

## Application News

# No. Q114

粉粒体測定  
Powder Property Analysis

## Aggregates Sizer を用いた異なるストレス 条件下におけるタンパク質の凝集性評価

The Assessment of Protein Aggregates under Different Stress by Aggregates Sizer

近年バイオ医薬品は、病原を特異的に攻撃できるため、副作用が少なく、効果が大きい点で注目を集めています。一方で、低分子医薬品と比較するとストレスに弱く、凝集しやすいという性質があります。バイオ医薬品がストレスにより凝集などを起こすと薬品としての効果の低下・消失だけでなく、免疫反応によるショック症状など重篤な副作用の可能性が指摘されています。そのため、バイオ医薬品が受ける可能性のあるストレス（輸送・保存・使用時などの熱・物理的ストレス）について安定性を評価する枠組みが整備されつつあります。

バイオ医薬品の一種であるタンパク質製剤では、凝集体は主に 0.2-10  $\mu\text{m}$  の SVP (Sub Visible Particle) と呼ばれる領域に生じます。しかし従来のタンパク質凝集体の評価手法では「SVP 領域を一度に測定できない」、「ストレスを与えながらの測定ができない」、「測定したサンプルが回収できない」、「定量ができない」といった問題がありました。こうした課題を克服するため、バイオ医薬品凝集性評価システム Aggregates Sizer (Fig. 1) が開発されました。

本報では、Aggregates Sizer を用い IVIG (Intravenous immunoglobulin, 静注用免疫グロブリン) に熱・物理的ストレスを与え、凝集体形成の評価を行いました。SVP 領域の凝集体の定量により、ストレスの種類や攪拌棒の材質ごとに凝集体形成過程・速度が異なることを示せたため、ここに報告します。

S. Totoki H. Maeda



Fig. 1 バイオ医薬品凝集性評価システム「Aggregates Sizer」  
Aggregation Analysis System for Biopharmaceuticals  
“Aggregates Sizer”

## ■ サンプル・測定手法

### Materials and Methods

サンプルには IVIG を用いました。凍結乾燥されたサンプルに PBS (Phosphate buffer saline, リン酸緩衝生理食塩水) pH7.4 を外液として透析を行いストックソリューションとしました (4 °C で保存)。測定には PBS (pH7.4) を用いて上記ストックソリューションを 0.87 mg/mL に希釈した溶液を用いました。

熱ストレスは 1.5 mL チューブ中で 1 mL の IMG 溶液 (0.87 mg/mL) に対し、5, 7, 9 分間 70 °C インキュベートした後、小容量セル (0.4 mL) で測定しました。攪拌ストレスについてはガラス、ステンレス (SUS316)、PEEK の 3 種類の攪拌棒を用いて評価しました。Aggregates Sizer 付属の回分セル (Fig. 2) 中で 5 mL の IVIG 溶液 (0.87 mg/mL) に室温中、190 ストローク / 分で 8 時間攪拌を行いながら測定しました。

SVP 領域の粒子径分布及び定量測定は Aggregates Sizer を用いた qLD 法 (Quantitative Laser Diffraction, 定量化レーザー回折法) により行いました。Aggregates Sizer は 405 nm の半導体レーザーを用いたレーザー回折・散乱方式の粒子径分布測定装置で、粒子による 0.04° ~ 160° の散乱光強度を検出します。ミー散乱理論より特定の直径・濃度における球状粒子の散乱パターン及び強度が導き出せるため、これを試料の散乱パターンと比較することにより、絶対濃度での粒子径分布を得ることが出来ます。ミー散乱理論を用いた qLD 法では試料物質の屈折率および密度が必要となりますが、今回は屈折率にはショ糖濃度勾配を用いて実験的に決定した 1.46-0.10i を、密度には 1.37 g/cm<sup>3</sup> をそれぞれ用いています。

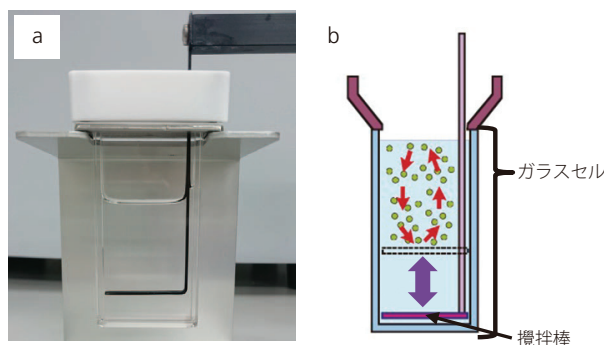


Fig. 2 回分セルの構造  
Structure of Batch Cell  
(a) 実物 (b) イメージ図  
攪拌棒が上下震動することで物理的ストレスを与える。

