

注意する。用いた抗HCP抗体が、原薬に含まれるHCPを偽りなく検出できていることを示すために、HCPの電気泳動後のタンパク質染色像とウエスタンブロッティング結果の比較が有用である。

抗HCP抗体の調製に際しては、タンパク質の種類により動物における抗体の産生されやすさが異なることも、考慮すべき事項の1つである。例えば、動物にHCPを免疫後、ある程度初期の段階で誘導された抗HCP抗体を用いてアフィニティーカラムを作製し、アフィニティーカラムを素通りしたHCP画分を再度免疫原として用いることにより、幅広いHCPに対する抗体が得られる可能性がある。また、一般的に低分子量のHCPに対する抗体は産生されにくいいため、試験に適した抗HCP抗体を得るためには、SECにより分取した低分子量画分を免疫原として用いることが有用な場合もあるかもしれない。

HCP残存と製品の安全性との関連については、HCP画分に含まれるタンパク質のヒトタンパク質との相同性、および生物学的活性の点から考える必要がある。動物細胞由来HCPのように、ヒトタンパク質との相同性が比較的高いHCPに関しては、製剤投与後に生物活性を示す可能性や、抗HCP抗体が産生されて生体内ヒトタンパク質に交差反応し、標的となったヒトタンパク質の機能に影響を及ぼす可能性が否定できない。一方、ヒトタンパク質との相同性が低い大腸菌等に由来するHCPでは、抗HCP抗体の産生が起りやすいため、繰り返し投与時の過敏症発現に関わる可能性がある。

どのような種類のHCPが生物学的活性を有するかについては不明の点が多いが、サイトカインおよびケモカインファミリー、ヒートショックプロテインはその候補かもしれない。最近のゲノム配列の報告によると、ヒトとマウスで全遺伝子の約80%が相同性を有することが明らかになっている。また、CHO K1細胞では13,374種類の遺伝子がヒトと共通している。したがって、理論的には非ヒト哺乳類細胞由来のHCPがヒトに投与された場合に機能し、安全性に影響する可能性がある。

## ②宿主細胞由来DNA

樹立された動物由来細胞株(Continuous cell line)に由来するDNAに関しては、残余の宿主DNAが腫瘍原性を有する可能性が懸念されていた。しかし、宿主細胞由来DNAが腫瘍原性を示すリスクは、ウイルスゲノムを導

入してワクチンを生産するような場合を除いて、過去に懸念されていたよりもはるかに低く、WHOではDNAは一般的な不純物として分類できるとの議論もなされている<sup>9)</sup>。実際、これまでに、残存DNAによる発がんや感染はヒトでは報告されていない<sup>9)</sup>。WHOからは、宿主細胞由来DNAの限度値として10ng/doseという数値が示されている<sup>9)</sup>。ただし、この値は腫瘍原性のリスクがより低いと考えられる微生物、二倍体細胞、初代培養細胞には適用されない。二倍体細胞、初代培養細胞については、適切なバリデーションのデータが得られていれば、原薬を対象とした規格及び試験方法を設定してDNA残存量が許容値以下であることを示す必要は必ずしもないと筆者は考える。微生物由来DNAにおいてCpG配列が免疫原性増強効果を持つという報告もあり、残存許容量は製品に応じて設定すべきである。

DNAの検出法としては、感度の点から、ハイブリダイゼーション法、DNA結合免疫リガンドアッセイ、定量的PCRが適しているとされている<sup>8,10)</sup>。その他に、蛍光色素であるPicoGreenなどを二重鎖DNAに挿入させ検出する方法も利用されている。検出可能なDNA量は、ハイブリダイゼーション法では6 pg、DNA結合免疫リ

## ベルテック社 クリーンルーム用製品

DEC-AHOL®-WFI 70% (70% IPA)  
STER-AHOL®-WFI 70% (70% 変性エタノール)



### 特徴

- ・cGMPに基く製造設備
- ・USP 注射用水(WFI)で希釈
- ・0.2µmフィルター透過
- ・ダブルバッグ包装
- ・γ線照射滅菌済
- ・各種証明書をLot#毎に発行  
納品毎に添付  
(分析試験・無菌性試験  
γ線照射・LAL Test)
- ・豊富なバリデーションデータ



試供品あります。

その他、様々な滅菌・消毒・洗浄剤や器材消耗品、モニタリングシステム等の製品がラインナップ化されています。

カタログのご請求、お問合せは下記までお願いします。

テクノケミカル株式会社

〒113-0021 東京都文京区本駒込 1-27-9  
TEL: 03-3947-7310 FAX: 03-3947-7306

HP: www.technochemical.com  
E-mail: info@technochemical.com

DM資料請求カード№63

グンドアッセイでは3pg, 定量的PCRでは1pg以下, PicoGreenを用いた方法では5pgとされる。宿主細胞由来DNAは, 異なる塩基配列を持つDNA断片の集合体であるため, 設定した方法により被験試料中のDNA量を適切に評価できていることを示す必要がある。また, 試料中のタンパク質の消化やDNAの抽出等の前処理が必要な場合は, 添加回収実験によりDNAの回収率を確認し, 前処理方法の妥当性を示す。DNA結合免疫リグンドアッセイを除き, 標準DNAは, 宿主細胞を製品と同様に培養して調製し, アガロースゲル電気泳動によりサイズを確認しておく。

ハイブリダイゼーション法では, 宿主細胞から調製したDNAをプローブ作製用鋳型とする。配列非特異的な方法であるが, 宿主細胞DNAに特異的である。ハイブリダイゼーション法は, 頑健性や精度が十分でないとする報告もある。検出されるのは50bp以上のDNAである。

DNA結合免疫リグンドアッセイは, ビオチン標識した一本鎖DNA結合タンパク質およびウレアーゼ標識した抗一本鎖DNA抗体を利用したイムノアッセイであり, 原理はHCP結合免疫リグンドアッセイと同じである<sup>11)</sup>。本アッセイは, 真度が優れているとされる。配列非依存的な方法であり, 原薬を得るまでの工程あるいは測定の際の操作中に混入された宿主細胞以外のDNAも検出されることに注意が必要である。また, 検出されるのは600bp以上のDNAであり, 80bp以下のDNAにより反応が阻害されることにも注意が必要である。

定量的PCR法では, 精製工程における宿主細胞のゲノム由来の総DNAの除去を反映できると考えられる特定の遺伝子領域を増幅することにより定量する。増幅されるDNAフラグメントは150bp以上とすることが推奨されている。選択したプライマーの妥当性について, 増幅された遺伝子産物の塩基配列と予測される塩基配列を比較することにより検証する必要がある。宿主細胞として樹立された動物由来細胞株を用いる場合は, 最終的な特定のDNAの除去率とWHOが推奨している宿主細胞由来DNAの限度値である10ng/doseとの関連を示すことが望ましいと筆者は考える。本法はハイブリダイゼーション法と比較して定量的検出限界と頑健性が改善され, 低濃度DNA測定の精度が高いとされる。今後, 宿主細胞由来DNAの定量において定量的PCR法の利用は増加することが予測される。

### ③プロテインA

プロテインAをリグンドとするアフィニティークロマトグラフィーでは, 目的物質の溶出の際に, 一部のプロテインAが目的物質とともに溶出されることがあるため, その後の工程では, 製造工程由来不純物としての評価が必要である。プロテインA残存に伴うリスクとしては, 異種タンパク質であるプロテインAに対する免疫応答が起る可能性や, プロテインAがサイトカイン受容体を活性化して炎症反応を惹起する可能性等が考えられる。

プロテインAの評価には抗プロテインA抗体を用いたELISAが用いられる。プロテインAは目的物質である抗体と高い親和性を有するため, 共存する目的物質による反応阻害に注意が必要である。界面活性剤やキレート試薬, あるいは酸性溶液を用いた前処理によりプロテインAを目的物質と分離させて測定する方法が報告されている。

### ④その他の主要な不純物

MTXは, 免疫定量法, 逆相HPLC等により定量できる。ゲンタマイシンは, ELISA, 免疫定量法等により定量できる。ウシ血清アルブミンやインスリン等タンパク質は, ELISAにより測定できる。免疫定量法として, 蛍光偏光免疫測定法を使用する場合が多い。

蛍光偏光免疫測定法の原理について, MTXの測定に例に説明する。MTXを蛍光標識したものはフリーで存在すると, 溶液中で活発な回転運動を行っているため, 偏光励起光(485nm)を当てて生じる蛍光の偏光度は小さくなる。一方, 抗MTX抗体と結合した蛍光標識MTXは分子量が大きいため溶液中での回転運動が抑制され, 偏光励起光を当てて生じる蛍光の偏光度は大きくなる。試料中のMTXと蛍光標識MTXは抗MTX抗体に対し競合するため, 既知濃度の標準液の蛍光偏光度から標準曲線を作成し, 試料の蛍光偏光度を測定することにより試料中のMTX濃度を求めることができる。測定したい物質に対応した各種キットが市販されている。

