

分光分析装置を用いたライフサイエンス分野へのソリューション

Providing Solutions for the Life Science Field Using Spectroscopic Analyzers

内ヶ島 美岐子

UCHIGASHIMA Mikiko

抗体医薬品の創薬や製剤の研究、品質管理、また、近年注目されているエクソソームを用いた医療や創薬に関する研究などに向けて、表面プラズモン共鳴イメージング装置や粒子トラッキング解析装置、ラマン分光装置などを用いたソリューション提供を行っている。これらの製品の概略と測定事例を紹介するとともに、外部機関とのコラボレーションで取り組んでいるライフサイエンス領域での先導的な研究開発について紹介する。

We provide solutions using surface plasmon resonance imaging device, particle tracking analysis device, Raman spectroscopic device, etc. for research on drug discovery and formulation of antibody drugs, quality control, and research on medical treatment and drug discovery using exosomes, which have been attracting attention in recent years. I will introduce the outline of these products and measurement examples, I will also introduce leading research and development in the life science field, which we are working on in collaboration with external organizations.

はじめに

HORIBAグループの理化学分析装置のアプリケーションは幅広い研究領域や業界のモノづくりに活用されている。その中でも、特にバイオ・ライフサイエンス領域での用途拡大、ソリューション提供を強化するため、HORIBAでは2014年にバイオ・ライフサイエンスに特化した取り組みをスタートさせた。理化学分析装置の中でも、特に分光技術を用いた製品を核に、医薬品、食品、化粧品市場をターゲットに活動しており、中でも医薬品市場への展開に力を入れている。創薬、製剤研究から生産まで、医薬品に関わるすべての場面で使用される計測機器の提供を目指している。これまでの低分子医薬のみならず、抗体医薬、核酸医薬、細胞医薬、遺伝子治療など多様化するモダリティに、HORIBAは「はかる」ことで貢献している。本稿では、これらの分光技術を用いた製品を核に医薬品市場に向けた展開の例を紹介するとともに、社外とのコラボレーションにより取り組んでいるライフサイエンス領域での新たな展開についても紹介する。

技術と製品

HORIBAのはかる技術は、ライフサイエンス市場においても様々な場面で使用されている。特に、近年、表面プラズ

モン共鳴イメージング(Surface Plasmon Resonance Imaging: SPRi)法、粒子トラッキング解析(Particle Tracking Analysis: PTA)、ラマン分光法は、医療分野での研究開発や医薬品の品質管理等の目的での使用が注目されている。

SPR法とは、ラベルフリーで分子間相互作用を観察できる方法である。金属膜を蒸着したセンサー上の分子と、その表面を通過する分子の相互作用によって生じる屈折率の変化を検出することで、各種パラメーター(結合定数、解離定数、親和性/結合活性など)の評価が可能になる。タンパク質-タンパク質、DNA-DNAなどの同種間の相互作用だけでなく、DNA-タンパク質など異種分子間相互作用も測定可能である。さらに、抗体-微生物など、細胞表面との相互作用も計測することができる。HORIBAのSPRiはSPRの測定点を複数点センサー上に並べたもので、同時に多数分子による相互作用の観察が可能となるのが特長である。

PTAは、粒子にレーザーを照射し、各粒子の散乱光をトラッキングする方法である。粒子径によってブラウン運動速度が異なるため、各粒子の拡散速度から粒子径と個数を計算する。したがって、ナノ粒子のサイズを測るとともに、その個数もカウントすることができる方法である。

ラマン分光法は光を物質に照射した際に発生するラマン散乱光を検出することで、分析対象の分子構造や組成の情報を取得する分光分析法である。分子選択性の高い分析法であり、特別な試料の前処理を必要としない、非破壊、非接触といった特長を有することから、バイオ・ライフサイエンス分野においても広く応用が期待されている。

低分子医薬品に代わり、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品が台頭してきている。バイオ医薬品は、より複雑な

