

増加した。希釈系列を分析した時の回帰直線の決定係数は0.995以上と直線性については同等な結果が得られた。

C.1.2.3 苛酷試験試料における不溶性微粒子数

抗体溶液製剤を40°C保管したとき、25µm以上の微粒子数は10個/容器以内、10µm以上の微粒子数は250個/容器以内、5µm以上の微粒子数は700個/容器以内、2µm以上の微粒子数は4000個/容器以内で、経時的な変動は認められなかった(図3)。別途、SECにて可溶性の会合体含量(%)を測定したところ経時的な増加が認められ、4週間後では3倍の会合体含量となった(図4)。

C.1.3 バイオ医薬品品質試験のシステム適合性

バイオ医薬品の品質試験におけるシステム適合性設定の課題を明らかにし、バイオ医薬品の品質試験に適したシステム適合性設定の考え方を明らかにすることを目的に、HPLC(ペプチドマッピング、糖鎖プロファイル、SEC、RP)、CE(等電点、SDS)、SDS-PAGE、ELISAに関して、システム適合性試験の設定事例に関するアンケート調査を実施した。現在、意見を集約中である。今後、参加企業との議論を経て、システム適合性の要件を明らかにする。

C.2 新規宿主細胞

わが国で開発された新たな生産用基材であるTgカイコを用いて製造されるバイオ医薬品の品質安全性評価・管理手法の確立のため、HCP(宿主細胞由来タンパク質=カイコ繭由来タンパク質)評価系の構築、及び、Tgバンク作製技術の開発を行った。

C.2.1 抗カイコ繭由来タンパク質測定系の構築

カイコ繭タンパク質に対する抗体を作製し、特異性の評価を行ったところ、抗血清は、BSAにはほとんど反応しなかったが、繭タンパク質には強く反応し、特異抗体が産生されていることが確認された。抗繭由来タンパク質IgGを用いて、繭由来タンパク質のウェスタンブロットを行った(図5)。200kDa前後に検出される最もメジャーな繭タンパク質で

あるセリシンに加え、広い分子量範囲でマイナーな繭タンパク質が検出された(図5パネル右)。

カイコ繭由来タンパク質を検出するサンドイッチELISAを構築し、感度および直線性ともに良好な結果が得られることを確認した。同時再現性試験および測定間再現性試験を行ったところ、C.V.値は、いずれも10%程度以内であった。また、検出限界は0.16ng/mLと算出された。

Tgカイコ繭から組換えタンパク質を抽出する工程で得られた溶液(抽出液、工程1、工程2)をサンプルとして用いて、残留HCP濃度を測定した(表8)。結果は、それぞれのサンプルをSDS-PAGEにより推定した場合の残存HCP量と良く一致しており、作製したELISAが残存HCPを定量するために有用であると考えられた。

C.2.2 Tgカイコを用いるバイオ医薬品製造の工程管理手法の開発

Tgバンクの作製・管理手法の開発のため、ニュートラルレッドを含む人工飼料の利用により卵巣を染色し、組織の識別を簡易化する方法による卵巣採取の効率化を図った。また、卵巣に隣接する組織である紐体と共に卵巣を採取し、再移植の際にレシピエントの紐体と絡めることで、移植後の産卵効率の向上を図った。これらの改良の結果、Tgカイコの凍結・融解卵巣をレシピエントの輸卵管に絡ませた移植、及び、凍結・融解精液の人工受精との組合せでは、受精卵産卵成功率が30%を超えるレベルに達した。組織採取・凍結・再移植の手法について、さらに改良を行うと共に、今年度からは大型液体窒素タンクを用いたTgバンクの本格的な運用試験を開始した(図6)。

個体選別法としては、卵や幼虫の全身で恒常的に強く発現するプロモーターと蛍光タンパク質を組み合わせた新たな組換えマーカーが本年度に開発され(Tsubota et al, G3, 4:1347-1357, 2014)、卵でも早期選抜可能な、有用な組換えマーカーであることが示された(図7)。

C.3 血中薬物濃度分析

高分子薬物の血中濃度測定において、LCMSを用いた選択反応モニタリング (SRM) 測定法は、リガンド結合法による測定を補完する手法として注目されている。一方、LCMSによる分析は、マトリックス等の影響により分析が困難なことがあり、測定方法の最適化が課題となっている。また、既存分析法バリデーションのガイドライン*を適用することが難しい場合があることも指摘されている。

そこで本年度は、抗体医薬品を添加したマウス血清を試料として、多機関共同研究により、測定方法の最適化を検討するとともに、既存ガイドライン*に従いバリデーションを行い、同ガイドライン**の基準の適用の可否を検討した。また、内標準物質として、安定同位体標識 Fab の作製を開始した。

* 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」 薬食審査発 0711 第 1 号 H25 年 7 月 11 日 (LC ガイドライン)

** 「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法 (リガンド結合法) のバリデーションに関するガイドライン」 薬食審査発 0401 第 1 号 H26 年 4 月 1 日 (LBA ガイドライン)

C.3.1 各機関により採用された前処理条件概要

- ①タンパク質精製：7機関中6機関で、有機溶媒を用いた沈殿法が採用された。6機関中5機関がメタノール沈殿を、1機関がアセトン沈殿法を採用した。
- ②還元/アルキル化操作：酵素消化前に、2機関が還元アルキル化を行った。また、1機関は DTT による還元操作のみ行った。
- ③トリプシン消化条件：トリプシン溶液の濃度は 1~20 mg/mL、消化温度は 37°C または 60°C、消化時間は 1~20 時間であった。
- ④ペプチド精製方法：酵素消化後に、固相抽出によるペプチド精製を行った機関は 4 機関であった。2 機関は固相抽出のみ、1 機関はフィルター処理のみ、残りの 1 機関については固相抽出及びフィルター処理を併用した。

各機関により検討された測定方法の概要を表 9 にまとめた。

C.3.2 分析法バリデーション

5 機関で実施したバリデーション結果を表 10 に

示す。結果の概要は、以下のとおりであった。

- ①選択性：機関 B において、一個体で SIL-IS の妨害ピークが確認されたことを除き、analyte 及び SIL-IS の妨害ピークは検出されなかった。
- ②検量線、及び定量限界 (LLOQ)：いずれの機関も相関係数は 0.9946~0.9987 の範囲であり、直線性は良好であった。検量線用標準試料の各濃度の真度は、3 機関では $\pm 15\%$ 以内であったが、2 機関で $\pm 15\%$ を超える濃度点がみられ、そのうち 1 機関は、20% 以上となる濃度点が確認された。選択性、真度及び精度等に基づいて定められた LLOQ は、0.5~3.9 $\mu\text{g/mL}$ の範囲であった。
- ③真度及び精度：QC 試料の分析により評価した。各濃度における平均真度は、2 機関で $\pm 15\%$ 以内と良好であったが、3 機関で $\pm 15\%$ 以上となる濃度点が確認され、そのうち 2 機関では $\pm 20\%$ 以上となる濃度点がみられた。一方、平均精度は、全ての機関が 15% 以下 (LLOQ, 20 以下) であり良好であった。
- ④マトリックス効果：個体間の精度は、3 機関で 15% 以下であったが、2 機関については 15% 以上となる濃度点がみられた (1 機関は 20% 以上)。
- ⑤キャリーオーバー、希釈の妥当性、及び安定性：キャリーオーバーは、5 機関中 4 機関は良好であった。また、希釈妥当性及び安定性については、試験を実施した全ての機関で、良好な結果が得られた。

C.3.3 SIL-Fab 発現系の作製

作製した Fab 発現株を ^{15}N 標識硫酸アンモニウム、及び L-メチオニンを含有した培地を用いて培養した後、培養上清の SDS-PAGE を行った結果、H 鎖及び L 鎖より構成されたヘテロダイマーの Fab を確認することができた。

C.4. 抗薬物抗体分析

C.4.1 Drug tolerance 改善法の開発と標準化

抗薬物抗体 (ADA) は、infusion reaction 等の有害反応や有効性低下につながることから、バイオ医薬品の安全性を阻害する要因の一つとなり得る。ADA の測定では、投与後の薬物が血清試料中に残存し、ADA 検出を妨害することが問題となっている。

Drug tolerance 改善のための分析法を開発し、Drug tolerance 改善法の測定プラットフォーム間での有用性の比較を行うために、4 機関による共同研究を行なった。4 機関で使用された分析法は、機関 A は、LOCI 法、それ以外の機関は ECL 法である。Drug tolerance は、共存薬物存在下での ADA 測定により、仮カットポイント (CP) を用いた Drug tolerance limit (DTL) を評価した。

Drug tolerance 改善法として、全機関で酸解離法 (試料に酸を加え、ADA-薬物結合体を分離後、中和し、ADA を測定する方法) が検討された。機関 D ではさらに、酸による ADA の変性・失活の可能性を懸念して、酸解離を行わず、標識薬物濃度、インキュベーション時間と温度の 3 条件を最適化することにより、共存薬物と標識薬物の置換を促す方法 (平衡移動) による Drug tolerance 改善が試みられた (表 11)。

各機関で最適化した条件で分析した結果の代表例として、B-mAb 共存下で抗 B-mAb 抗体を測定した結果を表 12 に示す。表 12 の測定値は、duplicate または triplicate での平均値で、網掛けした数値が、仮 CP から陽性と判断された数値である。

