

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 特性に応じた凝集体の評価手法の開発と標準化

研究分担者 株式会社 ユー・メディコ 内山 進

要旨

サイズが異なるポリスチレン標準粒子を用いてフローイメージング(FI)法および定量的レーザー回折・散乱(qLD)法による粒子濃度の定量評価可能範囲の検証を行った。その結果、予想値からのズレが10%以下であった場合を定量可能であるとの基準を設けた場合、 $2\mu\text{m}$ では0.00001~0.001%、 $5\mu\text{m}$ では0.0005と0.001%、 $10\mu\text{m}$ では0.00005%のみが定量可能であった。今回の濃度範囲に限ると、 $2\mu\text{m}$ 以外の粒子のカウントにはFI法は不向きであることとなる。qLD法の場合、同様の基準では、220nmでは0.0025と0.005%、500nmおよび900nmでは0.0001~0.0025%、 $2\mu\text{m}$ では0.0025と0.005%、 $10\mu\text{m}$ では0.005~0.025%が定量可能な範囲であった。また、 $1\mu\text{m}$ シリカ粒子の場合、0.00001~0.001%のいずれについてもFI法ではカウントが理論値を大きく下回る結果となり、定量評価できない可能性が見出された。一方、qLD法では、シリカ粒子の場合、0.0005~0.005%の範囲が定量可能であった。最後に、qLD法により抗体医薬凝集体の測定を行ったところ、200nm~ $10\mu\text{m}$ の幅広い範囲に粒子の増加が確認された。

研究協力者

クラユヒナエレナ ユー・メディコ研究員  
横山雅美 ユー・メディコ研究員

A. 目的

バイオ医薬品に含まれる蛋白質凝集体の定量評価法の確立が最終目的である。本年度は、標準粒子を用いたフローイメージング(FI)法および定量的レーザー回折・散乱(qLD)法の定量評価可能範囲の検証を目的とした。また、qLD法による抗体医薬凝集体の定量可能性の検証も目的とした。

B. 研究方法

FI法による分析はFluid Imaging Technology社のFlowCAM VSを用いて行った。qLD法による分析は島津製作所製Aggregates Sizerを用いて行った。FI法では、メーカー指定のOQ( $10\mu\text{m}$ の濃度・サイズが既知の標準粒子を用いた測定でサイズで誤差が5%以内、カウントで誤差が10%以内であることを確認)を実施後、国立医薬品食品衛生研究所にて、標準粒子をもとに調製後、送付された、濃度が異なるポリスチレンおよびシリカ粒子の測定を行った。以下、送付された粒子の濃度は“予想値”と記載することとする。粒径は、観測された対象物の面積に

基づき球形仮定して得た数値 (ABD、Area Based Diameter) として得た。

qLD 法では、送付された粒子について測定を行い、メーカーの工場出荷時に決定された装置定数を用いた解析を行った。qLD 法では得られる結果は体積基準であることから、球形仮定して体積より粒径を求めた。qLD 法の解析の際に利用する溶質の屈折率は、屈折率計を用いた実測により決定した (ポリスチレン粒子は 1.59、シリカ粒子は 1.43、グロブリン凝集体は 1.46)。測定を行ったポリスチレン粒子のサイズは、FI 法では  $2\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、qLD 法では 220nm、500nm、900nm、 $2\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$  であり、それぞれの粒子について 0.00001~0.001%の範囲で複数濃度の試料の測定を行った。また、屈折率が蛋白質凝集体に近い値を持つシリカ粒子についても適切に評価可能かどうかを検証するため、 $1\mu\text{m}$  シリカ粒子について、0.00001~0.001%の範囲で、FI 法および qLD 法により測定を行った。

最後に装置に付属の攪拌装置により攪拌ストレスを与え作製したイムノグロブリン凝集体について qLD 法による評価を実施した。

## C. 結果

### C.1. FI 法

図 1 に代表的な測定例として  $5\mu\text{m}$  のポリスチレン粒子 (PS) の測定結果を示した。全てのサイズの粒子について、測定を行った濃度範囲では直線的な濃度依存性を示し、決定係数は 0.99 以上であった (ただし、 $10\mu\text{m}$  0.0005%は予想値からの誤差が大きく予想値の 20%程度の濃度となったため省いた)。次に、各濃度について予想値からのズレについて評価した (表 1)。まず、送付試料に記載の数値 (予想値) からのズレが 10%以下の結果であった場合を定量可能で

あるとの基準を設けた。この基準に従うと、ポリスチレン粒子の場合、 $2\mu\text{m}$  では 0.00001~0.001% (但し、0.0001%は 11%の誤差であったため除く)、 $5\mu\text{m}$  では 0.0005 と 0.001%、 $10\mu\text{m}$  では 0.00005%のみが定量可能であった。この結果は、今回の濃度範囲に限ると、 $2\mu\text{m}$  以外の粒子の濃度定量には FI 法は不向きであることとなる。なお、基準を“ズレが 20%以下“に広げると、 $2$  および  $5\mu\text{m}$  では 0.00001~0.001%の全ての範囲で定量可能との結果となり、また、 $10\mu\text{m}$  では 0.00005~0.001% (但し、0.0005%は 23%の誤差であったため除く) の範囲で定量可能との結果となった。ただし、 $1\mu\text{m}$  シリカ粒子の場合、0.00001~0.001% (95,493~9,549,297 個/mL) のいずれについてもカウントが理論値を大きく下回る (理論値の 10~20%程度であった) 結果となり、定量評価できない可能性が見出された。なお、ブランク測定では、バックグラウンドとして 100 個/mL 以下の粒子がカウントされ、そのほとんどが 0~ $2\mu\text{m}$  の範囲に含まれていた。

### C.2. qLD 法 (ポリスチレンおよびシリカ粒子)

まず、予想値からのズレが 10%以下の結果であった場合を定量可能であるとの基準を設けた (表 2)。この基準に従うと、ポリスチレン粒子の場合、220nm では 0.0025 と 0.005%、500nm および 900nm では 0.0001~0.0025%、 $2\mu\text{m}$  では 0.0025 と 0.005%、 $10\mu\text{m}$  では 0.005~0.025%が定量可能な範囲であった。予想値からのズレが 20%以下まで測定可能と基準を広げると  $2\mu\text{m}$  では 0.0005~0.01%の全範囲、 $5\mu\text{m}$  では 0.005~0.025%も定量可能、となった。

