OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	輸送時の振動周波数と加速度に着目したタンパク質医薬品凝集の解析
Author(s)	城, 慎二
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91903
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　城　慎二　）	
論文題名	輸送時の振動周波数と加速度に着目したタンパク質医薬品凝集の解析

論文内容の要旨

第1章　序論　現在，タンパク質医薬品の有効性は広く認識されているが，タンパク質医薬品が免疫原性を持つと，投与したタンパク質が異物として認識されるようになり，薬効低下や，場合によってはショック症状を引き起こす．タンパク質凝集体は免疫原性を高め得るため，タンパク質凝集の原因を理解し，凝集体を低減する必要がある．溶液製剤の場合，溶液中でのタンパク質分子同士の相互作用による凝集に加え，輸送時などの振とうで発生する物理的な力による，界面を介した凝集も知られている．物理的な力は周波数と加速度で規定できるが，これまでの研究によりタンパク質医薬品は輸送時の荷役時の落下などにより高加速度（高g）力を受けることが見出され，高g力と凝集の関係が研究されてきた．振動などの低加速度（低g）力も輸送時の凝集に関与することが示唆されたが，周波数のみを指標としており，低g力を周波数と加速度の組み合わせとして捉え，凝集への寄与を解析した先行例はなく，従って，低g力による凝集メカニズムも不明であり，適切な凝集抑制戦略が立てられていない．以上から，本博士論文では輸送時の低g力と凝集の関係を周波数と加速度の観点から明らかとすることを目的とした．

第2章　輸送時に加わる凝集を引き起こす物理的な力の特定　バイアルに充填した3種類のタンパク質溶液に，10～55 Hz及び0.7～9.7 Gの範囲で周波数と加速度を変動させて，振とうによる低g力を加えた．その結果，低い加速度では変化が認められなかったが，加速度の上昇とともに2～100 μmのミクロン凝集体濃度が急激に上昇した．このことから，加速度の上昇に伴って凝集体が徐々に増加するわけではなく，ミクロン凝集体の生成の有無に関する振とうの周波数と加速度の境界線が存在することが示唆された．この境界線の位置は，凝集に対する安定性が異なる3種類のタンパク質溶液で類似しており，さらにタンパク質濃度，温度及び粘度に影響を受けなかった．一方，バイアル中の溶液量，バイアルの向き及びバイアルサイズといった，溶液の動きに影響するパラメーターを変化させた場合は，境界線の位置に変化が認められた．したがって，ミクロン凝集体生成の境界線は，タンパク質溶液の物性以上に，溶液の動きと関連している可能性が示唆された．

第3章　低g力による凝集体生成メカニズム解明　タンパク質が疎水性の気液界面や固液界面に吸着すると，部分的なアンフォールティングを経て，タンパク質同士が界面上で相互作用しフィルムを形成する．気液界面を介した凝集体の生成は，振とうなどにより気液界面の面積が狭くなる際にフィルムが圧縮されて凝集が促進され，再び面積が広がる際に個々の凝集体としてバルク溶液中に移動するメカニズムが提案されており，気液界面の膨張圧縮率の高さに加えて，膨張圧縮の繰り返しが重要であると考えられている．本研究で見出したミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数と加速度の境界線を上回る加速度の振とう（AAB）及び下回る振とう（ABB）を加えた際の溶液の動きを高速度カメラで撮影した結果，AABを加えた場合のみ，波の崩壊を伴う溶液の動きが観察された．AABでは，高い膨張圧縮率を伴う面積変化を繰り返し生じさせることで気液界面を介した凝集が生じたと考えられた．また，タンパク質フィルムを形成させたバイアルに，タンパク質を含まない緩衝液を入れてAAB及びABBを加えると，気液界面を含む状態でAABを加えた場合のみ固相から剥離した凝集体が多く確認された．したがって，AABにより気体―液体―固体の界面が大きく動くことで生じるせん断応力や界面張力が，固相表面で形成したタンパク質フィルムを剥離させることにより凝集体を生じさせたと考えられた．これまでの波に関する研究から，振とうによる崩壊を伴う波の発生に必要な加速度は，液体の高さ/直径比（H/D比）が低いほど高くなることが報告されているが，本研究で見出したミクロン凝集体生成の周波数と加速度の境界線の位置も，H/D比の低下に伴い上昇する傾向が認められた．これらの結果からも，波の崩壊を伴う溶液の動きがミクロン凝集体生成に関する振とうの境界線に関係することが示唆された．

第4章　総括　周波数と加速度の組み合わせとして低g力を検討したことで，凝集体生成へとつながる低g力には周波数と加速度からなる境界線が存在し，ある周波数における振とうの加速度が境界線を上回る場合には波の崩壊を引き起こし，界面を介した凝集が生じることを明らかにした．この研究が，輸送等の振動によって生じる凝集体生成リスクの正しい理解と対応につながり，タンパク質医薬品の品質確保に貢献すると期待される．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　城　慎二　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授 副 査　教授 副 査　教授	内山　進 大政　健史 紀ノ岡　正博

