

バイオ・ライフサイエンス分野における粒子径分布 ～Analytical Solution Plazaにおけるソリューション提案～

Particle Size Studies for Biotechnology and Life Science
- Application Proposal from HORIBA Analytical Solution Plaza -

篠崎 陽子

SHINOZAKI Yoko

才原 浩司

SAIHARA Koji

光成 京子

MITSUNARI Kyoko

粒子径分布測定装置は、セラミックスをはじめ、電池材料、触媒、顔料、化粧品、食品、製薬など幅広い分野において、研究開発や品質管理目的として使用されている。種々の工業プロセスにおいて、粉体をはじめとして取り扱う粒子の大きさは製品の機能性を特徴づける重要なファクタである。粒子径分布装置は、ナノテクノロジーの分野はもとより、バイオ・ライフサイエンス分野での用途が著しく拡大してきている。特に医薬品開発・製造の過程においては、従来主流であった低分子医薬品はもとより、抗体医薬、核酸医薬、細胞医薬、遺伝子治療など、医薬品モダリティが多様化し、エクソソームやリポソームといった細胞由来のものや薬物送達システム (Drug Delivery System : DDS) 等の評価ニーズが高まっている。バイオ医薬品は、より複雑な分子構造を有し、分析試料に対する損傷の程度などを考慮しながら分析・評価しなければならない。よって、従来通りの分析原理や手法が適応できない場合があり、異なる分析アプローチを検討する必要がある。低分子医薬品に関しても、これまでとは異なる尺度での評価、迅速検査法やハイスループットに対する要求が高まっており、これらを満たす分析装置・アプリケーションの提案が必須となっている。HORIBAグループでは測定対象に応じた複数の粒子径分析技術を有しており、粒子分析の幅広いソリューションを提供している。本稿では、粒子径分析技術の中でも特に、近年注目されている動的光散乱技術を取り上げ、バイオ・ライフサイエンス領域でのアプリケーションを紹介する。

Particle size analyzers are used for R&D and quality control purposes in a wide range of fields, including ceramics, battery materials, catalysts, pigments, cosmetics, foods, and pharmaceuticals. In various industrial processes, the size of particles, including powders, is an important factor in characterizing the functionality of products. The application of particle size analyzers has been remarkably expanding not only in the field of nanotechnology, but also in the fields of biotechnology and life sciences. Particularly in the process of drug development and manufacturing, drug modalities are diversifying, including antibody drugs, nucleic acid drugs, cellular drugs, and gene therapy, as well as small molecule drugs, which have been the mainstream in the past and there is a growing need to evaluate cell-derived products such as exosomes, liposomes and drug delivery systems (DDS). Biopharmaceuticals have more complex molecular structures and must be analyzed and evaluated while considering the degree of damage to the sample. Therefore, conventional analytical principles and methods may not be applicable and different analytical approaches need to be considered. For small molecule pharmaceuticals as well, there are increasing demands for evaluation using different scales, rapid testing methods, high throughput and it is essential to propose analyzers and applications that satisfy these demands.

The HORIBA Group possesses multiple particle size analysis technologies that are suited to different measurement targets and offers a wide range of solutions.

This paper focuses on dynamic light scattering technology, which has been gathering attention in recent years among particle size analysis technologies and introduces its applications in the fields of biotechnology and life science.

はじめに

人の身体に影響を与える製剤の製剤設計において、有効性、安全性の確保とともに、服用のしやすさを考慮した錠剤の開発や、より効率的な薬物送達することを目的としているDDS (Drug Delivery System)の開発等、様々な研究が進んでいる。その中で、粒子径は非常に重要な設計要素の一つであり、評価方法も多岐に渡ってきている。低分子医薬品の原材料や賦形剤といったマイクロサイズを評価するためには、粒子を水や有機溶媒で分散させる湿式測定手法、造粒粉末等を粉末のまま測定に用いる乾式測定手法、他にもスプレー状のサンプルを測定する手法等、供給形態に合わせた測定手法が多数開発されているレーザ回折/散乱式の原理を用いた粒子径評価装置が有効である。一方、高分子やバイオ医薬品といった、ナノサイズの粒子径評価では、動的光散乱の原理を用いた装置が有効となる。

