

B3. 凝集体・不純物評価

B3.1. 凝集体の評価

市販のヒト化抗体製剤を稀釈し、ガラスバイアル中にて室温で回転子により 250rpm で 6 時間攪拌した。生じた凝集体の粒子径及び相対光散乱強度(%)を Malvern 社の Zetasizer Nano-ZS により測定した。凝集体の分子量及び相対分布は ACQUITY BEH200, SEC, 1.7 μ m カラム(waters)で測定した。

B3.2. 酸変性抗体結合カラムの作製と分離

タイプ II ペプチド(ヒト IgG 特異的結合ペプチド)を Fmoc 法による固相合成で作製し、N 末端に NH₂-PEG4 によるリンカーを付加した。アミンカップリング法を用いて HiTrap NHS-activated HP Column に固定化した。

B4. 国際的動向調査と意見交換

USP ワークショップ(不純物:2010 年 11 月;糖鎖, 活性:2011 年 10 月)に参加し、USP, FDA 等と試験法や国際調和等に関して意見交換した。

倫理面への配慮

市販品を試料として用いていること、動物を使用していないことから、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果及び考察

C.1. 糖鎖試験法

我々は、(1) 単糖分析、(2) オリゴ糖分析(中性オリゴ糖, 酸性オリゴ糖)及び(3) グリコフォーム分析法から構成される標準的糖鎖試験法策定を目指しており、単糖分析法は本事業の前期間で策定を終了している(*Biologicals* に発表)。中性オリゴ糖をもつ医薬品として抗体医薬品があること、抗体医薬品糖鎖試験の標準化は要望が高いことから、本期間では、バイオ医薬品に共通して利用可能な中性オリゴ糖試験の要件を明確にすることに加え、抗体医薬品の糖鎖試験の標準化をめざした。アンケート調査に基づき分析手法として 2AB/親水性相互作用及び逆相 HPLC, APTS/CE, HPAEC-PAD, MS を選択し、分析条件の最適化、問題点の抽出と解決策の検討、分析バリデーションを実施した。免疫原性に関与する非ヒト型構造や、生物活性に寄与するフコース非結合糖鎖の重要性を考慮し、主な糖鎖である FG0, FG1, FG2 等に加え、M5, α Gal や NeuGc を含む微量糖鎖等 15 個の糖鎖に対する分離度や再現性を重視して評価した。

その結果、本研究で検討した方法はいずれも中性糖鎖の評価法として利用できること、とりわけ 2AB/親水性相互作用 HPLC(特に HILIC/UHPLC)並

びに APTS/CE は、M5, α Gal 及び NeuGc を含む微量糖鎖に対する分離能が高く、抗体医薬品の糖鎖試験法として特に有用であることが明らかになった。また、良好な試験結果を得るためには、標準品/標準物質を試料と同様に処理することによって標準糖鎖を調製し、主要糖鎖の溶出順やピーク強度比の再現性を確認することが重要であることが確認された。これらの知見をもとに、2AB/親水性相互作用 HPLC 及び APTS/CE を用いた抗体医薬品の標準的糖鎖試験法を策定した(頁 3)。

C2. 結合親和性試験法

我々は、バイオ医薬品の生物活性試験として(1) 生化学的試験、(2) 結合性試験、(3) 細胞応答性試験、並びに(4) データ解析法・バリデーションの標準化を目指している。抗体医薬品の生物活性評価では、薬理作用や体内動態制御に関わる生体分子との結合性試験が必須である。従来の結合性試験法では、生体分子との結合量を指標に結合活性が評価されているが、抗体医薬品では、生体分子との解離速度が有効性に影響する可能性も考えられていることから、結合速度及び解離速度を反映した結合親和性の評価が可能な試験法の開発が必要と考えられた。そこで本研究では、カイネティクス解析により結合親和性(解離定数 K_D)の算出が可能な SPR 法に着目し、抗体医薬品の結合親和性試験法としての開発と標準化を行った。

抗体医薬品類の FcRn 結合性をモデルとして、リガンド結合条件、リガンド固定化量、アナライト濃度、結合解離及び再生用緩衝液、送液時間等について最適化と課題抽出を行った。その結果、リガンド固定化量やセンサーチップの違いにより、同一アナライトにおいても測定される K_D の値は異なっていたが、同一フローセルでの併行精度は良好であり、同一フローセルで測定した対照物質との K_D の比を結合親和性の指標とすることで、SPR 法を用いた結合親和性試験を品質評価に適用できると考えられた。また、リガンド固定化量 200~450RU, Chi2 15 以下、対照物質と親和性確認用物質 2 種類の親和性順を規定することによりシステムの性能を確認できること、対照物質を 6 回測定したときの相対標準偏差が、7%程度であることを確認することにより、システムの再現性を確認できると考えられた。これらの結果を基に標準的試験法を策定した(頁 4)。

C3. 凝集体の評価技術に関する研究

C3.1. 動的散乱法等による凝集体の評価

凝集体評価法として、動的散乱法と SEC の有

用性を比較した。動的光散乱法により、未処理の抗体医薬品試料の粒子径分布を測定すると、約90%が粒子径約13 nmの単量体として検出されたのに対し、攪拌処理後の試料では粒子径約1900 nmの凝集体のみが検出された。同一試料をSECにより測定した結果、未処理の試料ではほとんどが分子量約14万の単量体として検出されたのに対し、攪拌処理後の試料ではピークが検出されなかった。SECにおいて攪拌処理後の凝集体が検出されなかったのは、粒子径が大きすぎるためカラムに入ることができなかつたためと考えられる。本検討結果から、抗体医薬品の凝集体評価に際して、現在一般的手法として用いられているSECに加え、動的光散乱法など、粒子サイズの大きな分子に対応できる手法を併用する重要性が示された。

C3.2 酸変性抗体結合カラムの作製と分離、並びに酸変性抗体除去後の凝集体形成能の評価

トラスツズマブをMab Select SuReカラムにアプライし、pH2.5の溶出液で溶出した。得られた溶出画分をタイプIIペプチドカラムで分画し、素通り画分および溶出画分を得た。Mab Select SuRe溶出画分、タイプIIペプチドカラム精製素通り画分(タイプII精製 Fra A)および溶出画分(タイプII精製 Fra D)を4°Cで保存し、凝集体(R.T.10.13)および単量体(R.T.11.65)の含量(面積%)をSECにより経時的に測定した。タイプII精製 Fra D 2日以降で凝集体の面積が増加したことから、タイプIIペプチドが認識するIgGは凝集体を形成しやすいことが分かった。一方、Mab Select SuRe精製直後のトラスツズマブでは、わずかではあるが凝集体の形成が起こったのに対し、タイプII精製 Fra Aでは凝集体の形成は起きなかった。これは、酸変性構造体がタイプIIペプチドカラムによって除去されたことによるものと考えられる。従って、抗体医薬品の精製で用いられるMab Select SuReで生成された凝集体形成能を有する酸変性体の除去のため、タイプIIペプチドカラムを用いた精製プロセスを取り入れることが効果的であることが示唆された。

C4. 国際動向調査と意見交換

USPワークショップに参加し、糖鎖試験法、SPR等バイオアッセイ、生物活性定量値の信頼性確保のための統計解析法、及び凝集体を含む不純物に関する規格及び試験法、並びにその他の工程内管理等評価の現状について情報収集すると共にUSP、FDA及び企業の専門家と意見交換し、標準化の参考とした。

D. 結論

抗体医薬品の品質・安全性確保のための共通基盤技術として、①標準的糖鎖試験法、②標準的結合活性測定法、③凝集体評価法の開発を行った。

① 糖鎖試験法

抗体医薬品を用いて、中性オリゴ糖等試験法としての各種HPLC、CE及びMSの最適化、課題と対応策の抽出、分析バリデーションを実施した。いずれの方法も中性オリゴ糖の分析に利用可能であり、特に抗体医薬品糖鎖試験法として、2AB誘導体化HILIC/UHPLC、及びAPTS誘導体化CEが優れていることを明らかにした。本結果を基に以下の抗体医薬品の標準的試験法を策定した。今後、本研究結果を活用し、日局糖鎖試験法を作成する。

② 生物活性試験法

SPRを用いた抗体医薬品のFcRn結合親和性試験法を策定した。本研究結果を活用し、SPR法に関する日局参考情報原案を作成中である。

③ 凝集体評価法

動的光散乱法はSECでは検出できない粒子径約2µmの凝集体を高感度で検出可能であり、凝集体に関する工程内管理試験あるいは規格試験法として有用であることを確認した。また、独自に開発したペプチドカラムにより、抗体医薬品の製造工程中で生じ凝集体生成の要因となり得る酸変性構造体を除去できることを示した。

< I. 抗体医薬品の糖鎖試験法(概略) >

1 糖鎖の遊離

pH 7.2の50 mMリン酸緩衝液中で、抗体100 µgにPNGaseF 5 mU (1 U = 1 µmol/min)を37°Cで16時間作用させる。

2 遊離糖鎖の精製

カーボン固相抽出カラム(100 mg)に遊離糖鎖を含む溶液を注入し、水2 mLを通す。5 mmol/L酢酸アンモニウムを含む50%アセトニトリル1 mLで糖鎖を溶出し、溶出液を減圧で蒸発乾固する。

3 遊離糖鎖の誘導体化

3. 1 2AB誘導体化

糖鎖乾固物に、2-ピコリンボラン22 mgに、2AB 10 mgにメタノール/酢酸混液(10:1) 200 µLを加えて溶かした液5 µLを加えて、65°Cで時々攪拌しながら2時間加温する。1 mLのアセトンを加えよく混合し、遠心して、上清を吸引除去する。

3. 2 APTS誘導体化

糖鎖乾固物に、APTS 5 mgを15%酢酸96 µLに

溶解した液 5 μ L 及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム 10 mg をテトラヒドロフラン 160 μ L に溶解した液 5 μ L を加えて、55 $^{\circ}$ C で 90 分間加熱する。90 μ L の蒸留水を加え反応を止める。

4 誘導体化糖鎖の分析

4. 1 親水性相互作用 HPLC (2AB)

検出器：蛍光光度計 (Ex : 330 nm, Em : 420 nm)
カラム：カルバモイル基結合シリカゲルを充てんしたカラム (2.0 X 150 mm, 3 μ m)、移動相 A : 100 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.5)、移動相 B : アセトニトリル、移動相の送液：0 \sim 2 分、70 %B、2 \sim 92 分、70 \rightarrow 50 %B、流量：毎分 1.0 mL、温度：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

4. 2 逆相 HPLC (2AB)

検出器：蛍光光度計 (Ex : 330 nm, Em : 420 nm)
カラム：オクタデシル基結合シリカゲルを充てんしたカラム (4.0 X 250 mm, 3 μ m)、移動相 A : 0.1% 酢酸、移動相 B : 0.1% 酢酸を含む 90% アセトニトリル、移動相の送液：0 \sim 5 分、95 %B、5 \sim 95 分、5 \rightarrow 90 \rightarrow 35 %B、流量：毎分 0.2 mL、温度：30 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

4. 3 キャピラリー電気泳動 (APTS)

レーザー励起蛍光検出器 (Ex : 488 nm, Em : 520 nm)、キャピラリー：内壁が中性ポリマー等で修飾されたフューズドシリカキャピラリー (50 μ m X 500 mm)、泳動用緩衝液：ポリエチレングリコール 35000 を 0.5% 含む 50 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.0)、印加電圧：30 kV、温度：30 $^{\circ}$ C 付近の一定温度、試料導入：加圧法 (0.5 psi, 5 秒)

