

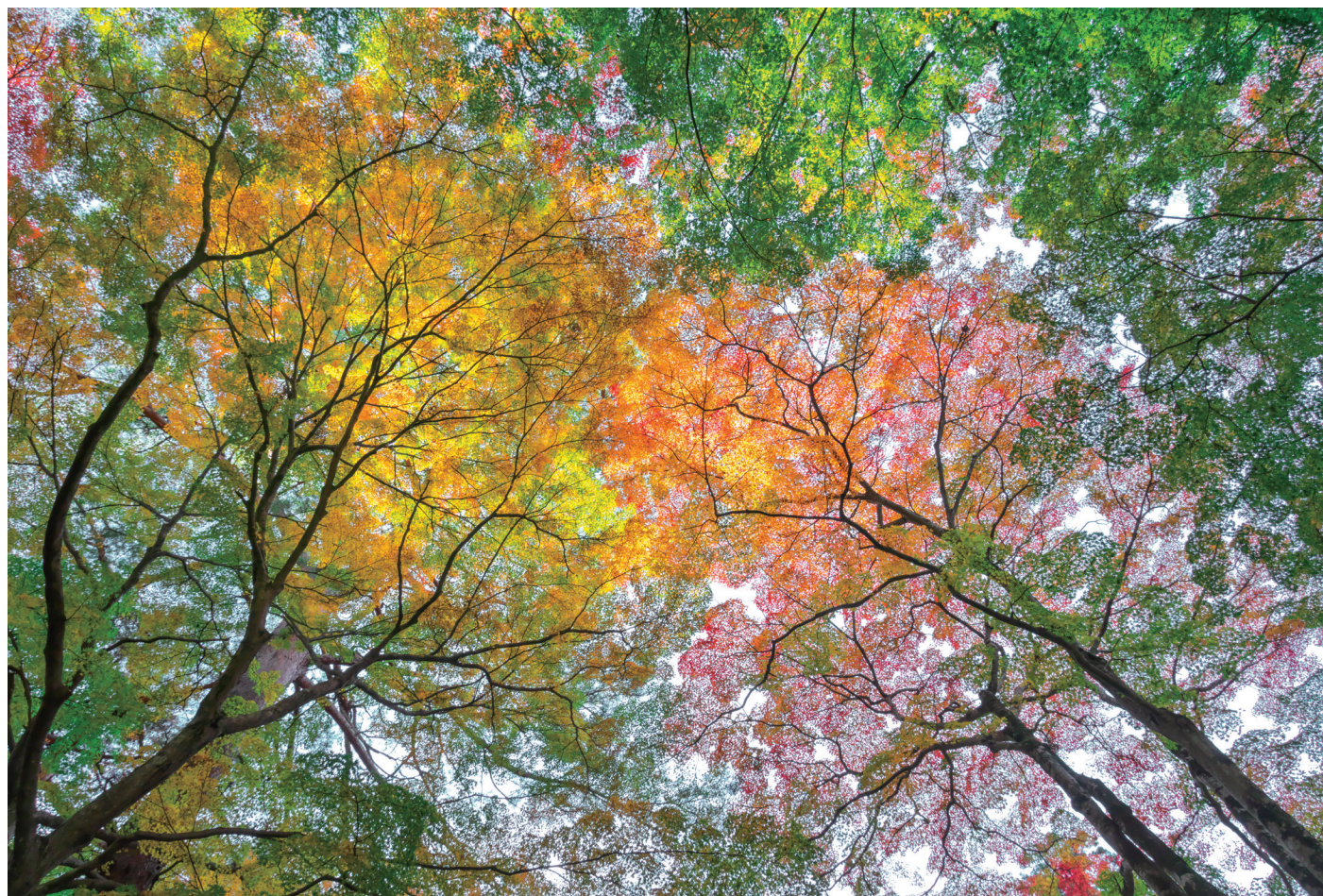
# Readout

HORIBA Technical Reports

October 2021 No. **55**

## 特集 2021 堀場雅夫賞

ライフサイエンス分野の分光分析・計測技術

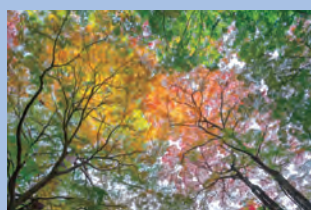


**HORIBA**

<https://www.horiba.com/jp/publications/readout/>



2021年の堀場雅夫賞では、コロナウイルスの蔓延以前から社会的ニーズとなっている、抗体医薬品の開発や生産、さらにはコロナウイルスの蔓延によって大きな関心事となったワクチンの開発、生産に寄与する分析・計測技術に焦点を当てました。この領域は人間の健康や生命に直結するものであり、世界的に関心と投資が集まっている領域でもあります。



#### ■表紙写真

撮影: 写真家 松井秀雄氏  
(二科会写真部 会員)  
真秋の色を求め、有名観光地から少し離れた森林を尋ねました。水の音に誘われて滝に近づいた所でふと見上げると、赤や緑の葉が醸し出す模様がこの世のものと思えない別世界に出会いました。しばし、時の経つのを忘れて撮影に没頭しました。

#### ■誌名について

誌名 Readout(リードアウト)には、「当社が創造・育成した製品・技術を広く世にお知らせし、多くの皆様に読み取っていただきたい」という願いが込められています。

## 特集 2021堀場雅夫賞 ライフサイエンス分野の分光分析・計測技術

### 巻頭言

- 4 医薬品の革新, 人と健康の未来に貢献する  
西方 健太郎

### 総説

- 6 2021 堀場雅夫賞: 募集分野と受賞者について  
野口 慎太郎

### 2021 堀場雅夫賞 受賞者論文 ライフサイエンス分野の分光分析・計測技術

- 8 受賞内容  
11 マイクロフロー光誘導加速による革新的バイオ計測技術の開発  
飯田 琢也  
18 AI 駆動型の高速細胞形態ソーター群とその応用開発  
太田 禎生  
22 近赤外光応答性細胞死誘導プローブの作用機構解明と治療効果計測基盤の構築  
佐藤 和秀  
28 分光データを利用した医薬品生産プロセスのリアルタイムモニタリングと制御  
金 尚弘

### 2021 堀場雅夫賞 審査委員 特別寄稿

- 34 医薬品製剤開発における粒子設計研究の役割  
竹内 洋文  
41 製薬産業の現状と課題 (創薬技術, 創剤技術そして製薬技術)  
伊吹 リン太  
46 バイオ医薬品開発と分析化学  
津本 浩平  
54 適正な臨床検査を実施するための原則とは  
前川 真人  
59 ラマン分光技術の臨床検査への展開  
ユルゲン ポップ

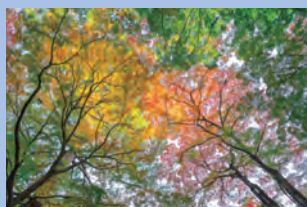
### 特集論文

- 66 迅速かつ安全なバイオ医薬品生産に貢献する HORIBA の分析ソリューション  
クロマトグラフィに代わる革新的分光分析技術 (A-TEEM およびラマン) と光学技術 (ViewSizer) による迅速・正確・低コスト分析手法  
リンダ キダー ヤロー, アダム M ギルモア, ショーン トラヴァース  
74 ライフサイエンス分野に向けた蛍光バイオプローブの開発  
フローリアン フォルマネク  
82 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  
内ヶ島 美岐子  
88 1 細胞レベルの ATP を高感度に検出する微生物迅速検査装置 Rapica  
小牧 直人, 中山 秀喜, 深尾 嘉希, 中井 陽子  
93 In Vitro Diagnostics 市場における HORIBA Medical の歴史と今後の展望  
野村 尚之  
99 ポイントオブケア検査市場に向けた画期的ヘマトロジー技術  
ダミアン イゼブ, フィリップ ピエコック, ブノア トウイ,  
オーレリアン デーヌ, ミカエル ボロックナー

### トピックス

- 106 令和二年度近畿地方発明表彰  
110 第 10 回 HORIBA Group IP World Cup Gold Award 受賞案件の紹介  
113 HORIBA World-Wide Network

The theme of 2021 Masao Horiba Awards is analytical and measurement technologies for development and production of biopharmaceuticals with high social needs, and vaccines or therapeutic drugs of today's great interest on the pandemic of COVID-19. This research field is directly related to human health and life, and is a field that is attracting global interest and investment.



I visited a forest detached from a famous sightseeing spot searching for the color of true autumn.

When I suddenly looked up, there was another world that seems out of this world with patterns created by red and green leaves.

For a while, I was so absorbed in taking pictures that I didn't notice the passage of time.

-Photographer MATSUI Hideo-  
(Member of Nikakai Association of Photographers)

#### Name of this Journal

This Journal is named "Readout" in the hope that "the products and technology we have created and developed will be read out and so become widely known".

## 2021 Masao Horiba Awards Optical/Spectroscopic Measurement Technologies for Life Science

### Foreword

- 4** HORIBA's Contribution to the Future of Pharmaceutical Innovation and Human Health  
*NISHIKATA Kentaro*

### Review

- 6** Eligible Fields and Award Winners for 2021 Masao Horiba Awards  
*NOGUCHI Shintaro*

### Feature Articles by 2021 Masao Horiba Awards Winners

- 8** Award Details
- 11** Development of Innovative Bio-Measurement Technology by Micro-Flow Light-Induced Acceleration  
*IIDA Takuya*
- 18** Development of Ultrafast Machine Vision-Activated Cell Sorters and Its Applications  
*OTA Sadao*
- 22** Elucidation of the Mechanism of Near-Infrared Light-Induced Cell Death and Method Establishment for Measuring Therapeutic Effects  
*SATO Kazuhide*
- 28** Real-Time Monitoring and Control of Pharmaceutical Production Processes Using Spectroscopic Data  
*Sanghong KIM*

### Guest Forum by 2021 Maso Horiba Awards Judges

- 34** The Role of Particle Design Studies in Developing Pharmaceutical Dosage Forms  
*TAKEUCHI Hirofumi*
- 41** Current Status and Objectives on Technologies in Pharmaceutical Industry  
*IBUKI Rinta*
- 46** Analytical Chemistry for Biopharmaceutics  
*TSUMOTO Kouhei*
- 54** Principles of Good Practice for Laboratory Medicine  
*MAEKAWA Masato*
- 59** Translational Raman Spectroscopic Approaches for Clinical Routine  
*Jürgen POPP*

### Feature Article

- 66** Improving Speed and Safety of Biopharmaceutical Manufacturing with HORIBA Analytical Solutions  
Innovative spectroscopic (A-TEEM and Raman) and optical techniques (ViewSizer) offer faster, accurate and less costly alternatives to chromatographic quantitative analysis in biotechnology  
*Linda Kidder YARLOTT, Adam M. GILMORE, Sean TRAVERS*
- 74** Fluorescent Bioprobes for Life Science Applications  
*Florian FORMANEK*
- 82** Providing Solutions for the Life Science Field Using Spectroscopic Analyzers  
*UCHIGASHIMA Mikiko*
- 88** Introduction of "Rapica" for Sensitive and Rapid Detection of ATP at the Level of One Microbial Cell  
*KOMAKI Naoto, NAKAYAMA Hideki, FUKAO Yoshiki, NAKAI Yoko*
- 93** History of HORIBA Medical Products to Contribute to the In Vitro Diagnostic Testing  
*NOMURA Naoyuki*
- 99** Disruptive Technologies in Haematology for POCT Market  
*Damien ISEBE, Philippe PIEDCOQ, Benoit THOUY, Aurélien DAYNES, Michael BRUCKNER*

- 113** HORIBA World-Wide Network

# 医薬品の革新， 人と健康の未来に貢献する



西方 健太郎

NISHIKATA Kentaro

株式会社堀場製作所  
開発本部長 博士(工学)

General Manager

Research & Development Division

HORIBA, Ltd.

Ph. D.

西方 健太郎

HORIBAは創業の早い段階から医学・医療分野での分析・計測に着目し、1980年代から血液分析分野で事業を本格化しました。学問分野での歴史を振り返りますと、創業者の堀場雅夫が医学博士を取得した1960年代には、医学・農学を含む広義の生物学が物理学と対極にあると考えられていました。その後分子生物学・遺伝子工学等が急速に発展し、生物学と物理学の境界は曖昧になってきました。更には、その発展が生命倫理をも脅かす域に達する危機感から、社会的な側面も含めた総合的な学問としてのライフサイエンスが発展しました。近年、HORIBAは、このライフサイエンス分野、中でも創薬・製薬分野において、分光分析技術を応用する事に大きな期待を頂いています。

現在、新型コロナウイルスの感染拡大が継続しており、100年来のパンデミックの最中にある事は言うまでもありません。このような状況下では、直面する感染症のワクチンや治療薬のみならず、従来の低分子医薬品、核酸や抗体を用いた高分子医薬品、細胞や細胞外小胞体を利用した創薬といった様々な研究も強く求められています。このような市場環境や要望の変化に対応すべく、HORIBAはバイオ・ライフサイエンスプロジェクトを立ち上げ、お客様に寄り添って新しい技術開発を行う事を強化しています。

また、開発した医薬品を広く社会へ届けるために、各医薬品モダリティに応じた生産プロセスの構築も求められています。近年、非破壊非接触かつ迅速な分析が可能な分光技術への期待が高まっており、弊社の蛍光分光装置やラマン分光装置、粒子解析装置への需要が増えています。測定対象を非破壊に近い状態でその場で分析できる分光学的手法の利点を活かすためのサンプリングや前処理についても様々な工夫も求められます。HORIBAは、これらの要求に対しても、新たにインダストリアルソリューションプロジェクトを立ち上げ、HORIBAは200年の歴史を有する

JOBIN YVONの分光技術と各種産業分野のプロセスをモニタリングする技術、経験を融合させ、チャレンジを始めています。

更には、得られる数多くのスペクトルデータや画像の処理、蓄積、生産プロセス管理への活用などにはデータサイエンスを応用した知見も重要であることは明確であり、それらは研究開発効率や製造プロセスでの生産性向上に資するものでなくてはなりません。このようなデータサイエンスを応用する動きに対しても、HORIBAは新たなプロジェクト(IoT and Data Science Project)を立ち上げ、製品が生み出すデータの信頼性・完全性と付加価値の向上に努めています。

本号の特集と関連してご紹介する2021堀場雅夫賞は設立18年目を迎えます。本賞は一貫して、社会の様々な課題解決のために必要とされる地道な学術研究を支援してきましたが、昨年は新型コロナウイルスのパンデミックにより、1年延期を余儀なくされる異例の事態となりました。本年は、今まさに待望される新たな医薬品開発、ひいては人の健康に貢献する分析・計測を見据えた募集テーマを設定しました。本賞を受賞された新進気鋭の研究者のますますのご活躍を期待するとともに、我々もこの分野へのさらなる貢献に努めたいと思います。

\*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。



HORIBAは、1963(昭和38)年頃から医学用分析計(医学用ガス分析計など)を開発・販売。その後、1996年にフランスの血球計数装置の専門メーカーABX社の買収により、医用(臨床検査)事業の本格参入が始まった。また、1997年に分析技術に優れたフランスのJOBIN YVON社の買収により、技術の拡大強化をはかってきた。その融合した技術や製品をベースにして2014年にライフサイエンスの事業を本格的に開始した。最近では分析機器メーカーの島津製作所との連携により、多様に変化する領域に対して、創業者の遺志を受け継ぐチャレンジを続けている。

## 2021堀場雅夫賞：募集分野と受賞者について

Eligible Fields and Award Winners for 2021 Masao Horiba Awards

### 野口 慎太郎

NOGUCHI Shintaro

2021年の堀場雅夫賞は「ライフサイエンス分野の分光分析・計測技術」をテーマとして開催することになりました。本来は昨年開催予定でしたが、2020年初めから世界的に大流行したCOVID-19の影響で延期となり本年改めて開催するという異例の出来事でした。本稿を執筆している現在では先進国を中心に少しずつワクチン接種が進んではいるものの、まだまだ世界的な危機的状況は続いています。COVID-19の蔓延は社会的にも様々な変化をもたらし、我々の日常生活、ビジネス形態なども大きく変わりました。その過程で、研究者だけでなく世界中の人々が感染症や生命、ワクチン、医薬品に関する事柄に従来とは異なる大きな関心を持つようになりました。そのような状況で、ライフサイエンスに関連した研究を堀場雅夫賞の募集対象に設定したことに大きな意義を感じながら活動してきました。

今回の堀場雅夫賞の対象領域はCOVID-19の蔓延以前から社会的ニーズとなっている、バイオ医薬品を始めとした新しい医薬品モダリティの開発と生産に加え、COVID-19の蔓延によって大きな関心事となったワクチンや治療薬の開発と生産に関する研究としました。この領域は人間の健康や生命に直結するものであり、世界的に関心と投資が集まっている領域でもあります。今回の賞がこの領域の研究開発を加速させるためのネットワークの構築や拡大に繋がるきっかけとなることを期待しています。また、技術面ではライフサイエンス分野で汎用的に使用されている分離分析や質量分析などとは異なる分光技術に焦点をあてました。さらに、研究開発と生産という2つの重要な要素が繋がることによって初めて広く世界の人々の健康な生活に貢献できるものになると考え、研究内容が社会実装に繋がることも重要なポイントとして掲げました。具体的な趣旨と対象技術分野は以下の通りです。

#### 〈2021年堀場雅夫賞趣旨〉

「近年、従来の医薬品や治療では対応できない疾患への対応が社会的に強く求められており、個別化医療などの新しい医療が実現されつつあります。それに伴って生まれた医療と創薬の融合領域においては、従来の低分子医薬品に加え、核酸や抗体を用いた高分子医薬品、細胞や細胞外小胞体を医療した創薬研究が活発になっています。このような研究対象の多様化に伴って、分析に関するニーズも多様化しており、従来広く用いられてきた分離分析に加えて分光学的手法への期待が高まっています。さらに、開発した医薬品を広く社会へ届けるために各医薬品モダリティに応じた生産プロセスの構築が求められており、そこでも分光学的手法を用いた計測技術への関心が高まっています。研究開発、生産のいずれにおいても分析・計測が重要であることは言うまでもありませんが、生きた測定対象を非破壊に近い状態でその場分析できる分光学的手法の利点を生かすためのサンプリングや前処理についても様々な工夫が求められます。また、得られる数多くのスペクトルデータや画像の処理、蓄積、生産プロセス管理への活用などにはデータサイエンスを応用した知見も重要であることは明確であり、それらは研究開発効率や製造プロセスでの生産性向上に資するものでなくてはなりません。感染が拡大している新型コロナウイルスに対する安全で効果の高いワクチンや治療薬の早期実現のためにも分野の壁を越えた研究アプローチが求められています。2021堀場雅夫賞では、このような背景のもと、ライフサイエンス分野の中でも特に先端の創薬および製薬に寄与する分光分

析・計測技術の研究を募集します。開発や生産プロセスの効率化に繋がり、産業応用が可能な技術の研究開発に取り組んでおられる国内外の研究者・技術者からの応募を歓迎します。」

このような趣旨のもと、対象技術分野を以下のように設定しました。

〈対象技術分野〉

ライフサイエンス分野の中でも特に先端の創薬および製薬に寄与する分光分析・計測技術で、開発や生産プロセスの効率化に繋がり、産業応用が可能となる下記視点を俯瞰できる技術を対象とする。

(1) 「蛋白質や細胞などの生産プロセス効率化に活用できる分光技術を用いた計測・自動化に関する研究」

生産プロセスの効率向上に繋がる計測、自動化技術およびデータサイエンスを活用した新しいプロセスコントロール手法に関する研究

(2) 創薬分野における分光技術を用いた生体由来試料の分析手法に関する研究

先端創薬の飛躍的な進歩に繋がる技術で、特に細胞、微生物、細胞外微粒子を対象としたもののうち、将来の産業化や生産プロセスでの活用・効率化を視野に入れた研究

\*マイクロ流体デバイスなどを用いた試料の前処理、データサイエンスを用いたデータ解析手法など研究分野の壁を越えた研究開発に特に期待

上述の通り、今回は創薬(研究開発)や生産性向上に繋がる研究に加え、それらの橋渡しとなる研究を対象とするため、試料の前処理やデータ解析に関する研究も対象としました。その結果、薬学や生命工学、情報工学など多岐に渡る分野から数多くのご応募をいただくことができました。ご多忙のなかご応募いただいた研究者の方々にこの場を借りて御礼申し上げます。

ご応募いただいた研究はすべて治療や診断、医薬品開発につながる貴重なものであり、審査委員の先生方は審査に大変なご苦勞をされたことと思いますが、厳正な審査の結果、飯田琢也氏(大阪府立大学)、太田禎生氏(東京大学)、佐藤和秀氏(名古屋大学)の3名が堀場雅夫賞に、金尚弘氏(東京農工大学)が特別賞に選ばれました。

飯田氏は光照射による生体試料の濃縮をマイクロ流体デバイス内で実現する技術(LAC-SYS)を確立され、迅速かつ高感度な光学的バイオ分析技術のプラットフォームを構築されました。太田氏は「人を介さない画像解析に画像は必ずしも必要ない」という発想のもと、細胞画像の再構築をせず直接AIで高速判別することによって高速で細胞を判別・分取する技術(ゴーストサイトメトリー法)を確立されました。佐藤氏は患者の負担が非常に少ない新しいがん治療法である近赤外光線免疫療法(NIR-PIT)を開発されました。また、本法に用いるプローブの特性評価を通してがん細胞の細胞死が誘導されるメカニズムも解明されており、治療効果を計測する基盤を構築されました。特別賞を受賞された金氏は医薬品生産プロセスにおいて近赤外吸収スペクトルを元にリアルタイムに品質モニタリングが可能になる新しい統計モデルを開発されました。

安心で安全なワクチンや医薬品の早期開発と市場供給が求められている現状において、様々な医薬品モダリティに合わせた高度な分析・モニタリング技術が必要になっています。受賞者の方々の研究成果はこのニーズに将来に渡って貢献するものであり、冒頭記載した世界中の方々の関心事にも応える貴重なものです。いずれも堀場雅夫賞受賞に相応しい研究と確信しております。本賞が皆様の研究の益々の発展に寄与し、これからの時代に求められるワクチンや治療薬の実現に一日も早く寄与できることを祈念しております。

最後に、コロナ禍という難しい状況下にも関わらず、今回の活動の場を与えて下さった皆様、活動を支えて下さった皆様に感謝申し上げます。



野口 慎太郎

NOGUCHI Shintaro

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  
Bio/Life Science Project  
Sales Division  
HORIBA, Ltd.

## 堀場雅夫賞について

堀場雅夫賞は、国内外の大学または公的な試験研究機関において、分析・計測およびその応用に関する科学技術分野で顕著な業績を挙げつつある研究者・技術者を奨励表彰するものです。

## 対象分野

ライフサイエンス分野の分光分析・計測技術



## 審査委員会 (敬称略, 順不同)

### ● 審査委員長

竹内 洋文 岐阜薬科大学 先進製薬プロセス工学研究室 特任教授

### ● 審査委員

伊吹 リン太 立命館大学 総合科学技術研究機構 客員教授

津本 浩平 東京大学大学院 工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 教授

前川 真人 浜松医科大学 臨床検査医学講座 教授

### ● 海外審査委員

Jürgen Popp Professor, Scientific Director,  
Leibniz Institute of Photonic Technology (Leibniz IPHT)

### ● 社内審査委員

内ヶ島 美岐子 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

野口 慎太郎 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  
BLS Solution Salesチーム チームリーダー



## 堀場雅夫賞受賞



大阪府立大学 大学院理学系研究科 物理科学専攻 教授  
(兼務)研究推進機構 LAC-SYS研究所(RILACS)所長

飯田 琢也 氏

### 【受賞研究題目】

マイクロフロー光誘導加速による  
革新的バイオ計測技術の開発



東京大学 先端科学技術研究センター  
准教授

太田 禎生 氏

### 【受賞研究題目】

AI駆動型の高速細胞形態ソーター群とその応用開発



東海国立大学機構 名古屋大学 高等研究院・医学系研究科  
病態内科呼吸器内科  
S-YLC特任助教

佐藤 和秀 氏

### 【受賞研究題目】

近赤外光応答性細胞死誘導プローブの作用機構解明と  
治療効果計測基盤の構築

## 特別賞受賞



東京農工大学 工学部化学物理工学科  
准教授

金 尚弘 氏

### 【受賞研究題目】

分光データを利用した医薬品生産プロセスの  
リアルタイムモニタリングと制御



## Development of Innovative Bio-Measurement Technology by Micro-Flow Light-Induced Acceleration

マイクロフロー光誘導加速による革新的バイオ計測技術の開発

Dr. IIDA Takuya

飯田 琢也

In the measurement of biological samples (proteins, nucleic acids, microorganisms, etc.) on the medical treatment, pharmaceutical and public health area, the conventional method is often complicated and requires long-term operation, and there is room for improvement in sensitivity. The authors have developed a microflow-type light-induced acceleration system (LAC-SYS) to realize rapid and highly sensitive measurement, where the measurement targets and probe particles are condensed by synergistic utilization of the “optical pressure” and “light-induced convection” in a narrow space of the microchannel for the acceleration of reaction when photoresponsive materials (substrate, particles) in liquid are irradiated with light. As a result, we achieved tens to hundreds of times higher sensitivity than the conventional method, and succeeded in quantitatively evaluating a very small amount (femtogram-level) of proteins in a few minutes. This technology innovates a wide range of bio-measurement such as drug development, personalized medicine, and food inspection.

医療、創薬、公衆衛生における生体試料(タンパク質、核酸、微生物など)の測定では、従来法は煩雑かつ長時間の操作が必要なが多く、感度も改善の余地があった。筆者らは、液中の光応答性材料(基板、粒子)への光照射時に生じる「光圧」と「対流」を相乗的に利用し、流路内の狭小空間で測定対象とプローブ粒子を濃縮して反応を加速することで迅速・高感度な計測を実現するマイクロフロー型の光誘導加速システム(LAC-SYS)を開発した。これにより従来法と比べて数十～数百倍の高感度を達成し、極微量(fgオーダー)のタンパク質を数分間で定量評価することに成功した。本技術は医薬品開発や個別化医療、食品検査など幅広いバイオ計測を革新するものである。

### Introduction

In recent years, a rapid, highly sensitive, low-cost, and compact biological sample detection system has been eagerly desired for the establishment of tailor-made drug discovery for personalized medical care, telemedicine using ICT technology, preventive medical care, and smart healthcare. Specifically, the cost reduction of preventive medical care and drug discovery, which leads to the reduction of medical expenses in Japan, which is increasing due to the declining birthrate and aging population, including the diagnosis of cancer and adult diseases, has become an important issue. In addition, due to the recent rapid growth of industrial activities in emerging countries and the problem of liberalization of imports and exports, there is also a need for technology such as genetic testing of food

and beverage production areas and the rapid and highly sensitive analysis and detection of foreign substances such as allergens and pathogenic bacteria. As conventional methods, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an antigen-antibody reaction is known for protein testing<sup>[1]</sup>, and a polymerase chain reaction (PCR) method is often used for nucleic acid testing such as DNA and RNA<sup>[2]</sup>. However, the conventional techniques require a high degree of professional pretreatment, and a process such as long-term incubation or complicated cleaning is required, and the detection time often takes several hours or more. There are also problems that a large amount of sample is required for analysis of a dilute target, and that reagents and devices used for fluorescent staining are expensive. In addition, since proteins cannot be amplified like nucleic acids, a breakthrough for the condensation of sample was

required for trace detection.

In order to solve these problems, technologies for non-destructive and non-contact condensation of biological samples for high-throughput analysis and measurement have been desired<sup>[3-5]</sup>. It is worth remembering that the technology of optical tweezers, which uses laser light to trap biomaterials contactlessly<sup>[6]</sup>, was awarded the Nobel Prize in Physics in 2018. Although the use of infrared wavelengths in this technology allows for low-damage manipulation, it was limited to precise motion control of a small number of biomolecules and cells. On the other hand, the authors theoretically predicted the possibility of controlling “plasmonic super-radiance” in which a large number of metallic nanoparticles (NPs) are densely arranged by optical trapping under thermal fluctuations in water at room temperature<sup>[7]</sup>. The plasmonic super-radiance is a quantum-mechanical effect, where the localized surface plasmon (LSP) in each NP strongly interact with each other via the light electromagnetic field for the increase of the radiative relaxation rate (the probability that an excited electron will emit energy as light). Based on this prediction, by focusing on the broadening of the LSP spectrum and the red-shift to the infrared region due to the increase of the radiative relaxation rate in a high-density metallic NPs, the principle of a photothermal biosensor was proposed, where pg-level proteins can be detected by accumulating them in the laser focal area due to the synergistic effect of the light-induced convection generated by the photothermal effect and the optical trapping of gold NP (AuNPs) fixed beads<sup>[8]</sup>. However, since many proteins and biological substances are sensitive to heat, it is necessary to condense them while controlling the thermal effect.

In this study, we have developed the “Light-induced Acceleration System (LAC-SYS)”, which enables high-throughput bioanalysis and measurement by controlling various biochemical reactions involving proteins, double-strand formation of nucleic acids, and condensation of microbes using laser irradiation. Particularly, we have focused on the development of a novel system that integrates microfluidic channels and LAC-SYS to increase the probability of interaction between the laser and NPs or microparticles (MPs) as probes in a narrow space. Furthermore, we also promoted the elucidation of the mechanism of optical condensation without damaging the target biomaterials, and aimed to carry out the entire process from the acquisition of new principles to the development of systems that will innovate spectroscopic analysis and measurement technology in the field of life science (Figure 1).

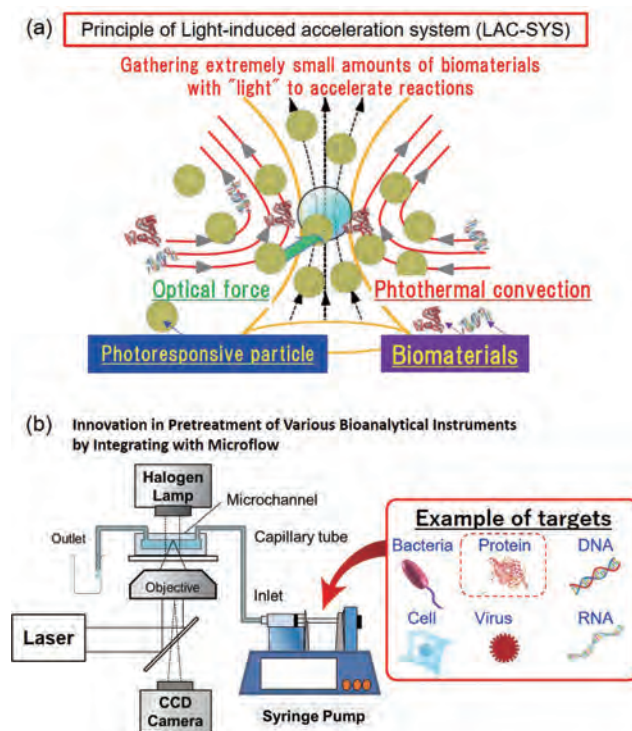


Figure 1 Schematic images of the light-induced acceleration system (LAC-SYS); (a) Basic principle, (b) microflow-type LAC-SYS.

## Detection of trace amounts of proteins by microflow optical condensation

As a main part of this research, we developed a micro-flow LAC-SYS by constructing a system that can introduce target molecules and small particles as probes, and irradiate them with a laser using pressure-driven flow by a syringe pump in a microchannel as shown in Figure 1(b)<sup>[9][10]</sup>. For example, in order to elucidate the basic principle in our literature<sup>[9]</sup>, we investigated the phenomenon that occurs when a protein is accumulated on the surface of a bubble (light-induced bubble) by using “optical pressure” derived from dissipative force, which is a kind of light-induced force, to accumulate metal NPs, and convection generated by the photothermal effect was also used as an auxiliary effect (Figure 2(a)). Specifically, an aggregate of AuNPs fixed on the surface of plastic beads (AuNP-fixed beads) were introduced as probe particles into a narrow microchannel of 400  $\mu\text{m}$  in width and 100  $\mu\text{m}$  in height, which is the same scale as blood vessels (for example, the thickness of small veins and arteries is 100-200  $\mu\text{m}$ ). They were used as probe to detect the target protein (in this case, albumin derived from egg white), and the research was carried out based on the idea that highly efficient trace detection would be possible by increasing the probability of interaction with laser light. In the search for conditions, we conducted experiments to launch and accumulate

AuNP-fixed beads on the ceiling of microchannel by optical pressure. Theoretical calculations confirmed that high-density metallic NPs on the surface of the beads can generate strong optical pressure even when using a laser in the infrared wavelength range, which is less damaging to living organisms, and we confirmed that AuNPs can efficiently generate optical pressure and light-induced convection in the preliminary experiments before our main research. As a result, AuNP-fixed beads and proteins were transported to the surface of the light-induced bubbles using the optical pressure and the convection generated by the photothermal effect (light-induced convection). As shown in the schematic image of Figure 2(b)(i), in the high concentration region (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), where the amount of protein in the observation region ranged from 340 pg to 3.4 ng, a large number of bubbles were generated and remained stable for a long time (Figure 2(c)).

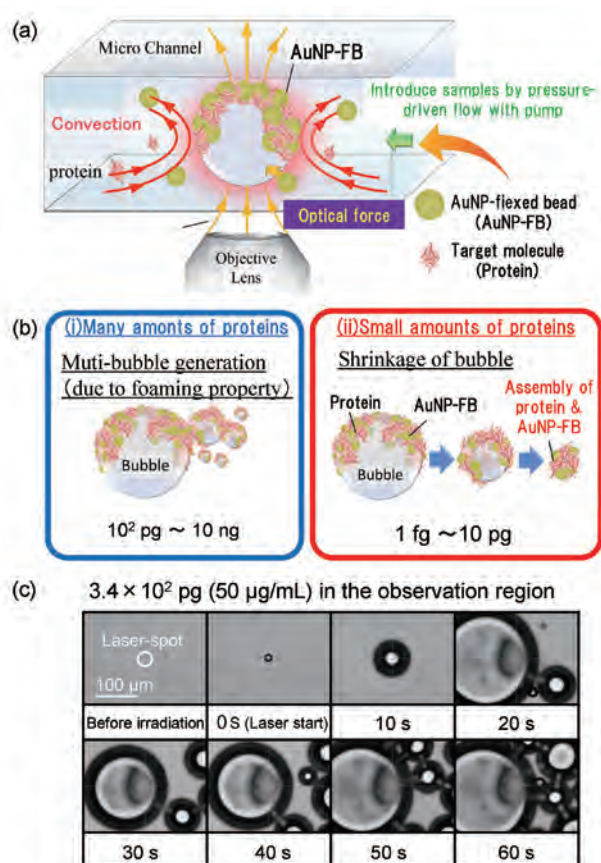


Figure 2 (a) Schematic image of microflow-type LAC-SYS using AuNP-fixed beads as probe particles. (b) Schematic images of the phenomena depending on the amount of proteins. (c) Optical transmission image of multi-bubble generation when a large amount of proteins are added.

On the other hand, in the low-concentration region (0.5 ng/mL to 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), where the amount of protein in the observation region is 3.4 fg to 34 pg, a single bubble disappeared in 3 to 10 minutes when the laser was turned off after 10 seconds of irradiation from bubble generation.

In this case, the larger the amount of protein, the larger the aggregates remained (Figure 3(a), (b)). The amount of introduced target protein (in the observation region) is plotted on the horizontal axis, and the cross-sectional area of the bubble observed by optical microscopy is plotted on the vertical axis in Figure 3(c), and the cross-sectional area obtained from the transmission image of the aggregate is plotted on the vertical axis in Figure 3(d). It was found that the larger the amount of protein in the range of 1 fg to 100 pg, the larger the bubble was generated and the larger aggregate remained, which positively correlated with the size of the bubble, indicating the possibility of using this method for quantitative analysis of proteins. In particular, as shown in the inset of Figure 3(d), it shows high linearity and can be used for quantitative evaluation even when the amount of protein is only a few fg to a few hundred fg in the observation region, indicating the possibility of using it for trace analysis of proteins. We have previously reported that proteins as small as 1 pg can be detected by synergistically using light-induced force and light-induced convection in a quiescent fluid<sup>[8]</sup>, and this result shows that we have succeeded in detecting proteins with two to three orders higher sensitivity. Since this is similar to the aggregate formation when bubblegum shrinks, we call this new type of biosensor as a “bubblegum sensor”. Considering that protein adsorption occurs even after laser irradiation is stopped due to pressure-driven flow, we expect that thermal damage can be avoided since the concentration process is based on cooled bubbles. Furthermore, we have succeeded in the quantitative detection of antigens and antibodies on the order of sub-pg/mL concentration by accelerating the antigen-antibody reaction through non-thermal optical condensation using optical pressure as the main driving force<sup>[10]</sup>, and have elucidated the possibility of performing specific detection in just a few minutes with one to two orders higher sensitivity than conventional methods such as ELISA, suggesting the possibility of a breakthrough in protein measurement.

### Light-induced acceleration of DNA double strand formation

DNA has a strand-like structure consisting of four types of bases (adenine (A), thymine (T), guanine (G), and cytosine (C)). Base pairs with high complementarity, such as A-T and G-C, selectively bind to each other through a molecular recognition mechanism to form a double strand (hybridization). On the other hand, bases of the same species show low complementarity, called mismatching. AuNPs with a diameter of 30 nm were used as probe particles <I> chemically modified with 12-base, 4.08 nm long single-stranded DNA with a thiol group attached to the end as shown in Figure 4 (a), and the same size AuNPs modified with the same length of single-stranded DNA with the chemical

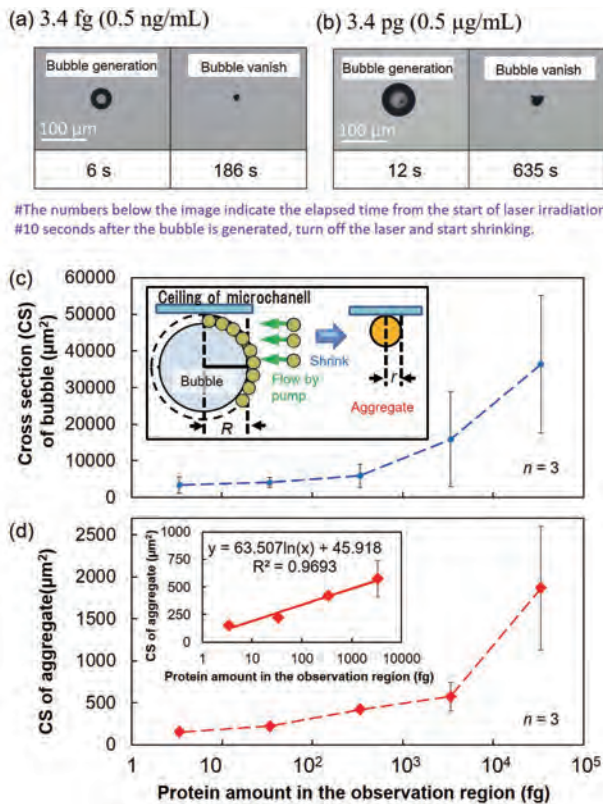


Figure 3 Relationship between the aggregate size and protein amount after the shrinkage of light-induced bubbles (for low concentrations).

(a), (b) Optical transmission images of the aggregates after bubble contraction for each protein concentration. Dependence of (c) the cross section (CS) of the bubble and (d) the area of the aggregate obtained after bubble contraction on the mass of the protein present in the observation region (inset: magnified view and approximate curve in the low concentration region)

structure of the end reversed were used as probe particles <I>. Each of them was dispersed in phosphate buffer solution and used. Dispersions of these probe particles <I> and <II> and a dispersion of single-stranded target DNA (24 bases) as a target were dropped onto a glass substrate, mixed, and allowed to diffuse sufficiently, and we try to control hybridization with the single-stranded DNA on the surface of the probe particles by irradiation of an infrared laser focused strongly with a high-magnification objective lens.

When the laser beam is focused near the droplet surface as a non-equilibrium open system, the convection due to the photothermal effect of the AuNPs and the condensation due to the evaporation are expected to occur, and the probe DNA on the surface of AuNP and the target DNA are expected to form a double strand efficiently. Therefore, even with a dilute concentration of 100 pM (about 300 million DNA strands were contained the 5 µL solution) of complementary strand DNA, a macroscopic network-like assembly of about 0.1 mm can be formed after only 2 min of laser irradiation (Figure 4(b)). On the other hand, no large aggregates were obtained when the same concentration

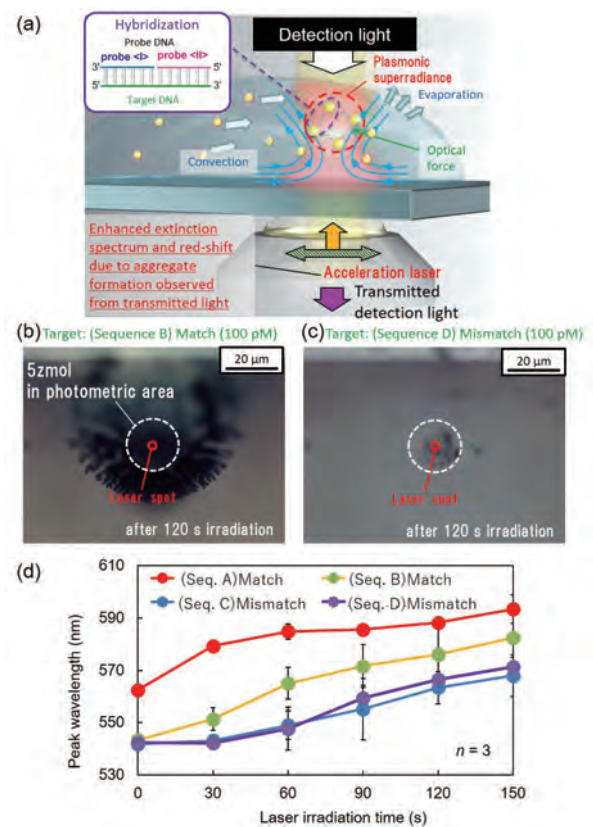


Figure 4 Light-induced acceleration of DNA double strand formation.

(a) Schematic image of the principle. Optical transmission images of light-induced network formation for (b) full-match DNA and (c) mismatch DNA added to DNA on the surface of the probe particle as target DNA. (d) Dependence of the peak wavelength of the absorbance spectra for each sequence on the laser irradiation time.

of fully mismatched DNA was used (Figure 4(c)), and it was confirmed that the difference in the base sequence also affects the aggregation phenomenon induced by light irradiation. Also, we measured the change in the local extinction spectrum of the white light transmitted through the region surrounded by the dashed lines, and observed a significant broadening and red-shift in a few minutes only when the complementary DNA was added, which is similar tendency to the theoretical prediction in the literature<sup>[7]</sup>. Even in the same full-match case, the spectral shift was larger for sequences with higher complementarity, such as “sequence A” containing G-C bonds, than for “sequence B” with only A-T bonds (Figure 4(d)). Furthermore, the number of DNA in this photometric region before laser irradiation was estimated to be about 5 zmol estimated from the above concentration (zmol: ~10<sup>2</sup> molecules), indicating that the formation of macroscopic aggregates that can be fully observed by optical microscopy was achieved in only a few minutes by triggering the double-strand formation of a very small amount of DNA. On the other hand, any aggregate could not be observed in a mixture of probe particles and target DNA at the same concentration under an optical microscope simply by letting the mixture stand

for 3 hours, but macroscopic aggregates could be formed very quickly by accelerating the reaction under optical condensation. This is an important achievement that shows that specific detection of trace DNA is possible through this process.

### Principle of damage-free light-induced assembly of microbes by bubble-mimetic substrate

We have measured the number of bacteria in liquid based on the optical condensation of microbes such as bacteria using “light-induced convection” and “bubble” generated when a substrate coated with a metallic nanofilm exhibiting a finite absorption rate in the wavelength range of the irradiated light is locally heated by laser irradiation<sup>[12]</sup>, and we have also performed the optical condensation of useful bacteria with the high viability using a multi-pore substrate<sup>[13]</sup>. In these studies, there were some problems such as the reduction of the survival rate when the laser power was increased. However, we also clarified the principle of “damage-free light-induced assembly” by coating the upper part of the solid-liquid interface with a metallic nanofilm to mimic a bubble and minimize the thermal effect on the trapping site<sup>[14]</sup>.

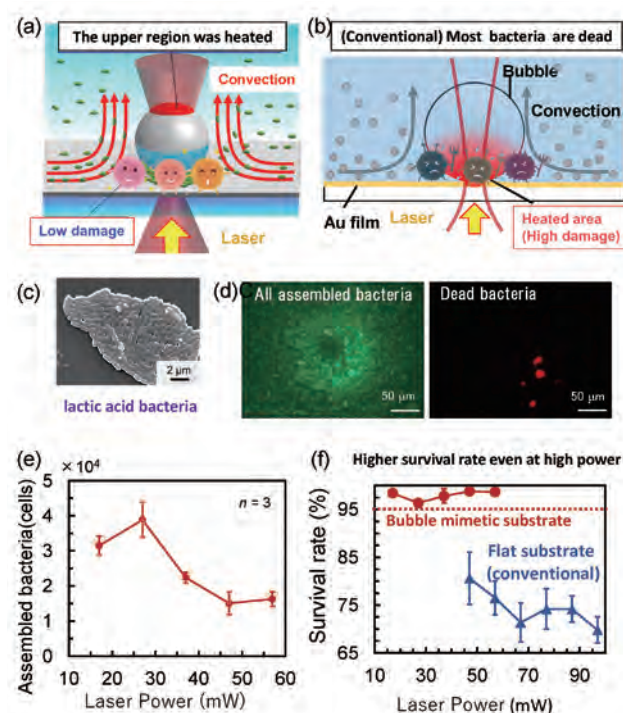


Figure 5 Low-damage light-induced acceleration of microbial condensation by controlling the position of heat sources.

- Schematic of optical condensation using an imitation bubble,
- Schematic of optical condensation using a conventional flat photothermal substrate.
- Electron micrograph of an example of microbe.
- Fluorescence images of optically-condensed bacteria.
- Laser power dependence of the number of aggregated bacteria.
- Laser power dependence of the survival rate of assembled bacteria.

As shown in Figure 5(a), polystyrene beads with a diameter of 100 μm were chemically fixed onto a glass bottom dish as an imitation bubble, and a thin platinum (Pt) film was coated on top of the bead by ion sputtering to create a “bubble-mimetic substrate (BMS)”. In particular, *Lactobacillus casei* (*L. casei*), a type of lactic acid bacteria, was used as a target, and green fluorescent dye (SYTO 9), which stains all the bacteria including live ones, and red fluorescent dye (PI), which stains only dead ones, were used to determine the viability. The optical system used for the experiment was an inverted microscope as shown in Figure 1(b), where a laser was defocused from below onto a Pt thin film coated on the top of a 100 μm diameter bead, and optical condensation was performed in the power range of about 15-60 mW without syringe pump.

Figure 5(d) shows the main results of the light-induced assembly of fluorescently stained *L. casei*. We found that about 40,000 bacteria could be aggregated after 5 minutes of irradiation with 27 mW laser, and a high aggregation rate of the order of  $10^4$ - $10^5$  bacteria was achieved after only a few minutes of laser irradiation (Figure 5(e)). Furthermore, we found that the survival rate of higher than 95%, which is almost the entire population, can be maintained while using convection due to the photothermal effect (Figure 5(f)). In order to elucidate the mechanism of the highly efficient light-induced assembly and the high survival rate, we evaluated the convection velocity by simulations combining theories of electro-dynamics and thermo-fluid dynamics, and estimated the number of bacteria entering the region around the imitation bubble to be about 50,000, which is consistent with the order of the number of bacteria trapped in the experiment. Furthermore, it was found that the bubble-mimetic substrate causes less damage even with high laser power because the heat source and trapping site are spatially separated. On the other hand, as shown in Figure 5(b), the conventional method of generating a bubble on the surface of a flat substrate<sup>[12]</sup> inevitably causes damage to the microbes due to the high temperature near the laser irradiation point, and the survival rate decreased with higher power (Figure 5 (f)).

### Conclusion

Based on the accelerating assembly process of biological nanomaterials and probe particles introduced into a micro-flow system using “optical condensation” by the electro-magnetics and thermohydrodynamics actions of light, we have clarified that it is possible to achieve a dramatically high-throughput in terms of measurement time, sensitivity, and sample volume for the first time in the world. In particular, we clarified the highly efficient photothermal effect of densely assembled metallic NPs arising from quantum effect and utilized it for “optical condensation

of biological samples,” and clarified a new principle that enables the detection of proteins on the order of fg ( $10^{-15}$  gram) in just a few tens of seconds to a few minutes by condensing them with laser irradiation. Remarkably, we have obtained initial results on “light-induced acceleration” of antigen-antibody reaction by extending this principle<sup>[10]</sup>, and have found that it can speed up protein detection by 2-3 orders of magnitude faster (from 5 hours to 3 minutes), increase sensitivity by 1-2 orders of magnitude higher (from pg-order to fg-order), and drastically reduce sample volume (from several hundred  $\mu\text{L}$  to several hundred nL) by eliminating the multi-step process that has been the bottleneck in conventional ELISA and a significant reduction in sample volume (from several hundred  $\mu\text{L}$  to several hundred nL). Moreover, we succeeded in light-induced acceleration of DNA double strand formation on the order of zmol (hundreds of DNA molecules), which could be applied to rapid and highly sensitive genetic testing. In addition, they succeeded in developing a substrate that can be used to measure the number of bacteria in just a few minutes, which takes several days by the conventional culture method.

These results have a high potential to open up an important

core technology for the construction of a next-generation platform for spectroscopic analysis and measurement technology for biological science, which boasts overwhelming speed and sensitivity. As shown in Figure 6, our developed micro-flow LAC-SYS can contribute to the creation of a platform for spectroscopic analysis and measurement technology in the life science field, which will lead to ultra-smart applications in drug discovery, medical testing, food testing, and environmental measurement, as well as to scientific and technological innovations that transcend the fields of physics, chemistry, and biology regarding the optical control of various biological functions.

The basic structure of the system is based on a simple optical system, which makes it easy to be compact and portable, and it is expected to be developed into a “future spectroscopic analysis and measurement technology” useful for smart drug discovery, self-care medicine and telemedicine, and on-site food inspection. Furthermore, our technology will contribute to the development of low-cost and simple devices for evaluating the local effects of rare and expensive new drugs and fluorescent probes in cancer treatment and screening, and to environmental measurements such as the measurement of biological genes (DNA, RNA) and harmful particles in the environment, including advanced measurement technology for biological cells and microbes.

### Acknowledgement

The author would like to express his sincere thanks to Prof. Shiho Tokonami, the Deputy Director of the RILACS of Osaka Prefecture University, for her support through joint research, and to Dr. Mamoru Tamura, Dr. Yushi Nishimura, Dr. Yasuyuki Yamamoto, Ms. Mayu Ueda, Mr. Kota Hayashi, and other alumni and graduate students for their cooperation in carrying out the research. Also, the author would like to express his deep gratitude to Prof. Hajime Ishihara and Prof. Syoji Ito of Graduate School of Engineering Science in Osaka University, and Prof. Ikuhiko Nakase, the Assistant Director of RILACS, for their fruitful discussions. This work was partially supported by JST-Mirai Program (No. JPMJMI18GA, No. JPMJMI21G1), Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (No. 17H00856, No. 21H04964), Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (No. 18H03522), Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (No. 16H06507) from JSPS KAKENHI, AMED (No. JP20he0622017), and the Key Project of Osaka Prefecture University.

\* Editorial note: This content is based on HORIBA’s investigation at the year of issue unless otherwise stated.



Figure 6 Future image of innovation in medical testing and drug discovery process by micro-flow type LAC-SYS.



## References

- [1] E. Engvall, P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G", *Immunochemistry*, 8, 871-874 (1971).
- [2] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", *Science*, 230, 1350-1354 (1985).
- [3] E. A., Raiber, R. Hardisty, P. van Delft, et al. "Mapping and elucidating the function of modified bases in DNA", *Nat. Rev. Chem.* 1, 0069 (2017).
- [4] A. Altaalar, J. Munoz, A. Heck, "Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics", *Nat. Rev. Genet.* 14, 35 (2013).
- [5] Y. Bian, R. Zheng, F. P. Bayer, et al. "Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS". *Nat. Commun.* 11, 157 (2020).
- [6] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, S. Chu, "Observation of a single-beam gradient force optical trap", *Opt. Lett.* 11, 288 (1986).
- [7] T. Iida, "Control of Plasmonic Superradiance in Metallic Nanoparticle Assembly by Light-Induced Force and Fluctuations", *J. Phys. Chem. Lett.*, 3, 332 (2012).
- [8] Y. Nishimura, K. Nishida, Y. Yamamoto, S. Ito, S. Tokonami, T. Iida, "Control of Submillimeter Phase Transition by Collective Photothermal Effect", *J. Phys. Chem. C*, 118, 18799 (2014).
- [9] M. Ueda, Y. Nishimura, M. Tamura, S. Ito, S. Tokonami, T. Iida, "Microflow-mediated optical assembly of nanoparticles with femto-gram protein via shrinkage of light-induced bubbles", *APL Photon.* 4, 010802 (2019).
- [10] T. Iida, S. Tokonami, I. Nakase, "Detection method for substance to be detected and detection system for substance to be detected", *PCT/JP2020/032758* (2020).
- [11] T. Iida, Y. Nishimura, M. Tamura, K. Nishida, S. Ito, S. Tokonami, "Submillimetre Network Formation by Light-induced Hybridization of Zeptomole-level DNA", *Sci. Rep.* 6, 37768 (2016).
- [12] Y. Yamamoto, E. Shimizu, Y. Nishimura, T. Iida, S. Tokonami, "Development of a rapid bacterial counting method based on photothermal assembling", *Opt. Mater. Exp.*, 6, 1280 (2016).
- [13] S. Tokonami, S. Kurita, R. Yoshikawa, K. Sakurai, T. Suehiro, Y. Yamamoto, M. Tamura, O. Karthaus, T. Iida, "Light-induced assembly of living bacteria with honeycomb substrate". *Sci. Adv.* 6, eaaz5757 (2020).
- [14] K. Hayashi, Y. Yamamoto, M. Tamura, S. Tokonami, T. Iida, "Damage-free Light-induced Assembly of Intestinal Bacteria with a Bubble-mimetic Substrate", *Commun. Biol.*, 4, 385 (2021).



Dr. IIDA Takuya

飯田 琢也

Professor, (Concurrent) Director of RILACS  
 Department of Physical Science,  
 Graduate School of Science,  
 Osaka Prefecture University.  
 (Concurrent) Research Institute for Light-induced  
 Acceleration System (RILACS)

## Development of Ultrafast Machine Vision-Activated Cell Sorters and Its Applications

AI駆動型の高速細胞形態ソーター群とその応用開発

OTA Sadao

太田 禎生

A cell sorter that performs image information analysis in real-time to separate a large number of cells were desired. However, there is always a tradeoff between the processible information per cell (quality) and the number of cells per time (quantity). Therefore, it has been a great challenge to enable high throughput imaging cell sorter that holds the advantages of optical microscope (high quality) and flow cytometry (high quantity simultaneously). In order to overcome this challenge, we proposed and realized a new approach named “ghost cytometry”, originating from a concept that image reconstruction is not always necessary in image analysis when performed by machines, not by humans. This method utilizes the motion of each cell in microchannels to acquire its compressed image signal by a single pixel detector, and directly applies AI-based analysis to the signal, resulting in the development of the ultrafast and accurate image-free “imaging” cell sorter. This technology is expected to be widely applied in various biotechnologies and cell-based clinical methods.