HORIBAではFigure 1に示すように、バイオ・ライフサイエンス分野においていろいろなアプリケーションを提供している。本稿では、そのうち粒子径技術を用いた製品を核に、バイオ・ライフサイエンス分野に向けた粒子径分布の測定事例を紹介する。

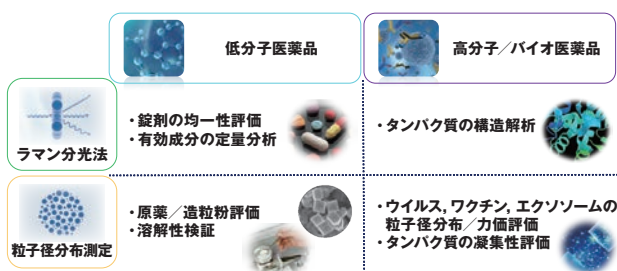


Figure 1 Analytical cases for small molecules and biopharmaceuticals.



Figure 2 nano Partica SZ-100V2.

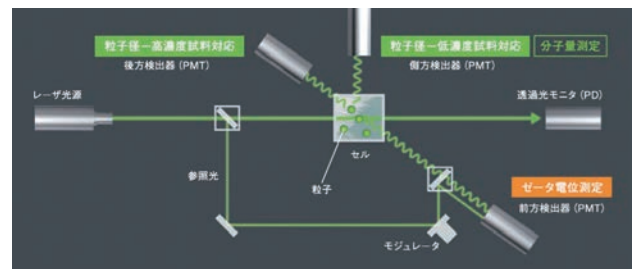
動的光散乱技術

動的光散乱法 (DLS : Dynamic Light Scattering)

粒子は液相中でブラウン運動をしており、この粒子にレーザ光を照射すると、レーザ光はさまざまな角度へ散乱する。このとき、ある特定の角度から定点位置での散乱光強度の時間変化を追うことで、粒子のブラウン運動に伴う散乱光強度のゆらぎを観察することができる。小さい粒子は速く、大きい粒子は遅く動くので、散乱光強度は小さい粒子で高周波に、大きい粒子で低周波にゆらぐ。散乱光強度のゆらぎ信号から自己相関関数を計算し、それを演算処理することで拡散係数を算出する。拡散係数からはStokes-Einsteinの関係式によって粒子径を求めることができる。これがDLSの原理である (Figure 3)。

DLSを用いた分析装置では、レーザドップラー法によるゼータ電位や、Debyeプロットにより光散乱強度から分子量を測定することも可能である。

また、最近ではゲル分析が可能なゲルユニットオプション (Figure 4)もある。粒子のブラウン運動による散乱光のゆ



(Stokes-Einstein式)

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

d : 粒子径, k_B : Boltzmann定数, T : 絶対温度, η : 粘度, D : 拡散係数

Figure 3 Optical system of nano partica SZ-100V2.

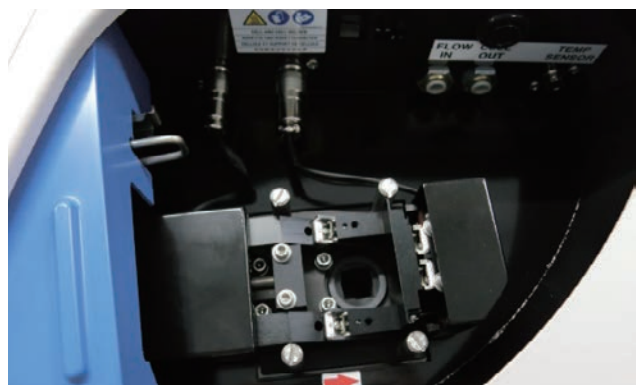


Figure 4 Gel unit.

