



医薬品の安全性と 有効性確保のための粒子分析技術

フローイメージング法と光遮蔽法を
組み合わせたバイオ医薬品の特性評価

White paper - November 2024

Copyright © Yokogawa Electric Corporation

医薬品の安全性と有効性確保のための粒子分析技術

フローイメージング法と光遮蔽法を 組み合わせたバイオ医薬品の特性評価

Austin Daniels PhD

Author Information

Yokogawa Fluid Imaging Technologies
200 Enterprise Dr. Scarborough, ME 04074

はじめに

バイオ医薬品の研究、開発、製造における目標の一つに、臨床現場での医薬品の安全性および有効性の確保が挙げられます。これを実現する上で重要な役割を果たすのが、分析技術です。各種の分析技術を使用することで、研究者は原薬（API）、製剤工程の配合物、そして医薬品のさまざまな特性を測定できます。こうした重要品質特性（CQA）の測定により、開発から製造までの全工程を通して製品の品質を評価・管理でき^{1,2}、患者によりよい治療効果をもたらすことができます。

バイオ医薬品の研究課題に取り組むには、正確なCQAデータ（図1）を収集しなければなりません。ある目的に対して効果的なCQAデータを得るには、後述する「補完的な（complementary）分析法」と「直交的な（orthogonal）分析法」の併用が必要となる場合があります。これらの用語は、異なる分析法から得られる情報の関連性や、それらを組み合わせてサンプルへの理解を深める方法を示すものです。これらの用語を理解することで、十分に信頼できるCQAデータを得るための適切な分析法やその組み合わせを決定できるようになります。このホワイトペーパーでは、2022年にSimon氏ら³が提唱したこれらの用語の定義を取り上げます（古い文献ではこれらの用語に対してSimon氏らとは異なる定義が使用されている場合がありますが、重要な点はおおむね一致しています）。

