

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630066

研究課題名(和文) バイオ医薬品の活性維持を目的とした凍結タンパク質水溶液のin-situ評価

研究課題名(英文) In-situ evaluation of frozen protein solutions to maintain the stability of biopharmaceuticals

研究代表者

高松 洋 (TAKAMATSU, Hiroshi)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20179550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品の製造や輸送・保存のためには薬剤溶液の凍結が行われる。本研究は、この凍結過程が原因で生じる薬剤の失活を可能な限り防止することを目的とした。氷、溶質、未凍結濃縮液の相互作用を知るために、方向性凝固ステージとレーザーラマン顕微鏡を組み合わせた独自のシステムを用いて凍結状態のタンパク質および糖の水溶液を観察し、さらに、タンパク質の変性を定量化する手法を開発した。タンパク質とトレハロースの濃度比を変化させるとともに凍結界面の進行速度をコントロールして両溶質が共局在できるようにすれば、凍害防御効果が期待できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Freezing of protein solutions is an important process for production, transportation, and storage of biopharmaceuticals. The aim of this study was to minimize the denaturation of an organic matter due to the freezing process. A lysozyme aqueous solution was used as a model protein with trehalose as a cryoprotective agent. The binary solution or each component solution was frozen in a microchannel on a directional solidification stage combined with a laser Raman microscope, and observed to obtain spatial distribution of water, ice, and each solute. Protein denaturation was also evaluated from the Raman spectra. These experimental results revealed that optimization of lysozyme/trehalose concentration and the freezing speed led to colocalization of both solutes, which is helpful in enhancing the stability of lysozyme because of the cryoprotective effect of trehalose.

研究分野：熱工学

キーワード：凍結保存 バイオ医薬品 ラマンイメージング タンパク質変性

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組み換えや細胞の大量培養といったバイオテクノロジーで製造された医薬品のことをバイオ医薬品と言う。例えば、組み換え DNA 技術によるホルモン、酵素、抗体などのタンパク質性医薬品がその一つであり、癌や C 型肝炎に使うインターフェロン、糖尿病に使うインスリンなどが有名である。このバイオ医薬品は、従来の医薬品では対応できなかった疾患に対応しうることから、世界中でその開発競争が激化している[1]。しかし、化学合成でつくる従来の低分子医薬品よりも複雑な構造を持ち、高感度な分子構造で設計されているため、製造工程のわずかな違いで最終製品の特性が大きく異なる結果となる。一方、品質管理も難しく、製造から患者に投与するまで有効成分を安定に保持する必要がある。その間の保存や輸送は、通常、凍結した状態あるいは凍結乾燥状態で行うが、上述のように分子構造が複雑であるため凍結過程で生物活性が失われる可能性がある。したがって、凍結技術が薬剤の最終的な効用をも左右することになる。

2. 研究の目的

タンパク質と氷の相互作用に関する従来の研究では、条件次第ではタンパク質が氷界面に吸着され、濃縮液内の濃度が予想より低いといった結果が報告されている[2]。しかし、結果に最も大きな影響を及ぼす凍結速度が制御されておらず、タンパク質の状態に関する情報も皆無である。そこで、本研究は、レーザーラマン顕微鏡に方向性凝固ステージを組み込んだ独自の方向性凝固低温ラマン顕微鏡システムを用いてタンパク質や糖の水溶液を温度制御下で凍結させ、凍結した状態のまま、氷、溶質、未凍結部分をラマンイメージングし、その分布に及ぼす凍結温度や凍結速度などの凍結条件、タンパク質の種類や濃度、およびタンパク質以外の添加剤の影響を明らかにする。さらに、タンパク質の変性を in-situ で定量化する方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 方向性凝固低温ラマン顕微鏡システム

本研究で用いた実験装置は、2 つの独立した温度調節ステージから成る方向性凝固ステージを正立型レーザーラマン顕微鏡(ナノフoton社製 RAMAN-11)に組み込んだものである(図 1)。液体窒素の流量と内蔵ヒータへの電力を調整することによって、温度調節ステージの温度をフィードバック制御できる。ステージ間ギャップは可変であり、本研究では 4 mm に固定した。

