

表3 その他のバルク水の導電率とTOCの測定結果

会社	導電率(μ S/cm)		温度(°C)	測定装置	TOC(ppb)		測定装置	製造数量 (kL/day)
	インライン	オフライン			インライン	オフライン		
AJ社 A工場 (UF水)		0.67 0.67 0.70	25.0 24.4 26.0	アナテル A643P (HUA社)		67 87 93	アナテル A643P (HUA社)	5
AK社 A工場 (UF水)		0.68 0.70 0.72	25 25 25	アナテル A-1000 S20P Organics Analyzer (HUA社)		96.7 107.6 139.3	アナテル A-1000 S20P Organics Analyzer (HUA社)	
AN社 (Low Pyrogen Water (USP))	0.53 0.57 0.58		19 20 19	200CR(Thornton社)		77 60 53	アナテル アクセス 643P(HUA社)	1.8
AQ社 (UF水)		0.41 0.48 0.40		ES-12(堀場製作所)	13.5 12.1 12.3		ACCURA-H (T&Cテクニカル社)	3 3 3
AS社 A工場 (UF水)		0.78 0.79 0.73	25 25 25	DS-15(堀場製作所)				約80
BM社 (UF水)	0.28 0.29 0.30			200CR(Thornton社) 等	100 87 79		アナテル A-1000 S20(HUA社) TOC-VCSH(島津 製作所)等	1.3 1.3 1.3
BR社 B工場 (RO水)					51 39 28	51 39 28	アナテル アクセス 643(HUA社)	

表4 容器入り滅菌精製水の導電率とTOCの測定結果

会社	導電率 (μ)	温度(°C)	測定装置	TOC (ppb)	測定装置	容量 (mL)	材質
AM社	1.14	20	CM-20S (東亜電波工業)			500	ポリプロ ピレン
	1.21	20					
	1.19	20					
(3年)	1.23	20					

会社欄の()内は保存期間

表5 容器入り注射用水の導電率とTOCの測定結果

会社	導電率 (μ S/cm)	温度(°C)	測定装置	TOC (ppb)	測定装置	容量 (mL)	容器の材質
AM社	1.06 1.19 1.11 (3年) 1.32	20 20 20 20	CM-20S (東亜電波工業)			500	ポリプロピレン
AR社-1 (4年)	2.90 3.10	20 20	CM-40S (東亜電波工業)	408 289	TOC-VCSH (島津製作所)	10	ガラス
AR社-2 (5年)	4.46	20		465		5	ガラス
AV社 (6年)	9.43	25.0	導電率計(京都電子)	91.6	900 Lab (SIEVERS社)	1	ガラス
AX社-1	4 3 3	20 20 20	CM-60 (東亜電波工業)			1	ガラス
AX社-2	2 2 3	20 20 20				20	ガラス (バイアル)
BC社-1 (4年) (4年) (4年)	2.08 1.93 2.10 3.14 2.71 2.59			31.8 41.0 82.1 55.4 52.0 42.8		5	ガラス
BC社-2 (4年) (4年) (4年)	1.34 1.30 1.33 1.85 1.67 1.49			384 434 408 1320 1320 1120		20	ポリエチレン
BC社-3 (3年5箇月) (3年1箇月) (3年)	1.22 1.21 1.27 1.28 1.47 1.44			188 170 335 590 802 857		100	ポリエチレン
BC社-4 (6箇月) (4箇月) (2箇月) (3年4箇月) (3年2箇月) (3年1箇月)	1.34 1.31 1.30 2.00 1.90 1.91		DS-52 (堀場製作所)	2930 2440 756 3180 3150 3090	900 (SIEVERS社)	100	ポリエチレン (ゴム栓付)
BC社-5 (4年) (4年) (4年)	0.95 0.96 0.99 1.13 1.13 1.16			196 190 174 291 277 302		500	ポリエチレン
BC社-6 (3年9箇月) (3年9箇月) (3年9箇月)	1.13 1.13 1.17 1.18 1.20 1.19			185 180 186 241 235 240		1000	ポリエチレン
BC社-7 (1箇月) (1箇月) (製造直後) (5年4箇月) (5年3箇月) (5年1箇月)	1.23 1.19 1.12 1.79 2.24 1.71			119 112 98.8 940 1160 973		1000	ポリエチレン (ゴム栓付)
BD社						1.5	ガラス

会社	導電率 (μ S/cm)	温度(°C)	測定装置	TOC (ppb)	測定装置	容量 (mL)	容器の材質		
BF社-1						0.5	ガラス		
BF社-2						1.0	ガラス		
BG社-1	1.60 1.50 1.49	20 20 20	DS-8F (堀場製作所)	190 175 158	900 (SIEVERS社)	20	ガラス		
(6年4箇月)	2.38	20		202					
(6年4箇月)	2.60	20		1950					
(6年4箇月)	2.73	20		1380					
(5年1箇月)	3.09	20		135					
BG社-2	2.25 2.32 2.59	20 20 20		169 190 249		12	ガラス		
(6年4箇月)	3.35	20		361					
(6年4箇月)	3.37	20		162					
(6年4箇月)	3.24	20		593					
(5年)	3.67	20		2360					
BH社-1						4~50	ガラス (バイアル)		
BH社-2						1~5	ガラス、 プラスチック		
BK社 A作業所-1	0.6 0.5 0.5	25 25 25	CM-60G (東亜電波工業)	376 454 411	TOC-5000A (島津製作所)	500	ポリプロピレ ン		
(2年)	0.5	25		445					
(3年)	0.5	25		457					
(5年)	0.5	25		391					
BK社 A作業所-2	0.6 0.5 0.5	25 25 25		303 457 303		1000	ポリプロピレ ン		
(2年)	0.6	25		326					
(3年)	0.6	25		587					
(5年)	0.6	25		410					
BK社 C作業所	1.21 1.20 1.17	20 20 20		DS-15 (堀場製作所)				20	ポリエチレン
(0.5年)	1.24	20							
(1年)	1.32	20							
(1.5年)	1.39	20							