抗 B-mAb 抗体は、酸解離により、すべての ADA 濃度で Drug tolerance が改善した (機関 A~D)。また機関 D では、標識薬物濃度を 2 倍にし、標識薬物とのインキュベーション時間を 2hr から 48hr に延長かつインキュベーション温度を室温から 37°C に変更することによって、Drug tolerance が改善した。両法とも ADA 濃度が低いほうが、改善効果が大きかった。

各機関の測定値を GraphPad Prism 5J を用いて、4パラメータロジスティック回帰し、得られた曲線に仮 CP を内挿して Drug tolerance limit (DTL) を算出し、改善法あり/改善法なしの DTL 比を算出した結果を表 13 に示した。シグナルが仮 CP を下回らない等の理由で、DTL が算出できないものについては、改善効果をグラフから判断した。表 13 には、機関 A, B で検討された個別試料の結果も併せて示した。

ほとんどのモデル ADA で Drug tolerance 改善効果

を得ることが確認できたが、3 機関で測定を実施した抗 EPO 抗体 BM802 については、機関 A では酸解離により、レスポンスが低下し、Drug tolerance も改善されなかった。機関 D では、酸解離法でも平衡移動法 (標識薬物とのインキュベーション時間を 2hr から 48hr に延長かつインキュベーション温度を室温から 37°C に変更) でも改善がみられなかった。機関 B では、わずかに改善されたが、ADA の特性によっては、今回設定された条件においても、十分な Drug tolerance 改善効果が得られない場合があると考えられた。

C.4.2 抗 EPO 抗体国際標準品の共同検定

WHO より配布された抗 EPO ヒトモノクローナル抗体 10 種について、SPR 法、及び、LOCI 法で、カットポイントをまたぐ希釈倍率を測定した。カットポイントは、50 検体の個別血清の測定値から 5% 偽陽性を許容するレベルとして設定した。

C.5 臨床安全性

抗体医薬品の有害事象のうち、infusion reaction、心不全、及び、穿孔についてリスク因子を検討するため、初回発現時期の解析や年齢・性別・適用理由等に関する粗オッズ比の計算を行った。

初回発現時期や粗オッズ比の計算から、インフリキシマブでは 30 代または乾癬、セツキシマブ及びリツキシマブでは 60 代以上、トラスツズマブでは男性または胃癌、トシリズマブでは 10 代以下が infusion reaction のリスク因子である可能性が示唆された (表 14 および表 15)。なお、セツキシマブ・インフリキシマブ及びリツキシマブの infusion reaction 報告症例における抗ヒスタミン剤の併用割合は、全有害事象報告症例で見た時よりも高かった (表 16)。その他、トラスツズマブ及びベバシズマブでは女性または乳癌、トシリズマブ及びエタネルセプトでは 60 代以上、インフリキシマブではベッチェット症候群が心不全のリスク因子である可能性が示唆され、ベバシズマブでは遠隔転移を伴う結腸癌・直腸癌、インフリキシマブでは男性またはクローン病、リツキシマブでは 60 代以上またはびま

ん性大細胞型リンパ腫が穿孔のリスク因子である可能性も示唆された。(表 15)

C.6. ウイルス安全性

C.6.1 CHO 細胞内在性レトロウイルス様粒子の解析

バイオ医薬品製造に頻用されている CHO 細胞では、非感染性内在性レトロウイルス様粒子が産生されていることが知られている。CHO 細胞ゲノムには数百に上る内在性ウイルスゲノムが散在するため、ウイルス様粒子をコードしている遺伝子を特定することは未だにできておらず、簡便なウイルス粒子数の測定系もない。そこで、CHO 細胞ゲノムデータ等を使って CHO 細胞から産生されるウイルス様粒子をコードしている内在性レトロウイルス遺伝子を特定することにした。

チャイニーズハムスターの転写産物のデータベースをダウンロードし、感染複製能力のあるレトロウイルスの Gag タンパク質を保持している遺伝子を検索した。その中から ORF が残っている可能性のある gag 遺伝子を絞り込んだ。このうち gag ORF の全長を保持している遺伝子は 4 つ見つかったが、gag 遺伝子全長に渡って発現が見られたのは ChERV-050801 (図 8) のみであった。また従来まで CHO 細胞でウイルス様粒子産生に関係していると考えられてきた CHIAP34 や MG-2L は、全く発現していなかった。(図 8)。

さらにこれを確認するために、CHO 細胞上清からウイルス様粒子を超速心によって濃縮し、ショ糖密度勾配超速心法でウイルス様粒子を精製したところ ChERV-50801 のみが検出された (図 9A)。またウェスタンブロット解析によって Gag タンパク質解析したところ細胞外に放出されたウイルス粒子はウイルス自身の Pro (プロテアーゼ) によって切断されていなかった (図 9)。

C.6.2 Q-PCR によるウイルスクリアランス試験

ウイルスクリアランス試験に Q-PCR を用いる場合、ウイルスゲノム断片の残存等が原因となり、感染価と Q-PCR によるウイルスゲノム量の相関性が

得られない場合がある。そこで、生体由来材料に混入リスクが報告されているヒトパルボウイルス B19 (B19) を材料に、ウイルス除去膜の工程処理前後における感染価及び Q-PCR によるゲノム量の変化を解析し、工程のウイルス除去率評価に応用可能な Q-PCR の条件について課題と対応策を明らかにした。

ビリオン (ウイルス粒子) を試料とした場合、50 U/mL の DNase I 及び 10 U/mL の Micrococcal Nuclease 処理でややゲノムの減少傾向が認められたが、その他の条件ではゲノム濃度の低下は認められなかった (図 10)。一方、遊離ゲノムを試料とした場合、Nuclease の濃度及び反応時間依存的にゲノム濃度の低下が認められた。そこでビリオン中ゲノムが減少せず、遊離ゲノムが検出限界未満となる条件の内、反応時間が最短であった Micrococcal Nuclease 2 U/mL、30 分の反応をサンプル処理条件として設定した。

ウイルス除去ろ過膜処理前後の試料について、感染価を評価したところ、分取したろ過後液はいずれも検出限界未満となったが、Log Reduction Value (LRV) は、2 回の run で ≥ 2.20 , ≥ 2.00 といずれも低かった。また、対照となるろ過前サンプルを 24°C 又は 5°C で静置したサンプルでも感染価の低下が認められたことから、得られた LRV がウイルスの除去によるものか、不活化によるものかの判別は困難であった。

一方、988 bp Q-PCR による測定では、Nuclease⁻では LRV が 2.04~2.56 であったのに対して、Nuclease⁺ではろ過前サンプルの値は殆ど低下せず、ろ過後サンプルでは大きく低下し検出限界未満となり、LRV 値は ≥ 5.03 (Run1), ≥ 5.26 (Run2) となった (表 17)。988 bp Q-PCR では Nuclease⁻, +ともに対照となるろ過前サンプルの値の低下は認められなかった。

D. 考察

D.1. 品質

D.1.1 O-結合型糖鎖試験法の開発と標準化

O-結合型糖鎖の解析において、適切な遊離方法が

ないことが、大きな課題となっている。近年、ピーリング反応を抑制した O-結合型糖鎖遊離法についていくつか報告がなされている。アルカリとしてアンモニアを用いて糖鎖の還元末端をグリコシルアミンとしておく方法、EDTA 処理や TFA 処理などによりカチオンを除去する方法、遊離と同時に PMP 誘導体化する方法などである。そこで、O-結合型糖鎖の標準的な糖鎖試験法を作成すべく、モデル試料を用いて分析方法の最適化を行ったところ、アルカリとしてカルバミン酸アンモニウムを用いた方法で、良好にピーリング反応を抑えることができた。その他の方法に関しては更なる検討が必要であるとともに、ピーリング反応などの副生成物をどの様に扱うのかについて議論が必要である。

なお、ピーリング反応による分解が生じていても、ペプチドマップ法と組み合わせることで、確度の高い糖鎖の付加部位、及び構造の推定が可能であった。

D.1.2 凝集体評価法の開発と標準化

D.1.2.1 凝集体評価法の分析能の比較

光遮蔽法 (LO) は、注射剤の不溶性異物試験において、粒子径 10 μm 以上の微粒子の評価に使用されている。本研究により、10 μm だけでなく 5 μm のポリスチレン粒子も感度良く測定できることが確認された。2 μm の粒子については、今回の試料が本分析には粒子数が多すぎたため、より低濃度での検討が必要である。

フローイメージング法 (FI) では、10、5 及び 2 μm の粒子について感度よく、また、広い濃度範囲で測定が可能であった。1 μm のシリカ粒子では、計数率が低く、適切な評価ができないことが確認された。

レーザー回折法 (LD) では、2 μm 以上の粒子では LO 及び FI と比べて著しく感度が低く、この粒子径の粒子は、粒子を個数として計測する手法がよいと考えられた。1 μm のシリカ粒子については、今回検討した 3 つの定量法のなかで唯一良好な測定結果が得られた。500 及び 900 nm の粒子では、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で定量することができ、この範囲の粒子の定量法の一つとして有用であることが確認された。

動的光散乱法 (DLS) では、60 nm から 500 nm の粒子について、感度良く (0.25~0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度) 粒子を検出でき、20%以内の誤差で粒子径を得ることができた。粒子径の大きな粒子については、得られる粒子径の変動が大きいことに注意が必要である。タンパク質製剤中の凝集体の評価、品質試験にどの様に利用できるかについては今後検討が必要である。

ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) 及び共振式質量測定法 (RMM) については、新しい分析法でありデータが少ないことから、バイオ医薬品凝集体分析法としての特徴を明らかにすることが、今後の課題である。

D.1.2.2 不溶性微粒子試験低容量化の検討

注射剤の不溶性微粒子試験法として、光遮蔽粒子計測法 (LO) は国際調和された試験法である。現在 25 mL 以下の注射剤においては、10 本以上の内容物を集めて試験することとなっている。USP において、2014 年 8 月に<787> Subvisible Particulate Matter in Protein Injections が制定され、タンパク質の注射剤において、低容量 (0.2 mL 以上) での LO 測定が認められ、容器毎に評価できるようになった。低容量での試験が可能となるならば、必要な試料量の削減だけでなく、容器毎の評価となるため、不適切な検体をより検出しやすくなるかもしれない。

今回の検討結果では、低容量化した分析においても、良好な直線性が確認できた。測定精度の若干の低下が認められたものの、それほど大きくはなく (相対標準偏差で 2 倍程度)、また、測定条件を低容量測定に適したものとすることで改善される可能性がある。今後、精度についてより多くのデータを集めるとともに、実試料のばらつきについてもデータを収集する予定である。また、タンパク質製剤中の凝集体は、屈折率の関係で LO では検出しにくい可能性がある点や試料の希釈の是非についても議論していく必要がある。

D.1.2.3 過酷試験試料における不溶性微粒子数

抗体溶液製剤において、不溶性微粒子数と可溶性

会合体含量の間に相関は認められなかった。一部の粒子径の評価だけでは、凝集体全体を評価はできないことが示された。

D.2 新規宿主細胞

D.2.1 抗カイク繭由来タンパク質測定系の構築

8M尿素にて抽出した繭タンパクをウサギに免疫することにより作製したポリクローナル抗体は、ウエスタンブロットによる評価により、メジャーなタンパク質であるセリシンだけでなく、マイナーな繭タンパク質群にも反応することが確認された。ただし、15kDa以下の低分子のタンパク質には反応性が見られなかったことから、この分子サイズのHCPの検出が重要になる場合には、他の方法を用いた測定系を開発する必要がある。また、組換えタンパク質の精製後に残存するHCPの検出性についても、より詳細な解析が必要であろう。

抗繭タンパク質IgGを利用して構築したサンドイッチELISAでは、0.39ng/mLから25.0ng/mLの範囲での定量性が確認された。また、検出限界は、0.16ng/mLと算出された。バイオ医薬品に残存するHCPは、通例、100ppm以下とされていることから、想定される目的タンパク質濃度の試料に残存するHCP定量に適用できると考えられた。

D.2.2 カイク繭由来タンパク質測定系の構築

Tgバンクとして、精子の凍結保存は実績があり、既に確立された技術である。しかしながら、精子(精液)の採取には、多くのオス個体数が必要であり、手間と時間を要するため、卵巣と同様に、精巣凍結保存と精巣移植によって系統復帰と自然交配が可能になることが望ましい。凍結した精巣移植に関しても、卵巣移植と同様にカイクで可能であることが示唆されたため、Tgバンクとして精巣の利用も検討しておく必要があると思われる。

D.3 血中薬物濃度分析

バリデーションを実施した結果、一部の機関は、既存ガイドライン(LBAガイドライン)の真度(±20%)及び精度(20%以下)の基準を満たしていた。

その他の機関では、一部のバリデーション項目が既存のガイドラインの基準を満たさなかったが、今後、さらに測定方法の最適化を進めることで、既存ガイドラインで求められる信頼性の基準を満たすことが可能になるものと思われる。

内標準物質としての使用を目的に作製したSIL-Fabは、非標識の培地にて分泌させた場合と同様の収量が得られた。非標識の培地にて分泌させた際には、物理的・化学的性質、及び免疫化学的性質に関しては正常なFab分子が分泌されていたことを確認している。

D.4 抗薬物抗体分析

全4機関で測定を行った抗B-mAb抗体については、LOCI法、ECL法ともに、設定された酸解離によりDrug toleranceを改善することができた。機関Aと機関Bの検討結果から、Drug toleranceの改善に影響すると考えられたパラメータは、酸解離の時間であり、短い方がDrug tolerance改善効果が高かった。これは、酸解離時間が長くなると、ADAが失活するためと考えられたが、40分間酸解離させた機関Dで、酸解離の効果が最大であったので、プロトコールによって、時間の影響に違いがあると考えられる。

4機関全てで、ADA濃度が低いほど改善効果が大きくなっており、ADA濃度が低く、薬物が残存することが想定される実試料において、Drug tolerance改善のための前処理が有用であると考えられた。

今回、検討した酸解離法は、抗B-mAb抗体の測定においては、LOCI法、ECL法どちらにも有用なDrug tolerance改善法であることが示唆された。また、他の抗mAb抗体で検討した結果も、ほぼ同等であり、有用性が確認できた。抗EPO抗体BM802では、改善効果がみられなかったが、抗EPOポリクローナル抗体LS-C11323の結果(機関A)で、酸解離でDrug toleranceが改善していることから、モノクローナル抗体であるBM802が特に酸に弱い特性を持っていたためと考えられる。ヒト生体内のADAの特性については、十分な知見がなく、ポリクローナル抗体であれば、一般に改善効果があるのか

は、さらに検討の余地がある。

機関Dで実施した平衡移動法は、抗BmAb抗体のDrug toleranceを大きく改善できた。酸処理によるADAの変性の可能性がある場合、酸解離法に代わる有用な方法である。ただし、長時間のインキュベーションによって、薬物非共存下でのレスポンスが低下すること、測定に時間がかかるという問題がある。

以上、今回検討した2つの分析法、2つの前処理による5測定法を比較すると、機関Dの酸解離処理を含むECL法が、Drug tolerance改善効果が最大であった。また、レスポンスも他の2機関のECL法より、かなり大きかった。プロトコルを比較すると、機関Cと機関Dの酸解離法は、酸解離時間以外は類似しているため、測定条件の詳細な比較を行って、Drug tolerance改善法の標準化を進める予定である。

D.5 臨床安全性

セツキシマブ等のinfusion reaction報告症例における抗ヒスタミン剤の併用割合が、全有害事象報告症例で見た時よりも高かったことについては、抗ヒスタミン剤の併用がリスク因子である可能性もあったが、これはむしろ、リスクの高い患者で積極的に抗ヒスタミン剤が使われていると見るのが妥当であろう。

D.6 ウイルス安全性

D.6.1 バイオ医薬品製造細胞が産生するウイルス様粒子

CHO細胞から放出されるレトロウイルス様粒子には、感染性が認められず、危険視されてはいない。しかし、レトロウイルスは極めて柔軟性に富んだウイルスであるため、例えばCHO細胞に外来性レトロウイルスが感染した場合、組換えなどによってヒト細胞に感染性をもつ新たな組換えウイルスが出現することも十分考えられる。内在性レトロウイルスの遺伝子が明らかになれば、このような潜在的な危険性を評価することができるようになる。また遺伝子が明らかになったことによって簡便なウイル

ス様粒子のコピー数の測定が定量PCRによって容易になると考えられる。

D.6.2 Q-PCRによるウイルスクリアランス試験

ウイルス粒子中ゲノムを分解せずに、遊離ゲノムのみを選択的に分解できるMicrococcal Nuclease処理条件を見出し、Q-PCRを用いたウイルス粒子数測定における遊離ゲノムやその断片の影響を最小化することができた。その結果、静置したる過前の対照試料でも試料中ウイルスの感染価の低下が認められ、感染価による評価では、ウイルス除去膜によるB19ウイルス除去率の評価が困難であった条件においても、Nuclease+条件でのQ-PCRを用いることで、全てのウイルス粒子を選択的に測定できるものと考えられた。また、本法を用いることにより、ウイルス除去膜工程のろ過後液で、検出限界未満にまでB19ゲノムが除去されたことを示すことができた。以上より、適切なプライマーを設定したQ-PCRは、Nuclease+条件でB19のウイルス除去膜での除去率を適正に評価でき、ウイルス安全性評価の面からも有用な手法であることが示された。

E. 結論

1. 品質

- (1) カルバミン酸アンモニウムを用いたアルカリβ-脱離によるO-結合型糖鎖遊離方法を最適化した。
- (2) 凝集体評価法としての利用が考えられている光遮蔽法、フローイメージング法、レーザー回折法、動的光散乱法、ナノトラッキング解析法、及び、共振型質量測定法に関して、標準粒子を用いた分析能力の比較を行い、これらの分析法を適用可能な粒子径・濃度を確認した。
- (3) タンパク質注射剤の不溶性微粒子試験の低容量化の課題として、低容量測定に適した測定条件の設定、精度に関するデータの取得、実製剤での微粒子含量に関するデータの収集が必要であることを明らかにした。また、苛酷試験試料において、不溶性微粒子数と可溶性会合体含量に相関がないことを見出した。

2. 新規宿主細胞

Tg カイコ由来バイオ医薬品の製造工程由来不純物評価法として、カイコ繭由来タンパク質測定用の ELISA を構築し、その有用性を示した。また、Tg カイコのバンク化による管理手法確立に必要な組織採取・凍結・再移植技術の開発を進めた。

3. 血中薬物濃度分析

マウス血清中の抗体医薬品を対象として、LCMS による血中濃度測定の前処理方法を最適化した。一部の機関では、既存ガイドラインの真度及び精度の基準に準拠した分析を実施可能であることが実証された。安定同位体標識 Fab を作製した。

