OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	バイオ医薬品の不均一性評価法の確立と応用：抗体医薬品の凝集形成メカニズムの解明とAAVベクターの包括的品質評価
Author(s)	丸野, 孝浩
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105489
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

バイオ医薬品の不均一性評価法の確立と応用：抗体医薬品の凝集形成メカニズムの解明とAAV ベクターの包括的品質評価

丸野　孝浩

2025 年 12 月

目次

第 1 章 緒言 1
1.1 研究の背景：バイオ医薬品の重要性と品質課題 1
1.2 本研究が対象とするバイオ医薬品とその品質課題 4
1.2.1 抗体医薬品と凝集体の問題 4
1.2.2 AAV ベクターの不均一性の問題 6
1.3 本研究の目的と構成 8
第 1 部：抗体医薬品の実用環境下での凝集形成メカニズムの解明 9
第 2 章 プレフィルドシリンジにおける界面相互作用を介した凝集形成メカニズムの解明 9
2.1 背景 9
PFS の普及とバイオ医薬品への応用 9
バイオ医薬品における凝集体の問題 10
本研究の着眼点と目的 11
2.2 試料および方法 11
2.2.1 試料 11
2.2.2 試料の準備と保管 13
2.2.3 吸光度・透過率測定 13
2.2.4 SE-HPLC 13
2.2.5 フローイメージング顕微鏡（FIM） 13
2.2.6 吸着した mAbs の定量 14
2.2.7 液中高速原子間力顕微鏡（HS-AFM） 14
2.3 結果 15
2.3.1 サンプリング方法の異なる GLS/SO-、GLS/SO+、COP シリンジから得られたタンパク質溶液中のミクロン凝集体の定量 15
2.3.2 シリコーンオイルのドロップレットとタンパク質の凝集体の識別 20
2.3.3 異なるサンプリング方法による抜取り後のシリンジバレルに吸着したタンパク質の定量 20
2.3.4 高速液中原子間力顕微鏡（HS-AFM）によるシリンジ内表面へのアダリムマブ吸着のリアルタイム観察 23
2.4 考察 25
凝集体発生と吸着量の関係に関する考察 25
2.5 本章の結論 30
第 3 章 分析過程における機械的ストレスを介した凝集形成メカニズムの解明 30
3.1 背景 30
3.2 試料と方法 33
3.2.1 試料 33

3.2.2 ITC（Isothermal Titration Calorimetry）測定 34
3.2.3. ITC サーモグラムの解析とモデルフィッティング 35
3.2.4 可溶性および不溶性画分の特性評価 35
3.3 結果 37
3.3.1 異なる撹拌回転数における PPAR-ロシグリタゾン相互作用の ITC サーモグラム 37
3.3.2 PPAR-リガンド相互作用の発熱量プロットの非線形フィッティング 42
3.3.3 FP シリンジで撹拌した PPAR のキャラクタリゼーション 42
3.3.4 抗体医薬品の抗原結合能評価および製剤条件検討への応用 43
3.4 考察 45
3.4.1 低撹拌回転数での PPAR-ロシグリタゾンの相互作用における結合不可能画分率 45
3.4.2 高撹拌回転数での PPAR-ロシグリタゾンの相互作用における結合不可能画分率 46
3.4.3 パドルの先端形状が PPAR-ロシグリタゾン相互作用に与える影響 46
3.4.4 撹拌後の可溶性および不溶性画分の特性評価 46
3.4.5 撹拌中の変性や凝集を抑制するために考えられる方法 47
3.4.6 ITC 測定におけるタンパク質の変性や凝集の原因として考えられるもの 47
3.5 本章の結論 50
第 1 部の結論 50
第 2 部：アデノ随伴ウイルスベクターの包括的品質評価法の開発と応用 50
第 4 章 多波長検出超遠心分析沈降速度法による AAV ベクターの包括的分散状態評価方法の確立 50
4.1 背景 50
既存の AAV ベクター分析法の限界 51
SV-AUC の利点と課題 52
4.2 試料と方法 54
4.2.1 AAV ベクターの調製 54
4.2.2 SV-AUC 測定用試料の調製 54
4.2.3 密度コントラスト SV-AUC 55
4.2.4 SV-AUC のデータ解析 55
4.2.5 AAV-EP と AAV-FP の沈降係数分布のピーク面積の波長依存性 56
4.2.6 分子量計算 56
4.2.7 偏比容計算 56
4.2.8 屈折率増分（dn/dc）計算 57
4.2.9 モル吸光係数の決定 57

4.2.10 多波長 SV-AUC による PP と凝集体の識別 57
4.2.11 多波長検出 SV-AUC における検出波長の選択 58
4.3 結果と考察 58
4.3.1 AAV 試料に含まれる成分のキャラクタリゼーション 58
4.3.2 多波長検出 SV-AUC による AAV5-EP および AAV5-FP の吸収スペクトルの決定 60
4.3.4 各波長におけるモル吸光係数の決定 61
4.3.5 多波長 SV-AUC による PP と凝集体の識別 64
4.3.6 多波長 SV-AUC 実験における最適な検出波長の選択 66
4.3.7 AAV 試料の包括的な特性評価のためのワークフロー 69
4.5 本章の結論 72
第 5 章 超遠心分析バンド沈降速度法による少量 AAV ベクターでの分散状態評価方法の確立 73
5.1 背景 73
5.2 試料と方法 75
5.2.1 試料調製 75
5.2.2 UV 吸収測定 75
5.2.3 BS-AUC 75
5.2.4 BS-AUC のデータ解析 76
5.2.5 SV-AUC 76
5.2.6 SV-AUC のデータ解析 76
5.2.7 BS-AUC 測定の繰り返し再現性および BS-AUC と SV-AUC の沈降係数分布プロファイルの比較 76
5.2.8 PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下における BS-AUC の定量下限（LOQ）の決定 77
5.3 結果と考察 77
5.3.1 BS-AUC による AAV ベクターのサイズ分布解析 77
5.3.2 AAV ベクター試料に含まれる粒子の沈降挙動に対する重水の影響 78
5.3.3 BS-AUC の繰り返し再現性と SV-AUC の結果との比較 79
5.3.4 成分の同定と定量に関する MW-BS-AUC と MW-SV-AUC の比較 83
5.4 本章の結論 85
第 6 章 AAV ベクターの製造工程における品質特性の変動とその生物活性への影響評価 86
6.1 背景 86
AAV ベクター製造の現状と品質管理の重要性 86
生物活性に影響を与える可能性のある QA に関する先行研究 86
本章の目的 87
6.2 実験方法 87

6.2.1 AAV ベクターの製造および精製 87
6.2.2 ゲノム力価測定 89
6.2.3 クライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）分析 90
6.2.4 UV 分光法 90
6.2.5 動的光散乱法 90
6.2.6 キャピラリーゲル電気泳動法 91
6.2.7 BS-AUC 分析 91
6.2.8 フローサイトメトリー 92
6.2.9 宿主細胞由来タンパク質（HCP）定量のための ELISA 92
6.2.10 宿主細胞由来 DNA（HCD）定量のための qPCR 分析 92
6.2.11 脱アミド化率分析のためのペプチドマッピング 92
6.2.12 保管安定性試験 93
6.2.13 統計解析と作図 94
6.3 結果 94
6.3.1 AAV ベクターの製造 94
6.3.2 AAV8-CMV-EGFP の QA 95
6.3.3 ベクター収量と VP 化学量論との相関 101
6.3.4 AAV8-CMV-EGFP の品質評価結果間の相関 102
6.3.5 VP 関連パラメータと遺伝子導入効率の関係 103
6.3.6 脱アミド化率と遺伝子導入効率の関係 104
6.3.7 脱アミド化率と VP2 化学量論の遺伝子導入効率への寄与の区別 105
6.4 考察 107
6.5 本章の結論 109
第 2 部の結論 110
第 7 章 総括および展望 110
7.1 総括 110
7.2 展望 111
抗体医薬品の凝集研究の展望 111
AAV ベクターの品質評価と製造プロセス開発の展望 112
略語リスト 113
記号リスト 115
図表目次 116
参考文献 119
発表論文 131
その他発表論文 132
謝辞 136

第 1 章 緒言

1.1 研究の背景：バイオ医薬品の重要性と品質課題

近年、バイオテクノロジーの急速な進展に伴い、分子生物学的手法を用いて製造されるバイオ医薬品[1]の研究開発および臨床応用が進んでいる。抗体医薬や遺伝子治療用ベクターに代表されるバイオ医薬品は、がん、自己免疫疾患、アレルギー、遺伝性疾患など、これまで有効な治療法が限られていた多くの疾患に対する革新的な治療選択肢となっている。抗体医薬は、特定の分子（抗原）を標的とするよう設計され、単一の細胞クローンから生産される免疫グロブリンを有効成分とするバイオ医薬品である。1975 年のハイブリドーマ法の開発に端を発し、1986 年に最初の抗体医薬品であるムロモナブ-CD3 が米国食品医薬品局（FDA）に承認された。2001 年には抗 CD20 抗体キメラ抗体であるリツキシマブが承認され、抗体医薬品として最初の大きな成功を収めた[2]。当初のマウス抗体は高い免疫原性、つまり、生体内で抗薬物抗体を産生させる性質、を持つ可能性が懸念されていた[3]。この免疫原性の問題を克服するため、抗体医薬品の構造は、マウス抗体から、抗体の骨格である定常領域をヒト由来とすることで免疫原性を低減したキメラ抗体、マウス抗体の抗原結合部位だけをヒト抗体に移植したヒト化抗体、そして完全ヒト抗体へと進化を遂げた。FDA による抗体医薬品の承認は 2006 年以降、毎年続くようになり[4]、2024 年末までに、抗体を基盤としたバイオ医薬品の FDA による承認品目は 159 に達した[5]。世界的な抗体医薬品の市場規模は、過去 11 年間（2014–2024）で 650 億ドル（USD）から 2670 億ドル（USD）へと 4 倍以上増加しており、現在のパイプラインに基づいた予測モデルでは、その市場規模は 2034 年までに約 5810 億ドル（USD）に達すると見込まれている[5]。現在、抗体医薬品はがん、アレルギー、自己免疫疾患、感染症など多様な疾患の治療に用いられ、医薬品市場において中心的な役割を担っている。事実、2024 年における世界の医薬品売上げ上位 10 品目において、バイオ医薬品は 5 品目を占め、売上高ベースでの比率は 50%を越えている（図 1）[6]。この臨床上の成功は、標的分子への極めて高い特異性と親和性に由来する有効性の高さと、それに伴う副作用の少なさに起因する。

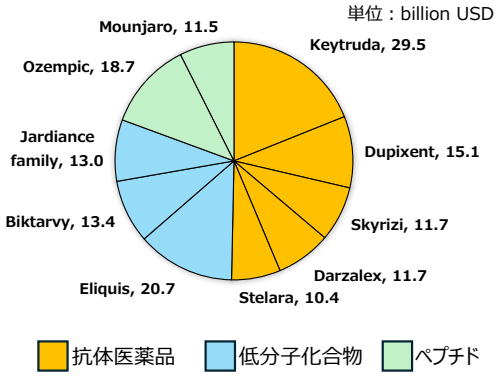


図 1 医薬品売上げ上位 10 品目におけるバイオ医薬品の比率（2024 年）

出典（https://www.genengnews.com/topics/drug-discovery/top-10-best-selling-drugs-2/）に基づき作成

アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、アデノ随伴ウイルスを改変し、治療用遺伝子を搭載した、*in vivo* 遺伝子治療の主要なプラットフォームである。2012 年に欧州で AAV1 ベクター製品が初めて承認されてから 2025 年 8 月までに 8 種類の医薬品が欧州と米国を中心に承認されるなど、その臨床応用は急速に現実のものとなっている。加えて、AAV ベクターを用いて臨床試験は 2022 年 6 月までに 255 に達しており、近年その数が増加傾向にあることも特筆すべき点である（図 2）[7]。

表 1 日米欧で承認された *in vivo* 遺伝子治療製品（AAV ベクター製品）

2025 年 8 月 22 日現在

製品名	販売企業	おもな適用	ベクター	導入遺伝子	投与	承認国・年
Beqvez	Pfizer	血友病 B	AAV-Spark100	F9 (Padua 変異)	静脈内	カナダ・2024 米国・2024 欧州・2024
Elevidys	Sarepta Therapeutics	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	AAVrh74	microdystrophin	静脈内	米国・2024 日本・2025
Hemgenix	CSL Behring	血友病 B	AAV5	F9 (Padua 変異)	静脈内	米国・2022 欧州・2023
Roctavian	BioMarin	血友病 A	AAV5	F8	静脈内	欧州・2022 米国・2023
Kebilidi(US) Upstaza(EU)	PTC Therapeutics	AADC 欠損症	AAV2	AADC	被殻内	欧州・2022 米国・2024
Zolgensma	Novartis	脊髄性筋萎縮症	AAV9	SMN1	静脈内	米国・2019 欧州・2020 日本・2020
Luxturna	Spark Therapeutics（米国） /Novartis	両アレル性 RPE65 変異 遺伝性網膜ジストロフィー	AAV2	RPE65	網膜下	米国・2017 欧州・2018 日本・2023
Glybera	UniQure	リポ蛋白リパーゼ(LPL)欠損症	AAV1	LPL	筋肉内	欧州・2012

出典（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ https://www.nihs.go.jp/mtgt/）を改変

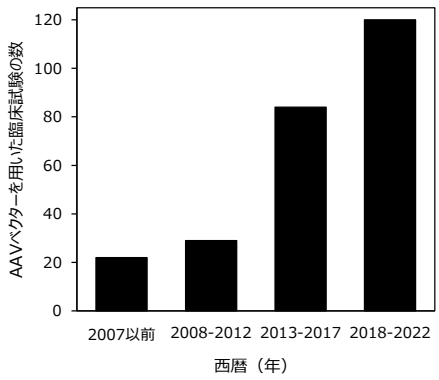


図 2 2022 年 6 月までに実施された AAV ベクターを用いた臨床試験の件数の推移

文献[7]に掲載された図（論文中 Figure 1D）の数値情報を元に作成した。

しかしながら、これらのバイオ医薬品はタンパク質や核酸といった高分子を構成成分とすることから、従来の低分子医薬品と比較して複雑な構造を持つこと、加えて物理化学的に不安定であるという課題を抱えている。そのため、製造工程、保管、輸送、そして最終的な患者への投与に至る一連のプロセスにおいて、凝集体形成、化学修飾、不純物の混入といった品質の変動が生じやすい。これらの品質の変動は、単に医薬品の有効性を低下させるだけでなく、時として予期せぬ、あるいは重篤な免疫原性を誘発し、患者の安全性を脅かす重大なリスクとなりうる。例えば、抗体医薬において、特に直径 1–100 µm の凝集体（ミクロン凝集体）は免疫原性を誘発する潜在的なリスクを持つと指摘されている[8]。また、AAV ベクター製剤に含まれる空粒子（Empty Particle: EP）などの不純物は、治療効果を減弱させる[9]だけでなく、CD8+ T 細胞の増殖といった過剰な免疫応答を引き起こす可能性がある[10]。

このような背景から、FDA、欧州医薬品庁（EMA）、医薬品医療機器総合機構（PMDA）といった各国の規制当局は、バイオ医薬品の品質、特に粒子状物質や不純物について厳格な管理を求めており、その監視と低減に努めることを強く推奨している。したがって、バイオ医薬品の品質を担保し、安全かつ有効なバイオ医薬品を安定的に供給するためには、その複雑な特性を深く理解することが必要である。このため、高感度かつ高分解能な分析技術を用いて品質特性（QA）を正確に評価・管理することが重要となってくる。

本研究では、現代のバイオ医薬品を代表する二つの重要なモダリティー、「抗体医薬」と「遺伝子治療」から、抗体医薬品と AAV ベクターを取り上げ、それぞれが品質の面で直面する重要な課題の解決を目指す。本研究で抗体医薬品と AAV ベクターに着目した理由は、両者が構造や作用機序に大きな差異を有しつつも、どちらもタンパク質や核酸といった高分子の複雑な構造に起因して化学的・物理的「不均一性」が生じるという共通の課題を抱えるためである。表 2 に抗体医薬品および AAV ベクターにおける分子の不均一性とその代表例を要約した。抗体医薬品は、臨床上最も成熟したモダリティーである抗体医薬を代表するものであり、製造から投与に至る過程で生じる物理的不均一性、特に凝集体形成が医薬品の有効性および安全性に直結する。一方、AAV ベクターは、近年急速に発展している新規モダリティーである遺伝子治療を構成する基盤技術の一つであるが、カプシドタンパク質および内包核酸に由来する化学的・物理的な不均一性が絡み合う極めて複雑な系である。従って、本研究では抗体医薬品を成熟したモダリティーにおける凝集体形成メカニズム解明のモデルとして、AAV ベクターを新規モダリティーにおける包括的品質評価法確立のモデルと位置付けた。

表 2 抗体医薬品および AAV ベクターにおける分子の不均一性とその代表例

分類	定義	項目	
		抗体医薬品	AAV ベクター
化学的不均一性	共有結合や化学構造に起因する分子内・一次構造レベルの変化	アミノ酸修飾（脱アミド化、酸化、異性化） N 末端のピログルタミル化 C 末端のリジン残基欠損 糖鎖修飾	アミノ酸修飾（脱アミド化、酸化） VP1 と VP3 の N 末端残基のアセチル化 翻訳開始点が異なる VP3 アイソフォーム VP1/VP2/VP3 の化学量論 ゲノム DNA の欠損や切断 ゲノム DNA のメチル化 糖鎖修飾
物理的不均一性	立体構造や会合状態など、分子間・高次構造レベルの変化	部分的変性や構造の揺らぎ （可溶性・不溶性）凝集体	完全粒子比 部分粒子 過剰充填粒子 （可溶性・不溶性）凝集体 カプシド構造の変性・歪み

本研究は、「分子の不均一性」に関連した品質課題に対し、先進かつ様々な分析技術を駆使した多面的な品質評価を通じてその根本原因を分子レベルで解明すること、ならびに信頼性の高い品質評価法を確立することで、バイオ医薬品開発の科学的基盤を構築することを目的とする。

1. 抗体医薬品においては、製造・輸送・保管・投与や品質評価の過程で生じる界面相互作用や機械的ストレスを原因とする凝集体の生成と、その発生メカニズムに焦点を当てた。
2. AAV ベクターにおいては、EP、遺伝子断片を内包する部分粒子（Partial Particle: PP)、過剰充填粒子（Overpacked Particle: OP)、凝集体といった多様な目的物質由来不純物が混在する複雑な分散状態を、先進的な分析手法を用いて評価することに焦点を当てた。

1.2 本研究が対象とするバイオ医薬品とその品質課題

1.2.1 抗体医薬品と凝集体の問題

抗体医薬品、特にモノクローナル抗体（mAb）は、バイオ医薬品市場において中心的な役割を果たしている。抗体医薬品の剤形は凍結乾燥製剤あるいは液剤のいずれかとなるが、過去 20 年の間に凍結乾燥から液剤の処方への切り替わりを経ていることがわかる[11]。加えて近年、製剤開発技術の発展により製剤の高濃度化が可能となり、患者および医療従事者の利便性を高めるプレフィルドシリンジ（PFS）剤形での供給が増加している

（図 3）[12]。

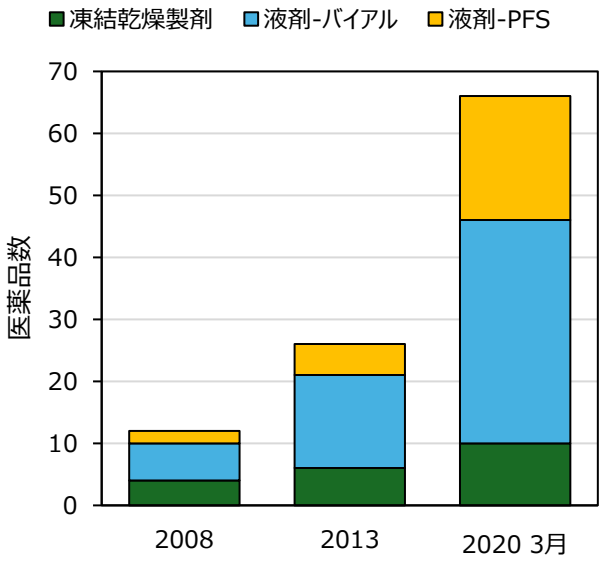


図 3 日本における抗体医薬品あるいは融合タンパク質製剤の剤形の変遷
文献[12]に掲載された図（論文中 Figure 2）を改変した。

しかし、抗体医薬品はその主成分であるタンパク質の物理化学的な不安定性から、製造、保管、輸送、投与といった様々な過程で、変性・会合し、凝集体を形成しやすいという課題をもつ。凝集体は、ナノメートルサイズのナノメートル凝集体から、ミリメートルサイズの凝集体まで、その粒子径は非常に広範である（図 4）[13], [14]が、なかでも直径 1–100 µm のミクロン凝集体は。免疫原性を誘発する潜在的なリスクをもつと指摘されており、その存在は医薬品の品質を損なう重大な懸念事項となっている[8]。このため、FDA をはじめとする各国の規制当局は、バイオ医薬品中の粒子を適切にモニターし、その低減に努めることを強く推奨している[15]。このとき、単一の分析手法では広範な粒子径を網羅できないため、複数の分析手法を組み合わせる必要がある[16]。図 4 にはバイオ医薬品の凝集体分析において代表的な手法とそれらが分析対象とする粒子径範囲をまとめた。

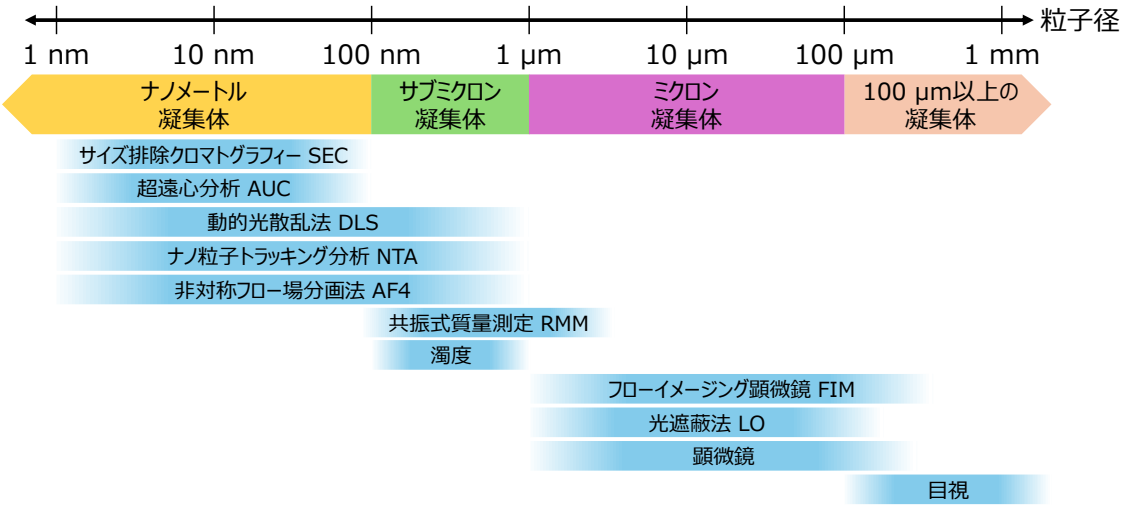


図 4 凝集体の粒子径、名称と評価方法の対応
凝集体の粒子径と名称の対応付けは Narhi らの論文[13]に倣った。

タンパク質の凝集体形成のメカニズムについては、これまでにも精力的な研究が行われてきた。例えば、Gerhardt らは、シリコーンオイル（SO）が塗布されたガラス製 PFS 内において、撹拌ストレスによって SO 表面に形成されたタンパク質性フィルムが崩壊し、ミクロン凝集体が生じるモデルを提唱した[17]。また、Sediq らは、撹拌中に容器表面に吸着したタンパク質が物理的に削り取られることが凝集体発生の根本原因であると報告している[18]。さらにステンレス鋼表面への mAb の不可逆的な吸着が凝集を引き起こすこと[19]や、ガラスバイアルへの吸着と落下・振とうといった複合的な機械的ストレスが相乗的に作用して凝集を促進すること[20]も示されている。これらの先行研究は、容器などの固相表面へのタンパク質の吸着と、それに続く機械的ストレスによってタンパク質の凝集が誘発されるという共通の概念を提唱している。

本研究では、これらの知見を基盤としつつ、これまで十分な解明がなされてこなかった二つの項目、すなわち「PFS 製剤の投与操作：プランジャーによる薬液の排出操作」と「バイオ医薬品の品質評価に用いられる分析操作：等温滴定型熱量測定における撹拌操作」に焦点を当てた。これらの過程で生じる界面相互作用や機械的ストレスが、どのように凝集体を生成するのか、本研究ではその詳細なメカニズムを解明し、凝集を抑制するための科学的根拠を提示することを目指した。

1.2.2 AAV ベクターの不均一性の問題

抗体医薬品と並び、AAV ベクターは *in vivo* 遺伝子治療における主要なプラットフォームとして急速にその地位を確立しており、2024 年末までに 8 種類の AAV ベクター医薬品が上市されるなど、臨床応用が現実のものとなっている。AAV ベクターは、3 種類のウイルスタンパク質（VP1、VP2 および VP3）が会合して形成される直径約 25 nm の正二

十面体カプシド[21], [22]に治療用遺伝子を含む核酸として多くの場合一本鎖 DNA（ssDNA）を内包する[23]。AAV が発見された当初のポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた研究では VP は VP1、VP2 および VP3 のウイルス粒子における化学量論が 7:8:72[24]あるいは 3.5:2.7:52.0[25]をとると報告された。近年では VP1、VP2 および VP3 のウイルス粒子における化学量論は慣例的に 5:5:50 と表現されることが多い[26]。一方で近年のキャピラリーゲル電気泳動を用いた精密な VP の定量を通して、血清型および製造ロットに加えて密度勾配遠心時の密度違いの画分によっても VP 化学量論が異なることが分かってきた[27]–[29]。化学量論の多様性に加えて、VP の一次構造にも多様性が存在する。具体的には VP の脱アミド化、酸化、糖鎖修飾といった翻訳後修飾を受けた VP や、VP3 の翻訳開始点の違いによって生じる鎖長の短い VP3 アイソフォームが挙げられる[27], [30], [31]。さらには、特に VP1 特異領域の高次構造が動的で、かつこの領域の運動性が内包核酸の有無に影響されることが水素重水素交換質量分析（HDX-MS）を用いた研究から明らかになっている[32], [33]。このような AAV ベクター粒子そのものの化学的・物理的複雑さに加えて、AAV ベクターの製造工程では、目的とする治療用遺伝子を正しく内包した完全粒子（Full Particle: FP）の他に、EP、PP、過剰充填粒子 OP、そして複数の粒子が会合した様々なサイズの凝集体が生じる、つまり、分散状態が不均一となる場合がある[34]。これらの目的物質由来不純物は AAV ベクターの有効性と安全性に深刻な影響を及ぼす。EP や PP は、標的細胞表面の受容体において FP と競合するため、FP の細胞への取り込みを阻害し、その治療効果を減弱させる[35]。さらに、EP を含むカプシド粒子自体が、望ましくない免疫応答（CD8+ T 細胞の増殖）を誘発し、安全性のリスクを高める可能性が指摘されている[10]。また、凝集体は AAV ベクターの生体内分布に影響を与え、予期せぬ免疫応答の原因となりうる[36]。これらのリスクから、EMA、FDA、PMDA といった規制当局は、製剤に含まれる EP の粒子濃度を重要な評価項目として挙げている[37]–[39]。

加えて近年、AAV ベクターの化学的な不均一性が生物活性に影響を及ぼすことが明らかになってきた。例えば、カプシドを構成する VP1、VP2、VP3 の化学量論の変動[40]–[43]や、特定のアスパラギン残基の脱アミド化といった翻訳後修飾[44]が、ベクターの遺伝子導入効率を左右する QA であることが報告されている。また、AAV6 ベクターを用いた研究では、光ストレスにより、メチオニン残基やヒスチジン残基の酸化や、内包核酸の架橋が生じること、特に後者は生物活性の低下に支配的に関与することが示されている[30]。

従って、AAV ベクターの品質を保証するためには、これらの多様な不純物や微細な構造特性を網羅的かつ定量的に評価できる高度な分析手法が不可欠である。本研究では、この課題に応えるため、先進的な分析技術、特に超遠心分析（AUC）を基盤とする手法を開発・応用し、AAV ベクターの包括的な品質評価方法の確立を目指した。

1.3 本研究の目的と構成

本研究の目的は、バイオ医薬品を代表する 2 つの分子種、すなわち「抗体医薬品」と「AAV ベクター」が直面する主要な品質課題に対して、課題となる現象が生じるメカニズムを詳細に理解すること、および、そのために必要な信頼性の高い品質評価方法を確立することである。これらを通して、バイオ医薬品の供給方法（充填容器）の最適化や製造プロセスの最適化を含めた品質管理戦略の立案に貢献するための科学的基盤を構築し、バイオテクノロジー産業の発展に貢献することを目指した。この目的を達成するため、本研究では以下の 3 つの研究目標を設定した。

第一の研究目標は、いまだ理解が乏しい、抗体医薬品の実用環境下および品質評価時の凝集体形成メカニズムを理解することである。先行研究により、抗体医薬品の凝集が容器などの固相表面への吸着と機械的ストレスの複合作用によって誘発されることが示唆されている[17]–[20]。しかし、医薬品の最終投与段階で避けて通ることのできない操作や、医薬品の品質を評価する分析の際に伴う機械操作が凝集体形成に与える影響については、いまだ十分に調査されてこなかった。

そこでここでは、以下の二つに焦点を当てた。第一に、PFS 製剤の投与時、すなわちプランジャーによる薬液の排出操作が、排出されたタンパク質の分散状態に与える影響を明らかにする。フローイメージング顕微鏡（FIM）によるミクロン凝集体の定量評価と、液中高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）によるナノスケールでの吸着現象の可視化を組み合わせることで、容器素材と凝集体形成の関係を議論した。第二に、タンパク質の物理化学的特性評価、特に分子間の相互作用解析に広く利用されている等温滴定型熱量計（ITC）測定中の滴定シリンジの撹拌操作が、分析対象のタンパク質を不安定化させる可能性を検討する。撹拌条件を系統的に変調させ、測定から得られる熱力学データへの影響を調べた。加えて撹拌操作後のタンパク質の物理化学的特性の変化を組み合わせて評価することで、当該分析実施時に起こりうる凝集形成のメカニズムを推定し、信頼性の高い測定データを取得するための最適条件を導出した。

第二の研究目標は、AAV ベクター製剤の複雑な分散状態を包括的に評価するための実用的な分析方法を開発することである。AAV ベクター製剤には、目的とする FP に加え、EP、PP、OP、凝集体といった不純物が共存することしばしば認められるが、それらをどのようにして正確に定量するかは長年の課題となっている。既存の分析方法には分離能や定量性の面で課題があった。この課題を克服するため、本研究では AUC を基盤とした新たな分析手法開発に取り組んだ。第一に、多波長検出超遠心分析沈降速度法（MW-SV-AUC）を開発し、従来の超遠心分析沈降速度法（SV-AUC）で評価していた分散状態だけでなく、各粒子成分の濃度決定、タンパク質と核酸の比率に基づいた粒子のキャラクタリゼーションまで実行可能な包括的分析手法を確立する。これにより、従来の SV-AUC では特定が困難であった PP、OP や凝集体の特徴を明らかにすることが可能になる。第二に、SV-AUC の課題であった、試料必要量の多さの克服に取り組む。超遠心分析バンド沈

降速度法（BS-AUC）に SV-AUC で広く適応されている分散状態解析モデル（サイズ分布解析モデル）を適用することで、SV-AUC の数十分の一という極めて少量の試料であっても SV-AUC と同等の分離能と定量性を達成する方法の確立に取り組んだ。これにより、開発初期段階や希少な AAV ベクター試料であっても分散状態の評価を可能にする実用性の高い分析法を確立することが可能になると考えられる。

第三の研究目標は、AAV ベクターの品質の変動が生物活性に与える影響を明らかにし、潜在的な重要品質特性（pCQA）を特定することである。AAV ベクターの有効性は完全粒子比だけでなく、カプシドタンパク質の化学量論や微細な化学構造の変化によっても左右される可能性が指摘されているが、その詳細な検証はこれまで十分に行われてこなかった。そこで本研究では、容器と培養スケールを変調させて製造した 10 ロットの AAV ベクターについて、14 項目にわたる QA の変動を評価し、どの QA の変動が生物活性の指標である遺伝子導入効率に影響するかを調べた。評価した QA の中から VP の化学量論と特定のアスパラギン残基の脱アミド化率を抽出し、各ロットの遺伝子導入効率と対比させることで、これらの 2 つの QA の変動が遺伝子導入効率に影響していることを明らかにした。さらに、短期保管加速試験を行うことで、これらの QA が独立して遺伝子導入効率に影響を与えていることを明らかにした。

以上の目的を達成するために、本論文は下記の構成とした。緒言に続く第一部では、抗体医薬品の実用環境下および品質評価時での凝集形成メカニズムの解明に取り組む。第 2 章では、PFS における界面相互作用と物理的ストレスに起因する凝集について、第 3 章では、品質評価実施時における機械的ストレスに起因する凝集形成メカニズムの解明に取り組む。第二部では、AAV ベクターの包括的な品質評価に焦点を当てる。第 4 章で MW-SV-AUC による AAV ベクターの包括的分散状態評価方法の確立について、第 5 章で、その少量化を可能にする BS-AUC の確立について述べる。第 6 章では、AAV ベクターの QA の変動が生物活性に与える影響を評価し、pCQA を特定する。最後に第 7 章では、本研究全体で得られた知見を総括し、今後の展望を述べる。

第 1 部：抗体医薬品の実用環境下での凝集形成メカニズムの解明

第 2 章 プレフィルドシリンジにおける界面相互作用を介した凝集形成メカニズムの解明

2.1 背景

PFS の普及とバイオ医薬品への応用

薬剤が充填された状態で供給される PFS（図 5）は、薬剤投与時の安全性向上、投与量の正確性の改善、そして患者および医療従事者の利便性向上といった利点から、医薬品投与の形態として広く受け入れられている。近年、タンパク質の高濃度化技術や製剤

開発技術の進展に伴い、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品においても PFS 剤形での供給が増加している[45]。PFS の注射筒（バレル）には、伝統的にガラス製バレルが用いられてきたが、その内表面にはプランジャーヘッドの摺動性を確保するために、スプレー塗布法や焼付け法などによって SO による処理が施されている[46], [47]。一方で、近年では、塗布された SO に起因するタンパク質凝集体の生成も報告されており、そのリスクを低減するために、シクロオレフィンポリマー（COP）などの SO の塗布を必要としない、ポリマー製 PFS も実用化され始めている[48]–[50]。

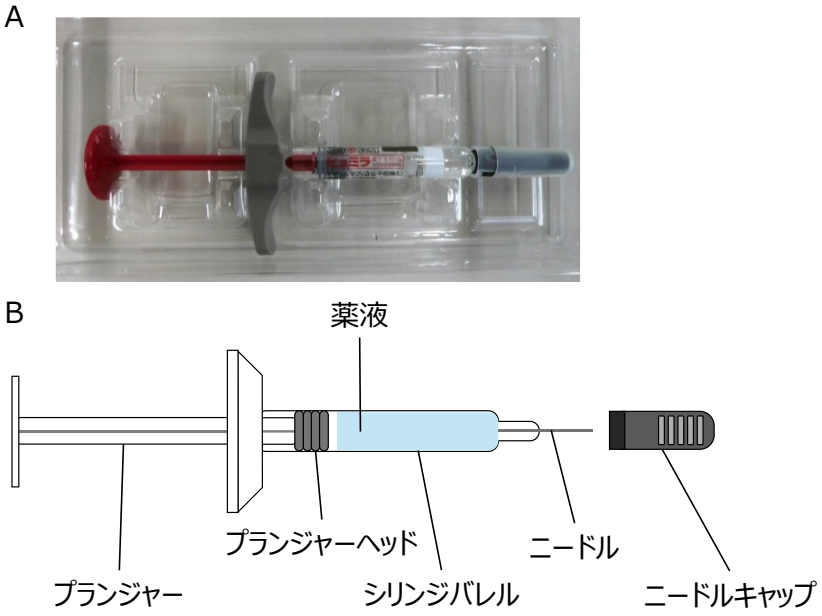


図 5 PFS 製剤の例とデバイスの構成図
（A）アダリムマブ（商品名：ヒュミラ）の PFS 製剤、（B）PFS のデバイス構成図

バイオ医薬品における凝集体の問題

抗体医薬はバイオ医薬品を代表するモダリティーの一つである。それを代表する抗体医薬品はその有効成分であるタンパク質が物理化学的に不安定であるため、凝集体を形成しやすい。凝集体には、ナノメートル凝集体（直径 100 nm 未満)、サブミクロン凝集体（直径 100 nm–1 μm)、ミクロン凝集体（直径 1 μm–100 μm）など様々なサイズがある（図 4）[13]が、特にミクロン凝集体は免疫原性を誘発する潜在的なリスクがあると指摘されている[8]。Moussa らによる調査では、各種ストレスにより形成される抗体医薬品のミクロン凝集体が、炎症性サイトカインの産生、樹状細胞の活性化、T 細胞の増殖、および T 細胞によるサイトカインの産生といった免疫応答を引き起こすことが分かっている[51]。各種ストレスとそれにより生じる抗体医薬品のミクロン凝集体濃度との関係の一例を図 6 に要約した。ミクロン凝集体が生じる要因は多岐にわたっており、かつその量が極微量であっても免疫応答を引き起こす可能性がある。

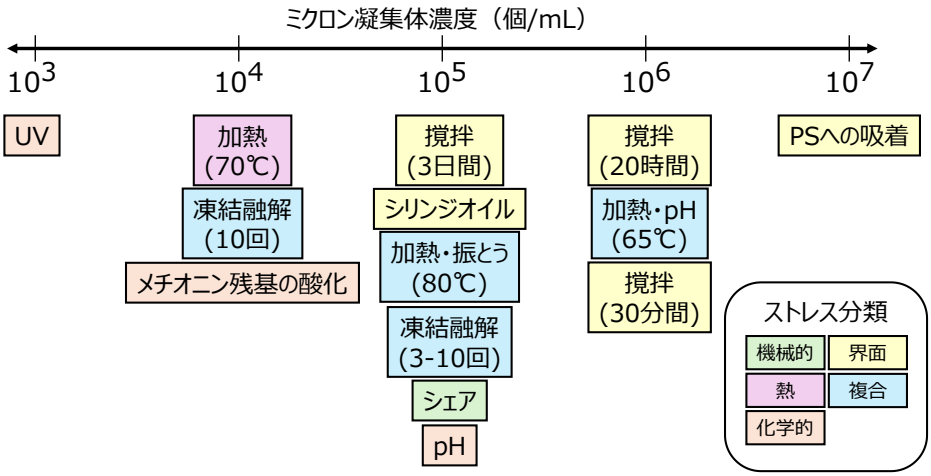


図 6 各種ストレスとそれにより生じる抗体医薬品のミクロン凝集体濃度との関係の一例
文献[51]に掲載された表（論文中 Table 2）元に作成した。

本研究の着眼点と目的

複数の先行研究により、「固相表面へのタンパク質吸着」と「撹拌・振とうなどの機械的ストレス」が複合的に生じることが凝集体形成の主要因であるという重要な知見が示されてきた[17]–[20]。しかし、近年その利用が高まっている PFS 製剤が患者に投与される際の「プランジャーを押し込んで薬液を排出する」という操作が薬液内のタンパク質の凝集性に与える影響についてはこれまで十分に検討されてこなかった。その排出操作は、プランジャーヘッドがシリンジ内壁を物理的に掃き出す作用を伴うため、バレル内壁にタンパク質が吸着した場合には、薬液の排出操作が吸着したタンパク質を剥離させ、凝集体形成をもたらす可能性が考えられた。

そこで本章では、PFS からの薬液排出操作がタンパク質凝集体形成に与える影響を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するため、シリンジバレルの素材（SO フリーガラス製シリンジ、SO コートガラス製シリンジ、および SO フリーCOP 製シリンジ）とサンプリング方法（プランジャーを動かさずに薬液を取り出す方法とプランジャーを押し込んで薬液を排出する方法）を比較検討する。この実験デザインにより、プランジャーヘッドの「掃き出し」作用が凝集体形成に与える影響を評価し、バレル内部へのタンパク質吸着量とミクロン凝集体形成との間の関係を明らかにする。

2.2 試料および方法

2.2.1 試料

抗体医薬品

対象にはアダリムマブ、エタネルセプト、およびインフリキシマブを採用した。それぞれ Abbvie 社、Pfizer 社、Janssen Biotech 社から購入した。これらの製剤はいずれも

2010 年代半ばにおける代表的な抗 TNFα製剤であり、臨床的に広く使用されていた。一方で、これらは主要市場において物質特許が満了あるいは満了間近であり、バイオシミラーの流通を含めた臨床利用のさらなる増加が見込まれていた。加えて、これらの製剤は、構造的に異なる分子を代表している、つまり、アダリムマブは完全ヒト型抗体、エタネルセプトは受容体-Fc 融合タンパク質、インフリキシマブはキメラ抗体である、ことから、抗体医薬における主要なモダリティーを網羅していると考えた。プレフィルドシリンジ使用下におけるタンパク質の安定性、シリコーンオイルやシリンジバレルとの相互作用、凝集挙動などを比較・解析する上で、これら 3 製剤は適切かつ代表性の高いモデル分子であると考えられた。

アダリムマブおよびエタネルセプトについてはバレル表面に塗布され、薬液中に漏出している可能性のある SO を除去するために、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。アダリムマブとエタネルセプトの溶液をシリンジから回収し、20 mM 酢酸（pH5.0）緩衝液で透析した後、カラム体積 5 mL の SP-セファロースカラム（GE Healthcare、現 Cytiva）にアプライし、100 mL の 20 mM 酢酸（pH5.0）緩衝液を通液した。続いて 0.4 M NaCl を含む 100 mM リン酸緩衝液（pH8.0）で溶出した。インフリキシマブ溶液はバイアル内の凍結乾燥したインフリキシマブを超純水で溶解し調製した。最後に、それぞれの市販製剤に使用されているものと同じ組成の溶媒に対して各抗体溶液を透析した（表**3**）。溶媒調製に用いた試薬はポリソルベート 80（日油株式会社）を除き、全て和光純薬工業株式会社（現 富士フイルム和光純薬株式会社）あるいはナカライテスク株式会社から購入した。抗体の最終濃度は、すべて 1 mg/mL に調整した。調製した製剤の pH は、アダリムマブが 5.0、エタネルセプトが 6.2、インフリキシマブが 7.4 であった。

表 3 各製剤の溶媒に含まれる添加剤

製剤名	添加剤
アダリムマブ	6.2 mM クエン酸一水和物、1.0 mM クエン酸ナトリウム二水和物、0.5 mM リン酸水素二ナトリウム二水和物、7.2 mM 二塩基性リン酸ナトリウム、105 mM 塩化ナトリウム、65.8 mM D-マンニトール、0.1%ポリソルベート 80
エタネルセプト	7.7 mM リン酸水素二ナトリウム二水和物、21 mM リン酸二水素ナトリウム、97.5 mM 塩化ナトリウム、28.6 mM 精製スクロース、36.2 mM L-アルギニン塩酸塩
インフリキシマブ	8.0 mM リン酸水素二ナトリウム二水和物、1.7 mM リン酸水素二ナトリウム二水和物、73 mM スクロース、0.1% ポリソルベート 80

シリンジ

本研究では、3 種類のシリンジを使用した。SO コーティングを施したガラスシリンジ（GLS/SO+）と SO コーティングを施していないガラスシリンジ（GLS/SO−）（共にトップ）と、COP シリンジ（テルモ）を使用した。すべてのシリンジは 1 mL ロングタ

イプを用い、プランジャーヘッドは i-coating™ コーティングが施された塩素化ブチルゴム製のものを用いた。

2.2.2 試料の準備と保管

シリンジ先端が下向きになるようにシリンジを立て、各シリンジに 1 mL の抗体溶液またはコントロールとして製剤用溶媒を充填した。その後、5 mm のヘッドスペースを持たせて、プランジャーヘッドでシリンジを密栓した。それぞれの実験条件で 3 本のシリンジを使用した。サンプリング方法には抜取り法と押出し法を採用した。抜取り法では、プランジャーヘッドを取り外した後、ゲルローダーチップで試料溶液を静かに取り出し、マイクロチューブに回収した。また、押出し法では、シリンジに 27 G 注射針（テルモ）を装着した状態でプランジャーをシリンジ先端方向に押して試料溶液を静かに押し出し、マイクロチューブに回収した。

シリンジに充填した直後にシリンジから抜取りまたは押出された抗体溶液を初期試料とした。保管試験には初期試料と同じタイミングで充填した試料を 4 ℃の暗所で 1 週間静置した後、抜取りまたは押出しにて調製した試料を用いた。各時点で 3 本のシリンジから得られたタンパク質溶液を 1 本の遠沈管に回収した。回収した試料溶液は、後述する UV 吸収測定、SE-HPLC、フローイメージング顕微鏡などの分析に使用した。

2.2.3 吸光度・透過率測定

280 nm の吸光度（A_{280}）と 350 nm の透過率（T_{350}）を BioSpectrometer Basic（Eppendorf）を用いて測定した。シリンジから採取した試料溶液を 15,000×*g*、4 ℃で 30 分間遠心分離し、遠心分離前後の A_{280} の差から不溶性凝集体の割合を推定した。測定は 4 回行い、各実験値の平均値と標準偏差を算出した。

2.2.4 SE-HPLC

試料溶液は Alliance HPLC システム（Waters）を用いて分析した。20 µL の試料溶液を HPLC システムに注入し、PBS（pH 7.4）を用いて 0.5 mL/min の流速で溶出した。TSK gel G3000SWXL カラム（東ソーバイオサイエンス）を用いて 215 nm と 280 nm で同時に UV 吸収を検出した。測定は 4 回行い、各実験値の平均値と標準偏差を算出した。

2.2.5 フローイメージング顕微鏡（FIM）

ミクロン凝集体の係数には、FlowCam8100（横川電機）を用いた。図 7 に FIM の模式図を示す。0.15 mL の試料溶液を流速 0.05 mL/min で送液した。直径 1–100 µm の範

囲の粒子を計数した。測定は 4 回行い、各実験値の平均値と標準偏差を算出した。データ解析には、VisualSpreadsheet ソフトウェア（横川電機）を使用した。

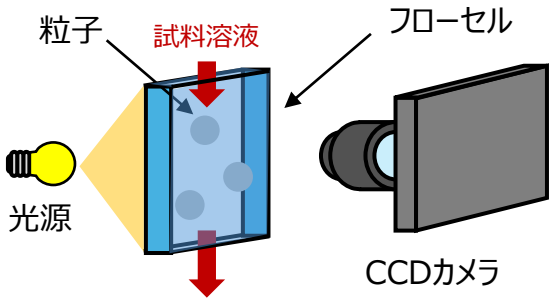


図 7 フローイメージング顕微鏡の模式図

SO ドロップレットと 2 μm 以上の粒子でのタンパク質の凝集を識別するために、2 つの異なるアプローチを用いた。まず、SO ドロップレットであることが明確に認識できる粒子を選択するために、統計的フィルターを使用した。次に、観察された粒子画像から SO ドロップレットを抽出するのにも有効な円形度（Hu）フィルターを用いた。

2.2.6 吸着した mAbs の定量

試料溶液をシリンジバレルから取り出した後、各抗体製剤で採用されている溶媒を用いてシリンジバレルを穏やかに 3 回洗浄した。次にシリンジバレルに 1.2 mL の溶出液（1% SDS 水溶液）を充填した後、超音波水槽 US-1R（アズワン）で 40 kHz、15 分間超音波処理した。その後シリンジバレル内部の溶出液を回収した。この処理を 3 本のシリンジについて行い、合計 3.6 mL の溶出液を得た。溶出液に含まれる抗体の濃度を μBCA 法により決定した。測定は 4 回行い、各実験値の平均値と標準偏差を算出した。

2.2.7 液中高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）

HS-AFM 装置には先行研究[52]にて開発された装置、市販品 SS-NEX（生体分子計測研究所）、と同等の装置構成を有する自製装置を用いた。HS-AFM 観察は、長さ 7 μm、幅 2 μm、厚さ 90 nm の小型カンチレバーBL-AC7（オリンパス）を用いて、室温で行った。各シリンジバレルは約 2×2 mm の大きさに破砕し、HS-AFM によりシリンジバレル内壁表面の観察を行った。HS-AFM 観察の際には、PS を含まないアダリムマブ溶液を最終濃度 0.1 mg/mL で溶媒に加えた。すべての HS-AFM 画像は、1 fps のフレームレートで撮影した。

2.3 結果

2.3.1 サンプリング方法の異なる GLS/SO-、GLS/SO+、COP シリンジから得られたタンパク質溶液中のミクロン凝集体の定量

アダリムマブ

充填直後（初期）のすべてのバレルから抜取りした溶液中のミクロン凝集体濃度は数百個/mL であった（図 8 および表 4)。1 週間後には、3 種類のバレル全てにおいてミクロン凝集体濃度が数百個/mL オーダーで増加したが、いずれも 1000 個/mL 以下にとどまった。

サンプリング方法の違いがどのようにミクロン凝集体の発生に影響するかを調べるため、シリンジから試料溶液を押出して試料溶液を調製した。PFS で治療用タンパク質を投与する際には、シリンジのバレルから溶液を押出すのが一般的な操作である。GLS/SO－および GLS/SO+シリンジでは、充填直後に押出された溶液においては、抜取りされた溶液と比較してミクロン凝集体濃度が大幅に増加した（図 8 および表 4)。1 週間の保管後、GLS/SO－のシリンジでは凝集体濃度がさらに増加したが、GLS/SO+のシリンジではわずかに減少した。タンパク質を含まないコントロール試料の場合、ミクロン凝集体濃度は 1000 個/mL 未満であった。これは、押出されたタンパク質溶液で検出されたミクロン凝集体のほとんどがタンパク質の凝集体であり、GLS/SO+シリンジにコーティングされた SO 潤滑剤がバレル表面から脱離することによって生じた SO ドロップレットではないことを示している。一方で、COP シリンジ内のタンパク質溶液に含まれるミクロン凝集体濃度は、初期の時点でも保管後の時点でも小さかった。これらの濃度は、COP シリンジから抜取りして調製した溶液で観察された濃度と同様であった。

このように凝集体濃度に対して保管時間やサンプリング方法による影響が認められた一方、可溶性画分の濃度や単量体の割合について検出可能な変化は今回の実験を通して認められなかった（表 5)。したがって、以下では凝集体の定量結果にのみ焦点を当て説明することとする。