5. 試験結果

試料溶液及び標準溶液から得られたクロマトグラムまたは、エレクトロフェログラムが類似していること及び異常な糖鎖ピークが認められないことより判定する。

< II. SPR を用いた結合試験法 (概略) >

抗体医薬品の FcRn 結合親和性試験法

1 リガンド

CHO 細胞発現ヒト FcRn 細胞外領域組換えタンパク質 (FcRn 原液) 8 μ l を 152 μ l の固定化用バッファー (10 mM sodium acetate [pH 5.0]) で希釈し、FcRn 希釈液とする。

2 アナライトの調製

抗体医薬品類を測定用緩衝液で希釈し、希釈原液を調製する。希釈原液 125 μ l を測定用緩衝液 125 μ l で 2 倍系列希釈し、アナライト溶液とする。アナライト濃度は、抗体医薬品では 670, 335, 168, 84, 42 nM、Fc 融合タンパク質では、5360, 2680, 1340,

670, 335 nM とする。希釈操作は、低吸着チップを用いて SPR 解析用プラスチックバイアルで直接行い、攪拌はピペッティングにより行う。

3 センサーチップの調製：アミンカップリングによるリガンドの固定化

センサーチップ CM5 を用いる。流速は 10 μ l/min とし、活性化試薬 (100mM NHS/ 400mM EDC) を 7 分間送液する。固定化量目標値を 300 RU とし FcRn 希釈液を送液する。ブロッキング試薬 (1M ethanolamine) を 7 分間送液する。同じ操作をフローセル (Fc) 2, 3, 4 について行い、最後に、Fc1 に NHS/EDC と ethanolamine を 7 分ずつ連続して送液し、対照とする。

4 測定

測定用緩衝液は 50 mM sodium phosphate/ 150 mM NaCl [pH 6.0]、再生用緩衝液は 100 mM Tris/ 200 mM NaCl [pH 8.0] を用いる。結合、解離、再生フェーズは、それぞれ、120, 150, 30 秒間とし、流速は 30 μ l/min とする。各 run の最初に、1340 nM のアナライトを 3 回流した後、試料の測定を行う。各アナライトについて、高濃度試料から順に測定する。

5 データ解析

解析データには、Fc 2, 3, 4 のデータから、Fc1 のデータを引いたものを用い、さらに、0 濃度試料ブランクの測定値をバックグラウンドとして差し引く。BIA evaluation software を用い、bivalent analyte モデル (RI=0, kd1 の初期値を 0.1 に設定) により解析する。試料注入の前後でセンサーグラムが乱れている領域は、解析対象に含めない。kd1/ka1 を解離定数 K_D とする。算出された K_D と標準物質の K_D の比を結合親和性の試験結果とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文による発表 14 件
それ以外 (レビュー・書籍等) の発表 28 件
その主なもの

原著論文

- 1) A. Harazono, N. Kawasaki, A. Ishii, T. Arato, S. Yanagihara, A. Koga, Y. Tsuda, M. Kimura, M. Sakita, T. Sato, K. Kakehi *et al.*: A comparative study of monosaccharide composition analysis as a carbohydrate test for biopharmaceuticals, *Biologicals*, 39(3), 171-180 (2011)
- 2) R. Kuribayashi, N. Kawasaki *et al.* : Rapid

evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/mass spectrometry with a column-switching system, *J. Pharm. Biomed Anal*, in press

- 3) K. Yamada, K. Kakehi: *J Pharm Biomed Anal*, 55(4), 702-727 (2011)
 - 4) M. Kinoshita, K. Kakehi *et al.*: *Biomed Chromatogr.*, 25(5), 588-593 (2011)
 - 5) K. Tanaka, Y. Ito *et al.*: *Journal of neuroimmunology*, 236, 27-28 (2011)
 - 6) T. Hatanaka, Y. Ito *et al.*: *Peptide Science*, 25-26 (2012)
 - 7) E. Maeda, K. Kakehi *et al.*: *J Chromatogr A.*, 1217(45), 7164-7171
 - 8) K. Yamada, K. Kakehi *et al.*: *Anal Chem.*, 82(17), 7436-7443 (2010)
 - 9) H. Takada, K. Kakehi *et al.*: *Mol Biol Cell.*, 21(4), 674-685(2010)
 - 10) J. Yang, Y. Ito *et al.*: *CJournal of biochemistry*, 148, 507-515 (2010)
 - 11) 新見伸吾: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 129, 55-60 (2011) (他 3 報)
- レビュー・書籍等
- 1) 川崎ナナ: 臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理, *PHARMSTAGE*, 11(10), 4-8 (2012)
 - 2) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の不純物の評価(2), *ファームテグシヤパン*, 28(4), 113-119 (2012)
 - 3) 鈴木琢雄, 石井明子ら: *ファームテグシヤパン*, 28 (1), 57-64 (2012)
 - 4) 橋井則貴, 川崎ナナら: *ファームテグシヤパン*, 27(13),99(2633)-104(2638) (2011)
 - 5) 橋井則貴, 川崎ナナら: 再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス, *薬学雑誌*, 132(4), 489-497 (2012)
 - 6) 遊佐敬介, 川崎ナナら: *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 42(5), 444-447 (2011)
 - 7) 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品開発における潮流と規制. *バイオ治験薬の品質・安全性確保*, *ファームテグシヤパン*, 26, 69-80(2010)
 - 8) 新見伸吾ら: 治療用タンパク質の免疫原性その 4, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 42(9), 818-826 (2011)
 - 9) 橋井則貴, 石井明子, 新見伸吾, 川崎ナナ: バイオ医薬品 CMC 申請のための品質評価と申請書作成 実学集, 技術情報協会(東京), 3-18, 19-35 (2011)
 - 10) 荒戸照世: *バイオ/抗体医薬品・後続品にお*

ける CMC 研究・申請と同等性確保, *サイエンス&テクノロジー*, 17-25 (2011) (他 18 報)

2. 学会発表 57 件
その主なもの
- 1) R. Kuribayashi, N. Kawasaki *et al.*: Assessment of the glycan heterogeneity of monoclonal antibodies by LC/MS with a column-switching system: Application for process analytical technology., 8th World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, (Mar. 19-22, 2012), Istanbul, Turkey
- 2) A. Harazono, N. Kawasaki *et al.*: Comparison of mass spectrometric glycoform profiles of innovator and biosimilar erythropoietin product, USP Science & Standards Symposium on Biologics & Biotechnology, (Oct. 3-6, 2011), Seattle, USA
- 3) S. Niimi: Japanese Concerns of the Japanese Regulatory Agency regarding Immunogenicity of Monoclonal Antibody Products in Relation to their Efficacy and Safety, 1st Immunogenicity Determinates and Correlate Conference Prediction and Mitigation Risk, (May 9-11, 2011), Providence, USA
- 4) S. Niimi: Japanese Perspective on Impurities and Identification of Monoclonal Antibody Products, USP Sponsored Workshop at the 2010 AAPS-PSWC Meeting Impurities, Adulteration and the Changing Role of USP in Global Drug Quality, (Nov. 13-14, 2010), New Orleans, USA
- 5) 川崎ナナ: バイオ医薬品開発動向と課題. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム(2012, 3,28-31) 札幌
- 6) 原園 景, 柳原繁弘, 岡本寿美子, 中島和幸, 森啓太郎, 佐藤貴之, 四方 靖, 村上弘次, 掛樋一晃, 川崎ナナら: 抗体医薬品の糖鎖試験法の検討. 日本薬学会第 132 年会(2012, 3, 28-31) 札幌
- 7) 石井明子, 柳原繁弘, 森啓太郎, 川崎ナナら: 表面プラズモン共鳴法を用いた抗体医薬品の FcRn 結合親和性試験法の標準化. 日本薬学会第 132 年会(2012, 3, 28-31) 札幌 (他 50 演題)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

抗体医薬品の製造方法、品質特性解析法及び試験法の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究代表者 川崎 ナナ

研究要旨 抗体医薬品の製法開発、品質・安全性確保のための共通基盤技術として、標準的糖鎖試験法、結合性試験法、凝集体評価法の開発を行った。①抗体医薬品の糖鎖試験法としての逆相及び親水性相互作用 HPLC, HPAEC/PAD, キャピラリー電気泳動並びに質量分析などの特徴、課題並びに留意すべき事項を明らかにし、標準的試験法を策定した。②抗体医薬品の結合性試験法として、表面プラズモン共鳴法を用いた Fc 受容体結合親和性試験法の分析手順を作成し、標準的試験法として適用できることを確認した。③動的光散乱法は、粒子径の大きな凝集体を高感度で検出可能であり、凝集体に関する工程内管理試験あるいは規格試験法として有用であることを確認した。また、抗体医薬品の製造工程中で生じる可能性がある酸変性構造体の除去が可能なペプチドカラムを独自に開発した。現在、本研究の成果を基に、①糖鎖試験法、及び②表面プラズモン共鳴法を用いた結合試験法の日局参考情報原案を作成中である。

研究分担者

- | | |
|-------------------------------------|-------|
| (1) 国立衛研生物薬品部 | 石井 明子 |
| (2) 国立衛研生物薬品部 | 新見 伸吾 |
| (3) (独)医薬品医療機器総合機構
バイオリーサイエンス推進部 | 荒戸 照世 |
| (4) 協和発酵キリン(株)生産本部 | 柳原 繁弘 |
| (5) 中外製薬(株) CMC 開発部 | 岡本寿美子 |
| (6) (財)化学及血清療法研究所菊池研究所 | 中島 和幸 |
| (7) アステラス製薬(株)バイオドプロジェクト | 森 啓太郎 |
| (8) 大日本住友製薬(株)技術研究本部 | 佐藤 貴之 |
| (9) エーザイ(株)筑波研究所 | 四方 靖 |
| (10) (株)ベネシス研究開発本部 | 村上 弘次 |
| (11) 近畿大学薬学部 | 掛樋 一晃 |
| (12) 鹿児島大学理工学研究科 | 伊東 祐二 |

A. 研究目的

多くの抗体医薬品が癌や自己免疫疾患等に対して優れた治療効果を上げており、抗体医薬品開発に対する世界中の期待や関心が高まっている。抗体医薬品開発・製造の特徴は、抗体基本骨格の高い共通性を生かした共通の技術を利用できることである。共通する基盤技術としての工程管理手法、品質特性解析法及び試験法を開発することは、抗体医薬品開発の促進、品質、有効性及び安全性の確保、承認申請/審査業務の基盤整備及び迅速化に不可欠である。

抗体医薬品の作用には、標的分子に結合して生

体内反応を抑制する中和作用や、標的細胞上の抗原に結合し、Fc 受容体等のエフェクター分子の活性化を介して生じる細胞傷害作用等がある。生体内でこれらの機能が適切に発揮されること、かつ、安全性が担保されるためには、製造された抗体が意図する一次構造を持つことはもとより、糖鎖などの翻訳後修飾が適切になされていること、適切な生物活性を有していること、凝集体及び変性体の形成が適切にコントロールされていることなどを工程もしくは製品で管理する必要がある。

抗体医薬品の糖鎖部分は、高次構造の安定性、体内動態、生理活性の調節、抗原性などに関与する場合がある。その一方で、糖鎖不均一性は培養条件の変動により変化することから、工程パラメータ、工程内管理試験、または規格試験により、糖鎖不均一性の恒常性が担保される必要がある。欧米薬局方では、2011年に糖鎖試験法が収載され、さらに、抗体医薬品に関する参考情報の整備が進められているが、日本国内では糖鎖試験法は整備されておらず、早急に標準化を進め、及び国際調和に向けた準備を進める必要がある。

抗体医薬品の生物活性としては、抗原との結合性、及び、細胞傷害活性や体内動態制御に関わる Fc 受容体との結合性が適切に保たれていることが必要である。欧米薬局方では旧来より生物活性試験に関する項が整備され、現代の科学水準に見合った改訂が進められている。しかし、日本国内では、生物活性試験やデータ統計解析に関する標準的考え方が定まっておらず、開発企業が独自に

