ナノスケール
イメージングテクノロジー

✔ **操作はサンプルをアプライしてワンクリックするだけ！**

ナノ粒子のサイズ分布と濃度を簡便にかつ迅速に計測可能。

✔ **サンプルアプライから最短40秒で結果を取得可能！**

観察されたナノ粒子のブラウン運動を専用のトラッキングアルゴリズムにより解析しナノ粒子のサイズ分布と濃度を最短40秒で計測します。

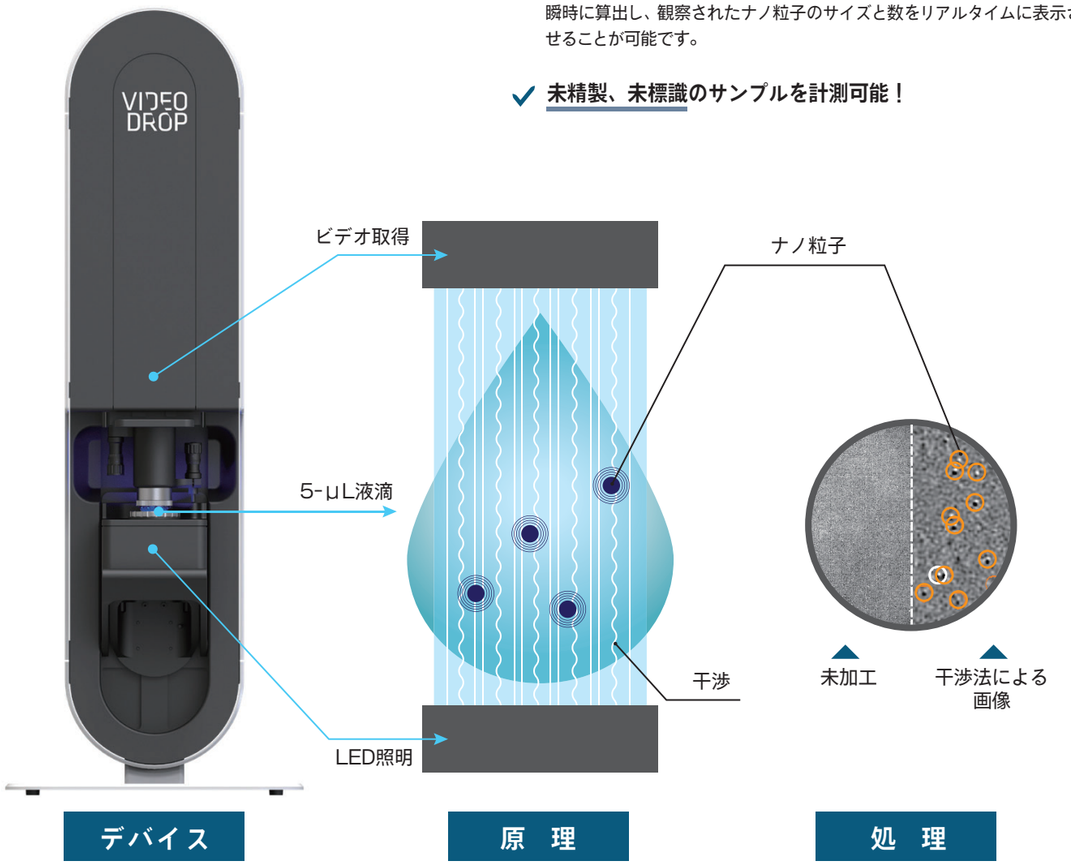
✔ **最小サンプル量は5μLで貴重なサンプルも無駄なし！**

マイクロウェルにアプライしたナノ粒子を含む5～10μLの溶液にLED光を照射すると、ナノ粒子によって拡散された光と入射光の間の干渉を検出することが可能になります。

✔ **リアルタイムで観察&計測表示！**

干渉法と高速カメラを使用してナノ粒子の軌道を観察。
専用ソフトに搭載されたトラッキングアルゴリズムは、軌道速度と距離を瞬時に算出し、観察されたナノ粒子のサイズと数をリアルタイムに表示させることが可能です。

