

Application News

No. Q118

粉粒体測定

感作ラテックスの分散性／安定性評価

－体外診断用医薬品（臨床検査薬）分野における qLD 法の活用－

体外診断用医薬品（臨床検査薬）の中には、抗原もしくは抗体などのタンパク質を表面に吸着したラテックス（感作ラテックス）を使用するものがあります。感作ラテックスを用いた検査は、他の手法と比較して簡便・迅速に実施可能なため、病気や妊娠の有無の検査などに広く用いられています。感作ラテックスを用いた手法の中には、感作ラテックスと検査対象物質の抗原抗体反応により生ずる凝集を利用して検査を行うものがあります。こうした手法の場合、感度を高めるためには検査対象物質との凝集は促進する必要がありますが、その一方で、自己凝集や検査対象物質以外の物質との非特異的な凝集は使用可能期間の短期化や誤った検査結果につながるため、抑制が必要です。そのため、凝集性のコントロールが重要な課題となります。凝集性には感作ラテックス濃度、溶液組成（pH、塩濃度など）といった複数の要素が関与するため、創薬においては多岐に渡る条件検討を実施し、分散性・安定性との関係性を評価することが必要となっています。

バイオ医薬品凝集性評価システム「Aggregates Sizer TC」（以下、Aggregates Sizer TC）は 1 測定数秒程度で粒子径分布の定量測定が完了するため、このような多岐に渡る条件検討の効率化に有用です。また回分セルを用いた攪拌試験により、安定性の加速試験を実施することも可能です。本報では、Aggregates Sizer TC を用いて、ProteinA もしくは ProteinG を感作したラテックスについて分散性と安定性を評価しました。分散性に関しては、ProteinA 感作ラテックスを使用期限を過ぎて保管することで凝集を生じさせた上で、原液と希釈液のそれぞれに分散処理を加え、濃度が分散性に与える影響を評価しました。安定性の確認としては、ProteinG 感作ラテックスに対し、pH や塩濃度の異なる溶液中で攪拌ストレスを与え凝集を促進することで、溶液組成が安定性に与える影響を評価しました。その結果、条件ごとの分散性・安定性の差異を確認できたため、ここに報告します。

H. Maeda

■ サンプル・測定手法

分散性評価としては、市販の ProteinA 感作ラテックス（粒子径 1 μm 、原液濃度 25 mg/mL）を用いました。まず使用期限が過ぎるまで試料を冷蔵保存することで、凝集を生じさせました。次に試料の原液と 10 希釈液のそれぞれに対し 1 分間超音波バス（100 W）による分散処理をかけた後、さらにそれぞれ希釈率が 5000 倍となるよう希釈し、粒子径分布を測定しました。

安定性評価としては、市販の ProteinG 感作ラテックス（粒子径 1 μm 、原液濃度 14 mg/mL）をリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4）、リン酸緩衝生理食塩水+1 M 塩化ナトリウム、およびクエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0 の 3 種類の溶液で 2800 倍希釈した後、25 $^{\circ}\text{C}$ 温調下で、材質がステンレスの攪拌棒を用いて 180 ストローク/分で攪拌しながら、1 時間粒子径分布のモニタリング測定をしました。

粒子径分布及び定量値の測定は Aggregates Sizer TC を用いた qLD 法（Quantitative Laser Diffraction Method、定量化レーザ回折・散乱法）により行いました。セルには回分セルを用いました。計算パラメータとして屈折率には 1.62-0.00i を、密度には 1.05 g/cm³ を用いています。

■ 結果・考察

まず分散性評価の結果として、分散処理前後の粒子径分布を図 1 に示します。分散処理がない状態では使用期限を過ぎているため凝集が生じてしまっていることが分かります。2 種類の濃度で分散処理を行った結果を比較すると、10 倍希釈の状態分散処理を行った場合は一次粒子まで分散されていますが、原液の場合、分散処理なしの状態からわずかしが分散が進んでおらず、濃度が分散性に影響を与えていることが分かります。

