

されている。 $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルからは全ての化学物質の H が検出される。従って、医薬品の $^1\text{H-NMR}$ を測定すると原薬とともに有機不純物や残留溶媒由来の H も同時に検出されることから、不純物プロファイルとして NMR のスペクトルの有用性が期待される。しかしながら、一般的に NMR は検出感度が低く、またクロマトグラフィーに代表される分離分析を伴わないことから純度試験法としての利用は未だ検討されていない。我々はペプチド製医薬品の安定性および種差の評価への NMR 法の利用を検討してきた。^{1, 2)} 本研究では原薬と不純物の代用としてメタノールとトルエンを用いた溶液の NMR 測定を行い、医薬品の純度試験としての NMR 法の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

0.03 vol % の TSP を含む CDCl_3 溶液を用いて、100mM のメタノールと 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 10mM のトルエンの両方を含む溶液を調整した。各溶液 700 μl を NMR のサンプルチューブに導入して、 $^1\text{H-NMR}$ を積算回数 1, 4, 16, 64, 128, 256 回で測定した。NMR の測定は Varian 社製 400MHzNMR を用いた。

スペクトルは位相調整した後、メタノールのメチル基(3.49ppm)のシグナルおよびトルエンのメチル基(2.36ppm)のシグナルについてピーク面積と S/N 比を求めた。

C. 研究結果

NMR 法の純度試験法としての有用性を検証する為には原薬の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに対する不純物のスペクトルの定量限界および検出限界を求める必要がある。そこで、本研究では原薬と不純物の代わりにメタノールとトルエンをそれぞれ用い、 CDCl_3 溶液中に 100mM のメタノールとメタノールに対して 0.01 %~10% のトルエン(0.01mM~10mM)を含んだ溶液を調整して NMR を測定した。NMR の感度は測定

際の積算回数に大きく依存する。そこで、測定は積算回数を 1, 4, 16, 64, 128, 256 回でそれぞれ行った。代表的な NMR スペクトルを Fig.1 に示す。メタノールと 10%のトルエンを含む溶液の NMR スペクトルより、メタノールのメチル基は 3.5ppm にダブルット、トルエンのメチル基は 2.36ppm にシングレットとして示された。トルエン濃度の低下とともにメチル基のシグナルは小さくなるが、積算回数 256 回で測定すると 0.01%のトルエン濃度でもメチル基のシグナルは明らかに観測されることがわかった (Fig.1f)。

次に、トルエン濃度の異なる各サンプルの NMR スペクトルからトルエンのメチル基のピーク面積を求め、濃度と面積との相関を調べた。トルエン濃度 10%のメチル基の積分値を 10 として、各濃度におけるピーク面積を補正し、それぞれの濃度と積分値をプロットした。積算回数 $nt = 64, 128, 256$ 回におけるトルエン濃度と面積とのプロットを Fig. 2 に示す。積算回数 256 回ではトルエンのメチル基は全ての濃度とピーク面積に直線性がみられ、0.01%でも積分値は濃度と良い相関を示した (Fig.2C)。一方、積算回数 128 回では、0.1%~10%で濃度と積分値に直線性がみられたが、0.05%, 0.01%のピーク面積は実際の面積よりも大きな値を示した (Fig.2B)。積算回数 64 回では 0.1%以下のピーク面積が実面積よりも大きな値を示した (Fig.2A)。以上の結果より、NMR によるピーク面積からの濃度の定量性は比較的良好な直線性がみられ、積算回数を増やすことによって定量限界が広がることがわかった。積算回数を 256 回に増やすとメタノールに対して 0.01%のトルエンを定量可能なことが示された。

NMR においてピーク強度を比較する為にはピーク間の積分値から面積を求める方法が一般的である。しかし、特定のピークを不純物として規定することができれば、原薬と不純物のピークの S/N 比を比較することによって、容易

に定量可能であることが予測される。面積はスペクトルの位相に大きく影響するが、同一スペクトル中では主原料と不純物の S/N 比は常に一定である。そこで、次に S/N 比からの不純物の定量法の可能性について、メタノールとトルエンのスペクトルから検討を行った。S/N 比は積算回数によって大きく変化することから、メタノールとトルエンのメチル基について S/N 比を求め、各濃度における S/N 比と積算回数との相関性を調べた。Figure3 に示すように、100mM のメタノールのメチル基の S/N 比は積算回数と良好な直線性がみられた。この結果は、シグナルのノイズを基準とした定量性が可能であることを示している。また、トルエンのメチル基の S/N 比も 1.0%と 0.5%濃度では 1 回から 256 回までの積算回数で直線性がみられることから、少ない積算でも S/N 比による定量が可能であることが示された。一方、トルエンの濃度が 0.1%以下では、積算回数が少ないと S/N 比が直線から外れて大きくなってしまった。しかしながら、0.01%のトルエンでも 64 回から 256 回の積算で直線性がみられることから、積算回数を増やすことによって、定量性が確保されることが示された。トルエン濃度とメチル基の S/N 比との相関をプロットしたところ、Fig. 4 に示すように、256 回の積算によって、0.05%から 10%まで直線性がみられた。また、4 回の積算でも 0.1%から 10%まで S/N 比と濃度に直線性があることから、少ない積算でも定量可能であることが示された。

D. 考察・結論

医薬品のうち原薬の不純物は有機不純物と無機不純物および残留溶媒に分類される。このうち有機不純物と残留溶媒は、その殆どが化合物中に水素原子を含む有機化合物であることから、NMR による定性・定量が可能となる。しかしながら、NMR は他の分析手法と比べて感度が低いことから、純度試験の試験法として

は未だ確立されていない。本研究では、医薬品の純度試験の分析法として NMR 法の有用性について検討を行った。原薬と不純物の代わりに 100mM のメタノールと 0.01%から 10%の濃度のトルエンをそれぞれ用いて測定溶液を調整し、標準的な 400MHzNMR で $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した(Fig.1)。トルエンの濃度とメチル基の面積値について相関を調べたところ(Fig.2)、256 回の積算ではメタノールに対して 0.01%のトルエンの濃度でも定量性があることが示された(Fig.2B)。この結果より、NMR では不純物の検出限界および定量限界を 0.01%以下に設定が可能であり、純度試験法として NMR が有効であることが明らかとなった。256 回の積算に要する時間は 15 分程度なので、本測定法は十分実用的である。

NMR スペクトルのピーク強度を求める方法として、一般的に使われている面積値を利用したが、今回、ベースラインに対するピークの S/N 比を利用する方法についても検討を行った。ピーク面積の大きさはスペクトルの位相がずれると変化するが、S/N 比は位相に影響し難いことから、化合物濃度はピークの S/N 比の大きさと相関することが予測される。しかしながら、S/N 比は積算回数によって変化し、積算回数を増やしてノイズを少なくすると同一ピークの S/N 比は誤差が大きくなることも考えられた。そこで、メタノールとトルエンのピークの S/N 比について、濃度と積算回数との相関について検討を行った(Fig.3, 4)。その結果、積算回数が少なくてもトルエンのメチル基の S/N 比と濃度に良い相関がみられたこと(Fig.3)、また、積算回数を 256 回に増やしても 0.05%まで定量性があることがわかった(Fig.4)。この結果より、NMR による定量にはピークの S/N 比が面積の代用として利用可能であることが示された。

医薬品中の残留溶媒に関しては ICH の基準(ICH Q3C)があり、リスクに応じて、使用を避けるべき溶媒(クラス 1)、残留量を規制すべき溶

媒(クラス 2)および低毒性の溶媒(クラス 3)の 3 段階に分類されている。このうち、医薬品の製造に用いられ規制対象となるクラス 2 溶媒は 29 種類がリストに載せられているが、うち 23 種の濃度限度値が 100ppm~3880ppm に設定されている。本法によりこれらの溶媒が測定対象となりうると考えられ、簡便な残留溶媒の同定および定量法として NMR 法は使用可能であると考えられる。

以上、医薬品の純度試験法としての NMR の有用性を検討した結果、NMR 法では不純物濃度が原薬に対して 0.01%~0.05%まで定量性があることが明らかとなった。NMR では試料を特別な前処理をせず重溶媒に溶解して測定するため、医薬品の類縁物質とともに残留溶媒等の揮発性の有機化学物質の定量にも NMR による不純物分析法は有効であることが考えられる。今後、実際の医薬品を用いて NMR 法の検出能力について実証を行い、本分析法の局方一般試験法としての有用性について評価を行う予定である。

F. 参考文献

1. Ohno, A.; Kawasaki, N.; Fukuhara, K.; Okuda, H.; Yamaguchi, T., Time-dependent changes of oxytocin using $(1)H$ -NMR coupled with multivariate analysis: A new approach for quality evaluation of protein/peptide biologic drugs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2009**, *57*(12), 1396-9.