また、シリカ粒子の場合、0.0005~0.005%の範囲が定量可能であった。

### C.3. qLD 法 (イムノグロブリン凝集体)

攪拌に伴って 200nm~10 $\mu$ m の幅広い範囲で凝集体の発生が観測された。特に数百 nm 以上の粒子の発生量が多く、1~2 $\mu$ m 付近にピークを有していた。攪拌時間を変化させた際には、サイズ分布のパターンは大きく変化すること無く、凝集体量が増加していた。各サイズの凝集体を時間に対してプロットするとほぼ直線的に増加していた。

### D. 考察

まず、ポリスチレン粒子について、予想値からの誤差が 10%以下を定量可能とした場合について考察する。FI 法では、2 $\mu$ m では 0.00001~0.001%をカバーしていた (0.0001%を除く)。これは粒子数では 22,736~2,273,642 個/mL に相当する (濃度から個/mL への変換は粒子の密度を用いて行った。以降も同様)。ブランク測定のバックグラウンド (100 個/mL 以下) は、粒子濃度を考えると、この程度のバックグラウンドは今回測定濃度範囲では問題とならないと言える。5 $\mu$ m の場合、0.00025%以下では誤差範囲内の測定は出来なかったが、これは約 36,000 個/mL 以下 (最も薄い試料は 1,455 個/mL (0.00001%)) の評価が難しいこととなる (ただし、予想値からのズレを 20%まで許容すると定量可能)。バックグラウンドが 100 個/mL 以下 (0~2 $\mu$ m の範囲に集中) であることを考えると、0.00025%以下の定量が出来なかった理由としてバックグラウンド以外の要因を考慮する必要がある。10 $\mu$ m の場合、0.00005%は 909 個/mL であり、この場合、100 個/mL のバックグラウンドがカウントに優位に影響を与える点を考慮する必要がある、0~2 $\mu$ m の範囲の粒子はカウントしない、などの対応策が考えられる。シリカ粒子の場合、測定を行った全ての濃度で

予想値を大きく下回る数値となったが、これはシリカ粒子の屈折率が水と近い (水の屈折率は 1.33) ため、鮮明に粒子を捉えることができず、その結果、少ないカウントとなった可能性が考えられる。

qLD によるイムノグロブリン凝集体の評価については、サイズや濃度が既知の蛋白質凝集体の標準試料は存在しないため、得られた数値の真値からのズレは判断出来ないが、今後、希釈系列を作成して定量可能な範囲の検証、FI 法などの他の手法で測定した結果との比較、などを実施し、蛋白質凝集体の評価における利用可能性を更に検証する必要がある。

### E. 結論あるいは、まとめ

FI 法については、2, 5, 10 $\mu$ m のポリスチレン標準粒子を使った測定から定量可能範囲は粒子サイズにより変化することが分かった。2 $\mu$ m の粒子では 0.00001~0.001% (22,000~2,274,000 個/mL) の範囲をカバーしていたが、5 や 10 $\mu$ m の粒子の場合には、範囲が限定されていた。シリカ粒子の場合には、測定を行った濃度範囲 (0.00001~0.001%、95,493~9,549,297 個/mL) では適切な粒子数の評価が難しく、今後、測定条件の設定を含めた測定法の改良が必要である。qLD 法ではポリスチレン粒子の場合 500 と 900nm では測定を行った全範囲について、測定が実現できていたが、220nm や 2 $\mu$ m では範囲が限られていた。ただし、シリカ粒子については測定全範囲について適切な評価が可能であり、これは FI 法と比べ利点になると考えられる。

### F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表等

### 論文発表

- 1) Uchiyama, S., Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1844, 2041-2052 (2014).
- 2) Volkin, D., Hershenson, S., Ho, R., Uchiyama, S., Winter, G., Carpenter, J. Two Decades of Publishing Excellence in Pharmaceutical Biotechnology, *J. Pharm. Sci.* 104: 290-300 (2015).
- 3) Totoki, S., Yamamoto, G., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K. Quantitative laser diffraction method for the assessment of protein subvisible particles. *J. Pharm. Sci.* 104: 618-626 (2015).
- 4) Krayukhina, E., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins. *J. Pharm. Sci.* 104: 527-535 (2015).

### 学会発表等

- 1) Elena Krayukhina, Kouhei Tsumoto, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui ” 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).
- 2) Elena Krayukhina, Kouhei Tsumoto, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui ” Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins” Protein aggregation and immunogenicity. (2014, 7. 16, Breckenridge, Colorado)
- 3) Sinichiro Totoki, Gaku Yamamoto, Susumu Uchiyama, Kiichi Fukui “Size and Quantity Measurement of Subvisible

Particles by Laser Diffraction Method.”

Protein aggregation and immunogenicity. (2014, 7. 16, Breckenridge, Colorado)

- 4) Susumu Uchiyama “Biophysical factors governing antibody aggregation” Protein aggregation and immunogenicity. (2014, 7. 16, Breckenridge, Colorado)
- 5) Susumu Uchiyama “Biophysical studies on antibody aggregation” JAACT International Symposium (2014, 11. 12, 北九州)

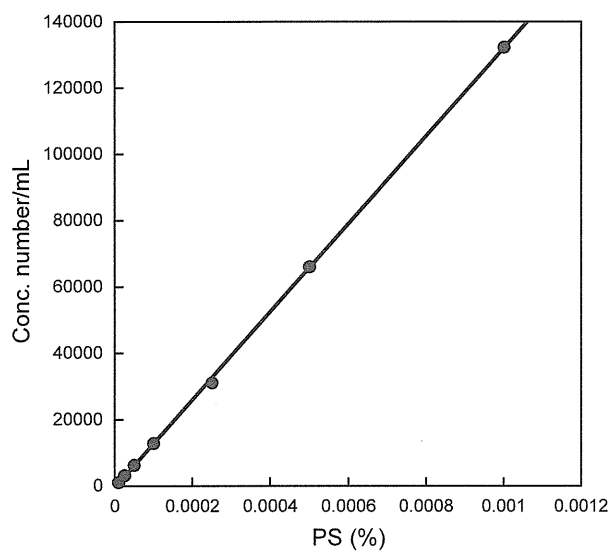


図1. 5 μmPS の FI 法による定量結果

表1 ポリスチレン粒子(PS)の定量的レーザー回折・散乱(qLD)法による定量結果

重量濃度 %	粒子径	PS 220 nm	PS 500 nm	PS 900 nm	PS 2 μm	PS 5 μm	PS 10 μm	シリカ 1 μm
0.0001			97%	101%				
0.00025		66%	100%	102%				
0.0005		64%	97%	101%	90%			100%
0.001		64%	95%	98%	90%			99%
0.0025		101%	94%	94%	94%	78%		97%
0.005		98%			91%	81%	94%	97%
0.01					86%	88%	95%	
0.025						81%	92%	

