

# IV 研究報告



# 富山シャクヤクのブランド化推進事業 —実生産規模乾燥調製法の効率化に関する検討—

田村 隆幸, 東 一彦, 大江 勇, 寺崎 さち子, 川筋 透, 竹林 憲司, 高山 信幸, 米田 哲也,  
小笠原 勝, 小木曾 英夫

## Efficient processing method of *Paeonia lactiflora* Pallas for large-scale production

Takayuki TAMURA, Kazuhiko AZUMA, Isamu OE, Sachiko TERASAKI, Toru KAWASUJI,  
Kenji TAKEBAYASHI, Nobuyuki TAKAYAMA, Tetsuya YONEDA, Masaru OGASAWARA, Hideo OGISO

### 要 約

これまでに、「富山シャクヤク」としてブランド化を図る品種「春の粧」を栽培する生産者が高品質シャクヤクを安定的に出荷するための乾燥調製法を確立した。今回は、さらに効率的な乾燥調製法に改良することを目指して、根を切断して乾燥する方法や、自然乾燥と機械乾燥を併用した方法で乾燥試験を実施した。平型乾燥機での乾燥において、根を長さ3cmにカットすることにより、生薬の品質（成分含量及び白色度）に影響なく乾燥効率を向上（乾燥期間は14日から12日に、乾燥機稼働日数は7日から6日に短縮）できることを明らかにした。自然乾燥と機械乾燥を併用した方法においては、乾燥サンプルの品質の同等性確認により、屋内自然条件下又はビニールハウスでの乾燥日数の目安と乾燥機での仕上げ乾燥条件を明らかにし、低コスト乾燥法を確立した。

### Summary

We have established a processing method for farmers who aim to ship stably high quality peony root derived from "Haru-no-Yosooi which is a cultivar of *Paeonia lactiflora* selected for the brand of Toyama. In this study, aiming to improve to a more efficient method, we carried out a drying test to investigate the effect of cutting and to establish a method of using natural drying and mechanical drying together. As a result using flat-bed dryer, we clarified that the drying efficiency improved without affecting the quality (component content and whiteness) of the crude drug by cutting into a length 3 cm (drying period was shortened from 14 days to 12 days, and the dryer working days were shortened from 7 days to 6 days.) . As a result using natural drying, we revealed the indication of the days for drying and finishing drying conditions with dryer in indoor natural conditions or in vinyl house by confirming the quality equivalence of the dried samples, and we established low cost drying method.

キーワード：シャクヤク, 乾燥, 平型乾燥機, 高品質

Key words : Peony root, Drying, Flat-bed dryer, High quality

我々は、薬用植物指導センターで保有する230のシャクヤク園芸品種の中から薬用として高品質で、かつ切花生産も可能な品種を選定し、その栽培普及と利用促進により付加価値の高い「富山シャクヤク」のブランド化を推進するため、平成22年度から関連する研究を進めてきた。平成26年度までに、品種別の薬理試験及び成分分析、並びに栽培試験での生育及び病害調査の結果から、総合的に評価して優良な3品種を選抜した<sup>1)</sup>。選抜の際には、新たに4年間栽培して得た生薬での薬効の再評価及び成分の再分析を実施し、品質の安定性及び再現性を確認している。選抜3品種のうち実用化が最も進んでいる「春の粧」について、出荷先予定企業から乾燥した生薬としての出荷を求められたことから、平成27年度からは、生産者が使用予定の

乾燥機を用いて目標とする高品質な生薬が実生産規模で調製加工できることを実証し、報告した<sup>2)</sup>。平成30年度からは、生産者による「春の粧」の栽培が開始されたことを契機に、乾燥期間の短縮やコスト削減が要望されるようになった。すでに実証した方法<sup>2)</sup>でも連続送風から断続送風に変更することにより、時間当たり乾燥処理量を向上させ燃料を削減できていたが、さらなる乾燥調製法の効率化に向けて検討を行ったので報告する。

## 実験方法

### 1. 乾燥試験

#### 1-1. 材料

##### (1) シャクヤク試料

平成29年及び令和元年の各年10月から11月に、薬用植物指導センター（中新川郡上市町広野2732）で慣行法により4年間栽培したシャクヤク（品種名：「春の粧」及び「梵天」）の根を収穫し、試料とした。試料は、土付きの状態ではガラ袋（PP袋）に約20 kgずつ入れ、日陰となる屋外の土の上に並べ、その上にビニールシートを被せて乾燥を防止し、次の「(2) 貯蔵後の再選別」の実施まで約3ヶ月間貯蔵した。平成29年収穫の試料は「1-3. 乾燥機による乾燥」に、令和元年収穫の試料は「1-4. 自然乾燥と機械乾燥を併用した乾燥」に使用した。

##### (2) 貯蔵後の再選別

第17改正日本薬局方<sup>3)</sup>（以下、「日局17」という。）の医薬品各条「シャクヤク」における生薬の性状を参考に、概ね次の規格に適合するものを選別し、試験に供した。

- ・太さ 直径1.0 cm～3.0 cm
- ・長さ 7 cm～30 cm
- ・側根を分離し（股割り）、腐り、虫害、変色が認められるもの、皮の剥離の著しいもの（部分）、細根及び根茎部は除外する。

##### (3) 洗浄

選別後の試料は、回転式洗浄機（図1）を用いて水のみで洗浄した。試料の根皮は剥かなかった。

##### 【回転式洗浄機の概要】

洗浄槽サイズ：幅120 cmの六角柱型（六角形の一边は40 cm）

回転数：約45 rpm

##### 【洗浄の条件】

- ・洗浄1回当たりのシャクヤク重量：約20 kg
- ・予備洗浄：水に浸漬10分間



図1 回転式洗浄機

・洗浄時間：計1分30秒（30秒洗浄で水の入換え）

#### 1-2. 根の切断による乾燥期間の短縮に係る検討

##### (1) 切断する長さ

乾燥期間の短縮を目的として、根を長さ3 cm又は6 cmにカットし、乾燥期間及び生薬の品質をカットしない場合と比較した。なお、切断する長さについて、出荷先予定企業との事前の協議により3 cm以上が要件であったが、切断面が褐変化する可能性及びカットする労力を考慮して6 cmでのカットも実施した。

##### (2) 切断する工程

切断した根の断面は湿度の高い条件下で褐変化するため、カットする工程の違いによる乾燥期間及び生薬の品質への影響を明らかにすることを目的として、洗浄後、乾燥前にカットする場合と、乾燥開始4日後（乾燥途中）にカットする場合で、比較した。

#### 1-3. 乾燥機による乾燥

##### (1) 乾燥機

大紀産業(株)製 1坪型循環式平型乾燥機 HK-200-3.3C（図2）

乾燥槽は、幅1800 mm、奥行1800 mm、深さ500 mm（底板の位置調節を下段に設定）のサイズで、底板の多数の穴から温風が上方向に送風される。

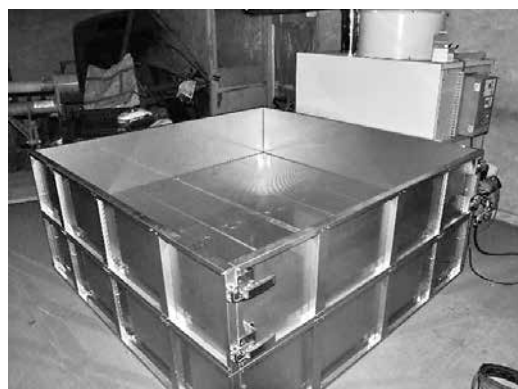


図2 試験に用いた平型乾燥機  
（循環用の幌状シートを外した状態）

##### (2) 乾燥方法

既報<sup>2)</sup>において、目標とする品質を満たす生薬の調製加工が可能であることを実生産規模で実証した次の方法により乾燥した。

##### 【乾燥槽への設置方法】

底面が網目の容器（外寸 幅×奥行×深さ：595×399×229 mm）に水洗済みのシャクヤク根を15 kgずつ入れ、この容器を乾燥槽内に1段当たり13個として2段に重ねて計26個を入れた。1回当たり

に乾燥できる生根は合計390 kgとなる。

#### 【加温乾燥前の無加温送風】

平型乾燥機による1回当たりの乾燥処理量390 kgの洗浄に要する時間は7時間程度であり、洗浄当日の夕方から乾燥機を稼働できるが、根の表面の余分な水分の除去と、急激な乾燥による表面硬化を和らげることを目的として翌日の朝までの16時間は無加温で送風した。

#### 【断続送風による乾燥】

無加温送風の後、乾燥機を下記の設定で稼働させた。基礎検討の結果<sup>4)</sup>から連続送風より断続送風の方が短い稼働日数で乾燥し、また、休止期間を利用して次ロットの乾燥も同時進行することを想定して、24時間の稼働につき同時間の休止を繰り返す断続送風乾燥とした。休止期間中は試料を乾燥機から取り出して室内で保管した。乾燥期間中は下記の要領で乾燥槽内の容器の位置を入れ換えた。

#### 【乾燥機の設定条件】

- ・温度：30℃
- ・風量（インバーター設定値）：50 Hz
- ・循環機能（排気口ダンパー開閉度）：1（全開放）
- ・乾燥槽循環用の幌状シート：設置

#### 【乾燥槽内の容器の入れ換え方法】

- ・48時間ごとに、①水平方向の位置、②上段、下段の位置を入れ換える。①は図3の規則に従う。
- ・①と②を同時に実施し、48時間ごとに同じ要領で入れ換えを繰り返す。
- ・位置の入れ換え時に、容器内のシャクヤクを混合する。

#### (3) 乾燥中の重量測定

乾燥機での乾燥期間中は容器ごとの重量を24時間ごとに測定した。また、乾燥槽内の容器の位置の違いによる乾燥の進行への影響の有無を確認した。

### 1-4. 自然乾燥と機械乾燥を併用した乾燥

#### (1) 根の切断

洗浄した「春の粧」の根を長さ3 cmにカットし、乾燥の経過及び得られた生薬の品質をカットしない場合と比較した。

#### (2) 自然乾燥

根を網皿に広げ、薬用植物指導センター送風乾燥室又はビニールハウスで、令和2年2月19日から40日間、乾燥した。乾燥期間中の温度及び湿度をデータロガー（株ティアンドデイ、RTR-507）で記録した。

#### (3) 乾燥機による仕上げ乾燥

自然乾燥の後、「1-3. 乾燥機による乾燥」に記載の平型乾燥機を用いて、30℃で6時間の温風乾燥を2回実施し、乾燥を完了した。ただし、屋内自然乾燥の「カット無」については、前述の仕上げ乾燥でも完了しなかったため、その後、除湿機を稼働した室内に保管して乾燥を完了した。

### 1-5. 乾燥完了の判定

日局17ではシャクヤクの乾燥減量は14.0%以下と規定されている。正式な乾燥減量の試験を実施するにはサンプリングした試料を粉末として6時間加熱乾燥する必要がある。乾燥現場では簡易に乾燥の完了を判定できる方法が必要である。そこで、別の乾燥サンプルを用いた検討により、木材用水分計（RiXEN社製M70-D）で13%以下であれば要件を十分に満たしたことから、これを乾燥完了の目安とした。なお、平成26年度から毎年実施している乾燥試験における乾燥完了時の乾燥歩留りは、「春の粧」では約45%、「梵天」では約50%である。

また、乾燥完了直前の状態から乾燥完了に達するまでは、乾燥機では燃料の浪費が大きいことから、除湿

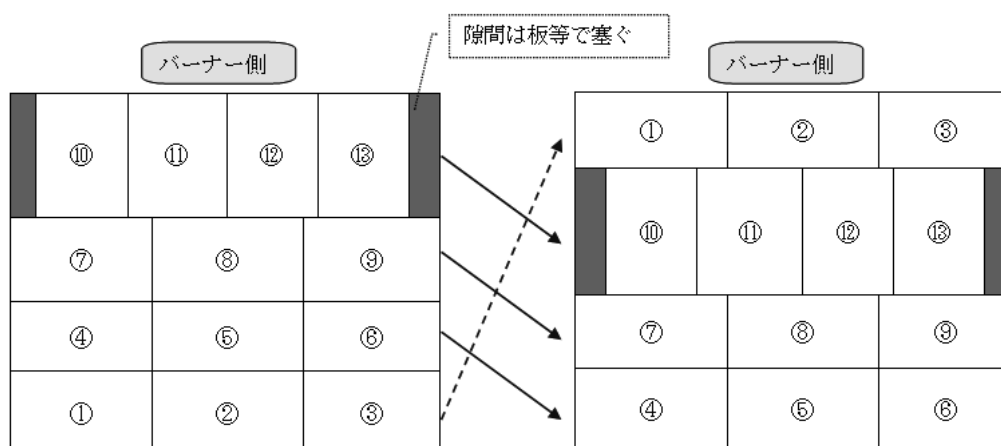


図3 乾燥槽内の容器の水平方向入れ換え規則（乾燥槽を上方から見た概略図）

器を稼働させた室内で保管することにより仕上げ乾燥を行った。乾燥完了直前の目安は、乾燥開始時を100%としたときの乾燥歩留まりが「春の粧」では約50%、「梵天」では約54%のときとした。

## 2. 白色度による評価

生薬シャクヤクは、市場では内部の色が白く充実したものが良品と評価されることから、ブランドイメージ形成のため、「富山シャクヤク」を白く仕上げることも目指し、白色度でも評価することとした。

乾燥したシャクヤク根500 gを細断後、粉碎して得られた粉末を試料とし、その色彩を分光色差計（日本電色工業(株)製 NF 555）で測定し、得られたL\*a\*b\*値からハンター氏白色度を求めた。10回の測定値の平均を結果とした。

## 3. 成分分析

### (1) エキス含量（乾燥エキス調製法）

乾燥したシャクヤク根の各粉末試料を用いて、日局17医薬品各条「シャクヤク」の定量法の抽出法に準じ、図4に従って乾燥エキスを作製した。この重量を生薬に対する含量%で表し、エキス含量とした。

### (2) 主要10成分の定量法

各粉末試料について、シャクヤクの主要10成分（ペオニフロリン、アルビフロリン、オキシペオニフロリン、ベンゾイルペオニフロリン、ペンタガロイルグルコース、没食子酸、没食子酸メチル、カテキン、安息香酸、ペオノール）を次の方法により定量した。

日局17の定量法に準じて試料溶液を調製し、下記

条件により分析した。各成分の定量値は、換算した生薬の乾燥物に対する含量%とした。

分析機器：UPLC（Waters社製 H-class）

検出器：PDA（検出波長：232,280,257 nm）

カラム：ACQUITY UPLC HSS C18 1.8 μm  
(2.1×50 mm)

カラム温度：25℃

移動相：A：薄めたリン酸（1→1000）

B：アセトニトリル

### グラジエント条件

| 時間 (min) | 流量 (mL/min) | %A | %B  | 曲線 |
|----------|-------------|----|-----|----|
| 0        | 0.49        | 95 | 5   |    |
| 1.1      | 0.49        | 75 | 25  | 3  |
| 2.5      | 0.49        | 10 | 90  | 6  |
| 3.0      | 0.49        | 0  | 100 | 6  |
| 3.2      | 0.49        | 0  | 100 | 6  |
| 3.4      | 0.49        | 95 | 5   | 6  |

注入量：0.5 μL

内標準物質 (IS)：ケルセチン (4.8 μg/mL)

## 4. 日本薬局方「シャクヤク」の規格試験

令和元年に収穫した「春の粧」を3 cmに切断し、平型乾燥機で乾燥して得た生薬について、日局17の方法に従い、以下の規格試験を実施した。

①生薬の性状、②確認試験（(1)呈色、(2)TLC）、③純度試験（重金属）、④乾燥減量、⑤灰分、⑥酸不溶性灰分、⑦ペオニフロリン含量

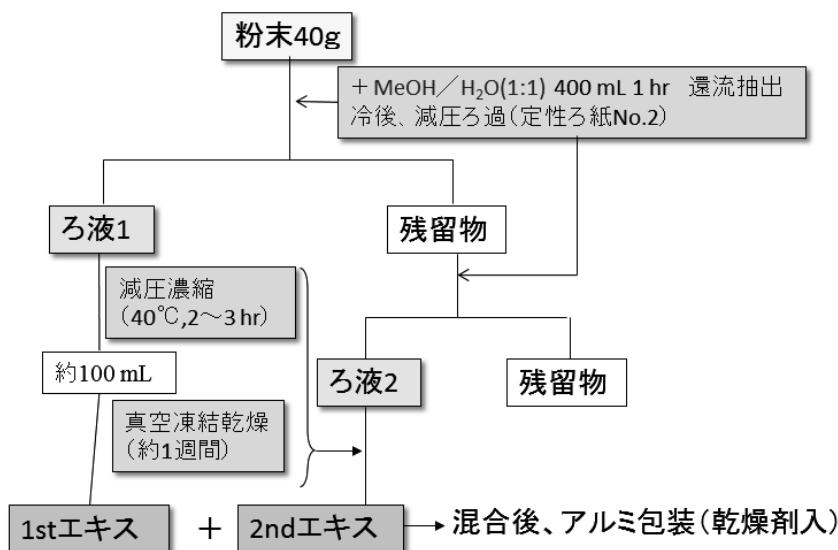


図4 シャクヤク乾燥エキスの調製法

## 結 果

### 1. 乾燥機による乾燥

#### (1) 根のカットによる乾燥期間短縮効果

「春の粧」を用いて、加温乾燥開始4日後に3 cm又は6 cmにカットして乾燥したときの重量変化を図5に示す。乾燥歩留まりが約50%に達する（乾燥完了直前の状態）までの期間で評価した結果、「カット無」が14日であるのに対して「3 cmカット」では12日で、乾燥期間を2日間短縮可能であった。「6 cmカット」については、乾燥効率の向上効果は認められなかった。

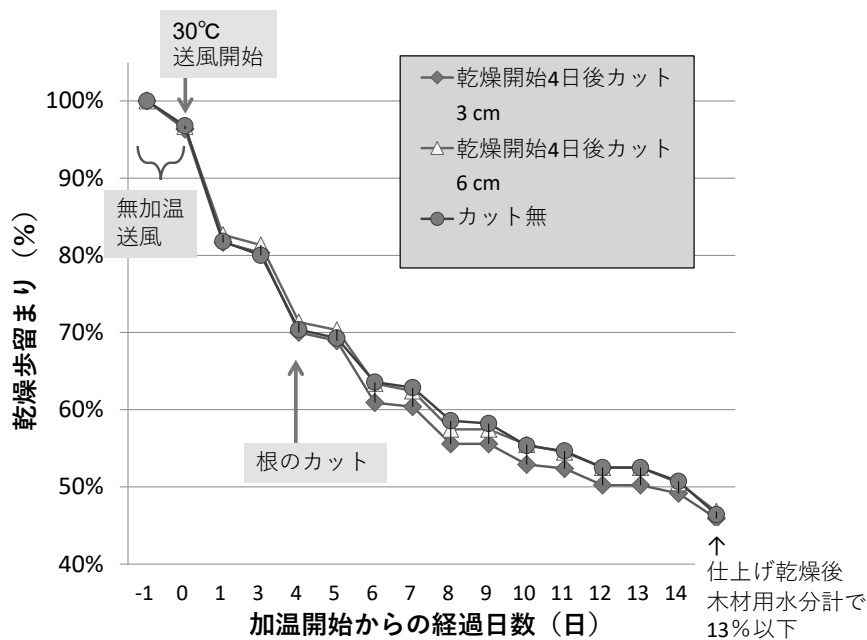


図5 シャクヤク根の乾燥に伴う重量変化（品種：春の粧）

乾燥した試料の外観及び輪切りの写真を図6に示す。カットした断面を含む外観及び輪切りしたときの断面を目視で確認したところ、どのサンプルにも問題となるような変色又は変化は認められなかった。

#### (2) 根をカットする工程の検討

「梵天」を用いて、乾燥前に3 cm又は6 cmにカットした場合と、加温乾燥開始4日後に同様にカットした場合の重量変化を図7に示す。乾燥歩留まりが約54%に達する（乾燥完了直前の状態）までの期間で評価した結果、「カット無」が14日であるのに対して、カットする工程に関わらず「3 cmカット」では12日で、乾燥期間を2日間短縮可能で

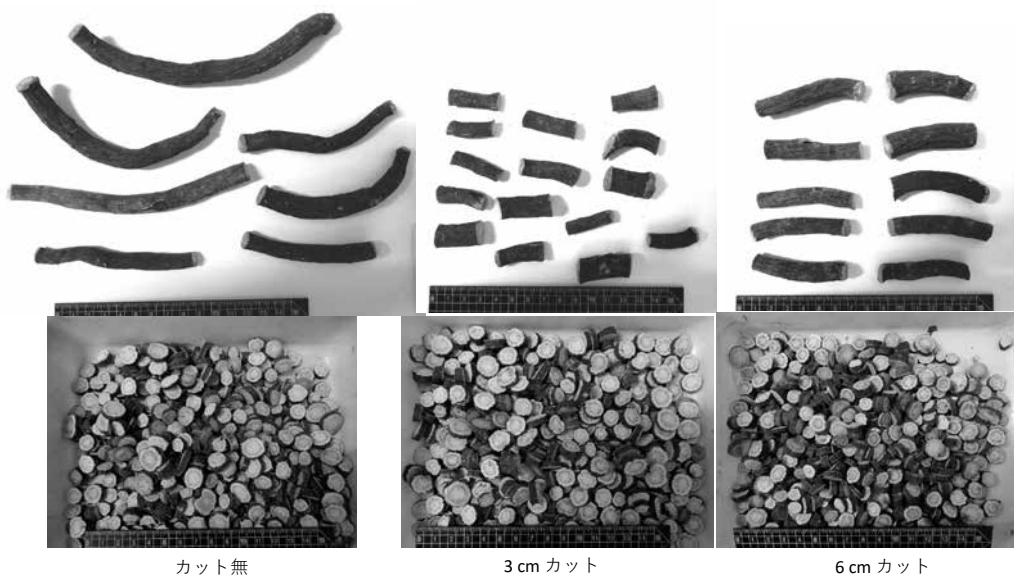


図6 乾燥した試料の外観

あった。「6 cmカット」については、乾燥効率の向上効果は認められなかった。

外観評価では、どちらの工程でカットしても問題となるような変色又は変化は認められず、工程の違いによる差もなかった。

(3) 乾燥槽内の位置の違いが乾燥の進行に及ぼす影響

乾燥機での乾燥期間中の24時間ごとの「春の粧」及び「梵天」の重量について、乾燥槽内の上段と下段の比較、水平方向の位置の比較を行った結果（データ掲載なし）、いずれの重量差も重量の2%未満であり、乾燥の進行への影響はなかった。加温乾燥開始から24時間後の重量については、全体的に上段より下段の方が軽い傾向があったが、その後、全ての位置で同様に乾燥が進行した。

(4) カットして乾燥した生薬の白色度

「富山シャクヤク」の目標とする規格を、目視で

白色と認識できる「白色度60以上」として設定した。

加温乾燥開始4日後に3 cm又は6 cmにカットして乾燥した「春の粧」の粉末試料の白色度については、「カット無」の70.8に対して「3 cmカット」では69.9で同等で、「6 cmカット」では66.5でやや低かったが、いずれのサンプルも目標値を超えた（図8）。

同様に乾燥開始4日後にカットした「梵天」の白色度については、「カット無」の69.8に対して「3 cmカット」及び「6 cmカット」はそれぞれ69.5及び68.8で同等となり、カットの有無及びその長さの影響は見られなかった。一方、乾燥前にカットした場合、「3 cmカット」及び「6 cmカット」はそれぞれ71.5及び71.0で同等となり、いずれの長さでもやや高くなった。

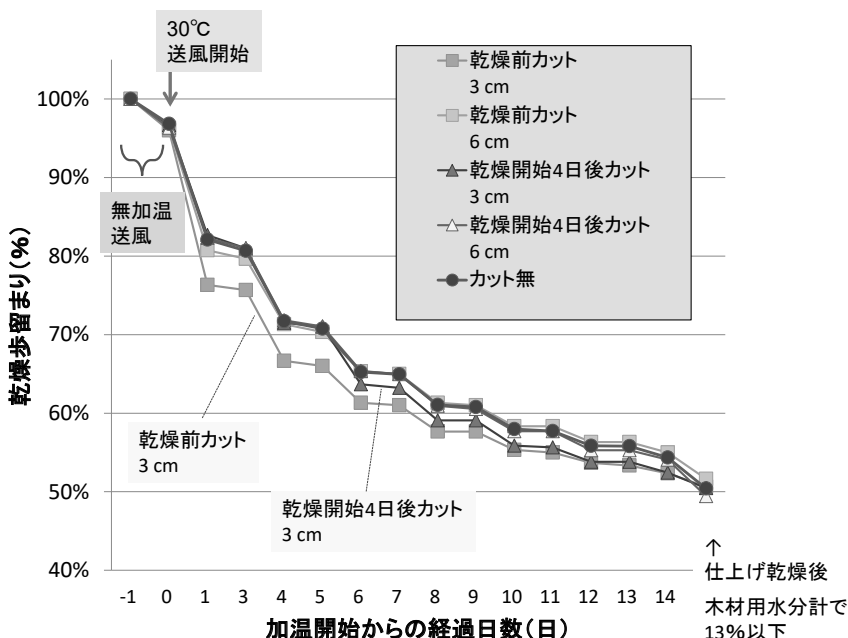


図7 シャクヤク根の乾燥に伴う重量変化（品種：梵天）

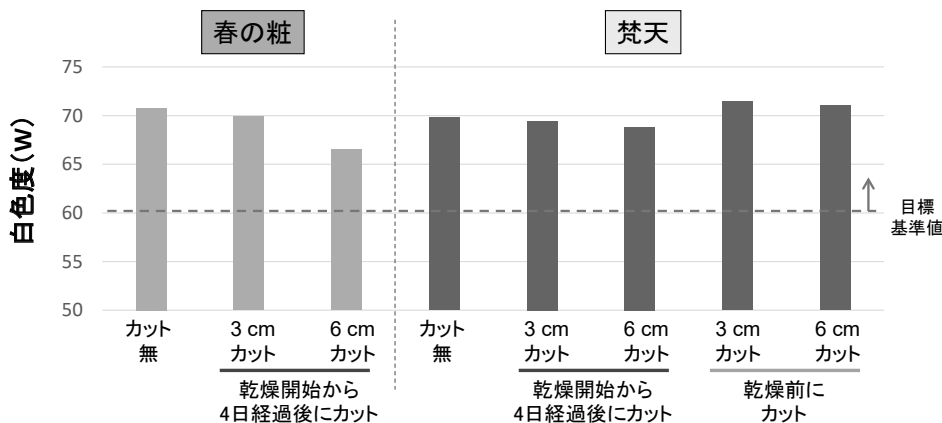


図8 乾燥した試料（粉末）の白色度



#### (5) カットして乾燥した生薬のエキス含量

エキス含量は、生薬中の成分を溶媒で抽出した重量の割合で、日局17ではシャクヤクに試験は設定されていないが、エキス製剤の収量に大きく影響するため重要な項目である。一般に高い方が生薬使用企業からの評価は高くなるが、企業によって求める規格値は異なる。調製加工の方法をコントロールすることにより企業が求めるエキス含量に調整できる可能性もあり、カットによる変動を検討した。

加温乾燥開始4日後に3 cm又は6 cmにカットして乾燥した「春の粧」のエキス含量については、「カット無」の51.0に対して「3 cmカット」及び「6 cmカット」はそれぞれ50.2及び51.4で同等で、カットの有無及びその長さの影響は見られなかった（図9）。また、「梵天」を用いて検討した、カット工程及びカット長さの違いがエキス含量に及ぼす影響については、いずれのサンプルも「カット無」と同等であり、カットの有無、工程及び長さの影響は見られなかった。

#### (6) カットして乾燥した生薬の主要成分含量

生薬シャクヤク中のペオニフロリン含量は日局17で2.0%以上であることが規定されているが、実需者からはさらに高含量の生薬が要望されていることから、「富山シャクヤク」の規格を3.0%以上としている。

加温乾燥開始4日後に3 cm又は6 cmにカットして乾燥した「春の粧」の主要成分含量については、「カット無」と同等であったことから、カットの有無及びその長さの影響は見られなかった（図10）。また、「梵天」を用いて検討した、カット工程及びカット長さの違いがエキス含量に及ぼす影響については、いずれのサンプルも「カット無」と同等であ

り、カットの有無、工程及び長さの影響は見られなかった。

#### (7) カットして乾燥した生薬の日局規格試験

試験結果は図11に示すとおり、全て適合であった。今回実施できなかったヒ素の純度試験については、今後実施予定である。

## 2. 自然乾燥と機械乾燥を併用した乾燥

### (1) 乾燥期間中の乾燥場所の温湿度

屋内自然乾燥では、温度は0～約20℃の範囲で、湿度は約50%～約100% RHの範囲で経過した（図12）。一方、ビニールハウスでは、温度は0～約40℃の範囲で、湿度は約20%～約100% RHの範囲で推移した（図13）。

