薬 剤 学, **80** (5), 249–252 (2020)

≪若手研究者紹介≫

原薬物性改善を目的とした共結晶の探索手法開発及び評価に関する研究

前 野 祐 介* Yusuke Maeno
日産化学株式会社 物質解析研究部

1. は じ め に

テレビドラマなどの影響もあり，中学生の頃から医療に関係する職種に就きたいと考えていた私は，熊本大学薬学部へ進学した．成績は悪いほうではなかったため，無事に大学３年へ進級したときには希望する研究室に入ることができた．選択した研究室では，核酸や免疫に関連するタンパク質の立体構造をＸ線結晶構造解析により決定し，原子レベルでの生体内相互作用や反応を解明する構造生物学的研究を行っていた．研究室を紹介された当初は液晶ディスプレイに映し出されたクルクル回るタンパク質の立体構造を見て「パソコンにかじりついて構造解析をすることが多い研究室なのか」と思っていた．そんな私に与えられたテーマは，ヒト免疫にかかわる受容体タンパク質とリガンドの大量発現及び精製法の構築であった．目的とするタンパク質の構造解析のためには良質な結晶を得る必要があるが，そこに至るまでにはタンパク質を発現させる宿主の選択，クローニング，精製条件など検討項目は多岐にわたることを知った．日々数十リットルの大腸菌培養液と格闘しながら，培養・精製系を確立し，数ミリグラム程度のタンパク質を得るところまでたどり着いたが，結晶構造を明らかにすることなく大学院修了を迎えることになってしまった．この悔しい思いをバネに，研究を通じて成功体験を得てみたいと思うようになり，企業で研究者になるという選択をし，日産化学に入社した．

*2010 年熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程修了．同年日産化学工業（株）（現日産化学（株））入社．2019 年博士（薬学）取得．同年第 44 回製剤・創剤セミナー Postdoctoral Presentation Award 受賞．趣味：サッカー，酒を嗜みながらの料理．連絡先：〒274–8507 千葉県船橋市坪井西 2–10–1
E-mail: maenoy@nissanchem.co.jp

2. 原薬の物性研究

日産化学は原薬開発を行う，いわゆる原薬メーカーであり，私は入社以来，主に原薬の物性研究や理化学試験法開発を担当してきた．化学的・物理的試験にはほとんど触れたことがなかった私にとって，分析化学は一から学びなおす必要がある分野であった．汎用的なものから特殊なものに至るまで，数多くの分析装置の原理原則などを先輩方に教えてもらい，入社後数年間は企業研究者として最低限必要な知識を必死に積み重ねた（このとき後輩に譲らずにとっておいた教科書が大いに役立った）．このような社会人 1〜2 年目の社員に対して，日産化学には「自発的に考えて行動する人材になれ」と，一つのテーマを１年かけて調査・検討して技術論文を書かせる研修が存在する．入社１年目の私には，「医薬品共結晶の技術調査と社内適用」を研究テーマとして与えられた．2010 年頃は既に共結晶に関する研究成果が盛んに報告され，原薬の物性改善技術として注目を集めていた[1]．医薬品における共結晶とは，一般的に２種類以上の分子からなる結晶性複合体であり，原薬と対をなす分子（コフォーマー）がイオン結合以外の相互作用を形成して存在する結晶形態を指す．研修期間中にモデル原薬をいくつか調達し，見よう見まねで検証を行った．原薬と各コフォーマーをボールミルでひたすら混合し，使えるようになっ

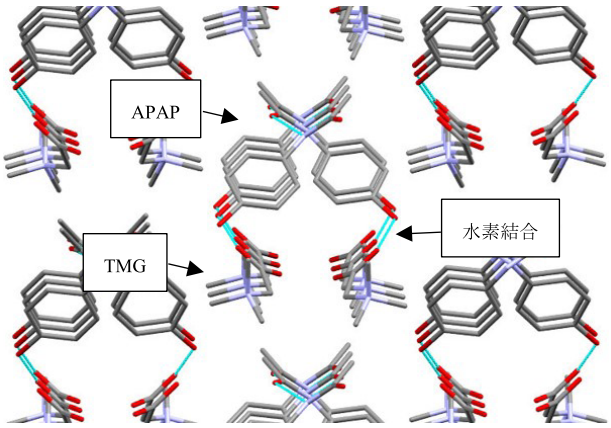

図 1　APAP-TMG の結晶構造

て間もない IR や XRD で評価を行い，文献通りのピークシフトや回折パターンが確認できたときには，小さいながら一つの達成感を味わうことができた．1 年間の研修を終えた後も，社内の開発テーマで共結晶を適用できるものがないか模索を続けていたときに，一つの転機が訪れた．

