

図3 選択性の確認

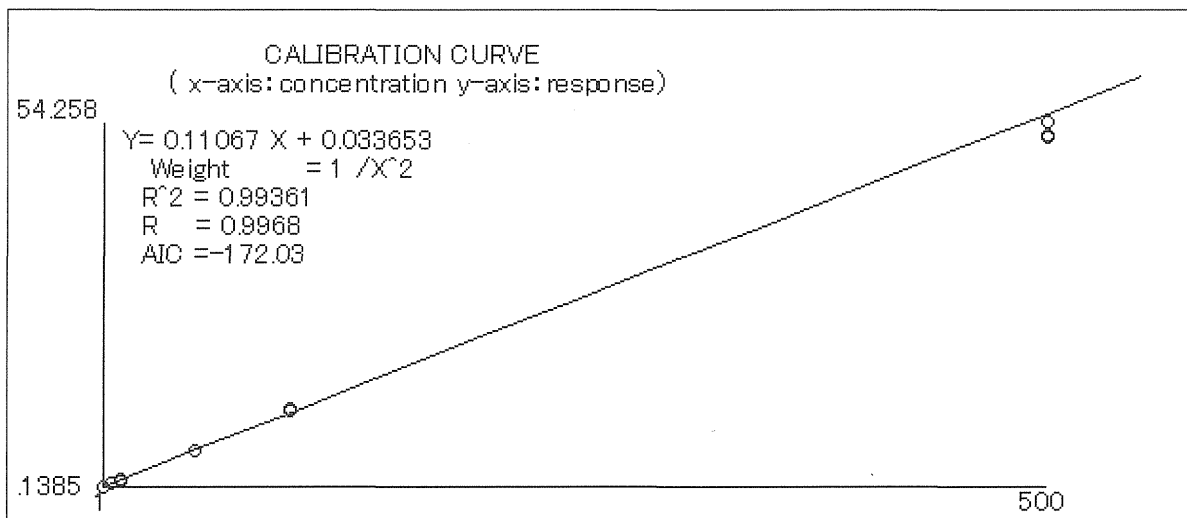


図4. 検量線. 縦軸, analyte のピーク面積/SIL-IS のピーク面積; 横軸, マウス血清に添加した抗体医薬品 A の濃度( $\mu\text{g/mL}$ )

分担研究課題 バイオ医薬品の品質安全性評価法の開発と標準化

研究分担者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

バイオ医薬品の品質安全性評価において、臨床検体中の抗薬物抗体分析法の開発と標準化が重要課題となっている。特に、試料中に投与後薬物が残存する場合、共存薬物が抗薬物抗体分析を妨害し、偽陰性結果につながることから、その回避の手法の開発と標準化が必要である。本研究では、LOCI (Luminescent oxygen channeling assay) 法を用いた抗薬物抗体分析における Drug tolerance 改善のための前処理方法について検討し、酸解離法が有用であることを見出した。また、6種類のモデル抗薬物抗体に関して、前処理による Drug tolerance limit の改善率を明らかにした。

研究協力者

生物薬品部 第二室 西村和子

$\gamma$ -globulin, 10mg/ml Dextran 500 [pH 7.6]

- ・ ヒト混合血清 (Lonza #1114-490E Human Serum, AB)

A.目的

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うる。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。本研究では、LOCI (Luminescent oxygen channeling assay) 法 (AlphaLISA) に関して、Drug tolerance 改善のための分析法の開発とその評価を行った。

- ・ Unconjugated AlphaLISA Acceptor Beads

- ・ AlphaScreen Streptavidin Donor Beads

- ・ 測定したモデル ADA

抗 B-mAb 抗体, BM802 (抗 Erythropoietin

モノクローナル抗体), LS-C11323 (抗

Erythropoietin ポリクローナル抗体),

HCA204 (抗 Adalimumab モノクローナル

抗体), HCA213 (抗 Infliximab モノクロー

ナル抗体), HCA241 (抗 Golimumab モ

ノクローナル抗体)

B.研究方法

B.1. 試料および試薬

- ・ ADA 測定用 AlphaLISA アッセイバッファ  
ー (50mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl,  
0.5% BSA, 0.1% Tween-20, 0.05% Bovine

B.2. LOCI 法による ADA 測定

LOCI 法の測定原理を図 1 に示す。ビオチン  
化薬物が結合したストレプトアビジンドナー  
ビーズと、薬物を化学結合させたアクセプター  
ビーズを用いた。ADA 存在下では、ドナービ

ーズとアクセプタービーズに結合した薬物がそれぞれ ADA と結合し、2種のビーズが近接する。このとき励起光 680nm を照射すると 615nm の発光が検出される。

Drug tolerance の検討では、10%ヒト混合血清（アッセイバッファーで希釈）に ADA と薬物をスパイクし、1hr インキュベートして ADA と薬物を十分に結合させたものを試料とした。

プレートに試料を 2.5 $\mu$ l とり、ビオチン化薬物（ウェル中終濃度 50ng/ml）と薬物結合アクセプタービーズ（同 20 $\mu$ g/ml）を含むアッセイバッファーを添加後 60min、さらにストレプトアビジンドナービーズを添加（同 20 $\mu$ g/ml）後 60min インキュベートして、Alpha 適合プレートリーダー（Enspire 2300）で Em 615nm 発光を測定した。試料調製から測定まで、室温で行なった。

カットポイント（CP）は、個別別ブランク血清を用いた CP 設定は行わずに、陰性対照（n=6）の平均値に 1.329\* を乗じて求めた仮 CP を使用した。（\*：背景値（個別別ブランク血清）の相対標準偏差を 20% と仮定し、t 分布表の母集団無限大における臨界値を用いた 95% 信頼区間上限値として設定した。）

3 濃度の ADA にそれぞれ 5 濃度の薬物を添加して測定したときの測定値を 4 パラメータロジステック回帰し、得られた曲線に仮 CP を内挿して得られた薬物濃度計算値を Drug tolerance limit（DTL）とした。

### B.3. Drug tolerance 改善のための前処理方法

#### B.3.1. 酸解離

ADA-薬物混合試料 2.5 $\mu$ l（マトリックス：10%血清）に、酸溶液として 600mM Glycine-HCl [pH3.0] を 5 $\mu$ l 添加、10min 後にビオチン化薬物と薬物結合アクセプタービー

ズを含む中和バッファー（アッセイバッファー：1M Tris-HCl [pH9.5] 83:17）を 7.5 $\mu$ l 添加により中和した。対照には酸溶液の代わりに PBS 5 $\mu$ l を添加、ビオチン化薬物と薬物結合アクセプタービーズを含むアッセイバッファーを添加した。

#### B.3.2. 長時間インキュベーション

ビオチン化薬物と薬物結合アクセプタービーズを含むアッセイバッファーを添加後、通常 60min のインキュベーション時間を、一晚（O/N）に延長した。

#### <倫理面への配慮>

ヒト血清は市販のプール血清を使用しており、その他の試薬を含め、倫理面での配慮を要する試薬は使用していない。

## C. 結果

### C.1. 前処理方法の検討

Drug tolerance を改善する方法として一般的な酸解離法（試料に酸溶液を加え、ADA 薬物結合体を分離し、ADA を測定する方法）と長時間インキュベーション法（試料と標識薬物とのインキュベーション時間を長くして、共存薬物と標識薬物の置換を促す方法）の 2 法を用いて、改善効果の有無を検討した。

ADA の Drug tolerance を①酸解離あり、通常インキュベーション(+AD, 60min)、②酸解離なし、通常インキュベーション(-AD, 60min)、③酸解離あり、長時間インキュベーション(+AD, O/N)、④酸解離なし、長時間インキュベーション(-AD, O/N) の条件で比較した（図 2）。抗 B-mAb 抗体、抗 EPO 抗体 LS-C11323 では、長時間インキュベーションの効果があったが、酸解離のほうが有効であった。なお、併用によ