エタネルセプト

抜取りしたエタネルセプト溶液中のミクロン凝集体濃度は、シリンジへの充填直後に抜取りした初期試料溶液であっても、シリンジの素材に大きく依存した（図 8 および表 4)。GLS/SO+シリンジから取得した溶液に含まれるミクロン凝集体濃度は、GLS/SO－および COP シリンジから取得した溶液に含まれる濃度よりも約 3 倍または 5 倍高かった。保管後、GLS/SO+シリンジではミクロン凝集体濃度は初期試料に比べて約 2 倍に増加したが、GLS/SO－および COP シリンジでは初期溶液と同程度であった。これらの結果は、エタネルセプトの凝集体発生はシリンジバレルの SO コーティングに鋭敏であることを示している。

GLS/SO－および GLS/SO+シリンジから押出した溶液は、抜き取った溶液に比べてミクロン凝集体濃度が顕著に増加していた（図 8 および表 4)。これらの増加は、初期試料と保管後試料の両方で認められた。GLS/SO+シリンジでは、初期試料においてもミクロン凝集体濃度が 10000 個/mL を超えており、保管後には初期試料に比べて約 1.4 倍にまで増加した。GLS/SO－のシリンジでは、保管後試料において 10000 個/mL を超えるミクロン凝集体濃度が確認された。COP シリンジから押出された溶液には、抜取りされた溶液よりもわずかに高いミクロン凝集体が認められており、保管を行った溶液で最も高い濃度が観察された。

インフリキシマブ

アダリムマブと同様に、インフリキシマブの溶液は、初期の時点では 1 mL あたり数百個のミクロン凝集体を含み、保管後もその濃度はわずかに増加した。保管後のミクロン凝集体の最高濃度は、GLS/SO－シリンジで約 1000 個/mL であった（図 8 および表 4)。GLS/SO－および GLS/SO+シリンジからの溶液の初期試料でのミクロン凝集体濃度は、シリンジから抜取りした溶液のそれよりも高かった。しかし、保管することで、どちらのシリンジの種類においてもミクロン凝集体濃度は減少した。COP シリンジから抜取りした溶液のミクロン凝集体濃度は、保管後に約 5 倍に増加したが（図 8 および表 4)、1000 個/mL 以下にとどまった。

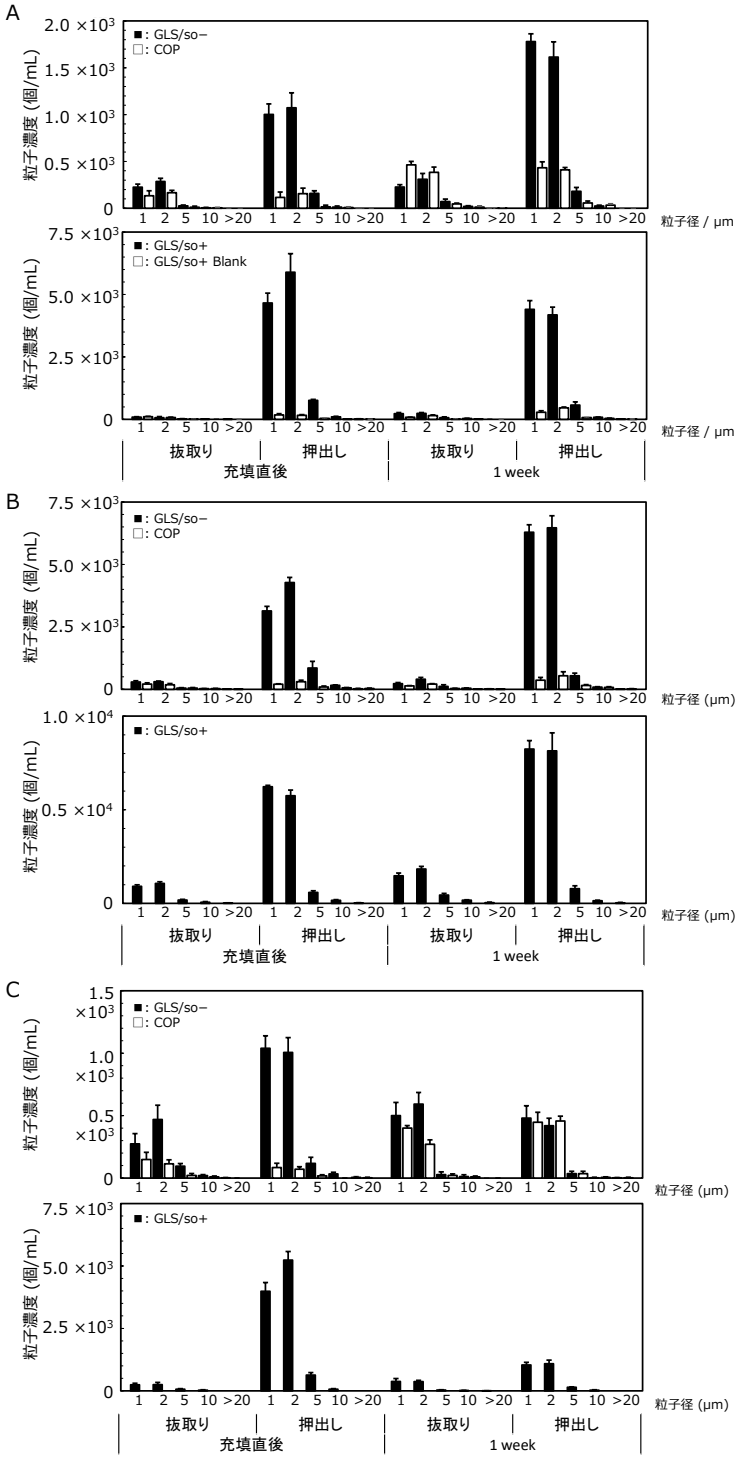


図 8 フローイメージング顕微鏡で測定した抗体医薬品溶液のミクロン凝集体濃度

（A）アダリムマブ、（B）エタネルセプト、（C）インフリキシマブの結果を示す。上段は、各粒径（それぞれ 1, 2, 5, 10, >20 μm）における GLS/SO－および COP の粒子濃度。下段は、各粒径における GLS/SO+の粒子濃度を示している。アダリムマブの場合、試料溶液とブランクの違いを説明するために、ブランク（1 週間、押出し）の結果を加えた。エラーバーは 4 回測定による標準偏差を示す。全粒子濃度の統計的評価の結果は補足表 2 にまとめた。

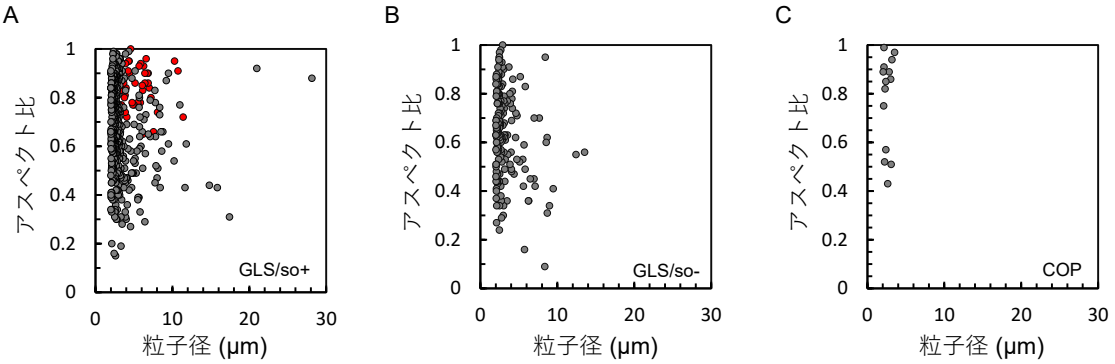


図 9 押出しにより調製した試料溶液で観察された 2 μm 以上の粒子の代表的な散布図
それぞれ GLS/SO+（上段）、GLS/SO－（下段左）、COP（下段右）の結果を表している。GLS/SO+のプロットでは、赤丸が統計的フィルターで除外された粒子を示す。

表 4 各条件におけるミクロン凝集体濃度の要約
各行の下段の数値は 2 μm 以上の粒子の濃度を示す。

シリンジバレル	調製方法	保管期間（week）	アダリムマブ（個/mL）	エタネルセプト（個/mL）	インフリキシマブ（個/mL）
GLS/SO+	抜取り	0	186±29	2252±181	579±147
			92±34	1335±126	335±114
	押出し		11422±1138	12755±469	9921±612
			6750±793	6520±411	5939±277
GLS/SO－	抜取り		542±70	677±38	863±195
			317±40	387±38	592±122
	押出し		2248±298	8446±318	2202±87
			1243±189	5299±470	1160±136
COP	抜取り		314±87	471±108	294±82
			170±36	259±66	148±36
	押出し		294±89	694±109	176±24
			183±62	488±96	94±24
GLS/SO+	抜取り	1	570±45	3968±280	795±135
			342±72	2496±157	418±36
	押出し		9250±742	17351±1547	2286±268
			4845±422	9110±1148	1251±166
GLS/SO－	抜取り		631±80	803±178	1132±207
			401±76	572±138	631±124
	押出し		3598±253	13391±854	940±118
			1815±184	7097±587	462±71
COP	抜取り		908±44	390±23	702±57

		444±57	254±10	300±41
押出し		933±89	1155±319	948±61
		503±29	791±209	504±32

表 5 SE-HPLC および UV 吸収測定による凝集体定量結果

抗体	シリンジバレル	調製方法	保管期間（week）	不溶性凝集体（%*）	単量体（%）	二量体（%）
アダリムマブ	GLS/SO+	抜取り	0	<1	99.5±0.1	0.5±0.1
		押出し		<1	99.5±0.0	0.5±0.0
	GLS/SO−	抜取り		<1	99.5±0.1	0.5±0.1
		押出し		<1	99.7±0.1	0.3±0.1
	COP	抜取り		<1	99.7±0.0	0.3±0.0
		押出し		<1	99.7±0.0	0.3±0.0
	GLS/SO+	抜取り	1	<1	99.7±0.0	0.3±0.0
		押出し		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
	GLS/SO−	抜取り		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
		押出し		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
	COP	抜取り		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
		押出し		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
エタネルセプト	GLS/SO+	抜取り	0	<1	97.2±0.0	2.9±0.0
		押出し		<1	97.2±0.0	2.9±0.0
	GLS/SO−	抜取り		<1	97.2±0.0	2.8±0.0
		押出し		<1	97.2±0.0	2.8±0.0
	COP	抜取り		<1	97.2±0.0	2.8±0.0
		押出し		<1	97.2±0.0	2.8±0.0
	GLS/SO+	抜取り	1	<1	97.4±0.0	2.7±0.0
		押出し		<1	97.4±0.0	2.6±0.0
	GLS/SO−	抜取り		<1	97.4±0.0	2.6±0.0
		押出し		<1	97.5±0.0	2.6±0.0
	COP	抜取り		<1	97.5±0.0	2.6±0.0
		押出し		<1	97.5±0.0	2.6±0.0
インフリキシマブ	GLS/SO+	抜取り	0	<1	99.8±0.0	0.2±0.0
		押出し		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
	GLS/SO−	抜取り		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
		押出し		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
	COP	抜取り		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
		押出し		<1	99.8±0.0	0.2±0.0
	GLS/SO+	抜取り	1	<1	99.7±0.0	0.3±0.0
		押出し		<1	99.7±0.0	0.3±0.0
	GLS/SO−	抜取り		<1	99.7±0.0	0.3±0.0
		押出し		<1	99.7±0.0	0.3±0.0
	COP	抜取り		<1	99.7±0.0	0.3±0.0
		押出し		<1	99.7±0.0	0.3±0.0

*試料溶液を 15000×g で 30 分間遠心し、遠心分離前後の A280 の差から不溶性凝集体の割合を算出し、遠心分離前に存在していた A280 に対する割合とした。

2.3.2 シリコーンオイルのドロップレットとタンパク質の凝集体の識別

GLS/SO+から押出された抗体医薬品溶液に含まれる粒子について、2 μm 以上の粒子について、2 種類の画像フィルター、すなわち、先の研究で用いられた統計的フィルター[53]と、値が 0.95 以上の円形度（Hu）を用いて、シリコーンオイルのドロップレットとタンパク質の凝集体の識別を行った。統計的フィルターは、GLS/SO+から放出された各抗体医薬品溶液のフローイメージング顕微鏡測定において、目視により明らかに SO ドロップレットであると判断される画像を基に生成した。

2 μm 以上の分類された粒子の濃度を表 4 に要約した。2 μm 以上のタンパク質性粒子の濃度は、抜取りされた溶液のものと比較して、押出によって有意に増加した。さらに、3 種類の抗体医薬品のすべてにおいて、押出された抗体医薬品溶液中のタンパク質質粒子の濃度は、抜取りされた抗体医薬品溶液中の濃度よりも有意に高かった（$p < 0.01$）。以上のことから、本研究では、抗体医薬品溶液を静置した状態でも、ガラスバレルに SO コーティングを施すことにより、抗体医薬品溶液中のミクロン凝集体の濃度が増加することが示された。

2.3.3 異なるサンプリング方法による抜取り後のシリンジバレルに吸着したタンパク質の定量

アダリムマブ

ミクロン凝集体濃度の増加とシリンジバレルへのタンパク質の吸着の関係を調べるため、各種条件における吸着したタンパク質の量を測定した。抜取り後のシリンジバレルに吸着したアダリムマブの吸着量（表面積あたりの質量）は時間に依存し、GLS/SO+と COP のシリンジでは保管後に増加したが、GLS/SO－のシリンジでは変化しなかった。タンパク質吸着量には、バレルの種類によって明確な違いが認められた。COP シリンジよりも GLS/SO+および GLS/SO－シリンジにおいては COP シリンジに比べて有意に多くのアダリムマブが吸着することが分かった（図 10A および表 6）。

保管後、GLS/SO+シリンジおよび COP シリンジから溶液を押出により調製した場合にも、溶液を抜取りした場合と同様に吸着量の増加が認められた。吸着したアダリムマブは、GLS/SO－シリンジと GLS/SO+シリンジでは、初期試料において抜取り後よりも押出し後の方が僅かに少なかった（図 10A および表 6）。しかし、この 2 つの例外を除いては、サンプリング方法による吸着量の明らかな違いは認められなかった。したがって、押出後の吸着タンパク質の量は明らかにバレルタイプに依存しており、保管後の吸着量は

GLS/SO+シリンジで最も多く、次いで GLS/SO－シリンジ、COP シリンジという序列であった。

エタネルセプト

抜取りによるサンプリングでは、GLS/SO－シリンジ内のエタネルセプトの吸着量にわずかな時間依存性が認められたものの、保管後の GLS/SO+シリンジおよび COP シリンジでの吸着量は、初期試料と同等であった（図 10B および表 6)。押出しによるサンプリングでは、GLS/SO+シリンジの吸着タンパク質密度にわずかな時間依存性が見られたが、保管後の GLS/SO－および COP シリンジの密度は、初期試料の吸着量とほぼ同じであった。保管後の吸着量は、抜取り後の吸着量とほぼ同じオーダーであった。GLS/SO+シリンジの吸着量は、GLS/SO+シリンジのサンプリング方法によって若干の差異が認められたものの、他のシリンジタイプでは基本的に同じ水準であった（図 10B および表 6)。

インフリキシマブ

3 種類のシリンジでは、タンパク質吸着量の明らかな時間依存性は認められなかった。保管後の密度の序列は、アダリムマブの場合と同じで、GLS/SO+シリンジで最も吸着量が多く、次いで GLS/SO－シリンジおよび COP シリンジであった（図 10C および表 6)。押出しによるサンプリングでは、保管後、初期試料と比較して、吸着量が僅かに増加（GLS/SO－シリンジおよびCOP シリンジ)、または減少（GLS/SO+シリンジ）した。タンパク質吸着量はバレルの種類に依存し、保管後の吸着量は GLS/SO+シリンジが最も高く、次いで GLS/SO－および COP シリンジであった。GLS/SO－および COP シリンジでは、サンプリング方法は吸着量にほとんど影響しなかったが、GLS/SO+シリンジから押出された後は、抜取りした試料と比較して約 15%の低下が見られた（図 10C および表 6)。

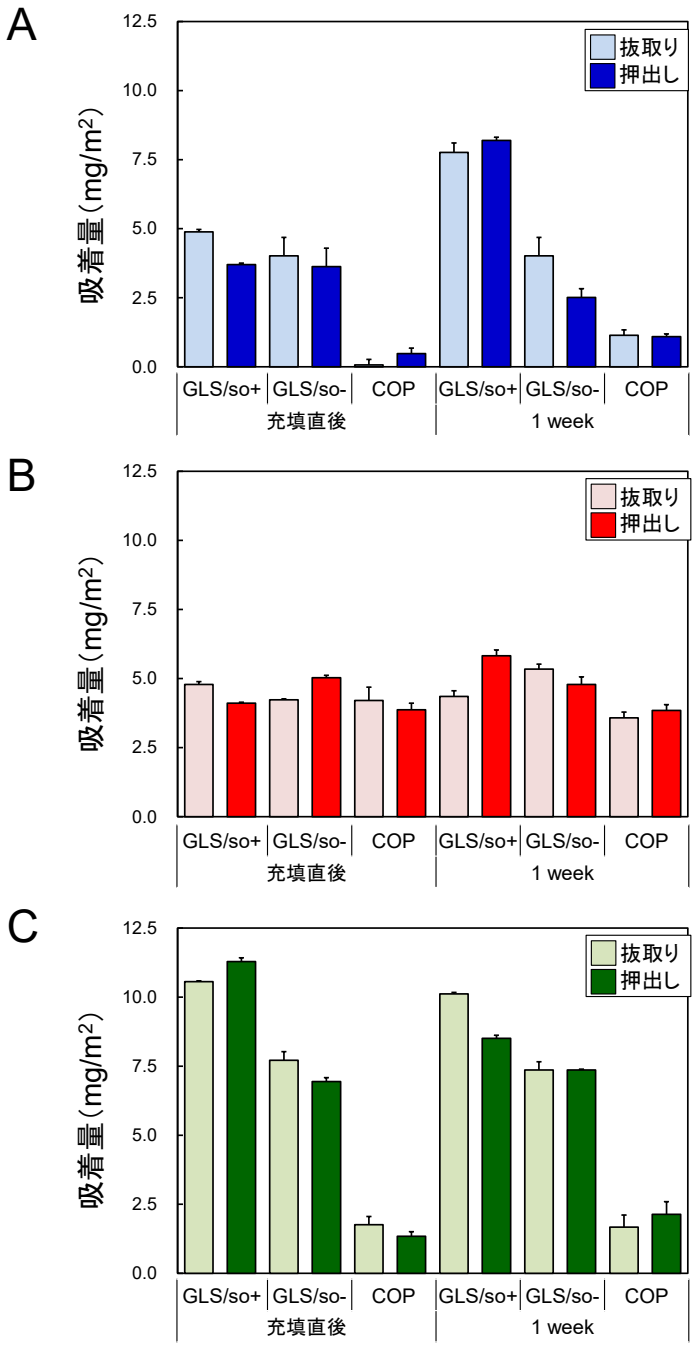


図 10 シリンジ内表面への mAb 吸着定量結果

（A）アダリムマブ、（B）エタネルセプト、（C）インフリキシマブの結果を示す。エラーバーは 4 回測定による標準偏差を示す。

表 6 各条件におけるタンパク質吸着量の要約

シリンジバレル	調製方法	保管期間（week）	アダリムマブ（mg/m²）	エタネルセプト（mg/m²）	インフリキシマブ（mg/m²）
GLS/SO+	抜取り	0	4.89±0.09	4.79±0.10	10.56±0.03
	押出し		3.70±0.06	4.11±0.03	11.28±0.14
GLS/SO−	抜取り		4.02±0.67	4.23±0.03	7.71±0.31
	押出し		3.63±0.39	5.03±0.09	6.94±0.14
COP	抜取り		0.07±0.20	4.21±0.48	1.76±0.30
	押出し		0.48±0.20	3.87±0.24	1.34±0.16
GLS/SO+	抜取り	1	7.76±0.34	4.35±0.21	10.12±0.05
	押出し		8.20±0.12	5.83±0.21	8.51±0.11
GLS/SO−	抜取り		4.02±0.67	5.34±0.18	7.36±0.30
	押出し		2.51±0.32	4.79±0.27	7.36±0.03
COP	抜取り		1.14±0.20	3.58±0.21	1.68±0.44
	押出し		1.10±0.10	3.84±0.21	2.14±0.46

2.3.4 高速液中原子間力顕微鏡（HS-AFM）によるシリンジ内表面へのアダリムマブ吸着のリアルタイム観察

シリンジ素材表面への吸着をリアルタイムで観察するために、HS-AFM を用いた。シリンジ表面を観察しているところにアダリムマブを添加し、吸着の様子を観察した。GLS/SO−表面に対してはアダリムマブ添加後すぐに抗体と見られる分子の吸着が観察された（図 11）。その後、約 20 秒で材料表面が完全に覆われた。GLS/SO+表面に対してはアダリムマブ添加後速やかに材料表面が抗体分子に覆われた（図 11）。一方で COP 表面に対しては、アダリムマブ添加後 15 分を経過してもその表面が完全に抗体分子に覆われることは無かった（図 11）。観察された一連の画像から、ガラス表面では少なくとも 2 層のアダリムマブ分子の吸着層が見られたが、COP 表面ではアダリムマブ分子の吸着層 1 層のみであった（図 11）。得られた画像から GLS/SO−表面に吸着した代表的な分子の相対的高さを算出したところ、約 4 nm との値を得た。これを mAb の 3 次元座標から推定した分子サイズと比較したところ、1 分子の抗体が「フラットオン」様式で吸着した場合の分子高さとよく一致することが分かった。

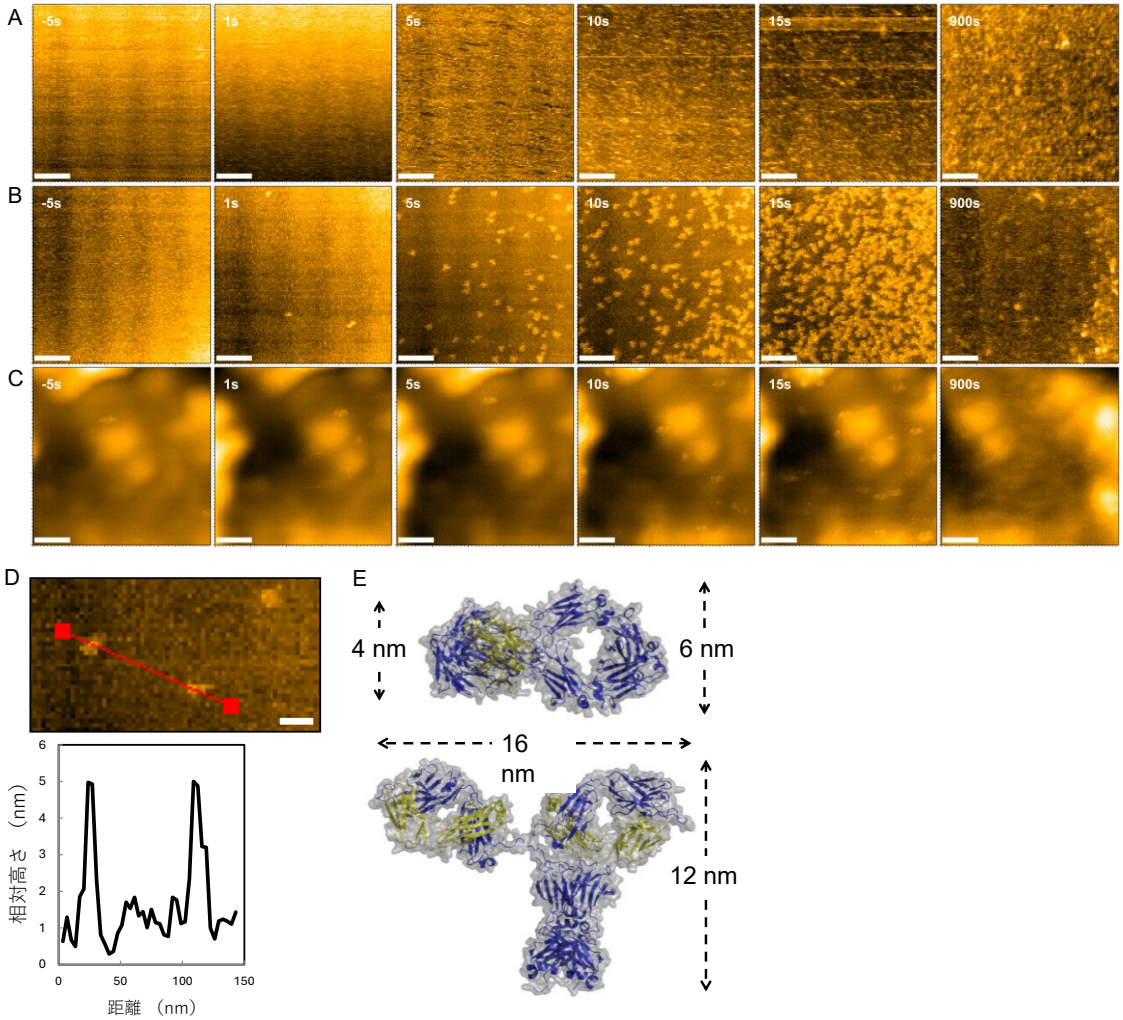


図 11 HS-AFM を用いて撮影したシリンジ内表面へのアダリムマブ吸着のリアルタイム観察結果

（A）GLS/SO+、（B）GLS/SO－、（C）COP それぞれのシリンジを破砕し、破片を用いてシリンジ内面に対応する材料表面にアダリムマブが吸着している様子を示す HS-AFM 画像。画像の左上には、アダリムマブ添加後の経過時間を示した。スケールバーは 100 nm を表す。（D）GLS/SO-の表面に吸着したアダリムマブ分子を HS-AFM で観察した結果（上）と、赤線上での相対高さ。スケールバーは 25 nm を表す。（E）立体構造に基づいて推定した mAb の分子サイズ（PDB ID:1HZH）。

加えて、アダリムマブ添加後の GLS/SO－シリンジ表面を長時間（図 12）観察すると、表層の吸着分子に興味深い特徴、つまり、単量体の抗体よりもやや大きなサイズの粒子が表面で揺らいでいるのが認められた。

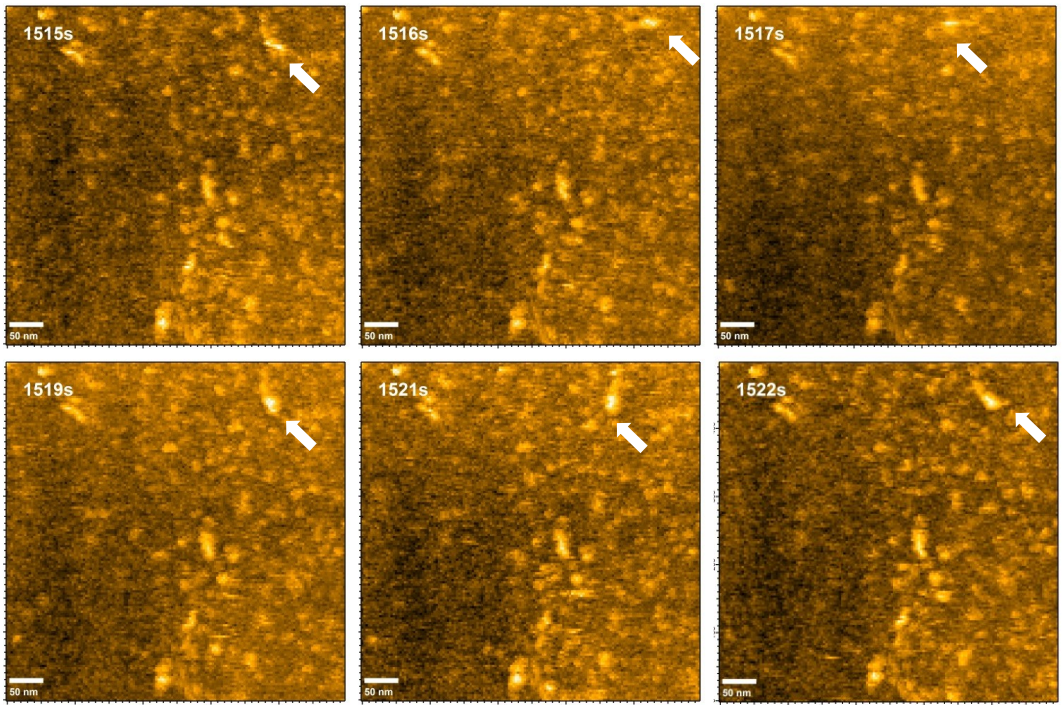


図 12 HS-AFM により観察された、タンパク質吸着層の表層で揺れ動くアダリムマブ粒子の代表的な画像
GLS/SO－シリンジ表面を長時間観察したところ、表層に吸着した分子の興味深い特徴が明らかとなった。白い矢印は、同じアダリムマブが複数層をなして形成した表面に、弱く結合したアダリムマブ粒子が結合したまま揺れ動く様子を示している。

2.4 考察

凝集体発生と吸着量の関係に関する考察

GLS/SO－と GLS/SO+の両シリンジにおいて、抜取りにより調製したタンパク質溶液と押出しにより調製したタンパク質溶液のミクロン凝集体濃度は大きく異なり、ミクロン凝集体の発生がサンプリング方法に依存することが明らかとなった。ガラス製シリンジでは、今回の研究で使用したすべての抗体医薬品について、押出しにより調製された試料中のミクロン凝集体濃度が抜取りにより調製された試料中の濃度よりも高かった（図 8 および表 4）。GLS/SO+シリンジ内のエタネルセプト溶液では、やや高濃度（初期は 2252 個/mL、保管後は 3968 個/mL）でミクロン凝集体が生じており、これは押出しにより調製した溶液でも顕著な増加を示した。ガラスバレルのプランジャーヘッドによる溶液の射出がミクロン凝集体の発生を促すことが明確に示されたと言える。

溶液を抜取った後のシリンジと押出した後のシリンジのバレル表面に同程度のタンパク質が吸着していたことは、押出した溶液のみが高濃度のミクロン凝集体を含んでいたため、やや予想外であった。Couston らは、シリカ表面に対してタンパク質は一層目においては不可逆的に吸着するが、2 層目以降は可逆的に吸着することを示唆している[54]。

今回の研究では、ガラス表面に下層の吸着タンパク質を介して間接的に吸着したタンパク質は不安定で吸着面から剥離しやすい可能性があり、そのため抜取り後にガラス表面を緩やか溶媒で洗浄しても吸着したタンパク質が取り除かれてしまう可能性が考えられた。以下の計算は、このような弱く吸着したタンパク質が、押出時にミクロン凝集体を形成するという考えを支持するものである。

保管後、GLS/SO－シリンジから押出されたアダリムマブ溶液中のミクロン凝集体の増加量は 3598 個/mL であった。ミクロンの凝集体が球形で密度が 1.28 g/cm^3[55]と仮定すると、フローイメージング顕微鏡の画像から得られた粒度分布から、3598 個のミクロンの凝集体を構成するアダリムマブ分子の総重量は 0.33 µg と見積もることができる。この重量をバレルに 5 mm のヘッドスペースを持たせて 1 mL の溶液を充填した際に溶液が接触可能なバレル表面の面積（6.9 cm^2）で割ると、吸着密度は 0.48 mg/m^2 となる。この値は、抗体が「フラットオン」様式で単層吸着した場合の吸着密度（1.3 mg/m^2）よりも小さい。この計算結果により、不安定に吸着したタンパク質分子の単層が放出されただけでも、プランジャーヘッドの掃引による放出時に相当数のミクロン凝集体が発生することを示唆している。

COP シリンジでは、3 種類の治療用タンパク質のミクロン凝集体濃度はいずれも低く、抜取りにより調製したタンパク質溶液と押出しにより調製したタンパク質溶液のミクロン凝集体濃度にはわずかな差しか認められなかった。後述するように、これらの結果は、GLS の場合と異なり、COP シリンジに対してはタンパク質吸着量が少ないために、プランジャーヘッドの掃引による凝集体発生が生じにくいためと考えられた。

3 種類の抗体医薬品の吸着量を定量したところ、それらの吸着密度は使用したサンプリング方法によって基本的に変化しないことが示唆された（図 10）。しかし、アダリムマブとインフリキシマブの吸着密度は、バレルの種類に大きく依存しており、SO コーティングされたガラス表面で最も吸着密度が高く、次いでコーティングなしのガラス表面、COP 表面の順であった。COP シリンジでは、保管後の吸着密度はアダリムマブで 1.10 mg/m^2、インフリキシマブで 2.14 mg/m^2 であった。抗体の分子量を 150 kDa とし、抗体分子が表面に均一に分布すると仮定すると、1.10 mg/m^2 は 152 nm^2/分子、2.14 mg/m^2 は 112 nm^2/分子に相当する。立体構造から見積もった抗体分子 1 個の直径は約 12–16 nm なので、1.10 mg/m^2、2.14 mg/m^2 の吸着密度は、それぞれバレル表面に単層および二層で吸着していることを意味する。エタネルセプトの場合、保管後の COP シリンジでの吸着タンパク質密度は、3 種類のバレルの中で最も低かったが、他のバレルタイプとの差はわずかであった。概して、ガラス製シリンジは COP シリンジよりもタンパク質の吸着密度が顕著に高かった。タンパク質の吸着量は、タンパク質や固体の表面電荷を含むいくつかの因子に依存しており、溶液の状態によっても影響を受けるため、タンパク質の吸着挙動を単純に説明することは困難であるものの、今回の結果は、全反射蛍光分析を用いた固液界面でのヒト mAb（mAb-1）の吸着脱着に関する過去の研究結果とよく一致している[54]。当

該研究において、未処理シリカよりもはるかに疎水性が高いオクタデシルトリクロロシラン（OTS）コートシリカへのmAb-1の吸着は、未処理シリカよりもはるかに低いことが示された（2 mg/m²対5.5–12 mg/m²）。OTSコートシリカと未処理シリカの接触角はそれぞれ107.1°と51.2°であるのに対し、ガラスとCOPの接触角はそれぞれ68.0°±1.3°と93.2°±0.5°であった。したがって、COPのシリンジがGLS/SO-のシリンジに比べてタンパク質の吸着密度が小さいのは、バレル材料の接触角の違いで説明できる。 ただし、接触角の異なるポリマーへのフィブロネクチン吸着量と接触角の関係は直線的ではなく、約70°–80°で最大となることに注意が必要である[56]。当該研究では、ガラスの接触角と評価したポリマーの接触角の大小関係にかかわらず、フィブロネクチンタンパク質はポリマー表面よりもガラス表面に高い密度で吸着することが示されている[56]。GLS/SO+シリンジの内表面に吸着したアダリムマブの吸着密度は 8.20 mg/m²（5.52 nm²/分子）であり、これは 6 層相当のタンパク質吸着層が形成されていることを示唆するものである。一方、GLS/SO－シリンジに吸着したアダリムマブの吸着密度（2.51 mg/m²）は、2 層相当のタンパク質層が形成されたことに相当する。この推定は、HS-AFM の観察結果ともよく一致する。

図11Dおよび図11Eに示すように、シリンジ表面への吸着をリアルタイム観察から、アダリムマブ分子はガラス表面にフラットオン様式で吸着しており、吸着したタンパク質分子は成長して膜を形成しているように見えた。第一層の分子は、明らかな脱離が観察されなかったことから、表面に安定的に吸着していると考えられる。図12に示したようなタンパク質吸着層の表層にゆるやかに吸着したタンパク質分子が、プランジャーヘッドの掃引によるミクロン凝集体形成と関わっている可能性が考えられる。以前の研究では、ケイ素酸化物 SiOx 表面に吸着したタンパク質が天然構造を失う可能性が示唆されていた[57], [58]が、HS-AFMではアダリムマブの明らかなアンフォールディングは観察されなかった。一方、我々の観察結果は、mAb がガラス微粒子に吸着しても天然構造を維持することを示した過去の研究結果[19]と一致している。

この結果から、ガラスシリンジ表面を覆う表層の2〜6層に存在するタンパク質分子は、プランジャーヘッドの掃引時にバレル表面から削られたり脱離したりして、ミクロンサイズの粒子として放出されるが、バレル表面に直接吸着したタンパク質分子は掃引時にも付着したままであることが示唆された。さらに、HS-AFM 観察により、COP バレルの表面には 20 nm 程度の凹凸構造があることが明らかになった（図 13）。したがって、バレル表面に直接吸着したタンパク質分子の安定した結合に加えて、プランジャーヘッドと凹凸のあるバレル表面の間に形成される凹凸構造も、吸着したタンパク質の表面からの脱離の抑制に重要な役割を果たしていると考えられる。

タンパク質の吸着密度とミクロン凝集体の濃度は、3 つの治療用タンパク質で異なり、この違いは、タンパク質の電荷と疎水性（例えば、糖鎖修飾パターンの違いによる）とバレル表面に起因すると考えられる[42]。さらに、3 つの治療用タンパク質の製剤条件

の違いも、タンパク質の吸着密度やミクロン凝集体の程度に影響を与えている可能性がある。アダリムマブは時間依存的な吸着挙動を示し、押出し時からミクロン凝集体の増加が大きく、吸着密度は 4–8 mg/m^2 であったのに対し、インフリキシマブの吸着挙動は明らかな時間依存性を示さず、押出し時にもミクロン凝集体の増加が少なく、吸着密度は 8–11 mg/m^2 であった。これらの違いは、アダリムマブのシリンジ表面への吸着は遅く弱い一方、インフリキシマブのシリンジ表面への吸着は速く強いという異なる吸着挙動の存在を示唆している。Fc 融合型タンパク質であるエタネルセプトの吸着量は 3 つのバレルタイプでほぼ同じであり、IgG 抗体との分子特性の違いによりこのような違いが生じた可能性が考えられる。

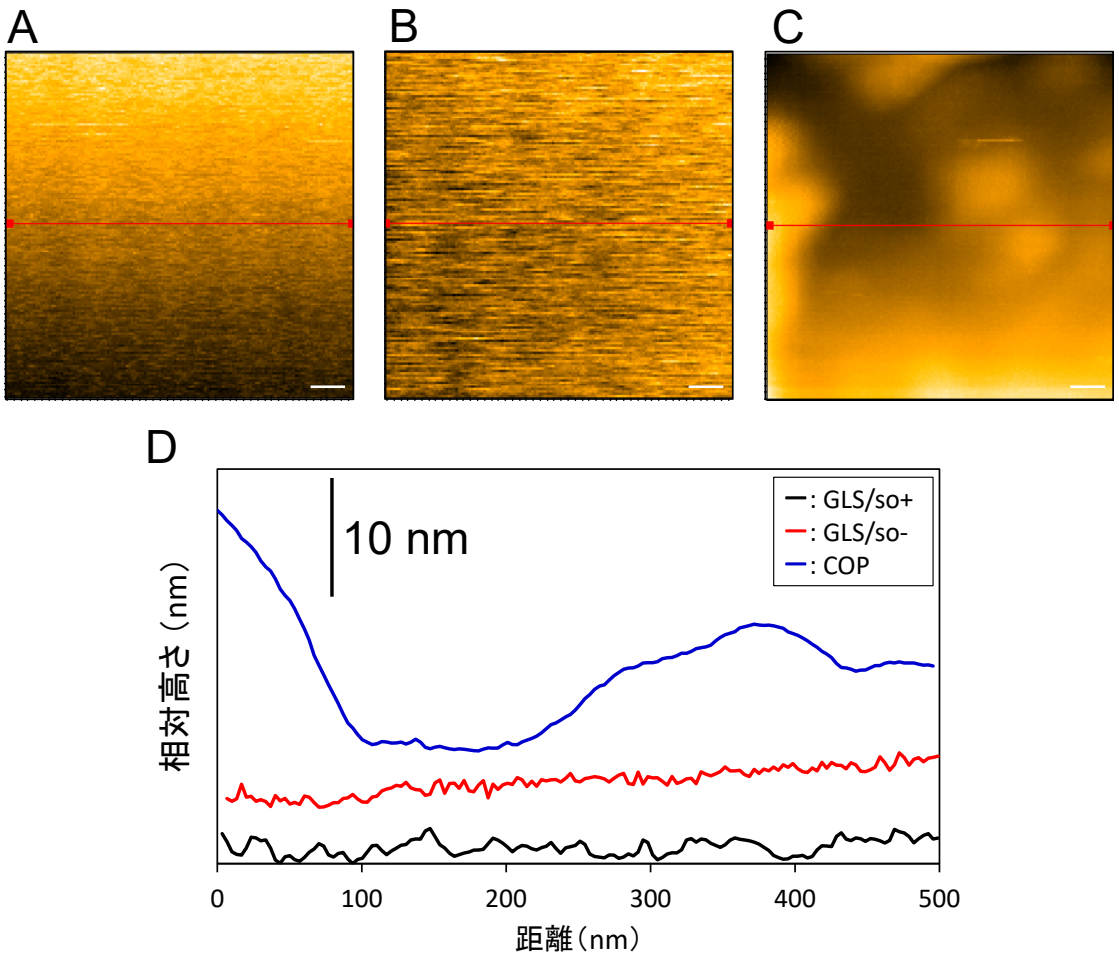


図 13 HS-AFM で観察した各種類のシリンジ内表面の代表的画像
（A）GLS/SO+、（B）GLS/SO－、（C）COP の各シリンジ表面の HS-AFM 画像。スケールバーは 50 nm を示す。（D）各シリンジ表面の高さプロファイルの画像。（A）–（C）に示した赤線における相対高さを描図している。

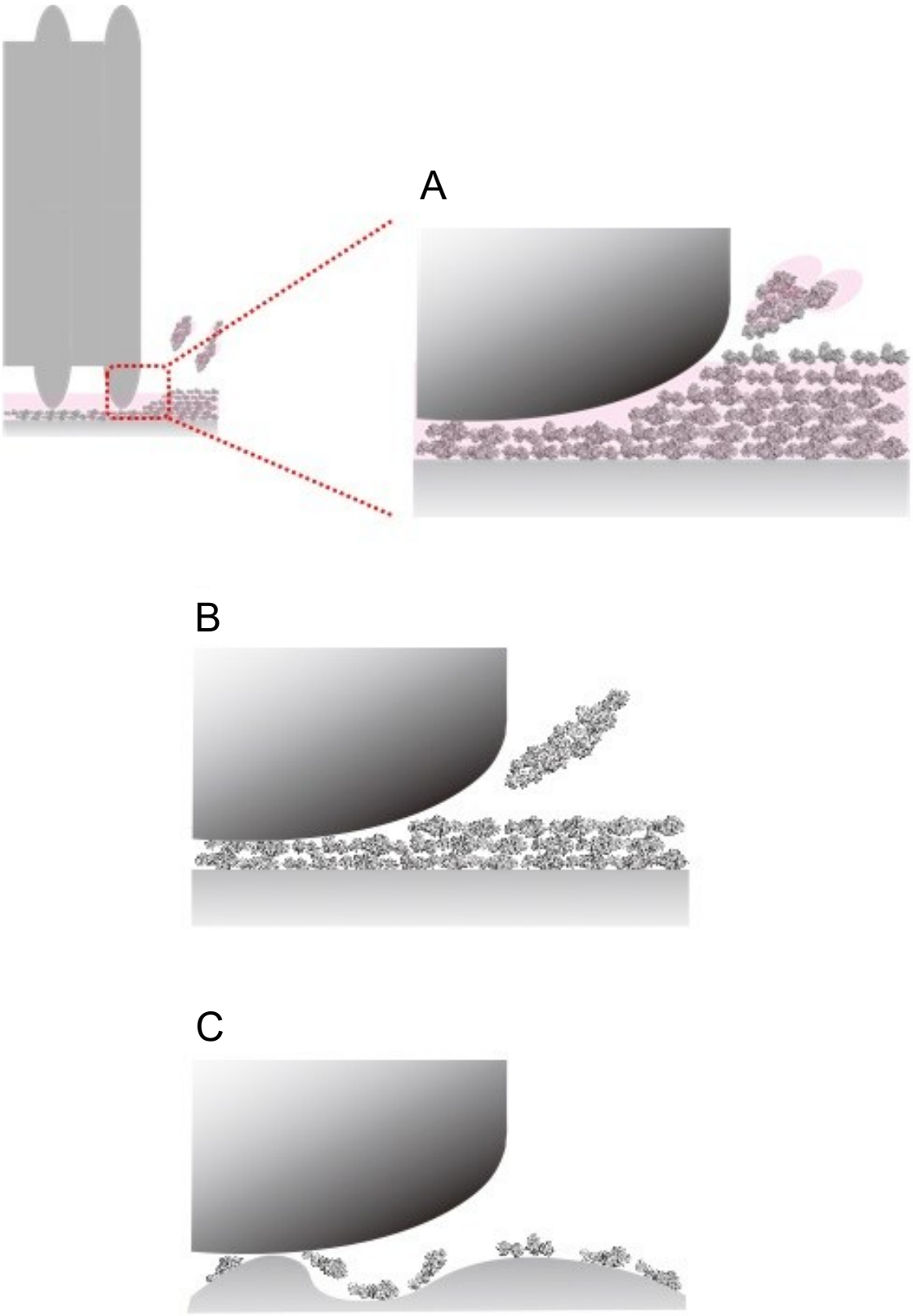


図 14 バレル表面に吸着した mAb がシリンジのプランジャーヘッドによって押し出されミクロン凝集体を形成するモデル図
それぞれ（A）GLS/SO+シリンジ、（B）GLS/SO－シリンジ、（C）COP シリンジを示す。

2.5 本章の結論

本研究により、医療用シリンジのバレル表面へのタンパク質の吸着が増加すると、製剤中のミクロン凝集体の濃度が増加する傾向にあることが示された。驚くべきことに、吸着したタンパク質の層が単層であっても剥離すると、1 mL あたり数千個のミクロン凝集体が生じる。注目すべきは、COP シリンジにおけるタンパク質の吸着密度は、ガラスシリンジに比べてはるかに小さかった。その結果、押出しにより調製した試料溶液においても、ミクロン凝集体の濃度は最小限に止まった。本研究の結果は、タンパク質吸着を最小限に抑えるバレル素材を用いることによって、シリンジからの薬液排出時の凝集体形成を低減することができることを示すものである。

バイオ医薬品の製造、保管、投与において、ミクロンサイズの粒子濃度が最小限に抑えられることが望ましい。したがって、タンパク質吸着について今回用いた COP と同等の性質を有する材料で作られたシリンジを用いた PFS の利用は、製剤中のミクロン凝集体を最小限に抑えるための戦略として非常に有望であると考えられる。

第 3 章 分析過程における機械的ストレスを介した凝集形成メカニズムの解明

3.1 背景

等温滴定型熱量計（ITC）測定は、溶液中での分子間相互作用に伴う微小な熱量変化を直接観測することにより、結合の熱力学パラメータを包括的に決定する分析手法である。一度の測定で、結合の化学量論（n）、親和性（解離定数 K_D）、エンタルピー変化（ΔH）、エントロピー変化（ΔS）を得ることができる。1990 年代初頭に市販の ITC が発売されて以来、この技術を用いた研究の数は著しく増加した。特に、測定セルの小容量化を達成した ITC は、0.1 µcal [59]という微小な熱量変化を観測するのに十分な感度を持っており、生化学、構造生物学、創薬化学、材料科学など、さまざまな分野でのその利用が加速している。

図 15 に ITC の模式図を示した。ITC は断熱ジャケット内に参照セルと試料セルを有する。両セル間の温度差（ΔT）がゼロになるように、電気的なフィードバックがかけられている。試料セルに対象とする試料溶液を充填する。参照セルには通常、水が充填される。試料溶液に含まれる分子が何らかの反応に関わり、それにより熱の出入りが起こると、セル間の温度に差が生じるようになる。これを再びゼロに戻すように電気的なフィードバックが起こり、その際の電流量が記録される。分子間相互作用の典型的な ITC 測定においては，滴定シリンジに試料溶液を充填したのち、試料セル内の試料溶液に規定量が逐次的に注入される。

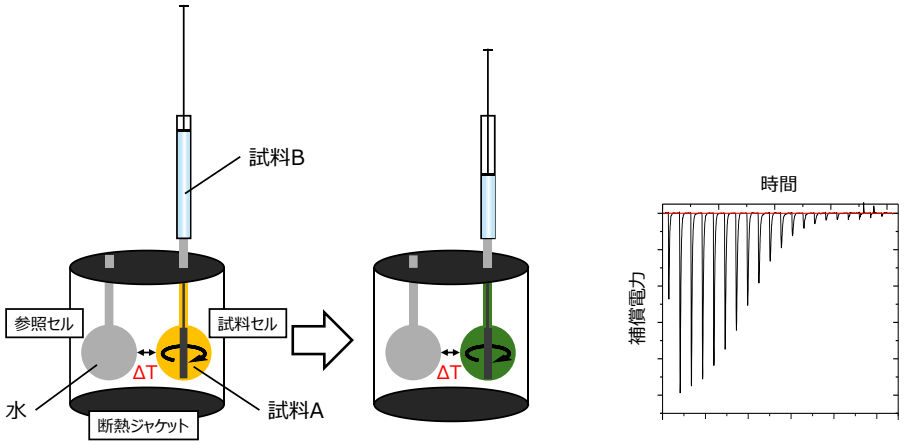


図 15 ITC 装置の模式図と取得されるデータの例

観測されるシグナルの積分値は、分子間相互作用のエンタルピー変化に相当し、全熱量に対する各滴定液の熱量の比が、各滴定液中の相互作用に関与した分子の割合に相当する。滴定ごとに推定された分率をもとに反応モル比や化学量論がわかれば、解離定数を正しく導くことができる。

抗体医薬品の有効性を保証する上で最も基本的な要件は、標的抗原に対する特異的かつ高い結合親和性である。ITC は、この抗原-抗体間相互作用を定量的に評価するために広く利用される。特に、ITC によって決定される化学量論は、製剤中に含まれる抗体分子のうち、実際に抗原と結合する能力を持つ分子の割合を厳密に示す指標となる。加えて、抗体医薬品の作用機序において、抗原への結合だけでなく、抗体 Fc 領域を介した Fc 受容体との相互作用がその機能を発揮する上で極めて重要である。この相互作用は、Fc 領域の翻訳後修飾、特に糖鎖の構造によって大きく影響を受ける。ITC は、こうした Fc 領域の機能的完全性を評価する上でも活用される。例えば、IgG1-Fc 領域の糖鎖構造が Fc 受容体の一種である FcγRIIb への結合親和性に与える影響を ITC で評価した研究では、糖鎖を段階的に除去していくと結合親和性が著しく低下することが示された[60]。加えて、抗体の Fc 領域からフコースを除去する糖鎖改変によって、FcγRIIIa への結合がエンタルピー的に有利な方向へ変化しすることで結合親和性が向上することも ITC によって明らかにされている[61]。このように、ITC は抗体医薬品の重要品質特性である糖鎖修飾の状態が、Fc 受容体との相互作用に与える影響を熱力学的観点から詳細に解析することを可能にする。また、IgG1 と FcγRIIIa との相互作用において、IgG1 の Fc 領域に加えて Fab 領域も両者の相互作用に関与していることが示された ITC 測定結果を端緒に、その後の HDX-MS および架橋質量分析（XL-MS）を用いた詳細な解析により Fab 領域の CL ドメインが FcγRIIIa に近接し特異的に相互作用していることが実証された研究成果も報告されている[62]。