### (2) 乾燥中の重量変化及び3 cmカットの影響

乾燥期間中の各サンプルの重量変化を図14に示す。屋内自然乾燥及びビニールハウス乾燥のいずれでも、3 cmカットにより乾燥が早く進行した。屋内自然乾燥について30日後の乾燥歩留りで比較すると、「カット無」の60.2%に対して「3 cmカット」は50.8%で、乾燥完了直前の状態（約50%）となった。「カット無」では40日後でも55.8%で、乾燥完了直前の状態には至らなかった。ビニールハウス乾燥について20日後の乾燥歩留りで比較すると、「カット無」の57.5%に対して「3 cmカット」は50.8%で、乾燥完了直前の状態となった。なお、「カット無」では30日後に50.8%となり、乾燥完了直前の状態となった。

### (3) 乾燥して得た生薬の目視検査

カットした断面を含む外観及び輪切りしたときの断面を目視で確認したところ、全ての生薬サンプルについて、問題となるような変色又は変化は認めら

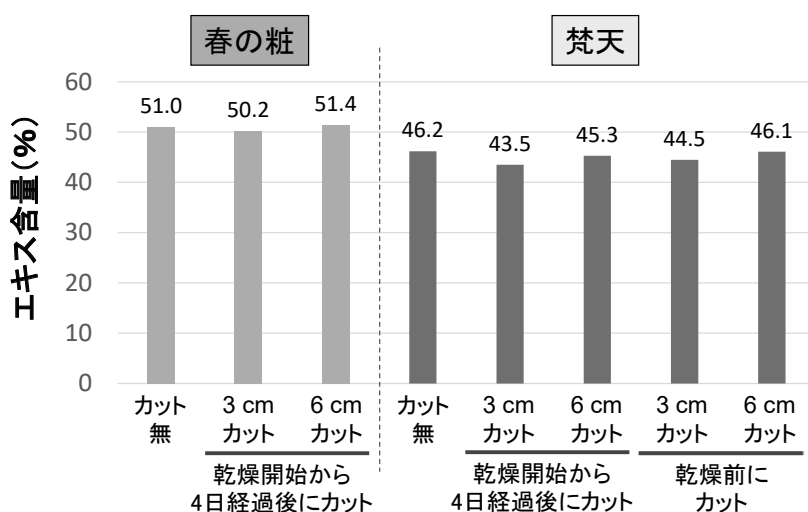


図9 カットして乾燥した生薬のエキス含量

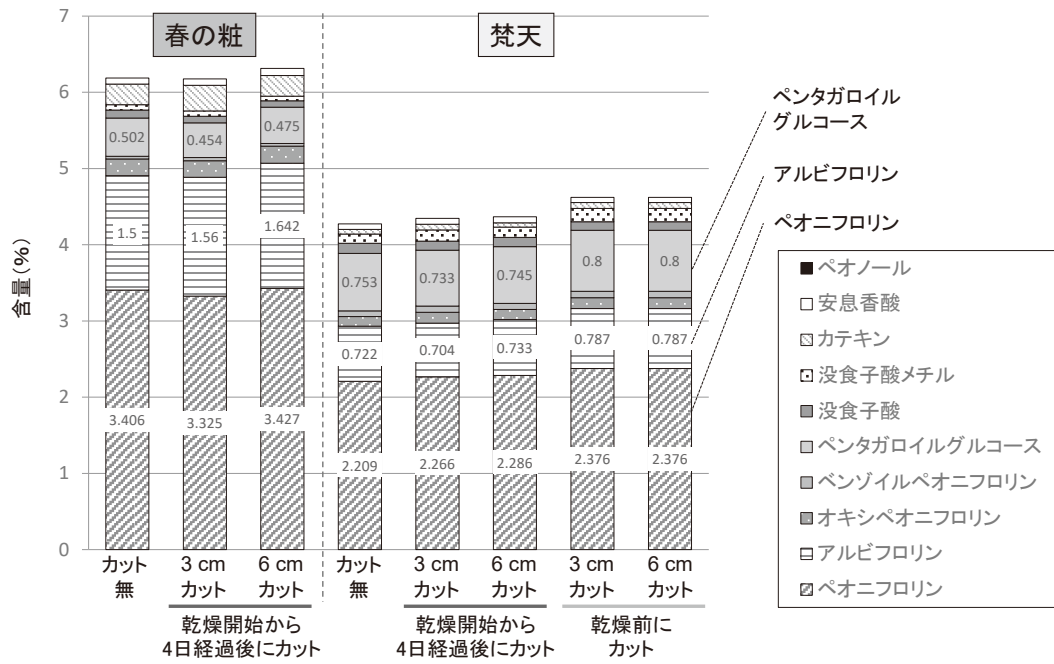


図10 カットして乾燥した生薬の主要成分含量

| 試験項目            | 規格値等           | 測定値等           | 判定 |
|-----------------|----------------|----------------|----|
| 生薬の性状           | —              | —              | 適合 |
| 確認試験(呈色)        | 青紫色～青緑色        | 青紫色～青緑色        | 適合 |
| 確認試験(TLC)       | 色調(紫色)、Rf値が等しい | 色調(紫色)、Rf値が等しい | 適合 |
| 純度試験(重金属)       | 10ppm以下        | —              | 適合 |
| 乾燥減量            | 14.0%以下        | 8.09%          | 適合 |
| 灰分              | 6.5%以下         | 2.82%          | 適合 |
| 酸不溶性灰分          | 0.5%以下         | 0.07%          | 適合 |
| ペオニフロリン含量(HPLC) | 2.0%以上         | 3.58%          | 適合 |

図11 3 cmカットして乾燥した生薬の日局規格試験の結果 (春の粧)

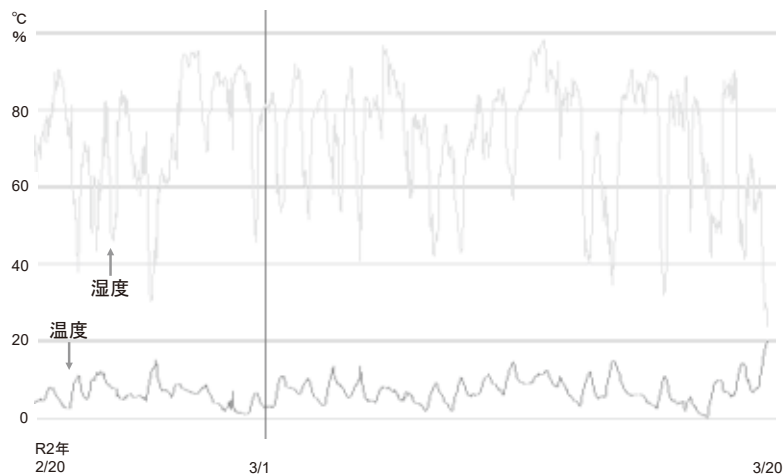


図12 屋内自然乾燥における温湿度経過

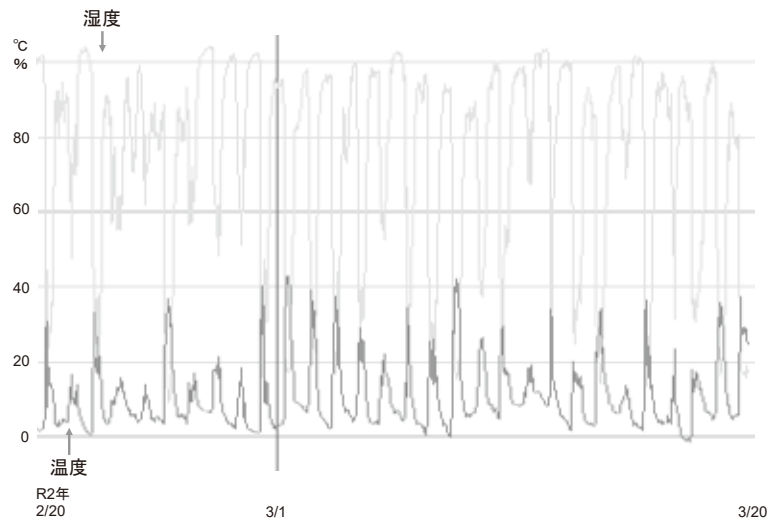


図13 ビニールハウス乾燥における温湿度経過

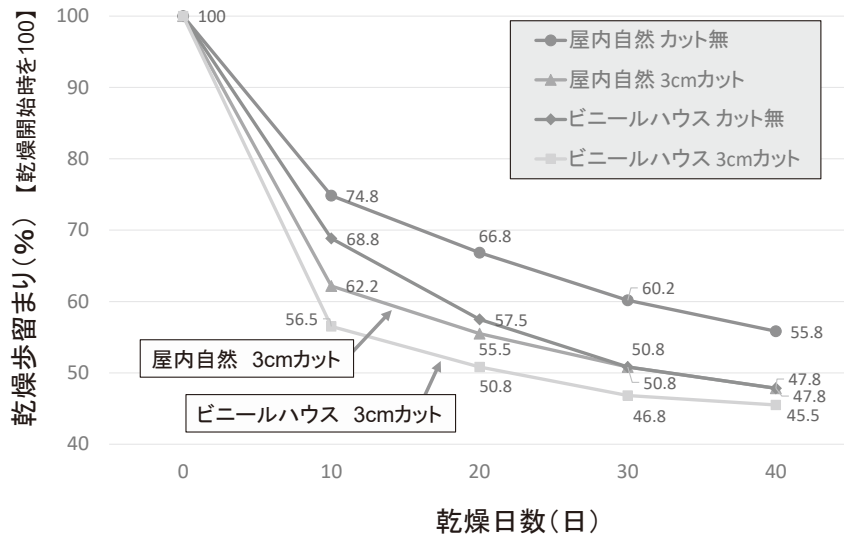


図14 自然乾燥中の重量変化 (春の粧)

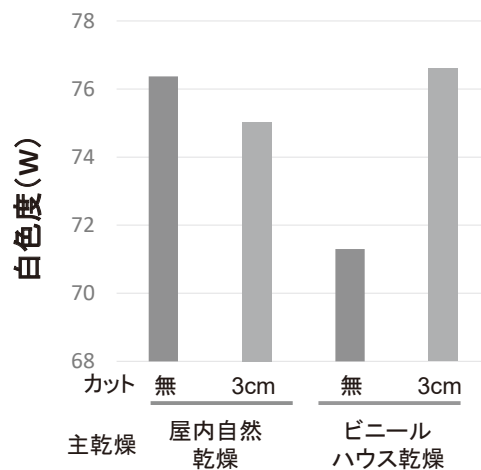


図15 自然乾燥と機械乾燥を併用して乾燥調製した試料 (粉末) の白色度 (春の粧)

れなかった。

#### (4) 乾燥して得た生薬の白色度

屋内自然乾燥及びビニールハウス乾燥により得た生薬の白色度を図15に示す。乾燥場所及び3cmカットの有無に関わらず、全てのサンプルで目標規格の60を超え、70以上であった。屋内自然乾燥では3cmカットによる影響はなかったが、ビニールハウス乾燥では「3cmカット」の76.6に対して、「カット無」は71.3と、減少した。

#### (5) 乾燥して得た生薬の主要成分含量

屋内自然乾燥又はビニールハウス乾燥により得た生薬の主要成分含量は、全てのサンプルについて、対照とした平型乾燥機による乾燥品と同等であった(図16)ことから、自然乾燥の場所の違い及び3cmカットの影響は見られなかった。

### 考 察

現在、県内で栽培されているシャクヤク品種「梵天」は、奈良県では伝統的な調製加工法により根の周皮を剥いて自然乾燥することが要求されるが、本県では乾燥時期の積雪で多湿となり品質の劣化(外面の褐変化や中心部の変質に伴う成分変化)が発生するリ

スクが高いことから、未乾燥の生薬で出荷されている<sup>5)・6)</sup>。一方、令和4年度に初収穫を予定しているブランド用品種「春の粧」は、生産者側で皮付の状態乾燥調製して出荷することが決定している。そのため、県内生産者等で組織する「富山型薬用作物生産協議会」は、乾燥機を用いて高品質な生薬を短期間で生産することを目指して、シャクヤク用に改良した平型乾燥機を導入した(平成26年度、国の薬用作物産地確立支援事業を活用)。しかし、シャクヤクを乾燥するために必要な条件や期間等が不明であったため、我々は当該乾燥機を用いて実生産規模での乾燥調製法を確立した<sup>2)</sup>。今回は、さらに効率的な方法に改良することを目指して、根を切断して乾燥する方法や、自然乾燥と機械乾燥を併用した方法で乾燥試験を実施した。

平型乾燥機での乾燥については、乾燥完了までの期間が短縮できれば、乾燥機の稼働時間の減少によるコスト削減に加えて、乾燥期間内(11月～3月)における乾燥回数の増加、すなわち生薬処理量の増加が可能となる。そこで、切断した根をサンプルとして、確立した乾燥調製法(30℃)により乾燥した場合に、生薬への品質に影響なく乾燥期間を短縮できるかどうか、「春の粧」で実験した。カットする長さを3cm又は6cmとして対照(カット無)と比較した結

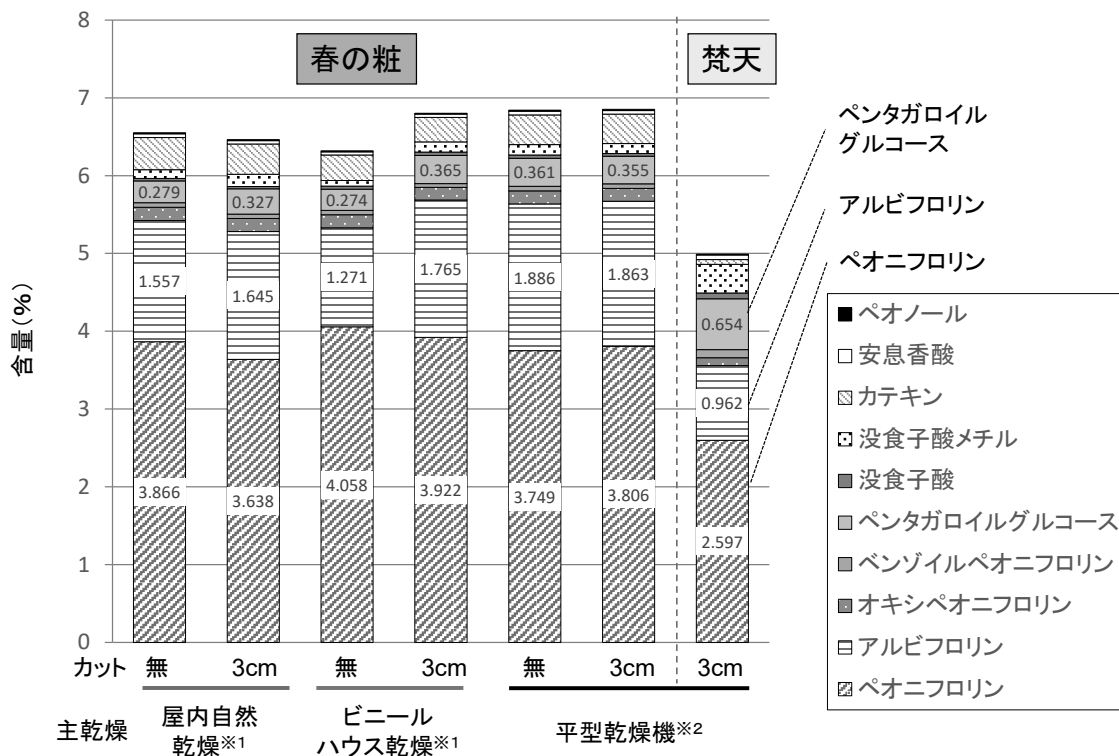


図16 自然乾燥と機械乾燥を併用して乾燥調製した生薬の主要成分含量

※1 屋内自然乾燥又はビニールハウス乾燥の後、平型乾燥機で仕上げ乾燥(30℃で6時間×2回)  
 ※2 1日のうち7h稼働、17h休止のプログラムで17回稼働し、休止日を含む23日間で乾燥(30℃)

果、「3 cmカット」だけが有効であった。その効果は、品質に影響なく乾燥期間が2日間短縮（乾燥機稼働日数としては7日から6日に短縮）し、乾燥1回当たりの消費灯油量としては外気温等により変動するが30～40L程度が削減できた。これを10アール当たりの目標収量（生根3トン）で試算すると、約27,000円（生薬売却による粗収入に対して約2.3%の金額）のコストダウンとなるが、さらにコストを削減するための方法も現在検討中である。これは、カットにより見かけ比重（かさ比重）が大きくなり乾燥槽に入れる生根を増量できることを利用したもので、前述の金額を含めて75,000円以上のコストダウンを見込んでいる。一方で、カット作業にはコストを要することとなり、すぐに利用できる機械も整備されていないため、実生産での本乾燥法の活用については今後の生産拡大に応じて検討する必要がある。

次に検討したカットする工程については、洗浄後すぐに実施すると運搬作業のロスが無いと考えられるが、根の切断面に水滴が付着するような条件下では褐変化による外観及び成分の品質低下が懸念されたため、乾燥開始4日後にカットする試験群を設定し、工程の違いによる乾燥期間及び生薬の品質への影響を調査した。その結果、前述の「3 cmカットにより品質に影響なく乾燥期間が2日間短縮」という効果はカット工程の違いに関わらず確認でき、乾燥前にカットした場合に懸念された品質の低下は認められなかった。乾燥試験では、根を洗浄後に順次カットし、乾燥用の容器（底面及び側面が網目状）に入れ、室内で保管していたが、最初にカットした根については無加温送風開始まで約8時間が経過していた。褐変化については、ポリフェノールオキシダーゼ（PPO）によるフェノール性化合物の変色反応の可能性が指摘されており<sup>7)</sup>、PPO活性の至適温度は約30℃であるとの報告<sup>8)</sup>から、今回のサンプルでは保管温度が低かったために酵素反応がほとんど進行しなかったことが推察された。

冬の自然乾燥が不向きである本県の気象条件において、乾燥機により乾燥条件を一定にすることで、品質の生産年次変動を抑え、高品質な生薬を安定して生産できるよう、これまでに乾燥機での乾燥調製法を確立した。この方法は、大量の生根（3トン以上）を計画的に複数回に分けて乾燥期間内に乾燥する方法としては有効であるが、令和4年度から6年度までの「春の粧」の乾燥出荷予定農家は比較的小規模であり、所有するビニールハウスや作業所を利用してコストを抑えた乾燥法を要望している。そこで、自然乾燥と機械乾燥を併用した低コスト乾燥法を確立することを目指

して、当センターにおいて屋内自然乾燥又はビニールハウス乾燥の後、平型乾燥機で仕上げ乾燥を実施した。その結果、得られた生薬中の主要成分含量は、いずれの乾燥方法でも対照とした平型乾燥機による乾燥品と同等であり、高品質生薬が生産可能であることを確認した。ただ、カットせずに乾燥した生薬粉末の白色度については、屋内自然乾燥の76.4に対して、ビニールハウス乾燥では目標規格の「60以上」を満たしたものの、71.3と低下した。同じビニールハウス乾燥でも「3 cmカット」のサンプルでは低下しなかったことから、「カット無」では乾燥に時間がかかり根の内部に水分が多い状態で30℃以上となり変色に係る酵素反応が進行したこと、また風通しが比較的悪かったことが影響したものと考えられた。

今回得られた自然乾燥中の重量変化の結果等を基に、自然乾燥と機械乾燥を併用した乾燥法として、下記の目安を提案する。ただし、当センターにおける2月19日に乾燥を開始した事例を基にしているため、開始時期や気象の年次変動により乾燥期間や品質への影響は異なると考えられる。今後は、当該乾燥法による農家での乾燥調製が実施される前に、実際に現地で予定している方法で試験乾燥し、生薬の品質を確認する予定である。

#### 【自然乾燥と機械乾燥を併用した乾燥法】

- 1 自然乾燥として次のいずれかの方法で乾燥する。
  - (1) カットしない場合
    - ①屋内自然条件下で40日以上乾燥
    - ②ビニールハウスにおいて約30日間乾燥  
※白色度がやや低下する可能性あり
  - (2) 3 cmカットする場合
    - ①屋内自然条件下で約30日間乾燥
    - ②ビニールハウスにおいて約20日間乾燥
- 2 自然乾燥の後（自然乾燥終了の目安：乾燥歩留りが約50%）、仕上げ乾燥として平型乾燥機等を用いて30℃、6時間の乾燥を2回行う（2回目は1回目終了から18時間以上経過後）。
- 3 仕上げ乾燥後は、出荷まで高温高湿の環境を避けて保管する。

「春の粧」の栽培法に関しては、植付時の苗重量と株間の最適条件（2条植の場合）をこれまでに明らかにし<sup>9)</sup>、現在は切花用に採花した場合の根の収量及び品質への影響を調査することにより切花との兼用栽培法を検討している。また、平型乾燥機での乾燥に関しては、乾燥処理量の向上や容器の入れ換え作業の省略等による軽労化を検討している。今後はこれらの成果

を活用し、さらに富山シャクヤクの生産振興とブランド化を推進したいと考えている。

## 文 献

- 1) 川筋透, 田村隆幸, 横田洋一, 宮本(山口)朋美, 本田裕恵, 竹林憲司, 大江勇, 高田正明, 松永孝之: 富山シャクヤクのブランド化推進事業報告(平成24-26年度) 選抜品種の特性比較, 富山県薬事研究所年報, 43, 29-34 (2015)
- 2) 田村隆幸, 東一彦, 大江勇, 横田洋一, 竹林憲司: 富山シャクヤクのブランド化推進事業 一実生産規模乾燥調製法の実証と調製加工における成分変動一, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 46, 13-19 (2018)
- 3) 厚生労働省: 第17改正日本薬局方, 1817 (2016)
- 4) 田村隆幸, 高田正明, 大江勇: 実生産規模でのシャクヤクの乾燥調製を目指した基礎検討, 富山県薬事研究所年報, 42, 33-38 (2014)
- 5) 公益財団法人日本特産農産物協会: 地域特産作物(工芸作物, 薬用作物及び和紙原料等)に関する資料(平成29年産), 14 (2019)
- 6) 村上守一: 富山のシャクヤク栽培, 和漢薬, 753 (2016)
- 7) 林隆章, 桂英二, 金島弘恭, 山岸喬: 芍薬の科学的变化(第5報), 芍薬の変色について, 道衛研所報, 33, 35-38 (1983)
- 8) 松永孝之, 田村隆幸: シャクヤクの褐変化反応について, 富山県薬事研究所年報, 44, 27-31 (2016)
- 9) 田村隆幸, 東一彦, 大江勇, 寺崎さち子, 川筋透, 竹林憲司, 横田洋一, 米田哲也, 小笠原勝, 小木曾英夫: 富山シャクヤクのブランド化推進事業 一ブランド品種「春の粧」に適した栽培法の検討一, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 47, 17-21 (2019)

# 高度分析機器を用いたバイオ医薬品の特性解析法の検討

小島 理恵子

## Investigation on analytical methods of biopharmaceutical products using advanced analytical instruments

Rieko KOJIMA

### 要 約

本研究は、近年国内外で開発が加速されているバイオ医薬品に関する製薬企業からの新たなニーズを見据えて、富山県薬事総合研究開発センターにおいてバイオ医薬品の解析技術を確認することを目的とする。R1年度までに、NISTmAb（モノクローナル抗体の標準品 RM8671）を対象とした特性解析法の検討を行い、所有する液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置（LC-TOF/MS）を使ったインタクト解析、サブユニット解析、ペプチドマッピング等の特性解析技術を確認してきた。R2年度は、①バイオ医薬品の生物活性や安定性に影響を及ぼす糖鎖について、キャピラリー電気泳動を使った解析法の検討、②バイオ医薬品（G-CSF製剤）を対象とした解析法の検討、を行ったので報告する。

### Summary

The biopharmaceutical industry has increased significantly over recent years and is believed to have great potential for further development. In this study, we aimed to establish the analytical methods of biopharmaceuticals, especially therapeutic proteins, for technical support of pharmaceutical companies in Toyama prefecture. Here we investigated glycosylation profile of NISTmAb (standard monoclonal antibody RM8671) using capillary electrophoresis. We also applied the analytical methods we have established so far to G-CSF formulation (filgrastim) and optimized the methods.

### 緒 言

バイオ医薬品は、従来の化学合成医薬品と比べて分子量がはるかに大きく、複雑な構造を持つ。バイオ医薬品は遺伝子組換え技術や細胞培養技術により生産されるため、糖鎖修飾等の様々な翻訳後修飾を受け、不均一性を生ずる。翻訳後修飾に伴う不均一性は、タンパク質の活性、すなわち、薬剤としての機能に影響を及ぼすことがあるため、バイオ医薬品の取り扱いには適切な品質評価と管理が求められる。医薬品規制調和国際会議（ICH）や厚生労働省から公示されているガイドライン<sup>1,2)</sup>においても、バイオ医薬品は従来の化学合成医薬品と比して、多角的で複雑な解析が必要とされている。創薬研究開発センターでは、製薬企業へ技術的な支援を行うことを目的として、液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置（LC-TOF/MS）を用いたバイオ医薬品の品質特性解析法の検討を行っている。これまでに解析対象としてNIST（米国国立標準技術研究所）が開発したモノクローナル抗体標準品NISTmAb（RM8671）を選定し、インタクト解析、サブユニット解析、ペプチドマッピング等の特性解析法のプロトコル作成およびプロトコルの改良を

行ってきた<sup>3,4)</sup>。本研究では、LC-TOF/MS解析において感度およびイオン化効率が低く解析が困難であったNISTmAbの遊離糖鎖について、キャピラリー電気泳動を使った解析法を検討したので報告する。また、抗体以外のバイオ医薬品（製剤）に対してこれまでに培った解析技術を応用し、G-CSF製剤（フィルグラスチム）の解析法を確認したので報告する。

### 方法及び結果

#### 1. NISTmAbの遊離糖鎖解析

遊離糖鎖解析は、タンパク質に修飾された糖鎖をグリコシダーゼ処理や化学的な方法により切り出し、糖鎖の種類や割合を解析する手法である。糖鎖はその種類によってはタンパク質の生物活性に影響を与え、特に抗体医薬品ではADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity: 抗体依存性細胞障害)、CDC (Complement Dependent Cytotoxicity: 補体依存性細胞障害) 活性が変動するため、重要な品質評価項目である。

NISTmAbには50種類近いN型糖鎖が修飾されることが報告されている<sup>5,6)</sup>が、G0F、G1F、G2F<sup>a)</sup>の

3種類がメジャーな糖鎖成分であり、残りはマイナーな糖鎖成分から構成される。NISTmAbの遊離糖鎖をGlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit (Waters社)を用いて調製し、LC-TOF/MSにより解析したところ、メジャー成分であるG0F、G1F、G2Fの検出および解析は可能だったが、マイナー成分はほとんど解析できなかった(図1A)。一般的に糖鎖はイオン化効率が低いことが知られている。また、LC-TOF/MSを使った解析では糖鎖構造の推定は可能だが、MS/MS測定を繰り返すMS<sup>n</sup>測定機能を有してい

ないため、糖鎖構造を決定することは困難である。したがって、糖鎖を感度良く検出しプロファイルを解析するには、LC-TOF/MS以外の解析法が有効であると考えられた。そこで、キャピラリー電気泳動装置を用いたNISTmAb遊離糖鎖の解析法を検討した。遊離糖鎖の標識および精製は、Fast Glycan Labeling and Analysis Kit (SCIEX社)を使用し、SCIEX社のプロトコルに従って行った。その結果、メジャーな糖鎖ならびに数種類のマイナーな糖鎖が検出され、LC-TOF/MSでの遊離糖鎖解析と比較して、高感度かつ

