

令和3年度

第2回 国立衛研例会

2022年1月25日（火曜）
13:30～15:00

国立医薬品食品衛生研究所
2階 共用会議室 + Webex 併用

プログラム

総合司会： 薮島由二（医療機器部）

13:30-13:35 開会挨拶（合田所長）

13:35-13:40 Web 参加者への連絡事項等（総合司会）

13:40-14:05 座長：中村 亮介（医薬安全科学部）

アデノ随伴ウイルスベクターの品質評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部

○山本 武範

14:05-14:30 座長：中村 亮介（医薬安全科学部）

抗体医薬品の高次構造多様性が生物活性、安定性に及ぼす影響

¹国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部, ²東京大学工学系研究科, ³東ソー株式会社, ⁴九州大学, ⁵鹿児島大学

○木吉 真人¹, 柴田 寛子¹, 多田 稔¹, 原園 景¹, 橋井 則貴¹, 長門石 暁², 寺尾 陽介³, Jose M.M. Caaveiro⁴, 伊東 祐二⁵, 井出輝彦³, 津本 浩平², 石井明子¹

14:30-14:55 座長：中村 亮介（医薬安全科学部）

外部標準法定量 NMR（EC-qNMR）のすすめ

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部

○西崎 雄三

14:55-15:00 閉会挨拶（本間副所長）

<講演 20 分 + 質疑応答 5 分>

アデノ随伴ウイルスベクターの品質評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部第一室

○山本 武範

【緒言】

近年、遺伝子治療の臨床開発・実用化が大きく進展しており、遺伝子を直接体内に投与する *in vivo* 遺伝子治療においては、非分裂細胞に対しても長期間の遺伝子発現が可能なアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) ベクターが開発の主流となっている。日本では 2020 年に、脊髄性筋萎縮症を適応とするオナセムノゲン アベパルボベク(商品名：ゾルゲンスマ)が AAV ベクターを用いた遺伝子治療用製品として初めて承認された。AAV ベクターは、導入遺伝子をコードする一本鎖 DNA (ベクターゲノム) がタンパク質性の外殻 (カプシド) に包まれた構造を有している。AAV ベクターの品質管理においては、ベクターゲノムとカプシドに関する特性のほか、生物活性、含量、不純物等を明らかにする必要がある。近年、ウイルスベクターの分析技術の開発が急速に進展しており、従来の手法と新しい手法の分析技術の限界点や留意点を明らかにするとともに、どのような品質評価を行うことが妥当かを整理することが重要となっている。以上の背景の下、当部で取り組んでいる AAV ベクターの品質評価に関する主な研究の概略を示す。

【取り組みの概要】

イオン交換クロマトグラフィーを用いた完全粒子と中空粒子の分離に関する研究：

AAV ベクターの製造では、ベクターゲノムを封入したウイルス粒子(完全粒子)の他に、ゲノムを封入していない空のウイルス粒子(中空粒子)が目的物質由来不純物として産生される。中空粒子の混入は有効性や安全性の低下の原因となるため、その含有量を測定し、低減化を図ることが品質管理上重要である。AAV ベクターの中空粒子の含有率の測定法として、従来は透過型電子顕微鏡 (TEM) によって視覚的に中空粒子を判別・計測する方法が用いられてきた。また最近では、超遠心分析法を用いて、完全粒子と中空粒子を両粒子の沈降速度の違いを利用して分離測定する方法が用いられている。しかし、これらの方法はスループット性が低い点、TEM は測定に主観が入る点、また特に超遠心分析法は多量の試料を必要とする点などが課題となっている。AAV ベクターの製法確立などの開発段階の品質評価においては、定量性や再現性に加えて、ハイスループットであること、少量・低濃度の AAV ベクター試料でも実施可能であること、操作が簡便であることなどが求められる。以上の観点から、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた中空粒子の含有率の測定は有用と考えられる。当室では、超高速 HPLC を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって、AAV ベクターの完全粒子と中空粒子を分離する条件を確立した。また、このシステムを用いて、少量の AAV ベクター試料から、中空粒子の含有率を高感度かつ再現性良く測定可能であることを示した。スループット性の高さも考慮すると、本法は特に AAV ベクターの開発初期 (ベクター製造条件の検討時など) および品質管理において有用な分析手法になり得ると考えられる。

