

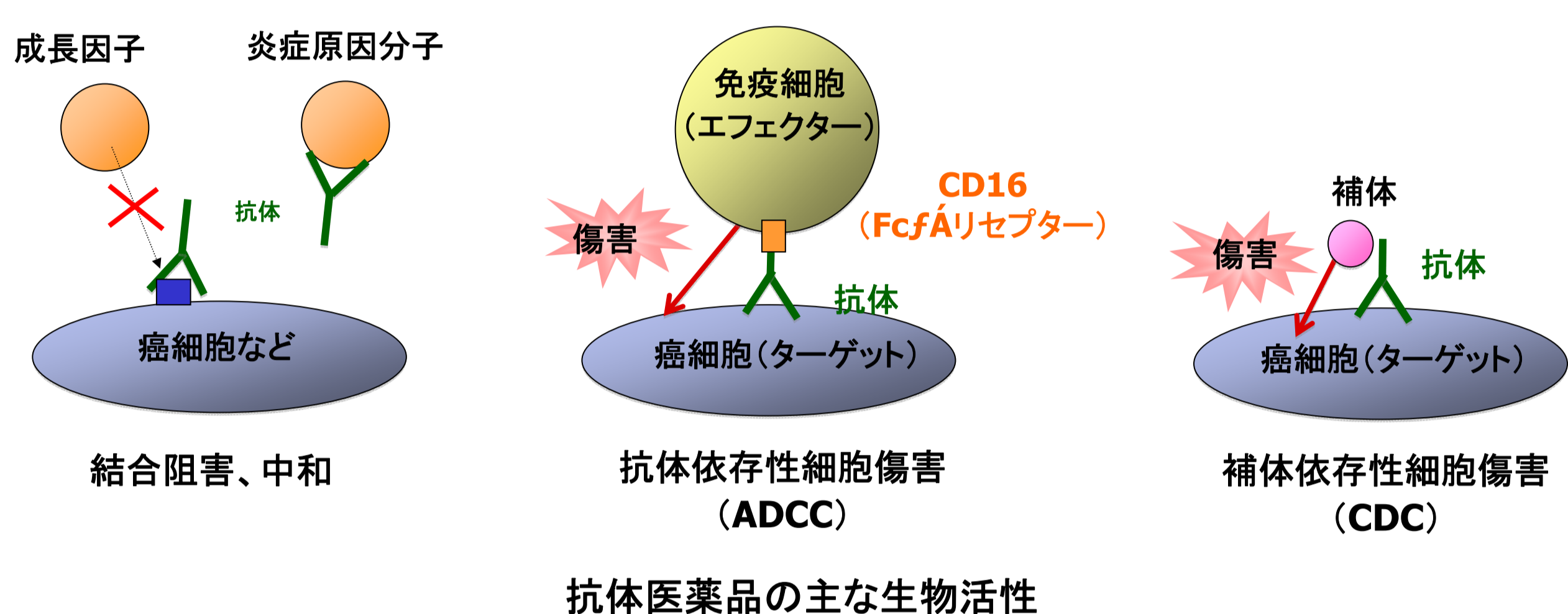
抗体医薬品のバイオ後続品の特性解析としての 細胞傷害活性測定方法の検討

一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
○広崎春佳, 前田洋祐, 山中秀徳, 屋形直明, 武吉正博



