

いと考えられた。一方で、本試験法に規定された測定対象ではないものの、最近注目されている10 μ m未満の微粒子数についても同様に測定を行った。その結果、5 μ m以上の微粒子数は700個/容器以内で変動し、2 μ m以上の微粒子数は4000個/容器以内で変動した。これらについても経時的な変動は認められなかった(図1)。

別途、同じ試料について、サイズ排除クロマトグラフィーにて可溶性の会合体含量(%)を測定した(図2)。不溶性微粒子数に関しては経時的な変化は認められなかった一方で、可溶性の会合体に関しては経時的な増加が認められ、40 $^{\circ}$ C保管する前に比べ4週間後では3倍の会合体含量となった。

以上の結果から、今回の検討では、抗体溶液製剤を40 $^{\circ}$ Cで保管した場合、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(図3)。

C.2 光遮へい粒子計数法の希釈直線性及び精度の確認

凝集体共同研究班の共同研究において配布された段階希釈済の粒子径標準物質について、10 μ m以上の微粒子数及び5 μ m以上の微粒子をそれぞれ測定した。測定の際の試料の吸引量は5 mL、1 mL、0.2 mLと変動させた。なお、光遮へい型自動微粒子測定装置については、吸引量5 mLでの測定用に校正したものを用いた。

図4に測定結果を示した。横軸に粒子径標準物質の濃度、縦軸に得られた不溶性微粒子数をプロットした。その結果、全ての吸引量に関して、良好な希釈直線性があることが確認された。C.1における実際の溶液製剤を用いた検討における変動幅は、5 μ m以上の微粒子に関しては700個/容器以内、2 μ m以上の微粒子に関しては4000個/容器以内であったが、これらの粒子

径領域においても良好な直線性が認められており、C.1における測定結果の信頼性も確認できたと考えられる。

図4に示した測定は3回の試験結果の平均値であるが、3回の測定結果の相対標準偏差を図5に示した。吸引量5 mLでの試験結果に比較し、吸引量1 mL及び0.2 mLにおける試験結果の精度が相対的に低いことが示された。

D. 考察

今回の検討では、抗体溶液製剤を40 $^{\circ}$ Cで4週間保管したが、不溶性微粒子数と可溶性会合体含量の間には相関は認められなかった。今回採用した苛酷条件では可溶性会合体含量が苛酷前の3倍量に増加したものの、二量体(Dimer)より大きな会合体の顕著な増加は認められておらず、苛酷条件が不十分であった可能性も考えられる。一方で、より苛酷な条件下においても各種凝集体評価法の間に相関は認められないという報告もあり(Vasco F. et al. mAbs4:6, 740-752, 2012)、今回の結果はそれを再現する結果となった。

一方、日本薬局法の一般試験法である不溶性微粒子試験法に関し、微粒子標準品の測定に関し希釈直線性を確認したところ、広い微粒子数範囲で良好な直線性が確認できた。測定の際の吸引量を5 mLから1 mLや0.2 mLに減らした場合も、直線性は失われなかった。低吸引量で測定精度の悪化が認められたが、本検討で用いた光遮へい型自動微粒子測定装置は吸引量5 mLでの測定用に校正したものを用いており、吸引量1 mL及び0.2 mLでの測定用に装置を校正することで精度を向上できる可能性も考えられる。今後さらに、実際のたん白質製剤を用いた検討を行うなどし、不溶性微粒子試験法の精度及び直線性の確認を実施していきたいと考え

る。

E. 結論あるいは、まとめ

バイオ医薬品における特徴と課題を明らかにするため、本年度は先ず、不溶性微粒子試験について、基礎的データの採取を行った。今回の検討では、不溶性凝集体量と可溶性会合体含量の間に相関は認められなかった。一方で、標準微粒子を用いた検討では、良好な希釈直線性が認められ、光遮へい粒子計数法の適格性が確認できた。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表等

論文発表等

特になし。

学会発表等

特になし。

報道発表等

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

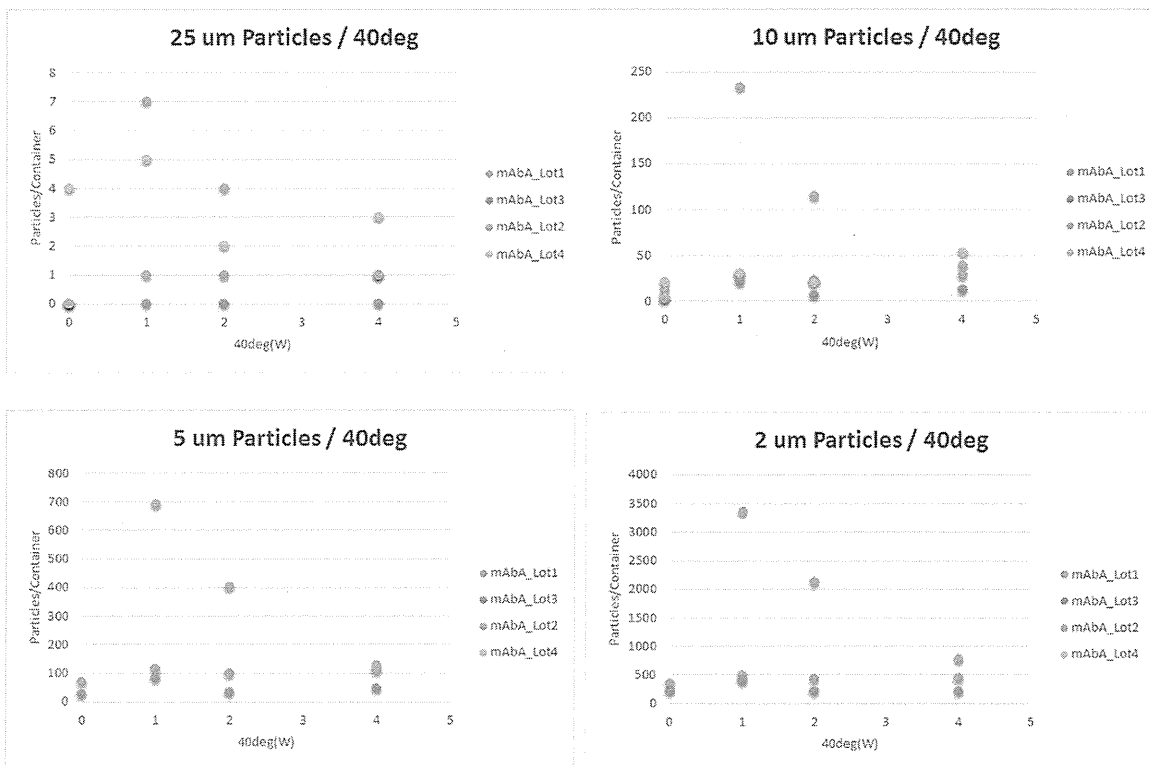


図1 抗体溶液製剤の不溶性微粒子数

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) 10 μm 以上の微粒子数、左下) 5 μm 以上の微粒子数、右下) 2 μm 以上の微粒子数

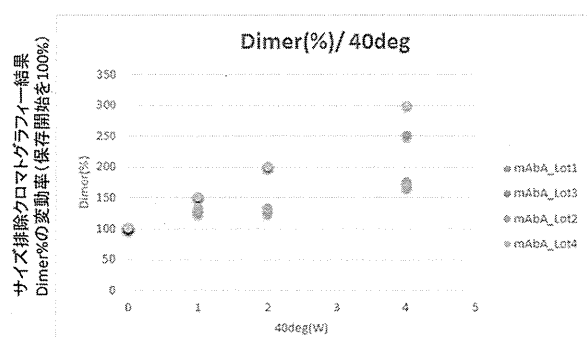


図2 抗体溶液製剤の可溶性会合体含量

図1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。

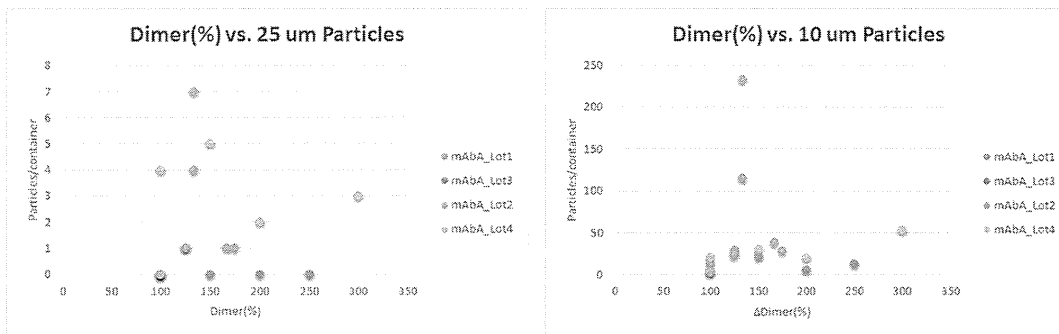


図3 抗体溶液製剤の不溶性微粒子数と可溶性会合体含量の相関
 微粒子数を縦軸に、会合体含量を横軸に、それぞれプロットした。
 左) 25 μm 以上の微粒子数、右) 10 μm 以上の微粒子数

