

# IV 研究報告



# 富山シャクヤクのブランド化推進事業 —ブランド品種「春の粧」に適した栽培法の検討—

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

## Optimization of the cultivation method for "Haru-no-Yosooi", a cultivar of *Paeonia lactiflora* Pallas aiming at promoting of the brand

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

### 要 約

「富山シャクヤク」としてブランド化を図る品種「春の粧」を生産者に普及する際には、高品質かつ多収量を実現する栽培マニュアルが必要となるが、現在の富山県作成のシャクヤク栽培マニュアルは「春の粧」の生育特性を考慮して最適化されたものでない。

本研究では、「春の粧」に最適な植付時の苗重量及び株間を明らかにするための栽培試験を実施し、4年間栽培した単収及び労働報酬の試算、並びに乾燥調製した生薬の成分含量等により評価した。その結果、最適な栽培条件として苗重量は「70~80 g」、株間は「50 cm」と決定した。

今回の結果を基に「春の粧」栽培マニュアルを作成し、生産者の収益性向上による生産拡大及びブランド化の推進を目指す。

### Summary

Farmers need cultivation manual which achieves high quality and the numerous yields about "Haru-no-Yosooi" which is a cultivar selected for the brand of Toyama. However, the current peony cultivation manual which we made is not optimized in consideration of growth characteristics of the cultivar.

In this study, we carried out a cultivation examination to clarify seedling weight and planting space which was most suitable for "Haru-no-Yosooi". We evaluated the root that we cultivated for four years by production per unit and the ingredient content of the estimate of the labor reward and the crude drug.

As a result, we determined that seedling weight was "70-80 g", and planting space was "50 cm" as the most suitable cultivation condition.

We make "Haru-no-Yosooi" cultivation manual based on this result and aim at production expansion and promotion of the branding by the profitability improvement of the producer.

キーワード：シャクヤク, 栽培, ペオニフロリン

Key words : Peony root, Cultivation, Paeoniflorin

### 緒 言

生薬「シャクヤク（芍薬）」は、第17改正日本薬局方<sup>1)</sup>（以下「日局」）において「シャクヤク *Paeonia lactiflora* Pallas の根である」と規定され、鎮痛、鎮痙、活血等の作用を期待して漢方処方に配合されるほか、婦人薬や胃腸の鎮痛鎮痙薬等の製剤にも配合される。日本漢方生薬製剤協会による調査<sup>2)</sup>では、国内でのシャクヤクの年間使用量1,560トンのうち国内生産量はわずか34トン（平成27及び28年度の平均値、自給率：約2.2%）で、輸入に依存している。シャクヤクを含む原料生薬の安定確保のため、業界団体として

も国と連携して国内栽培の拡大に取り組んでいる。

我々は、薬用植物指導センターで保有する230の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の推進により付加価値の高い「富山シャクヤク」のブランド化を図るため、平成22年度から関連する研究を進めてきた。平成26年度までに実施した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>3)</sup>。選抜の際には、新たに4年間栽培して得た生薬を試料として薬効、成分及び栽培面における品質の安定性と再現性を確認している。平成27年度からは、選抜

品種のうち実用化が最も進んでいる「春の粧」について、高品質な生薬を安定して生産するための栽培法及び実生産規模での乾燥調製法の確立<sup>4)</sup>、<sup>5)</sup>に取り組んだ。基本的な栽培法については、県内で主に栽培されている薬用品種「梵天」での栽培試験結果を基に作成した栽培マニュアル<sup>6)</sup>が参考となる。しかし、品種によって根の増殖速度や伸長範囲等の収量に関する特性が異なることから、栽培普及の際には「春の粧」の特性に応じて最適化した栽培法としてマニュアルを作成する必要がある。そこで、品質面及び収量面の評価により、「春の粧」の最適な植付時の苗重量及び株間について検討したので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 栽培試験

富山県の「梵天」栽培マニュアルでは、植付時の苗重量は30 g程度で、株間は50 cm間隔であるが、「春の粧」では苗を大きくすること、あるいは株間を広げることによる増収効果を検討した。根が長く伸びるといふ「春の粧」の特性を活かして株当たり収量の増加が期待される一方で、株間を広げると面積当たりの株数が減少するため、増収効果は単収(10 a当たり収量)及び時間当たり労働報酬を算出して評価した。

#### 1-1 植物材料

薬用植物指導センターで4年間栽培したシャクヤク *Paeonia lactiflora* Pallas 品種「春の粧」を掘り取り、株分けにより作製した苗を試験に供した。

#### 1-2 栽培場所

薬用植物指導センター圃場

所在地：富山県中新川郡上市町広野2732

標高：62 m

土壌：黒ボク土

土質：埴壤土

#### 1-3 栽培方法

##### (1)栽培期間

平成26年11月から平成30年10月までの4年間

##### (2)基肥(10 a当たり)

乾燥鶏糞 300 kg、苦土石灰 100 kg、過燐酸石灰 60 kg

##### (3)整畦

畦裾幅 120 cm、畦高 20 cm

黒マルチ(厚さ 0.03 mm)被覆

##### (4)植付け

平成26年11月22日、2条チドリ植え、株間 50 cm、条間 40 cmで苗を植え付けた。

##### (5)追肥(10 a当たり)

畦の中央のマルチに追肥用の切込みを入れ、下記の量を施用した。

##### ア 6月上旬(2~4年目)

化成肥料(N:P:K=15:15:15) 40 kg

過燐酸石灰 20 kg

##### イ 10月中旬(1~3年目)

1年目 乾燥鶏糞 150 kg

2及び3年目 乾燥鶏糞 300 kg

#### (6)収穫

栽培4年目(平成30年)の10月15日、振動式掘取機(松山(株)製 VD-1050A)を用いて地下部を掘り取った。

### 1-4 試験群

植付時の苗重量は30 g区(30~40 g)、50 g区(50~60 g)及び70 g区(70~80 g)の3種類で、株間は50 cm及び60 cmの2種類とし、それらの組み合わせで計6種類の試験群を設定した。各試験群の栽培株数は16株とし、各群中央の10株を調査対象とした。

### 1-5 生育調査

#### (1)地上部

平成28年、29年及び30年(2~4年目)の各年8月、草丈及び茎数を測定した。

#### (2)地下部

収穫した根のうち太さの直径が1 cm以上の生根(未乾燥)を収量として1株ごとに計量した。

### 1-6 品質評価用の試料調製

上記の収量用に選別した根をポリプロピレン製ガラ袋に入れ、屋外の日陰となる土の上に置き、その上にビニールシートを被せて乾燥を防止し、3ヶ月間貯蔵した。その後、屋内で3ヶ月間の自然乾燥により生薬を調製した。生薬は試験群ごとにまとめ、粉碎機により粉末試料とし、品質評価(白色度及び成分分析)に供した。

## 2. 白色度

各試料粉末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(主要10成分の定量)

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、アルピフロリン、オキシペオニフロリン、ベンズ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)

## 結 果

### 1. 栽培試験

栽培2年目から4年目までの各年8月に調査した草丈及び茎数の結果を図1及び図2にそれぞれ示す。

#### (1) 2年生株の地上部の生育調査結果

苗重量の増加 (30 g区, 50 g区, 70 g区) に伴い、草丈及び茎数は増加傾向であった。株間50 cmと60 cmの比較では、草丈及び茎数に差は認められなかった。

#### (2) 3年生株及び4年生株の地上部の生育調査結果

苗重量の増加に伴い、草丈には影響が認められなかったが、茎数は増加傾向であった。株間の影響については、草丈には差が認められなかったが、茎数では60 cmの方が多い傾向であった。

#### (3) 4年生株の根の収量調査結果 (図3)

1株当たりの生根収量は、苗重量が70 g区で株間が60 cmの試験群で最大値 (1,463 g/株) となった。苗重量の増加に伴い収量は増加傾向であった。30 g区及び50 g区においては、株間の違いによる収量への影響はなかったが、70 cm区においては株間60 cmの方が収量が多い傾向であった。

#### (4) 単収及び労働報酬による評価

生根収量が明らかに少なかった苗重量30 g区を除く各試験群について、1株当たりの生根収量の結果を基に算出した単収及び労働報酬の試算結果を表1

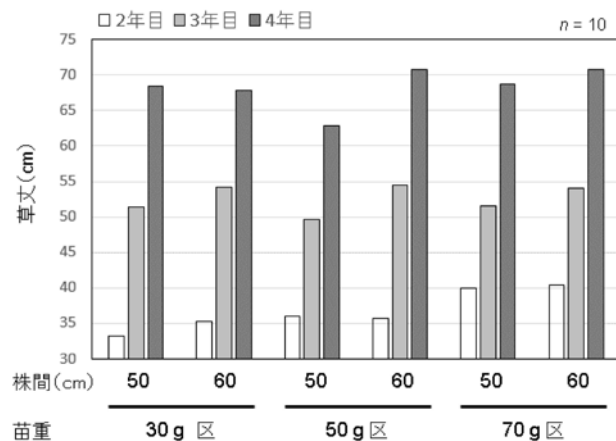


図1 栽培2年目から4年目の草丈 (8月調査)

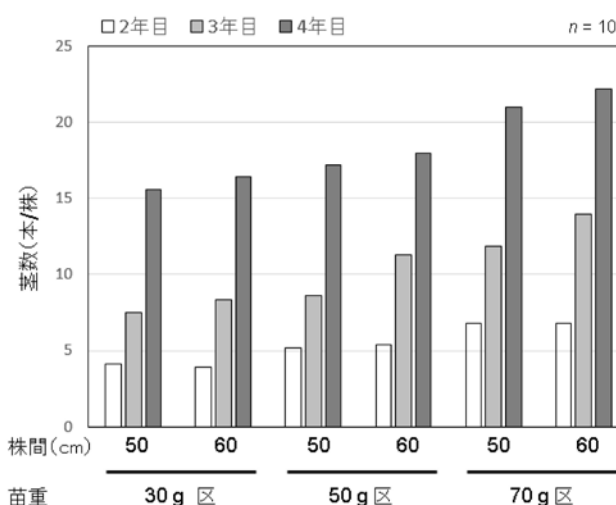


図2 栽培2年目から4年目の茎数 (8月調査)

