

X線・熱・電子線のコラボレーション分析が切り拓く謎多きアセトアミノフェンの評価

山本 泰司*, 益田 泰明*, 佐藤 寛泰*

複数の結晶多形をもつ医薬品原薬は、温度や湿度によって別の結晶多形に相転移し、結晶構造の違いが医薬品のバイオアベイラビリティや安全性に大きな影響を及ぼすことが知られている。100年以上前から世界各国で様々な治療に使用されているアセトアミノフェンにも複数の結晶多形があることが報告されている。アセトアミノフェンの結晶多形には安定相と準安定相が存在するが、その結晶制御や評価手法、詳細な熱的挙動や結晶構造情報については詳細に知られていない。本稿では一般的な複数の評価手法とリガク独自技術を併せた『コラボレーション分析』をアセトアミノフェン結晶多形の結晶構造物性分析に適用した。その結果、コラボレーション分析によりアセトアミノフェンの熱的挙動と結晶構造が明らかとなったのでその詳細について記述する。

1. アセトアミノフェン

アセトアミノフェン (Acetaminophen) は、1873年にドイツで合成されたパラアミノフェノール誘電体である。1893年に初めて von Mering によって医薬品として使用され、1949年にアセトアミノフェンがアセトアニリド、またはフェナセチンの活性代謝物であると明らかになってから、本格的に解熱鎮痛薬として使用された。19世紀後半には、アミノピリンがアセトアミノフェンと並び解熱鎮痛剤として広く使用されていたが、消化管内における発がんの可能性や肝機能障害の副作用が問題視されたため、副作用が少ない安全なアセトアミノフェンが注目を集めた。現在では、世界保健機関 (World Health Organization : WHO) がアセトアミノフェンをエッセンシャル・ドラッグ (必須薬) とし、各国のガイドラインにおいても鎮痛の薬物療法としての第一選択薬としている⁽¹⁾。日本においては、表1に示すように非ステロイド性抗炎症薬 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) と比較して安全性が高いと評価されたため、日本産科婦人科学会が妊娠中

の解熱鎮痛薬としてアセトアミノフェンを勧め、2011年には承認容量を鎮痛効果が得られる海外の主要国と同容量の1日最大4000 mg/日まで引き上げた⁽²⁾。更に、新型コロナウイルスにおける発熱時にも推奨されるなど今後も多様な治療薬としての利用が増えることが予想される。このように抗炎症薬として高い安全性を持つ一方で、解熱や鎮痛の作用機序は、中枢系におけるシクロオキシゲナーゼの阻害と考えられているが詳細については未だ明らかとなっていない^{(3),(4)}。

2. アセトアミノフェンの結晶多形

結晶多形は、同一化学式で表されるが結晶構造の異なる化合物を示し、医薬品の原薬候補となる化合物にも多く存在している。個々の結晶多形は、結晶構造内の分子のパッキング状態が異なり、特有の物理的・化学的特性を示すため、医薬品原薬の安定性・工業特性・バイオアベイラビリティなどに影響を与える⁽⁵⁾。近年、医薬品の分子構造が複雑化傾向にあることや、安定的な結晶多形が市場販売後に明らかとな

表1. アセトアミノフェンとNSAIDsの違い。

	アセトアミノフェン	NSAIDs
作用機序	主に脳の中枢神経系におけるシクロオキシゲナーゼの阻害。	シクロオキシゲナーゼの阻害によるプロスタグランジンの抑制。末梢に作用。
解熱・鎮痛作用	有り	有り
抗炎症作用	あまり無い	有り
副作用	肝障害が稀にある	喘息発作、腎機能障害、消化器症状など
投与可能な年齢	15歳未満の投与可能	主に15歳以上

*株式会社リガク プロダクト本部 アプリケーションラボ

り、販売停止や再開を余儀なくされたリトナビル(Ritonavir)の事例もある⁽⁶⁾。加えて、既知物質が公知であっても、新規結晶構造を有し、当該物質に比べ有利な性質であれば、結晶多形の発明として権利取得が可能なことから、その特許論争も多い。したがって結晶多形は、プレフォーミュレーション研究における物性検討やプロセス研究などの注意すべきポイントの1つとなる。