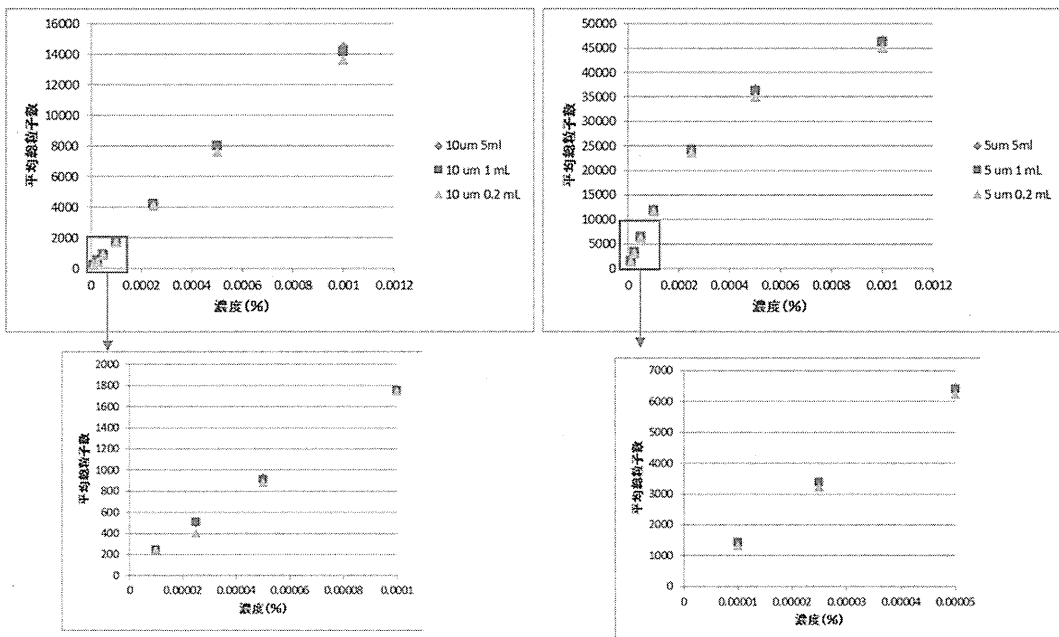


図4 粒子径標準物質の不溶性微粒子数
 段階希釈された粒子径標準物質をそれぞれ測定した。3回の試験結果の平均値を縦軸に、
 粒子径標準物質の濃度（理論値）を横軸に、それぞれプロットした。
 左) 10 μm 以上の微粒子数、右) 5 μm 以上の微粒子数

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 バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究
研究分担者 水野保子 東レリサーチセンター

要旨

① One-pot PMP 法及び LC-MS/MS 分析による O-結合型糖鎖の分析法について検討した。その結果、主に副生成物が検出され、One-pot PMP 法の更なる検討が必要であると考えられた。②ポリスチレン粒子（10, 5, 2 μm ）を用いて不溶性微粒子試験 低容量法の直線性データを取得したので報告する。なお、2 μm 粒子では $5.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}\%$ 、5 μm 粒子及び 10 μm 粒子では $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3}\%$ の範囲で評価した。

第一部 O-結合型糖鎖

研究協力者

森脇有加 東レリサーチセンター 生物科学研究部

A. 目的

O-結合型糖鎖分析条件の最適化を行うために、Fc 融合タンパク質及びウシフェチュインを用いて、One-pot PMP 法を検討した。

B. 研究方法

(1) 試料及び試薬

Fc 融合タンパク質は国立医薬品食品衛生研究所（以下衛研と記載）より提供され、ウシフェチュインはシグマアルドリッチ社より、3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP) は東京化成工業株式会社より、その他の試薬は高純度なものを購入し使用した。

(2) 糖鎖の遊離及び誘導体化

Fc 融合タンパク質及びウシフェチュインについて、以下の方法で糖鎖の遊離及び誘導体化

を行った。試料 5 mg を水 0.5 mL に溶解した。200 μL (2 mg 相当) 採取し遠心エバポレーターで減圧乾固した。0.5 mol/L PMP/28%アンモニア水溶液 400 μL に溶解し、50°C で 15 時間加熱後、窒素ブローで乾固した。水 1 mL に溶解後、氷酢酸 50 μL を添加した。ジクロロメタン 1 mL で 3 回洗浄後、14%アンモニア水 20 μL を添加した。窒素ブローで乾固後、水 1 mL に再溶解し、未精製 PMP 化 O-結合型糖鎖溶液を調製した。

アセトニトリル及び水で平衡化した SEP-PAK C18 に未精製 PMP 化 O-結合型糖鎖溶液をロードした。水 3 mL、5%アセトニトリル 3 mL 及び 10%アセトニトリル 3 mL で洗浄後、20%アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を遠心エバポレーターで減圧乾固した後、水 40 μL に溶解した。このうち 30 μL を採取し、氷酢酸 7.5 μL を添加した。ジクロロメタン 75 μL で洗浄後、14%アンモニア水 7.5 μL を添加、混合し、精製 PMP 化 O-結合型糖鎖溶液を調製した。

(3) PMP 化 O-結合型糖鎖の LC-MS/MS 分析

以下の条件で測定した。

装置：質量分析計：maXis impact

(Bruker Daltonics Inc.)

液体クロマトグラフ：LC-30A

(島津製作所)

検出波長：UV 245 nm

カラム：TSK-gel Amide 80 HR

(4.6 X 250 mm, 5 μm)

カラム温度：20°C

移動相 A：100 mmol/L 酢酸アンモニウム

(pH 6.0)

移動相 B：アセトニトリル

流量：毎分 1.0 mL (スプリット比 1 : 4)

移動相の送液：

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0~120	10→50	90→50

イオン化方式：ESI (Electrospray ionization)

測定イオン：正イオン

キャピラリー電圧：4500 V

ネブライザー：2.2 bar

ドライガス：8.0 L/分

Dry Temp：220°C

測定範囲 (MS 及び MSMS)：m/z 50~1550

コリジョンガス：窒素

<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. 結果

Fc 融合タンパク質及びウシフェチュインの O-結合型糖鎖を One-pot PMP 法により調製し、LC-MS/MS 分析した。

LC-MS/MS 分析により得られた PMP 化 O-結合型糖鎖のプロファイルを図 1 及び図 2 に示した。また、LC-MS/MS 分析により推定した各ピークの構造及びピーク面積から算出した含量

(%) を表 1 及び表 2 に示した。

Fc 融合タンパク質からは、Hex₂-2PMP (ピーク 1, 97%) に相当するピークが主に検出された。その他に Hex₃-2PMP (ピーク 2), NeuAc₁Hex₁-2PMP (ピーク 3) 及び NeuAc₁Hex₁HexNAc₁-2PMP (ピーク 4) に相当するピークがそれぞれ 1%程度検出された。

ウシフェチュインからは、ピーリング反応による副生成物と考えられるピークが最も多く検出された (ピーク 1, 63%)。その他に、NeuAc₁Hex₁HexNAc₁-2PMP (ピーク 2, 31%) 及び NeuAc₂Hex₁HexNAc₁-2PMP (ピーク 3, 6%) に相当するピークが検出された。