AAV ベクターの含量の測定法に関する研究：

製品中における目的 AAV ベクターの含量は患者への投与量に直結するパラメータであり、安全性の観点からも高い定量性が求められる。AAV ベクターの含量は、一般に定量 PCR (qPCR) 又はデジタル PCR (dPCR) により AAV ベクターの外殻に封入されているベクターゲノムのコピー数 (ゲノムタイター) を計測することで決定される。これまでに、同一の AAV ベクター試料について異なる機関で測定を実施した場合に、含量が測定機関の間で大きく異なることが課題の一つとなっている。このため、より安定的な含量の測定系の確立に向けた研究を進めている。qPCR がリファレンスに対するキャリブレーションによる相対定量を行うのに対し、dPCR はキャリブレーションなく絶対定量が可能なので、当室では特に dPCR に焦点を当て、検討を進めている。これまでに、測定の際の前処理として行われる AAV ベクターからのゲノム抽出の工程がゲノムコピー数算出に大きな誤差を生じさせること、またその誤差の原因となる因子も一部明らかにしている。現在、最適なゲノム抽出法を確立すると共に、安定な含量測定のための留意事項を纏める取り組

みを進めている。

一方で、AAV ベクターの粒子数はウイルスからのゲノム抽出工程を経ず測定が可能であり、AAV ベクター含量を測定するうえでの指標の一つになり得る可能性がある。試料中の AAV ベクターの粒子数は、従来は ELISA を用いて標準 AAV ベクターに対する相対定量により測定されている。当室では、表面プラズモン共鳴法を応用して、標準 AAV ベクターによるキャリブレーションを用いることなく、AAV ベクターの粒子数を簡便に測定できる手法を確立しており、広範な AAV 血清型に拡張できるかの検討をも進めている。

本発表では、上記の研究内容を含め、AAV ベクターの特性解析法や品質評価法に関する当部の取り組みを紹介したい。

Studies on the quality evaluation of adeno-associated virus vectors

Takenori Yamamoto

Division of Molecular Target and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-44-270-6535, Fax: +81-44-270-6539, E-mail: tyamamoto@nihs.go.jp

抗体医薬品の高次構造多様性が生物活性、安定性に及ぼす影響

¹ 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部, ² 東京大学工学系研究科, ³ 東ソー株式会社, ⁴ 九州大学, ⁵ 鹿児島大学

○木吉真人¹, 柴田寛子¹, 多田 稔¹, 原園 景¹, 橋井 則貴¹, 長門石 暁², 寺尾 陽介³, Jose M.M. Caaveiro⁴, 伊東祐二⁵, 井出輝彦³, 津本浩平², 石井明子¹

【緒言】

抗体医薬品は分子量約 150,000 の巨大なタンパク質を有効成分とする医薬品であり, その有効性, 安全性に影響する要因は多岐にわたる. 特にタンパク質分子の立体構造は, ターゲット分子との親和性, 凝集性などの品質特性や安定性と密接に関わっている. 発表者はこれまで抗体医薬品と抗原あるいは Fc γ 受容体(Fc γ R)の分子間相互作用メカニズム解明を主な研究対象とし, 高次構造解析技術等を基盤に, 抗体医薬品の有効性・安全性の向上と, 品質評価技術の高度化のための研究を行ってきた.

本発表では, 抗体とその相互作用分子の構造解析を行った研究や, Fc 糖鎖の機能への影響, 次世代抗体医薬品として期待されるペプチドコンジュゲート抗体の特性を解析した研究例など, これまで行ってきた抗体医薬品の構造と機能に関する研究について述べる.

