

結晶成長学に基づく医工理連携研究の新展開



研究室紹介

丸山 美帆子*

New Developments in Medical-Industrial Collaboration Research
Based on Crystal Growth Science

Key Words : crystal growth, polymorphism, kidney stone, calcium phosphate,
calcium oxalate

はじめに

私の研究対象は結晶です。結晶は、「原子や分子が規則正しく配列し、対称性を持つ固体構造」と定義されます。私たちの生活にはさまざまな場所で結晶が利用されています。例えば電子機器類には半導体結晶が欠かせません。材料、光学素子、化粧品、顔料、医薬品、エネルギーを生み出す太陽電池…具体的な例を挙げればさらにたくさんの項目が挙げられます。また、天然に産する結晶(鉱物)の組成、構造、組織の特徴などの情報から、かつてその結晶が生じた環境を読み解くことができます。宇宙から飛来した隕石の研究などもその一例です。地球温暖化を引き起こす二酸化炭素を結晶化して、地上のCO₂濃度を制御しようとする研究もあります。骨や歯、尿路結石、血管石灰化など生物が関わってできる結晶(バイオミネラル)は、医学の分野と切り離せないトピックでもあります。このように、結晶は多様な分野を横断的につなぐ存在でもあります。

私は学生時代に地球科学を専攻し、地球科学の分野でも極めて重要な結晶成長学に関連する研究を進めて参りました。結晶成長学とは、原子や分子からどのように結晶が形成され成長するのかを研究する学問で、結晶から自然環境を読み解くためにも、また目的に合った結晶を育成するためにも重要です。私が主催する研究室では、結晶成長を主軸として、

医薬品化合物の結晶構造の制御技術開発や、バイオミネラルに関連する医工理連携研究を進めています。本稿ではこれらについて紹介させていただきます。

1. 医薬品開発に向けた結晶多形制御技術の開発

前職(大阪大学大学院工学研究科、森勇介研究室)に在席していた2015年頃から、医薬品化合物の結晶多形制御の研究に着手しました。結晶多形とは、化学式は同じですが結晶構造が異なる物質を指し、最も有名な例がダイヤモンドと炭素などです(この場合、同素体とも言います)。医薬品として使用される化合物の多くは有機低分子で、90%以上の有機低分子には結晶多形が存在すると言われています。多形の違いにより、安定性、溶解性、バイオアベイラビリティ(薬剤としての作用を示す指標)、製剤特性など薬剤として極めて重要な性質が異なるので、医薬品の開発においてその化合物が有する多形を網羅的に把握することが重要です。医薬品は常温常圧下で用いられるので、この環境で安定な構造を安定形と呼びます。常温常圧下で不安定な別の結晶構造は準安定形と呼ばれ、特に結晶化が難しくなります。医薬品開発では物質安定性が重視されますので、「今得られているこの結晶形が本当に最安定形なのか?」という問いに答えるためにも網羅的な多形把握が必要になるわけです。さらにもう一步進んだ考え方では、「より速くよく効く薬」の開発に向けて、準安定形の高い溶解度が期待される点もあります。しかし、準安定形は結晶化制御が困難で高純度のものが得にくいという問題点や、安定性が低く経時に伴い安定形に相転移してしまうなどの問題点があるため、「安定性の高い準安定形の結晶化技術」が求められています。

私たちは、モデル化合物としてアセトアミノフェン、イブプロフェン、インドメタシンなどを用いて



* Mihoko MARUYAMA

1980年8月生まれ
現在、大阪大学 大学院工学研究科 電気電子情報通信工学専攻 量子情報エレクトロニクス部門 機能創製バイオマテリアル領域 教授
博士(理学)
専門/結晶工学
TEL : 06-6879-7697
FAX : 06-6879-7697
E-mail : maruyama@eei.eng.osaka-u.ac.jp

