1版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：８２６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2017
課題番号：２６４６０２４９

研究課題名（和文）免疫グロブリン製剤に含まれる凝集体の特性と安全性に関する研究

研究課題名（英文）Studies on characteristics of aggregates contained in therapeutic intravenous immunoglobulins

研究代表者

石井　明子（Ishii-Watabe, Akiko）

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究者番号：５０２９１１１７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：各種の人免疫グロブリン製剤を用いて、含まれる凝集体・多量体含量、及び各種ストレスによる凝集体のできやすさを評価し、製剤に含まれる分子の特性と凝集体の関連を調べた。酸性条件下で攪拌により生じた凝集体に含まれる分子種についてLC/MSによるペプチドマッピングをおこなったところ、溶液中及び凝集体中の糖鎖プロファイルには大きな差は認められなかったものの、凝集体中ではIgG4の割合が増加していることが明らかになった。以上の結果から、免疫グロブリン製剤に含まれるIgGの各サブタイプのうちIgG4が最も凝集体を生じやすいこと、凝集には糖鎖構造以外の構造及び物理的化学的性質が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated protein aggregate/multimer contents and propensity to form aggregate of each human intravenous immunoglobulin product (IVIG) induced by various stresses. Aggregates induced by stirring at neutral or acidic conditions were analyzed by LC/MS/MS in order to investigate their characteristics. Fc oligosaccharide profiles of IgG1, IgG2/3 and IgG4 were not different between soluble and aggregated antibodies, but intensity of IgG4 glycopeptide significantly increased in aggregates. These results suggest that IgG4 subclass in IVIG is labile to mechanical stress, and that structure/physicochemical properties other than Fc oligosaccharide make contribution on aggregate formation of IVIG.

研究分野：生物薬品学

キーワード：免疫グロブリン製剤　IVIG　凝集体　糖鎖

様 式 C－19、F－19－1、Z－19、CK－19（共通）

１．研究開始当初の背景

タンパク質医薬品製剤に含まれる不純物の一つである凝集体は、補体活性化等による急性のアレルギー反応や、抗薬物抗体による遅発性過敏症等の有害作用との関連が懸念され、凝集体の特性と安全性の関連、及び、製剤中での凝集体生成機構と生成抑制の手法が注目されている。

ヒト血漿由来ポリクリローナル IgG 製剤である「免疫グロブリン製剤」は、ヒト血漿から低温エタノール分画法により製造される医薬品で、ヒト IgG が有効成分である。日本では、低及び無ガンマグロブリン血漿血症、重症感染症における抗生物質との併用、特発性血小板減少性紫斑病、川崎病等が適応疾患となっている。本製剤には、凝集体含量が高く筋肉内投与によってのみ使用される製剤と、凝集体含量を低減するための処理が施された静脈内投与用の製剤がある。これらの製剤については、製造方法に依存して、残存する凝集体や有効成分である可溶性 IgG の特性が異なると想定されるが、各製剤の分子特性に関する研究は行われていない。そこで、本研究では、免疫グロブリン製剤に着目し、各製剤に残存する凝集体の特性（粒子径、組成)、及び、凝集体を形成する分子種の特定、ストレス負荷時の凝集体形成への影響を解析することにより、免疫グロブリン製剤の品質管理・安全性向上に資する知見、ならびに、今後、必要性が高まる皮下投与用の高濃度モノクローナル抗体医薬品製剤の創製と品質管理・安全性確保にも応用可能な知見を得ることを目的とする。

２．研究の目的

本研究は、抗体医薬品製剤に含まれる凝集体は、補体活性化による過敏症反応、免疫原性、有害反応との関連が懸念されていることから、免疫グロブリン製剤等に含まれる凝集体の特性や凝集体を形成しやすい分子の特性を解析することにより、抗体医薬品製剤の製法開発、品質管理に有用な知見を得ることを目的としている。

