

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	低分子医薬品開発における脂溶性評価システムおよび沈殿抑制剤スクリーニングシステムの開発
Title(English)	
著者(和文)	山下太郎
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第4075号, 授与年月日:2012年9月30日, 学位の種別:論文博士, 審査員:三原 久和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第4075号, Conferred date:2012/9/30, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

低分子医薬品開発における脂溶性評価システム
および沈殿抑制剤スクリーニングシステムの開発

山下 太郎

略語一覧

ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion (吸収、分布、代謝、排泄)
DMSO	dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
ESI	electrospray ionization (エレクトロスプレーイオン化)
FaSSIF	fasted-state simulated small intestinal fluid (絶食下における人工小腸液)
HPLC	high performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
HPMC	hydroxyl propyl methyl cellulose (ヒドロキシプロピルメチルセルロース)
HPMC-AS	hydroxyl propyl methyl cellulose acetate succinate (ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート)
ITZ	itraconazole (イトラコナゾール)
JP	Japan Pharmacopoeia (日本薬局方)
MS	mass spectrometry (質量分析法)
SAR	structure activity relationship (構造活性相関)
SGF	simulated gastric fluid (人工胃液)
SIM	selected ion monitoring (選択イオンモニタリング)
UPLC	ultra performance liquid chromatography (高耐圧高速液体クロマトグラフィー)
USP	United States Pharmacopoeia (米国薬局方)
UV	ultraviolet (紫外吸光光度法)

目次

第1章 緒論

1-1	背景	1
1-1-1	医薬品開発における物性値の重要性.....	1
1-1-2	医薬品開発の流れ、および難溶性化合物の課題に対するアプローチ	2
1-1-3	脂溶性 ($\log D$)	3
1-1-4	溶解度	5
1-1-5	難溶性化合物に対する製剤技術.....	7
1-1-6	溶出試験	8
1-2	本研究の目的	9
	参考文献	11

第2章 高速 $\log D$ システムにおけるウォータープラグ前処理法の開発

2-1	緒言	14
2-2	実験操作	19
2-2-1	試薬	19
2-2-2	HPLC-MS 条件	22
2-2-3	ウォータープラグ前処理法.....	22
2-2-4	自動分注機の設定.....	23
2-2-5	96 穴プレートを用いた $\log D_{7.4}$ サンプル調製	23
2-3	結果と考察	24

2-3-1	ウォータープラグ法のプログラミング検討.....	24
2-3-2	市販医薬品を用いたウォータープラグ法の検証.....	29
2-3-3	自動分注機を用いたオクタノール相希釈の自動化.....	32
2-3-4	計算ソフトによる $\log D_{7.4}$ と実測値の比較.....	35
2-3-5	ウォータープラグ法とフラスコ振とう法のスループット比較....	37
2-4	結言	39
	参考文献	40

第3章 高速 $\log D$ システムにおける水相凍結前処理法の開発

3-1	緒言	42
3-2	実験操作	44
3-2-1	試薬	44
3-2-2	HPLC-UV 条件	46
3-2-3	水相凍結法を用いた $\log D_{7.4}$ サンプル調製.....	46
3-2-4	水相凍結法を用いた $\text{pH}\text{-}\log D$ プロファイルのサンプル調製.....	47
3-2-5	$\log D$ 、 $\log P$ および $\text{p}K_a$ の計算式.....	47
3-3	結果と考察	48
3-3-1	水相凍結法の開発.....	48
3-3-2	市販医薬品を用いた水相凍結法の検証.....	50
3-3-3	水相凍結法の $\text{pH}\text{-}\log D$ プロファイルへの応用.....	52
3-3-4	水相凍結法とウォータープラグ法のスループット比較.....	54
3-3-5	合成誘導化戦略における $\log D$ スクリーニングの有用性	55
3-4	結言	56

参考文献	58
------------	----

第 4 章 沈殿抑制剤スクリーニングにおける溶剤シフト法の開発

4-1 緒言	60
4-2 実験操作	64
4-2-1 SGF と FaSSIF を用いた塩基性化合物の沈殿抑制剤評価	64
4-2-1-1 試薬	64
4-2-1-2 メディアの調製	65
4-2-1-3 塩基性化合物 A の HPLC-UV 条件	65
4-2-1-4 SGF と FaSSIF を用いた溶剤シフト法による 沈殿抑制剤スクリーニング	66
4-2-1-5 SGF と FaSSIF を用いた溶出試験による沈殿抑制剤の評価 ..	66
4-2-2 DMSO と FaSSIF を用いたイトラコナゾール (ITZ) の 沈殿抑制剤評価	67
4-2-2-1 試薬	67
4-2-2-2 メディアの調製	68
4-2-2-3 ITZ の HPLC-UV 条件	68
4-2-2-4 DMSO と FaSSIF を用いた溶剤シフト法による 沈殿抑制剤スクリーニング	69
4-2-2-5 溶剤エバポレーション法による 沈殿抑制剤スクリーニング	70
4-2-2-6 ITZ の固体分散体調製法	70
4-2-2-7 固体分散体の溶出試験	71

4-3	結果と考察	72
4-3-1	SGF と FaSSIF を用いた塩基性化合物の沈殿抑制剤評価	72
4-3-1-1	塩基性化合物 A の物理化学的特性	72
4-3-1-2	SGF と FaSSIF を用いた溶溶シフト法による 塩基性化合物 A の沈殿抑制剤スクリーニング	72
4-3-1-3	SGF と FaSSIF を用いた溶溶シフト法と 溶出試験法の比較	78
4-3-2	DMSO と FaSSIF を用いたイトラコナゾール (ITZ) の 沈殿抑制剤評価	81
4-3-2-1	ITZ の物理化学的特性	81
4-3-2-2	DMSO と FaSSIF を用いた溶溶シフト法による ITZ の沈殿抑制剤スクリーニング	83
4-3-2-3	溶溶シフト法による ITZ の沈殿抑制剤評価	86
4-3-2-4	溶溶シフト法と ITZ の固体分散体の溶出比較	88
4-3-3	製剤戦略における沈殿抑制剤スクリーニングの有用性	90
4-4	結言	92
	参考文献	94

第 5 章 物性スクリーニングにおける UPLC-MS を用いた定量の高速化

5-1	緒言	96
5-2	実験操作	97
5-2-1	試薬	97
5-2-2	メディアの調製	98

5-2-3	HPLC-UV 条件	99
5-2-4	UPLC-MS 条件	99
5-2-5	DMSO ストック溶液を用いた溶解性試験.....	100
5-3	結果と考察	101
5-3-1	溶解性試験における UPLC-MS のパフォーマンス	101
5-3-2	UPLC-MS および HPLC-UV を用いた 溶解性試験の定量に関する比較	102
5-4	結言	104
	参考文献	105
第 6 章 結論		
6-1	本研究の総括	106
6-2	今後の展望	109
	参考文献	112
	原著論文	113
	謝辞	114

第 1 章

緒論

1-1 背景

1-1-1 医薬品開発における物性値の重要性

新規医薬品開発メーカーの使命は、一日も早く新薬を上市し、患者のもとへ薬を届けることである。病気で苦しむ患者に、より早く新薬を届けるため、医薬品開発では特にスピードが要求される。医薬品開発において課題を早く解決することは重要であり、その一つに高脂溶性・難溶性という物性面での課題が挙げられる。

低分子の医薬品開発において、リード化合物は大規模ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングによって見出される。しかしながら、ターゲットとなるタンパク質等との相互作用の観点から得られるリード化合物は、高脂溶性および難溶性化合物であることが多い。これらの化合物の特徴として、ADME 特性（吸収、分布、代謝、排泄）、特に吸収に課題をもつことが知られている¹⁻⁴⁾。

錠剤やカプセル剤に代表される経口固形製剤において、化合物は口から投与された後、胃（酸性）を通過し、腸（中性）で吸収されることが知られている（図 1-1）⁵⁾。中性の腸液中で溶解している化合物は、腸管膜を透過し、門脈および肝臓を経由し、全身血中に暴露される。水溶液中で溶解度が低い化合物や、膜透過性が低い化合物は吸収されず、血中濃度が上がらないことが多い。この様に、薬物の吸収過程において、溶解性および膜透過性は重要な物性パラメーターであり、適切な脂溶性、良好な溶解性を有する化合物を創出することは重要である。

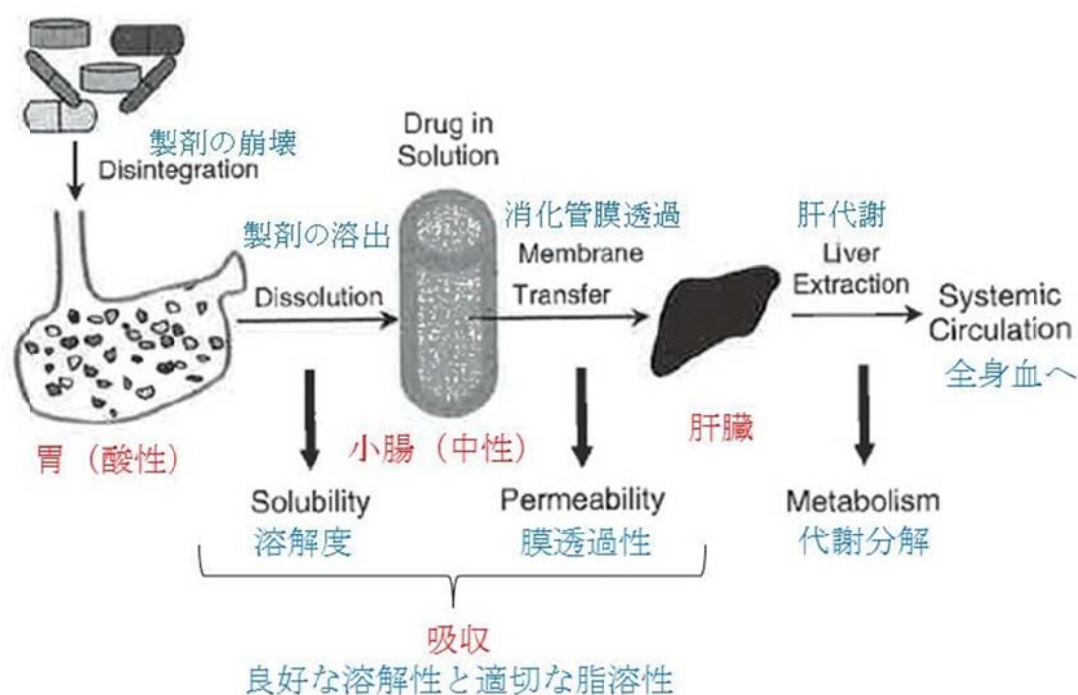


図 1-1 医薬品の吸収過程⁵⁾。

1-1-2 医薬品開発の流れ、および難溶性化合物の課題に対するアプローチ

難溶性および高脂溶性という物性の課題に対するアプローチとして、2つの方法が挙げられる (図 1-2)。一点目は、探索ステージにおいて、溶解性の向上する構造をドラッグデザインし、合成展開を行う方法である。合成研究者は、構造、物性値、活性値 (薬効) などを総合的に考察し、構造と各種パラメーターの関係 (構造活性相関、SAR) から開発研究へ進める化合物の構造を最適化する^{5,6)}。この際、合成研究者は、リード化合物に水溶性の官能基を導入、脂溶性官能基を削減し、溶解性の向上を図る。ドラッグデザインに際し、構造活性相関を早く把握し、効率的な合成戦略に生かすためには、高いスループットで物性値 (脂溶性・溶解性) を測定できるシステムが求められている⁷⁻⁹⁾。

二点目は、開発ステージにおいて、可溶化剤（沈殿抑制剤）などの製剂的工夫を用いて、難溶性化合物の溶解性を向上させる方法である¹⁰⁻¹²⁾。この場合、効率的に難溶性化合物の溶解性を改善する添加剤を見出すために、高いスループットをもった製剤処方のスクリーニングシステムが必要である。

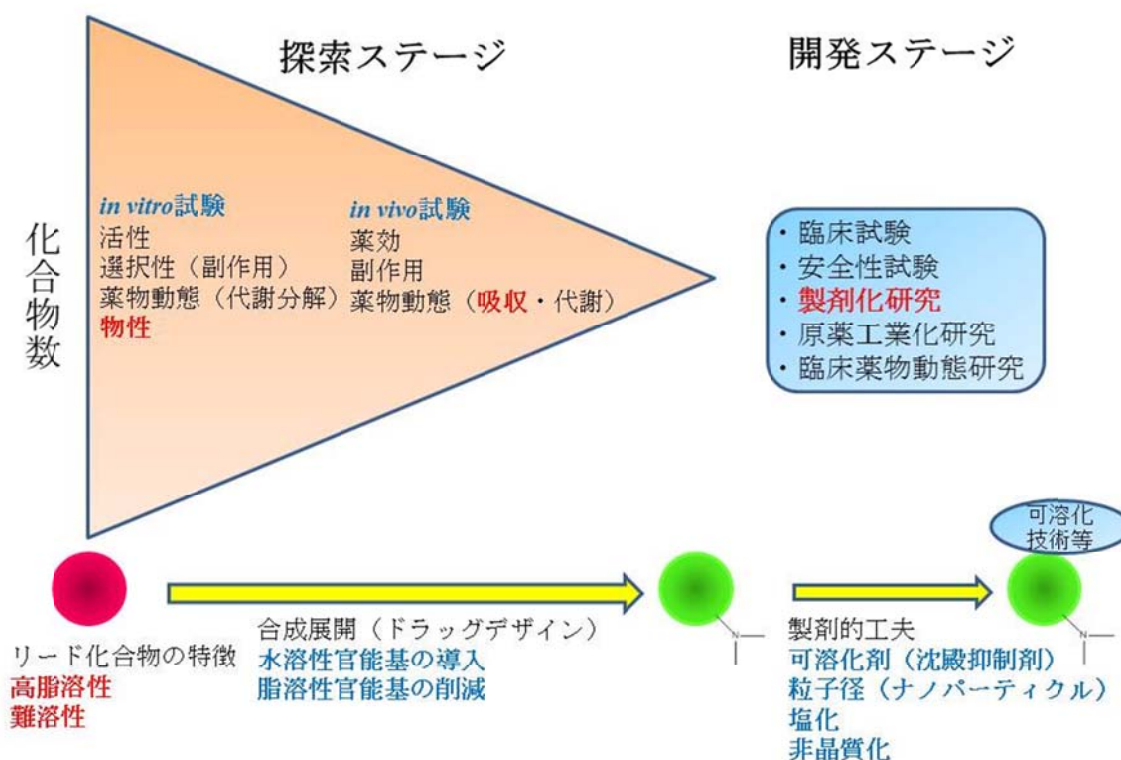


図 1-2 医薬品開発の流れ、および難溶性化合物の課題に対するアプローチ。

1-1-3 脂溶性 ($\log D$)

合成展開において指標となる物性パラメーターとして、脂溶性と溶解性がよく使われている⁵⁾。 $\log D$ はオクタノール/水分散係数であり (図 1-3 A)、医薬品開発における脂溶性の指標として利用されている¹³⁾。特に $\log D_{7.4}$ (pH7.4 における $\log D$) は ADME 特性 (吸収、分布、代謝、排泄) との関係も報告されており^{1-4,14,15)}、高脂溶性化合物群

の物性改善を目的とした合成誘導化戦略⁵⁾において重要なパラメーターである。経口医薬品では、 $\log D_{7.4}$ が 1~3 の化合物は、溶解性と膜透過性のバランスが良いと言われている¹⁶⁾。 $\log D_{7.4}$ が 1 以下の化合物では、膜透過性が低くなり、逆に $\log D_{7.4}$ が 3 以上の化合物では、溶解性が低くなる。よって、吸収に最適な化合物を合成するためには、 $\log D_{7.4}$ が適切な範囲にある化合物構造をデザインすることが必要となる。

また、脂溶性の指標として、オクタノール/水分配係数 $\log P$ も知られている¹⁷⁾。 $\log P$ は電荷を有さない状態の $\log D$ であり、 $\log P$ と $\log D$ の関係は図 1-3 B の通りである。薬物の吸収過程を考察する際は、中性環境下での脂溶性が重要なため、一般的には $\log P$ よりも $\log D_{7.4}$ が使われる¹⁸⁾。

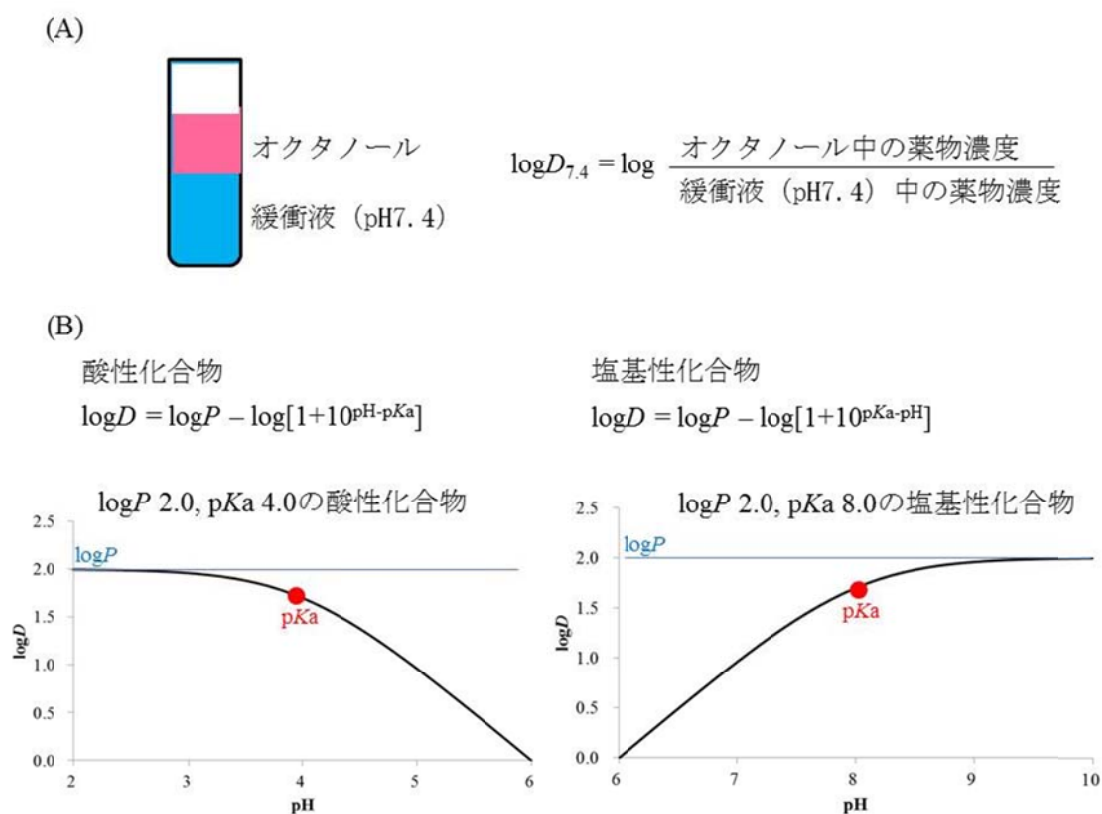


図 1-3 (A) $\log D$ (水-オクタノール分散係数)。(B) $\log D$ と $\log P$ (水-オクタノール分配係数) の関係。

$\log D$ の一般的な測定法として、フラスコ振とう法^{19,20)}が挙げられる (詳細 第 2 章)。

この方法では、試験管や分液ロートなどの容器を用い、化合物をオクタノール (上相) / 水 (下相) に二相分配させる。両相の濃度比より $\log D$ を算出する。フラスコ振とう法の欠点として、スループットが低い点が挙げられる。この要因として、二相分離を手動にて行っていること、および試験管や分液ロートなどスループット向上に適さない容器を使っていることが挙げられる。よって、 $\log D$ の情報を適切にドラッグデザインに反映させるためには、高スループットで $\log D$ を評価できるシステムの構築が必要である。

1-1-4 溶解度

溶解性は医薬品の吸収評価において重要な物性パラメーターである。薬物の溶解過程は、結晶格子が崩れる過程および崩れた結晶格子が溶媒和する過程に二分される (図 1-4)。溶解性の評価法として、結晶からの溶解度 (Thermodynamic solubility) を測定する方法、およびジメチルスルホキシド (DMSO) ストック溶液からの見かけの溶解性 (Kinetic solubility) を評価する方法の 2 種が知られている (図 1-5)^{5,17,21,22)}。医薬品分野において、一般的に溶解度とは Thermodynamic solubility を指す。探索ステージにおいて合成された新規化合物は、DMSO ストック溶液として保管され、薬効、毒性、物性評価に利用される。少サンプル量でハイスループットの評価ができることから、合成展開においては DMSO 溶液からの析出を評価する Kinetic solubility 評価がよく利用されている。これらの評価においては、生体内を模倣し、pH1~pH7.4 の水溶液がメディア (試験液) として、よく使用される。また、近年、生体を模倣した試験液として、胆汁酸 (タウロコール酸ナトリウム) を含む人工腸液 (FaSSIF; fasted-state simulated small intestinal fluid, pH6.5) も注目されている²³⁻²⁵⁾。

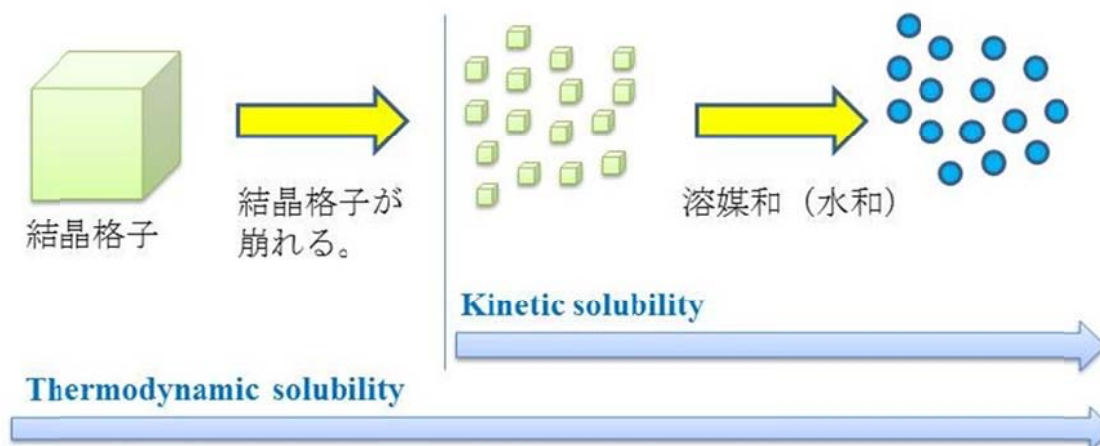


図 1-4 薬物の溶解過程。

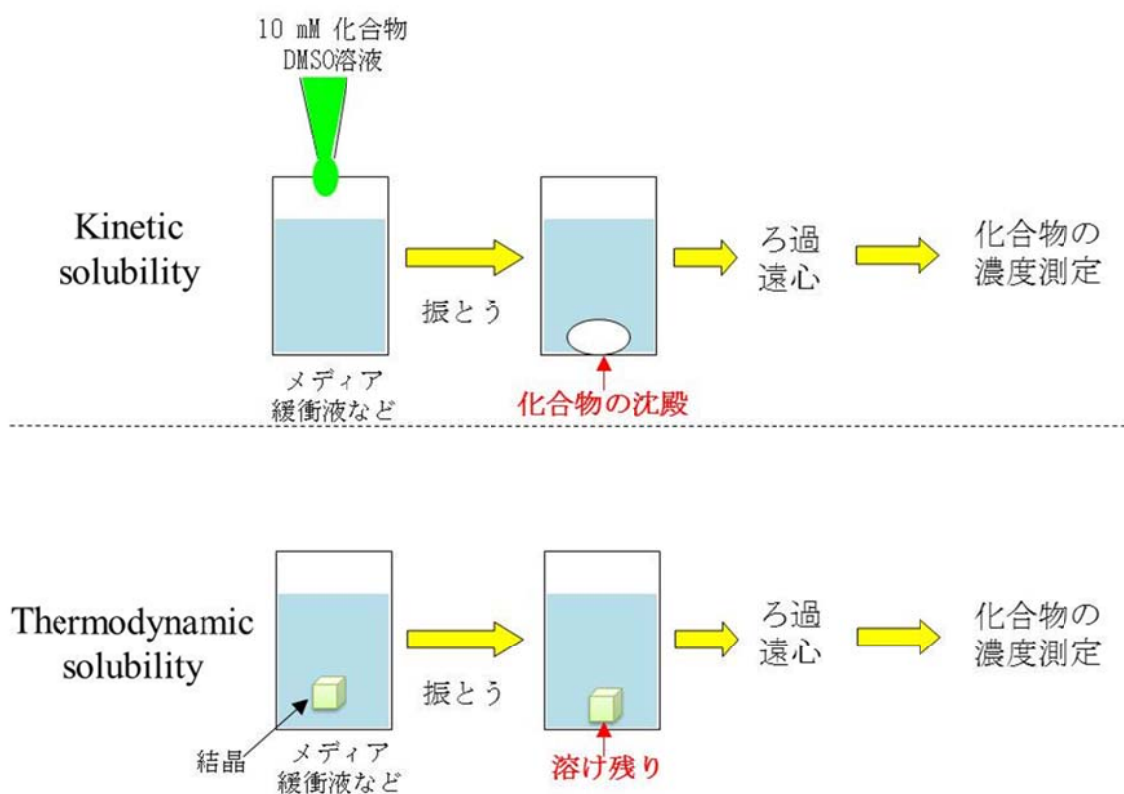


図 1-5 Kinetic solubility および Thermodynamic solubility の評価方法。

1-1-5 難溶性化合物に対する製剤技術

製剤的工夫において、難溶性化合物の吸収を改善するためには、腸で高い濃度（見かけの溶解度）を維持することが重要である¹⁰⁻¹²。薬物の溶解過程は、結晶格子が崩れる過程および崩れた結晶格子が溶媒和する過程に二分される（図 1-4）。結晶からの溶解度が低い場合、溶解性改善の方法として固体分散体^{26,27}や脂質製剤²⁸⁻³⁰が挙げられる（図 1-6）。固体分散体では、化合物を非晶質（アモルファス）でポリマー内に封じ込める。生体内において、固体分散体から溶出した薬物は一時的に高い濃度を維持し、その後、化合物の溶解度に応じて析出する。脂質製剤では、化合物をオイル脂質、エマルジョンに溶かし、溶解性を改善する。この方法でも、生体内において、製剤から溶出した薬物は一時的に高い濃度を維持し、その後、化合物の溶解度に応じて析出する。この様に、難溶性化合物の吸収改善を目的とする製剤的工夫では、アモルファスや溶液状態で化合物を経口投与し、腸内で一時的に高い濃度を維持させ、その後、化合物が沈殿するまでの時間を引き延ばすことが重要である。

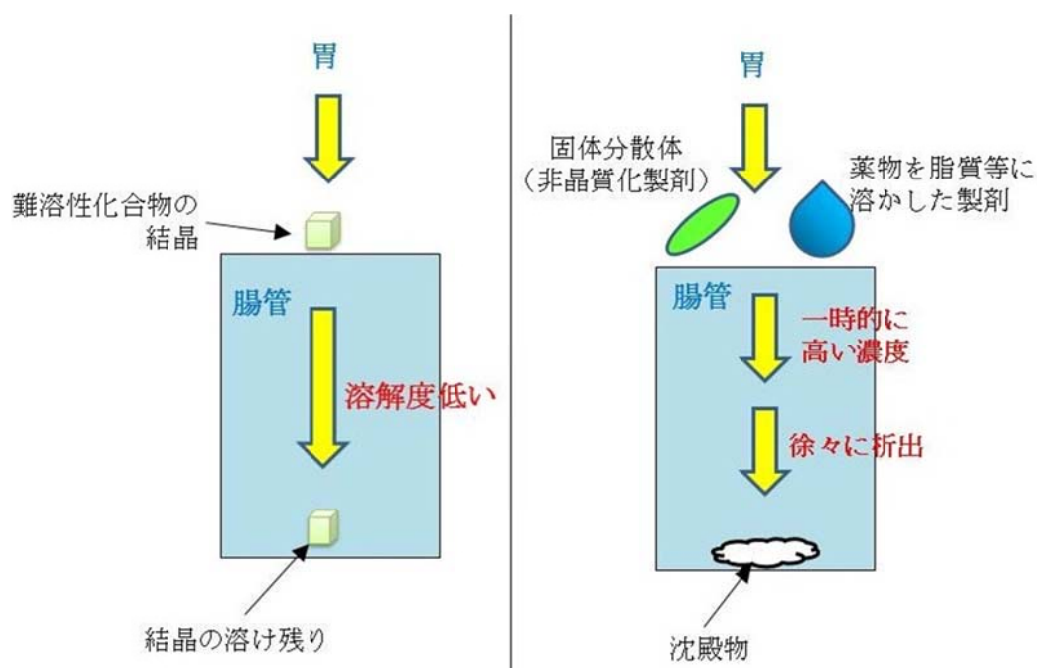


図 1-6 固体分散体および脂質製剤による製剤的工夫。

1-1-6 溶出試験

腸内での化合物の析出を防ぐため、沈殿抑制剤の選定は重要であり、これらの評価は一般的には USP（米薬局方）³¹⁾や JP（日本薬局方）³²⁾に記載されるパドル法の溶出試験機によって行われている²⁶⁻³⁰⁾（図 1-7）。溶出試験機では一般的に数百～900 mL の試験液を用い評価を行う。溶出試験機の欠点として、多くの化合物量が必要な点、およびスループットが低い点が挙げられる。特に開発初期では使用できるバルク量が少ないこと、また、効率良く沈殿抑制剤を見出すためにも、小スケールでスループットの高い評価法が求められている。

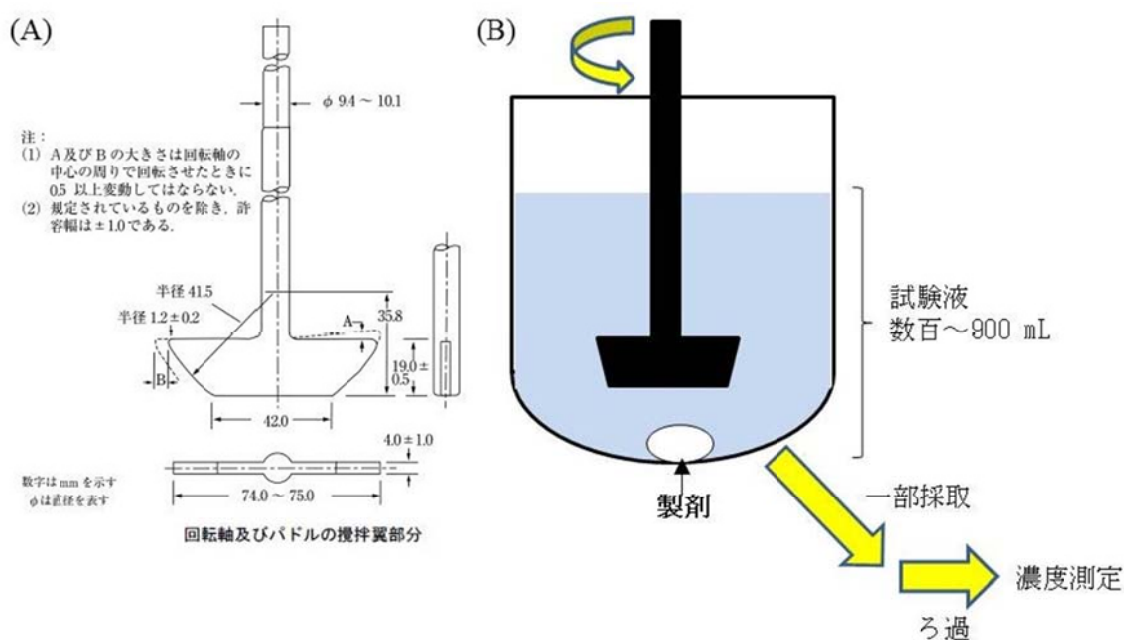


図 1-7 (A) 日本薬局方による溶出試験のパドルサイズ。³²⁾ (B) 溶出試験による製剤評価。

1-2 本研究の目的

本研究では、難溶性および高脂溶性という物性面の課題を効率的に解決するために、探索ステージの合成展開で有用な $\log D$ スクリーニングシステム、および開発ステージの製剤設計で有用な沈殿抑制剤スクリーニングシステムを開発することを目的とする。

第 2 章および第 3 章では、 $\log D$ をスループット高く測定できるシステムの開発を試みる。システムのスループットを上げるためには、96 穴プレートを用いたミニチュア化が必要であるが、その際の課題としてオクタノール相のコンタミネーションが挙げられる。高脂溶性化合物では、上相（オクタノール相）の薬物濃度は、下相（水相）より高くなるため、水相採取時にオクタノールがコンタミネーションすることは測定結果に大きな影響を与える。特に、ミニチュア化で液量を減らすことにより、ハンドリングの観点から、コンタミネーションは起こりやすいと考えられる。過去、96 穴プレートを用いてオクタノールのコンタミネーションを防いだ報告は無く、オクタノールのコンタミネーションを防ぐ前処理法が求められている。そのため、第 2 章および第 3 章では、コンタミネーションを回避する前処理法として、ウォータープラグ法および水相凍結法の開発を試みる。

第 4 章では、沈殿抑制剤スクリーニングシステムの開発を試みる。沈殿抑制剤の評価には、一般的に溶出試験機を用いた評価法が使われているがスループットが低いという欠点がある。近年、96 穴プレートを用いてスループットを上げたソルベントエバポレーション法が報告されたが、同時に、エバポレーション時の化合物の析出や、揮発性有機溶媒に化合物を高濃度で溶かさなければならないという欠点も報告された^{33,34)}。そのため、ソルベントエバポレーション法では適用できる化合物特性に制限があり、より簡便で汎用性のある方法が求められている。そのため、第 4 章では、ソルベントエバポレ

ーション法の欠点を解決する方法として、ソルベントシフト法を用いた沈殿抑制剤スクリーニング法の開発を試みる。

第 5 章では UPLC-MS を用いて、定量法的高速化を試みる。第 2～第 4 章では、主に 96 穴プレートを用いサンプル前処理法のスループット向上を検討するが、それらの定量には一般的な HPLC を用いる。そのため、本研究の目的であるスループットの高いシステムを構築するためには、定量のスループットを向上させる必要がある。近年、1.7 μm の小さいシリカゲル充填剤を用いた UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) が、HPLC よりも短時間で高分解能の分析ができることから注目されている³⁵⁻³⁸⁾。第 5 章では、物性スクリーニングの定量法のスループットを上げることが目的とし、Kinetic solubility 試験に UPLC-MS を導入し、一般的な HPLC-UV との比較検討を行う。

最後に、第 6 章では、本研究の総括を行い、今後の展望を述べる。

第 1 章 参考文献

- (1) Lipinski, C. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235-249.
- (2) Martin, Y. C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3164-3170.
- (3) Kerns, E. H.; Di, L. *Drug Discovery Today Technol.* **2004**, *1*, 343-348.
- (4) Waterbeemd, H. V. D.; Smith, D. A.; Beaumont, K.; Walker, D. K. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1313-1333.
- (5) Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*; Elsevier, Inc.: London, UK, 2008.
- (6) Shamovsky, I.; Connolly, S.; David, L.; Ivanova, S.; Norden, B.; Springthorpe, B.; Urbahns, K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1162-1178.
- (7) Chen, Z.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1043-1049.
- (8) Hartmann, T.; Schmitt, J.; Rohring, C.; Nimptsch, D.; Noller, J.; Mohr, C. *Current Drug Delivery* **2006**, *3*, 181-192.
- (9) Ulmeanu, S. M.; Jensen, H.; Bouchard, G.; Carrupt, P. A.; Girault, H. H. *Pharm. Research* **2003**, *20*, 1317-1322.
- (10) Brouwers, J.; Brewster, M. E.; Augustinjs, P. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2549-2572.
- (11) Timpe, C. *American Pharm. Review* **2010**, *February*, 12-21.
- (12) Janssens, S.; Van den Mooter, G. *J. Pharm. Pharm.* **2009**, *61*, 1571-1586.
- (13) Bhal, S. K.; Kassam, K.; Peirson, I. G.; Pearl, G. M. *Molecular Pharm.* **2007**, *4*, 556-560.
- (14) Ishigami, M.; Honda, T.; Takasaki, W.; Ikeda, T.; Komai, T.; Ito, K.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 282-288.

