

微小重力下における医薬品原薬結晶の新規多形の探索 -良溶媒と貧溶媒の組合せおよびファインバブルの導入効果の検討-

日大生産工 (学部) ○藤井大喜 日大生産工 (学部) 大塚貴裕
日大生産工 亀井真之介, 下村修一, 高橋岩仁, 松本真和, 大塚誠

1. 諸言

製薬分野では、医薬品の有効性と安全性が重要視される。医薬品の薬効と安全性を保障する概念として、医薬品の溶解性、安定性、およびバイオアベイラビリティといった製剤特性は原薬の結晶特性が影響しており、晶析操作は新薬の製造や既存品の改良を行う上で重要な技術であり、現在も様々な工夫のなされた結晶析出法と多様な溶媒の組み合わせを考えた研究が行われている。地上での晶析操作において、結晶核発生過程では母液の溶液濃度に依存する密度差対流が、核成長過程では溶液密度差対流や粒子沈降現象による二次元核発生が生じており、重力の存在が核生成や核成長の再現性に影響している¹⁾。そのため、重力の影響を排除した実験系として、落下塔や飛行機の放物線飛行による自由落下実験が地球上での微小重力環境として行われているが、再現時間の短さなどの課題が残っている。一方、現在注目を集めている国際宇宙ステーション (ISS) における実験では、打ち上げから地球への帰還まで 30 日程度の微小重力実験が可能である。先行研究例としては、水素元素の可視化を目指したセルラーゼの大型結晶作製²⁾ や糖非発酵グラム陰性細菌由来による新規ジペプチド産生酵素の構造と機能の解析³⁾ などが行われている。我々は、本研究で JAXA により ISS で行われている「Kirara シェアサービス」を利用した微小重力下での医薬品晶析実験を行い、採取した結晶の観察・分光測定・解析を行い、重力を排除した微小重力空間での晶析操作が医薬品結晶に及ぼす影響を検討する。また、落下塔からの自由落下や微小重力実験シミュレーター装置を用いることで擬似微小重力空間を再現し、地上で人工的な微小重力空間下での新規結晶多形の探索および創生をも試みる。この際、擬似的な気-液混合流体相を形成できるファインバブル

を導入することによって、微小重力下でのファインバブルの併用が核生成機構の効率的な制御に及ぼす影響を検討し、新規医薬品結晶の創生とその再現性の向上を目指す。

2. 実験装置および方法

2.1 カウンターディフュージョン法

高品質タンパク質結晶生成実験を始めとした微小重力下での晶析操作において採択されている結晶化法であるカウンターディフュージョン法 (CD法) の概略図を Fig. 1 に示す。晶析対象物質を溶解させた良溶媒をキャピラリーに充填し、アガロースゲルを介した双方向拡散によりキャピラリー内の良溶媒濃度を低下させることで晶析対象物質を晶析させることができる⁴⁾。本研究では、晶析物質、良溶媒、貧溶媒およびモデル不純物として、インドメタシン (IMC)、エタノール (EtOH)、蒸留水 (H₂O) およびアセメタシン (ACM) を選択した。

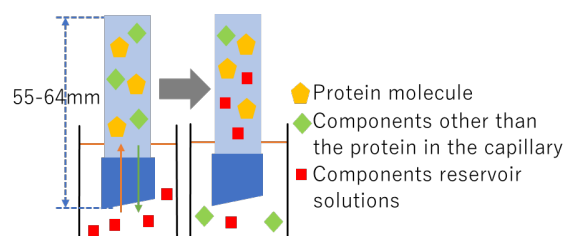


Fig. 1 Experimental apparatus CD method

2.2 地上重力下での貧溶媒晶析操作

予備晶析実験および微小重力晶析との比較対象を目的として、地上重力下でのCD法模擬装置による晶析操作を行った。実験装置を Fig. 2 に示す。片側をプラスチック粘土で閉じたガラスキャピラリーにIMC-EtOH飽和溶液を充填した後、アガロースゲル (1%) の入ったシリコンチューブを反対側に付けることで溶液を密閉させる。このガラスキャピラリーを貧溶媒 H₂Oの充填したスクリー瓶にシリコンチュ

Search for a novel polymorph of pharmaceutical compounds under microgravity
- Examination of the combination of good and non solvents and the effect of
introducing fine bubbles -

Taiki FUJII, Takahiro OTSUKA, Shinnosuke KAMEI, Shuichi SHIMOMURA,
Iwahito TAKAHASHI, Masakazu MATSUMOTO and Makoto OTSUKA