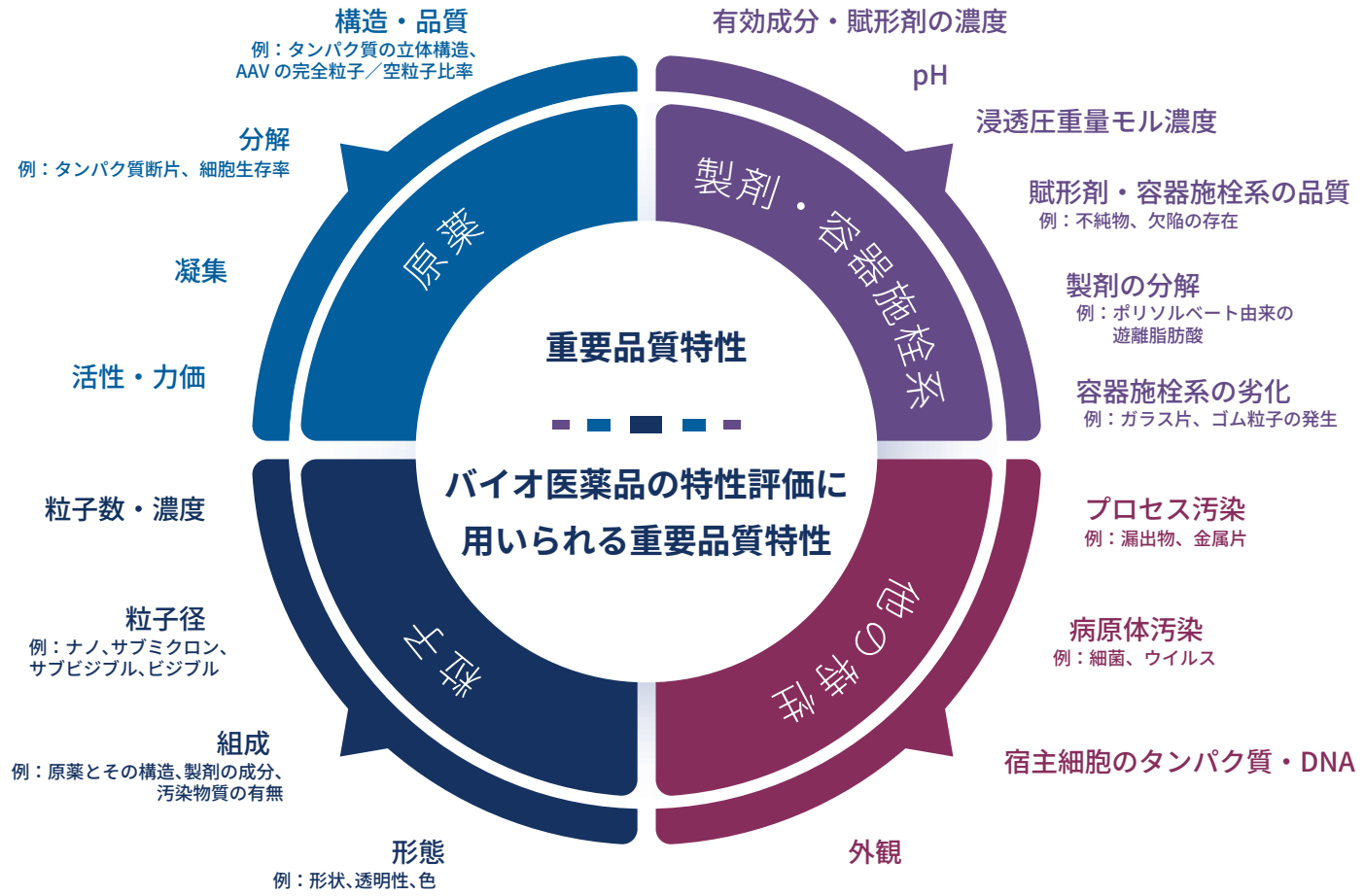


図 1. バイオ医薬品に関する重要品質特性（CQA）

本ホワイトペーパー内で使用される用語の定義

重要品質特性（CQA）

バイオ医薬品サンプルの安定性と品質を総合的に示す特性で、製品の有効性に関係すると考えられるさまざまな項目から構成されます。例えば、原薬（API）の物理的および化学的特性、APIの分解生成物（凝集体を含む）、粒子の含有量などが挙げられます。

直交的な分析法

バイオ医薬品製剤に関する同一のCQAを、異なる測定原理で分析する技術です。例えば、フローイメージング法と光遮蔽法はいずれもサブビジブル粒子の数とサイズを評価しますが、それぞれ「デジタルイメージング」と「光の遮断」という異なる原理を用います。そのため、これらは互いに直交的な分析法です。

分析技術

医薬品のCQAデータを収集する手段です。測定するCQA、必要なダイナミックレンジ、サンプル中の測定対象（粒子測定の場合は粒子径範囲など）、測定原理、データの収集方法、測定バイアスや誤差などに応じて、適切な分析技術を選択します。

補完的な分析法

特定の研究課題における、バイオ医薬品製剤の新たな情報を得るための分析技術です。一般的には、異なるCQAを測定する分析法を指します。例えば、タンパク質の凝集解析においては、円偏光二色性法と動的光散乱法がともにフローイメージング法（FI法）の補完的な技術にあたります。円偏光二色法はFI法とは異なる特性（前者はタンパク質の立体構造、後者はサブビジブル粒子の含有量）を測定します。一方で動的光散乱法は、FI法と類似の特性を異なるダイナミックレンジで（前者はナノ粒子、後者はサブビジブル粒子）測定します。

直交的な分析法

ある分析法に対する「直交的な分析法」は、その分析法と同じCQAを異なる測定原理で評価する別の分析法を指します。

互いに直交的な分析法は、同じCQAをほぼ同じダイナミックレンジで評価する必要があります（例えば粒子径測定の場合、測定可能なサイズ範囲はほぼ同じであるべきです）。各分析法は独自の測定原理に基づくため、同一のCQAに関する独立した評価結果が得られ、それらを比較することが可能です。ただし、そのCQAは同じアプリケーション（研究課題やその他の目的など）に関連するものである必要があります。この点は、複数のCQAデータを収集できる分析法を採用する際に重要です。つまり、複数のCQAを評価できる二つの分析法がある場合、それらがある特定のアプリケーションに関連する共通のCQAを一つ以上評価できる場合にのみ、それらの分析法は「直交的」とみなされます。

直交的な複数の分析法を併用することで、特定の特性に関する評価結果の信頼性や正確性を高めることができます⁴。どの分析法で得られたデータにも、測定原理に伴う制約が原因のバイアスや系統誤差が生じます。このバイアスが原因で、同じ特性を評価するために用いられた直交的な分析法でも、異なる値が得られる場合があります⁵。一つの分析法だけでCQAを評価する場合、バイアスやその他のデータ収集に関わる問題を把握するのは困難です。しかし、直交