NeuAc₁Hex₁HexNAc₁-2PMP に相当する m/z 1005.40 のプロダクトイオンスペクトルを図 3 に示した。NeuAc₁Hex₁HexNAc₁-2PMP の構造を支持する結果であった。

D. 考察

Fc 融合タンパク質及びウシフェチュインから One-pot PMP 法により糖鎖を遊離・誘導体化し、LC-MS/MS により糖鎖プロファイルを作成した。各ピークを LC-MS/MS で帰属した。Fc 融合タンパク質からは、既報では報告がない Hex₂-2PMP に相当するピークが主成分として検出された。前処理中に生じた副生成物の可能性も考えられるが、詳細は不明である。ウシフェチュインからはピーリング反応による副生成物と考えられるピークが主成分として検出された。調製方法の更なる検討が必要であろう。

E. まとめ

O-結合型糖鎖分析法策定の一環として、One-pot PMP 法及び LC-MS/MS 分析による O-結合型糖鎖の分析を行った。O-結合型糖鎖試験法への適用可能性を、Fc 融合タンパク質由来糖鎖及びウシフェチュインを用いて検証した。本法では主に副生成物が検出され、現状では適用

は難しいと思われる。

F. 健康危機情報

本研究の各種操作を通常の方法で実施した場合には健康への影響はない。

G. 研究発表等

論文発表等（総説も含みます）

なし。

学会発表等

なし。

報道発表等

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

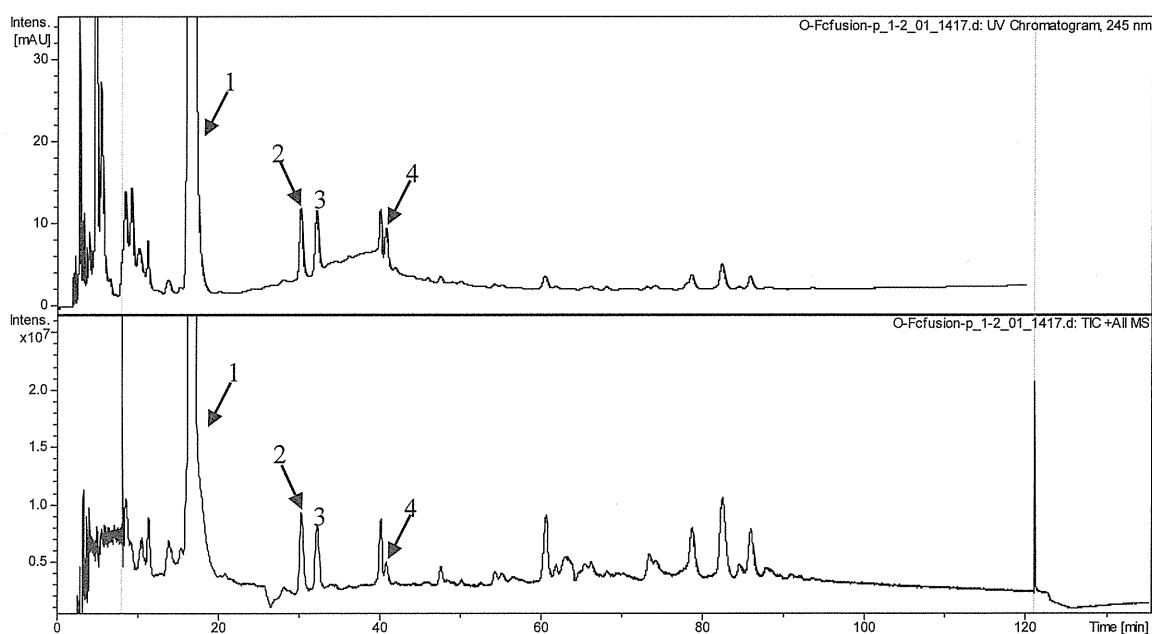


図1 Fc融合タンパク質のから調製したPMP化O-結合型糖鎖のLC-MS/MS分析

上段：UVクロマトグラム

下段：トータルイオンカレントクロマトグラム

表1 Fc融合タンパク質から調製したPMP化O-結合型糖鎖の組成比

ピーク	保持時間 (分)	ピーク 面積 (UV)	含量 (%)	分子量		推定糖鎖構造
				計算値	理論値	
1	16.4	18795	97.1	672.27	672.27	Hex ₂ -2PMP
2	30.1	250	1.3	834.32	834.32	Hex ₃ -2PMP
3	32.1	220	1.1	801.31	801.31	NeuAc ₁ Hex ₁ -2PMP
4	40.7	100	0.5	1004.38	1004.39	NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc ₁ -2PMP
Total		19365	100.0			

Hex：ヘキソース

HexNAc：N-アセチルヘキソサミン

NeuAc：N-アセチルノイラミン酸

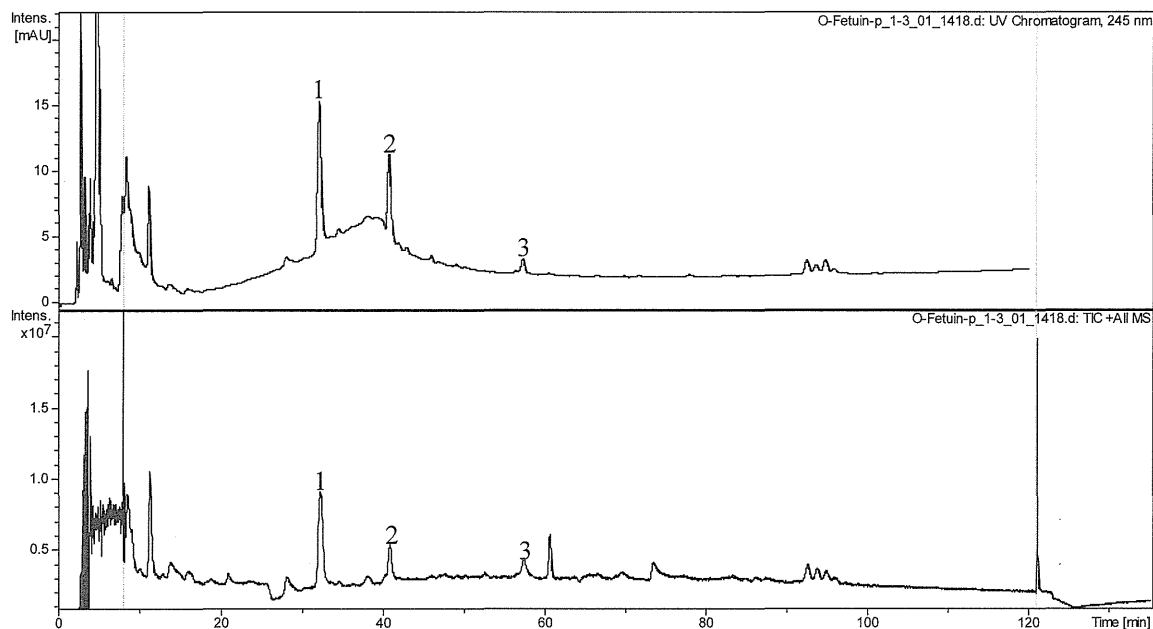


図2 ウシフェチュインから調製した PMP 化 O-結合型糖鎖の LC-MS/MS 分析

上段：UV クロマトグラム

下段：トータルイオンカレントクロマトグラム

表2 ウシフェチュインから調製した PMP 化 O-結合型糖鎖の組成比

ピーク	保持時間 (分)	ピーク 面積 (UV)	含量 (%)	分子量		推定糖鎖構造
				計算値	理論値	
1	32.1	333	63.2	801.31	801.31	NeuAc ₁ Hex ₁ -2PMP
2	40.7	164	31.1	1004.39	1004.39	NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc ₁ -2PMP
3	57.2	30	5.7	1295.48	1295.48	NeuAc ₂ Hex ₁ HexNAc ₁ -2PMP
Total		527	100.0			

