

微小な結晶から結晶構造と水素原子の位置を可視化する



西山 裕介
Nishiyama Yusuke

1 はじめに

低分子医薬品は、風邪薬や花粉症、生活習慣病等日常的に投与される錠剤や散剤等に有効成分すなわち API (active pharmaceutical ingredient) として含まれる。さてその結晶構造は錠剤や散剤から直接決定できるのだろうか。低分子 API の 70% 以上は複数の異なる結晶を取りうる (結晶多形) と言われているが、結晶形によって医薬品の安定性・溶解度・吸収性が異なり、医薬品としての効能に大きな違いがあることが知られている。そのため、医薬品における結晶形の制御、すなわち API が想定した結晶形であることの確認は、品質管理において非常に重要である。結晶構造の決定は単結晶 X 線回折法が王道であるが、残念ながら錠剤中の API の結晶は多くの場合一辺 1 μm 前後の微結晶であり、小さすぎるため構造決定は困難である。そこで、一般的には粉末 X 線回折法や ^{13}C 固体 NMR (核磁気共鳴: nuclear magnetic resonance) 法により結晶形の同定が行われている。あらかじめ想定される結晶形の粉末 X 線回折パターンや、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルを測定してデータベース化しておき、錠剤から測定されたパターンやスペクトルとパターンマッチングすることにより、結晶形の同定を行ったり、意図していない結晶形が含まれていないことを確認するわけである。しかしながら未知の結晶形が意図せずして含まれている場合には、当然そのパターンはデー

タベースに含まれておらず、この従来法ではその存在を見逃してしまう。このような現象は実際に観測されており、市販されている医薬品に未知の結晶が含まれていることを確認した¹⁾。また、低分子医薬品の結晶構造においては水素位置を精密に決定することが求められる。構造の安定機構に水素結合が重要な役割を果たしているのみならず、知的財産の点で重要な塩・共結晶の区別には、H の位置を 10 pm 単位の精度で決定する必要がある²⁾。しかしながら X 線回折法で得られる水素位置の精度では不十分である。

筆者らは電子回折 (microED) 及び固体 NMR を用いることにより、微結晶から水素位置も含めて結晶構造を直接測定する手法を開発した³⁾。microED により 1 μm 以下の微結晶から結晶構造の決定ができる。しかしながら、その構造は完全ではなく、1) H がはっきりと見えない、2) C・N・O といった原子番号の近い原子を取り違える、といった問題がある。そこで、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{14}N 、 ^{15}N を直接観測できる固体 NMR を相補的に用いることにより、より正しい結晶構造が得られる。

2 電子回折

まず微結晶からの結晶構造解析法として、X 線の代わりに電子線を照射する電子回折に着目した。電子は X 線と比べると物質への相互作用が $10^4 \sim 10^5$

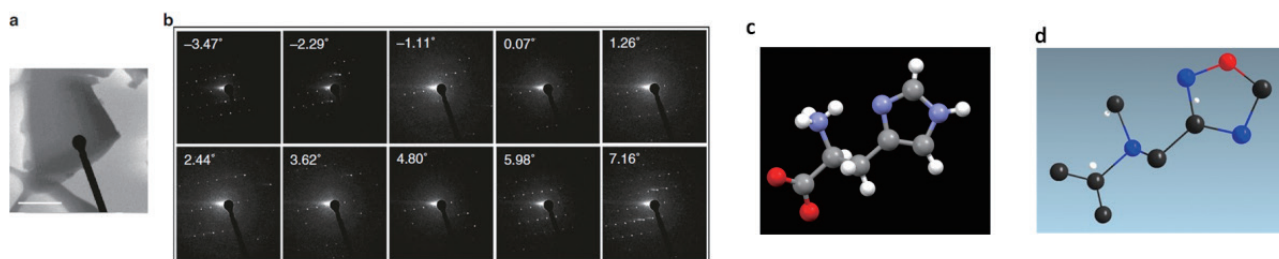


図1 L-histidine 結晶の TEM 像 (a) 及び回折パターン (b), 中性子回折で得られている構造 (c), microED で得られた初期構造 (d)。c,d では C (黒), N (青), O (赤), H (白) で示されている。参考文献 3 より引用 (Licensed under CC BY 4.0)

