

(付 録)

【用語集】

○ 標準品

国際的ないしは国内の公機関によって制定された国際標準品あるいは国内標準品

○ 標準物質 (参照品)

標準品に対して校正された標準となる物質

注意事項*1

「原則として下記の条件を満たしていることが望まれる」とは、自動化された閉鎖系での抽出装置を用いるなど、交差汚染を防ぐ装置が用いられていたり、調製済みのキット製品等が採用されている場合などでは、「下記の条件」を満たすことが可能な場合もあることを意味している。この場合、そうした対策の妥当性を説明するとともに、必要に応じて交差汚染防止が十分に成されていることを示すデータの提示が求められるであろう。

注意事項*2

2-3) 及び 2-4) 等で、試薬製造メーカーのデータを提出することによって必要とされるデータに代えようとする場合にどの程度のデータが必要とされるかは、採用しようとしている試験法等に依存するためにケースバイケースで判断する必要がある。しかし、少なくともガイドラインの趣旨に添ったデータが提出される必要があり、もし十分なデータが試薬製造メーカーによって提供されない場合には、各申請者が必要なデータを作成しなくてはならないケースも想定される。また企業の知的財産等の関係で試薬製造メーカーから全てのデータが申請者に提出されない場合、診断薬等としてすでに承認を受けている場合には、その承認書に関するデータを試薬製造メーカーより直接規制当局へ提出するか、あるいはドラッグマスターファイルに準じた取り扱いが必要となると考えられる。但し、診断薬としての承認に必要とされるデータと血漿分画製剤の NAT において必要とされるデータは必ずしも同一ではない可能性があり、追加のデータが必要となることも考慮すべきである。

注意事項*3

遺伝子型の分類として、HBV と HCV ではジェノタイプが、HIV については主としてサブタイプという表現が使用されている。HIV のサブタイプ等とは HIV-1 M グループ内の各サブタイプ、HIV-1 のその他のグループ及び HIV-2 等の広義の HIV 遺伝的変異を包括する。ここでの記載の目的は、NAT によるウイルス遺伝子の検出に当たって、ウイルス遺伝子の塩基配列の差異によらず、できる限り多くのジェノタイプやサブタイプ等を検出できることを示すことを求めているものである。従ってここでは、それらを全て包含することを目的として「等」としている。

注意事項*4

ここで述べられている詳細な情報とは、プライマー等の特性解析結果としての純度、最適濃度、ロット間の一定性等を含めた情報であり、さらにロット間のイールド等のデータも含めて情報を明らかにしておくことにより、イールド等がその基準に達しないときには製造されたプライマーの品質が何らかの問題がないか検討する必要性を指摘したものである。

注意事項*5

2-5) 試験の最適化と特異性の確認や 2-6) 検出感度は NAT によるウイルス検出の根幹であり、市販試薬等でその製造メーカーからの情報ではその妥当性が立証されない場合が想定され、必要に応じて複数のウイルスジェノタイプ等の検出能や、国内あるいは国際標準品

を用いた検出感度の評価が必要になることもあると思われる。この点に関して、試薬製造メーカーからガイドラインで求められている程度に必要な十分なデータが提供される場合には、それで代えることも可能である。

注意事項*6

陰性血漿とウイルスをスパイクした血漿を合わせて 20 本以上を適切な比率でならべて試験を行う。具体的な比率については自動化された機器をもちいるのか、用手法によるのか等によって異なると考えられる。

注意事項*7

注意事項*7

NAT による検出感度について、安全技術調査会で議論を行い、輸血用血液製剤のプール前の原血漿に対して HCV、HBV については 2000IU/mL、HIV については 4000IU/mL とするとの結論を出している。なお、血漿分画製剤については、プール後の原料血漿の NAT の検出限界が 100IU/mL を担保できるべく精度管理を行うこと。

血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドライン(コメント)			
コメント		理由、根拠、修正案	対応案
ガイドライン全体へのコメント			
	修正案はEP、及びICHのガイドラインから逸脱しない内容であることを希望	当社ではNATはEP、及びICHのガイドラインに準拠して行われているため	FDAやEMAのガイドラインとの整合性は取れていると理解していますが、EPやUSPのガイドラインについてはこれまで十分な比較検討を行ってきておりません。
	技術の進歩に合わせて内容を見直すことは大切だが、minimum requirementであること		規制的要件については安全技術調査会等での議論に基づいて整備をする必要があると思います。本ガイドラインは技術的要件を中心に記載されるものと理解しております。
	海外のNATに関するガイダンスとの整合性を図っておく必要があること。		NATガイドライン作成時にはFDA及びEMAガイドラインとの整合性は取れていたと考えられます。最新のガイドラインとの比較では、制度の違いに基づくと思われる差異も見られるようですが、本ガイドラインの目的を超えているかどうかの判断をしたいと思います。
注意事項(Q&A)の整備			必要に応じて見直します
個別項目へのコメント			
1. ガイドラインの目的及び適用範囲			
1-1) 目的			
	現在は、代表的なウイルスについて国際標準品が設定されていることから、コピー数表記ではなくIUに変更するほうがよい。		全体を通して見直して、IU表記に統一したいと思います。

