

剤の逆流を防ぐために10分間以上かけて注入し、刺入した注射針はそのまま5分間脳内に保持した後に抜く。最後に皮膚縫合を行う。

測定には、EI236注入前、注入直後、24時間後、7日後に脳のMRI撮影を行い、EI236の分布を調べる。なお、EI236注入直後のMRI撮影後に鎮痛を目的として、酒石酸ブトルファノール(2.5mg/kg、0.5mL/kg)を皮下投与する。24時間後および7日後のMRI撮影時には、マスク吸入によりイソフルランで全身麻酔を行う(維持麻酔濃度は2-3%)。MRI撮影法は、T1強調画像、T2強調画像、T2*強調画像、拡散強調画像とし、24時間および7日後の撮影には、上記と同じ方法で全身麻酔を行う。また、MRIとともに、CT撮影も行う。7日後の撮影終了後、ペントバルビタール(100mg/kg)の腹腔内投与により安楽死を行う。

C. 研究結果

今回は正常ラットの脳のMRI撮影とEI236注入後の画像所見について、検討した。

MRIの撮像において、頭部を2個のフェイスト・アレイコイルで上下に挟み、諸条件を検討した結果、ラットの脳内構造を明瞭に撮像することが出来た。

脳内に注入されたEI236は、T2、T2*強調画像において低信号を示し、特にT2*強調画像上でもっとも明瞭なコントラストが得られた。

D. 考察

EI236は、MRI画像において、低信号を示し、特にT2*強調画像では良好なコントラストが得られた。このことから、MRIによりEI236の分布や拡散を経時的に把握することが可能であると考えられた。

今後の研究を進める上で注意すべき点としては、EI236による陰性造影像と他に低信号を示す物質との鑑別があげられる。たとえば、脳内注入に伴って出血が起こったり、あるいは空気が混入したりした場合である。空気はMRI画像上で無信号であり、また血液はT2*強調画像上で低信号となる。その場合は、他の撮像方法で得た画像所見と比較して、EI236と他の低信号物質とを鑑別する必要がある。

EI236の溶媒を検討する必要がある。調整されたEI236溶液は、非常に沈殿しやすく、脳内への均等な注入が比較的困難であった。

E. 結論

EI236は、20ulの微量であっても、医療用MRI装置で脳内分布・拡散および時間的な残存を確かめることが出来る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 中山智宏 放射線治療
放射線生物学(近代出版)
102-110 東京, 2015.

2. R. Nakano, K. Edamura, T. Nakayama, K. Teshima, K. Asano, T. Narita, K. Okabayashi, H. Sugiya, Differentiation of canine bone marrow stromal cells into voltage- and glutamate-responsive neuron-like cells by basic fibroblast growth factor. *Journal of Veterinary Medical Science*. 77 27-35 2015.

2. 学会発表

なし

3. 知的財産権の出願・登録情報

なし

H. その他 1

犬骨髄間質細胞の機能を有するニューロンへの分化とそのメカニズムの解明

Rei NAKANO, Kazuya EDAMURA, Tomohiro NAKAYAMA, Kenji TESHIMA, Kazushi ASANO, Takanori NARITA, Ken OKABAYASHI, Hiroshi SUGIYA (2015): Differentiation of canine bone marrow stromal cells into voltage- and glutamate-responsive neuron-like cells by basic fibroblast growth factor, *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 77, 27-35.

脊柱に強い外力が加わって脊椎が脱臼または骨折し、脊髄に損傷が生じる病態を外傷性脊髄損傷という。犬では、交通事故、落下、暴力などの結果として外傷

性脊髄損傷が生じ、重症例においては車椅子での生活が余儀なくされる。脊髄損傷の重症例では現在の医療技術を駆使しても機能回復は困難であり、未だ画期的な治療法は確立していない。そのような背景から、人医療域においては、脊髄損傷の根治を目指して様々な新規治療法の開発が行われている。それらの中で、最も注目され多くの研究が行われているのが幹細胞を用いた脊髄再生医療である。犬においても、嗅粘膜神経鞘細胞、脂肪組織由来幹細胞、脱分化脂肪細胞、骨髄間質細胞 (BMSCs) を用いた脊髄再生医療の研究が行われ始めている。これらの細胞の中で、採取および培養が容易で、自己移植が可能であり、倫理面での問題も少ないという理由から、BMSCs が最も臨床応用に近い細胞源と考え、今回の研究を行った。

BMSCs は、骨髄液から分離される非造血系の接着細胞であり多分化能を有している。犬 BMSCs を脊髄損傷モデル犬に移植すると運動機能が改善することが報告されており、臨床例においても同様の結果が得られている。しかし、犬 BMSCs の脊髄再生メカニズムについては不明な点が多い。これまで、損傷脊髄に移植された BMSCs から放出される栄養因子が脊髄再生にとって重要であると考えられているが、それだけでは完全な機能回復は得られない。外傷性脊髄損傷は、脊髄中心部の壊死を伴うことが多く、本病態を完全に回復させるためには、BMSCs を機能の有するニューロンへと分化誘導し、損傷を受けた中心部のニューロンと置換することも重要な治療戦略の一つとなり得