これらの技術を用いたアプリケーションとして抗体医薬品とエクソソームを対象とした例を紹介する。

アプリケーション

抗体医薬品分析

近年、医薬品の形態が多様化しており、従来主流であった



Figure 1 OpenPlex

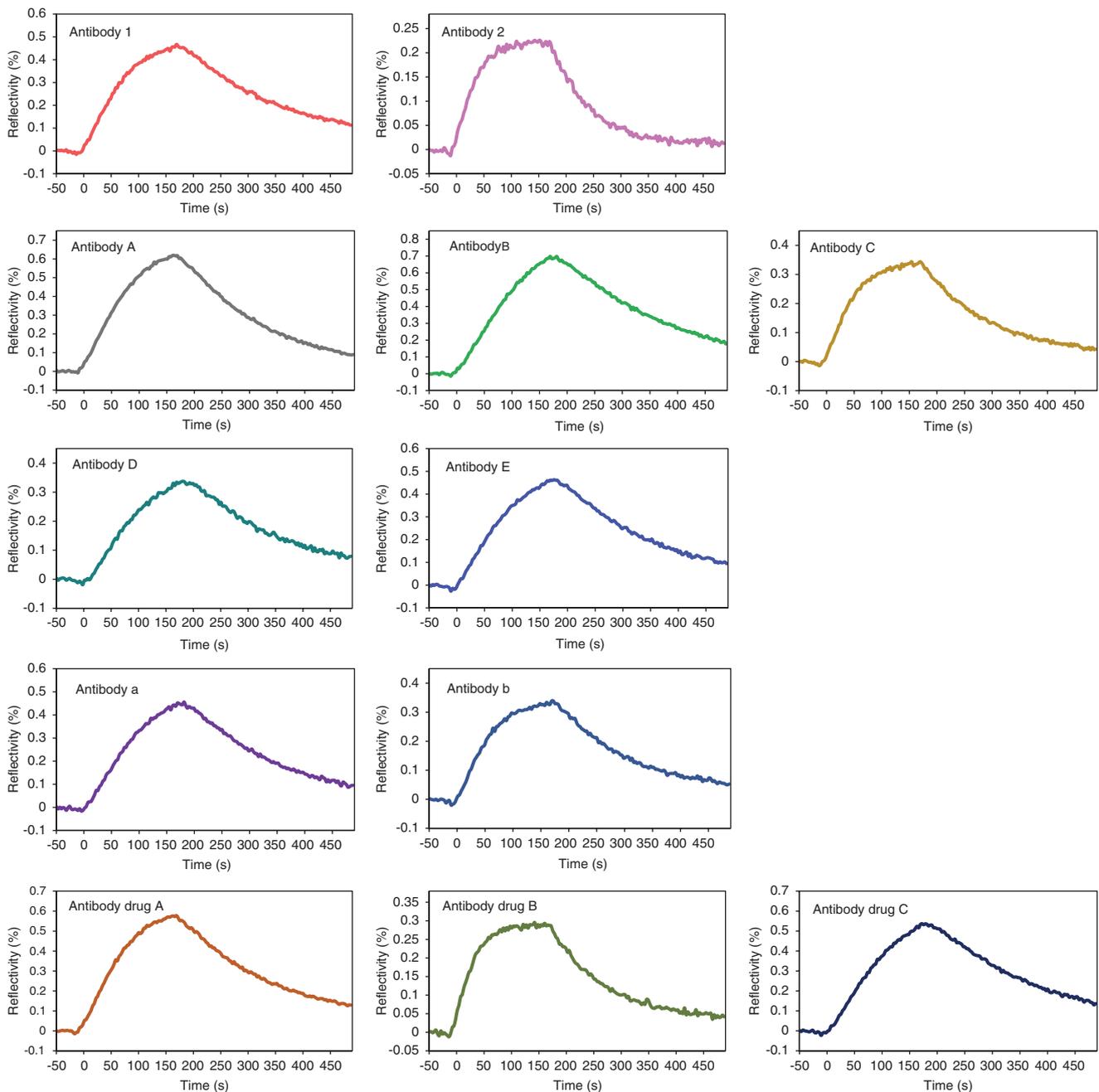


Figure 2 Measurement results with OpenPlex

分子構造を有しており、その物理化学的特性を評価するために低分子医薬品とは異なる分析手法が求められる。特に開発が活況となっている抗体医薬品では、その機能活性や構造安定性、コロイド安定性を解析し、議論することが必須である。このような要求に対する我々のソリューションについて測定事例を交えて紹介する。

(1)SPRIによる測定例

抗体の結合能を解析する手法として、HORIBAのSPRI (Figure 1)を用いることができる。標的との相互作用を速度論的に解釈することができ、マルチチャンネルによる多検体同時測定が可能である。12種類の抗体をセンサー上に固定化し、Fc受容体を送液して相互作用解析を行った結果 (Figure 2)、糖鎖構造の違いによるわずかな速度論量の差が検出された。この結果は、抗体が持つ抗原との相互作用の様々なメカニズムに応じた評価ができる可能性を示している (Figure 2)。

