

セルロース膜を通過するタンパク質の可視化

学習院大学 理学部 物理 教授 西坂 崇之

序論

学習院大学における西坂崇之教授の研究室において、旭化成メディカルの開発したウィルス濾過膜である Planova™ について、その濾過機構に関する研究を行った。このテキストは、その中で得られたもっとも大きな成果である「再現性のある測定系の構築」にフォーカスしてまとめたものである。データの取得は EF 共同研究員の中山莉菜子氏が中心となって進められた。

本研究によって、簡便でありながら定量的に長時間のデータを取得できるシステムが完成した。先行研究として、日本血液製剤機構の久保純博士による実験がある（過去の国際 Planova™ ワークショップで発表）。市販の一般的な蛍光顕微鏡によって、濾過膜内に捕捉された蛍光ウィルスが画像として撮影された。しかしこの手法は、従事者の技術に依存する要素があまりに多く、結果の再現性にたいへんな障壁があった。これに対し本研究で構築した測定系では、データ取得を行う個人の器用さに頼る部分を可能な限り排除し、これまでにおよそ不可能と考えられていた「自動撮影」の系が完成された。十分な量の測定試料が提供されれば、それに応じて網羅的なデータ取得が可能になると考えられる。

1. 研究の背景

人間に作用機序のある「くすり」を極端に簡単に分類するなら、解熱剤・抗生剤・抗ウイルス剤に代表される低分子の化学物質と、インスリン・血漿分画製剤・抗体に代表される高分子のタンパク質に分けることができる。後者は高機能の生体分子であって、経口で摂取することはできず皮下もしくは静脈注射で体内に取り込む必要がある。

ヒト治療に用いる薬として、これらの安全性を担保するには、薬剤精製の最後の段階でウィルスを除去するプロセスが不可欠であり、ここで活躍するのが「ウィルス濾過膜」である。ターゲットタンパク質を高効率で通過させながらも、ウィルスだけを濾し取る夢の材料であり、ヨーロッパ、米、そして日本を中心として 90 年代より広範に利用され、製薬においてスタンダードとなりつつある新しい方法論である。フィブリノーゲン等の血漿分画製剤や、オブジーボに代表され

るようなリコンビナント抗体の作製に関わる、次世代の最重要技術の 1 つなのだ。

しかしながら、この濾過膜がウイルスをふるい分ける仕組みは、本質的なところで全く解明されていない。構造から類推される、粒子のブラウン運動を加味した分子ふるいモデルが提案されているものの、これだけでは説明のできない現象が製薬会社の現場では数多く報告されているのだ。再利用のできない医療部品であるため、高い性能を維持したまま少しでも多くのターゲットタンパク質を通過させる方法が見つかれば、最終的な薬のコストを大きく下げる貢献が期待できる。そのために濾過の原理解明が急務である。

そこで西坂研究室では、ウイルス濾過膜の中における生体分子の動きを直接可視化する研究を開始した。これまでに培った光学顕微鏡のリソースを用い、蛍光標識したタンパク質やウイルスについて、その挙動を定量的に評価するのである。

研究に実際に用いる濾過膜は、1980 年代に旭化成メディカル社によって開発された Planova™ である。世界初のウイルス濾過膜としてアメリカ政府の機関である食品医薬品局 (FDA, Food and Drug Administration) の認可を得ており、現在でも MilliporeSigma、Pall 社の製品を抑え、年商 200 億円という世界一のシェアを誇っている。最終的には、生体分子の運動の特徴を体系化することにより、より高性能の膜構造、効率的な濾過条件を提案することを目標としている。

2. 本研究の目的

新しいシステムを構築し、久保氏の実験の再現と確認を目的とする。『1. 研究の背景』で述べた、従事者の技術に依存する部分を可能な限り排除し、簡便かつデータが取得できる系の構築を試みる。キーワードとしては、撮影の「自動化」、そして取得した映像に対する「定量化」である。

なお補足だが、本課題の立案時にはライトシート顕微鏡による可視化が必要となると想定されていたが、実際に生体分子の試料を観察したところ、共焦点光学系を用いた場合でも十分な S/N で信号を捉えることができた。そこで研究の方向性を修正し、もともとの課題名である『セルロース膜を通過するタンパク質のライトシート照明による可視化』を現在のものに変更したという経緯がある。