る効果は認められなかった。抗 Infiximab 抗体、抗 Adalimumab 抗体および抗 Golimumab 抗体では、酸解離の有無にかかわらず、長時間インキュベーションによる Drug tolerance 効果は認められなかった。また、インキュベーション時間が同じであれば、酸解離が有効であった。抗 EPO 抗体 BM802 は、どちらの方法も効果が認められなかった。

## C.2. 酸解離による Drug tolerance 改善効果

Drug tolerance 改善のための前処理方法として酸解離法を選択し、まず、前処理の酸溶液として 600mM Glycine-HCl [pH3.0]と 810mM AcOH のどちらが有用かを検討した。抗 B-mAb 抗体の薬物 (B-mAb) 共存下でのレスポンスを比較すると、図 3 に示すように、600mM Glycine-HCl [pH3.0]のほうが改善効果が大きかったため、酸溶液として 600mM Glycine-HCl [pH3.0]を選択した。

次に 6 種類のモデル ADA を用いて、酸解離による Drug tolerance 改善効果について検討を行なった。ADA 濃度として 3 濃度を設定し、共存薬物濃度は、シグナルが仮 CP をまたぐように設定した。

測定結果を、表 1 と図 4 に示す。表 1 の測定値は、duplicate 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。図 4 の曲線は、測定値を 4 パラメータロジスティック回帰して得られたもので、これから算出した DTL を表 2 に示した。抗 B-mAb 抗体では、すべての ADA 濃度で Drug tolerance が改善し、中濃度・低濃度で改善効果が顕著であった。BM802 は、酸解離によりレスポンスが低下し、Drug tolerance も改善がみられなかった。LS-C11323 は、すべての濃度で酸解離が有効であった。抗 Adalimumab 抗体、抗 Infiximab

抗体は、抗 B-mAb 抗体と同様の結果が得られた。抗 Golimumab 抗体は、ADA 低濃度では、レスポンスが低く、検討できなかった。

## D. 考察

血清中 ADA の測定では、投与後の薬物が試料中に残存し、ADA 検出を妨害することが問題となっている。ADA-残存薬物結合体による偽陽性を回避し、ADA 産生の有無を正しく判断するために、Drug tolerance を改善する方法の検討を行なった。

LOCI 法は、SPR 法等に比べてアッセイ時間が短く、wash 操作がない簡便なプレートアッセイであることから、本研究では ADA の血清中濃度測定における Drug tolerance 改善法の検討にあたり、測定プラットフォームとして LOCI 法を取り上げた。2 種の抗 EPO 抗体と 4 種の抗 mAb 抗体について、共存薬物に対する Drug tolerance の改善に一般的に有効とされている、①酸解離法、②長時間インキュベーション法を比較検討した。

測定した ADA 濃度は、FDA が推奨している ADA アッセイの最小感度 250-500ng/ml を参考に、5000, 500, 50ng/ml の 3 濃度を設定した。それぞれの ADA 濃度に対して、共存薬物濃度はシグナルが仮 CP をまたぐように設定した。

検討した 6 種の ADA のうち、2 種で長時間インキュベーションによる Drug tolerance 改善効果が見られたが、酸解離による効果を上回るものではなく、相乗効果も認められなかった。

酸解離法は、BM802 以外は、すべて Drug tolerance 改善がみられた。表 1, 2 に示したように、ADA 濃度が低い方が、酸解離による Drug tolerance 改善効果が大きくなる傾向が見られた。従って、ADA 濃度の低い血清試料でも、酸解離により、共存薬物の存在化下での ADA

の測定が可能になることが確認できた。BM802は、酸解離によりレスポンスが低下し、酸に弱い抗体であると考えられる。同じEPOの抗体でも、ポリクローナル抗体であるLS-C11323では、Drug toleranceが改善していることから、ポリクロであれば改善効果があるのかは、ヒト投与後血清中ADAの特性の解析などにより、さらに検討の余地がある。4種の抗mAb抗体では、共存mAb濃度が低いところでは、酸解離するとレスポンスが低下したが、高濃度ではレスポンスが上昇し、結果として、DTLが上昇していた。これは、ADA自体は、BM802と同様に酸に弱い、共存薬物濃度がADA濃度と同程度以上になると、酸解離による効果が上回ることを示唆している。抗EPOモノクローナル抗体であるBM802は、長時間インキュベーション法でも、Drug toleranceを改善できなかったため、他の前処理方法を検討する必要がある。

なお、すべての測定でBackgroundとして測定した10%ヒト混合血清のシグナルの平均値が、酸解離により最大30%低下し、仮CPが低下した。これもDTLの上昇に寄与しており、実際の測定でも同様のことはあり得るので、注意すべき点である。

本研究の結果の実試料の測定への適用については、mAb製剤のトラフ値が一般には、数 $\mu\text{g/ml}$ ~数十 $\mu\text{g/ml}$ であることを考慮すると、酸解離法を使えば、ADAの測定が可能になるケースもあるが、感度のさらなる向上が必要である。しかしながら、本研究で用いたEPO製剤のトラフ値は添付文書によると20mU/ml(約1ng/ml)であるので、酸解離しなくても、低濃度のADAまで測定可能である。モデルとして用いたADAと実試料中ADAで、薬物結合親和性に大きな差がある場合は、実試料中ADAに

近い結合親和性を持つモデルADAでの評価が必要であり、DTL評価結果をトラフ値と合わせて考えることで、適切な分析法を確立することができると考えられる。

これらの検討の他、我々は、WHOが主導するヒト抗EPOモノクローナル抗体測定の国際共同研究に参加した。この共同研究は、抗EPO抗体測定系の評価と測定結果の相互比較を可能にする抗EPO抗体標準品の策定が目的であった。欧州では、過去に、epoetin alfa製剤において、ADA産生が要因と考えられる重篤副作用が生じたことがある。また、バイオシミラー製品も開発されていることから、EPOはバイオ医薬品の中でも、ADA分析法の標準化の必要性が高いと認識されていると思われる。

ヒト抗EPOモノクローナル抗体10種を試料として、各機関において任意の分析法により、それぞれの抗体について、陰性、陽性判定のendpointを決定した。我々は、SPR法とLOCI法の2つのプラットフォームでADAの測定を行なった。50名分のヒト個別血清の測定からCPを算出し、陰性、陽性を判定した。SPR法とLOCI法で得られたendpointは大きく異なったが（SPR法では約0.03 $\mu\text{g/ml}$ まで、LOCI法では約 $2 \times 10^{-7} \mu\text{g/ml}$ まで）、11種類のうち9種類でLOCI法が低い値であった。

## E. 結論

- 1) LOCI法によるADA分析において、DTL改善に適した酸解離の条件を見出した。
- 2) 酸解離法を用いた前処理によるDTL改善効果は、ADA濃度が低いときほど大きく、抗体価が低い実試料でより有用と考えられた。
- 3) モデルADA 6種類のうち1種類（抗EPOモノクローナル抗体）では、酸によりDTLが低下した。前処理法の標準化には、実試料

ADA の酸に対する耐性等についても、データの蓄積が必要である。

- 4) 今回用いた測定条件では、酸解離により Background 値が低下するため CP が低下した。一連の分析で、前処理の有無の両方の方法を用いる場合、CP はそれぞれ設定する必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表等

##### 論文発表等

- 1) 石井明子：第 4 章 生体試料薬物濃度分析（リガンド結合法）におけるバリデーションのガイドラインのポイントおよび実施の注意点、医薬品開発における生体試料薬物濃度分析手法, pp.43-56, 技術情報協会, 東京 (2014).

##### 学会発表等

- 1) ISHII-WATABE, Akiko, SUZUKI, Takuo, NISHIMURA, Kazuko, MORI, Keitaro, YAMAGUCHI, Hideto, TORIKAI,

Masaharu, YANAGIHARA, Shigehiro, KOGA, Junichi, WATANABE, Takayuki, HAMAJI, Yoshinori, ISHIDA, Masato, MIYAMOTO, Tomomi, KAWASAKI, Nana “Design and the validity test suitable for a therapeutic antibody potency assay using ELISA”, USP 6<sup>th</sup> Bioassay Workshop, Jun. 2-3 (2014) Rockville, USA.

- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

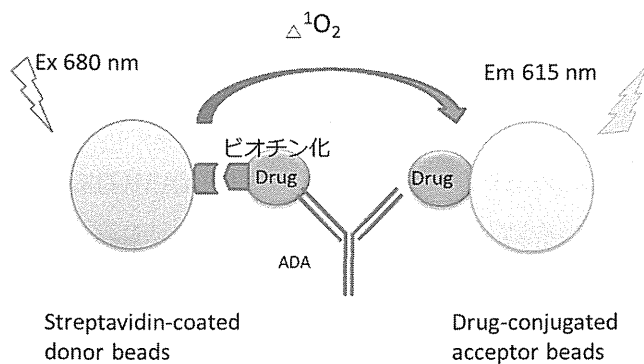


図1 LOCI法の原理

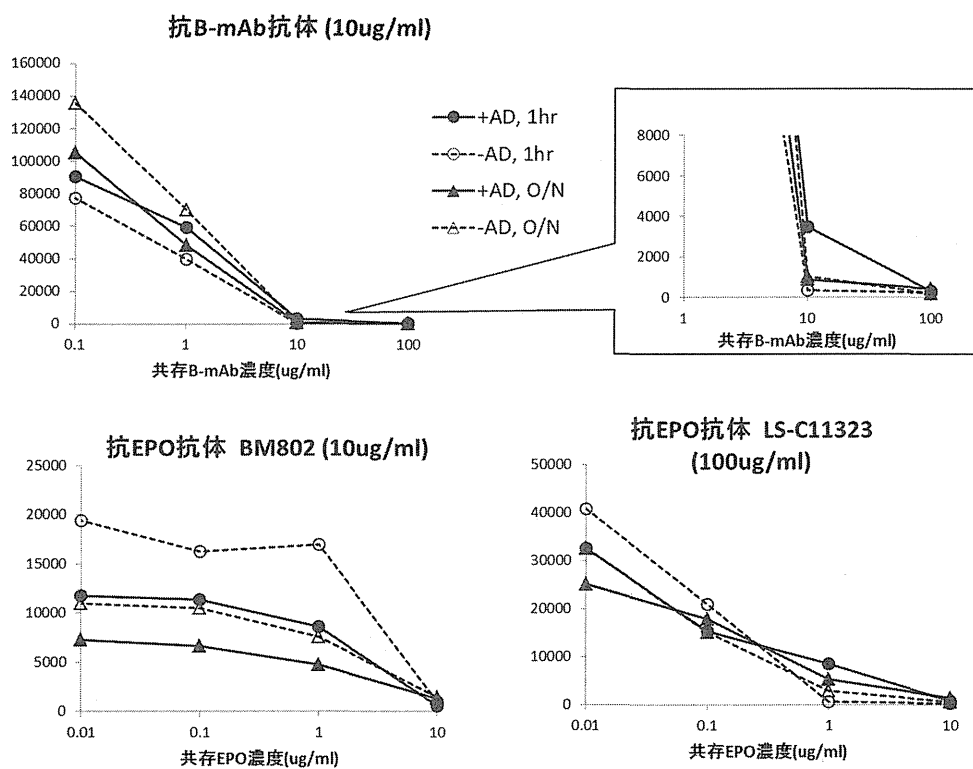


図2 長時間インキュベーション法と酸解離法の比較

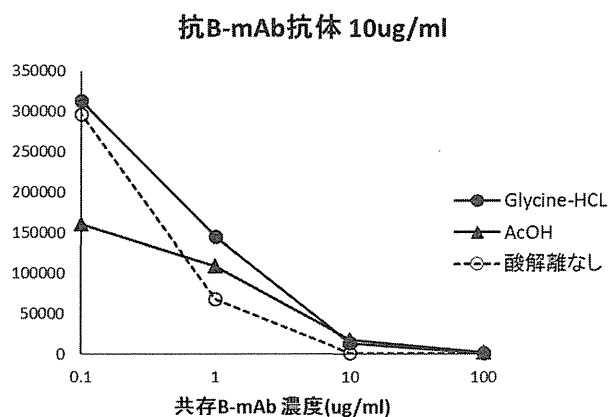


図3 酸解離法に用いる酸の種類を検討

表1 モデル ADA 測定における Drug tolerance 改善法の検討

抗B-mAb抗体

ADA濃度 (µg/ml)	酸解離	共存薬物濃度(µg/ml)								Back ground	仮CP	
		0	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000			
H	5	なし	52638			48855	12929	401	392	522	532	707
		あり	51359			41354	18330	1149	354	401	378	503
M	0.5	なし	5102		4854	1830	-09	358	376		532	707
		あり	4196		4149	2472	1232	417	524		378	503
L	0.05	なし	831	990	698	527	442	410			532	707
		あり	749	574	651	546	462	349			378	503

抗EPO抗体 BM802

ADA濃度 (µg/ml)	酸解離	共存薬物濃度(µg/ml)								Back ground	仮CP	
		0	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000			
H	5	なし	49747		48498	42786	36371	2359	484		450	598
		あり	14795		17555	14736	10807	984	575		389	517
H'	2.5	なし	20666		20812	18608	11231	1271	556		450	598
		あり	6308		5903	6114	4227	658	438		389	517
M	0.5	なし	2271		2395	2295	1485	534	420		450	598
		あり	1108		1297	1074	887	421	404		389	517

抗EPO抗体 LS-C11323

ADA濃度 (µg/ml)	酸解離	共存薬物濃度(µg/ml)								Back ground	仮CP	
		0	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000			
H	5	なし	9632		5417	1110	588	430	536		435	578
		あり	6510		5807	3762	1155	515	418		366	487
H'	2.5	なし	5145		2592	893	500	487	436		435	578
		あり	3541		3032	2281	1099	414	398		366	487
M	0.5	なし	1316		890	519	494	471	495		435	578
		あり	1046		776	792	545	414	424		366	487

抗Adalimumab抗体 HCA204

ADA濃度 (µg/ml)	酸解離	共存薬物濃度(µg/ml)								Back ground	仮CP	
		0	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000			
H	5	なし	41683			39269	39083	669	543	586	584	776
		あり	30330			30774	26618	5266	529	565	571	759
M	0.5	なし	14622		15463	11161	664	598	598		584	776
		あり	9233		10186	10001	4649	928	529		571	759
L	0.05	なし	1768	2170	2110	1174	539	570			584	776
		あり	1582	1532	1377	1546	1007	583			571	759

抗Infliximab抗体 HCA213

ADA濃度 (µg/ml)	酸解離	共存薬物濃度(µg/ml)								Back ground	仮CP	
		0	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000			
H	5	なし	17109			23766	16607	921	592	644	606	806
		あり	14173			13075	15381	5140	611	588	543	721
M	0.5	なし	9536		8995	8560	1056	575	648		606	806
		あり	5912		6061	5479	2429	758	552		543	721
L	0.05	なし	1362	1295	1347	1017	592	646			606	806
		あり	1069	1000	1061	1016	866	644			543	721

抗Golimumab抗体 HCA241

ADA濃度 (µg/ml)	酸解離	共存薬物濃度(µg/ml)								Back ground	仮CP	
		0	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1000			
H	5	なし	4748			4346	3711	742	671	642	642	853
		あり	5235			3980	4031	976	635	617	551	733
M	0.5	なし	1303		1275	1282	643	627	585		642	853
		あり	1041		1029	990	879	596	602		551	733
L	0.05	なし	847	693	655	615	620	707			642	853
		あり	613	601	602	608	571	548			551	733