✔ **未精製、未標識のサンプルを計測可能！**



meiwafosis
meiwafosis.com
メイワフォーシス 株式会社

東京 TEL (03)5379-0051 FAX (03)5379-0811
〒160-0022 新宿区新宿1-14-2 KI御苑前ビル

名古屋 TEL (052)686-4794 FAX (052)686-5114
〒464-0075 名古屋市千種区内山3-10-18 PPビル3F

大阪 TEL (06)6212-2500 FAX(06)6212-2510
〒542-0074 大阪市中央区千日前1-4-8 千日前M'sビル9F

仙台 TEL (022)218-0560 FAX (022)218-0561
〒981-3133 仙台市泉区泉中央1-28-22 プレジデントシティビル3階

テクノロジーラボ 東京都立産業技術研究センター 〒135-0064 東京都江東区青海2-4-10 製品開発支援ラボ318

VIDEO DROP

ナノ粒子イメージングアナライザー

アプリケーションノート No.01

レンチウイルスベクター粒子の
リアルタイム定量解析のための新たなアプローチ

レンチウイルスベクターは、分裂細胞と非分裂細胞において安定して効率的に遺伝子導入する運び屋であり、CAR-T細胞療法などex vivoで細胞に遺伝子を導入するための強力なツールとして利用されることが多くなっている。
レンチウイルスベクターの製造・生産過程において、バッチリリースを可能にするには適切な品質管理が必要とされる(1)。
使用可能な標準的品質管理方法のうち非常に重要なのは、レンチウイルスベクター粒子の定量化、つまり物理的力価である。現在まで、このような特性評価は、サンプルの事前準備を必要とするp24タンパク質の定量化による間接的な方法か、調整可能抵抗パルスセンシング（TRPS）などの物理的方法によって行われてきた。これら2つの方法は、製品の真の性質を正確に反映できないために複数の重要な制限があるばかりでなく、比較的長く時間がかかる(2)。
Videodropは、レンチウイルスベクターの物理的力価について、リアルタイムかつ簡単にラベルフリー測定を実施する新たな光学的手法である。
フルフィールド干渉法（3）に基づくこの手法について、多様なレンチウイルスベクターのサンプルを用いて、医療品(DP）のリリースやインプロセス管理といった状況で、試験を行った。
我々は、aratinga.bio社の製造に関して、レンチウイルスの物理的力価測定方法について3種類、すなわちp24ELISA、qNano及びVideodropを比較した。Videodropによる解析と他の2つの方法との相関は、R^2値が高くロバストであった。この結果は、Videodropは、DPリリース及びインプロセス管理において重要であり、継続的改善に役立つツールとなりうることを示し、より複雑で時間がかかる物理的力価の標準的測定方法よりも、使いやすく迅速な測定を可能にする。

Introduction

aratinga.bio社は、前臨床段階のバイオテクノロジー企業であり、in vivoでレンチウイルスベクターを利用してT細胞に狙いを定めて変換する、市販の CAR-T細胞療法向けの製品の開発を行っている。
レンチウイルスベクターのパイロット版バッチとGMPバッチの生産において、aratinga.bio社は、そのウイルス粒子の特性評価をより適切に行うための革新的かつ重要なソリューションを探している。ウイルスの物理的力価を定量化するため、内部参照として、p24 ELISAと可変調整電気抵抗ナノパルス法(TRPS）を利用したqNanoを使った。
Videodropは、1滴のサンプルからナノ粒子濃度を測定する新しいタイプの顕微鏡である（4, 5)。
この方法の利点はシンプルなことにあり、測定はリアルタイム、ラベルフリー、濾過不要で、非破壊的に行われ、必要なサンプル量はわずか 5 μL～10 μLである。よって、この技術は特に、レンチウイルスベクター力価の評価に使用できる。
ここで、明らかになっている2つのニーズ、つまり精製と濃縮後のレンチウイルスベクター最終製品の特性評価と、上流工程（USP）及び下流工程（DSP）の各段階におけるインプロセス管理について、Myriade社の技術とp24タンパク質の定量化とTRPS を連続して比較する。

実験方法

3種類の手法を用いて、レンチウイルスベクターの物理的力価を評価した。

■Myriade社の技術

Videodropには、干渉計の現象を利用して溶液中のナノ粒子が検出できる画像を作るカスタマイズされた顕微鏡が使われている(3)。
ナノ粒子と微粒子が観察できる動画を記録する。図1は、レンチウイルスベクターの回折限界点（直径およそ110nm）を示している。
記録されたフィルムを用いて、微粒子をカウントし、サンプル濃度の推定と、その動きの追跡を行い、流体力学的半径を推定することができる。顕微鏡の倍率とカメラスピードにより、少量のサンプル(5μLまで）を使ったスピーディな測定（1分以内）が可能になった。サンプルは、大きな細胞破片がある場合でも、ラベル付けや濾過は不要である。
　Videodropはイメージング装置であるため、マイクロメートル領域であれば、従来の顕微鏡と同じように物体を観察でき、サンプルの純度管理が可能になる。サンプルはDPBS（Gibco社）で希釈し、滴下量7 μLで三連で測定した。