らぎ同様に、ゲルも散乱光にゆらぎを持つ。ゲルは網目構造の中に溶媒を含み、その構造がゆらいでいるため、レーザー光を照射することで、得られる散乱光はゆらぎ情報を持ち得る。ゲルは多くの場合、位置によって網目構造が異なっているため、粒子径の様に均一な系で1点を測定するだけではゲル全体を表せない。そのため、多点で測定を行い、平均化処理をする必要がある。

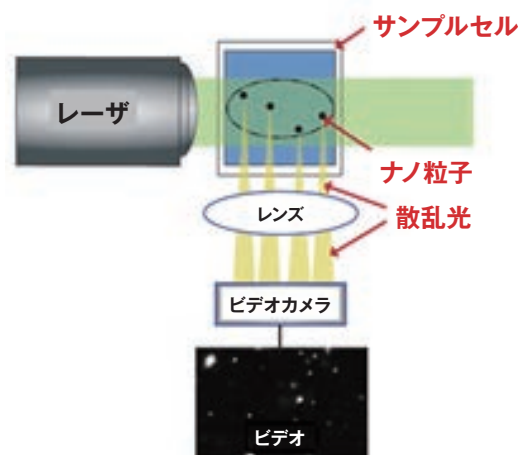
粒子軌跡解析法(PTA : Particle Tracking Analysis)

PTAでは実際にカメラを用いてブラウン運動をしている粒子の輝点を観察する。粒子を1つずつカウントして粒子径分布を求めるため、縦軸が絶対値となり個数濃度の情報が得られることが最大の長特である。原理は液相中でブラウン運動をしている粒子にレーザー光を照射し、粒子によって散乱された光をCMOSカメラ画面で観測し、その動きをトラッキングする (Figure 6)。粒子の散乱光の移動距離から拡散速度を計算し、拡散速度はStokes-Einsteinの関係式によって粒子径へと変換され、これにより粒子径分布を求めることができる。また、カメラ画面上で捉えた散乱光の数と測定部の体積から個数濃度を計算することが可能である。さらに、粒子が蛍光特性を有する場合、蛍光フィルターを用いて散乱光と分離することで、蛍光特性を有する粒子を分けて測定することもできる。

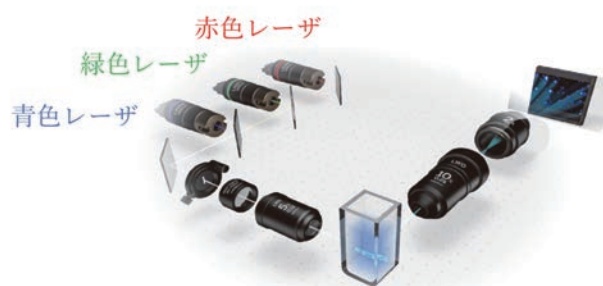
PTAを用いたViewSizer3000は、3波長のレーザー光源を搭載しており、小さい粒子径から大きい粒子径までを同時にワイドレンジで解析することが可能である。また、それぞれの波長に合った蛍光物質を利用することで蛍光ラベルされた試料の測定もできる。さらに、攪拌可能なセル構造により、高い再現性を有する。



Figure 5 ViewSizer3000.



a) 概略図



b) 装置内構成

Figure 6 Instrument configuration of ViewSizer3000.

アプリケーション事例

エクソソームの分析事例

細胞から排出される細胞外小胞の一つにエクソソームがある。エクソソームは排出した細胞由来の膜たんぱく質やmiRNAといった機能因子を含んでおり、細胞の挙動を知ることができるため、バイオマーカーや薬効研究など、再生医療や予防医療で注目を集めている。エクソソームが発現している機能因子を解析する研究も進められており、その一つに特定の機能因子を蛍光ラベルして判別する技術がある。正常細胞と比較してガン細胞は多くのエクソソームを排出するという予想もあり、エクソソームを判別して個数濃度を測定する手法が注目されている。PTAは蛍光特性を持つ粒子を判別し、個数濃度と粒子径分布を求めることが可能である。本稿では、エクソソームに含まれ膜たんぱく質CD9を蛍光ラベルし、PTAを用いて個数濃度と粒子径分布を評価した事例を示す。

まず、ヒト血清由来エクソソームの全粒子の粒子径分布と個数濃度の測定を行った。次に、ヒト血清由来エクソソームの膜たんぱく質CD9をAlexa 488で蛍光ラベルした粒子をカメラ画面上で確認し、蛍光測定モード(ロングパスフィルター (LPF)を用いて散乱光をカットし蛍光だけを観察)にて粒子径と粒子個数濃度を測定した。全粒子の個数濃度

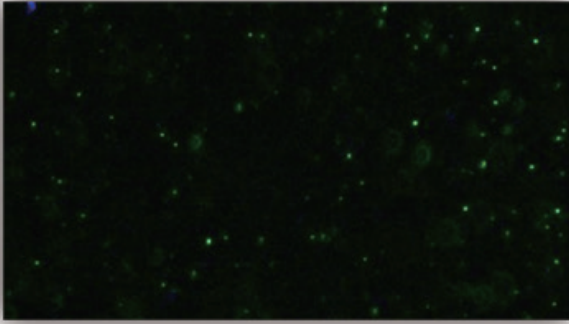


Figure 7 Exosome whole particle image by ViewSizer3000.