設定しているのが現状であり、わが国においても生物活性試験の標準化が求められている。

凝集体の生成は、生体内での抗薬物抗体の産生やそれに伴う有効性低下、あるいはアレルギー等の有害事象発現の原因となり得るため、厳密に管理しなければならない。抗体医薬品の精製工程には、通例、酸性溶液による溶出工程を含むプロテインAクロマトグラフィーが含まれるため、凝集体が形成されやすい。また、一回の投与量が多いため、製剤中の抗体濃度が通常 10 mg/ml 以上と高濃度になることも、製剤化や保存の過程で凝集体が産生されやすい原因となっている。したがって、凝集体を高感度で測定する方法の開発及び凝集体生成を避けられる工程開発につながる凝集体生成機構の解明が必要である。

本研究の目的は、上記の課題を解決するため、抗体医薬品の品質・安全性確保につながる共通技術として、糖鎖試験法、結合性試験法、凝集体評価法の開発と標準化を行うことである。本年度は、①糖鎖試験に用いられる逆相及び親水性相互作用 HPLC、HPAEC/PAD、キャピラリー電気泳動並びに質量分析などの特徴、課題並びに留意すべき事項を明らかにし、標準的糖鎖試験法としての有用性を評価した。②結合性試験法として、カイネテイクス解析による結合親和性測定が可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) 法をとりあげ、多機関共同検定により標準化試験法としての適用可能性を評価した。③凝集体の高感度測定法として動的光散乱法に着目し、その有用性をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と比較した。また、特異的ペプチドを用いて分離される酸変性構造体の凝集体形成能について検討した。

B. 研究方法

1. 抗体医薬品の糖鎖試験法の共同研究

(1) 試料

マウスミエローマ細胞 (SP2/0) 産生抗体医薬品 X を機関 A にて購入し、各機関に配布した。

(2) 遊離糖鎖の調製

抗体 100 µg に、pH 7.2 の 50 mM リン酸緩衝液中で、PNGaseF 5 mU を 37°C で作用させて糖鎖を遊離し、カーボン固相抽出により糖鎖を精製した。

(3) 2-アミノベンズアミド (2AB) 誘導体化及び逆相 (RP) HPLC

糖鎖乾固物に、2-ピコリンボラン 22 mg に、2AB 10 mg にメタノール/酢酸混液 (10 : 1) 200 µL を加えて溶かした液 5 µL を加えて、65°C で 2 時間加温した。アセトンを加えて遠心し、上清を除去した。Hypersil ODS (4.0 または 2.1 X 150 mm, 3

µm)、溶離液に A: 0.1% 酢酸、B: 0.1% 酢酸を含むアセトニトリル/水混液 (9:1) を用い、グラジエント条件により誘導体化糖鎖を溶出し、励起波長 330 nm、蛍光波長 420 nm にて検出した。

(4) 8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホン酸 (APTS) 誘導体化糖鎖のキャピラリー電気泳動 (CE)

糖鎖乾固物に、APTS 5 mg を 15% 酢酸 96 µL に溶解した液 5 µL 及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム 10 mg をテトラヒドロフラン 160 µL に溶解した液 5 µL を加えて、55°C で 90 分間加熱した。中性ポリマーで修飾された内径 50 µm、外径 360 µm、全長 50 cm、有効長 40 cm のフューズドシリカキャピラリー及び 0.5% ポリエチレングリコールを含む 50 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、30 kV で泳動し、励起波長 488 nm、蛍光波長 520 nm にて検出した。

(5) その他の分析法

各機関は、独自の条件にて分析を行った。

(6) 糖鎖プロファイルの評価

n = 3 × 2 日の分析を行い、GOF に対する各ピークの相対ピーク面積及びピーク高さの比を求めた。

2. SPR 解析を用いた抗体医薬品の結合親和性試験法の共同研究

(1) 試料及び試薬

SPR 解析のリガンドには、CHO 細胞で発現、精製したヒト FcRn 細胞外ドメインを用い、アナライト (対照物質、親和性確認用物質、被験物質 1-4) には、抗体医薬品あるいは Fc 融合タンパク質医薬品の市販製剤を購入して用いた。リガンドとアナライトは機関 A より各機関に配布した。

(2) 装置

SPR 解析装置として、機関 A、B では、Biacore T200、機関 C では Biacore 3000 を用いた。

(3) FcRn 結合親和性の測定

FcRn 原液を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で希釈し、アミンカップリングによりセンサーチップ CM5 のフローセル (Fc) 2,3,4 に 200~400RU の範囲で固定化し、Fc1 をブランクとした。

アナライト濃度は、抗体医薬品は 670~42 nM、Fc 融合タンパク質は 5360~335 nM とした。流速は、Biacore T200 では 30 µl/min、Biacore 3000 では 20 µl/min とし、送液時間は結合フェーズ 120 秒間、解離フェーズ 150 秒間、再生は 30 秒間とした。

各機関 2 枚のセンサーチップについて試験を実施し、センサーチップ 1 では、対照物質の測定を 6 回 (システムの再現性確認のための試験)、システムの性能確認のための試験、及び、被験物質の親和性試験 3 回を実施した。センサーチップ 2 で

は、対照物質の測定 6 回を、対照物質の繰り返し注入 6 回に変え、その他はセンサーチップ 1 と同様に実施した。

(4) データ解析

BIA evaluation software を用い、bivalent analyte RI=0 モデルにより解析した。バックグラウンドとして、Fc1、および、アナライトを含まない 0 nM の試料のセンサーグラムを差し引いた。

3. 凝集体の評価技術に関する研究

3.1. 動的光散乱及び SEC による凝集体の評価

(1) 試料

25 mM NaCl を含む 25 mM Na Citrate (pH6.0)、で抗体医薬品製剤を 0.1 mg/ml に希釈した。

(2) 凝集体の形成

試料 0.5ml を直径 1.2cm のガラスバイアル中に室温で回転子により 250rpm で 6 時間攪拌した。

(3) 凝集体の分析

凝集体は Malvern 社の Zetasizer Nano-ZS 及び Waters 社の ACQUITY BEH200, SEC, 1.7 μ m カラムにより測定した。

3.2. 特異的ペプチドを用いて分離される画分の凝集体形成能の評価

(1) 材料

ヒト IgG 特異的結合ペプチドであるタイプ II ペプチドは Fmoc 法による固相合成で作製し、N 末端に NH₂-PEG4 によるリンカーを付加した。ペプチドはアミンカップリング法を用いて HiTrap NHS-activated HP Column (GE Healthcare 社) に固定化した。

ヒト IgG1 抗体であるトラスツズマブは中外製薬より購入し、0.2 mg/ml に希釈した。Mab Select Sure カラムは GE Healthcare 社より購入した。

(2) タイプ II ペプチド固定化カラムを用いた酸変性体構造体の分離

酸変性体構造体の分離は、タイプ II ペプチド固定化カラム及びタンパク質精製システム Profinia (Bio Rad 社) を用い、流速 1.0 ml/min、室温で PBS (塩濃度 137 mM) を Running Buffer, 0.1M グリシン塩酸緩衝液/0.15M NaCl (pH2.5) を溶出液として用いて行った。

(3) 凝集体の分析

凝集体は Waters 社の ACQUITY BEH200, SEC, 1.7 μ m カラムにより測定した。

(倫理面への配慮)

市販品を試料として用いていること、動物を使用していないことから、特に配慮を必要としない。

C. 研究結果

1. 抗体医薬品の糖鎖試験法の共同研究

はじめに、各種 HPLC 法を用いて抗体医薬品の糖鎖を分析し、糖鎖プロファイルと比較した。2AB 誘導体化及び RP/HPLC によって得られた代表的なクロマトグラムを図 1A に示す。保持時間は機関間で大きく異なったが、類似したパターンのクロマトグラムが得られ、対応するピークのピーク強度比は同様であった (表 1)。2AB 誘導体化及び HILIC/UHPLC を用いた場合、分析条件は異なるが、類似した糖鎖プロファイルが得られた。ピーク強度比は、RP/HPLC 及び HILIC/HPLC (22 年度) と同様であった。その他の HPLC として、2-アミノピリジン (2AP) 誘導体化及び RP/HPLC を検討したところ、2AB 誘導体化糖鎖とは溶出順序は異なることが確認されたが、2AB 誘導体化法と 2AP/RP HPLC, HILIC HPLC で得られた主要糖鎖のピーク強度比は、ほぼ同様であった。HPAEC/PAD では、主要糖鎖のプロファイルは得られたが、微量糖鎖の検出は難しかった。

つぎに、APTS 誘導体化及び CE を用いて糖鎖試験を実施した。分離能の高いプロファイルが得られ (図 1B)、ピーク強度比は 2AB 誘導体化法と同様であった。

さらに、MS による試験を実施した。2AB 誘導体化糖鎖の ESI/MS 及び遊離糖鎖の MALDI/MS を行った。各ピークの単糖組成を明確に示すことができた。2AB 誘導体化糖鎖においては、副反応物のピークが認められた。主要糖鎖のピーク強度比は、類似した値が得られた。重鎖の MS を行ったところ、観測された質量値は、N 末端のピログルタミン化、C 末端リジンの脱落、並びに 4 カ所の S-S 結合を仮定して求めた平均質量とよく一致した。微少なピークでは、ピーク強度比は、異なっていた。インタクト MS を行ったところ、いずれの機関も、主要なピークの質量値は、重鎖 N 末端のピログルタミン化及び C 末端リジンの脱落、並びに 16 カ所の S-S 結合を仮定して計算した平均質量と近い値を示した。

2. SPR 解析を用いた抗体医薬品の結合親和性試験法の共同研究

SPR 法 (図 2) による抗体医薬品の FcRn 結合親和性試験法に関する共同研究手順を作成し、各機関センサーチップ 2 枚について試験を実施した。まず、独立して調製した対照物質を 6 回測定し、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 、解離定数 K_D に関する併行精度を求めた (表 2)。フローセル間

で得られた値に相違があるものの、各フローセルにおける精度はいずれも良好であり、 K_D の相対標準偏差 (RSD) は、フローセル (Fc) 2, 3, 4 でそれぞれ、機関 A では 6.4, 6.0, 6.3%, 機関 B では 3.1%, 3.4%, 3.1%, 機関 C では 4.1, 5.8, 7.6% と良好であった (表 2)。またこの結果から、Fc1 をブランクとして、Fc2,3,4 を用いた測定が可能であることが確認できた。別に繰り返し注入による再現性についても試験を実施し、同様に精度が良好であることを確認できた。

生物活性試験では一般に、標準物質と活性を比較することにより相対力価を算出する。また、表 2 に示した併行精度の解析結果から、各フローセルでの K_D 測定値はリガンド固定化量により変動し得ると考えられる。そのため、SPR 法による結合親和性試験では、同一フローセルで測定した標準物質 (ここでは対照物質) と K_D を比較して、標準物質との K_D の比 (relative K_D) として試験結果を表示することが妥当と考えられる。3 機関で実施した被験物質の試験結果 (relative K_D) は、4 つの被験物質について、機関 A では RSD が 2.3~8.8%, 機関 B では 3.3~6.5% と良好であった。機関 C では 4.4~23.6% であった。被験物質ごとにみると、RSD は、被験物質 1 について 2.3~12.7%, 被験物質 2 について 2.7~15.3%, 被験物質 3 について 3.1~18.5%, 被験物質 4 について 4.2~23.6% であった。

図 3 は、各フローセルで得られた relative K_D 及び relative K_D 平均値を表示したグラフである。各チップ 9 データから得られる平均値について、6 枚のセンサーチップでの RSD を求めたところ、被験物質 1~4 について、それぞれ、13.8, 11.6, 8.4, 14.5% であり、概ね良好であった。