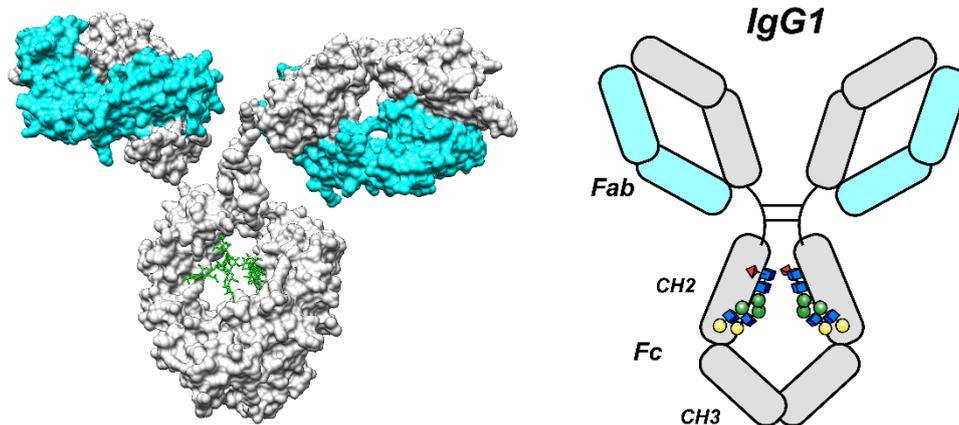


Fig 1. 抗体医薬品の構造と部位の名称

【実験】

X 線結晶構造解析は, 高エネルギー加速器研究機構 (KEK ; つくば市) のフォトンファクトリー (PF) にあるビームラインを用いて行った. 抗体医薬品の Fc γ RIIIa に対する親和性解析は, 表面プラズモン共鳴 (SPR) (Biacore 8K, Cytiva)を用いた. 生物薬品部で構築したレポーター細胞を用いて Fc γ RIIIa 活性化を評価した. 溶液中での分子のダイナミクスの解析は, 水素-重水素交換質量分析 (HDX-MS) (nanoACQUITY UPLC, SynaptG2-S Q-TOF mass spectrometer, Waters)を用いた. 熱安定性の評価には示差走査型熱量測定 (DSC) (MicroCal PEAQ DSC, Malvern)を用いた. サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (AKTA Avant, Cytiva)を用いて, タンパク質試料の精製, 分析を行った.

【結果と考察】

抗体医薬品の Fc 糖鎖不均一性を評価する新たな方法として, 東京大学及び東ソー (株) との共同研究により独自に開発した組換え Fc γ RIIIa を固定化したカラムを用いて, 抗体医薬品の Fc 糖鎖バリエーションの分離を行い, Fc 糖鎖のガラクトースの抗体依存性細胞傷害 (Antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 活性への寄与を明らかにした. さらに, Fc γ RIIIa-Fc 複合体の X 線結晶構造解析を行うことで, Fc の Fc γ RIIIa への結合様式に着目した分子モデルを作成した.

また, 水素-重水素交換質量分析 (HDX-MS) や, 示差走査型熱量測定 (DSC) などの手法を用いて, 抗体医薬品の糖鎖バリエーションの特性を多角的に解析することで, 抗体 Fc における糖鎖のタンパク質高次構造への寄与, 及び ADCC 活性における寄与を明らかにした. また, 鹿児島大学との

共同研究において、この Fc 部位にペプチドをコンジュゲートした抗体についても、動的構造と ADCC 活性の関連を明らかにした。これらの結果は、Fc 部位の溶液中での動的構造(ダイナミクス)の抑制によって、抗体分子全体の物理化学的性質や生物活性が顕著に変化する可能性を強く示唆するものである。