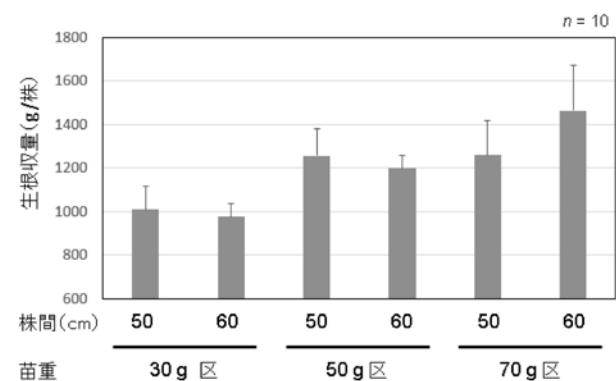


図3 栽培4年目の生根収量 (10月収穫)

に示す。

10アール当たりの収量及び労働報酬で評価した結果、最高となったのは苗重量が「50 g区」又は「70 g区」のいずれも株間が「50 cm」であり、このときの生根単収は約3,150 kg/10 aで労働報酬は約980円/hであった。

表1 単収及び労働報酬の試算結果

栽培条件			試算値			
植付時の 苗重量	株間 (cm)	10 a 当たり 株数 <sup>※1</sup>	10 a 当たり 生収量 (kg)	所得 <sup>※2</sup> (粗収益－ 経費)	労働時間 <sup>※2※3</sup> (4年間)	時間当たり 労働報酬
50 g 区	50	2,500 株	3,142	410,228円	420 h	977円/h
	60	2,083 株	2,497	281,173円	410 h	686円/h
70 g 区	50	2,500 株	3,149	411,428円	420 h	980円/h
	60	2,083 株	3,048	391,128円	410 h	954円/h

※1：畦間160 cm、2条チドリ植えで計算

※2：栽培マニュアル記載の梵天での経営試算を基に算出

※3：栽培株数の違いによって、苗の植付、追肥、茎葉の刈取、摘蕾の労働時間を調整

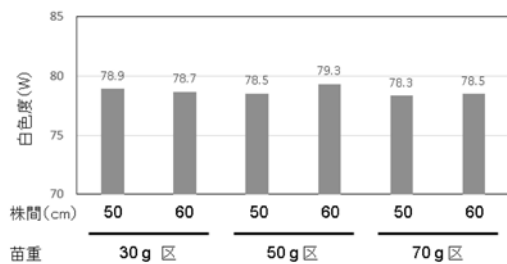


図4 各試験群から調製した生薬粉末の白色度

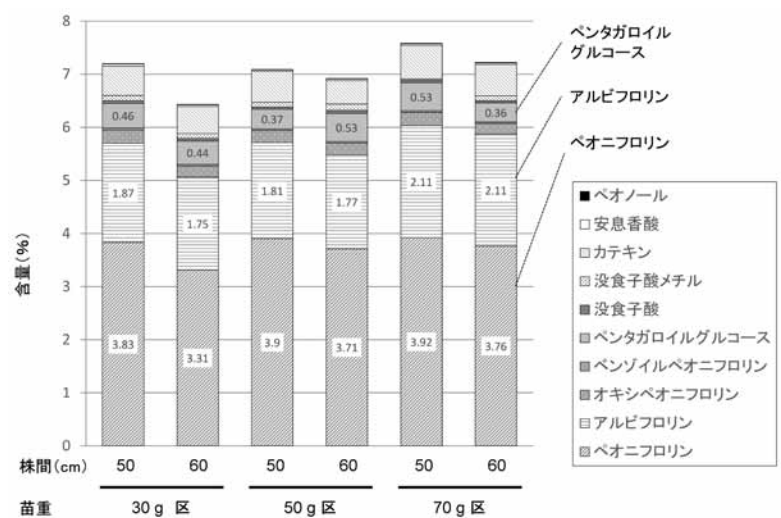


図5 各試験群から調製した生薬中の成分含量

## 2. 白色度

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。目視で白色と認識できる白色度60を目標値として設定した。

各試験群の粉末試料の白色度は78.3～79.3の範囲で、群間で差は認められなかった。どのサンプルでも目標値の60を大きく超え、良好な白色の生薬が得られた。なお、同様に調製した「梵天」(苗重量：50 g, 株間：50 cm)については75.9であった。

## 3. 成分分析 (主要10成分の定量)

各試験群の粉末試料について、主要10成分を定量した結果を図5に示す。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」の基準値を

3.0%以上としている。

試験群のうち、苗重量が「30 g区」の株間が「60 cm」の試験群ではペオニフロリン含量が3.31%であり、他の試験群よりやや低かったが、その他の試験群では3.71%～3.92%の範囲で同等の含量であった。

## 考 察

高品質な富山シャクヤクの出荷を目指して、「春の粧」の生産者での栽培が平成30年11月から開始されているが、今後の生産拡大及びブランド化を推進するためには、収益性の向上が必要不可欠である。そこで、平成27年度からの「富山シャクヤクのブランド化推進事業」では、実生産規模での乾燥調製法の確立と効率化の検討とともに、高品質かつ多収量を実現する「春の粧」栽培マニュアルの作成に取り組んでいる。今回、最適な植付時の苗重量及び株間を決定するため、栽培試験を実施し、得られた生薬について品質面及び

収量面により評価した。

植付時の苗重量の増加（30 g区、50 g区、70 g区）が草丈に及ぼす影響については、栽培2年目には重い苗ほど草丈が高くなる傾向があったが、3年目及び4年目には差はなかった。また、株間は50 cmと60 cmで比較したが、いずれの苗重量においても株間の違いによる草丈への影響はほとんどなかった。一方、苗重量が茎数に及ぼす影響については、栽培2年目から4年目まで、重い苗ほど茎数が多くなる傾向があり、株間についても60 cmの方が茎数はやや多くなる傾向があった。1株当たりの生根収量については、苗重量の増加に伴い収量は増加傾向であり、50 g区及び70 g区と比較して30 g区では収量が少なかった。これらの結果から、十分な収量を得るには50 g以上の苗を植え付ける必要があり、栽培期間中の地上部の生育状況確認においては、特に茎数が多いことが多収量の目安であると考えられた。最適な株間については単収及び時間当たりの労働報酬を考える必要がある。苗重量70 gにおいては、株間50 cmより60 cmの方が1株当たり収量は多かったが、10 a当たりの植付株数から推定した単収及び労働報酬で評価すると、株間50 cmの方が多かった。苗重量については、「50 g区」及び「70 g区」でいずれも株間50 cmのとき労働報酬が最大となったが、過去の「梵天」を栽培する農家の圃場で発生した生育不良の事例では、30 g程度の小さい苗であったことが原因となって排水不良等の環境において病害が発生したものと推定された。このことから、リスクを考慮して「70 g」を推奨することが良いと考えられた。

各試験群の品質評価の結果では、粉末の白色度及びペオニフロリン等の主要成分について試験群間でほとんど差がなかった。苗重量が「30 g区」の株間が「60 cm」の試験群でペオニフロリン含量がやや低かった（他の5つの試験群平均値の約86%）原因については、根の太さの違いによるものではないと考えられる。同一品種でペオニフロリンが低くなる原因の多くは根が太いことに起因するが、これはペオニフロリン及びアルビフロリンは根皮付近に多く含有されているため、太い根ほど皮部率が下がることで両成分の含量は低下するためである。今回の結果ではペオニフロリン以外の成分は同等であることから、他の原因であると考えられるが現在のところ不明である。

今回の結果から、「春の粧」栽培マニュアルにおける最適な栽培条件として苗重量は「70~80 g」、株間は「50 cm」と決定した。我々は現在、薬用で栽培する株から切花生産もできる栽培法についても検討しており、今後さらに生産者の収益性向上を目指し、高品質な富山シャクヤクの生産振興とブランドを推進に貢

献したいと考えている。

## 文 献

- 1) 厚生労働省：第17改正日本薬局方，1817（2016）
- 2) 山本豊，黄秀文，佐々木博，武田修己，樋口剛央，向田有希，森祐悟，山口能宏，白鳥誠：日本における原料生薬の使用量に関する調査報告，生薬学雑誌，73（1），16-35（2019）
- 3) 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，42，29-34（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（2015）
- 5) 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—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—，富山県薬事総合研究開発センター年報，46，13-19（2019）
- 6) 富山県：薬都とやまの薬用作物栽培ハンドブック，21-29（2014）

# 微粒子コーティング法を用いた苦味マスキング法の検討と評価（第3報）

永井 秀昌, 明官 勇雄, 薬事研究会製剤部会

## Evaluation of Bitter Taste Masking using Fine Particle Coating Method (Third report)

Hidemasa NAGAI, Isao MYOKAN,

The Drug Formulation Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

### 要 約

口腔内崩壊錠（OD錠）は口に含んだ際に唾液や少量の水で容易に崩壊することから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者にも服用しやすく、服薬アドヒアランスの改善が期待できる剤形として、近年急速に普及している。OD錠の製剤設計においては、口腔内で数十秒程度の間に崩壊させるための優れた崩壊性と苦味の遮蔽（マスキング）を施す必要がある。

我々は簡便で効果的な苦味マスキング法を明らかにするため、微粒子コーティング法による最適条件の検討及び味覚センサによる評価を実施している。今回は予備造粒法を用いた苦味マスキング法を検証するため、マスキングを施したコーティング顆粒を用いてOD錠を試作し、味覚評価を行った。その結果、ワースター法を用いた顆粒コーティングにより、苦味薬物の簡便なマスキングが実施できることを確認した。ワースター法を用いることで、OD錠の開発に必要な原薬の苦味マスキングを簡便かつ有効に実施できると考えられる。

### Summary

An Orally Disintegrating Tablet (ODT) easily disintegrates in saliva when it is held in the mouth. Therefore, it can be taken easily by elderly patients who have difficulty in swallowing conventional tablets. In recent years, the ODT has been rapidly spread as a dosage form which help to improve drug adherence. In the formulation design of ODTs, it is necessary to provide excellent disintegration and bitterness masking.

