

抗体凝集体の測定を目的とした微粒子定量技術の開発

古川 琴浩, 片山 晃治

1 はじめに

抗体医薬品とは抗体を用いた医薬品の総称で、近年がんと等の疾患の治療薬として注目されている。また、その世界市場は近年急速に拡大している¹⁾。抗体医薬品は薬効が高い一方で、振動や攪拌、熱等のストレスにより抗体が部分的に変性し、凝集体を生じる場合があることが知られている^{2)~4)}。この抗体凝集体の発生により、薬効の低下やアレルギー反応等の副作用発生が懸念されており⁵⁾⁶⁾、米国食品医薬局 (FDA) のガイドライン⁷⁾でも抗体凝集体の定量的な測定の必要性が記載されるなど、品質管理における重要な項目として世界で認識がされてきている。

抗体凝集体は数十 nm から数十 μm と幅広い分布を取りうるため、その粒子径に応じた測定法で測定する必要がある。例えば、0.1 μm 以下の領域ではサイズ排除クロマトグラフィーが、2 μm 以上の領域ではマイクロフローイメージングなどの顕微鏡ベースの測定手法が多く用いられている⁸⁾。

一方、0.1~2 μm の領域を測定する手法としては動的光散乱法やレーザー回折散乱法などが挙げられるが、いずれも定量性に限りがある³⁾。当該領域における王道の分析手法がないことから、新規技術の開発が期待されている。

そこで我々は、0.1~2 μm 領域の粒子を定量可能な新規技術開発に取り組んだ。具体的な施策として、まず

粒子をそのサイズに応じて分離し、その後分離された粒子を個々に検出することをコンセプトとした (図1)。本報告では開発技術の概要と、抗体凝集体の測定事例を紹介する。

2 粒子分離技術の開発

2-1 Pinched-Flow Fractionation 法の概要

粒子をそのサイズに応じて分離する技術として、Pinched-Flow Fractionation⁹⁾¹⁰⁾ (以降 PFF 法と記載) を用いた。PFF 法は、マイクロ流路を用いて流体力学的に粒子を分離する手法である。また、マイクロ流路とは、流路幅や高さがマイクロメートルオーダーの微細な溝が形成されたデバイスである。

PFF 法による粒子分離概要を図2に示す。まず、二つの入り口から粒子を含むサンプル液と、粒子を含まないシース液とをそれぞれ導入し、流路幅が相対的に狭い狭隘流路内へ導入する。ここで、シース液の流量がサンプル液の流量に対して十分に大きくなるよう設定すると、粒子は狭隘流路内の壁面へ抑えつけられながら下流へ流れていく。この時、粒子サイズによって壁面と粒子の重心位置との距離に僅かな差が生じ、この差を拡大流路 (流路幅が相対的に広く設計された流路) によって増幅することで粒子分離を行う。

