



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

# 博士学位論文

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

西海 遥夏

2024 年 6 月  
大阪大学大学院工学研究科  
生物工学専攻  
高分子バイオテクノロジー領域

# 目次

第1章 序章 .....	4
第1節 研究背景.....	4
バイオ医薬品 .....	4
バイオ医薬品の不純物粒子分析 .....	4
不純物粒子分析における顕微鏡の利用 .....	5
抗体医薬品の不純物粒子分析 .....	5
遺伝子治療薬の不純物粒子分析 .....	9
不純物粒子分析技術の開発 .....	16
畳み込みニューラルネットワークによる不純物粒子分析 .....	20
第2節 博士論文構成.....	26
第2章 抗体医薬品の不純物粒子分析 .....	30
第1節 緒言 .....	30
第2節 実験材料および実験方法.....	34
実験材料 .....	34
実験方法 .....	35
第3節 結果 .....	45
フローイメージング顕微鏡による不純物粒子の測定 .....	45
形態パラメータの解析による不純物粒子の類似性評価 .....	48
予測モデルの正答率 .....	49
学習済み CNN と形態パラメータによる解析の不純物混合サンプルの組成予測 .....	51
第4節 考察 .....	53
脂質粒子を遊離脂肪酸粒子のモデル粒子とする妥当性について .....	53
不純物粒子サンプルと不純物混合サンプルを使用する妥当性について .....	53
フローイメージング顕微鏡ごとで取得される形態パラメータの違い .....	54
$2 \mu\text{m}$ 以上の粒子画像を分類する学習済み CNN $>2 \mu\text{m}$ の分類性能 .....	56
CNN による抗体医薬品の不純物粒子分析 .....	59
第5節 小括 .....	61
第3章 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 .....	62
第1節 緒言 .....	62
第2節 実験材料および実験方法.....	67
実験材料 .....	67
実験方法 .....	69
第3節 結果 .....	78
超遠心分析バンド沈降速度法による不純物分析 .....	78

クライオ電子顕微鏡画像による不純物粒子分析 .....	78
輝度比による解析と CNN の分類性能の比較 .....	81
高純度 AAV サンプルの不純物粒子分析 .....	85
第 4 節 考察 .....	90
輝度比による解析と CNN の F/E 比評価の正確性 .....	90
CNN による不純物粒子分析へのアプローチ .....	91
高純度 AAV サンプルの不純物粒子分析 .....	94
第 5 節 小括 .....	98
第 4 章 総括と展望 .....	99
第 1 節 総括 .....	99
第 2 節 展望 .....	101
補足資料 .....	104
発表論文 .....	109
本学位論文に関与する原著論文 .....	109
その他発表論文 .....	109
参考文献および参考資料 .....	110
謝辞 .....	121

## 第1章 序章

### 第1節 研究背景

#### バイオ医薬品

バイオテクノロジー応用医薬品（以下「バイオ医薬品」と呼ぶ。）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と定義されている<sup>1,2</sup>。バイオ医薬品は、従来主要な処方薬であった低分子医薬品の約200倍から1,000倍の分子量を持ち、その構造と製造工程はより複雑である。一方で、生物を資源として製造されるため安全性が高く<sup>3</sup>、また標的分子に対する特異性も高いため、がんや心臓病、感染症、関節炎、多発性硬化症といった幅広い疾患の治療に利用されている<sup>4</sup>。バイオ医薬品は、その用語が1980年代に誕生して以来、多くの製品が上市し、売上高を伸ばしてきた。2016年には全処方薬の約10%に相当する約200種類のバイオ医薬品が市場に導入され、2018年には約400種類のバイオ医薬品が日本、米国、欧州で承認された<sup>5</sup>。近年の急成長を考慮すると、今後もさらなるバイオ医薬品の開発や製造が予想される。

#### バイオ医薬品の不純物粒子分析

現在、ほとんどのバイオ医薬品は遺伝子組換え技術により生産されており<sup>6</sup>、宿主に目的遺伝子を導入することで、目的物質である組換えタンパク質が合成される。最終製品となるまでの製造工程は、複雑かつその工程数も多い。このためバイオ医薬品には、目的物質であるタンパク質以外に、製剤の品質と安全性を損なう不純物粒子が混入する可能性がある<sup>7</sup>。バイオ医薬品に含まれる可能性のある不純物粒子は、目的物質の物理化学的性質が変化した目的物質由来不純物、宿主細胞由来タンパク質や核酸などの製造工程由来不純物、および製造工程には本来存在しない外来性の化学物質または微生物といった混入汚染物質に分類される<sup>7-9</sup>。これらの不純物粒子は、その特性によっては患者の命に関わるような有害事象をもたらす危険性を秘めているほか、有効性や安全性に悪影響を与える可能性が指摘されている<sup>9-12</sup>。このため、製剤に含まれる不純物粒子のレベルを最小限にし、かつその品質特性を明らかにすることが必要不可欠である。医薬品規制調和国際会議では、

日本、米国および欧州の規制当局と製薬業界の専門家らにより、医薬品の品質規格を設定するにあたって考慮すべき原則や適切な分析手順を定めたガイドラインが発行されており、組換えタンパク質医薬品に関する同様のガイドラインも世界保健機関によって提供されている<sup>13</sup>。これらのガイドラインは、バイオ医薬品の品質を確保するための工程内管理や品質管理戦略の構築に有用であり、製造されたバイオ医薬品が定められた規格に準拠するためにも、精確で再現性のある堅牢な不純物粒子分析手法が必要とされる。

### 不純物粒子分析における顕微鏡の利用

バイオ医薬品には、様々なサイズや質量、構成、特性を持つ不純物粒子が混入する可能性があり、分析目的や分析範囲が多岐にわたることから、製品開発の各段階で不純物分析手法をどのように選択するかが重要となる<sup>7</sup>。多くの場合、バイオ医薬品の不純物粒子の分析には、クロマトグラフィーや光遮蔽粒子計測法、目視試験といった複数の分析手法を組み合わせることが望ましいとされる<sup>7,14</sup>。さらに、分析手法の選択および組み合わせにあたっては、目的物質から目的物質由来不純物と製造工程由来不純物を分離、あるいは識別することに重点をおくよう最適化される<sup>15,16</sup>。しかし、なかには目的物質とサイズや質量、および構成が類似する不純物粒子が存在することがあり、上記の分析手法を組み合わせたとしても、それら不純物粒子を目的物質から分離、検出、および識別するのは困難なことがある。そのような場合、不純物分析において有効な補完的データを与えることが可能であるのは、顕微鏡による分析である。顕微鏡を用いた特性解析は、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の特性評価で実施されているほか<sup>17</sup>、近年開発や承認が進む遺伝子治療薬の特性評価にも応用が期待されている。

### 抗体医薬品の不純物粒子分析

#### 抗体医薬品

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（以下「抗体医薬品」と呼ぶ。）は、がん、炎症性疾患、新血管疾患、臓器移植、感染症、呼吸器疾患、眼科疾患の

治療に利用されている<sup>1</sup>。現在 100 品目を超える抗体医薬品が日米欧で承認されており、そのほとんどが、がんや自己免疫疾患の治療に使用されている。世界保健機関は、2030 年には新たながん患者数が 2,700 万人に増加すると推定しており<sup>18</sup>、将来的な抗がん剤治療の需要を考慮すると、抗体医薬品が承認済みの抗がん剤において主要グループになることが予想される<sup>1</sup>。また、従来の抗体医薬品よりも優れた有効性を持つ次世代抗体の普及や、高特異性抗体の開発も進んでいる。このため、抗体医薬品の市場は今後も動的に発展し、販売数や売上のさらなる増加が見込まれる。

### 抗体医薬品に含まれる不純物粒子

抗体医薬品には、製造工程や輸送、保管、投与の段階で、目的物質由来不純物粒子や製造工程由来不純物粒子が発生、および混入する可能性がある<sup>19-22</sup>。これに対し日本薬局方では、抗体医薬品を含むタンパク質医薬品注射剤で生じる不溶性微粒子が、製品の安全性に関わる重要品質特性として評価、および管理するべきとしている<sup>23</sup>。第十七改正日本薬局方第二追補で収載された一般試験法〈6.17〉「タンパク質医薬品注射剤の不溶性微粒子試験法」では、10 μm 以上、および 25 μm 以上の不溶性微粒子について、1mLあたりに含まれる粒子数に上限値を設けているほか、タンパク質医薬品注射剤の取扱いの留意事項を記載している<sup>24</sup>。一般試験法の大部分は、日本薬局方、米国薬局方、および欧州薬局方の調和合意に基づいており、三薬局方による不純物粒子の厳しい規制が設定されている<sup>16,25-31</sup>。また、米国薬局方の General Chapter<1787> “Measurement of Subvisible Particulate Matter”によると、非経口製剤における不純物粒子は、そのサイズによって、目で見える粒子（ビジブル粒子）と、目で見えない粒子（サブビジブル粒子）に分類され、100 μm を超える粒子がビジブル粒子、1-100 μm の範囲の粒子がサブビジブル粒子と定義されている<sup>26</sup>。ビジブル粒子やサブビジブル粒子が最終製剤に含まれている場合、重篤な副作用を引き起こす危険性が示されていることから、製剤の安全性および安全性に影響を与える可能性がある品質特性として規制対象となっている<sup>26</sup>。非経口製剤中に存在する粒子はさらに、内在性粒子、内因性粒子、外来性粒子という 3 つのカテゴリーに分類される<sup>26,32</sup>。内在性粒子は、

原薬および他の製剤成分から成る粒子と定義される。非経口製剤に含まれる代表的な内在性粒子は、凝集体である。凝集体は、目的物質であるタンパク質が様々な要因で変性し、相互作用することで形成される多量体である。凝集体は、pH 変化や浸透圧変化といった化学的ストレスや、温度変化や攪拌、振盪といった物理的ストレスを受けることで生じ、薬理作用の低下や免疫原性を増強させる危険性が報告されている<sup>20,33-39</sup>。このため、アメリカ食品医薬品局（Food and Drug Administration; FDA）の発表するガイドラインでは、製剤に含まれる凝集体を最小限にすることが推奨されている<sup>40-42</sup>。次に、内因性粒子は、最終製品に含まれる材料に由来する粒子と定義され、賦形剤といった目的物質以外の成分や、組立工程で利用される資材や包装材を発生源とする。例として、ステンレス、シール、ガスケット、包装用ガラス、エラストマー、送液用チューブ、シリコーンオイル油滴、遊離脂肪酸などが挙げられる。最後に、外来性粒子は、目的物質や製造工程に由来しない粒子を指し、生物源由来物質（纖維、昆虫、花粉、植物物質など）、建築材料（ガラス、プラスチック、ゴム、金属、塗料など）、ヒト由来の異物（上皮細胞、毛髪、衣類の一部など）が例として挙げられる（図1）。このように、粒子の発生源は複数存在するため、適切な工程管理戦略を構築するためにも、不純物粒子が何であるかを特定し、それらが内在性粒子、内因性粒子、および外来性粒子のいずれであるかを分類することが重要である。

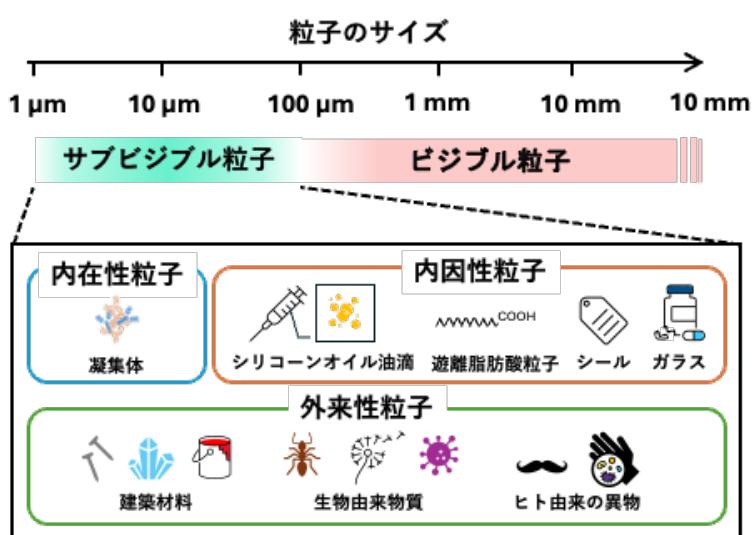


図1. 抗体医薬品に含まれる可能性のある不純物粒子のサイズ範囲と3つのカテゴリー

## 顕微鏡による不純物粒子分析

非経口製剤では現在、三局方により規制対象となっている粒子サイズは、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上の粒子に限定されている。しかし、米国薬局方 General Chapter <1787>では、 $2\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$ の凝集体も免疫原性を持つ可能性があるとして、非経口製剤に含まれうる他の不純物粒子と区別しつつ、凝集体を定量することが推奨されている<sup>26</sup>。そこで、非経口製剤の不純物粒子分析に利用されるのが、フローイメージング顕微鏡である。フローイメージング顕微鏡は、液体製剤中に存在する微小粒子の画像を取得することで、粒子のサイズや形態を解析することが可能な光学顕微鏡である<sup>17,38,43-50</sup>。フローイメージング顕微鏡には、石英素材の小さく薄いフローセルと、それを照射する光源が搭載されている。液体サンプルを注入すると、ポンプによって液体サンプルがフローセルに送液される。そこで、高性能の高速 CCD (Charge-coupled device) カメラがフローセル内の様子を連続撮影することで、フローセルを通過した液体の画像を取得することができる。溶液とは異なる屈折率を持つ粒子が液体サンプルに存在する場合、粒子は背景と比較して光の強度を低下させるため、粒子の検出と粒子画像の切り出しが可能となる(図2)。検出された粒子画像は、画像解析により、粒子のサイズや円形度、アスペクト比、透明度といった、形態に基づくパラメータ(以下「形態パラメータ」と呼ぶ。)を取得することが可能となる。フローイメージング顕微鏡は、透明度の高い粒子の検出に優れており、粒子によって遮断された光の強度から粒子濃度と粒子サイズを評価する光遮蔽粒子計測法よりも、正確な粒子の形態を高感度で評価可能な分析手法として、非経口製剤の特性解析に使用されている<sup>51</sup>。実際に FDA の Kotarek らは、アナフィラキシー症状の誘発により回収となったバイオ医薬品の事故原因調査において、光遮蔽粒子計測法では検出できなかつた粒子がフローイメージング顕微鏡では検出されたことを報告しており<sup>52</sup>、フローイメージング顕微鏡を利用した不純物粒子定量の重要性が示唆されている。

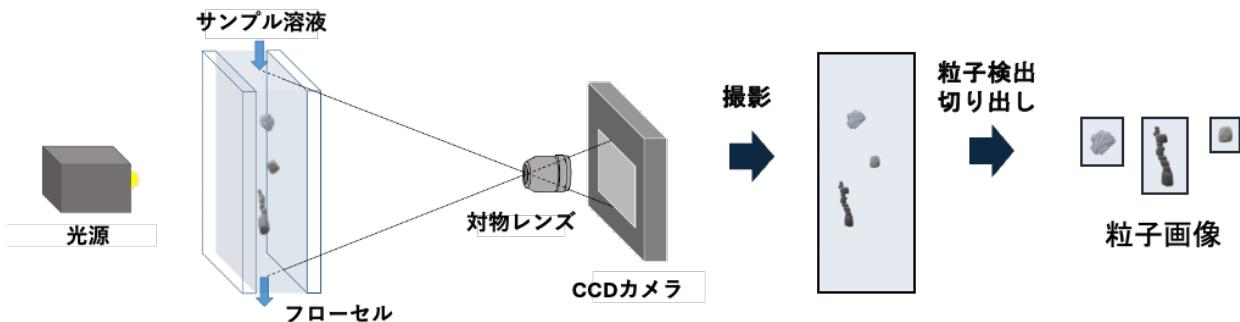


図2. フローイメージング顕微鏡による分析の概略

## 遺伝子治療薬の不純物粒子分析

### 遺伝子治療

遺伝子治療は、特定の疾患を治療するために患者へ遺伝子を補うほか、患者の異常な遺伝子の発現を改変および操作し、細胞の生物学的な特性を改善する技術である<sup>53-56</sup>。遺伝子治療は、これまで従来の薬物療法では完治できなかった疾患にも対処できる治療法として、今世紀における研究のホットスポットの一つとなっている。遺伝子治療の始まりは、19世紀に遡り<sup>57</sup>、1970年にアメリカでアルギナーゼを含むパピローマウイルスを投与することでアルギニン血症の治療を試みたのが、人類初の遺伝子治療試験であった<sup>58</sup>。1990年にはアデノシンデアミナーゼ (Adenosine deaminase; ADA) 遺伝子を保有する組換えレトロウイルスを使用して形質転換したT細胞を投与することにより、ADA欠損症の治験を行なった<sup>59</sup>。この治験は、連邦政府により初めて承認された遺伝子治療実施プロトコルであり、以来長い道のりを経て、遺伝子治療は現在、多くの医療分野で新たな治療への選択肢を生み出している。遺伝子治療は、*ex vivo* 遺伝子治療と *in vivo* 遺伝子治療の2種類に大別される<sup>54</sup>。*ex vivo* 遺伝子治療は、患者から採取した細胞を培養し、細胞に目的遺伝子を導入することで形質転換した細胞を患者に移植する治療法である。一方、*in vivo* 遺伝子治療は、ベクターと呼ばれる遺伝子を送達するための分子を用いて、患者体内の標的細胞に目的遺伝子を導入する治療法である。遺伝子を導入するには、患者の標的細胞の細胞膜を越え、核内に輸送する必要があるため、遺伝子治療には様々なベクターが利用されている。ベクターは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに分類され、2010年から2020年ま

でに実施された臨床試験の、およそ 70%でウイルスベクターが用いられている<sup>56</sup>。なかでも、臨床応用が承認された初めてのベクターであるのが、アデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus; AAV）ベクターである<sup>60</sup>。

### アデノ随伴ウイルスベクター

AAV は、1965 年にアデノウイルス製剤の不純物として発見された、パルボウイルス科の非エンベロープウイルスである。AAV は現在 100 種類以上の血清型が報告されており<sup>61</sup>、その血清型によって組織指向性が異なる。AAV は、非病原性であるため他のウイルスベクターと比べて安全性が高く、また組織指向性による治療の選択性や形質導入効率も高い。さらに、AAV によって送達された DNA ゲノムは、非分裂細胞だけでなく分裂細胞においても導入遺伝子が安定的かつ長期的に発現することが知られている<sup>56,62</sup>。これらの有用性により、AAV は血友病や脊髄性筋萎縮症といった難病に対する治療薬として承認され、治療に用いられている。2019 年以降、米国や欧州のみならず、日本でも AAV ベクター製剤が承認されるようになった。現在日本で承認されているのは、脊髄性筋萎縮症の治療薬である Zolgensma (Novartis Gene Therapies 社) と、RPE65 欠損レーバー先天性黒内障の治療薬である Luxturna (Spark Therapeutics 社) であり、それぞれ AAV 血清型 9 と AAV 血清型 2 が使用されている。

AAV は、カプシドと呼ばれる正二十面体の外郭を持ち、そのサイズはおよそ 26 nm ほどである<sup>63-65</sup>。カプシドを形成するサブユニットは、ウイルスタンパク質 (Viral protein: VP) と呼ばれ、AAV カプシドの場合、3 種類の VP (VP1、VP2、および VP3) のモル比がおよそ 1:1:10 となる VP60 量体から構成される (図 3 (a))。AAV カプシドには、およそ 4.7 kb の一本鎖 DNA ゲノムを内包することができる。野生型 AAV の DNA ゲノムには、ウイルスゲノムの複製に必要な Rep、VP の生成に必要な Cap、およびカプシド形成に必要な AAP と呼ばれる 3 つのオープンリーディングフレームが含まれており、そのオープンリーディングフレームを挟むようにして逆位反復配列が隣接している (図 3 (b))。治療で用いられる組換え AAV ベクターは、オープンリーディングフレームを目的遺伝子に置換すること

で作製することが可能である（図 3 (c)）。組換え AAV ベクターは主に、HEK293 細胞を用いた一過性トランسفエクションと呼ばれる製造方法により產生される<sup>66-68</sup>。一過性トランسفエクションでは、目的遺伝子とその両サイドに野生型 AAV 由來の逆位反復配列を含むトランスジーンプラスミド、Rep 遺伝子および Cap 遺伝子を含む Rep-Cap プラスミド、VP の発現と DNA ゲノムの複製に必要なタンパク質の遺伝子を含むヘルパープラスミドが用いられる。これら 3 種類のプラスミドを HEK293 細胞に感染させることで、VP の発現、および目的遺伝子を内包しながらのカプシド形成が細胞内で行われ、組換え AAV ベクターが产生される。

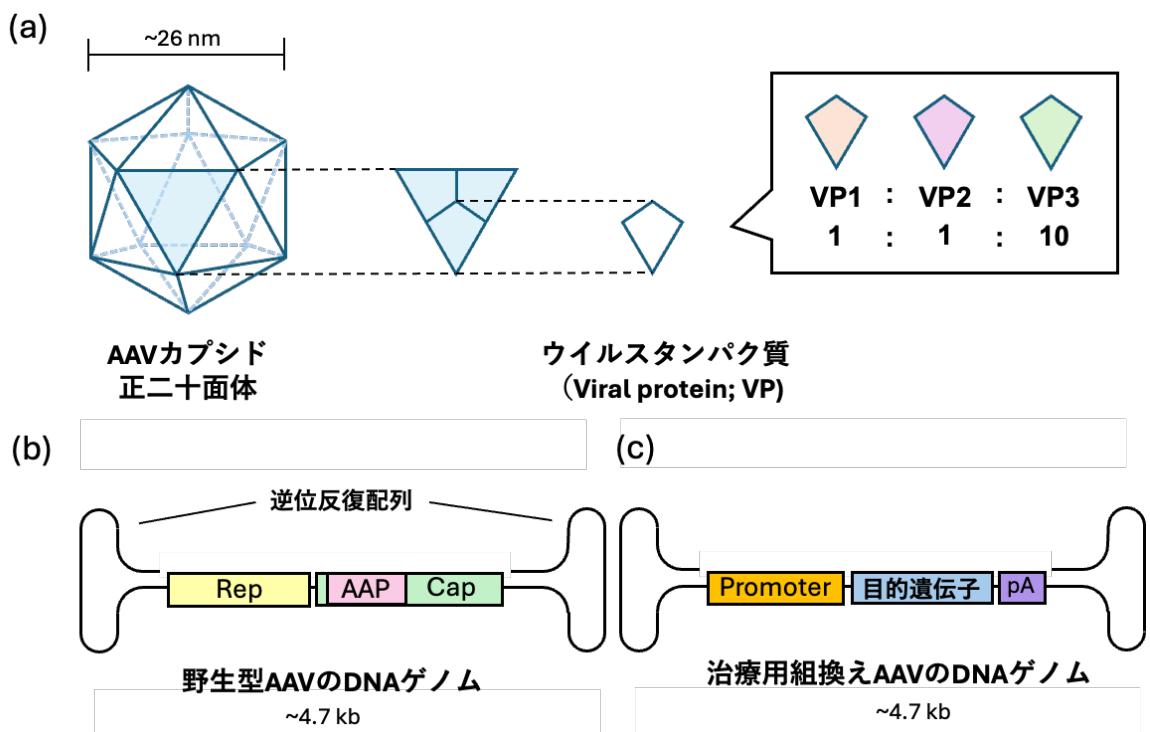


図3. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の (a) カプシド構造、(b) 野生型 AAV の DNA ゲノム、および (c) 治療用組換え AAV の DNA ゲノム

#### アデノ随伴ウイルスベクター製剤に含まれる主要な不純物粒子

組換え AAV ベクター製剤に含まれる主な不純物粒子は、空粒子と呼ばれる AAV カプシドである<sup>69,70</sup>。空粒子は、HEK293 細胞の形質転換において、カプシド形成時に遺伝子が

内包されなかったカプシド、あるいは遺伝子が内包されたものの物理化学的ストレスによって遺伝子が放出してしまったカプシドを指す。通常、カプシド内が「空」の状態のAAV粒子が空粒子と呼ばれ、完全長のDNAゲノムを内包するAAV粒子は完全粒子と呼ばれる<sup>71-75</sup>。すなわち、完全粒子は組換えAAVベクター製剤における目的物質であり、空粒子は目的物質由来不純物として分類される<sup>8,76</sup>。空粒子は、細胞で生成される総AAV粒子のおよそ50%から90%に相当する可能性があり<sup>67,77</sup>、空粒子を実質的に除去しない場合、組換えAAVベクター製剤には、完全粒子よりも過剰の空粒子を含むことになる。この際に問題となるのが、AAVカプシドに対する免疫反応の増強である。AAVカプシドは主要組織適合性複合体クラスIの提示経路にアクセスすることが可能であり、その結果、カプシド特異性細胞障害性T細胞による抗原認識と抗原排除を活性化することが示されている<sup>78-82</sup>。なかでも、AAV血清型2およびAAV血清型8のカプシドに由来するペプチドが、形質導入の標的細胞であった肝細胞において、免疫毒性に関与していたという報告もあり<sup>83</sup>、実際にAAV血清型8を使用した臨床試験では患者の死亡が確認されるという有害事象も見られた<sup>84-86</sup>。死亡原因と空粒子の直接的な関係性は未解明であるものの、空粒子がカプシド反応性リンパ球を誘発したこと、肝臓毒性を示す酵素であるトランスマニナーゼが上昇したと推測されている<sup>79,87</sup>。また、マウスを用いた実験では、完全粒子よりも空粒子がT細胞の増殖を有意に高く誘導したという報告もあり、空粒子自体の免疫原性も示唆されている<sup>79,87</sup>。これらの結果から、空粒子を除去することが、免疫毒性を最小限に抑えるための戦略とされ、FDAのガイダンスにおいても空粒子の除去とその特性評価が推奨されている<sup>76</sup>。現在、FDAやCMCガイダンスに対し、全AAV粒子のうち空粒子が占める割合を30%未満にするよう推奨する企業も存在する一方<sup>88</sup>、その推奨は非現実的であると主張する企業も見られる<sup>72</sup>。しかし、これまで数多く報告されている空粒子の免疫毒性を考慮すると、今後は空粒子の混入がごく僅かな高純度組換えAAVベクター製剤の需要が高まることが予想される。

空粒子の除去は、製造の下流工程において、タンジェンタルフローフィルトレーション、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマ

トグラフィー、そして密度勾配超遠心分離などを組み合わせた精製により実施される<sup>69,75,89,90</sup>。なかでも密度勾配超遠心分離は、空粒子などの不純物を効率よく分離し、かつ完全粒子の濃縮も同時に可能な手法として組換え AAV ベクターの臨床製造でよく使用される。しかし、これらの手法を用いて空粒子を注意深く除去したとしても、空粒子を完全に取り除くことはほぼ不可能である。各精製手法には限界があるうえ、組換え AAV ベクターは、加熱や pH 変化により、内包していた DNA ゲノムを放出することが示されている<sup>91-93</sup>。このため、組換え AAV ベクター製剤には、投与の段階で少なからず空粒子が含まれるというのが現状である。現時点では、組換え AAV ベクター製剤の投与において、空粒子の残留レベルは考慮されていないものの、2023 年に米国で承認されたデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬 ELEVIDYS (Sarepta Therapeutics 社) について、FDA の Briefing Document では、製造工程によっては空粒子の除去が不十分であることを指摘しつつ、カプシド用量の増加による安全性と有効性の低下を懸念している<sup>94</sup>。

## 顕微鏡による不純物粒子分析

組換え AAV ベクター製剤に含まれる空粒子を定量するためには、さまざまな分析手法を用いることが可能である<sup>95,96</sup>。超遠心分析 (Analytical ultra-centrifugation; AUC) や電荷検出質量分析 (Charge detection mass spectrometry; CDMS) は、それぞれ沈降係数および質量の違いに基づき完全粒子と空粒子を分離することで、精製サンプルにおける全 AAV 粒子に含まれる完全粒子の割合 (Full/Empty ratio; F/E ratio、以下「F/E 比」と呼ぶ。) を正確に解析することができる手法である<sup>95,97-99</sup>。その他、カプシドの完全性を観察する手法として、透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy; TEM) が用いられる<sup>73</sup>。TEM は、電子銃によって加速された電子線を試料に照射し、その透過電子線の情報から試料分子の電位の空間分布を解析することで、高解像度顕微鏡画像を取得することができる手法である。TEM による AAV 粒子の観察は従来、負染色法が用いられてきた<sup>100</sup>。負染色法では、酢酸ウランなどの重金属を含む染色液で、試料間にある隙間や試料周辺の支持膜（ろ紙など）を染色し、試料のコントラストを TEM で観察する手法である。試料が乗っていない

支持膜部分には、重金属が残存しているため電子線の透過量が減少する。このため、試料部分は白く、それ以外の部分は黒く見える電子顕微鏡画像を得ることができる。負染色法で組換え AAV ベクター製剤を分析すると、空粒子はカプシド内に DNA ゲノムが存在しないため、重金属がカプシド内部に残存することになる。よって、空粒子の中心部は黒く写る。一方で、完全粒子は、カプシド内の DNA ゲノムが重金属の侵入を防ぐため、粒子の中心部分は白いままである（図 4 (a)）。この中心部の染色度合いの違いにより、顕微鏡画像に写る AAV 粒子を完全粒子と空粒子に分類することが可能となり、F/E 比を求めることができる。しかし、負染色法では、酢酸ウランといった酸性の染色液を使用することにより pH 変化が生じ、DNA ゲノムの放出やカプシドの変性、あるいはカプシド崩壊による F/E 比評価の不正確性が懸念されている。また負染色法は、染色液を乾燥させる工程が含まれており、この乾燥による試料へのダメージも、不正確性の要因となる。その結果、TEM による F/E 比の分析結果は、AUC や CDMS といった他の分析手法と一致しないことが多く、信頼性と精度に問題があった<sup>67,95,101</sup>。

そこで、近年新たな特性解析手法として応用が期待できるのが、クライオ電子顕微鏡である。クライオ電子顕微鏡の基本的な測定原理は TEM と同様である。一方、TEM との大きな違いは、(1) 測定条件と (2) サンプル調製の 2 点である。

#### (1) 測定条件

クライオ電子顕微鏡では、試料の観察が液体窒素温度下 (-196°C) で行われる。液体窒素温度下では室温と比較して、電子線による損傷が 6 倍も軽減することが知られている<sup>102</sup>。これにより、通常の TEM よりもはるかに高い電子線量で試料の高解像度画像を取得することが可能となる。

#### (2) サンプル調製

クライオ電子顕微鏡分析のための前準備として、アモルファス状の薄い氷の層で試料を急速に凍結する氷包埋法が用いられる。氷包埋法では、液体窒素により冷却した液体エタンに、ごく少量の液体サンプルをアプライした金属製のグリッドを浸けることで、サンプルの溶媒である水分子をアモルファス状にする（ガラ

ス化）ことができる。これにより、溶液環境における試料を固定した状態で観察ができるだけでなく、凍結時に観察対象の分子よりも大きなサイズを持つ氷の生成が抑えられ、氷と分子の衝突による試料へのダメージや変性を防ぐことができる。また、負染色法と異なり染色液を使用しないため、染色による変性の心配がなく、ほぼ天然状態の分子を観察することが可能となる。

このようにクライオ電子顕微鏡は、試料を変性させることなく高解像度で分子を観察できる手法として開発され、2017年にはノーベル化学賞の受賞対象として選ばれた<sup>103</sup>。さらに近年、クライオ電子顕微鏡画像を利用した立体構造解析も盛んに行われている<sup>102</sup>。懸命な立体構造解析ソフトの開発により、X線結晶構造解析や核磁気共鳴画像法では観察が難しいAAVのような巨大高分子に対しても構造解析が可能となった<sup>104</sup>。クライオ電子顕微鏡により取得したAAVの粒子画像は、通常のTEMと同様に完全粒子と空粒子の区別が容易である。原子が密であるほど透過する電子線量が減少するため、負染色法とは逆に、完全粒子の中心は白く写り、空粒子の中心は黒く写る(図4(b))。したがって、粒子の中心部の明暗を表す形態パラメータから、不純物である空粒子と完全粒子を識別することが可能となる。一方、クライオ電子顕微鏡画像は、高解像度であるがゆえに、データ容量が膨大であり、さらに顕微鏡画像から観察対象である分子の画像を検出するにはRELIONやCryoSPARCといった専用の解析ソフトウェアが必要である。ゆえに、各解析ソフトウェアにおける粒子画像の切り出しには多くの時間と、多種多様なアルゴリズムに対する専門的知識と豊富な経験が要求される<sup>105</sup>。

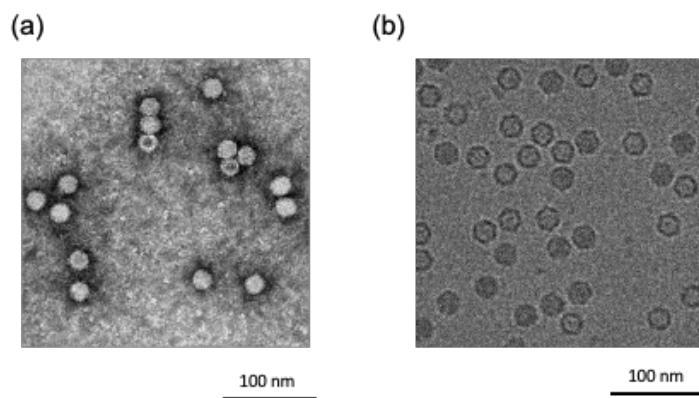


図4. AAV粒子の(a) 負染色法による電子顕微鏡画像と、(b) クライオ電子顕微鏡画像。

## 不純物粒子分析技術の開発

前述したように、バイオ医薬品中に含まれる粒子を画像化する技術は複数存在し、その粒子画像から粒子の定量を補完的に実施することが可能である。しかし、バイオ医薬品に含まれる不純物粒子のなかには、粒子の形態が類似しているために、形態パラメータや目視による粒子の識別や同定が、依然として困難であるものがある。そこで、粒子を識別、および同定する新たな分類手法として、人工知能の利用が進んでいる<sup>106-110</sup>。

## 人工知能

近年、バイオテクノロジーや生命科学分野において、人工知能（Artificial intelligence; AI）の利用が急速化している。AI の起源は 20 世紀のロボット発明から始まったとされる<sup>111</sup>。1955 年には John McCarthy によって「人工知能（AI）」という用語が造語され、AI を「判断力のある機械を作製するための科学および工学」であると定義した。AI はその後、複雑な課題を解決するための代表的な高度コンピュータ技術として発展し、工学のみならず、社会学や心理学など、あらゆる分野で急速に利用が拡大している。医療分野においても AI の応用は目覚ましいものがある。実際、アメリカの手術用ロボット製造会社であるインテュイティブサージカル社が、AI を利用した手術システム「Da Vinci」を開発した<sup>112</sup>。Da Vinci は、2000 年に FDA によって承認され、現在 5,000 台以上の装置が世界中で稼働している。また、AI を活用することで、疾患や遺伝形質の予測因子として一塩基多型などの DNA 変異体を特定する新たな計算手法も開発されるなど、AI は医療分野の発展にも大きく貢献している<sup>113</sup>。

## 機械学習

AI の応用には、仮想と物理という 2 つの主要部門がある<sup>111</sup>。物理 AI は医療機器や医療用ケアロボットといった物理的実体に利用される。一方仮想 AI は、経験を通じて学習方法を向上させる数学的アルゴリズムの機械学習が含まれる。機械学習には 3 つのタイプのアルゴリズム；（1）強化学習、（2）教師なし学習、（3）教師あり学習がある。

### (1) 強化学習

強化学習は、教師なし学習や教師あり学習とは異なり、既知の目的変数や入力変数といった静的データセットに依存せず、動的な環境で動作するアルゴリズムである<sup>114</sup>。強化学習では、環境とソフトウェアエージェントの間で行われる試行錯誤のやりとりを通じてデータポイントが収集され、実行されるアクションごとにソフトウェアエージェントは報酬と呼ばれるスカラーを受け取り、その蓄積報酬を最大化させる手段を学習するアルゴリズムである。強化学習は、自動車の自動運転システムやエレベータの制御システムなどに利用されている<sup>115,116</sup>。