私の職場である物質科学研究所は千葉県船橋市に所在する．研究所の徒歩圏内には食事処が数店舗と日本大学薬学部があり，最寄り駅では多くの学生も乗降する．大学が近いという好条件もあり，当時の上司である大塚正史博士らの計らいで，薬剤学研究室の講師であった深水啓朗先生（現明治薬科大学教授）から技術指導いただける機会が得られた．先生はその後明治薬科大学分子製剤学研究室へ栄転されてからも指導を続けて下さり，得られた成果をまとめ 2019 年に学位を取得することができた．ここからはその内容について紹介したい．

3. 共結晶の物性評価[2)]

結晶内における分子間相互作用を明らかにするためには，様々な分析手法を用いてキャラクタリゼーションを行うことが重要である．本研究では，モデル原薬としてアセトアミノフェン（APAP）の実用的な共結晶の探索を行い，得られた新規結晶形に対して種々の物性評価を行うとともに，製剤学的応用について検討した．APAP は既に多くの共結晶形成例が知られており，そのうちシュウ酸（OXA）との共結晶化（APAP-OXA）による打錠時の圧縮成形性改善例が報告されている[3)]．しかしながらシュウ酸は刺激性が強いため，これに代わるコフォーマーの探索を行った．医薬品として使用実績のある添加剤，あるいは医薬品との共結晶形成が報告されているコフォーマー計 29 化合物について，振動型ボールミルを用いた grinding 法による共結晶探索スクリーニングを実施した．

各粉砕混合物の XRD を測定したところ，APAP とトリメチルグリシン（TMG）の組合せで新規の回折パターンが得られたことから，新規結晶性複合体（APAP-TMG）を形成していることが示唆され，IR 及び熱分析の結果により裏付けられた．次に，単結晶を調製して単結晶 X 線構造解析を行ったところ，APAP-TMG の結晶格子中に APAP と TMG は 1：1 で存在していた（図 1）．更に APAP 及び TMG の分子間で水素結合が確認され，本複合体は共結晶と判断された．

次に，既報の APAP-OXA と比較しながら，APAP-TMG の製剤学的評価を行った．モンサント硬度計を用いた圧縮成形性の評価において，APAP 単独での圧縮成形品はモンサント硬度計に錠剤をセットする過程で崩壊してしまったが，APAP-TMG の硬度は 11.6 ± 1.5 kg と成形性は良好であり，APAP-OXA（13.0 ± 1.4 kg）とほぼ同等の硬度を有していた．さらに味覚センサーを用いた評価を行ったところ，ヒトが感じる味覚のうち「苦味」と「渋み」において TMG の添加濃度依存的にセンサーの応答が小さくなったことから，APAP 及び TMG 共存下での APAP 苦味抑制効果が期待できることが示唆された．以上の結果より，APAP-TMG のキャラクタリゼーションにより共結晶であることを明らかにしたほか，種々の製剤学的な応用に関する可能性を示すことができた．

4. 共結晶の新規探索手法

複数の結晶形態のうち，イオン結合を形成する塩の場合は，主にカウンターイオンの使用実績などから候補を選定するが，共結晶の場合はカウンターイオン種と比較して非常に多岐にわたるコフォーマーを適用可能である．言い換えれば，選択・検討したいコフォーマーの数だけ試験数は増加し，原薬消費量は増える．その反面，結晶形態を選定する開発初期段階において，物性研究のための十分な原薬量の確保が困難であることから，結晶形態の効率的な探索方法開発が課題となっている．本研究では，原薬消費量を極限まで低減させた効率的な新規共結晶探

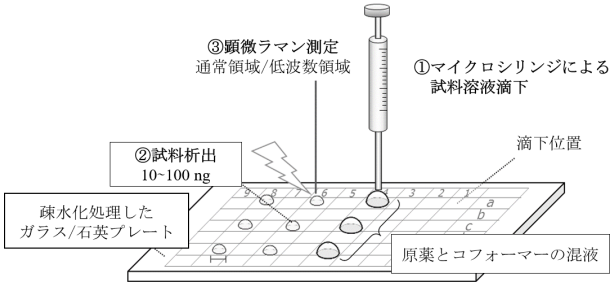

図 2　ナノスポット法の概要

索スクリーニング法を構築した.

探索手法の概要は次の通りである (図 2). ①マイクロシリンジを用いて微小量の試料溶液をガラスプレート上に滴下, ②自然乾燥により溶媒を留去, 微細試料を析出させ, ③顕微ラマン分光法にて共結晶形成を評価する試験系を構築した. 本手法を「ナノスポット法[4]」と命名し, 種々の条件設定を行い, モデル原薬にカフェイン (CAF) を用いた手法の実用性を評価した.