(2)PTAによる測定例

抗体の凝集物は、薬効低下のみならず、副作用を引き起こす恐れがある。特に、sub-visible particles (SVP)と呼ばれる100 nm~10 μmの凝集物は、管理方法についてアメリカ医薬品食品局 (Food and Drug Administration : FDA)のガイドラインが出されるなど、重要度が高まってきている。PTAは、この領域に強みをもった粒子計測法である。従来の散乱法とは異なり、粒子カウントに基づく定量的なコロイド安定性の解析が可能となる点が特徴である。ViewSizer 3000 (Figure 3)の温調機能を用いて50℃で一定時間加熱した抗体溶液を測定することによって経時的に粒子数が増える様子を観察することができた (Figure 4)。このことは、PTA法が抗体医薬品のコロイド安定性を議論する上で有用な手法であることを示している。

(3)Raman分光法による測定例

抗体医薬品は、一般的に数mg~数百mg/mlといった高濃度で製剤化される。故に、凝集化を抑制する製剤条件を検討したり、安定性に優れた抗体を選抜したりする必要がある。凝集物の評価は液体クロマトグラフィー、X線小角散

乱法 (Small Angle X-ray Scattering : SAXS) や静的光散乱法 (Static Light Scattering : SLS)、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering : DLS) を用いて評価されるが、これらはすべてコロイド情報しか得られない。また、高濃度のタンパク質溶液 (抗体医薬品) をそのまま測定することが困難という課題がある。一方、ラマン分光法では、高濃度溶液を直接測定し、抗体の二次構造や三次構造を反映した情報の取得が可能である。よって、ラマン分光法を用いることで、製剤条件下の抗体について、構造安定性を議論することが期待できると考え、ラマンスペクトルの温度依存性を評価した。ここでは、特に芳香族アミノ酸やアミド由来のラマンバンドに着目することによって抗体の構造安定性を議論できる可能性を見出した。このことは、抗体医薬品の製剤研究において有用な知見につながるものと考え