背景と目的

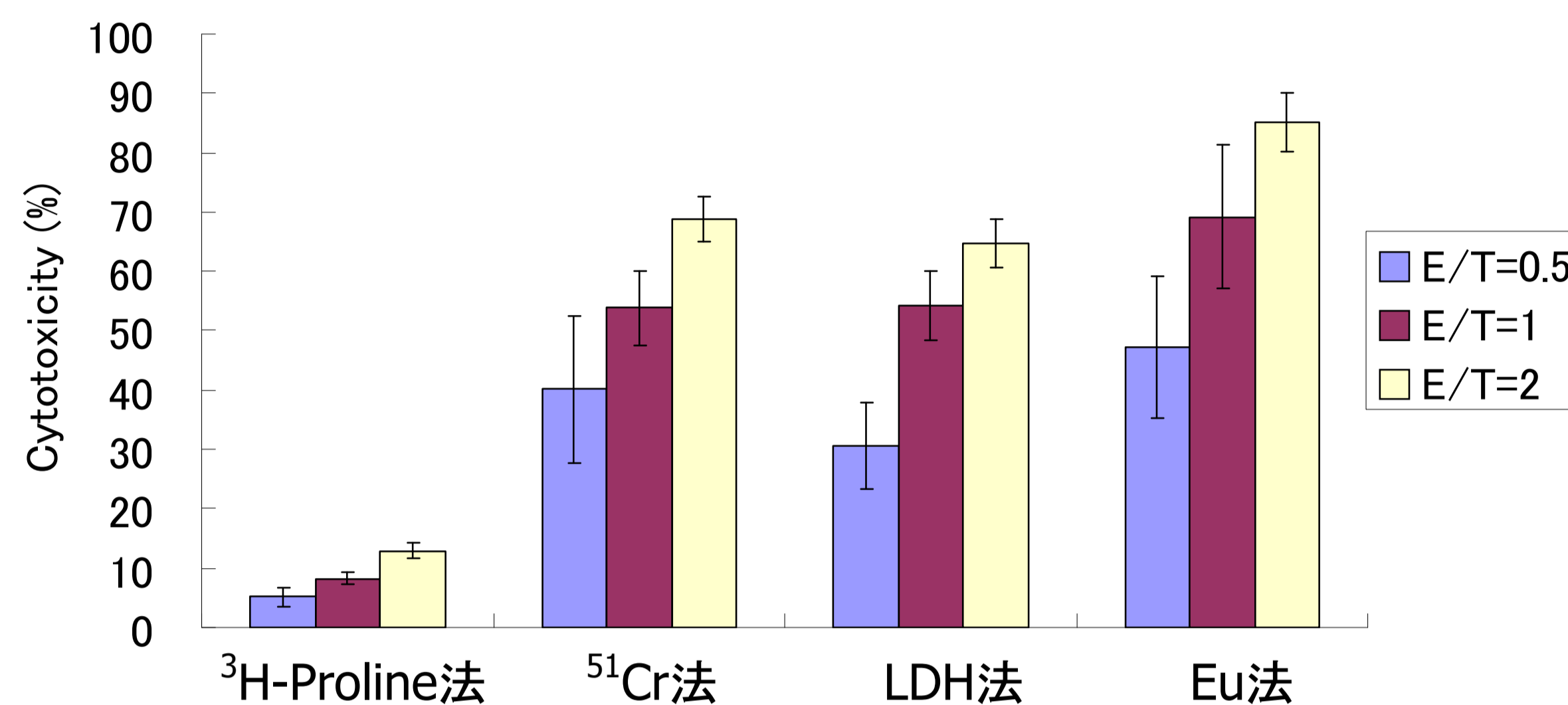
抗体医薬品の品質保証において安定性試験は有効性を判断するための試験である。抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)や補体依存性細胞傷害活性(CDC)を作用機序とする抗体医薬品のバイオ後続品を開発する場合には、ADCCやCDCに基づく細胞傷害活性を定量的に測定することが求められるようになることが予想される。現在、抗体医薬品の細胞傷害活性測定で最も一般的に用いられている測定法は⁵¹Cr release法であるが、放射性同位元素(RI)を使用することによる問題等もあるため、他に多くのRIを使用しない測定法等が開発されている。今回、バイオ後続品の安定性試験の中で細胞傷害活性測定を実施することを想定して、これら測定法間のパフォーマンスの比較を実施した。



結果

1.各測定法における測定値と細胞傷害活性

	測定値			
	³ H-Proline法	⁵¹ Cr法	LDH法	Eu法
Max Release	58246	806	0.331	56638
Spontaneous Release	10370	91	0.026	4702
Max - Spontaneous	47876	715	0.305	51936
Spontaneous (%)	18	11	8	8

