



Title	落下・振とう複合ストレスによるバイオ医薬品の凝集に関する研究
Author(s)	鳥巣, 哲生
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69512">https://doi.org/10.18910/69512</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名 ( 鳥巣 哲生 )	
論文題名	落下・振とう複合ストレスによるバイオ医薬品の凝集に関する研究
論文内容の要旨	
<p>タンパク質凝集体は免疫原性を持つことが指摘されており、薬効の著しい低下やアナフィラキシーショックのような重篤な副作用を引き起す。そのため、バイオ医薬品に含まれるタンパク質の凝集体は、バイオ医薬品開発において喫緊に解決すべき課題の一つとなっている。本研究では、バイオ医薬品の輸送中に起るタンパク質の凝集に着目した。バイオ医薬品は、輸送中に熱、凍結融解、落下、振とうなどのストレスを複合的に受ける可能性があり、その中でも落下と振とうについては避けることが非常に困難である。これまでに、落下と振とうのそれぞれがタンパク質の凝集を引き起すとの報告はあるが、実際の輸送時を想定した落下と振とうの複合的な作用によるタンパク質の凝集については報告がない。そこで本研究では、落下・振とう複合ストレスによる抗体の凝集について検討を行った。本研究では、摩損度試験機を用いて落下・振とう複合ストレス試験を実施し、生成した凝集体について分析を行った。摩損度試験機は、錠剤が製造や輸送中に受ける振動や衝撃などの機械的ストレスに対する錠剤の物理的安定性を評価する機器として広く利用されており、剤形は異なるものの、バイオ医薬製剤も輸送中に錠剤と同様の機械的ストレスを受けると考えられることから本研究で使用した。</p> <p>まず、バイアル中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成について検討した。落下・振とう複合ストレスにより生成したタンパク質凝集体を、サイズ排除クロマトグラフィー、動的光散乱およびフローイメージング法を用いて分析した。その結果、可溶性の凝集体を経由せず、<math>\mu\text{m}</math>オーダーのタンパク質凝集体が落下・振とう複合ストレスによって著しく増加することが明らかとなった。また、充填容量が少ないほど落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度が速いという結果が得られた。抗体溶液の充填容量が少ないほど振とうの効果は高くなり、充填容量が多いほど落下の効果が高くなることが知られており、振とうストレスが落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成に重要であることが示唆された。一方で、振とうストレスのみではタンパク質凝集体が生成しなかったことから、落下ストレスが凝集体生成を引き起すために必要であることが明らかとなった。落下ストレスはキャビテーション発生を通じた立体構造の変化を、振とうストレスは攪拌による壁面からの抗体の剥離をそれぞれ引き起し、落下・振とう複合ストレスによる<math>\mu\text{m}</math>オーダーの凝集体生成を促進すると考えられた。落下ストレスによりヒドロキシラジカルが生成することが知られており、ヒドロキシラジカルによる酸化が凝集体生成に寄与している可能性が考えられたが、LC-MSの結果から、落下に伴って生成したヒドロキシラジカルによる酸化等の化学的修飾は起こらないことが明らかとなった。以上の結果から、落下・振とう複合ストレスによる<math>\mu\text{m}</math>オーダーの凝集体の増加は、落下による抗体の立体構造変化、変性した抗体の壁面への吸着、振とうによる吸着した抗体の壁面からの剥離という経路で起こることが示唆された。</p> <p>次に、プレフィルドシリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成について検討を行った。共振式質量測定法の結果から、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において、落下ストレスは抗体の立体構造の変化だけでなく<math>\text{nm}</math>オーダーの凝集体生成（核形成）を引き起すことが示された。その他のタンパク質凝集体生成経路については、バイアルの場合と同様であると考えられた。摺動性を向上させるため、ガラス製プレフィルドシリンジの内壁にはシリコンオイルが塗布されるが、シリコンオイルの塗布によって、プレフィルドシリンジ内壁への抗体の吸着量が増加し、落下・振とう複合ストレスにより生成するタンパク質凝集体の量も増加した。非イオン界面活性剤は、プレフィルドシリンジ内壁などの固液界面や、キャビテーションバブル表面の気液界面を覆うことにより、抗体のプレフィルドシリンジ内壁への吸着および落下ストレスによる核形成を抑制し、落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成を抑制した。ただし、非イオン界面活性剤の添加によってプレフィルドシリンジ内壁からのシリコンオイルの遊離が促進されることも明らかとなった。シリコンオイルは、アジュバントとしての作用を持ち、免疫原性を高めるとの報告がある。そのため、非イオン界面活性剤は、タンパク質の凝集を抑制する目的でバイオ医薬品の添加剤として広く使用されているが、シリコンオイルが塗布されたプレフィルドシリンジを容器として使用する場合</p>	