実験対象とするタンパク質や糖の水溶液は、自作のマイクロチャンネルに封入して用いた。このマイクロチャンネルは、幅 1 mm、長さ 10 mm のスリットを有するシリコンシート(厚さ 0.05 mm)を 2 枚の石英ガラス(24×24

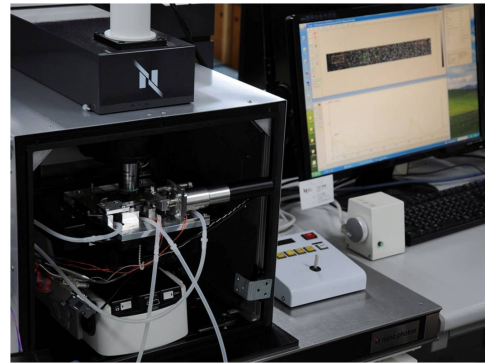


図 1 方向性凝固低温ラマン顕微鏡システム

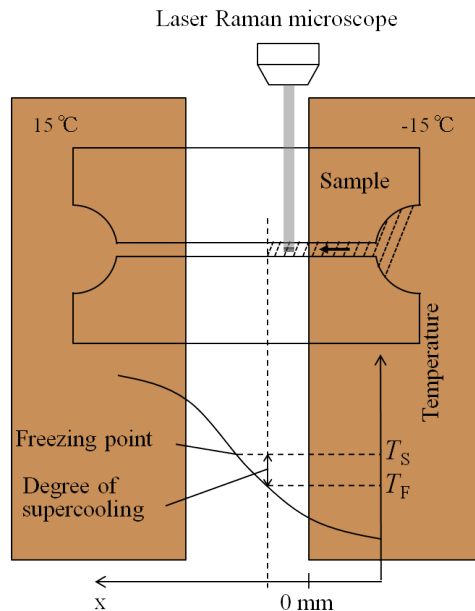


図 2 方向性凝固実験系における凍結温度 T_F と凝固点 T_S の関係

mm, 厚さ 0.15 mm) に挟んで作製したものである。植氷を行うためにチャンネルの両端は開放された液だめとした。

試料に温度勾配を与え、低温側を過冷却状態に維持して植氷すると、低温側から凍結が始まる(図 2, 凍結温度 T_F)。水-氷界面は高温ステージに向かって進行し、凝固温度 T_S の位置で停止する。この T_S は試料の濃度により変化する。本実験系の最大の利点は、低温側から高温側に向かって凍結温度 T_F が高くなるため、異なる過冷却度 $T_F - T_S$ で凍結された試料を一度の実験で得られることである。

(2) 温度分布の計測

実験に先立ち、マイクロチャンネル内の温度分布を計測した。あらかじめ検定した熱電対(直径 0.3 mm)をマイクロチャンネルの石英ガラスに貼付し、チャンネル内を精製水で満たした。上から別の石英ガラスを被せ、高温ステージおよび低温ステージをそれぞれ 20, -20, 15, -15, 10, -10 に維持した。低温ステージの縁を $x=0$ mm と定め、1 mm おきに $-3 \leq x \leq 7$ mm の範囲で温度計測を行った。

(3) ラマンイメージング実験

トレハロース二水和物 (Trehalose Dihydrate, Wako) および卵白由来リゾチーム (Lysozyme from Egg White, Wako) を重水 (Deuterium Oxide, Wako) に溶解して調製した下記の水溶液を用いた。

- 10%リゾチーム水溶液 (w/v)
- 10%トレハロース水溶液
- 10%リゾチーム・5%トレハロース水溶液
- 10%リゾチーム・10%トレハロース水溶液
- 10%リゾチーム・50%トレハロース水溶液