4. 抗薬物抗体分析

LOCI法あるいはECL法を用いた抗薬物抗体分析において、共存薬物による妨害の回避のために有用な前処理方法を見出した。また、WHO が主催する抗薬物抗体国際標準品の共同検定に参加した。

5. 臨床安全性

抗体医薬品の有害反応の初回発現時期や粗オッズ比の計算から、インフリキシマブでは 30 代または乾癬、セツキシマブ及びリツキシマブでは 60 代以上が infusion reaction のリスク因子である等の可能性が示唆された。

6. ウイルス安全性

CHO 細胞の内在性レトロウイルス様粒子の遺伝子を特定した。また Q-PCR を用いたウイルス除去率の測定において、Nuclease による前処理が有用であることを見出した。

F. 健康危機情報

JADER を用いた粗オッズ比の計算等から、インフリキシマブでは 30 代または乾癬、セツキシマブ及びリツキシマブでは 60 代以上、トラスツズマブでは男性または胃癌、トシリズマブでは 10 代以下が infusion reaction のリスク因子である可能性が示唆された。

Infusion reaction 報告症例における抗ヒスタミン剤の併用割合は、全有害事象報告症例で見た時よりも高かった。

トラスツズマブ及びベバシズマブでは女性または乳癌、トシリズマブ及びエタネルセプトでは 60 代以上、インフリキシマブではベーチェット症候群が心不全のリスク因子である可能性が示唆され、ベバシズマブでは遠隔転移を伴う結腸癌・直腸癌、インフリキシマブでは男性またはクローン病、リツキシマブでは 60 代以上またはびまん性大細胞型リンパ腫が穿孔のリスク因子である可能性も示唆された。

G. 研究発表

論文発表等 (総説を含む)

- 1) 川崎ナナ：生物薬品の局方収載の現状と課題 (Current Status and Issues of Biologicals in Japanese Pharmacopoeia) .レギュラトリーサイエンス学会誌, 4(2) : 149-154(2014)
- 2) 川崎ナナ：8.バイオ後続品の品質評価の現状と課題. 医薬ジャーナル, 50(5) : 1375-1380(2014)
- 3) Hashii, N., Harazono, A., Kuribayashi, R., Takakura, D., Kawasaki, N.: Characterizations of N-glycan heterogeneities of erythropoietin products by liquid chromatography/mass spectrometry and multivariate analysis. Rapid Commun. Mass Spectrom., 28: 921-932 (2014).
- 4) Shimokawa, M., Kobayashi, K., Sekino, K., Toyoshima, S.: Analysis of perception gap on alliance activities between Japanese biotechnology venture companies and pharmaceutical companies. Regulatory Science for Medical Products, 5(1) 13-27(2015)
- 5) Gallat, F. X., Matsugaki, N., Coussens, N.P., Yagi, K.J., Boudes, M., Higashi, T., Tsuji, D., Tatano, Y., Suzuki, M., Mizohata, E., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Park, J., Song, C., Hatsui, T., Yabashi, M., Nango, E., Itoh, K., Coulibaly, F., Tobe, S., Ramaswamy, S., Stay, B., Iwata, S., Chavas, L. M. : In vivo crystallography at X-ray free-electron

lasers: the next generation of structural biology, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*, 17: 369-370 (2014).

- 6) 原園景, 石井明子, 川崎ナナ: 日本薬局方収載に向けて糖鎖試験法の解説 *Pharm. Tech. Japan*, 31(1): 81-92 (2015)
- 7) 石井明子, 川崎ナナ: 第13章第2節 バイオ医薬品(組換えタンパク質医薬品)の品質関連規制と対応の留意点. 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術, pp.523-531, 技術情報協会 東京 (2014).
- 8) 立松謙一郎: 遺伝子組換えカイコによる組換えタンパク質生産, *JATAFF ジャーナル*, 2(7): 31-37 (2014).
- 9) 瀬筒秀樹: カイコの遺伝子組換え技術の新展開, *JATAFF ジャーナル*, 2(7): 24-30 (2014).
- 10) 瀬筒秀樹, 立松謙一郎: 医療用有用タンパク質の生産を目指した組換えカイコの作製と展開, *生化学*, 86(5): 553-560 (2014).
- 11) 富田正浩: 遺伝子組換えカイコ繭でのタンパク質生産, *生物試料分析* 37, 159-168 (2014).

学会発表等

- 1) Ishi-Watabe, A., Suzuki, T., Nishimura, K., Mori, K., Yamaguchi, H., Torikai, M., Yanagihara, S., Koga, J., Watanabe, T., Hamaji, Y., Ishida, M., Miyamoto, T., Kawasaki, N.: "Design and the validity test suitable for a therapeutic antibody potency assay using ELISA", *USP 6th Bioassay Workshop*, Jun. 2-3 (2014) Rockville, USA.
- 2) Krayukhina, E., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K.: Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins. 第14回蛋白質科学会年会 (2014.6.27, 横浜).
- 3) Krayukhina, E., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K.: Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins. 2014 Workshop on Protein aggregation and immunogenicity (2014.7.16, Breckenridge).
- 4) Uchiyama, S.: Biophysical factors governing

antibody aggregation. 2014 Workshop on Protein aggregation and immunogenicity (2014.7.17, Breckenridge).

- 5) 内山進: Biophysical studies on antibody aggregation. *JAAC International Symposium* (2014.11.12, 北九州).
- 6) Totoki, S., Yamamoto, G., Uchiyama, S., Fukui, K.: Size and Quantity Measurement of Subvisible Particles by Laser Diffraction Method. 2014 Workshop on Protein aggregation and immunogenicity (2014.7.16, Breckenridge).
- 7) Takeda, S., Kuroiwa, S., Kokubo, M., Motokawa, Y., Kuwabara, N., Futahashi, M., Suzuki, T., Tatematsu, K. I., Sezutsu, H., Chikamatsu, K.: "Expression of the recombinant tumor antigen in transgenic silkworm", 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, Dec. 5 (2014) Maehashi, Japan.
- 8) 石井明子: バイオ医薬品の品質評価に関する最新動向. *JASIS 2014 日本薬局方セミナー* (2014.9.5, 東京).
- 9) 石井明子: 抗体医薬品さらなる発展への課題: 規制の観点から. 第39回日本薬学会関東支部学術講演会 (2014.12.13, 東京).
- 10) 石井明子, 原園景, 多田稔, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 川崎ナナ: カイコが創る次世代抗体医薬品. 第135回日本薬学会年会シンポジウム (2015.3.26, 神戸).
- 11) 瀬筒秀樹: 新しい昆虫産業を創る!—カイコにおける次世代ゲノム改変技術の開発と異分野融合—. H26年度日本農学会シンポジウム「ここまで進んだ! 飛躍する農学」(2014.10.6, 東京).
- 12) 瀬筒秀樹: "新蚕業"創出に向けた基盤技術の開発と今後の展開方向. 第7回公開シンポジウム「カイコ産業の未来」(2015.1.16, 東京).
- 13) 立松謙一郎, 笠嶋めぐみ, 坪田拓也, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 小林功, 内野恵郎, 飯塚哲也,

- 米村真之, 高須陽子, 田村俊樹, 瀬筒秀樹: 医薬品の開発・生産を目指した遺伝子組換えカイコの作製と高度化. 第135回日本薬学会年会シンポジウム (2015.3.26, 神戸).
- 14) 伊藤孝司, 西岡宗一郎, 小林功, 久保勇樹, 原園景, 石井明子, 川崎ナナ, 瀬筒秀樹: 組換えカイコを用いるネオグライコバイオロジクスの創製. 日本薬学会第135年会 (2015.3.26, 神戸).
- 15) 西岡宗一郎, 小林功, 原園景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: トランスジェニックカイコ由来ヒトリソーム酵素の分子特性解析と化学酵素法に基づく人工糖鎖修飾. 第55回日本生化学会中国・四国支部例会 (2014.6.6, 松山).
- 16) 西岡宗一郎, 小林功, 原園景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: 組み換えカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシンAの分子特性とエンドグリコシダーゼによる糖鎖改変. 第33回日本糖質学会年会 (2014.8.10, 名古屋).
- 17) 西岡宗一郎, 小林功, 原園景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: トランスジェニックカイコ由来ヒトリソーム酵素の分子特性解析とグライコシターゼによる糖鎖修飾 (2014.10.18, 京都).
- 18) 西岡宗一郎, 小林功, 原園景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸駿介, 東哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: 組換えカイコ由来ヒトリソーム酵素の分子特性とグライコシターゼによる *in vitro* 糖鎖修飾. 第5回グライコバイオロジクス研究会 (2014.11.1, 兵庫).
- 19) 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. 第37回分子生物学会年会 (2014.11.27, 横浜).
- 20) 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させたガン抗原の解析. 工学フォーラム2014 (2014.10.26, 東京).
- 21) 黒岩聡志, 小久保倫文, 元川揺子, 桑原伸夫, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. 第37回日本分子生物学会 (2014.11.27, 横浜).
- 22) 橋井則貴: 高分子LCMS バイオアナリシスの現状と課題について. 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム (2014.8.20, 板橋).
- 23) 平山奈保子, 小林哲, 石井明子, 川崎ナナ, 豊島聰: 各種の抗体関連バイオ医薬品の投与症例における有害事象初回発現時期の解析. 第4回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2014.9, 東京).
- 24) 小林哲, 石井明子, 太田悠葵, 村山一茂, 高久明美, 豊島聰, 川崎ナナ: 抗体医薬品による infusion reaction の初回発現時期の比較. 日本薬剤疫学会第20回学術総会 (2014.10, 愛媛).