- (15) Liu, X.; Tu, M.; Kelly, R. S.; Chen, C.; Smith, B. J. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 132-139.
- (16) Comer, J. E. A. In *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004; pp 21-45.
- (17) 浅川 直樹; 岩渕 晴男 In *創薬の分析化学 開発タイムラインにそった全過程*; 丸善出版: 東京, 日本, 2011; pp 19-36.
- (18) 芦澤 一英 *日本薬理学雑誌* **2006**, *127*, 213-216.
- (19) Waterbeemd, H. V. D.; Lennernas, H.; Artursson, P.; Mannhold, R.; Kubinyi, H. In *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; Folkers, G. Eds.; Wiley & Sons, Inc: Weinheim, Germany, 2003; pp 3-242.
- (20) JIS (日本工業規格) Z-7260-117 分配係数 (1-オクタノール/水) の測定—フラスコ振とう法
- (21) 菅谷 幸子; 吉葉 孝子; 梶間 隆; 石濱 泰 *薬学雑誌* **2002**, *122*, 237-246.
- (22) Avdeef, A. In *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2003; pp 91-115.
- (23) Galia, E.; Nicolaides, E.; Horter, D.; Lobenberg, R.; Reppas, C.; Dressman, J. B. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 698-705.
- (24) Erez de la Cruz Moreno, M.; Oth, M.; Deferme, S.; Lammert, F.; Tack, J.; Dressman, J. B.; Augustijns, P. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1079-1089.
- (25) Lardia-Arana, D.; Kristensen, H. G.; Mullertz, A. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *95*, 248-255.
- (26) Kushida, I.; Ichikawa, M.; Asakawa, N. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 258-266.

- (27) Yamashita, K.; Nakate, T.; Okimoto, K.; Ohike, A.; Tokunaga, Y.; Ibuki, R.; Higaki, K.; Kimura, T. *Int. J. Pharm.* **2003**, *267*, 79–91.
- (28) Gao, P.; Rush, B. D.; Pfund, W. P.; Huang, T.; Bauer, J. M.; Morozowich, W.; Kuo, M.; Hageman, M. J. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2386-2398.
- (29) Gao, P.; Guyton, M. E.; Huang, T.; Bauer, J. M.; Stefanski, K. J.; Lu, Q. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 221-229.
- (30) Odeberg, J. M.; Kaufmann, P.; Kroon, K. G.; Hoglund, P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 375-382.
- (31) USP (米国薬局方) 第 34 版
- (32) 日本薬局方 第 16 版
- (33) Shanbhag, A.; Rabel, S.; Nauka, E.; Casadevall, G.; Shivanand, P.; Eichenbaum, G.; Mansky, P. *Int. J. Pharm.* **2008**, *351*, 209–218.
- (34) Dai, W. G.; Pollock-Dove, C.; Dong, L. C.; Li, S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 657–672.
- (35) Novakova, L.; Matysova, L.; Solich, P. *Talanta* **2006**, *68*, 908-918.
- (36) Wren, S.; Tchelitcheff, P. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1119*, 140-146.
- (37) Mensch, J.; Noppe, M.; Adriaensen, J.; Melis, A.; Mackie, C.; Augustijns, P.; Brewster, M. *J. Chromatogr., B* **2007**, *847*, 182-187.
- (38) Castro-Perez, J.; Plumb, R.; Granger, J. H.; Beattie, I.; Joncour, K.; Wright, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 843-848.

第 2 章

高速 $\log D$ システムにおけるウォータープラグ前処理法の開発

2-1 緒言

$\log D$ はオクタノール/水分散係数であり、医薬品開発における脂溶性の指標として利用されている¹⁾。特に $\log D_{7.4}$ (pH7.4 における $\log D$) は ADME 特性 (吸収、分布、代謝、排泄) との関係も報告されており²⁻⁷⁾、高脂溶性化合物群の物性改善を目的とした合成誘導化戦略において重要なパラメーターである。

$\log D$ の一般的な測定法として、フラスコ振とう法が挙げられる⁸⁾。図 2-1 にフラスコ振とう法の一例を示す。この方法では、試験管や分液ロートなどの容器を用い、化合物をオクタノール (上相) / 水 (下相) に二相分配させる。その後、両相を手動にて二相分離する。二相分離後、薬物濃度が濃いオクタノール相は、HPLC 分析に適した濃度まで有機溶媒などを用いて希釈する。最後に、水相および希釈されたオクタノール相を HPLC にて分析し、両相の濃度比より $\log D$ を算出する。フラスコ振とう法の欠点として、スループットが低い点が挙げられる。この要因として、二相分離を手動にて行っていること、および試験管や分液ロートなどスループット向上に適さない容器を使っていることが挙げられる。

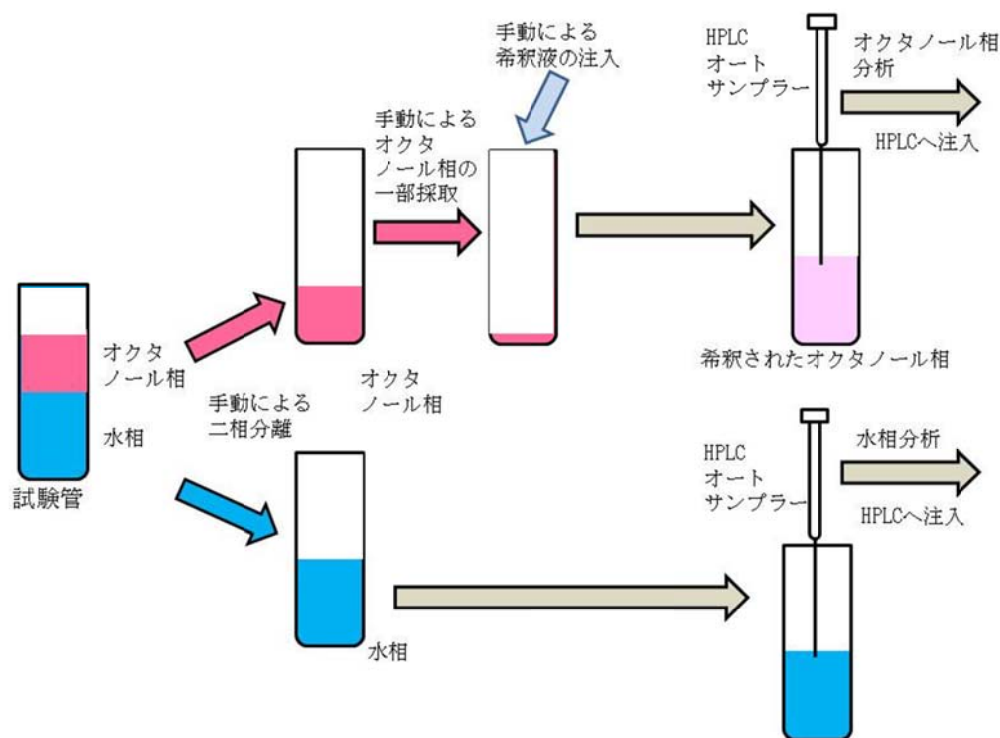


図 2-1 フラスコ振とう法による $\log D$ 前処理スキーム。

$\log D$ のスループットを上げた測定法として、HPLC の保持時間を利用した方法 ($\log k$ 法) が知られている⁹⁻¹¹⁾ (図 2-2)。 $\log k$ 法では、化合物とオクタデシル基 (C18 カラム固定相) の疎水性相互作用を利用し、 $\log D$ が既知である標準物質と被験物質の保持時間の関係から脂溶性を評価する。特に、中性化合物ではフラスコ振とう法の結果 ($\log D$) と、 $\log k$ 法の結果が一致することが知られている。 $\log k$ 法の欠点として、酸性物質や塩基性物質では、イオン化した化合物が固定相であるシラノール基と相互作用し、フラスコ振とう法の結果と $\log k$ 法の結果が一致しにくい点が挙げられる¹²⁾。

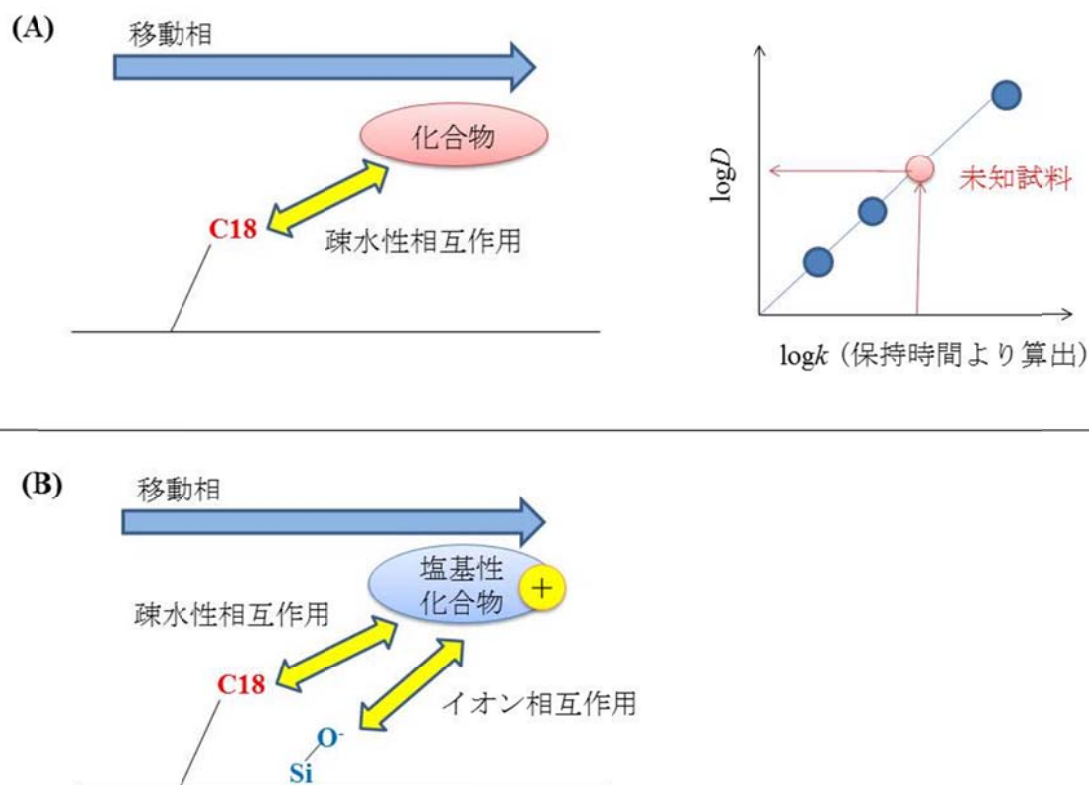


図 2-2 (A) HPLC の保持時間を利用した $\log k$ 法による $\log D$ 測定。(B) 電荷を有する化合物を $\log k$ 法で分析する際に生じる固定相とのイオン相互作用。

本章では、スループットの高い $\log D$ 評価系（高速 $\log D$ システム）を構築するため、フラスコ振とう法の前処理の自動化および 96 穴プレートを用いたミニチュア化を行うことを計画した（図 2-3）。化合物をオクタノール（上相）/水（下相）に二相分配させる。薬物濃度が濃いオクタノール相を自動分注機にて一部採取し、HPLC 分析に適した濃度まで有機溶媒などを用いて希釈する。この希釈したオクタノール相を HPLC-MS で分析する。また、二相分配したサンプルの水相を直接 HPLC のオートサンプラーにて採取し、HPLC-MS で分析する。このシステムでは、前処理の自動化および 96 穴プレートを用いたことにより、フラスコ振とう法と比較しスループットの著しい向上が期待される。

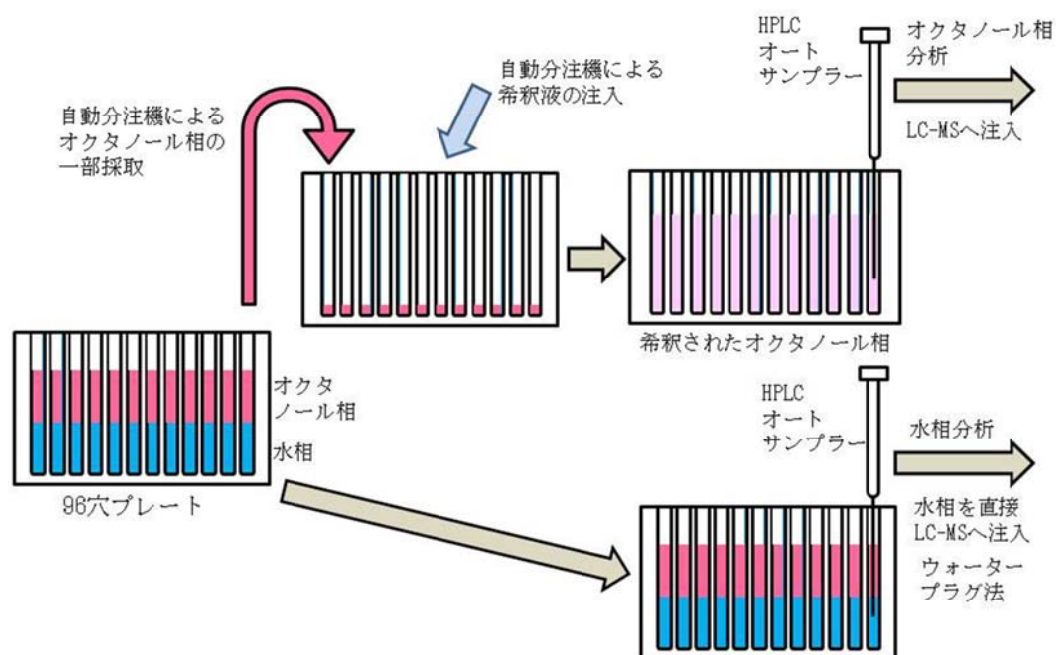


図 2-3 96 穴プレートを用いた自動 $\log D$ 評価システム

96 穴プレートを用いた高速 $\log D$ システムを開発する際の課題として、水相採取時のオクタノールのコンタミネーションが挙げられる。表 2-1 に例として、高脂溶性化合物 ($\log D = 3 \sim 5$) の評価において $\pm 10\%$ の測定精度に影響を与えるオクタノールコンタミネーションの許容量を記す。高脂溶性の化合物では、上相（オクタノール相）の薬物濃度は下相（水相）より高くなる。例えば、 $\log D = 3$ の化合物の場合、上相と下相の濃度比は、 $10^3:1$ となる。HPLC のオートサンプラーにて $2.5 \mu\text{L}$ の水相を採取する場合、水相採取時に少量のオクタノール ($2.5 \times 10^{-4} \mu\text{L}$) がコンタミネーションすることは、 $\pm 10\%$ の測定精度で下相の薬物濃度に影響を与える。さらに、 $\log D = 4, 5$ の場合は、より少量のオクタノールのコンタミネーションが、下相の薬物濃度に大きな影響を与える。特に、96 穴プレートを用い、水およびオクタノールの液量を減らしたことにより、フラスコ振とう法に比べて、コンタミネーションは起きやすいと考えられる。また、オ

クタノールの粘性が高いため、自動化によってオクタノールを完全に取り除くことは難しい。

表 2-1 ±10%の測定精度に影響を与えるオクタノールコンタミネーションの許容量。

	$\log D = 3$	$\log D = 4$	$\log D = 5$
オクタノール相と水相の濃度比	$10^3 : 1$	$10^4 : 1$	$10^5 : 1$
オートサンプラーで水相を採取する量	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
±10%の測定精度に影響を与える オクタノールのコンタミネーション量	$2.5 \times 10^{-4} \mu\text{L}$	$2.5 \times 10^{-5} \mu\text{L}$	$2.5 \times 10^{-6} \mu\text{L}$

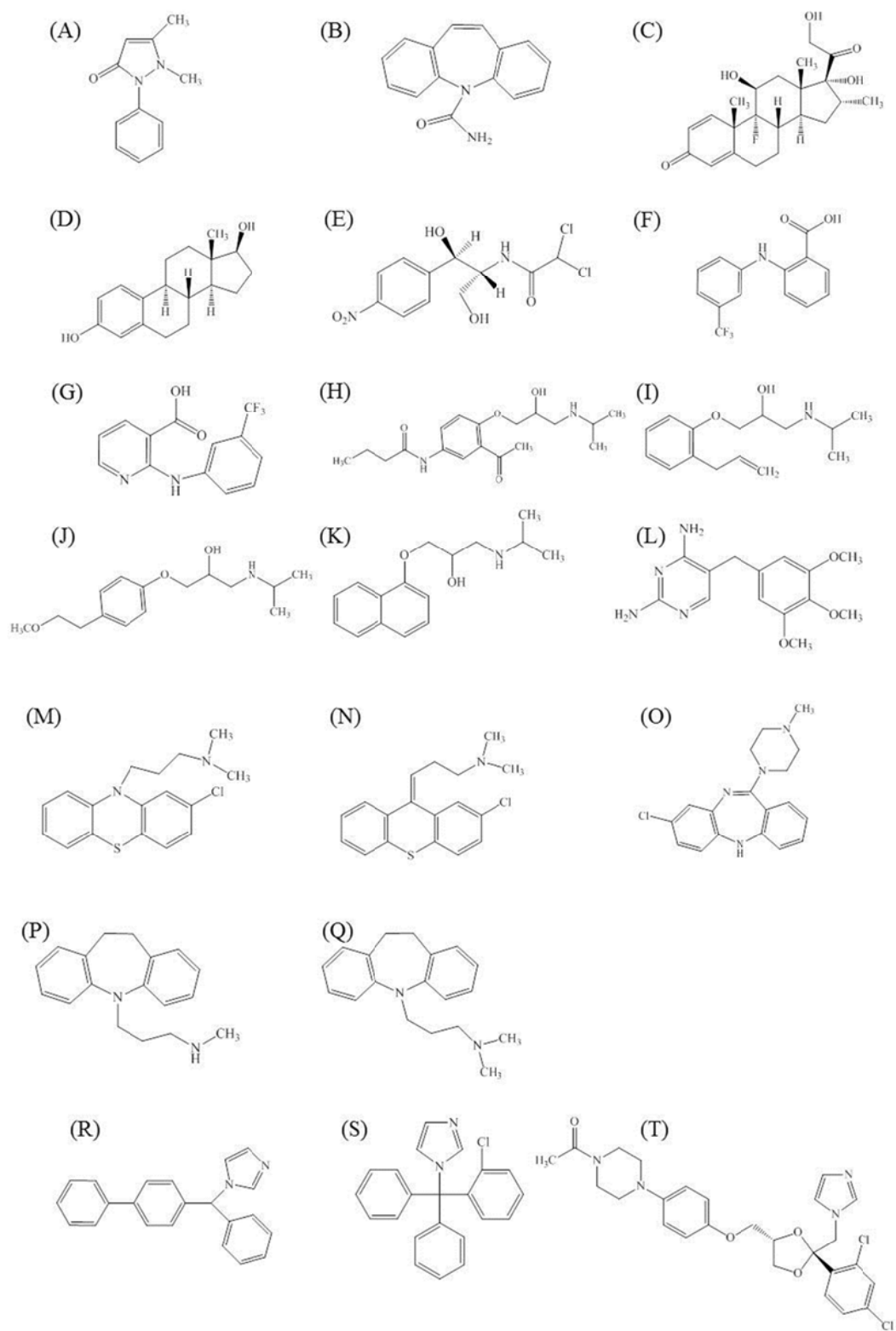
本章では、コンタミネーションの課題を解決するために、水がオクタノールを弾く性質に着目し、水相の前処理法としてウォータープラグ法を開発することを試みた。水相を採取するシリンジに予め水を吸引し（ウォータープラグ）、ニードルがオクタノール相を通過する際に、ウォータープラグがオクタノールを弾き、コンタミネーションを防ぐことを仮説として考え、検討した。特に、オクタノールのコンタミネーションを防ぐ水相の前処理法に関しては報告例が無く、ウォータープラグ法の開発によりスループットの著しい向上が期待された。オクタノール相の前処理として、フラスコ振とう法では手動にてオクタノール相を一部採取し、HPLC 分析に適した濃度まで有機溶媒にて希釈する。しかし、粘性の高いオクタノールを手動にて採取することは、スループットが低くなる要因であった。本章ではスループット向上を目的とし、オクタノール相の前処理に自動分注機を導入し、前処理の自動化を試みた。水相の前処理としてウォータープラグ法を用い、さらにオクタノール相の前処理に自動分注機を導入することにより、スループットの高い $\log D$ 評価システムが構築できると考えた。

2-2 実験操作

2-2-1 試薬

検討に用いた市販医薬品の構造を図 2-4 に示す。アンチピリン、カルバマゼピン、デキサメタゾン、エストラジオール、クロラムフェニコール、フルフェナム酸、ニフルム酸、アセブトロール、アルプレノロール、メトプロロール、プロプラノロール、トリメトプリム、クロルプロマジン、クロルプロチキセン、クロザピン、デシプラミン、イミプラミン、ビホナゾール、クロトリマゾール、ケトコナゾール、リドカイン、テルブタリン、ブロモクリプチン、ジルチアゼム、アミオダロンは、Sigma Aldrich 社より購入した。

ジメチルスルホキシド (DMSO) は、DOJINDO 社の UV スペクトルグレードを使用した。1-オクタノール (試薬特級)、エタノール (HPLC グレード)、ギ酸 (HPLC グレード) は和光純薬社より入手した。アセトニトリル (HPLC グレード)、リン酸水素二ナトリウム (試薬特級)、リン酸二水素ナトリウム (試薬特級) は、純正化学社より購入した。水は MilliQ Gradient A 10 システム (Millipore 社) で精製したものを使用した。緩衝液 (pH7.4) は、10 mM リン酸水素二ナトリウムおよび 10 mM リン酸二水素ナトリウムを混合し、pH メーター (Seven Multi pH meter、Mettler Toledo 社) にて pH7.4 に調製した。オクタノールに少量の緩衝液を添加し、一晩、緩衝液で飽和させたオクタノールを実験に使用した。同様に、緩衝液に少量のオクタノールを添加し、一晩、オクタノールで飽和させた緩衝液を実験に使用した。



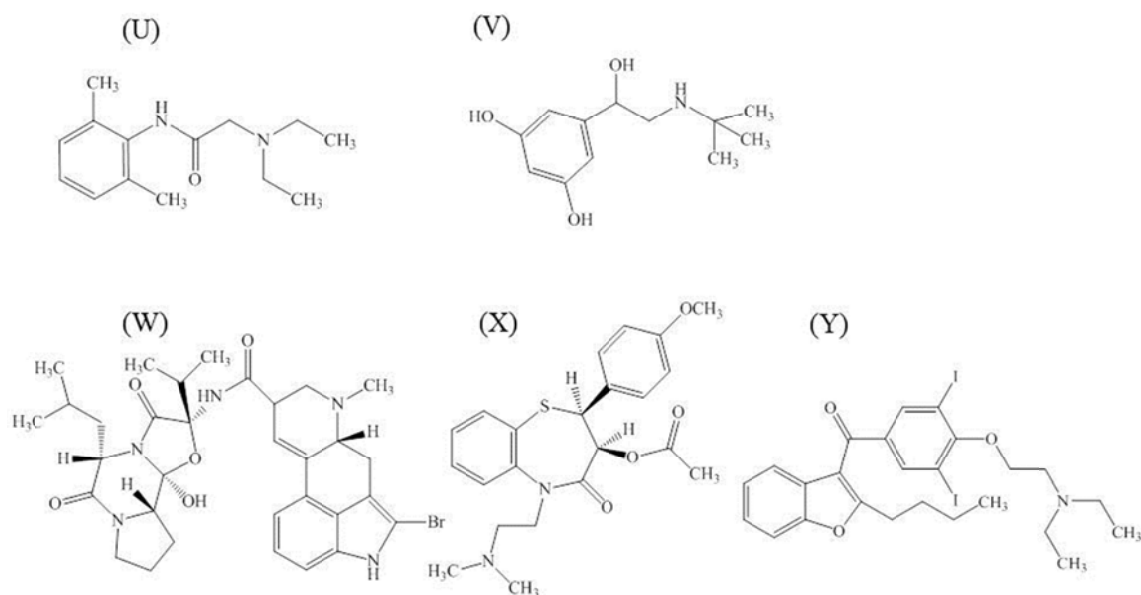


図 2-4 検討に用いた市販医薬品の構造。(A) アンチピリン、(B) カルバマゼピン、(C) デキサメタゾン、(D) エストラジオール、(E) クロラムフェニコール、(F) フルフェナム酸、(G) ニフルム酸、(H) アセブトロール、(I) アルプレノロール、(J) メトプロロール、(K) プロプラノロール、(L) トリメトプリム、(M) クロルプロマジン、(N) クロルプロチキセン、(O) クロザピン、(P) デシプラミン、(Q) イミプラミン、(R) ビホナゾール、(S) クロトリマゾール、(T) ケトコナゾール、(U) リドカイン、(V) テルブタリン、(W) プロモクリプチン、(X) ジルチアゼム、(Y) アミオダロン。

2-2-2 HPLC-MS 条件

HPLC-MS は以下の機器を使用した；クォータナリーポンプ (Alliance 2690、Waters 社)、オートサンプラー (HTS-PAL、CTC Analysis 社)、MS 検出器 (ZQ2000、Waters 社)、ソフトウェア (Masslynx Quanlynx ver 4.0、Waters 社)。カラムとして Develosil RP aqueous C30 (2.0 × 35 mm、粒子径 5 μm、野村化学社) を用い、カラムは 25°C で使用した。移動相として、A 溶媒：水/ギ酸 (1000/1, v/v)、B 溶媒：アセトニトリルを使用した。ポンプの流速は 1.0 mL/min に設定し、以下のグラジエントモードを使用した：0 min、移動相 B 0%；4.0 min、移動相 B 90%；4.5 min、移動相 B 90%；4.6 min、移動相 B 0%；5.5 min、移動相 B 0%。流路はカラム出口と MS 検出器の間で分岐し、MS 検出器へ 0.4 mL/min、廃液へ 0.6 mL/min の流速で送液した。オートサンプラー (CTC-PAL) では、Hamilton 社の 25 μL マイクロシリンジ (22S-G、ニードル内径 0.15 mm、ニードル外径 0.72 mm、ニードルボリウム 0.77 μL) を用いた。MS 検出器は四重極のものを使用し、イオン化は ESI モード (electrospray ionization) を用いた。エストラジオールおよびデキサメタゾン はネガティブモードで、それ以外の化合物はポジティブモードで測定した。イオンソース条件を以下に示す；キャピラリー電圧 3.5 kV、ソース温度 120°C、脱溶媒温度 350°C。コーンガスとして窒素 50 L/h、脱溶媒ガスとして窒素 400 L/h を使用した。化合物の分析は SIM (selected ion monitoring) モード、ドウェルタイム 0.20 s で行った。

2-2-3 ウォータープラグ前処理法

水相を採取するためのウォータープラグ法は、HPLC-MS システムのオートサンプラ

(HTS-PAL) を用いて行った。詳細な検討は 2-3-1 に示す。以下に、最終的に採用したプログラミングを示す。(1) エタノールにてシリンジ内を洗浄する。(2) シリンジに 2.5 μL の水 (ウォータープラグ) を吸引する。(3) 水相サンプル 2.5 μL を吸引する。(4) ニードル外面をエタノールで洗浄する。(5) ニードル外面を水で洗浄する。(6) HPLC-MS にサンプルを注入する。(7) ニードル内部をエタノールで 2 回、洗浄する。(8) ニードル内部を水で 2 回、洗浄する。

2-2-4 自動分注機の設定

オクタノール相の希釈に使用する自動分注機として、Beckman 社の Biomek2000 を使用した。8 連ピペットとして MP-20 および MP-200 を用いた。チップとして、日本 Genetics 社の低吸着ポリマーチップをセットした。

2-2-5 96 穴プレートを用いた $\log D_{7.4}$ サンプル調製

化合物を DMSO に溶かし、10 mM ストック溶液を調製した。10 mM ストック溶液 10 μL を 96 穴プレート (31 mm ディープウェルプレート、ポリプロピレン、シリコンキャップ、Agilent 社) に分注した。次に 300 μL のオクタノールを各ウェルに加え、シェーカー (Taitec M36、Taitec 社) にて 5 分間、振とうした。さらに、600 μL の緩衝液 (pH7.4) を添加し、室温にて 1 時間、振とうした。水相とオクタノール相を二相分離するため、振とう後のプレートを 2000 rpm で 5 分間、遠心分離 (Himac CF-8DL、日立工機社) した。このプレートをプレート A とする。

プレート A を自動分注機 (Biomek2000、Beckman 社) にセットし、オクタノール相を 10 μL 採取し、490 μL の水/エタノール (1/1, v/v) で 50 倍希釈した。これをプレ

ート B とする。さらにプレート B より、10 μL を採取し、490 μL の水/エタノール (1/1, v/v) で 50 倍希釈した (計オクタノール 2500 倍希釈)。これをプレート C とする。