たくさんの細胞を、高精度かつリアルタイムに形態情報解析しながら分離を行うセルソーター<sup>※1</sup>の実現が、長い間望まれてきた。しかし従来顕微鏡を用いた細胞分離は低速であり、既存フローサイトメトリー技術<sup>※2</sup>で得られる情報は光強度総量に限定されているため、その両立は容易ではなかった。そこで私たちは、「人を介さない画像解析には画像は必ずしも必要ない」という逆転の発想に基づいた、ゴーストサイトメトリー法を着想し、実験的に実証した。マイクロ流路中の細胞の動きを利用して細胞画像情報(信号)を計測した上で、画像の再構成は行わずに直接AIで高速判別するというアプローチにより、高速・高精度な細胞の分離を実現した。本技術は、希少細胞を用いた医療診断、細胞解析に基づく創薬スクリーニングなど、バイオ・細胞医療分野への幅広い応用を、期待できる。

※1 セルソーター：種々の細胞をそれぞれの特徴に基づき選択的に分取する装置。

※2 フローサイトメトリー技術：流体中を流れる細胞に光を当て、光散乱強度や蛍光強度を用いて分析してきた技術群の総称。

### Introduction

Imaging and analyzing many single cells hold the potential to significantly increase our understanding of heterogeneous systems involved in various complex life systems and diseases. Many key applications in these fields require accurate and high throughput isolation of specific populations of cells according to information contained in the high content images. However, there is always a trade-off between the processible information per cell (quality) and processible number of cells per time (quantity). This

trade-off is depicted in Figure 1. For cytometry technologies, this trade-off caused critical challenges that have to be simultaneously solved: (1) ultrafast imaging technology that simultaneously meets the needs of high sensitivity, polychromaticity, high speed and continuous acquisition, and (2) ultrafast information technology that continuously performs both computational image production and analysis which is costly in terms of both time and money. As a result, there has been no high throughput imaging-activated cell sorting technology that holds advantages of both optical microscopy (high quality) and flow cytometry (high

quantity).

In a series of works, we proposed and experimentally demonstrated that directly applying machine learning methods to compressed imaging signals measured using a single pixel detector enables ultrafast, sensitive, and accurate image-free (without image production), imaging-based cell analysis as well as sorting in real time, which we call ghost cytometry<sup>[1]</sup> (GC, Figure 1). GC has enabled the fast cell sorting based on the cells' image information in both fluorescence and label-free modes, which we name machine-vision based cell sorters (ViCS). Furthermore, using this ViCS, we have developed an ultrafast pooled platform for cell image-based phenotypic screening of genes, which can be scaled up at a large scale.

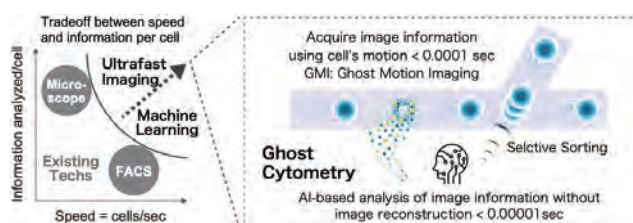


Figure 1 Ghost cytometry simultaneously achieved speed and rich information by “image analysis without image reconstruction”

Moreover, based on the invention, we founded a start-up company ThinkCyte Inc., which develops these ViCS machines through the co-development with renowned companies. Further, we are now striving to realize its practical use in the fields of medical diagnosis, drug discovery, and cell therapy, and a series of joint research with several pharmaceutical companies is underway.

### Key feature of our technology 1: ghost cytometry

Our key concept was ghost cytometry (GC), which is an approach of image analysis without image production. In GC, we applied machine learning methods to compressed imaging signals measured using a single pixel detector for enabling ultrafast, image-free, “image”-based cell analysis as well as sorting in real time (Figure 2). Thanks to skipping the time-consuming image reconstruction process, the time required for image inferring was reduced down to 10 microseconds which is orders of magnitudes shorter than other methods relying on image reconstructions. With GC, we developed a series of ultrafast cell sorters which classifies cell based either fluorescence image information or label-free image information. In the case of the fluorescence mode, fluorescent signals are detected by converting image information into temporal waveforms compressively. In the case label-free modes, refractive index distribution of

cells is detected; these label-free morphological modalities obtained are similar label free microscopy images including darkfield and bright field images.

Figure 3 shows an example workflow of GC utilizing a machine learning model to classify the cells by directly analyzing the imaging waveforms. It first starts with preparing a training data set: for each cell, we simultaneously measure the GC imaging waveforms and molecular labels that reflect types, states, phenotypes, and other characteristics of cells. Using this training data set, we then develop a model based on machine learning methods. Finally this model predicts the labels directly from the GC imaging signals of unknown cells.

In the fluorescence modes, GC can classify localization of fluorescence molecules in the cell morphology, even if their total intensities are the same or if the same kind of cell lines are used. This is particularly useful when users know what image pattern to recognize and what kind of specific molecules are their targets which is often the case in drug screening or biological research. With these pre-knowledge, one can chemically or genetically label the molecule of interest to visualize the fluorescent image pattern of interest with a good signal-to-noise-ratio. Using various optical probes, the GC can classify a variety of fluorescent patterns effectively, including nuclear translocation of molecules, organelle morphologies, and protein-protein interactions. On the other hand, that label-free mode can be useful especially when users don't want to stain cells with chemical or biological labels or damage them before the downstream uses. In addition, this approach is also effective when users are not clear about what the target molecules are or what image patterns should be specifically recognized. This label-free GC has demonstrated accurate classification of cells based on their kinds, states, and functions without observing molecular labels.

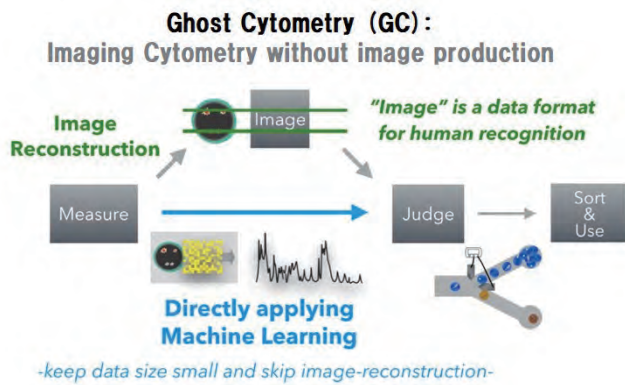


Figure 2 Image-free imaging cytometry driven by machine learning: In conventional workflows of image-based cytometry, imaging technologies were to reconstruct a clear 2D/3D images for human recognition, followed by analysis based on human recognition. Our radical idea of ghost cytometry (GC) is, “apart from human recognition-based imaging cytometry, reconstructing 2D images is not necessary for machine learning-based analysis (AI)”. In GC, its compressive imaging technology works to extract cell’s imaging information as a temporal waveform of signals measured by a single pixel detector, followed by analysis without image reconstruction using machine learning methods. Thereby, GC enabled the world’s first and fastest image-free “imaging” cell sorter by skipping the most time-consuming and computer-intensive image reconstruction in the data-intensive flow cytometry.

Example workflow of GC utilizing supervised machine learning

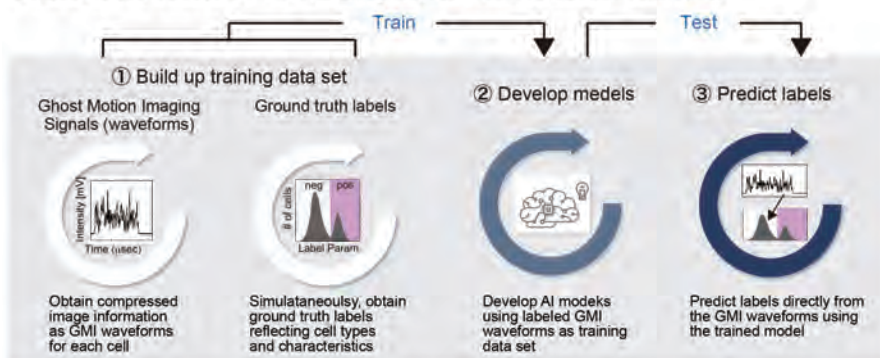


Figure 3 Example workflow of ghost cytometry utilizing supervised machine learning methods

Key feature of our technology 2: machine vision-activated cell sorting

By combining GC’s efficient signal processing implemented in a field programmable gate array with a microfluidic device, we realized ultrafast and accurate cell sorting based on real-time analysis of “imaging” data. Figure 4 shows its first prototype and, since then, this machine vision-activated cell sorter (ViCS) has evolved to be more stable and more flexible one through development by ThinkCyte Inc. together with excellent other companies.

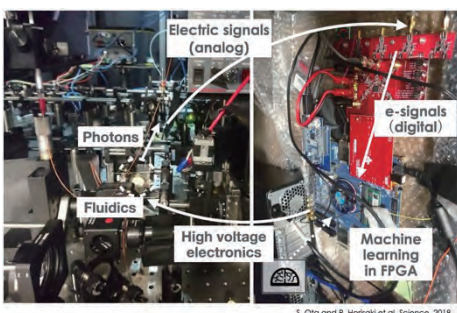


Figure 4 The first prototype of ultrafast machine vision-based cell sorter (ViCS), enabled by combining the optical ghost imaging signal acquisition, the real-time machine learning-based analysis implemented in FPGA, a microfluidic cell sorting technology.

Application

In the field of drug discovery, we have developed a pooled cell phenotypic screening method using ViCS. In this application, the fluorescence mode ViCS is used when the cell phenotype is specifically known (i.e. the localization of a specific molecule or a specific intracellular organelle), and the label-free mode ViCS is used when no specific explicit imaging feature is available. While high-content screening used to take long time (several months) and high cost, our method can significantly accelerate it at lower cost. We believe we can contribute to society by greatly accelerating drug discovery research and development.

In the field of cell therapy, regenerative medicine, and cell-based production, the label-free GC and ViCS can evaluate cell types and functions without using stains or antibodies, and to enrich cells of interest. This method can be thus used for automatic monitoring of cell production lines and improving cell qualities by removing unwanted cells or contaminating particles. Similarly, it can be used in the evaluation of cells that produces antibodies and drugs. While remarkably effective cell-based drugs currently seem to put pressure on medical costs, such a system may greatly contribute to its reduction.

## Conclusion

In conclusion, we proposed and realized “ghost cytometry”, an approach based on AI-assisted cell analysis of their “image” information without image production. More concretely, by directly applying AI-based analysis to a compressed “image” signals in temporal domains, we skip a time-consuming image reconstruction process and realized the ultrafast and accurate image-free “imaging” cell sorter. We expect this technology to be widely adopted in biological sciences, and industrial applications including biotechnology, drug discovery, and cell therapy and regenerative medicine.

\* Editorial note: This content is based on HORIBA’s investigation at the year of issue unless otherwise stated.

## References

- [ 1 ] Ota, S., Horisaki, R., Kawamura, Y., Ugawa, M., Sato, I., Hashimoto, K., Kamesawa, R., Setoyama, K., Yamaguchi, S., Fujiu, K., Waki, K., & Noji, H. (2018). Ghost cytometry. *Science*, 360(6394), 1246–1251.



**OTA Sadao**

太田 禎生

Associate Professor  
Research Center for Advanced Science and Technology,  
The University of Tokyo  
Ph.D.

## Elucidation of the Mechanism of Near-Infrared Light-Induced Cell Death and Method Establishment for Measuring Therapeutic Effects

近赤外光応答性細胞死誘導プローブの作用機構解明と治療効果計測基盤の構築

### SATO Kazuhide

佐藤 和秀

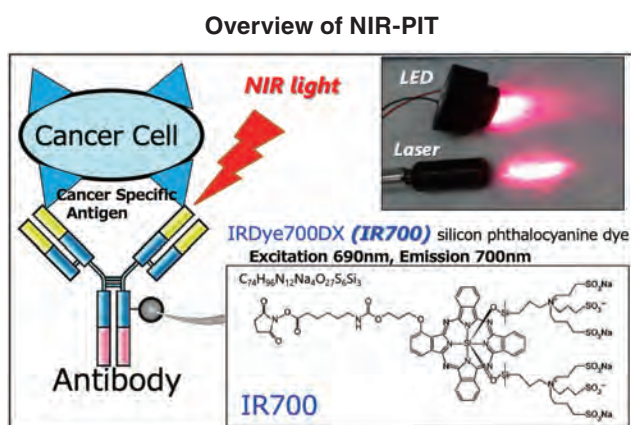
Near-infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) is a new cancer treatment that involves the application of a near-infrared light probe (IR700) to a specific antibody that binds to antigens on the surface of cancer cells. However, despite its impressive efficacy and innovation, the detailed mechanism of cell death has remained unclear. From the viewpoints of analytical chemistry, condensed matter chemistry, and optics, it has been clarified that NIR-PIT cell death is the world's first photochemical-induced cell death, and the cell death can be measured and quantified by IR700 near-infrared fluorescence spectroscopy at 700 nm, thus establishing the basis for a therapeutic biomarker. Due to the novelty of this cell death, this therapy was recognized as a new cancer modality and was implemented clinically in Japan ahead of the rest of the world.

がん細胞表面の抗原に結合する特異的な抗体に近赤外線に反応するプローブ (IR700) をつけ、局所的に近赤外線を当てる事で治療を行う近赤外光線免疫療法 (NIR-PIT) は新しいがん治療として注目を集めている。しかしながら、その素晴らしい効果や革新性とは裏腹に、詳しい細胞死のメカニズムは不明であった。分析化学、物性化学、光学の観点から、NIR-PITの細胞死が世界初の光化学誘導細胞死である事が解明され、その細胞死がIR700の700 nmの近赤外蛍光分光測定により計測・定量でき、治療バイオマーカーとしての基盤が確立された。この細胞死の新規性により、新しいがんのモダリティとして本治療が認められ、世界に先駆けて日本で臨床実装された。

### Introduction

Near-Infrared photoimmunotherapy (NIR-PIT) is a next-generation cancer-targeting therapy in which antibodies specific to antigens on the surface of cancer cells are attached to probes that react to near-infrared light and are then locally irradiated with near-infrared light (Figure 1)<sup>[1]</sup>. This photo-targeted therapy is a futuristic, and multidisciplinary treatment method in which probes (chemistry) and antibodies (pharmacology and biology) are conjugated under optimal conditions (conjugation chemistry), and near-infrared light (optics and physics) is added (Figure 1). Irradiation with near-infrared light at 690 nm, the peak absorption of the probe, immediately expands the cancer cells and induces cell death. It is currently undergoing international Phase III trials (LUZERA-301)<sup>[2,3]</sup> and was approved by PMDA in Japan in September 2020 for the treatment of recurrent and previously treated stage IV head and neck cancer<sup>[4]</sup>. It is now being recognized as

the fifth cancer treatment after surgery, chemotherapy, radiotherapy, and cancer immunotherapy. So far, various application studies of NIR-PIT therapy have been conducted all over the world, and further development of this therapy is expected from here. Although this therapy has attracted attention for its innovation, the detailed mechanism of cell death in NIR-PIT had not been fully elucidated at the time of the introduction of Phase III trials. This was a barrier to its approval and implementation. In this review, we will provide an overview of NIR-PIT, which is attracting attention as a “fifth cancer therapy”, its cell death mechanism, and the prediction of its efficacy by near-infrared spectroscopic imaging derived from its elucidation.



**Figure 1** Overview of NIR-PIT  
NIR-PIT is a new therapeutic method in which an antibody-IR700 complex, in which IR700DX, a light-absorbing substance, is added to the antibody, binds to cancer-specific antigens that are highly expressed on the surface of target cancer cells, and is then exposed to NIR light.

## About NIR-PIT

There are four known treatment methods for cancer: (1) surgery (surgical and endoscopic resection), (2) chemotherapy (anti-cancer drugs), (3) radiotherapy, and (4) cancer immunotherapy. These existing cancer treatments cause injury not only to cancer cells but also to surrounding normal tissues and organs. In anticancer drug therapy, chemical substances that cause damage to both normal cells and cancer cells are administered, but since the dosage is based on an extremely narrow dosage design that allows normal cells to recover earlier than cancer cells, the dosage is strictly determined, and if an overdose occurs, not only the cancer but also the individual may die. In addition, surgery requires the resection of normal tissues surrounding the cancer as margins, and radiation therapy inevitably causes injury to normal cells within and through the irradiation area. Therefore, it would be ideal if there were a cancer-targeted therapy that could superspecifically damage only cancer cells in the body without damaging normal cells and tissues.

Based on the above idea, Dr. Hisataka Kobayashi and his colleagues at the National Cancer Institute (NCI) in USA announced the development of Near-Infrared Photoimmunotherapy (NIR-PIT) in 2011<sup>[1]</sup>. NIR-PIT is a photo-targeted therapy that combines near-infrared light and antibody photo-probe adducts, in which IR700, a light-absorbing probe, is covalently attached to antibodies that bind to cancer-specific antigens. NIR-PIT is super-selective because it is doubly targeted by NIR-light and antibodies (Figure 1).

NIR-light is used in TV remote controls, CD players, etc., and is a safe light that has almost no adverse effects when irradiated to the human body. IR700 is a probe that absorbs

light in the near-infrared region of 690 nm and emits fluorescence at 700 nm, and was originally developed by LICOR as a dye for microscopic observation in biology. Antibodies are biomaterials that have been actively used in medicine, biology, and engineering in recent years, and are among the existing biomolecules that can bind specifically and stably to molecules on the surface of cell membranes. Among the existing biomolecules, antibodies can bind specifically and stably to cell surface molecules<sup>[4]</sup>. As described above, NIR-PIT is a multidisciplinary therapy that combines biology, pharmacology, chemistry, optics, engineering, and physics.

## Mechanisms of cell death in NIR-PIT

It has been proposed that oxidative stress is the main mechanism of cell death using photosensitive substances<sup>[5]</sup>. This pathway is often considered to be one in which the energy difference between photoexcitation and photoemission of a photosensitive substance acts on mitochondria and other organs, resulting in cell injury by oxidative stress agents such as singlet oxygen and free radicals, leading to cell apoptosis. The detailed mechanism of cell death in NIR-PIT has been unknown for a long time, which has been a barrier to its clinical implementation. Since the cell death reaction in NIR-PIT proceeded even after the cell function was stopped at 4°C, and the inhibition of cell death was not sufficiently effective even when oxidative stress inhibitors (free radical scavengers) were added, it was inferred that the oxidative stress was not the main mechanism for NIR-PIT. Therefore, it is inferred that the mechanism of NIR-PIT is not based on oxidative stress as in conventional photodynamic therapy (PDT).<sup>[5]</sup>

NIR-PIT has a very different therapeutic mechanism compared to conventional cancer cell death. When the antibody-IR700 conjugate bound to the cell surface is irradiated with near-infrared light (690 nm), the cell surface is rapidly injured, the cell morphology changes, and then the cell bursts, leaking the cytoplasmic contents and causing cell death within a few minutes. Thus, the mechanism is necrosis (rapid destruction of cells) rather than apoptosis, which is the conventional slow death of cancer cells. Since near-infrared light irradiation itself is harmless to cells, it can only damage the target cells to which the antibody-IR700 conjugate binds. In fact, when cells with and without antibody-IR700 conjugates were co-cultured and irradiated with NIR light at the same time, cell death was observed only in the cells with antibody-IR700 conjugates, while the neighboring cells without antibody-IR700 conjugates were not injured at all. The antibody-IR700 conjugate can selectively destroy not only cells in vitro but also target cells in vivo in space and time.<sup>[6]</sup>

### Aggregation by photochemical reaction of IR700 and detection of released products by mass spectrometry

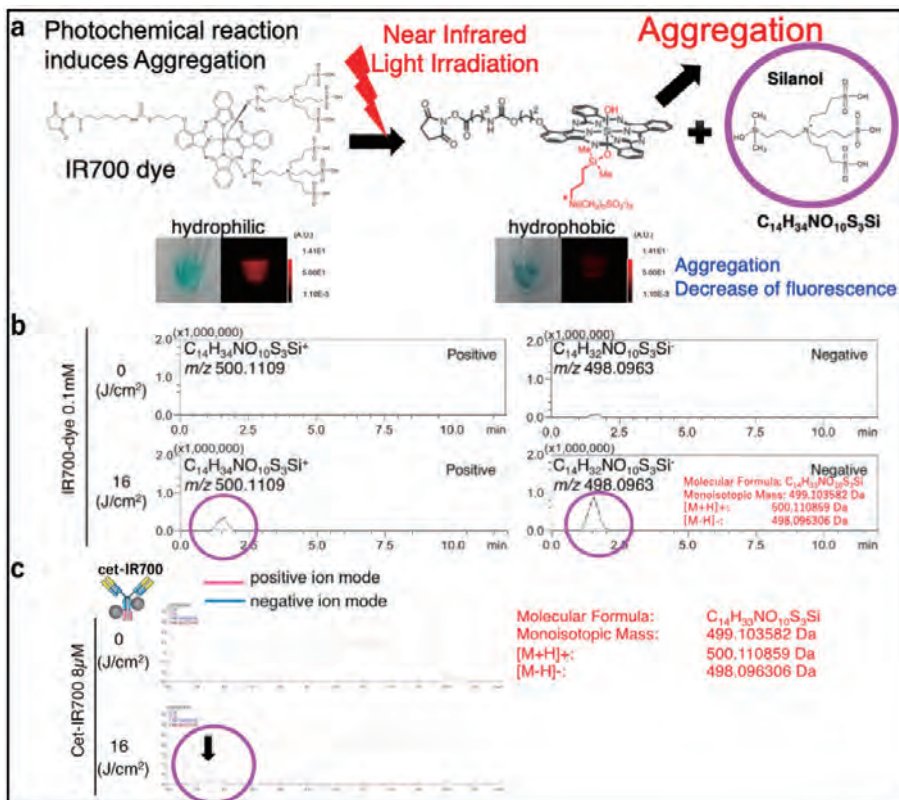


Figure 2 Aggregation by photochemical reaction of IR700 and detection of released products by mass spectrometry

- The photochemical reaction of IR700 as the starting point of NIR-PIT action: the silanol group attached to the silicon of the silicon phthalocyanine ring of IR700 is released by near-infrared light irradiation, and as a result, the hydrophilic nature of IR700 suddenly becomes hydrophobic and aggregates. As a result of aggregation, the fluorescence is lost.
- The silanol groups released from the supernatant after irradiation were detected by mass spectrometry (IT-TOF MS), proving the reaction.
- IT-TOF-MS analysis showed a peak of silanol group only at 16 J/cm<sup>2</sup> near-infrared light irradiation. By product scan (MS3) analysis, the structure was determined and proved to be silanol group.

Originally, IR700 dye (IR700 DX) was developed and marketed with the merit that its fluorescence hardly fades compared to other dyes (AlexaFluor680, etc.) during the number of scans in the fluorescence observation environment of microscope slide samples. However, the accumulation of *in vitro* and *in vivo* experiments with NIR-PIT clearly showed that the fluorescence of IR700 faded, which was a contradiction. As a hypothesis to resolve this discrepancy, we hypothesized a change in the chemical nature of IR700 due to photochemical reactions. The hypothesis is that the chemical nature (hydrophilic) of IR700 is rapidly changed to hydrophobic by the release of the silanol side chain by near-infrared light. The hydrophobized IR700 forms aggregates in the aqueous solution, and as a result of the aggregation, the fluorescence is lost from the solution in a series of photochemical reactions (Figure 2a)<sup>[7]</sup>. It was thought that the aforementioned discrepancy could be explained by the difference between the inclusion state of the slide samples using non-water-soluble inclusion material and the water-rich biological environment.

Based on these hypotheses, in order to prove this mechanism, we attempted to measure the silanol groups (molecular weight 500) above and below the silicon phthalocyanine ring of IR700, which are thought to be released upon aggregation, by mass spectrometry. IT-TOF-MS was able to detect the peak of the molecular weight only in the case of light irradiation (Figure 2b). In addition, it has been found that this liberation reaction is enhanced in the

absence of oxygen and in an environment rich in electron donors, while the presence of electron absorbers inhibits the reaction. This indicates that this reaction is independent of oxygen and free radicals, and has the advantage that the reaction proceeds more easily in tumors under hypoxic conditions.

Next, in order to prove that the above reaction also occurred in the antibody-IR700 adduct, cetuximab-IR700 (cet-IR700) was irradiated in the near-infrared to prove that silanol could be measured and detected by mass spectrometry. In addition, the solution of cet-IR700 was confirmed by the product scan method to be of IR700 origin, not antibody origin, with the structure of the silanol group (Figure 2c).

SDS-PAGE analysis was performed to study the effect of photochemical reaction of IR700 on antibody IR700 adduct and antibody IR700 adduct-antigen protein complex. First, we found that NIR light irradiation (peak 690 nm NIR light laser irradiation) caused the antibody (cetuximab) band to smear on SDS-PAGE, resulting in the loss of IR700 fluorescence. The photochemical reaction of IR700 resulted in the protein denaturation, i.e., aggregation of the added antibody proteins (Figure 3a). As shown in the figure, the denaturation increased in a near-infrared light-dependent manner, and the aggregation was almost complete at 64 J/cm<sup>2</sup>. It is also clear that the near-infrared fluorescence is lost due to aggregation. In order to investigate the effect



**Examination of protein aggregation and loss of fluorescence of cet-IR700 by near-infrared irradiation and changes in the antibody-IR700 adduct-antigen protein complex using SDS-PAGE**

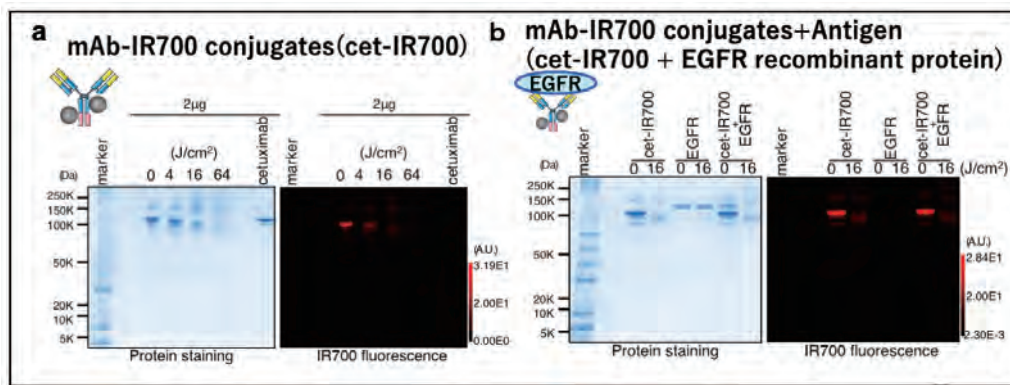


Figure 3 Examination of protein aggregation and loss of fluorescence of cet-IR700 by near-infrared irradiation and changes in the antibody-IR700 adduct-antigen protein complex using SDS-PAGE  
 a. The band of cet-IR700 became a smear in a light-dependent manner and lost its fluorescence, indicating that it was aggregated.  
 b. When cet-IR700 was bound to an antigen protein (EGFR) and irradiated with near-infrared light, the band of the antigen protein also became smeared, indicating that not only cet-IR700 but also its binding partner antigen was aggregated. With aggregation, fluorescence was also lost.

of the photochemical change of cet-IR700 on the binding partner antigen protein, we conducted a near-infrared irradiation experiment with cet-IR700 bound to EGFR protein (antibody-IR700 adduct-antigen protein complex) (peak 690 nm near-infrared laser irradiation measured at 16 J/cm<sup>2</sup>). SDS-PAGE showed that not only cetuximab but also EGFR protein, the antigen, was aggregated (Figure 3b). In addition, the loss of NIR fluorescence of IR700 was observed. From the above, it was confirmed that the complex of antibody IR700 adduct and antigen was aggregated by light irradiation. This indicates that the photochemical aggregation of IR700 causes the antibody to aggregate and also causes the antigen protein, the binding

partner of the antibody, to aggregate.

Although we were able to prove the photochemical reaction by mass spectrometry above, it is necessary to capture the change visually. This mechanism can be clarified by imaging the changes in a single antibody molecule and quantitatively measuring the photochemical reaction. Therefore, we attempted to perform nano-imaging in liquid by atomic force microscopy (AFM). Panitumumab-IR700 (pan-IR700) was adhered to a mica substrate and the top of the substrate was filled with 10 mM phosphate buffer containing 50 mM MgCl<sub>2</sub> for nano-imaging in liquid. Macroscopic views of 1.0 μm and microscopic images of

**Observation and Quantification of Changes in panitumumab-IR700 (pan-IR700) under Near-Infrared Light Irradiation by Nano-Imaging in Liquid Using FM-AFM**

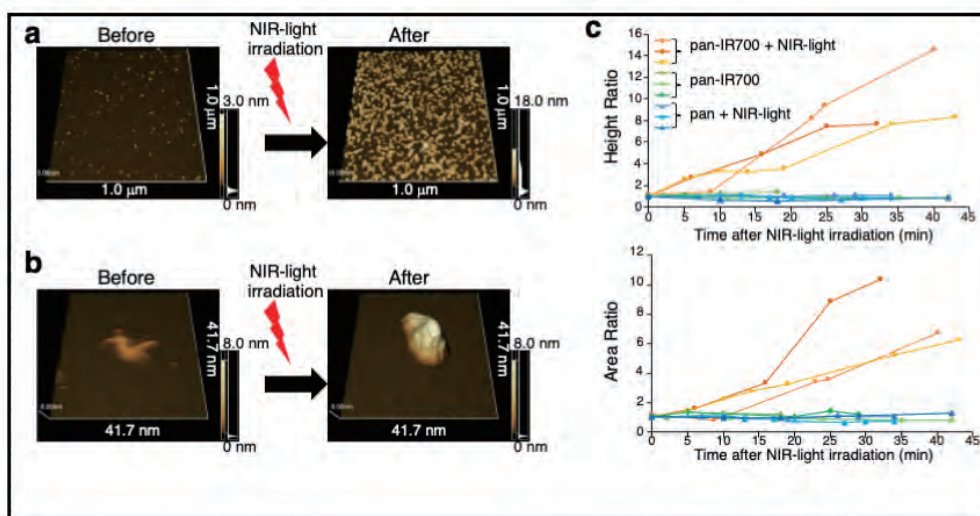


Figure 4 Observation and Quantification of Changes in panitumumab-IR700 (pan-IR700) under Near-Infrared Light Irradiation by Nano-Imaging in Liquid Using FM-AFM The changes of pan-IR700 before and after near-infrared light irradiation were investigated by nano-imaging in liquid using FM-AFM.  
 a. The pan-IR700 molecules depicted on the mica substrate aggregated and became larger after light irradiation, and adhered to the mica substrate.  
 b. pan-IR700 molecules depicted on the mica substrate have a Y-shape, but they aggregate and completely change their structure after light irradiation.  
 c. Results of change quantification by liquid nano-imaging using FM-AFM; the height and area significantly increased only in the group where Pan-IR700 was irradiated with NIR-light.

Relationship of IR700 fluorescence and in vitro cell death, in vivo anti-tumor effects, respectively

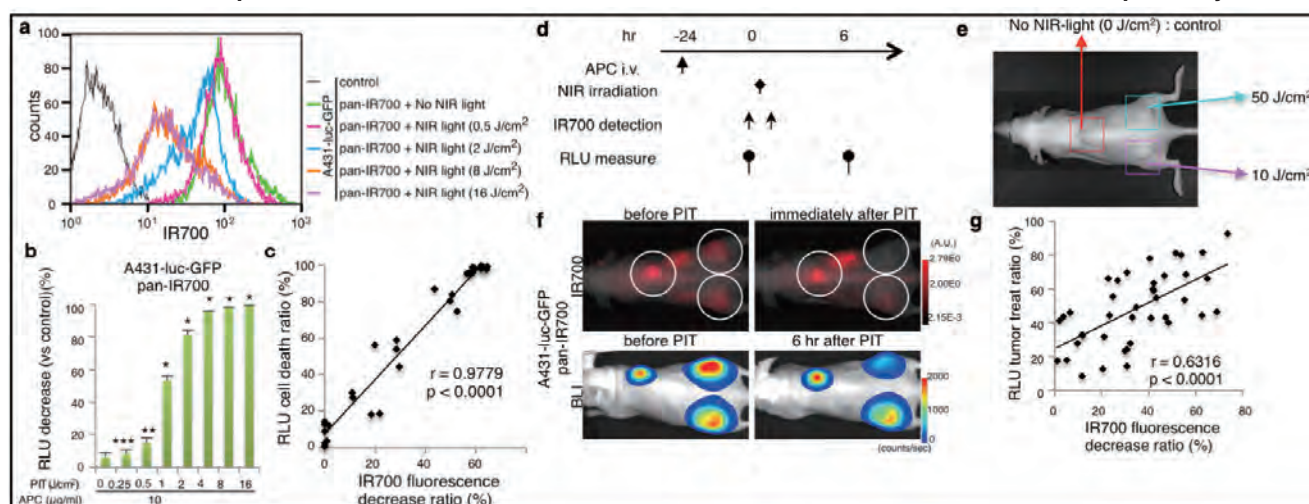


Figure 5 Relationship of IR700 fluorescence and in vitro cell death, in vivo anti-tumor effects, respectively  
 a. IR700-fluorescence in vitro was detected before and after NIR-PIT with flow cytometry.  
 b. Cytotoxicity in vitro was detected before and after NIR-PIT with luciferase activities.  
 c. Positive correlations between decrease of IR700 fluorescence and cytotoxicity is detected ( $r = 0.9779$ ).  
 d. in vivo NIR-PIT regimen is showed.  
 e. Mouse tumor inoculation outline and light dose.  
 f. Representative image of treated mice.  
 g. Positive correlations between decrease of IR700 fluorescence and anti-tumor effects is detected ( $r = 0.6316$ ).

41.7 nm were taken. In the macroscopic image, a single molecule of pan-IR700 attached to the mica substrate was agglomerated and expanded as an oligomer by near-infrared light irradiation (measured value: 16 J/cm<sup>2</sup>). In the micro-image, a single molecule of pan-IR700 in the shape of a Y-shape underwent structural changes upon light irradiation, and expanded, deformed, and aggregated as an oligomer (Figure 4a, b). As a control, pan-IR700 alone (no light irradiation) and antibody (pan) plus light irradiation (16 J/cm<sup>2</sup>) were tested in the same way for quantification. As a result of quantification of the height and Area values over time, only the combination of pan-IR700 and light irradiation (16 J/cm<sup>2</sup>) was found to be dominant, with the height and Area values expanding over time (Figure 4c). Therefore, nano-imaging confirmed that the antibody-IR700 agglomerates upon near-infrared light irradiation.

In order to analyze the relationship between photochemical reactions and cell death in vitro, we analyzed the relationship between the loss of IR700 fluorescence on the cell membrane before and after light irradiation and cell death. It is known that near-infrared fluorescence is lost in a dose-dependent manner, and measuring the near-infrared fluorescence of IR700 in IR700 antibody adducts was thought to reflect the degree of protein aggregation. Changes in near-infrared fluorescence were quantified by flow cytometry (Figure 5a), and cell death was quantified by luciferase activity (Figure 5b), and the respective changes were analyzed as a scatter plot. The results showed a positive correlation between the decrease in IR700 fluorescence and the increase in cell death ( $r = 0.9779$ ) (Figure 5c). This result suggests that cell death can

be measured from the amount of decrease in near-infrared fluorescence in target cells bound with IR700 antibody adducts, proving that IR700 photochemistry is strongly associated with cell death in NIR-PIT.

To analyze the relationship between the photochemical reaction and the in vivo anti-tumor effect, we analyzed the relationship between the loss of IR700 fluorescence in tumors before and after light irradiation and the anti-tumor effect (Figure 5d). As shown in Figure 5e, three tumors were created in the same individual and irradiated with 0, 50, and 100 J/cm<sup>2</sup> of near-infrared light, respectively, and the amount of change was measured. The change in IR700 fluorescence was quantified by the 700 nm channel of the PEARL imager, and the anti-tumor effect was quantified by the luciferase activity, which was analyzed in relation to the scatter plot (Figure 5f). The results showed a positive correlation between the decrease in IR700 fluorescence and the increase in antitumor effect ( $r = 0.6316$ ) (Figure 5g). This result suggests that the anti-tumor effect can be measured from the amount of decrease in IR700 fluorescence (700 nm) across the target tumor bound with IR700 antibody adducts, proving that the photochemical reaction of IR700 is strongly related to the anti-tumor effect of NIR-PIT. Since this decrease in IR700 fluorescence may predict therapeutic efficacy, optimization of real-time imaging of IR700 fluorescence is underway.

Conclusion

The above results suggest that the initiation point of cell death in NIR-PIT is the hydrophobization of IR700 by

## Mechanism of cell destruction by NIR-PIT

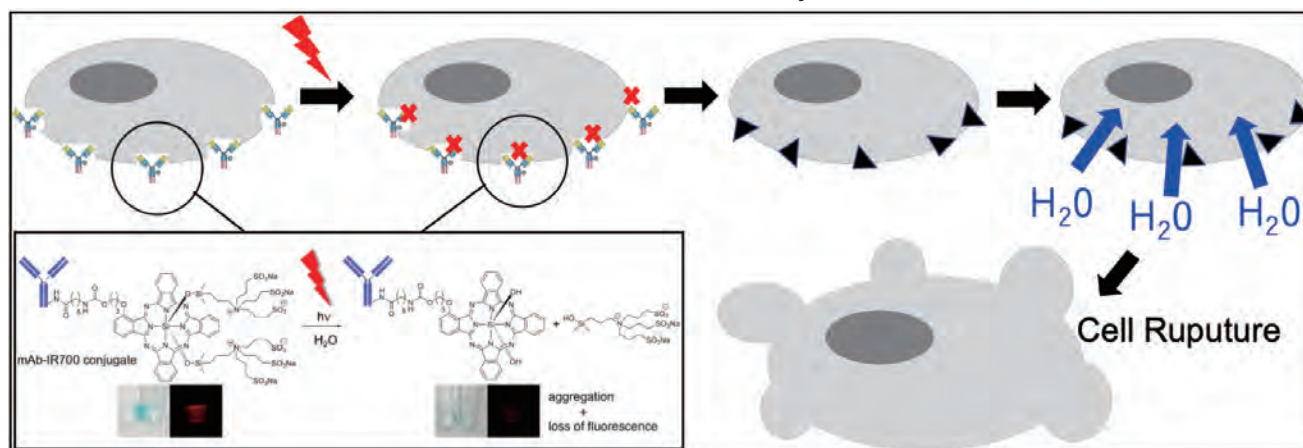


Figure 6 Mechanism of cell destruction by NIR-PIT

The antibody-IR700 complex binds to cancer-specific antigens on the cell surface. When the cells are irradiated with near-infrared light, the silanol group is released from IR700 and rapid hydrophobization occurs, resulting in the formation of aggregates including antibody and antigen proteins. This causes physical damage to the cell membrane. The osmotic disparity causes water to flow into the cell from outside the cell, causing the cell to rupture. Thus, the cell contents are disseminated to the surrounding area as necrosis to produce active cell destruction.

near-infrared light irradiation and the subsequent aggregation of antibody and antigen proteins<sup>[7]</sup>. In this study, the aggregation of antibody-IR700 adducts by near-infrared light irradiation was revealed by nano-imaging, and the results were convincing enough to propose a new concept of cell death in NIR-PIT. Integrating these analytical chemical data, cell culture, and animal studies, the authors propose the following mechanism of action of NIR-PIT (Figure 6). The antibody-IR700 complex, which binds to cancer-specific antigens on cell membranes, suddenly aggregates upon NIR irradiation and acts as a physical cell membrane barrier by denaturing the cell membrane antigen to which it binds. This mechanism was considered to be a novel photocell death that is completely different from previous concepts. The clarification of this mechanism proved the superiority of NIR-PIT as a new anti-cancer modality, and led to its limited approval in Japan as a “fifth cancer treatment” ahead of other countries. In addition, as a further application, it is thought that it is possible to predict the effect of treatment in real time by measuring and evaluating near-infrared fluorescence before and after treatment as described in this paper, and devices are being developed that apply intraoperative fluorescence imaging devices. We look forward to the development of future applications.

\* Editorial note: This content is based on HORIBA’s investigation at the year of issue unless otherwise stated

## References

- [ 1 ] Mitsunaga M.; Ogawa M.; Kosaka N.; Rosenblum L. T.; Choyke P. L.; Kobayashi H. Cancer Cell-Selective in Vivo near Infrared Photoimmunotherapy Targeting Specific Membrane Molecules. *Nat. Med.* 2011, 17 (12), 1685–1691.
- [ 2 ] NCT03769506, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03769506>
- [ 3 ] <https://rakuten-med.com/jp/news/press-releases/2020/09/25/7637/>
- [ 4 ] Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L : Monoclonal antibody therapeutics : history and future. *Curr Opin Pharmacol* 12 : 615-622, 2012
- [ 5 ] Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):250-81.
- [ 6 ] Sato K, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Selective cell elimination in vitro and in vivo from tissues and tumors using antibodies conjugated with a near infrared phthalocyanine RSC *Adv.* 2015 Mar 3;5(32):25105-25114.
- [ 7 ] Sato K, Ando K, Okuyama S, Moriguchi S, Ogura T, Totoki S, Hanaoka H, Nagaya T, Kokawa R, Takakura H, Nishimura M, Hasegawa Y, Choyke PL, Ogawa M, Kobayashi H. Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy. *ACS Cent Sci.* 2018 Nov 28;4(11):1559-1569.



SATO Kazuhide

佐藤 和秀

Designated Assistant Professor  
Institute for Advanced Research, Respiratory Medicine / S-YLC,  
Nagoya University.

## Real-Time Monitoring and Control of Pharmaceutical Production Processes Using Spectroscopic Data

分光データを利用した医薬品生産プロセスのリアルタイムモニタリングと制御

Dr. Sanghong Kim

金 尚弘

To realize the continuous production in the pharmaceutical industry, it is essential to monitor the production process in real time, but it is often difficult. In addition, conventional methods for predicting pharmaceutical quality from near-infrared spectra have drawbacks, such as a decrease in prediction accuracy over time. In this study, a stable and accurate method for predicting the quality of pharmaceuticals from near-infrared spectra was developed using data science techniques. As a result, a new analysis method was established that can contribute to realize real-time quality management and control, and to improve the efficiency of the pharmaceutical production processes.

医薬品連続生産の実現には生産プロセス内の医薬品の情報をリアルタイムにモニタリングする技術が必要不可欠であるが、それは困難であることが多い。また、従来の近赤外スペクトルから医薬品品質を予測する手法には、予測精度が経時的に低下するなどの欠点があった。本研究では、近赤外スペクトルから医薬品品質を安定的かつ高精度に予測する手法の開発を目的とし、データサイエンスの技術を活用して品質予測のためのデータ解析手法を開発した。その結果、従来法とは異なる新しい解析手法を確立することができた。本手法を用いたリアルタイムな品質管理・制御を行うことで、医薬品生産プロセスの効率化を実現することが期待される。

### Introduction

In the pharmaceutical production process, strict quality control based on Good Manufacturing Practice (GMP) is required. In recent years, there has been a shift from batch processes to continuous processes and the introduction of Quality by Design (QbD) and Process Analytical Technology (PAT)<sup>[1]-[4]</sup> to improve the efficiency of pharmaceutical production processes. In order to achieve the above goals, it is necessary to monitor and control the quality of pharmaceuticals in real time. However, it is often difficult to measure the quality of a drug directly in real time. In order to solve this problem, this research developed and put into practical use a method for constructing a statistical model to estimate drug quality from variables that can be measured relatively easily in real time, such as near-infrared spectra.

### Main

#### Process Nonlinearity, Model Maintenance, Input Variable Selection

There are many studies on methods for predicting drug

quality from near-infrared spectra, but most of them use the classical method of partial least squares (PLS)<sup>[5]-[8]</sup>. However, PLS is known to have some problems such as inability to cope with nonlinearity and high maintenance load because the estimation accuracy decreases with time. In this research, a new method called locally-weighted PLS to improve PLS was developed. Locally-weighted PLS can cope with nonlinearity by selectively using historical data that are similar to those around the conditions for which quality prediction is required. In addition, since a new model is automatically constructed for each quality prediction, the estimation accuracy can be maintained for a long time. **Figure 1** shows the results of PLS and locally-weighted PLS prediction of the concentration of the active ingredients in the powder after mixing for a mixing process. Locally-weighted PLS reduced the root mean square error of prediction (RMSEP) from 1.84 to 1.13. This allows for more strict quality control and more efficient drug production processes.

In addition to the development of locally-weighted PLS, a method to select the variables that are useful for estimation was developed. It is said that various physicochemical

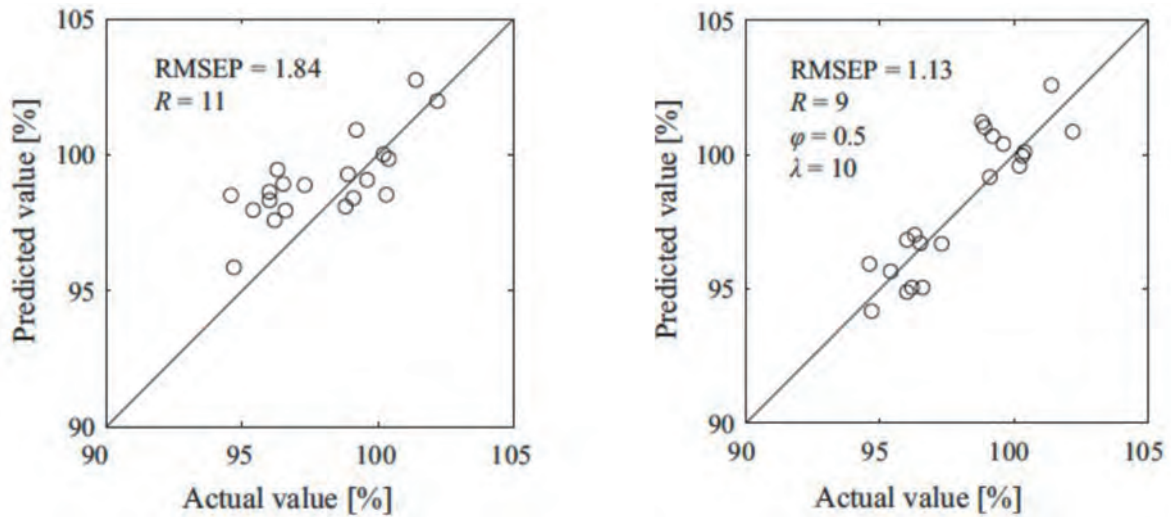


Figure 1 Prediction results by PLS (left) and locally-weighted PLS (right)

factors coexist in near-infrared spectra, and it is not always possible to make good predictions by selecting functional groups and their corresponding wavelength regions, or by selecting wavelength regions by referring to the spectra of active ingredients and other ingredients as pure substances. The wavelength regions selected by the developed method are shown in Figure 2 as the blue region. The target granule is composed of API (Active Pharmaceutical

Ingredient) and five other components. The peaks of API and other components do not exist in the selected region, which may seem useless for estimation. However, the RMSEP was reduced to 1.13 from 1.84 by using absorbance at those wavelengths compared to use the absorbance at wavelengths selected by conventional method: variable importance on the projection (VIP) [12].

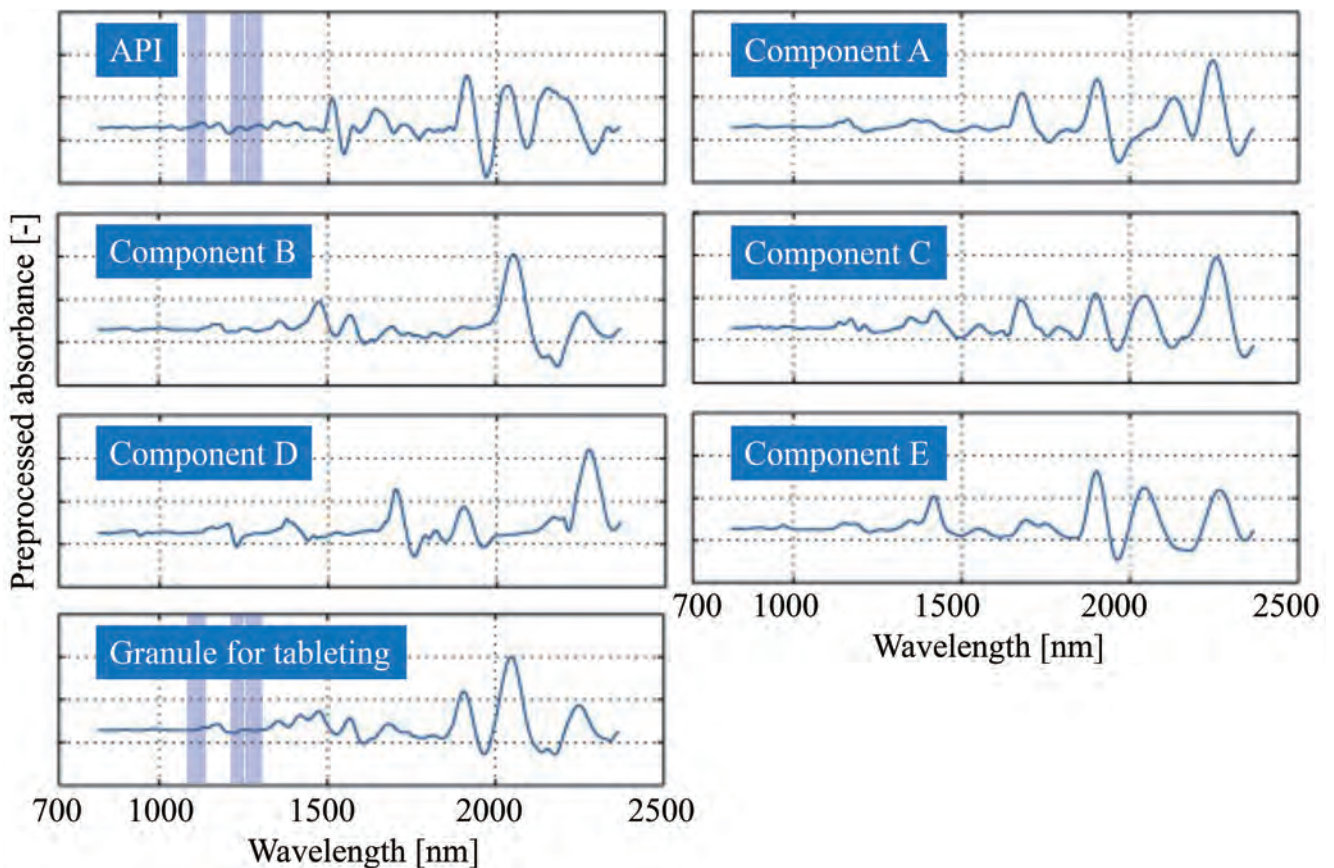


Figure 2 Wavelength selection result of the proposed method and preprocessed absorbance of each component of a drug

The detailed information can be found in the paper [9].

### Input Variable Scaling

When using statistical methods to build a quality prediction model, it is necessary to pre-process the input variables. Although input variable scaling, a data preprocessing method in which the values of each input variable are multiplied by the scaling factor of the input variable, can have significant effect on the estimation performance of soft sensors, research on input variable scaling has not been actively conducted. Hence, this research focuses on input variable scaling. In past research, autoscaling was commonly used [11-13]. In addition, Pareto scaling, level scaling, Poisson scaling, range scaling, and VAST scaling [14] have been considered.

In this research, a new method of preprocessing near-infrared spectra was developed, and it was found that it can improve the prediction accuracy of the impurity concentration inside the device. In the case of spectral data, it is difficult to evaluate the importance of each variable because hundreds to thousands of variables need to be

handled simultaneously.

An example of the application of the proposed method to the prediction of magnesium stearate concentration is shown in Figure 3. Figure 3 shows the near-infrared spectra of magnesium stearate and methanol solutions of magnesium stearate with different concentrations. Unlike Section 2-1, it was known in advance that the blue region in the figure is important for concentration prediction because it is a solution system. The evaluation results are shown in Figure 4. From Figure 4, it can be seen that the proposed method is able to correctly determine the important regions for concentration prediction. Accordingly, the prediction error was reduced by 45%.

The detailed information can be found in the paper [15].