Hex：ヘキソース

HexNAc：N-アセチルヘキソサミン

NeuAc：N-アセチルノイラミン酸

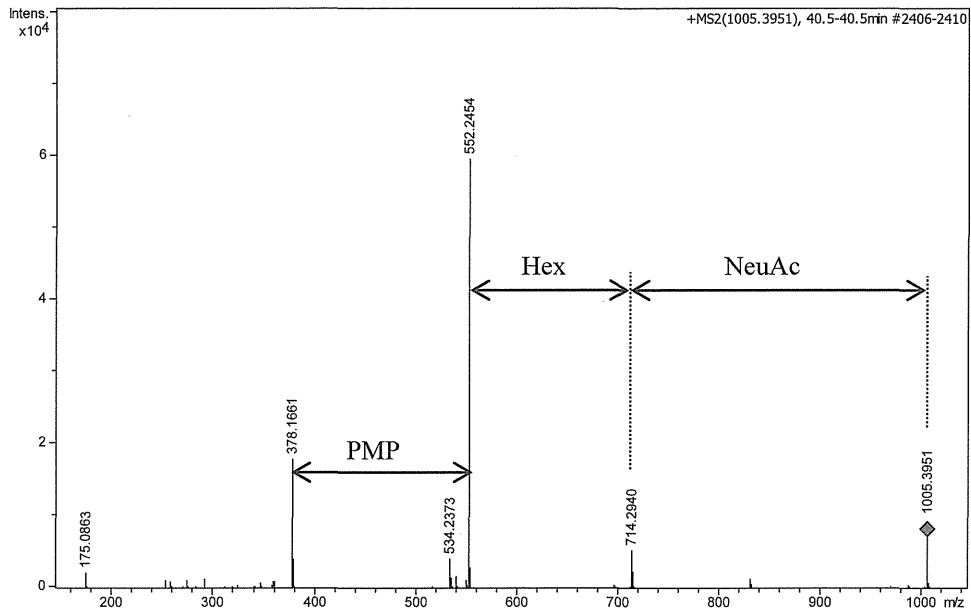


図3 m/z 1005.40 (NeuAc₁Hex₁HexNAc₁-2PMP) のプロダクトイオンスペクトル

Hex : ヘキソース

NeuAc : N-アセチルノイラミン酸

第二部 凝集体

研究協力者

吉永良介, 小川泰一郎 (榊東レリサーチセンター 名古屋研究部)

A. 目的

光遮蔽粒子計数装置 (以下 LO) を用いてたん白質製剤の凝集体評価 (対象粒子径: 2~10 μm) を実施するにあたり, ポリスチレン粒子 (対象粒子径: 2, 5, 10 μm) で LO (低容量法) の定量性を確認した。

B. 研究方法

国立医薬品食品衛生研究所提供の各濃度のポリスチレン粒子溶液 ($1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3}\%$) を測定した。2 μm 粒子の溶液について粒子数が多いことから 100 倍希釈をした後 ($5.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5}\%$), 測定を行った。

<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. 結果と考察

10 μm 粒子については, 濃度 (%) に対する平均総粒子数の回帰直線は $y = 1.52 \times 10^7 x + 183$, 相関係数 (r) 0.999 であり, 良好な直線性が得られた。

5 μm 粒子については, 濃度 (%) に対する平均総粒子数の回帰直線は $y = 6.25 \times 10^7 x + 5,851$, 相関係数 (r) 0.965 であった。 5.0×10^{-4} 及び 1.0×10^{-3} の高濃度ポイントが直線性から外れており, 良好な直線性が得られなかった。原因は高濃度ポイントにおける 5 μm 粒子の個数が LO の最大粒子個数濃度を超えてためと考えられる。

2 μm 粒子については, 濃度 (%) に対する平均総粒子数の回帰直線は $y = 9.32 \times 10^8 x + 322$, 相関係数 (r) 0.998 であり, 良好な直線性が得られた。

D. まとめ

ポリスチレン粒子 (2, 5, 10 μm) において, LO の最大粒子個数濃度を超えない範囲で良好な直線性が得られた。しかし, すべての粒子径の結果について既知濃度と比較して実測濃度は低く得られていた。これは溶液中のポリスチレン粒子が容器の底に沈殿しやすく, 測定溶液が均一でなかったことが原因と考えられる。

F. 健康危機情報

本研究の各種操作を通常の方法で実施した場合には健康への影響はない。

G. 研究発表等

論文発表等 (総説も含みます)

なし。

学会発表等

なし。

報道発表等

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

分担課題名 バイオ医薬品の糖鎖・不純物の評価法について

研究分担者 横山 毅 所属 一般社団法人 日本血液製剤機構

ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ を用い、DLS によるポリスチレンビーズおよびシリカビーズの粒子径測定を実施した。第 16 改正日本薬局方参考資料で定められている判定基準『ポリスチレンラテックス粒子の場合、平均粒子径の測定値は根付けられた粒子径範囲から 2%以内でなければならない』『再現性については相対標準偏差が 2%未満でなければならない。』『多分散指数の測定値は、0.1 未満でなければならない。』のすべてに適合する検体はなかった。

研究協力者 手島 澄人

A. 研究目的

バイオ医薬品の原薬・製剤中に含まれる目的物質由来不純物（凝集体等）及び製造工程由来不純物（宿主細胞由来タンパク質：HCP 等）は管理すべき品質特性と考えられることが多い。特に凝集体は免疫原性等ヒトに投与された際に予期せぬ免疫応答を引き起こす可能性が指摘されており、その評価手法に大きな関心が寄せられている。

本研究では、種々のストレスによって誘導される凝集体の特性を解析するとともに、それらの分析法を比較することで、凝集体の特性毎に適した評価手法の開発と標準化を行う。加えて、近年特に管理方法の在り方について高い関心が寄せられている HCP について、生産細胞による HCP の特性の差異及びその評価手法に関する研究を実施する。これらの研究の遂行により、バイオ医薬品不純物の品質管理戦略の構築への貢献が期待される。

B. 研究方法

ELSZ の電源を入れ、30 分間暖機運転した。測定検体を減圧脱気した後、清浄な圧縮空気でダストを吹き飛ばしたディスポーザブルセルに 2 mL 程度入れ、測定部のホルダーに差し込む。解析ソフト ELSZ で以下の条件となる分析用の SOP を作成して測定を実施した。

条件①

測定原理： 光子相関法
光学配置： ホモダイン法
測定角度： 165.0
測定温度： 25°C±0.3°C

分散媒： WATER(屈折率 1.3328, 粘度 0.8878)

積算回数： 70 回

試料濃度： ポリスチレンビーズ 60 nm : 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%, 0.00005%, 0.000025%を測定した。

※国立医薬品食品衛生研究所において水で希釈調製されたものを用いた。

分布解析： CONTIN 法

条件②

測定原理： 光子相関法

光学配置： ホモダイン法

測定角度： 165.0

測定温度： 25°C±0.3°C

分散媒： WATER(屈折率 1.3328, 粘度 0.8878)

積算回数： 70 回

試料濃度： ポリスチレンビーズは各粒子径に対し 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%, 0.00005%, 0.000025%を、シリカビーズは 0.002%, 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001%, 0.00005%を測定した。※国立医薬品食品衛生研究所において水で希釈調製されたものを用いた。なお、500 nm の粒子に関しては、日本血液製剤機構中央研究所において 0.001% の検体より、LC/MS 用超純水および国立医薬品食品衛生研究所より送付された水で 4 倍希釈した 0.00025% の検体も測定した。

分布解析： MARQUARDT 法

各検体、各条件につき 1 もしくは 3 回の測定を行い、平均粒子径及び多分散指数を記録した。第

16 改正日本薬局方 参考資料で定められている以下の3つの判定基準より、適合、不適合を判断した。

【判定基準】

- I. ポリスチレンラテックス粒子の場合、平均粒子径の測定値は根付けられた粒子径範囲から2%以内でなければならない。
- II. 再現性については相対標準偏差が2%未満でなければならない。
- III. 多分散指数の測定値は、0.1 未満でなければならない。

(倫理面への配慮)

研究対象としてヒトおよび実験動物を本試験では用いないため、人権擁護上の配慮、動物愛護上の配慮は特に必要がないものと判断した。

C. 研究結果

平均粒径に関しては、すべての検体において測定値が表示値よりも高値であり、第16改正日本薬局方 参考資料で定められている判定基準『ポリスチレンラテックス粒子の場合、平均粒子径の測定値は根付けられた粒子径範囲から2%以内でなければならない』に適合しなかった(図,表1~6)。

