

# Advanced Instruments OsmoTECH® HT 自動マイクロ浸透圧計のご紹介

Emily Hyatt, Nancy Perlmutter, Linda Buck, Meredith Pesta and Mark Rothenberg, Ph.D.  
Advanced Instruments, Norwood, MA 02062

## はじめに

近年、バイオ医薬品業界は様々な治療法を通じて急速な成長と革新を遂げています。その中で業界が直面している課題の一つは、pH、代謝物、エンドトキシンレベル、製品濃度、浸透圧など、バイオプロセス全体を通して重要な品質特性（CQA）をモニターする効率的な方法を見つけることだと言えます。業界がより自動化されたプロセスへと移行する一方で、安全で効果的な医薬品を確実に製造するためには、バイオプロセスの初期段階における意思決定の信頼性を維持することが最も重要です。

様々な医薬品技術において、浸透圧はバイオプロセス全体を通してモニターされている標準的なCQAです。浸透圧は、原料QC、溶液調製、細胞培養モニタリング、緩衝液置換モニタリング、安定性試験、最終製品QCおよびリリースなどで広くモニターされています。自動化とスループットの向上という業界のトレンドに追随するため、Advanced Instrumentsは、OsmoTECH® HTと呼ばれる、初の96ウェルプレートベースの浸透圧計を開発しました。自動化されたハイスループット試験は、ヒューマンエラーを減らしながら、時間とコストを大幅に節約できるため、多くのラボにとって貴重なものとなっています。浸透圧のハイスループット試験は、短時間で多くの異なる溶液を評価しなければならない製剤開発作業にとって特に重要です。とりわけ、遺伝物質を含む脂質ナノ粒子（LNP）を含む製剤は注意深くモニターする必要があります。LNPは浸透圧に敏感で、早期の破裂を防ぐために正確なアイソトニック条件を必要とするからです(1)。

どのようなプロセスを自動化する場合でも、以下のような要素が重要になります：

- 複数のサンプルを継続的かつ一貫した方法で測定する能力
- サンプル量の最小化：これは技術やアッセイによって異なるが、サンプル廃棄は常に懸念事項となっている
- サンプルのキャリーオーバーの最小化
- プレート間およびプレート内のばらつき最小化
- エッジ効果や蒸発の可能性を最小限に抑制

浸透圧測定の自動化に関心が集まっている分野の一つは、下流のバッファーと製剤開発です。サンプル量は非常に重要な検討事項であり、どのPAT分析を選択するかを決定する際に大きな影響を及ぼす可能性があります。製剤開発の担当者は、製剤について複数の分析を行うため、サンプル量を最小限に抑えることが最も重要です。OsmoTECH HTは、Advanced Instrumentのインテリジェントな凝固点降下技術によって得られる特徴的な精度を維持することを目指しており、浸透圧の正確な測定とラン間およびラン内の高い再現性を実現します。以下の研究は、OsmoTECH HTが、キャリアオーバーやエッジ効果を生じることなく、さまざまな種類の試料を高精度で測定できることを示しています。

## メソッドと材料：

### テスト対象

テスト対象は、2台のOsmoTECH HT浸透圧計の評価です。

Salt スタンダードについては、装置1台当たり0 mOsm/kgスタンダードで16テスト、2000 mOsm/kgスタンダードで96テストの設定で測定しました。タンパク質ベースのスタンダードについては、装置あたりの測定回数は48回としました。各測定は96ウェルプレートの1ウェルあたり1回行いました。

タンパク質コントロールについては、それぞれの装置でタンパク質コントロールのレベルごとに48サンプルを測定しました。測定キャリアオーバー試験では、Protinol™ 320と50 mOsm/kg Salt スタンダードを使って、カラムベースでテストしました。各テストは96ウェルプレートの1ウェルにつき1回の測定としました。

タンパク質と糖溶液については、さまざまなウシ血清アルブミン（BSA）とスクロースを含む10種類の溶液を、1台のOsmoTECH HTで1サンプルあたり8回測定しました。各テストは96ウェルプレートの1ウェルにつき1回の測定としました。

蒸発試験には、各 OsmoTECH HT でClinitrol 290™ と 400 mOsm/kg 標準液のフルプレートを1枚ずつ測定しました。各テストは96ウェルプレートの1ウェルにつき1回の測定としました。