We have examined the conditions of bitter taste masking by the fine particle coating method and evaluated them using a taste sensor to establish the most ideal condition. In this study, in order to verify the bitterness masking using the pre-granulation method, ODTs were prepared using the coated granules, and their tastes were evaluated. We confirmed that the granular coating using the Wurster method enables masking of bitter drugs. This study demonstrates that masking ODTs are easily and effectively developed by using the Wurster method.

キーワード：微粒子コーティング, 苦味マスキング, 味覚センサ, ワースター法

Key words : Fine particle coating, Bitterness masking, Taste sensor, Wurster method

### 緒 言

口腔内崩壊錠（OD錠）は口に含んだ際に唾液や少量の水で容易に崩壊することから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者にも服用しやすく、服薬アドヒアランスの改善が期待できる剤形として、近年急速に普及している。OD錠の製剤設計においては、口腔内で数十秒程度の間に崩壊させるための優れた崩壊性と苦味の遮蔽（マスキング）を施す必要がある。

これまで、化学的苦味マスキング剤として知られるシクロデキストリン（CyD）を用いて苦味薬物のマスキングを行い、試作したOD錠の苦味を味覚センサにて評価を行ってきた。今回は、昨年度に続き、微粒子コーティング法による苦味マスキングの最適条件を検

討し、味覚センサにより評価することで、より効果的な苦味マスキング手法の検討を行ったので、その結果を報告する。

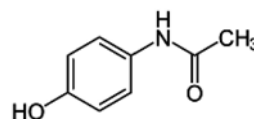
### 実験方法

#### 1. 試薬

##### 1) 苦味薬物

アセトアミノフェン（AA, 山本化学工業(株)）

構造式：



粒子径の異なる 3 種類を使用



(平均粒子径：①178.2 μm, ②279.3 μm, ③658.7 μm)

## 2. 装置

- 1) 複合型流動層造粒コーティング装置：FD-MP-01D (パウレック)  
ユニット：SPC (ワースター) ユニット
- 2) レーザー回折式粒子径分布測定装置：SALD-2300 (島津製作所)
- 3) 卓上型電子顕微鏡：TM4000Plus (日立ハイテクノロジーズ)
- 4) ロータリー式打錠機 VELA5 (菊水製作所)
- 5) 味認識装置：TS-5000Z (インテリジェントセンサーテクノロジーズ)  
センサ：医薬品評価用苦味センサ 2 種 (C00, AE1)

## 3. 実験手順

### 1) 溶液の調製

コーティング用基剤には、胃溶性のヒプロメロース (HPMC) を用い、固形分を蒸留水に溶解し、8%水溶液に調製したものをコーティング液とした。

ヒプロメロース (TC-5R) 水系処方

ヒプロメロース	120 g (胃溶性コーティング基剤)
蒸留水	1,380 g
合計	1,500 g

### 2) 微粒子コーティング

微粒子コーティング及び流動層造粒は、複合型流動層造粒コーティング装置を用いて行った。装置の操作条件はTable 1 に示す通りである。得られたコーティング品は、乾式法により粒子径分布の測定を行うとともに、表面形状を電子顕微鏡で観察した。

Table 1 顆粒コーティング条件

給気温度	80℃
排気温度	40-45℃
風量	1.0 m <sup>3</sup> /min
スプレーエア量	50 NL
払い落とし圧力	0.4 MPa
スプレー速度	4.5-9.5 g/min
仕込み量	300 g
コーティング量	コーティング液として 1,125 g/300 gあたり (ヒプロメロースとして90 g/300 gあたり)
ユニット	ワースターコーティング：SPC (ボトムスプレー)

### 3) 口腔内崩壊錠の打錠

下記処方を秤量し、ポリ袋に入れて約3分間混合したのち、ロータリー式打錠機 (φ10 mm隅角, 3本立) を用いて、1錠402 mg (硬度50 N程度) になるように充填深さを調整して打錠を行った。得られた口腔内崩壊錠について、硬度及び崩壊時間の測定を行った。

a) コントロール錠剤	(1錠あたり)	(1パッチあたり)	
AA原薬 (平均粒子径の異なる3種)	200.0 mg	50.00 g	
直打用乳糖水和物 (ダイラクトーズR)	112.0 mg	28.00 g	
直打用結晶セルロース (セオラスUF702)	48.0 mg	12.00 g	
クロスボビドン (コリドンCL)	40.0 mg	10.00 g	
ステアリン酸マグネシウム	2.0 mg	0.50 g	
合計	402.0 mg	100.5 g	(250錠分)

### b) マスキング顆粒含有錠剤

AAコーティング顆粒 (平均粒子径の異なる3種)	260.0 mg	65.00 g	
直打用乳糖水和物 (ダイラクトーズR)	52.0 mg	13.00 g	
直打用結晶セルロース (セオラスUF702)	48.0 mg	12.00 g	
クロスボビドン (コリドンCL)	40.0 mg	10.00 g	
ステアリン酸マグネシウム	2.0 mg	0.50 g	
合計	402.0 mg	100.5 g	(250錠分)

### 4) 味の評価

検体を希釈する希釈液には10 m mol/L (mM) 塩化カリウムを用い、3) で作製したコントロール錠剤およびマスキング顆粒含有錠剤2錠を測定用カップに入れ、AAの濃度が75 mMとなるように調製した。

## 4. 解析方法

各検体につき味認識装置のプログラムに従って4回測定し、最初の1回目のデータを除いた計3回のデータを以下の解析に使用した。

### 1) 電圧値での評価

得られた3回の測定データについて、専用の解析アプリケーションを用いて補完加算処理し、平均して得られた値を各センサの電圧値として評価した。味認識装置では最初に検体溶液中で測定する先味に加え、各センサを3回の洗浄後に基準液中で測定する後味 (CPA値) の測定も行った。なお、人工脂質膜がブ

ラス荷電であるC00とAE1は、マイナス側に出力するセンサであるため、結果のグラフは絶対値に変換して比較した。その際、正の値については、0とみなして表示した。

## 2) 推定値での評価

推定値は、得られた3回の測定データを専用の解析アプリケーションを用いて補完加算処理し、各センサ値に固有の係数を乗じることによって算出される値であり、1以上の差を示した場合に味の差を識別することができる味覚項目である。

## 実験結果

### 1. 微粒子コーティング実験

ワスター法によって、粒子径の異なる3種類のアセトアミノフェン(AA)のコーティングを実施し、下記の通りのコーティング品を得た。いずれのAAについても、得られたコーティング品の粒子径は600-700 μm程度となり、シャープな粒子径分布を有していることが確認された。

Table 2 粒子コーティング条件と得られた顆粒の平均粒子径

原薬粒子径	スプレー速度	給気温度	平均粒子径
178.2 μm	5→10 g/min	80℃	617.2 μm
279.3 μm	5→10 g/min	80℃	685.3 μm
638.3 μm	5→10 g/min	80℃	671.4 μm

また、卓上型電子顕微鏡(SEM)を用いて、原薬およびコーティング顆粒の表面形状を観察したところ、SPCユニットを用いたコーティング顆粒では、コーティング基剤が粒子表面に展延されている様子が確認された(Fig. 1)。

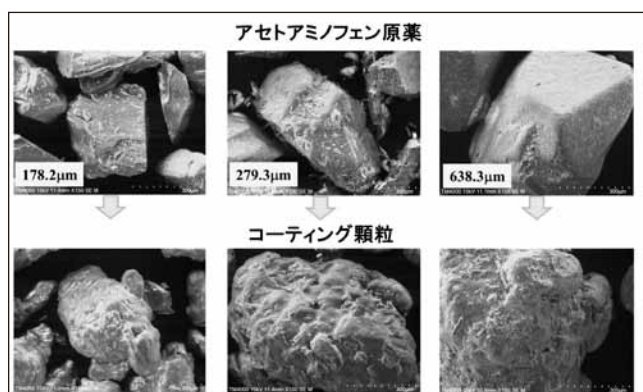


Fig. 1 AA原薬(上)およびコーティング顆粒(下)のSEM写真

### 2. 粒子コーティング法によるAAのマスキング効果

コントロール錠剤及びマスキング顆粒含有錠剤につ

Table 3 AAの味覚評価(電圧値)

電圧値	C00	AE1	CPA1 (C00)	CPA1 (AE1)
コントロール錠1 (D <sub>50</sub> : 178.2 μm)	4.70	51.24	0.00	1.46
コントロール錠2 (D <sub>50</sub> : 279.3 μm)	4.28	47.72	0.00	1.31
コントロール錠3 (D <sub>50</sub> : 638.3 μm)	3.90	55.92	0.00	2.05
マスキング顆粒含有錠剤1	2.35	32.62	0.00	0.70
マスキング顆粒含有錠剤2	2.78	31.96	0.01	0.69
マスキング顆粒含有錠剤3	2.95	38.25	0.00	0.86

(各測定値は3回測定した平均値を示す)

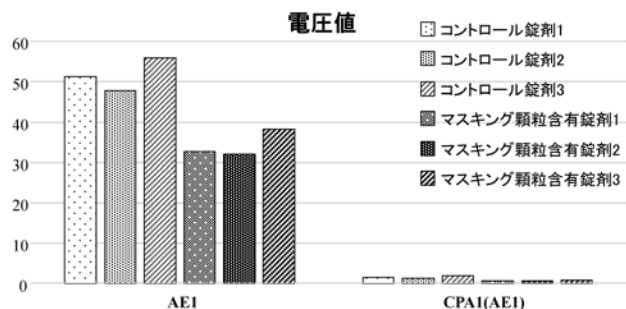


Fig. 2 AAコーティング顆粒含有錠剤のAE1電圧値

Table 4 AAの味覚評価(推定値)

