

創薬における溶解性スクリーニング法の開発

菅谷幸子,* 吉葉孝子, 梶間 隆, 石濱 泰

Development of Solubility Screening Methods in Drug Discovery

Yukiko SUGAYA, Takako YOSHIBA, Takashi KAJIMA, and Yasushi ISHIHAMA
Department of Physical Chemistry, Analytical Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.,
5-1-3, Tokodai, Tsukuba, Ibaraki 300-2635, Japan

(Received September 6, 2001; Accepted December 25, 2001)

We developed two methods for solubility screening of drug candidates in drug discovery. The first is a solution-precipitation (SP) method, in which the sample solutions are prepared by adding the drug solution in dimethylsulfoxide (DMSO) to buffers followed by filtering off the precipitate using 96-well filterplate. The second is a powder-dissolution (PD) method, in which the solid samples are dissolved to the buffer in the HPLC vial equipped with the filter membrane in the HPLC autosampler. An HPLC equipped with a photodiode array detector is used to measure the concentration of the sample solutions in both methods. The SP method was used for high throughput screening the solvating process of the candidates in aqueous solutions with lower sample consumption, and the PD method was used for screening both inter-molecular interaction in solid state and solvation in aqueous solution with more sample amount than that of SP method. Therefore, the solubility screening from early to final stage of lead optimization process would be successfully accomplished by using both methods complementarily.

Key words—solubility screening; drug discovery; high throughput screening; solution-precipitation; powder-dissolution

緒 言

薬物候補化合物の溶解性は、経口投与時の生物学的利用率に影響を与えるだけでなく、各種薬理試験における薬効を見極める上でも重要な因子である。したがって、新薬の溶解性を早期段階から評価していくことは非常に重要である。

近年、コンビナトリアルケミストリーや化合物ライブラリーの充実及び *in vitro* 薬効評価システムの HTS 化などにより、新薬開発のスピードは年々加速している。それに伴い ADME やそれに影響を与える物理化学的性質に関わるパラメーターの評価法についても迅速化する必要がある。脂溶性、¹⁻³⁾ 膜透過性、^{4,5)} 酸解離定数、^{6,7)} 血漿タンパク結合率^{8,9)} などについて高速スクリーニング法が報告されている。しかし飽和溶解度測定には、従来のフラスコ振とう法を用いている限り数十時間は必要でありその高速化には限界がある。最近滴定法による測定法が

報告されたが測定時間の問題でやはり多検体評価には適していない。¹⁰⁾ 一方コンピュータプログラムによる *in silico* 測定法は化合物を合成する必要がなく多検体処理も迅速に行えるなどのメリットを有するが、溶解度については現在のところ実測値との乖離が大きく、満足のいく結果は得られていない。¹¹⁾ 最近 2 つのグループから、薬物の高濃度 DMSO 溶液を用いる濁度法に基づく高速実測法が報告された。^{11,12)} これらの方法は、薬物の DMSO 溶液を緩衝液に添加することによって生成する沈殿を比濁分析法又は濁度滴定法によって分析するものである。用いる DMSO 溶液は *in vitro* 薬理評価用として調製されるため、溶液調製の手間がいらず高速化がはかれるというメリットがある。しかし比濁分析は精度及び感度に問題があり、1 化合物当たり 1 プレート (96 サンプル) の調製を行う必要がある。¹²⁾ またコンビナトリアルケミストリーで合成された検体は酸性移動相を用いた LC/MS で精製・濃縮される場合が多く、分解を考慮する必要があるが、比濁分析法は分離分析法ではないため純度が低下した試料に

については結果を見誤るおそれもある。

さて、化合物の溶解過程は結晶格子がこわれ各分子間の相互作用がなくなる過程（分散過程）と分子が溶媒和（水和）する過程に分けることができる。¹³⁾ 上記の DMSO 溶液を用いる方法は、後者の溶媒和過程のみに注目しており、固体試料を用いる従来のフラスコ振とう法とは異なり固体物性（結晶性など）の影響を受けにくいと考えられる。我々はこれに注目し、化学構造由来の溶解性を評価する化合物最適化の早期段階における溶解性スクリーニング法として、DMSO 溶液を用いた試料分子の溶媒和過程の高速測定法（溶液沈殿法）を検討した。比濁分析法の問題点を克服するため、96 穴ろ過プレートを用いて試料溶液の迅速ろ過を行うとともに、高流速急勾配溶出条件下で多検体を HPLC 分析することにより迅速・簡便で試料の純度試験も同時に行える方法の開発を検討した。また、薬物及び薬物候補化合物 30 種についてフラスコ振とう法と比較し、本法で得られる溶解性パラメーターの特徴についても検証した。

一方、化合物の最適化段階の後期では固体試料の分散過程も含めた溶解性を評価する必要がある。徳村らはスピッツ中で固体試料を緩衝液へ分散させ、30 分静置させた後、沈殿をろ過し HPLC 分析する方法を報告している。^{14,15)} 今回我々はフィルター付き HPLC バイアルを用いて HPLC オートサンプラー中で静置・ろ過過程を行う方法を新たに検討した（固体溶解法）。さらに標準溶液に濃度既知の薬効評価用 DMSO 溶液を使用すること、及び HPLC 分析に溶液沈殿法と同様の高流速急勾配溶出条件を採用することによって迅速性・必要試料量の軽減・操作性の向上を検討した。