る。しかし、現在のところ、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化するという報告はなく、またそのメカニズムも不明である。本研究では、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化することを明らかにし、さらにそのメカニズムについても検討した。

1. β -mercaptoethanol (BME) および butylated hydroxyanisole (BHA) を用いて犬 BMSCs を分化誘導した際のニューロンに関する mRNA とタンパク質の発現および細胞機能解析

これまでに、犬 BMSCs を BME と BHA により処理すると、ニューロン様の形態へと変化し、ニューロンマーカーを用いた免疫染色に対しても陽性を示し、ニューロンと類似した微細構造を有することが報告されている。しかし、このような形態学的変化や免疫染色を用いた検討のみでは、犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化するか否かについて明らかにすることはできない。ヒトやマウスの BMSCs では、ニューロン分化に伴うニューロンマーカーの mRNA 発現や細胞機能の解析が行われている。しかし、犬 BMSCs では過去にこのような検討は行われていない。そこで、本章では、犬 BMSCs を BME と BHA を用いて処理し、ニューロンに関する mRNA およびタンパク質の発現を real-time RT-PCR およびウエスタンブロッティングにて確認した。さらに、Ca²⁺イメージングにより細胞の機能解析も行った。

犬 BMSCs を BME と BHA を用いて処理したところ、その多くが時間依存的にニ

ューロンに類似した形態へと変化した。免疫染色を行ったところ、ニューロン様細胞はニューロフィラメント L 鎖 (NF-L) や神経特異的エノラーゼ (NSE) といったニューロンマーカーに対して陽性であった。さらに、BME および BHA 処理後には、SOX2、NES、TUBB3 といった神経幹細胞に関する mRNA の発現量が有意に減少し、MAP2、NF-H、NF-L、SLC1A1、SLC2A3 といったニューロンに関する mRNA の発現量は有意に増加した。イオンチャネルの mRNA 発現においては変化しないものもあった。BME および BHA 処理後の犬 BMSCs では、NES、NF-L、NSE といったニューロンに関するタンパク質の発現量が有意に上昇した。しかし、今回得られたニューロン様細胞は、KCl に反応せずニューロン類似の機能は認められなかった。

本検討で用いた化学的な分化誘導法では、犬 BMSCs は機能を有するニューロンへと分化することができなかった。本研究では、一部のニューロンマーカーおよびイオンチャネルの mRNA 発現が上昇せず、成熟したニューロンへと分化誘導されていない可能性が示唆された。さらに、本検討で用いた方法では、犬 BMSCs が短時間で剥離してしまい機能を十分に検証できなかった。これらのことを解決するためには、他の因子やサプリメントを用いたより長期間培養が可能なニューロン分化法を検討することが必要であることが考えられる。

2. 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による犬 BMSCs の機能を有するニューロンへの分化

犬 BMSCs が機能を有するニューロンへ分化するか否かを明らかにするためには、分化誘導法の改善が必要であった。ヒトやマウスでは、成長因子を添加することで、BMSCs が機能を有するニューロンへと分化したことが報告されている。そこで、予備実験にて過去に報告のあるニューロン分化培地を検討したところ、犬 BMSCs は bFGF を添加することで生存が維持でき、ニューロン分化培地としても期待できる結果が得られた。bFGF は神経系組織に高発現しており、ニューロン再生や脊髄機能の改善に重要な機能を果たしている。本章では、bFGF を用いて犬 BMSCs が機能を有するニューロンへと分化することを検証した。

犬 BMSCs を 2% B27 supplement を含む Neurobasal-A medium に bFGF (100 ng/mL) を添加した培養液で培養後に、ニューロン (MAP2、NEFL、ENO2)、神経幹細胞 (NES)、グリア (GFAP) に関する mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。さらに、ニューロン (NF-L、NSE) に関するタンパク質の発現と局在をウエスタンブロッティングおよび免疫染色にて確認した。さらに、Fluo3-AM を用いた Ca²⁺イメージングにて細胞機能の検討を行った。

犬 BMSCs は、bFGF で処理することにより細胞の生存を維持することができた。また、bFGF 処理によりニューロンに関する mRNA およびタンパク質の発現が上昇し、犬 BMSCs はニューロン様の形態へと変化した。一方で、神経幹細胞およびグリアに関する mRNA の発現は有意に低下した。これらの結果から、犬 BMSCs は bFGF で処理することにより、ニューロンマ-

ターを発現するニューロン類似の細胞へと分化することが示唆された。本検討で得られたニューロン様細胞を高濃度の KCl または L-glutamate で刺激すると、細胞内 Ca²⁺濃度が上昇した。これらの結果から、bFGF 処理により、犬 BMSCs が脱分極および L-glutamate 刺激に反応する機能を有するニューロン類似の細胞へと分化したことが示唆された。

本研究において、bFGF は犬 BMSCs の生存維持と脱分極および L-glutamate 刺激に反応する機能を有するニューロン類似の細胞への分化に寄与することが明らかとなった。これらの結果は、重度の脊髄損傷等の神経疾患に対する新規の細胞移植治療法の発展に貢献するものと考えられる。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担） 研究報告書

磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

研究分担者 棗田豊 横浜市立大学大学院医学研究科 薬理学 客員教授

研究要旨：

これまで磁性体粒子を介した Drug Delivery System は、主に熱を発生させるために臨床応用がされており、薬剤そのものを到達させる時間を短縮したり、投与量を最小限に抑えつつ有効性を高める臨床応用には未だ至っていない。癌組織や周囲の正常組織に対して最適な有効性と安全性を求めるには、投与量、暴露時間、温度調節など臨床応用までに解決すべき多くの課題が残されており、医学、生物、物理、薬学、工学など様々な分野に亘る科学者とのコラボレーションが必要とされている。

Drug Delivery System としての磁性体微小粒子の活用は、1978 年の Widdler の研究から 36 年が経過した現在においても尚、Pre-Clinical Drug Development の段階にあり、Phase- I 臨床試験に移行する前の段階である。

本研究では、First In Human 試験および Proof of concept 試験を開始できる前提となる基礎データの収集と解析を行うとともに、過去の実施例から学び、科学的、倫理的に試験実施を可能とする十分な検討と準備を行う。

また、臨床試験を準備するに際し、信頼性に欠ける紙媒体でのデータ収集を廃し、GCP に則ってモニタリングや監査を可能とする国際標準の EDC (Electronic Data Capture) の導入を検討し、効率的かつ正確なデータ収集とデータの品質を保証するデータマネージメントシステムを確立する必要がある。

そこで、横浜市大附属病院において、オープンソースの国際標準 EDC である OpenClinica の導入を目指した実証実験を開始し、さらに、東京理科大学薬学部と琉球大学医学部のアタマジラミ治療薬の医師主導治験において適用試験を開始した。また、名古屋大学病院、東北大学病院との連携を視野に、臨床研究の基盤整備及び OpenClinica 導入に向けて意見交換を行った。

A. 研究目的

医師主導で進める臨床試験においても、モニタリングや監査を義務付ける法の規制が施行されることになった。磁性抗がん剤を用いた臨床試験も医師主導で実施される可能性があり、その前提として、GCP に則った臨床試験実施体制およびデータの品質を保証できるデータマネジメントの基盤を確立する。

患者を被験者とする臨床試験の実施に際し、オープンソースの国際標準 EDC (Electronic Data Capture) である OpenClinica を導入し、ログ管理のされた環境でデータの収集とデータマネジメントを行うとともに、信頼性保証のプロセスを確立することを目的とした。

B. 研究方法

磁性抗がん剤を用いた臨床試験を実施する前段階として、癌患者を被験者とする便秘症の調査研究を行い、実施体制・基盤の整備を図る。

(倫理面への配慮)

臨床試験データの取得に際して、インフォームドコンセント上の扱い、個人情報の扱いについて、GCP 等の基準に沿った運用を行うためのルール作りを行う。

C. 研究結果

実施計画書作成段階であり、臨床結果は次のステップとなる。症例報告書の作成に関しては、研究責任医師等は、同意を取得したすべての被験者を速やかに EDC シス

テムに登録し、「調査項目及び調査時期」にて規定した情報を速やかに EDC システムに記録するよう、準備を進めている。

並行して実運用における課題対応の知見を得るため、東京理科大学薬学部と琉球大学医学部で行われるアタマジラミ治療薬の医師主導治験において OpenClinica を適用し、一部で試験を開始した。

また、名古屋大学病院と、臨床研究の基盤整備及び OpenClinica 導入に向けて意見交換し、基本的な合意を得た。東北大学臨床研究センターと、臨床研究の基盤、メガバンクデータ管理について情報交換を行った。

D. 考察

規則の整備に関しては、世界標準である ICH-GCP を念頭に臨床研究に関する規則 (標準業務手順書) を整備し、病院長、倫理審査委員会、研究者、倫理審査委員会事務局等の責務と業務を明確にする。疫学研究においてもデータの品質管理は同様であるが、その性格上、同意取得の取得方法や個人情報の管理には十分な配慮が必要である。

E. 結論

臨床研究基盤整備に関しては、他大学および海外研究機関と共同研究を可能にするため、国際的に共有可能な EDC システムの導入が必要不可欠である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. HIGURASHI, H. ENDO, T. UCHIYAMA, S. UCHIYAMA, E. YAMADA, H. OHKUBO, E. SAKAI, H. TAKAHASHI, S. MAEDA, K. WADA, Y. NATSUMEDA, Y. HIPPO, A. NAKAJIMA, H. NAKAGAMA: Conditional knockout of the leptin receptor in the colonic epithelium revealed the local effects of leptin receptor signaling in the progression of colonic tumors in mice. Carcinogenesis 2014 Sep; 35(9): 2134-2141

2. 学会発表

- 1) 棗田豊：医薬品・医療機器等開発支援事業に関して、シンポジウム「先端医療機器の薬事承認を効率化するレギュラトリーサイエンスの現状と将来展望」電子通信情報学会総合大会 2015年3月、南草津、滋賀