表2 Drug tolerance limit 改善効果の比較

ADA	ADA濃度	Drug tolerance limit (ug/ml)*)		Ratio
		酸解離なし	酸解離あり	
抗B-mAb抗体	H (5ug/ml)	2.19	3.88	1.8 ↑
	M (0.5ug/ml)	0.062	1.08	17.4 ↑↑
	L (0.05ug/ml)	0.001	0.047	47.0 ↑↑↑
抗EPO抗体 BM802	H (5ug/ml)	16.1	4.62	0.29 ↓
	H' (2.5ug/ml)	3.69	2.37	0.64 ↓
	M (0.5ug/ml)	0.904	0.593	0.66 ↓
抗EPO抗体 LS-C11323	H (5ug/ml)	0.076	1.418	18.7 ↑↑
	H' (2.5ug/ml)	0.039	0.737	18.9 ↑↑
	M (0.5ug/ml)	0.004	0.184	46.0 ↑↑↑
抗Adalimumab抗体 HCA204	H (5ug/ml)	14.2	12.4	0.9 —
	M (0.5ug/ml)	0.329	1.67	5.1 ↑
	L (0.05ug/ml)	0.035	0.31	8.9 ↑
抗Infliximab抗体 HCA213	H (5ug/ml)	5.43	14.6	2.7 ↑
	M (0.5ug/ml)	0.378	1.78	4.7 ↑
	L (0.05ug/ml)	0.030	0.38	12.7 ↑↑
抗Golimumab抗体 HCA241	H (5ug/ml)	2.14	3.08	1.4 —
	M (0.5ug/ml)	0.055	0.303	5.5 ↑
	L (0.05ug/ml)	**)	**)	—

\*) 4P回帰曲線からの計算値

\*\*\*) 計算不可



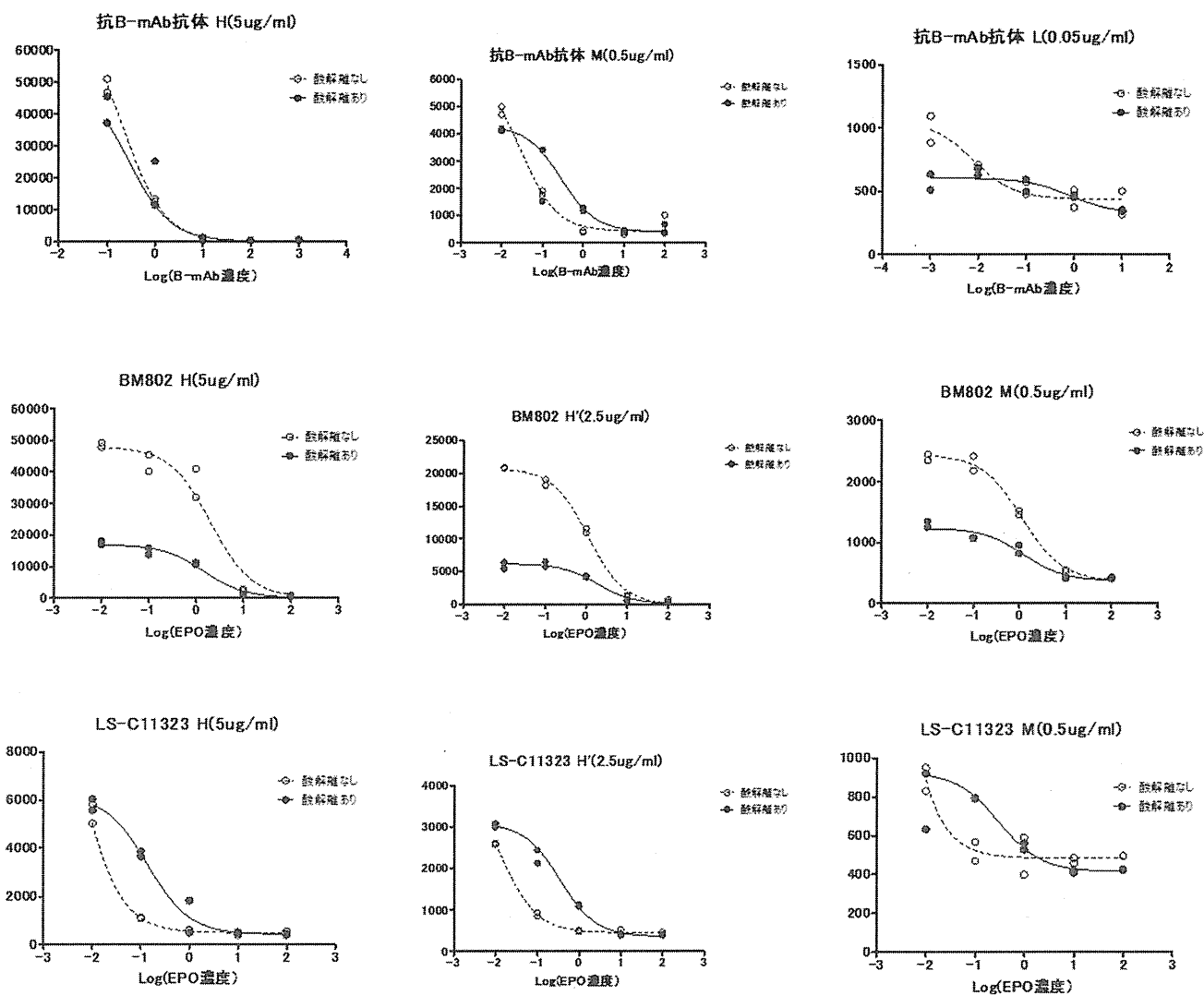


図 4a 抗 B-mAb 抗体, 抗 EPO 抗体 (BM802, LS-C11323) の Drug tolerance 測定値と 4P ロジスティック回帰曲線