シールを外したプレート A を HPLC-MS にセットし、ウォータープラグ法を用いて水相を直接採取し、MS 分析を行った。同様の方法で、プレート C を HPLC-MS にセットし、2500 倍希釈したオクタノールの MS 分析を行った。両相の濃度比より、次の式を用い、 $\log D_{7.4}$ を算出した。

$$\log D_{7.4} = \log \frac{[\text{オクタノール相の薬物濃度}]}{[\text{緩衝液 pH7.4 中の薬物濃度}]}$$

$$\approx \log \frac{[2500 \text{ 倍希釈オクタノール相の MS 面積}] \times 2500}{[\text{水相の MS 面積}]}$$

2-3 結果と考察

2-3-1 ウォータープラグ法のプログラミング検討

水相採取には HPLC-MS に付属されているオートサンプラー (HTS-PAL) を用い、水相 2.5 μL を自動で採取し、HPLC-MS に直接注入することを考えた (図 2-3)。水相採取時におけるオクタノールのコンタミネーションを回避することを目的とし、各種サンプリングプログラミングを検討した。コンタミネーションの影響をモニターしやすくするために、モデル化合物として高脂溶性化合物ビホナゾール (文献値¹³⁾ $\log D_{7.4} = 4.8$) を用いた。図 2-5~2-7 に検討に用いたプログラミングを表示する。また、図 2-8 に各プログラミングを検討した際のビホナゾールの水相のクロマトグラムを示す。クロマトグラムのピーク強度はビホナゾールの水相濃度と相関し、ピーク強度が大きいことは、コンタミネーションが大きいことを示している。コントロールサンプルとして、エッペ

ンドルフチューブを用い、ビホナゾールをオクタノール/緩衝液 pH7.4 (300 μ L/600 μ L) に二相分配させ、両相を手動にて慎重に分離した際の水相のクロマトグラムを示す。その他のクロマトグラムは、96 穴プレートを用いて、ビホナゾールをオクタノール/緩衝液 pH7.4 (300 μ L/600 μ L) に二相分配させ、オートサンプラーで水相を直接採取した際の水相のクロマトグラムを示す。プログラム No.1 では、オートサンプラーを用いて水相 2.5 μ L を直接採取した (図 2-5)。その後、ニードルをオクタノール相から引き抜く際に、ニードル外側にオクタノールが付着した。この付着したオクタノールを洗浄ポートに設置したエタノールを用いて洗浄し、HPLC-MS に水相サンプルを注入した。図 2-8 にプログラム No.1 の水相分析時のクロマトグラムを示す。その結果、プログラム No.1 はコントロールと比較しピーク強度が大きかった。このことから、ニードルがオクタノール相を通過し、水相を採取する際に、オクタノールのコンタミネーションが起こったことが考えられる。オクタノールのコンタミネーションを防ぐため、水がオクタノールを弾く性質を利用したウォータープラグ法を検討した。図 2-6 にプログラム No.2 のスキームを示す。プログラム No.2 では、まずオートサンプラーに設置されている水ポートより 2.5 μ L の水をシリンジに注入し、これをウォータープラグとした。次に、オクタノール/緩衝液 pH7.4 へニードルを入れ、水相 2.5 μ L を直接採取した。最後に、ニードルを引き抜く際にニードル外側に付着したオクタノールを、洗浄ポートのエタノールを用いて洗浄し、HPLC-MS に水相を注入した。図 2-8 にプログラム No.2 の水相分析時のクロマトグラムを示す。その結果、プログラム No.2 のピーク強度は、コントロールとほぼ同じであった。この結果から、シリンジがオクタノール相を通過し水相を採取する際に、ウォータープラグがオクタノールを弾き、コンタミネーションを防いだことが考えられる。次に、オクタノールの粘性が高いため、ニードルをオクタノール相から引き抜く際に、オクタノールがニードル外側に付着した。このことから、ニードル外側を適切に洗浄することが重要だと考えた。そこで、水相採取後にエアを吸引し、

ニードル外側に付いたオクタノールと採取した水相の間にエアギャップをつくることを考えた。図 2-7 にプログラム No.3 のスキームを示す。プログラム No.3 では、まずウォータープラグ 2.5 μL をシリンジに注入した。次に、オクタノール/緩衝液 pH7.4 へニードルを入れ、水相 2.5 μL を直接採取した。ニードルをサンプルから引き抜いた後、エアギャップ 2.5 μL を吸引した。最後に、ニードルを引き抜く際に、ニードル外側に付着したオクタノールを洗浄ポートのエタノールを用いて洗浄し、HPLC-MS に水相を注入した。図 2-8 にプログラム No.3 の水相分析時のクロマトグラムを示す。その結果、プログラム No.3 のピーク強度はコントロールと比較し大きかった。このことから、エアをシリンジに吸い込む動作により、ニードル周りに付着していたオクタノールがシリンジ内に混入し、コンタミネーションが起こったと考えられる。以上の結果から、コンタミネーションを防ぎながら、水相を直接サンプリングする手段としてウォータープラグ法が有効であり、エタノールを用いた洗浄によりニードル周りに付着したオクタノールを取り除けることが分かった。また、サンプリング後にエアを吸引することにより、ニードル周りのオクタノールがコンタミネーションすることも分かった。上記プログラミング No.1~3 の検討より、オクタノールのコンタミネーションを効果的に防ぐことができるプログラミング No.2 を最終的なプログラミングとして選択した。

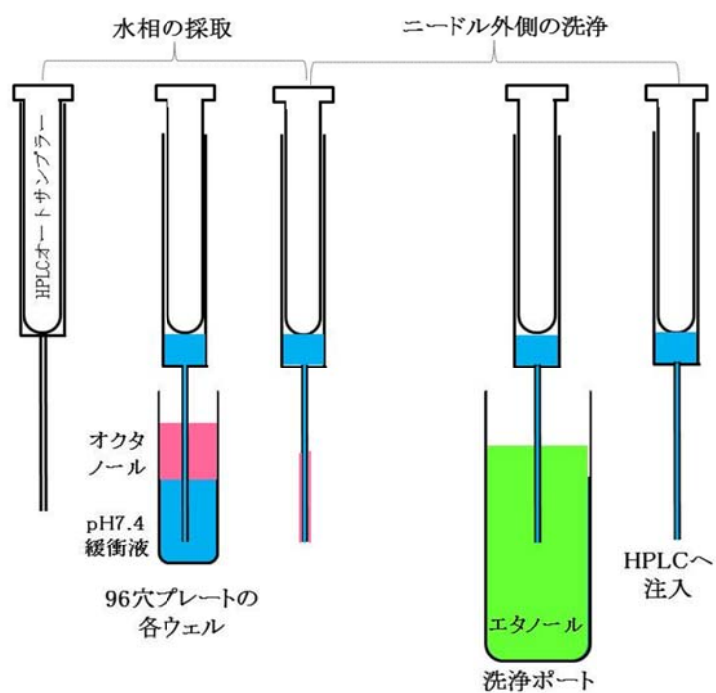


図 2-5 検討プログラミング No.1 のスキーム。

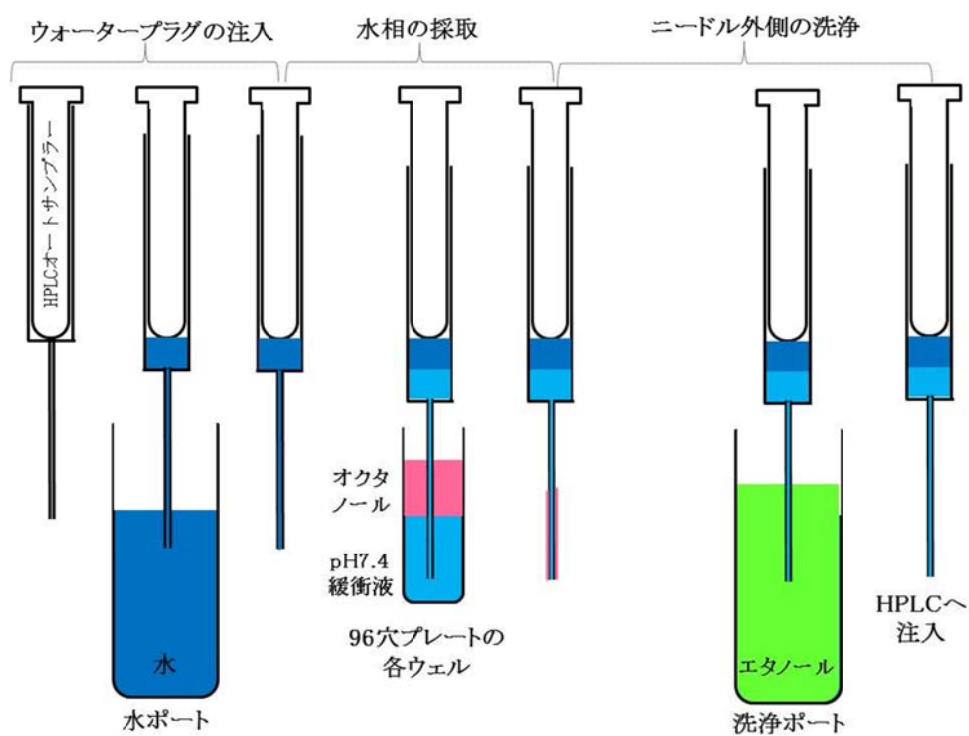


図 2-6 検討プログラミング No.2 のスキーム。

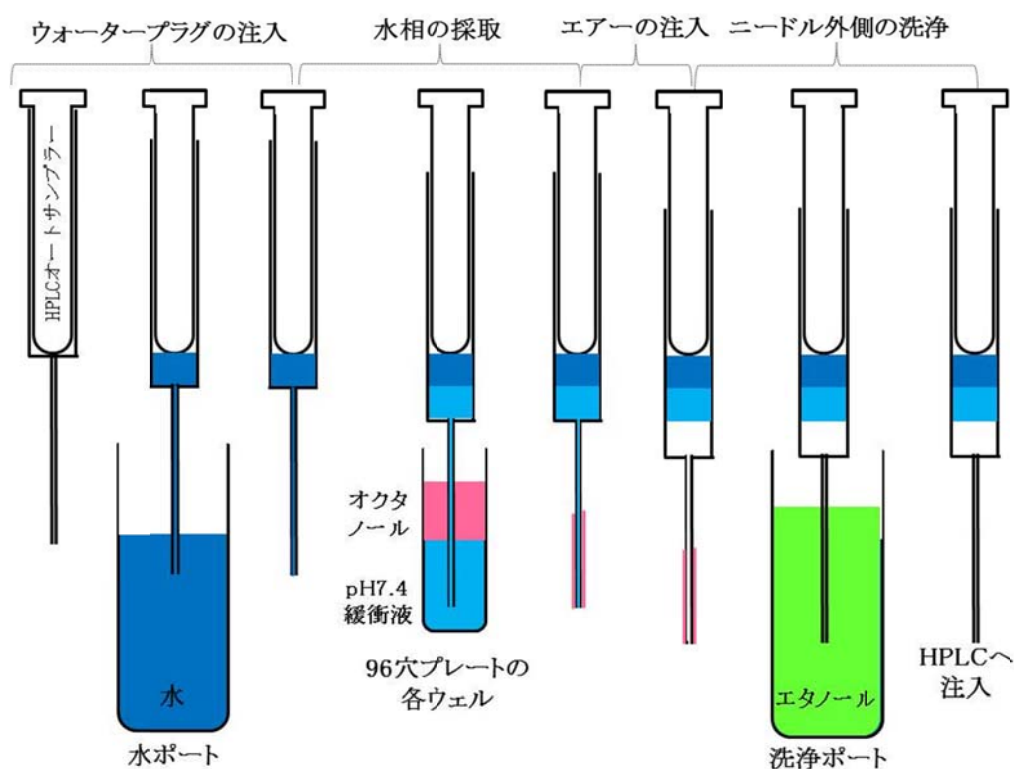


図 2-7 検討プログラミング No.3 のスキーム。

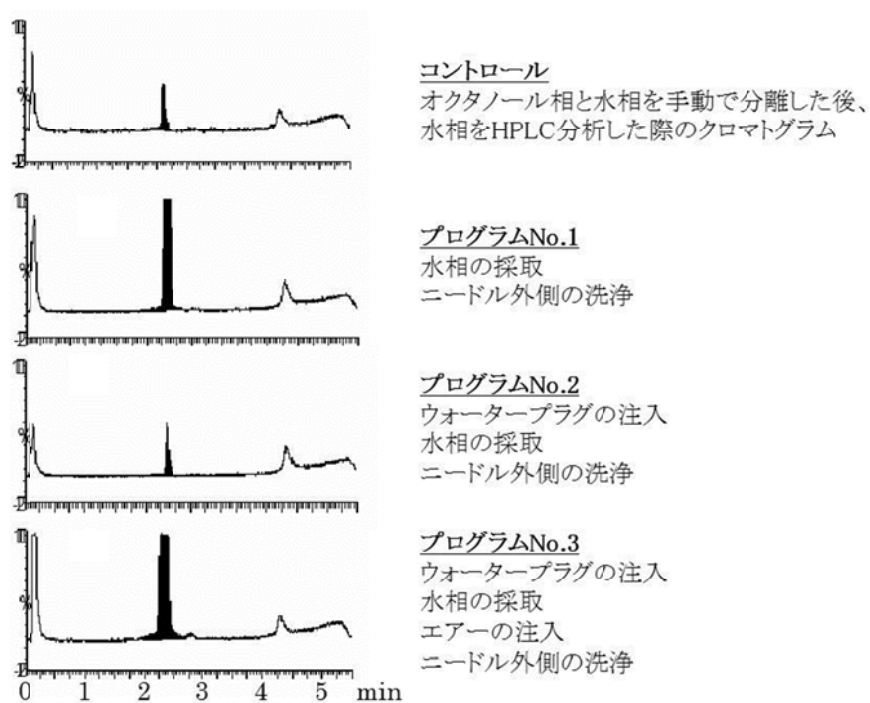


図 2-8 各プログラミング検討における水相のクロマトグラム（モデル化合物；ビホナゾール）。

2-3-2 市販医薬品を用いたウォータープラグ法の検証

2-3-1 で開発したプログラミングを、市販医薬品 25 化合物を用いて検証した。化合物の構造を図 2-4 に示す。化合物として、文献値の $\log D_{7.4} = -1 \sim 6$ の範囲で、中性化合物（図 2-4、A～D）、酸性官能基を有する化合物（図 2-4、E～G）、塩基性官能基を有する化合物（図 2-4、H～Y）を用いて検討を行った。96 穴プレートで、化合物をオクタノール/緩衝液 pH7.4 (300 μ L/600 μ L) に二相分配させ、オートサンプラーで水相を直接採取し、MS 分析を行った。オクタノール相は手動にて 10 μ L 採取し、水/エタノール (1/1, v/v) で 2500 倍希釈し、MS 分析を行った。オクタノール相および水相の濃度比より $\log D_{7.4}$ 値を算出し、文献値との比較を行った。表 2-2 にウォータープラグ法で得た市販医薬品の $\log D_{7.4}$ と文献値¹³⁻¹⁶⁾の $\log D_{7.4}$ を示す。 $\log D_{7.4} = 0 \sim 5$ の範囲で、ウォータープラグ法の $\log D_{7.4}$ 値と文献値は一致し、よい相関が見られた ($R^2 = 0.9835$ 、図 2-9)。アミオダロン（文献値¹³⁾ $\log D_{7.4} = 6.1$ ）をウォータープラグ法で分析したところ、HPLC のインジェクターバルブ等でキャリーオーバーが見られ、MS 面積の再現性が得られなかった。また、 $\log D_{7.4}$ が 0 以下の範囲では、水相の化合物濃度が高いため、水相の分析時に MS 検出器におけるイオン飽和が見られ、定量性が得られなかった。上記の結果から、ウォータープラグ法を用いた本システムの適用範囲は、 $\log D_{7.4} = 0 \sim 5$ と判断した。経口医薬品開発において最適な $\log D_{7.4}$ の範囲は $0 \sim 3$ という報告¹⁷⁾があり、ウォータープラグ法は、この範囲を十分、網羅している。また、ウォータープラグ法は、酸性化合物、中性化合物、塩基性化合物に幅広く適応可能であることが分かった。一般的に、フラスコ振とう法では、化合物を粉体の状態からアッセイする。高速 $\log D$ 法では、スループットを上げるため、粉体の代わりに 10 mM DMSO 溶液を用いてアッセイを行った。そのため、オクタノール/緩衝液 pH7.4 (300 μ L/600 μ L) 中に 1.1 v/v% の DMSO が入っていた。しかし、本法から得られた $\log D_{7.4}$ 値が文献値と一致している

ことから（表 2-2、図 2-9）、1.1 v/v% DMSO の $\log D_{7.4}$ 値に対する影響は小さいと考えられる。

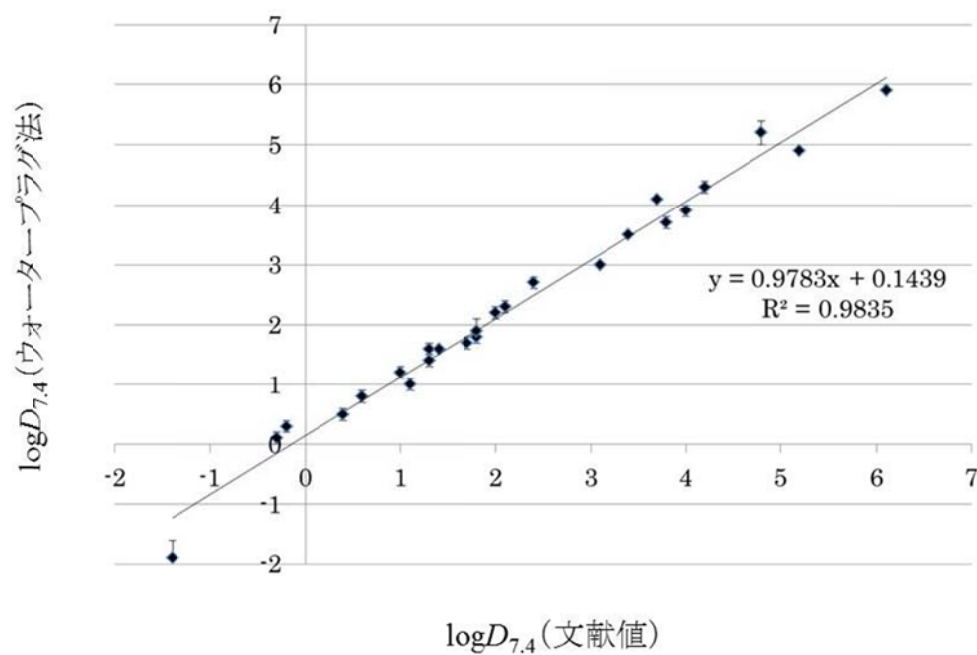


図 2-9 ウォータープラグ法を用いて得られた市販医薬品の $\log D_{7.4}$ と文献値の相関。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。

表 2-2 ウォータープラグ法によって得られた市販医薬品の $\log D_{7.4}$ 。水相はウォータープラグ法を用いて分析し、オクタノール相は手動にて 2500 倍に希釈し分析した。

化合物	$\log D_{7.4}$ (ウォータープラグ法)		$\log D_{7.4}$ (文献値)	参考文献
	平均値 (n = 3)	標準偏差 (n = 3)		
アンチピリン	0.5	0.1	0.4	13
カルバマゼピン	1.8	0.0	1.8	14
デキサメタゾン	1.9	0.2	1.8	13
エストラジオール	3.9	0.1	4.0	13
クロラムフェニコール	1.0	0.1	1.1	13
フルフェナム酸	2.2	0.1	2.0	15
ニフルム酸	1.6	0.0	1.4	16
アセブトロール	0.1	0.1	-0.3	13
アルプレノロール	1.2	0.1	1.0	13
メトプロロール	0.3	0.1	-0.2	13
プロプラノロール	1.4	0.1	1.3	13
トリメトプリム	0.8	0.1	0.6	13
クロルプロマジン	3.5	0.0	3.4	13
クロルプロチキセン	4.1	0.0	3.7	16
クロザピン	3.0	0.0	3.1	13
デシプラミン	1.6	0.1	1.3	13
イミプラミン	2.7	0.1	2.4	13
ビホナゾール	5.2	0.2	4.8	13
クロトリマゾール	4.9	0.0	5.2	16
ケトコナゾール	3.7	0.1	3.8	16
リドカイン	1.7	0.1	1.7	13
テルブタリン	-1.9	0.3	-1.4	13
ブロモクリプチン	4.3	0.1	4.2	16
ジルチアゼム	2.3	0.1	2.1	13
アミオダロン	5.9	a	6.1	13

a. アミオダロンは HPLC-MS システムへの吸着があり、再現性が得られなかったため、n = 1 の結果を記した。

2-3-3 自動分注機を用いたオクタノール相希釈の自動化

2-3-1 および 2-3-2 において、ウォータープラグ法を用いて、水相採取の自動化に成功した。ただし、これらの検討において、オクタノール相の希釈は手動で行っていた。オクタノール相の前処理として、手動にてオクタノール相を 10 μL 採取し、HPLC-MS 分析に適した濃度まで、水/エタノール (1/1, v/v) で 2500 倍希釈した。粘性の高いオクタノールを手動にて採取することは、スループットが低くなる要因であった。そこで、スループット向上を目的とし、オクタノール相の前処理に自動分注機 (Biomek2000) を導入し、前処理の自動化を試みた (図 2-3)。

図 2-10 に、オクタノール/緩衝液 pH7.4 (300 μL /600 μL) を分注した 96 穴プレートの断面図を示す。プレート下面を高さ 0%、上面を 100%とした時に、オクタノール相 10 μL を採取するため、高さ 65%の位置からサンプリングすることを分注機に設定した。

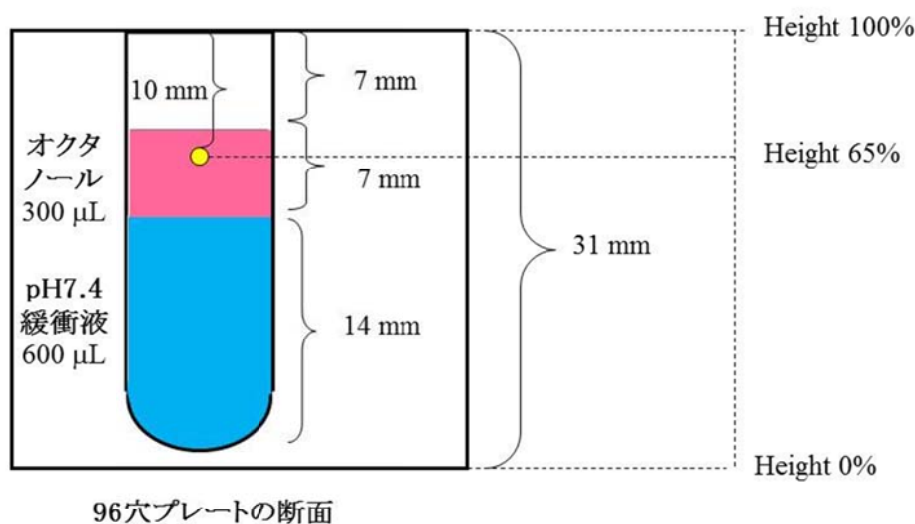


図 2-10 オクタノール 300 μL と緩衝液 600 μL が入った 96 穴プレートの断面図。プレート底面を Height 0%、上面を 100%とした際に、自動分注機を用いて Height 65%の位置からオクタノール 10 μL を採取した。

クロロプロマジン（文献値¹³⁾ $\log D_{7.4} = 3.4$ ）をモデル化合物とし、分注機を用いたオクタノール相の採取および希釈を検討した（表 2-3）。96 穴プレートでクロロプロマジンをおクタノール/緩衝液 pH7.4（300 μL /600 μL ）に二相分配させ、分注機を用いてオクタノール相 10 μL を水/エタノール（1/1, v/v）で 2500 倍希釈し、MS 分析した。比較対象として、二相分配させた後、手動にてオクタノール相 10 μL を採取し、水/エタノール（1/1, v/v）で 2500 倍希釈したサンプルを MS 分析した。MS の面積（平均値、標準偏差）を比較したところ、自動分注機による結果と手動による結果は一致した。

表 2-3 クロルプロマジンを用いたオクタノール相の希釈検討。自動分注機および手動により、オクタノール相を 2500 倍希釈した際の LC-MS の面積(平均値、標準偏差、相対標準偏差、 $n = 8$)。

LC-MS 面積	自動分注機による オクタノール相の希釈	手動による オクタノール相の希釈
平均値 ($n = 8$)	26568	26129
標準偏差 ($n = 8$)	2228	3140
相対標準偏差	8.4%	12.0%

また、市販医薬品 9 化合物を用いて、自動分注機から得られた $\log D_{7.4}$ 値と文献値^{13,15,16)}を比較検証した(表 2-4)。モデル化合物として、 $\log D_{7.4} = 0 \sim 5$ の範囲で、中性化合物(図 2-4、A)、酸性官能基を有する化合物(図 2-4、F、G)、塩基性官能基を有する化合物(図 2-4、K、M、O、Q、R、X)を用いた。96 穴プレートを用いて、化合物をオクタノール/緩衝液 pH7.4 (300 μ L/600 μ L) に二相分配させ、自動分注機にてオクタノール相の採取・2500 倍希釈を行い、MS 分析した。水相は、ウォータープラグ法を用い MS 分析した。両相の濃度比より、 $\log D_{7.4}$ を算出した。その結果、自動分注機およびウォータープラグ法を組み合わせたシステムから得られた $\log D_{7.4}$ (平均値、標準偏差) と文献値は、 $\log D_{7.4} = 0 \sim 5$ の範囲でよく一致した。また、このシステムは、酸性、中性、塩基性化合物の $\log D_{7.4}$ 測定に幅広く適用できることが分かった。上記の結果から、自動分注機とウォータープラグ法を組み合わせるスループットの高い、高速 $\log D$ システムが構築できた。

スループットの高い脂溶性の評価法として HPLC の保持時間を利用した $\log k$ 法が知られている⁹⁻¹¹⁾。しかし、酸性化合物や塩基性化合物では、疎水性相互作用以外にカラム固定相とのイオン相互作用が影響するため、シンプルに脂溶性を評価することは難しい¹²⁾。それに対し、本システムは、酸性化合物や塩基性化合物の脂溶性がシンプルに

評価できるという利点がある。

表 2-4 ウォータープラグ法、および自動分注機によるオクタノール相希釈によって得られた市販医薬品の $\log D_{7.4}$ 。

化合物	$\log D_{7.4}$ (ウォータープラグ法および 分注機によるオクタノール相希釈)		$\log D_{7.4}$ (文献値)	参考文献
	平均値 (n = 3)	標準偏差 (n = 3)		
アンチピリン	0.5	0.1	0.4	13
フルフェナム酸	2.2	0.1	2.0	15
ニフルム酸	1.6	0.0	1.4	16
プロプラノロール	1.2	0.0	1.3	13
クロルプロマジン	3.5	0.0	3.4	13
クロザピン	3.1	0.0	3.1	13
イミプラミン	2.4	0.1	2.4	13
ビホナゾール	4.9	0.1	4.8	13
ジルチアゼム	2.0	0.1	2.1	13

2-3-4 計算ソフトによる $\log D_{7.4}$ と実測値の比較

計算ソフトによる $\log D$ は、創薬において合成研究者がドラッグデザインを行う際に、よく使用されている。計算ソフトによる $\log D$ の結果を検証するため、市販医薬品 25 化合物の計算値と実測値（文献値）を比較した（表 2-5、図 2-11）。その結果、複数の化合物で、計算値と実測値の間に大きな差が見られた。例えば、クロザピンは、実測値（文献値）の $\log D_{7.4}$ は 3.1 であるのに対し、計算値の $\log D_{7.4}$ は 2.0 と、実測値と計算値の間には大きな差が見られた。よって、 $\log D$ を実測することは重要であり、高いスループットで $\log D$ を測定できるウォータープラグ法は、創薬において有用な前処理法である。

表 2-5 計算ソフトによる $\log D_{7.4}$ と実測値（文献値）の比較。計算ソフトは、Advanced Chemistry Development 社の ACD/Physchem History ver12.01 を使用した。

化合物	計算値 $\log D_{7.4}$	実測値（文献値） $\log D_{7.4}$	参考文献
アンチピリン	0.3	0.4	13
カルバマゼピン	2.7	1.8	14
デキサメタゾン	1.9	1.8	13
エストラジオール	4.1	4.0	13
クロラムフェニコール	1.0	1.1	13
フルフェナム酸	2.6	2.0	15
ニフルム酸	1.8	1.4	16
アセブトロール	-0.1	-0.3	13
アルプレノロール	0.8	1.0	13
メトプロロール	-0.3	-0.2	13
プロプラノロール	1.0	1.3	13
トリメトプリム	0.7	0.6	13
クロルプロマジン	3.3	3.4	13
クロルプロチキセン	4.4	3.7	16
クロザピン	2.0	3.1	13
デシプラミン	1.4	1.3	13
イミプラミン	2.8	2.4	13
ビホナゾール	4.8	4.8	13
クロトリマゾール	5.4	5.2	16
ケトコナゾール	3.4	3.8	16
リドカイン	1.8	1.7	13
テルブタリン	-1.7	-1.4	13
ブロモクリプチン	5.1	4.2	16
ジルチアゼム	2.3	2.1	13
アミオダロン	7.0	6.1	13

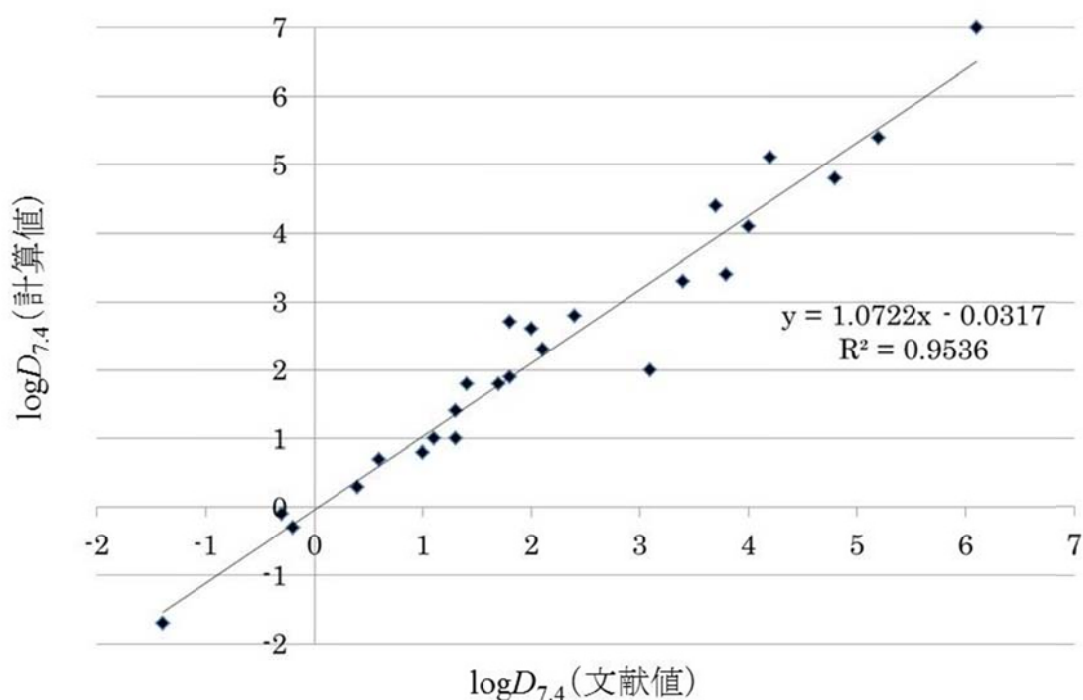


図 2-11 計算ソフトによる $\log D_{7.4}$ と実測値（文献値）の比較。計算ソフトは、Advanced Chemistry Development 社の ACD/Physchem History ver12.01 を使用した。

2-3-5 ウォータープラグ法とフラスコ振とう法のスループット比較

図 2-12 に、一般的なフラスコ振とう法および、ウォータープラグ法を用いた高速 $\log D$ システムのスキームを示す。フラスコ振とう法では粉の検体を用いるのに対し、高速 $\log D$ システムでは 10 mM DMSO 溶液を用いた。一般に創薬の探索ステージにおいては、合成研究によって創出された新規化合物は 10 mM の濃度で DMSO に溶解させ、薬理、薬物動態、安全性など様々な *in vitro* 試験に使用される。この DMSO ストック溶液を高速 $\log D$ システムに用いることにより、粉体の秤量プロセスを省略した。また、試験容器として、フラスコ振とう法では試験管などが一般的に使用されるが、高速 $\log D$ システムでは 96 穴プレートを使用することにより、スループットの向上が可能となっ