実験の部

装置及び器具 HPLC システムには多波長検出器を装備した LC-10Avp（島津製作所）を用いた。ただし固体溶解法ではオートサンプラーに SIL-10A を、溶液沈殿法では SIL-10Avp をそれぞれ用いた。カラムには粒子径 3 μm のものとして YMC-pack Pro C18（内径 4.6 mm, 長さ 35 mm）を、粒子径 2 μm のものとして Imtakt Presto FT-C18（内径 4.6 mm, 長さ 30 mm）を用いた。固体溶解法では UF-604R 超音波発生装置（シャープ）及び 0.45

μm の PVDF 膜を備えた MINI-UNI フィルター付き HPLC サンプルバイアル（ワットマン）を用いた。溶液沈殿法では、マイクロミキサーに E-36（タイテック）及び Micromixer（大洋科学工業）を用いた。UNIFILTER 350 96 穴ろ過プレート（ワットマン）及び UNIVAC マイクロプレート吸引装置（ワットマン）を用いてプレートろ過を行った。分注の際には、プロライン 8 連マルチチャンネルピペット（バイオヒット）及び AUTO DROPPER model/EDR-500A 96 穴同時自動分注装置（バイオテック）を使用した。

試薬 用いた薬物はすべてシグマ、和光純薬工業及び東京化成工業より入手した。ただし、ER-030346, ER-023835 及び ER-034634 は当社で合成したのを用いた。DMSO は分光分析用のものをアルドリッチより入手した。TFA はシークエンス分析用のものをピアスより入手した。Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) は GIBCO BRL から入手した。日本薬局方崩壊試験第 1 液 (JP1) 及び第 2 液 (JP2) は日本薬局方に準拠して調製した。

操作法 溶液沈殿法

1. DMSO 溶液の調製 試料を DMSO にて正確に希釈し 10—50 mM の濃度に調製したものを DMSO 溶液とした。DMSO 溶液を 96 穴プレートに 50 μl ずつ正確に分注した。

2. 標準溶液の調製 96 穴プレートに DMSO を 250 μl ずつ正確に分注した。これに DMSO 溶液を 2.5 μl ずつ正確に分注した。その後、マイクロミキサーにて数分間旋回振とうしたものを標準溶液とした（濃度：0.1—0.5 mM）。

3. 試料溶液の調製 96 穴ろ過プレートに各緩衝液 (JP1 及び PBS) を 250 μl 正確に分注した。これに DMSO 溶液を 2.5 μl ずつ分注し、マイクロミキサーで旋回振とうした (1000—2500 rpm)。その後、マイクロプレート吸引装置にて、 -20 inHg まで吸引し、96 穴プレートにろ過回収した。これを試料溶液とし、標準溶液に続き HPLC にて分析を行った。

4. HPLC 分析 検出は多波長検出器 (190—370 nm) 及び単波長検出器を用いて行った。カラムには上述の粒子径 3 μm のカラムをカラム温度 50 $^{\circ}\text{C}$ で用いた。流速は 3.0 ml/min で、注入量は 20 μl とした。移動相には A 液として 0.1% TFA 及び 1

%アセトニトリルを含む水溶液を、B液としてアセトニトリルとエタノールの等量混合液を用い、以下の時間表に従って分析を行った。

Time (min)	A%	B%
0	100	0
1.5	0	100
2.0	0	100
2.0	100	0
2.3	Stop	

固体溶解法

1. 標準溶液調製 溶液沈殿法に準じて標準溶液1を調製した。さらにDMSOで10倍に希釈し標準溶液2とした。

2. 試料溶液調製 試料をフィルター付HPLCサンプルビンに1—2 mg 秤取した。緩衝液を0.5 ml 添加した後、超音波を3分間照射し試料を分散させた。あらかじめ37℃に温調しておいたHPLCオートサンプラー中で1時間静置した後、フィルター付ピストン部分を押し過ろし、これを試料溶液とし、標準溶液1, 2に続き、HPLCにて分析を行った。

3. HPLC条件 溶液沈殿法と同様の条件で行った。

結果と考察

1. 溶液沈殿法

1-1. HPLC条件の設定 本法では幅広い構造多様性を有する化合物に対し単一の分析条件下で高速分析を行う必要がある。そこで、カラム圧の上限値以内で、小さな粒子径の充填剤を用いた短いカラムを使用し高流速急勾配溶出条件下での分析条件を設定することとした。カラムには充填剤粒径が3 μm のものと2 μm のものを用いて比較した。試料には安息香酸アルキルエステル6種を用いた。カラム圧をできるだけ下げるため、カラム温度は50℃に設定した。移動相には、簡便に調製ができること、適用範囲ができるだけ広いことを考慮し、A液として、0.1%TFA, 1%アセトニトリルを含む水溶液を、B液として、アセトニトリル・エタノール混液(1:1)を用いた。溶出条件はA濃度100%から始め、1—2分でB濃度100%になるように、また流速はカラム圧の上限値以下でできるだけ高くなるように設定し、試料が最もよく分離される条件を選択した。結果をFig. 1に示す。2 μm カラムはカ