### (2) 製造工程由来不純物の評価に関する考え方

製造工程由来不純物の評価では, 原薬や製剤中に残存あるいは混入する可能性がある不純物を考え, 測定項目を決定し, これをもとに, (1)原材料の評価, (2)工程中間体や原薬あるいは製剤中の不純物の評価, および, (3)精製工程の不純物クリアランス能の評価を実施する

(図1)。(1)原材料の評価は、製造工程に持ち込まれる不純物に関する管理のために必須であり、原材料についても必要に応じて規格及び試験方法を設定する。原薬あるいは製剤に混入する可能性のある各不純物は、(2)工程中間体や原薬あるいは製剤中の不純物の評価、および、(3)精製工程の不純物クリアランス能の評価の結果をもとに、①工程パラメータ、②工程内管理試験、③原薬あるいは製剤の規格及び試験方法、のいずれかにより管理されることになる。不純物について必ずしも原薬あるいは製剤の規格及び試験方法が必要でないことは、ICH Q6Bガイドライン<sup>1)</sup>にも明記されており、不純物のうち、効果的な工程管理により許容できるレベル内に収まっていることを適切な方法によって実証していれば、原薬や製剤を対象とする規格及び試験方法に含めなくてもよい場合がある。

残存する不純物の量が安全性確保の観点から許容できるレベルであるか否かについては、非臨床・臨床試験結果および既承認製品での経験や文献・ガイドラインの情報等の既存の知識を基に考える。例えば、構造が既知の不純物は、既知の毒性情報と原薬および製剤中残存量から評価が可能である。また、構造が同定できないHCPのような不純物についても、目的物質の構造や製造工程が類似した既承認製品に関して蓄積された知識を活用して、評価が可能な場合も考えられるかもしれない。不純物評価の結果、不純物残存量が恒常的に許容量以下になっていないと考えられた場合は、製造方法を改良し、不純物残存量を低減化する必要がある。

#### ①原材料の評価

精製や修飾工程で用いられる試薬・試液類は、目的を達成した後は、それ自身が製造工程由来不純物となり得る。PEG化試薬に含まれる残留溶媒の評価のように、各試薬・試液の受け入れ試験においても必要に応じて不純物評価を実施する。

#### ②工程中間体、原薬、製剤における不純物の評価

原薬や製剤のみならず、工程中の中間体についても被験試料に含め、適切な分析技術を用いて不純物含量の評価を行う。製造工程のどの段階の試料を用いて評価を実施すべきか否かは、不純物の種類によって異なる。例えば、培地成分のように、除去された後に総量が増加する可能性のない不純物に関しては、工程のある段階で恒常

的に残存許容量以下になることが示されれば、それ以降の工程中間体や原薬での評価は不要である。一方、エンドトキシンや微生物のように、製造工程の最終段階まで混入の可能性を考えなければならないものについては、原薬や製剤を対象とした評価が必要となる。

#### ③精製工程の不純物クリアランス能の評価

不純物の管理手法を考える際には、原材料、中間体、原薬、製剤中の不純物量測定その他、実験室スケールでの添加回収実験等による不純物クリアランス試験が有用な場合がある。不純物クリアランス試験は、不純物の除去効率に影響する工程パラメータの特定や、求められる不純物除去効率を達成し得る工程パラメータの範囲設定による製造工程の最適化の検討のためにも利用される。また、不純物クリアランス試験の結果が、不純物について規格値を設定しない根拠にできることもある。

#### ④製造工程由来不純物の評価の実例

バイオ医薬品原薬の開発過程において評価対象とされた製造工程由来不純物の種類、および選択された不純物管理手法に関する実例として、医薬品医療機器総合機構から公表されている審査報告書の中から、関連する情報を抜粋したものを表2に示す。審査報告書の記載が実際に実施された不純物評価のすべてではないと考えられるが、不純物の管理手法が個々の製品に応じて選択されていることがわかる。

エンドトキシンは、大腸菌を宿主とする場合は細胞基材に由来する製造工程由来不純物として、それ以外の場合も混入汚染物質として、製剤中の混入量を管理する必要がある。表2は原薬に関するものであるが、大腸菌を宿主とする製品以外においても、原薬を対象としてエンドトキシンの混入を評価・管理しているケースが多いことがわかる。バイオ医薬品では、製剤で新たに評価が必要となる製造工程由来不純物として想定されるのはあまりなく、審査報告書の実例においても、規格及び試験方法としてエンドトキシンと無菌試験がほぼすべての製品で設定されているのみである。

表2 製造工程由来不純物評価項目と管理手法選択の例(審査報告書からの抜粋)

製造工程	目的物質	原薬 製造工程由来不純物の管理		
宿主細胞	基原	工程での恒常的な除去の実証	工程内管理試験の設定	原薬の規格試験の設定
大腸菌	成長ホルモン		精製工程 エンドトキシン バイオバーデン	HCP 宿主細胞由来DNA 残留溶媒(アセトニトリル) 尿素 エンドトキシン
	PEG化成長ホルモンアナログ		PEG化前の中間体 総DNA量 HCP エンドトキシン 微生物限度試験	エンドトキシン 微生物限度試験
	副甲状腺ホルモン[1-34]	宿主細胞由来DNA エンドトキシン トリプシン DHFRフラグメント テトラサイクリン アセトニトリル 残留金属 残留陽イオン 残留陰イオン グリシン		大腸菌由来ポリペプチド
酵母	尿酸オキシダーゼ	宿主細胞由来DNA		HCP バイオバーデン エンドトキシン
	HPVワクチン	宿主細胞由来DNA HCP 脂質 炭水化物		エンドトキシン 無菌
動物細胞 (CHO細胞)	リソソーム酵素	DNA グリセロール ■セファロース ■キレートセファロース		HCP エンドトキシン
	血液凝固第IX因子	宿主細胞由来不純物 HCP 宿主細胞由来DNA PACE-SOL ProFIX 培地由来不純物 PVA MTX インスリン ビタミンK1 ヒドロコルチゾン ブトレシン セレン 精製工程由来不純物 イミダゾール 銅イオン EDTA	培養工程 微生物限度 マイコプラズマ 外來性ウイルス	エンドトキシン 微生物限度試験
	ヒト化抗VEGF抗体	HCP DNA MTX ゲンタマイシン インスリン 培地成分 残留溶媒 プロテインA		エンドトキシン
	CTLA4-Fc融合タンパク質	MTX インスリン		HCP DNA Protein A MCP-I様タンパク質 重金属 遊離チオール エンドトキシン 微生物限度試験

## おわりに

本稿では、バイオ医薬品の製造工程由来不純物の分析と評価について、事例を紹介しながら概説した。バイオ医薬品の原薬や製剤に含まれる製造工程由来不純物は、製品の安全性に関わる重要な品質特性の1つである。安全性確保の観点から許容できる不純物のレベルは、個々の製品および投与量等に依存しており一律に規定できない場合もある。その場合は、最終的に非臨床試験・臨床試験の結果から判断せざるをえない。近年、分析技術の発達により高精度・高感度で不純物を測定することが可能となっている。バイオ医薬品の製造工程由来不純物の適切な分析による評価は、有効で安全なバイオ医薬品の患者への提供に貢献するだけでなく、初回ヒト投与臨床試験の安全性確保にも極めて重要である。

### 参考文献

- 1) 平成7年7月20日 薬審第755号 分析法バリデーションに関するテキスト(実施項目)について(ICH Q2Aガイドライン)
- 2) 平成9年10月28日 医薬審第338号 分析法バリデーションに関するテキスト(実施方法)について(ICH Q2Bガイドライン)
- 3) CPMP position statement on host cell proteins (HCP) impurities, routine testing versus validation studies. 1997 [cited; Available from : HYPERLINK "http://www.ema.europa.eu/docs/en\_GB/document\_library/Scientific\_guideline/2009/09/WC500003322.pdf" http://www.ema.europa.eu/docs/en\_GB/document\_library/Scientific\_guideline/2009/09/WC500003322.pdf]
- 4) Wang, X., Hunter A. K., Mozier N. M. : Host cell proteins in biologics development: identification, quantification and risk assessment, *Biotechnol bioeng.*, 103(3), 446-58(2009)
- 5) Huang, L. Y., Dumontelle J. L., Zolodz M., Deora A., Mozier N. M., Golding B. : Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products, *Clin microbiol*, 47(11), 3427-34(2009)
- 6) Champion, K., Madden, H., Dougherty, J., Shacter, E. : Defining your product profile and maintaining control over it, Part 2, *BioProcess International*, 3(8), 52-7(2005)
- 7) WHO Expert Committee on Biological Standardization : Highlights of the 46th meeting, October 1996, in *WHO Weekly Epidemiological Record*, 72, 141-145(1997)
- 8) United States Pharmacopoeia, General Information <1130>Nucleic acid-based techniques-Approaches for detecting trace nucleic acids (residual DNA testing), *WHO Technical Report Series.*, 878, 19-56(1998)
- 9) Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J. : WHO study group on cell substrates for production of biologics, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007, *Biologicals.*, 36(3), 203-211(2008)
- 10) [http://www.nihonmdc.com/pages/reagents/thresh\\_dna.html](http://www.nihonmdc.com/pages/reagents/thresh_dna.html)

