

BMC
Article no: 1486

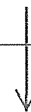
AUTHOR QUERY FORM

Dear Author:

During the preparation of your manuscript for publication, the questions listed below have arisen. Please attend to these matters and return this form with your proofs.

Many thanks for your assistance.

| Query References | Query | Remarks |
|------------------|--|---------|
| q1 | AUTHOR: please supply all author names wherever et al. is used in Reference list | |



Please see the attached file (List of reference.doc)

Time-Dependent Changes of Oxytocin Using $^1\text{H-NMR}$ Coupled with Multivariate Analysis: a New Approach for Quality Evaluation of Protein/Peptide Biologic Drugs

Akiko OHNO,^{*,a,b} Nana KAWASAKI,^a Kiyoshi FUKUHARA,^b Haruhiro OKUDA,^b and Teruhide YAMAGUCHI^a

^aDivision of Biological Chemistry and Biologics, National Institute of Health Sciences; and ^bDivision of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences; Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan.

Received September 2, 2009; accepted September 29, 2009; published online October 5, 2009

A new method that combines $^1\text{H-NMR}$ and principal component analysis (PCA) was employed to obtain the quality evaluation of biopharmaceuticals, with regard to their quality, consistency, and differences in protein modification patterns. To assess the feasibility of the method, three $^1\text{H-NMR}$ spectra of oxytocin (OXT) were collected every 7 d (at Day 0, 7 and 14), and time-dependent changes in the spectra were found by PCA of the $^1\text{H-NMR}$ signals from 0.5–9.0 ppm, excluding the region around the water signal (4.6–5.0 ppm). Although the three OXT spectra seemed similar by simple visual inspection, time-dependent differences among the three spectra were clearly distinguished by a PCA scores plot. Peak changes indicating both OXT decomposition and the emergence of new OXT decomposition products within the timeframe of the experiment were also observed by a PCA loading plot. The results demonstrate that this method can evaluate the consistency of biopharmaceutical quality.

Key words quality evaluation; biologic drug; principal component analysis; $^1\text{H-NMR}$; oxytocin

The biotechnology industry has grown significantly in the past decade and continues to grow at a rapid rate. Biopharmaceuticals such as oxytocin (OXT), insulin, and somatropin are large, complex molecules that are receiving increased attention as therapeutics in humans, particularly since this class of molecules can potentially exert pharmacological effects that are unattainable by synthetic chemical products. However, while biologics show great potential value in medicine, many technical hurdles must be overcome before such treatments are made practical. In particular, since biologic drugs are typically derived from living sources such as microorganisms, plants, or human or animal cells, the production and use of such material introduces certain hazards that are not presented by small molecule drugs manufactured through chemical synthesis.¹⁾ In addition, to fully understand the mechanism of action of a protein/peptide drug, not only the primary amino acid sequence but also the folding, post-translational processing, and multimerization properties of the biologic within the cell must be considered. Moreover, different cell types or cell growth conditions may yield different protein modification patterns, as well as different impurities, into the desired product.^{2,3)} Therefore, all of these complications may potentially influence the intended pharmacological effect of biologic drugs. With respect to safety and efficacy concerns surrounding biologics, the consistency of biologics between production lots, including maintenance of tight quality control specifications, is an important consideration for manufacturing biologic drugs.

To date, many analysis methods, such as sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE),^{4,5)} capillary electrophoresis (CE),⁶⁾ mass spectrometry (MS), tandem MS (MS/MS),⁷⁾ liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), high-performance liquid chromatography (HPLC)⁸⁾ and nuclear magnetic resonance (NMR), are employed to evaluate physicochemical characteristics and purity, and thus determine the quality of biopharmaceuticals.^{2,3,9,10)} However, characterizing the full complexity of bi-

ologics by present examination methods is still currently difficult. Therefore, new analytical techniques that provide more detailed evaluation of biologic quality are necessary. Among the various analytical techniques, we focused on NMR profiling as the most suitable tool for rigorous quality evaluation because this approach can provide structural information on all compounds contained in product lots, and can distinguish structural differences. Principal component analysis (PCA) is often useful for profiling and classifying sample groups, and to characterize the most effective variables in separation compounds.^{11,12)} Therefore, small differences in product quality, e.g. a structural change or the appearance of a decomposition product, are thought to be appropriately evaluated by the combination of PCA using multivariate statistics and $^1\text{H-NMR}$.

Herein, we demonstrate that $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy coupled with PCA can provide a molecular fingerprint to precisely characterize a specific protein/peptide, using the determination of time-dependent changes of OXT as an example of this method. The results suggest that this new methodology can be useful for the quality evaluation of a manufactured protein/peptide biologic drug.

Experimental

Chemicals and Reagents All reagents used for $^1\text{H-NMR}$ experiments were purchased from Wako Chemicals, were of analytical grade (purity >99%), and were used without further purification. Deuterium oxide (D_2O , isotopic purity 99.9%) containing 0.75% 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid, sodium salt (TSP) was purchased from Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.). TSP was used as an internal standard at a chemical shift (δ) of 0.0 ppm for $^1\text{H-NMR}$ measurements.

Sample Preparation and $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopic Analysis OXT (5 mg) was dissolved in 60 μl of D_2O containing 0.75% TSP, 30 μl of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.2), and 510 μl of ultrapure water to produce a 600 μl solution for NMR measurements. The sample was introduced into an NMR test tube, and nuclear Overhauser effect spectroscopy ($^1\text{H-NOESY}$) spectra were recorded every 7 d at 25 $^\circ\text{C}$ using a Varian 600 MHz NMR spectrometer equipped with a coldprobe. Thirty-two free induction decays (FIDs) with 77 K data points per FID were collected using a spectral width of 9615.4 Hz, an acquisition time of 4.00 s, and a total pulse recycle delay of 2.02 s. The

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: ako-ohno@nihs.go.jp

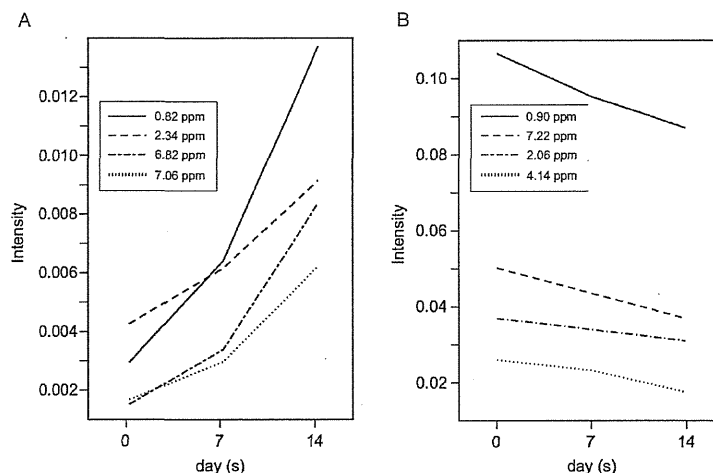


Fig. 4. Time-Dependent Changes in the OXT ^1H -NMR Spectrum Showing the Formation of New Decomposition Products (A) and the Decomposition of OXT (B)

and 4.14 ppm) is associated with larger decreases in integrated intensity over time (Fig. 4B). In addition, while the time-dependent increases in intensity for each variable in Fig. 4A are surmised to be due to new peaks from OXT decomposition products of OXT, identifying individual peaks in Fig. 1 associated with these decomposition products is difficult, as these peaks are minor signals. The peaks corresponding to these particular variables were too small to analyze further. On the other hand, peaks for each variable in Fig. 4B could be identified: the variable at 0.90 ppm was attributed to both the δH (δ 0.88) and $\gamma'\text{H}$ (δ 0.89) of Ile and to the $\delta'\text{H}$ (δ 0.90) of Leu; the variable at 7.22 ppm to the 2', 6'H (δ 7.22) of Tyr; the variable at 2.06 ppm to the γH (δ 2.05) of Pro and to the βH (δ 2.08) of Gln; and the variable at 4.14 ppm to the αH (δ 4.14) of Gln and to the αH (δ 4.16) of Ile. Therefore, some amino acids for each variable in Fig. 4B are inferred to be associated with OXT decomposition, although proposing a specific decomposition mechanism for OXT is difficult owing to the complexity of protein/peptide systems.

Recently biotechnology-derived drugs for medical treatment are increasingly receiving attention, but many problems associated with the quality, efficacy, and safety of biologics persist. Almost all biologics are designed to mimic human proteins to better predict pharmacological effects, and are thus produced from recombinant or non-recombinant cell-culture expression systems. Preserving the consistency of these complex products during the production is important, as well as reducing or eliminating molecular heterogeneity and higher-order structural aggregates. In addition, since raw materials derived from animals or humans may be used during production,¹⁾ consideration of possible viral contamination is also crucial. To date, the quality of manufactured biologics is evaluated by measuring biological activity of the biologics, rather than through analysis of physicochemical information. In fact, the product complexity and purity for quality control of biologics are quite difficult to evaluate by current physicochemical methodologies, such as SDS-PAGE, CE, MS, and HPLC.^{2–10)}

As a new approach for assessing the quality of biopharmaceuticals, we examined a method to distinguish time-depend-

ent changes of OXT ^1H -NMR spectra by introducing PCA of NMR signals. We initially found that simple visual inspection was insufficient to distinguish whether the three ^1H -NMR spectra of OXT, gathered every 7 d for 14 d, showed time-dependent changes. However, the PCA scores plot of these same spectra clearly revealed time-dependent changes. In addition, peak changes associated with both new decomposition products and the decomposition of OXT were also observed by the PCA loading plot. Therefore, a combination of ^1H -NMR and PCA techniques can provide a molecular fingerprint capable of precisely identifying a protein/peptide biologic, and can represent a powerful new approach for assessing the quality of protein/peptide biologic drugs. The study concerning the feasibility and the limitation of this method in terms of the molecular size is currently under way.