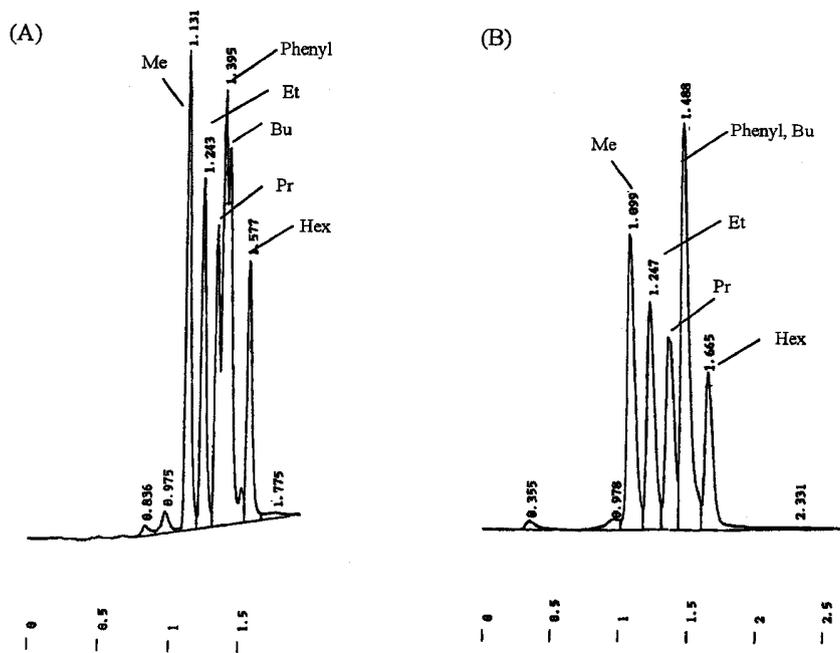


Fig. 1. Fast HPLC Chromatograms

(A) Chromatogram with 3 μm particle column (4.6 mm id, 35 mm length), (B) Chromatogram with 2 μm particle column (4.6 mm id, 30 mm length); sample, 6 alkyl benzoates (methyl, ethyl, propyl, butyl, hexyl and phenyl esters); flow rate, (A) 3.0 ml/min, (B) 1.0 ml/min; gradient condition, (A) B conc. 0-100% (0-1.5 min), (B) B conc. 0-100% (0-2.0 min); other conditions are described in the experimental section.

ラム圧が高く、1.0 ml/min 以上に流速を設定できなかった。一方 3 μm カラムは 3 ml/min で分析を行うことが可能であった。2 μm カラムではベンジルエステルとブチルエステルが全く分離されていないのに対して 3 μm カラムでは部分的に分離しており、また得られたピークも全体的に 3 μm カラムの方がシャープであった。以上の結果より、3 μm カラムを用いた HPLC 条件を設定した。発色団として α,β -不飽和カルボニル基を分子内に 1 つ有する

テストステロンを試料とし S/N=10 となる試料濃度より定量限界を算出したところ約 100 nM (254 nm) であった。

1-2. 振とう時間 旋回振とう時間の沈殿生成に対する影響について検討した。旋回振とう時間に対する試料溶液濃度の経時変化を Fig. 2 に示した。フルルビプロフェン、スリンダック、ジピリダモル及びフェニトインの 4 化合物は振とう時間の影響は認められず、ほぼ 15 分以内に平衡に達した。

