

基礎医学

1 医学研究と分析技術

1.1 分析技術の革新がもたらした医学の進歩

1.1.1 インスリンの発見

今から約 100 年前の 1921 年、カナダの医学者 Frederick Banting は、膵臓を摘出した糖尿病犬に対し別の犬の膵臓抽出物を静脈注射すると血糖値が低下することを実験的に示した。瞬間に膵臓抽出物の精製法の研究が始まり、1922 年 1 月 11 日にはカナダのトロント病院にて、Banting と Best が糖尿病患者である 14 歳の少年にインスリンを世界で初めて投与し、血糖値および糖尿の低下、ケトン尿の消失を確認した。翌 1923 年に Banting と Best はインスリン発見の功績により、ノーベル医学生理学賞を受賞した。その後インスリンの高純度精製法が発展し、持続効果の高い製剤への改良、ヒトインスリンの開発など、産業スケールでの精製・反応・分離研究が重ねられた¹⁾。

1.1.2 Sanger の研究を可能にした分析技術

1950 年代になり、イギリスの生化学者 Frederick Sanger は芳香族核置換反応基質として 2,4-ジニトロ-1-フルオロベンゼン (DNFB) をタンパク質の N 末端アミノ基と反応させ、加水分解、エーテル抽出、クロマトグラフィーなどの分離により N 末端アミノ酸を決定する方法 (Sanger 法) を考案し、インスリンを構成する二つのポリペプチド A 鎖・B 鎖の 1 次構造を決定した²⁾³⁾。これは同時にタンパク質が規則正しく配列したアミノ酸によって構成されていることの証明であり、Sanger は 1958 年にノーベル化学賞を受賞した。(参考: Sanger は同様の発想により DNA の分子配列を決定する手法を開発し、1980 年に 2 度目のノーベル化学賞を受賞している。) この一連の研究では、Sanger の斬新なアイデアはもちろんのこと、それを実現した分析技術を見落としてはならない。タンパク質・ペプチド・アミノ酸の標識法、電気泳動法、分配クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーといった試料の分離検出法、標的タンパク質の分解法 (酸分解、酵素分解) など、当時多くの分析化学者によって技術革新が起き、Sanger の挑戦的アイデアを具現化した。このように、医学の飛躍的進歩の背景には分析技術の革新があり、特に分析技術の柱をなす抽出・精製・反応・分離・検出の技術開発は今後も極めて重要な位置を占めるだろう。

1.2 マイクロ・ナノスケール分析の必要性

1.2.1 実験スケールの課題

医学研究・生命科学研究の中核基盤である分析実験にとって、その実験スケールは重要である。開始試料の量、抽出効率、精製手法、損失量、反応効率、分離、検出感度など多くの要素を考慮する必要がある。Banting の時代は大量の膵臓抽出物を得るために家畜臓器を集めて使っていた。Sanger の実験では、1 回の実験に精製インスリン 1 g を使い A 鎖 100 mg, B 鎖 200 mg を分離し分析していた²⁾³⁾。検出感度の低さから多量のタンパク質が必要であったが、この頃には治療用の高純度インスリンが薬局でも入手できるようになっていた。Sanger らがタンパク質分析の対象にインスリンを選んだのは、製薬企業からの研究資金を獲得し易かったのと同時に、貴重な高純度タンパク質の中でインスリンが最も入手し易かったという理由もあった。近年は様々な疾患研究が行われているが、ヒトを対象とする研究においては分析スケールの問題が見えてくる。