平均粒径の相対標準偏差(CV)に関しては、60 nm : 0.0001, 0.00025, 0.0005, 0.001%、220 nm : 0.0005, 0.0001, 0.00025, 0.0005, 0.001%、500 nm : 0.00025, 0.001%、900 nm : 0.00025%において第16改正日本薬局方 参考資料で定められている判定基準『再現性については相対標準偏差が2%未満でなければならない。』に適合したものの、他の条件では不適合であった(図,表1~6)。

多分散指数に関しては、60 nm : 0.0001, 0.00025, 0.0005, 0.001%、220 nm : 0.0001, 0.00025, 0.0005, 0.001%、500 nm : 0.001%において第16改正日本薬局方 参考資料で定められている判定基準『多分散指数の測定値は、0.1 未満でなければならない。』に適合したものの、他の条件では不適合であった(図,表1~6)。

D. 考察

約7000~8500 nmに相当する高粒子径ピークが検出されたことが第16改正日本薬局方参考資料

で定められている判定基準に適合しない主原因と考えられた。高粒子径ピークが検体のコンタミネーションに起因するのか、水で希釈したことで生じたポリスチレンビーズの凝集体に起因するのか確認するため、高粒子径ピークが検出されなかった500 nm : 0.001%の検体をLC/MS用超純水および国立医薬品食品衛生研究所より送付された水で0.00025%となるよう希釈した。希釈検体の粒子径をDLSにより測定した結果、両条件共に高粒子径ピークが検出された(図7)。

本結果より、高粒子径ピークは検体のコンタミネーションではなく、水で希釈したことで生じたポリスチレンビーズの凝集体である可能性が示唆された。界面活性剤および極性の低い分散媒を検討し、凝集体形成を抑制できれば測定精度は改善するのかもしれない。

E. 結論

ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ を用い、DLS による国立医薬品食品衛生研究所から配布されたポリスチレンビーズおよびシリカビーズの粒子径測定を実施した。第16改正日本薬局方参考資料で定められている判定基準『ポリスチレンラテックス粒子の場合、平均粒子径の測定値は根付けられた粒子径範囲から2%以内でなければならない』『再現性については相対標準偏差が2%未満でなければならない。』『多分散指数の測定値は、0.1 未満でなければならない。』すべてに適合する検体はなく、本基準を前提とし、分散媒に水を使用したポリスチレンビーズおよびシリカビーズの粒子径解析は困難であると判断した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 60 nm ポリスチレンビーズの DLS 測定結果

粒子径/材質	希釈倍率		試料の濃度 μg/mL	繰り返し回数	平均粒径 (nm)	平均粒径 平均値 (n=3)	CV(%)	多分散指数	多分散指数 平均値 (n=3)	判定	高粒子径ピーク
1	2.5 x 10 ⁻⁵	0.000025	0.25	1	69.1	70.6	2.06	0.102	0.088	不適合	無
				2	70.7						
				3	72.0						
2	5.0 x 10 ⁻⁵	0.00005	0.5	1	71.7	70.0	2.16	0.086	0.084	不適合	無
				2	68.8						
				3	69.5						
3	1.0 x 10 ⁻⁴	0.0001	1.0	1	69.3	70.0	1.57	0.039	0.049	不適合	無
				2	71.3						
				3	69.5						
4	2.5 x 10 ⁻⁴	0.00025	2.5	1	70.9	71.6	1.35	0.050	0.062	不適合	無
				2	72.7						
				3	71.2						
5	5.0 x 10 ⁻⁴	0.0005	5.0	1	71.2	70.7	0.78	0.039	0.033	不適合	無
				2	70.7						
				3	70.1						
6	1.0 x 10 ⁻³	0.001	10.0	1	72.8	71.9	1.20	0.065	0.045	不適合	無
				2	71.7						
				3	71.1						

表2 220 nm ポリスチレンビーズの DLS 測定結果

粒子径/材質	希釈倍率		試料の濃度 μg/mL	繰り返し回数	平均粒径 (nm)	平均粒径 平均値 (n=3)	CV(%)	多分散指数	多分散指数 平均値 (n=3)	判定	高粒子径ピーク
1	2.5 x 10 ⁻⁵	0.000025	0.25	1	240.1	259.1	9.76	0.111	0.134	不適合	有
				2	287.8						
				3	249.4						
2	5.0 x 10 ⁻⁵	0.00005	0.5	1	241.9	240.2	0.71	0.114	0.110	不適合	有
				2	238.5						
				3	240.3						
3	1.0 x 10 ⁻⁴	0.0001	1.0	1	241.1	240.4	1.28	0.038	0.052	不適合	無
				2	243.0						
				3	237.0						
4	2.5 x 10 ⁻⁴	0.00025	2.5	1	240.1	240.4	0.31	-0.009	-0.003	不適合	無
				2	239.8						
				3	241.2						
5	5.0 x 10 ⁻⁴	0.0005	5.0	1	241.9	240.9	0.38	-0.019	-0.010	不適合	無
				2	240.2						
				3	240.5						
6	1.0 x 10 ⁻³	0.001	10.0	1	241.7	240.5	0.57	-0.013	-0.009	不適合	無
				2	239.0						
				3	240.7						

表3 500 nm ポリスチレンビーズの DLS 測定結果

粒子径/材質	希釈倍率		試料の濃度 μg/mL	繰り返し回数	平均粒径 (nm)	平均粒径 平均値 (n=3)	CV(%)	多分散指数	多分散指数 平均値 (n=3)	判定	高粒子径ピーク
1	2.5 x 10 ⁻⁵	0.000025	0.25	1	1202.4	1027.6	17.37	0.479	0.414	不適合	有
				2	1034.6						
				3	845.7						
2	5.0 x 10 ⁻⁵	0.00005	0.5	1	713.9	788.7	11.70	0.290	0.321	不適合	有
				2	760.4						
				3	891.9						
3	1.0 x 10 ⁻⁴	0.0001	1.0	1	547.8	593.7	6.71	0.188	0.229	不適合	有
				2	613.8						
				3	619.5						
4	2.5 x 10 ⁻⁴	0.00025	2.5	1	555.0	546.5	1.35	0.222	0.209	不適合	有
				2	541.6						
				3	542.9						
5	5.0 x 10 ⁻⁴	0.0005	5.0	1	543.0	530.5	2.06	0.183	0.184	不適合	有
				2	525.9						
				3	522.7						
6	1.0 x 10 ⁻³	0.001	10.0	1	549.3	552.9	1.28	-0.035	-0.012	不適合	無
				2	548.3						
				3	561.0						

表4 900 nm ポリスチレンビーズのDLS測定結果

粒子径材料	希釈倍率		試料の濃度 μg/mL	繰り返し回数	平均粒径 (nm)	平均粒径 平均値 (n=3)	CV(%)	多分散指数	多分散指数 平均値 (n=3)	判定	高粒子径ピーク
1	2.5 x 10 ⁻⁵	0.000025	0.25	1	1660.0	1953.6	14.51	0.608	0.717	不適合	有
				2	2225.8						
				3	1975.1						
2	5.0 x 10 ⁻⁵	0.00005	0.5	1	4122.5	3807.5	17.00	1.560	1.389	不適合	有
				2	4237.0						
				3	3063.0						
3	1.0 x 10 ⁻⁴	0.0001	1.0	1	7817.2	6568.9	17.14	2.929	2.418	不適合	有
				2	6259.0						
				3	5630.5						
4	2.5 x 10 ⁻⁴	0.00025	2.5	1	1066.2	1068.3	0.37	0.352	0.370	不適合	有
				2	1072.9						
				3	1065.9						
5	5.0 x 10 ⁻⁴	0.0005	5.0	1	1032.0	992.5	3.57	0.331	0.327	不適合	有
				2	963.4						
				3	982.0						
6	1.0 x 10 ⁻³	0.001	10.0	1	979.1	932.9	5.62	0.243	0.258	不適合	有
				2	943.7						
				3	876.0						