は、シリコンオイル油滴の増加に注意が必要である。シリコンオイルを塗布していないプレフィルドシリンジを使用した場合、本研究で用いた3種類の抗体の構造安定性およびコロイド安定性と落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度に相関が見られた。今後さらに検討を行うことで、構造安定性やコロイド安定性をはじめとする種々の物理化学的指標から落下・振とう複合ストレスに対する凝集安定性を予測できるようになる可能性がある。

本研究の結果から、落下と振とうが複合的に作用し、タンパク質凝集体の著しい増加を引き起こすことが明らかとなった。このような複合的な作用は、個々のストレスに対する安定性試験では評価できないため、複合的なストレスに対する安定性試験を実施することが重要である。摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験の再現性は、これまで実施してきた振とうストレスや凍結融解ストレスに対する安定性試験の再現性と同等であり、摩損度試験機を用いることで落下・振とう複合ストレスに対する安定性を再現性良く評価できると考えられる。現在、摩損度試験機は、低分子医薬品の開発においてのみ使用されているが、今後バイオ医薬品の分野でも活用されることで、より高品質で安全なバイオ医薬品の開発に繋がると期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (鳥巣 哲生)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 大久保 忠恭 副査 教授 赤井 周司 副査 教授 高木 達也

## 論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は、抗体などのタンパク質を主成分とするバイオ医薬品に対する落下・振とう複合ストレスの影響を解明するために、様々な物理化学的分析手法を駆使して落下・振とうによるバイオ医薬品の凝集機構を明らかにした。タンパク質凝集体は免疫原性を持つことが指摘されており、薬効の著しい低下やアナフィラキシーショックのような重篤な副作用を引き起こすため、バイオ医薬品に含まれるタンパク質の凝集体は、バイオ医薬品開発において喫緊に解決すべき課題の一つとなっている。本研究では、バイオ医薬品の輸送中に発生するタンパク質の凝集に着目している。バイオ医薬品は、輸送中に熱、凍結融解、落下、振とうなどのストレスを複合的に受ける可能性があり、その中でも落下と振とうについては避けることが非常に困難である。これまでに、落下若しくは振とうのそれぞれがタンパク質の凝集を引き起こすとの報告はなされてきたが、実際の輸送時に想定される落下と振とうの複合的な作用によるタンパク質の凝集についての研究報告は無かった。そこで本研究では、落下・振とう複合ストレスによる抗体の凝集について検討を行い、摩損度試験機を用いて落下・振とう複合ストレス試験を実施し、生成した凝集体について分析を行った。摩損度試験機は、低分子錠剤が製造や輸送中に受ける振動や衝撃などの機械的ストレスに対する錠剤の物理的安定性を評価する機器として広く利用されており、剤形は異なるものの、バイオ医薬製剤も輸送中に錠剤と同様の力学的ストレスを受けると考え本研究で使用されている。