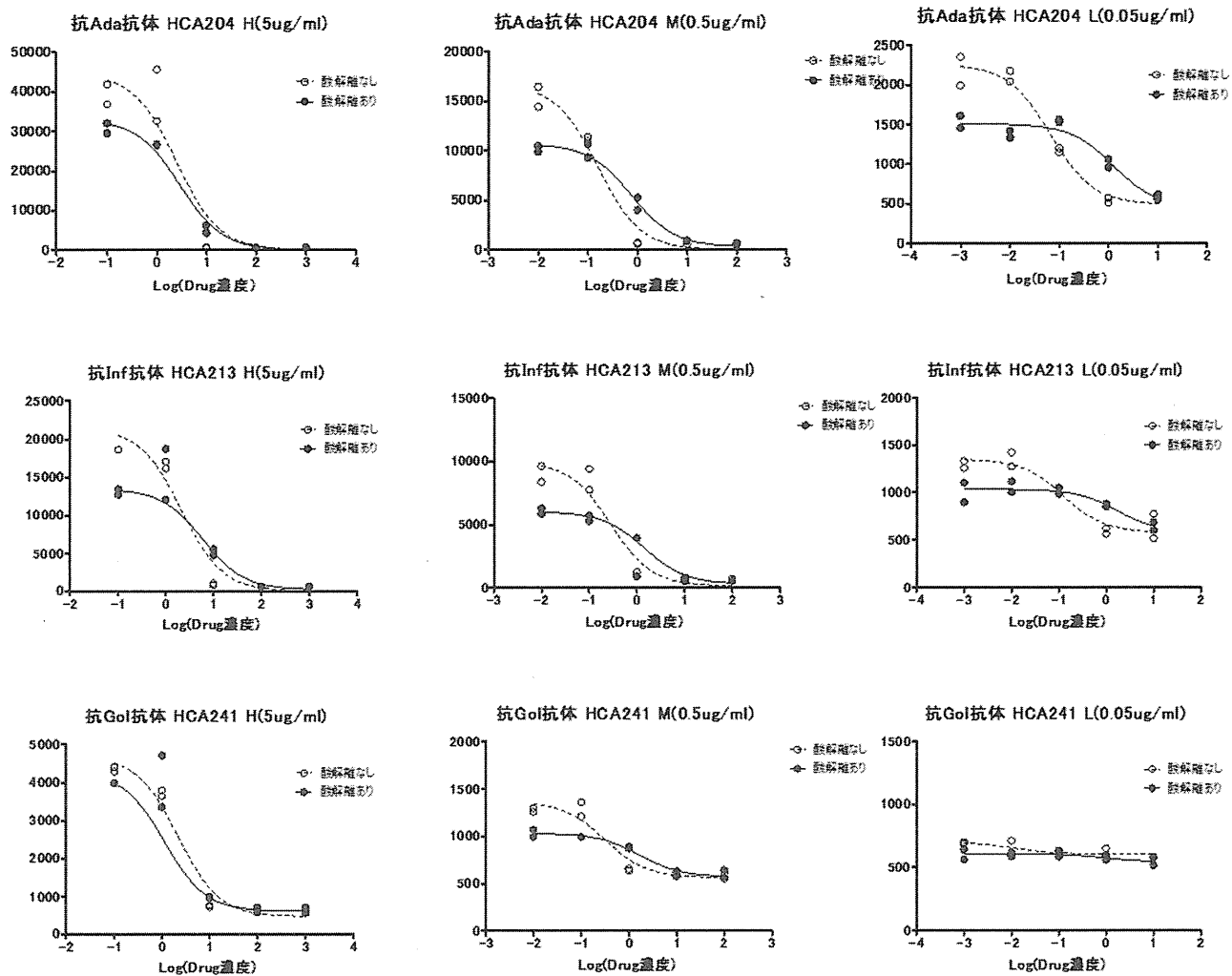


図 4b 抗 Adalimumab 抗体, 抗 Infliximab 抗体, 抗 Golimumab 抗体 の Drug tolerance 測定値と 4P ロジスティック回帰曲線

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題 バイオ医薬品の化学修飾と機能評価に関する研究

研究分担者 アステラス製薬 バイオ技術研究所 山口 秀人

要旨：バイオ医薬品の開発が活発化しており，①凝集体を評価する試験法，及び②糖鎖の恒常性を評価する試験法の整備の整備が急務となっている．①標準的な凝集体分析法の設定を目指し，今年度は特にポリスチレン粒子およびシリカ粒子を試料とし，DLS（動的光散乱法）およびLO（光遮蔽型自動微粒子測定法）の各試験法について検討を行った．DLSでは60，220，500 nmにおいて理論値±10%の50%粒径値が得られた．900 nm以上の粒子径は測定が困難であった．一方LOでは，一部の試料を除き少容量（1 mL）でも高容量（5 mL）と同等の粒子個数濃度，粒度分布，直線性および近似曲線の傾きを得ることが可能で，同等の測定が可能であった．②標準的な糖鎖試験法の設定を目指し，今年度は特にO型糖鎖の糖鎖分析法を取り上げ，試験法の検討を行った．2種の糖タンパク質（アバタセプト，フェツイン）から非還元的β脱離法にてO型糖鎖を遊離し，BlotGlyco（住友ベークライト）を用いて2-ABラベル化を行った．得られた試料をHPLC分析し，糖鎖構造を推定した．得られたクロマトグラムについてアバタセプトで90.7%，フェツインで86.7%の糖鎖構造を推定した．

## 第一部 凝集体試験法

研究協力者

古木 健一朗 アステラス製薬バイオ技術研究所  
主任研究員  
熊谷 崇 アステラス製薬バイオ技術研究所  
研究員  
武藤 峻 アステラス製薬バイオ技術研究所  
研究員

### A. 目的

バイオ医薬品の開発が活発化しており，凝集体を評価する試験法の整備が急務となっている．

本研究では，標準的な凝集体分析法の設定を目指し，今年度は特にポリスチレン粒子およびシリカ粒子を試料とし，DLS（動的光散乱法）およびLO（光遮蔽型自動微粒子測定法）の各試験法について検討を行った．

### B. 研究方法

#### (1)試料

##### (1-1)DLS 分析用

送付された以下の試料を用い，攪拌および超音波処理10分を行った後，12時間以内に測定を実施した．

- ・ポリスチレン 粒子径 60 nm  
0.000025%，0.00005%，0.0001%，0.00025%，  
0.0005%，0.001%の6系列．

- ・ポリスチレン 粒子径 220 nm  
0.000025%，0.00005%，0.0001%，0.00025%，  
0.0005%，0.001%の6系列．
- ・ポリスチレン 粒子径 500 nm  
0.000025%，0.00005%，0.0001%，0.00025%，  
0.0005%，0.001%の6系列．
- ・ポリスチレン 粒子径 900 nm  
0.000025%，0.00005%，0.0001%，0.00025%，  
0.0005%，0.001%の6系列．
- ・シリカ 粒子径 1000 nm  
0.00005%，0.0001%，0.0002%，0.0005%，0.001%，  
0.002%の6系列．
- ・ポリスチレン 粒子径 2000 nm  
0.00005%，0.0001%，0.00025%，0.0005%，  
0.001%の5系列．

##### (1-2)LO 分析用

送付された以下の試料を用いた．試料は20回，ゆっくりと転倒混和し，2分間静置した後，測定した（日本薬局方「注射剤の不溶性微粒子試験法」およびUSP788「Particulate matter in injection」に準じた）．

- ・ポリスチレン(PS) 粒子径:10 μm  
0.00001%，0.000025%，0.00005%，0.0001%，  
0.00025%，0.0005%，0.001%の7系列．
- ・ポリスチレン(PS) 粒子径:5 μm  
0.00001%，0.000025%，0.00005%，0.0001%，  
0.00025%，0.0005%，0.001%の7系列．
- ・ポリスチレン(PS) 粒子径:2 μm

0.00005%, 0.0001%, 0.00025%, 0.0005%, 0.001%の5系列。

## (2)測定

### (2-1) DLS 分析

以下の装置, 条件で実施した。

- ・装置：UPA-UT（日機装）
  - ・透過性：透過
  - ・試料屈折率：1.59<sup>\*1</sup>
  - ・試料形状：真球形
  - ・溶媒屈折率：1.333
  - ・測定時間：120 s<sup>\*2</sup>
  - ・測定回数：3回
  - ・測定試料量：20 μL
- \*1: ポリスチレン測定時(シリカ測定時は1.48を使用)
- \*2: 粒子径 900 nm, 1000 nm は 240 s で測定

測定後, 下記6項目の数値データをまとめた。

- ・MV：体積平均径
- ・MN：個数平均径
- ・MA：面積平均径
- ・CS：比表面積 (m<sup>2</sup>/ml)
- ・SD：(d84%－d16%) / 2
- d84%：累積カーブが84%となる点の粒径 (μm)
- d16%：累積カーブが16%となる点の粒径 (μm)
- ・50%粒径：累積カーブが50%となる点の粒径

### (2-2) LO 分析

以下の装置, 条件で実施した。

- ・装置：KL-04A(Lion)
- ・測定シリンジ容量：25 mL
- ・吸引流量：25 mL/min
- ・空吸引容量：2.0 mL
- ・測定容量：1.0 mL および 5.0 mL
- ・空測定回数：1回
- ・測定回数：3回
- ・排出流量：100 mL/min
- ・洗浄：測定終了毎 (精製水 25 mL)

(倫理面への配慮)

市販品を試料として用いていることから, 特に配慮を必要としない。

## C. 研究結果

### (1) DLS 分析

#### 粒子径：60 nm

試料濃度 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%の結果を図 1～4 および表 1 に示す。試料濃度 0.00005%, 0.000025%の結果は十分な感度が得ら

れなかったためデータ不採用とした。

n=3 の繰り返し測定において, 0.001%, 0.0005% は粒度分布図に再現性がみられたが, 0.00025%, 0.0001%では粒度分布図の再現性が低下した。

表 1 において, 各濃度の 50%粒径は 61 nm～65 nm であった。

#### 粒子径：220 nm

試料濃度 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%, 0.00005%, 0.000025%の結果を図 5～10 および表 2 に示す。

n=3 の繰り返し測定において, 0.001%, 0.0005%, 0.00025%粒度分布図に再現性がみられたが, 0.0001%, 0.00005%, 0.000025%では粒度分布図の再現性が低下した。