3. 知的財産権の出願・登録情報

1) 特許所得

2) 実用新案登録

3) その他

3. その他活動

- 1) 棗田豊が理事長を務める特定非営利活動法人ライフイノベーション総合支援機構が、特区横浜プロジェクト研究開

発等推進事業（医薬品及び医療機器開発支援事業）を受託（平成26年4月1日より平成26年9月30日まで、22,626,207円）

- 2) 平成26年度医療国際展開加速化促進事業（中東での医療講座の実施）に、東京大学医科学研究所非常勤講師として参加（平成27年1月9日より1月15日まで）

4. 講演

（平成26年）

- 3月 棗田豊 「臨床研究へのEDCの導入について」横浜臨床腫瘍研究会 横浜
- 3月 棗田豊 「キャリア開発における日米の違い」ポストドクターのキャリア教育を考える ポストドクキャリア開発支援事業合同シンポジウム 横浜
- 4月 Yutaka Natsumeda: Activities of Yokohama/KSLION. Alliance Forum Foundation/QB3 Symposium, San Francisco USA
- 5月 棗田豊 「医薬品・医療機器等開発支援プロジェクト：薬事相談等支援事業」BIOTech2014 東京
- 9月 棗田豊 「臨床試験におけるデータマネージメントの重要性」東京大学医科学研究所セミナー 東京
- 9月 棗田豊 「臨床試験の概論・基礎知識」東京大学医科学研究所治験・TR教育コース 東京
- 10月 棗田豊 「医薬品・医療機器等開発支援：Pre-PMDA機能と臨床研究の国際標準化」BioJapan2014 横浜
- 12月 棗田豊 「医薬品および医療機器開発の新たな動きと今後の発展性」みなと

みらい産官学ラウンドテーブル第 23
回セミナー 横浜

(平成 27 年)

- 1 月 Yutaka Natsumeda: Outline and
basic knowledge of translational
research & clinical trials.
Symposium on Latest & Essential
Knowledge of Translational
Research and Clinical Trial,
Arabian Gulf University, Bahrain
- 1 月 Yutaka Natsumeda: Outline and
basic knowledge of translational
research & clinical trials.
Symposium on Latest & Essential
Knowledge of Translational
Research and Clinical Trial, Sheikh
Khalifa Medical City, Abu Dhabi,
UAE
- 3 月 棗田豊 「国の健康医療政策とアカデ
ミアの対応」 琉球大学、沖縄
- 3 月 棗田豊 「臨床に活かされるまでの課
題」パネルディスカッション「ゲノ
ム・エピゲノム情報と保健・医療」医
療パラダイムシフトシンポジウム
東京

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担） 研究報告書

磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

研究分担者 浦野勉 横浜市立大学大学院医学研究科 客員教授

研究要旨：

本研究申請は、磁性抗がん剤の開発とそれに付随する医療機器の開発研究である。このような特殊な物理特性をもつ抗がん剤と、それと組み合わせて使用する医療機器の開発を進めるためにはどのようなプロセスが必要かについて検討した。いずれも新薬および新規の医療機器としての評価が必要である。

A. 研究目的

特殊な物理特性を持つ新規抗がん剤との組み合わせによって使用する医療機器の開発を進めるにあたって、一般的なプロセスについて検討する。新規抗がん剤との併用で用いる医療機器としての効力を裏付ける非臨床薬理試験では、医療機器としての有効性やその作用機序などについて、検討が必要と思われる。一般に諸国の医薬品や医療機器の承認審査では、ヒトを用いた臨床試験結果に基づく有効性評価を中心として評価される。しかし、医療機器として求められる機能や使用方法の設定が、臨床での有効性及び安全性を十分担保できるかどうか、という観点から、非臨床の重要性を考察する。

B. 研究方法

本研究は特殊な物理特性を持つ新規抗がん剤との組み合わせで用いる医療機器の開発を目的とするが、医療機器においても、通常薬剤・医療機器開発に求められる事項と変わることはないため、医療機器の承認審査時に必要とされる非臨床薬理試験の範囲は、医療機器自体の安全性のみならず、医療機器を用いた際の抗がん剤の有効性及び作用機序の必要性を検討する。がん治療においてはそれぞれの適応とされる癌種に応じた有効性の検討についての必要性を検討した。

C. 研究結果

医療機器と抗がん剤による組み合わせの非臨床薬理試験の現状と承認審査時における評価の考え方については、電気安全等要求される医療機器自体の安全性の担保はもと

より、抗がん剤の作用機序の検討とともに、適応癌種に対する有効性の検討も重要であると思われた。

D. 考察

医療機器と抗がん剤とを組み合わせた際の効力を裏付ける非臨床試験の評価においては、磁性抗がん剤そのもの薬理作用と、交流磁場を印可した際の磁性特性を併用した際の、薬理作用の変化及びその効力管理が必要であると考えられた。また、その際に使用する医療機器の有効性及び安全性担保については、臨床使用を想定し、非臨床での検討を続けて行く必要がある。本研究は医療機器の薬事開発で求められる事項についての検討であり、基本的に我国で求められる要求規格に適合する必要がある。ただし、国際規格に適合した製品が求められており、この点についても考慮していく必要がある。