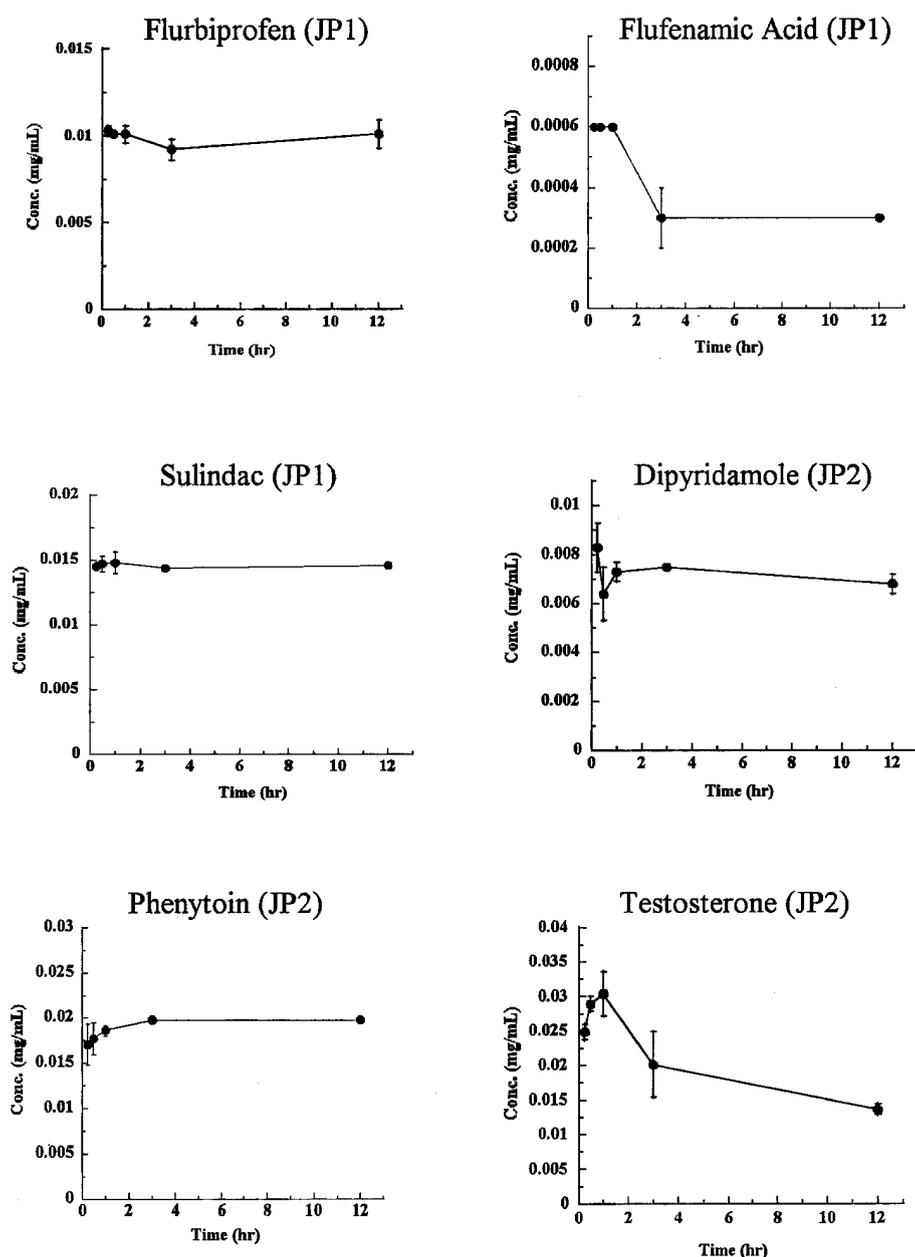


Fig. 2. Dependence of Mixing Time on Solubility by Solution-Precipitation Method (Error bars: SD ($n=6$)).

一方フルフェナミン酸及びテストステロンは過飽和状態が比較的長く持続し、平衡到達に3時間以上必要であった。以上の結果より、すべての化合物に対して画一的な条件下で平衡後の濃度を測定することは困難であることが分かった。ただし、今回の6化合物については15分後の値と平衡値との乖離は2倍程度であった。化合物最適化の早期段階での溶解性の評価は、化合物の構造変化に由来する溶解性の変動を把握することを目的としている。また溶解性に課題がある場合、オーダーを越える改善が求められることがほとんどである。したがってスクリーニングにおけるこの程度の乖離は許容範囲であり、スクリーニングとして求められる精度及び迅速性を考慮し振とう時間は15分に設定した。

1-3. 精度 本法の併行精度及び室内再現精度について検討した。試料には、試料濃度が100 ng/mlから10 µg/mlレベルになるような6種の化合物を選んだ。結果をTable 1に示す。併行精度及び室内再現精度はRSD 20%以下であり、スクリーニング法として十分な精度を有していた。

1-4. DMSO 濃度の影響 Lipinski らの方法では、UVセルにあらかじめ添加した緩衝液に薬物の

DMSO 溶液を滴定し、薬物濃度と濁度の関係から溶解性を判定している。¹¹⁾この場合試料溶液中のDMSO 濃度は薬物濃度増加に伴い増加することになる。一方 Bevan らの方法では、試料溶液中のDMSO 濃度の変化を避けるために一定量のDMSO を含む緩衝液を希釈溶液として用いて試料溶液を調製している。¹²⁾本法では上記2法とは異なり試料溶液を段階的に希釈(添加)する訳ではないが、一定量のDMSO が溶解性に与える影響については評価しておく必要がある。そこで、DMSO を1, 2及び5%添加したときの各化合物の溶解性について検討した(Fig. 3)。フルルビプロフェンの溶解性はDMSO 濃度の増加によってほとんど影響を受けなかった。その他の化合物はDMSO 濃度の上昇に伴い溶解性は増加したものの、その増加量は2倍程度であり、振とう時間同様溶解性スクリーニング法としての影響は少ないと考えられる。

1-5. フラスコ振とう法との比較 設定した方法を用いて、のべ30試料の溶解性測定を行い、フラスコ振とう法との比較を行った。フラスコ振とう法は、各試料を少量試験管に取り緩衝液を加え、25℃で24時間振とう後、固相をろ過し試料溶液とし