2. A. Ohno, T. Kawanishi, H. Okuda, K. Fukuhara, A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using 1H -NMR Coupled with Multivariate Analysis, *Chem. Pharm. Bull.* **60** (3) 320—324 (2012)

G. 健康危険情報

なし.

H. 研究発表

1. 論文発表

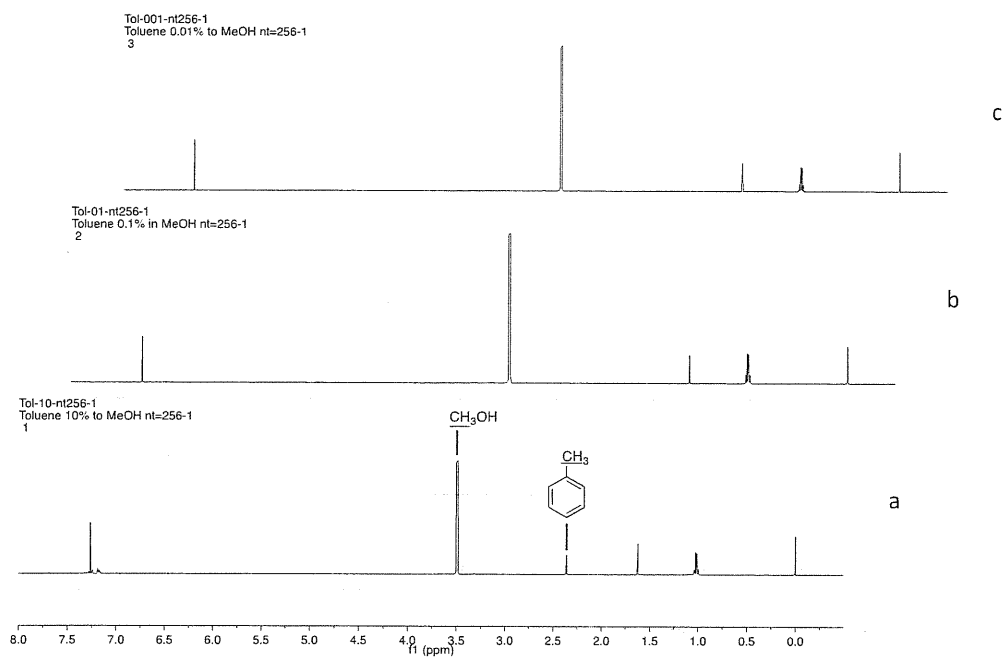
A. Ohno, T. Kawanishi, H. Okuda, K. Fukuhara, A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using 1H -NMR Coupled with Multivariate Analysis, *Chem. Pharm. Bull.* **60** (3) 320—324 (2012)

2. 学会発表

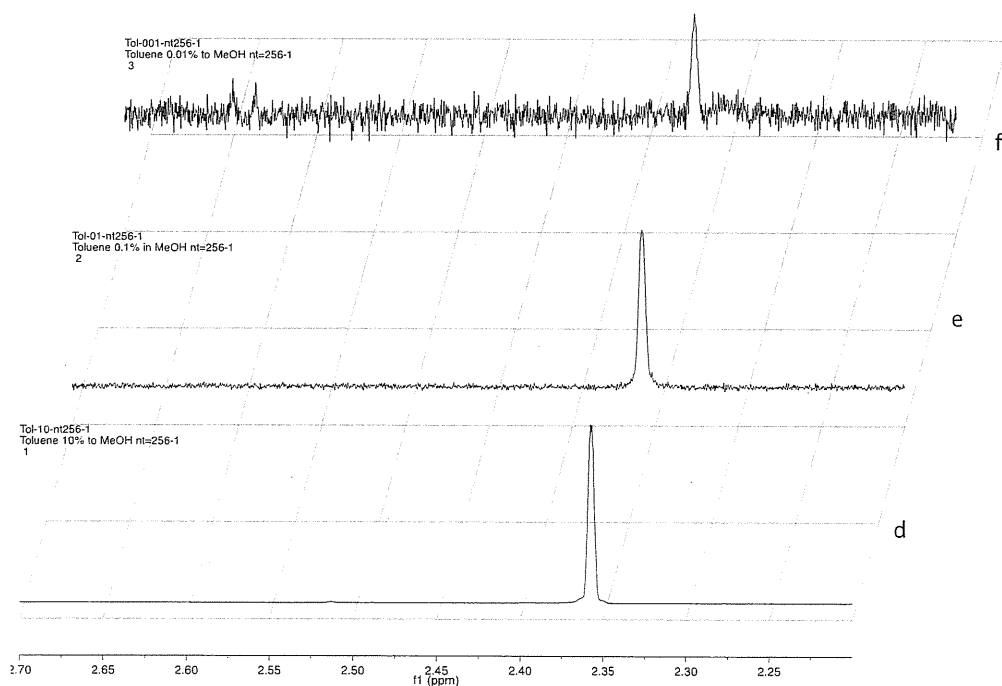
Ohno, A., Kawanishi, T., Okuda, H., Kurihara, M., Fukuhara, K., New approach to qualify evaluation for a difference of the high-order structure of peptide/protein drugs, 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition, (2011.8) (Philadelphia, PA, USA)

I. 知的財産権の出願・登録状況

登録および登録予定共になし.



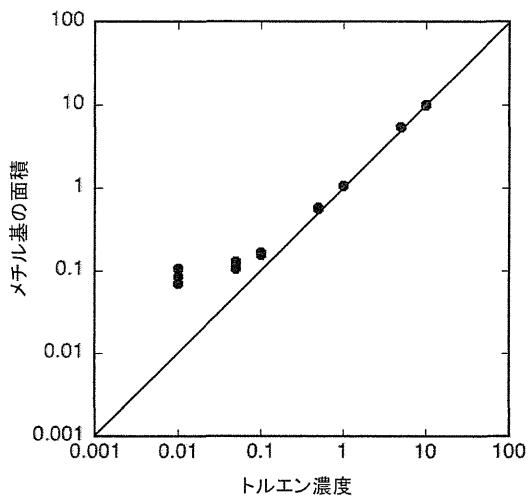
a) 100mM methanol and 10mM toluene in CDCl_3 , nt = 256; b) 100mM methanol and 0.1mM toluene in CDCl_3 , nt = 256; c) 100mM methanol and 0.01mM toluene in CDCl_3 , nt = 256



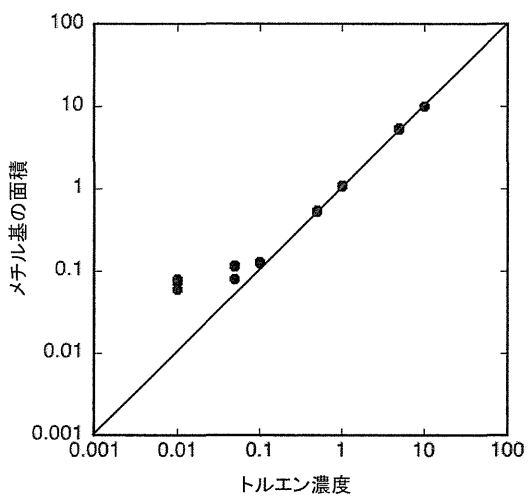
d) Methyl signal of 10 mM toluene (10 % to methanol); e) Methyl signal of 0.1 mM toluene (0.1 % to methanol); f) Methyl signal of 0.01mM toluene (0.01 % to methanol)

Fig.1 メタノール(100 mM)とトルエン(10, 0.1, 0.01 mM)の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