倍強い。そのため、X 線では散乱強度が不十分な 100 nm ほどの非常に小さな結晶からも構造解析に十分な散乱パターンが得られる。更に X 線とは異なり電子線はレンズを構成できる。そのため、光学顕微鏡のレンズを置き換える形で電子顕微鏡を作ることができる。実際に電子回折は TEM (透過型電子顕微鏡: transmission electron microscope) の測定モードのひとつであり、TEM 像で適切な結晶を発見したら、そこで電子回折モードに切り替えてその結晶の電子回折パターンの測定ができる。歴史的には電子回折は電子損傷に強い無機結晶の解析に用いられてきた。一方、近年の高感度カメラの開発により低い電子照射でもパターンが得られるようになり、加えて試料を 100K 程度の低温に保ち電子損傷を低く抑えることにより、有機物の電子回折も得られるようになった。単結晶 X 線回折と同様に試料を回転させて複数の電子回折パターンを得る microED 法により、逆格子空間を 3 次元的に構築し、タンパク質の結晶構造が解けるようになった^{4,5)}。更に 2018 年に低分子医薬品への応用が発表され、注目を浴びている^{6,7)}。

われわれは、モデル化合物として L-histidine の微結晶を用いて microED 測定を行った。図 1a の結晶の角度を変えながら、図 1b に示す一連の回折パターンを得た。この回折パターンを X 線回折で用いられる標準的な解析ソフトを用いて、図 1d の初期構造を得た。骨格の構造は正しく再現されているが、水素原子が見えていない、C・N・O の帰属が正しくないという問題がある。この問題は電子の散乱能が非常に強いことに起因する。ここで microED の構造解析に用いたソフトは、結晶内での散乱は 1 回のみと仮定して解析している。この仮定は X 線回折の場合には問題ないが、結晶内で複数回散乱する (多重散乱) 電子回折の場合には成り立たない。多

重散乱の効果を解析に組み込むことでこの問題はかなり解決するが⁸⁾、その手順は複雑であり更に結果も完全というわけではない。低分子医薬品の解析の場合、化学構造は既知であり C・N・O の帰属の間違ひは多くの場合正しく修正できるが、H が見えない問題は依然として大きい。実際に L-histidine の場合は、a) 双性イオンかどうか b) イミダゾール環のプロトン化の状態 c) イミダゾール環の回転の区別が付かない。

3 固体 NMR

これらの問題に答えるために固体 NMR 測定を行った。近年の高速試料回転 (MAS: magic angle spinning) 技術の進展はめざましく、120 kHz 以上の超高速の試料回転が実現している。図 2 に示すように高速の試料回転は、¹H 固体 NMR スペクトルの感度と分解能を劇的に向上させる⁹⁾。また、測定困難とされてきた ¹H/¹⁴N 相関スペクトルが容易に測定できるようになった¹⁰⁾ (図 3)。従来は、窒素原子の NMR といえば、スピン操作が容易な ¹⁵N が測定されてきた。しかしながら ¹⁵N の天然存在比が 0.4% 以下と非常に少ないため感度が非常に低く長時間の測定が要求された。一方で、高速 MAS により観測可能になった ¹H/¹⁴N 相関測定は高い ¹H 及び ¹⁴N の天然存在比 (どちらも 99% 以上) のため、数分から数十分程度で観測可能であり、ハイスループットの測定が実現した。

まず、a) 双性イオンの問題は、L-histidine は図 4a に示す 2 つの構造のうちどちらかだが、その区別は H の位置のみであり microED の結果からは分らない。一方で ¹H/¹⁴N 相関スペクトルを見ると 1 つの相関信号が非常に周波数の低い (-300 ppm) 付近に現れていることが分かる。この信号はシフト位置

