

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03182

研究課題名(和文)医療検体の高品位常温乾燥保存を目指した保存操作の設計と検体劣化の予測

研究課題名(英文)The deterioration prediction and the preservation protocol design of liquid biopsy specimens for the high-quality non-cryogenic dry preservation

研究代表者

白樫 了(Shirakashi, Ryo)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：80292754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：疾患の早期発見や個別化医療で重要となる臨床検査で用いる検体中のバイオマーカー分子の「質」(活性)は、採取後に急速に劣化する。本研究では、バイオマーカー分子の活性を長期間にわたり室温以上の乾燥状態で維持する簡便な方法として、真空乾燥保存を提案し、バイオマーカー分子を含む水溶液に添加する保護物質の種類とその添加量・調合比や添加による活性の劣化速度の変化(検体の有効保存期間)を、保護物質水溶液のガラス転移曲線、誘電分光特性から推定する方法を提案した。また、提案した乾燥方法では、室温で長期間(2カ月程度)保存しても「質」がまったく変化しないこともわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「質」を維持した検体の保存が可能になることで、「質」の低下のため臨床応用されていない10万種以上のバイオマーカーが利用できるようになる。これにより、早期の疾患発見や被験者独自の未病や疾患状態の特定が可能になるので、治療費の抑制できる。また、極低温を必要としない乾燥状態で保存することで、保存維持費を抑制できる。これは、個人の疾患・生理状態を検体の状態でアーカイブできるので、国民の健康管理に資する。本研究の成果は、これらを実現するために不可欠な、乾燥状態で検体を保護する添加物質の選定方法や乾燥方法、「質」が保持される期間の予測方法を提示した点に学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The quality (enzymatic activity) of biomarker molecules in clinical specimens rapidly deteriorate after the collection from patients. In this study, the vacuum drying at room temperature is proposed as a simple feasible method of preserving the enzymatic activity of biomarker molecule. Using the glass transition curve and the dielectric spectrum of the added protective agents, the methods for; 1) designing the amount and preparation of the added protective agents and 2) predicting the deterioration rate of biomarker molecules (shelf time of specimens), are proposed. The enzymatic activity of the sample biomarker molecule is proved to keep its original enzymatic activity for at least two months by preserving the sample with the proposed vacuum-dry preservation method.

研究分野：相変化熱工学

キーワード：乾燥 バイオマーカー 酵素活性 検体保存

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の臨床検査では、血中にあるがん由来の核酸やバイオマーカーである複数のタンパク質(酵素)を定量検出することで、疾患の早期発見や個人差のある疾患の性質の同定が可能になりつつある¹⁾。また、DNA や RNA 等の核酸を増幅する PCR 技術や高速化した次世代シーケンサーにより、遺伝子の解読によるテーラーメイド創薬への期待が高まってきている。しかしながら、遺伝子の発現に直接関わる RNA やバイオマーカーであるタンパク質は極めて劣化が速く、これまでに有効なバイオマーカーは 15 万種ほど発見されているが、臨床検査では、100 種程度しか実用化されていない。この劣化を抑制すべく、簡便且つ高品位な RNA やタンパク質の長期保存法が望まれているものの劣化の機序・抑制方法については不明な点が多い。

常温乾燥による臨床検体の保存は、現在利用されている低温(凍結)保存や凍結乾燥とことなり、低コストで温度管理を必要としないことから、検査や治療用の薬剤の流通にとっても鍵となる技術と言える。現況では、海外の医療器具メーカーより DNA の乾燥保存を目的としたキットが発売されているが、臨床検査に耐える RNA やタンパク質の乾燥保存については、ほとんど実現されていない³⁾。

2. 研究の目的

本研究は、血液等の液性検体を、簡便かつ低コストで長期間にわたり高品位で保存する方法に必要な常温乾燥により操作を設計する理論と手法の構築を目指している。乾燥により検体に含まれる検査対象となる生体分子を劣化させないためには、劣化反応を媒介する生体内にある液相状態の水をできるだけ除去して、さらに、残留する水分子の運動を強く抑制することが不可欠である。その際、乾燥に伴う生体分子の凝集や水和結合の喪失等による変性を回避する必要があることから、乾燥に先立って生体分子を保護する添加物質(保護物質)の選定が重要になる。この保護物質により、検体に残留する水分がガラス化され、加えて検体中の生体分子が保護物質の分子と干渉することで、生体分子の高次構造の変化や凝集が抑制される。