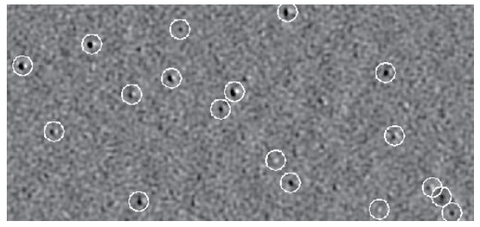


図1. Myriade社の技術で獲得したレンチウイルスベクターサンプルの画像

■p24タンパク質の定量化

Cell Biolabs社のQuickTiter™ HIV Lentiviral Quantitation Kit（レンチウイルス定量化キット）(HIV p24 ELISA)を用いてウイルスの定量化を行った。これは、HIVコアタンパク質p24の検出と定量化のために開発された酵素免疫測定法である。HIV-1 p24のマウスモノクローナル抗体を、マイクロタイタープレートのストリップウェル上にコートし、HIV-1 p24抗原の量を、その吸光度と既知の組換型p24抗原標準曲線のそれとを比較することで測定した[1]。

■TRPS

qNanoは、可変調整電気抵抗ナノパルス法（TPRS）を利用した装置で、コールター原理に基づいている。コールター原理とは、「開口部を粒子が通り抜けると、同時に電流が発生し、インピーダンスが変化する、その変化は開口部を横切る粒子の体積に比例する」というものである(6)。DPBS（Gibco社）での事前希釈と0,22 µmの濾過ののち、NP150ナノポア（Izon Science Ltd社）を用いて、サンプルの解析を行った。測定は、35 µLのサンプルについて三連で実施した。
これら3種類の手法はすべて、製造後-80° Cで保管され、室温で解凍されたサンプルを使って実施された。

[1]レンチウイルス粒子 （LP） あたりおよそ2000分子のp24が存在するという事実に基づいて算出した。よって、1LPには、p24が2000 x 24 x 103 / (6 x 1023) g=8 x 10-5 pg含まれている。

結果・考察

レンチウイルスベクター最終製品の特性評価
CAR-T 細胞製品生産に使用する原料のリリースに先立ち、適切な試験を実施して、製品が規制基準を満たしていることを確認する必要がある(1)。
レンチウイルスベクターのバッチがリリースされたら、留分（以下、「医療品（DP）」)の力価を、正確に測定すること。さらに、再現性を実証するためにその価を過去のバッチと比較しても良い。
8種類の医療品の物理的力価を、p24 ELISA、qNano及び Videodropを用いて測定した。p24 ELISAとVideodrop の結果は強い相関を示した（相関係数 $R^2 = 0.95$）が、qNanoとではわずかに相関が弱かった（相関係数 $R^2 = 0.85$）。

インプロセス管理

インプロセス管理試験は現在、医薬品有効成分（API）や中間体（intermediates)の製造過程における進行状況をモニターするために最も広く用いられている試験/基準である（7）
研究者は、プロセスからの逸脱を避けるため、プロセス管理における主要生産段階を特徴付けて、重要なパラメータの限界を定義するべきである(1)。この方法をとれば、リアルタイムでのプロセス改善が可能となるとともに、あとで確実に再現できるようになる。
USP/DSPの段階には、生産、清澄、精製、濃縮、透析濾過及び濾過が含まれるが、その過程で、レンチウイルスベクターの物理的力価のほか、感染力価が強い影響を受ける可能性がある。よって、リアルタイムで生産の質をモニターして生産量を算出するには、インプロセス管理によってその過程での力価の進化（evolution）を評価する必要がある。
4つの異なるバッチにおける6留分の物理的力価を、p24 ELISA、 qNano及び Videodropを用いて測定した。評価した留分は、ハーベストしたバルク（HB)、清澄しハーベストしたバルク（HCB)、ベンゾナーゼ処理後に清澄しハーベストしたバルク（HCBB)、AEX溶出液（E2)、接線流濾過後の製剤原料（DS）及び0,22 µm濾過後の医薬品(DP)である。
p24 ELISAとqNanoで測定した力価は、Myriade社のVideodropで測定した結果との間に特に強い相関がみられた（それぞれ相関係数$R^2 = 0.96$、$R^2 = 0.94$)。