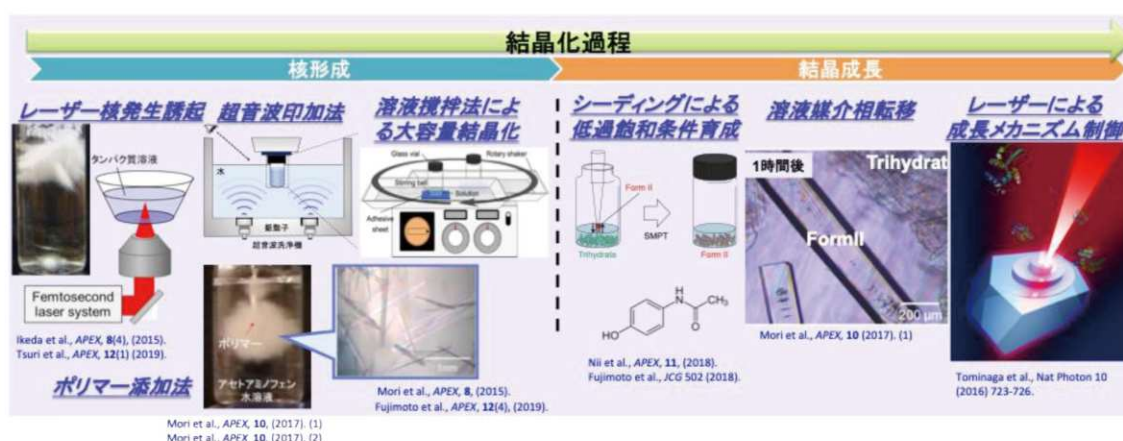


図1 結晶の核発生や成長を制御する技術群。目的に応じたサイズ、品質の結晶を作るためには、核形成と結晶成長のステージを分けて制御する技術が必要である。

きました。タンパク質の結晶化のために開発された短パルスレーザーによる核形成誘起は、上記の医薬品化合物の系でも有効です¹⁾。医薬品化合物を溶解させた溶液に短パルスレーザーを集光照射すると、キャビテーションバブルが発生します。このバブル周辺で濃度場に不均一が生じ、局所的に濃度が高い領域が発生してここで結晶核形成が起こると考えています²⁾。ただし、準安定形のみを核形成するには、溶液の条件制御も重要なファクターとなります。溶液の条件をやや高い過飽和度（結晶化を考える際のパラメータ。与えられた温度での物質の溶解度を C_e とし、その溶液に溶かし込んだ物質量を C とすると、過飽和度 σ は $\sigma = (C - C_e) / C_e$ で定義される）に設定し、レーザーを照射して強制的に核形成を促すと、準安定形のみを核形成できる条件があります。この条件で連続的にレーザー集光照射を行って多数の結晶核形成を促すと、溶液濃度が急速に低下するので、安定形が自然核形成できなくなります。こうすることで、高純度の準安定形が得られるという戦略です³⁾。同様に、超音波印加でも高効率な準安定形の選択的結晶化が実現できます^{4,5)}。水溶液に超音波を印加すると、多数のキャビテーションバブルが一度に発生しますので、レーザー照射による核形成よりも効率が上がる場合があります。その他、ポリマー表面の構造を利用する技術⁵⁻⁷⁾、溶液の流れを制御する技術などで⁸⁾、一般的に得るのが難しい準安定形を選択的に結晶化できるようになりました。一見、それぞれの技術に共通点が無いようにも思えますが、一貫しているのは「結晶の核形成を運任せにせず所望のタイミングで強制制御すること」と、

「一度できた結晶は、ゆっくりと成長させて結晶内部欠陥を少なくすること」でした^{3),9)}。結晶成長の王道とも言える古典的な着眼ですが、それを達成するためにはあらゆる最先端技術を使いますし、実に楽しくワクワクする研究です。準安定形と安定形の結晶構造が酷似しているため、純粋な準安定形を作るのは極めて困難と言われていたアスピリンを対象として、フェムト秒レーザーを駆使して純粋な準安定形結晶が得られた時には本当に感動しました¹⁰⁾。なお、各技術の詳細については、引用文献に委ねさせていただきます（図1）。

