

空間オフセット型ラマン分光法による バイオ医薬品原材料の識別

サンプリングすることなく原材料を容器越しに直接測定



著者

Frédéric Prullière
Christopher Welsby
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

基準に適合したバイオ医薬品原材料の継続的な供給を確保することが、業界全体の課題となっています。世界需要の増大によって、医薬品/バイオ医薬品業界は深刻な状況に陥りました。2008年には、ブタインフルエンザの世界的流行による適格なブタの供給不足に加え、天然ヘパリンの価格が2倍に高騰するという悪条件が重なり、過硫酸コンドロイチン硫酸に汚染されたヘパリンの流通を招きました(1)。この事件を受け、世界中の規制当局が、バイオ医薬品メーカーに対し、既存のコントロール体制を強化すること、またPAT (Process Analytical Technology) にもとづくソリューションを実装し、バイオプロセスをより厳格にコントロールすることを強く勧告しました。これらのコントロールのうち、基準を満たしていない原材料の流入を食い止める防衛の第一線として有効なのが、受け入れ時の原材料のスクリーニングまたは同定試験です。ただし、現在の同定試験プロトコルの多くは、フーリエ変換赤外 (FTIR) またはラマン分光法にもとづいており、バイオ医薬品の製造に求められる品質とスピードを満たすという意味では適切とは言えません。

一般に、バイオ医薬品製造の上流プロセスは継続的に稼働しています。また、培地調製タンクおよび反応器でサイクルあたり 800 ~ 1600 kg もの培地、炭水化物、バッファ、アミノ酸が消費されるとなれば、原材料の需要量に倉庫の供給プロセスが対応しきれない可能性があります。そのうえ、同定や品質検査のために原材料の容器を開封してサンプルを採取する作業には相当な時間がかかることから、倉庫において製造に必要なとされる需要量を満たすことがさらに困難になります。

今回の研究の目的は、Agilent Vaya ラマンハンドヘルド装置により、原材料を相互に正確に識別できることを実証することです。Vaya では、容器越しの原材料の測定が可能です。この機能により、原材料を受け入れてから、バイオ医薬品の上流プロセスにリリースするまでの時間を大幅に短縮できます。

Agilent Vaya ラマンシステムによる同定試験



図 1. Agilent Vaya ラマンハンドヘルド分光装置を使用して、検査倉庫で紙袋越しに原材料を測定している様子

Agilent Vaya ラマンハンドヘルド分光装置（図 1）を使用することで、生物製剤用のバイオ医薬品原材料の同定検証が迅速になります。分光分析の専門家でなくても、内容物の同定が必要な場所で、透明および不透明容器越しに同定試験を実施することが可能です。Vaya 装置では、空間オフセット型ラマン分光法（SORS）により、わずか数秒で同定試験が完了し、合否結果が得られるため、1 名のオペレータが数時間で原材料の受け入れと製造段階へのリリースに容易に対応できます。また、サンプリング室、容器の開封、個人用保護具、サンプリング室への原材料の出し入れが不要になります。

空間オフセット型ラマン分光

ラマン分光法は、単色光を照射して成分を仮想的な電子状態に遷移させる励起と、それに続く共有結合の振動モードのプロビングにもとづく分析法です。一般には、励起後の脱励起により単色光（レーザー）の波長がシフトし、分子内の部分構造に特有のバンド（シフト）からなるラマンスペクトルが生成されます。

従来のラマン分光法（図 2）では、容器自体ではなく容器の内容物が主に励起されるように、レーザーの焦点を光学的に配置し、分光装置の開口部からのオフセット位置でラマン信号を最大にすることで、透明容器越しの分析が可能になります。

