



Title	タンパク質凝集抑制のための抗体のプレフィルドシリンジ表面への吸着機構解明
Author(s)	米田, 早紀
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88009
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

タンパク質凝集抑制のための 抗体のプレフィルドシリンジ表面への 吸着機構解明

米田 早紀

2021 年 12 月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース

内容

第1章 序論.....	6
第1節 研究背景.....	6
バイオ医薬品について	6
バイオ医薬品中で発生する粒子について	6
タンパク質の溶液中での安定性	10
タンパク質の溶液安定性のための添加剤	11
非経口抗体医薬品の剤型	14
第2節 博士論文構成.....	18
第2章 タンパク質のホウケイ酸ガラスおよびシクロオレフィンポリマーシリンジへの吸着.....	20
第1節 緒言.....	20
第2節 実験材料および手法	24
材料.....	24
タンパク質サンプルの準備	24
シリンジ内壁に吸着したタンパク質の定量	25
タンパク質の COP シリンジへの吸着量の、タンパク質バルク濃度依存性に基づく Langmuir モデル解析	27
タンパク質の構造安定性およびコロイド安定性分析	28
タンパク質の表面ゼータ電位測定	29
タンパク質分子のモデリングおよびタンパク質の表面アクセシビリティ計算	30
シリンジ素材の表面ゼータ電位測定	30
シリンジ表面の接触角測定	31
高速液中原子間力顕微鏡 (High speed-atomic force microscopy, HS-AFM) による、タンパク質の吸着動態の観察	31
GLS および COP シリンジ中で発生したサブミクロンおよびミクロン凝集体の定量	32
第3節 結果.....	34
タンパク質の溶液中での安定性	34
タンパク質およびシリンジ表面の溶媒中における電気的特性	37
シリンジからのタンパク質剥離量の SDS 濃度依存性	40
COP シリンジへのタンパク質吸着量の濃度依存性と Langmuir 解析	41
タンパク質吸着量の pH および塩濃度依存性	43
高速液中原子間力顕微鏡 (High speed-atomic force microscopy, HS-AFM) による、タンパク質の吸着動態の観察	45
第4節 考察.....	59
タンパク質およびシリンジ表面の溶媒中における電気的特性	59

HS-AFM によるタンパク質の吸着動態観察と UPLC との吸着量との比較.....	59
タンパク質および PFS 表面の物理化学特性と吸着量との関係性	60
COP シリンジへのタンパク質吸着量の濃度依存性と Langmuir 解析	62
タンパク質のシリンジバレルへの吸着および凝集体発生に対する、界面活性剤の効果	63
第 5 節 小括.....	65
第 3 章 mAb のポリマーシリンジへの吸着と吸着機構解析	66
第 1 節 緒言.....	66
第 2 節 実験材料および手法	67
材料.....	67
シリンジ素材の表面接触角測定	67
シリンジ素材の表面ゼータ電位測定	68
mAb サンプルの準備	68
PFS バレル内壁に吸着したタンパク質の定量	69
吸着量と、PFS バレルおよびタンパク質の物理化学的特性との相関解析	69
第 3 節 結果.....	73
シリンジ素材の表面ゼータ電位と接触角	73
mAb の PFS バレルへの吸着量の pH および塩濃度依存性	75
シリンジへの吸着量と、シリンジおよびタンパク質の物理化学的特性との相関解析	75
第 4 節 考察.....	79
mAb のシリンジへの吸着量の pH および塩濃度依存性.....	79
シリンジへの吸着量と、シリンジおよびタンパク質の物理化学的特性との相関解析	80
第 5 節 小括.....	83
第 4 章 総括.....	86
参考文献.....	88
発表論文.....	96
謝辞.....	97

第1章 序論

第1節 研究背景

バイオ医薬品について

近年、生物を利用して製造されるバイオ医薬品の利用が拡大している。バイオ医薬品の一つである組換えモノクローナル抗体医薬品は、登場してから 20 年以上が経過し、その有効性の高さから販売が急激に増加している^{1,2}。近年流行している COVID-19 の治療においても、二種類の抗体を併用する抗体カクテル療法が用いられるなど、今後も抗体による治療が医薬品開発の中心的なターゲットの一つとなると予想される。

バイオ医薬品中で発生する粒子について

抗体医薬品の製造開発、輸送、保管、さらには投与の段階で様々な要因により発生する製剤中の粒子は、重篤な副作用を引き起こす可能性があることが示唆されている^{3,4}。そのため、注射剤に含まれる粒子については、品質にかかわる重要な事項として米国食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration, FDA）などの規制当局により厳しく規制が設定されており、USP<788>（Particle matter in injections）や日本薬局方 6.17（不溶性微粒子試験）では、容量が 100 mL 以下の注射剤中の粒子については、 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 、 $\geq 25\ \mu\text{m}$ のサイズの粒子濃度はそれぞれ、6,000 個/mL、600 個/mL 以下であることが求められている^{5,6}。

抗体医薬品中で発生する粒子は Li らによると、3 種類に分類することができ、それぞれ、外因性、内因性、内在性粒子と呼ばれる⁷。外因性粒子は周囲の環境から混入する可能性のある粒子（例えば空気中に漂う繊維や髪の毛など）、内因性粒子は製造中に混在する可能性のある粒子（例えばゴム断片や金属片、ガラス片など）、内在性粒子は製剤の劣化により発生する粒子（例えばタンパク質凝集体など）である。外因性の粒子の混在はまれであり製造設備のメンテナンスや工程の管理により防げるが、内因性粒子は発生そのものを防ぐことは難しく⁸⁻¹⁰、適切にコントロールされ発生を抑制する必要がある。内在性粒子、とくに

タンパク質凝集体については、患者に対する安全性の担保のために医薬品の保管期間を通じて正確にモニタリングされ、管理される必要がある⁷。

タンパク質凝集体のサイズ範囲は、数十 nm から数百 μm 程度と幅広いが、現時点においてすべてのサイズ範囲の粒子を網羅的に定量、評価できる手法は存在しない¹¹。さらに、タンパク質凝集体の特性は一様でなく、量とサイズのみならず、形状、密度、屈折率などの性質が多様であるが、この多様性を網羅的に分析する手段が不足している¹²⁻¹⁷。そのため、目的の粒子サイズやタイプに従って、サイズや濃度の分析手法を選択する必要がある（図 1、表 1）。非経口製剤の場合は、上述のとおり、薬局方において 10 μm 以上の大きさをもつ粒子については不溶性微粒子試験による数的な制限が設定されており、製剤中の粒子の測定には、光遮蔽法（Light Obscuration, LO）の使用が規定されている^{5,6}。一方、近年の研究において、10 μm よりも小さなサイズ範囲の粒子の濃度分布の分析の必要性が認識されてきている¹⁸⁻²⁰。さらに、現状では、タンパク質凝集体のサイズと、それぞれのサイズの粒子がもつ免疫原性との関係性が完全には明らかになってはいないため、凝集体の評価においては、測定原理が異なる複数の手法を用いて定量や分析を行い、できる限り異なるサイズ領域を複数の手法で網羅できるようにすることが望まれてきた。例えば、本博士論文の著者は、サブミクロン（0.3~2.0 μm ）、およびミクロン領域（2~20 μm ）のサイズをもつタンパク質凝集体の定量について、異なる手法間での定量結果の整合性を確認している¹⁶。具体的には、サブミクロンのサイズ範囲では、定量的レーザー回折法（Quantitative laser diffraction, qLD）、共振質量測定法（Resonant mass measurement, RMM）、およびナノ粒子追跡法（Nano-particle tracking analysis, NTA）を比較し、ミクロンサイズ領域では、qLD と LO に加え、フローイメージング法（Flow imaging, FI）を比較した。サブミクロン範囲においては、qLD と RMM とで、ミクロン範囲においては qLD と FI とで、首尾よく凝集体定量の結果が一致したことから、これらの原理を用いた凝集体定量の有効性が確認された。なかでも FI は、LO よりも粒子のカウント漏れが少ない可能性、および粒子一つ一つの形状

や透明度などの形態情報も取得できることから、タンパク質凝集体分析の試験法では不可欠の手法となりつつある非常に注目されている分析手法である^{21,22}。

タンパク質溶液にかかるストレスの種類により、発生するタンパク質凝集体のサイズ分布やその変化の仕方は異なる。例えば、加熱ストレスの場合は、ナノメートルサイズの粒子の発生後、徐々に大きいサイズの粒子へと成長していくようなプロファイルとなるが、攪拌や、振とう、またシリンジ壁面からの強制的な剥離（押し出し操作）の場合は、発生する凝集体は初期からサブミクロンからミクロンサイズの粒子が多い^{16,23,24}。よって、幅広いサイズ領域において、タンパク質凝集体のサイズ分布変化を計測することで、凝集体の発生要因の特定が実現できる可能性がある。

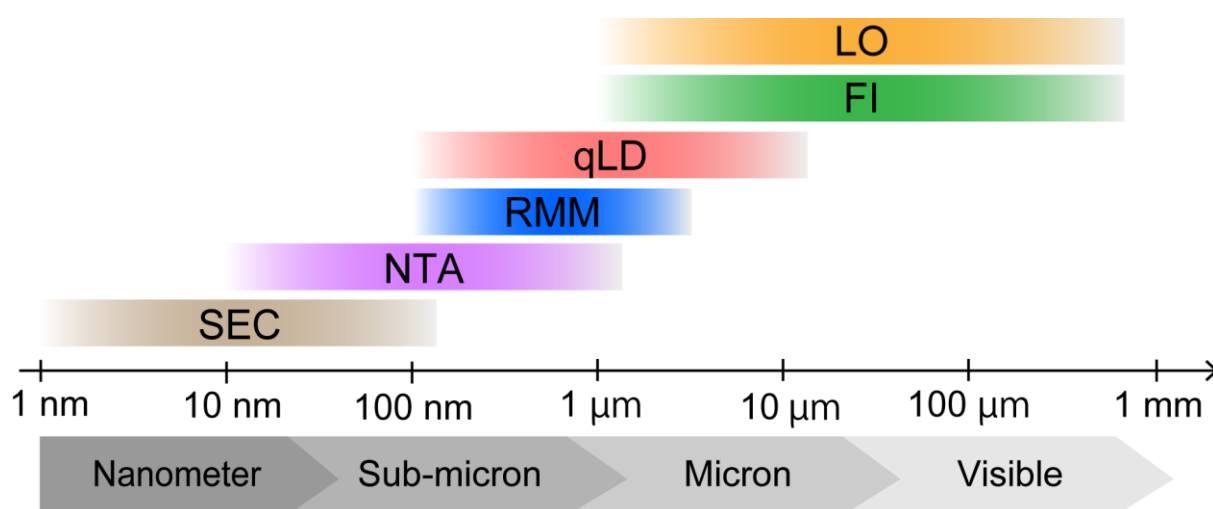


図 1: タンパク質凝集体のサイズ範囲とそれぞれのサイズ領域における粒度分布の分析手法。SEC: サイズ排除クロマトグラフィー (Size exclusion chromatography)、NTA: ナノ粒子追跡法 (Nano-particle tracking analysis)、RMM: 共振質量測定法 (Resonant mass measurement)、qLD: 定量的レーザー回折法 (Quantitative laser diffraction)、FI: フローイメージング法 (Flow Imaging)、LO: 光遮蔽法 (Light Obscuration)。

表 1: 粒子サイズに応じたタンパク質凝集体の粒度分布の分析手法

手法	サイズ範囲	利点	課題
SEC	1 nm ~ 40 nm 程度	堅牢かつ簡便な分析が可能である。 検出感度および再現性が高い。	分析の過程でサンプルの希釈を伴う。 サイズと量のダイナミックレンジが低い。 製剤条件とは異なる溶媒で分析することになる。
NTA	数十 nm~ 数百 nm 程度	サブミクロン領域の粒子の多分散系のサイズ分布の取得が可能である。	粒子径の大きな粒子が混在する場合、サイズの小さい粒子の情報の取得が難しくなる。 観察領域が狭いため、粒子全体の分布を反映しているか検証する必要がある。
RMM	200 nm~2 μ m 程度	溶媒よりも密度が大きい粒子と小さい粒子を区別できる。	観察する液量が微量であるため、全体の粒子径分布を反映しているか検証する必要がある。 流路が閉塞しやすいため、適切な洗浄と装置の管理が必要である。
qLD	150 nm~20 μ m 程度	サブミクロンからミクロン範囲まで、幅広いサイズ分	サンプルの必要容量が大きい。

		布にわたる分析が可能である。 時間依存的なサイズ分布の変化の観察が可能である。	光学モデルの妥当性の検証が必要である。
LO	2 μm 程度以上	薬局方で規定されている分析法である。 分析が簡便である。	粒子と溶媒とが近い値の屈折率を持つ場合、粒子数が少なく計測される傾向がある。 含まれている粒子の形状把握や粒子の種類の区別は困難。
FI	1~数百 μm 程度	画像から粒子の形状と数の情報を取得できる。 タンパク質凝集体と、シリコンオイルドロップおよび気泡との区別が可能である。	焦点外の画像がぼやける場合がある。 5 μm 以下の粒径だと、タンパク質凝集体とシリコンオイルドロップとの区別が困難になってくる。

参考文献（PHARM TECH JAPAN, Vol.34, No.7, 2018）より抜粋。

タンパク質の溶液中での安定性

タンパク質の溶液中での安定性は、タンパク質の化学的安定性と物理的安定性により説明できる²⁵。タンパク質が溶液中で化学的な修飾を受けにくい場合、化学的安定性が高いと言える。一方、タンパク質の物理的安定性は、タンパク質自体の構造安定性、およびタンパク質分子のコロイド安定性と関係する。構造安定性は、タンパク質の天然状態と変性状態の自由エネルギー変化が大きく、熱や攪拌などのストレスが加わっても天然状態で存

在する確率が高い性質である。コロイド安定性は、タンパク質分子間に斥力が働き、反発しあうことで、分散しやすい性質である²⁶⁻²⁸。タンパク質の化学的、物理的安定性の低下はタンパク質凝集につながる。

タンパク質製剤中でのタンパク質性の粒子の発生要因は、タンパク質自体の溶液中での構造安定性およびコロイド安定性の低下だけでなく、タンパク質の気液および固液界面への吸着、タンパク質と医療デバイスに塗布されたコート剤との相互作用、さらに包装素材へのタンパク質の吸着および製品への物理化学的ストレスに伴う吸着タンパク質の剥離など、非常に多様な要因があげられる。近年の凝集体メカニズム研究では、タンパク質溶液に、加熱や物理的な振とうなど、様々なストレスをかけてタンパク質凝集体を発生させる加速試験を用いた手法によるアプローチが主流となっている²⁹⁻³¹。しかしながら、それぞれの研究結果はケーススタディとして取り扱われることが多く、タンパク質凝集体の発生は、メカニズムの全容は明らかとなっていない³²⁻³⁵。こうした状況の下、近年、タンパク質の気液、固液界面への吸着およびフィルム層の形成、物理ストレスによるタンパク質フィルムの界面からの剥離が、界面を介したタンパク質凝集体形成につながる可能性が示唆されている³⁶⁻³⁹。つまりこれらの研究に基づくと、タンパク質の気液、固液界面への吸着を最小限にとどめられれば、タンパク質凝集体の発生を抑制できる可能性がある、という凝集抑制のための重要なアイデアが得られることとなる。

タンパク質の溶液安定性のための添加剤

タンパク質医薬品における、タンパク質性の粒子の発生に対して、添加剤による溶液側の物性の変更によって抑制する手法が主流である。タンパク質製剤に多く用いられる添加剤として、緩衝剤、塩、糖類、アミノ酸、さらには界面活性剤があげられる⁴⁰。

緩衝剤は、主にタンパク質溶液の pH の安定化のために添加される。タンパク質の構造は溶液の pH に大きく左右されるため、立体構造の保持の観点からも適切な pH 選択が必要である³⁴。よって、タンパク質の等電点もアミノ酸配列のみから一義的には決まらないが、

治療用抗体の多くは、アミノ酸配列に基づく、等電点は pH 6 以上であると推定される。さらに、アスパラギンやグルタミン残基は pH4 以下または 7 以上において脱アミノ化しやすく、システインやセリン残基は高 pH でラセミ化しやすい。よって、タンパク質に電荷をもたせて静電的な斥力を与え、溶液中でのコロイド安定性を増強させるためだけでなく、特定のアミノ酸残基に起こる化学変化を防ぐために、製剤は弱酸性から中性 (pH4.5~7.5) に保たれることが多い^{25,41}。また、タンパク質溶液の長期安定性を達成するため、タンパク質それぞれに対して適切な緩衝剤が選択される。

塩の添加は、溶液のイオン強度を上げたり、溶液中のタンパク質間の静電引力を減少させたりする効果がある。その効果は、タンパク質を安定化するための効果の程度の指標となる、ホフマイスター系列に従って説明することができる^{42,43}。ホフマイスター系列によって、塩はカオトロピック塩とコスモトロピック塩とに分類され、それぞれ異なる効果を持つ。例えば、コスモトロピックイオンに分類される硫酸陰イオンやリン酸陰イオンは、タンパク質の構造安定性を高める。一方、カオトロピックイオンに分類されるヨウ素酸塩や過塩素酸陰イオンは、タンパク質の構造を不安定化する効果がある。しかし、塩の濃度によっては、タンパク質の構造を不安定化したり、タンパク質の凝集を促進したりすることが分かっている⁴⁴。例えば、タンパク質の凝集が静電相互作用による場合、高イオン強度（高塩濃度）の方が凝集抑制に効くが、タンパク質の凝集がタンパク質どうしの疎水性相互作用による場合、塩濃度の増加は凝集促進に影響すると考えられる⁴⁵。

糖類は、溶液に添加することにより、タンパク質分子の周りから選択的に排除される効果をもち、タンパク質の水和を誘導すること（選択的水和とよばれる）でタンパク質が折りたたまれた構造を保つことでタンパク質の構造安定性を増す^{42,46}。バイオ医薬品においてはスクロース、マンニトール、およびトレハロースなどが使用される場合が多い⁴⁷。これらの糖類は凍結保護剤としてタンパク質製剤に添加され、特に凍結融解ストレスに対してタンパク質製剤の安定性を増強する⁴⁸。

添加剤として添加されるアミノ酸類の代表例は、ヒスチジン、グリシンとアルギニンがある⁴⁹。ヒスチジンやグリシンは、緩衝材として溶液 pH を最適化するために用いられる場合が多い。ヒスチジンはさらに、溶液中のヒドロキシラジカルを除去する抗酸化剤としても知られている。アルギニンは様々な分子相互作用を介してタンパク質と相互作用すると報告されている。アルギニンはグルタミン酸のカルボキシル基とは水素結合、静電相互作用の両方を介して直接相互作用し、プロリンやバリン残基とはメチレン基を介した分散、疎水性相互作用の両方で結合することでタンパク質の疎水性パッチと結合する。これらのアミノ酸の添加により、タンパク質間の弱い相互作用を低減することができる。

界面活性剤は、溶液中のタンパク質、また、気液界面および固液界面に吸着することでタンパク質どうしの相互作用、およびタンパク質の界面吸着を防ぐ。日本では、医薬品添加物として 100 種類以上の界面活性剤が使用されており⁵⁰、特にモノクローナル抗体製剤の 70%以上に、ポリソルベート 80 またはポリソルベート 20 のいずれかが添加されている¹⁷。また近年では、バイオ医薬品の液体製剤に対するポロキサマー188 の使用も増えてきている^{17,51,52}。ポリソルベート類は両親媒性の非イオン性の界面活性剤で、共通骨格として、異なる側鎖にランダムに分布した合計 20 の繰り返し単位のポリオキシエチレン (POE) に結合したソルビタンリングで構成されている (図 2 (a))⁵³。一方、ポロキサマーは、2 つのポリオキシエチレン鎖 (PEO) が 1 つの疎水性ポリオキシプロピレン鎖 (PPO) に隣接するトリブロックコポリマーである (図 2 (b))⁵³。P188 の分子量は約 8.4kDa で、親水性部分が分子量の約 80%を占めており、親水性/親油性のバランスが比較的高い⁵²。界面活性の観点からすると、ポロキサマー188 に比べてポリソルベート 80 のほうが、界面張力を低下させるのに効果的でタンパク質の界面への吸着低減効果はポリソルベート 80 の方が高いことが報告されている^{54,55}。しかしながら、ポリソルベート類は、製剤に残留する消化酵素などにより加水分解されたり、溶液中に残存する過酸化化物による自己酸化されたりして分解または劣化し、遊離脂肪酸やアルデヒド類などを産生し、タンパク質製剤の安定性を損ねたり、遊離物が核となって粒子が形成される懸念もある⁵⁶⁻⁵⁸。

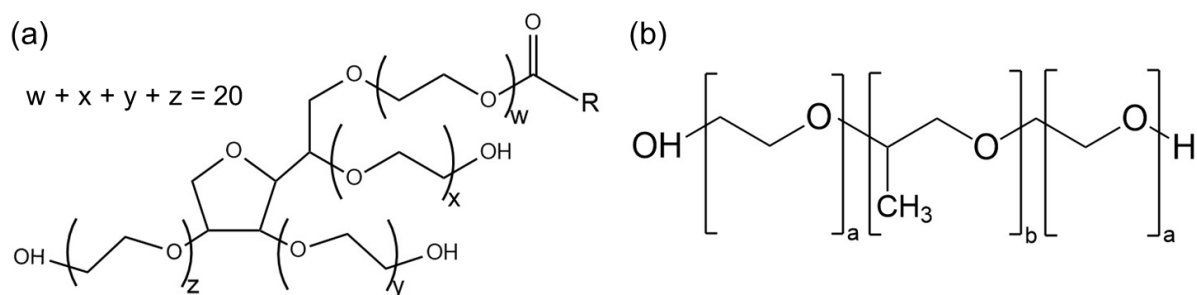


図 2: (a) ポリソルベートの構造。RCO は、ポリソルベート 20 では主としてラウリン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$)、ポリソルベート 80 では主としてオレイン酸 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}-$) であり、その他の脂肪酸も含む。(b) ポロキサマー188 の構造。

非経口抗体医薬品の剤型

非経口製剤、なかでも注射用の製剤の剤型は様々であり、ガラスバイアルの使用の開始は 1850 年代にまでさかのぼる^{40,59}。ホウケイ酸ガラスを成形したバイアルは、現在、凍結乾燥製剤および液体製剤の、最も主流な包装形態となっている。凍結乾燥品は薬液を凍結および乾燥させて粉末のケーキ状態として提供され、使用前に薬液で再構成してから投与に用いられるため、コンタミネーションのリスクがあること、医療従事者の手間が多いことなどが懸念点であった^{60,61}。そのため、再構成の不要な液体製剤の販売が増加している。なかでも、利便性や投与の簡便性の理由により、あらかじめ注射器に薬液が充填された状態のプレフィルドシリンジ (PFS) 品の販売が加速している⁴⁰。一方、PFS 剤型の使用には特有の懸念点もある。典型的な PFS の容量は 0.25~5.0 mL と限られており、製品の濃度は 50~180 mg/mL の高濃度となりうる⁶²。高濃度のタンパク質はタンパク質-タンパク質間相互作用によるネットワーク形成による粘度増加、およびタンパク質凝集体の発生を引き起こす可能性がある^{40,63}。さらに、PFS には注射針が据え付けられており、注射器内外の圧力差により、注射針における詰まりが発生する可能性も示唆されている⁶⁴。さらに、PFS バレルの素材であるホウケイ酸ガラスには、プランジャーヘッドと呼ばれるゴム栓との摩擦

を低減するため潤滑剤としてシリコンオイルが 0.2~1 mg スプレー塗布されている⁴⁵。シリコンオイルは製剤中で粒子形成やタンパク質凝集体を誘起する原因となることが報告されている^{34,39,65,66}。このような懸念から、シリコンオイルの塗布技術が発展し、シリコンオイルの焼き付けやバレルへの架橋を行うことで、シリコンオイル層の厚みを 10 分の 1 以下にし、製剤中へのシリコンオイル粒子の剥離も低減できるシリコンオイルコーティング技術が開発されてきた⁶⁷。それでもやはり、タンパク質製剤中にシリコンオイルが遊離してくる可能性はあり、シリコンオイルにより発生した凝集体やシリコンオイルドロップにタンパク質が吸着した粒子の免疫原性の懸念を完全に排除することができないことになるため、できる限りシリコンオイルの使用は避けた方が良くと考えられる^{19,20,40}。こうした状況のもと、近年では、専用のプランジャーヘッドを備え付けた、シリコンオイルフリーのホウケイ酸ガラスバレル、またはシクロオレフィンコポリマー (COC) やシクロオレフィンポリマー (COP) などのポリマー素材で成形された PFS が商品化されている⁶⁸⁻⁷¹。ガラスシリンジは最も広く使用されている選択肢であるが⁷²、ひび割れや破損などの脆弱性が懸念される^{73,74}。一方、ポリマー類の PFS への適用については、水や CO₂/O₂ の透過性の高さ、または浸出物/溶出物の懸念もあるが、タンパク質製剤での保管におけるタンパク質凝集体発生の抑制において、シリコンオイルフリーCOP の PFS の有用性が実証されている^{40,68,75,76}。

シリコンオイル塗布されたホウケイ酸ガラスシリンジ (GLS/so+)、シリコンオイルフリーガラスシリンジ (GLS/so-)、およびシリコンオイルフリーCOP シリンジ (COP) を用いた PFS への 3 種類のタンパク質製剤を用いた、PFS 中で発生するタンパク質凝集体に関する先行研究において、PFS へ吸着するタンパク質の量が多いほど、PFS の押し出し操作によって排出されるタンパク質凝集体の濃度が高くなることが示された²⁴。よって、医療用タンパク質の界面への吸着、特に PFS のバレルへの吸着量を低減することが、患者への投与時のタンパク質医薬品の安全性向上に貢献できる可能性が示唆された。この先行研究において、タンパク質の種類のみならず、タンパク質が接触する PFS バレルの種類によっても、タンパク質凝集体の濃度が異なったことから、タンパク質溶液の物性だけでなく、タ

ンパク質溶液が接触する容器側の材質が、タンパク質の固液界面安定性およびタンパク質凝集体発生に影響を与える可能性も示唆された。

そこで本博士論文では、タンパク質医薬品中で発生するタンパク質凝集体の発生を抑制するために、タンパク質凝集体発生の原因であると考えられる、タンパク質の固液界面への吸着メカニズムの解明を目的とした。さらに、吸着メカニズムに基づき、表面素材の物性ごとに対応する、タンパク質のシリンジバレルへの吸着量およびタンパク質凝集体量の低減に対する有効手段を提案する。

第2節 博士論文構成

本博士論文の構成は下記の通りとなっている。

まず、第2章では、医療用タンパク質であるモノクローナル抗体アダリムマブ (mAb) および遺伝子組み換え融合タンパク質アバタセプト (CTLA4-Ig) のプレフィルドシリンジ (PFS) への吸着について、ホウケイ酸ガラス (GLS) シリンジおよびシクロオレフィンポリマー (COP) シリンジを用いて解析を行った。GLS も COP も、抗体医薬品実製剤に用いられる PFS の材質である。タンパク質の吸着は、タンパク質が置かれる溶液の pH およびイオン強度によって変化するため、本研究においても、mAb および CTLA4-Ig のシリンジへの吸着量の pH 依存性および塩濃度依存性を定量した。また、高速液中原子間力顕微鏡 (High-speed atomic force microscopy, HS-AFM) を用いて、各表面への吸着動態のリアルタイムモニタリングも行った。さらに、タンパク質の吸着にどのような相互作用が関与するかを検証するため、それぞれのタンパク質およびシリンジ表面について、溶液中での物理化学的特性を調べた。結果としては、親水性表面であるホウケイ酸ガラスへの吸着には、タンパク質とシリンジ表面との静電相互作用の寄与が大きいと考えられ、一方、疎水性表面であるシクロオレフィンポリマーへの吸着には、タンパク質とシリンジ表面との静電相互作用のほかに、疎水的な相互作用の寄与が出てくると考えられた。実際、タンパク質のバレルへの吸着、および凝集体発生の抑制に対して、疎水性相互作用を低減させるために用いられる界面活性剤の効果がガラスシリンジに対してよりも COP シリンジに対して大きかった。このことから、タンパク質医薬品の容器材質ごとに適したタンパク質製剤の安定化手法を考える必要があることが示唆された。

第3章では、第2章で得られた知見から、シリンジの材質の物性がタンパク質の吸着量にもかかわる可能性が高いと考え、さまざまな物性を持つポリマーの物理化学的特性を調べたうえで、mAb の吸着定量を行った。さらに、タンパク質およびポリマーの持つ物理化学的特性と、mAb のポリマーへの吸着量との相関関係の解析より、mAb の吸着にはどの特性が寄与するのかを推定した。その結果、ポリマー-PFS への mAb の吸着は、PFS バレル表

面の疎水度、およびタンパク質間相互作用のパラメータである第二ビリアル係数 B_{22} で説明できる可能性が示された。PFS バレル素材の特性を含む、これらのパラメータによってタンパク質の吸着量を予測できる可能性が示されたことは、今後、タンパク質製剤の処方のみならず包装設計の上で、タンパク質、処方、容器を統合的に検討する必要があることを示す重要な知見となると考えられる。

