

図 11 腫瘍の分布に基づく放射線治療による腫瘍の縮小反応（眼窩浸潤の症例）

鼻腔内の腫瘍容積は、有意な減少が見られた（ $p=0.008$ ）。群間の比較では、RT 開始時と 3 回目に有意な減少が見られた。また、鼻腔外（眼窩内）も同様であり（ $p=0.02$ ）、RT 開始時と 4 回目に有意な縮小が見られた。

眼窩内の腫瘍容積が縮小することは、内側より圧迫変位した眼球の位置が改善することを意味し、RT4 回目には顔貌の改善が見込まれることを示している。

評価法	症例	チーア1				チーア2			
		反応群 n=5		上顎骨浸潤 n=3		篩板浸潤 n=2		眼窩浸潤 n=6	
		鼻腔内	鼻腔外	鼻腔内	鼻腔外	鼻腔内	鼻腔外	鼻腔内	鼻腔外
RT開始時との比較		3回目 4回目	4回目	3回目	4回目	3回目	4回目	3回目	4回目

図 12 統計のまとめ

黄色で塗られている部分は、有意差を示している。反応群、上顎骨浸潤、眼窩浸潤の腫瘍容積は、RT4 回目までに縮小が見られることが明らかとなった。篩骨浸潤症例では、RT 開始時と比較して、治療後に有意な腫瘍容積の減少が見られなかった。

### 【考察】

骨を融解し鼻腔外に浸潤した腫瘍は、放射線治療で有意な縮小が見られた。今回の結果から、眼窩浸潤、上顎骨浸潤、反応群の腫瘍容積は、治療 4 回目には有意差が明らかとなった。このことは、治療 4 回目の時点において、腫瘍により変化した顔貌に改善が見られる可能性を示している。

鼻腔内腫瘍に対する治療効果の判定が困難な点は、鼻腔が骨に覆われ、外見から腫瘍の大きさを測定出来ないためである。また、内部に空気も存在することから、体表からの超音波検査を行うことも難しい。皮下に浸潤した腫瘍の容積は、鼻腔内の腫瘍容積よりも大きな縮小効果が見込まれるものの、顔貌上の改善が見られた場合は、腫瘍本体の縮小も起こっていることを示している。したがって、顔貌上の変化は、鼻腔

内における腫瘍縮小の指標となると考えられた。

## H. その他 6

### 鼻腔内腫瘍の犬において放射線治療による腫瘍の縮小に関する検討 ～腫瘍の残りやすい部位はどこか～

#### 【背景】

犬の鼻腔内腫瘍の治療には、放射線治療が実施されている。これまで鼻腔内腫瘍に対する放射線治療に関して、生存期間、症状の改善、あるいは放射線治療による副作用に着目した研究論文が数多く報告されている。ある報告においては、放射線治療による生存期間は外科手術単独よりも有意に延長し、臨床症状は 95%の犬で改善したことが認められている。しかしながら、腫瘍自体の大きさの変化に関する報告は少ない。したがって、本研究では FOCUL ユニットの備えた放射線治療装置を使用し、放射線治療期間中の腫瘍容積の減少傾向を評価した。

#### 【材料および方法】

2008 年 11 月から 2013 年 5 月に麻布大学付属動物病院を受診し、鼻腔内腫瘍と診断され、鼻腔全体に腫瘍が存在した犬(短頭種は除く)、11 頭を本研究に用いた。全ての犬は、鼻腔および頭部の CT 撮影を行い(東芝社製、Asteion4、FOCUL ユニットの一部分)、その断層像を元に放射線治療計画を作成した。放射線治療には、LINAC(東芝社製、PRIMUS、FOCUL ユニットの一部分)を使用し、X線による治療を行った。放射線治療のプロトコールは、1 回線量 7~8Gy (X線のエネルギー: 6MV)、週 1 回の合計 4 回、総線量 28~32Gy である。なお CT は治療前に毎回撮影された。腫瘍縮小の推移を検討するため、CT 画像は画像ビューワーソフト (OsiriX ver. 5.5.2 64-bit) を用いて腫瘍容積を測定した。腫瘍縮小を評価する目的で、下記の 2 点に着目した。

- ① 放射線治療 1 回目の腫瘍容積を 100% として、治療 4 回目の残存腫瘍の割合を鼻腔の部位ごとに比較した。部位は外鼻孔・腹鼻甲介・篩骨甲介に分け、外鼻孔は鼻軟骨までとし、腹鼻・篩骨甲介は鼻骨吻側端から嗅球までを二等分した範囲に設定した。
- ② 腫瘍に縮小傾向が見られる症例について

ては、縮小のパターンを CT の横断面画像にて視覚的に検討した。

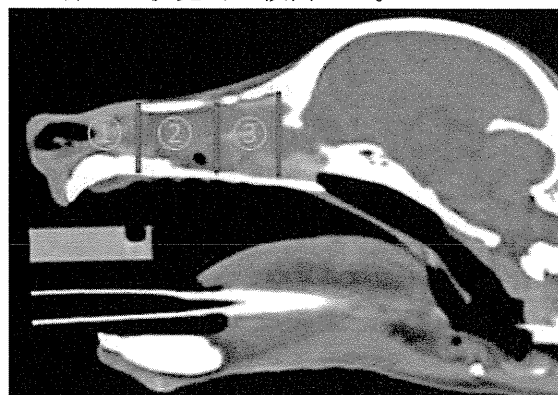


図 1 鼻腔内の解剖学的区分方法

解剖学的にどの部位の腫瘍が残存しやすいかを調べる目的で、腫瘍の位置により(1)外鼻孔・鼻前庭、(2)腹鼻甲介、(3)篩板・篩骨甲介に分類した。(2)と(3)は(1)の終わりから嗅球までを二等分した範囲とした。放射線治療開始時 (RT1) と 4 回目の放射線治療時 (RT4) の腫瘍容積は、CT 断層像を用いて計測した。RT1 の腫瘍容積を 100% とし、RT4 の放射線治療時における残存腫瘍の割合を求めた。

#### 【結果】

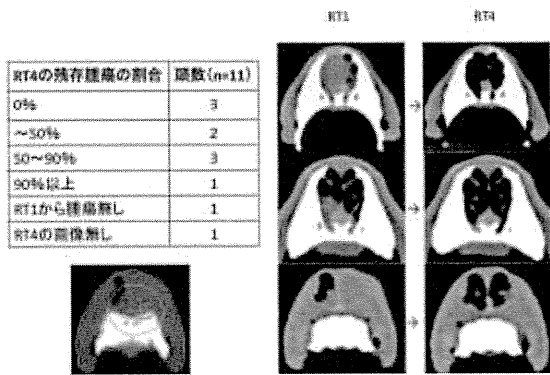


図2 外鼻孔・鼻前庭における腫瘍容積の変化  
11 症例中、3 症例で腫瘍がほぼ消失した。残存腫瘍が 50%以下となった症例は 2 例、残存腫瘍が 50~90%となった症例は 3 例、残存腫瘍が 90%以上となった症例は 1 例であった。  
画像は、腫瘍がほぼ消失した症例における RT1 と RT4 に撮像された断面像である。これらの 3 症例は、移行上皮癌、腺癌、移行上皮癌であった。