**すべてのテストで使用された材料/機器を以下に示します。**

Material/Equipment	AI Part number
OsmoTECH HT	OsmoTECH HT
OsmoTECH HT Micro-sample tubes	HT1000
Calibration and Verification Standard Set	3MA635
Pipette capable of delivering 50 µL (calibrated)	NA
Pipette tips	240821
OsmoTECH HT Calibration Tray	635951
Sealing Roller for plate evaporation cover	807006
OsmoTECH HT 96 Well Kit	635920
OsmoTECH HT System Fluid	635934
OsmoTECH HT Cleaning Reel	635910

すべてのランは、OsmoTECH HTのユーザーガイドに記載されているプロトコールに従って行われた。

### 精度と正確さのテスト：

以下に示す溶液を、指示された反復回数テストしました。

Solutions	N Repts	AI Part number
0 mOsm	16	3MA000
50 mOsm	16	3MA005
100 mOsm	32	3LA011
Clinitrol™ 290	48	3MA029
300 mOsm	48	3MA003
500 mOsm	48	3LA051
850 mOsm	48	3MA085
900 mOsm	48	3LA091
1500 mOsm	64	3LA151
2000 mOsm	96	3MA200
Protinol™ Protein-Based Controls (3-levels)	48	3MA028

### キャリーオーバーの分析：

ウェル間のサンプルのキャリーオーバーがあるかどうかを調べるため、2種類のサンプル、タンパク質を含むProtinol 320（品番3MA028）試薬と50 mOsm Saltスタンダード（品番3MA005）を用いて、2台のOsmoTECH HT浸透圧計で12回の独立した測定を行いました。サンプルは以下の順序で測定しました：

- 高レベルサンプルの3回の繰り返し測定(Protinol 320)
- 低レベルサンプルの5回の繰り返し測定(50 mOsm/kg スタンダード)

### 蒸発の分析

蒸発またはエッジ効果のレベルを調べるため、96ウェルマイクロプレートにClinitrol 290と400 mOsm/kg Saltスタンダードを分注し、OsmoTECH HT 96ウェルキットと蒸発防止用プレートカバー付きローラーを使用し、2台のOsmoTECH HTで測定しました。

### 複雑なサンプルの分析

OsmoTECH HTがより複雑なサンプルを測定する能力を評価するため、濃度の異なるBSA（Proliant Cat# 68100-100 g）とシュクロース（MilliporeSigma Cat# S0389-500 g）のカクテルを以下の濃度で調製し、標準操作手順に従って2台のOsmoTECH HTで測定しました。

100 mg/ml BSA, 100 mM Sucrose
100 mg/ml BSA, 200 mM Sucrose
100 mg/ml BSA, 300 mM Sucrose
100 mg/ml BSA, 350 mM Sucrose
150 mg/ml BSA, 100 mM Sucrose
150 mg/ml BSA, 200 mM Sucrose
150 mg/ml BSA, 300 mM Sucrose
200 mg/ml BSA, 100 mM Sucrose
200 mg/ml BSA, 200 mM Sucrose
200 mg/ml BSA, 300 mM Sucrose

## 結果

### Salt スタンダード（塩標準）を使用した際の精度と正確さ：

0~300mOsm/kgのSalt スタンダードを2台のOsmoTECH HT装置で測定しました。ウェル当たり単一レプリケートで測定し、プレート当たりの測定ウェル数は、0 mOsm/kg サンプルで16ウェル、300 mOsm/kg サンプルで48ウェルでした。すべての結果は精度と精度の許容基準を満たし、規格外は観察されませんでした。

## 3 Advanced Instruments

観察された最も高い標準偏差 (SD) は、300mOsm/kgのサンプルで1.1mOsm/kgであり、これは最大許容SDである3mOsm/kgの範囲内に十分に収まっています。

Sample	Instrument	N	Mean (mOsm/kg)	SD	Min (mOsm/kg)	Max (mOsm/kg)	Acceptance Criteria	
							Mean Accuracy ( $\pm 3$ )	SD
0 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	16	0.1	0.3	0	1	0 - 3	$\leq 3$
	OsmoTECH HT #2	16	0.1	0.3	0	1	0 - 3	$\leq 3$
50 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	16	51.0	0.0	51	51	47 - 53	$\leq 3$
	OsmoTECH HT #2	16	51.0	0.0	51	51	47 - 53	$\leq 3$
100 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	32	100.3	0.5	100	102	97 - 103	$\leq 3$
	OsmoTECH HT #2	32	100.3	0.5	100	101	97 - 103	$\leq 3$
Clinitrol™ 290	OsmoTECH HT #1	48	291.4	0.7	290	294	287 - 293	$\leq 3$
	OsmoTECH HT #2	48	291.2	0.7	290	292	287 - 293	$\leq 3$
300 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	48	300.5	1.0	299	304	297 - 303	$\leq 3$
	OsmoTECH HT #2	48	300.9	1.1	299	303	297 - 303	$\leq 3$