的な分析法で得られた測定値は独立しているため、これらのデータを使用して結果をクロスチェック・検証することで、こうした誤差を制御できます。

例えば、二つの直交的な分析法を使用して粒子濃度を測定した結果、一つの手法で想定より低い数値が得られた場合について考えてみます。もう一方の分析法でより高い粒子濃度が得られた場合、最初の分析法では正しく測定されていない可能性があります。これはデータ収集に関する問題が原因かもしれませんが、サンプルに何らかの変化（粒子の透過性の変化など）が生じ、そのバイアスによって一方の分析法のみが影響を受けた可能性も考えられます。一方、もう一方の分析法でも低い濃度が得られた場合は、サンプル内の粒子濃度が実際に低下していると考えられ、バイアスの影響は少ないことが示唆されます。

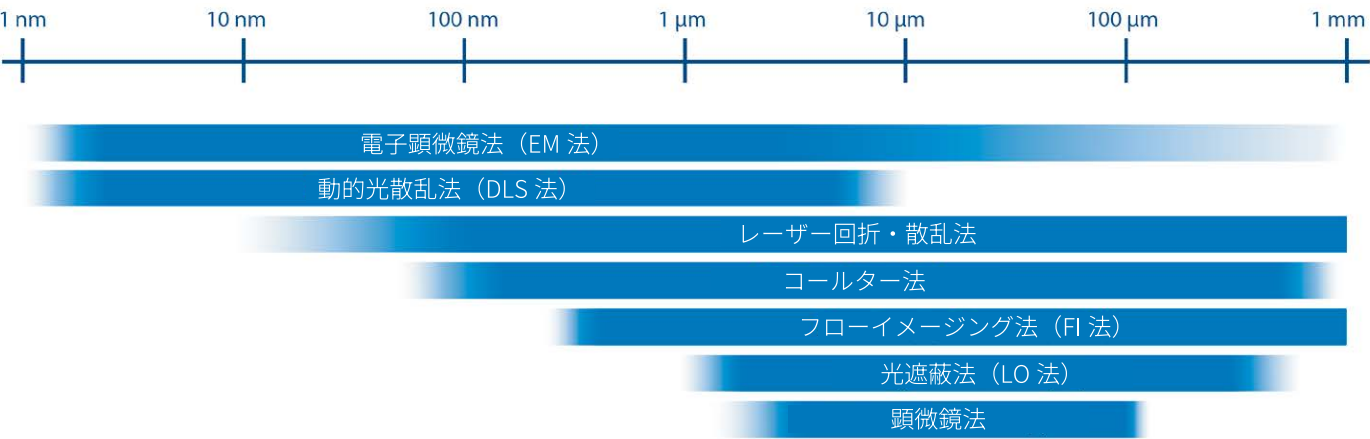


図 2. 代表的な分析技術で測定可能な粒子径範囲

補完的な分析法

ある分析法に対する「補完的な分析法」とは、特定のアプリケーションに関連するCQAについて追加の情報を提供する分析法です。先ほど説明した「直交的な分析法」もこの中に含まれますが、一般的には異なるCQAを測定する技術を指します。補完的であるが直交的ではない分析法を使えば、他の分析法では測定できない全く新しい特性の情報が得られます。そこで、関連する全ての特性を測定するためにも、ほとんどのアプリケーションでこのような分析法が必要とされます。直交的な分析法の場合と同様に、二つの分析法が補完的であるには、各手法がともに、ある特定のアプリケーションに関連する特性を評価していなければなりません。

各分析法が異なるCQAを測定する場合、これらの技術は補完的です。例えば、サンプル中のタンパク質凝集を調べる場合、タンパク質の立体構造を測定する技術と粒子径を測定する技術を補完的な分析法として利用できます。また、同一の特性を異なるダイナミックレンジで測定する場合も、各分析法は補完的だとみなされます。前述の例において、ナノ粒子の粒子径分布を解析する方法とサブビジブル粒子の粒子径分布を解析する方法は、いずれも同じ特性（粒子径分布）を評価していますが、補完的な分析法として用いることが可能です。

フローイメージング法とその直交的な分析法

フローイメージング法 (FI 法)：
主にサブビジブル粒子の数、サイズ、形状の分析に用いられます。液体サンプルをマイクロ流路に流し、サンプル中に存在する全ての粒子をデジタル光学顕微鏡で撮影してその情報を取得します。FI法はサブビジブル粒子の効率的な測定方法ですが、他の分析法でもサブビジブル粒子の情報を得ることができます。FI法を直交的な分析法として他の方法と組み合わせることで、より多くの利点を享受できる場合も多くあります。以下に、FI法と併用可能なサブビジブル粒子の測定法をいくつか紹介します。