Figure 3 ViewSizer 3000

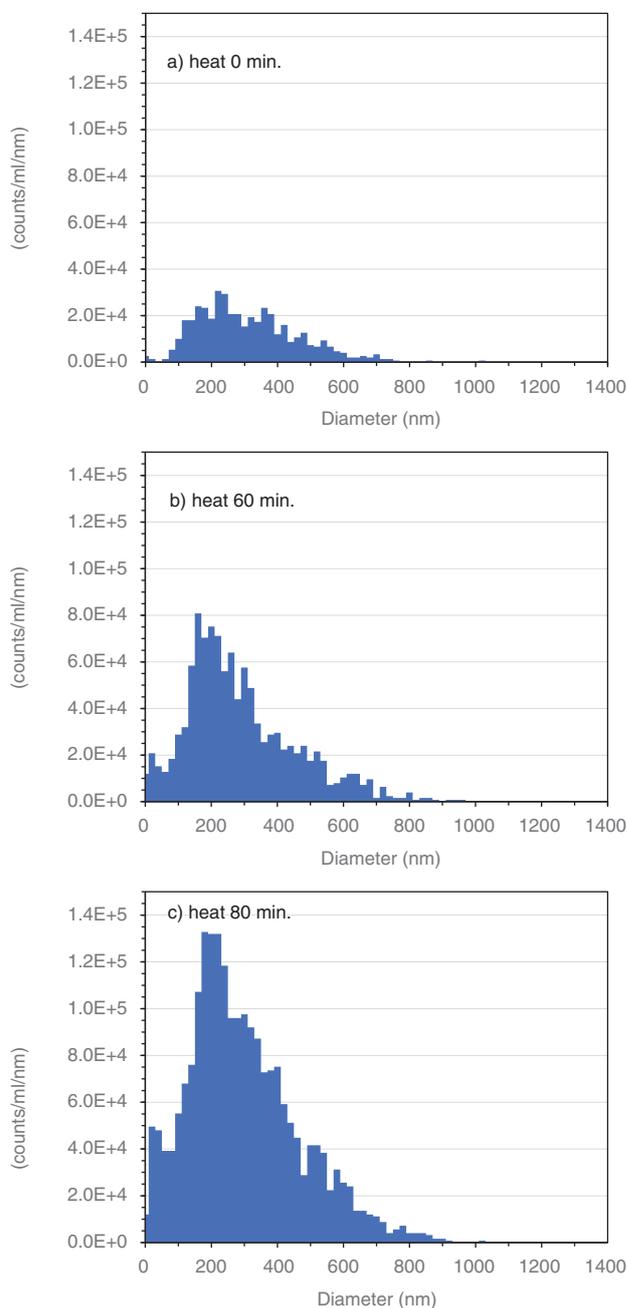


Figure 4 Measurement results with ViewSizer3000

ている^[1]。

エクソソーム分析

エクソソームは細胞が分泌する膜小胞(φ50~150 nm)で、血清や尿など我々の体液中に存在している。その表面は脂質やタンパク質、糖などから構成され、内部にはタンパク質や核酸が含まれ、分泌した細胞によって構成分子種は異なる。このことは、疾患に関連する細胞から分泌されたエクソソームが疾患特異的な分子プロファイルを示すことを意味しており、含有される分子を標的としたリキッドバイオプシーが可能である。また、薬物送達システム(Drug Delivery System: DDS)への応用も研究されており、医療(臨床検査・診断)と創薬(治療薬開発)の両面から注目されている。本稿ではエクソソームの表面タンパク質同定法としてSPRi法の適用可能性評価と、エクソソームの粒子濃度計測としてPTA法の適用可能性評価の例を示す。

(1) SPRiによる測定例

OpenPlexは数多くのリガンド(最大192)をスポット状に固定化したバイオチップを用いる方式を採用しており、同時に数多くの相互作用を検出できる装置である。また、イメージング機能によって相互作用を可視化することもできる。さらに、細胞や細菌、エクソソームなど比較的大きな検体をアナライトとして用いることができるのも大きな特長である。

以下に測定事例を示す。エクソソームはヒト血清から超遠心分離法によって精製したものをを用いた。また、バイオチップはエクソソームマーカーであるタンパク質(CD9, CD63, CD81)に対する抗体を固定化し、特異吸着を防ぐ処理をしたものをを用いた。このバイオチップ上に、エクソ

ソーム溶液200 μL (10¹⁰粒子数/ml 以上)を流して各種抗体との相互作用を評価したところ、すべての抗体との相互作用がイメージング像および反射率変化として観察することができた(Figure 5)。本結果から、エクソソームの表面タンパク質を同定する手法としてSPRi法が有用であることを示すことができた^[2]。

上述の通り、OpenPlexは多種類のリガンドを固定化したバイオチップを用いるため、エクソソーム表面に存在する多種類のタンパク質を1回の測定で同定することができる。このことから、新規マーカーのスクリーニング探索や創薬応用の際に必要な品質管理の手法として適していると期待される。

(2) PTAによる測定例

ViewSizer3000は、3波長のレーザ光源を用いることで、大きい粒子は赤色で、小さい粒子は青色で解析を行うために、ワイドレンジでの粒子測定が可能である。また、それぞれの波長に合った蛍光物質を利用すれば、蛍光染色された粒子測定も可能となる。

以下にViewSizer3000を使ったエクソソームの測定事例を示す。エクソソームはヒト血清からMagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS(富士フィルム和光純薬工業)で精製した^[3]。得られたエクソソーム溶液を100倍に希釈し、ターゲットとなるエクソソームを蛍光試薬で染色した。染色後、ViewSizer3000の蛍光モードで、蛍光粒子の粒度分布を計測し、その後、溶液中の全粒子も計測した。結果、全粒子の約40%が蛍光試薬で染色されていることが明らかになった(Figure 6)。この結果から、全粒子中のエクソソームの割合を算出する手法としてViewSizer3000が有用であ