## 結果・考察

### Results and Discussions

代表例として熱ストレスおよびガラス棒による攪拌ストレス条件により生じた IVIG 凝集体の粒子径分布および生成量を Fig. 3 に示します。熱ストレスを与えた場合、0.2  $\mu\text{m}$  付近の凝集体のみが増えており、1  $\mu\text{m}$  以上の凝集体の生成は見られません。一方攪拌ストレスを与えた場合、時間の経過に伴い 0.2-10  $\mu\text{m}$  の領域の凝集体が増加していることがわかります。FDA は SVP 領域を 0.2-2  $\mu\text{m}$ 、2-10  $\mu\text{m}$  の2つの区間に分割して評価する案を示唆していますが、Aggregates Sizer ではこの区間での凝集体生成量の変化を1回の測定で捉えられています。

また質量換算のみならず個数換算での凝集体生成量を求め

ることができます。これらの結果から、qLD 法はタンパク質の製造・精製過程での熱や攪拌の影響評価に有効であると考えられます。

## 参考文献

### Reference

本資料は大阪大学内山進先生らとの共同研究のもと投稿した論文 "Quantitative Laser Diffraction Method for the Assessment of Protein Subvisible Particles" (Totoki et al, 2014, J. Pharm. Sci. 104 (2) : 618-626) の一部を要約したものです。詳細は原著論文をご参照ください。

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.24288/references> (オープンアクセス)

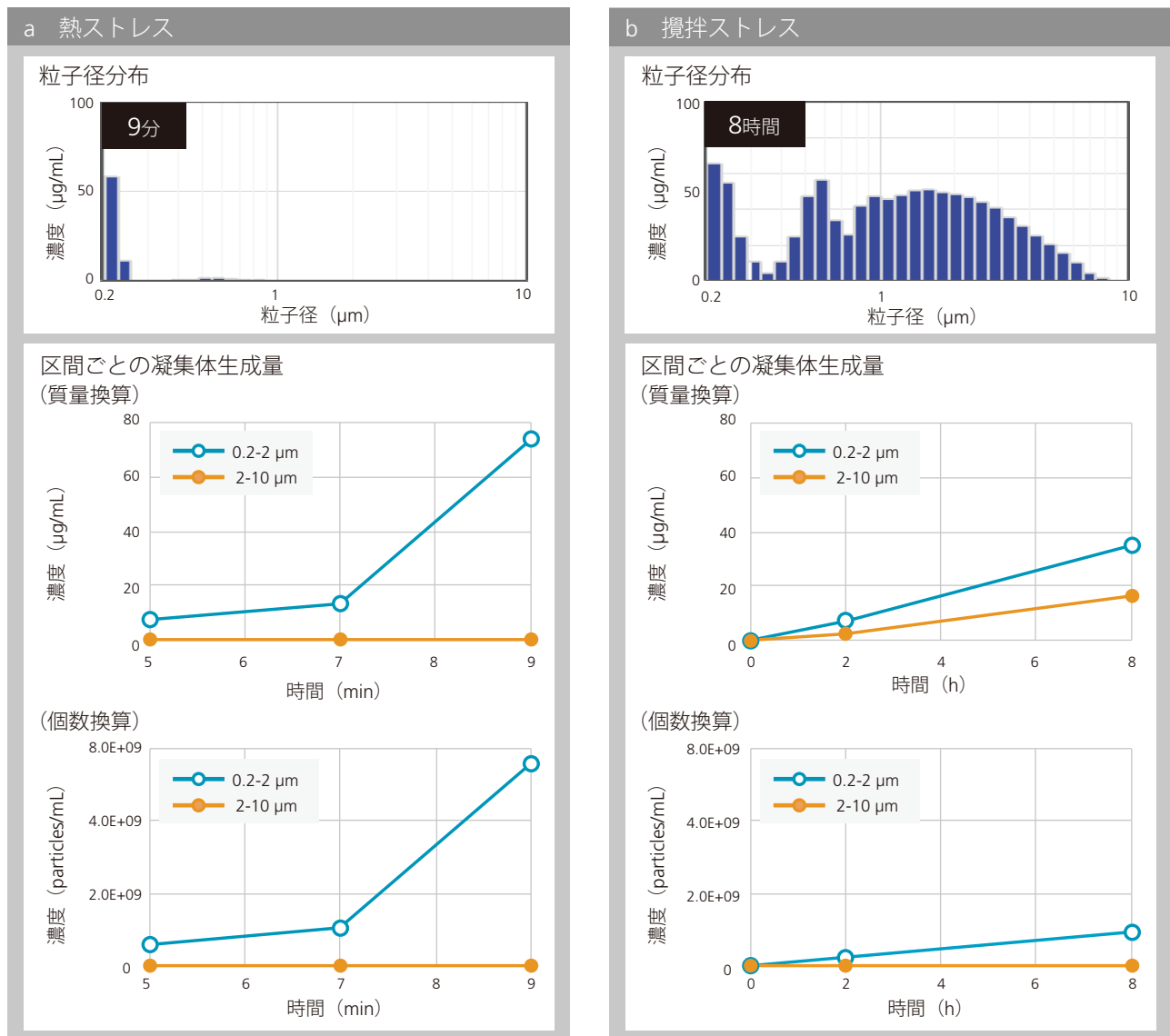


Fig. 3 熱・攪拌ストレスにより生じた IVIG の凝集体の粒子径分布および生成量  
Particle Size Distributions and Amounts of the IVIG Aggregates under Heat or Stir Stress