### (2) 教師なし学習

教師なし学習は、トレーニングデータ内の入力特徴量、すなわち説明変数のみを必要とし、学習アルゴリズムはその説明変数に基づいてトレーニングデータ内の隠れた構造を発見する。多変量のデータを一貫したグループに分類するクラスタリングは、教師なし学習に分類される。バイオインフォマティクス分野では、クラスタリングはマイクロアレイや遺伝子発現解析に使用され、K 近傍法や階層的クラスタリング、スペクトルクラスタリングといったクラスタリングアルゴリズムが含まれる。正しい目的変数を事前に知ることができないため、クラスタリングのパフォーマンスを直接測定することは不可能である。その代わり、クラスタリングにより注目しているデータが分類されたかどうかをパフォーマンスの指標とするのが一般的である<sup>112,117</sup>。

### (3) 教師あり学習

教師あり学習は、各トレーニングサンプルの目的変数が既知である必要がある。そのため、トレーニングサンプルは、説明変数と目的変数がペアの状態となっている。学習アルゴリズムは、プロセス内で定義された特徴を使用して、説明変数から目的変数の値を予測するモデルをトレーニングする。目的変数が連続値である場合、予測モデルは「回帰関数」と呼ばれ、離散的な値のセットを取る場合、予測モデルは「分類器」と呼ばれる。教師あり学習問題の場合、既知の目的変数と予測された

目的変数の差を測定することで、学習済みモデルのパフォーマンスを定量化することが可能である。教師あり学習には決定木やサポートベクターマシン、ニューラルネットワーク、線形回帰、非線形回帰といった手法が含まれており、これらは疾患診断、医薬品の研究開発、ゲノム機能解析、バイオマーカーの認識、医用画像診断といった用途で広く使用されている<sup>112</sup>。

抗体医薬品の不純物粒子分析では、フローイメージング顕微鏡から取得される形態パラメータの項目数や種類が多く、多変量の説明変数から目的変数を予測するためには複雑な機械学習モデルが使用される。過去に報告された抗体医薬品に含まれる不純物粒子を同定する機械学習モデルとしては、決定木、サポートベクターマシン、勾配ブースティング決定木、ランダムフォレストが応用されている<sup>118,119</sup>。分類器としての決定木は、各説明変数で決定された閾値をもとにデータの分割を繰り返すことで、目的変数を予測する教師あり学習アルゴリズムである<sup>120</sup>。決定木のトレーニングでは、各説明変数での閾値や、データを分割する説明変数の順序および項目が学習される。決定木は、閾値や説明変数の次元が多くなるほど複雑となり、分類精度に影響する。サポートベクターマシンは、データを目的変数に分割するための超平面となる関数を選択する教師あり学習アルゴリズムである。サポートベクターマシンのトレーニングでは、各データと超平面までの最小距離であるマージンを最大化しながら超平面を選択していく。サポートベクターマシンは過学習が少なく、多変量の説明変数の分類に適しているとされる。勾配ブースティング決定木とランダムフォレストは、決定木の分類精度をより高めるために考案されたアンサンブル学習アルゴリズムである。勾配ブースティング決定木では、一部のトレーニングデータから作製された決定木モデルが誤分類したデータをもとに、誤分類を最小限にするような新たな決定木をモデルに追加することで、全体としての分類精度を向上させることが可能である<sup>121</sup>。ランダムフォレストは、トレーニングデータからランダムに抽出された複数のデータセットから決定木を作製し、それぞれの決定木で予測された目的変数の多数決をとることで、説明変数が多変量であっても学習を高速化させることが可能である<sup>122</sup>。

## 深層学習

機械学習は、その学習アルゴリズムの違いによりさらに細分化される。従来の機械学習では、説明変数であるトレーニングデータ内のパターン認識システムを構築する必要があるものの、生データから適切な内部表現や特徴ベクトルに変換する特徴抽出器を設計するためには、かなりの専門知識と慎重なエンジニアリングが必要であった。そこで、機械に生データを与え、パターン認識に必要な特徴を自動的に検出できるようにしたのが深層学習である<sup>108</sup>。深層学習では、生データという単一表現をより抽象的な特徴に変換する非線形モジュールを構成する。このような変換を組み合わせることで、非常に複雑な学習モデルを構築することが可能となる。予測モデルが分類器である場合、抽出する特徴を最も抽象化するためには、パターン認識に重要な説明変数の一部を強調・增幅し、パターン認識には無関係である部分の変動を最小限にするといった学習アルゴリズムを構築する。例えば、ピクセル値の行列として表現される画像はまず、画像内の特定の方向および特定の位置において、分類対象の要素（以下モチーフ）となる輪郭の存在を示す特徴が学習される（第一層）。次に、輪郭の特定の配置を認識することでモチーフを検出する（第二層）。最後に、検出されたモチーフが組み合わさり、分類対象の一部として検出される（第三層以降）。これらの特徴抽出層は人の手で設計されるのではなく、汎用性の高い学習手順でトレーニングデータから学習されるため、手作業でのエンジニアリングがほとんど必要なく、利用可能となるデータ量を大幅に増加させることができる。深層学習には、画像のパターン認識が可能な畳み込みニューラルネットワークや、文字変換予測で利用される再帰型ニューラルネットワークなどが含まれている。これらは、AI技術が長年達成できなかつた高次元データ内の複雑構造を発見することに優れており、画像認識、薬物動態および薬物活性の予測、DNA の突然変異の影響を予測など、多くの分野で適用することが可能である。

## 人工知能による不純物粒子の分類例

バイオ医薬品のなかで、形態の類似性を原因とした粒子の同定が困難であり、特に分類

手法の検討が進められているのが、凝集体とシリコーンオイル油滴である。凝集体はその形状が様々である一方、シリコーンオイル油滴は球状であるため、球状粒子の識別を目的とした形態パラメータのフィルターとして、アスペクト比が 0.85 以上、あるいは円形度が 0.95 以上である粒子をシリコーンオイル油滴とみなしていた<sup>49,123,124</sup>。しかし、これらのフィルターは、凝集体よりもシリコーンオイル粒子が多く存在する場合には凝集体の定量に大きな誤差が生じることが多く、そのため正確な特性評価が困難とされていた<sup>119,123,125</sup>。そこで、単一の形態パラメータではなく、複数の形態パラメータを総合的に解析することで粒子の同定を可能にする AI の活用が進んできた。Shibata らは、フローイメージング顕微鏡から取得可能な形態パラメータに基づき、10 μm 以上のサイズを持つ凝集体とシリコーンオイル油滴を区別するため、決定木、畳み込みニューラルネットワーク、サポートベクターマシンを応用した<sup>118</sup>。これにより、10 μm 以上のサイズ範囲の凝集体とシリコーンオイル油滴の誤分類率が 10%以下に抑えられ、三葉局方によって規制対象となっている非経口製剤に含まれる粒子を高精度で同定できる可能性が示された。さらに Saggū らは、フローイメージング顕微鏡から取得した形態パラメータを利用し、ランダムフォレストによる分類モデルの構築を試みた。1-10 μm 範囲の凝集体とシリコーンオイル油滴をそれぞれ独立して分類した結果、誤分類率が 5%以下となり、構築したモデルが高い精度で凝集体とシリコーンオイル油滴を分類可能であると示した<sup>119</sup>。このように AI は、粒子の形態パラメータから粒子を同定することが可能である一方、フローイメージング顕微鏡から取得できる形態パラメータの項目数やその種類は、装置に搭載される解析ソフトウェアのアルゴリズムに依存しており、粒子分類において重要性の高い形態学的な特徴量が見逃される可能性があるほか、重要性の低い特徴量も同時に取得することで粒子分類性能が低下する可能性もある<sup>119</sup>。

### 畳み込みニューラルネットワークによる不純物粒子分析

形態パラメータは通常、粒子画像から決定された粒子の関心領域に基づいて計算される、粒子の形態を示す指標である。粒子画像から取得される形態パラメータの値は、関心領域

を決定する閾値や解析アルゴリズムに依存するほか、粒子分類に対する各形態パラメータの重要性や高い分類性能を有するための形態パラメータの組み合わせは、実際に解析するまで明らかにはならない。そこで、形態パラメータ非依存的な分類手法として、粒子分類において重要な形態学的な特徴量を粒子画像から自動的に抽出し、抽出した特徴量に基づいて粒子を分類する畳み込みニューラルネットワーク（Convolutional Neural Network; CNN）が注目されつつある。

## CNN

医療分野において、深層学習は画像のパターン認識に優れていることから、X線画像やCT（Computed tomography; CT）画像、磁気共鳴画像、ポジトロンCT画像といった医療用画像から疾患の発見、病期分類、治療効果のモニタリング、手術および放射線治療の指導など、治療における様々な段階で深層学習の利用が増加している<sup>107-109,126</sup>。画像のパターン認識で最も使用されるアルゴリズムが、CNNである<sup>127,128</sup>。CNNの起源は、1979年に福島邦彦らによって提唱されたネオコグニトロンと呼ばれる学習モデルにさかのぼる<sup>129</sup>。1990年に、LeCunらによって、手書きの数字を分類するためのアルゴリズムとしてCNNが初めて利用され、その後1990年代の始めから物体検出や文字認識、顔認識など多くのアプリケーションで利用されるようになった<sup>108</sup>。1993年には、CNNが医療用画像の分析に導入され、胸部X線画像から肺結節を検出することに成功した<sup>130</sup>。また、同年にCNNを用いてマンモグラムから微小石灰化を検出することにも成功し<sup>131</sup>、その翌年には腫瘍の検出にも成功するなど、医療用画像におけるCNNの有用性が示されてきた。

## CNNの構造

CNNの基本的な構造は、(1) 畳み込み層、(2) プーリング層、(3) 全結合層の3つの成分で構成される（図5）<sup>108,127,128</sup>。以下では、画像解析におけるCNNの構造に焦点をあてながら説明する。

### (1) 疊み込み層

疊み込み層は、特殊な線形演算である疊み込みなどの数学演算の積み重ねから構成される。デジタル画像では、ピクセル値は 2 次元の数値配列として表すことができる。これに対し、最適化可能な特微量抽出器である小さな格子状の数値データ（以下「フィルター」と呼ぶ。）が画像の全範囲に適用されるようスライドされる。スライドするごとに、フィルターと重なる画像部分の数値データと、フィルターの数値データの要素ごとの積と和が計算され、それらの数値がテンソルと呼ばれる正行列に変換される。最終的に出力されたテンソルは特徴マップと呼ばれ、以降の層で利用される。CNN のトレーニングにおいては、誤差逆伝播法や確率的勾配降下法といった非線形演算を通じて、教師データであるクラス既知の目的変数と、出力された目的変数の差を最小限に抑えるよう、フィルターの数値データが最適化される。通常、特徴マップは入力テンソルと比較して高さと幅が減少するため、多くのレイヤーを適用したい場合には、入力テンソルの両側に 0 の行列を追加するパディングと呼ばれる手法が用いられる。

### (2) プーリング層

プーリング層では、後続するトレーニングにおいて学習しなければならないパラメータの数を減らすため、特徴マップの次元を削減するダウンサンプリング操作が行われる。最も一般的なダウンサンプリング操作は、最大プーリングである。最大プーリングでは、特徴マップからパッチと呼ばれる  $n$  行  $n$  列の正方領域を抽出し、各パッチの最大値のみを出力する。

### (3) 全結合層

疊み込み層とプーリング層を繰り返し適用したのち、出力される特徴マップは最終的に 1 次元のベクトルに変換され、全結合層へ結合される。全結合層では、入力された 1 次元ベクトルが重みづけされ、シグモイド関数や ReLU 関数といった活性化関数を通じて出力ベクトルとなるニューラルネットワークが実装される。全結合層のレイヤーの数だけ入力ベクトルの重みづけと出力が行われ、最終的には活性

化関数を通じて各目的変数、すなわち分類クラスに対する確率が output される。これにより、入力した説明変数に対する分類クラスが予測される。トレーニングにおいては、重みづけに必要な重みやバイアス値が学習される。

ニューラルネットワークは、人の脳の神経伝達をモデルとしたネットワークであり、入力層、隠れ層、出力層が相互的に接続された多数のニューロンによって構成される<sup>132</sup>。各層では、活性化関数を利用して入力値に重みとバイアスを加重し、次層の入力値として出力する。活性化関数は、入力ベクトル値とバイアスの合計に重み付けした値を、次の層に渡す際に使用され、ニューロンの起動を決定する関数である。活性化関数には、シグモイド関数、ソフトプラス関数、tanh 関数、ソフトマックス関数、ソフトサイン関数、ReLU (Rectified Linear Unit) 関数、ELU (Exponential Linear Units) などがあり、それぞれ用いるデータや学習モデルの種類によって使い分ける<sup>133</sup>。なかでも ReLU 関数は、深層学習のアプリケーションのなかで最も広く使用されている活性化関数のひとつであり、他の活性化関数と比較して優れた汎用性とパフォーマンスを示す。ReLU 関数は、入力ベクトル値が 0 未満の場合に出力ベクトル値を 0 で返す閾値演算となっており、入力ベクトル値を  $x_i$  とした場合、以下の式で表される（式 1）。

$$f(x) = \max(0, x) = \begin{cases} 0, & x_i < 0 \\ x_i, & x_i \geq 0 \end{cases} \quad (\text{式 } 1)$$

ReLU 関数はほぼ線形関数であるため、最終的なクラス決定において意味を持たない入力ベクトルを切り捨て、誤差を最小限にするための重みの最適化を容易にする線形モデルの特性が保管されており、学習の高速化が可能となる。

ニューラルネットワークによる分類問題では、最終層でソフトマックス関数が用いられる。ソフトマックス関数は、実数ベクトルから確率分布を計算するために使用され、確率の合計が 1 に等しい、0 から 1 までの出力値を返す。最終層までの層数を  $n$  とすると、ソフトマックス関数は以下の式で表される（式 2）。

$$f(x_i) = \frac{e^{x_i}}{\sum_{j=1}^n e^{x_j}} \quad (\text{式 } 2)$$

ソフトマックス関数では、入力された説明変数が各クラスに属する確率を返すことで、最

も確率の高かったクラスを最終的な出力値として決定する。

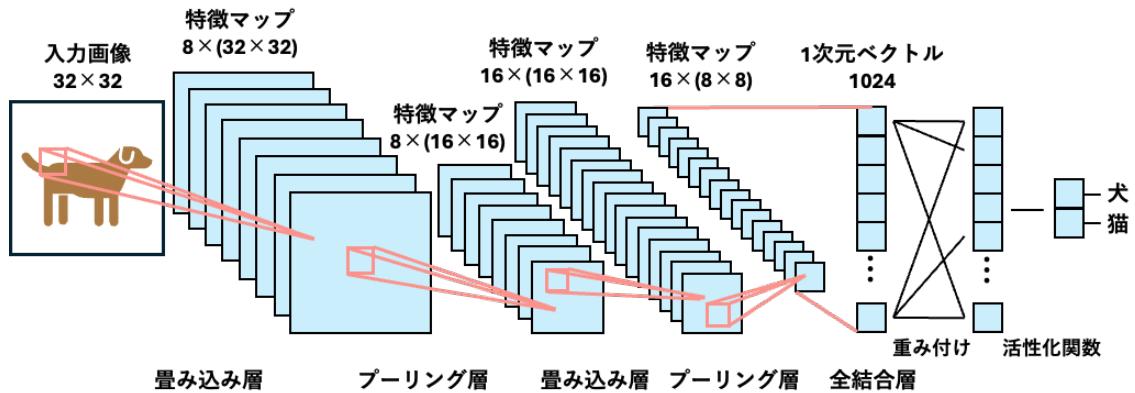


図 5: CNN の構造例。畠み込み層およびプーリング層では、入力画像 (32 pixel × 32 pixel) の特徴マップが使用するフィルターの枚数分抽出され、最終的に 1024 ユニットの 1 次元ベクトルに全結合される。

## バイオ医薬品における CNN の応用

これまで、人の目では区別のつけられない粒子や、形態パラメータに基づく解析では発生源を特定できない粒子を分類するための CNN が開発してきた。Riba らは、組換えモノクローナル抗体の生産細胞株として最もよく使用されているチャイニーズハムスター卵胞細胞株について、イメージングフローサイトメトリーにより取得した細胞の画像から、高抗体生産性細胞と低抗体生産性細胞を単一細胞レベルで分類する CNN を開発した<sup>134</sup>。これにより、クローニング細胞の成長度合いの予測や、高生産性細胞株の開発といった製剤開発のワークフローに CNN を応用できる可能性が示唆された。Calderon ら、および Gambe-Gibuena らは、フローイメージング顕微鏡を使用し、抗体医薬品で生じる凝集体の発生源となる物理化学的ストレスを粒子画像から同定するための CNN を開発した<sup>45,47</sup>。精度や分類クラス数の限界などはあるものの、このような CNN の活用により、目的物質がどのようなストレスにより目的物質由来不純物となるかを特定することが可能となり、製剤の品質に影響する要因の解明やガイドラインの策定といった、品質管理戦略のさらなる開発が期待できる。

以上の背景に基づき、本博士論文では、バイオ医薬品に含まれる不純物粒子の画像分類を可能とする CNN を構築し、バイオ医薬品において同定が困難とされる不純物粒子を定量することを目的とした。さらに、構築した CNN の性能を、正答率やスループットで評価し、形態パラメータに基づく解析や検出原理の異なる不純物粒子分析手法と比較することで、バイオ医薬品の不純物粒子分析における CNN の有用性を明らかにした。

## 第2節 博士論文構成

バイオ医薬品の有効性と安全性を担保するためには、製剤に含まれる多様な不純物粒子を分離、識別しつつ、それらを定量する必要がある。バイオ医薬品のなかには、不純物粒子分析において顕微鏡による補完的分析が実施されているものもあるが、不純物粒子の性質によっては、定量は可能であっても、種類の異なる不純物粒子をそれぞれ分離し、識別することが困難となる場合がある。そのような不純物粒子は、人の目で区別することはほぼ不可能であるため、これまで顕微鏡により取得される粒子の形態パラメータに基づく分類手法が検討されてきた。しかし、形態パラメータに基づく分類手法は、実製剤を模倣するような複数種類の不純物粒子が含まれる溶液の分析に応用可能であるかは明らかとなっていない。また形態パラメータは、算出するために使用される計算式やアルゴリズムによってその値が変動する可能性があるほか、使用する顕微鏡によって粒子分類に重要とされる形態パラメータを探査し、その組み合わせを最適化する必要があり、場合によっては形態パラメータの重要性が人の解釈によって異なることもある。一方 CNN は、取得された粒子画像から、粒子分類に必要な形態学的特徴を自動的に抽出するため、形態パラメータの算出方法や解析方法に依存しない粒子の同定が可能となると考えた。

現在上市するバイオ医薬品の不純物粒子分析において、粒子を可視化するための顕微鏡技術が確立されており、定量と識別が課題となっているのが、抗体医薬品と組換え AAV ベクター製剤である。抗体医薬品は、米国薬局方により推奨されている、 $2\text{-}10 \mu\text{m}$  の凝集体を内因性粒子から区別し、かつ凝集体と内因性粒子が混在した溶液の組成を予測することは困難であった。さらに、組換え AAV ベクター製剤で定量が求められる空粒子は、一見すると人の目でも明らかに完全粒子と区別可能ではある一方、完全粒子か空粒子か判断できない粒子も存在する。凝集体も空粒子も、製剤の有効性と安全性を低下する危険性が報告されているため、それらを正確に定量可能とする解析パラメータ非依存的な解析手法の検討は必要不可欠である。以上の背景から、本研究では、解析パラメータ非依存的な解析手法である CNN を応用し、未だ識別が困難とされるバイオ医薬品の不純物粒子を定量することを目的とした。この目的を達成するため、第2章では、抗体医薬品において識別

と定量が求められている不純物粒子を定量可能な CNN の構築と、その分類性能の評価に取り組んだ。第 3 章では、第 2 章で構築した CNN 構造を応用し、組換え AAV ベクター製剤で識別と定量が求められている不純物粒子を定量可能な解析プログラムの構築と、その分類性能、スループット、および検出限界の評価に取り組んだ。

第 2 章では、抗体医薬品（テタガム P 筋注シリソジ 250、CSL Behring 社）に含まれる可能性のある不純物粒子である内在性粒子の凝集体から、3 種類の内因性粒子を分類するための CNN の構築を行なった。本研究に用いた抗体医薬品は、あらかじめ注射器に充填された状態で販売されており、押し出し抵抗低減のために注射器の内壁にシリコーンオイルが塗布されている。よって、内因性粒子の一つとして、シリコーンオイル油滴を分類対象とした。さらに、市販されているほとんどの抗体医薬品には、タンパク質の変性を防ぐための界面活性剤が添加されている。界面活性剤は、長い年月をかけて分解し、分解物である遊離脂肪酸が粒子を形成することが報告されている<sup>135,136</sup>。遊離脂肪酸粒子は凝集体と類似した形態を持つ可能性があるものの、それらを分類する手法は検討されていなかった。よって本研究では、さらなる分類対象として、内因性粒子に部類される遊離脂肪酸粒子も選定した。遊離脂肪酸粒子は、炭素鎖の長さによりその形態が異なるほか、界面活性剤の分解後に生じる遊離脂肪酸の種類や分布は明らかになっていない<sup>137</sup>。このため、遊離脂肪酸粒子の形態を模倣した 2 種類の脂質粒子を遊離脂肪酸粒子のモデル粒子とし、本研究に使用した。抗体医薬品の不純物粒子分析に利用可能なフローイメージング顕微鏡は、現在 3 種類存在する。よって、3 種類のフローイメージング顕微鏡から取得されるそれぞれの粒子画像の分類に対応可能とする CNN 構造を構築した。CNN の学習に必要なトレーニングデータを得るために、凝集体、シリコーンオイル油滴、および 2 種類の脂質粒子の粒子画像を各フローイメージング顕微鏡で取得し、学習済み CNN を作製した。学習済み CNN が、2-10 μm のサイズ範囲において粒子分類を可能とするか検証するため、学習済み CNN の正答率を評価した。さらに、各フローイメージング顕微鏡画像から取得した形態パラメータによる解析も実施し、粒子の形態の類似性評価と、形態パラメータに基づく分類器（予測モデル）も作製した。その結果、学習済み CNN は、形態パラメータにより類似性が高い

とされた 2-10  $\mu\text{m}$  の不純物粒子を、形態パラメータに基づく予測モデルよりも高い正答率で分類可能であることが示された。学習済み CNN の分類性能をさらに評価するため、凝集体と内因性粒子（シリコーンオイル油滴、あるいは 2 種類の脂質粒子のいずれか）を特定の組成で含む不純物混合サンプルを調製し、学習済み CNN と形態パラメータに基づく予測モデルを用いて不純物混合サンプルに含まれる不純物粒子の分類を行い、不純物混合サンプルの組成の理論値と、学習済み CNN および形態パラメータに基づく予測モデルが予測する組成を比較した。結果は、使用するフローイメージング顕微鏡の種類に関わらず、学習済み CNN が予測した組成は、理論値と近い値を示し、本研究で構築した CNN が抗体医薬品に含まれる不純物粒子の組成を予測できる可能性が示された。

第 3 章では、血友病 B の治療に利用可能な血液凝固第 IX 因子の遺伝子を含む血清型 8 の組換え AAV ベクター製剤に対し、目的物質由来不純物と目的物質の分類に取り組んだ。製造される AAV 粒子のうち最大約 90% を占め、かつ混入が避けられない目的物質由来不純物である空粒子と、目的物質である完全粒子を本研究の分類対象とした。CNN の学習に必要なトレーニングデータを取得するため、100 keV の加速電圧を備えたクライオ電子顕微鏡により、空粒子および完全粒子それぞれの電子顕微鏡画像を取得し、空粒子と完全粒子を分類可能な学習済み CNN を作製した。学習済み CNN の分類性能を評価するため、クライオ電子顕微鏡画像の従来の画像解析手法である、AAV 粒子内部の輝度の強度を反映した形態パラメータに基づく解析も実施した。形態パラメータによる解析と CNN から算出した F/E 比を、組換え AAV ベクター製剤の不純物分析のゴールドスタンダードとして使用されている超遠心分析 (AUC) により算出した F/E 比と比較したところ、それぞれから算出された F/E 比はほとんど一致していた。続いて、形態パラメータによる解析と CNN を、分類精度やスループットの観点から比較した。まず、分類精度を比較するため、完全粒子と空粒子を複数の異なる組成で混合し、AAV 混合サンプルを作製した。次に、AAV 混合サンプルにおける F/E 比の理論値と、形態パラメータによる解析および CNN から算出された予測値に対して線形回帰分析を行なった。その結果、形態パラメータによる解析と CNN での不純物粒子分析結果はほとんど一致していたが、CNN がわずかに高い精度を

持つことが示された。次に、形態パラメータによる解析と CNN を用いて、解析する粒子数の変化に伴う F/E 比予測値の変動を確認した。その結果、CNN は、形態パラメータによる解析よりも少ない粒子画像数で F/E 比を予測可能であることが示された。CNN が高純度の AAV 製剤に応用可能であるか評価するため、組換え AAV ベクター製剤に含まれる空粒子の割合が 5%を下回るよう精製した高純度 AAV サンプルを作製し、AUC、形態パラメータによる解析、および CNN を用いて F/E 比の決定を行なった。その結果、AUC では評価できなかった高純度 AAV サンプルの F/E 比を、CNN では高い精度で再現性良く予測することができ、高純度 AAV サンプルの F/E 比を評価可能であると示された。

本研究結果から、CNN を活用することで、バイオ医薬品の売上高の多くを占める抗体医薬品や、今後需要が高まる予想される組換え AAV ベクター製剤に対して、製剤に含まれる可能性のある不純物粒子を定量できる可能性が示された。粒子画像から取得する形態パラメータを検討することなく、粒子画像の取得のみで CNN が各分野で課題となっている不純物粒子を単粒子レベルで分類することが可能であったという事実は、識別が困難な不純物粒子であったとしても、光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡により粒子の画像化を可能とする場合、CNN がバイオ医薬品の不純物粒子分析に応用可能であることを示す重要な知見である。

第 4 章では、第 2 章および第 3 章で得られた結果を総括するとともに、CNN によるバイオ医薬品の不純物粒子分析の展望について記述した。

## 第2章 抗体医薬品の不純物粒子分析

### 第1節 緒言

バイオ医薬品において、注射剤および輸液といった非経口製剤に含まれる可能性のある不純物粒子は、目的物質由来不純物と、製造工程由来不純物、または混入汚染物質に分類される。日本薬局方、米国薬局方、および欧州薬局方の三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である「6.07 注射剤の不溶性微粒子試験法」においては、これらの不純物を不溶性微粒子と記しており、「製剤中に意図することなく混入した、気泡ではない容易に動く外来性、不溶性の微粒子である。」と定義している<sup>16</sup>。また特に、米国薬局方 Chapter <1787>では、注射剤等の非経口製剤に含まれる粒子を、内在性粒子（目的物質由来不純物）、内因性粒子（製造工程由来不純物）、および外来性粒子（混入汚染物質）の3つに分類している<sup>26</sup>。

三薬局方では、容量 100 mL 以下の注射剤に含まれる不溶性微粒子が、10 μm 以上または 25 μm 以上である場合、それぞれ 6,000 個/mL 以下または 600 個/mL 以下の粒子濃度であることが求められている<sup>16,26,29</sup>。しかし近年、三薬局方において必須事項として記載されてはいないものの、米国薬局方 Chapter <1787>では、サブビジブル粒子と呼ばれる 2-100 μm サイズの粒子が、患者の免疫反応を増強させる可能性があるとして<sup>11,40,138</sup>、規制対象の 10 μm 以上の粒子だけでなく、2-10 μm の粒子も評価することが推奨されている<sup>26</sup>。さらに同 Chapter では、製造工程の一貫性および製品の品質を考慮するためには、非経口製剤に含まれる内在性粒子を特定・評価すべきとし、内在性粒子を内因性粒子から区別することも推奨している。このため、粒子の特性を正確に分析し、粒子の同定を可能とする分析手法の開発が求められている。

また三薬局方では、注射剤に含まれる粒子のサイズと粒子濃度を測定するための試験法として、光遮蔽粒子計測法の使用が優先されている<sup>16,25,29,30</sup>。しかし、透明度が高い粒子や粘性の高い乳剤など、光遮蔽粒子計測法で試験できない場合は、フローイメージング顕微鏡を使用した顕微鏡粒子計測法を用いるよう定められている。フローイメージング顕微鏡は、光遮蔽粒子計測法では観測が困難な粒子を検出できるだけではなく、粒子画像と粒

子の形態パラメータを取得することが可能である。粒子の形態パラメータは、内在性粒子と内因性粒子の分類に利用でき、形態パラメータを使用した粒子の同定が試みられてきた<sup>118,119,123,125,139</sup>。現在、製剤の分析に利用可能なフローイメージング顕微鏡は FlowCam 8100（以下「FlowCam」と呼ぶ。）（Yokogawa Fluid Imaging Technologies 社）、iSpect DIA-10（以下「iSpect」と呼ぶ。）（島津製作所）、および MicroFlowImaging 5200（以下「MFI」と呼ぶ。）（Bio-Techne 社）の 3 種類である。どのフローイメージング顕微鏡を利用するかは各製薬企業で決定されている一方で、これら 3 種類のフローイメージング顕微鏡は、光学設計や解析ソフトウェアのアルゴリズムがそれぞれ異なっており、粒子画像から算出される形態パラメータの項目や値が顕微鏡間で異なることが報告されている<sup>17,38,118</sup>。この違いは、粒子の定量だけでなく分類性能にも影響しており<sup>38,48</sup>、顕微鏡の設計や解析アルゴリズムに依存しない分類手法の検討が求められる。

これまで、抗体医薬品における不純物粒子の分類は、内在性粒子である凝集体と、内因性粒子であるシリコーンオイル油滴を対象とした研究が進められてきた<sup>49,119,123,139–142</sup>。抗体医薬品は、利便性、簡便性や安全性の向上、さらには自己注射の実現により、患者の通院を必要とする点滴からの解放と医療従事者の負担軽減を理由とした、あらかじめ注射器に薬液が充填されたプレフィルドシリンジ品としての販売が加速している<sup>143</sup>。シリコーンオイルは、注射器内のプランジャー・ストッパーの押し出し時の動きを滑らかにする潤滑剤として利用されており、非経口製剤で最もよく存在する内因性粒子のひとつである。凝集体とシリコーンオイル油滴は、そのサイズ範囲が類似しているものの、異なる光学特性と形態を持つため区別が可能である。一方、評価することが望ましいとされている 2-10 μm のサイズ範囲においては、装置の感度や分類性能に問題があり、凝集体とシリコーンオイル油滴の分類が困難であった<sup>49,119,123,139–141,144</sup>。そこで Calderon らは、サブビジブル粒子の定量をカバーできるフローイメージング顕微鏡の FlowCam を利用し、粒子画像から凝集体とシリコーンオイル油滴を分類するための CNN を開発した<sup>47</sup>。しかしながら、分類対象のサイズ分布については言及しておらず、CNN が 2-10 μm のサイズ範囲で不純物粒子を分類できるかは明らかとなつていなかった。また、Calderon らの CNN は、凝集体画像の

み、あるいはシリコーンオイル油滴画像のみで構成されるトレーニングデータセットを使用しておらず、クラス未知の粒子画像を「凝集体を大部分とする粒子群」か、あるいは「シリコーンオイル油滴を大部分とする粒子群」に分類するのみにとどまっており、単粒子レベルでの粒子の同定は実現されていなかった。さらに、CNN を利用した粒子の同定のほとんどは、FlowCam による粒子画像の利用にとどまっており<sup>45,47</sup>、その他 2 種類のフローイメージング顕微鏡である iSpect と MFI から取得される粒子画像により学習した CNN の分類性能は明らかになっていなかった。

また、粒子を同定するための手法検討は、凝集体とシリコーンオイル油滴の分類に限定されていた。一方で、シリコーンオイル油滴以外にも、頻繁に発生することが予測される内因性粒子は存在する。その一つが、遊離脂肪酸粒子である。遊離脂肪酸粒子は、凝集体の発生を抑制するために添加される界面活性剤が分解され、水溶媒中で粒子となることで生じる<sup>145-148</sup>。遊離脂肪酸粒子の発生は、製造工程で使用する宿主由来の加水分解酵素を原因とする場合と、ラジカル反応に基づいた自己酸化を原因とする場合がある<sup>147</sup>。特に抗体医薬品では、長期間（18-36 ヶ月）の冷蔵保管（2-8°C）後、20%以上の界面活性剤が分解され、遊離脂肪酸粒子となっていたことが報告されている<sup>148</sup>。抗体医薬品で一般的に使用される界面活性剤はポリソルベート 20 とポリソルベート 80 であり<sup>149</sup>、それらの脂肪酸側鎖の組成は、ラウリン酸（40-60%）、ミリスチン酸（14-25%）、パルミチン酸（7-15%）、カプリリン酸（≤10%）が主な種となっており、ロットごとで組成が異なる。これらの遊離脂肪酸は溶解度が限られているため、抗体医薬品中のサブビジブル粒子となる傾向が報告されている<sup>145</sup>。ゆえに、シリコーンオイル油滴だけでなく、遊離脂肪酸粒子も同様に内因性粒子として特定し、凝集体と区別しながら定量する必要があるものの、その分類手法はこれまで検討されていなかった。

以上より、抗体医薬品の不純物粒子分析では、2-10 μm の凝集体からシリコーンオイル油滴、あるいは遊離脂肪酸粒子を区別しつつ定量することが困難であったこと、さらに顕微鏡の設計や解析アルゴリズムに依存しない分類手法の検討が十分ではないことが、先行研究における課題としてあげられる。そこで第 2 章では、形態パラメータ非依存的な解析手

法である CNN が、使用する顕微鏡や分類対象とする粒子の種類に依存しない手法であるかを検討しつつ、薬局方で言及されるサブビジブル粒子のサイズ範囲である 2-10 μm の凝集体と内因性粒子（シリコーンオイル油滴、あるいは遊離脂肪酸粒子）を定量することを目的とした。このためにまず、3 種類のフローイメージング顕微鏡画像のいずれにも対応可能となる CNN 構造を構築した。注射剤で発生しうる不純物粒子を再現するため、凝集体、シリコーンオイル油滴、および 2 種類の脂質粒子を作製した。界面活性剤の分解物として生じる遊離脂肪酸粒子は、分解経路や側鎖の組成により形態やサイズが異なるため、実際に生じうる遊離脂肪酸粒子を完全に模倣したサンプルを作製することは困難である。そこで本研究では、遊離脂肪酸粒子のモデル粒子として、パルミチン酸から成る脂質をサブビジブル粒子サイズに微細化した脂質粒子を作製した。脂質粒子は微細化する方法によってその形態が異なるため、固形脂質を粉碎あるいは融解した脂質を噴霧（スプレー）することで、2 種類の脂質粒子を作製し、分類対象とした。次に、これらの粒子を用いて学習させた CNN の正答率を、分類対象の粒子の種類や使用する顕微鏡ごとに比較し、粒子の形態や装置の設計が分類性能に及ぼす影響を検討した。また、凝集体、シリコーンオイル油滴、および 2 種類の脂質粒子の各粒子の類似性を、形態パラメータを用いて評価するとともに、従来の粒子分類手法として形態パラメータに基づく予測モデルを作製し、その正答率を確認した。次に、CNN の分類性能をさらに検証するため、内在性粒子と内因性粒子を特定の組成で混合し、形態パラメータに基づく予測モデルと CNN が予測する粒子組成を算出し、組成の理論値と比較した。最後に、2-10 μm の不純物粒子に対する CNN の分類性能を、過去の文献や形態パラメータに基づく分類結果と比較しながら評価するとともに、異なるフローイメージング顕微鏡を利用した不純物粒子分析に対する CNN の有用性を議論した。