これまでの研究で、保護物質および残留水分がガラス化していると保護効果が高いこと、同じガラス化でも添加した保護物質のうち共存する水分子の回転緩和時間(β 緩和時間)が長くなるものほど劣化速度が遅いこと、乾燥操作によっても劣化速度が変化し、検体表面と内部で含水率の分布が原因と考えられること、がわかってきていることから、酵素を構成するタンパク質の高次構造の維持に寄与している水の分子運動の大小、保護物質(+残留水)のガラス化の有無が、劣化の機序を支配していると考えられる。以上より、乾燥保存で鍵となる事項は、1)保護物質の種類と濃度、2)検体の乾燥操作、の2段階であると考えられる。

そこで、本研究では、保護物質を添加した液性検体の保護機序を明らかにして、最も需要が多い血液検体中の特に脆弱なバイオマーカー分子である酵素を例にとり、保護物質の物性と乾燥操作が検体の保護効果に及ぼす影響(劣化する速度)を予測することを目標としている。

3. 研究の方法

そこで本研究では、血液検査における対象酵素で、特に環境(温度や水分等)の変化に敏感な、LDH(Lactose Dehydrogenase; 乳酸脱水素酵素)をモデル検体、保護物質として、低分子二糖類(Trehalose)と高分子安定剤(ϵ -Poly-L-Lysine: PLL)を例として用いて、上記 2. で記載した 1), 2) と保存後の酵素活性の経時変化の関係を明らかにして、保存プロセスを設計する指針を提案する。具体的な実験・測定内容は、以下の通りとなる。

- 1) 保護物質水溶液の物性測定(ガラス転移曲線(DSC)、水溶液中の水分子の β 緩和時間(水分子の回転緩和時間)(誘電分光)、拡散係数(特に過飽和水溶液中の水の相互拡散係数)。
- 2) 保護物質を添加した LDH に添加する濃度や各保護物質の質量比が、LDH の劣化(酵素活性の低下)に及ぼす影響を測定する。
- 3) 1), 2) の実験・測定結果より、水分子の回転緩和時間から LDH が劣化する速度を推定する方法を提案、保護物質が LDH の劣化を抑制する機序と劣化の程度を決定する特性値の提案。

4. 研究成果

(1) ガラス転移曲線の測定(Trehalose+PLL 水溶液のガラス転移曲線): 図 1 に Trehalose と PLL を合わせた水溶液の質量含水率を横軸、その水溶液のガラス転移温度を縦軸としたガラス転移曲線を示す。図中の各線は、同じ質量濃度で Trehalose と PLL の濃度比が異なる場合に対応している。この図より、保護物質が Trehalose のみの水溶液では、室温 25°C で二水和物結晶となる濃度(含水率 10wt%)とガラス転移温度がほぼ一致しており、含水率 10wt% 以下過度の乾燥はタンパク質の劣化を促す二水和物結晶を促進し、これ以上の含水率では、ガラス化することなく、不安定な過飽和状態にあることが分かった。同じ含水率において Trehalose に PLL を添加すると、含水率 10wt% 以上におけるガラス転移温度が上昇するため、多少の吸湿でも安定したガラス状態を保てる可能性があることがわかった。一方、PLL 水溶液のガラス化温度は低く、常温ではガラス化していない可能性があることがわかった。

(2) 保護物質水溶液中の水分子の β 緩和時間(水分子の回転緩和時間)： 含水率を一定にした保護物質水溶液中にある Trehalose と PLL の質量比を変えた場合の水分子の回転の β 緩和時間(水分子の最も速い回転緩和時間)を、誘電分光により測定した結果、緩和時間が最も長くなる質量比が存在すること、Trehalose 水溶液に PLL を僅かに添加すると緩和時間が急激に短くなること、がわかった。すなわち、PLL の質量割合が高くなると徐々に緩和時間が長くなり、極大値を示したのち、PLL 水溶液では再び緩和時間が短くなることがみてとれる。この結果は、Trehalose に PLL を適度に添加することで、劣化速度に関連する水分子の運動を抑制できることを示唆している。