た。フラスコ振とう法では、オクタノール相と水相の分離は手動にて行っていたが、ウォータープラグ法の開発により水相の採取を自動で行うことが可能となった。また、HPLC 分析に適した濃度までオクタノール相を希釈する工程を、フラスコ振とう法では手動で行っていたが、高速 $\log D$ システムでは分注機を導入することにより自動化が可能となった。同じ労力で比較した際に、フラスコ振とう法では1週間に10~20検体のスループットに対し、高速 $\log D$ システムでは1週間に400検体の評価が可能となった。高速 $\log D$ システムでは、前処理のほぼ全てを自動で処理できるようになった。そのため、HPLC の分析時間が、高速 $\log D$ システムのスループットにおける律速となっている。近年、HPLC よりも小さい粒子径の充填剤を用い、高速分析の利点を有する UPLC が着目されている。今後、UPLC の導入により、分析時間が短縮できれば、さらに、システム全体のスループットが向上できると期待される。

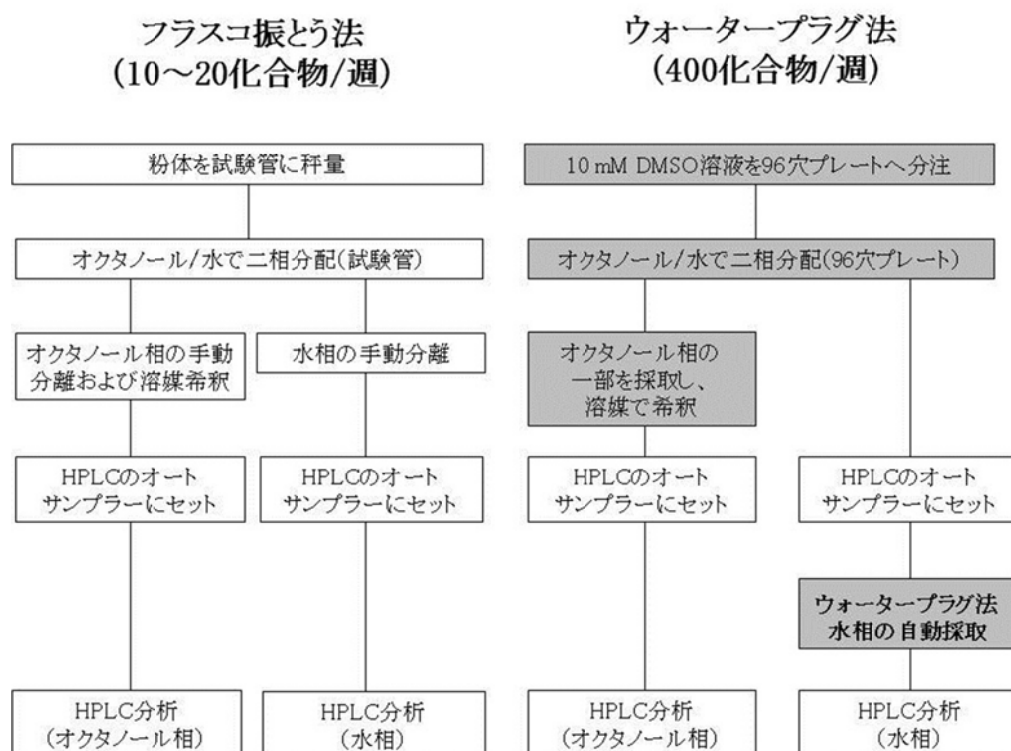


図 2-12 フラスコ振とう法およびウォータープラグ法のスキーム。

2-4 結言

本章では、スループットの高い $\log D$ 評価系を構築するため、フラスコ振とう法の前処理の自動化および 96 穴プレートを用いたミニチュア化を検討した。その際の課題として、高脂溶性化合物において、水相採取時のオクタノールのコンタミネーションがあった。特に、96 穴プレートを用い、水およびオクタノールの液量を減らしたことにより、コンタミネーションは起きやすいと考えられた。本章では、コンタミネーションの課題を解決するために、水がオクタノールを弾く性質に着目し、水相の前処理法としてウォータープラグ法の開発を試みた。モデル化合物として高脂溶性化合物ビホナゾール（文献値¹³⁾ $\log D_{7.4} = 4.8$ ）を用いて検討した。その結果、水相を採取するシリンジに予め水（ウォータープラグ）を吸引することにより、ウォータープラグがオクタノールを弾き、コンタミネーションを防ぐことを実証できた。また、市販医薬品の検討結果より、ウォータープラグ法から得た $\log D_{7.4}$ と文献値は、 $\log D_{7.4} = 0 \sim 5$ の範囲で一致した。ウォータープラグ前処理法の開発により、一般的なフラスコ振とう法に比べ、20~40 倍のスループットで $\log D_{7.4}$ を評価できた。

$\log D$ の評価法として、フラスコ振とう法や、HPLC の保持時間を利用した $\log k$ 法が一般的に知られている。しかしながら、スループットが低い点や、酸性・塩基性化合物に適用できないという欠点が、それぞれの方法にあった。本研究のウォータープラグ法は、これらの欠点を解決できる画期的な方法であった。また、学術的には、少サンプルにおける $\log D$ 評価で、オクタノールのコンタミネーションを回避した方法および、そのコンタミネーション回避に関するメカニズムに焦点をあてた報告例は無かった。よって、水がオクタノールを弾くメカニズムを利用したウォータープラグ法は、オクタノールのコンタミネーションを回避し、スループット向上に成功した新規性のある方法であ

る。

今後、ウォータープラグ法を使用することにより、スループット高く $\log D$ を評価することができ、 $\log D$ を指標とした効率的な合成展開が可能となる。それゆえ、高脂溶性・低溶解性の課題を、従来のフラスコ振とう法より早く解決できる可能性が期待される。

第 2 章 参考文献

- (1) Bhal, S. K.; Kassam, K.; Peirson, I. G.; Pearl, G. M. *Molecular Pharm.* **2007**, *4*, 556-560.
- (2) Martin, Y. C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3164-3170.
- (3) Ishigami, M.; Honda, T.; Takasaki, W.; Ikeda, T.; Komai, T.; Ito, K.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 282-288.
- (4) Liu, X.; Tu, M.; Kelly, R. S.; Chen, C.; Smith, B. J. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 132-139.
- (5) Kerns, E. H.; Di, L. *Drug Discovery Today Technol.* **2004**, *1*, 343-348.
- (6) Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235-249.
- (7) Waterbeemd, H. V. D.; Smith, D. A.; Beaumont, K.; Walker, D. K. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1313-1333.
- (8) Waterbeemd, H. V. D.; Lennernas, H.; Artursson, P.; Mannhold, R.; Kubinyi, H. In *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; Folkers, G. Eds.; Wiley & Sons, Inc: Weinheim, Germany, 2003; pp 3-242.
- (9) Valko, K. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1037*, 299-310.

- (10) Kaliszan, R.; Haber, P.; Baczek, T.; Siluk, D.; Valko, K. *J. Chromatogr., A* **2002**, *965*, 117-127.
- (11) Valko, K.; Slegel, P. *J. Chromatogr., A* **1993**, *631*, 49-61.
- (12) Kah, M.; Brown, C. D. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1401-1408.
- (13) Lombardo, F.; Shalaeva, M. Y.; Tupper, K. A.; Gao, F. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2490-2497.
- (14) Interview form of Tegretol[®], Novartis Co. Ltd.
- (15) Rotonda, M. I. L.; Amato, G.; Barbato, F.; Silipo, C.; Vittoria, A. *Quant. Struct. Act. Relat.* **1983**, *2*, 168-173.
- (16) Avdeef, A. In *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2003; pp 23-66.
- (17) Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*; Elsevier, Inc.: London, UK, 2008; pp 45.

第3章

高速 $\log D$ システムにおける水相凍結前処理法の開発

3-1 緒言

$\log D$ はオクタノール/水分散係数であり、医薬品開発における脂溶性の指標として利用されている¹⁾。特に $\log D_{7.4}$ (pH7.4 における $\log D$) は ADME 特性 (吸収、分布、代謝、排泄) との関係も報告されており²⁻⁷⁾、高脂溶性化合物群の物性改善を目的とした合成誘導化戦略⁸⁾において重要なパラメーターである。

合成誘導化戦略において、スループットの高い $\log D$ 評価系が必要となる。第2章では、一般的なフラスコ振とう法⁹⁾を改良することにより、96穴プレートを用いてミニチュア化した高速 $\log D$ システムを開発した^{10,11)}。その際にオクタノールのコンタミネーションを回避する前処理法としてウォータープラグ法を開発した。過去、96穴プレートを用いた $\log D$ スクリーニング系において、コンタミネーションを回避した報告例はなかったため、ウォータープラグ法を用いてスループットの高い $\log D$ 評価系が構築できた。しかし、創薬初期では化合物の純度が低いことがあり、サンプル内に不溶性の成分が不純物として含まれることがある。その様なサンプルをウォータープラグ法で測定する際に、不溶性成分がニードルに詰まり、ウォータープラグが機能しない場合があることが明らかになってきた¹²⁾。よって、ウォータープラグ法以外のアプローチで、オクタノールのコンタミネーションを防ぐ前処理法を開発することが要求された。

臨床試験のモニタリングなどにおいて、液体窒素を用いた液-液抽出法が、生体試料の前処理に使われている¹³⁾。この方法では、二相の液体を用い、目的成分を一方の相に抽出させる。次に、一方の相を液体窒素により凍結し、もう一方の相と分離させる。

本章では、オクタノールのコンタミネーションを回避する目的で、この方法を $\log D$ の前処理に応用することを試みた。図 3-1 に 96 穴プレートを用いた水相凍結法のスキームを示す。96 穴プレートを用い薬物を水相およびオクタノール相に二相分配した後、プレートの底を液体窒素に浸し、水相を凍結させた。凍った水相表面からオクタノールを除去できれば、コンタミネーションの回避が期待できると考え検討を開始した。

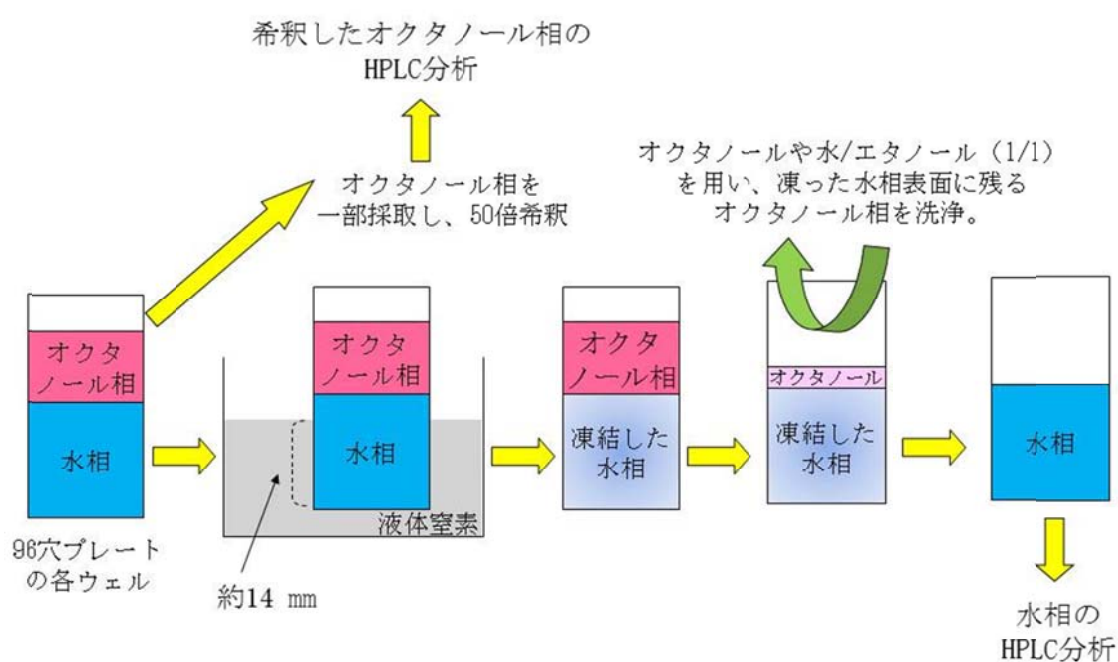


図 3-1 96 穴プレートを用いた水相凍結法のスキーム。

3-2 実験操作

3-2-1 試薬

検討に用いた試薬の構造を図 3-2 に示す。カルバマゼピン、デキサメタゾン、アルプレノロール、メトプロロール、プロプラノロール、クロルプロマジン、デシプラミン、イミプラミン、ケトコナゾールは、Sigma Aldrich 社より購入した。アンチピリンはキシダ化学社より入手した。フルフェナム酸、ケトプロフェン、インドメタシンは和光純薬社より得た。

ジメチルスルホキシド (DMSO) は、和光純薬社の試薬特級グレードを使用した。1-オクタノール (試薬特級) は東京化成より購入した。エタノール (HPLC グレード)、アセトニトリル (HPLC グレード)、リン酸 (試薬特級)、酢酸 (試薬特級)、ホウ酸 (試薬特級)、1 mol/L 水酸化ナトリウム (容量滴定用)、塩化カリウム (試薬特級)、リン酸水素二ナトリウム (試薬特級)、リン酸二水素ナトリウム (試薬特級) は、和光純薬社より入手した。水は MilliQ Gradient A 10 システム (Millipore 社) で精製したものを使用した。緩衝液 (pH7.4) は、10 mM リン酸水素二ナトリウムおよび 10 mM リン酸二水素ナトリウムを混合し、pH メーター (F-53、堀場製作所) にて pH7.4 に調製した。イオン強度 0.3 の広域緩衝液は pH2~12 の範囲で、文献既知の方法¹⁴⁾により調製した。オクタノールに少量の緩衝液を添加し、一晚、緩衝液で飽和させたオクタノールを実験に使用した。同様に、緩衝液に少量のオクタノールを添加し、一晚、オクタノールで飽和させた緩衝液を実験に使用した。液体窒素は、エーザイ株式会社 筑波研究所で使用されているインハウスの液体窒素を使用した。

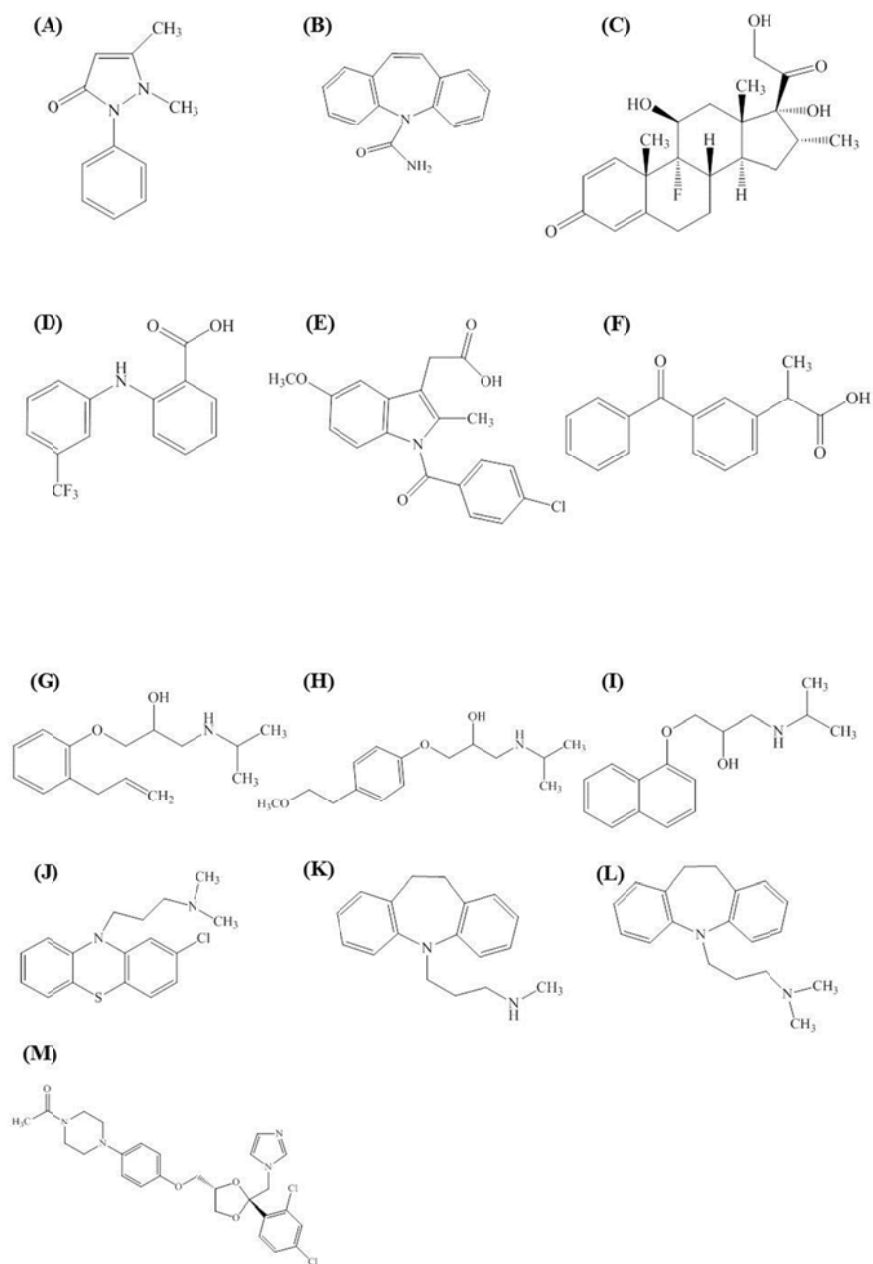


図 3-2 検討に用いた市販医薬品の構造。(A) アンチピリン、(B) カルバマゼピン、(C) デキサメタゾン、(D) フルフェナム酸、(E) インドメタシン、(F) ケトプロフェン、(G) アルプレノロール、(H) メトプロロール、(I) プロプラノロール、(J) クロルプロマジン、(K) デシプラミン、(L) イミプラミン、(M) ケトコナゾール。

3-2-2 HPLC-UV 条件

HPLC-UV は Agilent 社の 1100 システムを使用した。HPLC は以下のユニットによって構成されている; バイナリーポンプ、96 穴プレート対応オートサンプラー、カラムヒーター、ダイオードアレイ検出器、ソフト Chem Station ver 9.01。カラムとして YMC Pro C18 (4.6 × 35 mm、粒子径 3 μm、YMC 社) を用い、カラムは 40°C で使用した。移動相として、A 溶媒: 水/リン酸 (1000/1, v/v)、B 溶媒: アセトニトリルを使用した。ポンプの流速は 2.0 mL/min に設定し、以下のグラジエントモードを使用した: 0 min、移動相 B 5%; 3.0 min、移動相 B 90%; 3.5 min、移動相 B 90%; 3.51 min、移動相 B 5%; 5.0 min、移動相 B 5%。ダイオードアレイ検出器は、UV 210 nm に設定した。

3-2-3 水相凍結法を用いた $\log D_{7.4}$ サンプル調製

化合物を DMSO に溶かし、10 mM ストック溶液を調製した。10 mM ストック溶液 10 μL を 96 穴プレート (31 mm ディープウェルプレート、ポリプロピレン、シリコンキャップ、Agilent 社) に分注した。次に電動 8 連ピペット (Biohit eLINE、Biohit 社) を用い 300 μL のオクタノールを各ウェルに加え、シェーカー (Taitec Micro Mixer E36、Taitec 社) にて 5 分間、振とうした。さらに、電動 8 連ピペットを用い、600 μL の緩衝液 (pH7.4) を各ウェルに添加し、室温にて 1 時間、振とうした。水相とオクタノール相を二相分離するため、振とう後のプレートを 2000 rpm で 5 分間、遠心分離 (KUBOTA 7780、クボタ社) した。このプレートをプレート A とする。電動 8 連ピペットを用い、プレート A のオクタノール相を 10 μL 採取し、490 μL の水/エタノール (1/1, v/v) で 50 倍希釈した。これをプレート B とする。プレート A の底を液体窒素の入ったデュワ瓶に付け、約 60 秒間かけて水相を凍結させた。電動 8 連ピペットを用い、凍っていないオクタノール相を取り除いた。次に、凍った水相表面にオクタノール 400 μL

を添加・回収し、水相表面に残るオクタノール相を洗浄した。同様に、オクタノールを用いた洗浄は 2 回、行った。次に、凍った水相表面に 400 μL の水/エタノール (1/1, v/v) を添加・回収し、水相表面に残るオクタノールを洗浄した。その後、プレート A を水浴に浸し、凍結した水相を約 10 分で融解させた。HPLC システムのオートサンプラーにプレート A をセットし、水相 50 μL を HPLC に注入した。同様に、プレート B をオートサンプラーにセットし、50 倍希釈したオクタノール相 5 μL を HPLC に注入した。

3-2-4 水相凍結法を用いた pH-log D プロファイルのサンプル調製

pH-log D プロファイルを得るために、イオン強度 0.3 の広域緩衝液 (pH2~12) を水相に使用した。それ以外の実験操作は、3-2-3 と同様であった。

3-2-5 log D 、log P および p K_a の計算式

log D は両相の濃度比より、次の式を用いて算出した。

$$\log D = \log \frac{[\text{オクタノール相の薬物濃度}]}{[\text{緩衝液中の薬物濃度}]}$$

$$\approx \log \frac{[50 \text{ 倍希釈オクタノール相の UV 面積}] \times 50 (\text{希釈率}) \times 50 \text{ } \mu\text{L} (\text{水相注入量})}{[\text{水相の UV 面積}] \times 5 \text{ } \mu\text{L} (\text{オクタノール相注入量})}$$

また、p K_a (酸解離定数) および log P (電荷を有さない分子状態での分配係数) は以下の式を用い、Microsoft Excel 2003 のフィッティングプログラミングより算出した。

1 価の酸性化合物の場合 : $\log D = \log P - \log[1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}]$

1 価の塩基性化合物の場合 : $\log D = \log P - \log[1 + 10^{(\text{p}K_a - \text{pH})}]$

3-3 結果と考察

3-3-1 水相凍結法の開発

図 3-1 に 96 穴プレートを用いた水相凍結法のスキームを示す。スクリーニングに適したメソッドを構築するために、水相を短時間で凍結させる方法として液体窒素を選択した。96 穴プレート（高さ 31 mm）を用い薬物を水相およびオクタノール相に二相分配した後、プレートの底から約 14 mm まで液体窒素に浸し、水相を凍結させた。次に凍結していないオクタノール相を取り除いた。凍結した水相表面に残ったオクタノール相を取り除くため、オクタノールおよび水/エタノール（1/1, v/v）を用いて凍結水相表面の洗浄を行った。

初めに、液体窒素を用いた水相の凍結時間に関する検討を行った。水相凍結法では 96 穴プレートの底を液体窒素に浸し、水相を凍らせる。水相の凍結過程は、目視による確認および凍結時間によってコントロールした。文献¹⁵⁾よりオクタノールの融点は -16~-17°C であるため、液体窒素に 120 秒以上、プレート底面を浸すと水相のみならずオクタノール相まで凍結することを目視で確認した。検討の結果、液体窒素に浸す時間として、約 60 秒間が水相の凍結およびオクタノール相の非凍結に最適であることが分かった。

次に、凍結した水相表面に残るオクタノール相を取り除くため、各種洗浄方法を検討した。凍結水相表面に、オクタノールおよび水/エタノール（1/1, v/v）各 400 μ L を洗浄液として添加・回収し、洗浄効果を確認した。表 3-1 に各種洗浄方法の検討結果を示す。オクタノールのコンタミネーションをモニターしやすくするため、高脂溶性化合物 ケトコナゾール（文献値¹⁶⁾ $\log D_{7.4} = 3.8$ ）をモデル化合物として使用した。水/エタノール

ル（1/1）を用いて洗浄を4回行った際の $\log D_{7.4}$ は 2.9 であった。この結果より水/エタノール（1/1）による4回の洗浄では、凍結水相表面に残るオクタノール相は完全に除去することができず、コンタミネーションによって文献値より低い値が出たと考えられる。一方、洗浄液にオクタノールを使うことにより、凍結水相表面に残るオクタノール相を取り除くことができ、文献値とほぼ同じ値の $\log D_{7.4}$ （3.5～3.8）が得られることが明らかになった。このことから、オクタノール相を除去するためには、高い親和性のある溶媒を洗浄液として使用することが重要であることが分かった。以上の結果から洗浄方法として、オクタノールにより2回洗浄した後に、水/エタノール（1/1）により1回洗浄する方法を選択した。2回のオクタノールによる洗浄にて凍結水相表面のオクタノール相を除去し、次に洗浄液として使用したオクタノールを取り除くため水/エタノール（1/1）により1回洗浄した。

表 3-1 洗浄方法の検討におけるケトコナゾールの $\log D_{7.4}$ 値。

凍結した水相表面の洗浄方法	$\log D_{7.4}$ (n = 3)	
	平均値	標準偏差
水/エタノール（1/1）洗浄 4 回	2.9	0.2
オクタノール洗浄 1 回、水/エタノール（1/1）洗浄 1 回	3.5	0.1
オクタノール洗浄 1 回、水/エタノール（1/1）洗浄 2 回	3.7	0.1
オクタノール洗浄 2 回、水/エタノール（1/1）洗浄 1 回	3.8	0.1
文献値 ¹⁶⁾	3.8	-

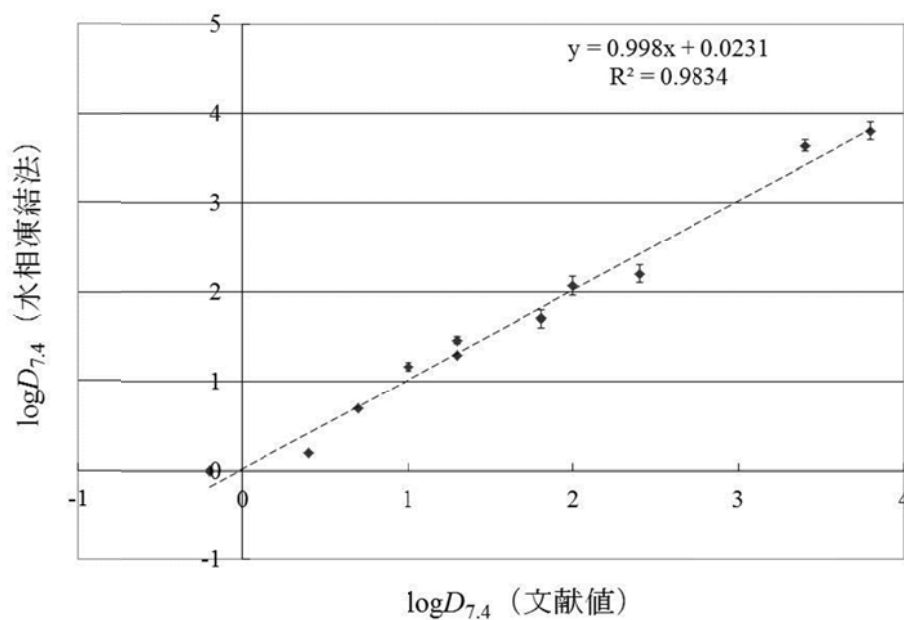
3-3-2 市販医薬品を用いた水相凍結法の検証

3-3-1 で開発した水相凍結法を、市販医薬品 13 化合物を用いて検証した。化合物の構造を図 3-2 に示す。化合物として、文献値の $\log D_{7.4} = 0 \sim 4$ の範囲で、中性化合物（図 3-2、A～C）、酸性官能基を有する化合物（図 3-2、D～F）、塩基性官能基を有する化合物（図 3-2、G～M）を用いて検討を行った。表 3-2 に水相凍結法で得た市販医薬品の $\log D_{7.4}$ と文献値¹⁶⁻¹⁹⁾の $\log D_{7.4}$ を示す。 $\log D_{7.4} = 0 \sim 4$ の範囲で、水相凍結法の $\log D_{7.4}$ 値と文献値は一致し、よい相関が見られた ($R^2 = 0.9834$ 、図 3-3)。 $\log D_{7.4} = 4$ の高脂溶性化合物では水相濃度が $0.03 \mu\text{M}$ となり、HPLC-UV の定量下限付近の濃度であった。よって、水相凍結法の上限を $\log D_{7.4} = 4$ と判断した。経口医薬品開発において最適な $\log D_{7.4}$ の範囲は $0 \sim 3$ という報告²⁰⁾があり、水相凍結法は、この範囲を十分、網羅している。また、水相凍結法は、酸性化合物、中性化合物、塩基性化合物に幅広く適応可能であることが分かった。

一般的に、フラスコ振とう法では、化合物を粉体の状態からアッセイする。本法では、スループロットを上げるため、粉体の代わりに 10 mM DMSO 溶液を用いてアッセイを行った。そのため、オクタノール/緩衝液 $\text{pH}7.4$ ($300 \mu\text{L}/600 \mu\text{L}$) 中に $1.1 \text{ v/v\%}$ の DMSO が入っていた。しかし、本法から得られた $\log D_{7.4}$ 値が文献値と一致していること（表 3-2、図 3-3）、第 2 章でウォータープラグ法を検討した際も 1.1% の DMSO の影響が少なかったことから、 $1.1 \text{ v/v\%}$ の DMSO の $\log D_{7.4}$ 値に対する影響は小さいと考えられる。

表 3-2 水相凍結法によって得られた市販医薬品の $\log D_{7.4}$

化合物	$\log D_{7.4}$ (水相凍結法)		$\log D_{7.4}$ 文献値	参考文献
	平均値 $n = 3$	標準偏差 $n = 3$		
アンチピリン	0.2	0.0	0.4	17
デキサメタゾン	1.7	0.1	1.8	17
フルフェナム酸	2.1	0.1	2.0	18
インドメタシン	0.7	0.0	0.7	16
アルプレノロール	1.2	0.0	1.0	17
メトプロロール	0.0	0.0	-0.2	17
プロプラノロール	1.3	0.0	1.3	17
カルバマゼピン	1.7	0.1	1.8	19
クロルプロマジン	3.6	0.1	3.4	17
デシプラミン	1.5	0.0	1.3	17
イミプラミン	2.2	0.1	2.4	17
ケトコナゾール	3.8	0.1	3.8	16

図 3-3 水相凍結法を用いて得られた市販医薬品の $\log D_{7.4}$ と文献値の相関。

エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。

3-3-3 水相凍結法の pH-log D プロファイルへの応用

解離基を有する酸性化合物や塩基性化合物では、pH によって log D が変化する。これらの各 pH における生体内挙動（膜透過性、溶解性等）の考察や、基礎物性を考察するために、pH-log D プロファイルを取得することは重要である。3-3-3 では、スループット良く pH-log D プロファイルを取得するために、水相凍結法の pH-log D プロファイルへの応用を調べた。pH-log D プロファイル取得のために、イオン強度 0.3 の広域緩衝液（pH2~12）を水相に使用し、各 pH における log D を測定した。酸性のモデル化合物としてケトプロフェンを、塩基性のモデル化合物としてメトプロロールを使用した。図 3-4 にケトプロフェンおよびメトプロロールの pH-log D プロファイルを示す。実測値 log D は水相凍結法を用いて測定した。計算値の log D は、文献値²¹⁾の log P および p K_a を用いて以下の式から算出した。ケトプロフェン; $\log D = \log P - \log[1 + 10^{(pH - pK_a)}]$ 。メトプロロール; $\log D = \log P - \log[1 + 10^{(pK_a - pH)}]$ 。図 3-4 の結果から、水相凍結法により得た実測値の log D は、文献値 (log P , p K_a) から算出した log D と、pH2~pH12 の広範囲において一致した。

また、表 3-3 には、水相凍結法の pH-log D プロファイルからフィッティングにより得た log P および p K_a を示す。水相凍結法から得た log P および p K_a は、文献値とほぼ一致するものであった。これにより、図 3-4 において水相凍結法により得た log D と文献値 (log P , p K_a) から算出した log D が一致したと考えられる。上記の結果より、96 穴プレートを用いた水相凍結法が pH2~pH12 の広い範囲で、pH-log D プロファイル取得へ応用可能であることが明らかになった。

