

生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

分担研究者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

協力研究者 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 日局各条ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン（HMG）では、純度試験として、LH 活性（精のう重量法または卵巣アスコルビン酸法）が、定量法として FSH 活性（卵巣重量法）が設定されている。LH 活性は、HMG の有効性及び安全性に關与するパラメータであるが、定量法としては設定されていない。また、LH 活性の測定法には二種類の方法があり、異なった値が得られる可能性がある。さらに、LH/FSH 活性比は 1 以下と広い規格となっている。そこで、LH 活性試験や純度試験のあり方について検討することを目的に、各メーカーにおける LH 活性の管理状況を調査し、さらに製剤中に残存している不純物を明らかにした。

A. 研究目的

HMG（HMG）は閉経後の婦人の尿からウイルスを除去又は不活化する工程を経て精製されたもので、卵胞刺激ホルモン（FSH）作用と黄体形成ホルモン（LH）作用を持つ。HMG は主に不妊治療に用いられ、FSH は胎状卵胞の発育を促進する。LH は FSH と協調的に作用するが、過剰な LH 活性は、卵巣過剰刺激症候群と呼ばれる副作用を引き起こす可能性がある。そこで、LH 活性は有効性及び安全性に關わる重要なパラメータであり、LH/FSH 活性比は適切に管理されていることが必要である。日本薬局方第十六改正では、定量試験として設定されているのは FSH 活性のみであり、LH 活性は純度試験において、FSH 活性に対する LH 活性の比（LH/FSH 活性比）が 1 以下であることを確認することになっている。LH 活性の測定方法として、精のう重量法または卵巣アスコルビン酸減少法の二種類の方法が設定されている。測定方法が異なれば、得られる値も異なる可能性がある。表 1 に市販されている HMG 製剤の一覧を示す。臨床の場合においては、LH/FSH 活性比が約 1 の製剤、やや低い製剤、及び非常に低い製剤が、必要に応じて使い分けられているようである。局方 HMG 各条における LH 活性の許容範囲は幅広く、LH 活性に關する製品間差は大きいと思われる。そこで、本研究では、適切な LH 活性の規格及び純度試験の方法について考察すべく、HMG の LH 活性管理状況の調査、局方の問題点について考察を行った。特に、FSH 及び LH とともに実験動物を用いたバイオアッセイが採用されているため、頑健性、再現性及び動物愛護の精神を考慮し

て、理化学的試験法や ELISA などへの変更が可能かどうか検討する必要があると考え、製剤に含まれる不純物の同定を行った。

B. 研究方法

1. 試料

HMG 剤として、HMG 注射用 150 IU 「テイゾー」(あすか製薬)、「TYK」及び 100 IU 「TYK」(大正薬品工業)、「フェリング」(フェリングファーマ)、「F」(富士薬品工業)を用いた。修飾トリプシンはプロメガ社より購入した。その他の試薬は、高純度なものを使用した。

2. 還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化

300 IU の下垂体性性腺刺激ホルモンを PD-10 カラム (GEヘルスケア)にて脱塩し凍結乾燥した。6 mol/L グアニジン塩酸及び 5 mmol/L EDTA を含む 200 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 100 µL を加えて溶解し、200 mM ジチオスレイトール (DTT) 溶液を 1 µL 加え攪拌し、37 °C で 2 時間放置した。400 mM ヨード酢酸溶液を 1.2 µL 加え攪拌し、遮光下室温で 30 分間放置した。50 mM DTT を 1.2 µL 加えたのち PD MiniTrap G-25 カラム (GEヘルスケア)にて脱塩し、凍結乾燥した。100 IU 相当量を 20 µL の 4 mmol/L の EDTA を含む 20 mmol/L のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、1 µL の 0.25 mg/mL 修飾トリプシン溶液を加え、37 °C で 6 時間消化した。0.1% ギ酸溶液で 2 倍に希釈し、1 µL を LC/MS/MS に供した。

3. LC/MS/MS

液体クロマトグラフには Paradigm MS4

(Michrome BioResources) 質量分析計には,Orbitrap Elite (ThermoScientific), イオン源にはナノエレクトロスプレーを使用した. カラムには, L-Column L2-C18 (CERI, 0.1 x 150 mm, 3 μ m), 溶離液には, A: 0.1% ギ酸(A)及びB: 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリルを用いた. 試料は, 同カートリッジ式トラップカラムに吸着させ, 0.1% TFA で脱塩した後, 流路を反転させ, 室温, 流速 0.5 μ l/min で, 0-2 min, 5% B, 2-62 min, 5-65% B 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, 400-2,000 とした. データ依存的に MS/MS 測定を行った.