第 2 章 タンパク質のホウケイ酸ガラスおよびシクロオレフィンポリマーシリンジへの吸着

第1節 緒言

溶液中でのタンパク質凝集体の形成要因は様々であるが、近年、タンパク質の界面への吸着、フィルム形成、およびそのフィルムの脱離が、タンパク質凝集体につながることを示唆されていることから、気液、および固液界面におけるタンパク質の吸着動態を検証することは、今後の安定なタンパク質医薬品創出のためにも必要不可欠であると考えられる。先行研究において、材質の異なるプレフィルドシリンジ（PFS）を用いて PFS 中から押し出し操作により排出されるタンパク質凝集体量を定量すると、PFS バレルへのタンパク質の吸着量が多いほど、排出されるタンパク質凝集体量も多いことがわかった²⁴。さらに、タンパク質の種類のみならず、タンパク質が接触する PFS バレルの種類が異なれば、同じタンパク質溶液を充填していたとしても排出されるタンパク質凝集体量の濃度が異なったことから、タンパク質溶液の物性だけでなく、タンパク質溶液が接触する容器側の材質が、タンパク質の固液界面安定性およびタンパク質凝集体発生に影響を与える可能性も示唆された。この結果は、PFS 内の吸着量を最小限にできれば、タンパク質凝集体の発生も最小限にできる可能性があることを示している。よって、本研究では、タンパク質の固液界面への吸着のメカニズム解明を目的とした。

本章では、実際に PFS 製剤に使用されている、ホウケイ酸ガラス製および新規の医療用ポリマー素材であるシクロオレフィンポリマー製の PFS バレルを用いて、モノクローナル抗体アダリムマブおよび遺伝子組換え融合タンパクアバタセプトの吸着特性の解析を行った。

モノクローナル抗体アダリムマブ（以下、mAb）は、遺伝子組み換えヒト型抗ヒト TNF- α モノクローナル抗体製剤である（販売名：ヒュミラ）⁷⁷。ヒュミラは抗体医薬品における売り上げトップの抗体医薬品で、2019 年時点での売り上げが 2 兆 2000 億円（196 億ドル）を突破しており、医薬品の売り上げトップ 10 の総売り上げの 21%を占める⁷⁸。販売されて

いる剤型はペンタイプも含めたプレフィルドシリンジである⁷⁹。また、抗体のモデルタンパク質として、研究開発に用いられる場合も多い^{24,75}。そのため本研究においても、得られた知見を一般的な抗体医薬品への適応拡大ができることが望ましいため、アダリムマブを用いることにし、物性解析およびシリンジバレルへの吸着機構を検証した。

遺伝子組み換え融合タンパク質アバタセプト（以下、CTLA4-Ig）は、ヒト細胞障害性 T リンパ球抗原-4 (CTLA-4) の細胞外ドメインとヒト免疫グロブリン G の定常領域から構成され、抗リウマチ薬などとして使用されている⁸⁰。販売剤型は点滴静注用の液体バイアル品、皮下注用プレフィルドシリンジ、およびオートインジェクターがある⁸¹。先行研究において、融合タンパク質のモデルタンパク質として研究に使用されている例が複数あり、本研究にも使用した^{75,82,83}。

近年、高速液中原子間力顕微鏡（High-speed atomic force microscopy, HS-AFM）によるタンパク質分子の挙動の解析が行われている⁸⁴。HS-AFM を用いた分析では、様々なタンパク質の分子間相互作用や構造変化を観察することができる⁸⁵。HS-AFM で抗体を観察する研究は、抗体抗原結合の解析においてよく用いられてきたが^{86,87}、近年では、抗体分子の固液または気液界面への非特異吸着の観察に応用する例もみられる^{24,88}。抗体分子の基本構造は Y 字型であり、2 本の重鎖（約 50 kDa）と 2 本の軽鎖（約 25 kDa）からなる（図 3(a)）⁸⁸。重鎖は定常領域と可変領域から構成され、ヒンジ領域の 2 箇所ジスルフィド結合により 2 本の重鎖が結合している。軽鎖も定常領域と可変領域から構成されており、定常領域が重鎖と結合しており重鎖とのジスルフィド結合がある（抗原結合フラグメント、antigen-binding fragment, Fab）。ヒンジの反対側は結晶フラグメント（Crystalline fragment, Fc）と呼ばれる。抗体分子は、球状のタンパク質と比較して構造の非対称性が高いので、吸着時の分子配向性も議論される。界面上で抗体分子が取りうる配向性は、Flat-on, End-on, Head-on, Side-on 配向がある（図 3(b~e)）。Flat-on では、抗体は表面に対して Y 字型を保ったまま平行に配向し、End-on では Fc 領域を表面側に、Head-on では Fab 領域を表面側に配向する。Side-on は、抗体の Y 字が横たわるような形で配向することを指す。抗体の配向性は、抗体

の吸着時の密度を考える指標ともなり、Flat-on だと抗体 1 分子が界面と接触する面積が最大となる、すなわち界面における吸着分子の密度が最小となる。一方、End-on または Head-on で吸着すると、吸着分子の密度は最大となる。本研究においても、シリンジ素材に吸着していくタンパク質の分子挙動と配向性を観察するため、HS-AFM を使用した。

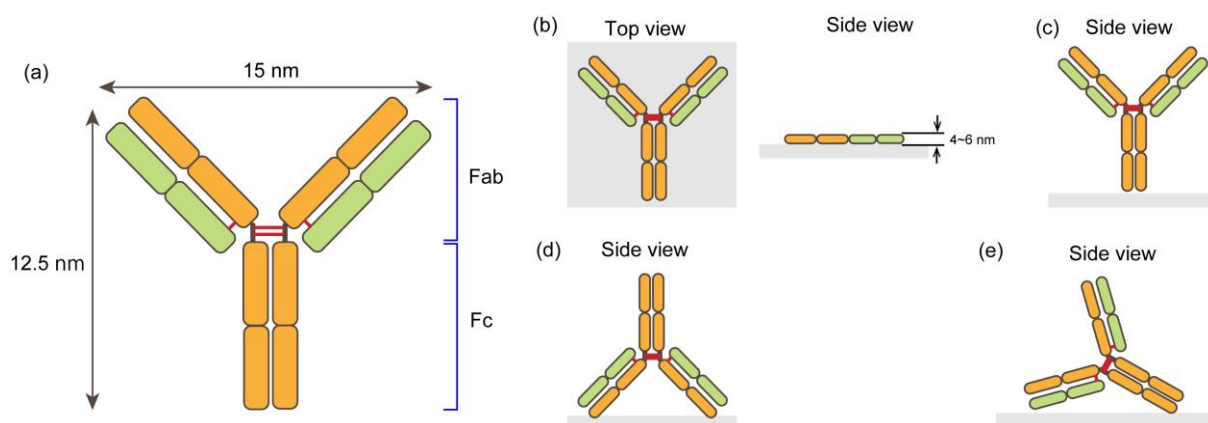


図 3: (a) 抗体構造の模式図。抗体が (b)Flat-on, (c) End-on, (d) Head-on, (e) Side-on 配向で表面吸着した場合の模式図。オレンジ：重鎖、黄緑：軽鎖、茶線：ヒンジ、赤線：ジスルフィド結合。

本章では、吸着量の分析のほか、シリンジバレル中で発生する mAb および CTLA4-Ig のタンパク質凝集体量がシリンジの種類で異なるかということ、また、それぞれのタンパク質の凝集体発生に対する界面活性剤の効果を検証するため、ローテーターを用いて 18 rpm で 5000 回の回転ストレスをかけた場合の、可溶性のタンパク質凝集体、および $>1 \mu\text{m}$ 以上の粒子の定量を行った。18 rpm の回転ストレスでは、シリンジ中のヘッドスペース (3.36 mm の球形の気泡) が 35 mm の液柱の中を滞ることなく往復する (図 4)。この回転ストレスでは、PFS バレルに吸着したタンパク質が、気泡が動いてくることによりはがされるため、タンパク質の吸着および脱離による凝集体発生が分析できると考えた (図 4 (c))³⁹。

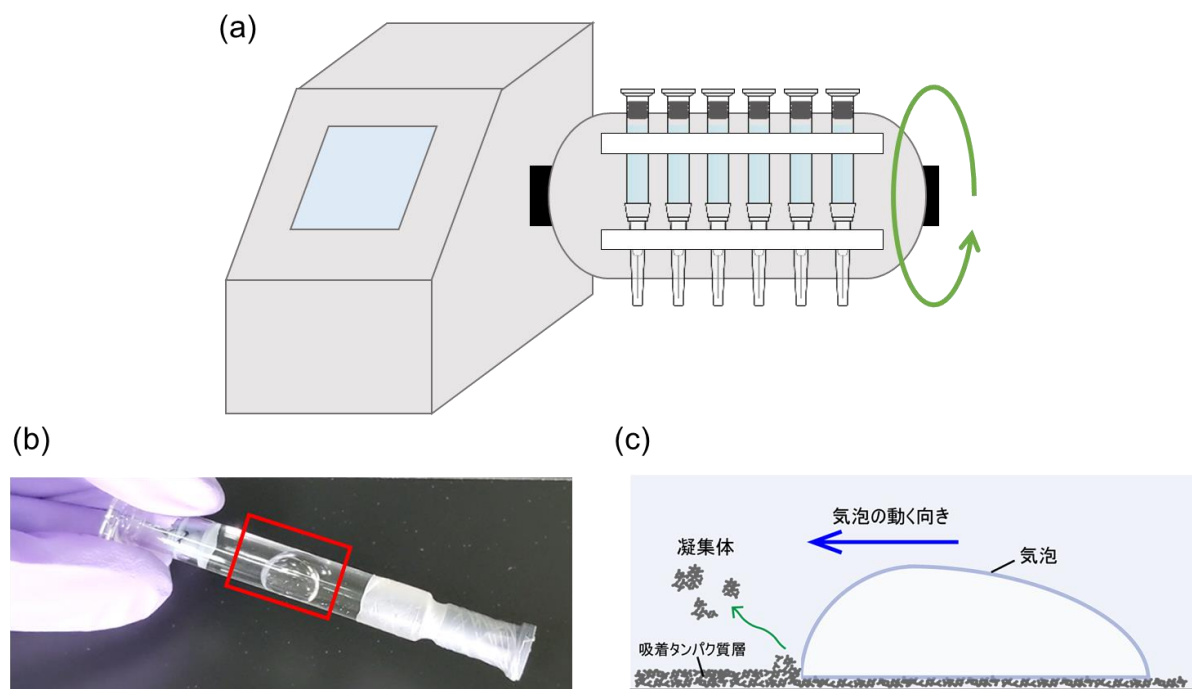


図 4: (a) ローテーターによる 18 rpm 回転ストレスの模式図。(b) シリンジ中を動くヘッドスペース（気泡）の写真。(c) シリンジ中を動くヘッドスペース（気泡、(b)の赤枠部分）の模式図。

第2節 実験材料および手法

材料

本研究には2種類の市販の医療用タンパク質、アダリムマブ（販売名：ヒュミラ皮下注シリンジ 40 mg, エーザイ株式会社、以下、mAb）とアバタセプト（販売名：オレンシア皮下注 125 mg, ブリストル・マイヤーズスクイブ、以下、CTLA4-Ig）を購入した。ポリソルベート 80 (PS80) は日油株式会社、ポロキサマー188 (P188) は Sigma-Aldrich 社より購入した。その他の試薬は特記しない限り、富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

本研究では ISO11040 に準拠したホウケイ酸ガラス (GLS) シリンジとシクロオレフィンポリマーシリンジ (COP) シリンジを用いた。COP シリンジおよびプランジャーヘッド (*i-coating*TM プランジャー) はテルモ株式会社から提供された。

HS-AFM によるタンパク質の吸着動態のリアルタイム観察には、ホウケイ酸ガラスおよびシクロオレフィンポリマー (COP) の基板を使用した。ホウケイ酸ガラスシート (18×18 mm², 厚み: 0.13~0.17 mm, 以下 GLS) は松波硝子工業株式会社から購入した。COP シート (20×20 mm², 厚み: 0.15 mm, 以下 COP) は日本ゼオン株式会社から提供された。高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) 用のカンチレバー (BL-AC10DS-A2) は、オリンパス株式会社から購入した。カンチレバーのばね定数は 0.1 N/m で、共振周波数は 1500 kHz、半径は 24 nm であった。カンチレバーの先端をより鋭利にするため、フェロセンを電子ビームによってカンチレバーの先端に蒸着させる処理を行った。

方法

タンパク質サンプルの準備

mAb と CTLA4-Ig は製品のプレフィルドシリンジより回収し、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) に限外濾過により透析した。その後、サンプルを SP セファロースカラム (Cytiva) に供し、0.4 M 塩化ナトリウムを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8) で溶出した。最後にタンパク質溶液を水または 10 mM リン酸緩衝液に限外濾過で透析した。タンパク質吸着量の

濃度依存性の検討では、溶液 pH は 7 に調製し、タンパク質濃度は 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, および 2.0 mg/mL に調製した。シリンジからのタンパク質の剥離量のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 濃度依存性、吸着量の pH 依存性、吸着量の塩濃度依存性の検証では、タンパク質各タンパク質溶液は 10 mM リン酸緩衝液中に 1 mg/mL となるように調製した。シリンジからのタンパク質の剥離量の検証では、タンパク質溶液は pH 7 に調製した。吸着量の pH 依存性の検証では、タンパク質溶液は pH 1 毎に pH 4~9 に調製した。吸着量の塩濃度依存性の検証では、50 mM または 500 mM の塩化ナトリウムを含んだ pH 5 または 7 の 10 mM リン酸緩衝液に、タンパク質溶液を限外濾過により透析した。

界面活性剤を含有するサンプルは、アダリムマブに対しては PS80 を、アバタセプトに対しては P188 を添加することで作製した。PS80、P188 はそれぞれ、ヒュミラおよびオレンシアの処方添加剤であるため選択した^{79,80}。0.1 %の界面活性剤含有タンパク質試料は、それぞれ、0.2 %界面活性剤を含む 10 mM リン酸緩衝液と 2 mg/mL タンパク質を含む 10 mM リン酸緩衝液とを混合することにより作製した。

各タンパク質試料の PFS への充填操作は無菌条件下で行った。まず、各条件に調製されたタンパク質試料と同じ溶媒条件で、タンパク質を含まない溶媒（コントロール溶液）をポアサイズ 0.22 μm の溶液フィルターに通し、その後同じ溶媒組成のタンパク質溶液をフィルターに通液することで微小な不純物を取り除いた。上記フィルター済みの溶液を用いて、タンパク質溶液は 1 mg/mL に調製した。タンパク質試料は 1 mL ずつ、GLS および COP シリンジに、1 条件につき 3 本ずつに充填した。ヘッドスペース（気泡）は 5 mm となるようにプランジャーを取り付けた。シリンジに充填されたタンパク質試料は 3 日間、2~8°C の温度条件下で保管した。

シリンジ内壁に吸着したタンパク質の定量

試料保管後、充填されていた試料溶液は、プランジャーを抜き取り、シリンジ針の反対側から回収した（図 5）。各シリンジは 1 mL のタンパク質が溶解していない溶媒（pH 4~9

に調製された 10 mM リン酸緩衝液、pH 5 または 7 の 50 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液、pH 5 または 7 の 500 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液、および 0.1 % の PS80 または P188 を含む pH 5 の 10 mM リン酸緩衝液) で 3 回洗浄した。

シリンジに吸着したタンパク質の剥離量が界面活性剤濃度によって変化するかどうかを検証するため、洗浄後の COP シリンジに 1, 5, 7.5, 10 % (w/v) の SDS 水溶液を 1.2 mL ずつ充填し、40 kHz の超音波に 15 分間さらし、壁面に吸着したタンパク質を剥離した。回収した溶液は、SDS 濃度が 3 % (w/v) となるように、1 % SDS で剥離したタンパク質サンプルは 5 % SDS 水溶液と 1:1 で混合することで、5 % SDS で剥離したタンパク質サンプルは 1 % SDS 水溶液と 1:1 で混合することで希釈し、7.5, 10 % SDS で剥離したタンパク質サンプルは、水でそれぞれ 2.5 倍、3.3 倍希釈した。同様に、GLS シリンジからについては、1 %, 7.5 % の SDS 水溶液で剥離されるタンパク質の量を比較した。

タンパク質の剥離量の SDS 濃度依存性タンパク質のシリンジからの剥離量検討後の実験では、7.5 % (w/v) のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を用いて、シリンジに吸着したタンパク質量を測定した。洗浄後のシリンジに 7.5 % SDS 水溶液を 1.2 mL ずつ充填し、40 kHz の超音波に 15 分間さらすことで壁面に吸着したタンパク質を剥離した。回収した溶液は、SDS 濃度が 3 % (w/v) となるように水で 2.5 倍希釈して測定用の試料溶液とした。

剥離したタンパク質試料溶液中のタンパク質量は、逆相クロマトグラフィーを用いて定量した。逆相クロマトグラフィーには Vanquish™ UPLC (Thermo Fisher Scientific 株式会社) に Protein BEH C4 1 mm × 100 mm (担体粒子径 1.7 μm, 日本 Waters 株式会社) を接続したシステムを使用した。移動相 A には 0.1 % (v/v) トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA) 含有の水を、移動相 B には 0.1 % (v/v) TFA 含有のアセトニトリルを用いた。カラム温度は 80°C、検出の波長は UV210 nm に設定した。移動相 B の割合を 15 分間で 30 % から 98 % まで変化させるリニアグラジエントによりタンパク質を溶出した。得られたピーク面積値からタンパク質量を算出し、さらにシリンジの表面積あたりの吸着量を計算した。なお、吸着量計算に用いたピーク面積は、実際に得られたピーク面積に、UPLC に供する際

の希釈率をかけることで算出した。分析は 3 回行い、3 回の平均値を結果とした。対照となる 2 群間の比較における統計解析では、ウェルチの t 検定を行った。

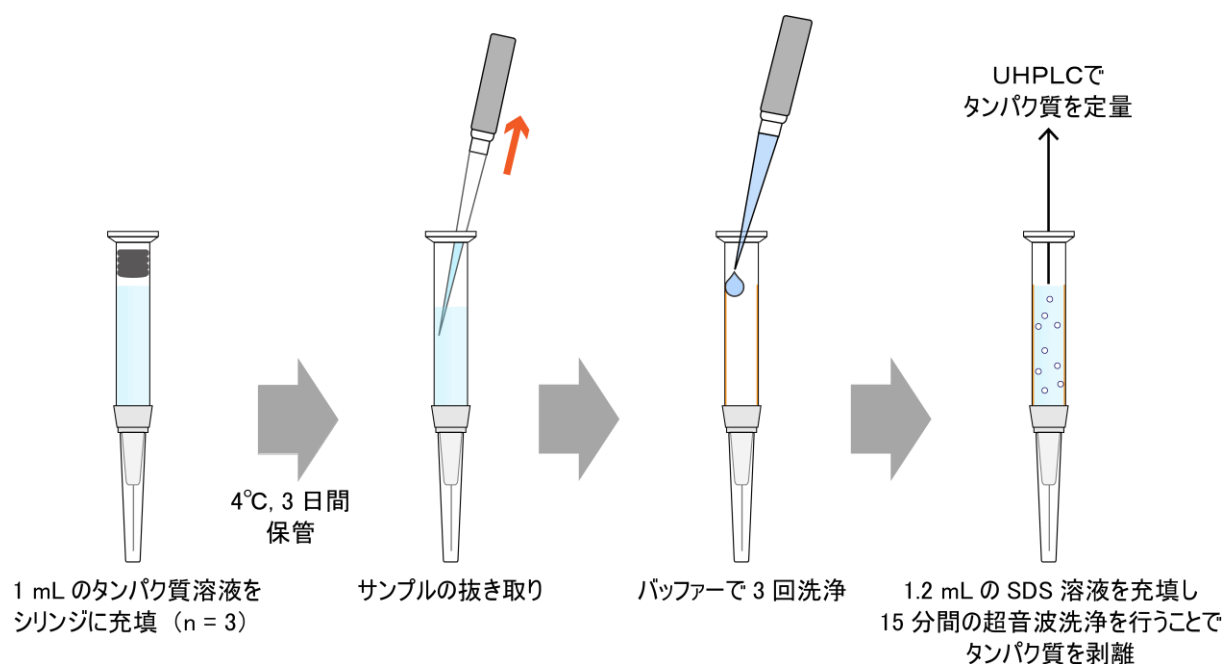
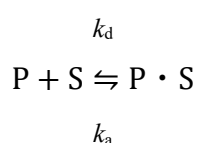


図 5 : PFS バレルへのタンパク質の吸着および剥離の方法。

タンパク質の COP シリンジへの吸着量の、タンパク質バルク濃度依存性に基づく Langmuir モデル解析

タンパク質の表面への吸着分析には、しばしば Langmuir の吸着等温式が使用される^{89,90}。本研究においても、COP シリンジへの吸着量のタンパク質バルク濃度依存性の結果が Langmuir モデルに当てはまるかを解析した。Langmuir モデルが適用できる要件は、以下の 4 つがある⁹⁰ ; 1) 表面は均一な吸着サイトをもつ、2) 各吸着サイトは個々の溶質分子に結合する、3) 吸着が動的な可逆平衡状態にある、4) 吸着挙動を変えるための表面上の溶質間の相互作用がない。以上の条件を満たす場合、同等の吸着サイトを持つ表面への溶質の吸着反応は、平衡条件下での可逆吸着プロセスについて次のように表される。



ここで、P、S、および P・S は、それぞれ溶液中の溶質、溶質吸着に利用可能な表面サイト、および表面サイトに吸着した溶質を表し、 k_a および k_d はそれぞれ吸着および脱着の速度定数を表す。ここで、 Q (mol/m²) がすべての結合部位が満たされたとき、すなわち、表面飽和時に吸着した溶質の量、 q (mol/m²) は、ある溶液濃度 (C) において表面に吸着した溶質の量であるとする、表面への溶質の吸着速度は、溶質の溶液濃度 (C mol/L) と吸着用の空のサイトの数 ($Q - q$) に比例するものとして表すことができる。

$$\frac{dq}{dt} = k_a C(Q - q) - k_d q \quad (\text{式 1})$$

動的平衡条件下では、吸着速度と脱着速度は互いに等しく、吸着システムの古典的なラングミュア吸着モデルが得られる。

$$k_a C(Q - q) = k_d q \quad (\text{式 2})$$

これを q について表すと、以下の式になる。

$$q = \frac{QC}{C + K_{eq}^{-1}} \quad (K_{eq} = \frac{k_d}{k_a}) \quad (\text{式 3-1})$$

解析には SAS Institute Japan 株式会社の JMP Pro 16 ソフトウェアを用い、タンパク質濃度 C に対する吸着量の実測値に当てはまるような Q (mol/m²) および K_{eq} を推定した。また、mAb について、不可逆な吸着層があると仮定した式 3-2 を用いてのフィッティングも行った。

$$q = \frac{QC}{C + K_{eq}^{-1}} + Z \quad (K_{eq} = \frac{k_d}{k_a}) \quad (\text{式 3-2})$$

ここで Z (mol/m²) は、不可逆吸着層の量である。

タンパク質の構造安定性およびコロイド安定性分析

タンパク質構造安定性の指標として、示差走査蛍光光度 (Differential scanning fluorimetry, DSF) を用いて融解温度 (T_m) を決定した。DSF 測定には、Unchained lab 社の UNcle を用いた。1 mg/mL に調製された pH 5, 7 の 10 mM リン酸バッファー中に溶解した mAb および CTLA4-Ig を 8.8 μ L ずつ、ガラスキャピラリーに充填し、温度に対して蛍光強度の重心平均 (barycentric mean, BCM) 波長をプロットした。 T_m 値はタンパク質の天然状態の半分が

変性状態に変化した温度として推定された。測定は各条件につき 3 回行い、3 回の平均値を結果とした。同じタンパク質、異なる pH における T_m 値の比較では、ウェルチの t 検定を行った。

タンパク質のコロイド安定性の指標として、静的光散乱法 (Static light scattering, SLS) を用いて第二ビリアル係数 (B_{22}) を測定した。SLS 測定には、AntonPaar 社の LiteSizer500 を用いた。SLS で測定された散乱強度より、式 4 によって B_{22} が決定される。

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} + 2B_{22}c + \dots \quad (\text{式 4})$$

$K, c, R(\theta)$, および M_w はそれぞれ、光学定数、タンパク質濃度、タンパク質の過剰レイリー率、および重量平均分子量を示す。各条件におけるタンパク質の希釈系列 (10, 8, 6, 4, 2 mg/mL) 60 μ L ずつ準備し、SLS で各 $R(\theta)$ の値を取得した。タンパク質濃度 c に対して、 $Kc/R(\theta)$ をプロットし、直線の傾きから B_{22} を決定した。

タンパク質の表面ゼータ電位測定

溶液中に存在するコロイド粒子の表面ゼータ電位とは、分子滑り面と分子周囲の溶液との間の界面の電位であり、電気泳動によって測定される。電解溶液中の粒子にレーザーを照射すると、ドップラー効果により粒子からの散乱光の周波数がシフトする。屈折率 n の溶媒に分散した試料に波長 λ のレーザービームを照射し、散乱角 θ で検出した場合、移動速度 V とドップラーシフト量 Δf の関係は式 5 で表される。

$$\Delta f = \frac{2V \sin \frac{\theta}{2}}{\lambda} \quad (\text{式 5})$$

電気移動度 U は、式 6 によって得られる電気泳動速度 V および電場 E から計算される。

$$U = \frac{V}{E} \quad (\text{式 6})$$

ゼータ電位 ξ は式 6 により得られる U とスモルコフスキー方程式 (式 7) から計算される。

$$\xi = \frac{4\pi\eta U}{\varepsilon} \quad (\text{式 7})$$

タンパク質溶液の表面ゼータ電位の測定には、AntonPaar 社の LiteSizer500 を用いた。10

mM リン酸バッファーで、pH 1 ごとに pH 3 から pH 10 に調製された 1 mg/mL の mAb および CTLA4-Ig の表面電位を測定した。測定は 3 回行い、3 回の平均値を結果とした。

アミノ酸配列を用いたタンパク質の等電点の計算は、Sednterp ソフトウェアを用いて確認した。タンパク質のアミノ酸配列を入力し、システイン残基はジスルフィド結合を形成していると仮定して等電点を算出した。

タンパク質分子のモデリングおよびタンパク質の表面アクセシビリティ計算

mAb および CTLA4-Ig の完全長の構造モデルは、Schrödinger 社の Maestro11.5 ソフトウェアを使用して構築された。mAb の完全長の構造は、完全長のヒト IgG B12 (PDB id: 1HZH) を鋳型として、アミノ酸配列を当てはめることでホモロジーモデリングを行った。Protein-protein BLAST (blastp) 検索の結果、アダリムマブの配列と 1HZH との配列相同性は 84 % であった。CTLA4-Ig の構造は、ヒト CTLA-4 アポホモダイマー (PDB id: 3OSK) とヒト IgG1-Fc (PDB id : 5JII) の結晶構造を鋳型として作成した。Protein-protein BLAST (blastp) 検索の結果、アバタセプトの CTLA-4 部分の配列と 3OSK との配列相同性は 98 %、アバタセプトの Fc 部分と 5JII との配列相同性は 98 % であった。静電ポテンシャル表面は、溶質の誘電率を 1、溶媒の誘電率を 80、溶媒の pH は 5, 7 を設定し、Poisson-Boltzmann 方程式を使用して決定された。 $\pm 4 \text{ kT/e}$ の等電位面をタンパク質モデルの表面にマッピングした。さらに、Maestro11.5 ソフトウェアで作成された上記構造を用いて、タンパク質の溶媒接触表面積の計算を BIOVIA 社の Discovery Studio ソフトウェアを用いて行った。Discovery Studio ソフトウェアでは、静電ポテンシャル表面を、溶質の誘電率を 1、溶媒の誘電率を 80、イオン強度を 0.01 M と 0.5 M に設定して、pH 5, 7 における $\pm 1 \text{ kT/e}$ の等電位面をタンパク質モデルの表面にマッピングした。

シリンジ素材の表面ゼータ電位測定

シリンジの表面ゼータ電位は、流動電位と流動電流の測定値から決定される。流動電位

と流動電流は、固体サンプルを含む測定セルを通して電解質溶液をポンプで送ることによって発生する。表面ゼータ電位 ζ は、ヘルムホルツ-スモルコフスキー方程式（式 8）を使用して計算される。

$$\zeta = \frac{dU}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \kappa \quad (\text{式 8})$$

ここで、 U , p , η , ε , ε_0 , および κ はそれぞれ、流動電圧、サンプル全体の圧力差、粘度、電解質溶液の誘電率、真空誘電率、および電解質伝導率を表す。シリンジの表面ゼータ電位測定には AntonPaar 社のシリンダーセルを装填した SurPASS™3 を用いた。NaOH および HCl をもちいて、それぞれ pH 12 と pH 2 に調製した 10 mM リン酸バッファーを用意し、これらを目的の pH に滴定後、シリンジバレル内を 2 回リンスした。測定は 1 条件につき 5 回行い、中央値 3 点の平均値をデータ点とした。pH 10 から pH 3 まで pH を滴定していき、pH 1 ごとにゼータ電位測定を行った。GLS と COP とのゼータ電位の値における統計解析では、ウェルチの t 検定を行った。