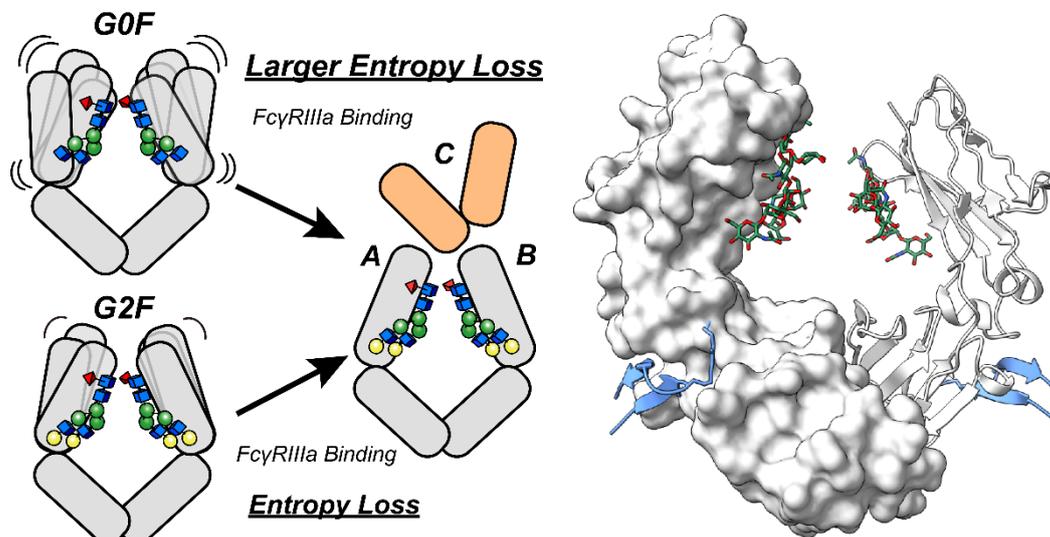


Fig2. 左) Fc 糖鎖は抗体分子の動的構造を抑制することで、抗体分子は FcγRIIIa との結合時に熱力学的に有利な分子状態を取る。右) ペプチドをコンジュゲートした次世代抗体医薬品の構造 (PDB ID; 6IQH)。

【結論】

抗体医薬品の溶液中での動的構造(ダイナミクス)は、安定性や機能などの性質と密接に関わっている。本研究により、抗体医薬品に含まれる各バリエーションや新規なコンジュゲート抗体の特性解析における動的構造解析の有用性が明らかになり、品質管理戦略構築における重要品質特性の特定や、より安定な抗体分子の開発への応用が期待される。

Structure and function of therapeutic antibody

Masato Kiyoshi¹, Hiroko Shibata¹, Minoru Tada¹, Akira Harazono¹, Noritaka Hashii¹, Satoru Nagatoishi², Yosuke Terao³, Jose M. M. Caaveiro⁴, Yuji Ito⁵, Teruhiko Ide³, Kouhei Tsumoto², Akiko Ishii-Watabe¹

1 National Institute of Health Sciences,

2 The University of Tokyo,

3 Tosoh Corporation,

4 Kyushu University,

5 Kagoshima University,

Tel: +81-044-270-6514

外部標準法定量 NMR (EC-qNMR) のすすめ

国立医薬品食品衛生研究所・食品添加物部
○西崎雄三

【緒言】

NMR は、静磁場に置かれた原子核が、その原子核に固有の周波数と共鳴し、低エネルギーから高エネルギー状態に遷移する現象を利用したスペクトル法である。回転座標系を用いて簡単に示すと、静磁場に置かれた原子核は、z 軸のまわりを歳差運動する。このときの正味の磁化成分 M_0 は、z 軸上に存在し、xy 平面には存在しない。通常、NMR は y 軸方向の磁化成分を検出するように設計されており、そのため、パルス照射して、磁化成分を y 軸方向に傾けさせ、これをシグナルとして検出する。この瞬間、磁化成分を構成する xy 成分は扇のように広がり、位相の一致が失われ、減衰する。すなわち FID であり、この減衰を T_2 緩和と呼ぶ。また、磁化成分を構成する z 成分は、z 軸に沿って、もとの熱平衡状態に戻り、これを T_1 緩和と呼ぶ (図 1)。このことから、NMR で定量性を確保するためには、パルス照射後の T_2 緩和を考慮して、FID をもれなく取込む時間 (取込み時間: AQ) を設ける必要がある。また、通常 NMR 測定では SN 比を向上させるために積算を行うが、この際は、 T_1 緩和を考慮して、もとの熱平衡状態に戻る時間 (遅延時間: D_1) をパルス照射ごとに設ける必要がある (図 2)。