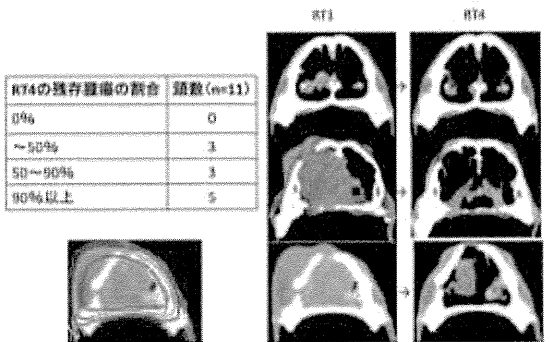


図3 腹鼻甲介における腫瘍容積の変化  
11 症例中、残存腫瘍が 50%以下の症例は 3 例、50~90%の症例が 3 例、90%以上の症例が 5 例であった。画像は、50%以下に縮小した 3 例における RT1 と RT4 に撮像された断面像である。これらの 3 例は、移行上皮癌、腺癌、移行上皮癌であった。

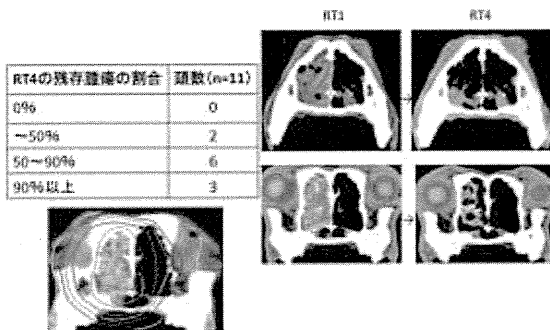


図4 篩骨、篩骨甲介における腫瘍容積の変化  
11 症例中、残存腫瘍が 50%以下の症例は 2 例、50~90%の症例が 6 例、90%以上の症例が 3 例であった。画像は、50%以下に縮小した例におけ

る RT1 と RT4 に撮像された断面像である。これらの 2 例は、いずれも腺癌であった。

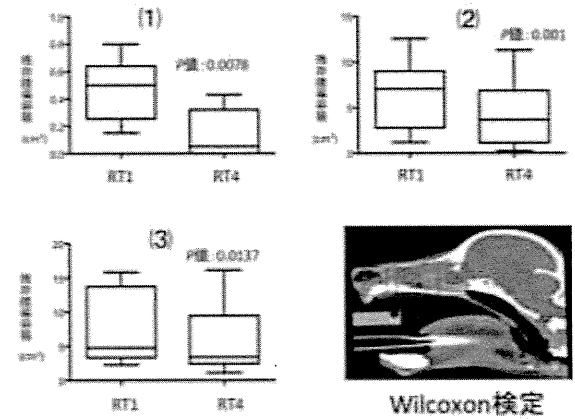


図5 各部位ごとの RT1 と RT4 の腫瘍容積の比較  
RT1 と RT4 の腫瘍容積をウィルコクソン検定により比較した。全ての部位で有意差が認められたことから、腫瘍が有意に縮小していると考えられた。

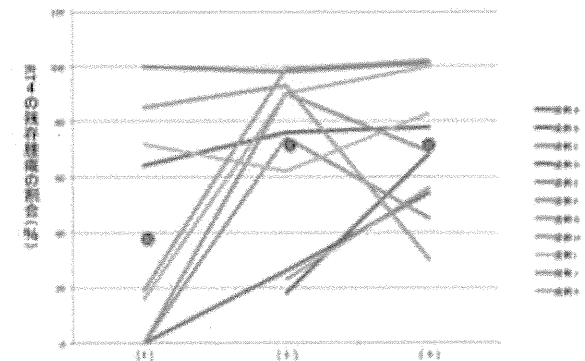


図6 各症例における各部位の RT4 時の残存腫瘍容積

縦軸はRT4時のRT1に対する残存腫瘍の割合(%)で、横軸が部位(1)、(2)、(3)を表している。赤丸はそれぞれの部位での平均値を示している。(1)の部位は縮小しやすい傾向が見られたが、(2)と(3)では残像腫瘍が多い傾向が見られた。

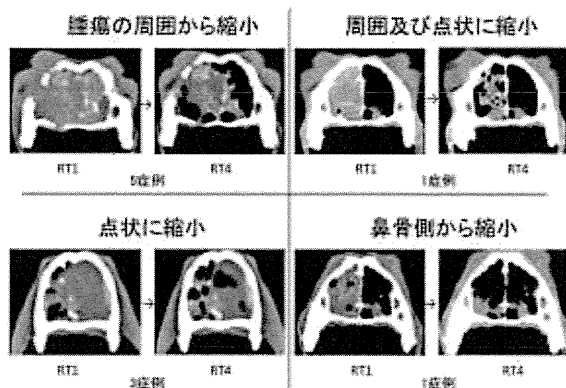


図6 腫瘍縮小のパターン

腫瘍の縮小が認められた症例において、RT1とRT4に撮影されたCT断面像を比較した(n=9)。周囲から縮小した症例は5例、点状に縮小した症例は3例、周囲から縮小した5例のうち点状にも縮小していた症例は1例であった。また、鼻骨側から縮小したのは1例であった。縮小のパターンは様々であったが、周囲から縮小する例が多く認められた。

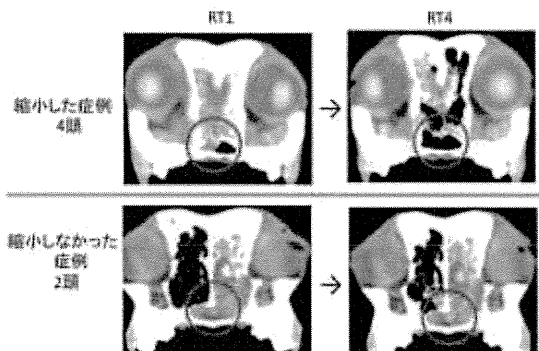


図7 鼻咽頭部の腫瘍縮小

鼻咽頭部に浸潤した腫瘍がどの程度縮小するかを調べた。11症例中6例で鼻咽頭部への浸潤が見られ、4症例で図7のようにほぼ消失した。しかし、2例では変化が認められなかった(どちらも腺癌)。しかし、その2例は他の鼻腔内部位においても、腫瘍の縮小は認められなかった。したがって、この変化は部位に特有なものではないと考えられた。