### Model and Parameter Selection

Research on statistical modeling methods has been actively conducted, however, the usefulness of the methods has usually been evaluated by using a single dataset in most of the research, and the robustness of the methods have not

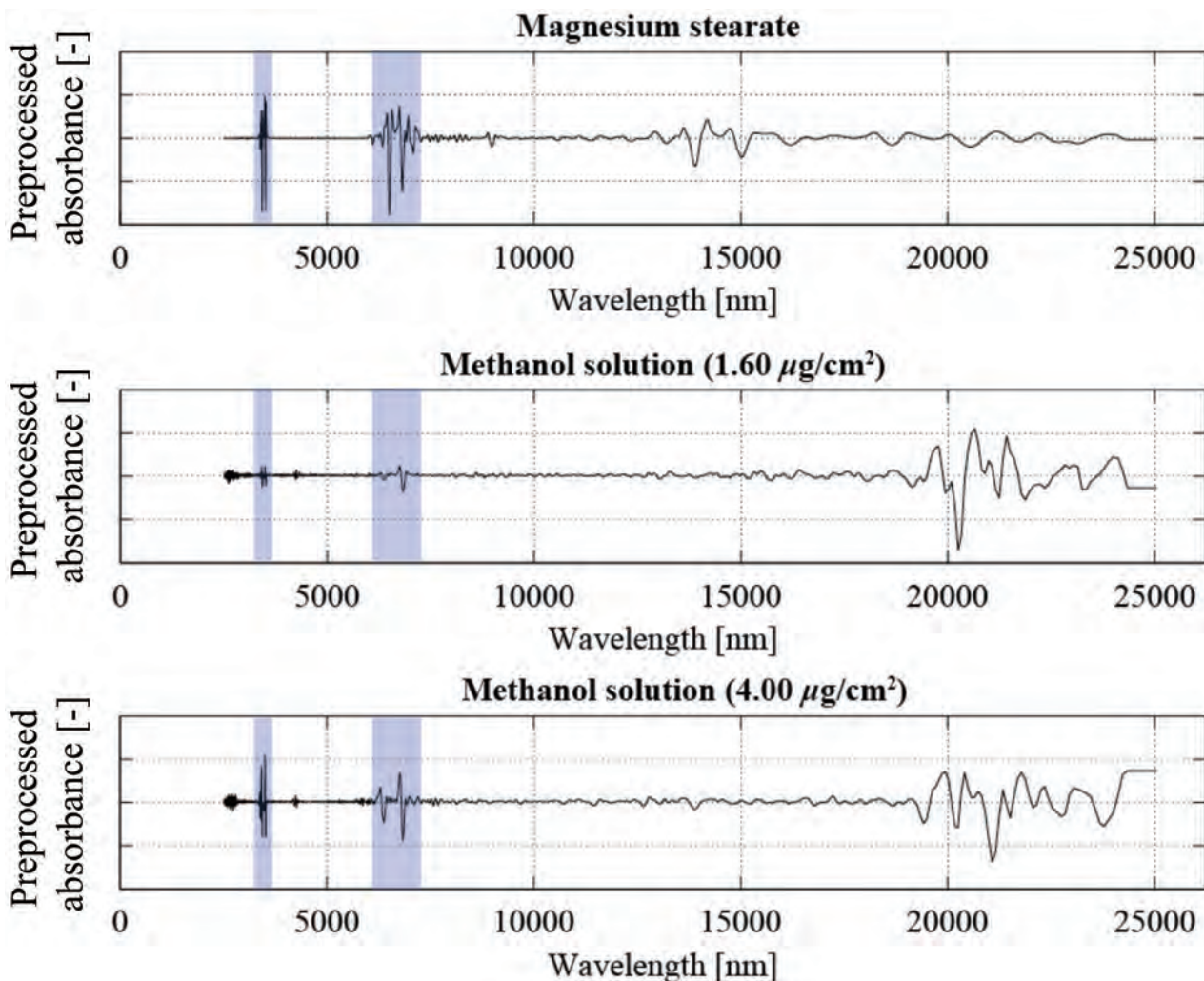


Figure 3 Preprocessed absorbance of magnesium stearate and its methanol solution

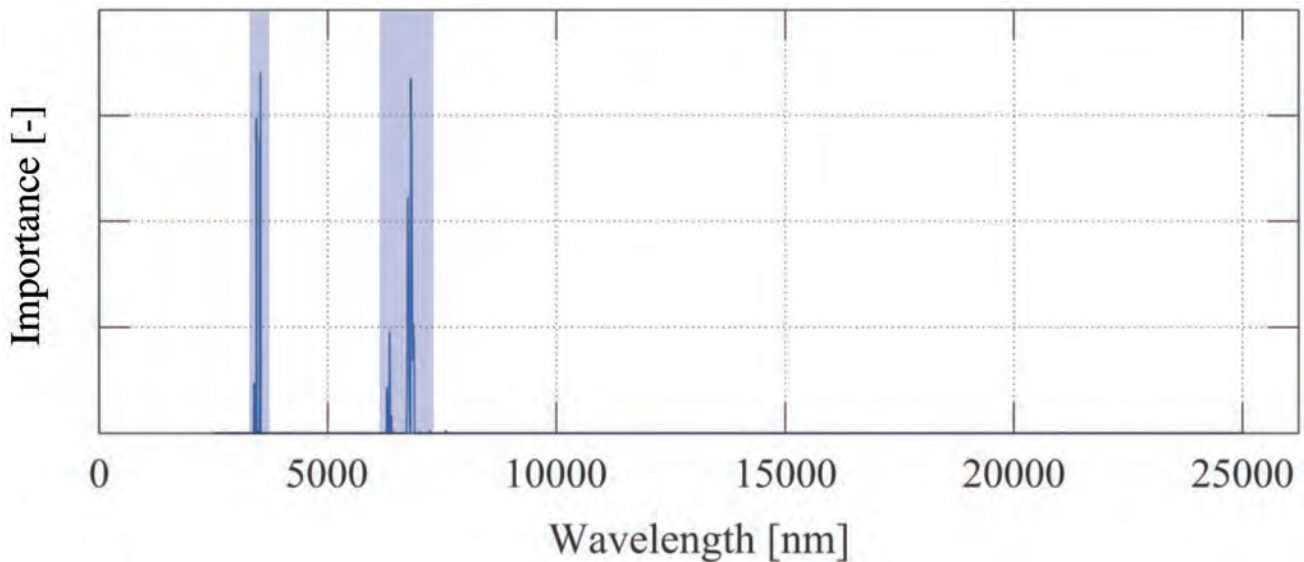


Figure 4 Importance evaluation result of the proposed method

been evaluated. To propose a highly reliable method, it is necessary to evaluate whether the developed soft-sensor can stably estimate the difficult-to-measure variables for various processes and a wide range of operating conditions. In this research, partial least squares (PLS), locally weighted PLS, support vector regression (SVR), and artificial neural network (ANN), which are widely used for soft-sensor design, are compared using twelve real-world datasets. The result of comprehensive comparative study in 6 datasets is shown in Figure 5. In Figure 5,  $p$  denotes the ratio of the number of samples used to model construction to the number of all the samples in each dataset. The result showed that locally weighted PLS outperformed the other methods. At the same time, the drawback of locally weighted PLS has also been made clear. locally weighted PLS is a modified version of PLS which is a linear regression method, and locally weighted PLS can deal with nonlinearity. However, while the conventional parameter tuning method can adapt to the nonlinearity of the target process, it has also a risk of excessively adapting to variations in measured values due to the influence of noise. Thus, a new parameter tuning method is proposed to improve the accuracy while guaranteeing the minimum prediction accuracy, and showed that the prediction accuracy of active ingredient and impurity concentrations can be improved.

The detailed information can be found in the paper <sup>[16]</sup>.

## Conclusion

In this research, real-time monitoring methods of continuous pharmaceutical processes were investigated. Some of the developed technologies have already been put to practical use and have achieved social contribution. In addition to the content of the former section, the research

on measurement and automation using data science and process control technology for many processes in the pharmaceutical production process, including the granulation process, drying process, and tableting process have been conducted. This research is expected to make a significant contribution to society, as it is planned to be put to practical use by our joint research partners.

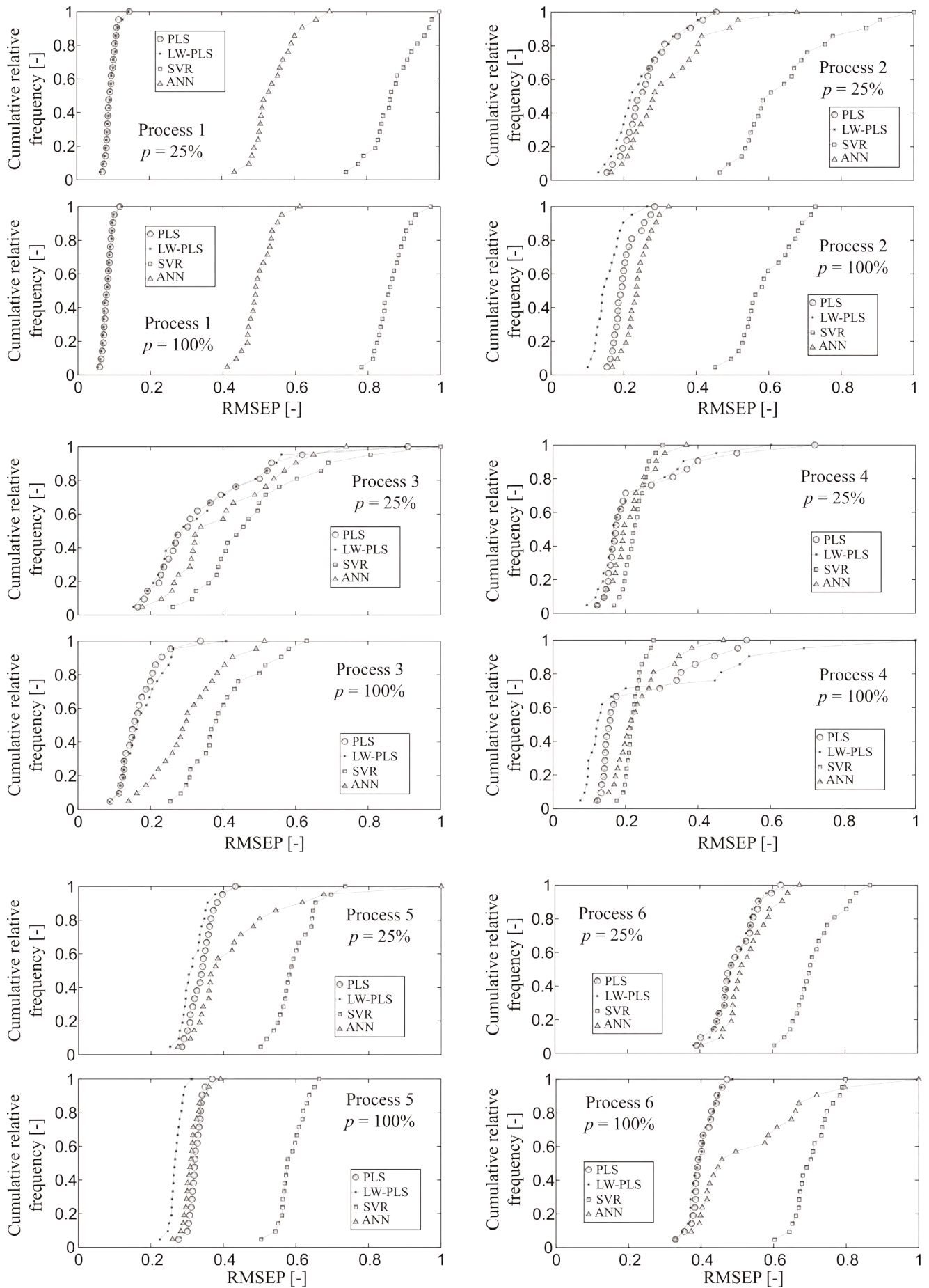


Figure 5 Result of comprehensive comparative study



\* Editorial note: This content is based on HORIBA's investigation at the year of issue unless otherwise stated.

## References

- [ 1 ] FDA 2004. Pharmaceutical cGMPs for the 21st century—a risk-based approach final report.
- [ 2 ] ICH 2005. ICH harmonised tripartite guideline—pharmaceutical development Q8 (R2).
- [ 3 ] ICH 2005. ICH harmonised tripartite guideline—quality risk management Q9.
- [ 4 ] ICH 2008. ICH harmonised tripartite guideline—pharmaceutical quality system Q10.
- [ 5 ] Moes, J.J., Ruijken, M.M., Gout, E., Frijlink, H.W., Ugwoke, M.I., 2008. Application of process analytical technology in tablet process development using NIR spectroscopy: blend uniformity, content uniformity and coating thickness measurements. *Int. J. Pharm.* 357, 108–118.
- [ 6 ] Berthiaux, H., Mosorov, V., Tomczak, L., Gatamel, C., Demeyre, J., 2006. Principal component analysis for characterising homogeneity in powder mixing using image processing techniques. *Chem. Eng. Process.* 45, 397–403.
- [ 7 ] Virtanen, S., Antikainen, O., Yliruusi, J., 2007. Uniformity of poorly miscible powders determined by near infrared spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 345, 108–115.
- [ 8 ] Wu, H., Tawakkul, M., White, M., Khan, M., 2009. Quality-by-design (QbD): an integrated multivariate approach for the component quantification in powder blends. *Int. J. Pharm.* 372, 39–48.
- [ 9 ] Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wold, S., 2001. *Multi- and Megavariate Data Analysis. Principles and Applications.* Umetrics Academy.
- [10] Kim, S., Kano, M., Nakagawa, H., Hasebe S., 2011. Estimation of active pharmaceutical ingredients content using locally weighted partial least squares and statistical wavelength selection, *Int. J. Pharm.*, 421, 269–274
- [11] Engel J, Gerretzen J, Szymańska E, Jansen JJ, Downey G, Blanchet L, et al. 2013. Breaking with trends in pre-processing? *Trends Anal. Chem.* 50, 96–106.
- [12] van den Berg RA, Hoefsloot HCJ, Westerhuis JA, Smilde AK, van der Werf MJ., 2006. Centering, scaling, and transformations improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 142.
- [13] Todeschini R, Consonni V, Maiocchi A., 1999/ The k correlation index theory development and its application in chemometrics. *Chemom Intell Lab Syst* 46, 13–29.
- [14] Keun HC, Ebbels TMD, Antti H, Bollard ME, Beckonert O, Holmes E, et al., 2003. Improved analysis of multivariate data by variable stability scaling application to NMR-based metabolic profiling. *Anal Chim Acta*, 490 265–76.
- [15] Kim, S., Kano, M., Nakagawa, H., Hasebe S., 2015. Input variable scaling for statistical modeling, *Comput. & Chem. Eng.*, 74, 4, 59–65
- [16] Matsuyama, Y., Kim, S., Hasebe S., 2021 Robust parameter tuning method of LW-PLS and verification of its effectiveness by twelve industrial processes", *Comput. & Chem. Eng.* 146 107224



**Dr. Sanghong Kim**

金尚弘

Associate Professor  
Department of Applied Physics and Chemical Engineering,  
Tokyo University of Agriculture and Technology.

## 医薬品製剤開発における粒子設計研究の役割

### The Role of Particle Design Studies in Developing Pharmaceutical Dosage Forms

竹内 洋文

TAKEUCHI Hirofumi

岐阜薬科大学  
先進製薬プロセス工学  
特任教授

Emeritus Professor

Laboratory of Advanced Pharmaceutical Process Engineering  
Gifu Pharmaceutical University



患者中心の医療 (patient centric therapy) の実現のために、薬物投与に関しても、その方法、剤形を中心に検討が続けられている。有効性、安全性の確保はもちろん、服用のしやすさを考慮した新しい剤形の開発、より効率よく薬物送達することを目的としたDDS (Drug Delivery System) の開発など様々な研究が進んでいる。いずれの研究においても、剤形を形作るための粒子設計研究が重要な役割を果たすことが多い。最近の製剤開発の動向を紹介すると共に、そのもとになる粒子設計研究のいくつかを紹介する。

In order to realize patient centric therapy, studies on drug administration is progressed focusing on its route and type of dosage forms. In addition to guaranteeing efficacy and safety in drug administration, there are development of new dosage forms that take into consideration ease of administration, and development of DDS for the purpose of more effective drug delivery. In either study, particle design research in developing the dosage forms is important. Recent trends in dosage form design development and the particle design researchs to support them will be introduced.

#### はじめに

医薬品をヒトに投与する際に、薬物は必要量に分割されるだけでなく、有効性、安全性を確保するように最適な剤形として設計される。具体的な剤形名としては、錠剤、カプセル剤、注射剤、点眼剤、貼付剤などがよく知られている。例示した剤形だけでもわかるように、様々な投与ルートがあり、薬物によって最適な投与ルートが選択される。また、同一薬物でも複数の投与ルートが選択される場合もある。投与ルート決定には様々な理由、事情があるが、近年では患者中心の医療 (patient centric therapy : PCT) も理由の一つとしてクローズアップされている。

剤形、投与ルートを基準としてPCTを考えると、経口投与が患者にとっては負担が少なく、好ましい投与ルートと言える。アドヒアランスと表現するが、確実に投与を実行されるという観点でも望ましい投与ルートと認識されている。経口投与する剤形として、公定書である現行の第17改正日本薬局方 (JP17) には錠剤の他、カプセル剤、顆粒剤、散剤 (粉薬)、経口服液剤、シロップ剤、経口ゼリー剤、フィルム剤の8種の剤形名が規定されている。また、錠剤の中の小項目として、口腔内崩壊錠 (orally disintegrating tablet :

ODT) も正式な剤形名として規定されている。また、フィルム製剤はJP17になってから追記された剤形であり、またその小項目として口腔内崩壊フィルム (orally disintegrating film : ODF) が規定されている。このように多くの剤形名が投与経路別に整理され局方に規定されたのは10年程前の第16改正からであるが、ODTを中心とした服用のしやすさを考慮した多くの製品が開発され、PCTが定着しつつあった時期と一致する。

一方、体内に入った薬を目的の部位に効率よく届けることも製剤研究の重要な課題である。いわゆるドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発研究である。初期のDDS研究には、経口投与製剤の徐放性製剤、さらには投与経路を注射から経皮に投与経路変更などの検討が含まれる。これらの製剤は早くから製品化もされてきた。DDS製剤としては、血流中に投与される薬物を微粒子担体に封入し、目的部位への送達効率を高める研究は活発に行われ、制癌剤を中心として製品化されている。微粒子担体としては、リン脂質からなるリポソーム、リピッドエマルジョン、アルブミン等がある。腫瘍組織等の目的の部位に100%送達するような理想的なターゲティング製剤は未だ開発されていないが、微粒子担体の活用によってそのターゲティング効率は

高まっている。

著者らは、所属していた岐阜薬科大学製剤学研究室の伝統であった粒子設計研究を基盤として、2000年初頭からは「人に優しい製剤設計」<sup>[1]</sup>を目標として掲げた製剤研究を行ってきた。本稿では、目的とする製剤設計に対して粒子に着目した粒子設計研究が有益であることを示す事例に焦点を当て、我々の研究を中心に紹介したい。

## 服用しやすい固形製剤と粒子設計研究

### 口腔内崩壊錠

前述の口腔内崩壊錠(ODT)の最初の製品は、海外製品である。Zydisの名称で知られる製品は凍結乾燥法を活用して、鋳型に入れた溶液、懸濁液から調製される<sup>[2]</sup>。多孔性の構造から、水に触れたとき極めて速やかな崩壊が起こり、代表的なODTとして知られている。国内でもこの手法によるODTの製品化は何製品か知られているが、通常の錠剤と同様な硬度を有する、そして可能であれば通常の錠剤と同様な打錠機(圧縮成形機)を用いて生産が可能なODT開発が進み、多くの製品が利用されている。

錠剤の調製は、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤等種々の添加剤を処方することによって達成される。これらの種類、処方量を決定することを製剤では処方検討と言うが、ODTの場合は、口腔内で30秒以内という崩壊特性、さらに通常の錠剤硬度と言う特性をクリアするために通常の処方設計検討だけでは解決に至るのは難しい。例えば、賦形剤としては、溶解性により優れたマンニトール、エリスリトールなどが好ましいが、これらの賦形剤は圧縮成形性に劣る。そのため、成形性を向上する必要がある、検討が進んでいる。ODTを直接打錠で製するためのマンニトールの製品もあり、乳糖の場合と同様に噴霧乾燥造粒法を基本とした粒子加工が行われている。また、崩壊特性の確保のためには、賦形剤だけでなく、他の添加剤の検討も併せ、総合的な処方検討が必要である。

ODTのための粒子設計研究に関して、我々が取り組んできたいくつかを紹介したい。賦形剤に関しては、成形性をほとんど示さないエリスリトールの一部を多孔性シリカと噴霧乾燥法によりコンポジット粒子化し、混合して成形すると通常の錠剤と同様の硬度を示すことを明らかにした<sup>[3]</sup>。多孔性シリカ粒子を少量処方することにより、錠剤硬度が若干向上する場合は経験的に知られていたが、劇的な成形性向上はシリカ添加の効果では説明がつかない。粉末X線回折では非晶質化は検出されず、糖類の非晶質化はその理由ではないことは明らかとなっていたが、その後、糖類、シリカの比率を変えて、熱分析等での解析を総合的に評価して、糖類が高エネルギー状態にあることが寄与していることが明らかとなった<sup>[4]</sup>。粉末X線では同一

ピークであることからいわゆる結晶多形ではなく、また、多孔性シリカがその高エネルギー状態の安定化に寄与していることが固体分散体に関する研究から推定された<sup>[5]</sup>。Figure 1にはコンポジット粒子を用いたモデル処方適切な崩壊剤を処方することにより目的の崩壊特性(30秒以内が目標)が得られた例を示す。

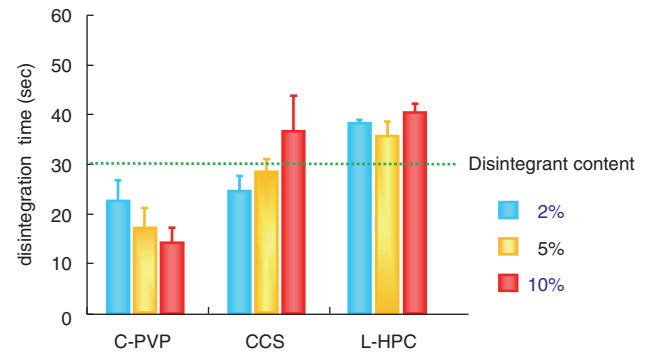


Figure 1 Disintegration time of erythritol tablet containing composite particle prepared by spray-drying with silica and disintegrant  
Formulation of tablets: Erythritol + 10% composite particle + 2-10% disintegrant + 0.2% lubricant  
Disintegrant: C-PVP: cross povidone, CCS: croscarmellose sodium, L-HPC: low substituted hydroxy propyl cellulose

結合剤を利用して圧縮成形性を高めることは通常の錠剤設計の手法であるが、ODTの場合は、崩壊時に結合剤が溶解して錠剤内のへの水の浸入を遅延させ、結果として崩壊時間が目的に適わなくなることが確認された。できるだけ効率よく、少量の添加で崩壊時間を遅延させることなく成形性を確保する処方検討の過程で、代表的な結合剤ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)の粒子径を小さくして混合することで目的を達成できることを見出し、さらに、HPCのグレードも考慮してHPC-SSL微粉によりODTモデル処方を例示できた<sup>[5]</sup>。HPC-SSL微粉はメーカーにより生産プロセスも確立し市販されており、現在は、ODT以外にも錠剤硬度調整等に広く使用されている。滑沢剤に関しては、ステアリン酸マグネシウム(StMg)が以前より圧倒的に多く利用されているが、一部の医薬、健康食品では他の素材も利用されている。その一つ、シヨ糖脂肪酸エステル(SE)に関してStMgと比較して疎水度を大きく低下できる製品もあることから、その効果を検討した。Figure 2には、錠剤の代表的な賦形剤乳糖に各種SE(S-370F, S-770, S-1170, S-1570;この順に親水性が向上)を処方して製した錠剤の崩壊時間を調べたところ、予想されたように滑沢剤の親水性の向上は崩壊時間の短縮につながる事が明らかとなった(Figure 2)<sup>[6]</sup>。一方、ODTに汎用される各種マンニトールを賦形剤とした錠剤に関して同様な検討をしたところ、Figure 2に示すように、StMgあるいは相対的に疎水性の高いSEの方が崩壊時間が顕著に短縮できる場合もあることが明らかとなった。この逆転現象に関しては、極めて速やかな崩壊の場合は、錠剤内部では疎水部が適度に存在する方が賦形剤マンニトールの溶解に水が消費されることなく速やかに内部まで浸透するためと考えている。

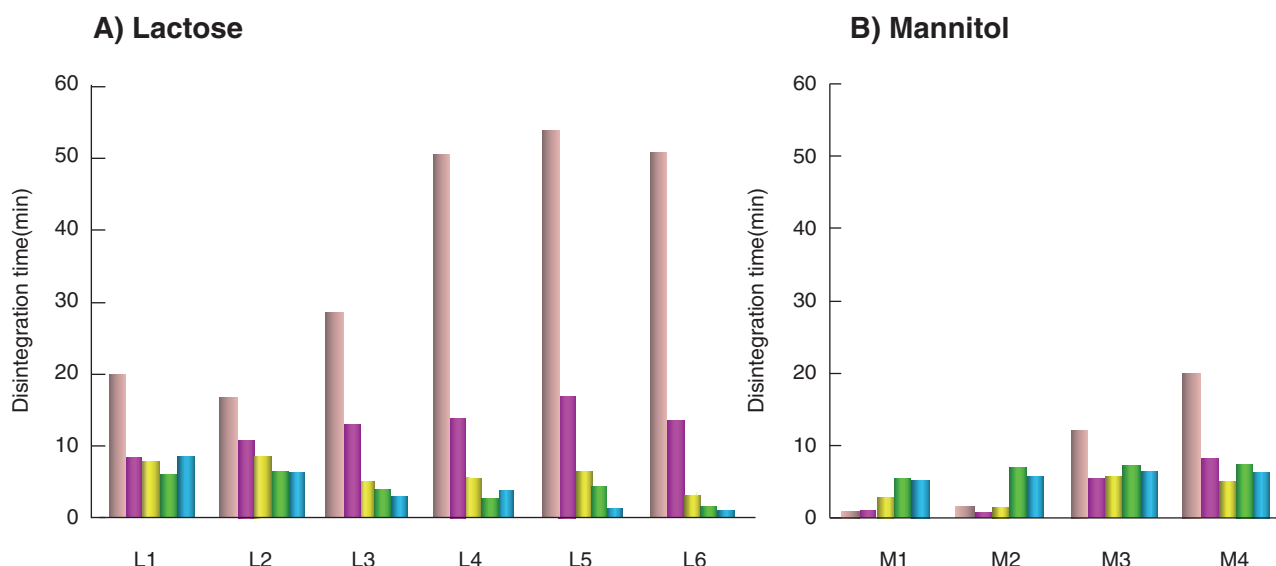


Figure 2 Disintegration time of tablets formulating magnesium stearate (Mg-st) or different type of sugar alcohol (SE) as a lubricant  
Formulation of tablet: Mannitol or lactose + magnesium stearate (1%) or sugar alcohol  
■ Mg-st ■ S-370F ■ S-770 ■ S-1170 ■ S-1570  
L1: Dilactose S, L2: Super Tab 21AN, L3: Fast-Flo Lactose, L4: Tablettose 100, L5: Flow lac 100, L6: Super Tab 11SD  
M1: Parateck M200, M2: Fine mannitol, M3: PEARITOL 200SD, M4: Mannitol (crystal)

Table 1 Premixed or co-processed excipients with mannitol for direct tableting of ODT

Trade name	Formulation
F-MELT	Mannitol, xylitol, microcrystalline cellulose, cross povidone, Metasilicate aluminic acid magnesium or Anhydrous calcium hydrogen phosphate
SmartEx	Mannitol, L-HPC, PVA
Ludiflash	Mannitol, Collidone CL-SF, Collicoat SR30D
Pearitol FLASH	Mannitol, corn starch
Granfiller D	Mannitol, carmelose, cross-povidone

L-HPC: Low-substituted hydroxy propyl cellulose  
PVA: poly vinyl alcohol

各医薬品添加剤メーカーも、口腔内崩壊錠の直接打錠用の賦形剤の開発にとどまらず、崩壊性等の機能も併せ持つように、複数の添加剤の最適な混合(プレミックス製品)、あるいは複合粒子化(コンポジット化)により製品化を行っている。Table 1にはそのいくつかをリストアップし、その成分と共に示す。ODTの開発の盛んな日本のメーカーだけでなく、海外メーカーの製品も複数あることから、ODTへの注目度、今後の進展が期待される。

### 口腔内崩壊フィルム

口腔内崩壊フィルム製剤(ODF)は口腔内崩壊錠と同様な特性を有する製剤であり、その形態からさらなる活用も期待される剤形である。すでに、局方剤形名としても追加されたことは先に述べた。海外では2004年にChloraseptic Relief Strips (Prestigre社)で初めて医薬品として開発、承認されたのを皮切りに、製品開発が続いた。国内では2006年に“ボグリボースODフィルム”が医薬品ODFとして初めて上市された。それ以降、欧米同様にOTC医薬品製剤も進んでいる。

ODFは、ODTと比較して服用のしやすさは同等以上であることに加え、用量調節を錠剤と比較して容易にできる点で、新しい小児用製剤としての期待も大きい。欧米では子供用用量の製品も承認されている。国内でも、承認例はないが小児向けの剤形としての注目も高まりつつある。医療の現場では、小児は体重、年齢群に合わせて投与量を決定することも多い。海外では、投与量の調整が容易であるフィルム製剤の開発として、テープ状に長いODFを調製して、投与量から算出された必要なフィルムの長さをカットして投与する手法も提案されている。Weinigら<sup>[7]</sup>は、フィルム自体に目盛を入れる手法、フィルム剤をカットするための各種デバイスを示している。Nieseら<sup>[8]</sup>は、随時投与量調節が必要な薬物warfarinを例として、テープ・ディスペンサーなどの調整用のデバイスの開発、それに適した処方調製、例えば柔軟性の維持等を検討している。また、小児に限らず、個別化処方のための剤形としての有用性も報告されている。Visserら<sup>[9]</sup>は、solvent casting法にて、HPMC基剤に各種モデル薬物含有させて、小スケールでの調製を検討し、その可能性を見いだせたと結論している。我々も、院内処方を目的として、フラコナゾールODFを高含量を維持しながら、十分な引張強度、実用上充分短い崩壊時間を示すODFの調製を報告している<sup>[10]</sup>。

錠剤の賦形剤に相当するフィルムを形成する素材は、フィルム基剤と呼び、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)、ポリビニルアルコール(PVA)、プルランなどが使用されている。この中では、HPMCが最も一般的に利用されている。HPMCは錠剤のフィルムコーティング剤として製膜性等の検討が蓄積されていることが理由の一つと考えられる。

我々は、種々の基剤の特徴を明確にしODT同様に今後のODF製剤開発に寄与することを目的として種々の検討を行った。HPMCを用いてフィルム調製を試み、当時用途開発をしていた湿式粉碎で微細化した崩壊剤低置換度ヒドロキシプロピルセルロース(L-HPC)をフィルムに処方することで劇的な崩壊時間の短縮が可能であることを報告した<sup>[11]</sup>。HPCは、他の基剤では処方必須となる可塑剤を添加することなく、機械的強度に優れたODFが調製できること<sup>[12]</sup>、適切な親水性微粒子の処方によって崩壊時間をコントロール可能なこと<sup>[13]</sup>、等も明らかにした。新しい剤形では特にその評価法の確立は重要である。ODFに処方された薬物の苦みを検出する味センサーによる評価<sup>[14]</sup>、崩壊時間終点を自動取得できるODFのための崩壊試験システムの開発<sup>[15]</sup>等も検討し報告した。

## 薬物送達のための粒子設計

### 薬物担体としてのリポソーム

細胞膜の構成成分であるリン脂質は水中で閉鎖小胞を形成することが報告され、リポソームと呼ばれている。二重膜からなるリポソームは、生体膜モデルとしての実験での利用と共に、生体適合性に優れた微粒子薬物担体としての活用が期待された。実際、制癌剤ドキシソルビシンの担体として注射剤として製品化(ドキシル<sup>®</sup>等)もなされている。一方、リポソームを利用してインスリンの消化管吸収を目指す研究も早くから始まった研究であるが、こちらは実用化されるには至っていない。

薬物担体微粒子は、通常サブミクロンサイズである。最も一般的な手法である薄膜水合法で調製したリポソームは数 $\mu\text{m}$ のサイズのものが含まれるが、比較的簡単に100-200 nm程度にサイズ調整することが可能である。また、リポソームは調製時に、リン脂質と共に少量の荷電物質を処方すれば、正電荷、負電荷いずれにも帯電した粒子を作ることができ、コレステロールを適量処方すれば、その処方量により表面膜の流動性は変化し、疎水化度もコントロール可能である。リポソーム粒子の表面は高分子、界面活性物質などで修飾することも可能であり、投与経路に応じた粒子設計が可能と考えられた。

### 粘膜付着性リポソームによるペプチド経口投与

リポソームを利用したDDS研究はリン脂質がリポソームを形成することが報告されて間もない1970年代ころから活発に行われていた。筆者がリポソームの製剤研究を本格的にスタートした1990年頃は、製剤研究では錠剤、顆粒の粘膜付着による滞留時間制御がトピックスの一つとなっていた。リポソーム粒子の表面修飾、小さい粒子の消化管粘膜への付着に関する興味から、粘膜付着特性が知られていたキトサン(CS)でリポソーム表面を修飾したキトサンコーティングリポソーム(CS-Lip)を調製し、その効果を検討し

た<sup>[16]</sup>。期待通りの粘膜付着リポソームが設計できたことから、インスリンを封入して、ラットに経口投与し、薬理効果である血糖値の変化を測定した。その結果、CSでコーティングされていないリポソームに封入した場合と比較して、初期の血糖値低下作用は大きいだけでなく、その効果が、少なくとも12時間まで持続していることが確認され、in vitroで確認した粘膜付着作用が実際にin vivoでも効果を発揮していることが確信された<sup>[17]</sup>。

その結果を受け、粘膜付着リポソームの有用性、あるいはその機能の最大化を目的とした検討を種々の観点で行ったが、粒子設計の観点で最も注目した結果は、リポソームのサイズによってその滞留性が大きく異なったことである<sup>[18]</sup>。消化管内の粒子の挙動は直接確認する手法しかなかったので、リポソーム粒子に脂溶性の蛍光物質を封入し、投与後一定時間後の消化管を輪切りにした切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Figure 3に示す写真はいずれも投与2時間後のものであるが、リポソームの粒子径によって確認できるリポソーム量(赤い部分)が大きく異なる。さらに、CSコーティングによってその傾向は強くなることがわかる。腸管での粒子状物質の吸収はパイエル氏板が作用していると一般に言われているが、リポソーム粒子の場合は、そのような傾向は認められず、さらに一部のリポソーム粒子が消化管上皮細胞を透過している様子が示された<sup>[19]</sup>。最近までの検討で、同様の実験系で実際の高分子モデル物質(FITC-Dextrane)が血流中に確認できたことから、CS-Lipによる高分子物質の吸収を確信するに至っている。薬理効果、吸収量いずれの評価においても吸収促進剤をリポソームに同時封入することによって、効果が増大したことより、封入された高分子薬物の一部は粘膜近傍で放出され吸収されていることも推定している<sup>[20]</sup>。

### 経肺投与におけるリポソームの滞留

吸入による肺内投与は、ペプチド等の高分子薬物の吸収を目指した投与ルートとして期待されてきた。消化管と比較して分解酵素が少なく、また、上皮細胞の厚みも薄く薬物吸収には好ましい条件がそろっているためである。実際、I型糖尿病では頻回の投与が必要なインスリンの粉末吸入剤も開発、上市された。残念ながら、現時点では注射に代わる剤形としては広くは受け入れられず、発売中止となっている。

リポソームを経肺投与に適用するための目標としては、薬物の徐放、消化管同様の滞留性の増大等が考えられた。呼吸器系は肺内で閉塞しているため肺胞内での粘膜付着特性がどのような効果を示すかに関しては興味があった。また、肺胞内には肺胞マクロファージが存在し、異物である微粒子は肺胞内では貪食されることも知られている。肺内投与後の表面修飾リポソーム粒子の挙動を明らかにするため、肺内投与一定時間後に組織側と気管支肺泡洗浄液(BALF)

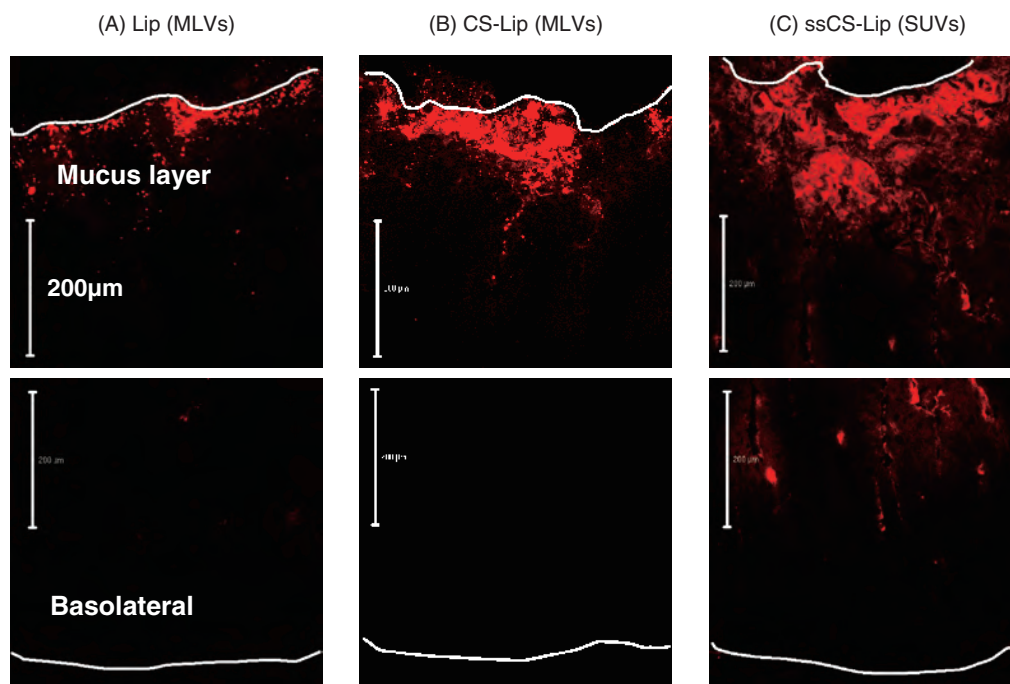


Figure 3 Confocal laser scanning micrographs of slice samples of upper part of the intestinal tract at 2hr after intragastrical administration of (A) Lip (MLVs), (B) CS-Lip, (C) ssCS-Lip in rats  
Lip: liposome, CS-Lip: chitosan coated liposome, ssCS-Lip: submicron sized CS-Lip  
The mean particle size of liposomes: (A) 7.56  $\mu\text{m}$  (B) 3.58  $\mu\text{m}$  (C) 0.28  $\mu\text{m}$ . Lipid formulation of liposomes: DSPC: DCP: Chol.=8: 2: 1. Red parts means presence of corresponding liposomes.

のリポソムの量を実測したところ、CS-Lipは組織側に多く存在し、表面にくし形の親水ポリマーPVAが形成されたPVA-Rコーティングリポソーム(PVA-R-Lip)は肺内洗浄液側に多く滞留していることが明らかとなった。ペプチド薬物を封入して投与した場合、CS-LipよりPVA-R-Lipの方がより長時間に亘って薬理効果が確認され、肺内組織への移行より肺胞内での滞留持続がDDSとしてより効果的であると判断された<sup>[21]</sup>。

PVA-R-Lip に関しては、PEGリポソーム同様に静脈注射後の血中滞留性に優れること、そのために腫瘍組織への移行性が高いことを実験動物を用いてすでに明らかにしている。この場合は、血液採取、分離、定量により評価が可能であるが、組織内での長期の滞留性評価にはより非侵襲の評価が有効である。IVIS Imaging Systemは、このようなDDS微粒子の滞留性評価するために有効な機器である。このPVA-R-Lipの肺内滞留性に関して、測定に適したマーカーとしてindocyanine greenを封入し、表面未修飾リポソームと滞留性の比較を行ったところ、測定の際にはあるもののPVA-R-Lipに関しては有意に高い残存が確認された<sup>[22]</sup>。PVA-R-Lip表面のPVA層は、静脈注射時の肝臓のマクロファージの貪食を低減させたのと同様に、肺胞内でのマクロファージによる貪食を有効に低減させていると推定できる。

### リポソーム点眼投与製剤による後眼部送達

眼科治療の薬物投与には点眼剤が最も一般的な剤形である。主として眼の前面、結膜等の部位に作用する薬物の剤

形である。これに対して、後眼部には視覚にとって極めて重要な組織である網膜があるが、これに適応する点眼製剤は存在しない。近年、超高齢化が進むにつれて、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症(AMD)等の重篤な後眼部疾患が増大している。これらの疾患は治療しないと失明に至ることもある点が特に問題点として挙げられる。幸い、治療すべき症状の一つである黄斑近傍に出現する浮腫に起因する新生血管の発生を高確率で抑制する有力な薬物は開発されている。ただ、その送達は現時点では、侵襲的な硝子体内注射に限られているため、点眼での送達が可能になれば薬物治療の進展に大きく貢献できる。

リポソーム粒子の点眼後の眼内移行の評価を目的として、マウスを用いて蛍光マーカー(クマリン-6)を封入したリポソーム懸濁液を点眼し、網膜を観察してその送達特性を評価したところ、ナノサイズのリポソーム粒子は後眼部に届いていることを明らかにした(Figure 4)。送達に影響を及ぼす要因を調査したところ、粒子径が小さいほど送達効率が向上すること及びリポソーム粒子の硬さも効率に影響を及ぼすことが明らかとなった<sup>[23]</sup>。ナノサイズの粒子の硬さを定量的に表す手法が確立されていなかったため、動的光散乱法(DLS)により測定される平均粒子径( $d_{50}$ 値)と原子間力顕微鏡(AFM)を用いて測定される粒子の径(高さ方向の距離)の比( $R_d$ )を用いて数値化することを提案した。予想されたようにポリスチレンのような極めてリジッドなポリマー粒子は、両者の値はほぼ同じで $R_d$ はほぼ1.0となり、リポソーム粒子も、構成リン脂質の種類から推定されるrigidityを反映した値を示した<sup>[24]</sup>。なお、点眼リポソーム

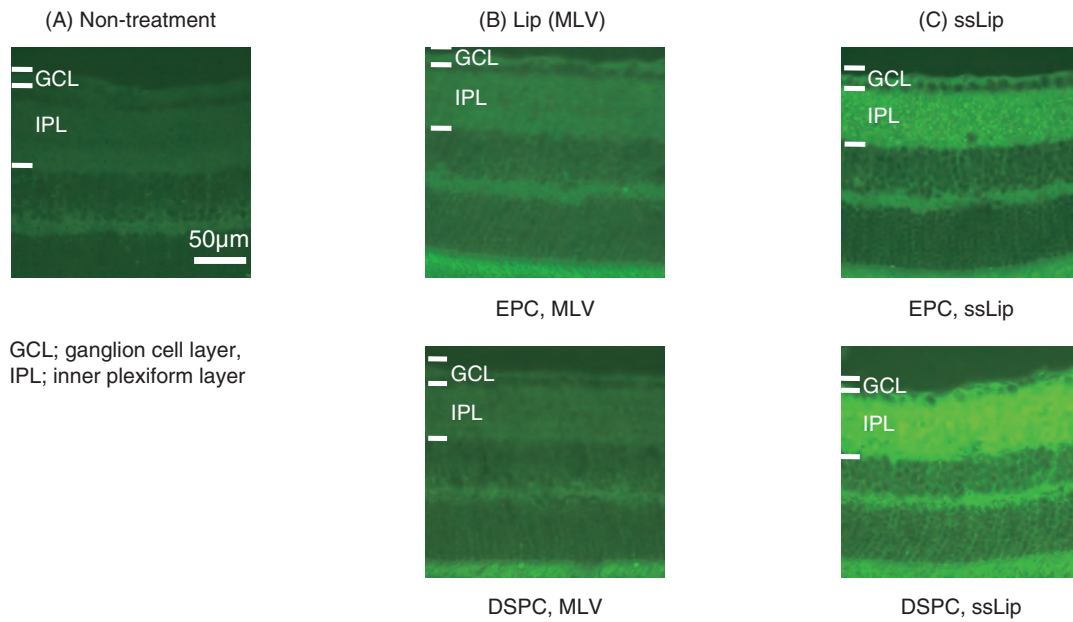


Figure 4 Delivery of coumarin-6 (fluorescence marker for liposomes) with liposome to posterior part of eye observed with fluorescence microscopy 30 min after instillation to the eye in mice  
 Lip: liposome, ssLip: submicron sized Lip, EPC: egg phosphatidyl choline, DSPC: di-stearoyl phosphatidyl choline  
 EPC liposomes are relatively softer compared with DSPC liposomes.

の薬効評価に関しては、抗酸化あるいは抗炎症薬物をリポソーム化してモデル動物に投与し、光照射によって誘発される網膜障害の抑制<sup>[25]</sup>あるいは脈絡膜血管新生を抑制などを確認している<sup>[26]</sup>。

## おわりに

人に優しい製剤設計を考える上で、その構成要素である粒子の設計が重要であることを示す事例をいくつか紹介した。固形製剤のための数十µm以上の粉体粒子、DDSのためのサブミクロンサイズのリポソーム等、粒子としてはバラエティに富むが、いずれの粒子もその調製、評価がうまくかみ合っただけで目的とする製剤の設計に到達できる。どの分野においても製品の評価は分野独自のものであることが多いが、研究者は目的とする評価の本質を明確にし、他分野を含めた協力を得ることも重要であろう。長年、研究活動の場としている粉体工学会／製剤と粒子設計部会はそのような情報交換促進を目的の一つとしている。マッチングの推進により、PCTに貢献できる製剤開発を続けたいと思う。

\* 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] 竹内洋文, ヒトに優しい固形製剤設計「医薬品製剤化方略と新技術」竹内洋文編, シーエムシー出版(2007)3-7.
- [2] Seager H., Drug-delivery products and the Zydis fast-dissolving dosage form., *J. Pharm. Pharmacol.*, 50(1998)375-382.
- [3] Takeuchi H., Fuji Sylsya Chemical Ltd., Jpn. Patent No. 5026675(2012)
- [4] Tanimura S, Tahara K, Takeuchi H. Spray-dried composite particles of erythritol and porous silica for orally disintegrating tablets prepared by direct tableting. *Powder Technol.* 286(2015)444-450.
- [5] 谷村信爾, 川添博義, 山本浩充, 竹内洋文. 噴霧乾燥HPC-Lを結合剤として用いた低成形性医薬品粉末の直接打錠. *粉体工学会誌.* 43(2006)648-652.
- [6] 林洗仁, 竹内淑子, 田原耕平, 内田実, 竹内洋文. 滑沢剤ショ糖脂肪酸エステルの乳糖錠剤における崩壊 挙動抑制とそのメカニズムに関する検討. *粉体工学会誌.* 49(2012)750-757.
- [7] Wening, K., J. Breitreutz J., Oral drug delivery in personalized medicine: Unmet needs and novel approaches. *Int. J. Pharm.* 404(2011)1-9.
- [8] Niese, S. Quodbach J., Development of a dosing device for individualized dosing of orodispersible warfarin films. *Int. J. Pharm.*, 561(2019)314-323.
- [9] Visser J. C., Woerdenbag H. J. Crediet S., Gerrits E., Lesschen M. A., Hinrichs W. L.J., Breitreutz J., Frijlink H. W., Orodispersible films inn individualized pharmacotherapy: The development of a formulation for pharmacy preparations. *Int. J. Pharm.*, 478(2015)155-163.
- [10] Matsumoto M., Arai K., Fujita A. Tsuji M., Hayakawa S., Sawakami K., Sawakami K, Shida S., Nohara Y., Sumiyaa K., Murata K., Takeuchi Y., Takeuchi H., Murata R., Characterization of Orally Disintegrating Films Containing Fluconazole, *Journal of Drug Interaction Research*, 43(2019) 55-59.
- [11] Takeuchi H., Yamakawa R., Nishimatsu T., Takeuchi Y., Hayakawa K., Maruyama N., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 23 (2013)471-475.
- [12] Takeuchi Y., Umemura K., Tahara K., Takeuchi H., Formulation design of hydroxypropyl cellulose films for use as orally disintegrating dosage forms. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 46(2018)93-100.
- [13] Takeuchi Y., Nishimatsu T., Tahara K., Takeuchi H., Novel use of insoluble particles as disintegration enhancers for orally disintegrating films. *J. Drug. Delivery Sci. Technol.*, 54,(2019)101310.
- [14] Takeuchi Y, Usui R, Ikezaki H, Tahara K, Takeuchi H. An advanced technique using an electronic taste-sensing system to evaluate the bitterness of orally disintegrating films and the evaluation of model films. *Int J Pharm.*, 531(2017)179-190.
- [15] Takeuchi Y., Kawamoto M, Tahara K, Takeuchi H. Design of a new disintegration test system for the evaluation of orally disintegrating films. *Int J Pharm.*, 553(2018)281-289.
- [16] Takeuchi H, Yamamoto H, Niwa T, Hino T, Kawashima Y. Mucoadhesion of Polymer-Coated Liposomes to Rat Intestine in Vitro. *Chem. Pharm. Bull.*, 42(1994)1954-1956.
- [17] Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., Enteral Absorption of Insulin in Rats from Mucoadhesive Chitosan-Coated Liposomes. *Pharm. Res.*, 13,(1996)896-901.
- [18] Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 47(2001)39-54.
- [19] Takeuchi H, Matsui Y, Sugihara H, Yamamoto H, Kawashima Y. Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs. *Int. J. Pharm.*, 303(2005)160-170.
- [20] Makhlof A, Werle M, Tozuka Y, Takeuchi H. A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. *J. Cont. Rel.*, 149(2011)81-88.
- [21] Murata M, Nakano K, Tahara K, Tozuka Y, Takeuchi H. Pulmonary delivery of elcatonin using surface-modified liposomes to improve systemic absorption: Polyvinyl alcohol with a hydrophobic anchor and chitosan oligosaccharide as effective surface modifiers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 80(2012) 340-346.
- [22] Murata M, Tahara K, Takeuchi H. Real-time in vivo imaging of surface-modified liposomes to evaluate their behavior after pulmonary administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 86 (2014)115-119.
- [23] Hironaka K, Inokuchi Y, Tozuka Y, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H. Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. *J Contr. Rel.*, 136(2009)247-253.
- [24] Nakano K, Tozuka Y, Yamamoto H, Kawashima Y, Takeuchi H. A novel method for measuring rigidity of submicronsize liposomes with atomic force microscopy. *Int. J. Pharm.*, 355 (2008)203-209.
- [25] Hironaka K, Inokuchi Y, Fujisawa T, Shimazaki H, Akane M, Tozuka Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H. Edaravone-loaded liposomes for retinal protection against oxidative stress-induced retinal damage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 79(2011)119-125.
- [26] Shimazawa M, Inoue Y, Masuda T, Onodera R, Tahara K, Shimizu Y, Mibe Y, Tsuruma K, Takeuchi H, Hara H. Topical diclofenac-loaded liposomes ameliorate laser-induced choroidal neovascularization in mice and non-human primates. *Curr. Neurovasc Res.*, 14(2017)46-52.



## 製薬産業の現状と課題（創薬技術，創剤技術そして製薬技術）

Current Status and Objectives on Technologies in Pharmaceutical Industry

伊吹 リン太

IBUKI Rinta

立命館大学総合科学技術研究機構

客員教授

Professor

Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University



21世紀における日本の繁栄を支えるのは20世紀同様モノ造りであり，その一つが世界の人々に健康を届ける製薬産業であろう。薬のモノ造りを支える技術は創薬技術，創剤技術，製薬技術が融合して初めて具現化し，世界の患者さんに価値ある薬剤を届けることが可能となる。日本はこれまでかかる創薬，創剤そして製薬技術の進歩に少なからず貢献してきた。一方，各技術の更なる発展には各々課題が存在し，この課題を克服してこそ日本の製薬産業に未来は存在する。ここでは創薬技術，創剤技術，製薬技術について各々の現状と課題について解説する。

The Monozukuri, a manufacturing technology, that contributed to Japanese progress in the 20th century will also support Japanese prosperity in the 21st century. One of such Monozukuri is definitely a pharmaceutical technology that can offer health to the people all over the world. The technology of pharmaceutical Monozukuri that delivers valuable medicines to the world can be created with fusion among the technologies of drug discovery, drug delivery system and pharmaceutical manufacturing. Japan showed some contributions to development of those technologies until now. However, in each technology there are technical barriers to be overcome for the further progress and Japanese pharmaceutical industry can survive by providing some feasible solutions to those barriers. This paper describes the current status and objectives on the technologies of drug discovery, drug delivery system and pharmaceutical manufacturing

### はじめに

1990年以降この30年は日本にとって失なわれた30年と評される。確かに30年前，日本の一人当たりのGDPは世界3位を誇り，IMD (International Institute for Management Development) 世界ランキングは第1位であった。それが2020年には前者が23位，後者が34位と過去の栄光には程遠い。30年前に日本が世界のトップに立てた背景には，日本独自のInnovationとGlobalizationが存在したと筆者は考える。Innovationでいえば日本は改良型技術によるモノ造りが得意であり，Globalizationでいえば日本を基盤とするInternationalizationであった。そしてその後日本的Innovationは世界に通用しにくくなり，価格競争の前にそのプレゼンスを失った。今や改良型モノ造りではなくまさしく独走型モノ造りが世界を牽引する。そして市場はまさにInternationalではなくGlobalに展開しなければならない。

生産人口の減少，超高齢化社会を迎える中，この危機的状

況から日本を救い出すものは何か？ その一つはまさしく世界の人類に貢献し，世界をリードしうるモノ造り産業を再興することにある。その意味で世界の人々を病から救い健康を増進する製薬産業はGlobalに市場を有しそして本分野で実績を有することより，モノ造り再興の一端を担うことが期待される。製薬産業を支える技術としてはどうしても新薬開発，いわゆる薬物を創出する創薬技術が注目される。勿論創薬は重要であるがそれだけでは薬は生まれない。薬物が体内において薬剤から適切に放出される創剤技術 (Drug Delivery System：以下DDS)そして薬物，薬剤を高品質で大量に製造する製薬技術が総合的に機能してはじめて価値ある薬が患者さんのもとにTimelyに届けられ，役立つことができる。以下，各技術の現状と課題について私見を述べる。

### 創薬技術

よく知られているが日本は新薬を創出できる数少ない国の

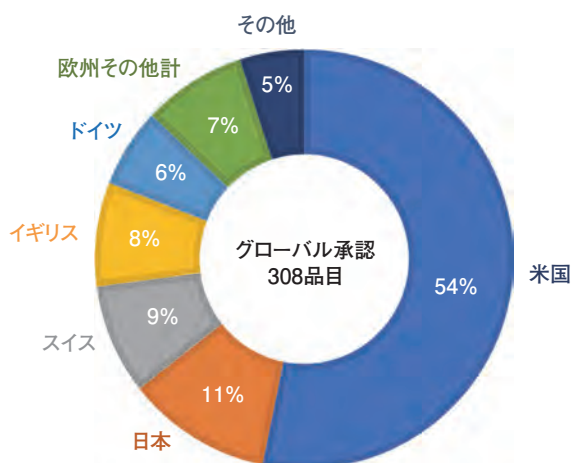


Figure 1 Ratio on number of new active ingredients developed by each designated country and approved globally between years of 2010 and 2019 (欧州その他計はデンマーク、イタリア、フランス、ベルギーの合計)  
出所：PMDA, FDA, EMAの各公開情報、Clarivate Analytics Cortellis Competitive Intelligence  
出典：医薬産業政策研究所 政策研ニュースNo.62(2021年3月)をもとに作成

一つである。Figure 1には2010年から2019年までの国別新薬創出数を示したが、日本は世界第2位の新薬を創出できる国であり、この傾向は1990年から変わらず推移している。しかしながら今後創薬技術においてもその手法が変化中、日本の製薬産業もこれに対応していかなくてはならない。それでは一体創薬技術にどのような変化が起こったのか？

最近創薬の領域ではモダリティというTermがよく用いられるが、端的に言えばモダリティとは低分子医薬、ペプチド(中分子)医薬、抗体医薬、核酸医薬、細胞医薬、再生医療といった治療手段のことである。20世紀まではその治療手段として低分子医薬が主流であったが、21世紀になって様相は一変する。まずは抗体医薬、核酸医薬の台頭である。よくいわれるが、低分子化合物で新たに治療できる疾患はますます少なくなり、未だ治療薬が見出されていない疾患は抗体医薬や核酸医薬が新たに適用されることになった。さらには、従来の創薬技術だけではなく細胞医薬や再生医療といった様々な最新テクノロジーを巻き込んだアプローチもいよいよ本格化となる。即ちこれがモダリティである。日本はこれに対応できるのであろうか。幸い本邦はiPS細胞研究のお家元であり、また多彩な創薬先進技術研究も展開されている。従来の製薬企業の枠を無くし、多くの先進技術が結集しうる組織を作ること、これが今後の創薬を進化させる創薬医療技術のモデルであろうか。

## 創剤技術(DDS)

創剤技術(DDS)とは薬物分子を体内のこれを必要とする組織に必要な量を送達する薬剤を創る技術である。世界的にも創剤開発研究は20世紀後半に積極的に展開され、薬物の治療効果を高め、副作用を低減するとともに、患者さんの利

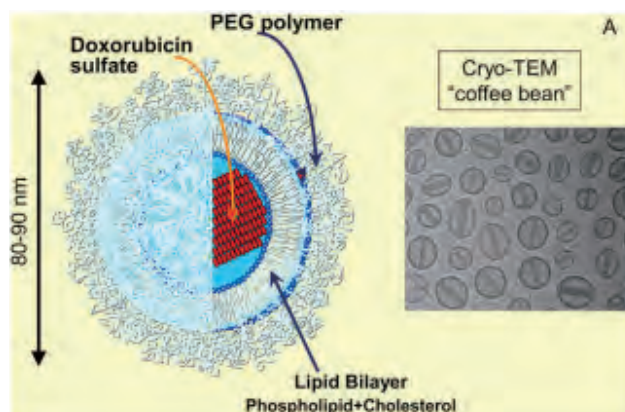


Figure 2 Pegylated liposomal doxorubicin. Left panel: schematic drawing of liposome; right panel: Cryo-TEM picture liposomes with characteristic rod precipitate (doxorubicin sulfate) and ovoid shape. (Quoted from Gabison, Patil and La-Beck)<sup>[1]</sup>

便性を高めることにも貢献した。例えばドキシル<sup>®</sup>という抗がん剤が2000年に上位置されたが、これはドキソルビシンという比較的古い抗がん剤をリポソームという約100 nmのリン脂質からなる小胞体(Figure 2)に含有させて静脈内投与すると、水溶液投与に比べはるかに癌組織への送達率を高めた、という薬剤である。リポソームの外層はポリエチレングリコールで被覆されているが、このためリポソームがマクロファージからの認識、補足から逃れることができる。またその大きさが100 nmであることより癌組織では新生血管より漏れ出し、癌組織への移行を高める。こうした工夫で水溶液の静脈内投与に比較して本リポソーム製剤を静脈内投与後におけるドキソルビシンの癌組織への移行率が飛躍的に高まることが明らかとなった<sup>[1]</sup>。ここで特筆すべきはがん組織への送達率を飛躍的に高めることで、他の健常組織への移行量を低減し、副作用の発現を抑えることにもつながる。

一方薬物を持続的に体内に送り込むことにより、投与回数を減らして患者さんへの負担を軽減し利便性を高めることもDDSの代表的な機能である。その代表例ともいわれるDDSが、日本の研究者によって開発され1990年代に上市された。ホルモンアナログであるリュープロレリン酢酸塩を含有する注射剤で前立腺がんを主として治療するDDS、即ちリュープリン<sup>®</sup>である。本DDSは薬物を含有する生解性高分子よりなる大きさ数十 $\mu$ mの小胞体(Figure 3)で、これを一旦体内に皮下注射すると3か月間にわたり薬物を持続的に放出し続ける。本DDSの登場により、これまで通常の水溶液注射剤では1日1回の投与であったものを、3か月に1回の投与で同等の治療効果を得ることが可能となった<sup>[2]</sup>。

またこれまで注射剤でのみ投与可能であったタンパクを他の投与ルートにより体内に送達するDDS研究も20世紀後半には積極的に行われ、21世紀にはインシュリンを経肺ルートから投与可能なデバイスも上市された。一方20世紀後半には経口薬を皮膚から經由して体内に送達する経皮製剤技

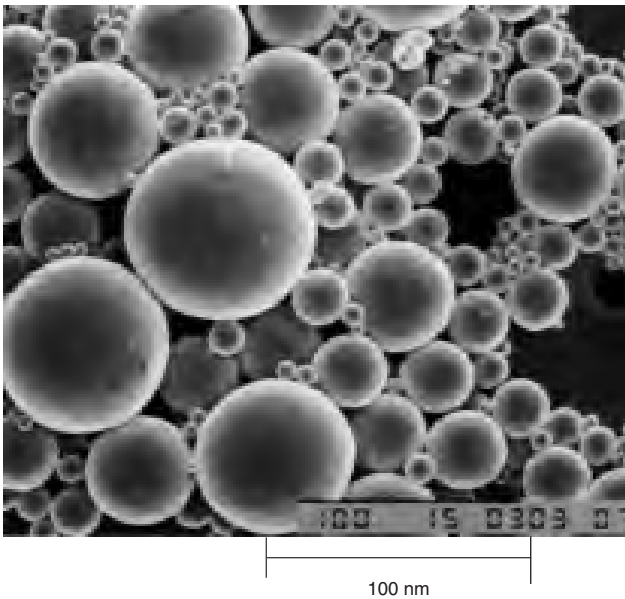


Figure 3 Scanning electron micrograph of LPGA microspheres containing Leuporelin acetate. Gifted by Dr. Hiroaki Okada.