光遮蔽法 (LO 法)：
サブビジブル粒子の分析において最も広く用いられている分析法の一つです。光源を通過するようにサンプルを流し、粒子が検出器に投影する影を利用して、粒子数と粒子径分布を記録します。LO法は、サブビジブル粒子を測定するための主な公定法です。USP<787>や<788>などの規格に準拠するため、企業はLO法を使用して、ロットリリース時に非経口医薬品中の10μm以上および25μm以上の粒子数を測定します^{6,7}。LO法は普及している方法ではありますが、バイオ医薬品製剤中に多く見られる半透明粒子の検出⁸や、粒子濃度が20,000個/mLを超えるサンプルの解析には課題があります。

方法	フローイメージング法 (FI 法)	光遮蔽法 (LO 法)
測定原理	フローセルを通過するサンプルの光学顕微鏡画像をカメラで撮影します。その画像を解析して各粒子の画像を分離することで、粒子数を決定します。また、粒子画像の解析により、粒子径や他の形態的特性（アスペクト比や円形度など）も特定できます。	レーザーとフォトダイオードの間にあるマイクロ流路をサンプルが通過します。この際にサンプル中の粒子がダイオードに届く光の一部を遮断することで、粒子径に比例する電気信号が生成されます。この信号を使用して、粒子の数とサイズを測定します。
粒子数の測定	可能	可能
粒子径の測定	可能	可能
粒子形態の測定	可能	不可
粒子径範囲	2～100 μm	2～100 μm
処理能力	0.2 mL/分	10 mL/分
最小サンプル量	100 μL	100 μL
最大粒子濃度	約1,000,000個/mL	約30,000個/mL
半透明粒子の検出感度	高	標準
粒子種の識別	可能（気泡、シリコーン油など）	不可
サンプル導入方法	ピペットによるサンプル供給	サンプル中に吸入用のラインを入れる
自動化対応	可能（自動での液体ハンドリング）	不可
公定法で定められた粒子径測定技術か	はい	はい（USP <787>およびUSP <788>）
USP推奨のサブビジブル粒子分析法か	はい（USP <1788>）	はい（USP <787>およびUSP <788>）

表 1. フローイメージング法と光遮蔽法の比較

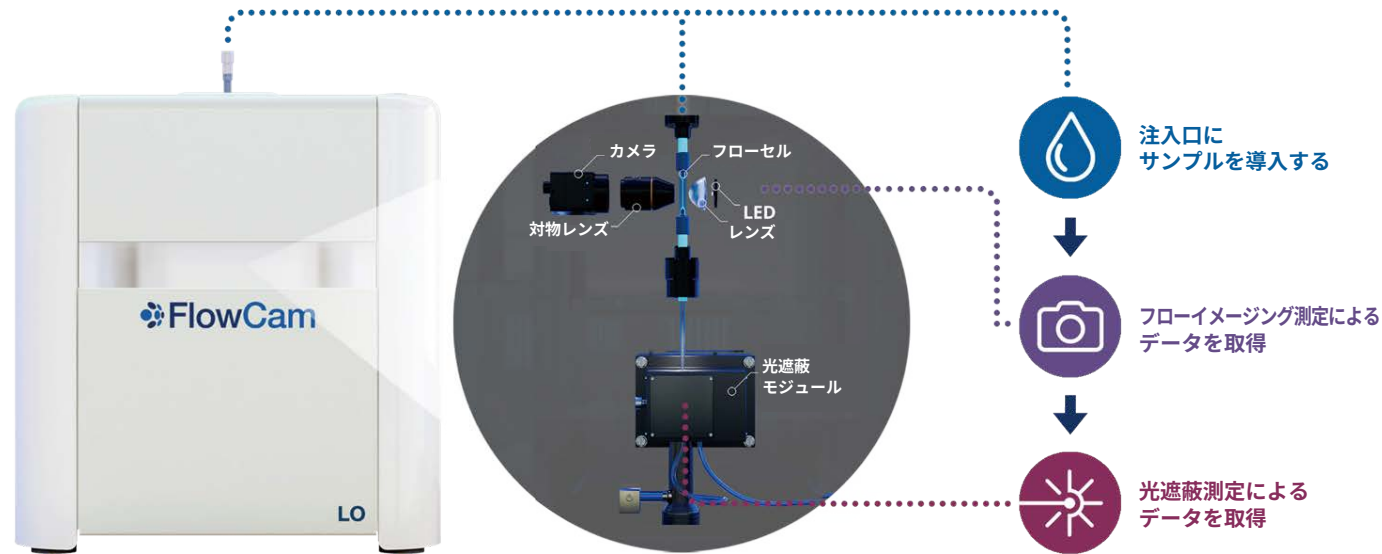


図 3. FlowCam LO の測定概要。最初にフローイメージング測定を実施し、その後に光遮蔽モジュールで光遮蔽測定を実施

LO法の測定原理はFI法に似ています。しかし、LO法は光学顕微鏡のようなデジタル画像ではなく、光遮蔽によって粒子を検出するため、FI法に対する直交的な分析法として使用できます。表1に、FI法とLO法の設計および性能面での比較を示します。