会社欄の()内は保存期間

表6 製薬用水の医薬品各条に導電率とTOCを規定することに対する意見

会社	意見
AI社	導電率のモニタリングについては、参考情報「製薬用水の品質管理」で、(1)標準温度(20°C)でモニタリングを行う場合、(2)標準温度以外の温度でモニタリングを行う場合のそれぞれの指針が示されています。医薬品各条に規定する際にも、製薬用水と同じく、それぞれの指針を示して規定していただきたい。
AF社	・導電率の測定について:「結晶セルロース」の試験用に下記の機器を持っているため、測定・管理は可能である。 東亜電波工業製デジタル電気伝導率計 CM-30V型 ・TOCの測定について: 現在、オフラインで測定できるTOC計を持っていないので、規定されれば、機器の購入が
BB社	・弊社では、日常的な水質管理をUSPと日局の両方で実施している部分があり、業務の効率化や水質管理に対する考え方の統一という点で、日局の製薬用水各条をTOCと導電率で規定すること、ならびに三極間での調和を望みます。 ・EPではWFIの管理項目としてTOCや導電率の他に、硝酸塩、重金属などが規定されていますが、三極調和の際にはこれらの要否についても御検討いただければと思います。 ・導電率計の電極について、EPで材質などが規定されていますが、国内で探すのが困難でした。導電率を規定する際には、使用電極についての調和も必要ではないかと考えます。 ・今回のテーマから外れるかもしれませんが、医薬品の製造現場ではアルコールなどによる消毒が行われ、このような場所で製薬用水のサンプリングを行った場合に、本来の水質よりも高いTOC結果が得られる場合があります。このような状況でのサンプリングに関する情報(他社での方法、運用)など、運用面での問題についても、今後アンケートの対象としていただければと思います。 ・日局に記載されている純度試験については、試験の簡素化、環境に対する影響を考慮し、機器分析(導電率、TOC)への移行が望ましいと考えています。また、機器分析を行うことで傾向分析管理も可能となりますので、是非、導電率、TOCへの変更の検討をお願い致します。 ・また、導電率とTOCに移行した際に、各試験条件も可能な限りUSP等と同等となることを希望致します(3極それぞれ)
BF社	特に導電率は、溶存炭酸ガスの影響を受けやすいため、検体により、サンプリング・試料調整の方法を規定すべきと考えます。共通試料の測定時には、ある程度の標準操作を示してもらうことを希望します。
BM社	TOC測定においては、検体の状態(インラインで測定する場合とオフラインで測定する場合等)により測定結果に差が生じる可能性があると考えますので、その辺りの規定も考慮いただければと思います。
AB社	製薬用水の医薬品各条の変更(塩化物、硫酸塩等の純度試験の項目⇒導電率、過マンガン酸カリウム還元性物質⇒TOC)に賛成します。
AA社	従来の純度試験から導電率及びTOCでの管理へ変更することについて賛成です。
AD社	固形製剤を含め、製薬用水の品質確保のためにTOCが必須と考えるのであれば、設定するのは良いと思います。製剤の種類毎に製薬用水の基準を設定し、効率的な規格を決めて頂きたい。単に外国薬局方との整合性やTOC装置メーカーのために設定するのは賛成しかねます。
AK社 A工場	現行の日局製薬用水各条に規定された無機塩類等の試験より迅速であり、数値管理できるので好ましいと考えます。 今回のように、共通資料での予備検討のような段階を経て、各社の実態を踏まえてから、基準値の設定を行うことは非常に良いことであると考えます。
AK社 B工場	日局に規定することは良いと考えます。B工場には測定装置がなく、現状はA工場での測定としております。今後は、当工場においても測定装置を購入し、常時実施可能な状態にしたいと考えます。
AO社	1. 導電率について: 現在日局15では導電率の測定時に温度の規定がありますが、各社より市販されている導電率計は温度補正式により補正して算出する機能があるため、測定時の温度についてはフレキシブルに対応できる状況であります。USPについても同じですが、特に仕込み水として用いる製薬用水の評価においては、公定書に準拠した方法を求められることから、温度補正機能をわざわざOFFにして換算表より確認している状況です。今後、この辺りの公定書と実状との格差を擦り合わせて頂くことを希望します。 2. TOCについて: 現在、RO膜によるイオン交換が主流となってきていますが、現在もイオン交換樹脂(混床式純水装置)により製した精製水を使用している企業も多くあると思います。各レギュレーションもROによる精製水についてはTOCの基準を設けていますが、イオン交換樹脂による基準は設けていないのが現状です。過マンガン酸カリウム還元性物質試験で定性的に確認することになってはいますが、基準値に格差があります。今後、イオン交換法による精製水についても推奨値の設定を希望します。
AM社	なるべく早い時期に規定していただきたい。
AL社	導電率やTOCで規定されることに賛成です。規定されるに際し、以下の点を考慮お願いいたします。 ・サンプリングポイントによる測定値の変動(インラインを含めてサブリングポイントの定義、など) ・水のロットの管理など
AQ社	製造用水、特に注射用水は常時使用しており、迅速に品質評価を行うため、日局参考情報においても日常管理には導電率、TOCによる適切な管理を推奨しております。したがって、各条における製造用水についても、同様な考え方に立って、数多くのデータを収集して基準をご提示頂ければと存じます。
AS社	弊社では容器入りの水は取り扱っておりません。1.のデータは自社での製造専用のデータです。 導電率とTOCによる規定について: 特に問題ありません

会社	意見
AU社	イオン交換樹脂の樹脂交換や樹脂再生後にTOCが大きく上昇する傾向があり、アラートレベル、アクションレベルの設定が難しい。D工場では、精製水の導電率の基準値は $1.0 \mu\text{S/cm}$ 以下としている。
AW社	・校正手順、評価基準等に関して各薬局方と調整いただきますようお願いいたします。 ・時期尚早と考えます。原薬(経口製剤用)は最終工程においても製薬用水として水道水を用いているため、各条に導電率とTOCを規定した場合、基準値によっては使用不可となる可能性が高い。また、水道水の処理が必要となるため、設備の改修も必要となる。
AY社	過マンガン酸カリウム還元性物質を有機体炭素(TOC)に変更することには、精度及び試験の簡便性の点からも賛成です。
AZ社	・医薬品各条にTOCによる規格を設定するには、その測定原理、装置を十分考慮した内容にするため、装置メーカー等とも情報交換を行って検討する必要がある。 ・導電率、TOCを規定した場合、3薬局方間の国際調和も懸案し、現行の医薬品各条の規格項目の見直しが必要と思われる。
BP社	導電率とTOCで規定することには特に意見はありません。これらの測定項目は主にインラインで常時モニタリングしていますが、これらの結果をもって品質試験結果の代用ができるよう、検討をお願いいたします。それであれば、TOC計を新たに購入する必要性も生じます。
BQ社	無機塩類や過マンガン酸カリウム還元性物質などの試験項目を廃止して、導電率とTOCによる管理にすることは賛成である。ただし、設備的な問題があるので、必須とすると問題がある。経過的措置として、現行の試験項目での適合、「又は導電率とTOCの規格への適合」とするのが現実的かと思う。