(A) nt = 64



(B) nt = 128



(C) nt = 256

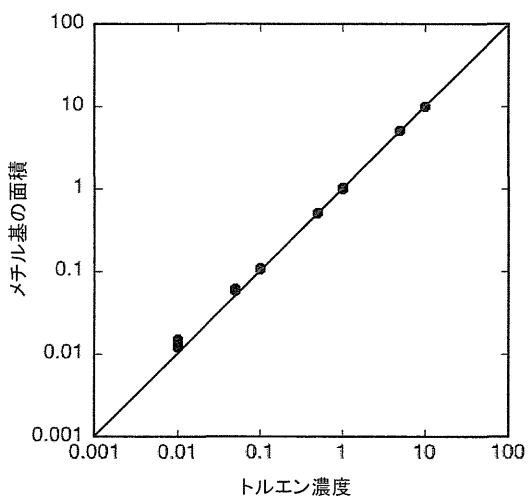


Fig. 2 積算回数(nt = 64, 128, 256)におけるトルエンの濃度とメチル基の面積との相関 (10%トルエンのメチル基の面積値を10として補正)

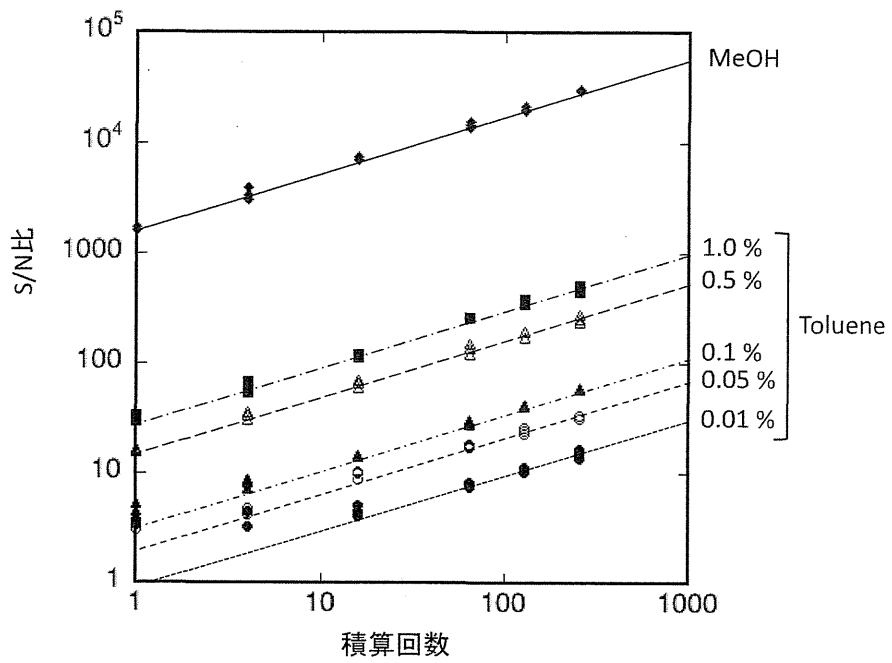


Fig. 3 トルエンおよびメタノールのメチル基の S/N 比と積算回数との相関

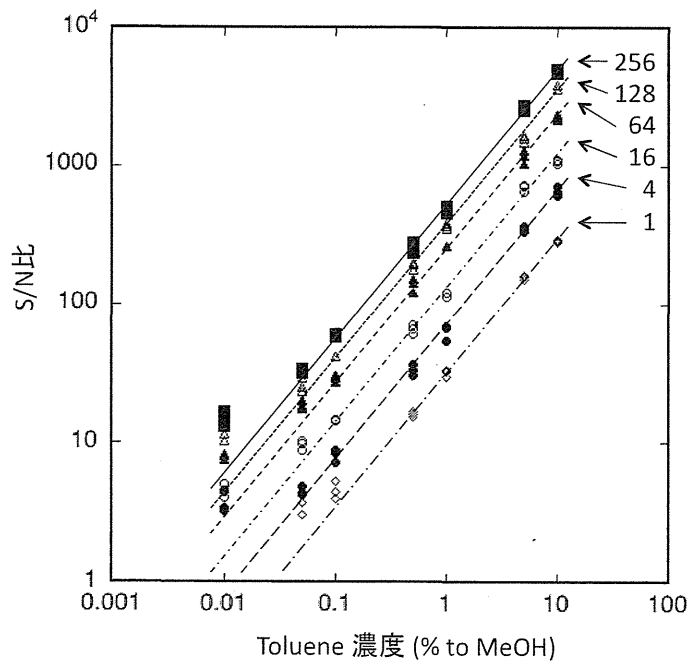


Fig. 4 トルエンの濃度とメチル基の S/N 比との相関

生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

研究分担者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長
研究協力者 原園 景 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部主任研究官

研究要旨 第十六改正第一追補に新規掲載されたエポエチンアルファ及びベータは、遺伝子組換え糖タンパク質であり、糖鎖不均一性の変動は薬理作用等に影響することから、日局で初めてグリコフォーム試験及び/または糖鎖試験が設定された。今度その他の遺伝子組換え糖タンパク質医薬品や、エポエチンカップ（エポエチンアルファ後続品）が新規掲載されるときにも、糖鎖試験法が設定されることが予想されるが、それらはその時点での科学技術レベルを反映したものであるべきと考えられる。本研究では、現時点で先端技術と考えられる LC/ESI/MS を用いて国内外のバイオ後続品を含む様々なエポエチン製剤のグライコフォームを分析し、LC/ESI/MS が糖鎖不均一性管理法として有用であることを確認した。

A. 研究目的

第十六改正第一追補に新規掲載されたエポエチンアルファ及びベータは、3 個の *N*-結合型糖鎖 (Asn24, 38, 83) と 1 個の *O*-結合型糖鎖 (Ser126) が結合したアミノ酸 165 残基 (MW: 18,235.7) からなる糖タンパク質で (図 1)、腎性貧血等の治療に適応されている。エポエチンアルファ及びベータの先行品に加えて、日本ではエスポーを参照品として epoetin kappa が、欧州では Eprex/Erypo を参照品として epoetin zeta 及び INN を取得していない 1 品目がバイオ後続品/バイオシミラーとして承認されている (表 1)。

エポエチンの結合糖鎖はシアル酸を多数含み、シアル酸結合数及び糖鎖の構造は生物活性に影響を及ぼすことが知られている。等電点電気泳動やキャピラリー電気泳動による表面電荷の違いに基づいたアイソフォームプロファイルがエポエチンの品質評価法として利用されているが、各グリコフォームに対する特異性が高いとは言い難く、7 本前後のグリコフォーム分布を管理できる程度である。また、遊離糖鎖のプロファイルで管理する方法も採用されているが、この方法ではグライコフォームの分布は分からない。今後、その他の糖タンパク質医薬品や、エポエチンのバイオ後続品などが日局に掲載されることが予想されることから、グリコフォーム分布を適切に管理できる試験法の開発が望まれる。本研究では、質量分析を用いたグライコフォーム分析法の品質管理手法としての有用性を評価するために、エポエチン先行品及び後続品を用いて、グライコフォームプロフ

イルの比較を試みた。

略語: LC, 液体クロマトグラフィー; ESI, エレクトロスプレーイオン化; MS, マススペクトロメトリー; EDTA, エチレンジアミン四酢酸; TFA, トリフルオロ酢酸; NeuAc, *N*-アセチルノイラミン酸; NeuGc, *N*-グリコリルノイラミン酸; Hex, ヘキサース; HexNAc, *N*-アセチルヘキサース; GlcNAc, *N*-アセチルグルコサミン; Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; GalNAc, *N*-アセチルガラクトサミン; PNGase, ペプチド-*N*-グリカナーゼ

B. 研究方法

1. 試料

エポエチン製剤として, Espo (*epoetin alfa*, 協和発酵キリン株式会社, 日本), Espo の後続品である Epoetin alfa BS injection [JCR] (*epoetin kappa*, 日本ケミカルリサーチ株式会社, 日本), Epogin (*epoetin beta*, 中外製薬株式会社, 日本), Eprex (*epoetin alfa*, Ortho BioTech Product, L.P. (Janssen-Cilag Ltd), 英国), 並びに Eprex の後続品である Epoetin alfa Hexal (*no INN*, Hexal Biotech, ドイツ) 及び Silapo (*Epoetin zeta*, Standa Arzneimittel, ドイツ) を用いた。各製剤は、そのまま、もしくは 10 mM 酢酸アンモニウム溶液で希釈し 1500 IU/ml とした後、4 倍量の冷アセトンを加え、 -20°C で 2 時間放置した後、12000 \times g で 20 分遠心し、上清を除去し、水に溶解した。400 IU 相当量を LC/ESI/MS 分析にか