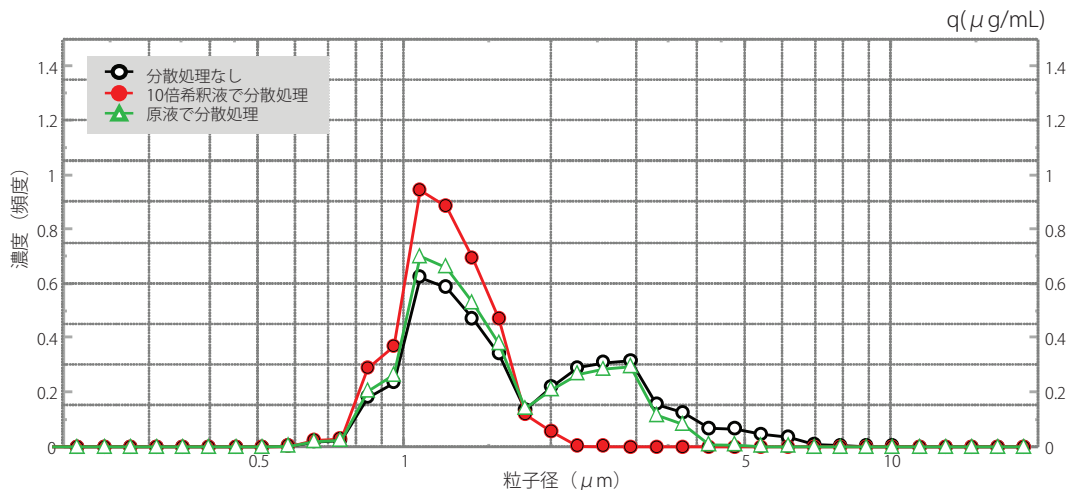
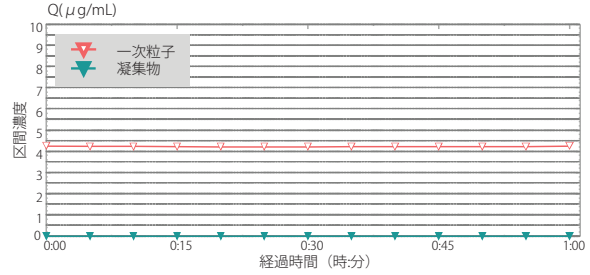
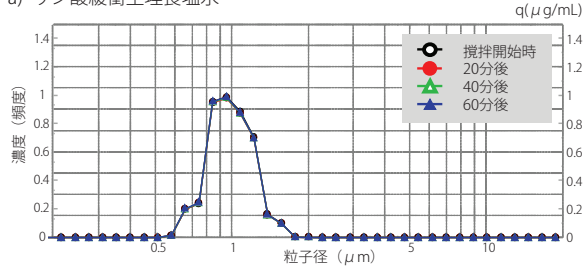
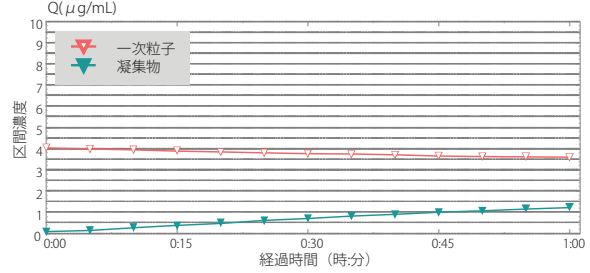
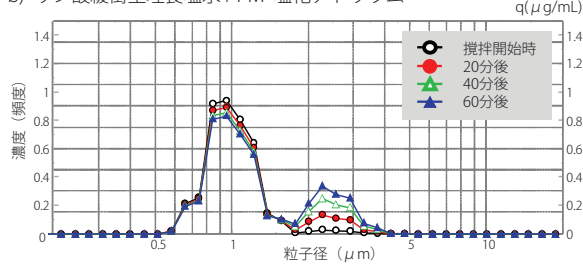


