cyclodextrin on Limaprost, a PGE₁ Derivative, in Limaprost Alfadex Tablets (Opalmon[®]) in Highly Humid Conditions. *Chem. Pharm. Bull.*, **62**, 786-792 (2014). 査読有

<http://doi.org/10.1248/cpb.c14-00150>

10. A. Altaf, H. Aldawsari, Z.M. Banjar, D. Iohara, M. Anraku, K. Uekama and F. Hirayama, Potential Use of C₆₀/2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles as A New Photosensitizer in Treatment of Cancer. *Int. J. Photoenergy*, **2014** (2014), Article ID 570506, 8 pages.

<http://doi.org/10.1155/2014/570506>

11. H. Aldawsari, A. Altaf, Z.M. Banjar, M. Okubo, D. Iohara, M. Anraku, F. Hirayama and K. Uekama, Combined Use of Cyclodextrins and Hydroxypropylmethyl-cellulose Stearoyl Ether (Sangelose[®]) for the Preparation of Orally Disintegrating Tablets of Type-2 Antidiabetes Agent Glimepiride. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **80**, 61-67 (2014). 査読有
DOI: 10.1007/s10847-014-0386-6

12. T. Hirotsu, T. Higashi, K. Motoyama, F. Hirayama, K. Uekama and H. Arima, Improvement of Pharmaceutical Properties of Insulin through Conjugation with Glucuronylglucosyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **80**, 107-112 (2014). 査読有
DOI: 10.1007/s10847-014-0407-5

〔学会発表〕(計4件)

1. 庵原大輔、安楽 誠、上釜兼人、平山文俊、非晶質性シクロデキストリンの結晶化挙動、日本薬剤学会第32年会、5/11-13 (2017)、大宮ソニックシティ、埼玉県・さいたま市
2. 田淵 良、川瀬大輝、庵原大輔、安楽誠、山口幸輝、衛藤 仁、平山文俊、イソソルビドと β -シクロデキストリンとの複合体形成、日本薬剤学会第30年会、5/21-23 (2015)、長崎ブリックホール、長崎県・長崎市
3. 田淵良、高口恵理子、庵原大輔、安楽誠、平山文俊、グルクロニルグルコシル- β -シクロデキストリン/ポリアクリル酸結合体の調製と可溶化能、第33回シクロデキストリンシンポジウム、9/8-9 (2016)、かがわ国際会議場、香川県・高松市
4. 庵原大輔、井上靖雄、関屋 昇、山本政信、石田宏之、崎山庸子、安楽 誠、有馬英俊、上釜兼人、平山文俊、リマプロスト/ α/β -シクロデキストリン 3

成分包接複合体の形成と固体状態でのリマプロスト安定化機構の解明、第33回シクロデキストリンシンポジウム、9/8-9 (2016)、かがわ国際会議場、香川県・高松市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.sojo-u.ac.jp/~dio/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 文俊 (HIRAYAMA, Fumitoshi)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号：90094036

(2) 研究分担者

庵原大輔 (IOHARA, Daisuke)
崇城大学・薬学部・講師
研究者番号：40454954