



Title	畳み込みニューラルネットワークを用いたバイオ医薬品の不純物粒子分析
Author(s)	西海, 遥夏
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/98763">https://doi.org/10.18910/98763</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 西海 遥夏 )

論文題名 畳み込みニューラルネットワークを用いたバイオ医薬品の不純物粒子分析

## 論文内容の要旨

バイオ医薬品は、複雑かつ多様な工程を経て製造されるため、様々な不純物粒子が混入する可能性がある。不純物粒子の特性によっては製剤の有効性と安全性を損なう可能性があるため、製剤に含まれる不純物粒子を識別しつつ、正確に定量することが求められている。バイオ医薬品の不純物粒子分析では、顕微鏡による解析が補完的手法として用いられ、粒子の定量だけでなく、透明度や円形度といった形態の指標となる形態パラメータを解析することが可能である。一方で、標的とする不純物粒子の形態が、目的物質や他の不純物粒子と類似する場合、粒子の形態パラメータの解析では粒子の同定が難しく、また使用する解析手法によって分析結果が左右されてしまうという問題があった。そこで本研究では、形態パラメータ非依存的な解析手法として、粒子画像から識別に必要な特徴量を自動的に抽出することが可能な畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を構築し、現在不純物粒子の定量と識別が課題となっているバイオ医薬品である、抗体医薬品と組換えアデノ随伴ウイルスベクター製剤の不純物粒子分析に取り組んだ。

抗体医薬品に含まれる不純物粒子は、内在性粒子、内因性粒子、および外来性粒子に分類される。米国薬局方では、2-10  $\mu\text{m}$ の内在性粒子も免疫原性を持つ可能性があるとして、フローイメージング顕微鏡による不純物粒子の定量、および内因性粒子との識別を強く推奨している。そこで、光学設計の異なる3種類のフローイメージング顕微鏡に対し、取得した2-10  $\mu\text{m}$ の粒子画像から内因性粒子を定量可能なCNNの構築に取り組んだ。不純物粒子として、抗体医薬品で生じる内在性粒子の凝集体と、内因性粒子であるシリコンオイル油滴、また、界面活性剤の分解物である遊離脂肪酸のモデル粒子を分類対象とした。まず、畳み込み層、バッチ正規化、プーリング層、および全結合層を含む全15層のCNN構造を設計した。さらに、粒子の形態パラメータから、粒子がどの不純物粒子であるかを予測する分類器も同時に作製した。続いて、形態パラメータに基づく分類器とCNNの不純物粒子の分類性能を比較した。形態パラメータに基づく分類器は、使用する顕微鏡や分類する不純物粒子の種類によっては分類正答率が70%であった。一方CNNは、いずれも約80%以上の分類正答率を示した。次に、内在性粒子と内因性粒子を特定の比率で混合した不純物混合サンプルを各フローイメージング顕微鏡で測定し、形態パラメータに基づく分類器とCNNでその組成を予測した。その結果、形態パラメータに基づく分類器よりも、CNNは理論値と近い値で組成を予測することが可能であった。以上の結果から、本研究で構築したCNN構造は、各フローイメージング顕微鏡で利用可能であり、形態パラメータ非依存的に、抗体医薬品に含まれる不純物粒子を識別しつつ定量できる可能性が示された。

次に、組換えアデノ随伴ウイルスベクター製剤 (AAV製剤) の不純物粒子分析に取り組んだ。AAV製剤には、目的物質である完全粒子のほかに、空粒子が目的物質由来不純物として含まれる。クライオ電子顕微鏡で取得したAAV粒子画像のなかには、完全粒子と空粒子との識別が困難である粒子が存在する。そこで、抗体医薬品の不純物粒子分析において構築したCNN構造を応用し、クライオ電子顕微鏡画像からAAV製剤の純度 (全AAV粒子における完全粒子の割合 : F/E比) を評価可能なプログラムを構築した。並行して、粒子内部の明暗を示す形態パラメータ (輝度比) による解析や、超遠心分析 (AUC) を実施し、それぞれの手法から得られるF/E比を比較することで、CNNの分類性能を評価した。その結果、輝度比による解析とCNNは、AUCと同様の性能でF/E比を算出することが可能であった。さらに、完全粒子と空粒子を特定の組成で混合したAAV混合サンプルや、空粒子の割合が5%を下回るよう精製した高純度AAVサンプルを輝度比による解析とCNNで分析し、それぞれの精度やスループットを比較した。その結果、CNNが輝度比による解析と比較して、高い精度とスループットでF/E比を算出可能であることが示された。よって、本研究で構築したCNN構造は、クライオ電子顕微鏡画像にも応用可能であり、AAV製剤の不純物粒子を正確に定量可能であると示唆された。

以上の結果から、本研究で構築したCNN構造は、抗体医薬品とAAV製剤に含まれる不純物粒子を高精度かつ単粒子レベルで定量できる可能性が示され、光学設計や測定原理、スケールの異なる顕微鏡画像に応用可能であることが明らかになった。よって、製剤に含まれる粒子が、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡によって画像化可能である場合、本研究で構築したCNN構造は、バイオ医薬品の不純物粒子分析において非常に強力なツールとなりうると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 西海 遥夏 )			
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	内山 進
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	栗栖 源嗣