シリンジ表面の接触角測定

シリンジ内表面の水滴の接触角を測定するため、GLS または COP シリンジを細かく砕き、測定に用いた。シリンジの小片は超アルカリイオン水（e-WASH, E PLAN Co. Ltd.）で一晩浸潤することで洗浄した。洗浄後のシリンジ小片は自然乾燥した。表面接触角測定には協和界面科学株式会社の Drop Master DM-501 を用い、2 μ L の超純水の接触角を測定した。接触角は、測定後に曲率補正を実行することで決定され、3 回の測定値より平均値を算出した。GLS と COP との接触角の値における統計解析では、ウェルチの t 検定を行った。

高速液中原子間力顕微鏡（High speed-atomic force microscopy, HS-AFM）による、タンパク質の吸着動態の観察

COP および GLS へのタンパク質の吸着動態の HS-AFM 観察には Nanoexplorer（株式会社生体分子計測研究所）を使用した。HS-AFM 観察にはタッピングモードを使用した。HS-

AFM 観察のため、COP および GLS のシートを $1.5 \times 1.5 \text{ mm}^2$ の大きさに砕き、ガラスの円柱サンプル台 ($\phi : 1.5 \text{ mm}$) に取り付けた。タンパク質は 10 mM リン酸バッファー (pH 5 および 7) に 0.01 mg/mL に調製した。HS-AFM の観察セルはシリンジポンプに接続されており、リン酸バッファーまたはタンパク質溶液は一定流速でサンプルセルにロードした。HS-AFM 観察では最初に、 $120 \text{ }\mu\text{L}$ の観察用セルに、ローディング速度 $60 \text{ }\mu\text{L/min}$ で 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液を流し、COP または GLS 表面を観察した。次に、 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液中に溶解した 0.01 mg/mL のタンパク質溶液を観察用セルにロードした。mAb の観察では、mAb 分子がすべての基板表面を覆った後、バッファーを 3 時間再度ロードした。表面を緩衝液で 3 時間洗浄した後、カンチレバーを COP または GLS の表面の分子に近づけ、層を形成する mAb 分子を除去して表面を露出させた後、形成された溝の深さを測定することで mAb 層の高さを決定した。mAb 分子の配向は、Igor ソフトウェア (株式会社ヒューリンクス) を使用して決定した。mAb 分子で覆われた表面の面積は、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して測定した。測定は各条件 3 回ずつ行い、結果にはそのうちの 1 回分を示した。

GLS および COP シリンジ中で発生したサブミクロンおよびミクロン凝集体の定量

1 mg/mL に調製された mAb (pH 7, PS80+/-) および CTLA4-Ig (pH 5, P188+/-) を GLS および COP シリンジ 3 本ずつに充填し、ヘッドスペース (気泡) が 5 mm になるようにプランジャーヘッドを取り付けた。ローテーターは、Biosan 株式会社の Multi Bio RS-24 を使用した。室温下で、 18 rpm の回転速度で $5,000$ 回転させた (回転時間は約 $4 \text{ h } 38 \text{ min}$)。回転後、GLS シリンジには太さ 27 ゲージ、長さ 1 インチの注射針を取り付けその先端から、COP シリンジは据え付け注射針の先から、プランジャーを押すことでタンパク質溶液を排出し、試料を回収した。回収した試料の可溶性凝集体の定量はサイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography, SEC) で、タンパク質凝集体を含む、ミクロンサイズの凝集体の定量をフローイメージング法 (Flow Imaging, FI) で行った。

SEC では、サンプル溶液は 5°C, 15,000 rpm で 30 分間遠心分離し、上清 20 μ L を Waters 株式会社の ACQUITY ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) システムに供した。カラムは東ソー株式会社の TSK gel UP-SW3000 column を使用した。200 mM KCl を含む 133 mM リン酸緩衝生理食塩水を移動相として、0.5 mL/min の流速でアイソクティック溶出を行った。検出は紫外検出器を用い、検出波長は 280 nm とした。各サンプルにつき注入は 3 回行い、モノマーおよびオリゴマーの面積%を算出し、平均値を使用した。

ミクロンサイズの粒子は、横河ソリューションサービス株式会社の、モノクロ電荷結合デバイス (CCD) またはカラー CCD を備えた FlowCam8100™ を使用して測定した。0.15 mL のサンプル溶液を、0.05 mL/min の流速で流した際にカメラで検出される粒子の量を分析した。データ分析には Visual-Spreadsheet ソフトウェア (Fluid Imaging Technologies) を使用し、サイズが 2 μ m より大きく、真円度が 0.95 未満のタンパク質凝集体の量を測定値とした。

SEC とフローカムの結果について、同じ溶液条件における GLS と COP 中での凝集体量の統計解析では、ウェルチの t 検定を行った。

第3節 結果

タンパク質の溶液中での安定性

mAb および CTLA4-Ig の、pH5 および 7 の 10 mM リン酸バッファー中での構造安定性およびコロイド安定性を測定した。 T_m 値は溶液中のタンパク質の構造安定性の指標であり、第二ビリアル係数 B_{22} はコロイド安定性の指標である。各条件における mAb および CTLA4-Ig の BCM プロットおよびデバイプロットは図 6 に示した。表 2 に、図 6 の各プロットより算出された pH 5 および 7 の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液中の mAb および CTLA4-Ig の T_{m1} 、 T_{m2} 、および B_{22} の値を示した。mAb については、図 7 に、0 mM NaCl 条件に加え、50 mM または 500 mM の NaCl が添加された場合のデバイプロット、表 3 には図 7 の各プロットより算出された、0, 50, および 500 mM NaCl を含む 10 mM リン酸バッファー中 (pH 5, 7) における mAb の B_{22} の値を示した。

mAb、CTLA4-Ig のどちらも、 T_m の値が pH 5 より 7 で有意に高かったことから、タンパク質の構造安定性は pH 5 よりも pH 7 の方が高いと言える。一方、コロイド安定性については、mAb は pH 5 において正の値、pH 7 において負の値を示し、CTLA4-Ig は逆に pH 5 において正の値、pH 7 において正の値を示した。このことから、mAb は pH 5 において、CTLA4-Ig は pH 7 においてより高いコロイド安定性をもつことが示唆された。mAb は pH 5 では塩濃度上昇につれ B_{22} の値が減少し、正から負へ変化した。pH 7 ではどの NaCl 濃度においても B_{22} の値は負を示した。

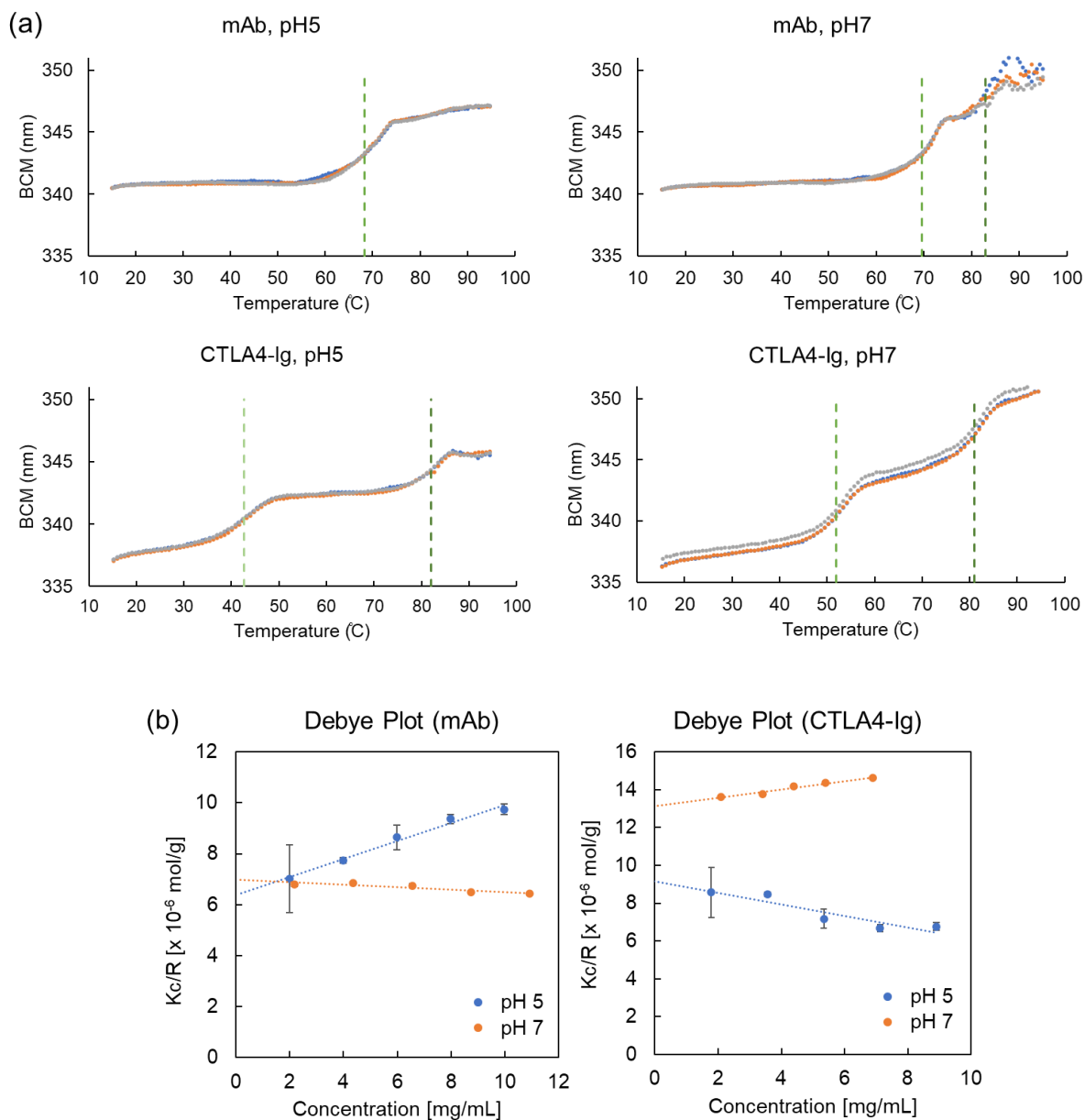


図 6: (a) mAb と CTLA4-Ig の pH 5, 7 における DSF 測定 の BCM プロット。青、オレンジ、灰はそれぞれ 1, 2, 3 回の測定回 の プロット で、黄緑破線は T_{m1} 、濃緑破線は T_{m2} を表す。(b) mAb と CTLA4-Ig の pH 5, 7 における SLS 測定 の デバイプロット。

表 2: mAb と CTLA4-Ig の T_{m1} , T_{m2} , and B_{22} の値

Protein	pH	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	B_{22} (mol*ml/g ²)
mAb	5	68.26±0.23	-	3.54×10 ⁻⁴
	7	69.57±0.48	82.85±0.16	-4.96×10 ⁻⁵
CTLA4-Ig	5	42.58±0.23	81.99±0.29	-3.05×10 ⁻⁴
	7	51.97±0.17	81.07±0.09	2.18×10 ⁻⁴

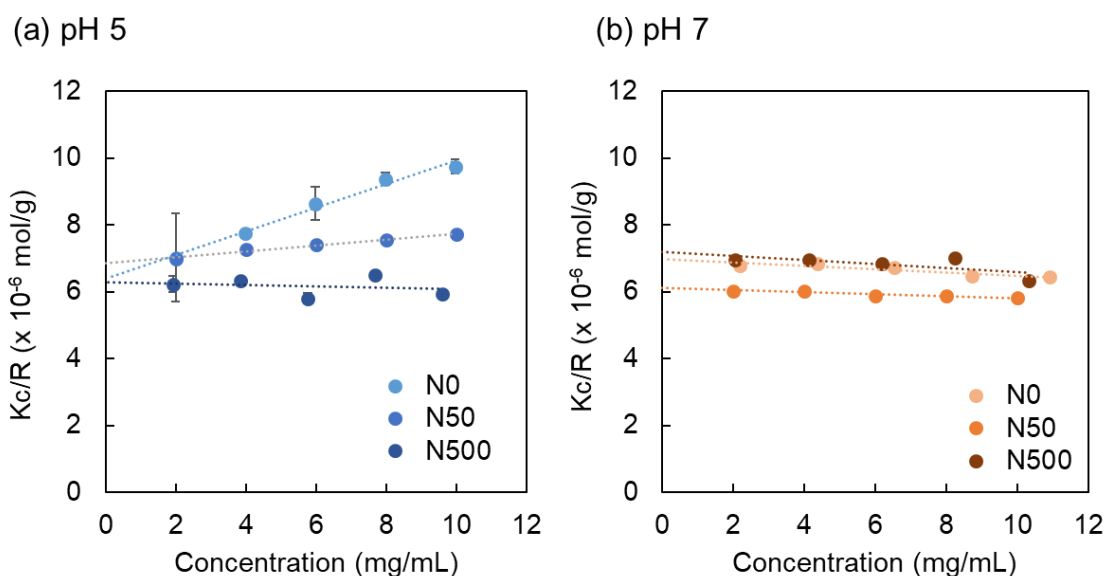


図 7: 0, 50, 500 mM NaCl を含む、(a) pH 5 および (b) pH 7 の 10 mM リン酸バッファー中での mAb のデバイプロット。N0: 0 mM NaCl, N50: 50 mM NaCl, N500: 500 mM NaCl。

表 3: 0, 50, および 500 mM NaCl を含む 10 mM リン酸バッファー中 (pH 5, 7) における mAb の B_{22} の値。

B_{22} (mol*ml/g ²)	pH 5	pH 7
N0	3.54×10 ⁻⁴	-4.96×10 ⁻⁵
N50	8.62×10 ⁻⁵	-2.99×10 ⁻⁵
N500	-2.16×10 ⁻⁵	-5.93×10 ⁻⁵

タンパク質およびシリンジ表面の溶媒中における電気的特性

タンパク質およびシリンジ表面の 10 mM リン酸バッファーにおける表面ゼータ電位の pH 依存性をプロットした (図 8)。GLS および COP シリンジの表面ゼータ電位は、pH3~10 にかけてすべての pH で負の値を示し、酸性から塩基性になるにしたがって負の値は大きくなった。一方、タンパク質の表面ゼータ電位は酸性から塩基性になるにつれて正から負の値に減少し、mAb、CTLA4-Ig の等電点がそれぞれ、pH 7.4、pH 5.1 と観測された。

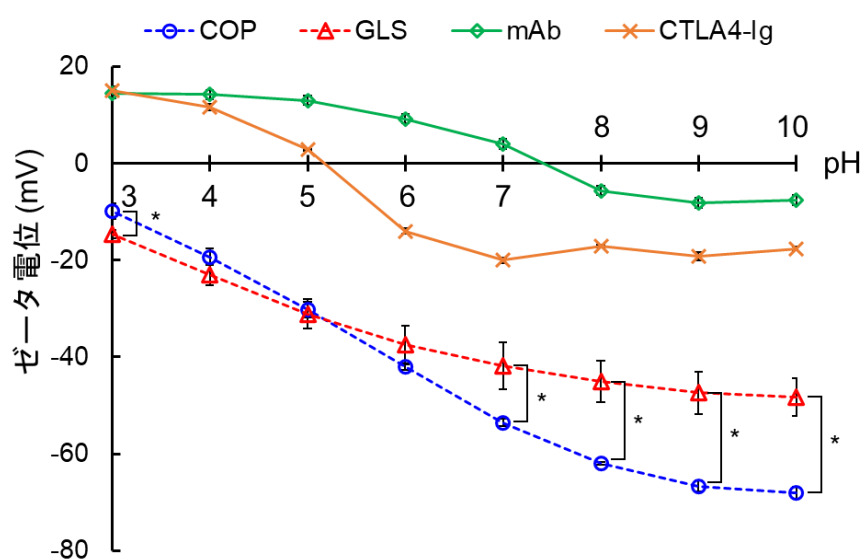


図 8: タンパク質およびシリンジ表面の 10 mM リン酸バッファー中における表面ゼータ電位の pH 依存性。*: $p < 0.05$ 。

タンパク質およびシリンジ表面の疎水度

水の GLS 表面における接触角の分布を図 9 に示した。シリンジ中央部とシリンジ先端部とでは、接触角に有意差がなかったため、GLS と COP の接触角の比較ではシリンジ中央部で測定した接触角を用いた。シリンジ表面の疎水度の評価は、水滴の接触角により評価した。GLS 表面の接触角は非常に小さく、 $8.5 \pm 0.8^\circ$ であり、親水性表面と分類した。一方、COP の接触角は $94.8 \pm 1.3^\circ$ であり、疎水性表面と分類した。

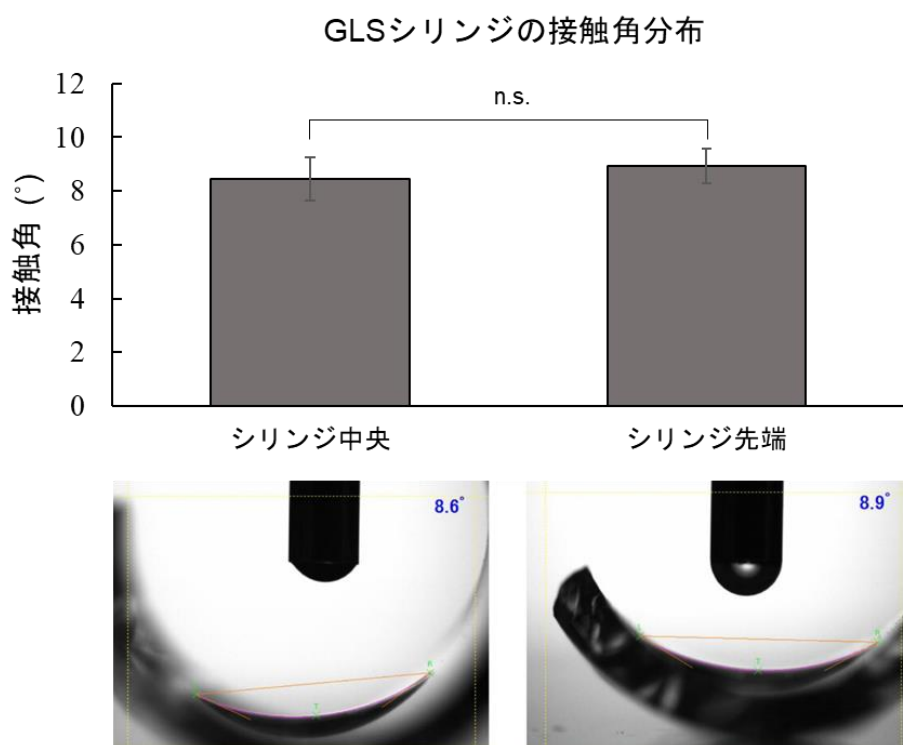


図 9: ガラスシリンジの中央部および先端部における水の接触角。

mAb および CTLA4-Ig それぞれの pH 5 および pH 7 における電位マップおよび疎水表面は図 10 に示した。さらに、タンパク質の予測立体構造から計算された、タンパク質分子表面への溶媒接触可能面積 (Total solvent accessible area, TSA) および、正電荷をもつ残基、負電荷をもつ残基、疎水性残基、それぞれの溶媒接触可能領域 (Residue solvent accessible area, RSA) を表 4 に示した。pH 5 において、mAb は正電位面が張り出しているが、pH 7 ではその電位面が縮小した (図 10 (a))。これは、ゼータ電位測定によって観測された mAb の等電点が pH 7.4 であったことと一致する結果である。CTLA4-Ig は pH 5 において CTLA4 の領域に負の電位が分布しているが、その負の電位面は pH 7 でより大きくなった (図 10 (a))。この結果も、ゼータ電位測定の結果と一致した。タンパク質分子の疎水表面の面積は、どちらのタンパク質でも pH 5 と 7 で、タンパク質の疎水性には pH 依存性はなかった (図 10 (b))。イオン強度が 0.01 M の場合と 0.5 M の場合とを比較すると、pH 5 でも 7 でも、mAb 表面に張り出している正電位面は 0.5 M において 0.01 M よりも縮小した (図 10 (c, d))。

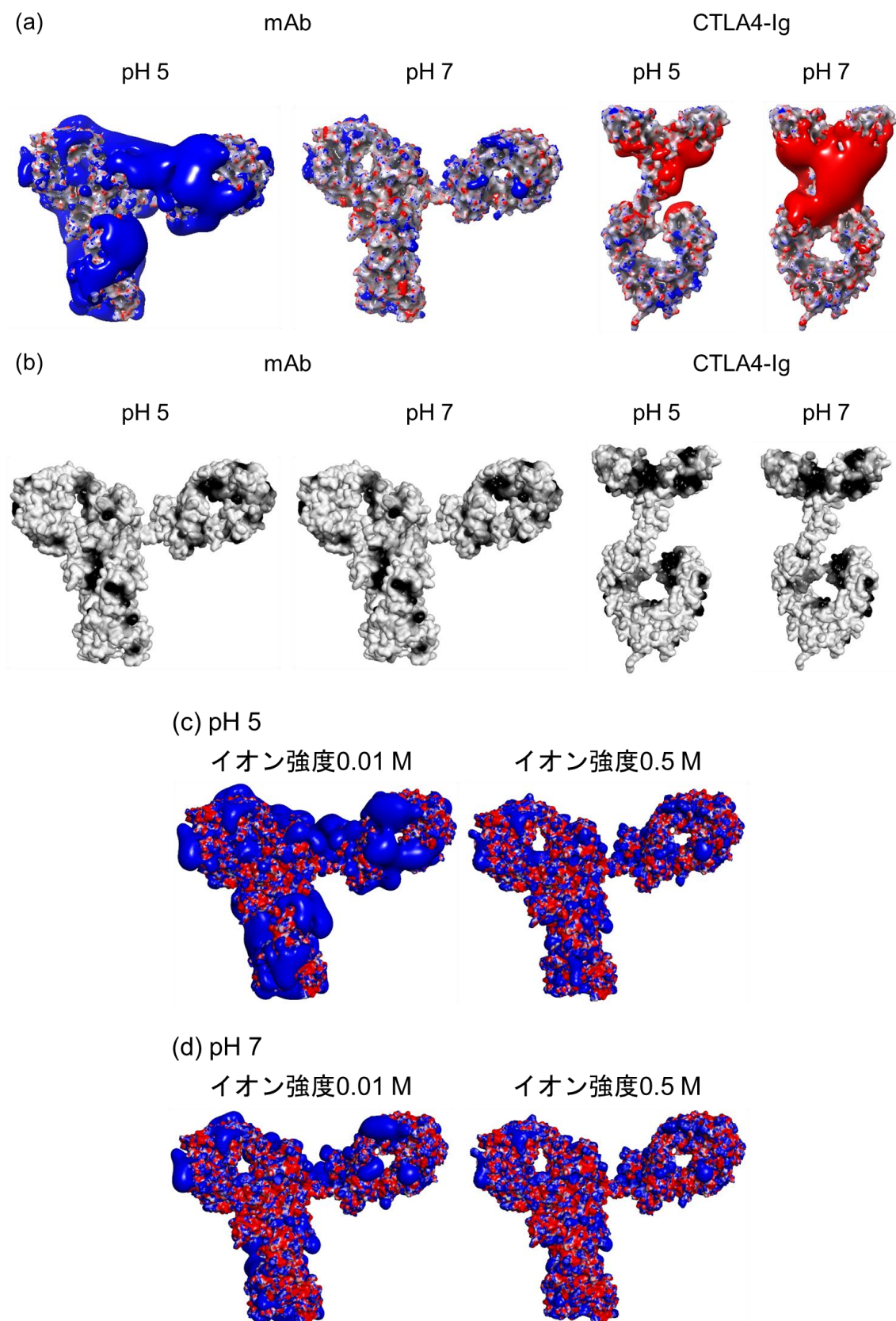


図 10: mAb (PDB: 1HZH) と CTLA4-Ig (PDB: 3OSK, 5JII) の pH 5 と 7 における、溶媒の誘電率 80 の条件での $\pm 4 kT/e$ 等電位面 (a) および疎水/親水表面 (b) マップ。mAb の pH 5

(c)と pH 7 (d)における、溶媒のイオン強度が 0.01 M と 0.5 M の条件での $\pm 1 kT/e$ の等電位面の比較。

(a) 青: 正電位面、赤: 負電位面、灰: 疎水表面。(b) 白: 親水性部分、黒: 疎水性部分。

表 4: タンパク質分子表面の溶媒接触可能面積 ($\text{\AA}^2$)

	mAb		CTLA4-Ig	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
TSA ^{*1}	66,712	66,715	37,950	37,865
Positively charged RSA ^{*2}	47,062	14,159	25,200	7,417
Negatively charged RSA ^{*2}	9,108	42,014	5,949	23,580
Hydrophobic RSA ^{*2}	10,542	10,542	6,801	6,868

^{*1} TSA, Total solvent accessible area; ^{*2} RSA, Residue solvent accessible area

シリンジからのタンパク質剥離量の SDS 濃度依存性

最初に、吸着したタンパク質を剥離する際の界面活性剤の濃度依存性を検証した。1.0 mg/mL のタンパク質を充填、保管し、シリンジを洗浄した後に残存しているタンパク質を 1, 5, 7.5 および 10 % のドデシル硫酸ナトリウムによって剥離されたサンプルを、逆相クロマトグラフィーに供した際のピーク面積を比較した (図 11)。COP シリンジから剥離される mAb 量は、1 % より 5 % の SDS を用いた場合の方が多く、mAb ではそれ以上の SDS 濃度で剥離されるタンパク質量に差がなかった。さらに、GLS シリンジから剥離される mAb 量は、1 % より 7.5 % の SDS を用いた場合の方が多かった。一方、COP シリンジから剥離される CTLA4-Ig 量は、1 % SDS より 5 % SDS を用いた場合の方が多かった。7.5 % SDS で剥離される CTLA4-Ig 量は、5 % SDS で剥離された量よりも少なかったが、10 % SDS で剥離された量とは差がなかった。GLS シリンジから剥離される CTLA4-Ig 量は、1 % SDS と 7.5 % SDS とでは差がなかった。

以上より、COP シリンジからタンパク質を剥離するのには 5 % 以上の SDS 濃度が必要で

あり、また、GLS シリンジから剥離される mAb 量についても 7.5 %SDS を用いた方が 1 %SDS を用いた場合よりも多かったことから、以降の実験においてタンパク質剥離のための SDS 濃度は 7.5 %と設定した。

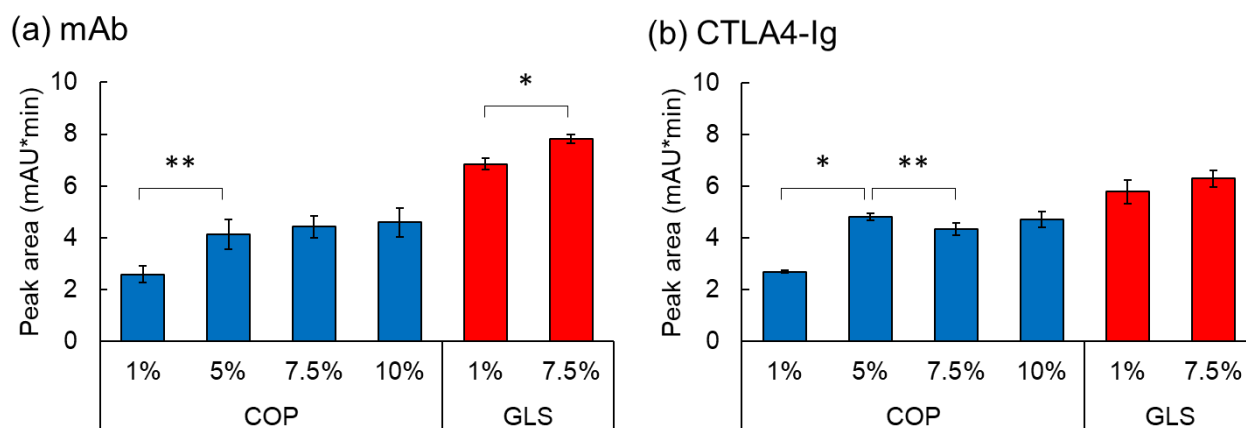


図 11: シリンジから剥離された(a) mAb および(b) CTLA4-Ig の UV210 nm のピーク面積比較。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

