

微小重力下における Indomethacin-Acemetacin-EtOH / H₂O 系での インドメタシンの多形現象

日大生産工（院）○藤井 大喜 日大生産工 亀井真之介, 下村 修一, 高橋 岩仁
 有人宇宙システム(株) 佐藤 巨光 (株)コンフォーカルサイエンス 田仲 広明
 日大生産工（研究員）大塚 誠 日大生産工 松本真和

1. 緒言

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品質（結晶構造（多形）、粒径など）が影響しているため、晶析操作は新薬の製造や既存品の改良を行う上で重要であり、様々な工夫のなされた新規な結晶析出法と多様な溶媒の組み合わせに関する研究が活発に行われている^{1,2)}。地上重力下での晶析操作では、結晶核発生過程において母液の溶液濃度に依存する密度差対流、結晶成長過程において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、重力の存在が結晶核化および結晶成長の再現性に影響を及ぼしている³⁾。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^{4,5)}が、再現時間の短さなどが課題として挙げられる。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などが行われている^{6,7)}。本研究では、抗炎症薬や解熱鎮痛剤として多くの製剤に用いられており、複数の多形を有するインドメタシン (IMC) を晶析対象物質として、JAMSS 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 IMC 晶析実験を行い、採取した結晶の観察・ラマン分光測定・解析により重力を排除した微小重力下での晶析操作が IMC の多形現象に及ぼす影響を検討する。

2. 実験装置および方法

2.1 実験装置

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晶析する際に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) の構造をFig. 1に示す。

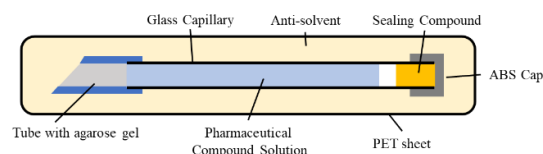


Fig. 1 Experimental apparatus CD method

晶析対象物質の溶解した良溶媒をガラスキャピラリー内に充填し、キャピラリーの片端にシーリングコンパウンド、反対の片端にアガロースゲルを充填したゲルチューブを装着させる。このガラスキャピラリーとリザーバー溶液として晶析対象物質の貧溶媒をポリエチレンテレフタレート製の袋に装填し、恒温槽に入れる。これによりリザーバー溶液はアガロースゲルを介してキャピラリー内に拡散し、反対にキャピラリー内の良溶媒もアガロースゲルを介してキャピラリー外へ拡散する。このような双方向拡散の結果、キャピラリー内の良溶媒濃度が低下し、キャピラリー内に晶析対象物質が析出する。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、IMC、エタノール

Polymorphism of Indomethacin in the Indomethacin-Acemetacin-EtOH/H₂O System under Microgravity

Taiki FUJII, Shinnosuke KAMEI, Syuichi SHIMOMURA, Iwahito TAKAHASHI,
 Naohiro SATO, Hiroaki TANAKA, Makoto OTSUKA
 and Masakazu MATSUMOTO

(EtOH)，蒸留水 (H₂O) およびアセメタシン (ACM) を選択した。

2.2 実験操作

298 Kにおいて、15 mlのEtOHにIMCを約0.35 g加え、マグネティックスターラーを用いて500 rpmで30分以上攪拌を行った。その後、目的とする不純物濃度に応じたACMを溶液に加え、再び500 rpmで30分以上攪拌を行い、この溶液をIMC-ACM-EtOH溶液として用いた。ACMに対するIMC質量比 ϕ は0, 0.3, または1.0%に設定した。

2.3 キャピラリー内に析出した結晶の測定

キャピラリー内に析出した結晶は偏光顕微鏡を用いて測定した。また、キャピラリー内に析出した結晶は非常に少量かつCD法ではゲルチューブ側から徐々に良溶媒濃度が下がることにより、キャピラリー内で結晶の析出した箇所も重要なパラメーターとなる。そのため、本研究では少量の試料に対して非破壊・非接触でキャピラリー越しに試料の測定を行うことのできるラマン顕微鏡を用いて測定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 偏光顕微鏡を用いた観察

Fig. 2に各サンプルの晶析実験後の偏光顕微鏡写真を示す。観察の結果、いずれのサンプルにおいてもキャピラリー内での結晶生成が確認された。

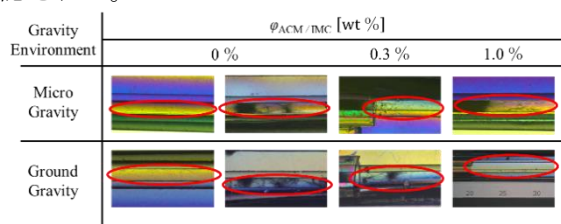


Fig. 2 Polarized light microscope after crystallization experiment

3.2 ラマン顕微鏡を用いた測定結果

3.2.1 キャピラリー内における観察位置を変化させた場合の比較

Fig. 3にゲルチューブ近傍、Fig. 4にキャピラリー中間部、Fig. 5にシーリングコンパウンド近傍に析出した結晶のラマンスペクトルを示す。キャピラリー内のいずれの析出箇所においても1615, 1648, 1688 cm⁻¹に α 型IMC, 1213,