1-2)適用範囲			
	最終製品のウイルス検査は、安全技術調査会で実施しないこととされたことから削除するほうがよい		ご提案どおりとしたい。
	HCV, HBV, HIV以外のウイルス検出への適用をどう考えるか: パルボウイルスB19はFDAでもその要件が示されており、検討が必要となるであろう。(FDAの 10^4 IU/mlに準じるのがよい。) HEVは北海道で限定して試行されており、また各社で受け入れ試験として行われている実態もある。WNVなど将来的に必要なかもしれない。		NATガイドラインにHIV, HCV, HBV以外のウイルスについて規制的要件を挿入するには、上の委員会ので結論を待つ必要がある。技術的要件としてパルボウイルスB19やHEV, WNVについて、特に注意すべき事項があればそれを記載することは可能では。
2. 検査精度の確保及び試験方法の標準化のための方策			
62	NATガイドライン中に「試験・検査」という言葉ができてきますが((項目2-1)の最後)、試験と検査の違いがあれば教えてください。		
	HBVへの適用では、血清学的試験により高タイトーの血漿を排除したうえでNATを適用しないと汚染が起きやすいが、その点についての記載がない。		交差汚染に可能性の言及については、実態に関する調査を含めて判断したい。
	Multiplex PCRに関する記載がないが、記載の必要性も含めて議論が必要。		FDAのガイドラインではMultiplex PCRに関する記載も整備されており、Multiplex PCRを導入するときの注意点やバリデーションのあり方については記載が可能ではないか。
	①個別NATの実施に当たっての記載が必要か。あまり具体的に書き過ぎても困る可能性あり。 ②他の方法(TMA法等)の必要性 ③Taq polymeraseの化学修飾(Hot startなど)への言及		

<p>2-1) 施設・設備の整備等に関する事項</p>			
<p>2-1)の修正(追記)を希望</p>		<p>NATは数ダースコピーのウイルス遺伝子を検出できることから、増幅産物による汚染などが起きないように十分な配慮をする必要がある。留意事項には作業者の導線や更衣、材料の流れ、エアフローや給気、除染法などが含まれる。最近の市販NATキットは自動化されたインハウスシステムと同様にNAT試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系のNAT試験を採用している場合には、NAT試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。開放系では、マスターミックスの調製、資料の処理や抽出、NATによる増幅、及び増幅産物の検出といったNAT試験の各ステップを開放系で行う場合には、原則的通りに、試験はそれぞれ異なるエリアや区画で実施する必要がある。(*1)</p>	
<p>63</p>	<p>2-1)で引用されているようにNATのこの部分の記載について時間も経過しており、最近の市販NATキット等は調整済みで、閉鎖系かつ分注済みのものが利用可能である。試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられており、最近の市販システムを用いる場合には本記載はもはや不要である。この記載は変更する必要がある。</p>	<p>最近の市販NATキットは自動化されたインハウスシステムと同様にNAT試験のために一つのシステムを用いている。同時に試薬もチューブやカセットに入った調整済みのものが用いられる。さらに、汚染が起こりやすい増幅及び検出操作も閉鎖系で行われる。従って、このような閉鎖系のNAT試験を採用している場合には、NAT試験の各ステップに対応したエリアや区画を分ける必要がない。種々の試薬やテストキットを用いるNAT試験をインハウスのシステムを用いて開放系で実施する場合には、ANTが数コピーから数十コピーのウイルスゲノムを検出できることから、NATによる増幅産物の汚染が起きないように最善の注意を払う必要がある。従って開放系で実施するNATの試験設備はガイダンスに示された条件に適合する必要がある。(*1)</p>	

	自動化機器が普及している中で、本文の(*1)の内容について、例えば「交差汚染の防止等がなされている場合はこの限りではない。」など、本文中に記載し、条件設定した方がよいのではないでしょうか		
2-2) 機器, 器具の保全、管理に関する事項			
	NAT検査におけるシステム適合性試験とは、具体的にどういことをすればよいのでしょうか。		検出の確認(ランコントロール)、検出系の性能(特異性)、再現性が挙げられますが、試験ごとに実施することではなくバリデーションも含めてのことです。
2-3) (被験) 検体の移送・保管、試薬の保管・管理に関する事項			
	抽出法やプライマー、プローブ等の市販キットの使用: バリデーション、キットの受け入れ試験、キット変更の場合などの記載が必要ではないか。(USPにはキットの要件が記載されている。)		USPの市販キットの使用に関するGeneral Chapterを参考に案文を作成してみます
2-4) 核酸の抽出・増幅及び増幅産物の検出に関する事項			
	ウイルスゲノムの変異により検出が出来なくなる可能性について、適切な評価を行うことを記載すべき(HIVのゲノム変異)。	EMAがHIVのゲノム変異により検出が出来ないキットがあることについて注意喚起を行った(シングルターゲットに代えてデュアルターゲットPCRの推奨)	ゲノムの変異が起きている可能性を日ごろから検討することとして、血清試験で陽性になった検体のゲノム解析を行う必要性について言及する案文を提案。また、デュアルターゲットPCRを行う場合に考慮すべき事項についての記載についても案文を提案します。
	Realtime PCR/RT-PCRでの検出の確認に関してカットオフ値の設定に関する記載がない。		用手法での記載と比較して適切に整備したいと思います
2-5) 試験の最適化と特異性の確認、非特異的反応の除去に関する事項			

	<p>(3) 増幅産物の特異性の確認 「増幅産物が目的としたものであることを2段PCR、制限酵素マッピング、配列解析、増幅産物の分子サイズ、特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションなどにより確認する必要がある」と記載すべきである。</p>		
	<p>①特異性の確認 ○核酸→ウイルス遺伝子</p>		<p>ウイルス遺伝子に修正します</p>
	<p>③増幅産物が特異的である確認 キットの使用者で、様々なジェノタイプのウイルスを入手する場合は困難な場合もあることから、次の一文を記載する。 ・ウイルス遺伝子型等に対する検出感度 ○最終行に、「市販キットを使用する場合は、試薬製造メーカーのデータをもって代えることができる。」を追記する。</p>		<p>市販キットの使用に関する考慮事項と共に、どのように記載するかを検討する。</p>
	<p>・NAT検査におけるばらつきは、一般的にどれくらいまでを許容すると考えればよいでしょうか。</p>		<p>一概には言えないのではないのでしょうか。検出限界近くの低濃度のウイルス溶液では、採取サンプル中に含まれるウイルス量は非常にばらつくことが想定されています。一方で、FDAのバルボウイルスの検出限界のように、10^4 IU/mlであればこのような希釈液でのサンプリングによる誤差はそれほど大きいとは考えにくい。</p>
	<p>・定量NAT試験系は、分析法バリデーションに従った方がよいのでしょうか。</p>		<p>ICH Q2A及びICH Q2Bが参考になると考えられるが、全てが適用可能か検討させていただきます。</p>