## 直打用賦形薬

# 無水リン酸水素カルシウムGS (GSカリカ)

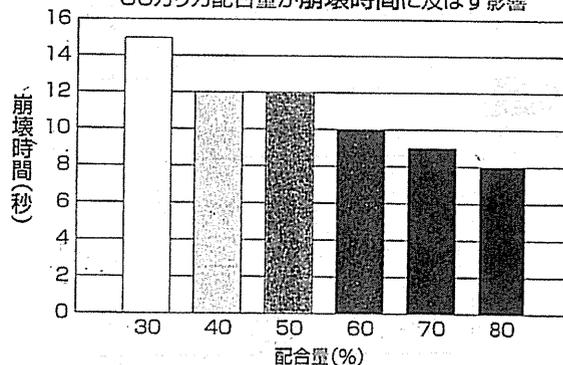
### 特長

- 崩壊時間 — “極めて早い崩壊” (速崩壊)
- 混合均一性 — 良好
- 直打 — 連続打錠可能
- 小型の錠剤 — 可能
- JP/USP/EP — 3局対応

錠剤1錠中(200mg)の成分						
成分	配合率(%)					
アセトアミノフェン	5					
GSカリカ	30	40	50	60	70	80
結晶セルロース	61	51	41	31	21	11
クロスカルメロースナトリウム	3					
ステアリン酸マグネシウム	1					

打錠条件: φ8 200mg錠 打錠圧力: 10KN

GSカリカ配合量が崩壊時間に及ぼす影響



コメント: GSカリカ30%配合処方では崩壊時間15秒の早い崩壊を示す。GSカリカ配合量の増加に伴い、崩壊時間はより短くなる。

**大 協和化学工業株式会社**

東京都中央区日本橋室町 3-4-7 TEL.03-6202-3011

DM資料請求カード№12

特集 (バイオリジクス)

**バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題  
ーバイオ医薬品の開発, 製造, 及び臨床試験の  
安全性確保における特性理解の重要性ー**

**The Recent Topic of the Quality and Safety  
of Biopharmaceuticals**

**-Importance of Understanding the Properties and Characteristics  
of Novel Biopharmaceuticals from Development  
through Manufacturing and Safety Clinical Trials-**

中澤 志織, 橋井 則貴, 鈴木 琢雄, 多田 稔,  
石井 明子, 川崎 ナナ\*

Shiori NAKAZAWA, Noritaka HASHII, Takuo SUZUKI, Minoru TADA,  
Akiko ISHII and Nana KAWASAKI

**Abstract**

Biopharmaceuticals are of great clinical importance and have become powerful therapeutic agents for hepatitis, diabetes, some blood disorders, and cancers. The continuing development of novel biopharmaceuticals is expected to provide new treatments for a number of diseases for which there is currently no cure, and to improve patient quality of life. Regulatory authorities have announced ICH guidelines and draft guidelines for the development of biopharmaceuticals, such as S6(R1) and Q11, as well as draft guidance on requirements for the use of materials in first-in-human administration (FIH). The draft Q11 indicates that an understanding of the properties or characteristics of new substances is crucial for identifying critical quality attributes for process development and control strategies. S6(R1) and draft guidance on FIH recommend sufficient characterization of new biopharmaceuticals that possess novel structures, multiple functions, and molecular-targeting properties for safety in clinical trial. There is a great need for the development of methods with which to characterize new biopharmaceuticals from development through manufacturing, and to predict their modes of action and safety appropriately.

## 抄 録

バイオ医薬品は、肝炎、糖尿病、及びある種の血液関連疾患やがん領域において標準的治療薬となっており、その医療上の重要性は増す一方である。治療法のない疾患への新たな治療法の提供やQOLの向上を目的として、新規な医薬品開発への期待はさらに高まっている。規制側からも、ICH Q11案、ICH S6(R1)案、並びに「治験対象医薬品ヒト初回投与試験の安全性に関するガイダンス (FIH) 案」などが立て続けに示された。Q11案では、重要品質特性を特定するために、徹底した特性解析が重要であること、また、S6(R1)案及びFIH案においても、新規な分子構造、複合型機能、及び高い分子標的性を有するバイオ医薬品及びその被験薬の安全性確保には、特性への十分な理解が不可欠であることが示された。新規なバイオ医薬品の研究開発から生産に至る過程において、作用機構と安全性の予測につながる新たな特性解析法の開発の必要性が高まっている。

**Key words:** biopharmaceuticals, quality, safety, critical quality attributes characterization

## 1. はじめに

バイオ医薬品は、糖尿病、肝炎、及びある種の血液関連疾患やがん治療における標準的治療薬となっており、医療上の重要性は増す一方である。さらに最近では、標準的治療法のない疾患への新たな治療法の提供、投与間隔の延長、及び毒性の低減を目的として、様々な改変・修飾・融合型タンパク質、糖鎖改変タンパク質、及び細胞毒性が高い低分子化合物の分子標的性を高めた薬物結合抗体など、新規な医薬品が次々と開発されており、バイオ医薬品への期待は高まるばかりである。

規制側からも平成22年から23年にかけて、「ICH Q11 (原薬の開発と製造に関するガイドライン) 案」<sup>1)</sup>、「ICH S6(R1) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価に関するガイドライン案」<sup>2)</sup>、並びに「治験対象医薬品ヒト初回投与試験の安全性に関するガイダンス (案)」<sup>3)</sup>などが立て続けに示された。いずれもパブコメを終了し、現在、議論が深められているところである。これらは、品質管理、非臨床安全性評価、及び臨床試験の安全性確保に関するガイドラインで、適用される開発ステージが異なっている。しかし、いずれも新規な分子構造、複合型機能、並びに高い分子標的性を有するバイオ医薬品の開発において、製品の特性を十分に理解することが重要であることを示している。本稿では、これらのガイド

ライン案における特性解析の位置づけと重要性を概説するとともに、バイオ医薬品の品質・安全性確保に対する我々の取り組みを紹介する。

## 2. 品質管理における特性解析の重要性

ICH Q11案は、「より進んだアプローチ」すなわちクオリティバイデザイン (QbD) に基づく原薬の開発と製造に対する考え方を示したガイドライン案で、化学薬品だけでなくバイオ医薬品も対象とされている。ICH Q11案の特徴は、バイオ医薬品原薬においても、重要品質特性 (Critical quality attribute; CQA) を早期に特定し、CQA に基づく製造工程開発とライフサイクル全般に適用できる管理戦略を構築すべきとしていることである。CQA とは、有効性・安全性を確保するために、適切な限度内、範囲内、また分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質であり、製造工程/管理手法を開発するための要となる。

バイオ医薬品に共通のCQAとして、目的物質由来不純物であり、免疫原性との関連性が指摘されている凝集体、製造工程由来不純物である宿主由来タンパク質やDNA、並びに外来性感染性物質であるウイルス、プリオン、マイコプラズマ及び細菌などが挙げられるだろう。医薬品や製造方法ごとにCQAとなり得る品質特性として、例えば抗体医薬品の場合、N末端ピログルタミン酸、

C末端 Lys 残基の有無, 脱アミド体, Met 残基酸化体及びグルコース付加体などの分子変化体, 糖鎖, ジスルフィド結合, 製造工程由来不純物プロテインAなどが考えられる。また, インスリン類縁体では多量体安定性が, PEG 化サイトカインや薬物結合抗体では, 修飾分子の結合位置と結合数なども CQA の候補となるかもしれない。これらの CQA 候補が, CQA であるか否かは, 徹底した特性解析, 安定性試験, 非臨床試験, 及び臨床試験結果に基づいて判断され, 開発ステージが進むにつれ見直されるとされている。

しかし, バイオ医薬品は構造が複雑で不均一な分子の集合体であり, 長い複雑な工程を経て製造されるので, CQA 候補はあまりにも多く複雑で, 特定は容易ではないだろう。また, デザインスペース<sup>4)</sup>を設定するためには, CQA が適切と想定される限度内, 範囲内, また分布内にあるロットを多数用意し, 有効性・安全性への影響を検証する必要がある。このとき, 臨床試験により検証することは合理性に欠け, 動物の使用も, 3R (Reduce, Refine, Replace) の原則に準じて最小限にすべきである。製法によって特性が変動しやすいバイオ医薬品の製造・管理において, ICH Q11が示す方向性, すなわち CQA に基づきデザインスペースを設定し, ライフサイクル全般に適用できる管理戦略を構築することは魅力的に映る。しかし, それを実行に移すためには, 特性解析法, とりわけ有効成分の体内動態 (Pharmacokinetics), 及び薬力学 (Pharmacodynamics) を考慮し, 体内動態制御や薬理作用に関連する生体分子との相互作用に着目した薬理作用・安全性予測法の開発が不可欠であろう。