Table 1. Reproducibility of Solution-Precipitation Method

Compounds		Repeatability (n=6)			Intermediate precision (n=3)
		Day1	Day2	Day3	
Flufenamic acid (JP1)	Mean (mg/ml)	0.0004	0.0006	0.0005	0.0005
	SD	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001
	RSD (%)	4.2	12.0	9.1	13.3
Flurbiprofen (JP1)	Mean (mg/ml)	0.0094	0.0097	0.0094	0.0095
	SD	0.0002	0.0003	0.0003	0.0002
	RSD (%)	2.5	2.6	3.1	2.0
Sulindac (JP1)	Mean (mg/ml)	0.0138	0.0141	0.0138	0.0139
	SD	0.0002	0.0004	0.0003	0.0002
	RSD (%)	1.3	2.8	2.3	1.2
Tamoxifen (JP1)	Mean (mg/ml)	0.0087	0.0082	0.0079	0.0083
	SD	0.0001	0.0003	0.0003	0.0004
	RSD (%)	1.3	3.2	4.2	4.4
Phenytoin (JP2)	Mean (mg/ml)	0.0154	0.0178	0.0179	0.0170
	SD	0.0011	0.0008	0.0009	0.0014
	RSD (%)	6.9	4.6	4.9	8.4
Testosterone (JP2)	Mean (mg/ml)	0.0245	0.0257	0.0230	0.0244
	SD	0.0016	0.0027	0.0040	0.0014
	RSD (%)	6.7	10.4	17.6	5.5

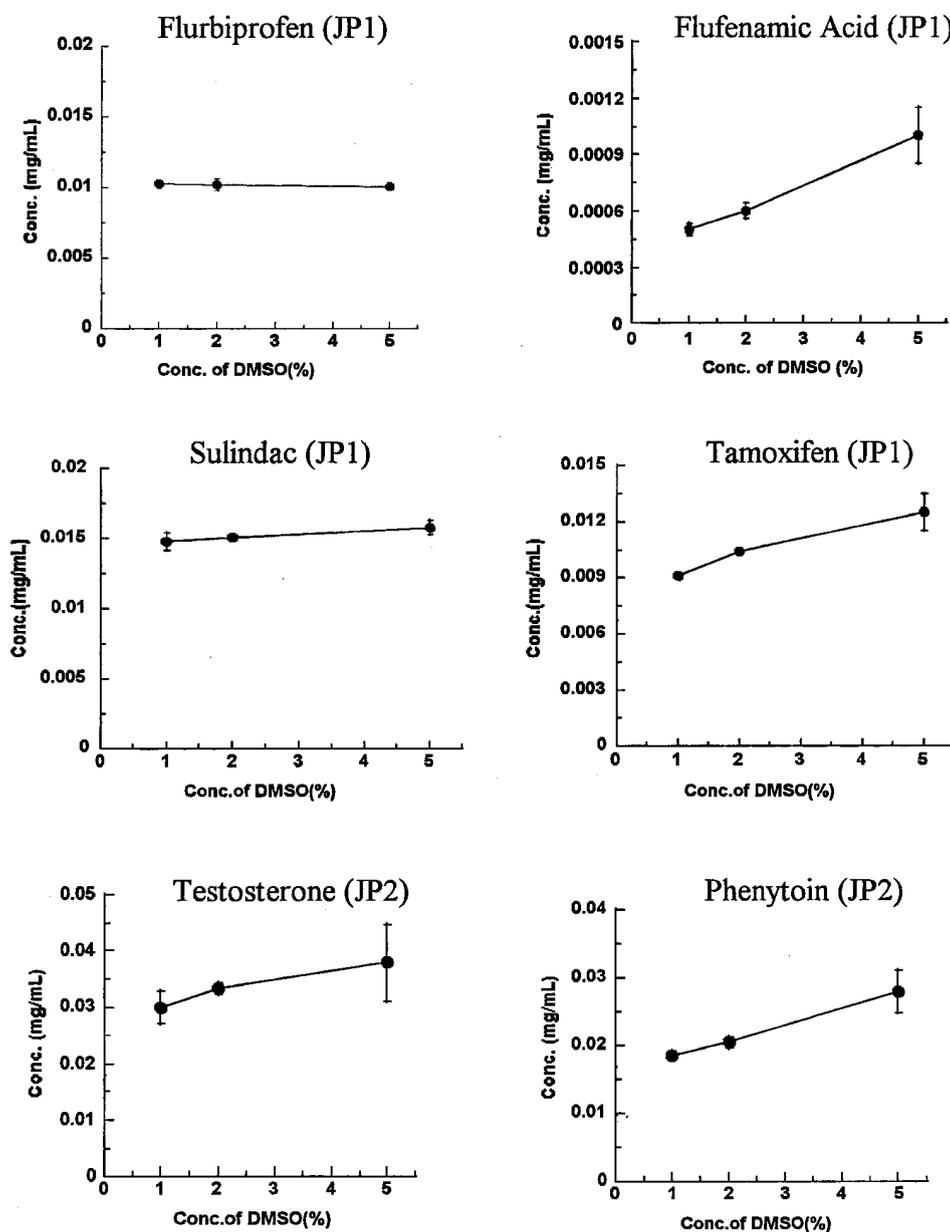


Fig. 3. Influence of DMSO Concentration on Solubility
(Error bars: SD ($n=3$)).