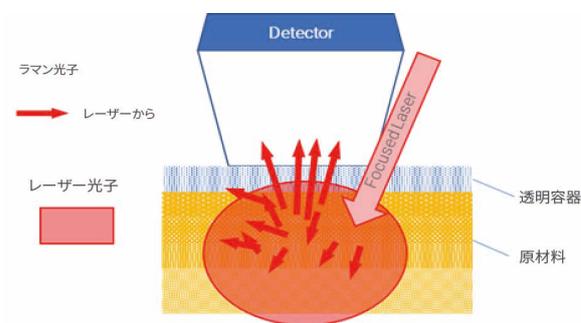


図 2. 従来のラマン分光法の構成

SORS は従来のラマン分光法とは異なり、拡散散乱材料を通過する光伝搬の特性とラマン分光法を組み合わせることにより、真の容器越しの分析を実現します。

SORS では、近点照明（検出器に近い位置）と、物理的なオフセット（検出器より離れた位置）によって相互にずれた収集エリアが使用されます（図 3）。

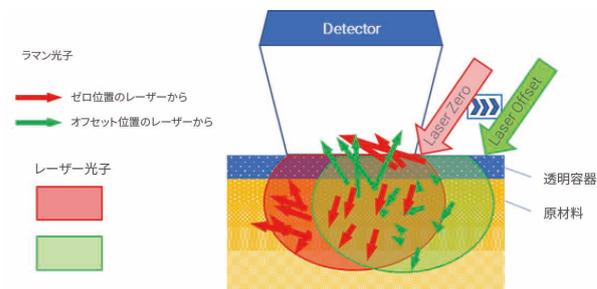


図 3. SORS 分光法の構成

このオフセット構成では、レーザーが成分内に伝搬し、主にサンプル表面下から発生したラマン光子が検出エリアで収集されます。この構成で生成されるのは、サンプル表面下の「情報」を豊富に含むスペクトルです。一方、物理オフセットなし、つまりオフセット「ゼロ」で生成されるスペクトルには、最上層の「情報」が豊富に含まれます。容器越しに原材料を同定する際には、原材料に関する情報が豊富な「オフセット」スペクトルから、容器に関する情報が豊富な「ゼロオフセット」スペクトルを差し引くことができます。これによって得られるスペクトルは、容器の寄与を除外した原材料のみのスペクトルに相当し、それをもとに同定検証を行えます。

従来のラマン分光法とは異なり、SORS では、同定試験を多様な透明および不透明容器越しに確実に実施できます。褐色瓶、FIBC、多層紙袋、色付きおよび透明プラスチックライナ、および不透明の色付きポリエチレン製容器など、容器内の原材料を正確に同定することが可能です。

SORS 技術を搭載した分光装置は、弱くそして小さいラマン断面を持つ原材料の透明容器越しの同定に特に有効です。SORS 分光装置には、超高感度 CCD 検出器が搭載されており、かなり減衰したオフセット信号、すなわちゼロオフセット構成における低散乱体からの微弱な信号が捕捉されます。

実験方法

バイオ医薬品原材料を相互に識別する Vaya 装置の性能を評価するために、一般的に用いられている幅広い原材料を購入しました。すべてのサンプルは、Sigma Aldrich 社製の試薬グレードで、透明および不透明容器で提供されました。サンプルの測定は、納品されたままの状態で行いました。サンプルには、アミノ酸、生物学用バッファ、細胞培地、界面活性剤、および無機塩の 5 つのクラスの代表的なバイオ医薬品原材料を選択しました。具体的には次のとおりです。

- **生物学用バッファ**：グッドバッファの 1 つである HEPES (2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸)、CHES (2-(シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸)、TRIS (2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1,3-ジオール)。3 種類のバッファはすべて、白色ポリエチレン製容器で納品されました。
- **界面活性剤**：Triton X100[®] (2-[4-(2,4,4-トリメチルペンタン-2-イル)フェノキシ]エタノール)、PEG (ポリエチレングリコール)、およびポリソルベート 80 (PS 80)。Triton X100 および PEG は白色ポリエチレン製容器で、またポリソルベート 80 は褐色瓶で納品されました。
- **アミノ酸**：L-アラニン、L-フェニルアラニン、グリシン。3 種類のアミノ酸はすべて、白色ポリエチレン製容器で納品されました。

- **細胞培地**：HAM's F10 および RPMI-1640。細胞培地は少量であったため、ガラスバイアルと半透明の小型 PE 製容器 (無色) に移しました。
- **無機塩**：リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸カルシウム (TCP)。3 種類の無機塩はすべて、白色ポリエチレン製容器で納品されました。