1680 cm⁻¹に γ 型IMC特有のピークが確認され、宇宙と地上との重力環境による違いはみられなかった。

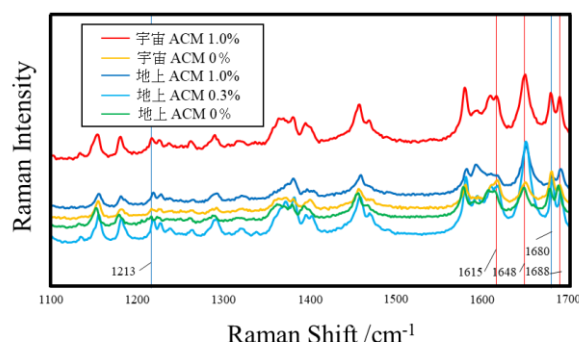


Fig. 3 Raman spectra of IMC crystals crystallized around gel tubes in microcapillary

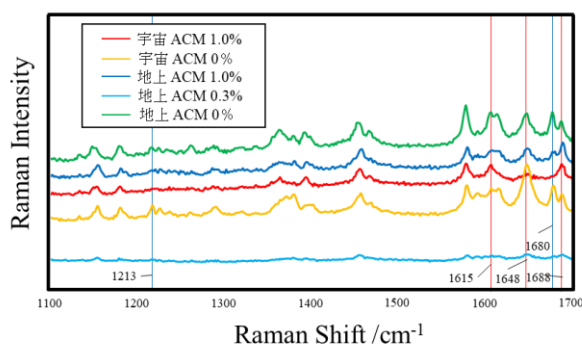


Fig. 4 Raman spectra of IMC crystals crystallized in the middle of capillary in microcapillary

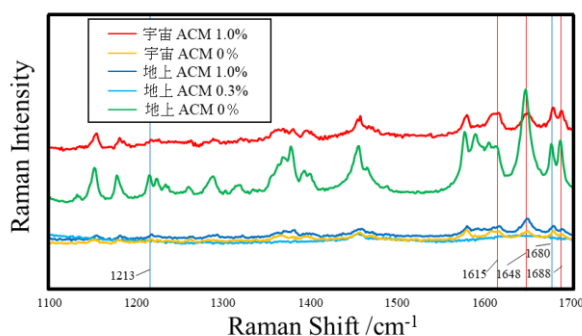


Fig. 5 Raman spectra of IMC crystals crystallized around sealing compound in microcapillary

3.2.2 IMC質量比を変化させた場合の比較

Fig. 6に ϕ が1.0%の結晶化母液、Fig. 7に ϕ が0%の結晶化母液から析出した結晶のラマンスペクトルを示す。 ϕ によらず、1615, 1648, 1688 cm⁻¹に α 型IMC, 1213, 1680 cm⁻¹に γ 型IMCに起因するピークがみられた。また、この傾向は

析出箇所または重力環境を変化させた場合においても同様であった。

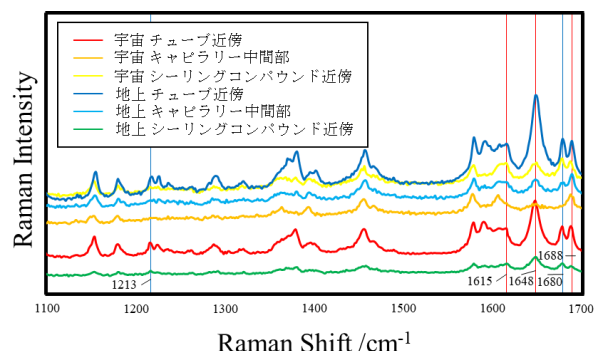


Fig. 6 Raman spectra of IMC crystals crystallized from crystallization mother liquid with ACM concentration of 1.0%

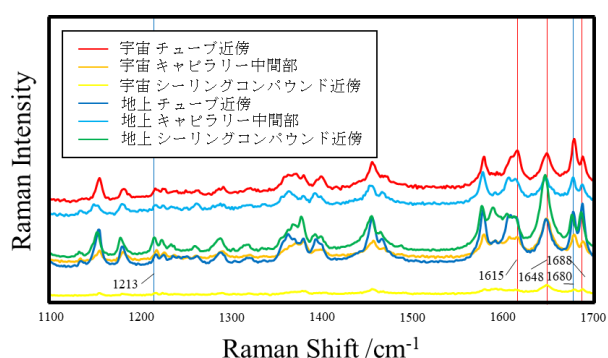


Fig. 7 Raman spectra of IMC crystals crystallized from crystallization mother liquid with ACM concentration of 0%

謝辞

本研究は、令和6年度大学院生産工学研究科横断型プログラム（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) 出束祐人, 白川善幸, 数値解析による液液二相拡散現象の定量化と形態制御, ホソカワ粉体工学振興財団年報, **25**, 168 (2017)
- 2) 山邊麻衣子, 内田博久, 松岡正邦, 超臨界晶析技術の医薬品製造への応用, 高圧力の科学と技術, **12**, 331 (2002)
- 3) 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2024-10-07)

jp/protein/researchers/project/microgravity.html#ctop (参照2024-10-07)

- 4) 間宮幹人, 永井秀明, 奥谷猛, 落下塔を利用したバルク結晶材料の合成, 日本マイクロ重力応用学会誌, **26**, 88 (2009)
- 5) 牧原正記, 早川惇二, 微小重力環境下でのガラスの創製, 応用物理, **64**, 39 (1995)
- 6) 立岡美夏子, 中村彰彦, 石田卓也, 高橋幸子, 厳斌, 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, International Journal of Microgravity Science and Application, **34**, 340108 (2017)
- 7) 阪本 泰光, 野中 孝昌, 鈴木 義之, 小笠原 渉, 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, **58**, 221 (2016)
- 8) 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, **46**, 323 (2004)