#### 【考察】

本研究より、外鼻孔(鼻先)の腫瘍は、放射線治療に反応しやすく、他の部位と比較

して縮小しやすいと考えられた。しかし、腹鼻および篩骨甲介は、縮小しにくい傾向がみられた。その理由の一つとして考えられることは、これらの部位は鼻甲介、上顎骨および鼻骨によってX線が減衰を受けやすく、その結果、外鼻孔と比較して放射線治療による効果が低下したと思われる。

腹鼻甲介と篩骨甲介の腫瘍縮小については、差は見られなかったが、残存腫瘍が90%以上の症例は腹鼻甲介の方がやや多く見られた。鼻腔内の放射線量の分布を確認した結果、矢状面および横断面の双方で、腫瘍中心部(腹鼻甲介および鼻中隔付近)における線量分布が多かったものの、この部位での縮小はあまり見られなかった。その理由としては、腹鼻甲介は腫瘍の中心部に相当するために低酸素状態にあり、そのため放射線による生物学的効果が減弱したと考えられる。

今回の結果より、鼻腔内腫瘍に対して放射線治療を行った場合に、腫瘍が残存しやすい部位が判明した。そのことから、腫瘍が残りやすい部位には予め線量を上げ、反対に縮小しやすい部位には放射線障害を少しでも減らすために線量を下げ、放射線治療計画を立てることが有効であると考えられた。

## H. その他 7

### 脳腫瘍のイヌにおける放射線治療前後の変化

#### 【背景】

脳腫瘍の画像診断には MRI 検査が一般的に用いられ、画像の読像は診断、予後の判定に非常に重要である。治療面において、イヌの脳腫瘍は放射線感受性とされ、放射線治療は治療の選択肢の一つである。

しかし、放射線治療は脳腫瘍の重要な治療法であるにもかかわらず、これまで定期的に画像を撮像し、治療後の変化について詳細に検討した報告はない。

本研究の目的は、放射線治療の効果を評価すること、および放射線治療前後での画像の変化を評価することである。

#### 【材料および方法】

2007年6月から2012年11月までに日本大学生物資源科学部付属動物病院に来院し、MRI検査で脳腫瘍が疑われ、放射線治療を受けたイヌの症例を対象とした。ただし、下垂体腫瘍および外科手術を受けた症例は除外した。その結果、対象症例は17頭となった。カルテの記録から、症例の年齢、性別、体重、品種、神経症状などの情報を得た。

放射線治療は、緩和的放射線治療（週1回、初回のみ5Gy、2～5回目は8Gy、総線量37Gy）、もしくは根治的放射線治療（月水金の週3回、各4Gyを計12回、総線量48Gy）を実施した。

脳腫瘍はMRI所見を基に、髄内および髄外腫瘍に分類した。MR画像は、スライス厚を3.5～4.5mmに設定して撮像した。肉眼的腫瘍容積（GTV）は、DICOMビューワーソフトで計測し、得られた容積は脳容積で相対化した。さらに治療前後の容積比（放射線治療後肉眼的腫瘍容積/初診時肉眼的腫瘍容積比）を算出した。

#### 【結果】

対象症例は、髄内腫瘍が3頭、髄外腫瘍が14頭であった。それぞれの症例群で、年齢、性別、体重、品種に明らかな差はなかった。RT後の神経症状に関して、髄内腫瘍

は2頭で完全寛解（CR）、1頭で部分寛解（PR）となった。髄外腫瘍では、3頭が完全寛解、4頭が部分寛解、7頭が変化無し（SD）であった。

放射線治療前後での比較が可能であった症例においてMR画像上で観察されたmass effectは、髄内腫瘍3頭全てで改善がみられ、髄外腫瘍11頭のうち、1頭で改善、10頭で変化がなかった。病変周囲浮腫は、髄内腫瘍の2頭で改善、1頭で変化がなく、髄外腫瘍の9頭で変化がなく、2頭で進行した。

肉眼的腫瘍容積について調べたところ、髄内腫瘍では初診時肉眼的腫瘍容積/脳容積比の中央値が5.37%（4.12～7.67%）、治療後容積比の中央値が25.94%（10.31～27.67%）、髄外腫瘍では初診時肉眼的腫瘍容積/脳容積比の中央値が1.96%（0.26～6.42%）、治療後容積比の中央値が66.87%（40.98～108.47%）であった。

髄外腫瘍に関して、放射線治療法による比較を行った結果、評価可能な緩和的放射線治療3頭における初診時肉眼的腫瘍容積/脳容積比の中央値が3.93%（3.5～4.43%）、治療後容積比の中央値が66.44%（52.52～100.82%）であった。一方、根治的放射線治療7頭における初診時肉眼的腫瘍容積/脳容積比の中央値は1.00%（0.26～6.42%）、治療後容積比の中央値が67.29%（40.98～108.47%）であった。

#### 【考察】

髄内腫瘍において、放射線治療後に神経症状、mass effectが顕著に改善され、肉眼的腫瘍容積が縮小した症例が多かったのに対し、髄外腫瘍では比較的变化の少ない症例が多いことから、放射線治療は髄内腫瘍に対し、より早期に効果を示す可能性が示唆された。

これまでの研究において、髄外腫瘍において、根治的放射線治療を行った症例が、緩和的放射線治療を行った症例よりも生存期間が長いことが示された。しかし、緩和的放射線治療では初診時肉眼的腫瘍容積が大きく、かつ浮腫の重篤な症例が多いことから、治療選択上においてバイアスが生じている可能性がある。今後、症例数を増や

し、より多くのデータを基に治療効果を比較検討していく必要がある。

## H. その他 8

### 手術後放射線治療もしくは放射線治療単独で治療した脳腫瘍のイヌの治療成績の比較

#### 【背景】

イヌの脳腫瘍において、放射線治療単独の成績を報告した論文は比較的多いが、手術と組み合わせた場合の予後を報告したものはほとんどない。今回、脳腫瘍のイヌで、手術後放射線治療もしくは放射線治療単独で治療を行なったときの予後を比較した。

#### 【材料および方法】

2007年4月から2012年11月に、日本大学生物資源科学部附属動物病院に来院し、MRI検査で脳腫瘍を疑われたイヌ（下垂体腫瘍を除く）のうち、1)手術を行い、さらに放射線治療を行ったもの（Sx-RT群）と、2)手術なしで放射線治療のみを行ったもの（放射線治療単独群）について調べた。放射線治療は、緩和的放射線治療（週1回、初回のみ5Gy、2～5回目は8Gy、総線量37Gy）、もしくは根治的放射線治療（月水金の週3回、1回4Gyで計12回、総線量48Gy）を行なった。

カルテの記録から年齢、性別、体重、品種、放射線治療の方法、生存期間などを調べた。生存期間は、初診時から死亡日までとした。

Sx-RT群の全症例で、腫瘍の病理組織学的診断が行われている。しかし、放射線治療単独群での、病理学的検査情報が不備であった。両群で病変部を適切に比較するため、全症例で改めてMR画像を検討し、髄内／髄外腫瘍に分類した。