Acknowledgements We thank Mr. H. Watanabe and Mr. K. Kushida (Varian Technologies Japan Ltd.) for their technical assistances in measuring NMR spectra. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 20390038) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

References

- Schiff L. J., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **41**, 65–70 (2005).
- Murano G., *Dev. Biol. Stand.*, **91**, 3–13 (1997).
- Kemsley J. N., "Chemical & Engineering News," Vol. 87, 2009, pp. 20–23.
- Silva M. M., Lamarre B., Cerasoli E., Rakowska P., Hills A., Bailey M. J., Wheeler J. X., Burns C. J., Gaines-Das R. E., Jones C., Robinson C. J., *Biologicals*, **36**, 383–392 (2008).
- Faber B. W., Remarque E. J., Kocken C. H., Cheront P., Cingolani D., Xhonneux F., Jurado M., Haumont M., Jepsen S., Leroy O., Thomas A. W., *Vaccine*, **26**, 6143–6150 (2008).
- Bayol A., Bristow A., Charton E., Girard M., Jongen P., *Pharmeuropa Bio*, **2004**, 35–45 (2004).
- Anumula K. R., *Anal. Biochem.*, **350**, 1–23 (2006).
- Royle L., Campbell M. P., Radcliffe C. M., White D. M., Harvey D. J., Abrahams J. L., Kim Y. G., Henry G. W., Shadick N. A., Weinblatt M. E., Lee D. M., Rudd P. M., Dwek R. A., *Anal. Biochem.*, **376**, 1–12 (2008).
- Domann P. J., Pardos-Pardos A. C., Fernandes D. L., Spencer D. I., Radcliffe C. M., Royle L., Dwek R. A., Rudd P. M., *Proteomics*, **7 Suppl 1**, 70–76 (2007).
- Wada Y., Azadi P., Costello C. E., Dell A., Dwek R. A., Geyer H., Geyer R., Kakehi K., Karlsson N. G., Kato K., Kawasaki N., Khoo K. H., Kim S., Kondo A., Lattova E., Mechref Y., Miyoshi E., Nakamura

- K., Narimatsu H., Novotny M. V., Packer N. H., Perreault H., Peter-Katalinic J., Pohlentz G., Reinhold V. N., Rudd P. M., Suzuki A., Taniguchi N., *Glycobiology*, **17**, 411—422 (2007).
- 11) Plumb R. S., Jones M. D., Rainville P. D., Nicholson J. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **46**, 193—198 (2008).
- 12) Barton R. H., Nicholson J. K., Elliott P., Holmes E., *Int. J. Epidemiol.*, **37 Suppl 1**, i31—i40 (2008).
- 13) Nicholson J. K., Foxall P. J., Spraul M., Farrant R. D., Lindon J. C., *Anal. Chem.*, **67**, 793—811 (1995).
- 14) Wold S., Albano C., Dunn W. J., Edlund U., Esbensen K., Geladi P., Hellburg S., Johansson E., Lindberg W., Sjoström M., “Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry,” D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, 1984.
- 15) Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Wold S., “Multi- and Megavariate Data Analysis,” Umetrics Academy, Umeå, 2001.
- 16) Holmes E., Loo R. L., Stamler J., Bictash M., Yap I. K., Chan Q., Ebbels T., De Iorio M., Brown I. J., Veselkov K. A., Davignus M. L., Kesteloot H., Ueshima H., Zhao L., Nicholson J. K., Elliott P., *Nature (London)*, **453**, 396—400 (2008).

最近の日局における生物薬品各条及び 生物薬品関連試験法の改正について*2

早川 堯 夫*1

本稿では、最近の日局における生物薬品各条及び生物薬品関連試験法の改正について述べます。

最近の日局改正について、既に告示されたものと今後告示予定のスケジュールを Table 1 に示します。

生物薬品各条及び生物薬品関連試験法を審議している生物薬品委員会は 15 名の委員から構成されています。Table 2 に平成 21 年 8 月 25 日現在の生物薬品委員会開催実績を示します。平成 18 年度は 5 回、平成 19 年度は 4 回、平成 20 年度は 4 回、平成 21 年度は 3 回開催し、1 回の開催当たりの審議時間は 3 時間あまり、延べ 50 時間以上審議を行ってきました。

1. 第十五改正第一追補及び平成 20 年 7 月の 部分改正の概要

第十五改正第一追補¹⁾では、注射用テセロイキン（遺伝子組換え）、プロタミン硫酸塩、プロタミン硫酸塩注射液の 3 品目を改正し、平成 20 年 7 月の部分改正では、ヘパリンナトリウムを改正しています。

ヘパリンナトリウムの部分改正は、アメリカを中心として異物混入ヘパリンにより有害事象が多発したことを受けて、緊急対応として、過硫酸コンドロイチン硫酸 (OSCS) 限度試験を規定したものです。

1.1 ヘパリンナトリウム改正の経緯

2007 年 11 月にアメリカ等でヘパリンナトリウム投与によるアナフィラキシーが頻発し、死者が 200 名以上出た問題について、2008 年 3 月に FDA が原因物質として OSCS を発表しました。これを受けて 2008 年 7 月に日局を一部改正し、OSCS の限度試験を設定しました。

更に 2010 年 1 月には、後述する確認試験及び純度試験の改正を行う予定としています (2010 年 3 月現在まだ改正されていない)。

1.2 OSCS 限度試験

ヘパリンナトリウム及び OSCS の混入ヘパリンナトリウムの ¹H-NMR スペクトルを Fig. 1 に示します。もしヘパリンナトリウムの中に OSCS が混入しているとなれば、2.18 付近に OSCS の *N*-アセチル基由来のピークが他のピークと重ならず特異的に検出されます。これを利用して OSCS の混在許容量を規定しています。

2. 第十五改正第二追補の概要

第十五改正第二追補²⁾では、生物薬品各条の新規収載がカルシトニン（サケ）、精製ヒアルロン酸ナトリウム及びヘパリンカルシウムの 3 品目、改正がヒト下垂体性腺刺激ホルモン、パソプレシン注射液、プロタミン硫酸塩注射液、ヘパリンナトリウムの 4 品目です。生物薬品関連試験法としては、一般試験法の新規収載がたん白質のアミノ酸分析法、参考情報の改正がバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験です。

2.1 新規収載：カルシトニン（サケ）(Table 3)

基原に記載されていますように、本品は、合成された 32 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドで、血中カルシウム濃度低下作用を有するホルモンです。

規格項目は、性状、確認試験、吸光度、旋光度、構成アミノ酸、ペプチド含量、純度試験、水分及び定量法と

*1 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

*2 当協会主催の第 3 回日本薬局方に関する説明会 (平成 21 年 8 月 26 日：東京、9 月 1 日：大阪) における講演による。

Table 1 最近の日局改正について

| |
|-------------------------|
| ・ 第十五改正：平成 18 年 3 月告示 |
| ・ 同第一追補：平成 19 年 9 月告示 |
| ・ 部分改正：平成 20 年 7 月告示 |
| ・ 同第二追補：平成 21 年 9 月告示 |
| ・ 部分改正：平成 22 年 1 月告示予定 |
| ・ 第十六改正：平成 23 年 3 月告示予定 |

Table 2 生物薬品委員会 審議状況

| |
|-----------------------------|
| 委員数：15名（平成 21 年 8 月 25 日現在） |
| 委員会開催実績： |
| 平成 18 年度 第 1 回～第 5 回（5 回） |
| 平成 19 年度 第 6 回～第 9 回（4 回） |
| 平成 20 年度 第 10 回～第 13 回（4 回） |
| 平成 21 年度 第 14 回～第 16 回（3 回） |

Table 3 新規収載：カルシトニン（サケ）

| |
|---|
| 局外規からの移行された品目 |
| 基原：本品は、合成された 32 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドである。本品は、ホルモンで血中カルシウム濃度低下作用を有する。 |
| 規格項目 |
| ・ 性状 |
| ・ 確認試験：紫外吸収スペクトル |
| ・ 吸光度 |
| ・ 旋光度 |
| ・ 構成アミノ酸 |
| ・ ペプチド含量：80.0%以上 |
| ・ 純度試験：酢酸 7.0%以下，類縁物質 3%以下 |
| ・ 水分：電量滴定法，10.0%以下 |
| ・ 定量法：バイオアッセイ |
| EP, USP は液体クロマトグラフィーによる定量法を採用しているが，標準品の供給が困難なためバイオアッセイとした。 |

なっています。

EP 及び USP では、本品の定量法に液体クロマトグラフィーを採用していますが、日局では標準品の供給が困難なためバイオアッセイを採用しています。

本品は、日本薬局方外医薬品規格（局外規）から移行された品目です。Table 4 に局外規からの主な変更点を示します。

名称は「サケカルシトニン（合成）」から「カルシトニン（サケ）」に、性状は「水に極めて溶けやすい」から「水に溶けやすい」に、紫外吸収スペクトルを用いた確認試験は吸収極大の記載から参照スペクトルとの比較に変更しています。

構成アミノ酸については、溶解液を変更し、アミノ酸

分析の試験条件の詳細を記載することになっています。

酢酸に関する純度試験については、局外規ではガスクロマトグラフィーで測定していましたが、日局では国際調和の観点から EP で採用されている液体クロマトグラフィーが提案され、採用されています。ただし、EP とは試料を溶解する溶媒と含量規格が異なります。