4. データベース検索

MS データは, 検索エンジン PEAKS DB (Bioinformatics Solutions 社)を用いて, Swiss-Prot human データベースに対して検索を行った. 検索結果は, ペプチド及びタンパク質に対して, $-10 \times \log_{10}$ (P-value)が 20 以上のもの (P-value 1%に相当する) ののみを同定とした.

C. 研究結果

1. HMG の現状の調査

局方における LH 活性に関する記述は次のようになっている。「黄体形成ホルモン 定量法及び次の方法により試験を行うとき, 黄体形成ホルモン単位の卵胞刺激ホルモン単位に対する比率は 1 以下である. 黄体形成ホルモンの測定法には精のう重量法と卵巣アスコルビン酸減少法がある. 黄体形成ホルモン単位の卵胞刺激ホルモン単位に対する比率が 1 以下, 0.10 以上の場合, 精のう重量法を用いることができる.」この記述からは, LH/FSH 活性比が 0.1 以上 1 以下の場合には精のう重量法が使用でき, 卵巣重量法は常に使用できると読み取れる. しかしながら, 一般的には, LH 活性の測定には, 精のう重量法が使用されるケースが多く, LH/FSH 活性比が低い場合に, FSH が測定に影響を及ぼし正確な測定結果が得られないことから, 卵巣アスコルビン酸法が使用されているようである. 実際, 第五 WHO 国際標準品 ヒト尿由来 FSH 及び LH バイオアッセイ用の検定においては, 卵巣アスコルビン酸法による測定は行われていない. そこで, 局方の書きぶりを LH 活性測定の実態に合わせる必要があると考え, 製造会社における LH 活性の管理方法について調査を行った. LH/FSH 活性比が約 1 の製剤では, 局方の規格 (精のう重量法) で確認し, LH/FSH 活性比の低い製剤では, 局方の規格に加えて, 免疫学的な手法にて LH 含量が少ないことを確認しているケースがあった (データ非表示).

また, 米国薬局方では, LH と FSH の活性比は約 1 であり, 活性比の調節のために, LH 活性の 30% まで妊婦尿由来胎盤性性腺刺激ホルモン (hCG) を添加して良いことになっている. そこで, 本邦における HMG への hCG 添加の有無についてアンケート調査したところ, 添加していると回答した会社はなかった (データ非表示).

2. HMG 製剤中のタンパク質の同定

動物を用いない純度試験を検討するため, トリプシン消化ペプチドを LC/MS/MS で分析し HMG 製剤に含まれるタンパク質成分を同定した. HMG 製剤に加えて, FSH 活性のみを精製した精製卵胞刺激ホルモン製剤も同時に分析した. 結果を表 2 に示す. タンパク質のアクセッション, 分子量とタンパク質名を示し, その右側に, 各製剤で同定された場合にはタンパク質グループ番号を記入した. 表の上の方に, 有効成分である FSH の サブユニット (Follitropin subunit beta), FSH, LH 及び hCG に共通する サブユニット (Glycoprotein hormones alpha chain), hCG の サブユニット (Choriogonadotropin subunit beta), 並びに LH の サブユニット (Lutropin subunit beta) を示した. FSH はいずれの製剤においても検出されていたが, LH 及び hCG については, 検出されていない場合もあった. これは, その他のタンパク質が大量に存在していたことから, 相対的な含量が少なく, 検出が妨害されたと思われる. hCG が観測されていることから, 閉経期婦人尿には, 由来は不明であるが hCG が含まれていると思われる. LH よりも hCG の方がスコアが高く検出されていたことから, LH 活性に占める hCG の貢献度は高いことが推測される. 不純物として, Serum albumin, Protein AMBP, Plasma serine protease inhibitor, Complement component C7, CD27 antigen, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B, Ribonuclease pancreatic, Alpha-1-acid glycoprotein 2 など非常に多くのタンパク質が同定された. 血中から尿中への排泄には, 分子量や電荷が関与する. 分子量が数万 Da 以下のタンパク質は尿中に排泄される. 今回, 分子量の非常に大きなタンパク質も検出されていたが, これは, タンパク質断片化物が検出されたと考えられる. 製剤間で検出されたタンパク質が異なっているが, これは, 不純物タンパク質の量比は変動が大きいことを示唆しているのかもしれない.