3. 凝集体の評価技術に関する研究

3.1. 動的光散乱及び SEC による凝集体の評価

動的光散乱法により、未処理の抗体医薬品試料の粒子径分布を測定すると、約 90% が粒子径約 13 nm の単量体として検出されたのに対し、攪拌処理後の試料では粒子径約 1900 nm の凝集体のみが検出された (図 4)。同一試料を SEC により測定した結果、未処理の試料ではほとんどが分子量約 14 万の単量体として検出されたのに対し、攪拌処理後の試料ではピークが検出されなかった (図 5)。未処理の試料と攪拌処理後の試料を 100 対 1 で混合して動的光散乱により測定した結果、粒子径約 1800 nm の凝集体のみが検出された (図 4)。

3.2. 特異的ペプチドを用いて分離される画分の凝集体形成能の評価

抗 HER2 抗体トラスツズマブを Mab Select SuRe カラムにアプライし、pH2.5 の溶出液で溶出した。得られた溶出画分をタイプ II ペプチドカラムで分画し、素通り画分および溶出画分を得た。Mab Select SuRe 溶出画分、タイプ II ペプチドカラム精製素通り画分 (タイプ II 精製 Fra A) および溶出画分 (タイプ II 精製 Fra D) を 4°C で保存し、凝集体 (R.T.10.13) および単量体 (R.T.11.65) の含量 (面積%) を SEC により経時的に測定した (表 3)。

タイプ II 精製 Fra D 2 日以降で凝集体の面積が増加したことから、タイプ II ペプチドが認識する IgG は凝集体を形成しやすいことが分かった。一方、Mab Select SuRe 精製直後のトラスツズマブでは、わずかではあるが凝集体の形成が起こったのに対し、タイプ II 精製 Fra A では凝集体の形成は起きなかった。

D. 考察

1. 抗体医薬品の糖鎖試験法の共同研究

HPLC 法、CE 法、及び MS 法について抗体医薬品の糖鎖試験法としての実行可能性を評価した。

2AB 誘導体化及び RP/HPLC では、低流速でならかなグラジエント条件を用いることにより、(1,6) G1F と (1,3) G1F の分離はできないが、G0F, G1F, G2F の存在比や α Gal 付加の程度、高マンノース型糖鎖の存在比、フコシル化の程度の評価が可能である。誘導体化及び精製法の違いによる不純物の影響に気をつける必要があることが示唆された。2AB 誘導体化及び HILIC/UHPLC では、短時間で、分離能の高いクロマトグラムが得られることを確認した。2AP 誘導体化及び RP/HPLC または HILIC/HPLC において、2AB 誘導体化糖鎖と同様の糖鎖プロファイルが得られることを確認した。HPAEC/PAD では、遊離糖鎖をそのまま分析できることが特徴であるが、PAD の特異性は高くはないことから微少ピークの評価は難しいことが示唆された。

APTS 誘導体化 CE では、非常に短時間 (11~16 分以内に溶出) で高い分離能のエレクトロフェログラムが得られた。用いるキャピラリー、試薬、泳動バッファーは、溶出時間に大きく影響するため、その選択は重要であることが確認された。

MS ではピーク強度比は存在比を表さないが、G0F, G1F 及び G2F の比は、他の分析法と大きく違わなかった。ただし、MALDI/MS では、繰り返し分析の再現性は低かった。2AB 糖鎖では不純物のピークが観測されることから MS で分析する利点は少ないと思われた。重鎖の MS では、主要な結合糖鎖の単糖組成が推定されたが、糖鎖プロ

ファイルの機関間の再現性は低く、更なる検討が必要である。抗体の MS では、主要なグライコフォームの観測質量値の計算値からのずれは小さく（最大でも 6 Da）、MS による確認試験の実行可能性を示唆している。ベースラインが低い機関間では同様のプロファイルを示すことを確認した。

糖鎖試験は、糖鎖がどのように医薬品の有効性及び安全性に関わっているのか、及びロット間で糖鎖プロファイルの変動範囲はどの程度かを考慮して設定すべきである。非ヒト型糖鎖が結合する可能性がある場合、その存在量が一定以下であることを確認するため、微量糖鎖を検出できる特異性の高い分析法を選択する必要がある。また、エフェクター活性を期待する抗体など糖鎖構造が有効性及び安全性に影響を及ぼすことが想定される場合には、目的の糖鎖構造並びに糖鎖プロファイルを持っていることが確認できる分析法を選択する必要がある。本研究で検討した各種分析法は、精度や分離能（特異性）は異なるが、主要な糖鎖の不均一性の評価に利用可能と思われる。そのなかで、2AB 誘導体化及び HILIC/UHPLC、APTS 誘導体化及び CE は分離能が高く抗体医薬品の糖鎖試験法として特に有用と思われる。

試験法の策定においては、システム適合性試験を適切に設定する必要がある。糖鎖試験では、糖鎖の遊離及び誘導体化などの試料調製方法と、糖鎖の分離法を評価することが必要であり、それぞれ、適切な標準品/標準物質を同時に処理し試験を行うことにより、及び標準品/標準物質より調製した糖鎖試料を用いて主要糖鎖の溶出順やピーク強度比の再現性を確認することにより評価可能であると考えられる。

2. SPR 解析を用いた抗体医薬品の結合親和性試験法の共同研究

IgG 骨格を持つ各種抗体医薬品に共通して適用可能な FcRn 結合親和性をモデルとして、結合親和性試験法案を作成し、標準的試験法としての実行可能性を 3 機関での共同研究により評価した。

リガンド固定化量やセンサーチップの違いにより、同一アナライトにおいても測定される K_D の値は異なっていたが、同一フローセルでの併行精度は良好であり、同一フローセルで測定した対照物質との K_D の比を結合親和性の指標とすることで、SPR 法を用いた結合親和性試験を品質評価に適用できると考えられた。

SPR 法を用いた結合親和性試験を設定する際に必要となるシステム適合性には、システムの性能として、リガンド固定化量、親和性確認用物質の

K_D の比較、Chi2、繰り返し測定時の K_D の再現精度等を設定することが考えられる。共同検定の結果を踏まえ、本研究で実施した抗体医薬品の FcRn 結合親和性試験では、システムの性能として、リガンド固定化量は 200~450RU、Chi2 は 15 以下、対照物質と親和性確認用物質 2 種類の親和性順を規定することができると考えられる。また、システムの再現性は、対照物質の 6 回の測定で確認することができると考えられ、その相対標準偏差は、7%程度が目安と考えられる。

共同研究を実施した 3 機関のうち、Biacore 3000 を用いた機関 C では、2 枚のセンサーチップいずれにおいても RSD が大きい傾向にあった。機関 A 及び B が用いた Biacore T200 では、センサーグラムの理論曲線とのフィッティングが自動化されており、結合開始ポイントおよび解離開始ポイントを手動で設定する必要がなく、フィッティングの再現性が向上している。抗体と FcRn の結合および解離は、非常に速く、結合開始/解離開始ポイントでのセンサーグラムの傾きが大きいことから、手動での設定によるずれが、算出される K_D に影響しやすく、この点が、ばらつきの大きさにつながった可能性が考えられる。SPR 法を用いた試験法の性能を評価する際には、データ解析法の精度も考慮する必要があると考えられる。

3. 凝集体の評価技術に関する研究

3.1 動的光散乱及び SEC による凝集体の評価

凝集体評価法として、動的光散乱法と SEC の有用性を比較した。SEC において攪拌処理後の凝集体が検出されなかったのは、粒子径が大きすぎるためカラムに入ることができなかったためと考えられる。本検討結果から、動的光散乱法では、粒子径約 1800nm の凝集体は粒子径約 13nm の単量体と比較して、少なくとも 100 倍以上高い感度で測定でき、凝集体の管理法としても適していることが示された。一方、凝集体の量が過剰に評価される点は結果の解釈に注意すべき点である。

3.2 特異的ペプチドを用いて分離される画分の凝集体形成能の評価

汎用されるプロテイン A カラムである Mab Select SuRe で精製した画分では、保存中に凝集体が形成されたのに対して、独自に開発したタイプ II ペプチドカラムを用いて精製した画分 (Fra A) では凝集体の形成が起らなかった。これは、酸変性構造体がタイプ II ペプチドカラムによって除去されたことによるものと考えられる。従って、抗体医薬品の精製で用いられる Mab Select SuRe で生成された凝集体形成能を有する酸変性体の除

去のため、タイプIIペプチドカラムを用いた精製プロセスを取り入れることが効果的であることが示唆された。

E. 結論

抗体医薬品の製法開発、品質・安全性確保のための共通基盤技術として、①標準的糖鎖試験法、②結合活性測定法、③凝集体評価法の開発を行った。

①糖鎖試験法策定の一環として、抗体医薬品を用いて、中性糖鎖を試験するときのHPLC、CE及びMSを用いた様々な糖鎖プロファイリング法の有用性を多機関共同研究により検証した。いくつか課題があったが、いずれの方法も主要な結合糖鎖の不均一性の評価に利用可能と思われた。そのなかで、2AB誘導体化及びHILIC/UHPLC、APTS誘導体化及びCEは特に分離能が高く、良好な糖鎖プロファイルを示した。それぞれの分析法の特徴、課題並びに糖鎖試験設定において留意すべき事項を明らかにし、標準的試験法を策定した。本研究結果を活用し、日局糖鎖試験法を作成中である。

②生物活性試験法策定の一環として、表面プラズモン共鳴法を用いた抗体医薬品のFc受容体(FcRn)結合親和性試験法を策定した。3機関計6枚のセンサーチップにおける K_D 比の平均値に関する相対標準偏差は4つの被験物質に関して概ね良好であり、実施した共同研究の分析手順は標準的試験法として実行可能と考えられた。本研究結果を活用し、表面プラズモン共鳴法に関する日局参考情報原案を作成中である。

③動的光散乱法はサイズ排除クロマトグラフィーでは検出できない粒子径約 $2\mu\text{m}$ の凝集体を高感度で検出可能であり、凝集体に関する工程内管理試験あるいは規格試験法として有用であることを確認した。また、独自に開発したペプチドカラムにより、抗体医薬品の製造工程中で生じ凝集体生成の要因となり得る酸変性構造体を除去できることを示した。

F. 研究発表

1) 海外

原著論文による発表 5件
それ以外(レビュー等)の発表 1件
学会発表 6件

2) 国内

原著論文による発表 1件
それ以外(レビュー等)の発表・著書 19件
学会発表 21件

主な研究発表

原著論文(海外)

- 1) S. Nakazawa, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 420, 61-67(2012)
- 2) A. Harazono, T. Kobayashi, N. Kawasaki, S. Ito, M. Tada, N. Hashii, A. Ishii, T. Arato, S. Yanagihara, Y. Yagi, A. Koga, Y. Tsuda, M. Kimura, M. Sakita, S. Kitamura, H. Yamaguchi, H. Mimura, Y. Murata, Y. Hamazume, T. Sato, S. Natsuka, K. Kakehi, M. Kinoshita, S. Watanabe, T. Yamaguchi: A comparative study of monosaccharide composition analysis as a carbohydrate test for biopharmaceuticals, *Biologicals*, 39(3), 171-180 (2011)
- 3) K. Yamada, K. Kakehi: Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use, *J Pharm Biomed Anal.*, 55(4), 702-727 (2011)
- 4) K. Tanaka, M. Nishimura, Y. Yamaguchi, S. Hashiguchi, S. Takiguchi, M. Yamaguchi, H. Tahara, T. Gotanda, R. Abe, Y. Ito, K. Sugimura: A mimotope peptide of Abeta42 fibril-specific antibodies with Abeta42 fibrillation inhibitory activity induces anti-Abeta42 conformer antibody response by a displayed form on an M13 phage in mice, *Journal of neuroimmunology*, 236, 27-28 (2011)
- 5) T. Hatanaka, S. Tsukamoto, K. Sakamoto, K. Arima, Y. Ito: Isolation and affinity maturation of human IgA-specific peptide from random peptide T7 phage library for designing a new IgA affinity ligand, *Peptide Science*, 25-26 (2012)