表5 1μm シリカビーズのDLS測定結果

粒子径材料	希釈倍率		試料の濃度 μg/mL	繰り返し回数	平均粒径 (nm)	平均粒径 平均値 (n=3)	CV(%)	多分散指数	多分散指数 平均値 (n=3)	判定	高粒子径ピーク
1	5.0 x 10 ⁻⁵	0.00005	0.5	1	8337.6	6997.9	19.26	3.001	2.498	不適合	有
				2	7013.8						
				3	5642.3						
2	1.0 x 10 ⁻⁴	0.0001	1.0	1	2661.3	3177.4	14.08	0.946	1.142	不適合	有
				2	3420.4						
				3	3450.6						
3	2.0 x 10 ⁻⁴	0.0002	2.5	1	3212.7	3270.0	5.03	1.208	1.164	不適合	有
				2	3141.9						
				3	3455.3						
4	5.0 x 10 ⁻⁴	0.0005	5.0	1	1861.8	1803.8	11.53	0.640	0.654	不適合	有
				2	1976.5						
				3	1573.0						
5	1.0 x 10 ⁻³	0.001	10.0	1	1345.2	1596.7	14.40	0.505	0.590	不適合	有
				2	1796.2						
				3	1648.6						
6	2.0 x 10 ⁻³	0.002	20.0	1	1090.9	1086.1	2.01	0.394	0.376	不適合	有
				2	1062.3						
				3	1105.1						

表6 2μm ポリスチレンビーズのDLS測定結果

粒子径材料	希釈倍率		試料の濃度 μg/mL	繰り返し回数	平均粒径 (nm)	平均粒径 平均値 (n=3)	CV(%)	多分散指数	多分散指数 平均値 (n=3)	判定	高粒子径ピーク
1	5.0 x 10 ⁻⁵	0.00005	0.5	1	4819.5	7053.9	58.80	1.850	2.503	不適合	有
				2	4502.3						
				3	11839.9						
2	1.0 x 10 ⁻⁴	0.0001	1.0	1	測定不可	測定不可	測定不可	測定不可	測定不可	不適合	有
				2	測定不可						
				3	8870.9						
3	2.5 x 10 ⁻⁴	0.00025	2.5	1	測定不可	測定不可	測定不可	測定不可	測定不可	不適合	有
				2	測定不可						
				3	測定不可						
4	5.0 x 10 ⁻⁴	0.0005	5.0	1	7932.5	6494.1	31.07	2.400	1.924	不適合	有
				2	7362.5						
				3	4187.4						
5	1.0 x 10 ⁻³	0.001	10.0	1	3224.6	3398.8	11.19	0.884	0.957	不適合	有
				2	3834.9						
				3	3136.8						

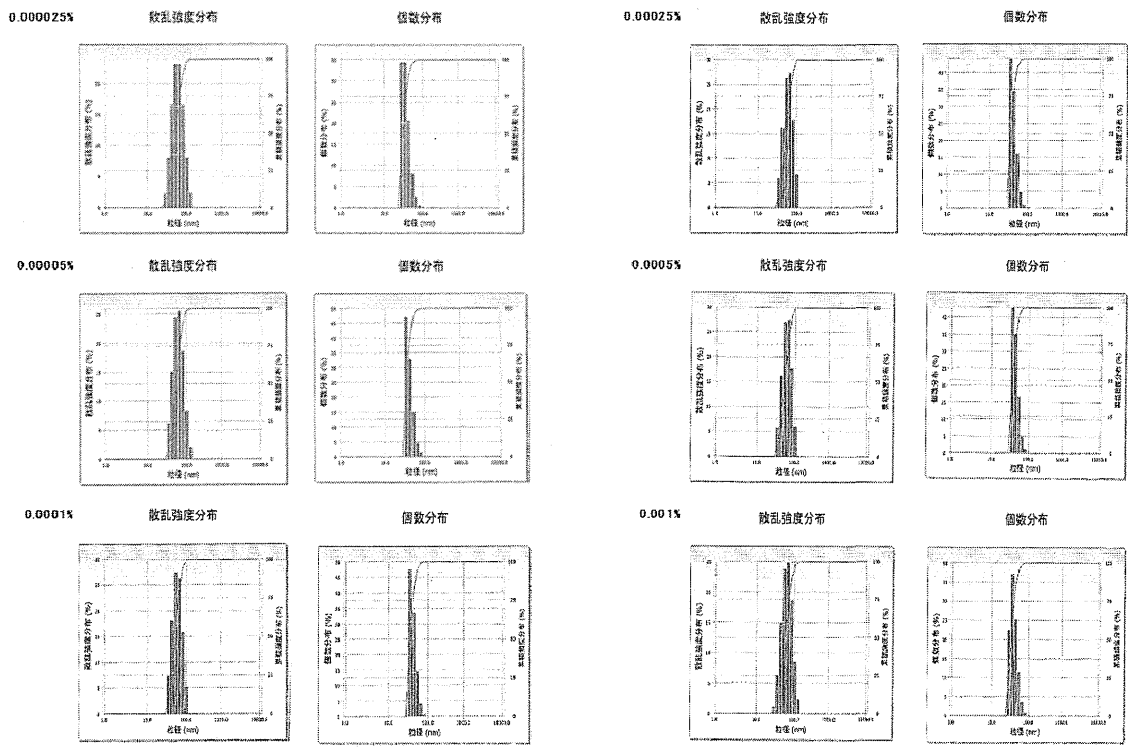


図1 代表的な測定図 (60 nm ポリスチレンビーズ)

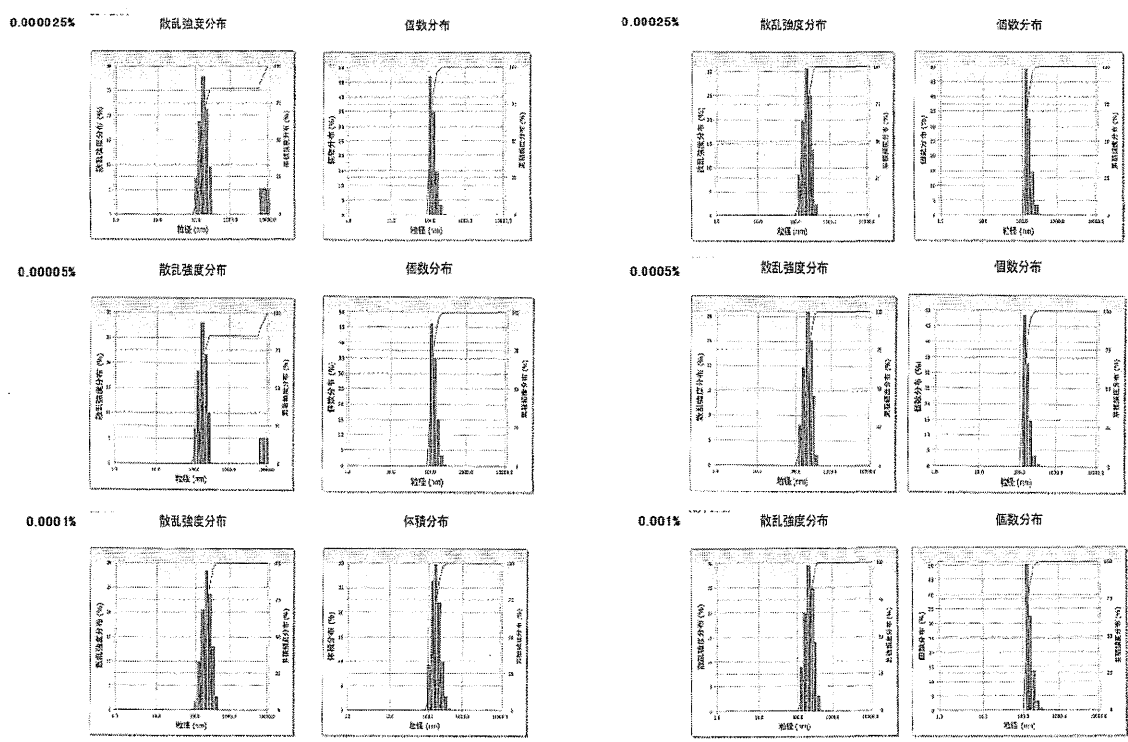


図2 代表的な測定図 (220 nm ポリスチレンビーズ)