2. 隕石研究の手法で尿路結石形成機序を解明する 医工理連携研究

現在進めているもう一つの大きな研究テーマが、尿路結石（以下、結石と記載）の形成機序の解明を目指す医工理連携研究です。2017年秋にご縁があり、名古屋市立大学医学部 腎・泌尿器科学分野の安井孝周教授らから、「結晶を作る研究室であれば、体内でできる結晶の塊である結石を溶かせないか？」というご相談をいただきました。結石の主成分であるシュウ酸カルシウム（CaOx）やリン酸カルシウム（CaP）の結晶は、酸性条件におけば溶かすことができます。しかし、人の体内でpHの自在制御はできません。そのため、結石は一度できたら基本的には溶けず、自然排石か手術によって体外に排石されるまで成長し続けます。これに加えて、結石の形成機序は未だ十分に明らかではないという状況でした。細胞内での結石形成初期に関しては様々な研究が行われていますが、実際に結晶が凝集して固化す

る過程は細胞外の尿路で起こる現象で、これが明らかではないのです。そこで私にひらめいたのは「隕石から46億年前の太陽系環境を調べるように、尿路結石から体内環境を調べれば、結石の形成機序を明らかにできるのではないか？」という考えでした。今思えば突拍子も無い提案でしたが、その場にいた全員が「面白い!」と同意してくださり、尿路結石形成機序解明の研究プロジェクトMETEOR (Medical and Engineering Tactics for Elimination of Rocks) Projectに着手しました。

着眼そのものは「結晶ができた環境を知る手がかりは結晶そのものである」という地球科学的な発想です。しかし、目的を達成するための道筋は「できないことをできるようにする」という工学的なアプローチの連続でした。結石が持つ結晶構造や含有成分、有機物の分布状態を維持したまま、結石内部構造が観察できるサンプルを作る技術開発が最初の一步でした。結晶工学と医学だけでは達成できぬと、私の学生時代の同期たちに声をかけて共同研究を拡大していきました。試行錯誤の結果、極めて状態が良い尿路結石の薄片（岩石や鉱物を観察するために作る厚さ20~30 μm 程度の岩石のスライス。顕微鏡観察の他、ラマン分光分析、赤外分光分析など各種分析手法が適用可能）が作れるようになりました。初めて結石の薄片を観察した日、その自然が繊りなす美しさに驚愕しました（図2）。生体由来物質ゆえ繊細であり、細心の注意を払わないと、観察・分析中にサンプルを変質させてしまいます。それらに配慮して確立した結晶成分のマッピング技術の開発¹¹⁾、結石に含有されているタンパク質の局在状態の可視化技術の開発¹²⁾により、全く新しい結石形成機序の様子が見えてきました。

最も多く見られるシュウ酸カルシウム (CaOx) 結石には、 CaOx 一水和物 (COM) という安定形と、 CaOx 二水和物 (COD) という準安定形が含有されています。私たちは、体内で準安定形であるCODが相転移して安定形のCOMになる過程で、結石がより緻密で固くなり、破碎が困難になるという証拠を見出しました¹³⁾。さらに、この現象を人の結石を用いて実験的に証明することができました¹⁴⁾。結石中の相転移現象にいち早く気づいたのは、これまでに携わってきた医薬品化合物の結晶多形制御研究の経験があったためです。準安定形を作りたいの

