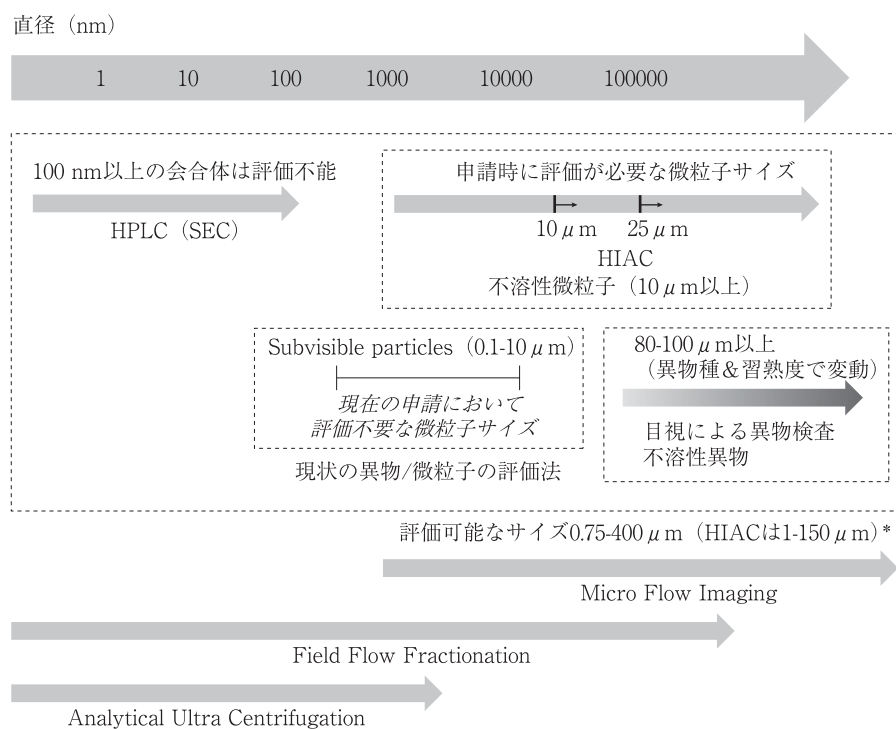


性異物・凝集体・Subvisible particles 研究の現状と将来の展望についての見解を述べる。

2.1 不溶性異物・微粒子・Subvisible particles の定義

各種タンパク質会合体および凝集体試験法、不溶性微粒子試験法、そして不溶性異物検査法の Working range を図22に示した。この図から明らかなように、現在、評価・規制されているタンパク質会合体および凝集体、不溶性微粒子(粒径 $10\mu\text{m}$ 以上のものと $25\mu\text{m}$ 以上のもの)、そして不溶性異物(目視検査で確認されるもので異物種&習熟度で変動するもののおよそ粒径 $80\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 以上のものは、粒径 $0.1\mu\text{m}$ 以下のものと粒径 $10\mu\text{m}$ 以上のもののみで、粒径 $0.1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ のものに関しては、規制はもちろん評価さえされていないのが現状であり、このサイズのタンパク質凝集体は、特に、Subvisible particles と分類されるようになった⁹⁾(Subvisible particles の定義、特に粒径に関しては、異論も存在するものの、本質的にはSEC



*2007 Protein Stability ConferenceにおいてImmunoGen社のChi-Ting Huangらによって発表された内容 (タイトル: Qualification of protein particles in parenteral solutions using Light obscuration and micro imaging) を参照

図22 各種不溶性異物/微粒子評価法における Working range

で評価不能なサイズを下限とし、不溶性微粒子として評価するものを上限とするParticlesがSubvisible particlesと定義される)。この粒径に属するタンパク質の凝集体“Subvisible particles”は、大した問題ではないように思われているものの、例えば、粒径が約10 nm程度のIgG分子では、粒径0.1 μm ~ 10 μm のIgG凝集体は、計算上およそ1000~1,000,000,000個程度のIgG分子が凝集したものであるし、保存・保管時に凝集現象が進行することによってさらに大きい凝集体となる可能性も否定できない⁹⁾。しかしながら、SECで評価可能なタンパク質の2量体と会合体に関しては厳しく規制されているにもかかわらず、粒径0.1 μm ~ 10 μm のタンパク質凝集体が規制されていないのは、その領域を評価可能な測定法がその時点において存在していなかったとしても、タンパク質凝集体の免疫原性のリスクを考慮すると非常に重大で深刻な問題であるといえる。

2.2 各種バイオ医薬品中のペプチド/タンパク質の会合・凝集体の評価法

2.2.1 SEC法(Size Exclusion Chromatography：サイズ排除クロマトグラフィー)

一般的にバイオ医薬品中のペプチド/タンパク質会合体の定量的評価法としてはSEC法が使用されている。SEC法は、実験プロトコルが簡便な点、そして再現性が高い点等の利点を有する非常に有用な分析法である。しかしながら、SEC法には会合・凝集体の定量的評価において以下のような問題点が存在しており、SEC法で得られる定量結果に関して米国の研究開発者やFDAによってその正当性に対する疑問が指摘されている¹⁰⁾。

- (1) 粒径0.1 μm より大きいタンパク質の会合・凝集体はカラムトップでトラップされるため評価不能である。
- (2) カラム内マトリックス成分とサンプル間でinteractionが起り得る。
- (3) カラム内で移動相によって希釈されるため、実際には存在すると考えられる reversible associationが明らかに阻害される。
- (4) 高い圧力下でマトリックス間を移動することによって分子間相互作用の弱い会合体が解離・せん断する可能性がある。
- (5) 分離原理が分子量ではなく流体力学的体積に基づいているため同じ物質でも変性の有無、不均一な会合状態、または糖鎖含有量によって retention timeが大きく異なる可能性がある(図23)。

SEC法によるそれら会合体の定量的評価における問題点を軽減、もしくは克服可能な評価法として最近FFF(Field Flow Fractionation：フィールドフロー分画)法とAUC(Analytical UltraCentrifugation：超遠心分析)法が注目を浴びている。