COP シリンジへのタンパク質吸着量の濃度依存性と Langmuir 解析

COP シリンジへの mAb および CTLA4-Ig の吸着量の濃度依存性を測定した (図 12 (a, b))。吸着量の濃度依存性の統計検定は、吸着量が増加したか否かを分析するため、片側検定を行った。mAb, CTLA4-Ig のどちらについても、バルクタンパク質濃度が 0.25 から 1.0 mg/mL に上昇するにつれタンパク質吸着量は増加、または増加傾向を示した。1.0 mg/mL と 1.5 mg/mL とでは吸着量に差がなく、吸着量は飽和点に達したと言える。よって、以降の実験では、mAb, CTLA4-Ig のバルク濃度は 1.0 mg/mL として吸着量の分析を行った。

mAb の吸着データについて、式 3-1 の Langmuir 解析を適用したフィッティング結果を図 12 (c)に示した。その結果、 $Q_{\max}$ および K_{eq} がそれぞれ 2.6×10^{-8} , 5.0×10^5 となり、実測値のプロットとモデルとの RMSE が 1.5×10^{-9} となった。mAb については不可逆の吸着層があると仮定した式 3-2 にて、不可逆層の吸着量 Z が $1.1 \times 10^{-8} \text{ mol/m}^2$ の場合のフィッティングを行った。その結果、 $Q_{\max}$ および K_{eq} がそれぞれ 1.5×10^{-8} , 2.7×10^5 となり、実測値のプロットとモデルとの RMSE が 9.7×10^{-10} となった (図 12 (d))。

CTLA4-Ig の吸着データについて、式 3-1 の Langmuir 解析を適用したフィッティング結果を図 12 (e)に示した。 $Q_{\max}$ および K_{eq} がそれぞれ 2.4×10^{-8} , 4.3×10^5 となり、実測値のプロットとモデルとの RMSE は 8.5×10^{-10} となった。

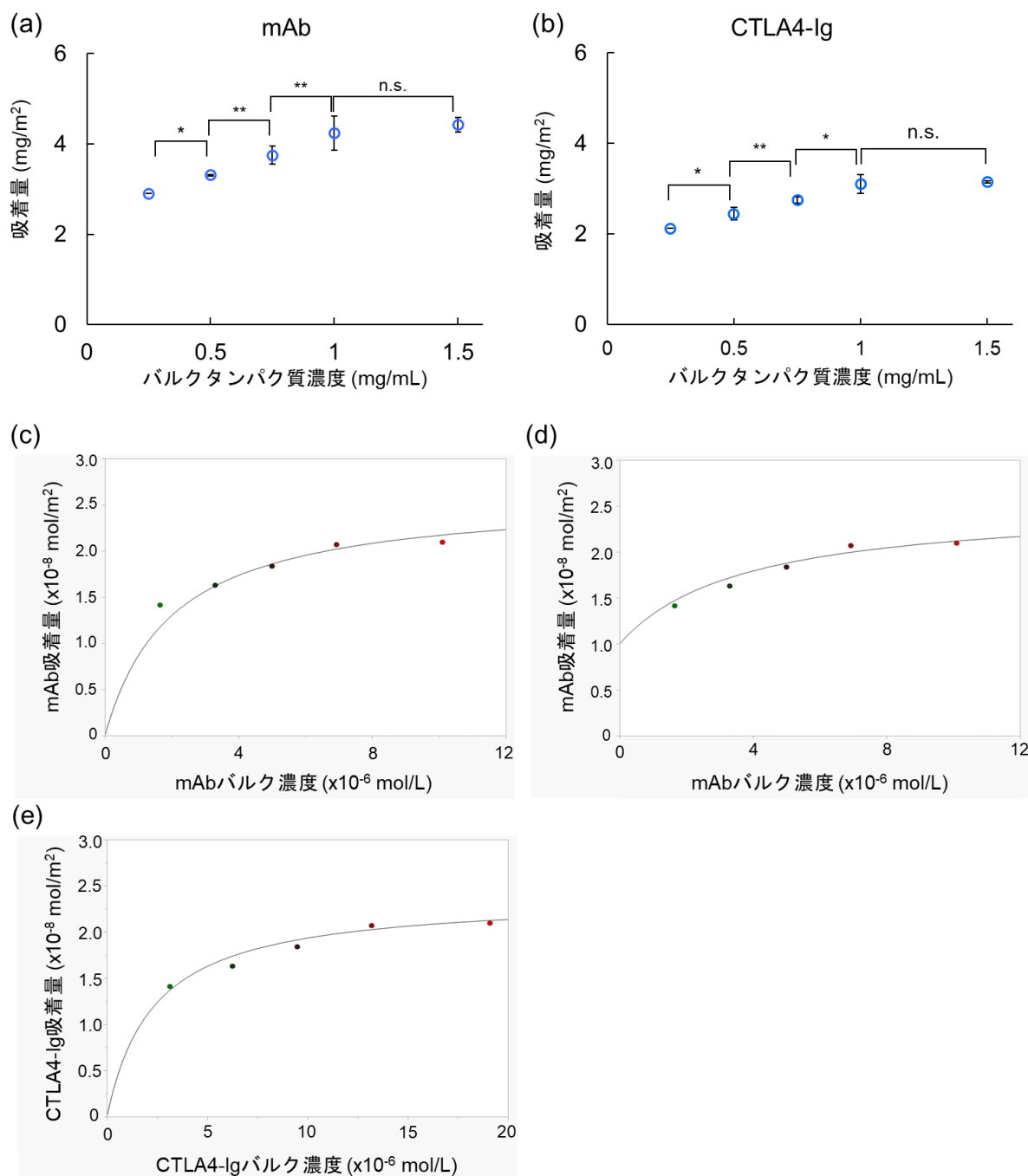


図 12: (a) mAb と (b) CTLA4-Ig の吸着量における、タンパク質濃度依存性。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。mAb の吸着データに式 3-1 を適用した場合(c)と式 3-2 を適用した場合(d), および CTLA4-Ig の吸着データに式 3-1 を適用した場合(e) のフィッティング結果。

タンパク質吸着量の pH および塩濃度依存性

タンパク質の固液界面吸着への影響を考察するため、ハウケイ酸ガラスシリンジ (GLS) およびシクロオレフィンポリマーシリンジ (COP) におけるモノクローナル抗体アダリムマブ (mAb) および遺伝子組換え融合タンパク質アバタセプト (CTLA4-Ig) の pH 依存性と塩濃度依存性を調べた。mAb と CTLA4-Ig それぞれの吸着量の pH 依存性は図 13 (a), (b) に、pH 5 と 7 における mAb と CTLA4-Ig それぞれの吸着量の塩濃度依存性は図 13 (c), (d) に示した。

まずタンパク質吸着量の pH 依存性について、mAb の吸着量は GLS, COP どちらにおいても pH 7 で最大で、酸性または塩基性条件では吸着量は減少した (図 13 (a))。一方、CTLA4-Ig の吸着量は GLS, COP どちらにおいても pH 4 から 5 にかけて増加し pH 5 で最大となったが、それ以上の pH 条件下では吸着量が減少した (図 13 (b))。GLS と COP との吸着量を比較すると、mAb では pH 7 以下の条件で、CTLA4-Ig では pH 5 以下の条件で、COP よりも GLS への方がタンパク質の吸着量が多かったが、mAb では pH 8 より塩基性の条件で、CTLA4-Ig では pH 6 以上の条件で、GLS よりも COP への方がタンパク質の吸着量が多くなった。

次にタンパク質吸着量の塩濃度依存性について、mAb の吸着量は、pH 5 において、塩濃度の上昇につれ COP では増加したが、GLS では N0 と N50 とでは吸着量に差がなく、N500 でのみ増加した (図 13 (c))。一方、pH 7 においては、COP では N0 から N50 に上がると吸着量は増加したが、N50 から N500 へ塩濃度を上げて吸着量に変化はなかった。一方 pH 7 において、GLS では N0 から N50 に塩濃度を上げて吸着量は変化しなかったが、N50 から N500 へ塩濃度を上げると吸着量は減少した。CTLA4-Ig の吸着量は、pH 5 においては COP, GLS どちらのシリンジでも、溶媒の塩濃度の上昇につれ吸着量が減少したが、pH 7 では、COP への吸着量は N0 と N500 で比較した場合のみ増加していたが、GLS への吸着量の塩濃度上昇によっては変化がなかった (図 13 (d))。

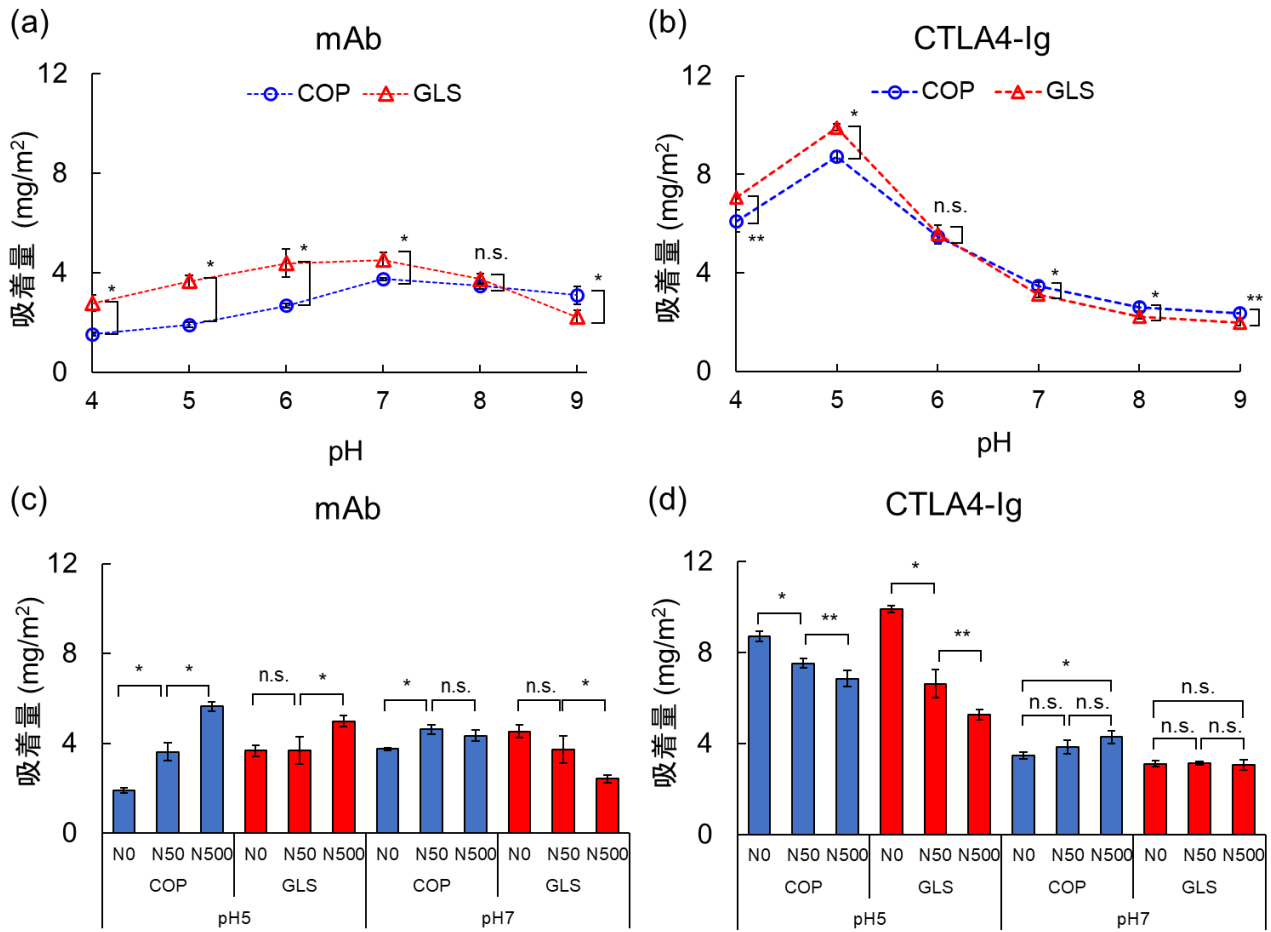


図 13: (a) mAb の GLS/COP への吸着量の pH 依存性。 (b) CTLA4-Ig の GLS/COP への吸着量の pH 依存性。 (c) mAb の GLS/COP への吸着量の塩濃度依存性。 (d) CTLA4-Ig の GLS/COP への吸着量の塩濃度依存性。 (c, d) N0, N50, N500 はそれぞれ、溶液中の NaCl 濃度が 0, 50, および 500 mM であることを示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.1$ 。

高速液中原子間力顕微鏡 (High speed-atomic force microscopy, HS-AFM) による、タンパク質の吸着動態の観察

pH 5 および 7 の 10 mM リン酸バッファー中での、mAb および CTLA4-Ig の表面への吸着のリアルタイム観察を HS-AFM を用いて行った。HS-AFM 観察では、吸着した分子の配向性、吸着層形成、および吸着動態を分析した。mAb および CTLA4-Ig の GLS および COP への吸着における pH 依存性の結果より、表面間で吸着量の差が顕著であった mAb については GLS および COP 表面への吸着を pH 5 および 7 で、表面間で吸着量（吸着層数）の差があまり見られなかった CTLA4-Ig については GLS 表面への吸着を観察した。

mAb の pH 5 および 7 の溶液中における COP および GLS 表面への吸着動態を図 14 に示した。pH 5 では、mAb が COP 表面全体を覆いつくすまでに 11 分 47 秒かかった（図 14 (a)）。吸着した mAb 分子の大半は Flat-on 配向であった。pH 7 では、mAb が COP 表面全体を覆いつくすまでに 18 分 12 秒かかった（図 14 (b)）。表面に吸着した mAb 分子のほとんどは Flat-on 配向であった。また、pH 5 では、観察範囲全体にまばらに吸着していく様子が観察されたが、pH 7 では、後から観察範囲内に流れてきた別の mAb 分子は、すでに表面に吸着されている分子に近づいていく挙動をした。吸着層の厚みは、pH 5、pH 7 のどちらにおいても 3~5 nm であった（図 15 (a, b)）。

GLS 表面上への吸着動態は、図 14 (c, d) に示した。pH 5 では、観察範囲全体に mAb がまばらに吸着していく様子が観察されたが、pH 7 では、表面への吸着と、表面へすでに吸着した mAb への別の mAb の結合が明らかに同時に発生することが観察された。GLS 表面でも、最終的には、pH 5, 7 どちらの条件においても、mAb 分子の均一な層の形成が確認され、観察範囲全体が mAb 層で覆われる時間はそれぞれ、12 分 39 秒、29 分 19 秒であった。吸着層の厚みは、pH 5、pH 7 のどちらにおいても 3~5 nm であった（図 15 (c, d)）。

COP および GLS 表面に吸着した mAb 分子は、pH 5, 7 のどちらにおいても、2~2.5 nm の高さをもつ Fab ドメインと 3 nm の高さを持つ Fc ドメインから成る、典型的な Y 字型構造を維持しており、これは吸着時に大きな構造変形は発生しなかったことを意味する（図 16）。

タンパク質サンプルを送液中での吸着動態の観察を行った後、タンパク質を含まないバッファーを送液することで、吸着したタンパク質層の剥離が起こるか、または吸着層の厚みが増えるかを観察した (図 17)。しかしながら、3 時間のバッファー送液中に COP および GLS 表面上に形成したタンパク質層が剥離していく様子は観察されなかった。カンチレバーを観察基板までごく至近距離まで近づけることで、バッファー送液後に残っているタンパク質層を物理的に除去し、タンパク質層を除去することで露出した基板表面とタンパク質層の高さの差を測定した (図 18)。その結果、pH 5 では、COP 表面上に 2.5~3 nm のタンパク質層が残っており、これは、mAb 分子がフラットオン配向で 1 分子吸着した際の高さ (図 16) と等しく、タンパク質層 1 層分が残っていたと結論づけられる。一方、pH 7 では、COP 表面には 4~5 nm の mAb 層が残っており、これは mAb 分子がフラットオン配向で 2 分子吸着した高さと同様、タンパク質層 2 層分が残っていたと結論づけられる。同様に、GLS の表面上には、pH 5, 7 どちらの条件においても、バッファー洗浄後もタンパク質層が 4~5 nm 分残っており、タンパク質層 2 層分がバッファー洗浄後にも残っていたと結論づけられる。

CTLA4-Ig の pH 5 および 7 の溶液中における GLS 表面への吸着動態は図 19 に示した。pH 5 において CTLA4-Ig は、pH 7 における mAb と同様の GLS 表面への吸着挙動を示した。具体的には、後から観察範囲内に流れてきた別の CTLA4-Ig 分子は、すでに表面に吸着されている分子に近づいていく挙動をし、27 分 11 秒で観察範囲全体が CTLA4-Ig で覆われた (図 19 (a))。しかし、pH 7 では、CTLA4-Ig は観察時間内にすべての GLS 表面を覆いつくすことはなかった (図 19 (b))。形成された CTLA4-Ig 層の高さは pH 5 で約 3 nm だったが、pH 7 では約 1~3 nm であった (図 20)。

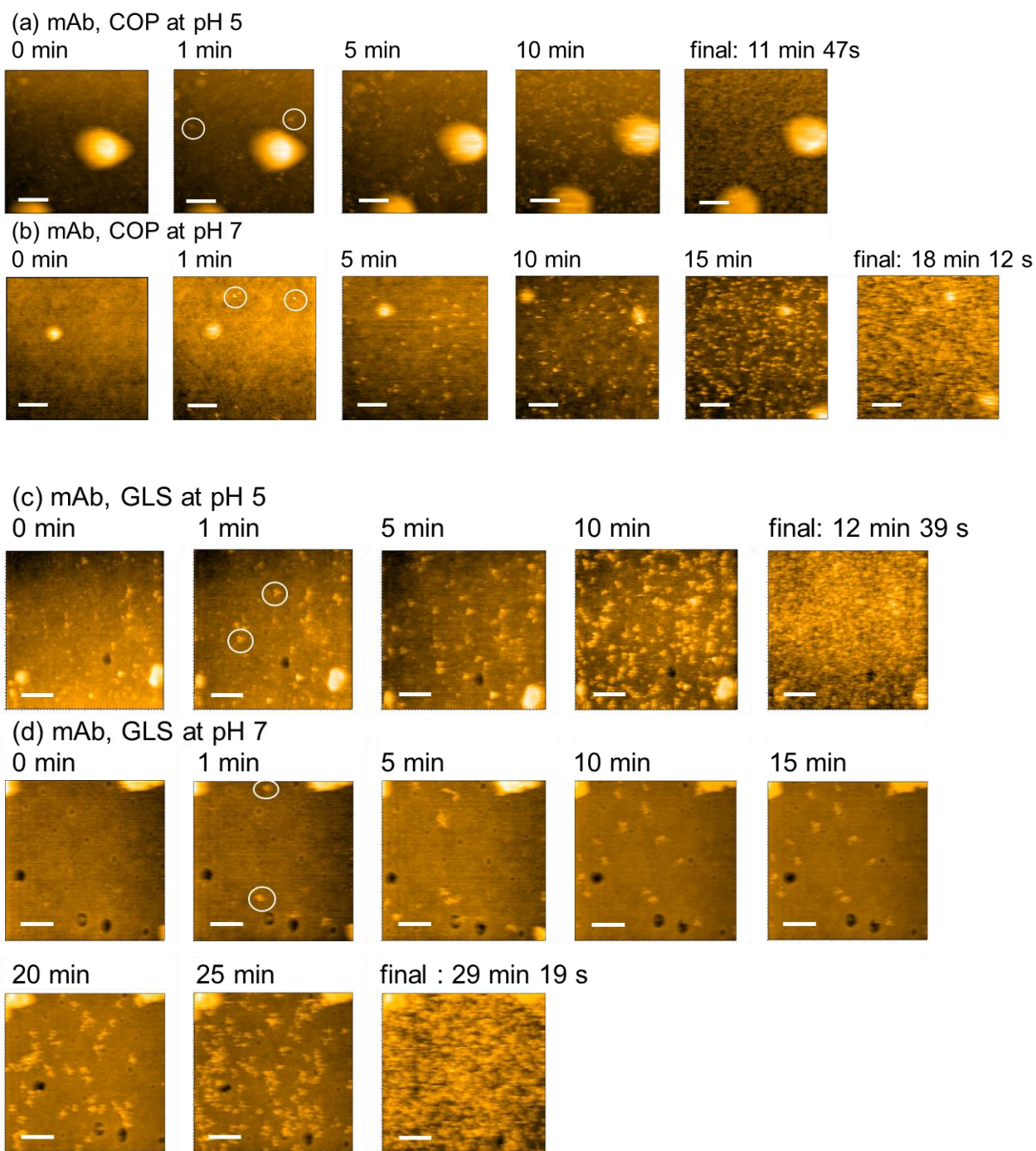


図 14: モノクローナル抗体アダリムマブ (mAb) の (a) pH 5 における COP への吸着、(b) pH 7 における COP への吸着、(c) pH 5 における GLS への吸着、および (d) pH 7 における GLS への吸着を観察した HS-AFM 画像。(a~d) スケールバー: 100 nm。各条件において、1 min に示された白丸は最初に表面上に吸着した分子を表す。

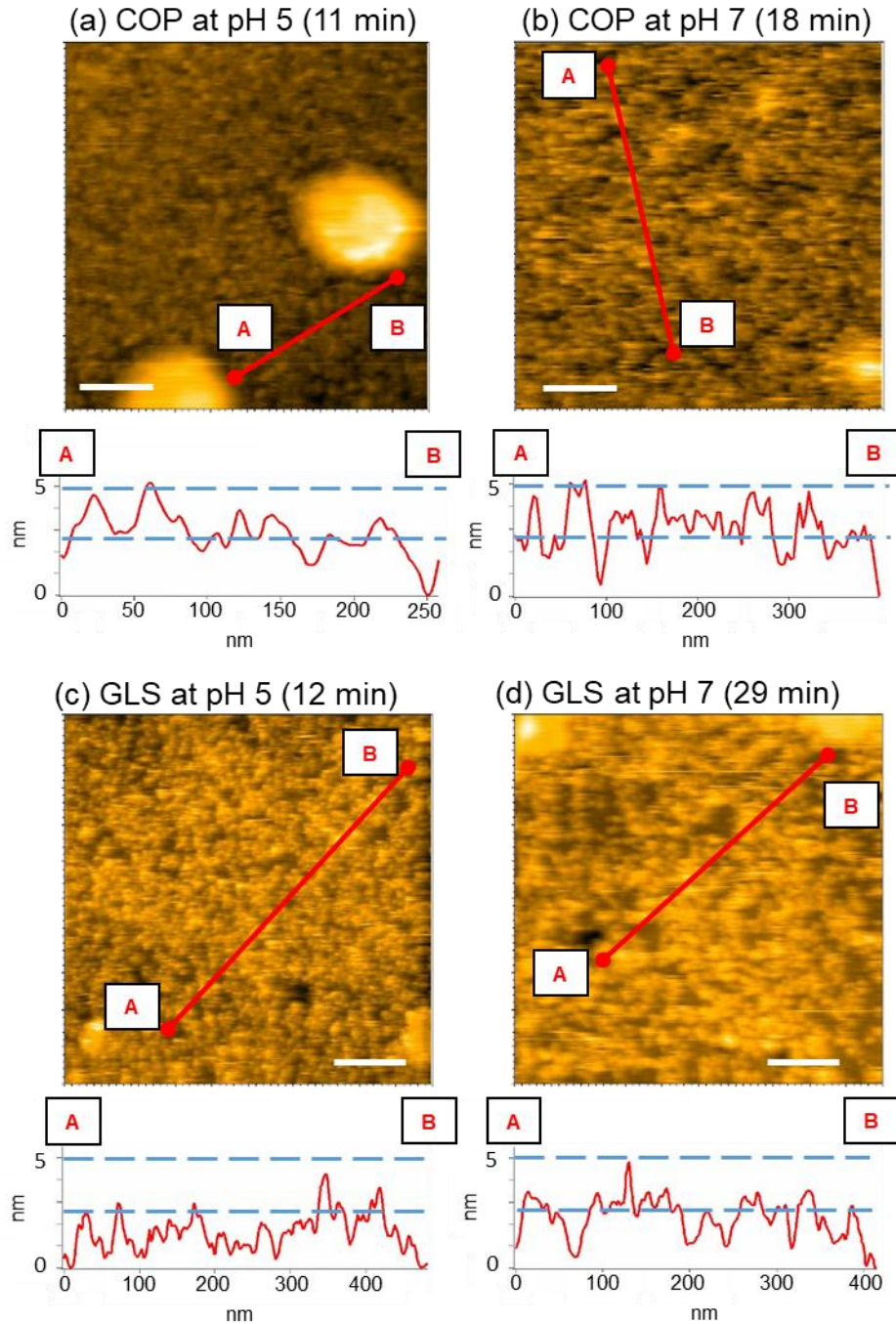
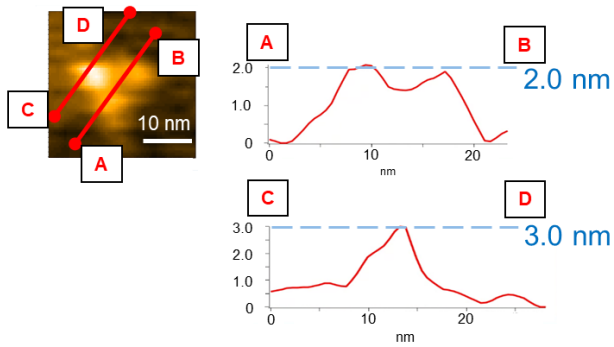
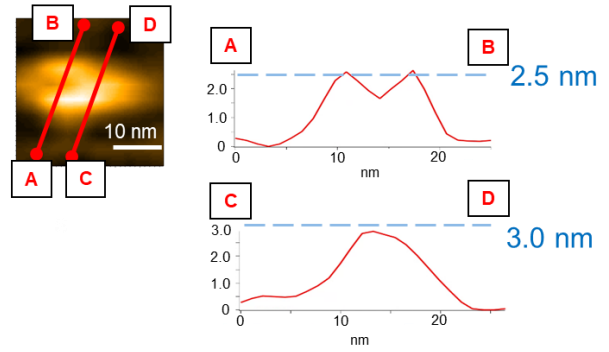


図 15: (a) pH 5 における COP 表面、(b) pH 7 における COP 表面、(c) pH 5 における GLS 表面、および (d) pH 7 における GLS 表面に mAb 分子が均一なタンパク質層を形成する直前のタンパク質層の厚みの測定結果。(a~d) スケールバー: 100 nm。

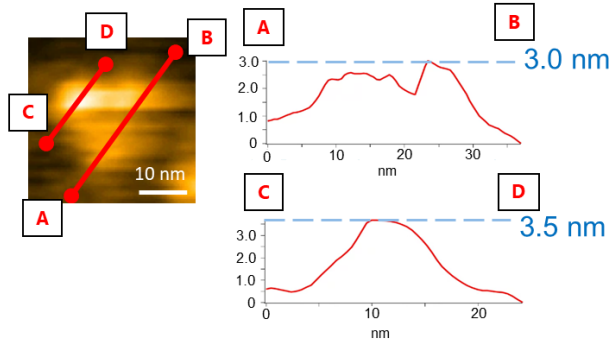
(a) COP at pH 5



(b) COP at pH 7



(c) GLS at pH 5



(d) GLS at pH 7

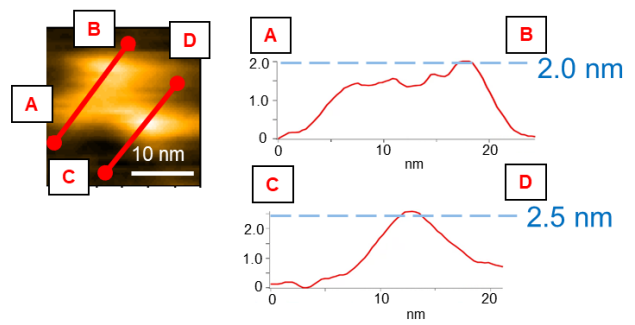


図 16: (a)pH 5 における COP、(b)pH 7 における COP、(c)pH 5 における GLS、および(d)pH 7 における GLS 表面へフラットオン配向で吸着した mAb 分子の高さの測定結果。

