



ダイナミック粒子画像解析システム iSpect<sup>™</sup> DIA-10

# フローイメージング法によるバイオ医薬品中の 不溶性微粒子評価

前田 裕貴

#### ユーザーベネフィット

- ◆ 第十八改正日本薬局方第二追補で参考情報として収載されたフローイメージング法による評価が可能です。
- ◆ 少量のサンプルで測定が可能です(最小測定量:50 μL、デッドボリューム:50 μL以下)。
- ◆ マイクロセル方式により、見逃しの少ない粒子検出(撮影効率90%以上)が可能です。

### ■はじめに

バイオ医薬品は高い特異性と効果を持つ一方で、低分子 医薬品と比較してストレスに弱く、凝集を生じやすいです。 凝集の発生は効果の低下・消失だけでなく、免疫反応によ る副作用の原因となる可能性があります。

バイオ医薬品中の凝集物などの不溶性微粒子の評価とし ては、米国薬局方や日本薬局方で試験法として定められて いる光遮蔽法(Light Obscuration, LO法)が広く用いられて います。近年、光遮蔽法と比較して、透過性の高い粒子へ の感度が高く、また画像から粒子の分類も可能なフローイ メージング法(Flow Imaging, Fl法)により評価した事例が 報告されており、米国薬局方や日本薬局方でも参考情報と して収載されています1),2),3),4)。

ダイナミック粒子画像解析システム iSpect™ DIA-10はFI 法に基づく分析装置で、サンプル使用量が少なく、見逃し が少ない光学系のため、バイオ医薬品の不溶性微粒子評価 に適しています。ここではiSpect DIA-10を用いてタンパク 質溶液中の不溶性微粒子のサイズおよび濃度を評価した例 を紹介します。



図1 ダイナミック粒子画像解析システム iSpect<sup>™</sup> DIA-10

## ■試料と方法

試料には凍結乾燥品のヒト免疫グロブリンを用いました。 試料粉末を1 mg/mLとなるようにクエン酸-リン酸バッ ファーpH 5.0に溶解させ、100 nmのシリンジフィルタを通 したものを試料溶液としました。タンパク質凝集体を生じ させるため、試料溶液を二つに分け、一方は80度に設定し たヒートブロックで3分間加熱し、もう一方はPEEK(ポリ エーテルエーテルケトン)樹脂製の撹拌板で10分間撹拌し ました。

このように作成した2種類のタンパク質凝集体溶液(加熱 凝集試料、撹拌凝集試料)を表1の測定条件で測定しました。

8 frame/sec
97 %
50 µL
220
0.1 mL/min

#### ■測定結果

図2に粒子径分布と散布図を、図3に粒子画像を示します。 また、表2、図4に観測粒子数および個数濃度の測定結果を 示します。



図2 粒子径分布と散布図



a) 加熱凝集試料



b) 撹拌凝集試料

図3 粒子画像の一部

表2 観測粒子数および個数濃度

		加熱凝集試料	搅拌凝集試料
観測粒子数(個	)		
(全体)		32246	18813
(サイズ別)	<2 µm	20129	4669
	2 µm – 10 µm	11797	14057
	10 µm – 25 µm	298	78
	≧25 μm	22	9
粒子濃度(個/n	nL) *1		
(全体)		668102	389784
(サイズ別)	<2 µm	417051	96737
	2 µm – 10 µm	244421	291246
	10 µm – 25 µm	6174	1616
	≧25 μm	456	186
1 粒子濃度は観	則粒子数、観測エリアの	の体積、撮影枚数な	ら計算



粒子径分布、散布図および粒子濃度から、同じタンパク 質濃度でも与えるストレスの条件が異なっていることでマ イクロメートルオーダーの凝集体の量や形状パラメータが 異なることが分かります。また粒子画像からひも状の粒子 や塊状の粒子が確認できます。

また図5に示すように、二値化処理閾値を調整することで、 2 μmのポリスチレンラテックス標準粒子についても検出可 能であることを確認しています。



図5 ポリスチレンラテックス粒子(2 µm)の測定結果

#### ■まとめ

以上のようにiSpect DIA-10を用いることで、フローイ メージング法によるタンパク質溶液中のマイクロメートル オーダーの不溶性微粒子の粒子画像の取得およびサイズ・ 濃度の評価が可能です。iSpect DIA-10は少量のサンプルを 高い撮影効率で測定可能なため、バイオ医薬品中の不溶性 微粒子の評価に有用です。

- 1) 内山 進, "バイオ医薬品に含まれる凝集体の適切な分析に向けて" 薬学雑誌, 138, 1503-1507 (2018)
- 2) Kiyoshi M et al., "Collaborative study for analysis of subvisible particles using flow imaging and light obscuration:

- experiences in Japanese biopharmaceutical consortium" Journal of Pharmaceutical Sciences, 108, 832-841 (2019) 3) Unated States Pharmacopeia, "1788.3 Flow Imaging Method for the Determination of Subvisible Particulate Matter" 4) 第十八改正日本薬局方第二追補、"参考情報 G3-17-182 フローイメージング法によるバイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)原 薬/製剤中の不溶性微粒子の評価法"

iSpectは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

#### 初版発行:2020年 2月 A改訂版発行:2025年 3月 株式会社島津製作所 https://www.an.shimadzu.co.jp/ Q123A-JP 島津コールセンター 🚾 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として 承認・認証等を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその 手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。 本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および 登録商標です 豆菜向ほじす。 本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

<sup>&</sup>lt;参考文献>