数値は予想値からのズレ

表2 ポリスチレン粒子(PS)のフローイメージング(FI)法による定量結果

重量濃度 %	粒子径	PS 2 μm	PS 5 μm	PS 10 μm	シリカ 1 μm
0.00001		107%	80%	35%	
0.000025		103%	89%	153%	9%
0.00005		101%	87%	108%	11%
0.0001		89%	89%	81%	12%
0.00025		90%	86%	81%	13%
0.0005		102%	91%	23%	14%
0.001		98%	91%	84%	14%

数値は予想値からのズレ

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 免疫原性評価法標準化に向けての  
科学的根拠に基づく評価技術の開発

研究分担者 株式会社 Ig-M 秦信子

バイオ医薬品のバイオアナリシスについては、リガンド結合法による生体試料中薬物濃度分析法の策定が進行中であり、またその評価を補完するものとして LC/MS による薬物濃度分析も行われている。これらの分析法が信頼性を得て多用されるべく、リガンド結合法では ECL 法による分析を、また LC/MS では分析前処理と測定メソッドの検討を開始した。

研究協力者

鳥澤亜矢 研究開発部研究員

伊賀朋世 研究開発部研究員

1、免疫原性評価に関する研究

LBA を用いた抗薬物抗体測定

A. 目的

実試料 ADA 測定における偽陰性回避の方策確立を目的とし、Drug tolerance 改善のための分析法開発、及び各プラットフォームにおける Drug tolerance 改善法の有用性の比較を行う。

B. 研究方法

抗 B-mAb 抗体及び抗 EPO 抗体を共通試料として、個別試料 D について ADA 測定系を構築し、Drug tolerance 改善のための分析開発を行った。Drug interference を考慮に入れた戦略として、全検体を前処理なしで ADA 測定を行い、薬物濃度が高い検体の偽陰性を評価した。また、酸解離などの前処理を行い、酸に弱い ADA を含む検体の偽陰性を評価した。この ADA 評価結果から、酸解離等前処理の必要性について、分析

法を定める。

免疫原性評価の使用装置として、抗原抗体反応を用い対象物質の検出を原理とする Ligand Binding Assay の Electrochemiluminescence (ECL) 法のブリッジングアッセイ及び直接法で測定した。また多くの生体試料中の医薬成分の分析法として確立されている Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法でも測定した。

C. 結果

ECL 法、ブリッジングアッセイ測定による評価が最も再現性が見られた。酸解離処理は未処置に比較すると、明らかに有意であることから本試料では有効と考えられる。

D. 考察

ELISA 法及び ECL 法の測定は、反応時間や分析時間が短く、高感度な検出が可能であることからよく利用される。本研究において ELISA 法、及び ECL 法の直接法とブリッジング法での比較により、それぞれの利点が明らかとなった。

ELISA 法は、技術が確立されており、低コス

トで行えるが、定量範囲が狭く、マトリックスの影響が大きく洗浄による低親和性抗体検出に難がある。

ECL 法は、定量範囲が広く、高感度であり、マトリックスの影響が小さい。直接法よりブリッジング法がさらに安定的である。

抗薬物抗体の分析法としては、分析対象物質に多様性があり、バリデーション段階でヒト由来の標準物質があるとは限らない。スタンダード検量線をもとに分析することとは別の評価法の標準化を模索していく。

## 2、液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS) によるバイオ医薬品の血中濃度 測定技術の開発

### A. 目的

LC/MS を用いたバイオ医薬品のバイオアナリシスは、対象薬物検出用抗体を作製せず、操作性が簡便であることから、リガンド結合法によるバイオアナリシスを補完する分析法として有用である。しかし試料中に含まれる成分等の影響により、分析対象バイオ医薬品を選択的に分析することが困難な一面があり、前処理方法の最適化が重要である。

LC/MS 測定メソッド、及び前処理方法の検討を行う。

### B. 研究方法

質量分析用サンプルの調整法の検討し、BCA 法によるタンパク質定量を行う。LC/MS のメソッドを確定する。

### C. 結果

酵素消化で、サンプルに Lys-C を加えて 37°C、4 時間インキュベートの後、トリプシン消化を行うと、回収率が 95% となった。他は詳細な検

討はできていない。LC/MS のメソッドの検討も試料数が増えないと比較できない。

### D. 考察

LC のメソッドに関しては、検量線の直線化が得られたことから、測定条件は外れていないことが考えられる。

リガンド結合法との相関性を見ていくには、数多くの資料での検討が必要である。LC/MS のメソッドは、今回の試験をベースに実施していることが考えられるが、分析サンプルの前処理は、ホルモンの種類により検討が不可欠となる。

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：バイオ医薬品の血中濃度測定技術に関する研究

研究分担者：菊池慶実 所属：味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所

### 研究要旨

血中などの生体試料に含まれている医薬品タンパク質の濃度を測定するため、その標準品となる安定同位体標識タンパク質を高品質で調整することを目的とし、*Corynebacterium glutamicum* を宿主としたタンパク質発現系である Corynex<sup>®</sup> を使用して抗体断片である Fab の発現を検討した。

#### A. 研究目的

血中などの生体試料に含まれている、医薬品として投与された抗体などのタンパク質の濃度を測定する血中薬物濃度測定系を確立する。そのために、味の素株式会社において開発されてきた、*Corynebacterium glutamicum* を宿主としたタンパク質発現系である Corynex<sup>®</sup> を利用し、標準品となる安定同位体標識タンパク質を高品質で調整することが可能かどうかを検証することを目的としている。

#### B. 研究方法

今回の検討では、トラスツズマブの Fab 領域をモデルとし、その発現を検討した。

当該 Fab の H 鎖と L 鎖のアミノ酸配列から、*C. glutamicum* のコドンの使用頻度を考慮し塩基配列をデザインし、それぞれを *C. glutamicum* 由来の強力な構成的プロモーターである *cspB* プロモーターと *C. ammoniagenes* 由来の細胞表層タンパク質 CspA のシグナル配列の下流に接続した発現遺伝子を構築した。構築した H 鎖と L 鎖の発現遺伝子カセットを *C. glutamicum* のプラスミド pPK4 に挿入した後、*C. glutamicum* YDK010Δ*pbp1a* 株に発現プラスミドを導入し形質転換体を取得した。

形質転換体を、<sup>15</sup>N で標識された硫酸アンモニウム、及び L-メチオニンを含む培地にて培養した。培養終了後、培養上清を非還元 SDS-PAGE に供した。

#### C. 研究結果

造成したトラスツズマブ Fab の発現株、を <sup>15</sup>N で標識された硫酸アンモニウム、及び L-メチオニンを含む培地を用いて 1L スケールで培養し、培養上清を非還元 SDS-PAGE に供し、ゲルを SYPRO Ruby にて染色した結果、培養上清に H 鎖

