定量レーザ回折・散乱法 (qLD 法) による濃度評価

Concentration Evaluation by Quantitative Laser Diffraction Method (qLD)

洲本 高志*, 前田 裕貴, 小川 貴弘, 赤坂 剛

Takashi Sumoto, Hiroki Maeda, Takahiro Ogawa, Tsuyoshi Akasaka

Received 3 February 2016; Accepted 8 April 2016

Quantitative laser diffraction method (qLD) is the extended technology of laser diffraction method to evaluate particle size distribution as a relationship between particle diameter and number concentration of particles dispersed in medium. qLD method can be applied to the concentration evaluations for various applications of particle size analysis for protein aggregates and fine bubbles.

In addition, qLD method can monitor the time changes of concentration such as aggregation process of protein.

Keywords: Particle size analysis, Laser diffraction method, Number concentration, Protein aggregation

1. 緒 言

粒子径分布測定装置の多くは、粒子量の合計を100%とする相対粒子量としての粒子径分布を測定してきた。ところが近年、バイオ医薬品に含まれる凝集体やファインバブル（微細気泡）の評価などの分野において、個数濃度（個/mL）としての粒子径分布測定が求められるようになってきた。

従来のレーザ回折・散乱法（laser diffraction method 以下ではLD法と略す）は、相対粒子量しか求めることができなかったが、標準粒子による校正とMie散乱理論に基づく補正を加えることによって個数濃度または体積濃度を求めることが可能になった。この新しい手法を従来のLD法と区別するために、「定量レーザ回折・散乱法（Quantitative laser diffraction method）」¹⁾と呼び、qLD法と略すことにする。

ここでは、qLD法の基本的な考え方と、qLD法を用いたタンパク質の測定例を紹介する。

2. qLD法の考え方

Fig. 1にqLD法で用いる光学系を示す。これは、従来のLD法で用いられるものと共通である。液中に分散した粒子群を投入したセルにレーザ光を照射すると、粒子群から散乱光が発せられる。前方（散乱角度で60度まで）の散乱光はレンズで集光し、同心円状にセンサ素子が配置されたWingセンサを用いて、散乱角度に依存して変化する散乱光を検出する。図に示すようにWingセンサのWing部で検出される散乱光強度を個々の素子の面積比率を考慮して補正してやれば、全体が同心円状のセンサで検出した場合と同等の情報が得られる。

さらに側方および後方の散乱光もそれぞれのセンサ素子で検出する。このようにして、散乱角度に依存した散乱光強度の変化を光強度分布データとして検出し、そのパターンから粒子径分布を計算するのがLD法である。粒子径分布は全く同じで濃度だけが異なるA、Bの2種類のサンプルを測定した場合、Fig. 2に示すように、散乱角度に依存して変化するパターンは同じで、強度は濃度に比例する光強度分布データが得られる。この2つの光強度分布データを従来のLD法で処理すると、Fig. 3(a)に示すように粒子量の合計を100%とする全く同じ粒子径分布が求められる。ここで、光強度は濃度に比例することから、濃度の違いを考慮すれば、(b)図に示す粒子径分布が得られ（粒子量の単位は不明）、さらに、

粉体工学会2015年度秋期研究発表会技術賞受賞研究
株式会社 島津製作所
(〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1)
Shimadzu Corporation
(1 Nishinokyou Kuwabara-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511,
Japan)
* 責任著者連絡先 t-sumo@shimadzu.co.jp

Fig. 1 Optical system for qLD method

Fig. 2 Scattered light intensity distribution data

Fig. 3 Conversion from normalized particle amount to concentration

濃度が既知の標準粒子の散乱光強度で校正を行えば、個数濃度（個/mL）または体積濃度（ $\mu\text{L/mL}$ ）としての粒子径分布が求められる。この校正には、測定対象と同じ屈折率を有する標準粒子を用いる必要があるが、通常そのような標準粒子が存在しないので、濃度が既知のPSL粒子から検出される散乱光強度に対して、Mie散乱理論に基づいて、測定対象と同じ屈折率の場合の散乱光強度を算出し、それを用いて校正をおこなう。従来のLD法の特長は測定範囲が広いことであるが、qLD法では、定量測定の正確さを担保するために、ある程度測定範囲を限定し、その中心付近の粒子径に該当するPSL粒子で校正を行った方がよいと考えている。ここで報告する実験においては、測定範囲を100 nmから10 μm に限定、1 μm のPSL標準粒子を用い、タンパク質の屈折率としては、実験¹⁾で確認し1.46-0.1*i*を使用して校正を行っている。測定対象によっては、同じ検出光学系を用い、測定範囲を例えば1~100 μm とし、10 μm のPSL標準粒子で校正を行うことも可能である。

3. 測定例

近年、抗癌剤などの用途で、急速に普及しつつあるバイオ医薬品は基本的にはタンパク質であり、このバイオ医薬品中に100 nm~10 μm 程度の大きさの凝集体が含まれていると、人体に重篤な副作用を引き起こす危険性が懸念されている。しかし、現状では明確な規制はなく、この粒子径範囲の濃度を正確に測定できる技術も確立されていない。

温度や機械的ストレスがタンパク質を凝集させる要因になると考えられており、それらの影響をバイオ医薬品開発の初期段階で吟味し、凝集しにくい安定なタンパク質を原材料として選択する必要がある。

qLD法を用いると個数濃度として粒子径分布を評価することができるので、凝集体の発生量の大小を評価することができる。また、温度や機械的ストレスの条件下で、凝集体の濃度の時間的変化を観察することができるのでバイオ医薬品に用いるタンパク質の安定性に関する