## 第2節 実験材料および実験方法

### 実験材料

#### 凝集体サンプル

Tetragam P 筋注シリンジ 250 (CSL Behrings 社) はプレフィルドシリンジから回収し、30 kDa カットオフのスピンカラムを使用して、pH5 に調製した 200 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（以下、「抗体バッファー」と呼ぶ。）に限外濾過により透析した。透析したサンプルは、0.5 mg/mL となるように抗体バッファーで希釈調製した。内在性粒子である凝集体を発生させるため、0.5 mg/mL に調製したサンプルを、2.5 mm × φ5 mm のマグネットスターを用いて 350 rpm で 1 時間攪拌し<sup>50</sup>、これを凝集体サンプルとした。

#### シリコーンオイルサンプル

粘土 1,000 cp のシリコーンオイル (Avantor 社) を、抗体バッファーで 2% w/v になるよう調製した。その後、シリコーンオイルがサブビジブル粒子サイズの油滴状になるよう、周波数 750 Hz、出力 200 W の超音波を 1 時間かけ、これを内因性粒子であるシリコーンオイルサンプルとした。

#### 脂質粒子サンプル 1-脂質粒子（粉碎）サンプル

パルミチン酸からなるグリセロールトリエステル (Dynasan<sup>®</sup> 116、Cremer Oleo 社) を液体窒素で冷却し、0.08 mm のフィルターを備えたローターミル PULVERISETTE 14 クラシックライン (Fritsch 社) を用いて 10,000 rpm で粉碎した。次に、粉碎した脂質粒子を 63 µm の篩 (Restsch 社) にかけ、篩を通過したものを回収したのち、2 倍の質量の粉末スクロースと混合し、これを脂質粒子（粉碎）とした。脂質粒子（粉碎）は、使用するまで 2°C の冷暗所で保管し、フローイメージング顕微鏡による測定時は 48 mg/L になるよう抗体バッファーで希釈した。

## 脂質粒子サンプル 2-脂質粒子（スプレー）サンプル

脂質粒子（粉碎）の作製に使用したものと同様のグリセロールトリエステルをホットプレートで融解し、ポリエチレングリコール-400（Polyethylene glycol-400; PEG-400）を含む特注の液槽に移し<sup>150</sup>、温度を90°Cに保った。融解したグリセロールトリエステルを冷却しながら個体粒子として噴霧するため、B-290ミニスプレードライヤー（Büchi社）に加え、冷却器を備えた除湿器（Hirmer社）をセットした。溶解したグリセロールトリエステルは、窒素による圧力（92 mbar）をかけ、流速473 L/hで90°Cから9°Cに急速冷却しながら噴霧させた。噴霧させた脂質粒子は、サイクロン式の回収装置で回収し、回収した脂質粒子の2倍の質量の粉末スクロースと混合することで、これを脂質粒子（スプレー）とした。脂質粒子（スプレー）も、使用するまで2°Cの冷暗所で保管し、フローイメージング顕微鏡による測定時は48 mg/Lになるよう抗体バッファーで希釈した。

## 実験方法

### フローイメージング顕微鏡による不純物粒子の測定

凝集体サンプル、シリコーンオイルサンプル、脂質粒子（粉碎）サンプル、および脂質粒子（スプレー）サンプルに含まれる粒子画像を取得するため、FlowCam、iSpect、およびMFIの3種類のフローイメージング顕微鏡を用いた。各フローイメージング顕微鏡は、不純物粒子サンプル測定前の使用前点検として、流路に異物が混入していないか確認するためのMilliQの測定、および、5 μmあるいは20 μmのポリスチレンビーズである標準粒子の測定を行い、各メーカーが推奨している分析基準を満たしていることを確認した。不純物粒子サンプルを測定する際に、各フローイメージング顕微鏡で使用した分析サンプル量や流速などの測定設定、および背景の平均グレースケール強度や倍率といった光学設定を表1にまとめた。サンプルを1回測定するごとに、次の測定でキャリーオーバーがないよう、酵素洗剤あるいは1 Mの水酸化ナトリウム溶液でフローセルを洗浄した。取得した粒子画像については、各フローイメージング顕微鏡の解析ソフトウェアを使用し、面積相当径（Area-based diameter; ABD）、球相当径（Equivalent spherical diameter; ESD）、円相当径

(Equivalent circular diameter; ECD) といった粒子のサイズ、円形度や透明度といった形態パラメータ（表 2）、および粒子濃度を取得した。

表 1. 3 種類のフローイメージング顕微鏡の設定

パラメータ	フローイメージング顕微鏡		
	FlowCam	iSpect	MFI
ハードウェア設定			
セルの厚み (μm)	80	120	100
セルの幅 (μm)	700	1,000	1,760
グレースケール(bit)	8	8	10
対物レンズの倍率	×10	×4	×5
画素数(pixel)	1920 × 1200	1280 × 1024	1757 × 1406
背景の平均輝度	170-180	240	- **
ソフトウェア設定			
プライミング量 (mL)	0.20	0.20	0.20*
解析サンプル量 (mL)	0.50	0.50	0.50
流速 (mL/min)	0.10	0.1*	0.17*
撮影効率 (%)	71.5	72	85*
推奨測定範囲 (μm) <sup>151-153</sup>	2-1,000	5-100	1-70
解析サイズ範囲(μm)	1-80	1-80	1-80
セグメンテーション閾値	Dark 10, Light 10	200	- **
粒子間の最近傍距離 (μm)	1	20	- **
直径の種類	ESD <sup>*1</sup> , ABD <sup>*2</sup>	ABD <sup>*2</sup>	ECD <sup>*3</sup>
解析ソフトウェア	VisualSpreadsheet version 3.4	iSpect Viewer version 1.2.5	MFI View Analysis Suite version 1.3

\* 変更不可のパラメータ

\*\* 非公開

<sup>\*1</sup> Equivalent Spherical Diameter; ESD<sup>\*2</sup> Area-Based Diameter; ABD<sup>\*3</sup> Equivalent Circular Diameter; ECD

表2. 3種類のフローイメージング顕微鏡で取得される形態パラメータの一覧

FlowCam	iSpect	MFI
Circularity	Area Based Diameter	Equivalent Circular Diameter
Aspect ratio	Equivalent Perimeter Diameter	Area
Area	Maximum Length	Perimeter
Area based diameter	Pattern Width	Circularity
Length	Vertical Feret Length	Intensity Mean
Width	Horizontal Feret Length	Intensity STD
Equivalent spherical diameter	Perimeter	Intensity Min
Filled diameter	Convex Envelope Perimeter	Intensity Max
Perimeter	Area	Max Feret Diameter
Convexity	Circularity	Aspect Ratio
Intensity	Aspect Ratio	
Sigma intensity	Feret Aspect Ratio	
Sum intensity	Average Brightness	
Compactness		
Elongation		
Roughness		
Edge gradient		
Circle fit		
Symmetry		
Circularity (Hu)		
Filled Area		
Feret Max Angle		
Feret Min Angle		

### 円形度と平均輝度を使用した形態分布の解析

不純物粒子の混合サンプルについて、粒子の形態の類似性を評価するため、各フローイメージング顕微鏡とその解析ソフトウェアから得られた各不純物粒子サンプルの円形度と平均輝度を散布図にプロットし、粒子の形態分布を図示化した。FlowCam と iSpect の円形度 (Circularity) は、ABD にあたる粒子の直径 $x_A$ と、粒子の周長を円周とみなした際の円

の直径 $x_{\text{Ep}}$ を用いて、以下の式に基づいて計算した（式3）。

$$\text{Circularity} = \frac{x_{\text{A}}}{x_{\text{Ep}}} \quad (\text{式3})$$

一方、MFIの円形度はFlowCamとiSpectで算出される円形度と異なり、粒子の周長に対する、粒子の直径（ECD）から計算される円周の比で表される。MFIにおける粒子の直径（ECD）がどのように定義されているかは未公開であるため、MFIの円形度データはMFI独自の計算方法によるものであることに留意した。続いて、各不純物粒子サンプルの円形度および平均輝度の散布図を全て重ね合わせ、形態分布の重なりを観測した。

## CNNの構築

フローイメージング顕微鏡による粒子画像の分類が可能なCNNを構築するため、MATLAB2019b（version 9.7.0.1216025、The MathWorks社）のDeep Learning Toolboxを利用して入力層から出力層までの内部構成要素を最適化し、画像分類に実装した（図6）。まず、入力する粒子画像はそのサイズが異なる場合、分類結果に偏りが生じる可能性があるため、フローイメージング顕微鏡で取得した不純物粒子サンプルの粒子画像は32 pixel × 32 pixelに正規化し、これを入力画像とした。CNNの構造としては、全結合層の前にバッチ正規化を含む3つのモジュールを組み込むことで、学習と分類の効率化を行った。ニューラルネットワークでは、層の前後で入力ベクトル値の分布が変化することで、学習効率の低下や初期パラメータの最適化を厳密に行う必要性が生じる。つまり、厳密な最適化ができない場合、学習速度や分類性能が低下する可能性がある。そこで、層の入力ベクトル値をトレーニングデータのミニバッチごとに正規化することで、層ごとの分布の変化を抑制する処理を、バッチ正規化と呼ぶ<sup>154</sup>。CNNの学習を効率化させる方法としては、これまでドロップアウトと呼ばれる正規化が定番であり、フローイメージング顕微鏡画像の分類モデルにもドロップアウトが用いられてきた<sup>47</sup>。ドロップアウトは、学習過程においてニューラルネットワークからニューロンをランダムに除外することで学習を効率化する手法であるが、分類対象によっては分類性能が低下することがある<sup>155</sup>。そこで本研究では、ドロッ

プアウトではなくバッチ正規化を CNN 構造に組み入れた。バッチ正規化を組み入れることで、ドロップアウトによる正規化が不要となり、抽出されるすべての特徴量を分類に使用することが可能となることから、CNN の分類性能が向上すると予測した。まず、第一モジュールは、畳み込み層とバッチ正規化層、ReLU 関数、そして入力画像を 24 フィルタ一分の  $16 \times 16$  行列の特徴マップに変換する最大プーリング層から構成した。第二モジュールは、24 フィルタ一分の  $16 \times 16$  行列の特徴マップを 48 フィルタ一分の  $8 \times 8$  行列の特徴マップに変換する畳み込み層、バッチ正規化、ReLU 関数、および最大プーリング層から構成した。第三モジュールは、48 フィルタ一分の  $8 \times 8$  行列の特徴マップを 96 フィルタ一分の  $8 \times 8$  行列の特徴マップに変換する畳み込み層、バッチ正規化層、および ReLU 関数から構成した。これら 3 つのモジュールにより抽出された特徴量を、全結合層の入力層における合計 6,144 個のニューロンとし、後続して学習された重みによる重み付けを行った。重み付けした成分を、クラス分類に有効なソフトマックス関数に入力し、最終的に最も確率が高くなったクラスを CNN による予測クラスとした。

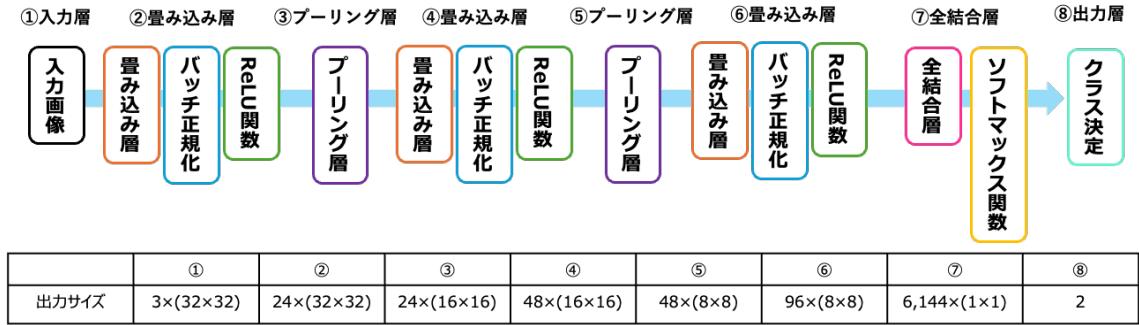


図 6. 本研究で構築した CNN の構造の概略と出力サイズ

### CNN のトレーニングと正答率による分類性能評価

FlowCam、iSpect、および MFI で取得された粒子画像を CNN の入力値として使用するため、以下の画像処理を行った。FlowCam から取得される粒子画像は 3 次元のグレースケール画像であり、検出された順番で TIFF 画像に集約される。よって MATLAB により、粒子画像が集約した TIFF 画像から個々の粒子画像を切り出し、これらを使用した。球相当径

が 2  $\mu\text{m}$  以上である粒子画像の選択は、FlowCam の解析ソフトウェアである VisualSpreadsheet (version 3.4) により行った。iSpect から取得される粒子画像は、4 次元のグレースケール画像である。4 次元めには、画像に基づくピクセル値が格納されていないため、1 次元から 3 次元のピクセル情報のみを使用した。また iSpect では、CCD カメラによるフローセルの撮影ごとに粒子画像が切り出され、異なるフォルダーに保存される。このため、MATLAB により、サンプル測定で作成されたすべてのフォルダーから粒子画像を一つのフォルダーに統一するプログラムを作製し、これを利用した。面積相当径が 2  $\mu\text{m}$  以上である粒子画像は、MATLAB を使用し、解析ソフトウェアである iSpect Viewer (version 1.2.5) から取得される全粒子のすべての形態パラメータと、粒子画像名を紐づけることで、それぞれのサイズごとに粒子画像を分別し、CNN の入力画像とした。MFI は、グレースケールが他のフローイメージング顕微鏡と異なる 10 bit であるが、保存される粒子画像は 8 bit の 1 次元のグレースケール画像である。FlowCam と iSpect と同様に 3 次元とするため、MFI で取得される 1 次元のピクセル値を複製し、3 次元化した。円相当径が 2  $\mu\text{m}$  以上である粒子画像は、iSpect と同様に MATLAB を使用し、解析ソフトウェアである MFI View Analysis Suite (version 1.3) から取得される全粒子のすべての形態パラメータと、粒子画像名を紐づけることで、サイズごとに粒子画像を分別し、CNN の入力画像とした。

各内因性粒子から凝集体粒子を分類可能とする 3 つの学習済み CNN を作製するため、凝集体サンプル、シリコーンオイルサンプル、脂質粒子（粉碎）サンプル、および脂質粒子（スプレー）サンプルをフローイメージング顕微鏡により測定し、粒子画像と粒子の形態パラメータを取得した。まず、米国薬局方の General Information Chapter <1787> で説明されているサブビジブル粒子のサイズ範囲が 2-100  $\mu\text{m}$  であることから<sup>26</sup>、取得した全粒子画像のうち、粒子の直径が 2-100  $\mu\text{m}$ （以下「>2  $\mu\text{m}$ 」と表記する。）である粒子画像をトレーニングデータセットとして、>2  $\mu\text{m}$  の粒子画像を分類するための学習済み CNN（以下「CNN<sub>>2  $\mu\text{m}$</sub> 」と呼ぶ。）を作製した。トレーニングでは、>2  $\mu\text{m}$  の凝集体粒子画像 15,000 枚と内因性粒子画像（シリコーンオイル油滴、脂質粒子（粉碎）、あるいは脂質粒子（スプレー））15,000 枚を CNN のトレーニングデータセットとした。トレーニングデータセット

の内訳は、合計 30,000 枚の粒子画像のうち 70% (21,000 枚) は学習で使用し、30% (9,000 枚) は検証に使用した。続いて、学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> の分類性能を確認するため、クラス既知の粒子画像 300 枚をランダムに選び、学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> で分類した。これにより得られた混同行列から、CNN<sub>>2 μm</sub> の分類性能評価指標を算出した。分類評価指標は、CNN による予測ラベルと教師データの実測ラベルで構成される混同行列に基づき、正答率 (Accuracy)、適合率 (Precision)、再現率 (Recall)、および F 値 (F-score) を評価指標とするのが一般的である。学習済み CNN の分類した粒子画像が、凝集体であれば「真」と返し、内因性粒子であれば「偽」と返すと仮定する。この場合、CNN によって「真」と予測された凝集体粒子画像の数は真陽性 (True positive; TP)、「偽」と予測された凝集体粒子画像の数は偽陰性 (False negative; FN)、「真」と予測された内因性粒子画像の数は真陽性 (False positive; FP)、「偽」と予測された内因性粒子画像の数は偽陰性 (False negative; FN) と表現される。すると、正答率、適合率、再現率、および F 値は、それぞれ以下の式で表わされる。

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{FP} + \text{TN} + \text{FN}} \quad (\text{式 } 4-1)$$

$$\text{Precision} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}} \quad (\text{式 } 4-2)$$

$$\text{Recall} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \quad (\text{式 } 4-3)$$

$$\text{F-score} = \frac{2\text{TP}}{2\text{TP} + \text{FP} + \text{FN}} \quad (\text{式 } 4-4)$$

正答率は、CNN の予測がどれだけ正しいかを示す指標である。再現率は、実際に「真」である画像のうち、CNN によって「真」と予測された画像の割合を示し、適合率は、CNN によって「真」と予測された画像のうち、実際に「真」である画像の割合を示す。F 値は、再現率と適合率を同時に評価する指標であり、再現率と適合率の両者を重要視する場合に利用される。本研究では主に、正答率に着目して CNN の分類性能を評価するが、凝集体のみ誤分類が多くなるといった分類の偏りの有無を確認するため、補足結果として再現率、適合率、および F 値も必要に応じて計算した（補足表 1）。

## 形態パラメータに基づいた予測モデル

フローイメージング顕微鏡で取得した表 2 の形態パラメータに基づき、MATLAB の Statistics and Machine Learning Toolbox を利用して、凝集体と各内因性粒子を分類可能な予測モデルを作製した。予測モデルを作製するための教師あり機械学習アルゴリズムとして、複雑な決定木 (Decision tree; DT)、細かいガウス SVM (Support vector machine; SVM)、勾配ブースティング決定木 (Gradient boosting decision tree; GBDT)、およびランダムフォレスト (Random forest; RF、MATLAB におけるバギング木) を使用した。予測モデルの学習では、各フローイメージング顕微鏡で取得した各不純物粒子サンプルから、 $2 \mu\text{m}$  以上のサイズを持つ 15,000 枚の粒子画像に相当する形態パラメータをトレーニングデータセットとして抽出し、それぞれのデータセットに不純物粒子のクラスのラベル付けをした。10 分割交差検証を使用して予測モデルの正答率を検証し、最も高い正答率を示した予測モデルを選定した。

## 学習済み CNN と形態パラメータに基づいた予測モデルによる不純物粒子組成の予測

学習済み CNN と形態パラメータに基づいた予測モデルの分類性能を評価するため、凝集体を含む不純物粒子混合サンプルをフローイメージング顕微鏡ごとに調製した。まず、CNN および形態パラメータに基づいた予測モデルのトレーニングデータセットを取得するためには測定した不純物粒子サンプルの粒子濃度を利用し、凝集体サンプルと内因性粒子サンプル（シリコーンオイルサンプル、脂質粒子（スプレー）サンプル、あるいは脂質粒子（粉碎）サンプル）の粒子数が 1:1 になるよう混合した不純物粒子混合サンプルを調製した。凝集体と各内因性粒子が会合しないよう、混合後すぐに不純物粒子混合サンプルをフローイメージング顕微鏡で測定し、粒子画像と粒子の形態パラメータを取得した。

フローイメージング顕微鏡により取得した不純物混合サンプルの粒子画像から、 $>2 \mu\text{m}$  の粒子画像を全て抽出し、作製した学習済み CNN $>2 \mu\text{m}$  と形態パラメータに基づいた予測モデルを用いて、凝集体と内因性粒子に分類した。分類した粒子画像の合計数と、内因性粒子に分類された粒子画像数を計算することで、不純物混合サンプルに含まれる内因性粒子

の割合（%）の予測値を算出した。また、不純物混合サンプルに含まれる内因性粒子の割合の理論値として、不純物混合サンプルの調製に使用した各不純物粒子サンプルの液量とサイズ分布から、調製後の不純物混合サンプルに含まれる内因性粒子の割合を計算した。

### 第3節 結果

#### フローイメージング顕微鏡による不純物粒子の測定

内在性粒子である凝集体と、内因性粒子であるシリコーンオイル油滴、脂質粒子（粉碎）、あるいは脂質粒子（スプレー）を分類する CNN のトレーニングデータを取得するため、各不純物粒子サンプルの粒子画像を、FlowCam、iSpect、または MFI の 3 種類のフローイメージング顕微鏡でそれぞれ取得した（図 7）。各フローイメージング顕微鏡で取得された粒子画像について、特に FlowCam で取得された粒子画像は、iSpect と MFI で取得された粒子画像と比較して、どの粒子サイズにおいても粒子内部の輝度が全体的に大きく、FlowCam の光学設計では粒子の撮影において光の回り込みが大きいことが確認された。粒子内部の輝度の様子が類似していた iSpect と MFI の粒子画像に関しても、背景輝度が異なっていることは明らかであり、光学設計の違いが粒子画像に現れていることが観測された（図 7 (e)-(l)）。また、FlowCam と比べて低倍率の対物レンズを搭載する iSpect と MFI では、粒子の種類に関わらず、粒子サイズが  $10 \mu\text{m}$  を下回るとほとんどの粒子が球状として観察され、類似した形態を示していた（図 7 (e)-(l)）。いずれのフローイメージング顕微鏡、粒子の種類においても、定量と識別が求められる  $2\text{-}10 \mu\text{m}$  の粒子画像は、その外観から粒子を同定することができず、さらに、 $10\text{-}15 \mu\text{m}$  のサイズであっても、特に凝集体と 2 種類の脂質粒子の粒子画像は粒子の同定が難しく、形態パラメータに基づく解析を実施したとしても、粒子の同定が困難であることが想定される。

次に、取得した粒子画像の数、分析したサンプル量（mL）、および粒子の直径から、各不純物粒子サンプルと不純物混合サンプルの粒子濃度を計算し、サイズ分布を得た（図 8）。不純物混合サンプル 1 mLあたりに含まれる粒子数は、調製に用いた 2 種類の不純物粒子サンプルに含まれる粒子数の合計とほぼ等しかった。さらに、不純物粒子サンプルと不純物混合サンプルに含まれる粒子のほとんどは、定量と識別が求められる  $10 \mu\text{m}$  未満のサイズ範囲で観測された。また、FlowCam と iSpect、および MFI で取得された不純物粒子サンプルおよび不純物混合サンプルのサイズ分布についてそれぞれ比較すると、そのグラフの形状は顕微鏡ごとで異なっていた。特に、FlowCam と MFI では、粒子サイズが大きくなる

ほど粒子濃度が小さくなつた一方、iSpect では  $3\text{-}5 \mu\text{m}$  で最も粒子濃度が大きくなつた（図 8 (d)–(f)）。これにより、iSpect では粒子サイズが  $3 \mu\text{m}$  を下回る場合に粒子の検出数が小さくなるような光学設計および解析アルゴリズムが搭載されていることや、粒子サイズの定義、すなわち粒子サイズの算出方法の違いが、サイズ分布に影響を与えていることが示された。

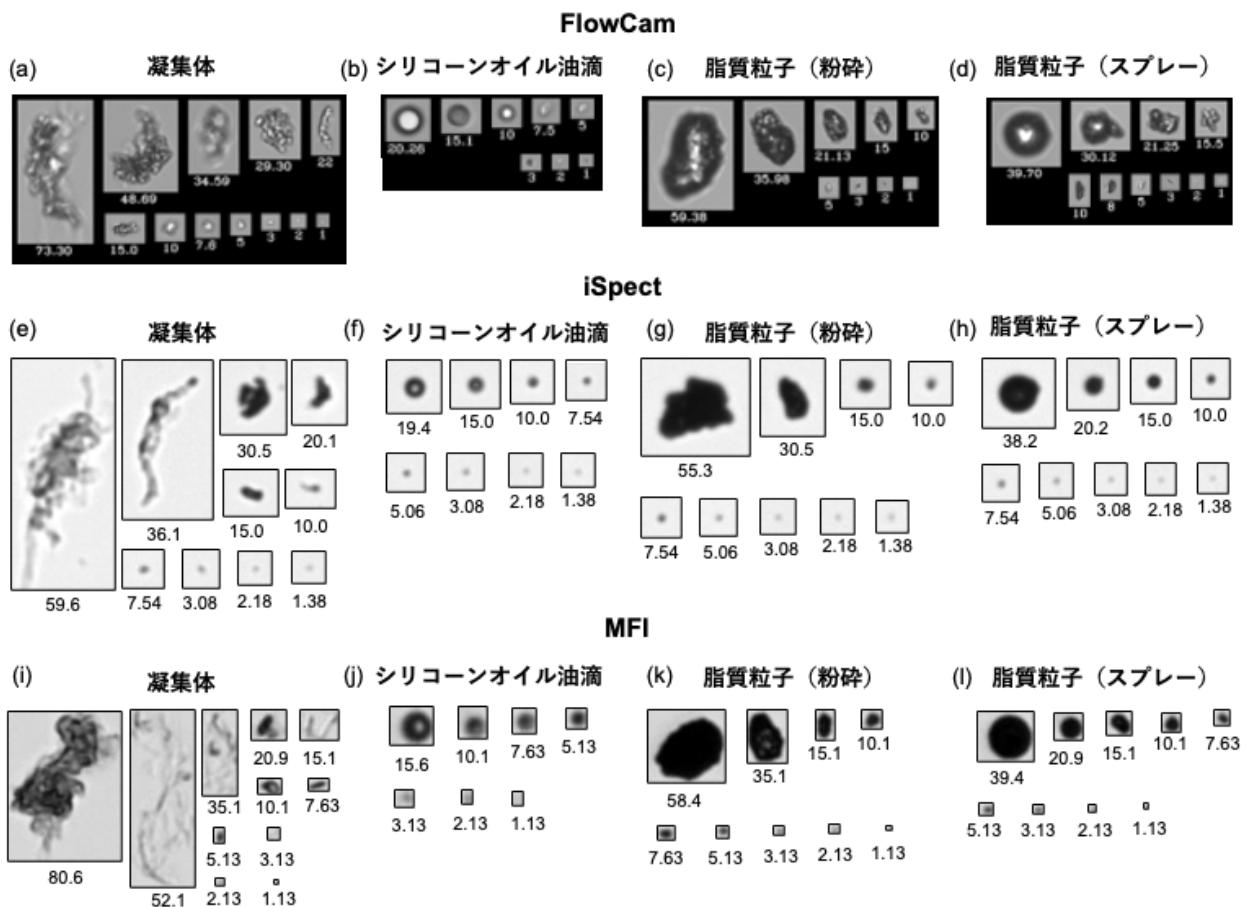


図 7. FlowCam により取得した(a)凝聚体、(b)シリコーンオイル油滴、(c)脂質粒子 (粉碎)、(d)脂質粒子 (スプレー) の粒子画像。iSpect により取得した(e)凝聚体、(f)シリコーンオイル油滴、(g)脂質粒子 (粉碎)、(h)脂質粒子 (スプレー) の粒子画像。MFI により取得した(i)凝聚体、(j)シリコーンオイル油滴、(k)脂質粒子 (粉碎)、(l)脂質粒子 (スプレー) の粒子画像。

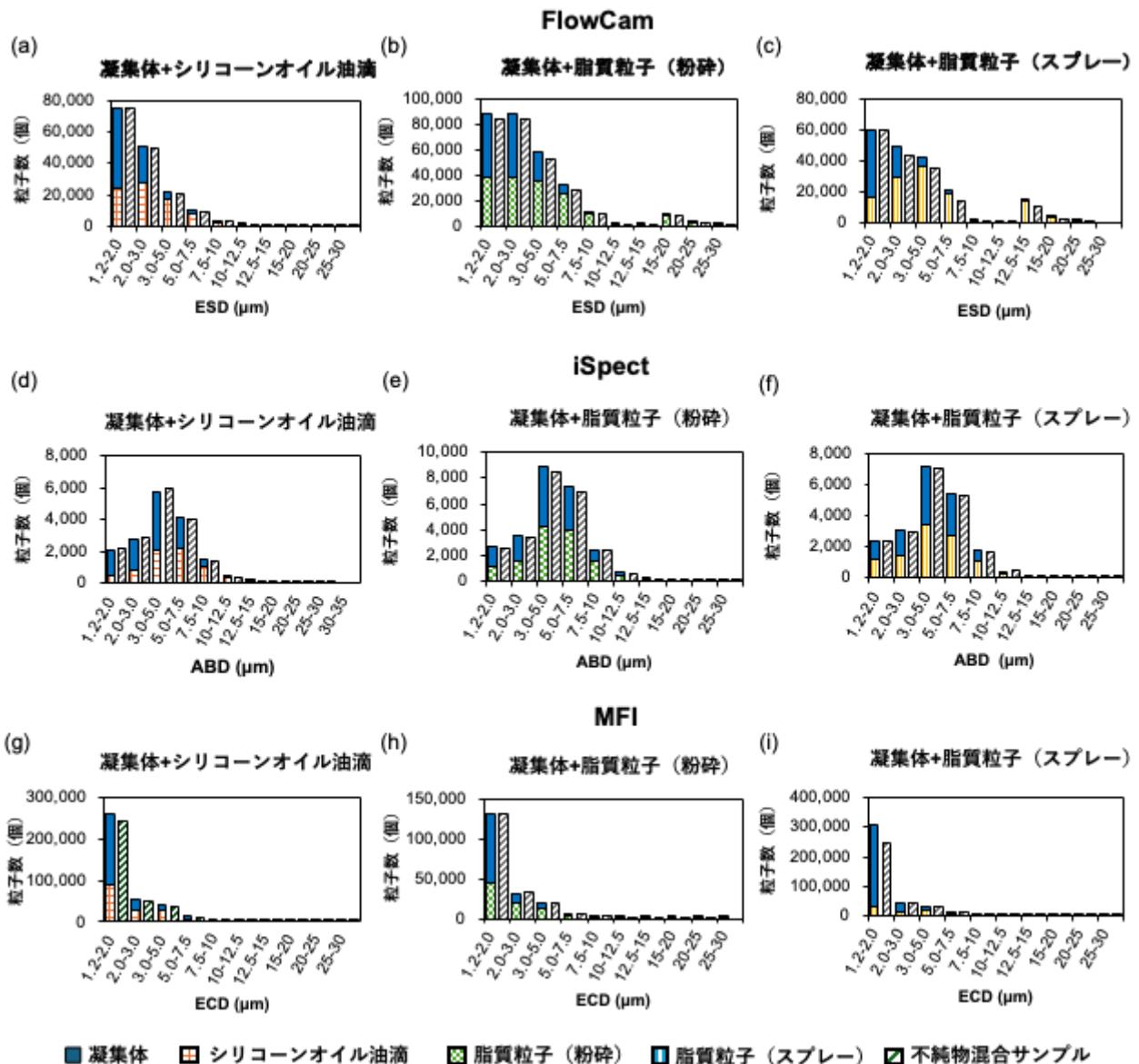


図 8. FlowCam で取得した (a) 凝集体とシリコーンオイル油滴、およびその混合サンプルのサイズ分布、(b) 凝集体と脂質粒子（粉碎）、およびその混合サンプルのサイズ分布、(c) 凝集体と脂質粒子（スプレー）、およびその混合サンプルのサイズ分布。iSpect で取得した (d) 凝集体とシリコーンオイル油滴、およびその混合サンプルのサイズ分布、(e) 凝集体と脂質粒子（粉碎）、およびその混合サンプルのサイズ分布、(f) 凝集体と脂質粒子（スプレー）、およびその混合サンプルのサイズ分布。MFI で取得した (g) 凝集体とシリコーンオイル油滴、およびその混合サンプルのサイズ分布、(h) 凝集体と脂質粒子（粉碎）、およびその混合サンプルのサイズ分布、(i) 凝集体と脂質粒子（スプレー）、およびその混合サンプルのサイズ分布。

## 形態パラメータの解析による不純物粒子の類似性評価

凝集体と内因性粒子の形態の類似性を確認するため、各不純物粒子サンプルの形態分布を比較した。粒子の視覚的特徴を説明するためには、一般的に粒子の円形度と平均輝度が用いられるため<sup>38,119</sup>、粒子画像から円形度と平均輝度を取得し、それぞれを横軸および縦軸とする散布図を作成した（図9）。続いて、各不純物粒子サンプルの散布図を重ね合わせ、形態分布の重なりを観測した。その結果、凝集体と各内因性粒子の形態分布は大きく重なっていた。さらに、同じ不純物サンプルの形態分布をフローイメージング顕微鏡ごとに比較すると、使用する顕微鏡によって異なる分布が観測された。特に、FlowCamにより取得された不純物粒子の平均輝度の分布範囲は、iSpect と MFI により取得された不純物粒子の平均輝度の分布範囲よりも小さくなかった。一方、円形度の分布に関しては、実験方法「円形度と平均輝度を使用した形態分布の解析」で明記したように、各装置で異なる定義の円形度が使用されているため比較が困難であるものの、同じ定義の円形度を使用する FlowCam は、iSpect の円形度の分布は不純物粒子間で異なっていた。特に、シリコーンオイル油滴は球体状であるため、円形度は 1 を中心に分布することが容易に予測できるが、FlowCam での円形度の分布範囲は iSpect よりも小さかった（図9 (b), (g)）。

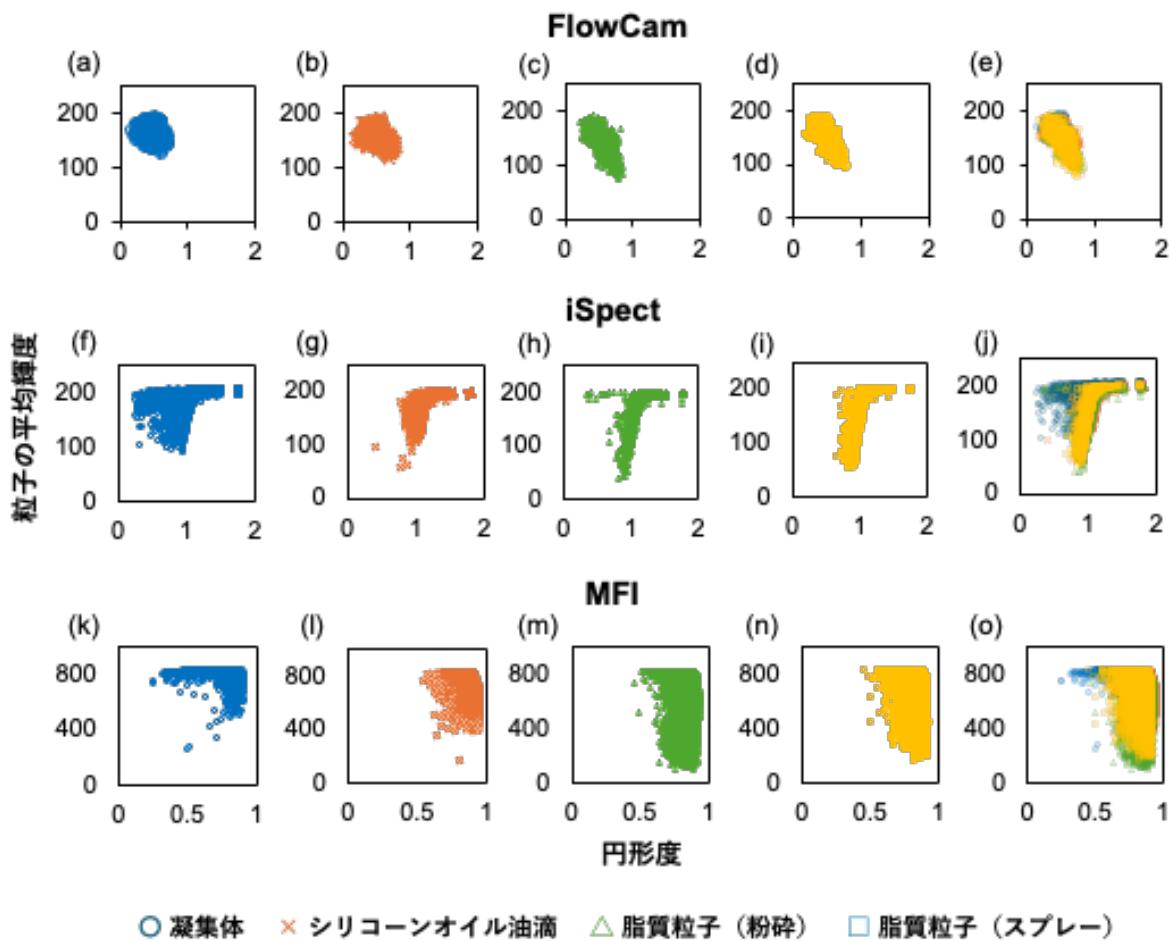


図 9. FlowCam により分析した(a)凝集体、(b)シリコーンオイル油滴、(c)脂質粒子（粉碎）、(d)脂質粒子（スプレー）の形態分布と、(e)各不純物粒子の形態分布の重ね合わせ。iSpect により分析した(f)凝集体、(g)シリコーンオイル油滴、(h)脂質粒子（粉碎）、(i)脂質粒子（スプレー）の形態分布と、(j)各不純物粒子の形態分布の重ね合わせ。MFI により分析した(k)凝集体、(l)シリコーンオイル油滴、(m)脂質粒子（粉碎）、(n)脂質粒子（スプレー）の形態分布と、(o)各不純物粒子の形態分布の重ね合わせ。