E. 結論

特殊な物理特性を持つ新規抗がん剤とそれに付随する医療機器の開発には新規抗がん剤の薬理作用だけでなく、医療機器を使用した際の抗がん剤と医療機器それぞれの安全性について検討する必要がある。また、基本戦略の観点でも薬事法、PL法、保険制度など、医療機器の関連法を熟知した上での研究推進が必要である。また、特殊な物理特性である磁性を生かした新しい磁性抗がん剤とその医療機器の開発は、我が国の薬事行政にとっても極めて意義深いと考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Kim J-H, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Sigh DJ, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Yoshida K, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I and Ishikawa Y: A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging. Sci. Rep. in press, 2015

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担） 研究報告書

磁性抗がん剤を用いた医療機器の開発

研究分担者 平田邦生 理化学研究所放射光科学総合研究センター 専任技師

研究要旨：

磁性抗がん剤の開発において、磁性を制御することが必須となる。このため、磁性を有し制癌効果を示す物質の立体構造を原子分解能で決定をすることは、将来的な薬剤設計にとって極めて重要である。私は本研究の分担者として、磁性抗がん剤の候補物質の微小結晶（数ミクロン～10ミクロン程度の大きさの単結晶）構造解析を行い、磁性抗がん剤候補物質の主に磁性に関連する構造知見を得ることにより全体へ貢献する。

A. 研究目的

SPring-8 では研究方法に詳細を記すマイクロフォーカスビームライン BL32XU を用いた制癌効果を有する種々の試料について、その結晶から原子分解能 ($d_{\min} < 1\text{\AA}$) での構造解析を実現することを目的としている。我々は以前に磁性とともに制癌効果を有する物質の5ミクロン程度の微小結晶から 0.8\AA での結晶構造解析に成功している(Scientific Report へ報告済み)。そのノウハウを活かした効率のよいミクロンオーダーの微小結晶からの構造解析手法の確立を目指す。

B. 研究方法

本研究において重要である測定技術は高フラックス微小 X 線を利用したいわゆる微小結晶構造解析である。これに関連する X 線自由電子レーザーを用いた高フラックス微小 X 線を利用した蛋白質の結晶構造解析について以下に述べる。

ミトコンドリア内膜に存在するチトクロム酸化酵素(以下 CcO)は呼吸によって体内に取り込まれた酸素を水にまで還元する

反応と共役してミトコンドリア内膜を介したプロトン能動的輸送を行う細胞呼吸末端酵素である。 CcO が形成する膜内外のプロトン濃度勾配は細胞のエネルギー源である ATP の合成に利用されることから、 CcO は細胞のエネルギー変換過程で最も重要な呼吸鎖末端酵素である。

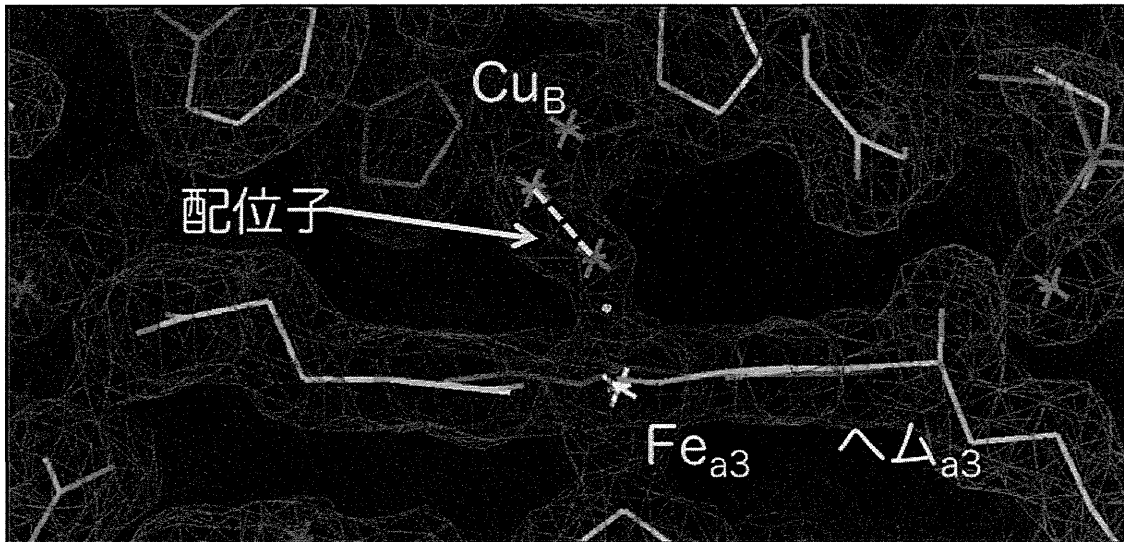


図 1. チトクロム *c* 酸化酵素 (C_cO) の酸素還元中心の電子密度。へム_{a3}(Fe_{a3})と Cu_Bの間に配位子の電子密度が確認できる

ウシ心筋由来酸化型休止型(以下単に酸化型と呼ぶ)C_cOの構造解析は1995年に決定され¹、その後、その分子機構を構造情報から理解するために、主に高分解能構造解析を中心としたC_cOの構造生物学を展開した^{2,3}。詳細については参考文献を参考にさせていただきたいが、特に酸化型の酸素還元中心の配位分子種の特定は反応サイクル中の電子の授受のタイミングとプロトンポンプ機構のカップリングを理解する