術もいろいろな薬物に適用され、汎用されている。このように新規投与ルートによる患者さんの利便性改善はまさにDDSの真骨頂であった。

経口剤の領域でも創剤技術の研究開発は盛んに展開された。その最たるものが水に溶けない薬を溶解させ、消化管からの吸収を高める技術であった。20世紀後半、低分子薬の開発ではその薬効を高めるため、多くの疎水性置換基を分子に導入する試みがなされた。そのためこれまで見られなかった薬効が持たされたが、その一方で分子量が増大するとともに疎水性が飛躍的に増大し、殆ど水に溶けない薬物分子が多数創生された。即ち界面活性剤で無理やり溶かし評価する *In Vitro* では微量で薬効を発揮するが、*In Vivo* では消化管では溶解せず結果として全く吸収されないため薬効が発揮できない。例えば水への溶解度が1 µg/mlの薬物の臨床投与量が10 mgの場合、これを100 mlの水とともに投与しても、胃の中では僅かに0.1 mg (投与量の百分の一)しか溶解せず、殆どの薬物は便より体外に排出されてしまう。こうした状況を解決されるべく開発された技術が固体分散技術である。この技術は薬物分子を水溶性高分子の分子構造内にアモルファスとして分散させるもので、経口投与後胃の中で水溶性高分子から解き放された薬物分子が溶解度以上の高濃度で溶解し、小腸で大部分が吸収されることを可能とする。筆者自身も臓器移植に用いられる免疫抑制剤タクロリムス (Figure 4) の経口剤開発に携わったが、本薬物も水に溶けにくい薬物であり、その製剤設計には固体分散技術が応用された。Figure 5には本薬物を結晶粉末のままと固体分散処理によりアモルファス化した粉末をイヌに投与した後の血漿中濃度時間推移を示したが、固体分散技術により本薬物の経口吸収が著しく改善されていることがわかる<sup>[3]</sup>。さらに言えば本技術は単に薬物の投与量を低減させるのみではなく、個体間の吸収率変動を小さ

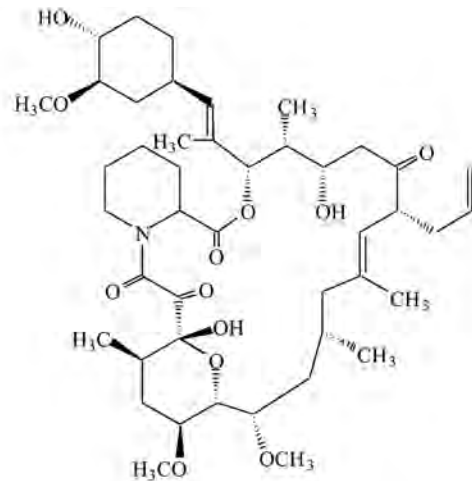


Figure 4 Chemical structure of Tacrolimus. Mw:822.05

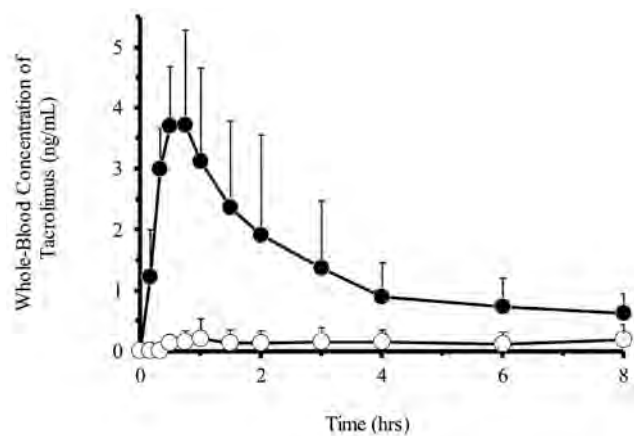


Figure 5 Time course of blood level of Tacrolimus after oral dose of crystalline powder or solid dispersion powder in dogs at a dose of 3.2 mg/kg. Gifted by Dr. Kazunari Yamashita.

くし、結果として患者間での有効性を高めるとともに副作用の発現を低下させるという効果ももたらす。

ここで筆者とタクロリムスの創剤開発について少し述べておきたい。タクロリムスはもともと免疫抑制作用を基に臓器移植時における移植拒否を抑制する薬物として開発されたが、その後多くの自己免疫疾患にも適用する臨床開発が実施された。そのため経口剤以外にも多くの製剤が開発され世界中で使用されるに至ったが (Table 1), その全てに関わることができたのは筆者にとって大きな経験となった。本薬物が非常に水に溶けにくいという物性を有するこ

Table 1 Dosage forms developed for Tacrolimus and its first year approved all over the world

剤形	領域	世界初承認時
注射剤	移植	1993
経口剤 (速溶剤)	移植, 関節リウマチ等	1993
経口剤 (小児用顆粒剤)	移植等	2001
経口剤 (持続性製剤)	移植等	2008
外用剤	アトピー性皮膚炎	1999
点眼剤	春季カタル	2008

とよりいずれの製剤開発も一筋縄ではいかなかったが、そこが創剤に対する研究冥利であったといまさらながら感じられる。

こうした創剤開発研究は20世紀終盤に最盛期を迎え、多くの有用なDDSが開発された。ところが21世紀になるとこうしたDDS開発研究はだんだん下火となり、最近では画期的な創剤技術は見当たらない。これも創薬技術と同様できるものはやりつくし、これまでの技術延長ではもはや新しい技術は創生されないのであろう。創剤技術の世界もモダリティ変革が求められ、まさに医薬工連携の出番でもある。本邦においてもこうした動きが加速されるのか、まさにこれからが正念場となる。

## 製薬技術

創薬技術が踊り場を迎え、そして創剤技術が停滞する中、今製薬領域で注目されるのが薬物あるいは薬剤を高品質で効率よく生産する製薬生産技術の動向である。これまで製薬産業は労働集約型産業の典型であり、自動化、無人化が遅れている産業とされていた。その原因として考えられるのがこの業界の特徴である多品種少量生産故であろうか。さらに製造工程が多岐にわたるとともに複雑であり、また薬剤に高品質が求められることにより製造条件が厳しく設定され、その結果高度の製造環境が必要となる。それだけにレギュレーションの制約も厳しく、こうした環境が自動化、無人化の遅れの原因となっていた。

しかしながら一方でこうした労働集約型産業でたびたび問題になるのがヒューマンエラーによる品質問題の発生である。最近でも経口の水虫剤に睡眠剤が混入するという信じられない事案が生じたのはこの典型でもある。こうした問題に対し、21世紀になってから医薬品の高度な品質を担保するGlobalな取り組みがなされてきた。その一つがICHガイドラインの中で議論されたQuality by Design即ち、『品質は作り上げるものである』というコンセプトである。このコンセプトは医薬品の品質が製造後の品質試験でのみ保証されるものではなく、医薬品の製造工程が科学的に堅牢な領域で設計されかつ管理されておりその結果医薬品の品質が保証される、というものである。これをソフトな取り組みとするならば、ハードな取り組みとは製造工程の自動化、無人化である。一言で自動化といっても単にロボット等の製造技術導入のみで達成されるものではない。製造技術のみならず、その製造が問題なく各工程で進行していることをWatchする自動計測技術も当然必要になってくる。さらに完全無人化となれば製造中に逸脱傾向が生じた場合これを補正して正しい工程にもどす制御技術も要求される。

こうした製造技術、自動計測技術、制御技術の融合は多く

の分野（例えば飛行機の自動操縦システム）で日常化されているが、製薬の分野で21世紀になってからようやく検討が開始された。その中で最も先行しているのが、経口固形製剤（錠剤）の製造法、いわゆる連続生産と呼称される製法である。本製法は、『薬物及び添加剤の秤量及び切り取り⇒混合⇒造粒⇒滑沢剤の添加と混合⇒打錠⇒検査』の各工程が無手下連続的に進行し、錠剤が製造される。ちなみにこれまでの常法では各工程が逐次的に行われ、その都度、何らかのヒトの関与があり、ヒューマンエラーが生じる素地が生じていた。これに対し連続生産では、各工程が連続的に行われ、かつ各工程で重要パラメーター（例えば薬物濃度、水分量など）が非破壊、非接触で同時計測されることにより、工程での品質保証を可能とする。さらには1錠毎の錠剤含量を同時計測する検討も進んでいて、製造後の品質試験なしでの出荷も可能となってきた。こうした錠剤の連続生産は2015年に米国で初めて承認され、その技術を応用した製品承認数は本邦も含めて年々増加している。なお現在上述した自動計測に汎用されているのは近赤外分光法（near-infrared spectroscopy, 以下NIR）が主であるが、錠剤中の薬物含量が低下するなか、NIRより定量感度に優れるラマン分光法の活用も今後期待される。

以上高品質の医薬品製造を支える製造技術及び自動計測技術の重要性について述べてきたが、日本におけるこれら技術のポテンシャルは非常に高い。一方錠剤の自動化・無人化製造システムが促進されれば、設備さえ整えられれば世界のどこでも高品質の医薬品が製造でき、広く人々に供給することが可能となる。日本の本分野での技術革新が世界の人々の健康にあまねく貢献することを切に期待する。

## おわりに

製薬産業の現状と課題について、創薬技術、創剤技術（DDS）、製薬技術の点から私見を述べてみた。世界の人々の健康増進のために各技術がますます進歩して止まないことを希望する。即ち創薬技術においては未だ薬物のない疾病に対する新薬が創出され、創剤技術においては次世代の技術を結集したDDSが創出され、そして製薬技術においては一層の自動化、無人化が進むことであろうか。本邦においてかかる製薬先端技術が持続的に発展し、日本再興の一役を担うことを切に希望する。

## 参考文献

- [1] Alberto Gabizon, Raphael Catane, Beatrice Uziely, Bela Kaufman, Tamar Safra, Rivka Cohen, Francis Martin, Anthony Huang, and Yechezkel Barenholz, "Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes", *Cancer Research*, vol.154, pp.987-992, 1994.
- [2] H.Okada, "One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate", *Adv. Drug. Del. Rev.*, vol.28, pp.43-70, 1997
- [3] Kazunari Yamashita , Toshiomi Nakate, Kazuto Okimoto, Atsuo Ohike, Yuji Tokunaga, Rinta Ibuki, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura, "Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus", *Int J Pharm.*, vol.28, pp.79-91, 2003

## バイオ医薬品開発と分析化学

### Analytical Chemistry for Biopharmaceutics

津本 浩平

TSUMOTO Kouhei

東京大学大学院  
工学系研究科バイオエンジニアリング専攻  
教授

Professor

Department of Bioengineering, School of Engineering,  
The University of Tokyo



抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品開発研究において、分析化学的手法の重要性が認識されている。それは、特に、抗体医薬品ではタンパク質が分子コロイドとして存在し、かつ配列に規定された立体構造を持つ生体高分子を、コロイド安定性と構造安定性の双方から精緻に解析する必要があるためである。本稿では、近年高度化が著しいコロイド安定性に関する方法論と、高濃度下における構造安定性評価におけるラマン分光の有用性を中心に現状を概観する。

In the research and development of biopharmaceutics, including antibodies, importance of analytical chemistry has become more and more recognized. In particular, the proteins in biopharmaceutics exist as molecular colloid and have unique conformations regulated by their sequences, which means that precise analyses of the drug candidates from the viewpoints of both colloidal and conformational stabilities are required for the process. This article reviews recent progresses on the methods for evaluation of colloidal stability, and of conformational stability under higher concentration of the molecules.

### はじめに

医薬品開発においてモダリティ創薬というアプローチが浸透しつつある中、バイオ医薬品、特に抗体医薬品に関するモダリティも改めて注目が集まっている。既存の抗体を改良し、機能や物性を付加・向上させることでその価値を高める次世代抗体戦略への期待が大きいことがその背景にある。たとえば、抗体-薬物複合体ADC、多重特異性抗体、キメラ抗原受容体CARなどが挙げられる。これらは次世代抗体とも呼ばれている。このようなタイプの新薬開発において常に重要となるのが、標的分子に対する特異的な作用と安定な物性である。その蛋白質としての物性、安定性の評価が不可欠である。従来より熱安定性および凝集性の評価が行われ、分光学的な分析技術をベースとした様々な手法が用いられている。そして近年では、糖鎖状態に関する物性評価、また製剤化における高濃度条件下での物性評価も重要視され始めている。本稿では、蛋白質の会合凝集体検出、糖鎖改変された抗体の物性に関する分析例、そして高濃度抗体の分析技術例について紹介する。

### 蛋白質の会合凝集体

蛋白質の会合凝集は様々な外的ストレス、例えば熱ストレス、酸化ストレス、振動ストレス、酸性ストレス、光ストレスなどによって生じる。どのストレスも、凝集へと導かれる分子レベルでの状態変化は同じである。それは蛋白質の変性である。蛋白質はその機能を発揮するために、正確な三次元立体構造を形成する。抗体の場合は、その厳密な立体構造認識により、ある特定の抗原のみ対して高い親和性をもって結合する。このことは、立体構造を安定に保つことが必要不可欠であることを意味する。この安定化を議論する際に最も注目すべきは、蛋白質の構造形成(フォールディング)の駆動力が疎水性相互作用である点である。個々の蛋白質の立体構造は、そのアミノ酸配列の中で疎水的なアミノ酸を内部に、親水的なアミノ酸を外側に配置するように立体的に折りたたまれ安定化する。ところが蛋白質が変性してしまうと、その内部の疎水部位が外側へ露出することになる。多くの蛋白質は、その疎水部位の露出を起点に、分子間で疎水性相互作用を起し、さらに蛋白質の変性が促進される。このような過程により蛋白質の部分変性は最終的に凝集体へと不可逆的に移行する<sup>[1]</sup>。

凝集体は、その粒子径から主に3つの大別されている。invisible particle (IVP, <0.1 μm), subvisible particle (SVP, 0.1-100 μm), そしてvisible particle (VP, >100 μm)である。近年の不溶性微粒子試験法においては10 μm以上の微粒子について限度値が設定されている。つまり凝集体の評価にはnmレベルのinvisible領域からμmレベルのsubvisible領域まで幅広いサイズ域の凝集体を定量的に分析・評価する技術が必要になってきているのである。Figure 1には粒子径に応じた各種分析装置の位置づけ、Table 1には文献・学会等で取り上げられたバイオ医薬品の凝集体分析に用いる主な分析装置をリスト化した。

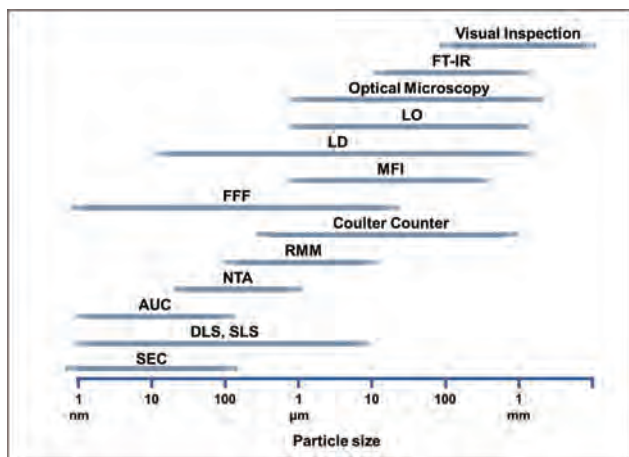


Figure 1 凝集体を検出する代表的な分析装置とそのサイズ域

## 凝集分析

Figure 1のように、会合凝集体の分析手法には、それぞれ特色のある原理に基づいた様々な装置が利用されている。ここでは全ての装置を解説することはできないため、従来より用いられてきた代表的な手法(SEC法, DLS法)とSVPにも対応できる分析技術(MFI法, quantitative LD法)について概説する。

### Size-Exclusion Chromatography (SEC)

凝集体の評価において長年用いられている分析手法としてサイズ排除カラムクロマトグラフィー (SEC)がある。従来の製剤においても、会合体・凝集体に関する定量試験法としてSEC分析法が設定されている。SECにおいては、一定のポアサイズの粒子で充填されたカラムの中に高分子を流し入れ、分子ふるいの原理に従って、大きいサイズの高分子は早く移動し、小さいサイズの高分子はポア内に入り込むことにより遅く移動する差を利用して、凝集体を分離・検出する。少量の試料(数十から数百μL)で解析が可能である。検出は主にUV検出であるため、少なくとも数百μg/mLの濃度は必要となる。分析できるサイズ範囲は 10 kDa から約500 kDaである<sup>[2]</sup>。多角度光散乱検出器(MALS)装置を検出に導入することで、正確な分子量も算出可能である。500 kDa以上のサイズが分離できないため、数十から数百nmサイズとμmサイズの粒子を分離できない。凝集体の安定性によってはカラム内で解離してしまうこともある。またカラム粒子は密に充填されているため、大きい粒子径の凝集体は詰まることがあり、0.2 μmのフィルターを通した試料による分析となってしまう、SVPの分析は困難

Table 1 文献・学会・記事等で取り上げられている主な凝集体分析装置

	Company A	News A	Center A	News B	Conference A	Paper A	Paper B
SEC	✓	✓	✓		✓	✓	✓
DLS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SLS	✓		✓			✓	✓
AUC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Nano Tracking Analysis (NTA)	✓	✓	✓		✓		✓
Resonant Mass Measurement (RMM)	✓	✓	✓		✓		
Coulter Counter	✓		✓			✓	✓
Field-Flow Fractionation (FFF)	✓				✓	✓	✓
Micro-Flow Imaging (MFI)	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Laser Diffraction (LD)		✓		✓			
Light Obscuration (LO)	✓	✓				✓	✓
Optical Microscopy	✓	✓	✓			✓	✓
Infrared Microscopy/FT-IR	✓		✓				✓
Visual Inspection	✓	✓	✓			✓	✓

[Company A] <http://www.coriolis-pharma.com/service-and-key-expertise/aggregate-and-particle-analysis/protein-aggregation-analysis/>

[Center A] <https://mvsc.ku.edu/content/particle-characterization-submicron-subvisible-and-visible-particles>

[News A] <http://www.biopharminternational.com/analyzing-protein-aggregation-biopharmaceuticals-0>

[News B] <http://www.chemengonline.com/particle-sizing-technology-selection/?printmode=1>

[Conference A] <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/158757-Protein-Aggregation-at-PepTalk-2014/>

[Paper A] J. Pharm. Sci. (2010) 99, 3302-3321.

[Paper B] J. Pharm. Sci. (2012) 101, 914-935.

である。さらに抗体の種類によってはカラムに非特異的に吸着し、分離能の低下、分子量の概算が容易ではなくなる場合も多く、SECでは実際の凝集体のサイズ・量を低く見積もってしまう場合がある。このような場合、溶出溶媒への添加剤としてL-アルギニン塩酸塩を一定濃度加えることで改善される。Figure 2にモノクローナル抗体のSEC分析例を示す。酸性条件にて精製されたモノクローナル抗体は単量体以外にも、二量体と多量体に相当するピークが観察される。

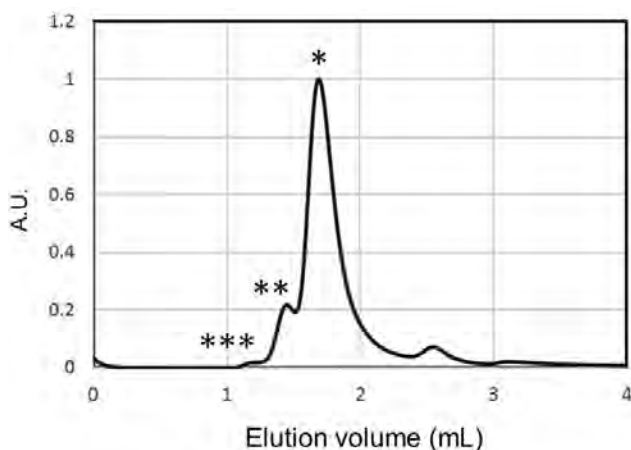


Figure 2 モノクローナル抗体のSEC分析例。プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。(\*)単量体ピーク、(\*\*)二量体ピーク、(\*\*\*)多量体ピーク。

### Dynamic Light Scattering (DLS)

先述のSECと並んで簡便かつ迅速に解析できる分析機器の1つである動的光散乱分析(DLS)も広く活用されている。液中の分子や粒子のブラウン運動は、レーザー光を照射するとその分子・粒子サイズに応じて異なる強度で散乱を引き起こす。DLSはこれらの強度の変化を解析することでブラウン運動の速度を算出し、ストークス・アインシュタインの式から粒子径を求める装置である。少量の試料(数十から数百 $\mu$ L)で測定可能で、フィルターを通さなくても測定可能である。分析できるサイズ範囲はサブnmから数十 $\mu$ mである。継時的な変化や温度変化におけるサイズ変化を追うこともできる。一方でSECのようにサイズを細かく

分離することはできず、大まかな粒子径分布として計測され、定量的な解析も適さない。また散乱強度の大きい粒子径の大きな分子が共存している場合、小さい分子が検出、またはずれる場合がある。Figure 3にモノクローナル抗体のDLS分析例を示す。モノクローナル抗体を酸性条件で分析すると、数百nmレベルの大きな粒子径をもつ粒子の存在が観察される。

### Field Flow Fractionation (FFF)

FFF法はメンブレン(薄層, 厚みは100~500  $\mu$ m)中で粒子を分離・分析する手法である。

薄層はフロー系となっており、その中では流れが放物線の上に層流している。そこに垂直な圧力を加えると粒子は薄層の端に向かって移動する。その結果、拡散速度が低い大きな粒子ほどこの力に押されて移動速度は低下し、SECとは逆に小さい分子サイズが先に溶出し、大きな分子サイズをもつ分子種は後に溶出される。試料量や濃度などはSECと同程度でよく、MALS装置の併用も可能である。FFF法ではSECのような固定相との接触がないため、弱い会合体の分解が起きにくく、またサイズ範囲がより大きいSVP領域も、SECに比べて分離し分析することができるとされており、近年注目されている<sup>[3]</sup>。FFF法の分析例をFigure 4に示す。モノクローナル抗体の単量体ピークが先に、より大きい分子サイズが後に溶出される。

### Micro-Flow Imaging (MFI)

SECやDLSではInvisible領域、大きくてもサブ $\mu$ mまでの分子径しか評価できない。それ以上の分子径をもつ、subvisible領域の会合凝集体を測定できる分析機器の1つとしてmicro-flow imaging (MFI)がある。たとえばEli Lilly社は不溶性微粒子検出に対するMFIの有用性を議論している<sup>[4]</sup>。MFIはマイクロ流路内を流れる試料に対して、直接デジタルカメラによる撮影を行い、その画像処理から粒子のサイズ個数、さらに画像も観察することができる。したがってその粒子が、蛋白質の凝集体なのか、気泡なのか、その他の混入物なのかを正確に知ることができる<sup>[5]</sup>。試料の量は数百 $\mu$ Lから1 mL必要であるが、数百 $\mu$ g/mL以下の

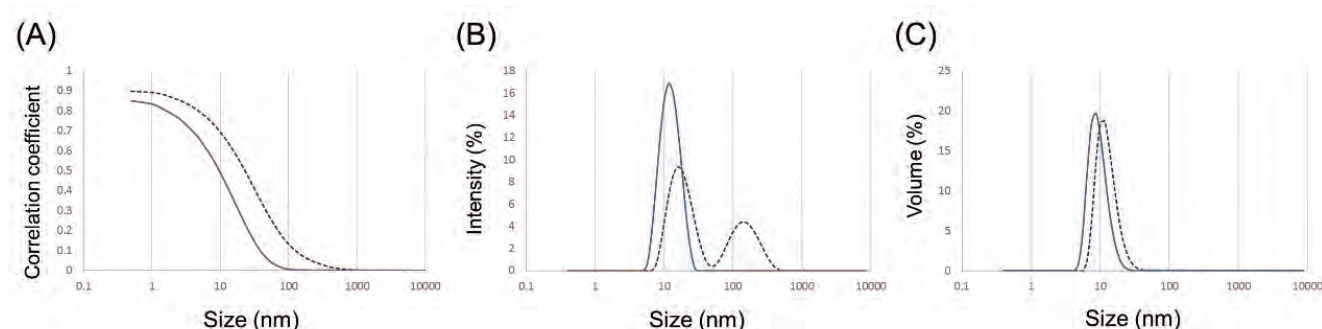


Figure 3 モノクローナル抗体のDLS分析例。点線はプロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。実線はSEC精製後の単量体画分の試料。(A) Correllograms, (B) intensity分布グラフ, (C) Volume分布グラフ。



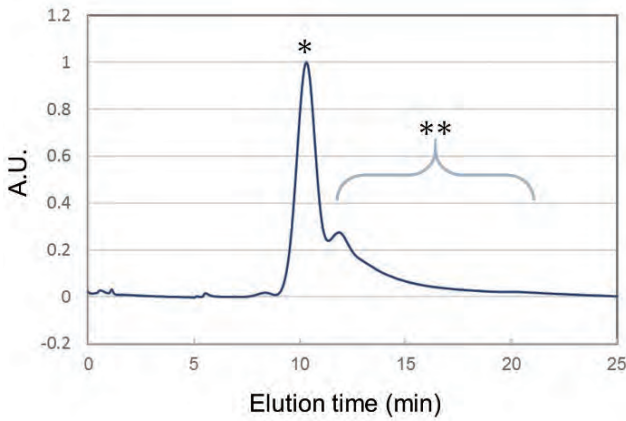


Figure 4 モノクローナル抗体のFFF分析例。プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。(\*)単量体ピーク、(\*\*)二量体以上の会合体・凝集体画分。

濃度でも解析可能である。分析できるサイズ範囲は1-100 μmであり、10 μm間隔で粒子を分類し、その個数と代表的な画像を残す。比較的多量の試料を分析するため、データの定性的な再現性は高い。その一例をFigure 5に示す。抗体は酸性条件下でμmサイズの粒子(SVP)を形成しやすく、時間と共に増加することが分かる。さらに画像データからは、数十nmサイズにおいて糸くずの塊のような形状をした粒子が観察される。

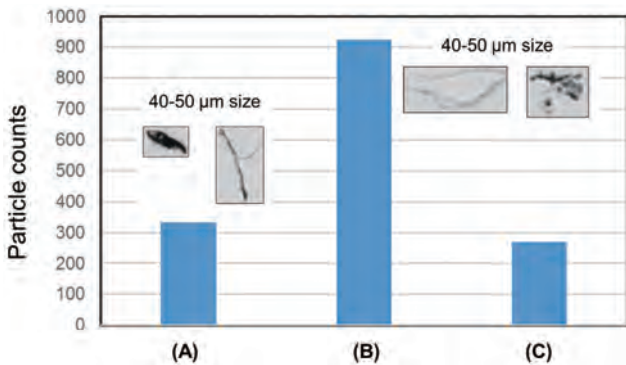


Figure 5 モノクローナル抗体のMFI分析例。プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した30分後(A)と2時間後(B)の試料。(C)SEC精製後の単量体画分の試料。

### Quantitative Laser Diffraction (qLD)

従来より、粒子からの散乱角度に依存した光強度分布の空間的なパターンに基づくレーザー回折・散乱法(LD法)が相対粒子量(全体を100%とした際の割合)を求める際に用いられてきた。近年、粒子の個数や濃度を精密に評価する重要性がでてきたことを踏まえて、標準粒子による校正とMie散乱理論に基づく補正を加えることにより、個数濃度や体積濃度を求めることを可能にした定量レーザー回折・散乱法(qLD法)が開発されている。本分析手法は主にSVPを定量的に分析することができる。このqLD法を搭載した分析装置としてSHIMADZUのAggregate Sizerがある<sup>[6]</sup>。この装置の特徴は、攪拌ストレスによる凝集体形成を追跡し、継時変化におけるSVPの変化量を観察することができる。その一例をFigure 6に示す。時間変化と共にSVPの量が増加しており、特に酸性条件下ではその量も多く、SVPの生成速度も速くなっている。

### 糖鎖状態を指向した物性評価

抗体医薬品のほとんどはIgG型であり、その重鎖Fc領域のアスパラギン(N297)にはN型糖鎖が付加している。抗体のN型糖鎖パターンは抗体の安定性、生物活性および免疫原性等に影響を与えることが知られている。中でも、抗体医薬の主要な作用機序の一つである抗体依存性細胞傷害活性(ADCC活性)は、糖鎖構造の影響を大きく受けるため、臨床効果を高めるための糖鎖改変がなされた抗体医薬の開発が盛んに行われている。その一方で、中和抗体やアゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体を用いた抗体医薬においてはADCC活性が不要あるいは望ましくない場合があり、糖鎖を欠如あるいは改変させることでADCC活性を消失させた抗体の利用が検討されている。しかしながら、糖鎖が付加しないアミノ酸変異体や酵素処理により糖鎖を完全に除去した抗体では、熱安定性の顕著な低下や凝集性の上昇がみられる。以上のように糖鎖構造は抗体医薬の性能に大きな影響を与えることから、高機能、高品質な医薬品用抗体を開発するためには、抗体の糖鎖構造の最適化が重要であると考えられる。ここでは、糖鎖構造最適化のための技術開発として熱測定を活用した研究例を紹介する。

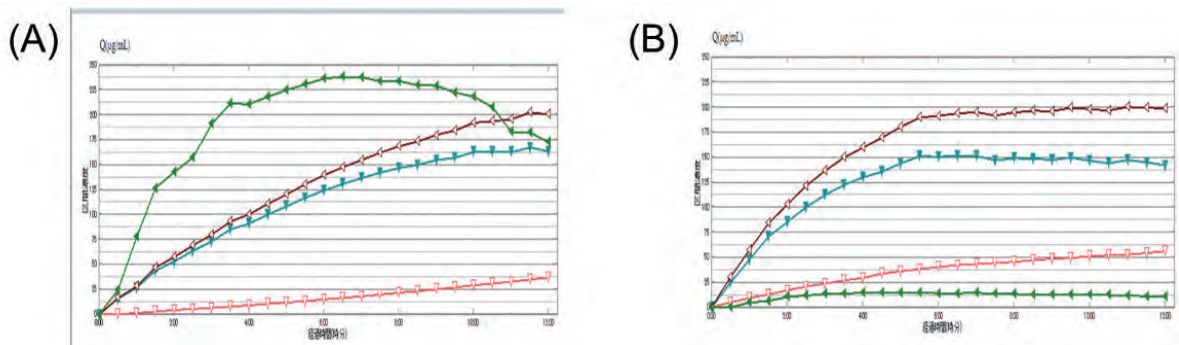


Figure 6 モノクローナル抗体のqLD分析例。(A)プロテインAカラムから酸性緩衝液(20 mM クエン酸Na, 150 mM NaCl, pH 3.0)で溶出した際の試料。(B)SEC精製後の単量体画分の試料。(緑)10 μm以上、(赤)0.2-1.0 μm、(青)1.0-10 μm、(茶)0.1-10 μm。

モノクローナル抗体の糖鎖構造は均一ではない。その不均一な糖鎖を分離する技術の1つとして、Fc受容体FcγRIIIAをベースとして設計されたりガンドを固定化したアフィニティーカラム (FcRカラム)が、モノクローナル抗体のN-グリカン分析、分離する非常に有効な手段であると考えられる。医薬品リツキサンをFcRカラムに通すと、リツキサンは主に3つピークに分離された<sup>[7]</sup> (Figure 7A)。またExpi293 (HEK293)やExpiCHO (CHO)細胞で発現された組換え抗体においても同様の傾向が観察され、さらにそれらの分離ピーク強度が異なることも明らかとなった<sup>[8]</sup>。これらのピーク分離やその強度の違いは、N-グリカンの末端糖鎖(ガラクトース残基)の含有率の違いによることが明らかとなった。興味深いことに、この糖鎖構造の相違がADCC活性にも影響を及ぼす可能性が示唆された。これらの熱安定性をDSCで評価したところ、CH2ドメインの変性温度(Tm1)が僅かであるが異なる可能性が示唆された。このことは、抗体産生における糖鎖修飾反応は細胞株によって差異があるだけでなく、現在使用されている抗体医薬品の糖鎖構造には分布があり、抗体の蛋白質の物性(熱安定性)に影響を与えていることを示すものである。

これまで医薬品用抗体の産生にはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が最も多く用いられてきたが、コストの面

から、酵母、植物および昆虫細胞等を用いた抗体の産生が検討されている。動物、ヒト、植物、昆虫はそれぞれ特有の糖鎖プロセッシング機構を持ち、異なる糖鎖パターンの蛋白質を産生する。そこで、糖転移酵素の共感染により簡便に糖鎖改変体を産生できるカイコバキュロウイルス発現系を用いることによって、カイコで発現させる蛋白質の糖鎖修飾パターンをヒト型、動物型に改変する研究が進められている。著者らは抗Her2抗体をモデルに、カイコバキュロウイルス発現系をベースとした糖鎖パターンの異なる抗体の機能と熱測定を行った<sup>[9]</sup> (Figure 7B)。カイコバキュロウイルス発現系由来抗体では、昆虫型として知られる少マンノース型、CHO細胞由来抗体では、動物型として知られるN-アセチルグルコサミン型糖鎖が主に検出された。また、カイコバキュロウイルス発現系においてN-アセチルグルコサミン転移酵素を共感染させることにより取得した糖鎖改変抗体では、動物型として知られるN-アセチルグルコサミン結合型糖鎖の割合が増加していた (Figure 7B)。DSCによる熱安定性解析を行ったところ、CH2の変性温度(Tm1)がCHO細胞発現系、糖鎖改変カイコバキュロウイルス発現系、カイコバキュロウイルス発現系の順に高く、少マンノース型の非還元末端にNアセチルグルコサミンが付加することより安定性が向上することが示唆された。レポーターアッセイ法によりADCC活性を評価した結果、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体とCHO細胞由来抗体の

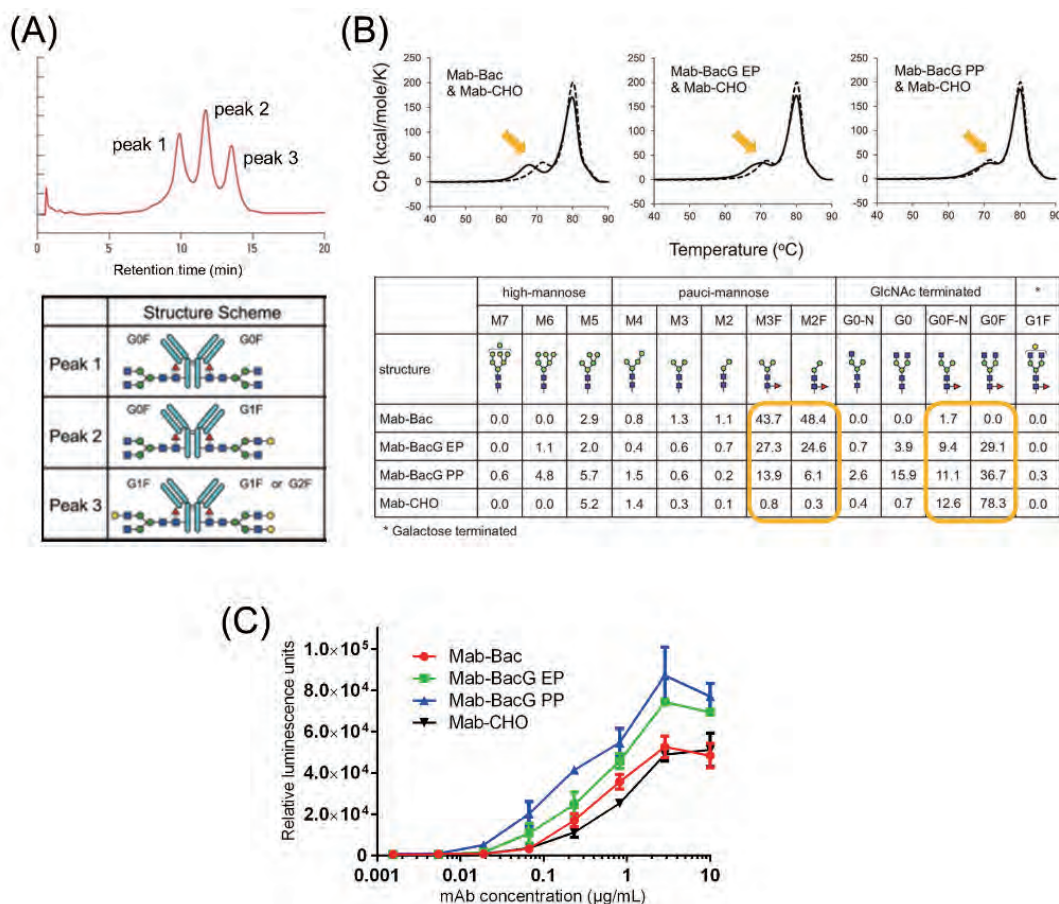


Figure 7 (A) FcRカラムによるリツキサンのピーク分離と糖鎖構造の違い、(B) 発現細胞の違いによる糖鎖構造変化とDSC測定による熱安定性変化、(C) ADCC活性 (Mab-Bac: 昆虫細胞, Mab-BacG EPおよびPP: N-アセチルグルコサミン転移酵素導入細胞, Mab-CHO: CHO細胞)

活性は同程度であったが、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の活性はカイコバキュロウイルス発現系由来抗体よりも上昇していた。フコース残基をもたない糖鎖では、N-アセチルグルコサミン結合型糖鎖を持つ抗体は、少マンノース型糖鎖をもつ抗体よりもADCC活性がわずかに高いことが報告されていることから、Nアセチルグルコサミン結合型への糖鎖改変と、糖鎖改変に伴うフコシル化糖鎖の減少により、ADCC活性が向上したと考えられる<sup>[9]</sup> (Figure 7C)。実際にカイコバキュロウイルス発現系由来抗体の安定性を動物細胞由来抗体と同等以上に向上させるためには、糖鎖修飾以外に安定性に影響を与える因子を明らかにすることが必要である。また、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の糖鎖改変が抗体クローンにより大きく異なることから、糖鎖改変効率をコントロールする方法の開発が望まれる。

## 高濃度分析技術

承認されている抗体医薬品は注射剤が多く、そのため蛋白質濃度は数10 mg/mLから100 mg/mLと非常に高い。蛋白質の高濃度化は、凝集体の形成を促進させ、抗体の不活化、さらには沈殿物として不可逆的な状態で堆積することがある。そのため高濃度溶液の物性評価は品質管理の観点から非常に重要なステップの1つとなっている。しかし蛋白質溶液の分析は一般的に数mg/mL前後で実施することが多いため、高濃度の蛋白質溶液をそのまま分析する技術には限りがある。その主な原因は、高濃度による粘性や吸光度の増大である。そのために多くの分析技術は分析のためのサンプル調製や検出が困難になる。そこでここでは高濃度における詳細な分子レベルでの(特にコンフォメーション)知見を得るために、近年注目されている分析技術、ラマン分光法について紹介する。

ラマン分光法は、その検出原理より10 mg/mL以上の高濃度条件を必要とすることから、抗体医薬品をそのまま解析することができる。得られるラマンスペクトルより、蛋白質主鎖の二次構造、水素結合の状態、コンフォメーション、蛋白質表面の側鎖の局所環境変化などを議論することができ、蛋白質間相互作用に関する情報を得ることも可能である<sup>[10-13]</sup>。特に威力を発揮する分析技術として使われる情報

に、各種のアミノ酸側鎖に関する官能基レベルでの分子状態、相互作用状態がある。このような特色から、近年では抗体医薬の品質管理技術の1つとしてのラマン分光の位置づけが高まってきている<sup>[14-16]</sup>。

我々はラマン分光法を用いて、低濃度から高濃度へと抗体溶液が変化する際に、3段階の相互作用変化が少なくとも起きていることを明らかにしている (Figure 8)<sup>[12]</sup>。まず1段階目は抗体表面を覆う水和水が蛋白質濃度の上昇と共に脱水する変化である。これは2800  $\text{cm}^{-1}$ からの4000  $\text{cm}^{-1}$ 間のIgGに由来するC-H伸縮と水分子に由来するO-H伸縮のスペクトル変化から観察された。そして2段階目として、抗体1分子間の距離が近づくことによる双極子-双極子相互作用が強くなり、抗体同士が分子間で相互作用する様子が1856/1830のスペクトル強度比より観察された。その際に表面の水和水がさらに解離する様子も観察されている。そしてさらに高濃度領域になると、3段階目として1856/1830のスペクトル強度比から抗体分子間の相互作用はさらに強まり、CH- $\pi$ 相互作用が大きな役割を果たす可能性が示唆された。

このようにラマン分光を用いて高濃度製剤に対する抗体の分子特性を明らかにできることが分かりつつある。抗体の品質管理に関する最新の総説においても、ラマン分光は重要な位置づけにあることがうかがえる<sup>[17]</sup>。最近の研究では、凝集抑制のために用いられる添加剤に関するラマンスペクトルへの影響についての報告がなされた<sup>[18]</sup>。高濃度下において凝集抑制剤の添加は必要不可欠であるため、実際の製剤サンプルに対しては、ラマンスペクトルのより正確な分析が必要となる。さらにラマン分光を活用した抗体評価に関する別の研究例として、培養条件の違いにおける抗体の糖鎖修飾モニタリングや<sup>[19]</sup>、また抗体の劣化(化学修飾など)に対してラマン分光を活用する例も報告されている<sup>[20]</sup>。このような分析が高濃度サンプルにおいてどのような議論が可能かなど、今後もラマン分光分析による新たな評価項目の拡張が期待される。

## おわりに

本稿では、次世代抗体医薬品の開発に重要な最先端の分析

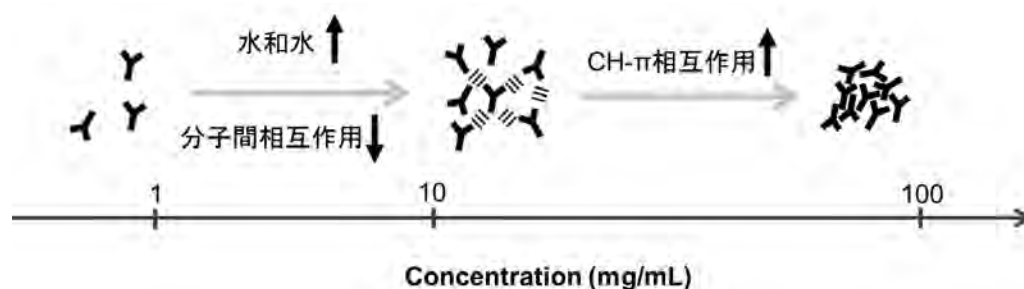


Figure 8 ラマン分光法より観察された抗体の濃度変化に伴う蛋白質間相互作用と水和水の変化

技術に関する研究例を紹介した。抗体の分子設計、抗原の分子情報には、分子動力学計算が威力を発揮し始めている。またさらに品質管理においては、多様性を有する糖鎖構造が重要な機能を示すために、その発現系の選択とコントロールを、簡便かつ迅速に分析することが必須になっている。今まで不可能とされてきた、修飾糖鎖を化学的に加工する技術の開発が進んでいることも指摘しておくべきである。さらには高濃度の抗体医薬品をコロイダルおよびコンフォメーションな観点より分析することができる技術が着実に確立しつつある。AIをフル活用した各種分析もはや遠い未来の話ではなくなっていることを付記しておきたい。

\*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] A.L. Fink, Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid, *Fold. Des.* 3, R9-23(1998).
- [2] T. Ito, K. Tsumoto. Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress, *Protein Sci.* 22, 1542-1551 (2013).
- [3] W. Fraunhofer, G. Winter, The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceuticals, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 369-383(2004).
- [4] D.K. Sharma, P. Oma, M.J. Pollo, and M. Sukumar, *J. Pharm. Sci.* 99, 2628-2642(2010).
- [5] E. Krayukhina, K. Tsumoto, S. Uchiyama, K. Fukui. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins, *J. Pharm. Sci.* 104, 527-535(2015).
- [6] S. Totoki, G. Yamamoto, K. Tsumoto, S. Uchiyama, K. Fukui, Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles, *J. Pharm. Sci.* 104, 618-626(2015).
- [7] Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Tada M, Tamura H, Tanaka T, Terao Y, Morante K, Harazono A, Hashii N, Shibata H, Kuroda D, Nagatoishi S, Oe S, Ide T, Tsumoto K, Ishii-Watabe A. *Sci. Rep.* 8, 3955(2018)
- [8] Kosuge H, Nagatoishi S, Kiyoshi M, Ishii-Watabe A, Tanaka T, Terao Y, Oe S, Ide T, Tsumoto K. *Biotechnol. Prog.* e3016 (2020).
- [9] Egashira Y, Nagatoishi S, Kiyoshi M, Ishii-Watabe A, Tsumoto K. *J. Biochem.* 163, 481-488(2018).
- [10] Z. Q. Wen, Raman Spectroscopy of Protein Pharmaceuticals, *J. Pharm. Sci.* 96, 2861-2878(2007).
- [11] A. Rygula, K. Majzner, K. M. Marzec, A. Kaczor, M. Pilarczyk, M. Baranska, Raman spectroscopy of proteins: a review, *J. Raman Spectrosc.* 44, 1061-1076(2013).
- [12] C. Ota, S. Noguchi, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy, *Pharm. Res.* 33, 956-969(2016).
- [13] C. Ota, S. Noguchi, K. Tsumoto, The molecular interaction of a protein in highly concentrated solution investigated by Raman spectroscopy, *Biopolymers* 103, 237-246(2015).
- [14] Rolinger L, Rüdert M, Hubbuch J, A critical review of recent trends, and a future perspective of optical spectroscopy as PAT in biopharmaceutical downstream processing, *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 2047-2064(2020).
- [15] Murali K. Maruthamuthu, Scott R. Rudge, Arezoo M. Ardekani, Michael R. Ladisch, Mohit S. Verma, Process analytical technologies and data analytics for the manufacture of monoclonal antibodies, *Trends Biotechnol.* 38, 1169-1186(2020)
- [16] Yoann Le Basle, Philip Chennell, Nicolas Tokhadze, Alain Astier, Valérie Sautou, Physicochemical stability of monoclonal antibodies: A review, *J. Pharm. Sci.* 109, 169-190 (2020)
- [17] Anurag S Rathore, Saxena Nikita, Garima Thakur, Navnath Deore, Challenges in process control for continuous processing for production of monoclonal antibody products, *Curr. Opin. Chem. Engineer.* 31, 100671(2021).
- [18] Alaa A. Makki, Victor Massot, Hugh J. Byrne, Renaud Respaud, Dominique Bertrand, Elhadi Mohammed, Igor Chourpa, Franck Bonniera, Understanding the discrimination and quantification of monoclonal antibodies preparations using Raman spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 194, 113734(2021)
- [19] Meng-Yao Li, Bruno Ebel, Cédric Paris, Fabien Chauchard, Emmanuel Guedon, Annie Marc, Real-time monitoring of antibody glycosylation site occupancy by in situ Raman spectroscopy during bioreactor CHO cell cultures, *Biotechnol. Prog.* 34, 486-493(2018).
- [20] Bethan S McAvan, Leo A Bowsher, Thomas Powell, John F O'Hara, Mariangela Spitali, Royston Goodacre, Andrew J Doig, Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics, *Anal. Chem.* 92, 10381-10389(2020).

## 適正な臨床検査を実施するための原則とは

### Principles of Good Practice for Laboratory Medicine

前川 真人

MAEKAWA Masato

浜松医科大学医学部 臨床検査医学  
教授 博士 (医学)

Professor

Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine.

MD, PhD



臨床検査は客観的な情報を提供してくれるため、医療にとって欠かせないものであり、診療上の決定に寄与する割合が60~70%と言われる。従って、臨床検査はいつでもどこでも同等の結果を提供する必要がある。そのためには、分析前プロセス、分析プロセス、分析後プロセスを適確に管理し、標準化とハーモナイゼーションを進めることが肝要である。臨床検査結果が標準化されれば、多数の方から経時的に収集し、遺伝的要素・生活習慣・生体情報・画像検査情報をはじめ、オミックス解析などの研究成果を臨床所見と組み合わせたビッグデータを人工知能と組み合わせることで、究極の個別化医療が期待される。

Laboratory medicine gives us indispensable for medicine and objective information, and the proportion of the influence of laboratory medicine upon clinical decisions is from 60 to 70%. Therefore, laboratory medicine should supply standardized results both at all times and all laboratories. For this purpose, total laboratory process consisted of pre-analytical, analytical and post-analytical process shall be precisely managed, and standardization or harmonization of laboratory medicine shall be promoted. Standardized laboratory medicine would be expected to lead to ultimate personalized medicine (precision medicine) by integration of artificial intelligence and big data, for example longitudinal personal laboratory results, genetic factors, lifestyle habit, biological information, imaging information, research outcomes including omics analysis and clinical findings.