表 2 において, 各濃度の 50%粒径は 224 nm～240 nm であった。

#### 粒子径：500 nm

試料濃度 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%の結果を図 11～14 および表 3 に示す。試料濃度 0.00005%, 0.000025%の結果は十分な感度が得られなかったためデータ不採用とした。

n=3 の繰り返し測定において, 粒度分布図の再現性が低かった。

表 3 において, 各濃度の 50%粒径は 464 nm～531 nm であった。

#### 粒子径：900 nm

試料濃度 0.001%の結果を図 15 および表 4 に示す。試料濃度 0.0005%で十分な感度が得られなかったためデータ不採用とし, 0.00025%以下の濃度は測定を実施しなかった。

n=3 の繰り返し測定において, 粒度分布図の再現性が低かった。50%粒径は 1064 nm であった。

#### 粒子径：1000 nm

試料濃度 0.001%の結果を図 16 および表 5 に示す。試料濃度 0.0005%で十分な感度が得られなかったためデータ不採用とし, 0.00025%以下の濃度は測定を実施しなかった。

n=3 の繰り返し測定において, 粒度分布図の再現性が低かった。50%粒径は 1698 nm であった。

#### 粒子径：2000 nm

試料濃度 0.001%の結果を図 17 および表 6 に示す。試料濃度 0.0005%で十分な感度が得られなかったためデータ不採用とし, 0.00025%以下の濃度は測定を実施しなかった。

n=3 の繰り返し測定において, 粒度分布図の再

現性が低かった。50%粒径は2250 nmであった。

900 nm以上の粒子径は、測定時間240s以上の測定も実施したが、良好な再現性を得ることができなかった。

## (2) LO分析

### 粒子径：10 μm

測定容量5 mLの結果を表7に示す。試料は、繰り返し回数(3)で良好な再現性を示し、測定値は、試料を球形と仮定した場合の理論値に近い結果が得られた。粒子径も10±1 μmに約85%分布している結果が得られた(図18)。また、0.00001%~0.0005%の間で、良好な直線性を示し、相関係数は、0.9989であった(図19)。なお、0.001%は、装置の定格粒子個数濃度(10000個/mL)を超過しているため、解析に含めないものとした。

測定容量1 mLの結果を表8に、示す。試料は、繰り返し回数(3)で良好な再現性を示し、測定値は、試料を球形と仮定した場合の理論値に近い結果が得られた。粒子径も測定容量5 mLと同様に、10±1 μmに約85%分布している結果が得られた(図20)また、0.00001%~0.0005%の間で、良好な直線性を示し、相関係数は、0.9995であった(図21)。そして、近似曲線は5 mLでの測定と同等の傾きを示した。なお、0.001%は、装置の定格粒子個数濃度(10000個/mL)を超過しているため、解析に含めないものとした。

### 粒子径：5 μm

測定容量5 mLの結果を表9に示す。試料は、繰り返し回数(3)で良好な再現性を示し、測定値は、試料を球形と仮定した場合の理論値に近い結果が得られた。粒子径も5±1 μmに約85%分布している結果が得られた(図22)。また、0.00001%~0.00005%の間で、良好な直線性を示し、相関係数は、0.9989であった(図23)。なお、0.0001%~0.001%は、装置の定格粒子個数濃度(10000個/mL)を超過しているため、解析に含めないものとした。

測定容量1 mLの結果を表10に、示す。試料は、繰り返し回数(3)で良好な再現性を示し、測定値は、試料を球形と仮定した場合の理論値に近い結果が得られた。粒子径も測定容量5 mLと同様に、5±1 μmに約85%分布している結果が得られた(図24)また、0.00001%~0.00005%の間で、良好な直線性を示し、相関係数は、0.9995であった(図25)。そして、近似曲線は5

mLでの測定と同等の傾きを示した。なお、0.0001%~0.001%は、装置の定格粒子個数濃度(10000個/mL)を超過しているため、解析に含めないものとした。

### 粒子径：2 μm

測定容量1 mLおよび5 mLともに、0.00005%、0.0001%において、装置の定格粒子個数濃度(10000個/mL)を大きく超過していたため、測定不能であった(測定容量5 mL：表11、測定容量1 mL：表12)。

## D. 考察

### (1) DLS分析

本DLS測定は、装置検出部の上に液滴を添加する測定系である。そのため、大きな粒子径の試料では、粒子の沈降により粒度分布がばらつき、また、ブラウン運動が遅いため十分な感度を得ることができない場合がある。今回の測定において、900 nm以上の粒子径では、再現性を得られず、50%粒子径も理論値±10%以上であったため、測定が困難なケースであると考えられた。

60nm, 220 nmの50%粒径において、理論値±10%であった。

500 nmでは50%粒径は理論値±10%であったが、粒度分布の再現性は低かった。試料濃度が高くなるにつれ粒度分布の再現性が改善していることから、より高い試料濃度で測定を実施することが必要と考えられる。

### (2) LO分析

本研究では、LION社製の光遮蔽型微粒子測定装置：KL-04Aを用いて、粒子径10, 5, 2 μmについて、各濃度の試料の粒子個数濃度(個/mL)測定し、粒度分布、直線性を確認した。また、粒子個数濃度(個/mL)、粒度分布、直線性について高容量測定(5 mL)と少容量測定(1 mL)の比較を行った。

装置の定格粒子個数濃度の範囲内において、粒子径10, 5 μmの試料いずれにおいても、粒子個数濃度(個/mL)粒子分布、直線性ともに良好な結果が得られた。

また、粒子個数濃度(個/mL)粒子分布、直線性、近似曲線の傾き、いずれも、高容量測定(5 mL)と少容量測定(1 mL)で同等の結果が得られた。一方で、粒子径10 μmの0.00001%~0.0001%および粒子径5 μmの0.00001%の試料では、高容量測定(5 mL)と比べて、少容量測定(1 mL)の方が相対標準偏差が2~6%程度、大きくなる傾向がみ

られた。これらの試料は、いずれも粒子個数濃度 2000 個/mL 以下の試料であり、このことから、粒子個数濃度 2000 個/mL 以下では、高容量の方がばらつきは小さくなることが、示唆された。

## E. 結論

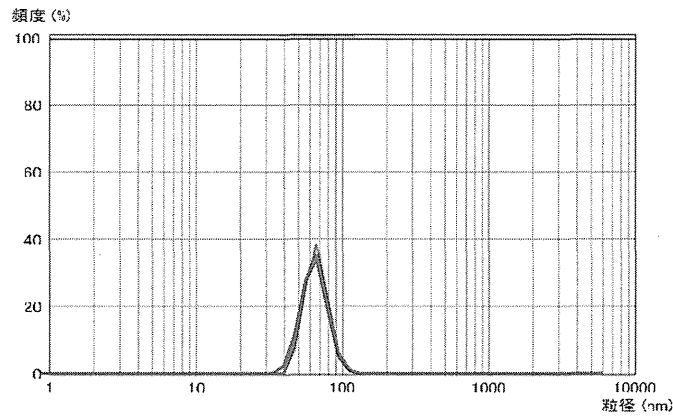
### (1) DLS 分析

今回の測定では、60, 220, 500 nm において理論値±10%の 50%粒径値が得られた。900 nm 以上の粒子径は測定が困難であると示唆された。

500 nm の粒子径の結果から、試料濃度を高くすることで、再現性が改善することが示唆された。

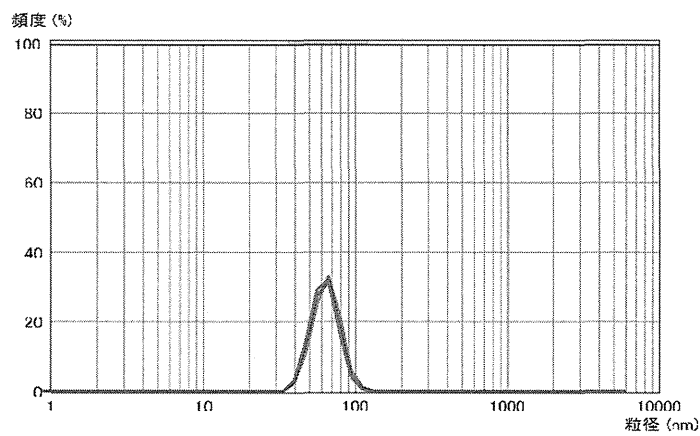
### (2) LO 分析

本研究において、少容量 (1 mL) でも高容量 (5 mL) と同等の粒子個数濃度、粒度分布、直線性および近似曲線の傾きを得ることが可能で、同等の測定が可能であることが示唆された。一方で、粒子個数濃度 2000 個/mL 以下では、高容量の方がばらつきが小さくなることから、試料の量、測定個数範囲、要求する精度を考慮し、測定容量を決定する必要があると考える。