推定値	酸性苦味 (先味)	渋味 (先味)	酸性苦味 (後味)	渋味 (後味)
コントロール錠1 (D <sub>50</sub> : 178.2 μm)	0.66	8.07	-0.09	0.37
コントロール錠2 (D <sub>50</sub> : 279.3 μm)	0.60	7.52	-0.19	0.33
コントロール錠3 (D <sub>50</sub> : 638.3 μm)	0.55	8.81	-0.41	0.52
マスキング顆粒含有錠剤1	0.33	5.14	-0.18	0.18
マスキング顆粒含有錠剤2	0.39	5.03	0.00	0.17
マスキング顆粒含有錠剤3	0.41	6.02	-0.41	0.22

(各測定値は3回測定した平均値を示す)

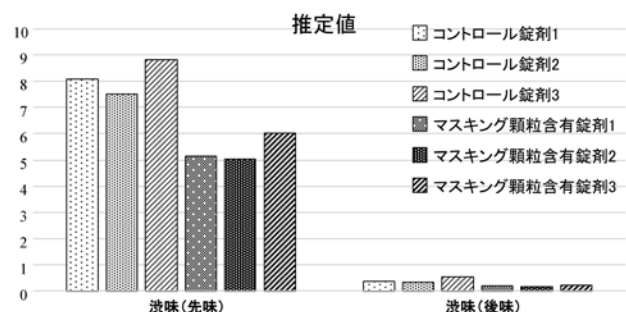


Fig. 3 AAコーティング顆粒含有錠剤の推定値

いて、懸濁した溶液を味認識装置で評価した。なお、これまでの検討により、アセトアミノフェンの苦味はAE1センサ(推定値では渋味)に反応することが明らかとなっており<sup>1)</sup>、AE1センサの電圧値と渋味の値で

評価を行った。その結果、AAの苦味に応答するAE1センサの電圧値は、いずれのコーティング顆粒含有錠剤においても低下した。このことから、今回用いたすべての粒子径のAA顆粒はマスクング効果を示すことが確認された。また粒子径の違いは、マスクング効果の差に影響を与えなかった (Table 3, Fig. 2)。

また、解析アプリケーションを用いて電圧値を推定値に変換し、味覚項目にて評価した。その結果、AE1センサ値は渋味として表され、電圧値での場合と同様に、コーティング顆粒含有錠剤にマスクング効果が認められ、コントロールと比較して渋味 (先味) が1/2程度に抑制された。また、この結果は官能試験による結果とも相関していた (Table 4, Fig. 3)。

## 考 察

我々は平成29年度より口腔内崩壊錠の製剤開発へ応用することを目的として、微粒子コーティング法を用いてアセトアミノフェン (AA) を用いた苦味マスクングの評価研究を行ってきた。初年度は、AA (微粉グレード) に胃溶性コーティング基剤 (アミノアルキルメタクリレートコポリマー E) を用いて、流動層内部に整粒機構を備えた複合型流動層造粒コーティング装置により微粒子コーティングを行った<sup>1)</sup>。その結果、コーティング処方中に可溶化剤として加えたラウリル硫酸ナトリウムがAAの苦味に応答するAE1センサに誤応答することが判明したため、正確な苦味の評価が行えなかった。また、微粒子コーティング法と流動層造粒法での苦味マスクング効果に差が認められず、少量のコーティング液で苦味マスクングを行うためには、流動層造粒等で造粒して、粒子径を大きくした後コーティングする方法 (予備造粒法) が有効であると考えられた。

そこで昨年度は、コーティング基剤として味覚センサに影響を与えないヒプロメロース、及び予備造粒法を想定したAA結晶顆粒を用いて、顆粒コーティング法による簡便な苦味マスクング効果の検討を行った<sup>2)</sup>。その結果、予備造粒法による顆粒コーティング法としてはワースター法によるコーティングが造粒品を粉碎、凝集させることなく効率的に顆粒コーティングを行えることが確認された。また、その際の最適なスプレー速度と給気温度の条件についても明らかとなり、原薬に対して30%程度の比較的低用量で苦味マスクング効果が認められることが明らかとなった。

最終年度となる今年度は、予備造粒法を用いて試作したコーティング顆粒を用いてOD錠を試作し、その苦味を評価することによりマスクング効果の評価を

行った。その結果、いずれのOD錠においても苦味マスクング効果が確認され、マスクング効果に顆粒の粒子径による差が認められないことを確認した。

今回の検討により、予備造粒法によるワースター法を用いた顆粒コーティングにより、苦味薬物の簡便なマスクングが実施できることを確認した。実際、味認識装置でマスクング効果が認められたOD錠については、官能試験では若干の苦みが残っており、完全な苦味マスクングには30%以上のコーティングが必要になると考えられる。

今回、我々はAA顆粒を予備造粒品と見なして、顆粒コーティング及びOD錠の試作を行ったが、ワースター法では予備造粒からコーティングまでの工程を一貫して実施できることも実験により確認している。このため、ワースター法を用いることで、OD錠の開発に必要な原薬の苦味マスクングを簡便かつ有効に実施できると考えられる。

## 文 献

- 1) 佐藤公ら：微粒子コーティング法を用いた苦味マスクング法の検討と評価, 家庭薬研究, 37, 42~47 (2018)
- 2) 永井秀昌ら：微粒子コーティング法を用いた苦味マスクング法の検討と評価 (第2報), 富山県薬事総合研究開発センター年報, 46, 20~23 (2019)

# 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）—

宮本朋美, 本田裕恵, 柳橋 努, 小島理恵子, 小笠原 勝,  
高山信幸, 相川幸彦, 川尻千賀子, 薬事研究会生物部会

### Quality evaluation of biopharmaceuticals — Examination of Comparability of Biosimilar —

MIYAMOTO T, HONDA H, YANAGIBASHI T, KOJIMA R, OGASAWARA M,  
TAKAYAMA N, AIKAWA Y, KAWASHIRI C,

The Biological Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

#### 要 約

バイオ医薬品の品質評価において、バイオ後続品は、先行バイオ医薬品との比較試験：①構造解析や物理的・化学的性質に関する比較試験、②生物活性に関する比較試験等により先行バイオ医薬品との同等性/同質性を示す必要がある。

本研究では、バイオ医薬品の特徴を理解するとともに、バイオ医薬品の品質評価法の習得と効率的な評価系の検討を目的として、エリスロポエチン製剤を題材に、比較試験として品質に係る物理的・化学的特性解析や有効性に係わる生物活性試験を実施してきた結果を報告する。

#### Summary

In characterization of biopharmaceuticals, it necessary to evaluate the comparability of biosimilar compared with reference biological product by: 1) structural analysis and comparative tests on physical and chemical properties; 2) comparative tests on biological activity.

The aim of this study to understand the characteristics of biopharmaceuticals, to learn of quality evaluation methods for biopharmaceuticals, and to examine of efficient evaluation systems. We used the erythropoietin preparations as a subject, and examined the physical and chemical properties related to quality, and bioactivity tests related to effectiveness. We will report the results of these comparative tests

#### 緒 言

バイオ後続品とは、「国内で既に新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等/同質の品質、安全性及び有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」のことを指す。一般に、バイオ後続品は、その品質、安全性及び有効性について、先行バイオ医薬品との比較から得られた同等性/同質性を示すデータ等に基づき開発することができる。

バイオ後続品は、先行バイオ医薬品とは異なる細胞基材、遺伝子発現構成体、培養・精製工程、製剤化工程により製造される。そのために、①構造・組成、②物理的・化学的性質、③生物学的性質、④免疫学的性質、⑤不純物等（目的物質由来不純物、宿主由来タンパク質や培養液等に由来する工程由来不純物、ウイルス等混入汚染物質、等）について明らかにすることが求められる。また、先行バイオ医薬品との比較試験：

①構造解析や物理的・化学的性質に関する比較試験、②生物活性に関する比較試験等により先行バイオ医薬品との同等性/同質性を示す必要がある。

薬事研究会生物部会においては、平成29年から3カ年の研究計画で、バイオ医薬品の特徴を理解するとともに、バイオ医薬品の品質評価法の習得と効率的な評価系の検討を目的として共同研究を開始した。エリスロポエチン製剤を題材に、先行バイオ医薬品とバイオ後続品、及び改良されたバイオベター品について実施してきた品質に係る物理的・化学的特性解析や有効性に係わる生物活性試験に関するこれまでの結果を報告する。

#### 被験製剤

局方標準品並びに先行バイオ医薬品、バイオ後続品として下記の市販製剤を使用した。また、先発バイオ医薬品と基本的に同じ効果をもたらすことが期待されるバイオ後続品に対し、先発薬より高い効果をもたら

す改良品として、販売承認を得るための非臨床、臨床のデータを完全に備えた生物製剤承認申請が必要とされるバイオベター品の市販製剤についても検討した。

- 局方標準品：エポエチンアルファ標準品
- 先行バイオ医薬品：エポエチンアルファ（エスポー），協和発酵キリン
- バイオ後続品：エポエチンカッパ（エポエチンアルファ BS），キッセイ薬品JCRファーマ
- バイオベター品：ダルベポエチンアルファ（ネスプ），協和発酵キリン

## 方法及び結果

### 1. 物理的・化学的特性解析

#### 1-1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による分子量測定<sup>1)</sup>

被験物質 (0.54 µg/75 µL) に電気泳動用Sample Buffer Solution (2ME+) (Wako) 25 µLを加え、95°Cで5分間加熱し、12%ポリアクリルアミドゲルにアプライした (15 µL/well)。分子量範囲10-250 kDaの分子量マーカー (Precision Plus Protein Unstained Standards, Bio-Rad) を使用した。泳動後、染色試薬 (Oriole Fluorescent Gel Stain, Bio-Rad) の手順に準じてゲルを染色し、ケミルミイメージング装置 (FUSION-FX7, Vilber-Lourmat) により化学発光の撮影を行った。分子量マーカーの各バンドの分子量 (10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kDa) 及び移動度から算出した一次回帰式を用いて、各サンプルで観察されたバンドの分子量を算出した。