表7 共通試料一覧

検体	提供会社	試料の内容	容量 (mL)	材質	製造年月日	製造番号	使用期限	容器の備考	滅菌条件
1	BS社	精製水	500	ポリエチレン		6019	2010年11月		
2	AM社	滅菌精製水	500	ポリプロピレン	2006年8月24日	A68TS1	2009年8月	酸化防止剤わずかに添加	105°C、40分
3	BT社	滅菌精製水	500	ガラス(瓶)		606028	2009年6月		
4	BC社	注射用水	5	ガラス(アンブル)		06K27C	2009年11月	添加剤無添加	
5	BH社	注射用水	5	ポリエチレン	2006年7月	06L08	2009年7月		ろ過滅菌、 105°C、30分
6	BG社	注射用水	20	ガラス(アンブル)	2006年11月29日	660120			121°C、20分
7	AX社	注射用水	20	ガラス(ハイアル)				ホウ珪酸ガラス ブタジエンゴム/シリコン コーティング	
8	BK社	注射用水	20	ポリエチレン	2006年9月4日	K6173	2009年9月	無添加	無菌充てん
9	BC社	注射用水	20	ポリエチレン		61112C	2009年11月		無菌充てん
10	BK社	注射用水	500	ポリプロピレン、 ゴム栓	2006年6月16日	6F85N	2011年6月	イルガノックス(容器の酸化防止剤)500ppm	オートクレーブ
11	BC社	注射用水	500	ポリエチレン		61105D	2009年11月		無菌充てん

表8 共通試料の導電率測定結果

単位: $\mu S/cm$

検体	測定機関											平均	SD	
	AJ社工場	AB社-2	BF社-2	AU社B工場	AS社	BK社	AA社	BG社	AB社-1	BO社	BB社B工場			BF社-1
1	0.907	1.023	0.967	0.837	1.077	1.248	1.513	0.860	1.043	0.384	0.993	0.943	0.983	0.264
2	1.077	1.340	1.120	1.210	1.331	1.415	2.120	1.038	1.267	0.563	1.067	1.057	1.217	0.360
3	0.653	0.763	0.723	0.687	0.719	0.964	0.738	0.639	0.843	0.879	0.737	0.830	0.765	0.097
4	1.677	2.207	1.990	2.407	1.774	2.053	2.267	1.811	2.180	1.962	1.940	2.183	2.038	0.219
5	-	-	-	-	1.293	1.557	2.177	1.205	1.463	1.271	1.180	1.177	1.306	0.148
6	1.390	1.907	1.630	1.913	1.637	1.646	1.574	1.369	1.807	1.724	1.700	1.803	1.675	0.175
7	2.840	3.217	3.150	2.893	2.977	2.557	3.227	2.450	2.953	2.533	2.943	2.920	2.888	0.259
8	1.113	1.537	1.283	1.610	1.286	1.427	2.627	1.116	1.500	1.316	1.183	1.157	1.321	0.175
9	1.103	1.413	1.233	1.447	1.267	1.420	2.653	1.082	1.420	1.165	1.220	1.027	1.254	0.152
10	1.100	1.353	1.190	2.020	1.210	1.382	1.636	1.007	1.240	0.575	1.187	1.077	1.248	0.350
11	1.093	1.353	1.170	1.180	1.254	1.418	1.959	1.019	1.267	0.523	1.260	1.043	1.212	0.328
装置 メー 力一	HUA社	HUA社	HUA社	HUA社	東亜電波 工業	東亜電波 工業	東亜電波 工業	堀場製作 所	堀場製作 所	堀場製作 所	COS社	横河電機		
機種	アナテル A643P	アナテル A643P	アナテル アクセス 643	アナテル A643P	CM-60S	CM-60G	CM-60G	DS-8F	ES-12	DS-15	CHE-12	Model SC82		
セル /セル 定 数	Sn=100%	0.58			1.020	CT- 57101C/1 0.05m-1	10.17/m	1.063×0.1	9382-10D /1.097	#3551- 10D / 0.0981	3582(Lot.2 07076)/ 1.055	4.70		

注) -:測定不可、各検体の測定結果の平均値については、□の値を除いて計算した。□の値については、スミルノフの棄却検定を行った結果、危険率1%で有意に他の値からかけ離れた異常値と判断されたので、平均値の計算から除外した。

表9 共通試料のTOC測定結果

単位: ppb

検体	測定機関											平均	SD	
	AJ社A工場	AB社-2	AU社B工場	BF社-2	AB社-1	BG社	BF社-1	BK社	BO社	BB社B工場	AA社			AS社
1	217	195	198	236	159	156	169	166	127	184	345	142	177	33
2	243	202	207	253	170	185	200	175	170	195	315	161	206	44
3	310	273	230	270	197	303	331	297	292	262	371	227	280	48
4	85	158	267	117	162	123	90	116	56	241	148	101	139	62
5	-	-	-	3415	2583	2993	3143	2680	228	3404	2805	2200	2830	395
6	113	135	174	100	193	141	176	237	222	306	219	188	184	58
7	328	365	301	494	261	324	387	393	810	533	635	276	426	165
8	788	626	662	276	462	639	686	670	631	674	751	549	618	137
9	649	493	595	429	399	527	539	582	504	509	471	463	513	71
10	280	228	523	955	209	267	246	251	239	225	399	185	253	58
11	372	351	303	762	232	326	347	299	327	336	469	286	332	59
装置 メーカー	HUA社	HUA社	HUA社	HUA社	SIEVERS社	SIEVERS社	SIEVERS社	島津製作所	島津製作所	島津製作所	島津製作所	T&Cテクニカル社		
機種	アナテルA643P	アナテルA643P	アナテルA643P	アナテルアクセス643	900 Lab	900	810	TOC-5000A	TOC-5000A	TOC-5000	TOC-VCPH	Pheonix 8000		

注) 一:測定不可, 各検体の測定結果の平均値と標準偏差については、□ の値を除いて計算した。検体5のBF社-2の測定値 3415ppb については、エラー表示とともに示された数値であるので、異常値として平均値の計算から除外した。また、BO社の測定値 228ppb も、他社の測定値からかけ離れた値であり、かつ、測定を繰り返すと、2500ppb 程度の高い値が出たり、200ppb 程度の低い値が出たりすることであるので、これも異常値として平均値の計算から除外した。その他の □ の値については、スミルノフの棄却検定を行った結果、危険率1%で有意に他の値からかけ離れた異常値と判断されたので、平均値の計算から除外した。

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)
分担研究報告書
生物薬品の試験法及び各条規格の改正と国際調和に関する研究
ーエリスロポエチンのキャピラリー電気泳動および
SDS-PAGE による規格試験ー

