

X線結晶学 — その歩みと薬学への寄与 —

吉柳節夫

X-Ray Crystallography — Its History and Contribution to The Pharmaceutical Sciences —

Setsuo Kiryu

ABSTRACT

In this article, a brief history of the x-ray crystallography during about ten years, 1965-1975, is described. It includes the developments of crystallographic computation, the methods of phase angle determination, diffractometric instruments and new x-ray sources. It also describes some applications of x-ray diffractometry to the solid-state pharmaceuticals in same period.

はじめに

大学を卒業して40年余を経過した。その間に医薬品の結晶学的研究、溶解速度等の相間移動速度、医薬品の血漿タンパク結合、医薬品イオンの電気化学その他、広い意味での製剤物理解化学的研究に携わって来たが、いずれも断片的な結果に終わり、まとめて公表するにはいささか内容の乏しいものばかりである。そこで、ここでは私の学生の頃にあたかも長い眠りから覚めたように劇的な発展を遂げ、自然科学の各分野に大きなインパクトを与えた回折結晶学の歴史を振り返り、その一端を述べたいと思う（とくに1960年代から70年代にかけての様相について）。ただ、私自身の研究のまとめでも、膨大になりすぎた最新の知識の総説でもない。若い日にかいま見たある自然科学の流れのスケッチである。内容も大半が入門者向けの成書の域を出ていない。この点もお許し願いたい。

I. 回折結晶学の歩み

1. X線構造解析事始め

1995年は「X線発見100周年」として、日本結晶学会誌や他の科学雑誌に大きく取り上げられた。またその2年後の1997年はトムソン (J.J.Thomson) による「電子発見100周年」として科学雑誌の紙面を賑わせた。真空放電の中でのマイナスの電気を帯びた放射線である「陰

極線」はすでに1858年に発見されていたが、後にトムソンによってそれが負電荷を帯びた粒子（電子）の流れであることが確認されたのである。ドイツのヴェルツブルグ大学のレントゲン（W.C.Roentgen）もまた1895年に陰極線の研究の中で、それまでに知られていなかった未知の放射線（X線）を発見し、それによって1901年に創設された第1回ノーベル物理学賞を授与された。いずれも1900年のプランクの量子仮説に始まる20世紀初頭の新しい物理学の胎動の時期での出来事であった。X線の本質が波動であるか、粒子線であるか（このことは後の量子力学の成立以後は新たな意味をもつことになるが）の議論に終止符をうったのは、結晶によるX線の回折現象の発見であった。いくつかの実験の結果から波動として推定されるX線の波長と結晶格子の大きさの対比から、ミュンヘン大学のラウエ（M.T.F.von Laue）は結晶が回折格子の役割を果たしてX線の回折現象が起こることを予見し、他の共同研究者とともに硫酸銅の単結晶にX線を照射して予想通りの回折像（今日でいうラウエ写真）を得た。これによりラウエは1914年のノーベル物理学賞を授与された。このことはX線が電磁波であることと結晶が原子の規則正しい配列により成り立っていることを同時に立証したことになる。さらに英国のヘンリー・ブラッグ（W.H.Bragg）とローレンス・ブラッグ（W.L.Bragg）の父子も同様な研究を行い、息子のローレンス・ブラッグはラウエの式よりもはるかに簡単で分かり易く、今日でも多くの教科書に記載されているブラッグの式（ブラッグの反射条件、 $n\lambda = 2d \sin \theta$ ）を導いた。当時日本でも東京大学の寺田寅彦がブラッグらとは独立に同様な法則を発見していたが、他の似たような発見と同様に世界の果ての島国での発見は学問の中心であるヨーロッパには届かなかった。ブラッグ父子はこの回折現象を逆に利用して回折データから、結晶構造を探る「結晶構造解析」の方法を確立し、塩化ナトリウム、ダイヤモンド等の構造を決定した。すなわちX線構造解析の事始めである。これらの業績により、父子は1915年のノーベル物理学賞を授与された。この時ローレンス・ブラッグは若干25歳であった。翌1916年の受賞者は特性X線の発見者パークラ（C.G.Barkla）であった。X線は真空中で高速の電子線が金属の対陰極（ターゲット）に衝突することにより発生する。衝突による制動で電子のもつ運動エネルギーが失われ電磁波に変わったものは連続波長のX線で連続X線または白色X線と呼ばれる。ラウエの回折実験はこの白色X線を用いて行なわれた。それに対して特性X線（または固有X線）はターゲット金属の内部軌道の電子の遷移により発生するものでその金属に固有の単一波長のX線であり、回折実験には連続X線よりはるかに有用である。ローレンス・ブラッグは後にケンブリッジのキャベンディッシュ研究所の所長になった。彼の下でこの研究所で行なわれたX線回折に関わる研究が20世紀後半の科学に画期的な貢献を果たすことになる。すなわちケンドルー（J.C.Kendrew）によるX線回折法を用いた最初のタンパク質（ミオグロビン）結晶の構造決定、ケンドルーの師ペルーツ（M.F.Perutz）によるヘモグロビンの構造決定、及びクリック（F.H.C.Crick）とワトソン（J.D.Watson）がX線回折繊維像の解析に基づいて行なったDNAの二重らせん構造の決定である。彼ら4人はともに1962年のノーベル賞を受賞した。コンピュータもない時代にタンパク質結晶の構造

解析に挑戦したペルーツたち、容易に成果が出なくても彼らを支え続けたブラッグ所長にはヨーロッパの科学の伝統と自負を感じさせるものがある。

2. X線構造解析の方法

X線の回折は電磁波であるX線と物質内の電子との相互作用によって起こる。電子は原子の位置に集中して存在するから、原子によって散乱されると言ってもよい。結晶のように原子が規則正しく配置されている構造の場合は、入射するX線と結晶の関係がブラッグの反射条件に合致したとき鋭い反射が起こる。通常低分子の結晶で、X線の波長が0.154nm（銅の $K\alpha$ 線）の場合には3次元の様々な方向に数千個程度の反射が観測される。各々の反射からは反射の数だけの「構造因子」という量を求めることができる。逆に結晶構造が分かっていると個々の構造因子を、したがってまたどちらの方向にどのような強度の反射が起こるかを計算することができる。実測によって得られた数千個の構造因子から結晶構造を計算によって求めるのがX線構造解析である。この結晶構造と反射の像の関係を数学的には「フーリエ変換」という。言い換えれば構造解析とは結晶の実像にX線を入射したとき生じる回折像（フーリエ変換像）に「フーリエ逆変換」を施して元の実像を得る操作のことである。光学顕微鏡ではこの過程をレンズがやってくれているがX線の波長でのレンズは存在しない。将来X線波長でのレーザーが出現すればホログラフィーによって結晶構造、分子構造を目で見ることができるようになるかも知れないが、現状では未だ夢である。したがって上記の過程は数値計算によるしか方法がない。