図 1 分散処理前後の ProteinA 感作ラテックスの粒子径分布

a) リン酸緩衝生理食塩水



b) リン酸緩衝生理食塩水+1 M 塩化ナトリウム



c) クエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0

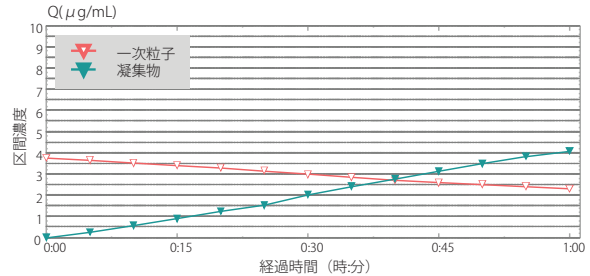
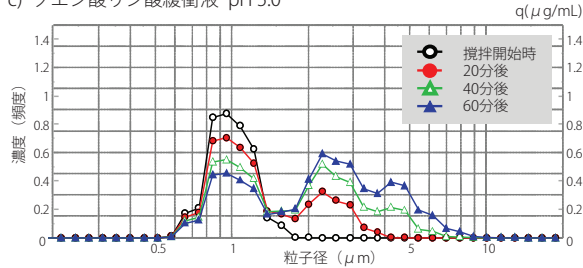


図2 溶液組成ごとの ProteinG 感作ラテックスの粒子径分布および粒子量の時系列変化
左：粒子径分布 右：粒子量の時系列変化

*時系列変化のグラフ中の一次粒子、凝集物はそれぞれ 0.50-1.74 μm、1.74-20 μm の区間粒子量から算出しています。

次に安定性評価の結果を図2、図3に示します。

図2の溶液組成ごとの粒子径分布からリン酸緩衝生理食塩水の場合は凝集物が生じておらず、リン酸緩衝生理食塩水+1 M 塩化ナトリウムでは 2 μm~3 μm にピークをもつ凝集物、クエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0 では 2 μm~7 μm までのブロードな分布をもつ凝集物が生じていることがわかります。また一次粒子と凝集物の粒子量の時系列変化のグラフからもリン酸緩衝生理食塩水では粒子量に変化がなく、凝集物が生じていないことがわかります。またリン酸緩衝生理食塩水+1 M 塩化ナトリウム、クエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0 では一次粒子の減少と凝集物の増加が見られ、クエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0 の場合の方が勾配が急になっています（なお、ここでは一次粒子量は 0.50-1.74 μm の区間粒子量、凝集物量は 1.74-20 μm の区間粒子量として算出しています）。

図3は全粒子量に占める一次粒子の割合の時系列変化を示しています。攪拌60分後では一次粒子の割合がリン酸緩衝生理食塩水+1 M 塩化ナトリウムが 3/4 程度、クエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0 は 1/2 程度となっていることがわかります。このことから、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水+1 M 塩化ナトリウム、クエン酸リン酸緩衝液 pH 5.0 の順で安定性が低くなっていると考えられます。

以上の結果から、Aggregates Sizer TC が感作ラテックスの分散性・安定性の評価に有用であることがわかります。

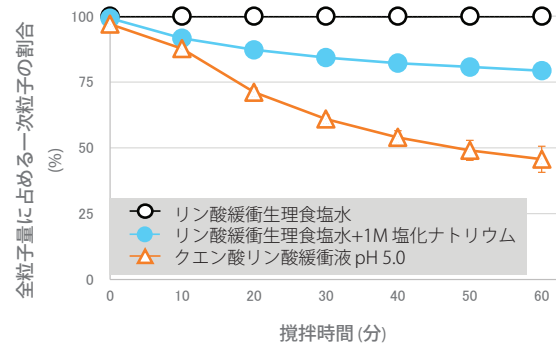


図3 ProteinG 感作ラテックスにおける溶液組成ごとの全粒子量に占める一次粒子の割合の時系列変化
*エラーバーは n=3 での標準誤差を示す。