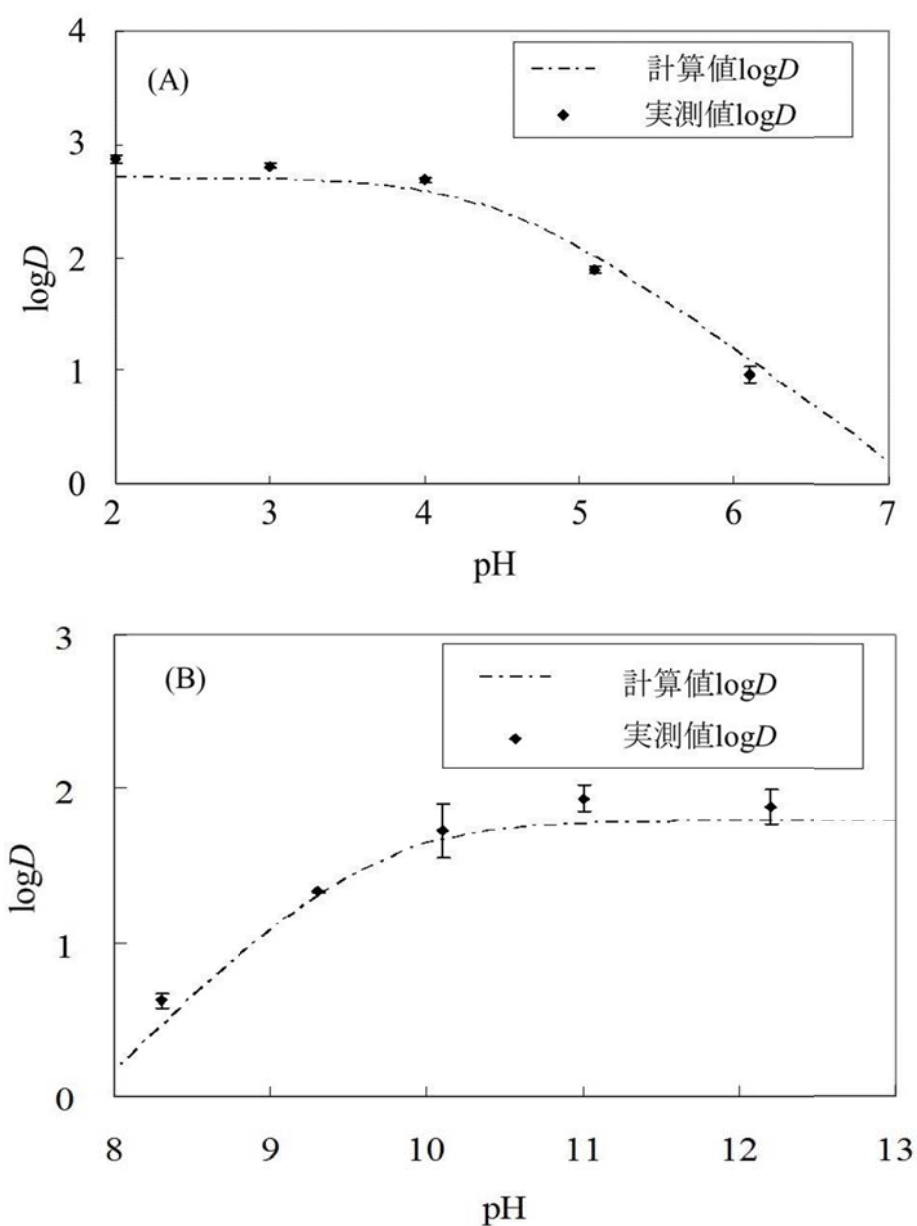


図 3-4 (A) ケトプロフェンおよび (B) メトプロロールの pH- $\log D$ プロファイル。エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$)。実測値 $\log D$ は水相凍結法を用いて測定した。計算値の $\log D$ は、文献値²¹⁾の $\log P$ および pK_a を用いて以下の式から算出した。ケトプロフェン; $\log D = \log P - \log[1+10^{(pH-pK_a)}]$ 。メトプロロール; $\log D = \log P - \log[1+10^{(pK_a-pH)}]$ 。

表 3-3 ケトプロフェンおよびメトプロロールの $\log P$ 値、 pK_a 値。

化合物	pK_a^*	pK_a	$\log P^*$	$\log P$	参考文献
	水相凍結法 より算出	文献値	水相凍結法 より算出	文献値	
ケトプロフェン	4.3	4.5	2.9	2.7	21
メトプロロール	9.5	9.6	1.9	1.8	21

* $\log P$ および pK_a は、水相凍結法から得た pH - $\log D$ プロファイルを 3-2-5 に記した式にフィッティングすることにより算出した。

3-3-4 水相凍結法とウォータープラグ法のスループット比較

図 3-5 に、ウォータープラグ法および水相凍結法を用いた高速 $\log D$ システムのスキームを示す。第 2 章においてウォータープラグ法のスループットは、1 週間に 400 検体であると述べた。一方、同じ労力で比較した場合、水相凍結法のスループットは 1 週間に 100 検体であると考えられる。この要因は、ウォータープラグ法では水相の分離を自動で行っているのに対し、水相凍結法では水相の凍結・融解という自動化に適さない工程を行っているためである。よって、スループットの観点では、水相凍結法はウォータープラグ法より劣っていると考えられる。しかし、創薬初期において、化合物の純度が低く、不溶性成分がサンプルに含まれていることがある。ウォータープラグ法では、水相とオクタノール相を分離せずに HPLC にセットし、ニードルで水相のみを採取する（図 2-3）。この場合、不溶性成分がニードルに詰まり、ウォータープラグが機能しないことが起こる。水相凍結法では、HPLC にセットする前に、水相とオクタノール相を完全に分離するため（図 3-1）、不溶性成分の影響は少ないと考えられる。よって、目的やサンプルの状態に応じて、ウォータープラグ法と水相凍結法を相補的に使用すると、より効率的なスクリーニングができると期待される。

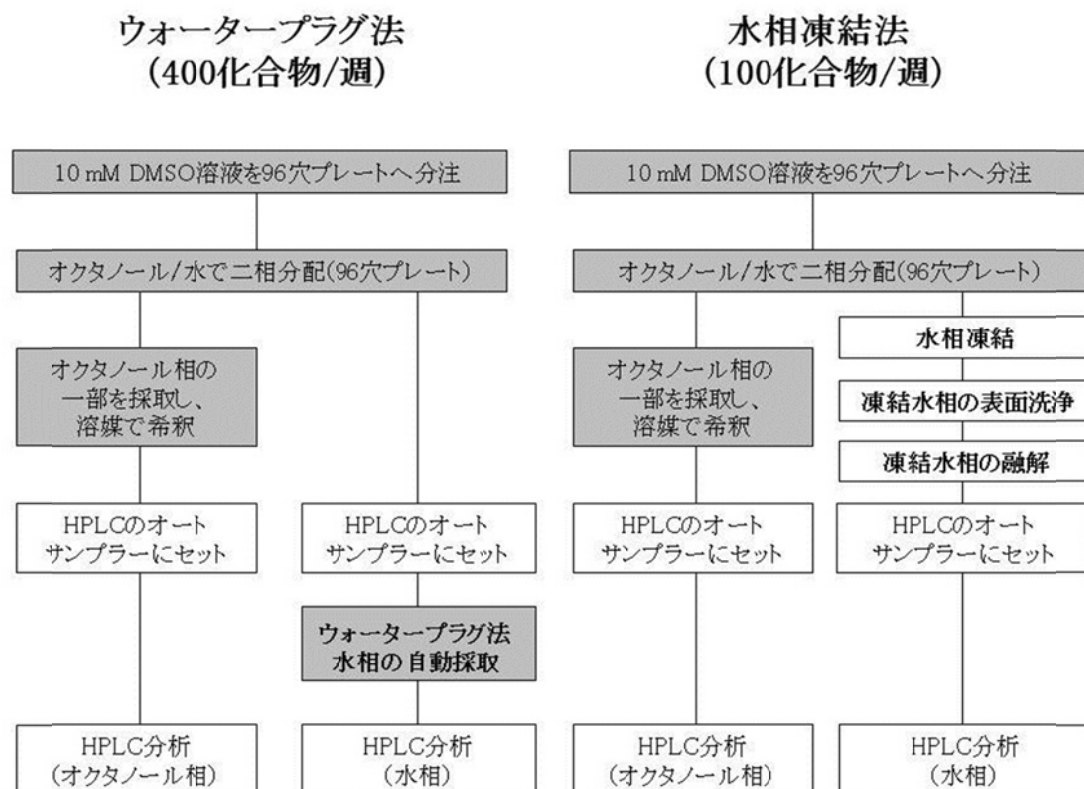


図 3-5 ウォータープラグ法および水相凍結法のスキーム。

3-3-5 合成誘導化戦略における $\log D$ スクリーニングの有用性

探索ステージでは、合成誘導化戦略により、化合物の構造最適化を行う。*in vitro* 試験において、化合物の各パラメーター（活性、選択性、薬物動態）を評価する。*in vitro* 試験の結果より、合成研究者は、置換基と各パラメーターの関係を把握し、次の化合物構造をデザインする。一般的に、ドラッグデザインおよび *in vitro* 試験は 1 週間サイクルで行われ、効率的に構造活性相関を把握するためには、スループット高く多検体を評価することが必要となる（図 3-6）。従来、オクタノールのコンタミネーションの課題のため、 $\log D$ をスループット高く評価することは難しかった。前章および本章で開発した、ウォータープラグ法や水相凍結法により、スループット高く $\log D$ を評価するこ

とが可能となった。それゆえ、 $\log D$ および構造に関する多くの情報を合成誘導化戦略に活用することができ、効率的に物性の課題を解決できることが期待される。

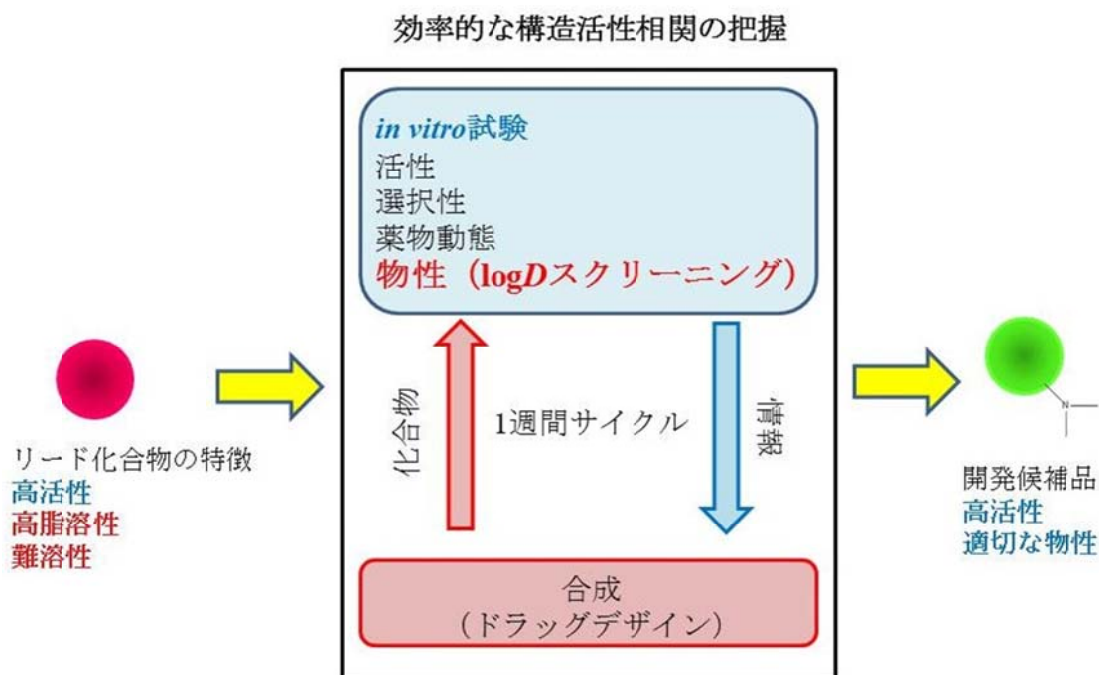


図 3-6 合成誘導化戦略における $\log D$ スクリーニングの活用。

3-4 結言

本章では、オクタノールのコンタミネーションを防ぐ方法として水相凍結法を用いた $\log D$ の前処理法を開発した。96 穴プレートを用いてコンタミネーションを回避した報告例は、第 2 章のウォータープラグ法以外に無く、水相凍結法の開発によって複数のアプローチでオクタノールのコンタミネーションが回避できると考えた。高脂溶性化合物 ケトコナゾールをモデル化合物として検討した結果、凍結した水相表面を適切に洗浄することがオクタノール相の除去に効果的であることを明らかにした。そして、本章で開発した水相凍結法の結果は $\log D_{7.4} = 0 \sim 4$ の範囲で文献値と一致し、本法は幅広い $\log D$

の範囲において有用であった。

$\log D$ の評価法として、フラスコ振とう法や、HPLC の保持時間を利用した $\log k$ 法が一般的に知られている。しかしながら、スループットが低い点や、酸性・塩基性化合物に適用できないという欠点が、それぞれの方法にあった。本研究の水相凍結法は、これらの欠点を解決できる画期的な方法であった。また、学術的には、少サンプルにおける $\log D$ 評価で、オクタノールのコンタミネーションを回避した方法および、そのコンタミネーション回避に関するメカニズムに焦点をあてた報告例は、第2章のウォータープラグ法以外では無かった。よって、水相を凍結させるメカニズムを利用した水相凍結法は、ウォータープラグ法と同様に、オクタノールのコンタミネーションを回避し、スループット向上に成功した新規性のある方法である。

また、解離基を有する酸性化合物や塩基性化合物では、pH によって $\log D$ が変化する。これらの各 pH における生体内挙動（膜透過性、溶解性等）の考察や、基礎物性を考察するために、pH- $\log D$ プロファイルを取得することは重要である。酸性化合物としてケトプロフェン、塩基性化合物としてメトプロロールを用いた検討の結果、水相凍結法は pH2～pH12 の広い範囲において、pH- $\log D$ プロファイルの取得に有用であることが分かった。

今後、水相凍結法やウォータープラグ法を相補的に使用することにより、スループット高く $\log D$ を評価することができ、 $\log D$ を指標とした効率的な合成展開が可能となる。それゆえ、高脂溶性・低溶解性の課題を、従来のフラスコ振とう法より早く解決できる可能性が期待される。

第 3 章 参考文献

- (1) Bhal, S. K.; Kassam, K.; Peirson, I. G.; Pearl, G. M. *Molecular Pharm.* **2007**, *4*, 556-560.
- (2) Martin, Y. C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3164-3170.
- (3) Ishigami, M.; Honda, T.; Takasaki, W.; Ikeda, T.; Komai, T.; Ito, K.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 282-288.
- (4) Liu, X.; Tu, M.; Kelly, R. S.; Chen, C.; Smith, B. J. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 132-139.
- (5) Kerns, E. H.; Di, L. *Drug Discovery Today Technol.* **2004**, *1*, 343-348.
- (6) Lipinski, C. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44*, 235-249.
- (7) Waterbeemd, H. V. D.; Smith, D. A.; Beaumont, K.; Walker, D. K. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1313-1333.
- (8) Shamovsky, I.; Connolly, S.; David, L.; Ivanova, S.; Norden, B.; Springthorpe, B.; Urbahns, K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1162-1178.
- (9) Waterbeemd, H. V. D.; Lennernas, H.; Artursson, P.; Mannhold, R.; Kubinyi, H. In *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; Folkers, G. Eds.; Wiley & Sons, Inc: Weinheim, Germany, 2003; pp 3-242.
- (10) Dohta, Y.; Yamashita, T.; Horiike, S.; Nakamura, T.; Fukami, T. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8312-8315.
- (11) Yamashita, T.; Nishimura, I.; Nakamura, T.; Fukami, T. *JALA* **2009**, *14*, 76-81.
- (12) Nishimura, I.; Hirano, A.; Yamashita, T.; Fukami, T. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2984-2988.

- (13) Santos, S. R. C. J.; Campos, E. V.; Sanches, C.; Gomez, D. S.; Ferreira, M. C. *CLINICS* **2010**, *65*, 237-243.
- (14) Fernandez, C. M.; Martin, V. C. *Talanta* **1977**, *24*, 747-748.
- (15) In *The Merck Index, Twelfth Edition*; Merck & CO., Inc.: Whitehouse Station, New Jersey, 1996; pp 1160-1161.
- (16) Avdeef, A. In *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2003; pp 23-66.
- (17) Lombardo, F.; Shalaeva, M. Y.; Tupper, K. A.; Gao, F. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2490-2497.
- (18) Rotonda, M. I. L.; Amato, G.; Barbato, F.; Silipo, C.; Vittoria, A. *Quant. Struct. Act. Relat.* **1983**, *2*, 168-173.
- (19) Interview form of Tegretol®, Novartis Co. Ltd.
- (20) Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*; Elsevier, Inc.: London, UK, 2008; pp 45.
- (21) Chiang, P. C.; Hu, Y. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2009**, *12*, 250-257.

第 4 章

沈殿抑制剤スクリーニングにおける溶剤シフト法の開発

4-1 緒言

低溶解性の課題にする改善の手法として、以下の 2 つの方法が考えられる。一つ目の方法は、探索ステージにおいて合成展開で化合物の物性を改善する方法であり、この指標として前章では脂溶性スクリーニング系を構築した。二つ目の方法は、開発ステージにおいて製剤的工夫により、化合物の溶解性を向上させることである¹⁻⁶⁾。本章では、効率的に溶解性向上に寄与する添加剤を見出す方法を構築する。

医薬品は経口投与後、胃（酸性）を通過し、腸（中性）で吸収されることが知られている。難溶性化合物の吸収を改善するためには、腸で高い濃度を維持することが重要である。例えば、難溶性の塩基性化合物は、胃（酸性）では電荷を有するため良く溶けるが、腸で pH 環境が中性に移行するに伴い、電荷が無くなり、溶解度が減少するため、吸収されにくくなると考えられる。そのため、腸で化合物の沈殿を抑制する製剤的工夫ができれば、吸収改善に大きく役立つと考えられる。

薬物の溶解過程は、結晶格子が崩れる過程および崩れた結晶格子が溶媒和する過程に二分される。結晶からの溶解度が低い場合、溶解性改善の方法として固体分散体が挙げられる^{4,5)}。固体分散体では、化合物を非晶質（アモルファス）でポリマー内に封じ込める。生体内において、固体分散体から溶出した薬物は一時的に高い濃度を維持し、その後、化合物の溶解度に応じて析出する。また、その他の溶解性改善の方法として、脂質などに化合物を溶かし、溶解性を改善する方法もある^{2,3,6)}。この方法でも、生体内において、製剤から溶出した薬物は一時的に高い濃度を維持し、その後、化合物の溶解度

に応じて析出する。この様に、難溶性化合物の吸収改善を目的とする製剤的工夫では、アモルファスや溶液状態で化合物を経口投与し、腸内で一時的に高い濃度を維持させ、その後、化合物が沈殿するまでの時間を引き延ばすことが重要である。

腸内で析出を防ぐための添加剤として、沈殿抑制剤の選定は重要であり、一般的に、これらの評価は USP 法や JP 法に記載されるパドル法の溶出試験機によって行われている²⁻⁵⁾。溶出試験機では一般的に数百～900 mL の試験液を用い評価を行う。また、近年、生体を模倣した試験液として、人工胃液 (SGF; simulated gastric fluid, pH1.8)、胆汁酸を含む人工腸液 (FaSSIF; fasted-state simulated small intestinal fluid, pH6.5) も注目され、製剤研究に使用されている⁷⁻⁹⁾。溶出試験機の欠点として、多くの化合物量が必要な点、およびスループットが低い点が挙げられる。特に開発初期では使用できるバルク量が少ないこと、また、効率良く沈殿抑制剤を見出すためにも、小スケールでスループットの高い評価法が求められている。

2008 年に、スループット高く沈殿抑制剤を評価する方法として、96 穴プレートを用いた溶剤エバポレーション法 (溶剤キャスト法) が報告された^{10,11)}

(図 4-1)。この方法では、化合物および沈殿抑制剤をアルコールなどに溶かし、96 穴プレートに分注する。エバポレーションにより溶媒を除去した後、化合物と沈殿抑制剤からなる固体に FaSSIF を加えて、FaSSIF 中で化合物の溶出に対する沈殿抑制剤の効果を調べる。この方法では、96 穴プレートを用いているため、溶出試験と比べて少サンプル量で、スループット高く、沈殿抑制剤をスクリーニングできるという利点がある。しかし、この論文の筆者らは同時に、この方法の欠点を 2 点述べていた。一点目は、この方法では、結晶化しやすい化合物はエバポレーションにより溶媒を除く過程において結晶化するため、サンプルに沈殿抑制剤の効果を見ることができない点である。二点目は、溶媒をエバポレーションするため、化合物をアルコールやアセトンなどに溶かす必要があるが、難溶性化合物の場合、これらの揮発性溶媒に高濃度に化合物を溶かすこと

が難しい点である。よって、溶溶ベントエバポレーション法では、適用できる化合物の特性に制限があり、より簡便で汎用性のある方法の開発が求められている。

本章では溶溶ベントエバポレーション法の欠点を改善し、シンプルに短時間で沈殿抑制剤を評価できる方法（溶溶ベントシフト法）を構築することを目的とした。この方法では、化合物を SGF や DMSO（ジメチルスルホキシド）に高濃度で溶かし、沈殿抑制剤を含んだ状態で、FaSSIF で希釈し、化合物の析出に対する沈殿抑制剤の効果をモニターする（図 4-2）。溶溶ベントシフト法では、エバポレーションの過程を省いている点、および、化合物を高濃度で溶かす溶媒（DMSO など）を使用している点から、溶溶ベントエバポレーション法の欠点を解決できる可能性が考えられた。本章では、まず、塩基性化合物に対する沈殿抑制剤スクリーニング法として、胃（酸性）から腸（中性）への析出過程を模倣し、酸性の SGF に化合物を高濃度で溶かし、沈殿抑制剤と混ぜた状態で FaSSIF を用いて希釈する溶溶ベントシフト法を検討した。次に、酸性溶液に対する溶解度が低く、SGF が使用できない難溶性化合物（イトラコナゾール、ITZ）を評価するために、DMSO に化合物を高濃度で溶かし、沈殿抑制剤を含んだ FaSSIF で希釈する溶溶ベントシフト法を検討した。溶溶ベントシフト法の様に、高濃度の化合物溶液を FaSSIF で希釈し、その沈殿過程において、ハイスループットで沈殿抑制剤をスクリーニングした報告例は無く、本法の開発により前溶溶ベントエバポレーション法の欠点が解決されたメソッドができると考え検討を行った。

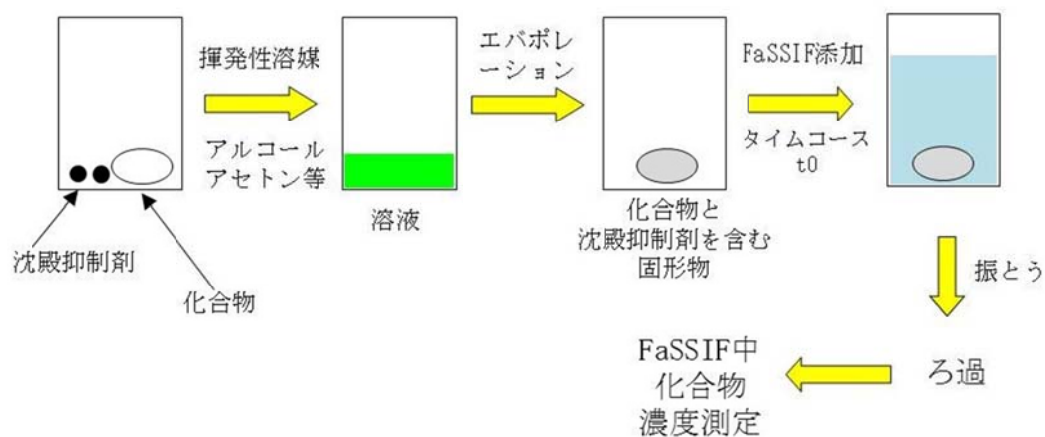


図 4-1 ソルベントエバポレーション法による沈殿抑制剤の評価スキーム。

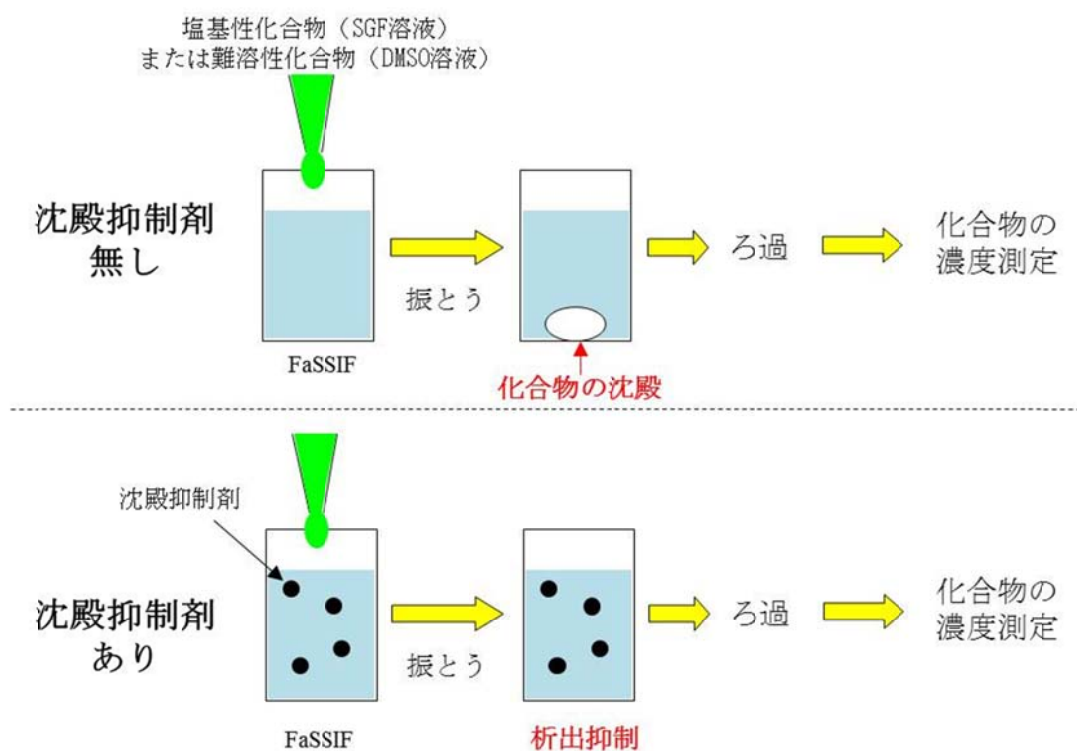


図 4-2 ソルベントシフト法による沈殿抑制剤の評価スキーム。

4-2 実験操作

4-2-1 SGF と FaSSIF を用いた塩基性化合物の沈殿抑制剤評価

4-2-1-1 試薬

塩基性モデル化合物 A（フリー体、結晶）は、メルク社（プロセスリサーチ部門、Rahway 研究所、ニュージャージー州）で合成されたものを使用した。ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート（HPMC-AS、AQOAT®）は信越化学社より入手した。キャプティソルは CyDex 社のものを使用した。ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（HP-β-CD）、ラウリル硫酸ナトリウム（SLS）、ポリオキシル 40 モノステアレート、N-メチルピロリドン（NMP）は和光純薬社より購入した。クレモフォール ELP はナカライ社より入手した。ポリエチレングリコール 400 (PEG 400) は丸石社のものを使用した。ポリソルベイト 80 (Tween 80) は ICN Biomedical 社より得た。ポロキサマー 407 は BASF 社より購入した。ゲルシア 50/13 は Gattefosse 社のものを使用した。ヒドロキシプロピルセルロース（HPC SL）は日本ソーダ社より入手した。オイドラギット S100 は Degussa 社のものを使用した。ビタミン E TPGS は Eastman 社より購入した。

タウロコール酸ナトリウムは Spectrum 社より購入した。レシチンは Alfa Aesar 社のものを使用した。塩化ナトリウム（試薬特級）、塩化カリウム（試薬特級）、1 mol/L 水酸化ナトリウム（容量滴定用）、1 mol/L 塩酸（容量滴定用）、リン酸二水素カリウム（試薬特級）、リン酸（HPLC グレード）は和光純薬社より得た。アセトニトリル（HPLC グレード）は純正化学社より入手した。水はミリポア社の Milli-Q Gradient A 10 system

で精製したものを使用した。

4-2-1-2 メディアの調製

人工胃液 SGF (simulated gastric fluid, pH1.8) は以下の成分で調製した; 34 mM 塩化ナトリウム、17.5 mM 塩酸水溶液。この水溶液の pH は約 1.8 であった。

人工腸液 FaSSIF (fasted state simulated small intestinal fluid, pH6.5) は以下の成分で調製した; 3 mM タウロコール酸ナトリウム、0.75 mM レシチン、29 mM リン酸二水素カリウム、103 mM 塩化カリウム水溶液。pH メーター (Seven Multi、Mettler Toledo 社) を用い、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、pH6.5 に調製した。

4-2-1-3 塩基性化合物 A の HPLC-UV 条件

HPLC-UV は Agilent 社の 1100 システムを使用した。HPLC は以下の構成のものを使用した; バイナリーポンプ、96 穴プレート対応オートサンプラー、カラムヒーター、ダイオードアレイ検出器、ソフト Chem Station ver 9.03。カラムとして MG C18 (4.6 × 50 mm、粒子径 3 μm、資生堂社) を用い、カラムは 40°C で使用した。移動相として、A 溶媒 : 水/リン酸 (1000/1, v/v)、B 溶媒 : アセトニトリルを使用した。ポンプの流速は 1.0 mL/min に設定し、以下のグラジエントモードを使用した : 0 min、移動相 B 5%; 3.0 min、移動相 B 90%; 3.5 min、移動相 B 90%; 3.51 min、移動相 B 5%; 6.0 min、移動相 B 5%。ダイオードアレイ検出器は、UV 290 nm に設定した。オートサンプラーの注入量は 5 μL とした。

4-2-1-4 SGF と FaSSIF を用いたソルベントシフト法による沈殿抑制剤スクリーニング

沈殿抑制剤を 0.4% (w/v) の濃度で水に懸濁または溶解させ、96 穴プレートの各ウェルに 50 μ L ずつ分注した。次に、電動 8 連ピペット (Proline、Biohit 社) を用いて、化合物 A の 4 mg/mL SGF 溶液 を 100 μ L ずつ各ウェルに加えた。その後、FaSSIF 400 μ L を各ウェルに添加し、この時点を経験タイムコースの t_0 とした。タイムコース t_0 におけるサンプル濃度は以下の通りであった；化合物 A 0.73 mg/mL、沈殿抑制剤 0.036% (w/v)。また、 t_0 でのメディア組成は水/SGF/FaSSIF (1/2/8, v/v/v) であり、このメディアの pH は pH6.5 であった。振とう機 (M-BR-022UP、Taitec 社) を用い、プレートを 37°C にて振とうした。タイムコース 1、2、4 時間の時点において、Millipore 社のフィルター (MultiScreen HTS Solubility 0.45 μ m filter plate) にサンプルを分注し、遠心分離 (2000 rpm、5 分間、Himac CF-8DL、日立社) により、沈殿を取り除いた。ろ液をアセトニトリル/水 (5/5, v/v) を用い 10 倍希釈した。ろ液を 10 倍希釈したサンプルを HPLC/UV で分析し、濃度既知の化合物 A 標準サンプルとピーク面積を比較し、ろ液中の化合物 A の濃度を算出した。

4-2-1-5 SGF と FaSSIF を用いた溶出試験による沈殿抑制剤の評価

塩基性化合物 A に対する沈殿抑制剤の評価は、USP II パドル法を用いた溶出試験機 (VK7010、Varian 社) にて評価した。化合物 A の 4 mg/mL SGF 溶液 160 mL および 0.4 w/v% の沈殿抑制剤入り水溶液/懸濁液 80 mL を溶出試験機に入れた。次に、640 mL の FaSSIF を溶出試験機に投入し、この時点を経験タイムコースの t_0 とした。タイム

コース t0 におけるサンプル濃度は以下の通りであった；化合物 A 0.73 mg/mL、沈殿抑制剤 0.036% (w/v)。また、t0 でのメディア組成は水/SGF/FaSSIF (1/2/8, v/v/v) であり、このメディアの pH は pH6.5 であった。溶出試験機の攪拌速度は 100 rpm、温度は 37°C に設定した。適切なタイムポイントにおいて、サンプル 1 mL を採取し、遠心分離 (2000 rpm、5 分間、Himac CF-8DL、日立社) にて沈殿を取り除いた。上清をアセトニトリル/水 (5/5, v/v) を用い 10 倍希釈した。上清を 10 倍希釈したサンプルを HPLC/UV で分析し、濃度既知の化合物 A 標準サンプルとピーク面積を比較し、上清中の化合物 A の濃度を算出した。