3. 装置と結果

研究室で現有の倒立型光学顕微鏡に、以下の装置を搭載し、観察系を構築した（図 1）。装置名、会社／型番の順番で記し、[] に注目すべき特徴を記した。

- | | | |
|--------------|--------------------------|------------------|
| 1. 顕微鏡 | Nikon／Ti-E PFS | [倒立型、焦点位置自動追尾] |
| 2. 共焦点光学系 | 横河／CSU-1 | [断層撮影、3次元再構成] |
| 3. SCMOS カメラ | Andor／Zyla | [高感度、広視野] |
| 4. シリンジポンプ | KD Scientific／Legato 210 | [1.5 mL/h, 安定流速] |
| 5. 対物レンズ | Nikon／S Fluor 10x | [開口数 0.50] |

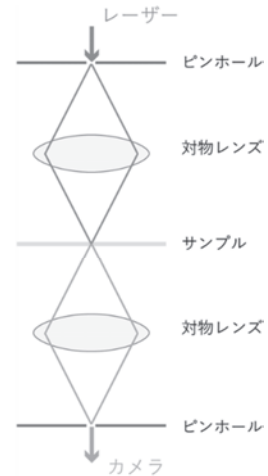
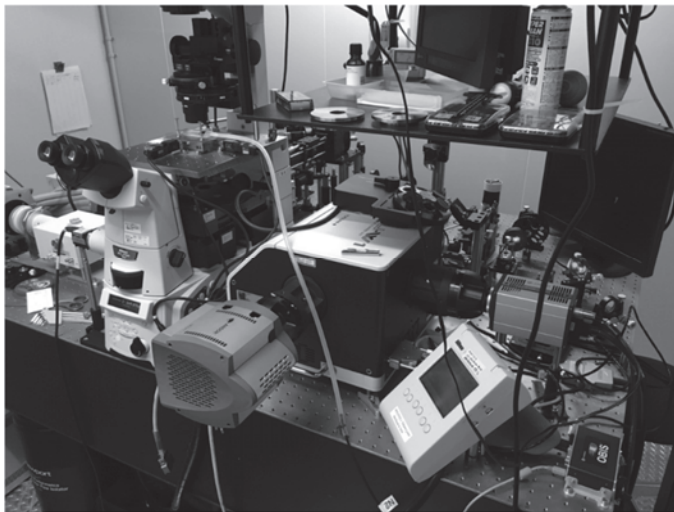


図 1 西坂研究室で構築した撮影システムの本体（左）と、共焦点顕微鏡の原理の概念図（右）。通常の光学顕微鏡では、焦点ではない上下の色素からの信号もひろってしまいが、共焦点顕微鏡では、ピンホールを通過できる深さ方向に限られた範囲からの信号しか画像化されない。結果として、光軸方向に鋭い切片が再構成される。

観察に用いるウイルス濾過膜は中空の形状をしており、ここに生体分子を含む溶液を圧力をかけて流入する。濾過膜の基本原理は「分子ふるい」と理解されており、サイズの小さいタンパク質（～5 nm）は濾過膜を通過し、やや大きいウイルス（>20 nm）は濾過膜に捕捉されると期待される。一本のファイバー（以下、「中空糸」と呼ぶ）は観察面に対し平行に固定する（図 2）。

テスト用の生体試料として、DyLight488 によって蛍光標識した牛血清アルブミン (BSA) を調整し、中空糸に流し込んだ。径がもっとも太く見える観察面（図 2 における焦点）において、上記セットアップによって中空糸に試料が入っていく様子を画像化した。共焦点セクションングによって撮影した例を図 3 に示す。この撮影条件ではカメラが広解像（2,048×2,048）であるため、中空糸の両側の膜

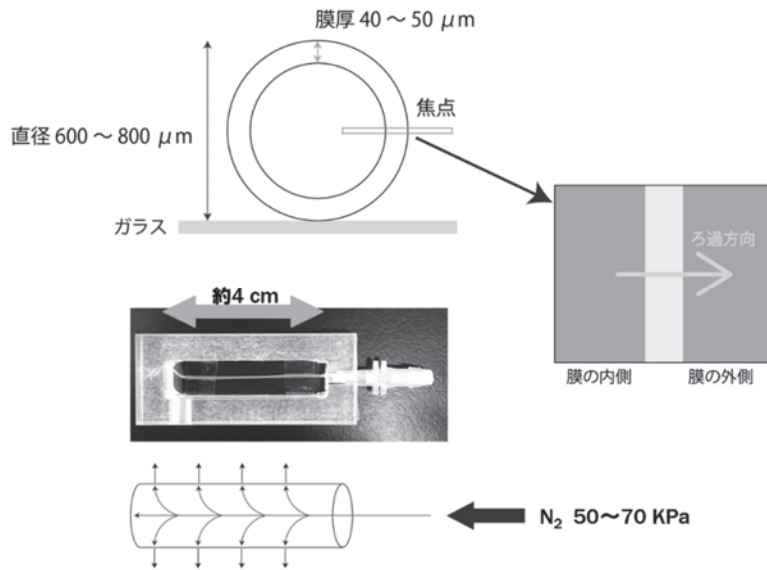
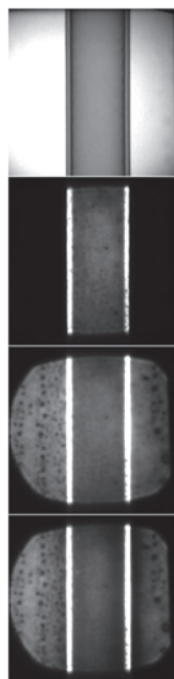