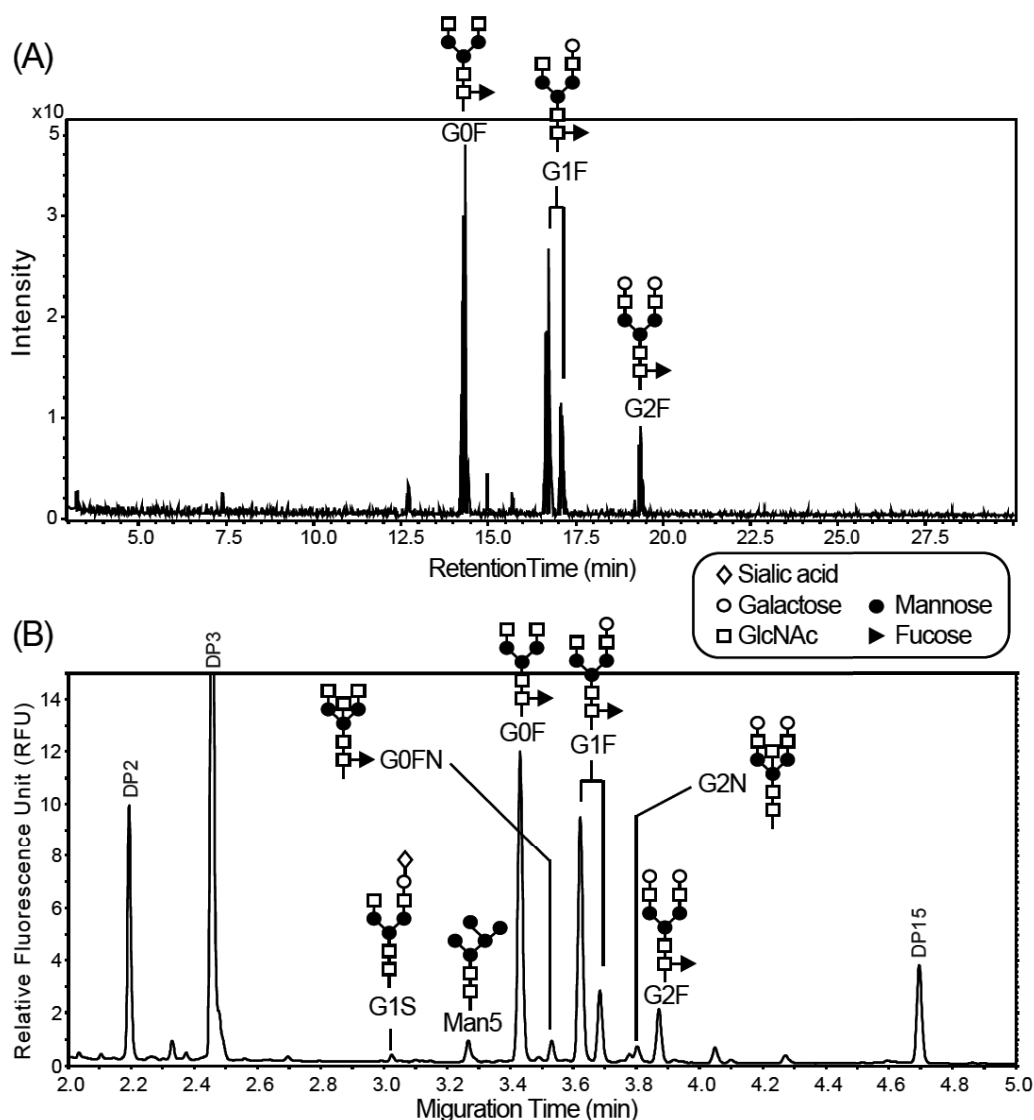


図1 NISTmAbの遊離糖鎖解析

- (A) NISTmAb遊離糖鎖のトータルイオンクロマトグラム。NISTmAbから遊離糖鎖をGlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit (Waters社)を用いて調製し、LC-TOF/MS解析を行った(リニアグラジエント溶出)。使用カラム: AQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130 Å 1.7  $\mu$ m 2.1x150 mm(Waters社)、移動相A: 50 mM ギ酸アンモニウム、移動相B: アセトニトリル。
- (B) NISTmAb遊離糖鎖のキャピラリー電気泳動チャート。NISTmAbから遊離糖鎖をFast Glycan Labeling and Analysis Kit (SCIEX社)を用いて調製し、キャピラリー電気泳動を行った。使用キャピラリー: 50  $\mu$ m I.D., 全長 300 mm, 検出: LIF (Laser-induced Fluorescence) Excitation: 488 nm/Emission: 520 nm, 注入: 1.0 kV, 5.0 sec, 分離: 30.0 kV, 5.25 min。DP2, DP3, DP15は糖鎖標準品。



短時間で糖鎖の検出および解析が可能になったことが確認できた(図1B)。しかしながら、現段階では検出できる糖鎖の種類が少ないため、今後、試料調製法や測定・解析条件の検討を行い、糖鎖の同定数を上げる必要がある。

- a) ガラクトースを含まないN型糖鎖をG0, 1つあるいは2つのガラクトースを含むものをそれぞれ, G1, G2とし, さらにフコースが付加されたものをG0F, G1F, G2Fと表す。

## 2. G-CSF製剤のLC-TOF/MS解析

これまで当センターではNISTmAbを対象とした解析法<sup>3,4)</sup>を検討してきたが、実利用においてはバイオ医薬品の製剤そのもの(製品形態)や抗体以外の種々のタンパク質が解析対象となる。タンパク質は分子量が大きく複雑な構造を持つため、安定性や親水性、電気的性質等は個々のタンパク質で大きく異なる。したがって、タンパク質の性質に合わせた前処理、LCの分離・溶出条件、測定法の調整がその都度必要となる。そこで、①当センターのLC-TOF/MSを用いてモノアイソトピック質量<sup>b)</sup>が測定可能な30kDa以下の分子量を持つこと、②抗体以外のバイオ医薬品であること、③富山県内の製薬企業に対する支援を目的とすること等を考慮し、G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor, 顆粒球コロニー形成刺激因子)製剤の特性解析をLC-TOF/MSを用いて行った。G-CSFは骨髄中の好中球前駆細胞に存在するG-CSF受容体に結合し、好中球前駆細胞から好中球への分化を促進することで、末梢血中の好中球数を増加させる働きを持つことから、がん化学療法による好中球減少、再生不良性貧血などの治療に用いられる。国内では複数のG-CSF製剤が販売されているが、本研究では、ヒト膀胱細胞由来のG-CSF遺伝子発現により組換え体(大腸菌)で産生されるG-CSF製剤のフィルグラスチムを解析対象とした。フィルグラスチムのG-CSFは175個のアミノ酸残基から構成される比較的小さなタンパク質(C<sub>845</sub>H<sub>1339</sub>N<sub>223</sub>O<sub>243</sub>S<sub>9</sub>, 約19kDa)を主成分とし、添加剤として、ポリソルベート80, D-マンニトール, pH調整剤として、酢酸ナトリウム等を含有した注射剤である。

フィルグラスチム注射剤原液をLC-TOF/MSに注入し、インタクト解析<sup>c)</sup>したところ、9min付近にG-CSFのピークが溶出したが、その他に添加剤成分に由来すると考えられる夾雑ピークも複数認められた(図2A)。これらの夾雑ピークは解析に影響する可能性があるため、脱塩処理により添加剤成分の除去を試みたが、脱塩カラムの成分に由来すると考えられる別の夾雑ピークが増加する結果となった(図2B)。

そこで、カラムを通さず、アセトン沈殿による精製を試みたところ、大部分の夾雑ピークを除くことができ(図2C)、G-CSF製剤の前処理にはアセトン沈殿が有効であることが分かった。デコンボリューション<sup>d)</sup>後の質量スペクトルからは約10成分がピークとして観測されたが、そのうち存在比の90%以上を占めるNative(未修飾)のG-CSFの質量スペクトルは、理論上の質量スペクトルと一致し、モノアイソトピック質量もわずか1ppm以下の誤差で算出できることが確認できた(図2D)。その他のマイナー成分については、メチオニン残基が酸化等の翻訳後修飾を受けた成分や、精製過程で人工的な修飾を受けた成分の可能性が考えられる。

次に、アセトン沈殿により精製したフィルグラスチム注射剤を試料として、ペプチドマッピング<sup>e)</sup>を行った(図3)。ペプチドの調製には、塩基性アミノ酸(Lys, Arg)のカルボキシル基側ペプチド結合を切断するトリプシンが一般的に用いられるが、G-CSFには塩基性アミノ酸の数が少なく、さらに配列上偏って存在しているため、適切な長さのペプチドが調製できないことが懸念された。そこで、芳香族アミノ酸(Tyr, Phe, Trp)のカルボキシル基側ペプチド結合を切断するキモトリプシンを使用してペプチドを調製した。サンプル調製および測定・解析は、当センターのホームページで公開している「抗体のペプチドマッピング基礎編」プロトコルに準じて行った<sup>7)</sup>。その結果、シーケンスカバー率<sup>f)</sup>、フラグメントカバー率<sup>g)</sup>ともに目標値を達成し、良好なカバー率を示した(図3B)。また、翻訳後修飾として、1番目のMetが7.3%の割合で酸化されていることが分かった。さらに、非還元条件でのキモトリプシン消化によるペプチドマッピングの結果では、G-CSFに存在する2つのジスルフィド結合が検出できた。

- b) モノアイソトピック質量: 分子を構成する各元素のうち最も存在比の高い同位体のみから構成される精密質量。  
c) インタクト解析: タンパク質をそのままの状態で質量分析計により解析する方法。タンパク質全体の分子量に加え、翻訳後修飾(糖鎖やアミノ酸修飾等)の一部についておおまかな情報を得られ、ある程度の不均一性を評価できる。  
d) デコンボリューション: 価数の異なる複数の質量スペクトルから0価に相当する質量に変換する処理。  
e) ペプチドマッピング: タンパク質をプロテアーゼ処理によりペプチドに分解し、アミノ酸配列の確認やアミノ酸修飾の有無および割合を解析する手法。  
f) シーケンスカバー率: MS測定で検出したペプチドの分子量から確認できたアミノ酸配列の割合。  
g) フラグメントカバー率: MS/MS測定で検出したフラグメントイオンから確認できたアミノ酸配列の割合。

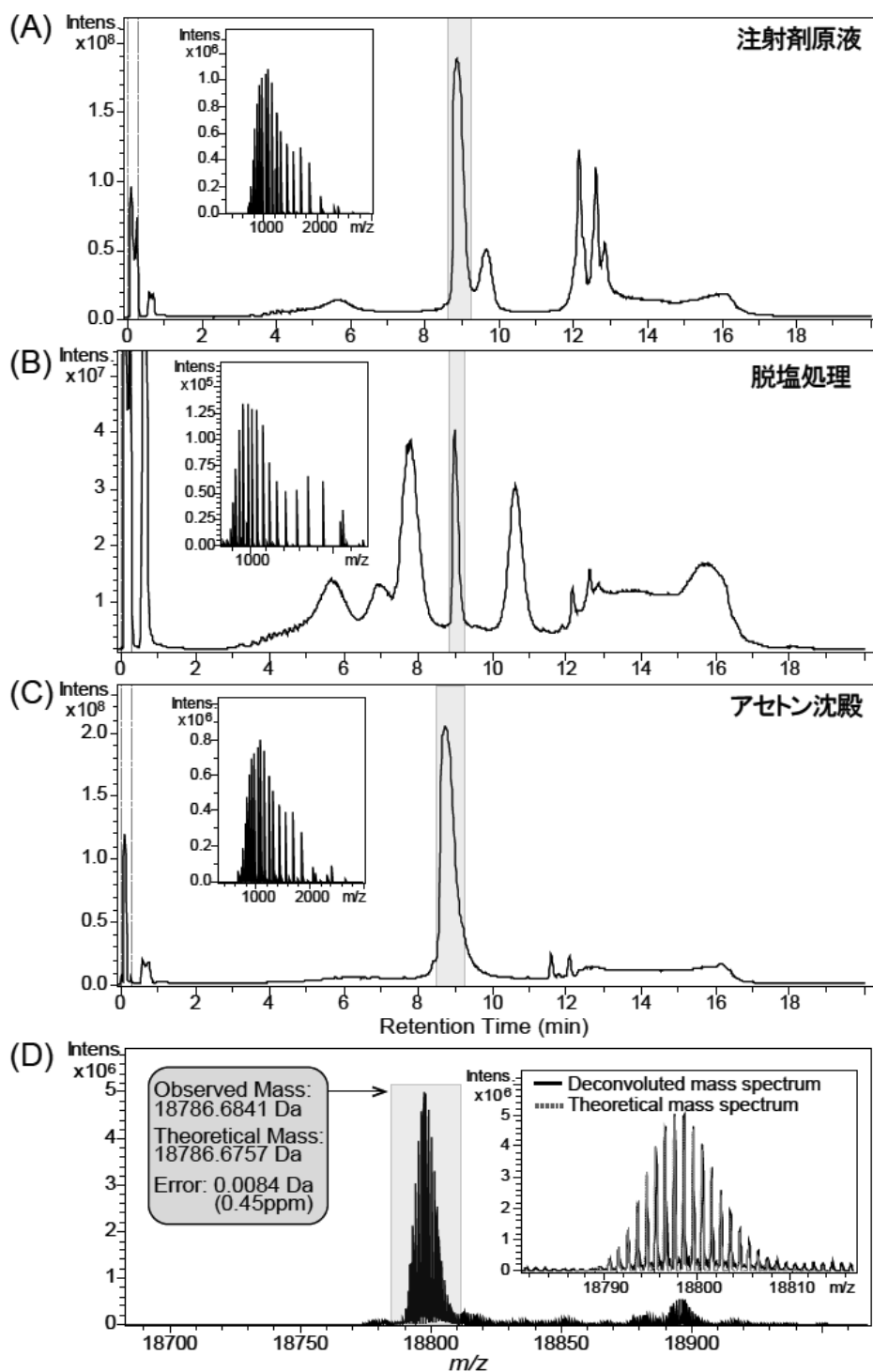


図2 LC-TOF/MSを使ったフィルグラスチムのインタクト解析

- (A) フィルグラスチム注射剤原液のトータルイオンクロマトグラム。9 min付近に溶出されるG-CSFのピークをグレーでハイライト表示し、その質量スペクトルを隣に示した。0.2  $\mu\text{g}$ のG-CSFを含む注射剤原液をインジェクトし、リニアグラジエント溶出を行った。使用カラム: BioResolve RP mAb Polyphenyl 2.1x150 mm (Waters社), 移動相A: 0.1%ギ酸, 移動相B: 0.1%ギ酸/アセトニトリル。
- (B) フィルグラスチム注射剤を脱塩カラム (Zeba™ Spin Desalting Column, 7K MWCO, Thermo Fisher Scientific社) を用いて脱塩処理し、1  $\mu\text{g}$ 相当量のG-CSFをインジェクトしたときのトータルイオンクロマトグラム。分析条件は (A)と同じ。
- (C) フィルグラスチム注射剤をアセトン沈殿により精製し、1  $\mu\text{g}$ 相当量のG-CSFをインジェクトしたときのトータルイオンクロマトグラム。分析条件は (A)と同じ。
- (D) (C) で示したG-CSFのピークをデコンボリューション処理したときの0値の質量スペクトル。メジャー成分であるNativeのG-CSFスペクトルをグレーでハイライト表示し、隣に拡大した質量スペクトルを示す。

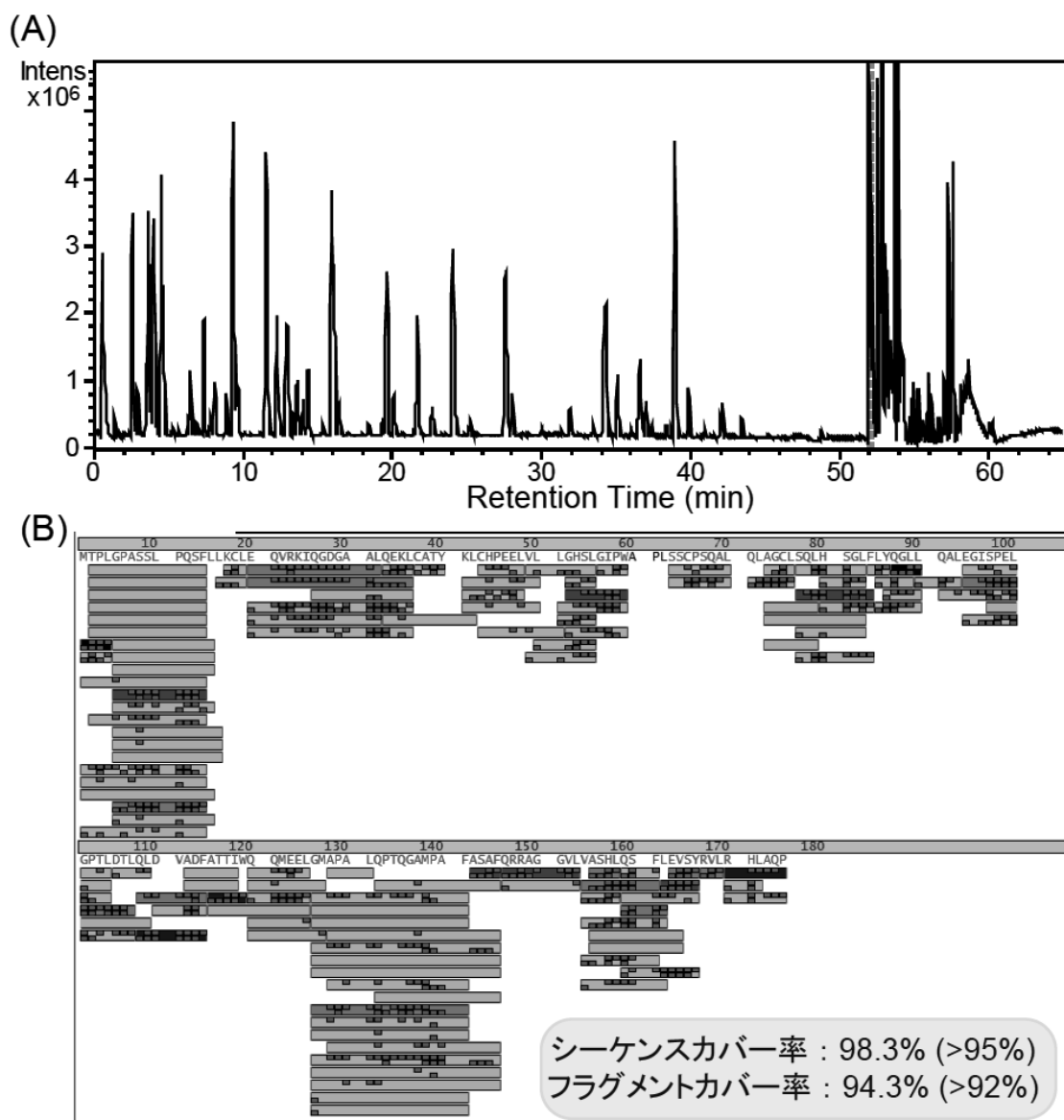


図3 ペプチドマッピングによるフィルグラスチムのアミノ酸配列解析

- (A) 還元条件でキモトリプシン消化を施したフィルグラスチムのベースピーククロマトグラム。使用カラム：AQUITY UPLC BEH C18 1.7 $\mu$ m 1.0 x 100 mm (Waters社)，移動相A：0.1% ギ酸，移動相B：0.1% ギ酸/アセトニトリル。
- (B) ペプチドマッピング解析結果のイメージ図 (BioPharma Compassソフトウェアによる解析)。アミノ酸配列の下に表示されたグレーのバーは、MS測定により観測されたペプチド配列を示し、シーケンスカバー率に反映される。バー中の個々のアミノ酸に相当する小さな四角形はMS/MS測定により観測されたフラグメントイオンを示し、フラグメントカバー率に反映される。右下にフィルグラスチムのシーケンスカバー率、フラグメントカバー率、およびそれぞれの目標値を ( ) 内に示す。

## まとめ

バイオ医薬品は、長期間に渡る培養工程に加えて、多くの精製工程を経て製造されるため、各工程におけるタンパク質の状態を正確に把握することが重要である。また、ロット間における品質も適正に評価しなければいけない。キャピラリー電気泳動装置を用いた遊離糖鎖解析では、LC-TOF/MSを用いた解析法と比較して、高感度かつ短時間で糖鎖の検出および解析が可能であり、多検体解析も比較的簡便に行えることから、バイオ医薬品の糖鎖の品質評価に適している。また、G-CSF製剤であるフィルグラスチムを対象としたLC-TOF/MS解析から、前処理としてアセトン沈殿が適していることや、LC条件や適切な酵素選択等についてある程度の調整が必要であるものの抗体分析に準じた方法により一連の解析が可能であることが分かった。一方、R1年度までに薬事研究会生物部会の中で研究対象としていたエリスロポエチン製剤<sup>8)</sup>のインタクト解析において、エリスロポエチンは、通常、タンパク質の分離に用いるC2、C4ベースの疎水性の低いカラムでは分析できず、ペプチド等の比較的低分子の分析に用いる疎水性の高いC18カラムを用いて分析する必要があることが分かった（データ未掲載）。これは、エリスロポエチンが複雑な糖鎖修飾（親水性）を受けることによりタンパク質全体の疎水性が下がり、C2やC4カラムに結合しないためと考えられる。これらのことからバイオ医薬品の特性解析では、個々のバイオ医薬品の性質を見極め、最適な分析法をその都度検討する必要があることが分かる。今後、本研究の中で得られた技術的知識や情報、ノウハウ等を積極的に活用し、富山県内企業ならびに大学等の支援につなげたいと考える。

## 文献

- 1) 生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定（ICH, Q6B）。
- 2) 「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」について（薬食審査発1214第1号）。
- 3) 小島理恵子，小木曾英夫：バイオ医薬品の品質特性解析—液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置を利用したNISTモノクローナル抗体標準品の解析—，富山県薬事総合研究開発センター年報，47，45-49（2020）
- 4) 小木曾英夫，小島理恵子，薬事研究会生物部会：タンパク質製剤開発のための品質評価技法—高分

解能質量分析計を用いた抗体医薬の品質特性解析—，富山県薬事総合研究開発センター年報，48，43-51（2021）

- 5) De Leos M et al., NIST Interlaboratory Study on Glycosylation Analysis of Monoclonal Antibodies: Comparison of Results from Diverse Analytical Methods, Mol Cell Proteomics, 2020 Jan;19 (1) :11-30.
- 6) Zhao J et al., Analysis of NIST Monoclonal Antibody Reference Material Glycosylation Using the LC-MS/MS-Based Glycoproteomic Approach, J. Proteome Res., 2021, 20, 1, 818-830
- 7) 富山県薬事総合研究開発センター ホームページ，実験マニュアル（バイオ医薬品の分析）「抗体のペプチドマッピング基礎編」<https://www.pref.toyama.jp/documents/15986/manual103.pdf>
- 8) 宮本朋美ら：バイオ医薬品の品質評価—バイオ後続品の同等性／同質性の検討（活動3年間のまとめ）—，富山県薬事総合研究開発センター年報，47，26-33（2020）

# 連続式造粒法とバッチ式造粒法との顆粒物性の比較

永井 秀昌, 宮本 朋美, 明官 勇雄, 薬事研究会製剤部会

## Evaluation of Properties of Granules by Continuous and Batch Granulations

Hidemasa NAGAI, Tomomi MIYAMOTO, Isao MYOKAN,  
The Drug Formulation Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

### 要 約

連続生産は従来のバッチ生産で行われていた製造工程毎に区切りながら生産する方法とは異なり、工程間を切れ目無く連続的に生産する方法である。連続生産の造粒部分で用いられる2軸スクリュウは、これまでのバッチ生産で用いられている造粒法とは異なる造粒機構であり、乾燥機構には気流乾燥が採用されている場合もある。このため、既存の造粒法や乾燥法との相違点を確認し、連続生産に特徴的な処方特性やパラメーターを明らかにすることが今後の連続生産への移行に必要なとなる。

そこで、連続生産機（試作機）を用いて、モデル処方による各種パラメーターの影響を比較するとともに、バッチ式造粒機との顆粒物性の比較も行った。その結果、顆粒物性に与える影響として、スクリュウ回転数よりも滴下水分量の影響が大きいことが確認された。また、塑性限界（PL）を基準に造粒時の水分量を比較した結果、連続式では攪拌造粒よりも最適水分量が低くなることが明らかとなった。

### Summary

Continuous Manufacturing is a method of continuously producing without a break between the processes, unlike Batch Manufacturing. The twin-screw granulation is different from the batch granulation methods, and spiral dryer may be adopted as continuous drying. Therefore, it is necessary to confirm the differences from batch granulation and clarify the characteristic of Continuous Manufacturing. Hence, using a lab-scale continuous granulation equipment, the effects of various parameters were compared, and the granules properties were also compared with batch granulators. As a result, it was confirmed that effect of the liquid to solid ratio was larger than the screw rotating speed as the granule properties. In addition, as a result of comparing the water contents of granulation based on the plastic limit (PL), it was clarified that water contents were lower in the continuous granulation than the high-shear mixer.

**キーワード：**連続生産；2軸スクリュウ；顆粒物性；塑性限界（PL）

**Key words：**Continuous manufacturing；Twin-screw；Granule properties；Plastic limit (PL)

### 緒 言

連続生産は従来のバッチ生産で行われていた製造工程毎に区切りながら生産する方法とは異なり、工程間を切れ目無く連続的に生産する方法である。近年、連続生産はPMDA等の規制当局が導入を積極的にサポートしており<sup>1)</sup>、医薬品の製造・流通の仕組みに革新を起こす技術であることから、将来的には医薬品製造のスタンダードになると考えられる。今後、国内・海外大手製薬企業が連続生産技術を導入し、製造委託を行う際、県内企業が連続生産での製造を受託するためには、導入の促進や技術習得を実施しておくことが重要である。連続生産の造粒部分で用いられる2軸スクリュウは、これまでのバッチ生産で用いられている造粒法とは異なる造粒機構であり、乾燥機構には特





殊な気流乾燥が採用されている場合もある<sup>2)</sup>。このため、既存の造粒法や乾燥法との相違点を確認し、連続生産に特徴的な処方特性やパラメーターを明らかにすることが今後の連続生産への移行に必要なとなる。

そこで、当センターに新規導入した連続生産機（Gf-105、フロイント産業製）を用いて、連続生産に特徴的な機構（2軸スクリュウによる造粒と気流乾燥）を用いた製剤開発法やプロセス解析工学（PAT）を用いた品質管理法を習得することを目的に実験を行った。



## 実験方法

### 1. 装置

#### 1) 造粒機

| a) 造粒乾燥連続装置<br>(連続生産機)  | b) 攪拌造粒機  | c) 流動層造粒機  | d) 押出造粒機  |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |
| Gf-105<br>(フロイント産業株)  | FS-GS-5<br>(アーステクニカ株)   | FL-LABO<br>(フロイント産業株)  | MG-55-2<br>(株ダルトン)  |

#### 2) 物性測定機器

| a) レーザー回折式粒子径分布測定装置  | b) 卓上型電子顕微鏡   |
|--|---|
|  |  |
| SALD-2300 (株島津製作所)   | TM4000Plus (株日立ハイテクノロジーズ)   |

### 2. 処方および滴下水量

(モデル処方)

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| アセトアミノフェン (微粉, 八代製薬株)               | 60%     |
| 乳糖水和物 (200M, DFE Pharma)            | 21%     |
| トウモロコシデンプン (日澱化学株)                  | 9%      |
| 低置換度ヒドロキシプロピルセルロース (LH-21, 信越化学工業株) | 10%     |
| ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-SSL, 日本曹達株)     | 外添加3.5% |

(滴下水量)

滴下水量はモデル処方の塑性限界 (Plastic limit: PL) を測定し, 塑性限界の水分量を100%とした際の割合で比較を行った (モデル処方の塑性限界: 0.458 ml/g)

滴下水量: 加水割合として20, 25, 30% (PLに対してそれぞれ43.7, 54.6, 65.5%の水分量)

#### ②造粒手順

- ア. 処方を秤量し, 容器回転式混合機 (TCV-5, 株徳寿工作所) にて5分間混合を行った
- イ. 篩過品を造粒乾燥連続装置に投入し, 以下の条件で造粒を行った  
粉体供給速度: 2 kg/hr (33 g/min), 風量: 1.1 m<sup>3</sup>/min, 給気温度: 120 °C, 排気温度: 75-80 °C  
2軸スクリュウ回転数 (2条件): 50 rpm, 100 rpm,  
水滴下速度 (3条件): 7, 8, 10 ml/min (加水割合20, 25, 30%)
- ウ. 造粒物は目開き1,000 μmのふるいで篩過し, 顆粒剤とした。

### 3. 実験手順

#### 1) 造粒乾燥連続装置 (連続式) による造粒実験

##### ①バッチ量と滴下水量

バッチ量: 330 g/batch (供給スピード33 g/minで10分間運転した条件)

#### 2) 攪拌造粒機による造粒実験

##### ①バッチ量と滴下水量

バッチ量：500 g/batch  
 滴下水量：PLに対して40.2, 57.4, 74.6%の水を  
 滴下

②造粒手順

- ア. 秤量した処方500 gを攪拌造粒機に仕込み、以下の条件で1分間混合した。  
 (回転数 アジテーター：400 rpm, クロス  
 チョッパー：1,500 rpm)
- イ. 規定量の水を滴下しながら、アと同じ条件にて4分間造粒した。
- ウ. 排出口から取り出し、流動層造粒機 (FLO-1型, フロイント産業株) で10分間乾燥したのち、目開き1,000 μmのふるいで篩過し、顆粒剤とした。

3) 流動層造粒機による造粒実験

①バッチ量と滴下水量

バッチ量：250 g/batch  
 結合液濃度：ヒドロキシプロピルセルロース水溶液として5, 8, 10%濃度の水溶液をスプレー

②造粒手順

- ア. 秤量した処方250 gを流動層造粒機に仕込み、設定温度65 ℃, スプレーエア圧0.1 MPa, パルスエア圧0.2 MPaで造粒し、スプレー量がヒドロキシプロピルセルロースとして3.5%に達した時点で停止した。
- イ. 乾燥は排気温度が38 ℃に達するまで行い、得られた造粒物は目開き1,000 μmのふるいで篩過し、顆粒剤とした。