D. 考察

HMG は FSH 作用及び LH 作用を有していること, また, FSH 及び LH 活性はどちらも有効性及

び安全性に係わることから適切に管理されている必要がある。そこで、LH は純度試験ではなく定量試験とすべきではないかと考え、生物薬品委員会での議論を求めた。この点について、生物薬品委員会で、実際に使用している医療機関の意見及び製造メーカーの意見を聞き、実態に合わせて修正することに決まった。また、LH 活性の測定法が二種類あることに関して、卵巣アスコルビン酸減少法は LH/FSH 活性比の低い製剤で使用されていることが分かり、この点についても、LH の測定法の記述を実態に合わせて修正することに決まった。つまり、LH/FSH 活性比がある値以下の場合にだけ使用できるという形になると予想される。しかしながら、試験の適否の判定が、LH/FSH 活性比が 1 以下ということであれば、本試験を実施する必要性が不明であり、本試験法の取り扱いについて議論する必要がある。また、卵巣アスコルビン酸減少法は動物を用いたバイオアッセイであり、精度及び感度が低いことから、動物を用いない精度及び感度の高い分析法へ置き換えることが望ましいと考えられる。

今回 HMG 製剤の状況を調べた結果、市販されている製剤の LH/FSH 活性比については、一部の製剤では明確に示されていないことが分かった。治療上重要な医薬品の特性については情報が適切に提供されていることが必要であり、LH/FSH がどのレベルで調整されているのかが明確にされていることが望ましいと思われた。

また、FSH 活性や LH 活性測定を理化学的試験法や ELISA 等の免疫化学的方法に置き換えられないか検討する目的で、HMG 製剤に含まれる不純物タンパク質の同定を行った。その結果、非常に多くのタンパク質が混在していることが分かった。また、LH の量は微量であること、及び hCG も含まれており、HMG の LH 活性は、LH と hCG の両方よることが示唆された。この結果より、LH 活性測定の代替えとしては、理化学的試験法は難しく、ELISA のような免疫学的手法を用いて、hCG と LH の両方を評価する方法がよいのではないかと思われた。

E. 結論

1. 第十六改正 HMG 各条において純度試験とされている LH 活性試験は定量試験とすべきであること、また、卵巣アスコルビン酸減少法の取り扱い

に問題があることを明らかにした。その結果、生物薬品委員会では、医療機関及び製造メーカーの実態を調査し、その結果を踏まえて、LH 試験を見直すこととなった。

2. 動物を用いない純度試験作成のための予備的検討を行い、HMG 製剤中には非常に多くの不純物タンパク質が含まれていることを明らかにした。

3. LH 活性は LH と hCG 両方によるものであることが示唆されたことから、動物代替法として、免疫学的手法などを用いて、hCG と LH の両方を評価する必要性が示唆された。

謝辞

製薬企業における、hCG 添加の有無及び LH 及び hCG の評価の状況については、日本薬局方原案審議委員会 生物薬品委員会を通じて実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 1) 川崎ナナ：生物薬品の局方収載の現状と課題 レギュラトリーサイエンス学会誌 投稿中
- 2) Harazono A, Hashii N, Kuribayashi R, Nakazawa S, Kawasaki N: Mass spectrometric glycoform profiling of the innovator and biosimilar erythropoietin and dargepoetin by LC/ESI-MS. J. Pharm. Biomed. Anal., 83, 65-74 (2013)
- 3) 川崎ナナ, 宮田直樹：一般名がわかるSTEMの知識 生物薬品 日本薬剤師会雑誌, 65(2), 133-136 (2013).

総説など

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表2. ヒト下垂体性腺刺激ホルモン製剤及び精製下垂体性腺刺激ホルモン製剤で検出されたタンパク質の一覧