生存解析はKaplan-Meier法を用い、log-rank検定を用いてSx-RT群／放射線治療単独群、髄内／髄外腫瘍、緩和／根治的放射線治療を比較した（有意水準 $P < 0.05$ ）。

#### 【結果】

対象となった症例は24頭であり、オス6頭、去勢オス4頭、避妊メス14頭、年齢中央値が9歳齢、体重中央値が9.65kgであった。Sx-RT群7頭のうち、緩和的放射線治療を行ったものが4頭、根治的放射線治療が3頭、放射線治療単独群17頭のうち、緩

和的放射線治療を行ったものが10頭、根治的放射線治療が7頭であった。

全てのイヌの生存期間中央値は657日（26～1195+日）であり、Sx-RT群（中央値803日：範囲141～995+日）と放射線治療単独群（同657日：範囲26～1195+日）で差はなかった。さらに、全ての髄内腫瘍（6頭）と髄外腫瘍（18頭）で比較したところ、生存期間に差はなく、Sx-RT群の髄内腫瘍（3頭）と髄外腫瘍（4頭）、RT単独群の髄内腫瘍（3頭）髄外腫瘍（14頭）を比較しても差はなかった。

全てのイヌを放射線治療方法により比較したところ、根治的放射線治療を行なった10頭は、緩和的放射線治療を行なった14頭より有意に長く生存した（それぞれ中央値1064日：範囲226+～1195+日、352日：範囲26～995+日）。さらに、放射線治療単独群で検討したところ、根治的放射線治療を行なったイヌは、緩和的放射線治療を行なったものより、有意に長く生存した（それぞれ中央値1107日：範囲226+～1195+日、314.5日：範囲26～739日）。

#### 【考察】

症例数が少なくかつ治療群間の偏りがあることから、今回の結果から断定的なことは言えないが、根治的放射線治療を行なった症例は、緩和的放射線治療を行なった症例より長期生存する可能性がある。今後、手術単独で治療した症例の結果と比較するとともに、脳腫瘍の最適な治療法を探っていきたい。

## H. その他 9

### 放射線治療を行った鼻腔内リンパ腫のネコの予後に関する検討

#### 【背景】

リンパ腫は、放射線治療に非常に高い感受性である。そのため、鼻腔内に限局したリンパ腫のネコにおいては、放射線治療が選択されることが多い。しかし、生存期間や予後因子についての報告は少ない。また、CT/MRI 所見と予後との関係を検証した報告はほとんどない。

今回、日本大学生物資源科学部付属動物病院における症例のカルテ情報および CT、MRI 所見をまとめ、生存期間に影響する因子についての解析を行った。

#### 【材料および方法】

2007 年 10 月から 2013 年 1 月の間に、ANMEC 放射線腫瘍科に来院したネコのうち、ステージ 1 の鼻腔内リンパ腫と診断され、放射線治療を行った 20 頭について調べた。カルテ情報から、年齢、性別、体重、品種、来院前の使用薬剤、初診時の症状(鼻出血、顔面変形、くしゃみ)、血液検査結果などを評価した。CT/MRI 所見(鼻腔内充満、鼻中隔破壊、鼻梁皮下浸潤、硬口蓋破壊、眼窩浸潤、鼻咽頭充満、蝶形骨洞充満、前頭洞充満、篩板破壊、脳浸潤、脳浮腫、寛解)について評価した。生存期間は、初診日から死亡日までとした。生存解析は Kaplan-Meier 法を用い、log-rank 検定を用いて比較した(有意水準  $P < 0.05$ )。

#### 【結果】

症例の性別は、去勢オス 10 頭、避妊メス 10 頭だった。体重中央値は 4.33kg、年齢中央値は 9.75 歳齢であった。19 頭で週 1 回の緩和的放射線治療、1 頭で週 3 回の根治的放射線治療を行い、総線量中央値は 40Gy だった。MRI 検査を行った 8 頭のうち 7 頭で脳浸潤が認められ、うち 4 頭で顕著な浮腫が認められた。全てのネコの生存期間中央値は 101 日(範囲: 57~1923+日)であった。解析を行なったところ、CT で篩板直前に腫瘍の充満が見られるものも含めて「篩板破壊(の可能性)あり」としたとき、破

壊のある 14 頭は、破壊のない 6 頭と比較して、有意に短い生存期間であった。しかしながら、CT で明らかな脳浸潤が認められた 6 頭となかった 12 頭の生存期間で、有意差はなかった。まとめると、負の予後因子は鼻出血、FIV 陽性、鼻中隔破壊、鼻梁皮下浸潤、蝶形骨洞充満、前頭洞充満、篩板破壊であった。来院前のプレドニゾロンの使用、くしゃみ、顔面変形、鼻腔内充満、硬口蓋破壊、眼窩浸潤、鼻咽頭充満、脳浸潤は、予後に関係しなかった。寛解が認められた 10 頭(生存期間中央値 1326 日)は、なかった 5 頭(同 84 日)より、有意に長く生存した。経過観察中に腎転移が認められた 7 頭(生存期間中央値 84 日)は、なかった 13 頭(同 1326 日)と比較して、有意に生存期間が短かった。

#### 【考察】

重度の篩板破壊、脳浸潤を認めた症例で、長期生存するものがあつたことから、放射線治療の有効性が改めて示された。一方で、初診時の腫瘍量、浸潤範囲が大きい症例の中で、経過観察中に腎転移を生じるものがあつたこと、腎転移が認められた症例は例外なく短命であつたことから、負の予後因子の多い症例では、早期から、放射線治療と併せて抗がん剤による徹底的な全身治療を行なう必要があるかもしれない。



磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

研究分担者 平田 邦生 独立行政法人理化学研究所・専任技師

A. 研究目的

SPring-8では研究方法に詳細を記す  
マイクロフォーカスビームラインBL32  
XUを用いた制癌効果を有する種々の試  
料について、その結晶から原子分解能  
( $d_{min} < 1.0\text{\AA}$ )での構造解析を実現す  
ることを目的としている。我々は以前  
に磁性とともに制癌効果を有する物質  
の5ミクロン程度の微小結晶から $0.8\text{\AA}$   
での結晶構造解析に成功している (sub  
mitted)。そのノウハウを活かした効  
率のよいミクロンオーダーの微小結晶  
からの構造解析手法の確立を目指す。

B. 研究方法

構造解析とは、一般に、物質の原子  
配列を決定する分析法である。そのプ  
ローブとして X 線, 中性子線, 電子線  
が用いられる。それぞれのプローブは,  
物質との相互作用 (散乱・吸収) の機  
構が異なるが、構造解析においては,  
規則正しい原子配列によるプローブ光  
との干渉による回折現象を利用して  
いる。この構造解析という分析法の始  
まりは、おそらく 1913 年に英国科学雑誌  
*Nature* に発表された以下の X 線結晶構  
造解析に関する 2 本の論文ではないか  
と思われる。

X-Rays and Crystals, T. Terada, *Nature*, **91**,  
135-136 (10 April, 1913). The Structure of  
the Diamond, W. H. Bragg & W. L. Bragg,

*Nature*, **91**, 557 (31 July, 1913).

