

1 フローイメージング法によるバイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)原薬／製剤中の不溶性微粒子の評価法〈G3-17-182〉

バイオテクノロジー応用医薬品(以下「バイオ医薬品」という。)には、外来性の物質、製造工程に由来する物質及び処方成分や一次容器からの溶出物に加えて、タンパク質それ自身が凝集してできたタンパク質凝集体などの不溶性微粒子が含まれる可能性がある。注射剤に含まれる微粒子を評価・管理することは、最終製品の品質を確保する上で重要であるが、タンパク質凝集体については、タンパク質製剤の免疫原性に影響する可能性が懸念されており、より厳密な評価・管理が求められる。フローイメージング法は、試料溶液をフローセルに導入し、連続的に画像を撮影し、得られたデジタル画像を数値情報に変換して解析することにより、溶液に含まれる微粒子の計数、粒子径分布の測定、形状及び光学的特性の評価を行う手法である。光遮蔽粒子計数法では屈折率の高いポリスチレン標準粒子を用いて得られた粒径応答曲線により粒子径が算出されるため、水との屈折率の差が小さいタンパク質凝集体は検出されないか小さく検出される恐れがある。一方でフローイメージング法は光遮蔽粒子計数法と比較して、溶媒と粒子との屈折率差の影響を受けづらいことが示されている。また、形状及び光学的特性を評価することにより、タンパク質凝集体、シリコーン油、気泡及びその他の不溶性微粒子を区別できる場合もある。フローイメージング法による粒子数の定量的評価や含まれる粒子の特性解析は、タンパク質医薬品の不溶性微粒子の評価方法として有用と考えられる。本参考情報では主に、タンパク質医薬品注射剤などバイオ医薬品に含まれる不溶性微粒子の評価法について記載する。

1. 測定の原理

装置は、一般に、試料導入部、画像を取得する領域であるフローセル、各部位をつなぐ流路、ポンプ(チューブポンプやシリンジポンプ)、光源を含む光学系、撮像装置であるカメラ及び取得した画像を解析する画像解析装置などからなる。フローセルに流れてきた試料溶液に光源より光が照射され、撮像装置により画像が取得される。測定可能な粒子径はフローセルの厚さと対物レンズの倍率、カメラの性能などにより規定され、多くの場合、測定範囲は約2 ～ 100 μm 程度である。粒子画像データは画像解析装置によって処理され、例えば画像の背景部分と粒子部分の濃淡に基づいて画像中の粒子の境界が認識され、粒子個々の形状及び光学的特性の評価が行われる。微粒子の計数値を測定体積で除することで粒子濃度が求められる。

2. 測定

2.1. 装置

測定は、一般に次の手順で行われる。対物レンズの倍率は測定する粒子の大きさに応じたものを使用し、通常、4 ～ 20倍の対物レンズが使用される。測定前に、フローセルを洗浄し、フローセル内にとどまっている粒子がないことを確認する。なお、セルの洗浄には微粒子を含まない水の他、必要に応じて洗剤や薄めた水酸化ナトリウム溶液、エタノールなどを使用できる。その後、装置の使用手順に定められた方法にて焦点を適切に合わせる。装置ごとに必要な測定条件(流量、測定容量、画像取得頻度、背景から粒子を区別するための閾値など)を設定

する。フローセルに導入された溶液のうち実際に画像解析された割合を画像取得効率という。画像取得効率を設定できる装置の場合、画像取得効率は、測定容量、流量、画像取得頻度から算出され[画像取得効率=画像取得頻度(frames/s)×画像一枚当たりの測定容量(mL/frame)／流量(mL/s)×100 (%)]、同じ粒子が複数回計数されないように、また、実際に測定される容量が十分となるよう、適切に設定する。測定領域を設定できる場合、計数の正確性は、計数標準粒子を測定することにより確認できる。さらに、機器の性質上、粒子の一部が測定領域に収まらず、一部が欠けた粒子画像が得られることが想定される。部分的に撮像された粒子の取扱いについては事前に設定しておく。

2.2. 操作法

試験は外部から微粒子が混入しない条件下、できれば層流等により清浄度の保たれたキャビネット中で行う。試料は、含まれる粒子が均一になるように、例えば容器をゆっくりと旋回させるなど、穏やかに十分に振り混ぜる。容器を開封する際には、容器開口部の外表面を微粒子試験用水で洗浄し、内部が汚染されないよう注意して栓を開ける。溶液中に存在する微粒子を測定するにあたり、操作中に気泡や新たな凝集を引き起こさないように注意が必要である。必要に応じて、気泡を除くために、容器を大気圧下にしばらく放置する、又は減圧して放置する。超音波処理はタンパク質を凝集、変性させるおそれがあることから、適切ではない。装置に導入する試料の液量は、測定容量と風袋容量を考慮して決定する。測定容量は、試料の特性、画像取得効率及び求める分析法の精度等を考慮して十分な容量とする。試料の粘度が高い、粒子数が多いなど、必要な場合は、希釈直線性を確認し、試料を希釈することも可能である。測定回数は機器の性能及び試料の特性を考慮し適切に設定する。

閾値は、分析結果に大きな影響を及ぼすので、閾値を個別に設定できる装置を使用する場合は、事前に粒子境界が適切に認識されていることを確認する。その際、実試料や実試料を劣化させた試料、若しくはタンパク質凝集体を模して作製された標準粒子などを使って、粒子の形状が正しく評価されていること、ノイズを粒子として認識していないことも確認することが望ましい。なお、異なる閾値で取得したデータを比較する際は、閾値の差が測定結果に与える影響を十分に考慮する必要がある。

