

ライフサイエンスの問題を解決する分析装置

Life Science Analytical Tools for Real Life Problems

Marinella SANDROS

Fran ADAR

光が物質、すなわち試料中の分子に作用すると、さまざまな興味深い現象が起きる。試料に光が吸収されることもあるが、試料の特性によっては光の放射、反射、散乱として観測される。HORIBAグループ科学システム機器部門(HORIBA Scientific)では、これらの現象を測定するための分析装置(ツール)を製造し、ユーザーによる計測・分析を支援している。これらのツールは研究における問題の解決に用いられるほか、さまざまな分野で製品開発する手掛かりとなる。とりわけライフサイエンスの分野は、近年急速に成長し、現在も拡大を続ける重要な市場である。植物、動物、ヒトを含む生物の科学的研究に従事するあらゆる部門はライフサイエンスに分類される。本稿では、ライフサイエンスのうち、医薬品および医療の領域におけるHORIBA製品の主な貢献にスポットを当て、これらが持つ強みを既存の技術と比較する。

When light interacts with matter (i.e. molecule/sample) many interesting phenomena occur. Light may get absorbed by your sample and depending on the sample properties you will observe light emission, reflection and scattering. HORIBA Scientific builds tools that measure these phenomena allowing our users to gain meaningful information about their samples. This information is used to solve outstanding problems in research or guide scientists to monitor product development in various fields. Life Science, in particular, is an attractive market because, over the years, it has experienced exponential growth, and continues to do so. All the divisions that engage in the scientific study of living organisms including plants, animals and human beings fall under the life science umbrella. This article will highlight the key contributions our products offer in the life science sub-divisions - pharmaceutical and health sciences - and will compare their advantages over existing technologies.

はじめに

HORIBA Scientificは、主に物理学と化学の研究を専門とする科学者に向けた高度な技術を応用したハイエンド型分析装置を長年にわたって開発し、最近では、その対象はライフサイエンス市場に拡大している。蛍光技術はすでにライフサイエンスにおいて広く利用されているが、「表面プラズモン共鳴イメージング」(SPRi)と呼ばれる新製品が我々の製品ラインに加わることで新たな展開を見せた。ライフサイエンスの顧客の需要に応えるためには、測定装置やソフトウェアに対するニーズや期待が物理学や化学の研究分野とは非常に異なっていることを理解しなければならない。ライフサイエンスにおける顧客の主な関心は、我々の製品が問題のソリューションを提供できるかどうかにあ

る。ライフサイエンスが直面している問題を解決するには、常に挑戦することが求められるが、その価値のある重要な市場といえる。本稿では製剤、バイオプロセス、医学的診断における蛍光分光、ラマン分光、およびSPRiを利用した技術の有用性について概説する。

製剤

人体は膨大な数の細胞からできている。これらの細胞は各種のタンパク質の働きによって、栄養素の処理や解毒、生理的反応の制御まで、さまざまな生体機能を果たしている。製薬分野では、幾年にもわたる低分子薬剤の開発ののち、「抗体」と呼ばれるY字型をした固有の種類タンパク質(Figure 1B)が、特定の疾病、つまりがんの治療において、