4) 押出造粒機による造粒実験

①バッチ量と滴下水量

バッチ量：250 g/batch  
 滴下水量：PLに対して40.2, 57.4, 74.6%の水を  
 滴下

②造粒手順

- ア. 秤量した処方250 gを練合機 (NV-5型, 株  
 入江商会) に仕込み、5分間混合した。
- イ. 規定量の水を霧吹きでスプレーしながら、10分間練合した。
- ウ. 練合機から取り出し、以下の条件でスク  
 リュー型押出造粒機にて造粒した。  
 (スクリュー回転数：30 rpm, パンチ径：  
 0.8 mm (ドーム型), 隙間プレート：1 mm)
- エ. 造粒後は流動層造粒機 (FLO-1型, フロイ  
 ント産業株) で10分間乾燥し、得られた造粒  
 品は目開き1,400 μmのふるいで篩過し、顆粒  
 剤とした。

実験結果

1. 造粒実験

連続式およびバッチ式 (攪拌・流動層・押出) 造粒機で得られた顆粒について、かさ密度, 安息角, 平均粒子径を測定し比較を行った。その結果, 連続式では滴下水分量の増加に伴い, かさ密度及び安息角は低下し, スクリューの回転数が小さい程, その効果はやや大きくなることが明らかとなった (Table 1, 2, Fig. 1)。また, 連続式とバッチ式を比較した結果, 連続式で得られた顆粒のかさ密度及び安息角は攪拌造粒品に類似することが確認された。

Table 1 各種造粒品のかさ密度 (g/cm<sup>3</sup>)

| 造粒方式               | 条件               | 1    | 2    | 3    | 4    | A.v. |
|--------------------|------------------|------|------|------|------|------|
| 連続式<br>(Gf-105)    | 加水割合20%, 50 rpm  | 0.55 | 0.56 | 0.56 | 0.55 | 0.56 |
|                    | 加水割合25%, 50 rpm  | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 | 0.51 |
|                    | 加水割合30%, 50 rpm  | 0.48 | 0.47 | 0.49 | 0.49 | 0.48 |
|                    | 加水割合20%, 100 rpm | 0.56 | 0.56 | 0.57 | 0.57 | 0.57 |
|                    | 加水割合25%, 100 rpm | 0.55 | 0.55 | 0.55 | 0.55 | 0.55 |
|                    | 加水割合30%, 100 rpm | 0.53 | 0.53 | 0.53 | 0.53 | 0.53 |
| 流動層造粒<br>(FL-LABO) | バインダー濃度5%        | 0.33 | 0.34 | 0.35 | 0.34 | 0.34 |
|                    | バインダー濃度8%        | 0.38 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 |
|                    | バインダー濃度10%       | 0.33 | 0.34 | 0.33 | 0.33 | 0.33 |
| 攪拌造粒<br>(FS-GS-5)  | 滴下水分量 (PLの40%)   | 0.59 | 0.59 | 0.59 | 0.59 | 0.59 |
|                    | 滴下水分量 (PLの57%)   | 0.57 | 0.58 | 0.57 | 0.57 | 0.57 |
|                    | 滴下水分量 (PLの75%)   | 0.61 | 0.60 | 0.59 | 0.59 | 0.60 |
| 押出造粒<br>(MG-55)    | 滴下水分量 (PLの40%)   | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.50 | 0.49 |
|                    | 滴下水分量 (PLの57%)   | 0.50 | 0.50 | 0.49 | 0.50 | 0.50 |
|                    | 滴下水分量 (PLの75%)   | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 | 0.49 |

Table 2 各種造粒品の安息角 (°)

| 造粒方式            | 条件               | 1     | 2     | 3     | 4     | A.v.  |
|-----------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 連続式 (Gf-105)    | 加水割合20%, 50 rpm  | 45.00 | 43.83 | 43.83 | 45.00 | 44.42 |
|                 | 加水割合25%, 50 rpm  | 42.61 | 42.61 | 43.83 | 42.61 | 42.92 |
|                 | 加水割合30%, 50 rpm  | 42.61 | 42.61 | 41.35 | 41.35 | 41.98 |
|                 | 加水割合20%, 100 rpm | 47.20 | 47.20 | 48.24 | 47.20 | 47.46 |
|                 | 加水割合25%, 100 rpm | 42.61 | 41.35 | 41.35 | 41.35 | 41.67 |
|                 | 加水割合30%, 100 rpm | 42.61 | 43.83 | 42.61 | 42.61 | 42.92 |
| 流動層造粒 (FL-LABO) | バインダー濃度5%        | 42.61 | 43.83 | 42.61 | 45.00 | 43.51 |
|                 | バインダー濃度8%        | 47.20 | 47.20 | 46.12 | 48.24 | 47.19 |
|                 | バインダー濃度10%       | 48.24 | 46.12 | 48.24 | 47.20 | 47.45 |
| 攪拌造粒 (FS-GS-5)  | 滴下水分量 (PLの40%)   | 43.83 | 45.00 | 46.12 | 46.12 | 45.27 |
|                 | 滴下水分量 (PLの57%)   | 41.35 | 41.35 | 40.03 | 42.61 | 41.34 |
|                 | 滴下水分量 (PLの75%)   | 40.03 | 41.35 | 41.35 | 41.35 | 41.02 |
| 押出造粒 (MG-55)    | 滴下水分量 (PLの40%)   |       |       |       |       |       |
|                 | 滴下水分量 (PLの57%)   |       |       |       |       |       |
|                 | 滴下水分量 (PLの75%)   |       |       |       |       |       |

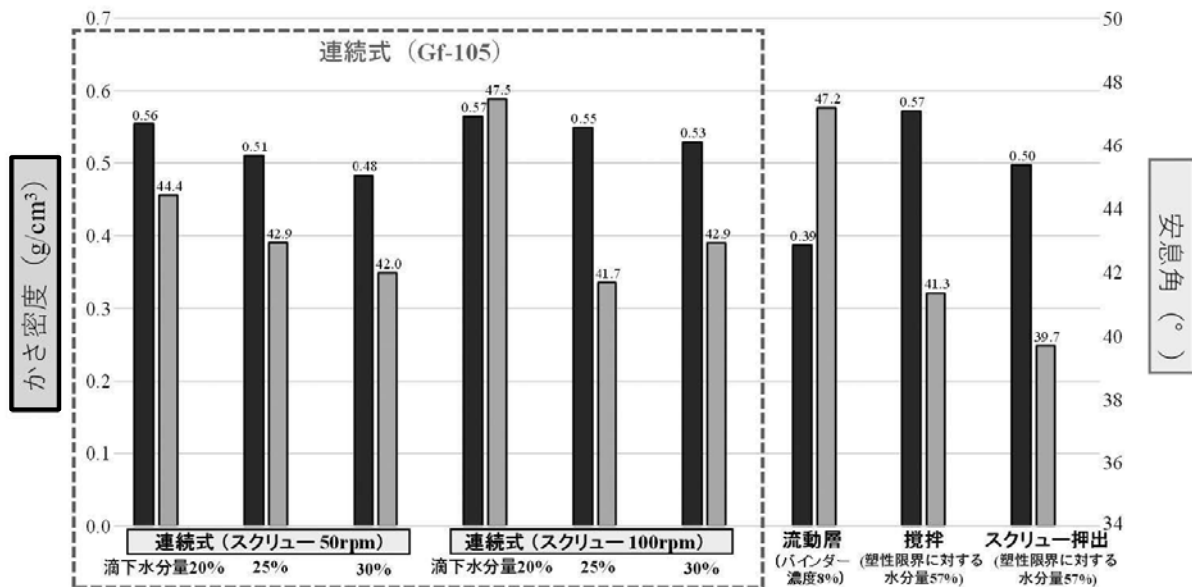


Fig. 1 各種造粒品のかさ密度及び安息角の比較

平均粒子径を測定した結果、連続式では滴下水分量の増加に伴い平均粒子径が増加し、スクリー回転数が小さい程その効果はやや大きくなることが明らかとなった (Fig. 2)。また、卓上型電子顕微鏡を用いて、顆粒の表面形状を撮影したところ、連続式で得られた顆粒は重質でやや丸みを帯びた形状であり、攪拌造粒品に類似していることが確認された (Fig. 3)。

## 2. 塑性限界 (PL) を基準とした連続式造粒と攪拌造粒の最適水分量の比較

連続式とバッチ式 (攪拌造粒) について、造粒時の最適水分量を比較するため、PLを基準とした水分量と平均粒子径との関係性をグラフ化した。モデル処方 PLは、処方を乳鉢中で蒸留水を滴下しながら混練

し、塑性状態に到達した際の滴下量から算出した (モデル処方の PL : 0.458 ml/g)。

その結果、今回のモデル処方において、平均粒子径 200 μm を目標値とした場合、攪拌造粒では PL に対して 67%、連続式ではスクリー回転数 50 rpm で 54%、100 rpm で 52% が適正水分量であることが明らかとなった (Fig. 4)。

## 考 察

今回、既存のバッチ式造粒機との相違点を確認し、連続生産に特徴的な処方特性やパラメーターを明らかにするため、アセトアミノフェンを配合するモデル処方を用いて、連続式・バッチ式造粒機での顆粒物性を



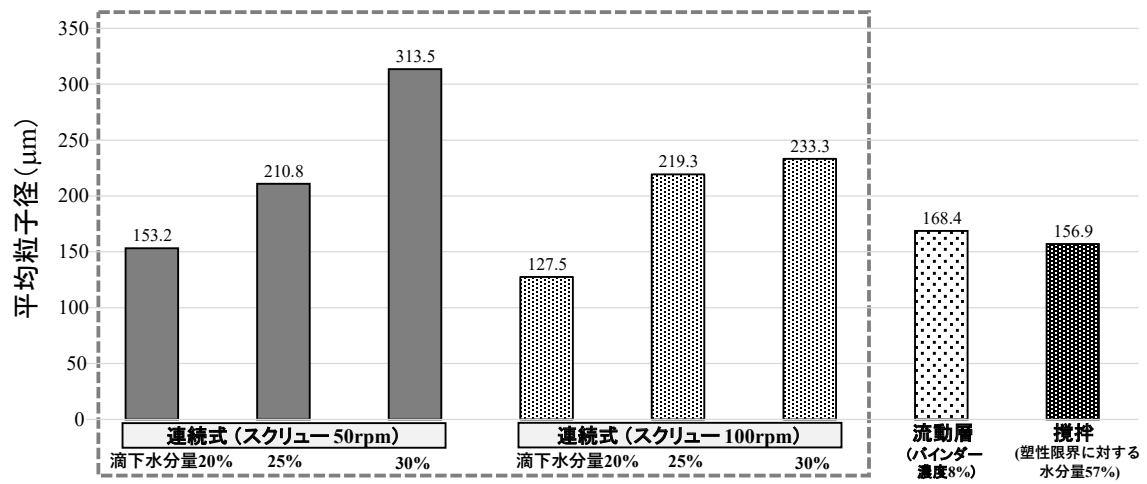


Fig. 2 各種造粒品の平均粒子径の比較

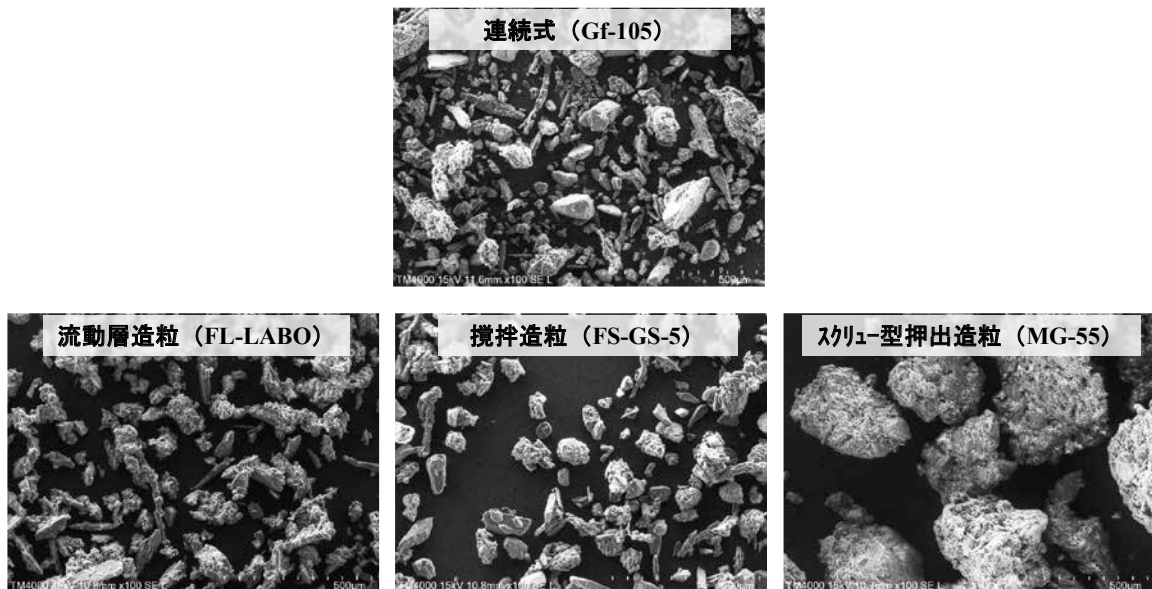


Fig. 3 各種造粒品の電子顕微鏡画像 (倍率100倍) の比較

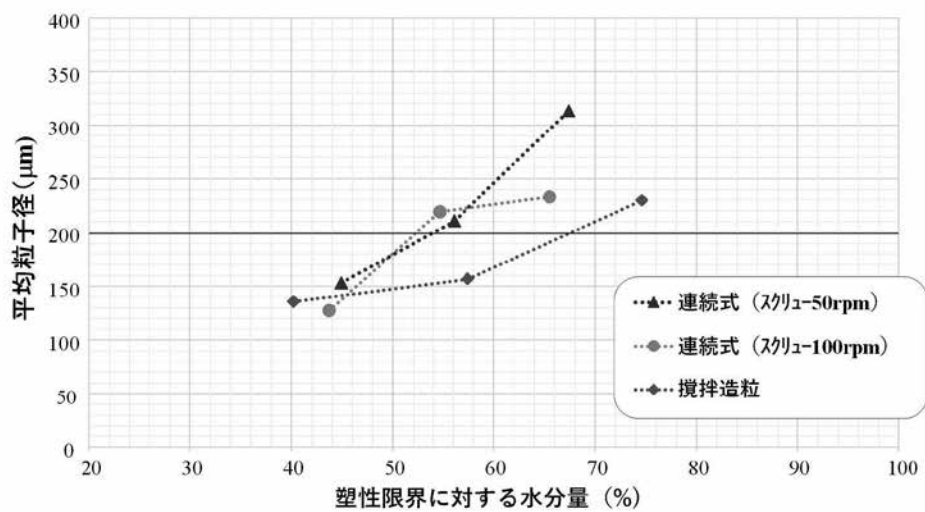


Fig. 4 連続式造粒機と攪拌造粒機の塑性限界 (PL) に対する水分量の比較

比較した。その際、連続式ではスクリー回転数と水滴下量を変化させた際の顆粒物性について比較を行った。その結果、連続式では滴下水分量の増加に伴い、かさ密度及び安息角が低下し、平均粒子径は増加することが確認され、スクリーの回転数が小さい程その効果は大きくなることが明らかとなった。しかしながら、スクリー回転数の違いによる顆粒物性への影響は小さく、連続式では滴下水分量が重要パラメーターになると考えられる。

また、連続式とバッチ式を比較した結果、連続式で得られた顆粒のかさ密度及び安息角は攪拌造粒品に類似することが確認された。このため、連続式と攪拌造粒について、造粒時の最適な水分量の比較を行うため、PLを基準とした水分量について検討した。この結果より、連続式では攪拌造粒よりも少ない水分量で造粒が進行し、攪拌造粒時の8割程度の水分量が最適水分量になると考えられた。

なお、連続生産機は機種によって造粒機構や乾燥機構が異なるため、今後は機構の違いによる顆粒物性や錠剤物性への影響について検討を行っていく予定である。

## 文 献

- 1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 革新的製造技術WG, 日本における連続生産の最新情報, 製剤機械技術学会誌, <https://www.pmda.go.jp/files/000239490.pdf> (2021)
- 2) 磯部重実, 連続造粒装置Granuformerを用いた安定生産に対する取り組み, 製剤機械技術学会誌, 27, 2, 136-141 (2018)

# タンパク質製剤開発のための品質評価技法

## —高分解能質量分析計を用いた抗体医薬の品質特性解析—

小木曾 英夫, 小島 理恵子, 薬事研究会生物部会

### Quality evaluation techniques for protein drug development using a time-of-flight mass spectrometry coupled with liquid chromatography

Hideo OGISO, Rieko KOJIMA,  
The Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

#### 要 約

液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) は、精密質量測定によりタンパク質の構造不均一性を解析可能なことから、タンパク質製剤開発における構造確認や品質評価に威力を発揮する。

本研究は、標準抗体NISTmAbを用いたLC-TOF/MSによる品質特性解析をテーマとして、本センターで作成した種々の解析プロトコルをブラッシュアップするとともに、新たに、宿主細胞由来タンパク質の解析のためのプロトコルを作成した。これら分析手法を確立することを通して、タンパク質製剤の品質特性解析における質量分析装置の有用性を確認した。

#### Summary

Liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS) is a very useful tool for structural confirmation and quality evaluation in protein drug development, because it can analyze structural heterogeneity of proteins by accurate mass measurement.

This study focused on the quality characterization of the standard antibody, NISTmAb, by LC-TOF/MS. We brushed up protocols that have been already prepared for the measurement performed in our center, and also prepared a new protocol for the analysis of host cell-derived proteins. Through the establishment of these analytical methods, we have shown the usefulness of mass spectrometry in the characterization of protein drugs.

#### 緒 言

バイオシミラー開発は、タンパク質の生産とその品質評価において、低分子医薬品の開発とは異なるノウハウを必要とする。薬事総合研究開発センターでは、抗体医薬の品質評価を1つの重要テーマとして位置付けており、日々、ノウハウの蓄積に取り組んでいる。これまでに高分解能質量分析計を用いて、抗体分子の品質特性解析を行うための基本的分析手法を習得し、更に再現性及び測定感度の向上を目的として、解析方法のブラッシュアップを進め、これらをプロトコル化してきた。

令和2年度の生物部会は、この「抗体分子の品質特性解析」に関するノウハウを県内製薬企業に共有化することを目的として開催した。内容は、基礎編として、1) 抗体分子を丸ごと測定するインタクト解析、2) 抗体分子を25 kDまで分解して測定するサブユニット解析、3) 抗体分子をペプチドまで分解して測定するペプチドマッピングを実施した。更に、応用編として、4) ペプチドマッピングを応用した糖ペプチ

ド解析、5) インタクト解析を応用した抗体のオリゴマー解析、6) ペプチドマッピングを応用したホストセルタンパク質解析を実施した。これら解析技術の経験を積み重ねながら、薬事総合研究開発センターのこれまでのプロトコルを更にブラッシュアップした。

#### 方 法

薬事総合研究開発センターのプロトコル（実験マニュアル）に従い実施した。新規プロトコルやバージョンアップしたプロトコルについては、順次改訂を予定している。（<https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryuu/1285/research/manual.html>）

#### 結果と考察

##### 1. インタクト解析

インタクト解析とは、抗体タンパク質分子をプロテアーゼ処理等行わずに丸ごと測定し、質量分析を行うことにより、タンパク質の状態（品質）を評価するも

の。ただし、逆相液体クロマトグラフ (LC) 分離時は80 °Cで加熱し、タンパク質の立体構造を解いた状態を測定する。熱変性を行わないとLCでの分離効率が悪くなることに加え、分子表面しかイオン化しないため価数が小さくなり、測定範囲 ( $m/z < 5000$ ) に収まらないため、熱変性は必要となる。分解能80,000の質量分析装置では、50kDa以下のタンパク質であれば、モノアイソトピック質量の測定が可能であるが、IgG分子の場合150kDaと大きな分子であるためモノアイソトピック質量は測定できず、平均質量での評価となる。従って、インタクト解析では、主要糖鎖の不均一性を含む主要な構造多様性のみを評価することになる。

今回の測定では、抗体のインタクト分子を評価するために質量15万前後のみならず、解離したサブユニットを検出するために、質量計算を4万以下にまで範囲を広げた。その結果、Light Chain (LC) 単量体とHeavy Chain (HC) 単量体に加え、抗体が半分に分離したLC1-HC1を検出できた (図1, 表1)。一方、HCの二量体 (HC2) やLCが1本脱離した分子 (LC1-HC2) は検出されなかった。また、糖鎖が付加したHC単量体は検出されなかった。このことは、糖鎖がHCとLCとの結合安定性に関与している可能性を示しているかもしれない。

## 2. サブユニット解析

抗体分子のインタクト解析では平均分子量でしか評価できないのに対して、25kDaまで限定分解して測定するサブユニット解析では、モノアイソトピック質量での評価が可能となる。平均分子量での評価の場合、最大7 Da程度の誤差を許容する必要があるのに対し、モノアイソトピック質量測定の精度は0.1Da程度まで向上する。このことにより、糖鎖やアミノ酸残基の不均一性の評価がサブユニットレベルでもある程度可能となる。サブユニット解析は、ペプチドマッピングの操作より簡便でかつ、前処理工程で生ずる人為的なメチオニン (M) 酸化やアスパラギン (N) 脱アミド化を最小限に抑えることができるのがメリットである。

これまでにNISTmAbで報告された糖鎖構造は多種多様に及んでおり、概ね47種の構造は確からしいとされている (参考文献1)。この糖鎖構造をProtein Reference Listに追加入力することにより、我々の解析システムにおけるプライベートデータベースを拡充させた。これにより今回の測定では、これまでアサインされなかった糖鎖をいくつか追加でアサインできるようになった (図2, 表2)。

## 3. ペプチドマッピング

抗体分子の特性解析においてペプチドマッピングは、アミノ酸配列の確認やアミノ酸残基の修飾割合を把握する上で重要な解析手法である。今回、抗体量として4  $\mu\text{g}$ 並びに14  $\mu\text{g}$ 相当それぞれをLC-MSに注入したときに得られたデータを比較したところ、14  $\mu\text{g}$ 注入では主要ピークが飽和していたため、アミノ酸修飾率のような量的評価を行うときは4  $\mu\text{g}$ 注入の飽和してないデータを用いることとした。4  $\mu\text{g}$ 注入でも今回の測定ではシーケンスカバー率95%以上、フラグメントカバー率は92%以上のデータが取得でき、シーケンス評価としても十分であった (図3)。このデータから評価したMの酸化やNの脱アミド化などのアミノ酸修飾率を表3に示した。なお、モノグリコシル化はセリン残基 (S) とリジン残基 (K) にのみ生ずる可能性を考慮し、他のアミノ酸残基のグリコシル化の可能性を考慮しなかったことから、推定評価とした。Kにモノグリコシル化が生じた場合トリプシンによる切断が行われなくなることから、miss cleavageを含むペプチドが生ずる。グリコシル化修飾されていない場合、トリプシンで切断されるため、Kの糖化の修飾率を同一ペプチドの検出量の比から求めることはできなかった。従って、糖化の割合を算出するには、トリプシン以外のプロテアーゼを用いる必要があると考えられる。

## 4. 糖ペプチド解析

トリプシン消化によるペプチドマッピングは最も効率の良い一次構造解析手法である。既知のアミノ酸修飾は、ペプチドマッピングにより解析可能であるが、糖鎖修飾を解析しようとする場合、幾つかの問題点に直面する。糖ペプチドはイオンサプレッションによる感度低下を招き易く、主に、共溶出する他のペプチドやトリフルオロ酢酸 (TFA)、Tris等の影響を受けるものと考えられる。また、ペプチドマッピングで通常用いられるC18カラムの分離条件では、糖鎖の違いによる分離が期待できないことも主な問題点となっている。我々はこれまでに、糖ペプチドを濃縮する前処理を追加することでイオンサプレッションによる感度低下を抑え、C18カラムの分離効率をわずかながら改善したLC条件を用いることにより、NISTmAbの糖鎖構造をペプチドレベルで解析するプロトコルを作成している。

今回の測定では、前処理方法をスピンカラム化して操作性を向上させるとともに、前述した47種類の糖鎖構造 (参考文献1) を反映した糖ペプチドをプライベートデータベース化することにより、従来のプロトコルに比べ、より多くの糖ペプチドを検出できるよ

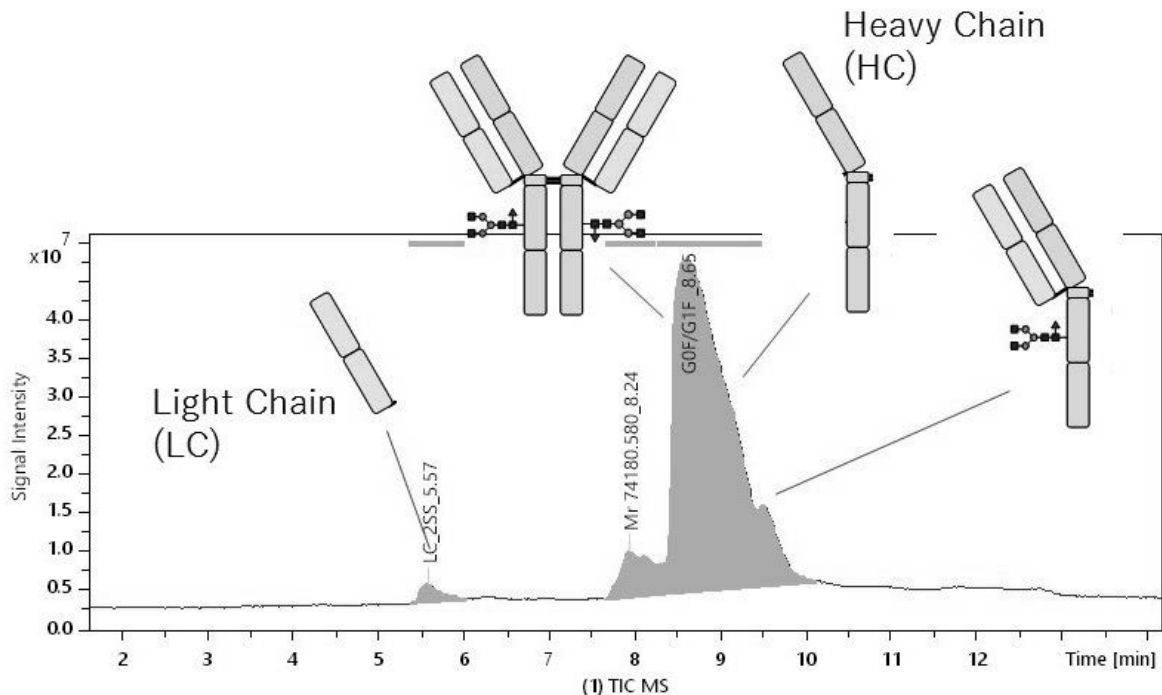


図1. インタクト解析のLC-MSクロマトグラム (ギ酸酸性下, 80 °Cの変性条件でタンパク質をLC分離)

NISTmAb 2  $\mu$ g/2  $\mu$ LをBioResolve RP mAb Polyphenylにて分離したときのトータルイオンクロマトグラムを示した。インタクト抗体 (2HC+2LC) の他に, 解離したサブユニット (HC, LC, HC+LC) が検出された。

表1. インタクト解析結果

| Protein         | Form             | Mr Ref     | Mr Sample   | $\Delta$ Mr [ppm] | $\Delta$ Mr [Da] | Int. [a.u.] | Rt Sample [min] |
|-----------------|------------------|------------|-------------|-------------------|------------------|-------------|-----------------|
| NISTmAb_LC1     | 2disulfide       | 23109.2729 | 23109.2229  | -2.16             | -0.05            | 1.00E+04    | 5.57            |
| NISTmAb_HC      | aglycon          | 49453.5116 | 49454.6942  | 23.91             | 1.1826           | 1.18E+04    | 9.26            |
| NISTmAb_LC1_HC1 | G0F              | 74020.3463 | 74019.6377  | -9.57             | -0.7086          | 3.96E+03    | 9.5             |
| NISTmAb_LC1_HC1 | G1F              | 74182.4869 | 74181.6019  | -11.93            | -0.885           | 5.85E+03    | 9.5             |
| NISTmAb_LC1_HC1 | G2F              | 74344.6275 | 74342.7288  | -25.54            | -1.8987          | 1.02E+03    | 9.5             |
| NIST mAb        | G0F/ aglycon     | 146591.8   | 146592.2227 | 2.88              | 0.4227           | 1.95E+02    | 8.65            |
| NIST mAb        | G1F/ aglycon     | 146754     | 146756.227  | 15.18             | 2.227            | 3.15E+02    | 8.65            |
| NIST mAb        | G0F/G0F - GlcNAc | 147834     | 147837.3891 | 22.92             | 3.3891           | 1.19E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G0F/G1F - GlcNAc | 147996.1   | 148001.062  | 33.53             | 4.962            | 1.65E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G0F/G0F          | 148037.2   | 148038.7573 | 10.52             | 1.5573           | 1.31E+04    | 8.65            |
| NIST mAb        | G0F/G0F + K      | 148165.3   | 148165.7181 | 2.82              | 0.4181           | 4.98E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G0F/G1F          | 148199.3   | 148200.9196 | 10.93             | 1.6196           | 2.38E+04    | 8.65            |
| NIST mAb        | G0F/G1F + K      | 148327.5   | 148328.7658 | 8.53              | 1.2658           | 4.98E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G1F/G1F          | 148361.4   | 148363.2871 | 12.72             | 1.8871           | 1.96E+04    | 8.65            |
| NIST mAb        | G1F/G1F + K      | 148489.6   | 148491.0321 | 9.64              | 1.4321           | 2.43E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G1F/G2F          | 148523.6   | 148525.4238 | 12.28             | 1.8238           | 8.58E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G1F/G2F + K      | 148651.8   | 148655.1649 | 22.64             | 3.3649           | 7.60E+02    | 8.65            |
| NIST mAb        | G2F/G2F          | 148685.7   | 148686.9945 | 8.71              | 1.2945           | 2.91E+03    | 8.65            |
| NIST mAb        | G2F/G2F + Hex    | 148847.7   | 148848.0657 | 2.46              | 0.3657           | 1.21E+03    | 8.65            |