構造解析の原理はすでにブラッグらによって明らかになっていたにも関わらず、実際には第2次大戦後までほとんど進展がなかった（とくに有機化合物について）のには、二つの要因がある。一つはフーリエ変換、逆変換の数値計算が膨大な計算量となることである。いま一つは原理的な問題の「位相問題（phase problem）」である。上記の構造因子は波すなわち正弦波（正確には複素数）の性格をもつ量である。波を規定するものは、波長、振幅、位相の3つである。回折反射の構造因子のすべてについてこの3者が得られるならば、直ちに計算によって構造を得ることができる。しかしながら、各反射の構造因子について実測で得られるのは反射強度すなわち構造因子の振幅の二乗に相当する量であって、位相は実測によって得られない。したがって実測によって得られた構造因子から直ちに計算によって構造を得ることは原理的に不可能であり、構造を解くには何らかの方法で各反射の位相についての情報を得なければならない。これが「位相問題」である。X線構造解析の歴史は、膨大な計算量、膨大な測定量、位相問題克服への戦いの歴史であった。

3. 計算への戦い

前述のように構造解析は実測によって得られた数千反射から得た構造因子を係数としたフーリエ級数の和を空間を3次元の基盤の目のように区切った各点ごとに求める計算（3次元フーリエ変換）の集積である。得られた値はその点の電子密度である。縦横高さの空間の刻みを仮に $30 \times 30 \times 60$ とすれば、電子密度を計算すべき空間の点の総数は54000点となるが、1点の

電子密度の計算に用いる構造因子（測定値）の数は数千個であるから、いかに膨大な計算となるかが分かるであろう。このようにして得られた電子密度の空間的地図はフーリエ合成図又はフーリエ・マップなどと呼ばれる（印刷される場合は電子密度は等高線で表示される）。電子は原子の位置に集中して存在するから、フーリエ・マップの中のピークの位置が原子の存在位置と解釈できる。ピークの高さは概ね電子の数、したがって原子番号に比例する。

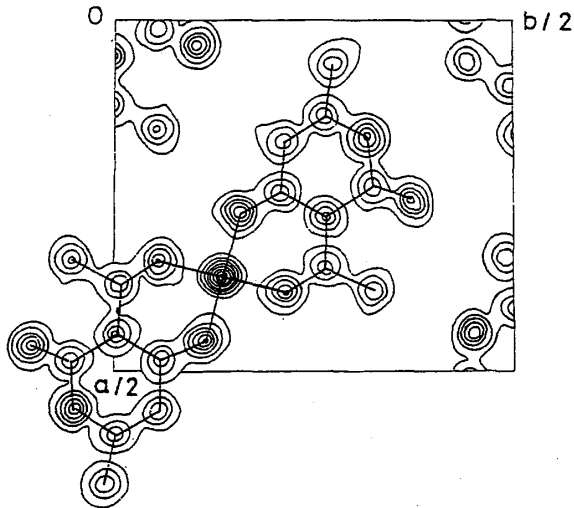


Fig. 1 The 2-Dimensional Fourier Map of Ni(II)-Dehydroacetic Acid Monoimide Complex projected along the c Axis

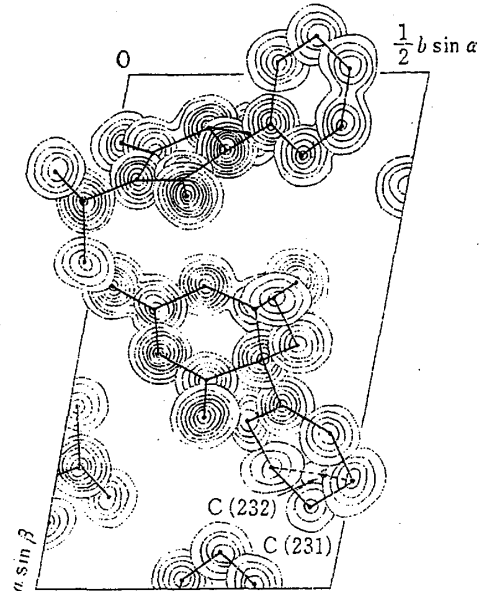


Fig. 2 Sections from the 3-Dimensional Final Electron Density Map of Aminopyrine-Cyclobarbitol Complex projected along the c Axis

Fig. 1はNi-dehydroacetic acid monoimide complexの構造解析¹⁾の際に計算途中で求めた2次元フーリエ・マップである。中央のNiのピークがC、Nのそれよりも高いことが認められる。当時、九大の井口研究室では保存料のデヒドロ酢酸が溶液中でアンモニア、アミン類と共存すると通常の緩和な条件でそのイミドを生じ、さらに銅などの金属イオンが存在すると金属化合物の沈殿を生じることを見出だしていた。この図はその化合物がキレート構造であることを示したものである。またFig. 2はアミノピリン-シクロバルビタール分子化合物の3次元フーリエ合成図である。²⁾前述のようにフーリエ合成には構造因子の大きさ（振幅）だけではなく、位相を必要とする。しかし実測では位相は得られないので、何らかの手段で近似的なモデルや確からしい部分構造を設定し、それに基づいて各反射の構造因子 (F_c) を計算する（これもまたフーリエ変換の計算である）。得られた F_c の位相角を実測の構造因子の振幅 (F_0) と組合せ、それによってフーリエ合成の計算を行なう。もしモデルがほぼ正しければ、得られたフーリエ・マップは化学的に妥当な構造を示すであろう。それによってモデルを修正したり未決定の原子を追加したりして、以上の計算を繰り返すと、構造は次第に真の構造に近付き、ほとんどの実測値 F_0 と計算値 F_c の振幅が一致してくる。これが構造解析の大まかな道筋である。電子計算機の登場前は3次元測定データを用いる3次元フーリエ合成は到底不可