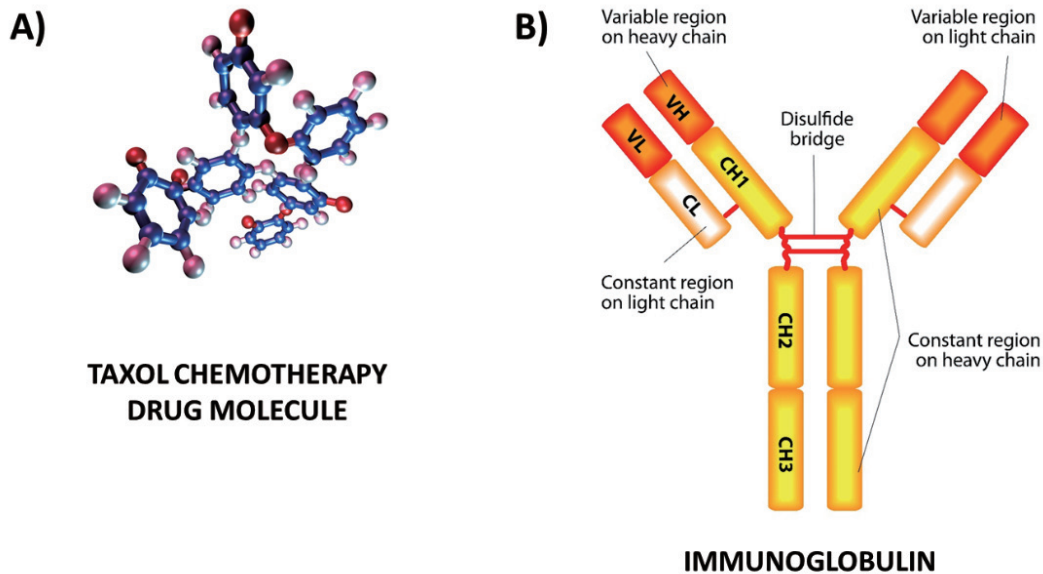


Figure 1 A schematic comparison between small molecule (TAXOL) and protein (antibody IMMUNOGLOBULIN) drugs.

低分子薬剤よりも効果的であることがわかってきた。しかし、この抗体分子の質量は150,000ダルトン (Da)であるのに対して、低分子抗がん剤 (TAXOL) は854ダルトン (Da)である。この分子量の違いは、抗体の方がはるかに複雑でその評価が難しいことを意味している。

抗体医薬の発見と開発の過程は極めて困難なものであり、その品質や利用可能性の早期評価が非常に重要な意味を持つ。抗体には凝集しやすい傾向があるため、抗体の不安定性が薬剤の評価を困難にしている要因のひとつとなっている。通常は「水を嫌う (疎水性の)」チロシン (Tyr) やトリプトファン (Trp) といった芳香族アミノ酸は分子内部の空洞に埋もれているが、タンパク質が凝集の前に折りたたまれた状態からほどけていくと、芳香族アミノ酸が水にさらされ、その局所環境が親水性へと変化する。タンパク質の三次構造におけるこの変化はラマン分光法によって観察することができる。この手法では、試料 (つまりタンパク質) に固有のスペクトル波形を、分子の指紋として得ることができる。ラマンスペクトルはタンパク質の局所環境の変化に敏感で、その二次および三次構造の動的ゆらぎの追跡を可能にしている。蛍光や示差走査熱量測定のような分子のコンホメーション (立体配座) の変化を捉える従来の技術と比べてラマン分光法の有利な点は、薬剤の安定性評価が患者に投与される濃度範囲で可能となることである。希釈すること自体が安定性に影響し測定精度の低下を引き起こすことを考えると、試料を希釈することなく高濃度の状態で製剤の安定性を評価できることはきわめて重要なことである。高濃度試料の評価においてタンパク質の構造に関する詳細な情報が得られる分析法は、現在ラマン分光法のみである。

卵白に由来含まれている低分子タンパク質のリゾチームを

用いた Fran Adar 博士の最近の研究^[1]では、20%のエタノール添加によって高次構造の変化が生じ、ラマンスペクトルにおける Trp のバンド比 (I_{877}/I_{760}) の相対強度が増大したことが明らかになった。これは Trp 成分周辺の局所環境の変化 (Figure 2) が疎水性の変化を伴って生じたことを示唆している。

また、東京大学の津本浩平教授^[2]は、IgG ポリクローナル抗体の安定性と濃度の関係を調査した。溶液の濃度が高くなると、チロシルダブレットの比 (I_{856}/I_{830} , 特定側鎖マーカー) が増大し始め、80 mg/mL を超える濃度で過飽和状態となった。この結果から、濃度が低い状態からチロシン側鎖が近隣の他のタンパク質と接近し始めることが見て取れる (Figure 3)。分析対象となったもう1つのタンパク質安定性マーカーは、トリプトファン (1555 cm^{-1} にある側鎖マーカー) に関するもので、濃度が高くなると分子間相互作用によってバンド幅が増大した (Figure 3)。これは、高濃度においては乱雑さ (エントロピー) が増大し、Trp 残基が隣り合った側鎖のアミノ酸残基に対する立体反発を避け、さまざまな立体配座をとるためである。