最初の論文は岩塩の構造解析によるもので、著者 T. Terada とは寺田寅彦のことである。2 番目の論文の著者は、この成果により 1915 年にノーベル物理学賞を受賞した Bragg 親子である。寺田の論文は、Bragg よりも 4 ヶ月前に発表されたが、構造解析の基本式となる Bragg の式を導出したことがノーベル賞の受賞に結びついたと言われている。今から約 100 年前、我が国は、構造解析のサイエンスで、世界の魁となっていたのである。その後、”Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid”と題する DNA の構造解析結果が J. D. Watson と F. H. C. Crick により *Nature* **171**, 737-738 (25 April, 1953) に発表され、DNA の 2 重らせん構造と水素結合による規則的な塩基配列がつかさどる DNA 複製のメカニズムを解明し、生命科学の分野での構造解析の歴史が始まる。1964 年には Dorothy Crowfoot Hodgkin が“X 線回折法による生体物質の分子構造の決定”

で、1985 年には Herbert Aaron Karle と Hauptman Jerome が “結晶構造を直接決定する方法（直接法）の確立”で、ノーベル化学賞を受賞し、構造解析の技術を大きく進展させた。そして、生物を形作る巨大分子であるタンパク質や核酸の立体構造を研究し、それらの機能を解明する生物学の一分野として、「構造生物学」という研究分野が誕生した。この分野の成果として、Ada E. Yonath, Thomas A. Steitz, Venkatraman Ramakrishnan らが“リボソームの構造と機能の研究”により 2009 年のノーベル化学賞を受賞したことは、記憶に新しい。日本では、3000 種類のタンパク質の立体構造を解明することを目標とした「タンパク 3000 プロジェクト」が行われた。プロジェクトにおいて構造解析の中心的な役割を果たした方法が X 線回折法である。特に、その拠点として世界最大のシンクロトロン放射光施設である SPring-8 (兵庫県佐用郡) とフotonファクトリー (高エネルギー加

速器研究機構，茨城県つくば市）が用いられ，放射光 X 線結晶構造解析法は，いまやタンパク分子の構造解析法の主流となっている。ここでは，X 線構造解析法の原理と，放射光を用いたタンパク質構造解析について概説する。

### 1. X 線構造解析法の原理

X線構造解析は，結晶中に規則的に並んだ原子によって回折されたX線回折強度を解析し，結晶の単位胞内の原子配列（結晶構造）を決定することである。この基となるのは（1）に示した観測構造因子と呼ばれるX線回折の基本式である。X線は電子のプローブである。よってX線は，結晶中の電子により散乱される。（1）式は，それを式で表した物であり，電子分布  $\rho(\mathbf{r})$  によって散乱された波の重ね合わせの式になっている。数学的には電子分布  $\rho(\mathbf{r})$  のフーリエ変換の形で表される<sup>1)</sup>

$$\mathbf{F}(\mathbf{h}) = \sum_j f_j \exp[2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}_j] \exp[-B_j (\mathbf{h}/2)^2] = \sum \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}] \quad (1)$$

$\mathbf{r}, \mathbf{h}$  は，それぞれ，物質中の原子位置と，散乱波の方向をベクトルで表している。

数学的には，式(2)の観測構造因子の逆フーリエ変換によって，物質中の電子密度を得る事ができる。その分布で，電子密度の高い位置（電子が集中して分布している場所）が原子座標であり，そこに局在している電子の数を調べることにより，原子の種類を知ることができる。これが，構造解析の基本式ともいえるものである。

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} \mathbf{F}(\mathbf{h}) \exp[2\pi i \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}]$$

しかし，実際の回折実験で測定される回折強度は，観測構造因子の二乗に比例する強度であり位相情報が失われている。これを位相問題という。また，フーリエ変換した電子密度は，フーリエの打ち切り効果とデータに含まれる測定誤差の影響もあり，完全な電子密度を再構成したものではなく，原子位置を決定するには十分ではない。よっ

て、この位相問題を解き、構造解析を行うには、原子配列を仮定した構造モデルを仮定し、モデルの原子座標  $\mathbf{r}$  に基づく位相を使って式(1)から回折強度を計算し、実験による測定強度との比較からモデルの最適化を行うことで、式(2)の逆問題を解き、原子配列を決定する。これを体系化した方法の一つが、先に述べた「直接法」である。

一般に、X線回折データを用いた結晶構造解析の手法には、単結晶構造解析と粉末結晶構造解析の2つがある。二つの手法の違いを説明するため、図1に実験の模式図をそれぞれ示した。違いは、試料の形状が、原子配列が結晶全体ですべてそろっている単結晶か、2-3ミクロンのサイズの結晶が集まった粉末試料かの違いである。単結晶試料から得られる実験データでは、図の様に回折斑点が観測され、その位置と強度の情報を用いて構造解析を行う。粉末回折では粉末状の結晶がランダムな方向を向いているため、回折された

X線の強度分布は単結晶回折のデータを全方向に回転させて重ね合わせたものとなり2次元検出器上では、リング状の強度分布が得られる。これは回折斑点の3次元の情報が一次元に縮退されてしまうため、巨大分子であるタンパク質の構造解析では、観測データの情報量として不十分である。そこで、解析に向けて十分な情報量を得るためには、単結晶構造解析が必須となる。よって、タンパク質分子の構造解析では、高品質な単結晶が必須となり、その結晶化が構造解析の正否を決定づけることになる。

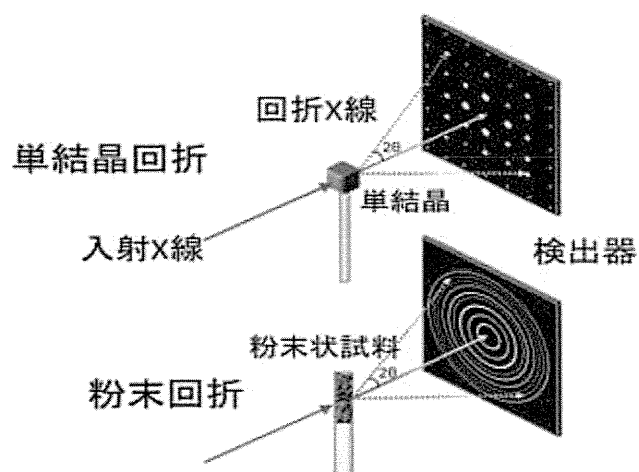


図1 単結晶 X 線回折と粉末 X 線回折

## 2. タンパク質の結晶化

タンパク質は一般に親水性の高分子で、塩類、アルコール、親水性高分子

等の添加により溶解度が低下し、不溶化し沈殿を形成する。この不溶化の過程をゆっくり進行させることで、分子が規則的に配列した結晶が析出することがある。しかし、このプロセスには未知な部分が多く、どのような条件で結晶化するかはタンパク質によって大きく異なるため、その結晶化の条件を探索するのが構造解析のはじめの重要なステップになる。