3. 画像解析

検出した粒子の粒子径は、円相当径(粒子の投影面積と等しい面積をもつ円の直径)にて示されることが多い。円相当径のほかに、球相当径やフェレー径などが使用できるため、粒子径の比較には注意する必要がある。

本参考情報はフローイメージング法による微粒子の計数を主な対象としているが、粒子の画像から由来を推定することや、画像の特徴に応じて粒子を分類できる場合もある。画像解析の結果得られる、粒子の特性を表すパラメーターの主なものには、粒子径の他、面積、粒子周囲長、アスペクト比、円形度などの形状に関するパラメーターの他、明暗度や粒子内での明暗度の標準偏差といった光学的なパラメーターがある。これらのパラメーターを使って、例えば、試料に含まれる粒子を、容器に由来するシリコーン油滴など由来ごとに分類することも可能である。シリコーン油滴との区別には、アスペクト比、真円度、周囲長、長さ、明暗度の平均値や標準偏差などが用いられる。各パラメーターを組み合わせ、最適な閾値を設定し、段階的にふるい分ける。蓄積した十分な画像データを使って分類モデルを

構築し、同じ装置で取得した画像データに適用することで、検出された粒子を由来ごとに分類することも可能と考えられる。ただし、これらのパラメーターは撮像装置や解析ソフトに組み込まれた定義式、画像解析装置のシステム及び測定条件に依存し、解像度や画素数、焦点の合わせ方によって測定値が異なる可能性のあること、由来の特定には顕微ラマン分光法など分子構造や組成情報の得られる適切な他の技術による分析が必要なることに留意する。

4. 分析法バリデーション

分析法バリデーションでは一般に、真度、精度、特異性(選択性)などで表現される分析能パラメーターが、事前に定めた基準を満たしていることを実証することにより、分析法の妥当性が示される。評価すべき分析能パラメーターは、分析法が用いられる試験法の目的によって異なる。医薬品中の不溶性微粒子を計数する試験法の場合は、実試料を反映した真度既知の分析対象がなく、真度既知の分析法を使った評価が難しいこと、また製剤や原薬など実試料に含まれ得る微粒子は粒子径分布が広く均質ではないため、通常の定量試験と同様に分析法バリデーションを行うことは難しい。したがって、例えば、平均粒子径が値付けされたポリスチレン標準粒子や、粒子径と粒子濃度が値付けされたポリスチレン計数標準粒子を使って以下の分析能パラメーターを評価することで妥当性が示される。用いる標準粒子及び計数標準粒子の粒子濃度や粒子径は、実試料に含まれる粒子濃度や粒子径分布、規格値などを考慮して適切に設定する。粒子径の異なる複数の標準粒子を使うことも、分析法の性能を評価するのに有効である。なお、適切な機関により認証され、粒子径分布若しくは粒子数が保証されている標準粒子を用いる。この他、屈折率が低いシリカ粒子やポリメチルメタクリレート粒子は、タンパク質凝集体のモデル粒子として適切な場合もあると考えられ、処方成分が試験対象試料と同様の溶液に添加した試料は、粒子と溶液の屈折率の差が小さいことで計測される粒子径が変動するか確認するのに有用と考えられる。

フローイメージング法により微粒子数を計数する場合のバリデーション手順例

真度：5、10及び25 μm ポリスチレン計数標準粒子を測定し、認証された粒子径及び粒子濃度の範囲内であることを確認する。

精度：併行精度及び室内再現精度を評価する。併行精度は、微粒子を含まない水又は処方成分が試験対象試料と同様の溶液に、3水準の粒子濃度となるよう5、10及び25 μm の標準粒子を添加した試料について各々3回測定を繰り返すことにより求める。室内再現精度については、同様に調製した試料について、少なくとも試験日と試験者を変更した条件で測定を行って算出する。

直線性：微粒子を含まない水又は処方成分が試験対象試料と同様の溶液に5、10及び25 μm の標準粒子を添加し、例えば5水準の粒子濃度について直線性を評価する。

特異性：モデルを使って粒子を分類するなどが必要な場合、実試料を劣化させた試料及び目的とする分析対象物を実試料に添加し、適切に分類できていることを確認する。

5. 装置性能の管理

5.1. 校正

フローイメージング法で算出される粒子径や粒子数は、標準粒子の測定値から算出される相対的な値ではなく、測定の原理

に基づいた絶対的な値であるが、計数標準粒子を使って装置が正しく稼働していることを確認し、必要に応じて装置側の設定を調節する必要がある。光学系の確認は必須であり、焦点が正しく合っていること、光源の明るさが適切であることなどを確認する。また、ポンプの性能も測定結果に影響し得るため、流量の調節と流量確認を実施する。なお、装置校正には、適切な機関により認証され、絶対的な方法により粒子径分布及び粒子数が保証されているポリスチレン計数標準粒子及びポリスチレン標準粒子を用いる。

5.2. システム適合性

測定実施前に装置の稼働状態が適切であること、適切に洗浄されていることを確認するため、以下のようなシステム適合性を設定することが推奨される。

適切な標準粒子の測定値(粒子径及び粒子数)があらかじめ定めた範囲内にあることを確認する。フィルターを通した水(用時調製)で、粒子数が規定した値以下であることを確認する。粒子径の範囲は、目的に応じて適切な範囲とする。粒子数が適切な範囲内でなかった場合は、使用する水の調製及び装置の洗浄を繰り返し、再測定する。

179