まず, 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. そのため, 手法の構築においては, ガラスプレート表面をコーティングする試薬や滴下する試料溶液濃度の最適化を行った. 炭化水素系やフッ素系のコーティング剤を用いてプレートに表面処理を施し, 希釈溶媒に用いるメタノールやエタノールの接触角を測定した. 結果, 液滴が速やかに乾燥し, かつ CAF を溶解するエタノールを希釈溶媒として選定し, その接触角が最大となったフッ素系コーティング剤 Novec™ 1720 を選択した. 検討を開始した当初は炭化水素系試薬を中心にコーティング剤の検討を行っていたが, 半導体材料を開発している社員がたまたま複数種のフッ素系コーティング剤を保有しており, これらを拝借したことがきっかけで新しい選択肢が増えることになった. 日ごろから異分野の研究員とも仲良く付き合っておくことも重要なのだと実感した. 続いて試料溶液濃度を設定するため, CAF と共結晶を形成することが知られている 10 種のコフォーマーをそれぞれ 50 nL 滴下し, 析出物のラマン測定を行った. 結果, 十分な強度を有するラマンスペクトルが取得可能な 0.2 mg/mL を設定した. 条件が設定できたため, 実際に CAF と各コフォーマー混液を試料溶液とし, 共結晶が形成されるか確認した. 結果, CAF と 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-B) 他

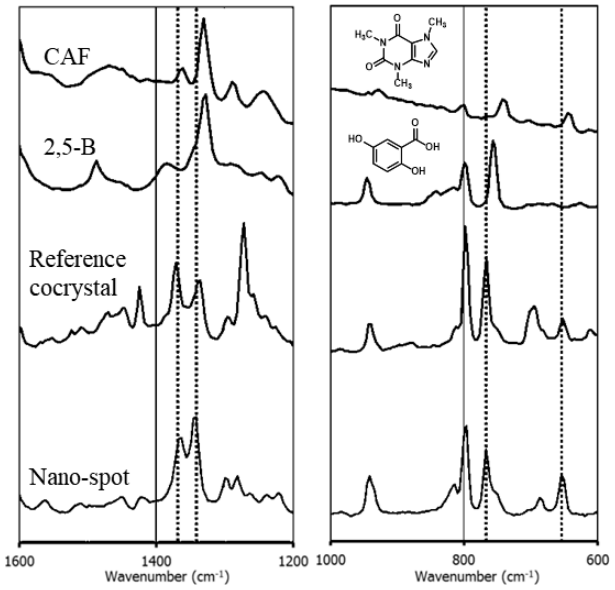

図 3　ナノスポット法を適用したラマンスペクトルの代表例. 点線は reference cocrystal に特徴的な波数を示す.

2 種類の組合せにおいて新規ピークの出現あるいはピークシフトが観察され, これらは別途調製した各共結晶の標準スペクトルと類似していたことから, スクリーニング手法の妥当性が示された (図 3). 終業後に一人実験室に籠ってせっせと顕微ラマン測定を行い, 試験系構築に至るまでに 700 点ほどのデータを取得した. 顕微ラマン測定のためには対象物を探し, 焦点を合わせる必要があるため, 測定時は装置に張り付いていなければならず, かなりの忍耐力が求められた. しかし, その忍耐力にも限界はあり, レーザーを当てっぱなしにしたまま考え事をしてしまい, 試料中に数多くの黒点を作ってしまったことが忘れられない.

その後, ナノスポット法の汎用性や網羅性を向上させるため, 更なる手法の改良を行った. 試料析出過程 (図 2 ②) において複数の有機溶媒蒸気を曝露させる結晶化操作を, 結晶の評価において低波数領域の顕微ラマン測定 (図 2 ③) をそれぞれ追加し「改良型ナノスポット法[5]」として再び実用性評価を行った. モデル原薬には通常領域のラマンスペクトルでは結晶形の判別が困難なカルバマゼピン (CBZ) を用い, 共結晶の形成が報告されているコフォーマー 10 種, 形成しないことが報告されている 1 種との組み合わせで正しく共結晶検出可能か検証を行った. このうち, フマル酸 (FMA) 及びシュウ酸 (OXA) の測定結果を図 4 に示した. 結果, ナノスポット法