た。結果を Table 2 に示す。本法による値がフラスコ振とう法による値よりも 5—45 倍高い化合物が 9 試料 (30%) で認められた。Bevan らも同様に比濁分析法とフラスコ振とう法の比較を行っているが、溶液の着色による影響を除くと両法による値はほぼ一致しており、異なった値を与えたのは 30 化合物中わずか 3 化合物のみであると報告している。¹²⁾我々はさらに化合物を増やし、計 80 化合物について比較を行ったところ、20 化合物 (25%) について異なった値を得た。本法とフラスコ振とう法との違

いを考えると、(1)振とう時間、(2) DMSO の存在、(3)溶液添加・固体添加の違いのいずれかが測定値の乖離の原因であると考えられる。そこで、スリンドラック、ER-030346、及び ER-034634 について、それぞれの影響を確認した。

スリンドラックの振とう時間の影響についてはすでに Fig. 2 に示している。ER-030346、及び ER-034634 について検討を行ったところ、いずれの化合物においても振とう時間の影響は認められなかった (Table 3)。次に、フラスコ振とう法において 1

Table 2. Comparison of Solution-Precipitation Method with Shake-Flask Method

No.	Compound	Solvent	Solubility (mg/ml)		Agreement ^{a)}
			Solution-precipitation	Shake-flask	
1	Benzbromarone	JP2	0.0176	0.0108	○
2	Cyclandelate	JP2	0.0046	0.0078	○
3	Dipyridamole	JP2	0.0063	0.0030	○
4	Fluorocortisone acetate	JP2	0.0183	0.0135	○
5	Flufenamic acid	JP1	0.0004	0.0004	○
6	Flurbiprofen	JP1	0.0094	0.0065	○
7	Furosemide	JP2	0.6599	0.3089	○
8	Hydroxyzine pamoate	JP2	0.3342	0.0178	×
9	Ibuprofen	JP1	0.0082	0.0222	○
10	Ketoconazole	JP2	0.0865	0.0019	×
11	Ketoprofen	JP2	0.5659	0.4291	○
12	Naproxen	JP2	0.3897	0.1296	○
13	Oxyphenbutazone	JP1	0.6367	0.1517	○
14	Oxyphenbutazone	JP2	> 0.8	> 1.0	○
15	Phenylbutazone	JP1	0.0079	0.0052	○
16	Phenyl salicylate	JP2	0.0033	0.0088	○
17	Phenytoin	JP2	0.0154	0.0169	○
18	Reserpine	JP1	0.0013	0.0012	○
19	Sulindac	JP1	0.0138	0.0019	×
20	Tamoxifen	JP1	0.0087	0.0067	○
21	Tamoxifen	JP2	0.0009	0.0002	○
22	Terfenadine	JP1	0.9161	0.0497	×
23	Terfenadine	JP2	0.1380	0.0066	×
24	Testosterone	JP2	0.0245	0.0179	○
25	Tolbutamide	JP2	0.7821	0.4929	○
26	Trichlormethiazide	JP2	0.7958	0.0845	×
27	ER-030346	JP1	0.0172	0.0005	×
28	ER-023835	JP1	0.0095	0.0011	×
29	ER-023835	JP2	0.0004	0.0008	○
30	ER-034634	JP2	0.0053	0.0008	×

a) ○ : Solubility (solution-precipitation) < 5-fold of solubility (shake-flask) .

Table 3. Dependence of Mixing Time on Solubility by Solution-Precipitation Method

Compounds	Mixing time (min)	Solubility (mg/ml)
ER-030346 (JP1)	15 min	0.0172
	3 hr	0.0184
	13 hr	> 0.0217
ER-034634 (JP2)	15 min	0.0053
	3 hr	0.0044
	13 hr	0.0063

%DMSO 緩衝液を溶媒として、固体試料を用いて測定を行った。その結果、測定値は DMSO を含まない場合とほぼ同等であり、溶液沈殿法とは異なる

値を示した (Table 4)。以上の結果から、フラスコ振とう法との溶解性の乖離は 1% DMSO の存在が原因ではなく、試料を固体で添加するか、溶液で添加するかによって生じているものと考えられる。すなわち溶液沈殿法では試料は DMSO に溶解している状態で緩衝液に添加されることから、本来の溶解度で反映されるべき固体結晶の格子エネルギーを過小評価しており、したがって、溶媒和エネルギーよりも結晶格子エネルギーが十分に大きな試料の場合に飽和溶解度と大きく異なる値が得られたものと考えられる。比濁分析法とフラスコ振とう法による値がほぼ一致していたのは方法の問題ではなく、測定試料群の選択が原因であったと考えられる。

Table 4 Comparison of Solution-Precipitation Method with Shake-Flask Method in 1% DMSO Solution

Compound	Solvent	Solubility (mg/ml)		
		Solution-precipitation		Shake-flask (solid sample)
		1% DMSO	0% DMSO	1% DMSO
Sulindac	JP1	0.0138	0.0019	0.0027
ER-030346	JP1	0.0172	0.0005	0.0005
ER-034634	JP2	0.0053	0.0008	0.0004

DMSO 溶液を緩衝液に添加する方法であれば、比濁分析法であっても本法であっても同じように飽和溶解度とは異なる値を与える可能性があると考えられる。しかし言い換えれば、短時間で評価を行う本法から得られる溶解性パラメーターは、化合物の化学構造式に基づく溶解性を表しており、化合物最適化の早い段階においては、同じ化学構造であっても試料ロットの結晶性の違いや塩形の違いによって影響を受けやすい飽和溶解度よりも有用な情報になると考えられる。

1-6. 検体処理能力 現時点での一日検体処理能力は緩衝液 2 種類に対する溶解性測定の場合で 200 化合物である。本法の試料調製ステップは全自動化可能であり、また律速段階である HPLC 測定をパラレルにすることで更なる高速化が可能になると考えられる。