Fig. 4 Batch cell for Aggregates Sizer

スクリーニングを効率的に行うことができる。ここではその測定例を紹介する。

本実験で用いたサンプルはウシガンマグロブリン (G 5009, シグマアルドリッチ製) で、サンプルをリン酸バッファ (pH 7.4, NaCl 150 mM) に投入し、1 mg/mL に濃度調製を行った溶液を使用した。測定装置は qLD 法を採用した島津バイオ医薬品凝集性評価システム Aggregates Sizer を使用した。光源は波長 405 nm の青紫色半導体レーザであり、30秒間隔での連続測定が可能である。

本実験においては、Fig. 4 に構造を示す回分セルに 5 mL のサンプル分散液を投入して測定を行った。この回分セルでは図に示すように搅拌プレートの上下運動でサンプルに機械的ストレスを加えながら粒子径分布を測定することができる。今回の実験では、回分セル内の凝集体の個数濃度の時間的変化を 5 分ごとに測定し最大 40 分までの変化を観察した。その結果を Fig. 5 および Fig. 6 に示している。温度条件は 23°C, 30°C, 42°C の 3 種類とし、搅拌プレートの材質は PEEK (ポリエーテルエーテルケトン樹脂) 製を用いている。

Fig. 5 および Fig. 6 は、それぞれ、粒子径区間 0.2~2 μm および粒子径区間 2~10 μm の範囲に存在する凝集体の総数の変化を個数濃度の変化として示している。図には同じ条件で 3 回の実験を行い、その平均値と標準誤差を表示している。

0.2~2 μm の範囲では、42°C の条件で、25分経過以降に凝集体の個数濃度が急速に増加し、30°C の条件でも 30 分経過以降に増加がみられる。しかし 23°C の条件下では凝集体の発生は少ない。このように、凝集体の発生状況には顕著な温度依存性が現れ、40分経過 42°C では約 4 億 5000 万個/mL の凝集体が発生している。2~10 μm の凝

Fig. 5 Change of number concentration of protein aggregate in the size range from 0.2 μm and 2 μm

Fig. 6 Change of number concentration of protein aggregate in the size range from 2 μm to 10 μm

集体の場合、23°Cでは15分以降に凝集体の発生が増えている。30°Cおよび42°Cでは当初から凝集体が発生していて、42°Cの場合40分後には、約25000個/mLの凝集体が発生している。

このような実験をバイオ医薬品の原材料の候補となるタンパク質に対して、様々な条件を設定して繰り返し実施される。そして凝集体の生成が無視できるものや無視できる条件 (添加剤など) が選択される。

ここで、粒子径区間を 0.2~2 μm および 2~10 μm の 2 つの区間に分けているのは、現時点では、明確な指針ではないが、FDA などの規制当局が推奨している設定にしたがったからである。実際、測定対象となる凝集体のサイズと個数が極端に異なるため、1つの区間として個数濃度で評価した場合、大きい方の凝集体の個数はほとんど誤差範囲になってしまう。しかし、サイズの大きな凝集体の影響は比較的少数であっても無視できない。

qLD 法以外にも個数濃度測定のために新しい手法^{2,3)}が提案されているが、現時点では、上記 2 区間を同時に測定でき、機械的ストレスを与えながら凝集体が生成さ

れるプロセスを観察できることは qLD 法の特筆すべき利点といえる。

4. 結 言

従来は、パーティクルカウンタなどの一部の測定手法を除いて、ほとんどの粒子径分布測定装置は粒子量の合計を100%とする相対的な粒子径分布を測定していた。しかし、タンパク質の凝集体やファインバブル（微細気泡）などの最先端の研究開発分野では、粒子径と個数濃度が、それぞれの応用分野に関わる現象・効果に及ぼす影響を評価する必要がある、個数濃度の測定は必須とな

る。

一方、従来の LD 法は、測定範囲が広く、測定時間が短いので、時々刻々の粒子径分布の変化を広い範囲にわたって評価できるという利点を持っている。qLD 法ではこの LD 法の利点を継承しつつ粒子量を濃度として測定できるので、個々の粒子径範囲の濃度変化も観察することができる。今後も qLD 法を用いて様々なアプリケーションに挑戦しようと考えている。

既に、ファインバブル（微細気泡）の個数濃度測定への応用を進めている⁴⁾。

References

- 1) Totoki, S., G. Yamamoto, K. Tsumoto, S. Uchiyama and K. Fukui: "Quantitative Laser Diffraction Method for the Assessment of Protein Subvisible Particles", *J. Pharm. Sci.*, **104** (2), 618-626 (2015)
- 2) Irie, A.: "Particles Tracking Analysis (PTA) for the size measurement of nanoparticles in liquid", *Funtai Gijutsu*, **7**, 632-635 (2015)
- 3) Ikeda, H.: "Resonant Mass Measurement", *Funtai Gijutsu*, **7**, 636-641 (2015)
- 4) Kobayashi, H., S. Maeda, K. Nishihara, T. Fujita, M. Maruyama and H. Shimaoka: "Measurement of number concentration of ultrafine bubbles using laser diffraction method and comparison with particle tracking analysis method", Japanese Society for Multiphase Flow, multiphase flow Symposium, E-115 (2015)