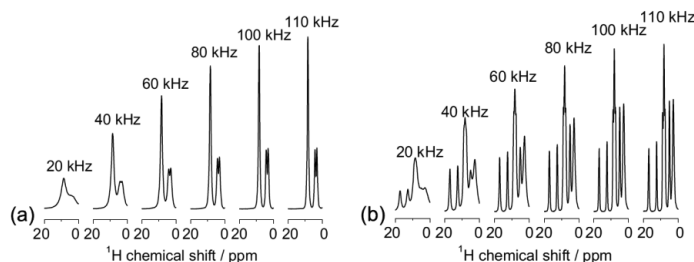


図2 様々な試料回転速度で測定した (a) glycine 及び (b) L-histidine の固体 ^1H NMR スペクトル (Reproduced from Ref. 9 with permission from Elsevier.)

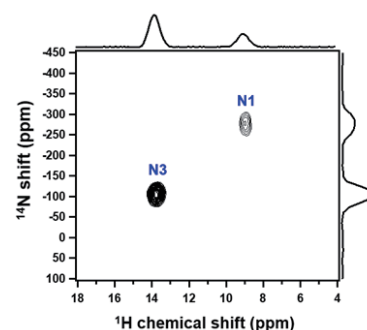


図3 70kHz の高速 MAS のもとで観測された L-histidine の固体 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 相関 NMR スペクトル。参考文献 3 より引用 (Licensed under CC BY 4.0)

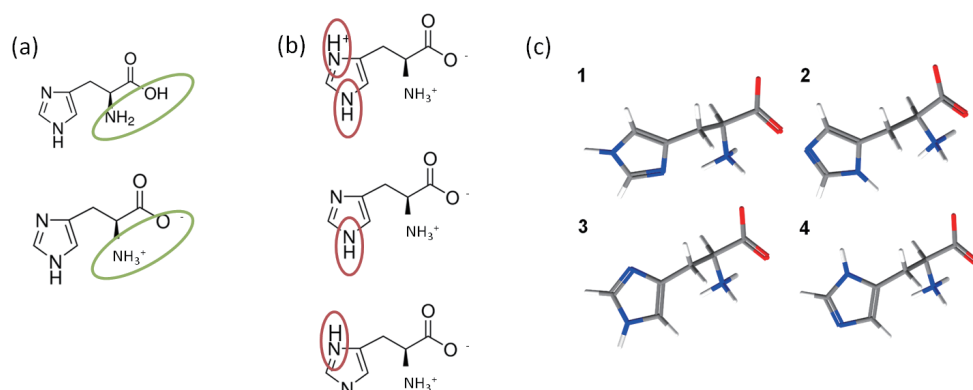


図4 L-histidine のいくつかの候補構造。(a) 双性イオン, (b) イミダゾール環のプロトン化, (c) イミダゾール環の 180 度回転。参考文献 3 より引用 (Licensed under CC BY 4.0)

から NH_3^+ と帰属できる。すなわち、L-histidine は双性イオンと分かった。次に b) イミダゾール環の 2 つの N は、両方ともプロトン化されうるし、もしくはどちらか一方のみがプロトン化されうる (図 4b の 3 つの構造)。再び違いは H の位置のみなので microED では解決できない。 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 相関スペクトルを再度見てみると、NH の相関は 2 つ現れていることが分かる。もしイミダゾール環の 2 つの N がともにプロトン化されていれば、 NH_3^+ とあわせて 3 つの相関が現れるはずであり、その可能性はここで否定される。このように固体 NMR 測定の情報と相補的に利用することにより、microED 結晶構造の精密化が行われる。しかし、依然としてイミダゾール環のどちらの N がプロトン化されているのか、また c) イミダゾール環の回転に関しては決めることができない。すなわち図 4c に示す 4 つの構造のいずれが正しいのかは分からない。実際に R-factor を比較しても有意な差は得られなかった。