分担研究者 早川 堯夫 医薬品医療機器総合機構
協力研究者 掛樋 一晃 近畿大学薬学部生物情報薬学研究室教授

研究要旨

生物由来医薬品、特にタンパク質性医薬品は細胞等による生合成を生産に利用することから、構造上の不均一性が存在する場合が多い。特に糖タンパク質性医薬品は、糖鎖による翻訳後修飾によりグリコフォームと呼ばれる多様な分子種の混合物となることは本質的に避けられない。一方、タンパク質性医薬品の不均一性は医薬品の品質及び特性を規定するものであり、その不均一性を特性解析し製品間さらに製造工程の変更においてもその恒常性が確保されなければならない。このような背景のもと、規格および試験方法に関して国際的な整合性を図るため、ICH によってガイドラインが作成されるとともに、我国においても生物由来医薬品の試験に適したキャピラリー電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などのいくつかの試験法が日本薬局方フォーラムに収載されるなど、国際的な調和を図るための作業が進められている。ヨーロッパ薬局方(European Pharmacopoeia 5.3: Erythropoietin concentrated solution, pp3494)に収載されているエリスロポエチンは、標準品を設定するために、これまでに二度ヨーロッパ薬局方収載の方法に基づいて各国で試験が行われたが、2006 年 11 月から 2007 年 2 月にかけて各国で複数の研究機関およびメーカーの協力により第 3 回目の試験が行われた。本研究では、ヨーロッパ医薬品品質管理部門(EDQM)からキャピラリー電気泳動法および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を使用するエリスロポエチンの規格試験について実施した”Collaborative study for the replacement of erythropoietin BRP(BSP091 study)”の結果について述べるとともに、エリスロポエチンの規格及び試験方法について EP が設定している試験法について考察した。

A. 研究目的

バイオテクノロジーの進歩に伴い、生理活性タンパク質やモノクローナル抗体などの大量生産が可能となり、様々な種類のバイオ医薬品が医療の現場に供給され、我国のバイオ医薬品市場は 5000 億円を越えるまで成長した。今後、抗体医薬品や糖鎖改変型タンパク質性医薬品、さらに実現が予測されるバイオ後続品の登場によりその市場規模は益々大きくなる

と考えられる。

バイオ医薬品の多くは動物細胞などを生産系として用い、目的物質を高度に精製して利用される。一方、成分が比較的不安定であり、構造上不均一なものが生産される可能性が高いため、設定した規格及び試験方法に基づいて一連の適切な分析手法により特性解析を行い、品質及び恒常性を厳密に確保しなければならな

い。

しかし、糖タンパク質でしばしば観察されるグライコフォームのように、製品が多様な分子種の混合物である場合、不均一性そのものが医薬品の品質を規定するものであり、製品の恒常性を保証するためには目的成分の解析に適した規格及び試験方法を設定する必要がある。以上のような背景のもと、ICH がバイオ医薬品に関する規格及び試験方法に関する国際調和を図るためのガイドラインを作成している他、米国薬局方(USP)や EDQM などの各国の関係機関は当該医薬品の標準品を提供し、規格及び試験方法の国際的な整合性に努めている。

エリスロポエチンは、コアタンパク質のアミノ酸が 165 残基からなる酸性糖タンパク質であり、腎性貧血等の治療薬として世界各国で使用されている。EDQM は ICH のガイドラインに準じた試験法により、標準品として供給するエリスロポエチン

B. 研究方法

【実験材料】

エリスロポエチン(BRP2 及び cBRP3、32,500 IU/バイアル = 250 µg/バイアル)は EDQM から提供された。キャピラリーゾーン電気泳動用の緩衝液に用いる尿素は MP Biomedicals の Ultra Pure grade を、プトレシンはナカライテスクの特級品、キャピラリーは GL サイエンス製の溶融シリカキャピラリーを使用した。脱塩には限外ろ過フィルターとして Ultrafree-MC(ミリポア社製)を使用した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動でイムノブロットには 1 次抗体としてウサギ抗エリスロポエチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を、2 次抗体としてウシ抗ウサギ IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

【キャピラリーゾーン電気泳動】

の規格を設定し、世界各国の研究機関との共同作業により設定した規格と試験法の妥当性について評価を行っている。これらは、国内におけるバイオ医薬品の試験や評価を行う場合の基本にもなるため、現行の規格と試験方法を十分に吟味に、さらに進歩した分析技術に基づく新しい試験方法や規格を積極的に提言していくことが重要である。

本研究では、ヨーロッパ薬局方(EP)が供給するエリスロポエチン標準品の次期ロット移行に伴う EDQM との共同作業として実施した”Collaborative study for the replacement of erythropoietin BRP(BSP091 study)”についてキャピラリーゾーン電気泳動法とポリアクリルアミドゲル電気泳動/イムノブロット法により現ロットおよび次期ロットの特性解析を行った結果について報告する。同時に、EDQM が提案するエリスロポエチンの規格及び試験方法についての有効性と問題点について考察した。

装置は Beckman MDQ(Beckman Coulter)を用い、内径 50 µm、全長 107 cm の溶融シリカキャピラリーを分析用キャピラリーとして用いた。泳動用緩衝液は、トリシン 447.9 mg、塩化ナトリウム 146.1 mg、酢酸ナトリウム 205 mg、尿素 105.1 g を約 100 mL の水に溶解後、プトレシン 55 µL を加え、酢酸で pH 5.55 に調整した後、全量を 250 mL とした。印加電圧は 15.4 kV、分析温度は 35 °C とし、検出には 214 nm の紫外外部吸収を用いた。また、分析用試料は erythropoietin BRP2 と cBRP3 をそれぞれ 250 µL の超純水に溶解し、限外ろ過フィルター(MWCO: 10,000)を用いて遠心ろ過した。フィルター上の溶液に超純水(200 µL)を加え遠心分離する操作を 2 回行ない、フィルター上に残ったエリスロポエチンを 1 mg/mL となるように超純水(250 µL)に溶解し分析用試料とした。分離用キャピラリーの

コンディショニングは 20 psi で 1.5 分間、水による洗浄を 3 回繰り返し、次に同じ条件で水酸化ナトリウム水溶液による洗浄を 3 回行い、そのまま 60 分間放置した。その後水で 2 回洗浄し、CZE 緩衝液で 2 回洗浄した。各分析間の洗浄は 20 psi で 10 分間水により洗浄し、20 psi で 5 分間水酸化ナトリウムにより洗浄し、最後に 20 psi で 10 分間 CZE 緩衝液によりコンディショニングを行った。試料溶液は 2 psi で 15 秒間注入し、分析時間は 80 分とした。

【ポリアクリルアミドゲル電気泳動】

電気泳動装置は Electrophoresis Power Supply-EPS610(Amersham Biosciences)を用いた。エリスロポエチン(BRP2 及び cBRP3)の各 1 バイアルに水(250 μ L)を加えて溶解し、約 1 mg/mL の濃度に調整した。また約 1 mg/mL の濃度に調整した試料を水で 10 倍に希釈して、約 0.1 mg/mL の濃度の溶液も準備した。SDS-PAGE 用の試料緩衝液はトリス 3.78 g、SDS 10 g およびブロモフェノールブルー 100 mg を水約 150 mL に溶解後、グリセロール(50 mL)を加えて塩酸で pH 6.8 に調整した後、全量を 250 mL としたものを使用した。SDS-PAGE はアクリルアミド/ビスアクリルアミドゲル(分離ゲル：12% T/2.6% C、濃縮ゲル：3% T/2.6% C)を使用し、約 1 mg/mL の濃度と約 0.1 mg/mL の濃度の試料をそれぞれ SDS-PAGE 用試