図3. 医療品の物理的力価測定方法の比較。
(A) p24 ELISAとVideodropの相関。(B) qNanoとVideodropの相関。

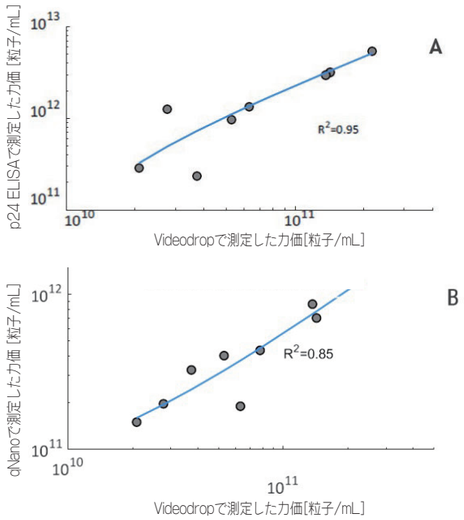
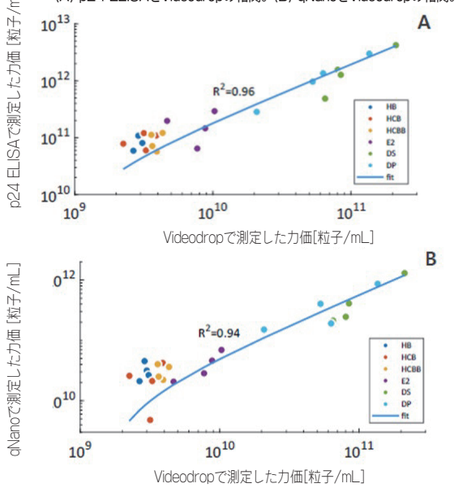


図2. 医療品の物理的力価測定方法の比較。
(A) p24 ELISAとVideodropの相関。(B) qNanoとVideodropの相関。



結論

本研究では、DPのリリースとUSP/DSPのインプロセス管理について、レンチウイルスベクターの物理的力価を測定する3つの手法を比較した。
Videodropを用いた測定値は、インプロセス管理の相関係数$R^2 = 0.95$、DPリリースの相関係数$R^2 = 0.85$と、qNanoとの間に強い相関性がみられた。p24 ELISAで測定した結果との相関性はさらに強く、DPでは$R^2 = 0.96$、多様なUSP/DSP留分のインプロセス管理では$R^2 = 0.93$であった。
Videodropを用いた測定結果は、レンチウイルスベクターの標準的な物理的力価測定方法と一致する。さらに、Videodropは、非常に迅速な力価測定方法で、使用する製品の量も少ないため、APIの管理に特に適しているようである。よって、Videodropは、医薬品リリースや、オフラインでのインプロセス管理に使用できる可能性がある。

参考文献

1.Li Y, Huo Y, Yu L, Wang J. Quality Control and Nonclinical Research on CAR-T Cell Products: *General Principles and Key Issues. Engineering.* feb 2019;5(1):122-31.
2.Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, Debyser Z, Gijsbers R. *Comparison of lentiviral vector titration methods. BMC Biotechnol*. 12 july 2006;6:34.
3.Boccara M, Fedala Y, Bryan CV, Bailly-Bechet M, Bowler C, Boccara AC. Full- field interferometry for counting and differentiating aquatic biotic nanoparticles: *from laboratory to Tara Oceans. Biomed Opt Express.* 1 sept 2016;7(9):3736.
4.Roose-Amsaleg C, Fedala Y, Vénien-Bryan C, Garnier J, Boccara A-C, Boccara M. Utilization of interferometric light microscopy for the rapid analysis of virus abundance in a river. Res *Microbiol.* 1 june 2017;168(5):413-8.
5.Dugat-Bony E, Lossouarn J, Paepe MD, Sarthou A-S, Fedala Y, Petit M-A, et al. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: a *comparative study of rapid procedures for extracting virus-like particles. bioRxiv*. 21 dec 2018;503599.
6.Heider S, Muzard J, Zaruba M, Metzner C. Integrated Method for Purification and Single-Particle Characterization of Lentiviral Vector Systems by Size Exclusion Chromatography and Tunable Resistive Pulse Sensing. *Mol Biotechnol*. july 2017;59(7):251-9.
7.Wood C. In-Process Control Testing. In: *Separation Science and Technology. Elsevier*; 2011. p. 397-427.

著者

aratinga.bio社
Victoire Barailles, Alice Pailleret, Aurélie Perier, Nicolas Delacroix, Cécile Bauche, Renaud Vaillant

Myriade社
Matthieu Greffet, David Poizat

訳者

メイワフォーシス株式会社

aratinga.bio