	陰性パネル:陰性血漿の調達法、現行の記載は十分か?「100検体を試験し、陰性であることを確認」の妥当性(従来の打率の考え方に基づいたものであり、現行のリアルタイムPCRとは考え方が異なる。)		リアルタイムPCRでの陰性血漿の評価法については再検討させていただきます。
	凍結乾燥されていないRNAウイルス標準品(社内標準品を含め)の安定性についてどのように考えられるか説明してほしい。	標準品の安定性について、DNAウイルスでは問題が少くないと思われませんが、RNAウイルスでは長期保存によりコピー数が低下する傾向があるように思われます。	
2-6)検出感度に関する事項			
	②検出感度の求め方 ・3回以上の独立した試験の実施 ○最終行に、「自動化機器の場合は、製造メーカーのデータをもって代えることができる。」		
	NATガイドラインに記載されている、n数に関する制定当時の考え方(根拠)を明示してほしい(例;頑健性のn=20、95%感度の3倍など)。		
	検出限界の解析のための標準品の希釈法:希釈には陰性血漿を用いるべき。		PBS等で希釈系列を作製すると、実サンプルとの抽出効率等の齟齬が出来る可能性を記載したいと思えます。
	バリデーションのための標準品や参照パネル;標準品、自社標準物質の記載について ①国際標準品、②国際標準品で校正された国内標準品 ③国際標準品又は国内標準品とのデータの互換性が保証された自社標準物質等(参照品)		国内標準品は、IU単位で表示されている場合には国際標準品に対して校正されています。自社標準物質の作製について追記する必要がありますか議論を行いたいと思えます。

	<p>ランコントロールについて、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスが必ず陽性になることを求めているが、HBVの検出感度はすでに数IUと非常に高感度であり、95%の検出感度の3倍量のランコントロールウイルスを設定することが困難である。ランコントロールの設定について適切な記載にしていきたい。</p>	<p>NAT法の技術革新が進み、高感度になったために非常に低濃度のランコントロールの調製が難しくなっている。</p>	
2-7)判定基準の設定に関する事項			
	<p>再試験の基準に関する記載が必要。</p>		<p>FDAガイドラインの記載を参考に記載案を提案させていただきます。</p>
2-8)従事者の技術の標準化と向上に関する事項			
2-9)汚染防止に関する事項			
	<p>汚染防止対策は、最新の市販されている閉鎖系システムを用いないで、インハウスの開放系を用いる場合に適用すべきである。</p>		<p>上記のコメント同様、適切な閉鎖系での対応をとる場合には、ここで書かれているような部屋の区別は不要とする記載を追記したいと思います。</p>
3. 試験、検出結果の意義づけ			
3-1)「陽性」と判定した結果の意義			
3-2)「陰性」と判定した結果の意義			
3-3)必要とされる検出限界値(*8)について			
4. 新技術の導入に関する事項			
【用語集】			
注意事項			
その他			
	<p>本活動のスケジュール(3年間)を教えてくださいませんか(大まかなものでかまいません)。</p>		<p>具体的スケジュールについてはNAT小委員会のスケジュールもあり、見通しについては少し待っていただきたい。</p>

<参考資料 2> NAT ガイドラインに対するコメントと対応案

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

原料血漿におけるパルボウイルス B19 の規格値に関する研究

研究分担者 岡田義昭 埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長

研究要旨

ヒトパルボウイルス B19 (以下 B19V) は、一過性の高いウイルス血症を呈するため血漿分画製剤の原料血漿の品質管理の上から重要なウイルスである。その一方で供血者の 40%~50%が B19V の感染性を阻止する中和活性を有していることから血漿分画製剤の原料基準は中和抗体の存在を考慮することが重要である。そこで中和活性や病原体不活化の評価等に必要な B19V の感染性を簡便に測定する方法として従来の nested RT-PCR による定性法を改良し、リアルタイム RT-PCR 法による感染性の評価系を構築した。従来法では結果が得られるまで RNA 調整後 6 時間を要したが、リアルタイム RT-PCR 法では 2.5 時間で結果を得ることができ、感染性の検出感度も従来法に比べて同等であった。昨年度報告した B19V に対して高感受性を示す人白血球細胞株を用いることで B19V の感染性を高感度で簡便に評価できるようになった。

A. 研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤の安全性向上に HBV、HCV、HIV を対象とした核酸増幅検査の貢献は、計り知れない。これらの検出感度は、可能な限りの高感度を要求されるため検出試薬の感度を考慮して決定されていることが多い。一方、B19V は一過性に高いウイルス血症を生じるが、抗体出現によって感染性は著明に低下することが知られている。また、B19 感染の多くは、不顕性感染となり献血者の 40~50%が B19V に対する抗体陽性と考えられている。また、感染後 1 年以上 B19V と抗体が共存し、NAT 法でウイルス遺伝子が検出されることも報

告されている。そのため、血漿分画製剤の原料血漿における B19V の規格は中和抗体を考慮して決定する必要がある。米国の FDA では、治験中に発生した B19V の感染事例の解析から感染が成立しなかった (抗体が陽転しなかった症例) ウイルス濃度を根拠に血漿分画製剤の原料血漿は 10^4 IU/mL 以下と規制している。

一方、B19V の感染評価系が報告され、各不活化法に対する B19V の不活化効果について解析が行われた結果、これまで B19V のモデルウイルスとして用いられてきたプタパルボウイルスやイヌパルボウイルスに比較して加熱処理に対して感受性が高いこと

(不活化され易いこと)が明らかとなった。

以上のことから B19V を用いた感染性の評価法が必要になった。我々を含め感染性の評価は、段階希釈した B19V を細胞に感染させ、転写された B19V-RNA を検出する方法が実施されていた。そのため RNA 精製、逆転写、1st-PCR、2nd-PCR、電気泳動による特異的バンドの検出の 5 行程が必要であり、RNA 精製後約結果が得られるまで約 6 時間を要した。行程が多いためコンタミ等が問題となる。そこで今年度は、リアルタイム RT-PCR 法を確立して 1 工程で結果が得られる検出系の確立を目指した。