と L 鎖より構成されたヘテロダイマーのトラスツズマブ Fab を検出することができた(図1)。現在、分泌された Fab の精製を実施している。

#### D. 考察

以前、同 Fab を非標識の培地にて分泌させた結果、タンパク科学的な解析や抗原認識能に関しては正常な Fab 分子が分泌されていたことを確認している。今回の <sup>15</sup>N 標識での培養においても分泌量に関しては以前の結果と同等であったことから、正常な <sup>15</sup>N 標識 Fab が生成されているものと推測される。

#### E. 結論

*C. glutamicum* を宿主としたタンパク質発現系である Corynex<sup>®</sup> を利用して <sup>15</sup>N 標識のトラスツズマブ Fab の分泌発現に成功した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし。
2. 学会発表  
特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他



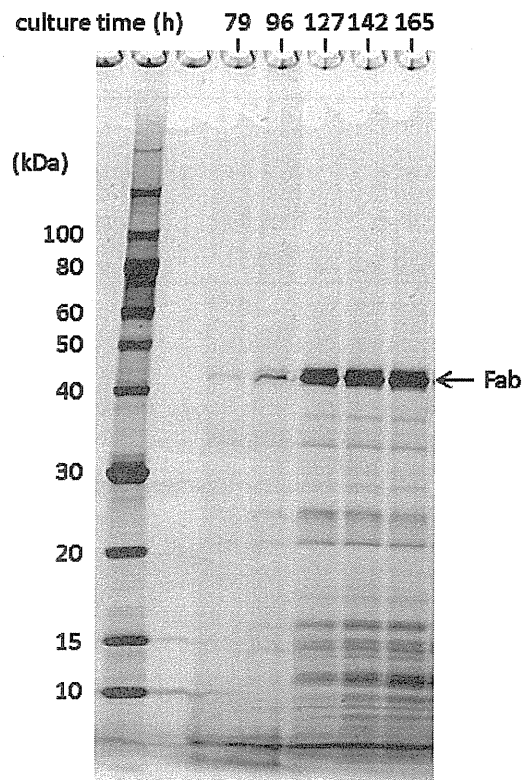


図1 培養上清の非還元 SDS-PAGE 像

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：LC/MS によるバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発

研究分担者 南出 善幸 所属 株式会社島津テクノリサーチ

研究要旨

LC/MS による抗体医薬品の血中濃度測定技術の最適化を目指して、マウス血清試料からの抗体医薬品の濃縮方法の最適化を検討した。メタノール、アセトニトリル、アセトンあるいはトリクロロ酸を用いた沈殿により抗体医薬品を沈殿濃縮し、トリプシンによる酵素消化を行った後、シリカゲルカートリッジカラムを用いて消化したペプチドを吸着、溶出を行った試料を LC-MS/MS により分析した。メタノール、アセトニトリル及びトリクロロ酢酸を用いた沈殿から調製した試料はスピнкаラムを通すことが困難であった。一方、アセトンを用いた沈殿からの試料は、スピнкаラムを良好に通過し、測定対象ペプチドの強度も強く、アセトン沈殿が抗体医薬品の濃縮に適していると判断した。また、直線性も併せて確認したが、添加した Analyte の安定同位体標識体が所定の時間に確認できず、直線性の確認はできなかった。

A. 研究目的

LC/MS による抗体医薬品の血中濃度測定技術の最適化を目指して、抗体医薬品を添加したマウス血清試料からの抗体医薬品の濃縮方法の最適化を検討した。また、抗体医薬品添加血清を用いて、直線性も併せて確認した。

B. 研究方法

有機溶媒（メタノール、アセトニトリル及びアセトン）及び酸（トリクロロ酢酸溶液）を用いて、マウス血清中のタンパク質を沈殿、濃縮し、得られた沈殿について、トリプシンによる酵素消化を行った。トリプシン消化物は、そのまま LC-MS/MS で測定、またはトリプシン消化物をスピнкаラムで精製した後 LC-MS/MS で測定し、それぞれの測定対象ペプチド（Analyte, VVSVLTVLHQDWLNGK）及びその安定同位体標識体（SIL-IS, VVSVLTVLHQDWL(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>,<sup>15</sup>N)NGK）のピーク面積を比較し、タンパク質の沈殿濃縮に適した溶媒を選定した。なお、LC-MS/MS による測定は SRM (Selected Reaction Monitoring) で行い、Analyte は m/z 603.50→805.70, SIL-IS は m/z 605.80→809.20 で測定した。

更に、抗体医薬品を添加したマウス血清（1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/mL）をアセトン沈殿により濃縮し、トリプシンによる消化後、スピнкаラムを通して精製したのち LC-MS/MS により測定し、直線性を確認した。

(倫理面への配慮)

研究で使用した動物血漿は信頼あるメーカーからの購入品であり、倫理面への問題はないと判断する。

C. 研究結果

抗体医薬品を添加したマウス血清試料にメタノール、アセトニトリル、アセトンまたはトリクロロ酢酸溶液を添加し、タンパク質を沈殿させた後、沈殿を 200mM 炭酸アンモニウム含有 10%メタノール溶液で溶解した後、トリプシンで酵素消化を行ったトリプシン消化試料を室温で静置した際、アセトニトリル及びトリクロロ酢酸溶液でタンパク質を沈殿させた試料は懸濁したため、スピнкаラムによるペプチドの精製を行ったが、スピнкаラムが詰まり精製が行えなかった。従って、アセトニトリル及びトリクロロ酢酸溶液沈殿試料については、分析カラムを詰まらせる可能性が高いことから、濃縮方法として不適切であると判断した。一方、メタノール及びアセトンによる沈殿をトリプシン消化した試料は、遠心分離により清澄な上清が得られ、その上清の一部をスピнкаラムで精製し、清澄な上清及び精製した試料を LC-MS/MS で分析した。清澄な上清はメタノール及びアセトン沈殿のいずれも Analyte 及び SIL-IS のピーク形状が悪く、スピнкаラムによる精製を行うことにより、Analyte 及び SIL-IS とともに良好なピーク形状になったが、Analyte 及び SIL-IS のピーク面積は、アセトン沈殿試料でメタノール沈殿試料に比

べ1.3~1.4倍大きかった(表1及び図1)。従って、トリプシン消化前のタンパク質の濃縮として、アセトン沈殿が適切であると判断した。

更に、抗体医薬品を添加したマウス血清(1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/mL)をアセトン沈殿により濃縮し、トリプシンによる消化後、スピнкаラムを通して精製したのち LC-MS/MS により測定し、直線性の確認を行った。