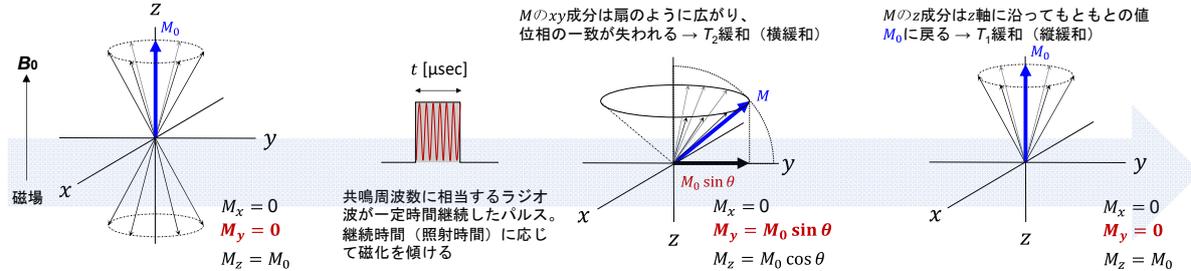


図 1 回転座標系におけるパルス照射後の磁化成分 M の挙動

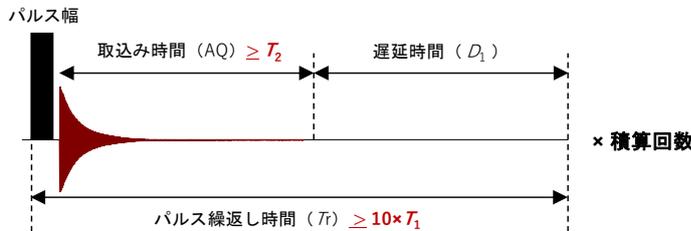


図 2 定量性を確保した NMR のパルス系列
通常、パルス幅は数 μ 秒であり、全体の繰返し時間 (秒) から無視して問題ない。

上記の定量性を確保したパルス系列を設定すると、同種核におけるシグナル応答値を分子間で比較することができる。すなわち、片方に純度既知の物質を基準として添加すると、基準物質のシグナル応答値から、もう片方の物質の絶対濃度ないし純度を求めることができる。この手法は、定量 NMR または qNMR と呼ばれる。

一般に、我々が手にする市販試薬 (標準品) に表示された純度は、クロマトグラフィーによる面積百分率法で値付けされた相対純度であり、クロマトグラム上で検出できない水分や不純物等の含量は無視される。したがって、食品や医薬品をはじめとする、これらの規格試験では、標準品を開発した試薬会社、購入してからの保管状態、不純物の組成の違いにより、分析結果や規格値に対する適否判定が、試験機関によって異なることが懸念される。このような問題の解決に、qNMR は非常に有効である。例えば、クロマトグラフィーによる定量試験、抗酸化能を評価するための力価試験、あるいは毒性試験において、自身が使用した標準品の絶対純度を予め qNMR で算出し、試料の調製濃度を校正すれば、標準品の品質の差異が試験機関間で解消される。現在、qNMR は、我が国の食品、医薬品の品質に関する公定法を収載した、食品添加物公定書および日本薬局方の中で、定量用標準品の規格試験として採用されている。さらに、日本工業規格 (JIS) としても標準化がなされ、規制科学分野における絶対的な地位を確立したといえる。

しかしながら、食品添加物公定書、日本薬局方および JIS を読むと、試料調製方法がすべて内部

標準法 qNMR (IC-qNMR : Internal Calibration qNMR) に限定されていることに気づく。内部標準による試料の汚染を避けたい高価な標準品、自ら単離した天然原料からの希少な (秤量すら困難な) 精製品、あるいは測定溶媒中において内部標準と溶解性や安定性が著しく異なる物質を測定するとき、IC-qNMR では解決困難な場面が実際には存在する。そこで演者は、上述の問題解決として、外部標準法 qNMR (EC-qNMR : External Calibration qNMR) に着目することとした。EC-qNMR の場合、IC-qNMR とは違い、方法論が未だに一般化されていない。また EC-qNMR の報告には 5% 以上の誤差が散見され、精度の低い測定法と認識されている。本衛研例会では、EC-qNMR の高精度化および標準化に資する検討、また日本電子 (株) と共同で作成した、EC-qNMR 完全自動化スクリプトについて紹介したい。