溶媒の違いは、試料を溶解するのに日局は水、EP は移動相 A（リン酸緩衝液 pH 3.0）：B（メタノール）= 95：5 を用いるというところです。

酢酸の規格については、日局は 7.0% 以下、EP は 4.0～15.0% と幅記載になっている点で異なります。日本では局外規の時も 7.0% 以下でした。パブコメの際に、

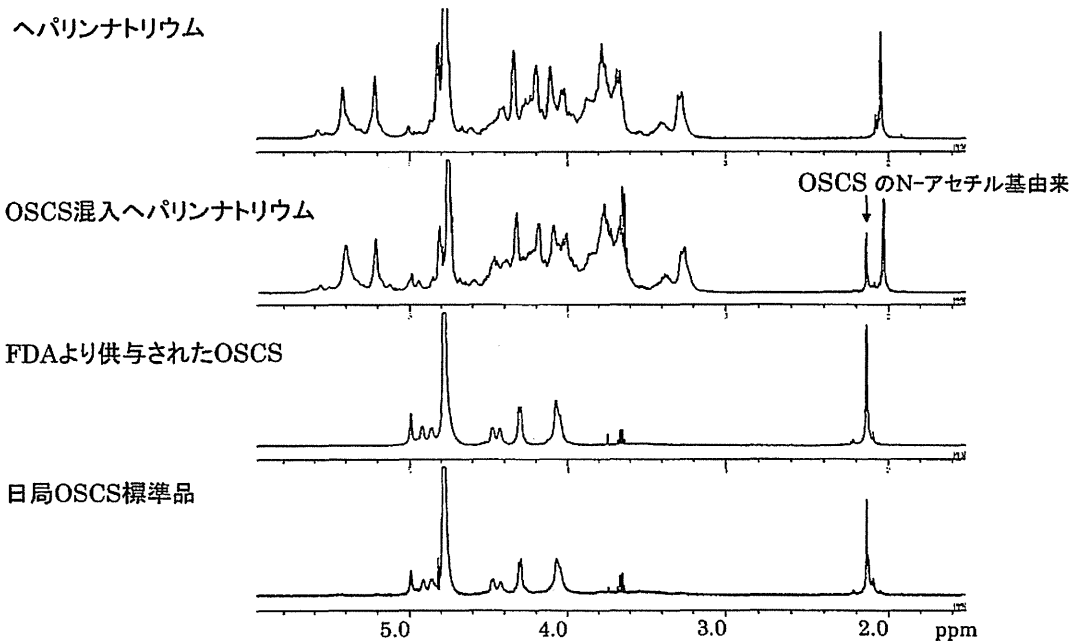


Fig. 1 ヘパリンナトリウム及び OSCS 混入ヘパリンナトリウムの ¹H-NMR

Table 4 カルシトニン(サケ)：局外規からの主な変更点

| 項目 | 局外規 | 日局 |
|-----------------------------|------------------------------------|--|
| 名称 | サケカルシトニン(合成) | カルシトニン(サケ) |
| 性状 | 水に極めて溶けやすい | 水に溶けやすい |
| 確認試験 紫外吸収スペクトル 構成アミノ酸 | 吸収極大の記載 | 参照スペクトルとの比較 ・溶解液の変更 ・アミノ酸分析の試験条件の詳細を記載 |
| 純度試験(酢酸) | ガスクロマトグラフィー | 液体クロマトグラフィー EPとの国際調和(但し溶媒, 含量規格はEPとは異なる) |
| 水分 | 容量滴定法(直接滴定) 通例水分を5~50mgを含む試料に適用 | 電量滴定法 水分含量(2mg以下)を考慮し, より適切な方法に変更 |
| 定量法 | | 「エーテル麻醉下」を削除 苦痛を与えない方法に変更 |

酢酸含量をEPに統一して欲しいとの意見がありました。市販製品の多くが酢酸3%台ということで、下限がEPの規格をはずれたところにありますので、わが国の現状を反映した規定になっています。

水分については、サンプルの水分含量を考慮し、従来の容量滴定法からより適切な方法である電量滴定法に変更しました。

定量法は、シロネズミに投与後1時間の血清カルシウム量を測定する方法で、カルシトニンの骨吸収抑制に伴う血清カルシウム低下作用を利用しています。なお、局外規ではエーテル麻醉下となっていたが、麻醉をエーテル麻醉に限定する必要はなく、またエーテル麻醉では覚醒することがあるため苦痛を与える可能性があるとの指摘がありました。そこで、「エーテル麻醉下」を削除し、苦痛を与えない方法を選択することとしました。

2.2 精製ヒアルロン酸ナトリウムQ&A

新規収載にあたってのポイントをQ&A方式で解説します。

質問1 名称変更の理由は？

回答1 日局に収載予定の「精製ヒアルロン酸ナトリウム」には注射剤と点眼剤が予定されています。当然それらは日局各条の規格に適合する必要があります。これを外用剤の添加剤として使用されているヒアルロン酸ナトリウムと区別するため、各条日本名に「精製」を付けて、「精製ヒアルロン酸ナトリウム」としました。

質問2 基原の平均分子量について、収載理由は？

回答2 市場の流通実態を考慮しますと、平均分子量で2つのグループに分けられ、それらを反映した規定が

必要と考えられましたので収載することとしました。日局では本品が本試験法で規定されているいずれかの平均分子量の規格に適合することを求めています。平均分子量を換算する計算式について、科学的に最適ではないとのご指摘を受けましたが、科学技術の進歩に伴う測定法の改正は今後の検討課題とすることとし、現段階では本試験内容が妥当と判断して設定しました。

平均分子量そのものを真に表現できることが最もよいわけですが、「こういう試験法でこういう操作法でやる時に、こういう規格に適合する」という規定の仕方でのconsistencyがあることも、品質コントロールの一つのあり方であり、現段階ではそのような見方をして平均分子量の規定をしているとご理解をお願いします。

質問3 pHの試験条件の変更及び削除の要望について。

回答3 本品は粘性が高く、容易に溶解することはできないとのご指摘がありました。濃度を下げてまでpHを設定する意義は低いものと判断し、削除しました。

質問4 現在の承認規格に一致させてほしい。

回答4 承認審査時の規格は、個々の製品について開発時の数少ないロットでの結果から設定されていますが、日局原案審議に当たっては、承認後日本国内に流通している製品の実測値をもとに設定しています。したがって、日局の規格値は必ずしも承認規格に一致するものではありません。

質問5 EPの規格及び試験方法と一致させてほしい

回答5 日局原案審議に当たっては、海外の薬局方も参考としていますが、日本で流通している製品の品質を

考慮し、主として国内流通製品の規格及び試験方法、実測値等をもとに設定しています。したがって、必ずしもEP等の海外薬局方の規格及び試験方法に一致するものではありません。

質問 6 純度試験 (7) 溶血性連鎖球菌及び (8) 溶血性の項目は必要ないのでは？

回答 6 基原がニワトリの鶏冠 (トサカ) の場合と微生物由来の場合があります。微生物由来の場合、混入の可能性を完全否定できないことから、安全上、管理すべき事項であるとの判断に基づき、設定しました。

質問 7 エンドトキシンの項を削除した理由は？

回答 7 日本薬局方では、エンドトキシンは原薬ではなく製剤で規定することを基本としていますので、項目を設定しません。原薬についても厳重に管理する必要がありますが、各社の責任において管理をお願いします。

質問 8 抗原性の項目が削除された理由は？

回答 8 抗原性は過去の実績を考慮し、また動物福祉の観点から設定しないこととしました。

質問 9 微生物限度試験において、精製ヒアルロン酸ナトリウムを 1g 使用することはメンブランフィルターの目詰まりを起こす等、困難であるので、使用量を 0.1g として欲しい。

回答 9 「1g 当たり」であり、使用量を 1g と規定したものではありません。

2.3 たん白質のアミノ酸分析法

参考情報の「アミノ酸分析法」を一般試験法化し、新規試験法として「たん白質のアミノ酸分析法」を規定しました。これに伴っていくつかの試薬も「生化学用又はアミノ酸分析用に製造したもの」として新たに規定しました。

国際調和文書である参考情報をどのように一般試験法化するかが議論のポイントでしたが、アミノ酸分析法の場合、一般試験法と参考情報に単純に切り分けることは困難であったことから、試験法の原理・原則の部分を抜粋して一般試験法を作成し、参考情報はそのまま残すこととしました。このため、一般試験法の名称は「たん白質のアミノ酸分析法」とし、参考情報「アミノ酸分析法」と区別しました。USP も調和文書と別の文書の二つとなっています。

国際調和文書は、科学的な原理・原則について認識を

共有することは当然の前提ですが、フォーマットのには必ずしも日本薬局方における一般試験法に配慮して作ったものではありません。ちなみにアミノ酸分析法の国際調和文書は、原理・原則とともに解説、説明等が多く掲載され、日局の一般試験法の書き振りとは異なっています。「たん白質のアミノ酸分析法」は国際調和文書を参考情報とし、それを一般試験法化した一つモデルケースと思います。

参考情報には他にも国際調和された生物薬品関連の分析法が収載されていますが、これらを一般試験法化するには必要に応じて同様の方法によると思います。一般試験法化により、各条の記載も、試験法名や試験法番号等を記載するなどの変更があります。なお、医薬品各条における試験法の表記方法については、17局原案作成要領に盛り込む予定となっています。