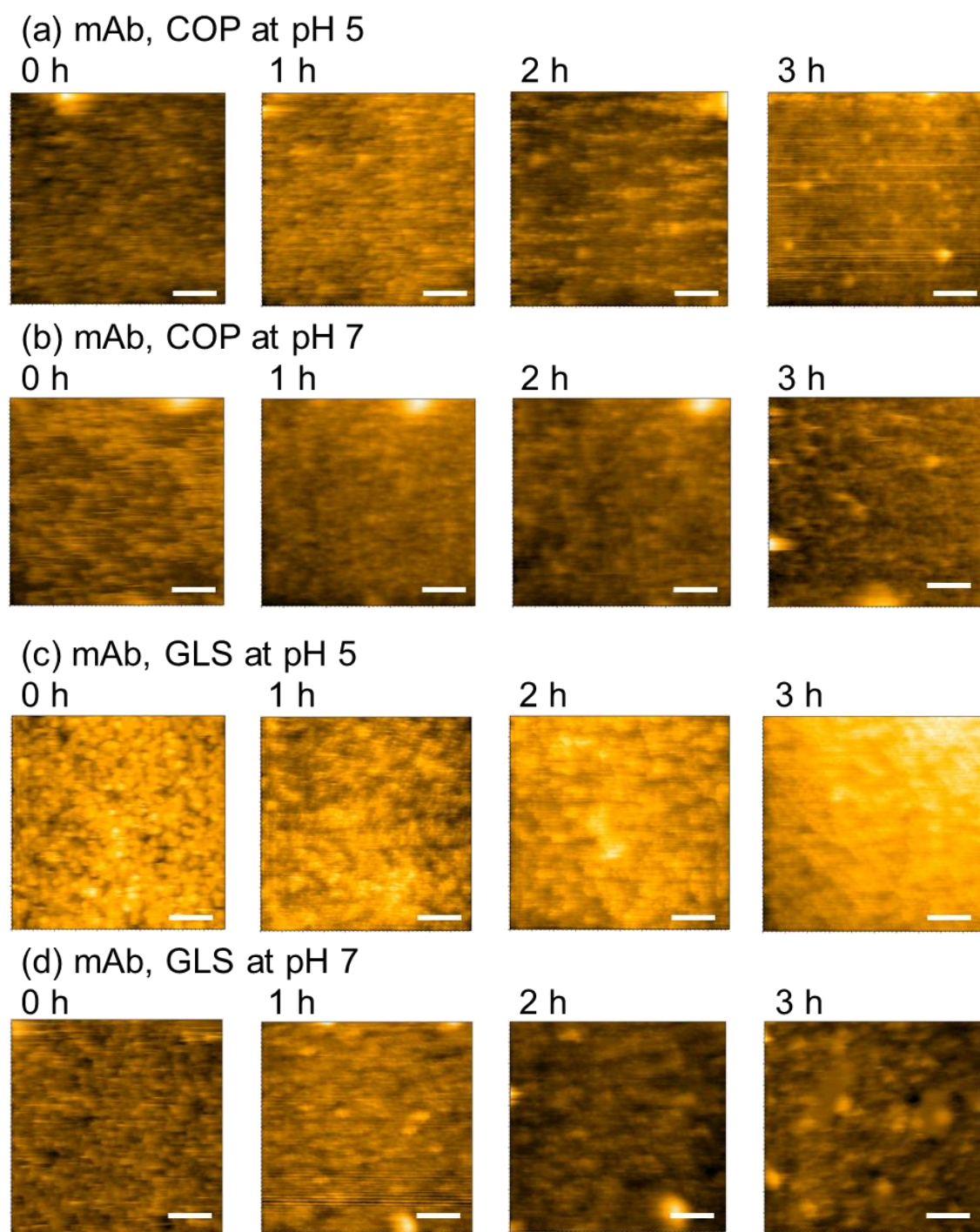


図 17: mAb タンパク質層形成後に (a) COP 表面に pH 5 の 10 mM リン酸バッファーを、(b) COP 表面に pH 7 の 10 mM リン酸バッファーを、(c) GLS 表面に pH 5 の 10 mM リン酸バッファーを、(d) GLS 表面に pH 7 の 10 mM リン酸バッファーを送液した際の mAb 層の変化を観察した結果。(a~d) スケールバー: 100 nm。

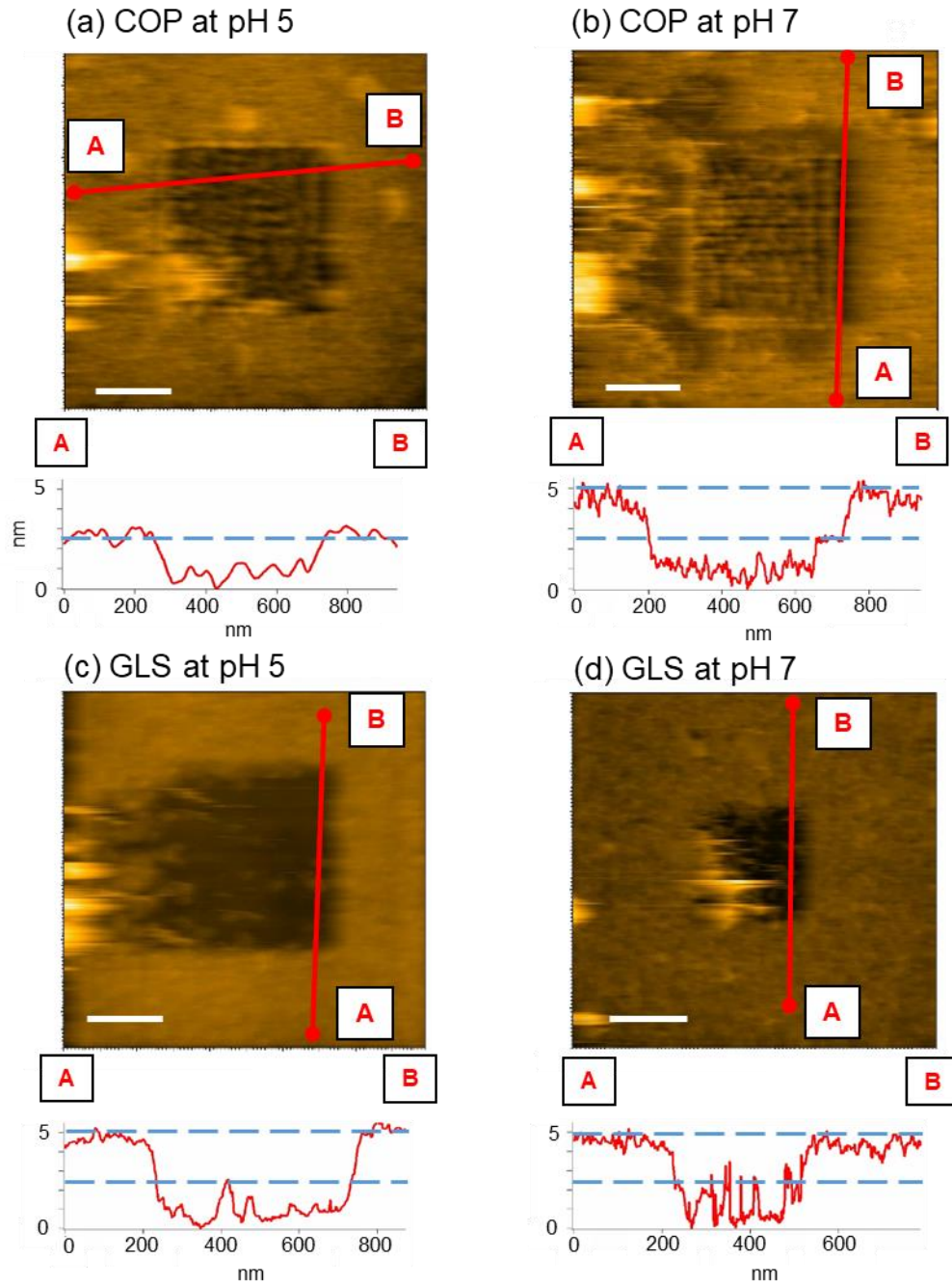


図 18: (a) COP 表面を pH 5 の 10 mM リン酸バッファーで、(b) COP 表面を pH 7 の 10 mM リン酸バッファーで、(c) GLS 表面を pH 5 の 10 mM リン酸バッファーで、(d) GLS 表面を pH 7 の 10 mM リン酸バッファーで洗浄した後に残った mAb 層の厚みの測定結果。(a~d) スケールバー: 200 nm。

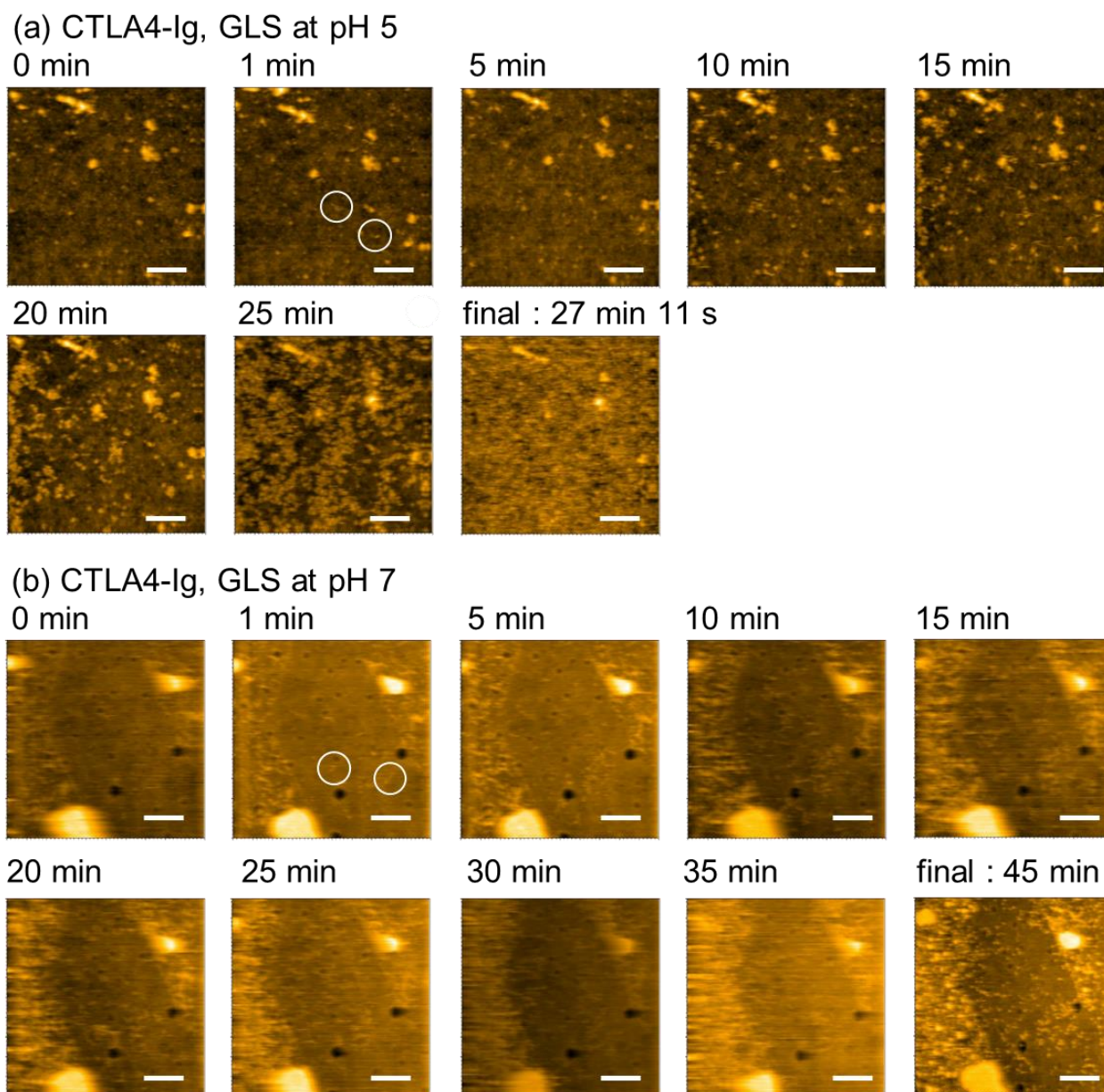


図 19: CTLA4-Ig の (a) pH 5 における GLS への吸着、および (b) pH 7 における GLS への吸着の様子。(a, b) スケールバー: 100 nm。各条件において、1 min に示された白丸は最初に表面上に吸着した分子を表す。

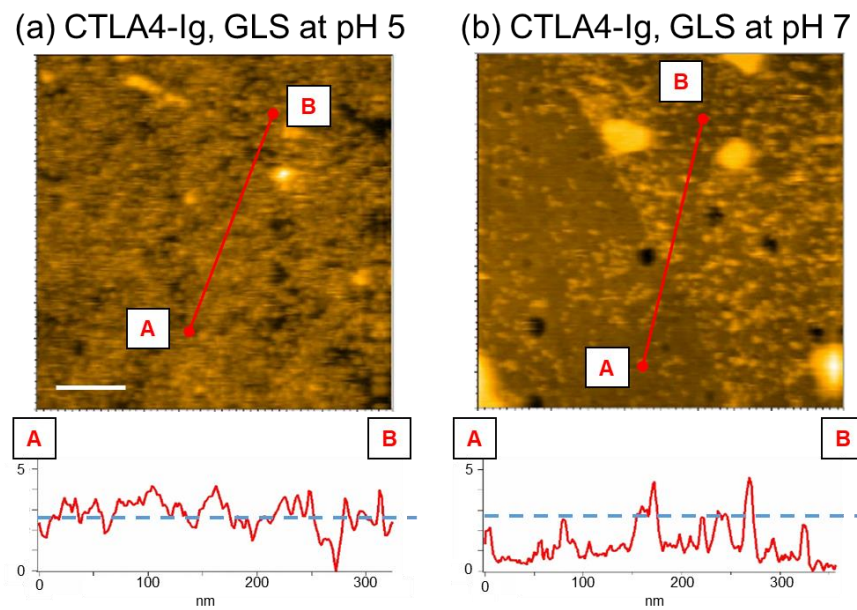


図 20: (a) pH 5 における GLS 表面、および(b) pH 7 における GLS 表面に CTLA4-Ig 分子が均一なタンパク質層を形成する直前のタンパク質層の厚みの測定結果。

タンパク質のシリンジバレルへの吸着および凝集体発生に対する、界面活性剤の効果

以上の項目では、タンパク質の GLS および COP シリンジバレルへの吸着について検証した。次に、タンパク質のシリンジバレルへの吸着、さらには凝集体抑制に対する、界面活性剤の効果を検証した。mAb に対してはポリソルベート 80 (PS80)、CTLA4-Ig に対してはポロキサマー188 (P188) を用い、静置で保管された際の吸着量 (図 21) と回転ストレスにおかれた際のタンパク質凝集体量の発生量 (図 22, 表 5) を、界面活性剤の添加がない場合と比較し、界面活性剤のタンパク質吸着に対する効果を検証した。

まず、mAb と CTLA4-Ig のシリンジへの吸着 (図 21) に対しては、どちらのタンパク質に対しても界面活性剤は吸着抑制に効果的に働き、界面活性剤を添加しなかった場合 (PS80-および P188-) と比較して、界面活性剤を添加した場合 (PS80+および P188+) の方がタンパク質の吸着量が有意に減少した。吸着量低減の効果は、どちらのタンパク質においても、GLS に対してよりも COP に対して高く、PS80+および P188+においては、COP から SDS で剥離されるタンパク質量が検出限界を下回っていた。

タンパク質凝集の防止に対する界面活性剤の効果进行分析するため、0.1 % PS80 を pH 7 の 1 mg/mL mAb 溶液に添加したところ、PS80 はミクロンサイズの粒子を GLS, COP どちらのシリンジにおいても増加させた (図 22 (a))。FI で取得された画像は、PS80-では繊維状、PS80+では小さな球形の粒子が多かった (図 22 (c, e))。SEC で測定された mAb の可溶性凝集体は、PS80-と PS80+とでは変化がなかった (表 5 (a))。

同様にして、0.1% P188 を pH 5 の 1 mg/mL CTLA4-Ig 溶液に添加したところ、P188 はミクロンサイズのタンパク質凝集体の形成を有意に減少させた (図 22 (b))。FI で検出された粒子のサイズや形状も P188-と P188+では明らかに異なっており、P188-では発生した繊維状の大きなミクロンサイズの粒子が、P188+ではほとんど発生せず、数ミクロンの球形の気泡が発生するにとどまった (図 22 (d, f))。ミクロン粒子発生の抑制効果は GLS シリンジと比較して COP シリンジでより顕著であった (図 22 (b, d, f))。一方、可溶性凝集体は、COP シリンジと GLS シリンジの両方に P188 を添加することで増加した (表 5 (b))。回転ストレ

ス前後（Control との差）において、オリゴマーが増えた割合が、COP シリンジでは P188- の場合 14.6 %であったのに対し P188+ の場合 12.7 %でオリゴマー形成を抑制していたのに対し、GLS では P188- の場合 9.2 %であったのに対し P188+ の場合 11.4 %とオリゴマー形成が促進された。

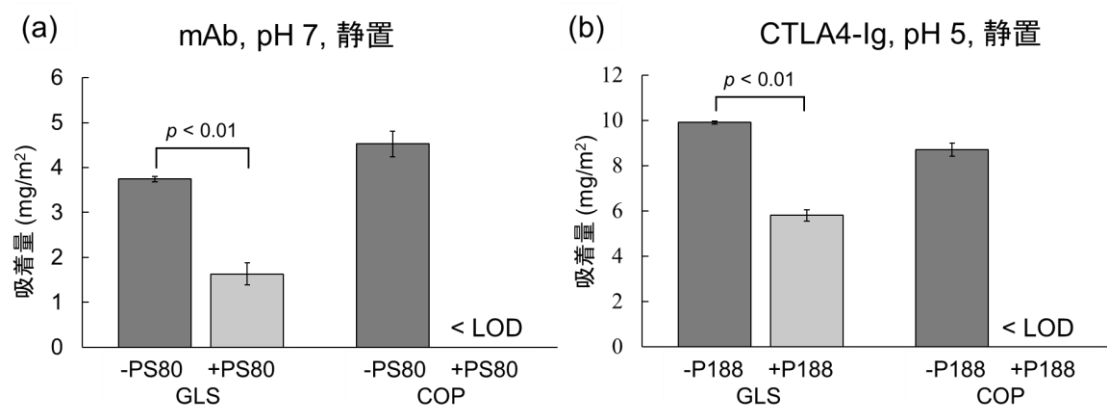
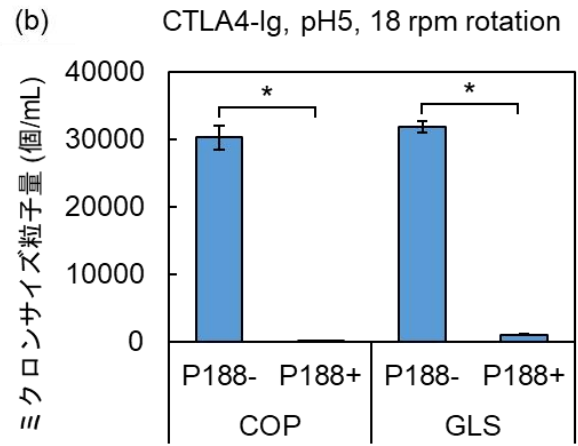
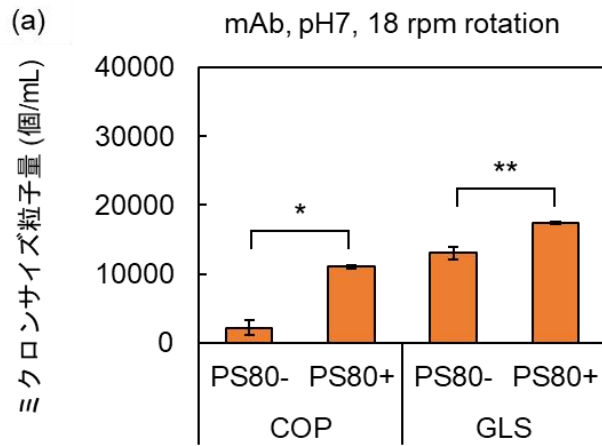


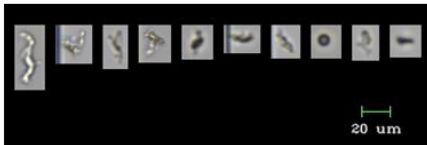
図 21: (a) mAb に PS80 を添加した場合（PS80+）としなかった場合（PS80-）のシリンジへの吸着量。(b) CTLA4-Ig に P188 を添加した場合（P188+）としなかった場合（P188-）のシリンジへの吸着量。



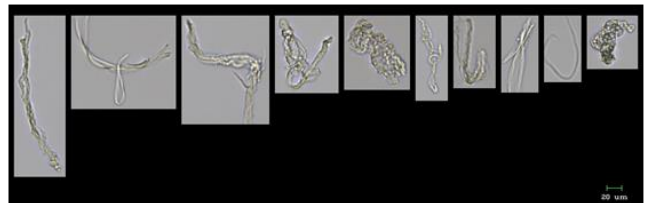
(c) mAb, COP, PS80-



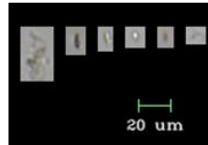
mAb, COP, PS80+



(d) CTLA4-Ig, COP, P188-



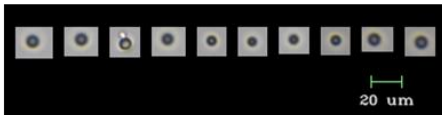
CTLA4-Ig, COP, P188+



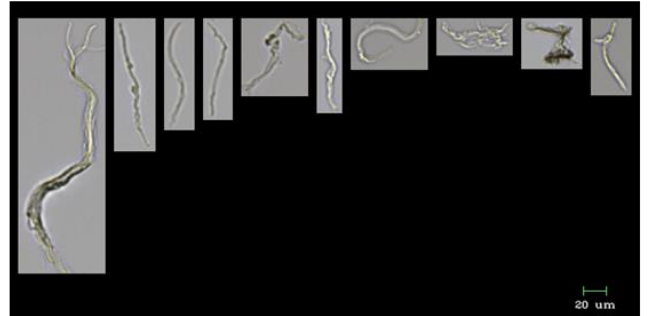
(e) mAb, GLS, PS80-



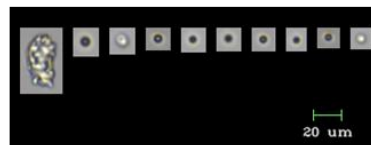
mAb, GLS, PS80+



(f) CTLA4-Ig, GLS, P188-



CTLA4-Ig, GLS, P188+



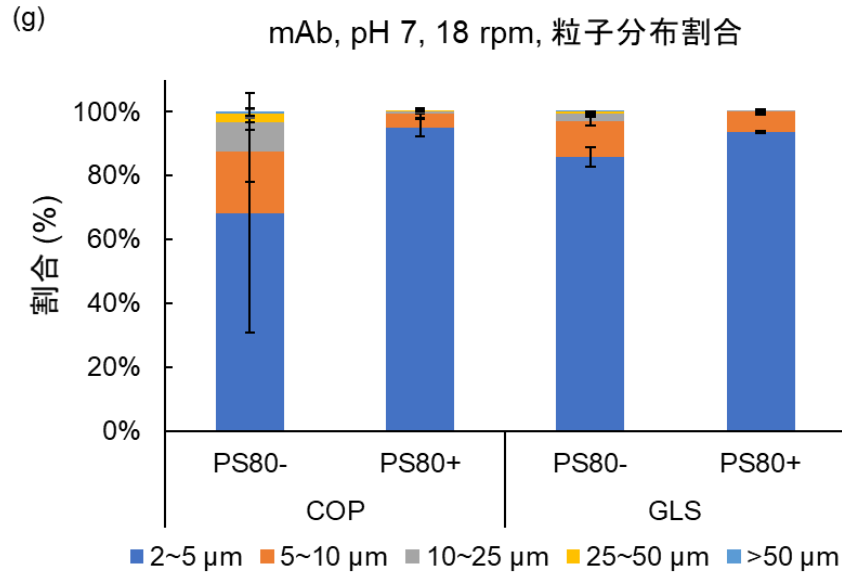


図 22: 18 rpm の回転ストレス条件において、(a) mAb に PS80 を添加した場合 (PS80+) としなかった場合 (PS80-) のシリンジ中で発生したミクロンサイズの粒子量、(b) CTLA4-Ig にポロキサマー188 を添加した場合 (P188+) としなかった場合 (P188-) のシリンジ中で発生したミクロンサイズの粒子量。(c) mAb に PS80 を添加した場合 (PS80+) としなかった場合 (PS80-) の COP シリンジ中で発生したミクロンサイズの粒子の例、(d) CTLA4-Ig に P188 を添加した場合 (P188+) としなかった場合 (P188-) の COP シリンジ中で発生したミクロンサイズの粒子の例。(e) mAb に PS80 を添加した場合 (PS80+) としなかった場合 (PS80-) の、GLS シリンジ中で発生したミクロンサイズの粒子の例。(f) CTLA4-Ig に P188 を添加した場合 (P188+) としなかった場合 (P188-) の、GLS シリンジ中で発生したミクロンサイズの粒子の例。(g) mAb, pH 7, 18 rpm ストレスで発生した凝集体のサイズ分布。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

表 5: 図 14 におけるモノマーとオリゴマーの割合と、コントロールの可溶性分から計算した保管およびストレス後の可溶性分の割合。

(a) mAb, pH 7, 18 rpm rotation

Conditions	Syringe	Soluble fraction	Monomer (%)	Oligomer (%)
PS80-	Control	100.0 $\pm$ 0.0	99.7 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
	COP	99.8 $\pm$ 0.0	99.7 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0
	GLS	99.7 $\pm$ 0.0	99.7 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
PS80+	Control	100.0 $\pm$ 0.0	99.6 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.1
	COP	100.3 $\pm$ 0.0	99.6 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1
	GLS	101.9 $\pm$ 0.0	99.7 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.0

(b) CTLA4-Ig, pH 5, 18 rpm rotation

Conditions	Syringe	Soluble fraction	Monomer (%)	Oligomer (%)
P188-	Control	100.0 $\pm$ 0.0	93.6 $\pm$ 0.0	6.4 $\pm$ 0.0
	COP	99.6 $\pm$ 0.0	79.0 $\pm$ 0.1	21.0 $\pm$ 0.1
	GLS	99.8 $\pm$ 0.0	84.4 $\pm$ 0.5	15.6 $\pm$ 0.1
P188+	Control	100.0 $\pm$ 0.0	86.9 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.1
	COP	101.1 $\pm$ 0.0	74.2 $\pm$ 0.0	25.8 $\pm$ 0.0
	GLS	101.1 $\pm$ 0.0	75.5 $\pm$ 0.1	24.5 $\pm$ 0.1

第4節 考察

タンパク質およびシリンジ表面の溶媒中における電気的特性

図 8 において、mAb、CTLA4-Ig の等電点はそれぞれ、pH 7.4、pH 5.1 と観測された。タンパク質のアミノ酸配列より Sednterp ソフトウェアを用いて各タンパク質の等電点を推定すると、mAb は pH 8.4、CTLA4-Ig は pH 5.9 と算出されたが、実際に観測された等電点はどちらも計算値よりも酸性側となっていた。この理由としては、緩衝液中に存在する塩化物イオンがタンパク質表面に結合することで、特に酸性条件下においてタンパク質の持つ正電荷が遮蔽され、より酸性側でタンパク質の持つ電荷が消失したと考えられる⁹¹⁻⁹³。

HS-AFM によるタンパク質の吸着動態観察と UPLC との吸着量との比較

吸着量の定量に際して mAb のシリンジ表面への吸着は pH 7 よりも pH 5 の方が多いであろうと予測していた。なぜなら、シリンジ表面のもつ電位は、pH 7 よりも pH 5 でより正に大きかったからであり（図 8）、吸着は静電相互作用が原因であると結論付けている方向が多かったためである^{55,94,95}。実際、HS-AFM による吸着動態の観察においては、pH 7 よりも pH 5 において、mAb がより速く吸着していくことが確認できた。一方、CTLA4-Ig では、pH 5 においては表面へ吸着していく様子が観察されたのに対して、pH 7 では完全にはタンパク質の吸着層が形成されなかった。CTLA4-Ig は pH 5 でわずかな正電荷を帯びているが、pH 7 では負電荷を帯びている。これらのことは、タンパク質と表面との間に、実際に静電的な引力または斥力（静電相互作用）があることを示している^{55,96}。

しかし、mAb の吸着では最終的に、pH 5 と 7 において同じ厚みの吸着層が形成されており、バッファーを流した後でも、明らかな吸着層の脱離は観察されず、1 層または 2 層分の吸着層が残存した（図 18）。HS-AFM の観察において mAb の分子サイズが 10 nm×13 nm であったことから計算すると、吸着層 1 層の mAb の密度は 1.9 mg/m² と計算される。したがって、UPLC で定量された mAb の吸着層（図 13）は、COP で、pH 5 において 1 層分、pH 7 において 2 層分あり、GLS ではどちらの pH でも少なくとも 2 層分の厚みがあると推

定される。この層数は、HS-AFM で mAb 層形成後にバッファー洗浄を行った後に残存していた mAb 層の数と一致していた (図 18)。以上のことから、タンパク質の PFS 表面への吸着は、PFS バレルとタンパク質との相互作用 (1 層目の形成) のみならず、PFS バレルに吸着したタンパク質へさらに吸着するタンパク質層 (2 層目以上の形成) があることが示された。このことは、丸野らのシリコンオイルフリーシリンジへの吸着が、COP シリンジでは 1 層分、ガラスシリンジでは 2 層分となった先行研究における結果を支持している²⁴。また、タンパク質の吸着が単層のみならず多層を形成する可能性があることは、ほかの研究グループからも報告されている^{97,98}。

タンパク質および PFS 表面の物理化学特性と吸着量との関係性

PFS 表面の電気的な特性について、表面ゼータ電位の pH 依存性は COP と GLS では同じ傾向を示した。このことから、COP と GLS は同様の電気的特性を持つことを意味する。吸着量測定には、COP および GLS シリンジに対して、同じタンパク質サンプルを使用したため、タンパク質と COP の間の静電相互作用の程度は、タンパク質と GLS の間の静電相互作用の程度と同じであると考えられる。しかし、COP に吸着したタンパク質の量は GLS への吸着量とは異なっていた。したがって、静電相互作用以外の相互作用、すなわち疎水性相互作用を考慮して、2つの表面間のタンパク質吸着レベルの違いを説明する必要がある。