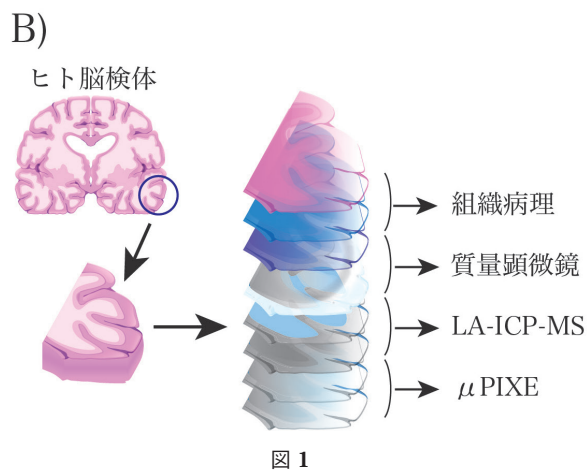
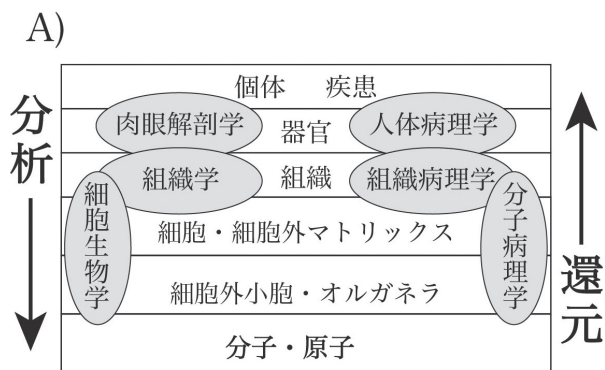
1.2.2 試料の制約

開始試料の量は、ヒト由来試料の場合に大きな制約となる。当然ながらヒト試料を分析する場合は、当該施設に於いて生命倫理委員会の承認を経る必要がある。そこで常に問題となる点が分析試料 (検体) の採取量と侵襲性である。患者生検の場合は診断・治療に必要な最低限度量である必要があり、死後検体のリソースでもその希少性から量は限られる。そのため、微量試料から最大の分析情報を得るための技術が欠かせない。そして貴重試料故に実験のやり直しはできない。筆者の場合はヒト検体と同条件のブタ臓器を用いて事前検討をしている。限られた試料を最大限に活用するため、抽出・精製の効率、試料に見合ったスケールへのダウンサイジングが必要である。この点で、生体試料の採取から抽出・分離・分析まで一貫してマイクロ・ナノ流路で行うような技術開発が期待される。

2 生体試料をどのように解析するか

2.1 組織上の局在情報を取得する分析法

生体は物質 (原子・分子) で構成されているが、我々は分析技術によりその物質を観測できる状況にある。原子や分子の相互作用から分子機能が生まれ、細胞や組織、器官を形成して生命活動を担う。医学には古くから人体解剖学・組織学という学術基盤があり、疾患の理解のために病理学がある。そのため生体試料を分析する際



に人体の組織構築を考慮することは、生命機能やその破綻病態を考える上で重要である。そしてその組織情報から分析を掘り下げることによって、生体を理解する階層がマクロ・ミクロのスケールから、ナノ・オングストロームのスケールまで深められてゆく。つまり、生体試料の組織構築情報を損なわないように分析し、分子・原子の要素情報を組織上に還元することによって、生命や疾患を理解する新しい組織情報を手に入れることができるのである（図 1A）。以下に生体組織をそのまま分析するイメージング手法として、質量顕微鏡、LA-ICP-MS、 μ PIXE を紹介する。凍結組織の連続切片を用い、HE 染色をはじめ複数の分析法により隣接切片を比較解析することができる（図 1B）。

2・1・1 質量顕微鏡

多くの質量顕微鏡はマトリックス支援レーザー脱離イオン化（matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI）と飛行時間型質量分析計（time of flight mass spectrometer, TOF-MS）を主体としたイメージング法である。MALDI は 2002 年にノーベル化学賞を受賞した田中耕一（島津製作所）らによって開発され、分子を結晶マトリックスにより包んでパルスレーザーを照射しイオン化する手法である。組織イメージングではリン脂質など低分子検出を得意とするが、使用するマトリックスの種類や誘導体化によって異なる分子種をイメージングできる⁴⁾。質量