能であった。したがって多くは2方向への2次元解析(投影図)を行なうのが普通であった。これだと実測すべき2次元反射数は数百、計算すべき平面の電子密度の点も数百~数千点でよい。私がX線解析の手ほどきを受けた上田幾彦先生(九大・物理)はブロマニル(キノンの4個の水素が臭素に置換されたもの)の2次元解析に卓上電動計算機を用いて2年を要し、計算用紙の山を築かれた。コンピュータの登場は構造解析に革命をもたらしたが、初期のものはまだ本格的な3次元解析には能力不足であった。Fig. 1は初期の九州大学の電算機を用いたものであるが、未だ2次元のフーリエ図である。当時の結晶学者にとっては世界最高のコンピュータIBM-7090は夢であったが、1966年にほぼ同等の能力の日立HITAC-5020Eが東大の大型コンピュータ・センターに導入され、続いて京大、九大に富士通の大型コンピュータが設置され、ようやく本格的な構造解析が可能となった(ただしそれらの能力は今日のパソコンに及ばないものであった)。前述のFig. 1のものも最終段階では3次元データを添えて東大に送ったが、全国の大学から殺到する計算のために計算結果が返ってくるのに10日もかかった。現在の論文では電子密度の図(フーリエ・マップ)が記載されることはない。現在の自動解析では回折計に付属したワークステーション程度のコンピュータが用いられるが、3次元フーリエ図はコンピュータの中で合成され、ピーク・サーチのプログラムが原子位置を見付け最終的に精密化された構造が出力される。今や人がフーリエ図を眺めて判断することはない。数年前の回折計の広告の中に、“Lunch Time Solution”というキャッチフレーズが目についた。昼食前に測定データを入力しておけば、帰ってきたときには分子構造が決まっているということである。高速化への一つの寄与として高速フーリエ変換法(fast Fourier transform, FFT)という計算法の開発がある。FFTはNMRなどのフーリエ変換分光法にも寄与している。

4. 位相問題への戦い

計算や測定の膨大さは技術的な問題であり、テクノロジーの進歩により解決し得るものであるが、位相問題は原理的な問題である。X線の回折反射から得られる構造因子は正弦波の性格を持つ物理量であり、その波としての振幅と位相がともに得られれば構造解析は単なる計算の問題に過ぎない。しかし測定によって得られるのは振幅の絶対値のみであって位相は得られない。したがって前項に述べたように初期モデルからスタートしてフーリエ変換、逆変換を繰り返して逐次正しい構造に近付いて行く方法がとられる。比較的簡単な分子で概略の形が分かっている場合は分子間距離、結晶格子の対称性、空間的スタッキングを考慮した試行錯誤でスタートモデルを設定することにより成功に到達したものも多い。1960年前後までに、医薬品としてもイソニアジド、ピラジナミド、アスピリンなどの構造が発表されている。この中でピラジナミドは阪大の高木義人氏によるもので、これによって同氏は国際結晶学連合より若手結晶学者に与えられるエワルド賞を授与された。³⁾位相は角度で表されるものであるが、結晶格子に対称中心があるとその値としては0度か180度しかとり得ない。言い換えると各反射の構造因子が正か負かいう二者択一の問題である。対称中心がないと0~360度のどのような値でもとり得るので位相問題の解決は格段に困難となる。多くの天然物分子の

ように光学活性分子ではその結晶は当然対称中心を持たない。そこで初期に登場した方法は「重原子法」である。原子番号が大きく電子を多く持つ原子はX線の散乱能が大である。したがって有機分子で重原子1個を持つものは、重原子1個の位置だけでスタート時のモデル構造となり得る。そのためキレート化合物、金属塩、天然物の重原子誘導体などが多く解析の対象となった。日本において有機化合物の構造解析を行っていたのは仁田勇教授の率いる阪大物理学科の研究室であった。この研究室からはカイニン酸亜鉛塩、トロポロンナトリウム塩などの構造が発表されている。世界的にみれば、ペニシリン、ビタミンB12などの構造を化学的方法に先んじて決定したとして、ホジキン (D.M.C.Hodgkin) は1964年のノーベル化学賞を授与された。これらは皆重原子を含んだ結晶構造であった。天然物重原子誘導体の解析で圧巻だったのは1964年の京都での国際天然物会議で、関学・名大、東大・三共、米国ウッドワードの3グループから同時に発表されたふぐ毒テトロドトキシンの構造発表であった。各重原子誘導体は異なっていたが、基本構造は一致しており天然物化学におけるX線構造解析の威力を印象づけた。重原子法とそれより発展した同型置換法はその後タンパク質結晶の解析での基本的手法となっている。

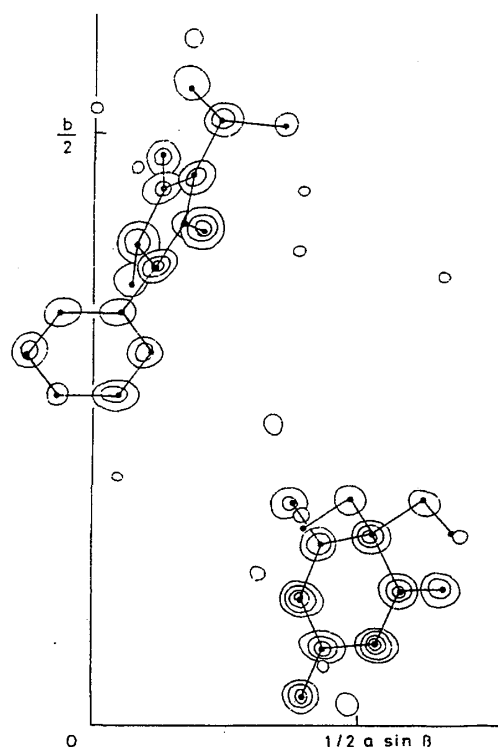


Fig. 3 The *E*-Map of Aminopyrine-Barbital Complex projected along the *c* Axis

ただ重原子を含まない結晶については、対称中心を有する結晶でさえも、挑戦して成功する確率は二分の一以下と言われていた。ここでブレイクスルーとして登場したのが「直接法」である。回折反射がある一つの結晶構造に由来する以上、数千個の反射が互いに全く無関係であるはずはないであろう。この点に注目して反射間に存在する統計的（確率的）関係を探り、それによって位相問題を解決しようとする試みは徐々に進行していた。とくにカール(J.Karle)