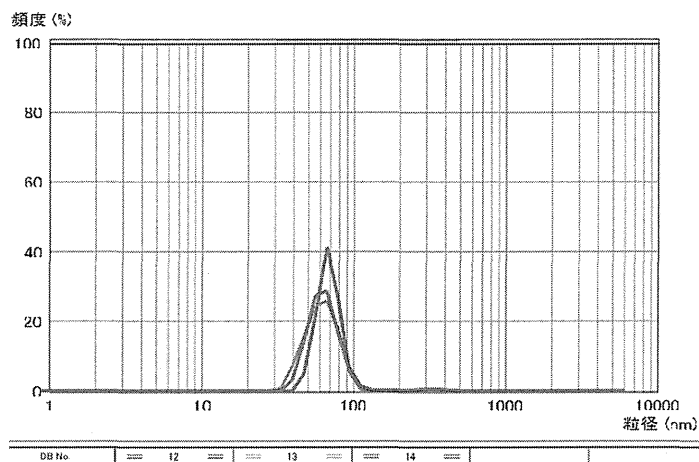
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.046	64.45	57.68	62.09	96.63	12.40	63.39
No.2	0.050	66.62	61.17	64.70	92.74	11.55	65.52
No.3	0.035	66.23	60.23	64.06	93.67	12.20	64.73
平均	0.040	65.77	59.69	63.62	94.35	12.05	64.55
標準偏差	0.01	1.16	1.81	1.36	2.03	0.44	1.08
CV%	17.79	1.76	3.03	2.14	2.15	3.69	1.67

図1 粒子径 60 nm, 試料濃度 0.001%の測定結果



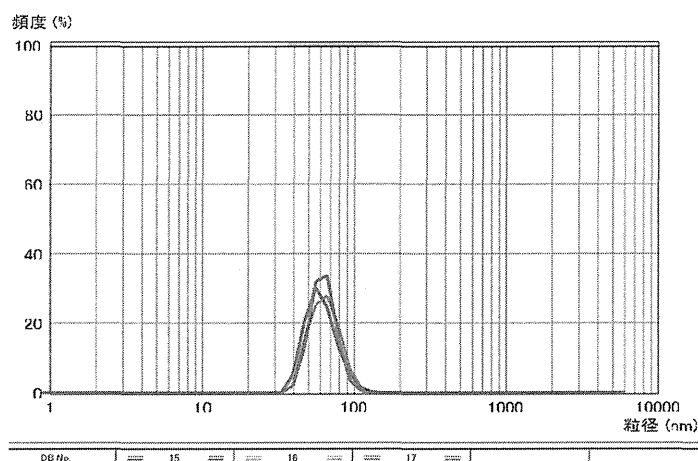
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.024	64.43	56.96	61.77	97.13	13.22	63.03
No.2	0.024	65.65	58.25	63.10	95.09	13.10	64.75
No.3	0.043	63.02	56.21	60.62	98.97	12.40	61.89
平均	0.030	64.37	57.14	61.83	97.06	12.91	63.22
標準偏差	0.01	1.32	1.03	1.24	1.94	0.44	1.44
CV%	36.57	2.04	1.81	2.01	2.00	3.43	2.28

図2 粒子径 60 nm, 試料濃度 0.0005%の測定結果



	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.010	67.97	62.92	66.24	90.58	11.02	67.18
No.2	0.008	63.17	53.14	59.56	100.73	15.62	61.58
No.3	0.011	70.25	56.14	62.37	96.19	14.42	62.60
平均	0.010	67.13	57.4	62.72	95.84	13.69	63.79
標準偏差	0.00	3.61	5.01	3.35	5.08	2.39	2.98
CV%	15.28	5.38	8.73	5.35	5.31	17.43	4.68

図3 粒子径 60 nm, 試料濃度 0.00025%の測定結果



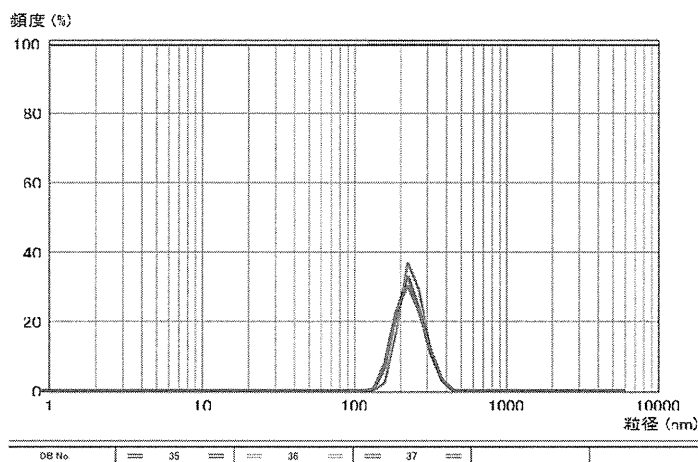
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.003	61.55	53.70	58.54	102.49	13.69	58.93
No.2	0.003	64.13	55.47	61.02	98.33	14.71	62.64
No.3	0.003	62.89	56.98	60.81	98.67	11.39	61.71
平均	0.003	62.86	55.38	60.12	99.83	13.26	61.09
標準偏差	0.00	1.29	1.64	1.38	2.31	1.70	1.93
CV%	0.00	2.05	2.96	2.29	2.31	12.83	3.16

図4 粒子径 60 nm, 試料濃度 0.0001%の測定結果



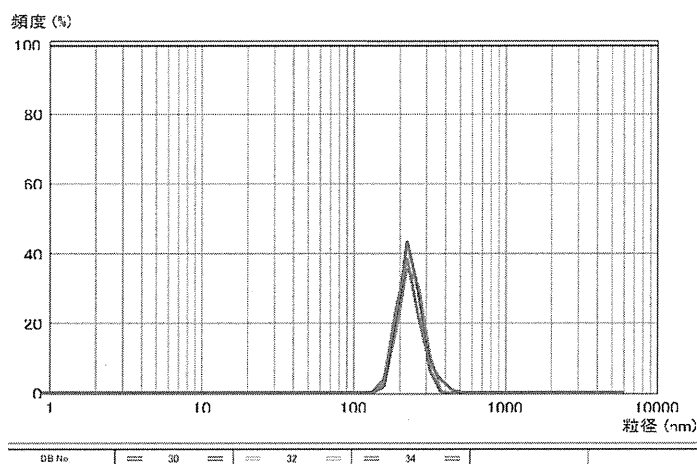
表 1 粒子径 60 nm の測定結果 (平均値)

濃度	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
0.001%	0.044	65.77	59.69	63.62	94.35	12.05	64.55
0.0005%	0.030	64.37	57.14	61.83	97.06	12.91	63.22
0.00025%	0.010	67.13	57.40	62.72	95.84	13.69	63.79
0.0001%	0.003	62.86	55.38	60.12	99.83	13.26	61.09
0.00005%	十分な感度が得られなかった						
0.000025%							