学会発表(海外)

- 1) R. Kuribayashi, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Assessment of the glycan heterogeneity of monoclonal antibodies by LC/MS with a column-switching system: Application for process analytical technology., 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, (Mar. 19-22, 2012), Istanbul, Turkey
- 2) A. Harazono, N. Hashii, N. Kawasaki: Comparison of mass spectrometric glycoform profiles of innovator and biosimilar erythropoietin product, USP Science & Standards Symposium on Biologics & Biotechnology, (Oct. 3-6, 2011), Seattle, USA
- 3) S. Niimi: Japanese Concerns of the Japanese

Regulatory Agency regarding Immunogenicity of Monoclonal Antibody Products in Relation to their Efficacy and Safety, 1st Immunogenicity Determinates and Correlate Conference Prediction and Mitigation Risk, (May 9-11, 2011), Providence, USA

論文発表 (国内)

- 1) 新見伸吾：ヒトIgG及びヒト化モノクローナル抗体製剤において様々なストレスにより誘導された凝集体の粒子径及び相対光散乱強度の動的散乱による測定, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 129, 55-60 (2011)

それ以外 (レビュー等) の発表 (国内)

- 1) R. Kuribayashi, S. Nakazawa, N. Kawasaki: N-glycan profiling by LC/MS. Glycoscience Protocol Online Database (GlycoPOD). <http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolListShow.action>
- 2) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ：バイオ医薬品の不純物の評価(2), *ファームテックジャパン*, 28(4), 113-119 (2012)
- 3) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ：バイオ医薬品の不純物の評価(1), *ファームテックジャパン*, 28(3), 43-48 (2012)
- 4) 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子：バイオ医薬品の生物学的性質・免疫化学的性質解析の現状, *ファームテックジャパン*, 28 (1), 57-64 (2012)
- 5) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ：バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, *ファームテックジャパン*, 27(13), 99(2633)-104(2638) (2011)
- 6) 橋井則貴, 中澤志織, 川崎ナナ：再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス, *薬学雑誌*, 132(4), 395-530 (2012)
- 7) 中澤志織, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ：バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題—特性解析の新しい位置づけと重要性, *レギュラトリーサイエンス学会誌*, 2(1), 21-30 (2012)

著書 (国内)

- 1) 川崎ナナ：『臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理』, 技術情報協会, PHARMSTAGE(東京), 11(10), 4-8 (2012)
- 2) 橋井則貴, 石井明子, 新見伸吾, 川崎ナナ共著：「第1章申請に必要な品質評価試験項目設定でのポイント 第1節申請をふまえた構造・特性解析での押さえ所」「第1章 第2節申請で求められる不純物分析のポイント」, 『バイオ医薬品 CMC 申請のための品質評価と申請書作成 実学集』, 技術情報協会(東京), 3-18, 19-35 (2011)

- 3) 川崎ナナ：参考情報 ペプチド及びたん白質の質量分析, 『日本薬局方技術情報 2011 (JPTI 2011)』(財)日本公定書協会編, じほう(東京), 307-311 (2011)
- 4) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英：抗体医薬品の品質確保, 『抗体医薬のための細胞構築と培養技術』, 大政健史監修, シーエムシー(東京), 290-297 (2010)
- 5) 新見伸吾：第6章 ウイルス除去, 不活化 2) 抗体医薬品製造におけるプラットフォーム精製工程によるウイルスクリアランス, 不純物の除去, 『医薬品の品質管理とウイルス安全性』, 文光堂, 222-236 (2011)
- 6) 荒戸照世：第2章 バイオ (抗体) 医薬品における製造方法の確立と管理, 『バイオ/抗体医薬品・後続品における CMC 研究・申請と同等性確保』, サイエンス&テクノロジー, 17-25 (2011)

学会発表 (国内)

- 1) 川崎ナナ：バイオ医薬品開発動向と課題. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム(2012, 3, 28-31) 札幌
- 2) 原園 景, 橋井則貴, 栗林亮佑, 高久明美, 柳原繁弘, 西 基宏, 岡本寿美子, 津田祐理子, 中島和幸, 森啓太郎, 筑紫周子, 佐藤貴之, 四方 靖, 村上弘次, 掛樋一晃, 木下充弘, 神末和哉, 阿部 碧, 川崎ナナ：抗体医薬品の糖鎖試験法の検討. 日本薬学会第 132 年会(2012, 3, 28-31) 札幌
- 3) 石井明子, 鈴木琢雄, 西村和子, 多田 稔, 柳原繁弘, 西 基宏, 佐古好美, 塩原靖幸, 森啓太郎, 川崎ナナ：表面プラズモン共鳴法を用いた抗体医薬品の FcRn 結合親和性試験法の標準化. 日本薬学会第 132 年会(2012, 3, 28-31) 札幌
- 4) 栗林亮佑, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ：カラムスイッチング法を用いた液体クロマトグラフィー/質量分析法による抗体医薬品の糖鎖不均一性解析技術の開発, プロセス解析工学の開発. 日本薬学会第 132 年会シンポジウム(2012, 3, 28-31) 札幌
- 5) 川崎ナナ：臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理. 第1回レギュラトリーサイエンス学会学術集会(2011, 9, 2-3) 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1 2AB誘導体化及びRP/HPLC (A), APTS誘導体化及びCE (B)

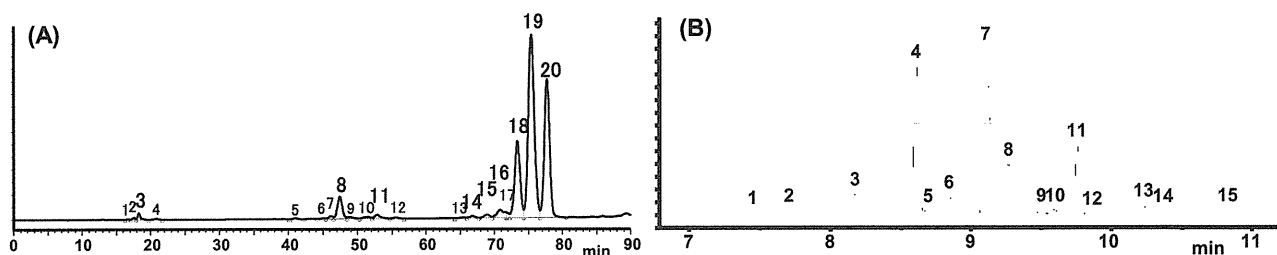


表1 各種分析法による抗体医薬品糖鎖プロファイリングの再現性 (各機関 n = 3回 x 2日)

2AB誘導体化/RP HPLC		peak 8	peak 15	peak 16	peak 18	peak 19	peak 20						
機関	推定糖鎖構造	M5	G2F+2H	G2F+H	G2F	G1F	G0F						
A	ピーク面積比 ^a	14.8	2.7	7.2	58.7	152.4	100.0						
	SD	0.11	0.00	0.01	0.39	1.3	0						
B	ピーク面積比 ^a	14.1	2.5	6.3	56.9	150.1	100.0						
	SD	0.09	0.00	0.01	0.43	1.6	0						
C	ピーク面積比 ^a	15.4	3.2	4.7	45.7	157.2	100.0						
	SD	0.11	0.01	0.02	0.91	3.2	0						
G	ピーク面積比 ^a	14.2	3.2	7.7	61.0	156.5	100.0						
	SD	0.55	0.23	0.37	1.4	2.1	0						
H	ピーク面積比 ^a	17.5	3.2	9.4	57.6	150.7	100.0						
	SD	0.25	0.13	0.17	0.4	0.3	0						
2AB誘導体化/HILIC HPLC		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5	peak 6	peak 7	peak 8	peak 10	peak 12	peak 13	
機関	推定糖鎖構造	G0-N	G0F-N	G0	G0F	M5	G0F-N+H	(1,6)G1F	(1,3)G1F	G2F	G2F+H	G2F+2H	
A	ピーク面積比 ^a	2.6	8.3	0.9	100.0	13.4	11.5	113.9	33.7	50.6	6.3	1.6	
	SD	0.13	0.02	0.06	0	0.10	0.46	0.35	0.21	0.20	0.32	0.84	
C	ピーク面積比 ^a	3.9	9.0	1.7	100.0	15.2	12.8	106.8	30.8	43.0	5.4	1.7	
	SD	0.09	0.05	0.19	0	0.33	0.29	1.4	0.63	1.5	0.59	0.20	
2AP糖鎖のRP HPLC		peak 2	peak 7	peak 8	peak 10	peak 11	peak 12	peak 13					
機関	推定糖鎖構造	M5	G0F-N	G0F-N+H	G0F	G1F	G2F	G2F+H					
F	ピーク面積比 ^a	12.4	7.8	18.4	100.0	160.9	68.8	4.6					
	SD	0.27	0.86	0.84	0	4.5	4.2	0.65					
2AP糖鎖のHILIC HPLC		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5	peak 6	peak 7	peak 10				
機関	推定糖鎖構造	G0F-N	G0	G0F	M5	G0F-N+H	G1F	G1F'	G2F				
F	ピーク面積比 ^a	8.8	2.8	100.0	11.9	13.2	125.6	38.2	62.1				
	SD	0.22	0.45	0	0.59	0.51	2.2	1.1	3.4				
HPAEC/PAD		peak 4	peak 5	peak 6	peak 7	peak 8							
機関	推定糖鎖構造	G0F	M5	G1F	G1F'	G2F							
A	ピーク面積比 ^a	100.0	10.4	112.0	32.0	37.8							
	SD	0.00	0.69	1.7	1.7	2.5							
APTS/CE		peak 3	peak 4	peak 6	peak 7	peak 8	peak 11	peak 13	peak 15				
機関	推定糖鎖構造	G0F-N	G0F	M5	(1,6)G1F	(1,3)G1F	G2F	G2F+H	G2F+2H				
D	ピーク面積比 ^a	13.3	100.0	10.7	118.1	32.7	45.5	5.4	2.4				
	SD	0.32	0	0.13	1.6	0.65	0.90	0.16	0.09				
E	ピーク面積比 ^a	10.1	100.0	9.5	118.3	32.5	46.5	5.1	2.4				
	SD	0.19	0	0.06	0.38	0.08	0.12	0.03	0.34				
I	ピーク面積比 ^a	4.5	100.0		102.9	30.9	31.0	5.6					
	SD	0.32	0		0.44	0.15	0.20	0.31					
糖鎖のMS		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5	peak 6	peak 7	peak 8	peak 9	peak 10	peak 11	
機関	推定糖鎖構造	M5	G0F-N	G0F-N+H	G0F	G0F-N+2H	G1F	G0F-N+3H	G2F	G1F+N	G2F+H	G2F+2H	
A ³	質量 (Da)	1354.6	1379.6	1541.7	1582.7	1703.7	1744.7	1865.8	1906.8	1947.8	2068.9	2230.9	
	ピーク面積比 ^a	8.7	28.9	14.4	100.0	3.9	142.3	1.6	42.2	1.4	4.2	1.4	
	SD	1.2	0.77	1.9	0	0.25	4.0	0.16	1.2	0.16	0.26	0.19	
遊離糖鎖		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5	peak 6	peak 7	peak 8	peak 9	peak 10	peak 11	
機関	質量 (M+Na, Da)	1257.5	1282.6	1444.6	1485.6		1647.7		1809.7		1971.7		
B	ピーク面積比 ^a	13.0	13.4	14.3	100.0		143.9		42.3		6.7		
	SD	3.8	1.0	1.3	0		5.73		1.67		0.83		
重鎖のMS		peak 1	peak 2	peak 3	peak 4	peak 5	peak 6	peak 7	peak 8	peak 11	peak 12		
機関	推定糖鎖	M5	G0F-N	G0F-N+H	G0F	G1F	G2F	G2F+H					
A	計算質量 (Da)	50544	50569	50732	50773	50935	51097	51259					
	観測質量 (Da)	50549	50568	50737	50777	50939	51100	51264					
C	ピーク面積比 ^a	2.2	0.3	2.4	100.0	159.1	50.9	3.5					
	SD	0.38	0.13	0.49	0	0.78	1.5	1.1					
C	観測質量 (Da)	-	-	50735	50772	50935	51097	-					
	ピーク面積比 ^a			8.9	100	161.0	35.5						
	SD			0.20	0	2.6	0.66						