けた。また、エポエチン 300 IU 相当量を 50 μ l の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2, 5 mM EDTA, 2.5 mM メチオニンを含む緩衝液中で 0.5 U の PNGase F (ロッシュ社製, ただし, 1 ユニットは至適条件で毎分 1 μ mol の基質を変化させる酵素量とする。)と 37°C で 14 時間反応させ, *N*-結合型糖鎖を除去した。

2. LC/MS

液体クロマトグラフィーには Paradigm MS4 (Michrome BioResources), 質量分析計には Qstar Elite (AB Sciex), イオン源にはナノエレクトロスプレーを使用した。溶離液には, 0.1% ギ酸 (A), 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル (B) 及び 0.1% 3,3,3-トリフルオロプロピオン酸 (C) を用いた。カラムには, MonoCap C18 fast flow (0.1 x 250 mm, GL Sciences) を用いた。試料は, MonoCap C18 Trap に吸着させた後, 0.1% TFA 40 μ l で脱塩した後, 反転させてカラムに流し, 流速 0.5 μ l/min, 0-5 min, 15% B 及び 10% C, 5-135 min, 15-80% B 及び 10% C のグラジエント条件にて溶出した。質量分析の *m/z* 範囲は, 1,000-4,000 とした。

3. グライコフォームプロファイル

グライコフォームを示すため, エポエチン溶出範囲のマスマスペクトルを積算し, 質量分析計付属のソフトウェアを用いて, 次の条件でデコンボリューションを行った。質量範囲: 25,000-50,000, S/N = 1; *m/z* 範囲: 1,600-3,600, 反復数: 20 回 (*N*-結合型糖鎖を除去した試料では, 質量範囲: 15,000-30,000; S/N = 1; *m/z* 範囲: 1,100-2,400)。各グライコフォームの質量の計算には, 次の原子量値, H: 1.00794, C: 12.0108, N: 14.00674, O: 15.9994, S: 32.066 を用いた。

C. 研究結果及び考察

1. LC/ESI/MS を用いたエポエチンのグライコフォーム分析

エポエチン製剤は, 界面活性剤や塩の分析への影響を除くため, アセトン沈殿を行った後, 逆相 LC/ESI/MS により分析し, 得られたマスマスペクトルをデコンボリューションすることでグライコフォームプロファイルを得た。代表例として, エポエチン先行品 A の LC/ESI/MS データを図 2 に示す。エポエチンは 65.5~74.5 分に溶出し, 約 1,600 ~3,600 の *m/z* 範囲に観測された。1,700 ~3,600 の *m/z* 範囲のエキストラクトイオンクロマトグラムを図 2A に, 溶出画分 (65.5-74.5 分) のマスマスペクトルを積算したスペクトルを図 2B

に, デコンボリューションスペクトルを図 2C に示す。質量約 28,000~32,000 Da にピークが認められ, 各ピークの質量から, ペプチド骨格 ($C_{809}H_{1301}N_{229}O_{240}S_5$: 18,235.7 Da) に, 主に組成が NeuAc_{10~14}Hex_n+3HexNAcFuc₃ (n = 16~24) に相当する糖鎖が結合していることが推測された。このことは, 報告されているエポエチンに結合する *N*-結合型糖鎖は, シアル酸が付加したコアフコシル化された 2 から 4 本鎖の複合型糖鎖で, *N*-アセチルラクトサミン構造を持つ場合があること, 並びに *O*-結合型糖鎖は, GalGalNAc からなる二糖に NeuAc が 1 又は 2 個結合した糖鎖であることと一致した。また, ピークが十分分離されていないが, NeuGc の存在 (もしくは, タンパク質の酸化) を示唆するピーク (質量+16) が認められた。さらに, シアル酸の *O*-アセチル化を示唆する質量差 42 のピークが認められた。ほぼ全てのピークについて結合糖鎖の単糖組成が推測できたことから, ペプチド骨格には不均一性はなく, 想定通りの配列を持つことが確認された。以上より, LC/ESI/MS によりエポエチンのグライコフォームプロファイルを示すことができることを確認した。

次に, 溶出時間とグライコフォームの関係を示す。各グライコフォームは, 糖鎖のサイズ及びシアル酸の数に応じて保持時間が異なっており, 65.5-66.7 分, 66.7-68.0 分, 68.0-70.0 分, 70.0-71.4 分及び 71.4-74.4 分においては, それぞれ, 主にシアル酸が 11, 12, 13, 13 から 14 及び 14 個結合したグライコフォームが溶出していた (図 2D-H)。エポエチンの各グライコフォームは, 逆相 HPLC においてはほぼ同一位置に溶出するが, シアル酸付加数が多いほど遅く, また, 糖鎖のサイズが大きいと僅かに早く溶出することが確認された。溶出画分ごとにグライコフォームを求めたところ, 全溶出画分から求めたときよりも微少なグライコフォームまで検出可能であった (図 2C-H)。*O*-アセチル化が 2 個存在した場合の質量差は 84 であり, HexHexNAc (365) の単位が一つ増加し NeuAc (291) が一つ減少した場合の質量差は 74 であることから, これらのピークは十分に分離せず重なってしまう。画分ごとにグライコフォームを求めることでアセチル化の程度を観測することが可能であり, エポエチン一分子に 4 個の *O*-アセチル化を含むピークも観測することができた (図 2F-H)。

なお, データは示していないが, デコンボリューションのパラメータはグライコフォームプロファイルに若干の影響を及ぼした。タンパク質は, ESI マスマスペクトルにおいては, ある範囲の価数

が一つ異なる一連のピーク群として観測される。デコンボリューション処理は、マススペクトル上のピークを元の質量に対応させるが、混在物のピークやバックグラウンドのケミカルノイズが偶発的にピークを作る可能性、さらに、ピーク強度比に影響を及ぼす可能性がある。そこで、元のマススペクトルの m/z 範囲をエポエチン由来のピークがはっきりと求められる 1,600-3,600 とし、また、対応させる質量範囲を 20,000 から 40,000 とし、デコンボリューション処理を行った。

2. 各エポエチン製剤のグリコフォームの解析

エポエチン溶出画分から得られたデコンボリューションスペクトルを用いて、各エポエチン製剤のグリコフォームの比較を行った (図 3)。図 3A, B, C, D, E 及び F は、それぞれ先行品 A, 先行品 A を参照として開発された後続品 A', 先行品 B, 先行品 C, 先行品 C を参照として開発された後続品 C' 及び C'' のグリコフォームプロファイルである。各製品のグリコフォームパターンは異なっており、それぞれ特徴的なグリコフォームプロファイルを示した。グリコフォームの特徴を表 2 にまとめた。先行品 A では、シアル酸付加数は、11 から 14 個で、13 及び 12 個が主要であり、O-アセチル化が比較的多く存在すること、後続品 A' では、シアル酸付加数は 10 から 14 個で、12 及び 13 が主要であり、糖鎖のサイズが大きなグリコフォームが多いこと、先行品 B では、シアル酸付加数は 10 から 14 個で、13 及び 12 個が主要であり、14 個付加したものが比較的多く存在し、また NeuGc が比較的多く存在すること、先行品 C では、シアル酸付加数は 11 から 14 個で、12 及び 11 個が主要であること、並びに O-アセチル化が多いこと、後続品 C' では、シアル酸付加数は 12 から 14 個であり、12 及び 13 個が主要であること、並びに低分子量領域でマンノース-6-リン酸を含む高マンノース型糖鎖が結合していると考えられるグリコフォームが存在すること、後続品 C'' では、シアル酸付加数が 10 から 13 個で、11 及び 12 個が主要であり、14 個のグリコフォームは非常に少なく、また、糖鎖のサイズの分布は広いこと、が示唆された。以上より、遊離糖鎖の糖鎖プロファイリングやタンパク質の等電点電気泳動及びキャピラリー電気泳動では十分に分からなかった各エポエチン製剤のグリコフォームプロファイルの特徴を詳細に示すことに成功した。