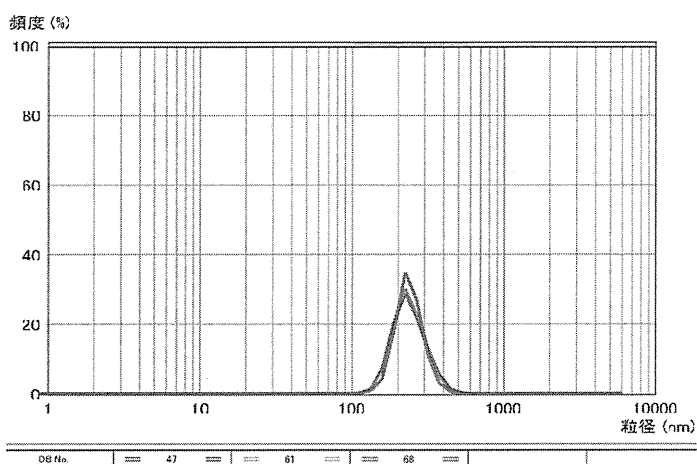
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.866	234.55	208.69	225.16	26.65	47.97	227.70
No.2	0.405	241.74	220.81	234.23	25.62	42.90	235.70
No.3	0.612	234.13	205.84	223.8	26.81	51.34	226.70
平均	0.612	234.13	205.84	223.8	26.81	51.34	226.70
標準偏差	0.23	4.28	7.95	5.67	0.65	4.25	4.93
CV%	37.73	1.83	3.86	2.53	2.41	8.28	2.18

図 5 粒子径 220 nm, 試料濃度 0.001% の測定結果



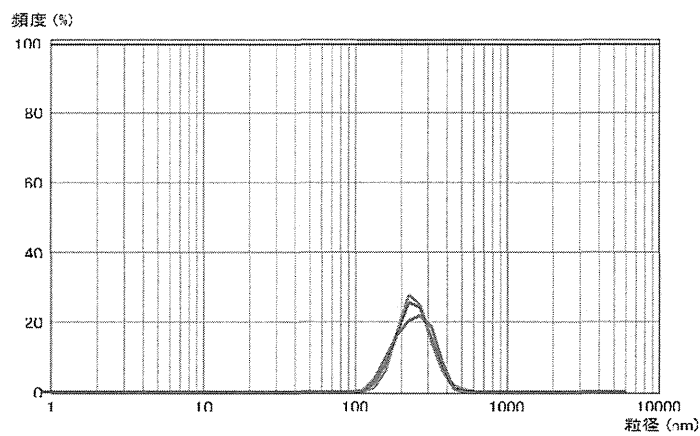
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.435	233.57	218.92	228.50	26.26	35.37	230.20
No.2	0.331	237.55	216.25	230.40	26.04	41.91	235.00
No.3	0.475	237.00	214.69	228.31	26.28	43.37	227.10
平均	0.414	236.04	216.62	229.07	26.19	40.22	230.77
標準偏差	0.07	2.16	2.14	1.16	0.13	4.26	3.98
CV%	17.95	0.91	0.99	0.50	0.51	10.59	1.72

図6 粒子径 220 nm, 試料濃度 0.0005%の測定結果



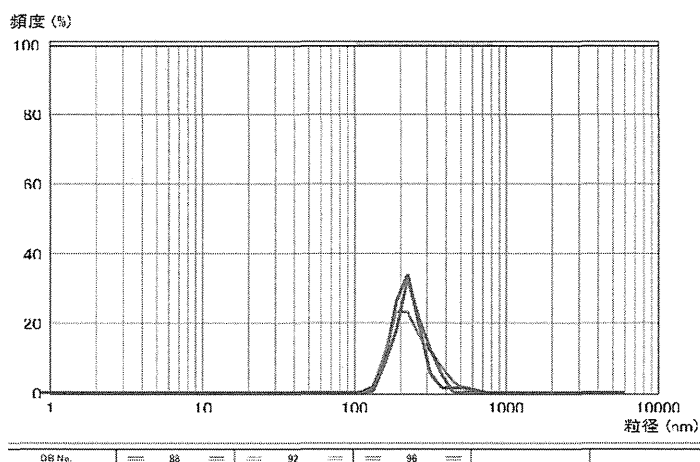
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.183	243.04	206.08	229.01	26.20	58.55	231.60
No.2	0.156	240.42	205.21	227.95	26.32	55.54	231.90
No.3	0.410	240.30	212.08	230.51	26.03	46.24	233.70
平均	0.250	241.25	207.79	229.16	26.18	53.44	232.40
標準偏差	0.14	1.55	3.74	1.29	0.15	6.42	1.14
CV%	55.80	0.64	1.80	0.56	0.56	12.01	0.49

図7 粒子径 220 nm, 試料濃度 0.00025%の測定結果



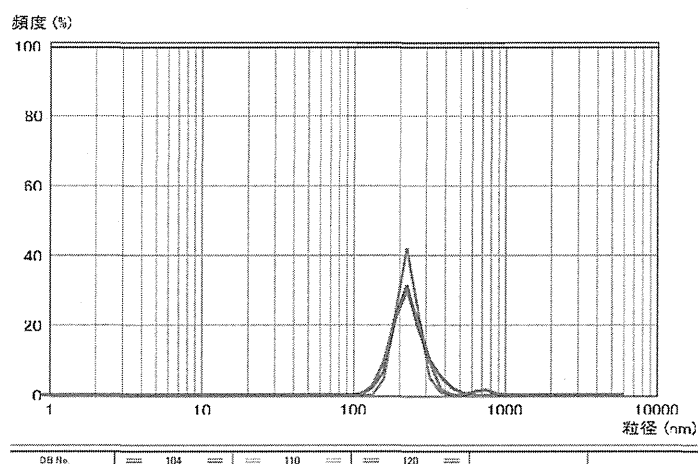
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.133	244.83	203.27	230.03	26.08	61.84	237.90
No.2	0.091	249.74	210.76	235.12	25.52	59.12	239.40
No.3	0.114	247.05	196.21	228.93	26.21	71.14	241.70
平均	0.113	247.21	203.41	231.36	25.94	64.03	239.67
標準偏差	0.02	2.46	7.28	3.30	0.37	6.30	1.91
CV%	18.61	0.99	3.58	1.43	1.41	9.84	0.80

図8 粒子径 220 nm, 試料濃度 0.0001%の測定結果



	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.056	234.82	202.40	220.30	27.24	45.32	219.90
No.2	0.066	244.32	195.62	224.50	26.73	72.09	224.90
No.3	0.040	238.88	204.60	226.49	26.49	55.64	229.90
平均	0.054	239.34	200.87	223.76	26.82	57.68	224.90
標準偏差	0.01	4.77	4.68	3.16	0.38	13.50	5.00
CV%	24.29	1.99	2.33	1.41	1.43	23.41	2.22

図9 粒子径 220 nm9-10, 試料濃度 0.00005%の測定結果



	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.038	239.56	200.18	224.55	26.72	56.44	226.10
No.2	0.031	227.22	210.63	221.44	27.10	36.39	223.90
No.3	0.052	241.51	197.44	221.14	27.13	53.11	223.90
平均	0.040	236.10	202.75	222.38	26.98	48.65	224.63
標準偏差	0.01	7.75	6.96	1.89	0.23	10.74	1.27
CV%	26.73	3.28	3.43	0.85	0.85	22.09	0.57

図 10 粒子径 220 nm, 試料濃度 0.000025%の測定結果

表 2 粒子径 220 nm の測定結果 (平均値)

濃度	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
0.001%	0.612	234.13	205.84	223.80	26.81	51.34	226.70
0.0005%	0.414	236.04	216.62	229.07	26.19	40.22	230.77
0.00025%	0.250	241.25	207.79	229.16	26.18	53.44	232.40
0.0001%	0.113	247.21	203.41	231.36	25.94	64.03	239.67
0.00005%	0.054	239.34	200.87	223.76	26.82	57.68	224.90
0.000025%	0.040	236.10	202.75	222.38	26.98	48.65	224.63