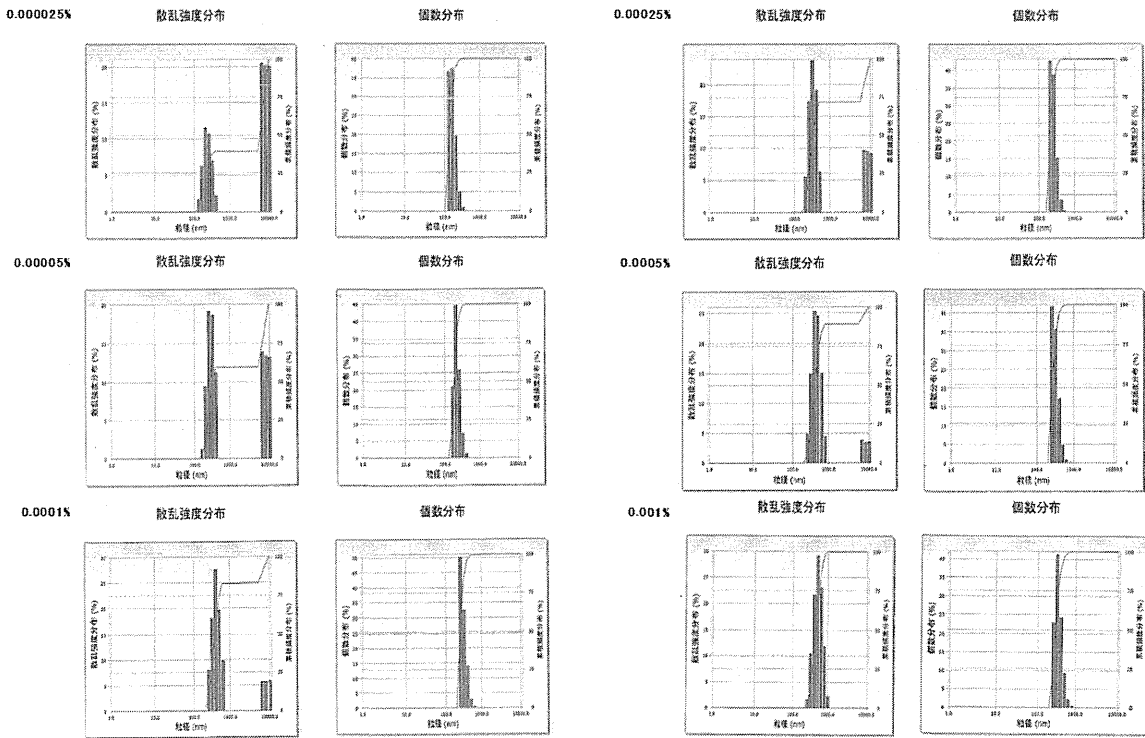


図3 代表的な測定図 (500 nm ポリスチレンビーズ)

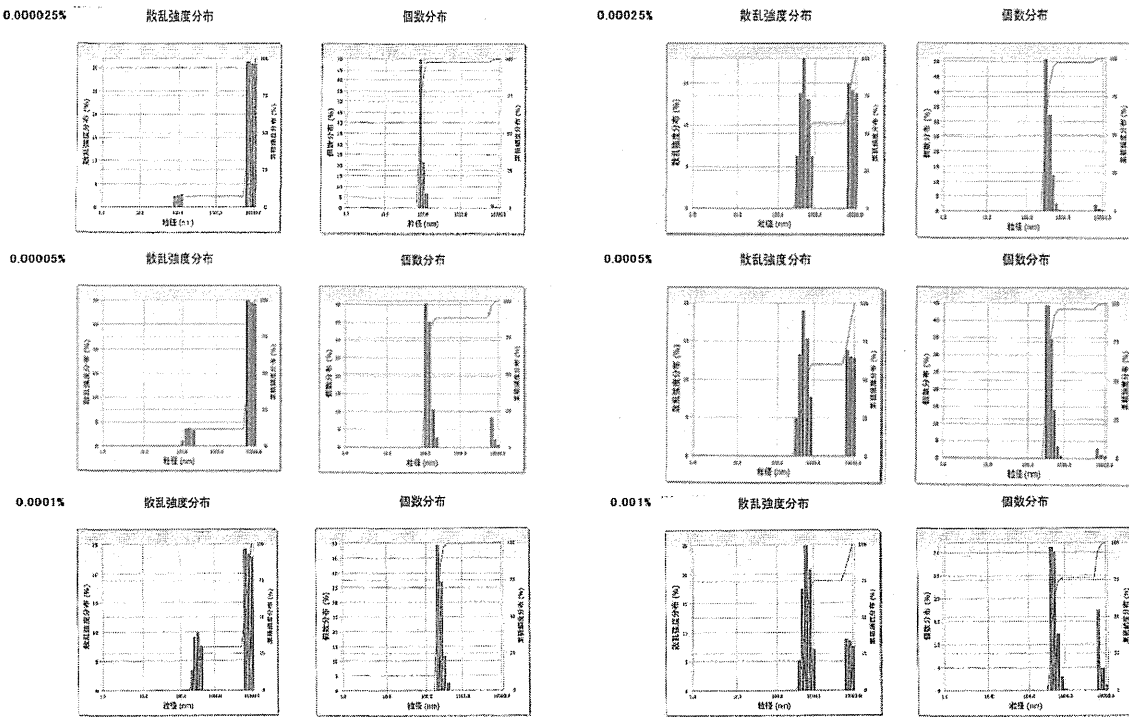


図4 代表的な測定図 (9000 nm ポリスチレンビーズ)

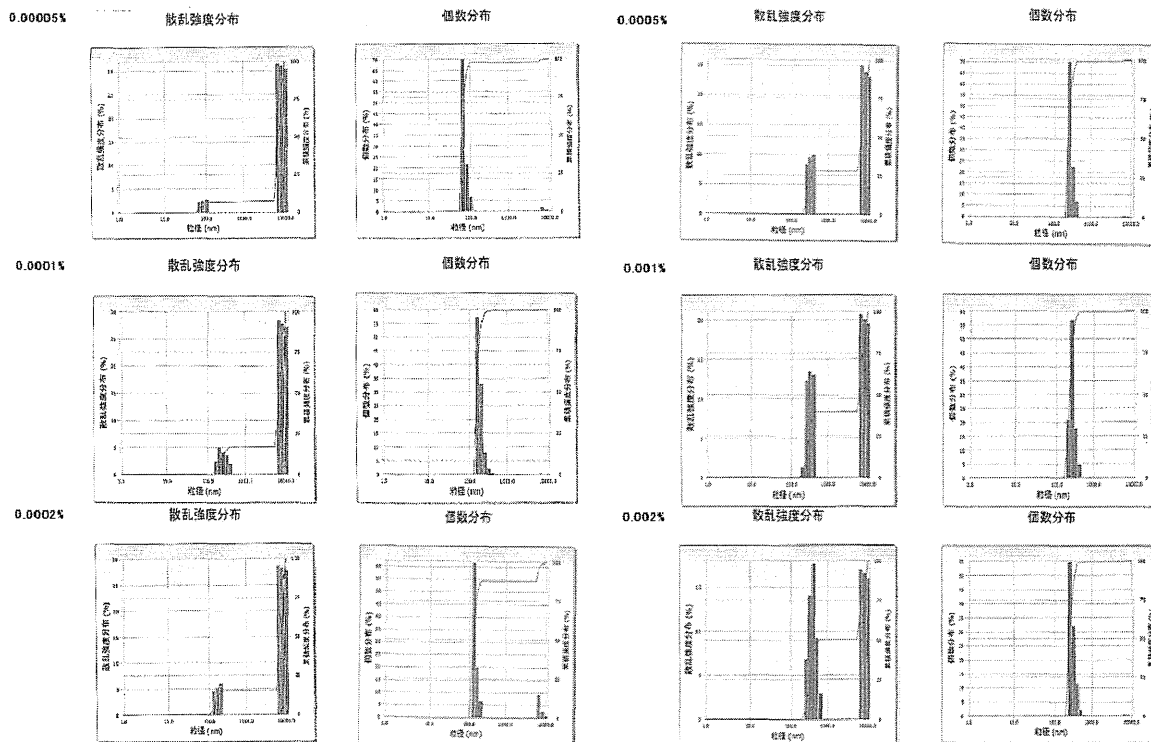


図5 代表的な測定図 (1 μm シリカビーズ)