高濃度のタンパク質薬剤の立体構造の変化を観測できることは、製薬科学者にとっては凝集傾向を測定する手段が得られるということの意味し、その重要性は極めて高い。薬剤の安全性や効能は凝集によって大きく損なわれるため、製剤開発プロセスのさまざまな段階における最初のスクリーニングツールとして、ラマン分光法を用いることができる。

バイオプロセス

モノクローナル抗体などのタンパク質ベースの医薬品製造プロセスでは、製薬科学者はチャイニーズハムスター卵巣

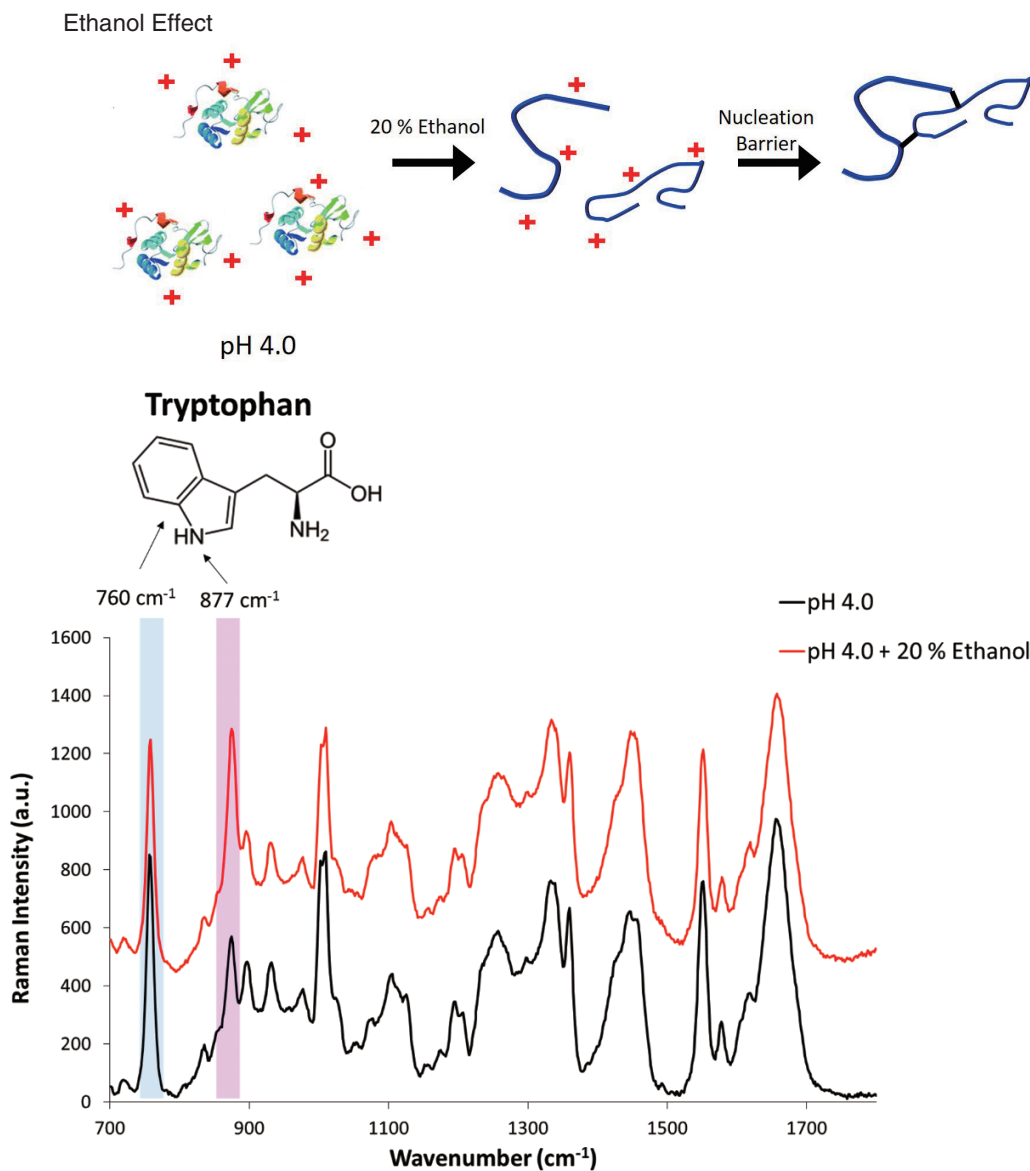


Figure 2 Raman Analysis of lysozyme (200 mg/mL) in 20 mM Citrate-PBS buffer at pH 4.0 before and after the addition of 20 % ethanol. Sample was excited with a 532 nm laser and a grating