4-2-2 DMSO と FaSSIF を用いたイトラコナゾール (ITZ) の沈殿抑制剤評価

4-2-2-1 試薬

イトラコナゾール (ITZ、フリー体結晶) は、和光純薬社より購入した。イトラコナゾール含有の固体分散体制剤であるイトリゾール®は、Janssen 社より入手した。ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) およびポリソルベイト 80 (Tween 80) は、和光純薬社のものを使用した。プルロニック F-68 は MP Biomedical 社から得た。ショ糖ステアレート S-570 は三菱化学フーズ社より購入した。ポリエチレングリコール 400 (PEG 400) は NOF 社より入手した。プロピレングリコール (PG) はアデカ社より得た。ラブラフィル M1944、ラブラゾル、ゲルシア 44/14 は Gattefosse 社のものを使用した。クレモフォール ELP、クレモフォール RH40、コリドン 17PF は BASF 社より入手した。ポリエチレングリコール硬化ヒマシ油 60 (HCO-60) は日光ケミカル社より購入した。ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC、Tc-5Ew®) およびヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS、AQOAT®) は信越化学社より

入手した。ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP- β -CD) は三菱商事社より得た。キャプティソルは CyDex 社のものを使用した。

タウロコール酸ナトリウムはナカライテスク社より購入した。レシチンは NOF 社より入手した。塩化カリウム (試薬特級)、1 mol/L 水酸化ナトリウム (容量滴定用)、リン酸二水素ナトリウム (試薬特級)、ジメチルスルホキシド (DMSO、試薬特級)、アセトン (試薬特級)、リン酸 (試薬特級)、アセトニトリル (HPLC グレード)、エタノール (HPLC グレード) は和光純薬社のものを使用した。水はミリポア社の Milli-Q Gradient A 10 system で精製したものを使用した。

4-2-2-2 メディアの調製

人工腸液 FaSSIF (fasted state simulated small intestinal fluid, pH6.5) は以下の成分で調製した; 3 mM タウロコール酸ナトリウム、0.75 mM レシチン、29 mM リン酸二水素ナトリウム、100 mM 塩化カリウム水溶液。pH メーター (F-53、堀場社) を用い、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、pH6.5 に調製した。

4-2-2-3 ITZ の HPLC-UV 条件

HPLC-UV は Agilent 社の 1100 システムを使用した。HPLC は以下の構成のものを使用した; バイナリーポンプ、96 穴プレート対応オートサンプラー、カラムヒーター、ダイオードアレイ検出器、ソフト Chem Station ver 9.01。カラムとして YMC Pro C18 (4.6 $\times$ 35 mm、粒子径 3 μ m、YMC 社) を用い、カラムは 40°C で使用した。移動相として、A 溶媒: 水/リン酸 (1000/1, v/v)、B 溶媒: アセトニトリルを使用した。ポンプの流速は 2.0 mL/min に設定し、以下のグラジエントモードを使用した: 0 min、移

動相 B 5%; 3.0 min、移動相 B 90%; 3.5 min、移動相 B 90%; 3.51 min、移動相 B 5%; 5.0 min、移動相 B 5%。ダイオードアレイ検出器は、UV 260 nm に設定した。オートサンプラーの注入量は 10 μ L とした。

4-2-2-4 DMSO と FaSSIF を用いたソルベントシフト法による沈殿抑制剤スクリーニング

沈殿抑制剤を 0.015% (w/v) の濃度で FaSSIF に懸濁または溶解させ、96 穴プレートの各ウェルに 200 μ L ずつ分注した。次に、電動 8 連ピペット (Proline、Biohit 社) を用いて、ITZ の 5 mg/mL DMSO 溶液 を 4 μ L ずつ各ウェルに加えた。この時点タイムコースの t0 とし、FaSSIF 中でのサンプル濃度は以下の通りであった; ITZ 0.1 mg/mL、沈殿抑制剤 0.015% (w/v)。また、各ウェルでの ITZ と沈殿抑制剤の重量比は、2:3 であった。振とう機 (Micro Mixer E-36、Taitec 社) を用い、プレートを 25°C にて振とうした。タイムコース 1、2、4 時間の時点において、Millipore 社のフィルター (MultiScreen HTS Solubility 0.45 μ m filter plate、MultiScreen Vacuum Manifold) を用い、サンプルをろ過し、沈殿を取り除いた。ろ液をアセトニトリル/水 (7/3, v/v) を用い 4 倍希釈した。ろ液を 4 倍希釈したサンプルを HPLC/UV で分析し、濃度既知の ITZ 標準サンプルとピーク面積を比較し、ろ液中の ITZ 濃度を算出した。

コントロールとして、約 0.1 mg の ITZ フリー体結晶を各ウェルに入れ、2% DMSO (v/v) を含んだ FaSSIF 200 μ L を添加した (t0)。その後の実験操作は、上記と同様であった。25°C で振とうし、適切な時間でサンプルをろ過した。ろ液を 4 倍に希釈し、HPLC/UV で分析し、ろ液の ITZ 濃度を算出した。

4-2-2-5 ソルベントエバポレーション法による沈殿抑制剤スクリーニング

ITZ および沈殿抑制剤を各 1 mg/mL、1.5 mg/mL の濃度で、エタノール/アセトン/水 (10/10/1, v/v/v) に溶かした。この溶液 20 μ L を 96 穴プレートの各ウェルに分注した。プレート対応エバポレーター (EYELA NE-3100、東京理化工械社) を用い 1 時間かけて、溶媒を蒸発させた。各ウェルに FaSSIF を 200 μ L 添加し、この時点をタイムコースの t_0 とした。振とう機 (Micro Mixer E-36、Taitec 社) を用い、プレートを 25°C にて振とうした。適切な時点において、Millipore 社のフィルター (MultiScreen HTS Solubility 0.45 μ m filter plate、MultiScreen Vacuum Manifold) を用い、サンプルをろ過し、沈殿を取り除いた。ろ液をアセトニトリル/水 (7/3, v/v) を用い 4 倍希釈した。ろ液を 4 倍希釈したサンプルを HPLC/UV で分析し、濃度既知の ITZ 標準サンプルとピーク面積を比較し、ろ液中の ITZ 濃度を算出した。

コントロールとして、約 0.1 mg の ITZ フリー体結晶を各ウェルに入れ、FaSSIF 200 μ L を添加した (t_0)。その後の実験操作は、上記と同様であった。25°C で振とうし、適切な時間でサンプルをろ過した。ろ液を 4 倍に希釈し、HPLC/UV で分析し、ろ液の ITZ 濃度を算出した。

4-2-2-6 ITZ の固体分散体調製法

固体分散体は溶媒蒸発法を用いて調製した。0.5 g の ITZ と 0.75 g の沈殿抑制剤を混ぜた後、525 mL のエタノール/アセトン/水 (10/10/1, v/v/v) に溶かした。溶媒をエバポレーター (EYELA NE-1、東京理化工械社) を用いて、50°C で蒸発させた。ナスフラスコ底に残ったフィルム上の固体を真空ポンプにて乾燥させた後、乳棒・乳鉢にて

すりつぶした。これを ITZ の固体分散体とした。固体分散体は粉末 X 線 (TTR-III、リガク社) にて分析し、ITZ 由来の結晶ピークが見られないことを確認した。

4-2-2-7 固体分散体の溶出試験

ITZ の固体分散体および結晶の溶出プロファイルは、JP パドル法 (NTR-VS3、富山産業社) にて取得した。ITZ として 30 mg を秤量し、300 mL の FaSSIF が入った溶出試験機に投入した。攪拌速度は 50 rpm、温度は 37°C に設定した。適切なタイムポイントにおいて、サンプル 2 mL を採取し、0.45 μm のディスクフィルター (GL クロマトディスク 13A、GL サイエンス社) にて、ろ過した。ろ液をアセトニトリルにて 2 倍希釈し、HPLC/UV で分析した。濃度既知の ITZ 標準サンプルとピーク面積を比較し、ろ液中の ITZ 濃度を算出した。

4-3 結果と考察

4-3-1 SGF と FaSSIF を用いた塩基性化合物の沈殿抑制剤評価

4-3-1-1 塩基性化合物 A の物理化学的特性

表 4-1 に、塩基性化合物 A の物理化学的特性（分子量、 $\log D_{7.4}$ 、 pK_a （酸解離定数）、溶解度）を示す。化合物 A は $pK_a = 8.8$ の官能基を有する塩基性化合物である。SGF 中での溶解度は 4.76 mg/mL と高い値を示すが、FaSSIF 中での溶解度は 0.11 mg/mL と SGF に比べて低い値を示す。このことから、投与量が高い場合、*in vivo* 動物試験において、化合物 A は、酸性の胃の中では溶けているが、中性の小腸に移行するにつれて溶解度が低下し、析出する可能性が示唆される。

表 4-1 塩基性化合物 A の物性値。

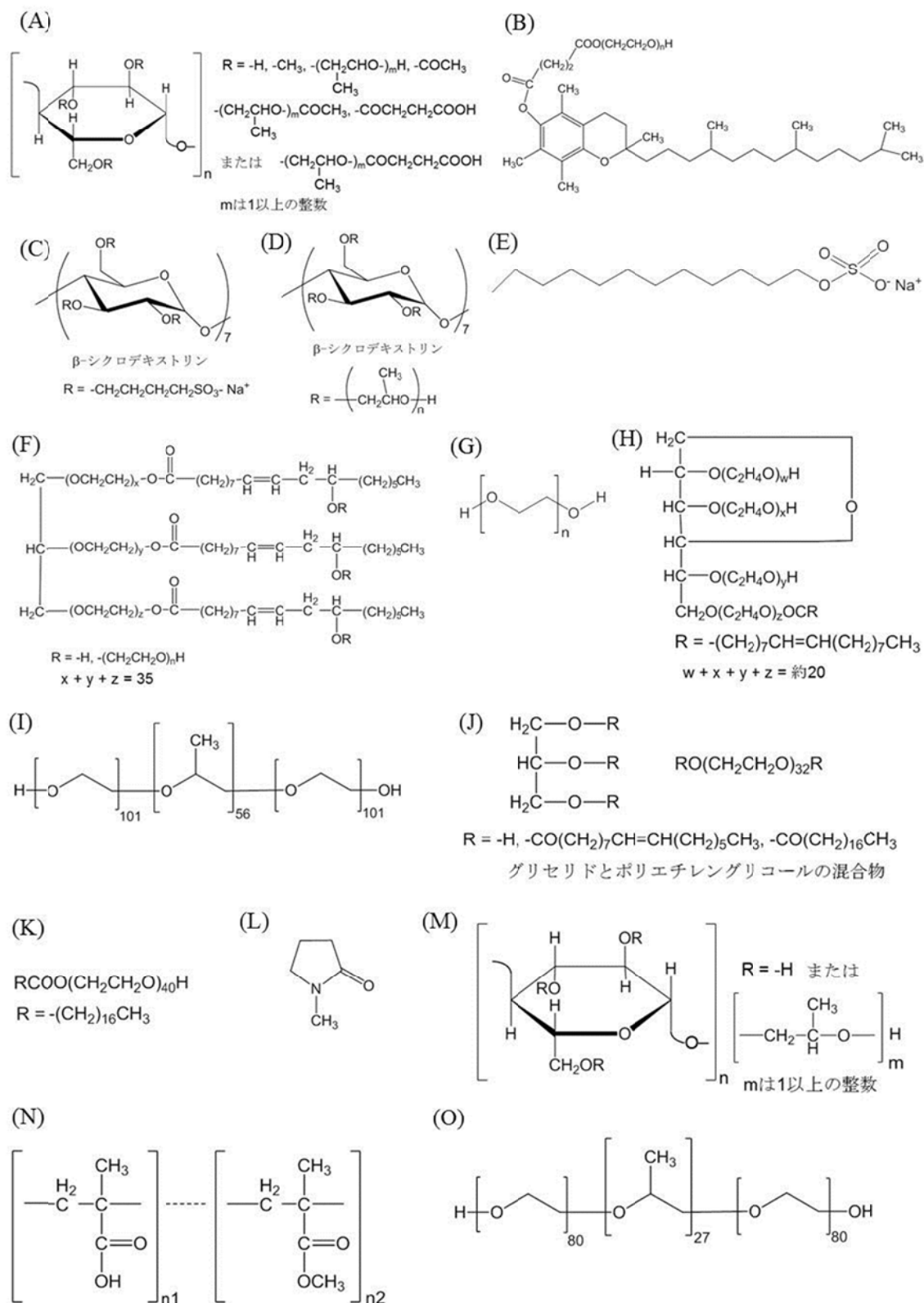
分子量	529 g/mol
$\log D_{7.4}$	1.1
pK_a	8.8
溶解度（SGF、pH1.8）	4.76 mg/mL
溶解度（FaSSIF、pH6.5）	0.11 mg/mL

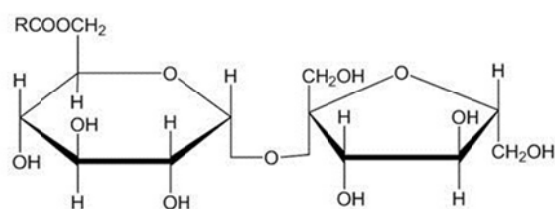
4-3-1-2 SGF と FaSSIF を用いたソルベントシフト法による塩基性化合物 A の沈殿抑制剤スクリーニング

中性環境下において、化合物 A の沈殿抑制に効果を発揮する沈殿抑制剤の候補として、物理的および化学的特性の幅広い観点で、ポリマー、界面活性剤、シクロデキスト

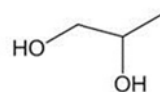
リン、オイル、賦形剤の中から、14 種類の沈殿抑制剤を選択した（図 4-3 A～N）。化合物 A の今後の開発（*in vivo* 動物試験）を考え、化合物 A と沈殿抑制剤の比率は 2/1（w/w）を設定した。初めに化合物 A を人工胃液 SGF（pH1.8）に 4 mg/mL の濃度で溶かした。化合物 A の沈殿過程をモニターしやすくするため、SGF に対する溶解度付近の濃度である 4 mg/mL に初期濃度を設定した。化合物 A の SGF 溶液は沈殿抑制剤を含む水溶液/懸濁液と混ぜ、最後に人工腸液 FaSSIF（pH6.5）と混ぜた。最終的なメディア組成は水/SGF/FaSSIF（1/2/8, v/v/v, pH6.5）であり、化合物 A の上限濃度は 0.73 mg/mL であった。このメディア中での化合物 A の沈殿過程および、沈殿抑制剤の効果を調べた。

図 4-4 に、SGF を用いた化合物 A の沈殿抑制剤スクリーニングの結果を示す。その結果、クレモフォール ELP、Tween 80、ゲルシア 50/13、ポリオキシシル 40 モノステアレート の 4 種が、沈殿抑制剤を含まないコントロール（約 0.5 mg/mL）よりも高い化合物 A 濃度（約 0.7 mg/mL）を示した。これら 4 種はオイル・脂質状のものであるため、脂質系の沈殿抑制剤が化合物 A の濃度維持に効果があると考えられる。一方、SLS やキャプティソルは、1 時間の時点において、それぞれ約 0.2 mg/mL、約 0.4 mg/mL とコントロールと比べて低い濃度を示した。また、これら 2 種の沈殿抑制剤を、初め SGF 中で化合物 A と混ぜたところ、白濁の析出が見られた。この要因として、これら 2 種の沈殿抑制剤は硫酸基を有するため、初めの SGF の酸性環境において、化合物 A の塩基性部位と静電的相互作用によって会合体を形成し析出したと考えられる。結果として、14 種類の沈殿抑制剤のスクリーニングから、脂質系の 4 種が化合物 A の沈殿抑制に対し効果を示し、また、硫酸基を有する 2 種は逆に沈殿を促進することが分かった。





$$R = -(CH_2)_{16}CH_3$$



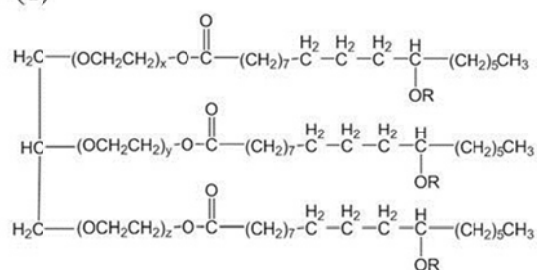
$$R = -H, -CO(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$$

グリセリドとポリエチレングリコールの混合物



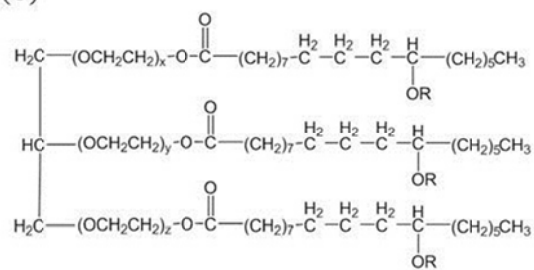
$$R = -H, -CO(CH_2)_6CH_3, -CO(CH_2)_8CH_3$$

グリセリドとポリエチレングリコールの混合物



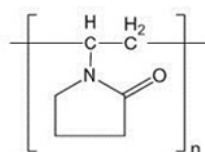
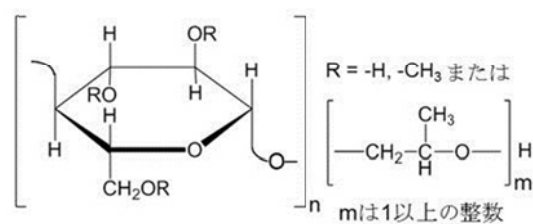
$$R = -H, -(CH_2CH_2O)_nH$$

$$x + y + z = 40$$



$$R = -H, -(CH_2CH_2O)_nH$$

$$x + y + z = 60$$



$$R = -H, -CO(CH_2)_{10}CH_3$$

グリセリドとポリエチレングリコールの混合物

図 4-3 検討に用いた沈殿抑制剤の構造。(A) ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS)、(B) ビタミン E TPGS、(C) キャプティソル、(D) ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP-beta-CD)、(E) ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、(F) クレモフォール ELP、(G) ポリエチレングリコール 400 (PEG 400)、(H) ポリソルベイト 80 (Tween 80)、(I) ポロキサマー407、(J) ゲルシア 50/13、(K) ポリオキシシル 40 モノステアレート、(L) N-メチルピロリドン (NMP)、(M) ヒドロキシプロピルセルロース (HPC SL)、(N) オイドラギット S100、(O) プルロニック F-68、(P) ショ糖ステアレート S-570、(Q) プロピレングリコール (PG)、(R) ラブラフィール M1944、(S) ラブラゾル、(T) クレモフォール RH40、(U) ポリエチレングリコール硬化ヒマシ油 60 (HCO-60)、(V) ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、(W) コリドン 17PF、(X) ゲルシア 44/14。

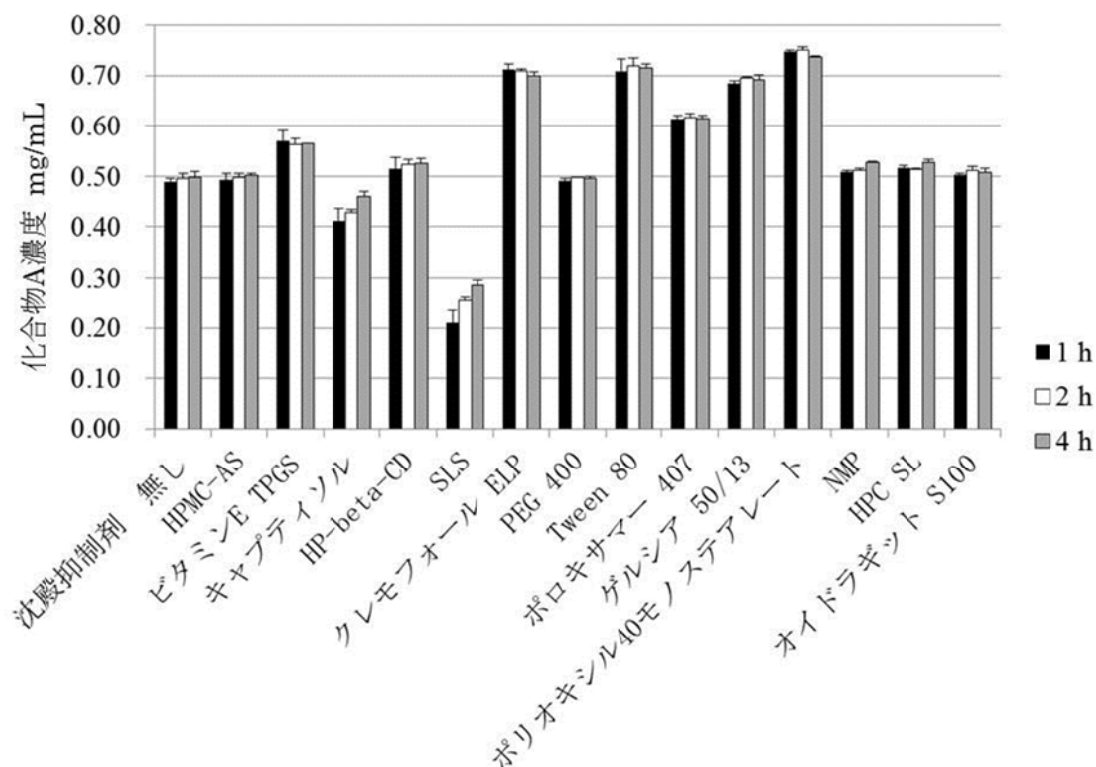


図 4-4 SGF と FaSSIF を用いたソルベントシフト法による沈殿抑制剤スクリーニング。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。沈殿抑制剤は以下のものを用いた；ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS)、ビタミン E TPGS、キャプティソル、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP-beta-CD)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、クレモフォール ELP、ポリエチレングリコール 400 (PEG 400)、ポリソルベイト 80 (Tween 80)、ポロキサマー407、ゲルシア 50/13、ポリオキシシル 40 モノステアレート、N-メチルピロリドン (NMP)、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC SL)、オイドラギット S100。

4-3-1-3 SGF と FaSSIF を用いた溶ベントシフト法と溶出試験法の比較

96 穴プレートと SGF を用いた溶ベントシフト法の結果を大スケールの溶出試験法と比較するため、溶出試験機を用いて沈殿抑制剤の化合物 A に対する効果を調べた。沈殿抑制剤として、96 穴プレートの結果から沈殿抑制効果の程度に応じて、SLS、ポリキサマー407、ポリオキシシル 40 モノステアレートの 3 種を選択した。96 穴プレートの実験と同様に、酸性環境下において化合物 A と沈殿抑制剤を 2/1 (w/w) の比率で混ぜ、その後、FaSSIF を添加し、水/SGF/FaSSIF (1/2/8, v/v/v, pH6.5) 中での化合物 A の濃度推移をモニターした (図 4-5)。溶出試験機から得られた結果と、96 穴プレートから得られた結果は良く一致し、両法の間には良い相関が見られた ($R^2 = 0.9690$ 、1 時間値) (図 4-6)。以上の検討から、96 穴プレートによる SGF と FaSSIF を用いた沈殿抑制剤スクリーニングの結果は、一般的に使われている溶出試験機の結果と良く一致するものであった。本スクリーニングの利点としては、96 穴プレートを用いたため、小スケールで、スループット高く、効率的に評価できることである。特に、今回の検討では、640 分の 1 の化合物量で、一般的な溶出試験評価と同等の結果が得られた。

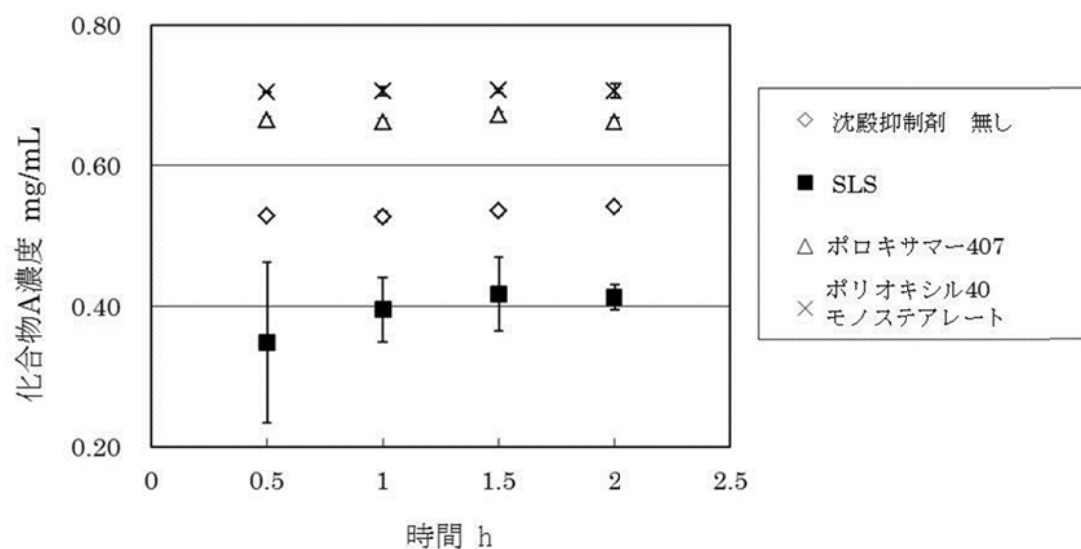


図 4-5 SGF と FaSSIF を用いた溶出試験機による沈殿抑制剤評価。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。沈殿抑制剤は以下のものを用いた；ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、ポリキサマー407、ポリオキシシル 40 モノステアレート。

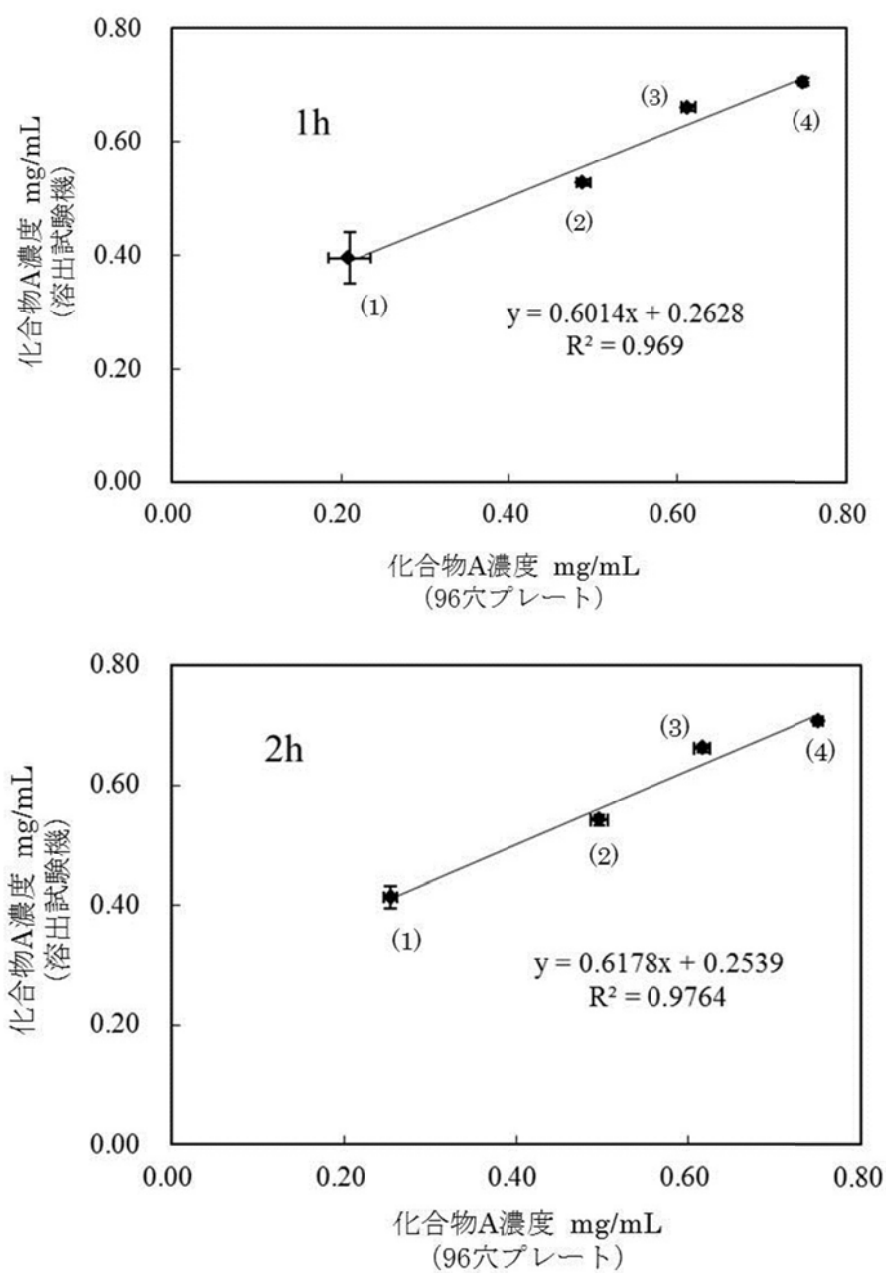


図 4-6 ソルベントシフト法と溶出試験法による相関。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。(1) ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、(2) 沈殿抑制剤 無し、(3) ポロキサマー 407、(4) ポリオキシル 40 モノステアレート。

4-3-2 DMSO と FaSSIF を用いたイトラコナゾール (ITZ) の沈殿抑制剤評価

4-3-1 において、塩基性化合物に適した沈殿抑制剤をスクリーニングするために、SGF と FaSSIF を用いた溶溶シフト法を開発した。しかし、イトラコナゾール (ITZ、図 4-7) の様に酸性溶液中でも溶解性が低い難溶性化合物には、上記の方法は適用できない (表 4-2)。そこで、難溶性化合物を高濃度で溶かせるジメチルスルホキシド (DMSO) を用いた溶溶シフト法の検討を試みた。

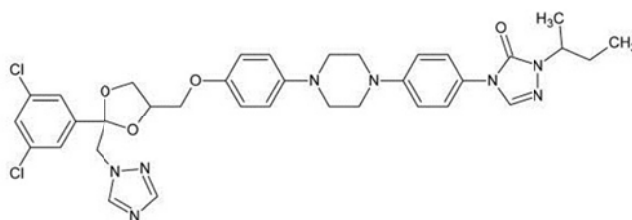


図 4-7 イトラコナゾール (ITZ) の構造。

4-3-2-1 ITZ の物理化学的特性

表 4-2 に、ITZ の物理化学的特性 (分子量、 $\text{clog}P$ (計算値による分子型脂溶性)、 $\text{p}K_a$ (酸解離定数)、溶解度) を示す¹²⁾。ITZ は 2 つの $\text{p}K_a$ (2、3.7) を有する弱塩基性化合物である。ITZ フリー体結晶の各水溶液に対する溶解度は以下の通りである; 1 ng/mL (pH7 緩衝液)、5 $\mu\text{g/mL}$ (0.1 mol/L 塩酸水溶液、pH1)、0.3 $\mu\text{g/mL}$ (FaSSIF、pH6.5)。またスポラノックス®の添付文書¹³⁾より、ITZ の臨床投与量は 50~200 mg/man と高い。このことから、ITZ は難溶性化合物に分類される。ITZ の溶解性を向上させるため、ITZ は固体分散体制剤 (ITZ/HPMC, 2/3, w/w) として開発され、市販 (スポラノックス®、イトリゾール®) されている^{14,15)}。

表 4-2 イトラコナゾール (ITZ) の物性値¹²⁾。

分子量	706 g/mol
clog <i>P</i>	6.2
p <i>K</i> _a	2, 3.7
溶解度 (緩衝液、pH7)	1 ng/mL
溶解度 (水溶液、pH1)	5 µg/mL
溶解度 (FaSSIF、pH6.5)	0.3 µg/mL

図 4-8 に、96 穴プレートを用いた FaSSIF 中 25°C における ITZ の Thermodynamic solubility (結晶からの溶解度) および Kinetic solubility (DMSO 溶液を希釈した際の見かけの溶解度) を示す。Kinetic solubility は、ITZ の 5 mg/mL DMSO 溶液 4 µL を 200 µL の FaSSIF に添加し、析出を取り除いた際の ITZ 濃度より求めた (最終 DMSO 濃度 2%)。Thermodynamic solubility は、ITZ の結晶に FaSSIF または 2% DMSO を含む FaSSIF を添加した際の溶液中の ITZ 濃度より求めた。これらの結果より、ITZ の Kinetic solubility は Thermodynamic solubility より高かった。この理由として、二つの点が考えられる。一点目は、一般的に Kinetic solubility では結晶格子が崩れる過程が無視されるため、Thermodynamic solubility より高い濃度になる点である¹⁶⁾。二点目は、ITZ 自身の過飽和能である。溶出試験機を用いた Kinetic solubility に関する文献¹⁷⁾より、ITZ は析出するまでの時間が長く、過飽和を保ちやすい化合物であることが報告されている。以上のことから、ITZ の Kinetic solubility の特徴として、Thermodynamic solubility より高い濃度で過飽和を保つ点が挙げられる。また、図 4-8 の結果から 2% の DMSO は Thermodynamic solubility に影響しないことを確認した。