### 3. 安全性確保における特性解析の重要性

バイオ医薬品による有害反応は, 薬理作用の過剰発現や, 未知の薬理作用に関連した変化によるものであることが多い。被験薬の主薬理的作用及び副次的薬理作用に関する知見は, ヒトでの安全性を推測する上でも重要である。多くのバイオ医

薬品は高い種特異性を示すため, 薬理試験においても<sup>3)</sup>, 毒性試験においても<sup>5)</sup>, ヒトに類似した反応性を示す適切な動物種を選択することが肝要である。非臨床試験の実施にあたっては, 適切な動物種を選択するためだけでなく, ヒトと動物間の薬理作用や毒性の差異を推定するために, バイオ被験薬の生物学的性質を十分に理解しておく必要がある。特に, 細胞を用いて, 薬理作用標的及び受容体への結合親和性, 及び占有率, 効果の持続時間及び用量-反応関係を検討することは有用である<sup>2,3)</sup>。また, 薬理学的反応性が適切でない動物種を用いた毒性試験からは, 誤った結論が導かれる可能性があるため, ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験により, 被験薬の安全性を評価することが奨励されている<sup>2,3)</sup>。融合タンパク質など複合型機能を有する被験薬に対しては, それぞれの機能を評価するのに適した複数の試験を実施する必要があるだろう。このように, 種特異性の高いバイオ医薬品の開発では, 薬理作用や安全性評価のための試験計画の設定や試験の妥当性の判定, あるいは安全性に対する直接的な評価として, 有効成分の特性解析の重要性が高まっている。

## 4. 薬理作用・安全性予測を指向した特性解析法の開発

新規な構造, 複合型機能, 及び高い特異性を有するバイオ医薬品の被験薬の安全性, 並びに市販後製品の有効性・安全性を確保するため, 薬理作用と安全性の予測を見据えた新たな評価系の確立をめざす我々の取り組みを紹介する。

### 4.1 インスリンアナログ製剤の多量体安定性評価と体内動態予測

インスリンは, 21個のアミノ酸残基からなるA鎖と30個のアミノ酸残基からなるB鎖からなる2本鎖タンパク質で, 皮下注射用製剤中では主に六量体を形成している。投与後に皮下組織で希釈され, 四量体, 二量体を経て単量体に解離し, 毛細血管内に吸収されその作用を発現する。イン

表1 ヒトインスリン及びそのアナログ製剤

型	アナログ	作用発現時間	作用持続時間	分子量	pI	製剤の pH
速攻型	ヒトインスリン	30-60分	4-12時間	5807.57	5.4	7.0-7.8
超速効型	リスプロ	5-15分	4-6時間	5807.57	5.65	7.0-7.8
	グルリジン	5-15分	1-2.5時間	5822.58	5.1	7.0-7.8
持効型	グラルギン	2-4時間	20-24時間	6062.89	6.7	3.5-4.5
	デテミル	2時間*	6-24時間*	5916.82		7.20-7.60
中間型	NPH	2-4時間	10-16時間	5807.57		7.0-7.5
	NPL	1-2時間	10-16時間	5807.57		7.0-7.8

\*用量依存

スリンの多量体安定性は、作用の発現時間と持続時間を左右することから、CQAの一つに位置づけられるべき特性である。

患者の血糖値を適切に保つために、作用時間の異なる様々なインスリンアナログやインスリン製剤が開発・販売されている(表1)。超速効型のインスリン リスプロ(リスプロ)、インスリン グルリジン(グルリジン)はいずれも、多量体安定性が低下するよう一次構造が改変されたアナログである。中間型イソフェンインスリン(NPH)及び中性プロタミンリスプロ(NPL)は、インスリン類に六量体構造を安定化する塩基性タンパク質プロタミンを加えた製剤である。持効型インスリン グラルギン(グラルギン)は、皮下投与後に凝集体を形成することにより、血管への吸収が遅延されたアナログであり、インスリン デテミル(デテミル)は、多量体安定性とは異なる機構。すなわち、ミリスチル化により皮下組織や血中での血清アルブミンとの結合を促し、毛細血管への吸収や遊離を抑えたアナログである。多量体安定性は、作用時間の異なるアナログ製剤の設計に利用されているが、現在のところ、製剤中での多量体安定性は実験動物を用いた生物活性から推測しているにすぎない。

#### 多量体安定性の評価

タンパク質の主鎖アミド水素やアミノ酸側鎖官能基の水素は、常に溶媒中の水素と交換してい

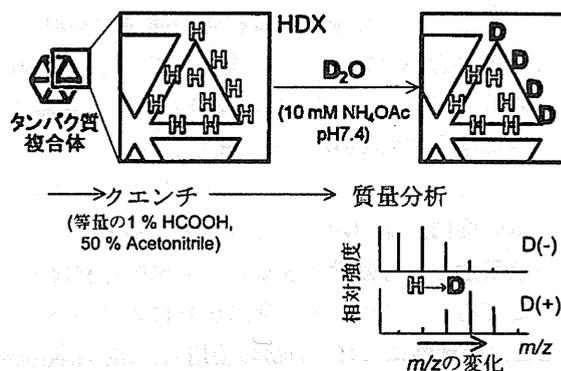


図1 HDX/MSによる多量体安定性解析の概要

タンパク質溶液を重水溶媒(中性)で希釈してHDX反応を行った後、酸を加えて反応を抑制した後、質量を測定する。タンパク質側鎖と末端アミノ酸の-OH、-NH<sub>2</sub>、-SH、-COOH、-CONH<sub>2</sub>など低いpKa値を持つ水素原子は、酸性条件下でも比較的高い交換反応性を保つため、逆交換反応により重水素を失った状態で観測される。一方、タンパク質主鎖アミド結合の水素と交換した重水素は、そのまま観測される。アルキル鎖やベンゼン環は容易にはHDX反応を起こさない。

る。同一官能基内では、分子内・分子間相互作用に関与しない水素原子ほど、速やかに交換される。交換される水素の数は高次構造の柔軟さや、溶媒からのアクセスのしやすさを反映するので、単量体は多量体よりも、より多くの水素を交換すると予想される。多量体タンパク質を重水に溶解すると、多量体安定性に依存して重水素が取り込まれ、その数はタンパク質の質量の変化として検出される(図1、水素/重水素交換質量分析法、HDX/MS)<sup>6-8)</sup>。表1の各種インスリンアナログ製剤についてHDX/MSを行い、取り込まれた重水

素数を時間ごとにプロットすると、図2の通りとなった<sup>9)</sup>。ヒトインスリンに比して、リスプロとグルリジンは、より速く・より多くの重水素を取り込み、中間型製剤のNPHとNPL、並びに持効型のグラルギンは重水素取り込みが遅く、取り込み数も少なかった。多量体形成とは異なる機序を利用した持効型デテミルの交換反応性は、ヒトインスリンと同程度であった。HDX反応性により、多量体安定性を評価することが可能となった。

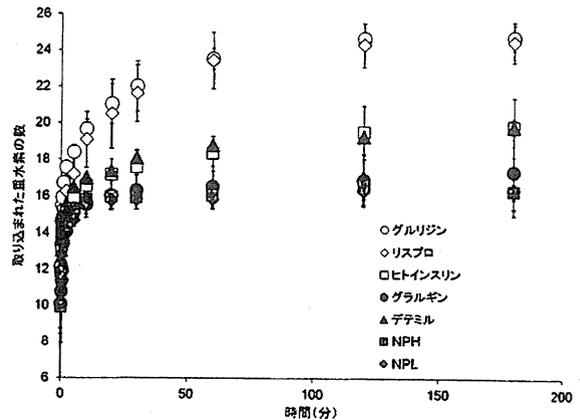


図2 インスリンアナログ製剤のHDX反応性  
各製剤原液を9倍容量の重水溶媒と混合して氷上でHDX反応を行った後、反応液と同容量の1%ギ酸/50%アセトニトリルで反応を抑制させた後、MSにより質量を測定した。  
分析条件：トラップカラム、C18トラップカラム；溶媒、0.1%ギ酸、50%アセトニトリル；MS装置、LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)；流速、50 μl/分。