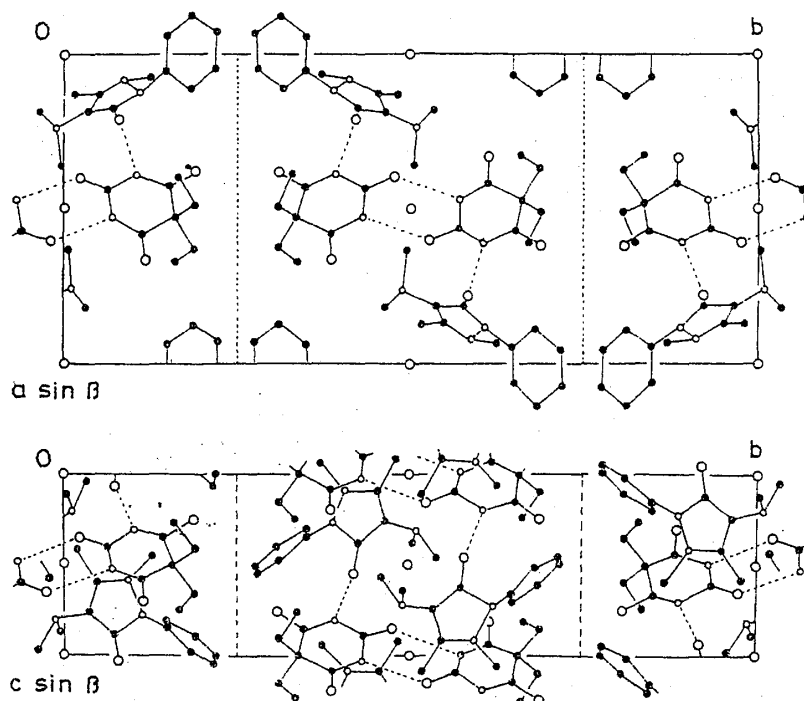


Fig. 4 The Molecular Arrangement of Aminopyrine-Barbital Complex projected along the c Axis and the a Axis

とハウプトマン(H.Hauptman)による不等式⁴⁾は彼ら自身や他の研究者によって次々と発展させられていった。直接法の効果は最初疑問視されていたが、1960年半ばよりJ.Karleと夫人のI.L.Karleによりあたかも魔法のように次々に成功例が報告された。さらに不可能と思われていた対称中心を有しない結晶(光学活性分子の結晶のような)にも成功をおさめ世界を驚嘆させた。彼らの方法は当時symbolic addition法と呼ばれていて、測定により得られた構造因子を規格化構造因子(E)に導き、その中の大きな値のものについて彼らが導いた位相決定法を施し、フーリエ合成(E -map)を行なうことが基本になっている。^{6,a)}Fig. 3は単斜晶系に属するアミノピリン-バルビタール分子化合物(薬局方名ピラピタール)結晶についての E -mapである。⁵⁾測定した3669反射のうち、symbolic additio法により位相を決定した394反射を用いたものであるが、測定データの1割強しか用いていないにもかかわらず分子構造がはっきりと浮かび上がっている。アミノピリン-シクロバルビタール分子化合物(当時市販されていた鎮痛薬セデスの主成分)はより対称性の低い三斜晶系結晶で同法には不利であったが解を得ることができた。²⁾どちらも2分子のバルビタールが2本の水素結合により連なり、その各々に1分子のアミノピリンが1本の水素結合により連なるという構造を示しており、それまで想像されていた構造の誤りを正した(Fig. 4)。⁵⁾1970年頃よりM.M.Woolfson作成の直接法プログラムMULTAN^{6,b)}は世界的に普及し、これを含む総合的な結晶解析のコンピュータプログラムが提供されるようになってX線解析の「大衆化」が始まった。カールとハウプトマンには1985年ノーベル賞が授与された。ノーベル賞の歴史で実際に物質の構造解析を行なったことによって受賞した者は数多くいたが、解析法の開発が対象となったものは彼らが

初めてである。一般には知られていない名前ではあったが、今日のX線構造解析法の大衆化を思えば、ブラッグ以来の偉大な貢献と言えよう。

5. 測定法への戦い

X線回折の測定は単結晶にX線（波長の定まった固有X線）を入射し、結晶内に無数に存在する格子面をBragg条件に合致するよう傾け、生じた回折反射について正確な3次元方向と強度を測定し記録するという操作である。初期にはこの測定は写真法によって行なわれた。すなわち単結晶のある軸を立て、その軸について回転させながらX線を入射し、Bragg条件によって次々に発生する反射を写真フィルムに撮影するのである。すべての反射を撮影するにはX線の入射角度、結晶軸を換えて撮影しなければならず、必要な強度範囲をカバーするために露出条件を様々に変化させて撮影しなければならなかった。写真法では1枚のフィルムに1回に数百点の反射を記録できるという利点があったが、回折反射強度は微弱であるので1回の撮影に数日間の露出を要し、また撮影後写真上の反射点の黒化度を一つ一つ手動でマイクロビーム光をあてて測定するという作業のために、必要なデータの収集が完了するのに数か月を要した。構造解析の速度は測定と計算のバランスに依存する。計算に要する時間が年単位であった時代には測定に要する時間が数か月であっても不自然ではなかったが、コンピュータの登場によりこのバランスは一変した。そこで約30年前に登場したのが4軸単結晶回折計である。数千個の反射をシンチレーションカウンターが一つ一つ3次元的に追いかけて測定して磁気テープに記録するという方式で、当然装置全体がコンピュータ制御である。これによって測定時間は数日乃至1週間に短縮され、データの質も大きく向上した。この装置は今も用いられているが、事情はさらに変化する。測定時間の一層の短縮を要請したのはタンパク質結晶学であった。タンパク質結晶の回折反射数は低分子結晶よりも遥かに多く、また結晶がX線照射により分解するという理由による。ここで写真法が持っていた1度に数百反射が測定できるという利点が見直されることになり、様々な2次元検出器が研究されることとなった。まず成功したのは、富士フィルムの開発したイメージングプレート（IP、商品名）である。輝尽性蛍光材料をプラスチックフィルムに塗布したもので写真フィルムと同様な取り扱いができる。露光後現像の代わりにレーザービームでスキャンするとX線を受けた部分が発光する。その光を光電子増倍管で捕らえて位置と強度を記録する。X線に対して写真フィルムより1～2桁感度が高く強度の範囲は1～10000以上にわたって直線性がある。医療用として普及しつつあるが、回折計用としても自動化した装置が既製品として売り出されている。またデジカメ等に使われているCCD (charge coupled device) はその大型化などに問題は残っているものの、高速化という点でIPに勝り、これを用いた回折計も市販されている。これらによって測定時間は日単位から時間単位にまで短縮された。現在の市販の回折計にはコンピュータ、解析ソフトが付属しているから、構造決定は1日の仕事となった。なお東工大の大橋裕二教授のグループが開発中の2次元ガスカウンターの1種のMSGC (micro strip gas chamber) は結晶の1回転（2秒）で必要な全回折データを得て解析に成功したそ