各クラスの原材料について、それぞれのラマンスペクトルを Agilent Vaya ラマン装置で容器越しに直接取り込みました。その後、識別のために、クラスごとに各原材料のスペクトルを重ねました。5 つのクラスの原材料の測定は、図 4 に示すように、メーカーから納品された容器のままで行いました (別途記載がない場合)。



図 4. Vaya 装置で白色ポリエチレン製容器越しに原材料を分析している様子と、納品時に原材料が入っていた容器の例 (生物学用バッファ)

各スキャンを取り込むために使用した分析条件は、装置によって自動的に設定され、オペレータは介入しませんでした。すべてのサンプルの測定は、室温で環境光 (自然光 LED ライト) 下で行いました。各スキャンは、35 秒以内に完了しました。ラマンスペクトルおよび SORS スペクトルの取り込み前に、性能適格性評価を実施しました。

結果と考察

HEPES、CHES、および TRIS バッファのラマンスペクトルを図 5 に示します。3 つのどのスペクトルにも特異的なラマンバンドが明確に現れており、これらのバンドをもとに、上流プロセスへのリリース前にバッファの同定およびスペシエーションを行えます。特に、HEPES および CHES は、部分的に共通する構造骨格を持っていますが、600 ~ 1300 cm^{-1} 領域に現れている脂環のバンドを使用すれば、容易に識別できます。

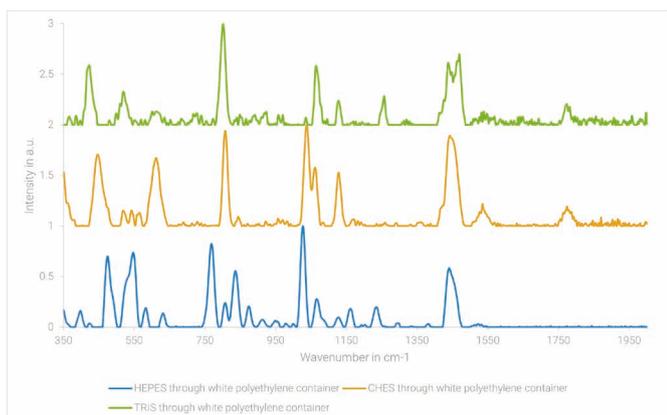


図 5. 各白色ポリエチレン製容器越しに直接得られた生物学用バッファのラマンスpekトルの重ね表示

Triton X100、PEG、および PS 80 界面活性剤のラマンスpekトルを図 6 に示します。Triton X100、PEG、および PS 80 は、相互に容易に識別できます。PS 80 のラマンスpekトルの 1650 cm^{-1} 付近に現れているバンドは、モノオレート類の存在を示す特徴的なバンドであり、他の 2 種類の界面活性剤と識別するうえで主要な役割を果たします。Triton X100 のspekトルの 1615 cm^{-1} にあるバンドは、芳香環の存在を示し、3 種類の界面活性剤を識別する際に役立ちます。