(3) 保護物質水溶液中の水の相互拡散係数： Trehalose 水溶液と PLL 水溶液における水の拡散係数を、過飽和状態を含む広い含水率範囲で測定した。本研究では、顕微赤外分光により測定した 1 次元非定常乾燥系における水分濃度分布の時間変化を提案した。この手法は、1 回の測定で未飽和からガラス転移や結晶析出がおきる過飽和状態における水の拡散係数が算定できること、一つの水分子の水素結合数比が測定できること、に利点がある。図 2 に含水率に対する水の拡散係数を、図 3 に含水率に対する水 1 分子中の水素の水素結合数(0-2 個)の比を示す(純水では比は一定になる)。図 2 から、水の拡散係数は、飽和度が比較的低い範囲では PLL と Trehalose の差がなく、自由体積理論で推定される値に等しいものの、飽和度が高くなる低含水率では Trehalose より PLL と共存する場合に高くなることが分かった。また、図 3 より、Trehalose 水溶液については、低含水率では水素結合数が増えており、水分子と Trehalose の干渉が大きくなっていることが示唆された。尚、本研究で測定したような高い過飽和度における相互拡散係数を直接測定した例は、寡糖であり非平衡状態における分子運動の新しい測定手法といえる。

(4) LDH の活性測定(保護物質と保護対象タンパク質の質量比、保護物質の質量比の影響) LDH に保護物質添加した真空乾燥では、乾燥前の試料液の厚さや濃度が重要であり、液膜が厚く保護物質濃度が高い場合は、試料表面がガラス化または結晶化することで、試料中に水分が閉じ込められて十分な脱水と試料全体のガラス化がおきないことが、研究成果(3)や実験結果よりわかった。そこで、LDH の真空乾燥では、適切な保護物質濃度を添加した十分に薄い液膜を用いて、乾燥後に試料全体がガラス化していることが確認できた条件で行った。

LDH 単位質量に対して添加する Trehalose または PLL の質量を変えた試料を、含水率 10%程度まで真空乾燥によりガラス化させ、乾燥終了直後に復水させた LDH の酵素活性を測定した結果を図 4 に示す。どちらの保護物質についても、LDH 質量の 800 倍程度までは、添加量を増やすほど活性が維持されることがわかった。また、Trehalose より PLL の方が LDH の劣化を抑制することがわかった。保護物質とタンパク質の分子量は、LDH>PLL>Trehalose の順であることと、タンパク質の酵素機能の保護効果は、タンパク質と保護物質の相互

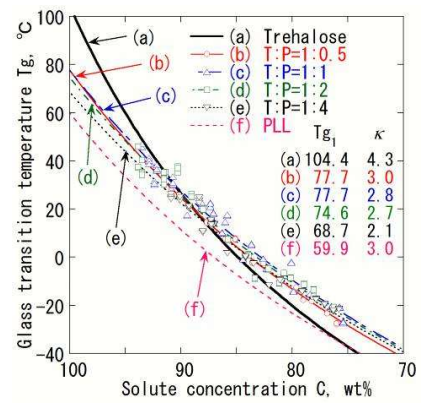


図 1 Trehalose-PLL-水系のガラス転移曲線 (T:Trehalose,P:PLL,数字は各成分の質量比)

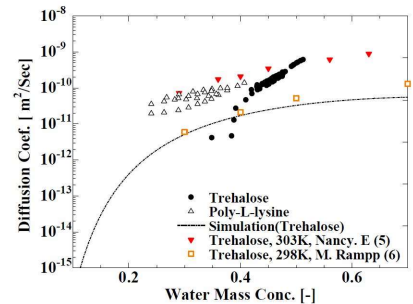


図 2 Trehalose/PLL 水溶液中の水の拡散係数

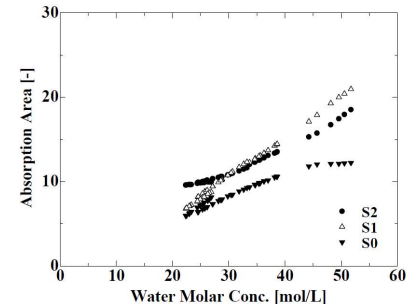


図 3 Trehalose 水溶液中の水の水素結合数比 (S₀:0, S₁:1, S₂:2)