うである。⁷⁾将来性は未だ未知数であるが、もし実用化されれば測定時間は分単位となり、単結晶さえ得られれば、測定・計算を合わせて構造解析はLunch Time Solutionとなるだろう。

X線は電子線が金属の対陰極に衝突することによって発生するのであるが、電子線の持つエネルギーの99%は熱と化するため、冷却水を循環させて対陰極の融解を防いでいる。この機構による限り実験室用のX線発生装置のX線強度については、現在に至るまで格段の進歩は見られず、将来についても期待できない。しかしここに全く異なる原理による強力なX線源が登場した。シンクロトロン放射 (synchrotron radiation) と呼ばれるもので、実験室用線源に比して1万倍もの強力なX線を発生する。日本では1982年に筑波の高エネルギー物理学研究所に建設され (フォトンファクトリー)、またその後播磨科学公園都市内に世界第1級の強力な放射光施設として、(財) 高輝度光科学研究センターSPring-8が建設され、1998年に共同利用が開始された。現在タンパク質結晶学ではシンクロトロン放射と2次元検出器の組合せが必須となった感があるが、強力であることその他、連続波長のパルス光であること等の特性を利用した新しい解析法の開発も進んでいる。

6. 生体高分子物質の構造解析

ケンドルー、ペルーツによるミオグロビン、ヘモグロビンの結晶構造解析に始まるタンパク質結晶学はその後、解析理論、実験技術の進歩によって大きな流れとなって発展した。実験技術、解析理論ともに低分子結晶のそれらと異なる開発が必要であったので、今ではタンパク質結晶学は通常の回折結晶学とは別種の学問分野として大きな存在となった感がある。日本結晶学会の年会の演題の半数程度が生体物質関係で占められるようになり、国際結晶学連合の論文誌*Acta Crystallographica*は4分冊の1つ (section D) をこの分野の論文に当てている。また解析されたタンパク質の構造は米国Brookhaven National LaboratoryのProtein Data Bank (PDB) に収録されている。単独のタンパク質はもとより酵素タンパクでは基質との複合体の解析も行なわれ、ヘモグロビンの構造を決定したペルーツ自身もヘモグロビンと数種の薬物の複合体の構造を発表している。⁸⁾薬学に関連しては、医薬品開発におけるstructure-based drug designからのアプローチとして、薬物と標的タンパク質の相互作用が注目されるようになり、日本結晶学会誌の特集記事の中にも度々取り上げられている。「特集：三次元構造とドラッグデザイン。結晶学は新しい薬を作れるか」、⁹⁾栗原弘之「医薬品開発とタンパク質結晶学」、¹⁰⁾宮野雅司「応用から見た構造生物、創薬を中心にして」¹¹⁾ではHIVプロテアーゼ阻害薬での成功例等が述べられている。また日本製薬工業協会加盟22社からなる「タンパク質構造解析コンソーシアム」は前記の大型放射光施設SPring-8に専用のビームライン (創薬産業BL) を建設し、2002年末より運用を開始する。

高分子物質は必ずしもすべてが結晶性ではないが、鎖状高分子を1方向に伸張するとその方向に周期構造を持つことになり、回折パターン (繊維回折像) が認められるようになる。それによって、単結晶の構造解析ほどではないが、構造に関する情報が得られる。有名なのは、ワトスン・クリックのDNAの二重らせん構造決定の基になったのが、R.E.Franklinによ

るDNAの繊維写真である。その優れた回折像の写真がなければ、DNAの構造決定は成功しなかったであろうし、もし彼女が若死にしていなかったら共にノーベル賞を受賞したであろうということは広く知られている。その他にも例えばコラーゲンの三重らせん構造もその繊維写真の解析から求められている（コラーゲンについては、最近新しいモデルも提案されている）。¹²⁾

7. 中性子線回折

X線の回折は結晶内の電子によって生じ、解析によって得られるのは結晶内の電子密度分布である。そこで電子密度のピークの高さ（正確にはピークの体積）は原子に属する電子数（原子番号）に相当する。したがって原子番号1の水素のピークは小さく、フーリエ・マップでも炭素、酸素などのピークのすそ野に隠れて見出すことはできず、1960年前半までの解析ではほとんど水素原子は対象にされていなかった。その後、測定値の精度が向上してくると、差フーリエ合成 ($F_0 - F_c$ 合成、D合成) という炭素、酸素原子などのピークを削り取る手法を適用して水素の低いピークを浮き上がらせ、その座標を決定することができるようになった。前述のアミノピリン-バルビタール複合体の解析⁵⁾では測定は写真法で行なったが、解析においては水素原子を見出すことはできなかった。Fig. 4では水素結合を点線で示しているが、水素原子自体を決定しているわけではなく、N-O間距離の短さから水素結合の存在を推定しているのである。アミノピリン-シクロバルビタール複合体の解析に際しては4軸単結晶回折計の利用が可能となっていたので、水素原子位置も決定できた。²⁾ただX線回折を利用するかぎり、得られる水素原子についてのパラメータの精度は低い（タンパク質結晶学では、未だ水素原子の決定はほとんど行なわれていない）。また炭素、窒素、酸素は原子番号として1ずつしか違わないので他の重原子の影響が大きい場合には区別が付きにくい。さらに水素原子について言えば、水素に属する電子は1個しかないが隣接する炭素原子などへの共有結合のために電子密度の分布は隣接原子の方向へやや偏っている。すなわち差フーリエ・マップのピーク的位置を水素原子の位置と解釈すると、それによって求めた水素-炭素の結合距離は原子核間の距離より短いことになる。これらの点を解決する方法に中性子線回折がある。量子力学の教えるところによれば、電子線や中性子線のような粒子線もまた波動の性格をもち結晶による回折現象を生じる。中性子は電荷を持たないので原子のもつ電子とは無関係でその散乱は原子核との相互作用による。X線の場合の原子散乱因子に相当する中性子線の散乱振幅（散乱長）は原子番号に無関係で水素についてもかなり大きな値をもっている。したがって得られるフーリエ図で水素の位置ははっきりと認められる（ただし水素の散乱振幅は負の値であるので、ピークではなく凹みとして現われる）。その結果、1950年代にすでに、水や無機化合物中の水素の位置が定められていった。また現在燃料電池自動車の開発が急がれていて、燃料の水素を貯蔵する手段として水素を金属に吸収させることが研究されているが、水素が金属とどのように結合しているかについてはX線解析は無力であり、中性子線回折に頼らざるを得ない。現在ではタンパク質結晶にまで中性子線回折による水素原子の位置