結果、図1に示すようにいずれも単一で幅広い泳動帯を認め、局方標準品並びに先行バイオ医薬品の分子量は、31.4-38.8 kDa並びに31.4-37.8 kDaと算出され、ほぼ同等であった。これらに比べ、バイオ後続品の泳

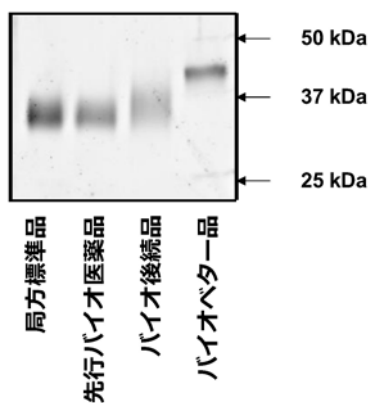


図1 SDS-PAGE像

動帯は数kDa高分子側の32.2-43.2 kDaとなり、エポエチンアルファ BS注の審査報告書の記載内容と一致した。一方、バイオベター品の分子量は40.9-45.5 kDaとなった。

#### 1-2. ウェスタンブロット法による製剤確認試験<sup>1)</sup>

被験物質 (0.54 µg/75 µL) に電気泳動用Sample Buffer Solution (2ME+) (Wako) 25 µLを加え、95°Cで5分間加熱し、12%ポリアクリルアミドゲルにアプライした (15 µL/well)。電気泳動後、セミドライ方式 (トランスブロットTurboシステム, Bio-Rad) によってPVDFメンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング試液 (5%スキムミルク in TNT buffer) で室温1時間ブロッキングし、一次抗体として3000倍希釈の抗ヒトEPO抗体 (Anti-human EPO Antibody (Rabbit), abcam, Cat #ab226956) を室温で2時間、二次抗体として5000倍希釈のHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, CST, Cat #7074S) を室温で1時間反応させ、ケミルミイメージング装置を用いて化学発光撮影によりバンドを検出した。

結果、図2に示すように局方標準品及び各被験製剤で単一の幅広い泳動帯を認めた。先行バイオ医薬品の泳動帯は標準品と同様の泳動パターンを示し、バイオ後続品の泳動帯は先行バイオ医薬品と比較してより高分子側に認められた。先行バイオ医薬品とバイオ後続品は移動度が異なるものの、ヒトエリスロポエチン製剤であることが免疫化学的に確認できた。

#### 1-3. 液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析計 (LC-TOF/MS) を用いたペプチドマッピング法による製剤確認試験

遠心式限外ろ過フィルター (Amicon Ultra, Merck) にて脱塩濃縮した先行バイオ医薬品及びバイオ後続品 (約10 µg/70 µL) に0.2 µg/µLのTrypsin

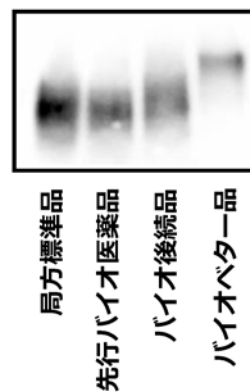


図2 ウェスタンブロット像

Gold (Promega) を 2  $\mu$ L 加え, 37°C で 12 時間以上加温後, 10% トリフルオロ酢酸溶液を 8  $\mu$ L 加えて反応を停止し, 試料溶液とした. 試料溶液 5  $\mu$ L を LC-TOF/MS (ブルカージャパン) で測定した. 得られたデータを解析ソフト (Biopharma Compass 及び Biotools,

ブルカージャパン) を用いて解析した.

<測定条件>

検出器: LC (LC-20A システム, 島津製作所),

TOF/MS (maXis II, ブルカージャパン)

カラム: Waters ACQUITY UPLC BEH C18

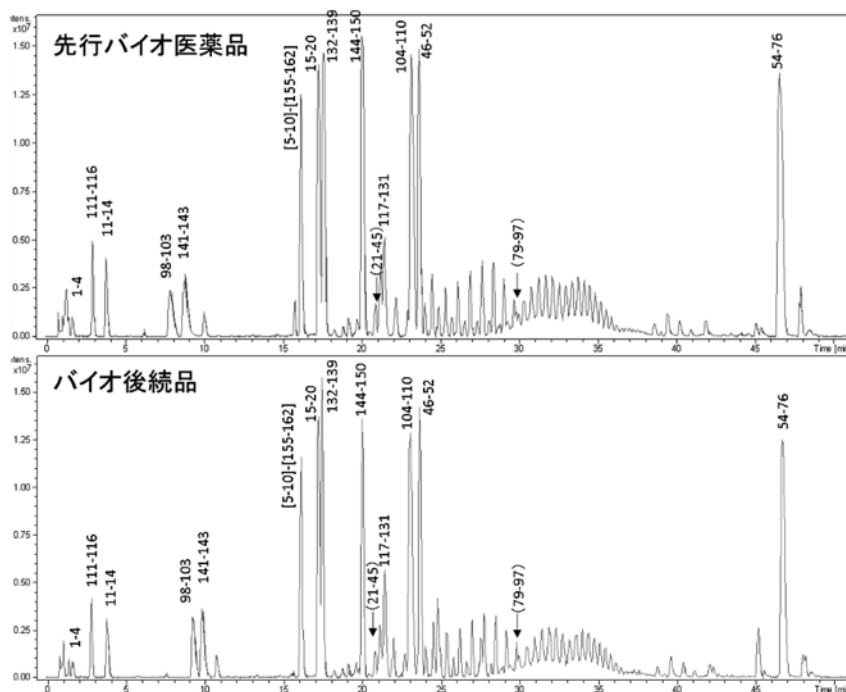


図3 ペプチドマッピングのベースピーククロマトグラム

表1 先行バイオ医薬品とバイオ後続品のトリプシン消化ペプチドの保持時間

Position	Sequence	先行RT (min)	後続RT (min)
1-4	APPR	1.70	1.67
5-10	LICDSR <sup>#1</sup>	16.18	16.15
11-14	VLER	3.86	3.85
15-20	YLLEAK	17.31	17.23
21-45	EAENTTTGCAEHCSLNENTTVPDTK <sup>#2, #2</sup>	(21.2-21.9)	(20.8-21.8)
46-52	VNFYAWK	23.70	23.70
53-53	R	-	-
54-76	MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	46.52	46.68
77-97	GQALLVNSSQPWEPLQLHVD	(29.7-30.1)	(29.8-30.2)
98-103	AVSGLR	7.91	9.30
104-110	SLTTLLR	23.19	23.08
111-116	ALGAQK	2.98	2.87
117-131	EAISPPDAASAAPLR	21.53	21.54
	EAISPPDAASAAPLR	-	-
132-139	TITADTFR	17.61	17.50
140-140	K	-	-
141-143	LFR	8.74	9.88
144-150	VYSNFLR	20.10	20.03
151-152	GK	-	-
153-154	LK	-	-
155-162	LYTGEACR <sup>#1</sup>	16.18	16.15
163-165	TGD	-	-

#1, #2 ジスルフィド結合

N結合型糖鎖結合部位: N24, N38, N83

O結合型糖鎖結合部位: S126

Column, 130Å, 1.7 μm, 1 mm×100 mm  
 カラム温度：55℃, 流量：毎分0.1 mL  
 移動相A：0.1%ギ酸-水  
 移動相B：0.1%ギ酸-アセトニトリル

非還元下, トリプシン消化した試料溶液をLC-TOF/MSで分析したペプチドマッピングにおいて, 先行バイオ医薬品及びバイオ後続品は, 類似したクロマトグラムを示した(図3). 解析ソフトによりペプチド配列の精密質量の実測値を目的のタンパク質の理論値と照合した結果(表1), クロマトグラム上の主要ピークは, MS測定範囲以下(<300 Daモノアイソトピック質量)の短いペプチド(トリペプチド以下)を除いた, ヒトエリスロポエチンをトリプシン消化した時の糖鎖のないペプチド及びMSにおいてO-結合型糖鎖が外れたペプチドに帰属された. 一方, 糖鎖を含むペプチドでは糖鎖構造の不均一性から幅広いピーク形状となり, おおよその糖鎖の質量を加えたペプチド質量と実測値からどの付近のピークか推測できたが, 複雑なマススペクトルの各イオンを各糖ペプチドの理論値と照合するには至らなかった. しかしながら, 帰属できたピークの保持時間は, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品とでほぼ等しく, いずれもヒトエリスロポエチンタンパク質のアミノ配列及びLICDSRとLYTGEACRとのジスルフィド結合が確認出来た.

#### 1-4. キャピラリー等電点電気泳動による糖鎖プロファイル分析

前述同様に脱塩濃縮した先行バイオ医薬品及びバイオ後続品20 μL(約1 mg/mL)と87 μLのキャピラリー等電点電気泳動用試薬:cIEF gel(SCIEX), Pharmalyte 3-10及び25-5(GE), Arginine及びIminodiacetic acid(Sigma), SimpleSol(Protein simple), pI marker 3.38(Protein simple)及び5.5(SCIEX)を混合して泳動用試料とした. キャピラリー電気泳動装置(PA800plus, SCIEX)にて以下の条件により測定し, pI markerの等電点と移動時間より, 得られたピークの等電点を算出した.

<測定条件>

検出器: UV280 nm

キャピラリー: Neutral Capillary, 50 μm i.d.  
 ×有効長20 cm(SCIEX)

等電点電気泳動: サンプル導入25 psi 99.9 sec 加圧,  
 Focusing Step 20 kV 10 min,  
 Chemical Mobilization 30 kV 25 min

糖鎖の種類(シアル酸の結合数)によりpI 3.38-5.5の間に複数のピークが認められた. 分離があまりよくないため改良の余地はあるものの, 等電点を6つの領域に分けた時のピークのArea%を表2に示す. 先行バイオ医薬品とバイオ後続品で存在比に違いがあるものの, 同様のピークパターンを示し, 類似性は高かった.