FI法は、半透明粒子の数とサイズをLO法よりも正確に取得でき^{5,9}、測定可能な粒子濃度の上限も高い点が特徴です（約1,000,000粒子/mL）。さらに、FI法ではサンプル中の粒子の形状や形態に関する情報を取得できるため、気泡を含むさまざまな粒子の種類や発生源を特定することが可能です¹⁰⁻¹²。一方、LO法ではこれらの情報を得ることはできません。しかし、LO法は粒子数および粒子径測定における確立された手法として価値があり、そのデータは公定基準値（compendial limits）だけでなく、LO法で過去に測定された大量のデータとも比較できます。FI法とLO法を併用することで、ロットリリース時に、サンプル中のサブミクロン粒子含有量に関する非常に有益な情報が得られます。両分析法の併用は、USP<1788>¹³でも推奨されています。

FlowCam LOは、サンプルにおけるFIデータとLOデータの収集プロセスを大幅に簡略化します¹⁴。FlowCam LOは、サブミクロン粒子の分析に対応したFIモジュールと光遮蔽モジュールを組み合わせており、少量のサンプルで両分析法による測定結果を収集できます。図3はFlowCam LO内のシステムの概略図です。両分析法の組み合わせにより、サンプル量と時間を節約できるだけでなく、各分析法から得られた測定結果をより直接的に比較し、結果の妥当性を検証することが可能となります。

FI法とLO法を併用する利点を説明するため、ウシ血清アルブミン（BSA）、ポリソルベート80（PS80）、およびそれらの混合物（BSA + PS80）を振動ストレスまたは加熱ストレスにさらし、FlowCam LOで測定しました。図4には各サンプルの粒子径分布およびFI顕微鏡画像¹⁵を、表2には各サンプル中の粒子濃度を示しています。FI法の結果から、タンパク質のみを含むサンプル（BSA）に振動ストレスを与えた場

合、加熱ストレスを与えた場合よりも多くのタンパク質凝集体が生じることが示されました。また、BSAとPS80の混合サンプルにおける結果から、ポリソルベートが加熱ストレス下よりも振動ストレス下において、タンパク質の凝集を有意に防ぐことも判明しました。

今回の実験では、全てのサンプルにおいて、LO法の方がFI法よりも低い粒子濃度が得られました。両方の測定値は同一のサンプルから得られたものであるため、これらの差異は主に、粒子の透明性によるバイアスに起因すると考えられます（図4からも透明粒子の存在が確認できます）。このような差異はありますが、LO法の結果はFI法の結果と同じ傾向を示しており、FI法による結論を裏付けるものとなっています。これらの測定はともにFlowCam LOで実施されたため、この直交的な分析法による検証は、サンプルや装置を追加で用意せずに実施できました。

顕微鏡法：サブミクロン粒子の測定におけるもう一つの公定法^{6,7}で、濾過によりサンプルから製剤緩衝液を取り除き、乾燥させた粒子を顕微鏡で観察します。この分析法の長所は、緩衝液を除去することで、緩衝液と屈折率が類似した粒子を検出しやすくなる点です。しかし同時に、濾過によってシリコンオイルなどの重要な粒子が除去されたり、粒子の凝集や形状変化が起こったりする可能性もあります。顕微鏡法では、粒子数や粒子径の測定を手作業で行う必要があるため、分析効率の低下に加えて、人的なバイアスや作業員間での結果のばらつきが生じます。さらに、顕微鏡法は密閉されていない環境で実施されるため、FI法やLO法以上に汚染リスクが高く、その対策として多くの場合は層流下での作業が推奨されます。

サンプルを液体状態のまま自動で測定できるFI法と比較すると、顕微鏡法には、濾過による粒子の変化などのデメリットがいくつか存在します。しかし、顕微鏡法をFI法の直交的な分析法として粒子の数やサイズ、形態の測定に使用することで、透明粒子に関するより多くの情報が得られます。