(NISTmAb\_Intact\_4022d /NISTmAb\_intact\_tutorial\_7.8)

BioPharmaCompass®を用いて, 質量<40,000はモノアイソトピック質量にて, 質量>40,000は平均質量にて評価した。

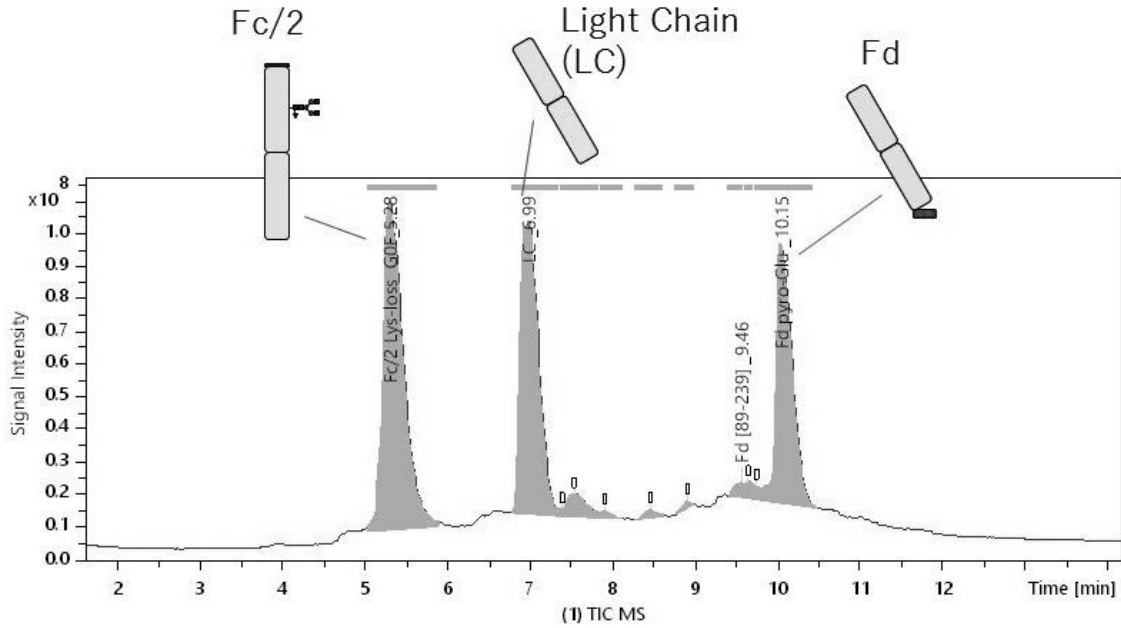


図2. サブユニット解析のLC-MSクロマトグラム

(限定分解した25kDのサブユニット3種をギ酸酸性下80℃の変性条件でLC分離)

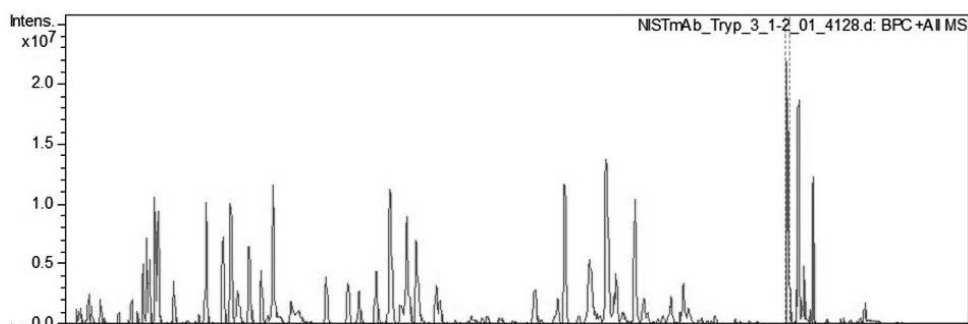
NISTmAb 20 μgをIdeSにより限定分解，変性還元処理，脱塩処理後，4 μg相当をBioResolve RP mAb Polyphenylにて分離したときのトータルイオンクロマトグラムを示した。

表2. サブユニット解析結果

| Protein     | Annotation                 | Mr Ref     | Mr Sample  | Δ Mr [ppm] | Δ Mr [Da] | Int. [a.u.] | Rel. Int. Sample [%] | Rt Sample [min] |
|-------------|----------------------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|----------------------|-----------------|
| LC          | LC TFA                     | 23227.3    | 23227.2524 | -2.05      | -0.0476   | 2.19E+03    | 0.1                  | 6.57            |
| LC          | LC 20x Dea                 | 23146.2781 | 23146.261  | -0.73      | -0.017    | 8.14E+03    | 0.4                  | 6.57            |
| LC          | LC SS                      | 23111.2886 | 23111.2707 | -0.77      | -0.0178   | 8.73E+04    | 3.9                  | 6.57            |
| LC          | LC Hex                     | 23275.357  | 23275.3358 | -0.91      | -0.0212   | 9.84E+04    | 4.4                  | 6.99            |
| LC          | LC                         | 23113.3042 | 23113.2987 | -0.24      | -0.0055   | 2.06E+06    | 91.3                 | 6.99            |
| Fd [89-239] | Fd [89-239] Hex            | 16026.7906 | 16026.762  | -1.78      | -0.0286   | 1.52E+03    | 1.9                  | 9.46            |
| Fd [89-239] | Fd [89-239]                | 15864.7377 | 15864.7283 | -0.59      | -0.0094   | 7.83E+04    | 98.1                 | 9.46            |
| Fd          | Fd pyro-Glu Hex            | 25834.8594 | 25834.84   | -0.75      | -0.0194   | 5.25E+04    | 4.2                  | 10.15           |
| Fd          | Fd pyro-Glu                | 25672.8066 | 25672.8177 | 0.43       | 0.0111    | 1.19E+06    | 95.8                 | 10.15           |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss              | 23775.9295 | 23775.9559 | 1.11       | 0.0264    | 3.13E+03    | 0.4                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1F+G (G2+A) | 25689.6066 | 25689.6195 | 0.5        | 0.0129    | 7.63E+03    | 0.9                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1F+N        | 25585.5956 | 25585.5715 | -0.94      | -0.0241   | 7.16E+03    | 0.9                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G0F-N        | 25017.384  | 25017.401  | 0.68       | 0.017     | 1.71E+04    | 2.1                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1F-N+G      | 25486.5272 | 25486.5311 | 0.15       | 0.0039    | 1.79E+04    | 2.2                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G0F          | 25220.4634 | 25220.4792 | 0.63       | 0.0158    | 2.77E+05    | 33.4                 | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G2F2+H       | 25706.6219 | 25706.6353 | 0.52       | 0.0134    | 1.94E+04    | 2.3                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 G0                    | 25202.5005 | 25202.4687 | -1.26      | -0.0317   | 2.25E+04    | 2.7                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G2F+2H       | 25868.6747 | 25868.6819 | 0.28       | 0.0072    | 7.97E+03    | 1                    | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 -Lys G2F+H            | 25706.6219 | 25706.6353 | 0.52       | 0.0134    | 1.94E+04    | 2.3                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G2F          | 25544.569  | 25544.5791 | 0.39       | 0.0101    | 7.73E+04    | 9.3                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G2F+G        | 25851.6594 | 25851.6649 | 0.21       | 0.0055    | 6.27E+03    | 0.8                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1F-N+A      | 25470.5323 | 25470.5039 | -1.11      | -0.0284   | 4.61E+03    | 0.6                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1F          | 25382.5162 | 25382.5286 | 0.49       | 0.0124    | 2.77E+05    | 33.4                 | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G2F+H+G      | 26013.7122 | 26013.7208 | 0.33       | 0.0086    | 5.33E+03    | 0.6                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1F-N        | 25179.4369 | 25179.4446 | 0.31       | 0.0077    | 2.08E+04    | 2.5                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G2F+N        | 25747.6484 | 25747.6362 | -0.47      | -0.0122   | 3.65E+03    | 0.4                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 G1                    | 25364.5533 | 25364.5145 | -1.53      | -0.0388   | 2.55E+04    | 3.1                  | 5.28            |
| Fc/2        | Fc/2 Lys-loss G1+A         | 25527.5537 | 25527.5657 | 0.47       | 0.012     | 9.84E+03    | 1.2                  | 5.28            |

(NISTmAb\_IdeS\_4085d / NISTmAb IdeS Digested\_Tutorial\_10.0, 11.0, 8.13)

BioPharmaCompass®を用いて，保持時間4.0-12.0minを一度にデータ処理した。



| Row | Proteins & Peptides                 | Unidentified                  | MW [kDa] | pI  | #Peptides | SC [%] | FragCov [%] | Score  | RMS90 [ppm] |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------|----------|-----|-----------|--------|-------------|--------|-------------|
| 1   | <input checked="" type="checkbox"/> | NIST mAb PM_Ogiso20200212a.HC | 49.6     | 8.5 | 85        | 99.6   | 92.7        | 6542.0 | 0.71        |
| 2   | <input checked="" type="checkbox"/> | NIST mAb PM_Ogiso20200212a.LC | 23.1     | 7.8 | 62        | 98.6   | 92.0        | 3884.3 | 0.69        |

NISTmAb\_Tutorial\_7.0

図3. ペプチドマッピングのLC-MSクロマトグラム

(抗体を変性条件下、トリプシンによりペプチドに分解したものをギ酸酸性下LC分離)

NISTmAb 50  $\mu$ gを還元変性後、脱塩処理し、トリプシン消化後、4  $\mu$ g相当をAQUITY UPLC BEH C18にて分離したときのベースピーククロマトグラムを示した。この時のシーケンスカバー率 (SC) は>98%、フラグメントカバー率 (FragCov) は>92%であった。

表3. ペプチドマッピングから算出したアミノ酸修飾率

| サブユニット | アミノ酸残基            | アミノ酸修飾    | %                 | ピーク強度比                        |
|--------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------------------|
| HC     | Q1                | ピログルタミン酸化 | 99.9              | 修飾体(1価)/[未修飾体(1価)+修飾体(1価)]    |
|        | K450              | 脱離        | 85.1              | 修飾体(1価)/[未修飾体(1価+2価)+修飾体(1価)] |
|        | M34               | 酸化        | 2.4               | 修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]    |
|        | M87               | 酸化        | 1.2               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | M101              | 酸化        | 1.2               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | M255              | 酸化        | 2.9               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | M361              | 酸化        | 3.5               | 修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]    |
|        | M431              | 酸化        | 1.3               | 修飾体(5価)/[未修飾体(5価)+修飾体(5価)]    |
|        | N78               | 脱アミド化     | 0.4               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | N86               | 脱アミド化     | 1.0               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | N289              | 脱アミド化     | 1.3               | 修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]    |
|        | N318              | 脱アミド化     | 16.0              | 修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]    |
|        | N364              | 脱アミド化     | 1.9               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | N383 (N392, N393) | 脱アミド化     | 11.0              | 修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)]    |
|        | S257?             | モノグリコシル化  | 0.1               | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)]    |
|        | K291?             | モノグリコシル化  | ?                 | (未修飾の同一ペプチド検出されず)             |
|        | K329?             | モノグリコシル化  | ?                 | (未修飾の同一ペプチド検出されず)             |
| S340?  | モノグリコシル化          | ?         | (未修飾の同一ペプチド検出されず) |                               |
| K341?  | モノグリコシル化          | ?         | (未修飾の同一ペプチド検出されず) |                               |

| サブユニット | アミノ酸残基 | アミノ酸修飾   | %    | ピーク強度比の算出                  |
|--------|--------|----------|------|----------------------------|
| LC     | M4     | 酸化       | 1.2  | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)] |
|        | M32    | 酸化       | 3.2  | 修飾体(4価)/[未修飾体(4価)+修飾体(4価)] |
|        | N136   | 脱アミド化    | 7.8  | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)] |
|        | N137   | 脱アミド化    | 2.0  | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)] |
|        | N151   | 脱アミド     | 1.7  | 修飾体(2価)/[未修飾体(2価)+修飾体(2価)] |
|        | S51?   | モノグリコシル化 | 57.2 | 修飾体(3価)/[未修飾体(3価)+修飾体(3価)] |
|        | K148?  | モノグリコシル化 | ?    | (未修飾の同一ペプチド検出されず)          |

- 1) Mの酸化, Nの脱アミド化, S, Kのモノグリコシル化の可能性を考慮したときにアサインされたアミノ酸残基を示した。
- 2) 同一ペプチド同一価数の修飾体と非修飾体とのピーク強度比から修飾率を算出した。
- 3) フラグメントイオンから修飾アミノ酸残基が特定できた場合、太字で示した。
- 4) C末K脱離に関しては、同一価数を考慮せず、ピーク強度比を算出した。
- 5) グリコシル化については推定評価であるため、「?」を付した。

うになった (表4, 図4).

### 5. オリゴマー解析

抗体医薬に含まれる凝集体は、抗原性の原因になる可能性が指摘されており、評価が必要である。質量分析で行える凝集体評価は、粒子径1~100 nm程度を分析対象とするサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によるオリゴマー (2量体, 3量体等) の評価に留まる。これまでに我々は、SECとインタクト質

量分析 (MS) とを組み合わせる行うオリゴマーの測定法についてプロトコル化している。

今回の測定では、酸性条件下で60℃加熱処理したNISTmAbの強制劣化物についてSEC-MSを用いて測定することにより、ダイマーの形成し始めからオリゴマー形成に至る過程を分子量変化で捉えることを試みた (図5a)。その結果、ギ酸酸性下の加熱処理によりダイマー形成が起こり、ギ酸濃度を高めた酸性度の強い条件においてダイマー形成が促進された。また、オ

表4. 糖ペプチド解析結果

| No. | RT [min] | m/z meas. | $\Delta m/z$ [mDa] | M meas.  | mSigma | Ions       | Name                | Molecular Formula | Annotations         | Area    | %        |
|-----|----------|-----------|--------------------|----------|--------|------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------|----------|
| 1   | 18.95    | 878.6872  | 0.336              | 2633.04  | 35.9   | [M+H+H2]3+ | G0F                 | C106H164N18O59    | Analyte List 201121 | 1786526 | 35.69405 |
| 2   | 18.88    | 932.7048  | 0.363              | 2795.093 | 32.4   | [M+H+H2]3+ | G1F                 | C112H174N18O64    | Analyte List 201121 | 1685680 | 33.67919 |
| 3   | 18.84    | 986.7223  | 0.221              | 2957.145 | 33.9   | [M+H+H2]3+ | G2F (G1F+H)         | C118H184N18O69    | Analyte List 201121 | 457410  | 9.138864 |
| 4   | 18.92    | 1215.987  | 0.556              | 2429.96  | 16.5   | [M+H+H+]2+ | G0F-N               | C98H151N17O54     | Analyte List 201121 | 158880  | 3.174357 |
| 5   | 18.95    | 865.0118  | 0.47               | 2592.013 | 35.1   | [M+H+H2]3+ | G1F-N               | C104H161N17O59    | Analyte List 201121 | 135236  | 2.70196  |
| 6   | 18.84    | 1040.739  | -0.353             | 3119.196 | 44.9   | [M+H+H2]3+ | G2F+H               | C124H194N18O74    | Analyte List 201121 | 99538   | 1.988728 |
| 7   | 19.19    | 967.3754  | 0.685              | 2899.104 | 13.7   | [M+H+H2]3+ | G1F-N+G             | C115H178N18O68    | Analyte List 201121 | 90898   | 1.816105 |
| 8   | 19.82    | 595.26    | 0.319              | 1188.505 | 37     | [M+H+H+]2+ | aglycosylated       | C50H72N14O20      | Analyte List 201121 | 78820   | 1.574791 |
| 9   | 18.88    | 919.0283  | -0.574             | 2754.063 | 62.9   | [M+H+H2]3+ | G1F-N+H             | C110H171N17O64    | Analyte List 201121 | 60716   | 1.213081 |
| 10  | 18.8     | 1094.757  | -0.459             | 3281.249 | 26.5   | [M+H+H2]3+ | G2F+2H              | C130H204N18O79    | Analyte List 201121 | 54184   | 1.082574 |
| 11  | 18.95    | 1203.472  | 0.965              | 2404.93  | 64.5   | [M+H+H+]2+ | M5                  | C96H148N16O55     | Analyte List 201121 | 53728   | 1.073463 |
| 12  | 19.06    | 1142.959  | 0.922              | 2283.903 | 140.7  | [M+H+H+]2+ | G0-N                | C92H141N17O50     | Analyte List 201121 | 51176   | 1.022475 |
| 13  | 18.95    | 1000.398  | 0.113              | 2998.171 | 49.2   | [M+H+H2]3+ | G1F+N               | C120H187N19O69    | Analyte List 201121 | 36058   | 0.720424 |
| 14  | 19.16    | 1035.068  | 0.15               | 3102.182 | 40.8   | [M+H+H2]3+ | G2+A                | C123H191N19O73    | Analyte List 201121 | 29882   | 0.59703  |
| 15  | 18.92    | 1054.416  | 0.442              | 3160.225 | 50.1   | [M+H+H2]3+ | G2F+N               | C126H197N19O74    | Analyte List 201121 | 26722   | 0.533895 |
| 16  | 19.1     | 1089.086  | 0.137              | 3264.235 | 105.4  | [M+H+H2]3+ | G2F+G               | C129H201N19O78    | Analyte List 201121 | 24544   | 0.490379 |
| 17  | 18.95    | 946.3777  | -2.263             | 2836.111 | 63.5   | [M+H+H2]3+ | G0F+N               | C114H177N19O64    | Analyte List 201121 | 23784   | 0.475195 |
| 18  | 18.99    | 1114.447  | -0.266             | 2226.879 | 71.7   | [M+H+H+]2+ | M3F                 | C90H138N16O49     | Analyte List 201121 | 21256   | 0.424686 |
| 19  | 18.84    | 973.0416  | -4.942             | 2916.103 | 109.7  | [M+H+H2]3+ | M5G1F hybrid        | C116H181N17O69    | Analyte List 201121 | 18582   | 0.371261 |
| 20  | 18.95    | 924.3595  | -1.075             | 2770.057 | 90.5   | [M+H+H2]3+ | M5G1 hybrid         | C110H171N17O65    | Analyte List 201121 | 16420   | 0.328065 |
| 21  | 18.88    | 1108.433  | 0.331              | 3322.277 | 33.6   | [M+H+H2]3+ | G2F+N+H             | C132H207N19O79    | Analyte List 201121 | 12224   | 0.24423  |
| 22  | 19.1     | 830.0006  | -0.244             | 2486.98  | 148.1  | [M+H+H2]3+ | G0                  | C100H154N18O55    | Analyte List 201121 | 11256   | 0.22489  |
| 23  | 18.92    | 1134.961  | 0.278              | 2267.907 | 95     | [M+H+H+]2+ | H2N3F1              | C92H141N17O49     | Analyte List 201121 | 11252   | 0.22481  |
| 24  | 19.13    | 1021.393  | 0.833              | 3061.158 | 66.5   | [M+H+H2]3+ | M5G0F hybrid+G      | C121H188N18O73    | Analyte List 201121 | 9070    | 0.181215 |
| 25  | 18.99    | 748.6329  | 0.708              | 2242.877 | 101    | [M+H+H2]3+ | M4                  | C90H138N16O50     | Analyte List 201121 | 8322    | 0.16627  |
| 26  | 19.06    | 816.3265  | 1.121              | 2445.958 | 162.8  | [M+H+H2]3+ | G1-N                | C98H151N17O55     | Analyte List 201121 | 7166    | 0.143174 |
| 27  | 19.03    | 870.3439  | 0.968              | 2608.01  | 181.3  | [M+H+H2]3+ | G1-N+H              | C104H161N17O60    | Analyte List 201121 | 6170    | 0.123274 |
| 28  | 19.28    | 1026.725  |                    | 1025.717 |        | [M+H]+     | H6N3G1 (3+)         |                   | Manual              | 5002    | 0.099938 |
| 29  | 19.06    | 884.0192  |                    | 883.0119 |        | [M+H]+     | G1 (3+)             |                   | Manual              | 4748    | 0.094863 |
| 30  | 18.95    | 978.3784  |                    | 977.3711 |        | [M+H]+     | M5G1 hybrid+H (3+)  |                   | Manual              | 4258    | 0.085073 |
| 31  | 18.95    | 981.3894  |                    | 980.3821 |        | [M+H]+     | G1F2 (3+)           |                   | Manual              | 3638    | 0.072686 |
| 32  | 19.1     | 1075.409  |                    | 1074.401 |        | [M+H]+     | M5G1F hybrid+G (3+) |                   | Manual              | 3112    | 0.062176 |
| 33  | 19.1     | 694.6163  |                    | 2080.827 |        | [M+H+H2]3+ | M3 (3+)             |                   | Manual              | 2204    | 0.044035 |
| 34  | 18.99    | 856.6663  |                    | 1711.318 |        | [M+H+H2]2+ | M6 (3+)             |                   | Manual              | 2016    | 0.040279 |
| 35  | 19.27    | 1539.586  | 4.042              | 3077.158 | 124.4  | [M+H+H+]2+ | H6N3G1              | C121H188N18O74    | Analyte List 201121 | 1752    | 0.035004 |
| 36  | 19.4     | 1027.062  |                    | 1026.054 |        | [M+H]+     | M5G1F hybrid+H (3+) |                   | Manual              | 1704    | 0.034045 |
| 37  | 19.13    | 1102.763  |                    | 3305.267 |        | [M+H+H2]3+ | G1F+N+G             |                   | Manual              | 1174    | 0.023458 |

N, GlcNAc; H, Hex; G, NGNA; A, NANA

NISTmAb\_Trp\_celbound\_1-2\_01\_4149d

MetaboScape®を用いて、各種糖ペプチドの精密質量からペプチドをアサインした。

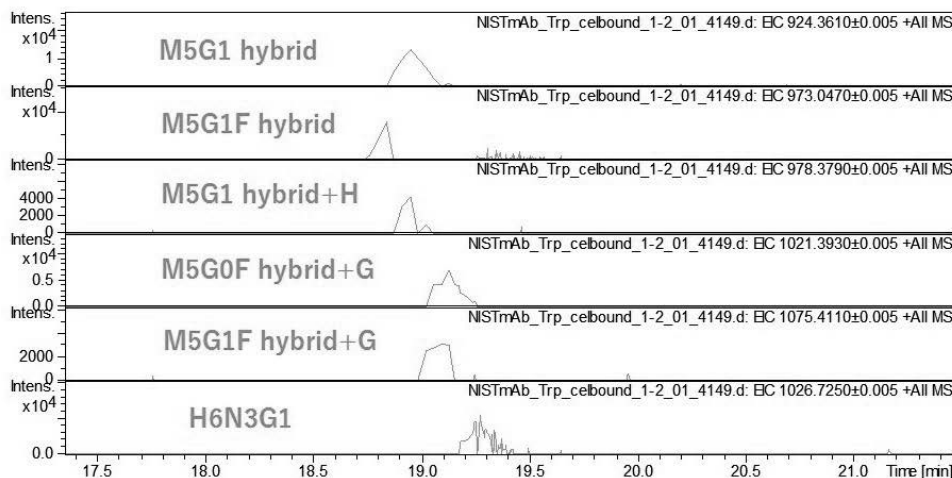


図4. 微量糖ペプチドのマスキングクロマトグラム例

NISTmAb 50  $\mu$ gを処理して得たペプチドマッピング用試料について、微結晶セルロースを充填したスピンカラムを用いて糖ペプチドを濃縮後、20  $\mu$ g相当をAQUITY UPLC BEH C18にて分離したときのマスキングクロマトグラム。検出限界付近のマイナー糖ペプチドを例示した。



リグマー形成の初期段階では、疎水性相互作用等による可逆的ダイマーが形成され、酸性度のより強い条件下では分子間ジスルフィド結合による不可逆的ダイ

マーに至ることが質量測定から推察された (図 5 b, c).