表2にアセトアミノフェンの結晶多形の一覧を示す⁽⁷⁾。アセトアミノフェンには、I型、II型、III型の3種類の結晶多形が存在しており、更にIII型については2種類の結晶系が報告されている。各結晶多形の特徴としては、I型は結晶構造が安定形を示し、溶液中から容易に結晶化するため、中枢性解熱鎮痛薬消炎剤の医薬品原薬として使用されている。II型は、I型に比べ溶解度が高いため錠剤化における圧縮性や溶解性などが優れる⁽⁸⁾。III型は、II型に比べ高い溶解度を示すが準安定形であり、限られた条件下でのみ結晶化し、非常に不安定であることが知られている。結晶化しても短時間で他の結晶多形へと結晶相転移することが報告されている⁽⁹⁾。そのためII, III型については、それらの結晶化制御や評価方法に課題がある。特にIII型の結晶構造は、2018年にCéleste A. Reissらによって、斜方晶系と単斜晶系の2種類が存在するという報告⁽⁷⁾と、英国のCambridge Crystallographic Data Centre (以下CCDC)が提供するケンブリッジ結晶構造データベース (以下CSD)には結晶構造情報が2件のみが報告されている。いずれも粉末X線回折法 (以下XRD) の結果を用いて求められた結晶構造であり、単結晶構造解析の報告例は未だにない。

3. アセトアミノフェンの結晶多形評価

医薬品規制調和国際会議ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) のガイドライン「Q6A」にお

いて、結晶多形の存在を確認する物理化学的な測定技術として、XRDと示差走査熱量測定 (以下、DSC測定) が記載されている。両手法は一般的に単独で使用されることが多いが、測定環境の違いにより形成された結晶相が異なる場合や、単独測定だけでは結晶多形の区別や新しい結晶多形の発見が困難な場合がある⁽¹⁰⁾。X線回折-示差走査熱量の同時測定装置 (以下、XRD-DSC同時測定装置、製品名：X-ray DSC) は、同一試料、且つ同一環境下で同時測定を行い、結晶多形の変化と熱的挙動を同時に観測可能となる。さらに本稿では、極微小サイズで、結晶構造情報が未知な単結晶を精密に解析する、電子線を用いた単結晶構造解析を加え、これらのXRD, DSC, 電子線を用いた『コラボレーション分析』によって、アセトアミノフェンの結晶多形と熱的挙動を明らかにする。

4. XRD-DSC同時測定による評価

4.1. ハイブリット型多次元ピクセル検出器 HyPix-3000を用いたXRD-DSC同時測定

X線回折装置内でXRDとDSCを同時に実行することができるX-ray DSCアタッチメントはリガク独自技術で開発された装置である。この装置を使用することで試料の結晶相転移、脱水、融解、凝固などの熱変化とそれに伴う結晶構造変化をその場で観察し、物性と構造を一对一に関連付けした研究を行うことが可能となる。

更に2次元検出器を用いれば短時間で結晶構造変化を捉えられる。一般的にはX線回折測定のための検出器は回折角度と強度を測定する1次元検出器が用いられる。この方法ではX線源と検出器の角度を等しく保ちながらゴニオメータを動かして回折線を測定する。この過程は終了角度から開始角度に戻る動作があるため、その間の試料変化を見逃す可能性がある。一方、2次元検出器は、ゴニオメータを固定した露光測定により、短時間の試料変化を捉えることができる。更に検出器面の垂直方向のみならず、円周方向に存在する回折線を2次元イメージとして取得することができるため、粗大粒や選択配向の情報を同時に取得することが可能である。特に、粗大粒が含まれる試料においては、加熱時の熱振動による粗大粒の位置変動、粒径差による融解温度のばらつき、液体中の粒子流動などが生じやすく、それらを含めたデータ解釈のためには2次元検出器を用いた測定が有効となる。アセトアミノフェンI型の粉末は、粗大粒を形成する 경우가多く、粉碎すると結晶構造が破壊されやすいため2次元検出器を用いたXRD-DSC同時測定が不可欠である。