決定が試みられている。¹³⁾ただ中性子線の線源として原子炉や加速器を必要とするので、実験室規模では行えないのが難点である。その他に中性子線による小角散乱法という手法はコロイド次元の粒子のサイズや形を探る手段として利用され、ウイルス等の構造研究に威力を発揮している。

8. 回折結晶学に未来はあるか

結晶学が眠りから覚めて走り始めてからほぼ半世紀が過ぎた。その間にコンピュータの進歩による解析時間の短縮、新技術開発による測定時間の短縮はほぼゴールに近付いたと言って良いだろう。低分子有機化合物結晶の場合、直接法の進歩で位相問題は克服されたと言ってよく、解析のスタートに際して解析が成功するか否かを心配する必要もなくなった。回折計の小型化によって研究者ごとに1台の回折装置が利用できるのも遠い未来のことではないと言われている。結晶構造解析法は一部の限られた専門家の手から大衆の手に移った。1968年ケンブリッジ結晶構造データベース (Cambridge Crystal Structure Data Base, CSD) ができたとき、それ以前の50年間に解析された結晶構造が約5000件登録されたが、現在では1年間に約15000件が登録され、その大半が結晶学を専門としない研究者によるものだそうである。⁷⁾かつては「X線構造解析の専門家」が存在して、何らかの意味のある物質 (医薬品など) の構造を解析すれば、研究業績として評価された。しかし *Acta Crystallographica* の編集委員を長く務められた芦田玉一名古屋大名誉教授は、数十年来行なわれてきた単に分子間、分子内の結合距離、結合角を決めたという解析結果は構造的に特別の特徴がない限り独立した論文としては認められないと言われている (一方で構造解析の大衆化によって、実験、解析ともに基本的な吟味に欠ける解析結果の報告が増えつつあることに対しても苦言を呈されている)。¹⁴⁾しかし一方で研究を離れたルーチンな構造解析は必要だとする意見もある。Structure-based drug designでPDBから検索した標的タンパク質とCSDから検索した医薬品候補化合物とのフィッティングを調べることが基本となることを思えば、多くの化合物についてその分子のディメンジョンを正確に定めて登録すること、すなわち「サービス結晶構造解析」は益々必要になると思われる。¹⁰⁾

回折結晶学に未来はあるだろうか。タンパク質結晶学、構造生物学はもはや結晶学の範疇から独立した大きな学問分野となり、新しい技術、理論を貪欲に取り入れながら発展して行くだろう。しかし本家の回折結晶学には何が残るだろうか。測定精度の向上による超精密な解析も一つの方向と考えられる。前述の差フーリエ合成で水素原子を含めてすべての原子のピークを削り去るとわずかな結合電子の分布をも浮かびあがらせることが可能となる。これには中性子線回折によって原子核の座標値を正確に定め、

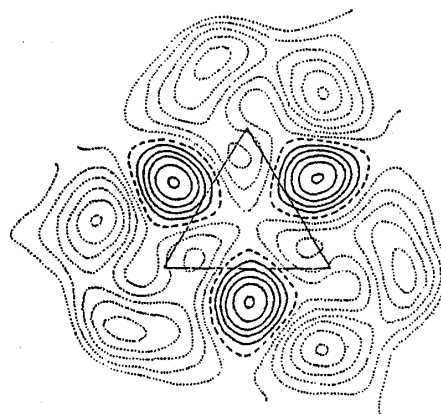


Fig. 5 The D-Map of the Cyclopropane Moiety of *cis*-1,2,3-Tricyanocyclopropane (A. Hartman *et al.*)¹⁵⁾

その座標値からの構造因子の計算値 (F_c) を利用したX-N合成の手法も加わり、すでに1970年前後から種々の報告がなされている。例えば、これによりシクロプロパン環のC-C結合の電子は環の外側にあり、結合が湾曲していること (bent bond) が認められた (Fig. 5)。¹⁵⁾このような結合電子、軌道電子などのいわゆる「電子密度分布解析」は大きな流れとは言えないが、今日でも地道に進行している。また2次元検出器の進歩による測定時間の短縮によって、短時間しか存在し得ない固相反応の中間状態の分子構造、励起状態分子の構造への挑戦も始まっている。⁷⁾しかし通常の低分子構造決定については、上述のようにもはや独立した研究とは認められないであろう。私も1973年からの1年間に行なったスイス、ベルン大学結晶学研究室での2つのシクロファン(1,10-dithia-[2.2]metacyclophane¹⁶⁾と8-nitro-1,10-dithia-[2.2] metacyclophane¹⁷⁾)の解析を最後にX線構造解析から足を洗った(これらは今日なら2日間の仕事であろう)。こじつけのようだが、この試料がレントゲンのいたドイツ、ヴェルツブルグ大学の有機化学研究室からのものであったことに、いささかの感慨を感じたものだった。

II. 薬剤学における回折結晶学

1960年始めの頃の日本の薬剤学は米国の影響を受けて物理化学的な手法によるもの (physical pharmacy) が主流であった (当時優れた物理化学者たちの薬学分野への参入によって米国ではpharmacyがscienceになったと評されていた)。固体医薬品が関わる分野でも結晶多形、低分子間の複合体結晶形成、非晶質高分子との複合体形成等がしばしば溶解性の改善等の観点から研究対象に取り上げられた。この場合それらの固相としての同定法で最も直接的なものは粉末X線回折パターンである。また非晶質と結晶とでは物性に大きな相違があり、そのため部分的に非晶質な系の結晶化度の測定にも不可欠な手法であった。ただ、固体としてのこれらの因子は製剤の同等性に若干の影響を与えるものとして注意を促す点ではあるものの、実用的な特性向上としては大きな流れにはなり得なかった。現在では他の物理化学的研究と同じく薬剤学研究の表舞台から去った感がある。

1. 結晶多形 (Polymorphism)

同一分子からなっていながら、構造の異なる結晶を結晶多形といい、古くからバルビタール類、ステロイド類、酢酸コルチゾン、パルミチン酸クロラムフェニコール、サルファ剤類、ピラジナミド、カカオ脂等の医薬品にも数多く知られている。多形には低温安定形と高温安定形があって、温度の上昇により低温形から高温形に変化することがあり、これを固相転移 (transition) という。この現象は示差熱分析計 (DTA)、示差走査熱量計 (DSC) 等で観察することができる (Fig. 6)。¹⁸⁾高温形も低温に戻したとき、そのままその形を保ったままであることがある (準安定形)。準安定形は安定形より自由エネルギーが大きいはずであるから、溶解度も大であることが予想される。その観点から1970年前後、多形を利用した溶解性の改善とそれによる消化管吸収の改善の研究が盛んに行なわれ、著しい効果の例も報告された。