報道発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 凝集体共同研究に用いた粒子径標準粒子

粒子径標準物質		lot	Mean Diameter (NIST Traceable)		Hydrodynamic Diameter	Size Distribution		Density	Index of Refraction
粒子径	材質		nm		nm	Std Dev	%CV	g/cm ³	@589
60 nm	ポリスチレン	42962	60	± 4	58-68	10.2	17.0	1.05	1.59
220 nm	ポリスチレン	42494	216	± 4	216-220	5.0	2.3	1.05	1.59
500 nm	ポリスチレン	43353	498	± 9		7.9	1.6	1.05	1.59
900 nm	ポリスチレン	42457	903	± 12		4.1	0.5	1.05	1.59
2 μm	ポリスチレン	43049	2.020	± 0.015		0.021	1.0	1.05	1.59
5 μm	ポリスチレン	43740	5.021	± 0.041		0.05	1.0	1.05	1.59
10 μm	ポリスチレン	43717	10.12	± 0.06		0.09	0.9	1.05	1.59
1 μm	シリカ	43789	0.99	± 0.02		0.02	2.0	2.01	1.40

表2 凝集体共同研究で用いた分析法と測定した粒子径

標準粒子	粒子径	材質	分析法	LO	FI	LD	DLS	NTA	RMM
			機関数	(5)	(5)	(2)	(5)	(1)*	(1)*
60 nm	ポリスチレン						○	○	
220 nm	ポリスチレン					○	○		
500 nm	ポリスチレン					○	○		
900 nm	ポリスチレン					○	○	○	○
2 μm	ポリスチレン			○	○	○	○		○
5 μm	ポリスチレン			○	○	○			
10 μm	ポリスチレン			○	○	○			
1 μm	シリカ			△	○	○			

LO: 光遮蔽; FI: フローイメージング; LD: レーザー回折; DLS: 動的光散乱; NTA: ナノ粒子トラッキング解析; RMM: 共振式質量測定法
 *, 希釈系列は実施機関にて作成した。
 ○: 測定を実施した粒子径; △: 一部の機関でのみ実施

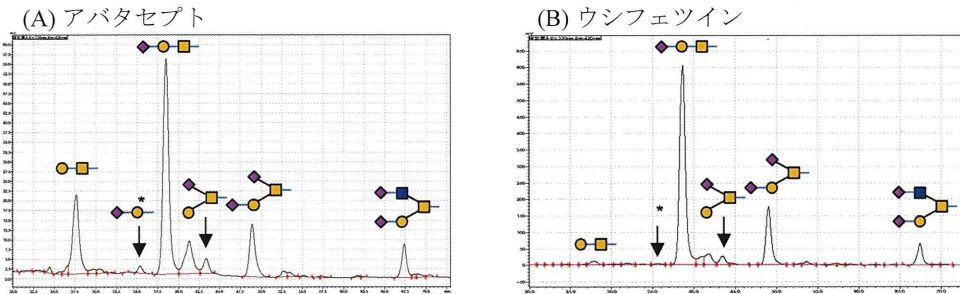


図1 カルバミン酸アンモニウムを用いたアルカリβ-脱離及び2AB誘導体化及びHILIC/FL

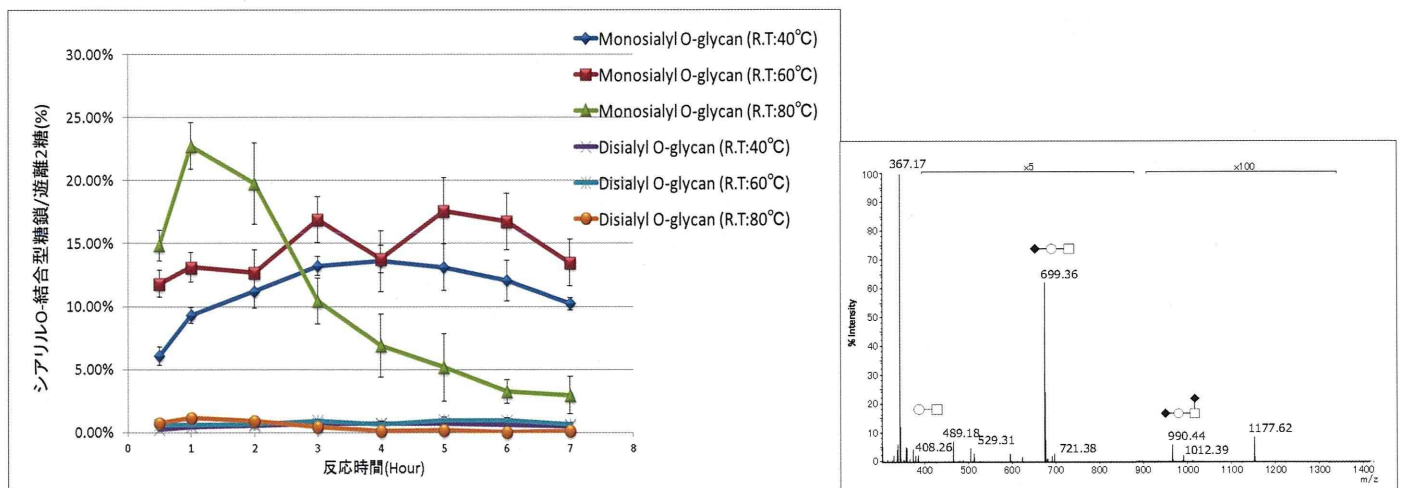


図2 還元的反応アルカリβ-脱離時の温度及び時間とMALDI TOF MSで検出したシアロ糖鎖シグナルの強度変化

表 3 光遮蔽法 観測濃度(個/mL)の計算濃度に対する比率 (%)

機関 A

ポリスチレン μg/mL	粒子径			
	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm
0.10		97%	134%	
0.25		93%	110%	
0.5	34%	89%	102%	
1.0	17%	82%	97%	
2.5	7.7%	67%	94%	
5.0	4.0%	50%	88%	
10	2.0%	32%	80%	
Number/mL at 10μg/mL	2.27.E+06	1.46.E+05	1.82.E+04	1.16.E+03

機関 B

ポリスチレン μg/mL	粒子径			
	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm
0.10		97%	154%	
0.25		93%	122%	
0.5	39%	90%	110%	
1.0	19%	83%	94%	
2.5	8.1%	67%	94%	
5.0	4.1%	50%	85%	
10	2.1%	33%	78%	

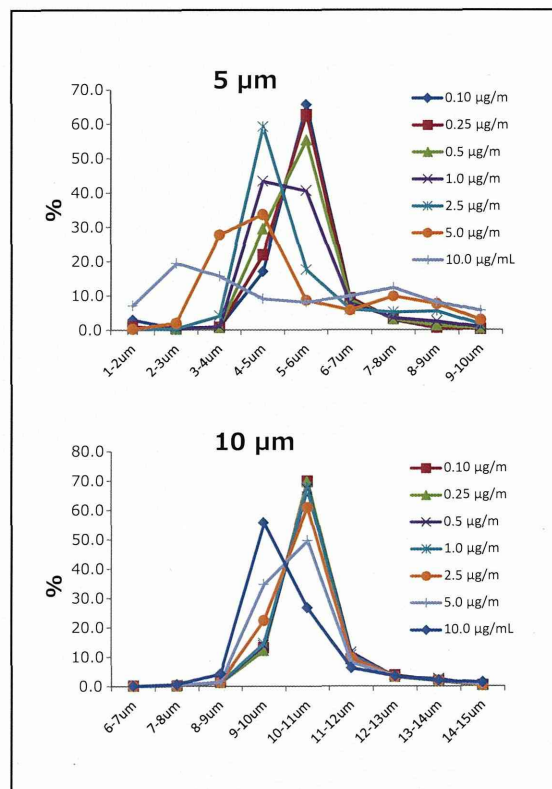
機関 C

ポリスチレン μg/mL	粒子径			
	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm
0.10		88%	120%	
0.25		58%	107%	
0.5	38%	84%	101%	
1.0	18%	79%	91%	
2.5	8.0%	62%	89%	
5.0	4.1%	43%	80%	
10	2.1%	32%	65%	

機関 D

ポリスチレン μg/mL	粒子径			
	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm
0.10		96%	128%	
0.25		93%	118%	
0.5	38%	89%	106%	
1.0	18%	83%	99%	
2.5		68%	94%	
5.0		51%	88%	
10		32%	81%	

参考図
光遮蔽 粒子径分布



推定値から 20%以上違いが見られた箇所をピンク色で示す。

表 4 フローイメージング 観測濃度(個/mL)の計算濃度に対する比率 (%)

機関 A	ポリスチレン	粒子径					シリカ	粒子径
	μg/mL	900 nm	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm	μg/mL	シリカ 1 μm
	0.10			116%	187%		0.20	
	0.25	0.26%		84%	113%		0.50	0.04%
	0.5	0.29%	18%	81%	124%		1.0	0.06%
	1.0	0.58%	80%	89%	87%		2.0	0.03%
	2.5	1.9%	83%	92%	89%		5.0	0.01%
	5.0	4.7%	80%	87%	82%		10	0.01%
	10	7.0%	75%	83%	88%		20	0.00%
	Number/mL at 10μg/mL	2.50.E+07	2.27.E+06	1.46.E+05	1.82.E+04	1.16.E+03		9.32.E+06