以上のように、ITC は抗体医薬品の品質評価において多岐にわたる応用が可能である。標的抗原に対する結合親和性や結合可能画分の精密な定量から、抗体の構造機能相

関の解明、さらには Fc 領域と Fc 受容体との相互作用の熱力学的解析まで、抗体の重要な機能を包括的に評価できる。これより、ITC は抗体医薬品の基礎研究、開発、そして製造における品質管理に至るまで、不可欠な分析技術となっている。

この ITC 測定から信頼性の高い熱力学パラメータを得るためには、いくつかの実験的要件を満たす必要がある。例えば、滴定する側と滴定される側の試料濃度を正確に決定することは、化学量論および結合エンタルピー変化を正しく算出するための大前提である。また、測定対象の結合親和性に応じて、結合定数（K_A）、測定セルに充填された試料のモル濃度（M）、化学量論（n）の積、$n \times M \times K_A$ で定義される c 値が適切な範囲（例えば 1〜1000 [63]）に収まるように実験を設計することが望ましいとされている。しかし、これらの実験的要件を慎重に満たしたとしても、化学量論が理論値からずれたり、測定ごとに結果がばらつくといった問題は頻繁に経験される。このような結果の乖離は、しばしば試料中に測定対象の分子と結合できない結合不可能画分が存在することに起因すると解釈されることが多い。

ITC 測定では、滴定シリンジ内に充填された溶液を熱量計セル内に充填した溶液に滴下する際、均一な混合を促進するために滴定シリンジ先端にデザインされたパドルが連続的に回転する。この撹拌は ITC 測定に不可欠な操作であるが、同時に分析対象に機械的ストレスを与える可能性がある。申請者は、異なるモデルの ITC 装置で同一の試料を測定した際に、装置間で化学量論に有意な差が生じることを経験しており、これがシリンジ先端のパドル形状や撹拌回転数の違いに起因するのではないかと推測した。撹拌回転数が最適でないために決定される熱力学パラメータが不確かになる可能性を指摘した報告[64]はあるものの、撹拌という物理的操作がタンパク質の安定性に与える影響や、それによって決定される熱力学パラメータの信頼性に及ぼす影響について詳細に調べた研究は、これまでのところ認められていない。

この撹拌ストレスは、分析法自体が引き起こすアーティファクトとして、タンパク質の変性や凝集を誘発する潜在的なリスクである。先行研究において、高いせん断応力、固液界面へのタンパク質吸着、そしてキャビテーションの発生といった機械的ストレスが、タンパク質の凝集を引き起こすことが報告されている。ITC 測定においても、ステンレス鋼製のシリンジ表面へのタンパク質吸着や、高速撹拌によるキャビテーションの発生が起こりうるため、これらの現象がタンパク質を不安定化させ、結合不可能画分を増加させている可能性が考えられる。

以上の背景から、本章では、これまで見過ごされてきた ITC 測定中の撹拌条件（パドル形状と撹拌回転数）が分子間間相互作用の熱力学パラメータに与える影響を評価することを目的とする。この目的を達成するため、撹拌条件を系統的に変調させた ITC 測定を行い、得られたサーモグラムを解析して熱力学パラメータの変化を評価する。さらに、撹拌後のタンパク質溶液を回収し、フローイメージング顕微鏡（FIM）や円偏光二色性（CD）スペクトル測定などの複数の分析手法を用いて、ミクロン凝集体の形成やタンパ

ク質の高次構造の変化を詳細に調べることで、導出された熱力学パラメータの変化との因果関係を明らかにする。最終的に、これらの結果を統合し、分析過程における機械ストレスを介した凝集体形成メカニズムを考察するとともに、信頼性の高い ITC データを取得するための最適条件を提案することを目指す。

検討は最初に単純化のためタンパク質-低分子化合物の相互作用系を用いた。具体的にはモデルタンパク質として II 型糖尿病治療の標的タンパク質の一つである核内受容体 PPARγ とそのリガンドであり臨床応用もなされているロシグリタゾンを用いた。

その後、抗体医薬品であるリツキシマブとモガムリズマブについて、それらの抗原由来ペプチドとの相互作用系についても検討を行った。

評価に用いた系の相互作用の模式図と反応式を図 16 に示す。

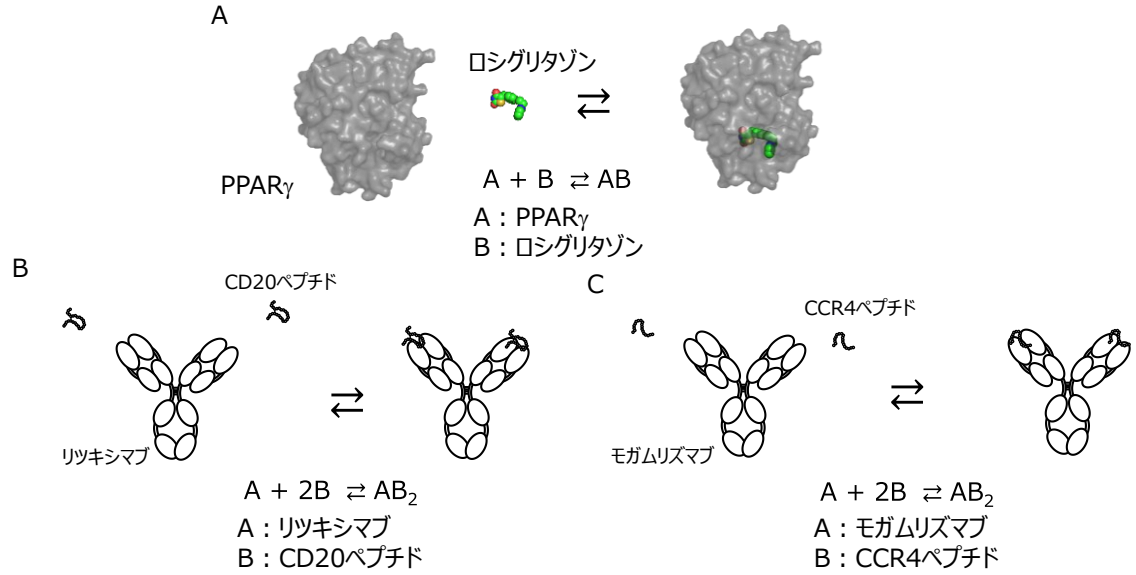


図 16 ITC 測定に用いた系の相互作用の模式図と反応式
（A）PPARγ-ロシグリタゾンの相互作用系。PPARγ は分子量 30.8 kDa のリガンド結合ドメインを表示した。（B）リツキシマブ-抗原（CD20）ペプチドの相互作用系。（C）モガムリズマブ-抗原（CCR4）ペプチドの相互作用系。

3.2 試料と方法

3.2.1 試料

ヒト PPARγ-リガンド結合ドメイン（以下、PPAR と称する）は、先行研究[65]の記述に従い大腸菌発現系を用いて発現させたのち、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。精製した PPAR は，1 mM の TCEP と 2%の DMSO を含む PBS pH7.4 に対して，4℃で一晩かけて透析した。PPAR の濃度は、BioSpectrometer basic（Eppendorf）を用いて PPAR の 280 nm におけるモル吸光係数から決定した。PPAR のモル吸光係数（10750 L/mol/cm）は文献[66]に記載された方法で決定した。ロシグリタゾンは Sequoia Research

Products 社から購入し、ITC 実験で使用した溶媒で溶解させた。

リツキシマブは中外製薬株式会社より購入した。CD20 ペプチドは、分子内ジスルフィド結合を有する 25 残基の環状ペプチド（アミノ酸配列：NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ）であり、ヒト CD20 タンパク質の細胞外ループの 163-187 残基に対応する。リツキシマブおよび CD20 ペプチドは ITC 実験用の溶媒で透析した。透析後のリツキシマブおよび CD20 ペプチドの濃度は 280 nm における吸光度とモル吸光係数から計算した。リツキシマブの吸光係数（1.629 L/g/cm）および CD20 ペプチドのモル吸光係数（4595 L/mol/cm）はアミノ酸組成からプログラム SEDNTERP を用いて計算した。

モガムリズマブは協和キリン株式会社より購入した。CCR4 ペプチドは 18 残基ペプチド（アミノ酸配列：DESIYSNYYLYESIPKPC）であり、ヒト CCR4 タンパク質の N 末端側 12-29 番目の残基に対応する。モガムリズマブおよび CCR4 ペプチドは ITC 実験用の溶媒で透析した。透析後のモガムリズマブおよび CCR4 の濃度は 280 nm における吸光度とモル吸光係数から計算した。モガムリズマブのモル吸光係数（221354 L/mol/cm）および CCR4 ペプチドのモル吸光係数（5617 L/mol/cm）はアミノ酸組成からプログラム SEDNTERP を用いて計算した。

CD20 ペプチドおよび CCR4 ペプチドの配列は先行研究[67], [68]で採用されたものと同一とし、どちらのペプチドも Shanghai Science Peptide Biological Technology 社より購入した。

3.2.2 ITC（Isothermal Titration Calorimetry）測定

ITC 測定には iTC200（Malvern Panalytical）および PEAQ ITC（Malvern Panalytical）を用いた。滴定にはフラットパドル（FP シリンジ）またはコークスクリューパドル（CP シリンジ）の滴定シリンジを用いた。PEAQ ITC を用いた滴定実験では，ピッチの小さいコークスクリューパドル（SpCP シリンジ）の滴定シリンジを用いた。図 17 にシリンジ先端の写真を示した。測定に用いるものと同じ濃度の PPAR 溶液 300 µL を用いて測定セルを 2 回共洗いした後、透析した PPAR 溶液（0.04 mM）を測定セルに充填した。ロシグリタゾンの滴定シリンジ内表面への吸着による実効濃度低下を避ける目的で滴定用シリンジにロシグリタゾン溶液を充填し、排出、これを 3 回繰り返し行った。滴定は、最初に 1 µL のシリンジ溶液（0.5 mM のロシグリタゾン）を滴下した後，25℃で 120 秒ごとに 2 µL を 19 回滴下した。

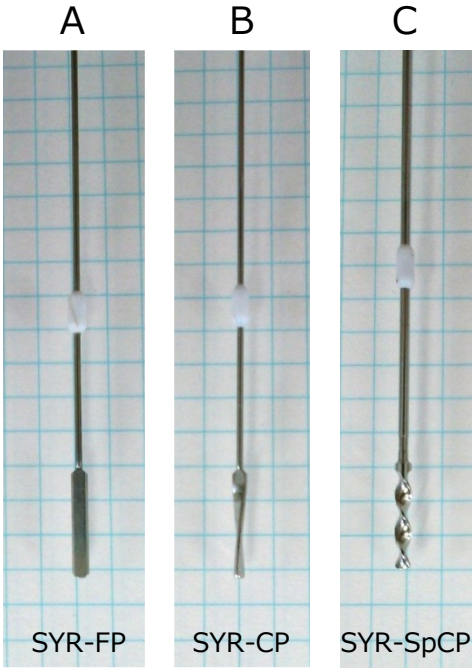


図 17 各滴定シリンジの先端形状
（A）フラットパドル（SYR-FP、FP シリンジ）、(B)コークスクリューパドル（SYR-CP、CP シリンジ）、(C）小ピッチコークスクリューパドル（SYR-SpCP、SpCP シリンジ）。背景のグリッドサイズは 3 mm ×3 mm である。

3.2.3. ITC サーモグラムの解析とモデルフィッティング

得られたサーモグラムの解析にはプログラム NITPIC（バージョン 1.2.2）を使用した[69]。プログラム SEDPHAT を使用して、正規化されたピークエリアプロットをフィットさせた[70]。相互作用モデルは PPAR-ロシグリタゾンの系については両者の結晶構造解析により明らかとなっている複合体構造情報[71]に基づき 1:1 結合モデル（A + B ⇄AB）を採用した。リツキシマブ-CD20 ペプチドおよびモガムリズマブ-CCR4 ペプチドの系については、1:2 結合モデル（A + B + B ⇄ AB + B ⇄ BA + B ⇄ BAB）を採用した。

プログラム SEDPHAT を用いたフィッティングでは、フィッティングパラメータとして K_D と ΔH に加えて、結合不可能画分率（Incompetent fraction）を組み込んだ。SEDPHAT を用いて、文献[72]に従い最終パラメータの不確かさを信頼区間 68%で推定した。

3.2.4 可溶性および不溶性画分の特性評価

より高い撹拌回転数で結合不可能画分率が増加する現象のメカニズムを明らかにするため、今回用いた 3 種類のパドルのうち、もっとも結合不可能画分率が大きく増加した FP シリンジを用いて撹拌した PPAR 溶液のキャラクタリゼーションを各種分析方法に

より行った。

試料調製

iTC200 の測定セルに 0.04 mM の PPAR 溶液を 0.3 mL 充填し、500、1000、1500 rpm の撹拌回転数でそれぞれ 1 時間、25℃にて撹拌した。撹拌時間は実際の測定（測定前安定化と滴定）に要する時間に合わせた。パドルには今回検討した 3 種類のパドルのうち、典型的な撹拌回転数である 1000 rpm において最も大きな結合不可能画分率を示した FP シリンジを用いた。試料溶液を回収し、以降に示す各種分析法を用いて撹拌後の PPAR 溶液のキャラクタリゼーションを行った。

UV 吸収測定

UV 吸収測定には、BioSpectrometer Basic（Eppendorf）とセル長 1cm の使い捨てキュベット（Eppendorf）を用いた。試料の 280nm の吸光度（A_{280}）と 350nm の濁度（T_{350}）を取得した。T_{350} は、目に見えない粒子（直径 100 nm–100 μm）および目に見える粒子（直径 100 μm 以上）の発生を反映する。ITC 試料セルから回収した試料を 15000×*g*、4℃で 30 分間遠心分離し、遠心分離前後の A_{280} の差から不溶性画分の割合を求めた。

円偏光二色性（CD）測定

CD の測定は、ペルチェ式温度制御装置を備えた分光光度計 J-720（日本分光）を用いて行った。25℃で 1 時間、各回転数で撹拌した後、ITC セルから回収した PPAR 溶液を 15000×*g*、4℃で 30 分間遠心分離し、不溶性画分を除去した。280 nm の吸光度（A_{280}）から上清中のタンパク質濃度を決定した。CD 測定は光路長 1 mm のセルを用いて 25℃および 90℃で行った。各撹拌条件での平均残基モル楕円率（θ）の変化率は、各試料において 25℃で観測された 222 nm での θ（$\theta_{222,\,25℃}$）と 90℃で観測された θ（$\theta_{222,\,90℃}$）の差（$\Delta\theta_{222}$）から算出した。

フローイメージング顕微鏡（FIM）測定

ミクロン凝集体を定量するために FIM 測定を行った。測定には、FlowCam8100（横川電機）を用いた。150 μL の試料溶液を流速 50 μL/min で送液し、直径 1-100 μm の粒子の画像を撮影し、計数した。データの解析には付属のソフトウェア VisualSpreadsheet（横川電機）を用いた。取得した粒子画像を二本の平行線で挟み込んだ際の距離（フェレー径）を 5° 間隔で 36 個取得し、36 個のフェレー径の平均値として球相当径（ESD）を算出した。

ヒドロキシルラジカルの定量評価

テレフタル酸（TPA）は 0.2 M の NaOH で pH6.5 に調整した 30 mM の溶液を用いた。そして，0.3 mL の 30 mM TPA 溶液を ITC セルに充填し，FP シリンジを用いて 1500 rpm，25 ℃で 1 時間撹拌した後、回収した。当該 TPA 溶液に含まれるヒドロキシテレフタル酸（hTPA）の濃度決定は文献[73]の方法に従った。試料溶液を 96 ウェルプレートに入れ、励起波長 315 nm、蛍光波長 425 nm で測定した。hTPA 溶液の蛍光強度の濃度依存性から求めた検量線に基づいて、観測される蛍光強度からヒドロキシルラジカル（・OH）濃度を算出した。検量線作成には 0.2 M NaOH に溶解した 549 μM hTPA 溶液（pH 6.5)を 0.2 M NaOH で 2 回 10 倍希釈し、続いて 3 倍希釈を 6 回繰り返した。最後の 5 回の希釈液について Infinite 200 PRO プレートリーダー（TECAN）を用いて、蛍光強度を記録した。キャビテーションによるヒドロキシルラジカルの発生と hTPA の定量の関係を図 18 に示す。

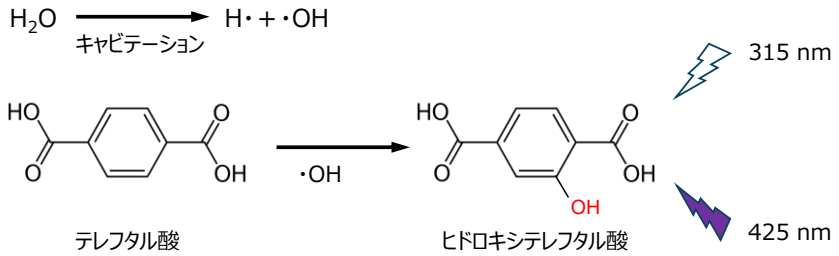


図 18 ヒドロキシテレフタル酸由来の蛍光強度に基づいたヒドロキシルラジカルの定量

3.3 結果

3.3.1 異なる撹拌回転数における PPAR-ロシグリタゾン相互作用の ITC サーモグラム

滴定シリンジに充填したロシグリタゾン溶液を、パドルによる連続撹拌を行いながら測定セル内の PPAR 溶液に滴下した。まず FP シリンジを用いて、500、750、1,000、1,250、1500 rpm の各撹拌回転数で滴定実験を行った（図 19)。撹拌回転数に依存した明確な違いが滴定曲線に認められた（図 19A)。観測されたサーモグラムの各ピークの積分値から算出した 1 回の滴下で生じる熱量変化（Q (cal/injection)）は 500 rpm で最小値を示した（図 19B)。各滴定を詳細に観察したところ、1000 rpm 以上の撹拌回転数を採用した場合と比較して、500 rpm の撹拌では発熱ピークの面積が最も小さく、滴定全体を通してピーク幅が最も広いことがわかった（図 19C および図 19D)。1500 rpm では、すべての滴定におけるピークの形状と最初の 1 回の滴定における熱量変化は、1000 rpm の場合と同様であった（図 19D および図 19E)。しかし、5 回目の滴定から Q が減少し始めた。

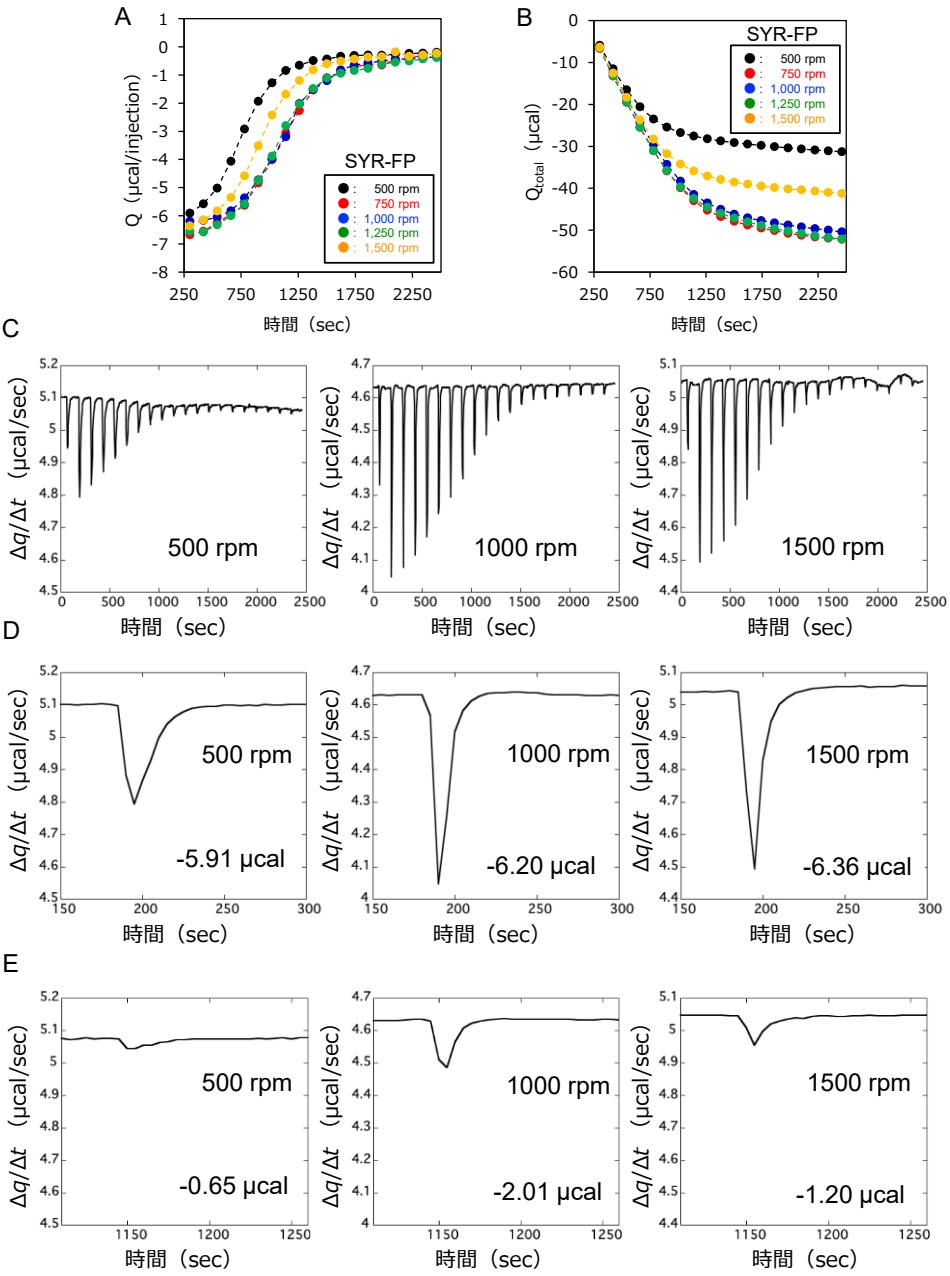


図 19 撹拌回転数とシリンジの先端形状が滴定プロファイルに与える影響（FP シリンジの場合）

（A）滴定曲線、（B）総発熱量プロット、（C）各撹拌回転数におけるサーモグラム全体像の比較。左から 500 rpm、1000 rpm、1500 rpm を示す。（D）滴下 2 回目の各撹拌回転数におけるサーモグラムの比較。左から 500 rpm、1000 rpm、1500 rpm を示す。（E）滴下 10 回目の各撹拌回転数におけるサーモグラムの比較。左から 500 rpm、1000 rpm、1500 rpm を示す。（A）および（B）では、プロット間の関係を視覚的に明示する目的で点線を加えた。

次に，CP シリンジおよび SpCP シリンジを用いて、パドル先端形状が滴定時の発

熱量に与える影響を調べた（図 20）。CP シリンジの発熱ピーク形状の撹拌回転数依存性は、FP シリンジの場合と同様で、1000 rpm 以下の撹拌回転数では、滴定初期の発熱量が小さく、ピーク幅の広がりが認められた。また、1500 rpm では、1000 rpm の場合と同様のピーク形状を示した。また、CP シリンジを用いた場合の発熱量 Q の撹拌回転数依存性は、FP シリンジの場合とよく似ていた。500 rpm および 1500 rpm での発熱量 Q は，滴定が進むにつれて減少し、750 rpm での発熱量 Q よりも低い値を示した。また，総発熱量 Q_{total} については、750 rpm 以上では CP シリンジは FP シリンジと同様の結果となり、500 rpm では CP シリンジの方が僅かに大きな値を示した。

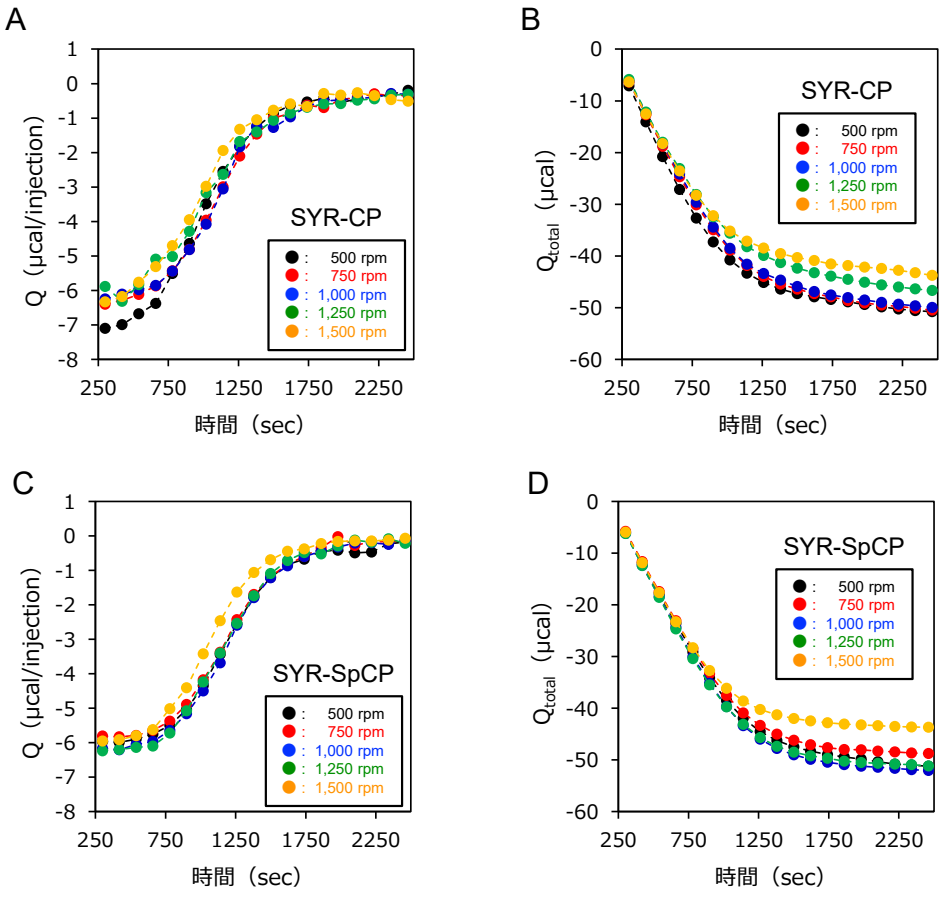


図 20 撹拌回転数とシリンジの先端形状が滴定プロファイルに与える影響（CP シリンジおよび SpCP シリンジの場合）

（A）滴定曲線、（B）総発熱量プロットの比較。プロット間の関係を視覚的に明示する目的で点線を加えた。

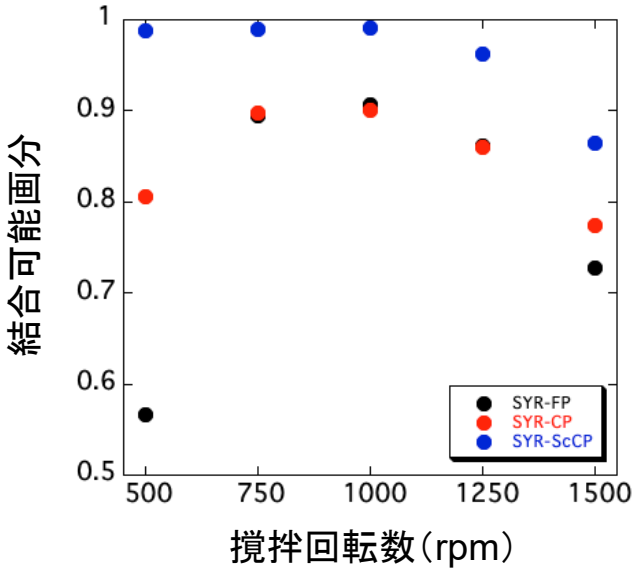


図 21 搅拌回転数を変調させた際の結合可能画分の変化

表 7 PPAR-ロシグリタゾン間相互作用の熱力学パラメータの要約

	K_D (μM)			ΔH (kcal/mol)			結合可能画分		
撹拌回転数 (rpm)	SYR-FP	SYR-CP	SYR-SpCP	SYR-FP	SYR-CP	SYR-SpCP	SYR-FP	SYR-CP	SYR-SpCP
500	1.84 (1.72, 1.96)	1.97 (1.70, 2.28)	1.48 (1.32, 1.66)	-6.38 (-6.45, -6.30)	-7.50 (-7.73, -7.29)	-6.19 (-6.30, -6.08)	0.566 (0.561, 0.571)	0.806 (0.793, 0.819)	0.988 (0.978, 0.997)
750	2.07 (1.76, 2.42)	1.71 (1.49, 1.96)	1.65 (1.27, 2.13)	-6.88 (-7.10, -6.68)	-6.53 (-6.69, -6.37)	-6.28 (-6.57, -6.02)	0.895 (0.879, 0.911)	0.897 (0.884, 0.910)	0.989 (0.960, N.F.)
1,000	1.70 (1.47, 1.96)	1.55 (1.07, 2.19)	1.51 (1.33, 1.70)	-6.36 (-6.52, -6.20)	-6.32 (-6.72, -5.97)	-6.51 (-6.63, -6.39)	0.907 (0.894, 0.920)	0.901 (0.870, 0.932)	0.991 (0.980, N.F.)
1,250	1.78 (1.53, 2.07)	2.26 (1.66, 3.04)	1.61 (1.26, 2.05)	-6.65 (-6.83, -6.48)	-6.25 (-6.68, -5.88)	-6.68 (-6.94, -6.44)	0.861 (0.849, 0.873)	0.860 (0.824, 0.896)	0.963 (0.941, 0.986)
1,500	1.75 (1.53, 1.99)	1.96 (1.41, 2.69)	1.50 (1.31, 1.72)	-6.63 (-6.80, -6.47)	-6.45 (-6.97, -6.02)	-6.36 (-6.50, -6.22)	0.728 (0.715, 0.741)	0.774 (0.740, 0.808)	0.866 (0.856, 0.876)

N. F. : Not Found

括弧内の値は Surface error projection 法によって推定された各パラメータの下限値（左）と上限値（右）を示す（信頼区間:68%）。

3.3.2 PPAR-リガンド相互作用の発熱量プロットの非線形フィッティング

異なるパドル先端形状を持つ 3 種類のシリンジを用いた、種々の撹拌回転数での ITC 測定から得られた発熱量プロットに対して非線形フィッティングを行った。既知の 1:1 の化学量論[53]を持つ PPAR-ロシグリタゾンの相互作用を、プログラム SEDPHAT[54]にて 1:1 の相互作用モデルを用いて解析した。図 21 および表 7 に示すように、SpCP シリンジを用いた 500、750、1000 rpm での撹拌を除くすべての条件で、結合不可能画分の存在が認められた。FP シリンジを用いた 500 rpm では結合不可能画分率が最大となり、これは発熱量 Q が最小であったことと一致した。すべてのパドルにおいて、1500 rpm のような高い速度で撹拌を行った場合では、結合不可能画分率は増加した。一方で、フィッティングにより得られた KD と ΔH は、いずれも撹拌回転数やパドルの形状と単純な相関関係を示さなかった。

3.3.3 FP シリンジで撹拌した PPAR のキャラクタリゼーション

PPAR-リガンド相互作用系では、3 種類のシリンジの中で FP シリンジにおいて高い撹拌回転数において最大の結合不可能画分率が示されたことから、以降の検討には FP シリンジを用いることとした。FP シリンジを用いて撹拌した試料について、可溶性画分と不溶性画分のキャラクタリゼーションおよびヒドロキシルラジカルの定量を行った。UV 吸収測定の結果、T_{350} は 500 rpm と 1000 rpm で撹拌後にわずかに、1500 rpm では有意に増加した（表 8)。また、この溶液を FIM で分析したところ、T350 の結果と同様に、500 rpm および 1000 rpm で撹拌した溶液では、ミクロン凝集体の数がわずかに増加していた（図 22)。凝集体濃度は、1500 rpm で撹拌した場合さらに増加した（図 22)。FIM で観測されたミクロン凝集体の粒子画像には、透明な外観と非球形の形態といった撹拌ストレスによって生成されるタンパク質凝集体の典型的な特徴[74], [75]が認められた。A280 および CD によるキャラクタリゼーションの結果、FP シリンジを用いて 1 時間撹拌したすべての溶液で、タンパク質濃度が 4.5–5.8%減少したことがわかった（図 22 および表 8)。遠心後上清を用いた CD スペクトルから、1000 rpm または 1500 rpm で撹拌した溶液では、タンパク質分子には部分的なアンフォールディングが生じていることが示された（図 22)。2 状態転移を仮定した場合のタンパク質の変性割合は、1000 rpm および 1500 rpm の溶液でそれぞれ 3.0%および 5.7%であった。加えて、高回転数で撹拌すると測定セルに充填した溶媒中にヒドロキシルラジカルの発生が認められたことから、測定中の撹拌を通して、溶液中にキャビテーションが発生していることが示唆された（表 9)。

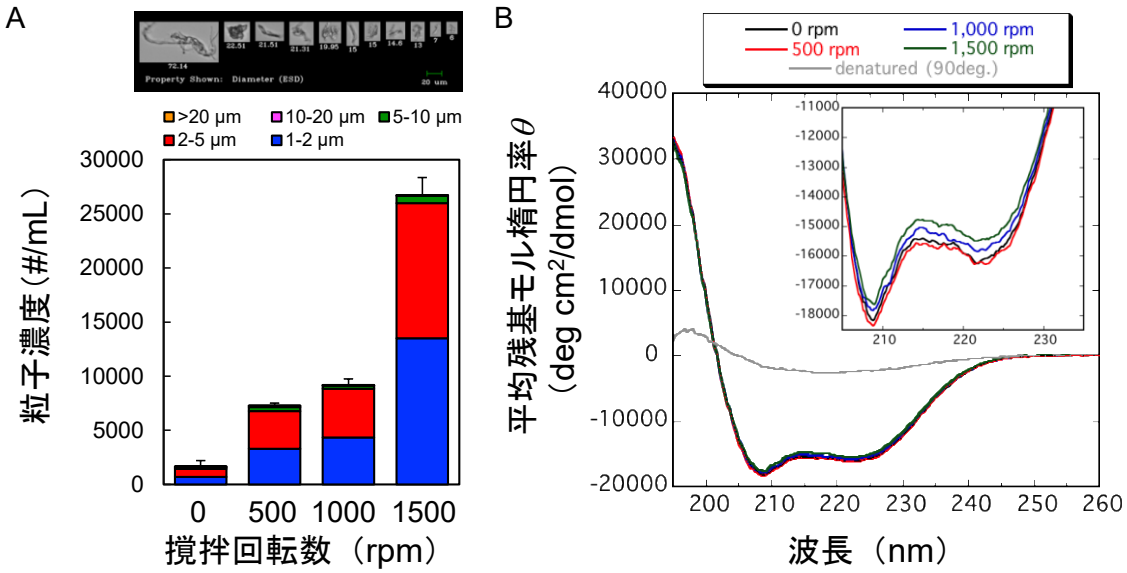


図 22 撹拌試料に含まれるミクロン凝集体と可溶性画分の特性

（A）撹拌によるミクロン凝集体の生成。上図は、FIM で得られたミクロン凝集体の代表的な画像。画像下部の値は、ESD を μm 単位で表している。エラーバーは 3 回測定による標準偏差を表す。（B）CD で評価した PPAR の二次構造に対する撹拌の影響。挿入図は 208 nm および 222 nm に観測された負の極大値付近の拡大図。

表 8 撹拌後の PPAR 溶液に含まれる可溶性画分および不溶性画分の定量結果

	撹拌回転数 (rpm)			
	0	500	1,000	1,500
不溶性画分* (%)	0	4.5	5.8	5.8
T_{350}	0.001	0.014	0.023	0.064
$\Delta\theta_{222}$ (%)	-	0.2	3.0	5.7

*試料溶液は 15000×*g*、4℃で 30 分間遠心した。遠心分離前後の A_{280} の差から不溶性画分の割合を算出した。

表 9 ヒドロキシルラジカルの定量結果

撹拌条件	ヒドロキシルラジカル
	nmol / (L min)
FP シリンジ, 1500 rpm	0.79 ± 0.02

3.3.4 抗体医薬品の抗原結合能評価および製剤条件検討への応用

滴定シリンジによる撹拌が相互作用パラメータに与える影響について、抗体

医薬品と抗原ペプチドの相互作用においても調べた。

図 23A にはリツキシマブに抗原である CD20 ペプチドを滴下した際の発熱量のプロットを示した。撹拌回転数 1500 rpm では 1000 rpm に比べて、滴定曲線は左側（低モル比側）にシフトしており、結合可能画分は小さく見積もられた（表 10 上段)。このことにより、PPARγとロシグリタゾンの系での減少と同様に、リツキシマブと CD20 ペプチドの系においても測定中の撹拌によって、測定セル内のリツキシマブの一部（約 25%）が結合能を失う可能性が示唆された。

次に用いたモガムリズマブと CCR4 ペプチドの系では、抗体医薬品が撹拌ストレスを受けた際の添加剤の有無が抗体医薬品の安定性に与える影響について抗原との相互作用の面から評価を試みた。図 23B にはモガムリズマブに抗原である CCR4 ペプチドを滴下した際の発熱量のプロットを示した。溶媒（PBS）に添加剤を加えない場合は、約 9%のモガムリズマブが結合能を失うが、各種添加剤（PS80、スクロース、あるいはヒスチジン）を加えることで、結合能を失う画分が低減された（表 10 下段)。

これらの結果は、ITC 測定が、抗原結合能の視点から抗体医薬品の撹拌ストレスへの安定性を評価する方法の一つとなりうることを示すものである。

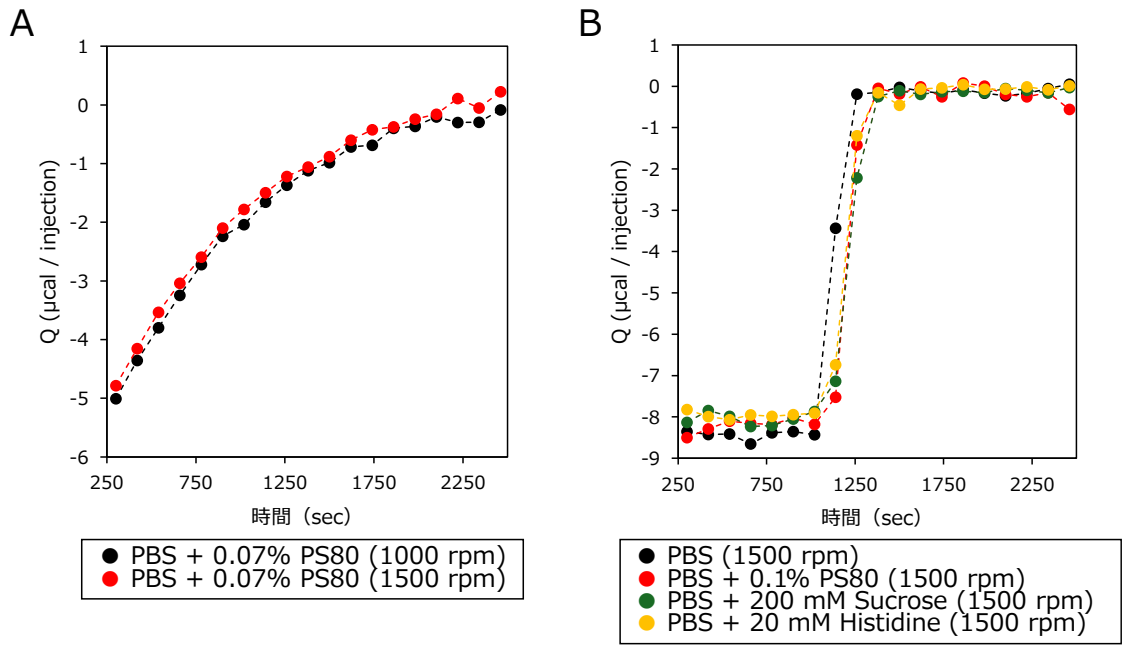


図 23 抗体医薬品と抗原ペプチドの ITC 測定結果

（A）リツキシマブと CD20 ペプチドの相互作用に伴う発熱量プロットおよび（B）モガムリズマブと CCR4 ペプチドの相互作用に伴う発熱量プロット。どちらも滴定シリンジには FP シリンジを用いた。プロット間の関係を視覚的に明示する目的で点線を加えた。

表 10 抗体医薬品と抗原ペプチド間相互作用の熱力学パラメータの要約

リツキシマブ / CD20 ペプチド			
条件	K_d（μM）	ΔH（kcal/mol）	結合可能画分
PBS + 0.07% PS80 (1000 rpm)	30.1(29.5, 30.4)	-10.3 (-10.4, -10.1)	0.990 (0.988, 1.007)
PBS + 0.07% PS80 (1500 rpm)	57.1 (57.0, 57.2)	-19.7 (-19.7, -19,7)	0.748 (0.746, 0.749)

モガムリズマブ / CCR4 ペプチド			
条件	K_d（μM）	ΔH（kcal/mol）	結合可能画分
PBS (1500 rpm)	0.44 (N. F., 3.2)	-23.6 (-23.9, -23.4)	0.910 (0.909, 0.913)
PBS + 0.1% PS80 (1500 rpm)	6.81 (2.5, 13.9)	-23.1 (-23.7, -22.5)	0.991 (0.980, N.F.)
PBS + 200 mM Sucrose (1500 rpm)	18.4 (9.9, 29.9)	-22.9 (-23.3, -22.5)	1.000 (0.990, N.F.)
PBS + 20 mM Histidine (1500 rpm)	12.6 (8.3, 18.2)	-22.7 (-23.0, -22.4)	0.980 (0.973, 0.987)

N. F. : Not Found.

3.4 考察

3.4.1 低撹拌回転数での PPAR-ロシグリタゾンの相互作用における結合不可能画分率

FP シリンジまたは CP シリンジを用い、500 rpm の撹拌回転数で滴定した場合、Q_{total} の値は、両パドルの最大 Q_{total} が得られる 750 rpm の場合に比べて有意に小さかった（図 19b)。大きな結合不可能画分率が一貫して観察された。さらに、500 rpm での初期滴定に基づく Q が小さいことは、混合が不十分であることを示唆している。また，SEGWE（Stokes-Einstein Gierer-Wirtz Estimation）法[76]を用いて算出した 25℃における水中のロシグリタゾンの拡散係数は 5.1×10^{-10} m^2/sec である。これを考慮すると、ロシグリタゾン分子が ITC セル（内径 11.0 mm×厚さ 2.2 mm）中を 10 mm を移動するのに必要な時間は、単純拡散で 10^5 秒となる。FP シリンジを 1000 rpm で撹拌させると、各滴下に伴う発熱反応は約 50 秒で完了することがサーモグラムから読み取れる（図 19D）ことから、溶液の均質化に対して撹拌回転数がどの程度寄与しているのか推定が可能と考えられる。なお、FP シリンジと CP シリンジを使用した場合、500 rpm の撹拌では完全な均質化には不十分である。また、500 rpm と 750 rpm の Q_{total} の比（$Q_{total500rpm}/Q_{total750rpm}$）は、滴定後半（滴下 10〜20 回目）ほど小さく、FP シリンジと CP シリンジを使用した 500 rpm の撹拌では混合が不十分であることを裏付けている（図 19)。反対に、SpCP シリンジを用いて 500 rpm で撹拌した場合、結合不可能画分率を生じさせることなく最大の Q_{total} が得られた。今回評価したシリンジのうち、最も高強度の機械的ストレスを付与すると考えられる FP シリンジであっても 500 rpm で撹拌した後のタンパク質溶液のキャラクタリゼーションでは、

直径 1 μm 以上の凝集体がわずかに増加したものの、タンパク質のアンフォールディングは見られなかった（図 22A)。これらの結果から、SpCP シリンジを用いた 500 rpm の撹拌は、タンパク質のフォールディングを維持しつつ、タンパク質とリガンドを均一に混合することができると考えられた。

3.4.2 高撹拌回転数での PPAR-ロシグリタゾンの相互作用における結合不可能画分率

ITC 測定結果（表 7）が示すように、1500 rpm のような高い撹拌回転数で滴定実験を行うと、3 種類のパドル全てで結合不可能画分が生じることが示された。1500 rpm の撹拌後の可溶性画分に含まれるタンパク質の CD 測定結果から、タンパク質がアンフォールドしていることが確認され、また、FIM で示されるミクロン凝集体の著しい増加も確認された（図 22)。

3.4.3 パドルの先端形状が PPAR-ロシグリタゾン相互作用に与える影響

今回得られた結果から、撹拌回転数が同じであっても、パドルの先端形状によって結合不可能画分率に対する影響が異なることが示された（図 21 および表 7)。滴定に SpCP シリンジを用いることで、タンパク質のアンフォールディングを抑えながら、最も効率的な混合が可能であると示された。FP シリンジや CP シリンジでは、Q_{total} が最大となる 750 rpm で均一に混合可能である一方、SpCp シリンジを用いた場合と比べて有意に多い結合不可能画分の発生が認められた。したがって、PPAR-ロシグリタゾン相互作用の熱力学パラメータを ITC によって正しく見積もるためには、SpCP シリンジを用いて撹拌回転数 500 rpm から 1000 rpm の範囲で滴定を行う必要があると結論される。

3.4.4 撹拌後の可溶性および不溶性画分の特性評価

滴定シリンジによる撹拌後の可溶性および不溶性画分のキャラクタリゼーション結果をもとに ITC 測定中に想定される凝集発生経路と、各測定で観測された成分を図 24 に示した。

撹拌回転数を 1000 rpm から 1500 rpm に変化させた場合、不溶性画分に変化が認められなかったにもかかわらず、液体の濁度を反映する T_{350} 値は増加した（表 8)。これは、1）今回採用した遠心分離(15000×*g*、30 分)で沈殿しない小さな可溶性の凝集体の濃度、2）図 24 の Agg_n で示される目視可能な 100 μm 以上の凝集体の平均サイズが大きくなり、結果として濁度が高くなったと解釈できる。1000 rpm 以上ではミクロン凝集体の粒子濃度が増加しているが、遠心分離後の溶液の UV 吸収測定ではこの増加は認められない。FIM で検出されたミクロン凝集体の数と大きさから計算される凝集体に含まれる単量体の濃度は最も凝集体が発生する 1500 rpm の撹拌であってもわずか pM オーダーであると推定され

る。一方、CD と UV 吸収の測定結果から、可溶性画分の総濃度を変えることなく、アンフォールドした成分が増加したと考えられた。

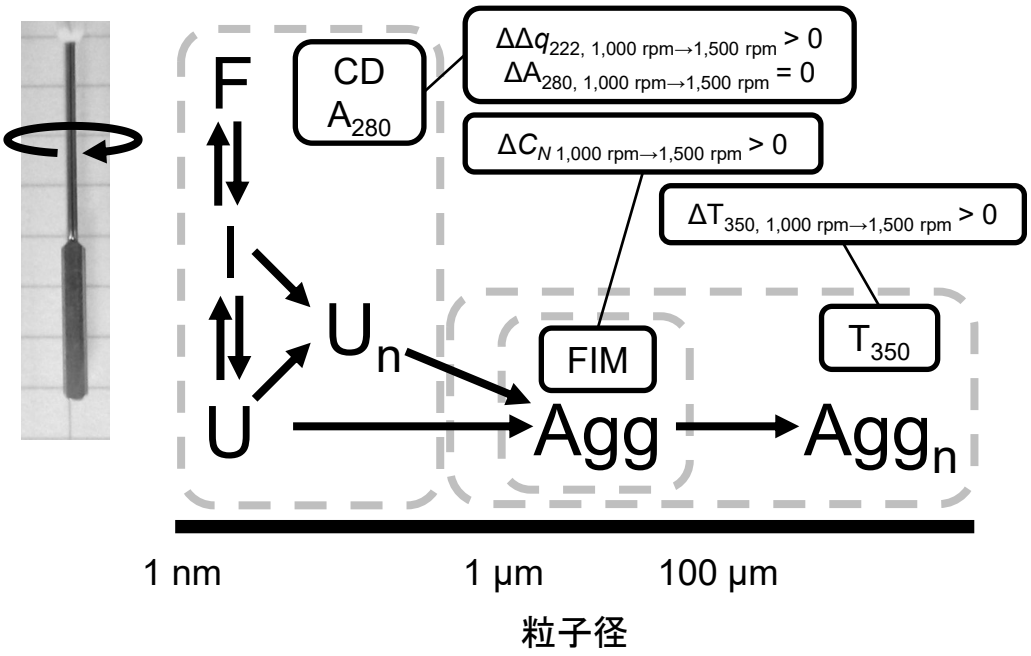


図 24 実験結果から想定される凝集体形成経路と各測定で評価される成分の要約
記号はそれぞれ、フォールドした単量体（F)、部分的にアンフォールドした中間体（I)、アンフォールドした単量体（U)、アンフォールドした単量体の多量体（Un)、ミクロン凝集体（Agg)、および目視可能な 100 μm 以上の凝集体（Agg_n）を示す。灰色の破線は、各測定の観察可能な粒径範囲を示す。撹拌回転数を 1000 rpm から 1500 rpm に上げたときのパラメータの変化を図に示した。C_N は粒子濃度を示す。

3.4.5 撹拌中の変性や凝集を抑制するために考えられる方法

タンパク質の構造安定性には温度依存性があることが知られている。変性のギブズエネルギーG は一般的に低温の方が大きいため、低温変性タンパク質[77]–[79]を除いて、低温ではほとんど変性しない。また、Lumry-Eyring モデルによれば、低温では凝集体の発生速度が遅くなるため、その発生は抑制される。ポリソルベート 20 や 80 などの界面活性剤は、固液界面に吸着し、タンパク質が界面に吸着するのを防ぐことで、タンパク質の固液界面での変性・凝集を抑制する。糖類の場合、一般に優先的水和[80]によりタンパク質の天然状態を安定化させるため、タンパク質の変性・凝集を抑制することができる。

3.4.6 ITC 測定におけるタンパク質の変性や凝集の原因として考えられるもの

1. せん断応力

凝集体の発生の度合いがシリンジの撹拌回転数に依存することが明らかになった

ことから、まず、せん断応力がタンパク質の変性や凝集に与える影響を調べた。 タンパク質の凝集過程に対するせん断の影響については、これまでに相反する報告がなされている。せん断が、リコンビナントヒト成長ホルモンの構造にわずかなコンフォメーション変化を引き起こすこと[81]、さらに、せん断速度依存的なIgG1の単量体の明確な減少が観察されている[82]。反対に、せん断単独ではタンパク質の凝集は起こらないことを示す報告もある[18], [83]。これらの相反する結果は、気液界面の有無などの実験条件の違い[68]、せん断応力を発生させる装置の違い、サイズや二次構造の種類と内容などの分子特性の違い[69], [70]などに起因すると考えられる。