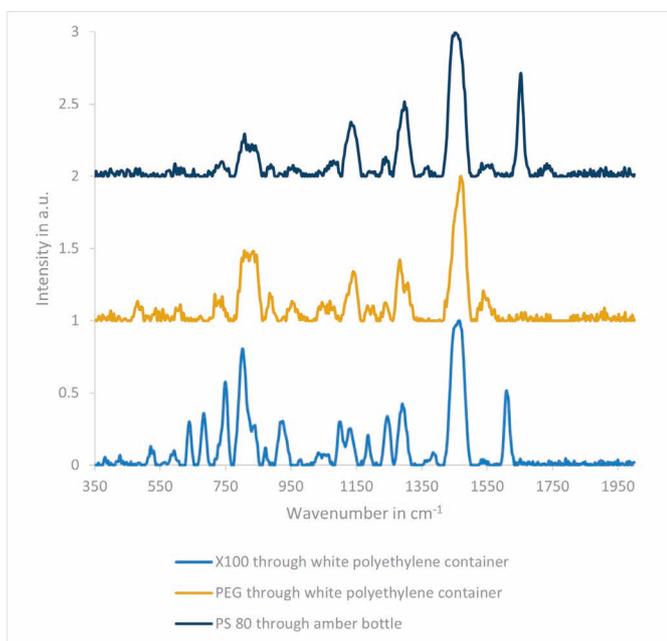


図 6. 各容器越しに直接得られた界面活性剤のラマンスpekトルの重ね表示

図 7 は、アミノ酸である L-アラニン、L-フェニルアラニン、および L-グリシンのspekトルの重ね表示です。これらの 3 種類のアミノ酸は、それぞれの特異的のマーカによって容易に識別できます (2)。アラニンについては、 852 cm^{-1} に現れている明確なバンドの存在が、他の脂肪族アミノ酸のspekトルと比較する際に決定的な識別因子になります。グリシンについては、 894 cm^{-1} (C α -C、OCO、COO-対称伸縮) および 1327 cm^{-1} (N-C α -H、NH $_3$ -逆対称面内変角 (横ゆれ)、NH $_3$ -逆対称面内変角 (横ゆれ)、N-C α -Ha) に現れている 2 つのバンドの存在によって、この成分のスペシエーションを行えます。また、フェニルアラニンについては、呼吸振動を示す 1005 cm^{-1} のバンド (δ 環) に注目することで、他の芳香族アミノ酸より単純な脂肪族アミノ酸との対比から容易にスペシエーションを行えます。