Accession	Avg. Mass	Description	HMVG						Purified HMVG	
			Product A	Product B	Product C	Product D	Product E	Product F	Product G	
P01225 FSHB_HUMAN	14700	Follitropin subunit beta	4	11	5	4	4	1	2	
P01215 GLHA_HUMAN	13075	Glycoprotein hormones alpha chain	5	25	10	9	7	2	3	
P01233 CGHB_HUMAN	17739	Choriogonadotropin subunit beta	43			16	21	53		
A6NKQ9 CGB1_HUMAN	20468	Choriogonadotropin subunit beta variant 1	43			16	21	53		
Q6NT52 CGB2_HUMAN	21221	Choriogonadotropin subunit beta variant 2	43			16	21	53		
P01229 LSHB_HUMAN	15345	Lutropin subunit beta				49	36			
P02768 ALBU_HUMAN	69367	Serum albumin	9	1	2	1	2	11	6	
P02760 AMBP_HUMAN	39000	Protein AMBP	1	2	1	18	6	5	4	
P05154 IFSP_HUMAN	45675	Plasma serine protease inhibitor	8	5	3	10	13	16	12	
P10643 CO7_HUMAN	93518	Complement component C7	3	18	13	28	9	3	1	
P26842 CD27_HUMAN	29137	CD27 antigen	6	21	16	41	11	20	17	
P20333 TNR1B_HUMAN	48291	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	19	17	14	51	16	10	11	
P07998 IRNAS1_HUMAN	17644	Ribonuclease pancreatic	12	3	15	59	24	21	5	
P19652 A1A2_HUMAN	23603	Alpha-1-acid glycoprotein 2	82	8	7	34	3	6	9	
P41222 PTGDS_HUMAN	21029	Prostaglandin-H2 D-isomerase	47	13	19	44	33	38	33	
O43291 SPIT2_HUMAN	28228	Kunitz-type protease inhibitor 2	16	9	11	119	48	44	20	
P02763 A1A1_HUMAN	23512	Alpha-1-acid glycoprotein 1		10	8	21	1	9	7	
Q16270 BP7_HUMAN	29130	Insulin-like growth factor-binding protein 7		28	17	5	17	13	24	
O75594 PGRP1_HUMAN	21731	Peptidoglycan recognition protein 1	29	14	4		12	40	8	
P15328 FOLR1_HUMAN	29819	Folate receptor alpha	13	4		3	14	52	28	
P30740 ILEU_HUMAN	42742	Leukocyte elastase inhibitor		23	21	30	31	14	19	
P01009 A1A1_HUMAN	46737	Alpha-1-antitrypsin		31	18	54	5	34	16	
P25311 ZA2G_HUMAN	34259	Zinc-alpha-2-glycoprotein	36		20	11	23	47	34	
P02788 TRFL_HUMAN	78182	Lactoferrin		36	6	62	19	58	29	
P19438 TNR1A_HUMAN	50495	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A	98		27	55	8	12	22	
P35555 FBN1_HUMAN	312237	Fibrillin-1	68	19	30	80	25	8		
P07996 TSPI_HUMAN	129383	Thrombospondin-1	62	27	31	50	100	28		
Q8NI32 LPD6B_HUMAN	20656	Ly6/PLAUR domain-containing protein 6B	52	42	32	61	94	17		
P80370 DLK1_HUMAN	41300	Protein delta homolog 1	64	55	38		37	68	38	
Q6UY11 DLK2_HUMAN	40548	Protein delta homolog 2	76		24	67	27	76	44	
Q6UXG3 CLM9_HUMAN	36060	CMRF35-like molecule 9	24	140	39	76	68	32		
Q16651 PRSS8_HUMAN	36431	Prostasin		15	9		10	23	14	
P02749 APOH_HUMAN	38298	Beta-2-glycoprotein 1	7	24		2	32	19		
P10153 IRNAS2_HUMAN	18354	Non-secretory ribonuclease		7		24	29	26	26	
Q03405 UPAR_HUMAN	36978	Urokinase plasminogen activator surface receptor	31		33	7	15	29		
P00747 PLMN_HUMAN	90569	Plasminogen	15	16		20	30	35		