図1に2次元検出器を用いたXRD-DSC同時測定の装置構成写真と概略図を示す。装置は全自動多目的X線回折装置SmartLabを使用し、検出器は長方形の検

表2. アセトアミノフェンの結晶多形の結晶構造情報⁽⁷⁾。

	I型	II型	III型	
結晶系	単斜晶	斜方晶	斜方晶	単斜晶
T/K	330	298	293	100
空間群	$P2_1/a$	$Pcab$	$Pca2_1$	$Pc11^e$
Z/Z'	4(1)	8(1)	4(2)	2(4)
a/Å	12.872(3)	7.405(3)	11.838(1)	11.755(1)
b/Å	9.370(2)	11.831(4)	8.569(1)	8.572(1)
c/Å	7.085(2)	17.156(6)	14.818(1)	14.516(1)
$\alpha/^\circ$	90	90	90	84
$\beta/^\circ$	116	90	90	90
$\gamma/^\circ$	90	90	90	90
V/Å ³	771	1503	1503	1455

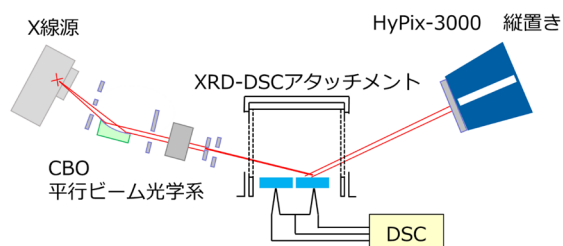


図1. 2次元検出器を用いたXRD-DSC同時測定の構成写真(上)と概略図(下).

出面を持つ2次元検出器ハイブリット型多次元ピクセル検出器HyPix-3000を用いた。本検出器は、走査方向に対して検出面が長くなるように縦置きに設置した。この設置法で、ゴニオメータを動かすことなく1回の露光測定で最大約30°の角度の2次元イメージ(試料から検出器面までの距離: 150 mm)が得られる。X-ray DSCアタッチメントには左側に基準試料、右側に測定試料を設置する。基準試料側には7 mm×7 mmの四角形のアルミパンの上に4.5 mgのアルミプレートを、測定試料側には基準試料側と同じアルミパンに4.98 mgのアセトアミノフェン(Sigma-Aldrich社製)を乗せた。制御ソフトは、X線分析統合ソフトウェアSmartLab Studio IIのXRD Measurementプラグインを用いた。

4.2. アセトアミノフェンI型のXRD-DSC同時測定結果

アセトアミノフェンI型のXRD-DSC同時測定結果をSmartLab Studio IIのXRD DSCプラグインにより解析を実施した。その結果を図2に示す。上段は、縦軸に熱流量と温度、横軸に時間を示したグラフ、下段は各温度における2次元イメージを示している。これは、I型を室温から190°Cまで昇温(第一昇温過程)し、その後、-20°Cまで降温した後、再度190°Cまで昇温(第二昇温過程)させて測定した結果である。XRD-DSC同時測定で得られたDSCチャートからは、第一昇温過程で1つ吸熱ピーク、第二昇温過程で吸熱・発熱ピークがそれぞれ1つずつ確認された。

2次元回折イメージは、測定開始時にスポット状の回折像が観測され、粉末粒子は微細粒ではなく粗大粒を形成していることが分かった。ここには示していな

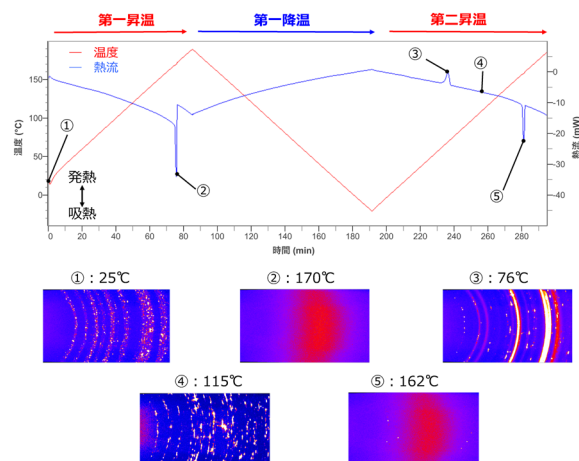


図2. XRD-DSC同時測定から得られたDSCチャート(上)と各温度の2次元イメージ(下).