論文審査の結果の要旨

第1章　序論　現在，タンパク質医薬品の有効性は広く認識されているが，タンパク質医薬品が免疫原性を持つと，投与したタンパク質が異物として認識されるようになり，薬効低下や，場合によってはショック症状を引き起こす．タンパク質凝集体は免疫原性を高め得るため，タンパク質凝集の原因を理解し，凝集体を低減する必要がある．溶液製剤の場合，溶液中でのタンパク質分子同士の相互作用による凝集に加え，輸送時などの振とうで発生する物理的な力による，界面を介した凝集も知られている．物理的な力は周波数と加速度で規定できるが，これまでの研究によりタンパク質医薬品は輸送時の荷役時の落下などにより高加速度（高g）力を受けることが見出され，高g力と凝集の関係が研究されてきた．振動などの低加速度（低g）力も輸送時の凝集に関与することが示唆されたが，周波数のみを指標としており，低g力を周波数と加速度の組み合わせとして捉え，凝集への寄与を解析した先行例はなく，従って，低g力による凝集メカニズムも不明であり，適切な凝集抑制戦略が立てられていない．以上から，本博士論文では輸送時の低g力と凝集の関係を周波数と加速度の観点から明らかとすることを目的としている．

第2章　輸送時に加わる凝集を引き起こす物理的な力の特定　バイアルに充填した3種類のタンパク質溶液に，10～55 Hz及び0.7～9.7 Gの範囲で周波数と加速度を変動させて，振とうによる低g力と凝集の関係を評価している．その結果，低い加速度では変化が認められなかったが，加速度の上昇とともに2～100 μmのミクロン凝集体濃度が急激に上昇したことを示している．このことから，加速度の上昇に伴って凝集体が徐々に増加するわけではなく，ミクロン凝集体の生成の有無に関する振とうの周波数と加速度の境界線が存在することが示唆されている．この境界線の位置は，凝集に対する安定性が異なる3種類のタンパク質溶液で類似しており，さらにタンパク質濃度，温度及び粘度に影響を受けていない．一方，バイアル中の溶液量，バイアルの向き及びバイアルサイズといった，溶液の動きに影響するパラメーターを変化させた場合は，境界線の位置に変化が認められている．したがって，ミクロン凝集体生成の境界線は，タンパク質溶液の物性以上に，溶液の動きと関連している可能性が示唆されている．

第3章　低g力による凝集体生成メカニズム解明　タンパク質が疎水性の気液界面や固液界面に吸着すると，部分的なアンフォールティングを経て，タンパク質同士が界面上で相互作用しフィルムを形成する．気液界面を介した凝集体の生成は，振とうなどにより気液界面の面積が狭くなる際にフィルムが圧縮されて凝集が促進され，再び面積が広がる際に個々の凝集体としてバルク溶液中に移動するメカニズムが提案されており，気液界面の膨張圧縮率の高さに加えて，膨張圧縮の繰り返しが重要であると考えられている．本研究で見出したミクロン凝集体生成に関する振とうの周波数と加速度の境界線を上回る加速度の振とう（AAB）及び下回る振とう（ABB）を加えた際の溶液の動きを高速度カメラで撮影した結果，AABを加えた場合のみ，波の崩壊を伴う溶液の動きが観察されている．AABでは，高い膨張圧縮率を伴う面積変化を繰り返し生じさせることで気液界面を介した凝集が生じたと考察している．また，タンパク質フィルムを形成させたバイアルに，タンパク質を含まない緩衝液を入れてAAB及びABBを加えると，気液界面を含む状態でAABを加えた場合のみ固相から剥離した凝集体が多く確認されている．したがって，AAB

により気体―液体―固体の界面が大きく動くことで生じるせん断応力や界面張力が，固相表面で形成したタンパク質フィルムを剥離させることにより凝集体を生じさせたと考えられた．これまでの波に関する研究から，振とうによる崩壊を伴う波の発生に必要な加速度は，液体の高さ/直径比（H/D比）が低いほど高くなることが報告されているが，本研究で見出したミクロン凝集体生成の周波数と加速度の境界線の位置も，H/D比の低下に伴い上昇する傾向が認められている．これらの結果からも，波の崩壊を伴う溶液の動きがミクロン凝集体生成に関する振とうの境界線に関係することが示唆されている．

以上のように，本論文は周波数と加速度の組み合わせとして低g力を検討したことで，凝集体生成へとつながる低g力には周波数と加速度からなる境界線が存在し，ある周波数における振とうの加速度が境界線を上回る場合には波の崩壊を引き起こし，界面を介した凝集が生じることを明らかにしている．この研究が，輸送等の振動によって生じる凝集体生成リスクの正しい理解と対応につながり，タンパク質医薬品の品質確保に貢献すると期待される．よって，本論文は博士論文として価値あるものと認める．