Table 1. 0-300 mOsm/kgのSaltスタンダードのテスト

500~2000 mOsm/kgのSaltスタンダードを2台のOsmoTECH HT装置で測定しました。ウェル当たり単一レプリケートで測定し、プレート1枚当たりの測定ウェル数は、500 mOsm/kgのサンプルで48ウェル、2000 mOsm/kgのサンプルで96ウェルでした。すべての結果は精度と精度の許容基準を満たし、規格外は観察されませんでした。観察された分散係数 (%CV) の最高値は0.5であり、これは許容される%CVの最大値である1.0の範囲内に収まっています。

Sample	Instrument	N	Mean (mOsm/kg)	%CV	Min (mOsm/kg)	Max (mOsm/kg)	Acceptance Criteria	
							Mean Accuracy ( $\pm 1\%$ )	%CV
500 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	47	501.4	0.2	500	505	495 - 505	$\leq 1$
	OsmoTECH HT #2	48	504.1	0.2	502	506	495 - 505	$\leq 1$
850 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	48	850.9	0.2	847	856	842.5 - 858.5	$\leq 1$
	OsmoTECH HT #2	48	850.5	0.3	846	859	842.5 - 858.5	$\leq 1$
900 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	48	901.7	0.3	895	911	891 - 909	$\leq 1$
	OsmoTECH HT #2	48	904.3	0.2	898	908	891 - 909	$\leq 1$
1500 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	64	1492.7	0.5	1480	1508	1485 - 1515	$\leq 1$
	OsmoTECH HT #2	64	1502.2	0.5	1483	1521	1485 - 1515	$\leq 1$
2000 mOsm/kg	OsmoTECH HT #1	96	2004.1	0.5	1973	2028	1980 - 2020	$\leq 1$
	OsmoTECH HT #2	96	2003.4	0.4	1985	2033	1980 - 2020	$\leq 1$

Table 2. 500-2000 mOsm/kgのSaltスタンダードのテスト

#### タンパク質コントロールを使用した際の精度と正確さ：

2台のOsmoTECH HT装置で、~240~320 mOsm/kgのProtinol™コントロール (牛血清アルブミン) を測定しました。ウェル当たり単一レプリケートで、1サンプル当たり48ウェル測定しました。すべての結果は、精度、正確性、再現性の合格基準を満たしていました。観察された最も高いSDは、Protinol 320サンプルの1.8 mOsm/kgで、これは最大許容SDである3 mOsm/kgをはるかに下回っています。

## 4 Advanced Instruments

Sample	Instrument	N	Mean (mOsm/kg)	SD	Min (mOsm/kg)	Max (mOsm/kg)	Acceptance Criteria	
							Accuracy	SD
Protinol 240	OsmoTECH HT #1	48	237.4	0.9	236	239	233 - 247	≤ 3
	OsmoTECH HT #2	48	236.5	1.7	233	240	233 - 247	≤ 3
Protinol 280	OsmoTECH HT #1	48	277.1	1.1	275	279	273 - 287	≤ 3
	OsmoTECH HT #2	48	278.7	1.5	276	282	273 - 287	≤ 3
Protinol 320	OsmoTECH HT #1	48	317.1	1.8	313	321	313 - 327	≤ 3
	OsmoTECH HT #2	48	317.2	1.8	313	321	313 - 327	≤ 3

### キャリアオーバーの結果：

キャリアオーバー試験は、高レベル試料としてProtinol™ 320を、低レベル試料として50 mOsm/kg Salt スタンダードを用い、2台のOsmoTECH HT装置で測定しました。96ウェルプレートでの試験は縦列式で、Figure1のヒートマップに矢印で示したように、プレートの上から開始しました。キャリアオーバーは、低レベルのコントロールが期待値より高い結果を示すことで判定されます。その結果、高レベル検体から低レベル検体へのキャリアオーバーは検出されませんでした。