顕微鏡では酸化インジウムスズ（indium-tin-oxide, ITO）など導電性素材でコートしたスライド上に 5~10 μ m 厚の組織切片をのせて解析することが多い。近年ではマトリックスフリーのスライド・試料基盤も開発されている。一般的な空間分解能は 5 μ m 前後であるが、分解能向上に向けた更なる技術開発に期待したい（図 2A）。

2・1・2 μ PIXE イメージング

PIXE（particle induced X-ray emission）イメージングは、加速器からプロトンなどの荷電粒子ビームを加速してスポット照射し、そこにある物質固有から発生する特性 X 線を半導体検出器でカウントしながら組織上を走査することによりイメージングするものである（図 2B）。特殊大型施設を必要とする（図 2C）が、低破壊的（非破壊ではない）に多元素同時分析が可能であること、ビームを 1 μ m まで絞り微量分析が可能であることなどの利点がある⁵⁾。PIXE では試料を専用の透過フィルムに貼り付ける必要があり（図 2C）、貴重試料の場合は特に切片作成前の実験計画が重要である。類似手法として、一次線に電子線を用いたエネルギー分散型 X 線分析（energy dispersive X-ray spectroscopy, EDX）があり、走査型電子顕微鏡（SEM）と組み合わせたイメージング法が便利である。

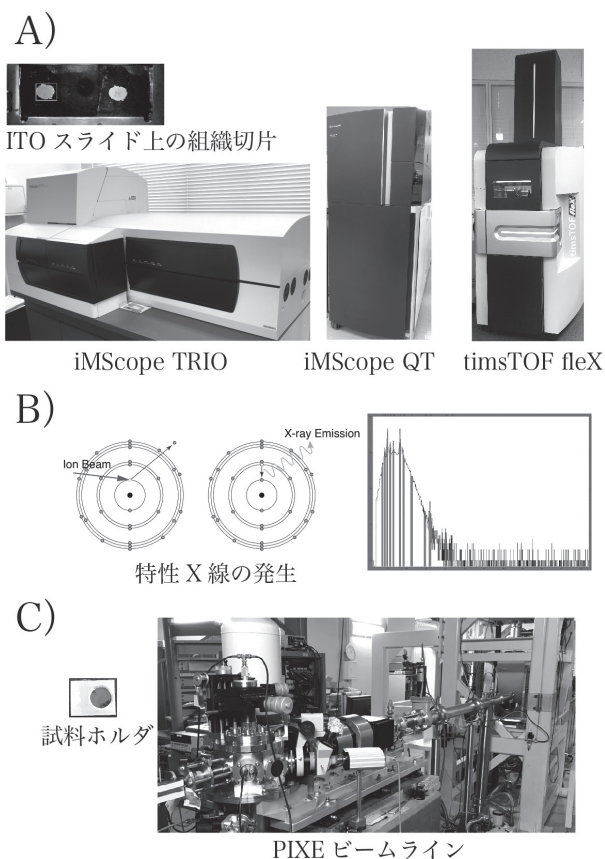


図 2

2・1・3 LA-ICP-MS 元素イメージング

レーザーアブレーション-誘導結合プラズマ質量分析法 (LA-ICP-MS) 元素イメージングは、組織表面に強力なパルスレーザー光を照射し、表面がプラズマ化して物質が爆発的に放出されることを利用した元素イメージング法であり、スループット性にも優れている⁶⁾。LA-ICP-MS イメージングの場合は通常のスライドガラスをそのまま使用できるという利点もある。空間分解能は5 μm 程度から、現在は1 μm に到達しつつあり、今後の更なる発展に期待したい。(LA-ICP-MS の詳細は11月号のミニファイル・平田の頁を参照。)