of 1800 lines/mm was used on the XploRA, a 200 mm focal length instrument.^[1]

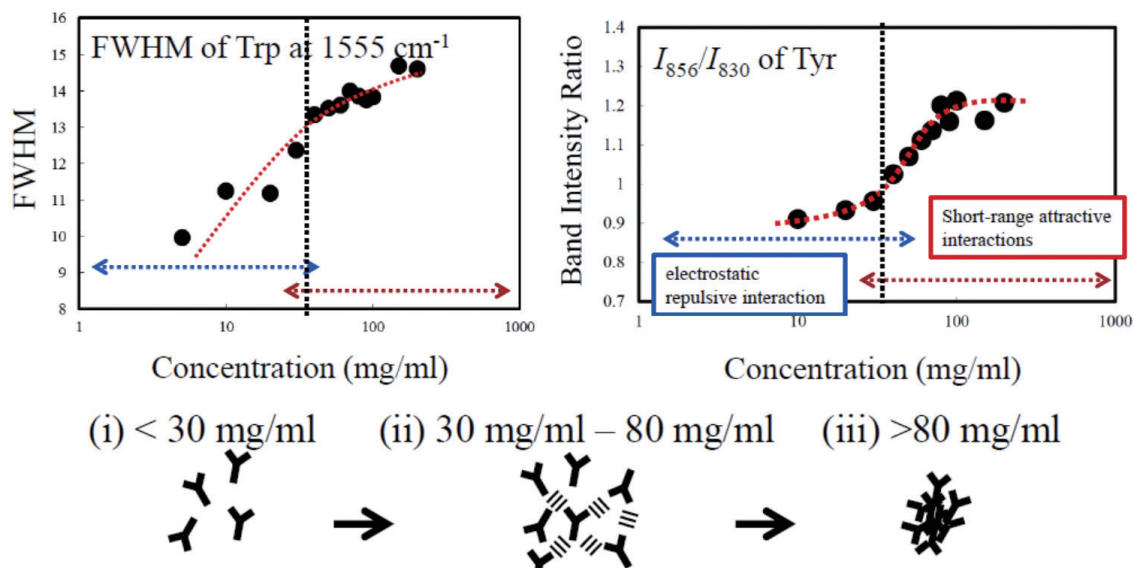


Figure 3 Comparison of the Trp band at 1555 cm^{-1} full width half maximum (FWHM) width (top left) and I_{856}/I_{830} tyrosyl ratios (top right) at concentrations ranging from 10 to 200 mg/mL. A schematic representation of the microenvironment around IgG molecules changes as the concentration increases (bottom (i)-(iii)).^[2]