一般試験法「たん白質のアミノ酸分析法」の 1.たん白質及びペプチドの加水分解には、方法 1 から方法 11 まであり、また 2. アミノ酸分析方法には、方法 1 から方法 7 まであります。本文中、もしくは試験条件にこれらの方法番号を記載することで簡略化を行います。

医薬品各条で本試験法を用いる場合については、委員会で議論されていませんが、案としては加水分解と分析方法の項立てとすれば、方法番号を記載することができると考えます。「加水分解 方法 1 による。」と冒頭に記載し、その後にはこれまでと同様の記載を行い、最後は「試料溶液及び標準溶液とする。」となります。分析方法についても、同様に項を立て、「分析方法 試料溶液及び標準溶液〇 μ L ずつを正確にとり、次の条件でたん白質のアミノ酸分析法<2.04>方法 1 により試験を行うとき、…」と続き、その後には試験条件やシステム適合性が続きます。

ただし、以前委員会で議論になりましたように、アミノ酸分析ではほとんど全自動の装置を使用しますので、試験条件やシステム適合性も装置メーカーによって異なり、一律に規定することは困難と思われます。試験条件やシステム適合性をどこまで規定するのは、今後の問題として残っています。

2.4 バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来 医薬品の製造に用いる細胞基材に対する マイコプラズマ否定試験 (Table 5)

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、人工培地に生育可能な最小の微生物であり、培養細胞を高頻度に汚染します。本試験法の適用対象は、現在はバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材としていますが、今後再生医療において数多く

Table 5 20. バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験

| | |
|----------|---|
| マイコプラズマ： | 無細胞壁の原核生物で、人工培地に生育可能な最小の微生物であり、培養細胞を高頻度に汚染 |
| 適用対象： | バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材 |
| 試験法： | A. 培養法 マイコプラズマを人工培地で培養・増殖させて検出 B. 指標細胞を用いた DNA 染色法 マイコプラズマを指標細胞で増殖後、DNA 染色によりマイコプラズマ DNA を検出 C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法 マイコプラズマ DNA を特異的プライマーを用いて PCR 検出 |

の細胞由来製品が作られる際に有効に使えるものと思えます。

試験法は、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法の三つの方法が記載されております。

本試験法は 10 年前の第十三改正日本薬局方第二追補に参考情報として初めて収載され、第十五改正日本薬局方第二追補で初めての改正となります。

主な改正点は、培養法の培養条件及び指標菌株と接種量の表示単位です。

培養法の培養条件は、欧米との国際調和を考慮して改正するものです。従来、カンテン平板培地、液体培地とも好気性及び嫌気性で半数ずつ培養していたものを、改正案ではカンテン平板培地は微好気的条件、すなわち 5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中のみとし、液体培地は気相の条件記載を削除しました。

指標菌株と接種単位については、従来の問題点として、DNA 染色法で陽性対象として例示されていた指標菌はコロニーを形成せずに接種が困難であること、また 100 CFU 以下の接種では陽性反応が認められないことなどが指摘されていました。

この問題点を勘案し、より適切に対応できるようにするため、まず、指標菌株を従来菌株名から ATCC コード番号 (具体的には、*M. hyorhinitis* DBS1050 及び *M. orale* CH19299 をそれぞれ ATCC29052 及び ATCC17981) に変更しました。これは、従来の呼称では菌株名が同じでも保存所や保存条件が異なることにより試験への不適切性が起こる可能性があるため、ATCC コード番号で表示することで、より適切な菌株を入手できるようにとの意図からです。EP でも同様の表示としています。更に、指標菌の接種量の表示単位として従来の CFU (コロニー形成単位) に加えて、コロニーを形成しない場合に対応するための CCU (色調変化単位) を併記しまし

た。

併せて、DNA 染色法の指標菌の例にコロニーを形成しやすい菌株 (*M. hyorhinitis* BTS7) を追加しました。

更にコロニーを形成せず、接種が困難あるいは陽性反応が認められないものの中には、継代数を重ねると培地に順化して細胞に接種ができなくなるものもありますので、改正案では「継代数の低いものを使用する」と明記しました。なお、EP では 15 継代以下の規定となっています。

3. 平成 22 年 1 月告示予定の部分改正

平成 21 年 8 月 25 日開催の薬事・食品衛生審議会日本薬局方部会です承された部分改正です。

3.1 ヘパリンナトリウム (Table 6)

従来、ヘパリンナトリウムは各条の中で主として活性のみを規定していましたが、同じような活性を持つ異物を混入してヘパリンに替えたためにヘパリンの事件が発生しました。

この事件から、生物活性のみではなく、理化学的な面からもヘパリンナトリウムの本質をとらえ、コントロールすべきとの考えとなりました。その一環として、まずヘパリンであることを理化学的に確認するために、弱陰イオン交換樹脂の HPLC (WAX-HPLC) でクロマトグラフィーを行い、ヘパリンナトリウム標準品と保持時間が一致することをみるという確認試験を設定しました。

純度試験は、過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) の項に関して、まだ危機管理措置を続ける必要があるとの判断から、¹H-NMR を使った従来方法を更に感度を高めた方法に変更されています。

一方、後述するように、将来の品質管理の方向性を示すために類縁物質の項を設けて、WAX-HPLC でヘパリ

Table 6 ヘパリンナトリウム 確認試験&純度試験改正

| 項目 | 15局 | 一部改正 (平成20年7月1日) | 一部改正案(部会段階) | |
|------|-------------------|----------------------------|---|--|
| 確認試験 | | | WAX-HPLC：ヘパリンナトリウム標準品と溶出時間が一致する | |
| 純度試験 | (1) 溶状 | 無色～淡黄色澄明 | | |
| | (2) バリウム | 混濁しない | | |
| | (3) 総窒素 | 3.0%以下 | | |
| | (4) たんぱく質 | 10mg/1mLにトリクロロ酢酸添加し白濁を生じない | | |
| | (5) 過硫酸化コンドロイチン硫酸 | | ¹ H-NMR：OSCSのN-アセチル基に由来するシグナルを認めない | ¹ H-NMR：OSCSのN-アセチル基に由来するシグナルを認めない(S/N変更) |
| | (6) 類縁物質 | | | WAX-HPLC：ヘパリンピーク以降の溶出時間にピークを認めない |
| | (7) ガラクトサミン | | | ガラクトサミン |

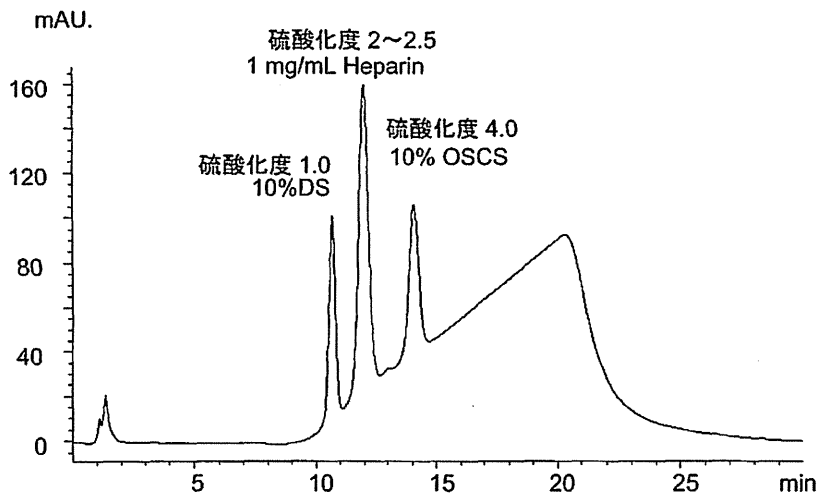


Fig. 2 確認試験用 WAX-HPLC による DS, ヘパリン及び OSCS の分離

ン以降に硫酸化度の高い多糖類の溶出ピークを認めないとの規定も設けました。

また、ガラクトサミンを純度試験に設定しています。もともとヘパリンはアミノ糖であるグルコサミンをベースにするものです。一方、問題となった過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) はガラクトサミンというアミノ糖を構成糖とする多糖類です。また、混在物質といわれているデルマタン硫酸もガラクトサミンを構成アミノ糖とする多糖類です。このガラクトサミンの量を1%以下と規定することによって、ヘパリンとは異なるガラクトサミンを構成アミノ糖として含む多糖類の許容量を制限しようとしています。

Fig. 2は、確認試験の一つのパターンです。これは故意に高濃度にしてありますが、デルマタン硫酸とヘパリン、OSCSが分離する条件下でヘパリン標準品に対して保持時間が一致するピークでヘパリンを確認します。

Fig. 3は、純度試験の類縁物質の例です。OSCSが例

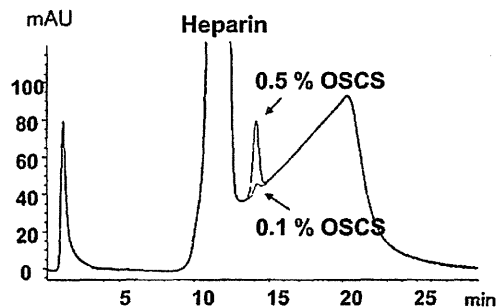


Fig. 3 純度試験用 WAX-HPLC による OSCS の検出

えば0.1%でも検出できるような条件のWAX-HPLC法でヘパリン以降のピークを規定することにより、OSCSの混入も含めて、他の硫酸化度の高いものが入ってくることをコントロールしています。

3.2 ヘパリンカルシウム (Table 7)