3. 各エポエチン製剤の O-結合型糖鎖の不均一性の解析

PNGaseF により N-結合型糖鎖を除去し、各エ

ポエチン製剤の O-結合型糖鎖の不均一性を比較した (図 4)。タンパク質部分の質量及びグリコフォームの質量から、結合している O-結合型糖鎖の単糖組成は、いずれの製品も NeuAc1Hex1HexNAc1 及び NeuAc2Hex1HexNAc1 と推定され、これは報告されている糖鎖構造と一致した。質量の 16 単位の増加が認められたが、NeuGc の存在が少ないと推測された製剤でも比較的強く観測されること及び酵素処理時間を延長するとその存在量が増加すること (データ非表示) から、この増加の大部分は NeuGc の存在によるものではなく、酵素処理操作中に起きたタンパク質の酸化によると考えられた。糖鎖を除くと容易に酸化される部位があることが推測される。O-アセチル化が認められていた先行品 A 及び C 並びに後続品 C' では、O-結合型糖鎖においても O-アセチル化が認められた。後続品 C' 及び C'' は、参照先行品である先行品 A とは大きく異なるパターンを示した (図 4C-E)。つまり、後続品 C' においては、ほとんどがシアル酸が二個結合した NeuAc2HexHexNAc であること、後続品 C'' においては、シアル酸付加の程度が低いこと、また、O-結合型糖鎖が付加していない分子がわずかに存在することが確認された。以上より、タンパク質の酸化が起きないような酵素処理条件の検討が必要ではあるが、N-結合型糖鎖を除去することにより、各製剤の O-結合型糖鎖結合状況を明らかにした。

以上より、いずれのエポエチン製剤も CHO 細胞により産生されるが、細胞株の違い、培養条件の違い、精製工程の違いなどにより、それぞれ特徴的なグリコフォームプロファイルを示すことを明らかにした。LC/ESI/MS によるグリコフォーム分析は、糖鎖不均一性の管理方法として有用であることが示された。

D. 結論

本研究では、LC/ESI/MS によるグリコフォーム分析の糖鎖不均一性管理方法としての有用性を評価するため、日本及び欧州にて販売されているエポエチン先行品及び後続品のグリコフォームの分析を行った。その結果、エポエチン先行品と後続品のグリコフォームの特徴 (シアル酸付加数とその分布、NeuGc の存在量並びに O-アセチル化の程度並びに O-結合型糖鎖付加状況) を明らかにし、各エポエチン製剤は、それぞれ特有の特徴を持つ異なったグリコフォームプロファイルを示すことを確認した。LC/ESI/MS によるグリコフォーム分析は、糖鎖の僅かな違いでも識別できることからグリコフォームに対する特異

性が高く、糖鎖不均一性の管理方法として有用であることが示された。

印刷中

E. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

なし

総説など

- 1) 川崎ナナ, 石井明子: 抗体医薬品のバイオ後続品の将来展望. 臨床と微生物. 39巻5号 459(059)-465(065) (2012)
- 2) 川崎ナナ, 石井明子: バイオ後続品. 日本病院薬剤師誌. 48 (9), 1079-1086 (2012).
- 3) 石井明子, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ後続品/バイオシミラーに関する国内外の規制動向と品質評価, ファームテクジャパン, 29(1), (2013),

2. 学会発表

- 1) A.Harazono, N. Hashii, R. Kuribayashi, N. Kawasaki: Comparison of glycoforms of innovator and biosimilar epoetins using LC/ESI/MS of intact proteins. 26th International Carbohydrate Symposium, (July 22-27, 2012) Madrid, Spain

F. 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. ヒトエリスロポエチンの構造及び結合する代表的な糖鎖

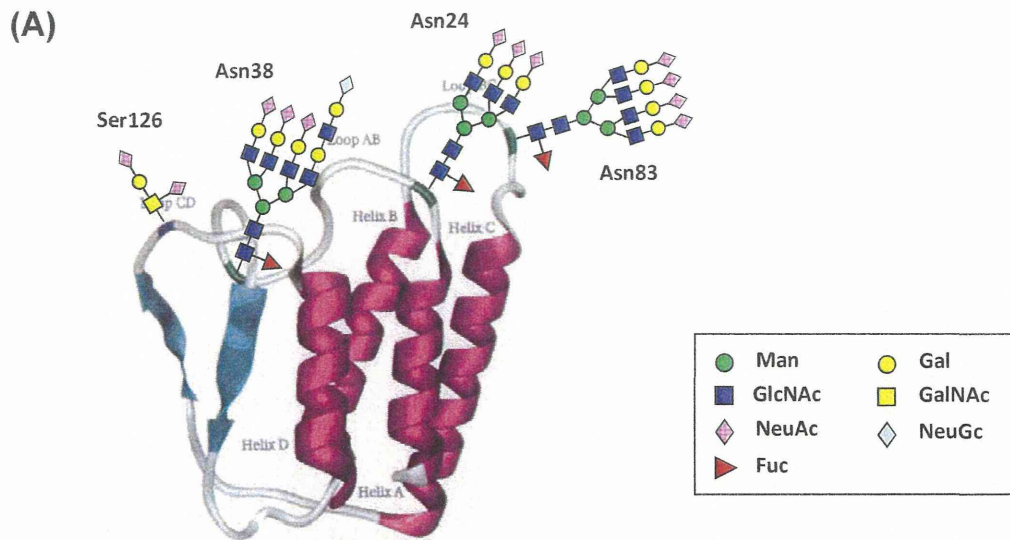
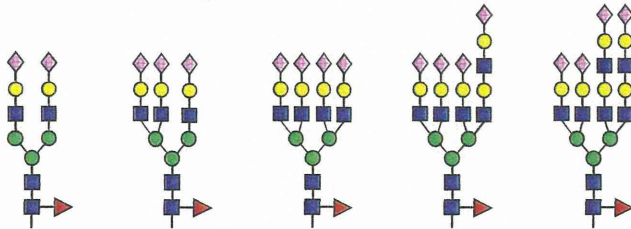


図: JBC, 1993, 268 (21) 15983-15993の図を改変

(B)

N-linked glycan



O-linked glycan

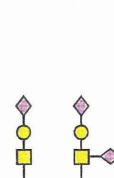
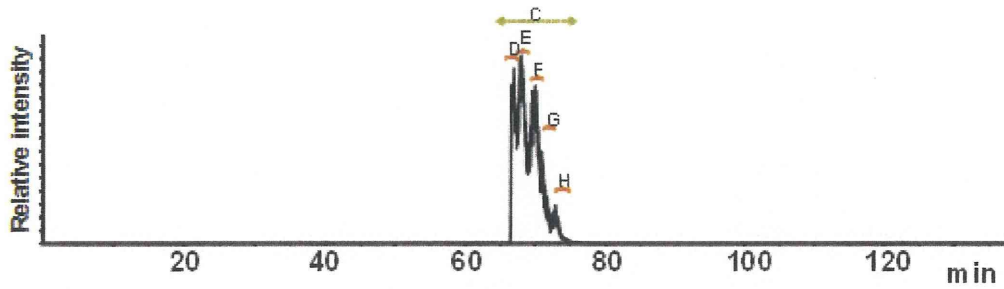
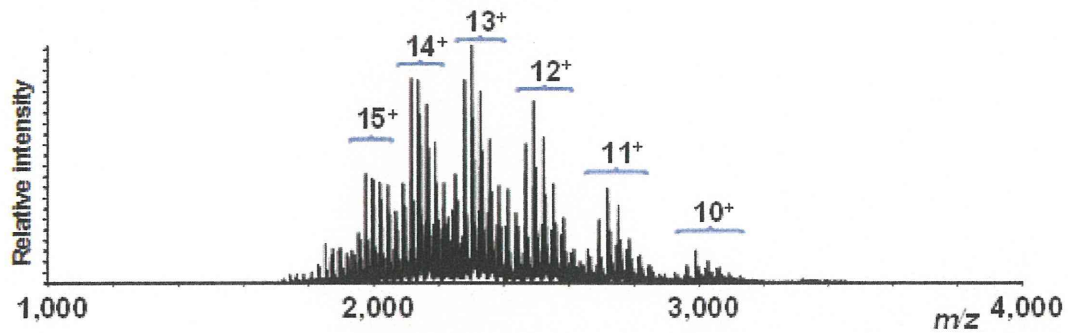