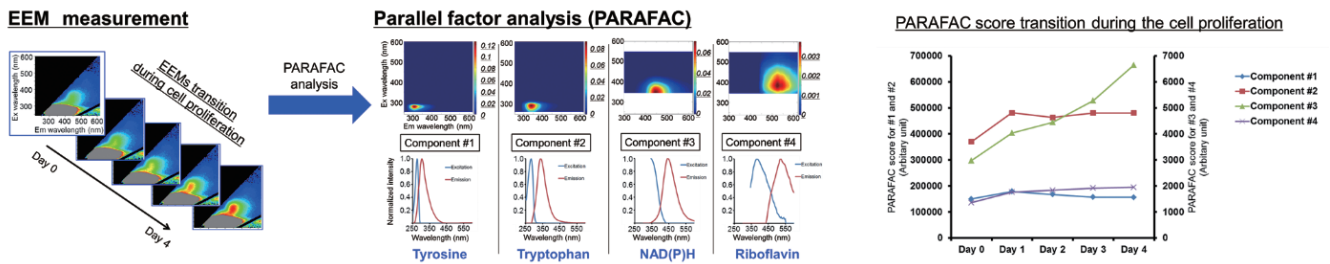


Figure 4 Monitoring cell proliferation over 4 days using ATEEM. The EEM data were analyzed using PARAFAC analysis. As a result, four spectral components were successfully extracted and assigned to tyrosine, tryptophan, NAD(P)H and Riboflavin.^[3]

細胞(CHO細胞)を使用している。特定のヒト疾患の治療を目的とした治療用モノクローナル抗体の生産を目的として、ヒトのDNAがこれらの細胞の遺伝子改変に使われる。改変された細胞は、バイオリアクターと呼ばれる装置内部に導入され、増殖する。ここでは、細胞の健全な成長と再生産を促進するよう成分調整が施された液体培地が使用される。それぞれの細胞から治療用抗体は少量しか生産されないため、バイオリアクターは生産条件に応じて数週間、あるいは数か月間にわたり培養を続け、300億個にもものぼる細胞を生産する。生産された細胞はより大きなバイオリアクターへと移され、細胞の生産がさらに続けられる。目的とする細胞の数量に達するまで、これが何度か繰り返される。

最適な生産を確立するために、細胞には定期的に成分調整された栄養素が供給される。タンパク質の生産効率を高めるためには、バイオリアクターの状態をオフライン・オンラインで監視することが何よりも重要となる。一方で、汚染要因となる物質の侵入を最小限に抑えなければ、生産されたタンパク質製剤の有効性に影響する恐れがある。その有効な解決策となるのがラマンプロブ技術である。プローブをバイオリアクターに直接挿入(閉ループ制御)して、生細胞密度、ブドウ糖、アンモニア、乳酸塩、グルタミン酸塩、グルタミンおよび総細胞密度の継続的なリアルタイムモニタリングを行うことが可能となる。これらの情報を用いれば、栄養供給の過程を最適化し、生産効率や濃度について良好な結果を出すことができるであろう。

バイオプロセスにおいて科学者たちが直面する課題の1つに、バイオリアクター内のいわゆる「上澄み」に含まれる遊離アミノ酸の測定がある。細胞培養中のアミノ酸の存在、種類および濃度を知ることは、細胞の成長を促進し生産量を高めるための最適な栄養量の確保に欠かせない。総合分析には通常、時間のかかるクロマトグラフ分離と質量分析の組み合わせ(すなわちLC-MS)を用いる必要があったが、最近、「吸収-透過・蛍光励起発光マトリクス」(Absorbance-Transmission and fluorescence Excitation-Emission

Matrix: A-TEEM)と呼ばれる今までにない新技術がHORIBAにより開発された。この技術は、バイオリアクターの状態を示す重要な指標となる遊離アミノ酸濃度のオフラインプロファイリングに非常に有用である。A-TEEMにより、蛍光性の試料成分すべての励起・発光スペクトルを個別に作成すると同時に、光を吸収したが蛍光を出さなかった成分についての情報も得ることができる。ラマン分光と同種のこの技術は、本質的に、試料ごとに固有の分子指紋の作成が可能である。

北川雄一^[3]らは、CHOリアクター内の複数の重要成分のモニタリングにおけるA-TEEMの有用性について解説している。これらの成分はリアクターの状態を知る上で大きな手掛かりとなる。Figure 4に示すように、細胞増殖のモニタリングが4日間にわたって行われ、EEMデータにおける成分分析が多変量解析の手法に基づくPARAFAC(Parallel Factor Analysis)を用いて実施された。その分光学的な特徴から、構成成分はそれぞれチロシン、トリプトファン、NAD(P)H、およびリボフラビンと判明した。同定された4つの成分のうち、NAD(P)Hは着実に増加している。この成分は細胞環境条件の変化を示す既知のバイオマーカーである^[4]。新しいA-TEEMシステムは、細胞培地に含まれる遊離アミノ酸のプロファイリングを可能とするだけでなく、従来手法と比べて時間とコストの低減も実現できる。