表2 キャピラリー等電点電気泳動(Area%)

pI	Area%			
	先行バイオ医薬品 No.1	バイオ後続品 No.1 No.2 mean		
① >4.5	1.56	9.52	10.68	10.10
② 4.22-4.5	21.63	27.97	19.45	23.71
③ 4.04-4.22	19.56	15.34	22.78	19.06
④ 3.82-4.04	40.15	30.24	20.43	25.34
⑤ 3.75-3.82	9.51	7.75	9.31	8.53
⑥ <3.75	7.59	9.17	17.35	13.26
total	100.0	100.0	100.0	100.0

先行バイオ医薬品は, n=1, バイオ後続品は, n=2での測定

#### 1-5. 超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC)によるシアル酸含量測定

局方に準じて試料を調製した. 前述同様に脱塩濃縮した先行バイオ医薬品, バイオ後続品, バイオベター品, または局方標準品(約0.8 nmol/45 μL)に水酸化ナトリウム試液5 μLを正確に加え, 氷水中で90分間放置した後, 希酢酸5 μLを正確に加えた. この液に水45 μL及び水/酢酸(100)混液(27:8)100 μLをそれぞれ正確に加え, 80℃で210分間加温した. 冷後, この液に局方記載の蛍光試液200 μLを正確に加え, 遮光下, 60℃で2時間加温した. 冷後, この液に水酸化ナトリウム試液200 μLを正確に加えて試料溶液とした. 別に用時, 0.4 mmol/L N-アセチルノイラミン酸試液250 μLを正確に量り, 0.1 mmol/L N-グリコリルノイラミン酸試液20 μL及び水180 μLをそれぞれ正確に加えた溶液45 μLを同様に処理し, 標準溶液とした. 試料溶液及び標準溶液2 μLを正確にとりUHPLCにて測定した. 試料溶液のN-アセチルノイラミン酸のピーク面積 $A_{T1}$ 及びN-グリコリルノイラミン酸のピーク面積 $A_{T2}$ , 並びに標準溶液のN-アセチルノイラミン酸のピーク面積 $A_{S1}$ 及びN-グリコリルノイラミン酸のピーク面積 $A_{S2}$ より, シアル酸の含量(mol/mol) =  $(A_{T1}/A_{S1} \times 10 + A_{T2}/A_{S2} \times 1/5) / (\text{採取した本品のモル数})$ を算出した.

先行バイオ医薬品とバイオ後続品(各2 Lots)のシアル酸含量(mol/mol)は, 先行バイオ医薬品(11, 11), バイオ後続品(10, 10)となり, 局方標準品(11)及びバイオベター品(16)であった. 先行バイ

オ医薬品及びバイオ後続品は、いずれも日局17エポエチンアルファのシアル酸含量規格 (10–12 mol/mol) 内であった。シアル酸の数が増加したバイオベター品のダルベポエチンアルファのシアル酸含量は、先行バイオ医薬品の約1.5倍だった。

## 2. 生物活性試験

### 2-1. フローサイトメトリー法によるマウス網状赤血球の増加を指標とした*in vivo*生物活性試験

日本薬局方の記載に準拠し、エリスロポエチン製剤の薬理活性 (造血作用) を網状赤血球数の増加を指標に評価した。先行バイオ医薬品及びバイオ後続品より調製した0.5及び2 IU/animalの投与液0.2 mLをそれぞれICR系マウス (雌, 5週齢, n=14) に3日間反復皮下投与した。陰性対照群には生理食塩液を同様に投与した (n=10)。最終投与後24時間にEDTA処理した毛細管を用いてマウスの尾より採血した。測定用チューブに血液5 µLを分取し、キャリブレーション用のマイクロビーズ (ビーズ径6.0 µm, 濃度 $1.0 \times 10^8$ ビーズ/mL, Bacteria Counting Kit for flow cytometry, Life technologies, Cat #B7277) 5 µL含むチアゾールオレンジ (濃度0.01 mg/mL, BD Retic-Count, Cat #349204) を1 mL添加して室温で30分間放置した。その後、自動細胞分析装置 (BD FACSCantoII, 日本ベクトン・デッキンソン) を用い、ビーズを500個取り込んだ際のチアゾールオレンジ陽性細胞 (網状赤血球) 数を計数した。

測定結果を図4に示した。陰性対照群, 先行バイオ医薬品0.5, 2 IU投与群, バイオ後続品0.5, 2 IU投与群の網状赤血球数は, それぞれ $2548 \pm 960$ ,  $3458 \pm 947$ ,  $5184 \pm 1268$ ,  $3435 \pm 635$ 及び $4469 \pm 604$  cells/µLとなり, 先行バイオ医薬品及びバイオ後続品の2 IU投与群では, 陰性対照群と比較し網状赤血球の有意な

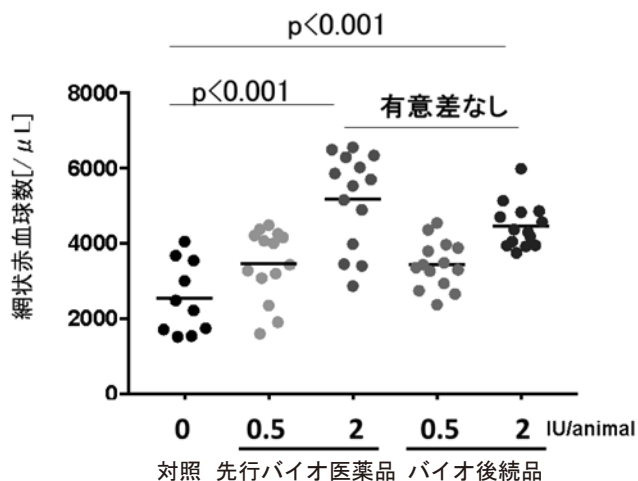


図4 エリスロポエチン製剤のマウスにおける造血作用

増加がみられた。また, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品の2 IU投与群の網状赤血球数に有意な差はみられなかった。よって, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品が同程度の造血作用を有することが示唆された。

### 2-2. エリスロポエチン受容体発現細胞の増殖を指標とした*in vitro*生物活性試験<sup>1)</sup>

ヒトエリスロポエチン受容体 (hEPO-R) 発現細胞の増殖を指標に, エリスロポエチン製剤の生物活性を評価した。細胞増殖は, テトラゾリウム塩 (WST-1) を用い細胞全体の脱水素酵素活性を指標として解析した。96穴プレートにヒト赤白血病由来TF-1細胞を播種し ( $2 \times 10^4$  cells/well), 段階希釈した被験製剤 (0.0032–2 nM) 存在下で3日間培養した。細胞懸濁液100 µLにWST-1溶液10 µLを添加し, 3時間培養後, 吸光度を測定した (450 nm/対照690 nm)。得られた吸光度より増殖曲線を作成し, 50%細胞増殖濃度 (EC<sub>50</sub>値) を算出した。

結果, 図5に示すように先行バイオ医薬品, バイオ後続品並びにバイオベター品のEC<sub>50</sub>値は, 各々, 0.069, 0.105, 0.524 nMと算出された。先行バイオ医薬品とバイオ後続品のEC<sub>50</sub>値に有意差は認められず, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は同程度の細胞増殖促進能を示した。一方, バイオベター品は, 先行バイオ医薬品及びバイオ後続品より弱い細胞増殖促進能を示した。バイオベター品は, 先行バイオ医薬品と比較してhEPO-Rへの結合親和性が低いことが報告されており, 本試験結果は先行情報と一致した。

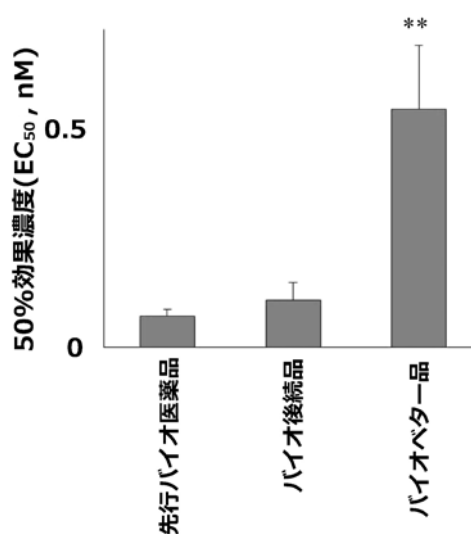


図5 細胞増殖における50%効果濃度

Each column represents the mean+SEM (n=10–15), \*\*p < 0.001 vs control, (one-way ANOVA followed by Tukey's test).