上で重要な研究対象であり、我々は結晶構造解析や分光学的手法など組み合わせこの解明に取り組んでいた。C_cOの酸素還元中心は、文字通り分子状酸素の還元反応が起こるC_cOの活性中心である。へム鉄およびその近傍に存在するCu_Bで構成されるこの活性中心図1には配位子の電子密度が認められており、特に酸化型C_cOでは過酸化物であろうと推定していた。

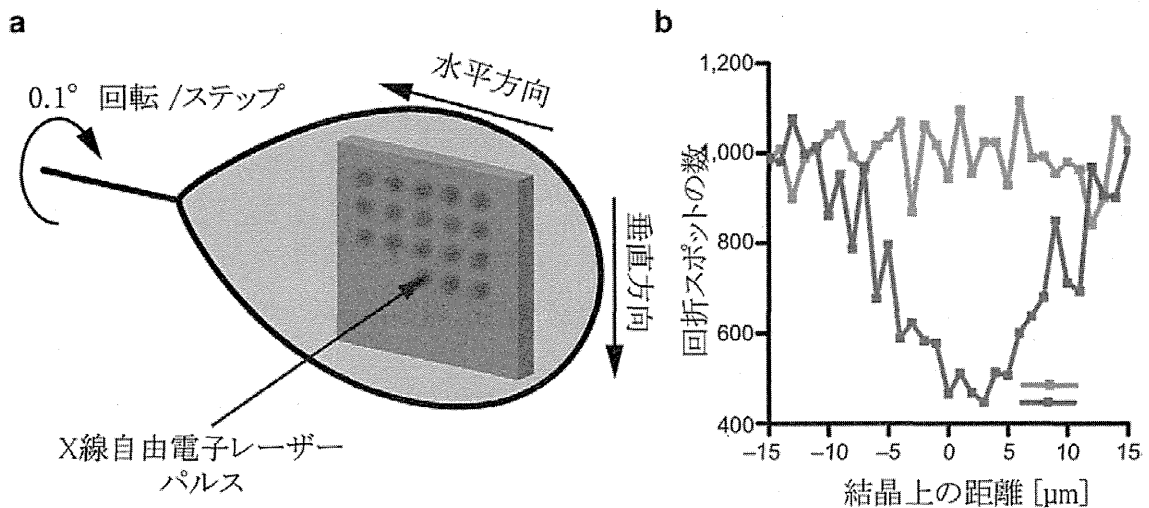


図 2 a:SF-ROX^{4,5}の実験コンセプト、
b: SACLA XFEL を利用した際の結晶上
の放射線損傷伝播。SACLA 1 μm 集光、
3E10 光子のパルスを減衰無しで照射
した点 (グラフ 0 μm 近傍) 周囲の回
折能減衰を回折イメージ上に観測さ
れる反射数で評価した。評価のための
イメージ (前: 青、後: 赤) は 1%程度
に強度を減衰させて取得している。

我々は高分解能酸化型 CaO 構造解析
による配位子同定を目指す中、「タン
パク質結晶の放射線損傷による構造
の曖昧さ」という X 線結晶構造解析に
おける重篤な問題に直面した。CaO 結
晶への X 線照射と結晶の吸収スペクト

ル測定を交互に行った結果、X 線の照
射により酸化型 CaO 結晶の吸収スペク
トルが変化することが明らかとなっ
たのである。しかもこの X 線照射の時
間はビームサイズ 50 ミクロン、2E10
光子/秒の強度の X 線 1 秒にも満たな
い。この吸収スペクトルの変化は X 線
照射により引き起こされる酸素還元
中心の電子状態の変化が主原因であ
ると考えられた⁶。X 線照射が構造解析
に及ぼす影響を見るために、回折デー
タ取得の際の X 線総露光量 (エネルギ
ー吸収量) を変化させて酸化型 CaO の
高分解能構造決定を行った。結果、露
光量が増えるに従って得られる構造
中の配位子の結合長が伸長すること

が明らかとなった。この時点で配位子の分子種はかす我々は配位子をその結合長から正確に同定するために少なくとも 2 \AA を超える高分解能で構造解析を行う必要があると考えていた。このためには結晶への「大強度」X線照射が必須であったが、「大強度」X線照射の結果、目的の配位子の形を歪めてしまうというジレンマに直面したのである。とりわけ電子密度の高い金属で構成されたCcOの酸素還元中心は放射線損傷感受性が高く、配位分子種の特定にはこの問題は深刻であった。

この問題を解決するため、我々はシンクロトロンビームライン（大阪大学蛋白質研究所ビームラインBL44XU）において合計400個あまりのCcO結晶の各結晶から1枚だけ（通常はフルデータ450枚収集）回折像を取得し、それらをマージして利用する手法を開発し⁷酸化型CcOの構造解析を行った。このように過去最少の放射線損傷量で収集したデータに基づいて決定し