B. 研究方法

1) B19V 感染性の評価

B19V は細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され、数カ所でスプライシングされて最終的にタンパク質に翻訳される。この性質を利用して B19V を感染させた細胞からスプライシングされた RNA が検出できた場合に感染性を有すると判断した。塩基配列の 584 番と 585 番の間で切れ、同様に 2087 番と 2088 番の間で切れて 584 番と 2088 番が結合した RNA ができるためスプライシング部位を挟むようにプライマーを設計した。増幅産物を検出するためのプローブはスプライシング部位を跨ぐように設計した (図 2)。スプライシングされてできる RNA からの cDNA と B19V-DNA とを明確に区別できる。

2) spliced B19-RNA の調整法及びリアルタイム RT-PCR の方法

KU812 由来のクローン株である F10 (当研究室で分離・維持している) を $3 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$ に調製し、これに $10^2 \sim 10^7$ 倍に PBS で希釈した B19 陽性血漿 $100 \mu\text{L}$ を添加した。ローテーターで回転させながら室温で 1 時間ウイルスを感染させた。感染後、 1mL の $10\% \text{FCS-RPMI}$ (エリスロポイチン 3 単位/mL 含む) を加え 2 日間培養し、遠心にて細胞を回収した。細胞に RNAsol を添加して RNA を抽出し、最終的に RNA は $15 \mu\text{L}$ の蒸留水に溶解した。リアルタイム RT-PCR は、キアゲン社の QuantiTect RT-PCR キットを使用し、プライマー及びプローブの濃度、RT-PCR の温度は仕様書に従った。また、サイクル数は 40 回とした。

3) リアルタイム RT-PCR 法の評価

B19 陽性血漿を 100 倍希釈して感染させた細胞由来の spliced B19-RNA を 10^7 感染価として 10 倍ずつ 10^7 まで PBS で希釈し、検量線を作製した。また、非感染細胞由来の RNA、 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 コピーの B19-DNA をリアルタイム RT-PCR に添加し、増幅の有無を検討した。

4) リアルタイム RT-PCR を用いた液状加熱による B19 不活化評価

5%アルブミン液 B19V を添加し、 60°C にて 0、1、2、6、10 時間液状加熱を実施した。PBS を用いてそれぞれの検体を 1 倍～ 10^6 倍まで希釈し 2) に従って感染させ、RNA を調整し、リアルタイム RT-PCR を行い不活化効果を評価した。

C. 研究結果

1) リアルタイム RT-PCR の評価

100 倍に希釈した B19V 陽性血漿を感染させた F10 細胞由来の RNA を 10 倍ずつ 10^7 まで PBS で希釈し、リアルタイム RT-PCR 法を行なったところ 10 倍希釈から 10^7 まで直線性が得られ、感染価の検量線を得ることができた。また、非感染細胞由来の RNA、及び 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 コピーの B19-DNA を添加してリアルタイム RT-PCR を行っても増幅は認められなかった。

2) リアルタイム RT-PCR を用いた液状加熱による B19 不活化評価

増幅が得られた場合を感染性陽性として検討すると図 3 に示すように 2 時間以上の液状加熱によって 5Log の不活化効果が認められた。不活化の効率は、従来の nested RT-PCR から得られた結果と同じであった。

D. 考察

B19V は、一過性であるが 10^{10} IU/mL を超えるウイルス血症を引き起こすため、このような高濃度のウイルス陽性血漿が原料血漿プールに混入した場合、プール血漿全体が汚染されてしまう危険性が存在する。その一方で B19V 感染では感染によって中和抗体が産生され B19V の再感染を阻止する。抗体保有率は、大人の 40~50% とされており、多くの献血者が B19V に感染した既往があることになる。米国の S/D 処理した新鮮凍結血漿による B19V 感染事例から、 10^4 IU/mL 以下では感染が成立しなかったことから米国では 10^4 IU/mL 以下を原料血漿の

規格値としている。経験からではなく科学的にその根拠を明らかにしておくことは安全性を確保するために必要である。我々は、これまで B19V の感染性の評価を行ってきたが、RNA の抽出、RT 反応、1st-PCR、2nd-PCR、電気泳動による特異的なバンドの確認の行程があり、RNA 精製後結果が得られるまで 6 時間を要した。これをリアルタイム RT-PCR で実施すると 2.5 時間で結果を得ることができた。PCR の操作が 1 回しかないため操作中のコンタミのリスクを減少させることができる。また、増幅産物を取り扱うことがないので測定室等を汚染させる可能性も減少させることもできる。

感染細胞と共に多量の B19V が検体に混入しているため精製した RNA に B19V-DNA が混入し、スプライシングされていない B19V のゲノムを増幅しないようなプライマーとプローブを設計することがこの測定系を確立するためのポイントとなる。従来法を確立する段階で B19 のゲノムを増幅しないでスプライシングされた RNA のみを増幅できるプライマーの検討を行っていたことが大いに役立った。スプライシングされる部位を跨ぎ、プローブの機能に支障をきさない塩基配列を有するプローブを作製することができた。

作製した系を用いて感染性を評価したが、スプライシングされた RNA の定量のために従来法で感染価が判明している血漿を 10^8 /mL として感染価を測定したが、陽性血漿を 100 倍希釈して感染させた細胞由来の RNA

は、1 倍希釈や 10 倍希釈では検量線から外れてしまい定量性はなかった。それよりも希釈した RNA では定量性が認められた。さらに陽性血漿を種々に希釈してから細胞に感染させ、それぞれの細胞中のスプライシング RNA を定量すると誤差が大きいがある程度の定量性が認められた。今回の測定系では、検体を種々に希釈して感染させることで感染価を求めたが、感染細胞内のスプライシング RNA の値からコントロールと比較して不活化や中和活性が求められるようになるとう検体数が大幅に減少し、利便性が高い測定法になると考えられた。

E. 結論

B19V の中和活性や不活化効率を評価するためにリアルタイム RT-PCR 法を用いた感染性の評価法を確立した。従来の方法では、RNA 精製後に最終的な結果が得られるまで試薬の調整を含め約 6 時間を要したが、新規方法では 2.5 時間で従来法と同等の感度で感染性を検出することができた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Krayukhina E,Uchiyama S,Nojima K,Okada Y,Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity.