【実験】

NMR の応答は相反定理に従う。すなわち、NMR の検出コイル (プローブ) が対象核の共鳴周波数に同調するとき限り、パルス幅とシグナル面積の積はプローブ固有の値 (Q 値) となる。塩濃度が高い試料の場合、感度は低下し、シグナル面積が小さくなるが、その分パルス幅は長くなるので、Q 値は一定である。2 本の NMR 管を用いて EC-qNMR を実施した場合、両者の関係性は以下の式で表すことができる。

$$Conc._A = Conc._C \times \frac{S_A}{S_C} \times \frac{H_C}{H_A} \times \frac{90PW_A}{90PW_C}$$

ここで、*Conc.*、モル濃度 (mol/L) ; *S*、シグナル面積 ; *H*、*S* に由来するプロトン数 ; 90PW、90°パルス幅 (μsec) ; A、分析種 ; C、基準物質 (内部標準または外部標準)。

分析種と基準物質が同じ NMR 試料管中にある場合、それぞれの磁化成分を y 軸方向に傾けるパルス幅は同じ値となり (図 1)、IC-qNMR では、通常、プローブに記録されたデフォルトの 90°パルス幅(90PW) が測定条件に適用される。一方、EC-qNMR では分析種と基準物質が異なる NMR 試料管にあるため、プローブのチューニングと 90PW 校正が、分析値にバラつきを与える要因であることは明白である。

本研究では、NMR が相反定理に従って応答することから、図 3 に示す手順で EC-qNMR を実施し、特にチューニングや 90PW 校正が与える分析値のバラつきを整理した。分析種および外部標準には、カフェイン (CAF) およびジメチルスルホン (DMSO₂) を用いた。いずれも、国際単位系 (SI) にトレーサブルな絶対純度が付与された認証標準物質を用い、これらの認証値を参照値として分析結果を考察した。

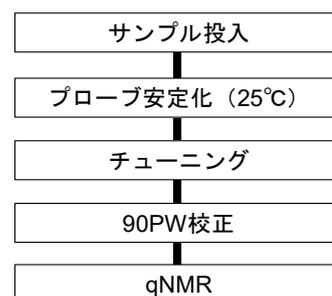


図 3 NMR の相反定理を成立させるための EC-qNMR 測定手順。

【結果と考察】

1. 90PW 校正の精度

NMR では照射中心の信号強度を PW に応じてプロットすると、正弦曲線が描かれる。この特性を利用し、10~450PW の範囲を 10 点アレイ測定し、正弦曲線とのカーブフィッティングから 90PW を校正する方法を採用した。カーブフィッティング法では、*T*₁ の長いシグナルに対して注意する必要があったが、*D*₁ を 60 秒以上に設定すれば、正弦曲線は歪むことなく正確に 90PW を校正できた (図 4)。

2. チューニングの精度

自動チューニングと手動チューニングでの結果を比較した。手動チューニングではウォブル曲線を監視しながら、反射値を 0 に調整した。自動チューニングでは反射値が 20~30 程度であったが、両者の EC-qNMR の結果は 1% 以内の誤差に収まったことから、自動チューニング機能が十分

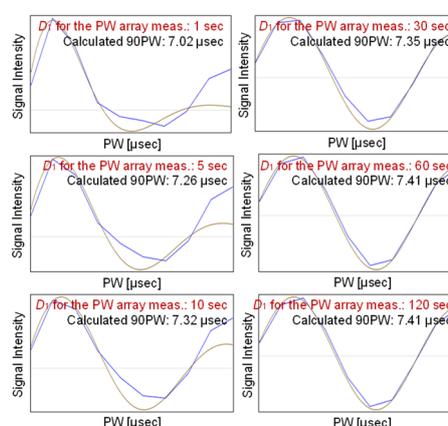


図 4 アレイ測定後に行う正弦曲線とのカーブフィッティング。*D*₁ を 1, 5, 10, 30, 60, 120 秒に設定して比較した。

信頼できることを確認できた(図5)。ただし、チューニングのタイミングには注意が必要である。EC-qNMRでは、通常サンプルの温度を一定にして測定を行う。NMR試料管を投入後すぐにチューニングすると、プローブ内に残存する温度むらにより、3%を超える誤差が生じた。EC-qNMRで正確な測定を行うためには、プローブ内の温度を十分平衡化させた後(経験上、5分以上)、チューニングする必要がある。