疎水性相互作用を説明するには、PFS 表面の接触角が役立つ。COP は GLS に比べ大きい接触角をもつため、COP がより高い疎水性を持つことを示している。高塩濃度の条件下では、静電遮蔽効果により分子の表面電位は減少し、静電気力が低下するが、疎水面どうしでの相互作用が起こる^{44,99,100}。本研究においては、GLS シリンジへの pH 7 の mAb および pH 5 の CTLA4-Ig の吸着量は、塩濃度上昇に伴い減少した (図 13 (c, d))。この結果は、タンパク質のわずかな正電荷が高塩濃度で遮蔽され、静電相互作用が減少したことを示す。実際に、mAb の pH 5 において、溶媒のイオン強度を 0.01 M と 0.5 M として $\pm 1 kT/e$ 等電位面をプロットすると、0.01 M の場合と比べて 0.5 M の場合に電位面は縮小した (図 10

(c))。よって、構造計算の結果からも、塩濃度の上昇によってタンパク質の周囲の電位が遮蔽されたことは明らかである。さらに、pH の上昇に伴うタンパク質の吸着量の減少は、COP 表面と比較して GLS 表面でより顕著であった (図 13 (a, b))。mAb の pH 9 で、また CTLA4-Ig の pH 7 以上で、GLS 表面と比較して、COP 表面に多くのタンパク質が吸着していたことも、GLS とタンパク質のどちらもが負の電荷を帯び、静電的な反発力が強く働き吸着量が減少したと考えることができ、親水性 GLS 表面へのタンパク質吸着が主に静電相互作用によって支配されているという考察を支持している⁹⁴。Attwood らの球状タンパク質の吸着についての研究においても、帯電した親水性表面には非常に高い親和性で吸着することが示されている⁹⁶。

塩濃度の上昇に伴い、COP 表面に吸着した pH 5 および 7 の mAb、および pH 7 の CTLA4-Ig の量が増加した (図 13 (c, d))。一方、タンパク質がわずかにしか電荷を帯びていない pH 7 の mAb と pH 5 の CTLA4-Ig は、COP への吸着量の塩濃度依存性が小さく、増加の程度が小さかった。このことは、タンパク質と COP との間に働く疎水性相互作用の吸着への寄与が強いためであると考えられる。タンパク質の疎水性領域が材料の疎水性表面に近づくと、疎水性表面を取り巻く水分子の放出が起こる¹⁰¹。その結果、疎水性の表面が互いに接触し、系全体の自由エネルギーが低下する。疎水性相互作用は、分散相互作用とともに、COP 表面へのタンパク質の吸着に大きく寄与すると考えられる^{55,94}。Höger らの研究においても、疎水性のシリコンオイルが塗布されたバイアルへの IgG1 吸着が、IgG1 が正電荷を帯びている酸性条件においては塩濃度の上昇に伴い増加したが、中性条件下では塩濃度の依存性がほとんどなかったことが報告されており、その傾向は本研究で得られた結果と一致しており、同様のメカニズムによる吸着が起こっていたと考えられる⁵⁵。以上のことから、疎水性の COP 表面へのタンパク質の吸着には疎水性相互作用が支配的となる可能性が示された。

本研究における重要な発見は、タンパク質の吸着が疎水性相互作用によって媒介される場合、静電引力によって媒介される場合と比較して、吸着するタンパク質の量は減少する

ことである。これは、静電相互作用と比較して疎水性相互作用のエネルギーが小さいことから説明できる。ここで、2種類の相互作用—静電相互作用と分散相互作用（疎水性相互作用の原因）がタンパク質と材料の表面相互作用に作用すると仮定する。表4より、pH5においてタンパク質表面の70%が正に帯電し、図8よりPFS表面は負に帯電している。電荷どうしの相互作用の強さが距離に反比例する条件を想定すると、タンパク質と表面の間の引力は分子が比較的離れている場合でも働く¹⁰²。分子間分散相互作用は水分子の放出を伴い、系全体の総自由エネルギーを低下させるが、タンパク質表面の15%のみが疎水性であるため、これらの相互作用はかなり弱い相互作用に相当する。ただし、COPへのタンパク質吸着量は、pH変化によって影響を受けること、また、pH5においてCTLA4-Igの吸着量が高塩濃度下で減少したことは、COPへの吸着においても、小さくはあるが確実に静電相互作用の寄与があることには留意が必要である。

COP シリンジへのタンパク質吸着量の濃度依存性と Langmuir 解析

COP シリンジへのタンパク質吸着量の濃度依存性の検証より、mAb、CTLA4-Ig どちらのタンパク質においても、吸着量は1 mg/mLで飽和点を迎えた（図12(a, b)）。

mAbの吸着データについて、式3-1のLangmuir解析を適用したフィッティング結果（図12(c)）では実測値のプロットとモデルとのRMSEが 1.5×10^{-9} となった。しかしながら、実測値は、式3-1の特徴でもある、バルクタンパク質濃度がゼロに近づいた場合に吸着量がゼロに近づく結果とはなっておらず、不可逆な吸着の存在が明確であったことから、mAbの吸着データについては式3-2を適用した解析も行った（図12(d)）。その結果、実測値のプロットとモデルとのRMSEが 9.7×10^{-10} となり、フィッティングが向上した。なお、タンパク質吸着量はmAbバルク濃度が0 mg/mLであれば0となるため、式3-2の適用はmAbバルク濃度が0 mg/mL以外の範囲（希薄タンパク質溶液）であることに留意が必要である。今回、タンパク質吸着量のタンパク質のバルク濃度依存性については、pH7で行ったため、mAbでは分子間引力傾向、CTLA4-Igでは分子間斥力傾向にある状態である（図6(b)）。よ

って、CTLA4-Ig の吸着については、Langmuir モデルの適用条件を満たしているため式 3-1 でのフィッティングの精度が高かったが、mAb の吸着については、実際、溶質であるタンパク質間に相互作用があるため、Langmuir モデルの適用条件 4) 吸着挙動を変えるための表面上の溶質間の相互作用がない、を満たしておらず、式 3-1 におけるフィッティングの精度が低かったのだと考えられる。以上の結果から、本研究におけるタンパク質の吸着量には、タンパク質のおかれる溶媒条件に依って不可逆の吸着過程と可逆の吸着過程があることが示唆される。Latour は、タンパク質の吸着は Langmuir 吸着プロセスのように見える場合があるが、適用条件を直接検証できない限り、適用は避けるべきだと述べている⁹⁰。よって、タンパク質吸着には可逆と不可逆の吸着過程があるものとして以降の解析を進めることとした。

タンパク質のシリンジバレルへの吸着および凝集体発生に対する、界面活性剤の効果

COP シリンジへのタンパク質吸着に疎水性相互作用が大きな寄与を持つことは、界面活性剤による吸着および凝集体量低減の効果からも支持される。PS80 および P188 による吸着量低減効果は、GLS シリンジに対してよりも COP シリンジに対して大きく、COP シリンジでは界面活性剤添加によりタンパク質の吸着が完全に防ぐことができた。非イオン性の界面活性剤は、タンパク質、および気液/固液界面における疎水性相互作用を阻害することで、タンパク質吸着抑制に働く。このことから、COP では寄与の大きな疎水相互作用を防ぐことによる吸着低減の効果が明らかであったといえ、逆に、界面活性剤により吸着が完全には抑制されていない GLS シリンジへの吸着については、疎水性相互作用以外の別の相互作用、つまり静電相互作用の影響で表面上に強く吸着するタンパク質があることを示唆している⁹⁷。

凝集体低減の効果については、PS80 および P188 において異なる傾向がみられた。mAb に対する PS80 の効果は、 $>10\ \mu\text{m}$ などの、比較的サイズの大きな粒子の数を減少させた点で、タンパク質凝集体の低減に寄与したと言えるが、粒子の数自体は増加した。凝集体の

粒子径分布（図 22 (g)）より、 $\leq 10 \mu\text{m}$ の粒子が多数を占めていることと、粒子の形状（図 22）から、PS80+の条件で発生した粒子の多くは界面活性剤由来の泡である可能性が高いと考えられる。

CTLA4-Ig に対する P188 の効果はミクロンサイズの凝集体の低減に顕著に現れた。一方で、オリゴマーなどの可溶性凝集体の発生は COP シリンジでは多少防ぐことができたが、GLS シリンジにおいてはむしろ増加させた。可溶性凝集体の発生が、GLS よりも COP シリンジでより抑えられているということも、界面活性剤を用いた CTLA4-Ig 凝集体の低減戦略が、GLS シリンジよりも COP シリンジに対してより有効であることを支持する。一方で、界面活性剤の添加により、ミクロンサイズの凝集体は抑えられるが可溶性凝集体は抑制しきれないという事実は、ほかの研究においてもみられる現象であり、そのメカニズムについては研究の余地がある¹⁰³。

第5節 小括

本章では、タンパク質のシリンジ表面における吸着層は、材料表面に吸着したタンパク質の層およびその上に形成されるタンパク質の層からなる多層構造を形成することを示唆した。PFS 表面とタンパク質との吸着には、PFS バレル素材のもつ物理化学的特性に大きな影響を受けることがわかった。親水性表面であるホウケイ酸ガラス（GLS）へのタンパク質の吸着は、静電相互作用により支配されており、疎水性表面であるシクロオレフィンポリマー（COP）へのタンパク質の吸着は、静電相互作用のみならず、疎水性相互作用の寄与もあることが示唆された。実際、疎水性相互作用を低減する、界面活性剤の吸着および凝集抑制に対する効果が、GLS シリンジよりも COP シリンジで大きいことが実証され、COP シリンジの使用は、医薬品開発において、より少ない添加剤組成での処方を達成することにも役立つ可能性が考えられる。

バレル表面の特性により吸着機構が異なるという事実は、タンパク質吸着抑制の手法を立てるために非常に重要な知見である。より詳細な分析を通じて、これらの相互作用がどの程度、タンパク質の吸着に寄与しているのかは明らかにされる必要がある。

第3章 mAb のポリマーシリンジへの吸着と吸着機構解析

第1節 緒言

第2章では、親水性のホウケイ酸ガラスシリンジと疎水性のシクロオレフィンポリマー (COP) 製のプレフィルドシリンジ (PFS) を用いたタンパク質吸着の分析を行った。その結果、親水性表面のガラスシリンジへの吸着には表面とタンパク質との静電相互作用の寄与が支配的であり、一方、疎水性表面の COP シリンジへの吸着には静電相互作用の寄与に加えて、表面とタンパク質との疎水性相互作用も寄与する可能性が示唆された。さらに、表面への吸着にはタンパク質の表面への直接の吸着のみならず、シリンジ表面にすでに吸着したタンパク質層へのタンパク質の吸着があることも示された。

そこで、タンパク質の表面への吸着は、静電相互作用および疎水相互作用の寄与によるタンパク質の表面への直接の吸着、および表面に直接吸着したタンパク質と溶液中のタンパク質との相互作用に起因する吸着の合計により決まる、という仮説のもと、タンパク質の吸着モデルの構築を試みた。第3章では、COP を含む、今後医療用途でも実用可能性のあるポリマー素材を材料としてプレフィルドシリンジ型に成形した PFS を用い、モノクローナル抗体アダリムマブ (mAb) の表面への吸着を分析し、詳細な吸着メカニズムの解明に迫った。この目的のため、最初に、複数の PFS バレル素材の電気的特性および疎水度を検証した。さらに、疎水度の違いに基づいて選出した4種類のシリンジについて、mAb の吸着評価を行った。最後に、mAb のポリマーシリンジへの吸着に関わる因子を推定し、mAb 吸着量と mAb および PFS バレルの物理化学的特性との重回帰分析を行うことで、吸着予測モデルを構築した。

第2節 実験材料および手法

材料

本研究では、医療用タンパク質、アダリムマブ（販売名：ヒュミラ皮下注シリンジ 40 mg, エーザイ株式会社）を購入し使用した。

用いたポリマーは、シクロオレフィンポリマー（COP）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリプロピレン（PP）、ポリカーボネート（PC）、ポリスチレン（PS）、ポリメチルペンテン（PMP）である。各ポリマーの構造は図 23 に示した。プランジャーヘッドはテルモ株式会社より提供された *i-coating*TM プランジャーを使用した。COP シリンジへの mAb 吸着量の分析結果は、第 2 章の図 13 の結果を使用した。

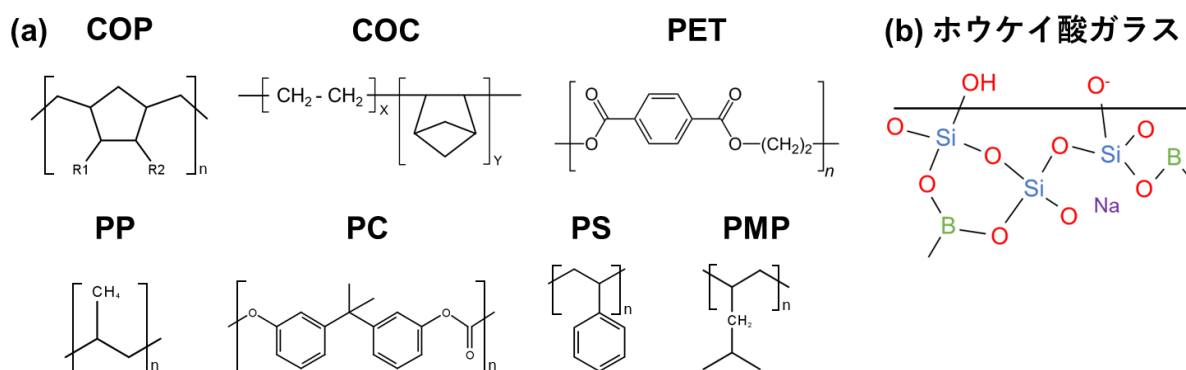


図 23: (a) シクロオレフィンポリマー（COP）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリプロピレン（PP）、ポリカーボネート（PC）、ポリスチレン（PS）、ポリメチルペンテン（PMP）の構造。(b) ホウケイ酸ガラスの構造。

方法

シリンジ素材の表面接触角測定

表面の接触角測定には、Biolin Scientific 社の Attention Theta Flex を用いた。測定に用いた COP、PET、PP、PC、PS および PMP のプレート（65×65 mm², 厚み：3 mm）は測定前にコンパクトイオナイザーに当てることで除電した。pH 7 に調製された 10 mM リン酸バッ

ファアを 1 $\mu\text{L/s}$ の速さで 3 μL 滴下した時の接触角を 10 秒間撮影し、その間の液滴の両端の接触角の平均値を算出することで 1 回の測定値を得た。1 種類のポリマー素材につき測定は 5 回繰り返し、その平均値をそのシリンジ素材の接触角とした。

シリンジ素材の表面ゼータ電位測定

ポリマーのシリンジバレルの表面ゼータ電位は、AntonPaar 社のシリンダーセルを装填した SurPASS™3 を用いた（第 2 章第 2 節参照）。NaOH および HCl をもちいて、それぞれ pH 12 と pH 2 に調製した 10 mM リン酸バッファーを用意し、これらを目的の pH に滴定後、シリンジバレル内を 2 回リンスした。測定は 1 条件につき 5 回行い、中央値 3 点の平均値をデータ点とした。pH 10 から pH 3 まで滴定により pH を変化させ、pH 1 ごとにゼータ電位測定を行った。

mAb サンプルの準備

アダリムマブ（以下、mAb）は製品のプレフィルドシリンジより回収した後、20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5）に限外濾過により透析した。その後、サンプルは SP セファローースカラム（Cytiva）に供し、0.4 M 塩化ナトリウムを含む 100 mM リン酸緩衝液（pH 8）で溶出した。最後にタンパク質溶液は水または塩化ナトリウムを含まない 10 mM リン酸緩衝液に限外濾過で透析した。さらに、吸着量の塩濃度依存性の検証のため、500 mM の塩化ナトリウムを含んだ pH 5 または 7 の 10 mM リン酸緩衝液に、限外濾過により透析した。

mAb 試料の PFS への充填操作は無菌条件下で行った。まず、各条件に調製された mAb 試料と同じ溶媒条件で、mAb を含まない溶媒（コントロール溶液）をポアサイズ 0.22 μm の溶液フィルターに通し、その後同じ溶媒組成のタンパク質溶液をフィルターに通液することで微小な不純物を取り除いた。フィルター済みの溶液を用いて、タンパク質溶液は 1 mg/mL に調製した。タンパク質試料は 1 mL ずつ、各ポリマーシリンジ（PET, PC, PMP）に、1 条件につき 3 本ずつに充填した。ヘッドスペース（気泡）は 5 mm となるようにプラ

ンジャーを取り付けた。シリンジに充填されたタンパク質試料は 3 日間、2~8°C の温度条件下で保管した。

PFS バレル内壁に吸着したタンパク質の定量

試料保管後、充填されていた試料溶液は、プランジャーを抜き取り、シリンジ針の反対側から回収した（第 2 章第 2 節、図 5 参照）。NaCl を含まない pH 5 または 7、500 mM NaCl を含む pH 5 または 7 の 10 mM リン酸緩衝液で 3 回洗浄した。その後、1.2 mL の 7.5% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を加えてパラフィルムにより密閉した。40 kHz の超音波に 15 分間さらし、壁面に吸着したタンパク質を剥離した。回収した溶液は、SDS 濃度が 3 % (w/v) となるように水で 2.5 倍希釈して測定用の試料溶液とした。

剥離したタンパク質試料溶液中のタンパク質量は、逆相クロマトグラフィーを用いて定量した。逆相クロマトグラフィーには Vanquish™ UPLC (Thermo Fisher Scientific 株式会社) に Protein BEH C4 1 mm × 100 mm (担体粒子径 1.7 μm, 日本 Waters 株式会社) を接続したシステムを使用した。移動相 A には 0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (Trifluoroacetic Acid, TFA) 含有の水を、移動相 B には 0.1% (v/v) TFA 含有のアセトニトリルを用いた。カラム温度は 80°C、検出の波長は UV210 nm に設定した。移動相 B の割合を 15 分間で 30 % から 98 % まで変化させるリニアグラジエントによりタンパク質を溶出した。得られたピーク面積値からタンパク質含量を算出し、さらにシリンジの表面積あたりの吸着量を計算した。分析は 3 回行い、3 回の平均値を結果とした。各シリンジ内の、各 pH における、吸着量の塩を含まない条件と 500 mM NaCl を含む条件との吸着量を比較する際には、ウェルチの t 検定を行った。

吸着量と、PFS バレルおよびタンパク質の物理化学的特性との相関解析

シリンジバレルと mAb の吸着量に、mAb およびシリンジバレルの物理化学的特性がどの程度寄与しているかを重回帰分析で調べた。重回帰分析では、mAb とシリンジバレルの

ゼータ電位差、mAb の第二ビリアル係数 B_{22} 、およびシリンジ素材の接触角を説明変数として、目的変数である吸着量を表すよう、モデル式として式 9 を立式した。回帰係数の決定には標準最小二乗法を用いた。最小二乗法は、予測値と実測値の残差の 2 乗和が最小になるように各係数を決定する手法である。

$$A = a_1 \times \Delta\zeta_{mAb-sur} + b_1 \times B_{22} + c_1 \times \gamma_{sur} + d_1 \quad (\text{式 9})$$

ここで、 A はタンパク質吸着量 ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$)、 $\Delta\zeta_{mAb-sur}$ はタンパク質とシリンジ素材のゼータ電位差 (mV , $\zeta_{mAb} - \zeta_{sur}$) (ζ_{mAb} はタンパク質のゼータ電位、 ζ_{sur} はシリンジ素材のゼータ電位)、 B_{22} はタンパク質の第二ビリアル係数 ($\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-2}$)、 γ_{sur} はシリンジ素材表面の接触角 (deg) を示しており、 a_1 , b_1 , c_1 はそれぞれの項にかかる回帰係数であり、 d_1 は切片である。 a_1 , b_1 , c_1 , および d_1 の単位は、 $\text{mg} \cdot \text{mV} \cdot \text{m}^{-2}$, $\text{mg}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{deg}^{-1}$, $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$ となる。用いたデータセットの値は表 6 に記載した。

PET、PC、COP、PMP への mAb の吸着量に関しては、疎水性相互作用が接触角に比例し、静電相互作用が接触角と反比例するという仮説を立て、mAb およびシリンジバレルの物理化学的特性がどの程度寄与しているのかを重回帰分析で調べた。解析には SAS Institute Japan 株式会社の JMP Pro 16 ソフトウェアを用いた。重回帰分析では、シリンジバレルの接触角 γ_{sur} (deg)、接触角の逆数 $1/\gamma_{sur}$ (deg^{-1})、タンパク質の第二ビリアル係数 B_{22} ($\text{mol} \cdot \text{mL} \cdot \text{g}^{-2}$) を説明変数として、目的変数である吸着量を表すよう、モデル式として式 10 を立式した。回帰係数の決定には標準最小二乗法を用いた。

$$A = a_2 \times \gamma_{sur} + b_2 \times 1/\gamma_{sur} + c_2 \times B_{22} + d_2 \quad (\text{式 10})$$

ここで、 A はタンパク質吸着量、 γ_{sur} はシリンジ素材表面の接触角、 B_{22} はタンパク質の第二ビリアル係数を示しており、 a_2 , b_2 , c_2 はそれぞれの項にかかる回帰係数、 d_2 は切片である。 a_2 , b_2 , c_2 , および d_2 の単位は、 $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{deg}^{-1}$, $\text{deg} \cdot \text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$, $\text{mg}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, $\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$ となる。

表 6: 吸着量予測式用のデータセット

タンパク質	NaCl 濃度 (mM)	バレル 素材	pH	ゼータ電位差 $\Delta\zeta_{mAb-sur}$ (mV)	第二ビリアル係数 B_{22} (mol ml/g ²)	接触角 γ_{sur} (deg)
mAb	0	GLS	4	37.2	9.5×10^{-4}	5.2
mAb	0	COP	4	33.5	9.5×10^{-4}	96.7
mAb	0	GLS	5	44.1	3.5×10^{-4}	5.2
mAb	0	COP	5	43.3	3.5×10^{-4}	96.7
mAb	0	GLS	6	46.7	1.2×10^{-4}	5.2
mAb	0	COP	6	51.3	1.2×10^{-4}	96.7
mAb	0	GLS	7	45.8	-5.0×10^{-5}	5.2
mAb	0	COP	7	57.5	-5.0×10^{-5}	96.7
mAb	0	GLS	8	39.4	-1.7×10^{-4}	5.2
mAb	0	COP	8	56.3	-1.7×10^{-4}	96.7
mAb	0	GLS	9	39.2	-1.5×10^{-4}	5.2
mAb	0	COP	9	58.5	-1.5×10^{-4}	96.7
mAb	0	PET	5	31.4	3.5×10^{-4}	62.7
mAb	0	PC	5	37.7	3.5×10^{-4}	81.0
mAb	0	TPX	5	37.3	3.5×10^{-4}	109.3
mAb	0	PET	7	37.0	-5.0×10^{-5}	62.7
mAb	0	PC	7	49.0	-5.0×10^{-5}	81.0
mAb	0	TPX	7	49.5	-5.0×10^{-5}	109.3
mAb	500	GLS	5	0*	-2.2×10^{-5}	5.2
mAb	500	COP	5	0*	-2.2×10^{-5}	96.7
mAb	500	GLS	7	0*	-5.0×10^{-5}	5.2
mAb	500	COP	7	0*	-5.0×10^{-5}	96.7
mAb	500	PET	5	0*	-2.2×10^{-5}	62.7
mAb	500	PC	5	0*	-2.2×10^{-5}	81.0
mAb	500	TPX	5	0*	-2.2×10^{-5}	109.3
mAb	500	PET	7	0*	-5.0×10^{-5}	62.7
mAb	500	PC	7	0*	-5.0×10^{-5}	81.0
CTLA4-Ig	0	GLS	9	28.2	1.9×10^{-4}	5.2
CTLA4-Ig	0	GLS	7	21.8	2.2×10^{-4}	5.2
CTLA4-Ig	0	GLS	5	33.9	-3.0×10^{-4}	5.2
CTLA4-Ig	0	COP	9	47.5	1.9×10^{-4}	96.7
CTLA4-Ig	0	COP	7	33.5	2.2×10^{-4}	96.7
CTLA4-Ig	0	COP	5	33.1	-3.0×10^{-4}	96.7

* 静電遮蔽の影響で、図 24 から示されるように、N500 では抗体およびバレル表面の電位は 0 付近であると考えられ、ゼータ電位差は 0 と設定した。

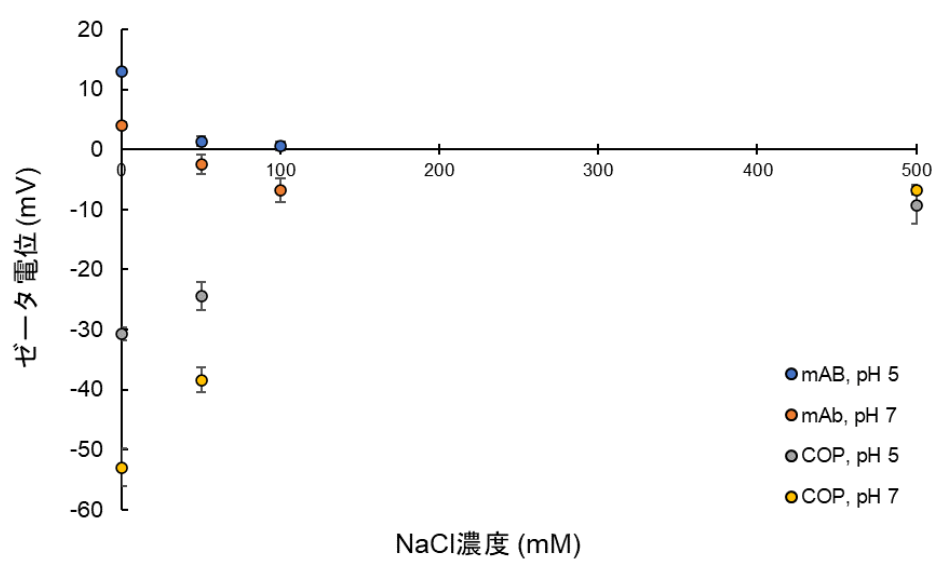


図 24: mAb および COP バレルのゼータ電位の塩濃度依存性。

第3節 結果

シリンジ素材の表面ゼータ電位と接触角

シリンジ素材上での 10 mM リン酸バッファー (pH 7) の接触角を図 25 (a)に、また、表面ゼータ電位の pH 依存性を図 25 (b)に示した。ポリマー素材の接触角は小さい順に PET < PC < COP < PS < PP < PMP となった。ゼータ電位の pH 依存性は、PET は比較的表面ゼータ電位の pH 依存性が小さく、pH が 4 から 10 に上がるにつれて、約 20 mV、徐々に値が小さくなった。PET と比較するとそのほかのポリマー (COP、PP、PC、PS、PMP) は、表面ゼータ電位の pH 依存性が大きく、pH が 4 から 10 に上がるにつれて約 50 mV 減少した。

pH 7 の 10 mM リン酸バッファーにおける接触角に対するゼータ電位のプロット (図 25 (c)) より、表面の特性の違いとして接触角が幅広い値で変化していることから、“親水性”、“比較的親水性”、“比較的疎水性”、“疎水性”の表面として、PET、PC、COP、PMP をそれぞれ選択し、すでに第 2 章で得られている COP の吸着量の塩濃度依存性に加え、PET、PC、PMP におけるモノクローナル抗体アダリムマブ (mAb) の吸着量の、pH および塩濃度依存性の分析を行い、表面素材の違いによってタンパク質の吸着量がどのように変化するかを分析することにした。