続く

O75509 TNR21_HUMAN	71845	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	75						83		57	
O14798 TR10C_HUMAN	27407	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10C	85						50		81	
P01860 IGHG3_HUMAN	41287	Ig gamma-3 chain C region	105				78		35			
Q01974 ROR2_HUMAN	104757	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR2	88						101		30	
P04156 PRIO_HUMAN	27661	Major prion protein				37			137		65	
Q9NQ36 SCUB2_HUMAN	109966	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2					71		126		45	
P01011 AACT_HUMAN	47651	Alpha-1-antichymotrypsin				80			95		80	
P98160 PGBM_HUMAN	468835	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	33			40					187	
Q9UK23 NAGPA_HUMAN	56073	N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase	97				110		70			
Q93038 TNR25_HUMAN	45385	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25	106						97		78	
P23142 FBLN1_HUMAN	77214	Fibulin-1	186				46		191			
P37173 TGFR2_HUMAN	64568	TGF-beta receptor type-2	179						184		60	
P07911 UROM_HUMAN	69761	Uromodulin	11				23					
P24821 TENA_HUMAN	240851	Tenascin							34		4	
Q96B86 RCMA_HUMAN	49347	Repulsive guidance molecule A	25								25	
Q9BX67 JAM3_HUMAN	35020	Junctional adhesion molecule C							20		42	
Q6EMK4 VASN_HUMAN	71713	Vasorin	20								42	
P12830 CADH1_HUMAN	97456	Cadherin-1				54			12			
P55000 SLUR1_HUMAN	11186	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1	35			34						
P04233 HG2A_HUMAN	33516	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	17						55			
Q14332 FZD2_HUMAN	63554	Frizzled-2	51				27					
P15692 VEGFA_HUMAN	27042	Vascular endothelial growth factor A	53			32						
P01133 EGF_HUMAN	133994	Pro-epidermal growth factor	22						64			
Q07954 LRP1_HUMAN	504610	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1									41	
Q9YG06 TNR11_HUMAN	66034	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A				35			47			
P98088 MUC5A_HUMAN	526612	Mucin-5AC (Fragments)							58		36	
P06681 CO2_HUMAN	83268	Complement C2	55								46	
P14207 FOLR2_HUMAN	29280	Folate receptor beta							46			
Q9UHX3 EMR2_HUMAN	90472	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2				25			66			
P08118 MSMB_HUMAN	12865	Beta-microseminoprotein							90			
Q8N251 LTBP4_HUMAN	173435	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4				30			85		15	
P80188 NGAL_HUMAN	22588	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin							103			
P01857 IGHG1_HUMAN	36106	Ig gamma-1 chain C region	105				81		41			
P08123 CO1A2_HUMAN	129314	Collagen alpha-2(I) chain	38						18			
Q95980 RECK_HUMAN	106457	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs							87			
Q8N423 LRB2_HUMAN	65039	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2					12		113			
P13598 ICAM2_HUMAN	30654	Intercellular adhesion molecule 2					93				39	
B9A064 IGLL5_HUMAN	23063	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	23				115					
							83		56			

続々

P0CG04 LAC1_HUMAN	11348	Ig lambda-1 chain Cregions						83	56	
P0CG05 LAC2_HUMAN	11294	Ig lambda-2 chain Cregions						83	57	
P0CG06 LAC3_HUMAN	11237	Ig lambda-3 chain Cregions						83	57	
P47871 GLR_HUMAN	54009	Glucagon receptor	81							60
Q8WZ42 TTIN_HUMAN	3815922	Titin	115	38						
P01834 IGKC_HUMAN	11609	Ig kappa chain Cregion						112	42	
Q96GF6 SREC2_HUMAN	92479	Scavenger receptor class F member 2							136	21
Q9NQ38 ISK5_HUMAN	120715	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	21	139						
Q9UM22 EPDR1_HUMAN	25437	Mammalian ependymin-related protein 1		26					146	
Q9GZX9 TWSG1_HUMAN	25017	Twisted gastrulation protein homolog 1	32						143	
Q9H461 FZD8_HUMAN	73300	Frizzled-8		73				105		
P46531 NOTCH1_HUMAN	272503	Neurogenic locus notch homolog protein 1						77	102	
Q75077 ADA23_HUMAN	91926	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 23							115	70
Q12907 LMAN2_HUMAN	40229	Vesicular integral-membrane protein VIP36	59					134		
P08637 FCG3A_HUMAN	29089	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A	77					116		
O60242 BAI3_HUMAN	171517	Brain-specific angiogenesis inhibitor 3							79	116
Q92820 GGH_HUMAN	35964	Gamma-glutamyl hydrolase		93					105	
Q14162 SREC_HUMAN	87387	Scavenger receptor class F member 1							125	82
P54108 CRIS3_HUMAN	27630	Cysteine-rich secretory protein 3		141					67	
P08572 CO4A2_HUMAN	167553	Collagen alpha-2(IV) chain						99	111	
P11047 LAMC1_HUMAN	177602	Laminin subunit gamma-1						36	185	
Q96FE7 P3IP1_HUMAN	28248	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1				54			167	
Q16787 LAMA3_HUMAN	366650	Laminin subunit alpha-3						74	152	
O00548 DLL1_HUMAN	78056	Delta-like protein 1						48	198	
Q7Z7M0 MEGF8_HUMAN	303100	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8						57	192	
Q9Y520 PRC2C_HUMAN	316911	Protein PRC2C	104	147						
Q8TER0 SNED1_HUMAN	152203	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1	101						164	
Q9H9P2 CHODL_HUMAN	30431	Chondrolectin	180					116		
P98095 FBLN2_HUMAN	126573	Fibulin-2	111						196	
P05451 REG1A_HUMAN	18731	Lithostathine-1-alpha	175						135	
P48304 REG1B_HUMAN	18665	Lithostathine-1-beta	175						135	
O00300 TR11B_HUMAN	46026	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B						132	186	

二乗剤以上で同定されたタンパク質を列挙した。