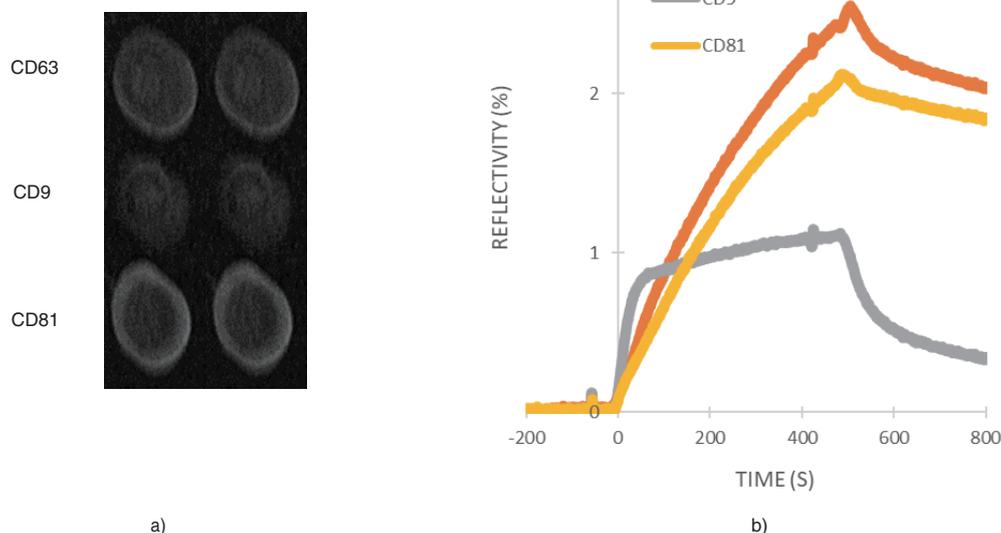


Figure 5 Exosomes detection results with OpenPlex
a) Spot Imaging
b) Reflectance change

ると言える。このようにViewSizer3000は、ターゲットとなるエクソソームの検出に有効であると期待される。

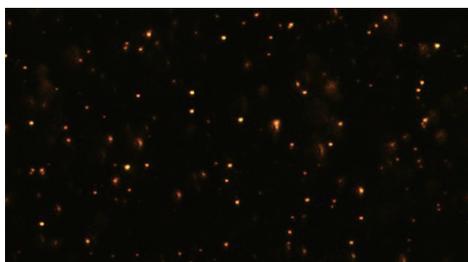
以上のように、我々はエクソソームを用いた基礎医学および創薬分野への貢献を期待し、疾患特異的なタンパク質の同定の研究に取り組んでいる。また、「同時多検体測定」、「細胞や細菌を対象とした相互作用解析」ができるOpenPlexの特長や、3波長を使用した蛍光計測も可能なViewSizer3000の特長を活かし、前述のバイオ医薬品を始めとした様々なモダリティを対象とした創薬領域でも活用されるよう取組みの幅を広げていきたいと考えている。

外部コラボレーション

これまで述べてきた分光分析装置によるソリューション提供に加えて、ライフサイエンス領域における外部機関と連携について紹介する。

(1) LC-Raman ; 高速液体クロマトグラフ -ラマン顕微鏡複合装置

2020年から島津製作所とHORIBAは、LC-Ramanシステムの共同開発を開始し、2021年6月に発売を開始した。高速液体クロマトグラフを用いて試料を分離し、専用のプレート上に捕集した試料中成分からラマン顕微鏡でラマンスペクトルを取得する。各成分が単離された状態でラマン分光法に供試することができるため、混合試料のままでは困難であった各成分の分子構造の情報取得が可能になる。本システムは、天然由来の未知機能性成分や、生体試料中のバイオマーカー探索などに貢献することが期待される。



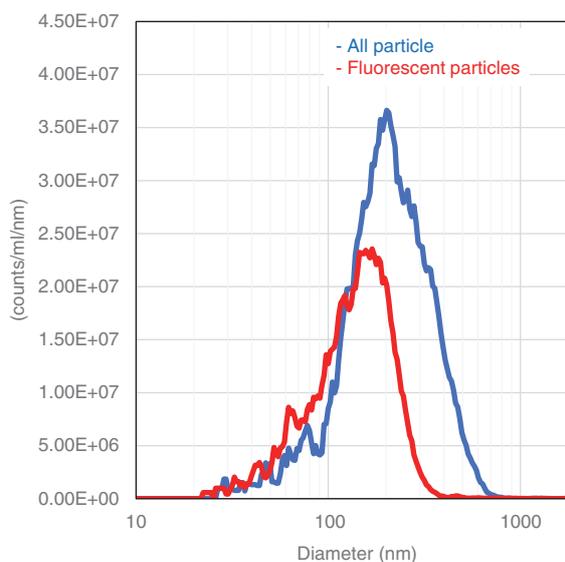
a)