### 2-3. 表面プラズモン共鳴法によるリガンド結合親和性を指標とした*in vitro*生物活性試験

エリスロポエチンは赤芽球系前駆細胞のエリスロポエチン受容体に結合することで前駆細胞の分化及び増殖を促して赤血球産生を促進する。今回、分子間相互作用解析装置を用い、表面プラズモン共鳴法により被験製剤のエリスロポエチン受容体との結合親和性を評価した。

捕捉用抗体の抗ヒトIgG-Fc抗体をHuman Antibody Capture Kit (GE Healthcare) によりセンサーチップ (CM5, GE Healthcare) に固定化した。アナライトとして、先行バイオ医薬品、バイオ後続品及びバイオベター品の0.117, 0.234, 0.469, 0.938, 1.875, 3.75, 7.5, 15及び30 nmol/Lの希釈溶液を調製した。作製したセンサーチップを分子間相互作用解析装置 (Biacore T200, GE Healthcare) に装着し、リガンド (エリスロポエチン受容体; ヒトFcキメラ組換え型, R&D systems) を捕捉後、調製した被験製剤の希釈溶液を用いてリガンドに対するアナライトの結合解離センサーグラムを取得した。カイネティクス解析及び平行線検定を実施し、被験製剤のエリスロポエチンと受容体との結合親和性を比較した。

カイネティクス解析の結果を表3に示した (n=

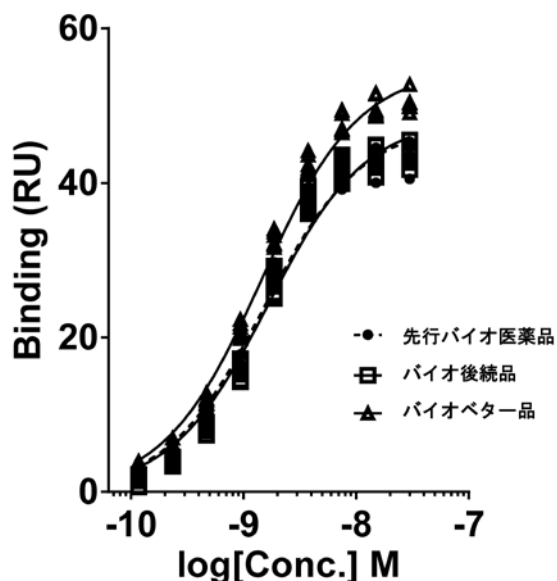


図6 結合量と対数濃度より得られたシグモイド曲線

9). 結合速度定数 ( $K_a$ ), 解離速度定数 ( $k_d$ ), 解離定数 ( $K_D$ ) 及び最大結合量 ( $R_{max}$ ) において、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は類似する値を示し、両者の値に統計学的に有意な差はみられなかった。一方、バイオベター品は、それぞれの値について先行バイオ医薬品と統計学的に有意な差が認められ、 $K_D$ が大きくなったことから、結合親和性は低下した。また、結合量と対数濃度の個々のデータ (n=9) より得られたシグモイド曲線を図6に示す。バイオベター品は最大結合量が大きく明らかにグラフの形状が異なるため、先行バイオ医薬品とバイオ後続品との平行線検定の結果、50%結合濃度 ( $EC_{50}$ 値) はそれぞれ、 $1.361E-09$ ,  $1.389E-09$  (M) となり、その効力比は、1.021で統計学的に有意な差はみられなかった。

### 考察および総括

エリスロポエチン製剤を題材に、先行バイオ医薬品とバイオ後続品、及び改良されたバイオベター品について有効性に係わる生物活性試験や品質に係る物理的・化学的特性解析を実施した。

SDS-PAGEによる分子量測定、及びウェスタンブロットリング法による製剤確認試験の結果、先行バイオ医薬品 (エポエチンアルファ) とバイオ後続品 (エポエチンカプパ) は分子量に差が認められたものの、免疫化学的にヒトエリスロポエチン製剤であることを確認することができた。分子量の違いが何に起因するのかを明らかにするため、ペプチドマップによる製剤確認試験や糖鎖プロファイルなどの特性解析を行った。

局方のペプチドマップによる確認試験では、非還元条件下、トリプシン処理した検体を液体クロマトグラフィーにより試験し、得られたクロマトグラムの比較により同一保持時間に同様のピークを検出することで確認する。本研究では検出をTOF/MSにし、得られたクロマトグラム上のピークをペプチド配列に帰属することにより、より多くの情報を得た。非還元条件下、トリプシン処理した検体をLC-TOF/MSによりペプチドマップを行い、糖鎖のないペプチド及びO-結合

表3 表面プラズモン共鳴法によるリガンド結合親和性のカイネティクス解析結果

	先行バイオ医薬品				バイオ後続品				バイオベター品			
	$K_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$ (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$ (RU)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$ (RU)
Mean	8.48E+06	2.73E-04	3.26E-11	42.07	8.28E+06	2.53E-04	3.12E-11	42.77	5.30E+06	2.15E-04	4.07E-11	49.22
SD	5.68E+05	3.64E-05	5.30E-12	1.55	4.04E+05	3.16E-05	3.87E-12	1.25	1.70E+05	2.57E-05	5.28E-12	1.29
CV(%)	6.69	13.36	16.27	3.68	4.88	12.49	12.40	2.93	3.21	11.96	12.96	2.62

型糖鎖がはずれたペプチドは、数塩基の極短いペプチドを除いて全ての主要ピークに帰属ができ、帰属できた範囲において先行バイオ医薬品とバイオ後続品の一次構造は同じで、S-S結合部位も一致しており、ヒトエリスロポエチン製剤であると確認できた。この結果は、トリプシン処理したエリスロポエチンを質量分析によりペプチドマップを行った既存の報告<sup>2)</sup>と、糖鎖のついたペプチドを詳細に解析できなかった点を除き、矛盾していなかった。従って、先行バイオ医薬品とバイオ後続品との分子量の違いはペプチドマップで詳細に検討できなかった、結合している糖鎖の不均一性に起因すると考えられた。

そこで、キャピラリー等電点電気泳動 (CE) による糖鎖プロファイル分析を実施した。糖鎖の種類 (シアル酸の結合数) によりpI 3.38-5.5の間で複数のピークが認められた。等電点を6つの領域に分けた時のピークのArea%から、先行バイオ医薬品とバイオ後続品で存在比に違いがあるものの、同様のピークパターンを示し、類似性は高いと考えられた。なお、今回CEで得られたエリスロポエチンの等電点 (約3.7-4.5) は、これまでの報告<sup>3)</sup>の等電点 (約3.9-4.8) よりも低い。CEではタンパク質の凝集、沈殿により再現性が得られないことがあるため、可溶化剤として尿素を用いることが多い。既報でも尿素を用いているが、尿素には見かけ上のpI値変化を引き起こす陽性勾配ドリフトが起こり、本来の等電点よりも高くなる。今回、我々は尿素の欠点を改善した可溶化剤を用いたため、陽性勾配ドリフトがおこらず、既報よりも等電点が低くなったと考えられる。

一方、エリスロポエチン製剤は、シアル酸の結合数が増加すると、エリスロポエチン受容体への結合親和性は低下するものの血中半減期が延長し、*in vivo*での生物活性が向上することが知られている。従って、糖鎖プロファイルの違いがシアル酸含量の変化を伴う場合は、生物活性に影響することから、製剤中のシアル酸含量を測定した。その結果、先行バイオ医薬品及びバイオ後続品は、いずれも日局17エポエチンアルファのシアル酸含量規格 (10~12 mol/mol) 内であり、同程度のシアル酸を含有していることが明らかになった。なお、シアル酸の数が増加したバイオベター品のシアル酸含量は、先行バイオ医薬品の約1.5倍であり、シアル酸の最大結合数が先行バイオ医薬品の14個に対し、バイオベター品では22個であり、約1.6倍となっていることと矛盾しない。また、局方のHPLC法をUHPLC法に改良することにより、検出感度の向上と測定時間の短縮ができ、効率的な評価法を確立できた。

これらの物理的・化学的特性解析の結果、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は、ウェスタンブロット法による免疫学的手法及びペプチドマッピングによる一次構造の分析により製剤中のヒトエリスロポエチンを確認することができた。結合している糖鎖の不均一性から、分子量や糖鎖プロファイルに違いがあるが、生物活性への関与が大きいシアル酸の結合数については、シアル酸含量が同程度のため生物活性に影響しないと考えられる。

実際に、マウスに製剤を投与し、網状赤血球の増加を指標とした*in vivo*生物活性試験では、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は同程度の造血活性を有していた。また、エリスロポエチン受容体への結合親和性において、結合速度定数、解離速度定数、解離定数及び最大結合量のいずれも先行バイオ医薬品とバイオ後続品とで同程度であった。さらに、エリスロポエチン受容体発現細胞において、先行バイオ医薬品とバイオ後続品は同程度の細胞増殖促進能を示す等、実施した生物活性試験において先行バイオ医薬品とバイオ後続品とは有効性に違いはなかった。

これらの結果を総合的に判断すると、物理的・化学的性質の比較では糖鎖構造の多様性による差異が認められるが、生物活性への関与が大きいシアル酸の含量は同程度であり、検討した*in vitro*及び*in vivo*の生物活性試験の比較ではいずれも同程度の結果が得られたことから、物理的・化学的品質の差異が有効性に影響を与えておらず、バイオ後続品は先行バイオ医薬品と同等/同質であると説明できる。なお、バイオ後続品の審査報告書を参考にすると、承認審査では認められた糖鎖構造の多様性に係る品質の差異が有効性・安全性に影響を与えないと判断する根拠を非臨床試験及び臨床試験の成績から説明するように求めている。また、糖鎖構造の多様性を管理するための品質規格も求められており、実際の同等性/同質性の評価においては、これらの項目を明らかにし、総合的な判断について説明できることが必要である。

最後に、3年間の生物部会活動を通して、局方の試験法の改良や生物活性試験における動物実験の代替法など、新たな評価系を検討することで、より効率的に多くの情報を得ることができた。一方、特性解析のうち、特にLC-TOF/MSを用いた解析では、MSの条件設定やデータの解析に熟練していないため、目的とした結果が十分に得られないこともあることが実感できた。

令和2年2月に最新の「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(薬生薬審発0204 第1号)が通知され、その中において、バイオ後続品の開

発に当たっては、先行バイオ医薬品の開発・承認以降の情報の蓄積や最新の科学技術を十分取り入れることが求められていることから、薬事研究会生物部会では、引き続きバイオ医薬品についてLC-TOF/MSを用いた解析等の物理的・化学的特性解析の習得を目指す予定である。

## 文 献

- 1) 宮本朋美, 松永孝之, 本田裕恵, 柳橋 努, 小笠原 勝, 高山信幸, 相川幸彦, 川尻千賀子, 薬事研究会生物部会: 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 –, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 46, 24-27, 2019
- 2) 原園景: バイオ医薬品の品質特性解析における質量分析, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn, 64 (3) , 93-96, 2016
- 3) Ben Cowpera, Xiang Li, Lei Yub, Yong Zhoub, W.H. Fanb, C.M. Raob: Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan., J. Pharm. Biomed. Anal., 153, 214-220, 2018

# ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討

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

## Basic study on the analysis of elemental impurities using inductivity coupled plasma mass spectrometry

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。また、マイクロ波分解装置では、密閉状態で化合物を分解することができ、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を用いて元素不純物の検出下限値の評価や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。また、当センターで調製したモデル製剤を用いて、製剤中の元素不純物分析における、汎用的な測定方法とサンプル分解法の確立を行った。

### Summary

In some cases, 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 validated the analytical methods of elemental impurities by ICP-MS and verified the measured values met the criteria defined in the ICH by testing the detection limits and spike recoveries. We also analyzed elemental impurities in model drugs which we were prepared, and established the versatile method of a sample digestion followed by the analysis of elemental impurities.