回転子表面でのせん断速度 γ は、文献[84]を参考に式1を用いて算出した。

$$\boldsymbol{\gamma = \frac{2\omega {R_c}^2}{{R_c}^2 - {R_s}^2}} \qquad \text{（式1）}$$

ここで、ω は角速度、R_s は回転子の半径、R_c は撹拌軸からセル内壁までの距離を示す。ITC 装置での撹拌の状況に似ていると思われるこの式を採用することとした。今回の実験では、コイン型の熱量測定セルを備えた ITC 装置を使用したため、R_c、ひいてはせん断速度 γ は位置依存性を有するが、FP シリンジの場合、今回のせん断速度は 1500 rpm で最大で 400/sec であった。AFM 実験は、さまざまなタンパク質分子のアンフォールディングに用いられてきたが、一般に、アンフォールディングに必要な力は、α ヘリックス構造が豊富なタンパク質で約 20 pN、β-シート構造が豊富なタンパク質で約 150 pN である[85]。タンパク質に 150 pN の最大力を与えるために必要なせん断速度は 5×10^7/sec と見積もられている[83]。ITC セル内のせん断速度（約 400/sec）はこの値よりもはるかに小さく、このオーダーのせん断速度では有意なタンパク質のコンフォメーション変化は起こらないことがいくつかの研究で示されている[86], [87]ことから、ITC 実験ではせん断応力単独による変性はほとんど起こらないと結論づけるのが妥当と考えられる。

2. 吸着を介した界面変性と凝集

タンパク質がステンレスやガラスなどの固体表面に吸着することはよく知られている[19], [88], [89]。水晶振動子マイクロバランス（QCM）測定によるリアルタイム観察から、ステンレス表面への吸着過程が数分から数十分という時間スケールで起こることが示されている[90]–[92]。したがって、ITC 実験中にタンパク質がステンレス製シリンジの表面に吸着する可能性が考えられる。これまでの研究では、タンパク質が固体表面への吸着することによって、立体構造変化が生じることが示されている[57], [93]–[95]。さらに、mAb を用いた研究では、凝集の原因が表面を介したプロセス、例えば、固体表面との相互作用に伴うアンフォールディングであることが示唆されている[19], [96]。ステンレス鋼表面に吸着した第一層目の mAb 分子は不可逆的にステンレス鋼表面に吸着しており、バルク

中の mAb 分子とはほとんど交換されない。この不可逆的に結合したタンパク質の層が鋳型となって、タンパク質の吸着や構造変化が起こり、さらなる層を形成すると考えられている。吸着分子層の上層（バルク側）に存在する分子の吸着はかなり不安定なので、撹拌中に層の崩壊が起こり、その結果、サブミクロン凝集体およびミクロン凝集体としてバルク中に放出されることになる。このように、吸着と固液界面の変性に焦点を当てた考察は、今回得られた CD と FIM の結果を説明することが可能である。

3. キャビテーション

通常、液体が急激な圧力変化にさらされ、比較的圧力の低い部分が形成されると、その場には空隙が生じる。この現象はキャビテーションと呼ばれる。水中でプロペラを高速回転させると、回転方向とは反対側のプロペラ表面付近にキャビテーションが発生することはよく知られている。同様に、今回の ITC 測定中の撹拌によってもキャビテーションは発生するのではないかと推測された。事実、テレフタル酸（TPA）とヒドロキシルラジカルの反応によって生成されるヒドロキシテレフタル酸（hTPA）を検出することでキャビテーションの発生の有無を評価した今回の実験では、高回転数で撹拌すると測定セルに充填した溶媒中にキャビテーションが発生することが確認された（表 10）。

タンパク質溶液を入れたバイアルやシリンジを落下させると、各容器が接地する際、溶液内にキャビテーションが発生し、凝集が促進される [20], [97], [98]。このことを考えると、ITC 実験中の撹拌によってキャビテーションが発生し、それによりタンパク質の凝集が促進されることは想像に難くない。ここでは、過去の報告[85]に従い、水中でのキャビティー形成の自由エネルギー変化 ΔG_{cav} を算出した。なお、ΔG_{cav} とキャビティーの半径との関係を簡略化するために、文献[99]の表 1 に記載されている 22 個の値をすべて用いて以下の式を算出した。

$$\Delta G_{cav} = 0.3764 \times B^3 - 0.3764 \times B^2 + 0.2006 \times B - 0.0708 \qquad \text{（式 2）}$$

ここで、B はキャビティーの半径(Å)を示す。

この式に基づくと、仮に 10 μm のキャビティーが形成された場合、それに伴うエネルギー変化 ΔG_{cav} は 4.7×10^{13} kcal/mol と計算される。この値は、典型的な球状タンパク質の変性のΔG（25 kcal/mol 程度）よりもはるかに大きい。キャビティー形成に伴う自由エネルギー変化の全てが、キャビティー周囲に存在するタンパク質分子の変性に使われると仮定すると、直径 10 μm のキャビティーが形成された場合、周辺 1.9×10^{12} 分子のタンパク質が変性することになる。さらに、このタンパク質の直径を 10 nm と仮定し、これがキャビテーションで変性・凝集し、1 μm の凝集体を形成すると仮定すると、1.9×10^{6} 個の粒子が生じる計算になる。

熱量測定セルに充填されたタンパク質の変性と凝集は、せん断応力によって引き

起こされるのではなく、タンパク質の固体表面への吸着および、または撹拌時のキャビテーションによって生じると考えられる。これまでに、低いせん断速度（$<10^3$/sec）でも、タンパク質が固液界面や気液界面に吸着すると、タンパク質の構造変化や凝集が促進されることが示されている[100], [101]ことから、これらの要因が単独または複合的にタンパク質の変性や凝集に関与していると考えられる。

3.5 本章の結論

ITC は、溶液中の分子間相互作用解析のゴールドスタンダードとして、様々な分野で利用されている。正確な熱力学パラメータを決定するためには、正確な濃度決定と適切な濃度条件での測定が重要である。

本研究では、ITC 滴定用シリンジの先端形状と撹拌回転数がタンパク質の安定性と混合効率、観測される熱量変化プロファイルに影響を与えることを実証した。タンパク質-リガンド相互作用の ITC 測定において、シリンジの撹拌回転数が低すぎても高すぎても正しい総反応熱が得られないことを示した本項の知見は、一般性があり、他の系にも適用可能であるものと考えられる。これは、総反応熱に影響を与える撹拌回転数は、タンパク質の立体構造や溶液の状態によって異なるが、総反応熱の減少の原因は、低いシリンジ撹拌回転数では混合が不十分であること、高いシリンジ撹拌回転数では変性・凝集が起こることにある。そのため、ITC 実験を始める際には、撹拌デバイスの形状の考慮と撹拌回転数の最適化が非常に重要であると言える。

第 1 部の結論

第 1 部では、抗体医薬品の凝集形成メカニズムについて、第 2 章および第 3 章において検討を行った。その結果、凝集形成は単一の要因によって生じるものではなく、分子表面への吸着挙動、界面との相互作用、ならびに操作条件といった複数の因子が関与する現象であることが示された。これらの結果は、凝集形成に関与する要因を検討する際に、分子の熱力学的安定性以外の観点も考慮する必要があることを示唆している。

第 2 部：アデノ随伴ウイルスベクターの包括的品質評価法の開発と応用

第 4 章 多波長検出超遠心分析沈降速度法による AAV ベクターの包括的分散状態評価方法の確立

4.1 背景

AAV ベクターは、その高い安全性と広範な組織指向性から、*in vivo* 遺伝子治療に

おける最も有望なプラットフォームとして急速に台頭している。実際に、2024 年末までに 8 種類の AAV ベクター医薬品が上市されるなど、その臨床的有用性は広く認められている。AAV ベクターは、3 種類の VP から成る正二十面体カプシド内部に、多くの場合、治療遺伝子としての一本鎖 DNA（ssDNA）を内包した、極めて精緻かつ複雑な構造を有する。しかし、この構造の複雑さゆえに、AAV ベクターの製造工程では、目的とする治療遺伝子を正しく内包した FP の他に EP、不完全な遺伝子断片を含む PP、OP そして複数の粒子が会合した凝集体が形成されることがある。これらは標的細胞表面の受容体と相互作用することで完全粒子と競合し、完全粒子による治療効果を低下させるだけでなく、免疫原性を引き起こす可能性がある。加えて、AAV ベクターの凝集体も治療効果を低下させる要因の一つであると考えられる。このため、AAV ベクターの製造過程および製造後の試料について、その分散状態を正確に知ることが重要である。事実、FDA、EMA、PMDA といった各国の規制当局は、EP の数や完全粒子比（=[FP]/([EP]+[FP])）を重要な評価項目として挙げ、その厳格な管理を求めている。したがって、これらの多様な粒子成分それぞれを正確に定量し、分散度を評価することは、AAV ベクターの品質管理における最も重要な課題の一つである。

既存の AAV ベクター分析法の限界

AAV ベクターの分散度評価を行うために、いくつかの分析法が用いられてきたが、それぞれに限界があった。

・陰イオン交換クロマトグラフィー法

少量試料で迅速に分析できる利点があるものの、EP と FP を完全に分離するためには、血清型ごとにカラムや移動相、溶出条件の最適化が必要であり、煩雑さが伴う。また、ベクターがカラム担体に吸着することで定量性に影響が出る可能性も懸念される。

・透過型電子顕微鏡法

ナノメートルスケールの分解能により、AAV ベクターを直接観察できる唯一のイメージング技術である。AAV ベクターに対して負染色を施した場合、EP においては染色剤がカプシド内部に浸透することでカプシドタンパク質部分とは電子線の透過率に差が生じる。このため、得られる顕微鏡像中、粒子の内部が染色されたカプシドは EP、内部が染色されていないカプシドは FP に対応するとみなされる。このとき考慮されるべきこととして、EP の個数の過小評価、つまり、空のカプシドに染色剤がうまく浸透せず、FP との区別が困難になる点が挙げられる。加えて、視野内の観察に限定されるため、観察結果が試料全体の分散状態を反映しているとは限らないことにも注意が必要である。事実、TEM の直接観察により得られる完全粒子比について陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）および SV-AUC で得られた結果と良い一致を示す報告[102]がある一方、SV-AUC の結果と一致しないとの報告[103]もあることから TEM の観察結果に基づいた EP と FP の比率

の議論は慎重に進める必要があると考えられる。

・吸光度法（A260/A280 比）

UV 分光光度計で測定される A260/A280 比は、純度の簡便な指標として広く用いられてきた。しかし、この手法は EP と FP 以外の不純物（遊離 DNA や宿主細胞由来タンパク質など）が存在する場合、その影響を排除できず、正確な EP と FP の比率の算出が困難であると考えられる。

SV-AUC の利点と課題

このような背景から、溶液中での粒子の分散状態を高い分解能で評価できる強力な手法として、AUC の手法の一つである SV-AUC が注目されている。SV-AUC は遠心力場での分子の沈降挙動を外部装置によって連続的に取得し、得られた沈降パターンの解析から溶質分子の分散状態を定量評価する分析手法である（図 25）。遠心力場において、溶質分子には遠心力、浮力、摩擦力が作用する。この 3 つの力が釣り合って溶質分子は一定速度で沈降する。この時の測定セル内の濃度分布の時間変化は以下の Lamm 方程式により記述される。

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(s\omega^2 r^2 c - Dr\frac{\partial c}{\partial r}\right) \qquad \text{（式 3）}$$

Lamm 方程式には解析解は知られていないが、数値解析により未知変数を決定できる。つまり、ある沈降係数と拡散係数を与えたときの濃度分布は Lamm 方程式によりシミュレートできるので、実測値を再現できる沈降係数と拡散係数を探索し求められる。Lamm 方程式は 1 種類の溶質の沈降を表現する方程式であるが、観測される沈降パターンを複数の分子種の沈降パターンの和と見なすことで、Lamm 方程式の重ね合わせとして解析可能となる。この数値解析による沈降パターンの解析にはプログラム SEDFIT[104]の $c(s)$解析（サイズ分布解析）が用いられることが多い。サイズ分布解析により対象試料の分散状態を沈降係数の分布として得ることができ、さらに、分子量、拡散係数、摩擦係数比、おおまかな分子形状などの情報を成分数を仮定することなく取得できる。

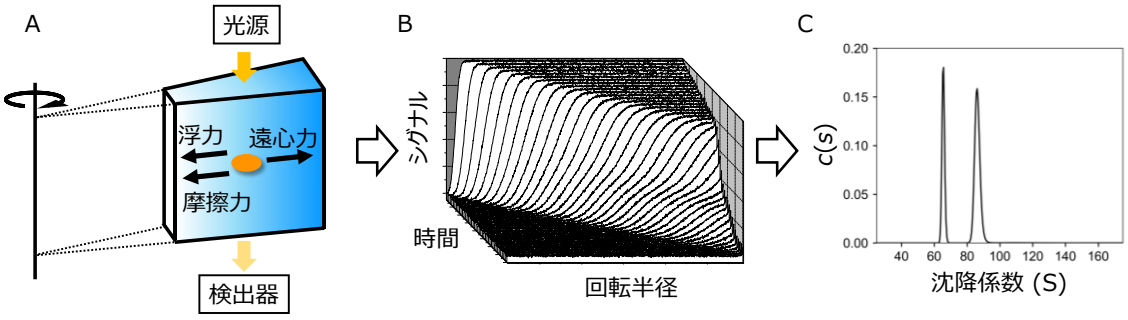


図 25 超遠心分析沈降速度法の概要

（A）遠心力場において溶質分子に作用する力。溶質分子の沈降に伴う濃度変化を外部装置(光源・検出器）により観察する。（B）遠心開始直後からセル内に含まれる溶質分子が完全に沈降するまでのプロファイルを取得する。（C）Lamm 方程式に対する数値解析の結果得られる沈降係数分布。決定される沈降係数と摩擦係数比から各ピーク成分の分子量を見積もることが可能となる。

SV-AUC はカラムや化学修飾（染色）を必要とせず、第一原理に基づいているため、近年、AAV ベクターの分散状態分析における「ゴールドスタンダード」の一つと認識され、申請者が論文発表した 2021 年以降、学術論文でもその旨の明記が認められるようになってきた。。

しかし、従来の SV-AUC にも解決すべき課題があった。第一に、ピークの明確な同定が困難であるという点である。AAV ベクターの SV-AUC 分析では、カプシドに内包される核酸の鎖長に依るものの概ね沈降係数（*s* 値）90–100 S、60–70 S 付近の成分がそれぞれ FP、および EP とみなされてきた。しかしこれは他の分析結果との整合性から導き出されたものであって、超遠心分析結果から行われるべき対象ピークの分子量や吸光特性に基づいたものではないという決定的な問題を抱えていた。SV-AUC で得られる沈降係数から粒子の分子量を正確に算出するには、偏比容（v-bar）や摩擦係数比（f/f_0）といった物理化学的パラメータが不可欠であるが、これらの値はしばしば理論値や文献値に依存しており、その不確かさがピーク同定の曖昧さにつながっていた。

第二には検出波長数の限界である。従来の SV-AUC はその装置上の制限から主に核酸の極大吸収波長 260 nm やタンパク質の極大吸収波長 280 nm といった、いずれか単一の波長で測定されてきた。この方法では、*s* 値が近い粒子群、例えば EP と PP などを区別し、それぞれの正体を特定することは極めて困難であった。近年、複数の波長で同時に沈降プロファイルを測定できる新しい AUC 装置が登場し、この課題を克服する道が開かれた。カプシド（タンパク質）と ssDNA（核酸）はそれぞれ特有の UV 吸収スペクトルを持つため、この多波長検出機能を活用すれば、各粒子の組成に関する詳細な情報を得られる可能性があると考えられた。

そこで本研究では、調製した試料に主として含まれる沈降係数 95 S、65 S 付近の成分の偏比容を実験的に決定し、算出したそれぞれの成分の分子量に基づいて、成分の帰属を試みる。

次に、沈降挙動の観察を複数の波長を用いることによって、解析の結果得られる沈降係数分布の波長依存性を調べる。これにより、カプシドならびに内包される核酸のUV吸収プロファイルを導出することができる。MW-SV-AUC で取得した多波長データとスペクトル分解解析を組み合わせることで、各粒子のタンパク質と核酸の組成比を直接的に算出し、従来法では不可能であった PP や凝集体の正体を特定する。

本研究の目的は、この MW-SV-AUC を用いて、AAV ベクター製剤に含まれる粒子群（FP、EP、PP、凝集体）を包括的に同定・定量する新たな分析ワークフローを確立することである。本研究で開発する手法は、AAV ベクターの品質評価の精度を飛躍的に向上させ、より安全で有効な遺伝子治療薬の開発に貢献するものである。

4.2 試料と方法

4.2.1 AAV ベクターの調製

全ての測定に用いた AAV ベクター試料は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合から提供を受けた。製造方法を以下に簡単に記す。ヘルパープラスミド、RepCap プラスミドおよび目的遺伝子を組み込んだプラスミドを用いたトリプルトランスフェクション法により HEK293T 細胞に計 3 つのプラスミドをトランスフェクションした。この時の RepCap プラスミドは、血清型 1 型、2 型、5 型、6 型の Cap 遺伝子をコードするものをそれぞれ用いた。細胞破砕後上清から回収した AAV ベクター試料をアフィニティークロマトグラフィーおよび塩化セシウム密度勾配超遠心により精製し、最終精製物を取得した。以下、それぞれ AAVXfp（X：血清型番号）と称することとする。EP の調製にはトランスフェクション時に目的遺伝子を組み込んだプラスミドを用いず、ヘルパープラスミドおよび血清型 5 型の RepCap プラスミドのみを用いるダブルトランスフェクション法により調製・精製した試料を準備した。以下、AAV5ep と称することとする。

4.2.2 SV-AUC 測定用試料の調製

98% $H_2{}^{18}O$ は大陽日酸、10×PBS は Thermo Scientific、Poloxamer 188（European pharmacopeia reference standard）は Sigma-Aldrich、その他の試薬はすべて富士フイルム和光純薬から購入した。密度コントラスト SV-AUC には、AAV5ep と AAV5fp を用いた。AAV5ep と AAV5fp は、Amicon Ultra 0.5 (MWCO 30kDa)（Merck Millipore 社製）を用いて、1 cm 光路長での吸光度が AAV5ep は 280nm で 0.95、AAV5fp は 260nm で 0.75 になるように濃縮した。なお、濃縮した試料は $H_2{}^{18}O$ の終濃度が 0%、32.5%、65% となり、かつ 1 cm の波長での吸光度が約 0.25 になるように調製した。その他の SV-AUC 実験では、提供を受けた各 AAV ベクター試料を光路長 1 cm での吸光度が約 0.25 になるように希釈または Amicon Ultra 0.5 (MWCO 30kDa)を用いて濃縮した。

4.2.3 密度コントラスト SV-AUC

AAV5 の FP および AAV5 の EP の偏比容を決定するために、密度コントラスト SV-AUC 実験を行った。溶媒には上述した濃度の $H_2{}^{18}O$ と 0.001% w/v ポロキサマー188 を含む PBS (pH7.4)を用いた。2 枚のサファイアウインドウで 12 mm ダブルセクター型のチャコールエポンのセンターピースを挟み込み、測定セルを組み立てた。センターピースのサンプルセクターに 390 µL の AAV ベクター試料を、リファレンスセクターに 400 µL の溶媒を充填した。データは、Optima AUC（Beckman Coulter 社）を用いて、10,000 rpm で 20℃の温度で取得した。沈降パターンの検出には UV 吸収光学系およびレイリー干渉（IF）光学系を用いた。UV 吸収光学系の検出波長は、$H_2{}^{18}O$ の終濃度が 0%の試料では 230 nm から 280 nm の範囲で 5 nm ごとに設定した。$H_2{}^{18}O$ を 32.5%、あるいは 65%含む AAV5ep と AAV5fp については検出波長を 230 nm とした。データは半径方向に 10 µm 刻みで取得した。IF 検出では、120 秒ごとにデータを収集した。他の AAV 血清型試料の多波長 SV-AUC については、$H_2{}^{18}O$ の終濃度が 0%の AAV5ep および AAV5fp と同様の方法でデータを取得した。

密度コントラスト SV-AUC による粒子の偏比容の決定の理論的根拠は以下の通りである。SV-AUC から実験的に決定された沈降係数は、式 4 に示されるように、溶媒の密度、粘度、および溶質の偏比容に依存する。したがって、ある溶質の SV-AUC 実験を密度と粘度の異なる溶媒中で行うことにより、溶質の偏比容を決定することができる。

$$s_{20,w} = s_{exp1}\frac{\eta_{exp1}}{\eta_{20,w}}\frac{(1-\bar{v}\rho_{20,w})}{(1-\bar{v}\rho_{exp1})} = s_{exp2}\frac{\eta_{exp2}}{\eta_{20,w}}\frac{(1-\bar{v}\rho_{20,w})}{(1-\bar{v}\rho_{exp2})} \quad \text{（式 4）}$$

ここで、s は沈降係数（S）、vbar は偏比容（cm^3/g）、溶媒密度（g/mL）および溶媒粘度（cP）を示す。添え字の 20, w および exp は、それぞれ 20℃の水中および各実験条件での値を表す。

4.2.4 SV-AUC のデータ解析

取得したデータは、プログラム SEDFIT（バージョン 16.2b）[104]に実装された continuous c（s）distribution model を用いて、摩擦比、メニスカス、時間非依存ノイズ、半径非依存ノイズを変数に設定した。正則化レベルは 0.68 に設定した。数値解析は沈降係数範囲 0〜250 S、0.5 S 毎に行った。溶媒密度および粘度はプログラム SEDNTERP[105]を用いて溶媒組成に基づきそれぞれ 1.00500 g/mL、1.0171 cP と計算した。偏比容は 0.68 cm^3/g とした。これらの設定は、他の血清型の AAV ベクター試料の多波長 SV-AUC についても同様である。密度コントラスト SV-AUC については、32.5%と 65%の $H_2{}^{18}O$ を含む

溶媒の密度と粘度を、文献[106]に従って以下のように計算した。

$$\boldsymbol{\rho = 0.1079 \times F_{H_2{}^{18}O} + \rho_0} \quad \text{（式 5）}$$

$$\boldsymbol{\eta = 0.0495 \times F_{H_2{}^{18}O} + \eta_0} \quad \text{（式 6）}$$

ここで、F $H_2{}^{18}O$ は $H_2{}^{18}O$ の割合、ρ_0 およびη_0 はそれぞれ PBS の密度（g/mL）および粘度（cP）を表す。

プログラム SEDPHAT[107]の "Hybrid Global Discrete Species Global Continuous Distribution "モデルを用いて、$H_2{}^{18}O$ 濃度の異なる溶媒中の AAV5ep または AAV5fp の沈降プロファイルをグローバルフィットさせ、偏比容を決定した。次に、沈降係数分布を定義し、沈降係数と摩擦係数比（f/f_0）から各成分の分子量を算出した。*c*(*s*)分布の図はプログラム GUSSI を用いて作成した[108]。沈降係数は、総 UV 吸収シグナルに対する相対的な平均二乗偏差(RMSD)が最小を示した検出波長 230 nm で得られた見かけの値(s_w)を記した。

4.2.5 AAV-EP と AAV-FP の沈降係数分布のピーク面積の波長依存性

AAV 5 の EP（以下、AAV5-EP と称する）および AAV5 の FP（以下、AAV5-FP と称する）の各検出波長におけるピーク面積 As(λ)は、それぞれ AAV5ep および AAV5fp 試料の *c*(*s*)分布における主要ピークを積分することにより得た。

4.2.6 分子量計算

VP1、VP2 および VP3 タンパク質の分子量はプログラム SEDNTERP を用いて各 VP タンパク質のアミノ酸組成に基づいて算出した。AAV-EP の分子量は、カプシド 1 分子には VP1:VP2:VP3 が 5:5:50 の比で含まれていると仮定して計算した[24], [109]。ssDNA の分子量は、設計された DNA 配列に基づいて 801507.6 Da と算出した。

4.2.7 偏比容計算

AAV-EP の偏比容はプログラム SEDNTERP[105]を用いてそのアミノ酸組成から計算した。AAV-FP の偏比容は、以下の式を用いて算出した。

$$\boldsymbol{vbar_{AAV-FP}} = \frac{\boldsymbol{vbar_{AAV-EP} \times Mw_{AAV-EP} + vbar_{ssDNA} \times Mw_{ssDNA}}}{\boldsymbol{Mw_{AAV-EP} + Mw_{ssDNA}}} \quad \text{（式 7）}$$

ここで、$vbar_{AAV\text{-}FP}$, $vbar_{AAV\text{-}EP}$, $vbar_{ssDNA}$ は、それぞれ AAV-FP、AAV-EP および

ssDNA の偏比容（cm^3/g）を示す。$vbar_{ssDNA}$ は、SV-AUC から得られた AAV5-EP と AAV5-FP の偏比容を用いて、式 7 を用いて 0.52 cm^3/g と計算された。これは文献[110]で述べられた値とよく一致していた。

4.2.8 屈折率増分（dn/dc）計算

AAV-EP の dn/dc はプログラム SEDFIT[104]を用いてそのアミノ酸組成から計算した。この時、カプシド 1 分子には VP1:VP2:VP3 が 5:5:50 の比で含まれていると仮定した。

AAV-FP の dn/dc は以下の式を用いて算出した。

$$\boldsymbol{dn/dc_{AAV-FP}} = \frac{\boldsymbol{dn/dc_{AAV-EP}} \times \boldsymbol{Mw_{AAV-EP}} + \boldsymbol{dn/dc_{ssDNA}} \times \boldsymbol{Mw_{ssDNA}}}{\boldsymbol{Mw_{AAV-EP}} + \boldsymbol{Mw_{ssDNA}}} \quad \text{（式 8）}$$

ここで，$dn/dc_{AAV\text{-}FP}$，$dn/dc_{AAV\text{-}EP}$，dn/dc_{ssDNA} は，それぞれ AAV-FP、AAV-EP、および ssDNA の屈折率増分（mL/g）を示す。なお、ssDNA の dn/dc は、文献[111]から 0.21 mL/g と算出した。

4.2.9 モル吸光係数の決定

各波長における AAV5-FP、AAV5-EP、その他の AAV-FP のモル吸光係数を以下のようにして求めた。

$$\boldsymbol{\varepsilon(\lambda)} = \frac{\boldsymbol{As(\lambda)} \times \boldsymbol{dn/dc} \times \boldsymbol{Mw}}{\boldsymbol{\Delta J} \times \boldsymbol{\lambda_{IF}}} \quad \text{（式 9）}$$

ここで、ε はモル吸光係数（L/mol/cm）、dn/dc は屈折率増分（mL/g）、Mw は分子量（kg/mol）、ΔJはフリンジ変化、λ_{IF} は干渉光学系レーザーの波長（cm）を示す。

各波長における ssDNA のモル吸光係数は、AAV5-FP の値から AAV5-EP の値を差し引くことで求めた。

$$\boldsymbol{\varepsilon_{ssDNA}(\lambda)} = \boldsymbol{\varepsilon_{AAV5-FP}(\lambda)} - \boldsymbol{\varepsilon_{AAV5-EP}(\lambda)} \quad \text{（式 10）}$$

4.2.10 多波長 SV-AUC による PP と凝集体の識別

PP および凝集体の同定は、11 の検出波長と各 AAV-EP および ssDNA のモル吸光係数とのプロットを用いて重回帰分析を行い、後述の偏回帰係数（α および β）を決定

した。

$$\boldsymbol{A_{obs}(\lambda) = Area_{capsid}(\lambda) + Area_{ssDNA}(\lambda)} \quad (式\ 11)$$

$$\boldsymbol{Area_{capsid}(\lambda) = \alpha \times \varepsilon_{capsid}(\lambda)} \quad (式\ 12)$$

$$\boldsymbol{Area_{ssDNA}(\lambda) = \beta \times \varepsilon_{ssDNA}(\lambda)} \quad (式\ 13)$$

ここで、A_{obs}、$Area_{capsid}$、および$Area_{ssDNA}$は、それぞれ、サイズ分布解析により観測された沈降係数ピーク面積、およびカプシドと ssDNA の沈降係数ピーク面積であり、ε_{capsid}とε_{ssDNA}は、それぞれカプシドと ssDNA のモル吸光係数（L mol^{-1} cm^{-1}）である。
カプシドの濃度を C_{capsid}、未知の粒子に含まれるカプシドと ssDNA の数をそれぞれ n_{capsid} と n_{ssDNA} とすると、α と β は測定セルの光路長（1.2 cm）を考慮して、以下のように表される。

$$\boldsymbol{\alpha = 1.2 \times C_{capsid} = 1.2 \times C_{particle} \times n_{capsid}} \quad (式\ 14)$$

$$\boldsymbol{\beta = 1.2 \times C_{ssDNA} \times n_{ssDNA} = 1.2 \times C_{particle} \times n_{ssDNA}} \quad (式\ 15)$$

PP や凝集体に含まれる ssDNA 粒子の数を以下のように算出した。

$$\boldsymbol{N_{nucleotide} = N_{AAV-FP} \times \frac{n_{ssDNA}}{n_{capsid}} = N_{AAV-FP} \times \frac{\beta}{\alpha}} \quad (式\ 16)$$

ここで、$N_{\mathrm{nucleotide}}$ は PP または凝集体に含まれる ssDNA 粒子の数、$N_{\mathrm{AAV\text{-}FP}}$（2,599 と予想）は本研究で使用した FP に内包された ssDNA の数、n_{ssDNA} と n_{capsid} はそれぞれ PP または凝集体に含まれる ssDNA とカプシドの数である。

4.2.11 多波長検出 SV-AUC における検出波長の選択

式 14 および式 15 で示される偏微分係数 α および β を決定するための検出波長について、必要最小数と選択されるべき波長の領域について検討を行った。それぞれの ssDNA 割合を持つ成分について、各波長で実験的に求めたノイズを加えて成分の面積プロットを作成した。2 波長での検出から得られたデータを用いて計算した係数 α および β と 11 波長の実験から求めた偏微分係数 α および β と比較した。

4.3 結果と考察

4.3.1 AAV 試料に含まれる成分のキャラクタリゼーション

図 26A に AAV ベクター試料の SV-AUC における典型的な沈降プロファイルとフ

ィッティング残差を示す。AAV5-EP と AAV5-FP の偏比容は、$H_2{}^{18}O$ の濃度を変化させた緩衝液を用いた密度コントラスト SV-AUC 実験を AAV5-ep および AAV5fp で実施することで決定した（図 26B)。SEDPHAT を用いたグローバルフィッティングから求めた AAV5ep 試料の主要成分の偏比容は 0.722 cm^3/g であり、アミノ酸組成から計算した値 0.718 cm^3/g とよく一致した。グローバルフィッティングの結果、f/f_0 は 1.33 となった。沈降係数の分布を図 26B に示す。主要成分の 67.3 S（$s_{20,w}$）における分子量は、f/f_0、溶媒密度および粘度を用いて計算した結果、3695.9 kDa となり、アミノ酸組成から計算した値 3705.5 kDa とよく一致した。同じく SEDPHAT を用いたグローバルフィッティングから求めた AAV5-fp の主要成分の偏比容は 0.686 cm^3/g で、計算値 0.687 cm^3/g とよく一致した。沈降係数 93.7 S（$s_{20,w}$）の成分の分子量について、f/f_0、溶媒密度および粘度を用いて求めた計算値は 4914.2 kDa であり、SV-AUC により決定される分子量の典型的な誤差の範囲内で FP の計算値（4507.0 kDa)と一致した。以上により、AAV5ep 試料で観測された 67.3 S（$s_{20,w}$）および AAV5fp 試料で観測された 93.7 S（$s_{20,w}$)の成分が、それぞれ AAV5 の EP と FP であると結論づけた。

MW-SV-AUC 測定結果により得られるこれら AAV5-EP および AAV5-FP のピークについて、それらの面積の波長依存性をプロットした（図 26C)。以上より、AAV5-EP および AAV5-FP の吸収スペクトルを導出した。

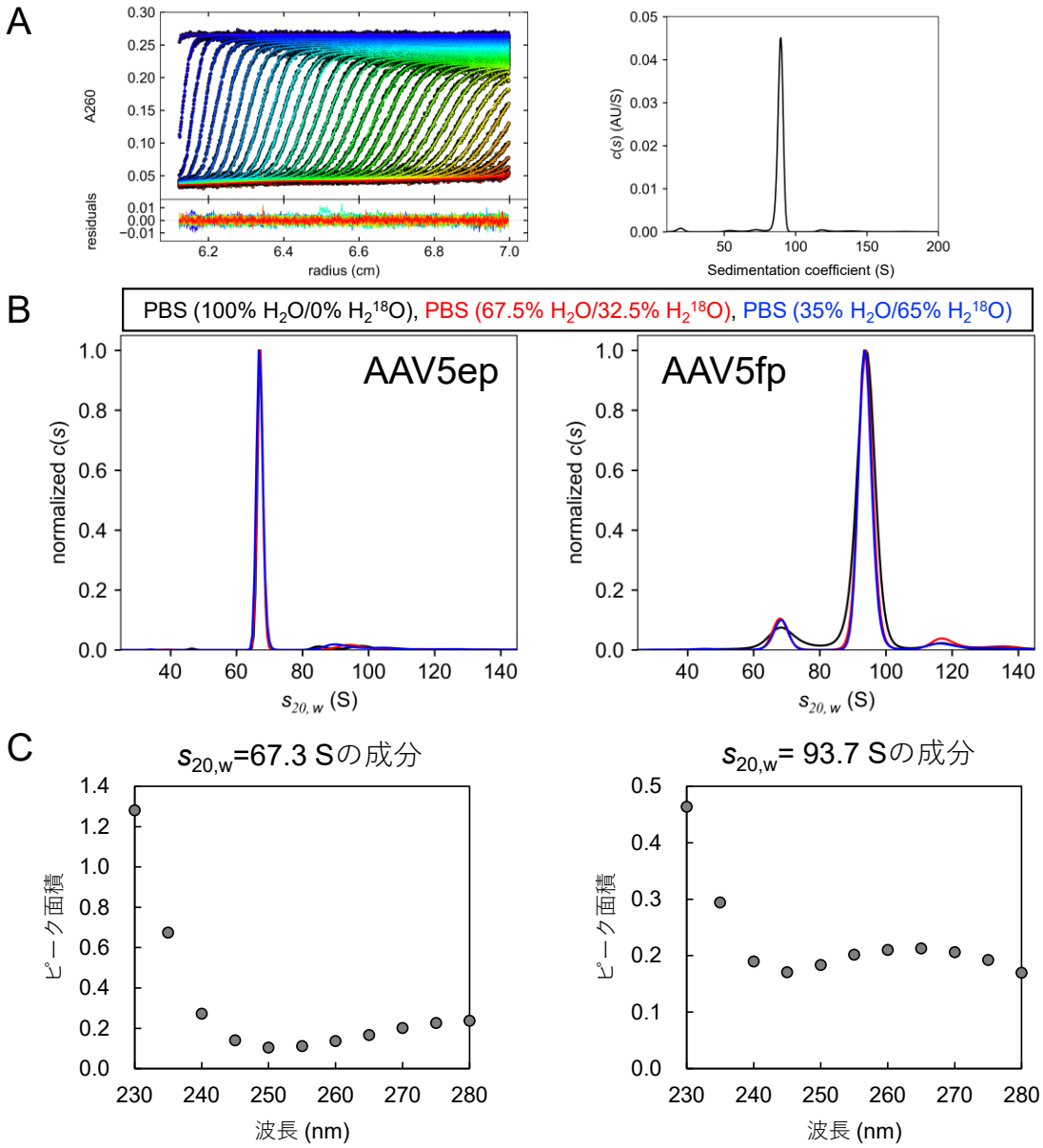


図 26 AAV-EP および AAV-FP 成分の特性評価
（A）AAVベクターの典型的な沈降プロファイル（左）、とSEDFITのサイズ分布解析により得られる沈降係数分布（右）。（B）密度コントラストSV-AUC実験におけるAAV5ep（左）とAAV5fp（右）の0 (黒)、32.5 (赤)、65% (青)の$H_2{}^{18}O$溶媒での沈降係数の分布図を重ね合わせたもの。沈降係数分布は、計算により求めた溶媒密度および粘度に加えて、実験的に決定された各成分の偏比容を用いて規格化した。(d) $s_{20,w}$=67.3 成分および93.7 S成分の多波長SV-AUC測定から得られた各波長でのピーク面積。

4.3.2 多波長検出 SV-AUC による AAV5-EP および AAV5-FP の吸収スペクトルの決定

AAV5ep 試料および AAV5fp 試料について多波長 SV-AUC のサイズ分布解析から求めた各波長でのピーク面積の総和は、AAV5ep 試料および AAV5fp 試料それぞれの測定

前に UV-VIS 分光光度計で測定した UV 吸収スペクトルと非常に良い一致を示した（図27)。このように、多波長 SV-AUC のサイズ分布解析から、各成分の吸収スペクトルの取得が可能であることが示された。同時に、この結果から、EP や FP 以外の成分の吸収が含まれる UV-VIS 分光光度計で測定したスペクトルから EP あるいは FP の吸光度を求めることには限界があることが示された。

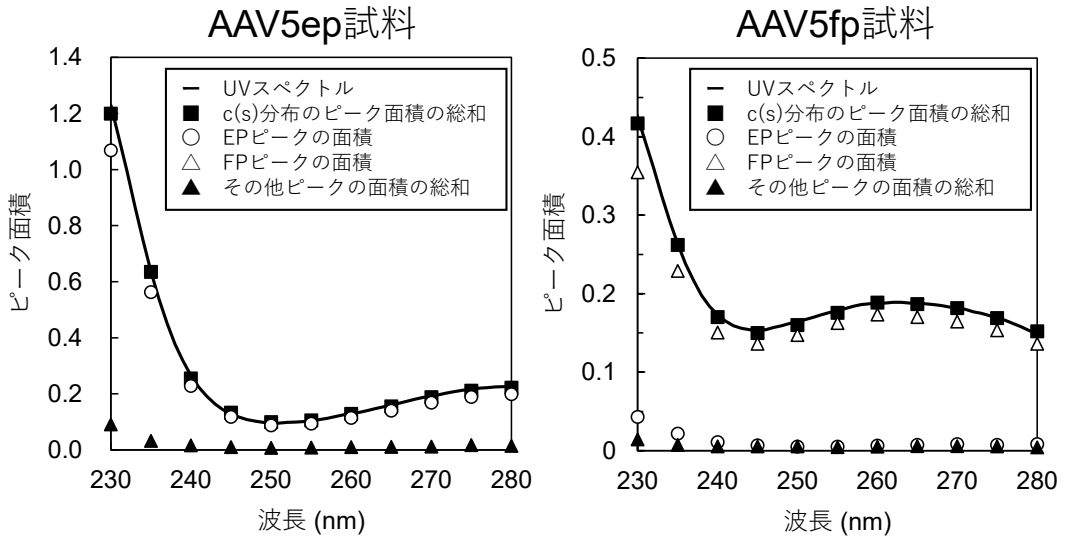


図 27 UV 吸収シグナルの整合性

AAV5ep試料およびAAV5fp試料のUV-VIS分光光度計で得られたUV吸収スペクトルと、多波長SV-AUCの*c(s)*分布解析で得られた各試料に含まれる成分のUV吸収ピーク面積との関係。EPピークの面積（○)、FPピークの面積（△)、その他（▲）のピーク面積、*c(s)*分布のピーク面積総和（■)、UV-VIS分光光度計で得られたUV吸収スペクトル（黒線）を示す。*c(s)*分布解析で得られるピーク面積の総和がUV-VIS分光光度計で得られる総吸光度と良い一致を示した。*c(s)*分布の各ピーク面積は、AUCセルの光路長である1.2 cmで割ることで、1 cmあたりの値に規格化した。

4.3.4 各波長におけるモル吸光係数の決定

多波長検出 SV-AUC によって AAV5 ベクターの EP および FP の UV 吸収スペクトルを取得することができた。これは SV-AUC を用いた、系内に存在する成分の分離定量により達成できたと言える。

AAV1fp、AAV2fp、および AAV6fp 試料についても同様に多波長 SV-AUC 測定を行うことで、それぞれの FP の吸収スペクトルを取得した。次に、式 9 に基づいて、230-280 nm の各波長における AAV1-FP、AAV2-FP、AAV5-FP、AAV6-FP、AAV5-EP、および ssDNA のモル吸光係数を求めた（**表 11**)。AAV5-FP の値から AAV5-EP の値を差し引くことで、カプシドに内包された ssDNA の 260 nm におけるモル吸光係数は 2.248×10^7 L/mol/cm と見積もられた。当該モル吸光係数は、ssDNA の組成に基づく計算値よりも約

20%小さかった。今回使用したAAVベクターに内包されるヌクレオチドの塩基数は設計上2599と想定される。1塩基の長さを0.34 nmとすると、直鎖状のssDNAの長さは約0.9 µmとなる。このssDNAが25　nmサイズのカプシド内に内包される結果、ヌクレオチドが近接し、淡色現象が生じたと考えられる。得られたssDNAのモル吸光係数を今回用いたAAVベクター試料に内包されるssDNAの塩基数で除算し、ヌクレオチド1塩基あたりの平均モル吸光係数を算出した（**表11**）。これにより、任意の核酸長を持つAAVベクターのFPおよびEPのモル吸光係数の計算が可能になった。SV-AUC実験により導出される各成分のピーク面積から以下の式を用いて、各成分の粒子濃度を決定することができる。

$$\boldsymbol{C\ (\#/mL)} = \frac{\boldsymbol{A_{(\lambda)} \times N_A}}{\boldsymbol{1.2 \times \varepsilon_{(\lambda)} \times 1000}} \qquad \text{（式17）}$$

ここで、$A_{(\lambda)}$は波長λでのピーク面積、N_Aはアボガドロ定数（/mol）、1.2は超遠心分析セルの光路長（cm）、$\varepsilon_{(\lambda)}$は波長λにおけるモル吸光係数（L/mol/cm）を表す。

完全粒子比はEP、FPそれぞれの粒子濃度から算出することができる。

表 11 各種血清型 AAV ベクター試料と ssDNA のモル吸光係数の要約

単位：10^7 L/mol/cm

波長（nm）	AAV1		AAV2		AAV5		AAV6		ssDNA*2
	EP*3	FP*1	EP*3	FP*1	EP*3	FP*1	EP*3	FP*1	
230	4.307	5.448	4.820	5.961	4.424	5.565	4.460	5.601	1.141 (4.391×10^{-4})
235	2.170	3.430	2.401	3.662	2.331	3.591	2.226	3.486	1.260 (4.849×10^{-4})
240	0.897	2.316	0.979	2.399	0.943	2.363	0.920	2.339	1.420 (5.463×10^{-4})
245	0.485	2.133	0.586	2.234	0.486	2.134	0.524	2.172	1.648 (6.339×10^{-4})
250	0.367	2.313	0.460	2.406	0.363	2.309	0.383	2.329	1.946 (7.488×10^{-4})
255	0.409	2.575	0.526	2.692	0.386	2.552	0.437	2.603	2.167 (8.336×10^{-4})
260	0.409	2.656	0.553	2.801	0.473	2.721	0.445	2.693	2.248 (8.648×10^{-4})
265	0.580	2.674	0.721	2.815	0.577	2.671	0.618	2.712	2.094 (8.058×10^{-4})
270	0.666	2.552	0.812	2.698	0.696	2.582	0.715	2.601	1.886 (7.256×10^{-4})
275	0.729	2.355	0.889	2.515	0.781	2.407	0.778	2.404	1.626 (6.255×10^{-4})
280	0.767	2.082	0.880	2.195	0.822	2.138	0.794	2.109	1.315 (5.060×10^{-4})

*1 各血清型の FP のモル吸光係数は SV-AUC 実験により決定した。*2 ssDNA のモル吸光係数は各波長における AAV5-FP の値から AAV5-EP の値を差し引くことで得た。括弧内の値は、ヌクレオチドごとの平均モル吸光係数を示す。*3 各血清型の EP のモル吸光係数は各波長における AAV-FP の値から ssDNA の値を差し引くことで得た。

4.3.5 多波長 SV-AUC による PP と凝集体の識別

密度コントラスト SV-AUC によって実験的に決定された AAV5-EP および AAV5-FP の分子量、偏比容、摩擦係数比 f/f$_0$ を用いて、完全なカプシドの分子数 n_{capsid}（n = 1、2、 3）と完全長 ssDNA の数 n_{ssDNA}（n = 0、 0.5、 1、 1.5、 2、 2.5、 3）の組み合わせごとにヌクレオチド数および沈降係数を計算した（表 12）。

表 12 各種会合状態におけるヌクレオチド数および沈降係数（いずれも計算値）の要約

		n_{capsid}					
		1		2		3	
		$N_{\mathrm{nucleotide}}$	s (S)	$N_{\mathrm{nucleotide}}$	s (S)	$N_{\mathrm{nucleotide}}$	s (S)
n_{ssDNA}	0	0	65.3	0	95.1	0	122.0
	0.5	1300	75.7	650	102.7	433	128.6
	1	2599	85.7	1300	110.2	866	135.1
	1.5	3899	95.4	1949	117.5	1300	141.4
	2	5198	104.7	2599	124.7	1733	147.7
	2.5	6498	113.7	3249	131.8	2166	154.0
	3	7797	122.5	3899	138.8	2599	160.1

この計算結果に基づくと、65–95 S で観測される成分はカプシド単量体＋ssDNA に限定されることが分かる。一方で、95–120 S の領域にはカプシド単量体＋ssDNA および、あるいはカプシド二量体＋ssDNA が観測されると予想される。同様に 120–140 S の領域にはカプシド二量体＋ssDNA またはカプシド三量体＋ssDNA、140–160 S ではカプシド三量体＋ssDNA が観測されると予想される（図 28A）。このように、観測された成分の沈降係数によっては、沈降係数だけでは会合状態を絞り込むことができない。

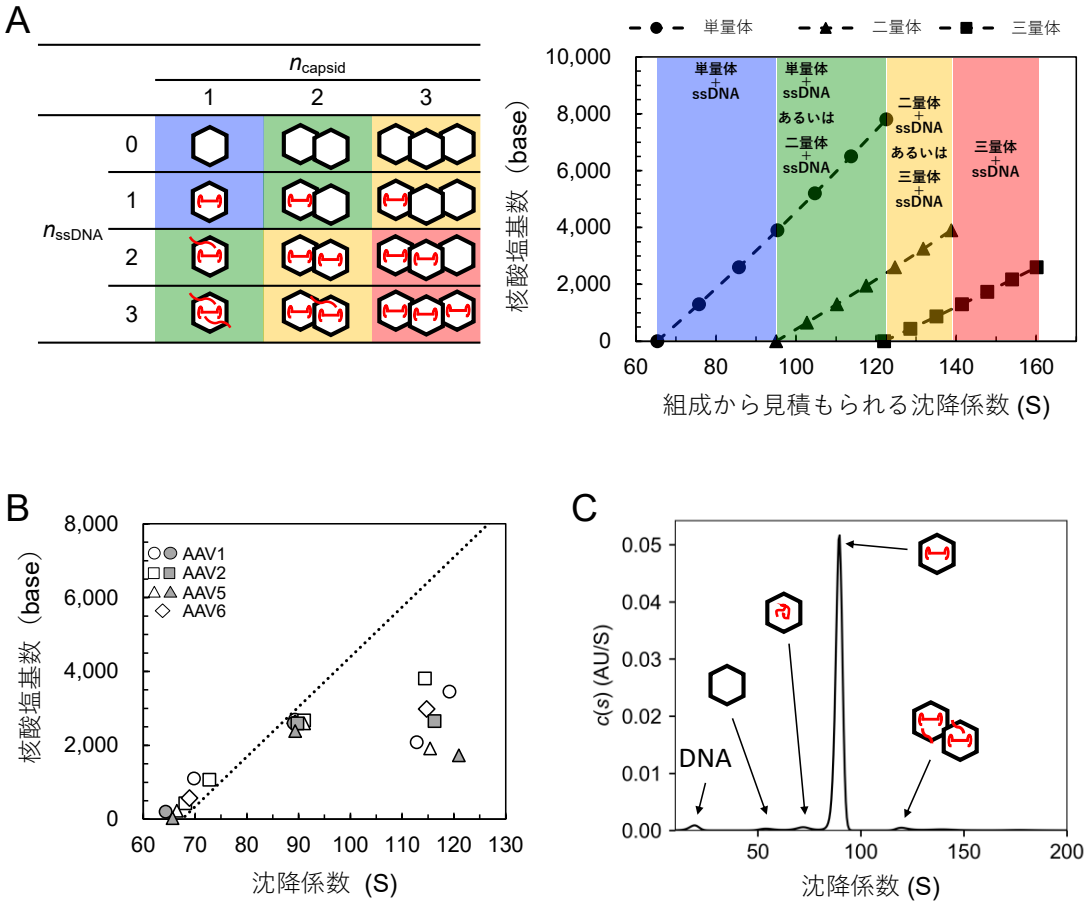


図 28 AAV ベクター粒子に含まれるヌクレオチドの塩基数および沈降係数の相関関係と多波長検出超遠心分析沈降速度法による粒子組成の特定

（A）60のVP分子（VP1:VP2:VP3=5:5:50）からなるカプシドの分子数n_{capsid}と完全長のssDNAの分子数n_{ssDNA}の組み合わせ（左）。カプシドあたりのヌクレオチドの塩基数と、粒子の各会合状態における沈降係数との相関プロット（右）。表 12の値を用いた。背景色は、それぞれの沈降係数で観測されうる成分の模式図（Aの左図）と対応させた。（B）AAV-EPおよびssDNAのモル吸光係数スペクトルを用いた重回帰分析から求めた、AAVカプシド1分子中のヌクレオチドの塩基数と沈降係数の関係。塗りつぶした色（白と灰）の違いは、各AAVベクター試料のロットの違いを示す。文献[112]で示された回帰直線の式［(沈降係数）＝0.0074×（内包されたssDNAの数）＋67.485］から算出した点線を表示した。この相関プロットは、多波長検出とモル吸光係数スペクトルを用いた重回帰分析に基づく今回のアプローチが、AAVベクター血清型にかかわらず、PPや凝集体中のssDNAを定量できることを示している。（C）AAV1ベクター試料の分散状態を網羅的に解析した代表的な結果。凝集体については、考えられる成分の代表的なものを示した。

このため、サイズ分布解析で検出された未知成分の詳細なキャラクタリゼーションのため、多波長 SV-AUC から決定した AAV-EP の UV 吸収スペクトルと ssDNA の UV 吸収スペクトルを用いて、未知成分の UV 吸収スペクトルを重回帰分析により分解解析することにより、未知成分を同定した。例えば、AAV1 ベクター試料に含まれる 69.8 S 成分の ssDNA とカプシド濃度の比([ssDNA]/[カプシド])は 0.43 と計算される。この結果は、69.8 S 成分のカプシドタンパク質が完全性を保っていると仮定すると、69.8 S 成分に含ま