### はじめに

国際臨床化学連合(IFCC)のホームページ内には、臨床検査医学はヘルスケアにとって隠れた宝物a hidden treasure in health careであると示されている<sup>[1]</sup>。すなわち、電子カルテに記載された客観的データの94%、臨床的な決定に影響を与える割合は60-70%、緊急異常値の報告によって影響される臨床的な決定に関与するものの90%、各種診療ガイドラインに記載されているうちの37%、種々の疾患領域や増大するコンパニオン診断に関与している割合が23%を占めているとのことである。なるほど、臨床検査、特に検体検査データはデジタルで表される結果が多いため客観的な根拠となりやすく、そのまま診療に用いられる傾向がある。しかし、測定値は種々の誤差を含む危険性があるため、常に安定した検査結果を得るためには留意すべきことが多々存在する。

すなわち、診療に重要な役割を有する臨床検査を有効活用

するためには、いつでもどこでも同じ適正な結果が得られるように管理することが重要である。そのためには、臨床検査値の変動要因を知り、それを最小限に抑えるとともに、分析の質保証を行い、標準化とハーモナイゼーションを進めることである。

### 臨床検査のプロセス

臨床検査、特に検体検査は、検査依頼から始まり、検体採取・前処理などの分析前プロセス、いわゆる測定を行う分析プロセス、結果を検証して解釈し、次のステップに繋げる分析後プロセスに分けることができる(**Figure 1**)。今は、新型コロナウイルス感染症の検査としてPCR検査が有名になったが、PCR検査も検体採取して、核酸抽出、PCRによって目的配列を増幅して検出、判定するという一連の作業から成り立っている。それゆえに検査結果が正しくない場合にはどのプロセスに問題が生じたのかをプロセスごとに検証する必要が発生する。たとえば偽陰性だった場合、PCR

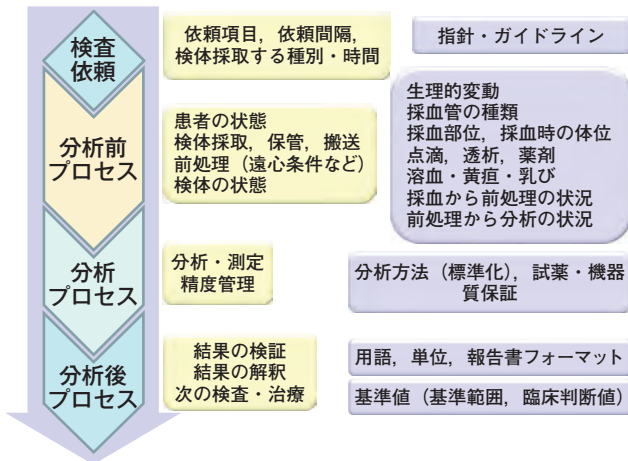


Figure 1 Total Testing Process of Laboratory Diagnostics

による検出が不適切だったか、検体採取がまずかったかは、確認する必要がある。重要なことは、各プロセスを最適化し、できる限り干渉要因を最小化し、病態(個性)による変動を適確に反映させた測定結果を得ることである。すなわち、真に診療に有用な臨床検査とするためには、検査の質保証と質確保が重要であり、方法の分析的妥当性を確保した上で、内部精度管理、外部精度保証を実施することが肝要である。

### 臨床検査値の変動要因

分析前・分析・分析後プロセスという3つのプロセスの中で、どこで最も検査過誤が発生しているかについて検討した報告によると、全ての検査過誤の60~70%が分析前プロセスに発生しているとのことである<sup>[2]</sup>。その原因としては、患者の取り違い、点滴液の混入、不適切な検体、溶血や乳びなど、自動化しづらく、人が介在しなければならない作業が多く、いわゆるヒューマンエラーが生じやすいプロセスと考えられる。また、外来患者よりも入院患者で試料の不備が高頻度で発生していることから、検査室が介在しにくい場所で過誤が発生しやすい状況になっていると考えられる。分析プロセスは自動化が進んでいるためか、最も少なくなっている。

#### 1) 生理的変動 — 分析前プロセス

分析前プロセスの中でも臨床検査値の変動に大きく関与しているのが、生理的変動であり、Table 1のように個体内変動と個体間変動に分けて考えることができる<sup>[3, 4]</sup>。Table 2には、Westgardのホームページから抜粋した腫瘍マーカーと生化学検査項目の個体内変動と個体間変動を示した<sup>[5]</sup>。生化学検査項目として日常検査で測定される項目の中で、ALPやTCは個体内変動/個体間変動(個体性指数)が小さい代表とされるもので、逆にナトリウムなどの電解質は個体性指数が大きいのが特徴である。腫瘍マーカーの多くは極めて個体性指数が小さく、従ってデータ判読では変動を厳しくみること、集団で得たカットオフ値よりも個別に

Table 1 Biological Variation Factors of Laboratory Data

種類	変動要因
個体内変動	日内変動
	日差変動, 季節間変動
	食事, 運動
	体位(採取時) 妊娠, 性周期
個体間変動	性別, 人種, 遺伝的個体差, 血液型 年齢, 職種 生活環境・生活習慣(食, 運動, 飲酒, 喫煙)

Table 2 Biological Variation Examples

検査項目	個体内変動	個体間変動	個体性指数
AFP	12.0	46.0	0.26
CA19-9	16.0	102.0	0.16
CEA	12.7	55.6	0.23
CA15-3	6.2	62.9	0.10
CA125	24.7	54.6	0.45
CYFRA 21-1	22.5	31.1	0.72
ALP	6.4	24.8	0.26
TC	5.4	15.2	0.36
Na	0.7	1.0	0.70

カットオフ値を意識した方がよいことを示している。

個体内変動は、文字通り、同一人物でもいつ、どのように検体を採取するかによって検査結果が変動することを示し、主に短期的な変動要因によるものとして日内リズム、食事、運動、体位などがある。一方、個体間変動は、人によって異なる要因を示し、避けられない生理的因子があげられる。性別、年齢、遺伝、生活習慣、職業居住環境などがあり、極めて大きな変動を示す検査項目もあるので注意が必要である。初診時に基準範囲と比較する時は特に注意が必要であり、健常者であっても基準範囲から逸脱する原因にもなりうる。

食事は短期的に個体内変動に影響する血糖値などがある一方、食習慣は個体間変動の要因となる。遺伝は個体の特性を示すため個体間変動の要因となるが、食事による短期的な変動の大小にも関係するため、広義では個体内変動にも影響を与えていると言える。

このように臨床検査値に大きな影響を及ぼす生理的変動に関して、IFCCのヨーロッパ支部のEFLM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)には生理的変動に関するワーキンググループがあり、各種項目の研究論文が掲載されている<sup>[6]</sup>。また、EFLM Biological Variation Database からは、500以上の参考論文、2000以上の生理変動の記録、200以上の分析物の記録が検索できる<sup>[7]</sup>。

## 2) 検体の採取方法・処理方法 — 分析前プロセス

検体の採取方法や処理方法も、患者の診療に有益で適切な検査結果を得るために非常に重要である。以下に例示する。

### ① 病態変動

脱水による濃縮や希釈は、患者自身に生じている病態でもある検査値に影響を与える要因である。一方、手術・輸血・輸液・透析・薬物投与など、医療処置が検査値に影響を与える場合がある。たとえば、グルコースを含む輸液中の患者からの採血で、輸液が混入することで血糖値が偽高値となり、インスリン投与によって低血糖の高リスクとなるなど、生命の危険にも直結する事案がたびたび注意喚起されている<sup>[8]</sup>。薬物投与によって尿酸値に影響を与えることがあるなど、知っておくべき事案はたくさんある。

### ② 検体採取量

現在、採血は主に真空採血管が使用されているが、採取量は真空度によって規定される。抗凝固剤が入っている採血管では採取する血液量が決まっているため、特に液体の抗凝固剤であるクエン酸ナトリウムを使用する凝固検査などでは、採血量が変わると血液の希釈量が変わってしまうため、結果に影響する。適正な採血が必須である。

### ③ 検体の性状

採血した検体が溶血、黄疸、乳び・濁りの場合に影響を受ける項目がある。特に、検査値に影響する原因として溶血が大きな問題となる。溶血により、赤血球中に多く含まれる乳酸デヒドロゲナーゼ(LD)やカリウムなどが血清や血漿に出てくるため、それらの偽高値を示すだけでなく、ヘモグロビンの赤色が比色法で測定する検査項目に影響する可能性がある。

### ④ 血清と血漿

生化学・免疫検査の試料として、血漿と血清のどちらを使用するのがよいかという議論はよく行われる。項目によって血清か血漿のいずれかでしかだめなものもある。血漿の方が、赤血球や血小板からの由来成分の影響を受けにくく生体内の状態を反映していると考えられること、測定までの時間が短縮でき取量が多いことなど、理論上・操作上の利点があげられる。しかし、フィブリノーゲンによる免疫反応の非特異反応や血小板の混入による影響や、万能の抗凝固剤がないなどの欠点や限界もある。特に、遠心条件(回転数・時間・温度)が血小板の混入の割合に影響するため、どこでも同じ条件での血漿をとるのは容易ではない。特に、新しくバイオマーカーを開発する時、血漿と血清、いずれを使用するかは難しい課題である。遠心条件によってデータが変わるようでは、カットオフ値が意味の無いものになってしまう、診療に使えないことになるため、最初から分析前プロセスの標準化を意識しておくのが望ましい。

### ⑤ 検体採取から前処理まで、前処理から測定まで

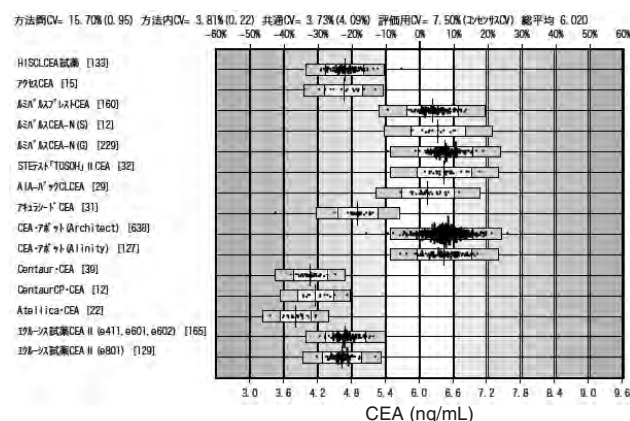
採血してから遠心分離まで、遠心分離後測定までの検体の保管温度や時間によって、測定値が変化する項目もあるため、できる限り迅速に対応する必要がある。尿検査などは、簡便な試験紙による尿定性検査や尿沈渣の検査では、特に新鮮尿を測定する必要があるが、日常診療や治験などで外部の衛生検査所に時間をかけて搬送されていることがあるようで、データに信頼性が確保できない場合がある。

### ⑥ 検体の保存

検体採取後に直ぐに測定できない場合、前処理をした後に保存することがある。その場合、検体の保存温度は物質の安定性に大きな影響を及ぼす。たとえば、ALT, LD, PSA, インスリンの4種類だけを見ても、項目によって保存温度による安定性が異なるため、これらの特性を理解して、最適の条件で保存する必要がある<sup>[9]</sup>。

## 測定 — 分析プロセス

正しく質保証された分析が行われることが重要である。標準化やハーモナイゼーションが進み、いつでもどこでも同じ結果が得られるのが大切であるが、検査項目によっては極めて困難なものもある。免疫アッセイでは多くの試薬・分析機が市場にあり、同じ項目を測定しているのにデータがバラバラな項目もある。日本医師会主催の臨床検査精度管理調査での腫瘍マーカーの一つであるCEAの結果をFigure 2に示す<sup>[10]</sup>。これらの項目では標準操作法や標準物質を準備することが困難であるため、どこでも同じ結果を出すためにはまだまだ時間がかかりそうである。なお、標準化とハーモナイゼーションは、ISO 17511で使い分けられている(Table 3)。すなわち、標準操作法で値付けされた標準物質の測定値を下位の測定法に伝達していくトレーサビリティチェーンが重要である(Figure 3)。分析によって得られた結果は、リアルタイムで内部精度管理が行われており、この作業は分析プロセスでもあり、分析後プロセ



Example from EQA scheme in 2020 sponsored by Japan Medical Association

Figure 2 Distribution of External Quality Assessment (EQA) Scheme for Carcinoembryonic antigen (CEA)



Table 3 Traceability classification of ISO 17511

分類	標準測定法	1次標準物質 (純品の標準物質)	2次標準物質 (値付けされた標準物質)	例
1	あり	あり SI単位にトレーサブル	あり	電解質, Glu, コルチゾール
2	あり	なし	あり	酵素
3	あり	なし	なし	凝固因子
4	なし	なし	あり	蛋白質, 腫瘍 マーカー, HIV
5	なし	なし	なし	蛋白質, EBV, VZV

Harmonization

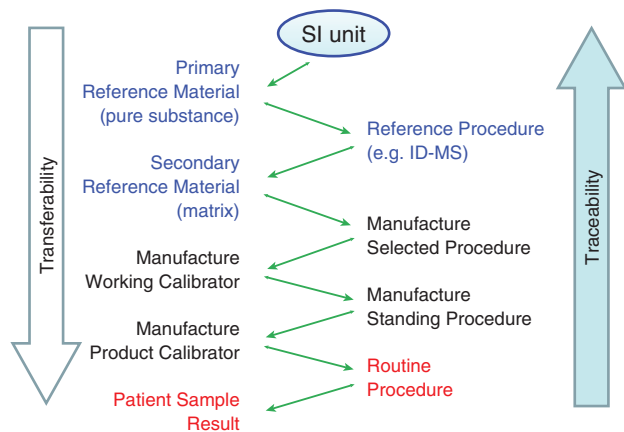


Figure 3 Traceability chain based on ISO 17511

スとも言えるため、結果の質保証として、まとめて次の項で記載する。

### 臨床検査の質保証

平成30年12月1日より改正医療法が施行され、院内で検体検査を行うすべての病院および診療所に以下の3つが義務化された<sup>[11]</sup>。

- ▶ 検体検査の精度管理責任者の配置
- ▶ 標準作業書の常備と従事者へ周知
- ▶ 作業日誌・台帳の作成

また同時に、下記の3つが努力義務となった。

- ・ 内部精度管理の実施および統計学的精度管理台帳の作成
- ・ 外部精度管理調査への参加および外部精度管理台帳の作成
- ・ 検査業務従事者に必要な研修を受けさせること

このように、医療機関などの検査担当部署において検査結果の質保証を行うべしという法律が制定されたことになる。

さて、精度管理は工業分野での品質管理から始まり、それ

を臨床検査が応用するに至ったわけであるが、両者には大きな違いがある<sup>[12]</sup>。すなわち、工場における品質管理は、常に同じ物を精度良く作製するように管理するためのものである。一方、臨床検査では管理したいものは患者試料の測定の妥当性であるが、そのために管理試料という患者試料ではないものを複数回測定して、それが精度良く測定できているかを管理するもので、管理している対象が本来の目的物ではない。従って、管理試料の測定値を管理するだけでは足りず、患者試料の測定値を管理する方法が必要である。すなわち、別途に患者試料の管理法として、個別検体管理を行っている。具体的には異常値チェック、関連項目との比のチェック、デルタチェック(時系列での大きな偏位)などを行っている。これが、いつでも同じ結果が出るように日々行う内部精度管理である。

それに加えて、外部精度管理調査に定期的に参加して調査試料を測定し、自施設の分析能力を推し量るとともに、他施設との隔たりを評価することが大切である。

### おわりに

臨床検査医学、特に検体検査は数値データが得られる客観性に富んだ情報を提供してくれる。従って、先述したように、臨床検査の各プロセスを適確に管理し、標準化とハーモナイゼーションを進め、有用な検査結果を継続的に得て、それと遺伝的要素、生活習慣、生体情報、画像検査情報を組み合わせることで各個体のデータを得る。この大勢の個体データを集めてビッグデータ化して、人工知能の力も借りて特徴を導き出していくことによって、これからの個別化医療が完成すると考えられる。すなわち、プレジジョン臨床検査医学から確固たる個別化医療につながるわけである。ポイントは、その材料となる検査結果の精確性と施設を跨いでの均一性である。現在、研究的に行われているオミックス解析なども臨床検査と同様に質を確保することによって、個別化医療をさらに発展させることができると期待される。

\*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] International Federation of Clinical Chemistry & Laboratory Medicine, Committee on Public Relations: Understanding laboratory medicine.  
[http://www.ifcc.org/media/330667/201510\\_LabMed\\_Slide\\_Kit.pdf](http://www.ifcc.org/media/330667/201510_LabMed_Slide_Kit.pdf)
- [2] Lippi G, et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clin Chem Lab Med* 49(7): 1113-1126, 2011
- [3] 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会：検体検査のサンプリング. 臨床検査のガイドライン JSLM2018 検査値アプローチ／症候／疾患. 日本臨床検査医学会, 東京, 2018: 6-11
- [4] 前川真人：臨床検査値に変動をもたらす生理的要因. 日本医師会雑誌 150巻特別号(1)S30-S33, 「臨床検査を使いこなす」, 日本医師会, 2021年6月15日発行
- [5] Desirable biological variation database specifications. WestgardQC.  
<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm#11>
- [6] European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Working Group: Biological Variation.  
<https://www.eflm.eu/site/page/a/1162>
- [7] EFLM Biological Variation Database.  
<https://biologicalvariation.eu>
- [8] 輸液注の四肢からの採血. 日本医療機能評価機構, 医療安全情報, No.126, 2017年5月.  
[https://www.med-safe.jp/pdf/med-safe\\_126.pdf](https://www.med-safe.jp/pdf/med-safe_126.pdf)
- [9] 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会：検体の保存安定性. 臨床検査のガイドライン JSLM2018 検査値アプローチ／症候／疾患. 日本臨床検査医学会, 東京, 2018: 27-32
- [10] 日本医師会臨床検査精度管理検討委員会：令和2年度 第54回臨床検査精度管理調査結果報告書, 日本医師会 2021
- [11] 医療法の一部改正(検体検査の精度の確保)に伴う平成30年度厚生労働省令第93号.  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000402682.pdf>
- [12] 桑克彦：POCTにおける質保証(QA, quality assurance)の基本. 医療と検査機器・試薬 43(2): 129-151, 2020

## Translational Raman Spectroscopic Approaches for Clinical Routine

### ラマン分光技術の臨床検査への展開

Prof. Dr. Jürgen POPP

ユルゲン ポップ

Leibniz Institute of Photonic Technology,  
Member of the Leibniz Research Alliance - Leibniz Health Technologies,  
Albert-Einstein-Str. 9, D-07745 Jena, Germany

Institute of Physical Chemistry & Abbe Center of Photonics  
Friedrich-Schiller University Jena,  
Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Germany



The article reviews our latest results on innovative technological and data analysis concepts for bringing Raman spectroscopy closer to clinical use in terms of diagnosing and targeted therapy of infectious diseases and cancer. The first part will report on clinical Raman solutions for rapid diagnosis of infectious diseases - in terms of rapidly identifying the infection causing pathogen its antibiotic resistance pattern and ideally also its immune response - being decisive parameters for a targeted antibiotic administration, which is crucial for the survival of patients. The second part will focus on nonlinear multi-modal Raman imaging for a fast and safe precise intraoperative tumor margin control, because reliable tumor margin recognition during an intervention is the key to effective tumor treatment.

#### Keywords

Raman spectroscopy, Artificial intelligence, Chemometrics, Microbial analysis, Infectious diseases, Cancer, Spectral histopathology

この論文では、感染症や癌の診断や標的治療の観点から、ラマン分光法をより臨床的に利用するための革新的な技術とデータ解析のコンセプトに関する我々の最新の成果を紹介する。まず、感染症の迅速な診断のための臨床的なラマンソリューションについて述べる。これは、患者の生存に必須の抗生物質標的投与の決定的なパラメータである感染症原因病原体の抗生物質耐性パターンおよび理想的な場合には免疫反応をも、迅速に特定するという点で重要な役割を果たしている。次に、術中の腫瘍マージンを迅速かつ安全に正確にコントロールするための、非線形多重モードラマンイメージングに注目する。なぜならば、手術中に腫瘍マージンを確実に認識することが効果的な腫瘍治療の鍵となるからである。

#### キーワード

ラマン分光, 人工知能, ケモメトリクス(計量化学), 微生物分析, 感染症, 癌, スペクトル組織病理学

### Introduction

Understanding the causes of diseases, recognizing them earlier and treating them more specifically - hopes that are associated with modern biomedicine - requires the determination of diagnostic, prognostic and predictive factors including their comprehensive evaluation in just a few steps or ideally in a single step. In this context, the sharp rise in cancer due to an ageing society and the rapid spread of life-threatening infectious diseases (due to in part unknown pathogens) and antibiotic-resistant germs, which is partly due to an increasing worldwide mobility

but also to the ill-considered administration of broad-spectrum antibiotics, should be mentioned in particular. An effective and early diagnosis and personalized therapy of cancer and infections requires new methods of differential diagnosis and represents an outstanding task of medicine. In principle, the following applies to all diseases: the earlier treatment begins, the better the chances of cure. There is therefore a great need for new diagnostic methods for a targeted early diagnosis of diseases in order to be able to use a targeted therapy as early as possible.

Raman spectroscopy plays a key role in the implementation

of these ambitious goals. The application of Raman methods to address biomedical research has grown rapidly over the past ten years and has advanced into a new era due to advances in instrumentation and most importantly due to an enhanced cross-disciplinary dialogue between spectroscopists and clinicians, which e.g. is fostered in Europe by the COST action Raman4clinics (<https://www.raman4clinics.eu/>).<sup>[1, 2]</sup>

This contribution will highlight our recent advances in translating Raman approaches towards routine clinical applications with focus on infectious diseases and cancer. Addressing this question requires new Raman instrumentation, which can be applied out of specialized labs in a clinical environment (e.g. operation theatre, bedside or in a doctor's practice).

### Point-of-care Raman spectroscopy for a rapid infectious disease diagnosis and treatment

Let's assume the following situation: a patient is at the doctor's office and after a short anamnesis the doctor decides that it is a bacterial infection and prescribes a certain antibiotic. Now one can ask the question, how does the doctor know that it is a bacterial infection, or in case is a bacterial infection, that the causing germs are not resistant to the prescribed antibiotic. While this approach was appropriate a few years ago, nowadays in the course of increasing antibiotic resistance, it would be very beneficial, that prior to prescribing an antibiotic or before taking an antibiotic, a precise diagnosis in terms of rapidly identifying the pathogen and characterizing its resistance profile takes place on which then a targeted therapy follows. In the following the great potential of optical technologies with focus on Raman spectroscopy to successfully address these unmet needs will be shown. At the same time, the hurdles that have to be overcome in order to move from an academic scientific process to a validated and verified product will be outlined.

First the question, what exactly is needed for an optimal and personalized treatment of infectious diseases will be addressed. Here, it is important to know whether the symptoms a patient - the so-called host response - is exhibiting are symptoms of an infectious disease or of another inflammatory disease. In case it is an infection, the next step is to find out what kind of pathogen is causing the infection, i.e. are the infection causing pathogens viruses, bacteria, or fungi? This knowledge is crucial for initiating an effective therapy. In the case of a bacterial infection, it is also necessary to know whether the bacterial pathogen is resistant to certain antibiotics or not.

### The host response:

In order to find out if the patient suffers from an infection or not it is important to consider the role of immune cells during an infection. When infectious agents enter the body, they interact with immune cells, i.e. among other with white blood cells including neutrophils, monocytes, eosinophils, T cells, B cells or the basophils. The interaction of pathogenic microorganisms, i.e. viruses, bacteria or fungi, with these immune cells leads to a certain cell response, causing molecular changes within the immune cells. Raman spectroscopy offers a very simple approach (requiring only a laser, a microscope, some filters and a spectrometer together with a sensitive camera) to monitor these molecular changes via the Raman spectral fingerprint. Raman spectroscopy requires very simple sample preparation steps. The isolation of white blood cells from whole blood can be achieved very easily via lysis of the red blood cells. After isolation, the white blood cells are placed under the microscope and irradiated with the Raman excitation laser. A notch filter separates the elastically scattered from the inelastically scattered Raman light, which is spectrally dispersed by a monochromator and detected by a camera (e.g. CCD camera). This simple analysis process, which has been established within the EU project Hemospec (<https://cordis.europa.eu/project/id/611682>), requires just 60 minutes from sampling to the final result. However, in order to achieve this white blood cell analysis two challenges had to be overcome: (1) since the Raman spectra of the different cell types or the activation of the different cells differ only minimally, a simple spectral analysis by eye is not possible and artificial intelligence methods are required to analyze the cellular Raman spectra (see below). (2) a large number of cells need to be examined and commercially available Raman setups are not able to measure several 1000 cells in a very short time. Therefore, a high-throughput Raman (HTR) setup has been developed within Hemospec and put to use in the clinic.<sup>[3, 4]</sup>

The investigation of the host response started with *in vitro* experiments, where isolated white blood cells here neutrophils from whole blood were spiked with various infectious agents such as bacteria and fungi. The individual cellular Raman signatures were analyzed by a PC-LDA analysis subsequent to a sophisticated data pre-treatment.<sup>[5]</sup> In detail, the Raman spectral data of infected neutrophils have been compared with those of uninfected neutrophils and with an accuracy of 90% the infected could be distinguished from the non-infected neutrophils.<sup>[5]</sup> The examination of the infected neutrophils revealed that it is possible to distinguish a fungal infection from a bacterial infection with an accuracy of 92%. Finally, neutrophils associated with Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* could be separated from

Gram-negative *E. coli* with an accuracy of 84%, i.e. Raman spectroscopy also allows to distinguish Gram-positive bacteria from Gram-negative bacteria. This *in-vitro* microbial infection diagnostics study<sup>[5]</sup> (see Figure 1) demonstrates that pathogen-specific activation can be detected with Raman data and opens up new possibilities for clinical diagnostic applications in terms of timely personalized therapy. For this, however, it is necessary to transfer the concept of the *in-vitro* stimulated cells shown in Reference [5] to patient samples.

In a recently published clinical study<sup>[4]</sup> we were able to show that it is possible to distinguish between inflammation, infection and sepsis by analyzing the Raman spectroscopic fingerprints of leukocytes from the blood of hospitalised patients from an emergency department. Using the aforementioned HTR approach<sup>[3]</sup>, we were able to clearly distinguish patients with viral infection from patients with bacterial infection. This clinical study paves the way for translating this Raman spectroscopic host response approach as a first steps towards a targeted therapy, as it allows to quickly choose the appropriate therapeutic approach based on the host response.<sup>[5]</sup>

**Pathogen diagnostics and antibiotic resistance:**

The currently approved microbiological methods to identify the infection-causing pathogens require the cultivation of bacteria and are therefore time-consuming, which means that a targeted antibiotic therapy is usually performed too late. Therefore, broad-spectrum antibiotics are often used empirically before the appropriate antibiotics matched to the infection-causing pathogen are found. However, this approach leads to more and more pathogens becoming resistant to antibiotics. To treat an infection

successfully, the physician needs the information about the type of the pathogen and its resistance to antibiotics - as quickly as possible. As mentioned above, standard microbiological methods usually require more than 24 hours due to cultivation, which is often too late.

To overcome this unmet medical need we have developed the so-called RAMANBIOASSAY™ - an approach that allows the identification of the pathogens as well as the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) in a very short time. The unique feature of this RAMANBIOASSAY™ approach is the dramatically reduced diagnostic time: in only 2 to 3.5 hours and with a very small number of microbial pathogens (a few hundred bacteria are sufficient), the pathogens can be clearly identified and their resistance properties can be determined without a prior cultivation step. Based on this information a physician can adapt the therapeutic antibiotic treatment specifically to the pathogen in question.

The basis of the RAMANBIOASSAY™ approach is the combination of chip-based Raman microspectroscopy with classical imaging. The smart use of laser light in a Raman setup in combination with a light microscope enables a label-free, non-destructive and culture-independent optical and spectroscopic characterization and identification of bacteria down to the level of single cells. Each molecule generates an individual signature in the Raman spectrum, creating a specific molecular fingerprint for each bacterium. Statistical evaluation algorithms enable automated classification and identification of bacteria and resistance to antibiotics. Furthermore, the additional integration of chip-based enrichment methods into miniaturized structures covers the entire process chain

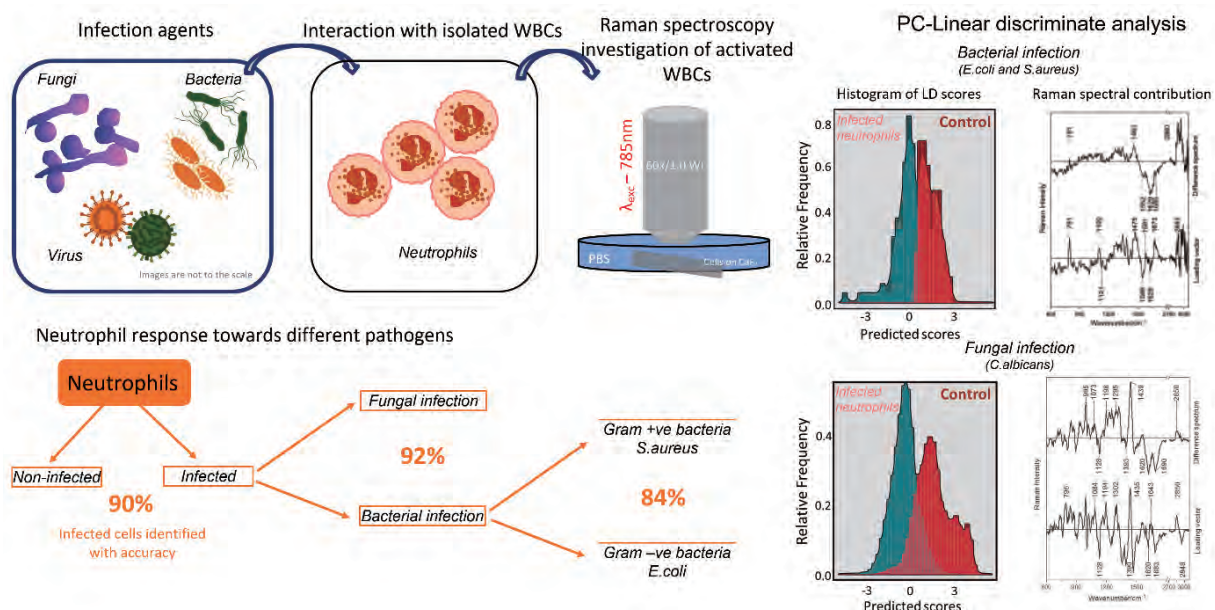


Figure 1 Summary of *in-vitro* Raman study to unravel the host response.[5] For details see text.

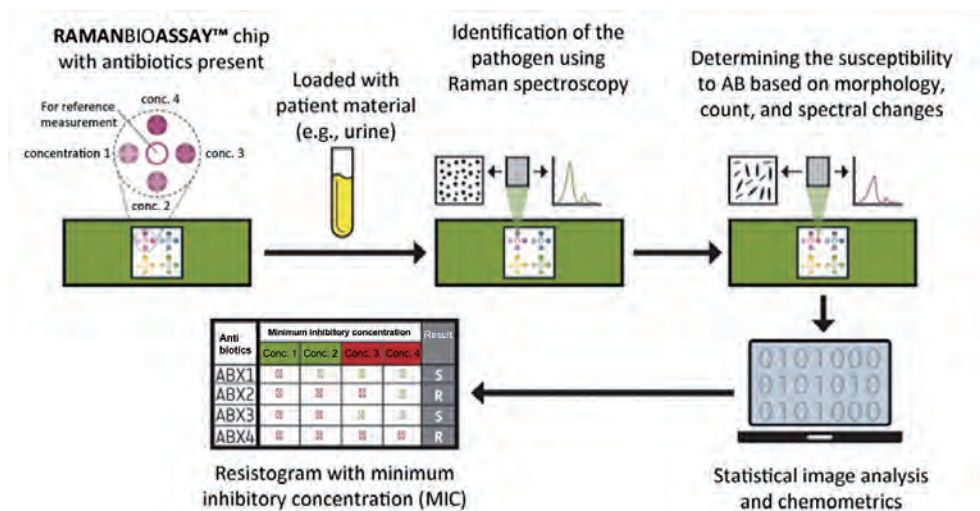


Figure 2 Schematic of the individual steps of the RAMANBIOASSAY™: The core is a chip onto which the bacteria from a patient sample are applied. Up to four different antibiotics are already present in four concentrations each. This means that the chip is ready for immediate use.

from sampling to final results (see Figure 2).

The Raman spectroscopic identification of the pathogen can be completed after 35 minutes. At the same time, the morphological changes of the pathogens in a short-term culture (on the RAMANBIOASSAY™ chip) together with the Raman spectra are used to determine to which antibiotic agent resistance exists and what the MIC is. This information is extracted from the morphological images and the Raman spectra using computer-assisted statistical image data analysis and chemometrics. By doing so the complete resistogram is thus already available after 2 to 3.5 hours and the physician can react much earlier than currently and does not have to resort to the application of a broad-spectrum antibiotics.

The potential of the RAMANBIOASSAY™ approach was demonstrated using the example of urinary tract infections with an identification of the pathogens, their resistance to antibiotics and their MIC from patient material.<sup>[6-11]</sup>

The uniqueness of the RAMANBIOASSAY™ approach lies in its independence from culture and the scalability of the approach. The independence from culture allows the analysis time to be reduced to 2 to approximately 3.5 hours after sample collection. The scalability enables universal use on the one hand in clinical microbiology in combination with pipetting robot compatible Raman chip platforms, which allows a high degree of automation in the clinical microbiology workflow, and on the other hand in the form of a closed cartridge-based approach with a miniaturized Raman reader for direct use in a physician's office or in a hospital without its own microbiology unit. Figure 3 shows the current status using the RAMANBIOASSAY™ chip together with the BioParticle Explorer (a manual Raman spectroscopy system

together with a microscope for morphological analysis) as well as future developments of the RAMANBIOASSAY™ for clinical microbiology or use in a physician's office.

Equally important as the development of clinically usable Raman devices (see Figure 3) is the development of tailored Raman spectroscopic analysis routines. As mentioned above the analysis of bacterial Raman spectra or changes within induced by e.g. antibiotics treatment cannot be analyzed by naked eye and require sophisticated artificial intelligence based spectral analysis routines.

In general, the success of Raman spectroscopy for medical diagnosis and therapy (and also other applications like e.g. in life sciences, process analytics, pharmacy or environmental analysis) is inherently connected with the development of customized Raman data evaluation algorithms for translating Raman measurement data (spectral data sets, image data, etc.) into qualitatively and quantitatively usable information for end users. In this context we have developed a universally applicable Raman data analysis software called RAMANMETRIX

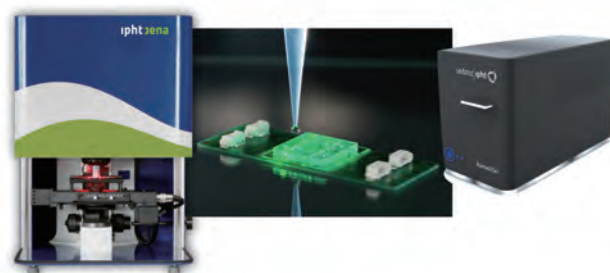


Figure 3 Photograph of RAMANBIOASSAY™ chip (middle) together with the BioParticle Explorer(left) and future developments towards a cartridge-based system with miniaturized reader for doctor's office and clinics without clinical microbiology (right).

(see: <https://docs.ramanmetrix.eu/>). This software allows for a one-click data analysis of Raman spectroscopic data in a robust and reliable way.

### Non-linear spectroscopic multimodal instrumentation for intraoperative tumor identification

The diagnostic gold standard in most surgeries is the extraction of biopsies and their histopathological examination to confirm the tumor and the tumor borders. The histopathological examination is carried out by means of rapid sections of non-contrasted tissue sections during the operation and definitively also on tissue sections of fixed material. Depending on the number of removed rapid sections, the rapid section diagnostic takes about 20-30 minutes. Then the surgeon is typically informed by telephone about the result and can decide on his/her further approach. If, for example, a sample in the border region of the tumor still shows tumor tissue, the surgeon will resection here and, if necessary, provide a new border section for rapid section diagnostics until the rapid sections indicate complete tumor resection.

This procedure is time-consuming, investigator-dependent, and dependent on the size, number and quality of the removed tissue samples, which are, of course, limited. Furthermore, since the quality of intraoperatively prepared frozen sections is not comparable to that of embedded tissue, the results of frozen section diagnostics often differs from those of an examination on embedded sections, which is why subsequent diagnostic confirmation using embedded sections is still necessary. For example, in head and neck surgery, depending on tumor size and location, the incidence of residual tumor (R1), i.e., subsequent finding of tumor cells in the incision margin, is approximately 7.5 - 10%. For such cases, the patient has to undergo a new operation and often also postoperative radiotherapy, which is an enormous burden for the patient. Therefore, even within the primary surgery, where possible, more tissue is removed than would actually be necessary to reach the tumor limit. However, the more tissue that is removed, the greater the impact on the patient's healing process. Thus, new methods and approaches are urgently needed for a fast and reliable intraoperative diagnosis.

Over the last few years, we have been investigating a multimodal nonlinear imaging approach that has the potential to reliably assess tissue and the success of surgery or endoscopy directly in the operating theatre or endoscopy room. The approach combines three different nonlinear imaging techniques namely two-photon excited autofluorescence (TPEF), second harmonic generation

(SHG) and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) displaying vibrations in the CH-stretch wavenumber region. The combination of these three modalities allows to determine the morphological and chemical composition (morphochemistry) of unfixed tissue sections in a label-free manner.<sup>[12]</sup> In order to translate the morphochemical information encoded in the multimodal spectroscopic images into medical relevant information photonic data science, i.e. machine and deep learning approaches are necessary.<sup>[13-16]</sup>

In the following we will briefly highlight the potential of multimodal nonlinear imaging in combination with innovative image analysis routines as a powerful tool for computer based spectral histopathology allowing for an automatic prediction of tissue types / disease and thus offering great potential to fulfill the aforementioned unmet medical needs in terms of reducing the time in an operative theatre due to instant feedback and smaller workload due to automatization.

In a recent study we investigated head and neck squamous cell carcinomas using the multimodal combination of CARS, TPEF and SHG. The analysis of the images by a machine learning classification model features a 90% accuracy compared to gold standard diagnosis of a blinded pathologist.<sup>[14, 15, 17, 18]</sup>

Furthermore, we could show that the utilization of deep learning approaches also allows for a pseudo-staining of multimodal images. The deep learning generated pseudo H&E images nicely represent the real H&E images and show that the combination of the three label-free non-linear imaging modalities CARS, TPEF and SHG yields information that can be translated into computational pseudo hematoxylin and eosin (HE) images.<sup>[13,16]</sup> For a clinical application compact and easy to use devices are needed. Thus, we have transferred the presented CARS/SHG/TPEF approach into a compact microscope suitable for clinical use in terms of a rapid *ex-vivo* tissue analysis.<sup>[12]</sup>

In order to further extend the applicability of this multimodal microscopy approach for *in vivo* tissue screening, various endoscopic probe concepts were also realized.<sup>[19-23]</sup> The core of all these setups are robust and alignment-free fiber laser concepts. In the following two concepts of endoscopic probes for multimodal nonlinear imaging, which have been researched or are still currently under investigation will be briefly summarized. The first is a rigid needle endoscope for neurosurgical applications.<sup>[21]</sup> This probe provides very good imaging in a compact design, there are no moving or electric parts in the probe head, but it is not flexible (which is fine for neurosurgery and some other fields of application, e.g., head and neck).

For applications requiring flexible endoscopes, a unique endoscopy concept using a double-core double-clad fiber and focus-combining micro-optical concept allowing for a background free, low-loss, high peak power laser delivery, and an efficient signal collection in backward direction has been successfully realized.<sup>[23]</sup>

## Conclusion

In conclusion this short review highlights the great potential of Raman spectroscopy in combination with innovative photonic data science concepts for clinical diagnosis and therapy.

In the first part of this contribution, we report on the culture-free isolation and identification of pathogens, their host-response and their antibiotic resistance by using a combination of Raman spectroscopy, chip-based sampling strategies as well as chemometric spectroscopic data analysis methods. The main advantages of this rather simple approach compared to conventional microbiological analysis methods is that the analysis result is available in just a few hours. This represents a major step forward, as antibiotic therapy can be started promptly and specifically tailored to the pathogen. It will be shown how this approach was transferred into an automated clinically applicable system the RAMANBIOASSAY™

The second part of this presentation reports on multimodal non-linear imaging solutions in the field of pathological cancer diagnostics. Here, the combination of CARS with SHG and TPEF imaging in combination with adapted image analysis methods represents a powerful *ex-vivo* and *in-vivo* approach for a label-free clinical intraoperative tissue diagnostic for tumor margin detection in terms of computer based spectral histopathology.

## Acknowledgement

*Financial support of the EU, the “Thüringer Ministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitale Gesellschaft”, the “Thüringer Aufbaubank”, the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF), the German Science Foundation, the Fonds der Chemischen Industrie and the Carl-Zeiss Foundation are greatly acknowledged.*

\* Editorial note: This content is based on HORIBA's investigation at the year of issue unless otherwise stated.



## References

- [1] C. Krafft, I. W. Schie, T. Meyer, M. Schmitt, and J. Popp, "Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications", *Chem. Soc. Rev.* 2016, 45, 1819-1849 and references cite therein.
- [2] C. Krafft, M. Schmitt, I. Schie, D. Cialla-May, C. Matthäus, T. Bocklitz, and J. Popp, "Label-free molecular imaging of biological cells and tissues by linear and non-linear Raman spectroscopic approaches", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 4392-4430 and references cite therein.
- [3] A. S. Mondol, N. Töpfer, J. Rüger, U. Neugebauer, J. Popp and I. W. Schie, "New perspectives for viability studies with high-content analysis Raman spectroscopy (HCA-RS)", *Sci. Rep.* 2019, 9, 12653.
- [4] A. Ramoji, D. Thomas-Rüddel, O. Ryabchykov, M. Bauer, N. Arend, E. J. Giamarellos-Bourboulis, J. Eugen-Olsen, M. Kiehntopf, T. Bocklitz, J. Popp, F. Bloos, U. Neugebauer, "Leukocyte Activation Profile Assessed by Raman Spectroscopy Helps Diagnosing Infection and Sepsis", *Crit. Care Explor.* 2021, 3(5), e0394.
- [5] N. Arend, A. Pittner, A. Ramoji, A. S. Mondol, M. Dahms, J. Rüger, O. Kurzai, I. W. Schie, M. Bauer, J. Popp and U. Neugebauer, "Detection and Differentiation of Bacterial and Fungal Infection of Neutrophils from Peripheral Blood Using Raman Spectroscopy", *Anal. Chem.* 2020, 92, 10560-10568.
- [6] U.-C. Schröder, F. Bokeloh, U. Glaser, J. Popp, U. Neugebauer, M. O'Sullivan, J. Ducrée, K. Wolf and W. Pfister, "Rapid, culture-independent, optical diagnostics of centrifugally captured bacteria from urine samples", *Biomicrofluidics* 2015, 9, 044118.
- [7] U. C. Schröder, C. Beletes, C. Assmann, U. Glaser, U. Hubner, W. Pfister, W. Fritzsche, J. Popp and U. Neugebauer, "Detection of vancomycin resistances in enterococci within 3 (1/2) hours", *Sci. Rep.* 2015, 5, 8217.
- [8] U.-C. Schröder, J. Kirchhoff, U. Hübner, G. Mayer, U. Glaser, T. Henkel, W. Pfister, W. Fritzsche, J. Popp and U. Neugebauer, "On-Chip spectroscopic assessment of microbial susceptibility to antibiotics within 3.5 hours", *J. Biophotonics* 2017, 10, 1547-1557.
- [9] J. Kirchhoff, U. Glaser, J. A. Bohnert, M. W. Pletz, J. Popp and U. Neugebauer, "Simple ciprofloxacin resistance test and determination of minimal inhibitory concentration (MIC) within two hours using Raman spectroscopy", *Anal. Chem.* 2018, 90, 1811-1818.
- [10] S. Kloß, B. Kampe, S. Sachse, P. Rösch, E. Straube, W. Pfister, M. Kiehntopf and J. Popp, "Culture independent Raman spectroscopic identification of urinary tract infection pathogens - A proof of principle study", *Anal. Chem.* 2013, 85, 697-708.
- [11] S. Kloß, B. Lorenz, P. Rösch, S. Dees, I. Labugger and J. Popp, "A Raman spectroscopy-compatible isolation procedure of single bacteria cells from sputum samples", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, 407, 8333-8341.
- [12] T. Meyer, M. Baumgartl, T. Gottschall, T. Pascher, A. Wuttig, C. Matthäus, B. F. M. Romeike, B. R. Brehm, J. Limpert, A. Tuennermann, O. Guntinas-Lichius, B. Dietzek, M. Schmitt and J. Popp, "A compact microscope setup for multimodal nonlinear imaging in clinics and its application to disease diagnostics", *Analyst* 2013, 138, 4048-4057.
- [13] T. Bocklitz, F.S. Salah, N. Vogler, S. Heuke, O. Chernavskaja, C. Schmidt, M. Waldner, F.R. Greten, R. Bräuer, M. Schmitt, A. Stallmach I. Petersen, J. Popp, "Pseudo-HE images derived from CARS/TPEF/SHG multimodal imaging in combination with Raman-spectroscopy as a pathological screening tool", *BMC Cancer*, 2016, 16, 534/1-1.
- [14] T. Meyer, D. Akimov, O. Guntinas-Lichius, M. Schmitt, B. Dietzek, F. v. Eggeling and J. Popp, "Multimodal nonlinear microscopic investigations on head and neck squamous cell carcinoma: Toward intraoperative imaging", *Head Neck* 2012, 35, E280-287.
- [15] E. Rodner, T. Bocklitz, F. von Eggeling, G. Ernst, O. Chernavskaja, J. Popp, J. Denzler and O. Guntinas-Lichius, "Fully convolutional networks in multimodal nonlinear microscopy images for automated detection of head and neck carcinoma: Pilot study", *Head Neck* 2019, 41, 116-121.
- [16] P. Pradhan, T. Meyer, M. Vieth, A. Stallmach, M. Waldner, M. Schmitt, J. Popp, T. Bocklitz, "Semantic Segmentation of Non-linear Multimodal Images for Disease Grading of Inflammatory Bowel Disease: A SegNet-based Application", *ICPRAM 2019*: 396-405; DOI:10.5220/0007314003960405.
- [17] T. Meyer, D. Akimov, O. Guntinas-Lichius, M. Schmitt, B. Dietzek, F. v. Eggeling and J. Popp, "Multimodal nonlinear microscopic investigations on head and neck squamous cell carcinoma: Toward intraoperative imaging", *Head Neck* 2012, 35, E280-287.
- [18] S. Heuke, O. Chernavskaja, T. Bocklitz, F. B. Legesse, T. Meyer, D. Akimov, O. Dirsch, G. Ernst, F. von Eggeling, I. Petersen, O. Guntinas-Lichius, M. Schmitt and J. Popp, "Multimodal nonlinear microscopy of head and neck carcinoma - toward surgery assisting frozen section analysis", *Head Neck* 2016, 38, 1545-1552.
- [19] A. Lukic, S. Dochow, O. Chernavskaja, I. Latka, C. Matthäus, A. Schwuchow, M. Schmitt and J. Popp, "Fiber probe for nonlinear imaging applications", *J. Biophotonics.*, 2016, 9, 138-143.
- [20] A. Lukic, S. Dochow, H. Bae, G. Matz, I. Latka, B. Messerschmidt, M. Schmitt and J. Popp, "Endoscopic fiber probe for nonlinear spectroscopic imaging", *Optica* 2017, 4, 496-501.
- [21] P. Zirak, G. Matz, B. Messerschmidt, T. Meyer, M. Schmitt, J. Popp, O. Uckermann, R. Galli, M. Kirsch, M. J. Winterhalder and A. Zumbusch, "Invited Article: A rigid coherent anti-Stokes Raman scattering endoscope with high resolution and a large field of view", *Apl. Photonics* 2018, 3, 092409.
- [22] J. Tragardh, T. Pikalek, M. Sery, T. Meyer, J. Popp and T. Cizmar, "Label-free CARS microscopy through a multimode fiber endoscope", *Opt. Express* 2019, 27, 30055-30066.
- [23] B. Messerschmidt, E. Pshenay-Severin, G. Matz, K. Reichwald, J. Bierlich, J. Kobelke, H. Bae, T. Meyer-Zedler, M. Schmitt, J. Popp, "CARS endomicroscopic imaging probe enabled by a double-core double-clad fiber and related focus-combining micro-optical concept", *Proceedings Volume 11636, Optical Biopsy XIX: Toward Real-Time Spectroscopic Imaging and Diagnosis*; 116360A (2021) <https://doi.org/10.1117/12.2578538>.

## Improving Speed and Safety of Biopharmaceutical Manufacturing with HORIBA Analytical Solutions

Innovative spectroscopic (A-TEEM and Raman) and optical techniques (ViewSizer)

offer faster, accurate and less costly alternatives to chromatographic quantitative analysis in biotechnology

迅速かつ安全なバイオ医薬品生産に貢献するHORIBAの分析ソリューション

クロマトグラフィに代わる革新的分光分析技術 (A-TEEMおよびラマン) と光学技術 (ViewSizer) による  
迅速・正確・低コスト分析手法

Linda Kidder YARLOTT

リンダ キダー ヤロー

Adam M. GILMORE

アダム M ギルモア

Sean TRAVERS

シヨーン トラヴァース

The transition of biotechnologies from research project to pharmaceutical products requires analytical solutions that ensure safety and efficacy. In this paper we describe several innovative HORIBA products and highlight how these novel approaches rapidly deliver key information to accelerate processes in biopharmaceutical manufacturing. The HORIBA product portfolio can transform a variety of biopharmaceutical QC processes including the rapid characterization of cell culture media and viral vectors, vaccine manufacturing and analysis of components needed for cell and gene therapies.

Key words

Fluorescence Spectroscopy

EEM Fluorescence Spectroscopy

A-TEEM Fluorescence Spectroscopy

バイオ技術を用いて研究・開発された医薬品を量産する際には安全性と生産効率を確認するための分析技術が不可欠である。この論文ではいくつかの革新的なHORIBA製品について解説し、高度な分析技術を新たに適用することによってもたらされる医薬品の量産プロセス高速化のカギとなる情報を明らかにする。HORIBA製品によるポートフォリオを適用することによって、細胞培養培地やウィルスベクター(遺伝情報伝達核酸分子)の迅速な特性評価、ワクチンの製造、遺伝子細胞治療に必要な成分の解析など、さまざまな医薬品の品質管理のプロセスを変革することができる。

キーワード

蛍光分光分析 EEM分光 A-TEEM分光

### Introduction

The publication of the human genome in February of 2001 was a tremendous achievement, and is just one of the multiple pieces of fundamental knowledge that has fueled the rapid pace of discovery and innovation in biotechnology. The tangible benefits to human health of this and other advances, like CRISPR-Cas9 gene editing, are just now being felt in the mainstream, as there is natural delay between discovery and commercialization. In many instances this transition to commercialization of transformative

innovations is slowed by the lack of complementary analytical technologies to confirm safety and efficacy. The innovation of novel analytical tools (or repurposing of existing ones) to enable biopharmaceutical manufacturing may not receive the same recognition as the initial discoveries, but commercialization absolutely depends on it. In recognition of the need for innovations in analytical tools, governments around the world have created public-private partnerships to solve this problem.

NIIMBL (National Institute for Innovation in Manufacturing

Biopharmaceuticals)<sup>[1]</sup> in the US, for example, is focused on the development of “novel real-time analytical technologies for integrated continuous processing for process integration and intensification.” Their goals are to enable “flexible and adaptive manufacturing, de-risk innovation, lower manufacturing costs and accelerate development and approval.” NIIMBL want to speed commercialization of novel biopharmaceutical product categories, such as Cell and Gene Therapy, and also want to streamline processes for existing products that lack efficient analytical tools such as: monoclonal antibodies (mAbs), vaccines, antibody-drug conjugates (ADCs), bispecifics, and virus-like particles (VLPs). Another government funded consortium is the Cell and Gene Therapy Catapult (CGT Catapult) in the UK,<sup>[2]</sup> aimed at accelerating the development of process analytical technologies (PAT) for cell and gene therapy manufacturing. HORIBA has joined CGT Catapult with the purpose of assessing the A-TEEM fluorescence technology as a way of reducing batch failures and manufacturing costs.<sup>[3]</sup>

### Traditional Analytical Approaches and Their Limitations

Chromatography is the workhorse in biotechnology, configurable with a wide range of detectors, stationary and mobile phase options, it is used to solve many analytical challenges. It is used for quantitative analysis, purification, classification, in R&D and for QA/QC. As omnipresent and useful as it is, separations techniques have drawbacks - chromatography is almost exclusively a lab-based technique. Although there have been attempts to make process-ready chromatography platforms, the challenges presented by these physical separations approaches are difficult to overcome robustly. Separations also tend to be quite expensive on a per-measurement basis, requiring solvents or gases for the mobile phase, columns and standards, and waste disposal fees for expended solvents. It is also slow compared to optical techniques - a fast chromatographic method typically takes tens of minutes to run compared to seconds-to-minutes for spectroscopy. Additionally, there are fundamental limitations in what

chromatographic methods can detect, as they are limited to the chemistry exposed on the outside of molecules, with no visibility to what may be buried inside. Ultimately separations techniques confirm **expected** components, therefore, unexpected components often go unnoticed, being “invisible” to the developed chromatographic method.

Molecular spectroscopy approaches like Fluorescence, Raman, near-infrared (NIR) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), on the other hand, are green, rapid, robust, and non-destructive technologies that can sit near-, at-, or even in-line. These techniques are sensitive to molecular environment in total, not just the molecules exposed on the exterior of a molecule, and spectroscopic libraries can be used to identify “unexpected” components. These attributes have contributed to molecular spectroscopy approaches, largely Raman and NIR, being incorporated as standard Process Analytical tools (PAT).

There is however a continuum of capability across these optical techniques, and some struggle to detect low concentration components, or to easily distinguish very similar components. Vaccines, ADCs, bispecifics, Adeno-Associated Virus (AAV) characterization (serotype differentiation, full vs. empty capsid) are all samples that require the highest level of specificity and sensitivity, so that even Raman cannot always reliably provide the detailed characterizations needed. Multidimensional excitation-emission matrix (EEMs) fluorescence should be the technique of choice based on its sensitivity and specificity. However, standard EEM implementations have struggled with repeatability and reproducibility. HORIBA has solved this with a patented 2-in-1 approach to multidimensional fluorescence spectroscopy called Absorbance, Transmittance and Excitation Emission Matrix (A-TEEM).<sup>[4]</sup> Table 1 compares A-TEEM with other optical spectroscopy techniques.

Summarizing, we find that in support of biopharmaceutical manufacturing, standard separations approaches,

Table 1 Comparison of Molecular Spectroscopy Analytical Techniques for Biopharmaceutical Analysis

Technique	Sensitivity	Selectivity	Comments	LOD (PPM)
A-TEEM (2-in-1) Fluorescence	↑	↑	UV/Vis & Fluorescence, Quantitative across broad concentration range	<0.001
2D/EEM Fluorescence	↑	↑	Poor analytical quantification, molecular fingerprint is concentration dependent	<0.1
Raman	●	●	Struggles with low concentrations	25-150
FTIR	●	●	Water interferes with molecular fingerprint	100-2000
UV/VIS	●	↓	Low selectivity Low information content	0.3
NIR	↓	↓	Struggles with low concentrations Low selectivity	0.1-1

although effective, are slow and mostly confined to the laboratory, and unable to characterize unexpected sample components, or differentiate samples based on non-surface characteristics. Vibrational spectroscopic techniques such as Raman, NIR, and FT-IR, are rapid and effective for many samples, able to operate on the manufacturing line, and can characterize samples on overall molecular environments, not just surface variations; but have constraints for low concentrations or highly similar samples. Fluorescence A-TEEM shares the speed and efficiency of Raman, adds the high specificity and sensitivity of fluorescence EEMs, and finally implements reproducibility and repeatability that transform it into a true analytical tool. We'll go into a bit more detail about A-TEEM implementation and applications in the next section.