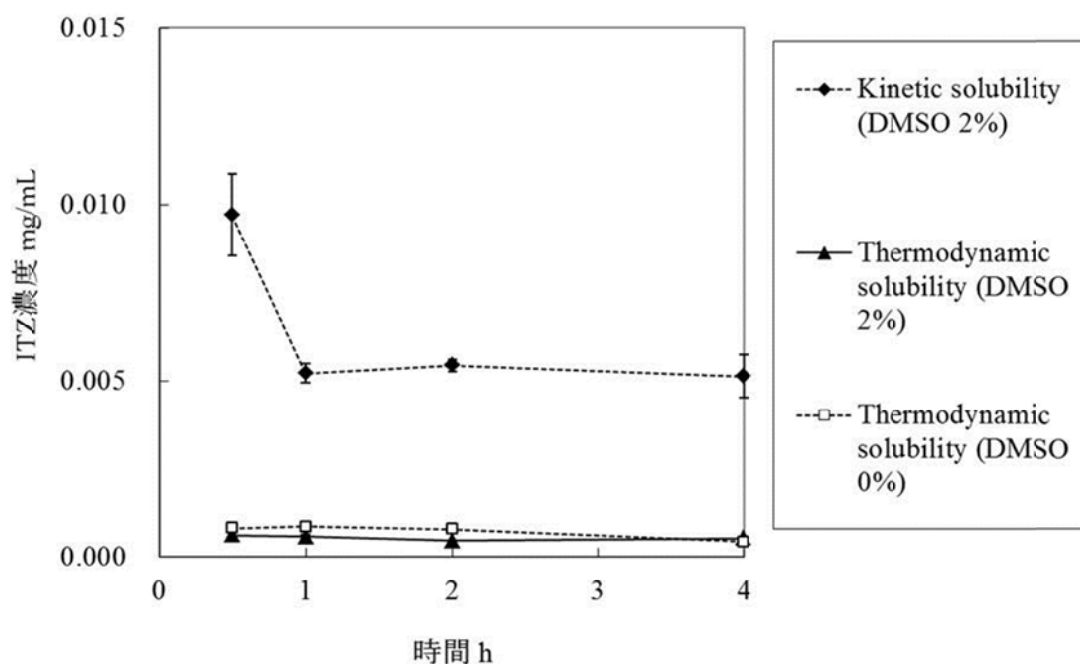


図 4-8 ITZ の FaSSIF 中での Thermodynamic solubility (結晶からの溶解度) および Kinetic solubility (DMSO 溶液を希釈した際の見かけの溶解度)。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。

4-3-2-2 DMSO と FaSSIF を用いたソルベントシフト法による ITZ の沈殿抑制剤スクリーニング

ITZ の FaSSIF 中での析出抑制に効果を発揮する沈殿抑制剤の候補として、物理的および化学的特性の幅広い観点で、ポリマー、界面活性剤、シクロデキストリン、オイル、賦形剤の中から 17 種類の沈殿抑制剤を選択した (図 4-3 A、C~H、O~X)。市販の ITZ 固体分散体制剤 (スポラノックス®、イトリゾール®) で、ITZ と HPMC の比率が 2/3 (w/w) であることから、本スクリーニングにおいても、ITZ と沈殿抑制剤の比率は 2/3

(w/w)を設定した。また、ITZ のエタノールやアセトンなど有機溶媒に対する溶解度が低いため、FaSSIF 中での有機溶媒含量を少なくすることを考え、ITZ を溶かすプレソルベントとして DMSO を選択した。

図 4-9 に、DMSO と FaSSIF を用いた ITZ の沈殿抑制剤スクリーニングの結果を示す。その結果、1～2 時間で、HPMC-AS において、ITZ が最も高い濃度（約 20 $\mu\text{g/mL}$ ）を示した。沈殿抑制剤無しのコントロールとの比較から、17 種類の沈殿抑制剤の中で、HPMC-AS（図 4-3 A）のみが ITZ の沈殿抑制に効果的であることが分かった。溶出試験機を用いた沈殿抑制剤^{12,18)}の研究において、FaSSIF 中で HPMC-AS は HPMC（図 4-3 V）よりも ITZ の析出を抑えるという報告例があり、今回の小スケールでのスクリーニング結果は、この文献の結果と一致するものであった。図 4-9 で、HPMC は結晶よりも高い濃度を示すが、沈殿抑制剤無しのコントロールとほぼ同じ結果であった。この結果より、ITZ は化合物自身が過飽和を保つ（沈殿しにくい）性質を有し、HPMC は ITZ に対する沈殿抑制効果が殆ど無いと示唆される。溶出試験機を用いた ITZ の過飽和に関する研究¹⁷⁾より、ITZ は化合物自身が過飽和能を有することが報告されており、今回の小スケールのスクリーニング結果は、この文献の結果と一致するものと考えられる。HPMC を用いた ITZ の市販固体分散体制剤の開発経緯¹⁴⁾において、HPMC は沈殿抑制の観点ではなく、ITZ の固体状態での物理的安定性維持（アモルファス状態の維持）の観点から選択されたと考えられる。今回、DMSO と FaSSIF を用いたソルベントシフト法のスクリーニング結果より、HPMC-AS のみが FaSSIF 中で ITZ に対する沈殿抑制効果があることが明らかになった。

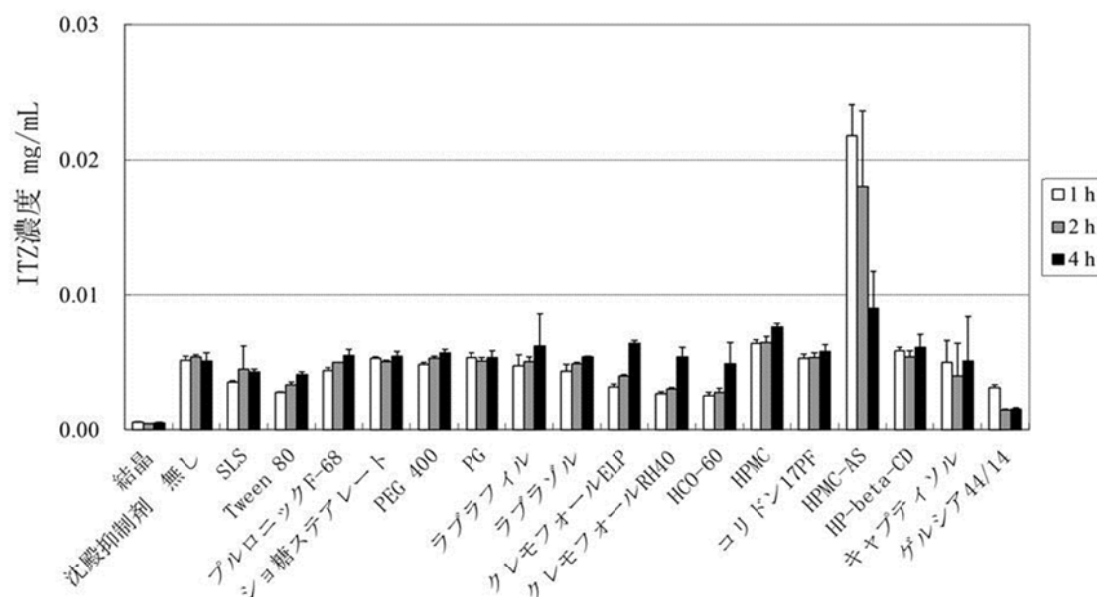


図 4-9 DMSO と FaSSIF を用いたソルベントシフト法による ITZ の沈殿抑制剤スクリーニング。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。沈殿抑制剤は以下のものを用いた；ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、ポリソルベイト 80 (Tween 80)、プルロニック F-68、ショ糖ステアレート S-570、ポリエチレングリコール 400 (PEG 400)、プロピレングリコール (PG)、ラブラフィル M1944、ラブラゾル、クレモフォール ELP、クレモフォール RH40、ポリエチレングリコール硬化ヒマシ油 60 (HCO-60)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、コリドン 17PF、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS)、ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP-beta-CD)、キャプティソル、ゲルシア 44/14。

4-3-2-3 ソルベントエバポレーション法による ITZ の沈殿抑制剤評価

難溶性化合物の沈殿抑制に寄与する沈殿抑制剤を見出すことを目的とし、ソルベントエバポレーション法を用いた沈殿抑制剤スクリーニングの報告例がある^{10,11)}。今回、ソルベントシフト法をソルベントエバポレーション法と比較するために、HPMC と HPMC-AS の ITZ に対する沈殿抑制効果をソルベントエバポレーション法で評価した。初めに、ITZ と沈殿抑制剤を 2/3 (w/w) の比率で、エタノール/アセトン/水 (10/10/1, v/v/v) に溶かした (ITZ 濃度 1 mg/mL、沈殿抑制剤濃度 1.5 mg/mL)。エタノール/アセトン/水 (10/10/1, v/v/v) は章 4-2-2-6 で、固体分散体の調製に使用した溶媒と同じ組成のものを使用した。溶媒を 96 穴プレート対応の遠心エバポレーターで除去し、沈殿物に FaSSIF を添加し、FaSSIF 中の ITZ の濃度を評価した。図 4-10 にソルベントエバポレーション法の結果を示す。2 時間までの結果では HPMC および HPMC-AS を用いた場合、ほぼ同じ ITZ の濃度を示していたが、4 時間の時点では、HPMC-AS を用いた場合、HPMC と比べて、2 倍の ITZ の濃度を示した。一方、ソルベントシフト法では、HPMC-AS を用いた場合、1~2 時間の時点で ITZ は最高の濃度を示した (図 4-9)。ソルベントエバポレーション法では、溶媒を除去する際に、HPMC-AS と ITZ は固形の沈殿物となり、この沈殿物から徐々に ITZ が FaSSIF 中に溶出した。一方、ソルベントシフト法では、ITZ の FaSSIF 中でのシンプルな析出過程をモニターした。以上の結果より、ソルベントシフト法では、ソルベントエバポレーション法に比べて短時間で、シンプルに、沈殿抑制剤として HPMC-AS を見出すことが可能であった。

以前の報告^{10,11)}では、ソルベントエバポレーション法の 2 つの欠点が提起されていた。一点目は、化合物によっては、溶媒を除去する際に沈殿 (結晶化) しやすい点であり、二点目は、アルコールやアセトンなどの揮発性の溶媒に、化合物を溶かさなければなら

ない点であった。しかしながら、ソルベントシフト法では、これら 2 つの欠点は改善された。ソルベントシフト法では、溶媒除去の過程が無いいため、スターティングマテリアルの沈殿（結晶化）の懸念は無い。本法の目的は、簡便（シンプル）および短時間に、難溶性化合物の溶解性向上に寄与できる沈殿抑制剤を見出すことである。この観点から、ソルベントシフト法は、ソルベントエバポレーション法よりも目的に合致した方法といえる。次に、ソルベントシフト法の利点として、揮発性の溶媒に化合物を溶かす必要が無く、ITZ を高濃度で溶かすプレソルベントとして、DMSO を用いている点が挙げられる。ITZ の有機溶媒に対する溶解度として、揮発性溶媒であるアルコールには、極めて溶けにくい（溶解度 0.1~1 mg/mL）ことが知られている¹³⁾。4-3-1 で、難溶性の塩基性化合物のために、SGF を DMSO の代わりに用いたソルベントシフト法も報告したが、ITZ の様に酸性の水溶液に対する溶解度が低い化合物には適用できない（表 4-2）。結果として、難溶性化合物の溶解性改善に適した沈殿抑制剤を、簡便（シンプル）および短時間に見出す観点において、DMSO を用いたソルベントシフト法は最も適した方法であると考えられる。

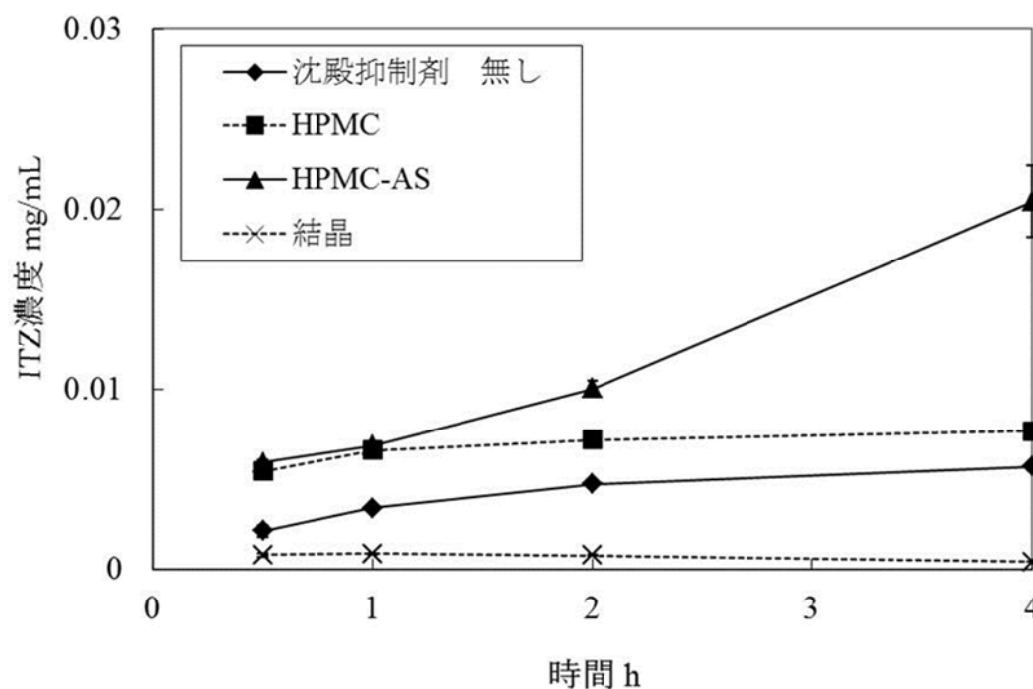


図 4-10 ソルベントエバポレーション法による ITZ の沈殿抑制剤評価。エラーバーは標準偏差を示す ($n = 3$)。沈殿抑制剤は以下のものを用いた；ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS)。

4-3-2-4 ソルベントシフト法と ITZ の固体分散体の溶出比較

96 穴プレートを用いたソルベントシフト法の結果を大スケールの溶出試験法と比較するため、ITZ の固体分散体の溶出試験を行った。FaSSIF が入った溶出試験機内に ITZ のフリー体結晶、イトリゾール® (ITZ の市販固体分散体制剤 ITZ/HPMC, 2/3, w/w)、固体分散体 (ITZ/HPMC, 2/3, w/w)、固体分散体 (ITZ/HPMC-AS, 2/3, w/w) を投入し、パドルで攪拌し、FaSSIF 中に溶出した ITZ の濃度を測定した。図 4-11 の結果より、2

～4 時間の時点で、HPMC-AS を用いた固体分散体は、HPMC を用いた固体分散体やイトリゾール®よりも高い ITZ の濃度を示した。この結果から、大スケールの溶出試験においても、HPMC-AS が HPMC よりも高い沈殿抑制効果を示したことが分かった。溶出試験において HPMC-AS を用いた固体分散体 (ITZ) の最大濃度は約 0.004 mg/mL であったのに対し (図 4-11)、96 穴プレートで HPMC-AS を使用した際の ITZ の最大濃度は約 0.02 mg/mL であった (図 4-9、図 4-10)。溶出試験の濃度がソルベントシフト法より低い要因として、溶出試験で用いた固体分散体はロータリーエバポレーターを用い徐々に溶媒を蒸発させ調製しているため、調製時に粉末 X 線で検出できないレベルの結晶の核ができている可能性が考えられる。また、その他の要因として、溶出試験のパドル攪拌と 96 穴プレートの振とうでは、ITZ の結晶核の形成や成長の様式が異なる可能性が考えられる。

溶出試験において、HPMC-AS と HPMC の固体分散体を同条件で比較した結果、HPMC-AS のほうが ITZ の濃度維持に効果的であった (図 4-11)。特に HPMC-AS を用いた固体分散体は、HPMC を用いた市販固体分散体制剤であるイトリゾールよりも高い濃度を維持した。このことから、FaSSIF 中において、HPMC-AS は HPMC よりも ITZ の濃度維持に効果的であった。この結果は、96 穴プレートを用いたソルベントシフト法の結果と一致しており、ソルベントシフト法では、一般的な溶出試験機よりも少ない検体量、高いスループットで効率的に HPMC-AS を見出すことができた。

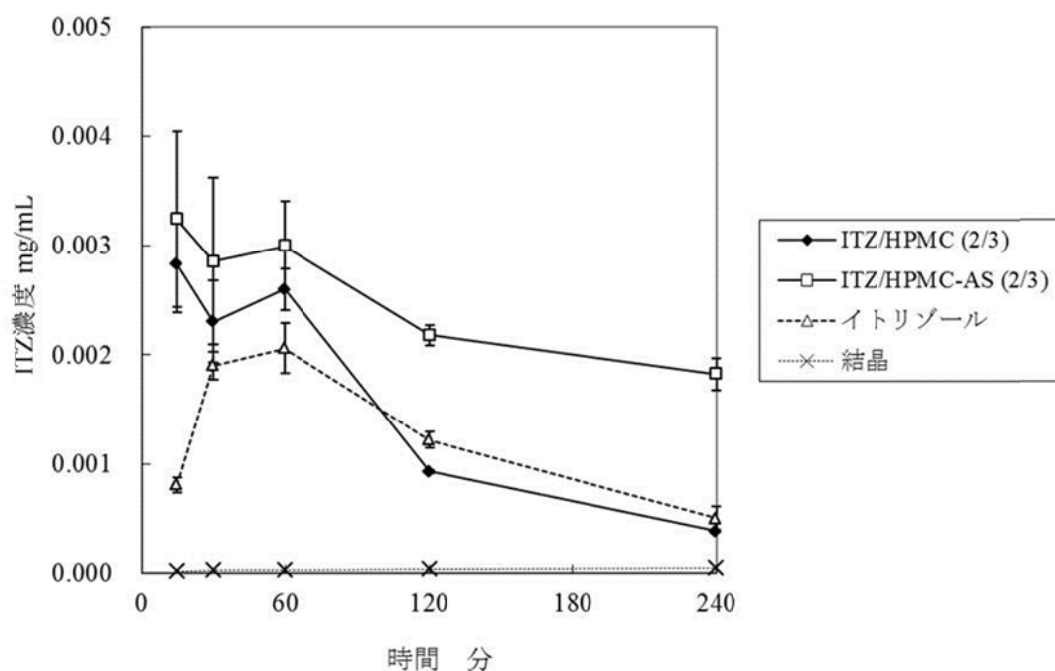


図 4-11 溶出試験機による ITZ の沈殿抑制剤評価。エラーバーは標準偏差を示す (n = 3)。ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート (HPMC-AS)。

4-3-3 製剤戦略における沈殿抑制剤スクリーニングの有用性

図 4-12 に開発ステージにおける創薬の流れを示す。探索ステージにおいて見出された開発候補品は、前臨床試験において動物での安全性を確認後、臨床試験へと進む。臨床試験には三つの相があり、第Ⅰ相では健常人での安全性を確認する。第Ⅱ相では小規模の患者群で有効性・安全性を確認し、第Ⅲ相では大規模の患者群で有効性・安全性を確認する。開発候補品の溶解性が低い場合、その改善策として可溶化剤等の製剤的工夫で溶解性を向上する方法が挙げられる。しかしながら、製剤化検討や溶出試験には、多

くの化合物量が必要となり、大量合成法が確立されていない開発初期（前臨床試験～第Ⅰ相臨床試験）には十分な製剤化検討を行うことができないという課題がある。本章で開発したソルベントシフト法を用いた沈殿抑制剤スクリーニング法は、少ない検体量でスループット高く評価できることから、開発初期における製剤設計に有用な方法だと考えられる。特に、開発初期に効率的に、溶解度向上に寄与できる添加剤を見出すことができれば、その後の製剤開発を効率よく進めることができると期待される。

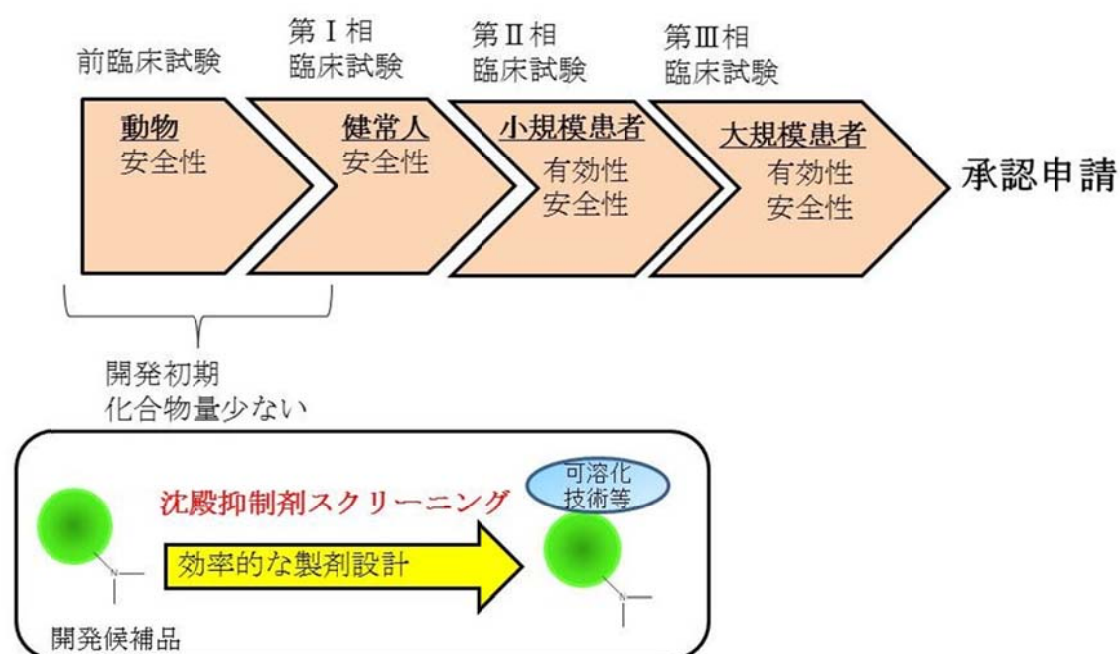


図 4-12 開発ステージにおける沈殿抑制剤スクリーニングの活用。

4-4 結言

難溶性化合物の沈殿抑制剤評価には、一般的に大スケールの溶出試験機が使用されている²⁻⁵⁾。しかし、その欠点として、スループットが低いことから、短時間に網羅的に効果のある沈殿抑制剤をスクリーニングすることは難しい。2008 年にスループット高く沈殿抑制剤をスクリーニングする方法として、96 穴プレートを用いた溶溶剤エバポレーション法が報告された^{10,11)}。しかし同時に、この方法の欠点として、エバポレーション時の結晶化の点、および揮発性の溶媒に化合物を高濃度で溶かさなければならない点が報告され、適用できる化合物に制限があった。よって、より簡便で汎用性のある方法が求められていた。

本章では、溶溶剤エバポレーション法の欠点を回避し、短時間で簡便・シンプルに沈殿抑制剤スクリーニングする方法として、溶溶剤シフト法の開発を試みた。4-3-1 において、塩基性化合物の沈殿抑制評価のために、胃 (SGF) から腸 (FaSSIF) への析出過程を模倣した溶溶剤シフト法を検討し、そこから得られた結果が大スケールの溶出試験法とよく相関することが分かった。

4-3-1 において、SGF と FaSSIF を用いた溶溶剤シフト法を報告したが、ITZ の様に酸性溶液 (SGF) で高濃度に溶解しない化合物に、この方法は適用できなかった。それゆえ 4-3-2 において、ITZ の様な難溶性化合物の沈殿抑制剤評価に適用できる汎用性のある方法として、DMSO と FaSSIF を用いた溶溶剤シフト法を開発することを試みた。その結果、ITZ の沈殿抑制剤として HPMC-AS を見出すことができ、その結果は溶溶剤エバポレーション法および大スケールの溶出試験法と一致するものであった。また、溶溶剤シフト法は、溶溶剤エバポレーション法の 2 つの欠点を解決し、より簡便・シンプルに短時間で沈殿抑制剤を見出すことができた。

また、学術的な観点では、ソルベントシフト法の様に、高濃度の化合物溶液を FaSSIF で希釈し、その沈殿過程において、ハイスループットで沈殿抑制剤をスクリーニングした報告例は無かった。よって、既法（溶出試験法・ソルベントエバポレーション法）の欠点を解決し、より簡便・シンプルに短時間で沈殿抑制剤を見出すことができるソルベントシフト法は新規性のある方法である。今後、ソルベントシフト法により、さらに効率的に効果的な沈殿抑制剤を見出す戦略が立ち、溶解性改善の課題解決に役立つと期待される。

過去の文献^{12,18)}において、HPMC-AS が ITZ の析出を抑制する報告がある。しかし、この文献では、析出抑制の事象のみ報告されており、そのメカニズムに関しては不明な点が多く、HPMC-AS が結晶の核化抑制や成長抑制に寄与していると考えられている。今回、ソルベントシフト法によって、構造・化学的特性・物理的特性の多様性から 17 種の沈殿抑制剤の ITZ に対する効果を調べた結果、HPMC-AS のみが沈殿抑制効果を示した（図 4-9）。このことから、HPMC-AS の構造や化学的・物理的性質が、ITZ の析出抑制に寄与していることが示唆される。今後、本法により、多種の化合物と、それに効果のある沈殿抑制剤の関係性が明らかにできるため、さらなる析出抑制のメカニズム解明が進むと考えられる。

第 4 章 参考文献

- (1) Brouwers, J.; Brewster, M. E.; Augustinijns, P. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2549-2572.
- (2) Gao, P.; Rush, B. D.; Pfund, W. P.; Huang, T.; Bauer, J. M.; Morozowich, W.; Kuo, M.; Hageman, M. J. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2386-2398.
- (3) Gao, P.; Guyton, M. E.; Huang, T.; Bauer, J. M.; Stefanski, K. J.; Lu, Q. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2004**, *30*, 221-229.
- (4) Kushida, I.; Ichikawa, M.; Asakawa, N. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 258-266.
- (5) Yamashita, K.; Nakate, T.; Okimoto, K.; Ohike, A.; Tokunaga, Y.; Ibuki, R.; Higaki, K.; Kimura, T. *Int. J. Pharm.* **2003**, *267*, 79-91.
- (6) Odeberg, J. M.; Kaufmann, P.; Kroon, K. G.; Hoglund, P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 375-382.
- (7) Galia, E.; Nicolaidis, E.; Horter, D.; Lobenberg, R.; Reppas, C.; Dressman, J. B. *Pharm. Res.* **1998**, *15*, 698-705.
- (8) Erez de la Cruz Moreno, M.; Oth, M.; Deferme, S.; Lammert, F.; Tack, J.; Dressman, J. B.; Augustijns, P. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1079-1089.
- (9) Lardia-Arana, D.; Kristensen, H. G.; Mullertz, A. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *95*, 248-255.
- (10) Shanbhag, A.; Rabel, S.; Nauka, E.; Casadevall, G.; Shivanand, P.; Eichenbaum, G.; Mansky, P. *Int. J. Pharm.* **2008**, *351*, 209-218.
- (11) Dai, W. G.; Pollock-Dove, C.; Dong, L. C.; Li, S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 657-672.
- (12) Van Speybroeck, M.; Mols, R.; Mellaerts, R.; Thi, T. D.; Martens, J. A.; Van

Humbeeck, J.; Annaert, P.; Van den Mooter, G.; Augustijns, P. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *75*, 354-365.

(13) Interview form of Sporanox[®], Janssen Co. Ltd.

(14) Verreck, G.; Six, K.; Van den Mooter, G.; Baert, L.; Peeters, J.; Brewster, M. E. *Int. J. Pharm.* **2003**, *251*, 165–174.

(15) Six, K.; Daems, T.; Hoon, J. D.; Van Hecken, A.; Depre, M.; Bouche, M. P.; Prinsen, P.; Verreckd, G.; Peeters, J.; Brewster, M. E.; Van den Mooter, G. *Euro. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24*, 179-186.

(16) Bard, B.; Martel, S.; Carrupt, P. A. *Euro. J. Pharm. Sci.* **2008**, *33*, 230-240.

(17) Bevernage, J.; Brouwers, J.; Clarysse, S.; Vertzoni, M.; Tack, J.; Annaert, P.; Augustijns, P. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 4525-4534.

(18) DiNunzio, J. C.; Hughey, J. R.; Brough, C.; Miller, D. A.; Williams III, R. O.; McGinity, J. W. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2010**, *36*, 1064-1078.