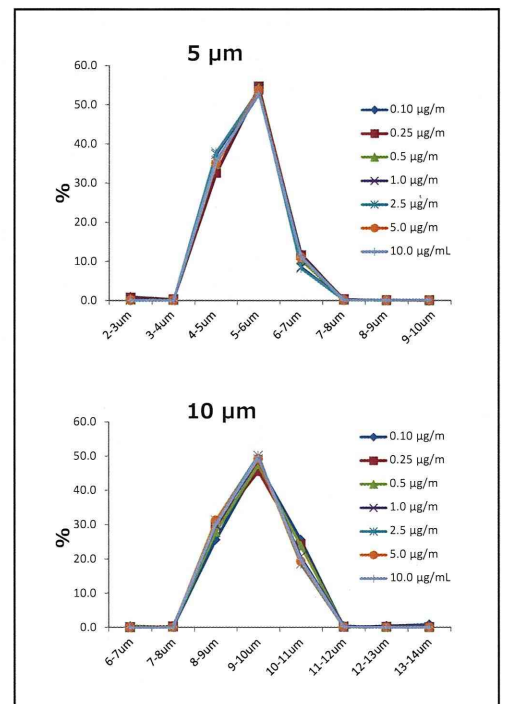
機関 B	ポリスチレン	粒子径				シリカ	粒子径
	μg/mL	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm	μg/mL	シリカ 1 μm
	0.10		96%	183%		0.20	
	0.25		100%	125%		0.50	0.07%
	0.5	106%	92%	110%		1.0	0.11%
	1.0	106%	90%	88%		2.0	0.05%
	2.5	106%	91%	88%		5.0	0.09%
	5.0	104%	93%	84%		10	0.09%
	10	103%	95%	82%		20	0.11%

機関 C	ポリスチレン	粒子径				シリカ	粒子径
	μg/mL	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm	μg/mL	シリカ 1 μm
	0.10		165%	301%		0.20	
	0.25		163%	224%		0.50	0.28%
	0.5	123%	118%	134%		1.0	0.36%
	1.0	125%	115%	122%		2.0	0.38%
	2.5	123%	125%	115%		5.0	0.29%
	5.0	129%	146%	110%		10	0.44%
	10	130%	126%	123%		20	0.72%

機関 E	ポリスチレン	粒子径				シリカ	粒子径
	μg/mL	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm	μg/mL	シリカ 1 μm
	0.10	107%	94%	174%		0.20	
	0.25	103%	90%	159%		0.50	4.7%
	0.5	101%	89%	118%		1.0	5.8%
	1.0	101%	89%	105%		2.0	6.3%
	2.5	102%	87%	82%		5.0	6.7%
	5.0	102%	91%	79%		10	7.1%
	10	98%	91%	84%		20	14%

機関 F	ポリスチレン	粒子径	シリカ	粒子径	ポリスチレン	粒子径
	μg/mL	900 nm	μg/mL	シリカ 1 μm	μg/mL	2 μm
	0.10		0.20		0.10	
	0.25	99.2%	0.50	99.7%	0.25	
	0.5	99.2%	1.0	90.8%	0.5	80%
	1.0	100.0%	2.0	87.3%	1.0	91%
	2.5	95.1%	5.0	85.8%	2.5	83%
	5.0	94.8%	10	92.4%	5.0	78%
	10	94.4%	20	89.8%	10	80%

参考図
フローイメージング 粒子径分布



推定値から 20%以上違いが見られた箇所をピンク色で示す。

表 5 レーザー回折 観測濃度(μg/mL)の濃度に対する比率 (%)

機関 G

ポリスチレン μg/mL	粒子径							シリカ μg/mL	粒子径 シリカ 1 μm
	220 nm	500 nm	900 nm	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm		
0.10								0.20	
0.25								0.50	
0.50								1.0	
1.0		97%	101%					2.0	
2.5	66%	100%	102%					5.0	100%
5.0	64%	97%	101%	90%				10	99%
10	64%	95%	98%	90%				20	97%
25	101%	94%	94%	94%	78%			50	97%
50	98%			91%	81%	94%		100	
100				86%	88%	95%		200	
250					81%	92%		500	

機関 E

ポリスチレン μg/mL	粒子径							シリカ μg/mL	粒子径 シリカ 1 μm
	220 nm	500 nm	900 nm	2 μm	5 μm	10 μm	25 μm		
0.10								0.20	
0.25								0.50	
0.5								1.0	
1.0		87%	76%					2.0	
2.5	110%	91%	90%					5.0	97%
5.0	109%	91%	93%	71%				10	95%
10	107%	89%	93%	82%				20	98%
25	94%	103%	86%	86%	74%			50	87%
50	100%			84%	72%	96%		100	
100				78%	82%	94%		200	
250					77%	90%		500	

推定値から 20%以上違いが見られた箇所をピンク色で示す。

表 6 動的光散乱 測定粒子径の認証値に対する比率 (%)

機関 A

ポリスチレン μg/mL	60 nm			220 nm			500 nm			900 nm			2 μm			シリカ μg/mL	1 μm		
	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI		Z-Average	SD	PdI
0.10															0.20				
0.25	75.7	2.9		234	3.9		633	155		821	117				0.5	1685	573		
0.5	67.8	1.2		245	4.9		505	20		2401	245		43305	47691	1.0	688	32		
1.0	69.9	1.3		235	2.6		527	26		725	122		21340	17660	2.0	814	62		
2.5	69.7	1.1		236	3.9		531	32		712	78		1444	443	5	2521	1689		
5.0	70.0	0.6		235	2.5		521	30		758	209		1143	206	10.0	622	139		
10	71.7	0.9		239	3.2		536	30		838	429		861	167	20	655	181		

機関 H

ポリスチレン μg/mL	60 nm			220 nm			500 nm			900 nm			2 μm			シリカ μg/mL	1 μm		
	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI		Z-Average	SD	PdI
0.10															0.20				
0.25	109.6		0.15	256		0.03	628		0.26	948		0.68			0.5	0		1.00	
0.5	67.7		0.06	246		0.02	537		0.27	839		0.64	1743		1.0	0		1.00	
1.0	91.5		0.18	251		0.05	578		0.14	844		0.47	30300		0.57	2.0	2320	1.00	
2.5	85.9		0.17	244		0.02	513		0.22	853		0.35	24870		0.18	5	1687	1.00	
5.0	76.6		0.14	238		0.03	572		0.31	854		0.30	2626		1.00	10.0	1070	0.76	
10	74.5		0.07	244		0.03	566		0.16	973		0.37	1849		1.00	20	1947	1.00	

機関 I

ポリスチレン μg/mL	60 nm			220 nm			500 nm			900 nm			2 μm			シリカ μg/mL	1 μm		
	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI		Z-Average	SD	PdI
0.10															0.20				
0.25	70.6	1.5	0.09	259	25.3	0.13	1028	178	0.41	1954	284	0.72			0.5	6998	1348	2.50	
0.5	70.0	1.5	0.08	240	1.7	0.11	789	92	0.32	3808	647	1.39			1.0	3177	447	1.14	
1.0	70.0	1.1	0.05	240	3.1	0.05	594	40	0.23	6569	1126	2.42			2.0	3270	164	1.16	
2.5	71.6	1.0	0.06	240	0.7	0.00	547	7	0.21	1068	4	0.37			5	1804	208	0.65	
5.0	70.7	0.6	0.03	241	0.9	-0.01	531	11	0.18	992	35	0.33	6494	2018	1.92	10.0	1597	230	0.59
10	71.9	0.9	0.05	240	1.4	-0.01	553	7	-0.01	933	52	0.26	3399	380	0.96	20	1086	22	0.38

機関 D

ポリスチレン μg/mL	60 nm			220 nm			500 nm			900 nm			2 μm			シリカ μg/mL	1 μm		
	MV	SD	PdI	MV	SD	PdI	MV	SD	PdI	MV	SD	PdI	MV	SD	PdI		MV	SD	PdI
0.10															0.20				
0.25				236	7.7	0.04									0.5				
0.5				239	4.8	0.05									1.0				
1.0	62.9	1.3	0.00	247	2.5	0.11	565	68	0.04						2.0				
2.5	67.1	3.6	0.01	241	1.5	0.25	510	101	0.06						5				
5.0	64.4	1.3	0.03	236	2.2	0.41	554	16	0.34						10.0				
10	65.8	1.2	0.04	237	4.3	0.63	545	27	0.38	1319	9	0.28	1777	43	0.40	20	2258	285	0.37

機関 J

ポリスチレン μg/mL	60 nm			220 nm			500 nm			900 nm			2 μm			シリカ μg/mL	1 μm		
	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI	Z-Average	SD	PdI		Z-Average	SD	PdI
0.05	83.1	3.8	0.17	251	7.5	0.15									0.10				
0.10	74.2	4.1	0.13	242	6.9	0.13	690	54.5	0.11	1513	228	0.81			0.25	1249	87	0.31	
0.25	67.0	0.4	0.03	255	2.7	0.12	644	37.6	0.24	1666	625	0.83	14423	20208	0.96	0.5	1255	65	0.09
0.5	68.7	0.8	0.05	232	1.3	0.06	544	18.2	0.07	1079	207	0.14	11042	16242	0.95	1.0	1055	91	0.35
1.0	68.4	0.2	0.04	230	3.2	0.01	591	10	0.12	1079	119	0.19	2341	613	0.91	2.5	989	104	0.19
2.5	68.9	0.9	0.03	232	1.2	0.01	539	19	0.07	1012	83	0.23	2113	696	0.82	5.0	1194	96	0.10
5.0	69.7	0.9	0.04	233	2.0	0.02	544	14	0.08	1014	106	0.18	1828	148	0.45	10	1157	38	0.06
10	71.7	0.9	0.02	235	2.5	0.01	556	5	0.03	1053	81	0.29	1624	83	0.34	20	1155	25	0.11