## 6. 宿主細胞由来タンパク質の解析

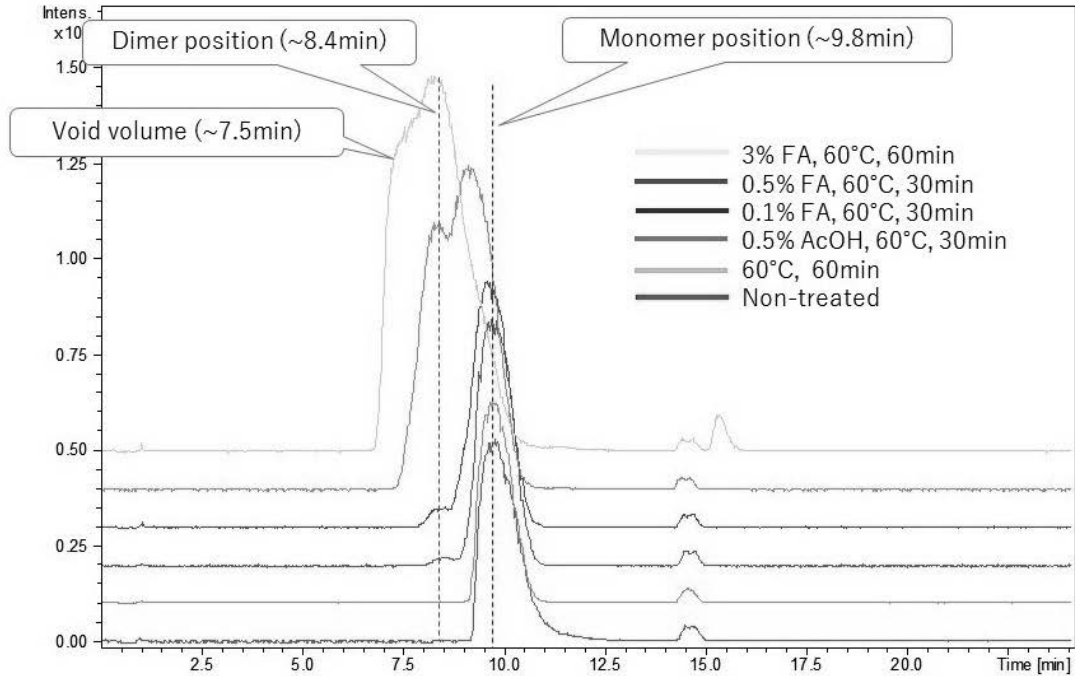


図 5 a. 抗体分子のサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) -MSクロマトグラム (抗体をネイティブ条件下でSEC分離後、ギ酸酸性とレイオン化)

NISTmAb 20  $\mu$ g を加熱処理した後、10  $\mu$ g 相当をAQUITY UPLC Protein BEH SECにて分離した時のクロマトグラム (m/z 3000-6000) を示した。FA : ギ酸, AcOH : 酢酸。

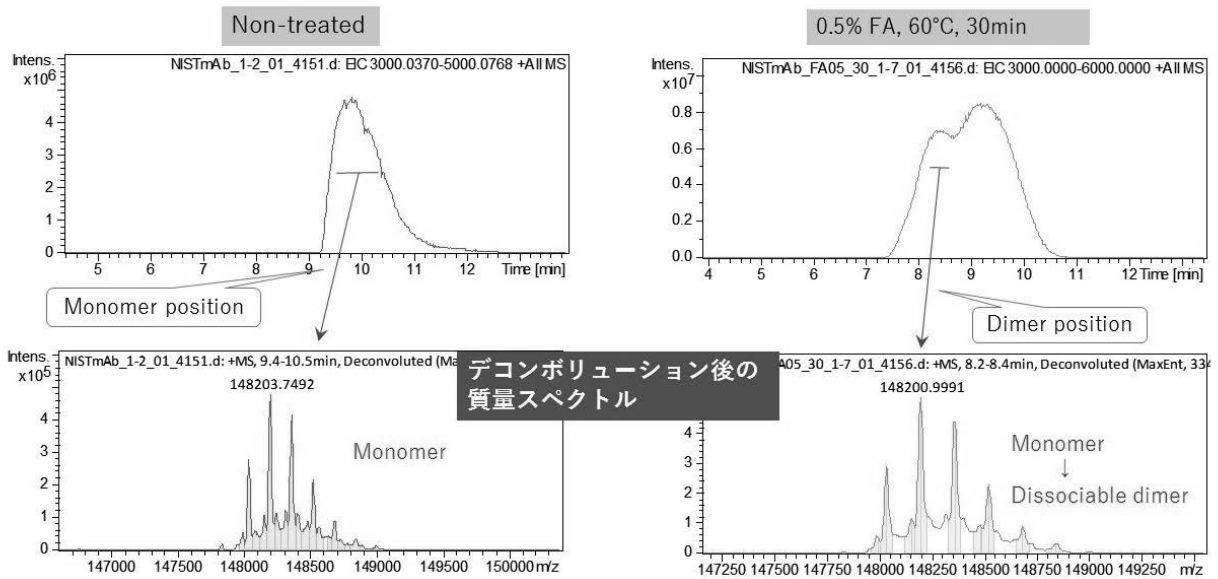


図 5 b. 0.5%ギ酸添加, 60°C, 30分処理によって生ずるダイマーの質量スペクトル

0.5%ギ酸, 60°C, 30分処理後に形成されるダイマーは、酸性条件下でのイオン化時にはモノマーに解離し得ることから、解離性ダイマーが生成したものと判断した。

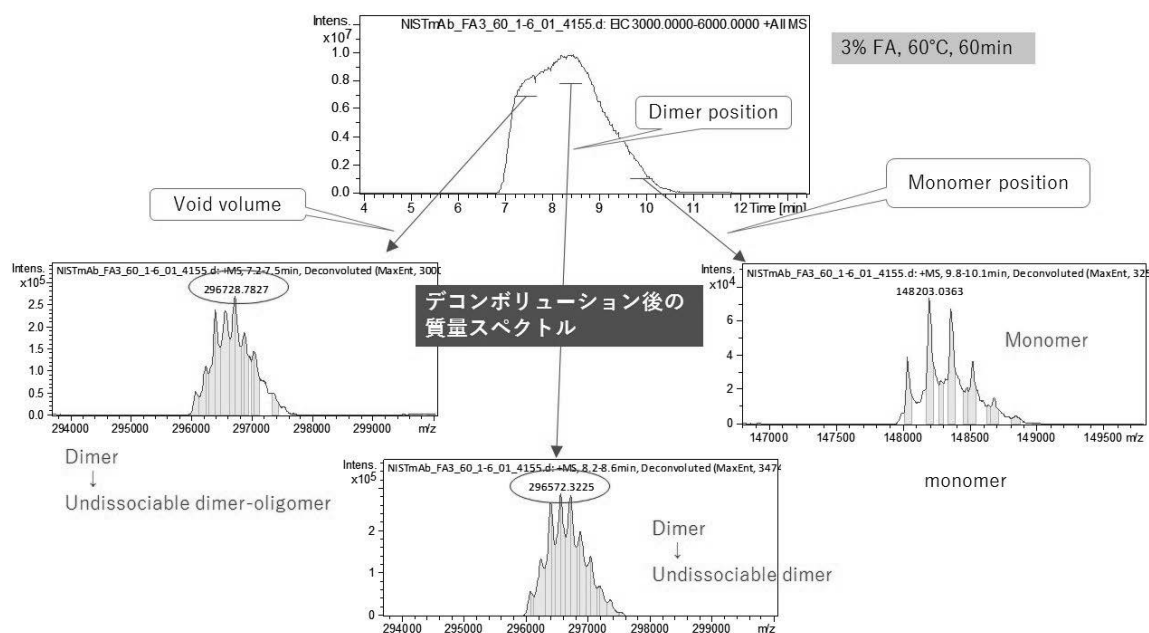


図 5c. 3%ギ酸添加, 60 °C, 60分処理によって生ずるオリゴマーの質量スペクトル

3%ギ酸, 60 °C, 60分処理後に形成されるダイマーやオリゴマーは, 酸性条件でのイオン化時にダイマーの質量として測定されることから, 非解離性ダイマーが生成したものと判断した。

動物培養細胞に特定のタンパク質を産生させ, 高度に精製したタンパク質製剤であっても, 微量の宿主細胞由来タンパク質 (Host Cell Proteins, HCP) の混入は避けられない。HCP不純物はELISAにより品質管理が行われているが, 課題も多く, より正確なHCP評価には質量分析手法が適していると考えられている。NISTmAbについて質量分析計を用いてHCPを測定した報告のうち, 2017年にHuangら (参考文献2) は, 1 ppm以上のレベルで検出されるHCPは50種類程度に及ぶことを報告している。このうち10 ppmレベル以上のHCPは8種類程度検出されている。質量分析によるHCP解析の多くは, 感度の高いオービトラップ型質量分析計やナノLCを組み合わせたプロテオミクス用システムにより行われているが, 我々のシステムはコンベンショナルLCにQ-TOFを組み合わせた装置であり, プロテオーム解析レベルの高感度性能を備えていない。そこで, 本システムを用いたHCP測定の限界を把握することも含め, 比較的少ない100  $\mu$ gのNISTmAbを測定試料とした方法のプロトコル化を検討した。その結果, Huangらの方法を参考にした時, 簡便で再現性良くHCP解析ができたことからプロトコルとして採用することとした。

更に今回の測定では, トリプシンとNISTmAbの量比を400:1に下げ, ノイズデータをカットオフすべく, かつシグナルthresholdを上げる等の改変を加えることにより, より効率的なHCP由来ペプチドの質量

データを取得することができた (図6)。これにより, Huangらが報告した20 ppm以上含まれるHCP定量値について, Huangらの報告値 (参考文献2) により近い値を導き出すことができた (表5 a, b)。

## 結 語

薬事総合研究開発センターのLC-TOF/MSシステムを用いて, 抗体医薬の特性解析を目的とした一連のプロトコルをブラッシュアップすることができた。本研究を通して, タンパク質分析におけるLC-TOF/MS装置の性能とその限界について理解を深めることができた。本研究の成果は, 抗体医薬のみならず全てのタンパク質製剤の特性解析や品質評価にも適用できるものである。日進月歩で進むこの分野において, 我々は創薬支援の立場から, 新規プロトコルの追加や既存プロトコルのブラッシュアップ作業を続けていく必要があると考えている。

## 参考文献

- 1) Mol. Cell. Proteomics (2020) 19, 11-30
- 2) Anal. Chem. (2017) 89, 5436-5444.

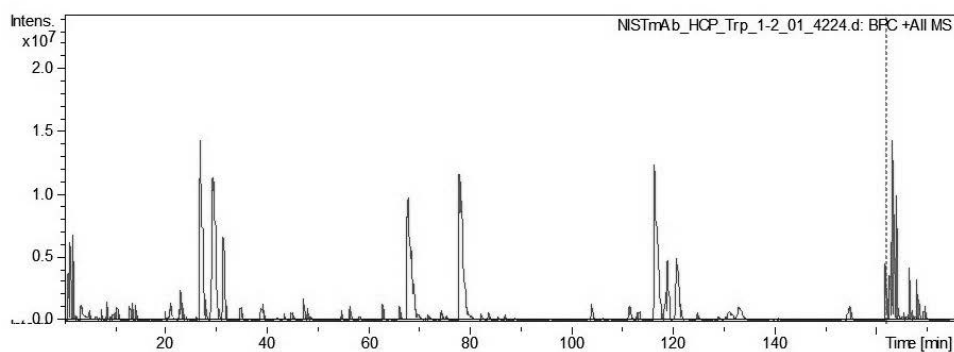


図 6. 宿主細胞由来タンパク質 (HPC) のためのペプチドマッピング

Huangらの方法を改変して、前処理、測定、解析を行った。NISTmAb 100  $\mu$ gを非変性下、トリプシン処理した全量をAQUITY UPLC BEH C18にて分離した時のベースピーククロマトグラム。この時、クロマト上で確認されるメジャーピークはNISTmAb由来ペプチドであり、HCP由来ペプチドは微小ピークとして検出された。

MS data file D:\Data\Ogiso\Bukai\210115\NISTmAb\_HCP\_Trp\_1-2\_01\_4241.d\NISTmAb\_HCP\_Trp\_1-2\_01\_4241.mgf

Database NCBIprot 20180907

Taxonomy Mus musculus (house mouse) (177,456 sequences)

| Family Member | Database | Accession | Score       | Mass  | Num. of matches | Num. of significant matches | Num. of significant sequences | emPAI | Description |  |
|---------------|----------|-----------|-------------|-------|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|-------|-------------|--|
| 1             | 1        | NCBIprot  | AIU56799.1  | 11126 | 25944           | 328                         | 328                           | 8     | 1.57        | anti-lox-1 15C4 light chain [Mus musculus]   |
| 2             | 1        | NCBIprot  | AIU56798.1  | 10162 | 51300           | 347                         | 347                           | 7     | 0.62        | anti-lox-1 15C4 heavy chain [Mus musculus]   |
| 3             | 1        | NCBIprot  | NP_031464.1 | 8146  | 39331           | 319                         | 319                           | 23    | 5.11        | ● fructose-bisphosphate aldolase A isoform 2 [Mus musculus]  |
| 3             | 2        | NCBIprot  | NP_033787.2 | 5106  | 39370           | 228                         | 228                           | 19    | 3.44        | ● fructose-bisphosphate aldolase C [Mus musculus]  |
| 3             | 3        | NCBIprot  | EDL15562.1  | 1394  | 11284           | 58                          | 58                            | 5     | 2.66        | aldolase 3, C isoform, isoform CRA_c [Mus musculus]  |
| 4             | 1        | NCBIprot  | AOR52367.1  | 2854  | 11248           | 64                          | 64                            | 2     | 0.69        | immunoglobulin light chain variable region, partial [Homo sapiens]                                     |
| 5             | 1        | NCBIprot  | Q922R8.3    | 2574  | 48070           | 81                          | 81                            | 5     | 0.38        | ● protein disulfide-isomerase A6   |
| 6             | 1        | NCBIprot  | ABC86083.1  | 761   | 15988           | 40                          | 40                            | 1     | 0.21        | immunoglobulin kappa light chain, partial [Mus musculus]   |
| 7             | 1        | NCBIprot  | AAF04609.1  | 476   | 10884           | 12                          | 12                            | 1     | 0.31        | immunoglobulin kappa chain, partial [Mus musculus]   |
| 8             | 1        | NCBIprot  | 1BI1_B      | 344   | 13814           | 13                          | 13                            | 2     | 0.54        | Chain B, The Crystal Structure Of H-2dd Mhc Class II In Complex With The Hiv-1 Derived Peptide P18-110 |
| 9             | 1        | NCBIprot  | BAA03821.1  | 281   | 49129           | 17                          | 17                            | 3     | 0.21        | cytokeratin 15 [Mus musculus]  |
| 9             | 2        | NCBIprot  | AAA39391.1  | 249   | 57807           | 14                          | 14                            | 3     | 0.18        | epidermal keratin subunit I, partial [Mus musculus]  |
| 10            | 1        | NCBIprot  | AAB05161.1  | 158   | 11369           | 12                          | 12                            | 1     | 0.3         | Ig 4A1.A4 light chain, partial [Mus musculus]  |
| 11            | 1        | NCBIprot  | AAA39825.1  | 151   | 62728           | 12                          | 12                            | 5     | 0.28        | ● neuroleukin [Mus musculus domesticus]  |

表 5 a. MASCOT®によるタンパク質同定

MASCOT解析でヒットした上位11種類のタンパク質を示した。Huangらの報告した上位4種類に相当するHCP (●) を検出できた。他は抗体由来ペプチド、または、混入ケラチン等であった。

|                                  | Peak Area |         |         |         | ppm   |
|----------------------------------|-----------|---------|---------|---------|-------|
|                                  | pep1      | pep2    | pep3    | mean    |       |
| $\beta$ -casein                  | 5162269   | 4824839 | 2333042 | 4106717 | 500   |
| neuroleukin                      | 194855    | 177339  | 137987  | 170060  | 20.7  |
| protein disulfide-isomerase A6   | 1145629   | 821096  | 698311  | 888345  | 108.2 |
| fructose-bisphosphate aldolase A | 1976489   | 1631712 | 1380518 | 1662906 | 202.5 |
| fructose-bisphosphate aldolase C | 655691    | 576363  | 489457  | 573837  | 69.9  |

表 5 b. NISTmAbに含まれるマウス細胞由来タンパク質の評価

各タンパク質に対してヒットしたペプチドのうち検出量の多い上位3つのピーク面積の平均値をそのタンパク質の量に相当すると仮定して、内部標準 $\beta$ カゼインを基準に含有量を評価した。

# 質量分析計を活用した医薬品中のニトロソアミン不純物の分析

米田 哲也, 高山 信幸, 竹林 憲司, 小笠原 勝, 薬事研究会分析部会

## An LC-MS/MS Method for Quantitative Determination of NDMA in Drug Products and Substances of Valsartan, Ranitidine and Metformin.

YONEDA T, TAKAYAMA N, TAKEBAYASHI K, OGASAWARA M,

The Chemical Analysis Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

### 要 約

ニトロソアミンは、高い発がん性を有すると考えられている。近年、医薬品中に許容摂取限度量以上のニトロソアミンが検出される事例が相次ぎ、世界中で医薬品の自主回収が行われた。医薬品中のニトロソアミンの定量分析方法を確立することは、医薬品の安全性を確保するために非常に重要である。

本研究では、LC-MS/MSを用いた、バルサルタン、ラニチジン及びメトホルミン中の*N*-ニトロソジメチルアミン (NDMA) の定量分析法の構築を目指し検討を行った。その結果、0.5~10ng/mLの濃度範囲において、相関係数 ( $R$ ) > 0.999の良好な直線性が得られた。検出および定量限界濃度は、それぞれ0.1ng/mL、0.5ng/mLであった。バルサルタン、ラニチジン及びメトホルミンについて添加回収試験を行った結果、回収率は89.6~110.3%であり良好な回収率であった。以上から、LC-MS/MSを用いた医薬品中のNDMAの分析方法を構築することができた。

### Summary

Nitrosoamines are considered to have high carcinogenic potency, and several medications have been subject to recall worldwide due to the presence of these impurities. To ensure the safety of pharmaceutical products, it is important to establish an analytical method for the quantitative detection of nitrosoamines.

In this study, an LC-MS/MS method was validated for the quantitative detection of NDMA in drug products and substances of valsartan, ranitidine, and metformin. Good linearity with a correlation coefficient ( $R$ ) > 0.999 was achieved at the concentration range of 0.5–10ng/mL. The limits of detection and quantification were 0.1ng/mL and 0.5ng/mL, respectively. Recovery tests were carried out by applying NDMA to valsartan, ranitidine and metformin. The recovery rates were determined to be 89.6–110.3%, which were well acceptable in the validation process. In conclusion, a practical LC-MS/MS method for the determination of NDMA in drug matrices was established.

**キーワード**：医薬品, ニトロソアミン, 液体クロマトグラフ質量分析計

**Key words** : drug, Nitrosoamine, Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry

### 緒 言

ニトロソアミンは、アミンにニトロソ基をもつ化合物の総称であり、古くから発がん性を有することが知られている<sup>1)</sup>。潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理 (ICH-M7) では、クラス1 (既知の変異原性発がん物質) に分類されている<sup>2)</sup>。

2018年6月にバルサルタン原薬において、ニトロソアミンの一つである*N*-ニトロソジメチルアミン (以下、NDMAと示す) が検出されたことを皮切りに、ラニチジンやメトホルミンを原薬とする様々な製剤からもニトロソアミンが検出され、世界的に医薬品の回

収が行われた<sup>3-11)</sup>。その後、ニトロソアミンの混入が排除できない製剤については、厳格な管理が求められている。なお製剤中のニトロソアミンの許容摂取限度量は、表1のとおり設定されている<sup>12)</sup>。従って、ニトロソアミンのリスク管理を行うには、表中の許容摂取限度量を正確に定量できる分析方法を構築しなければならない。この点において、許容摂取限度量は極めて微量であるため、製剤中に含まれる微量のニトロソアミンを検出するには、高感度な分析機器と分析技術が不可欠であることが示されている<sup>13)</sup>。

そこで本研究では、これまでの報告<sup>14)</sup>を参考に、製剤中に許容摂取限度量以上の混入が報告されたNDMAに焦点を当て、当センターのLC-MS/MSを

使用し、NDMAの分析条件の最適化、バルサルタン錠、ラニチジン塩酸塩及びメトホルミン錠を用いたNDMAの添加回収試験を通じて、NDMAの分析方法

を構築することを目的とした。以下にその検討内容を報告する。

表1. ニトロソアミンの一日摂取量の許容摂取限度量

| ニトロソアミン  | 許容摂取限度量<br>(ng/day) |
|--|---------------------|
| <i>N</i> -nitrosodimethylamine (NDMA)                          | 96                  |
| <i>N</i> -nitrosodiethylamine (NDEA)                           | 26.5                |
| <i>N</i> -nitroso- <i>N</i> -methyl-4-aminobutyric acid (NMBA) | 96                  |
| <i>N</i> -nitrosomethylphenylamine (NMPA)                      | 26.5                |
| <i>N</i> -nitrosoisopropylethylamine (NIPEA)                   | 26.5                |
| <i>N</i> -nitrosodiisopropylamine (NDIPA)                      | 26.5                |

## 方法及び結果

分析には、ACQUITY UPLC H-Class PLUSシステム、及びXevo TQ-XSタンデム四重極型質量分析計を用いた。なお、定量限界濃度の評価及び直線性の検討はグラジエント条件①、バルサルタン錠及びラニチジン塩酸塩についての添加回収試験はグラジエント条件②、メトホルミン錠についての添加回収試験はグラジエント条件③により分析を行った。

### LC-MS/MS分析条件

#### LC条件

装置：ACQUITY UPLC H-Class PLUSシステム

カラム：ACQUITY UPLC HSS T3,

1.8  $\mu$ m, 3.0  $\times$  100 mm

カラム温度：30  $^{\circ}$ C

注入量：10  $\mu$ L

流量：0.5mL/min

移動相A：0.1%ギ酸水溶液

移動相B：0.1%ギ酸メタノール

分析時間：5分 or 7分

グラジエント条件①：(A) 95% (B) 5%

グラジエント条件②：0~3.6分 (A) 95% (B) 5%

3.6~5分 (A) 95% $\rightarrow$ 5%

(B) 5% $\rightarrow$ 95%

4.5~7分 (A) 5% (B) 95%

グラジエント条件③：0~4分 (A) 97% (B) 3%

4~4.5分 (A) 97% $\rightarrow$ 3%

(B) 3% $\rightarrow$ 97%

4.5~7分 (A) 3% (B) 97%

#### MS条件

装置：Xevo TQ-XSタンデム四重極型質量分析計

イオン化モード：APCI

Voltages

mode：current corona：1.0 [uA] cone：25 [V]

Gas Flow

desolvation：800 [L/hr] cone：150 [L/hr]

nebulizer：4.0 [Bar]

APCI probe temp：450  $^{\circ}$ C

#### MRM条件

| 成分名     | プリカーサー<br>イオン<br>(m/z) | プロダクト<br>イオン<br>(m/z) | Cone | Collision<br>energy |
|---------|------------------------|-----------------------|------|---------------------|
| NDMA    | 75                     | 58                    | 25   | 10                  |
|         |                        | 43                    |      |                     |
| d6-NDMA | 81                     | 64                    |      |                     |
|         |                        | 49                    |      |                     |

### ① 定量限界濃度の評価

NDMA標準溶液の希釈液を作成し、上記分析条件において定量及び検出が可能な濃度範囲について検討した。その結果より定量限界濃度を算出した。定量限界濃度の評価については、各希釈溶液のS/N比を算出し、その値が10以上となる最も低い濃度を定量限界濃度とした。定量限界濃度については再現性を確認するため、6回繰返し注入によるRSDを算出した。

### 標準原液の調製

NDMA（東京化成）を10  $\mu$ L (10mg) 量り、10 mLのメスフラスコに入れメタノールでメスアップした（1 mg/mL）。1 mg/mLのNDMA溶液を精製水で希釈し、10 ng/mL、1 ng/mL、0.1 ng/mLのNDMA標準原液をそれぞれ調製した。

### 内標準原液の調製

d6-NDMA標準溶液 (100 μg/mL) (関東化学) を 1 mL量り, 10 mLのメスフラスコに入れメタノールでメスアップした (10 μg/mL). 10 μg/mLを精製水で希釈し, 100 ng/mLのd6-NDMA標準原液を調製した.

### 標準溶液の調製

上記で調製した標準原液と内標準原液を用いて, NDMAの濃度が 0.01~1 ng/mL, d6-NDMAの濃度が 10 ng/mLとなるよう標準溶液を調製した. なお, 希釈には精製水を用いた.

### 結果

プリカーサーイオン75に対してプロダクトイオン58及び43を比較すると, プロダクトイオン58の方が, 感度が良いことが分かった (表2). プロダクトイオン58で分析した場合, 0.5 ng/mLのNDMA標準溶液がS/N比10以上で最も低い濃度であったため, 0.5 ng/mLを定量限界濃度と設定した. 0.5 ng/mLの6回繰り返し注入のRSDは2.98%と十分な再現性が得られた. なお, プロダクトイオン43で分析した場合S/N比が10以上になるのは, 5 ng/mLであった.

表2. 定量限界濃度の検討

| NDMA 75>58 (d6-NDMA 81>64) |        |      | NDMA 75>43 (d6-NDMA 81>49) |        |      |
|----------------------------|--------|------|----------------------------|--------|------|
| 標準溶液濃度                     | ピーク面積比 | S/N  | 標準溶液濃度                     | ピーク面積比 | S/N  |
| 1 ng/mL                    | 0.113  | 30   | 1 ng/mL                    | 0.118  | 5    |
| 0.5 ng/mL                  | 0.062  | 22   | 0.5 ng/mL                  | 0.031  | 2    |
| 0.1 ng/mL                  | 0.023  | 3    | 0.1 ng/mL                  | N.D.   | N.D. |
| 0.05 ng/mL                 | N.D.   | N.D. | 0.05 ng/mL                 | N.D.   | N.D. |
| 0.01 ng/mL                 | N.D.   | N.D. | 0.01 ng/mL                 | N.D.   | N.D. |

N.D.= 検出不可

### ② 直線性の確認

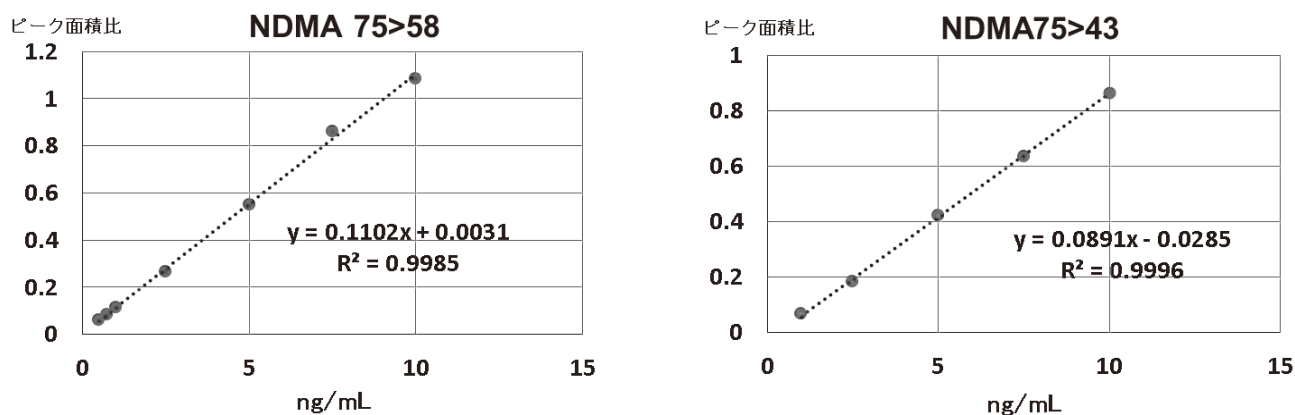
定量限界濃度と設定した0.5 ng/mLから10 ng/mLまでのNDMA標準溶液を調製し, 直線性の確認を行った.

### 結果

プロダクトイオン58で分析した場合, 0.5 ng/mL ~ 10 ng/mLの範囲では, 相関係数0.9992となり良好な

直線性が得られた (図1). プロダクトイオン43で分析した場合, 1 ng/mL ~ 10 ng/mLの範囲では, 相関係数0.9998となり良好な直線性が得られた. 従ってプロダクトイオン58で分析を行った方が, より低濃度までNDMAを検出できることが分かった. 以下の添加回収試験では, プロダクトイオン58を指標に分析することとした.

図1. 直線性の検討



### ③ バルサルタン錠の添加回収試験

市販のバルサルタン錠を使用し、添加回収試験を行った。添加するNDMA標準溶液の濃度は、試料300 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①と試料300 mgを溶媒5 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.6 ng/mL）の1/10を含む濃度を添加する条件②の2パターンで検討を行った。なお、それぞれの試料についてRSD（n=3）も算出した。

#### 試料調製方法

バルサルタン錠を乳鉢・乳棒で粉末にし、約300 mgを量り遠沈管に入れた。この遠沈管にメタノールを加え振り混ぜた。ここにNDMA標準溶液を加え、さらにd6-NDMA標準溶液を入れ、全量が10 mLまたは5 mLとなるように精製水を加えた。その後、振り混ぜて超音波処理を5分間行った。この液を12,000 rpmで10分間遠心分離し、上清をフィルターでろ過し、試料とした。添加したNDMAの濃度は、条件①では2.5, 5, 7, 5 ng/mL、条件②では1, 2.5, 5 ng/mLとなるよう調製した。

#### 結果

試料300 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①では、回収率95.51～97.52%と良好な結果となった。それぞれの添加濃度のRSD（n=3）は、2.5 ng/mLでは0.52%、5 ng/mLでは0.08%、7.5 ng/mLでは0.19%であった。試料300 mgを溶媒5 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.6 ng/mL）の1/10を含む濃度を添加する条件②では、回収率92.78～101.56%と良好な結果となった。それぞれの添加濃度のRSD（n=3）は、1 ng/mLでは4.54%、2.5 ng/mLでは1.46%、5 ng/mLでは1.47%であった。

### ④ ラニチジン塩酸塩の添加回収試験

市販のラニチジン塩酸塩錠は、すべて自主回収となっており入手が不可能であったため、ラニチジン塩酸塩原薬からの添加回収試験を想定し、「ラニチジン塩酸塩」（東京化成）の試薬を使用し添加回収試験を行った。添加するNDMA標準溶液の濃度は、バルサルタン錠の添加回収試験と同様に試料200 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.4 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①と試料400 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.8 ng/mL）の1/10を含む濃度を添加する条件②の2パターンにおいて検討を行った。なお、それぞれの試料につ

いてRSD（n=3）も算出した。LC-MS/MS分析条件については、上記で行ったバルサルタン錠の添加回収試験と同様とした。

#### 試料調製方法

ラニチジン塩酸塩を、約200 mgまたは約400 mgを量り遠沈管に入れた。この遠沈管にメタノールを加え振り混ぜた。ここにNDMA標準溶液を加え、さらにd6-NDMA標準溶液を添加し、全量が10 mLとなるように精製水を加えた。その後、振り混ぜて超音波処理を5分間行った。この液の上清をフィルターでろ過し、試料とした。添加したNDMAの濃度は、条件①では0, 4, 6, 8 ng/mL、条件②では0, 1, 2.5, 5 ng/mLとなるよう調製した。

#### 結果

試料200 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（6.4 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①では、回収率98.64～107.05%と良好な結果となった。それぞれの添加濃度のRSD（n=3）は、0 ng/mLでは3.00%、4 ng/mLでは0.66%、6 ng/mLでは2.13%、8 ng/mLでは0.64%であった。試料400 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（12.8 ng/mL）の1/10を含む濃度を添加する条件②では、回収率89.64～110.32%と良好な結果となった。それぞれの添加濃度のRSD（n=3）は、0 ng/mLでは5.20%、1 ng/mLでは0.43%、2.5 ng/mLでは1.38%、5 ng/mLでは3.67%であった。

### ⑤ メトホルミン錠の添加回収試験

市販のメトホルミン錠を使用し、添加回収試験を行った。添加したNDMA標準溶液の濃度は、バルサルタン錠やラニチジン塩酸塩と同様に試料900 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（3.3 ng/mL）を含む濃度を添加する条件①と試料3,000 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度（11 ng/mL）の1/10を含む濃度を添加する条件②の2パターンにおいて検討を行った。なお、それぞれの試料についてRSD（n=3）も算出した。LC-MS/MS分析条件については、上記で行ったバルサルタン錠やラニチジン塩酸塩の添加回収試験の条件から移動相のグラジェント条件を変更して分析を行った。

#### 試料調製方法

メトホルミン錠を乳鉢・乳棒で粉末にし、約900 mgまたは約3,000 mgを量り遠沈管に入れた。この遠沈管にNDMA標準溶液を加え、さらにd6-NDMA標準

溶液を添加し、全量が10 mLとなるように精製水を加えた。その後、振り混ぜて超音波処理を5分間行った。この液を12,000 rpmで10分間遠心分離し、上清をフィルターでろ過し、試料とした。添加したNDMAの濃度は、条件①では2, 3, 4 ng/mL条件②では1, 2.5, 5 ng/mLとなるよう調製した。

## 結果

試料900 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度 (3.3 ng/mL) を含む濃度を添加する条件①では、回収率100.24~108.21%と良好な結果となった。それぞれの添加濃度のRSD (n=3) は0 ng/mLでは1.56%, 2 ng/mLでは1.07%, 3 ng/mLでは1.14%, 4 ng/mLでは0.61%であった。試料3,000 mgを溶媒10 mLに溶かした際の許容摂取限度濃度 (11 ng/mL) の1/10を含む濃度を添加する条件②では、回収率98.37~105.68%と良好な結果となった。それぞれの添加濃度のRSD (n=3) は、0 ng/mLでは6.95%, 1 ng/mLでは2.91%, 2.5 ng/mLでは2.76%, 5 ng/mLでは1.16%であった。

## まとめ

0.5 ng/mL ~10 ng/mLの濃度のNDMAにおいて、良好な直線性と再現性を得ることができた。この分析条件を用いて、添加回収試験 (バルサルタン錠, ラニチジン塩酸塩, メトホルミン錠) を行った。その結果、許容摂取限度濃度のNDMAを添加しても、良好な回収率が得られた。さらに、その許容摂取限度濃度の1/10の濃度を添加しても良好な回収率が得られることがわかった。従って、当センターにおけるLC-MS/MSを用いてのNDMAの分析条件を構築することができた。今後、NDMA以外のニトロソアミン類についても分析方法の構築を進めていく予定である。

## 参考文献

- 1) <https://www.uspharmacist.com/article/fda-update-on-recent-voluntary-arb-drug-recalls>.
- 2) ICH M7 Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, International Conference on Harmonization, March 2018.
- 3) <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-reviewing-medicines-containing-valsartan-zhejiang-huahai-following-detection-impurity>.
- 4) <https://www.mhlw.go.jp/content/11126000/0003>

08146.pdf

- 5) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity>.
- 6) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-new-testing-results-including-low-levels-impurities-ranitidine-drugs>.
- 7) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ranitidine-article-31-referralema-review-ranitidine-medicines-following-detection-ndma\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ranitidine-article-31-referralema-review-ranitidine-medicines-following-detection-ndma_en.pdf)
- 8) <https://www.pmda.go.jp/files/000231528.pdf>
- 9) <https://www.hsa.gov.sg/announcements/news/hsa-recalls-three-out-of-46-metformin-medicines>
- 10) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-alerts-patients-and-health-care-professionals-nitrosamine-impurity-findings-certain-metformin>.
- 11) <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-update-metformin-diabetes-medicines>.
- 12) Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry: <https://www.fda.gov/media/141720/download>
- 13) <https://www.pmda.go.jp/files/000232925.pdf>
- 14) <https://www.edqm.eu/sites/default/files/omcl-method>.



# ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討（第2報）

高山 信幸, 米田 哲也, 竹林 憲司, 小笠原 勝, 薬事研究会分析部会

## A basic study on the analysis of elemental impurities using inductivity coupled plasma mass spectrometry (the Second report)

TAKAYAMA N, YONEDA T, TAKEBAYASHI K, OGASAWARA M,

The Chemical Analysis Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

### 要 約

製剤中には、原薬や添加剤、合成時の触媒や反応容器などから元素不純物が混入するケースが考えられる。安全安心な医薬品が求められていることから、これらの潜在的元素不純物の評価は重要な課題となる。

誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）は、ppb (=ng/ml) レベルまでの元素成分を測定することができる。マイクロ波分解装置では、密閉状態で化合物を分解するため、揮発性金属の飛散を抑制することができる。本研究では、ICP-MS測定における塩酸の添加の必要性やマイクロ波による試料前処理の影響を評価した。また、Os元素の測定における高精度な分析方法の確立を行った。汎用的な分解方法では分解できない製剤に関しては、フッ化水素酸を添加することで分解することができた。フッ化水素酸を使用した場合において、添加回収試験を実施し、得られた測定値が医薬品規制調和国際会議（ICH）で定められた適合基準を満たしていることを確認した。

### Summary

Various kinds of elemental impurities can be contaminated in drug products under pharmaceutical production. In order to meet the safety and security requirements, the establishment of the analytical methods for elemental impurities is an important issue.

The inductivity coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) can determine the extremely low level metal concentrations. The microwave digestion system can decompose compounds in closed vessels, which enables to avoid the loss of volatile elements. In this study, we evaluated the necessity of adding hydrochloric acid for ICP-MS measurements and the effects of the microwave digestion for sample preparation. In addition, we validated an analytical method to accurately determine the Os. Regarding drugs that were not digested by our standard digestion method, adding hydrofluoric acid was found to be effective in achieving their complete digestion. In this case, we carried out the spike recovery tests of some elements required for ICH-Q3D and verified that the measured values met the criteria defined in the ICH.

**キーワード：**医薬品, 元素不純物, 誘導結合プラズマ質量分析計, マイクロ波分解

**Key words :** drug, impurity element, inductivity coupled plasma mass spectrometry, microwave decomposition

### 緒 言

医薬品の品質評価において、人体に有害である金属成分の正確な分析は必須である。厚生労働省医薬品局より発行される「医薬品の元素不純物ガイドラインについて」では、平成29年4月1日以降に承認申請された新医薬品に対して医薬品規制調和国際会議（ICH）で検討された元素不純物ガイドラインICH-Q3Dが適用されており、元素不純物の各成分の一日の許容曝露量（PDE値）が設定されている（表1）<sup>1)</sup>。また令和3年6月公示の第十八改正日本薬局方には、日本薬局方の製剤は原則として一般試験法の元素不純物試験法

<2.66>に係る規定に従って適切に管理する旨の記載が通則に盛り込まれている。さらに今後、一定の猶予期間を設けた上、ICH-Q3Dを踏まえた管理規定が第十八改正日本薬局方の医薬品各条に措置される予定であることも示されている<sup>2)</sup>。

誘導結合プラズマ質量分析計（inductivity coupled plasma mass spectrometry: ICP-MS）は、非常に高感度な分析が可能であるため、医薬品中の金属分析に適している。ICP-MSでは、水溶液の状態サンプルを導入するため、錠剤などの固形サンプルはマイクロ波分解装置を用いて、水溶液中に分解する必要がある。富山県薬事研究会分析部会では、これらの装置を用い

て医薬品中の金属成分を正確かつ安定的に分析できる 包括的な手法を確立した<sup>3)</sup>。

表 1. Q3Dにおけるオプション1の元素不純物許容濃度。一日用量が10g以下の製剤中の元素不純物量を評価するためにオプション1が選択された場合には、これらの濃度限度値を用いることができる。

| 元素 | クラス | 経口製剤の濃度<br>µg/g | 注射剤の濃度<br>µg/g | 吸入剤の濃度<br>µg/g |
|----|-----|-----------------|----------------|----------------|
| Cd | 1   | 0.5             | 0.2            | 0.2            |
| Pb | 1   | 0.5             | 0.5            | 0.5            |
| As | 1   | 1.5             | 1.5            | 0.2            |
| Hg | 1   | 3               | 0.3            | 0.1            |
| Co | 2A  | 5               | 0.5            | 0.3            |
| V  | 2A  | 10              | 1              | 0.1            |
| Ni | 2A  | 20              | 2              | 0.5            |
| Tl | 2B  | 0.8             | 0.8            | 0.8            |
| Au | 2B  | 10              | 10             | 0.1            |
| Pd | 2B  | 10              | 1              | 0.1            |
| Ir | 2B  | 10              | 1              | 0.1            |
| Os | 2B  | 10              | 1              | 0.1            |
| Rh | 2B  | 10              | 1              | 0.1            |
| Ru | 2B  | 10              | 1              | 0.1            |
| Se | 2B  | 15              | 8              | 13             |
| Ag | 2B  | 15              | 1              | 0.7            |
| Pt | 2B  | 10              | 1              | 0.1            |
| Li | 3   | 55              | 25             | 2.5            |
| Sb | 3   | 120             | 9              | 2              |
| Ba | 3   | 140             | 70             | 30             |
| Mo | 3   | 300             | 150            | 1              |
| Cu | 3   | 300             | 30             | 3              |
| Sn | 3   | 600             | 60             | 6              |
| Cr | 3   | 1100            | 110            | 0.3            |

## 試験方法及び結果

### ① 水銀の安定化

ICP-MSの測定では、標準溶液や試料溶液の調製時に、金属を安定化させるために、酸を添加する必要がある。特にHgやAu、Ptなどの金属は王水にしか溶解しないため、硝酸・塩酸の添加が望ましい。Hgの安定性の検討として、硝酸のみが添加されているHg標準溶液（A社）と硝酸・塩酸が添加されているHg標準溶液（B社）のそれぞれを用いて、検量線を作成した。表2に検量線の濃度範囲を示す。各検量線のレベルにおける硝酸濃度は2.8%となるように硝酸を添加した。A社の標準溶液では、相関係数は、0.9925となった。適切にバリデーションされた場合、相関係数は0.999以上となることが多く、硝酸・塩酸が添加されているB社は、相関係数が0.9995と良好な値を示した（図1）。これにより、Hgを正確に定量するためには、塩酸を添加する必要があると分かった。

### ② 試料のマイクロ波分解の必要性

内服液剤中の金属濃度を測定する場合、製剤を水に溶解させるだけで、試料溶液を調製することが出来る。しかし、この場合、製剤中に含まれる有機物が、プラズマ部での金属のイオン化に影響を及ぼすため、マイクロ波処理により、製剤中の有機異物を無機物にまで完全に分解することが推奨されている<sup>4)</sup>。そこで、試料のマイクロ波分解の必要性を確認するため、X社の内服液剤を用い、希釈しただけの試料溶液とマイクロ波処理を施した試料溶液の両方で添加回収試験を実施した（図2）。添加回収試験用の試料溶液は、表3に示す元素が1,000倍希釈となるように添加した。また、測定の際には、表4に示される内標準溶液を100倍に希釈して用いた。内標準液の酸の終濃度が、硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように調製した。

#### ○試料溶液の調製方法

希釈のみによる調製：内服液剤を0.5 mL量り、25 mLメスフラスコに加えた。そこに、表3に示される

表2 検量線の濃度範囲

|    | 検量線レベル |         |       |        |        |         |
|----|--------|---------|-------|--------|--------|---------|
|    | 1      | 2       | 3     | 4      | 5      | 6       |
| A社 | 0 ppb  | 1.5 ppb | 9 ppb | 30 ppb | 90 ppb | 150 ppb |
| B社 | 0 ppb  | 1.5 ppb | 9 ppb | 30 ppb | 90 ppb | 150 ppb |

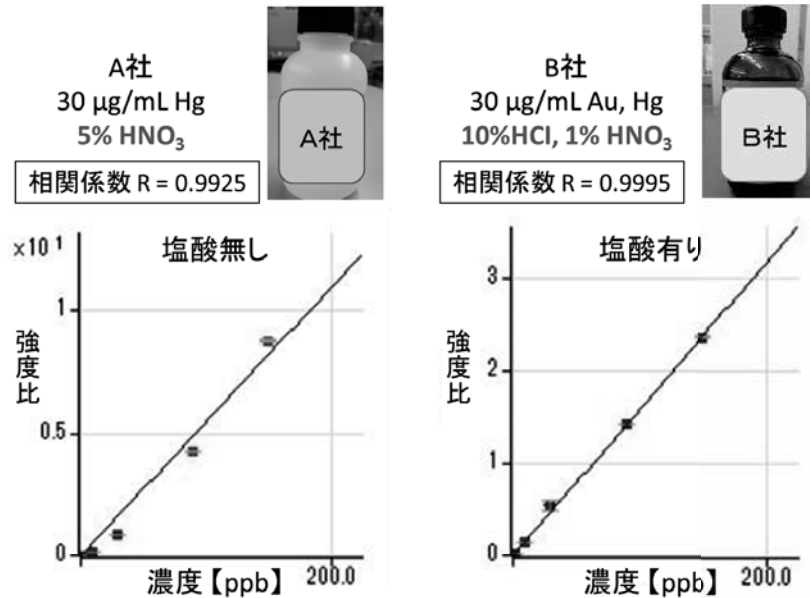


図1 A社とB社の標準溶液を用いた際の検量線の比較

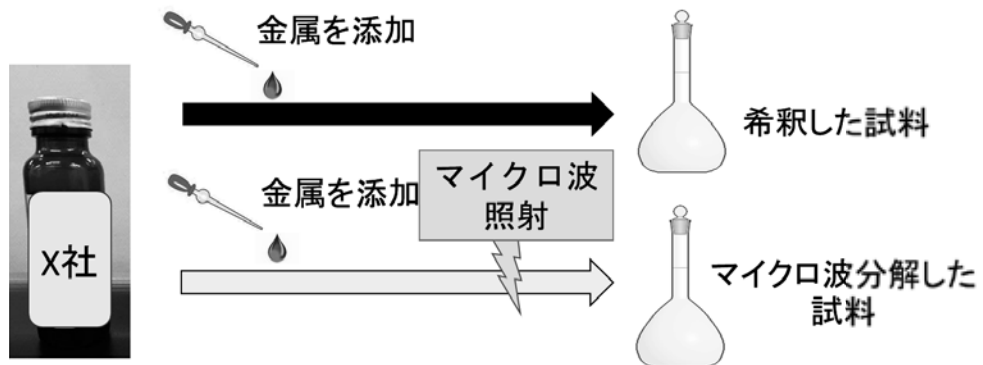


図2 添加回収試験用の試料溶液の調製方法

表3 標準溶液の組成

| 使用標準原液          | 含有元素   |
|-----------------|--|
| SPEX製 XSTC-2071 | 30000 ppb : Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru   |
| SPEX製 XSTC-2072 | 30000 ppb : Hg, Au   |
| SPEX製 XSTC-2073 | 30000 ppb : Ag, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Mo, Ni, Sb, Se, Sn, V<br>15000 ppb : As<br>5000 ppb : Cd, Pb, Tl |

表4 内標準溶液の組成

| 金属元素           | 濃度 (ppb) |
|----------------|----------|
| Te             | 25,000   |
| Sc             | 10,000   |
| Ge, In, Lu, Bi | 5,000    |

各標準溶液を25 μL加えた。さらに、35%塩酸0.5 mLと70%硝酸1.5 mLを加え、超純水でメスアップした。塩酸及び硝酸の終濃度は、それぞれ、0.7%、4.2%となる。

マイクロ波分解による調製：マイクロ波分解容器に、内服液剤1 mL、超純水5 mL、35%塩酸1 mL、70%硝酸3 mL、表3に示される各標準溶液を50 μLの順に加え、下記の分解条件により、マイクロ波分解を行った。分解後、分解液を50 mLメスフラスコに移し、超純水により、メスアップを行った。塩酸及び硝酸の終濃度は、それぞれ、0.7%、4.2%となる。

○マイクロ波分解の条件

1. 350Wで15分間マイクロ波照射

2. 15分間で700Wまでマイクロ波の出力上昇
3. 700Wで20分間マイクロ波照射
4. 50℃まで冷却（約30分間）

添加回収試験の結果を図3に示す。添加回収試験の適合基準は70%~150%である。内服製剤を希釈しただけの場合、As及びSeの回収率がそれぞれ152%、192%となり、適合基準外となった。これに対し、マイクロ波処理を施した際の添加回収試験では、すべての金属において回収率は約100%を示した。このことから、精度の高い分析を行うためには、製剤中の有機物をマイクロ波分解することが必要であることが確認できた。

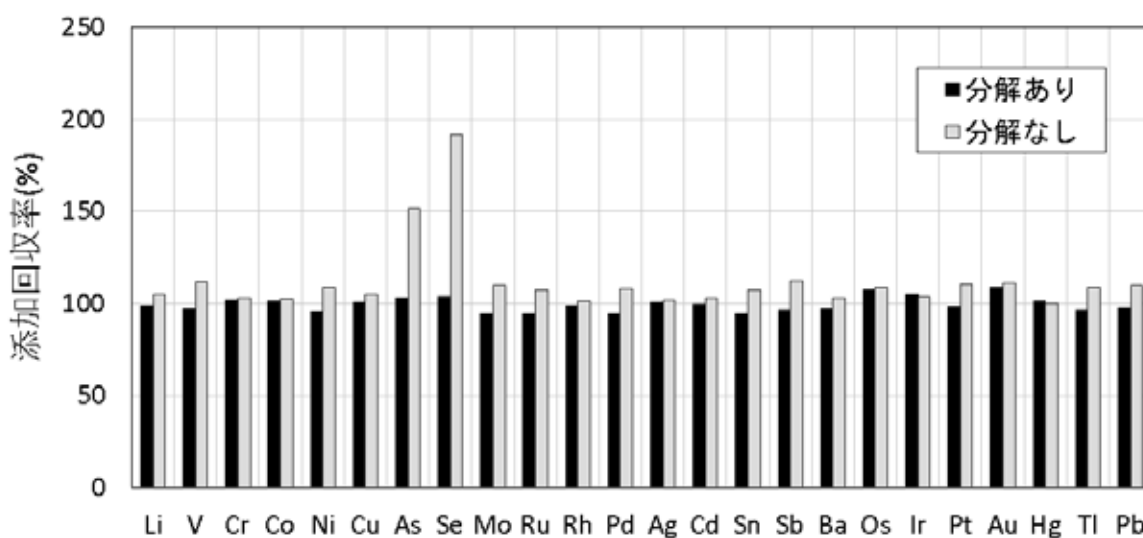


図3 内服液剤の添加回収試験結果

③ オスミウムの高精度分析の検討

Q3Dガイドラインに該当する元素の一つであるOsは、添加回収率が70~150%に収まらず、過大評価されることが報告されており、当センターにおいても散見される(図4)<sup>3,5)</sup>。これまでの報告によると、マイクロ波分解中にOsが揮発性の高いOsO<sub>4</sub>となり、ICP-MS中で過剰にイオン化されたためであると推測されており、チオ尿素を添加することで、Osの測定が安定化できると報告されている<sup>5)</sup>。そこで、オスミ

ウムの高精度分析の検討として、マイクロ波で試料を分解した後に、チオ尿素を添加し、Osの添加回収試験を実施した。その際、チオ尿素の添加濃度を1.0-0.01 g/Lの範囲とし、添加濃度の違いによる影響も評価した。添加回収試験の結果を表5に示す。結果は、チオ尿素の添加量が1.0 g/L-0.01 g/Lの範囲において、適合基準である70%付近となった。これは、チオ尿素が、Osと錯体を形成し、安定化することで、過剰なイオン化を抑制することが出来たと考えられる。

回収率が100%とならず70%台となってしまった原因として、チオ尿素を添加するまでの間にOsが揮散した可能性が考えられる。そのため、今後は、試薬調製

を迅速に行うことや、Osを安定化させるためのその他に試薬の探索など、より高精度な分析方法の検討が必要と考えられる。

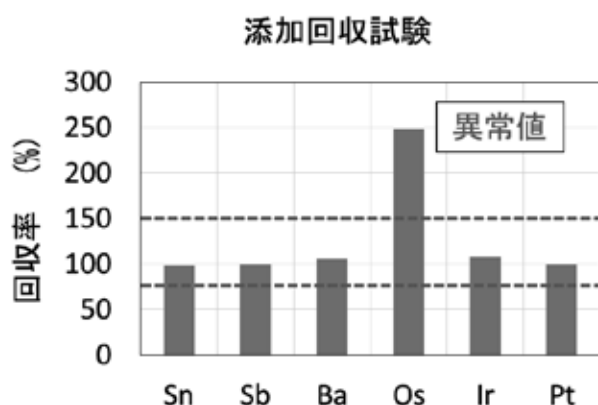


図4 Osの過大評価例

表5 チオ尿素を添加した際のOsの添加回収率

|       | チオ尿素の添加濃度 |         |          |      |
|-------|-----------|---------|----------|------|
|       | 1.0 g/L   | 0.1 g/L | 0.01 g/L | 0    |
| Os回収率 | 72%       | 76%     | 71%      | 251% |

#### ④ フッ化水素酸添加の必要性

当センターでは、製剤のマイクロ波分解において、汎用的な分解液である硝酸・塩酸のみでは、製剤を完全分解できないケースを度々経験している。一例を示すと、高血圧症の治療薬のアゼルニジピン錠16 mgは、汎用的なメソッドで分解すると、図5（左）のような未分解成分が確認される。原因について検討した結果、添加物として使用されている軽質無水ケイ酸が未分解であるためと推察された。そこで、フッ化水素酸を用いた分解条件について検討を行った。マイクロ

波分解容器に製剤を粉碎せずに投入し、超純水6 mL、塩酸1 mL、硝酸3 mL、フッ化水素酸0.1 mLを加え、マイクロ波分解処理を行った。マイクロ波の出力プログラムは、これまでと同様とした。分解処理液を確認したところ、図5（右）のように未分解成分は、確認されなかった。このことから、フッ化水素酸を添加することで、未分解成分を分解できることが分かった。

フッ化水素酸を添加することで、分解できたアゼルニジピン錠16 mg中の金属濃度の測定及び添加回収試験を下記の手順により実施した。

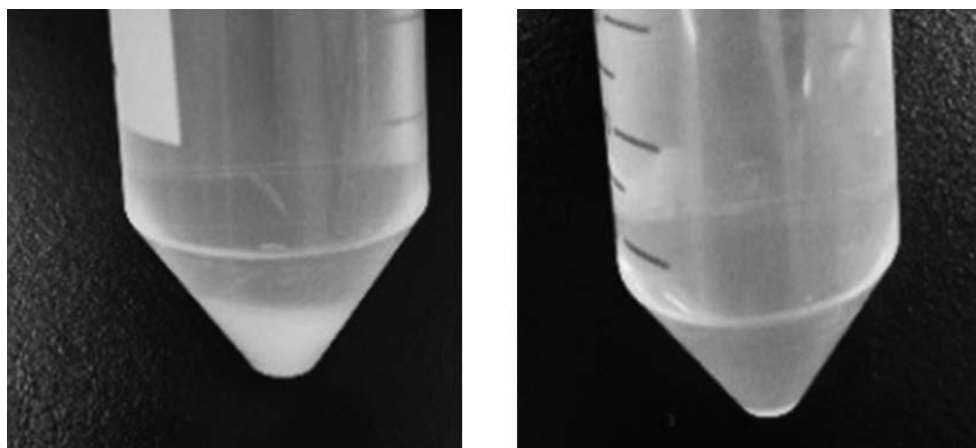


図5 (左) 汎用的メソッドによるアゼルニジピン錠の分解  
(右) フッ化水素酸添加によるアゼルニジピン錠の分解

標準溶液の調製

表6の標準溶液を超純水で希釈し、表7の各濃度となるように調製した。酸の終濃度は、硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように調製した。

内標準溶液の調製

表4の内標準溶液を超純水で100倍希釈し、酸の終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように調製した。

表6 標準溶液の組成

| 使用標準原液  | 含有元素  |
|---|---|
| アジレント製<br>ICH/USP Oral Target Elements Standard A | 5,000 ppb : Cd, Pb<br>15,000 ppb : As<br>30,000 ppb : Hg  |
| アジレント製<br>ICH/USP Oral Target Elements Standard B | 8,000 ppb : Tl<br>50,000 ppb : Co<br>100,000 ppb : V<br>150,000 ppb : Ag, Se<br>200,000 ppb : Ni                                |
| アジレント製<br>ICH/USP Oral Target Elements Standard C | 100,000 ppb : Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru  |
| アジレント製<br>ICH/USP Oral Target Elements Standard D | 550,000 ppb : Li<br>120,000 ppb : Sb<br>140,000 ppb : Ba<br>3,000,000 ppb : Cu, Mo<br>6,000,000 ppb : Sn<br>11,000,000 ppb : Cr |

表7 検量線の各レベルにおける濃度

| 元素 | レベル 単位【ppm】 |        |        |        |       |
|----|-------------|--------|--------|--------|-------|
|    | レベル 1       | レベル 2  | レベル 3  | レベル 4  | レベル 5 |
| Li | 0           | 0.22   | 0.44   | 0.66   | 1.1   |
| V  | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Cr | 0           | 4.4    | 8.8    | 13.2   | 22    |
| Co | 0           | 0.02   | 0.04   | 0.06   | 0.1   |
| Ni | 0           | 0.08   | 0.16   | 0.24   | 0.4   |
| Cu | 0           | 1.2    | 2.4    | 3.6    | 6     |
| As | 0           | 0.006  | 0.012  | 0.018  | 0.03  |
| Se | 0           | 0.06   | 0.12   | 0.18   | 0.3   |
| Mo | 0           | 1.2    | 2.4    | 3.6    | 6     |
| Ru | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Rh | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Pd | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Ag | 0           | 0.06   | 0.12   | 0.18   | 0.3   |
| Cd | 0           | 0.002  | 0.004  | 0.006  | 0.01  |
| Sn | 0           | 2.4    | 4.8    | 7.2    | 12    |
| Sb | 0           | 0.48   | 0.96   | 1.44   | 2.4   |
| Ba | 0           | 0.56   | 1.12   | 1.68   | 2.8   |
| Os | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Ir | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Pt | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Au | 0           | 0.04   | 0.08   | 0.12   | 0.2   |
| Hg | 0           | 0.012  | 0.024  | 0.036  | 0.06  |
| Tl | 0           | 0.0032 | 0.0064 | 0.0096 | 0.016 |
| Pb | 0           | 0.002  | 0.004  | 0.006  | 0.01  |

添加回収試験結果を図6に示す。フッ化水素酸を用いた場合でも、すべての元素において、添加回収試験が適合基準内であることが分かる。また、アゼルニジ

ピン錠中の金属濃度の測定結果では、すべての元素において、Q3Dガイドラインの許容濃度以下であることが分かった(図7)。

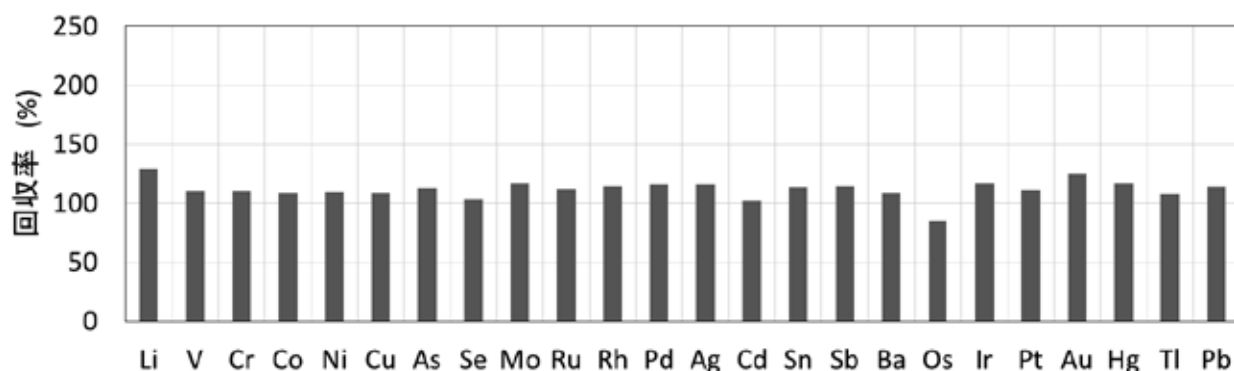


図6 添加回収試験結果

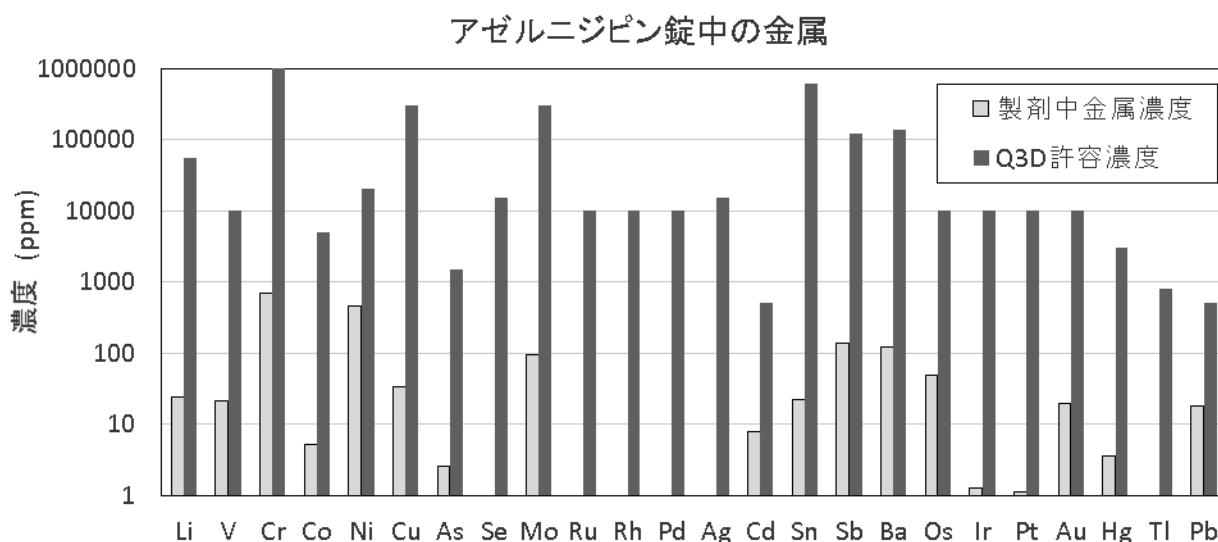


図7 アゼルニジピン錠中の金属濃度とQ3Dガイドラインの許容濃度との比較

### まとめと考察

本研究では、塩酸の添加によりHgが安定すること、また、マイクロ波による試料前処理の必要性を確認した。Osの高精度分析の際には、マイクロ波分解処理後に0.01 g/Lのチオ尿素を添加することにより、Osを正確に分析できることが分かった。さらに、汎用的な分解メソッドでは分解できない製剤に関しては、フッ化水素酸を用いる事で、製剤中の有機物の分解が可能となり、かつ金属濃度を正確に測定することも可能となることが分かった。