れる DNA が平均して完全長の ssDNA の 43%に相当することを示している。AAV の沈降係数とパッケージされた核酸の鎖長には相関関係があることが Burnham らにより報告されている[112]。Burnham らは、異なるサイズのゲノムを持つ AAV ベクターを用いて、沈降係数と内包された ssDNA 塩基数の関係が高い相関（決定係数 R^2=0.9978）を示すことを報告している[112]。次いで Nass らは、いくつかの AAV 血清型で観測された EP ピークと FP ピークの間の成分の沈降係数に基づいて、内包された DNA 塩基数を見積もっている[113]。今回各ピークのスペクトルを分解解析から見積もった ssDNA の鎖長と沈降係数の関係は、100 S 以下の沈降係数では彼らの提案による回帰直線とよく一致していた（図 28B）。

しかし、100 S 以上で観測された成分については、沈降係数と ssDNA 含量の間に相関は認められなかった（図 28B）。この結果は、110–120 S に観測された成分が、2 分子以上の ssDNA を含む AAV 単量体（例えば ssDNA 二量体）ではないことを示している。つまり、図 28A に示した DNA 塩基数と沈降係数の相関に基づく方法では、凝集体の成分を特定することが困難であることが分かる。一方、多波長 SV-AUC から取得されるカプシドと ssDNA の吸光係数スペクトルを用いることで、110–120 S で観測された凝集成分の[ssDNA]/[カプシド]比は、0.67（カプシド 1 個あたり 1741 塩基に相当、AAV5 ベクター試料の 121 S 成分）–1.47（カプシド 1 個あたり 3821 塩基に相当、AAV2 ベクター試料の 114 S 成分）と決定された。この比率と図 28A に示した関係から、凝集体の組成を特定することに成功した。例えば、図 28C に示すように、AAV1 の試料で観察された 119 S 成分は、カプシドとヌクレオチドから構成される凝集体であると判断された。この成分は、[ssDNA]/[カプシド]比（1.33）と図 28A に示した関係から、断片化したヌクレオチドがカプシドの表面に付着しているか、またはカプシドに巻き込まれている二量体である可能性が考えられる。このように、多波長 SV-AUC と核酸とカプシドのモル吸光係数を用いた重回帰分析を組み合わせたアプローチをとることで、沈降係数に基づいた未知ピークの同定が困難な場合でも、カプシドと核酸の比率を直接決定し、AAV ベクター試料の分布を包括的に理解することができる。

4.3.6 多波長 SV-AUC 実験における最適な検出波長の選択

多波長 SV-AUC で導出される沈降係数分布のピークがどのような成分か特定するために必要な最小の検出波長数と最適な波長を検討した。まず、異なる分率の ssDNA を持つ場合の PP の UV 吸収スペクトルをシミュレートし、11 波長の中から選択した 2 波長でのデータを用いて偏回帰係数（α および β）を計算した（式 14 と 15）。計算された偏回帰係数は、ssDNA の分率が 0.25 から 0.6 の範囲では、11 波長の結果から計算した偏回帰係数とよく一致した（図 29）。しかし、それ以外の領域では残差が大きくなり、特に ssDNA の分率が 0.7 以上になると残差が大きくなった。これらの結果から、未知の成分に含まれ

る ssDNA の含量を見積もるには、2 波長検出では不十分であることがわかった。次に、多波長 SV-AUC を行う際の波長の選定方法について 11 波長の結果と比較することでその妥当性を評価した。結果、タンパク質のペプチド結合の吸収領域（230 nm 付近)、核酸の吸収領域（260 nm 付近)、芳香族アミノ酸の吸収領域（280 nm 付近）の特徴を反映した 3 つの波長を選択した場合に 11 波長の場合と同等の結果を取得することが可能であると分かった（図 30)。2 波長のデータから計算した偏回帰係数の残差が最も大きくなる ssDNA の割合が 0.1、0.9、1 の系についても、3 つの波長（230 nm、260 nm および 280 nm）で偏回帰係数を計算したところ、その係数は 11 波長から求めた偏回帰係数とよく一致した。

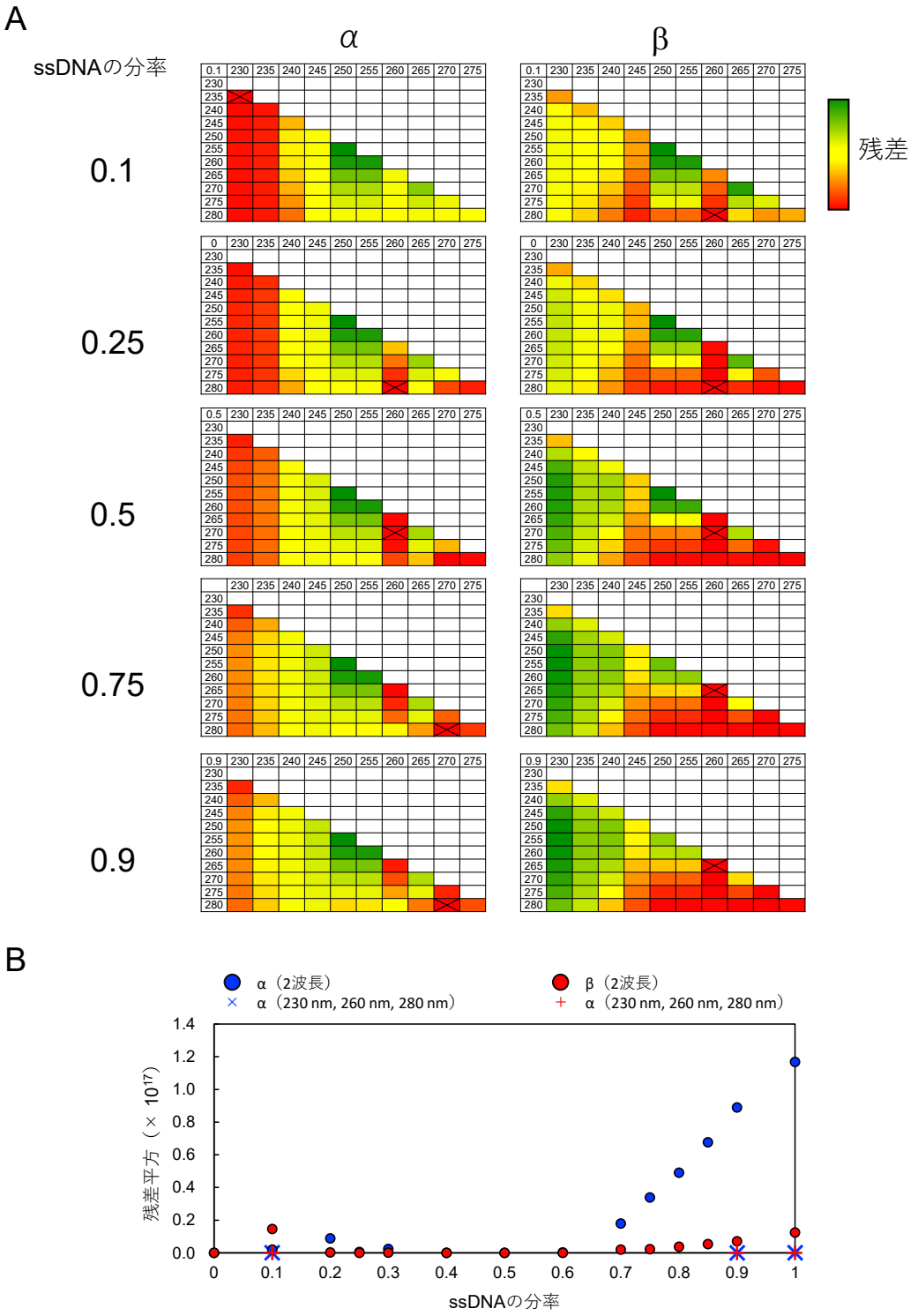


図 29 PP の識別のための検出波長の組み合わせ

（A）ssDNA の各分画における偏回帰係数の残差と 11 波長データセットの結果から得られた残差と比較したヒートマップ。最小の残差を示した波長の組み合わせに、交差した線を印した。（B）ssDNA の各分画における偏回帰係数の残差二乗プロット。11 波長データセットを用いた重回帰分析で算出した各係数と比較して、2 波長のデータを用いて算出した係数の最小値（青丸）と（赤丸）の間の残差平方を表示した。算出された係数と値は、

ssDNA の分率が 0.25 から 0.6 の範囲では、11 波長法のデータを用いた場合と一致した。しかし、それ以外の領域では残差平方値が増加した。特に、ssDNA の分量が増える（0.7 以上）と、α の残差が顕著に増加することが確認された。青（α）と赤（β）の十字で描かれているように、3 波長（230 nm、260 nm、280 nm）を用いた重回帰分析を利用することで、これらの大きな残差を解消することができた。縦軸は見やすくするため、係数（10^{17}）を乗じた値を示した。

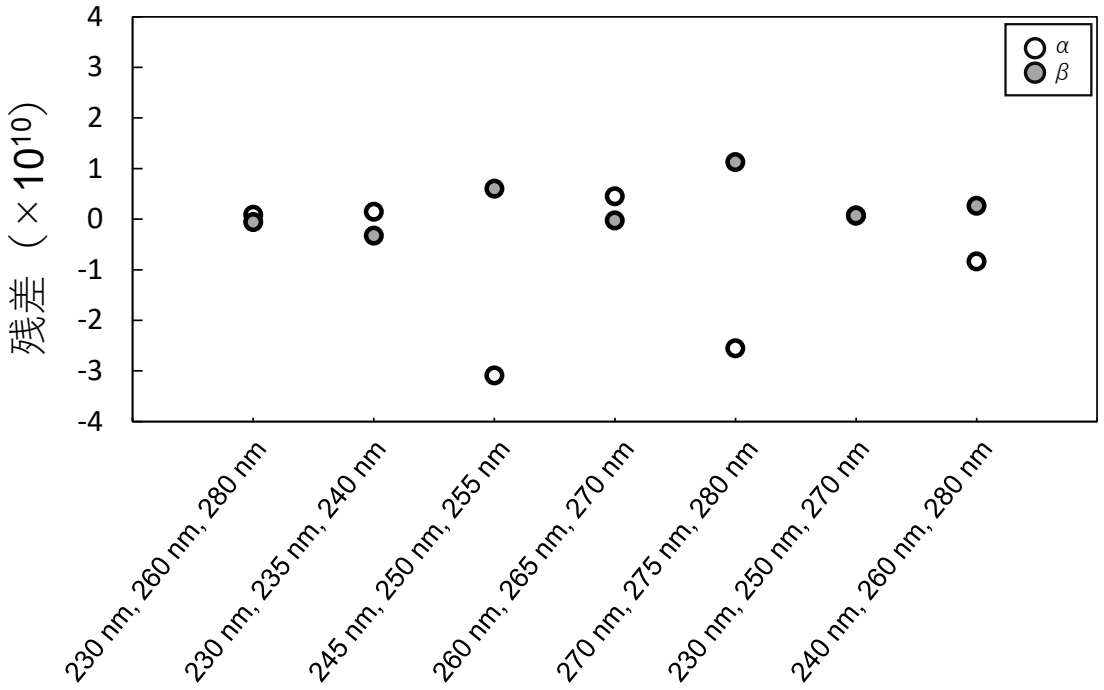


図 30 MW-SV-AUC 実験における特性評価に適した検出波長の選択
検出波長の各組み合わせにおいて算出される偏回帰係数と 11 個のデータポイントすべてを用いた重回帰分析で得られたものと比較し、その残差をプロットした。白丸と灰色の丸は、それぞれカプシドと ssDNA のスペクトルの偏回帰係数（α および β）を表す。縦軸は見やすくするため、係数（10^{10}）を乗じた値を示した。

4.3.7 AAV 試料の包括的な特性評価のためのワークフロー

今回確立した分析手法のワークフローを図 31 に示す。まず初めに密度コントラスト SV-AUC 実験を行い、AAV-EP と AAV-FP の偏比容を決定する。次に多波長吸収および屈折率検出を用いた SV-AUC を行い、各波長における EP と FP の吸光度を沈降係数分布のピーク面積から求める。各波長における EP、FP、完全長の ssDNA のモル吸光係数を求める。PP や凝集体に含まれる ssDNA の塩基数は、各成分の吸光度と EP および全長 ssDNA のモル吸光係数スペクトルを用いた重回帰分析によって見積もることができる。

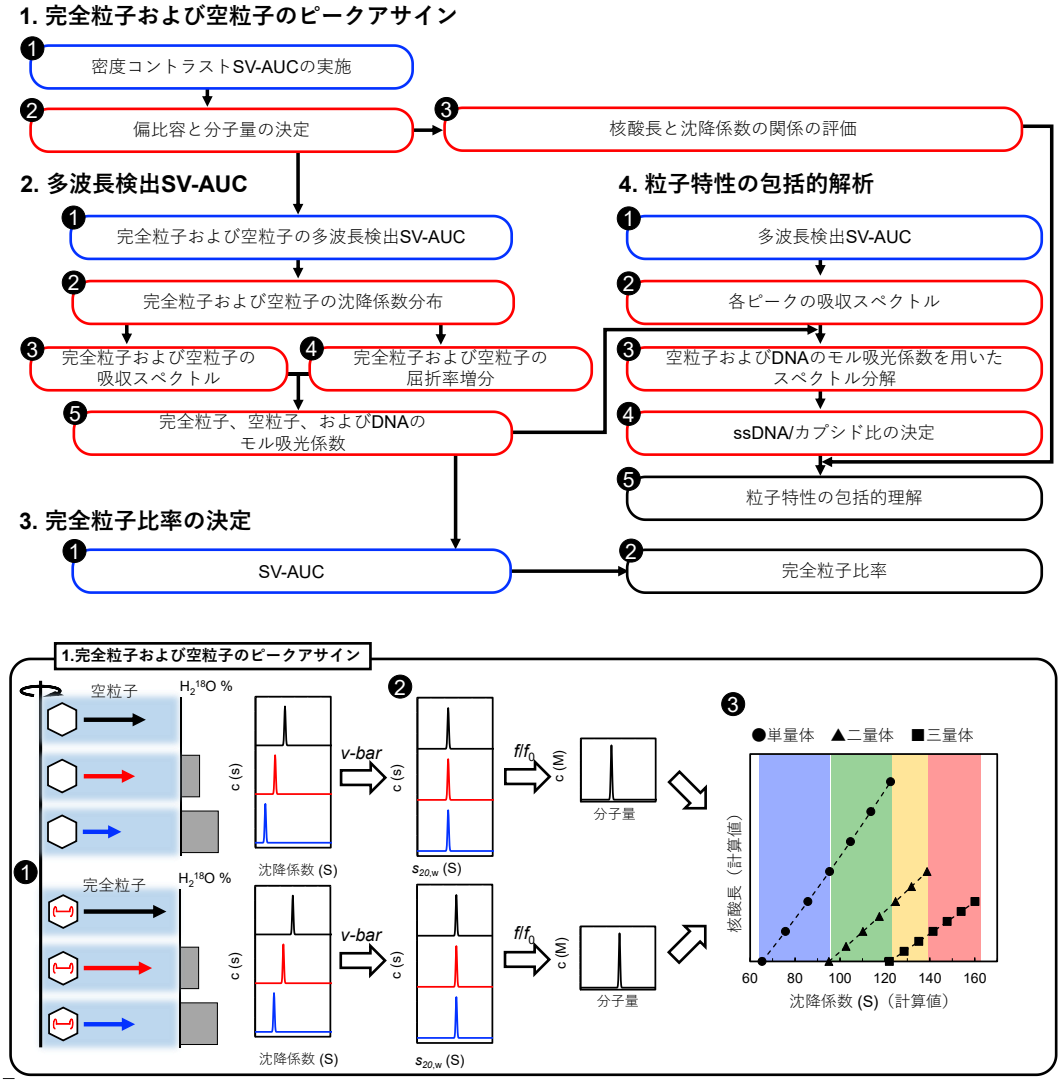


図 31 多波長検出と屈折率検出を用いた SV-AUC による AAV-EP、FP、およびそれらの不純物の粒子特性評価のワークフロー

データ取得（青）、パラメータの決定または粒子の特性評価（赤）、AAV ベクターの包括的な粒子特性評価のための重要な情報（黒）の各ステップをワークフローに示す。このワークフローには、EP と FP のピークの割り当て（工程 1）、MW-SV-AUC（工程 2）、完全粒子比の決定（工程 3）、粒子の包括的な特性評価（工程 4）の 4 つの工程が含まれている。工程 1 では、$H_2{}^{18}O$ 濃度を変調させて密度コントラスト SV-AUC 実験を行い、AAV-EP と AAV-FP の偏比容を決定する。黒、赤、青の矢印は、$H_2O/H_2{}^{18}O$ 比を変えた PBS 中の粒子の沈降速度を示している。溶媒の密度や粘度の違いにより、見かけの沈降係数（s）が変化する。各溶媒条件で $s_{20,w}$ を一致させるために最適な偏比容は、各 $H_2O/H_2{}^{18}O$ 比条件で取得された沈降データを用いたグローバルフィッティングによって決定される。沈降係数分布は、偏比容と f/f_0 を用いて、分子量分布に変換される。本工程で得られた値を用いて、n_{capsid} と n_{ssDNA} の組み合わせごとに、塩基数、沈降係数を算出する。工程 2 では、複数の波長で粒子の沈降挙動を観察する。沈降係数分布のピーク面積から、各波長における EP および FP の吸光度を求める。次に、屈折率増分から EP と FP の濃度を求める。そして、各波長における EP、FP、および完全長の ssDNA のモル吸光係数を求める。工程 3 では、SV-AUC 実験により得たピーク面積から EP および FP それぞれの粒子濃度、完全粒子比を求める。工程 4 では、各成分の吸光度と EP および全長 ssDNA のモル吸光係数スペクトルを用いた重回帰分析により、PP または凝集体に含まれる内包された ssDNA の塩基数を決定する。その後、工程 1 で得られた結果を考慮して、粒子の包括的な特性評価を行う。

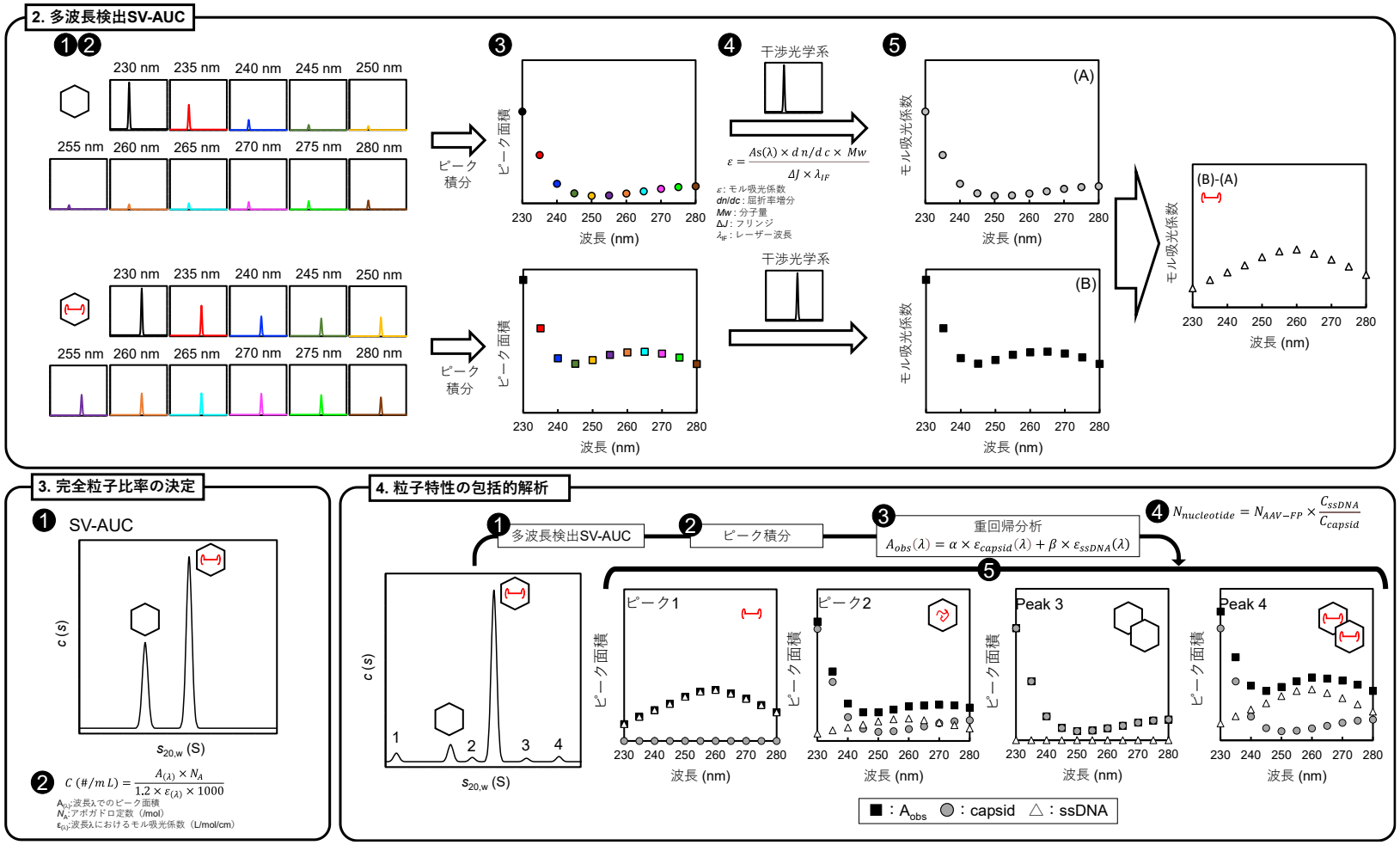


図 31 多波長検出と屈折率検出を用いた SV-AUC による AAV-EP、FP、およびそれらの不純物の粒子特性評価のワークフロー（続き）

4.5 本章の結論

本章では、AAV ベクター製剤の品質管理における課題、すなわち FP、EP、PP、OP、凝集体といった多様な粒子群の正確な定量という課題に対し、MW-SV-AUC を基盤とする新たな分析ワークフローを確立し、その包括的なキャラクタリゼーションを可能にした。本研究で開発した手法は、AAV ベクターの品質評価の精度と信頼性を飛躍的に向上させるものである。本章の成果を以下に要約する。

第一に、密度コントラスト SV-AUC を用いて AAV5-EP および AAV5-FP の偏比容を実験的に決定した。これにより、*s*値から算出される分子量の正確性が担保され、67.3 S のピーク成分が EP、93.7 S のピーク成分が FP であるという明確な帰属が可能となった。これは、理論値や文献値に依存し、ピーク同定に曖昧さが残っていた従来法の限界を克服する上で極めて重要な基盤となる。

第二に、多波長検出とスペクトル分解解析を組み合わせることで、各粒子の組成、すなわちカプシド（タンパク質）と ssDNA（核酸）の比率を直接的に算出する手法を開発した。これにより、従来の単一波長検出では不可能であった PP がどの程度の長さの核酸を内包しているか、あるいは凝集体がどのような構成要素（例：カプシド二量体＋核酸断片）から成るのかといった、より詳細な情報を得ることが可能になった。実際に、AAV1 試料で観測された 69.8 S の PP は FP に内包される完全長 ssDNA の約 43%の長さ相当の DNA を含んでいると算出され、本手法の有効性が実証された。この組成解析は、目的物質由来不純物の正体を特定し、その生成メカニズムの解明や製造プロセスの改善につなげる上で不可欠な情報を提供すると考えられる。

第三に、干渉光学系データとの組み合わせにより、EP、FP、およびカプシドに内包された ssDNA のモル吸光係数スペクトルを実験的に決定した。

結論として、本章で開発した MW-SV-AUC を基盤とする分析法は、AAV ベクター製剤に含まれる FP、EP、PP、OP、凝集体を、そのサイズ分布と組成の両面から包括的に同定・定量することを可能にする画期的な手法である。この手法は、カラムへの吸着リスクや条件最適化の煩雑さを伴うクロマトグラフィー法や、定量性に課題のある負染色を伴う電子顕微鏡法とは一線を画し、第一原理に基づいた高分解能かつ信頼性の高いデータを取得することができる。本研究の成果は、AAV ベクターの品質管理戦略の立案、製造プロセスの最適化、そしてロット間の同等性・同質性評価において新たな分散状態評価の方法を提示するものであり、より安全で有効な遺伝子治療薬の開発と安定供給に不可欠な基盤技術となると考えられる。

第 5 章 超遠心分析バンド沈降速度法による少量 AAV ベクターでの分散状態評価方法の確立

5.1 背景

SV-AUC の確立と残された課題

SV-AUC は、その高いピーク分離能から AAV ベクターの分散状態分析におけるゴールドスタンダードの一つとして認識されている。特に、今回開発した多波長検出機能を組み合わせた手法は、FP、EP、PP、凝集体を分離定量するだけでなく、それぞれの組成まで明らかにすることを可能にした。これにより、AAV ベクターの品質評価の精度は飛躍的に向上した。

しかしながら、この強力な SV-AUC 法にも実用上の大きな制約が存在する。それは、沈降プロファイルの全体にわたる解析を必要とする本分析手法の特性上、一回の測定に比較的多量の試料を必要とする点である。一般的に、SV-AUC で信頼性の高いデータを取得するためには、一測定あたり 2×10^{12} vg を超える粒子が必要となる。この試料必要量は、特に製造プロセスの最適化を目指す開発初期段階において大きな足枷となる。また、希少な臨床検体の分析や、十分量が製造・精製されていない段階の試料を分析する上でも、この試料必要量の多さは深刻な課題であった。このため、SV-AUC が持つ高い分解能を維持しつつ、より少ない試料量で分析可能な手法の開発が強く望まれていた。

BS-AUC への期待と従来法の限界

この課題を克服する代替法として、超遠心分析バンド沈降速度法（BS-AUC）が知られている。BS-AUC は、Vinograd らによって 1960 年代に初めて報告された手法[114], [115]であり、バンド形成用センターピースという特殊なセルを用いる点に特徴がある。このセルでは、少量の試料（例：15 µL）を高密度の溶媒に薄い層（バンド）として重層し、遠心力下で各成分がバンド状に沈降していく挙動を観察する（図 32）。原理的に、試料をセル全体に充填する SV-AUC よりもはるかに少ない試料量で測定が可能であるという大きな利点を持つ。しかし、これまで報告されてきた BS-AUC を AAV ベクターの分散状態評価に用いた例では、その解析手法に課題があった。具体的には、特定の回転半径における吸光度の時間変化を追跡する方法[116]では、EP と FP を完全に分離して定量するには分離が不十分であり、PP のような EP と FP の中間的な粒子が共存する場合には、各粒子を正確に定量することはさらに困難であった（図 32）。加えて、ピーク面積に関して、SV-AUC との対応関係に詳細な検討の余地が残されていた。

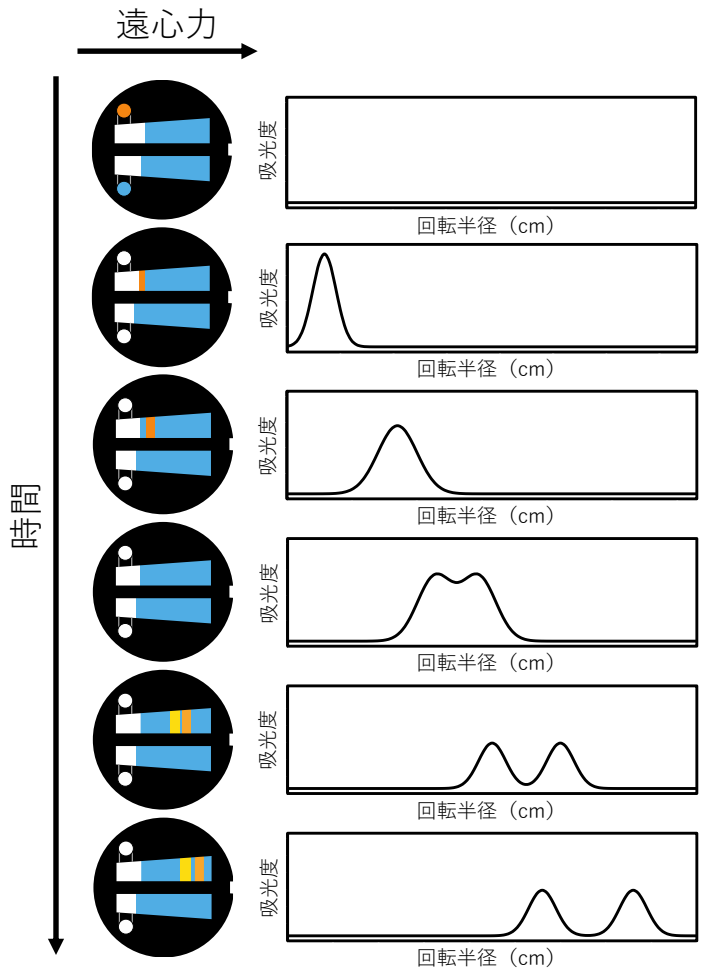


図 32 BS-AUC 実験の模式図

（左）バンド形成用センターピースの図と、遠心場における試料溶液の挙動。（右）各時点での吸光度分布プロファイル。円筒形のリザーバーウェルに充填された試料（オレンジ色）は、低いローター速度でキャピラリーを通してセクターに押し出され、センターピース内で高密度のセクター溶液（水色）の上に重層される。試料層中の成分は、拡散しながら、それぞれの沈降速度に応じてバンド状に沈降する。

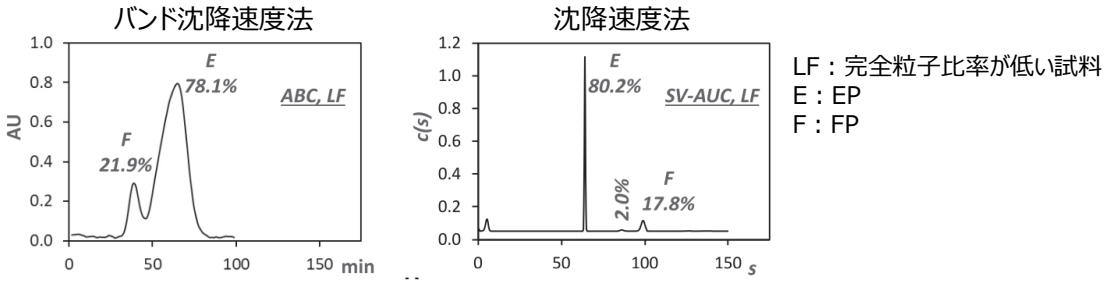


図 33 バンド沈降速度法を AAV ベクターの分散状態評価に用いた例

同一試料を用いてバンド沈降速度法（左）と沈降速度法（右）の結果を比較している。文献[116]に掲載された図（論文中 Figure 3）を元に作成した。

本章の目的

SV-AUC の量的な課題を克服するため、本章では、SV-AUC のデータ解析で絶大な威力を発揮する continuous c(s) distribution モデル（c(s)モデル）によるサイズ分布解析を、BS-AUC で得られる沈降プロファイルに適用するという新たなアプローチを試みる。この解析アプローチを導入することにより、BS-AUC の最大の利点である「少量性」と、SV-AUC の最大の利点である「高分解能」を両立させ、極めて少ない試料量で AAV ベクターの分散状態を正確に評価する手法を開発することを目的とする。本研究では、この手法の妥当性を検証するため、得られた沈降係数やピーク面積について、同一試料を用いて行う SV-AUC の結果と比較する。さらに、溶媒として重水（D_2O）を用いた際に生じる沈降係数の乖離の問題を特定し、^{18}O 同位体標識水（$H_2{}^{18}O$）を用いることでこれを解決する。最後に本手法の定量下限（LOQ）を決定し、SV-AUC と比較してどの程度の試料量削減が可能であるかを具体的に示す。本研究は、AAV ベクターの品質評価における分析の自由度を大幅に向上させる実用的なツールを提供することを目指すものである。

5.2 試料と方法

5.2.1 試料調製

HEK293T 細胞を用いて製造され、ポリエチレングリコール沈殿および塩化セシウム密度勾配超遠心分離を含む手順で精製された実験室グレードの AAV ベクター（血清型 8）を Vector Builder 社から購入した。プロモーターに CMV、GOI に EGFP を搭載した。最終溶媒は PBS+200 mM NaCl+0.001% ポロキサマーであった。

5.2.2 UV 吸収測定

UV 吸収測定は、BioMate 160 UV-Vis 分光光度計（Thermo Scientific）を用いて実施した。光路長 1 cm のキュベットを使用し、210-350 nm の範囲で 1 nm ごとに各波長の吸光度を収集した。

5.2.3 BS-AUC

測定試料として各 AAV ベクター溶液を 260 nm における吸光度が約 0.25 になるように調製した。12 mm バンド形成用センターピース（Spin Analytical）を使用し、リファレンスまたは試料のリザーバーウェルに 15 µL のバッファーまたは試料をそれぞれ充填した。2 枚のサファイアウィンドウでセンターピースを挟み込み、測定セルを組み立てた。リファレンスあるいはサンプルセクターにそれぞれ 250 µL または 240 µL の溶媒（0.001% ポロキサマー188 を含む PBS/D_2O または PBS/$H_2{}^{18}O$）を充填した。データは、Optima AUC（Beckman Coulter）を用い、20℃、20,000 rpm の条件下で UV 吸収検出システムを

使用して取得した。データは半径方向に 10 μm 刻みで、150 秒ごとに取得した。

5.2.4 BS-AUC のデータ解析

BS-AUC の沈降データは、プログラム SEDFIT（バージョン 16.2b）の analytical zone centrifugation c(s)モデルを用いて解析した。その際、ラメラ幅、摩擦係数比、メニスカス、TI ノイズ、および RI ノイズをフィッティングし、正則化レベルは 0.68 に設定した。沈降係数の範囲を 0-175 S、0.5 S 毎に評価した。溶媒の密度と粘度は、プログラム SEDNTERP を用いて計算した。沈降係数分布の図は、プログラム GUSSI（バージョン 1.3.2）を用いて作成した。

5.2.5 SV-AUC

12 mm ダブルセクター・チャコールエポンセンターピース（Beckman Coulter）を 2 枚のサファイアウィンドウ（Beckman Coulter）で挟み込み、測定セルを組み立てた。サンプルセクターに 390 μL の試料、リファレンスセクターに 400 μL の対応する溶媒を充填した。データは、Optima AUC（Beckman Coulter）を用い、20℃、20,000 rpm の条件で、多波長 UV 吸収光学系を用いて取得した。データは半径方向に 10 μm 刻みで取得した。

5.2.6 SV-AUC のデータ解析

SV-AUC の沈降データは、プログラム SEDFIT（バージョン 16.2b）の continuous c(s) distribution モデルを用いて解析した。その際、摩擦係数比、メニスカス、RI ノイズ、および TI ノイズをフィッティングし、正則化レベルは 0.68 に設定した。沈降係数の範囲は 0-250 S、0.5 S 毎に評価し、PBS の密度と粘度はプログラム SEDNTERP を用いてそれぞれ計算した。沈降係数分布図は、プログラム GUSSI（バージョン 1.3.2）を用いて作成した。

5.2.7 BS-AUC 測定の繰り返し再現性および BS-AUC と SV-AUC の沈降係数分布プロファイルの比較

PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下での BS-AUC 測定の繰り返し再現性を、2 つの異なるロットの AAV8-CMV-EGFP 試料（以下、AAV8-LotA および AAV8-LotB と称する）を用いて評価した。試料調製、測定、解析は上記の方法に基づいて実施した。同一試料を三重に測定（技術的反復）した。この三重測定を、AAV8-LotA については 1 回、AAV8-LotB については 2 回実施した。1 回の三重測定から、平均の見かけの沈降係数、平均ピーク面積、および標準偏差（SD）を算出した。PBS/H_2O 条件下で AAV8-LotB 試料を用いた SV-AUC

測定の繰り返し再現性を評価し、BS-AUC で使用したものと同じ試料溶液を使用した。230 nm で、半径方向に 10 μm 刻みで 150 秒ごとにデータを取得し、他の実験条件は上記と同じであった。解析は上記の方法に基づいて行い、平均の見かけの沈降係数、平均ピーク面積、および SD を 1 回の三重測定から算出した。

5.2.8 PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下における BS-AUC の定量下限（LOQ）の決定

BS-AUC の定量下限（LOQ）は、PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下で異なる濃度の AAV8-LotA 試料の希釈系列を用いた線形回帰分析によって決定した。これらの試料を用いた BS-AUC 実験は項目 5.2.3 および項目 5.2.4 と同様に実施した。サイズ分布解析を用いて異なる試料濃度におけるピーク 6 のピーク面積を決定した。データの線形回帰を用いて、ピーク面積を 230 nm での総ピーク面積に対してプロットすることで、230 nm で観測されたピークの LOQ を決定した。

5.3 結果と考察

5.3.1 BS-AUC による AAV ベクターのサイズ分布解析

BS-AUC 法を用いて、AAV8 ベクターについてデータ取得を行った。3 ロットの AAV ベクター製品について、PBS/D_2O 中でのバンド沈降挙動を 230 nm の検出波長で取得した。さらに、プログラム SEDFIT に実装されている analytical zone centrifugation c(s) モデルを用いたデータ解析を行い、SV-AUC と同様の高いサイズ分解能を持つ沈降係数分布を得た（図 34）。サイズ分布解析を適用することで、EP と FP の完全分離に加えて、PP や OP の有無も議論できることが分かった。

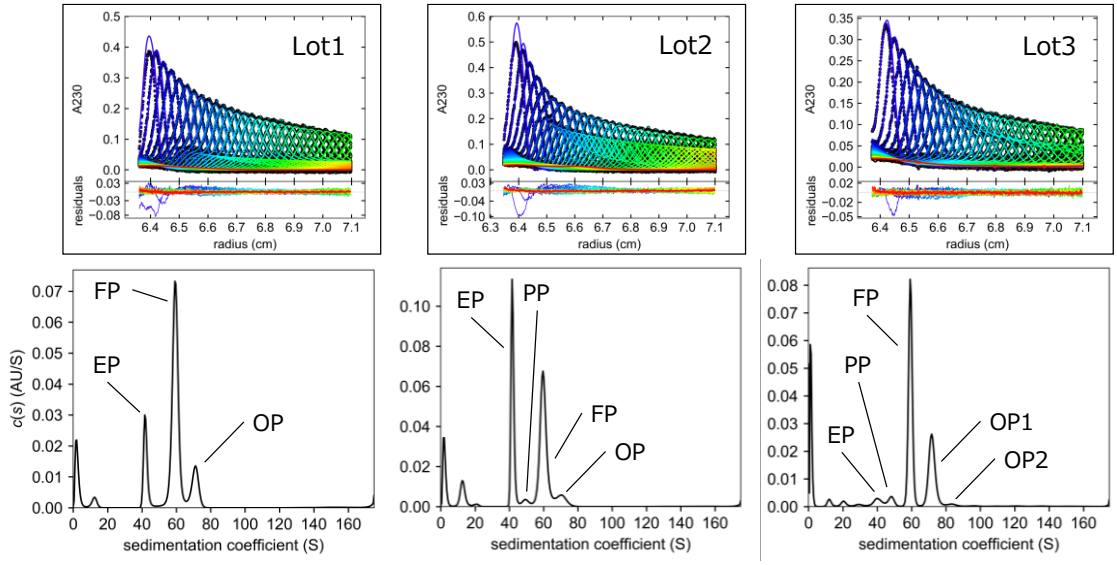


図 34 複数ロットの AAV8-CMV-EGFP の BS-AUC 測定結果
生データとフィッティング結果（上）およびサイズ分布解析から得られた沈降係数分布

（下）を示した。

次に、BS-AUC のサイズ分布解析から決定された沈降係数を評価した。PBS/D_2O 中での見かけの沈降係数が 41.9 S および 59.7 S の成分を、仮にそれぞれ EP および FP であるとし、PBS/D_2O 溶媒の密度と粘度、および各粒子の偏比容を用いて、それらの $s_{20,w}$（20℃水中での沈降係数）を計算したところ、それぞれ 74.3 S および 100.2 S であった。しかし、計算された値は、過去の研究結果から推定される AAV8 の EP の $s_{20,w}$（67 S）および 2.5 kb の核酸を持つ AAV8 の FP の $s_{20,w}$（89 S）の値よりも、それぞれ 11%および 13%大きかった。この $s_{20,w}$ に関する乖離は、Svedberg 式（式 18）から推測されるように、カプシド粒子が D_2O に曝されることによって引き起こされる、ペプチド結合中のアミドプロトンの水素-重水素交換に起因する分子量の増加が原因であると考えられた。

$$\frac{s}{D} = \frac{M(1-vbar\rho_0)}{RT} \qquad \text{（式 18）}$$

5.3.2 AAV ベクター試料に含まれる粒子の沈降挙動に対する重水の影響

ペプチド結合中のアミドプロトンの水素-重水素交換が回避するために、^{18}O 水条件下（PBS/$H_2{}^{18}O$）で BS-AUC 測定を実施した。これにより求められる $s_{20,w}$ は計算から求められる $s_{20,w}$ と良い一致を示すと期待された。AAV8-LotA を用いて PBS/D_2O と PBS/$H_2{}^{18}O$ の両条件下で BS-AUC 測定を、PBS/H_2O 条件下で実施した SV-AUC 測定を実施し、それぞれの測定から得られた沈降係数分布と各ピークの面積を比較した（図 35 および表 13）。加えて、それぞれの測定から得られた $s_{20,w}$ 値を比較した（図 36）。

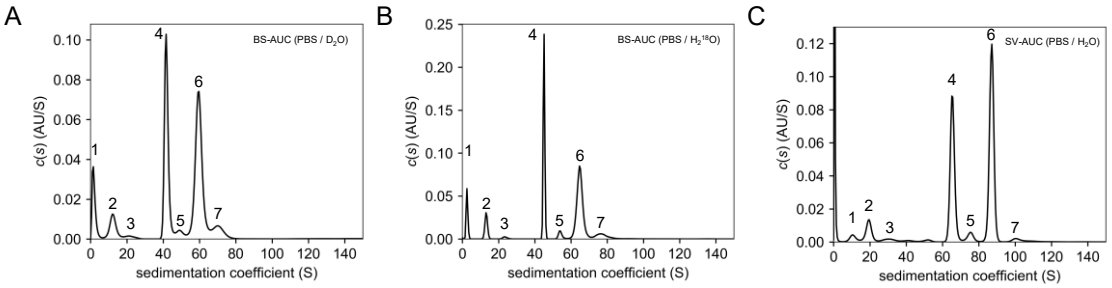


図 35 見かけの沈降泳数分布の比較
（A）PBS/D_2O 条件での BS-AUC 測定結果、（B）PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件での BS-AUC 測定結果、（C）PBS/H_2O 条件での SV-AUC 測定結果

表 13 各測定で得られた見かけの沈降係数とピーク面積の要約

ピーク番号	パラメータ	BS-AUC		SV-AUC
		PBS/D_2O 条件	PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件	PBS/H_2O 条件
1	s_w	1.9	2.6	10.7
	ピーク面積	0.077	0.067	0.019

2	s_w	12.4	13.2	19.4
	ピーク面積	0.054	0.054	0.051
3	s_w	22.0	23.6	30.7
	ピーク面積	0.010	0.008	0.015
4	s_w	41.9	45.1	65.5
	ピーク面積	0.261	0.260	0.261
5	s_w	49.6	54.2	75.4
	ピーク面積	0.021	0.023	0.025
6	s_w	59.7	64.9	87.1
	ピーク面積	0.343	0.326	0.350
7	s_w	70.9	77.4	104.8
	ピーク面積	0.049	0.049	0.018

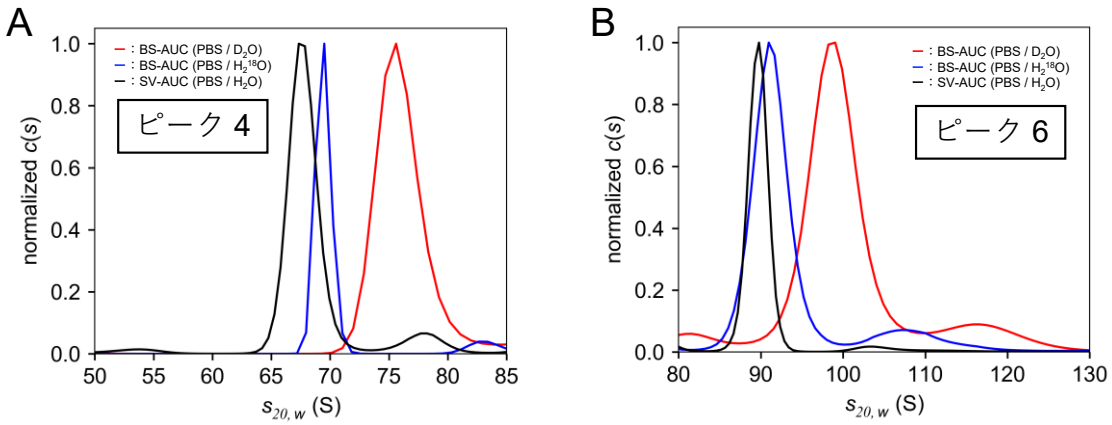


図 36 沈降係数 $s_{20,w}$ の比較
（A）AAV8-EP の沈降係数 $s_{20,w}$、（B）AAV8-FP の沈降係数 $s_{20,w}$ を示す。赤線：PBS/D_2O 条件での BS-AUC 測定結果、青線：PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件での BS-AUC 測定結果、黒線：PBS/H_2O 条件での SV-AUC 測定結果。

その結果、沈降係数分布のピークの高さにおいて、BS-AUC と SV-AUC の間で差異が認められたものの、観測された成分のピーク面積は、ピーク 1 と 7 を除いて、概ね非常によく一致していた（表 13)。予測した通り、PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下で得られた $s_{20,w}$ は、PBS/D_2O 条件下よりも SV-AUC の結果に近かった（図 36)。BS-AUC で観測されたマイナーピークであるピーク 1 と 7 の面積は、分散媒の種類に関わらず、SV-AUC プロファイルの対応するピークと比較して両方とも大きかった

5.3.3 BS-AUC の繰り返し再現性と SV-AUC の結果との比較

BS-AUC 測定の繰り返し再現性を評価するため、AAV8-CMV-EGFP の異なる 2 ロ

ット（AAV8-LotA および AAV8-LotB）の試料を用い、PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下で三重測定（技術的反復）を実施した。さらに、BS-AUC の結果を SV-AUC の結果と比較するために、AAV8-LotB を用いた SV-AUC の三重測定を 1 回実施した。図 37 は AAV8-LotA および AAV8-LotB の見かけの沈降係数分布の代表的なプロファイルを示しており、表 14 および表 15 に結果をまとめた。

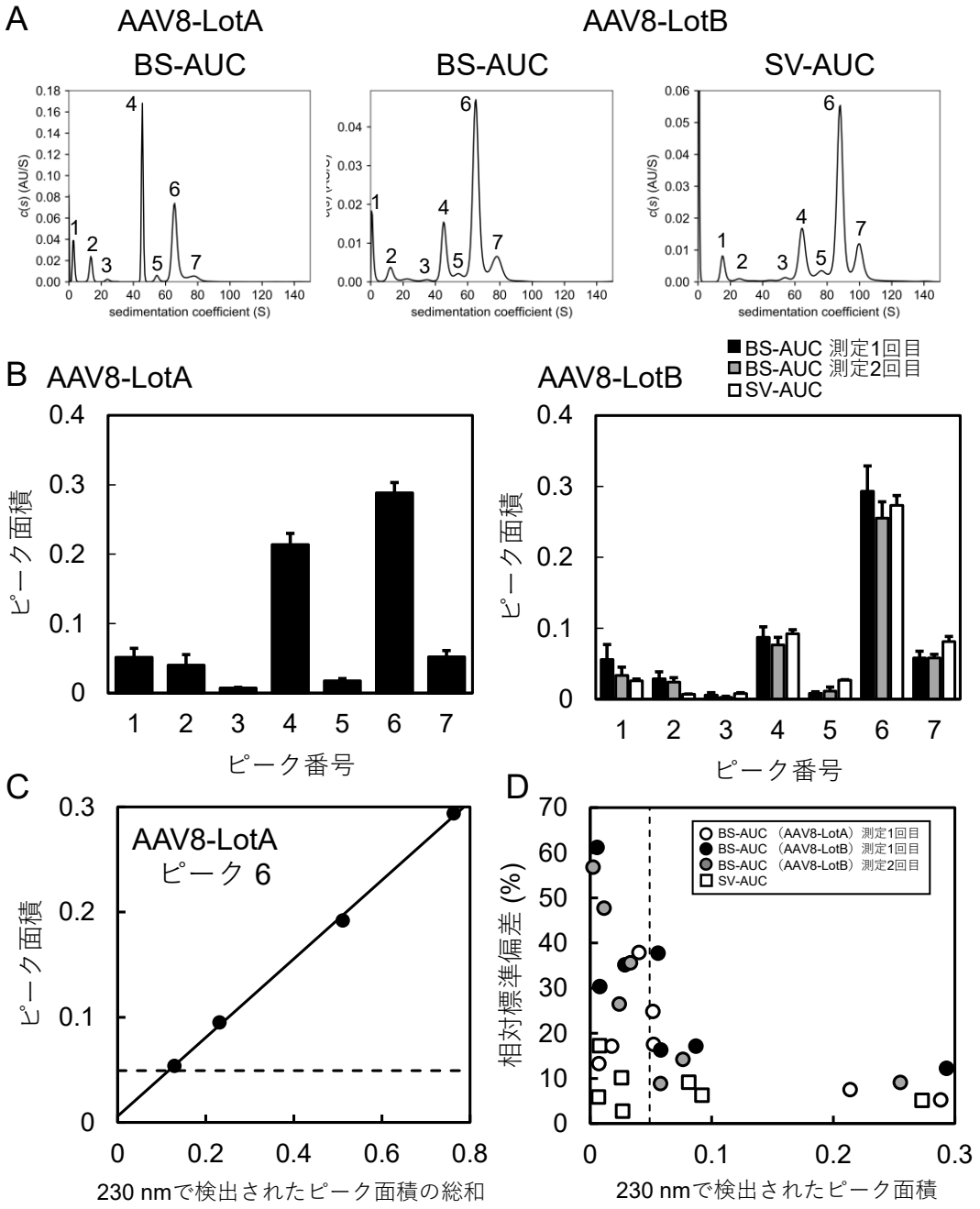


図 37 BS-AUC と SV-AUC 間での沈降係数分布の関係および BS-AUC の繰り返し再現性の

評価

AAV8-LotA について 1 回の BS-AUC 三重測定を実施した。AAV8-LotB について 2 回の BS-AUC 三重測定と 1 回の SV-AUC 三重測定を実施した。(A) AAV8-LotA（左）および AAV8-LotB（中央および右）の代表的な見かけの沈降係数分布。(B) 三重測定から得られた AAV8-LotA（左）および AAV8-LotB（右）のピーク面積の要約。右のパネルにおいて、黒、灰色、白の棒グラフは、それぞれ AAV8-LotB の 1 回目の BS-AUC 三重測定、AAV8-LotB の 2 回目の BS-AUC 三重測定、および AAV8-LotB の SV-AUC 三重測定の結果を示す。エラーバーは、三重測定から得られた各ピーク面積の標準偏差（SD）を示す。数値データはそれぞれ表 14 と表 15 に要約した。(C) BS-AUC のサイズ分布解析を用いて決定された 230 nm での総ピーク面積に対してピーク 6 のピーク面積の濃度依存性をプロットした図。(D) 各 AUC 測定の三重実験を用いて決定された相対標準偏差 RSD（%）と 230 nm でのピーク面積との関係。白、黒、灰色の丸は、それぞれ AAV8-LotA の BS-AUC 測定、AAV8-LotB の 1 回目の BS-AUC 測定、および AAV8-LotB の 2 回目の BS-AUC 測定の結果を示す。白の四角は、AAV8-LotB の SV-AUC 測定の結果を示す。