マイクロチャンネル内を水溶液で満たして方向性凝固ステージ上に置き、高温ステージを 15℃, 低温ステージを -15℃ に維持した。温度が安定したことを確認した後、氷核物質であるヨウ化銀を懸濁した重水を低温側液のために滴下して試料を凍結させた。

まず、凍結時の様子を動画として記録し、氷界面の進行速度を算出した。

次に、レーザーラマン顕微鏡を用いて 532 nm の励起光をライン状に照射し、20 倍対物レンズにて散乱光を集め、600 gr/mm の回折格子で分光計測 (波数分解能 1 cm⁻¹) した。この計測をマイクロチャンネル内の -2.0 ≤ x ≤ 2.3 mm の範囲で行った。一度の測定で得られるデータは 400 × 10 pixels (空間分解能 1.0 μm/pixel) であるので、マイクロチャンネルに沿って計測領域を移動させながら 14 回の計測を行い、データを結合して 4117 × 10 pixels のラマンイメージングデータを得た。

図 3 は、ある点におけるリゾチーム水溶液、トレハロース水溶液、リゾチーム-トレハロース混合水溶液のラマンスペクトルの例である。トレハロース水溶液には CH (2830~3030 cm⁻¹) および OH (2100~2815 cm⁻¹) の特徴的なピーク、リゾチーム水溶液にはこれらに加えて Amide I (AMD: 1590~1710 cm⁻¹) のピークが認められた。そこで、あらかじめ単溶質溶液で面積比 CH/OH, AMD/OH と濃度の関係の校正直線を得て、混合溶液における個々の溶質濃度算出に用いた。まず AMD/OH からリゾチームの濃度を求めた。そして、双方の溶質の寄与が考えられる CH/OH からリゾチームの濃度分の寄与を差し引き、トレハロースの濃度を算出した。このようにして得られたトレハロースおよびリゾチームの濃度を画像化し、凍結条件と

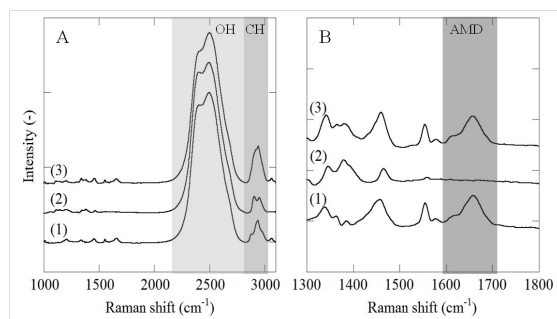


図 3 リゾチーム水溶液(1)、トレハロース水溶液(2)、リゾチーム-トレハロース混合水溶液(3)のラマンスペクトル

溶質の空間分布との関係について考察した。

(4) 凍結によるタンパク質変性の評価

タンパク質に凍結傷害が与えられると、タンパク質の二次構造である α -helix 構造が β -sheet 構造と呼ばれる別の立体構造へと変化する。この変化は、Amide I のピーク位置の変化として現れると予想される。Amide I ピークは主に C=O 伸縮振動、C-N 伸縮振動、N-H 面内振動から構成されるピークである。 α -helix と β -sheet の含有比により Amide I ピークの位置が異なり、 α -helix 構造が多いと低波数側に、 β -sheet 構造が多いと高波数側にピークが現れる。そこで、Amide I ピークの重心位置を算出し、氷界面の進行速度や溶質の空間分布との関係を調べた。

(5) pH 変化によるタンパク質変性の評価

タンパク質溶液の凍結過程では、氷晶間への溶質の取り込みや濃縮が生じる。このとき、局所的な pH の変化が起き、タンパク質の変性に繋がる恐れがある。そこで、下記の 4 つのタンパク質をそれぞれ重水に溶解して生体高分子モデル試料として使い、pH 変化がラマンスペクトルに与える影響を調査した。

- ウシ血清アルブミン(BSA)
- リゾチーム(LYS)
- β -ラクトグロブリン(BLG)
- キモトリプシノゲン(CHYM)