図2 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による結合親和性の測定

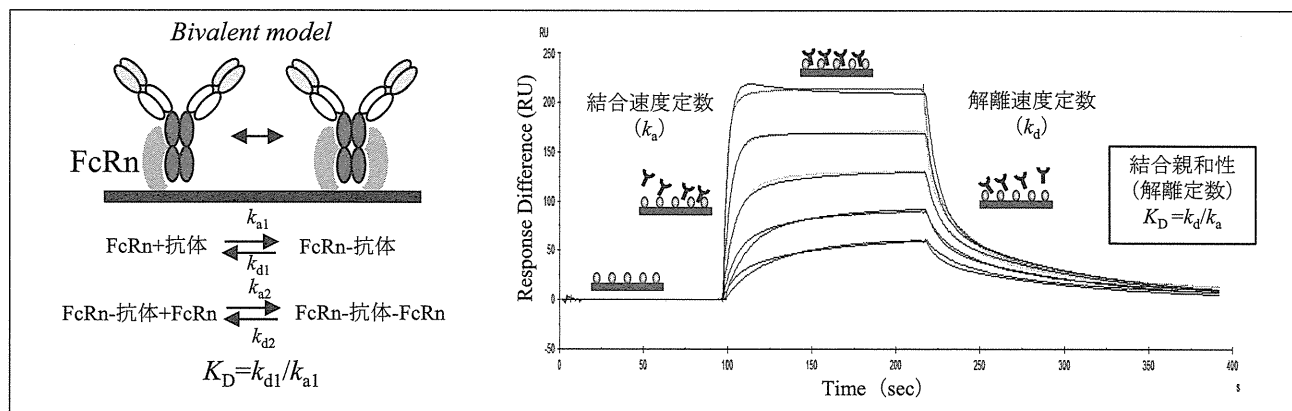


表2 対照物質の測定 (6回) による併行精度の確認

	機関A			機関B			機関C		
	Fc	Fc2	Fc3	Fc2	Fc3	Fc4	Fc2	Fc3	Fc4
固定化量	305 RU	293 RU	261 RU	302 RU	335 RU	291 RU	256 RU	232 RU	258 RU
k_{a1} (1/Ms)	mean 206,800	219,533	223,217	194,300	201,267	196,733	93,233	87,700	84,433
	SD 17,725	17,515	18,570	7,761	8,753	8,117	8,884	7,894	7,167
	RSD(%) 8.6	8.0	8.3	4.0	4.3	4.1	9.5	9.0	8.5
k_{d1} (1/s)	mean 0.197	0.234	0.234	0.144	0.153	0.168	0.107	0.102	0.095
	SD 0.010	0.012	0.011	0.008	0.010	0.008	0.007	0.010	0.011
	RSD(%) 5.2	5.0	4.7	5.4	6.4	4.9	6.8	9.8	11.9
K_D (nM)	mean 955	1,069	1,053	740	761	855	1,151	1,164	1,122
	SD 62	64	66	23	26	26	47	67	86
	RSD(%) 6.4	6.0	6.3	3.1	3.4	3.1	4.1	5.8	7.6

図3 被験物質の測定結果 (relative K_D)

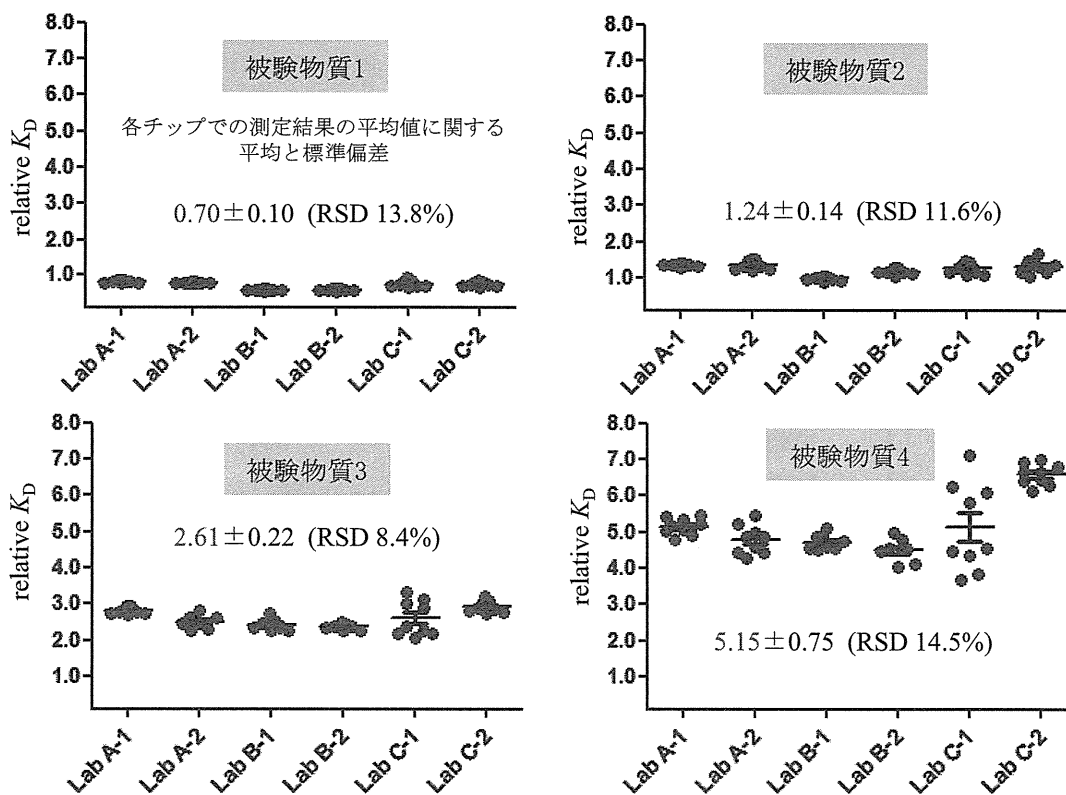


図 4

動的光散乱による単量体及び凝集体の測定

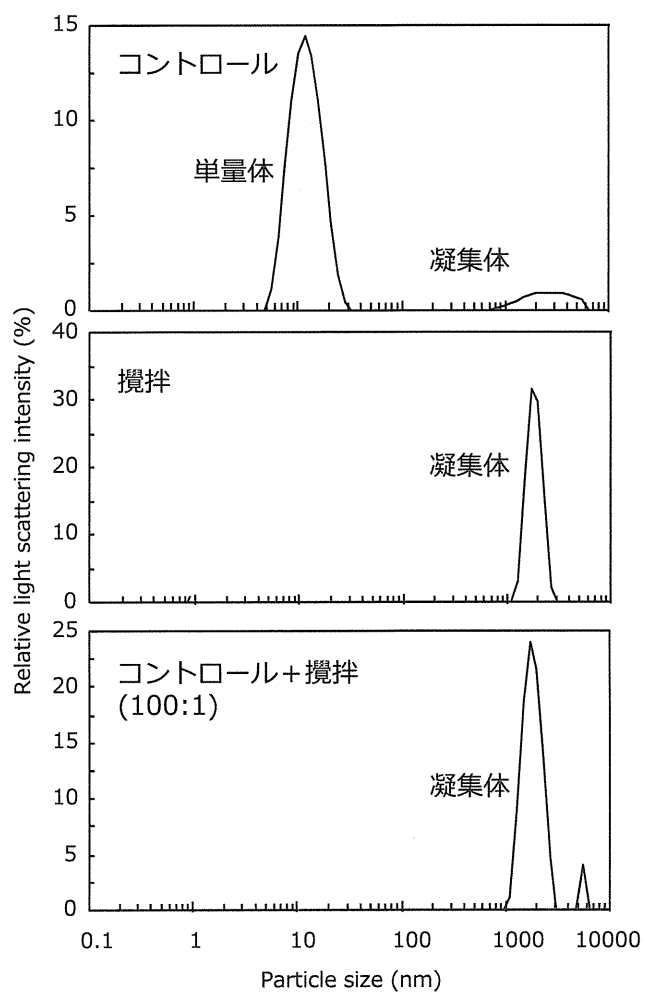


図5

SECによる単量体及び凝集体の測定

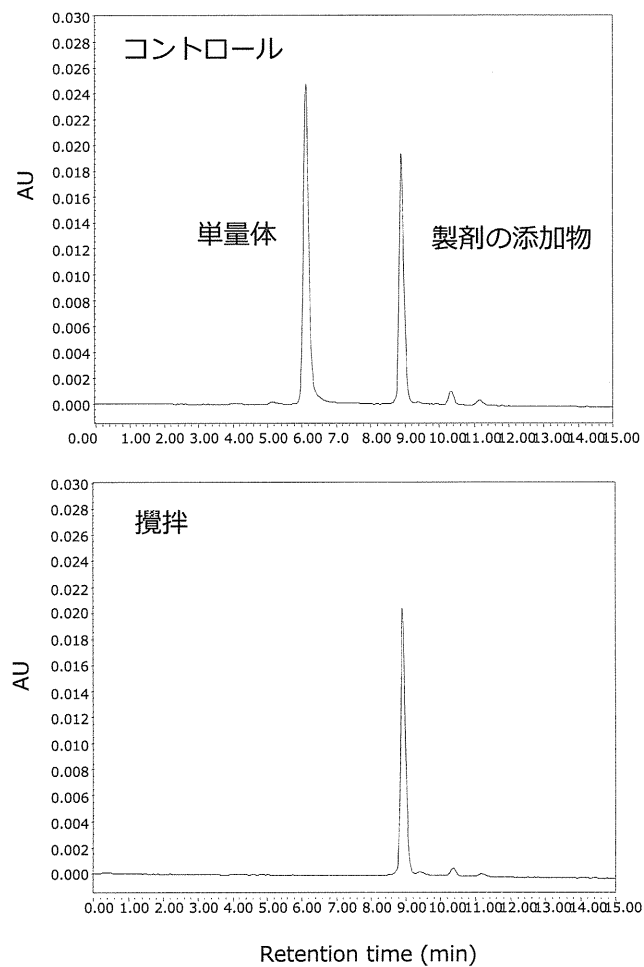


表3 Mab Select SuReカラム及びタイプIIペプチドカラムにより精製した画分における凝集体形成のタイムコース

サンプル	R.T. *	0 day	1 day	2 day	4 day	5 day
Mab Select SuRe精製IgG1	10.13	0.79	0.75	1.02	1.01	1.00
	11.65	99.17	99.16	98.90	98.82	98.98
タイプII精製Fra A	10.13	0.39	0.33	0.37	0.36	0.37
	11.65	99.38	99.55	99.54	99.54	99.56
タイプII精製Fra D	10.13	5.83	5.87	8.26	8.40	7.76
	11.65	94.06	93.02	91.72	91.57	92.14