J.Biosci Bioeng. 2013.115(19): 104-10.

2)Baylis SA,Blumel J,Mizusawa S, Matsubayashi K, SakataH, OkadaY, NublingCM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize Assays for detection of hepatitis E Virus RNA. Emerg.Infect.Dis. 2013.19(5):729-735.3)

3) 岡田 義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。検査と技術、42巻、4～7ページ、2014年

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、浜口 功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第 61 回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013 年

2) 岡田 義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第 61 回日本ウイルス学会、神戸、2013 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

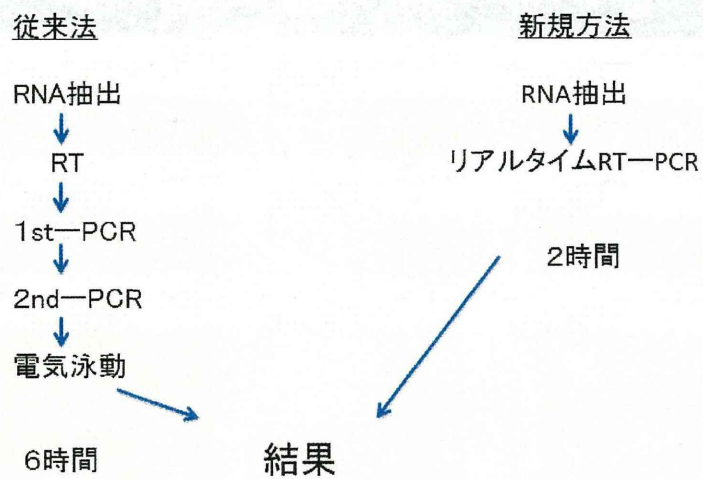


図1.感染性評価

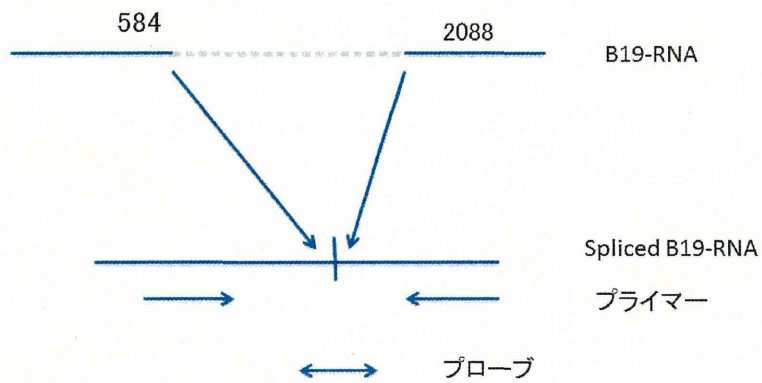


図2.プライマーとプローブの位置

希釈	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1
0 h	—	+	+	+	+	+	+
1 h	—	—	—	—	+	+	+
2 h	—	—	—	—	—	—	+
6 h	—	—	—	—	—	—	+
10h	—	—	—	—	—	—	—

図3.B19の液状加熱による不活化

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, T. Kawanishi	High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles	<i>Analytical Methods</i>	5	5899-5902	2013
Itoh,S. Hiruta,Y., ashii,N., Fujita,N., Natsuga,T., Hattori,T., Bandoc,A., Sekimoto,Y., Miyata,K., Namekawa,H., Mabuchi,K., Sakai,T., Shimahashi,H., Kawai,K., Yoden,H., Koyama,S., Odgaard Herr,S., Natsuka,S., Yamaguchi,T., Kawasaki,N	Determination of Galactosamine Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography.	<i>Biologicals</i>			印刷中
Yamaguchi T Kanayasu-Toyoda T Uchida E	Angiogenic cell therapy for severe ischemic diseases	<i>Chem.Pharm. Bull.</i>	36	176-181	2013
内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐 精一, 宮原美知子, 佐々 木裕子, 小原有弘, 大谷 梓, 松山晃文, 大倉華 雪, 山口照英	細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究	<i>医薬品医療機器 レギュラトリーサイ エンス</i>			印刷中
Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, Fukui K.	Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity	<i>J. Biosci Bioeng.</i>	115 (19)	104-110	2013
Baylis,SA,Blumel,J, Mizusawa,S, Matsubayashi,K, Sakata,H, Okada,Y, Nubling,CM, Hanschmann,KM, HEV collaborative Study Group	World Health Organization International Standard to harmonize Assays for detection of hepatitis E Virus RNA	<i>Emerg.Infect.Dis.</i>	19(5)	729-735	2013
岡田 義昭	輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発	<i>検査と技術</i>	42	4-7	2014



Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity

Elena Krayukhina,¹ Susumu Uchiyama,¹ Kiyoko Nojima,² Yoshiaki Okada,² Isao Hamaguchi,² and Kiichi Fukui^{1,*}

Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan¹ and Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen Musashi-Murayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan²

Received 27 June 2012; accepted 31 July 2012
Available online 24 August 2012

In the pharmaceutical industry, analysis of soluble aggregates in pharmaceutical formulations is most commonly performed using size-exclusion chromatography (SEC). However, owing to concerns that aggregates can be overlooked by SEC analysis, it has been suggested that its results should be confirmed with orthogonal methods. One of the main alternative methods for SEC is analytical ultracentrifugation sedimentation velocity (AUC-SV), which has been indicated as an important tool for the measurement of protein aggregation. The present study aimed to show that AUC-SV can be effectively applied for the characterization of marketed immunoglobulin pharmaceutical preparations to support the results obtained by SEC. In addition, the present research aimed to assess the appropriateness of two integration approaches for the quantitative analysis of the SEC results. Thus, the aggregates were measured in seven different preparations of human immunoglobulins by AUC-SV and SEC, and the acquired chromatographic data were processed by using either the vertical drop method or the Gaussian skim approach, implemented in the Empower II chromatography data software (Waters, Tokyo, Japan). The results of aggregation measurements performed using AUC-SV were in good agreement with those obtained using SEC. As expected, the Gaussian skim integration approach inherently provided lower estimates of aggregation content than the results of the vertical drop method. The finding of this study confirmed the complementary nature of AUC-SV to SEC for aggregate composition analysis and underscored the important role that the different integration methods can play in the quantitative interpretation of chromatographic results.