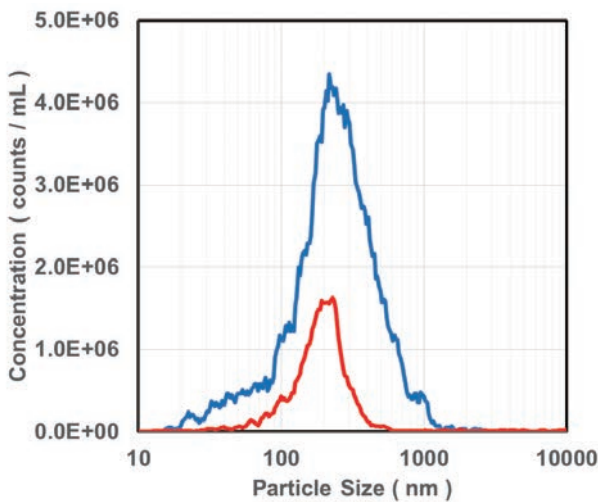


Figure 8 Comparison of ViewSizer3000 results between exosome whole particles and fluorescently labeled particles.
 — : Exosome whole particles
 — : Fluorescence labeled particles

は 2.3×10^8 counts/mL, 蛍光粒子の個数濃度は 5.5×10^7 counts/mLと得られ, 約24%のエクソソームがCD9を発現したことが分かった。(Figure 7およびFigure 8)

リポソームの分析事例

薬剤治療が奏功するか否かを決定する要因に関しては, 未だに不明な点が多く残されているが, その理由の一つとして, 目的の腫瘍組織へ薬剤が到達したことを確認する手段がないことが挙げられる。近年, リポソームを薬剤の送達物質として使用したドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System : DDS, 薬物送達システム) の研究が進展し, リポソームが脂質二分子膜の内部に水相を有する脂質閉鎖小胞構造を形成する性質を利用した“リポソーム医薬品”が, 既に数多く上市されている。一方, リポソームの構成成分である脂質二分子膜に注目すると, 脂質二分子膜にはタンパク質等を再構成することが可能であるため, 光増感物質等を用いれば, 目的の腫瘍組織への到達を確認することができるようになると思われる。したがって, リポソームは, 治療的機能 (Therapy) と診断的機能 (Diagnostics) を併せ持った「Theranostics製剤」として

の有用なツールに成り得ることが予想される (Figure 9)。ところで, DDSにおいては, 腫瘍でのEPR効果*を考慮して, リポソームの粒子径を20~200 nmになるような設計が求められる (Figure 10)。

本稿では, 「Theranostics製剤」としてリポソームを用いる際, 脂質二分子膜への光増感物質の含有量が, リポソームの粒子径にどの様に影響するのかを検討した事例を示す。

リポソームに様々な割合で光増感物質を組み込み, 各含有量 (0.0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0%) での粒子径を, 動的光散乱測定装置 nanoPartica SZ-100V2 を用いて測定した。その結果, 光増感物質の含有量の増加に伴い, リポソームの粒子径分布 (Figure 11) がブロードになると共に, 算術平均径も増加が確認された。いずれの場合もEPR効果の条件を満たす範囲内であることが確認された。

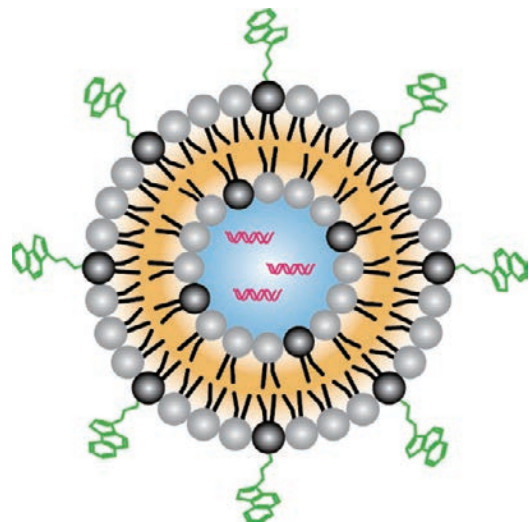


Figure 9 Theranostics Liposomes.