### 予測モデルの正答率

凝集体と内因性粒子を分類するための CNN の分類性能を評価するため、各フローイメージング顕微鏡から取得した凝集体と内因性粒子の粒子画像をトレーニングデータとした学習済み CNN を作製し、米国薬局方にて定量と分類が推奨されている  $2 \mu\text{m}$  以上の粒子画像を分類する学習済み  $\text{CNN}_{>2 \mu\text{m}}$  の正答率を算出した（表 3）。FlowCam により取得した粒

子画像でトレーニングした学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> の正答率は、内因性粒子の種類にかかわらず、全て約 92%以上となった。一方、iSpect により取得した粒子画像でトレーニングした学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> の正答率は、凝集体とシリコーンオイル油滴、あるいは脂質粒子（粉碎）の分類において約 88%以上、凝集体と脂質粒子（スプレー）の分類では、正答率が 79.6%の正答率となり、80%を下回る結果となった。MFI により取得した粒子画像でトレーニングした学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> の正答率は、内因性粒子の種類にかかわらず、いずれも約 79%となった。

次に、各フローイメージング顕微鏡で取得した各不純物粒子の形態パラメータに基づいて学習された予測モデルの正答率を表 3 にまとめた。形態パラメータに基づいて学習された予測モデルの正答率は、一部学習済み CNN の正答率よりも高かったものの、ほとんどの場合で学習済み CNN の正答率よりも低くなった。

表 3. 予測モデルの正答率\*

学習方法	シリコーンオイル油滴			脂質粒子（粉碎）			脂質粒子（スプレー）		
	FlowCam	iSpect	MFI	FlowCam	iSpect	MFI	FlowCam	iSpect	MFI
CNN	96.7%	88.1%	79.3%	92.4%	88.8%	78.8%	93.1%	79.6%	80.7%
DT	77.6%	83.5%	76.2%	82.1%	68.9%	77.9%	97.3%	68.7%	88.3%
SVM	<b>79.7%</b>	84.4%	73.6%	80.5%	<b>70.1%</b>	74.6%	96.3%	69.2%	86.3%
GBDT	78.5%	83.5%	<b>77.5%</b>	<b>83.0%</b>	69.9%	<b>78.2%</b>	<b>98.2%</b>	<b>69.5%</b>	<b>89.2%</b>
RF	79.1%	<b>84.5%</b>	76.3%	82.3%	66.7%	76.7%	97.5%	65.2%	88.0%

DT; Decision tree (決定木)

SVM; Support vector machine (サポートベクターマシン)

GBDT; Gradient boosting decision tree (勾配ブースティング決定木)

RF; Random forest (ランダムフォレスト)

\* 形態パラメータに基づいた予測モデルの中で、最も高い正答率を太字で示した。

## 学習済み CNN と形態パラメータによる解析の不純物混合サンプルの組成予測

以下の項目では、フローイメージング顕微鏡で取得した不純物混合サンプルの粒子画像を学習済み CNN で分類し、不純物混合サンプルに含まれる内因性粒子の割合を算出することで、米国薬局方にて定量と分類が推奨されている  $2 \mu\text{m}$  以上の粒子画像を分類する CNN<sub>>2 μm</sub> の分類性能について評価した（表 4）。FlowCam により取得した粒子画像でトレーニングした学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> は、各不純物混合サンプルの粒子組成の理論値から 12%以内の差で、予測値を算出した。特に、凝集体とシリコーンオイル油滴の分類においては、理論値と予測値との差が 2.9%のみとなった。凝集体と脂質粒子（粉碎）、および凝集体と脂質粒子（スプレー）の分類においては、理論値と予測値の差がそれぞれ 8.1%、および 11.7% となった。また、iSpect により取得した粒子画像でトレーニングした学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> は、いずれも理論値より高い粒子組成の予測値を算出したが、内因性粒子の種類にかかわらず、理論値と予測値の差は約 10% となった。MFI により取得した粒子画像でトレーニングした学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> は、凝集体とシリコーンオイル油滴の分類において、理論値よりも 14.6% 高い予測値を算出したものの、凝集体と脂質粒子の分類においては理論値と予測値の差が 7% 以内となった。

次に、各不純物混合サンプルにおいて、 $2 \mu\text{m}$  以上の粒子画像から解析された形態パラメータを使用し、形態パラメータに基づいて学習された予測モデルで粒子を分類したのち、不純物混合サンプルの組成を算出した。その結果、各予測モデルから算出された各不純物混合サンプルの組成は、ほとんどの場合で学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> よりも理論値との差が大きかった。さらに、学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> よりも高い正答率を示した予測モデルであっても、その予測値は理論値から大きく離れており、特に MFI における予測モデルは、全ての内因性粒子の割合を過剰評価していた。

表4. 不純物混合サンプルの組成予測結果

組成	シリコーンオイル油滴			脂質粒子（粉碎）			脂質粒子（スプレー）		
	FlowCam	iSpect	MFI	FlowCam	iSpect	MFI	FlowCam	iSpect	MFI
理論値	65.3%	30.1%	43.1%	57.8%	47.5%	60.1%	62.3%	43.3%	33.1%
予測値 (CNN)	62.4%	44.8%	57.8%	49.7%	51.7%	59.3%	50.6%	50.6%	39.7%
予測値 (MBA)	52.2%	41.0%	72.1%	53.0%	24.7%	80.7%	7.1%	39.3%	85.4%

MBA; Morphological parameter-based analysis (形態パラメータに基づく解析)

## 第4節 考察

### 脂質粒子を遊離脂肪酸粒子のモデル粒子とする妥当性について

本研究では、界面活性剤の分解により生じる遊離脂肪酸粒子を模倣するため、粉碎および噴霧（スプレー）の2通りの方法で脂質粒子を作製した。脂質として難水溶性のグリセロールトリエステルを使用したのは、脂質の溶解による形態学的特徴の変化を防ぐだけでなく、不純物混合サンプルにおいて、溶解した脂肪酸が凝集体に与える影響を最小限にすることが可能であるためである<sup>156</sup>。しかし、作製した脂質粒子が遊離脂肪酸粒子のモデル粒子となりえるかどうかは明らかではなかったため、モデル粒子としての妥当性を評価および議論する。

FlowCamにより取得した脂質粒子（粉碎）および脂質粒子（スプレー）について、一部は半透明な粒子であり、一部は楕円状の粒子であった（図7(c), (d)）。また、図8で示すように、2種類の脂質粒子のほとんどが10 μm未満のサイズを示していた。抗体医薬品に発生しうる遊離脂肪酸粒子のサイズは10 μm未満とされているほか<sup>146</sup>、Fishらが報告した遊離脂肪酸の粒子の特徴が半透明または楕円状であったことを考慮すると<sup>157</sup>、今回作製した2種類の脂質粒子は、抗体医薬品に含まれる可能性のある遊離脂肪酸粒子のモデル粒子とみなすことができると示唆される。したがって、作製した脂質粒子を遊離脂肪酸粒子のモデル粒子として、以降の考察を進めることとした。

### 不純物粒子サンプルと不純物混合サンプルを使用する妥当性について

3種類のフローイメージング顕微鏡：FlowCam、iSpectおよびMFIで取得した、4種類の不純物粒子：凝集体、シリコーンオイル油滴、脂質粒子（粉碎）、および脂質粒子（スプレー）の粒子画像は、そのサイズが10 μmよりも小さい場合、粒子の外観から粒子を同定することは困難であった（図7）。これは、不純物粒子の形態が類似していることを意味すると考えられる。同様に、各不純物粒子の平均輝度と円形度の形態分布が大きく重なっていたことも、10 μm未満の粒子の類似性が高いことを支持している（図9）。また、平均輝度と円形度だけでなく、粒子の対称性、アスペクト比といった他の形態パラメータ（表2）

を用いた主成分分析でも、バイプロットにおける各不純物粒子の分布は重なっており、粒子の識別が困難であることを示している（補足図1）。過去の研究においても、単一の形態パラメータや複数の形態パラメータの組み合わせによって、 $10\text{ }\mu\text{m}$  未満の凝集体とシリコーンオイル油滴を区別することは困難であるとしており、本研究結果も同様の傾向を示している<sup>123,125</sup>。さらに、不純物粒子サンプルのサイズ分布からは、本研究で使用した不純物粒子は、定量と識別が未だ困難とされる  $10\text{ }\mu\text{m}$  未満のサイズをもつことが示された（図8）。以上から、今回作製した不純物粒子サンプルは、それぞれ形態が類似しているため識別が容易ではなく、定量と識別が求められる  $2\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$  の不純物粒子を再現できたと考えられる。

また、不純物混合サンプル  $1\text{ mL}$ あたりに含まれる粒子数は、不純物混合サンプルの調製に使用した各不純物粒子サンプルの液量および粒子濃度から計算される粒子数と同様の値となった（図8）。すなわち、不純物混合サンプルを調製するにあたって、不純物粒子の分解や溶解、会合、凝集による粒子数の増減がほとんどなかったと仮定できる。したがって、不純物混合サンプルの調製に使用した各不純物粒子サンプルの液量および粒子濃度から計算した内因性粒子の割合を、不純物混合サンプルの組成の理論値であるものとして以降の解析を進めた。

#### フローイメージング顕微鏡ごとで取得される形態パラメータの違い

3種類のフローイメージング顕微鏡：FlowCam、iSpectおよびMFIを使用して取得した、4種類の不純物粒子：凝集体、シリコーンオイル油滴、脂質粒子（粉碎）、および脂質粒子（スプレー）の形態分布は、同じ不純物粒子サンプルを測定したにもかかわらず、使用したフローイメージング顕微鏡ごとに結果が異なっていた（図9）。Kiyoshi らや Zöllsr らの研究においても、凝集体を含む同一サンプルを FlowCam と MFI で測定した結果、取得されたアスペクト比、円形度、輝度の分布に差が生じたことが報告されており<sup>17,38</sup>、本研究の結果も同様の傾向を示している。これには、表1で示した各フローイメージング顕微鏡のハードウェア設定およびソフトウェア設定の違いが、影響していると考えられる<sup>17</sup>。

まず、各顕微鏡間の平均輝度の違いについて考察する。iSpect と MFI では、背景よりも輝度が小さい粒子のみを検出する一方<sup>17</sup>、FlowCam では、背景よりも輝度が小さい粒子と大きい粒子を検出することが可能である。なぜなら、FlowCam の光学設計は、MFI とは異なり、特定の光の回折パターンを生じるように設計されているため、背景よりも輝度の高い粒子の取得を可能とすることが報告されているためである<sup>17</sup>。図 7 からも明らかであるように、FlowCam から取得された粒子画像は、iSpect および MFI から取得された粒子画像と比較して、コントラストが小さい代わりに粒子内部の輝度が全体的に高く、粒子の多様な形態を観察することが可能である。一方 iSpect と MFI は、FlowCam のような光の回折パターンによる粒子の形態に変化がないため、コントラストが高く粒子内部の輝度が全体的に低くなると考えられる<sup>17</sup>。これらを考慮すると、特定の光の回折パターンの有無は、粒子の平均輝度の分布にも影響すると考えられ、表 1 で示したグレースケールの違いはあるものの、iSpect と MFI での粒子の平均輝度の分布傾向は類似していたことから、iSpect と MFI には、FlowCam のもつ特有の光の回折パターンがほとんどないと推察される。

次に、各顕微鏡間の円形度の違いについて考察する。表 1 で示すように、FlowCam では iSpect と MFI よりも高い倍率の対物レンズを使用している。FlowCam は、MFI よりも対物レンズの倍率が大きいため、被写界深度が浅く、焦点の合わない粒子画像を多く取得する可能性が指摘されており<sup>17,158</sup>、本研究でも粒子の輪郭がぼやけた焦点の合わない画像が多く取得されている（補足図 2）。実際に、表 1 で設定したセグメンテーション閾値にしたがって、輪郭がぼやけたシリコーンオイル油滴画像の関心領域を二値化すると、関心領域が円形とならず、本来球形であるシリコーンオイル油滴の円形度の値は 1 よりも小さくなつた（補足図 2 (b)）。よって、対物レンズの倍率の違いにより、FlowCam での円形度の分布範囲は、iSpect と MFI と比較して小さくなつたと考えられる。

さらに、図 8 における不純物粒子サンプルおよび不純物混合サンプルのサイズ分布からも、表 1 で示した各フローイメージング顕微鏡の光学設計や解析ソフトウェアのアルゴリズムの違いによる影響が顕著となっている。図 7 で示したように、各フローイメージング顕微鏡で取得される粒子画像の背景輝度が異なっていたことから、光源の強さ、あるいは

カメラのダイナミックレンジが各顕微鏡間で異なることが示唆される<sup>159</sup>。また、対物レンズの倍率の違いにより、粒子画像 1 pixelあたりのサイズ ( $\mu\text{m}$ ) も各顕微鏡で異なると考えられる。したがって、不純物粒子を模倣するような標準粒子を用いて各顕微鏡の粒子サイズの定義や算出アルゴリズムの統一を試みたとしても、粒子のサイズ分布や粒子の関心領域の面積を完全に揃えることは困難であることが推察される。

以上のことから、本研究結果は、粒子画像から取得される形態パラメータの値や分布は顕微鏡間で異なるという過去の研究結果を支持しており<sup>17,38</sup>、これには光学設計の違いが影響しているため、各顕微鏡で解析アルゴリズムを統一することは困難であると考察できる。

## 2 $\mu\text{m}$ 以上の粒子画像を分類する学習済み CNN<sub>>2 $\mu\text{m}$</sub> の分類性能

### 凝集体とシリコーンオイル油滴の分類について

FlowCam により取得した学習済み CNN<sub>>2  $\mu\text{m}$</sub>  は、96.7% の正答率を示しており、さらに、凝集体とシリコーンオイル油滴を含む不純物混合サンプルの粒子組成を、理論値から 3% の差で予測することができた。Calderon らも同様に、FlowCam で取得した粒子画像を利用し、凝集体とシリコーンオイル油滴を分類するための CNN を構築した。しかし、Calderon らの CNN は、凝集体とシリコーンオイル油滴の組成が 1:1 である混合サンプルに含まれる凝集体の割合を、理論値から 25% 以上過小評価、あるいは過大評価していた<sup>47</sup>。さらに Calderon らの CNN は、凝集体単独のクラスとシリコーンオイル油滴単独のクラスに分類するものではなく、粒子がどの「不純物粒子群」に属するかを予測するというものであった<sup>47</sup>。一方、本研究で構築した学習済み CNN<sub>>2  $\mu\text{m}$</sub>  は、96% 以上という高い正答率で単粒子レベルでの粒子分類を可能とした。したがって、本研究で構築した CNN 構造は、過去の研究で構築された CNN 構造よりも、正答率と分類クラスの正確さという点で優れていることを示唆している。Calderon らの CNN と、本研究で構築した CNN の構造の大きな違いは、バッチ正規化を使用するか、ドロップアウトを使用するかである<sup>160</sup>。ドロップアウトは、CNN のトレーニング過程で一部のニューロンをネットワークから完全に削除するた

め、学習効率を向上させることは可能であるものの、その分正答率は低くなることがある<sup>155</sup>。一方バッチ正規化は、ニューロンをネットワークから排除することなく、すべてのニューロンを使用して学習することが可能であるため、ドロップアウトの使用時とほとんど変わらない学習速度にもかかわらず、正答率が高くなることが報告されている<sup>160</sup>。したがって、これまで検討されてきた CNN よりも高い正答率を示したのは、バッチ正規化の導入によるものだと示唆される<sup>160</sup>。また、Calderon らの CNN は、分類する粒子のサイズについて言及しておらず、2-10 μm の粒子を CNN により凝集体、あるいはシリコーンオイル油滴に分類可能であるかは明らかでなかった。一方、本研究で分類対象とした不純物粒子は 2-10 μm の範囲で観測され、それらの形態の類似性は高かったにもかかわらず、CNN は、凝集体とシリコーンオイル油滴の粒子画像を高い正答率で分類した。このことから、CNN を活用することで、これまで不可能とされていた不純物粒子の同定が可能になると想定される。

次に、iSpect と MFI における学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> は、それぞれ 88.1% と 79.3% の正答率を示し、FlowCam における学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> よりも正答率は低くなった。また、iSpect と MFI における学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> は、凝集体とシリコーンオイル油滴を含む不純物混合サンプルの粒子組成を、理論値から 15% 以内の差で予測したものの、FlowCam における学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> より分類性能は劣っていた。これは先述した通り、FlowCam が独自の光学設計をもち、粒子の多様な形態を観察することが可能であることが、正答率の向上に大きく関わったと推察される。そこで、FlowCam と MFI で取得した凝集体とシリコーンオイル油滴の粒子サイズと、粒子内部領域の凹凸の程度を示す指標である輝度の標準偏差を使用して、各不純物粒子の形態分布を比較した（補足図 3）。その結果、シリコーンオイル油滴に関して、形態分布の広がりは FlowCam よりも MFI で小さくなっていた（補足図 3(b), (f)）。一方、凝集体の形態分布の広がりは装置間で大きな変化はなく、むしろ FlowCam では、凝集体とシリコーンオイル油滴の形態分布が大きく重なっていることから、輝度の標準偏差にもとづいた粒子の分類が困難であると予測される<sup>119</sup>。それでも関わらず、FlowCam における学習済み CNN<sub>>2 μm</sub> が最も高い正答率を示したという本研究結果は、高い正答率の学

習済み CNN を作製するには、粒子内部の形態が観察可能な粒子画像が必要である可能性を示す、新たな知見である。ただし、今回 iSpect に関しては、輝度の標準偏差の取得が不可能であったため、MFI と類似した形態分布を示すという仮定のもと考察していることに留意が必要である。

### 凝集体と脂質粒子の分類について

バイオ医薬品で最も一般的に利用される非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート 20 とポリソルベート 80 である<sup>149</sup>。使用する界面活性剤によって異なる形態の遊離脂肪酸粒子が生じることが予想されることから<sup>149,161</sup>、本研究では、形態の異なる 2 種類の脂質粒子を遊離脂肪酸粒子のモデル粒子として作製し、凝集体との分類を試みた。

まず、FlowCam により取得した 2  $\mu\text{m}$  以上の粒子画像を分類する学習済み CNN<sub>>2  $\mu\text{m}$</sub>  は、凝集体と脂質粒子（粉碎）あるいは脂質粒子（スプレー）の分類において、それぞれ 92.4% あるいは 93.1% の正答率を示しており、凝集体とシリコーンオイル油滴の分類よりも小さい値となった。さらに、どちらの学習済み CNN<sub>>2  $\mu\text{m}$</sub>  も、不純物混合サンプルの粒子組成を、理論値よりも 8.1%、あるいは 11.6% 小さく予測した。前項の「凝集体とシリコーンオイル油滴の分類について」と同様に、凝集体と各脂質粒子の輝度の標準偏差の分布を比較したところ、形態分布範囲はいずれも広く、FlowCam は各脂質粒子の形態を反映した粒子画像を取得できたと推察される（補足図 3）。しかしながら、凝集体とシリコーンオイル油滴を分類する学習済み CNN<sub>>2  $\mu\text{m}$</sub>  と比較して、凝集体と脂質粒子の不純物混合サンプルに含まれる粒子の誤分類が多かったという結果は、脂質粒子の形態パターンはシリコーンオイル油滴よりも凝集体と類似していることを意味する。しかし、形態パラメータに基づく解析では、凝集体と脂質粒子（スプレー）の不純物混合サンプルの粒子組成を、ほとんど予測できていなかったことを考慮すると、FlowCam での測定において凝集体と脂質粒子が混在したサンプルを分析する場合、CNN が最も高い正答率で粒子組成を予測できる可能性があると示された。

また、iSpect および MFI により取得した、2  $\mu\text{m}$  以上の粒子画像を分類する学習済み

$\text{CNN}_{>2 \mu\text{m}}$  も、FlowCam における学習済み  $\text{CNN}_{>2 \mu\text{m}}$  と同様に、凝集体とシリコーンオイル油滴の分類よりも小さい正答率を示した。一方で、iSpect および MFI における学習済み  $\text{CNN}_{>2 \mu\text{m}}$  は、凝集体と脂質粒子を含む不純物混合サンプルの粒子組成を、理論値から 1-6% の差で予測することが可能であった。いずれの学習済み  $\text{CNN}_{>2 \mu\text{m}}$  も、正答率こそ 80% 程度であったものの、ほとんどの不純物混合サンプルに対して形態パラメータに基づく解析よりも理論値に近い粒子組成を予測していたことは、CNN が、遊離脂肪酸粒子のモデル粒子である脂質粒子と凝集体を分類可能であることを強く裏付ける結果である。

### CNN による抗体医薬品の不純物粒子分析

本研究において構築した CNN は、異なる光学設計をもつフローイメージング顕微鏡から取得された粒子画像であっても、不純物混合サンプルに含まれる凝集体と内因性粒子を少なくとも約 80% 以上の正答率で分類し、不純物混合サンプルに含まれる内因性粒子の割合を理論値に近い値で予測することが可能であった。これまで着目されてきた凝集体とシリコーンオイル油滴の分類に関して、学習済み CNN による不純物混合サンプルの組成の予測値と理論値との差が最小で 3% 以内であったことは、形態パラメータに基づく解析では困難とされていた 2-10  $\mu\text{m}$  サイズの粒子の分類に CNN が有用である可能性を意味している<sup>123,125,139,141,144</sup>。また、これまで構築された、凝集体とシリコーンオイル油滴を分類するための予測モデルの分類性能は、正答率に基づく評価がほとんどであり、不純物粒子が混在するサンプル溶液の粒子組成を予測し、学習済み CNN の分類性能を評価したのは本研究が初めてである。さらに、これまで凝集体とシリコーンオイル油滴の分類に限定されていた CNN が、凝集体と遊離脂肪酸粒子のモデル粒子である脂質粒子の分類にも利用可能であることを実証し、内因性粒子の種類によらず凝集体との区別が可能であったという本研究結果は、CNN を抗体医薬品の不純物粒子分析に応用するにあたり重要な知見である。

また特筆すべきなのは、学習済み CNN の正答率や粒子組成予測といった分類性能が、使用する顕微鏡間で大きく変化しなかったことである。形態パラメータに基づく解析では、不純物混合サンプルの粒子組成の予測値が理論値から大きく外れているものが多く、使用

する装置や分類対象によって異なる分類性能を示した。形態パラメータに基づく解析での顕微鏡間の分類性能の違いは、過去の研究でも報告されており、本研究結果も同様の傾向を示した<sup>118,119</sup>。したがって、形態パラメータに基づく解析は、使用される装置や解析手法によって、使用される形態パラメータの値や項目、組み合わせが異なるため、正答率や組成予測結果が顕微鏡間で大きく異なると考えられる。一方 CNN は、異なる光学設計や解析ソフトウェアが搭載されたフローイメージング顕微鏡であっても、粒子画像を取得するというプロセスのみで、2 種類の不純物粒子が含まれる不純物混合サンプルの粒子組成を理論値と近い値で予測した。使用する顕微鏡間で CNN の分類性能が大きく変化しなかったということは、本研究で初めて明らかになった事実であり、各製薬企業で異なるフローイメージング顕微鏡が使用されていることを考慮すると、CNN は、形態パラメータに基づく解析よりもユニバーサルな不純物粒子分析が可能であると結論づけられる。本研究では、抗体医薬品の製剤に含まれる不純物粒子として、凝集体とシリコーンオイル油滴、遊離脂肪酸粒子に焦点をあてた。これらの多くは、製剤となってから投与されるまでに発生しると考えられるため<sup>21,22,49,144,145,147,157</sup>、本研究による CNN の不純物粒子分析への応用は、製剤の特性評価において有効となる可能性がある。現時点で、2-10 μm の凝集体は規制の対象とはなっていないものの、潜在的な免疫原性の危険性は依然として存在する<sup>20,39,162</sup>。したがって、将来的に 2-10 μm の凝集体も含量の規格値が設定される可能性があり、本研究で構築した CNN が、その規格値に対して十分な精度で凝集体の識別と定量を可能であるかどうかは、今後検討されなければならない。

さらに本研究では、凝集体と内因性粒子の二項分類を可能とする CNN を構築した。しかし、実製剤では 3 種類以上の不純物粒子が混在する可能性もある。分類問題を解決するための機械学習は、その分類クラスが多いほどモデルが複雑となり、高い正答率でモデルを構築することは困難とされる<sup>161</sup>。実際、凝集体と脂質粒子（粉碎）、脂質粒子（スプレー）をトレーニングデータとして多クラス分類では、どのフローイメージング顕微鏡画像を使用した場合でも、その正答率は 72%を下回っており、多クラス分類を可能とする CNN 構造については研究の余地がある（補足図 4）。

## 第5節 小括

第2章では、抗体医薬品で定量と分類が求められている 2-10 μm の凝集体と、内因性粒子であるシリコーンオイル油滴、脂質粒子（粉碎）、あるいは脂質粒子（スプレー）を分類することを目的とし、現存する3種類のフローイメージング顕微鏡それぞれに対応可能な CNN 構造を構築し、不純物粒子の分類性能を評価した。

第一に、2-10 μm の凝集体と内因性粒子の分類において、使用するフローイメージング顕微鏡の種類によっては、分類が困難とされていた 2-10 μm 未満の粒子を、CNN が 90% 以上の高い正答率で分類することが可能であることが実証された。さらに CNN は、凝集体と内因性粒子を含む不純物混合サンプルの組成を理論値と近い値で予測し、抗体医薬品の不純物粒子分析に CNN が有用である可能性が示された。また、これまで分類対象の中心になっていた凝集体とシリコーンオイル油滴だけでなく、凝集体と遊離脂肪酸粒子のモデル粒子の分類にも CNN が応用可能であると考えられ、分類対象に依存しない不純物粒子分析を可能とすることが示された。

第二に、フローイメージング顕微鏡から取得される形態パラメータに基づいた分類手法では、2-10 μm の凝集体と内因性粒子を含む不純物混合サンプルの組成を予測することが困難であり、使用する顕微鏡によってその分類性能は大きく異なっていた。一方 CNN は、使用する顕微鏡にかかわらず、粒子画像を取得するというプロセスのみで、不純物混合サンプルの組成を理論値に近い値で予測することが可能であり、本研究で構築した CNN は、よりユニバーサルな分類手法である可能性を示した。

抗体医薬品の不純物粒子を定量するためには、各製薬企業で解析手法を統一することが理想的ではあるが、異なるフローイメージング顕微鏡が使用されている現状では困難である。粒子画像を取得するというプロセスのみで、CNN が 2-10 μm の不純物粒子を単粒子レベルで分類することが可能であり、さらに使用するフローイメージング顕微鏡で分類性能が大きく変化しないという事実は、バイオ医薬品の品質管理戦略を構築するうえで非常に重要な知見である。一方、多クラス分類という残された課題もあり、CNN 構造のさらなる改善は必要である。

## 第3章 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

### 第1節 緒言

抗体医薬品だけでなく、定量と識別が求められる不純物粒子が含まれるバイオ医薬品として、組換え AAV ベクター製剤が挙げられる。組換え AAV ベクター製剤（以下「AAV 製剤」と呼ぶ。）は、遺伝子治療において遺伝子送達を担うウイルスベクターとして使用されている。AAVは、他のウイルスベクターであるレンチウイルスやアデノウイルスと比較して、組織指向性、遺伝子導入効率および安全性が高いとされ、特に *in vivo* 遺伝子治療の臨床試験応用において AAV 製剤の使用が中心となりつつある<sup>65,163</sup>。しかし、AAV 製剤の有効性と安全性について懸念されているのが、空粒子の存在である<sup>72,164-166</sup>。空粒子は、AAV 製剤の製造時に生じる、遺伝子を含まない AAV 粒子のことを指す。空粒子は、下流工程での除去が行われるもの、各精製方法に限度があるほか、AAVは物理化学的ストレスにより内包された DNA ゲノムをカプシドの外に放出することが報告されているため、最終製品から空粒子を完全に除去することは困難である。実際に Horowitz らは、加熱、pH の低下、および浸透圧の上昇により、AAV 製剤に含まれる空粒子の割合が増加したことを実証した<sup>93</sup>。さらに Bee らは、凍結融解を繰り返すことで、溶媒中の遊離 DNA ゲノム量が増加したことを示した<sup>91</sup>。したがって空粒子は、製造だけでなく、輸送や保管、投与においても生じる可能性がある。よって、AAV 製剤には少なからず空粒子が存在していると考えられる。

空粒子が含まれることによる AAV 製剤の安全性と有効性への影響は、これまで多くの先行研究で報告されている。Parker らは、完全粒子と同量の空粒子をマウスに投与すると、遺伝子の発現レベルが抑制されたことを実証した<sup>5</sup>。Gao らと Xiang らは、完全粒子と空粒子をマウスに同時投与することで、遺伝子の発現レベルが抑制されただけでなく、肝臓毒性を示すアラニンアミノトランスフェラーゼレベルが上昇したことを実証した<sup>83,164</sup>。さらに Pei らは、マウスを使用した実験により、空粒子が完全粒子よりもカプシド特異的 CD8+T 細胞の増殖を誘導したとする結果を示し、空粒子が生体内で免疫毒性を持つ可能性を示唆した<sup>165</sup>。2011 年に実施された血友病 B 患者の臨床試験においては、血液凝固第 IX

因子遺伝子を含む AAV8 製剤を高用量 ( $2 \times 10^{12}$  vg/kg) で投与した際、カプシド特異的 T 細胞の活性が関与する血清アミノトランスフェラーゼレベルが上昇したことが明らかとなつた<sup>167</sup>。空粒子の存在を考慮すると、実際に投与したカプシド用量は  $2 \times 10^{12}$  vg/kg よりも高い可能性があり、その結果、過剰な免疫反応や炎症が生じたと講じられている。ゆえに、空粒子の存在を可能な限り最小限にし、純度、すなわち製剤に含まれる全 AAV 粒子に対して完全粒子が占める割合 (F/E 比) を正確に評価することが推奨されている。

AAV 製剤の F/E 比を評価するには、超遠心分析 (AUC) や電荷検出質量分析 (CDMS) などの分析手法が利用される。これらは、高分解能で完全粒子と空粒子を分離可能であるものの、AAV 製剤に含まれる空粒子の割合が少なくなると、ノイズと空粒子由来の信号の区別が難しくなるために、空粒子の定量が困難になる。例えば、AAV 製剤の F/E 比を評価するためのゴールドスタンダードな手法である AUC では、通常、吸光度に基づいた定量を行うが、波長 280 nm における空粒子の吸光係数は完全粒子の吸光係数の 1/10 であるために、F/E 比が 90% である場合、空粒子の信号強度は完全粒子の 1% 程度になる。実際、F/E 比が 90% 以上であると予想される場合、空粒子の濃度の推定値の標準偏差が 20% を超える可能性があると報告されている<sup>99</sup>。試料の干渉散乱に基づいて分子量を計測するマスフォトメトリー法や、単一イオンの質量を分析可能な CDMS も F/E 比を決定できる有力な手法である。しかしながら、F/E 比が 92% を超える場合に、各手法で正確な評価が可能であるかは検討されていない<sup>71,95,97,168</sup>。

クライオ電子顕微鏡も、完全粒子と空粒子を区別し、F/E 比を評価することが可能な手法として、AAV 粒子の測定手順や解析方法について研究が進められてきた<sup>73,95</sup>。クライオ電子顕微鏡は、カプシドの完全性を維持しながら AAV 粒子を視覚化することで、カプシドのサイズや形状といった形態学的特徴を観察することが可能である。AAV 粒子は、内包される DNA ゲノムの有無によりカプシド内部の荷電状態が異なるため、クライオ電子顕微鏡により視覚化された AAV 粒子は、異なる形態学的特徴を持つ。この形態学的特徴の違いに着目すると、粒子内部の明暗の指標である輝度強度に基づいた解析を利用して、完全粒子と空粒子を分類することが可能である。これまで、クライオ電子顕微鏡による F/E

比の評価手法が開発され、その分析結果を評価原理が異なる他の分析手法の結果と比較することで分類精度が評価されていた<sup>73,95</sup>。一見すると、完全粒子と空粒子は人の目でも区別することが可能であり、粒子内部の輝度強度による分類が容易であると想定される。しかしながら、クライオ電子顕微鏡で取得された AAV 粒子画像の中には、完全粒子と空粒子のどちらであるか判別が困難なものも存在する（図 10）。実際に過去の研究では、粒子内部の輝度強度に基づいて算出された F/E 比が、他の分析手法による F/E 比よりも大きく下回っていたことが報告されており、区別が困難な AAV 粒子の存在を裏付けている<sup>95</sup>。さらに、F/E 比が 80% を上回る場合、クライオ電子顕微鏡では F/E 比を正確に評価可能であるかは明らかになっておらず<sup>73</sup>、需要が高まる高純度 AAV 製剤の F/E 比を正確に評価可能な手法の検討はされていなかった。

以上の背景から、クライオ電子顕微鏡で取得される AAV 粒子について、完全粒子と空粒子に分類することが困難な粒子を分類する手法の検討がされていなかったこと、さらに F/E 比が 92% を超える高純度 AAV 製剤の F/E 比を正確に評価可能である手法が確立されていないことが、先行研究における課題であると言える。そこで、第 2 章の結果をふまえると、これらの課題を解決するための手法のひとつとして CNN が有効であると考えられる。第 2 章では、使用するフローイメージング顕微鏡によらず、CNN が抗体医薬品に含まれる可能性のある不純物粒子を単粒子レベルで分類し、不純物が混合する溶液の組成を予測することが可能であると示された。したがって、フローイメージング顕微鏡画像とは測定原理やスケールの異なるクライオ電子顕微鏡で取得した画像であっても、CNN を利用することで、粒子内部の輝度強度による判別が困難な AAV 粒子を完全粒子と空粒子に分類することが可能であり、純度に関わらず AAV 製剤の F/E 比を正確に評価可能であると考えた。そこで本章では、第 2 章で構築した CNN 構造を応用し、クライオ電子顕微鏡により取得した AAV 粒子画像を完全粒子と空粒子に分類することで、AAV 製剤に含まれる空粒子を定量することを目的とした。本章でも、粒子の類似性を判断する手法として、形態パラメータである粒子内部の輝度強度に基づく解析も同時に行った。輝度強度に基づく解析と CNN の分類性能やスループットを比較し、AAV 製剤の不純物分析における両者の定量