1-7. プロジェクトへの適用 本法の化合物最適化段階への適用を検討した。ピラジン誘導体 80 種に対して脂溶性と溶解性パラメーター (PBS 中) の相関を検討したところ、脂溶性パラメーター $\log P$ が 4 以下から溶解性が向上することが分かった (Fig. 4)。本法は化合物をある一定のクライテリアでふるい落とす為の手段ではなく、構造-溶解性相関において、溶解性向上を考慮した化合物の構造をデザインするためのツールを提供するものである。したがって、定量限界を比濁分析法の $50 \mu\text{M}$ レベルから 100 nM レベルに向上させたことによって、溶解性の向上を目的とした化合物のデザインに対しより有益な情報を提供できたものとする。また、本法は HPLC を用いているので標準溶液の結果より純度に関する情報も同時に測定可能であった。さらに、JP1 を用いた試料溶液の結果から酸性側で不安定な化合物群を同定できた。

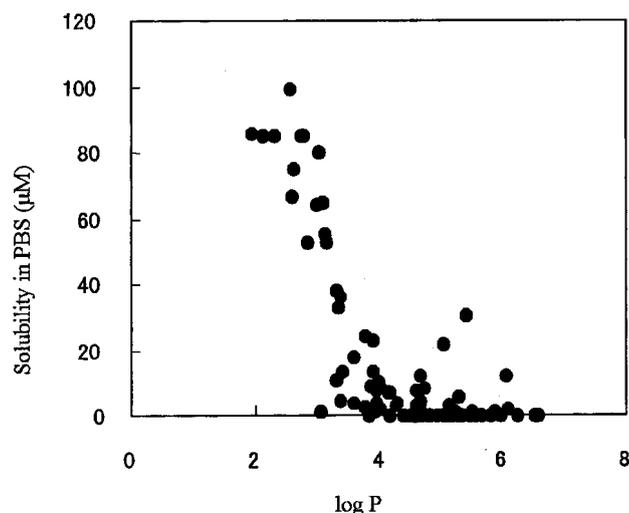


Fig. 4. Lipophilicity-Solubility Relationship for Pyrazine Derivatives

2. 固体溶解法

本法は徳村らの方法^{14,15)} (以下、従来法) を基本に開発されたものであり、(1)固体試料の緩衝液中への分散、(2)静置、(3)固液分離、(4)HPLC 分析の 4 ステップからなる。ここでは改良した部分を中心に検討を行い、設定した方法の再現性について評価した。

2-1. HPLC 条件の設定 従来法ではアイソクラティック溶出が用いられていたが、本法では短時間でより幅広い化合物に対し適用できるよう、溶液沈殿法と同様のグラジエント溶出条件を採用した。また多波長検出器の採用により、ピーク純度についての情報も得ることが可能となった。

2-2. 操作法 従来法では 37°C で静置した試料溶液 3 ml を固液分離する際、シリンジフィルターから最初にろ過する 1.5 ml を捨て、残りのろ液を回収していた。これはフィルターへの吸着を考慮したものである。また、操作途中での沈殿の析出

Table 5. Reproducibility of Powder-Dissolution Method

Compounds		Repeatability ($n=3$)			Intermediate precision ($n=3$)
		Day1	Day2	Day3	
Sulindac (JP1)	Mean (mg/ml)	0.0025	0.0013	0.0021	0.0020
	SD	0.0002	0.0002	0.0005	0.0006
	RSD (%)	9.0	17.8	22.1	31.1
Terfenadine (JP1)	Mean (mg/ml)	0.1424	0.1457	0.1381	0.1421
	SD	0.0037	0.0223	0.0068	0.0038
	RSD (%)	2.6	15.3	4.9	2.7
Ketoprofen (JP1)	Mean (mg/ml)	0.1384	0.1395	0.1287	0.1355
	SD	0.0026	0.0098	0.0009	0.0059
	RSD (%)	1.9	7.0	0.7	4.4
Dipyridamole (PBS)	Mean (mg/ml)	0.0010	0.0013	0.0011	0.0011
	SD	0.0004	0.0002	0.0002	0.0002
	RSD (%)	45.7	14.8	13.3	13.5
Testosterone (PBS)	Mean (mg/ml)	0.0234	0.0224	0.0216	0.0225
	SD	0.0008	0.0008	0.0001	0.0009
	RSD (%)	3.5	3.5	0.6	4.0
Phenytoin (PBS)	Mean (mg/ml)	0.0309	0.0204	0.0296	0.0270
	SD	0.0002	0.0002	0.0000	0.0057
	RSD (%)	0.7	0.9	0.2	21.2

Table 6. Comparison of Powder-Dissolution Method with Shake-Flask Method (37°C , $n=3$)

Compounds	Solvent	Solubility (mg/ml)		
		Powder-dissolution	Conventional method	Shake-flask
Dipyridamole	PBS	0.001	0.001	0.001
Ketoprofen	JP1	0.138	0.150	0.158
Phenytoin	PBS	0.031	0.028	0.026
Sulindac	JP1	0.003	0.004	0.002
Terfenadine	JP1	0.142	0.180	0.076
Testosterone	PBS	0.023	0.025	0.018