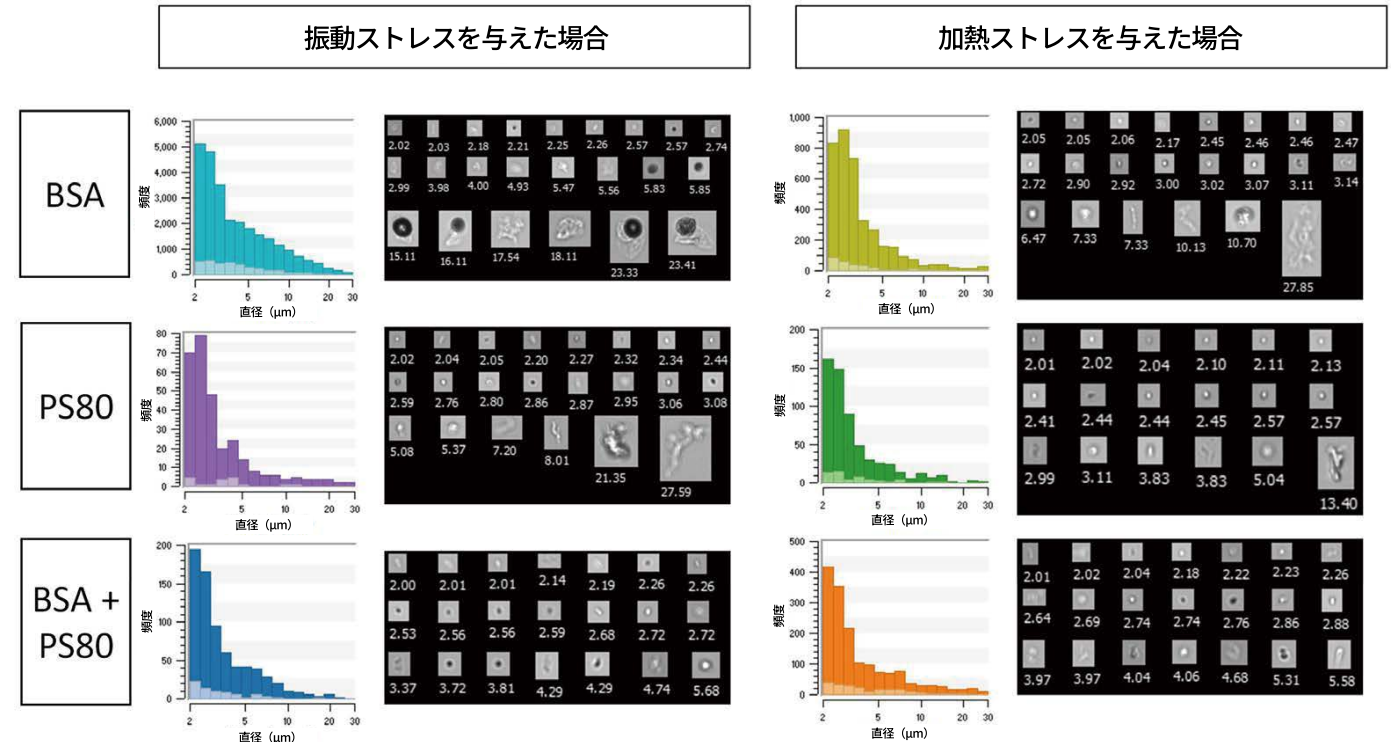


図 4. タンパク質(BSA)、界面活性剤(PS80)、またはその両方(BSA+PS80)を含むサンプルを振動または加熱ストレスにさらし、FlowCam LOで粒子径分布(ヒストグラム)とFI画像(コラージュ)を取得。暗色のヒストグラムバーはFIデータ、淡色のヒストグラムバーはLOデータを示す。

	振動ストレスを与えた場合（粒子数/mL）						加熱ストレスを与えた場合（粒子数/mL）					
	>2 μm		>10 μm		>25 μm		>2 μm		>10 μm		>25 μm	
	FIM	LO	FIM	LO	FIM	LO	FIM	LO	FIM	LO	FIM	LO
BSA	69000	6300	7000	490	280	13.88	9700	520	420	22	65	0
PS80	780	33	62	4	5	0	1500	95	70	3	5	0
BSA + PS80	1900	130	77	3	0	0	4100	380	340	28	31	2

表 2. 図 4 に示す各サンプルの粒子濃度を FIM 法および LO 法で測定した結果

レーザー回折・散乱法：粒子にレーザー光線を照射した際の光散乱を利用して、散乱モデルに基づき粒子径を計算する方法です。粒子径の測定範囲が広く、測定スループットがきわめて高いメリットがあります。しかし、測定時には大量のサンプルを用意し、それらを再循環させる必要があるため、粒子濃度が低いサンプルの測定は困難な場合があります。また、サンプルの屈折率に関する情報が必要な点や、粒子を一律に球状だと仮定する点もデメリットです。十分なサンプル量さえ確保できれば、レーザー回折・散乱法は、FI法に対する直交的な分析法としてサブビジブル粒子を高速に測定できるほか、サブミクロンサイズの粒子やビジブル粒子も測定できます。一方、FI法はサンプルの量と濃度に対する要件が緩く再循環も不要で、撮影した粒子画像の解析によって粒子の形状も取得できます。