タンパク質は一般に塩類の添加により沈殿し、この現象を塩析という。図1にタンパク質と塩類などの沈殿剤濃度に対するタンパク質結晶化の状態変化を表した相図を示す。タンパク質は、タンパク質および沈殿剤の濃度上昇に伴い飽和濃度（図中①）を超えて過飽和状態となるが、過飽和度が低い状態（準安定状態）（②）では何らかのきっかけがない限り結晶は析出しない。より過飽和度の高い状態（③）では結晶核の形成が起こり、生じた結晶核は飽和濃度に達するまで成長を続ける。さ

らに過飽和度の高い状態（④）では結晶を形成するまえに、ただちに沈殿を生じる。したがって、タンパク質の結晶化では、図中③の状態を作り出すことが重要となる。

タンパク質の結晶化には多くの方法があるが、蒸気拡散法がもっともよく利用されている（図3）。この方法では、タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合した液滴（結晶化ドロップ）を作成し、それより大量の沈殿剤溶液をリザーバに入れた密閉空間に封入する。両液を等量混ぜると、その時点（図中A点）では、沈殿剤濃度はリザーバの1/2、タンパク質濃度はタンパク質溶液の1/2の状態になるが、その後、結晶化ドロップの水分はより沈殿剤濃度の高いリザーバへ気相を通して移動（蒸気拡散）するため、タンパク質濃度、沈殿剤濃度ともに上昇し、③の領域に達し、核形成がおこると、生じた結晶核は飽和濃度に達するB点まで成長する<sup>2)</sup>。

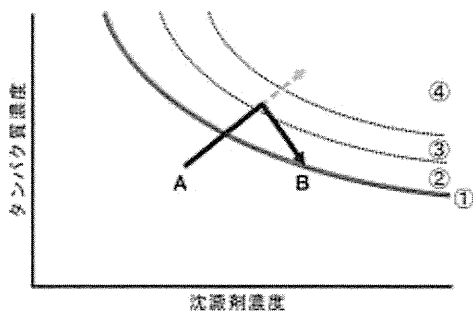


図2 タンパク質溶液の相図(phase diagram)

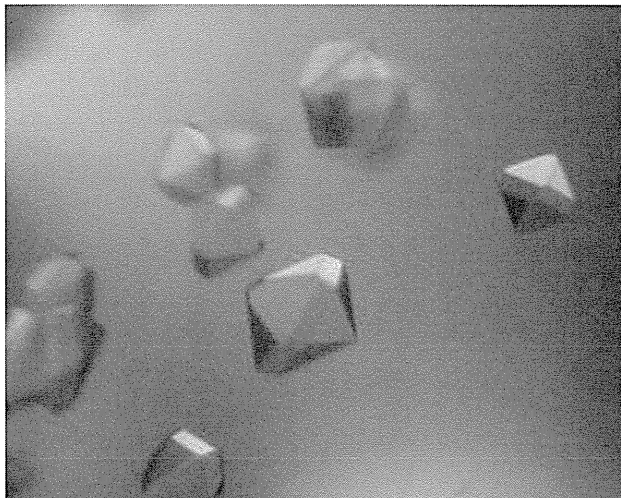
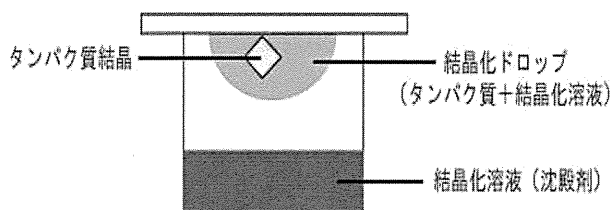


図3 ハンギングドロップ蒸気拡散法のセットアップ (上) とタンパク質結晶 (下)

実際のタンパク質の結晶化では、さまざまな溶媒条件に硫酸アンモニウムなどの塩類やポリエチレングリコール

などを沈澱剤として添加することで単結晶を生成できる。タンパク質結晶には体積比 25~75%程度の溶媒が含まれ、分子間の接触面積が相対的に小さく、結晶の規則性に欠陥が生じやすい。さらに、結晶の成長は溶媒環境の変化に依存するために、構造の揺らぎが助長される。そのために結晶格子の完全性が低くそこから得られる回折データは原子分解能に至らないため、これまで構造解析がなされたタンパク質結晶の分解能は 1.5~3.0 Å の範囲が一般的である。

### 3. タンパク質結晶構造解析での位相決定法

本来、X線回折によって得られるべき実測データは(1)式より各回折点の指数ごとの構造因子の構造振幅  $F(\mathbf{h})$  と位相  $\alpha(\mathbf{h})$  からなる複素数値  $\mathbf{F}(\mathbf{h})$  である。

$$\mathbf{F}(\mathbf{h}) = F(\mathbf{h}) \exp[i\alpha(\mathbf{h})]$$

(3)式を複素平面 (Harker 図) で表現

したものが図 4 である。しかし、実際のデータ収集で得られる回折強度  $I(\mathbf{h})$  はこの複素数値のノルムの二乗、つまり構造振幅の二乗に対応する。

$$I(\mathbf{h}) = \mathbf{F}(\mathbf{h}) \cdot \mathbf{F}^*(\mathbf{h}) = F(\mathbf{h})^2$$

この様に、X 線構造解析法の原理で述べたように、実際の回折実験で測定される回折強度は、観測構造因子の二乗に比例する強度であり位相情報が失われている。

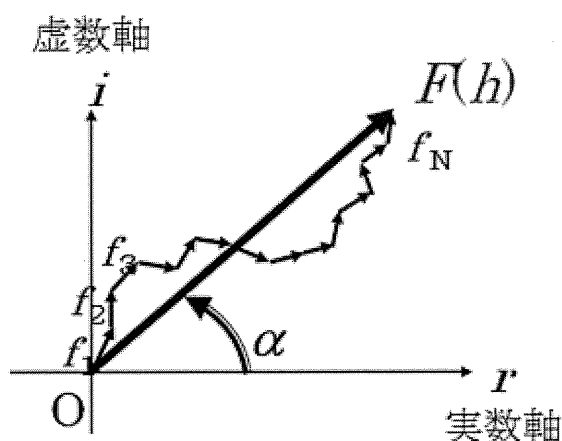


図 4 複素平面 (Harker 図) での結晶構造因子

Harker 図では各回折点の構造因子  $\mathbf{F}(\mathbf{h})$  は結晶格子内の各原子からの波の重ね合わせとして散乱因子  $f_i$  のベクトル和となり、構造振幅  $F(\mathbf{h})$  と位相  $\alpha(\mathbf{h})$  により表現できる。