３．研究の方法

(1) 試料

人免疫グロブリン製剤、乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン製剤、乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン製剤、乾燥スルホ化人免疫グロブリン製剤、乾燥ペプシン処理人免疫グロブリン製剤、ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン製剤は、市販製剤を購入した。

(2) 凝集体及び多量体含量

各種免疫グロブリン製剤に含まれる凝集体及び多量体含量の評価を、定量的レーザー回折及びサイズ排除クロマトグラフィーにより行った。

(3) 各種免疫グロブリン製剤の凝集体のできやすさを評価するため、溶媒を 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.7 に置換して 10mg/mL の溶液とし、-80℃及び 37℃にて凍結融解を 10 回、または、1000rpm、37℃で 48 時間攪拌することによりストレスを与え、動的光散乱により粒子サイズを評価した。

(4) 凝集体中の抗体の特性解析

免疫グロブリン製剤、並びに PEG 及び陰イオン交換処理免疫グロブリン製剤をリン酸ナトリウム緩衝液 pH6.8 あるいは酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5 の緩衝液に溶媒置換して 1mg/mL の溶液を作成し、30℃、1000 rpm で 12～100 hr 攪拌し、凝集体の生成を定量的レーザー回折法により評価した。また、溶液を 20000 x g、10 min 遠心し、上清を凝集体を含まない画分と凝集体にわけ、還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化を行い、LC/MS によりペプチドの同定、物理化学的変化及び IgG Fc 糖鎖プロファイルの解析を行った。

４．研究成果

(1) 各種免疫グロブリン製剤の凝集体及び多量体含量

各種免疫グロブリン製剤を 50 mg/mL に調製し、定量的レーザー回折により凝集体含量を測定したところ、凝集体形成抑制する処理を行っていない製剤では、1 µm 以上の凝集体は 20～30µg/mL 程度観測された。陰イオン交換クロマト処理した製剤、PEG 処理した製剤、ペプシン処理した製剤では、1µm 以上の凝集体はほとんど観測されなかった。それに対して、pH 4 処理した製剤、スルホ化した製剤では、それぞれ約 5 µg/mL、25 µg/mL 程度観測された。サイズ排除クロマトグラフィーにて多量体含量を調べたところ、PEG 処理した製剤を除き、比較的多くの二量体が存在していることが確認された。製剤によりアルブミンが添加されているものもあるが、凝集体含量との関連は不明であった。これらの製剤は独立して開発された製品であり、原料となるヒト血漿は共通のものではない。しかし、多検体のヒト血漿をプールしたものである点は共通しており、異なる免疫グロブリン製剤間で糖鎖プロファイルが類似しているという報告（Fokkink W. et al., PLOS ONE 2015, 10(10):e0139828）からも、原材料の特性は製品間で類似していると考えられる。以上の結果から、1 µm 以上の凝集体形成に関しては、陰イオン交換クロマト処理が効果的に働いており、ペプシン処理及びスルホ化処理は効果が弱いこと、多量体の形成に関しては PEG 処理が有効に作用していることが推測された。

(2) 各種免疫グロブリン製剤の凝集体のできやすさ
凝集体のできやすさを動的光散乱により評価した。凍結融解においては、スルホ化処理した製剤及びペプシン処理し F(ab')2 が主成分の製剤で 1 μm 未満の凝集体の増加が検出されたが、PEG 処理及び陰イオン交換処理した製剤、及びペプシン処理した製剤においては凝集体は検出されなかった。撹拌においては、いずれの製剤においても凝集体生成が認められたが、スルホ化処理された製剤において、単量体のシグナルの低下及び凝集体シグナルの増加が最も認められた。以上から、凝集体生成抑制処理のうちスルホ化処理は撹拌に対する凝集体抑制効果が弱いことが推測された。