### Fluorescence spectroscopy progression - from EEM to A-TEEM™

Fluorescence spectroscopy is an exceptionally sensitive tool. In some sense this sensitivity presents challenges for its adoption as a routine analytical tool, as clearly assigning a spectral change to a corresponding sample change can be quite complicated. There have been several advances though, that have enabled even complex fluorescence profiles to be converted into actionable information. Multivariate analysis and fluorescence Excitation Emission Matrix (EEM) spectroscopy taken together have advanced the use of fluorescence spectroscopy for routine use. An EEM is a 3D scan, resulting in a contour plot of excitation wavelength vs. emission wavelength vs. fluorescence intensity. EEMs are used for a variety of applications and, coupled with chemometrics, have shown success in monitoring batch endpoint and quality of final product in a bio-fermentation process.<sup>[5]</sup>

Fluorescence EEM spectroscopy unites the sensitivity of chromatography with the attributes of spectroscopic implementation, such as speed, robustness, low cost of measurement, and is effective for low concentration samples, and in looking for very slight environmental or molecular structural changes.

### The Limitation of Standard EEM Spectroscopy

The molecular identification capabilities of a standard EEM spectroscopy has some fundamental limitations. The inner filter effect (IFE) distorts the measured fluorescence spectrum of a molecule due to re-absorption that occurs at higher concentrations. The standard correction protocol uses a secondary measurement from a different absorbance spectrometer to adjust the measured fluorescence signal. But as the measurement does not occur simultaneously and with the same exact volumes, this approach doesn't provide a perfect correction. The imperfect match between data and correction means that an

EEM for a single component won't necessarily be reproducible, and this severely limits the ability of a traditional EEM for robust component identification as well as quantification.

### A-TEEM™ Spectroscopy Overcomes These Limitations

To overcome this limitation, HORIBA Scientific developed a new technology, called A-TEEM™ spectroscopy,<sup>[4]</sup> giving a spectrofluorometer the ability to simultaneously acquire Absorbance, Transmittance and a fluorescence Excitation Emission Matrix (A-TEEM) of a particular sample. Because the absorption spectra used for IFE correction are collected at the same time on the same sample as the fluorescence measurement, the correction is reproducible, and the A-TEEM data can be used for accurate sample ID as well as highly sensitive and specific component quantification.

A-TEEM provides *true and accurate representations of fluorescent molecules over a broad concentration range* (typically up to ~2 absorbance units). Additionally, absorbance and color information for all molecules, including non-fluorescent ones, is acquired and can be used in multivariate methods for comprehensive multi-component molecular identification. Interestingly, color can be a very sensitive indicator of protein product quality, and this information is acquired as part of the measurement. The A-TEEM method is a robust and extremely sensitive analytical technique, comprising the best attributes of both molecular spectroscopy (speed, low per measurement cost, lab-to-line placement) and chromatography (sensitivity and selectivity). A-TEEM therefore has the potential to replace traditional instruments like HPLC, GC, LCMS, and GCMS as a simpler, and faster analytical tool, with significantly lower per-sample measurement costs. A-TEEM is also a green approach to quantification compared to chromatography, as the need for a mobile phase goes away. Based on simultaneous use of fluorescence and absorbance spectroscopy, A-TEEM is validatable using the standard approaches for these two techniques.<sup>[6]</sup> A-TEEM molecular fingerprints are extremely information-rich, and multivariate analysis techniques are used to simplify the data and answer specific questions, providing direct and unambiguous results.

The A-TEEM fluorescence method provides a complete and traceable optical fingerprint of liquid samples, overcoming limitations that previously hampered adoption of fluorescence EEMs. This technique is well suited to the characterization of vaccines and other biopharmaceutical samples, with not only the sensitivity and specificity comparable to chromatographic methods, but also the speed, cost savings, and reproducibility of vibrational spectro-

scopic approaches.

### Cell Culture Media - Where Bioproducts Begin

The fundamental process in creating biopharmaceutical products is the growth of cells in bioreactors, fed by cell culture media, a specially formulated broth which contains a balance of nutrients to optimize cell productivity. The cost of the media itself is a small fraction of the value of the final product, therefore assessing its quality prior to the start of a bio-fermentation is a cost-effective way to ensure end-product quality and quantity. Standard approaches to perform this critical QC step are chromatography and mass spectrometry, making these measurements time consuming, expensive, and designed only to confirm what is expected, not to detect the unexpected. There is a growing interest in the use of molecular spectroscopic approaches for media QC, and both Raman and EEMs have been tested.<sup>[7,8]</sup> As is often the case, the combination of these two spectroscopic approaches may be the best way to cover the breadth of components that need to be characterized for this application.

As expected, A-TEEM provides a robust approach to assess the quality of cell culture media prior to the addition of cells.<sup>[9]</sup> We investigated eight different commercially available cell culture media samples, with the goal to differentiate between them, and also to study the sensitivity of the technique to detect environmental degradation. A more in-depth analysis of specific cell media components is a topic for future studies, and not addressed in this overview. Five samples from each of the eight types of media were analyzed, each sample was measured in triplicate resulting in 120 measurements, and each measurement took ~60 seconds. All cell culture media was stored at 4°C before testing and allowed to equilibrate to ambient laboratory temperature prior to analysis. The PCA showed clear differentiation between the different categories of media. To explore the specificity of the technique, a separate analysis including data

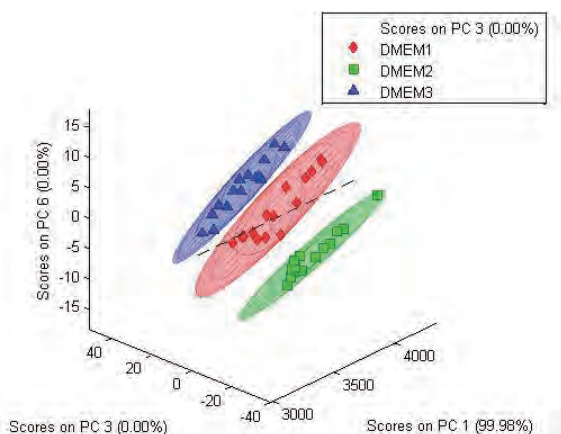


Figure 1 3D principal component scores plot showing ability of A-TEEM to differentiate within a cell culture category. DMEM samples of varying composition (types 1-3) were analyzed.

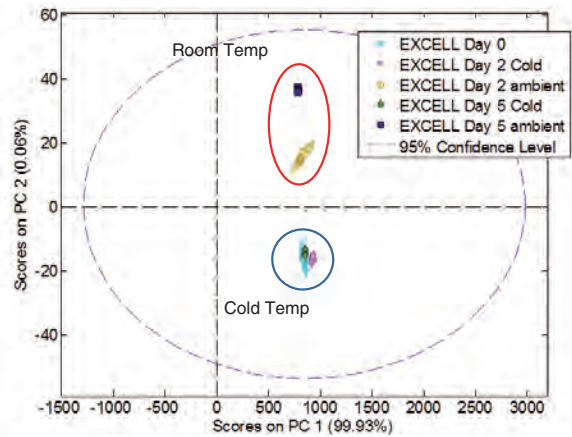


Figure 2 A-TEEM characterization of fresh from degraded cell culture media samples

from only a single category of media was performed. Figure 1 shows three different DMEM samples with slight compositional differences were easily distinguishable.

The final test for A-TEEM characterization of cell culture media was to compare fresh samples with those degraded through exposure to light, and elevated (room) temperature. A-TEEM was able to track the degree of degradation over a period of 5 days, as shown in Figure 2. A-TEEM provides a rapid approach to differentiating eight commercial cell media formulations, classifying three similar formulations, and tracking degradation of a cell media sample against adverse storage conditions.

### Viral Vectors Characterization

Researchers have turned to nature to understand how to deliver genetic material into human cells, and viruses provide a perfect mechanism. Several specific viruses, Adeno-Associate Virus (AAV) and lentivirus, for example, have been found to have appropriate characteristics, allowing scientists to manipulate them for the purpose of delivering genetically engineered payloads into human cells. These so-called viral vectors are the work horses of cell and gene therapy, and are making inroads into other applications, such as vaccines. In developing and deploying viral vectors, there are multiple parameters that are important to characterize for a complete picture of product quality. Measurements need to discriminate: 1) whole, broken, empty, aggregates, and infectious or non-infectious viruses; 2) empty from full capsids; and 3) vector serotypes. We'll present results from HORIBA's multi-laser Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) approach using the ViewSizer 3000™ technology showing how it can be used to determine infectious titer, and then briefly touch on as-yet unpublished results from the A-TEEM method on its ability discriminate empty from full capsids and discriminate between vector serotypes.

### Infectious Titer Determination with ViewSizer 3000

The ViewSizer 3000 is a nano-particle tracking (NTA) platform that incorporates three lasers to collect the most accurate distribution and concentration data across a wide range of sample sizes. The point of the three lasers is to compensate for a variety of known problems when looking at a polydisperse sample: large particles scatter too much light and will saturate the detector from one laser, whereas small particles will only weakly scatter, and will be hard to detect. With three different lasers with independent power control, particles size can be determined across a very broad range, with scattering signals optimized to provide the most accurate distribution and concentration results.

The Viral Plaque Assay is the most robust approach to determine Infectious Titer, and it is highly manual and very time consuming. Viral preparations are serially diluted and allowed to grow on the planar surface of cell culture monolayer. Over a period of time (hours to weeks) the viral cells proliferate, infecting the confluent cells and destroying them. Regions of dead cells appear as empty patches on the culture surface, and these regions or “plaques” are then manually counted to determine the number of Plaque Forming Units (PFU) in a given dilution. Multiplying the PFUs by the dilution factor determines the final infectious titer of the parent stock, expressed in PFU/mL.

To determine the utility of the ViewSizer 3000 approach, the following protocol was followed: samples were transferred to the ViewSizer 3000 cuvette, fitted with a magnetic stir bar, and twenty-five video segments were collected, with five seconds of stirring in between each to ensure completely independent sets of particles in each video. The measurements were recorded with the following parameters: frame rate: 30 frames/second; exposure: 15 ms; gain: 30; blue laser power: 210 mW; green laser power: 12 mW; and red laser power: 8 mW; temperature control: active, 22°C. Each run took between 15-20 minutes. Multiple users independently analyzed the samples using the same measurement and acquisition parameters described above. The data were then processed and plotted using the same settings. Particle sizes ranged from 50 nm to 1000 nm, with a significant enrichment of particles around 200 nm, as shown in Figure 3. The total viral particle concentration within the sample was  $1.6 \times 10^7$  particles/mL. The distribution tailing towards 1000 nm suggests the existence of host cell debris or other background particles contained within the cell culture growth media. The image extracted from the video recordings further validated the presence of larger viral aggregates.

Infectious titer data from multiple assay replicates performed by independent analysts were plotted as a function of measured particle concentration from the ViewSizer 3000 and fitted with a result shown in Figure 4. The result indicates an excellent  $R^2$  value of greater than 0.9. When the results are analyzed using only data from one of the three lasers available, correlation dropped to an  $R^2$  value of 0.6 because of its inability to properly count the aggregates. By using three lasers, all particles were counted and the improved correlation is presumably because infectious aggregates contribute to the titer and were quantified along with single virus particles. This result indicates that over the course of multiple experiments, the ViewSizer 3000 accurately and reproducibly determined the viral titer within a heterogeneous sample.

This demonstrates the ViewSizer 3000’s ability to assess not only intact viral particles and aggregates, but also potential cell debris and background noise generated during upstream processing. Since downstream processing depends strongly on the removal of these impurities to minimize further aggregation, quantifying infectious viruses reliably depends on understanding both the purity of the upstream sample and the downstream analytical precision. The ability to detect these aggregates and cell

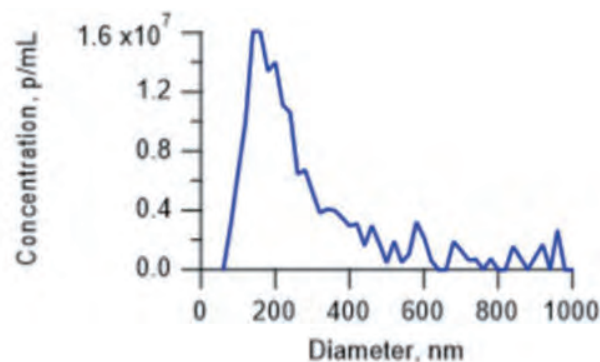


Figure 3 Measurement result of a human viral vector sample. Note the distribution tailing towards 1000 nm suggests the presence of host cell debris and aggregates.

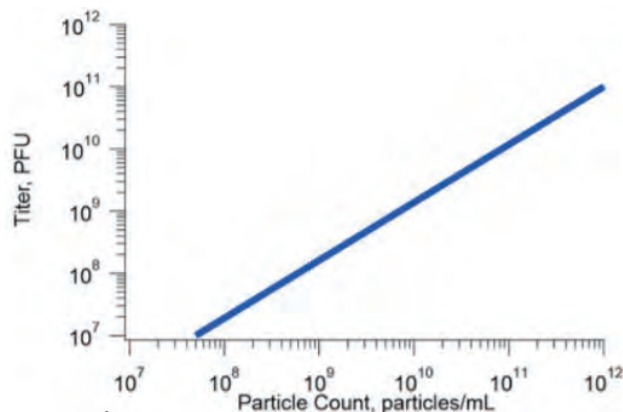


Figure 4  $R^2$  value of > 0.9 was achieved between titer and data collected from the ViewSizer 3000.

debris is also critical when examining the stability of the final product over time. As we saw with the roll out of Coronavirus vaccines, the stability of biologic preparations within a freezer is a crucial factor to understand. With ViewSizer we are able to compare fresh preparations of a sample to ones that have been in the freezer for a number of weeks. By monitoring the increasing number of aggregates/cell debris that are present in the stored samples versus time, it is possible to gain an understanding of how long a sample is stable in a freezer. Utilizing the multiple lasers of the system is a crucial factor in these studies, as the particles of interest are usually around 80-120 nm, while aggregates and debris can appear all the way up to a micron; suggesting that the ability to measure across that entire size range is an indispensable tool in understanding the stability of these biologic preparations.

In addition to the applications described above, there are several unpublished studies that point towards other very interesting applications of A-TEEM, including the differentiation of AAV serotypes (AAV2 from AAV9), and quantification of empty vs full capsid ratio.

#### Vaccine Characterization and Manufacturing QC

The NIIMBL Vaccines roadmap<sup>[10]</sup> noted that vaccine product release time is on the scale of weeks to months, rather than the one to two days that might be possible with the right analytical tools. Vaccines have historically been relatively simple formulations, with one or multiple vaccine component (live-attenuated vaccines, subunit, polysaccharide, conjugate, or toxoid) with a diluent, and perhaps an adjuvant (a component that enhances the immune response). With the events of the last 18 months, vaccine technology has made huge advances in the fight against the Coronavirus pandemic, and mRNA vaccines, and the use of viral vectors has proliferated. The ViewSizer has been used as an analytical tool in the analysis of adjuvants.<sup>[11]</sup> However, the focus of this section will be on describing an approach for QC for vaccine manufacture that might meet the NIIMBL goal of one to two days for product QC.

One of the struggles for standard vibrational spectroscopic approaches is that vaccines tend to be formulated at very low concentrations. Raman spectroscopy without resonant enhancement struggles to characterize protein samples under ~1 mg/ml. Although Surface Enhanced Raman (SERS) can be used to enhance signals, it is challenging to fully characterize the impact that SERS substrates might have on the vaccine components. A-TEEM has been shown to have very low limits of detection, recently calculated to be ~0.15 µg/mL for a well-characterized vaccine formulation.<sup>[12]</sup> For these same low

concentration vaccine samples, A-TEEM has shown the ability to readily detect post-translational modifications, as well as differentiate between samples with simple amino acid substitutions, even those of non-fluorescent amino acids. In addition to the low limits of detection, A-TEEM has also been shown to characterize complex mixtures, differentiating and quantifying components against strong backgrounds, most notably in wine.<sup>[13]</sup>

To demonstrate the suitability of A-TEEM to the analysis of vaccines, we tested four over-the-counter multicomponent canine vaccine products. We used the SOLO-JEC brand multi-component canine vaccines (Table 2) from Boehringer Ingelheim VetMedica that were available at a local retail store (Tractor Supply Store). We tested SOLO-JEC 5 (“protection against five common canine infectious diseases”); SOLO-JEC 6 (“delivers the same protection as SOLO-JEC 5 plus additional protection against coronavirus”); SOLO-JEC 9 (“delivers additional protection against four types of leptovirus that are known to infect dogs”); and SOLO-JEC 10 (“delivers the same protection as SOLO-JEC 9 plus additional protection against coronavirus”).

The vaccines were reconstituted according to the package directions, diluted with distilled water in a ratio of 1:61 and added to a cuvette for measurement. To ensure repeatability, six individual measurements were collected for each vaccine, and this was done on two separate days. The calibration data set therefore consists of 48 measurements. To test reproducibility, a third unique set of validation samples were collected on a different instrument by a different operator, with 5 repeat measurements for each vaccine formulation, resulting in a validation set with 20

Table 2 OTC multicomponent vaccine products tested for this study

Disease	Basic Program Solo-Jec 5&6		Lepto Included Solo-Jec 9&10	
	Solo-Jec 5	Solo-Jec 6	Solo-Jec 9	Solo-Jec 10
Distemper	•	•	•	•
Hepatitis		•	•	•
Adenovirus 1	•			
Adenovirus 2	•	•	•	•
Coronavirus		•		•
Parainfluenza	•	•	•	•
Parvovirus	•	•	•	•
Lepto (4 types)			•	•
Gentamicin	•	•	•	•
Amphotericin B	•			
Thimerosal		•	•	•
Adjuvant	•	•	•	•

Table 3 Samples used for Calibration and Validation

Vaccine	Calibration set (n=48)	Validation set (n=20)
Spectra 5	S5	U5
	S-5	
Spectra 6	S6	U6
	S-6	
Spectra 9	S9	U9
	S-9	
Spectra 10	S10	U10
	S-10	

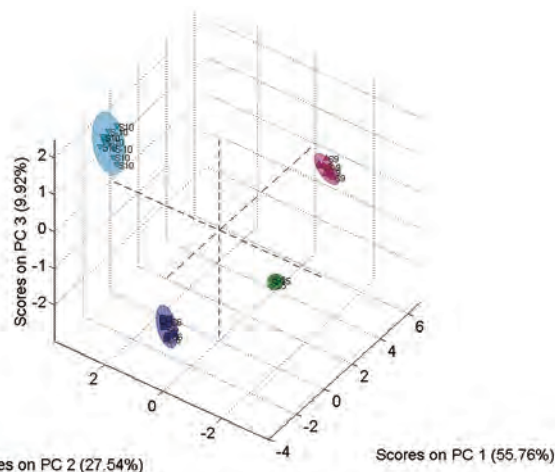


Figure 5 PCA scores scatter plot showing clear differentiation between 4 vaccine products, and excellent reproducibility for multiple measurements of a single vaccine type.

measurements, as shown in Table 3. A simple principal component analysis (PCA) was able to easily differentiate between the 4 vaccine products, with tight clustering of the calibration data.

In order to classify “unknowns” from the validation samples, a discriminant analysis model was created using Extreme Gradient Boost - Discriminant analysis. A-TEEM was able to identify and validate “unknown” samples with 100 percent certainty, as shown in Figure 6.

A-TEEM is the only spectroscopic approach that can perform this level of analysis on low concentration and complex vaccine formulations. Standard chromatographic QC approaches for vaccine batch analysis take days to complete. The results presented here demonstrate the potential for an on-line, rapid, sensitive and reproducible spectroscopic approach for vaccine QC, offer a potential solution to meet the goals for vaccine release that NIIMBL has set.

### Conclusion - The Future of Biopharma Characterization

HORIBA Instruments Inc. has a unique portfolio of analytical solutions that offer rapid, cost-efficient alternatives to chromatography, manual titer, qPCR, Analytical Ultra Centrifugation and other traditional analytical approaches. From A-TEEM to ViewSizer and with Raman as a complementary approach, these tools have the potential to

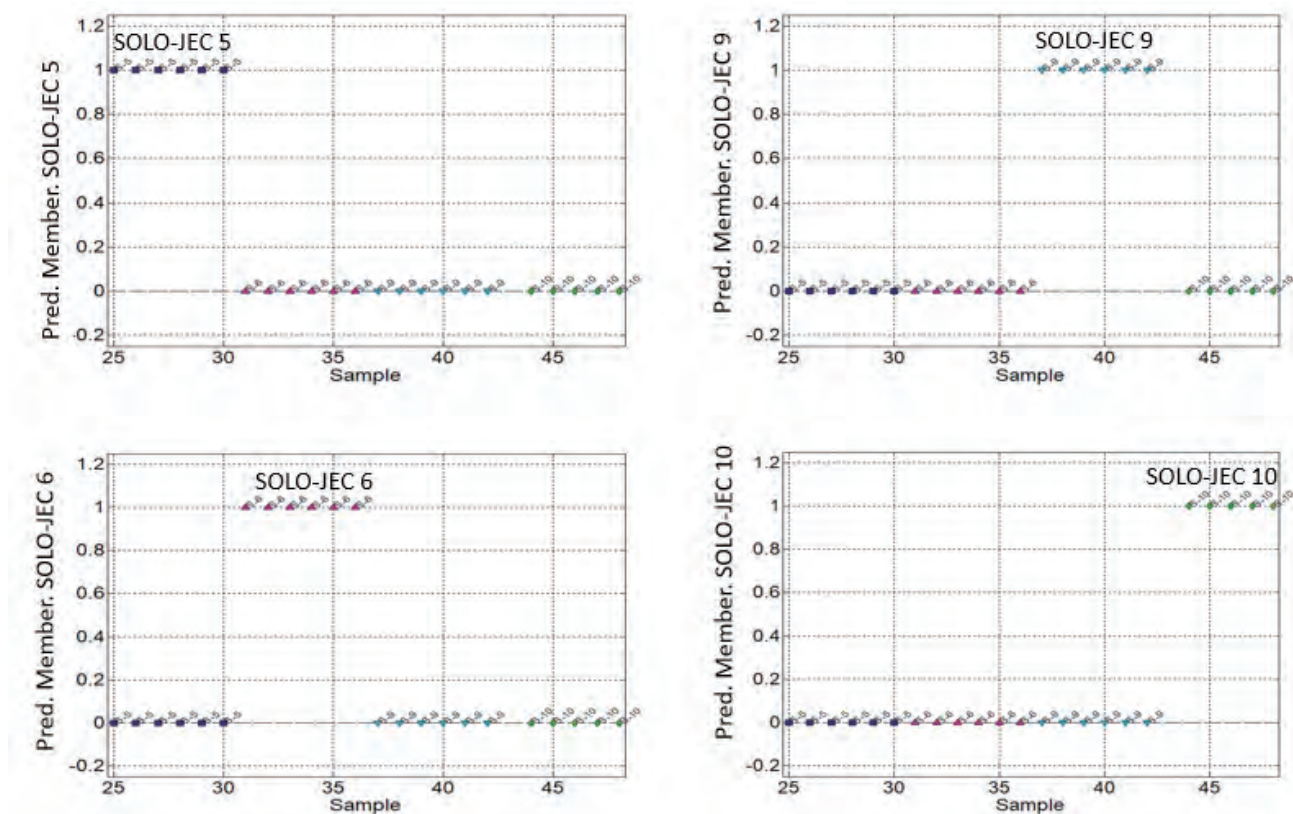


Figure 6 100% success in correctly identifying the vaccine product for unknown samples



shorten manufacturing times, and improve product safety with the ability to identify unknown components. The applications presented here are not meant to be an exhaustive compilation of the value that HORIBA tools provide to life science, but to highlight how spectroscopic and optical approaches offer a robust solution, as biopharmaceutical production methods scale to meet growing demand, and more information is needed more quickly. Starting with cell culture media, the fundamental raw material for all bioprocessing, both Raman and A-TEEM have proven utility in characterizing the quality of this material. Viral vectors are used to deliver novel vaccines and the components that make cell and gene therapies successful; ViewSizer and A-TEEM can be used to speed up analytical characterization steps that are needed in their manufacture. Finally, vaccines production has taken on new urgency, and A-TEEM has the potential to reduce QC time from weeks to hours. Other contributions in this version of Readout will explore other aspects and applications, including characterization of up-and-coming biotechnologies, like exosomes, and how HORIBA technologies are critical for the characterization of bioprobes.

\* Editorial note: This content is based on HORIBA's investigation at the year of issue unless otherwise stated.

## References

- [ 1 ] NIIMBL. <https://niimbl.force.com/s/about-niimbl>.
- [ 2 ] About Cell and Gene Therapy Catapult. <https://ct.catapult.org.uk/about-us>.
- [ 3 ] Editors, B. P. I. (2021, June 18). Horiba Joins CGT Catapult Consortium to Accelerate Development of PAT. BioPharm International. <https://www.biopharminternational.com/view/horiba-joins-cgt-catapult-consortium-to-accelerate-development-of-pat>.
- [ 4 ] Gilmore, A. M. & Tong, X. (2014, December 2). System and Method for Fluorescence and Absorbance Analysis, US Patent 8,901,153.
- [ 5 ] Peter P. Mortensen; Rasmus, Bro. Real-time monitoring and chemical profiling of a cultivation process. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 84, Issues 1-2, 1 December 2006, Pages 106-113.
- [ 6 ] Adam M. Gilmore. How to Collect National Institute of Standards and Technology (NIST) Traceable Fluorescence Excitation and Emission Spectra. National Center for Biotechnology Information. March 27, 2014.
- [ 7 ] Li et al., "Fluorescence Excitation-Emission Matrix (EEM) Spectroscopy for Rapid Identification and Quality Evaluation of Cell Culture Media Components," Applied Spectroscopy volume 65, Issue 11, 2011.
- [ 8 ] Li et al., "Rapid Characterization and Quality Control of Complex Cell Culture Media Solutions Using Raman Spectroscopy and Chemometrics." Biotech & Bioeng. Volume 2, Issue 107, 2010.
- [ 9 ] Alvin Togonon, Adam Gilmore, Ben Yang, Karoly Csatorday and Marinella Sandros. Monitoring Cell Culture Media Variability using A-TEEM™
- [10] The National Institute for Innovation in Manufacturing Biopharmaceuticals Vaccines Roadmap
- [11] P. Singh et al., "Particle size analyses of polydisperse liposome formulations with a novel multispectral advanced nanoparticle tracking technology", International Journal of Pharmaceutics, Vol. 566, 2019, pp 680-686.
- [12] Unpublished results
- [13] R. K. R. Ranaweera, "Authentication of the geographical origin of Australian Cabernet Sauvignon wines using spectrofluorometric and multi-element analyses with multivariate statistical modelling", Food Chemistry 335 (2021) 127592



**Linda Kidder YARLOTT, Ph. D.**

リンダ キダー ヤロー

HORIBA New Jersey Optical Spectroscopy Center  
HORIBA Instruments Incorporated



**Adam M. GILMORE, Ph. D.**

アダム M ギルモア

HORIBA New Jersey Optical Spectroscopy Center  
HORIBA Instruments Incorporated



**Sean TRAVERS, Ph. D.**

シヨン トラヴァース

Technical Sales Representative and Consultant for  
HORIBA Scientific  
Anatom Technology

## Fluorescent Bioprobes for Life Science Applications

ライフサイエンス分野に向けた蛍光バイオプローブの開発

### Florian FORMANEK

フローリアン フォルマネク

Bioprobes, and especially fluorescent bioprobes, have become essential tools for the detection and monitoring of important biological species and their related biological processes in live samples. Key applications of bioprobes fall into two main categories. The first one is bioimaging, from the cellular level, up to the organ and even small-animal level, *in-vitro* but also under *in-vivo* conditions. The second is biosensing, where probes are employed to detect various entities like ions, reactive oxygen species (ROS) or macromolecules, to help detect cancer, to observe drug internalization, and much more. This featured article will detail the typical characterization needs for the development and the use of the most common families of bioprobes: 1) determination of optical emission profiles; 2) measurement of size; 3) assessment of elemental composition or molecular signature. The article will showcase how HORIBA Scientific instruments are used by chemists all over the world to obtain rapid feedback on the best direction to follow to improve their synthesis processes.

#### key words

Fluorescence, Bioprobes, Sensing, Bioimaging

バイオプローブ、特に蛍光応答が得られる蛍光バイオプローブは、生体試料中の重要な生物種やその生体反応の検出と監視に不可欠な手法となっている。バイオプローブの主な適用分野は二つあり、まずバイオイメーjing(生体画像処理技術)分野では、細胞レベルから器官・小動物を対象に、インビトロ(試験管内)だけでなくインビボ(生体内)条件下でも用いられている。次にバイオセンシング(生体起源の分子認識機構を利用した化学的検出技術)分野があり、各種イオン、活性酸素(ROS)、高分子の検出に蛍光バイオプローブを用いることで、癌の検査や薬剤のインターナリゼーション(内部移行)の観察など多方面に応用されている。この特集論文では、広く用いられている何種類かのバイオプローブについて詳述し、分析ニーズの代表例について 1)発光特性の決定、2)大きさの計測、3)元素組成や分子シグネチャー(特徴的配列)評価 といった用途について紹介する。私たちHORIBAの科学分析機器が世界中の化学者の皆様にどのように使われて、皆様の分析プロセスの向上をもたらすベストの指針を提供しているかをお示したい。

#### キーワード

蛍光、バイオプローブ、センシング、バイオイメーjing

### Introduction

Bioprobes are fluorophores, fluorescent chemical compounds that re-emit light upon light excitation, intended

for Life Sciences applications. Bioprobes can be called many things, tags, labels, sensors, reporters, or sensors, but they always refer to same thing. They are sometimes used alone, as tracers in fluids, as dyes for staining, as



Figure 1 General families of fluorescent bioprobes.

indicators (when their fluorescence is affected by environmental factors such as polarity, temperature, viscosity, or pH), or bound to macromolecules, serving as a marker for affinity or bioactive reagents.

Bioprobes are employed in a variety of domains from biomedical research to clinical applications and diagnostics. The first application is biosensing, which is the detection of biomolecules using an analytical device (or biosensor) combining a biological component with a detector. Small point-of-care devices used for diagnostics often rely on fluorescent bioprobes for their optical readout. This is also the case for devices intended for the monitoring of anthropogenic pollutants in various water matrices and aquatic environments.

Bioprobes are widely used to stain tissues, cells, or other biomaterials in a variety of analytical methods, including fluorescence imaging and spectroscopy. For instance, for *in-vivo* bioimaging in cancer research, to help with guided surgery in combination with other multimodalities. For that purpose, many groups are currently working on the development of near-infrared (NIR) emitting tags which are better adapted to deep-tissue imaging, taking advantage of reduced interference from photon absorption and scattering in this optical window.

High-content screening (HCS) systems used in the pharmaceutical domain for drug discovery also rely on fluorescent probes. The most common analysis workflow involves labeling proteins with fluorescent tags, while changes in cell phenotype are measured using automated image analysis in multiwell plates, in order to optimize synthesis processes or to confirm if a drug has the expected effect on its target.

Flow cytometry, which is used for biomarker detection, cell counting and sorting, or microorganism identification, is based on labels for measuring the physical properties of cells or particles. In most cases, fluorescent bioprobes with characteristic excitation and emissions peaks are designed to attach to a specific biological structure, for example a surface protein, to allow sorting cells

in a fluidics setup, based on the fluorescence measured in different detection channels.

A new and rapidly growing field is the clinical application of bioprobes for photodynamic therapy (PDT), which shows great promises for cancer treatment by killing cell with the heat produced locally by the particles upon light absorption.

Here, research focuses on finding dyes with properties like good biocompatibility, specific targeting, or strong two-photon absorption.

Bioprobes can be grouped into 3 main categories, as illustrated in Figure 1. Organic dyes (e.g., fluorescein, rhodamine), biological fluorophores (e.g., green fluorescent protein, phycoerythrin, allophycocyanin) and fluorescent nanostructures or nanomaterials (e.g. quantum dots, AIEgens).

Organic dyes are small molecules mostly synthesized through chemistry, but which can also be found in nature, like in plants. Common tags employed for confocal fluorescence microscopy are found in this category.

Biological fluorophores on the other hand are large molecules, typically fluorescent proteins, the most famous of all being GFP (Green Fluorescent Protein). DNA, which falls into this category does not have intrinsic fluorescence but can be used as biotags once coupled to a fluorophore.

Finally, we have nanomaterials that are engineered with specific chemical functions or tailored structures to generate unique light emission. This class of material encompasses a wide range of objects, like metallic nanoclusters, core-shell fluorophores, carbon dots, supramolecule assemblies and many more.

## Characterization needs

### Simultaneous Absorbance and Fluorescence

When studying novel bioprobes with unknown characteristics

or with emission properties impacted by solvent effects, having a complete fluorescence profile of a given material over a large range of wavelengths is key to avoid reperforming additional measurements at a later stage. An Excitation Emission Matrix (EEM), which is basically a three-dimensional scan that results in a contour plot of excitation wavelength vs. emission wavelength vs. fluorescence intensity, can provide such information (Figure 2).

Of importance as well when characterizing concentrated solutions (typically above 0.1 to 0.2 absorbance units), which is often the case when synthesizing bioprobes, is to account for the Inner Filter Effect (IFE). The IFE is a well-known phenomenon that distorts the measured fluorescence spectrum of a molecule due to absorption within the optical path length of the liquid sample, traditionally measured in a cuvette. IFE can significantly affect fluorescence emission spectral profiles, distorting their general shape, shifting the spectral position of the peak maximums, and decreasing the emission intensities, preventing from performing true quantitative analysis.

IFE can be corrected using absorbance data, and the HORIBA Duetta two-in-one spectrometer is unique in that it combines absorbance and fluorescence measurements on the same platform, allowing real-time correction for the IFE, on the same sample at the same time, as illustrated in Figure 2. It also takes advantage of an extended wavelength detection up to 1100 nm to cover the useful

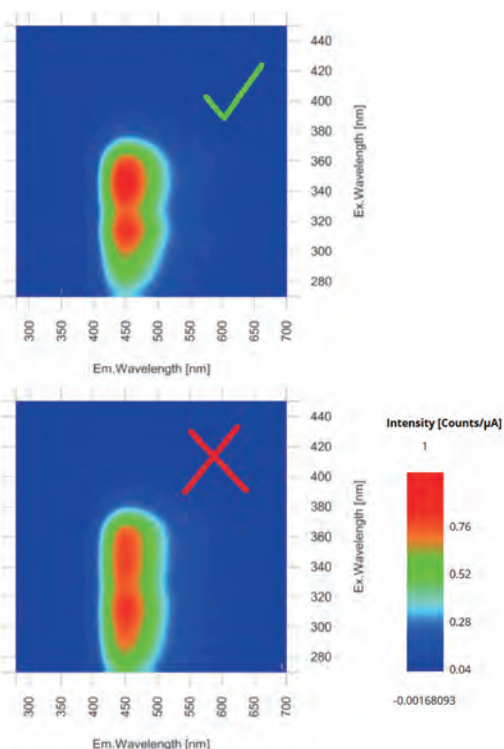


Figure 2 Fluorescence EEM profiles obtained with a HORIBA Duetta spectrometer, with (top) and without (bottom) inner filter effect correction.

NIR biological transparency window.<sup>[1]</sup>

### Quantum Yield

The fluorescence quantum yield (QY) is defined as the ratio of photons emitted to photons absorbed by a fluorophore, basically an indicator of its brightness. This parameter is crucial for fast bioimaging consideration, as samples are often light sensitive or present rapid time kinetics.

A reliable method for recording the QY is a comparative method which involves the use of well characterized reference standards with known properties.

A second approach compatible with liquid samples is based on lifetimes and different concentrations of a



Figure 3 Quanta-φ integrating sphere coupled to a FluoroMax-4 spectrometer by HORIBA for quantum field determination.

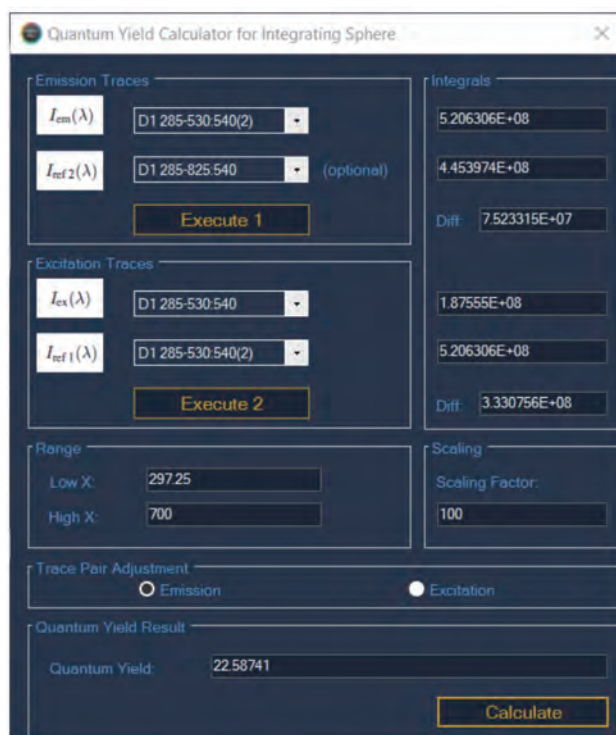


Figure 4 Interface window of the FelixFL software on the HORIBA Fluorolog-QM spectrometer with integrated quantum yield calculator.

quencher to calculate the QY of a molecule in accordance with the Stern-Volmer equation. HORIBA customers from the Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology (EMPA) recently reported on this method for their work on polyimide-based photoemitters for oxygen biosensing.<sup>[2]</sup>

However, the most accepted method to determine the absolute QY is to employ an integrating sphere (Figure 3), a sphere coated with an all-reflective surface to capture all the light going in and out.

A recent example of the use of the HORIBA Quanta- $\phi$  integrating sphere by scientists from the University of Chile explains the synthesis of an anthracene derivative dye with solvatochromic properties and highlights the importance of designing bright bioprobes for microscopy experiments on living cells.<sup>[3]</sup> Accurate quantum yield determination can be made easier using a dedicated application embedded in most HORIBA software, as seen in Figure 4.

### Lifetime

The fluorescence lifetime is a photophysical property of bioprobes, providing complementary information to the simple steady-state monitoring of fluorescence intensity. The technique has gained popularity thanks to its high sensitivity to microenvironmental parameters and changes in molecular conformation such as temperature, viscosity, pH, and ion concentration. At the same time, lifetime measurements are largely independent of fluorophore concentration and do not require calibration steps like intensity-based experiments.

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) sensors,

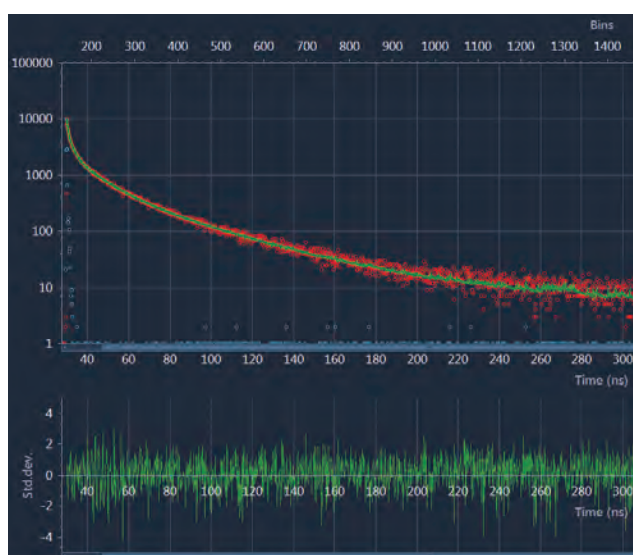


Figure 5 Lifetime decay (red) and fit (green) to a 5-exponential decay equation, expressed in photon counts. The lower graph shows the standard deviation error residuals from the fit to the fitted data.

which are widely used to monitor protein-protein interactions to elucidate cellular signaling, disease progression and drug efficacy, also benefit from a lifetime monitoring, especially for *in-vivo* applications. Figure 5 illustrates the lifetime decay for a solution of Qtracker 655 quantum dots, collected on a HORIBA DeltaPro spectrometer equipped with a photomultiplier and a DeltaDiode485L pulsed laser source.

### Polarization

Fluorescence anisotropy or fluorescence polarization is a measurement of the changing orientation of a molecule in space, with respect to the time between the absorption and emission events. Anisotropy is an excellent tool for understanding changes in macromolecule shape, as well as molecular binding.

Figure 6. exemplifies the confirmation of effective binding between an antibody and the bronchodilator drug Theophylline labeled with a fluorescein dye and mixed with an antiserum in pH 7.2 buffer, then incubated for 3 minutes. The free and the complexed drug were distinguished through polarization measurements.

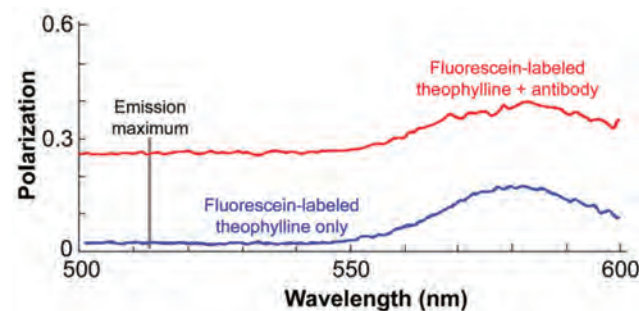


Figure 6 Polarization emission scan for labeled theophylline with (red) and without (blue) antibody ( $\lambda_{exc} = 485$  nm). The emission maximum for fluorescein-labeled theophylline is marked by a gray line.

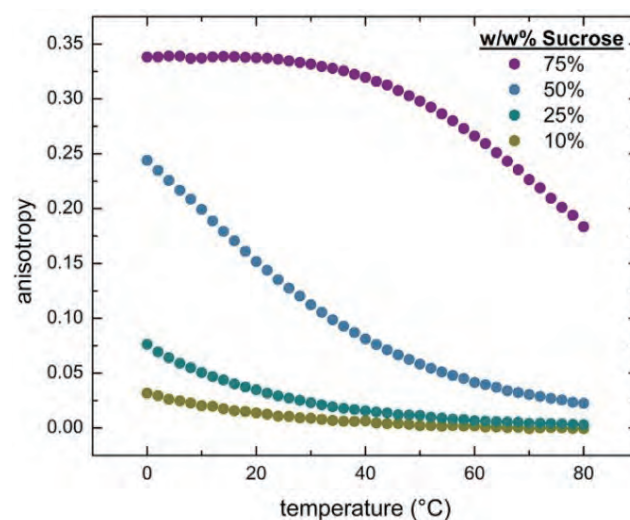


Figure 7 Fluorescein dissolved in sucrose solutions. With increased temperature, viscosity decreases, yielding faster rotation times and lower anisotropies.

Figure 7 shows additional polarization measurement of fluorescein dye dissolved in four aqueous solutions, performed with a HORIBA Fluorolog-QM spectrometer.

This indirect measure of the local viscosity gives information on sample aggregation, structural changes, molecular binding, and other mechanisms.

### Bioimaging

Fluorescent bioprobes, especially small organic molecules, have become indispensable tools in modern biology. For research on living cells, these probes need to fulfill specific requirements like high permeability and good intracellular solubility, good affinity and specificity for the target, photostability, as well as low toxicity.

Microscopes with epifluorescence illumination are routinely used to observe the penetration and distribution of labelled targets within cell organelles to provide information on their structure and functions. Figure 8 illustrates

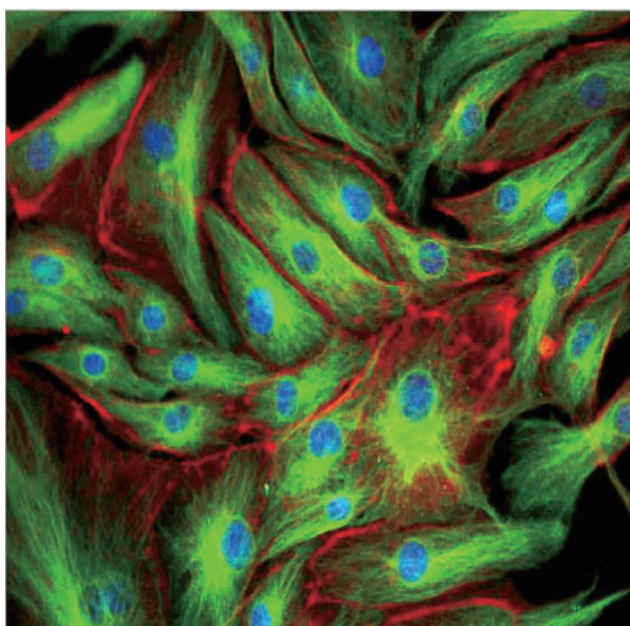


Figure 8 Epifluorescence imaging of Bovine Pulmonary Artery Endothelial cells (BPAE Line) with Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody, stained with BODIPY, Texas Red and DAPI fluorophores, using a HORIBA XploRA microscope.

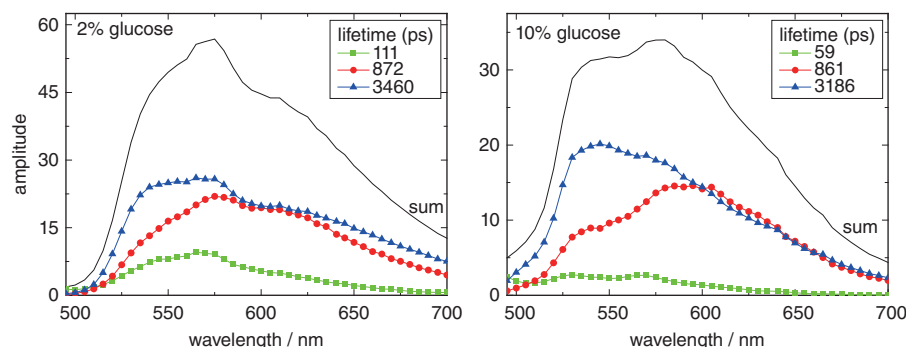


Figure 9 Left: Decay associated spectra for the FUN-1 dye in yeast cells grown in different growth media, also showing the sum spectrum that relates to the steady state emission. Right: FLIM measurement of DASPMI stained *Saccharomyces cerevisiae* in a polysaccharide polymer grown.

cell staining with multiple probes, Texas Red as a marker of proteins, DAPI as an indicator of membrane viability, and BODIPY to reveal neutral lipids.

The influence of environmental parameters on intra- and intermolecular interactions at the cellular level can also be obtained with microscopy instruments by monitoring the fluorescence lifetime of fluorophores instead of their intensity.

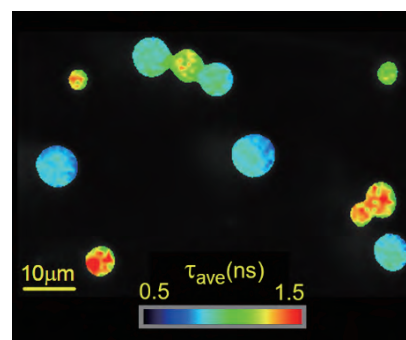
HORIBA now offers a new concept of wide field imaging, called FLIMera, capable of video-rate lifetime determination, based on time-correlated single photon counting technique (TCSPC) realized independently in each pixel.<sup>[4]</sup>

Figure 9 highlights research done with the FLIMera camera by HORIBA application teams in collaboration with Glasgow Caledonian University (UK). *Saccharomyces cerevisiae*, a single-celled fungus microorganism, was stained with a viscosity sensitive mitochondrial fluorescent probe called DASPMI to assess its viability. The cells displaying a longer average lifetime for DASPMI are associated with cells having a higher microviscosity, which is indicative of cell death (Figure 9 Right).

In addition, the decay associated spectra were determined for yeast cells suspended in growth medium, to investigate the photophysics of the fluorescence emission (Figure 9 Left). The use of the two-color FUN-1 stain, which transports into cell vacuoles, revealed the condition of plasma membranes through the formation of cylindrical intravacuolar structures.<sup>[5]</sup>

### Research based on HORIBA instruments

HORIBA Scientific is proud to count world-leading research teams among its customers. This following section will highlight a selection, far from exhaustive, of their recent publications in the field of bioprobes.



### Photodynamic therapy

Photodynamic therapy refers to treatments which involve light-sensitive therapeutics which can be switched “on” with a light source to destroy abnormal cells and treat various types of diseases.

The development of multifunctional bioprobes for simultaneous specific near-infrared (NIR) imaging and phototherapy of tumors being of great significance. For this purpose, our Fluoromax-4 spectrometer users at the City University of Hong Kong (China) reported on the integration of protoporphyrin IX (PpIX) into nanoscale metal-organic frameworks (NMOFs).<sup>[6]</sup>

Another example can be found in a recent publication in the journal *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, where a fluorophore called indocyanine green was co-encapsulated with a CT (Computed Tomography) contrast agent within nanoliposomes for imaging guided treatment. For this work, a Fluorolog-3 instrument from HORIBA recorded the fluorescence spectra in the NIR range and helped with the formulation of the particles.<sup>[7]</sup>

### Bioluminescence

Recently, our European laboratory, based South of Paris (France) on the Paris-Saclay campus, was closely involved in research with the famous Institut Pasteur.<sup>[8]</sup> Time-dependent chemiluminescence properties of core-modified coelenterazine luciferin analogues were recorded in the range of 250 to 800 nm using a HORIBA Aqualog spectrometer. These small molecules generated in bioluminescent organisms show great promise for bioimaging and therapeutics, by eliminating the need for external optical illumination and avoiding autofluorescence background in existing fluorescence techniques.

A recent publication highlights the application of such probes for the detection and imaging of peroxynitrite, a reactive nitrogen species (RNS), in live cells and mice *in-vivo*.<sup>[9]</sup> A HORIBA Fluoromax-4 spectrofluorometer was used to measure the bioluminescence emission of the synthesized compounds.

### Ion sensing

As detailed in the introduction, a major application for bioprobes is biosensing, especially to monitor inorganic ions which are essential for cellular activity.

Researchers from the College of Pharmacy at Seoul National University (Korea) have developed novel fluorescence cellular iron ions sensors to better understand cell death processes.<sup>[10]</sup> Their work required advanced characterization tools. A HORIBA FluoroMax-4 spectrometer was used to study the fluorescence response of their che-

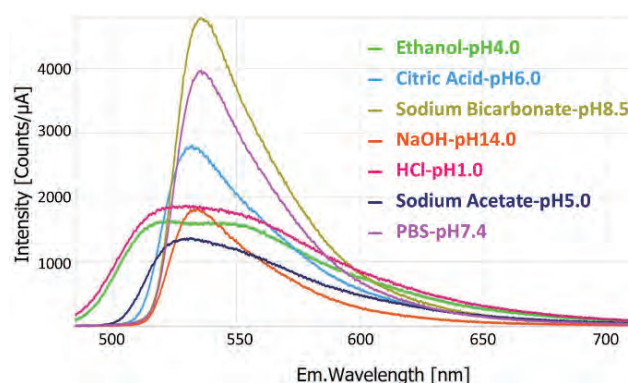


Figure 10 Fluorescence spectra of the widely used FITC dye (Fluorescein isothiocyanate) in different solvents and under varying pH conditions.

mosensors in the presence of various metal ions. The brightness of the probes was assessed by measuring the absolute quantum yield with an integrating sphere assembly. Finally, kinetics information was obtained through fluorescence decay curves and analyzed using the DAS6 decay analysis software.<sup>[11]</sup>

Another group from the College of Chemistry and Materials Science from Nanning (China) proposed an efficient fluorescent sensor to detect Ag<sup>+</sup> but also L-cysteine in complex biological fluids and living cells using nitrogen, boron, sulfur co-doped carbon dots. The fluorescence emission profile, quantum yield, as well as lifetime of those nanostructures were determined using a HORIBA QM-8075 QuantaMaster instrument.<sup>[12]</sup>

### Microenvironment

Bioprobe fluorescence spectra are very sensitive to local environment, including solvent polarity, pH and temperature. This sensitivity is often leveraged in cell physiology research as many processes (metabolism, cell proliferation, membrane potential, etc.) are affected by changes in these parameters. Figure 10 shows the evolution of FITC emission properties under different pH conditions.

Besides pH, other local environmental factors can be assessed with specific tailored probes. Scientists from the National Academy of Sciences of Belarus have for instance designed carboxyfluorescein bifluorophores as viscosity sensors in model lipid bilayers or internal membranes of live cells.<sup>[13]</sup> Indeed, viscosity is one of the key parameters that controls the diffusion rate of molecular species and affects the reaction speeds of diffusion-controlled processes at the microscopic scale.

For their research, they have used a HORIBA Fluorolog-3 spectrometer to measure the fluorescence spectra and degree of polarization of the molecules.

### A focus on quantum dots

An important class of fluorescent nanomaterials is nanoparticles of semiconductors called quantum dots or QDs. QDs are artificially designed nanostructures which display unique emission properties depending on their composition and shape. They offer several advantages over organic fluorophores, among them brighter emission, photostability, broader excitation spectra combined with sharper emission peaks to avoid signal overlap for multi-color labelling.

As quantum objects, QDs emission wavelengths directly relates to their dimension (Figure 11. a), therefore controlling their size at different steps of their production is key. Using a HORIBA SZ-100 analyzer relying on dynamic light scattering (DLS), CdTe QDs with a passivation coating layer were measured in aqueous solution in a microcuvette and revealed a monodisperse distribution centered around 9.9 nm with a standard deviation of 3.4 nm (Figure 11. d)

Because of their brightness, QDs emission profiles can readily be measured with any spectrofluorometer.

However, we have seen before that due to inner filter effects (IFE), the fluorescence of bioprobes may not coincide with the true fluorescence emission, even for low concentrations.<sup>[14]</sup> This is visible in Figure 11.b where InP/ZnS QDs were measured with the HORIBA Duetta instrument capable of simultaneous IFE correction. Besides the obvious difference in fluorescence intensity, we see that the position of the peak maximum is blue shifted by 15 nm.

Apart from controlling the expected optical emission properties, verifying the elemental composition of synthesized or purchased QDs is important to validate chemical synthesis routes, but also for safety and ecological consideration. This information can be easily obtained by using X-Ray Fluorescence (XRF) spectroscopy. Figure 11. c. shows a XRF spectrum of commercially available CdTe QDs functionalized with an organosulfur compound, characterized under solid form with a HORIBA XGT-9000 analyzer.