表 14 AAV8-LotA を用いた BS-AUC 測定（繰り返し再現性確認実験）結果

BS-AUC（AAV8-LotA）繰り返し再現性確認実験							
	s_w			ピーク面積			
ピーク番号	平均 (S)	SD (S)	RSD (%)	平均	SD	RSD (%)	総ピーク面積に占める比率 (%)
1	3.1	0.2	6.7	0.052	0.013	24.8	7.5
2	13.9	0.2	1.8	0.040	0.015	37.9	5.8
3	24.5	0.9	3.5	0.007	0.001	13.3	1.1
4	45.7	0.1	0.2	0.214	0.016	7.5	31.5
5	54.8	0.3	0.5	0.018	0.003	17.1	2.6
6	66.1	0.1	0.2	0.288	0.015	5.2	42.5
7	78.2	0.4	0.6	0.052	0.009	17.5	7.7

表 15 AAV8-LotB を用いた BS-AUC および SV-AUC 測定（繰り返し再現性確認実験）結果

BS-AUC（AAV8-LotB）繰り返し再現性確認実験 1 回目							
	s_w			ピーク面積			
ピーク番号	平均 (S)	SD (S)	RSD (%)	平均	SD	RSD (%)	総ピーク面積に占める比率 (%)
1	4.3	1.3	29.2	0.056	0.021	37.7	9.7
2	13.7	0.7	4.8	0.029	0.010	35.2	4.9
3	32.0	1.6	4.9	0.006	0.003	61.1	1.0
4	45.7	0.3	0.7	0.087	0.015	17.1	15.2
5	54.2	1.0	1.8	0.008	0.002	30.3	1.4
6	65.3	0.3	0.4	0.293	0.036	12.2	51.3

7	77.9	1.2	1.6	0.058	0.009	16.3	10.1

BS-AUC（AAV8-LotB）繰り返し再現性確認実験 2 回目

ピーク番号	s_w			ピーク面積			
	平均 (S)	SD (S)	RSD (%)	平均	SD	RSD (%)	総ピーク面積に占める比率 (%)
1	2.5	1.7	67.6	0.033	0.012	35.6	6.9
2	12.8	0.4	2.7	0.024	0.006	26.5	5.0
3	29.3	5.7	19.6	0.002	0.001	56.8	0.5
4	46.9	2.7	5.7	0.076	0.011	14.2	16.1
5	54.0	0.8	1.4	0.011	0.005	47.7	2.4
6	65.2	0.2	0.3	0.255	0.023	9.1	54.1
7	78.4	0.4	0.6	0.058	0.005	8.8	12.3

SV-AUC（AAV8-LotB）繰り返し再現性確認実験

ピーク番号	s_w			ピーク面積			
	平均 (S)	SD (S)	RSD (%)	平均	SD	RSD (%)	総ピーク面積に占める比率 (%)
1	15.8	0.2	1.1	0.026	0.003	10.1	5.0
2	26.4	0.4	1.6	0.007	0.000	5.9	1.3
3	51.8	2.6	5.1	0.008	0.001	17.2	1.5
4	64.8	0.2	0.4	0.092	0.006	6.3	17.9
5	76.7	0.4	0.5	0.027	0.001	2.8	5.2
6	87.9	0.4	0.4	0.273	0.014	5.1	53.1
7	100.8	0.5	0.5	0.081	0.007	9.2	15.7

AAV8-LotA の見かけの沈降係数の相対標準偏差（RSD）値は、ピーク 4、5、6 について 0.5%以下であり、SV-AUC 実験で得られる沈降係数の RSD 値と同等であった。2 つの主要成分であるピーク 4 と 6 の見かけの沈降係数は、それぞれ 45.7 ± 0.1 S（RSD 0.2%）と 66.1 ± 0.1 S（RSD 0.2%）であった。ピーク 4 と 6 のピーク面積は、それぞれ 0.214 ± 0.016（RSD 7.5%）と 0.288 ± 0.015（RSD 5.2%）であった。微量ピークであるピーク 5 と 7 のピーク面積の RSD は、それぞれ 17.1%と 17.5%と微量ピーク以外と比べて大きかった。

次に AAV8-LotB を用いて BS-AUC 測定の繰り返し再現性と、BS-AUC と SV-AUC の結果の関係を評価した。具体的には 2 回の BS-AUC 三重測定と 1 回の SV-AUC 三重測定を実施した。AAV8-LotA の測定で得られた結果と同様に、特に主要成分についての見かけの沈降係数の高い再現性が確認された。実際、主要成分であるピーク 6 については、

1 回目と 2 回目の実験でそれぞれ 65.3 ± 0.3 S（RSD 0.4%）と 65.2 ± 0.2 S（RSD 0.3%）であったのに対し、ピーク面積の再現性はピーク 6 において 0.293 ± 0.036（RSD 12.2%）と 0.255 ± 0.023（RSD 9.1%）であった。さらに、SV-AUC 実験におけるピーク 6 のピーク面積の再現性は 0.273 ± 0.014（RSD 5.1%）であった。

BS-AUC の定量下限（LOQ）は、主要成分（AAV ベクターの FP）であり、実際の AAV ベクター測定で観測される典型的なピーク面積値を持つピーク 6 のデータを用いて決定した。LOQ 決定のための検量線の総面積の上限は 0.75 に設定した。これは、約 5 × 10^{12} vg/mL の AAV ベクター15 µL を用いた BS-AUC で観測されるピーク面積の典型的な値である。一連の総濃度における BS-AUC の c(s)のピーク面積から計算された主要成分（ピーク 6）の 230 nm における OD 単位での LOQ は 0.049 であり、これは AAV8-CMV-EGFP の FP に換算すると、それぞれ 4.4 × 10^{11} vg/mL に相当する（ピーク 6 の成分が 15 µL の溶液に分散している場合)。観測されたピーク面積が LOQ 値以下の場合、ピーク面積の RSD 値は増加し、BS-AUC と SV-AUC 間のピーク面積の一致性は低下する（図 37D)。図 37D に示すように、BS-AUC におけるピーク面積の RSD は、ピーク面積が LOQ より大きい成分については概ね 10%未満であり、これらの成分に対する BS-AUC の再現性は SV-AUC に匹敵することを示している。一方、ピーク面積が LOQ 未満の場合、多くの場合で RSD は 20%を超えた。

さらに、BS-AUC の LOQ に基づき、EP の濃度単位での LOQ 値は、6.3 × 10^{11} cp/mL と計算された。BS-AUC実験における AAV8 試料の充填量（15 µL）を考慮すると、EP と FP の LOQ における必要試料量は、それぞれ 9.5×10^{9} cp と 6.6×10^{9} vg に相当する。

以上より、BS-AUC は、主要成分の沈降係数決定および濃度決定において SV-AUC に匹敵する正確性を持ち、一方で 1 回の分析に必要な試料量が SV-AUC より約 25 分の 1 とはるかに少ないという大きな利点を有することが示された。

5.3.4 成分の同定と定量に関する MW-BS-AUC と MW-SV-AUC の比較

PBS/$H_2{}^{18}O$ 条件下で実施された MW-BS-AUC と、PBS/H_2O 条件下で実施された MW-SV-AUC との間で、各成分のピーク面積の波長依存性を比較した。その結果、各成分のスペクトルは、ピーク 1 と 7 の成分を除き、230 nm より長波長領域でよく一致していることが示された。第 4 章で MW-SV-AUC について記述したように、MW-BS-AUC を用いた分解解析は、ピークの成分を同定するために使用できる。今回の MW-BS-AUC 測定から、ピーク 4、5、6、および 7 の成分は、それぞれ EP、[ssDNA]/[capsid]比が 0.11 の PP、FP、および[ssDNA]/[capsid]比が 1.53 の FP 単量体であると同定された。EP よりも小さい見かけの沈降係数を持つピーク 1、2、3 は、それぞれの A260/A280 比が 1.22、1.41、1.14 であることに基づき、異なる比率のタンパク質-DNA 混合物である可能性がある。さらに、ピーク面積が 230 nm 以下の波長（すなわち 210 nm と 220 nm）で 0.35 を超えた場

合、ピーク 4 と 6 で確認されたように、MW-BS-AUC の結果は MW-SV-AUC の結果と良好に一致した（図 38）。図 38 に示すように、PBS/$H_2{}^{18}O$ 中での MW-BS-AUC で様々な検出波長で得られたピーク面積を、PBS/H_2O 中での MW-SV-AUC に対するプロットすると、両者には良好な一致が確認された（決定係数 R^2：0.9787）。

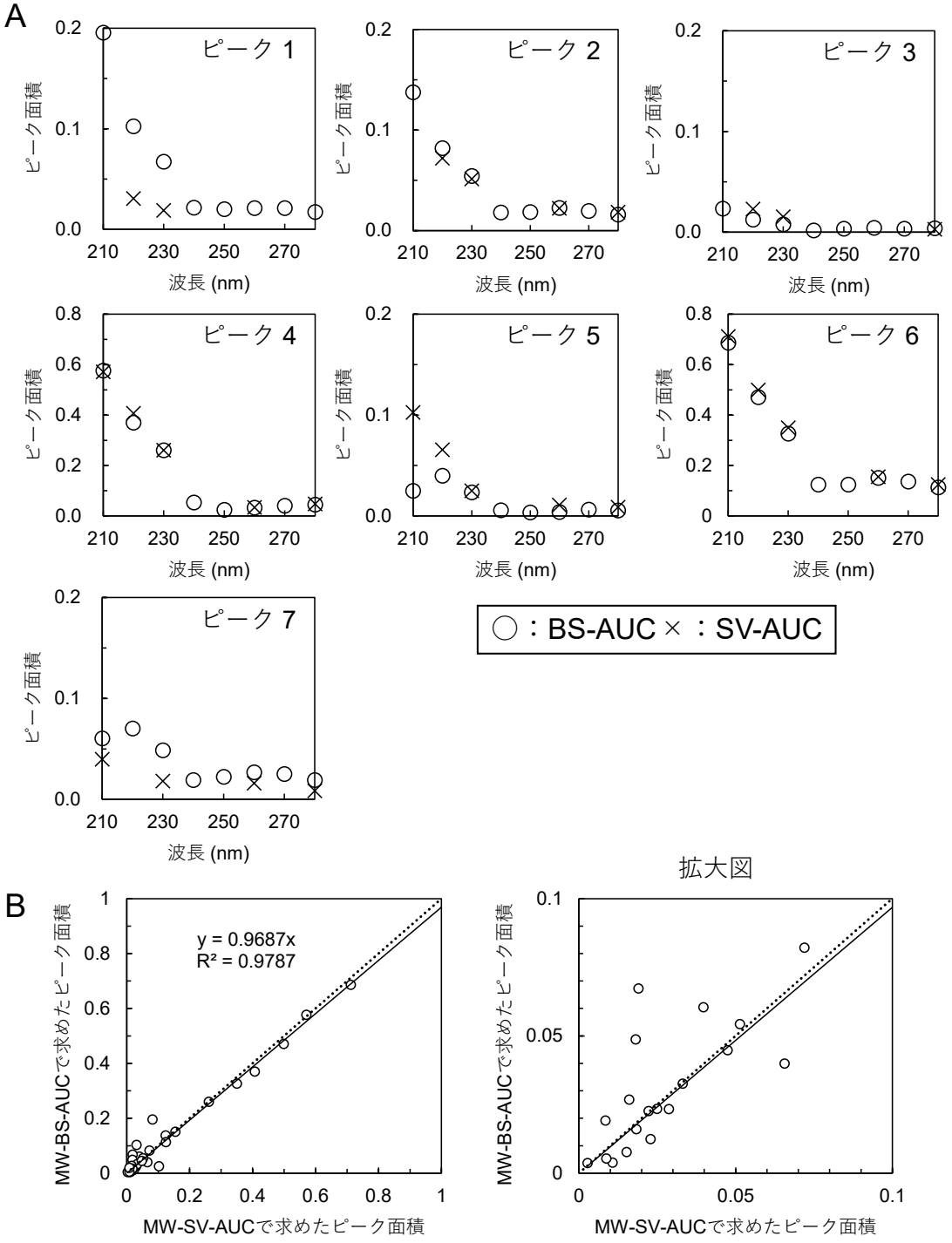


図 38 各波長で見積もられたピーク面積の比較

（A）測定に使用した検出波長は、MW-BS-AUC では 210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、

250 nm、260 nm、270 nm、および 280 nm であり、MW-SV-AUC では 210 nm、220 nm、230 nm、260 nm、および 280 nm である。ピークが検出されなかった波長については、測定法を問わずデータ点はプロットしていない。(B)（A）に示したデータ点から作成した散布図。横軸は MW-SV-AUC から得られたピーク面積値、縦軸は MW-BS-AUC から得られたピーク面積値を示す。左図は全体像を、右図は横軸および縦軸ともに 0 から 0.1 の範囲を拡大した図を示す。点線は y=x の関数の直線を表し、実線は全データを用いて回帰分析から得られた回帰直線を表す。図中に回帰式と決定係数を記載した。

5.4 本章の結論

本章では、AAV ベクターの品質評価における課題であった SV-AUC の多量の試料必要量を克服するため、BS-AUC のデータに高分解能なサイズ分布解析を導入するという新たなアプローチを確立し、同一試料を用いた SV-AUC 測定結果との対比から、AAV ベクターの少量・高分解能な粒子径分布解析を初めて可能にした。本手法は、SV-AUC が持つ分析の信頼性と、BS-AUC が持つ試料量の利便性を融合させたものであり、その成果は以下の点で要約される。

第一に、SV-AUC に匹敵する高い分解能を、極めて少ない試料量で達成した点である。サイズ分布解析の適用により、従来のバンド沈降速度法の解析法では困難であった EP、FP、さらには PP の完全な分離・定量に成功した。その定量性は、サイズ分布解析から得られた総ピーク面積が、測定前に UV 分光光度計で測定した吸光度と良好に一致することからも確認された。

第二に、SV-AUC と比較して、必要な総ベクター数を劇的に低減した点である。SV-AUC が一度の測定に約 2×10^{12} vg（260 nm で検出した場合）を必要とするのに対し、BS-AUC では約 25 分の 1（260 nm で検出した場合）から理想的には約 50 分の 1（230 nm で検出した場合）の粒子数（約 4×10^{10} vg）で SV-AUC と同等の定量が可能であることが示された。この試料量の低減は、AAV ベクターの品質評価における大きな進展であると言える。

第三に、主要な成分の定量において、SV-AUC に匹敵する高い再現性を実証した点である。複数ロットの試料を用いた再現性試験の結果、EP や FP といった主要ピークの沈降係数およびピーク面積は、十分な再現性を示した。一方で、ピーク面積が LOQ を下回る微量成分については、SV-AUC と比較してばらつきが大きくなる傾向も見られ、目的に応じて両手法を使い分けることの重要性も示された。

以上より、本章で確立したサイズ分布解析を導入した BS-AUC 法は、AAV ベクターの品質評価における強力かつ新たな実用的ツールであると結論される。その最大の利点である「少量性」により、製造プロセスの開発段階における試料の評価や、ロット間の比較分析、希少な臨床検体の分析など、試料量が限定される状況で大いにその威力を発揮すると考えられる。さらに、多波長検出 BS-AUC も可能であり、前章で示したような組成解析も少量試料で実施できる。本手法は、SV-AUC の量的課題を克服し、AAV ベクター医薬品の研究開発から品質管理に至るまで、分析の適用範囲を大幅に拡大させるものであり、

その学術的および産業的価値は極めて高いと考えられる。

第 6 章 AAV ベクターの製造工程における品質特性の変動とその生物活性への影響評価

6.1 背景

AAV ベクター製造の現状と品質管理の重要性

AAV ベクターの製造には、一過性のプラスミドトランスフェクション法を用いた HEK293 細胞培養システムが広く利用されている。特に浮遊細胞培養系は、実験室レベルの小規模生産から商業生産用のバイオリアクターを用いた大規模生産まで対応可能なスケーラビリティを持つ。

しかし、このような細胞を使った製造工程は本質的に変動を伴いやすく、たとえ実質的に同一の製造手順を用いたとしても、培養スケールや容器の種類といった僅かな条件の違いが、最終製品の QA にどのような変動をもたらすかについては、体系的な理解が不足していた。これらの品質の変動は、医薬品の有効性や安全性に直接影響を及ぼす可能性があるため、その変動要因を特定し、生物活性との対応関係を明らかにすることは、安定した品質の AAV ベクターを供給する上で極めて重要である。

生物活性に影響を与える可能性のある QA に関する先行研究

AAV ベクターの有効性、特に標的細胞への遺伝子導入効率は、複数の QA によって制御されることが知られている。

•EP 濃度: 目的物質由来不純物である EP は、FP と細胞受容体への結合で競合することで治療効果を減弱させるだけでなく、過剰な免疫応答（例：CD8+ T 細胞の増殖）を誘発するリスクがあるため、その濃度は規制当局が厳格な管理を求める重要な QA である。

• ウイルスタンパク質（VP）化学量論: AAV カプシドは、VP1、VP2、VP3 という 3 種類のタンパク質が約 1:1:10 の比率で 60 分子集合した正二十面体構造をとる。VP1 の特異領域はエンドソームからの脱出に、VP1/VP2 共通領域は核内への移行に重要な役割を担う。先行研究では、VP1 の比率が低いと遺伝子導入効率が低下すること[40], [43], [117]–[120]や、VP1/VP2 比が高いベクターの方が高い遺伝子導入効率を示すことが報告されている[42]。一方で、VP2 は形質導入に必須ではないとする報告[121]もあり、その役割についてはさらなる検証が必要であった。

• 翻訳後修飾（脱アミド化）: カプシドタンパク質のアスパラギン（Asp, N）残基の脱アミド化により遺伝子導入効率が低下することが報告されている。特に、AAV8 において N57 や N94 といった特定部位の変異が遺伝子導入効率を著しく低下させることが報告されており[44]、これらの部位は免疫応答に関与する可能性も指摘されている[10]。

本章の目的

これまでの研究は、個々の QA が生物活性に与える影響を明らかにしてきたが、実際の製造工程で生じる複数の QA の変動が、最終的な生物活性にどのように結びつくのか、その体系的な理解は十分ではなかった。加えて EP は生物活性に影響を与えることから、製品の QA の変動と生物活性の関係に基づいて pCQA を特定するには、高純度の FP 試料を準備する必要があった。第 4 章に述べた MW-SV-AUC と第 5 章に述べた BS-AUC を基盤とした品質評価方法を確立できたことで、試料の正確な完全粒子比の決定と分散状態の評価が可能になった。分析結果に基づいたフィードバックを通して、ラボスケールでの高純度 FP 試料を調製できるようになった[32], [34], [122]–[124]。そこで本章では、上流工程の条件（培養スケールと容器）を僅かに変調して製造し、同一条件の下流工程を経て製造された 10 製品の AAV8 ベクターを対象として、14 項目にわたる QA の変動を網羅的かつ定量的に評価し、どの QA が生物活性の指標である遺伝子導入効率に影響するのかを明らかにする。そのために、前章までに確立した BS-AUC による完全粒子比の定量を含めて、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）による VP 化学量論の正確な決定、そして LC-MS/MS システムを用いたペプチドマッピングによる特定アスパラギン残基の脱アミド化率の決定を行う。一連の分析により、VP 化学量論と特定アスパラギン残基の脱アミド化率の間に相関が見られたことから、両者の寄与を分離して評価するため、短期加速安定性試験を実施し、脱アミド化が独立して遺伝子導入効率に影響を与えることを直接的に検証するという独自のアプローチをとる。本研究は、AAV ベクターの品質の変動と生物活性の関係を深く理解し、科学的根拠に基づいた品質管理戦略の構築に貢献することを目指すものである。

6.2 実験方法

6.2.1 AAV ベクターの製造および精製

すべての AAV ベクターはトリプル・トランスフェクション法により作製した。培養容量と容器の種類を除き、同じ条件下で AAV ベクターを製造した。製造条件を表 16 に要約する。バッチ A（製品 1〜4）は 1 L フラスコで 0.2 L 培養し、その後細胞溶解と精製を行った。バッチ B（製品 5〜7）は 2 L フラスコで 1 L 培養し、その後細胞溶解と精製を行った。バッチ C（製品 8〜10）は 2 L バイオリアクターで 1 L 培養し、その後細胞溶解と精製を行った。培養容量に関わらず細胞溶解液 200 mL を精製に供した。合計で、3 バッチ、10 の AAV ベクター製品を調製した。同一培養条件で 製造した 10 の AAV ベクターを比較した場合、QA の変動幅が限定され、生物活性との関係性を統計的に議論する上で十分なダイナミックレンジを確保できない可能性があると考え、ここでは製造条件を僅かに変調した上でベクター製造を行った。

具体的にはプロモーターに CMV、目的遺伝子（GOI）に改良型緑色蛍光タンパ

ク質（EGFP）の遺伝子を搭載したトランスジーンプラスミド、血清型8のカプシドタンパク質の遺伝子を搭載した RepCap プラスミド、および Helper プラスミドを、細胞密度 2.0×10^6 cells/mL の浮遊系 VPC2.0 細胞（Thermo Fisher Scientific）に、プラスミド比 1:1:1 で共導入した。トランスフェクション試薬には FectoVIR-AAV（Polyplus）を使用した。トランスフェクションから 4 日後、培養液を回収し、細胞溶解を行った。細胞溶解液をフィルターろ過した後、AAVX カラム（Thermo Fisher Scientific）を用いたアフィニティークロマトグラフィー（AC）で精製した。精製された AAV ベクター試料は、次に塩化セシウム（CsCl）密度勾配超遠心（DGUC）に供した。3 M または 3.5 M の CsCl を含む精製試料を、SW41Ti ローター（Beckman Coulter）を備えた Optima XE-90 遠心機（Beckman Coulter）を用い、16℃で 24〜42 時間、18,000 rpm あるいは 25,000 rpm で遠心した。FP 画分をオンラインモニタリング装置で回収し、Slide-A-Lyzer G2 または Slide-A-Lyzer G3 透析カセット（Thermo Fisher Scientific）を用いて、200 mM NaCl、0.001 w/v% ポロキサマー188、1×PBS バッファーに対して透析した。その後、0.22 µm Millex-GV シリンジフィルター（Millipore）でろ過した。製造ワークフローを図 39 に示す。下流工程のモニタリングは、AC ピーク面積、AC 後の A260/A280、DGUC 後のピーク面積、DGUC 後の A260/A280、収量、および製造物の A260/A280 について実施した。

表 16 AAV8-CMV-EGFP ベクターの製造条件

ベクター番号	バッチ	培養容器	培養スケール (L)
1 2 3 4	A	1 L フラスコ	0.2
5 6 7	B	2 L フラスコ	1
8 9 10	C	2 L バイオリアクター	

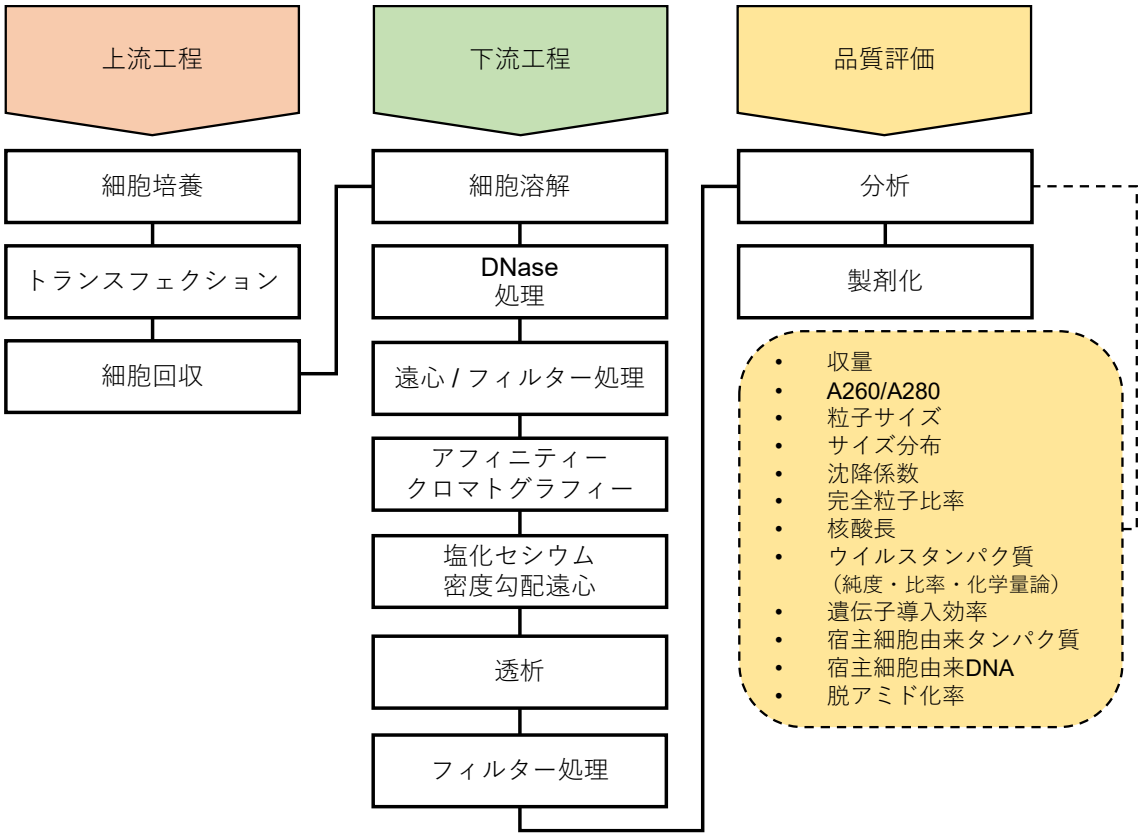


図 39 サイトメガロウイルスプロモーターと改良型緑色蛍光タンパク質を有する 10 の AAV ベクター（AAV8-CMV-EGFP）の製造工程および品質評価のフロー
上流工程、下流工程、および品質評価における各プロセス。明確にするため、各工程はオレンジ（上流工程）、緑（下流工程）、黄色（品質評価）で色分けした。

6.2.2 ゲノム力価測定

AAV ベクター含有試料を、DNase I バッファー、DNase I（タカラバイオ）、および 0.05 w/v% ポロキサマー188 から成る希釈バッファーで希釈した。AAV ベクターカプシド外の DNA を消化するために、この混合液を 37℃で 30 分間インキュベートした。その後 DNase I 不活化のため、終濃度が 50 mM になるように EDTA（pH 8.0）（NIPPON GENE）を添加した。その後、AAV ベクターカプシドを変性させる目的で試料を 95℃で 10 分間加熱した。前処理した試料を、Tris-EDTA（TE）バッファー（Invitrogen）中の 0.001 w/v% ポロキサマー188 で必要な濃度に希釈した。デジタル PCR（dPCR）は、ITR を標的とする特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマー（900 nM）と、フルオレセインアミダイト（FAM）蛍光色素を用いた特異的なプローブ（250 nM）（北海道システム・サイエンス）を用いた。プライマー、プローブ、ヌクレアーゼ非含有水、および QuantStudio Absolute Q DNA Master Mix（Thermo Fisher Scientific）からなる反応液を用いた。dPCR は、QuantStudio Absolute Q デジタル PCR システムおよび 16 ウェルマイクロ流体アレイプレート（Thermo Fisher Scientific）を用いて実施した。dPCR のシーケン

スは、96℃で 10 分間の酵素活性化を行った後、94℃で 5 秒および 54℃で 30 秒を 40 サイクル行った。
プライマーとプローブは以下のものを使用した。

ITR フォワードプライマー 5′ -GGAACCCCTAGT GATGGAGTT-3′
ITR リバースプライマー 5′ -CGGCCTCAGTGAGC GA-3′
ITR プローブ 5′ -[FAM]-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG [BHQ1]-3′

6.2.3 クライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）分析

カーボンフィルムでコーティングされた穴あきカーボングリッド（Quantifoil Ultra-Cu R1.2/1.3 300 メッシュ）に凍結試料を載せた。使用前に、グリッドを VES-10 マルチコーティングユニット（真空デバイス）を用いて 30 秒間グロー放電処理した。試料溶液（3 μL）をグリッドに適用し、Vitrobot Mark IV（Thermo Fisher Scientific）を用いて急速凍結した。すべての試料は、Tundra Cryo-TEM（Thermo Fisher Scientific）を用い、液体窒素温度、加速電圧 100 kV で観察した。画像は公称倍率 110,000 倍、4 μm フォーカス条件下、自動取得モードで記録した。

AAV ベクターの粒子画像は、以前に記述したように、取得した顕微鏡写真から切り出した。全粒子画像を、CNN 分類器を用いて FP と EP に分類した。CNN 分類器には AAV9 画像データセットで学習させたものを採用した[125]。学習済み CNN は MATLAB R2019b（バージョン 9.7.0.1216025）（The MathWorks）を用いて実装した。FP と EP の比率は、同定された FP および EP の画像数に基づいて計算した。

6.2.4 UV 分光法

紫外可視（UV-Vis）吸光度測定は、NanoDrop One（Thermo Scientific）、BioMate 160 UV–Vis（Thermo Scientific）、または UV-1900（島津製作所）分光光度計を用いて実施した。260 nm（A260）および 280 nm（A280）での平均吸光度、平均 A260/A280 比、および SD を 3 回測定の結果から算出した。

6.2.5 動的光散乱法

AAV ベクター試料の Z 平均径および D90 を、Zetasizer Ultra（Malvern Panalytical）を用いて 25℃で測定した。30 μL の試料をキュベットに充填した。各パラメータの平均値と SD を 3 回測定の実験から算出した。

6.2.6 キャピラリーゲル電気泳動法

VP 分析

1 µg の AAV ベクター試料を、10%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS; NIPPON GENE）14.4 µL および 2-メルカプトエタノール（ナカライテスク）4.83 µL と混合し、総容量が 80 µL となるよう Milli-Q 水で調整した。これを 70℃で 3 分間インキュベートした。Amicon（Merck Millipore）を用いて、3.5%の 2-メルカプトエタノールと 0.033% SDS から成る 70%マトリックス交換溶液（MES）でバッファーを 2 回交換した。回収した試料を 70℃で 3 分間インキュベートした。その後、Milli-Q 水で 20 倍希釈した 10 KD 内部標準（SCIEX）を 1 µL 加え、総容量が 70 µL となるよう Milli-Q 水で調整した。すべての実験には、フォトダイオードアレイ（PDA）検出器（214 nm）と 32 Karat ソフトウェア（バージョン 10.3、ビルド 20）を備えた PA800 Plus Pharmaceutical Analysis CE システム（SCIEX）を使用した。分離には、フューズドシリカキャピラリー（内径 50 µm、全長 30 cm、有効長 20 cm；SCIEX）を用いた。データ取得と解析は 32 Karat ソフトウェア（バージョン 10.3、ビルド 20）を用いて行った。各 VP ピークの補正面積を 214 nm での吸光係数で補正した後、60 量体中の VP 分子の化学量論を算出した。VP の平均化学量論、すなわち VP1、VP2、VP3 分子の化学量論、および SD を 3 回測定の実験から算出した。

核酸分析

各試料中の核酸は、プロテイナーゼ K（QIAGEN）を用いて抽出した。処理した試料は、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて前処理を行った。前処理した DNA をレーザー誘起蛍光検出器を備えた PA800 Plus システム（SCIEX）を用いて分析した。検出は励起波長 488 nm、検出波長 520 nm に設定した蛍光測定にて行った。分離はフューズドシリカキャピラリー（内径 50 µm、全長 30 cm、有効長 20 cm；SCIEX）および Nucleic Acid Extended Range Gel（SCIEX）と SYBR Green II RNA Gel Stain（SCIEX）を含むランニングバッファーを用いて実施した。サイズ標準として、一本鎖 DNA 7-K Ladder（PerkinElmer）を使用した。エレクトロフェログラムは 32 Karat ソフトウェア（バージョン 10.3、ビルド 20）を用いて解析した。

6.2.7 BS-AUC 分析

測定は 5.2.3 項、解析は 5.2.4 項と同様に実施した。粒子濃度は、検出波長 230 nm でのモル吸光係数を用いて、FP および EP ピークの面積を割ることで算出した。FP と EP の比率は、完全粒子比から算出した。$s_{20,w}$、完全粒子比および各パラメータの SD は、三重測定の実験から算出した。FP の $s_{20,w}$ 値を用いて、粒子の核酸長を算出した。算出には異なる核酸長を持つ AAV ベクターを用いた PBS/$H_2{}^{18}O$（0.001 w/v% ポロキサマー188 含有）中での BS-AUC 実験から導出した、以下の式を用いた[29]。

DNA 長 (塩基) = 104.81 × $s_{20,w}$ − 7194　　（式 19）

6.2.8 フローサイトメトリー

HeLaRC32 細胞を、24 ウェルプレートに 5 × 10^4 cells/well で、10%ウシ胎児血清（HYCLONE）を含む 0.5 mL の DMEM（Sigma-Aldrich）中に播種した。5 × 10^4の MOI で AAV ベクターを細胞に感染させ、3 回測定を行った。細胞を 37℃で 2 日間インキュベートした後、回収した。EGFP を発現する生存細胞の割合は、CytoFLEX フローサイトメトリーシステム（Beckman Coulter）を用いて決定した。

6.2.9 宿主細胞由来タンパク質（HCP）定量のための ELISA

HCP 含量は、HEK 293 HCP ELISA キット、3G（Cygnus Technologies）を用いて、製造元の指示に従って定量した。4 パラメータロジスティックフィットを用いて標準曲線を作成し、試料中の HEK293 由来 HCP を定量した。HCP 含量は各製品のタンパク質含量で正規化した。平均 HCP 含量と SD を実験から算出した。

6.2.10 宿主細胞由来 DNA（HCD）定量のための qPCR 分析

AAV ベクター含有試料から QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出し、抽出した DNA は resDNASEQ Human Residual DNA Quantitation Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて定量した。両手順は製造元から提供されたマニュアルに従って実施した。

6.2.11 脱アミド化率分析のためのペプチドマッピング

7.5 µg の AAV ベクター試料を、50 mM 炭酸水素アンモニウム（富士フイルム和光純薬)、6 M 塩酸グアニジン（富士フイルム和光純薬)、5 mM Tris(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩（富士フイルム和光純薬)、および 5 mM ヨードアセトアミド（富士フイルム和光純薬）と混合し、20℃で 1 時間、暗所でインキュベートした。変性させた AAV を 0.1 v/v%ギ酸（FA）（関東化学）を含む水で 10 倍に希釈し、MonoSpin S-type C18 カラム（ジーエルサイエンス）に適用した。適用した試料を 0.1 v/v% FA を含む蒸留水、および 0.1 v/v% FA を含む水/アセトニトリル（2/8）で洗浄し、0.1 v/v% FA を含むアセトニトリルで溶出した。溶出した AAV を凍結乾燥し、pH 6.5 の 50 mM 酢酸アンモニウム 30 µL に再溶解した。Rapyzime トリプシン（Waters）とリシルエンドペプチダーゼ R（Lys-C）（富士フイルム和光純薬）をトリプシン：Lys-C：タンパク質比 0.66:0.33:30 で混合し、37℃で

4 時間インキュベートした。消化は、1 v/v%トリフルオロ酢酸（東京化成工業）3 µL を添加して停止した。液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）測定には、Q Exactive HF-X 質量分析計（Thermo Fisher Scientific）に接続された Ultimate 3000 LC ポンプ（Thermo Fisher Scientific）を使用した。ペプチドを Acclaim Pepmap100 C18 カラム（粒子径 5 µm、0.3 × 5 mm、; Thermo Fisher Scientific）に捕集し、ACQUITY UPLC Peptide CSH C18 カラム（ポアサイズ 130 Å、粒子径 1.7 µm、1.0 × 150 mm ; Waters）を用いて分離した。移動相 A は 0.1 v/v% FA を含む水、移動相 B は 0.1 v/v% FA を含むアセトニトリルとした。分離のための LC 条件は、移動相 B の勾配を 45 分間で 5%–35%、流速 50 µL/min とした。フル MS スキャンは、イオン移送管温度 250°C、分解能 120,000、質量範囲（m/z）300–2,000、ファネルラジオ周波数（RF）レベル 40 で実施した。それに続くデータ依存 MS/MS スキャンは、27%の高エネルギー衝突解離、分解能 30,000 で実施した。ペプチド同定は Byos v.5.6.68（Protein Metrics）および BioPharma Finder v.3.2（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。定量は Xcalibur v.4.3.73 11（Thermo Fisher Scientific）の Quan Browser を用いて行った。

6.2.12 保管安定性試験

AAV8 ベクターの保管安定性に適した溶媒条件の導出を行った。今回は 4 つの異なるバッファー（F1、F2、F3、および F4）を用いた。各溶媒の組成を表 17 にまとめる。F2 と F3 は、以前の研究で採用されたものを部分的に改変した[126], [127]。

表 17 保管安定性試験に用いた溶媒とそれに含まれる添加物

溶媒	添加物
F1（pH 7.2）	2.97 mM 無水リン酸水素二ナトリウム、 1.06 mM リン酸二水素カリウム 355 mM NaCl 0.001 w/v% ポロキサマー188
F2（pH 7.6）	10 mM 無水リン酸水素二ナトリウム 1.47 mM リン酸二水素カリウム 100 mM NaCl 2.7 mM KCl 0.001 w/v% ポロキサマー188 4 w/v %（117 mM）スクロース
F3（pH 7.4）	20 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 2 mM $MgCl_2$ 0.001 w/v% ポロキサマー188

	2 w/v%（58.4 mM）スクロース
F4（pH 7.4）	20 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 2 mM $MgCl_2$ 0.001 w/v% ポロキサマー188 90 mM Arg

AAV8 ベクターを各溶媒で透析し、試料濃度を約 2×10^{12} vg/mL に調整した。調整した試料の半分を保管試験に使用した。保管試験は、Bee らの記述[127]に従い実施した。具体的には、試料に約－80℃と室温の間で 5 回の凍結融解を施し、2℃–8℃で 120 時間（5 日間）保存し、その後室温で 78 時間（3.25 日間)、暗所保存した。dPCR を実施するまで、保管後直ちに試料を凍結した。保管前後のゲノム力価を dPCR で測定した。回収率は、保存前のウイルス量（vg）に対する保管後のベクター量の比率として算出した。
さらに、N57、N94、または N263 の脱アミド化率と遺伝子導入効率の関係を、短期加速安定性試験によって調査した。ベクター番号 4、9、および 10 を、200 mM NaCl、0.001 w/v% ポロキサマー188、1× PBS で透析し、25℃で 1 週間および 3 週間暗所保存した。その後、N57、N94、および N263 の脱アミド化率と遺伝子導入効率を評価した。脱アミド化率と遺伝子導入効率は、6.2.12 項および 6.2.10 項で記述した方法に従った。

6.2.13 統計解析と作図

統計解析は JMP Pro（バージョン 16.0.0）（SAS Institute）を用いて実施した。相関分析については、ピアソン相関係数に基づいて相関の有無を判断した。中程度以上の相関を示すものに焦点を当てた。ピアソン相関係数の絶対値が 0.4 以上の場合、2 つの QA パラメータ間に相関があると判断した。基準は文献に基づいている[128]。散布図は JMP Pro（バージョン 16.0.0）（SAS Institute）を用いて作成した。

2 つの製品間の QA に統計的に有意な変動があるかどうかを評価するために、t 検定（Student の t 検定）を用いた。p 値が 0.05 未満の場合、2 つの製品の QA パラメータの平均値に差がないという帰無仮説を棄却し、それらの平均値に有意な差が存在するという対立仮説を支持することとした。

6.3 結果

6.3.1 AAV ベクターの製造

製造した AAV ベクター（AAV8-CMV-EGFP）の平均（±SD）収量は、培養液 0.2 L あたり $4.4 \times 10^{13} \pm 2.2 \times 10^{13}$ vg であった。平均（±SD）収量は、バッチ A で 2.7

× 10^{13} ± 1.8 × 10^{13} vg、バッチ B で 4.5 × 10^{13} ± 0.3 × 10^{13} vg、バッチ C で 6.6 × 10^{13} ± 1.8 × 10^{13} vg であった（図 40C)。アフィニティークロマトグラフィー（AC）および密度勾配超遠心（DGUC）のピーク面積、各精製ステップ後の収量、および A260/A280 比を含む、ダウンストリームプロセスの工程内結果を図 40 に示す。

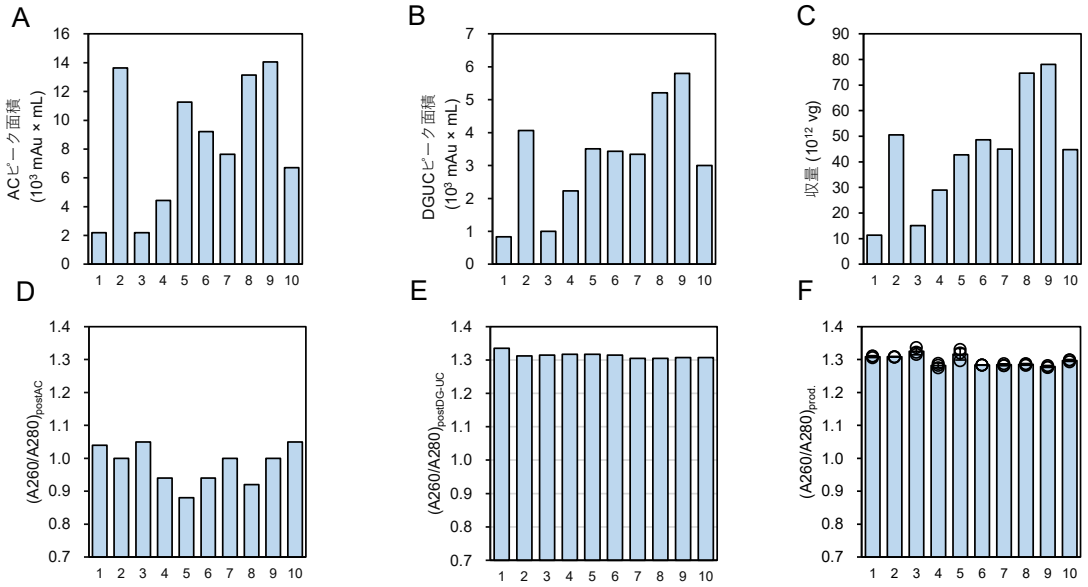


図 40 下流工程の工程内結果
（A）AC 実施時のピーク面積、（B）DGUC 実施時のピーク面積、（C）収量、（D–F）各ステップでの A260/A280。（D）AC 後、（E）DGUC 後、および（F）最終製造物をそれぞれ示す。（F）においては、棒グラフは 3 回測定の実験から得られた平均値、エラーバーは標準偏差（SD)、プロットは各測定の結果を示す。各棒グラフの横軸の数字は製造番号を示す。

6.3.2 AAV8-CMV-EGFP の QA

AAV ベクター間で変動のあるパラメータを抽出するため、10 の AAV8-CMV-EGFP ベクター製品について 14 項目の QA を評価した。各 QA の結果は以下の通りである。

カプシド完全性

10 の AAV ベクターについて、クライオ電子顕微鏡（cryo-EM）を用いてカプシド完全性を調べた。先行研究で得られた電子顕微鏡画像と同様に、ゲノムが充填された粒子と EP が観察された。本研究で製造されたすべての製品において、AAV ベクター粒子は正常に粒子を形成していた（図 41A)。さらに、すべての製品で観察された粒子の大部分は FP であり、凝集体と思われる粒子の集合は見られなかった。各製品の完全粒子比は、申請者が属する研究グループで開発した畳み込みニューラルネットワーク（CNN）ベースの画像分類法を用いて算出され、91.2%（ベクター番号 8）から 98.2%（ベクター番号 5）の範

囲であった（表 18）。次に、これら 10 個の AAV ベクターの 14 項目の QA を調査した。

粒子特性および分布

動的光散乱法（DLS）分析で観察された主成分の Z 平均径を調べた。10 製品について、繰り返し実験から得られた各製品の平均 Z 平均径は 28.2 nm（ベクター番号 2）から 30.1 nm（ベクター番号 5）の範囲であり（図 41B）、一般的に認められている AAV ベクターの値とよく一致していた。平均 Z 平均径よりも凝集体の影響を受けにくい指標である D90 を用いて、製品のサイズ分布を評価した。10 製品について、繰り返し実験から得られた各製品の平均 D90 は 23.9 nm（ベクター番号 8）から 28.7 nm（ベクター番号 6）の範囲であった（図 41C）。サイズ分布の変動が小さいのは、精製方法と最終溶媒条件を統一したことに起因する可能性がある。これらの数値は、cryo-EM 実験で凝集体が観察されなかった事実ともよく一致していた。

各製品の FP の平均沈降係数（$s_{20,w}$）は、繰り返し実験から得られ、10 製品で 93.0 S（ベクター番号 1 および 3）から 93.6 S（ベクター番号 4）の範囲であった（図 41D）。各製品の沈降係数分布から、製造された AAV8 ベクターは高い純度を有することが示された（図 42）。$s_{20,w}$ から推定された核酸長は、式 19 を用いて計算し、2.56 kb（ベクター番号 1 および 3）から 2.61 kb（ベクター番号 4）の範囲であり、設計上の核酸長である 2.52 kb とよく一致していた。FP と EP の粒子濃度は、超遠心分析バンド沈降速度法（BS-AUC）によって得られた沈降係数分布プロファイルの各ピーク面積と、検出波長 230 nm における各粒子のモル吸光係数（ε）から決定した。繰り返し実験から得られた各製品の平均の完全粒子比は、10 製品で 93.6%（ベクター番号 7）から 99.4%（ベクター番号 5）の範囲であった（図 41E）。BS-AUC で得られた完全粒子比は、cryo-EM 画像の CNN に基づいた画像分類によって推定された値とよい相関を示した（表 18）。

主要核酸の核酸長

10 製品の核酸長は 2.2 kb（ベクター番号 6）から 2.4 kb（ベクター番号 1）の範囲であった（図 41F）。ここで得られた平均核酸長は、設計上の核酸長 2.52 kb と比較して約 8%短かったが、これはおそらく DNA の両端にある逆向末端反復（ITR）領域が二次構造を形成し、ゲノム DNA のコンパクト化を引き起こしたためと考えられる。

ウイルスタンパク質（VP）の特性

10 個の AAV8 ベクターについて、繰り返し実験から得られた各ベクターの平均 VP 純度は 99.0%（ベクター番号 8）から 99.4%（ベクター番号 6 および 7）の範囲であった（図 41G）。本研究で採用した下流工程は、タンパク質不純物を高い割合で除去できることが示された。カプシドが 60 分子の VP から構成されると見なして、AAV ベクター粒子あ

たりの VP1、VP2、および VP3 分子の数を算出した（図 43)。総 VP 数に対する VP1 と VP2 の合計分子数の比率、(VP1 + VP2)/VP_{total}、は AAV ベクターの生物活性と正の相関があることが報告されている[129]。本研究では、繰り返し実験から得られた各ベクターの (VP1 + VP2)/VP_{total} の値は、10 個の AAV8 ベクターで 0.167（ベクター番号 8）から 0.241（ベクター番号 4）の範囲であった（図 41H)。(VP1 + VP2)/VP_{total} の変動は、VP2 分子の化学量論の変化に起因していた。VP1、VP2、および VP3 分子の平均（±SD）化学量論は、それぞれ 4.7（±0.3)、7.6（±1.2)、および 47.7（±1.3）であった。図 41I は、VP 分子の化学量論が製造条件の違いによって変化したことを明確に示している。得られた VP2 分子の最も高い化学量論はベクター番号 4 で 9.5、最も低い化学量論はベクター番号 8 で 5.4 であった。

遺伝子導入効率

50,000 の感染多重度（MOI）において、GFP 陽性細胞の割合に基づく各製品の遺伝子導入効率は、繰り返し実験から得られ、10 個の AAV8 ベクターで 50.9%（ベクター番号 8）から 63.1%（ベクター番号 7）の範囲であった（図 41J)。

宿主細胞由来タンパク質および宿主細胞由来 DNA

繰り返し実験で得られた各ベクターの平均宿主細胞由来タンパク質（HCP）含量は、10 個の AAV8 ベクターで検出限界以下から 139.8 ng/mg（ベクター番号 1）の範囲であった（図 41K)。Prod. 2 と 5 の HCP 含量は検出下限未満であった。繰り返し実験から得られた各ベクターの平均宿主細胞由来 DNA 濃度は、10 個の AAV8 ベクターで 130.6 ng/mL（ベクター番号 5）から 1600.8 ng/mL（ベクター番号 4）の範囲であった（図 41L)。