2・2 組織・細胞内の分子状態を反映した分析法

限られた量の生体試料を分析する場合、試料のロスを減らすために操作の手数を減らしたい。そのため試料をまるごと解析するというアプローチも有効である。この場合、質量分析におけるイオン抑制のように「検出されやすいものが優先的に検出される」という落とし穴があることも忘れてはならない。一方で、生体組織から内容を抽出・分離することは、試料をロスするリスクは伴うが、分離・精製により、目的とする分子を検出しやすくするというメリットもある(例：リン酸化ペプチド濃縮など)。また、分離法の工夫により、組織内・細胞内の生理的機能を保持した集団として分析することも可能であり、オルガネラや細胞外小胞、相分離液滴など生理機能的意味を付加した分析や、高分子複合体を丸ごと分析することも不可能ではない。将来は1滴の血液・一粒の涙など微量試料から如何に意味のある情報を引き出すのか、マイクロ・ナノ流路などにおける生理機能的な分離法の開発が期待される。

2・2・1 サイズ排除クロマトグラフィー

解析したい試料がクロマトグラフィーで分離できる程度の可溶性試料(例えば組織や細胞の懸濁液の超遠心上清など)である場合、クロマトグラフィーの構成を工夫することにより超分子複合体からペプチド・核酸・塩まで、生理的な条件下での機能的サイズを保ったまま分離分画が可能である。使用する担体の種類やカラムの長さ・サイズにより、分離能や分離スケールを変更できる。筆者の場合、試料容量最大500 μL までの分離には30 cm の長いサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラムを2本直列接続し、分離能を高めて使用している(図3A)。

これにより純度と単分散性の高い画分を回収できる場合、クロスリンク質量分析 (X-link MS) による複合体の結合部位解析や、多角度光散乱検出器 (MALS) による複合体の分子量決定、X線小角散乱法 (SAXS) による慣性半径や分子概形の情報など、構造生物学的に一段と深い解析が可能となる⁷⁾(図3D)。クロマトグラフィー

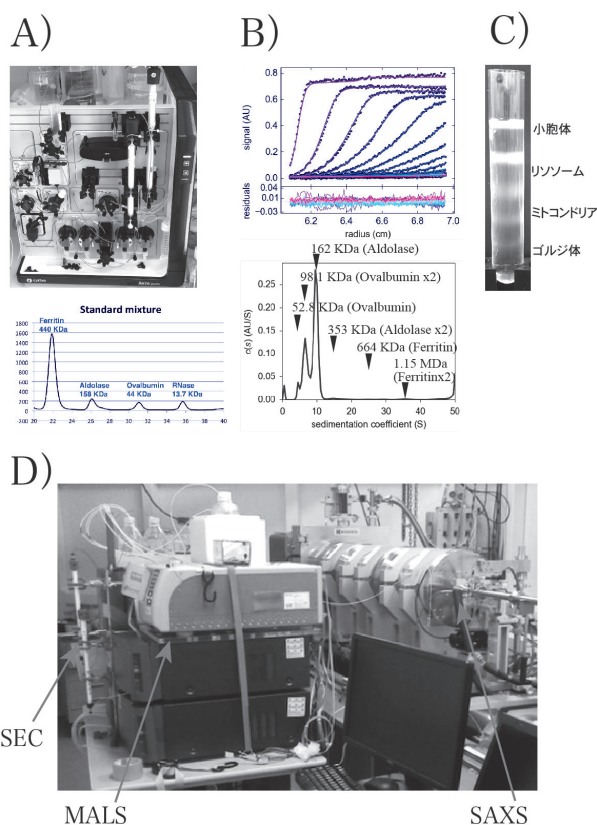


図 3

の場合、溶出容量が大きくなり試料濃度が希釈されるという理論上不可避な弱点もあり、他の分析との順序や適切なカラムの選択など、実験計画を工夫する必要があるだろう。また、SAXS ではX線を当てるセルのサイズは20 μL と小容量に高度化⁸⁾されてきており、標的試料と分離部の工夫によってマイクロ・ナノスケールの測定が進展することを期待したい(図3D)。