いが、2次元回折像の定性分析を実施した。解析はSmartLab Studio IIのPowder XRDプラグインを用いた。Powder XRDプラグインには、2次元イメージの情報に基づいて、デバイリングを2θ角度値ごとに直線状に表示し、更に1次元回折パターンに自動で変換する機能がある。定性分析からこの粗大粒の粉末はI型で間違いのないことを確認した。次に各熱反応ピーク付近の2次元回折像に着目した。第一昇温時、DSCチャートの吸熱ピークが観測された温度の170°Cでは、初期に観測された回折ピークは観測されず、ハローパターンが観測された。従って、吸熱反応は結晶相の融解に起因していることがわかる。降温した後、再び昇温させた第二昇温過程中の76°C付近で観測された発熱ピークは、2次元回折像が観測されていることから、結晶化が起きていることが分かる。粗大粒を示している回折パターンのピーク位置は初期結晶相のピーク位置と異なっており、I型とは異なる結晶相が成長していることが分かった。さらに加熱すると、DSCチャートには熱反応の変化が現れていないが、115°C付近で2次元回折像が変化されていた。

ここで第二昇温過程における76°Cと115°C付近の2次元回折像について定性分析を実施した。定性分析結果を図3に示す。上段に2次元イメージ、中段に1次元回折パターン、下段にCCDCに収載されているII型とIII型の回折パターンを示した。第二昇温過程中の76°Cでは、II型及びIII型の結晶相が同定され、115°C付近ではII型が同定された。つまり、I型は、再加熱によりII型及びIII型に結晶化した後、III型が融解またはII型へ結晶相が変化し、162°C付近でII型が融解することが考えられる。ここで、II型とIII型が同時に観測された76°C付近の熱的挙動の詳細を調査するため、試料を密閉状態で測定するDSC測定を実施した。

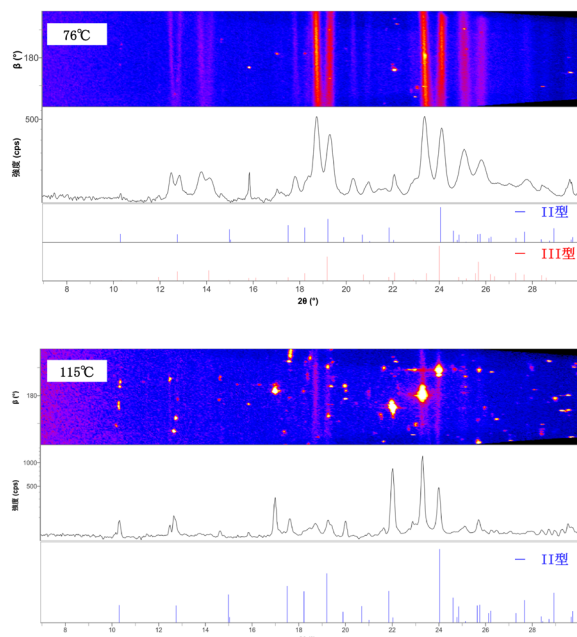


図3. 第二昇温過程の76°C(上)と115°C(下)の定性分析結果。

5. DSC単独測定による評価

DSCはThermoplus EVO3 DSCvesta2電気冷却システム(図4)を用いて測定した。測定は試料量5 mg, 試料容器はAl製密封容器を使用した。温度条件は、 -30°C から 200°C まで $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温(第一昇温)した後、 $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で -30°C まで降温、その後 200°C まで $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で再昇温(第二昇温)を行った。

DSC測定結果を図5に示した。第一昇温過程では 170°C に吸熱ピークが、第二昇温過程では 75°C 及び 121°C に発熱ピークが現れ、 158°C に吸熱ピークが確認された。まず、第一昇温と第二昇温過程で融解温度が異なることから両過程での結晶相は異なっていたことがわかる。