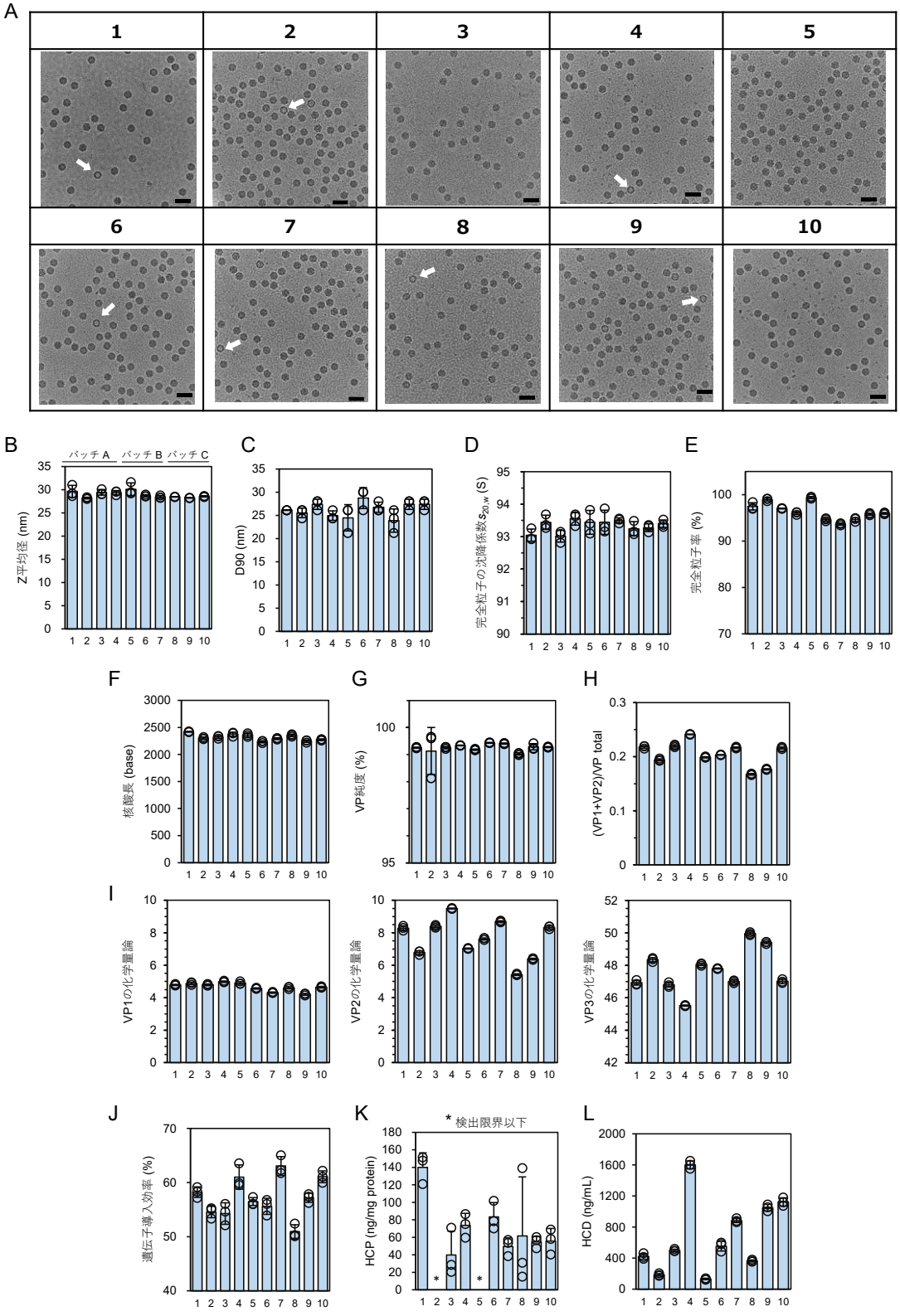


図 41 10 個の AAV8-CMV-EGFP ベクターにおけるカプシドの完全性、QA、およびベクター間の変動

（A）10 個の AAV8-CMV-EGFP ベクターのクライオ電子顕微鏡写真。スケールバーは 50 nm を示す。顕微鏡写真中に EP の存在が認められるものについては、EP を白矢印で指し示した。(B-L）各 QA における 10 製品のパラメータを示す棒グラフ。プロットは各測定の結果を示し、棒グラフは 3 回測定の実験から得られた平均値を示す。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。平均値と SD 値は、各 AAV ベクター製品の QA について 3 回実施した実験から算出した。(B）Z 平均径、(C）D90、(D）FP の沈降係数、$s_{20,w}$、(E）完全粒子比、(F）核酸長、(G）VP 純度、(H）(VP1+VP2)/VP_{total}、 (I）ウイルスタンパク質（VP）分子の化学量論比における製品間の変動、VP1（左)、VP2（中央)、および VP3（右)、(J）遺伝子導入効率、(K）宿主細胞由来タンパク質（HCP)、(L）宿主細胞由来 DNA（HCD)。各棒グラフの横軸の数字はベクター番号を示す。

表 18 異なる手法で見積もった完全粒子比の比較

	ベクター番号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cryo-EM	95.7	97.9	96.5	94.7	98.2	94.1	93.9	91.2	94.6	95.1
BS-AUC	97.5	99.0	97.0	96.0	99.4	94.6	93.6	94.6	95.8	96.0

（数値の単位：%）

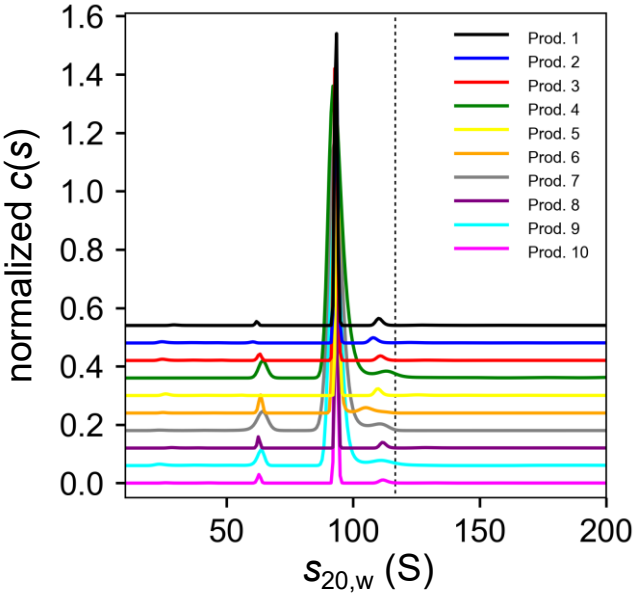


図 42 各 AAV8 ベクターの沈降係数分布の重ね合わせ

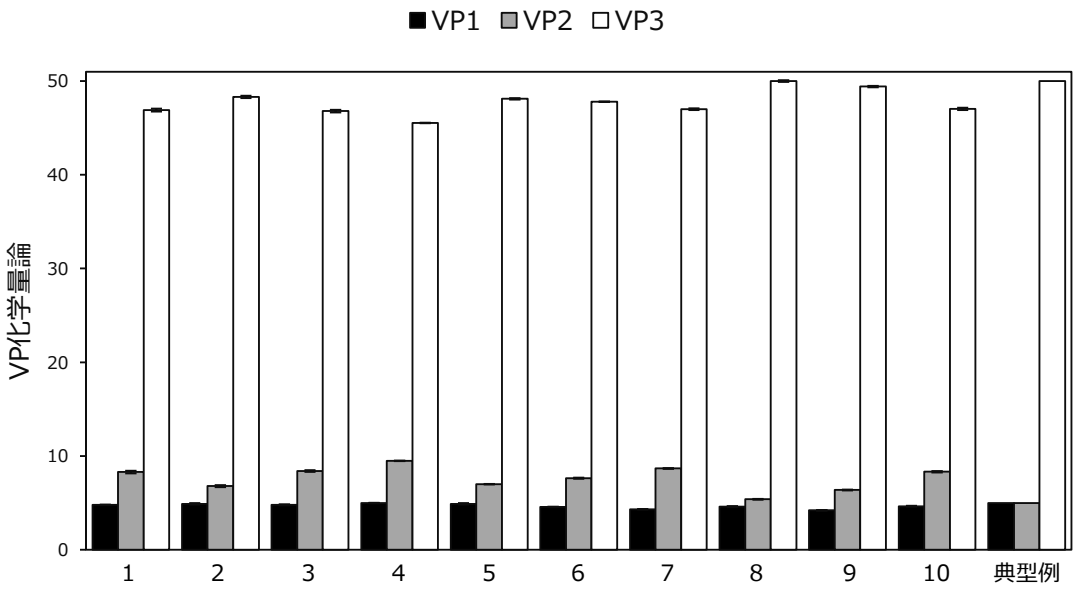


図 43 AAV ベクター粒子あたりの VP1、VP2、および VP3 分子の数

カプシドタンパク質の脱アミド化率

AAV8 ベクターのカプシドタンパク質の脱アミド化部位から 9 つの残基（N57, N94, N263, N305, N329, Q467, N479, N514, N653）を詳細な評価のために選定した。選定基準は AAV8 ベクターの遺伝子導入効率に影響を与えることが報告されている[130]こと、および免疫応答に関与することが AAV9 ベクターで報告された[131]アミノ酸残基のうち AAV8 で保存されているものとした。これらのうち、全 AAV8 ベクターで平均脱アミド化率が 1%を超えた残基 N57、N94、および N263 が相関解析に用いた。繰り返し実験から得られた各 AAV8 ベクターの N57、N94、および N263 の平均脱アミド化率は、10 個の AAV8 ベクターでそれぞれ 8.4%（ベクター番号 4）から 18.6%（ベクター番号 8)、1.6%（ベクター番号 2 および 4）から 2.8%（ベクター番号 8)、および 3.7%（ベクター番号 2 および 7）から 10.6%（ベクター番号 8）の範囲であった（図 44A–図 44C)。

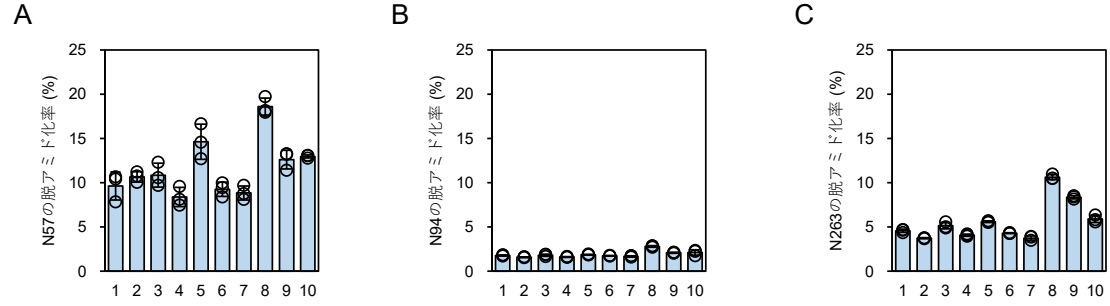


図 44 10 個の AAV8-CMV-EGFP ベクターにおける N57、N94、および N263 の脱アミド化率

（A-C）各アスパラギン残基の脱アミド化率。プロットは各測定の結果を示し、棒グラフ

は 3 回測定の実験から得られた平均値を示す。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。平均値と SD 値は、各 AAV8 ベクターについて 3 回実施した実験から計算した。各グラフの横軸の数字はベクター番号を示す。

製剤評価

高い精製度をもつ AAV ベクターであっても、溶液での保管安定性は製剤条件に依存する。選択された条件下で、凍結融解サイクルを通じた回収率に焦点を当てた製剤評価を行った。製剤条件 F1 および F2 において保管前後の AAV8 ベクターのゲノム力価の著しい減少が認められた。一方で F3 および F4 中の AAV8 ベクターのゲノム力価は凍結融解後も維持されることが分かった（図 45）。

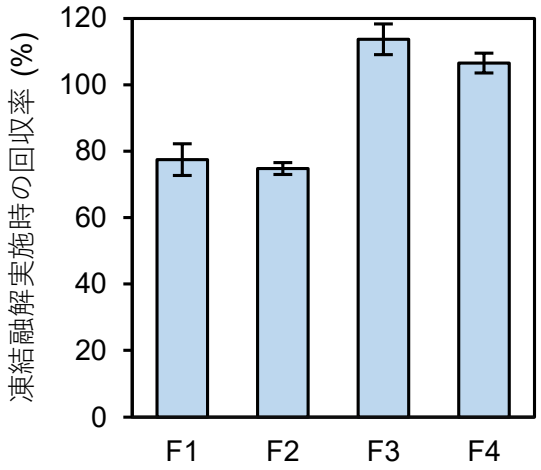


図 45 製剤条件を変調させた場合の回収率（凍結融解および保管前後のゲノム力価変化率）
グラフの横軸に製剤条件を示した。エラーバーは 3 回の繰り返し実験から計算した標準偏差を示す。製剤条件は 6.2.13 項の表 17 に示した。

6.3.3 ベクター収量と VP 化学量論との相関

ベクター収量とベクターの QA との相関を図 46 に示す。収量と VP3 分子の化学量論との間に正の相関が認められた（図 46A）。対応して、収量と VP2 分子の化学量論との間に負の相関が観察された（図 46B）。収量と遺伝子導入効率との間に相関は認められなかった（図 46C）。

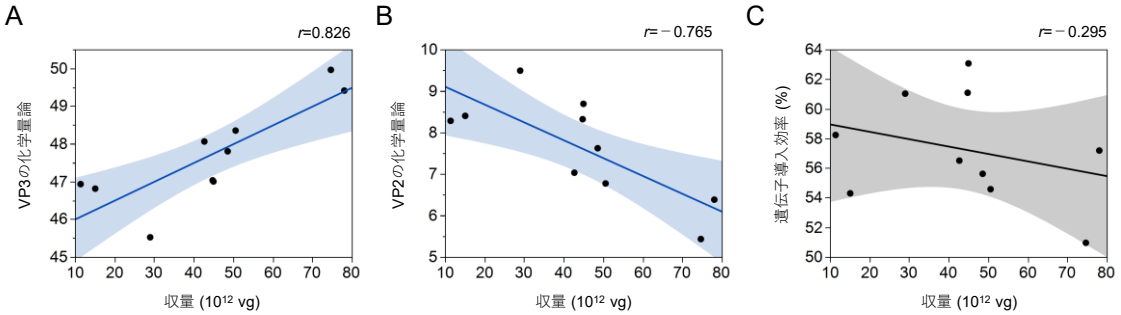


図 46 VP 化学量論および遺伝子導入効率と収量の関係
収量と VP3 の化学量論（A)、VP2 の化学量論（B)、遺伝子導入効率（C）をそれぞれ示す。

6.3.4 AAV8-CMV-EGFP の品質評価結果間の相関

本研究では、AAV ベクターにおける QA の変動が、遺伝子導入効率にどのように関与するかを明らかにすることを主目的とした。このため、ここでは 3 バッチの培養条件間の優劣や差異を評価するために製造条件を比較する方針は採らず、条件の違いによって結果として生じた QA の変動を説明変数として取り扱い、遺伝子導入効率との相関関係に着目した。この解析方針により、条件間比較に依らず、QA そのものが遺伝子導入効率に寄与するかどうかを検討することが可能であると考えた。具体的には、潜在的な相関関係を探索的に特定することを目的として、10 個の AAV ベクターにわたって測定された 17 の QA パラメータの全 136 通りの組み合わせについて、網羅的なペアワイズ相関解析を実施した（図 47)。ここで行った相関解析は、各品質特性を意図的に独立して制御した実験ではなく、製造条件の僅かな変調やベクター間差によって生じたデータを用いて実施したものである。このため、各項目間の相関には、培養条件や製造操作に起因する制御されていない要因が含まれている可能性がある。一方で、このような解析により、実製造環境に近い条件下において、複数の QA が同時に変動する状況を反映したデータから、遺伝子導入効率との関係性を俯瞰的に捉えることが可能となると考えられる。この解析を通じて、いくつかの有意な相関が明らかになった。これらのうち、遺伝子導入効率と VP 分子数または脱アミド化の度合いとの間で観察された相関は、特に実用上重要であると考えられた。したがって、以下の評価はこれら三者の関係に焦点を当てる。

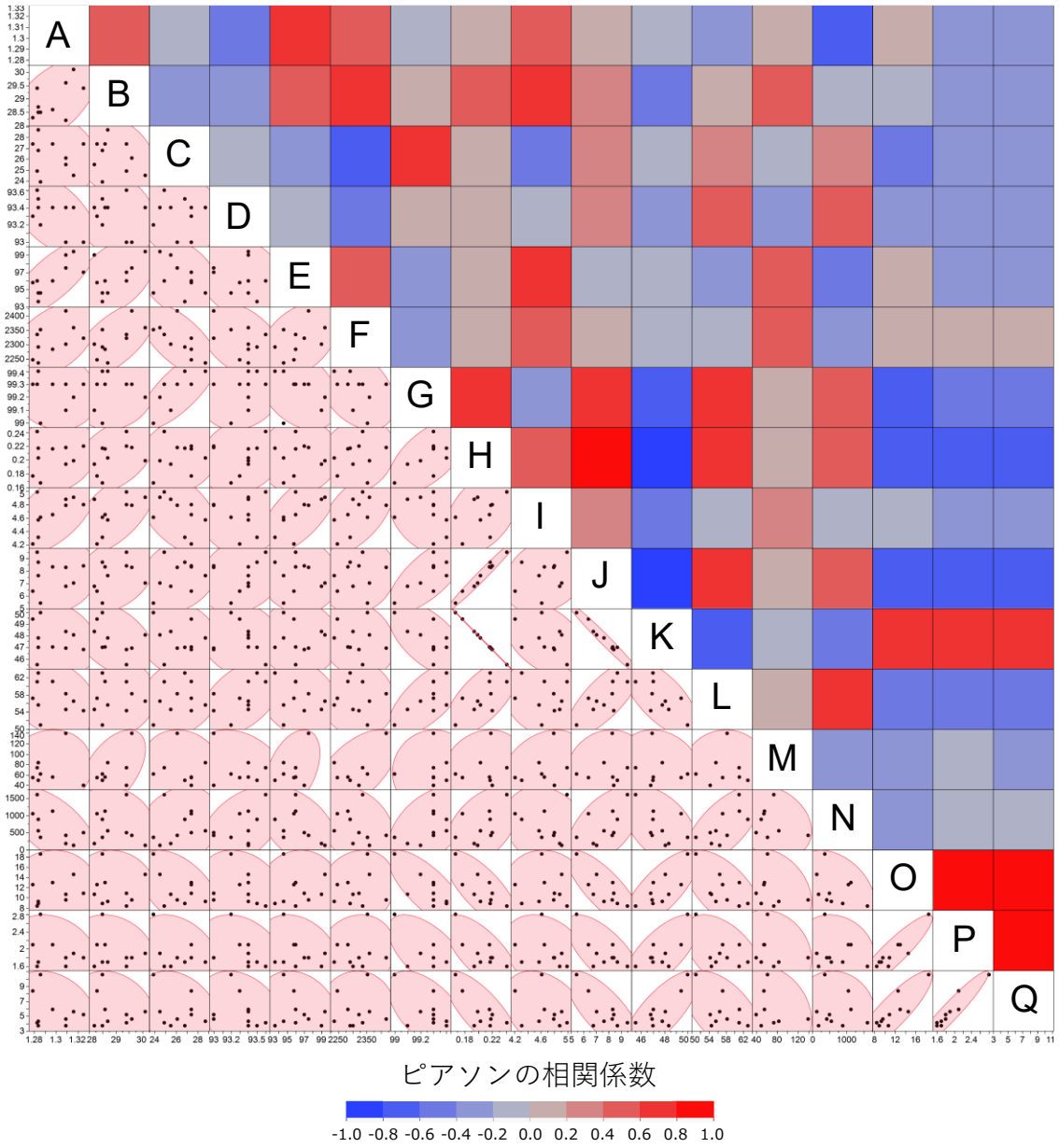


図 47 10 製品の 17 項目の QA パラメータ間の相関行列解析
グラフの左上から右下への対角線上に配置された四角は、10 種類の AAV8 ベクターの QA パラメータを示す。(A) 製品の A260/A280 比、(B) Z 平均粒子径、(C) D90、(D) FP の沈降係数 $s_{20,w}$、(E) 完全粒子比、(F) 核酸長、(G) VP 純度、(H) (VP1+VP2)/VP_{total}、(I) VP1 化学量論、(J) VP2 化学量論、(K) VP3 化学量論、(L) 遺伝子導入効率、(M) 宿主細胞由来タンパク質 (HCP)、(N) 宿主細胞由来 DNA (HCD)、(O) N57 の脱アミド化率、(P) N94 の脱アミド化率、(Q) N263 の脱アミド化率。対角線よりも上側の領域に表示されているヒートマップは、ピアソンの相関係数に対応する。ヒートマップの色調と相関係数の対応は本図の下部に凡例を示した。対角線よりも下側には、相関プロットと 95%信頼区間の確率楕円を示した。

6.3.5 VP 関連パラメータと遺伝子導入効率の関係

遺伝子治療において AAV ベクターを用いる主な利点は、治療遺伝子を標的細胞に

送達し、目的遺伝子（GOI）からタンパク質を発現させる点にある。この点を考慮すると、今回評価した項目のうち、遺伝子導入効率は最も注目すべき QA の一つと言える。まず初めに各 VP 分子の化学量論と遺伝子導入効率の関係を調べた。VP1 分子の化学量論と遺伝子導入効率との間に相関は認められなかった（図 48A）。一方で、VP2 はウイルスの感染性に必須ではないという先行研究[121]と異なり、VP2 分子の化学量論と遺伝子導入効率との間には正の相関が認められた（図 48B）。反対に VP3 分子の化学量論と遺伝子導入効率との間には負の相関が認められた（図 48C）。

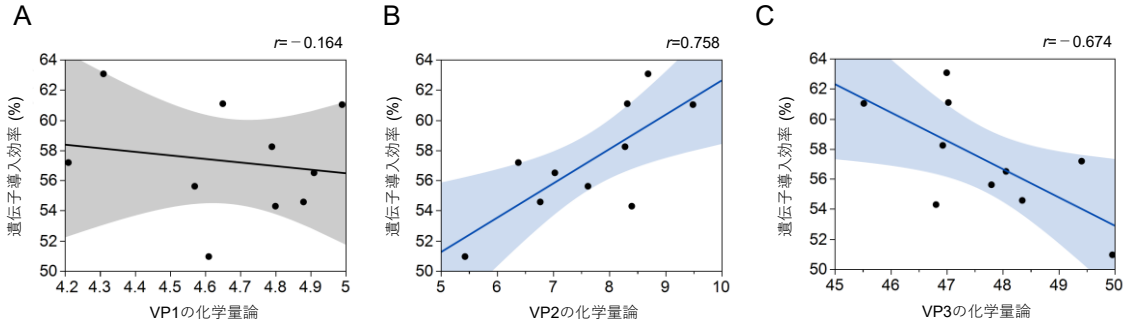


図 48 遺伝子導入効率と VP 化学量論の相関解析
遺伝子導入効率と VP1 の化学量論（A）、VP2 の化学量論（B）、VP3 の化学量論（C）をそれぞれ示す。

6.3.6 脱アミド化率と遺伝子導入効率の関係

先行研究では、AAV8 カプシドタンパク質の N57、N94、および N263 の脱アミド化が遺伝子導入効率を低下させることが示されている[130]。これと一致して、本研究では、N57、N94、および N263 の脱アミド化率と遺伝子導入効率との間に負の相関が観察された（図 49A–図 49C）。これら 3 つのアスパラギン残基のうち N57 と N94 は AAV1-10 血清型のすべてにおいて保存されている。このため N57 と N94 の脱アミド化は、他の血清型においても遺伝子導入効率の負の QA と見なされる可能性があると考えられた。

次に N57、N94、および N263 の脱アミド化率は互いに相関していた（図 49D–図 49F）。VP2 分子の化学量論は、N57、N94、および N263 の脱アミド化率と負の相関を示した（図 49G–図 49I）。

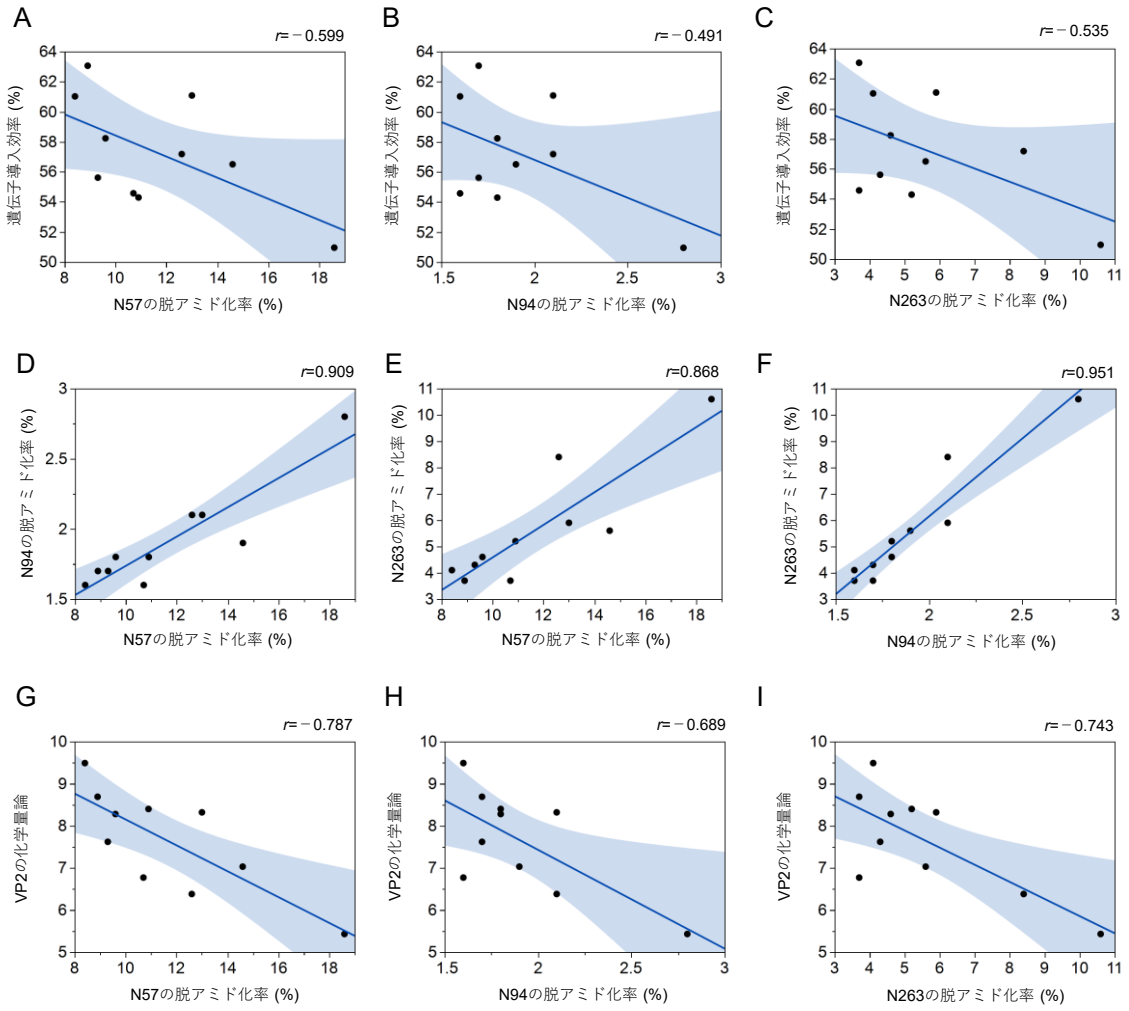


図 49 脱アミド化率と遺伝子導入効率の関係

これらの結果は、遺伝子導入効率の変化が VP2 化学量論の変化によるものか、脱アミド化率の変化によるものかを判断できないことを示している。これにより VP2 化学量論または脱アミド化率のいずれか一方のみを変化させた際の遺伝子導入効率の変動を調査する必要があると考えられた。AAV ベクターを含む溶液を 1 週間から 4 週間保管すると VP の脱アミド化率が増加することが知られている[132]。これを参考に、短期加速安定性試験を実施することで、脱アミド化率の変化が遺伝子導入効率へ与える影響の抽出を試みた。

6.3.7 脱アミド化率と VP2 化学量論の遺伝子導入効率への寄与の区別

脱アミド化率と VP2 化学量論との間に相関が確認されたため、N57、N94、および N263 の脱アミド化が遺伝子導入効率に与える影響を、一定の VP2 化学量論で評価するために、ベクター番号 4、9、および 10 について 25℃で短期加速安定性試験を実施した。この温度は、以前に AAV9 ベクターのアスパラギン残基の脱アミド化を促進するために使

用されたものである。3 週間の保存後、3 つの AAV8 ベクターすべての VP2 化学量論は変化しなかった（図 50A）。一方、3 つの AAV8 ベクターすべての遺伝子導入効率は保存期間中に有意に減少した（図 50B）。3 つの AAV8 ベクターすべての 3 つのアスパラギン残基すべての脱アミド化率は、保存期間中に有意に増加した（図 50C）。N57 と N94 については脱アミド化率と遺伝子導入効率との間に負の相関が見られたが、N263 については認められなかった（図 50D–図 50F）。これは、これらの N57 および N94 の脱アミド化が遺伝子導入効率に対して負に働く QA であることを示している。

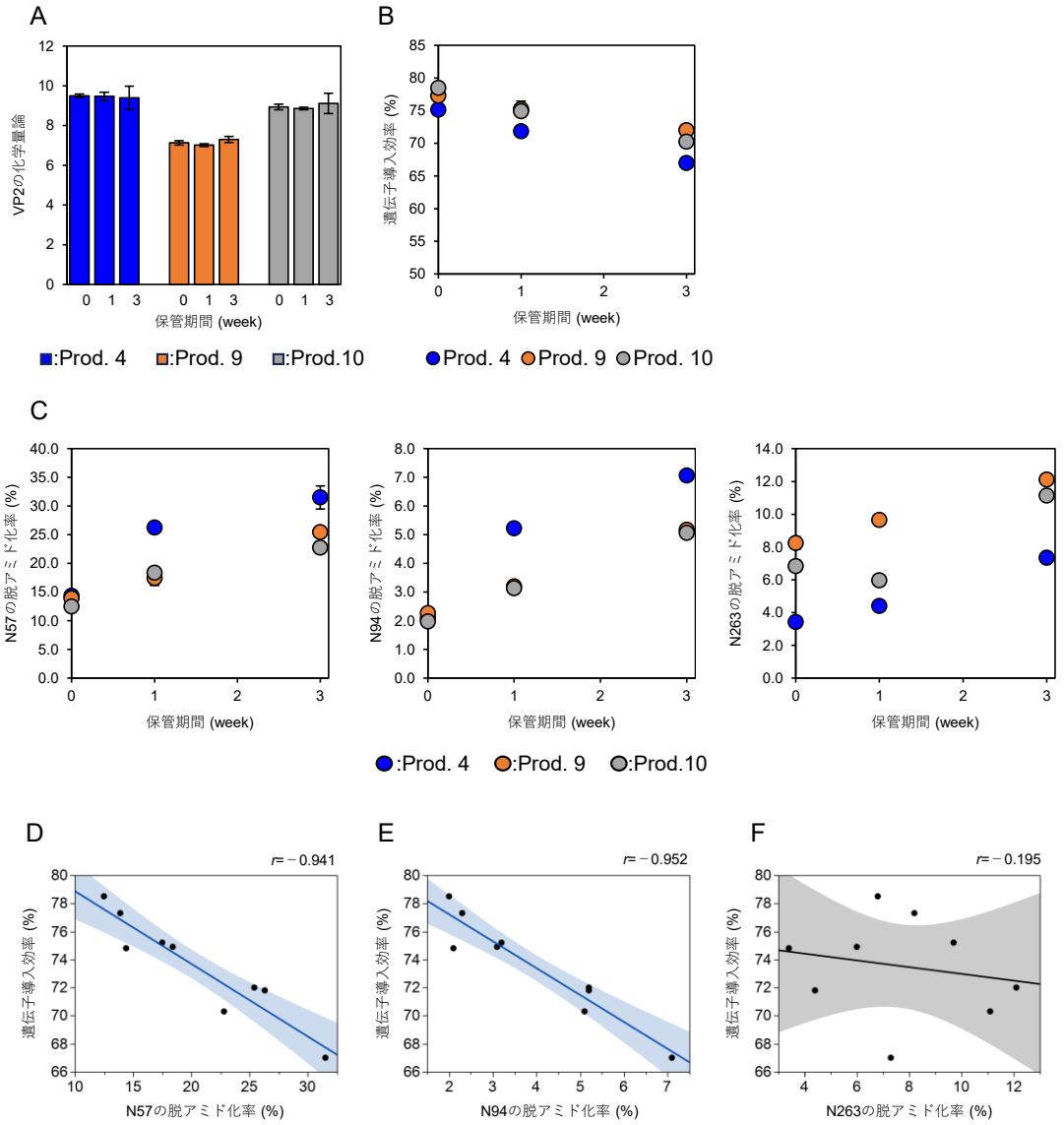


図 50 短期加速安定性試験の結果
（A）VP2 化学量論の保管期間依存性。（B）遺伝子導入効率の保管期間依存性。（C）N57、N94、N263 の脱アミド化率の保管期間依存性。（D-F）N57、N94、N263 の脱アミド化率と遺伝子導入効率の相関プロット。

6.4 考察

本研究では、10 個の AAV8-CMV-EGFP ベクターの製造と分析を通じて、工程内結果の変動と QA パラメータ間の相関を評価した。 収量は、VP2 分子の化学量論と有意な負の相関があり、VP3 分子の化学量論と有意な正の相関があった（図 46A および図 46B)。VP2 と VP3 タンパク質は同じ mRNA 分子種から翻訳される[133], [134]。標準的な開始コドン ATG を持つ VP3 タンパク質は、非標準的な開始コドン ACG を持つ VP2 タンパク質よりも多く翻訳される[135]。収量と VP3 分子の化学量論の間の正の相関は、より多くの VP タンパク質が翻訳されるほど、核内で形成されるカプシド粒子の数が増え、より多くの VP3 分子を持つカプシド粒子の集団、すなわちより少ない VP2 分子を持つ集団が増えるという仮説で説明できる。本研究では収量が遺伝子導入効率と弱い負の傾向を示したことから、AAV ベクターの製造量の向上は、治療上有効なベクターの取得にはつながらないことが示唆されたと言える。収量と遺伝子導入活性を同時に高い水準で達成するための一つの戦略は、最近の研究で示されたように、VP3 翻訳開始部位に変異を導入した変異型 AAV ベクターを用いることである。具体的には、AAV2-M203V 変異体ベクターおよび AAV2-M211V 変異体ベクターは、収量を減少させることなく、野生型 AAV2 ベクターと比較して有意に高い遺伝子導入効率を示している[129]。

AAV ベクターの分散状態を製造後から投与に至るまで安定に保持するには、製剤条件の最適化が不可欠である。リン酸緩衝液を含む製剤条件は AAV ベクターを基盤とした治療薬において広く用いられている[136]が、リン酸緩衝液条件下での凍結融解はゲノム力価を減少させる[137]。充填・最終製剤化および投与前の過程で複数の凍結融解サイクルが行われるため、ベクターが凍結融解サイクルを経ても、ゲノム力価や遺伝子導入効率といった AAV ベクターの活性に直接関連する QA に影響を与えない製剤条件を特定する必要がある。凍結融解サイクル後のゲノム力価の変化に関する今回の実験では、リン酸緩衝液中で行った凍結融解操作がゲノム力価を有意に減少させたが、先行研究[126], [127]に基づき使用したスクロースまたはアルギニンを含む Tris 緩衝液条件下では凍結融解操作後もゲノム力価の維持が認められた（図 45)。先行研究で示されたゲノム力価、粒子径、サイズ分布、遺伝子導入効率に加えて、本研究において示された、遺伝子導入効率と負の相関があった脱アミド化率を評価することは、凍結融解サイクルが AAV ベクターの QA に与える影響を評価する際に新たな研究視点を提供すると考えられる。

VP2 分子の化学量論は、遺伝子導入効率と正の相関があった（図 48B)。VP2 分子は、VP3 分子のアミノ酸配列と重複しない N 末端領域に 2 つの塩基性アミノ酸クラスターを含んでいる[138]。VP1/VP2 共通領域の C 末端側の塩基性アミノ酸クラスターは、AAV2 の核内移行における核局在化シグナル（NLS）として不可欠である[139]。その結果、VP2 分子の化学量論が大きいベクターは高い遺伝子導入効率を持つと考えられる。先行研究では、エンドソーム脱出のためのホスホリパーゼ A2 ドメインと核内移行のための NLS の両方を持つ VP1、およびカプシドの完全性と受容体結合に関与する VP3 が、AAV ベク

ターにおける標的細胞への GOI の形質導入に不可欠であることが示されている[121]。対照的に、NLS のみを持つ VP2 は遺伝子導入に必須ではないことが示されている[121]。以上より、VP2 は遺伝子導入に必須ではないものの、カプシド中の VP2 分子の化学量論は遺伝子導入効率に影響を与える QA であると結論される。

AAV8 ベクターの特定のアスパラギン残基の脱アミド化が遺伝子導入効率を減弱させることが示唆されている[130]が、各アスパラギン残基の脱アミド化率および遺伝子導入効率との関係は完全には理解されていない。これは、先行研究で実施された変異導入実験では、変異導入部位以外の場所で生じた変化が遺伝子導入効率に影響を与える可能性を排除できなかったことが一因である。本研究では、質量分析を用いたアミノ酸残基ごとの定量評価を通して N57、N94、および N263 が脱アミド化の主要な部位であることを示したが、これはこれらのアスパラギン残基に対する周辺の水分子のアクセス性という観点から説明できる。水素/重水素交換質量分析を用いた最近の研究により、N57 と N94 は水分子に非常にアクセスしやすい領域に位置していることが示されている[32], [33]。N263 は構造解析から明らかなように表面に露出している[140]。N57、N94、および N263 の脱アミド化率の間に相関が認められた（図 49D–図 49F）ことから、これら 3 つのアスパラギン残基は同時に脱アミド化を受けている可能性が考えられる。VP1 特異領域の N57 と N94、および VP3 領域の N263 の脱アミド化率が増加するにつれて、遺伝子導入効率が低下する傾向が認められた。短期加速安定性試験によるこれら 3 つのアスパラギン残基の脱アミド化のさらなる評価により、VP1 特異領域の N57 と N94 について脱アミド化が遺伝子導入効率の低下に有意に寄与することが示された。従って、少なくとも N57 と N94 の脱アミド化率は、AAV ベクターの潜在的な CQA（pCQA）として管理されるべきである。

ベクター番号 4 と 6 の比較では、N57 と N94 の脱アミド化率が同レベルである場合、VP2 分子の化学量論が大きいほど遺伝子導入効率が高いことが示された。同様の現象はベクター番号 9 と 10 の比較でも観察された。これらの比較は、VP2 分子の化学量論が遺伝子導入効率の正の因子であるという結論を支持する。加えて、短期加速安定性試験で示されたように、VP2 分子の化学量論に有意差が認められない AAV8 ベクター間であっても、脱アミド化率が高いほど遺伝子導入効率は低くなる。これらの結果は、VP2 化学量論と N57、N94、および N263 での脱アミド化の両方が、独立して遺伝子導入効率と相関する QA であるということを示している。以上より、今回の研究から、VP2 分子の化学量論と N57 および N94 の脱アミド化率が、遺伝子導入の観点から AAV ベクターの潜在的な CQA（pCQA）となりうることが明確に示された。

将来的な展望として、本研究で特定された、ベクター間で変動し AAV ベクターの品質に影響を与える QA パラメータは、AAV ベクター製造プロセスの開発、例えば実験計画法（DoE）を用いたデザインスペースの確立に有用であると考えられる。DoE では、温度、pH、撹拌回転数などの重要工程パラメータ（CPP）のデザインスペースを定めるために、どの QA が CQA となり得るかを把握することが不可欠である。本研究は、少なくとも

VP2 分子の化学量論および N57 および N94 の脱アミド化率が、CPP の特定とその範囲設定に利用可能な pCQA であることを実証した。

6.5 本章の結論

本章では、AAV ベクターの QA に生じた変動が最終的な生物活性にまで影響を及ぼすことを実証し、遺伝子導入効率を規定する独立した二つの重要な pCQA を初めて特定した。この知見は、複数の分析法を適用し、複数の AAV ベクターの QA を体系的に評価したことによって得られたものである。本章で得られた主要な結論は以下の通りである。

第一に、VP2 分子の化学量論が、AAV ベクターの遺伝子導入効率と有意な正の相関を示すことを明らかにした。VP2 の N 末端領域には核局在化シグナル（NLS）が存在することから、本結果は、VP2 の量が多いほど AAV ベクターの核への移行効率が高まり、結果として遺伝子導入効率が向上するというメカニズムを強く示唆する。したがって、VP2 分子の化学量論は、AAV ベクターの有効性を予測する上で極めて重要な QA であると結論付けられる。

第二に、VP1 の特異領域に存在する特定のアスパラギン残基（N57 および N94）の脱アミド化率が、遺伝子導入効率と有意な負の相関を示すこと明らかにした。さらに、短期加速安定性試験を通じて、脱アミド化率の経時的な増加と遺伝子導入効率の低下が直接的に相関することを示した。その際、VP2 分子数が有意な変化をしていなかったことから、脱アミド化が VP2 分子数とは独立して生物活性を低下させる要因であることが明確に示された。これらの結果から、N57 および N94 の脱アミド化率は、AAV ベクターの安定性や有効性を評価する上で監視すべき pCQA であると結論付けられる。

第三に、本研究は、先進的な分析法の組み合わせが、AAV ベクターの複雑な QA を解明する上で不可欠であることを示した。特に、BS-AUC による高精度な完全粒子比の決定、CGE による VP 化学量論の決定、そして LC-MS/MS による翻訳後修飾の決定は、生物活性と QA の間の対応関係を明らかにする上で決定的な役割を果たした。

結論として、本章では、AAV ベクター間の品質の変動を定量的に評価することで、VP2 分子の化学量論（正の因子）と特定アスパラギン残基の脱アミド化（負の因子）が、遺伝子導入効率を規定する独立した重要な QA であることを突き止めた。この成果は、単に収量を最大化するだけでなく、これらの pCQA を考慮に入れた製造プロセスの最適化（例えば、実験計画法の採用など）の重要性を示すものである。本研究で得られた知見は、科学的根拠に基づいた AAV ベクターの品質管理戦略の構築に直接的に貢献し、より安全で有効性の高い遺伝子治療薬の安定供給に向けた道筋を示すものである。

第 2 部の結論

第 2 部では、AAV ベクターを対象として、超遠心分析を基盤とした品質評価方法の確立と、それにより製造が可能となった高純度 AAV ベクターを用いた、生物活性に影響を与える AAV ベクターの QA の特定を行った。これらの検討により、複数の QA を並行して評価することの重要性が示され、生物活性との関係性を考察する上での一つの考え方を提示した。

第 7 章 総括および展望

7.1 総括

本研究は、「バイオ医薬品の不均一性評価法の確立と応用」という包括的なテーマの下、現代の医療において不可欠な役割を担う二つの重要なモダリティー、すなわち「抗体医薬」と「遺伝子治療」、それぞれを代表する「抗体医薬品」と「AAV ベクター」が直面する「分子の不均一性」が生じるメカニズム解明と、「分子の不均一性」の評価方法の確立に取り組んだものである。本研究では、最先端の分析技術を戦略的に組み合わせ、これらの品質課題の根本原因を分子レベルで深く理解し、より信頼性の高い品質評価法を確立することを目指した。

第 1 部では、抗体医薬品の根源的な品質課題である凝集形成のメカニズム解明研究に焦点を当てた。第 2 章では、医薬品の最終投与段階という実用上不可避な操作に着目し、PFS からの薬液排出操作がミクロン凝集体を著しく増加させる現象に焦点を当てた。その結果、ガラス製シリンジ内壁へのタンパク質の吸着と、投与時のプランジャー操作による物理的な掃き出し作用が、ミクロン凝集体を生成する主要な原因であることを突き止めた。FIM による凝集体の定量評価、シリンジ内壁への吸着量の定量に加えて、HS-AFM による吸着現象のナノスケールでの可視化を組み合わせることで、このメカニズムを明らかにした。さらに、タンパク質吸着が極めて少ない COP 製シリンジではミクロン凝集体の発生が抑制されることから、薬剤が直接触れる容器材質の最適化が凝集体形成を制御する鍵となることを示した。第 3 章では、品質評価に用いられる分析法自体が凝集のアーティファクトを生む可能性に焦点を当て、ITC 測定中の撹拌ストレスの影響を評価した。その結果、不適切な撹拌条件、特に高速撹拌は、ステンレス鋼製のシリンジ表面への吸着や、流体力学的なキャビテーションの発生を介してタンパク質の変性・凝集を誘発し、このことが測定データの信頼性を著しく損なう可能性があることを明らかにした。この研究は、分析法の妥当性を評価する際には、得られるデータの正確性だけでなく、分析プロセス自体が分析結果に与える影響についても慎重に検討する必要があることを実証するものである。これら二つの研究は、異なる現象を扱いながらも、根底には「界面（固液界面）におけるタンパク質の不安定化」という共通のメカニズムが存在することを示している。本研究は、バイオ医薬品の品質が、容器や分析機器との接触といった微視的な界面環境に大き

く左右されることを実証した点で重要である。

第 2 部では、抗体医薬品同様複雑な構造を持つ AAV ベクターの分散状態の不均一性の問題に取り組み、その包括的な評価法の開発と応用を目的とした研究に焦点を当てた。第 4 章では、AAV ベクター製剤の複雑な不均一性、すなわち FP、EP、PP、凝集体を包括的に評価するため、MW-SV-AUC を開発した。この手法は各粒子のサイズ分布を高分解能で評価するだけでなく、多波長検出データとスペクトル分解を組み合わせることで、各粒子の組成（タンパク質と核酸の比率）まで決定することを可能にした。これにより、従来法では同定が困難であった PP や凝集体の正体を明らかにする画期的な手法を確立した。第 5 章では、SV-AUC の実用上の大きな制約であった多量の試料必要量を克服するため、BS-AUC を確立した。その結果、SV-AUC の約 1/25（約 8×10^{10} vg）という極めて少ない試料量で、SV-AUC と同等のピーク分離能と定量性を達成することに成功した。この圧倒的な少量化は、製造プロセスの開発段階や希少な試料の分析など、量的な制限により SV-AUC の適用が困難であった場面での分散状態評価を可能にし、AAV ベクターの品質評価における AUC の適応範囲を大幅に拡大させるものである。これらの先進的な分析方法開発を通して製造が可能となった高純度 FP 試料を用いて、第 6 章では、実質的に同一の製造・精製手順で製造された 10 個の AAV8 ベクターについて、14 項目にわたる QA の変動と生物活性（遺伝子導入効率）との相関を体系的に評価した。その結果、VP の化学量論、特に VP2 の比率が遺伝子導入効率と正の相関を示し、一方で VP1 のアスパラギン残基（N57 および N94）の脱アミド化率が遺伝子導入効率と負の相関を示すことを見出した。さらに、短期加速安定性試験により、これら二つの因子が独立して生物活性に影響を及ぼす pCQA であることを初めて実証した。

本研究全体を通して、バイオ医薬品が抱える複雑な品質課題に対し、目的に応じた先進的分析技術を戦略的に組み合わせることが、その本質を理解する上で極めて有効であることが示された。本研究で得られた知見は、バイオ医薬品の品質管理に新たな科学的視点を提供し、より安全で有効な医薬品の安定供給に向けた学術的基盤を構築するものである。

7.2 展望

本研究は、抗体医薬品と AAV ベクターの品質評価に新たな知見と手法を示したが、さらなる理解の深化と技術の発展に向けて、研究面で以下の展望が考えられる。

抗体医薬品の凝集研究の展望

本研究で焦点を当てた「界面との相互作用に起因するタンパク質の不安定化」は、多様なバイオ医薬品に共通する課題である。今回明らかになった容器への抗体分子の吸着と投与操作に起因する凝集体形成は本研究で用いた抗体医薬品以外の分子種にも起こりえることから、近年臨床応用が拡大している IgG4 抗体や抗体薬物複合体（ADC）などにつ

いても、今後、固体表面への吸着と機械的ストレス下での凝集体形成との関係解明が求められてくると考えられる。また、本研究で投与操作時の凝集体発生が少ないことが示された COP 以外にも、吸着抑制ひいては凝集体形成抑制に有効な新しい容器材料や表面改良技術の開発と評価も重要な課題である。さらに、今回着目した ITC に限らず様々な分析工程における固体表面への吸着および機械的ストレスを適切に評価することで、より信頼性の高いバイオ医薬品の品質管理体系の構築、さらにはバイオテクノロジー産業の発展に貢献できると考える。

AAV ベクターの品質評価と製造プロセス開発の展望

本研究を通して MW-SV-AUC が AAV ベクターの完全粒子比を正確に決定できることが示されたことは GMP 省令に準拠した AAV ベクターの品質管理において、SV-AUC が利用される端緒となった。BS-AUC は少量で分析できるというその利点を活かし、プロセス開発、特に小スケールで製造された AAV ベクターの分散状態評価に利用され始めている。これらの分析法開発を通して製造が可能になった高純度の FP 試料を用いることで、本研究では、AAV ベクターの生物活性を規定する pCQA として、VP2 化学量論と特定部位の脱アミド化を特定した。この知見に基づく重要な次のステップは、これらの pCQA を能動的に制御する製造プロセスの開発である。例えば、VP2 の翻訳開始コドンである ACG を、ATG や CTG といった、より翻訳効率の高いコドンに改変することで VP2 の比率を高めるプラスミド設計や、脱アミド化を抑制する培養・精製・保管条件（pH、温度管理など）の最適化、あるいは安定な製剤処方の開発などが挙げられる。これらの pCQA を評価しながら、実験計画法を用いて重要工程パラメータ（CPP）を特定し、デザインスペースを確立することが、今後の AAV ベクター製造における重要な課題となると考えられる。分析法の観点からは、本研究で開発した MW-SV-AUC や BS-AUC といった先進的分析技術は、レンチウイルスベクターや mRNA-LNP 製剤といった他の新しいモダリティーの品質評価への拡大が期待される。最後に、本研究では *in vitro* の遺伝子導入効率を生物活性の指標としたが、今後は、ここで特定された pCQA が *in vivo* での有効性や、安全性、特に免疫原性にどのように影響するかを評価する必要がある。これらの研究を通じて、臨床応用における AAV ベクターが真に満たすべき品質要件が明らかになると考えられる。

本研究で示した分析科学を基盤として医薬品の品質の本質に迫るアプローチは、より安全で有効な次世代のバイオ医薬品を創出するための学術基盤の構築を通して、今後ますます多様化・複雑化するバイオ医薬品の研究開発を加速させることでバイオテクノロジー産業の発展に貢献するものと考えられる。

略語リスト

AAV：Adeno-Associated Virus　アデノ随伴ウイルス
AC：Affinity Chromatography　アフィニティークロマトグラフィー
ADC：Antibody–Drug Conjugate　抗体薬物複合体
AUC：Analytical Ultracentrifugation　超遠心分析
BS-AUC：Band Sedimentation AUC　超遠心分析バンド沈降速度法
CGE：Capillary Gel Electrophoresis　キャピラリーゲル電気泳動
CMV：Cytomegalovirus　サイトメガロウイルス
CNN；Convolutional Neural Network　畳み込みニューラルネットワーク
COP：Cycloolefin Polymer　シクロオレフィンポリマー
CPP：Critical Process Parameter　重要工程パラメータ
CsCl：Cesium Chloride　塩化セシウム
CV：Coefficient of Variation　変動係数
DGUC：Density Gradient Ultracentrifugation　密度勾配超遠心
DMSO：Dimethyl Sulfoxide　ジメチルスルホキシド
EDTA：Ethylenediaminetetraacetic Acid　エチレンジアミン四酢酸
EGFP：Enhanced Green Fluorescent Protein　改良型緑色蛍光タンパク質
EM：Electron Microscopy　電子顕微鏡
EMA：European Medicines Agency　欧州医薬品庁
EP：Empty Particle　空粒子
ESD：Equivalent Spherical Diameter　球相当径
FDA：Food and Drug Administration　米国食品医薬品局
FIM：Flow Imaging Microscopy　フローイメージング顕微鏡
FP：Full Particle　完全粒子
FR：Radio Frequency　ラジオ周波数
GMP：Good Manufacturing Practice　製造管理及び品質管理の基準
GOI：Gene of Interest　目的遺伝子
HCD：Host Cell DNA　宿主細胞由来 DNA
HCP：Host Cell Protein　宿主細胞由来タンパク質
HDX：Hydrogen–Deuterium Exchange　水素重水素交換
HEK：Human Embryonic Kidney　ヒト胎児腎臓
HS-AFM：High-Speed Atomic Force Microscopy　高速原子間力顕微鏡
hTPA：Hydroxyterephthalic Acid　ヒドロキシテレフタル酸
ITC：Isothermal Titration Calorimetry　等温滴定型熱量計
ITR：Inverted Terminal Repeat　逆向末端反復