しかしながら、有機物結晶における分子間力はせいぜい水素結合程度のものであるから、融解熱（融解エンタルピー）の差は僅かであり、そのことはDTA図の転移熱吸収の小ささからも明らかである。溶解度は融点と融解エンタルピーによって定まるものであるから、結果として多形による溶解性の改善に大きな期待はできない。はたして高エネルギーの固相は製剤原料として好都合な相だろうか。むしろ製剤としては不都合な現象が生じるの方が予想される。準安定形も保存中に安定形に変化しようとする傾向がある。デヒドロ酢酸結晶の準安定形（ β 形）は保存中に安定形（ α 型）に変化し、それによる結晶成長のため粒度の増大を来した（Fig. 7）。¹⁹⁾また製剤学では多形の問題に無水結晶と含水結晶も含めて論じられることが多いが、室温で準安定形である無水カフェインで製した顆粒剤の表面に安定形である含水カフェインのwhisker（細い針状結晶）が大量に発生したことが報告されている。^{20,a)}

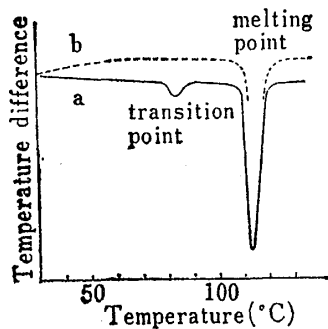


Fig. 6 The Differential Thermal Analysis of Dehydroacetic Acid Crystals
a) α -form, b) β -form.

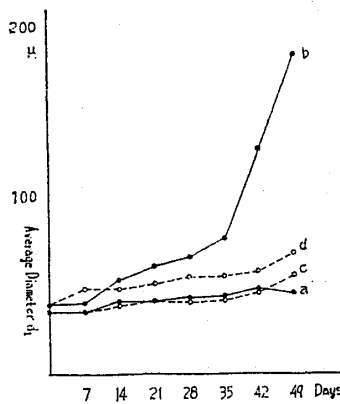


Fig. 7 Changes of Particle Sizes of Dehydroacetic Acid Powders
a) α -form, b) β -form,
c) α -form in aqueous suspension,
d) β -form in aqueous suspension,
at 37°C.

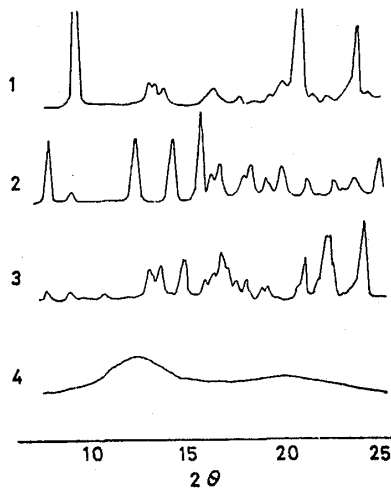


Fig. 8 Powder X-Ray Diffraction Spectra
1) aminopyrine, 2) cyclobarbital, 3) aminopyrine-cyclobarbital complex
4) aminopyrine-cyclobarbital-poly(vinylpyrrolidone) complex.

2. Solid Dispersion

異種の低分子間の複合体や低分子と高分子からなる複合体は、薬剤学ではしばしばsolid dispersionと呼ばれる。これらの研究もまた溶解性の改善という観点から行なわれたものが多い。難溶性分子ももし易溶性分子と複合体結晶を形成することができれば溶解性が改善されるのではないかと期待される。そこで難溶性のバルビタール、易溶性のアミノピリン、および両者の1:1複合体の溶解速度を比較検討したが、結果として複合体からの溶出は両者が等モル比で溶出するという特徴はあるものの、バルビタールの溶解速度としてはさほど改善は認められなかった。²¹⁾このことは、両者と水の3成分平衡図(相図)に拡散律速の溶解速度式を適用すれば当然の帰結である。²²⁾

非晶質固体の溶解度は極めて大きい、低分子の場合は不安定で短時間に結晶化が起こる。しかし非晶質高分子との複合体は安定でかつ結晶に比し溶解速度が1桁アップする。スルファチアゾール、^{20,b)}グリセオフルビン^{20,c)}等多くの報告がなされた。シクロバルビタール-アミノピリン-ポリビニルピロリドンの系も安定な非晶質固体を形成し(Fig. 8の4)、溶出に際し、等モル比、高速、かつ溶出液の液性に影響されにくい等の優れた性質を示した。²³⁾ただ多くの研究にも関わらず高分子複合体で実用化されたものはない。

3. 結晶の力学的性質

有機化合物における分子間力はさほど大きなものではないので、ある種の無機化合物のように大きな強度の異方性を示すことは少ない。しかしアスピリン結晶のように(Fig. 9)、²⁴⁾分子間力が弱く自由に動き易いアセチル基末端が1平面上((100)面に平行な面)に並んで互いに接触している場合にはこの方向の結合が弱く、この面に沿って動き易いことが想像される。事実アスピリンに力を加えると特定方向に塑性変形を生じ、*c*軸方向より見た偏光顕微鏡

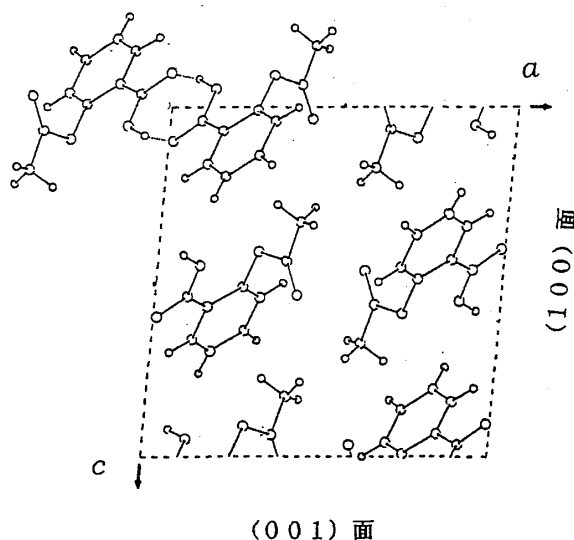


Fig. 9 The Molecular Arrangement of Aspirin projected along the *b* Axis (W. Wheatly)²⁴⁾