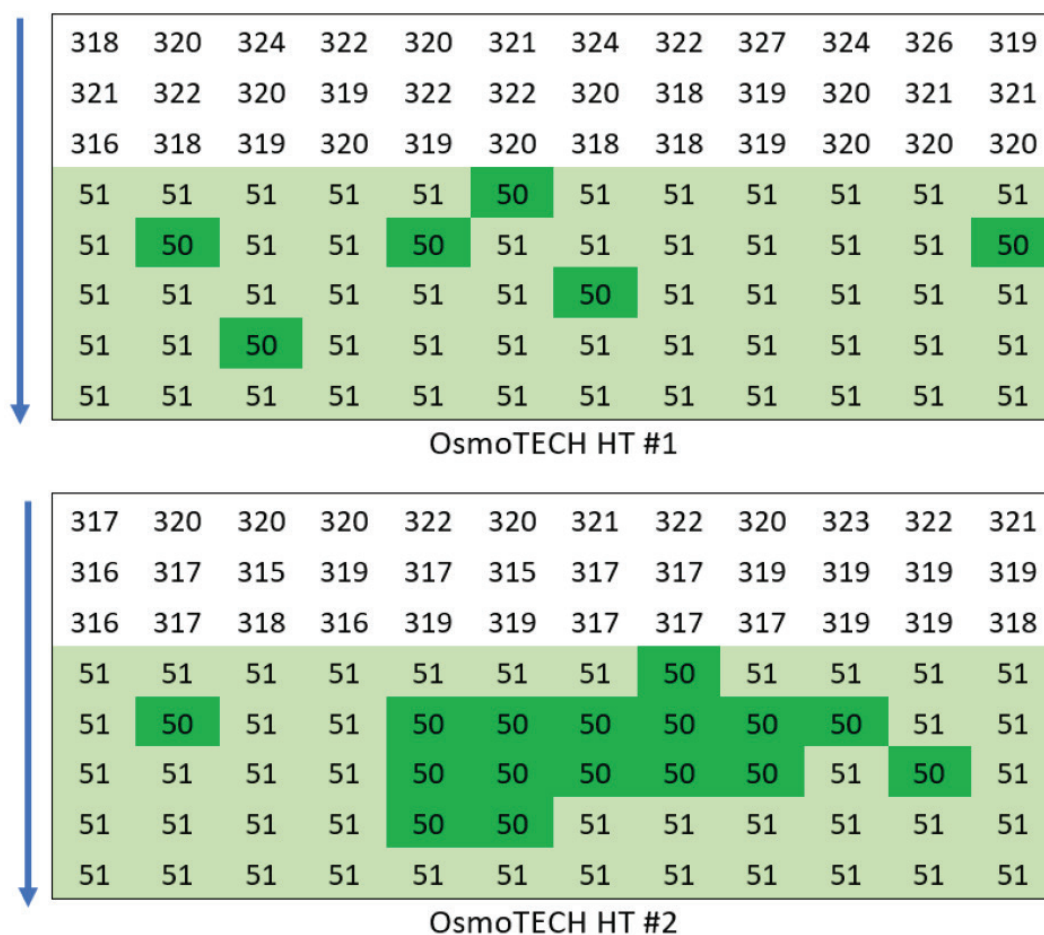


Figure 1. 2枚のプレートを用いた縦列キャリアオーバー試験による浸透圧の測定結果

## プロテインと糖溶液の測定結果

さまざまなBSAとスクロースを含む10種類の溶液を、1台のOsmoTECH HTで測定しました。ウェル当たり単一レプリケートで、1サンプルにつき8ウェルで測定したため、合計8レプリケート測定が実施されました。これらのサンプルの試験中、試験エラーは発生しませんでした。最高濃度のBSAとスクロース（200mg/mL、300mM）を除くすべてのサンプルの%CVは1.5未満で、これらのサンプルで良好な再現性が実証されました。

BSA (mg/mL)	Sucrose (mM)	Mean (mOsm/kg)	SD	%CV
100	100	150.9	1.6	1.1
	200	292.0	3.5	1.2
	300	446.8	3.2	0.7
	350	541.1	5.0	0.9
150	100	176.0	1.5	0.9
	200	329.0	4.3	1.3
	300	523.1	4.6	0.9
200	100	215.6	2.4	1.1
	200	403.3	5.5	1.4
	300	613.6	13.8	2.2