確認試験では、ヘパリンナトリウム標準品と保持時間

Table 7 ヘパリンカルシウム 確認試験&純度試験改正

| 項目 | 15局第二追補新規収載案 | 今回の一部改正案 | |
|------|-------------------|---|---|
| 確認試験 | (1) | トルイジンブルーO 溶液による呈色 | |
| | (2) | WAX-HPLC：ヘパリンナトリウム標準品と溶出時間が一致する | |
| | (3) | Ca の定性反応 | |
| 純度試験 | (1) 溶状 | 液は澄明である。400 nm における吸光度は 0.05 以下 | |
| | (2) 塩化物 | 0.021%以下 | |
| | (3) 重金属 | 30 ppm 以下 | |
| | (4) バリウム | 混濁しない | |
| | (5) 残留溶媒 | 別に規定する | |
| | (6) 総窒素 | 3.0%以下 | |
| | (7) たん白質 | 混濁を生じない | |
| | (8) 過硫酸化コンドロイチン硫酸 | ¹ H-NMR：OSCS の N-アセチル基に由来するシグナルを認めない[0.5%以下] | ¹ H-NMR：OSCS の N-アセチル基に由来するシグナルを認めない[0.1%以下] |
| | (9) 類縁物質 | | WAX-HPLC：ヘパリンピーク以降の溶出時間にピークを認めない |

が一致することを確認します。純度試験は OSCS に関する ¹H-NMR 及び類縁物質でコントロールしています。

3.3 ヘパリン各条の今後の改正方向

OSCS は製法由来不純物でもなく製品由来不純物でもなく、意図的に添加された異物です。この OSCS を対象とした特別な試験法の設定は、薬局方各条の設定項目としては本来そぐわないと考えられます。

有効性・安全性が長年にわたって立証されてきた医薬品について、その本質及び想定される製法由来不純物あるいは製品由来不純物をコントロールするのが、本来の薬局方の姿です。

OSCS は危機管理方策として日局に設定されましたが、これは原材料段階でのチェックなど、医薬品の品質確保全体戦略の中で日常管理としての合理的対策が講じられるべきものです。したがって、日本薬局方としては時機を見て（1年をめぐりに）日常的管理方策としてのヘパリン各条に改正する方向を目指し、16局追補で対応することを想定しています。

そのためには OSCS のみに注目するのではなく、ヘパリン以外の硫酸化多糖類を広義の類縁物質として包括的にコントロールできるよう、より普遍的で科学的合理性のある試験法を設定したいと考えています。WAX-HPLC 法はその試行策です。必要に応じて更なる改善、あるいはキャピラリー電気泳動法などのより適切な試験法の設定を検討したいと思います。

併せて、高分子多糖類の本質について、どの程度の理化学的な解析が各条に適切にかついても検討したいと思います。

4. 平成 23 年 3 月告示予定の第十六改正

第十六改正新規収載予定として現在審議中の生物薬品各条を Table 8 に示します。

生物関連試験法の改定については、ペプチド及びたん白質性医薬品の質量分析を収載する予定です。

4.1 ペプチド及びたん白質性医薬品の質量分析

本試験法は主にペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験に用います。従来は例えば分子量は、SDS-PAGE あるいはゲルろ過法で行われていましたが、質量分析法の適用が可能ということからの収載です。

アミノ酸組成・配列の確認にはアミノ酸分析あるいはペプチドマッピングが使われていましたが、これも質量分析法を有効に活用できると考えられます。

参考情報の案としてのペプチド及びたん白質の質量分析の目次を Table 9 に示します。まず原理があり、装置は MS と MS/MS を使うことをベースにしていますので、

Table 8 審議中（新規収載）

| 生物薬品各条 |
|------------------------------|
| ・ アプロチニン |
| ・ インターフェロンアルファ (NAMALWA) |
| ・ インターフェロンアルファ (NAMALWA) 注射液 |
| ・ エポエチンアルファ (遺伝子組換え) |
| ・ エポエチンベータ (遺伝子組換え) |
| ・ ダルテパリンナトリウム |
| ・ ナルトグラスチム (遺伝子組換え) |
| ・ 注射用ナルトグラスチム (遺伝子組換え) |
| ・ フィルグラスチム (遺伝子組換え) |
| ・ レノグラスチム (遺伝子組換え) |

Table 9 ペプチド及びたん白質の質量分析
参考情報(案)目次

| |
|--------------------|
| ・ 原理 |
| ・ 装置 |
| - MS 及び MS/MS の概念図 |
| ・ 各種測定様式 |
| - 1. MS |
| - 2. MS/MS |
| ・ 操作法 |
| - 1. MS |
| - 2. MS/MS |
| ・ 確認試験 |
| - (1) 分子質量の確認 |
| - (2) アミノ酸配列などの確認 |
| ・ 用語解説 |

概念図を記載します。次に各測定様式として MS と MS/MS について解説し、操作法についても MS と MS/MS が記載されます。また、確認試験として、分子質量とアミノ酸配列などの確認に用いることを解説します。更に質量分析に関わる用語の解説も記載します。

5. 日局審議における今後の課題

一変申請中の品目については、日局の審議を止めるか、一変の審議と並行して日局の審議をするかは意見の分かれるところですが、変更点に応じて個別に対応することにしたと思っています。

後続バイオ製品の問題については、対応する先行バイオ医薬品が既に日局に収載されている場合には、単純たん白質か糖たん白質か、原薬か製剤か等を考慮して、一般的名称、規格及び試験方法の設定策を検討する必要があります。また、日局品との関係をどうするかも検討課題となります。

6. 既収載の見直し

各条ではヒトインスリン製剤を新規収載し、ブタインスリン原薬及び製剤は削除する方向で見直します。

バソプレシン注射液は、従来、脳下垂体後葉から製造されていたため、主に臓器抽出製剤としての規格が設定されていますが、最近では合成品のみが流通している実態を受けて、合成品に対応する理化学的な試験方法を設定したいと考えています。ほぼ新規収載に近い見直しになります。これに伴い、バソプレシン原薬を新規収載したいと考えていますが、例えば試験法を HPLC 法とする場合に、我が国では理化学的な標準品を調達することが困難との問題があります。したがって、USP 標準品の供給の目途が立った段階で原案作成を進めたいと考えて

Table 10 インスリン製剤の見直し

| |
|----------------------------|
| 第 15 改正 |
| インスリン ← ブタ由来 |
| インスリン製剤 ← ブタ由来 |
| インスリン注射液 |
| インスリン亜鉛水性懸濁注射液 |
| 無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液 |
| 結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液 |
| イソフェンインスリン水性懸濁注射液 |
| プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液 |
| ヒトインスリン (遺伝子組換え) |
| 今後の検討 |
| ヒトインスリン (遺伝子組換え) |
| ヒトインスリン製剤 |
| ヒトインスリン注射液(仮) |
| ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮) |
| 二相性ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮) |

います。

パルナパリンナトリウムは、15 局に各条が収載されていますが、実際に流通している製品の製法は様々であり、それに対応したより適切な各条とするよう見直す予定です。

7. インスリン製剤の見直し (Table 10)

15 局で収載されているインスリンとインスリン製剤はブタ由来のインスリンですが、現在市場には存在していません。今後の検討としては、既に収載されている遺伝子組換えヒトインスリンをベースに、ヒトインスリン注射液 (仮称)、ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮称)、二相性ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮称) 等のヒトインスリン製剤を収載したいと考えています。

8. PDG 関連情報 (Table 11)

PDG 調和項目として、六つの生物薬品関連試験法が Stage 6 の段階となっています。更に EP、USP より Glycan Analysis (Glycan Mapping) を加える提案が 2 年ほど前にあり、平成 19 年 5 月にコンセプトペーパーが USP から届きました。生物薬品委員会では、コンセプトペーパーの内容とこの試験法を日局でどのように扱うか、また科学的進歩が急速なのでそのまま調和の方向で進めてよいかを検討し、様々な理由から、当時は調和事項とすることには同意しないこととなりました。

現在は、日局でもこの試験法の作成を検討しつつ、EP、USP の動向を調査することとなっていますので、日本で

Table 11 PDG関連情報：PDG調和項目

| | Harmonization item | CP | Stage | Sign-off |
|------|------------------------------------|-----|-------|------------|
| B-01 | Amino Acid Determination | USP | 6 | 2002. 9.9 |
| B-02 | Capillary Electrophoresis | EP | 6 | 2002. 9.10 |
| B-03 | Isoelectric Focusing | EP | 6 | 2002. 9.9 |
| B-04 | Protein Determination | USP | 6 | 2002. 9.10 |
| B-05 | Peptide Mapping | USP | 6 | 2002. 9.10 |
| B-06 | Polyacrylamide Gel Electrophoresis | EP | 6 | 1999.10.20 |
| B- | Glycan Analysis | | | |

検討しているものを国際調和のたたき台にすることを考えてもよいと思います。あるいはEP, USPでの考え方が日局の考え方と近いことがわかれば、調和事項とする可能性が出てきます。

9. Q4B 関連情報

2008年11月にQ4B拡大調和項目として、生物薬品関連試験法のうち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法及びキャピラリー電気泳動法が決定しています。

これを受けてポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Annex 10)は2009年6月にStep 2に到達し、現在意見公募中です(2009年10月にStep 4に到達しています)。