性について議論した。このためには、完全粒子が大部分を占める完全粒子サンプルと、空粒子のみで構成される空粒子サンプルの顕微鏡画像を、それぞれクライオ電子顕微鏡で取得し、完全粒子と空粒子の粒子画像を取得可能な画像処理プログラムを作製した。続いて、取得した粒子画像をトレーニングデータセットとして、AAV粒子を完全粒子と空粒子に分類可能なCNNを構築した。次に、CNNが分類対象とするAAV粒子の輝度強度を表すパラメータを取得するための解析アルゴリズム（以下「輝度比による解析」と呼ぶ。）を作製した。輝度比による解析では、クライオ電子顕微鏡画像の背景領域と粒子内部領域の平均輝度の比を計算することで、F/E比を算出する。輝度比による解析とCNNの分類性能を比較するため、完全粒子サンプルと空粒子サンプルを新たに作製し、クライオ電子顕微鏡画像の取得と、AAV製剤の不純物分析のゴールドスタンダードであるAUCを並行して実施し、それぞれから算出されるF/E比を評価した。その結果、輝度比による解析とCNNは、AUCと同様の正確性でF/E比を算出した。続いて、完全粒子と空粒子を特定の組成で含むAAV混合サンプルを調製し、輝度比による解析とCNNが予測する組成とその理論値を比較した。その結果、輝度比による解析とCNNは、AAV混合サンプルの組成を高い精度で予測したことが示された。最後に、塩化セシウム密度勾配超遠心分離（CsCl-density gradient ultracentrifugation; CsCl-DGUC）により純度を高めた（F/E比>95%）高純度AAV製剤のF/E比を、輝度比による解析とCNNで評価したところ、AAV製剤に含まれる空粒子がわずかである場合、CNNがより正確にF/E比を予測できる可能性が示された。これらの結果より、AAV製剤の不純物分析において、CNNがAAV製剤の不純物粒子を正確に定量できる強力なツールであることが世界で初めて明らかとなり、CNNをAAV製剤の特性評価に応用できる可能性が示された。また本研究は、100 keVの加速電圧を備えるクライオ電子顕微鏡をAAV製剤の不純物粒子分析に応用した初めての試みである。200 keVあるいは300 keVの加速電圧を備えるクライオ電子顕微鏡でF/E比を評価した過去の研究と、本研究での解析手法を、精度やスループットの観点で比較し、本研究結果がクライオ電子顕微鏡によるAAV製剤の分析に与える影響について議論した。

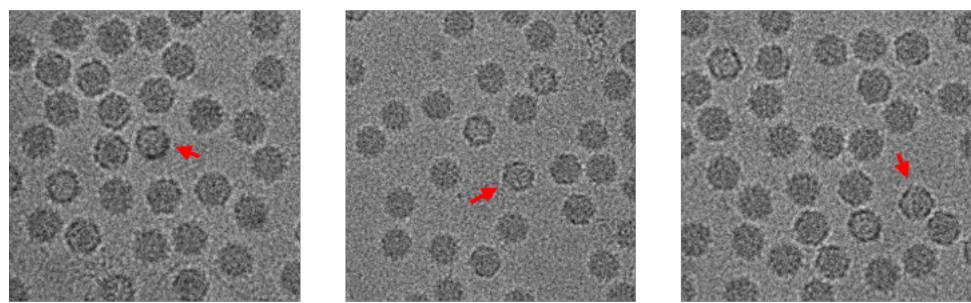


図 10. クライオ電子顕微鏡で取得された AAV 粒子において、完全粒子と空粒子の識別が困難な粒子の代表例

## 第2節 実験材料および実験方法

### 実験材料

#### HEK293 細胞株による AAV の產生

HEK293F 細胞 (Thermo Fisher Scientific 社) を 6 mM L-グルタミン(富士フィルム社)を含む BalanCD HEK293 培地(富士フィルム社)で 2 日あるいは 3 日間拡大培養した。拡大培養した HEK293F 細胞に、緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein; GFP) あるいは血液凝固第 IX 因子 (Factor-IX; FIX) を目的遺伝子として含むトランスジーンプラスミド (pAAV-HCRhAAT-FIXpadua-bFIX あるいは pAAV-CMV-EGFP)、血清型 8 あるいは血清型 9 の Cap 遺伝子を含む RepCap プラスミド (pRep2Cap8 あるいは pRep2Cap9)、ヘルパープラスミド、および形質転換試薬 FectoVIR-AAV (Polyplus 社) を加えて 3 日間あるいは 4 日間培養し、HEK293F 細胞を形質転換した。

#### AAV サンプル

形質転換細胞と培地を回収し、形質転換細胞を AAV-MAX 溶解緩衝液 (Life Technologies 社) で細胞溶解した。細胞溶解液中に含まれる AAV をポリエチレンギリコール-800 で一晩沈殿させ、その後 0.22 μm のフィルターで濾過した。濾液を 0.001%の界面活性剤 poloxamer-188 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (以下「AAV バッファー」と呼ぶ。) に溶解し、これをアフィニティクロマトグラフィーAKTA avant 150 (Cytiva 社) で精製した。続いて、CsCl-DGUC に基づき、超遠心分離機 Optima XE-90 (Beckman Coulter 社) でさらに精製し、フラクショネーターによる完全粒子と空粒子の分画回収を行なった。各分画は 100 kDa カットオフの透析カセットを使用し、溶媒を AAV バッファーに置換した。これにより、GFP を目的遺伝子として含む AAV 血清型 9 の完全粒子 (以下「完全粒子サンプル」と呼ぶ。) と空粒子 (以下「空粒子サンプル」と呼ぶ。)、FIX を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 の完全粒子 (以下「完全粒子<sub>100</sub>サンプル」と呼ぶ。) と空粒子 (以下「完全粒子<sub>0</sub>サンプル」と呼ぶ。)、および GFP を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 の完全粒子 (以下「完全粒子<sub>GFP</sub>サンプル」と呼ぶ) を作製した。F/E 比が確実に 90%以上となる高純

度完全粒子サンプルを作製するため、完全粒子<sub>100</sub>サンプル、および完全粒子<sub>GFP</sub>サンプルをそれぞれ再度 CsCl-DGUC により精製し、フラクショネーターで完全粒子を分画回収した。回収した分画を 100 kDa カットオフの透析カセットを使用して溶媒を AAV バッファーに置換し、それぞれ高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル、高純度完全粒子<sub>GFP</sub>サンプルとした（表 5）。

表 5：作製した AAV サンプルの名称とその詳細

サンプルの名称	血清型	目的遺伝子	分画	CsCl-DGUC の回数
完全粒子サンプル	9	GFP	完全粒子	1
空粒子サンプル	9	GFP	空粒子	1
完全粒子 <sub>100</sub> サンプル	8	FIX	完全粒子	1
完全粒子 <sub>0</sub> サンプル	8	FIX	空粒子	1
完全粒子 <sub>GFP</sub> サンプル	8	GFP	完全粒子	1
高純度完全粒子 <sub>FIX</sub> サンプル	8	FIX	完全粒子	2
高純度完全粒子 <sub>GFP</sub> サンプル	8	GFP	完全粒子	2

### 氷包埋とオートグリッドの作製

AAV 粒子をアモルファス状の氷で固定するため、氷包埋を行なった（図 11）。まず、銅製の 300 メッシュ Quantifiol R1.2/1.3 グリッド（EMJapan 社）に、厚さおよそ 5 nm から 8 nm のカーボン支持膜で表面全体をコーティングした。カーボン支持膜は疎水性であるため、表面の濡れ性を向上させる必要がある。これには、親水化と呼ばれるプラズマ処理が必要である。プラズマ処理では、グリッドをチャンバー内に配置し、チャンバー内が低真空になるまで電圧を印加させることで酸素分子のプラズマを発生させる。これにより、カーボン支持膜の C-C 結合が切断され、C-O 極性官能基が形成されるため、グリッド表面での試料の分散性が向上する。そこで、親水化処理装置 VES-10（VACCUME DEVICE 社）を使用し、12 mA の放電電流で 30 秒間グロー放電を行うことでプラズマ処理を行い、親水化グリッドを作製した。親水化グリッドの縁部分を、氷包埋専用のピンセットで挟み、

氷包埋専用の装置である Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific 社) を湿度 100%、温度 4°Cに設定し、内部のアーム部分に装着した。組換え AAV ベクターを含むサンプル 2.7-3.0  $\mu\text{L}$  を、親水化グリッドにアプライし、余分な液体をろ紙で吸収したのち、液体窒素で液化した液体エタンに浸し、サンプル溶媒の水分子をアモルファス化させた（氷包埋）。氷包埋したグリッドは、融解と氷の形成を防ぐため、測定するまで常に液体窒素中で保管した。顕微鏡での測定の直前に、グリッドリングと C リングを使用して氷包埋したグリッドを固定し、オートグリッドと呼ばれる測定用グリッドを作製した。

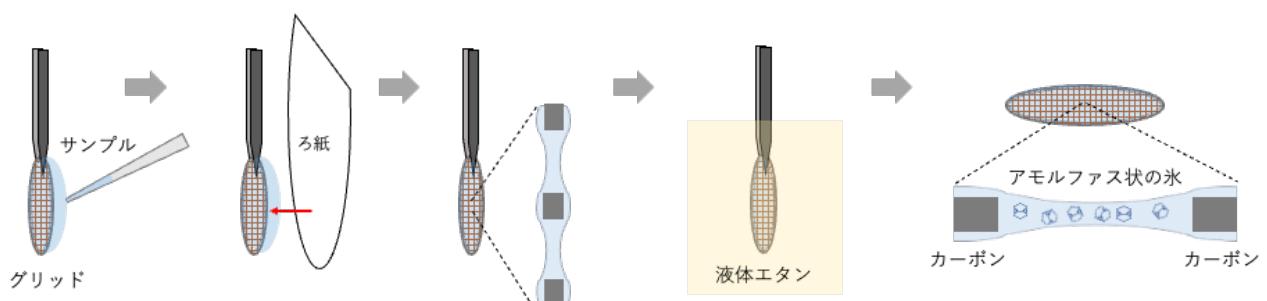


図 11. 氷包埋の概要図

### 不純物混合サンプル

後述する超遠心分析バンド沈降速度法で決定した、完全粒子<sub>100</sub>サンプルおよび完全粒子<sub>0</sub>サンプルのゲノム力価 (vector genome/mL; vg/mL)、カプシド力価 (capsid/mL; cp/mL)、および F/E 比に基づき、全 AAV 粒子における完全粒子<sub>100</sub>サンプルの粒子数の割合が、25% (以下「完全粒子<sub>25</sub>サンプル」と呼ぶ。)、50% (以下「完全粒子<sub>50</sub>サンプル」と呼ぶ。)、および 75% (以下「完全粒子<sub>75</sub>サンプル」と呼ぶ。) になるよう、完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルを混合した。

## 実験方法

### 超遠心分析バンド沈降速度法

完全粒子<sub>100</sub>サンプル、完全粒子<sub>0</sub>サンプル、および高純度完全粒子サンプルの F/E 比を決定するため、分析用超遠心機 Optima AUC (Beckman Coulter 社) を使用し、超遠心分析

バンド沈降速度法（Band sedimentation-analytical ultracentrifugation; BS-AUC）を実施した<sup>99</sup>。まず、光路長 1 cm、波長 230 nm における吸光度が 0.5 未満になるよう AAV バッファーで希釈した。測定前に AAV サンプルが AAV バッファーに拡散しないよう、バンドフォーミングセンターピース（Spin Analytical 社）と呼ばれるローディングチャネルを遠心分離機のローターに取り付け、センターピースのサンプル用ウェルとリファレンス用ウェルに、それぞれ 15 μL の AAV サンプルと AAV バッファーを加えた。AAV バッファーにおける AAV 粒子の移動境界面速度を分析するため、あらかじめローター内に設置されたセルに AAV バッファーを満たした。これらを 20°C、20,000 rpm で遠心分離しながら波長 230 nm あるいは 280 nm における吸光度を測定することで、沈降界面の様子をモニタリングした。セル中のサンプルの吸光度は、半径方向 10 μm の間隔で 180 秒ごとに測定され、摩擦や拡散、ノイズ等を考慮した解析ソフト SEDFIT を用いて理論曲線にフィッティングした。理論曲線からはサンプルの沈降係数の分布関数  $c$  (s) が得られ、完全粒子と空粒子の沈降係数に対応する各成分のピークの面積は、各成分の吸光度に対応するため、ピーク面積の比から F/E 比を決定した。さらに、FIX を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 の完全粒子と空粒子の波長 280 nm におけるモル吸光係数は、それぞれ  $7.34 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  と  $2.010 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  であるため<sup>99</sup>、これらを使用し、完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルのゲノム力価およびカプシド濃度を決定した。

## クライオ電子顕微鏡

F/E 比の算出に必要な AAV 粒子画像を取得するため、Ceta-F カメラを搭載した加速電圧 100 keV のクライオ電子顕微鏡 Tundra（Thermo Fisher Scientific 社）を使用した。まず、オートグリッドを TEM 本体にロードするため、ローディングステーションのカセットにオートグリッドをセットし、液体窒素環境を保ちながらトランスマウントデバイスによりオートグリッドを試料台に移動させた。グリッドの全体図であるアトラス（倍率×84）を撮影し、カーボン支持膜が破損している箇所が電子ビームの照射位置になるように試料台を移動させ、倍率をデータ取得用の×110,000 に変更し、アライメントを行った。アライメント

は、C2 対物レンズの絞りの中心を合わせる C2 Aperture と、電子ビームの傾きを調整するピボットポイント、電流軸を対物レンズの中心に合わせる Rotation Center を含めた 3 項目を、直前の測定から 24 時間経過した場合に必ず実施した。アライメント後、カメラの中心位置と電子ビームの照射位置を合わせるためのキャリブレーションを行った。キャリブレーション後、再度アトラスを撮影し、撮影するスクエアとホールを選択するため、スクエアおよびホールの全体図を、それぞれ倍率 $\times 940$  および $\times 8,000$  で確認した（図 12）。カーボン支持膜が破れておらず、大きな氷や固体化エタンなどの異物が混入していないと思われるスクエアおよびホールのみを選択し、それらを撮影対象とした。選択した各スクエアに対して電子ビームの照射角度がグリッド平面と垂直になるよう、試料台の傾きを調整した。最後に、カーボン支持膜上で、焦点を合わせるオートフォーカスと、撮影画像の対称性を上げるオートスティグマを実施した。すべての調整を終えたのち、選択したホールの自動撮影を高速リニアモードで行い、クライオ電子顕微鏡画像を取得した（表 6）。

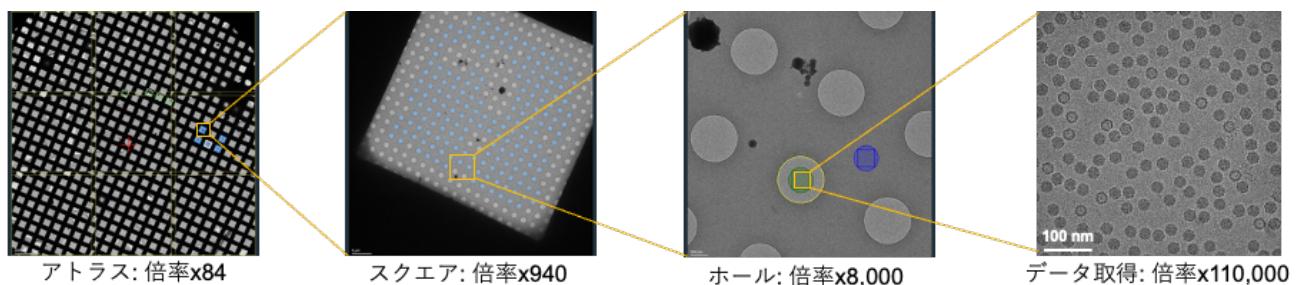


図 12. クライオ電子顕微鏡で取得可能な各倍率における画像

表 6. クライオ電子顕微鏡使用時の設定および条件

パラメータ	値
照射量	40-60 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup>
照射時間	2.0 s
スポットサイズ	2
C2 アパチャ一	50 μm
デフォーカス	-3.0、-4.0、および-5.0 μm
倍率	×110,000

### クライオ電子顕微鏡画像の画像処理方法

クライオ電子顕微鏡で取得した顕微鏡画像の生データは、64 bit (2<sup>64</sup> 階調) のグレースケール画像である。生データは、解像度が高い代わりにノイズが大きく、コントラストが小さい。このため、観察対象となるタンパク質の検出が困難であるほか、データの転送や処理に時間や容量を要するといった問題がある。そこで本研究では、粒子検出までのプロセスを単純化かつ短時間にするため、Python (version 3.11.4) とオープンソースライブラリーである Matplotlib、OpenCV、Numpy、Pandas、および SciPy を用いて、取得した電子顕微鏡画像から AAV 粒子画像を切り出すための画像処理プログラムを自作した。まず、取得した全電子顕微鏡画像の中から、ホールの縁が映っておらず、大きな氷や固体化エタンが混入していない顕微鏡画像を選択し、512 pixel × 512 pixel サイズの 8 bit (0-255 の 256 階調) JPEG フォーマットで保存した (図 13 (a))。保存した顕微鏡画像に対し、背景であるカーボン支持膜の濃淡差やノイズを低減するため、バンドパスフィルタと平滑化による背景の均一化を行った (図 13 (b), (c))。AAV 粒子が存在すると考えられる領域 (関心領域) を検出するため、平滑化した画像を二値化した (図 13 (d))。この際、バンドパスフィルタや平滑化により処理されきれなかったノイズも同時に関心領域となることがあるものの、その領域面積は AAV 粒子よりもかなり小さいため、検出された関心領域を一度すべて縮小させ、ノイズを除去した (図 13 (e))。残った関心領域を元の大きさに拡大させ、これを AAV 粒子の関心領域として検出し、それらの重心を決定した。関心領域の重心は AAV

粒子の重心でもあるため、関心領域の重心を中心とした  $36 \text{ pixel} \times 36 \text{ pixel}$  ( $29.97 \text{ nm} \times 29.97 \text{ nm}$  に相当) の正方領域を平滑化した顕微鏡画像から切り出し、これを粒子画像とした (図 13 (f))。

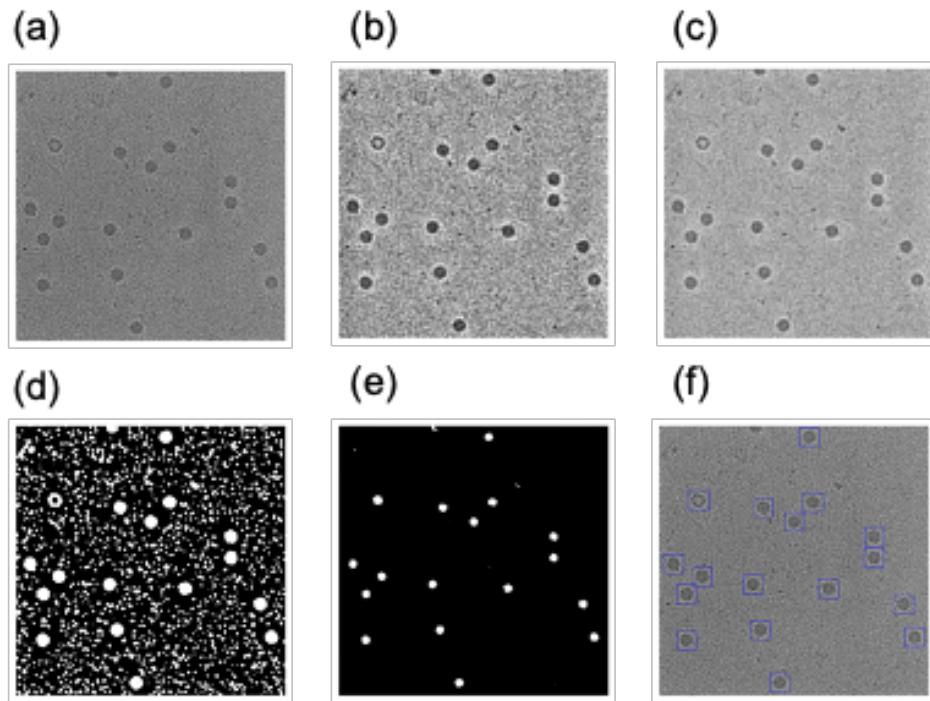


図 13. クライオ電子顕微鏡画像の (a) JPEG 画像データから、(b) バンドパスフィルター、(c) 平滑化、(d) 二値化、および (e) ノイズ除去を施し、(f) AAV 粒子を検出するまでのフロー。検出された AAV 粒子は青線で囲われた正方領域で (b) の画像データから切り出された。

### CNN の構築、トレーニング、および性能評価

クライオ電子顕微鏡で取得した粒子画像を完全粒子と空粒子に分類可能な CNN を構築するため、第 2 章で最適化した CNN の内部構造を第 3 章でも使用した (図 6)。まず、クライオ電子顕微鏡により、GFP を目的遺伝子として含む AAV 血清型 9 の完全粒子サンプルと空粒子サンプルを測定し、それぞれ粒子画像を取得した。完全粒子サンプルには、少なからず空粒子が含まれていたことが顕微鏡画像から判断できた。そのため、前項「クライオ電子顕微鏡画像の画像処理方法」により完全粒子サンプルの顕微鏡画像から粒子画像を切り出した後、空粒子と目視で判断できる粒子画像を手動で除去した。空粒子画像を除去

した完全粒子画像 7,000 枚と、空粒子画像 7,000 枚を CNN のトレーニングデータセットとした。トレーニングデータセットの内訳は、合計 14,000 枚の粒子画像のうち 80% (11,200 枚) は学習で使用し、20% (2,800 枚) は検証に使用された。学習済み CNN の分類性能は、クラス既知の粒子画像からランダムで選んだ 300 枚の粒子画像を学習済み CNN によって分類し、その分類結果から分類評価指標である正答率（式 4-1）を計算した。

## 輝度比による解析

クライオ電子顕微鏡で取得される完全粒子の粒子内部は黒く写るため、粒子内部領域の輝度は 0 に近づく。一方、空粒子の粒子内部は背景とほぼ同様の薄灰色であるため、粒子内部領域の輝度は 0 から遠ざかる（図 14 (a)）。この粒子内部の輝度の差が、完全粒子と空粒子を区別するための形態学的特徴であり、従来ではこの粒子内部の輝度に基づいて、AAV 粒子の分類が行われてきた。よって、本研究においても同様の方法を採用した。まず、前々項（クライオ電子顕微鏡画像の画像処理方法）において決定した各 AAV 粒子の重心に基づいて、重心を中心とした粒子内部にあたる円領域の平均輝度を計算した。一方この平均輝度は、背景の輝度の影響を大きく受けすることが予想された。なぜなら、グリッドにコーティングしたカーボン支持膜あるいは氷の厚さや均一性にムラがあるために、グリッドのスクエアあるいはホールごとに背景の輝度が異なる可能性があり、たとえ同じ空粒子であったとしても、その粒子内部の平均輝度が大きな差を持つと考えられるためである。よって、この影響を抑えるため、粒子内部の平均輝度と、背景領域の平均輝度の商（以下「輝度比」と呼ぶ。）を計算し、完全粒子と空粒子が持つ輝度比の差を利用して、粒子の分類を行なった。完全粒子の場合、背景領域の平均輝度は、粒子内部の平均輝度よりも大きくなるため、輝度比は 1.0 を下回る。一方、空粒子の背景領域の平均輝度は、粒子内部の平均輝度と同等か、あるいはわずかに異なるため、輝度比は 1.0 付近となる（図 14 (b), (c)）。そこで、検出した全 AAV 粒子について輝度比を算出し、輝度比を横軸としてヒストグラムをプロットすると、輝度比 0.5 付近に完全粒子を示すピークが現れ、輝度比 1.0 付近に空粒子を示すピークが現れる。この 2 つのピークに対してガウス関数のフィッティング

グを行い、それぞれのピーク面積を求ることで、全 AAV 粒子における完全粒子の割合 (F/E 比) を算出することが可能である (図 14 (d))。したがって、以上の工程を自動化するため、粒子の検出から F/E 比を計算するまでの解析アルゴリズムを python により作製した。最後に、平均輝度を求める円領域の直径を最適化するため、直径を 10-15 pixel (16.66-24.99 nm に相当) に変化させながら、完全粒子と空粒子に由来する 2 つのピークから分離度  $R$  を計算した。ピークにフィッティングしたガウス分布は、期待値  $\mu$  と標準偏差  $\sigma$  を使用して式 5 で表される。

$$G_{\mu,\sigma}(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{式 } 5)$$

また分離度  $R$  は、完全粒子と空粒子それぞれのピーク位置  $t_1, t_2$  とピーク幅  $W_1, W_2$  を用いて、式 6-1 から求めることができる。

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(W_2 - W_1)} \quad (\text{式 } 6-1)$$

ガウス分布において、ピーク位置  $\sigma$  はガウス関数のフィッティングにより得られた期待値  $\mu$  と等しく、ピーク幅  $W$  は標準偏差  $\sigma$  の 4 倍に等しいため、 $t = \mu$  と  $W = 4\sigma$  を式 6-1 に代入すると、式 6-2 が得られる。

$$R = \frac{\mu_2 - \mu_1}{2(\sigma_2 - \sigma_1)} \quad (\text{式 } 6-2)$$

ここでは、式 6-2 から算出された各分離度  $R$  において、最も高い分離度  $R$  を示した 12 pixel (19.99 nm に相当) を採用した (補足図 5)。

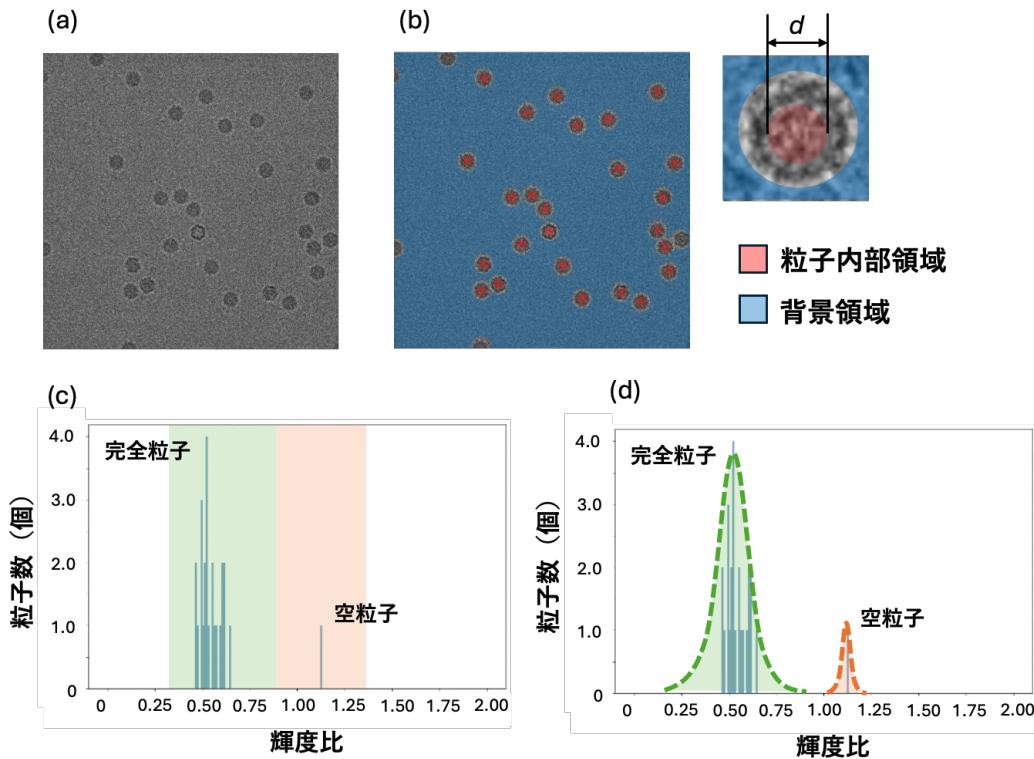


図 14. 輝度比による解析フローの概略図。(a) クライオ電子顕微鏡画像の JPEG 画像データ、(b) 直径  $d$  の粒子内部領域（赤色）と背景領域（青色）、(c) 粒子の輝度比をプロットしたヒストグラム、および (d) ヒストグラムの完全粒子（緑破線）および空粒子（橙破線）にあたるピークにフィッティングしたガウス分布。

#### CNN と輝度比による解析から算出される F/E 比の統計解析

クライオ電子顕微鏡で取得した完全粒子 100 サンプルの全ての顕微鏡画像から、1、4、8、16、40、または 80 枚の顕微鏡画像をランダムに選び、サンプルサイズがおよそ 100、500、1,000、2,000、5,000、または 10,000 となるよう粒子画像を切り出した。選択した粒子画像から、輝度比による解析と学習済み CNN の各分析手法で F/E 比を算出した。輝度比による解析では、サンプルサイズが 100、500、あるいは 1,000 の場合、ヒストグラムのデータ区間を 0.04 とし、サンプルサイズが 2,000、5,000、10,000 の場合、ヒストグラムのデータ区間を 0.01 に設定した。ランダムな顕微鏡画像の選択と、CNN および輝度比による解析から F/E 比を決定する操作を 10 回繰り返し、サンプルサイズごとに F/E 比の平

均、標準偏差（SD）、変動係数（CV）、および95%信頼区間（CI）の上限値と下限値の幅を計算した。

### AAV 混合サンプル

BS-AUCで分析した完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルのゲノム力価とカプシド力価に基づいて、完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルを混合し、F/E比の理論値が67.7%(以下「完全粒子<sub>75</sub>サンプル」と呼ぶ)、44.1%(以下「完全粒子<sub>50</sub>サンプル」と呼ぶ)、および21.6%(以下「完全粒子<sub>25</sub>サンプル」と呼ぶ)となる3種類のAAV混合サンプルを調製した。

### 第3節 結果

#### 超遠心分析バンド沈降速度法による不純物分析

BS-AUC を使用して、完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルの沈降係数分布  $c(s)$ を取得した（図 15）。完全粒子と空粒子の沈降係数は、先行研究により 59.7 S または 41.9 S と明らかになっているため<sup>99</sup>、60 S および 40 S 付近に位置する 2 つのピークは、それぞれ完全粒子と空粒子とみなすことができる。また、完全粒子<sub>100</sub>サンプルには、完全粒子と空粒子の中間の沈降係数を持つ AAV 粒子は観察されなかった（図 15 (a)）。次に、完全粒子と空粒子の粒子数の合計を 100% として、沈降係数分布の完全粒子に由来するピーク面積と空粒子に由来するピーク面積の比率から、F/E 比を算出した。その結果、完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルの F/E 比は、それぞれ 91.4% と 0.0% であった。

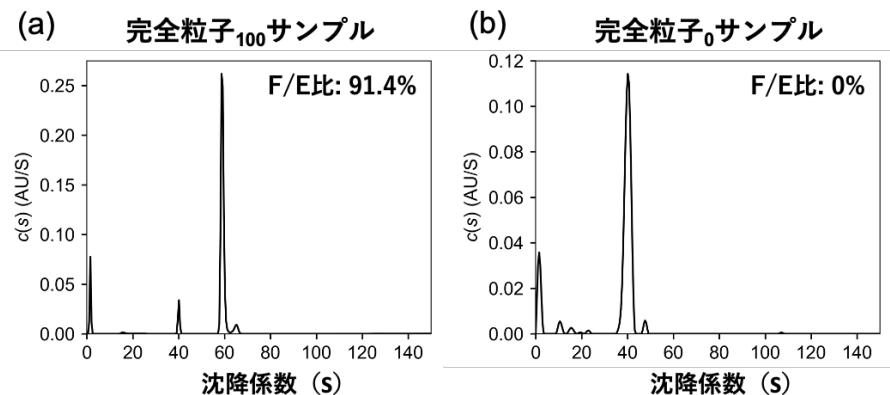


図 15. BS-AUC による (a) 完全粒子<sub>100</sub>サンプルと (b) 完全粒子<sub>0</sub>サンプルの沈降係数分布と F/E 比。

#### クライオ電子顕微鏡画像による不純物粒子分析

完全粒子と空粒子を分類するための学習済み CNN を作製するため、そのトレーニングデータセットとなる完全粒子画像と空粒子画像を取得した。後続する実験では、主に FIX を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 を使用した。CNN の分類性能が、目的遺伝子や血清型に依存するかどうかを確認すべく、トレーニングデータには GFP を目的遺伝子として含む AAV 血清型 9 の完全粒子画像および空粒子画像を使用した（図 16 (a), (c)）。まず、完

全粒子サンプルと空粒子サンプルから切り出した粒子画像（図 16 (b), (d)）をトレーニングデータセットとして学習した学習済み CNN は、正答率が 100%となった（図 16 (e)）。次に、輝度比による解析と学習済み CNN により、完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルの F/E 比を評価し（図 17 (a)-(d)）、BS-AUC による F/E 比（図 15 (a), (b)）と比較した（表 7）。その結果、輝度比による解析と学習済み CNN から決定した F/E 比は、どちらも BS-AUC による F/E 比と 1%以内の差を示した。

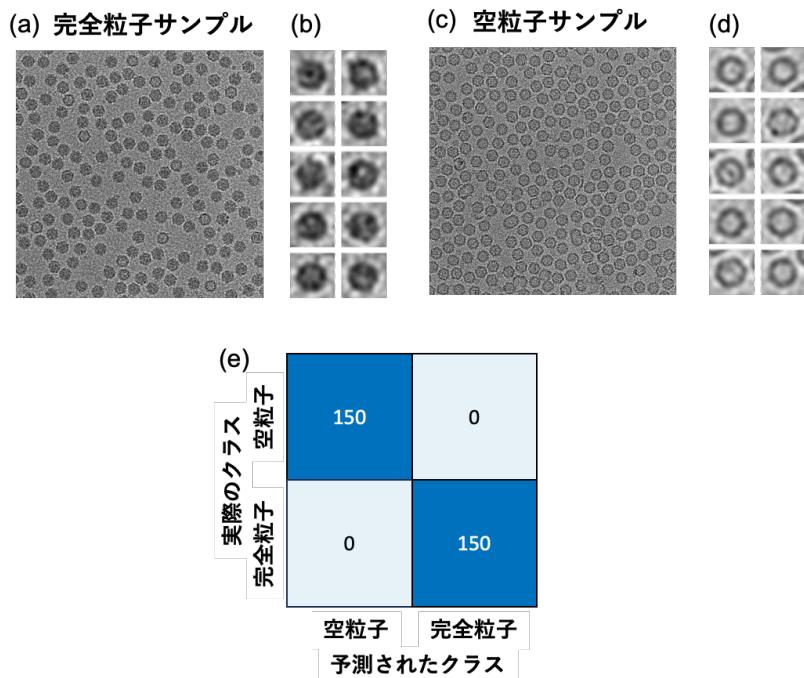


図 16. クライオ電子顕微鏡による、(a) 完全粒子サンプルと (c) 空粒子サンプルの電子顕微鏡画像の代表例。電子顕微鏡画像から切り出し、CNN のトレーニングで使用した (b) 完全粒子と (d) 空粒子の粒子画像の代表例。トレーニングにより学習した CNN の分類性能は、(e) 混同行列により表される。

(a) 完全粒子<sub>100</sub>サンプル (b) 完全粒子<sub>0</sub>サンプル

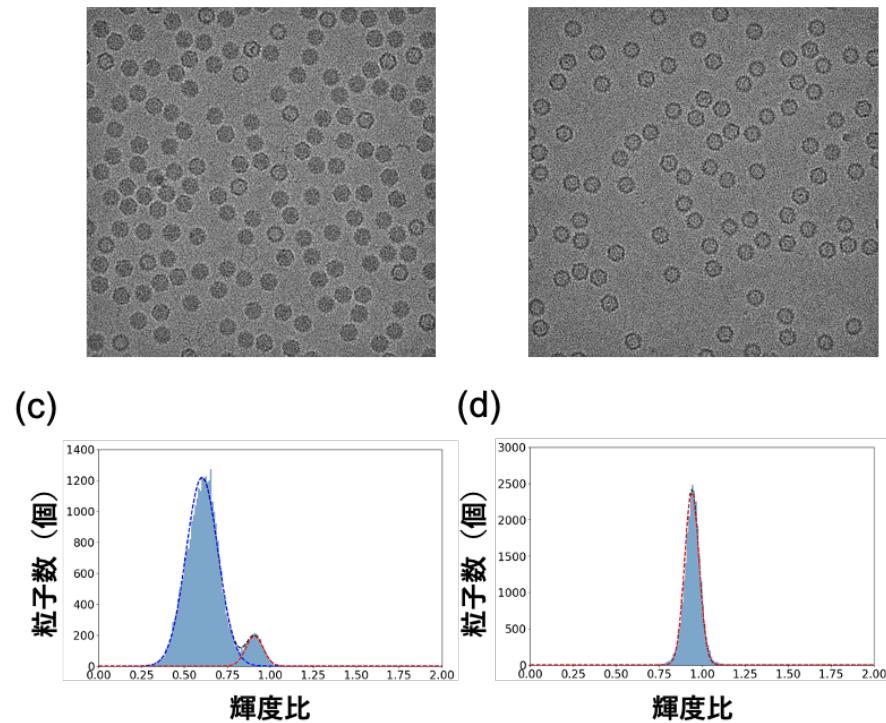


図 17. クライオ電子顕微鏡による、(a) 完全粒子<sub>100</sub>サンプルと (b) 完全粒子<sub>0</sub>サンプルの電子顕微鏡画像の代表例。輝度比による解析で得られた (c) 完全粒子<sub>100</sub>サンプルと (d) 完全粒子<sub>0</sub>サンプルのヒストグラム。水色で示されたヒストグラムは、データ区間を 0.01、度数を粒子数（個）、階級を輝度比として作製した。青破線は完全粒子に由来する分布へのフィッティングを表し、赤破線は空粒子に由来する分布へのフィッティングを表す。