試料溶液の最終濃度が 10 wt%、溶液の pH が 2, 4, 6, 8, 10 となるように、1 M 塩酸および 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて調節した。各試料のラマンスペクトルを計測し、Amide I バンド領域にてスペクトル強度が最大となる波数を比較した。

4. 研究成果

(1) 温度分布

高温ステージおよび低温ステージをそれぞれ 20℃, -20℃, 15℃, -15℃, 10℃, -10℃ に維持してマイクロチャンネル内の温度分布を計測した結果を図 4 に示す。計測結果をロジスティック曲線で回帰し、図中に実線で示した。位置 -4~0 mm が低温ステージ上、0~4 mm がステージ間隙、4~8 mm が高温ステージ上にそれぞれ対応する。

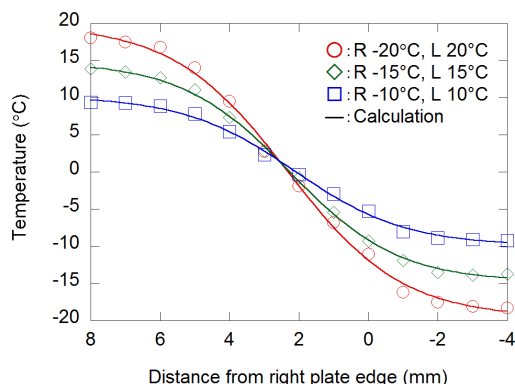


図 4 マイクロチャンネル内の温度分布

(2) 氷界面の進行速度

リゾチーム-トレハロース混合水溶液およびそれぞれの単溶質水溶液の氷界面進行速度の計測結果を図5および6に示す。界面進行の上流側、すなわち低温領域では、トレハロース水溶液よりもリゾチーム水溶液の方が界面進行速度は大きかった。リゾチームとトレハロースの分子量はそれぞれ 14307, 378.33 であるので、同じ質量分率の水溶液を調製するとリゾチーム水溶液の方がモル濃度は小さく、したがって凝固点は低くなる。そのため、リゾチーム水溶液では過冷却度が大きくなり、界面進行速度が大きくなったと考えられる。また、リゾチーム水溶液に混合するトレハロースの濃度が増すほど、界面進行速度は小さくなった。この原因は、水和力の大きなトレハロースは分子量が小さいながらも動粘度が大きくなることにあると思われる。

(3) ラマンイメージング

ラマンスペクトルから各溶質の濃度を算出し、凍結前の溶質濃度で正規化して得られた空間分布イメージングを図7に示す。リゾチーム水溶液では、低温ステージ上の凍結温度が低い領域 ($T < -11$) において溶質が氷中に閉じ込められて細かく分散していたが、凍結温度が高くなる ($T > -11$) と溶質の排斥とスポット状の濃縮が顕著になった。一方、トレハロース水溶液では、凍結温度が低い領域でも溶質が排斥されながら凍結することによってスポット状の濃縮が形成されていた。これは、粘度が小さく氷界面の進行速度が大

きいリゾチーム水溶液では、より小さな氷晶が形成されやすいためだと考えられる。リゾチーム-トレハロース混合水溶液では、両溶質の分布が類似、すなわち共局在していることが明らかになった。これは、リゾチーム-トレハロース間の相互作用を示唆しており、トレハロースによる凍害防御効果が期待できる。凍結温度が低い領域では細かい氷晶に溶質が閉じ込められており、凍結温度が高い領域では溶質の排斥とスポット状の濃縮が認められた。

ラマンイメージングにおいて 10×10 pixels の範囲を検査領域として濃度の標準偏差を算出した結果を図8に示す。トレハロースの添加量が少ない条件ではリゾチーム濃度の標準偏差が大きい。これは部分的な濃縮が生じていることを意味する。トレハロースの添加量が多くなるとリゾチーム濃度の標準偏差は小さくなった。トレハロースの添加には、リゾチームの局所的な濃縮を抑制する効果のあることが明らかになった。