そこで第一原理量子化学計算を用いることにより

固体 NMR パラメーターから更に構造情報を引き出す。結晶構造から量子化学計算を用いて結晶構造を最適化し A) NMR 化学シフト及び B) 格子エネルギーを計算することができる。計算された NMR 化学シフトと実験的に得られた NMR 化学シフトを比較することにより、結晶構造を評価することができる。この手法は特に水素原子の位置を正しく配置し実験的に確認するために用いられており、NMR 結晶学というひとつの分野を築いている。この NMR 結晶学のアプローチに従い、図 4c の 4 つの候補構造の NMR 化学シフトを計算し実験値との RMSD を比較した。4 つの構造のうち図 4c-1 の構造がもっとも良い一致を示し、また格子エネルギーも最小化された。この結果から、図 4c-1 の構造が正しい構造と決定した。中性子散乱で得られた結晶構造と比較すると水素原子の位置も含めて非常に良い一致を示していることが分かる (図 5)。すなわち微結晶から中性子回折と同等の質の結晶構造を得ることに成功した。

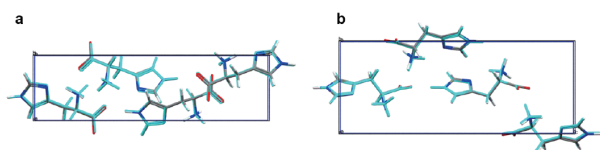


図5 本手法で得られた結晶構造と中性子回折で得られた構造（水色）の比較。b 軸方向から（a）及び a 軸方向から見た図。参考文献 3 より引用（Licensed under CC BY 4.0）

4 構造未知の結晶への応用

本アプローチは混合物に対しても適用できる。低分子医薬品の cimetidine の結晶形 B の構造決定を試みた。結晶形 B は針状結晶をなすため単結晶 X 線回折に適した大きな単結晶を作ることが容易ではない。また、少なくとも筆者らのラボでは常に結晶形 C の混在が認められた。microED 法においては、結晶が混在していても格子定数から容易に区別することができる。そこで結晶形 B の microED の初期構造を図 6 に得た。L-histidine の場合と同じくイミダゾール環の水素位置に不確かさが残る。固体 NMR スペクトルにおいては、その高い分解能から異なる結晶形の信号を分離して観測することができる。Cimetidine の場合は、それぞれの $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ 相関ピークが 3 本に分裂した。実はこのうち 2 本は結晶形 B の 2 つの異なるコンホメーションから来たものであり、残りの 1 本は結晶形 C の信号である。異なるバッチの複数の試料のスペクトルを比較することにより、結晶形 C の信号の帰属は曖昧さなしに決定できた。あとは L-histidine と同様に量子化学計算によ

り結晶構造の最適化、化学シフトの計算を行い、その一致から図 6b が cimetidine の結晶形 B の構造であると決定した。これは世界で初めて得られた cimetidine 結晶形 B の結晶構造である。

5 錠剤への拡張

上記のように異なる結晶形が混ざっていても microED、固体 NMR 共に目的とする結晶形の構造情報を得ることができた。実際の錠剤や散剤の場合ではどうだろうか？錠剤には成型したり、扱いやすくしたりするために無害と考えられている化合物が賦形剤として大量に含まれている。microED においては、目的の API の粒子を発見するのに手間がかかることになる。固体 NMR 測定においては問題はより深刻である。上に挙げた例では 2 つの結晶形の信号を分離するだけであったが、錠剤の固体 NMR スペクトルでは、API の信号が賦形剤の信号に覆い尽くされてしまう。実際に観測された ^1H DQ（二量子：double quantum）/SQ（単量子：single quantum）2 次元相関スペクトルを図 7a に示す。この錠剤は API として L-cystein を約 10% 含有するが残り 90% の賦形剤の信号に覆い尽くされていることが分かる。そこで、API の NMR 信号のみを選択的に観測する手法を開発した¹¹⁾。API と賦形剤の違いとして含まれている元素に注目する。H・C・O といった元素は API 及び賦形剤双方に含まれているのに対して、N (^{14}N , ^{15}N), F (^{19}F), Cl (^{35}Cl , ^{37}Cl) といった