表 7. クライオ電子顕微鏡と BS-AUC により決定した AAV サンプルの F/E 比

サンプル名	解析した 粒子数*	F/E 比		
		クライオ電子顕微鏡		BS-AUC
		輝度比による解析	CNN	
完全粒子 <sub>100</sub> サンプル	29,737	92.08%	90.81%	91.4%
完全粒子 <sub>0</sub> サンプル	26,040	0.00%	0.00%	0.0%

\* クライオ電子顕微鏡画像を使用した画像解析で切り出した粒子数にあたる

## 輝度比による解析と CNN の分類性能の比較

輝度比による解析および CNN から算出される F/E 比のばらつきが、解析する粒子数  $N$  (サンプルサイズ) でどのように変化するか調べた (図 18) (表 8)。その結果、輝度比による解析は、サンプルサイズが 1,000 以上となる場合に、95%信頼区間の幅が 1.0%以内となった。一方 CNN は、サンプルサイズが 500 の場合でも、95%信頼区間の幅が 1.0%以内となった。

サンプルサイズが 1,000 未満となった際に、輝度比による解析から算出される F/E 比がばらついた原因を調査するため、サンプルサイズを 100、500、1,000 とした際の輝度比のヒストグラムを観察した。その結果、95%信頼区間の幅が 1.0%以上となったサンプルサイズ  $N=100$  あるいは  $N=500$  の場合、輝度比のヒストグラムの一部は正規分布の形状になっておらず、ガウス関数のフィッティングが不完全であることが確認された (図 19 (a), (b))。またその際に算出された F/E 比は、収束値である 92.08% より過大評価、あるいは過小評価されていた。一方で、95%信頼区間の幅が 1.0%以内となったサンプルサイズ  $N=1,000$  の場合は、輝度比のヒストグラムはほとんど正規分布の形状になっており、ガウス関数が適切にフィッティングされていることが確認された (図 19 (c))。

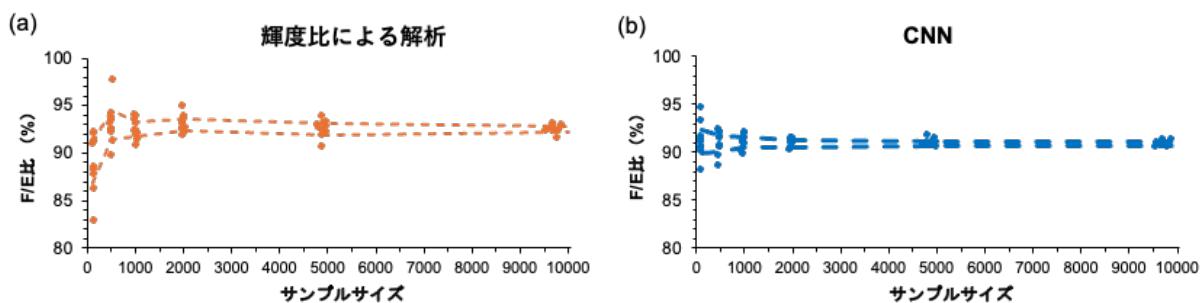


図 18. (a) 輝度比による解析と (b) CNN から決定した F/E 比に対するサンプルサイズの影響。サンプルサイズ、すなわち解析する粒子数をランダムに選び出し、100 個、500 個、1,000 個、2,000 個、5,000 個、10,000 個と変化させた際に得られた F/E 比をプロットした。これを 10 回繰り返し、各サンプルサイズにおける F/E 比の 95%信頼区間の上限と下限を破線で示した。

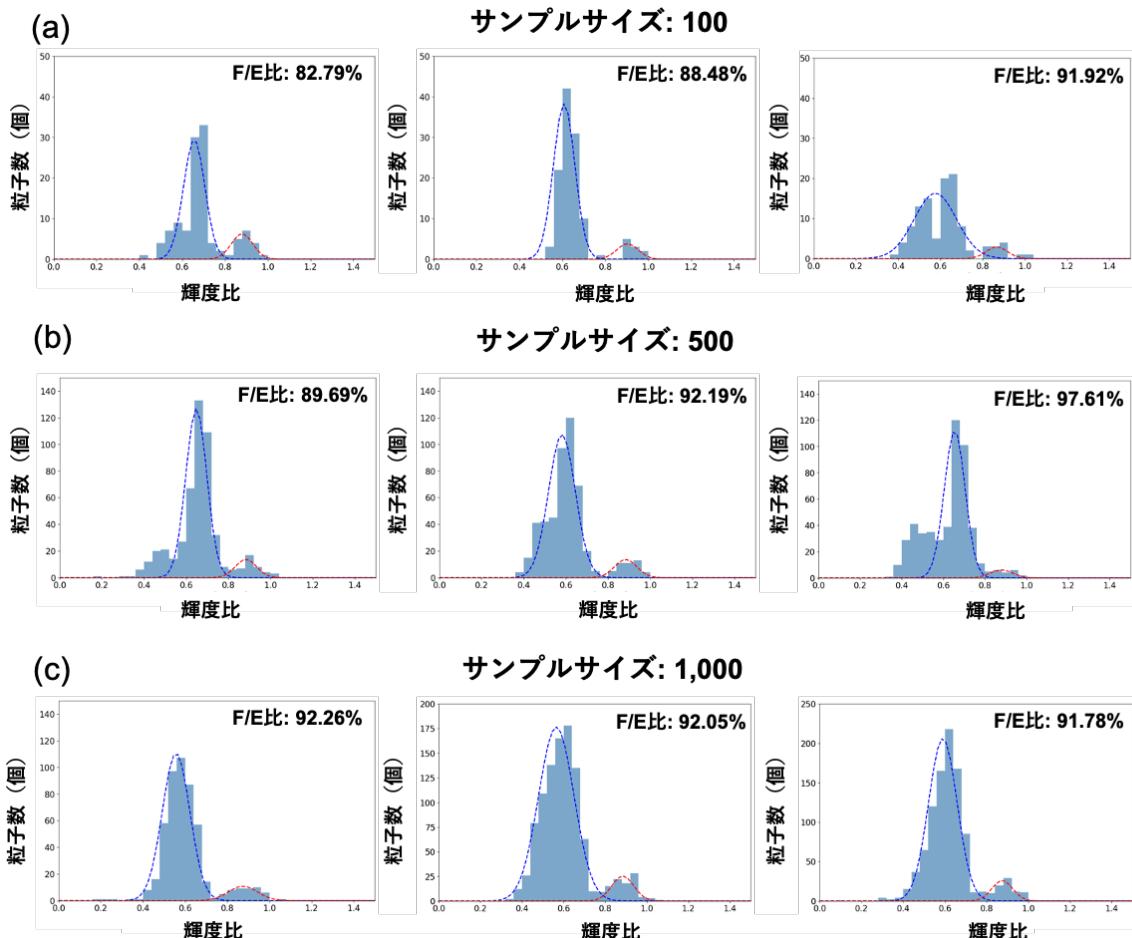


図 19. (a) サンプルサイズが 100、(b) サンプルサイズが 500、および (c) サンプルサイズが 1,000 の際に得られる輝度比のヒストグラムと F/E 比。水色で示されたヒストグラムは、データ区間を 0.04、度数を粒子数（個）、階級を輝度比として作製した。

表 8. 輝度比による解析と CNN から算出した完全粒子サンプルの F/E 比の統計

N	輝度比による解析				CNN			
	平均	SD	CV	95%CI 幅*	平均	SD	CV	95%CI 幅*
100	89.0%	3.0%	0.034	2.1%	91.1%	1.8%	0.019	1.3%
500	93.0%	2.1%	0.022	1.5%	90.9%	1.2%	0.013	0.87%
1,000	92.5%	1.07%	0.012	0.77%	91.0%	0.73%	0.008	0.52%
2,000	93.0%	0.90%	0.010	0.64%	90.9%	0.46%	0.005	0.33%
5,000	92.5%	0.88%	0.010	0.63%	90.9%	0.39%	0.004	0.28%
10,000	92.5%	0.43%	0.0047	0.31%	90.9%	0.25%	0.0027	0.18%

N: サンプルサイズ

SD: 標準偏差 (Standard deviation)

CV: 変動係数 (Coefficient of variation)

CI: 信頼区間 (Confidence interval)

\*: 95%CI の上限値と下限値の幅

続いて、前項で分析した完全粒子<sub>100</sub>サンプルと完全粒子<sub>0</sub>サンプルに加え、AAV 混合サンプルの F/E 比を輝度比による解析および CNN から算出し、F/E 比の理論値と算出値に対して線形回帰分析を行なった（図 20 (a)-(g)）（表 9）。その結果、各 AAV サンプルの F/E 比の予測値は、理論値と同様の値となった。さらに、輝度比による解析および CNN における回帰直線の決定係数は、それぞれ 0.9995 および 0.9999 と計算され、CNN が輝度比による解析よりもわずかに 1 に近い決定係数となった。

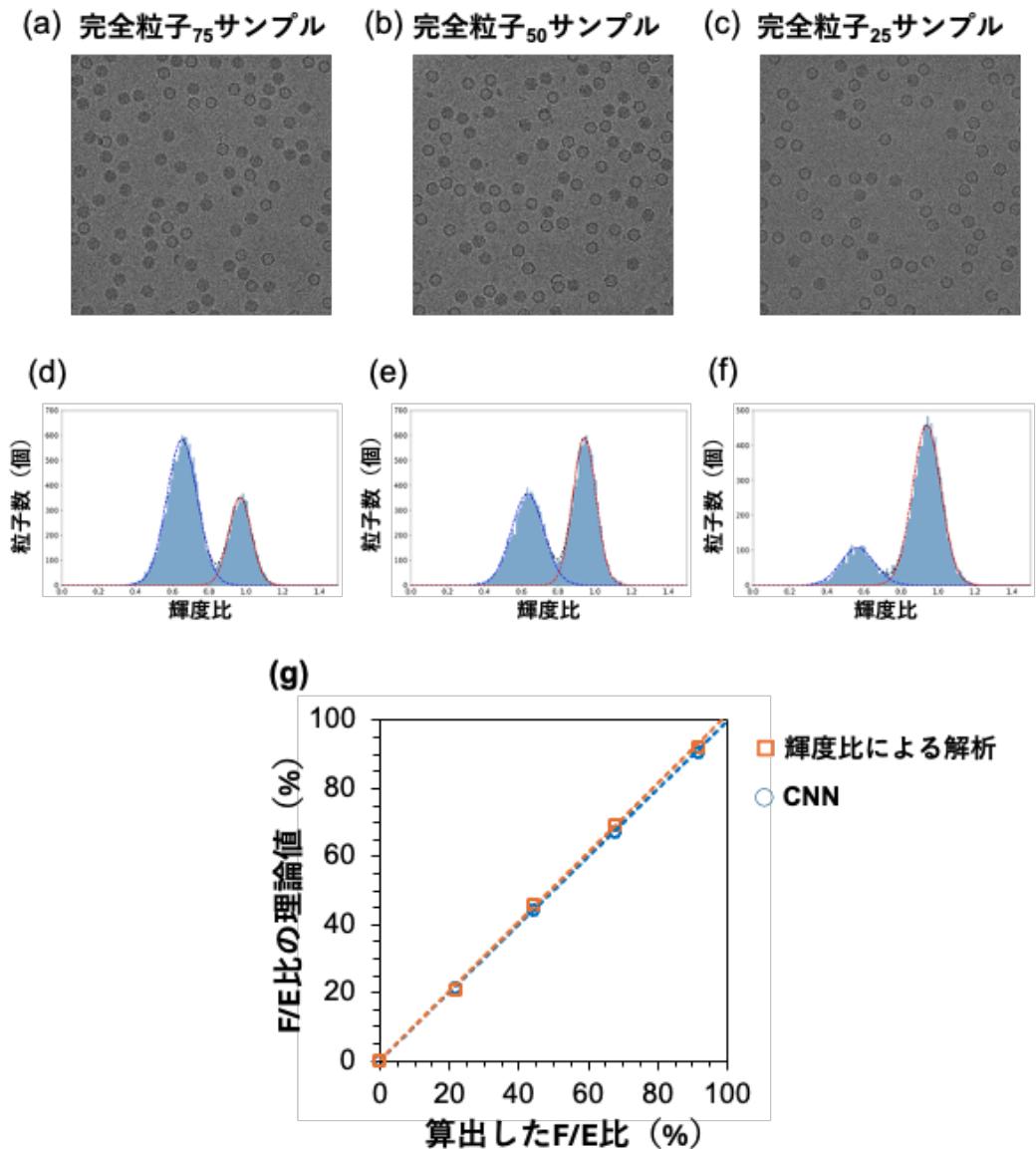


図 20. クライオ電子顕微鏡による (a) 完全粒子<sub>75</sub>サンプル、(b) 完全粒子<sub>50</sub>サンプル、および (c) 完全粒子<sub>25</sub>サンプルの電子顕微鏡画像の代表例。輝度比による解析から得られた (d) 完全粒子<sub>75</sub>サンプル、(e) 完全粒子<sub>50</sub>サンプル、および (f) 完全粒子<sub>25</sub>サンプルのヒストグラム。水色で示されたヒストグラムは、データ区間を 0.01、度数を粒子数 (個)、階級を輝度比として作製した。青破線は完全粒子に由来する分布へのフィッティングを表し、赤破線は空粒子に由来する分布へのフィッティングを表す。(g) 輝度比による解析と CNN から算出された F/E 比の予測値と理論値による線形回帰分析。それぞれ破線は線形近似直線を表す。

表 9. 輝度比による解析と CNN が算出した AAV 混合サンプルの F/E 比

サンプル名	解析した 粒子数	F/E 比		
		輝度比による解析	CNN	理論値
完全粒子 <sub>75</sub> サンプル	16,466	69.13%	67.24%	67.7%
完全粒子 <sub>50</sub> サンプル	16,952	45.79%	44.41%	44.1%
完全粒子 <sub>25</sub> サンプル	10,600	21.06%	21.34%	21.6%

### 高純度 AAV サンプルの不純物粒子分析

輝度比による解析および CNN が、目的遺伝子や精製回数の異なる AAV サンプルの F/E 比を評価可能であるか検討した。まず、輝度比による解析と CNN は、精製回数が異なる高純度 AAV サンプルの F/E 比のわずかな差を明らかにすることが可能であるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、GFP を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 で、CsCl-DGUC による精製回数が 1 回である完全粒子<sub>GFP</sub> サンプルを 2 ロットと、精製回数が 2 回である高純度完全粒子<sub>GFP</sub> サンプルを 2 ロットの、合計 4 ロットの AAV サンプルをクライオ電子顕微鏡で測定し、輝度比による解析と CNN から F/E 比を算出した（図 21）（表 5）（表 10）。その結果、CsCl-DGUC による精製回数が 2 回である高純度完全粒子<sub>GFP</sub> サンプルの F/E 比は、精製回数が 1 回である完全粒子<sub>GFP</sub> サンプルの F/E 比よりも約 3% 大きく算出された。

次に、輝度比による解析と CNN における F/E 比評価の再現性を確認するため、FIX を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 で、CsCl-DGUC による精製回数が 2 回である高純度完全粒子<sub>FIX</sub> サンプルの F/E 比を評価した。さらに、同サンプルを BS-AUC にて分析し、それぞれの手法から算出される F/E 比を比較した（図 22）（表 10）。その結果、輝度比による解析と CNN から算出された高純度完全粒子<sub>FIX</sub> サンプルの F/E 比は、CsCl-DGUC による精製回数の等しい高純度完全粒子<sub>GFP</sub> サンプルと同様の F/E 比であった。一方で、BS-AUC で

は高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=2)において空粒子は検出されなかった。さらに、高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=1)においては、図15と同様に沈降係数40S付近に空粒子とされるピークが確認されたものの、ピーク面積から算出されたF/E比とゲノム力価はそれぞれ99.7%と $1.76 \times 10^{13}$  vg/mLであり、これらの値から空粒子の濃度を計算すると $1.2 \times 10^{11}$  cp/mLであった。Marunoらによると、AAV血清型8の空粒子に対するBS-AUCの検出限界および定量限界は、それぞれ $2.6 \times 10^{11}$  cp/mLと $6.3 \times 10^{11}$  cp/mLである<sup>99</sup>。このことを考慮すると、高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプルに含まれる空粒子は、BS-AUCにおける検出限界および定量限界以下であると示された。

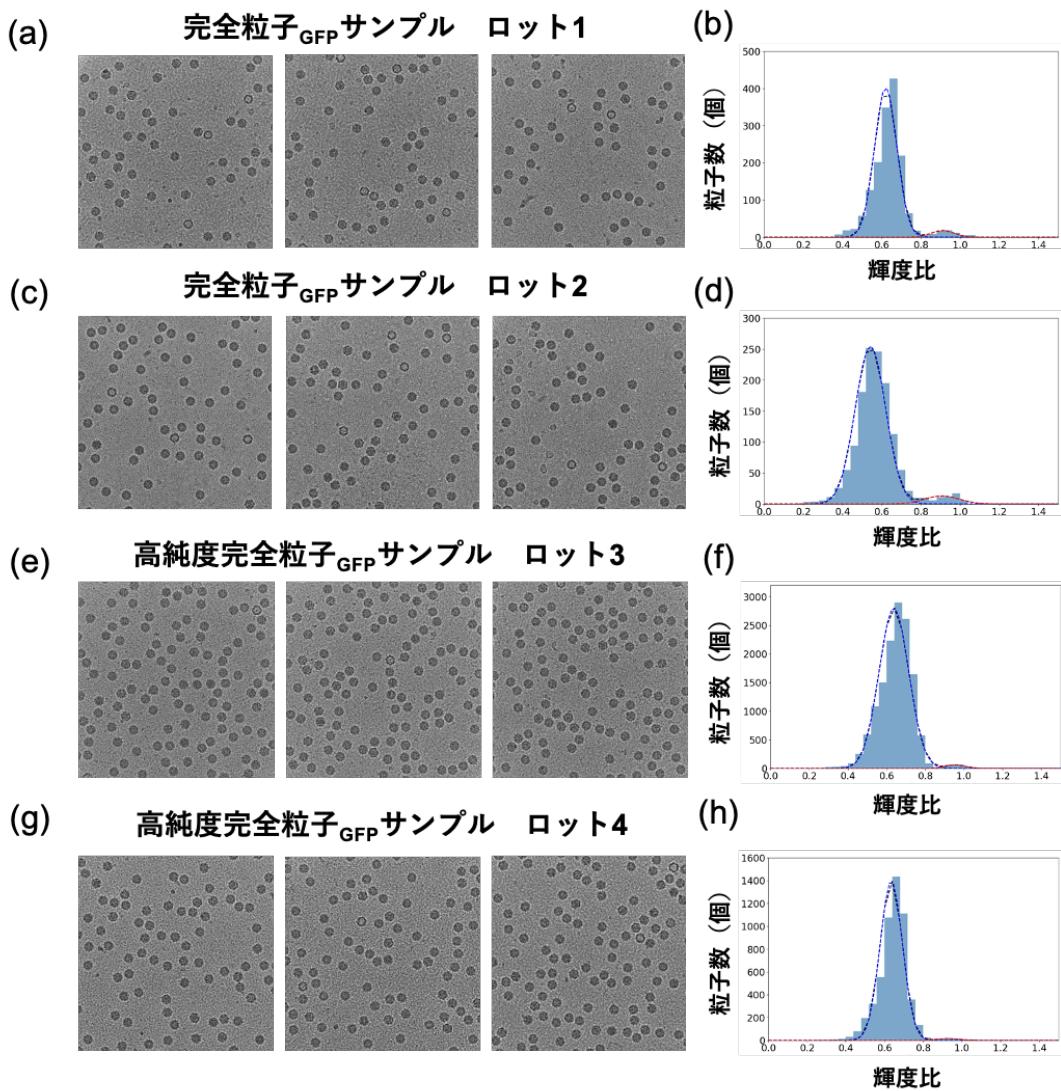


図 21. クライオ電子顕微鏡による、(a), (c) 完全粒子<sub>GFP</sub>サンプルと (e), (g) 高純度完全粒子<sub>GFP</sub>サンプル、および (a), (c) 高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプルの顕微鏡画像の代表例。輝度比による解析で得られた (b), (d) 完全粒子<sub>GFP</sub>サンプルと (f), (h) 高純度完全粒子<sub>GFP</sub>サンプル、および (j), (l) 高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプルのヒストグラム。水色で示されたヒストグラムは、データ区間を 0.04、度数を粒子数（個）、階級を輝度比として作製した。青破線は完全粒子に由来する分布へのフィッティングを表し、赤破線は空粒子に由来する分布へのフィッティングを表す。

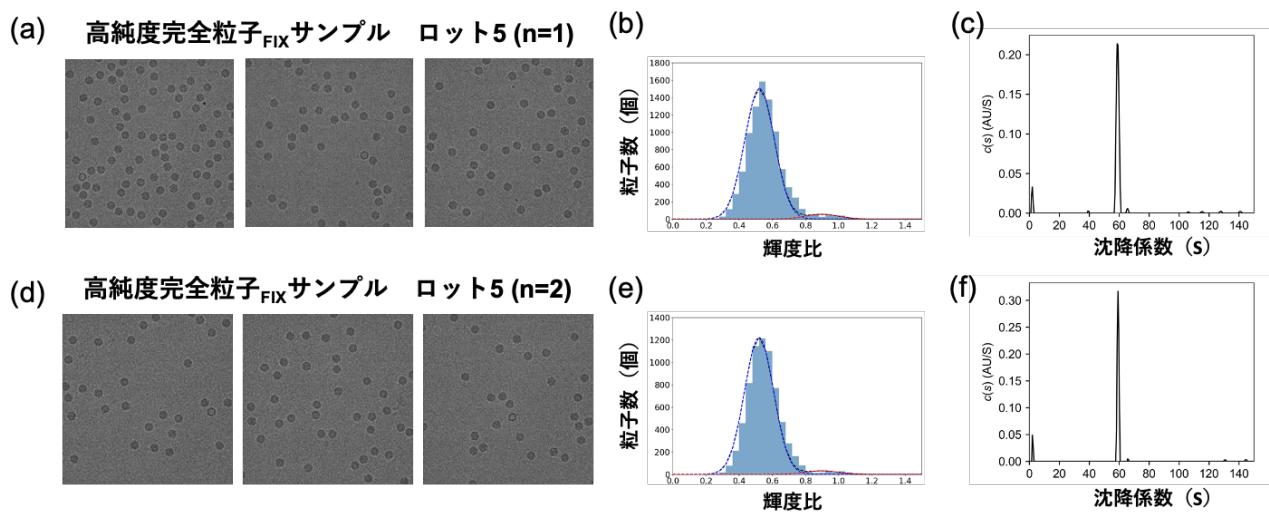


図 22. クライオ電子顕微鏡による、(a)高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=1)と、(d)高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=2)の顕微鏡画像の代表例。輝度比による解析で得られた(b) 高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=1)と、(e)高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=2)のヒストグラム。水色で示されたヒストグラムは、データ区間を 0.04、度数を粒子数(個)、階級を輝度比として作製した。青破線は完全粒子に由来する分布へのフィッティングを表し、赤破線は空粒子に由来する分布へのフィッティングを表す。BS-AUC による、(a) 高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=1)と (b) 高純度完全粒子<sub>FIX</sub>サンプル ロット5 (n=2)の沈降係数分布。

表 10. 輝度比による解析と CNN が算出した高純度 AAV サンプルの F/E 比

サンプル名	解析した 粒子数	ロット	F/E 比	
			輝度比による解析	CNN
完全粒子 GFP サンプル	1,584	1	95.68%	95.33%
完全粒子 GFP サンプル	1,337	2	94.61%	94.54%
高純度完全粒子 GFP サンプル	13,881	3	98.63%	97.89%
高純度完全粒子 GFP サンプル	5,438	4	98.87%	98.39%
高純度完全粒子 FIX サンプル	8,781	5 (n=1)	96.10%	97.03%
高純度完全粒子 FIX サンプル	7,384	5 (n=2)	97.14%	97.30%

## 第4節 考察

CNN は、単粒子レベルで粒子画像を分類することが可能な手法のひとつである<sup>107,108</sup>。CNN を利用した粒子分類は、高生産性細胞株の選定や非経口製剤の不溶性微粒子試験など複数のバイオ医薬品に関わる粒子を対象に実施され<sup>118,134</sup>、第2章の抗体医薬品の不純物粒子分析においても高い分類性能を示した。一方で、AAV 製剤において先行例はなく、これまでクライオ電子顕微鏡画像による AAV 製剤の不純物粒子分析では、AAV 粒子内部の輝度を示すパラメータに基づいた空粒子の定量が行われていた<sup>73,95,169</sup>。第3章では、世界で初めて CNN による AAV 製剤の不純物粒子分析を実施し、極めて高い分類性能で AAV 製剤の F/E 比を評価可能であることを明らかにした。本節では、従来法である輝度を示す形態パラメータに基づいた分析に加え、AAV 製剤の不純物分析に利用可能な、異なる原理の分析手法と比較しながら、CNN を応用することで実現される AAV 製剤の特性評価について議論する。

### 輝度比による解析と CNN の F/E 比評価の正確性

完全粒子と空粒子を分類するための学習 CNN の正答率は 100% となったことから、構築した CNN が完全粒子と空粒子を高い正答率で分類可能であることが示された。また、BS-AUC と、輝度比による解析および CNN から決定した完全粒子<sub>100</sub> サンプルおよび完全粒子<sub>0</sub> サンプルの F/E 比は、1%以内というわずかな差で一致していた。AAV 製剤の特性評価において、AUC は不純物分析手法のゴールドスタンダードとされており、F/E 比が 95% を下回る場合には、F/E 比評価において高い正確性を持つことが報告されている<sup>95,99,170</sup>。したがって、輝度比による解析および CNN は、AAV 製剤の F/E 比評価において BS-AUC と同様の正確性を持つことが示唆された。さらに、GFP を目的遺伝子として内包する AAV 血清型 9 の完全粒子画像と空粒子画像で学習させた CNN が、FIX を目的遺伝子として内包する AAV 血清型 8 のサンプルの F/E 比を正確に評価できたということは、作製した学習済み CNN は、AAV の血清型や目的遺伝子の種類に依存することなく粒子分類が可能であると考えられる。また、AAV 粒子を可視化する従来法であった負染色法では、サンプル調製に

伴う試料の酸性化や乾燥を原因とした粒子の崩壊や内包するゲノムの放出により、F/E 比を正確に分析することが困難であると報告されていた<sup>73,95,101,171</sup>。一方で、クライオ電子顕微鏡による分析は、氷包埋といった特有の作業工程によって AAV 粒子を天然構造に近い状態で観察することが可能であるため<sup>102,104,169,172</sup>、粒子の崩壊やゲノムの放出が最小限に抑えられると想定できる<sup>73</sup>。輝度比による解析および CNN が BS-AUC と同様の F/E 比を算出したという本研究結果は、氷包埋において余分な空粒子が生成されず、クライオ電子顕微鏡による分析ではアーティファクトを考慮することなく F/E 比を正確に定量できるという仮定を支持している。したがって、クライオ電子顕微鏡による AAV 製剤の分析では、氷包埋による空粒子の形成がほとんどないものとして以降の解析と考察を進めた。

### CNN による不純物粒子分析へのアプローチ

輝度比による解析および CNN から決定した F/E 比の線形回帰分析では、どちらも回帰直線の決定係数が 1.0 に近い数値を示した（図 20 (g)）。このことから、輝度比による解析および CNN が、理論値と相関よく F/E 比を算出でき、AAV 製剤の F/E 比評価において高い精度を持つと考えられる。しかしながら、輝度比による解析および CNN が算出した F/E 比はほとんど一致していたものの、CNN における決定係数は輝度比による解析よりもわずかに 1 に近く、AAV 製剤の F/E 比が大きくなるほど、輝度比による解析は F/E 比を過小評価する可能性が示された。

さらに、解析する粒子数に対する F/E 比のばらつきについても、輝度比による解析と CNN で異なる傾向が見られた（図 18）。サンプルサイズが 1,000 未満である場合、輝度比による解析では、F/E 比の SD が CNN よりも大きくなつた（表 8）。この理由としては、輝度比による解析において、ガウス関数のフィッティングが不完全であったことが原因であると考えられる。サンプルサイズが 1,000 未満である場合、データ区間の大きさを変化させたとしても、輝度比のヒストグラムに現れる完全粒子と空粒子のピークはガウス関数の形状にならない場合があった（図 19）。このため、ピークの形状によっては、F/E 比が過大評価、あるいは過小評価される可能性がある。実際に、サンプルサイズが 100、または

500 であった場合、輝度比による解析から算出した F/E 比は、サンプルサイズが大きくなつた場合の収束値である 92%よりも小さい値となり、輝度比による解析は F/E 比を過小評価した。したがって、信頼性の高い F/E 比を算出するためには、輝度比による解析は CNN よりも多くの粒子画像が必要となると考えられる。また、輝度比による解析では、F/E 比の 95% 信頼区間の幅が 1% 以内であるためには、粒子画像が少なくとも 1,000 枚必要である一方、CNN では少なくとも 500 枚で十分であることが示された（表 8）。クライオ電子顕微鏡による完全粒子<sub>100</sub>サンプルの測定において、顕微鏡画像 1 枚あたりで検出された AAV 粒子が約 125 個であったことを考慮すると、輝度比による解析と CNN で必要な顕微鏡画像数は、それぞれ 8 枚および 4 枚であると計算できる。このことから CNN は、輝度比による解析の 2 倍のスループットを持つと考えられる。過去の研究で使用されたクライオ電子顕微鏡は、200 keV あるいは 300 keV の加速電圧が搭載されており、25,517 粒子を RELION や CryoSPARC などの解析ソフトウェアでピッキングし、F/E 比を分析し終わるまでに要した時間は 7 時間以上であったと報告されている<sup>169</sup>。一方で、本研究で使用した 100 keV の加速電圧を搭載するクライオ電子顕微鏡は、顕微鏡画像を 1 枚取得するのに必要な時間は 30 秒から 1 分ほどであり、画像処理や CNN による分類で要する時間を加味しても、ひとつの AAV サンプルの F/E 比を算出するまでに要する時間は、およそ 2 時間程度である。したがって、本研究で構築した CNN および粒子検出を含む解析プログラムは、過去の研究と比較しても高いスループットをもつと示唆される。

次に、輝度比のヒストグラムに現れるピークがガウス関数にフィットしない原因について、さらに考察を進める。輝度比による解析では、輝度比のヒストグラムからも明らかなように、背景領域に存在する氷やカーボン支持膜の不均一性、装置由来のノイズが影響し、同じクラスに属する粒子であってもその輝度比は一定の値とならなかった。このため、完全粒子あるいは空粒子から算出される輝度比は分布を持った 2 つのピークとして現れると考えられる。この 2 つのピークを持つ 2 種類のガウス関数の交点から、輝度比を完全粒子と空粒子の範囲に分割することは可能ではあるものの、その交点も観察するサンプルによって変動することが、図 20 (d)–(f) からも示されている。氷や固体化エタンによる汚染を

完全に排除し、カーボン支持膜の厚みを均一にすることは限りなく不可能であることを考慮すると、完全粒子と空粒子に分類する特定の閾値を一義的に決定することは困難であり、輝度比による解析においてガウス関数のフィッティングは必要不可欠であると考えられる。こうした背景から、解析する粒子数が少なくなると、ガウス関数のフィッティングが不完全となり、F/E 比の過大評価、あるいは過小評価につながったと推察される。F/E 比を過小評価していた過去の研究では、完全粒子と空粒子を分類するための閾値をサポートベクターマシンにより決定する解析ソフトウェアが用いられていた<sup>173</sup>。しかし、粒子ごとの輝度のばらつきを考慮すると、サポートベクターマシンであっても厳密な閾値設定は困難であると想定されることから、過去の研究における F/E 比の過小評価につながったと推察される。対照的に CNN は、サンプルサイズが 1,000 未満であったとしても、F/E 比は収束値である約 91%付近でばらつき、過大評価や過小評価が観測されなかった。CNN は単粒子レベルでの分類が可能であり、背景領域に存在する氷やカーボン支持膜の不均一性の影響を受けることはない。したがって CNN は、輝度比という形態パラメータの変動を考慮することなく F/E 比を算出できる強力な分類手法であると考えられる。

また、輝度比による解析では、上記で説明した輝度比の分布によって、完全粒子と空粒子に由来する 2 つのピークが重なる領域が存在する（図 17）（図 20）。この重なった領域に分布する粒子画像は、人の目でも区別が容易でなく、完全粒子と空粒子に分類することは困難であった（図 10）。一方で、完全粒子と空粒子を分類する学習済み CNN の正答率が 100%を示し、F/E 比評価において CNN が BS-AUC と同様の正確性を持つことが示唆されたことをふまえると、CNN は、図 10 のような識別が困難とされる AAV 粒子を、完全粒子と空粒子に分類可能であったと考えられる。以上から、CNN は AAV 製剤の不純物粒子分析において高い精度とスループットをもち、AAV 製剤の F/E 比を正確に算出可能な手法であると結論づけた。

一方で、CNN の分類性能はトレーニングデータの質に依存する<sup>174,175</sup>。本研究では、AAV 製剤に最も含まれる可能性のある目的物質由来不純物として空粒子にのみ着目したが、DNA ゲノムの一部分のみがカプシドに内包された中間粒子や、VP の一部が欠損した破損

粒子といった「第三」の目的物質由来不純物も微量ながら存在する可能性がある<sup>71,72</sup>。これらの目的物質由来不純物は、人工的に生成あるいは単独で分画することが現状不可能であるため、トレーニングデータを収集できない限り CNN で分類することはできない<sup>176</sup>。この課題に対しては、輝度比といった形態学的特徴を示す形態パラメータの分析により解決できると想定される。前述した「第三」の目的物質由来不純物は、完全粒子と異なる形態を持つことが予想され、輝度比のヒストグラムに現れるピーク分解能の向上や、電子顕微鏡画像における粒子検出のための画像処理プログラムの改善により分類できる可能性がある。BS-AUCによる沈降係数分布からは、今回使用したAAVサンプルに中間粒子は観測されず、カプシドの完全性が確認できたため、クライオ電子顕微鏡に基づく画像解析において「第三」の目的物質由来不純物を考慮する必要はなかった（図 15）。しかし、中間粒子が完全粒子や空粒子よりも高い免疫原性を持つ可能性が報告されていることを考慮すると<sup>71,164</sup>、「第三」の目的物質由来不純物を目的物質から識別し、それらを正確に定量するためのさらなる手法検討が必要である。

また、前述したように、クライオ電子顕微鏡特有のサンプル処理である氷包埋では、氷の混入は避けられないものである。空粒子の中心に氷の粒が存在していた場合、輝度比による解析や CNN であっても、空粒子が完全粒子に誤分類されることがある（補足図 6）。よって、AAV 製剤の不純物粒子分析にクライオ電子顕微鏡画像を利用する場合、氷の混入を最小限にするような湿度や温度環境の設定が必要であり、オートグリッドの取り扱いに留意しなければならない。