Analyte は約 7.3 分に溶出したが、Analyte の安定同位体標識体である SIL-IS は Analyte とほぼ同じ時間(赤矢印)に認められなかった(図2, 下部)。一方、Standard Peptide では Analyte 及び SIL-IS とともに同一時間に溶出(図2, 上部)した。

上述の通り、トリプシン処理試料において、SIL-IS のピークが認められなかったため、直線性の確認はできなかった。

#### D. 考察

生体試料からのタンパク質の濃縮法として、有機溶媒や酸溶液による沈殿法がある。今回、メタノール及びアセトニトリル沈殿以外にプロテオーム解析で汎用されている、アセトン沈殿及びトリクロロ酢酸沈殿を検討した。アセトニトリル及びトリクロロ酢酸沈殿では、沈殿を 200mM 炭酸アンモニウム含有 10%メタノール溶液で溶解した後、トリプシンで酵素消化を行ったトリプシン消化試料を室温で静置した際に試料が懸濁し、その後のスピнкаラムによる精製が困難となったことから、分析カラムへの影響を勘案して、アセトニトリル及びトリクロロ酢酸沈殿は前処理として不適であると判断した。一方、メタノール及びアセトン沈殿はスピнкаラムによる精製も良好に行えたが、Analyte 及び SIL-IS のピーク面積はアセトンがメタノールに比べて大きかった。プロテオーム解析で汎用されているアセトンはメタノールに比べて除タンパク効果が高く、抗体医薬品を含むタンパク質の沈殿法としてアセトンが適切であると判断した。

抗体医薬品添加血清をトリプシン消化した Sample において、SIL-IS が Analyte の溶出位置に確認されず、SIL-IS のトランジションで約 5.6 分にピークが観察されたが、Analyte と溶出時間が異なることから、SIL-IS 以外の成分であると推察された。SIL-IS が Analyte と同一の溶出時間に確認できなかった原因として、前処理中にペプチドが酸化、切断等の修飾を受け、SRM のトランジションで検出できなかった可能性が推察されるため、消化反応でのペプチドの安定性を確認することが必要であると考えた。

#### E. 結論

抗体医薬品を含む血清からの抗体医薬品の濃縮法として、アセトンを用いた沈殿法が最適であった。

抗体医薬品添加血清をアセトン沈殿により濃縮し、トリプシン消化を行った後、LC-MS/MS による測定を行ったが、SIL-IS が Analyte と同一時間に溶出せず、直線性の確認はできなかった。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
発表無し
2. 学会発表  
発表無し

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
出願・登録予定なし。
2. 実用新案登録  
出願・登録予定なし。
3. その他

表1 前処理法によるピーク面積の差

測定対象	遠心上清		C-Tip C18 カラム処理	
	メタノール	アセトン	メタノール	アセトン
Analyte	126975	235341	81839	109461
	—	1.9 倍	—	1.3 倍
SIL-IS	13303040	15509364	24606547	33245956
	—	1.2 倍	—	1.4 倍

図1

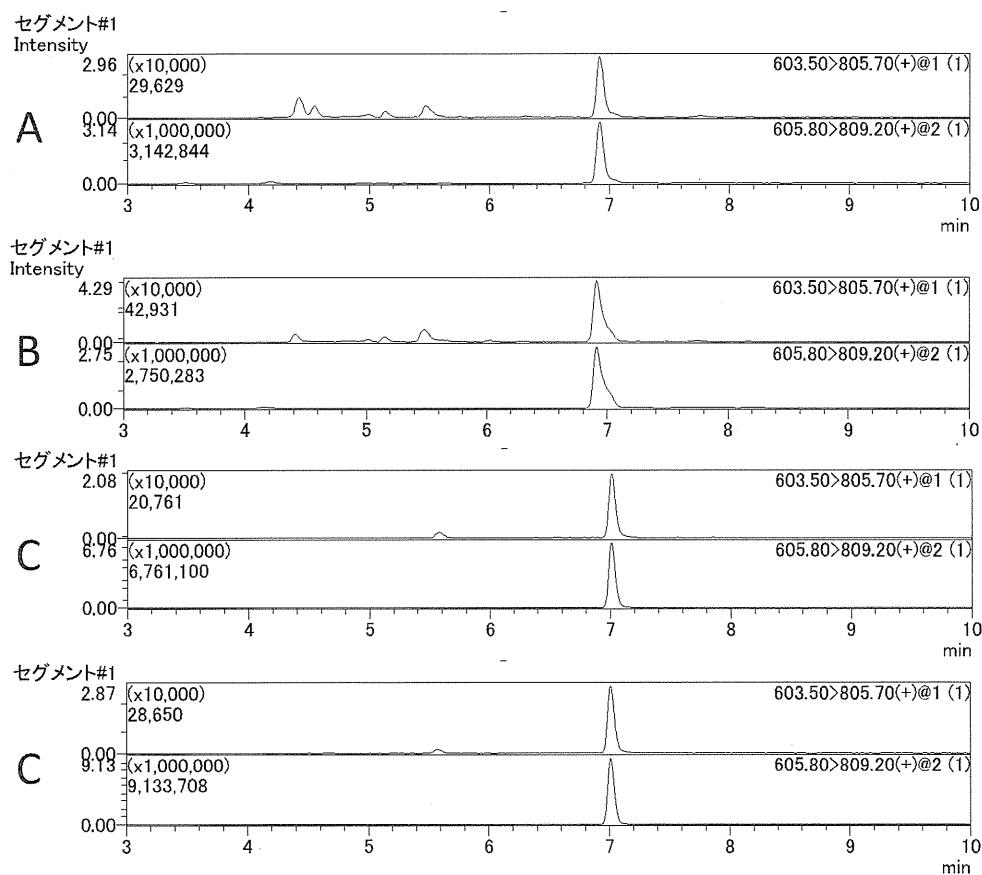


図1 前処理法によるクロマトグラムの差  
 A, メタノール沈殿上清; B, アセトン沈殿上清  
 C, メタノール沈殿上清をスピカラムで精製  
 D, アセトン沈殿上清をスピカラムで精製  
 上部, Analyte; 下部, SIL-IS