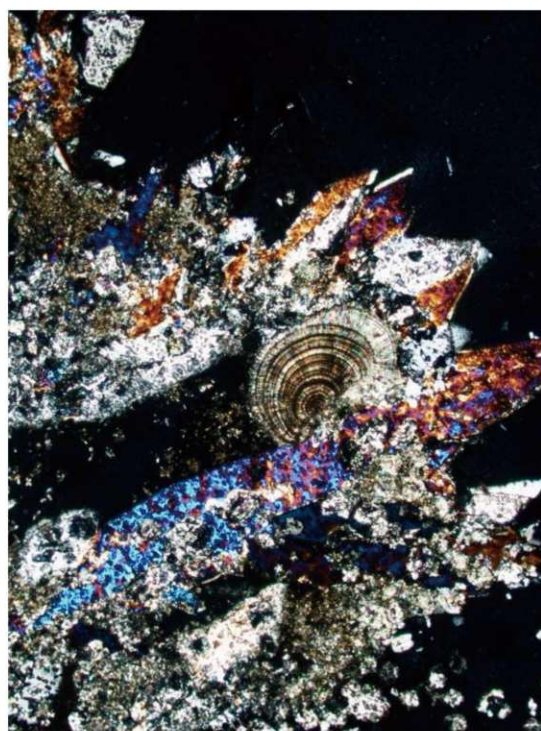


図2 シュウ酸カルシウムを主成分とするヒトの尿路結石薄片の偏光顕微鏡像。対物レンズ20倍で観察。2023 NIKON JOICO AWARDにて芸術特別賞を受賞した写真。薄片は田尻薄片製作所で作製している。

に、相転移して安定形になってしまう。様々な医薬品化合物で何度も目にした現象でした¹⁵⁾。この苦い経験が、新たな着眼につながりました。

また、最近私たちは、結石の発症や再発のバイオマーカーを発見しました¹⁶⁾。結石の70%を超える主成分が CaOx のため、多くの研究グループは尿沈渣（尿に含まれる細胞や結晶などの沈殿物を顕微鏡で調べて健康状態や病気の診断をする検査）において、 CaOx 結晶をバイオマーカーとして使えないかという研究を行っていましたが、 CaOx 結晶は健康者尿からもかなりたくさん結晶化するのでバイオマーカーになりません。私たちが尿沈渣で着眼したのは、リン酸カルシウム (CaP) 結晶です。結石症の再発を繰り返す患者の尿を冷却すると、 CaP 結晶が優位に見られることを見出したのです。ただし CaP は、通常の尿沈渣ではなかなか観察できません。泌尿器分野において尿沈渣は体内環境に近い常温で行うという常識があるのですが、 CaP 結晶は、常温においてはごく微量しか結晶化しないので、周辺にたくさん存在する CaOx 結晶に紛れてしまうのです。私たちは、結晶工学の観点からは、冷却した

方が結晶化が促進され、たくさんの結晶を観察できると考えたため、泌尿器分野の常識にとらわれずに冷却尿を観察しました。これが、新しい発見につながっています。さまざまな分野の研究者と連携して研究をしていると、「各分野の常識」にとらわれずに自由な発想で現象を見つめ、実験を行うことができます。こうした体制が、これからも新しい発見につながるものと考えています。今後私たちは、このバイオマーカーを臨床現場で活用できる新たな検査技術の開発を進めていく予定です。

尿路結石研究に加え、骨のリモデリング機構（骨が代謝し続けることで、健全な状態を保つ機構）や血管石灰化に関する共同研究にも着手しています（大阪大学医学部感染免疫医学講座、石井優教授ら）。私たちの体では、老化とともに骨や歯などの組織は骨密度の低下や歯のエナメル質の摩耗など、不健康な状態に近づいていきます。一方で、血管の石灰化や結石の成長は進行しやすくなるなど、体の中の結晶化機構が大きく乱れていきます。必要な場所で結晶組織が弱くなり、不必要な場所で結晶化が進み、病的組織が増えてくる。私は将来的に、「体の中で起こるさまざまな結晶化現象の乱れ」から老化現象を理解したら面白いのではないかと考えており、この着眼をもって日々の研究に努めています。

おわりに

本稿では、大阪大学大学院工学研究科電気電子情報通信工学専攻 機能創製バイオマテリアル領域（丸山研究室）で現在取り組んでいる2つの研究トピックを紹介させていただきました。学位取得直後は、まさかこのような形で研究が展開するとは思っていませんでした。改めて、人とのご縁が研究テーマにも大きく関わってくるのだなと感じています。これからも、私が学んできた地球科学的視点、結晶工学の視点、そして医工および多分野連携体制を活かしながら、研究室メンバー一同で新たな研究を切り拓いていく所存です。