Typical QDs have the disadvantage of showing potential cytotoxicity for biomedical applications, as their core-

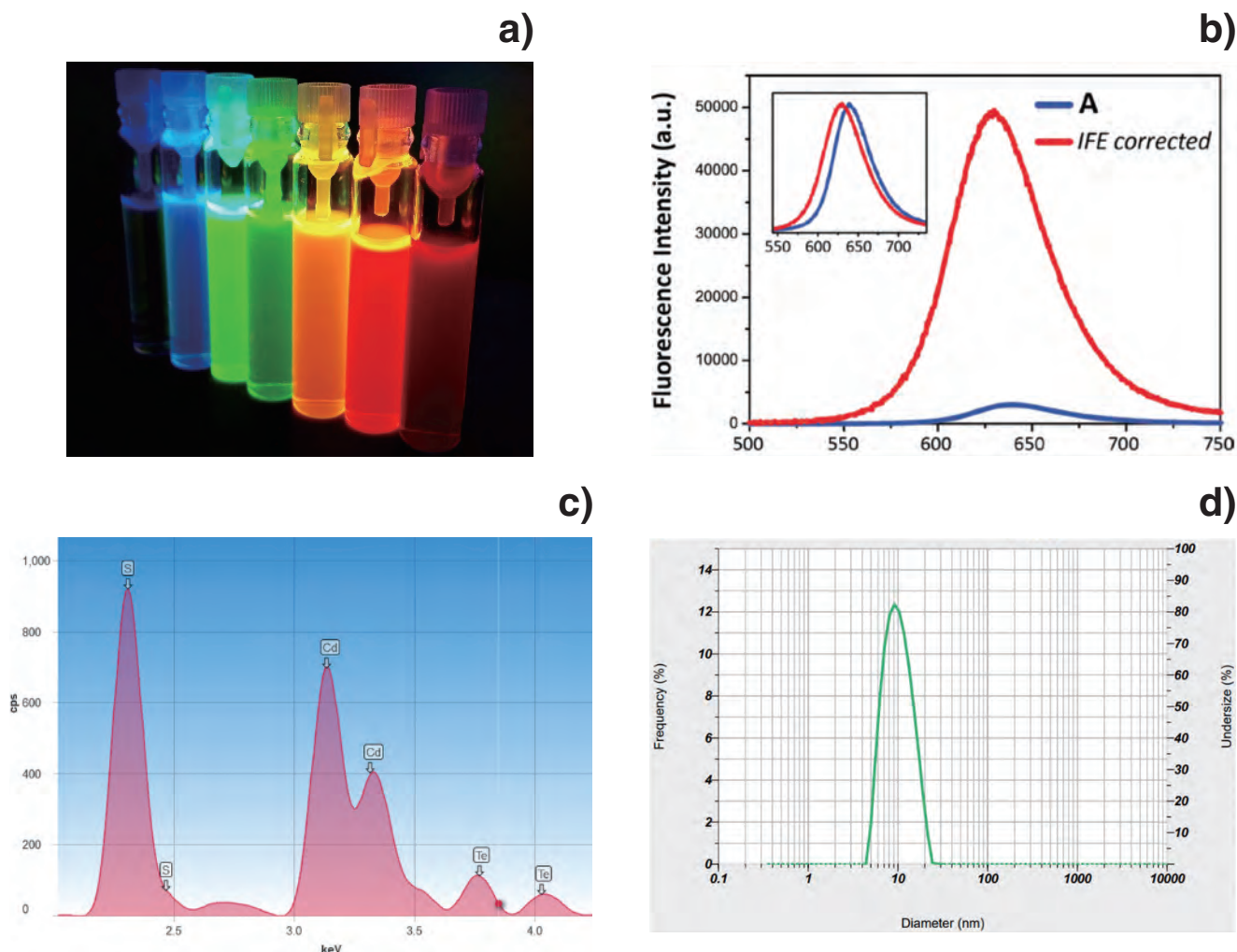


Figure 11 a) QDs of different sizes showing different emission colors. b) QDs fluorescence emission profile extracted from an Excitation Emission Matrix. c) QDs elemental composition determined by X-Ray Fluorescence spectroscopy. d) QDs size distribution obtained by dynamic light scattering.



shell structures often contain heavy metals in the form of binary chemical compounds such as lead sulfide (PbS), cadmium selenide (CdSe), gallium arsenide (GaAs), or zinc telluride (ZnTe), which can generate reactive oxygen species, which in turn damage cellular proteins, lipids, and DNA. Therefore, significant efforts have recently been made to find alternative biocompatible materials.

Such a structure, with low toxicity and chemical inertness can be found in the form of carbon dots. Researchers from the University of Madras (India) recently reported on carbon dot nanocomposites conjugated with chitosan, acting both as a nano-drug carrier (for dopamine encapsulation in this case) and as a delivery tracer through bioimaging.<sup>[15]</sup>

Besides photoluminescence characterization of the probes with a HORIBA Fluorolog-3 spectrometer, the authors also employed Raman spectroscopy with a HORIBA LabRAM HR microscope to confirm the intensity ratio of the D band (1378 cm<sup>-1</sup>) to the G band (1580 cm<sup>-1</sup>) to control the presence of defects or amorphous carbon.

Another approach to avoid QDs toxicity is to encapsulate them in order to prevent their degradation when internalized, and to control their release at the right target. Our FluoroMax user at the University of Leeds (UK) proposed “sweet” QDs capped with mannose, (a sugar monomer important in human metabolism), to probe multivalent interactions of HIV/Ebola receptors using a sensitive, ratiometric FRET assay. The detection scheme is based on the fluorescence intensity ratio measured at wavelengths of 626 nm and 554 nm.<sup>[16]</sup>

## Conclusion

We have seen that fluorescence bioprobes have become tools of choice for various applications in bioimaging and biosensing.

HORIBA Scientific offers a comprehensive suite of analytical tools capable of covering the variety of characterization needs required for the design and the optimization of chemical synthesis routes of such novel probes.

\* Editorial note: This content is based on HORIBA’s investigation at the year of issue unless otherwise stated.

## References

- [1] [https://www.horiba.com/en\\_en/products/detail/action/show/Product/duetta-1621/](https://www.horiba.com/en_en/products/detail/action/show/Product/duetta-1621/)
- [2] *Reversible and Broad-Range Oxygen Sensing Based on Purely Organic Long-Lived Photoemitters*. Applied Polymer Materials, 3 (2020).  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsapm.1c00064>
- [3] *CAPRYDAA, an anthracene dye analog to LAURDAN: a comparative study using cuvette and microscopy*. Journal of Materials Chemistry B, 8 (2020).  
<https://doi.org/10.1039/C9TB01738K>
- [4] [https://www.horiba.com/en\\_en/products/detail/action/show/Product/flimera-1989/](https://www.horiba.com/en_en/products/detail/action/show/Product/flimera-1989/)
- [5] *Viability of Saccharomyces cerevisiae incorporated within silica and polysaccharide hosts monitored via time-resolved fluorescence*. Photochemical & Photobiological Sciences, 12 (2013).  
<https://doi.org/10.1039/C3PP50202C>
- [6] *Harnessing combinational phototherapy via post-synthetic PpIX conjugation on nanoscale metal-organic frameworks*. Journal of Materials Chemistry B, 31 (2019).  
<https://doi.org/10.1039/C9TB01154D>
- [7] *Co-encapsulating indocyanine green and CT contrast agent within nanoliposomes for trimodal imaging and near infrared phototherapy of cancer*. Nanomedicine, 29 (2020).  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102269>
- [8] <https://research.pasteur.fr/fr/project/design-and-optimization-of-new-bioluminescent-systems-better-suited-to-in-cellulo-and-in-vivo-conditions/>
- [9] *A Bioluminescent Probe for Imaging Endogenous Peroxynitrite in Living Cells and Mice*. Analytical Chemistry, 90 (2018).  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00198>
- [10] *Novel turn-on fluorescent biosensors for selective detection of cellular Fe<sup>3+</sup> in lysosomes: Thiophene as a selectivity-tuning handle for Fe<sup>3+</sup> sensors*. Dyes and Pigments, 169 (2019).  
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.05.008>
- [11] [https://www.horiba.com/en\\_en/products/detail/action/show/Product/das6-1377/](https://www.horiba.com/en_en/products/detail/action/show/Product/das6-1377/)
- [12] *Red emission nitrogen, boron, sulfur co-doped carbon dots for “on-off-on” fluorescent mode detection of Ag<sup>+</sup> ions and l-cysteine in complex biological fluids and living cells*. Analytica Chimica Acta, 1035 (2018).  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.051>
- [13] *Fluorescent Properties of Carboxyfluorescein Bifluorophores*. Journal of Fluorescence, 30 (2020).  
<https://doi.org/10.1007/s10895-020-02535-w>
- [14] [https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material\\_Research/Quantum\\_Dots/How\\_IFE\\_Can\\_Affect\\_Fluorescence\\_Measurements.pdf](https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Application/Materials/Material_Research/Quantum_Dots/How_IFE_Can_Affect_Fluorescence_Measurements.pdf)
- [15] *Luminescent chitosan/carbon dots as an effective nano-drug carrier for neurodegenerative diseases*. RCS Advances, 10 (2020).  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=d0ra04599c>
- [16] [https://www.leeds.ac.uk/news/article/3841/quantum\\_dots\\_light\\_the\\_way\\_for\\_new\\_hiv\\_and\\_ebola\\_treatment](https://www.leeds.ac.uk/news/article/3841/quantum_dots_light_the_way_for_new_hiv_and_ebola_treatment)



**Florian FORMANEK**

フローリアン フォルマネク

HORIBA Scientific, France  
Global Life Sciences Market Manager  
Ph. D.

## 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

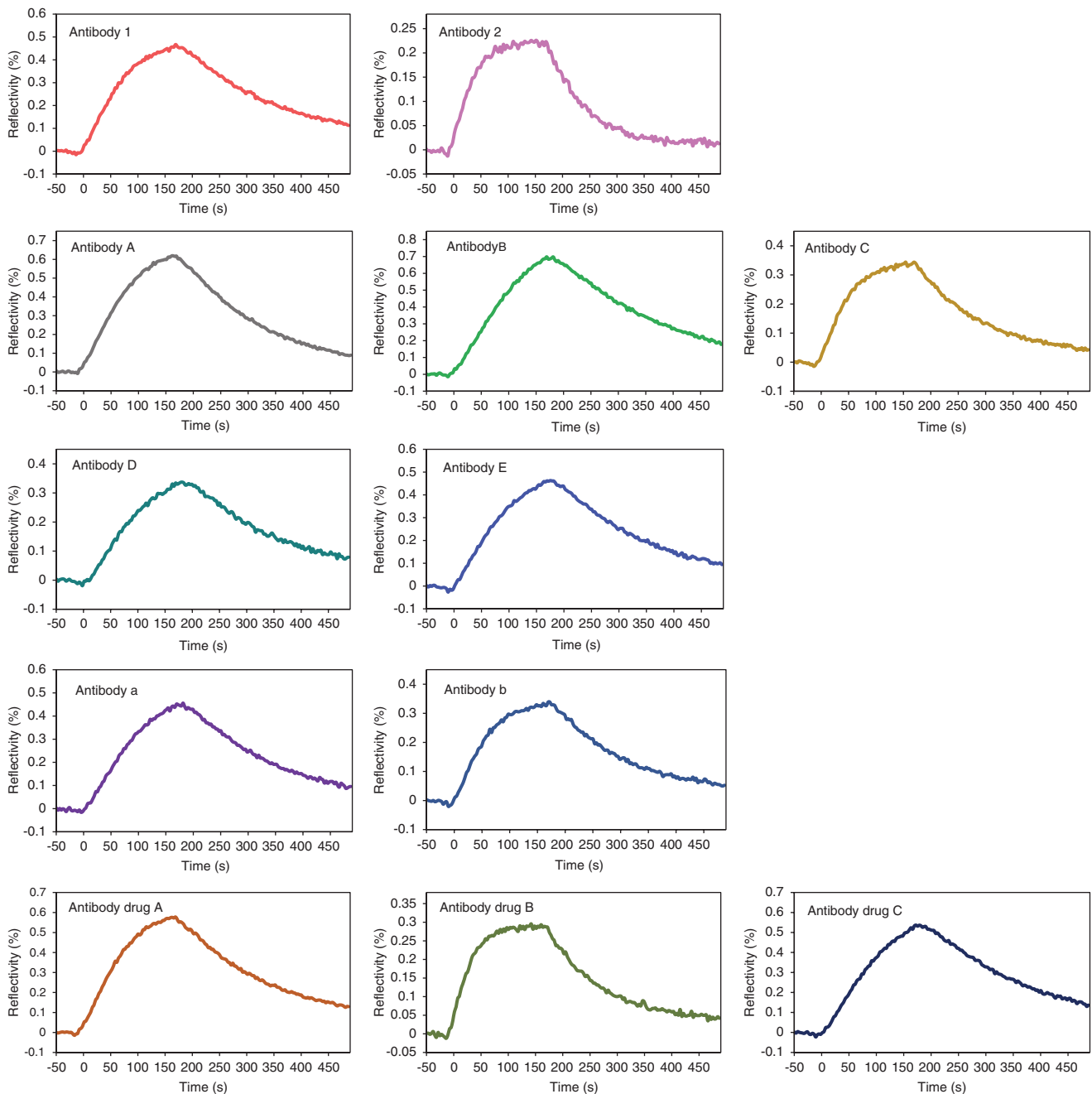


Figure 2 Measurement results with OpenPlex

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

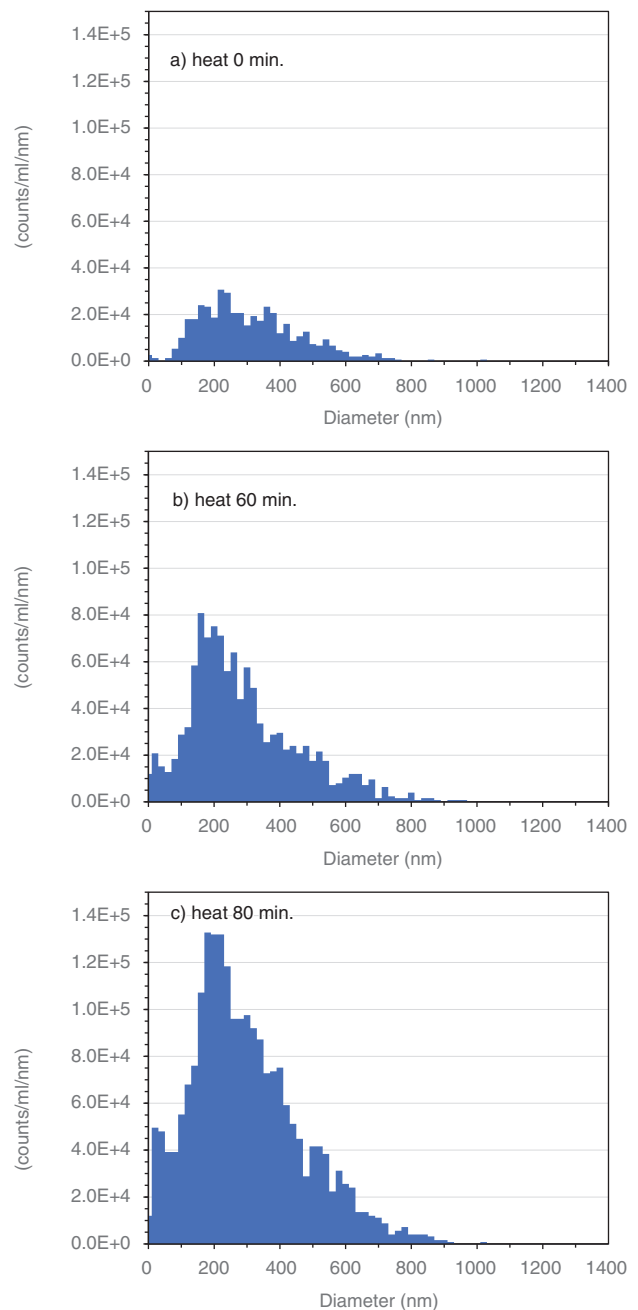


Figure 4 Measurement results with ViewSizer3000

ている<sup>[1]</sup>。

### 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 (10<sup>10</sup>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<sup>[2]</sup>。

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MagCapture<sup>TM</sup> Exosome Isolation Kit PS(富士フィルム和光純薬工業)で精製した<sup>[3]</sup>。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

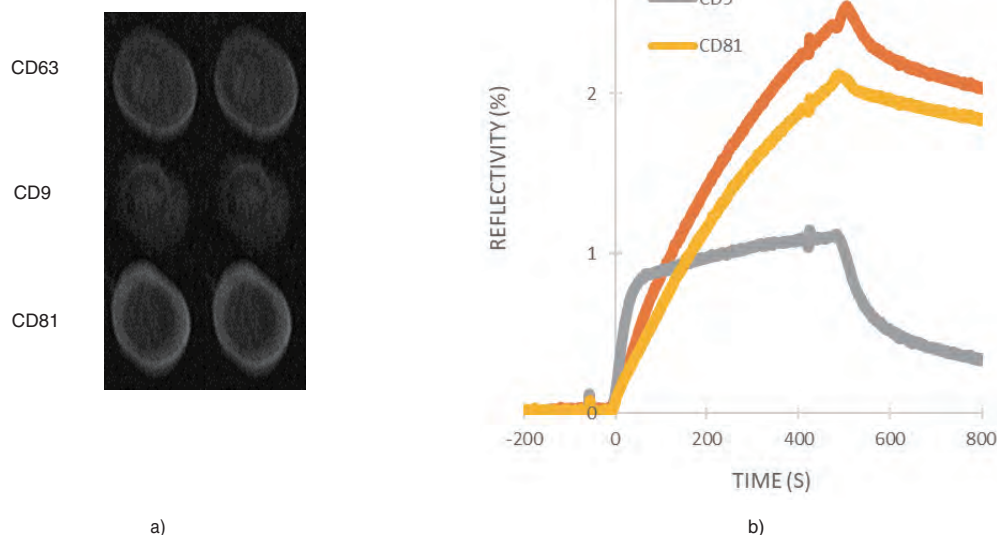


Figure 5 Exosomes detection results with OpenPlex  
a) Spot Imaging  
b) Reflectance change

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。

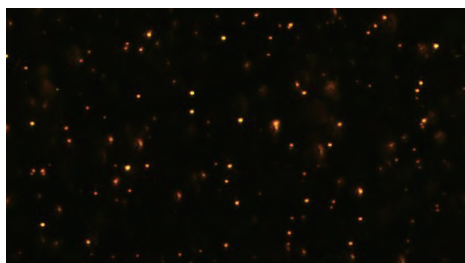
以上のように、我々はエクソソームを用いた基礎医学および創薬分野への貢献を期待し、疾患特異的なタンパク質の同定の研究に取り組んでいる。また、「同時多検体測定」、「細胞や細菌を対象とした相互作用解析」ができるOpenPlexの特長や、3波長を使用した蛍光計測も可能なViewSizer3000の特長を活かし、前述のバイオ医薬品を始めとした様々なモダリティを対象とした創薬領域でも活用されるよう取組みの幅を広げていきたいと考えている。

## 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。



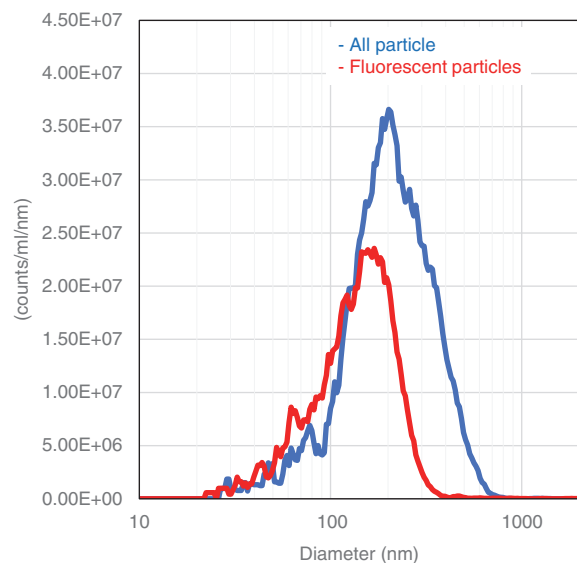
a)

### (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」<sup>[4]</sup>

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<sup>[5]</sup>、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<sup>[6]</sup>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<sup>[7]</sup>、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.

## 1細胞レベルのATPを高感度に検出する 微生物迅速検査装置 Rapica

Introduction of “Rapica” for Sensitive and Rapid Detection of ATP at the Level of One Microbial Cell

小牧 直人

KOMAKI Naoto

中山 秀喜

NAKAYAMA Hideki

深尾 嘉希

FUKAO Yoshiki

中井 陽子

NAKAI Yoko

微生物は目視で確認できないため、対象の微生物に応じた培地や温度条件で培養を行い、目視で観察できるサイズまでコロニー形成をさせることで検出することができる。しかし、微生物のコロニー形成までには微生物種にもよるが数日～数週間の時間を要する。医薬品の製造工程で使用される製薬用水では4～7日間、無菌医薬品の出荷試験に使われる無菌試験では14日間もの培養を行う必要がある。しかし、近年の技術発展により微生物の成分や代謝物を直接測定することで直接(非培養)もしくは短時間の培養で微生物検出ができる装置が開発されており、HORIBAでは、微生物が持つ極めて微量のATPを短時間で検出できる微生物迅速検査装置Rapicaを開発した。その特長及び測定事例について紹介する。

\*ATP: Adenosine triphosphate(アデノシン三リン酸)

キーワード

微生物迅速法, ATP法

Since microorganisms are invisible to the naked eye, and they can be visually confirmed when forming colonies by incubating under the appropriate culture media and temperature. Cultivation of microorganisms takes time: 4 to 7 days for pharmaceutical water used in pharmaceuticals, and 14 days for sterility tests used in release testing for sterile pharmaceutical products. HORIBA has developed Rapica, a rapid microbiological test system that can detect extremely small amounts of ATP possessed by microorganisms in a short time without culturing. We introduce its features and applications in this article.

key words

RMM : Rapid microbiological method, ATP method

### はじめに

微生物は増殖する過程で腐食や変質、見た目の悪化など、製品の品質に影響を与える要因となるため、様々な業界において、微生物の制御を目的とした殺菌や滅菌、抗菌などの処理や微生物検査が行われている。微生物検査は一般的に培地において微生物を増やす「培養法」が使われている。しかし、培養法には「数日単位の培養時間が必要」、「培養できない微生物は検出できない」、「手作業が多い」など、いくつかの課題もある。特に培養時間がかかることで、「汚染検知の遅れ」、「出荷検査結果待ちによる在庫管理費の上昇」、「環境中の微生物試験結果待ちによる生産効率の低下」、「開発期間の長期化」など、いくつかの点で品質やコストに直結する課題となる。

これに対し、微生物を増殖させずに検出する方法や、従来よりも短時間の培養で早期に検出する方法が研究開発されており、これらはまとめて微生物迅速法(RMM: Rapid



Figure1 Appearance of Rapica, the rapid microbial detection system



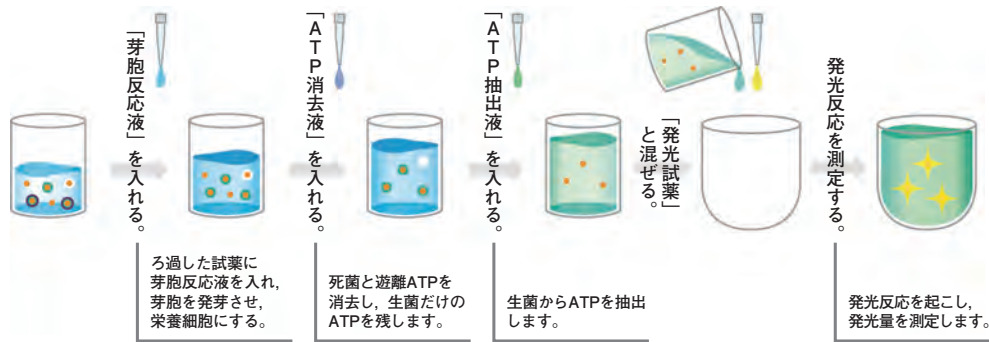


Figure 2 Overview of the measurement principle

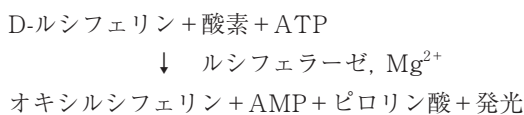
microbiological methods)と呼ばれている。飲料や食品などの業界ではすでに積極的に微生物迅速法を活用した検査が行われており、近年、製薬業界でもいくつかの手法が採用されてきた。また、遺伝子治療や細胞治療のような再生医療の領域では、製品の特性上、患者へ投与するまでの時間が短いため、検査結果を待たず出荷されており、短時間での微生物検査が求められている。

今回開発した微生物迅速検査装置Rapica (Figure 1)は、1細胞が持つATPを検出できる「高感度ATP法」を用いており、通常約2.5時間で微生物の検出が可能である。さらに試薬分注操作の自動化により、測定者からの微生物汚染リスクの低減、24検体の同時多検体処理、分注作業の技能差を無くすことによる高精度な測定を実現している。

## 高感度ATP法の測定原理

ATPとは、アデノシン三リン酸(Adenosine triphosphate)の略称であり、生物におけるエネルギーの使用や貯蔵を行うために使用される。ATPは、すべての生物が利用しており、生物由来の汚染指標として食品業界などで多く使われている。

ATPの発光反応は以下の通りである。



\* AMP: Adenosine monophosphate(アデニル酸)

発光基質であるD-ルシフェリン、ATP、酸素存在下で、酵素であるルシフェラーゼの触媒作用により、オキシルシフェリンが生成され、その際に発光する。光電子増倍管にて測定した発光量からATP量に換算される。ATP量の単位はamol( $10^{-18}$  mol)である。

Rapicaの測定手順の概要をFigure 2に示す。

Rapicaの測定で使用する試薬は以下の5種類である。

- [1] 前処理
- [2] ATP抽出液
- [3] 発光試薬
- [4] 校正用ZERO液
- [5] 校正用ATP標準液(1000 amol)

「前処理」は、①芽胞の発芽、②遊離ATPの消去という2種類の機能がある。ATP消去機能により、死菌由来のATPを消去し、生菌のみがサンプル中に残る。

次に、「ATP抽出液」によって、生菌の細胞膜、細胞壁を破壊し、ATPを抽出する。

最後に、「発光試薬」を投入することで、ATPは発光反応を起こし、その発光量を測定する。

「ZERO液」と「ATP標準液」は、測定毎のキャリブレーションに用いられ、発光量からATP量への換算を行う。

## 測定手順

Rapicaの測定手順は、サンプルをろ過し、測定機に入れるという非常にシンプルな操作である。測定時の試薬分注や発光測定は装置内ですべて自動的に実施される。各工程の詳細を以下に記載する。(Figure 3)



Figure 3 Measurement procedure

## ろ過工程

100 mLまでサンプルを入れることができる「ろ過容器」と0.4 μmのフィルタが付いた「サンプルカートリッジ」を組み立てる。(Figure 4)そこにサンプルを入れ、ろ過機にセッ

トし、0.1 mLまで自動吸引ろ過を行う。サンプルカートリッジのフィルタ上に微生物が捕集される。ろ過機では同時に12検体処理が可能である。

## 測定

ろ過終了後、サンプルカートリッジをろ過容器から取り外し、測定装置にセットする。また、分注に使用する「ピペットチップ」、発光測定時に使用する「発光チューブ」、測定に使用する5種類の「試薬」を測定装置にセットし、専用ソフトが搭載されたノートパソコンで測定を開始する。

測定結果は約2.5時間後に24検体同時に表示され、結果はPDF形式で保存される。

測定装置には、自動分注機及びターンテーブルが搭載されており、測定操作は自動化されている。(Figure 5)



Figure 4 Installing the Sample Cartridge and Filtration Container

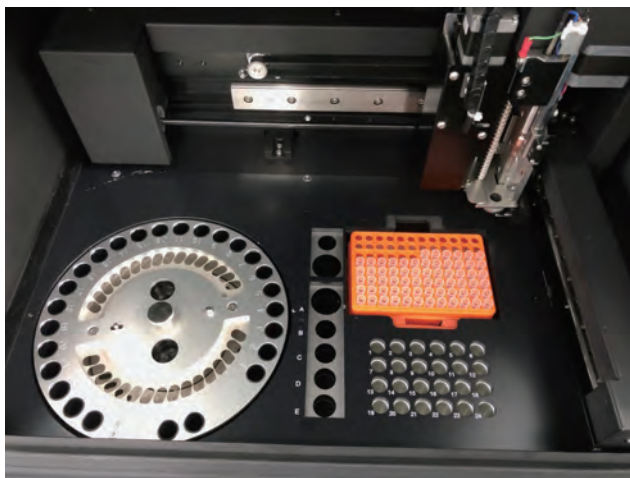


Figure 5 The inside of the system

## 装置性能

### ATP標準液を用いた装置性能評価

ATP標準液を用いて直線性の確認を行った。(Figure 6)自動分注機にて、ATP標準液を希釈し、複数の濃度サンプル(0, 1, 2, 4, 10, 20 amol)を調整し、サンプルサイズn=3で測定を行った。傾きは1.01, 相関係数( $R^2$ )は0.9988と高い直線性が得られた。

また、0 amolの測定結果から算出した検出限界( $3.3\sigma$ )は0.6 amolとなった。

### 薬局方収載標準菌株における1 cfu当たりのATP量

市販されている標準菌株を用いて、培養法との比較を行い、1 cfu当たりのATP量を算出した。評価方法は、以下の通りである。

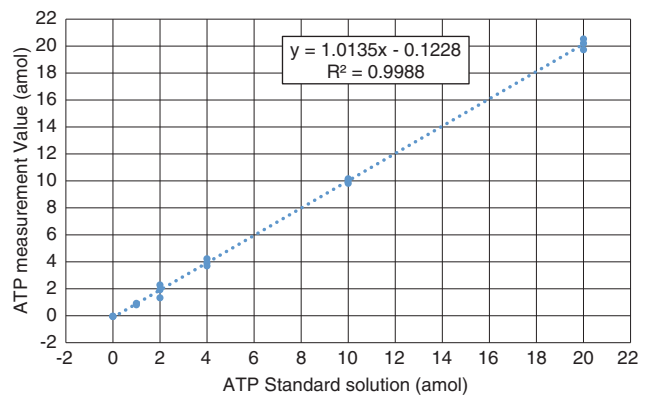
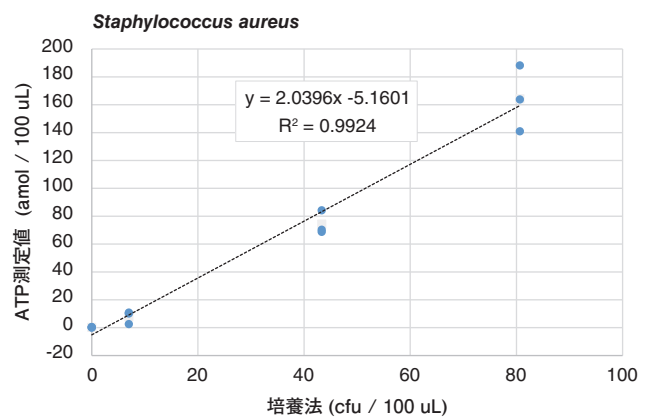


Figure 6 Linearity with ATP standard solution



使用菌株	培養条件	ATP量 (amol/cfu)
<i>Staphylococcus aureus</i> (NBRC 13276)	SCD培地/30°C/5日間	2.0
<i>Bacillus subtilis</i> (NBRC 3134)	SCD培地/30°C/5日間	2.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NBRC 13275)	SCD培地/30°C/5日間	0.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (NBRC 15842)	R2A培地/30°C/5日間	1.2
<i>Candida albicans</i> (NBRC 1594)	SCD培地/30°C/5日間	84

Figure 7 Measurement of ATP amount in standard strains

注射用蒸留水に48時間静置して飢餓処理を行った標準菌株を各濃度に段階希釈し、ATP測定及び寒天培地での培養を行った。培養結果は、サンプルサイズn=3の平均値をグラフにプロットした。近似曲線の傾きが1 cfu当たりのATP量となる。**Figure 7**には、*Staphylococcus aureus*の測定事例と他4菌種の1 cfu当たりのATP量を算出した結果を記載した。

*Staphylococcus aureus*や*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*などの細菌が持つATP量は1 amol前後、酵母である*Candida albicans*のATP量は84 amolであった。細菌よりも細胞が大きい酵母の方が多くのATPを保有している。その他の菌については参考文献<sup>[1]</sup>に記載があり、グラム陰性菌で平均1.48 amol, グラム陽性菌で平均5.54 amolである。

### 測定事例

Rapicaの測定手順には、ろ過工程が入っているため、粒子や固形物が含まれない液体が測定対象となる。しかし、サンプルによっては微生物の捕集方法や前処理に工夫をすることによって測定できる可能性がある。例えば、付着菌は、スワブでふき取ったのち、無菌水に微生物を遊離させることで測定ができる。また、空中浮遊菌は、無菌水に捕集可能なエアースンプラが市販されており、それを用いることでRapicaでの測定が可能となる。

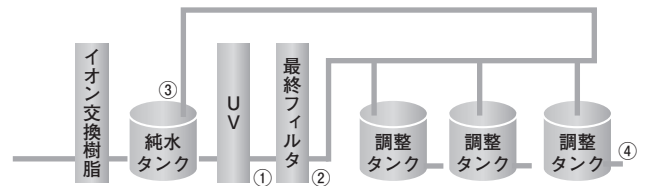
ここでは、純水設備の測定事例、市販点眼剤の測定事例、また、培養等で使用される生理食塩水や各種緩衝液を対象とした測定事例を紹介する。

#### 純水設備の測定事例

純水ラインで測定を行った事例を紹介する。**(Figure 8)**この純水ラインでは、規定以上の微生物が検出された場合、薬液を用いた洗浄を行っている。薬液での洗浄前後において、①UVランプ後段、②最終フィルタ後段、③純水タンクの戻りライン、④試薬調整タンクの出口にてサンプリングを行い、培養法とRapicaでの測定を行った。培養法では、貧栄養状態で微生物が増殖しやすいR2A (Reasoner's Agar No.2)培地を用いて30℃にて5日間の培養を行った。

一定の汚染が存在するサンプリングポイント①、②、④では、洗浄後のATP値及び培養法の結果は、両者ともに洗浄前と比較して減少しており、洗浄による汚染低減の効果を捉えることができた。

また、汚染レベルが低い、サンプリングポイント③では、洗浄前後でも両者はいずれもゼロ付近を示しており、傾向が一致していた。



測定箇所	洗浄	ATP法	培養法
		amol/ml	cfu/ml
①UVランプ後	前	75.6	47.7
	後	5.2	0.7
②最終フィルタ後	前	15.2	16.0
	後	2.1	7.3
③純水タンク戻り	前	0.5	0.0
	後	0.5	0.0
④調整タンク出口	前	2.5	1.7
	後	0.2	0.3

Figure 8 Sampling positions and measurement results of pure water generation facility

培養法では5日間必要な測定時間がRapicaでは即日で結果がわかるため、洗浄効果の確認に有用だと言える事例である。

#### 点眼剤の測定事例

点眼剤は、何度も開閉することによって微生物が混入することを想定しており、微生物の増殖による製品の劣化を防ぐために防腐剤が添加されている。防腐剤として使われることが多い塩化ベンザルコニウムは、ATP測定で使用するルシフェラーゼの酵素活性に影響を与えることがわかっている。そこで、日本薬局方第18改正 4.06無菌試験法に記載されている抗菌活性を除去する方法に倣い、注射用水50 mLで3回洗浄を行い、その後菌液(10, 40 cfu/mL)を添加し、測定を行った。使用した菌株は*Bacillus subtilis* (枯草菌・芽胞)である。

**Figure 9**の通り、点眼剤の有無による*Bacillus subtilis*の測定結果に差はなく、同程度のばらつきの範囲内に収まった。点眼剤の有無によるATP測定への差が見られなかった

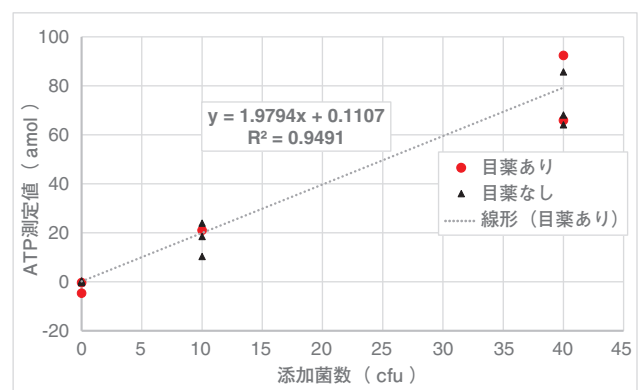


Figure 9 Measurement results of eye drops

Table 1 Measurement results of samples used for cell culture

サンプル名	洗浄前		洗浄後
	20 mLのろ過時間 (m : s)	ATP値 (amol/0.1 mL)	ATP値 (amol/0.1 mL)
生理食塩液	5 : 38	-0.3	—
0.1Mリン酸緩衝液	5 : 17	-0.3	—
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)	5 : 00	-0.3	—
ペプトン緩衝液	12 : 58	10.2	1.3
ペプトン緩衝液 (中和剤含有)	7 : 53	191.4	0.7

ことから、点眼剤によるATP測定への影響は認められなかった。このように適切な前処理をすることで測定に影響する成分を除去し、ATP測定を行える可能性を示す事例である。

### 培養で使用する標準的なサンプルの測定

バイオ医薬品では目的物質を産生する細胞を増殖させる培養工程がある。培養時には様々な液体が使用されており、よく使用されるものとして、生理食塩水、リン酸緩衝液、ペプトン緩衝液などがあり、それらのろ過時間の確認及びATP測定を行った。(Table 1)

ペプトン緩衝液を除くサンプルのろ過時間は、5分程度であった。注射用水20 mLのろ過時間は3-5分であることから、これらのサンプルは注射用水とろ過時間に大きな差が見られないため、サンプル由来の成分によるろ過影響は少ないと考えられる。一方、ペプトン緩衝液2種は、注射用水よりろ過時間が長く、サンプル由来の成分によるろ過影響を受けていると考えられる。

ATP測定結果では、ペプトン緩衝液2種でATPの含有が認められた。これらについて、注射用水20 mLで2回洗浄を行ったところ1.3 amol, 0.7 amolと検出限界付近までATP値の低減ができた。

このように生物由来成分を含むペプトン緩衝液のようなサンプルにおいても適切な前処理により、測定できる可能性がある。

### おわりに

今回紹介した微生物迅速検査装置Rapicaは、微生物汚染の予防保全や生産再開の早期判断などの観点から、より高度な品質管理に貢献するとともに、生産性の向上にも役立てていただける装置である。今後、多くのアプリケーションや各業種での測定事例を積み、多くのお客様に使用いただけるよう努めていく。

\*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] N. Hattori et al./Analytical Biochemistry 319(2003)287-295



#### 小牧 直人

KOMAKI Naoto

株式会社堀場アドバンスドテクノ  
Bio Industry 事業部 Rapica チーム  
Bio Industry Business Dept. Rapica Team  
HORIBA, Advanced Techno, Co.,Ltd.



#### 中山 秀喜

NAKAYAMA Hideki

株式会社堀場アドバンスドテクノ  
Bio Industry 事業部 Rapica チーム 博士  
Bio Industry Business Dept. Rapica Team  
HORIBA, Advanced Techno, Co.,Ltd.  
Ph.D



#### 深尾 嘉希

FUKAO Yoshiki

株式会社堀場アドバンスドテクノ  
Bio Industry 事業部 Rapica チーム  
Bio Industry Business Dept. Rapica Team  
HORIBA, Advanced Techno, Co.,Ltd.



#### 中井 陽子

NAKAI Yoko

株式会社堀場アドバンスドテクノ  
Bio Industry 事業部 Rapica チーム マネージャー  
Bio Industry Business Dept. Rapica Team Manager  
HORIBA, Advanced Techno, Co.,Ltd.

## In Vitro Diagnostics 市場における HORIBA Medicalの歴史と今後の展望

History of HORIBA Medical Products to Contribute to the In Vitro Diagnostic Testing

### 野村 尚之

NOMURA Naoyuki

人類の発展・サステナビリティにおいて医療・健康の分野は極めて重要な領域である。医療・健康を支える要素として、疾患の有無や、状態の変化を把握するための検査は特に重要であり、診断の分野において70%～90%の医療行為は検査を起点としている。体外診断(In Vitro Diagnostic: IVD)医療機器は、検査を支える非常に重要な役割を担っており、医療の現場を支えている。ここでは、HORIBA Medicalの提供するIVD用医療機器の製品の医療への貢献と今後の展望について記述する。

Medical and health care is one of the greatest topic on development on society development and sustaining. Most of the medical and health care treatment is based on diagnosis based on the result from various testing, analysis and interviews. In vitro diagnostic medical devices are critical testing source to achieve necessary care to the patient. This article describes how HORIBA medical have been supporting the medical field by providing IVD medical device.

### はじめに

グローバルにおける医療行為は数兆ドルを超える費用が年間計上されており、年々増加傾向にある。その中において、疾患に対する診断・診療が重要であることは言うまでもないことではあるが、この診断・診療、その結果の予後管理を行っていくうえで、検査はなくてはならない重要な役割を担っている。

その中でも、目に見えない体内のシグナルを定量的・定性的に報告を可能とする、IVD(体外診断)医療機器は臨床現場においては非常に重要な指標とされている。

ここでは、本領域における基本的ながら重要である、血液分野(Hematology)、生化学分野(Clinical Chemistry)におけるIVD機器の紹介とHORIBA Medicalの活動、そして、近年多様化する医療行為の中で、迅速性・簡易性における即時診断を重要視するPoint-of-Care Testing(POCT)<sup>[1]</sup>と呼ばれる検査手法におけるIVD機器の紹介とHORIBA Medicalの活動について記述する。

### Hematology分野

#### 血液とは…

血液は、体内を循環し、生きていくために必要な物質を供給、排出する機能を有する。生体の状態に伴い、循環・排

出される成分が異なる背景から、身体の状態を理解する上でも最も基本的な試料であるといえる。

血液は、構造的に液状の血漿(けっしょう)と呼ばれる成分、血漿内を浮遊して流動する血球成分に分けられる。検査における血液分野(Hematology)は、主に血球に関連する測定が表現される。すなわち、血液中の血球数(白血球、赤血球、血小板)、赤血球中のヘモグロビン濃度などである。また、血液の凝固・線溶に関わる血小板の反応が起因することを背景に止血分野(Coagulation / Hemostasis)もHematologyと関連して検査されるが、本項ではHematology、血球計数に限った議論をする。

#### Hematologyの検査(意義)

さて、血球計数はComplete Blood Cell Count(CBC)と呼ばれ、主に赤血球数・白血球数・血小板数の粒子計測を行う検査である<sup>[2]</sup>。

簡単にそれらの背景を紹介すると、酸素を体中の細胞に運ぶ役割を持つ赤血球数は、その増減によって貧血の状態を知ることができる。細菌などの異物が体内に入った際の防衛(免疫)機能を有する白血球の増減によって、この免疫の状態を知ることができる。そして血液を凝固させる機能を有する血小板数の増減によって血栓が発生しているかなどを知ることができる。

ほかの検査項目と複合的に照らし合わせ、最終的に病態や

疾患を診断する。もっとも簡便に検査できるCBCは、確定診断につなげるスクリーニング検査の役割として極めて有用である。

原理的には血液を数える、ということになるため、もっとも原始的な検査方法としては、顕微鏡下で数える血液試算法があげられる。一般的な顕微鏡・血球計算盤という比較的容易に揃えられ、簡便に計測できる手法としては、現在でも利用がされる場面もあるが、検査の頻度の向上、計測者の力量などから生じる誤差から、1950年代ごろより、自動化・効率化が求められた。

血球が不導体である特徴を利用した電気抵抗法(基礎原理の発明者Coulterからコールター法とも)を応用した血球計数装置の出現から<sup>[3]</sup>、急ピッチに発展が進んだ。電気抵抗法の技術は、血球数だけではなく容積を判別できるため、赤血球の平均体積の測定が可能であり、ヘマトクリット値の報告ができるようになった。同時に、赤血球内のヘモグロビンを測定するために溶血と比色法検査を自動で行うような改善がなされ、さらに、この溶血処理を最適化することで、白血球の形態を核の大きさでリンパ球と顆粒球、それ以外を簡易に分類する、3分類の報告ができるようになった。

種々の技術的工夫が重なり、自動血球計数装置は単純な粒子計測だけではなく、それにかかわる形態的な特徴や生化学的な項目を一部測定することが標準となった。

自動血球計数装置の発展に伴い、その利用も増えていき、技術的な革新も進んだ。簡易的な分類にとどまっていた白血球については、顕微鏡での目視法で行われる5分類に近づけさせるよう、フローサイトメトリー技術の転用が進んだ。ここから各メーカーごとに特徴を出していく形となり、種々の血液疾患をスクリーニング・フラグgingする機能を示すことで差別化にもつながった。

検査技術が確立されると、一般的な流れではあるが、フルオートメーション、検査室の自動化による、運用の効率化への要求が拡大した。測定項目や性能だけではなく、大量の採血管を自動で取り扱いから、装置へのローディング・アンローディング、測定後の検体の保管など、また検査結果を診断に効率よく伝えるための電子カルテ・病院内の情報システムへの通信連携など、業務効率へのソリューションに対するニーズへとシフトしていった。

同時に、簡便なスクリーニング用途としての有効性から、患者が最初に訪れる医療機関、クリニックや診療所などでも簡便に測定できるよう、小型化・簡易化への要求にもつながっている。こちらへの要求は後述のPOCT分野の項に記載する。

### HORIBAのHematology事業

堀場製作所の血球計数装置ビジネスは、1996年にフランスのABX社買収とともに継承して<sup>[3]</sup>開始した。ABX社は、当時広がっていく血球計数需要の中で、クリニックや小規模の病院・検査センターで簡易・簡便に利用できるよう、小型の血球計数装置を中心に製品展開していた。Figure 1にHORIBA Medicalにおける血球計数装置の製品を時間軸をもとに紹介する。

HORIBA Medicalとして下地となって支えたのは、この小型3分類製品Microsシリーズ<sup>[4]</sup>、5分類製品Pentraシリーズ<sup>[5]</sup>である。

Microsシリーズは、微量な検体量、小さなフットプリントをコンセプトに、クリニック数の多い国々を中心に実績をつなげていった。市場の要求に従い、柔軟なサンプル容器に対応できるオープンチューブモデル、感染性リスクに対応が期待される真空採血管からそのまま測定可能なクロードチューブモデルを拡充し、さらに、検査室等で要求が強くなった複雑な日常管理・データ管理をサポートするためのパソコン・ソフトウェア機能の拡充が進められた。



Figure 1 History of HORIBA Medical Hematology Product portfolio

以降30年にわたり、HORIBA Medicalの小型製品のブランドイメージを支えてきた。

Pentraシリーズは、少量の検体でも測定できるための希釈方式であるMulti Distribution Sampling System (MDSS)、白血球を流量制御されたフローを通しつつ、光学的・電氣的に細胞内構造・細胞体積をそれぞれ同時に測定するDouble Hydrodynamic Sequential System (DHSS)を技術的な訴求ポイントとした白血球5分類の血球計数装置である。Pentraシリーズは、1時間当たり60検体の処理能力を有するPentra 60と、ラックに収められた検体を自動で機器にへロードさせられるオートローダーも兼ね備えた80検体の処理能力を有するPentra 80、さらなる高速処理要望に応えるために、1時間あたりの検体処理数120検体を可能とする、Pentra 120が販売された。

より、多量検体を処理する検査機関への導入は、機器の精度管理・データ保証として要求される範囲が広がり、これをサポートする中継ソフト、Pentra MLの提供、最終的な要手法である目視検査につなげられるための自動標本作製ユニット (Slide preparation system :SPS)の拡充などを行い、分析器だけではなく、その運用サポート・効率化を意識したソリューションの提供を続けてきた。

Microsシリーズ、Pentraシリーズの技術基盤はHORIBAグループ参画後も血液検査のスペシャリストとして、醸成されていった。それと並行し、日本国内の堀場製作所との技術協業・移管を積極的に推進され、特に小型の領域においては、日本のエンジニアリング技術・ノウハウを取り入れ、安定稼働に繋がるシナジーを生み出した。しかしながら、特筆すべきは、共同で開発したC反応性蛋白質 (C-reactive Protein: CRP)との同時測定をコンセプトとした、革新的な製品の展開である<sup>[6]</sup>。小型血球計数装置で報告される白血球数に加え、もう一つの炎症マーカーとして知られるCRPを同時に測定させるアイデアは、臨床の現場においては極めて有用な提案であり、このコンセプトは長くHORIBA Medicalを代表する製品として事業を支え

ている。特に開業医・クリニックでの活用に注目が当たり、日本国内では2020年時点で10,000施設以上での稼働実績をもつ。本製品は、自動血球計数装置が基本的な構成にはなっているが、市場での活用としては、より患者に近い運用を提案する製品として活躍がされているため、後述の項にて詳細に触れる。

10年を超えるPentraシリーズの市場での実績を活用し、大型の病院・検査センターへのビジネス拡大を目指した、新概念、HORIBA Evolutive Laboratory Organization (HELO) Solutionを宣言した(Figure 2)。同時に、それを支える製品ブランドを刷新するため、Yumizenブランドを確立した。

HELO Solutionは、中心となる分析装置、Yumizen H1500/H2500に加え、それらを搬送ラインで接続するユニットYumizen T6000、それらをマネジメントするシステムであるYumizen P8000を基本構成とし、塗抹標本の画像自動読み取り装置など接続の幅を拡大し、大型検査室における血液検査の省力化・効率化に貢献する。

小型血球計数装置から発展させてきた技術・経験は、小型領域はPOCTビジネスの拡大としての展開を、大型製品はHELO Solutionのコンセプトの通り、総合的なソリューション提供を拡大し、さらなる成長を目指す。

## Clinical Chemistry分野

### Clinical Chemistryとは…

生化学(Clinical Chemistry)検査とは、血液や尿の体液成分の中の糖やコレステロール、タンパク、酵素などの各種成分の測定する分野を言う。これらを測定することで、健康状態、からだの異常、疾患の有無や栄養状態を推測することが可能となる。Hematologyと同様、IVD検査における一般的な検査項目として重要視されている。

### Clinical Chemistry検査

Clinical Chemistry検査は、原理としては酵素反応を利用



Figure 2 HELO Solution initiatives and Yumizen H1500/H2500 Automation

し、体液中の成分に色素反応を発生させ、それを分光法にて測定する比色法となる。Hematology分野と同様、あるいは、体液内の成分がHematologyと比較しても多量にある背景から自動分析装置の要望は高く自動血球計数装置に先立って実用化された。実質的に、体液サンプルを定量採取し、専用の試薬(項目によって複数反応させることも)と反応をさせ、分光光度計で測定、後処理として洗浄をする、という基本的なフローであり、機器としての差別化ポイントは、多検体処理をさせるための高速化・安定性、分光光度計ユニットの性能が重要となる。この際、機器の特性と試薬の特性がそれぞれメーカーごとに特徴があるため、その組み合わせで性能が変動する。各組合せごとにデータの保証・性能の検証が必要とされ、上述の自動血球計数機とは特徴が異なっていることがわかる。

自動分析装置として、システムが確立されると、用途に応じて同時に検査をしたい需要から、生化学分析装置で測定する範囲が増えたことも特筆するべきところである。一つは、電解質項目として知られる $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ である。これら電解質項目は、上述の酵素法ではなく、イオン選択性電極(Ion Selective Electrode: ISE)法で測定するものである。原理が異なるものの、用いる検体が同じであり、臨床目的での測定頻度も高い背景から、多くの場合この電解質分析ユニットが生化学分析装置にモジュールとして搭載されることが一般的になっている。

ほかにも、原理上は酵素ではなく、免疫反応による比色・濁度から測定される項目も増加傾向にある。他方で、この免疫項目については、試薬・反応の違いから専用の機器が必要になるケースが増えており、これらは免疫分析装置(Immunoassay)として分野が確立されている。代謝の反応であるタンパク質等を直接検出するこの免疫分析は、より特定の診断に有用として急激な成長を示している。

### HORIBAのClinical Chemistry事業

HORIBAにとって、Clinical Chemistry事業は、1999年Pentra 400(Figure 3)の開発、販売をしたことが下地となっている<sup>[7]</sup>。当時、HORIBAグループに参画した直後で、販売戦略上血球計数装置だけではラインアップ戦略上の脆弱性が懸念があり、IVD市場で同様に要求度の高いClinical Chemistryの分野にチャレンジしたことが背景である。

特筆するべき点は、上述の通り分析機器として重要である、分光光度計の部分においてHORIBAグループに同時期参画したJobin Yvon社のグレーティング技術の活用、電極技術を培ってきた日本のHORIBA技術を導入できることが見込まれたことである。特にJobin Yvon社のグレーティング技術は、世界的にも高水準な技術であり、世界をリードする生化学装置にも採用されている。



Figure 3 Pentra C400

本事業は、機器をHORIBAが開発・生産、試薬は既存の試薬メーカーからOEM供給する形で始まり、現在も米国・東南アジアを中心にグローバルに販売を行っている。Hematologyの事業と同様、ユーザー要求を受けながら試薬の項目追加、ソフトウェアのモデルアップを続けている。

特に米国での事業は、2009年以降堅調に拡大しており、HELOの展開に併せてClinical Chemistry分析装置もより多検体処理ユーザーへの提供できる製品ラインアップの準備が必要となった。適切な製品を自社にて開発するよりも同時期、米国への足掛かりを検討していた日本電子株式会社とのOEM協業を決断、Yumizen C1200というモデルで事業の展開を判断した。米国導入に向けた規制対応、試薬項目の承認準備を整え、2021年2月より米国での販売を開始した。

また、2021年1月、米国内のMedTestホールディングス社を買収。生化学分析装置用の試薬製造販売を中心としたビジネスを行っている会社であり、HORIBA Medicalが長らく検討していた、生化学分析装置の分析用試薬を開発・生産する技術・知見をグループ内に導入した。日本・フランス・米国の3か国における、専門性の異なる開発拠点を活用し、今後の更なるIVD事業の拡大を目指す。

### POCT分野

#### POCTとは…

Point-of-Care Testing (POCT)は、その表現の通り、その場で検査をする仕組みのことを表現する。IVD分野においては、より効率的な検査を実施する上では、検査サンプルを一か所に集約し、大量処理することが主流になっていることに対し、患者に物理的に近い環境で検査を行い、迅速にCareをすることを目的とした仕組みのことである。

#### POCTの意義

有用な事例としては、血糖測定が挙げられる。糖尿病と診断され、治療を受けている患者は、厳格な血糖管理が要求される。病態にもよるが、空腹時・食前・食後のタイミングで血糖を測定、病態管理だけではなく、インスリン投与



の判断をする。特にインスリン投与の判断においては、低血糖という生死にかかわる状態を避けるためにも血糖値を事前に正しく知っておくことが重要である。

同様な投薬治療における副反応の懸念、急性の疾患の際の応急的な措置の判断など、その場で迅速に対処の指標を得られる検査の需要が年々増加傾向となっている。

このPOCTの仕組みの有用性が広がるにつれ、リスクも広く議論がされるようになってきている。例えば、本来血糖値は、空腹時、食前、食後などのタイミング、どのように採血したか(静脈・指先、体位など)などでも測定結果に影響がある。また、検査室で血糖値(グルコース)を測定する生化学分析装置であれば、使用前には定期保守によって動作が保証されているか、精度管理や校正などによる日常保守によって測定値の保証がされているか、などの専門的な管理が要求される。すなわち、検査に用いる検体の準備、検査をする装置の管理など、本来専門的な教育や訓練を受けたうえで実施されるべきではあるが、POCTの期待される迅速性の中では、これらが失念されることが懸念され、正しい測定結果を報告することができないリスクが訴えられている。

これを回避するため、多くの国では、POCTに向けたガイドライン、医療機器の取り扱いに関する規制の整備を進めている。迅速な処置が必要な疾患は多く、POCTの要求は今後の延びることは明白である。ただし、正しく判断できるシステムでないと、最悪の場合は患者の生命にかかわってくる。このため、規制や標準の整備と両立した推進が本分野の成長を左右すると考えられる。

### HORIBAのPOCT事業

HORIBA Medicalは、前述のHematologyの分野において、小型の自動血球計数装置を基盤にPOCTへの製品展開を進めてきた。そのコアとなったのが、CRPと同時に測定するという革新的なコンセプトで開発されたMicros CRPである。

白血球数とCRPは、いずれも炎症反応にて増減することが知られている。一方で、外傷や細菌感染などの侵襲によって素早く反応する白血球と、それらの反応から発生するサイトカインをシグナルとして肝細胞から生成されるCRPは、増減のタイミングや機序が異なるため<sup>[6]</sup>、炎症反応の早期なスクリーニングに有効である。

例えば、細菌感染であれば、細菌の侵襲と同時に白血球が増加し、その反応に併せて数時間後からCRPの値も増加を始める。一方、ウイルス感染の場合、異物の侵襲との認識が行われなため、白血球数、CRPともに大きく増減をしない<sup>[8]</sup>。特に、細菌性である場合は抗生物質の投与で症状

を抑えることはできるが、ウイルス性感染であれば、抗生物質の投与は症状を緩和させられることはできない<sup>[9]</sup>。ウイルス性感染であっても細菌感染が併発する頃もある背景から、事前の処置として抗生物質の投与を判断することが多い近年は、抗生物質の濫用に伴う薬物耐性菌の懸念から適切な抗生物質の投与を心掛ける指導が行われており、簡便にスクリーニングできることは、臨床現場においても有用であることが示されている。

この白血球とCRPは、それぞれHematologyの分析装置と、Clinical Chemistryの分析装置と分けて測定が行われるため、全血と血漿の2種類の検体を準備する必要があり、組み合わせの有効性と反して、煩雑であった。特に、夜間・救急、あるいは診療所で、人手が少なく、迅速に結果が欲しい時に、前処理が必要であり、ほかの項目の結果を待たなければならない点が不便だった。全血検体で同時に測定できる技術の考案は、この煩雑さを払拭し、有用なタイミングで簡便に測定できる環境を作り上げた。POCTの運用例としては、理想的なもののひとつであると考えられる。

白血球とCRPの同時測定の製品開発は、日本国内における血球計数装置の製品開発を加速させることに繋がった。日本の開業医市場にマッチするようなデザイン性・操作性を考慮したモデルチェンジMicrosemiシリーズを日本国内向けに2009年、海外向けに2013年に販売を開始した(Figure 4)。これら日本の顧客向けに開発された製品は、測定結果や性能に加え、日本での販売実績で学んだ顧客から要求されるユーザビリティの導入である。ソフトウェアや消耗品交換の主義なども踏まえた改善は、海外でも高く評価され、市場拡大に大きく貢献をした。

ABX社のグループ参画を起点に、日本国内においては、POCT向けの製品展開を強化していくことを視野に、血球以外の事業展開も模索された。2000年にダイキン工業・三



Figure 4 Microsemi CRP



Figure 5 HORIBA POCT Product: (Left) Yumizen M100 Banalyst, (Right) Antsense Duo

共からの血糖分析装置・アントセンスシリーズの事業継承、2018年にローム社より自動免疫分析装置・バナリストの事業の継承を実施した(Figure 5)。これらの製品については、本稿では詳しく述べないが、堀場製作所が従来よりコア技術として持っている電気化学・電極技術とのシナジーが期待されるアントセンス<sup>[10]</sup>、より多くの分野の広がりが期待できる $\mu$ TAS技術を有するバナリストは、HORIBA MedicalのPOCT分野における製品ポートフォリオの拡充に繋げていく製品である。

## おわりに

HORIBA Medicalは、Hematology分野を中心に、Clinical Chemistry, POCT, また今回触れられなかったが、Coagulationも交えて、それぞれの分野に適切な製品展開を今後も継続的に実践していく。また、“分析する”から“分析の先”に切り替わりを始めているユーザーニーズを意識し、学術的なアプリケーション提案、IoTによるデータ連携、規制対応をサポートするサービスなどの新たな付加価値を提供するソリューションの検討を推進する。

最後に、医療機器は、人々の健康・生命を守る重要な領域として、法令や規格などによって厳しく規制されている。その性能に関する妥当性や有効性に限らず、提供する全社的な品質管理システム(Quality Management System)が適切であることが求められる。医療従事者として、新しい機能・性能、サービスの提供を意識しつつ、ユーザーへの安心安全に対応していく。分析を通じ、医療・健康・患者のQuality of Lifeに貢献し続けることがHORIBA Medicalの使命と考える。

## 参考文献

- [1] 小谷和彦：在宅臨床検査学の世界，臨床病理，2019，vol.67，no.4: p.366-368
- [2] ビジュアル解説！そうだったのか！身近なもののはかり方図鑑：文献出版，2021，p.112-113，ISBN978-4-580-88653-7
- [3] Franck Seguy：超小型・超精密を目指すABXの血液分析装置，Readout，2003，vol.26: p.34-37
- [4] 河野江利子，田窪孝行 他：自動血球計数装置Microsemi LC-660の基礎検討，医学検査，2008，vol.57，no.12: p.1402-1407
- [5] 杉山庸子：自動血球計数装置 PENTRA シリーズ，Readout，2002，vol.24: p.24-28
- [6] 杉山庸子，齊藤憲祐：全血微量検体を用いた血算とCRPの同時迅速測定，生物試料分析，2010，vol.33，no.3: p.207-212
- [7] Georges Ferrandi, Christophe Fudaly, Olivier Magnin, Stéphane Rougale: ABX初の臨床化学検査システム Pentra 400 HORIBAグループのアライアンスがもたらした成果，Readout，2003，vol.26: p.38-41
- [8] T. Okada et. al, A practical approach estimating etiologic agents using real-time PCR in pediatric inpatients with community-acquired pneumonia. J Infect Chemother, 2012, vol.18: p.832-840
- [9] 尾内一信：小児感染症における抗菌薬の適正使用一耐性菌を増やさないための世界戦略一，Readout，2015，vol.44: p.35-38
- [10] 内田一豊 他：POCT 対応血糖測定器アントセンス デュオの基礎的検討，医学検査，2015，vol.64，no.4: p.453-459



## 野村 尚之

NOMURA Naoyuki

株式会社堀場製作所  
医用事業本部 本部長  
General Manager  
Medical Business Division  
HORIBA, Ltd.