この結果はXRD-DSC同時測定から観測された結果と一致し、第一昇温過程における 170°C の吸熱ピークはI型の融解から、第二昇温過程で 158°C の吸熱ピークはII型結晶の融解から起因しているものである。第二昇温過程の 75°C の発熱ピークはXRD-DSC同時測定の結果からも確認されたピークで、II型とIII型の結晶化による発熱反応である。一方、 121°C で観測された発熱ピークはXRD-DSC同時測定では観測されなかったピークである。XRD-DSC同時測定でこの温度の付近では、II型しか観測されていないことから、この発熱ピークはIII型の結晶がII型の結晶へ構造相転移し、熱反応を起こしたことが考えられる。一般的に、低温安定結晶系から高温安定結晶系への相転移は吸熱反応を示す。しかし、結晶と結晶間の相転移にも関わらず、発熱反応を起こしていることは、相転移している結晶相が準安定相であることを示唆する。すなわち、準安定相のIII型が、III型よりも安定相のII型へ

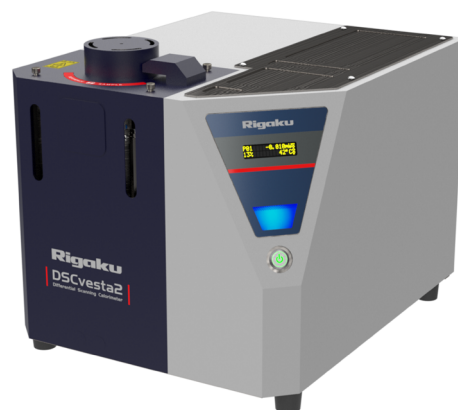


図4. Thermoplus EVO3 DSCvesta2の写真。

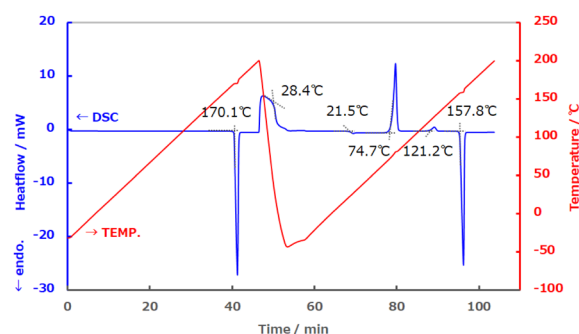


図5. DSC単独測定結果。

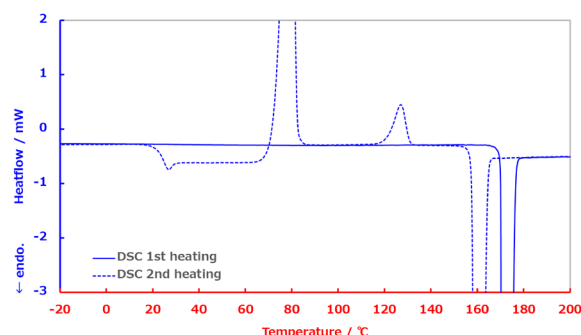


図6. DSC第一昇温と第二昇温の多重拡大チャート。

相変化したことが、XRD-DSC同時測定の結果と試料を密封して測定したDSC結果から明らかとなった。

加えて、DSCのベースラインを詳細に調べるため、第一昇温結果と第二昇温結果を重ね合わせ、図6に多重拡大チャートを示した。DSCのベースラインには結晶の非晶質への変化やガラス転移の有無などの情報が含まれている。図6には第一昇温過程は実線で、第二昇温は点線で示した。 20°C 付近のベースラインは、第一昇温過程ではシフトが見られていないものの、第二昇温過程では、吸熱方向にベースラインのシフトが観測された。これは、試料の初期状態はほぼ100%の結晶質で、融解した後、降温過程でガラス化したことを示唆している。XRD-DSC同時測定の結果ではガラス転位が確認されなかったが、両結果は、ガラス転移後のII型とIII型の結晶が、近い温度で生成されていることを示唆している。これは、両結晶の核生成及



図7. XtaLAB Synergy-EDの構成。

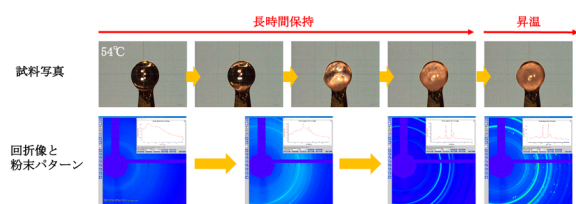


図8. 54°Cでの試料写真(上)と回折像及び粉末回折パターン(下)。

び成長が類似なメカニズムを有している可能性が考えられる。昇温速度を変えた非等温測定に加えて等温測定を行うことで、そのメカニズムを深堀することは次の課題になる。それにより詳細に各結晶を制御できる知見が得られると考える。