## 高純度 AAV サンプルの不純物粒子分析

輝度比による解析と CNN を、CsCl-DGUC による精製回数の異なる高純度 AAV サンプルに実施することで、精製回数を 1 回増加すると、F/E 比がおよそ 3% 大きくなることが示された。さらに、目的遺伝子の異なる高純度 AAV サンプルに対しても、輝度比による解析と CNN は F/E 比を再現よく算出した。また驚くべきことに、BS-AUC では精製回数 2 回の高純度 AAV サンプルに含まれる空粒子が検出限界および定量限界未満であったため、F/E

比を正確に評価することができなかった。一方、輝度比による解析と CNN では、精製回数 2 回の高純度 AAV サンプルの F/E 比を算出することが可能であると示された。BS-AUC では、F/E 比が 95% 以上と想定される場合、高純度 AAV サンプルの F/E 比を決定することが困難であると報告されており<sup>99</sup>、その傾向は、本研究で得られた結果と一致している。さらに、AUC とは原理の異なる AAV 製剤の不純物分析手法である CDMS やマスフォトメトリーでも、F/E 比が 95% 以上と想定される高純度 AAV サンプルの F/E 比を評価可能であるかは検討されていない<sup>71,95</sup>。したがって、F/E 比が 95% を超えるような高純度 AAV サンプルの F/E 比を再現性よく評価可能であった輝度比による解析と CNN は、需要が高まる予想される高純度 AAV 製剤の不純物粒子分析において強力なツールとなりうる可能性が示唆された。さらに、輝度比による解析と CNN は、1 回の CsCl-DGUC により F/E 比が 95% を超えると予想される高純度 AAV サンプルだけでなく、2 回の CsCl-DGUC によりわずかに上昇した F/E 比も評価可能であった。精製回数の違いによる F/E 比の変化を観測したのは本研究が世界初であり、本研究における解析プログラムが、AAV 製剤の安全性と有効性を向上するための製造開発に貢献できると考えられる。しかし、図 22 から示されるように、輝度比による解析では、検出された空粒子がわずかなために、空粒子に由来するピークがガウス関数と一致しておらず、輝度比による解析から算出された F/E 比の正確性には懸念が残る。一方 CNN は、前項において、検出される空粒子の数にかかわらず F/E 比を算出することが可能であると示されたことから、輝度比による解析よりも正確な F/E 比の予測が可能であると考えられ、高純度 AAV 製剤の不純物粒子分析において CNN がより有効であると結論づけた。CNN を含む本研究の解析プログラムは、AAV 製剤に含まれる粒子を単粒子レベルで検出および識別し、空粒子の定量を可能とするからこそ、高純度 AAV 製剤の F/E 比の評価が可能である。一方で、CNN もといクライオ電子顕微鏡による解析では、AAV カプシドの断片や、遊離核酸、凝集体といった幅広い不純物を対象とした解析が困難である。この場合、AUC など他の分析手法が有効であるため<sup>177,178</sup>、クライオ電子顕微鏡による不純物粒子分析は、AAV 製剤の特性解析における補完的手法として他手法と組み合わせることが好ましいと考えられる。

完全粒子は、凍結融解や加熱、pH 変化といった物理化学的ストレスにより、ゲノムを放出して空粒子になることが報告されており<sup>91,93</sup>、さらに、空粒子には形質導入の阻害や免疫毒性を示す可能性も報告されている<sup>5,83,164,165,167</sup>。実際に、健常ドナーから単離したヒト末梢血幹細胞と、FIX を目的遺伝子として含む AAV 血清型 8 の高純度完全粒子 FIX サンプルおよび空粒子を使用した免疫原性評価では、F/E 比が大きくなるにつれて、 $10^6$  ヒト末梢血細胞あたりに観測された IFN- $\gamma$  放出細胞数が増加傾向を示した（図 23）。異なる目的遺伝子や血清型の AAV 製剤に対する免疫原性の再現性を確認する必要はあるものの、この免疫原性評価の結果は、過去に報告されたマウスモデルを利用した免疫原性評価の結果と同様の傾向を示しており<sup>165</sup>、AAV 製剤における空粒子の混入が免疫反応を増強させる可能性を示唆し、高純度 AAV 製剤の必要性を支持するものである。したがって、空粒子の生成を抑制し、可能な限り空粒子を除去するための製造工程の検討や、精製直後の原薬、加速試験および劣化試験が実施された AAV 製剤の F/E 比を正確に評価可能な手法の検討は、AAV 製剤の安全性と有効性を担保する上で重要である。CNN が精製回数による F/E 比の変化をとらえることができ、高純度 AAV 製剤の F/E 比を予測できる可能性が示されたことは、今後、AAV 製剤の製造工程開発や品質管理戦略を構築する上で重要な知見となると考えられる。

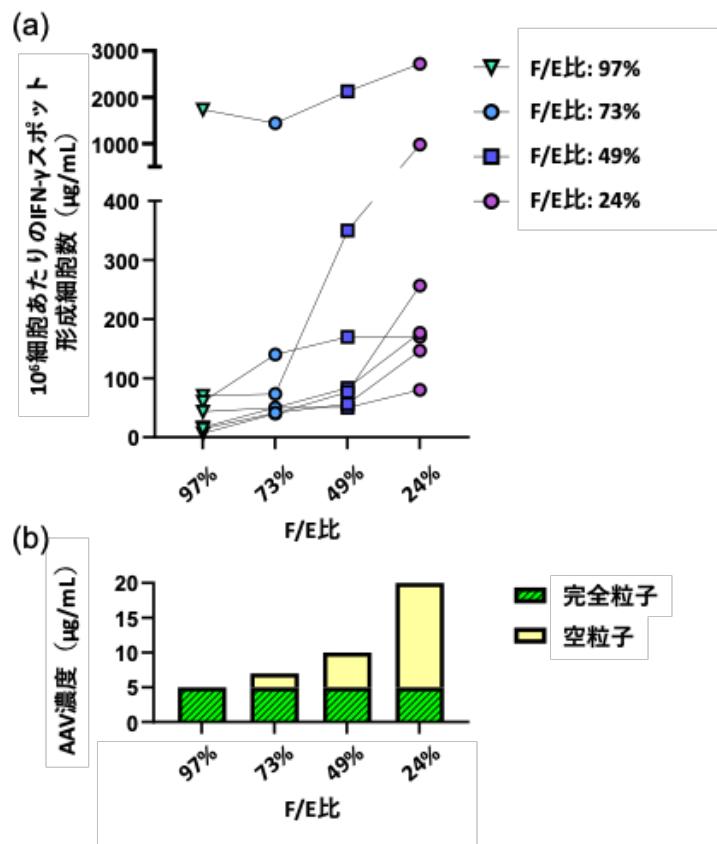


図 23. (a) 異なる F/E 比を持つ AAV サンプルの免疫原性評価。酵素結合免疫吸着スポット解析による、健常ドナーから単離したヒト末梢血細胞  $10^6$  細胞あたりの IFN- $\gamma$  スポット形成細胞数を横軸に示し、AAV サンプルの F/E 比を縦軸に示している。24 名の健常ドナーのうち、AAV 粒子に対して陽性反応を示した 13 名の健常ドナーの解析結果をデータポイントとした。(b) 免疫原性評価に使用した AAV サンプルの AAV 濃度と F/E 比。F/E 比 97% の AAV サンプルとして高純度完全粒子 FIX サンプルを使用した。

## 第5節 小括

第3章では、AAV製剤のF/E比を予測するため、クライオ電子顕微鏡で取得したAAV粒子画像を完全粒子と空粒子に分類することを目的とし、2種類の画像解析手法：輝度比による解析とCNNを実施し、それぞれの分類性能を評価した。輝度比による解析とCNNから決定したF/E比は、AAV製剤の不純物分析手法のゴールドスタンダードである超遠心分析（AUC）により決定したF/E比とほとんど一致しており、輝度比による解析とCNNがAAV製剤の不純物粒子分析に有用であると示された。また、解析する粒子画像数や、サンプルに含まれる完全粒子と空粒子の組成を変化させながら、輝度比による解析とCNNを実施することで、CNNは輝度比による解析よりも高いスループットかつ高い精度でF/E比を算出することが可能であると明らかになった。さらに、輝度比による解析とCNNは、AUCでも評価できなかった、高純度AAVサンプルのF/E比を算出することが可能であり、特にCNNは、高純度AAVサンプルに含まれるわずかな空粒子を分類し、F/E比を予測できる可能が示された。本研究結果により、CNNは、今後より一層需要が高まると予想される高純度AAV製剤のF/E比を予測可能であることが実証され、CNNが高純度AAV製剤の製造を目的とする製造工程の開発や、恒常性の確認、さらには純度の規格を満たすか試験するための品質管理に貢献できる可能性が示された。また、クライオ電子顕微鏡によるAAV製剤のF/E比評価において、CNNがスループットや正確性で優れた性能を示したという知見は、これまで立体構造解析が主な使用目的であったクライオ電子顕微鏡の応用範囲を広げるものであり、AAV製剤の不純物粒子分析だけでなく、イメージング分野にもインパクトを与える。

一方で、AAV製剤に含まれる可能性のある「第三」の目的物質由来不純物を、完全粒子と空粒子から識別し、分類するには、それらの不純物粒子を単離、分画する技術の確立や、さらなる画像処理手法の開発が必要である。CNNと輝度比による解析の、それぞれの利点および欠点の理解を通じて、これらの手法をどのように改善し、応用範囲を拡大していくかは、明らかにされる必要がある。

## 第4章 総括と展望

### 第1節 総括

バイオ医薬品に含まれる可能性のある不純物粒子は、そのサイズや形態が目的物質粒子、あるいは種類の異なる不純物粒子と類似していた場合、それらを形態パラメータにより識別・分類することは困難であった。さらに、形態パラメータに基づく不純物粒子分析手法では、解析する形態パラメータの項目や算出アルゴリズムを各製薬企業や顕微鏡ごとに統一することが困難であるため、使用する顕微鏡および解析手法によって不純物粒子の定量結果が異なることが問題視されており、形態パラメータ非依存的な解析手法の検討を課題としていた。そこで本博士論文では、バイオ医薬品の中で不純物粒子の定量と識別が課題となっている抗体医薬品と AAV 製剤に対し、解析パラメータ非依存的な解析手法のひとつである CNN を応用し、不純物粒子の定量に取り組んだ。

第2章では、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の粒子画像それぞれに対応可能かつ、抗体医薬品に存在しうる内在性粒子と内因性粒子を分類することができる CNN 構造を構築した。その結果、本研究で構築した CNN を利用することで、2種類の不純物粒子が含まれている不純物混合サンプルの組成を形態パラメータ非依存的に予測可能であると示された。従来の不純物粒子分類手法である形態パラメータによる解析では、不純物混合サンプルの組成を予測することが困難であった結果を考慮すると、本研究で構築した CNN 構造により、抗体医薬品に含まれる可能性のある不純物粒子の組成を単粒子レベルで予測できる可能性が示された。さらに、これまで形態パラメータに基づく解析では、使用されるフローイメージング顕微鏡の種類によって異なる解析手法が実施されており、本研究においても形態パラメータに基づく解析手法の種類よっては分類結果に大きな差が見られた。一方、本研究で構築した CNN は、使用するフローイメージング顕微鏡によらず、粒子画像を取得するというプロセスのみで不純物粒子の組成を予測でき、CNN がよりユニバーサルな特性解析手法となる可能性が示された。

第3章では、第2章で構築した CNN 構造をクライオ電子顕微鏡画像に応用し、AAV 製剤に存在する AAV 粒子を完全粒子と空粒子に分類することで、AAV 製剤の F/E 比評価が可

能な解析プログラムの構築に取り組んだ。クライオ電子顕微鏡により取得した粒子画像をトレーニングデータとして学習済み CNN を作製したところ、CNN の正答率は 100%に達し、第 2 章で構築した CNN 構造はクライオ電子顕微鏡画像にも応用可能であることが示された。続いて、形態パラメータである粒子の輝度に基づいて AAV 製剤の F/E 比を評価する解析アルゴリズム（輝度比による解析）も作製し、CNN と評価性能を比較した。その結果、輝度比による解析、および CNN は、不純物分析のゴールドスタンダードである AUC と同等の正確性で、AAV 製剤の組成を予測可能であることが示唆された。さらに、CNN では、輝度比による解析よりも高い精度で AAV 製剤の F/E 比を算出することが可能であり、さらに、AUC で評価が困難とされている、F/E 比が 95%以上と推測される高純度 AAV 製剤の組成も再現性よく予測可能であることが示された。空粒子の混入が、AAV 製剤の安全性や有効性を低下させる可能性を考慮すると、高純度 AAV 製剤の需要は高まることが予測され、本研究で構築した CNN 構造が、高純度 AAV 製剤の品質評価や製造工程開発に有用であると示された。

以上の結果から、本研究で構築した CNN 構造は、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡の双方に応用可能であり、抗体医薬品および AAV 製剤で識別が求められる不純物粒子の組成を形態パラメータ非依存的に予測することが可能であると考えられる。さらに CNN は、形態パラメータに基づく解析よりも分類性能や精度、スループットが高く、顕微鏡の光学設計や解析アルゴリズムに依存することなく不純物粒子を定量することが可能であり、本研究による CNN を利用することで、どの製薬企業においても同様の性能で不純物粒子を分析可能であることを実証した。本研究成果は、バイオ医薬品の品質管理を実施する上で、粒子画像を取得するのみで不純物粒子分析が可能となるだけでなく、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非常に価値のある内容と言える。

## 第 2 節 展望

バイオ医薬品のモダリティやパイプラインは年々増加傾向にあることから、分類を必要とする新たな不純物粒子が今後現れることが予想される。本研究で構築した CNN は、フローイメージング顕微鏡顕微鏡とクライオ電子顕微鏡、および抗体医薬品と AAV 製剤に対してのみその有用性が明らかになったものの、製剤に含まれる粒子を光学顕微鏡や透過型電子顕微鏡により画像化が可能であれば、現存する、あるいは将来的に展開するバイオ医薬品の不純物粒子分析において CNN が非常に強力なツールとなる可能性がある。

第 2 章では、フローイメージング顕微鏡で取得した抗体医薬品の不純物粒子の定量を取り組んだ。フローイメージング顕微鏡は、抗体医薬品の特性解析への利用だけでなく、細胞治療に関するバイオ医薬品の不純物粒子分析にも応用可能である<sup>179-182</sup>。細胞バンクや細胞ベースの製剤についても、細胞と形態が類似する不純物粒子のシリコーンオイル油滴や細胞片が混入する可能性が報告されており、細胞と不純物粒子を識別するための分析手法の開発が急務となっている<sup>179</sup>。したがって、フローイメージング顕微鏡で取得された粒子画像から粒子を同定することが可能であった本研究の CNN 構造は、抗体医薬品だけでなく細胞ベースの製剤に対しても応用が期待できる。また、再生医療やキメラ抗原受容体遺伝子改変 T 細胞治療等の細胞純度試験で利用可能なフローサイトメーターは、未分化細胞や異常増殖細胞といった目的物質関連不純物の識別に利用される<sup>183,184</sup>。蛍光検出が主流であったフローサイトメーターにも、フローイメージング顕微鏡と同様に明視野カメラが導入されているものが開発されていることから<sup>183</sup>、本研究で構築した CNN 構造は、フローサイトメーターで取得された粒子画像にも応用可能であると想定される。形態パラメータ非依存的かつ蛍光色素による染色を必要とすることなく細胞純度解析を行うことは、安定的に製品の品質評価を行うためにも重要であるため<sup>184</sup>、フローサイトメーターによる不純物粒子分析に利用可能な CNN の開発は、将来的に実現可能であり検討していくべきである。

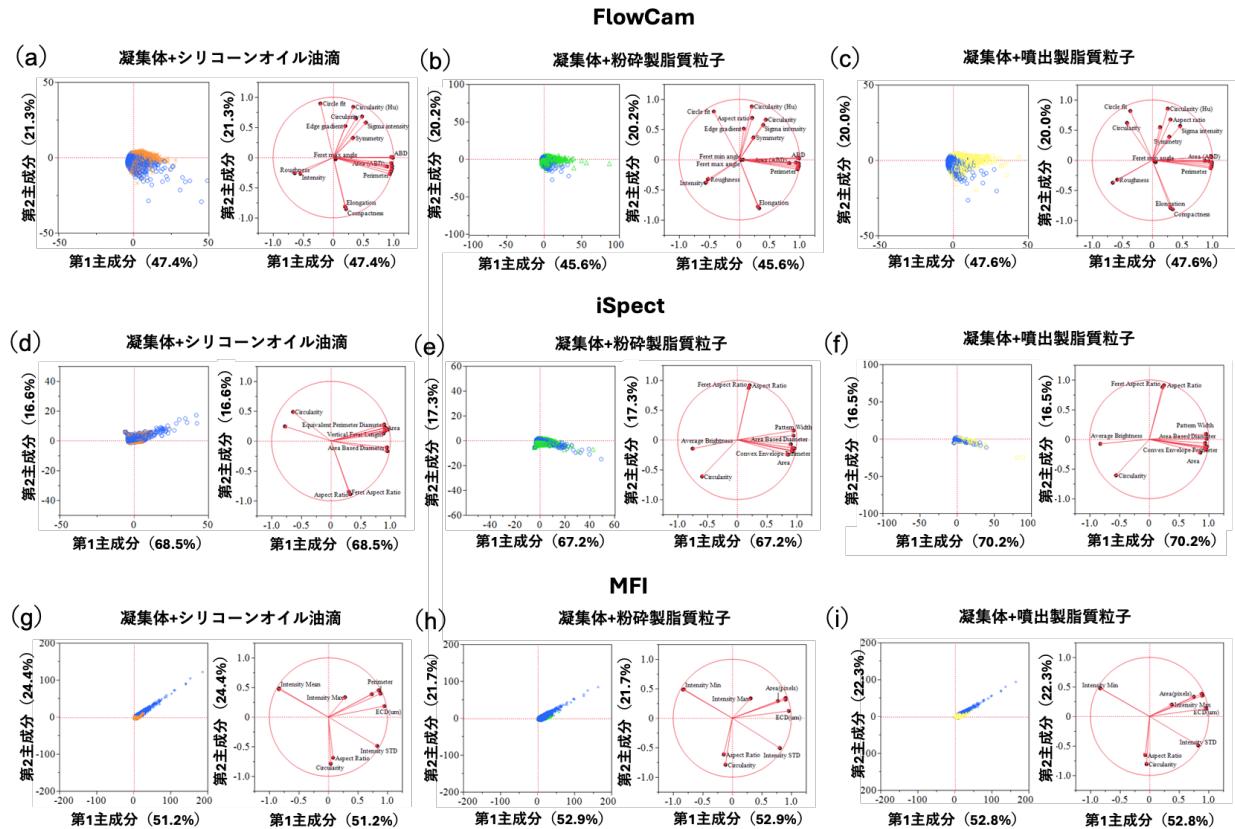
第 3 章では、クライオ電子顕微鏡による AAV 製剤の特性評価において、CNN が AAV 製剤の品質管理にも有用であることを世界で初めて実証した。CNN を利用した AAV 製剤の

不純物粒子分析では、単粒子レベルで空粒子を識別し、定量できる点で優れしており、カーボン支持膜に存在する氷などの混入の影響を受けないという利点がある。したがって、CNN の応用範囲を拡大させた本研究成果は、クライオ電子顕微鏡でしか確認できないようなウイルスや他のベクターといった巨大分子のバイオ医薬品の不純物粒子の定量にも応用が期待できる<sup>185,186</sup>。2020 年以降猛威を振るう新型コロナウイルスの予防薬である mRNA ワクチンもバイオ医薬品のひとつであり、脂質ナノ粒子をベクターとして投与されている<sup>187</sup>。脂質ナノ粒子は副次的有害事象を誘導している危険性が報告されており、AAV と同様に、核酸を含まない空ベクターの定量は今後必要になることが予想される<sup>188</sup>。mRNA ワクチンを可視化するための顕微鏡技術は十分確立されていないものの、クライオ電子顕微鏡により脂質ナノ粒子の可視化が可能となっていることを考慮すると<sup>186</sup>、将来的には画像化が可能となり、mRNA が含まれない脂質ナノ粒子の定量が必要になると予想される。そのような場合、本研究で構築した CNN 構造を応用することで、空ベクターを定量できる可能性があり、製剤の安全性評価に貢献できると想定される。一方で、クライオ電子顕微鏡の導入は、他の分析手法と比較してスループットが低く、特定の装置および設置環境が必要であるため、現在の GMP に準拠するよう品質評価を実施するには難易度が高い<sup>95</sup>。そのため、バイオ医薬品の現在の不純物粒子分析では、負染色法による TEM での観察が主流である<sup>189</sup>。しかしながら、TEM を利用したウイルス粒子の同定を可能とする手法の検討は十分ではなく<sup>190</sup>、細胞バンクから最終製品までの製造工程における堅牢なウイルス汚染試験を実施するためにも開発が急務である<sup>189,190</sup>。負染色法での染色斑や変性は依然として課題ではあるものの、クライオ電子顕微鏡と同様の測定原理を持つ TEM の粒子画像も、本研究で構築した CNN 構造が応用できる可能性があり、製剤の安全性を担保するための手法開発や工程内管理戦略の改善に貢献できると考えられる。

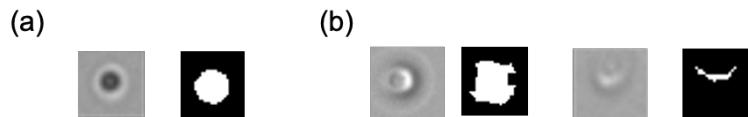
一方で、第 2 章および第 3 章で共通し、CNN による多クラス分類は依然として課題が残っている。バイオ医薬品に含まれうる不純物粒子は二項に限定されず、三項以上の不純物粒子が混入することが想定される。高い分類性能で多クラス分類を行うには、CNN 構造や画像処理方法の改善だけでなく、粒子の特徴が明瞭に現れるような顕微鏡の設計や、ト

レーニングデータセットが必要である<sup>190,191</sup>。粒子分類に適した顕微鏡の設計開発や、分類対象とする不純物粒子の単離が将来的に可能となれば、多様な不純物粒子の同定を定量する目的に加え、不純物粒子の発生源となる製造工程を特定するという側面からも、CNNを応用する重要性が高まる。複雑かつ多様な工程を経て製造されるバイオ医薬品は、その複雑さゆえに不純物が混入する可能性はゼロではなく、また製剤にも不純物粒子は発生・混入しうる。このため、バイオ医薬品の不純物粒子分析におけるCNNの有用性を明らかにした本研究は、より安全かつ有効性の高い医薬品を提供するための管理戦略の改善に貢献できる。

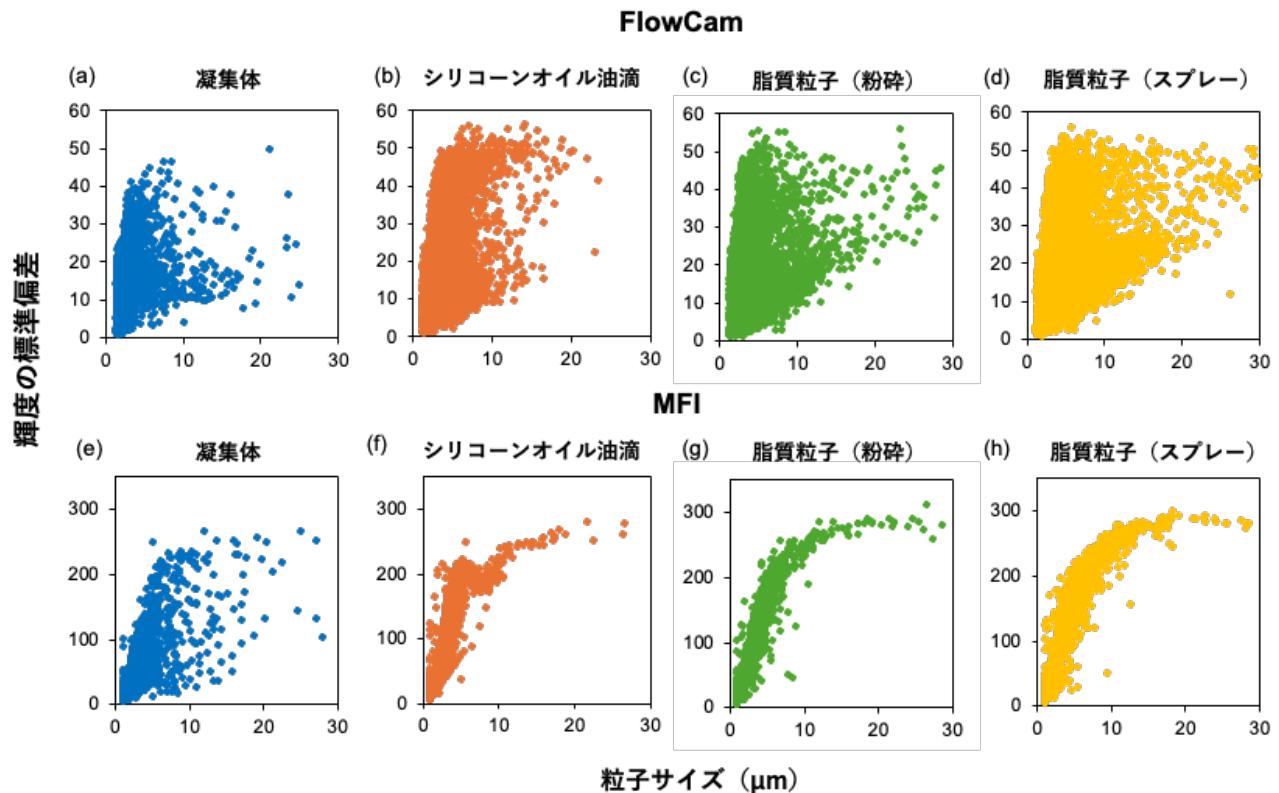
## 補足資料



補足図 1. FlowCam で取得した (a) 凝集体とシリコーンオイル油滴の形態パラメータに基づく主成分分析、(b) 凝集体と脂質粒子（粉碎）の形態パラメータに基づく主成分分析、(c) 凝集体と脂質粒子（スプレー）の形態パラメータに基づく主成分分析。iSpect で取得した (d) 凝集体と脂質粒子（粉碎）の形態パラメータに基づく主成分分析、(e) 凝集体と脂質粒子（粉碎）の形態パラメータに基づく主成分分析、(f) 凝集体と脂質粒子（スプレー）の形態パラメータに基づく主成分分析。MFI で取得した (g) 凝集体とシリコーンオイル油滴の形態パラメータに基づく主成分分析、(h) 凝集体と脂質粒子（粉碎）の形態パラメータに基づく主成分分析、(i) 凝集体と脂質粒子（スプレー）の形態パラメータに基づく主成分分析。



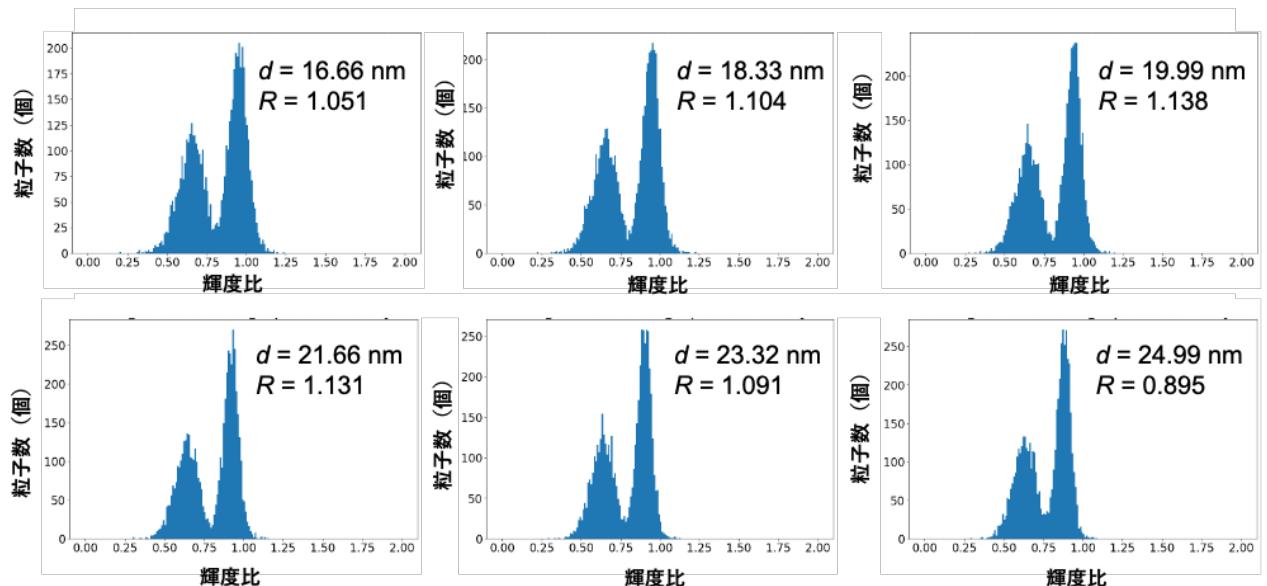
補足図2. FlowCamで取得された、(a) 焦点のあつているとされるシリコーンオイル画像とその二値化画像、および (b) 焦点の合つていないとされるシリコーンオイル油滴画像とその二値化画像。



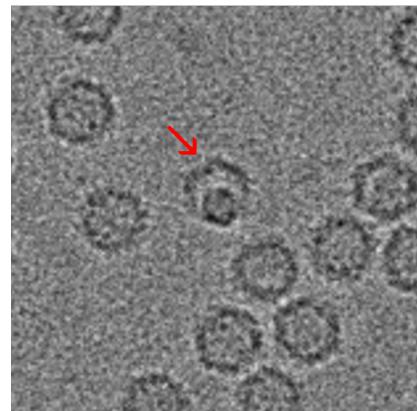
補足図3. FlowCamにより分析した (a) 凝集体、(b) シリコーンオイル油滴、(c) 脂質粒子 (粉碎)、(d) 脂質粒子 (スプレー) の輝度の標準偏差の分布。MFIにより分析した (e) 凝集体、(f) シリコーンオイル油滴、(g) 脂質粒子(粉碎)、(h) 脂質粒子 (スプレー) の輝度の標準偏差の分布。

FlowCam 分類正答率: 71.4%				iSpect 分類正答率: 69.9%				MFI 分類正答率: 60.1%				
真のクラス	凝集体			凝集体			凝集体			凝集体		
	脂質粒子 (粉碎)			脂質粒子 (粉碎)			脂質粒子 (粉碎)			脂質粒子 (粉碎)		
	脂質粒子 (スプレー)			脂質粒子 (スプレー)			脂質粒子 (スプレー)			脂質粒子 (スプレー)		
	凝集体	脂質粒子 (粉碎)	脂質粒子 (スプレー)		凝集体	脂質粒子 (粉碎)	脂質粒子 (スプレー)		凝集体	脂質粒子 (粉碎)	脂質粒子 (スプレー)	予測されたクラス
凝集体	78	4	4	凝集体	85	1	8	凝集体	71	21	5	予測されたクラス
脂質粒子 (粉碎)	7	65	33	脂質粒子 (粉碎)	7	60	28	脂質粒子 (粉碎)	29	39	42	予測されたクラス
脂質粒子 (スプレー)	6	38	63	脂質粒子 (スプレー)	7	18	88	脂質粒子 (スプレー)	12	18	63	予測されたクラス

補足図 4. FlowCam、iSpect、MFI から取得した凝集体と 2 種類の脂質粒子の粒子画像をトレーニングデータとして学習した CNN $>2 \mu\text{m}$  の混同行列。



補足図 5: 粒子内部の円領域の直径  $d$  を変化させた際に得られる輝度比のヒストグラム。直径  $d$  と完全粒子と空粒子にあたる 2 つのピークの分離度  $R$  を右上に記載している。青色で示されたヒストグラムは、データ区間を 0.01、度数を粒子数（個）、階級を輝度比として作製した。



補足図 6. CNN により完全粒子に誤分類された空粒子の例

補足表 1. 各フローイメージング顕微鏡で取得した粒子画像でトレーニングした学習済み CNN における 4 つの分類性能評価指標

		CNN <sub>&gt;2 μm</sub>		
		FlowCam	iSpect	MFI
評価指標	凝集体とシリコーンオイル油滴の分類器			
Accuracy	0.967	0.881	0.793	
Precision	0.964	0.958	0.863	
Recall	0.960	0.898	0.772	
F1 score	0.962	0.927	0.815	
評価指標	凝集体と脂質粒子（粉碎）の分類器			
Accuracy	0.924	0.796	0.807	
Precision	0.978	0.902	0.739	
Recall	0.974	0.873	0.899	
F1 score	0.976	0.887	0.811	
評価指標	凝集体と脂質粒子（スプレー）の分類器			
Accuracy	0.931	0.888	0.788	
Precision	0.911	0.911	0.892	
Recall	0.960	0.742	0.775	
F1 score	0.935	0.818	0.829	

## 発表論文

### 本学位論文に関する原著論文

- Haruka Nishiumi, Natalie Deiringer, Nils Krause, Saki Yoneda, Tetsuo Torisu, Tim Menzen, Wolfgang Friess, Susumu Uchiyama. Utility of Three Flow Imaging Microscopy Instruments for Image Analysis in Evaluating four Types of Subvisible Particle in Biopharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 2022 Nov;111(11):3017-3028.
- Haruka Nishiumi, Kiichi Hirohata, Mitsuko Fukuhara, Aoba Matsushita, Yasuo Tsunaka Mark Allen Vergara Rocafort, Takahiro Maruno, Tetsuo Torisu Susumu Uchiyama Combined 100 keV Cryo-Electron Microscopy and Image Analysis Methods to Characterize the Wider Adeno-Associated Viral Products. *J Pharm Sci.* 2024 Apr 2:S0022-3549(24)00123-0.

### その他発表論文

- 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.
- Yuki Yamaguchi, Natsumi Wakaizumi, Mine Irisa, Takahiro Maruno, Mari Shimada, Koya Shintani, Haruka Nishiumi, Rina Yogo, Saeko Yanaka, Daisuke Higo, Tetsuo Torisu, Koichi Kato, Susumu Uchiyama. The Fab portion of immunoglobulin G has sites in the CL domain that interact with Fc gamma receptor IIIa. *mAbs.* 2022;14(1);2038531.
- Hiroya Oki, Kazuki Kawahara, Minato Iimori Yuka Imoto, Haruka Nishiumi, Takahiro Maruno Susumu Uchiyama, Yuki Muroga, Akihiro Yoshida, Takuya Yoshida, Tadayasu Ohkubo, Shigeaki Matsuda, Tetsuya Iida, Shota Nakamura. Structural basis for the toxin-coregulated pilus-dependent secretion of *Vibrio cholerae* colonization factor. *Sci Adv.* 2022;8(41):eabo3013.