た構造中の配位子O-O結合長を 1.7 \AA と推定し、この時点では構造情報から、ではなく、ほぼ分光データによる観測結果から過酸化イオンであると結論づけた⁶。しかしこの構造解析で得たO-O結合距離 1.7 \AA も、共鳴ラマン分光法（対象は溶液）により決定されていた 1.5 \AA よりも 0.2 \AA 長いものであった。

シンクロトロン放射光を用いた「放射線損傷最少」の酸化型CcO高分解能構造決定を行い配位分子種の推定を行ったが、「あるがままの」配位子の構造を直接観測については実現不可能と考えられた。X線自由電子レーザーという新たな光源が出現するまでは。

【XFELを用いた回折実験】

時は過ぎ、2012年3月我々はSPring-8に併設されたXFEL施設であるSACLAの共同利用ユーザとして「タンパク質無損傷高分解能構造解析」の実現を目指し実験を開始した。XFEL

を用いれば酸化型 $Cc0$ の配位子を「あ
るがまま」捉えることができると期待
したのである。SACLA で利用可能な
XFEL は時間幅約 10 フェムト秒におよ
そ 10^{11} 個の光子を含み、波長領域が X
線領域にあるレーザー光である。レー
ザーであることにより空間コヒーレ
ンシーが高くなるというメリットも
考えられたが最初の実験で蛋白質の
結晶では大きなメリットは無いと判
断した。

タンパク質結晶の放射線損傷は結
晶に入射した X 線により引き起こされ
る光電効果で生じた電子（光電子）が
主な原因であるといわれている⁸。結
晶内で生じた光電子は結晶中に多く
含まれる水分子やタンパク質分子と
相互作用を起こしラジカルなど反応
性の活性分子種を数多く生成する。こ
れらが結晶の劣化（グローバル）やタ
ンパク質分子の状態変化（ローカル）
を誘起することが広く放射線損傷と
呼ばれているものである。前者は、デ
ータ収集中に結晶の劣化により回折

能が低下することにより得られるデ
ータセットの分解能が低下、モザイク
角の増大などによりデータ処理の困
難化などの原因となるものである。後
者は電子密度上、局所的な構造変化と
して現れる放射線損傷であり、結晶内
で起きるこの化学反応の時間スケ
ールは速いものでおおよそピコ秒オー
ダーであるとされている。そこで、10
フェムト秒/パルスで回折像を取得可
能な XFEL を用いれば放射線損傷の化
学反応が引き起こされる「前」の結晶
構造を反映した回折像を取得するこ
とができ、無損傷構造解析が実現でき
る（“Diffraction before
destruction”⁹）と考えた。

実験を開始した頃には既に米国 X 線
自由電子レーザー施設 LCLS（SLAC
Linac Coherent Light Source）を用
いたタンパク質結晶構造解析の報告
はあったが、常温微小結晶を用いたシ
リアルフェムト秒結晶構造解析
（Serial Femto-second
Crystallography 以下、SFX）^{10,11}で行

われていた。我々はこの方法とは大きく異なり、数百ミクロン大の大型凍結タンパク質結晶を用いた「高分解能構造解析」の実現を目指し測定を開始した。良質な $C\alpha$ タンパク質結晶標品を大量に調製する方法が確立していたこと、これまでのシンクロトロン光源で蓄積してきた高分解能構造解析やデータ収集経験を活用することが可能であること、大きな結晶を利用することで同じ強度の X 線を使う場合に分解能を稼ぐことができること、凍結結晶の利用により放射線損傷伝播の影響を抑えることができる、と考えたからである。

まず今回の $C\alpha$ の無損傷構造解析を実現するために確立した実験の概略図を図 2 に示した。XFEL を凍結 $C\alpha$ 結晶に 1 パルス（含まれる光子数およそ 10^{11} 個）照射し 1 枚の回折イメージを取得後、結晶をある量並進・ある角度回転させ、それまで XFEL 照射で損傷を受けていない結晶体積に次の XFEL を 1 パルス照射して回折イメー

ジを 1 枚取得する。これを繰り返して無損傷回折データを完成する方法である。

この方法を用いるにあたり実験事前に決定しなければならないことが 2 点あった。ひとつは「無損傷構造解析を実現できる結晶上 XFEL 照射点間の距離」、もうひとつは「照射点間での結晶の回転角度ステップ」である。

【使用した装置】

種々の実験パラメータ決定の説明の詳細を紹介する前に、今回の実験で利用した装置について触れておく。計画した実験が可能な回折計のポイントは以下の通りである。①試料結晶をミクロンオーダーで並進させることができること②結晶の回転が可能であること③凍結結晶を用いるため低温吹き付けガス装置が利用できること④数十 Hz でやってくる XFEL の 1 パルスを正確に切り出して試料に照射できること⑤回折像を取得する X 線検出器を有すること、などである。これ