LNP：Lipid Nanoparticle　脂質ナノ粒子
mAb：Monoclonal Antibody　モノクローナル抗体
MES：Matrix Exchange Solution　マトリックス交換溶液
MOI：Multiplicity of Infection　多重感染度
MS：Mass Spectrometry　質量分析
MW-SV-AUC：Multiwavelength SV-AUC　多波長検出超遠心分析沈降速度法
OP：Overfilled Particle　過剰充填粒子
OTS：Octadecyltrichlorosilane　オクタデシルトリクロロシラン
PBS：Phosphate-Buffered Saline　リン酸緩衝生理食塩水
PDA：Photodiode Array　フォトダイオードアレイ
PFS：Prefilled Syringe　プレフィルドシリンジ
PMDA：Pharmaceuticals and Medical Devices Agency　医薬品医療機器総合機構
PP：Partially Filled Particle　部分粒子
pCQA：Potential Critical Quality Attribute　潜在的な重要品質特性
QA：Quality Attribute　品質特性
QCM：Quartz Crystal Microbalance　水晶振動子マイクロバランス
rpm：Revolutions per Minute　回転毎分
RI：Radial Invariant　半径不変
SD：Standard Deviation　標準偏差
SO：Silicone Oil　シリコーンオイル
SV-AUC：Sedimentation Velocity AUC　超遠心分析沈降速度法
TCEP: Tris(2-carboxyethyl)phosphine　トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン
TE：Tris–EDTA　Tris-EDTA
TEM：Transmission Electron Microscopy　透過型電子顕微鏡
TI：Time Invariant　時間不変
TPA：Terephthalic Acid　テレフタル酸
Tris：Tris(hydroxymethyl)aminomethane　トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
UV：Ultraviolet　紫外
UV-Vis：Ultraviolet–Visible　紫外可視
VP：Viral Protein　ウイルスタンパク質
XL：Cross-Linking　架橋

記号リスト

D（m^2/s）：	拡散係数
dn/dc（mL/g）：	屈折率増分
f（kg/s）：	摩擦係数
f/f_0（-）：	摩擦係数比
Mw（g/mol）：	分子量
R^2（-）：	決定係数
$s_{20,w}$（S）：	20℃の水での沈降係数
s_w（S）：	見かけの沈降係数
v-bar（cm^3/g）：	偏比容
λ（nm）：	波長
ρ（g/mL）：	溶媒密度
η（cP）：	溶媒粘度

図表目次

図

図 1 医薬品売上げ上位 10 品目におけるバイオ医薬品の比率（2024 年）.....1
図 2 2022 年 6 月までに実施された AAV ベクターを用いた臨床試験の件数の推移.....2
図 3 日本における抗体医薬品あるいは融合タンパク質製剤の剤形の変遷.....5
図 4 凝集体の粒子径、名称と評価方法の対応.....6
図 5 PFS 製剤の例とデバイスの構成図.....10
図 6 各種ストレスとそれにより生じる抗体医薬品のミクロン凝集体濃度との関係の一例.....11
図 7 フローイメージング顕微鏡の模式図.....14
図 8 フローイメージング顕微鏡で測定した抗体医薬品溶液のミクロン凝集体濃度....17
図 9 押出しにより調製した試料溶液で観察された 2 μm 以上の粒子の代表的な散布図.....18
図 10 シリンジ内表面への mAb 吸着定量結果.....22
図 11 HS-AFM を用いて撮影したシリンジ内表面へのアダリムマブ吸着のリアルタイム観察結果.....24
図 12 HS-AFM により観察された、タンパク質吸着層の表層で揺れ動くアダリムマブ粒子の代表的な画像.....25
図 13 HS-AFM で観察した各種類のシリンジ内表面の代表的画像.....28
図 14 バレル表面に吸着した mAb がシリンジのプランジャーヘッドによって押し出されミクロン凝集体を形成するモデル図.....29
図 15 ITC 装置の模式図と取得されるデータの例.....31
図 16 ITC 測定に用いた系の相互作用の模式図と反応式.....33
図 17 各滴定シリンジの先端形状.....35
図 18 ヒドロキシテレフタル酸由来の蛍光強度に基づいたヒドロキシルラジカルの定量.....37
図 19 撹拌回転数とシリンジの先端形状が滴定プロファイルに与える影響（FP シリンジの場合）.....38
図 20 撹拌回転数とシリンジの先端形状が滴定プロファイルに与える影響（CP シリンジおよび SpCP シリンジの場合）.....39
図 21 撹拌回転数を変調させた際の結合可能画分の変化.....40
図 22 撹拌試料に含まれるミクロン凝集体と可溶性画分の特性.....43
図 23 抗体医薬品と抗原ペプチドの ITC 測定結果.....44
図 24 実験結果から想定される凝集体形成経路と各測定で評価される成分の要約.....47

図 25 超遠心分析沈降速度法の概要.....53
図 26 AAV-EP および AAV-FP 成分の特性評価.....60
図 27 UV 吸収シグナルの整合性.....61
図 28 AAV ベクター粒子に含まれるヌクレオチドの塩基数および沈降係数の相関関係と多波長検出超遠心分析沈降速度法による粒子組成の特定.....65
図 29 PP の識別のための検出波長の組み合わせ.....68
図 30 MW-SV-AUC 実験における特性評価に適した検出波長の選択.....69
図 31 多波長検出と屈折率検出を用いた SV-AUC による AAV-EP、FP、およびそれらの不純物の粒子特性評価のワークフロー.....70
図 32 BS-AUC 実験の模式図.....74
図 33 バンド沈降速度法を AAV ベクターの分散状態評価に用いた例.....74
図 34 複数ロットの AAV8-CMV-EGFP の BS-AUC 測定結果.....77
図 35 見かけの沈降泳数分布の比較.....78
図 36 沈降係数 $s_{20,w}$ の比較.....79
図 37 BS-AUC と SV-AUC 間での沈降係数分布の関係および BS-AUC の繰り返し再現性の評価.....80
図 38 各波長で見積もられたピーク面積の比較.....84
図 39 サイトメガロウイルスプロモーターと改良型緑色蛍光タンパク質を有する 10 の AAV ベクター（AAV8-CMV-EGFP）の製造工程および品質評価のフロー.....89
図 40 下流工程の工程内結果.....95
図 41 10 個の AAV8-CMV-EGFP ベクターにおけるカプシドの完全性、QA、およびベクター間の変動.....98
図 42 各 AAV8 ベクターの沈降係数分布の重ね合わせ.....99
図 43 AAV ベクター粒子あたりの VP1、VP2、および VP3 分子の数.....100
図 44 10 個の AAV8-CMV-EGFP ベクターにおける N57、N94、および N263 の脱アミド化率.....100
図 45 製剤条件を変調させた場合の回収率（凍結融解および保管前後のゲノム力価変化率）.....101
図 46 VP 化学量論および遺伝子導入効率と収量の関係.....102
図 47 10 製品の 17 項目の QA パラメータ間の相関行列解析.....103
図 48 遺伝子導入効率と VP 化学量論の相関解析.....104
図 49 脱アミド化率と遺伝子導入効率の関係.....105
図 50 短期加速安定性試験の結果.....106

表

表 1 日米欧で承認された *in vivo* 遺伝子治療製品（AAV ベクター製品）.....2
表 2 抗体医薬品および AAV ベクターにおける分子の不均一性とその代表例.....4
表 3 各製剤の溶媒に含まれる添加剤.....12
表 4 各条件におけるミクロン凝集体濃度の要約.....18
表 5 SE-HPLC および UV 吸収測定による凝集体定量結果.....19
表 6 各条件におけるタンパク質吸着量の要約.....23
表 7 PPAR-ロシグリタゾン間相互作用の熱力学パラメータの要約.....41
表 8 撹拌後の PPAR 溶液に含まれる可溶性画分および不溶性画分の定量結果.....43
表 9 ヒドロキシルラジカルの定量結果.....43
表 10 抗体医薬品と抗原ペプチド間相互作用の熱力学パラメータの要約.....45
表 11 各種血清型 AAV ベクター試料と ssDNA のモル吸光係数の要約.....63
表 12 各種会合状態におけるヌクレオチド数および沈降係数（いずれも計算値）の要約.....64
表 13 各測定で得られた見かけの沈降係数とピーク面積の要約.....78
表 14 AAV8-LotA を用いた BS-AUC 測定（繰り返し再現性確認実験）結果.....81
表 15 AAV8-LotB を用いた BS-AUC および SV-AUC 測定（繰り返し再現性確認実験）結果.....81
表 16 AAV8-CMV-EGFP ベクターの製造条件.....88
表 17 保管安定性試験に用いた溶媒とそれに含まれる添加物.....93
表 18 異なる手法で見積もった完全粒子比の比較.....99

参考文献

[1] M. Kesik-Brodacka, “Progress in biopharmaceutical development,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 65, no. 3, pp. 306–322, 2018, doi: 10.1002/bab.1617.

[2] S. Uchiyama, “Biophysical Characterization of Biopharmaceuticals , Including Antibody Drugs,” *Pharm. Soc. Japan*, vol. 136, no. 3, pp. 443–448, 2016, doi: 10.1248/yakushi.15-00236-2.

[3] A. Ishii-Watabe, T. Suzuki, M. Tada, and N. Kawasaki, “抗体医薬品の分子設計,” vol. 74, no. 1, pp. 4–11, 2014, doi: 10.14843/jpstj.74.4.

[4] A. Mullard, “FDA approves 100th monoclonal antibody product,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 20, no. 7, pp. 491–495, 2021, doi: 10.1038/d41573-021-00079-7.

[5] W. R. Strohl, “Structure and function of therapeutic antibodies approved by the US FDA in 2024,” *Antib. Ther.*, vol. 8, no. 3, pp. 197–237, Jun. 2025, doi: 10.1093/abt/tbaf014.

[6] A. Philippidis, “Top 10 Best-Selling Drugs.” Accessed: Oct. 24, 2025. [Online]. Available: https://www.genengnews.com/topics/drug-discovery/top-10-best-selling-drugs-2/

[7] W. Shen, S. Liu, and L. Ou, “rAAV immunogenicity, toxicity, and durability in 255 clinical trials: A meta-analysis,” *Front. Immunol.*, vol. 13, no. October, pp. 1–13, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1001263.

[8] J. F. Carpenter *et al.*, “Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 4, pp. 1201–1205, Apr. 2009, doi: 10.1002/jps.21530.

[9] K. Gao *et al.*, “Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side effects,” *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 1, no. 9, 2014, doi: 10.1038/mtm.2013.9.

[10] T. L. Wu *et al.*, “CD8+ T cell recognition of epitopes within the capsid of adeno-associated virus 8-based gene transfer vectors depends on vectors’ genome,” *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 1, pp. 42–51, 2014, doi: 10.1038/mt.2013.218.

[11] 内山, 進 クラユヒナ, エレナ、野田勝紀, “抗体医薬品の溶液物性,” 薬剤学, vol. 74, no. 1, pp. 12–18, 2014.

[12] S. Yoneda, T. Torisu, and S. Uchiyama, “Development of syringes and vials for delivery of biologics: current challenges and innovative solutions,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 18, no. 4, pp. 459–470, 2021, doi: 10.1080/17425247.2021.1853699.

[13] L. O. Narhi, J. Schmit, K. Bechtold-Peters, and D. Sharma, “Classification of protein aggregates,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 2, pp. 493–498, 2012, doi: 10.1002/jps.22790.

[14] S. Uchiyama, “Aggregates quantification of biopharmaceuticals in a wide range of sizes using orthogonal methods,” *American Pharmaceutical Review*, pp. 18–22, 2019.

[15] F. Guidance, "Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products," no. August, 2014.

[16] R. Bansal, S. Gupta, and A. S. Rathore, "Analytical Platform for Monitoring Aggregation of Monoclonal Antibody Therapeutics," *Pharm. Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1007/s11095-019-2690-8.

[17] A. Gerhardt, N. R. McGraw, D. K. Schwartz, J. S. Bee, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 6, pp. 1601–1612, 2014, doi: 10.1002/jps.23973.

[18] A. S. Sediq, R. B. Van Duijvenvoorde, W. Jiskoot, and M. R. Nejadnik, "No Touching! Abrasion of Adsorbed Protein Is the Root Cause of Subvisible Particle Formation during Stirring," *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 2, pp. 519–529, 2016, doi: 10.1016/j.xphs.2015.10.003.

[19] J. S. Bee *et al.*, "Monoclonal antibody interactions with micro- and nanoparticles: Adsorption, aggregation, and accelerated stress studies," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 9, pp. 3218–3238, 2009, doi: 10.1002/jps.21768.

[20] T. Torisu, T. Maruno, Y. Hamaji, T. Ohkubo, and S. Uchiyama, "Synergistic Effect of Cavitation and Agitation on Protein Aggregation," *J. Pharm. Sci.*, vol. 106, no. 2, pp. 521–529, 2017, doi: 10.1016/j.xphs.2016.10.015.

[21] S. M. Stagg, C. Yoshioka, O. Davulcu, and M. S. Chapman, "Cryo-electron Microscopy of Adeno-associated Virus," *Chem. Rev.*, vol. 122, no. 17, pp. 14018–14054, 2022, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00936.

[22] S. Daya and K. I. Berns, "Gene therapy using adeno-associated virus vectors," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 4, pp. 583–593, 2008, doi: 10.1128/CMR.00008-08.

[23] C. Li and R. J. Samulski, "Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy," *Nature Reviews Genetics*, vol. 21, no. 4. Nature Research, pp. 255–272, Apr. 01, 2020. doi: 10.1038/s41576-019-0205-4.

[24] F. B. Johnson and N. Cancer, "Structural Proteins of Adenovirus-Associated Virus Type 3," *Microbiology*, vol. 8, no. 6, pp. 860–863, 1971, doi: 10.1128/jvi.8.6.860-863.1971.

[25] J. A. Rose, J. V Maizel, J. K. Inman, and A. J. Shatkin, "Structural Proteins of Adenovirus-Associated Viruses," vol. 8, no. 5, pp. 766–770, 1971, doi: 10.1128/jvi.8.5.766-770.1971.

[26] T. P. Wörner *et al.*, "Adeno-associated virus capsid assembly is divergent and stochastic," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21935-5.

[27] H. Oyama, K. Ishii, T. Maruno, T. Torisu, and S. Uchiyama, "Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins with Two Types of VP3-Related Components by Capillary Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry," *Hum. Gene Ther.*, vol. 32, no. 21–

22, pp. 1403–1416, Nov. 2021, doi: 10.1089/hum.2021.009.

[28] T. Onishi *et al.*, "Enhancement of recombinant adeno-associated virus activity by improved stoichiometry and homogeneity of capsid protein assembly," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 31, no. December, p. 101142, 2023, doi: 10.1016/j.omtm.2023.101142.

[29] K. Hirohata *et al.*, "Applications and Limitations of Equilibrium Density Gradient Analytical Ultracentrifugation for the Quantitative Characterization of Adeno-Associated Virus Vectors," *Anal. Chem.*, vol. 96, no. 2, pp. 642–651, 2024, doi: 10.1021/acs.analchem.3c01955.

[30] R. Takino *et al.*, "Physicochemical and biological impacts of light stress on adeno-associated virus serotype 6," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 32, no. 4, p. 101362, 2024, doi: 10.1016/j.omtm.2024.101362.

[31] Y. Yamaguchi *et al.*, "Glycosylation of recombinant adeno-associated virus serotype 6," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 32, no. 2, p. 101256, 2024, doi: 10.1016/j.omtm.2024.101256.

[32] T. Ikeda *et al.*, "Higher-Order Structure of Adeno-Associated Virus Serotype 8 by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry," *Viruses*, vol. 16, no. 4, p. 585, 2024, doi: 10.3390/v16040585.

[33] X. Ye, Y. Hu, H. Qiu, and N. Li, "Probe capsid structure stability and dynamics of adeno-associated virus as an important viral vector for gene therapy by hydrogen-deuterium exchange-mass spectrometry," *Protein Sci.*, vol. 33, no. 7, pp. 1–18, 2024, doi: 10.1002/pro.5074.

[34] Y. Yamaguchi *et al.*, "Direct Identification and Quantification of Recombinant Adeno-Associated Virus in Crude Cell Lysate and Conditioned Medium by Mass Photometry," *Anal. Chem.*, vol. 97, no. 19, pp. 10405–10416, 2025, doi: 10.1021/acs.analchem.5c00793.

[35] K. Gao *et al.*, "Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side effects," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 1, no. November 2013, p. 9, 2014, doi: 10.1038/mtm.2013.9.

[36] J. F. Wright *et al.*, "Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation," *Mol. Ther.*, vol. 12, no. 1, pp. 171–178, 2005, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.02.021.

[37] European Medicines Agency (EMA), "Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products," 2014. [Online]. Available: www.ema.europa.eu/contact

[38] Fda and Cber, "Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs) Guidance for Industry," no.

January, 2020, [Online]. Available: https://www.fda.gov/drugs/electronic-regulatory-submission-and-review/electronic-common-

[39] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, "000230508." Accessed: Dec. 27, 2023. [Online]. Available: https://www.pmda.go.jp/files/000230508.pdf

[40] J. S. Johnson, C. Li, N. Diprimio, M. S. Weinberg, T. J. Mccown, and R. J. Samulski, "Mutagenesis of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Protein VP1 Uncovers New Roles for Basic Amino Acids in Trafficking and Cell-Specific Transduction," vol. 84, no. 17, pp. 8888–8902, 2010, doi: 10.1128/JVI.00687-10.

[41] Q. Wang *et al.*, "A Robust System for Production of Superabundant VP1 Recombinant AAV Vectors," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 7, no. December, pp. 146–156, 2017, doi: 10.1016/j.omtm.2017.11.002.

[42] T. Onishi *et al.*, "Enhancement of recombinant adeno-associated virus activity by improved stoichiometry and homogeneity of capsid protein assembly," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 31, no. December, p. 101142, 2023, doi: 10.1016/j.omtm.2023.101142.

[43] R. Popa-Wagner *et al.*, "Impact of VP1-Specific Protein Sequence Motifs on Adeno-Associated Virus Type 2 Intracellular Trafficking and Nuclear Entry," *J. Virol.*, vol. 86, no. 17, pp. 9163–9174, 2012, doi: 10.1128/jvi.00282-12.

[44] A. R. Giles *et al.*, "Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function," *Mol. Ther.*, vol. 26, no. 12, pp. 2848–2862, 2018, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.013.

[45] S. Uchiyama, "Liquid formulation for antibody drugs," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1844, no. 11, pp. 2041–2052, Nov. 2014, doi: 10.1016/J.BBAPAP.2014.07.016.

[46] A. Gerhardt, B. H. Nguyen, R. Lewus, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Effect of the siliconization method on particle generation in a monoclonal antibody formulation in pre-filled syringes," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 5, pp. 1601–1609, 2015, doi: 10.1002/jps.24387.

[47] S. Funke, J. Matilainen, H. Nalenz, K. Bechtold-Peters, H. C. Mahler, and W. Friess, "Silicone Migration From Baked-on Silicone Layers. Particle Characterization in Placebo and Protein Solutions," *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 12, pp. 3520–3531, 2016, doi: 10.1016/j.xphs.2016.08.031.

[48] K. Yoshino *et al.*, "Functional evaluation and characterization of a newly developed silicone oil-free prefillable syringe system," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 5, pp. 1520–1528, 2014, doi: 10.1002/jps.23945.

[49] E. Krayukhina, K. Tsumoto, S. Uchiyama, and K. Fukui, "Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 2, pp. 527–535, 2015, doi: 10.1002/jps.24184.

[50] L. Waxman and V. D. Vilivalam, "A comparison of protein stability in prefillable syringes made of glass and plastic.," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, p. pdajpst.2016.007146, 2017, doi: 10.5731/pdajpst.2016.007146.

[51] E. M. Moussa *et al.*, "Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates," *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 2, pp. 417–430, 2016, doi: 10.1016/j.xphs.2015.11.002.

[52] T. Ando, T. Uchihashi, and N. Kodera, "High-Speed AFM and Applications to Biomolecular Systems," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 42, no. 1, pp. 393–414, 2013, doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130324.

[53] D. Weinbuch *et al.*, "Micro-flow imaging and resonant mass measurement (archimedes) - complementary methods to quantitatively differentiate protein particles and silicone oil droplets," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 7, pp. 2152–2165, 2013, doi: 10.1002/jps.23552.

[54] R. G. Couston, M. W. Skoda, S. Uddin, and C. F. Van Der Walle, "Adsorption behavior of a human monoclonal antibody at hydrophilic and hydrophobic surfaces," *MAbs*, vol. 5, no. 1, pp. 126–139, 2013, doi: 10.4161/mabs.22522.

[55] E. Folzer *et al.*, "Determination of the Density of Protein Particles Using a Suspended Microchannel Resonator," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 12, pp. 4034–4040, 2015, doi: 10.1002/jps.24635.

[56] Y. Tamada and Y. Ikada, "Effect of preadsorbed proteins on cell adhesion to polymer surfaces," *Journal of Colloid And Interface Science*, vol. 155, no. 2. pp. 334–339, 1993. doi: 10.1006/jcis.1993.1044.

[57] Y. Wei, A. A. Thyparambil, and R. A. Latour, "Quantification of the influence of protein-protein interactions on adsorbed protein structure and bioactivity," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 110, pp. 363–371, 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.018.

[58] T. Perevozchikova, H. Nanda, D. P. Nesta, and C. J. Roberts, "Protein adsorption, desorption, and aggregation mediated by solid-liquid interfaces," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 6, pp. 1946–1959, 2015, doi: 10.1002/jps.24429.

[59] V. H. Le, R. Buscaglia, J. B. Chaires, and E. A. Lewis, "Modeling complex equilibria in isothermal titration calorimetry experiments: Thermodynamic parameters estimation for a three-binding-site model," *Anal. Biochem.*, vol. 434, no. 2, pp. 233–241, 2013, doi: 10.1016/j.ab.2012.11.030.

[60] Y. Mimura *et al.*, "Role of Oligosaccharide Residues of IgG1-Fc in FcγRIIb Binding," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 49, pp. 45539–45547, 2001, doi: 10.1074/jbc.M107478200.

[61] A. Okazaki *et al.*, "Fucose Depletion from Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy and Association Rate between IgG1 and FcγRIIIa," *J. Mol. Biol.*, vol. 336, no. 5, pp. 1239–1249, 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.007.

[62] Y. Yamaguchi *et al.*, "The Fab portion of immunoglobulin G has sites in the CL domain

that interact with Fc gamma receptor IIIa," *MAbs*, vol. 14, no. 1, 2022, doi: 10.1080/19420862.2022.2038531.

[63] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L. N. Lin, "Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter," *Anal. Biochem.*, vol. 179, no. 1, pp. 131–137, 1989, doi: 10.1016/0003-2697(89)90213-3.

[64] S. A. Kantonen, N. M. Henriksen, and M. K. Gilson, "Evaluation and Minimization of Uncertainty in ITC Binding Measurements: Heat Error, Concentration Error, Saturation, and Stoichiometry," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1861, no. 2, pp. 485–498, 2017, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.002.

[65] S. Harada *et al.*, "Structural basis for PPARγ transactivation by endocrine-disrupting organotin compounds," *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1038/srep08520.

[66] G. R. Grimsley and C. N. Pace, "Spectrophotometric Determination of Protein Concentration," in *Current Protocols in Protein Science*, 2003, pp. 3.1.1-3.1.9.

[67] J. Du *et al.*, "Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 20, pp. 15073–15080, 2007, doi: 10.1074/jbc.M701654200.

[68] T. Ishii *et al.*, "Defucosylated humanized aanti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 5, pp. 1520–1531, 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2697.

[69] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, and P. Schuck, "High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 11, pp. 5066–5073, 2012, doi: 10.1021/ac3007522.

[70] J. C. D. D. Houtman *et al.*, "Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling.," *Protein Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 30–42, 2007, doi: 10.1110/ps.062558507.Isothermal.

[71] R. T. Nolte *et al.*, "Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator- activated receptor-γ," *Nature*, vol. 395, no. 6698, pp. 137–143, 1998, doi: 10.1038/25931.

[72] S. Uchiyama *et al.*, "Structural basis for dimer formation of human condensin structural maintenance of chromosome proteins and its implications for single-stranded DNA recognition," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 49, pp. 29461–29477, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.670794.

[73] M. Duerkop, E. Berger, A. Dürauer, and A. Jungbauer, "Influence of cavitation and high shear stress on HSA aggregation behavior," *Eng. Life Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 169–178, 2018, doi: 10.1002/elsc.201700079.

[74] M. K. Joubert, Q. Luo, Y. Nashed-Samuel, J. Wypych, and L. O. Narhi, "Classification and

characterization of therapeutic antibody aggregates," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 28, pp. 25118–25133, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.160457.

[75] S. Yoneda *et al.*, "Quantitative Laser Diffraction for Quantification of Protein Aggregates: Comparison With Resonant Mass Measurement, Nanoparticle Tracking Analysis, Flow Imaging, and Light Obscuration," *J. Pharm. Sci.*, vol. 108, no. 1, pp. 755–762, 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2018.09.004.

[76] R. Evans *et al.*, "Improving the Interpretation of Small Molecule Diffusion Coefficients," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 6, pp. 3987–3994, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b05032.

[77] P. L. Privalov, "Stability of proteins: Small Globular Proteins," *Adv. Protein Chem.*, 1979, doi: 10.1016/S0065-3233(08)60460-X.

[78] P. L. Privalov, "Cold denaturation of protein," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 25, no. 4, pp. 281–306, 1990, doi: 10.3109/10409239009090612.

[79] S. Uchiyama *et al.*, "Thermodynamic characterization of variants of mesophilic cytochrome c and its thermophilic counterpart," *Protein Eng.*, vol. 15, no. 6, pp. 455–461, 2002, doi: 10.1093/protein/15.6.455.

[80] T. Arakawa, D. Ejima, Y. Kita, and K. Tsumoto, "Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1764, no. 11, pp. 1677–1687, 2006, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.08.012.

[81] Y.-F. Maa and C. C. Hsu, "Effect of High Shear on Proteins," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 51, no. 4, pp. 458–465, 1996, doi: 10.3115/980190.980212.

[82] R. Tavakoli-Keshe, J. J. Phillips, R. Turner, and D. G. Bracewell, "Understanding the relationship between biotherapeutic protein stability and solid-liquid interfacial shear in constant region mutants of IgG1 and IgG4," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 2, pp. 437–444, 2014, doi: 10.1002/jps.23822.

[83] J. S. Bee *et al.*, "Response of a concentrated monoclonal antibody formulation to high shear," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, no. 5, pp. 936–943, 2009, doi: 10.1002/bit.22336.

[84] D. Lo Presti, G. Giancontieri, and D. M. Hargreaves, "Improving the rheometry of rubberized bitumen: experimental and computation fluid dynamics studies," *Constr. Build. Mater.*, vol. 136, pp. 286–297, 2017, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2016.12.200.

[85] D. J. Brockwell, "Probing the mechanical stability of proteins using the atomic force microscope.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 6, pp. 1564–8, 2007, doi: 10.1042/BST0351564.

[86] P. J. B. Edwards, M. Kakubayashi, R. Dykstra, S. M. Pascals, and M. A. K. Williams, "Rheo-NMR studies of an enzymatic reaction: Evidence of a shear-stable macromolecular system," *Biophys. J.*, vol. 98, no. 9, pp. 1986–1994, 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.01.022.

[87] L. Brückl, T. Schröder, S. Scheler, R. Hahn, and C. Sonderegger, "The Effect of Shear on the Structural Conformation of rhGH and IgG1 in Free Solution," *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 6, pp. 1810–1818, 2016, doi: 10.1016/j.xphs.2016.03.020.

[88] K. Nakanishi, T. Sakiyama, and K. Imamura, "On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 3, pp. 233–244, 2001, doi: 10.1016/S1389-1723(01)80127-4.

[89] R. G. Couston, M. W. Skoda, S. Uddin, and C. F. van der Walle, "Adsorption behavior of a human monoclonal antibody at hydrophilic and hydrophobic surfaces.," *MAbs*, vol. 5, no. 1, pp. 126–39, 2012, doi: 10.4161/mabs.22522.

[90] M. P. Gispert, B. Saramago, A. P. Serro, and R. Colačo, "Bovine serum albumin adsorption onto 316L stainless steel and alumina: A comparative study using depletion protein radiolabeling quartz crystal microbalance and atomic force microscopy," *Surf. Interface Anal.*, vol. 40, no. 12, pp. 1529–1537, 2008, doi: 10.1002/sia.2929.

[91] T. Hagiwara, P. Nattawut, M. Shibata, and T. Sakiyama, "Monitoring of adsorption behaviors of bovine serum albumin onto a stainless steel surface by the quartz crystal microbalance based on admittance analysis," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 81, no. 4, pp. 783–789, 2017, doi: 10.1080/09168451.2017.1281724.

[92] C. Kalonia *et al.*, "Calculating the mass of subvisible protein particles with improved accuracy using microflow imaging data," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 2, pp. 536–547, 2015, doi: 10.1002/jps.24156.

[93] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 87–106, 2011, doi: 10.1016/j.cis.2010.12.007.

[94] A. A. Thyparambil, Y. Wei, Y. Wu, and R. A. Latour, "Determination of orientation and adsorption-induced changes in the tertiary structure of proteins on material surfaces by chemical modification and peptide mapping," *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 6, pp. 2404–2414, 2014, doi: 10.1016/j.actbio.2014.01.027.

[95] Y. Wei, A. A. Thyparambil, Y. Wu, and R. A. Latour, "Adsorption-induced changes in ribonuclease A structure and enzymatic activity on solid surfaces," *Langmuir*, vol. 30, no. 49, pp. 14849–14858, 2014, doi: 10.1021/la503854a.

[96] J. S. Bee, M. Davis, E. Freund, J. F. Carpenter, and T. W. Randolph, "Aggregation of a monoclonal antibody induced by adsorption to stainless steel," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 105, no. 1, pp. 121–129, 2010, doi: 10.1002/bit.22525.

[97] T. W. Randolph *et al.*, "Do not drop: Mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 2, pp. 602–611, 2015, doi: 10.1002/jps.24259.

[98] T. Torisu *et al.*, "Friability Testing as a New Stress-Stability Assay for Biopharmaceuticals," *J. Pharm. Sci.*, vol. 106, no. 10, pp. 2966–2978, 2017, doi: 10.1016/j.xphs.2017.05.035.

[99] S. Höfinger and F. Zerbetto, "On the cavitation energy of water," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 9, no. 2, pp. 566–569, 2003, doi: 10.1002/chem.200390060.

[100] Y.-F. Maa and C. C. Hsu, "Protein denaturation by combined effect of shear and air-liquid interface," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 54, no. 6, pp. 503–512, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970620)54:6<503::AID-BIT1>3.0.CO;2-N.

[101] S. T. Tzannis, W. J. M. Hrushesky, P. A. Wood, and T. M. Przybycien, "Adsorption of a Formulated Protein on a Drug Delivery Device Surface," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 189, no. 2, pp. 216–228, 1997, doi: 10.1006/jcis.1997.4841.

[102] X. Fu *et al.*, "Analytical Strategies for Quantification of Adeno-Associated Virus Empty Capsids to Support Process Development," *Hum. Gene Ther. Methods*, vol. 30, no. 4, pp. 144–152, Aug. 2019, doi: 10.1089/hgtb.2019.088.

[103] T. Tomono *et al.*, "Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 11, pp. 180–190, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.015.

[104] P. Schuck, "Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation," *Biophys. J.*, vol. 75, no. 3, pp. 1503–1512, 1998, doi: 10.1016/S0006-3495(98)74069-X.

[105] T. M. Laue, "Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins.," in *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science.*, A. J. R. and J. C. H. S. E. Harding, Ed., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992, pp. 90–125. [Online]. Available: https://cir.nii.ac.jp/crid/1572543024355943296

[106] P. Schuck, H. Zhao, C. A. Brautigam, and R. Ghirlando, *Basic Principles of Analytical Ultracentrifugation.*, 1st ed. CRC Press., 2015. doi: https://doi.org/10.1201/b19028.

[107] J. C. D. Houtman *et al.*, "Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling.," *Protein Sci.*, vol. 16, no. 1, pp. 30–42, 2007, doi: 10.1110/ps.062558507.

[108] C. A. Brautigam, *Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data*, 1st ed., vol. 562. Elsevier Inc., 2015. doi: 10.1016/bs.mie.2015.05.001.

[109] J. A. Rose, J. V Maizel, J. K. Inman, and A. J. Shatkin, "Structural Proteins of Adenovirus-Associated Viruses," *J. Virol.*, vol. 8, no. 5, pp. 766–770, 1971, doi: 10.1128/jvi.8.5.766-770.1971.

[110] H. Durchschlag, "Determination of the partial specific volume of conjugated proteins,"

Colloid Polym. Sci., vol. 267, no. 12, pp. 1139–1150, 1989, doi: 10.1007/BF01496937.

[111] T. M. Davis and W. D. Wilson, "Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data," *Anal. Biochem.*, vol. 284, no. 2, pp. 348–353, 2000, doi: 10.1006/abio.2000.4726.

[112] B. Burnham *et al.*, "Analytical Ultracentrifugation as an Approach to Characterize Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors," *Hum. Gene Ther. Methods*, vol. 26, no. 6, pp. 228–242, 2015, doi: 10.1089/hgtb.2015.048.

[113] S. A. Nass *et al.*, "Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 9, pp. 33–46, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.omtm.2017.12.004.

[114] J. Vinograd and R. Bruner, "Band centrifugation of macromolecules in self‐generating density gradients. II. Sedimentation and diffusion of macromolecules in bands," *Biopolymers*, vol. 4, no. 2, pp. 131–156, 1966, doi: 10.1002/bip.1966.360040202.

[115] J. Vinograd and R. Bruner, "Band centrifugation of macromolecules in self‐generating density gradients. III. Conditions for convection‐free band sedimentation," *Biopolymers*, vol. 4, no. 2, pp. 157–170, 1966, doi: 10.1002/bip.1966.360040203.

[116] H. Khasa, G. Kilby, X. Chen, and C. Wang, "Analytical band centrifugation for the separation and quantification of empty and full AAV particles," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 21, no. June, pp. 585–591, 2021, doi: 10.1016/j.omtm.2021.04.008.

[117] E. Kohlbrenner *et al.*, "Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system," *Mol. Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 1217–1225, 2005, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.08.018.

[118] M. Mietzsch, V. Casteleyn, S. Weger, S. Zolotukhin, and R. Heilbronn, "OneBac 2.0: Sf9 cell lines for production of AAV5 vectors with enhanced infectivity and minimal encapsidation of foreign DNA," *Hum. Gene Ther.*, vol. 26, no. 10, pp. 688–697, 2015, doi: 10.1089/hum.2015.050.

[119] J. S. Johnson and R. J. Samulski, "Enhancement of Adeno-Associated Virus Infection by Mobilizing Capsids into and Out of the Nucleolus," *J. Virol.*, vol. 83, no. 6, pp. 2632–2644, 2009, doi: 10.1128/jvi.02309-08.

[120] M. Urabe *et al.*, "Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression," *Mol. Ther.*, vol. 13, no. 4, pp. 823–828, 2006, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.11.024.

[121] K. H. Warrington, O. S. Gorbatyuk, J. K. Harrison, S. R. Opie, S. Zolotukhin, and N. Muzyczka, "Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus," *J. Virol.*, vol. 78, no. 12, pp. 6595–6609, 2004, doi: 10.1128/JVI.78.12.6595.

[122] Y. Yamaguchi *et al.*, "Unfolding of viral protein 1 N-termini facilitates genome ejection from recombinant adeno-associated virus serotype 8," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 33, no. 2, p. 101480, 2025, doi: 10.1016/j.omtm.2025.101480.

[123] K. Hirohata *et al.*, "Use of cesium chloride density gradient ultracentrifugation for the purification and characterization of recombinant adeno-associated virus," *Eur. Biophys. J.*, 2025, doi: 10.1007/s00249-025-01751-1.

[124] R. Nakatsuka *et al.*, "Multimass Analysis of Adeno-Associated Virus Vectors by Orbitrap-Based Charge Detection Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 96, no. 42, pp. 17037–17046, 2024, doi: 10.1021/acs.analchem.4c05229.

[125] H. Nishiumi *et al.*, "Combined 100 keV Cryo-Electron Microscopy and Image Analysis Methods to Characterize the Wider Adeno-Associated Viral Products," vol. 113, pp. 1804–1815, 2024, doi: 10.1016/j.xphs.2024.03.026.

[126] A. Bennett *et al.*, "Thermal Stability as a Determinant of AAV Serotype Identity," *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.*, vol. 6, pp. 171–182, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.omtm.2017.07.003.

[127] J. S. Bee *et al.*, "Impact of Time Out of Intended Storage and Freeze-thaw Rates on the Stability of Adeno-associated Virus 8 and 9," *J. Pharm. Sci.*, vol. 111, no. 5, pp. 1346–1353, 2022, doi: 10.1016/j.xphs.2022.01.002.

[128] P. Schober and L. A. Schwarte, "Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation," *Anesth. Analg.*, vol. 126, no. 5, pp. 1763–1768, 2018, doi: 10.1213/ANE.0000000000002864.

[129] T. Onishi *et al.*, "Enhancement of recombinant adeno-associated virus activity by improved stoichiometry and homogeneity of capsid protein assembly," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 31, no. December, p. 101142, 2023, doi: 10.1016/j.omtm.2023.101142.

[130] A. R. Giles *et al.*, "Deamidation of Amino Acids on the Surface of Adeno-Associated Virus Capsids Leads to Charge Heterogeneity and Altered Vector Function," *Mol. Ther.*, vol. 26, no. 12, pp. 2848–2862, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.013.

[131] S. J. Bing *et al.*, "Differential T cell immune responses to deamidated adeno-associated virus vector," *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, vol. 24, no. March, pp. 255–267, 2022, doi: 10.1016/j.omtm.2022.01.005.

[132] A. Rodriguez *et al.*, "Insight Into the Degradation Pathways of an AAV9," *J. Pharm. Sci.*, vol. 113, pp. 2967–2973, 2024, doi: 10.1016/j.xphs.2024.05.034.

[133] J. P. Trempe and B. J. Carter, "Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein," *J. Virol.*, vol. 62, no. 9, pp. 3356–3363, 1988, doi: 10.1128/jvi.62.9.3356-3363.1988.

[134] P. Cassinotti, M. Weitzand, and J. D. Tratschin, "Organization of the adeno-associated

virus (AAV) capsid gene: Mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein," *Virology*, vol. 167, no. 1, pp. 176–184, 1988, doi: 10.1016/0042-6822(88)90067-0.

[135] S. P. Becerra, J. A. Rose, M. Hardy, B. M. Baroudy, and C. W. Anderson, "Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: A possible ACG initiation codon," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 23, pp. 7919–7923, 1985, doi: 10.1073/pnas.82.23.7919.

[136] P. Grossen, I. Skaripa Koukelli, J. van Haasteren, A. H.E. Machado, and C. Dürr, "The ice age – A review on formulation of Adeno-associated virus therapeutics," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 190, no. July, pp. 1–23, 2023, doi: 10.1016/j.ejpb.2023.07.002.

[137] P. Pandharipande, T. Bhowmik, and N. Singh, "Considerations for Buffering Agent Selection for Frozen rAAV2 Mediated Gene Therapy Products," *J. Pharm. Sci.*, vol. 110, no. 10, pp. 3535–3539, 2021, doi: 10.1016/j.xphs.2021.06.019.

[138] J. S. Johnson, C. Li, N. DiPrimio, M. S. Weinberg, T. J. McCown, and R. J. Samulski, "Mutagenesis of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Protein VP1 Uncovers New Roles for Basic Amino Acids in Trafficking and Cell-Specific Transduction," *J. Virol.*, vol. 84, no. 17, pp. 8888–8902, 2010, doi: 10.1128/jvi.00687-10.

[139] M. Hoque *et al.*, "Nuclear Transport of the Major Capsid Protein Is Essential for Adeno-Associated Virus Capsid Formation," *J. Virol.*, vol. 73, no. 9, pp. 7912–7915, 1999, doi: 10.1128/jvi.73.9.7912-7915.1999.

[140] H.-J. Nam *et al.*, "Structural Studies of Adeno-Associated Virus Serotype 8 Capsid Transitions Associated with Endosomal Trafficking," *J. Virol.*, vol. 85, no. 22, pp. 11791–11799, 2011, doi: 10.1128/jvi.05305-11.

発表論文

1. **Sweeping of adsorbed therapeutic protein on prefillable syringes promotes micron aggregate generation**
   Takahiro Maruno, Hiroki Watanabe, Saki Yoneda, Takayuki Uchihashi, Satoru Adachi, Kunihito Arai, Taichi Sawaguchi, Susumu Uchiyama
   J Pharm Sci. 2018 107(6):1521-1529.
   ＊本学位論文第 2 章に関与する原著論文

2. **Stirring rate affects thermodynamics and unfolding kinetics in isothermal titration calorimetry**
   Takahiro Maruno, Tadayasu Ohkubo, Susumu Uchiyama
   J Biochem. 2020 168(1):53-62.
   ＊本学位論文第 3 章に関与する原著論文

3. **Comprehensive size distribution and composition analysis of adeno-associated virus vector by multiwavelength sedimentation velocity analytical ultracentrifugation**
   Takahiro Maruno, Kaede Usami, Kentaro Ishii, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama
   J Pharm Sci. 2021 110(10):3375-3384.
   ＊本学位論文第 4 章に関与する原著論文

4. **Size distribution analysis of the adeno-associated virus vector by the c(s) analysis of band sedimentation analytical ultracentrifugation with multiwavelength detection.**
   Takahiro Maruno, Kentaro Ishii, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama
   J Pharm Sci. 2023 112(4):937-946.
   ＊本学位論文第 5 章に関与する原著論文

5. **Variation of VP2 stoichiometry and deamidation of VP1 during production and their impacts on the transduction efficiency of AAV vectors**
   Takahiro Maruno, Mitsuko Fukuhara, Yasuo Tsunaka, Aoba Matsushita, Kiichi Hirohata, Karin Bandoh, Megumi Onaka, Risa Shibuya, Yuki Yamaguchi, Haruka Nishiumi, Yoshiki Nagashima, Daisuke Higo, Toshie Kuwahara, Tomoko Ueno, Masaharu Maeda, Guirong Kanai-Bai, Noriko Yamano-Adachi, Tetsuo Torisu, Takeshi Omasa, Susumu Uchiyama
   Mol Ther Methods Clin Dev. 2025 33(4):101581.
   ＊本学位論文第 6 章に関与する原著論文

その他発表論文

タンパク質の凝集体分析に関係する原著論文

1. **Collaborative study for analysis of subvisible particles using flow imaging and light obscuration: Experiences in Japanese biopharmaceutical consortium**
   Masato Kiyoshi, Hiroko Shibata, Akira Harazono, Tetsuo Torisu, Takahiro Maruno, Michiko Akimaru, Yuuka Asano, Mai Hirokawa, Keisuke Ikemoto, Yukari Itakura, Takafumi Iwura, Aya Kikitsu, Takashi Kumagai, Naoki Mori, Hiroaki Murase, Hirotaka Nishimura, Atsushi Oda, Taiichiro Ogawa, Takuma Ojima, Shinji Okabe, Shuntaro Saito, Satoshi Saitoh, Hiroyuki Suetomo, Kazuhiro Takegami, Momoko Takeuchi, Hidehito Yasukawa, Susumu Uchiyama, Akiko Ishii-Watabe
   J Pharm Sci. 2019 108(2):832-841.

2. **Synergistic effect of cavitation and agitation on protein aggregation**
   Tetsuo Torisu, Takahiro Maruno, Yoshinori Hamaji, Tadayasu Ohkubo, Susumu Uchiyama
   J Pharm Sci. 2017 106(2):521-529.

3. **Friability testing as a new stress-stability assay for biopharmaceuticals**
   Tetsuo Torisu, Takahiro Maruno, Saki Yoneda, Yoshinori Hamaji, Shinya Honda, Tadayasu Ohkubo, Susumu Uchiyama
   J Pharm Sci. 2017 106(10):2966-2978.

4. **An Assessment of the Ability of Submicron- and Micron-Size Silicone Oil Droplets in Dropped Prefillable Syringes to Invoke Early- and Late-Stage Immune Responses**
   Elena Krayukhina, Masami Yokoyama, Kayoko Kakuhou Hayashihara, Takahiro Maruno, Masanori Noda, Hiroki Watanabe, Takayuki Uchihashi, Susumu Uchiyama
   J Pharm Sci. 2019 108(7):2278-2287.

5. **A Collaborative Study on the Classification of Silicone Oil Droplets and Protein Particles Using Flow Imaging Method**
   Hiroko Shibata, Masahiro Terabe, Yuriko Shibano, Satoshi Saitoh, Tomohiro Takasugi, Yu Hayashi, Shinji Okabe, Yuka Yamaguchi, Hidehito Yasukawa, Hiroyuki Suetomo, Kazuhiro Miyanabe, Naomi Ohbayashi, Michiko Akimaru, Shuntaro Saito, Daisuke Ito, Atsushi Nakano, Shota Kojima, Yuya Miyahara, Kenji Sasaki, Takahiro Maruno, Masanori Noda, Masato Kiyoshi, Akira Harazono, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama,

Akiko Ishii-Watabe
J Pharm Sci. 2022 111(10):2745-2757.

AAV ベクターの品質評価に関係する原著論文

6. **Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Proteins with Two Types of VP3-Related Components by Capillary Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry**
Hiroaki Oyama, Kentaro Ishii, Takahiro Maruno, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama
Hum Gene Ther. 2021 32(21-22):1403-1416.

7. **Critical Calibration of Mass Photometry for Higher-Mass Samples Such as Adeno-Associated Virus Vectors**
Kimitoshi Takeda, Masanori Noda, Takahiro Maruno, Susumu Uchiyama
J Pharm Sci. 2023 112(4):1145-1150.

8. **Enhancement of recombinant adeno-associated virus activity by improved stoichiometry and homogeneity of capsid protein assembly**
Takayuki Onishi, Michika Nonaka, Takahiro Maruno, Yuki Yamaguchi, Mitsuko Fukuhara, Tetsuo Torisu, Masaharu Maeda, Susan Abbatiello, Anisha Haris, Keith Richardson, Kevin Giles, Steve Preece, Noriko Yamano-Adachi, Takeshi Omasa, Susumu Uchiyama
Mol Ther Methods Clin Dev. 2023 31:101142.

9. **Glycosylation of recombinant adeno-associated virus serotype 6**
Yuki Yamaguch, Kentaro Ishii, Sachiko Koizumi, Hiroaki Sakaue, Takahiro Maruno, Mitsuko Fukuhara, Risa Shibuya, Yasuo Tsunaka, Aoba Matsushita, Karin Bandoh, Tetsuo Torisu, Chie Murata-Kishimoto, Azusa Tomioka, Saho Mizukado, Hiroyuki Kaji, Yuji Kashiwakura, Tsukasa Ohmori, Atsushi Kuno, Susumu Uchiyama
Mol Ther Methods Clin Dev. 2024 32(2):101256.

10. **Quantification of full and empty particles of adeno-associated virus vectors via a novel dual fluorescence-linked immunosorbent assay**
Sereirath Soth, Mikako Takakura, Masahiro Suekawa, Takayuki Onishi, Kiichi Hirohata, Tamami Hashimoto, Takahiro Maruno, Mitsuko Fukuhara, Yasuo Tsunaka, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama
Mol Ther Methods Clin Dev. 2024 32(3):101291.

11. **Physicochemical and biological impacts of light stress on adeno-associated virus serotype 6**

Rie Takino, Yuki Yamaguchi, Takahiro Maruno, Ekaputra Ramadhani, Misaki Furukawa, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama

Mol Ther Methods Clin Dev. 2024 32(4):101362.

12. **Combined 100 keV cryo-electron microscopy and image analysis methods to characterize the wider adeno-associated viral products**

Haruka Nishiumi, Kiichi Hirohata, Mitsuko Fukuhara, Aoba Matsushita, Yasuo Tsunaka, Mark Allen Vergara Rocafort, Takahiro Maruno, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama

J Pharm Sci. 2024 113(7):1804-1815.

13. **Applications and limitations of equilibrium density gradient analytical ultracentrifugation for the quantitative characterization of adeno-associated virus vectors**

Kiichi Hirohata, Yuki Yamaguchi, Takahiro Maruno, Risa Shibuya, Tetsuo Torisu, Takayuki Onishi, Hideto Chono, Junichi Mineno, Yuan Yuzhe, Kiyoko Higashiyama, Kyoko Masumi-Koizumi, Kazuhisa Uchida, Takenori Yamamoto, Eriko Uchida, Takashi Okada, Susumu Uchiyama

Anal Chem. 2024 96(2):642-651.

その他総説・解説

14. **分子間相互作用解析プログラム“SEDPHAT”による等温滴定型熱量データ解析**

丸野 孝浩, 内山 進

Netsu Sokutei (2020) 47(1): 14-18

15. **ウイルスベクター品質管理における物理化学解析**

内山 進, 丸野 孝浩, 石井 健太郎, 鳥巣 哲生

創薬研究者がこれだけは知っておきたい最新のウイルス学 (2021) 第 9 章 第 5 節

16. **超遠心分析沈降速度法による分子間相互作用解析**

丸野 孝浩, 内山 進

創薬研究のための相互作用解析パーフェクト (2021) 第 3 章 第 6 節

17. **多波長超遠心分析によるウイルスベクターの粒子サイズ分布解析**

丸野 孝浩, 内山 進
生物物理 (2023) 63(4):202-204

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 高分子バイオテクノロジー領域 教授 内山　進 先生に、心より深く感謝申し上げます。

本学位論文の副査をお引き受けいただきました、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 生物化学工学領域 教授 大政　健史 先生、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 生命環境システム工学領域 教授 渡邉　肇 先生には多くのご助言とご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

さらに、研究の各段階においてご指導とご助言を賜りました、高分子バイオテクノロジー領域 准教授 鳥巣　哲生 先生、助教 山口　祐希 先生をはじめとする研究室の諸先生方に深く感謝いたします。日頃の議論を通じて多くを学ばせていただきました。

また、本研究の共同研究者の皆様に、心より感謝申し上げます。皆様からの貴重なご助言とご協力により、本研究を大きく発展させることができました。

加えて、在職中にもかかわらず学位申請の機会を認めてくださり、研究活動にご理解とご支援を賜りました株式会社ユー・メディコの関係各位に深く感謝申し上げます。

以上の皆様に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。