構造解析では、この位相情報をなんらかの手法で復元する必要がある。低分子結晶では直接法による位相決定が一般的であるが、生体高分子結晶は分解能が低く、情報量の不足からこの方法での位相決定は困難である。そこで、直接法の代わりに、分子置換法、同形置換法、異常分散法などの位相決定法が用いられている。

分子置換法 (Molecular Replacement (MR)法)<sup>3)</sup>では、すでに X 線解析された他の生体高分子 (これをモデル分子と呼ぶ。分解能が低い場合には主鎖構造だけ、あるいはポリアラニン構造の場合もある) が目的高分子と主鎖構造が似ている場合にのみ適用できる。既知モデル分子の構造を用いて、目的結晶内でそのモデル分子がどの方向を向き、どの位置にあれば観測データと適合するかを試行する。有意な解が見つかれば、その構造から位相を計算して目的結晶の近似的な位相とする方法である。実際の分子置換法では、解析を進める新規な構造と既知

モデル分子の構造が似ていることが重要であり、アミノ酸配列の相同性が高い場合や既知構造と補欠因子などの複合体の構造解析に広く利用されている。

多重同形置換法 (Multiple Isomorphus Replacement (MIR) 法) では、タンパク質結晶内の原子位置に変化を与えないように、他の重原子 (水銀イオンなど) を結晶中の特定の位置に挿入した複数の重原子誘導体結晶を調製して、その重原子の有無によって生じる回折強度変化から重原子位置を決定して位相を求める方法である。重原子誘導体結晶は、重金属化合物を溶かした溶液にタンパク質結晶を浸漬することにより調製する。しかし、この調製には様々な重原子種の様々な溶液条件でのスクリーニングが必要で、重原子との結合によりタンパク質の構造が変化してそれに伴い結晶構造が変化したり、結晶が壊れたりすることもあるほか、重金属原子をタンパク質に挿入できないことも多く、非常に骨の折れる大変な方法である。

そこで、1990年に Hendrickson らが開発したセレノメチオニンが導入されたタンパク質を用いる多波長異常分散法 (Multi-wavelength Anomalous Dispersion (MAD)法) は、同型置換法に代わる簡便かつ精密な位相決定法として注目され、放射光利用の進展に伴い多くの新規構造解析に利用されるようになった。MAD 法は、セレン原子などの異常散乱原子に見られる X 線散乱強度の波長依存性 (異常分散効果) から生じる回折強度変化から位相を決定する方法<sup>4-6)</sup>であり、唯一つの結晶から位相問題を解決することが出来る。異常分散効果は、特定の固有振動を持つ軌道電子が入射 X 線によって誘起される振動の共鳴現象であるが、入射 X 線の波長変化に伴ってその回折強度と位相を変化させる。波長 $\lambda$ の X 線での原子散乱因子  $f_{\lambda}$  を図 5 の複素平面で示した。

$$f_{\lambda} = f_0 + f_{\lambda}' + i f_{\lambda}'' \quad (5)$$

異常分散を考慮した原子散乱因子は、非異常分散項  $f_0$  と異常分散項の  $f_{\lambda}'$



と  $f_{\lambda}''$  からなる。異常分散項の実数  $f_{\lambda}'$  と虚数項  $f_{\lambda}''$  の値は  $f_0$  に比べて小さいが、波長依存性を示す。一般的なタンパク質結晶の回折実験に使われる波長領域では、タンパク質の主要構成原子である炭素、窒素、酸素の異常分散項は極めて小さいが、鉄・銅・亜鉛・水銀・白金などの重原子はその吸収端近傍で異常分散項  $f_{\lambda}$  は大きなものとなる。また、非異常分散項  $f_0$  はX線の散乱角が大きくなると小さくなるが異常分散項は内殻の電子の共鳴効果に由来するため、散乱角にはほとんど依存しないという特徴を持つ。

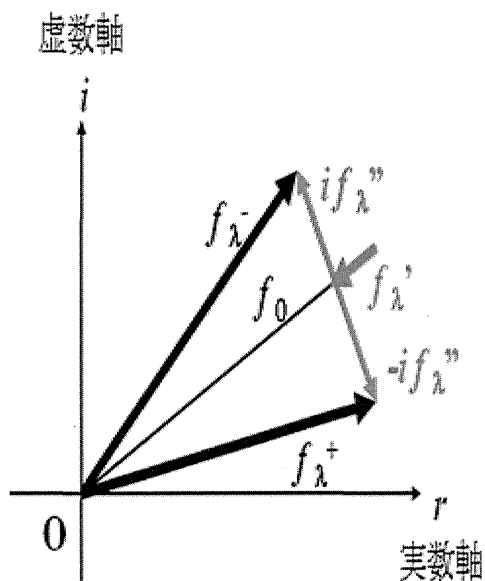


図5 異常分散項の寄与

原子散乱因子  $f_{\lambda}$  の非異常分散項  $f_0$  と異常分散項  $f_{\lambda}'$  と  $f_{\lambda}''$  の寄与を示す。

その異常分散効果を利用した位相決定の原理はKarle<sup>8)</sup>によって定式化された。一種類の異常散乱子を含む結晶について、複数の波長  $\lambda$  における反射  $h$  とその Friedel 対  $-h$  に対する構造振幅  $|F_{\lambda}(\pm h)|$  について連立方程式を解く事でタンパク質の位相  $\alpha_N$  を一義的に求める事ができる。図6にMAD法の構造振幅の関係性をHarker Harker図に示した。

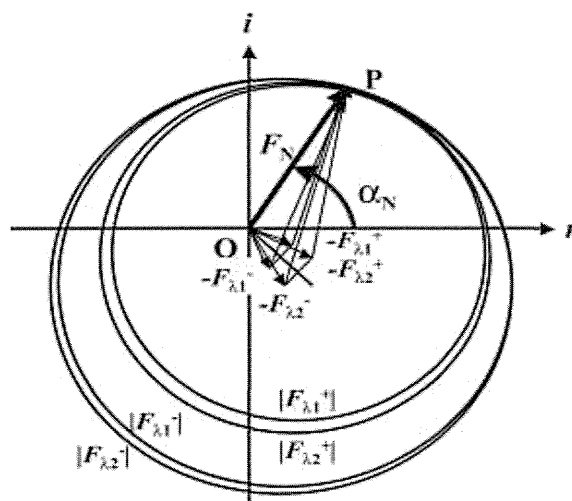


図6 多波長異常分散法による位相決定  
異常分散原子が含まれていると複数波長での構造振幅  $|F_{\lambda}(\pm h)|$  の測定によって非異常分散原子からの結晶構