写真ではあたかも重ねた紙のような多くの滑り面が発生していることが観察される (Fig. 10、未発表)。写真での結晶の上面また滑り面は (100) 面であり、滑りの方向 (写真の左右方向) は b 軸方向 (Fig. 9の紙面に垂直方向) である。バルビタールIV形結晶もアスピリン結晶と極めて類似した構造を持っているが、²⁵⁾全く同様な異方性の滑り変形を示す。東邦大学福岡英平教授は、アスピリン錠の各面のX線回折パターンを検討し、錠剤平面に平行にアスピリン粉末粒子の (100) 面が多く配向していることを見出だしている。²⁶⁾このことが加圧に際しての滑り変形によるものか、へき開の異方性によるものかは不明であるが、上記の力学的特性に関わりがあるであろうことは想像できる。

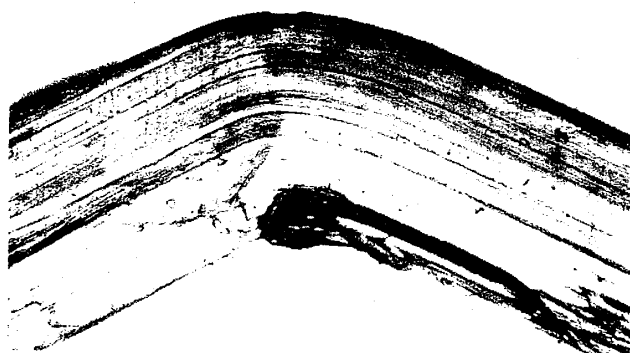


Fig. 10 The Plastic Deformation of an Aspirin Crystal viewed along the c Axis

終わりに

1960年頃動き始めたX線構造解析に関心を持ち、一貫してではなかったものの、ほぼ10年に亘って関わりをもった。その間の進歩は目覚ましく、本文中に述べたように方法論としては行き着くところまで行き着いた感がある。当時専門家が1年を要した仕事を結晶学を専門としない人でも1日のできる装置が現在では多くの化学系研究室に普及している。薬剤学における固体物性の分野も様相は異なっても似たような運命をたどった。学問の誕生、成長とそれに続く運命はあたかも生命体の一生を思わせるものがある。当時を思い現在を眺めるとき、ふと空しい気がしないでもないが、しばしの間でも大きく進んで行く学問分野を間近に見ることができたのは幸運であったと思う。

参考文献

- 1) Kiryu,S., *Acta Crystallogr.*, 23, 392-397 (1967) .
- 2) Kiryu,S.,Hirayama,F.,Iguchi,S., *Chem.Pharm.Bull.*, 22, 1588-1592 (1974) .
- 3) Takaki,Y.,Sasada,Y.,Watanabe,T., *Acta Crystallogr.*, 13, 693-702 (1960) .
- 4) Karle,J.,Hauptman,H., *Acta Crystallogr.*, 3, 181-187 (1950) .
- 5) Kiryu,S., *J.Pharm.Sci.*, 60, 699-703 (1971) .

- 6) 日本化学会編, "第4版 実験化学講座 10, 回折", 丸善 (1992), pp.130-133;
- a) Karle, J., Karle, I.L., *Acta Crystallogr.*, 21, 849 (1966);
- b) Declercq, J.P., Germain, G., Main, P., Woolfson, M.M., *Acta Crystallogr.*, A29, 231 (1973).
- 7) 大橋裕二, "結晶構造解析の未来 - 時間分割構造解析によるその場観察 -", 日本結晶学会誌, 42, 300-303 (2000); Ochi, A., Tanimori, T., Aoki, S., Nishi, Y., *J.Synchrotron Radiation*, 5, 1119 (1998).
- 8) Perutz, M.F., Fermi, G., Abraham, D.J., Poyart, C., Bursaux, E., *J.Am.Chem.Soc.*, 108, 1064-1078 (1986).
- 9) 日本結晶学会誌, 32, No.2 (1990).
- 10) 栗原宏之, 日本結晶学会誌, 38, 105-110 (1996).
- 11) 宮野雅司, 日本結晶学会誌, 42, 322-329 (2000).
- 12) 奥山健二, "モデルペプチドを用いたコラーゲンの構造研究", 日本結晶学会誌, 42, 346-353 (2000).
- 13) 新村信雄, "タンパク質中性子結晶学", 日本結晶学会誌, 38, 95-98 (1996); Kossiakoff, A.A., Shpungin, J., Sintchak, M.D., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87, 4468 (1990).
- 14) 芦田玉一, "Acta Crystallographica誌Co-editorを交代して", 日本結晶学会誌, 37, 328-331 (1995).
- 15) 丸茂文幸, "電子密度解析", 化学の領域, 30, 357-366 (1976); Hartman, A., Hirshfeld, F.L., *Acta Crystallogr.*, 20, 80 (1966).
- 16) Kiryu, S., Nowacki, W., *Z.Kristallogr.*, 142, 98-107 (1975).
- 17) Kiryu, S., Nowacki, W., *Z.Kristallogr.*, 142, 108-116 (1975).
- 18) Kiryu, S., Iguchi, S., *Chem.Pharm.Bull.*, 11, 843-845 (1963).
- 19) 吉柳節夫, 井口定男, 薬剤学, 24, 30-31 (1964).
- 20) 吉柳節夫, "医薬品の溶解性", 化学の領域, 31, 93-98 (1977);
- a) 山田正幸, 西村勇治, 松崎藤一郎, 薬誌, 96, 1223 (196);
- b) Simonelli, A.P., Metha, S.C., Higuchi, W.I., *J.Pharm.Sci.*, 58, 538 (1969);
- c) Meyerson, M., Gibaldi, M., *ibid.*, 55, 1323 (1966).
- 21) 吉柳節夫, 坂巻泰尚, 磯部光孝, 井口定男, 薬剤学, 32, 11-15 (1972).
- 22) 吉柳節夫, 井口定男, 薬誌, 89, 707-711 (1969).
- 23) 吉柳節夫, 芦矢 亮, 江崎信子, 松岡春江, 加藤京子, 井口定男, 薬剤学, 39, 216-219 (1979).
- 24) Wheatley, P.J., *J.Chem.Soc.*, 1964 (Suppl. II), 6036-6048.
- 25) Craven, M.M., Vizzini, E.A., *Acta Crystallogr.*, B27, 1917-1924 (1971).
- 26) Fukuoka, E., Makita, M., Yamamura, S., *Chem.Pharm.Bull.*, 35, 1564-1570 (1987).