第 5 章

物性スクリーニングにおける UPLC-MS を用いた定量の高速化

5-1 緒言

効率的に難溶性化合物の課題を解決するために、 $\log D$ スクリーニング法、および沈殿抑制剤スクリーニング法を開発し、スループットを向上させる検討を行ってきた。しかし、前章までに 96 穴プレート等を用いて、サンプル調製や前処理のスループットを向上させたが、定量に関しては HPLC を用いた一般的な測定法を用いていたため、本研究の目的であるスループットの高いシステムを構築する上で改善の余地があった。

近年、 $1.7\ \mu\text{m}$ の小さいシリカゲル充填剤を用いた UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) が、HPLC よりも短時間で高分解能の分析ができることから注目されている¹⁻⁶⁾。一般的に、van Deemter Curve の理論曲線より、 $1.7\ \mu\text{m}$ の充填剤では、線速度 (流速/カラムの断面積) を上昇させても、理論段高さは小さく、カラムの性能が良いことが知られている。しかし、従来の HPLC では、 $1.7\ \mu\text{m}$ の充填剤で流速を上げることはシステムの耐圧上、難しかった。それに対し、UPLC ではシステムの耐圧が向上し、短時間で高分解能の分析が可能となった。そして、UPLC を利用し、創薬の品質評価分野^{1,2)}や薬物動態分野^{3,4)}においてスループットを向上させた報告例も増えつつある。しかし、低分子創薬の物性分野において、UPLC-MS を利用した報告例や、UPLC と HPLC を比較検証した報告は、まだ無い。

本章では、物性スクリーニングにおける定量のスループット向上を目的とし、UPLC-MS を溶解性試験に導入することを検討した。溶解度には、Thermodynamic solubility (結晶からの溶解度)、Kinetic solubility (DMSO 溶液からの見かけの溶解度)

の 2 種があるが、本章では、溶解性スクリーニングで一般的に使われている Kinetic solubility 評価に UPLC-MS を用い、一般的な HPLC-UV との比較検討を行った。

5-2 実験操作

5-2-1 試薬

ウラシル、クロルプロマジン、クロザピン、イミプラミン、ビホナゾール、ジルチアゼム、エストラジオールは、Sigma Aldrich 社より購入した (図 5-1)。

ジメチルスルホキシド (DMSO) は、DOJINDO 社の UV スペクトルグレードを使用した。ギ酸 (HPLC グレード) およびリン酸 (HPLC グレード) は和光純薬社より入手した。アセトニトリル (HPLC グレード)、リン酸水素二カリウム (試薬特級)、リン酸二水素カリウム (試薬特級)、濃塩酸 (試薬特級)、水酸化ナトリウム (試薬特級)、塩化ナトリウム (試薬特級) は、純正化学社より購入した。水は MilliQ Gradient A 10 システム (Millipore 社) で精製したものをを使用した。

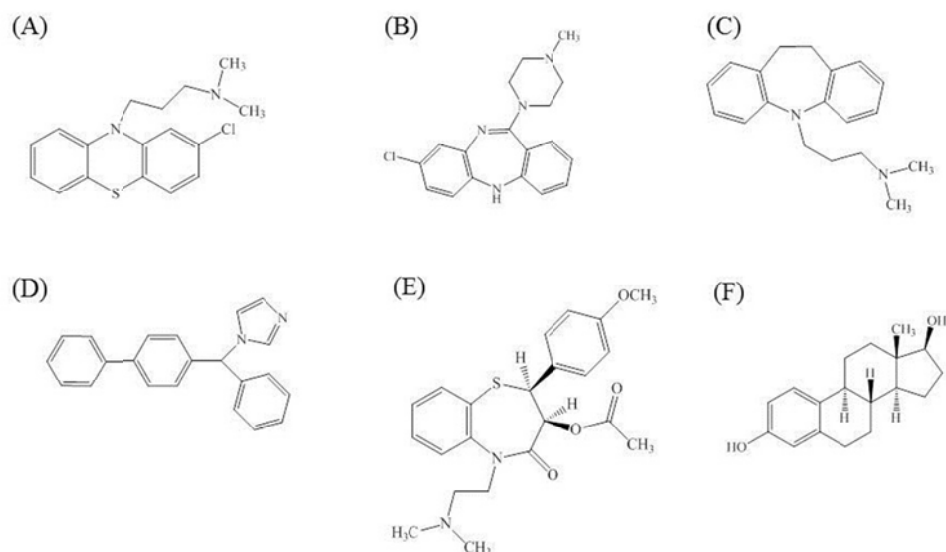


図 5-1 検討に用いた市販医薬品の構造。(A) クロルプロマジン、(B) クロザピン、(C) イミプラミン、(D) ビホナゾール、(E) ジルチアゼム、(F) エストラジオール。

5-2-2 メディアの調製

酸性水溶液である日本薬局方 1 液 (JP1, pH1.2) は、局方の調製方法 7 に従い、以下の成分で調製した; 35 mM 塩化ナトリウム、84 mM 塩酸水溶液。この水溶液の pH は約 1.2 であった。

中性水溶液である日本薬局方 2 液 (JP2, pH6.8) は、局方の調製方法 7 に従い、以下の成分で調製した; 50 mM リン酸二水素カリウム、24 mM 水酸化ナトリウム水溶液。この水溶液の pH は約 6.8 であった。

緩衝液 (pH7.4) は、200 mM リン酸二水素カリウムおよび 200 mM リン酸水素二カリウムを混合し、pH メーター (Seven Multi pH meter、Mettler Toledo 社) にて pH7.4 に調製した。

5-2-3 HPLC-UV 条件

HPLC-UV は Agilent 社の 1100 システムを使用した。HPLC は以下のユニットによって構成されている; バイナリーポンプ、96 穴プレート対応オートサンプラー、カラムヒーター、ダイオードアレイ検出器、ソフト Chem Station ver 9.03。カラムとして Capcelpak MG C18 (4.6 × 50 mm、粒子径 3 μm、資生堂社) を用い、カラムは 40°C で使用した。移動相として、A 溶媒：水/リン酸 (1000/1, v/v)、B 溶媒：アセトニトリルを使用した。ポンプの流速は 1.0 mL/min に設定し、以下のグラジエントモードを使用した：0 min、移動相 B 5%; 4.0 min、移動相 B 90%; 4.1 min、移動相 B 5%; 6.0 min、移動相 B 5%。ダイオードアレイ検出器は、UV 210, 260, 300 nm に設定し、検体の UV 強度に応じて使い分けた。オートサンプラーの注入量は 5 μL に設定した。

5-2-4 UPLC-MS 条件

UPLC-MS は Waters 社の Acquity システムを使用した。UPLC-MS は以下のユニットによって構成されている; バイナリーポンプ、96 穴プレート対応オートサンプラー、サンプルオーガナイザー、カラムヒーター、MS 検出器 (ZQ2000、Waters 社)、ソフト (Masslynx Quanlynx ver 4.0、Waters 社)。カラムとして BEH C18 (2.1 × 50 mm、粒子径 1.7 μm、Waters 社) を用い、40°C で使用した。移動相として、A 溶媒：水/ギ酸 (1000/1, v/v)、B 溶媒：アセトニトリルを使用した。ポンプの流速は 0.8 mL/min に設定し、以下のグラジエントモードを使用した：0 min、移動相 B 5%; 1.0 min、移動相 B 90%; 1.1 min、移動相 B 5%; 2 min、移動相 B 5%。流路はカラム出口と MS 検出器の間で分岐し、MS 検出器へ 0.3 mL/min、廃液へ 0.5 mL/min の流速で送液した。オートサンプラーの注入量は 5 μL に設定した。

MS 検出器は四重極のものを使用し、イオン化は ESI モード (electrospray ionization) を用いた。エストラジオールはネガティブモードで、それ以外の化合物はポジティブモードで測定した。イオンソース条件を以下に示す; キャピラリー電圧 3.5 kV (ポジティブモード), 3.0 kV (ネガティブモード)、ソース温度 130°C、脱溶媒温度 350°C。コーンガスとして窒素 50 L/h、脱溶媒ガスとして窒素 500 L/h を使用した。化合物の分析は SIM (selected ion monitoring) モード、ドウェルタイム 0.10 s で行った。

5-2-5 DMSO ストック溶液を用いた溶解性試験

化合物を DMSO に溶かし、10 mM ストック溶液を調製した。10 mM ストック溶液 10 μ L を 96 穴プレート (31 mm ディープウェルプレート、ポリプロピレン、シリコンキャップ、Agilent 社) に分注した。次に電動 8 連ピペット (Biohit eLINE、Biohit 社) を用い 490 μ L のメディアを各ウェルに加え、溶解性試験を開始した (溶解性試験の上限値; 200 μ M)。シェーカー (Taitec M36、Taitec 社) を用いて、25°C で 1 時間、振とうした。1 時間の振とう後、Millipore 社のフィルター (MultiScreen HTS Solubility 0.45 μ m filter plate) にサンプルを分注し、遠心分離 (2000 rpm、5 分間、Himac CF-8DL、日立社) により、沈殿を取り除いた。アセトニトリル/水 (5/5, v/v) を用い、ろ液を 2 倍または 100 倍希釈した。ろ液を 2 倍希釈したサンプルは HPLC-UV にて分析し、100 倍希釈したサンプルは UPLC-MS にて分析した。ただし、エストラジオールは 2 倍希釈したサンプルを HPLC-UV および UPLC-MS で分析した。

検量線サンプルとして、10 mM DMSO ストック溶液をアセトニトリル/水 (5/5, v/v) を用いて希釈し、0.02、0.2、2、20、200 μ M の化合物溶液を調製した。0.02、0.2、2 μ M の溶液は UPLC-MS にて分析し、2、20、200 μ M の溶液は HPLC-UV にて分析し、ピーク面積から検量線を作成した。ただし、エストラジオールでは、2、20、200 μ M の

溶液を UPLC-MS および HPLC-UV にて分析した。検量線を用いて、各メディアのろ液中の化合物濃度を算出し、これを Kinetic solubility (DMSO ストック溶液からの見かけの溶解度) とした。

5-3 結果と考察

5-3-1 溶解性試験における UPLC-MS のパフォーマンス

図 5-2 に、ウラシルおよびクロルプロマジン を UPLC-MS および HPLC-UV で分析した際のクロマトグラムを示す。UPLC-MS の短時間の分析においても、クロルプロマジンのピーク形状は定量分析に適した良好なものであった。C18 カラムに保持しにくいウラシルはデッドボリューム (システム内の配管の体積) を測る指標として分析した。デッドボリュームは次の式を用いて算出した。デッドボリューム = ウラシルの保持時間 $\times$ 流速。その結果、UPLC-MS および HPLC-UV のデッドボリュームは、それぞれ 180 μ L および 730 μ L であった。UPLC-MS のデッドボリュームが、HPLC-UV と比較し 1/4 以下であったことから、分析時におけるカラム平衡化時間を短縮することが可能となった。

MS 検出器の導入も分析時間の短縮を可能とした。特に、合成ルートが確立していない探索初期ステージのロットには、不純物が含まれることがよくある。HPLC-UV では不純物ピークを分離するために、より長い分析時間が必要とされる。しかし、MS 検出器の導入により、SIM (selected ion monitoring) モードを用い化合物のイオンのみモニターすれば、不純物の影響を受けないため、より短時間の分析が可能となった。また、データ解析時においても不純物ピークの影響が無いため、データの自動解析が可能となり、スループットの向上が可能となった。

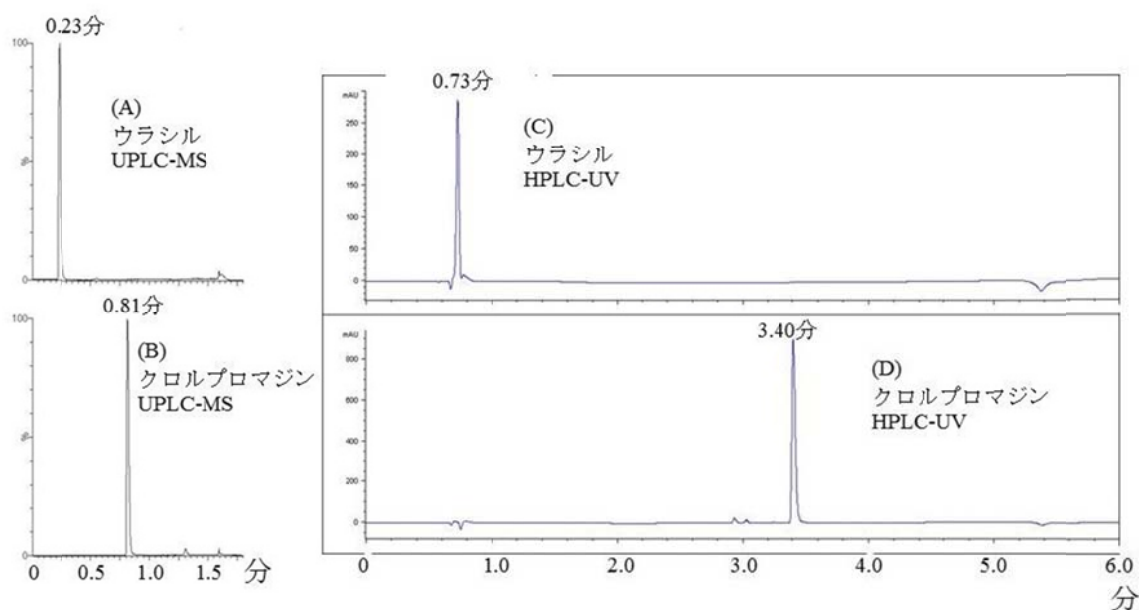


図 5-2 (A, B) UPLC-MS および (C, D) HPLC-UV で分析した際のウラシルおよびクロルプロマジンのクロマトグラム。

5-3-2 UPLC-MS および HPLC-UV を用いた溶解性試験の定量に関する比較

溶解性試験において UPLC-MS の定量結果を検証するために、UPLC-MS と HPLC-UV の比較を行った。UPLC-MS は計 2 分の分析条件（グラジエント分析 1 分、カラム平衡化および注入動作 1 分）、HPLC-UV は計 6 分の分析条件（グラジエント分析 4 分、カラム平衡化および注入動作 2 分）で検討を行った。表 5-1 に UPLC-MS で検量線サンプルを分析した際の各濃度における相対標準偏差（バラつき）および検量線の直線性 (R^2) を示した。その結果、各点の相対標準偏差は 5% 以内、 R^2 は 0.99 以上であり、物性スクリーニングの定量に十分適用できる値であった。Kinetic solubility を UPLC-MS および HPLC-UV で定量した結果を表 5-2 に示す。図 5-3 において、両方の結果は良く一致し、良い相関が見られた ($R^2 = 0.9969$)。結果として、UPLC-MS

により、HPLC・UV と比較し、物性スクリーニングの定量のスループットを 3 倍向上させることに成功した。

表 5-1 UPLC-MS で分析した際の検量線の各点における相対標準偏差（バラつき）および直線性（ R^2 ）

化合物	ピーク面積の相対標準偏差（%, n = 3）					R^2	検量線範囲（ μM ）
	0.02 μM	0.2 μM	2 μM	20 μM	200 μM		
クロルプロマジン	4.4%	4.8%	4.2%			0.9999	0.02-2
クロザピン	4.1%	3.4%	2.7%			0.9992	0.02-2
イミプラミン	1.8%	0.7%	1.3%			0.9994	0.02-2
ビホナゾール	4.9%	1.6%	2.0%			0.9991	0.02-2
ジルチアゼム	2.3%	0.5%	1.7%			0.9972	0.02-2
エストラジオール			4.8%	3.9%	0.6%	0.9987	2-200

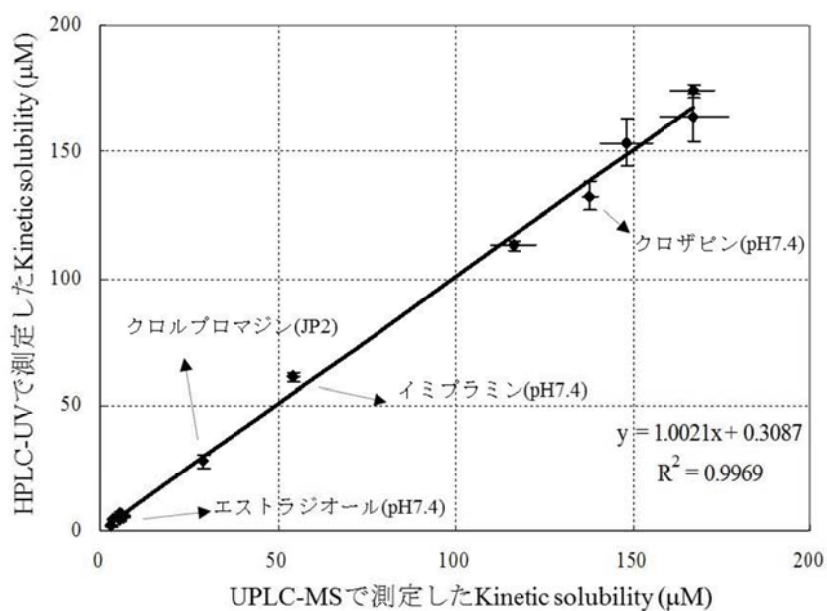


図 5-3 UPLC-MS および HPLC-UV にて定量した際の Kinetic solubility（DMSO ストックからの見かけの溶解度）の関係。エラーバーは標準偏差（n = 3）を示す。

表 5-2 UPLC-MS および HPLC-UV にて定量した際の Kinetic solubility (DMSO ストックからの見かけの溶解度)。

化合物	メディア	UPLC-MS で測定した Kinetic solubility (μM , n = 3)		HPLC-UV で測定した Kinetic solubility (μM , n = 3)	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
クロルプロマジン	JP2, pH6.8	28.7	1.7	27.6	2.6
	pH7.4 緩衝液	3.3	0.4	4.7	0.2
クロザピン	JP2, pH6.8	167.0	6.1	174.3	2.7
	pH7.4 緩衝液	148.4	7.5	153.6	9.8
	水	137.8	2.2	132.4	5.6
イミプラミン	JP2, pH6.8	116.5	6.4	112.9	1.9
	pH7.4 緩衝液	54.5	1.6	60.9	1.7
ビホナゾール	水	3.1	0.6	2.1	0.3
ジルチアゼム	pH7.4 緩衝液	167.3	9.6	163.4	9.3
エストラジオール	JP1, pH1.2	5.3	1.4	6.7	0.8
	JP2, pH6.8	6.3	0.7	5.6	0.5
	pH7.4 緩衝液	5.3	0.2	4.8	0.7
	水	6.1	0.3	6.5	0.6

5-4 結言

本章では、物性スクリーニングにおける定量のスループット向上を目的とし、Kinetic solubility 評価において、UPLC-MS と HPLC-UV の比較検討を行った。分析時間 2 分の UPLC-MS と分析時間 6 分の HPLC-UV を比較した結果、両法で測定した Kinetic solubility は一致し、良い相関が見られた。よって、UPLC-MS の導入により、従来の HPLC-UV と比較し、定量のスループットを 3 倍向上させることに成功した。

また、学術的な観点では、UPLC を利用し、創薬の品質評価分野や薬物動態分野においてスループットを向上させた報告例はあるが、低分子創薬の物性分野において、UPLC-MS を利用した報告や、UPLC と HPLC を比較した報告は無かった。本検討を

通じ、低分子医薬品の溶解性試験において、UPLC-MS が定量のスループット向上に有効であることが初めて示された。

効率的に難溶性化合物の課題を解決するために、第 2、3 章では $\log D$ スクリーニング法、第 4 章では沈殿抑制剤スクリーニング法を開発し、サンプル調製や前処理におけるスループットの向上を行ってきた。その際に、第 2 章では HPLC-MS、第 3 章では HPLC-UV、第 4 章では HPLC-UV を定量に用いた。本章において、UPLC-MS により定量のスループット向上が可能であることが分かったため、今後、UPLC-MS の導入により、さらに $\log D$ や沈殿抑制剤スクリーニングのスループットが向上し、より効率的な難溶性化合物の評価ができると期待される。

第 5 章 参考文献

- (1) Novakova, L.; Matysova, L.; Solich, P. *Talanta* **2006**, *68*, 908-918.
- (2) Wren, S.; Tchelitcheff, P. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1119*, 140-146.
- (3) Mensch, J.; Noppe, M.; Adriaensen, J.; Melis, A.; Mackie, C.; Augustijns, P.; Brewster, M. *J. Chromatogr., B* **2007**, *847*, 182-187.
- (4) Castro-Perez, J.; Plumb, R.; Granger, J. H.; Beattie, I.; Joncour, K.; Wright, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 843-848.
- (5) Wyttenbach, N.; Alsenz, J.; Grassmann, O. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 888-898.
- (6) Alsenz, J.; Meister, E.; Haenel, E. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 1748-1762.
- (7) 日本薬局方 第 16 版

第 6 章

結論

6-1 本研究の総括

本研究では、難溶性および高脂溶性という物性面の課題を効率的に解決するために、探索ステージの合成展開で有用な $\log D$ スクリーニングシステム、および開発ステージの製剤設計で有用な沈殿抑制剤スクリーニングシステムを開発することを目的し、検討を行った。

第 2 章および第 3 章では、 $\log D$ をスループット高く測定できるシステムの開発を試みた。システムのスループットを上げるためには、96 穴プレートを用いたミニチュア化が必要であるが、その際の課題としてオクタノール相のコンタミネーションがあった。高脂溶性化合物では、上相（オクタノール相）の薬物濃度は、下相（水相）より高くなるため、水相採取時にオクタノールがコンタミネーションすることは測定結果に大きな影響を与えた。特に、ミニチュア化で液量を減らすことにより、ハンドリングの観点から、コンタミネーションは起こりやすいと考えられた。過去、96 穴プレートを用いた前処理法で、オクタノールのコンタミネーションを回避した報告例は無く、コンタミネーションの回避を可能とする方法が必要であった。

第 2 章では、水がオクタノールを弾く性質を利用したウォータープラグ法の開発を試みた。モデル化合物として高脂溶性化合物ビホナゾールを用いて検討した。その結果、水相を採取するシリンジに予め水（ウォータープラグ）を吸引することにより、ウォータープラグがオクタノールを弾き、コンタミネーションを防ぐことを実証できた。また、市販医薬品の検討結果より、ウォータープラグ法から得た $\log D_{7.4}$ と文献値は、 $\log D_{7.4} =$

0～5 の範囲で一致し、本法は幅広い $\log D$ の範囲において有用であった。

第 3 章では、第 2 章のウォータープラグ法とは異なるアプローチである水相凍結法を用いてオクタノールのコンタミネーションを防ぐことを検討した。高脂溶性化合物ケトコナゾールをモデル化合物として検討した結果、凍結した水相表面を適切に洗浄することがオクタノール相の除去に効果的であることを明らかにした。そして、水相凍結法の結果は $\log D_{7.4} = 0 \sim 4$ の範囲で文献値と一致し、本法は幅広い $\log D$ の範囲において有用であった。

また、学術的には、少サンプルにおける $\log D$ 評価で、オクタノールのコンタミネーションを回避した方法および、そのコンタミネーション回避に関するメカニズムに焦点をあてた報告例は無かった。よって、水がオクタノールを弾くメカニズムを利用したウォータープラグ法および、水相を凍結させるメカニズムを利用した水相凍結法は、オクタノールのコンタミネーションを回避し、スループット向上に成功した新規性のある方法である。

第 4 章では、沈殿抑制剤スクリーニングシステムの開発を試みた。沈殿抑制剤の評価には、一般的に溶出試験機を用いた評価法が使われているがスループットが低いという欠点があった。近年、96 穴プレートを用いた溶剤エバポレーション法によりスループットを上げた方法が報告されたが、同時に、エバポレーション時の化合物の結晶化や、揮発性有機溶媒に化合物を溶かさなければならないという欠点も報告された。よって、溶剤エバポレーション法では適用できる化合物に制限があったため、より簡便で汎用性のある方法が求められていた。第 4 章では、溶剤エバポレーション法の欠点を解決する方法として、溶剤シフト法を用いた沈殿抑制剤スクリーニング法の開発を試みた。イトラコナゾール (ITZ) をモデル化合物とし、DMSO と FaSSIF を用いた溶剤シフト法を、既報の溶剤エバポレーション法や溶出試験法と比較検討した。溶剤シフト法の結果、ITZ の沈殿抑制剤として HPMC-AS を見

出すことができ、その結果は溶溶剤エバポレーション法および大スケールの溶出試験法と一致するものであった。よって、溶溶剤エバポレーション法の 2 つの欠点を解決し、より簡便・シンプルに短時間で沈殿抑制剤を見出すことができる汎用性のある方法の開発に成功した。

また、学術的な観点では、溶溶剤シフト法の様に、高濃度の化合物溶液を FaSSIF で希釈し、その沈殿過程において、ハイスループットで沈殿抑制剤をスクリーニングした報告例は無かった。よって、既法（溶出試験法・溶溶剤エバポレーション法）の欠点を解決し、より簡便・シンプルに短時間で沈殿抑制剤を見出すことができる溶溶剤シフト法は新規性のある方法である。

第 5 章では UPLC-MS を用いた定量法的高速化を試みた。第 2～第 4 章では、主に 96 穴プレートを用いサンプルの前処理法のスループット向上を検討したが、それらの定量には一般的な HPLC を用いた。そのため、本研究の目的であるスループットの高いシステムを構築する上で、定量のスループットを上げる必要があった。第 5 章では、物性スクリーニングの定量法のスループットを上げることを目的とし、Kinetic solubility 試験に UPLC-MS を導入し、一般的な HPLC-UV との比較検討を行った。分析時間 2 分の UPLC-MS と分析時間 6 分の HPLC-UV を比較した結果、両法で測定した Kinetic solubility は一致し、良い相関が見られた。よって、UPLC-MS の導入により、従来の HPLC-UV と比較し、定量のスループットを 3 倍向上させることに成功した。

また、学術的な観点では、UPLC を利用し、創薬の品質評価分野や薬物動態分野においてスループットを向上させた報告例はあるが、低分子創薬の物性分野において UPLC-MS を利用した報告や、UPLC と HPLC を比較検討した報告は無かった。本検討を通じ、低分子医薬品の溶解性試験において、UPLC-MS が定量のスループット向上に有用であることが初めて示された。

本研究では、難溶性および高脂溶性という物性面の課題を効率的に解決するために、 $\log D$ スクリーニングシステムおよび沈殿抑制剤スクリーニングシステムを開発することを目的とし検討を行った。その成果として、 $\log D$ スクリーニングの前処理法としてウォータープラグ法および水相凍結法を開発し、沈殿抑制剤スクリーニングの前処理法として溶溶剤シフト法を開発できた。さらに、定量法のスループット向上として UPLC-MS の可能性を検討し、物性スクリーニングにおける定量の高速化の有用性を示した。

6-2 今後の展望

本研究では、難溶性および高脂溶性という物性面の課題を効率的に解決するために、探索ステージの合成展開で有用な $\log D$ スクリーニングシステム、および開発ステージの製剤設計で有用な沈殿抑制剤スクリーニングシステムを開発した。各システムに関して今後の展望を述べる。

今後、 $\log D$ スクリーニングに関しては、物性値および構造に関するデータを如何に合成展開に利用するかが重要だと考える。物性面の課題解決のために $\log D$ の重要性は広く認知されているが、今までオクタノールのコンタミネーションの影響からスループットの高い $\log D$ の評価が難しかった。そのため、スクリーニングから得られた $\log D$ や構造に関する多くの情報を合成展開に活用した報告例は、まだ少ない。少ない例の一つとして、万有製薬つくば研究所の糖尿病プロジェクトにおいて、ウォータープラグ法による $\log D_{7.4}$ を合成展開の指標に使用した例を示す¹⁾(図 6-1)。この例では、 $\log D_{7.4} > 5$ のリード化合物から、 $\log D_{7.4} = 2.7$ の開発候補品を見出すことに成功した。今後、様々なプロジェクトにおいて $\log D$ を指標とした合成展開を行い、 $\log D$ と構造群の相関情報をデータベースに蓄積することにより、さらに効率的に合成展開をすることが期待でき

る (図 6-2)。

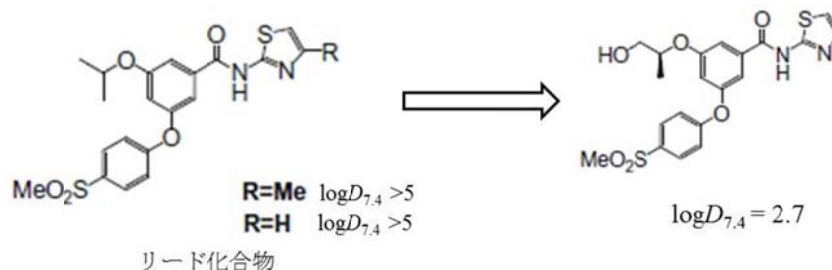


図 6-1 糖尿病プロジェクトにおいて、ウォータープラグ法により得られた $\log D_{7.4}$ を合成展開に使用した例¹⁾。

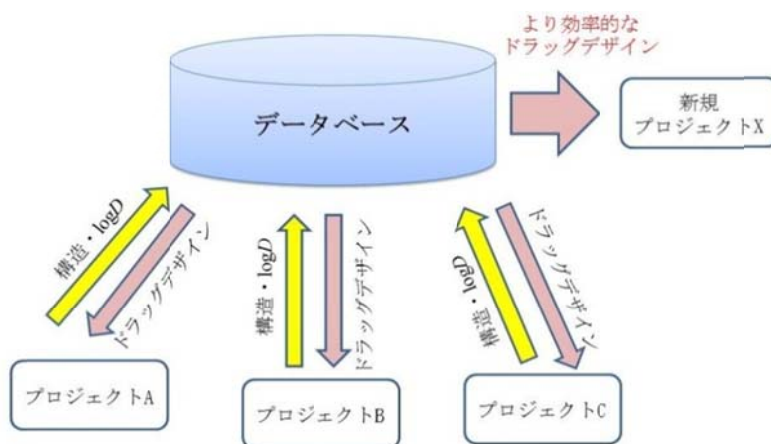


図 6-2 データベースへの蓄積および新規プロジェクトへの応用。

沈殿抑制剤スクリーニングに関しては、今後、沈殿抑制剤が効果を示すメカニズムを考察し、さらに汎用的なスクリーニング法を作ることが重要だと考える (図 6-3)。近年、医薬品の溶解性において過飽和が注目を浴びつつある²⁾。過飽和は一時的に高い見かけの溶解性 (濃度) を示すことであり、アモルファス製剤や溶液製剤などは腸内で過飽和を維持することにより吸収を改善できると考えられている。しかし、過飽和という現象論は知られているが、化合物の過飽和に関するメカニズム、沈殿抑制剤が過飽和に寄与するメカニズム、過飽和の定量法に関する研究は進んでいない。現在、過飽和や過

飽和維持時間の定量化、および過飽和メカニズムの解明に関する研究が始まりつつある²⁾。その研究の中で、沈殿抑制剤が過飽和維持に寄与するメカニズムを解明できれば、その知見を生かし、さらに汎用性のある沈殿抑制剤スクリーニング法が開発できると期待される。

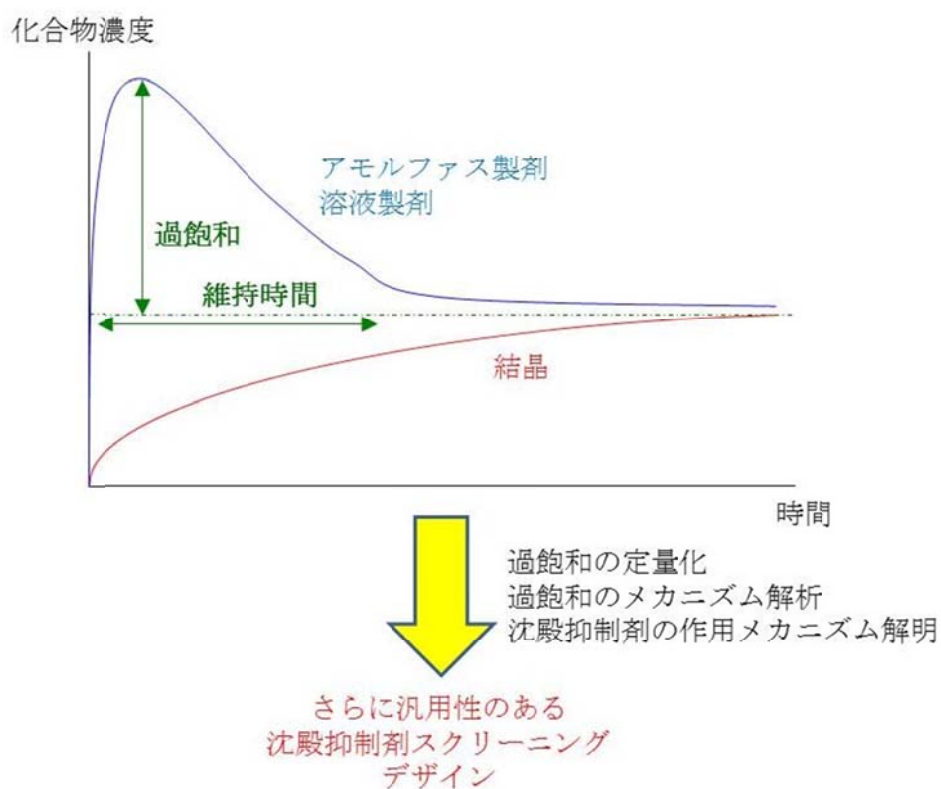


図 6-3 過飽和の定量化・メカニズム解明への取り組み、および今後の沈殿抑制剤スクリーニングデザインへの応用。

また、 $\log D$ スクリーニングおよび沈殿抑制剤スクリーニングにおいて、定量に UPLC-MS を導入することにより、さらにスループットの高いシステムが構築できることも考えられる。

本研究で構築したスクリーニングシステムにより、効率的に難溶性・高脂溶性の物性の課題を解決し、一日でも早く新薬を患者のもとへ届けられると信じている。

第 6 章 参考文献

(1) Iino, T.; Hashimoto, N.; Sasaki, K.; Ohyama, S.; Yoshimoto, R.; Hosaka, H.; Hasegawa, T.; Chiba, M.; Nagata, Y.; Eiki, J.; Nishimura, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3800-3809.

(2) Ozaki, S.; Minamisono, T.; Yamashita, T.; Kato, T.; Kushida, I. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *1*, 214-222.

原著論文

本学位論文は、以下の原著論文をもとに作成した。

(1) Dohta, Y.; Yamashita, T.; Horiike, S.; Nakamura, T.; Fukami, T. A System for log*D* Screening of 96-Well Plates Using a Water Plug Aspiration/Injection Method Combined with High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8312-8315.

(2) Yamashita, T.; Nishimura, I.; Nakamura, T.; Fukami, T. A System for log*D* Screening of New Drug Candidates Using a Water Plug Injection Method and Automated Liquid Handler. *JALA* **2009**, *14*, 76-81.

(3) Yamashita, T.; Yamamoto, E.; Kushida, I. Frozen Water Phase Method for log*D* Measurement Using a 96-Well Plate. *Talanta* **2011**, *84*, 809-813.

(4) Yamashita, T.; Kokubo, T.; Zhao, C.; Ohki, Y. Anti-Precipitant Screening System for Basic Model Compounds Using Bio-Relevant Media. *JALA* **2010**, *15*, 306-312.

(5) Yamashita, T.; Ozaki, S.; Kushida, I. Solvent Shift Method for Anti-Precipitant Screening of Poorly Soluble Drugs Using Bio-Relevant Medium and Dimethyl Sulfoxide. *Int. J. Pharm.* **2011**, *419*, 170-174.

(6) Yamashita, T.; Dohta, Y.; Nakamura, T.; Fukami, T. High Speed Solubility Screening Assay Using Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in Drug Discovery. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1182*, 72-76.

謝辞

本学位論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東京工業大学大学院
生命理工学研究科 生物プロセス専攻 三原久和教授に深く感謝申し上げます。

有益な御助言を賜りました東京工業大学大学院 生命理工学研究科 生物プロセス
専攻 堤浩先生に深く感謝します。

本研究を進めるにあたり、万有製薬株式会社 つくば研究所 化学研究部にて、お世
話になりました（故）堂田征史様、堀池里美様、西村生子様、中村立二様、深見竹広様
に感謝致します。堂田様におかれましては、故人の御冥福を深くお祈り申し上げます。

本研究に際し、万有製薬株式会社 つくば研究所 創薬技術研究部において御協力頂
きました、小久保互様、趙晨華様、大木康裕様に感謝します。

本研究において、エーザイ株式会社 つくば研究所 ファーマシューティカル・サイ
エンス&テクノロジー機能ユニットで御尽力頂きました、山本栄一様、尾崎俊亮様、櫛
田郁雄様に感謝申し上げます。

最後に、学位論文執筆に際し、応援してくれた父 隆雄、母 邦子、また、励まし支
えてくれた妻 千草、息子 翔太、娘 優花に感謝します。

山下 太郎

平成 24 年 7 月