図2. LC/MSによるエポエチンのグリコフォーム分析の例

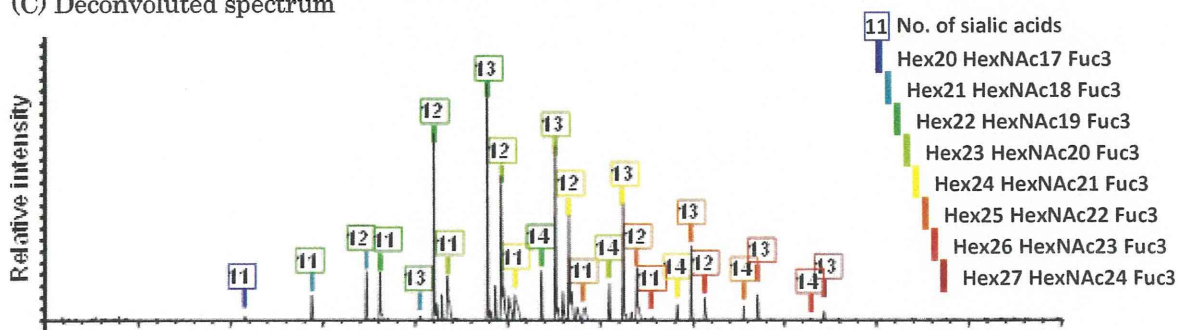
(A) Extract ion chromatogram of m/z 1,700-3,600