Table 4. 100mg/mL BSA 100mM シュクロースから200mg/ml BSA 300mM シュクロースまでのBSAとシュクロースの測定

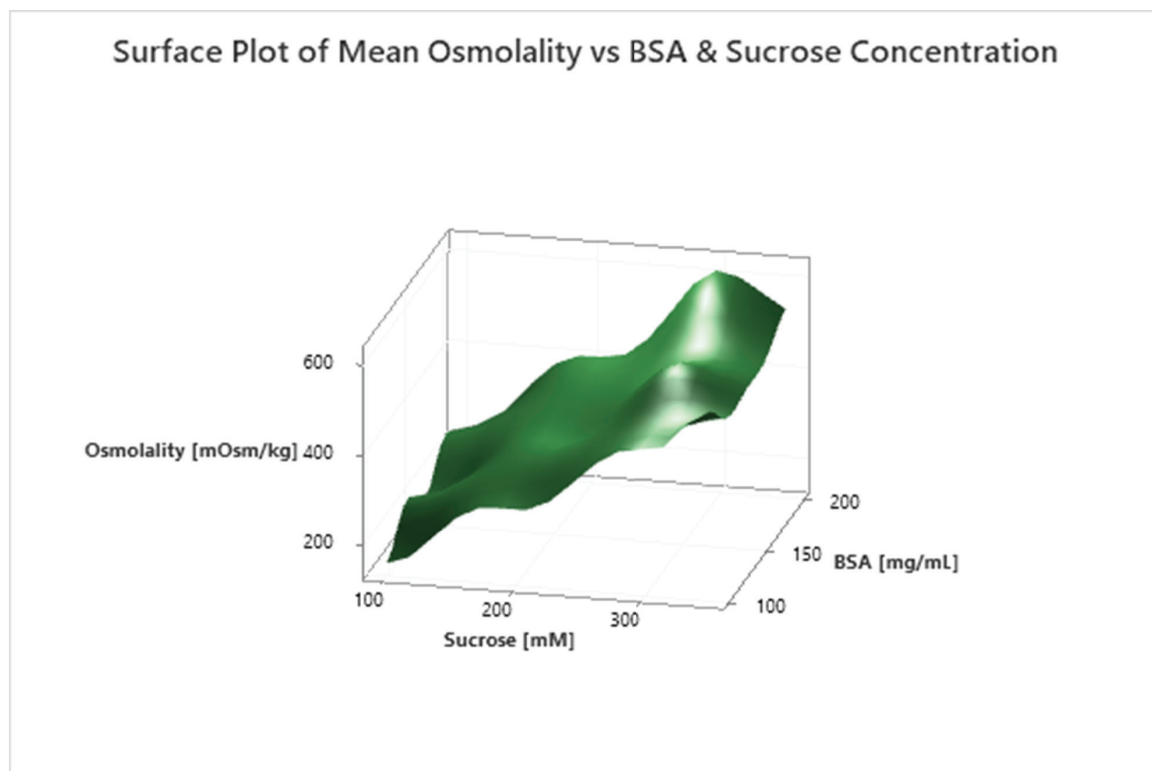


Figure 2. BSAとシュクロース・サンプルの浸透圧の結果を上に表示。BSAとシュクロースの濃度が高くなるにつれて、浸透圧は高くなる。



### 蒸発試験の結果

蒸発は、溶液から水分が除去され、溶液の総溶質濃度が増加するため、浸透圧の結果が予測値よりも著しく高くなることで示されます。

Clinitrol290™を96ウェルプレートに分注し、2台のOsmoTECH HT装置で浸透圧を測定しました。個々の結果はすべて290 ±4mOsm/kg以内でした。各プレートの平均精度結果は、許容仕様の 290 ± 3 mOsm/kg 以内でした。各プレートの精度は1 SD (<3 mOsm/kg) の許容範囲内でした。この浸透圧の結果から、蒸発の形跡は認められませんでした。

	OsmoTECH HT #1			OsmoTECH HT #2		
	Mean (mOsm/kg)	Standard Deviation	%CV	Mean (mOsm/kg)	Standard Deviation	%CV
Clinitrol 290™	290.5	0.92	0.30%	290.9	1.11	0.40%
400 mOsm/kg standard	401.8	1.09	0.30%	401.2	1.17	0.30%