造因子への寄与  $F_N$  の位相  $\alpha_N$  は一義的に決まる。

セレンを利用した MAD 法では、タンパク質を構成するアミノ酸の 1 つであるメチオニンをセレノメチオニンに置き換えたタンパク質を合成して結晶化することにより、はじめから異常散乱原子を含むタンパク質結晶を得ることができる。一般的に MAD 法を適用するためには、使用可能な波長範囲内で X 線の異常分散を引き起こす原子をタンパク質結晶内に導入する必要がある。前述のセレノメチオニンのほか金属タンパク質に固有の亜鉛・銅・鉄などの金属原子や同型置換法で導入する白金・水銀などの重原子が異常散乱原子として利用されている。さまざまな波長の X 線を得るためには、放射光施設が不可欠であり、国内では SPring-8 (播磨)<sup>9)</sup> と高エネルギー加速器研究機構 (KEK) Photon Factory (つくば)<sup>10)</sup> の 2 つの放射光施設に設置されたタンパク質構造解析用ビームラインが利用されている。近年で

は、溶媒平滑化などによる位相改良法の発展に伴い、複数波長ではなくより簡便に 1 波長だけの異常散乱効果から位相決定を行う単波長異常分散法 ( Single-wavelength Anomalous Dispersion (SAD) 法) による構造解析も実用化され、現在では新規構造解析において一般的な位相決定法となっている。

いずれの方法にせよある精度で初期位相が得られると、(2) 式に従って電子密度を計算し、その電子密度図を参照しながら部分的な分子構造の構築・修正を行うことができる。構築・修正後の構造から再度位相を計算して電子密度図を吟味し、構造の構築・修正を行う。いずれの方法でも初期位相には誤差を多く含むため、以上の操作を繰り返すことによって最終的な分子構造を構築する。

## 4. 回折強度測定

### 4.1. 放射光ビームラインでの回折強度測定

結晶に X 線を照射すると生じる回折

像は、ブラッグの条件を満たす逆空間の回折点によって構成される。結晶方位を変化させれば条件を満たす回折斑点が変化するので、連続的に結晶を動かしながらその回折像を記録することにより、逆空間内のあらゆる回折点を測定することができる。結晶の動かしかたや回折点を測定する装置の違いなどによってさまざまな測定法が考えられるが、現在タンパク質分子の結晶解析においては、ほとんどの場合、振動写真法が用いられる。つまり、結晶を回転軸の周りに微小角で振動させながら、その回折像を二次元検出器で連続的に収集する。回折能の低いタンパク質結晶からの高精度回折強度測定にはやや問題があったが、放射光 (synchrotron radiation) の高輝度 X 線利用や、高性能 2 次元検出器の技術開発により克服され、測定時間の短縮も進んでいる。

放射光とは、ほぼ光速で運動する高エネルギーの荷電粒子 (電子や陽電子) が、磁場などによってその進行方向を

曲げたり波打たせたりするときに発生する電磁波 (光) の総称で、輝度が高く紫外線から X 線まで広いエネルギー範囲をカバーする光である。図 3 に SPring-8 の偏向電磁石と標準アンジュレータが発生する放射光のエネルギースペクトルを示した。SPring-8 からの放射光の単面積あたりの明るさ (輝度) は、実験室の X 線発生装置から得られる X 線に比べ約 1 億倍となっている。

放射光利用の一般化はタンパク質結晶構造解析の飛躍的な発展をもたらし、現在 PDB に登録される立体構造の 80% 以上は放射光により解析されたものである。

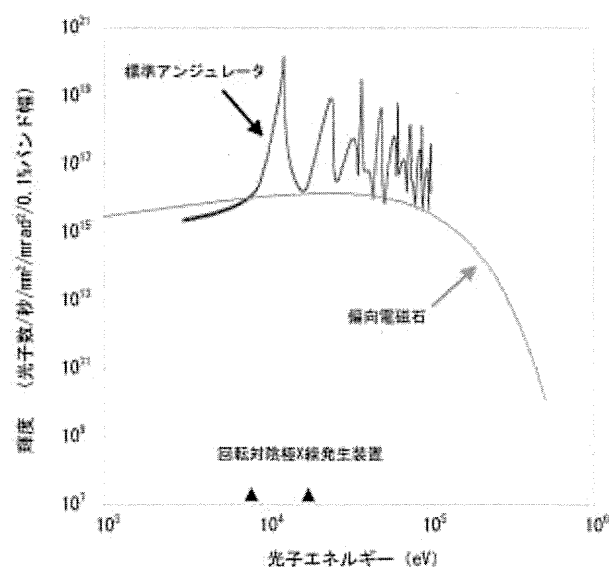


図 7 SPring-8 偏向電磁石と

## アンジュレータのスペクトル

偏向電磁石からは広いエネルギー範囲の白色光，アンジュレータ（磁石周期32mm）からは準単色の高輝度光が得られる。

### 4.2. 放射線損傷を低減する試料凍結

高輝度放射光は回折能の低いタンパク質結晶から高精度な回折強度測定を可能にした反面，放射線による試料の損傷<sup>3)</sup>が深刻となる。損傷を抑えるためには，サンプル結晶の冷却が必須となっている。タンパク質結晶は結晶体積の半分程度を水が占めるため，冷却時に結晶中の水が結晶性の氷に成長し，水分子の再配置や体積膨張により，タンパク質結晶の破壊に繋がる。このため，結晶中の水にグリセロールやトレハロースなどの抗凍結剤を加え，100K以下の低温で瞬間的に凍結させて，アモルファス状の氷で維持させる。これによって低温窒素ガス気流下での回折強度測定を行う<sup>11)</sup>。

サンプル結晶の凍結に成功すると，

回折斑点の形状を乱すことなく明瞭な回折イメージを保つことが出来る。回折斑点の割れや広がりが見られる場合や回折像が出なくなった場合には，凍結条件の再検討が必要である。

サンプル結晶は，クライオグループと呼ばれるナイロン繊維やカプトン膜で出来た微小なループで，結晶母液ごとサンプル結晶をすくい取って凍結させる。クライオグループには，Hampton Research 社<sup>12)</sup>のものなどが使用されている。

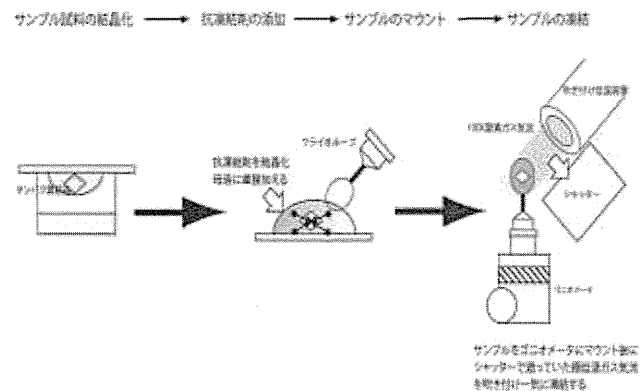


図 8 サンプル結晶凍結の手順

結晶サイズに適した結晶マウント用のクライオピンを使って結晶化プレートから結晶をすくい上げ，抗凍結剤入りのバッファに置換した後，結晶を凍結して回折強度測定を行う。凍結条件は