従来の PFF 法では、本開発で目指す測定範囲 0.1~2 μm を連続的に分離した事例はなかったため、検討を行った。

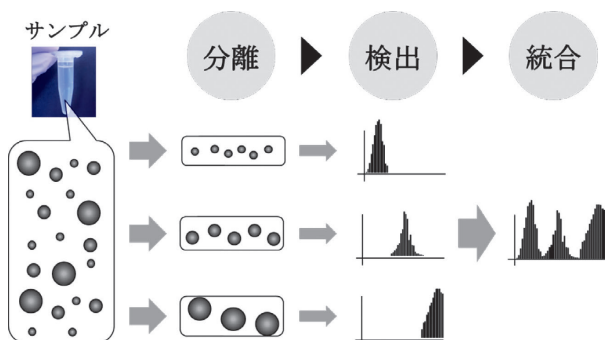


図1 開発技術の概要

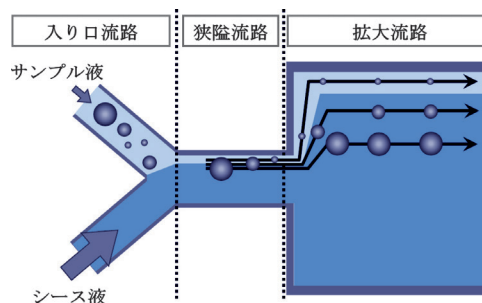


図2 Pinched-Flow Fractionation 法の原理

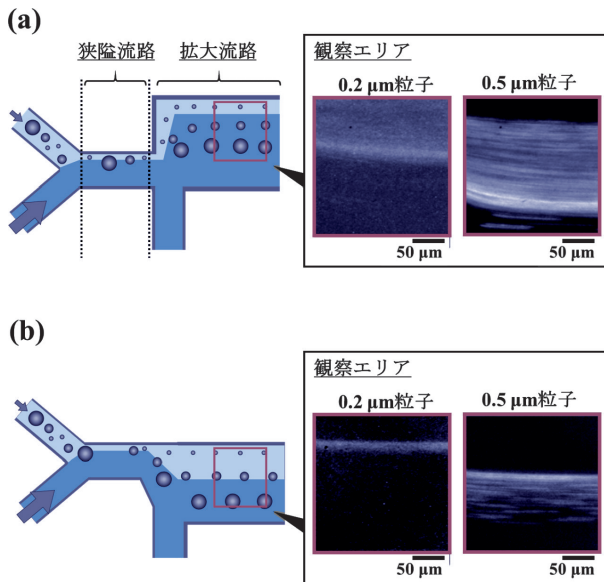


図3 PFF法による粒子分離結果
(a) 一般的なPFF流路, (b) 開発したPFF流路

2・2 粒子分離技術の構築

PFF法における粒子分離性能は、狭隘流路幅と拡大流路幅の比によって制御できることが知られている⁹⁾。しかし、ブラウン運動が寄与する0.1~2 μmの領域では、流路幅設計による粒子分離が達成できず、一般的なPFF法の適用は困難であった。そこで鋭意検討した結果、①速やかに狭隘流路内を通過させる流量設定、②狭隘流路から拡大流路へと続く流線に淀みが極力ないような流路設計、の2点が重要であると示唆された。

上記検討として蛍光粒子の分離実験を行ったので、概要を図3に示す。一般的なPFF法では、狭隘流路から拡大流路へ接続する部分の流路は両開き90°の構造⁹⁾である。当該流路に対し0.2, 0.5 μm 蛍光粒子をサンプル液として導入したところ、各粒子の流れる領域が一部重複し、分離が不完全である様子が確認された(図3-a)。そこで、サンプル液の流入する側の壁面は拡大せず、片側の壁面のみが拡大する構造に流路を変更したところ、0.2, 0.5 μm 蛍光粒子が完全に分離する様子を確認することができた(図3-b)。

3 粒子検出技術の開発

3・1 コールター法の概要

粒子検出技術は、コールター法¹¹⁾を用いた(図4)。コールター法は、アパーチャと呼ばれる微細な穴を用いて粒子を電気的に測定する技術である。この手法では、アパーチャを隔てて1対の電極が設置された装置を用い、粒子がアパーチャ内を通過する際の電流値変化を利用して粒子測定を行う。アパーチャ通過時の電流値減少幅が粒子径に、減少するシグナル数が粒子濃度に、それぞれ対応している。

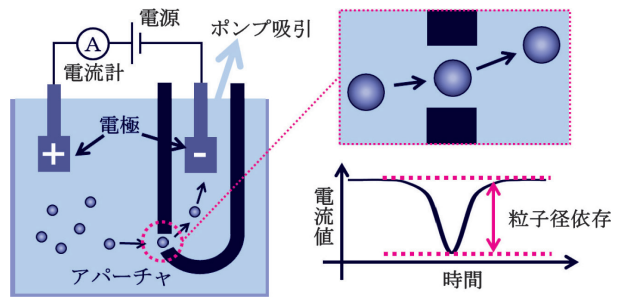


図4 コールター法の原理

コールター法は粒子個々のシグナルが得られるため、数的に含まれる割合の少ない粒子でも正確な測定が可能である。一方、測定できる粒子径範囲(ダイナミックレンジ)が比較的狭いという課題がある。アパーチャ径に対して、測定粒子径が小さすぎる場合は電流値変化が小さく(感度不足)、測定粒子径が大きすぎる場合には粒子がアパーチャを通過できない(詰まりによる測定不良)ためである。

3・2 粒子検出技術の構築

上記課題を解決するため、筆者らは、ダイナミックレンジの異なる複数のアパーチャをマイクロ流路内に並列することで、0.1~2 μm 範囲の粒子を検出することにした。

まず、マイクロ流路内でコールター法測定系を再現するための流路設計を行った。具体的には、図5のように、流路内にて局所的に微細構造を設け、アパーチャの役割を持たせた。また、アパーチャの上流側と下流側それぞれに電極を挿入できるよう流路を設計し、二つの電極間に直流電源を設置することで回路を構成した。