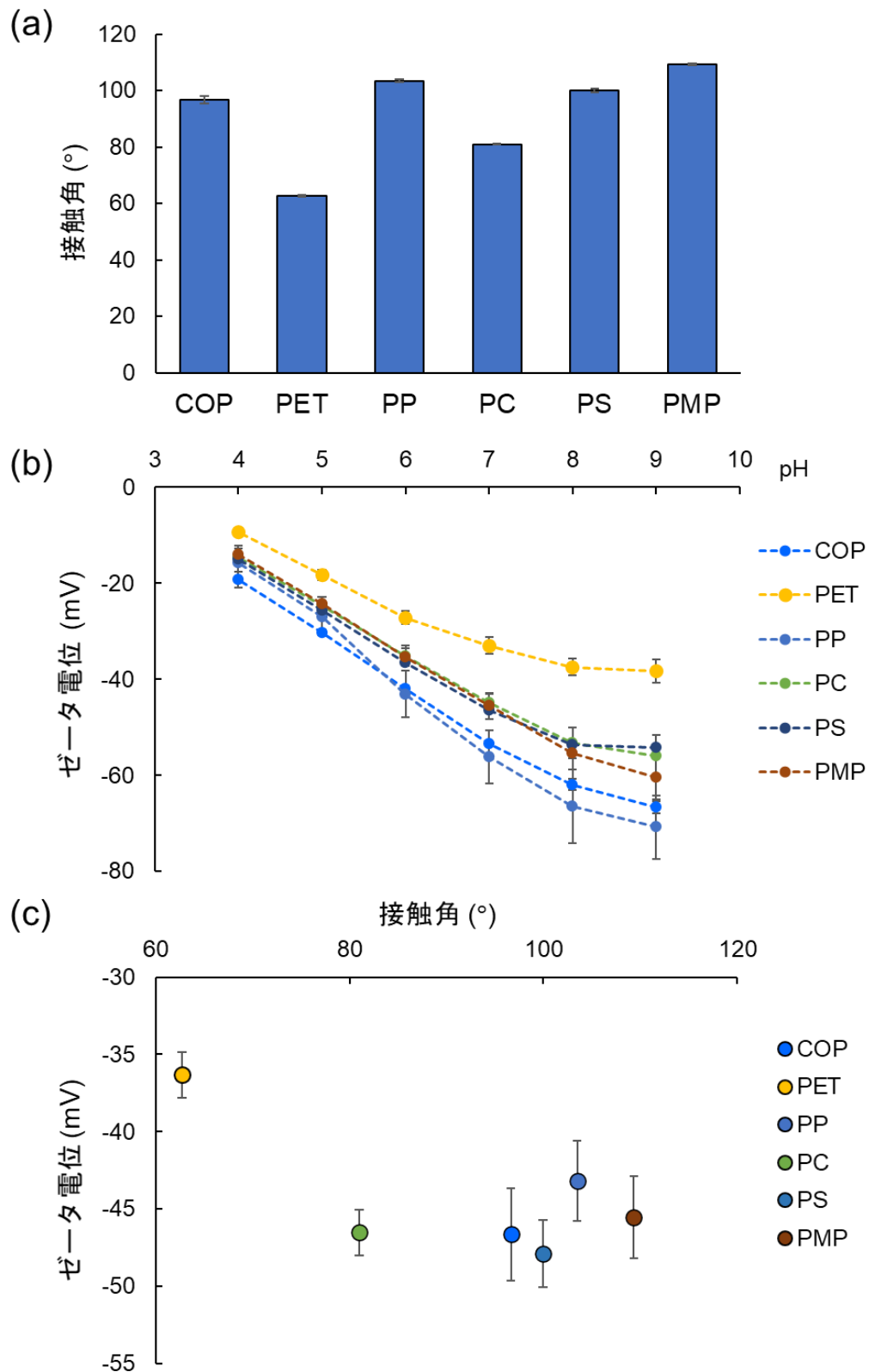


図 25: (a)シリンジ素材上での 10 mM リン酸バッファー (pH 7) の接触角および (b) 10 mM リン酸バッファーにおける表面ゼータ電位の pH 依存性。 (c) pH 7 における表面ゼータ電位と接触角の相関プロット。

mAb の PFS バレルへの吸着量の pH および塩濃度依存性

タンパク質の固液界面吸着への溶液 pH および塩濃度の影響を検証するため、PET、PC、COP、PMP への mAb の吸着量を pH 5, 7 および NaCl 添加あり (500 mM NaCl, N500) / なし (0 mM NaCl, N0) の条件において比較した (図 26)。pH 5 における mAb の吸着量は、N0 よりも N500 で有意に増加した。素材間の吸着量を比較すると、N0 では $COP < PC < PMP < PET$ の順に大きくなった。N500 では、吸着量は $PC \leq PET \leq PMP \leq COP$ となったが、N0 の場合と比較すると、素材間の吸着量の差は小さかった。一方、pH 7 における mAb の吸着量は、N0 では $COP < PC < PMP < PET$ の順に大きくなり、N500 の条件では、 $PC \leq COP \leq PET < PMP$ となった。N0 と N500 を比較すると、塩濃度増加により、PET と PC では吸着量が減少したが、COP では増加し、PMP では変化しなかった。

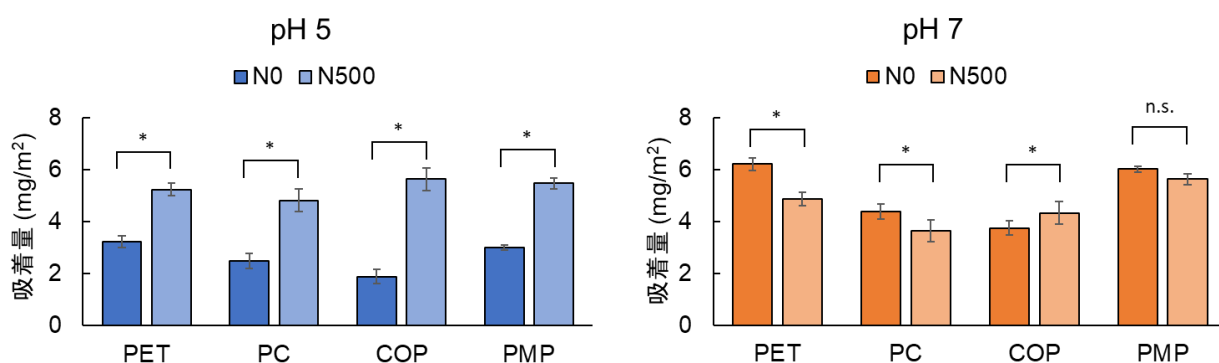


図 26: (a) pH 5 および (b) pH 7 における、5 種類の材質のシリンジ表面へのタンパク質吸着量の塩濃度依存性。N0: 0 mM NaCl, N500: 500 mM NaCl。* $p < 0.05$ 。

シリンジへの吸着量と、シリンジおよびタンパク質の物理化学的特性との相関解析

第 2 章および第 3 章の結果より、GLS, PET, PC, COP, および PMP のシリンジバレルのゼータ電位および接触角と吸着量との間に相関があると考えた。タンパク質については、表面との静電相互作用に対してタンパク質のゼータ電位が、さらに、タンパク質間相互作用が吸着量に寄与すると考えた。そこで、JMP Pro 16 を用いて、タンパク質とシリンジバレルのゼータ電位差 $\Delta\zeta_{mAb-sur}$ 、タンパク質の第二ビリアル係数 B_{22} 、シリンジバレルの接触角 γ_{sur} の 3 つの物理化学パラメータと、タンパク質の実測吸着量との重回帰分析を行い、

各パラメータの回帰係数（式 9 の a_1 , b_1 , c_1 , d_1 ）を算出した。その結果、 $a_1 = -0.012$, $b_1 = -3.6 \times 10^3$, $c_1 = 9.6 \times 10^{-4}$, $d_1 = 4.7$ と算出された。吸着予測式は以下のように表される。

$$A = -0.012 \times \Delta\zeta_{mAb-sur} - 3.6 \times 10^3 \times B_{22} + 9.6 \times 10^{-4} \times \gamma_{sur} + 4.7 \quad (\text{式 11})$$

用いたデータ点の、予測式 11 から算出した予測吸着量と、実測の吸着量とをプロットした結果が図 27 である。予測式の精度の指標である、 R^2 値、自由度調整 R^2 値、および誤差の標準偏差（RMSE）はそれぞれ、0.36, 0.30, 1.5 となり、予測吸着量と実測吸着量との相関は低く、上記 3 つのパラメータを用いて、すべての表面バレルへのタンパク質の吸着量を式 11 で予測することは難しいと示唆された。

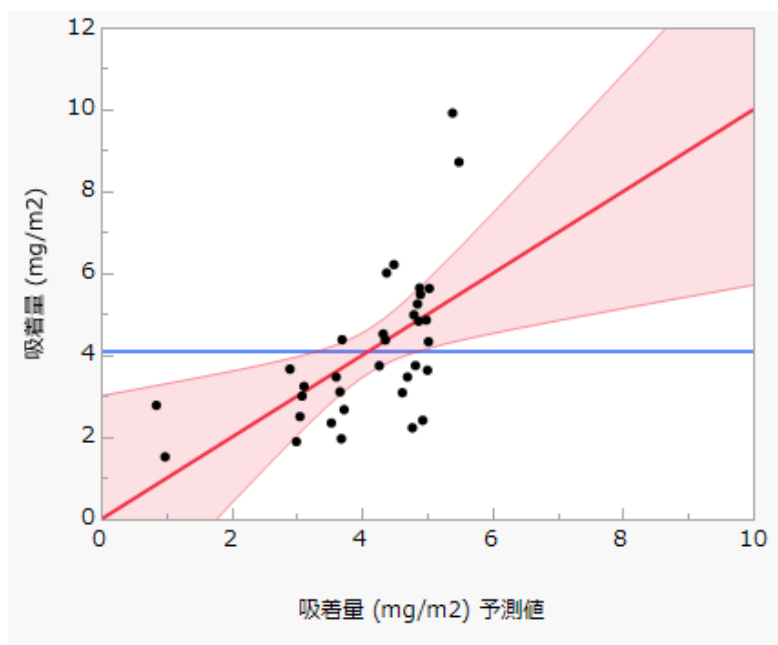


図 27: 式 11 による吸着量予測値と吸着量実測値のプロット。

次に、図 26 の結果をもとに、ポリマーPFS に限定して吸着モデルの立式を試みた。図 26 の結果をポリマーの接触角に対する吸着量にプロットし直したグラフが図 28 である。全体として、mAb の吸着量は接触角が約 90° となる場合に最小になる傾向が示された。これまでの考察と図 25 (c)および図 28 から、タンパク質の吸着量に対する静電相互作用は、接触角が大きくなるにつれ減少する負の相関を持つことから静電相互作用の寄与は接触角と反比例するものと仮定し、一方、タンパク質吸着量に対する疎水性相互作用は、接触角が大

きくなるにつれ増加する（比例する）ものと仮定した。そこで、シリンジバレルの接触角 γ_{sur} 、接触角の逆数 $1/\gamma_{sur}$ 、タンパク質の第二ビリアル係数 B_{22} 、の 3 つのパラメータと、タンパク質の実測吸着量との重回帰分析を行い、各パラメータの回帰係数（式 8 の a_2 , b_2 , c_2 , d_2 ）を算出した。データセットは図 28 の 16 点を用いた。その結果、 $a_2 = 0.19$, $b_2 = 1.3 \times 10^3$, $c_2 = -5.7 \times 10^3$, $d_2 = -27.8$ が得られた。したがって、吸着予測式は以下のよう
に表せる。

$$A = 0.19 \times \gamma_{sur} + 1.3 \times 10^3 \times 1/\gamma_{sur} - 5.7 \times 10^3 \times B_{22} - 27.8 \quad (\text{式 12})$$

予測式 12 から算出した接触角に対する予測吸着量変化と、各条件における実測の吸着量とをプロットした結果が図 29 (a)であり、全条件の予測値に対する実測値のプロットが図 29 (b)である。予測式の精度の指標である、 R^2 値、自由度調整 R^2 値、および誤差の標準偏差 (RMSE) はそれぞれ、0.80, 0.75, 0.65 と算出され、予測吸着量と実測吸着量との間には高い相関があり、上記 3 つのパラメータを用いてポリマー-PFS バレルへの mAb の吸着量が予測できることが分かった。

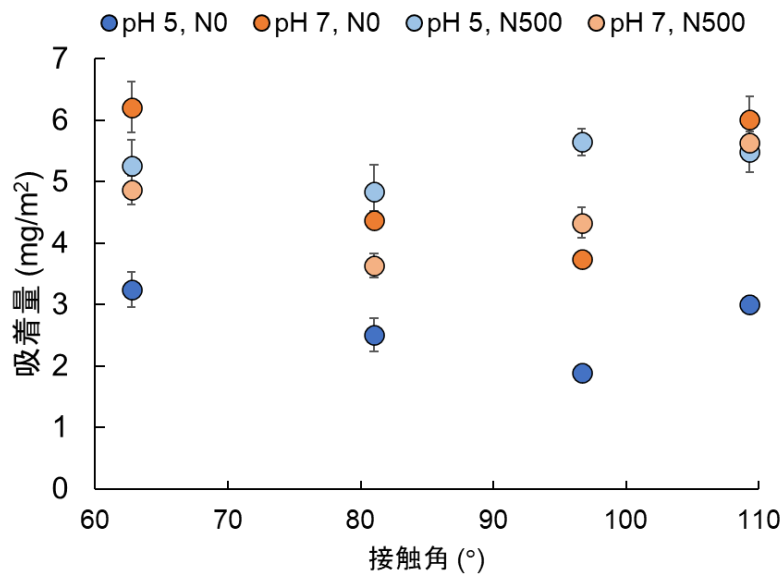


図 28: 接触角に対する mAb の吸着量のプロット。青：pH 5, 0 mM NaCl における吸着量、橙：pH 7, 0 mM NaCl における吸着量、薄青：pH 5, 500 mM NaCl における吸着量、薄橙：pH 7, 500 mM NaCl における吸着量。

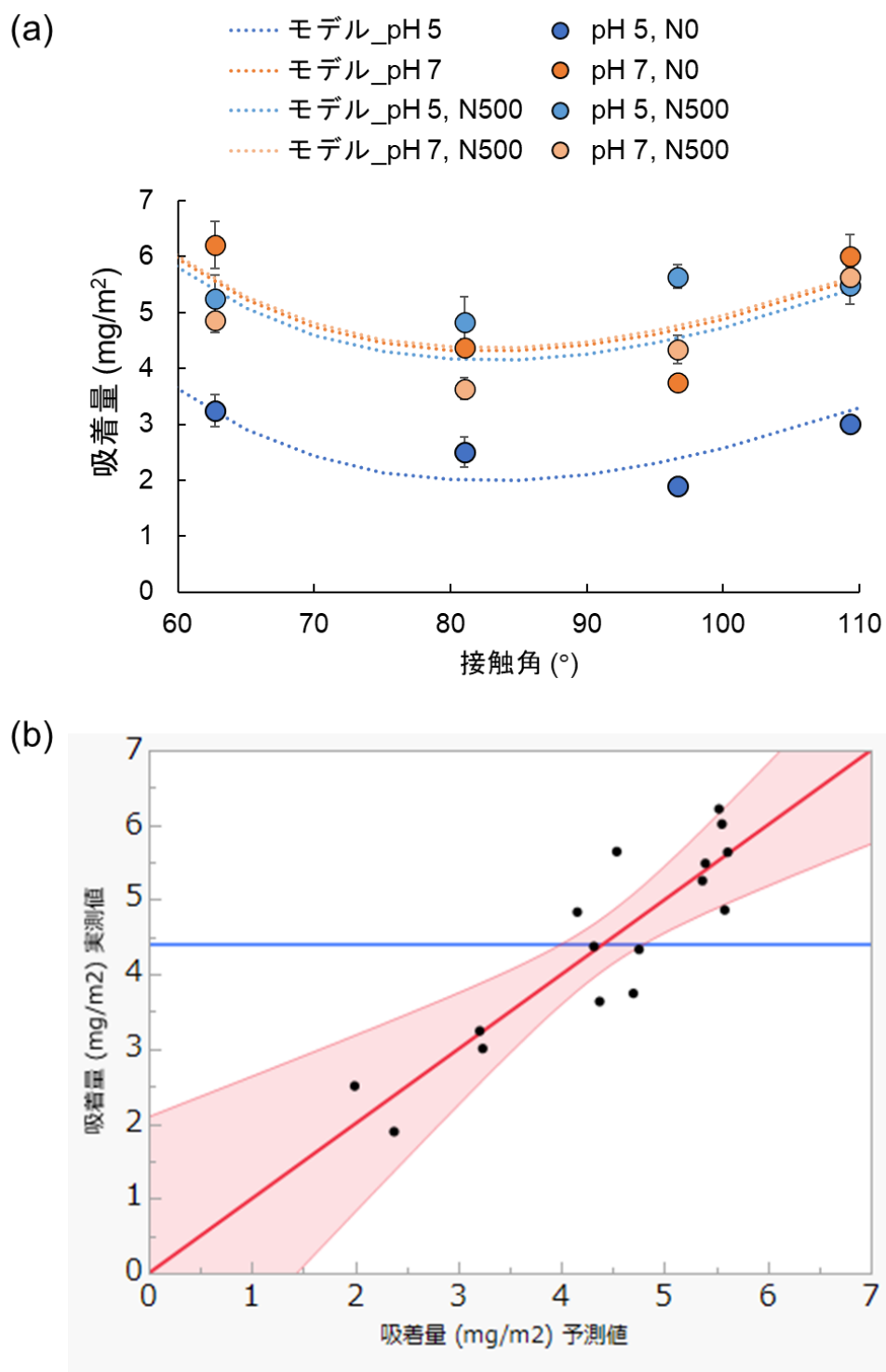


図 29: (a) 各溶液条件における、タンパク質吸着量の接触角依存性を示したモデルプロットと実際の吸着量。(b) 式 12 による吸着量予測値と吸着量実測値のプロット。

第4節 考察

mAb のシリンジへの吸着量の pH および塩濃度依存性

mAb のシリンジへの吸着量は、タンパク質溶液の pH と塩濃度に依存して変化した。図 22 の結果より、mAb の吸着に寄与する相互作用を考察した。第 1 章でも述べた通り、タンパク質の固液界面への吸着に対しては、タンパク質と表面との相互作用および、タンパク質間（表面に吸着したタンパク質と溶液中のタンパク質の間）の相互作用の両方が影響していると考えられる^{97,98,104}。本章の結果に対しても、上記 2 種類の相互作用について考える必要がある。シリンジ表面は pH 4~9 において負の電位を示し、一方、mAb は pH 5 では +13 mV、pH 7 では +4 mV を示すことから、mAb の静電相互作用による表面への直接の吸着は、pH 5 の方が pH 7 より多いはずであり、さらに塩を添加すると静電相互作用が弱まり、pH 5 での表面への直接の吸着は減少するはずである。一方で、タンパク質の分子間斥力（静電斥力）は pH 5 の方が pH 7 より大きく（第 2 章第 3 節、図 6, 7 参照）、pH 5 で塩を添加した高塩濃度条件下では、静電遮蔽によりタンパク質分子の表面電位が低下し、電気的な相互作用も減少し斥力が減少すると考えられる^{99,105}。実際、mAb 分子の分散安定性が良い（タンパク質間の斥力が大きい）pH 5 においても、塩の添加により静電遮蔽が起こり、分散安定性は低下していた（図 7, 表 3）。吸着量の定量結果は、pH 5 においては、どのシリンジ表面においても、塩濃度増加により mAb の吸着量は増加していた（図 26）。この結果は以下のように解釈できる。pH 5 では、N0 においては、mAb とシリンジ表面との静電相互作用による直接の吸着が主であり、吸着した mAb にさらに mAb が結合することはほとんど起こらない（mAb の第二ビリアル係数の値が正のため、図 7, 表 3 参照）。一方、N500 では静電遮蔽の効果によって、表面とタンパク質との疎水性相互作用およびタンパク質分子間の相互作用が強まり、表面に吸着した mAb 層へさらに別の mAb が結合しやすくなったため、全体の吸着量が増加したのである。

pH 7 では、mAb はわずかに正の電位をもっているが、等電点に近く mAb の疎水表面はほぼむきだしの状態である（図 10）。pH 7 における分散安定性は N0 の場合でも低く、塩濃

度を増加させても第 2 ビリアル係数 B_{22} の符号は変化しない (図 7, 表 3)。そのため、pH 7 においては、N0 条件下でもタンパク質とシリンジ表面との直接の相互作用による吸着に加え、タンパク質間の相互作用によるさらなる吸着層の形成も起こると考えられる。N500 では PET や PC など比較的接触角の小さい表面上への吸着量が減少したが、比較的接触角の大きい COP では増加し、PMP への吸着量は変化しなかった。つまり、親水性表面への mAb の静電相互作用による吸着は mAb が静電遮蔽を受けたことによって相互作用が減少したが、疎水性表面と mAb との吸着は、静電相互作用が減少したとしても、それを補う疎水性相互作用が存在し、およびタンパク質分子間どうしの相互作用が促進されたため、変化がなかった、または増加したと考えられる。以上より、本章で得られた結果は、第 2 章で示唆されていた mAb の吸着は親水性表面と疎水性表面とでタンパク質とシリンジ間の主要な相互作用が異なるという考えを支持しており、さらに、親水性表面への吸着ではタンパク質と表面間の静電相互作用の寄与が大きい、疎水表面への吸着ではタンパク質と表面間での疎水相互作用の寄与が大きくなると結論づけられる。

シリンジへの吸着量と、シリンジおよびタンパク質の物理化学的特性との相関解析

タンパク質の吸着量と物理化学パラメータとの相関解析には、タンパク質吸着量測定とその考察より、タンパク質と PFS の静電相互作用の要因となると考えられる、タンパク質と PFS バレルの表面電位の差と、タンパク質間の相互作用の指標となる B_{22} , およびバレルの疎水性の指標となると考えられる PFS バレル接触角を用いた。予測式 11 は、実際の吸着量を予測するには精度が低い結果となったが、これは、表面の GLS への吸着量も加味したためであると考えられる。実際、GLS の構造は、ほかのポリマー類とは異なり、構造内に酸素原子を多く含んでおり、さらには表面に解離の酸素基が露出したものとなっている (図 23 (b))。そのため、ほかのポリマーとは、電気性と疎水性の関係性が異なるため、予測式を立てる際には同時に用いるべきではないと考えた。そこで、表 6 の吸着量予測式用のデータセットより、GLS のデータ点を省き、ポリマーのみで吸着予測式の立式を行った。

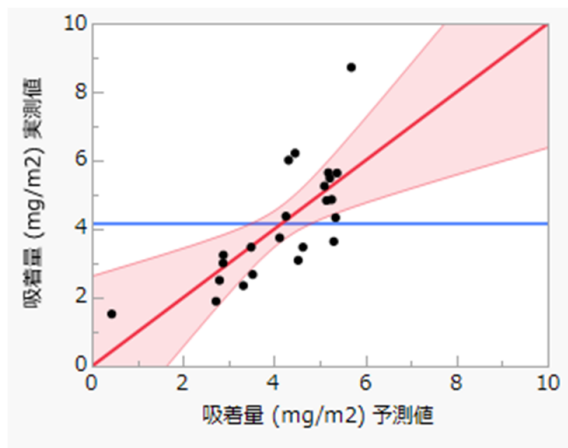
図 30 (a)に示す通り、 R^2 値、自由度調整 R^2 値、および誤差の標準偏差 (RMSE) はそれぞれ、0.56, 0.50, 1.2 となり、GLS のデータ点を含んだ場合よりも精度は向上したと言えるが、その精度は不十分であった。

これまでの考察より、接触角が増加するにしたがって疎水性相互作用の寄与が大きくなる一方で、静電相互作用の寄与は減少することが示唆された。そのため、疎水相互作用は接触角の大きさ γ_{sur} 、静電相互作用は接触角に反比例すると仮定し $1/\gamma_{sur}$ をパラメータとして、mAb と表面との直接の吸着を表せると仮説を立てた。実際の吸着量は、表面に吸着したタンパク質層への吸着もあることから、 γ_{sur} 、 $1/\gamma_{sur}$ に加え、タンパク質間の相互作用の指標となる mAb の B_{22} もパラメータに用いて、吸着予測式の立式を行った。図 29 に示した通り、これらのパラメータにより、吸着量実測値を表すことのできる予測式を立式することができた (式 12)。第 2 章の図 13 の、pH 5, 7, N0, N500 における GLS への吸着量を含めた場合は、予測式の精度は低下した (図 30 (b))。先述のとおり、ポリマーバレルと GLS バレルとでは、その物理化学的性質、およびそれに起因する吸着機構が異なる可能性が考えられる。従って、ポリマーPFS バレルの接触角および第二ビリアル係数 B_{22} のみを用いた予測式の適用範囲は限定的となるが、これらの情報から吸着予測式が構築できたことは、今後、新規ポリマー素材への抗体の吸着量予測が、より迅速にできる可能性を示唆する重要な知見となった。これにより、抗体医薬品の処方、さらには包装形態の選択がより迅速に行える可能性が広がる。

以上の結果から、ポリマーPFS バレルへのタンパク質の吸着量を最小限にとどめる戦略は、1. タンパク質の溶液中の分散安定性の向上と、2. シリンジバレルは適度な疎水度をもつことであると言える。1. については、タンパク質が自己会合しづらい条件、つまり、タンパク質が正電荷または負電荷を帯びているような条件に設定される必要がある。例えば、mAb の pH 5, または CTLA4-Ig の pH 7 の条件がそれに該当する。2. については、本研究で発見されたユニークな知見であると言えるが、シリンジバレルは 90° 程度の接触角をもつもの (親水性、疎水性の中間をもつもの) が、吸着量の低減に適していることを示唆す

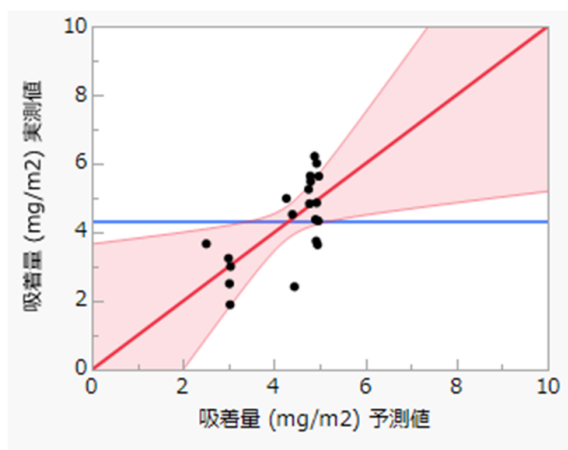
る。これは、PFS バレルとタンパク質の相互作用において、接触角に比例して増大する疎水性相互作用と、接触角に反比例する静電相互作用の合計が最小限になる条件であるからであると考えられ、今後、新規医療用ポリマーの開発における重大な指標となる。

(a)



$$\text{予測式} : A = -0.02 \times \Delta\zeta_{mAb-sur} - 4.2 \times 10^3 \times B_{22} + 2.5 \times 10^{-3} \times \gamma_{sur} + 4.9$$

(b)



$$\text{予測式} : A = 5.9 \times 10^{-4} \times \gamma_{sur} - 2.59 \times 1/\gamma_{sur} - 4.7 \times 10^3 \times B_{22} + 4.7$$

図 30: (a) 表 6 に示した吸着量予測式用のデータセットから GLS のデータセットを省き、予測式 9 を立てた場合の吸着量の予測値と実測値のプロット。 R^2 値、自由度調整 R^2 値、および誤差の標準偏差 (RMSE) はそれぞれ、0.56, 0.50, 1.2。 (b) 図 28 の吸着条件 16 点と図 13 における GLS の吸着量 (pH: 5, 7, NaCl: 0, 500 mM) 4 条件の計 20 点を用いて、予測式 10 を立てた場合の吸着量の予測値と実測値のプロット。 R^2 値、自由度調整 R^2 値、および誤差の標準偏差 (RMSE) はそれぞれ、0.46, 0.36, 1.0。

第5節 小括

本章では、医療用抗体アダリムマブ (mAb) の様々な物性を持つポリマーシリンジ表面への吸着量の定量および吸着量予測モデル式の立式を行った。

mAb 吸着量の pH および塩濃度依存性より、mAb の吸着を支配する相互作用は、シリンジ表面の持つ疎水度によって異なることが示唆された。親水性の高い表面 (接触角が 90° 以下) の表面、PET や PC では、mAb とシリンジ表面との静電相互作用が吸着にかかわる主要な相互作用となっていることが示唆された。一方、疎水性の高い表面 (接触角が 90° 以上) の表面、COP、PMP などの表面においては、mAb とシリンジ表面との静電相互作用の影響は低減し、疎水性相互作用の寄与が出てくることが示唆された。これらの結果から、疎水相互作用はバレル表面の接触角に比例して大きくなる一方で、静電相互作用はバレル表面の接触角とは反比例している可能性を考え、シリンジ表面の接触角 γ_{sur} とその逆数 $1/\gamma_{sur}$ を吸着予測モデルに組み込んだ。さらに、PFS バレルへの吸着は、mAb とバレル表面の直接吸着のみならず、タンパク質間の相互作用も関係する可能性があったため、タンパク質の B_{22} を含めた 3 つのパラメータを用いて、タンパク質の吸着量は予測できることを示した。

以上の結果から、タンパク質の吸着量を最小限にとどめる戦略は、1. タンパク質の溶液中の分散安定性の向上、2. シリンジバレルは適度な疎水度をもつこと、であると言える。さらに、タンパク質と PFS バレルとの相互作用を低減させる手法として、親水性表面側への吸着に対しては、タンパク質および PFS バレルの静電相互作用を低下させるために、両者の電荷をなくすことが有効であると考えられる。これは、溶液の塩濃度を上昇させることにより達成できる。疎水性表面側への吸着に対しては、タンパク質とバレル表面との疎水相互作用を低下させるため、界面活性剤を用いてこの両者の相互作用を抑制することが効果的であると考えられる。

今回精度の高かった吸着予測モデルは mAb の溶液 4 条件、4 種類のポリマーの物理化学的パラメータおよび吸着量の 16 点分から得られる結果であったが、複合的なパラメータによって決定されるタンパク質の一般性の高い吸着予測モデルの構築には、今後、様々な抗