2・2・2 超遠心法

組織や細胞の懸濁液のうち、上記クロマトグラフィー等では分離できないような大きなサイズの複合体・オルガネラ・小胞などについて生理的機能を保ったまま分離・分析する場合、密度勾配超遠心法が有効である(図3C)。近年はエクソソームなどの細胞外小胞や、相分離液滴など、古典的定義によるオルガネラとは異なる機能分子群も脚光を浴びており、密度勾配などを利用して分離分画条件を最適化した超遠心法の重要性が増している。また、試料の分離回収を目的とした通常の超遠心法とは別に、超遠心分析という手法もあり、巨大な複合体からペプチドまでの沈降係数から溶液中分子サイズを決定することができる⁷⁾⁹⁾(図3B)。超遠心分析の最大の利点は、試料を分離しながら分析できるという点であり、他の手法による分離が不安定である場合や平衡状態にある場合の測定などにも威力を発揮する。しかし、UVや蛍光などによる検出に十分な量の試料が必要であり、検

出条件の事前検討が必要となる。ナノスケール分析には今後の課題があるだろう。

3 微量分析の究極形へ向けて：将来展望

3・1 微量試料の採取・分離

3・1・1 細胞内試料の採取

1 細胞採取装置は様々なメーカーから製品化されつつあるが、細胞内・組織内からの微量採取には高度な技術と安定した制御システムが必要である。しかし、升島努（理研・広島大学）が発案して開発された細胞内サンプリング装置が改良を続け、近年製品化された（図 4A）。共焦点顕微鏡下にて内径 3 μm のガラスチップを使い、全自動で細胞内から fL オーダーの試料を採取する技術が確立されている。チップをそのまま質量分析へ導入することも可能であり、日本発の技術が様々な分析技術との融合によってさらに発展することを期待したい。

3・1・2 微量試料の完全溶液分離

フィールド・フロー・フラクショネーション（FFF）法は、分離部に固定相を含まず、チャンネル内の層流の移動方向に対し垂直の力場を発生させることにより生じる移動速度の差によって、液中に高分子からナノ微粒子まで分離する手法である。アイディア自体は 1966 年に Giddings により提唱¹⁰⁾されたが、近年実用化され、MALS と連結し巨大分子の分子量分布測定や、ICP-MS と連結しコロイド金属粒子測定などに使用されている。試料容量は分離距離や検出法に依存し、市販の FFF システム Eclipse（昭光サイエンス）では短距離で 50 μg 、長距離で 250 μg までの試料を分離できる。

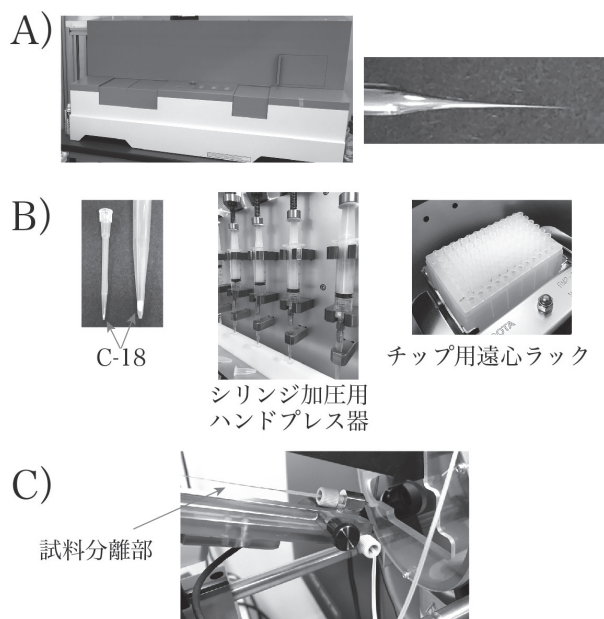


図 4

3・2 微量試料の調整・前処理

生体由来試料は不純物を含む。分離過程の試薬や組織由来でも、分析目的を妨害する場合は除く必要がある。スケールが小さくなるほど不純物が分析空間に与える影響は大きくなる。ナノフローへの詰まりは典型例であり、プロテオミクス解析では試料の脱塩・フィルター処理は必須である。目的により 1 μg 以下の小スケール消化物から、数百 μg 以上の大スケールの処理が必要な場合もある（図 4B）。近年 LC-MS の ESI には分離とスプレーが一体化したナノキャピラリーカラムが用いられることが多い（図 4C）。キャピラリー構造を利用した分析は今後も必須技術だろう。