(4) 凍結によるタンパク質変性

ラマンスペクトルより Amide I ピークの重心位置を算出し、氷界面進行速度との関係を調べた結果を図9に示す。天然状態の未凍結リゾチームの Amide I ピーク位置と比較すると、全ての凍結試料において氷界面進行速度が小さくなるにつれて Amide I ピーク重心位置が低波数側にシフトしていた。凍結界面の進行が遅いとタンパク質に大きなストレスを与え、変性を引き起こすことが示唆された。トレハロースを 10% または 50% 添加した混

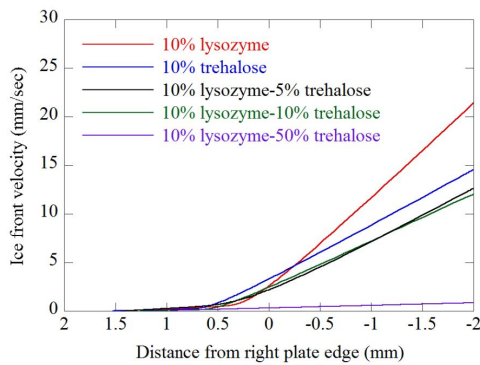


図5 低温ステージ端からの距離と氷界面進行速度の関係

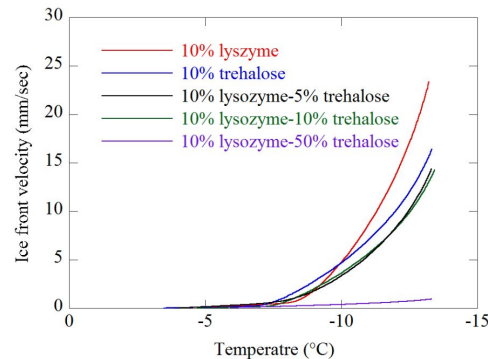


図6 流路内温度と氷界面進行速度の関係

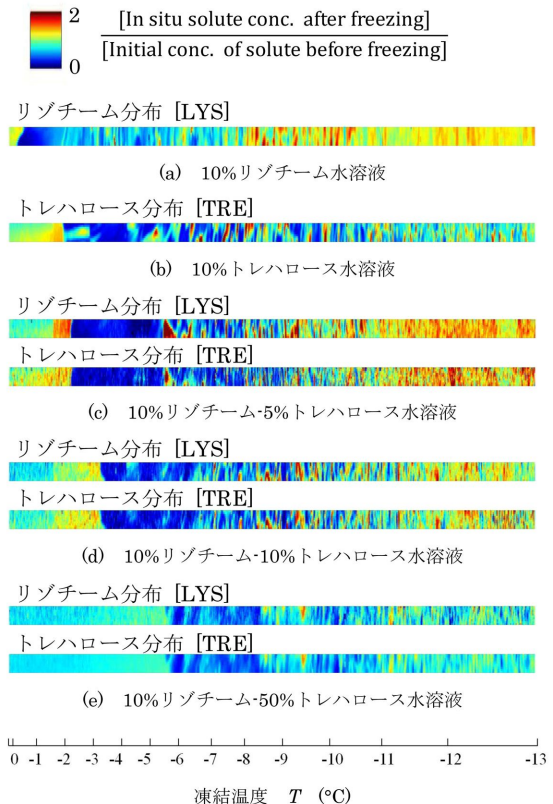


図7 ラマンイメージングより得られた各溶質成分の空間分布

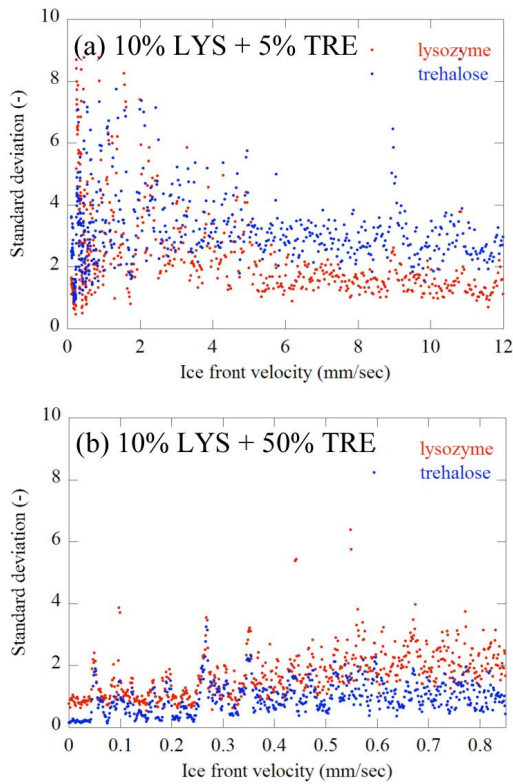


図 8 各溶質濃度分布の標準偏差

含水溶液に関しては、氷界面進行速度の大きい領域において天然状態と同じくらいの Amide I ピーク重心位置を示していた。これらの試料濃度と界面進行速度の範囲であれば、トレハロース添加による凍害防御効果が期待できると思われる。