6. 単結晶構造解析による構造決定

6.1. 電子回折による単結晶構造解析の概要

XRD-DSC同時測定及びDSC測定の各温度で確認された結晶多形について、原子・分子位置を含む結晶構造を決定するため、単結晶構造解析を実施した。

最新の単結晶X線構造解析装置は、線源と検出器の発展とともに、有機物の結晶の場合、数十 μm のサイズの単結晶でも、その原子や分子構造を可視化することが可能になっている。しかしながら、医薬品の殆どは、数十 μm の単結晶を作製することは難しい。図2で示したように、連続的なデバイリングを示す多結晶は、その一粒が非常に結晶性の高いサンプルであっても、サイズが数 μm しかなく、通常のX線を用いた単結晶構造解析は非常に困難である。最近、リガクと日本電子はお互いのコア技術を有機的に結合し、数百nmサイズの単結晶でも構造解析できる電子回折計XtaLAB Synergy-EDを開発した。電子回折は、電子線と物質の相互作用がX線に比べ、数千から数万倍強いため、X線で使用される結晶サイズの数千分の1程度の大きさでも構造を決定することができる。XtaLAB Synergy-EDの特長は結晶の探索からデータ測定・構造解析までを一気通貫で行えるワークフローにある(図7)。

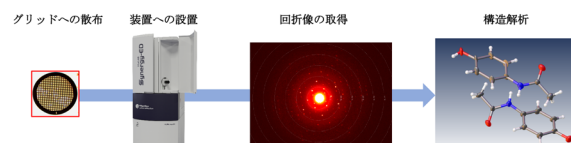


図9. 単結晶構造解析フロー。

表3. XtaLAB Synergy-EDにより得られた構造情報。

	I型	II型	III型
結晶系	単斜晶	斜方晶	斜方晶
T/K	293	298	293
空間群	$P2_1/n$	$Pbca$	$Pca2_1$
Z/Z'	4 (1)	8 (1)	4 (2)
a/ $\text{\AA}$	7.344 (5)	11.77 (15)	11.76 (12)
b/ $\text{\AA}$	9.645 (6)	7.5 (4)	8.52 (13)
c/ $\text{\AA}$	12.087 (7)	17.0 (2)	14.8 (3)
α°	90.0	90	90
β°	97.37 (5)	90	90
δ°	90.0	90	90
V/ $\text{\AA}^3$	849.1 (9)	1488 (81)	1481 (42)

6.2. X線単結晶構造解析装置による試料作製

ここでは、窒素ガス吹付け温調装置Cobraで試料を加熱・冷却させながら単結晶X線構造解析装置XtaLAB Synergy-DW (以下：XtaLAB Synergy-DW)にて得られたデバイリングとXRD-DSC同時測定から観測された回折パターンと比較して試料作製を実施した。I型の単結晶一粒を加熱し融解させた後、室温付近まで急冷させて非晶質相を得た。完全に非晶質化したことを試料観察カメラの映像と回折パターンから確認した後、試料を室温から徐々に再加熱させると、約54°C付近で結晶が確認された。これを48時間温度を保持すると結晶生成を試料観察カメラの映像と回折像によって確認できた。更に加熱すると、新たな結晶生成による回折像の変化が見られた。得られた回折像はいずれもリング状となっており、この過程では多結晶が生成したといえる。