速度論的評価に基づく体内動態予測

HDX反応による重水素の取り込みは一般に、擬一次反応で表すことができる<sup>10)</sup>。一次反応では、反応時間  $t$  経過後の出発物質 A の残存量  $A_t$  は  $A_t = A_0 \cdot \exp(-kt)$  ( $A_0$ : 反応時間  $t = 0$  の時の  $A_t$ ,  $k$ : 反応速度定数) と表されるので、交換し得る最大の重水素数を  $D_\infty$  とおくと、時間  $t$  経過後に未だ交換せずに残っている水素数は  $D_\infty \cdot \exp(-kt)$  で表される。さらに、HDX/MSで交換が観測されるインスリンの水素原子を交換反応の速い群・中速度の群・遅い群の3群に分けられると仮定し、それぞれに属する水素数を  $D_1, D_2, D_3$  と、各々の反応速度定数を  $k_1, k_2, k_3$  とおくと、反応開始から時間  $t$  経過後の重水素取り込み数  $D_t$  は次の式で表すことができる。

$$D_t = D_\infty - D_1 \cdot \exp(-k_1 t) - D_2 \cdot \exp(-k_2 t) - D_3 \cdot \exp(-k_3 t) \quad (式1)$$

時間ごとの取り込み重水素数の実測値を基に式1を用いてフィッティングを行うと、各群の水素原子の数と反応速度定数を求めることができる。表2は図2での重水素数の測定値から求められた、各反応速度群に属する水素原子の数である。インスリンアナログ製剤間の最大交換数  $D_\infty$  の大小関係は、図2の分子全体でのHDX反応性の傾向と一致しているが、交換し得る水素原子の中でも特に、交換反応の遅い群 ( $D_3, k \leq 0.1 \text{ min}^{-1}$ ) の寄与が強いことがわかる。

デテミルを除く6つのアナログ製剤では、これ

表2 HDXパラメータ

	各群の水素原子数			
	最大 ( $D_\infty$ )	遅い ( $D_3$ )	中速度 ( $D_2$ )	速い ( $D_1$ )
ヒトインスリン	20.3	3.9	1.5	3.0
リスプロ	24.5	7.3	2.6	2.5
グルリジン	24.7	7.2	2.6	2.8
グラルギン	18.0	2.0	1.8	4.2
デテミル	19.9	3.3	1.6	2.5
NPH	16.4	1.0	1.8	3.6
NPL	16.9	1.3	2.0	1.8

らの速度論的パラメータとヒトへの皮下投与時の体内動態パラメータ (文献値、表3) との間に相関関係を見出すことができる<sup>9)</sup>。すなわち、最大交換数 ( $D_\infty$ ) と交換反応の遅い水素数 ( $D_3$ ) は共に、作用時間の目安のひとつである最大血中濃度 ( $C_{max}$ ) との間に直線相関があることがわかる (図3A)。また、 $D_\infty, D_3$  の逆数と最大血中濃度到達時間 ( $t_{max}$ ) の間にも、直線相関の関係が認められる (図3B)。このように我々は、HDX反応性を指標とすることにより、インスリンの多量体安定性に基づく体内動態の差異を予測できること

表3 ヒトインスリン及びアナログ製剤の  $C_{max}$  及び  $t_{max}$  の文献値

	$C_{max}^{1)}$ ( $\mu\text{U/mL}$ )	$t_{max}^{2)}$ (min)	文献 <sup>3)</sup>
ヒトインスリン	43.3	109	(1)
	35.8	97.5	(2)
	40	104	(3)
	46	92	(3)
	46	82	(4)
51.1	101	(5)	
リスプロ	147.2	71	(6)
	81	71	(3)
	91.4	53	(5)
グルリジン	73	57	(3)
	92	83	(3)
	82	55	(4)
グラルギン	18.9	180	(7)
NPH	13.5		(8)
	20		(8)
	22.8	360	(7)
NPL	21.3	200	(6)

1) 最大血中濃度, 2) 最大血中濃度到達時間,  
3)  $C_{max}$  及び  $t_{max}$  は, 次の文献を参照した (1) Mudaliar SR et al. (1999) Diabetes Care 22, 1501-1506; (2) Lindholm A et al. (1999) Diabetes Care 22, 801-805; (3) Becker RH et al. (2008) Clin. Pharmacokinet. 47, 7-20; (4) European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use. Apidra. European Public Assessment Report - Product Information; (5) Eli Lilly Canada, Humalog Product Monograph; (6) T. Heise T et al. (1998) Diabetes Care 21, 800-803; (7) Lepore M et al. (2000) Diabetes 49, 2142-2148; (8) G.A. Brunner et al. (2000) Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 108, 100-105.

を見出した。

HDX/MS の特徴は,  $\mu\text{mol}$  から  $\text{pmol}$  程度の少量の試料で, 高次構造の動的な特徴を観察できる点であり, コンフォメーションの変化や, 同分子または他分子との相互作用の増減をも検出可能である。バイオ医薬品の高次構造評価法としての HDX/MS への注目は近年高まっており, 酸化ストレスによる IgG の構造変化の解析及び, PEG 化や異なる培地で製造したインターフェロンの同等性評価に HDX/MS を応用した報告がなされて

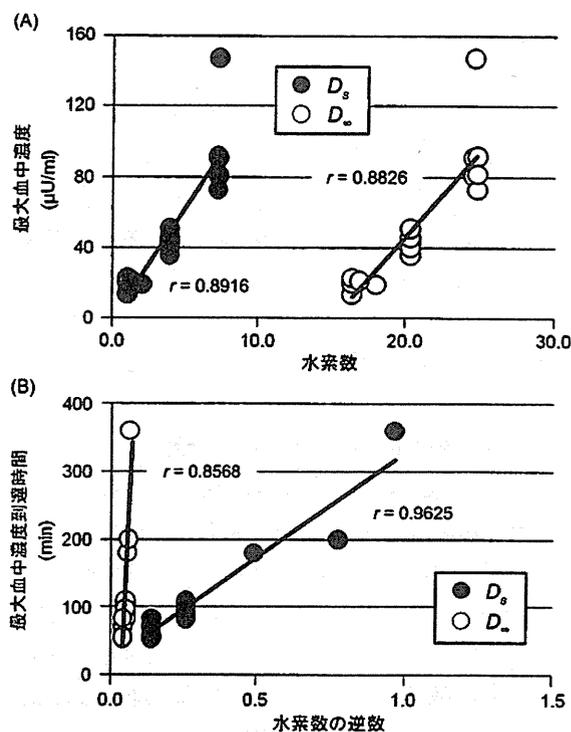


図3 HDX パラメータと最大血中濃度 ( $C_{max}$ ) (A) 及び最大血中濃度到達時間 ( $t_{max}$ ) (B) の相関性  $D_s$ , 反応速度の遅い水素原子数;  $D_{max}$ , 最大交換水素原子数.

いる<sup>11, 12)</sup>. HDX/MS は, 実験動物の使用を最小限にしながら新規アナログ製剤の分子設計, 工程最適化, 管理手法の開発を可能にするだけでなく, インスリン後続品開発における比較試験にも利用できるると期待される。

#### 4.2 抗体医薬品類の血中半減期の予測, 及び, 細胞傷害活性の評価

近年のバイオ医薬品の開発動向を製品群別に見ると, 抗体医薬品の承認品目数が最も多い<sup>13)</sup>. この傾向は海外でも同様であり, 抗腫瘍効果や免疫調節効果を期待した抗体医薬品が多数開発されている<sup>14)</sup>. IgG 骨格を持つ抗体医薬品は, 抗原 (標的分子) との結合部位を持つ Fab 領域と, Fc 受容体や補体に結合する Fc 領域から構成される多機能分子であり, Fc 領域は Fc 受容体との結合を介して, 抗体分子の体内動態や細胞傷害作用等