コールター法：二つの電極間にサンプルを流すことで生じる電界の乱れを記録して、サンプル中の粒子の数とサイズを測定します。コールター法は、本ホワイトペーパーに示す多くの分析法とは異なり光学的な分析法ではないため、測定結果は粒子の透明度に影響されません。しかし、製剤緩衝液の導電率をある一定値以上にする必要があるため、測定前に希釈や緩衝液の交換が必要な場合があります、これによってサンプル中の粒子の数やサイズ、種類が変化する可能性があります。一方のFI法は、緩衝液の導電率に関する制限がなく、多くの場合は希釈も不要です。コールター法とFI法を併用することで、FI法で見逃す可能性がある半透明粒子をコールター法で分析したり、コールター法では得られない希釈・交換前の溶媒（native solvent）中での粒子情報をFI法で取得したりできます。

電子顕微鏡法（EM法）：光源ではなく電子を使用する分析法で、ナノサイズからサブミクロンサイズの粒子の高解像度画像が得られます。一方、サンプルの前処理が複雑で分析時間も長くなるため、分析スループットが低下し、場合によっては粒子形態が変化する可能性もあります。また、操作には高度な訓練が必要で、経験豊富な技術者が必要となる場合もあり、日常的な使用は難しい面があります。EM法は、サブビジブル粒子のサイズおよび形態評価における直交的な分析法として使用でき、光学顕微鏡では観察が難しい粒子の微細な構造を捉えることができます。しかし、一度に観察できるサンプル量は非常に少なく、分析サンプル数も限られます。一方、FI法はサンプルの前処理が不要で、分析のスループットが高く使いやすいため、分析するサンプル数や一分析あたりのサンプル量を柔軟に設定できます。

フローイメージング法とその補完的な分析法

FI法と併用すべき補完的な分析法は、対象とする薬剤や研究課題に応じて異なります。例えば、薬剤中のタンパク質とその凝集体を評価する場合、FI法に加えて、他のサイズ範囲の粒子を測定する技術を併用すること（ビジブル粒子の測定には目視検査、サブミクロン粒子とナノ粒子の測定には動的光散乱法、タンパク質オリゴマーの測定にはサイズ排除クロマトグラフィーなど）が有効です^{2,16}。また、円偏光二色性法やフーリエ変換赤外分光法、蛍光分光法などを使

用してタンパク質の物理的・化学的構造を解析することも、タンパク質の構造解析に有用です。タンパク質以外を含むバイオ医薬品では、CQAの測定に別の分析法が必要となる場合があります（超遠心分析法を用いた、アデノ随伴ウイルスベクターの完全粒子／空粒子比率の測定など）²。以下に、FI法と同じく粒子の解析に有用な補完的な分析法を紹介します。

動的光散乱法（DLS法）：きわめて一般的な分析法の一つで、FI法のような光学技術で測定できる粒子径範囲の下限に近い、またはそれ以下のサイズの粒子（ナノ粒子、サブミクロン粒子、小さなサブビジブル粒子）を測定する効果的な方法です。バイオ医薬品に含まれるAPIモノマーはDLS法の測定範囲にあるため、FI法が対応するバイオ医薬品の安定性試験や製剤研究においても、DLS法による測定は重要です。

一方のFI法では、DLS法の結果に影響を及ぼす可能性があるより大きなサブビジブル粒子を測定できます。そのため、これらの測定結果を合わせることで、ナノメートルから数百マイクロメートルまでのきわめて広い範囲にわたり、タンパク質やウイルスベクター、ウイルス様粒子、固体脂質ナノ粒子、その他のナノ医薬品APIの凝集を観測できます。