© 2012, The Society for Biotechnology, Japan. All rights reserved.

[Key words: Immunoglobulin; Size-exclusion chromatography; Vertical drop method; Gaussian skim; Analytical ultracentrifugation sedimentation velocity]

Antibody aggregation is a common problem in the pharmaceutical industry, encountered during the manufacturing process and long-term storage of antibody products. It was suggested that the presence of antibody aggregates in a therapeutic product can affect drug efficacy or may even cause immunogenic reactions when administered to patients (1). To ensure that the bio-therapeutic product is consistent with quality standards and meets all regulatory requirements, an accurate measurement of aggregation content is necessary.

Size-exclusion chromatography (SEC) is currently employed for the quantification of soluble antibody aggregates as a quality control method. SEC separates molecules based on their hydrodynamic volume, provides highly reproducible results, is easy to perform, and is a relatively fast technique for the characterization of pharmaceutical formulations. The elution profiles generated by SEC are analyzed, and the fractional amount of each solute detected in

the sample is estimated from the area under the peak, which is calculated using chromatographic software. In general, the area under unresolved peaks is determined by the vertical drop method. This method involves the addition of a vertical line from the valley between the peaks to the horizontal baseline. However, the perpendicular separation of overlapping peaks has previously been shown to introduce significant errors in peak area estimation (2–4). Alternative approaches implemented in chromatographic data analysis packages allow more sophisticated approaches for the identification of unresolved peaks, such as the Gaussian skim method implemented in the Empower II software. This algorithm fits the shapes of the peaks observed in the chromatogram using a Gaussian profile and is assumed to better represent the shape of the parent peak in the overlapping peaks group. Nevertheless, the vertical drop method remains the most commonly applied approach for the integration of chromatographic peaks (5). Another problem with SEC is related to a nonspecific binding of protein aggregates to the column matrix, as recently discussed (6).

The above-mentioned issues potentially affect the accuracy of SEC measurements. Thus, it has been suggested that the results of

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 7440; fax: +81 6 6879 7442.
E-mail address: kfukui@bio.eng.osaka-u.ac.jp (K. Fukui).

the SEC method should be verified using different analytical techniques (7). Among alternatives to SEC method, analytical ultracentrifugation sedimentation velocity (AUC-SV) was found to be very suitable for this purpose (8).

The improvements in AUC instrumentation and data analysis packages have promoted an increase in the number of potential applications of AUC-SV (9–12). Particularly, it has been indicated as a valuable tool for monitoring antibody aggregation (8,13–16). Nevertheless, owing to the lower degree of reproducibility of AUC-SV results compared with SEC results, the implementation of AUC-SV to a routine characterization of pharmaceutical antibodies has not been successful until now. In the recent study presenting the summary opinion of the members of the protein characterization subcommittee of the European Immunogenicity Platform, it has been suggested that throughout the pharmaceutical development process, AUC should not be used for validation of SEC results but rather should be used as a complementary method for SEC (17).

The purpose of this study was to demonstrate that AUC-SV can very effectively be used for the characterization of marketed immunoglobulin preparations and to confirm the performance of SEC. Over the years, a number of studies have been performed using AUC-SV and SEC, as applied to custom monoclonal antibody formulations (13,14). In contrast, the present research was conducted using a wide range of available marketed products, consisting of four liquid formulations and three lyophilized formulations of pharmaceutical human immunoglobulin preparations. Based on the previous studies (18–20) and our own results (21), experimental and data analysis procedures for precise aggregation content measurement in immunoglobulin formulations using AUC-SV were developed. Following the established protocol, we confirmed that AUC-SV can very effectively be used to characterize marketed pharmaceutical products. To address the uncertainty that can result from application of different methods for chromatographic peak identification, we applied the vertical drop method and the Gaussian skim approach, implemented in the Empower II software to analyze SEC data. Although integration of chromatographic peaks using the vertical drop method consistently indicated a slightly greater amount of aggregates compared with the value estimated by using the Gaussian skim algorithm, we achieved good overall agreement between AUC-SV and SEC results.

MATERIALS AND METHODS

Human immunoglobulin preparations In the present study, four liquid and three lyophilized preparations of human immunoglobulins were used. Polyglobin-N 5% for intravenous injection (0.5 g/10 ml), a pH 4-treated acidic human normal immunoglobulin, was purchased from the Japanese Red Cross Society (Tokyo, Japan). Venoglobulin IH 5% for intravenous injection (0.5 g/10 ml), a polyethylene glycol-treated human normal immunoglobulin; Hebsbulin IH for intravenous injection (1000 units), a polyethylene glycol-treated human anti-HBs immunoglobulin; and Tetanobulin IH for intravenous injection (250 units), a polyethylene glycol-treated human tetanus immunoglobulin, were purchased from Benesis Corporation (Osaka, Japan). Glovenin-I for intravenous injection (500 mg), a freeze-dried polyethylene glycol-treated human normal immunoglobulin G, was purchased from Nihon Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Gammagard for intravenous injection (2.5 g), a freeze-dried ion-exchange resin-treated human normal immunoglobulin, was purchased from Baxter Limited (Tokyo, Japan). Sanglorpor for intravenous infusion (2.5 g), a freeze-dried pH 4-treated human immunoglobulin, was purchased from CSL Behring (Tokyo, Japan). For all lyophilized products, the immunoglobulin concentration in the reconstituted formulation was 50 mg/ml.