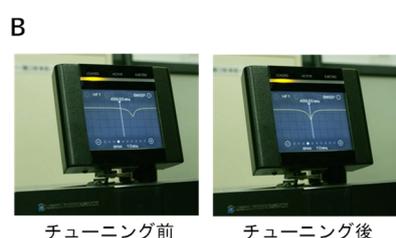


図5 自動チューニングと手動チューニングでの EC-qNMR 測定結果。

A) DMSO₂ を外部標準とした際の、CAF の分析値。CAF の認証値に対する相対値をプロットした。測定は3回×6日間行った。B) ウォブル曲線。

3. EC-qNMR 自動測定スクリプトの作成

EC-qNMRでは、校正した90PWをqNMR測定条件に反映させる必要がある。そのため測定試料数が多い場合は、オペレーターが装置から離れることができない。この問題解決のため、チューニング、90PW校正、qNMR測定の一連の動作を自動化するスクリプトを開発した。このスクリプトのMethodパラメーターには、qNMR測定条件の他に90PW校正のためのアレイ測定条件が設定できるようにデザインした。変化させるパルス幅の初期値、終了値およびステップの項目、さらにT₁の長いシグナルであっても正弦曲線が歪むことがないように、D₁を任意に変更できる(図6)。

start90	2[us]
end90	76[us]
step90	8.2[us]
calc90_relax_delay	60[s]
force_tune	<input checked="" type="checkbox"/>
autogain	<input type="checkbox"/>
receiver_gain	30
scans	32
dummy_scans	4
x_angle	90[deg]
x_offset	5[ppm]
x_sweep	20[ppm]
data_points	65536
relaxation_delay	60[s]
inv_gated_noe	<input type="checkbox"/>
decoupling	<input checked="" type="checkbox"/>
decoupler_offset	70[ppm]
decoupler_modulation	MPPB

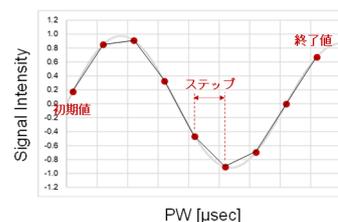


図6 自動測定スクリプトのMethodパラメーター。赤枠は、90PW校正アレイ測定条件の項目。他は、qNMR測定条件の項目となっている。ECAおよびECZ分光計対応。

【結論】

EC-qNMRはIC-qNMRよりも精度が低く、その原因が整理されていなかったため、絶対定量法の第一選択肢はいつもIC-qNMRであった。本研究では、EC-qNMRを適切な測定手順、測定条件に従って実施すれば、誤差1%以内で定量できることを示した。具体的には、温度が安定した状態でのチューニング、高精度な90PW校正が重要である。EC-qNMRでは分析種と外部標準の測定溶媒を統一する必要はなく、分析種の特性に応じて、強酸(TFA-d)や強塩基(NaOD)といった特殊な溶媒を使用した定量も可能である。また、測定毎に基準物質を調製する必要はなく、試料調製が簡便で経済的である。さらに、測定終了後のNMR試料液は、各種機器分析や生物活性試験の安全性や有効性を評価するための、純度既知の標準品として扱える点も魅力的である。国立衛研の研究業務の中で、EC-qNMRは迅速かつ正確な根拠データの取得に貢献できる。

External Calibration in qNMR

Yuzo Nishizaki

Department of Food Additives, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-44-260-6600, Fax: +81-44-270-6562, E-mail: ynishizak@nihs.go.jp