図 2

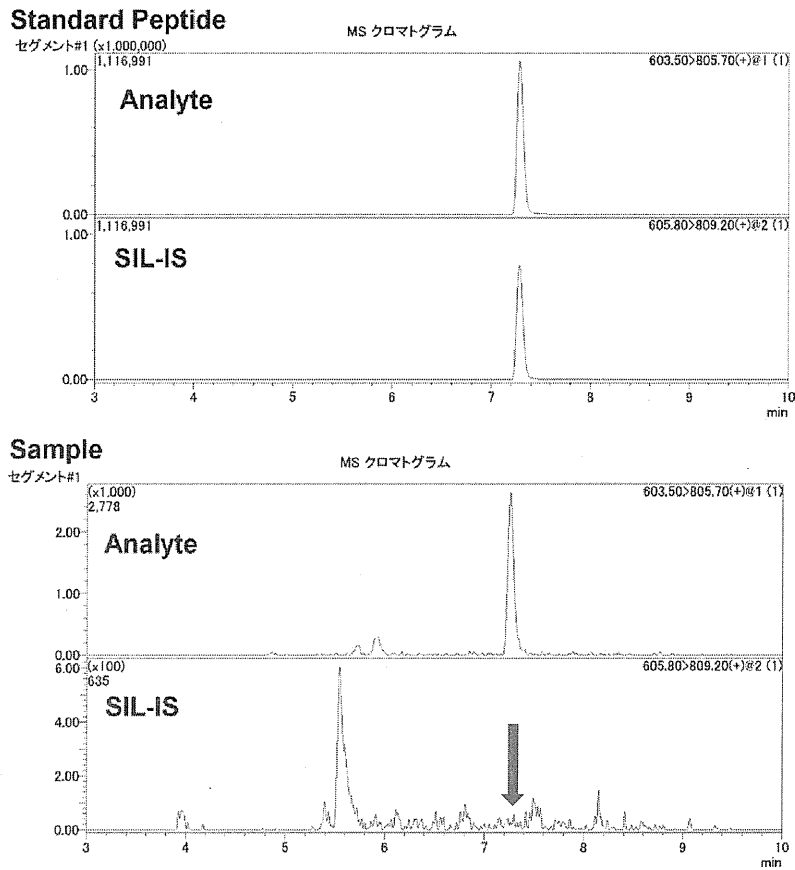


図2 Standardと試料中におけるAnalyteとSIL-IS

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：リガンド結合法によるバイオ医薬品の免疫原性評価法について

研究分担者 中村 隆広 所 属 株式会社新日本科学 安全性研究所  
研究協力者 野村 達希 所 属 株式会社新日本科学 安全性研究所  
横田 喜信 所 属 株式会社新日本科学 安全性研究所

研究要旨

抗薬物抗体（ADA：Anti-drug antibody）の測定は免疫原性を評価するだけでなく、非臨床・臨床試験における薬物の体内動態や薬理効果を適切に判断する上でも重要となる。そのため、ADA分析法は、各開発段階で適切な感度を満たし、ADA産生の有無（陽性又は陰性）を適切に評価する必要がある。しかしながら、薬物共存下では、ADAが共存薬物と複合体を形成することがあるため、偽陰性と判定されることが課題であった。そこで、本研究ではADA分析における偽陰性を回避することを目的として、酸処理による効果（ADA-薬物複合体の解離）を検証した。評価指標とした Drug Tolerance Limit (DTL) 及び 90%阻害濃度 (IC<sub>90</sub>) に改善が認められたことから、酸処理はADA分析法に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

ADA分析の課題として、ADAが血中薬物と複合体を形成することにより、偽陰性となる場合がある。本研究では、酸処理による効果（ADA-薬物複合体の解離）を検証することを目的とした。

(0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL) が共存する試料をそれぞれ調製した。また、陰性対照試料としてヒトプール血清を用いた。

B. 研究方法

【測定機器】

SECTOR Imager SI 6000, Meso Scale Discovery

【解析ソフト】

SoftMax Pro, Molecular Devices Japan

【試料・試薬】

国立医薬品食品衛生研究所から提供された以下の試料・試薬を使用した。

- ヒトプール血清
- 抗B-mAb抗体 (1.12 mg/mL)
- B-mAb (抗体医薬品, 10 mg/mL)

アミンカップリング法で作製した以下の標識体を使用した。

- ビオチン標識 B-mAb (0.671 mg/mL)
- ルテニウム標識 B-mAb (1.0 mg/mL)

【測定試料】

抗B-mAb抗体 (50, 500, 5000 ng/mL) 及び B-mAb

【測定方法】

ECL (Electrochemiluminescence) を用いたブリッジングアッセイとした。方法を以下に記載した。

I. 酸処理 (前処理)

1) ポリプロピレンプレート上で下記の溶液を混合した。

- ・ ビオチン標識 B-mAb (45 µL)
- ・ ルテニウム標識 B-mAb (45 µL)
- ・ 1 mol/L Tris-HCl\* (pH 9.5) (17 µL)

2) 別のポリプロピレンプレート上で下記の溶液を混合し、室温で5分間攪拌した。

- ・ 300 mmol/L の酢酸\* (180 µL)
- ・ 測定試料 (20 µL)

3) 50 µL の 2) の試料を 1) で調製したプレートに添加し、室温で約2時間攪拌した。

\*: 酸処理しない試料には、Tris buffered saline (TBS) を用いた。

II. 測定

I. で調製した試料を以下の手順で二重測定した。

- 1) Blocker Casein in TBS を Streptavidin Gold MULTI-ARRAY 96-Well Plate に添加した (150  $\mu$ L/well) .
- 2) 約 1 分間攪拌後, 室温で約 1 時間静置し, ブロッキングした.
- 3) 溶液を廃棄し, 洗浄液 (300  $\mu$ L/well) を添加した後, 洗浄液を除去した. 余分な洗浄液は, ペーパータオル上でたたいて除いた. この操作を合計 3 回繰り返した.
- 4) 酸処理あるいは前処理した測定試料を測定用プレートに添加した (50  $\mu$ L/well) .
- 5) 約 1 分間攪拌後, 室温で 2 時間攪拌した.
- 6) 3) と同様に洗浄した.
- 7) 2 $\times$ Read Buffer T を加え, 室温で約 1 分間攪拌した (150  $\mu$ L/well) .
- 8) SECTOR Imager SI6000 を用いて発光強度を測定した.

#### 【解析方法】

二重測定で得られた発光強度の平均値 (Mean) を測定値とした. SoftMax Pro を用いて 4-parameter 式 (X 軸 : B-mAb 濃度, Y 軸 : 測定値) でシグモイド曲線を構成した.

#### 【評価方法】

構成したシグモイド曲線に Screening cut point 値を内挿し, 得られた B-mAb 濃度を DTL と定義した. また, B-mAb 非共存下 (0 ng/mL) で得られた測定値の 1/10 をシグモイド曲線に内挿し, 得られた B-mAb 濃度を IC<sub>90</sub> と定義した. Screening cut point 値は, 陰性対照 (n=6) の Mean に 1.329\* を乗じて求めた.