## Disruptive Technologies in Haematology for POCT Market

ポイントオブケア検査市場に向けた画期的ヘマトロジー技術

**Damien ISEBE**

ダミアン イゼブ

**Philippe PIEDCOQ**

フィリップ ピエコック

**Benoit THOUY**

ブノア トゥイ

**Aurélien DAYNES**

オーレリアン デーヌ

**Michael BRUCKNER**

ミカエル ボロックナー

A blood count is one of the most common blood tests that provides valuable physiological information about the patient's state. The tests are generally performed in specialized laboratories using "Gold standard" high-throughput diagnostic instruments. These automatic haematology analysers are bulky, need qualified operators for sample and data manipulation, and have more maintenance-related requirements. They also must respond to a growing demand for new complex parameters, complexities that are not required for urgent screening at the Point-of-Care. In this article, we present disruptive technologies for sample preparation and cell detection allowing the development of new generic platforms in haematology for a wide range of Point-of-Care applications.

key words

blood count, sample preparation, cell detection

血球計数は、患者の状態に関する貴重な生理学的情報を提供する最も基本的な血液検査の一つである。この検査は通常、専門の検査室で「ゴールドスタンダード」のハイスループット診断機器を使って行われる。これらの自動血液分析装置は大型で、検体の取り扱いやデータの判断には専門のトレーニングを受けたオペレーターが必要であり、多くの複雑な日常管理が要求される。最も基本的な血液検査として、より簡便に取り扱われ、緊急スクリーニングにも有効なポイントオブケアでの利用が増えてきている。今後、特殊で複雑な検査に対する需要にも対応しなければならない。この記事では、広範囲のポイントオブケアアプリケーションのための血液検査における新しい汎用プラットフォームの基礎となる、サンプリングと血球検出のための革新的な技術を紹介する。

キーワード

血球計数, 検体前処理, 細胞検出

### Introduction

Blood count is one of the first prescribed and most ordered tests by doctors as it generally constitutes the first step in the diagnosis and monitoring of many pathologies and treatments. It provides physicians with valuable information on the patient's physiological state, allowing them to make treatment decisions. Nowadays, most automated hematology laboratory analyzers are based on costly, bulky, reagent consuming and complex hardware systems for blood preparation and measurement. Moreover, highly qualified and specialized laboratory technicians are required to handle such instruments.

Today and tomorrow's world and society are shaping up new challenges for the healthcare systems such as the one generated by the Covid 19 pandemic. Therefore, for delocalized and personalized health care applications, there is an increasing need for automated, compact and transportable point-of-care blood cell counters, operable without requiring any training or maintenance. Such solutions would eliminate the need for patients to travel into lab testing facilities and shorten the time needed for doctors to make treatment decisions. Point-of-care devices can be suitably deployed at the bedside, private clinics, research laboratories, rural areas as well as in developing countries.

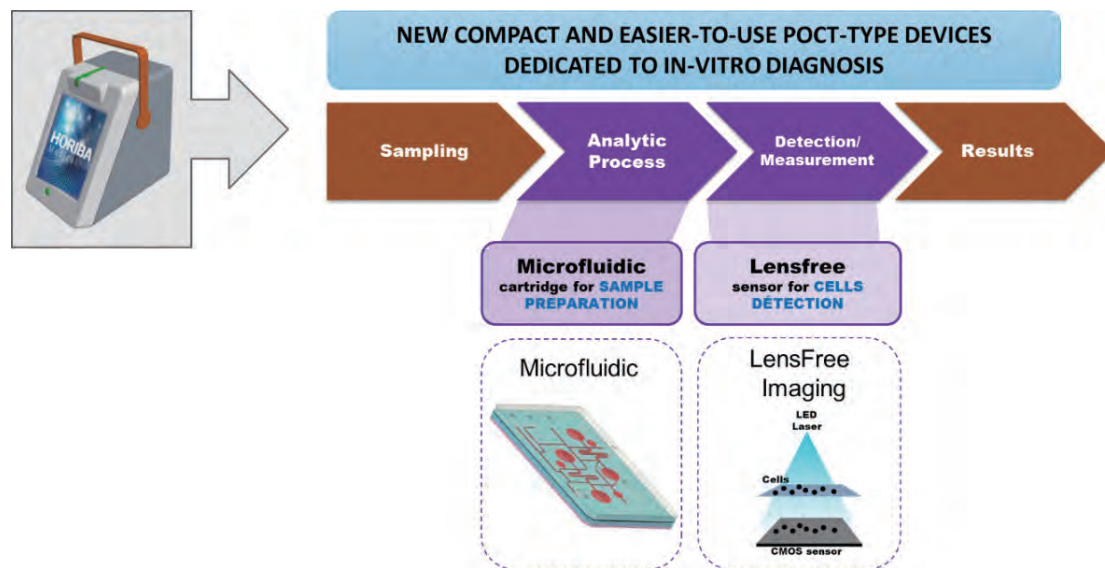


Figure 1 Scheme of the blood analyser principle based on innovative disruptive technologies

Using simple and smart technologies for blood preparation and cell measurement, low power and reagent consumption, these future low cost automated and miniaturized blood cell counters offer a genuine route towards a greater portability of hematology analyzers.

The work presented here is result of an “open innovation” collaborative program held since 2015 with a leading player in technologies development, the French Atomic Energy Commission (CEA), which is the biggest patent applicant in France. By combining their own expertise, both parties can accelerate the delivery of impactful technology solutions (Figure 1).

In this paper, we introduce first a new disruptive technology for cells detection, counting and differentiation, based on holographic lens-free imaging. Since all the optics and mechanical parts are removed, this low-cost technology, embedded in a device, should lead to ease-of-use with minimal operator training and remove the need for user maintenance. Secondly, we introduce an innovative microfluidic preparation cartridge for automated blood cell counters allowing low consumption and scaled-down integration. The whole blood preparation system embedded in these POCT devices answers different key challenges that need to be addressed regarding microfluidics technology: i) a large range of dilution, ii) dilution accuracy, iii) low cost per test and iv) maintenance free.

These two patented technologies<sup>[6, 7, 8]</sup> are well adapted to a POCT system, and, in the future, will enable us to propose a different approach to hematology, closer to the patient who needs it.

## Lens-Free Imaging

The Lens-Free Technology (LFT) is a simple imaging technique, developed in recent years and under continuing evolution and improvement. Based on in-line holography and numerical processing, LFT gives access to a reconstructed optical field revealing phase and absorption contrasts of the studied samples, which can be cells, particles, crystals, etc... It can generate highly contrasted images of biological objects on a large field-of-view with a micrometer-scale resolution using a very simplified optical setup without magnification. The components of a lens-free imaging system are uncomplicated, small and low-cost. In addition, the wide field of view, together with the high resolution of the sensor, leads to a count (> 10 000 cells) in a single-shot acquisition, consistent with the statistical performances required in haematology. The complexity of the system is transferred to digital processing requiring robust and powerful reconstruction algorithms. Hence, this technology allows the building of an automated, simple, cost-effective, robust, light weight and compact system meeting the requirements for screening point-of-care (POC) tests in human and veterinary markets (Figure 2).

In practice, the sample is simply positioned in a chamber between a light source and a high-resolution optical sensor, for example, a Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS) (typically a resolution of around 10 MPix and 2  $\mu\text{m}$  pixel size). This sample is illuminated from above by the point-like source of light and the sensor records interferences patterns (holograms) created by a combination of the light diffracted by the objects and the transmitted light. The raw data are then computerized with a numerical reconstruction algorithm, and dedicated

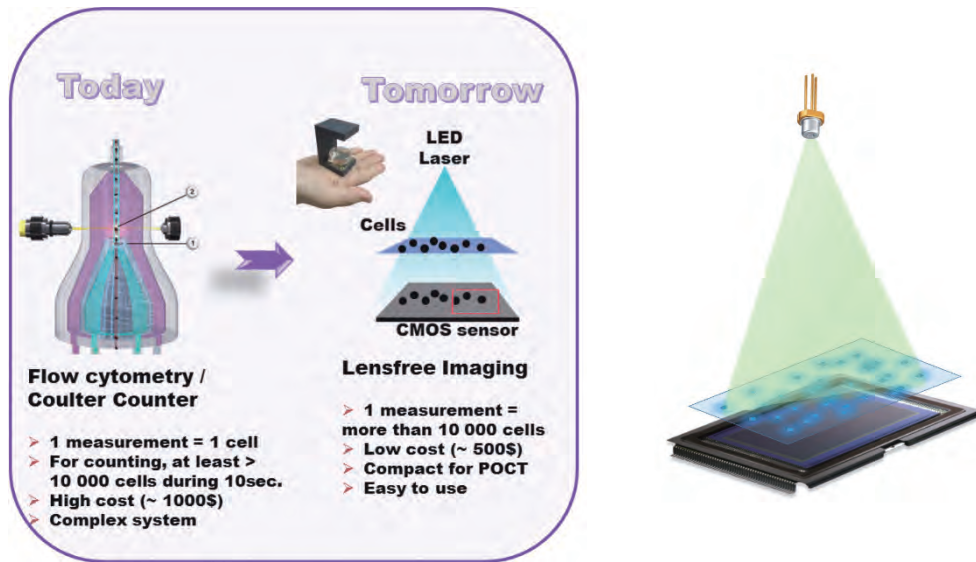


Figure 2 The advantages of the LensFree Imaging system, compared to classical Flow Cytometry setup

image processing workflows are specifically designed for each new application. Briefly, the reconstruction step allows, starting from the raw diffraction patterns acquisition, the reconstruction of an in-focus absorption map. From the acquired defocused hologram, classical gradient autofocus algorithms were applied to compute the position of the object plane (i.e. the focus plane). In this selected plane, an iterative reconstruction algorithm from a single image based on specific norm minimization is used. On this reconstructed image, grey-level thresholding is performed to detect the more contrasted objects. A binary mask is created: a 0 value is associated to the background,

and a 1 value is assigned to the detected components. At this stage, there are between hundreds and thousands of components, depending on the sample. The detected components are sorted out based on morphometric characteristics or finer supplementary criteria using grey-level. This leads to the identification and characterization of most of the blood cells, depending on the considered application (Figure 3).

This new technique for measuring cells requires increased computation capacities. We implemented algorithms on an Nvidia Jetson Nano Graphical Processing Unit (GPU)

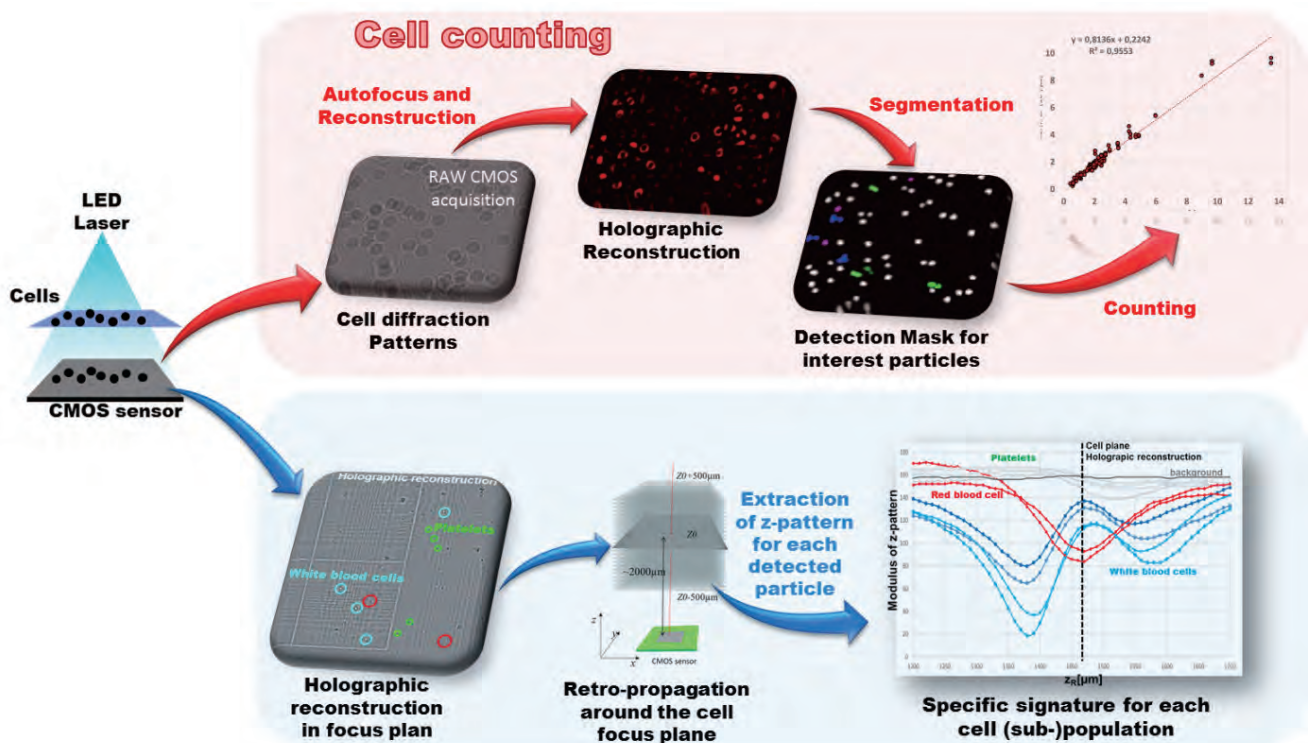


Figure 3 The steps of the algorithm for image reconstruction and cells detection and identification.

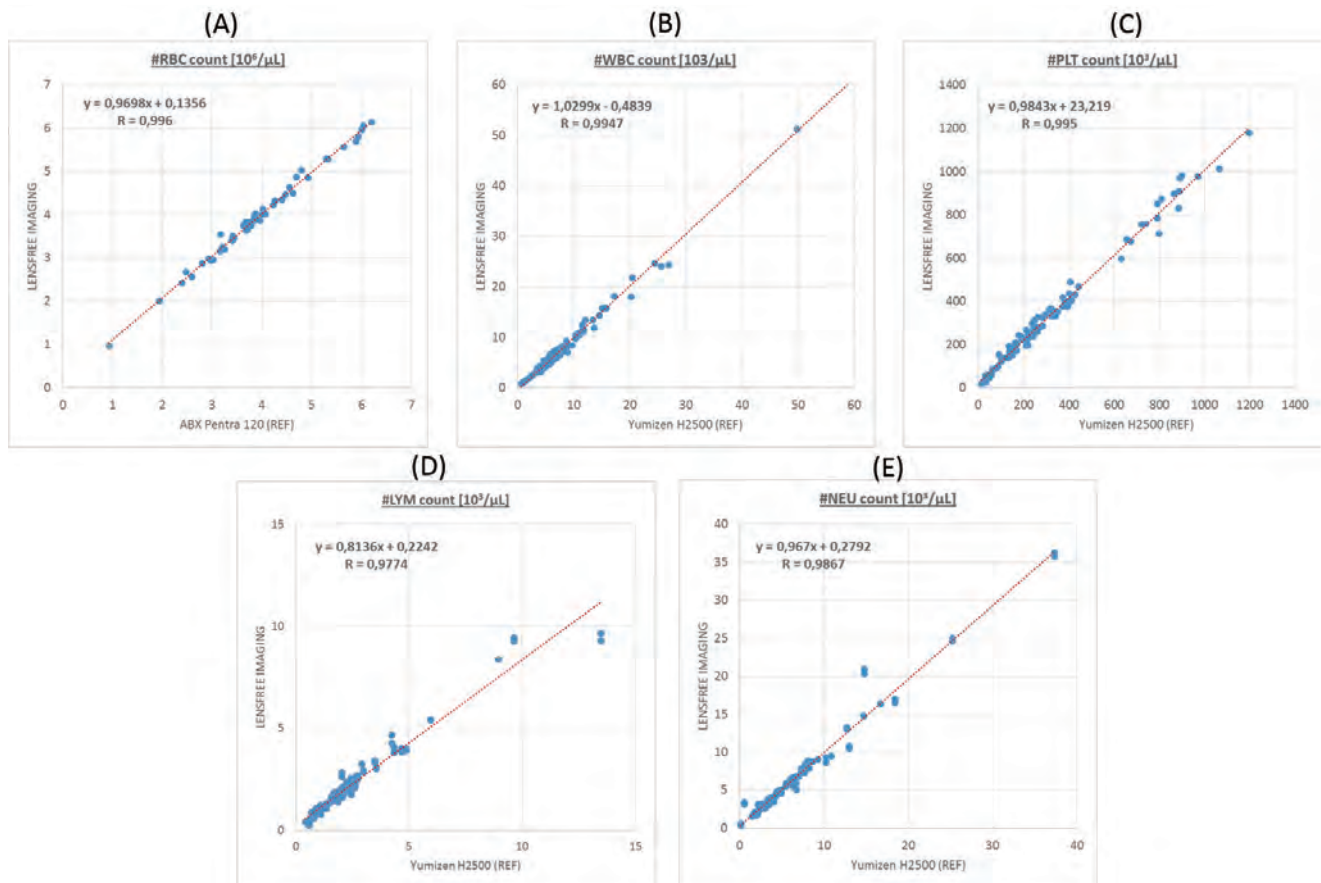


Figure 4 Summary of haematological analytical performances obtained with LFT in comparison with classical measurement systems embedded on current HORIBA Medical routine analysers

for massive parallelization. Increasing connectivity and the versatility of this sensor allow us to consider various and remote application fields.<sup>[2]</sup>

As a proof-of-concept, several applications have already been investigated with LFT, in the human and veterinary haematology field. We display, in Figure 4, performances obtained for red blood cells (RBC), white blood cells (WBC) and platelets (PLT) counting, as well as for lymphocyte (LYM) and neutrophil (NEU) identification, in comparison with results obtained with our reference HORIBA Medical analyzers (ABX Pentra 120 and Yumizen H2500).

Those preliminary results show good agreement between the LFT and conventional hematology analyzers on this set of parameters. No major discrepancies were observed among the different sample database evaluated (more than 100 normal and pathological samples). R correlation parameters are all located above 0.95.<sup>[1, 3, 4]</sup>

### Microfluidic Preparation

In this project, the main objective is to develop microfluidic cartridges allowing precise preparation of small samples with great accuracy and repeatability, and scaled-

down integration for the associated analyzer. However, developing such a system with a small footprint comes with several challenges regarding microfluidics technology such as: sample introduction, reagent management, efficient fluid sample mixing, low cost-per-test and more importantly, large yet precise dilutions (Figure 6a).

To reach the desired high dilution ratios of the small blood samples and still achieve high precisions, we opted for a technology based on a hyper-elastic membrane to create collapsible chambers with large volumes and high aspect ratios (Figure 6b). Optimal configuration of these chambers and channels was reached through extensive Computational Fluid Dynamic (CFD) simulation studies using the YALES2BIO software (Figure 5). This technology offers a high-volume precision as the amount of used liquids is directly controlled by the chamber size. Furthermore, the microfluidic cartridge can be easily replaced by a “Plug & Play” system, leading to a maintenance free system.

For a first application case as a proof-of concept, the cartridge was designed to handle two precise dilutions simultaneously, one at 1/1000 ratio and another one at 1/10 ratio. The first dilution of the whole blood is performed for counting the RBCs and the second dilution for

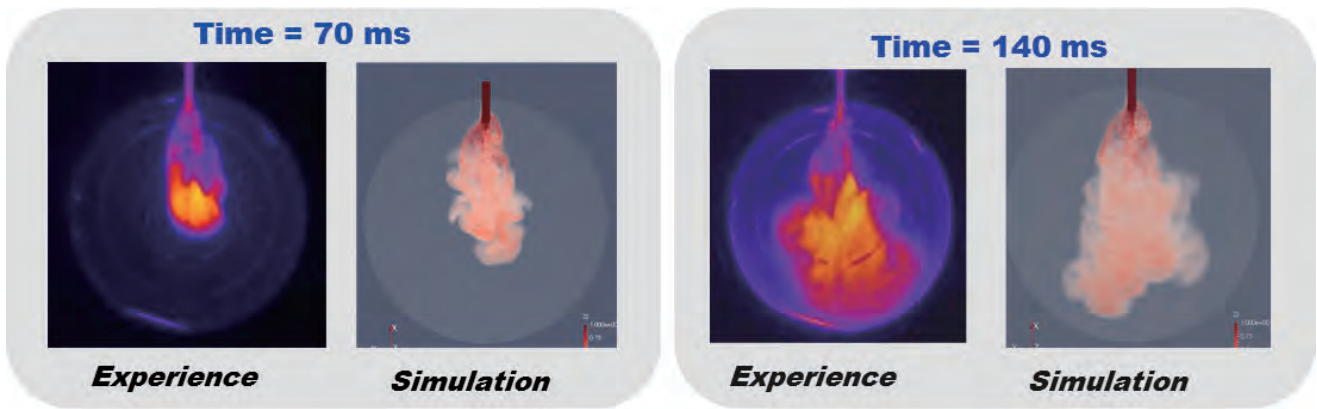


Figure 5 Comparison of sample injection on a dilution chamber. Experience confirms optimal results obtained by CFD computing.

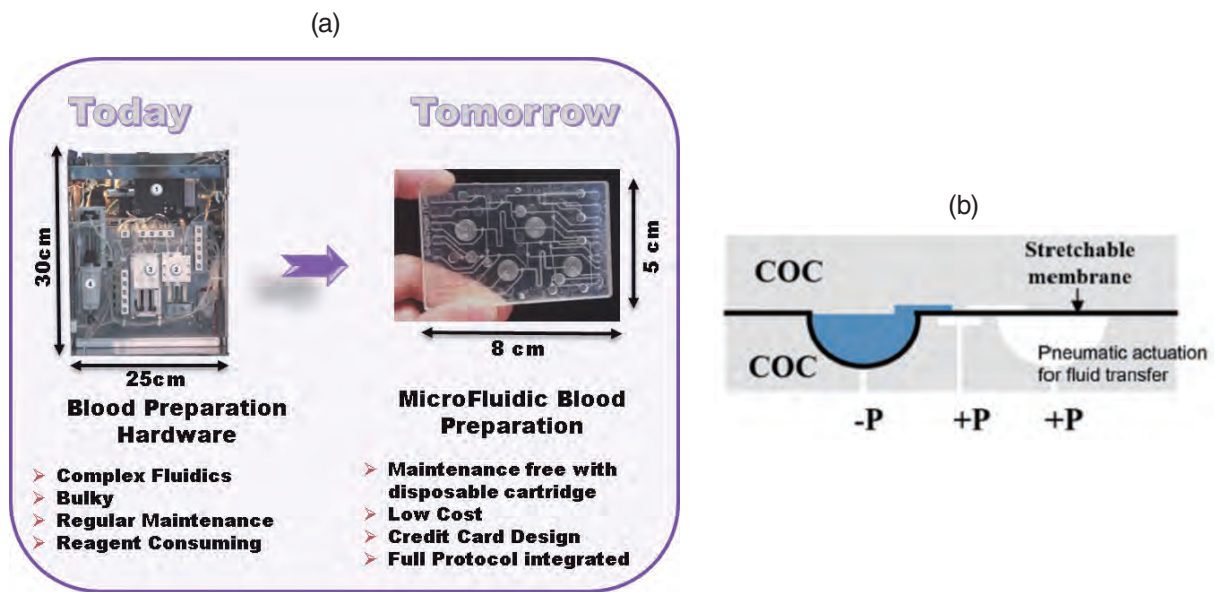


Figure 6 (a) The advantages of the Microfluidic preparation, compared to classical technology, (b) Principle of FlowStretch Technology. Chambers and valves are actuated using pneumatic pressure (COC : Cyclic Olefin Copolymer)

counting the WBC and the PLTs, and for the Hemoglobin measurement. During this second dilution, a lysis of RBCs is performed. This lysis step is necessary for two reasons: first, RBCs are numerous and can hinder the proper visualization of WBCs. Second, the lysis of RBCs allows the release of hemoglobin in the solution, and in this way the measurement of the hemoglobin concentration can be performed.<sup>[5]</sup>

To achieve the dilution protocol, a specific architecture and an associated protocol is designed. The several zones for different preparations are visible on Figure 7(a) one sample preparation for RBC counting (Zone I), and another one for WBC/PLT counting and Hemoglobin measurement (Zone II). The whole blood is first sampled in two successive cali-brated meandershaped channels (Figure 7(b)). Each meander channel is connected to two stretchable chambers that can be filled with reagents. By successive actions of the two opposed chambers, the calibrated blood sample is efficiently and quickly diluted and

mixed with calibrated reagent (Figure 7(b)). The precise and repeatable dilution ratio is simply provided by the ratio volume of the meander channel and collapsible chamber. Thus, the resulting dilution ratio is generated solely by the geometry of the cartridge and does not depend on fluid properties. Repeatability performances obtained for blood parameters with microfluidic preparation are shown in Figure 8 (Left). In Figure 8 (Right), the correlation of Hemoglobin measurement obtained with mock-up coupling Microfluidic sample preparation and LensFree Imaging sensor and the one obtained with classical routine analyser is depicted.

Figure 8 (Left) shows a good agreement between the expected statistical performances and the actual Coefficient of Variation (CV) measured during repeatability standard operating protocols. For each parameter, the actual value is slightly higher than the target. This is a normal effect of the variability introduced by the hardware such as the pneumatic driving of the actuated

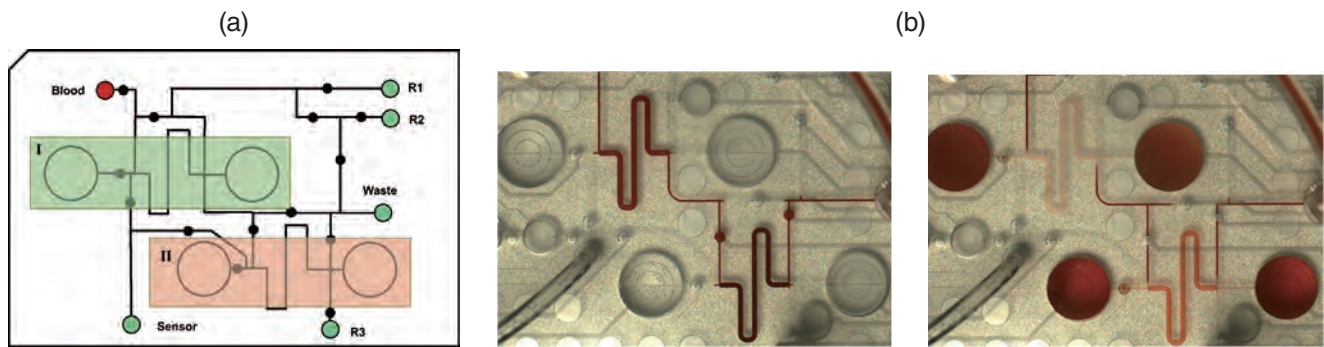


Figure 7 a) The architecture of the microfluidic cartridge with the two regions corresponding to the two performed dilutions. b) Representative images of the sampling and mixing steps in the meander shaped channel with the dilution chambers

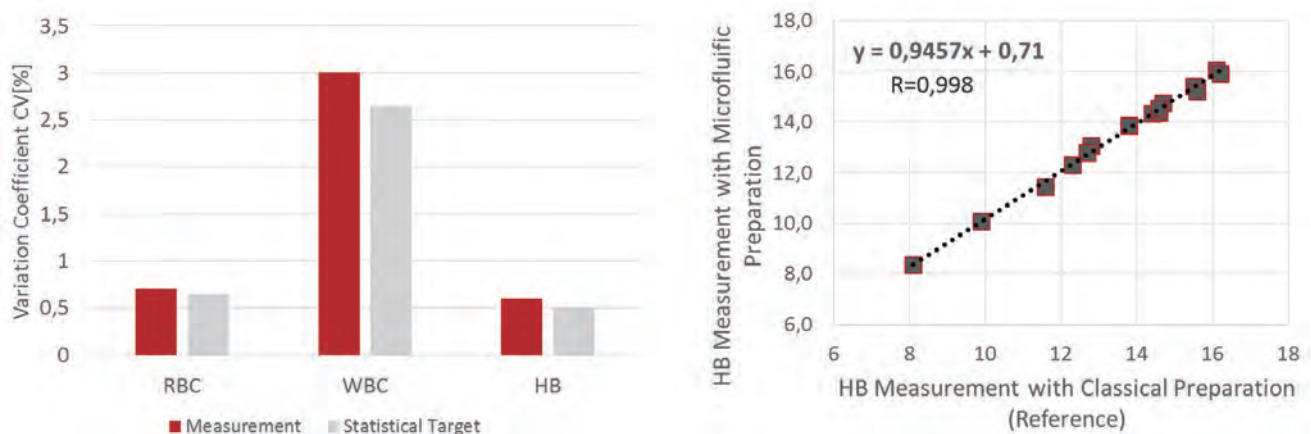


Figure 8 (Left) Repeatability performances for blood parameters with microfluidic preparation - (Right) Performances on Hemoglobin Measurement with mock-up coupling Microfluidic sample preparation and LensFree Imaging sensor

membrane. Likewise, the correlation on the hemoglobin parameter (Figure 8 Right) shows a good agreement with our qualified internal reference HORIBA Medical Yumizen H2500 It suggests an accurate preparation of the blood sample, from its sampling to the lysis, the dilution and the measurement of concentration.

### Conclusion

These innovative technologies pave the way to the development of new generic platforms for a wide range of POCT applications. The technology leads that we are following are opening a new way of performing diagnostics. By reducing the hardware complexity and the footprint of the instruments, we may now envision smaller, more reliable and more versatile devices. Whether it is at the doctor's office, closer the patient's bed at the hospital, or somewhere remote in the field, we propose two key assets for building more efficient ways of delivering the patient the care he/she needs. We have demonstrated a proof-of-concept feasibility on essential parameters. We now need to work on the enhancement of the algorithms involved in the computation of the LFT results. Indeed, since our primary goal is to deliver impactful insights to the physicians, we need to ensure now that we can address pathological conditions as well as healthy ones.

\* Editorial note: This content is based on HORIBA's investigation at the year of issue unless otherwise stated.



References

- [ 1 ] A. Ali-Cherif et al., International Conference on BioMedical Photonics | 16-17 March 2018, Towards a disruptive technology in Hematology: lens-free imaging for high precision red blood cell counting and sizing.
- [ 2 ] A. Ali-Cherif, et al., MIFOBIO 2018 (GDR ImaBio) | 5-11 Octobre 2018 : Imagerie holographique grand champ pour l'hématologie.
- [ 3 ] D. Isèbe, et al. "High accuracy platelet counting using LensFree imaging", Proc. SPIE 11075, Novel Biophotonics Techniques and Applications V, 110750O (22 July 2019);
- [ 4 ] T. Lavabre and al., Detection of circulating microfilariae in canine EDTA blood using lens-free technology: preliminary results, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2021, vol. 33(3) 572- 576.
- [ 5 ] D. Isebe, et al. Reusable microfluidic device for complete blood count applications, MicroTAS, October 2019
- [ 6 ] Allier, C. Method for identifying blood particles using a photodetector US10379027 filed on March 23, 2016 and issued on August 13, 2019.
- [ 7 ] Patent. Holographic method for characterizing a particle in a sample US10845286 filed on March 22, 2017 and issued on November 24, 2020
- [ 8 ] Patent. Microfluidic sample preparation device offering high repeatability US17/291139 filed on November 07, 2019.



**Damien ISEBE, Ph.D.**

ダミアン イゼブ

Innovation Project Manager  
Innovation Dept.  
HORIBA ABX SAS



**Philippe PIEDCOQ, M.D.**

フィリップ ピエコック

Development Engineer  
Innovation Dept.  
HORIBA ABX SAS



**Benoit THOUY, M.D.**

ブノア トゥイ

Algorithm Engineer  
Innovation Dept.  
HORIBA ABX SAS



**Aurélien DAYNES, Ph.D.**

オーレリアン デーヌ

Scientific Expert  
Innovation Dept.  
HORIBA ABX SAS



**Michael BRUCKNER, Ph.D.**

ミカエル ボロックナー

Innovation & Technology Manager  
Innovation Dept.  
HORIBA ABX SAS

## 令和二年度近畿地方発明表彰

Kinki Region Invention Awards 2020

### 京都発明協会会長賞

#### 粒度分布測定装置(特許第6189985号)

##### 表彰の概要

本発明表彰は、近畿地方における発明の奨励・育成を図り、科学技術の向上と地域産業の振興に寄与することを目的としており、近畿地方において優秀な発明、考案、又は意匠(以下「発明等」という。)を完成された方々、発明等の実施化に尽力された方々、発明等の指導、奨励、育成に貢献された方々の功績を称え顕彰するものである。HORIBAからは特許第6189985号(粒度分布測定装置)が京都発明協会会長賞を受賞した。

##### 表彰案件の概要

本発明は、従来手間のかかった測定条件の評価を、極めてシンプルな作業を行うだけで直感的に行うことができる粒子径分布測定装置に関する発明考案である。本発明はレーザー回折/散乱式の粒子径分布測定装置(Particaシリーズ)の「メソッド・エキスパート」として搭載されている。

##### 従来発明等の課題

レーザー回折/散乱式の粒子径分布測定装置では、回折/散乱光を複数の検出器で検出し、各検出器から出力された光強度信号の値により得られる光強度分布ベクトルを用いて、下記のEquation (1)に基づき粒子径分布を算出する。

$$s = Kq \dots\dots\dots (1)$$

ここで、sは各光検出器から出力された光強度信号の値から得られる、回折/散乱光の散乱角毎の光強度分布ベクトル、qは測定対象である粒子の粒子径分布を示すベクトル、Kは粒子径分布ベクトルを光強度分布ベクトルに変換するための係数行列である。

粒子径分布測定に際しては、測定結果に影響する係数行列Kを設定するための粒子の屈折率や溶媒の屈折率等の演算条件パラメータを適切に設定する必要がある。また、粒子を分散させるための超音波の印加時間や強度、データの取り込み回数、試料濃度といった測定条件パラメータも適切に設定される必要がある。

しかし、これらの演算条件パラメータや測定パラメータといった、オペレーター

が入力する操作パラメータを個々の試料に対して適切か判断するプロセスは非常に面倒であった。なぜなら、設定した操作パラメータが適切かは、測定結果や測定結果から得られる他の評価パラメータ(例えば平均径や中位径等の粒子径、あるいは粒子径分布の残差平方和)を参照しつつ、試行錯誤的に操作パラメータを変更して評価する必要があった。すなわち、個々の試料に対して最適な操作パラメータを設定するための評価を行う手順が複雑で、直感的に評価することは極めて困難であった。

例えば、ある試料に対して操作パラメータとして屈折率の値を得たい場合、1つの屈折率の値を設定して測定を行い、粒子径分布の測定結果を保存し、屈折率を変更して再演算し、再演算を繰り返して保存された測定結果を重ね書き又はディスプレイ上に並べて表示することで、その試料に対する最適な屈折率の値を得ることが行われてきた。しかも、屈折率の評価には測定結果を比較するだけでなく、平均径や中位径といった粒子径、粒子径分布の残差平方和といった複数の評価パラメータを参照することがあるため、保存と比較の手間はさらに面倒であった。そのため、もっと直感的で手間の少ない操作パラメータの評価手法が望まれていた。

## 本発明等の特徴

上述した背景から、本発明は、粒子径分布測定に際して個々の試料に対する操作パラメータ(測定条件パラメータや演算条件パラメータ)の評価を行うことを容易にする粒子径分布測定装置を提供することを目的としてなされたものである。

本発明の粒子径分布測定装置(**Figure 1**)は、一方の軸を操作パラメータの値、もう一方の軸を粒子径分布測定の測定結果から得られた評価パラメータ(平均径や中位径等の粒子径、あるいは粒子径分布の残差平方和)とした評価用グラフと、各操作パラメータに対する粒子径分布のグラフを示す測定結果グラフを同時に表示する。評価用グラフと測定結果グラフを同時表示することによって、オペレーターはどの操作パラメータの値が最適であるかを容易に評価できるようになる。

例えば、上述の例のように操作パラメータとして屈折率を得たい場合、5通りの屈折率を設定し、粒子径分布測定を行う。この一度の操作だけで、設定したそれぞれの屈折率に対する測定結果と評価パラメータ(平均径や中位径等の粒子径、あるいは粒子径分布の残差平方和)を同時に表示する。これらが同時に表示されることによって、5通りに設定した屈折率のうち、どの屈折率の値が測定条件として適切かを容易に判断することができる。さらに詳しく調べる場合には、適切だと判断した屈折率の値のさらに近傍の5通りの屈折率を設定し、測定結果と評価パラメータを比較する。これを繰り返せば、最適な屈折率の値を決定することができる。つまり、本発明の粒径分布測定装置によって、従来手間のかかった測定条件の評価を、極めてシンプルな作業を数回繰り返すだけで、直感的に行うことが可能になる。

**Figure 2**は操作パラメータをサンプル(粒子)の屈折率とする場合に、5通りまで屈折率をユーザーが指定して入力する画面(屈折率(実部)ウィザード)の例である。この例では、サンプルの屈折率(複素屈折



Figure 1 レーザ散乱式粒子径分布測定装置 (Partica LA-960V2)

ステップ 2. 分散係の屈折率を入力してください。	ステップ 3. サンプル屈折率の虚部を入力してください。
1.333	0
リストを閉く	
ステップ 4. サンプル屈折率の実部を入力してください。	ステップ 5. 実行ボタンを押してください。ウィザードは一時的に閉じられ、テストシーケンスが実行されます。
テスト値 1: 1.2	テスト値 4: 1.28
テスト値 2: 1.23	テスト値 5: 1.3
テスト値 3: 1.25	
テストシーケンスを実行 >>	
屈折率の候補を5つ入力できる	

Figure 2 屈折率設定画面の例

率)の実部を5通り設定している。虚部を5通り設定することも可能である。

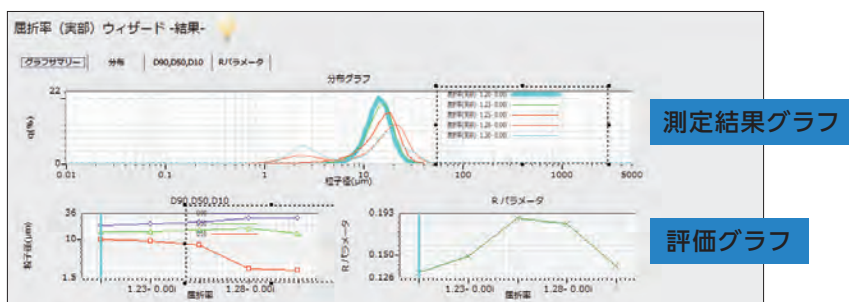


Figure 3 測定結果グラフおよび評価グラフの例

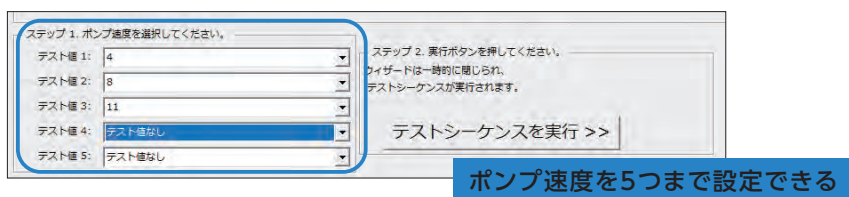


Figure 4 循環ポンプ速度設定画面の例

が良いことを示している。

Figure 4は測定条件パラメータの1つである循環ポンプ速度を操作パラメータとする場合の入力画面(循環ポンプ速度ウィザード)の例である。設定した測定条件パラメータの数だけ実験を自動で行い、測定結果グラフと評価用グラフを同じよう出力する。

【登録番号】

特許第6189985号

【発明者】

菅澤央昌



Figure 5 博士 菅澤央昌

Figure 3は入力した屈折率を操作パラメータとした測定結果グラフと評価グラフの表示例である。上部のグラフは複数の屈折率に対する粒子径分布を示した測定結果グラフである。横軸は粒子径、縦軸は頻度である。ユーザーが指定した5通りの屈折率に対する粒子径分布を、色を分けて表示している。左下のグラフ及び右下のグラフは、それぞれ屈折率に対する粒子径及び残差平方和(Rパラメータ)を示した評価用グラフである。粒子径は、パーセント粒子径であり、粒子径と通過分積算度との関係を示す粒子径分布グラフにおいて、通過分積算度が10%、50%、90%であるときの粒子径をD10、D50、D90とした。残差平方和は、横軸を光強度分布、縦軸を粒子径分布とした場合に回帰式から求められる残差の平方和であり、この値が小さいほど回帰式のあてはまり

## その他受賞案件

受賞名	特許番号	発明の名称	発明者氏名
発明奨励賞	特許第5813409号	ガス分析用プローブ	外村繁幸, 井戸琢也, 大西敏和
発明奨励賞	特許第6298309号	流量測定装置および 流量測定方法	坂本和也, 田中誠二, 南新吾
発明奨励賞	特許第5947709号	分光分析方法及び 分光分析装置	矢田隆章, 黒田峻, 横山一成, 高木想, 中井陽子



Figure 6 令和二年度近畿地方発明表彰式  
(左より 井戸琢也, 横山一成, 坂本和也)

\*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。

### 第10回HORIBA Group IP World Cup Gold Award受賞案件の紹介

Award Winners of HORIBA Group IP World Cup 2020



Figure 1 HORIBA Group IP World Cup

HORIBAグループで生まれた数々の独創的な技術や知的財産（以下、Intellectual Propertyの略語として「IP」ともいう）が事業の推進力となってきた。技術開発とその成果たる知的財産がHORIBAブランドの本質的な要素であり、HORIBA Group IP World Cupは、HORIBA Group is One Companyの精神のもと、事業を牽引する技術・知的財産をグループ全体で賞賛し、次なる成長の起爆剤となる技術・知的財産の創出をさらに奨励していくことを趣旨として創設された。

記念すべき第10回HORIBA Group IP World Cup\*では、海外を含むHORIBAグループの開発拠点から14件の応募があり、HORIBAの創業製品に関連する株式会社堀場アドバンスドテクノの「Self-cleaning electrodes（セルフクリーニング電極）」がGold Awardを受賞した。この知的財産は、電極筐体内に取り付けられた紫外線光源から紫外線を液絡部や応答ガラスへ照射することで、汚濁した液体試料内でも継続的に長期間安定して測定し続けることができる発明考案であり、今後のHORIBAグループを代表する技術として以下に紹介する。

\*第10回では、2019年6月1日から2020年5月31日の間に創作、出願、論文発表、特許登録、または外部表彰を受賞したなどの知的財産を対象としている。

### セルフクリーニング電極

IP：特願2018-052229(出願の名称：電極装置)

受賞者：西尾友志(株式会社堀場アドバンスドテクノ／日本)、  
江原克信(HORIBA (China) Trading Co., Ltd.／中国)



Figure 2 授賞式(受賞者：西尾友志)

## Gold Award受賞案件の概要

たとえばpHなどのイオンに応答するガラスは広い分野で使用されている。工業用途においては、その課題の一つとして、電極が長期間にわたりサンプルに浸漬されることで生じる電極ガラスの汚れが挙げられる。したがって、安定した正確な測定を行うためには、作業による電極の定期的な洗浄や校正が必要となり、メンテナンスに伴うコストの課題や、設置場所によっては定期的なメンテナンスが難しい場合が生じ得る。これまでに二酸化チタンの薄膜を電極表面にコーティングし、電極装置とは別個に設けた紫外線光源から紫外線を照射し、電極表面の汚れを分解する方法は、我々が既に論文等で提案している。しかし、汚れの種類によっては、電極表面まで紫外線が当たらず、十分な分解が出来ないという課題が生じ得る。

本受賞発明は、上記のような課題を克服したものであり、メンテナンスに手間がかからず、かつ表面に汚れが付着しにくいセルフクリーニング電極装置に関するものである。実現にあたり、紫外線が持つ、有機物質を分解したり、微生物等を死滅させたりする性質を利用した。そしてFigure 3に示すような、電極本体の支持管内部に紫外線光源を設け、そこから試料接触面に紫外線を射出する構造を提案した。本発明によると、たとえば汚染が著しい工場排水や環境水の測定時においても、光源から射出される紫外線を十分な光強度を保ったまま、電極本体の試料接触面に照射することができる。

検証結果の一例として、Figure 4に示すように液絡部に紫外線を照射した検証において、工場の放流槽にて、3か月間の試料接触部の汚れ防止を実現することが出来、その間のメンテナンスを不要とした。

また、二酸化チタンコーティングを施しておけば、紫外線照射と二酸化チタンの触媒効果の相乗効果により、試料接触面での防汚効果をより向上させることができる。

さらに、この発明を用いた電極は、内部液の組成であるKClをゲルに含有させることで、内部液の補充を不要にすることができ、より作業者のメンテナンス負荷を低減させることができる。

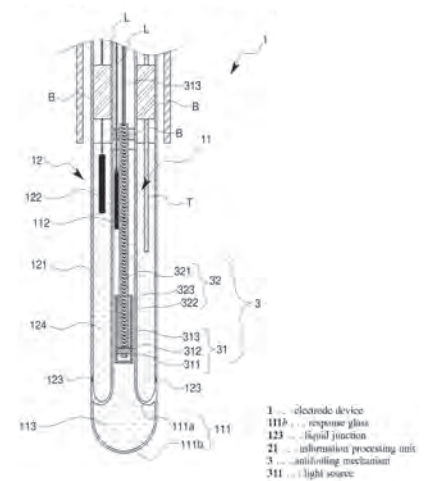


Figure 3 The end face of the electrode apparatus which concerns on this embodiment. 紫外線照射機構を示す図<sup>[1]</sup>

## Appearance After 3 Months

### Conventional (6101)

### Self-Cleaning electrode

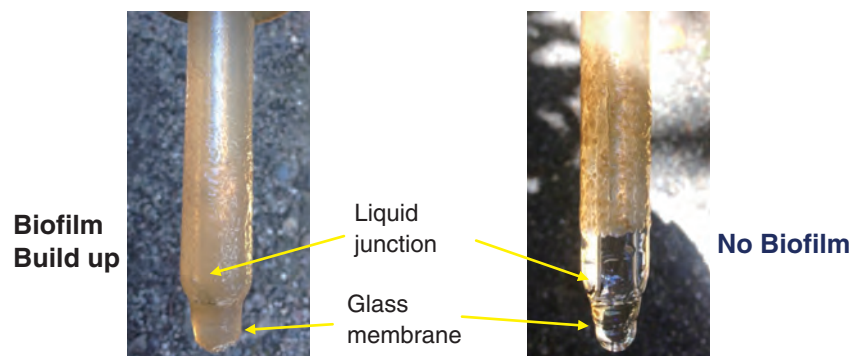


Figure 4 Experimental results according to the embodiment of the present invention 紫外線照射による効果を示す図

## その他受賞IP

### 【Silver Award】

ATLAS™ ディープラーニング ニューラルネットワークを使用したナビゲーション、位置推定、認識技術

IP：(特許)GB2568286

受賞者：Andrew Maloney, Paul Jeary, James Reuss, Joshua Davis  
(ホリバMIRA社／イギリス)

概要：カメラ、画像認識(コンピュータービジョン)、人工知能(ディープニューラルネットワーク)を使用して、衛星ナビゲーション(GNSS)の完全な代替手段を提供する技術。マシンビジョンカメラとニューラルネットワークを使用して、自分の位置を特定し、人や他の車両を認識して識別することで、自律的な運転を実現することが可能。

### 【Bronze Award】

半導体レーザー装置、及び分析装置

IP：特願2019-043099

受賞者：松濱誠, 粟根悠介, 伊関博臣, 榎田真太郎  
(株式会社堀場製作所／日本), 有本公彦  
(株式会社堀場アドバンスドテクノ／日本)

概要：ガス計測等に用いられる中赤外に発振波長をもつ量子カスケードレーザーに関連する技術。光源の温度を測定するサーミスタに接続された配線を樹脂封止する、又は配線を積層構造体であるサブマウントの中に設けることで、配線を介してサーミスタに伝わる周囲温度の影響を低減し、ガス計測における正確な波長制御を実現。

\*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】 US Patent Document US10,983,084B2 ELECTRODE DEVICE











---

## Readout HORIBA Technical Reports October 2021 No.55

発行日 2021年10月19日  
発行人 西方 健太郎  
発行元 株式会社堀場製作所  
〒601-8510 京都市南区吉祥院宮の東町2

<https://www.horiba.com/jp/publications/readout/>



DTP・製版・印刷・製本 株式会社 写真化学

<Readout編集委員会>

委員長 西方 健太郎

副委員長 野村 聡

編集委員 中谷 茂, 浦上 知佳子

松田 哲也, 大嶽 義浩, 坂本 淳一, 佐竹 博美

お問い合わせ先

株式会社堀場製作所 開発本部 開発企画センター  
産学官連携推進室

TEL : 075-313-8121 (代)

E-mail : [readout@horiba.co.jp](mailto:readout@horiba.co.jp)

**HORIBA**  
Explore the future