キャピラリー電気泳動法は、PDGが作成したQ4B評価文書を既にQ4Bに提出し、Q4Bの中で評価しています(2009年10月にStep 2に到達しています)。

10. 質疑応答

質問 1 マイコプラズマ試験について、第二追補の改正では触れられていませんが、PCR法は今後見直しされることがありますでしょうか。

回答 PCR法をどうするかは難しい問題です。詳しく説明しますと、PCR法は日本薬局方がEP, USPより先行して採用しました。その当時、例えばFDAなどはPCR法はDNA断片を検出する方法であって、生きたマイコプラズマを検出する方法ではないとの考えでした。またプライマーに問題があり、プライマー次第でどれだけのマイコプラズマがカバーできるのか変わるとの議論もあり、10年前はFDAとEP共にPCR法を局方に収載する考えは全くありませんでした。

現在も基本的には培養法が生きたマイコプラズマを検知する方法ですし、DNA染色法は、筆者は本当の専門家ではありませんが、日本の細胞バンクを管理している方の話では、マイコプラズマ汚染から細胞を管理するにはDNA染色法が一番良いとの意見もあります。

一方で、例えばルーチンで品質コントロールする際に

は、PCR法は非常に手軽に簡単に実施できます。

日本薬局方ではPCR法を公的な方法として認知するが、ただし、従来より実績のある培養法とDNA染色法の二つの方法を実施することが原則で、それでDNA染色法のみで陽性を示したときに、マイコプラズマDNAでないことを確認するという位置づけにしています。なお、日局で示している2段PCR法は感度と特異性に優れた方法であり、プライマーも含めてJISとほぼ同様の方法であること、培養細胞への汚染が知られているマイコプラズマの95%以上を検出できると確認されていること、公的細胞バンクの試験に現在も使用されている実績のある方法であることが確認されています。また、これは参考情報との位置づけで、本文に記載のとおりプライマーも含めて一例を示したものであり、妥当性が立証されれば例示の方法に限定されたものではないことから、今回は特に例示の記載を見直しする必要はないとされました。技術の進歩でプライマーなどが改良され、更に実施しやすい方法あるいはマイコプラズマをより広くカバーできる方法が出てきている、出るということであれば、妥当性を示した上で用いることはもちろん出来ると思います。

先ほど述べましたPCR法ではDNAだけしか見ていない、つまり不活性菌やゲノム断片も検出されるところをどのように克服するかによって利用範囲が広がる、と思います。例えばVero細胞などで少し培養して再度PCR法を実施し、該当するDNAが増えれば生きたDNAを検出していることになると思います。しかし、DNA染色法と比べて時間や労力の点でメリットがあるかどうかを考える必要もあります。

結局、従来の培養法あるいはDNA染色法に対してアドバンテージと合理的な根拠をどれだけ示していけるかによって利用できる程度が変わってくると思います。

実際のルーチンでの様々な管理の中で、PCR法を活用することは全く構わないことと思っています。

PCR法に関して今後の情勢変化によっては、見直しについて委員会の中で議論をしていきたいと考えています。

質問 2 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験における PCR の位置づけについて、ご意見を伺いたいと思います。現行のものでは、培養法と DNA 染色法と PCR 法が 3 法あり、PCR 法は培養法が陰性で DNA 染色法が陽性になったときに、その確認のために使えるといった位置づけになっています。この試験法が導入されたころの PCR は確か非常に曖昧なところがあったと思いますが、現在 PCR は、感度、精度も相当よくなりました。今後再生医療などのように非常にスピーディに結果を出さなければならないときは PCR に頼ってしまうと思います。そういう意味で PCR をあまり継子扱いせず、第 1 法でどちらでも選択できるような位置づけにした方が、ユーザーとしてはありがたいと思います。

PCR のプライマーを日局の参考情報としてよいと思いますが、EP のようにあまり指定せずに、このようなマイコプラズマを検出できて、しかもこのくらいの数まで検出できるという記載の方がよいと考えます。

回答 PCR を日局あるいは政府のガイドライン的なものに取載したのは、日本が最初ですので継子扱いにすることはありません。ただし、新規取載当時から様々な

議論があり、長所、短所のある検出方法ですので、日局の改正には、慎重にその限界を前提とした判断を下さなければいけないこととなります。ルーチンとして再生医療など様々なケースで PCR でマイコプラズマ否定試験を実施することは運用上構わないと思います。また日本薬局方では、規定された方法より良い方法と検証されていれば使用できることになっているので、そのようなプライマーや方法であることが示されれば、もちろんそれが使えます。設定した当初は、FDA などはけんもほろろで、PCR なんて信用できないと言っていました。培養法や DNA 染色法は昔から行われている方法ですし、特に我が国の衛研のセルバンクなどは DNA 染色法がお勧めの方法との意見でした。

このような状況で現在に至っていますが、薬局方の規定の中でどのように PCR を位置づけるか、より合理的に活用できるかなどについて、使い方、プライマー、あるいは試験条件など様々な要素を勘案しつつ、検討して行きたいと思っています。

文 献

- 1) 厚生労働省：日本薬局方の一部を改正する件，厚生労働省告示第 316 号，平成 19 年 9 月 28 日。
- 2) 厚生労働省：日本薬局方の一部を改正する件，厚生労働省告示第 425 号，平成 21 年 9 月 30 日。

平成 20 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告*6
日本薬局方一般試験法収載へ向けた SDS-PAGE 法及び
キャピラリー電気泳動法に関する研究

前田 瑛起*1,2, 北 莊一郎*1, 中世古みなみ*1, 木下 充弘*1,
田邊 豊重*3, 大庭 澄明*4, 早川 堯夫*5, 掛樋 一晃*1

Investigational Testing of SDS-PAGE and Capillary Electrophoresis
for Biological Therapeutics, Aimed for Listing on Japanese Pharmacopoeia
as General Tests

Eiki MAEDA*1,2, Soichiro KITA*1, Minami NAKASEKO*1,
Mitsuhiro KINOSHITA*1, Toyoshige TANABE*3, Sumiaki OHBA*4,
Takao HAYAKAWA*5 and Kazuaki KAKEHI*1

Summary

Biological therapeutics, such as hormones, enzymes, cytokines, antibodies, blood coagulation factors and vaccines, have been attracting much attention from the pharmaceutical industry, and the development of such products has been accelerating. Among them, antibody products, used as biological therapeutics, have been growing most rapidly. In this study, the performance of SDS-PAGE and capillary electrophoresis was investigated using commercially available antibody pharmaceuticals (tocilizumab, bevacizumab, rituximab and trastuzumab), in terms of the precision, linearity and the detection capability of degradation products. Capillary zone electrophoresis (CZE) showed the highest precision for peak areas and migration times, and analysis could be completed within 10 min, which is much faster than in the cases of SDS-PAGE and capillary gel electrophoresis (CGE). All the methods examined in this study gave a good linear relationship between sample concentration (sample dose) and band/peak area. As for detection capability of degradation products, good results were obtained with CGE. However, pressure injection was found to be problematic; because of the difficulties of sample injection into a capillary filled with a high-viscosity running buffer, as is often used in CGE, the variability of sample injection should be evaluated in advance. Furthermore, it is necessary to improve the sample preparation methods and the estimation methods for molecular weight under non-reducing conditions. Therefore, further investigation is necessary to develop and extend the versatility of testing methods for biological therapeutics.

*1 近畿大学薬学部 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

*2 武田薬品工業株式会社 CMC 研究センター開発分析研究所 大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85 (〒532-8686)

Analytical Development Laboratories, CMC center, Takeda Pharmaceutical Company Limited, 2-17-85 Jusohomachi, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan

*3 大阪医薬品協会技術研究委員会 大阪市中央区伏見町 2-4-6 (〒541-0044)

Research and Technical Committee, Osaka Pharmaceutical Manufacturers Association, 2-4-6 Fushimi-cho, Chuo-ku, Osaka 541-0044, Japan

*4 社団法人東京医薬品工業協会方局委員会 東京都中央区日本橋本町 3-4-1 (〒103-0023)

Pharmacopoeia and CMC committee, The Pharmaceutical Manufacturers' Association of Tokyo, 3-4-1, Nihonbashihon-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan

*5 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

*6 本研究は、平成 20 年度日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により実施したものである。

Key words

SDS-PAGE, Capillary electrophoresis, Antibody, Biological therapeutics, Tocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumab

緒言

近年のバイオテクノロジー技術の進展に伴い、ホルモン、酵素、サイトカイン、抗体、血液凝固因子、ワクチンなどのたん白質製剤の開発はますます活発になり、上市されるバイオ医薬品数は増加を続けている。日本薬局方はバイオ医薬品を各条に積極的に収載するという方針のもとに、第十四改正では2品目、第十五改正で4品目が収載され、第十六改正では13品目が収載予定となっている。これらのバイオ医薬品の中でも、毎年数十%の成長率を維持しているのが抗体医薬品であり、1994年から2008年にかけて世界で22種類の抗体医薬品が認可されている^{1,2)}。これにはモノクローナル抗体作成技術やヒト化及びヒト抗体作成技術の進展が大きく寄与し、今後の更なる進展が期待されている。このようなバイオ医薬品の発展を展望して、理化学試験法としてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法 (Capillary electrophoresis; CE)、アミノ酸分析法、ペプチドマッピング法、たん白質定量法などが日米欧3極薬局方国際調和検討グループ (PDG) 案件として取り上げられ、その成果は日本薬局方参考情報として収載されている³⁾。これらの試験法が参考情報から一般試験法として収載されれば、局方品製造関係者、新薬開発関係者そして規制当局などが、生物薬品各条や新規生物薬品の公的試験法としてより一層適切に活用できるようになる。一方、SDS-PAGEは、最近、ICH Q4Bで3薬局方一般試験法の3極規制当局における受入の対象として挙げられ、その評価作業が進められている。