(5) pH 変化によるタンパク質変性

4 つのタンパク質水溶液の pH を 2, 4, 6, 8, 10 と変化させ、Amide I バンドのピーク波数を比較した結果を図 10 に示す。pH6 で調製した BSA 水溶液を pH2 および 4 に変化させると、Amide I ピークは有意に高波数側にシフトした。これは BSA の α -helix 構造が崩壊し、 β -sheet 構造へと変化したことを示している。また、pH6 で調製した BLG 水溶液を pH8 および 10 に変化させると、ピーク位置が低波数側にシフトした。これは、三次構造は壊れているが特異的な二次構造は有しているモルテン・グロビュール状態と呼ばれる中間構造状態を示唆している。100 以上のアミノ酸残基をもつ生体高分子はモルテン・グロビュール状態を取り得ることが知られており、BLG は 162 残基程度を有する小さなタンパク質である。LYS と CHYM 水溶液については、有意なピークシフトは認められなかった。

pH 変化がもたらすタンパク質構造変化の可逆性を調べるため、pH6 から pH2 の変化で有意なピークシフトを示した BSA と pH6 から pH10 の変化で有意なピークシフトを示した BLG の水溶液をそれぞれ pH6 に戻して再度ラマンスペクトル計測を行った。このときの Amide I ピーク位置の変化を図 11 に示す。