Size-exclusion chromatography SEC analysis was performed in triplicate using a high-performance liquid chromatography (HPLC) workstation (Alliance 1100 HPLC system) with a TSK gel G3000SW_{XL} column (Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan) under standard conditions. The separation was conducted at a flow rate of 0.5 ml/min at room temperature and was monitored by UV detection at 280 nm. The elution buffer consisted of 1 mM potassium phosphate, 3 mM sodium phosphate, and 155 mM sodium chloride at pH 7.4. A minimum reproducible volume of 5 μ l of antibodies at formulation concentrations was injected into the HPLC system for analysis. This prevented excessive antibody dilution, as SEC itself is known to produce a high dilution of the sample that will tend to dissociate the reversible

aggregates (22). An antibody mass recovery of 94% and higher was confirmed for all studied samples and was in agreement with the values from previous studies (14,23). Chromatographic data were processed by the Empower II chromatography data software (Waters, Tokyo, Japan) using the ApexTrack integration algorithm combined with either the vertical drop method or the Gaussian skim method. The integration parameters were set at default, and Detect Shoulders event was enabled. To estimate the fractional amount of each peak, the calculated peak area was divided by the total area that was obtained by summation of the areas of the peaks, including the solvent peak, where it was present.

Analytical ultracentrifugation sedimentation velocity AUC-SV analysis was performed according to the experimental routine especially designed for the present study. It addresses specific requirements to conduct the measurement of aggregation content in immunoglobulin preparations in a very precise manner. Thus, the sedimentation experiments were conducted in a ProteomeLab XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) equipped with a 4-hole An60 Ti rotor. Beckman Coulter 12-mm double-sector charcoal-filled epon centerpieces manufactured after July 2008, when an improved manufacturing process was implemented by Beckman Coulter (19), and quartz windows were used for the experiments. The cells filled with 430 μ l of the prepared samples were placed in the rotor and thoroughly equilibrated at 20°C and 0 rpm for approximately 1 h before beginning data acquisition. Data were recorded at 40,000 rpm and 20°C using absorbance optics at 280 nm. The scanning was performed as quickly as possible between radial positions 5.9 and 7.2 cm, with a step size of 30 μ m until the sample was completely sedimented.

AUC-SV analysis of the selected preparations was complicated by the non-ideality of the formulations, containing high concentrations of excipients such as sugars and sugar alcohols. Therefore, the antibody formulations were diluted to the concentration of approximately 0.5 mg/ml using buffer consisting of 1 mM potassium phosphate, 3 mM sodium phosphate, and 155 mM sodium chloride at pH 7.4. The antibody samples were prepared immediately before the AUC-SV measurement. In this way, any potential decrease in the amount of aggregates due to reversible dissociation was minimized. AUC-SV runs were performed in triplicate, with three data sets collected in each run. The same combination of rotor hole position, cell housing, windows, and centerpiece was used for all consecutive runs, as recommended previously (19). This practice helped us to identify the micro-deformation of the centerpiece systematically affecting the quality of the data acquired for the cell placed in rotor hole 3. Therefore, these data were excluded from further analysis.

The SEC analysis of the reconstituted lyophilized preparations of immunoglobulins indicated relatively slow time-dependent change in the distribution of monomeric/dimeric forms of antibody, which was negligible compared with the time of the first sedimentation experiment, performed immediately after reconstitution. However, as the time interval between the reconstitution and the beginning of the second and third experiments was longer, the distribution was significantly affected. Thus, the results of the AUC-SV analysis are presented as the mean values of six measurements performed in three independent runs for the liquid formulations and as the mean values of two measurements performed in one run for the freeze-dried formulations.

The data were analyzed using the C(s) method of SEDFIT ((24); <http://www.analyticalultracentrifugation.com>). For the analysis, the meniscus was set to the midpoint position of the absorbance spike corresponding to the air-sample boundary and was floated during the fit. It was confirmed that the fitted meniscus position was physically relevant and was still located in the vicinity of the maximum of absorbance spike. The sedimentation coefficient (s) range was chosen so that no partial peaks were presented at the edges of the s-range and was 1–15 S, 1–20 S, 1–25 S, or 1–30 S, respectively. A grid resolution was selected in a way that resolution of s values corresponded to 0.05 S. The frictional ratio was initialized at 1.4 and floated during the fitting procedure. A regularization level of 0.68 was used. The buffer density and viscosity were calculated using the SEDNTERP software and were 1.00516 g/ml and 1.0175 cP, respectively. The partial specific volume was kept at the SEDFIT default value of 0.73 cm³/g, which in general provides a good estimate of the partial specific volume of proteins. The actual values could not be estimated owing to the polyclonal nature of the studied antibody formulations. The goodness of the obtained fits was evaluated by comparing the rmsd values of the resulting fits with the values obtained for the empty cells before the experiments. In this way, it was verified that all the fits had only a randomly distributed noise and that no systematic errors were introduced during the fitting routine. In addition, it was confirmed that no visible diagonal lines were present on the residuals bitmap. To estimate the relative abundance of the different species present in the samples, integration of the C(s) distributions was performed. The percentages of antibody monomers, oligomers, fragments, and albumin were calculated by dividing the corresponding peak area by the sum of the areas under all peaks.

RESULTS

Experimental routine for AUC-SV analysis of immunoglobulin preparations The development of an experimental routine for AUC-SV analysis of immunoglobulin preparations

followed two main phases: a systematic review of the available literature on the subject and testing of a theoretically designed protocol. First, based on the previous studies (18–20), a set of experimental parameters regarding rotor and cell components, sample concentration used for the analysis, optics applied for the detection, and software package for the data analysis were chosen. At the next step, the optimum rotational speed from the recommended range of 40,000–60,000 rpm was selected for AUC-SV analysis. Our previous study has shown that the hydrodynamic parameters of antibodies are affected by high rotational speed during sedimentation experiments, whereas the amount of dimeric antibody aggregate remained unaffected by the rotational speed (21). Thus, we excluded rotational speeds faster than 50,000 rpm from consideration, assuming that these high speeds can contribute to the imprecision of aggregation analysis. High-quality centerpieces, which have previously been shown to improve the precision of aggregates measurements, were Beckman Coulter charcoal-filled epon centerpieces. The Beckman Coulter Buyer's Guide recommends using the epon charcoal-filled centerpieces at speeds slower than 42,000 rpm. Finally, the possible presence of fast-sedimenting high-molecular weight aggregates was considered; thus a rotational speed of 40,000 rpm was selected for the AUC-SV experimental setup.