\*: 背景値 (個体別ブランク血清) 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.

#### (倫理面への配慮)

ヒト由来試料は, 倫理ポリシーが確認されたメーカーの製品を使用した.

#### C. 研究結果及び考察

酸処理による DTL 及び IC<sub>90</sub> の改善が認められた (表 1 及び図 1~3). DTL は, 500 ng/mL (血清中抗 B-mAb 抗体濃度として) において 7.5 倍, 50 ng/mL において約 73 倍向上した. IC<sub>90</sub> は, 500 ng/mL において約 16 倍, 5000 ng/mL において約 42 倍向上した. このため, 酸処理は ADA 分析法に有用であると考えられた.

#### D. 結論

酸処理による DTL 及び IC<sub>90</sub> の改善が認められたため, 酸処理は ADA 分析法に有用であることが示唆された.

#### E. 研究発表

無し.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

無し.

表 1 DTL 及び IC<sub>90</sub> の酸処理による影響

抗 B-mAb 抗体 (ng/mL)	酸処理	DTL ( $\mu$ g/mL)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL)
50	有	10.4	100 > <sup>a)</sup>
	無	0.142	100 > <sup>a)</sup>
500	有	59.7	19.1
	無	7.97	0.455
5000	有	145	14.0
	無	100 > <sup>b)</sup>	0.882

a) B-mAb (0  $\mu$ g/mL) における測定値を 90% 以上阻害できなかったため, 算出できなかった.

b) Screening cut point 値を下回らなかったため, 算出できなかった.

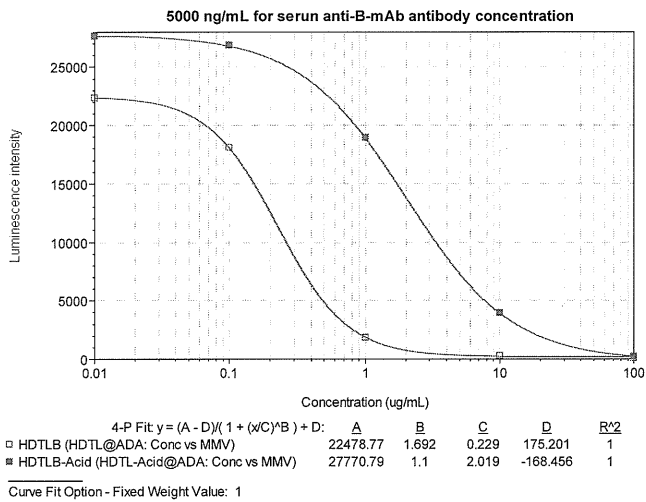


図1 DTL 及び IC<sub>90</sub> の算出に用いたシグモイド曲線 (血清中抗 B-mAb 抗体濃度 : 5000 ng/mL)  
[X 軸 : B-mAb 濃度 (μg/mL), Y 軸 : 発光強度, ■ = 酸処理あり, □ = 酸処理なし]

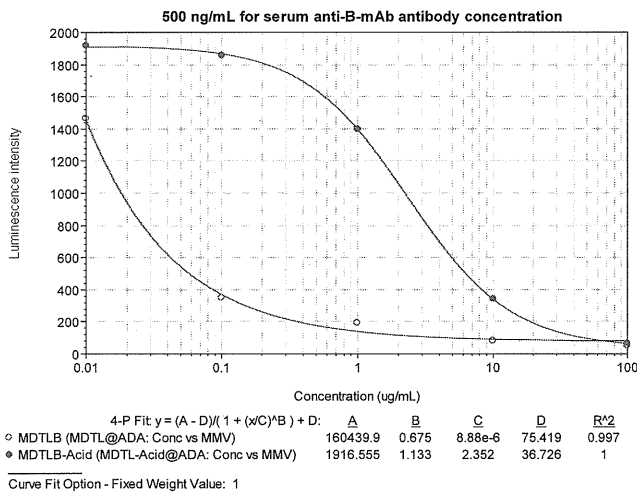


図2 DTL 及び IC<sub>90</sub> の算出に用いたシグモイド曲線 (血清中抗 B-mAb 抗体濃度 : 500 ng/mL)  
[X 軸 : B-mAb 濃度 (μg/mL), Y 軸 : 発光強度, ● = 酸処理あり, ○ = 酸処理なし]

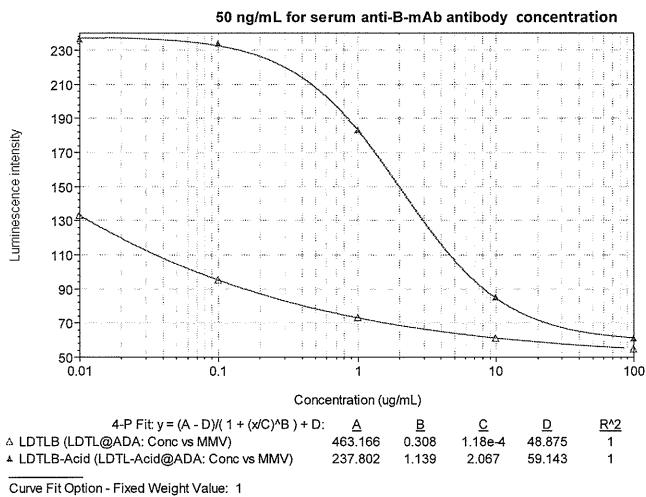


図3 DTL 及び IC<sub>90</sub> の算出に用いたシグモイド曲線 (血清中抗 B-mAb 抗体濃度 : 50 ng/mL)  
[X 軸 : B-mAb 濃度 (μg/mL), Y 軸 : 発光強度, ▲ = 酸処理あり, △ = 酸処理なし]



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

分担研究課題：液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS) 又は  
リガンド結合法 (Ligand Binding Assay) によるバイオ医薬品の評価法の開発

研究分担者：井上則子 株式会社 JCL バイオアッセイ 研究部部長

(1) LC-MS/MS によるバイオ医薬品の評価法の開発

要約

抗体医薬品を LC-MS/MS で分析した際のバリデーションパラメータの影響を調査する事を目的として、LC-MS/MS によるマウス血清中市販抗体医薬品 A の定量法開発と評価を行った。バリデーションパラメータとして検量線、キャリーオーバー、選択性、真度及び精度、マトリックス効果の評価した。しかしながら、日間再現性に課題がある状況であり、引き続き検討が必要であると考えられる。

研究協力者

後藤理恵子 西脇ラボ 化学分析部門

A.目的

抗体医薬品を LC-MS/MS で分析した際のバリデーションパラメータの影響を調査する事を目的として、LC-MS/MS によるマウス血清中市販抗体医薬品 A の定量法開発と評価を行った。