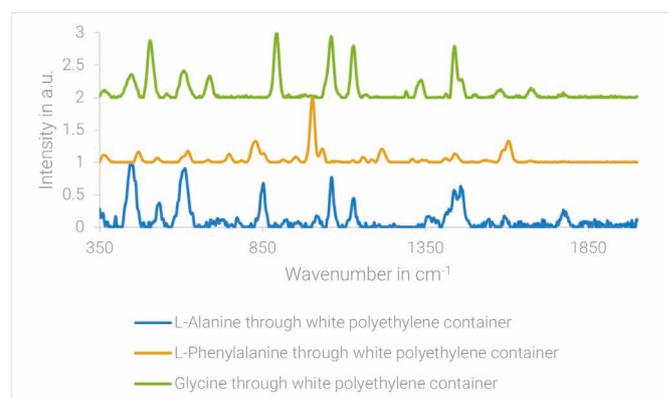


図 7. 各容器越しに直接得られたアミノ酸のラマンスpekトルの重ね表示

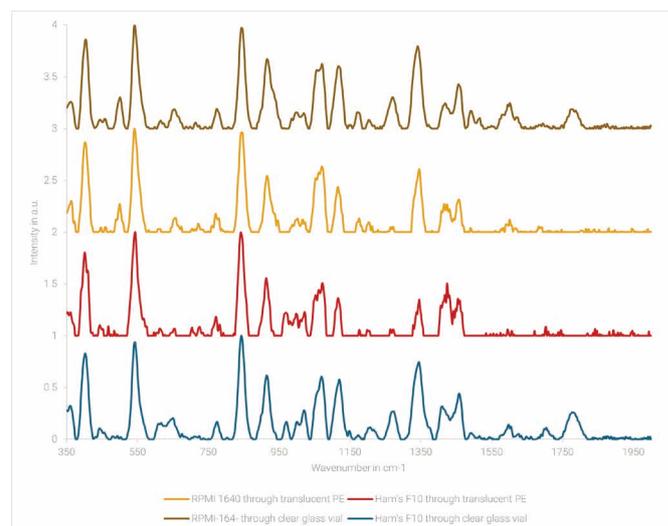


図 8. 各容器越しに直接得られた細胞培地のラマンスpekトルの重ね表示

図 8 は、RPMI-1640 および Ham's F10 細胞培地のスペクトルの重ね表示です。SORS 分光法では、透明なバイアル越しでも半透明のポリエチレン製容器越しでも、これらの 2 種類の乾燥粉末培地 (DPM) を識別できます。DPM は、塩化ナトリウムなどのラマン不活性の無機イオン性塩と、糖やバッファなどのラマン活性材料 (イオン性および有機) を主成分とし、この他にアミノ酸、ビタミン、無機塩などの低質量百分率のラマン活性材料が含まれています。その結果、取り込まれるラマンスペクトルには、DPM の組成が部分的に反映されますが、識別は、主に高質量百分率のラマン活性成分またはラマン散乱断面 (σ) の大きい成分、あるいはその両方にもとづいて行います。つまり、SORS は、組成を正確に確認する手段としては使用できないものの、DPM の高質量 % 成分または断面の大きい成分にもとづいて、納品される DPM を識別する迅速な手段になり得ます。

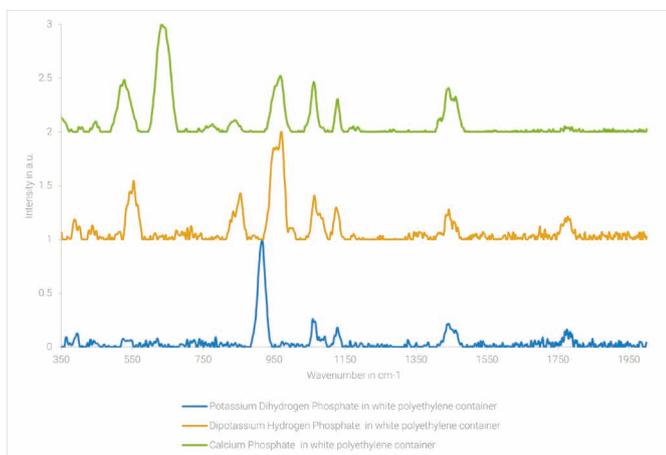


図 9. 各容器越しに直接得られた無機塩のラマンスペクトルの重ね表示

図 9 は、一般的に用いられている無機塩のスペクトルの重ね表示です。SORS 分光法では、「リン酸塩」コアや対イオンのプロトン化レベルに関わらず、3 種類すべてのリン酸誘導体を識別できます。

【お問い合わせ先】

Agilent ラマン製品に関する販売およびサポートは、ジャパンマシナリー株式会社に委託しております。お問い合わせはジャパンマシナリー株式会社までお願いいたします。

ジャパンマシナリー株式会社

電話番号:

03-3730-4891

お問い合わせフォーム:

<https://www.japanmachinery.com/contact/>

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, June 2, 2021
5994-3534JAJP
DE44321.2635532407

結論

Agilent Vaya ラマンハンドヘルド装置で提供される SORS 分光法により、容器を開封することなくバイオ医薬品原材料を正確に識別することができました。

容器越しの測定で、各原材料について十分に高品質のスペクトルが 35 秒未満で得られ、スペクトルをもとに、同じクラスの原材料を相互に識別することができました。

今回の研究で用いた乾燥粉末培地など、半透明容器入りの原材料も測定できました。以上の結果から、上流プロセスで使用される幅広い原材料について、容器の寄与を差し引くことのできる SORS の有効性が実証されました。

透明および不透明容器越しに高速分析を行える Agilent Vaya は、大量のバイオ医薬品原材料の試験に最適です。Vaya ラマン装置なら、原材料の同定を受け入れ直後の検疫で行えます。また、サンプリング室の清掃、サンプリング/分析のための隔離エリアへの容器の出し入れなど、FTIR や従来のラマン分光法で必要となる多くのステップの一部またはすべてが不要になります。さらに、原材料を無菌状態に保ち、その劣化に伴うコストを削減することもできます。

参考文献

1. Chess EK, Bairstow S, Donovan S, Havel K, Hu P, Johnson RJ, Lee S, McKee J, Miller R, Moore E, Nordhaus M, Ray J, Szabo C, Wielgos T. Case study: contamination of heparin with oversulfated chondroitin sulfate. *Handb Exp Pharmacol*. **2012**;(207):99-125. doi: 10.1007/978-3-642-23056-1_6. PMID: 22566223.
2. Raman Spectra of Amino Acids and their aqueous solutions. *Spectrochimica Acta Part A* **78**, **2011**, 1187-1195.