## 参考文献および参考資料

1. Kesik-Brodacka, M. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnol Appl Biochem* **65**, 306–322 (2018).
2. Rader, R. A. (Re)defining biopharmaceutical. *Nat Biotechnol* **26**, 743–751 (2008).
3. European Medicines Agency. *Summary of the Twelfth Annual Report of the EMEA*. (2007).
4. Rasmussen, A. S. B., Hammou, A., Poulsen, T. F., Laursen, M. C. & Hansen, S. F. Definition, categorization, and environmental risk assessment of biopharmaceuticals. *Science of The Total Environment* **789**, 147884 (2021).
5. Parker, M. & Li, Z. Biotechnology and drugs. in *Remington* 397–415 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-820007-0.00022-2.
6. Conner, J. *et al.* The Biomanufacturing of Biotechnology Products. in *Biotechnology Entrepreneurship* 351–385 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-404730-3.00026-9.
7. Roesch, A. *et al.* Particles in Biopharmaceutical Formulations, Part 2: An Update on Analytical Techniques and Applications for Therapeutic Proteins, Viruses, Vaccines and Cells. *J Pharm Sci* **111**, 933–950 (2022).
8. Wright, J. F. Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: Characterization and risk assessment. *Biomedicines* vol. 2 80–97 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biomedicines2010080> (2014).
9. Oshinbolu, S., Wilson, L. J., Lewis, W., Shah, R. & Bracewell, D. G. Measurement of impurities to support process development and manufacture of biopharmaceuticals. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **101**, 120–128 (2018).
10. Roesch, A. *et al.* Particles in Biopharmaceutical Formulations, Part 2: An Update on Analytical Techniques and Applications for Therapeutic Proteins, Viruses, Vaccines and Cells. *J Pharm Sci* **111**, 933–950 (2022).
11. Singh, S. K. Impact of Product-Related Factors on Immunogenicity of Biotherapeutics. *J Pharm Sci* **100**, 354–387 (2011).
12. Reijers, J. A. A. *et al.* Adverse immunostimulation caused by impurities: The dark side of biopharmaceuticals. *Br J Clin Pharmacol* **85**, 1418–1426 (2019).
13. Annex 4 Guidelines on the Quality, Safety and Efficacy of Biotherapeutic Protein Products Prepared by Recombinant DNA Technology Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 814. <http://www.who.int/biologicals/vaccines/en/>.
14. Ahrer, K., Buchacher, A., Iberer, G., Josic, D. & Jungbauer, A. Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering. *J Chromatogr A* **1009**, 89–96 (2003).
15. 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構. バイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)の品質確保の基本的考え方 〈G3-1-180〉 . 厚生労働省 vol. 参考情報 2529–2533 Preprint at (2021).
16. 第十八改正日本薬局方. 厚生労働省 Preprint at (2021).
17. Zölls, S. *et al.* Flow imaging microscopy for protein particle analysis - A comparative evaluation of four different analytical instruments. *AAPS Journal* **15**, 1200–1211 (2013).
18. Cornes, P. The economic pressures for biosimilar drug use in cancer medicine. *Target Oncol* **7**, 57–67 (2012).
19. Maruno, T. *et al.* Sweeping of Adsorbed Therapeutic Protein on Prefillable Syringes Promotes Micron

- Aggregate Generation. *J Pharm Sci* **107**, 1521–1529 (2018).
- 20. Bessa, J. *et al.* The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model. *Pharm Res* **32**, 2344–2359 (2015).
  - 21. Cromwell, M. E. M., Hilario, E. & Jacobson, F. Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS Journal* **8**, (2006).
  - 22. Gerhardt, A. *et al.* Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes. *J Pharm Sci* **103**, 1601–1612 (2014).
  - 23. Akiko ISHII-WATABE. Perspectives on the role of Japanese Pharmacopoeia in quality control of biotechnological products. *PMDRS* vol. 52 412–419 Preprint at (2021).
  - 24. 厚生労働省. 第十七改正日本薬局方第二追補. vol. 告示第49号 Preprint at (2019).
  - 25. The United States Pharmacopeia. <1788> Methods for the Determination of Particulate Matter in Injections and Ophthalmic Solutions. *Pharmacopeial Forum* vol. 44 Preprint at (2018).
  - 26. The United States Pharmacopeia. <1787> Measurement of Subvisible Particulate Matter / General Information. Preprint at (2015).
  - 27. United States Pharmacopoeia. <787> Sub-visible particulate matter in therapeutic protein injections. 663–665 (2014).
  - 28. United States Pharmacopeia. <788> Particulate Matter in Injections. 398–401 (2014).
  - 29. 2.9.19 Particulate contamination: Sub-visible particles. *European Pharmacopoeia* 4785–4787 (2021).
  - 30. 5.17.2. RECOMMENDATIONS ON TESTING OF PARTICULATE CONTAMINATION: VISIBLE PARTICLES. *EUROPEAN PHARMACOPOEIA* 4809–4810 (2021).
  - 31. Universität, H. Von & Urheberrechtlich, G. 2.9.20. PARTICULATE CONTAMINATION: VISIBLE PARTICLES. *European Pharmacopoeia* **107**, (2020).
  - 32. Novik, E. S., Dorenskaya, A. V., Borisova, N. A. & Gunar, O. V. Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections. *Pharm Chem J* **53**, 353–360 (2019).
  - 33. Hawe, A. *et al.* Forced degradation of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* **101**, 895–913 (2012).
  - 34. Kranz, W., Wuchner, K., Corradini, E., Berger, M. & Hawe, A. Factors Influencing Polysorbate's Sensitivity Against Enzymatic Hydrolysis and Oxidative Degradation. *J Pharm Sci* **108**, 2022–2032 (2019).
  - 35. Joubert, M. K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J. & Narhi, L. O. Classification and characterization of therapeutic antibody aggregates. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 25118–25133 (2011).
  - 36. Luo, Q. *et al.* Chemical modifications in therapeutic protein aggregates generated under different stress conditions. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 25134–25144 (2011).
  - 37. Masato, A., Kiichi, F. & Uchiyama, S. Suppression of Methionine Oxidation of a Pharmaceutical Antibody Stored in a Polymer-Based Syringe. *J Pharm Sci* **105**, 623–629 (2016).
  - 38. Kiyoshi, M. *et al.* Collaborative Study for Analysis of Subvisible Particles Using Flow Imaging and Light Obscuration: Experiences in Japanese Biopharmaceutical Consortium. *J Pharm Sci* **108**, 832–841 (2019).
  - 39. Rosenberg, A. S., Verthelyi, D. & Cherney, B. W. Managing uncertainty: A perspective on risk pertaining to product quality attributes as they bear on immunogenicity of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* **101**, 3560–3567 (2012).

40. Carpenter, J. F. *et al.* Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: Gaps that may compromise product quality. *J Pharm Sci* **98**, 1201–1205 (2009).
41. Rosenberg, A. S. Effects of protein aggregates: An Immunologic perspective. *AAPS Journal* **8**, 501–507 (2006).
42. U.S. Department of Health and Human Services Food, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), C. for B. E. and R. (CBER). Guidance for industry: Immunogenicity assessment for therapeutic protein products. *Biotechnol Law Rep* **32**, 172–185 (2013).
43. Corporation, S. *Characterization of Insoluble Subvisible Particles in Biopharmaceuticals by Flow Imaging Method.* (2020).
44. Hrycik, A. R., Shambaugh, A. & Stockwell, J. D. Comparison of FlowCAM and microscope biovolume measurements for a diverse freshwater phytoplankton community. *J Plankton Res* **41**, 849–864 (2019).
45. 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* **109**, 614–623 (2020).
46. Shibata, H., Harazono, A., Kiyoshi, M. & Ishii-Watabe, A. Quantitative Evaluation of Insoluble Particulate Matters in Therapeutic Protein Injections Using Light Obscuration and Flow Imaging Methods. *J Pharm Sci* **111**, 648–654 (2022).
47. Calderon, C. P., Daniels, A. L. & Randolph, T. W. Deep Convolutional Neural Network Analysis of Flow Imaging Microscopy Data to Classify Subvisible Particles in Protein Formulations. *J Pharm Sci* **107**, 999–1008 (2018).
48. Nishiumi, H. *et al.* Utility of Three Flow Imaging Microscopy Instruments for Image Analysis in Evaluating four Types of Subvisible Particle in Biopharmaceuticals. *J Pharm Sci* **111**, 3017–3028 (2022).
49. Weinbuch, D. *et al.* Micro-flow imaging and resonant mass measurement (archimedes) - complementary methods to quantitatively differentiate protein particles and silicone oil droplets. *J Pharm Sci* **102**, 2152–2165 (2013).
50. Yoneda, S. *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* **108**, 755–762 (2019).
51. Zölls, S. *et al.* Particles in therapeutic protein formulations, Part 1: Overview of analytical methods. *J Pharm Sci* **101**, 914–935 (2012).
52. Kotarek, J. *et al.* Subvisible Particle Content, Formulation, and Dose of an Erythropoietin Peptide Mimetic Product Are Associated with Severe Adverse Postmarketing Events. *J Pharm Sci* **105**, 1023–1027 (2016).
53. Li, X. *et al.* Viral Vector-Based Gene Therapy. *Int J Mol Sci* **24**, 7736 (2023).
54. Rashid, R. A. & Ankathil, R. Gene therapy: An updated overview on the promising success stories. *Malays J Pathol* **42**, 171–185 (2020).
55. Daya, S. & Berns, K. I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 21 583–593 Preprint at <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08> (2008).
56. Arabi, F., Mansouri, V. & Ahmadbeigi, N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview.

- Biomedicine & Pharmacotherapy* **153**, 113324 (2022).
- 57. September 14, 1990: The Beginning. *Hum Gene Ther* **1**, 371–372 (1990).
  - 58. Friedmann, T. Stanfield Rogers: Insights into Virus Vectors and Failure of an Early Gene Therapy Model. *Molecular Therapy* **4**, 285–288 (2001).
  - 59. Anderson, W. F. Human Gene Therapy. *Science (1979)* **256**, 808–813 (1992).
  - 60. Bryant, L. M. *et al.* Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev* **24**, 55–64 (2013).
  - 61. Gao, G. *et al.* Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J Virol* **78**, 6381–6388 (2004).
  - 62. Podsakoff, G., Wong, K. K. & Chatterjee, S. Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* **68**, 5656–5666 (1994).
  - 63. Janik, J. E., Huston, M. M. & Rose, J. A. Adeno-associated virus proteins: origin of the capsid components. *J Virol* **52**, 591–597 (1984).
  - 64. Wang, D., Tai, P. W. L. & Gao, G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 18 358–378 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9> (2019).
  - 65. Wang, J.-H., Gessler, D. J., Zhan, W., Gallagher, T. L. & Gao, G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduct Target Ther* **9**, 78 (2024).
  - 66. Maurer, A. C. & Weitzman, M. D. Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. *Hum Gene Ther* **31**, 499–511 (2020).
  - 67. Allay, J. A. *et al.* Good Manufacturing Practice Production of Self-Complementary Serotype 8 Adeno-Associated Viral Vector for a Hemophilia B Clinical Trial. *Hum Gene Ther* **22**, 595–604 (2011).
  - 68. Grieger, J. C., Soltys, S. M. & Samulski, R. J. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector. *Molecular Therapy* **24**, 287–297 (2016).
  - 69. Hebben, M. Downstream bioprocessing of AAV vectors: industrial challenges & regulatory requirements. *Cell Gene Ther Insights* **4**, 131–146 (2018).
  - 70. Jiang, Z. & Dalby, P. A. Challenges in scaling up AAV-based gene therapy manufacturing. *Trends in Biotechnology* vol. 41 1268–1281 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.04.002> (2023).
  - 71. Wagner, C., Fuchsberger, F. F., Innthaler, B., Lemmerer, M. & Birner-Gruenberger, R. Quantification of Empty, Partially Filled and Full Adeno-Associated Virus Vectors Using Mass Photometry. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
  - 72. BioPhorum Operation Group. Control of empty, full and partially filled capsids – BioPhorum establishing an industry position on this critical quality attribute. <https://www.biophorum.com/news/control-of-empty-full-and-partially-filled-capsids-biophorum-establishing-an-industry-position-on-this-critical-quality-attribute/> (2022).
  - 73. Colomb-Delsuc, M. *et al.* Assessment of the percentage of full recombinant adeno-associated virus particles in a gene therapy drug using CryoTEM. *PLoS One* **17**, (2022).

74. Lavoie, R. A. *et al.* Enrichment of adeno-associated virus serotype 5 full capsids by anion exchange chromatography with dual salt elution gradients. *Biotechnol Bioeng* (2023) doi:10.1002/bit.28453.
75. Wang, C. *et al.* Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Mol Ther Methods Clin Dev* **15**, 257–263 (2019).
76. Cellular, Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee (CTGTAC) Meeting #70: Toxicity Risks of Adeno-associated Virus (AAV) Vectors for Gene Therapy. Preprint at <https://www.fda.gov/media/151599/download> (2021).
77. Sommer, J. ürg M. *et al.* Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Molecular Therapy* **7**, 122–128 (2003).
78. Teijaro, J. R. Pleiotropic Roles of Type 1 Interferons in Antiviral Immune Responses. in 135–158 (2016). doi:10.1016/bs.ai.2016.08.001.
79. Hui, D. J. *et al.* AAV capsid CD8+ T-cell epitopes are highly conserved across AAV serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev* **2**, 15029 (2015).
80. Mingozi, F. & High, K. A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**, 23–36 (2013).
81. Finn, J. D. *et al.* Proteasome Inhibitors Decrease AAV2 Capsid derived Peptide Epitope Presentation on MHC Class I Following Transduction. *Molecular Therapy* **18**, 135–142 (2010).
82. Pien, G. C. *et al.* Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 1688–1695 (2009).
83. Xiang, Z. Q. *et al.* The Effect of CpG Sequences on Capsid-Specific CD8+ T Cell Responses to AAV Vector Gene Transfer. *Molecular Therapy* **28**, 771–783 (2020).
84. Shieh, P. B. *et al.* Re: “Moving Forward After Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy” by Wilson and Flotte. *Hum Gene Ther* **31**, 787–787 (2020).
85. Wilson, J. M. & Flotte, T. R. Moving Forward after Two Deaths in a Gene Therapy Trial of Myotubular Myopathy. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **40**, 14, 16 (2020).
86. Shen, W., Liu, S. & Ou, L. rAAV immunogenicity, toxicity, and durability in 255 clinical trials: A meta-analysis. *Frontiers in Immunology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1001263> (2022).
87. Baatartsogt, N., Kashiwakura, Y., Hiramoto, T., Kamoshita, N. & Ohmori, T. Successful Liver transduction by Re-administration of Different 4 Adeno-Associated Virus Vector Serotypes in Mice 5 6. doi:10.1101/2022.10.21.513281.
88. Dark Horse Consulting Group. Proposed DRAFT Guidance for FDA Consideration: Testing of Adeno-Associated Viral (AAV) Vector-Based Human Gene Therapy Products for Empty Capsids During Product Manufacture. Preprint at (2021).
89. Rieser, R. *et al.* Comparison of different liquid chromatography-based purification strategies for adeno-associated virus vectors. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
90. Lyle, A. *et al.* Process economics evaluation and optimization of adeno-associated virus downstream processing. *Biotechnol Bioeng* (2023) doi:10.1002/bit.28402.
91. Bee, J. S. *et al.* Quantitation of Trace Levels of DNA Released from Disrupted Adeno-Associated Virus

- Gene Therapy Vectors. *J Pharm Sci* **110**, 3183–3187 (2021).
- 92. Horowitz, E. D. *et al.* Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Uncoating and Genome Release. *J Virol* **87**, 2994–3002 (2013).
  - 93. Horowitz, E. D. *et al.* Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Uncoating and Genome Release. *J Virol* **87**, 2994–3002 (2013).
  - 94. FDA Briefing Document. *Food and Drug Administration* vol. BLA#125781/00 Preprint at (2023).
  - 95. Werle, A. K. *et al.* Comparison of analytical techniques to quantitate the capsid content of adeno-associated viral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* **23**, 254–262 (2021).
  - 96. Gimpel, A. L. *et al.* Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev* **20**, 740–754 (2021).
  - 97. Pierson, E. E., Keifer, D. Z., Asokan, A. & Jarrold, M. F. Resolving Adeno-Associated Viral Particle Diversity with Charge Detection Mass Spectrometry. *Anal Chem* **88**, 6718–6725 (2016).
  - 98. Richter, K. *et al.* Purity and DNA content of AAV capsids assessed by analytical ultracentrifugation and orthogonal biophysical techniques. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **189**, 68–83 (2023).
  - 99. Maruno, T., Ishii, K., Torisu, T. & Uchiyama, S. Size Distribution Analysis of the Adeno-Associated Virus Vector by the c(s) Analysis of Band Sedimentation Analytical Ultracentrifugation with Multiwavelength Detection. *J Pharm Sci* **112**, 937–946 (2023).
  - 100. Blessing, D. *et al.* Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* **13**, 14–26 (2019).
  - 101. Fu, X. *et al.* Analytical Strategies for Quantification of Adeno-Associated Virus Empty Capsids to Support Process Development. *Hum Gene Ther Methods* **30**, 144–152 (2019).
  - 102. Benjin, X. & Ling, L. Developments, applications, and prospects of cryo-electron microscopy. *Protein Science* **29**, 872–882 (2020).
  - 103. Benjin, X. & Ling, L. Developments, applications, and prospects of cryo-electron microscopy. *Protein Science* **29**, 872–882 (2020).
  - 104. Stagg, S. M., Yoshioka, C., Davulcu, O. & Chapman, M. S. Cryo-electron Microscopy of Adeno-associated Virus. *Chem Rev* **122**, 14018–14054 (2022).
  - 105. Toshio, M. Current Status and Prospects of Deep-learning-based AI Applications to Cryogenic Electron Microscopy Single Particle Analysis. *J-Stage* vol. 55 Preprint at (2020).
  - 106. Galata, D. L. *et al.* Applications of machine vision in pharmaceutical technology: A review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **159**, 105717 (2021).
  - 107. Chan, H.-P., Samala, R. K., Hadjiiski, L. M. & Zhou, C. Deep Learning in Medical Image Analysis. in 3–21 (2020). doi:10.1007/978-3-030-33128-3\_1.
  - 108. Lecun, Y., Bengio, Y. & Hinton, G. Deep learning. *Nature* **521**, 436–444 (2015).
  - 109. Rana, M. & Bhushan, M. Machine learning and deep learning approach for medical image analysis: diagnosis to detection. *Multimed Tools Appl* **82**, 26731–26769 (2023).
  - 110. Farkas, D., Madarász, L., Nagy, Z. K., Antal, I. & Kállai-Szabó, N. Image Analysis: A Versatile Tool in the

- Manufacturing and Quality Control of Pharmaceutical Dosage Forms. *Pharmaceutics* **13**, 685 (2021).
- 111. Hamet, P. & Tremblay, J. Artificial intelligence in medicine. *Metabolism* **69**, S36–S40 (2017).
  - 112. Hamet, P. & Tremblay, J. Artificial intelligence in medicine. *Metabolism* **69**, S36–S40 (2017).
  - 113. Rapakoulia, T. *et al.* EnsembleGASVR: a novel ensemble method for classifying missense single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics* **30**, 2324–2333 (2014).
  - 114. Habehh, H. & Gohel, S. Machine Learning in Healthcare. *Curr Genomics* **22**, 291–300 (2021).
  - 115. Yuan, X., Buşoniu, L. & Babuška, R. Reinforcement Learning for Elevator Control. *IFAC Proceedings Volumes* **41**, 2212–2217 (2008).
  - 116. Elbaz, K., Zhou, A. & Shen, S.-L. Deep reinforcement learning approach to optimize the driving performance of shield tunnelling machines. *Tunnelling and Underground Space Technology* **136**, 105104 (2023).
  - 117. Baştanlar, Y. & Özysal, M. Introduction to Machine Learning. in 105–128 (2014). doi:10.1007/978-1-62703-748-8\_7.
  - 118. Shibata, H. *et al.* A Collaborative Study on the Classification of Silicone Oil Droplets and Protein Particles Using Flow Imaging Method. *J Pharm Sci* **111**, 2745–2757 (2022).
  - 119. Saggu, M., Patel, A. R. & Koulis, T. A Random Forest Approach for Counting Silicone Oil Droplets and Protein Particles in Antibody Formulations Using Flow Microscopy. *Pharm Res* **34**, 479–491 (2017).
  - 120. Shmilovici, A. Support Vector Machines. in *Data Mining and Knowledge Discovery Handbook* 231–247 (Springer US, Boston, MA, 2009). doi:10.1007/978-0-387-09823-4\_12.
  - 121. Friedman, J. H. Greedy function approximation: A gradient boosting machine. *The Annals of Statistics* **29**, (2001).
  - 122. Kuhn, M. & Johnson, K. *Applied Predictive Modeling*. (Springer New York, New York, NY, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-6849-3.
  - 123. Strehl, R. *et al.* Discrimination between silicone oil droplets and protein aggregates in biopharmaceuticals: A novel multiparametric image filter for sub-visible particles in microflow imaging analysis. *Pharm Res* **29**, 594–602 (2012).
  - 124. Sharma, D. K., King, D., Oma, P. & Merchant, C. Micro-Flow Imaging: Flow Microscopy Applied to Sub-visible Particulate Analysis in Protein Formulations. *AAPS J* **12**, 455–464 (2010).
  - 125. Krause, N. *et al.* Oil-Immersion Flow Imaging Microscopy for Quantification and Morphological Characterization of Submicron Particles in Biopharmaceuticals. *AAPS Journal* **23**, (2021).
  - 126. Nattkemper, T. W. Multivariate image analysis in biomedicine. *J Biomed Inform* **37**, 380–391 (2004).
  - 127. Yamashita, R., Nishio, M., Do, R. K. G. & Togashi, K. Convolutional neural networks: an overview and application in radiology. *Insights Imaging* **9**, 611–629 (2018).
  - 128. Anwar, S. M. *et al.* Medical Image Analysis using Convolutional Neural Networks: A Review. *J Med Syst* **42**, 226 (2018).
  - 129. Fukushima, K. & Miyake, S. Neocognitron: A new algorithm for pattern recognition tolerant of deformations and shifts in position. *Pattern Recognit* **15**, 455–469 (1982).
  - 130. Sahiner, B. *et al.* Classification of mass and normal breast tissue: a convolution neural network classifier

- with spatial domain and texture images. *IEEE Trans Med Imaging* **15**, 598–610 (1996).
- 131. Zhang, W. *et al.* Computerized detection of clustered microcalcifications in digital mammograms using a shift-invariant artificial neural network. *Med Phys* **21**, 517–524 (1994).
  - 132. Wu, Y. & Feng, J. Development and Application of Artificial Neural Network. *Wirel Pers Commun* **102**, 1645–1656 (2018).
  - 133. Nwankpa, C., Ijomah, W., Gachagan, A. & Marshall, S. Activation Functions: Comparison of trends in Practice and Research for Deep Learning. (2018).
  - 134. Riba, J., Schoendube, J., Zimmermann, S., Koltay, P. & Zengerle, R. Single-cell dispensing and ‘real-time’ cell classification using convolutional neural networks for higher efficiency in single-cell cloning. *Sci Rep* **10**, 1193 (2020).
  - 135. Cao, X. *et al.* Free fatty acid particles in protein formulations, Part 1: Microspectroscopic identification. *J Pharm Sci* **104**, 433–446 (2015).
  - 136. Doshi, N. *et al.* A Comprehensive Assessment of All-Oleate Polysorbate 80: Free Fatty Acid Particle Formation, Interfacial Protection and Oxidative Degradation. *Pharm Res* **38**, 531–548 (2021).
  - 137. Calderon, C. P., Krhač Levačić, A., Helbig, C., Wuchner, K. & Menzen, T. Combining Machine Learning and Backgrounded Membrane Imaging: A Case Study in Comparing and Classifying Different Types of Biopharmaceutically Relevant Particles. *J Pharm Sci* **111**, 2422–2434 (2022).
  - 138. Singh, S. K., Zou, Q., Huang, M. & Bilikallahalli, M. Application of Biophysics in Formulation, Process, and Product Characterization: Selected Case Studies. in *Biophysics for Therapeutic Protein Development* 147–172 (Springer New York, New York, NY, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-4316-2\_7.
  - 139. Chen, X. G., Graužinytė, M., van der Vaart, A. W. & Boll, B. Applying Pattern Recognition as a Robust Approach for Silicone Oil Droplet Identification in Flow-Microscopy Images of Protein Formulations. *J Pharm Sci* **110**, 1643–1651 (2021).
  - 140. Probst, C. Characterization of Protein Aggregates, Silicone Oil Droplets, and Protein-Silicone Interactions Using Imaging Flow Cytometry. *J Pharm Sci* **109**, 364–374 (2020).
  - 141. Probst, C., Zayats, A., Venkatachalam, V. & Davidson, B. Advanced Characterization of Silicone Oil Droplets in Protein Therapeutics Using Artificial Intelligence Analysis of Imaging Flow Cytometry Data. *J Pharm Sci* **109**, 2996–3005 (2020).
  - 142. Kiyoshi, M., Tada, M., Shibata, H., Aoyama, M. & Ishii-Watabe, A. Characterization of Aggregated Antibody-Silicone Oil Complexes: From Perspectives of Morphology, 3D Image, and Fcγ Receptor Activation. *J Pharm Sci* **110**, 1189–1196 (2021).
  - 143. Yoneda, S., Torisu, T. & Uchiyama, S. Development of syringes and vials for delivery of biologics: current challenges and innovative solutions. *Expert Opin Drug Deliv* **18**, 459–470 (2021).
  - 144. Shah, M. *et al.* Evaluation of aggregate and silicone-oil counts in pre-filled siliconized syringes: An orthogonal study characterising the entire subvisible size range. *Int J Pharm* **519**, 58–66 (2017).
  - 145. Tomlinson, A., Demeule, B., Lin, B. & Yadav, S. Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism. *Mol Pharm* **12**, 3805–3815 (2015).

146. Siska, C. C. *et al.* Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 2: Contribution of Polysorbate Raw Material. *J Pharm Sci* **104**, 447–456 (2015).
147. Doshi, N., Demeule, B. & Yadav, S. Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations. *Mol Pharm* **12**, 3792–3804 (2015).
148. Saggù, M., Liu, J. & Patel, A. Identification of Subvisible Particles in Biopharmaceutical Formulations Using Raman Spectroscopy Provides Insight into Polysorbate 20 Degradation Pathway. *Pharm Res* **32**, 2877–2888 (2015).
149. Kerwin, B. A. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *J Pharm Sci* **97**, 2924–2935 (2008).
150. Traub-Hoffmann, K., Gegenfurtner, K., Kraft, K. U. & Friess, W. Spray congealed solid lipid microparticles as a sustained release delivery system for Gonadorelin [6-D-Phe]: Production, optimization and in vitro release behavior. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **154**, 18–32 (2020).
151. Yokogawa Electric Corporation. <https://www.yokogawa.co.jp/solutions/products-and-services/life-science/flowcam-flow-imaging-microscopy/flowcam-8000/>.
152. Shimadzu Corporation. <https://www.an.shimadzu.co.jp/products/particle-size-analysis/particle-size-analyzer/ispect-dia-10/index.html>.
153. Bio-Techne. <https://www.bio-techne.com/instruments/micro-flow-imaging>.
154. Ioffe, S. & Szegedy, C. *Batch Normalization: Accelerating Deep Network Training by Reducing Internal Covariate Shift*. <https://static.googleusercontent.com/media/research.google.com/ja//pubs/archive/43442.pdf> (2015).
155. Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A. & Salakhutdinov, R. *Dropout: A Simple Way to Prevent Neural Networks from Overfitting*. *Journal of Machine Learning Research* vol. 15 (2014).
156. Vagenende, V., Yap, M. G. S. & Trout, B. L. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry* **48**, 11084–11096 (2009).
157. Fish, R., Lin, J. & Doshi, N. Impact of Silicone Oil on Free Fatty Acid Particle Formation due to Polysorbate 20 Degradation. *Pharm Res* **37**, 216 (2020).
158. Liu, F., Gaul, L., Shu, F., Vitenson, D. & Wu, M. Microscope-based light gradient generation for quantitative growth studies of photosynthetic micro-organisms. *Lab Chip* **22**, 3138–3146 (2022).
159. Adeyemi, A. A., Barakat, N. & Darcie, T. E. Applications of digital micro-mirror devices to digital optical microscope dynamic range enhancement. *Opt Express* **17**, 1831 (2009).
160. Garbin, C., Zhu, X. & Marques, O. Dropout vs. batch normalization: an empirical study of their impact to deep learning. *Multimed Tools Appl* **79**, 12777–12815 (2020).
161. Fedorowicz, F. M., Chalus, P., Kirschenbühler, K., Drewes, S. & Koulov, A. Image Classification of Degraded Polysorbate, Protein and Silicone Oil Sub-Visible Particles Detected by Flow-Imaging Microscopy in Biopharmaceuticals Using a Convolutional Neural Network Model. *J Pharm Sci* **112**, 3099–3108 (2023).
162. Narhi, L. O. *et al.* Subvisible (2-100 µm) particle analysis during biotherapeutic drug product development:

- Part 1, considerations and strategy. *J Pharm Sci* **104**, 1899–1908 (2015).
- 163. Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L. & Gao, G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 53 (2021).
  - 164. Gao, K. *et al.* Empty virions in AAV8 vector preparations reduce transduction efficiency and may cause total viral particle dose-limiting side effects. *Mol Ther Methods Clin Dev* **1**, 9 (2014).
  - 165. Pei, X. *et al.* Efficient capsid antigen presentation from adeno-associated virus empty virions in vivo. *Front Immunol* **9**, (2018).
  - 166. Wright, J. F. AAV empty capsids: For better or for worse? *Molecular Therapy* vol. 22 1–2 Preprint at <https://doi.org/10.1038/mt.2013.268> (2014).
  - 167. Nathwani, A. C. *et al.* Adenovirus-Associated Virus Vector–Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *New England Journal of Medicine* **365**, 2357–2365 (2011).
  - 168. Wu, D., Hwang, P., Li, T. & Piszczeck, G. Rapid characterization of adeno-associated virus (AAV) gene therapy vectors by mass photometry. *Gene Ther* **29**, 691–697 (2022).
  - 169. Subramanian, S. *et al.* Filling Adeno-Associated Virus Capsids: Estimating Success by Cryo-Electron Microscopy. *Hum Gene Ther* **30**, 1449–1460 (2019).
  - 170. Yarawsky, A. E. *et al.* AAV analysis by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: beyond empty and full capsids. *European Biophysics Journal* **52**, 353–366 (2023).
  - 171. Allay, J. A. *et al.* Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial. *Hum Gene Ther* **22**, 595–604 (2011).
  - 172. Olinares, P. D. B. *et al.* Native Mass Spectrometry-Based Screening for Optimal Sample Preparation in Single-Particle Cryo-EM. *Structure* **29**, 186-195.e6 (2021).
  - 173. Frenkel, R. *et al.* ACUVRA: Anion-Exchange Chromatography UV-Ratio Analysis—A QC-Friendly Method for Monitoring Adeno-Associated Virus Empty Capsid Content To Support Process Development and GMP Release Testing. *AAPS J* **25**, 3 (2022).
  - 174. Vucetic, S. & Obradovic, Z. Classification on Data with Biased Class Distribution. in 527–538 (2001). doi:10.1007/3-540-44795-4\_45.
  - 175. Haibo He & Garcia, E. A. Learning from Imbalanced Data. *IEEE Trans Knowl Data Eng* **21**, 1263–1284 (2009).
  - 176. Fu, Q., Polanco, A., Lee, Y. S. & Yoon, S. Critical challenges and advances in recombinant adeno-associated virus (rAAV) biomanufacturing. *Biotechnol Bioeng* **120**, 2601–2621 (2023).
  - 177. Maruno, T., Usami, K., Ishii, K., Torisu, T. & Uchiyama, S. Comprehensive Size Distribution and Composition Analysis of Adeno-Associated Virus Vector by Multiwavelength Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *J Pharm Sci* **110**, 3375–3384 (2021).
  - 178. McIntosh, N. L. *et al.* Comprehensive characterization and quantification of adeno associated vectors by size exclusion chromatography and multi angle light scattering. *Sci Rep* **11**, 3012 (2021).
  - 179. Vollrath, I. *et al.* Subvisible Particulate Contamination in Cell Therapy Products—Can We Distinguish? *J Pharm Sci* **109**, 216–219 (2020).
  - 180. Farrell, C. J. *et al.* Cell confluence analysis on microcarriers by micro-flow imaging. *Cytotechnology* **68**,

2469–2478 (2016).

181. Sediq, A. S., Klem, R., Nejadnik, M. R., Meij, P. & Jiskoot, W. Label-Free, Flow-Imaging Methods for Determination of Cell Concentration and Viability. *Pharm Res* **35**, 150 (2018).
182. Wu, L. *et al.* Cell aggregation in thawed haematopoietic stem cell products visualised using micro-flow imaging. *Transfusion Medicine* **22**, 218–220 (2012).
183. Integrated Gulf Biosystems. Attune CytPix Flow Cytometer. <https://igbiosystems.com/attune-cytpix-flow-cytometer/> (2022).
184. 望月 純子. 臨床用iPS細胞の品質評価国際標準化に向けた取組み. 生物工学会誌 **100**, 666–669 (2022).
185. Luque, D. & Castón, J. R. Cryo-electron microscopy for the study of virus assembly. *Nat Chem Biol* **16**, 231–239 (2020).
186. Kulkarni, J. A. *et al.* On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS Nano* **12**, 4787–4795 (2018).
187. Park, J. W., Lagniton, P. N. P., Liu, Y. & Xu, R.-H. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how. *Int J Biol Sci* **17**, 1446–1460 (2021).
188. Abbasi, S. *et al.* Carrier-free mRNA vaccine induces robust immunity against SARS-CoV-2 in mice and non-human primates without systemic reactogenicity. *Molecular Therapy* **32**, 1266–1283 (2024).
189. YUSA, K., YUSA, Y. & UCHIDA, K. Viral safety testing for biopharmaceuticals: Current and future prospects. *Translational and Regulatory Sciences* **2**, 94–99 (2020).
190. Matuszewski, D. J. & Sintorn, I.-M. TEM virus images: Benchmark dataset and deep learning classification. *Comput Methods Programs Biomed* **209**, 106318 (2021).
191. Liu, S. & Hua, H. Extended depth-of-field microscopic imaging with a variable focus microscope objective. *Opt Express* **19**, 353 (2011).

## 謝辞

本研究を進め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 高分子バイオテクノロジー領域 内山進 教授、鳥巣哲生准 教授、津中康央 特任講師、福原充子 特任講師、丸野孝浩 特任研究員に謹んで感謝を申し上げます。学位審査および本学位論文の作成において、ご指導を賜りました、大阪大学工学研究科 紀ノ岡正博 教授ならびに栗栖源嗣 教授に心より感謝申し上げます。

本研究で使用した脂質粒子の作製、およびフローイメージング顕微鏡 MFI の測定方法をご指導していただきました、Coriolis Pharma Research GmbH Tim Menzen 氏、Nils Krause 氏、Ludwig-Maximilians-Universität München Wolfgang Frieß 教授、Natalie Deiringer 氏に厚く御礼申し上げます。機械学習の基礎ならびにプログラミングのご指導をいただきました Ateneo de Manila University Arni E. Gambe-Gilbuena 氏、英文校正に携わっていただきました同研究室 辻広子 事務補佐員に心より感謝申し上げます。また、カーボン支持膜の作製およびクライオ電子顕微鏡の測定方法をご指導していただきました、大阪大学蛋白質研究所 加藤貴之 教授、廣瀬未果 研究員、Themo Fisher Scientific 株式会社 菅哲彦 氏、末宗周憲 氏にも、深く御礼申し上げます。AAV の免疫原性評価手法のご指導と実験のご協力をいただきました、EpiVax Inc. Anne De Groot 氏、Kirk Haltaufderhyde 氏、Tamako Garcia 氏に厚く御礼申し上げます。そして、本研究の遂行において実験にご協力いただいた、同研究室 米田早紀 氏（卒業生）、松下青葉 研究員、廣畑貴一 氏、Mark Vergara Allen Rocafort 氏、ならびに、細胞培養のご指導をしていただきました、株式会社ユー・メディコ 横山雅美 氏に謹んで感謝を申し上げます。

続いて、本研究の遂行を支援してくださいました、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の皆様、大阪大学フェローシップ創設事業 超階層マテリアルサイエンスプログラム 飯島賢二 特任教授、植田靖子 氏、清水美和 氏、大久保亜紀 氏、日本学術振興会の皆様に深く御礼申し上げます。

さらに、研究室生活を温かく支えてくださった、同研究室の山口祐希 助教、山根拓也特任准教授、渋谷梨紗 特任助教、西口茂孝 特任助教、坂東果林 特任研究員、露峰明子 事

務補佐員、先輩方、学生諸氏、株式会社ユー・メディコの皆様に心より感謝を申し上げます。また、学会や研修等でディスカッションをしてくださった他大学の教員方、学生諸氏、企業の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に、博士後期課程への進学に理解を示し、いつも応援し支えてくれた家族ならびに友人たちに心から感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。