を防ぐため、さらに希釈操作を必要としていた。本法ではこれらの点を考慮し、希釈操作を除き、 37°C のオートサンプラー中ですべての操作（静置・ろ過・HPLCへの注入）を行うよう設定した。その結果、操作性は大幅に向上し、10化合物について、 $n=3$ で2種類の溶媒への溶解性を3時間で測定することが可能となった。

2-3. 精度 本法の再現性について検討した。Table 5に併行精度及び室内再現精度について評価した。溶解性が $1.0\text{--}2.5\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20.4\text{--}30.9\ \mu\text{g/ml}$ 及び $128.7\text{--}145.7\ \mu\text{g/ml}$ の試料に対する標準偏差

はそれぞれ $0.2\text{--}0.6\ \mu\text{g/ml}$ 、 $0.9\text{--}5.7\ \mu\text{g/ml}$ 及び $3.4\text{--}5.9\ \mu\text{g/ml}$ であり、溶解性スクリーニング法として十分な性能を有していることが分かった。

2-4. 従来法との比較 従来法及びフラスコ振とう法との比較を検討した。フラスコ振とう法については、各試料を少量試験管に取り緩衝液を加え、 37°C で24時間振とう後、試料溶液をろ過しHPLC分析した。結果をTable 6に示す。テルフェナジンを除き、いずれの試料も本法、フラスコ振とう法及び従来法の結果に大きな差は認められなかった。テルフェナジンについて、静置時間の影響を調べたと

ころ、6時間後、24時間後の固体溶解法による値はそれぞれ0.107及び0.100 mg/mlであり、1時間の時点では過飽和現象が起きていたと考えられる。したがって、静置時間は一律に1時間とするのではなく、過飽和の影響が大きい場合には、静置時間の延長を考慮する必要もある。今回の結果より、固体溶解法による値は飽和溶解度と一致しており、固体溶解法は、溶液沈殿法とは異なり試料の結晶性や結晶形などの固体状態も含めた溶解性パラメーターを測定できることが分かった。

ま と め

薬物候補化合物のDMSO溶液を用いた多検体溶解性スクリーニング法（溶液沈殿法）及び固体試料の溶解性の迅速評価法（固体溶解法）を開発した。溶液沈殿法から得られる溶解性パラメーターは、主として化学構造式に基づく溶媒と過程を反映しているため、溶解性向上をめざすプロジェクトの化合物最適化段階において特に有用であると考えられる。また、固体溶解法では、フィルター付きサンプルビンと高流速HPLCシステムを組み合わせることにより、迅速化を実現した。固体溶解法の試料処理能力は10化合物/3時間であり、測定精度も良好であった。溶液沈殿法と固体溶解法を相補的に用いることによって、探索段階の初期から後期にわたる溶解性スクリーニング法の微量化・迅速化が期待される。

謝辞 本研究を行うにあたって貴重な助言をいただいた五十嵐（伊藤）初江氏、石原比呂之博士、三輪敏紳博士をはじめとする物性研究室のメンバーに感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Ishihama Y., Oda Y., Uchikawa K., Asakawa N., *Anal. Chem.*, **67**, 1588–1595 (1995).
- 2) Lombardo F., Shalaeva M. Y., Tupper K. A., Gao F., Abraham M. H., *J. Med. Chem.*, **43**, 2922–2928 (2000).
- 3) Cheng Y. Y., Song J. C., Liu H., Pidgeon C., *Adv. Drug Del. Rev.*, **23**, 229–256 (1996).
- 4) Danelian E., Karlen A., Karlsson R., Winiwarter S., Hansson A., Lofas S., Lennernas H., Hamalainen M. D., *J. Med. Chem.*, **43**, 2083–2086 (2000).
- 5) Kansy M., Senner F., Gubernator K., *J. Med. Chem.*, **41**, 1007–1010 (1998).
- 6) Ishihama Y., Nakamura M., Miwa T., Kajima T., Asakawa N., *J. Pharm. Sci.*, in press.
- 7) Allen R. I., Box K. J., Comer J. E. A., Peake C., Tam K. Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 699–712 (1998).
- 8) Frostell-Karlsson A., Remaeus A., Roos H., Andersson K., Borg P., Hamalainen M., Karlsson R., *J. Med. Chem.*, **43**, 1986–1992 (2000).
- 9) Ishihama Y., Miwa T., Asakawa N., *Electrophoresis*, in press.
- 10) Avdeef A., Berger C. M., Brownell C., *Pharm. Res.*, **17**, 85–89 (2000).
- 11) Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., *Adv. Drug Del. Rev.*, **23**, 3–25 (1997).
- 12) Bevan C. D., Lloyd R. S., *Anal. Chem.*, **72**, 1781–1787 (2000).
- 13) Abraham M. H., Chadha H. S., “Lipophilicity in Drug Action and Toxicology, Chapter 18,” ed. by Mannhold R., Kubinyi H., Timmerman H., VCH, Germany, 1996, pp. 311–337.
- 14) Ito H., Tokumura T., Horie T., *Yakuzaigaku*, **57**, 260–261 (1997).
- 15) Tokumura T., *Pharm. Tech. Japan*, **16**, 1839–1847 (2000).