上記回路を一つのマイクロ流路内に3種類設け、それぞれ、小粒子検出用、中粒子検出用、大粒子検出用とした。

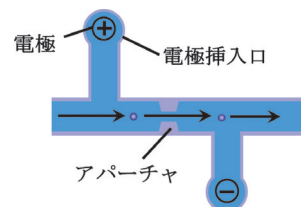


図5 マイクロ流路によるコールター法測定系

4 粒子分離 / 検出技術の開発

4・1 粒子分離, 粒子検出技術の統合

これまでに開発した粒子分離技術と粒子検出技術を統合したマイクロ流路の概要を図6に示す。本技術では、PFF法によって粒子をそのサイズごとに分離し、分離

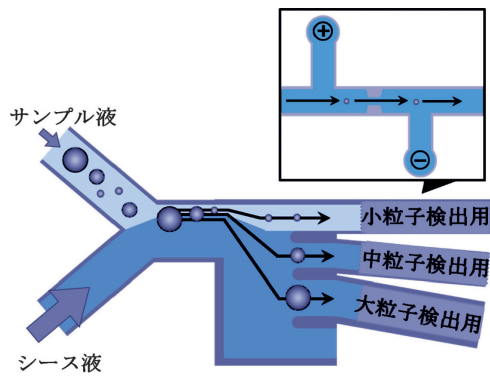


図6 粒子分離技術と粒子検出技術の統合

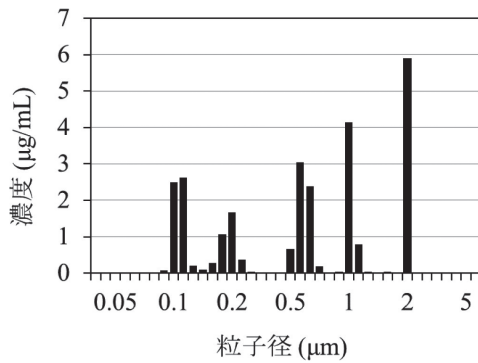


図7 開発法による標準粒子混合サンプルの測定結果

された粒子に適したアパーチャをもつ三つの粒子回収流路へ各々導入することで、0.1~2 µm 範囲の粒子を個々に測定する。

開発技術を用いて、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µm 粒子を混合したサンプルを測定した。なお、混合粒子サンプルは、各ポリスチレン標準粒子を終濃度 5 µg/mL となるよう調製し、前記粒子を懸濁する流体として Tween20 含有のリン酸緩衝液を用いた。結果として、小粒子検出用のアパーチャでは 0.1, 0.2 µm 粒子のシグナルが、中粒子検出用のアパーチャでは 0.2, 0.5 µm 粒子のシグナルが、大粒子検出用のアパーチャでは 0.5, 1, 2 µm 粒子のシグナルがそれぞれ確認された。これら三つのアパーチャで得られた結果を合算し、0.1~2 µm 範囲の粒子測定結果をヒストグラムで図7に示す。図7の通り、五つの粒子のピークに分離する様子を確認することができた。

4.2 レーザー回折散乱法との比較検証

本技術と他測定法を比較するため、0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µm のポリスチレン標準粒子を混合したサンプル（各濃度 5 µg/mL）の測定を、レーザー回折散乱法でも行った。その結果を図8に示す。図7と比較すると、0.2 µm と 2 µm のピークが消失し 0.1 µm のピークが増大していることから、混合粒子サンプルの正確な測定は難しいことを確認した。

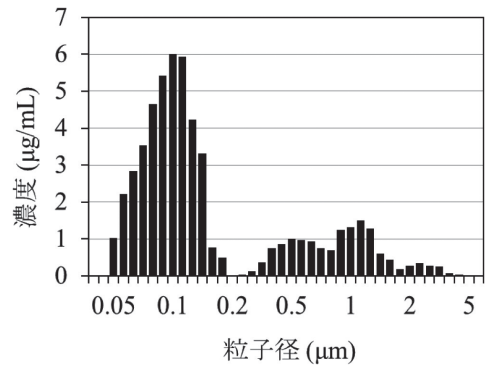


図8 レーザー回折散乱法による標準粒子混合サンプルの測定結果

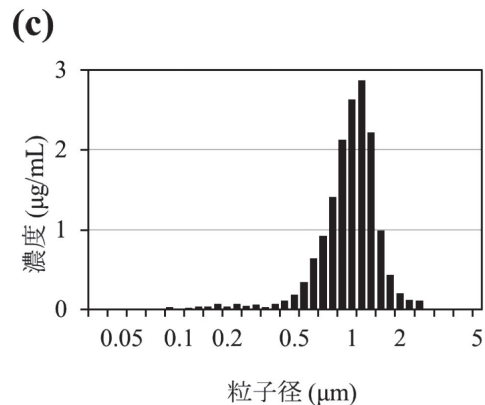
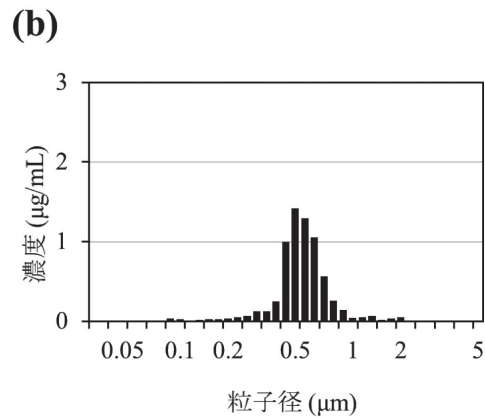
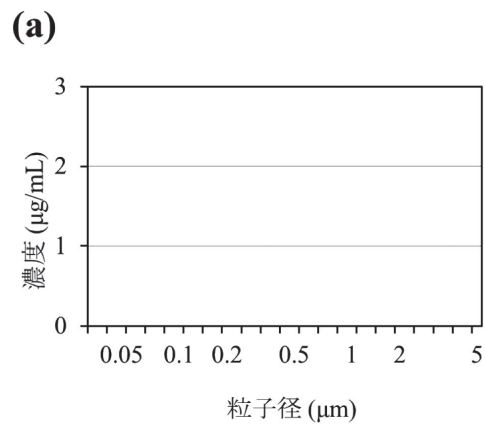