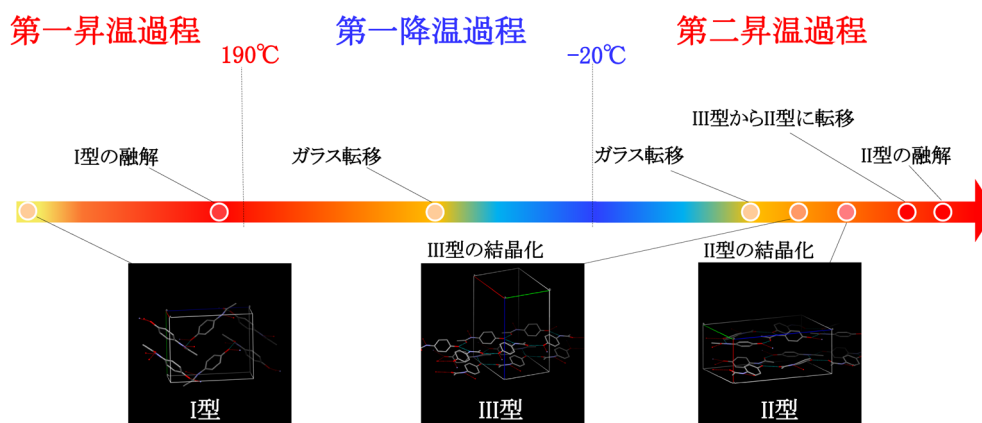


図10. アセトアミノフェンの結晶構造及び状態変化.

6.3. XtaLAB Synergy-EDによる評価

XtaLAB Synergy-EDにて、加熱前のI型、54°Cで保持して得られた多結晶、更に加熱して得られた多結晶のそれぞれ1粒を使い構造解析を行った。図9にその解析フローを示す。加熱した2種類の結晶の構造解析においては、調製したサンプルがサンプル内の潜熱により結晶相が変化しないよう素早くすりつぶし、電子回折用のグリッドに散布し測定を実施した。取得した回折像を解析した結果、54°Cで結晶化した結晶はIII型、更に加熱して得られた結晶はII型と判明した。さらに慎重にサンプル調整を行った結果、非晶化したI型を再加熱すると54°C付近でIII型に結晶化することが分かった。

表3に得られたI型、II型、III型を示した。本解析により、新たにIII型の結晶構造を単結晶から決定することができた。

7. まとめ

アセトアミノフェンの結晶構造と熱挙動を、X線回折、熱分析、電子回折法を用いて総合的に評価した。その結果、アセトアミノフェンI型結晶を融解させた後加熱するとガラス転移過程を経て準安定相のII型と準安定相のIII型の結晶多形がほぼ同時に結晶化し、さらに加熱することにより、III型がII型へ完全に結晶構造相転移することが明らかとなった(図10)。さらに、電子回折法と単結晶構造解析法の組み合わせにより、I型

とII型の分子構造に加えて、結晶構造が不安定で報告がなかったIII型の分子構造も単結晶構造解析としては、世界で初めて可視化に成功した。これによって、アセトアミノフェンの熱挙動の理解と、結晶多形の制御法に対して一つの知見が得られたと考えられる。

医薬品にはアセトアミノフェンと同様の特徴を有し、また評価技術に課題を持つ結晶多形が多く存在すると思われるため、本稿の評価技術の活用が、未知なる結晶多形解明の一助となることを願う。

参考文献

- (1) 甲斐健太郎, 他: 薬剤疫学, *Jpn. J. Pharmacoepidemiol.*, **17** (2012), 75–86.
- (2) 熊谷雄治, 他: 臨床薬理, *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **47** (2016), 31–37.
- (3) 星島宏, 他: 埼玉医科大学雑誌, **44** (2018), 151–152.
- (4) 郡司敦子, 他: 歯薬療法, **28** (2009), 109–116.
- (5) 分離技術会: 晶析の基礎と実践, 分離技術シリーズ35, (2021), 98–110.
- (6) 川上亘作: 熱測定, **37** (2010), 2–8.
- (7) C. A. Reiss, J. B. van Mechelen, K. Goubitz and R. Peschar: *Acta Cryst.*, (2018), C74, 392–399.
- (8) P. Di Martino, P. Conflant, M. Drache, J.-P. Huvenne, and A.-M. Guyot-Hermann: *J. Therm. Anal.* **48** (1997), 447–458.
- (9) C. Sudha, and K. Srinivasan: *J. Cryst. Growth* **401** (2014), 248–251.
- (10) 生天目由紀子, 佐藤博明: リガクジャーナル, **44** (2013), No. 1, 9–15.