ーブ側が下になるように充填し、室温298 Kで静置し晶析操作を行った。

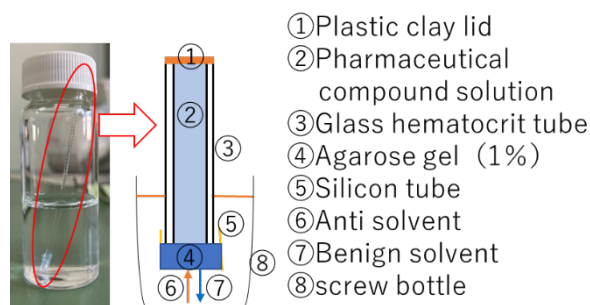


Fig.2 Structure and device diagram of a device similar to the CD method

3. 実験結果および考察

3.1 微小重力下における晶析実験と同様の試料を用いた地上重力下での予備晶析操作

IMC-EtOH飽和溶液にACMを質量比で0.1, 0.3, 1.0%加えた試料が晶析するのかわ確認するために、CD法模擬装置を用いて晶析操作を行った。実験開始から約24時間経過後の状態をFig. 3に示す。これより、いずれのACMの質量比においても結晶化していることがわかる。

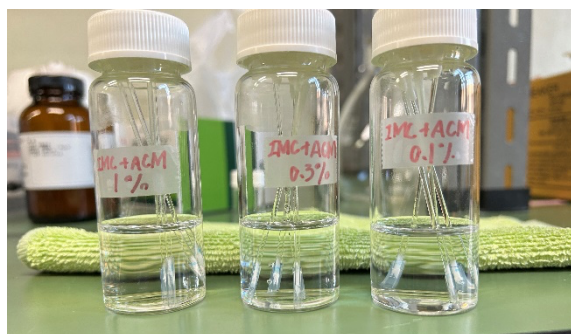


Fig.3. State of each capillary samples after 24 hours

以上の予備実験結果より、今回用いた3種類とACMを加えない試料の合計4種類を微小重力下での晶析実験の試料として選定した。

3.2 ラマン顕微鏡を用いた観察結果

微小重力下で貧溶媒晶析させた試料および地上重力下で貧溶媒晶析させた超微量試料をキャピラリーから取り出さずに測定することの可能性を検証するため、堀場製作所(神田試験室)のラマン顕微鏡を用いて観察を試みた。この際の試料として、IMC α 型-EtOH飽和溶液・IMC γ 型-EtOH飽和溶液をCD法模擬装置により晶析させたもの、IMC α 型-H₂O懸濁液・IMC γ 型-H₂O懸濁液の計4種類の試料を測定した。測定結果をFig. 4に示す。試料毎にピーク位置

などに違いが確認されたことからキャピラリー越しの測定ができたとわかる。これによりラマン顕微鏡を用いることで国際宇宙ステーションから持ち帰ってきた超微量サンプルをキャピラリーから取り出すことなく観察ができることが確認できた。

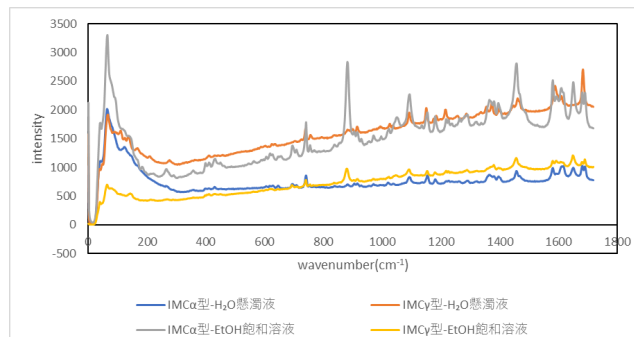


Fig.4. Raman spectra of IMC suspension samples in microcapillary by using a Raman microscopy

謝辞

本研究は、令和5年度大学院生産工学研究科横断型プログラム(ユニットテーマ:ファインバブルを用いたグリーンイノベーションプロセスの構築)の支援を受けて実施されました。ここに記して感謝の意を表します。

参考文献

- 1) JAXA, 微小重力がタンパク質結晶の品質に及ぼす効果, <https://humans-in-space.jaxa.jp/protein/researchers/project/microgravity.html#ctop>, (参照2023-10-11)
- 2) 立岡美夏子, 中村彰彦, 石田卓也, 高橋幸子, 巖斌, 田仲広明, 古林直樹, 伊中浩治, 五十嵐圭日子, 鮫島正浩, 水素原子の可視化を目指したセルラーゼの大型結晶作製, 日本マイクログラフィティ応用学会, No.34, (2017) pp.340108-1 - 340108-6
- 3) 阪本泰光, 野中孝昌, 鈴木義之, 小笠原涉, 田中信忠, 糖非発酵グラム陰性細菌由来新規ジペプチド産生酵素の構造と機能, 日本結晶学会誌, No.58 (2016) pp.221-227
- 4) 高橋幸子, 田仲広明, 宇宙環境を利用した高品質なタンパク質結晶の生成, 日本結晶学会誌, No.46, (2004) pp.323-331