(B) Integrated mass spectra at 65.6-74.5 min



(C) Deconvoluted spectrum



次に続く

図2. 続き

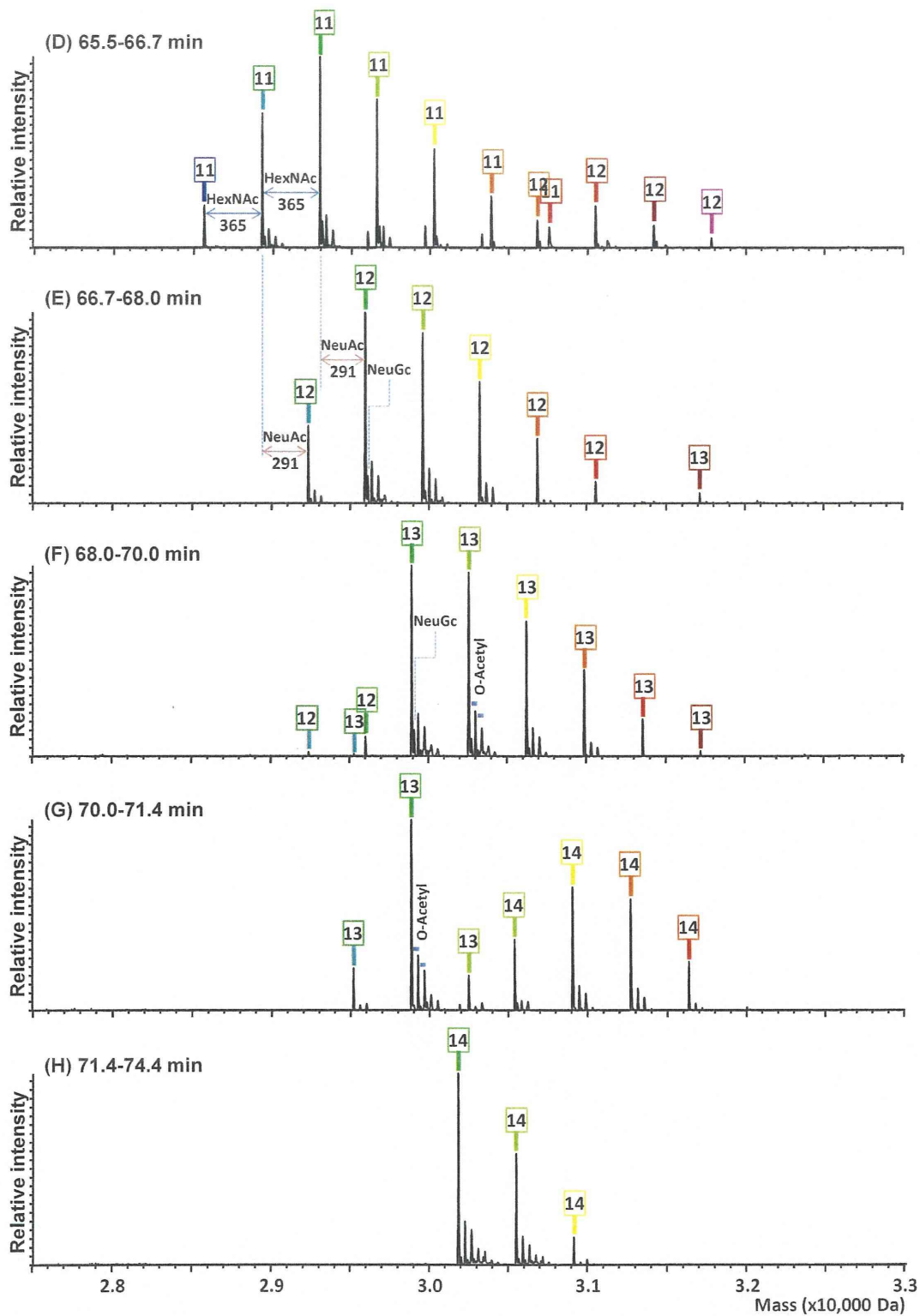


図 3. 各エポエチン製剤のグリコフォームの比較

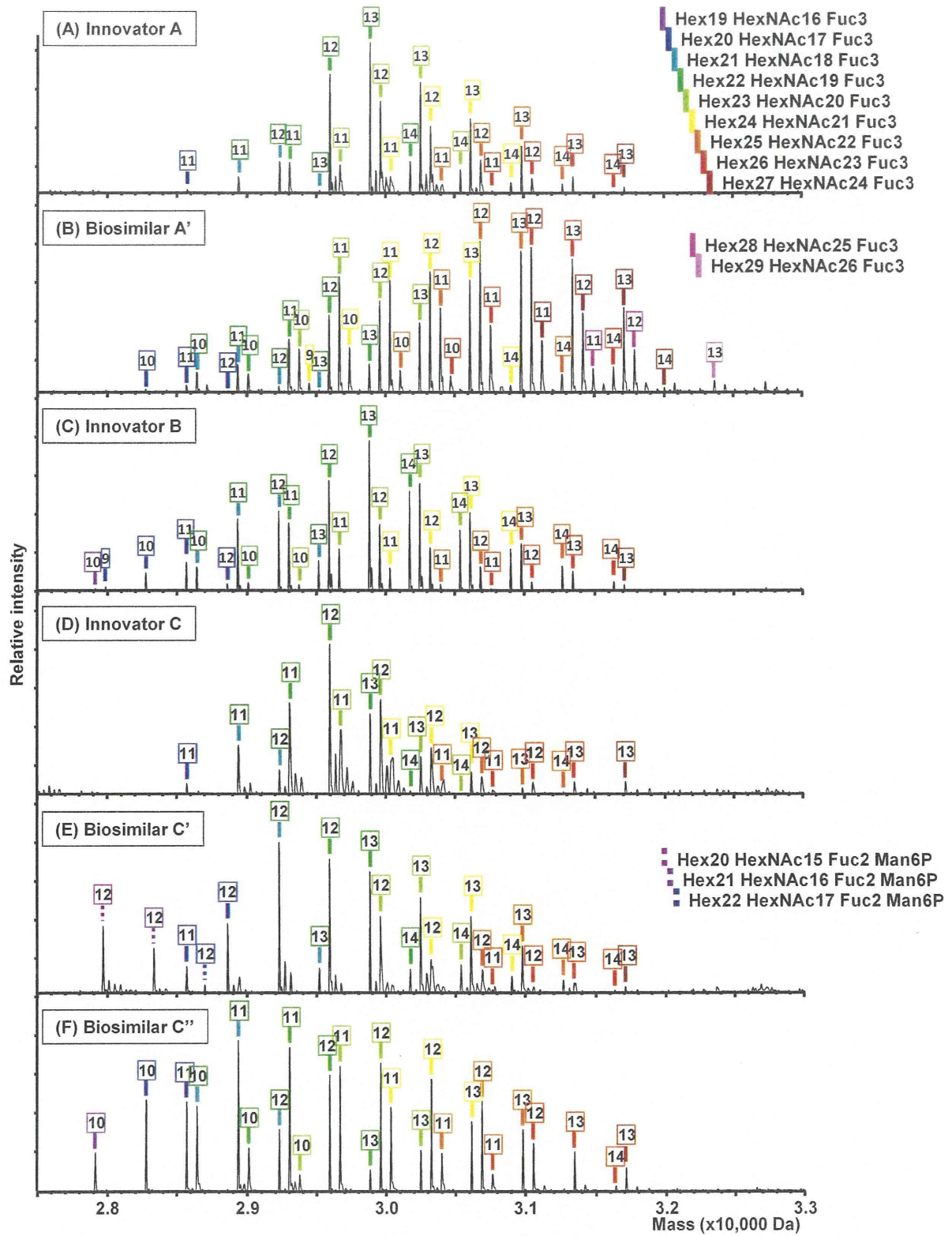
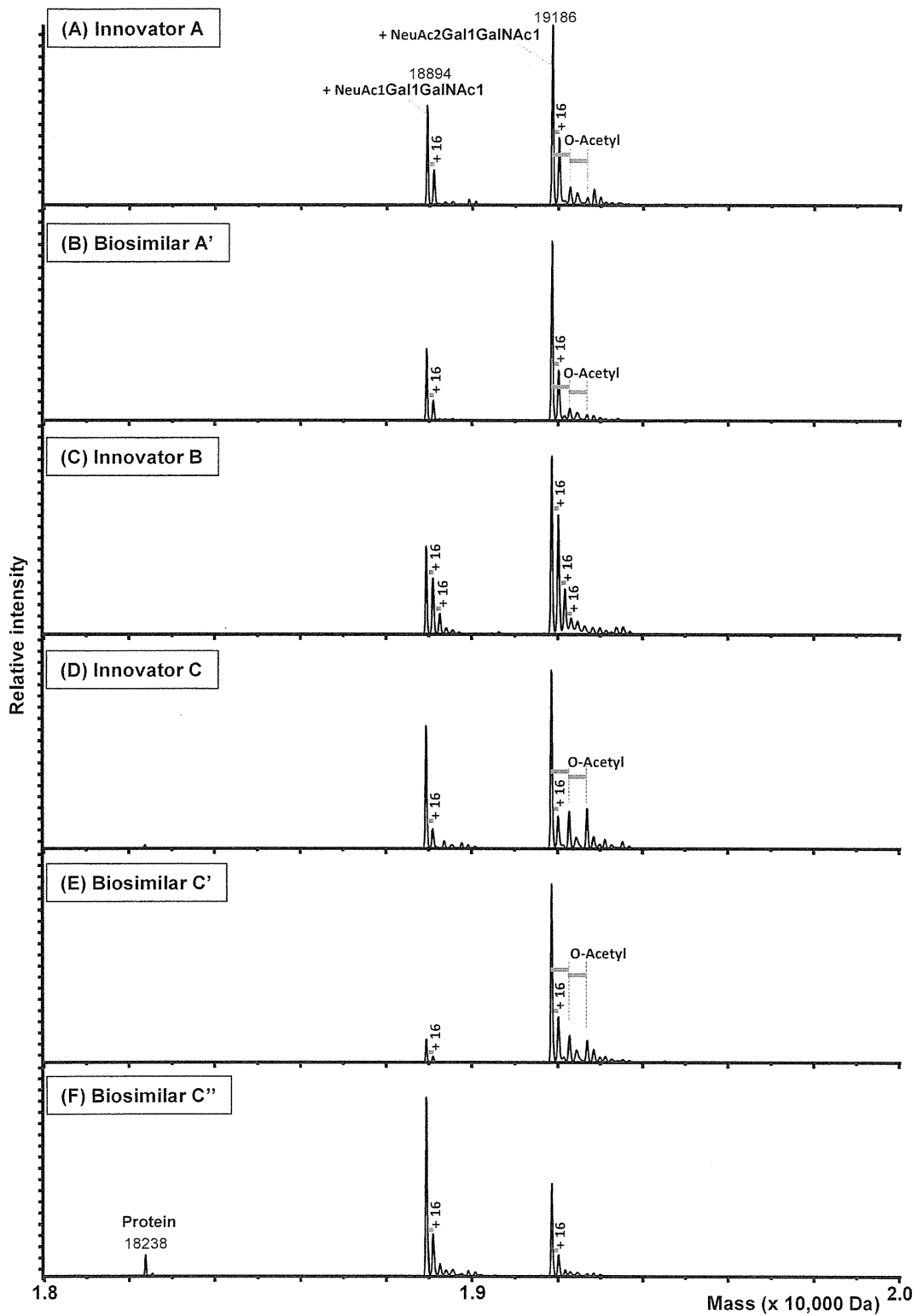


図 4. 各エポエチン製剤のグリコフォーム（O結合型糖鎖のみ）の比較



*, +16 の質量の増加は、酵素消化処理中のタンパク質の酸化によって考えられる。

表 1. 日米欧のエボエチン製剤

製品名	一般的名称 (INN)	承認	産生細胞	備考
新有効成分含有医薬品				
Epogen/Procrit Espo Eprex/Erypo	<i>epoetin alfa</i>	米国 1989年1月 日本 欧州	CHO	
Epogin NeoRecormon	<i>epoetin beta</i>	日本 1990年1月 欧州		
バイオ後続品/バイオシミラー医薬品				
Epoetin alfa BS injection [JCR]	<i>epoetin kappa</i>	日本 2010年1月	CHO	Espoの後続品
Silapo Retacrit	<i>epoetin zeta</i>	欧州 2007年12月	CHO	Eprex/Erypoのバイオシミラー
Binocrit Epostin alfa Hexal Abseamed	No INN	欧州 2007年8月	CHO	Eprex/Erypoのバイオシミラー

表2. 各エポエチン製剤のグリコフォームの特徴

製剤	シアル酸付加数	NeuGc	O-Acetyl化	その他の特徴
先行品A	11-14 (13>12>>11>14)	少ない	多い	
後続品A'	10-14 (13>12>11=14>>10)	少ない	ほとんどない	サイズの大きな糖鎖が多い
先行品B	11-14 (12>11>>13>>14)	有り	なし	
先行品C	11-14 (12>13>>11>10>14)	少ない	非常に多い	サイズの大きな糖鎖が少ない
後続品C	11-14 (12>13>>14>>11)	少ない	多い	Man6Pを含む高マンノース型糖鎖が結合した分子種が認められる
後続品C''	10-14 (11>12>10=13>>>14)	少ない	少ない	シアル酸付加数が少ない 糖鎖のサイズの分布が広い

分担研究報告書

分担研究課題 生薬に関する試験法及び各条規格の改正に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 丸山卓郎

ベラドンナ総アルカロイドの各条規格に関する研究

研究要旨 局方優先収載候補品目であるベラドンナ総アルカロイドの各条規格の検討を行い、性状、TLC 法による確認試験を設定するとともに、純度試験として重金属及びヒ素の規格を設定し、さらに、HPLC 法による定量法を設定し、含量規格値案をまとめた。

協力研究者

浅野年紀 大正製薬株式会社

山田修嗣 アルプス薬品工業株式会社

A. 研究目的

ベラドンナ総アルカロイドは、ナス科植物、*Atropa belladonna* Linné (ベラドンナ、セイヨウハシリドコロ) の根のエキスからアルカロイド画分を精製したものである。本品は、副交感神経遮断作用を有するトロパンアルカロイド、*l*-hyoscyamine 及び *l*-scopolamine (Fig. 1) 等を含む事から、鼻水や涙の分泌を抑制する作用がある。このため、本品は、アレルギー性鼻炎や感冒を標的とした多数の一般用医薬品に配合されている。しかしながら、現行の日本薬局方では、*Atropa belladonna* の根として、「ベラドンナコン」、その含水エタノールエキスとして、「ベラドンナエキス」が規定されているものの、「ベラドンナ総アルカロイド」の規格は無い。トロパンアルカロイド類は、その薬理作用とともに、毒性も強く、ベラドンナの実は、一粒で人を確実に死に至らし

める毒性を有する。従って、ベラドンナ総アルカロイドの有効かつ安全な使用のためには、局方収載による品質の規格化が望まれる。

そこで本研究では、「ベラドンナ総アルカロイド」の局方収載を目指し、第17改正日本薬局方原案作成要領に基づき、各条規格の検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