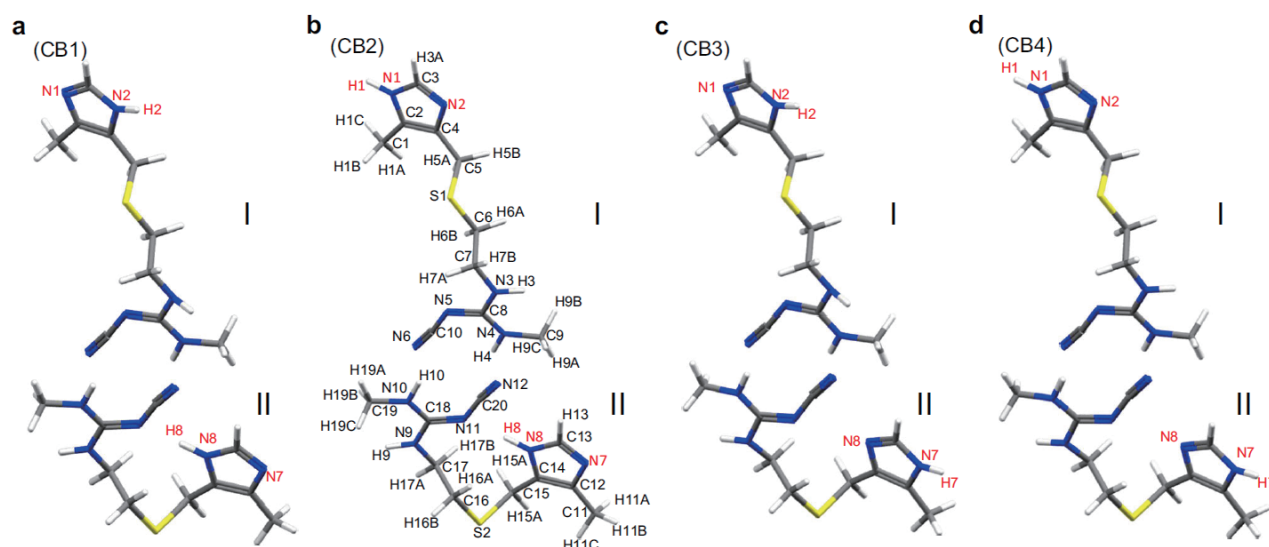


図6 cimetidine 結晶形 B の 4 つの候補構造。参考文献 3 より引用（Licensed under CC BY 4.0）

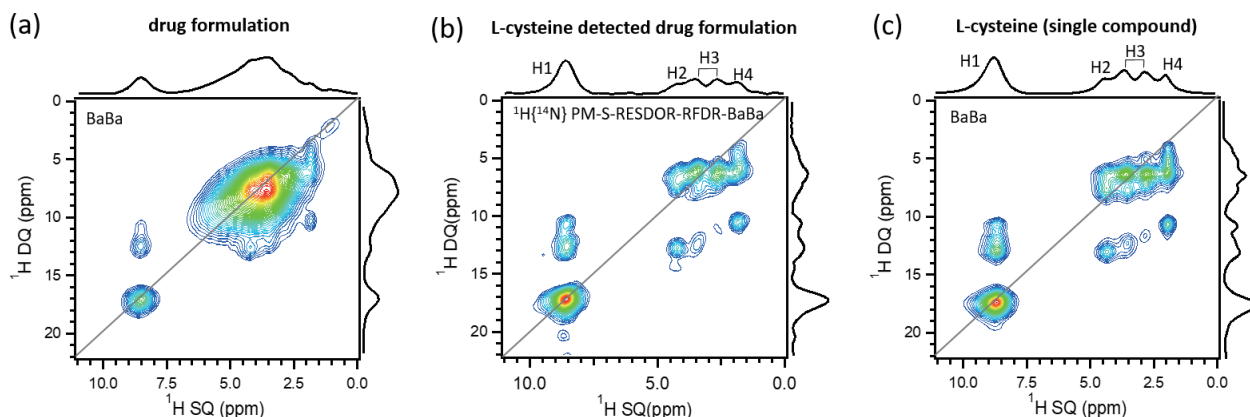


図7 (a)L-cysteine を API として含む錠剤の ^1H DQ/SQ スペクトル、(b) 錠剤からの信号を ^{14}N でフィルターした ^1H DQ/SQ スペクトル、(c) 純粋な L-cysteine の ^1H DQ/SQ スペクトル。(Reproduced from Ref. 11 with permission from Elsevier.)

元素は API のみに特有に含まれている。そこで、これらの特有の元素を観測すれば、その信号は当然 API からの信号と言える。更にこれらの元素の近傍の ^1H の信号も API からの信号である。 ^1H は API 結晶中に豊富に存在しているので、 ^1H 間のスピン拡散現象を用いて、API 内の ^1H 信号のみを偏極 (NMR 信号が出る状態に) することができる。L-cystein の場合には API に特有に含まれる元素として ^{14}N を用いることができる。このアプローチにより錠剤から賦形剤の信号を抑制した上で API の信号のみを選択的に観測することに成功した(図 7b)。実際に API のみの信号(図 7c)と比較すると、全く同じ信号として観測されていることが分かる。このように賦形剤が含まれている錠剤からも NMR 信号、ひいては NMR 化学シフトを決定することができ NMR 結晶学のアプローチを用いる準備ができた。

6 まとめ

1 μm 以下の微結晶から水素位置を含めて結晶構造を詳細に決定する手法を開発した。本手法では、全体構造を決定できる microED と、局所構造、特に ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N を直接観測できる固体 NMR を有機的に結合して活用した。複数の結晶形が混ざっている cimetidine 試料であっても結晶構造を解くことに成功した。この手法の拡張として錠剤は散剤等大量の賦形剤が含まれる系であっても API からの NMR 信号のみを選択的に観測する手法を開発した。これらの一連の手法は、錠剤や散剤等の医薬品に含まれる微結晶 API の構造解析に用いられ、未知の

結晶形の検出、品質管理等に活用されることが期待される。

謝辞