FI法の測定サイズ範囲を拡張する技術（FlowCam）：FlowCamは、対物レンズを変更して測定可能な粒子径範囲を変えることで、FI法に対する補完的なデータを収集できます。標準構成のFlowCamでは、10倍および20倍の対物レンズを使用して、直径2～100μmのサブビジブル粒子を効果的に測定します。FlowCam 8000シリーズでは、対物レンズをより低倍率の4倍レンズに交換することで、測定可能な粒子径範囲を15～600μmに変更できます。これにより、サブビジブル粒子を主なターゲットとしていたFI法が、ビジブル粒子やビジブル粒子とサブビジブル粒子の間のサイズである「グレーゾーン」粒子を測定するツールに変わります。このグレーゾーン粒子は、研究がはじまったばかりの領域です¹⁷。一方、FlowCam Nanoは高倍率の40倍レンズを使用し、他の方法では検出が難しい300nm～2μmのサブミクロン粒子を画像化・評価できます。各FlowCam装置の測定原理は全て同じですが、対物レンズの違いにより分析できる粒子径範囲が変わるため、これらは従来のFI測定に対する補完的な分析法として使用できます。

まとめ

「直交的な分析法」と「補完的な分析法」は、バイオ医薬品サンプルの特性を完全かつ正確に把握し、バイオ医薬品の設計・製造上の研究課題に対応するために非常に重要です。FlowCamを使用することで、サブビジブル粒子の数やサイズ、形態情報が得られます。これらの情報は、他のサブビジブル粒子分析法に対する直交的な分析法として、または他の生物物理的な分析法に対する補完的な分析法として有用です。

参考文献

1. Corvari V, Narhi LO, Spitznagel TM, et al. Subvisible (2-100 μm) particle analysis during biotherapeutic drug product development: Part 2, experience with the application of subvisible particle analysis. *Biologicals*. 2015; 43(6): 457-473. doi:10.1016/j.biologicals.2015.07.011
2. Roesch A, Zölls S, Stadler D, 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*. 2021;000. doi:10.1016/j.xphs.2021.12.011
3. Simon CG, Borgos SE, Calzolari L, et al. Orthogonal and complementary measurements of properties of drug products containing nanomaterials. *Journal of Controlled Release*. 2023;354:120-127. doi:10.1016/j.jconrel.2022.12.049
4. Carpenter JF, Randolph TW, Jiskoot W, et al. Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *J Pharm Sci*. 2009;98:1201-1205. doi:10.1002/jps
5. Ripple DC, Hu Z. Correcting the Relative Bias of Light Obscuration and Flow Imaging Particle Counters. *Pharm Res*. 2016; 33(3): 653-672. doi:10.1007/s11095-015-1817-9
6. United States Pharmacopeia. USP <787> Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections.
7. United States Pharmacopeia. USP<788> Particulate Matter in injections.
8. Zölls S, Gregoritz M, Tantipolphan R, et al. How Subvisible Particles Become Invisible — Relevance of the Refractive Index for Protein Particle Analysis. *Pharm Biotechnol*. 2013;102(5):1434-1446. doi:10.1002/jps
9. 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*. 2021;000. doi:10.1016/j.xphs.2021.09.047
10. Strehl R, Rombach-Riegraf V, Diez M, 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*. 2012;29(2):594-602. doi:10.1007/s11095-011-0590-7

11. Calderon CP, Daniels AL, Randolph TW. Deep Convolutional Neural Network Analysis of Flow Imaging Microscopy Data to Classify Subvisible Particles in Protein Formulations. *J Pharm Sci*. 2018;107(4):999-1008. doi:10.1016/j.xphs.2017.12.008
12. Shibata H, Terabe M, Shibano Y, et al. A Collaborative Study on the Classification of Silicone Oil Droplets and Protein Particles Using Flow Imaging Method. *J Pharm Sci*. 2022;111(10):2745-2757. doi:10.1016/j.xphs.2022.07.006
13. United States Pharmacopeia. USP <1788> Methods for the Determination of Subvisible Particulate Matter.
14. Yokogawa Fluid Imaging Technologies. Measuring Subvisible Particles and Aggregates using FlowCam LO [White Paper]. Published online 2021. <https://info.fluidimaging.com/flowcam-lo-white-paper-download>
15. Yokogawa Fluid Imaging Technologies. Characterizing Protein Aggregates with Orthogonal and Complementary Analytical Techniques [White Paper]. Published online 2022. <https://info.fluidimaging.com/protein-aggregate-orthogonal-methods-white-paper>
16. Narhi LO, Corvari V, Ripple DC, et al. Subvisible (2-100 μm) particle analysis during biotherapeutic drug product development: Part 1, considerations and strategy. *J Pharm Sci*. 2015;104(6):1899-1908. doi:10.1002/jps.24437
17. Telikepalli SN, Carrier MJ, Ripple DC, et al. An Interlaboratory Study to Identify Potential Visible Protein-Like Particle Standards. *AAPS PharmSciTech*. 2023;24(1). doi:10.1208/s12249-022-02457-9