医学的診断

牛乳に対する幼い子供のアレルギー反応は、 α -ラクトアルブミン(LAC)が原因となって引き起こされる。このため、このアレルゲン血液から検出できるロバストな診断プラットフォームを構築することにより、診断の向上を図ることができる。診断プラットフォームに欠かせない条件は、良好な感度、再現性、および特異性を達成することであるが、スクリーニングによって捕捉リガンド(相互作用を測定する対象物質と特異的に結合する物質)を選択することが重要になる。表面プラズモン共鳴イメージング(SPRi)は、特定の対象に対して複数種のリガンドをセンサ上に配

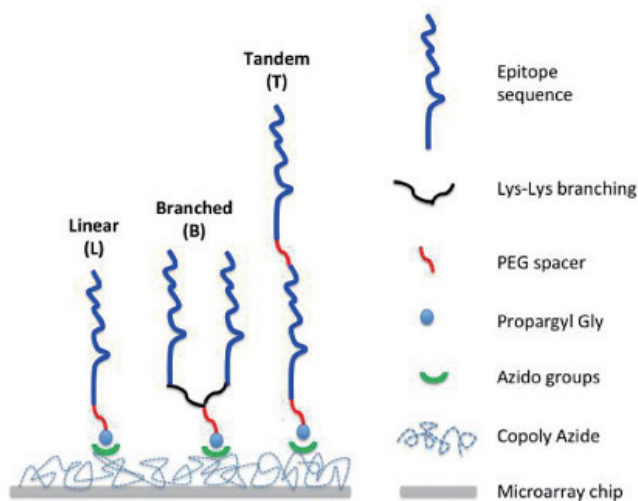


Figure 5 A schematic representation of the three different configuration of peptides (ligands) used on the microarray chip: linear (L), branched (B) and Tandem (T).^[5] (Reproduced with permission from ref.5, Copyright 2017, Elsevier)

列すること(マイクロアレイ)によりスクリーニングを可能とする,リアルタイムかつラベルフリーな測定技術である。スクリーニングに加え,試料の動力学的パラメーターの取得も可能である。最近, Renzo Vanna博士のグループは^[5], 新型のSPRiシステム「XelPlex」を用いて3種類の形状(直線, 分岐, タンデム)のペプチドのマイクロアレイによるLAC抗体のスクリーニングを行った(Figure 5)。

タンデム形状(LAC1_T)は,直線(LAC1_L)および分岐(LAC1_B)ペプチドに比べ,結合能力の向上において最もすぐれていた(Figure 6)。その理由は速度の遅い解離相にあるとされ,タンデム形状が多価相互作用を受ける(分析物が複数のペプチドと結合する)と結論できた。この情報

は結合親和性の値しか得ることができない酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)などの従来の手法では取得不可能なものである。一方,SPRiシステムならば上記のように,親和性の数値の背後にあるメカニズムを見抜くことが可能となる。

おわりに

本稿では,医薬品や医療分野における実際の問題について,我々の製品(Figure 7)を使ったソリューションを紹介した。ラマン分光(Raman),SPRiおよびA-TEEMといったラベルフリー技術の効果は,競合する技術には無い高い有用性を持っている。これらの技術に共通するのは,紹介した各アプリケーションにおいて,評価の時間とコストを低減することができるという効果である。各技術はいずれも将来有望な技術であり,ライフサイエンス市場における一層の活用と普及が見込まれる。