本研究は、理研 JEOL 連携センターの Candelaria Guzman-Afonso 博士、You-lee Hong 博士、Nghia Tuan Duong 博士、Henri Colaux 博士、理研放射光科学研究センターの山崎俊夫博士、米倉功治博士、University of Warwick の G.N. Manjunatha Reddy 博士、日本電子株式会社の飯島寛文博士、齊藤晃宏博士、福村拓真博士、青山佳敬博士、元木創平博士、JEOL ASIA Pte の及川哲夫博士との綿密な共同研究により行われました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Bordignon, S., et. al., *Cryst. Growth Des.*, **17**, 5744-5752 (2017)
- 2) Rajput †, L., et. al., *IUCrJ.*, **4**, 466-475 (2017)
- 3) G.-Afonso †, et. al., *Nat. Commun.*, **10**, 3537 (2019)
- 4) Shi, D., et. al., *eLife*, **2**, 01345 (2013)
- 5) Yonekura, K., et. al., *Prog. Natl. Acad. Sci.*, **112**, 3368-3373 (2015)
- 6) Jones, C.G., et. al., *ACS Cent. Sci.*, **4**, 1587-1592 (2018)
- 7) Gruene*, T., et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 16313-16317 (2018)
- 8) Palatinus, L., et. al., *Science*, **355**, 166-169 (2017)
- 9) Nishiyama*, Y., *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **78**, 24-36 (2016)
- 10) Nishiyama*, Y., et. al., *J. Magn. Reson.*, **208**, 44-48 (2011)
- 11) Hong, Y.-I., et. al., *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **106**, 101651 (2020)

((株)JEOL RESONANCE / (国研)理化学研究所)