らの要求仕様は従来シンクロトロン放射光施設で利用している回折計とほぼ違いが無いいため、最初の測定時には SPring-8 所内で利用していた蛋白質結晶構造解析に用いていた回折計を SACLA に持ち込んで利用した。2013 年の実験時に利用した装置の外観は図 3 に示したとおりである。④のパルスを選択に関しては SACLA に備え付けられているパルスセレクタ（数十 Hz で利用可能な XFEL のパルスを正確に 1 つずつタグ付けして利用することが可能な装置）を利用し 1 パルスのみを結晶に照射することを容易に実現することができた。SPring-8 構造生物学ビームラインで利用されている汎用制御ソフト BSS¹²を用いて回折計を制御し測定を実現した。また今回の Cα0 回折実験ではゴニオメータへの凍結結晶マウントは人間が行ったが、SPring-8 で利用している試料結晶自動交換ロボット SPACE¹³を用いてハッチ外からのコンピュータ制御により、自動で結晶をマウントすることも可

能である。凍結結晶は Uni-puck (Crystal Positioning Systems 社) を用いて 32 個(ピン)ストレージにおいておくことが可能である。この SPACE は測定効率を向上するため、測定後のサンプルピンはソレノイドを利用してゴニオメータ上から落とすことが可能になっている。特に今回の実験では、結晶を回収する必要がない場合には測定にかかる時間を一部短縮できる。

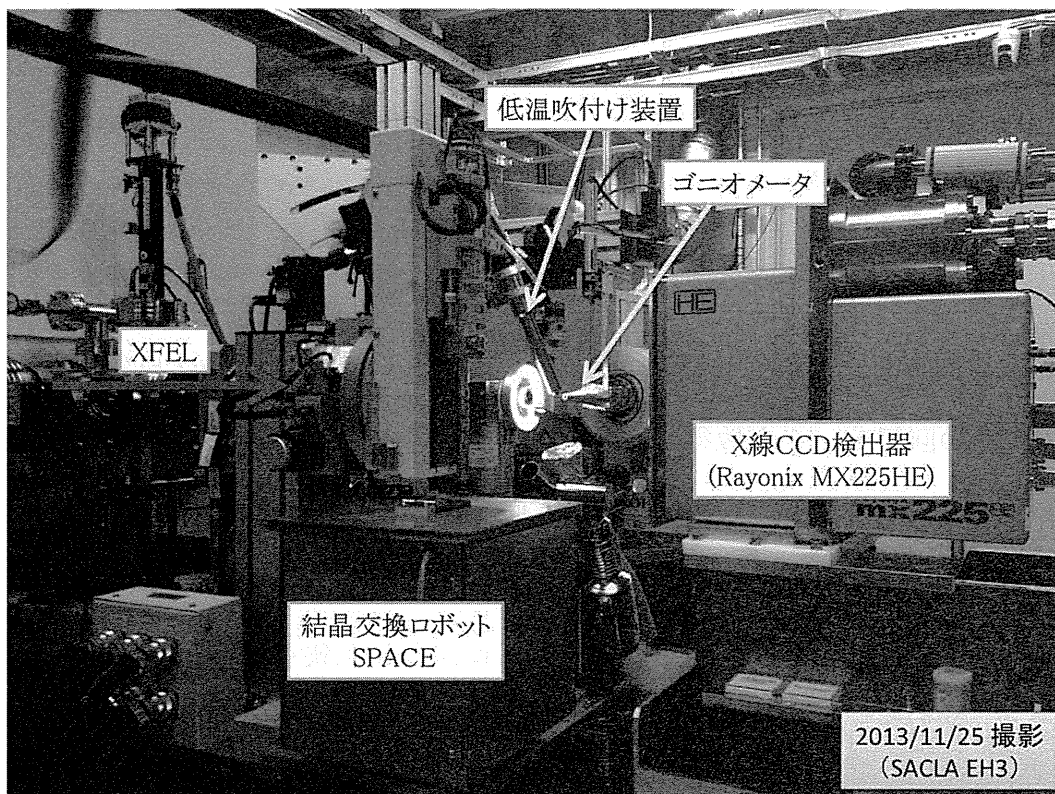


図 3 SACLA 回折計 XFEL は図の左（上流側）からやってくる (Diffractometer for SF-ROX at SACLA)

【放射線損傷の伝播距離について】

本測定において凍結 Cc0 結晶に XFEL を 1 パルス照射した場合、結晶上どの程度の距離まで放射線損傷が広がるかを明確に知る必要があった。我々は解析の対象となる酸化型 Cc0 結晶を用いて X 線照射による損傷の伝播距離を実験的に決定した。この測定に

については SPring-8・理研ターゲットタンパクビームライン BL32XU での放射線損傷伝播距離の定量化で利用している方法と同じである¹⁴。まず半値全幅 1 ミクロン程度に集光された XFEL をシリコンのアッテネータで 1 % 程度の強度になるまで減衰させ、1 ミクロンステップで 31 点、水平方向に移動させながら各露光位置から回折イメージを 31 枚取得し、各イメージ上に観測された反射スポットの数を取得した。これを「損傷がないときの結晶の回折能」のリファレンスとした。