したがって、国内的にも国際的にも日本薬局方参考情報に収載された試験法の一般試験法への取り込みは重要な課題であるが、その際に一般試験法に収載すべき部分と、参考情報に留めておく部分などについて慎重に吟味する必要がある。また、有用で効果的な活用の仕方、特長と限界についても把握しておく必要がある。そのため、各試験法についての技術的留意点や要点を実際の試料を用いて検討し、データを蓄積しておくことは極めて重要である。

そこで本研究では、日本薬局方参考情報に収載されているSDS-PAGE及びCEの2つの試験法について、既に

上市されているTocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumabの4種類の抗体医薬品を試料とし、試験法の特徴や技術的留意点を明らかにすることを目的として検討を行った。

実験方法

1. 試料

試料は市販製剤であるTocilizumab (分子量約148,000, 軽鎖: $C_{1,033}H_{1,606}N_{278}O_{337}S_6$, 重鎖: $C_{2,181}H_{3,338}N_{582}O_{672}S_{15}$), Bevacizumab (分子量約149,000, 軽鎖: $C_{1,034}H_{1,591}N_{273}O_{338}S_6$, 重鎖: $C_{2,235}H_{3,413}N_{585}O_{678}S_{16}$), Rituximab (分子量約144,500, $C_{6,426}H_{9,900}N_{1,700}O_{2,008}S_{44}$), Trastuzumab (分子量約148,000, 軽鎖: $C_{1,032}H_{1,603}N_{277}O_{335}S_6$, 重鎖: $C_{2,192}H_{3,397}N_{583}O_{671}S_{16}$)を用いた。各試料は調製時にバイアル中で適切に溶解し使用後、残存溶液を近畿大学附属奈良病院薬剤部から供与された。各試料約1 mLを調剤から3日以内 (冷所保存) に5 Lの蒸留水で透析 (12時間, 冷所) 後、凍結乾燥したものを試料とした。その他の試薬及び試液は特級あるいはHPLCグレードのものを使用した。

2. 装置

SDS-PAGEはゲル電気泳動装置 (Mini Protean 3 cell) 及びパワーサプライ (POWER PAC 3000) 共にBio Rad製のものをを用いて実施した。ゲル画像はスキャナー (GT-9300UF, EPSON製) を用いて取得し、Image Master 2D Platinum (GEヘルスケア製) を用いてデータ処理した。CEはP/ACE™ MDQ及びProteome Lab™ PA800 (共にBeckman Coulter製) を使用した。

3. 操作手順

3.1 SDS-PAGE

3.1.1 試料調製

3.1.1.1 非還元条件

凍結乾燥した4種の抗体医薬品1 mgをそれぞれ水に溶解し1 mg/mLの水溶液とした。この試料溶液20 μ Lに18 μ Lの反応溶液を加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した後、沸騰水浴中に10分間浸した。反応溶液として、250 mmol/L トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8), 4.6%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 20%グリセリンの混液を使用した。数分間放冷後、1%プロモフェノー

ルブルー (BPB) 水溶液 (2 μL) を加えた。次いで反応溶液と 1% BPB 水溶液を 9:1 の比率で混合した希釈溶液で 0.03, 0.06, 0.13, 0.25 及び 0.50 mg/mL となるように希釈した。これらの試料溶液は分析直前に遠心分離 (14,000 rpm, 10 分間) し、その上清を 10 μL ずつゲルに導入した。

3.1.1.2 還元条件

凍結乾燥した 4 種の抗体医薬品 1 mg をそれぞれ水に溶解し 1 mg/mL 水溶液とした。この試料溶液 20 μL に、反応溶液と 2-メルカプトエタノール (2-ME) を 9:1 の比率で混合した溶液を 18 μL 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した後、沸騰水浴中に 10 分間浸した。以後は非還元条件と同様に処理したものを試験に用いた。

3.1.1.3 分子量マーカー

分子量マーカーは Bio Rad 製 Precision Plus Protein™ Unstained Standards を用いた。本分子量マーカーは 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa の未染色リコンビナントたん白質から構成されており、試料溶液と同様に 10 μL ずつゲルに導入した。

3.1.2 ポリアクリルアミドゲルの作成

ポリアクリルアミドゲルは分離 (下層) ゲルと濃縮 (上層) ゲルからなる不連続な緩衝液系ゲルを用いた。分離ゲルは分析対象となる試料の分子量に合わせ、非還元条件では 6%、還元条件では 10% とした。操作は一部

を除き、第十五改正日本薬局方中の参考情報 6. SDS-PAGE¹⁾ に準じて行った。

3.1.2.1 分離ゲルの調製

目的濃度 (非還元条件では 6%、還元条件では 10%) の分離ゲルを調製するため、Table 1 に従い各成分をメートルガラス内で混和した。各成分はあらかじめセルローズアセテート膜 (孔径: 0.45 μm) でろ過した。過硫酸アンモニウム (APS) 及び *N, N, N', N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 混和前に 5 分間超音波処理して脱気し、APS 及び TEMED を加えて混合した後、直ちに Bio Rad 製 Mini Protean 3 cell のゲル形成枠ガラス板の間に 4.8 mL を注いだ。この液の上に 0.1 mL の水飽和ブタノールを載せ室温で 30 分間静置しゲルを重合した。

3.1.2.2 濃縮ゲルの調製

分離ゲルの重合が完了した後、ろ紙を用いて水飽和ブタノール層を取り除き、ゲルの上部を水 (50 μL) で 2 回洗浄した。次いで、Table 1 に従い濃縮ゲルの調製に必要な各成分を混合した。分離ゲルの調製時と同様に、各成分はセルローズアセテート膜 (孔径: 0.45 μm) を用いてあらかじめ、ろ過して用いた。APS 及び TEMED 混和前に 5 分間超音波処理により脱気し、APS 及び TEMED を加えて混和した後、直ちにゲル形成枠内の分離ゲル上に注いだ。直ちにサンプルコウムを気泡が混入しないように濃縮ゲル溶液中に差し込み、室温で約 30 分間静置

Table 1 Preparation of Polyacrylamide Gels

| | Composition of solution | Volume of each solution (mL) | | | |
|---------------------|---|------------------------------|-------|-------|-------|
| | | 5 mL | 10 mL | 15 mL | 20 mL |
| 6 % Acrylamide gel | Water | 2.6 | 5.3 | 7.9 | 10.6 |
| | Acrylamide solution ^(a) | 1 | 2 | 3 | 4 |
| | 1.5 mol/L Tris solution (pH 8.8) ^(b) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 |
| | 100 g/L SDS ^(c) | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| | 100 g/L APS ^(d) | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| | TEMED ^(e) | 0.004 | 0.008 | 0.012 | 0.016 |
| 10 % Acrylamide gel | Water | 1.9 | 4 | 5.9 | 7.9 |
| | Acrylamide solution ^(a) | 1.7 | 3.3 | 5 | 6.7 |
| | 1.5 mol/L Tris solution (pH 8.8) ^(b) | 1.3 | 2.5 | 3.8 | 5 |
| | 100 g/L SDS ^(c) | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| | 100 g/L APS ^(d) | 0.05 | 0.1 | 0.15 | 0.2 |
| | TEMED ^(e) | 0.002 | 0.004 | 0.006 | 0.008 |
| Concentrating gel | Water | 0.68 | 2.1 | 3.4 | 6.8 |
| | Acrylamide solution ^(a) | 0.17 | 0.5 | 0.83 | 1.7 |
| | 1.0 mol/L Tris solution (pH 6.8) ^(f) | 0.13 | 0.38 | 0.63 | 1.25 |
| | 100 g/L SDS ^(c) | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.1 |
| | 100 g/L APS ^(d) | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.1 |
| | TEMED ^(e) | 0.001 | 0.003 | 0.005 | 0.01 |

- (a) Acrylamide solution: 30% acrylamide/bisacrylamide (29:1) solution
- (b) 1.5 mol/L Tris solution (pH 8.8): 1.5 mmol/L Tris-hydrochloric acid buffer (pH 8.8)
- (c) 100 g/L SDS: 100 g/L Sodium dodecyl sulfate solution
- (d) 100 g/L APS: 100 g/L Ammonium persulfate solution
- (e) TEMED: *N, N, N', N'*-Tetramethyl-ethylenediamine
- (f) 1.0 mol/L Tris solution (pH 6.8): 1.0 mmol/L Tris-hydrochloric acid buffer (pH 6.8)

1. ゲルを凍結させた。

凍結完了後、慎重にリンブルコウムを抜き取り、サンブルコウムによって形成された溝やその付近を水でゆすぎ、キムワイブを用いて非重合アクリルアミドを除去した。この際、ゲルの溝に非重合アクリルアミドが入り込み、試料導入や分析に支障をきたす場合があるため、細い注射針などを用いて溶液を除去した。その後、泳動装置に取り付け試験に使用した。

3.1.3 分析条件

泳動緩衝液として3.0%トリス、14.4%グリシン、1.0% SDS 水溶液を用いた。泳動緩衝液を陽極側に135 mL、陰極側に250 mL 注ぎ入れ、約2.5時間泳動した。初めの約1時間は5 mA/gel で泳動し、導入した試料を濃縮ゲル内で濃縮した。試料が濃縮ゲルと分離ゲルの境界を通過したことを確認した後、印加電流を10 mA/gel に変更した。泳動は試料の最先端がゲルの端を越えない適切な時間で終了した。