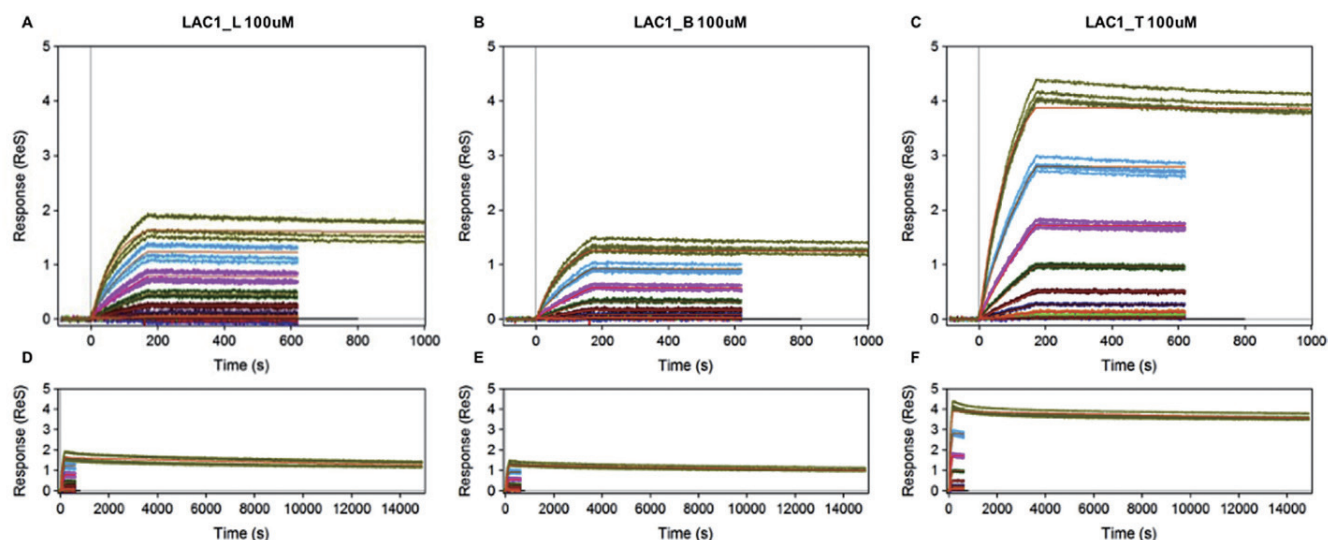


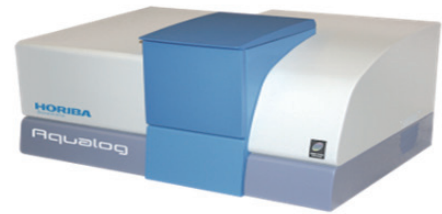
Figure 6 SPRi study of alpha lactalbumin (LAC) antibody binding to the microarray peptide pre-functionalized with various orientation of alpha lactalbumin IgE epitopes LAC1_L, LAC1_B, LAC1_T. The SPRi association (A-C; association rates were deduced from 3 min of association) and dissociation curves (D-F, dissociation rates were deduced from 4 h of dissociation) after the injection of 8 different concentrations (0.98-500 nM) of the antibody (colored plots).^[5] (Reproduced with permission from ref.5, Copyright 2017, Elsevier)



Raman



SPRi



A-TEEM

Figure 7

参考文献

- [1] Marinella G. Sandros and Fran Adar. Assessing biotherapeutics stability using Raman Spectroscopy. (Application note) <http://www.horiba.com/scientific/products/horiba-life-science-solutions/application-notes/>
- [2] Chikashi Ota, Shintaro Noguchi, Satoru Nagatoishi and Kouhei Tsumoto. Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy, *Pharm. Res.*, 33, 956-969(2016).
- [3] Yuichi Kitagawa, Takumi Moriyama, Daisuke Irikura, and Yasushi Nakata. Holistic Analysis of Mammalian Cell Proliferation using Fluorescence Spectroscopy. (Application note) <http://www.horiba.com/scientific/products/horiba-life-science-solutions/application-notes/>
- [4] D.W.Zabriskie and A.E.Humphrey, Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 337-343(1978).
- [5] Alessandro Gori, Marina Cretich, Renzo Vanna, Laura Sola, Paola Gagni, Giulia Bruni, Marta Liprino, Furio Gramatica, Samuele Burastero, Marcella Chiari *Analytica Chimica Acta* 983, 189-197(2017).



Marinella SANDROS, Ph.D.

Business Development Manager for Life Sciences
SPRi Product Manager
HORIBA Instruments Inc.



Fran ADAR, Ph.D.

Worldwide Raman Applications Manager
HORIBA Instruments Inc