注) 動的光散乱は定量的な手法ではないので、粒子径を示す。

観測された粒子径が、標準粒子の認証値と 20%以上異なった箇所をピンク色で示した。

観測粒子径のばらつきの RSD が 5%以上の箇所をピンク色で示した。

多分散性指数 (PdI) が 0.2 以上の箇所をピンク色で示した。

表7 光遮蔽測定のパラチニのばらつき

① 5 mL で測定したときの粒子数 (個/mL) のばらつき (n = 3)

粒子径	10.12 μm	5 mL		機関A		機関B		機関C		機関D	
		平均	RSD (%)	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)
0.10	175	2.5		280	3.5	244	0.63	219	4.8	232	0.90
0.25	439	2.0		556	2.5	502	0.69	485	4.6	535	0.20
0.5	877	1.1		997	0.70	929	0.92	918	0.50	960	2.2
1.0	1755	1.7		1714	2.3	1767	0.68	1658	2.9	1794	1.1
2.5	4387	1.2		4253	1.0	4254	0.43	4025	2.3	4295	0.90
5.0	8775	1.3		7691	1.6	7966	0.68	7298	1.9	7979	0.90

② 低容量で測定したときの粒子数 (個/mL) のばらつき (n = 3)

1 mL							0.2 mL					
平均	機関B		機関D			機関E		平均	機関A		機関B	
RSD (%)	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)	RSD (%)	Average	RSD (%)	Average	RSD (%)	
3.3	242	1.6	254	4.3	212	3.9	14.1	237	10.4	243	17.7	
4.7	509	1.3	557	8.0	448	4.8	5.3	547	9.2	402	1.4	
4.3	912	7.0	943	3.5	892	2.3	5.4	927	6.7	885	4.1	
2.9	1751	2.3	1766	4.2	1769	2.3	1.7	1728	1.7	1745	1.6	
1.5	4231	2.9	4245	1.1	4061	0.44	3.3	4130	3.0	4102	3.5	
0.66	7992	0.32	8045	0.47	8156	1.2	1.8	7560	2.3	7638	1.3	

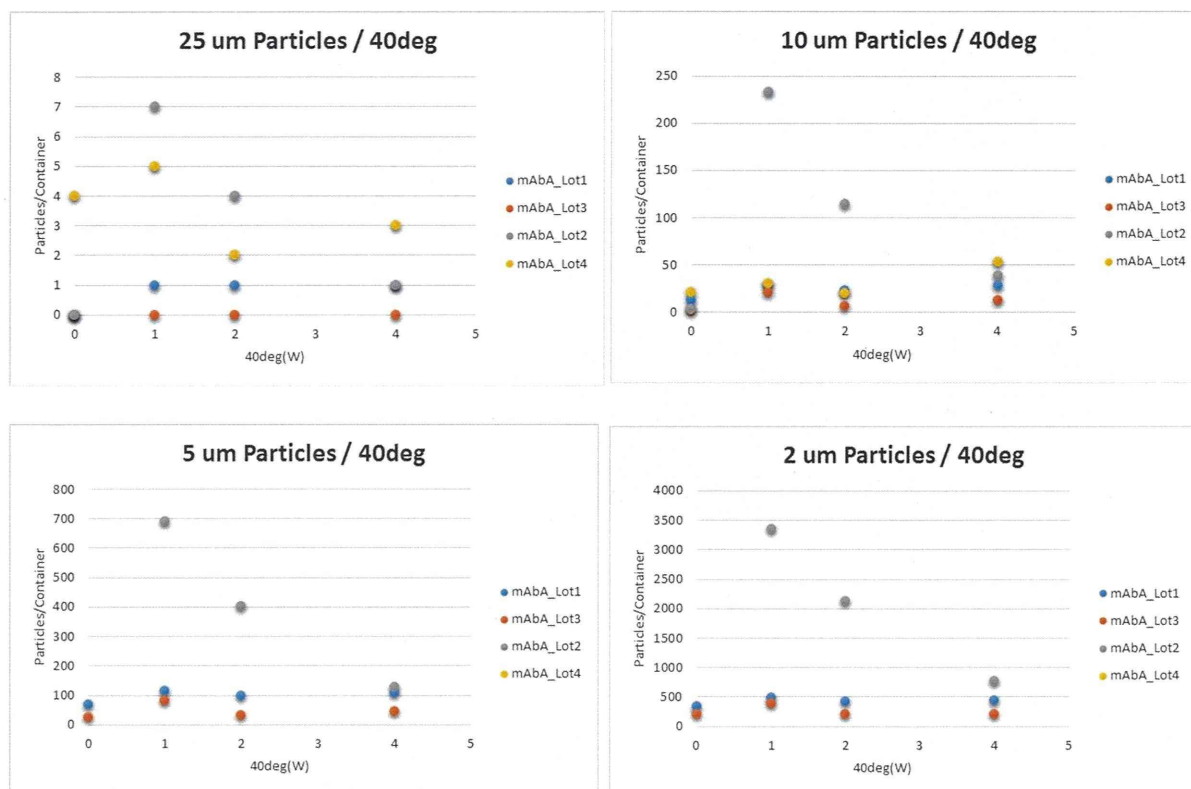


図3 抗体溶液製剤の不溶性微粒子数

40°Cで抗体溶液製剤（mAbA）を保管し、0, 1, 2, 4 週間後の不溶性微粒子数を測定した。

左上) 25 μm 以上の微粒子数, 右上) 10μm 以上の微粒子数

左下) 5μm 以上の微粒子数, 右下) 2μm 以上の微粒子数

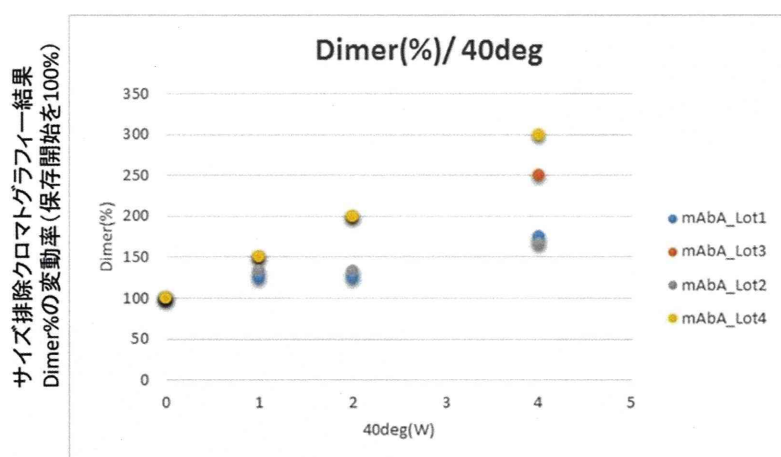


図4 抗体溶液製剤の可溶性会合体含量

図3の試料について、限外ろ過クロマトグラフィー法を用い、会合体（Dimer）含量を測定した。

縦軸の会合体含量については、0週間目の試料の会合体量を100%とし、標準化した。

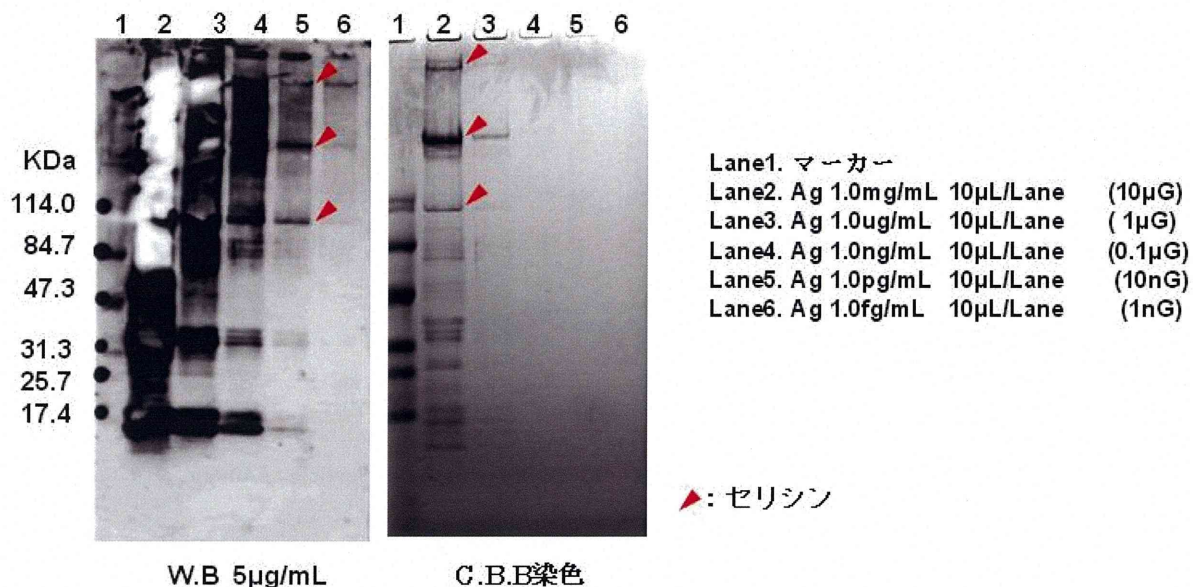


図5 ウェスタンブロットによる抗 HCP (カイコ繭由来タンパク質) 抗体の評価

表8 Tg カイコ繭より抽出・精製したタンパク質溶液中 HCP の測定

Sample	希釈倍率	A450	測定値 (ng/mL)	残存 HCP (μ g/mL)
Tg カイコ由来タンパク質(抽出液)	2560	1.399	6.94	17.76
Tg カイコ由来タンパク質(工程 1)	2560	1.793	9.57	24.49
Tg カイコ由来タンパク質(工程 2)	2560	0.298	0.94	2.39