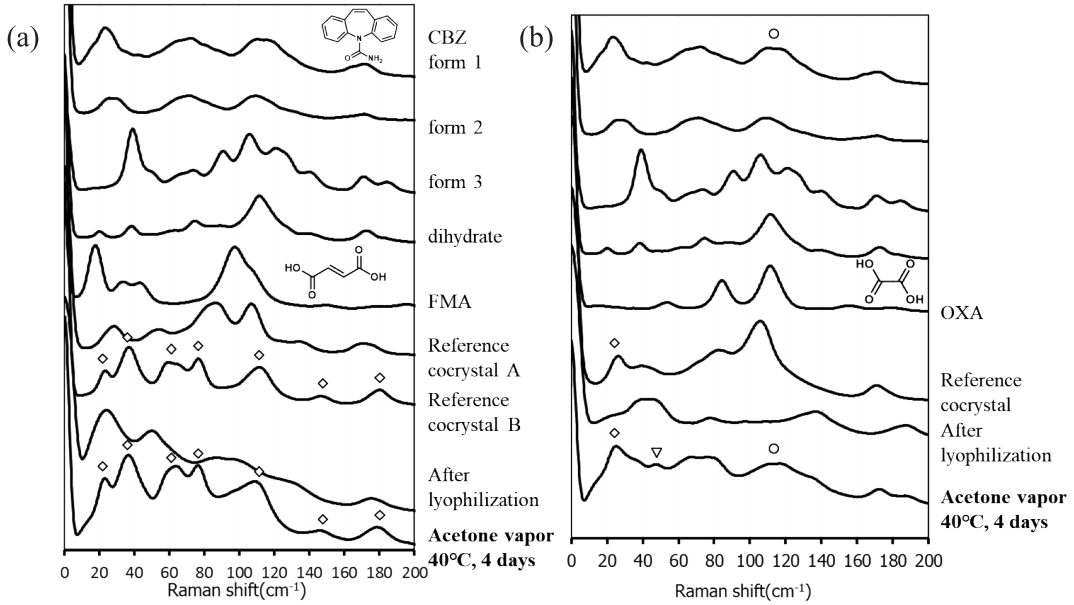

図 4　改良型ナノスポット法を適用した低波数領域のラマンスペクトルの代表例．(a) CBZ/FMA の組み合わせ，(b) CBZ/OXA の組み合わせ．▽, ○, ◇はそれぞれ対応するスペクトルの特徴的な波数との一致を示す．

の場合と同様に既報と同じ共結晶を感度良く検出できただけでなく，溶媒蒸気曝露による共結晶への転移（図 4 (a)）や共結晶の結晶多形を示唆する新規スペクトル（図 4 (b)▽）を確認することができた．以上，ナノスポット法ならびに改良型ナノスポット法の開発により，1 測定条件あたり 10〜100 ng と超微量の共結晶探索スクリーニングが実施可能となった．

5. お わ り に

本稿の執筆依頼をいただいてから研究活動を振り返り，実験の基礎（の基礎）から懇切丁寧に指導いただいた先輩，論文の指導や（入社 8 年目にして人生初の）学会発表の機会を提供していただいた先生方と，多くの方々にお世話になってきたことを改めて実感することができた．

日産化学に入社してから今年で 11 年目となるが，手掛ける原薬の種類も低分子化合物からペプチドや核酸へと年々変化してきている．更に，直近の 5 年間は原薬開発以外に機能性材料（化粧品向けや細胞培養向け材料など）の開発にも携わっている．こうした材料の形態はゾル・ゲルなどさまざまであり，加えて製品によって解明すべき特性は異なるため，原薬の評価とは違った新しい視点や手法が求められる．しかし，当然のことながらモノを正しく評価して理解することがより良い製品につながるという本質に変わりはない．これまで積み重ねてきた経験を活かし，変化する状況に柔軟に対応しながら新しい分野への挑戦を続けていきたい．

最後に，技術指導から学位取得まで広くご指導賜りました明治薬科大学分子製剤学研究室 深水啓朗教授に心より御礼申し上げます．

引 用 文 献

1) 深水啓朗, 経口製剤の開発におけるコクリスタル研究の現状と将来, 日本薬理学雑誌, **150**, 36–40 (2017).
2) Y. Maeno, T. Fukami, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Tagami, T. Ozeki, T. Suzuki, K. Tomono, Novel pharmaceutical cocrystal consisting of paracetamol and trimethylglycine, a new promising cocrystal former, *Int. J. Pharm*., **473**, 179–186 (2014).
3) S. Karki, T. Friščić, L. Fábián, P. R. Laity, G. M. Day, W. Jones, Improving mechanical properties of crystalline solids by cocrystal formation: New compressible forms of paracetamol, *Adv. Mater.* **21**, 3905–3909 (2009).
4) Y. Maeno, M. Inoue, T. Suzuki, K. Tomono, T. Fukami, Microanalysis of pharmaceutical cocrystals using a nano-spot method coupled with Raman spectroscopy, *CrystEngComm*, **18**, 8004–8009 (2016).
5) Y. Tanabe, Y. Maeno, K. Ohashi, H. Hisada, A. Roy, J. Carriere, R. Heyler, T. Fukami, Screening a trace amount of pharmaceutical cocrystals by using an enhanced nano-spot method, *Eur. J. Pharm. Biopharm*., **136**, 131–137 (2019).