料緩衝液と 1 : 1 で混合した溶液を分析試料とした。電圧は濃縮ゲル部分では 40 mA で約 1 時間、分離ゲル部分では 60 mA で約 3 時間印加した。約 1 mg/mL の試料溶液を分析したゾーンはクーマシー染色液(0.2%w/v Coomassie Brilliant Blue R250 の 40%メタノール-10%酢酸水溶液)で染色した。

【イムノブロット】

前述の SDS-PAGE で泳動された約 0.1 mg/mL の濃度の試料溶液を分離したゾーンは、BIO-RAD TRANS-BLOT SD を用いて 100 mA、50 分間 PVDF 膜に転写し、3%スキムミルク-0.05%Tween20 を含む PBS で 1 時間ブロッキングし、0.05%Tween20 を含む PBS で 4 回洗浄した。ウサギ抗エリスロポエチン抗体を 0.05%Tween20 PBS 溶液で 6 μ g/5 mL の濃度に調整し、その全量を用いて膜上の EPO と 14 時間反応させた。洗浄し、二次抗体としてウシ抗ウサギ IgG-HRP を同様に 6 μ g/5 mL の濃度に調整し、その全量を用いて 1.5 時間反応させた。洗浄後、アビジン DH (25 μ L) -ペルオキシダーゼ標識化ビオチン H (25 μ L) に 0.05%Tween20 を含む PBS を加えて 5 mL とした溶液を反応させた。洗浄後、0.05%DAB 及び 0.0031%過酸化水素を含む 100 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 20 mL に浸し、茶色に発色した EPO のバンドを検出した。

C. 結果及び考察

生物由来医薬品の試験・評価法は対象がタンパク質性医薬品の場合、構造上の不均一性が生じることからその品質及び特性について製造ロット間で恒常性を確保するために、一元化された基準のもとに規格を設定し、各種理化学的手法によって確かな同等性を確保する必要がある。本研究では、糖タンパク質性医薬品であ

るエリスロポエチン標準品の次期ロットへの移行に伴い、EDQM がエリスロポエチンの評価方法として採用しているポリアクリルアミドゲル電気泳動-イムノブロット法、ペプチドマッピング、キャピラリーゾーン電気泳動法、サイズ排除クロマトグラフィー、Polycythaemic mouse bioassay、Normocythaemic mouse bioassay の 6 種の方法の内、ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動-イムノブロットイング法とキャピラリーゾーン電気泳動法について検討した。

【キャピラリーゾーン電気泳動】

エリスロポエチン BRP2 および cBRP3 を各計 3 回分析した結果を Fig.1 に示す。いずれのクロマトグラムにおいても 7 本のピークが 50 分から 60 分の間に観察され、 $R_s > 1.5$ で良好に分離することができた。エリスロポエチンには N-結合型糖鎖の結合部位が 3 箇所、O-結合型糖鎖の結合部位が 1 箇所存在し、等電点の異なるタンパク質の分子種であるグライコフォームが存在することが知られている。

りも優れた分離性能を示す。今回の試験でのグライコフォームの泳動時間ならびに相対ピーク面積の再現性を Table1 および Table2 に示す。8 種類の isoform の内、最も早く観察される isoform 1 は検出限界以下であり、ピークを確認することはできなかった。また、BRP2 と cBRP3 で各 isoform の平均泳動時間は isoform 2 がそれぞれ 50.8 分と 51.7 分、isoform 3 で 51.9 分と 52.7 分、isoform 4 で 53.1 分と 53.8 分、isoform 5 で 54.4 分と 55.0 分、isoform 6 で 55.7 分と 56.3 分、isoform 7 で 57.1 分と 57.6 分、isoform 8 で 58.2 分と 58.7 分であった(Table1)。また、相対ピーク面積は BRP2 と cBRP3 について

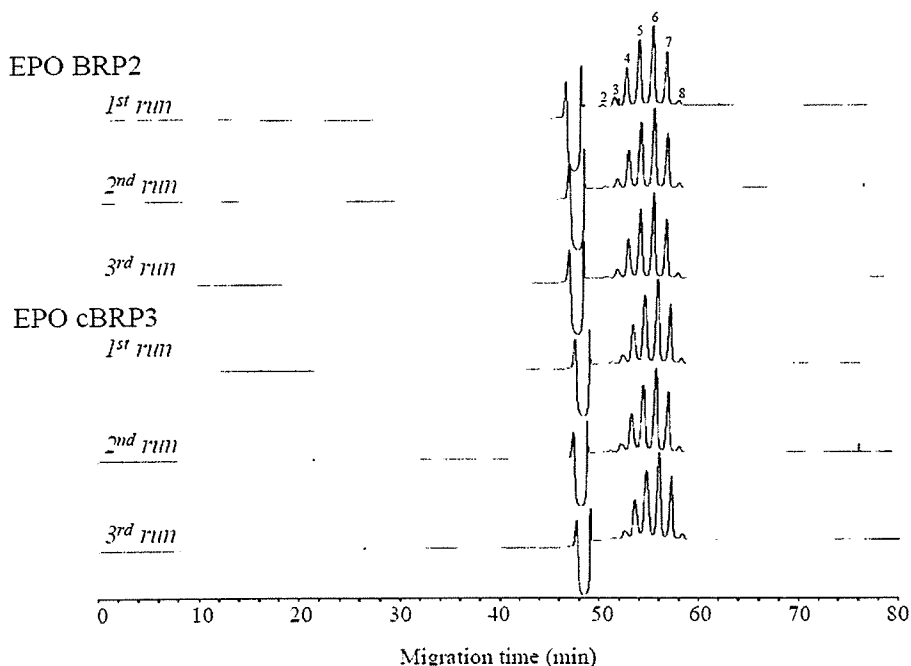


Fig.1 Analysis of erythropoietin BRP2 and cBRP3 by capillary electrophoresis

Fig.1 で観察された 7 本のピークはエリスロポエチンのグライコフォームの違いに基づくものであり、BRP2 ならびに cBRP3 とともに良好な分離が達成された。

キャピラリー電気泳動法による糖鎖構造の異なる分子種の検出は、過去に $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質にも適用され高い分離能が評価され、等電点ゲル電気泳動法よ

isoform 2 で 1.05% 及び 0.73%、isoform 3 で 4.40% 及び 3.54%、isoform 4 で 16.64% 及び 15.66%、isoform 5 で 27.82% 及び 27.90%、isoform 6 で 29.83% 及び 31.49%、isoform 7 で 18.71% 及び 19.12%、isoform 8 で 1.54% 及び 1.55% であり、それぞれ EDQM が規定する各 isoform 組成値に適合した (Table2)。また、isoform 5 と isoform