図2 久保氏により提案された、中空糸撮影の概念図（上）と、実際の測定に使われた自作のチャンバー（下）。窒素ポンペにより一定の圧力をかけることで生体分子を含む溶液を中空糸に流し、膜における移動を焦点面で可視化する。本研究では最終的にシリンジポンプによって試料を注入し、再現性のある結果を得た。



明視野像

5 min.

10 min.

25 min.

図3 蛍光 BSA が中空糸膜に侵入する様子。低倍の対物レンズに対して解像度の高いカメラを使用したため、両側の切片が撮影できている。流速を一定にしているので定圧の条件では無くなっており、最も不確定な要因を除くことに成功した。ファイバーの直径は 0.5 mm.

を同時に撮影することができている。CMOS カメラには標準の機能でピクセルにビニングをかけ、画素当たりの明るさを明るくして見かけの S/N を上げることができるが、ここではビニング処理は行っていない。明視野で膜厚を見ると $66 \text{ pixel} = 51 \mu\text{m}$ となっており、これは報告されている膜厚と一致する。蛍光のシグナルについて、時間と共に強度が増大している様子が得られた。

この明るさ分布を解析したところ、大きな特徴として、強度プロファイルとして膜の外側の端がはっきりと識別できた。他の対物レンズ、および共焦点ではなく平行光のレーザーで撮影した例では、分布はなだらかになり端の位置は識別できない。

また2つ目の特徴として、高解像・広視野のカメラの効果のため、中空系の両側の膜のプロファイルが同時に撮影できている。この利点を生かし、複数データの表示において、片側のピークをそろえて表示するという方法を考案した(中山による「ピーク補正手法」)。撮影中には、中空系に溶液を流すため、 xy 方向へのドリフトが発生する。これを片側のピークの位置を合わせることで、中空系内のピークがどのように移動したかという絶対値について、反対の端を見ることで正確な定量化ができるのである。見かけの移動距離は2倍になるが、膜内において中空系が移動している様子を簡便に示すことができる。

さらに3つ目の特徴として、時間ゼロにおける蛍光強度がフラットとなった。これは流路切り替えのシステムを導入した結果であり、ここからバックグラウンドの明るさを正確に決定することができる。

4. 考察とまとめ

今後解決すべき問題点として、以下の3つが挙げられる。

1. 退色の効果を加味した定量性(共焦点光学系下で十分な校正を行えば対応できる)
2. 通過したタンパク質の定量化(回収した溶液を分光器に入れ、濃度を測定すれば、濾過によるロスが定量化できる)
3. 濾過膜が時間と共にドリフトし、 z 方向への変位によりフォーカスが合わなくなる

特に3の問題を解決するために、新しいセルの作製を行った。濾過膜中空系の太さと同程度の厚さのアルミ板を準備し、2枚を少し話して並べ溝を作成する。その溝に中空系をはさみ、つぶさないようにして上から押さえることで、連続撮影の障害となる全ての方向へのドリフトを押さえるという設計である。「アルミ

ガイド」という新しい切り口を入れることで、より安定した撮影に貢献できると考えられる。

そして今回の研究の結論として、新しく可能になった技術の大枠を以下の4つに列挙する。

1. 蛍光生体試料の濃度の正確な見積もり（分光器）
2. ロスなく、中空系に試料を流すシステムの作成
3. 共焦点光学系、セクショニング撮影
4. 一定流速

以上の特徴によって、取得する画像から、中空系内の生体試料濃度の定量的な見積りが可能となった。久保氏の提案した「濾過膜内の生体分子ダイナミクス追跡」が、精密な評価も含めて行うことのできる実験系が構築されたことになる。「中空系における生体試料のふるまいのライブイメージング」という表現も当てはまるかも知れない。Planova™ のウイルス濾過を可視化する技術は、本研究によって、新しい段階に突入した。