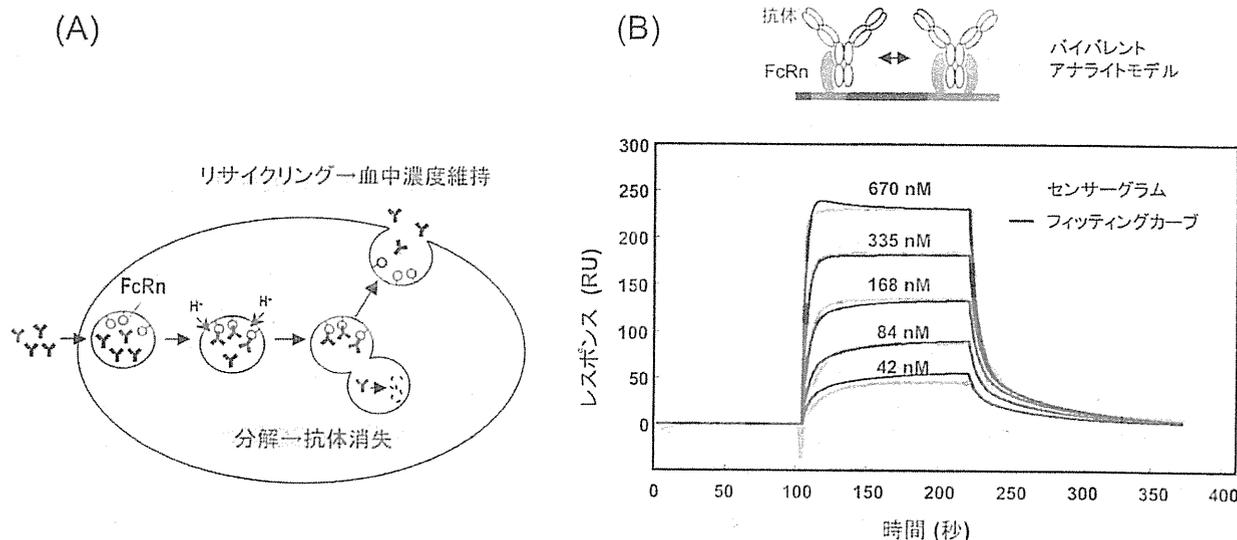


図4 FcRnによるIgGリサイクリング機構 (A), 及び、表面プラズモン共鳴法による抗体医薬品のFcRn結合親和性解析 (B) (A) FcRnは、細胞内に取り込まれたIgGとエンドソームで結合し、IgGがリソソームに輸送されて分解される過程を抑制する。FcRnと結合し、分解を免れたIgGは細胞表面に輸送され、FcRnと解離して血中にリサイクルされる。(B) SPR法によりFcRnと抗体医薬品(インフリキシマブ)の結合特性を測定したセンサーグラム。抗体医薬品とFcRnの結合親和性は、バイバレントアナライシスモデルにより、センサーグラムと理論曲線のフィッティングを行うことにより解析できる。

を調節する機能を担っている。したがって、抗体医薬品の特性解析のうち、生物活性評価においては、抗原との結合と、それに伴う抗原の生理機能の中和・阻害活性に加えて、体内動態に関連する特性として、抗体の輸送に関わる受容体FcRnとの結合性<sup>15)</sup>、ならびに、薬理作用に関連する特性として、Fc $\gamma$ 受容体を介した抗体依存性細胞傷害 (Antibody dependent cellular cytotoxicity: ADCC)<sup>16)</sup>等の評価が必要と考えられる。

#### FcRn結合性評価による血中半減期の予測

ヒト生体内IgGの血中半減期は約20日と極めて長い<sup>17)</sup>。その理由として、細胞内でのIgG分解を抑制する作用を持つFc受容体(FcRn)との結合が関わっていることが知られている<sup>18)</sup>。しかし、ヒトIgGの骨格構造を持つ抗体医薬品や、ヒトIgG由来のFc領域を持つFc融合タンパク質医薬品の血中半減期は、製品により大きく異なっている<sup>17)</sup>。一般に、バイオ医薬品の血中半減期には、分子量、等電点、糖鎖等の翻訳後修飾構造、受容

体結合性等、多くの要素が影響する。我々は、抗体医薬品(IgG骨格を持つ抗体及びFc融合タンパク質)の血中半減期とFcRn結合親和性の関連を明らかにする目的で、10種類の代表的な既承認抗体医薬品について、表面プラズモン共鳴 (SPR)法を用いてヒトFcRnとの結合親和性を解析した(図4)。その結果、ヒトIgG1由来Fc領域を持つ抗体医薬品のFcRn結合親和性は、製品により異なっており、特にFc融合タンパク質ではFcRn結合親和性が低いことが明らかになった。また、一部の抗体を除いて、FcRn結合親和性とヒトでの血中半減期(文献値)に相関が認められ、FcRn結合親和性が血中半減期制御に関わるCQAの一つであることが示唆された(図5)<sup>19)</sup>。FcRn結合親和性が高いにも関わらず、血中半減期が短い抗体医薬品については、標的分子との結合に伴う細胞内への移行と分解の影響が大きいこと等が考えられる。

本解析において評価対象とした抗体医薬品の中には、アロタイプの違いによりFc領域のアミノ

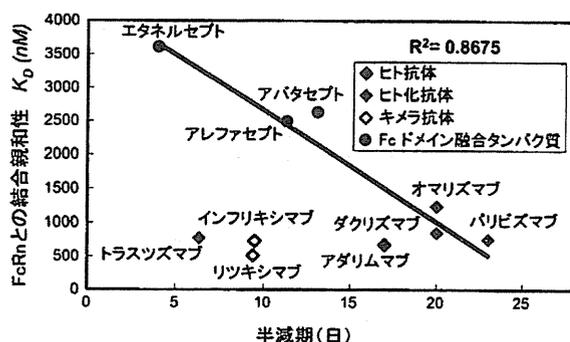


図5 抗体医薬品のFcRn結合親和性と血中半減期の相関性

SPR解析により求めたFcRn結合親和性( $K_D$ )と、文献で報告されているヒトでの血中半減期をプロットした。血中半減期は、以下の文献を参照した(アダリムマブ, Wiseman MH et al. (2003) Clin. Ther. 25, 1700-1721; ダクリズマブ, Vincenti FR et al. (1998) N. Eng. J. Med. 338, 161-165; エタネルセプト, Lee H. et al. (2003) Clin. Pharmacol. Ther. 73, 348-365; インフリキシマブ, Cornillie F et al. (2001) Aliment. Pharmacol. Ther. 15, 463-473; オマリズマブ, Casale TB et al. (1997) J. Allergy Clin. Immunol. 100, 110-121; バリビズマブ, Subramanian KN et al. (1998) Pediatr. Infect. Dis. J. 17, 110-115; リツキシマブ, Maloney DG et al. (1997) Blood 90, 2188-2195; トラスツズマブ, Tokuda Y. et al. (1999) Br. J. Cancer 81, 1419-1425)。アバタセプト及びアレファセプトの血中半減期は、製品添付文書を参照した。

酸2残基の配列が異なる製品(エタネルセプト, バリビズマブ, トラスツズマブ)がある<sup>19)</sup>。また、Fc領域に結合している糖鎖の構造も製品により異なっていると考えられる。そこで、これらの限定的な差がFcRn結合親和性に影響している可能性を考え、パパイン消化によりFc領域をFab領域(抗体の場合)あるいは受容体領域(受容体-Fc融合タンパク質の場合)から分離してFcRnとの結合親和性を測定した。興味深いことに、FcRn結合親和性が相対的に低い抗体医薬品のFcRn結合親和性は、パパイン消化により上昇し、FcRnに高親和性を示す抗体医薬品と同程度になることが明らかになった<sup>19)</sup>。すなわち、Fc領域のアミノ酸配列や糖鎖構造の相違がFcRn結合親和性に影響しているのではなく、Fab領域あるいは受容体領域の構造がFc領域内のFcRn結合部位の高次構造に影響する結果、各抗体医薬品

類が固有のFcRn結合親和性を有していると考えられ、高次構造を反映した特性解析の重要性が示された。

### 細胞傷害活性とFc $\gamma$ 受容体結合性

本来、液性免疫を担う生体内分子であるIgGは、Fc $\gamma$ 受容体との結合によるエフェクター細胞の活性化を介して、標的細胞を傷害する活性(ADCC活性)を示し得る。抗腫瘍効果を持つ抗体医薬品には、作用発現機構(Mechanism of action: MOA)にADCC活性が関与しているものもあり、ADCC活性は、CQAになり得る生物活性である。一方で、標的分子の中和等による生体反応の調節を目的とした抗体医薬品において、意図しないADCC活性が発揮された場合は、安全性上の問題となり得る。そのため、抗体医薬品の開発段階では、想定される効能効果によらず、ADCC活性に関連した特性解析を行う必要があると考えられる。

現在汎用されているADCC活性測定法では、エフェクター細胞としてヒト末梢血単核球細胞が用いられる。しかし、この場合、ドナーやロットの違いによる再現性等の問題があるため、より頑健性の高い代替試験法の開発が望まれている。ADCC活性の評価においては、生理的条件下に近い状態で抗原と結合した抗体医薬品の活性(Fc $\gamma$ 受容体結合・活性化能)を測定することが重要となるため、我々は、細胞膜上に発現する抗原に対する抗体医薬品の結合とそれに追従するFc $\gamma$ 受容体への結合を同時に評価可能な実験系として、bridging assay系を構築し、その有用性について検討を進めている(図6A)。

標的細胞及びFc $\gamma$ 受容体を発現するモデルエフェクター細胞を、各々異なる蛍光色素で標識し、抗体医薬品と共に両者を混合してフローサイトメーターを用いて解析したところ、抗体の存在に依存して両蛍光色素陽性(double positive)の細胞集団の増加が観察された(図6B)。これらの集団では、細胞の大きさを反映する前方散乱光