6の間の分離度(Rs)はBRP2の3回の平均がRs=2.1、cBRP3の3回の平均がRs=1.9であり、isoform 5とisoform 6のRsがRs>1という基準を満たした。さらにisoform 2の泳動時間の相対標準偏差はBRP2では0.73%、cBRP3では0.17%であり、基準値のisoform 2の泳動時間の相対標準偏差が2%以下という基準を満たし

”solution”において、エリスロポエチンのグライコフォーム評価技術の等電点電気泳動法からキャピラリーゾーン電気泳動法への移行のための共同作業に参加している。Fig.1で示したように、キャピラリーゾーン電気泳動法によるエリスロポエチンのグライコフォーム評価技術は、高い分離能と定量性を兼ね備えた方法であ

Table 1 Determination of migration times of glycoforms of erythropoietin BRP2 and cBRP3 by capillary zone electrophoresis method

	BRP2		cBRP3	
	Time (min)	RSD	Time (min)	RSD
Isoform 1	—	—	—	—
Isoform 2	50.8	0.732	51.7	0.167
Isoform 3	51.9	0.730	52.7	0.320
Isoform 4	53.1	0.635	53.8	0.334
Isoform 5	54.4	0.572	55.0	0.243
Isoform 6	55.7	0.520	56.3	0.379
Isoform 7	57.1	0.460	57.6	0.393
Isoform 8	58.2	0.246	58.7	0.418

Table 2 Determination of peak areas of glycoforms of erythropoietin BRP2 and cBRP3 by capillary zone electrophoresis method

	BRP2			cBRP3		
	Area (Mean)	RSD	Area (%)	Area (Mean)	RSD	Area (%)
Isoform 1	—	—	—	—	—	—
Isoform 2	6554	5.3	1.05	5681	11.0	0.73
Isoform 3	28154	8.5	4.40	28099	8.2	3.54
Isoform 4	109236	0.5	16.64	126960	2.2	15.66
Isoform 5	187138	0.3	27.84	231140	0.8	27.90
Isoform 6	205585	0.3	29.83	267334	1.5	31.49
Isoform 7	132053	1.2	18.71	165850	1.7	19.12
Isoform 8	11106	7.5	1.54	13755	3.9	1.55

た。これらの結果から、現行ロットであるBRP2と次期ロット候補のcBRP3はキャピラリー電気泳動で同等性が確保されていることがわかった。

我々は1997年末から1998年始めに実施された“Collabulative study for the replacement of isoelectric focusing test by capillary zone electrophoresis test in the monograph on erythropoietin concentrated

るが、連続分析により分離能が顕著に低下するという問題があった。今回のBSP091 studyと前回実施時の試験では電気泳動用緩衝液に若干変更点があったため、再現性と頑健性について評価した。前回実施時における分析条件を用いて繰り返し分析を行った結果をFig.3aに示す。前回の条件では1~4回目の分析までは良好な分離を示すものの、分析を繰り返

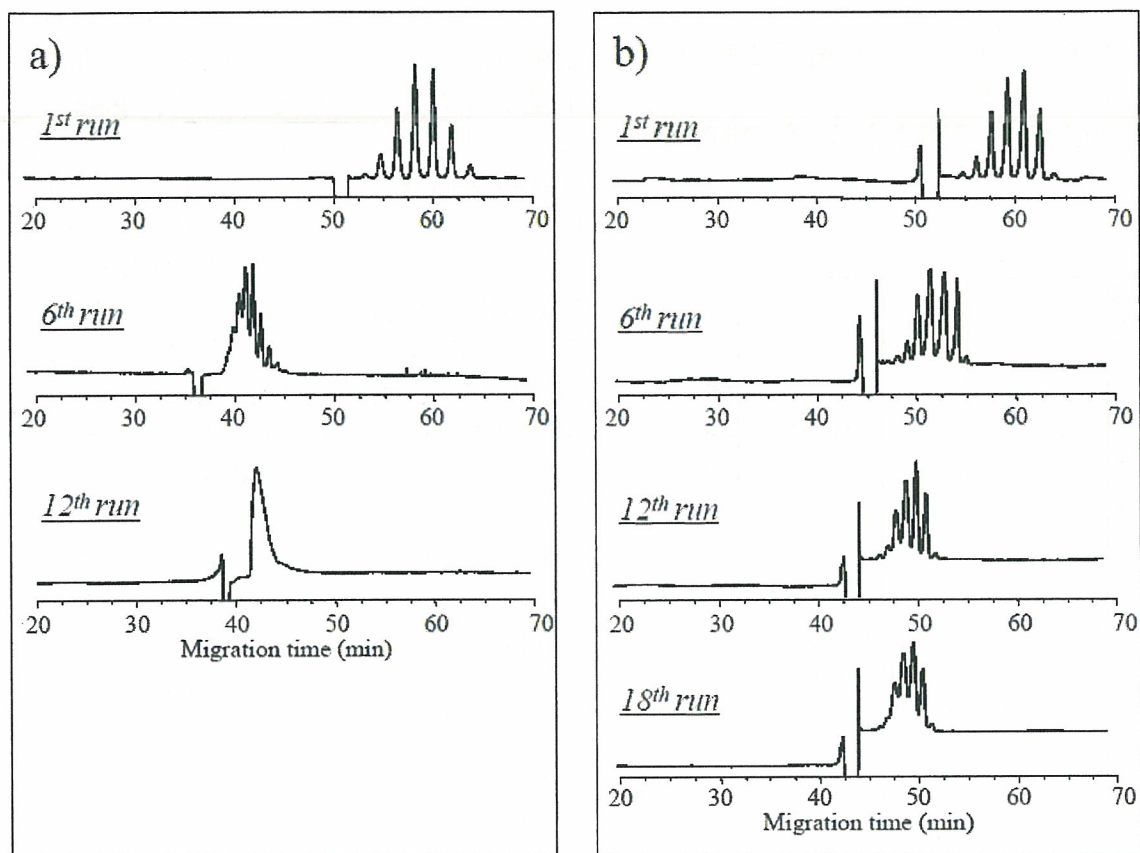


Fig. 2 Repetitive analysis of erythropoietin preparation.
a) previous method, b) BSP091 study method

すと 6 回目の分析では各アイソフォームピーク間の分離が著しく低下し、12 回目の分析では全く分離されず単一のブロードなピークとなった。また分離能の低下は 0.1 N NaOH や 0.1 N HCl による洗浄を行っても全く回復しなかった。一方、BSP091 study に記載の分析条件では、1~4 回目までの分析では前回の条件を用いた場合と同様の分離を示し、6 回目以降でグリコフォームピークの泳動時間は早くなるものの、グリコフォームの分離は保たれていた。12 回目以降では isoform 2 や isoform 3 の分離は徐々に低下し、18 回目の分析では分離されなかった。また、分離能の低下は 0.1 N NaOH による洗浄によって回復することができた。BSP091 study と前回実施の試験での電気泳動条件の違いは、泳動用緩衝液に