体やシリンジバレルにおける吸着量について、複数の溶液 pH やイオン強度におけるビッグデータを収集する必要があると考えられる。本研究における吸着量測定や、物理化学的パラメータの取得のプロトコルはある程度の時間を要する測定法であったため、今後、多くの条件でのタンパク質やシリンジバレルの物理化学的特性、およびタンパク質の吸着量を迅速に測定可能なハイスループットな測定プロトコルの開発によって、吸着予測モデルの精密化を期待する。

第4章 総括

本研究によって、治療用タンパク質の PFS バレルへの吸着は、材料表面に吸着されたタンパク質の層と表面のタンパク質に吸着されたタンパク質の層からなる多層構造を形成することが明らかとなった。親水性の高い表面から成る PFS バレルへの吸着には静電相互作用の寄与が、疎水性の高い表面から成る PFS バレルへの吸着には疎水性相互作用の寄与が大きいことも示された。さらに、mAb のポリマーPFS バレルへの吸着量は、主にはシリンジバレル素材の接触角とタンパク質間相互作用の指標である第二ビリアル係数によって予測できることが示された。

タンパク質医薬品は、薬物活性をもつタンパク質の等電点よりも低い pH で処方されることが多いことを考慮すると、親水性表面へのタンパク質の吸着は、負に帯電したバレル表面と正に帯電したタンパク質との間の静電相互作用によって支配されると考えられる。親水性表面へのタンパク質の吸着は、イオン強度の高い溶液における遮蔽効果によって低減できる。一方で、そのような条件下においては、タンパク質のコロイド安定性が低下するため、親水性表面上に吸着したタンパク質へのほかのタンパク質分子の吸着（結合）を増加させることにつながり、タンパク質凝集体の発生を引き起こす。そのため、表面への吸着を比較的少なく、コロイド安定性を保つことのできる妥協の結果として、比較的低いイオン強度の溶媒を使用することになると考えられ、親水性表面を持つバレルへの吸着を最小限に抑えることは、実製剤においては今のところ難しいと考えられる。

一方、疎水性表面へのタンパク質の吸着は、疎水性相互作用の寄与が支配的となる。そのため、タンパク質が電荷を帯びタンパク質間の相互作用が減少する条件、つまり、タンパク質分子のコロイド安定性が高い条件では、吸着が最小限に抑えられる。さらに、界面活性剤を使用したタンパク質吸着の抑制が、疎水性を示す COP 表面に対してより効果的であったことは、疎水性ポリマー素材バレルへの吸着・凝集抑制は、親水性素材バレルより少ない添加剤（主には界面活性剤）の使用で達成できると言え、今後、添加剤の劣化や分解による懸念も払拭できる。

現在の治療用抗体医薬品は、100 mg/mL 以上のように高濃度であり、本研究とは異なる条件である、シリコンオイル潤滑剤が塗布された注射器に充填されている。したがって、この研究で提案されたメカニズムは、現在汎用されている治療用抗体で発生する現象を説明したものではないが、今後、包装形態を含めた医薬品開発において非常に有用であると言える。タンパク質医薬品の場合、吸着/脱離による医薬品有効成分の損失とタンパク質凝集が懸念されるため、本研究によるタンパク質吸着メカニズムの包括的な解明は、より安全で効果的な医薬品の開発に大きく貢献できる。

参考文献

1. Volkin DB, Hershenson S, Ho RJY, Uchiyama S, Winter G, Carpenter JF. Two Decades of Publishing Excellence in Pharmaceutical Biotechnology. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):290-300. doi:10.1002/jps.24285.
2. Waters R, Urquhart L. World Preview 2019, Outlook to 2024. *Eval Pharma.* 2019;(12th Edition,June):1-26.
3. Moussa EM, Panchal JP, Moorthy BS, et al. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):417-430. doi:10.1016/j.xphs.2015.11.002
4. Uchino T, Miyazaki Y, Yamazaki T, Kagawa Y. Immunogenicity of protein aggregates of a monoclonal antibody generated by forced shaking stress with siliconized and nonsiliconized syringes in BALB/c mice. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(10):1341-1351. doi:10.1111/jphp.12765
5. Obscurtion L, Count P. United States Pharmacopeia <788>thirty sixth ed., United States Pharmacopeial. Published online 2013:1-3.
6. 6.17 タンパク質医薬品注射剤の不溶性微粒子試験法. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA)
7. Li J, E. KM, Tu Raymond. Protein Instability at Interfaces During Drug Product Development Fundamental Understanding, Evaluation, and Mitigation. Published online 2021. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-57177-1
8. Zhao J, Lavalley V, Mangiagalli P, Wright JM, Bankston TE. Glass Delamination: a Comparison of the Inner Surface Performance of Vials and Pre-filled Syringes. *Ageing Int.* 2014;15(6):1398-1409. doi:10.1208/s12249-014-0167-y
9. Srinivasan C, Ma Y, Liu Y, et al. Quality attributes and evaluation of pharmaceutical glass containers for parenterals. *Int J Pharm.* Published online 2019. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118510
10. Reynolds G, Paskiet D. Glass delamination and breakage. *Bioprocess Int.* Published online 2011.
11. Krayukhina E, Yoneda S, Koga H, Maruno T, Uchiyama S. バイオ医薬品の分析のコツ 品質評価のための基礎と応用、第10回 タンパク質の凝集と凝集体評価. *PHARM TECH JAPAN.* 2018;23(7):121-131.
12. Fischer H, Polikarpov I, Craievich AF. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci.* 2009;13(10):2825-2828. doi:10.1110/ps.04688204
13. Folzer E, Khan TA, Schmidt R, et al. Determination of the Density of Protein Particles Using a Suspended Microchannel Resonator. *J Pharm Sci.* 2015;104(12):4034-4040. doi:10.1002/jps.24635
14. Demeule B, Messick S, Shire SJ, Liu J. Characterization of particles in protein solutions: Reaching the limits of current technologies. *AAPS J.* 2010;12(4):708-715.

doi:10.1208/s12248-010-9233-x

15. Sharma DK, King D, Oma P, Merchant C. Micro-flow imaging: Flow microscopy applied to sub-visible particulate analysis in protein formulations. *AAPS J.* 2010;12(3):455-464. doi:10.1208/s12248-010-9205-1
16. Yoneda S, Niederleitner B, Wiggenhorn M, 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.* 2019;108(1):755-762. doi:10.1016/j.xphs.2018.09.004
17. Yoneda S, Uchiyama S. 第6章 分散を目的とした界面活性剤の選択と使用、分散状態の評価 第5節 バイオ医薬品のタンパク質分散に使用される界面活性剤. 界面活性剤の選び方、使い方 事例集. Published online 2019.
18. FDA C. Immunogenicity testing of therapeutic protein products — developing and validating assays for anti-drug antibody detection. *United States Food Drug Adm.* 2019;(January):1-33. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
19. Uchino T, Miyazaki Y, Yamazaki T, Kagawa Y. Immunogenicity of protein aggregates of a monoclonal antibody generated by forced shaking stress with siliconized and nonsiliconized syringes in BALB/c mice. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(10):1341-1351. doi:10.1111/jphp.12765
20. Krayukhina E, Yokoyama M, Hayashihara KK, et al. 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. *J Pharm Sci.* 2019;108(7):2278-2287. doi:10.1016/j.xphs.2019.02.002
21. Kiyoshi M, Shibata H, Harazono A, et al. Collaborative Study for Analysis of Subvisible Particles Using Flow Imaging and Light Obscuration: Experiences in Japanese Biopharmaceutical Consortium. *J Pharm Sci.* 2019;108(2):832-841. doi:10.1016/j.xphs.2018.08.006
22. Gambe-Gilbuena A, Shibano Y, Krayukhina E, Torisu T, Uchiyama S. Automatic Identification of the Stress Sources of Protein Aggregates Using Flow Imaging Microscopy Images. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):614-623. doi:10.1016/j.xphs.2019.10.034
23. Ahmadi M, Bryson CJ, Cloake EA, et al. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm Res.* 2015;32(4):1383-1394. doi:10.1007/s11095-014-1541-x
24. Maruno T, Watanabe H, Yoneda S, et al. Sweeping of Adsorbed Therapeutic Protein on Prefillable Syringes Promotes Micron Aggregate Generation. *J Pharm Sci.* 2018;107(6):1521-1529. doi:10.1016/j.xphs.2018.01.021
25. Uchiyama S. Liquid formulation for antibody drugs. *Biochim Biophys Acta - Proteins*

- Proteomics*. 2014;1844(11):2041-2052. doi:10.1016/j.bbapap.2014.07.016
26. Uchiyama S. Biophysical characterization of biopharmaceuticals, including antibody drugs. *Yakugaku Zasshi*. 2016;136(3):443-448. doi:10.1248/yakushi.15-00236-2
 27. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Tomitsuka T, Uchiyama S, Fukui K. Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: Influence of colloidal and conformational stabilities. *Pharm Res*. 2013;30(5):1263-1280. doi:10.1007/s11095-012-0965-4
 28. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Kishi N, Uchiyama S, Fukui K. Behavior of Monoclonal Antibodies: Relation between the Second Virial Coefficient (B_2) at Low Concentrations and Aggregation Propensity and Viscosity at High Concentrations. *Pharm Res*. 2012;29(2):397-410. doi:10.1007/s11095-011-0563-x
 29. Torisu T, Maruno T, Yoneda S, et al. Friability Testing as a New Stress-Stability Assay for Biopharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 2017;106(10):2966-2978. doi:10.1016/j.xphs.2017.05.035
 30. Torisu T, Maruno T, Hamaji Y, Ohkubo T, Uchiyama S. Synergistic Effect of Cavitation and Agitation on Protein Aggregation. *J Pharm Sci*. Published online 2017. doi:10.1016/j.xphs.2016.10.015
 31. Randolph TW, Schiltz E, Sederstrom D, et al. Do not drop: Mechanical shock in vials causes cavitation, protein aggregation, and particle formation. *J Pharm Sci*. 2015;104(2):602-611. doi:10.1002/jps.24259
 32. Rudiuk S, Cohen-Tannoudji L, Huille S, Tribet C. Importance of the dynamics of adsorption and of a transient interfacial stress on the formation of aggregates of IgG antibodies. *Soft Matter*. 2012;8(9):2651-2661. doi:10.1039/c2sm07017k
 33. Renuka Thirumangalathu, Sampathkumar Krishnan, Margaret Speed Ricci, David N Brems, Theodore W Randolph JFC. Silicone Oil- and Agitation-Induced Aggregation of a Monoclonal Antibody in Aqueous Solution. *J Pharm Sci*. 2009;98(9):3167-3181. doi:10.1038/jid.2014.371
 34. Jones LS, Kaufmann A, Middaugh CR. Silicone oil induced aggregation of proteins. *J Pharm Sci*. 2005;94(4):918-927. doi:10.1002/jps.20321
 35. Kim NA, Hada S, Kim DJ, Choi DH, Jeong SH. Off-label use of plastic syringes with silicone oil for intravenous infusion bags of antibodies. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021;166:205-215. doi:10.1016/j.ejpb.2021.07.001
 36. Koepf E, Schroeder R, Brezesinski G, Friess W. The film tells the story: Physical-chemical characteristics of IgG at the liquid-air interface. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;119:396-407. doi:10.1016/j.ejpb.2017.07.006
 37. Koepf E, Richert M, Braunschweig B, Schroeder R, Brezesinski G, Friess W. Impact of formulation pH on physicochemical protein characteristics at the liquid-air interface. *Int J Pharm*. 2018;541(1-2):234-245. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.02.009
 38. Koepf E, Eisele S, Schroeder R, Brezesinski G, Friess W. Notorious but not understood:

- How liquid-air interfacial stress triggers protein aggregation. *Int J Pharm.* 2018;537(1-2):202-212. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.12.043
39. Gerhardt A, McGraw NR, Schwartz DK, Bee JS, Carpenter JF, Randolph TW. Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes. *J Pharm Sci.* 2014;103(6). doi:10.1002/jps.23973
 40. Yoneda S, Torisu T, Uchiyama S. Development of syringes and vials for delivery of biologics: current challenges and innovative solutions. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021;18(4):459-470. doi:10.1080/17425247.2021.1853699
 41. Liu JL, Lu K V., Eris T, et al. In vitro methionine oxidation of recombinant human leptin. *Pharm Res.* 1998;15(4):632-640. doi:10.1023/A:1011998331254
 42. He F, Woods CE, Litowski JR, et al. Effect of sugar molecules on the viscosity of high concentration monoclonal antibody solutions. *Pharm Res.* 2011;28(7):1552-1560. doi:10.1007/s11095-011-0388-7
 43. Bye JW, Falconer RJ. Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: A reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability. *Protein Sci.* 2013;22(11):1563-1570. doi:10.1002/pro.2355
 44. Gerhardt A, Bonam K, Bee JS, Carpenter JF, Randolph TW. Ionic strength affects tertiary structure and aggregation propensity of a monoclonal antibody adsorbed to silicone oil-water interfaces. *J Pharm Sci.* 2013;102(2):429-440. doi:10.1002/jps.23408
 45. Li J., Krause M.E. TR. Overview of the Impact of Protein Interfacial Instability on the Development of Biologic Products. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences. AAPS *Adv Pharm Sci.* 2021;43.
 46. Shimizu S, Smith DJ. Preferential hydration and the exclusion of cosolvents from protein surfaces. *J Chem Phys.* 2004;121(2):1148-1154. doi:10.1063/1.1759615
 47. Ionova Y, Wilson L. Biologic excipients: Importance of clinical awareness of inactive ingredients. *PLoS One.* 2020;15(6):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0235076
 48. Hauptmann A, Podgoršek K, Kuzman D, Srčič S, Hoelzl G, Loerting T. Impact of Buffer, Protein Concentration and Sucrose Addition on the Aggregation and Particle Formation during Freezing and Thawing. *Pharm Res.* 2018;35(5). doi:10.1007/s11095-018-2378-5
 49. Kamerzell TJ, Esfandiary R, Joshi SB, Middaugh CR, Volkin DB. Protein-excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(13):1118-1159. doi:10.1016/j.addr.2011.07.006
 50. Hitoshi Y, Sugie S. 医薬品分野における界面活性剤. *オレオサイエンス.* 2002;2(11):697-704.
 51. Honda S, Miyafusa T, Imamura H, Watanabe H, Oishi A. 蛋白質の安定性分析と安定化設計（後編）. *PHARM TECH JAPAN.* 2018;34(5):107-115.
 52. Grapentin C, Müller C, Kishore RSK, et al. Protein-Polydimethylsiloxane Particles in Liquid Vial Monoclonal Antibody Formulations Containing Poloxamer 188. *J Pharm Sci.*

2020;109:2393-2404. doi:10.1016/j.xphs.2020.03.010

53. Paschen CA, Klemm D, Graf T, et al. Simultaneous quantification of polysorbate 20 and poloxamer 188 in biopharmaceutical formulations using evaporative light scattering detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2021;192. doi:10.1016/j.jpba.2020.113640
54. Li J, Pinnamaneni S, Quan Y, Jaiswal A, Andersson FI, Zhang X. Mechanistic understanding of protein-silicone oil interactions. *Pharm Res.* 2012;29(6):1689-1697. doi:10.1007/s11095-012-0696-6
55. Höger K, Mathes J, Frieß W. IgG1 adsorption to siliconized glass vials-influence of pH, ionic strength, and nonionic surfactants. *J Pharm Sci.* 2015;104(1):34-43. doi:10.1002/jps.24239
56. Kishore RSK, Kiese S, Fischer S, Pappenberger A, Grauschopf U, Mahler H. The Degradation of Polysorbates 20 and 80 and its Potential Impact on the Stability of Biotherapeutics. Published online 2011:1194-1210. doi:10.1007/s11095-011-0385-x
57. Dwivedi M, Blech M, Presser I, Garidel P. Polysorbate degradation in biotherapeutic formulations: Identification and discussion of current root causes. *Int J Pharm.* 2018;552(1-2):422-436. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.10.008
58. Roy I, Patel A, Kumar V, et al. Polysorbate Degradation and Particle Formation in a High Concentration mAb: Formulation Strategies to Minimize Effect of Enzymatic Polysorbate Degradation. *J Pharm Sci.* 2021;110(9):3313-3323. doi:10.1016/j.xphs.2021.05.012
59. Ampoules CG. James Alexander Corporation. (908):1-2.
60. Asakura T, Seino H, Nozaki S, Abe R. Occurrence of coring in insulin vials and possibility of rubber piece contamination by self-injection. *Yakugaku Zasshi.* 2001;121(6):459-463. doi:10.1248/yakushi.121.459
61. Preston ST, Hegadoren K. Glass contamination in parenterally administered medication. *J Adv Nurs.* 2004;48(3):266-270. doi:10.1111/j.1365-2648.2004.03195.x
62. Basu B, Dharamsi A, Makwana S, Makasana Y. Prefilled syringes: An innovation in parenteral packaging. *Int J Pharm Investig.* 2011;1(4):200. doi:10.4103/2230-973x.93004
63. Li J, Cheng Y, Chen X, Zheng S. Impact of electroviscous effect on viscosity in developing highly concentrated protein formulations: Lessons from non-protein charged colloids. *Int J Pharm X.* 2019;1(December 2018):100002. doi:10.1016/j.ijpx.2018.100002
64. De Bardi M, Müller R, Grünzweig C, et al. On the needle clogging of staked-in-needle pre-filled syringes: Mechanism of liquid entering the needle and solidification process. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;128:272-281. doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.006
65. Baldwin RN. Contamination of Insulin by Silicone Oil: a Potential Hazard of Plastic Insulin Syringes. *Diabet Med.* Published online 1988. doi:10.1111/j.1464-5491.1988.tb01109.x
66. Liu J, Ronk M, Fujimori K, Lee H, Nashed-Samuel Y. Analysis of Silicone Oil in Prefilled Syringes and Biopharmaceutical Drug Products Using High-Performance Liquid Chromatography. *AAPS PharmSciTech.* 2021;22(2):1-9. doi:10.1208/s12249-021-01947-6

67. Felsovalyi F, Janvier S, Jouffray S, Soukiassian H, Mangiagalli P. Silicone-oil-based subvisible particles: Their detection, interactions, and regulation in prefilled container closure systems for biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2012;101(12):4569-4583. doi:10.1002/jps.23328
68. Werner BP, Schöneich C, Winter G. Silicone Oil-Free Polymer Syringes for the Storage of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci.* 2019;108(3):1148-1160. doi:10.1016/j.xphs.2018.10.049
69. Applications C, Description P. SILICONE-FREE PLUNGERS TO ENABLE DELIVERY OF COMPLEX , SENSITIVE BIOLOGICS. 2016;103(2).
https://www.gore.com/system/files/2019-11/PB8759_Rev3_MA_US_SEP19-e.pdf
70. SHOTT syringe.pdf. <https://www.schott.com/english/news/press.html?NID=com5685>
71. Kiminami H, Takeuchi K, Nakamura K, et al. Low Leachable Container System Consisting of a Polymer-Based Syringe with Chlorinated Isoprene Isobutene Rubber Plunger Stopper. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2015;69(6):713-724. doi:10.5731/pdajpst.2015.01080
72. Prefilled syringes market. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/prefilled-syringes-market-16618331.html>
73. Chow EJ, Kitaguchi B, Trier M. Effects of subzero temperature exposure and supercooling on glass vial breakage: Risk management and other applications in cold chain distribution. *PDA J Pharm Sci Technol.* Published online 2012. doi:10.5731/pdajpst.2012.00772
74. Jiang G, Akers M, Jain M, et al. Mechanistic studies of glass vial breakage for frozen formulations. II. Vial breakage caused by amorphous protein formulations. *PDA J Pharm Sci Technol.* Published online 2007.
75. Krayukhina E, Tsumoto K, Uchiyama S, Fukui K. Effects of syringe material and silicone oil lubrication on the stability of pharmaceutical proteins. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):527-535. doi:10.1002/jps.24184
76. Teska BM, Brake JM, Tronto GS, Carpenter JF. Aggregation and Particle Formation of Therapeutic Proteins in Contact With a Novel Fluoropolymer Surface Versus Siliconized Surfaces: Effects of Agitation in Vials and in Prefilled Syringes. *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2053-2065. doi:10.1016/j.xphs.2016.04.015
77. Abbott Laboratories. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION, Humira (adalimumab). Published online 2011:70.
78. Pharma's biggest bockbusters.pdf.
79. FDA F and DA. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION adalimumab. Published online 2002:70.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/125057s0276lbl.pdf
80. Bristol-Myers Squibb Company. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION, ORENCIA (abatacept). Published online 2013.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125118s171lbl.pdf
81. オレンシア製品基本情報 <https://www.orencia.jp/orencia/product/index>.

82. Sumit Majumdar, Brandi M Ford, Kevin D Mar, Vince J Sullivan, Robert G Ulrich AJMD. Evaluation of the effect of syringe surfaces on protein formulations. *J Pharm Sci.* 2012;100(7):2563-2573. doi:10.1002/jps
83. Cordes AA, Carpenter JF, Randolph TW. Accelerated stability studies of abatacept formulations: Comparison of freeze-thawing- and agitation-induced stresses. *J Pharm Sci.* 2012;101(7):2307-2315. doi:10.1002/jps.23150
84. Uchihashi T, Ganser C. Recent advances in bioimaging with high-speed atomic force microscopy. *Biophys Rev.* 2020;12(2):363-369. doi:10.1007/s12551-020-00670-z
85. Ando T, Uchihashi T, Scheuring S. Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy. *Chem Rev.* 2014;114(6):3120-3188. doi:10.1021/cr4003837
86. Yogo R, Yamaguchi Y, Watanabe H, et al. The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fcγ receptor III. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-48323-w
87. Zhang P, Liu X, Liu P, et al. Capturing transient antibody conformations with DNA origami epitopes. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-9. doi:10.1038/s41467-020-16949-4
88. Kanthe A, Ilott A, Krause M, et al. No ordinary proteins: Adsorption and molecular orientation of monoclonal antibodies. *Sci Adv.* 2021;7(35):1-14. doi:10.1126/sciadv.abg2873
89. Rabe M, Verdes D, Seeger S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;162(1-2):87-106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007
90. Latour RA. The Langmuir isotherm : A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior. Published online 2014:949-958. doi:10.1002/jbm.a.35235
91. Fogh-andersen N, Siggaard-andersen O, Poul Jannik Bjerrum. Ionic Binding, Net Charge, and Donnan Effect of Human Serum Albumin as a Function of pH. *Clin Chem.* 1993;39(1):48-52.
92. Gokarn YR, Fesinmeyer RM, Saluja A, et al. Effective charge measurements reveal selective and preferential accumulation of anions, but not cations, at the protein surface in dilute salt solutions. *Protein Sci.* 2011;20(3):580-587. doi:10.1002/pro.591
93. Filoti DI, Shire SJ, Yadav S, Laue TM. Comparative Study of Analytical Techniques for Determining Protein Charge. *J Pharm Sci.* 2015;104(7):2123-2131. doi:10.1002/jps.24454
94. Mathes J, Friess W. Influence of pH and ionic strength on IgG adsorption to vials. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;78(2):239-247. doi:10.1016/j.ejpb.2011.03.009
95. Jones K, O'Melia C. Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength. *J Memb Sci.* 2000;165:31-46. doi:10.1016/S0376-7388(99)00218-5
96. Attwood SJ, Kershaw R, Uddin S, Bishop SM, Welland ME. Understanding how charge and hydrophobicity influence globular protein adsorption to alkanethiol and material surfaces. *J Mater Chem B.* 2019;7(14):2349-2361. doi:10.1039/c9tb00168a

97. Defante AP, Kalonia CK, Keegan E, et al. The Impact of the Metal Interface on the Stability and Quality of a Therapeutic Fusion Protein. *Mol Pharm*. 2020;17(2):569-578. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b01000
98. Kalonia CK, Heinrich F, Curtis JE, Raman S, Miller MA, Hudson SD. Protein Adsorption and Layer Formation at the Stainless Steel-Solution Interface Mediates Shear-Induced Particle Formation for an IgG1 Monoclonal Antibody. *Mol Pharm*. 2018;15(3):1319-1331. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b01127
99. Chi EY, Krishnan S, Kendrick BS, Chang BS, Carpenter JF, Randolph TW. Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Sci*. 2003;12(5):903-913. doi:10.1110/ps.0235703
100. Jungbauer A, Machold C, Hahn R. Hydrophobic interaction chromatography of proteins: III. Unfolding of proteins upon adsorption. *J Chromatogr A*. 2005;1079(1-2 SPEC. ISS.):221-228. doi:10.1016/j.chroma.2005.04.002
101. Ostuni E, Grzybowski BA, Mrksich M, Roberts CS, Whitesides GM. Adsorption of proteins to hydrophobic sites on mixed self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2003;19(5):1861-1872. doi:10.1021/la020649c
102. Laue T. Proximity energies: A framework for understanding concentrated solutions. *J Mol Recognit*. 2012;25(3):165-173. doi:10.1002/jmr.2179
103. Horn J, Jena S, Aksan A, Friess W. Freeze/thaw of IGG solutions. *Eur J Pharm Biopharm*. 2019;134(December):185-189. doi:10.1016/j.ejpb.2018.12.001
104. Perevozchikova T, Nanda H, Nesta DP, Roberts CJ. Protein adsorption, desorption, and aggregation mediated by solid-liquid interfaces. *J Pharm Sci*. 2015;104(6):1946-1959. doi:10.1002/jps.24429
105. Gerhardt A, Bonam K, Bee JS, Carpenter JF, Randolph TW. Ionic strength affects tertiary structure and aggregation propensity of a monoclonal antibody adsorbed to silicone oil-water interfaces. *J Pharm Sci*. 2013;102(2):429-440. doi:10.1002/jps.23408

発表論文

- Tetsuo Torisu, Takahiro Maruno, **Saki Yoneda**, Yoshinori Hamaji, Shinya Honda, Tadayasu Ohkubo, Susumu Uchiyama. Friability Testing as a New Stress-Stability Assay for Biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2017;106(10):2966-2978.
- Takahiro Maruno, Hiroki Watanabe, **Saki Yoneda**, Takayuki Uchihashi, Satoru Adachi, Kunihiro Arai, Taichi Sawaguchi, Susumu Uchiyama. Sweeping of Adsorbed Therapeutic Protein on Prefillable Syringes Promotes Micron Aggregate Generation. *J Pharm Sci.* 2018;107(6):1521-1529.
- **Saki Yoneda**, Bertram Niederleitner, Michael Wiggenghorn, Hiroki Koga, Shinichiro Totoki, Elena Krayukhina, Wolfgang Friess, Susumu Uchiyama. Quantitative Laser Diffraction for Quantification of Protein Aggregates: Comparison With Resonant Mass Measurement, Nanoparticle Tracking Analysis, Flow Imaging, and Light Obscuration. *J Pharm Sci.* 2019;108(1):755-762. ※本学位論文に關与する原著論文
- **Saki Yoneda**, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama. Development of syringes and vials for delivery of biologics: current challenges and innovative solutions. *Expert Opin Drug Deliv.* 2021;18(4):459-470. ※本学位論文に關与する総説
- **Saki Yoneda**, Takahiro Maruno, Asuka Mori, Ayana Hioki, Haruka Nishiumi, Rio Okada, Makoto Murakami, Wang Zekun, Ayano Fukuhara, Nozomi Itagaki, Yosuke Harauchi, Satoru Adachi, Kumi Okuyama, Taichi Sawaguchi, Tetsuo Torisu, Susumu Uchiyama, Influence of Protein Adsorption on Aggregation in Prefilled Syringes. *J Pharm Sci.* 2021;110(11):3568-3579. ※本学位論文に關与する原著論文

謝辞

本研究を遂行するにあたり、厚いご指導を賜りました、大阪大学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 内山進 教授、鳥巢哲生 助教、丸野孝浩 氏、株式会社ユー・メディコ 福原彩乃 氏に謹んで感謝いたします。

本博士学位論文を作成するにあたり、ご指導を賜りました、大阪大学工学研究科生物工学専攻 生物プロセスシステム工学領域 紀ノ岡正博 教授、ならびに大阪大学工学研究科生物工学専攻 蛋白質結晶学研究室 栗栖源嗣 教授に厚く感謝申し上げます。

本研究で使用したシクロオレフィンポリマーシリンジおよびプランジャーヘッド (*i-coating*TM プランジャー) を提供していただきました、テルモ株式会社 木南英明氏、阿部吉彦氏、上田 努氏にお礼申し上げます。ポリマープレフィルドシリンジバレルの成形・提供、また、実験のご協力をいただきました、株式会社 ZEON 澤口太一氏、板垣 望氏に厚く御礼申し上げます。

そして、研究活動のみならず研究室生活において大変お世話になりました、同研究室の吸着チーム 森飛鳥氏、西海遥夏氏、日置彩那氏、村上 誠氏、Wang Zekun 氏、岡田梨櫻氏、さらに、先生、同期、諸先輩方、学生諸氏、研究員、事務補佐、株式会社ユー・メディコの方々に心から感謝いたします。

尚、本研究は日本学術振興会特別研究員奨励費（課題番号：21J10270）の助成を受けて遂行されました。

最後に、博士後期課程に進学するにあたり、理解を示し、いつも支えてくれた両親、妹、親戚一同、そして、いつも励まし応援してくれた多くの友人に深い感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。