(3) 凝集体中の抗体の特性解析
免疫グロブリン製剤、並びに PEG 及び陰イオン交換処理免疫グロブリン製剤をリン酸ナトリウム緩衝液 pH6.8 あるいは酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5 の緩衝液に溶媒置換して 1 mg/mL の溶液を作成し、30℃、1000 rpm で 12～100 hr 撹拌し、凝集体の生成を定量的レーザー回折法により評価した。撹拌なしではいずれも凝集体は検出されなかったが、pH 6.8 では少量、pH 4.5 ではより多くの凝集体が生じた。撹拌処理により生じた物理化学的変化を調べることを目的に、遠心により凝集体を分取し LC/MS によるペプチドマッピングをおこない、溶液中の抗体と凝集体の抗体 Fc 領域の糖鎖プロファイルを比較したところ、大きな差は認められなかった。しかし、pH 4.5 で生じた凝集体においては、IgG のサブクラス由来のピーク強度に差があり IgG4 由来の糖ペプチドシグナル強度比の増加が認められ、IgG4 は特に凝集体が生じやすいことが分かった。以上の結果から、IgG 特に IgG4 は酸性条件下で凝集体を形成しやすいこと、凝集には糖鎖構造の関与は低くそれ以外の物理的化学的性質が関わっていることが示唆された。

５．主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計 1 件）
① Ishii-Watabe A, Shibata H, Harazono A, Hyuga M, Kiyoshi M, Saitoh S, Iwura T, Torisu T, Goda Y, Uchiyama S, Recent topics of research in the characterization and quality control of biopharmaceuticals in Japan.
J Pharm Sci. 2017;106:3431-3437. PMID: 28802881

〔学会発表〕（計 10 件）
① 石井明子，バイオ医薬品の品質評価に関する最新動向.
JASIS 2014 日本薬局方セミナー(2014.9)

② 石井明子，抗体医薬品　さらなる発展への課題：規制の観点から.
第 39 回日本薬学会関東支部学術講演会(2014.12)

③ 石井明子，バイオ医薬品の免疫原性.
第 35 回動物細胞工学会シンポジウム　バイオ医薬品の物性と免疫原性(2016.1)

④ 石井明子，バイオ医薬品の品質に関する今後の展望.
レギュラトリーサイエンス　エキスパート研修会・専門コース(2015.11)

⑤ 石井明子，バイオ医薬品の不純物評価・管理の概要.
第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6)

⑥ 石井明子，バイオ医薬品（組換えたんぱく質医薬品）の品質と免疫原性.
第 16 回日本蛋白質科学会年会(2016.6)

⑦ 原園 景，バイオ医薬品の品質評価と質量分析に期待される役割.
第 44 回 BMS コンファレンス（BMS2017）(2017.7)

⑧ 石井明子，バイオ医薬品の品質管理戦略構築と分析法.
JASIS 2017 特別セミナー　分析・科学機器と日本薬局方(2017.9)

⑨ 石井明子，斎藤嘉朗
バイオ医薬品の安全性評価法の概要と留意点. 日本免疫毒性学会(2017.9)

⑩ 原園 景，柴田寛子，木吉真人，鳥巣哲生，板倉由佳里，古木健一朗，福田 潤，末友 裕，

山﨑勝由，大庭澄明，小島昌太，西村仁孝，中家修一，前田裕貴，内山 進，横山雅美，クラユヒナ エレナ，石井明子
バイオ医薬品のタンパク質微粒子評価のための多機関共同測定による光遮蔽法とフローイメージング法の比較． 第138年会日本薬学会（2018.3）

〔図書〕（計2件）
① **石井明子，川崎ナナ**
動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術．
第13章第2節 **バイオ医薬品（組換えタンパク質医薬品）の品質関連規制と対応の留意点．**
技術情報協会 pp.523〜531(2014)

② **新見伸吾，石井明子，原園景，川崎ナナ**
バイオ医薬品の品質管理戦略 第2章 **品質特性解析** II **不純物の評価．**
じほう pp.29-35(2015)

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.nihs.go.jp/dbcb/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
石井 明子 （ISHII, Akiko）
国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長
研究者番号：50291117

(2)研究分担者
原園 景 （HARAZONO, Akira）
国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
研究者番号：20280753