添加するプトレシン濃度が、BSP091 study では 2.5 mM であるのに対し、前回実施の試験では 0.025 mM であり、分離能の低下と再現性の違いがプトレシン濃度に起因すると考えられる。このことから繰り返し分析の再現性を確保するには泳動用緩衝液中のプトレシンの濃度が重要であると考えられる。また、連続分析により泳動時間の再現性低下の原因としてキャピラリーのシラノール基の再生不良が考えられた。実際、グリコフォーム分離度の低下は 0.1 M の水酸化ナトリウムでキャピラリーを洗浄することで回復することができた。“BSP091 study”に記載の方法では、水酸化ナトリウムによる洗浄時間は 20 psi で 5 分間としているが、より高い再現性を達成するためには水酸化ナトリウムによる洗浄時間を延長

することが望ましいと考えられる。

【ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノブロット】

約 1 mg/mL の BRP2 および cBRP3 を

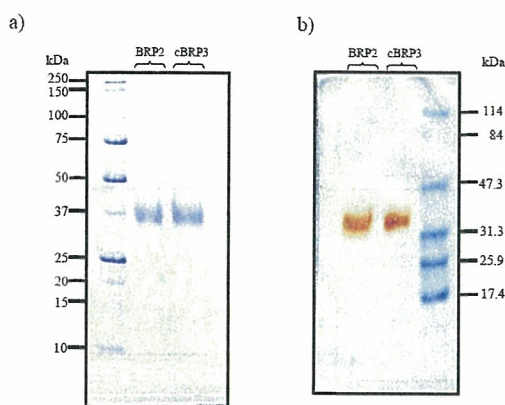


Fig.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis a) and immunoblotting b) of erythropoietin preparations

SDS-PAGE 後クーマシーブルーにより染色したところ、BRP2 および cBRP3 ともに、37 kDa より低分子側にブロードなバ

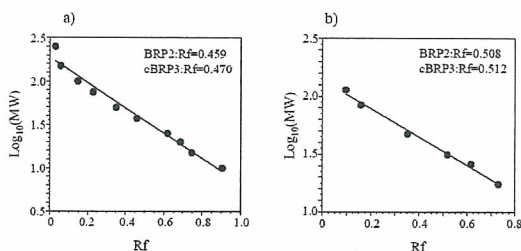


Fig.4 Relationship between Log_{10}Mw and R_f values

ンドが同程度の強度で観察され、他にバンドが確認されなかったことから両エリスロポエチン標品が同等であることが確認できた(Fig.3a)。また、分子量マーカーの分子量と R_f の関係から両エリスロポエチン標品の分子量は 34 kDa と算出さ

D. 結論

本研究ではヨーロッパ医薬品品質管理部門(EDQM)が提供するエリスロポエチン標準品(BRP2)の次期ロット(cBRP3)移行

れたが、EDQM の Safety Data Sheet ではエリスロポエチンの分子量は 30.6 kDa と記載されており、SDS-PAGE では理論分子量より大きく見積もられた(Fig.4a)。次に、ヒトエリスロポエチンのアミノ酸 28-189 番目をエピトープとして認識する抗ヒトエリスロポエチン抗体を用いたイムノブロットを行った結果、BRP2 および cBRP3 ともに分子量マーカー 31.3 kDa と 47.3 kDa の間にブロードなバンドが同程度の強度で観察され、他にバンドは検出されなかった(Fig.3b)。また、クーマシーブルーによる染色の場合と同様にして、イムノブロットにより観察されたバンドの移動度から分子量を計算したところ、両エリスロポエチン標準品の分子量は約 33 kDa と算出された(Fig.4b)。クーマシー染色法とイムノブロットの両方法において BRP2 ならびに cBRP3 は同じ泳動位置に同じ強度のバンドを与えたことから、次期ロットである cBRP3 は現ロットである BRP2 と同等の物理化学的特性を持つことがわかった。

エリスロポエチンを SDS-PAGE により分離し、クーマシーブルー染色ならびにイムノブロット法により検出する試験法は、エリスロポエチンのグリコフォームの総和としての均一性確認試験、純度および不純物の確認試験として有効であった。しかしながら、SDS-PAGE では理論分子量より大きく算出されることに加え、単純タンパク質に比べブロードなバンドとして観察されることから、不均一性を持つことは明らかであるが、その不均一性がどのような意味を持つかを評価することはできなかった。

に伴う ”Collaborative study for the replacement of erythropoietin BRP(BSP091 study)”として、両ロットの特性解析を行い、EDQM が提案するエリスロポエチンの規

格及び試験方法についての有効性と問題点について考察した。

“BSP091 FINAL STUDY PROTOCOL”に従いキャピラリー電気泳動法により、エリスロポエチンBRP2及びcBRP3の分析を行った結果、いずれも7種のアイソフォーム(isoform 2-8)を高い分離能で分離でき、観察された各アイソフォームの相対比はEDQMの規格値に適合した。また、isoform 5とisoform 6の分離度(Rs)は $R_s > 1$ であり、isoform 2の泳動時間の相対標準偏差が2%以下となり規格値を満たした。一方、ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びイムノブロット法においてBRP2及びcBRP3は、クーマシー染色法では約34 kDaに、イムノブロットでは約33 kDaにそれぞれ一本のブロードなバンドが観察され、他に不純物等に由来するバンドは観察されなかった。以上の結果から次期ロットであるcBRP3は現ロットであるBRP2と同等の物理化学的特性を持つことがわかった。

BSP091 studyではエリスロポエチンの物理化学的特性解析法として、キャピラリー電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動/イムノブロット法その他、ペプチドマッピング法、サイズ排除クロマトグラフィーが採用されている。いずれの方法も汎用性の高い分析方法であり、単純タンパク質のみからなる医薬品の特性解析法として有用であるといえる。一方、エリスロポエチンのように不可避的な不均一性を持つ医薬品の場合、製品の恒常性を保証するための成分の解析法としては、キャピラリー電気泳動法を除く3種の方法では十分ではない。特にタンパク質の翻訳後に付加される糖鎖の構造については生産条件の微細な変化などに伴って変動し、さらにそれらの変化が医薬品の活性等にも影響を及ぼすことが知られているが、タンパク質に付加する糖鎖の解析に関する試験法ならびに規格についてはヨーロッパ薬局方、日本薬局方のいずれ