図9 抗体凝集体濃度の経時変化
(a) 未加熱, (b) 加熱後 10 分, (c) 加熱後 120 分

5 抗体凝集体の測定

標準粒子の測定による本技術の性能確認が完了したため、続いて、抗体をサンプルとした測定を行った。市販抗体医薬品に対し、(a) 未加熱サンプル、(b) 60℃ 30分の加熱処理を行った後に室温で10分放置したサンプル、(c) 60℃ 30分の加熱処理を行った後に室温で120分放置したサンプルを準備し、各々開発技術で測定を行った。測定結果を図9に示す。

図9の通り、未加熱のサンプルではほとんど粒子が検出されなかったが、加熱処理を加えた両サンプルでは凝集体と思われる粒子のピークが確認され、かつ経時的にそのピークトップの位置が大粒径側にシフトしていく様子を確認することができた。

6 まとめ

PFF法による粒子分離技術と、コールター法による粒子検出技術を統合した技術構築を行い、従来では困難であった0.1~2μm範囲の粒子を定量可能な技術開発を実現した。さらに、市販抗体医薬品を用いてその抗体凝集体が検出可能であること、抗体凝集体が経時的に変化していく様子を確認することができた。

本開発技術を用いることで、抗体医薬品の品質管理、また、加熱劣化試験のような安定性の検証への寄与が期待できる。さらに、本開発技術は抗体に限らず様々なサンプルに適用可能なため、幅広い分野で利用することができると思われる。

謝辞 本研究開発の実施にあたり、技術的なご指導・ご助言をいただきました千葉大学大学院工学研究院の関実先生、ならびにご協力頂いた方々に対し深く感謝いたします。

文 献

- 1) BBブリッジ：“2020年版 バイオ医薬品製造技術の最新動向とビジネス展望”，p.20 (2020)。
- 2) 今村比呂志，本田真也：生物物理，59, 147 (2019)。

- 3) 内山 進：YAKUGAKU ZASSHI, 136, 443 (2016)。
- 4) V. Filipe, A. Hawe, W. Jiskoot：Pharm. Res., 27, 796 (2010)。
- 5) E. M. Moussa, J. P. Panchal, B. S. Moorthy, J. S. Blum, M. K. Joubert, L. O. Narhi, E. M. Topp：J Pharm Sci., 105, 417 (2016)。
- 6) A. M. Fathallah, M. Chiang, A. Mishra, S. Kumar, L. Xue, C. R. Middaugh, S. V. Balu-Iyer：J Pharm Sci., 104, 3691 (2015)。
- 7) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration：“Guidance for industry. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products”，(2014)。
- 8) M. Kiyoshi, H. Shibata, A. Harazono, T. Torisu, T. Maruno, M. Akimaru, Y. Asano, M. Hirokawa, K. Ikemoto, Y. Itakura, T. Iwura, A. Kikitsu, T. Kumagai, N. Mori, H. Murase, H. Nishimura, A. Oda, T. Ogawa, T. Ojima, S. Okabe, S. Saito, S. Saitoh, H. Suetomo, K. Takegami, M. Takeuchi, H. Yasukawa, S. Uchiyama, A. Ishii-Watabe：J Pharm Sci., 108, 832 (2019)。
- 9) M. Yamada, M. Nakashima, M. Seki：Anal. Chem., 76, 5465 (2004)。
- 10) J. Takagi, M. Yamada, M. Yasuda, M. Seki：Lab Chip, 5, 778 (2005)。
- 11) R. W. Deblois, C. P. Bean：Rev. Sci. Instrum., 41, 909 (1970)。



古川 琴浩 (Kotohiro FURUKAWA)
東ソー株式会社ライフサイエンス研究所
(〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1)。
東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻(修士)。
《趣味》水泳、映画鑑賞。



片山 晃治 (Kouji KATAYAMA)
東ソー株式会社ライフサイエンス研究所
(〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1)。
日本大学大学院理工学研究科電子工学専攻(修士)。
《趣味》DTM (Desk Top Music)、キャンプ。

会社ホームページ URL：

<https://www.tosoh.co.jp/>