*: R.T. 10.13は多量体、R.T. 11.65は単量体と推定されるピーク

天然物医薬品の評価手法と標準化に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

研究者 合田 幸広

研究期間 平成 22 年 4 月～平成 24 年 3 月

研究要旨 標準化を指向した品質評価法として、遺伝子鑑別、LC-ELSD、LC/MS プロファイル分析、細胞運動能抑制、Tyr リン酸化変動等各種試験法を検討、天然物医薬品に対する試験法の適性を評価すると共に、単味生薬製剤の承認基準案について検討を行った。

分担研究者

- (1) (株) ツムラ生薬研究部 近藤健児 中井洋一郎
- (2) 三栄源エフ・エフ・アイ(株) 中川 誠
- (3) 日本粉末薬品株式会社八尾工場 横倉胤夫
- (4) (株) 栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (5) (株) ウチダ和漢薬研究開発部 川崎武志
- (6) (株) 島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス事業統括部 白崎良成 二宮健二
- (7) 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野教授 水上 元
- (8) 富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野教授 小松かつ子
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 袴塚高志
- (10) エスエス製薬株式会社成田研究所・製剤開発研究部分析研究課 廣田浩之
- (11) アサヒフードアンドヘルスケア株式会社学術技術部 松本一浩
- (12) 興和(株) 医薬事業部薬粧開発部 小泉裕久
- (13) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課 木村博明 浅羽祐介
- (14) ゼリア新薬工業株式会社中央研究所コンシューマヘルスケア研究部 小林正治郎
- (15) 大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所分析研究室 日向野太郎 平山千穂
- (16) 慶應義塾大学薬学部教授 木内文之
- (17) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官 日向昌司
- (18) 大正製薬株式会社医薬事業グループ医薬化学研究所 濱口卓也
- (19) 北里大学東洋医学総合研究所長 花輪壽彦

A. 研究目的

天然物医薬品は、合成品と違い、医薬品としての規格化・標準化が困難で、現代科学の水準に照らして、再現性の良い医療を行い、医薬品として新効能等を取得する為の品質規格条件が明確で

はない。本研究では、産官学の研究者が共同で、現代科学の水準に基づき、分子生物学、植物化学、分析化学的な手法を組み合わせながら、生薬、西洋ハーブ、漢方処方等の天然物医薬品について、標準化を指向した品質評価手法の確立をはかることを目的とする。

B. 研究方法

本研究は、生薬、西洋ハーブ、漢方処方の3分野を対象としている。生薬分野では、生薬の基原の鑑別法の開発を実施するとともに、基原種の差によるメタボローム分析を実施し、多変量解析による標準化法の確立をはかる。また、単味生薬について、調査研究を実施し文献情報集を作成する。西洋ハーブでは、基原の鑑別法を確立するとともに、プロファイル分析等を実施し、新規医薬品の作出に貢献する。漢方処方では、抗腫瘍活性を持つ麻黄湯、および構成生薬である麻黄をモデル医薬品とし、生体由来の医薬品あるいはバイオ医薬品の評価法やガイドラインを参考に、標準化法の確立をはかる。

(倫理面への配慮)

本研究漢方処方分野で用いているヒト癌由来細胞株 HuH-7 細胞および MDA-MB-231 細胞は、研究用に頒布されている細胞株で、倫理的な問題は無い。また、その他のヒト由来材料や実験動物を用いた実験は実施していない。

C. 研究結果及び考察

<生薬分野>

互いに類似生薬の関係にある半夏及び天南星をモデル生薬とし、各基原植物 *Pinellia ternata* (ハンゲ)、*P. pedatisecta*、*Arisaema* sp. (両者ともテンナンショウ) の葉緑体 DNA trnL-F IGS 領域の塩基配列解析を行った結果、当該領域が上記 3 種の鑑別に有効である事を示す結果が得られた。NMR メタボローム解析では、各試料は基原植物毎にグループ分けされ、基原植物と水性エキ

スの成分パターンに相関関係が見出された。また本事実には各試料の NMR 及び塩基配列データを用いた PLS 回帰分析の結果からも支持され、混合物の NMR データから、基原植物を鑑別するモデル式の構築に成功した。分子系統樹及び NMR メタボローム解析の結果、*P. pedatisecta* は、ハンゲの基原である *P. ternata* よりも、*Arisaema* 属植物と遠い関係にあることが示唆され、テンナンショウの基原植物として、両者を同等に扱う事は不適切であると考えられた。現在、これらの事実を元にテンナンショウの規格基準を定めている日本薬局方外生薬規格（局外生規）の改訂作業が進められている。また、公的規格に反映させることを考慮しながら、両者をどのように区別していくか、遺伝子的及び形態学的検討を行った。また、局方収載が決定している生薬である党参と晋耆、及び赤芍について、中国も含め幅広く植物及び生薬市場品等を集め、遺伝子的な解析を行い、各生薬の遺伝子的な多様性について検討した。また、晋耆、地竜について確認試験法を確立するとともに、地黄、朮類生薬について、NO 産生抑制能と基原種の関係について明らかにした。また別に、局方医薬品承認申請の手引き改訂を目指し合計 31 品目の生薬について網羅的調査を行い、日本において長年の使用実績がある生薬の有効性及び安全性に関するエビデンス等を収集し、およそ 2300 頁からなる単味生薬に関するエビデンスのデータ集(I)(II)を完成させた。さらに、本調査より、単味生薬製剤の効能効果として新規に追加、改訂されるにふさわしいものをいくつか見出すことができた。今後は、見出された効能効果について、さらに詳細な調査を行い、個々の生薬の状況に即した承認審査ガイドラインを検討していく必要があるものと考えられる。

上記のように、生薬分野では、天然物医薬品の標準化のための基盤となる基原植物の鑑別法の確立と、基原植物の違いが成分プロファイルに与える影響の解析方法で、十分な成果が出せ、その結果を公的な規格に反映させることが決定している。今後は、このような成分プロファイルの差と、薬効との関係を解析していく必要がある。また、単味生薬に関するエビデンスのデータ集を完成させ、生薬製剤承認基準策定に向けて、より具体的な段階に移行できる見通しを得るに至った。

<西洋ハーブ分野>

ブラックコホシユ、チェストツリー、イチョウ葉、赤ブドウ葉等について成分プロファイルを利用した品質評価を実施するとともに、PCR-RFLP 法に基づく遺伝子鑑定法を確立した。これらの手

法を、欧州で医薬品として利用されている製品と日本国内で健康食品として市販されている製品に適用した結果、後者では、かなりの割合で誤った基原や保存状態の悪い原材料を使用していることが判明した。また、ブラックコホシユやイチョウ葉では、HPLC-ELSD 等を利用し良好な成分分離を示す分析系を確立するとともに、多変量解析により主成分分析を行った結果、欧州で医薬品として利用されている製品と日本国内で健康食品として市販されている製品は、容易に区分できることを明らかにした。また、多くの西洋ハーブにおいて基原の正しくない健康食品の流通を確認しており、エビデンスが確立している西洋ハーブの場合には、積極的に一般用医薬品として流通させたほうが、消費者の利益になるものと考えられた。なお、本研究の成果を利用し、平成 23 年 1 月に、赤ブドウ葉がダイレクト OTC として承認され、複数の製品についても、承認審査が進んでいる。

<漢方処方分野>

抗腫瘍活性を持つ麻黄湯、および構成生薬である麻黄をモデル医薬品とし、生体由来の医薬品あるいはバイオ医薬品の評価法やガイドラインを参考に、種々の評価法について具体的に検討し以下の結果を得た。

麻黄湯及び麻黄は、HGF で誘導されるヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞の運動能を、濃度依存的に低下させた。HGF や EGF で誘導されるヒト肝癌細胞株 HuH-7 細胞の増殖を麻黄は濃度依存的に抑制した。両法とも定量性が確認され、生物学的評価法として有用であることが判明した。さらに、インビトロキナーゼ測定法を用い、麻黄の阻害効果を解析した結果、複数のキナーゼで高い阻害活性が確認された。次いで、麻黄の細胞増殖阻害との関連性が推定されたキナーゼにつき、培養ヒト腎臓癌細胞でキナーゼ基質のリン酸化について検証した結果、麻黄による阻害効果が確認された。次にリン酸化チロシン抗体アレイを用い、HuH-7 細胞での麻黄によるリン酸化の変動を解析した結果、癌細胞の増殖や癌転移に関わる複数のレセプター型チロシンキナーゼのリン酸化が抑制されていることが判明した。このうち、HGF レセプターの MET には、化学発光による測定法が試験法として有用であった。また、麻黄エキスで処理したヒト肝臓癌由来 HuH-7 細胞の miRNA について miRNA アレイを用いて解析した結果、2 倍以上発現が上昇している 6 種の miRNA が見出された。このうち、hsa-miR-16、hsa-miR-22、hsa-miR-192 については、発現上昇により癌の増殖や転移を抑

制することが明らかとなった。

次に、局方麻黄で含量規定があるエフェドリンにつき抗腫瘍効果を検討したが、活性は見出せなかった。そこで、前述した生物学的評価法を利用し活性化化合物群の単離を試み構造決定に至った（特許申請の関係で構造等を記載しない）。これらの化合物について生物学的特性解析を行った。その結果、化合物 A は、濃度依存的に運動能抑制活性、細胞増殖抑制作用、c-MET キナーゼ阻害活性、c-Met の下流の Akt のリン酸化抑制活性を有する一方、ERK のリン酸化に影響を与えないことが判明した。Met-Akt シグナル経路は、細胞運動に関わっていることから、化合物 A の細胞運動阻害作用の作用機構を明確に示しているものと考えられる。さらに、麻黄のキナーゼ阻害作用が、化合物 A に起因するか検証した。インビトロキナーゼ測定法を用い、麻黄で阻害効果が観察されたキナーゼを含む 50 種のキナーゼについて化合物 A の阻害効果を解析した（特許申請準備中につき未掲載）。麻黄で阻害されたキナーゼと化合物 A で阻害されたキナーゼに相関が観察された。以上の結果は、麻黄で確認されていた効果と矛盾しないことから、同化合物は麻黄の活性本体のひとつであるものと推定された。

D. 結論

<生薬分野>

生薬分野では、生薬の基原の各種鑑別法の開発を実施するとともに、基原種の差によるメタボローム分析を実施した。また、基原と生理活性の関係を検討した、さらに、局方収載が決定している生薬である党参と晋耆、及び赤芍について、多数の植物及び生薬の遺伝子解析を実施し、生薬の多様性を解析した。これらの結果は、公的な規格設定に積極的に利用される予定である。

また、生薬製剤承認基準案策定の基盤整備として、31 品目の生薬について、その有効性及び安全性を保証するエビデンスの収集を行い、およそ 2300 ページからなるデータ集を作成した。

<西洋ハーブ分野>

標準化を指向して、各種西洋ハーブについて、基原の鑑別法を確立するとともに、様々なプロファイル分析等を実施した。その結果、医薬品及び健康食品として流通する製品で成分組成に大きな違いがあること示した。また、多くの西洋ハーブにおいて基原の正しくない健康食品の流通を確認した。本研究の成果を反映して、赤ぶどう葉がダイレクト OTC として承認された。

<漢方処方分野>

麻黄湯及び麻黄をモデルとし、抗腫瘍活性を対象として生物学的評価手法について検討した。その結果、麻黄湯の活性は、麻黄に由来することが判明し、麻黄の抗腫瘍活性を担保するためには、細胞運動抑制活性、キナーゼ阻害アッセイ及び miRNA 発現解析等が有用であるものと考えられた。またさらに、麻黄由来の活性成分の探索と評価を実施したところ、麻黄で見出されている様々な抗腫瘍効果を裏付ける生物学的な活性と同様の活性を持つ化合物を見出した。