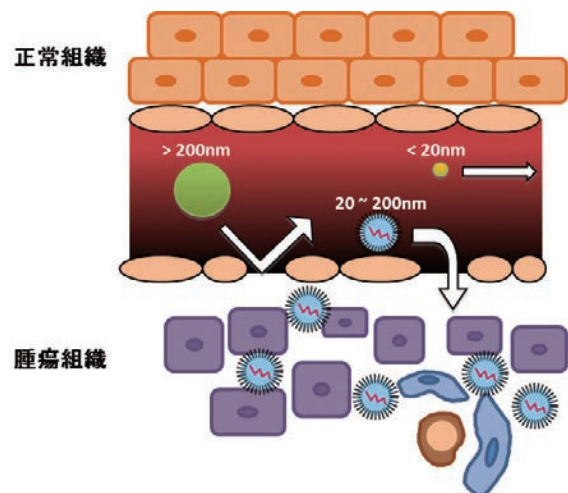


Figure 10 EPR effect.

*EPR効果：腫瘍組織の血管内皮は正常組織のものより粗い隙間構造を持っているため, 特定のサイズ (20~200 nm) を持つ粒子が, 透過し易くなる現象

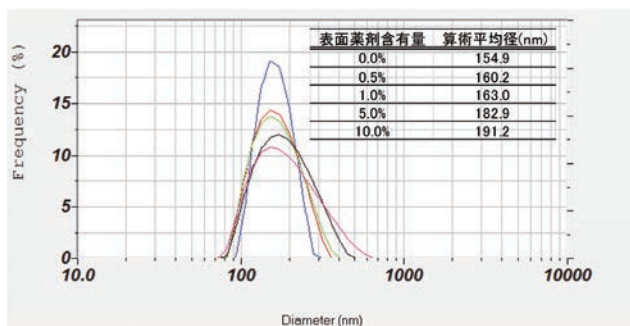


Figure 11 Particle size distribution depending on surface drug content.
— : 0.0% — : 0.5% — : 1.0% — : 5.0% — : 10.0%

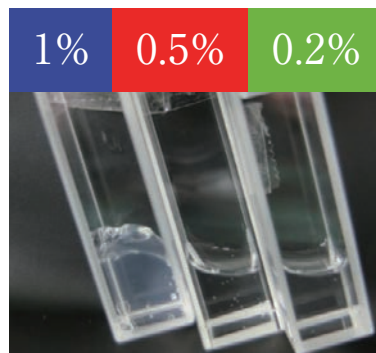


Figure 12 Samples with various cellulose concentrations.

動的光散乱測定により，“脂質二分子膜を再構成する光増感物質の含有量”と“リポソームの粒子径”に関する知見(EPR効果に関する)を得られることがわかった。この結果に、さらにゼータ電位と蛍光測定等から得られる結果を合わせることで、より正確に「Theranostics製剤」としてのリポソームが有する診断的機能を評価することができる。

セルロースナノファイバーの分析事例

セルロースナノファイバー (CNF) は木材やパルプなどのバイオマスから得られるセルロースを主成分として、原材料をナノサイズまで化学的・機械的に取り出した繊維状物質で、軽さ、高い強度、高い透明性、高い弾性率、低い線熱膨張係数、大きい比表面積等の多数の特徴がある。環境負荷が少ないことから、自動車、家電、住宅・建材、化粧品、ライフサイエンス等、様々な分野で活用が研究されており、実用化も進んでいる。CNFは物理ゲルに分類され、物理的に絡み合い、絡み合う力は立体的な絡み合いの他に静電気力なども含まれる。また力を加えると網目構造は崩れる。そのため、現状ではレオロジー等の評価しかなく、分布や数値として評価できるnanoPartica SZ-100V2のゲルユニットを用いての網目構造解析が注目されている。前述したように、ゲルは場所ごとに不均一な網目構造をもつため、測定箇所を変更して平均化する必要がある。動的光散乱式粒子径分布測定装置のオプションとして開発されたゲルユニットは、上下方向に測定セルが自動で動作し、多点で測定することが可能である