B.研究方法

B.1 使用機器

- ・ Nexera UHPLC system, SHIMADZU
- ・ AB SCIEX Triple Quad 5500, AB SCIEX

B.2 試料

共通試料（国立医薬品食品衛生研究所より提

供）

- ・ マウス血清（6 個体）
- ・ 市販抗体医薬品 A（50mg/mL）
- ・ 内標準物質：  
VVSVLTVLHQDWL（13C6;15N）NGK  
（純度 99.7%）

B.3 主な器具及び試薬

- ・ TPCK 処理トリプシン, SIGMA ALDRICH,  
T1426

B.4 分析法

【濃縮・精製方法】

メタノール沈殿, トリプシン消化, 固相抽出

【評価項目】

- ・ 検量線

(1-500 µg/mL の 8 ポイント, n=1, 2 日間)

・ キャリーオーバー

・ 真度・精度

(LLQC, LQC, MQC, HQC 各濃度 n=3)

・ 選択性 6 個体 (n=1)

・ マトリックス効果

(LLQC, LQC, MQC, HQC 各濃度 n=3)

#### 【前処理方法】

図 1 に示す。

#### 【LC-MS/MS の条件】

図 2 に示す。

#### <倫理面への配慮>

提供品及び市販品を使用して実施したため、特に配慮を必要としない。

### C. 結果と考察

#### C.1. 前処理方法の最適化

提供いただいた濃縮・精製方法で LC-MS/MS 分析を行ったが、LC において夾雑と一緒に溶出されている事が原因で、評価できなかった。このため前処理方法を図 1 に示すように変更した。また、LC-MS/MS 条件についても図 2 に示すように変更した。

#### C.2. 検量線

ブランク試料 (n=1) , ゼロ試料 (n=1) 及び検量線 (1-500 µg/mL の 8 ポイント, 各濃度 n=1) を 2 回分析した (図 3)。ブランク試料及びゼロ試料は検量線の計算から除外した。

1 日目の検量線においては 5 µg/mL の真度については 115.4%であったが、その他の濃度の真度は±15%以内であった。2 日目の検量線において

は 5 µg/mL 及び 100 µg/mL のポイントについては、異常値であったため、検量線算出から除外された。2 µg/mL の真度については 84.4%であったが、その他の濃度の真度は±15%以内であった。

#### C.3. キャリーオーバー

最高濃度の検量線用標準試料を測定した後のブランク試料のピーク面積値を比較した (図 4)。なお、本項目は 1 日目に評価した。

抗体医薬品 A 及び IS 共にキャリーオーバーは確認されなかった。

#### C.4. 真度及び精度

4 濃度 (LLQC, LQC, MQC 及び HQC) の真度及び精度用 QC 試料 (各 n=5) を 1 回分析することによって、真度及び精度を求めた (図 5)。なお、本項目は 1 日目に評価した。

CV は 15%以内であった。真度は MQC 及び HQC では±15%以内であったものの、LQC で +20.8%、LLOQ では +26.7%であった。

#### C.5. 選択性

個体別ブランク血清 (6 個体, n=1) を分析し、抗体医薬品 A に対する妨害ピークを確認した (図 6)。なお、本項目は 1 日目に評価した。

全ての個体別ブランク試料において、抗体医薬品 A 及び IS の溶出位置にピークは確認されず、定量値への影響はないと考えられた。

#### C.6. マトリックス効果

個体別ブランク血清 (6 個体) を用いて調製した 4 濃度 (LLQC, LQC, MQC 及び HQC) のマトリックス効果試料 (各 n=3) を 1 回分析することによって、真度及び精度を求めた (図 7)。

なお，本項目は2日目に評価した。

CVはLQCの2個体で24.9%，26.4%であったが，その他については15%以内であった。

#### C.7. 考察

1日目に検量線，キャリーオーバー，選択性，真度及び精度について評価した結果，真度が高めに算出されていた以外の問題点はなかった。しかしながら，2日目に検量線及びマトリックス効果を評価した結果，CVがLQCの2個体で24.9%，26.4%と高い他，真度がHQCの3個体で20%以上であった。その他，2日目の分析では検量線での異常値も発生した。これら2日間の分析を総合的に考慮すると，日間再現性に課題がある状況であり，引き続き検討が必要であると考えられる。

#### D.結論

検量線，キャリーオーバー，選択性，真度及び精度，マトリックス効果について評価した。しかしながら，日間再現性に課題がある状況であり，引き続き検討が必要であると考えられる。

#### E.研究発表等

論文発表等

なし。

学会発表等

なし。

報道発表等

なし。

## 図1 前処理方法

血清 (25  $\mu$ L)

↓←メタノール (75 $\mu$ L) を添加後, 混合

↓←遠心分離 (20,000 $\times$ g, 5 分間)

↓←上清除去

沈殿物

↓←200mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (50  $\mu$ L) を添加

↓←混合, タンパクを粉砕

↓←SIL-IS 溶液 (25  $\mu$ g/mL, 10 L) を添加

↓←20 mM DTT 水溶液 (10  $\mu$ L) を添加

↓←インキュベート (60 $^\circ$ C, 30 分)

↓←20 mM IAA 水溶液 (10  $\mu$ L) を添加後, 混合

↓←室温 (30 分, 遮光)

↓←トリプシン溶液 (1 mg/mL, 10  $\mu$ L) を添加後, 混合

↓←インキュベート (37 $^\circ$ C, 16 時間)

↓←10%ギ酸 (12  $\mu$ L) を添加後, 混合

↓←遠心分離 (20,000 $\times$ g, 5 分間)

上清

↓←水 (500  $\mu$ L) を添加後, 混合

↓←サンプルを固相 (Oasis HLB 30 mg/cc, waters) へロード

固相は予めアセトニトリル, 水 各 500  $\mu$ L で活性化

↓遠心 (1800 $\times$ g, 1 分間)

↓←洗浄 (10%アセトニトリル) (1000  $\mu$ L) を添加

↓遠心 (1800 $\times$ g, 1 分間)

↓←溶出 (アセトニトリル) (1000  $\mu$ L)

濃縮遠心 40 $^\circ$ C

↓←再溶解 (水/アセトニトリル/ギ酸, 95:5:0.25) (90  $\mu$ L) を添加後, 混合

↓←遠心 (20,000 $\times$ g, 1 分間)

↓←Ultrafree MC, 0.22  $\mu$ m (Millipore) に分取

↓←遠心分離 (12,000 $\times$ g, 2 分間)

全量をバイアルに分取