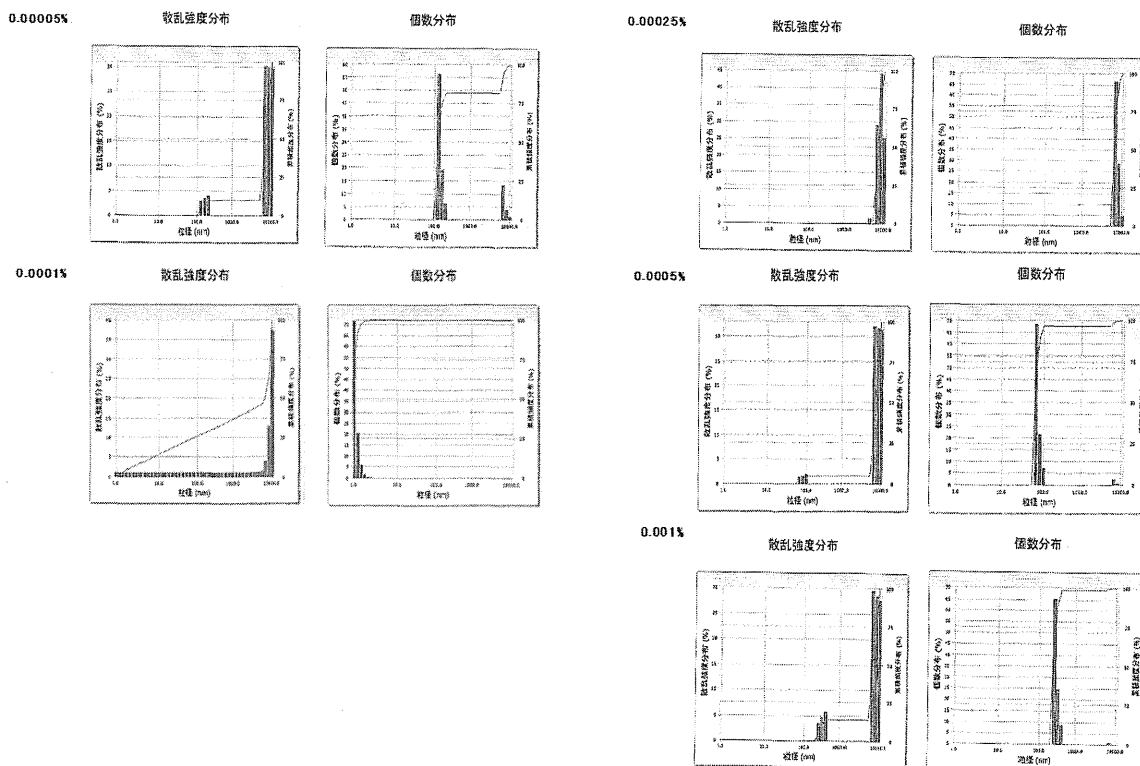
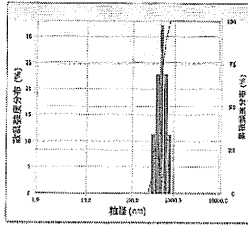
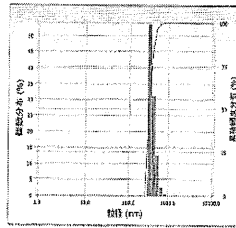


図6 代表的な測定図 (2 μm ポリスチレンビーズ)

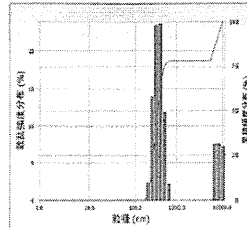
0.001% (国立医薬品食品衛生研究所配布検体)
散乱強度分布



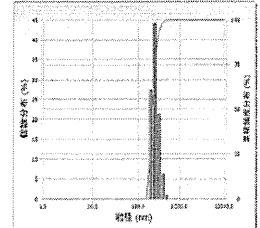
個数分布



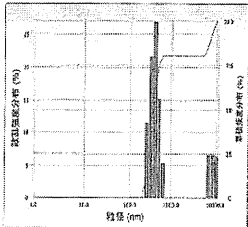
0.00025% (0.001%を検体を国立医薬品食品衛生研究所配布水で1/4希釈)
散乱強度分布



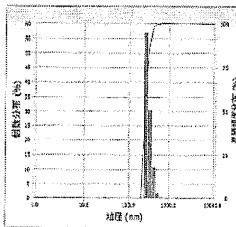
個数分布



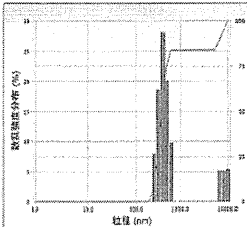
0.00025% (国立医薬品食品衛生研究所配布検体)
散乱強度分布



個数分布



0.00025% (0.001%を検体をLC/MS用超純水で1/4希釈)
散乱強度分布



個数分布

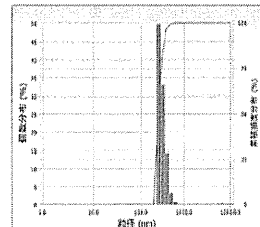


図7 500 nm ポリスチレンビーズの希釈検討結果

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

TG カイコ繭生産タンパク質における不純物の評価に関する研究

株式会社免疫生物研究所 遺伝子組換え事業部 富田 正浩

遺伝子組換えカイコ（TG カイコ）を用いた組換えタンパク質生産系において宿主由来タンパク質（HCP）となるカイコ繭タンパク質を抽出し、ウサギに免疫することによりポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて ELISA 系を構築し、精製タンパク質に残留する HCP の検出キットとしての性能を評価した。その結果、本キットは、幅広い抗原検出特異性と高い検出感度を有しており、TG カイコにより製造するバイオ医薬品の品質モニタリングに利用する HCP 検出キットとして有効であることを確認した。

研究協力者

株式会社免疫生物研究所 瀬川 辰也

株式会社免疫生物研究所 王 小彪

A. 目的

バイオ医薬品に混入する可能性のある宿主由来タンパク質（Host Cell Proteins: HCP）は、患者に予期しない免疫反応等を引き起こす恐れがあるため、HCP を高感度に検出する測定系が求められている。CHO、大腸菌、酵母等を宿主とする生産系では、既に多くの HCP ELISA キット等が開発されているが、新規の組換えタンパク質生産系である遺伝子組換えカイコ（TG カイコ）の系では、まだ HCP 検出系が確立していない。そこで本研究では、TG カイコ生産系において HCP となり得るカイコ繭タンパク質を高感度で検出する ELISA 系を構築し、繭由来精製タンパク質溶液を用いた評価を実施する。

B. 研究方法

B.1. 免疫

1) 免疫用動物

家兔（日本白色種雌 15～20 週齢、体重 約 2.5 kg）2 羽を使用した。

2) 免疫抗原

カイコ（pnd-w1）の繭より 8M 尿素にて抽出したタンパク質を免疫抗原として使用した。

3) 抗原の調製

抗原濃度を 500 μ g/0.5 mL に調製した。Adjuvant を同量加えガラスシリンジにてエマルジョンを作製した（初回免疫時のみ ADJUVANT COMPLETE FLEUND（DIFCO 社製#263810）を使用し、2 回目以降は ADJUVANT INCOMPLETE FLEUND（DIFCO 社製#263810）を使用した）。

4) 投与方法

得られたエマルジョンを皮下及び皮内に注射した。以後 14 日毎に合計 10 回の免疫を行った。8 回免疫後の 7 日後に耳静脈より 50 mL 程度の部分採血を実施し、EIA による力価測定に用いた。10 回免疫後の 7 日後に麻酔下で、耳介および心刺採血による 100～150mL 程度の全採血を実施した。