(2) ムーンショット型農林水産研究開発事業 『土壌微生物叢アトラスに基づいた環境制御による循環型協生農業 プラットフォーム構築』

本プロジェクトは、内閣府が掲げるムーンショット目標5 “2050年までに、未利用の生物機能等のフル活用により、地球規模でムリ・ムダのない持続的な食料供給産業を創出”に基づき立ち上がった、未来型の食料として「ダイズ」に着目し、作物の土壌栽培に適する要件（「健康な土壌とはなにか」）の定義づけを行い、農業の活性化や未来型食生活に向けた持続的な食料供給産業の創出をめざしている。ここでは、土壌微生物、作物、環境の相互作用の解析・制御により、循環型協生農業を可能とする技術とソフトを集約した、「循環型協生農業プラットフォーム」構築をめざしており、HORIBAは古くから培ってきた電気化学センサーの技術を用いて、ダイズの生育過程における土壌ミネラルイオンの測定を担当している。ミネラルイオンの値とダイズの分子生物学的な情報を紐づけることで、分光技術だけでなく電気化学センサーシーズによるライフサイエンス領域でのソリューション形成に繋がることが期待される。

(3) 戦略的イノベーション創造プログラム(SIP) 「スマートバイオ産業・農業基盤技術」^[4]

HORIBAは、研究課題「スマートバイオ産業・農業基盤技術」に参画している。本研究課題のグループでは、生産から流通・消費までのデータ連携により最適化を可能とするスマートフードチェーンの構築を目指しており、その中で堀場は農産物中の残留農薬評価を担当している。食品の安全・安心を確保するため、農産物中の残留農薬を管理することは重要であり、我々はすでに自社で開発した農薬のモノクローナル抗体を用いて、生産の現場で簡便に農産物中



b)

Figure 6 Exosomes detection results with ViewSizer3000
a) Fluorescence imaging
b) Particle size distribution comparison

の残留農薬を測定できるイムノクロマトキットの開発に取り組んでいる。

(4) その他

上記以外にも医薬品や化粧品の研究開発に関連する様々な取組みを大学や研究機関と協力して進めている。本稿では主にバイオ医薬品に着目して紹介したが、低分子医薬品の分野でも蛍光分光法を用いた原薬の結晶性評価^[5]、経皮製剤の評価で重要となる有効成分の皮膚への浸透をラマン分光法を用いて測定する取組み^[6]などにも注力している。皮膚を対象とした測定は化粧品分野からも高い関心をいただいている。

おわりに

ここに記載した例以外にも、我々は、透過ラマン分光装置を用いた錠剤中の有効成分の分析^[7]、ラマン分光装置や蛍光発光分光装置を用いた抗体医薬品や遺伝子治療薬等の製造に必要な大量細胞培養用途であるバイオリクター内の培地の分析など、創薬研究のみならず、生産プロセスや品質管理にも使用できる計測機器やアプリケーションを検討している。

今後、様々なソリューションを提供することで、医薬品、食品、化粧品などのライフサイエンス市場への貢献を加速させたいと考えている。

*編集局注：本内容は特段の記載がない限り、本誌発行年時点での自社調査に基づいて記載しています。

参考文献

- [1] “The Molecular Interaction of a Protein in Highly Concentrated Solution Investigated by Raman Spectroscopy” C.Ota, S. Noguchi, K.Tsumoto: Biopolymers. 2015; 103(4): 237-46
- [2] “表面プラズモンによる循環EV解析”高田勇吉, 澁田樹, 入倉大祐, 小野恭裕, 廣岡良隆, 梅村創：日本臨床検査医学会(岡山), 2019年11月19-24日
- [3] “粒子径分布測定法PTAを用いたエクソソームの各種精製方法の比較”才原浩司, 入倉大祐, 楊逸明, 河野猛, 駒谷慎太郎：第7回日本細胞外小胞学会(東京), 2020年10月26-27日
- [4] <https://www8.cao.go.jp/cstp/gaiyo/sip/index.html>
- [5] “蛍光指紋を用いた原薬アモルファス状態の評価／Assessing Amorphous State of Active Pharmaceutical Ingredient Using Fluorescent Fingerprint”日本薬学会
- [6] “Advanced Formulation Design for Topical Creams Assisted with Vibrational Spectroscopic Imaging” Y.Ozawa, Y. Watanabe, D.Ando, T.Koide, T.Fukami: *Chem. Pharm. Bull.*, 69, 271-277(2021)
- [7] 医薬品固形製剤の生産におけるラマン分光法の活用」柏木伸介, 大橋令：製材機械技術学会誌, 27(2),154-163(2018)



内ヶ島 美岐子

UCHIGASHIMA Mikiko

株式会社堀場製作所
営業本部 バイオ・ライフサイエンス (BLS) プロジェクト
副プロジェクトマネジャー
Deputy Project Manager
Bio/Life Science Project, Sales Division
HORIBA, Ltd.