## 論文審査の結果の要旨

バイオ医薬品は、細胞培養や遺伝子組換えといった分子細胞生物学的手法を用いて製造される医薬品であり、有効性や安全性の高さから様々な疾患に利用される。しかし、バイオ医薬品の製造工程は複雑かつ多様となっており、低分子医薬品と比較して安定性が低いことから、目的物質由来不純物、製造工程由来不純物、混入汚染物質に分類される様々な不純物粒子が混入・発生する可能性がある。このような不純物粒子は製剤の有効性と安定性に悪影響を及ぼす危険性があることから、規制当局や世界保健機関により、不純物粒子の定量と同定が求められている。バイオ医薬品の不純物粒子分析は、光遮蔽粒子計測法など複数の分析手法を組み合わせるが、不純物粒子の特性によっては定量と同定が困難となることがある。そのような場合、顕微鏡による分析が重要な補完的手法のひとつとなっている。顕微鏡を利用した不純物粒子分析では、粒子画像から透明度やアスペクト比、円形度といった形態パラメータを取得することが可能であり、形態パラメータを説明変数とした機械学習に基づく粒子の同定が可能となる。しかし、不純物粒子はその形態が類似している場合、形態パラメータに基づく解析では誤分類が多く、また取得される形態パラメータは装置のスペックに依存するため、使用する装置によって不純物粒子の定量結果が左右されてしまうことから、形態パラメータ非依存的な解析手法が求められている。そこで本博士論文では、形態パラメータ非依存的な手法として畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を顕微鏡画像に応用し、バイオ医薬品に含まれる不純物粒子の定量を目的としている。

本論文では、バイオ医薬品のなかで定量と同定が課題となっている抗体医薬品とアデノ随伴ウイルスベクター製剤 (AAV 製剤) に着目し、それぞれの製剤に高頻度で含まれる不純物粒子の定量が可能な CNN を検討している。まず、抗体医薬品の不純物粒子分析について、抗体医薬品の特性解析にも利用可能な、異なる光学設計を持つ 3 種類のフローイメージング顕微鏡を使用し、抗体医薬品に高頻度で発生しうる 2-10  $\mu\text{m}$  サイズの 4 種類の不純物粒子；凝集体、シリコーンオイル油滴、および 2 種類の遊離脂肪酸のモデル粒子を定量対象としている。本論文では、顕微鏡の種類に依らず単粒子レベルでの不純物粒子の同定を行うため、バッチ正規化を組み入れた独自の CNN 構造を構築している。さらに、顕微鏡から取得される形態パラメータに基づく分類器を作製し、形態パラメータ非依存的な手法である本論文での CNN と分類性能を比較している。結果は、形態パラメータに基づく分類器よりも、本論文で構築された CNN が高い正答率で不純物粒子を同定しており、3 種類のどのフローイメージング顕微鏡画像に対しても応用可能であると示されている。さらに、本論文での CNN 構造は、過去文献とは異なりバッチ正規化を組み込んでおり、これが単粒子レベルかつ高正答率で粒子の同定が可能となったことが示唆されている。続いて、2 種類の不純物粒子を特定の比率で混合した不純物混合サンプルの組成を、形態パラメータに基づく分類器と CNN によって予測したところ、形態パラメータに基づく解析よりも CNN が、不純物混合サンプルの組成の理論値と近い予測値を算出したことが示されている。よって本論文で構築された CNN は、使用するフローイメージング顕微鏡によらず、2 種類の不純物粒子が混合する抗体医薬品の不純物組成を予測できる可能性が示唆されている。

次に、AAV 製剤に高頻度で混入および発生しうる不純物粒子を定量するため、本論文で構築された CNN 構造を応用し、クライオ電子顕微鏡により取得した AAV 粒子画像を、目的物質の完全粒子と目的物質由来不純物の空粒子に分類可能であるか検討している。同時に、AAV 粒子の輝度を示す形態パラメータに基づいた解析手法である輝度比による解

析や超遠心分析（AUC）も実施し、輝度比による解析と CNN を、精度とスループットの観点から、それぞれの分類性能を比較している。その結果、輝度比による解析と CNN は、双方とも、AUC と同様の正確性で空粒子を定量可能であることが示されている。一方で、CNN が輝度比による解析よりも高い精度とスループットで分析が可能であることが明らかとなっている。さらに、空粒子の含量がわずかである高純度 AAV 製剤に対しても、CNN は再現性よく空粒子を定量することが可能であると示されており、AUC を含めたこれまでの空粒子定量手法よりも、CNN は高い感度を持つことが示唆されている。

以上から、本論文で構築された CNN 構造は、フローイメージング顕微鏡とクライオ電子顕微鏡の双方に応用可能であり、かつ形態パラメータに基づく解析よりも高い分類性能、精度、およびスループットで、形態パラメータ非依存的に不純物粒子を単粒子レベルで識別しつつ定量できる可能性が示されている。本論文では、抗体医薬品と AAV 製剤に対してのみ CNN の応用が検討されたものの、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡により不純物粒子が画像化可能である場合には、本論文で構築された CNN が不純物粒子分析において強力なツールのひとつとして製剤の特性解析や製造開発に有用であると考えられる。さらに、本論文の CNN 構造が、測定原理の異なる顕微鏡画像にも応用可能であることは、利用目的が限定されている他の顕微鏡にも応用範囲を拡大できる可能性があり、イメージング分野においてもインパクトを与える。したがって本論文は、バイオ医薬品の有効性と安全性を担保するだけでなく、イメージング分野で CNN の応用範囲を広げるという点でも重要な知見であり、博士論文として価値あるものと認める。