Table 5: 2枚の96ウェルマイクロプレートから異なるOsmoTECH HTで異なる溶液を使用して測定した平均値。

291	291	290	292	290	290	292	290	292	293	293	293
290	290	290	290	290	290	290	290	290	291	291	291
291	291	291	291	290	291	291	291	290	291	290	290
290	291	290	289	290	289	290	291	290	289	290	291
290	291	290	289	293	290	291	290	289	289	291	290
290	291	290	289	290	291	290	291	291	290	291	289
290	291	290	290	290	290	291	291	289	290	289	289
291	291	291	291	292	290	290	291	292	290	291	290

OsmoTECH HT #1

292	291	291	292	291	291	293	291	293	292	291	289
291	291	291	292	292	293	291	292	290	291	290	289
291	291	290	292	291	291	291	291	290	290	289	293
290	290	291	290	291	291	291	290	290	289	289	291
291	291	291	290	292	291	291	291	293	291	289	293
290	291	290	290	291	290	291	290	289	290	289	289
290	291	291	292	292	291	290	291	290	290	290	291
291	292	291	292	292	290	292	293	293	294	289	290

OsmoTECH HT #2

	OsmoTECH HT #1	OsmoTECH HT #2
<b>Mean</b>	290.5 mOsm/kg	290.9 mOsm/kg
<b>SD</b>	0.92	1.11
<b>%CV</b>	0.3%	0.4%

Figure 3: Clinitrol 290™標準液を用い、浸透圧への蒸発の影響を測定するために実施した2種類のマイクロプレートのヒートマップ。

2台の OsmoTECH HT 浸透圧計で、400 mOsm/kg キャリブレーション標準度をフルプレートで分析したプレートの浸透圧の結果。個々の結果はすべて400±4mOsm/kg以内でした。プレートの平均精度結果は、許容仕様の 400 ± 3 mOsm/kg の範囲内です。精度は1SD (≦3mOsm/kg) の許容範囲内でした。この浸透圧の結果から、蒸発の形跡は認められませんでした。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	402	402	401	401	400	400	401	402	404	403	404	401
B	400	400	401	401	402	400	400	401	402	401	401	402
C	401	401	400	401	400	400	401	401	401	402	401	399
D	401	403	401	402	402	402	403	403	403	403	402	402
E	401	402	401	402	401	401	403	403	402	403	403	402
F	402	402	401	401	402	401	402	404	402	403	402	401
G	401	401	402	402	402	401	402	403	402	403	402	400
H	401	403	402	403	403	402	403	404	404	403	403	402

OsmoTECH HT #1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	402	401	402	402	402	400	402	401	404	404	399	400
B	402	401	402	400	402	402	401	401	400	400	400	401
C	400	400	401	403	401	401	402	400	401	401	399	401
D	403	401	401	401	401	400	401	400	401	400	399	401
E	402	401	401	402	400	401	401	401	400	398	400	399
F	401	401	401	401	400	401	400	402	401	401	400	402
G	403	402	402	401	400	401	401	402	404	400	402	400
H	402	402	402	401	401	403	403	404	403	402	403	401

OsmoTECH HT #2

	OsmoTECH HT #1	OsmoTECH HT #2
<b>Mean</b>	401.8 mOsm/kg	401.2 mOsm/kg
<b>SD</b>	1.09	1.17
<b>%CV</b>	0.3%	0.3%

Figure 4: 400 mOsm/Kgの標準度の浸透圧に対する蒸発の影響を調べるために行った2枚のマイクロプレートのヒートマップ。



	Clinitrol 290			400 mOsm/kg standard		
	Mean (mOsm/kg)	Standard Deviation	%CV	Mean (mOsm/kg)	Standard Deviation	%CV
Outer Edge wells	291.01	0.91	0.31	401.76	1.03	0.26%
Inner Wells	290.47	0.61	0.21	401.28	0.65	0.16%

Table 6: 2台の異なるOsmoTECH HT装置で96ウェルマイクロプレートの外側ウェルと内側ウェルの平均値を算出。

## ディスカッション

OsmoTECH HTは、96ウェルマイクロプレートを用いて凝固点降下浸透圧分析をハイスループットで実施するために設計されています。本試験の結果、凍結エラーや異常値などの試験エラーは認められず、結果はすべて装置の仕様範囲内でした。

各サンプルは各ウェルから単一レプリケートで測定されたため、最小サンプル量50 $\mu$ Lで浸透圧の正確な測定に十分であることが証明され、結果的にサンプルの無駄を減らすことができました。また、各マイクロプレート内の結果は、プレート内変動が最小であることを示しています。