多成分系からなる天然物医薬品の場合、標準化には、基原の確定がまず重要であり、基原種がコントロール出来る場合には、さらに特定の活性化化合物の含量のコントロールと組み合わせて、活性の標準化として、適切な生物学的な試験を設定していくことが効果的であるものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Kakigi Y., Mochizuki N., Ichio T., Hakamatsuka T., Goda Y., Analysis of Terpene Lactones in a Ginkgo Leaf Extract by High-Performance Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Biosci. Biotech. Biochem.* 74, 590-594 (2010).
- 2) 丸山卓郎, 近藤健児, 四柳雄一, 山本豊, 川崎武志, 司馬真央, 寺坂和祥, 山根真由, Shu Zhu, 坂田こずえ, 藤田正雄, 穂山浩, 西村直行, 小松かつ子, 水上元, 合田幸広, PCR-RFLP 法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験に対する妥当性確認試験, *生薬学雑誌*, 64, 96-101 (2010).
- 3) Goda, Y, Attendance of 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, *Farumashia*, 46, 375 (2010).
- 4) Manissorn, J., Sukrong, S., Ruangrunsi, N., Mizukami, H., Molecular phylogenetic analysis of *Phyllanthus* species in Thailand and the application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for *Phyllanthus amarus* identification, *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 1723-1727 (2010).
- 5) 合田幸広, 袴塚高志, 一般用漢方製剤の承認基準について, *医薬品情報学*, 11, 210-216 (2010).
- 6) Kakigi Y., Hakamatsuka T., Goda Y., Takeshi Ichio T., Mochizuki, N.,

- Investigation of Biologically Active Components in Ginkgo Leaf Products on the Japanese Market, *Biosci. Biotech. Biochem.* 75, 777-779 (2011).
- 7) 袴塚高志, 西洋ハーブの有効性・安全性を担保する品質評価に関する研究, *Aromatopia*, 20, 8-10 (2011).
 - 8) Zhu S., Bai Y.-J., Oya M., Tanaka K., Komatsu K., Maruyama T., Goda Y., Kawasaki T., Fujita M., Shibata T., Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast trnK intron sequence, *Food Chemistry*, 129, 1884-1850 (2011).
 - 9) Hyuga, S., Shiraishi, M., Hyuga, M., Goda, Y., Hanawa, T., "Ephedrae herba, a major component of maoto, inhibits the HGF-induced motility of human breast cancer MDA-MB-231 cells through suppression of c-Met tyrosine phosphorylation and c-Met expression." *J. Trad. Med.* 28, 128-138 (2011).
 - 10) Kakigi, Y., Hakamatsuka, T., Icho, T., Goda, Y., Mochizuki, N., "Comprehensive analysis of flavonols in Ginkgo biloba products using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-violet detection and time-of-flight mass spectrometry." *Biosci. Biotech. Biochem.* 76, in press (2012).
2. 学会発表等
- 1) 袴塚高志, 高橋敏, 寺崎さち子, 横田洋一, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (8) イチョウ葉製品の崩壊性について, 日本食品化学学会第 16 回総会・学術大会, 2010 年 6 月, 大阪.
 - 2) 柿木康宏, 鴨脚毅, 袴塚高志, 合田幸広, 望月直樹, イチョウ葉エキス中のフラボノイド類の網羅的分析, 日本食品化学学会第 16 回総会・学術大会, 2010 年 6 月, 大阪.
 - 3) 合田幸広, 一般用医薬品承認審査合理化等検討会 (中間報告) への対応研究, 日本 OTC 医薬品協会生薬製品委員会講演会, 2010 年 6 月, 東京.
 - 4) 島戸陽太, 牧野利明, 水上 元, 白朮と蒼朮の薬能の違いに関する研究-RAW264 細胞を用いた抗炎症作用の比較-, 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島.
 - 5) 何敬愉, 朱姝, 小松かつ子, 合田幸広, 党参の基原と品質に関する研究 (2) Codonopsis 属植物及び党参の ITS 領域の塩基配列について, 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島.
 - 6) 若菜大悟, 丸山卓郎, 山本豊, 合田幸広, メタボローム解析による半夏, 天南星の判別, 日本生薬学会第 57 回年会, 2010 年 9 月, 徳島.
 - 7) 花輪壽彦, 近代漢方の過去・現在・未来, 第 20 回漢方治療研究会, 2010 年 9 月, 東京.
 - 8) Hanawa, T. and Odaguchi, H., Current situation of Oriental Medicine Research Center, Kitasato University, Japan, Cooperative seminar of global research network for traditional medicine, The 16th anniversary of K IOM international symposium, 2010 年 10 月, 大韓民国.
 - 9) 花輪壽彦, 漢方の臨床 28 年の経験から, 第 18 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2010 年 11 月, 東京
 - 10) 袴塚高志, 西洋ハーブの品質評価, 第 18 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 平成 22 年 11 月, 東京.
 - 11) 丸山卓郎, 半夏の基原-DNA 解析及び天南星との鑑別について, 第 26 回生薬に関する懇談会, 2010 年 12 月, 東京.
 - 12) 合田幸広, 一般用医薬品承認審査合理化等検討会 (中間報告) への対応研究, 大阪家庭薬協会講演会, 2011 年 1 月, 大阪.
 - 13) 日向須美子, 日向昌司, 白石真澄, 花輪壽彦, HGF により誘導される乳癌細胞の運動能及び c-Met のチロシンリン酸化の麻黄湯による抑制, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月, 静岡.
 - 14) 白石真澄, 日向須美子, 日向昌司, 花輪俊彦, ヒト乳癌細胞の c-Met 遺伝子発現に対する麻黄湯および麻黄の効果, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月, 静岡.
 - 15) 袴塚高志, 遠藤明仁, 勢ヶ康代, 合田幸広, 森田英利, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (9) ヒト腸内乳酸菌の遺伝子発現に及ぼすブラックコホシ健康食品の影響, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月, 静岡.
 - 16) 合田幸広, 天然物の基原と品質, 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会, 2011 年 5 月, 東京.

- 17) 袴塚高志, 遠藤明仁, 勢ヶ康代, 森田英利, 合田幸広, 西洋ハーブの有効性・安全性及び品質確保に関する研究 (10) ブラックコホシユによる腸内細菌遺伝子発現変動のDNAマイクロアレイ解析, 日本食品化学学会第 17 回総会・学術大会, 2011 年 5 月, 東京.
- 18) 丸山卓郎, 生薬の品質評価のための新たな手法の確立, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011 年 8 月, 富山.
- 19) 日向須美子, 白石真純, 日向昌司, 合田幸広, 花輪壽彦: 麻黄湯と構成生薬の麻黄による HGF-c-Met シグナルの阻害, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011 年 8 月, 富山.
- 20) 白石真純, 日向須美子, 日向昌司, 花輪壽彦, 抗癌剤耐性ヒト肝臓癌細胞を用いた漢方薬の MDR-1 に対する効果の解析, 第 28 回和漢医薬学会学術大会, 2011 年 8 月, 富山.
- 21) 何敬愉, 朱姝, 小松かつ子, 合田幸広, 神谷洋, 横倉胤夫, 党参の基原と品質に関する研究 (3) -*Codonopsis* 属植物及び党参の ITS 領域の塩基配列, 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月, 東京.
- 22) 袴塚高志, 西洋ハーブの品質評価における Corona CAD の応用, CORONA USER' S FORUM 2011, 2011 年 10 月, 大阪.
- 23) 袴塚高志, 西洋ハーブの品質評価における Corona CAD の応用, CORONA USER' S FORUM 2011 (Tokyo), 2011 年 10 月, 東京.
- 24) 日向須美子, 白石真純, 日向昌司, 合田幸広, 花輪壽彦, c-Met 発現ヒト癌細胞の HGF により誘導される細胞運動, 細胞分散, 及び細胞増殖に対する麻黄湯の抑制効果, 日本薬学会 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌.
- 25) 白石真純, 日向須美子, 日向昌司, 花輪壽彦, MDR-1 高発現ヒト肝臓癌細胞 Pac-1 を用いた漢方薬の薬剤耐性に対する効果の解析, 日本薬学会 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌.

F. 知的財産権の出願・登録状況

国内特許出願 特願 2009-86363, 特開 2010-235529

国際特許出願 国際出願番号 : PCT/JP2010/055622

発明者 : 花輪壽彦, 日向須美子, 日向昌司. 発明名称 : 麻黄を成分とする MET 阻害剤.

天然物医薬品の評価手法と標準化に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部
研究者 合田 幸広

研究要旨 標準化を指向した品質評価法として、遺伝子鑑別、LC-ELSD, LC/MS プロファイル分析、細胞運動能抑制、Tyr リン酸化変動等各種試験法を検討、天然物医薬品に対する試験法の適性を評価すると共に、単味生薬製剤の承認基準案について検討を行った。

分担研究者

- (1) (株)ツムラ生薬研究部生薬研究課 中井洋一郎
- (2) 三栄源エフ・エフ・アイ(株)品質保証部検査課 中川 誠
- (3) 日本粉末薬品株式会社八尾工場 横倉胤夫
- (4) (株)栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (5) (株)ウチダ和漢薬研究開発部 川崎武志
- (6) (株)島津製作所分析計測事業部バイオ臨床ビジネスユニット 二宮健二
- (7) 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野教授 水上 元
- (8) 富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野教授 小松かつ子
- (9) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 袴塚高志
- (10) エスエス製薬株式会社成田研究所・製剤開発研究部分析研究課 廣田浩之
- (11) アサヒフードアンドヘルスケア株式会社学術技術部 松本一浩
- (12) 興和株式会社生薬事業部薬粧開発部 小泉裕久
- (13) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課 浅羽祐介
- (14) ゼリア新薬工業株式会社中央研究所コンシューマヘルスケア研究部 小林正治郎
- (15) 大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所 平山千穂
- (16) 慶應義塾大学薬学部教授 木内文之
- (17) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官 日向昌司
- (18) 大正製薬株式会社生薬事業グループ生薬化学研究所 濱口卓也
- (19) 北里大学東洋医学総合研究所所長 花輪壽彦

A. 研究目的

天然物医薬品は、合成品と違い、医薬品としての規格化・標準化が困難で、現代科学の水準に照

らして、再現性の良い医療を行い、医薬品として新効能等を取得する為の品質規格条件が明確ではない。本研究では、産官学の研究者が共同で、現代科学の水準に基づき、分子生物学、植物化学、分析化学的な手法を組み合わせながら、生薬、西洋ハーブ、漢方処方等の天然物医薬品について、標準化を指向した品質評価手法の確立をはかることを目的とする。

B. 研究方法

<生薬の品質評価手法と標準化に関する研究>

使用した生薬及び植物体の入手先は、特に記述したもの以外は、昨年度の報告書に記載したものを使用した。

B-1. 党参

党参はキキョウ科の *Codonopsis pilosula*, *C. pilosula* var. *modesta*, *C. tangshen* などの根に由来する生薬である。天然物医薬品の品質確保の基本は、正しい基原の原材料を使用することであることから、本研究では、*Codonopsis* 属植物の遺伝子多型に基づく同定法を開発する。本年度は、今年度は主として HS 事業で集められた日本市場品及び香港市場品を主な実験材料とし、核 rDNA の ITS 領域を対象とし、PCR 法で増幅した。

B-2. 赤芍

芍薬は中国において白芍と赤芍に区別され、『中国薬典』では、白芍は *Paeonia lactiflora* Pallas (シャクヤク) の根を湯通しした後に外皮を除去したもの、あるいは外皮を取り除いて湯通ししたものと、赤芍を *P. lactiflora* または *P. veitchii* Lynch の根であると規定している。一方、日本では芍薬を白芍と赤芍に区別して用いることは少なく、一般に皮付きのものを赤芍と称してきた。本研究では、収集された中国及び日本市場品の赤芍について、ITS 領域の塩基配列を検討し、種の確定と遺伝子の多様性について調査した。

B-3. 晋耆

シンギは *Hedysarum polybotrys* の乾燥した根であり、現在日本薬局方への収載が検討されてい