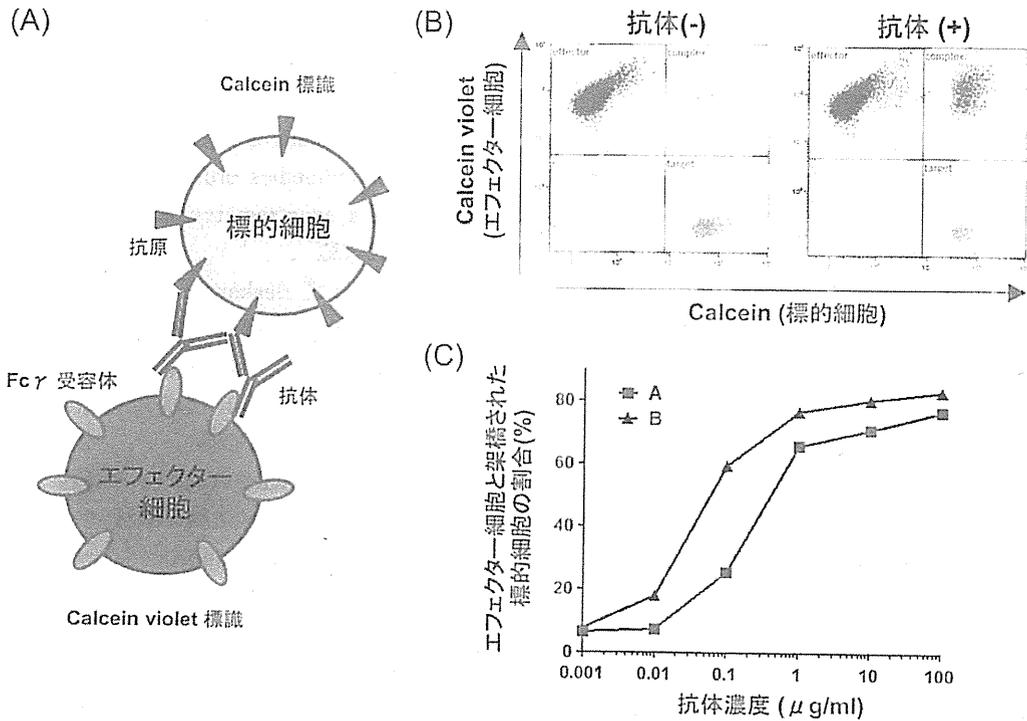


図6 Bridging assay による抗体医薬品の結合特性評価

- (A) Bridging assay の模式図。標的細胞を Calcein で、Fc $\gamma$  受容体を発現するエフェクター細胞を Calcein violet で標識し、抗体存在下で培養することで両細胞が架橋された複合体が形成される。
- (B) フローサイトメーターにより細胞集団の蛍光強度を測定した結果、抗体の添加により両蛍光色素陽性の集団の割合の増加が認められる。
- (C) ADCC 活性の異なる2つの抗体 A、B を用いた例。エフェクター細胞と架橋された標的細胞の割合を指標とすることで各々の抗体の細胞架橋能を定量的に評価できる。

が増大しており、標的細胞とエフェクター細胞が抗体により架橋されたものであると考えられた。抗体による標的細胞とエフェクター細胞の架橋能を定量的に示すため、標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された細胞の割合を指標としたところ、抗体濃度の増加に伴って架橋された標的細胞の割合の増加が認められた（未発表データ）（図6C）。抗体 A、B は、同じ標的分子に結合するものの、ADCC 活性の異なる抗体であり、本アッセイ系の結果は、ADCC 活性の違いを反映していると考えられる。

最近の抗体医薬品の開発動向では、これまで主流であった IgG1 とは異なるサブクラス（IgG2、IgG4）の骨格構造を持つ抗体医薬品や、Fc 領域のアミノ酸配列あるいは糖鎖構造を改変した抗体

医薬品が増えている。これらの中には、有効性・安全性の向上を目指し、エフェクター活性の増強あるいは抑制を意図したものが少なくない。抗原との結合、Fc $\gamma$  受容体との結合と活性化、エフェクター分子の放出、という多段階の反応からなる ADCC 活性の評価については、我々が検討している bridging assay を含め、品質評価に適した方法の開発が課題である。有効性・安全性に直結した生物活性評価系の開発は、力価の一定性を保証することによる臨床試験の安全性確保に貢献すると共に、構造活性相関の解析による CQA 特定にも貢献し得るものと考えられる。また、作用発現機構に関する科学的知見を踏まえた生物活性評価系の開発は、ヒトにおける薬理作用及び安全性の予測による臨床試験の安全性確保にも貢献し得

るものと考えられる。

### 文 献

- 1) 「ICH Q11：原薬の開発と製造（化学薬品とバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）ガイドライン（案）」に関する御意見・情報の募集について。平成23年6月28日厚生労働省医薬食品局審査管理課
- 2) 「ICH S6(R1)：バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価（案）」に関するご意見・情報の募集について。平成22年1月8日厚生労働省医薬食品局審査管理課
- 3) 医薬品開発におけるヒト初回投与の安全性を確保するためのガイダンス案。平成23年5月11日厚生労働省医薬食品局審査管理課
- 4) 「ICH Q8：製剤開発に関するガイドライン」の改訂について。平成22年6月28日厚生労働省医薬食品局審査管理課
- 5) 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について 医薬審第326号平成12年2月22日
- 6) Hvidt A, Linderstrøm-Lang K. Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1954; 14: 574-575.
- 7) Englander SW, Mayne L, Bai Y, Sosnick TR. Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrøm-Lang. *Protein Science*. 1997; 6: 1101-1109.
- 8) Hamuro Y, Coales SJ, Southern MR, Nemeth-Cawley JF, Stranz DD, Griffin PR. Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2003; 14: 171-182.
- 9) Nakazawa S, Hashii N, Harazono A, Kawasaki N. Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2012; 420: 61-67.
- 10) Zhang Z, Smith DL. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation *Protein Sci*. 1993; 2: 522-531.
- 11) Burkitt W, Domann P, O'Connor G. Conformational changes in oxidatively stressed monoclonal antibodies studied by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Science*. 2010; 19: 826-835.
- 12) Houde D, Berkowitz SA, Engen JR. The utility of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry in biopharmaceutical comparability studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 100: 2071-2086.
- 13) 我が国で承認されたバイオ薬品（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 HP 内）[http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved\\_biologicals.html](http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html)
- 14) Strohl WR. Therapeutic monoclonal antibodies: past, present, future. *Therapeutic monoclonal antibodies: From bench to clinic* John Wiley & Sons, Inc., 2009: 3-50.
- 15) Ishii-Watabe A, Suzuki T, Tada M, Kawanishi T, Yamaguchi T, Kawasaki N. [FcRn, a critical regulator of antibody pharmacokinetics] *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*. 2010; 136: 280-284.
- 16) Jiang XR, et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies *Nature reviews. Drug discovery*. 2011; 10: 101-111.
- 17) Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics *Journal of pharmaceutical sciences*. 2004; 93: 2645-2668.
- 18) Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 715-725.
- 19) Suzuki T, et al. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR *Journal of immunology*. 2010; 184: 1968-1976.

---

**薬局**別冊

May 2011  
Vol.62 No.6

---

## 特集

■一般試験法（参考情報を含む）の改正 ― ①

### 理化学試験法

四方田千佳子

株式  
会社 **南山堂**

## 理化学試験法

### Key Points

四方田 千佳子

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第一室長

- ⊕ 新たに収載されたものは参考情報の近赤外吸収スペクトル測定法、システム適合性、誘導結合プラズマ発光分光分析法である。
- ⊕ 一般試験法で大きく改正されたものは、液体クロマトグラフィーである。
- ⊕ 一般試験法で試験法自体が改正されたものは、プラスチック性医薬品容器試験法の塩化ビニルモノマーの限度試験である。
- ⊕ 窒素定量法では、装置の自動化が可能となるような修正が行われた。
- ⊕ 残留溶媒試験法では、基本方針の転換が図られている。

### はじめに

理化学試験法委員会関連の試験法では、第十五改正日本薬局方(日局15)以後、一般試験法として新たに追加されたものはないが、一部改正が行われた試験法は、定性反応、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、水分測定法、旋光度測定法、重金属試験法、窒素定量法、プラスチック性医薬品容器試験法、残留溶媒試験法、導電率測定法である。また、理化学試験法委員会関連で参考情報に新たに追加されたものとして、近赤外吸収スペクトル測定法、システム適合性、誘導結合プラズマ発光分光分析法がある。

そのほか、澄明性試験法に関しては、いったん新規試験法としてパブリックコメントを求めた経緯があるが、試験法として再考の余地がある部分があるとの見解となり、さらに

修正が行われる予定となっている。

### 定性反応

定性反応は確認試験法に用いられる簡便な試験法で、イオンや元素に特異的で医薬品成分を確認することができる。

第一追補で、メシル酸塩の定性反応が新たに追加され、第二追補で、リン酸塩の定性反応が一部改正された。

#### ① メシル酸塩の定性反応

メシル酸塩の定性反応は、医薬品各条の確認試験法に収載される例が増えたため、一般試験法としての採用が提案された。メシル酸(メタンスルホン酸)を確認する方法として、2つの方法が収載された。(1)はメシル酸塩に水酸化ナトリウムを加えると発生する亜硫酸