まず、バイアル中での落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成について検討が行われた。落下・振とう複合ストレスにより生成したタンパク質凝集体を、サイズ排除クロマトグラフィー、動的光散乱およびフローイメージング法を用いて分析している。その結果、可溶性の凝集体を経由せず、マイクロメートルオーダーのタンパク質凝集体が落下・振とう複合ストレスによって著しく増加することが明らかとなった。また、充填容量が少ないほど落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度が速いという結果が得られた。抗体溶液の充填容量が少ないほど振とうの効果は高くなり、充填容量が多いほど落下の効果が高くなるため、振とうストレスが落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成に重要であることが示された。一方で、振とうストレスのみではタンパク質凝集体が生成しなかったことから、落下ストレスが凝集体生成を引き起こすために必要であることが明らかとなった。落下ストレスはキャビテーション発生を通じた立体構造の変化を、振とうストレスは攪拌による壁面からの抗体の剥離をそれぞれ引き起こし、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成を促進することが示された。落下ストレスによりヒドロキシラジカルが生成することから、ヒドロキシラジカルによる酸化が凝集体生成に寄与している可能性が考えられたが、LC-MSの結果から、落下に伴って生成したヒドロキシラジカルによる酸化等の化学的修飾は起こらないことが明らかとなった。以上の成果から、落下・振とう複合ストレスによるマイクロメートルオーダーの凝集体の増加は、落下による抗体の立体構造変化、変性した抗体の壁面への吸着、振とうによる吸着した抗体の壁面からの剥離という経路で起こることが示された。

次に、プレフィルドシリンジ中での落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成について検討がなされた。共振式質量測定法の結果から、落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成において、落下ストレスは抗体の立体構造の変化だけでなくナノメートルオーダーの凝集体生成（核形成）を引き起こすことが示された。その他のタンパク質凝集体生成経路については、バイアルの場合と同様であった。摺動性を向上させるため、ガラス製プレフィルドシリンジの内壁にはシリコンオイルが塗布されるが、シリコンオイルの塗布によって、プレフィルドシリンジ内壁への抗体の吸着量が増加し、落下・振とう複合ストレスにより生成するタンパク質凝集体の量も増加した。非イオン界面活性剤は、

プレフィルドシリンジ内壁などの固液界面や、キャビテーションバブル表面の気液界面を覆うことにより、抗体のプレフィルドシリンジ内壁への吸着および落下ストレスによる核形成を抑制し、落下・振とう複合ストレスによるタンパク質凝集体生成を抑制していた。また、非イオン界面活性剤の添加によってプレフィルドシリンジ内壁からのシリコンオイルの遊離が促進されることも明らかとなった。シリコンオイルは、アジュバントとしての作用を持ち、免疫原性を高めるため、非イオン界面活性剤は、タンパク質の凝集を抑制する目的でバイオ医薬品の添加剤として広く使用されているが、シリコンオイルが塗布されたプレフィルドシリンジを容器として使用する場合は、シリコンオイル油滴の増加量に注意が必要であることが分かった。シリコンオイルを塗布していないプレフィルドシリンジを使用した場合、本研究で用いた3種類の抗体の構造安定性およびコロイド安定性と落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成速度に相関が見られた。今回の成果により、構造安定性やコロイド安定性をはじめとする種々の物理化学的指標から落下・振とう複合ストレスに対する凝集安定性を予測できることが示された。

本研究の結果から、落下と振とうが複合的に作用し、タンパク質凝集体の著しい増加を引き起こすことが明らかとなった。このような複合的な作用は、個々のストレスに対する安定性試験では評価できないため、複合的なストレスに対する新たな安定性試験を実施することの重要性が示された。摩損度試験機を用いた落下・振とう複合ストレス試験の再現性は、これまで実施してきた振とうストレスや凍結融解ストレスに対する安定性試験の再現性と同等であり、摩損度試験機を用いることで落下・振とう複合ストレスに対する安定性を再現性良く評価できることが明らかとなった。現在、摩損度試験機は、低分子医薬品の開発においてのみ使用されているが、今後バイオ医薬品の分野でも活用されることで、より高品質で安全なバイオ医薬品の開発に繋がる。

上記成果は落下・振とう複合ストレスによる凝集体生成機構の物理化学的基盤を明らかにしたもので、その意義は大きく、バイオ医薬品の開発に関して有用な知見を与えるものであると考えられ博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。