3・3 微量試料の検出・分析

マイクロ・ナノスケールでの分離・反応のエンドポイントとなるのが検出部である。最小量の試料から得る情報を最大化するため、継続的な技術開発が必須である。また、研究目的に応える必要がある。

3・3・1 定量的検出

生体試料分析において物質の同定とともにその定量情報を得ることは極めて重要である。特にバイオマーカー探索など検体間比較には定量値が必須である。プロテオミクスの分析手法は DDA（data dependent acquisition）と DIA（data independent acquisition）に大別される。DDA における定量法として安定同位体タグ法（TMT, iTRAQ など）があり、定量性とペプチド網羅性のバランスが良い。限られた数の検体間で網羅的かつ定量的に比較探索を行う場合に威力を発揮し、標的分子の同定後、さらに標的分子のカバー率を上げて修飾などの深い解析を行うこともできる。DIA 法は Ruedi Aebersold らによって開発¹¹⁾され、すべてのスペクトルに関してライブラリーを用いて同定数を最大化することを志向した解析法である。分析器の感度のみならず、測定手法を含めた改良により年々同定数が増加しており、国内でも Hela 細胞のペプチド消化物 1 μg から 1 万以上のタンパク質を同定している¹²⁾。

3・3・2 微量試料の更なる分析へ

マイクロ・ナノスケールにおける微量試料の分離技術の発展と同時に、X 線をはじめとする量子ビーム技術を活用した分析法の高感度化・分析環境の高度化がさらに進むことにより、微量試料を用いた分析に新たな展開が期待できる。分析分野、特にマイクロ・ナノスケールの基盤技術は日本が最も得意とする技術分野であり、斬新なアイディアと精密技術の融合、医工連携の醸成により、社会に貢献する技術革新と新たな医学の進歩を生み出すことができるだろう。

文 献

- 1) C. Quianzon, I. Cheikh : *J. Comm. Hosp. Int. Med. Perspect.*, **2**, 18701 (2012).
- 2) F. Sanger, H. Tuppy : *Biochem. J.*, **49**, 463 (1951).
- 3) F. Sanger, E. Thompson : *Biochem. J.*, **53**, 366-74 (1953).
- 4) C. Harkin, K. Smith, B. Flinders, R. Heeren, T. Moore, D. Cobice : *Mass Spec. Rev.*, **41**, 662 (2021).
- 5) M. Oikawa, N. Suyu, T. Konishi, T. Ishikawa, T. Hamano, S. H. Takeda : *Int. J. PIXE*, **25**, 217 (2015).
- 6) Y. Makino, Y. Kuroki, T. Hirata : *J. Anal. At. Spectrom.*, **34**, 1794 (2019).
- 7) T. Ogawa, N. Hirokawa : *Biophys Rev.*, **10**, 299 (2018).
- 8) N. Shimizu, T. Mori, Y. Nagatani, H. Ohta, S. Saijo, H. Takagi, M. Takahashi, K. Yatabe, T. Kosuge, N. Igarashi : *AIP Conf. Proc.*, **2054**, 060041 (2019).
- 9) S. Uchiyama, F. Arisaka, WF. Stafford, T. Laue : *Analytical Ultracentrifugation. Springer.*, (2016).
- 10) J. C. Giddings, F. J. F. Yang, M. N. Myers : *Science*, **193**, Issue 4259, 1244 (1976).
- 11) L. C. Gillet, P. Navarro, S. Tate, H. Röst, N. Selevsek, L. Reiter, R. Bonner, R. Aebersold : *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, O111.016717 (2012).
- 12) Y. Kawashima, H. Naga, R. Konno, M. Ishikawa, D. Nakajima, H. Sato, R. Nakamura, T. Furuyashiki, O. Ohara : *J Proteome Res.*, **21**, 1418 (2022).

〔獨協医科大学 小川 寛之〕