酸によりヨウ素酸カリウムデンプン紙が酸化され、ヨウ素が生成し青変するものである。(2)は、希塩酸で発生した亜硫酸イオンが塩化バリウムと反応して、亜硝酸バリウムとして白色の沈殿を形成するものである。

現在日局16には、8種類のメシル酸塩が収載されているが、ジヒドロエルゴタミンメシル酸塩とプロモクリプチンメシル酸塩では、この定性反応は適用されておらず、(2)法が採用されているのは、ドキサゾシンメシル酸塩と、ベタヒスチンメシル酸塩錠の2品目で、ほかは(1)法が採用されている。

## 2 リン酸塩の定性反応

リン酸塩の定性反応では、医薬品各条に記載通りの操作をしても、明確な沈殿の形成が確認できないとの指摘を受け、調査を行ったところ、日局の七モリブデン酸六アンモニウム試液は、七モリブデン酸六アンモニウム四水和物を水に溶解しているため酸性溶液となっていないが、もともとの試験法の出典である米国薬局方(USP)では、三酸化モリブデンから硝酸酸性の試液を調製することとなっている。しかし、リン酸塩の定性反応では酸性での沈殿形成が想定されているため、確認試験法で検液が中性付近であるものは、沈殿が生じにくいことが明らかとなった。そこで、操作法のなかに、「リン酸塩の中性又は希硝酸酸性溶液に…」となっていた部分から「中性又は」を削除し、試験は酸性の条件下で実施されるべきことと改正した。

したがって、もし検液が中性である場合には、硝酸酸性とすることを求めることとなった。

## 液体クロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーでは、システム適

合性に関する詳細な解説が必要と判断されたが、一部分は参考情報としての収載が望ましいということとなった。したがって、液体クロマトグラフィーの改正と並行して、参考情報の準備が進められた。

第一追補で、一般試験法の液体クロマトグラフィーに関してかなりの加筆修正がなされた。システム適合性は試験を行うのに適切な性能を有していることを確認するためのものであり、規格試験法のなかに規定されていることが必要で、システム適合性に合致する性能が確認されなければ試験を行うことはできないとされた。システム適合性の項目には、「システムの性能」「システムの再現性」および「検出の確認」があり、それぞれについて解説が加えられた。

「検出の確認」は、純度試験において、限度値付近の標準溶液との比較のみで規格が設定されている場合には、この項目を設ける必要はないが、主ピークとの面積百分率などのように定量的な評価を必要とする場合には、設定する必要がある。限度値付近でピークが確実に検出でき、一定の幅で直線性が得られることを示す。ただし、限度値レベルでの検出が、システムの再現性で確認できる場合には設定しなくてもかまわない。

「システムの性能」では、分析対象成分と分離度を規定する物質との間で、分離度の下限値を示す。純度試験ではさらに、分析対象成分と分離度を規定する物質の溶出順を規定する。さらに必要な場合には、シンメトリー係数を規定する。適切な分離度を規定する物質がない場合には、分析対象となっている物質のピークの理論段数やシンメトリー係数で規定することもできる。

「システムの再現性」は、適切な濃度の標準溶液などのくり返し注入した場合の相対標準偏差(RSD, %)の上限値で規定され、原則と

して6回の注入を要求するが、グラディエント分析時などのように、時間がかかりすぎる場合には、回数を減らすことができる。ただし、回数を減らす場合には、後述するシステム適合性の参考情報に記載されている表を基に、統計的に同等な精度が得られるように、RSDの上限値をより小さな値とし、より厳しく設定する必要がある。

さらに、欧州薬局方(EP)の2.2.46 Chromatographic separation techniquesに記載されている用語集から次の2つが追加された。S/N比(クロマトグラムノイズに対するシグナルの比)、ピークバレー比(不完全な分離を示す2つのピーク間の分離の指標となる値で、小さい方のピークのピーク高さを、ピークの谷の高さで除した値)である。S/N比は、図1に示すように、 $H$ :対象物質のピークの基線(バックグラウンドノイズの中央値)からのピーク高さ、 $h$ :対象物質のピークの前後における試料溶液または溶媒ブランクのクロマトグラムのバックグラウンドノイズの幅としたときに、

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

で求められる。ここで注意を要するのは、実

際には分母に2が掛かっているため、ノイズ幅の半分で計算しているのと同じこととなり、JIS K 0124高速液体クロマトグラフィーと同じ取り扱いである。一方、JIS K 0114ガスクロマトグラフィーでは、ノイズ幅そのまま計算に用いられるためS/N比は局方の式の倍の数值となっている。なお、基線およびバックグラウンドノイズは対象物質のピーク高さの midpoint におけるピーク幅( $w$ )の20倍に相当する範囲で測定することとなっており、JIS K 0124と同じである。現在EPでは $w$ の5倍の範囲と記載されているが、これは安易に範囲を狭めた結果で、近々修正される予定と聞いている。

また、溶媒ブランクを用いる場合、対象物質が溶出する位置付近で、上記とほぼ同様の範囲で測定する。

さらに、日局16では、液体クロマトグラフィーによる確認試験で多波長検出器を使用できるように記載することとなり、実際の記載では、MSなども包含するように、化学構造に関する知見が得られる検出器が用いられる場合、保持時間の一致に加えて、化学構造に関する情報が一致することを確認することで、より特性の高い確認を行うことができるとした。

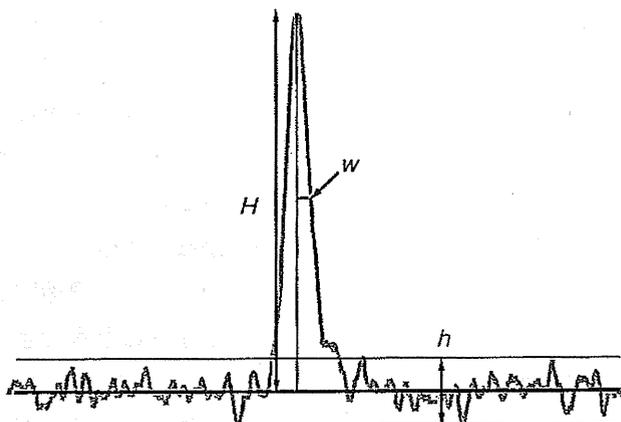


図1 クロマトグラムのS/N比の説明

## ガスクロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーの改正に伴って、システム適合性は液体クロマトグラフィーのシステム適合性の規定を準用するという記載が追記された。

## 参考情報、システム適合性

当初、液体クロマトグラフィーのシステムの再現性において、くり返し注入の回数を減らしたときの相対標準偏差の許容限度値を示した表は、一般試験法のなかに収載する予定であったが、規格値に関わる問題ではなく、むしろ運用上の数字であるとして、必ずしも一般試験法のなかに取り込まない方がよいと判断されたため、参考情報に関する技術情報としてシステム適合性を収載することとした。それに伴い、このくり返し回数の変更の表も含めて、必ずしもクロマトグラフィーに限定されない、分析法一般に対する参考情報として記載された。

ここで、許容限度値の設定に関しては、液体クロマトグラフィーの場合に、定量法では「原薬の場合に、含量規格の幅が5%以下の場合には、1.0%以下を目安として適切に設定する」と記されているが、これはEPの2.2.46 Chromatographic separation techniques

のRepeatability requirementsの表を念頭に置かれたもので、EPでは経験に基づいた値を設定したものである。

システムの再現性の試験の質を落とさずにくり返し注入の回数を減らす方法として、表1が与えられている。表から、くり返し注入回数が6回の場合に許容限度値が2%と規格が設定されている場合には、くり返し注入回数を3回ですまそうとすると、0.95%の限度値以内のRSDを示せば、同じ精度を保証できていることを確認することができる。すなわち、この表を使えば、分析精度を確認しながら、くり返しの回数を減らせることになる。

最後にシステム変更時の考え方が記載され、カラムなどを交換したときに、システム適合性試験に合致しない場合には、試験結果が適切に得られるか再検証する必要があるとしている。

## 水分測定法

容量適定法において、調製法2に準じて調製販売されていた試薬に、安定性の向上を目的として、2-メチルイミダゾールが添加されたため、水分測定用試薬として添加剤を加えた試薬を用いることができるような記載として欲しいとの要望が出された。そこで、第一追補において、性能を向上させることを目的

表1 注入のくり返し数を減らしたときの相対標準偏差の許容値

注入回数	許容限度値(RSD-%)					
	1	2	3	4	5	10
6						
5	0.88	1.76	2.64	3.52	4.40	8.81
4	0.72	1.43	2.15	2.86	3.58	7.16
3	0.47	0.95	1.42	1.89	2.37	4.73
2	0.13	0.26	0.39	0.52	0.66	1.31