キャリーオーバー分析は、マイクロプレート内で複数の種類の検体を使用する場合に非常に重要であり、装置で使用されたサンプルプローブが後続のウェルを交差汚染していないことを証明します。これは、各サンプル間のピペットとサンプルプローブの徹底的な洗浄によって達成されます。これにより、本実験でテストされたサンプルタイプでは、キャリーオーバーの懸念がなくなります。粘性のあるサンプルや粘着性のあるサンプルの場合は、キャリーオーバーの懸念がないか確認するために、同様のキャリーオーバーテストを行うことを推奨します。

ほとんどの検体を2台のOsmoTECH HT装置で試験した結果、装置間のばらつきが最小であることが試験を通して一貫して認められました。

より複雑な溶液を測定するOsmoTECH HTの能力を評価するため、異なる濃度のBSAとシュクロースをモデルとして取り上げました。複雑な溶液は、分子間の相互作用がより複雑なため、凝固温度で安定させるのに、より多くの時間を必要とします。この分子の複雑さが、浸透圧を測定する際に、より複雑な分析をもたらします。OsmoTECH HTを使用して収集したデータは、200mg/mLのBSAと200mMのシュクロースまでの濃度のBSAとシュクロースで、浸透圧を正確に測定できることを示しています（Table 2およびFigure 4）。200mg/mL BSA/300mMシュクロース溶液の分子の複雑さが、一貫した凝固点降下への到達を妨げ、結果として規格外の測定値を示したと考えられます。

蒸発の懸念は、装置が一度に1サンプルを測定することから生じるもので、特に96ウェルプレート全体を測定する場合、測定前にプレートにしばらくサンプルが放置されます。各試料検査には約90秒かかり、96試料のフルプレートには約3時間40分かかりますが、これは正常な条件下では蒸発を許容することになります。この懸念は、プレートに置かれる粘着性の蒸発カバーで解決されます。この実験では、サンプルがテストの順番待ちをしている間に蒸発しないことが実証され、OsmoTECH HT上でのエッジ効果や蒸発の懸念がなくなりました。

要約すると、OsmoTECH HTは高スループットの浸透圧測定を精度と正確さの許容範囲内で自動化できることが示されました。

シングルサンプルや低スループットのマルチサンプル浸透圧計と比較すると、OsmoTECH HTには、他のラボ業務を完了するために立ち去る時間が増えるという利点があります。これは、細胞培養ラボ、溶液調製ラボ、製剤開発ラボなど、大量のサンプルを処理しなければならない環境では特に価値があります。このようなラボで試験されるサンプルは、一般に単純なもの（低濃度溶液、単純な塩および/またはイオン溶液など）であり、本実験のデータで実証されたように、OsmoTECH HTで確実に測定できます。

OsmoTECH HTは、目的のアプリケーションにおいて、技術者による装置への操作を最小限に抑えながら、信頼性が高く、精密で正確な浸透圧測定結果を得ることができます。OsmoTECH HTは、96ウェルプレート上のサンプル位置と各位置のサンプルIDを指定してランをセットアップでき、ランが開始されると、プレート内の指定された各サンプルを自動的に測定します。サンプルの位置とIDはシステムにあらかじめ登録しておくことができるので、よく使用するプレートレイアウトを装置に保存して、あとで使用することができます。さらに、OsmoTECH HTは、従来のTECH浸透圧計と同様に、柔軟なデータ管理機能、堅牢なデータ保全性、cGMP準拠のソフトウェアを備えているため、研究開発からプロセス開発、GMPバイオプロセスまで、さまざまなコンプライアンスニーズのラボに適用できます。

## References

(1) Karmacharya, P., Patil, B.R. & Kim, J.O. Recent advancements in lipid-mRNA nanoparticles as a treatment option for cancer immunotherapy. J. Pharm. Investig. (2022). <https://doi.org/10.1007/s40005-022-00569-9>

輸入販売元

 **KIKO-TECH**  
キコーテック株式会社 事業開発部

本社 大阪府箕面市船場西三丁目10番3号  
〒562-0036 TEL 072(730)6790 FAX 072(730)6795  
東京支社 神奈川県川崎市中原区新丸子東三丁目1200番地 KDX武蔵小杉ビル  
〒211-0004 TEL 044(430)3245 FAX 044(433)4390

<https://www.kiko-tech.co.jp/>