このゲルユニットを用いて、セルロース濃度の異なるCNFを分析した事例を示す。

セルロース濃度を0.2%、0.5%、1.0%と変えたサンプルを測定した(Figure 12)。各試料、100 μmずつ10箇所の測定ポイントを変化させて自己相関関数を測定し、平均化演算した結果をFigure 13に示す。セルロース濃度が高くなるほど、網目サイズが小さくなっていることが確認できた。

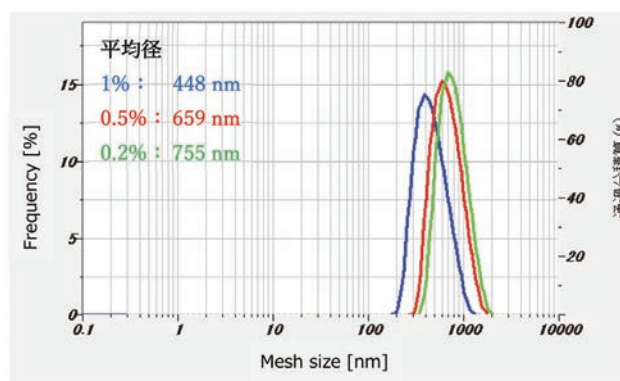


Figure 13 Mesh size distribution at various concentrations of CNF.

以上のように、エクソソーム、リポソーム、CNFといったアプリケーションをはじめ、バイオ・ライフサイエンス分野への貢献を期待し、HORIBAがラインナップしている種々製品の長特長を活用し、様々なモダリティを対象に提案できるように取り組みの幅を広げていきたいと考えている。

おわりに

今回はバイオ・ライフサイエンス分野において、粒子径分布、特に動的光散乱に着目して、分析事例をその測定装置とともに紹介した。従来から用いられている低分子医薬品はもとより、種々のモダリティの分析に用いることで、これまでとは異なる尺度での評価、迅速検査法の確立、ハイスループット化等、様々な角度から貢献することが可能であることを示した。

動的光散乱の技術以外にも、レーザ回折／散乱式粒子径の技術を用いた蛍光菌の分析事例等、粒子径分布は様々な研究開発に貢献している。HORIBAグループでは、分析計測技術開発、分析手法の提案ができるよう日々研鑽している。お客様の見据える課題をともに考え、経験を頼っていただけるようなトータルソリューションを提供できるよう努めていく。

*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] Y.Tamura, A.Suganami. Bioorg Med Chem Lett. 2012 Dec 15; 22(24): 7481-5.
- [2] Y.Tamura, A.Suganami. Int J Pharm. 2015 Dec 30; 496(2): 401-6.
- [3] K.Saihara, D.Irikura, Y.Shinozaki, S.Tanaka, Y.Yiming, S.Komatani. Tetraspan Positive Extracellular Vesicle Visualized by Particle Tracking Analysis System RSC Tokyo Internation Conference 2019
- [4] 佐藤優穂, 才原浩司, 相馬結花 低分子及び高分子医薬品開発における分析技術 粉体技術 粉体工学会 Vol.13 No.2 2021
- [5] 山口哲司 Readout No.45 2015 Aug 31: 35-39
- [6] 伊串達夫 Readout No.40 2013 Mar 31: 69-73



篠崎 陽子

SHINOZAKI Yoko

株式会社堀場テクノサービス
分析技術本部
Analytical & Testing Technology Department
Analytical & Testing Technology Department
Analytical Technology Division
HORIBA Techno Service Co., Ltd.



才原 浩司

SAIHARA Koji

株式会社堀場テクノサービス
分析技術本部
Analytical & Testing Technology Department
Analytical & Testing Technology Department
Analytical Technology Division
HORIBA Techno Service Co., Ltd.



光成 京子

MITSUNARI Kyoko

株式会社堀場テクノサービス
分析技術本部
Analytical & Testing Technology Department
Analytical & Testing Technology Department
Analytical Technology Division
HORIBA Techno Service Co., Ltd.