参考文献

- 1) K. Ikeda, M. Maruyama, Y. Takahashi, Yo. Mori, H. Y. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Applied Physics Express*, **8** (2015) 045501.
- 2) H. Y. Yoshikawa, R. Murai, H. Adachi, S. Sugiyama, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, H. Masuhara, and Y. Mori: *Chemical Society Reviews*, **43** (2014) 2147-2158.
- 3) 丸山美帆子, 吉川洋史: *日本結晶成長学会誌*, **44** (2017) 1-12.
- 4) Yo. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, K. Ikeda, S. Fukukita, Y. H. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Applied Physics Express*, **8** (2015) 065501.
- 5) Yo. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, Y. H. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Applied Physics Express*, **10** (2017) 025501.
- 6) Yo. Mori, M. Maruyama, Y. Takahashi, Y. H. Yoshikawa, S. Okada, H. Adachi, S. Sugiyama, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Applied Physics Express*, **10** (2017) 015501.
- 7) Y. Tsuru, N. Inaoka, M. Maruyama, K. Tsukamoto, H. Adachi, H. Y. Yoshikawa, K. Takano, M. Imanishi, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Journal of Crystal Growth*, **557** (2021) 125994.
- 8) R. Fujimoto, M. Maruyama, S. Okada, H. Adachi, H. Y. Yoshikawa, K. Takano, M. Imanishi, K. Tsukamoto, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Applied Physics Express*, **12** (2019) 045503.
- 9) 丸山美帆子, 吉村政志, 森勇介: *月間ファインケミカル*, **47** (2018) 5-16.
- 10) Y. Tsuru, M. Maruyama, R. Fujimoto, S. Okada, H. Adachi, H. Y. Yoshikawa, K. Takano, S. Murakami, H. Matsumura, T. Inoue, K. Tsukamoto, M. Imanishi, M. Yoshimura, and Y. Mori: *Applied Physics Express*, **12** (2018)

- 015507.
- 11) M. Maruyama, K. P. Sawada, Y. Tanaka, A. Okada, K. Momma, M. Nakamura, R. Mori, Y. Furukawa, Y. Sugiura, R. Tajiri, K. Taguchi, S. Hamamoto, R. Ando, K. Tsukamoto, K. Takano, M. Imanishi, M. Yoshimura, T. Yasui, and Y. Mori: PLOS ONE, **18** (2023) e0282743.
- 12) Y. Tanaka, M. Maruyama, A. Okada, Y. Furukawa, K. Momma, Y. Sugiura, R. Tajiri, K. P. Sawada, S. Tanaka, K. Takano, K. Taguchi, S. Hamamoto, R. Ando, K. Tsukamoto, M. Yoshimura, Y. Mori, and T. Yasui: Scientific Reports, **11** (2021) 16841.
- 13) M. Maruyama, Y. Tanaka, K. Momma, Y. Furukawa, H. Y. Yoshikawa, R. Tajiri, M. Nakamura, K. Taguchi, S. Hamamoto, R. Ando, K. Tsukamoto, K. Takano, M. Imanishi, S. Usami, K. Kohri, A. Okada, T. Yasui, M. Yoshimura, and Y. Mori: Crystal Growth & Design, **23** (2023) 4285-4293.
- 14) U. Michibata, M. Maruyama, Y. Tanaka, M. Yoshimura, H. Y. Yoshikawa, K. Takano, Y. Furukawa, K. Momma, R. Tajiri, K. Taguchi, S. Hamamoto, A. Okada, K. Kohri, T. Yasui, S. Usami, M. Imanishi, and Y. Mori: Urolithiasis, **52** (2024) 57.
- 15) M. Maruyama, H. Y. Yoshikawa, K. Takano, M. Yoshimura, and Y. Mori: Journal of Crystal Growth, **602** (2023) 126990.
- 16) 特願 2024-004939, 発明者：丸山 美帆子, 田中 勇太郎, 森 勇介, 吉村 政志, 安井 孝周, 岡田 淳志, 山田 泰正, 松川 泰治, 発明の名称：尿路結石症の発症を判定するためのバイオマーカーおよびその用途, 特許権者：国立大学法人大阪大学, 公立大学法人名古屋市立大学, ユーハ味覚糖株式会社



タンチョウ