Aggregation analysis of liquid human immunoglobulin preparations The SEC chromatogram of Polyglobin (Fig. 1A) showed a major peak corresponding to the monomeric form of the antibody. The asymmetry of the monomer peak was attributed to the nonspecific binding of the highly concentrated antibody to the SEC column packing material (6), which is a common problem in protein chromatography. A shoulder peak eluted before the major peak suggested the presence of a dimeric component in the solution. When either integration algorithm was applied for the data analysis, the area under the dimeric peak was estimated to be approximately 0.8% of the total signal (Table 1). This estimate was lower compared with that obtained by AUC-SV analysis. In *C(s)* distribution (Fig. 1B), in addition to monomeric and dimeric peaks, minor peaks corresponding to antibody fragments and trimeric aggregates were observed. Nevertheless, the results of triplicate measurements showed that these species were present at amounts below the commonly accepted limit of AUC-SV quantification of 1% (25) and therefore could not be considered to be reliably measured. In addition, the standard deviation of the obtained values indicated low reliability of these estimates.

The fraction of dimeric aggregates present in the Venoglobulin formulation was higher than that estimated for Polyglobin (Table 1). Similar to Polyglobin, the AUC-SV analysis of Venoglobulin indicated the presence of trace amounts of fragments and trimeric aggregates below the accepted limit of quantification. The estimates of the total quantity of aggregates derived from AUC-SV measurements and integration of chromatogram using the Gaussian skim approach were in good agreement. The results of peak separation using the vertical drop method and the Gaussian skim approach were consistent, although the amount of dimeric aggregates calculated by the vertical drop method was slightly higher than that obtained by the Gaussian skim approach.

The results of AUC-SV and SEC obtained for Hebsbulin were in good agreement, indicating the presence of only monomeric and dimeric forms of the antibody (Fig. 1E and F). The amount of dimeric aggregates was estimated to be the highest by SEC with the vertical drop method (2.62%), followed by SEC with the Gaussian skim approach (2.54%), and AUC-SV (2.25%; Table 1).

The *C(s)* distribution of Tetanobulin showed two peaks corresponding to the monomeric and dimeric forms of the antibody (Fig. 1H). The amount of dimeric aggregates derived from the AUC-

SV analysis was lower than the value obtained using the vertical drop method for chromatographic data analysis (Table 1). The SEC analysis detected a minor peak in the chromatogram corresponding to trimer/higher aggregates, which was not detected by AUC-SV (Fig. 1K). Integration of the chromatographic peaks showed that these species were present at amounts below the estimated limit of AUC-SV detection of 0.2% (25). Moreover, the obtained value was close to the limit of detection previously determined for SEC (TSK gel SEC Brochure – Tosoh Bioscience GmbH).

Aggregation analysis of lyophilized immunoglobulin preparations The two major peaks corresponding to the monomeric and dimeric forms of the antibody were detected by SEC and AUC-SV analyses of the Glovenin formulation. In the chromatogram (Fig. 1I), these peaks co-eluted and were baseline-unresolved. From integration of the chromatogram by using the vertical drop method, the amount of dimeric aggregates was estimated to be 1.18% higher compared with the estimate produced by the Gaussian skim integration algorithm and 1.39% higher compared with the estimate determined by the *C(s)* analysis of the AUC-SV data.

The chromatographic profile obtained for Gammagard indicated the presence of four major peaks corresponding to solvent, monomeric, dimeric, and trimeric forms of the antibody. The AUC-SV analysis also detected albumin and trace amounts of high-molecular weight aggregates. The amount of dimeric aggregates estimated by the vertical drop method of SEC chromatogram was significantly higher compared with that calculated using the Gaussian skim algorithm. However, the Gaussian skim algorithm failed to accurately resolve a minor peak corresponding to solvent preventing accurate quantification of the monomeric form of the antibody (Table 1).

There was a significant difference between the AUC-SV and SEC results obtained for Sanglopor independent of the integration approach applied to the SEC data analysis. Similar to other immunoglobulin preparations, the dimeric aggregates amount determined by the Gaussian skim algorithm was lower than that obtained by the vertical drop method. It is interesting that the amount of dimeric aggregates estimated by AUC-SV was lower than that calculated using the vertical drop method but was higher than that resulting from integration using the Gaussian skim approach. The AUC-SV analysis revealed the presence of two antibody fragments and trace amounts of high-molecular weight aggregates, which were not detected in the elution profile.

DISCUSSION

In the present study, the aggregate compositions of different preparations of human immunoglobulins were analyzed using AUC-SV and SEC with the vertical drop method and the Gaussian skim approach. Although AUC-SV and SEC degrees of precision differed, these two analytical techniques provided similar results in the quantification of aggregates confirming the complementary relationship between AUC-SV and SEC. As has been discussed (6,14,16,17), both SEC and AUC-SV methods can be used to quantify the aggregates in the pharmaceutical formulations. Due to its simplicity, speed, and reproducibility of obtained results, SEC is routinely used as a quality control method to evaluate the aggregation of pharmaceuticals. In contrast to SEC, AUC-SV does not conform to the requirements specified for the quality control methods because of the relatively low precision and repeatability. However, AUC-SV offers a significant advantage over SEC as it provides matrix-free separation of the solutes, and therefore, it can be performed to ensure that the sample's composition has not changed owing to interaction with the column packing material. In addition, larger soluble aggregates eluted in the void volume of the SEC column can be detected and characterized by AUC-SV (14).