国内の市場に流通するベラドンナ総アルカロイド、3 検体を使用した。

2. 実験方法

2-1. 性状

各検体の外観を観察するとともに、第17改正日本薬局方原案作成要領に従い、水、エタノール(99.5)及び定量法に使用するメタノールの溶解性を試験した。

2-2. 確認試験

「日局」ベラドンナコンの確認試験を参考に、

下記の条件で検討を行った。

試料 2 mg をとり、エタノール (95) 1 mL を加えて溶かし、試料溶液とする。別にアトロピン硫酸塩標準品 2 mg をエタノール (95) 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液について、各 5 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルにスポットし、アセトン/水/アンモニア水 (28) 混液 (90:7:3) で、7 cm 展開した後、薄層板を 80°C, 10 min 加熱乾燥し、冷後、噴霧用ドラッグエンドルフ試液を噴霧し、発色するスポットの色調及び R_f 値を観察した。

2-3. 純度試験

2-3-1. 重金属

試料 1.0 g を磁製るつぼにとり、希塩酸 1.2 mL を加え混和後、硝酸マグネシウム六水和物のエタノール (95) 溶液 (1 \rightarrow 10) 10 mL を加えて混和し、沸騰水浴上で溶媒を蒸発させた後、徐々に加熱して炭化させた。以下、日本薬局方、一般試験法、重金属 <1.07> の項が規定する第 4 法に従い、操作した。

2-3-2. ヒ素

試料 2.0 g をとり、日本薬局方、一般試験法、ヒ素 <1.11> の項が規定する第 4 法に従い、操作した。

2-4. 定量法及び含量規格

「日局」ベラドンナコン、ベラドンナエキス、ロートコン及びロートエキスの定量法を参考に、下記の条件で検討を行った。

試料 25 mg を精密に量り、メタノールに溶かして正確に 25 mL とした。この液、5 mL を正確に量り、内標準物質（プルシン二水和物の移動相

溶液；1 \rightarrow 2500）3 mL を正確に加え、更に移動相を加えて 25 mL とし、試料溶液とした。別に、アトロピン硫酸塩標準品、約 25 mg を精密に量り、移動相に溶かして正確に 25 mL とし、標準原液 A とした。また、スコポラミン臭化水素塩標準品、約 25 mg を精密に量り、移動相に溶かして正確に 25 mL とした。この液 3 mL を正確に量り、移動相を加えて正確に 25 mL とし、標準原液 B とした。標準原液 A 5 mL 及び標準原液 B 2 mL をそれぞれ正確に量り、内標準液 3 mL を正確に加え、移動相を加えて 25 mL とし、標準溶液とした。試料溶液及び標準溶液 10 μ L につき、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行った。それぞれの液の内標準物質のピーク面積に対するヒヨスチアミン（アトロピン）のピーク面積の比 Q_{TA} 及び Q_{SA} 並びにスコポラミンのピーク面積の比 Q_{TS} 及び Q_{SS} を求め、次式によりヒヨスチアミン及びスコポラミンの量を計算した。

ヒヨスチアミンの量 (mg)

$$= M_{SA} \times Q_{TA} / Q_{SA} \times 0.8551$$

M_{SA} : 乾燥物に換算したアトロピン硫酸塩標準品の秤取量 (mg)

スコポラミンの量 (mg)

$$= M_{SS} \times Q_{TS} / Q_{SS} \times 6/125 \times 0.7894$$

M_{SS} : 乾燥物に換算したスコポラミン臭化水素酸塩標準品の秤取量 (mg)

HPLC 条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210 nm）

カラム：内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィーオクタ

デシルシリル化シリカゲルを充填したもの。

カラム温度：20°C

移動相：リン酸化二水素カリウム 6.8 g を水 900 mL に溶かし、トリエチルアミン 10 mL を加え、リン酸で pH 3.5 に調製した後、水を加えて 1000 mL とした液/アセトニトリル混液 (9:1)

C. 研究結果

1. 性状

各検体の外観は、いずれも白色であり、結晶性の粉末であった。また、各溶媒に対する溶解性は、水に溶けにくく、エタノール (99.5) に溶けやすく、メタノールに極めて溶けやすかった。

2. 確認試験

実験方法に記載の条件で試験を行った結果、いずれの検体においても、アトロピン標準品と色調及び R_f 値の一致するスポットを明瞭に観察可能であった (Fig. 2)。

3. 純度試験

本品の原料は、植物の地下部であることから、純度試験として、重金属及びヒ素の規格設定を検討した。

3-1. 重金属

日本薬局方が定める重金属試験は、Pb, Cu, Cd, Hg などの有害性重金属が、pH 3.0-3.5 で、硫化ナトリウム試液によって呈色する性質を利用するものである。従って、ベラドンナ総アルカロイドのように、検体自身が試験溶液の液性に影響を与える場合、正確な試験結果を得られない危険がある。このため、試験法設定に当たり、予め希塩酸により試料を中和する操作を加えた。また、第4法では、本来、エタノールに点火し燃焼するこ

とになっているが、爆発的な燃焼により試料が飛散することがあるため、沸騰水浴上での溶媒留去とした。

各試料の測定値及び添加回収試験の結果を Table 1 に示した。各試料の重金属含量は、2.38-5.07 ppm であった。また、添加回収試験の結果は、84.8-119.4% と、いずれの試験区においても回収率 70% を上回っており、原案作成要領が定める基準を満たしていた。

3-2. ヒ素

各試料の測定値及び添加回収試験の結果を Table 2 に示した。各試料のヒ素含量は、0.01-0.04 ppm であった。また、添加回収試験の結果は、71.6-93.5% と、いずれの試験区においても回収率 70% 以上を満たしていた。

4. 定量法及び含量規格

実験方法に記載の条件で試験を行い、システム適合性について確認するとともに、定量値から含量規格値を検討した。システム適合性については、参考としたロートコン等の定量法において、内標準物質が規定されていることから、理論段数及びシンメトリー係数は設定せず、各化合物の分離度及び溶出順を規定することとした。各化合物は、スコポラミン、アトロピン、内標準物質の順に溶出され、試験に用いた各試料の分離度は、スコポラミンとアトロピンの間が、20.4-21.0、アトロピンと内標準物質の間が、7.6-8.8 であり、参考としたロートコン等の定量法に規定されている 11 及び 4 以上を満たしていた (Fig. 3)。

システムの再現性については、6 回繰り返し分析を行い、内標準物質に対するスコポラミンのピーク面積比の相対標準偏差を算出した結果、

0.16-0.39% だった。

各検体におけるヒヨスチアミン及びスコポラミンの含量は、それぞれ 97.06-98.19% 及び 1.94-2.19% であり、両者の和として算出した総アルカロイド量は、99.0-100.38% であった。

D. 考察

ベラドンナ総アルカロイドの局方収載に向け、各条規格の内、性状、確認試験法、純度試験法、定量法及び含量規格値に関する検討を行った。

性状の項においては、試料の観察結果から、「白色の結晶又は結晶性の粉末」と規定することが妥当であると考えられた。また、各溶媒に対する溶解性は、「水に極めて溶けにくく、エタノール(99.5)に溶けやすく、メタノールに極めて溶けやすい」とすることが望ましい。

純度試験法の設定においては、当初、重金属については、第2法、ヒ素については、第3法による試験を検討したが、いずれも添加回収試験において、十分な結果が得られなかったため、第4法を適用した。その際、重金属試験については、試料が塩基性を有することを考慮し、中和の操作を加えた。

確認試験法及び定量法は、原料であるベラドンナコン及び同種のアルカロイドを含有するロートコンなどが既に局方収載されていることから、それらの方法を参考に検討を行った。原料植物エキスを精製した物であるため、確認試験法、定量法共に、夾雑物や妨害ピークが現れることも無く、

特に問題は無かった。

各アルカロイドの含量規格値については、今回の測定結果から、ヒヨスチアミンを 95.0-99.0%、スコポラミンを 1.3-3.9% 含有することとし、また、両者の和を、総アルカロイドとして、99.0-102.0% 含むとする案をまとめた。このものに関しては、当初、99.0% 以上とする意見があった。この場合、通則上、その含有値の範囲は、99.0-101.0% となる。しかし、本品及び分析用標準品は、高度に精製されているとはいえ、天然物由来であることから、極微量の不純物の含有の可能性が否定出来ないこと、総アルカロイドが、2化合物の和により算出することに起因する数値上の誤差を勘案すると、上限値を 102.0% までとすることが、妥当であると考えられる。

E. 結論

局方優先収載候補品目であるベラドンナ総アルカロイドの各条規格を検討し、性状、確認試験、純度試験、定量法、含量規格値案をまとめた。

F. 研究発表

1. 学会発表

特になし

2. 論文発表

特になし

H. 知的所有権の取得状況

特になし