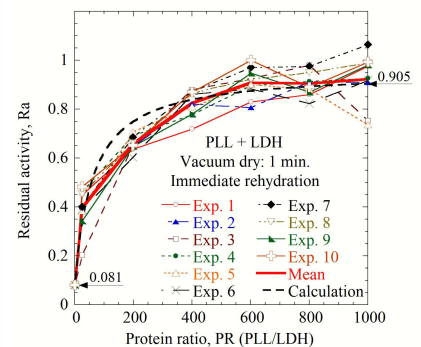
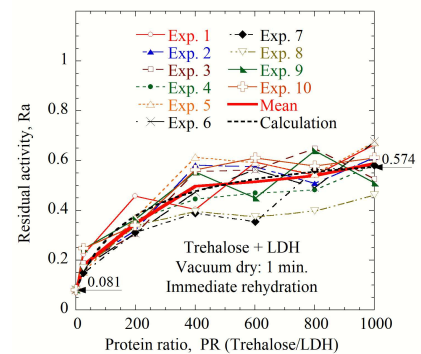


図 4 乾燥 LDH 活性 (上:Trehalose, 下:PLL, Protein ratio は質量比)

作用が支配的であることから、図4の結果より、LDHにPLLやTrehaloseの結合サイトがあり、それに保護物質が結合した割合が、乾燥後の酵素活性に比例すると仮定したモデルを提案した。同モデルより、Trehalose、およびPLLのLDHへの結合定数は、それぞれ0.12と5.3と算定され、PLLはTrehaloseより44倍大きい結合定数であることがわかった。TrehaloseとPLLの質量比を変えた保護物質を添加した際のLDHの保護効果を同様の実験で測定したところ、得られた値を用いて計算されたLDHの酵素活性と極めてよく一致した。この結果に加えて、研究成果(1)より試料がすべてガラス化していることを考慮すると、保護物質の選択や調合のスクリーニングでは、ガラス転移温度のみならず、保護対象タンパク質への保護物質の結合定数が、重要な特性値となりうるということが分かった。

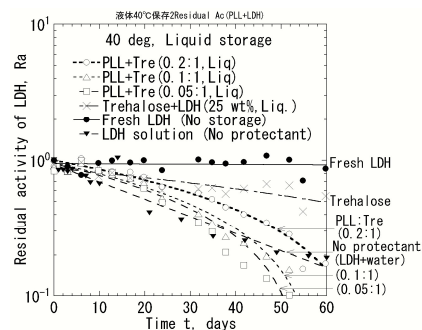


図5 液中LDH活性 (Tre:Trehalose,数字は成分の質量比)

(5) LDHの劣化速度の測定(保護物質の質量比の影響): TrehaloseとPLLの質量比を変えた保護物質をLDH質量の800倍程度添加した試料を常温真空乾燥させて、60日間程度にわたり保存した際のLDHの酵素活性の変化を測定した。測定は相対湿度1%以下、保存温度25°Cと40°Cの2条件でおこなった。25°Cで保存した試料は、乾燥直後の活性を40日間以上維持し、劣化がまったく見られなかった。一方、低湿度ではあるが、40°Cの高温で保存した場合は、Trehaloseだけを保護物質とした試料については、60日後には活性が直後の10%程度まで低下してしましたが、PLLを添加した試料は、殆ど劣化がみられなかった。研究成果(1)より、保存温度25°CではPLL水溶液以外の試料は、すべてガラス化している。一方、40°Cの高温では、すべての試料は、ガラス転移温度以上であり、特にTrehaloseのみを含んだ試料は、高い過飽和状態にあり、この状態を長時間保持すると二水和物結晶を生成することが実験によりわかった。ガラス化していないPLLのみを含んだ試料でも長期間劣化を抑制できたことから、低含水率では、劣化の直接原因となるLDHに水和して高次構造を維持している水分子の動きが十分に遅いことが推測された。LDH周囲の水分子の運動速度と劣化の関係を調べるため、保護物質とLDHの質量比を800程度に維持したまま、高含水率(75wt%)の試料を40°Cで40日間保存した(図5)。その結果、劣化速度が最も低くなるTrehaloseとPLLの質量比が存在することが分かった。また、この質量比は研究成果(2)の水分子の β 緩和時間が最も長くなる質量に等しく、脱ガラス化した過飽和度が高い状態では、水分子の β 緩和時間より保存期間を推定できることが示唆された。