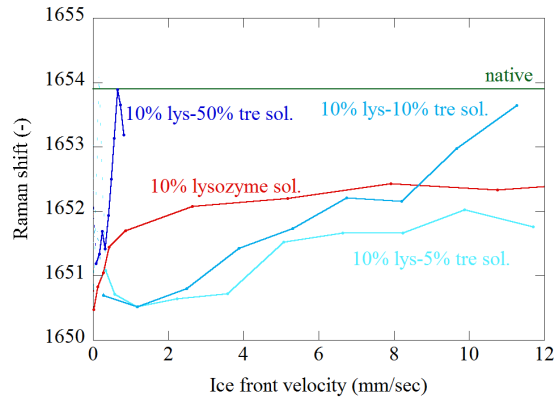


図 9 トレハロース添加濃度および凍結界面進行速度と Amide I ピークの重心位置の関係

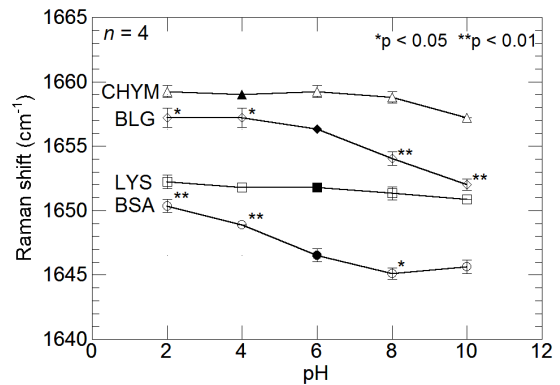


図 10 pH 変化が Amide I 領域のラマンピーク波数に与える影響

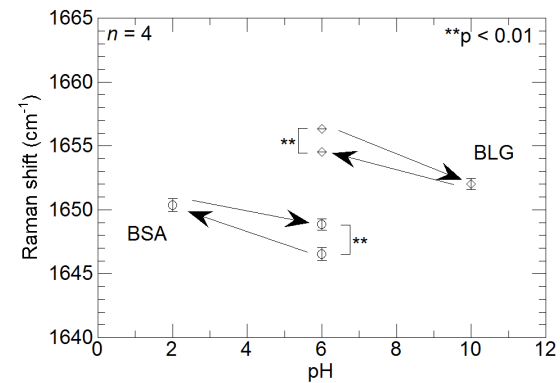


図 11 pH 変化がタンパク質構造に与える影響の不可逆性

水溶液を pH 6 に戻しても、BSA ではピーク位置が高波数側にシフトしたまま、BLG もピーク位置が低波数側にシフトしたままであった。これは pH 変化によるタンパク質変性が不可逆変化であることを示している。

以上の研究結果から、凍結温度の低い領域では低温状態のみならず氷晶の微細化による固液界面表面積の増加が、また、凍結温度の高い領域では溶質の濃縮による pH の変化が、それぞれタンパク質の変性を引き起こしていることが示された。しかし、タンパク質とトレハロースの濃度比を変化させるとともに凍結界面の進行速度をコントロールして両溶質が共局在できるようにすれば、凍害

防御効果が期待できることが明らかになった。

<引用文献>

[1] <http://www.natureasia.com/ja-jp/nature/ad-focus/detail/110630/1>, 新たなるバイオ医薬品開発—最前線レポート, Nature, 2011年6月30日号.

[2] A. Twomey et al., J. Physical Chemistry B, 117, pp. 7889-7897, 2013.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

A. Twomey, K. Kurata, H. Takamatsu, A. Aksan, Microheterogeneity in frozen protein solutions, International Journal of Pharmaceutics, 査読有, 487, pp.91-100, 2015.

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.032

H. Hirahara, Y. Nagare, A. Twomey, K. Kurata, T. Fukunaga, A. Aksan, H. Takamatsu, Observation of ice-solute interaction in freezing of trehalose and albumin solutions by using confocal Raman microscope equipped with directional solidification stage, Proceedings of the 15th International Heat Transfer Conference, 査読有, IHTC15-8933 (14 pages), 2014.

DOI: 10.1615/IHTC15.bma.008933

[学会発表](計3件)

岡晋司, 平原豪人, 藏田耕作, 福永鷹信, 高松洋, 凍結トレハロース-リゾチーム混合水溶液のラマンイメージング計測, 熱工学コンファレンス 2014, 東京, 平成 26 年 11 月 8-9 日.

H. Hirahara, Y. Nagare, A. Twomey, K. Kurata, T. Fukunaga, A. Aksan, H. Takamatsu, Raman microscopic observation of ice-solute distribution after directional solidification of sugar and protein solutions, The 7th Kyushu University-KAIST Joint Workshop on Frontiers in Mechanical Engineering, Fukuoka, September 25-27, 2014.

H. Hirahara, Y. Nagare, A. Twomey, K. Kurata, T. Fukunaga, A. Aksan, H. Takamatsu, Observation of ice-solute interaction in freezing of trehalose and albumin solutions by using confocal Raman microscope equipped with directional solidification stage, The 15th International Heat Transfer Conference, Kyoto, August 10-15, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高松 洋 (TAKAMATSU, Hiroshi)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 20179550

(2)研究分担者

藏田 耕作 (KURATA, Kosaku)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 00368870

福永 鷹信 (FUKUNAGA, Takanobu)
九州大学・大学院工学研究院・技術職員
研究者番号: 60591196