3.1.4 たん白質の染色及び脱色

泳動後直ちに泳動装置からゲル板を取り外し、水でゲル板やゲルの溝をよくすすぎ、泳動緩衝液を洗い流した。スパーテルを用いて慎重に2枚のゲル板のうちの片方を取り外し、濃縮ゲルを分離ゲルから切り離した。切り離れた分離ゲルをもう片方のゲル板から離してタッパウェアに移し、30 mL の染色液 (0.2% Coomassie Brilliant Blue R250, 40%メタノール, 10%酢酸) を注ぎ、静かに振り混ぜながら室温で1時間染色した。その後、染色液を捨て、40 mL の脱色液 (40%メタノール, 10%酢酸) を注ぎ、室温で静かに振り混ぜながら1時間脱色した。1時間後、脱色液を入れ替え、更に30分間ゲルを脱色した。その後ゲルを水で洗浄し、ゲル画像を取得した。

3.1.5 試験

非還元条件及び還元条件のそれぞれについて、精度試験としてゲル内のばらつきに1枚、ゲル間の検討に3枚のゲルを使用して電気泳動を行った。直線性については3枚のゲルに5濃度の試料を導入して試験を実施した。

3.2 CE

SDS-PAGEと同様に、非還元及び還元条件について、キャピラリーゲル電気泳動法 (CGE) とキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) の2種類の試験法により検討した。CGEについては非還元及び還元条件ともに Beckman Coulter 社の IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit を用いた。CZEについては本研究室で開発した分析条件⁵⁾を用いた。

3.2.1 試料調製

3.2.1.1 非還元条件, CGE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品2 mg をそれぞれ水に

溶解し5 mg/mL の水溶液とし、その一部 (20 μ L) に IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit 付属の SDS サンプル緩衝液 (100 mmol/L トリス-塩酸, pH 9.0, 1% SDS 含有) を75 μ L, 250 mmol/L ヨードアセトアミドを5 μ L, 10 kDa 内部標準溶液を2 μ L 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した。その後、14,000 rpm で1分間遠心分離したものを70°C で10分間たん白変性し、3分以上放冷後、14,000 rpm で再度10分間遠心分離した後、上清100 μ L を CE に用いた。

3.2.1.2 還元条件, CGE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品2 mg をそれぞれ水で5 mg/mL の溶液とした。この溶液20 μ L に SDS サンプル緩衝液を75 μ L, 2-ME を5 μ L, 10 kDa 内部標準溶液を2 μ L 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した。以後は非還元条件と同様に CE に供した。

3.2.1.3 非還元条件, CZE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品1 mg をそれぞれ水に溶かし1 mg/mL 溶液とし、その10 μ L に CZE 用反応溶液 (250 mmol/L トリス-塩酸, pH 6.8, 4.6% SDS 含有) を10 μ L 加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混和した。これを沸騰水浴に10分間浸し、放冷後14,000 rpm で10分間遠心分離した。その上清10 μ L を、水で2倍希釈した CZE 用反応溶液で希釈して目的の試料濃度に調整し試料溶液とした。

3.2.1.4 還元条件, CZE

凍結乾燥した4種の抗体医薬品1 mg をそれぞれ水に溶解し1 mg/mL 溶液とした。この溶液10 μ L に、CZE 用反応溶液を9 μ L, 2-ME を1 μ L 加えボルテックスミキサーを用いてよく混和し、非還元条件と同様に処理して CE に供した。

3.2.2 分析条件

3.2.2.1 CGE

電気泳動用緩衝液には IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit 付属の SDS ゲル緩衝液 (Beckman Coulter 製のポリマーを含む緩衝液で pH 8.0, 0.2% の SDS を含有) を用い、印加電圧を-15 kV (試料導入側が陰極、廃液側が陽極)、分析温度を25°C として220 nm の紫外外部吸収検出で分析した。試料は-5 kV で20秒間電氣的に導入した。キャピラリーカラムは有効長 (試料導入末端側から検出窓までの長さ) 20 cm, 全長30 cm, 内径50 μ m のフューズドシリカキャピラリーを用いた。分析ごとに0.1 mmol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (70 psi, 3分間), 0.1 mmol/L 塩酸 (70 psi, 1分間), 水 (70 psi, 1分間) の順で試料導入末端側からキャピラリーを洗浄し、同じく加圧法で SDS ゲル緩衝液をキャピラリーに充てん (70 psi, 10分間) して分析に用いた。

3.2.2.2 CZE

CZE用緩衝液は0.1% SDSを含む25 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 5.8) を用いた。印加電圧は25 kV (試料導入側が陽極、廃液側を陰極)、分析温度25°Cで200 nmの紫外吸収検出で分析した。試料は1 psiで5秒間加圧することにより導入した。キャピラリーカラムは有効長40 cm、全長50 cm、内径50 μ mのフューズドシリカキャピラリー内壁をカルボキシル基で修飾したキャピラリー (FunCap CE TypeC, GL Sciences製) を用いた。分析ごとに1 mol/L塩化ナトリウム水溶液 (20 psi, 1分30秒間)、水 (20 psi, 1分間) の順で加圧法により試料導入末端側からキャピラリーを洗浄し、同じく加圧法によりCZE用緩衝液で平衡化 (20 psi, 4分間) した後分析に使用した。

実験結果

1. SDS-PAGE

1.1 精度

0.25 mg/mLに調製した試料溶液を各レーン10 μ Lとなるようにゲルに導入して電気泳動したところ、非還元条件でFig. 1-a、還元条件でFig. 1-bに示す結果が得られた。非還元条件では、使用したすべての試料が約150 kDaの位置にIgG由来のバンドを与えた。また、還元条件では、約50 kDaの位置に重鎖 (Hc) 由来のバンドが、そして約25 kDa付近に軽鎖 (Lc) 由来のバンドが観察された。また、これらのバンド以外に数本の薄いバンドが観察された。IgG、Hc及びLc由来のバンドについて、バンド面積及び相対移動度を求め、それぞれの相対標準偏差 (RSD値) を算出した (Table 2)。同一ゲル上のこれらのバンドのバンド面積及び相対移動度のRSD値 (n=6) は $\leq 4.2\%$ 及び $\leq 1.5\%$ であり、ゲル間におけるRSD値 (n=3) は $\leq 15.1\%$ 及び $\leq 3.9\%$ であった。

1.2 直線性

非還元及び還元条件共に0.03, 0.06, 0.13, 0.25及び0.50 mg/mLのTocilizumab溶液 (10 μ L/lane) をそれぞれ3枚のゲルに導入し分析した結果をFig. 2-a及びFig. 2-bに示す。Tocilizumabに由来するバンドの平均バンド面積 (n=3) を算出し、ゲルへの試料導入量に対してプロットしたところ、Table 3に示すように良好な直線性 ($R \geq 0.9966$) が観察された。

1.3 不純物の検出

非還元及び還元条件のSDS-PAGEの結果より、分子量マーカーの相対移動度とマーカーたん白質の分子量の

常用対数 ($\log_{10} Mr$) から作成した検量線を用いて試料溶液中に観察されたバンドの分子量を算出した (Table 4)。検量線はゲル毎にそれぞれ作成したものを用いた。検量線を作成する際、検量線はマーカーたん白質の高分子量側でわずかにS字曲線を描いた。そのため、直線部分で分子量の算出を行う必要がある。Fig. 3は還元条件下でSDS-PAGEにより作成した検量線であるが、マーカーたん白質の $\log_{10} Mr$ が2.0以上の部分で直線性を失っていることがわかる (点線)。そのため、分子量算出には試料溶液レーンで検出された全バンドの分子量算出が可能な $\log_{10} Mr$ が2.0以下の範囲の検量線を使用すべきである。そこで、 $\log_{10} Mr$ の値が2.0以上の2個のプロットを除いた6個のプロット (実線) を用いて検量線を作成したところ相関係数が0.9615から0.9916へと改善され、良好な直線性が確保された。作成した検量線を使用してTocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumabの重鎖及び軽鎖に由来するバンドの分子量を算出したところ、同一ゲル内平均 (n=6)、ゲル間平均 (n=3) どちらもHcが53~54 kDa、Lcが24~25 kDaであった。還元条件ではIgGのジスルフィド結合が開裂してジスルフィド結合を持たないHcとLcとなっており、分子量測定結果は理論値とほぼ等しい値を示した。一方、非還元条件では、ゲル上で検出された分子量250, 150, 100, 75及び50 kDaのマーカーたん白質すべてを検量線作成に用い、算出した分子量をTocilizumab, Bevacizumab, Rituximab, Trastuzumabそれぞれの理論分子量である148, 149, 145及び148 kDaと比較したところ、最大で27 kDaの誤差が生じていることが示された。

また、主成分以外に観察されたバンドのいくつかは、使用した抗体医薬品間で共通して観察されることが明らかとなった。Fig. 4のBand 2, Band 4, Band 5の3つのバンド及びBand 3, Band 7の2つのバンドは、それぞれのIgGとの相対移動度がほぼ同じであることから、似通った分解過程を経て生成した不純物分子であることが示唆された。また、これらのバンドは還元条件では観察されなかったことから、IgG中のジスルフィド結合の一部が開裂した分子に由来する可能性が示唆された。

2. CGE

2.1 精度

調製した0.25 mg/mLの試料溶液をそれぞれ3回ずつ繰り返し分析した結果、非還元条件でFig. 1-c、還元条件でFig. 1-dに示す結果が得られた。非還元条件では約30分にIgG由来のピークが観察され、還元条件では約15分にLcが、約20分にHcのピークが観察された。CGEでは泳動緩衝液が高い粘性を持ち加圧法による試