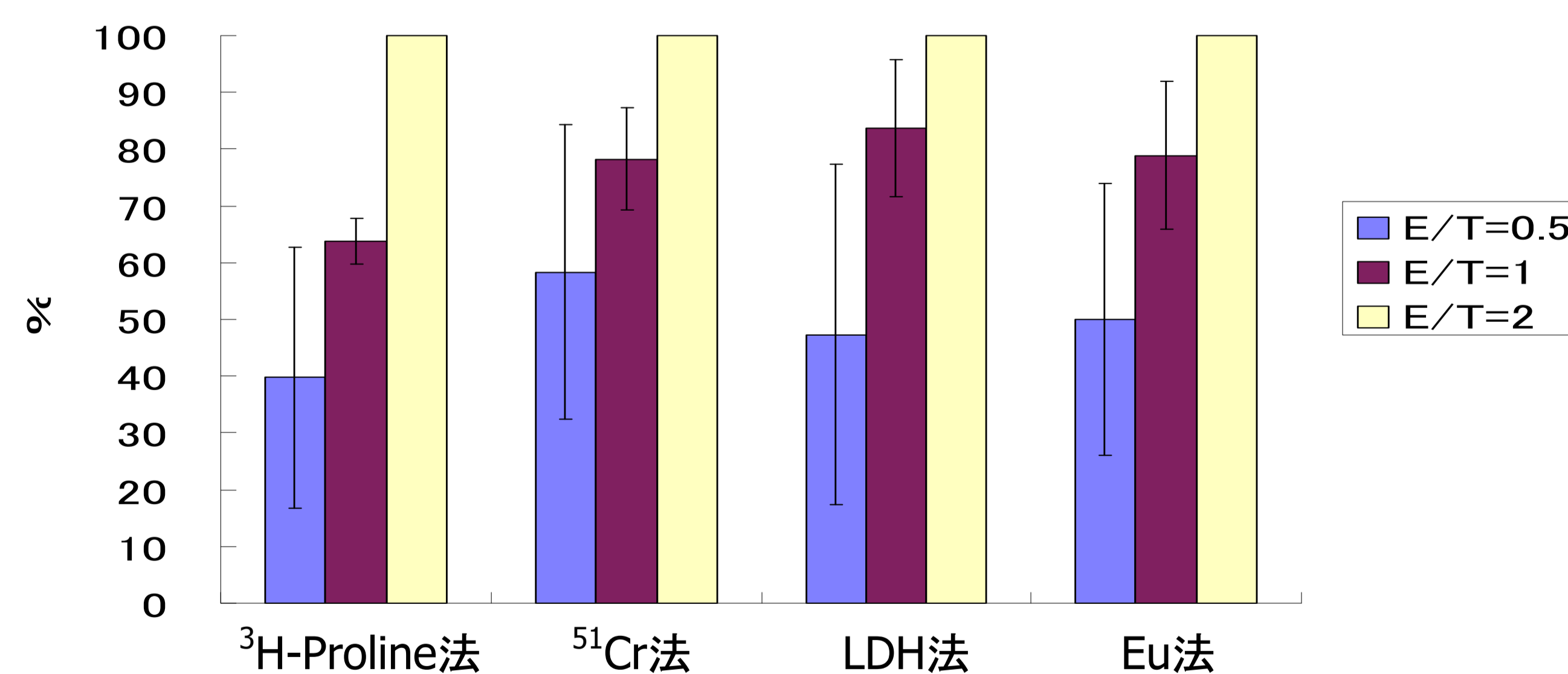


	Cytotoxicity (%)				CV (%)			
	³ H-Proline法	⁵¹ Cr法	LDH法	Eu法	³ H-Proline法	⁵¹ Cr法	LDH法	Eu法
E/T=0.5	5	40	31	42	30	31	24	31
E/T=1	8	54	54	66	12	12	11	20
E/T=2	13	69	65	84	11	5	6	6

- Max release から Spontaneous release を差し引いた測定幅は、³H-Proline法とEu法で大きい。
- Spontaneous release の割合は³H-Proline法が高い。
- 細胞傷害活性を⁵¹Cr法と比較すると、LDH法で同程度、Eu法でやや高く、³H-Proline法で有意に低く算出された。

原因としては、³H-Prolineは細胞の構造タンパク質に取り込まれるため、細胞が傷害されても細胞から放出されにくく、傷害に伴うreleaseが小さくなったと考えられる。

2. E/T=2の時の細胞傷害活性を100とした時の各E/T比における細胞傷害活性率の割合



	E/T=2を100とした時の各E/T比における細胞傷害活性率の割合 (%)			
	³ H-Proline法	⁵¹ Cr法	LDH法	Eu法
E/T=0.5	40	58	47	50
E/T=1	64	78	84	79
E/T=2	100	100	100	100

- E/T=2の時の細胞傷害活性を100とした時の各E/T比における細胞傷害活性率の割合を比較すると、いずれの測定法でも⁵¹Cr法と同様であった。

実験

ナチュラルキラー(NK)細胞株の細胞傷害活性を測定する単純化した系で、測定法間の比較を行った。

【細胞】

エフェクター細胞(E): NK92MI(ヒトNK細胞株)

ターゲット細胞(T): K562(NK92MI感受性細胞株)

【測定方法】

- ³H-Proline標識: β放射線放射活性
- ⁵¹Cr標識: γ放射線放射活性
- ユーロピウム(Eu): 時間分解蛍光
- 乳酸脱水素酵素(LDH): 吸光度

【実験手順】

ターゲット細胞に標識(³H-Proline, ⁵¹Cr, Eu)

↓

エフェクター細胞と混合培養(E/T比=2, 1, 0.5)

↓

培養上清中の³H-Proline, ⁵¹Cr, Eu, LDH量を測定

【細胞傷害活性の計算】

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \frac{\text{E/T混合値} - \text{Spontaneous release}}{\text{Max release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

* Max release: ターゲット細胞を全て傷害したときの数値

* Spontaneous release: ターゲット細胞のみで培養したときの数値

まとめ

- E/T=2の時の細胞傷害活性を100とした時の各E/T比における細胞傷害活性率の割合を比較すると、いずれの測定法でも⁵¹Cr法と同様に細胞傷害活性を測定することが可能であり、抗体医薬品のバイオ後続品の活性評価に有用であると考えられる。
- ³H-Proline法では他の測定法と比較して細胞傷害活性が低く算出される。