にも規定されていない。糖タンパク質糖鎖の解析については、質量分析法やキャピラリー電気泳動法などによる解析技術が精度・感度・迅速性の点において目覚しく進歩しており、今後それらの技術を糖タンパク質性医薬品の特性解析へと応用し、医薬品の品質と恒常性を確保するための試験方法や規格を積極的に提言していくことが必要であると考えられる。

E. 研究成果

1. Nakajima K, Kinoshita M, Matsushita N, Urashima T, Suzuki M, Suzuki A, Takehi K. Capillary affinity electrophoresis using lectins for the analysis of milk oligosaccharide structure and its application to bovine colostrum oligosaccharides. *Anal Biochem.* 2006 348(1), 105-114.
2. Naka R, Kamoda S, Ishizuka A, Kinoshita M, Takehi K. Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography. *J Proteome Res.* 2006 5(1), 88-97.
3. Kamoda S, Nakanishi Y, Kinoshita M, Ishikawa R, Takehi K. Analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides in glycoproteins detected on two-dimensional gel by capillary electrophoresis using on-line concentration method. *J Chromatogr A.* 2006 1106(1-2), 67-74.
4. Kamoda S, Takehi K. Capillary electrophoresis for the analysis of glycoprotein pharmaceuticals. *Electrophoresis.* 2006 27(12), 2495-2504.
5. Matsuno YK, Nakamura H, Takehi K. Comparative studies on the analysis of urinary trypsin inhibitor (ulinastatin) preparations. *Electrophoresis.* 2006 27(12), 2486-2494.

6. Kamoda S, Ishikawa R, Kakehi K. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *J Chromatogr A*. 2006 1133(1-2), 332-339.
7. Matsuno YK, Yamada K, Tanabe A, Kinoshita M, Maruyama SZ, Osaka YS, Masuko T, Kakehi K. Development of an apparatus for rapid release of oligosaccharides at the glycosaminoglycan-protein linkage region in chondroitin sulfate-type proteoglycans. *Anal Biochem*. 2007 362(2), 245-257.
8. Itoh S, Kawasaki N, Hashii N, Harazono A, Matsuishi Y, Hayakawa T, Kawanishi T. N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J Chromatogr A*. 2006 1103, 296-306.
9. Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Ishii-Watabe A, Kawanishi T, Hayakawa T. Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2006 348, 259-68
10. 早川堯夫：第十四改正日本薬局方第二追補について，*医薬品研究*，2006 37, 27-41.
11. 早川堯夫：局方の国際調和と日本薬局方の今後の動向，*医薬品研究*，2006 37(10), 676-696.
12. 早川堯夫：第十五改正日本薬局方の概要、医薬品各条(生物薬品)及び今後の動向，*医薬品研究*，2006 37(10), 769-788.
13. 早川堯夫：Biotechnology(品質)に関するガイドラインの動向について，*医*

薬品研究, 2007 38(1), 14-23.

日本薬局方等医薬品基準の国際ハーモナイゼーションに関する研究
分担研究報告書

「生薬に関する試験方法ならびに各条の改正と国際調和に関する研究」

分担研究者 関田節子 徳島文理大学香川薬学部

研究要旨 第14改正日本薬局方(JP)第二追補の新規収載品目として生薬「ブシ」「ブシ末」の規格が収載された。平成17年度開催FHH会議においてその内容を紹介し、「加工附子」として既収載の中国、韓国、ヴェトナムの薬局方における試験法の比較を行った。本年度は香港からの要請により、香港市場の関連生薬の加工法の差異、アルカロイド含量調査を行った。

A. 研究目的

生薬は、通常、薬用植物の薬用部位を緩和な条件で乾燥したものであるが、「コウジン」、「カンキョウ」のように特異な条件により加工する場合がある。「ブシ」もその一つで、含有成分のアコニチン系アルカロイド類の毒性軽減を目的とした加工法が工夫されてきた。日本薬局方(JP)では、「ブシ」「ブシ末」の収載にあたり、基原植物 *Aconitum carmochaeli* Debxaux 及び *Aconitum japonicum* Thunberg に対し、加工法を下記の3通りに規定し、ジエステルアルカロイドであるアコニチン、ヒパコニチン、メサコニチンの量をHPLC法で測定し、加工法別に純度を規定している。

- 1 高圧蒸気処理により加工する。
- 2 食塩、岩塩又は塩化カルシウムの水溶液に浸せきした後、

加熱又は高圧蒸気処理により加工する。

- 3 食塩の水溶液に浸せきした後、石灰を塗布することにより加工する。

また、定量法は滴定法で行い、ベンゾイルアコニンとして含量を算出し、3通りの加工法別に規格値を規定している。

香港は中国薬典(CP)とは別に独自の薬局方を作成していて、香港市場の生薬について調査を進めている。そこで香港市場の加工附子の調査に協力して加工法の異なる附子片のアルカロイドについて測定を行った。

B. 研究方法

▶ 試料:黄附片,黒附片,淡附片,生附片,白附片,ほう附片は香港市場で

各3試料を入手した。

▶ 純度試験:JP「ブシ」の純度試験法を適用した。

▶ 定量法:JP「ブシ」の定量法を適用した。

C. 研究結果

1. アコニチン(A), ヒパコニチン(H), メサコニチン(M)の含量 ($\mu\text{g/g}$)

	A	H	M
生附片	34.0	740.6	260.2
黄附片	20.2	200.0	158.0
黒附片	0.1	30.0	0.2
淡附片	2.3	45.0	15.2
白附片	3.8	45.6	10.3
ほう附片	5.0	38.0	35.3

2. ベンゾイルアコニン (BA) の含量 ($\mu\text{g/g}$)

	BA
生附片	207.0
黄附片	21.4
黒附片	98.7
淡附片	30.1
白附片	76.2
ほう附片	6.7

D. 考察

JP では加工法が1~3のどれであっても純度試験値はアコニチン $60\mu\text{g}$ 以下, ヒパコニチン $280\mu\text{g}$ 以下, メサコニチン $140\mu\text{g}$ 以下, 定量法でベンジルアコニンとして1の加工法の場合は0.7~1.5%, 2の加工法の場合0.1~0.6%, 3の加工法の場合0.5~0.9%とされている。香港市場の加工附片:

黄附片, 黒附片, 淡附片, 白附片はジエステルアルカロイド量はそれほど高い値を示さなかったが, モノエステルアルカロイド含量が高い値を示した。また, 今回は平均値を求めたが一部に個体差の大きい試料があることから加工法の詳細な情報収集が必要である。また, 入手した試料数は各加工法につき3試料であったが今後数を増やして実態を把握することが重要である。

結論

香港市場の附子加工片について JP 第14改正第二追補収載の「ブシ」試験法を適用してアコニチンジエステル類, モノエステル類の測定を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし。
2. 学会発表

関田節子:日本生薬学会関東支部シンポジウム, 平成18年12月9日, 東京

H. 知的財産の出願・登録状況

なし