### 参考文献

- 1) 厚生労働省: 合意ガイドライン 元素不純物ガイドラインQ3D., 4版 2014
- 2) 厚生労働省: 第十八改正日本薬局方., 2021
- 3) 高山信幸, 米田哲也, 竹林憲司, 小笠原勝, 薬事研究会分析部会: ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討., 富山県薬事総合研究開発センター年報, 47 34-38 2020
- 4) Juliano S. Barin, Bruna Tischer, Rochele S. Picoloto, Fabiane G. Antes, Fabiana E. B. da Silva, Fávero R. Paula, Érico M. M. Flores: Determination of Toxic Elements in Tricyclic Active Phar-

maceutical Ingredients by ICP-MS: A Critical Study of Digestion Methods., 29 352-358 2014

- 5) Cornel Venzago, Maximilian Popp, Jessica Kovaca, Andrea Kunkel: Pharmacopeial requirements for elemental impurities: a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilization., J. Anal. At. Spectrom., 28 1125-1129 2013



# V 資 料



# 「令和2年度分析データ信頼性確保事業」事業報告

## External quality control for laboratories of pharmaceutical companies in 2020

小笠原勝, 米田哲也, 竹林憲司

Masaru OGASAWARA, Tetsuya YONEDA, Kenji TAKEBAYASHI

富山県における2019年の医薬品生産金額は、全国4位に下がったものの、前年比11.1%増の6,937億円で過去最高を更新した。その一方で、ジェネリック医薬品の大手メーカーが医薬品医療機器等法に違反したとして、2021年3月に富山県より業務停止命令を受けた。ジェネリック医薬品への信頼を取り戻すためには、今後、県内薬業界を挙げて今まで以上に品質管理体制を強化する必要があると言われている。

本研究は、平成21年度より一般社団法人富山県薬業連合会と共同で、県内製薬企業の品質管理部門を対象に外部精度管理を実施し、試験検査の技術力の強化、及び県内医薬品産業の更なる活性化を目的として実施している<sup>1-8)</sup>。具体的には、参加企業に同一の試料を配布し、同一の試験方法で分析を実施していただき、その結果をとりまとめて解析する。この結果を各社にフィードバックするとともに、期待する結果が得られなかった参加企業に対しては原因調査及び技術指導を行う。これにより、県内製薬企業の試験検査技術力の向上及びその水準の維持に寄与するものである。令和2年度は、要望の多い試験項目を中心に、定量（HPLC法）、定量（UV法）、水分測定（容量滴定法）、定量（電位差滴定法）について実施し、結果解析、原因調査及び改善指導を行ったので、その概要について報告する。

### 1. 実施方法

#### (1) 試験項目及び試験方法

試験項目は、フルコナゾール含有カプセルの定量（HPLC法）、プロベネシド含有錠の定量（UV法）、デヒドロ酢酸ナトリウムの水分測定（容量滴定法）、フェルビナクの定量（電位差滴定法）とした（表1）。なお、水分測定（容量滴定法）及び定量（電位差滴定法）については、市販試薬を対象品目として用い、参加施設に対象品目名を知らせなかった。

フルコナゾール含有カプセルの定量（HPLC法）、プロベネシド含有錠の定量（UV法）及びフェルビナクの定量（電位差滴定法）は、日本薬局方に準じた試験方法とした。デヒドロ酢酸ナトリウムの水分測定（容量滴定法）は、医薬品添加物規格に準じた試験方法とした。

表1 試験項目及び参加施設数等について

| 試験項目            | 対象品目                                     | 主な使用機器                   | 参加企業数 |
|-----------------|--|--------------------------|-------|
| 定量<br>(HPLC)    | 試料A<br>日局フルコナゾールカプセル<br>(ジフルカンカプセル50 mg) | 高速液体クロマトグラフ,<br>乾燥機, pH計 | 31    |
| 定量<br>(UV)      | 試料B<br>日局プロベネシド錠<br>(ベネシド錠250 mg)        | 分光光度計, 乾燥機               | 34    |
| 水分測定<br>(容量滴定法) | 試料C<br>(デヒドロ酢酸ナトリウム)                     | カールフィッシャー水分計             | 31    |
| 定量<br>(電位差滴定法)  | 試料D<br>(フェルビナク)                          | 電位差滴定装置, 乾燥機             | 27    |

#### (2) スケジュール

今年度は新型コロナウイルスの感染拡大防止の観点から、実施説明会及び結果報告会を取り止め、試験手順説明資料を電子メールにより、また試験試料を宅配便により令和2年11月16日に参加者宛に配布し、当センターへの試験結果報告期限を令和3年1月18日とした（年明けの大雪に伴う通勤困難期間を考慮し、最終的に

試験結果報告期限を1月29日まで延長した)。報告内容を取りまとめて下記(3)の方法により評価し、その評価結果に応じて原因調査、改善指導及び再試験依頼等を実施した。試験結果報告書は令和3年3月22日に郵送により参加者宛に送付した。

### (3) 評価方法

危険率1%でGrubbsの方法により検定を行い、異常値と判断されたデータを棄却した後、ISO/IEC Guide 43 (JIS Q 0043) に従い、ロバスト法の第1四分位数Q1、第3四分位数Q3及びメジアンQ2から次のようにZスコアを求めて判定した。

$$Z = (X_i - Q_2) / \{(Q_3 - Q_1) \times 0.7413\}$$

|Z| ≤ 2 満足

2 < |Z| ≤ 3 疑わしい

|Z| > 3 不満足

※Xi: 各参加施設の報告値

ただし、定量(電位差滴定法)は「平均値±1.0%以内」の場合、水分測定試験は「平均値±0.5%以内」の場合、Zスコアの値に関わらず「満足」と判定することとした。

### (4) 評価結果に基づく対応

「不満足」の施設に対しては、原因調査(聞き取り調査等)及び改善指導を実施するとともに、再試験を依頼した。また、「疑わしい」の施設に対しても、原因調査及び改善指導を実施した。さらに、再試験を依頼した「不満足」の施設及び再試験を希望した「疑わしい」の施設から、再試験結果の報告を受け、初回試験のQ1、Q2及びQ3を用いてZスコアを算出し、再度評価した。

## 2. 結果及び考察

### (1) 日局フルコナゾールカプセル(ジフルカンカプセル50mg)の定量試験(HPLC法)

31施設のうち「不満足」が2施設、「疑わしい」が2施設であった。不満足と判定された2施設では、全体の値と比較して、含量値が①高値あるいは②低値、また疑わしいと判定された2施設では、③やや高値あるいは④やや低値であった(図1~3)。

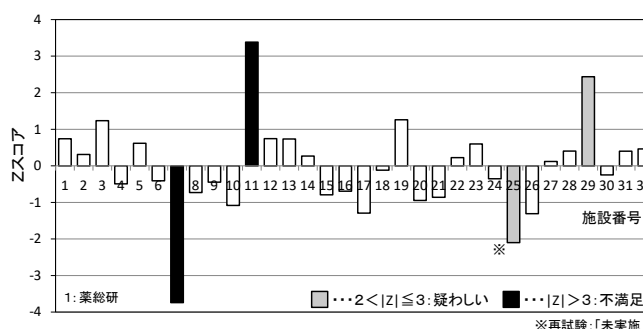
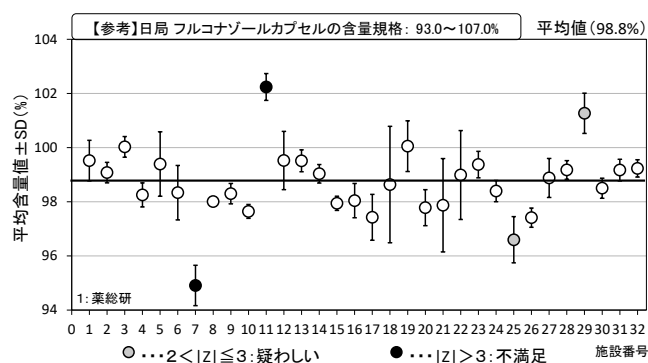


図1 フルコナゾール含有カプセルの定量試験(HPLC法)の報告値

図2 フルコナゾール含有カプセルの定量試験(HPLC法)のZスコア



図3 フルコナゾール含有カプセルの定量試験(HPLC法)の評価結果

原因調査の結果、①高値の施設では1カプセルの平均質量の算出値が高めであったこと、②低値の施設では試料溶液の調製時における定量成分の抽出操作が不十分であったこと、③やや高値の施設では試料溶液の調製時における試料溶液の体積変動（濃縮）あるいはメスアップが不正確であったこと、④やや低値の施設では標準溶液の調製時における標準品の秤量、ホールピペットの操作、あるいはメスアップが不正確であったことが、「不満足」あるいは「疑わしい」と判定された主な原因であると推察された。また今回の試験方法において、「必要ならば粉末とする」との手順になっていたことから、カプセル内容物について粉末化操作を実施した施設と実施しなかった施設とが半々程度に分かれた。そこで、粉末化操作の有無と含量値との関連性について確認したところ、両者に明らかな関連性は認められなかった（図4）。

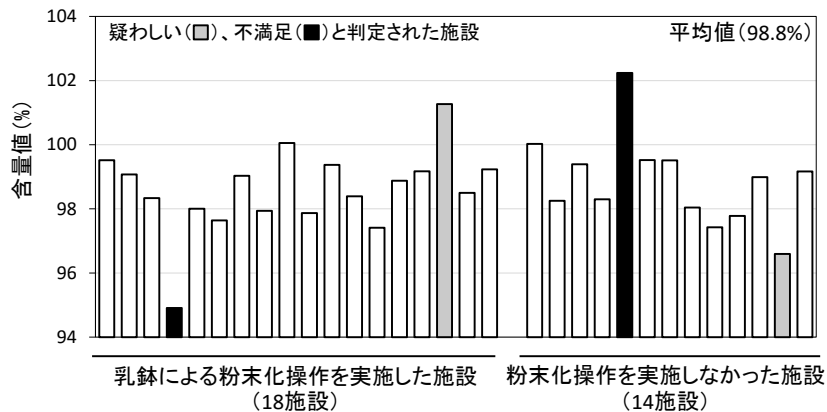


図4 カプセル内容物の粉末化操作の有無と含量値の関係

(2) 日局プロベネシド錠（ベネシッド錠250 mg）の定量試験（UV法）

34施設のうち「疑わしい」が3施設認められた。「不満足」と判定された施設は見受けられなかった。なお、1施設において試験操作に誤りが認められたため、当該施設を統計処理から除外した。疑わしいと判定された3施設のうち、①やや高値が1施設、②やや低値が2施設であった（図5～7）。

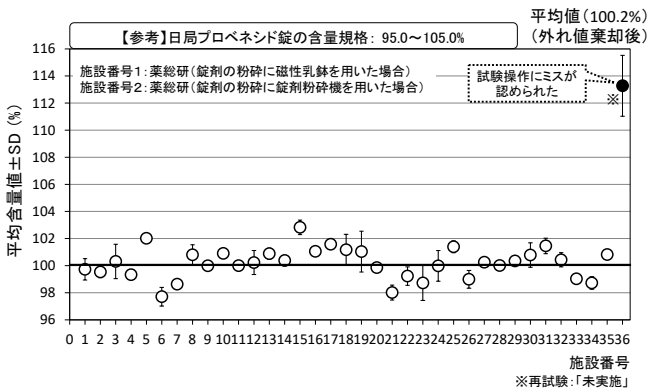


図5 プロベネシド含有錠の定量試験（UV法）の報告値

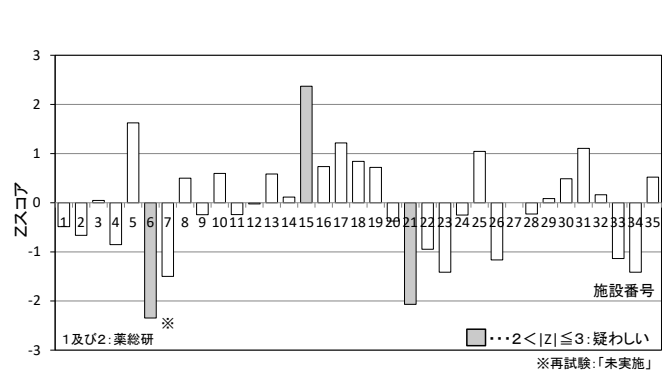


図6 プロベネシド含有錠の定量試験（UV法）のZスコア

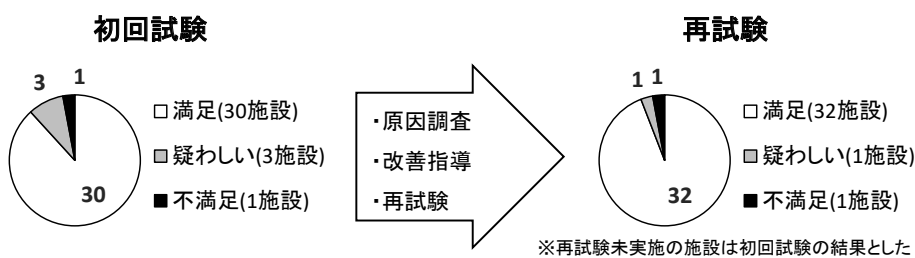


図7 プロベネシド含有錠の定量試験（UV法）の評価結果

原因調査の結果、①やや高値の施設では標準溶液の調製に何らかの問題があった可能性が考えられた。今回の試験では標準品がやや溶けにくく、また標準溶液及び試料溶液の体積変化が生じやすく、かつ希釈操作を繰り返す試験法であったため、調製法の影響が含量値に出やすかった可能性が考えられた。②やや低値の施設では試料溶液の調製に何らかの問題があった可能性が考えられた。とくに標準溶液と試料溶液の調製を別々に行っていたため、温度等の影響による体積変化によりメスアップ後の濃度が異なってしまった可能性が考えられた。また今回の試料であるプロベネシド錠はフィルムコーティング錠であったため、当該錠剤の粉碎過程において各参加施設が選択した方法は、磁性乳鉢、メノウ乳鉢、及び錠剤粉碎機に分かれた。そこで、これら粉碎方法と含量値の関係性について検討したところ、いずれの方法を用いても平均含量値にほとんど差は認められなかった。ただし、磁性乳鉢を用いた場合、含量値の相対標準偏差は、他の方法に比較してやや大きい値を示した(図8)。

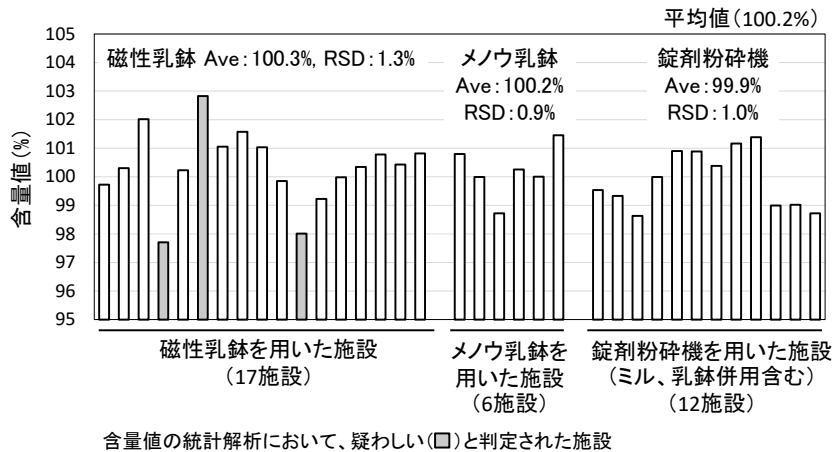


図8 磁性乳鉢、メノウ乳鉢、錠剤粉碎機を用いた際の含量値との比較検討

(3) デヒドロ酢酸ナトリウムの水分測定試験(容量滴定法)

31施設のうち棄却検定により外れ値と判定された施設が2施設認められた。これら2施設を統計処理から除外したところ、残り29施設はすべて「満足」と判定された(図9~10)。

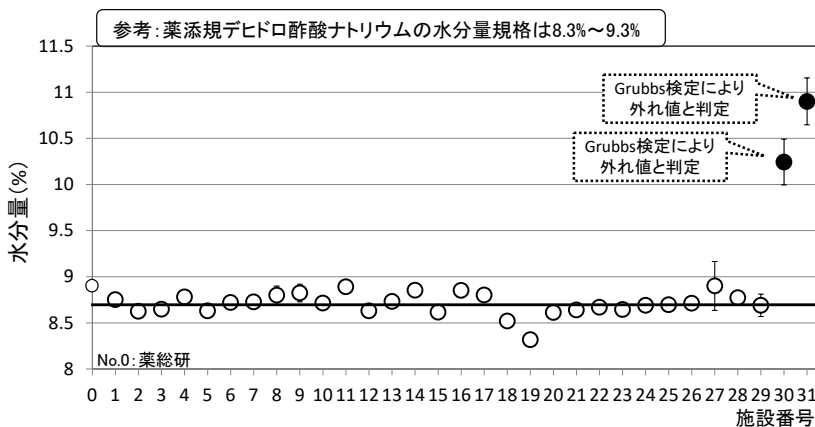


図9 デヒドロ酢酸ナトリウムの水分測定試験(容量滴定法)の報告値

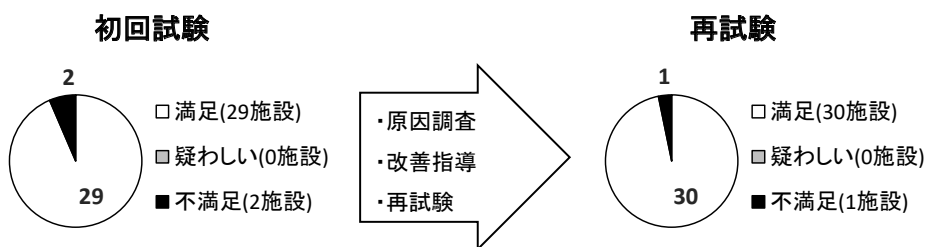


図10 デヒドロ酢酸ナトリウムの水分測定試験(容量滴定法)の評価結果

外れ値と判定された2施設について原因調査を実施したところ、1施設は水分計の状態が測定を実施する上で十分な精度を発揮できる状態ではなかった可能性が考えられた。当該施設については、この点を踏まえて再試験を実施していただいたところ、「満足」な結果が得られた。もう一方の施設についても水分計の状態に不備があった可能性を踏まえて再試験を実施していただいたが、再度不満足と判定される結果となった。そこで、さらに詳細な原因調査を実施した結果、この施設では水分測定に必要な試薬（各施設ごとに準備するもの）の規格が他の施設とは異なる特殊な規格であったことが判明した。このことから、試験結果が不満足となった原因として、試料と当該水分測定用試薬に含まれる成分との間で何らかの副反応が発生したことによるものではないかと考えられた。現在、当センターにおいて使用可能であることを確認した水分測定用試薬をこの施設に配布し、継続して原因の究明に取り組んでいる。

#### (4) フェルピナクの定量試験（電位差滴定法）

27施設のすべてにおいて「満足」な結果が認められた（図11）。

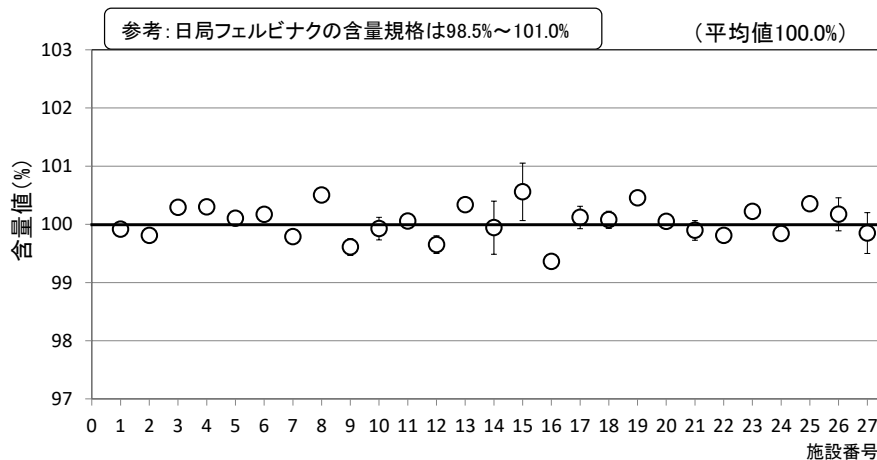


図11 フェルピナクの定量試験（電位差滴定法）

### 3. まとめ

今年度4項目の試験について実施したところ、全体として「不満足」と判定されなかった施設の割合は96%（のべ123施設中118施設）であり、前年度の94%（のべ126施設中118施設）と同様に良好な結果であった。また、水分測定試験の1施設を除き、再試験を実施した全施設が「満足」と判定される結果となった。

HPLC法による定量試験では、標準品の乾燥、秤量、ホールピペット操作、メスアップ、標準溶液と試料溶液の調製のタイミング、あるいは、平均質量の算出など、基本操作のミスにより試験結果にバラツキが生じたものと考えられた。このことから、基本操作を正確に行うことの重要性についてあらためて参加施設に注意喚起した。UV法による定量試験では、比較的溶解しにくい試料の場合は完全に溶解したことを目視で十分に確認すること等の重要性についてあらためて参加施設間で情報共有した。水分測定試験では、試験実施者が気付かなかった測定機器の不備を、本事業を通じて見出すことができた。一方、電位差滴定法による定量法では、昨年度に引き続きすべての参加施設において満足と判定される結果が得られた。このことは、本事業の継続的な実施が多少なりとも寄与した結果であれば幸いである。その他、普段の業務では気づき難い問題点について本事業を通じて参加者間で情報共有することにより、個々のレベルアップに繋がったものとする。

「不満足」や「疑わしい」の判定結果が得られた施設は、改善に向けて原因調査や再試験等に積極的に取り組んでいただいた。本事業にご協力いただいたことあらためて感謝を申し上げますとともに、今後も県内製薬企業の試験技術力の向上とその水準の維持に寄与し、県内医薬品産業の更なる発展に繋げていきたい。

### 文 献

- 1) 寺崎さち子, 横田洋一, 出町幸男, 製薬企業の品質管理部門を対象とした外部精度管理, 富山県薬事研究所年報, 39, 69-76 (2012)
- 2) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成25年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年

報, 41, 41-47 (2014)

- 3) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成26年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 42, 39-45 (2015)
- 4) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成27年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 43, 35-40 (2016)
- 5) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成28年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 44, 43-48 (2017)
- 6) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成29年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 45, 39-44 (2018)
- 7) 竹林憲司, 横田洋一, 小笠原勝, 「平成30年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 46, 39-43 (2019)
- 8) 小笠原勝, 米田哲也, 竹林憲司, 「令和元年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 47, 51-55 (2020)



## VI 講演・学会発表など



## 1. 講演・学会・誌上发表

「Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation」

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志

第104回アメリカ免疫学会, 2020.5.8-12, ホノルル

肥満による糖尿病の進展には, 内臓脂肪組織における慢性炎症が深く関与することが明らかになってきた. 本研究では, 好中球と脂肪細胞の相互作用が, 早期の内臓脂肪組織炎症に重要であることを独自に明らかにした (Watanabe et al., FASEB J, 2019). 肥満に伴い増加する遊離脂肪酸により, 内臓脂肪組織から脂質メディエーターであるロイコトリエンB4が産生され, 好中球が先だつて内臓脂肪組織に浸潤する. 浸潤した好中球は, 脂肪細胞との相互作用により炎症性サイトカインIL-1 $\beta$ 前駆体を高発現する. 産生された成熟IL-1 $\beta$ は, 脂肪細胞に作用し遊走因子の産生を誘導することによって, マクロファージの内臓脂肪組織浸潤を促進し, 炎症を増悪することが示唆された.

「溶出試験における落下位置と溶出率の関係について」

竹林憲司, 高山信幸, 米田哲也, 小笠原勝

全国薬事指導協議会総会, 2020.10.16, 紙上開催

過去の医薬品・医療機器等一斉監視指導の後発医薬品品質確保対策において, 当県は日局X錠の28製剤の溶出試験 (以下, 「過去の溶出試験」) を実施したところ, そのうちの1製剤のみが不適合の判定結果となった. また, OOS処理手順に従い他の試験者により試験を行った場合でも不適合となった. 原因を調査したところ, 溶出率が基準値 (85.0%) 以下となった錠剤は全てベッセル底中心部に落下したものであったことなどから, 錠剤の落下位置が試験結果の判定に大きく影響した可能性が考えられた.

そこで, 本研究では, 当該製剤 (不適合ロットとは別ロット) 及び他の2製剤を用い, 溶出試験における錠剤の落下位置と溶出率の関係について検討を行った. その結果, ベッセル底中心部へ落下する確率及びそのときの溶出率の低下度合は製剤によって大きく異なること, また今回OOSとなった製剤はとりわけベッセル底中心部へ落下する確率が高いことが分かった.

「NMRデータに基づく芍薬の成分プロファイリングと多変量解析」

董昱卓, 當銘一文, 朱姝, 田村隆幸, 吉松嘉代, 小松かつ子

日本薬学会 第141年会, 2021.3.27, 広島県広島市及びオンライン

生薬「芍薬」の市場品は, 日本では加工方法によって真芍, 生干芍薬, 皮付き芍薬に分けられ, 中国では基原植物や産地等により白芍と赤芍に区別される. これらの各種芍薬の品質を客観的に評価し, 成分的特徴を見出すことを目的に, qHNMR法を用いたメタボローム解析を行った. その結果, *Paeonia lactiflora*を基原とする芍薬において, albiflorin, 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose, gallic acid及びsucroseは日本市場品 (日本産芍薬・中国産芍薬) の区別に寄与し, 一方, paeoniflorinなどのモノテルペン類は基原の異なる赤芍の区別に寄与することが示唆された. 複合成分系である生薬成分を網羅的に解析する方法として, HPLC法による品質評価と比較して, qHNMR法は簡便性に優れていることが示された.

「富山のくすりーその歴史と新しい形ー」

高津聖志

プラスチック成形加工学会誌「成形加工」第33巻 第6号 特別講演解説 (2021)

## 2. 共同研究論文リスト

Morita M, Kaizawa T, Yoda T, Oyama T, Asakura R, Matsumoto S, Nagai Y, Watanabe Y, Watanabe S, Kobayashi H, Kawaguchi K, Yamamoto S, Shimozawa N, So T, Imanaka T.: Bone marrow transplantation into Abcd1-deficient mice: Distribution of donor derived-cells and biological characterization of the brain of the recipient

mice. *J Inherit Metab Dis.* 2021 May; 44 (3) : 718-727.

Shiino H, Furuta S, Kojima R, Kimura K, Endo T, Tamura Y.: Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA. *FEBS J.* 2021 May; 288 (10) : 3285-3299.

Inoue S, Kohmura H, Igarashi M, Yokoi N, Morohashi S, Nomoto E, Yui H, Tamura T, Yasunaga M, Shiraishi Y, Kato M, Yano T, Hishida A.: Development of program for estimating optimum harvest date of medicinal plant *Angelica acutiloba*. *Climate in Biosphere*, 2021; 21: 21-25.

### 3. 知的所有権

#### (1) 特 許

| 発 明 の 名 称                   | 登 録 番 号       |
|-----------------------------|---------------|
| 食後血中中性脂肪濃度上昇抑制剤及び飲食品        | 特許第 4815421 号 |
| がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物       | 特許第 5548874 号 |
| インフラマソーム活性制御剤               | 特許第 6036193 号 |
| ラッカーゼ及びそれを用いたエピテアフラガリン類の製造法 | 特許第 6047813 号 |
| 抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体BD-23等】     | 特許第 6596624 号 |

#### (2) 特許出願

| 名 称                               | 出 願 ・ 公 開 番 号                                |
|-----------------------------------|--|
| 抗齶蝕性口腔用組成物及び飲食品                   | 特開2009-221191                                |
| 抗歯周病性口腔用組成物及び飲食品                  | 特開2009-219484                                |
| I L - 1 及び T N F 活性阻害剤            | 特願2013-271897<br>PCT国際出願 (PCT/JP2014/084076) |
| 抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体BD-17】            | 特開2017-081915                                |
| 乾式造粒物及び該乾式造粒物を含有する固形製剤並びにそれらの製造方法 | 特開2018-35132                                 |
| 自然免疫を活性化する粘膜ワクチン用アジュバント           | 特開2017-178890                                |