(6) 結論: 一連の研究より、保護物質の選定では、保存時の含水率、温度においてガラス化していることが望ましいため、ガラス転移曲線が重要であるが、加えて保存するタンパク質と保護物質の結合定数がわかると、添加量や調合比を算定できる可能性があることがわかった。また、保存中に脱ガラス化した際は、劣化が進行するが、保護物質の水和結晶等は避ける必要がある。その劣化の速度は試料中の水分子の運動の目安である β 緩和時間より、推定できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kiyoshi TAKANO, Ryo SHIRAKASHI	4. 巻 35
2. 論文標題 Development of Dry-preservation Technology for Biological Protein at Room Temperature - Measurements of Glass Transition Temperature and Residual Activity of Lactate Dehydrogenase -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transactions of the Japan Society of Refrigeration and Air Conditioning Engineers	6. 最初と最後の頁 325-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11322/tjsrae.18-33AC_OA	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ryo Shirakashi, Yuki Amano, Jun Yamada	4. 巻 38
2. 論文標題 Measurement of the Water Relaxation Time of α -Polylysine Aqueous Solutions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal Thermophysics	6. 最初と最後の頁 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10765-017-2213-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yukiko Otsuka, Ryo Shirakashi, Kazuhiko Hirakawa	4. 巻 56
2. 論文標題 Bound states of water in gelatin discriminated by near-infrared spectroscopy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 111602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/JJAP.56.111602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ryo Shirakashi, Kiyoshi Takano	4. 巻 35
2. 論文標題 Recrystallization and Water Absorption Properties of Vitrified Trehalose Near Room Temperature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-018-2420-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kiyoshi Takano
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF DRY-PRESERVATION TECHNOLOGY FOR BIOLOGICAL PROTEIN AT ROOM TEMPERATURE
3. 学会等名 the 9th Asian Conference on Refrigeration and Air Conditioning (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 魏霖
2. 発表標題 生体保護物質水溶液中の水分拡散に関する研究
3. 学会等名 日本機械学会熱工学コンファレンス 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 魏霖
2. 発表標題 顕微赤外分光による高濃度生体保護物質水溶液の水分拡散係数の測定
3. 学会等名 日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高野 清, 白樫 了
2. 発表標題 医療検体の常温乾燥保存を目的とした耐乾燥保護物質のガラス化・乾燥特性
3. 学会等名 第54回日本伝熱シンポジウム講演論文集
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高野 清, 白樫 了
2. 発表標題 医療検体の常温乾燥保存を目的とした LDH タンパク質の長期保存における保護物質の効果
3. 学会等名 第56回日本伝熱シンポジウム講演論文集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白樫 了
2. 発表標題 誘電・近赤外分光による保護物質・タンパク質水溶液における水の分子運動および水素結合状態の測定
3. 学会等名 第60回低温生物学会セミナー及び年会講演要旨集
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 清, 白樫 了
2. 発表標題 医療検体の高品位保存を目的とした常温乾燥・再水和LDHの活性におよぼす保護物質の影響
3. 学会等名 第57回日本伝熱シンポジウム講演論文集
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Lin Wei and Ryo Shirakashi
2. 発表標題 Measurement of Diffusion Coefficient and Hydrogen Bond of Water in Dry-protective Solution by Microscopic NIR Spectroscopy
3. 学会等名 CRY02020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白樫 了
2. 発表標題 生物から学ぶ技術：乾燥保存と高密度熱物質交換
3. 学会等名 第5回 生物の優れた機能から着想を得た新しいものづくりシンポジウム（於 京都工芸繊維大）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo SHIRAKASHI
2. 発表標題 High Quality Biopreservation - Water in Biological System -
3. 学会等名 2018 International Summer School of Heat Transfer, Hosted by Key laboratory of Efficient Utilization of Low and Medium Grade Energy (Tianjin University), Ministry of Education (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白樫 了
2. 発表標題 誘電・近赤外分光による保護物質・タンパク質水溶液における水の分子運動および水素結合状態の測定
3. 学会等名 第65回低温生物工学会セミナー（於 京都市成長産業創造センター(ACT京都)（新型コロナウイルス感染拡大のため、誌上開催変更）） （招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高野 清 (TAKANO Kiyoshi)		