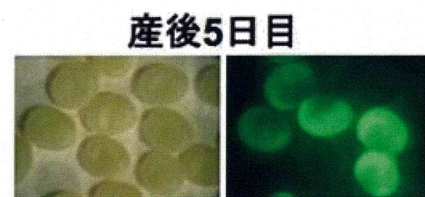
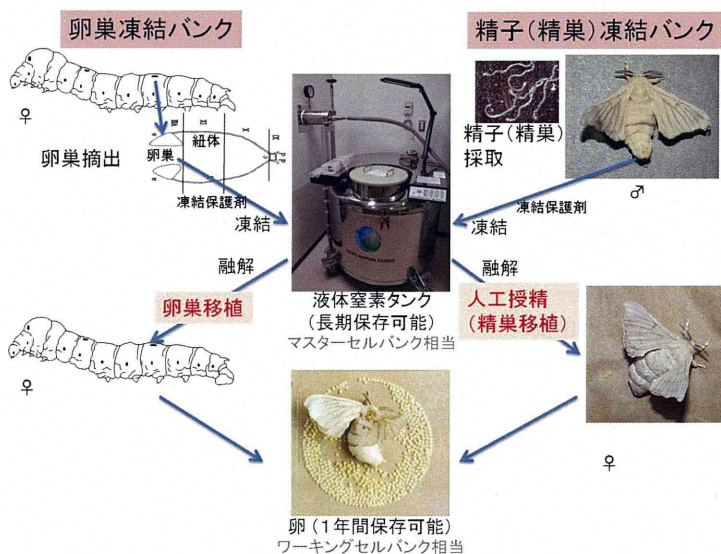


図6 Tg カイコのバンク化のための組織採取・凍結・再移植技術の開発

図7 卵での組換え体選別手法の開発

表 9 各機関で検討した測定方法の概要

機関	使用した血清(μL)	タンパク質精製方法	SIL-IS (SIL-ペプチド) ①濃度 ②希釈溶媒 ③添加量	還元/アルキル化操作 ①還元溶液 ②添加量 ③温度 ④反応時間	トリプシン消化 ①酵素消化溶液 ②バッファー ③添加量 ④温度 ⑤時間	ペプチド精製方法	LC装置	LC分離カラム	LC条件 ①移動相 A ②移動相 B ③グラジュエント ④カラムオープン温度 ⑤流速	MS装置	MS条件 ①spray voltage ②15V ③Q1 Precursor ion ④Q3 Product ion ⑤注入量
A	10	メタノール沈殿(75%)	①0.1μg/mL ②0.1% CHAPS ③5μL	なし	①20 mg/mL in 50mM AcOH ②100mM NH ₄ HCO ₃ ③5μL ④60°C ⑤1h	固相抽出 OASIS μElution MCX プレート (Waters)	Prominence UFLC (Shimadzu)	XBridge BEH300 C18, 3.5 μm (2.1×50 mm, Waters)	①0.02% FA ②ACN ③20%B (0~1.5min), 20~30%B (1.5~7.5min) ④55°C ⑤400μL/min	API 4000 (AB Sciex)	①5.5kV ②24V ③Q1 Precursor ion: m/z 603.7 (analyte), 606.0 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 805.7 (analyte), 809.2 (SIL-IS) ⑤0.5μL
B	25	なし	①1μg/mL ②H ₂ O/ACN/FA,50/50/0.1 ③10μL	<還元> ①8M GuHCl/500 mM TCEP ②100μL/5μL ③60°C ④10min <アルキル化> ①500mM IAM ②25μL ③60°C ④10min	①5 mg/mL in 50 mM NH ₄ HCO ₃ ②50mM NH ₄ HCO ₃ ③10μL ④37°C ⑤19h	なし	Nexera (Shimadzu)	ACQUITY UPLC BEH300 C18, 1.7μm (2.1 mm. x 50 mm, Waters)	①0.1% FA/ 5% ACN ②0.1% FA/ 95% ACN ③15~27%B (0~4min) ④60°C ⑤800μL/min	QTRAP5500 (AB Sciex)	①5.0kV ②23V(analyte)/27V (SIL-IS) ③Q1 Precursor ion: m/z 603.5 (analyte), 605.7 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 805.5 (analyte), 171.2 (SIL-IS) ⑤5μL
C	25	メタノール沈殿(75%)	①1μg/mL ②DMSO ③10μL	<還元> ①10 mM DTT ②20μL ③60°C ④30min	①8 mg/mL in 50mM AcOH ②200mM NH ₄ HCO ₃ , 10%CH ₃ OH ③10μL ④37°C ⑤16h	Millex-LG, 0.20 μm (Millipore)	Ultimate 3000 (Dionex)	ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7μm (1.0×100 mm, Waters)	①0.1% FA/ 2% ACN ②0.1% FA/ 90% ACN ③10~60%B (0~15min) ④60°C ⑤40μL/min	TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific)	①3.0kV ②15V ③Q1 Precursor ion: m/z 603.7 (analyte), 606.0 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 805.7 (analyte), 809.2 (SIL-IS) ⑤5μL
D	25	メタノール沈殿(70%)	①1 mg/mL ②H ₂ O ③5μL	なし	①1 mg/mL in 1% TFA ②200mM NH ₄ HCO ₃ ③5μL ④37°C ⑤3h	なし	Prominence UFLC (Shimadzu)	Aeris WIDEPORE, 3.6 μm XB C18 (2.1×50 mm, Phenomenex)	①0.1% FA ②0.1% FA in ACN ③5%B (0~0.5min), 5~26%B (0.5~0.51min), 26%B (0.51~3min), 26~90%B (3~3.1min) ④40°C ⑤400μL/min	API 5000 (AB Sciex)	①5.0kV ②22V ③Q1 Precursor ion: m/z 603.7 (analyte), 606.0 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 805.7 (analyte), 809.2 (SIL-IS) ⑤2 μL
E	25	メタノール沈殿(75%)	①25μg/mL ②H ₂ O ③20μL	<還元> ①20 mM TCEP ②10μL ③60°C ④30min <アルキル化> ①20mM IAA ②10μL ③RT ④30min	①1 mg/mL in 50mM NH ₄ HCO ₃ ②200mM NH ₄ HCO ₃ ③10μL ④37°C ⑤16h	固相抽出 OASISHLB 30 mg/cc (waters) Ultrafree MC, 0.22 μm (Millipore)	Nexera (Shimadzu)	SunFire, 3.5 μm (2.0×50 mm, Waters)	①0.1% FA ②0.1% FA in ACN ③10~22%B (0~12min) ④40°C ⑤300μL/min	AB SCIEX Triple Quad 5500 (AB SCIEX)	①5.5kV ②23V ③Q1 Precursor ion: m/z 603.7 (analyte), 606.0 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 805.7 (analyte), 809.2 (SIL-IS) ⑤5μL
F	25	アセトン沈殿(75%)	①1μg/mL ②0.1%FA,10%ACN ③10μL	なし	①8 mg/mL in 50mM AcOH ②200mM NH ₄ HCO ₃ , 10%CH ₃ OH ③10μL ④37°C ⑤16h	C-Tip C18 カラ ム	Nexera (Shimadzu)	Aeris PEPTIDE 1.7μm XB-C18 (2.1×150 mm, Phenomenex) MASTRO C18 3μm (2.1×150 mm, 島津ジ ーエルシー)	①0.1% FA/ 2% ACN ②0.1% FA/ 90% ACN ③5~60%B (0~10min) ④60°C ⑤200μL/min	LCMS-8050 (Shimadzu)	①4.0kV ②18V ③Q1 Precursor ion: m/z 603.7 (analyte), 606.0 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 805.7 (analyte), 809.2 (SIL-IS) ⑤5μL
G	25	メタノール沈殿(75%)	①1μg/mL ②DMSO ③10μL	なし	①8 mg/mL in 50mM AcOH ②200mM NH ₄ HCO ₃ , 10%CH ₃ OH ③10μL ④37°C ⑤20h	なし	Nexera (Shimadzu)	Aeris WTDEPORE XB-C8 (2.1×150 mm, Phenomenex)	①0.05% FA/ 3% ACN ②0.05% FA/ 60% ACN ③0~60%B (0~10min) ④40°C ⑤200μL/min	MS-2020 (Shimadzu)	①3.0kV ②20V ③Q1 Precursor ion: m/z 559.6 (analyte), 561.0 (SIL-IS) ④Q3 Product ion: m/z 672.9 (analyte), 676.9 (SIL-IS) ⑤- μL