**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た「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る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が適用されることとなり、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)。今後はさらにその規制が強化されていく可能性も考えられる。

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。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。

### 試験方法及び結果

#### ①検出下限値の評価

本検討では、ICP-MSがQ3Dガイドラインに規定されている元素の濃度を評価するのに十分な性能を持っているかを確認した。試験方法はブランク溶液を10回

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10 g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 µg/g	注射剤の濃度 µg/g	吸入剤の濃度 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

表2 標準原液の組成

使用標準原液	含有元素
SPEX製 XSTC-2071	30,000 ppb : Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru
SPEX製 XSTC-2072	30,000 ppb : Hg, Au
SPEX製 XSTC-2073	30,000 ppb : Ag, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Mo, Ni, Sb, Se, Sn, V 15,000 ppb : As 5,000 ppb : Cd, Pb, Tl

表3 内標準原液の組成

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

表4 ICP-MSの検出下限値

元 素	Li	V	Cr	Co	Ni	Cu	As	Se	Mo	Ru	Rh	Pd
許容1日曝露量の10%量 (ppb) 経口製剤	5500	1000	110000	500	2000	30000	150	1500	30000	1000	1000	1000
許容1日曝露量の10%量 (ppb) 吸入剤	250	10	30	30	50	300	20	1300	100	10	10	10
ICP-MSの検出下限値 (ppb)	0.131	0.021	0.017	0.004	0.010	0.023	0.023	0.066	0.111	0.002	0.018	0.006
ICP-MSの検出下限値 (ppb) <sup>a)</sup>	0.655	0.105	0.085	0.020	0.050	0.115	0.115	0.330	0.555	0.010	0.090	0.030

元 素	Ag	Cd	Sn	Sb	Ba	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb
許容1日曝露量の10%量 (ppb) 経口製剤	1500	50	60000	12000	14000	1000	1000	10000	1000	300	80	50
許容1日曝露量の10%量 (ppb) 吸入剤	70	20	600	200	3000	10	10	10	10	10	80	50
ICP-MSの検出下限値 (ppb)	0.012	0.001	0.013	0.007	0.003	1.190	0.052	0.002	2.737	0.729	0.171	0.005
ICP-MSの検出下限値 (ppb) <sup>a)</sup>	0.060	0.005	0.065	0.035	0.015	5.950	0.260	0.010	13.685	3.645	0.855	0.025

a) 製剤中濃度に換算したICP-MSの検出下限値 (1日投与量10 gの製剤を本試験方法で測定した場合)

測定し、その標準偏差を3倍した値を検出下限値とし、各元素のそれぞれの検出下限値を算出した<sup>1)</sup>。

性能の評価については、PMDAの「製剤中の元素不純物の管理」をもとにPDE値の30%を管理閾値として設定し、さらに機器の測定誤差を考慮してPDE値の10%が正確に測定できることを目安として設定した。また、剤型については、後述のモデル製剤として用いる経口製剤及び管理値が最も厳格な吸入剤を想定していた。

#### 標準溶液の調製

標準原液（表2）を超純水で希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.0%、塩酸0.5%となるように調製した。

#### ブランク溶液の調製

酸の最終濃度が硝酸4.0%、塩酸0.5%となるように調製した。

#### 内標準溶液の調製

内標準原液（表3）を超純水で100倍希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.0%、塩酸0.5%となるように調製した。

## 結 果

1日投与量10 gの経口製剤を想定した場合、すべての元素において、Q3Dガイドラインで規定されたPDE値の10%以下の検出下限値となり、本装置は経口製剤中の金属含量の測定に対して、十分な測定能力を持つことが明らかとなった（表4）。

1日投与量10 gの吸入剤を想定した場合、AuにおいてはQ3Dで規定されたPDE値の10%に対して十分な測定能力を持つとは言えない結果となったが、Auには測定時にキャリーオーバーの影響が認められたため、正しく評価した場合にはより精密な測定能力が得られると思われる。

## ②コーンスターチ中の金属含量測定及びマイクロ波照射後の添加回収試験

ICP-MSでは、粘性のある試料や完全分解していない試料を測定する場合、イオン化の際に噴霧部の汚染、試料の噴霧がバラつく等の不具合を生じてしまう。そのため、そのような試料は液体に完全分解させるための前処理が必要となる。本検討では、医薬品の賦形剤として一般的に使用されているコーンスターチをマイクロ波試料前処理装置（アントンパール社製）で酸分解し、実際にICP-MSでの測定が可能かを確認した。また、マイクロ波照射後の添加回収試験も同時に行った。

#### 試料の調製

マイクロ波分解容器にコーンスターチ0.1 gを入れ、超純水3 mL、70%硝酸溶液3 mL、30%過酸化水素水1 mLを加えた。以下に示した条件でマイクロ波分解を行った。35%塩酸1 mLを加え、超純水で希釈して50 mLとした。また、ブランク溶液及び添加回収試験溶液も同様の方法で調製した。

#### ○マイクロ波分解の条件

1. 350Wで20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35分間マイクロ波照射

#### 標準溶液の調製

標準原液を超純水で希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%、過酸化水素0.6%となるように調製した。

#### 内標準溶液の調製

内標準原液を超純水で100倍希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%、過酸化水素0.6%となるように調製した。

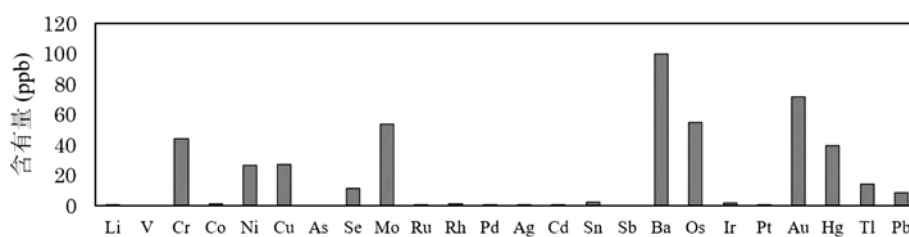


図1 コーンスターチ中の金属含量

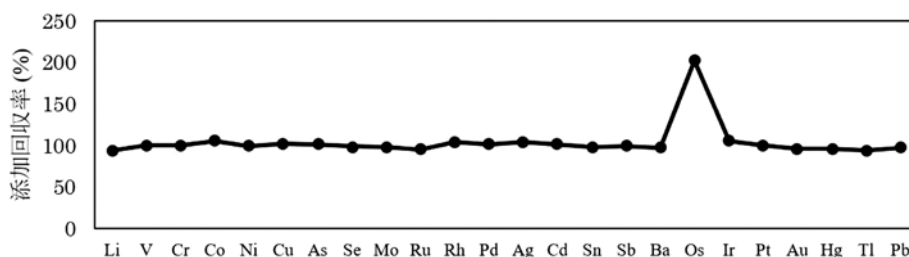


図2 添加回収試験（マイクロ波照射検体）

## 結 果

マイクロ波照射後のコーンスターチ中の金属元素を測定した結果、Au及びHgのキャリアオーバーが確認されたが、それ以外の金属元素においては問題なく測定ができた(図1)。また、添加回収試験の結果、ほとんどの元素で回収率100%前後を示したが、オスミウムにおいては回収率が200%となり、添加量よりも高い値を示した(図2)。

### ③オスミウムの高感度分析の検討

上記の添加回収試験の結果、オスミウムの過剰評価が確認された。これについては、サンプルをマイクロ波処理した際に、オスミウムがより揮発性の高い四酸化オスミウムとなり、オスミウムが過剰にイオン化されたことが原因と考えられた<sup>2)</sup>。そこで、四酸化オスミウムをオスミウムに還元するという目的で、マイクロ波照射後に還元剤溶液を添加し、測定を行った。

#### 還元剤溶液①の調製

チオ尿素0.05 gに超純水50 mLを加えて溶かした。

#### 還元剤溶液②の調製

アスコルビン酸0.1 gに超純水50 mLを加えて溶かした。

#### 還元剤溶液③の調製

チオ尿素0.05 g及びアスコルビン酸0.1 gに超純水50 mLを加えて溶かした。

#### 試料の調製

マイクロ波分解容器に標準原液を添加し、超純水3 mL、70%硝酸溶液3 mL、30%過酸化水素水1 mLを加えた。以下に示した条件でマイクロ波分解を行い、還元剤溶液①～③で希釈して50 mLとした。

#### 標準溶液の調製

標準原液を超純水で希釈し、酸の最終濃度が硝酸

4.2%、過酸化水素0.6%となるように調製した。

#### 内標準溶液の調製

内標準原液を超純水で100倍希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.2%、過酸化水素0.6%となるように調製した。

## 結 果

還元剤溶液の添加により、オスミウムを約7割の回収率で測定することができた(表5)。また、還元剤の種類や組み合わせによる回収率の変化は認められなかった。このことから、オスミウムの測定において、還元剤の添加が有効であることが明らかとなった。

### ④モデル製剤の金属含量測定

金属を予め添加した錠剤サンプル(表6)に対して、金属元素の測定を行い、そのデータから実際の金属添加量を算出できるかを試験した。試験方法については、上記の検討結果を基に設定した。

#### 試料の調製

マイクロ波分解容器に金属含有錠剤サンプルを入れ、超純水6 mL、70%硝酸溶液3 mL、35%塩酸溶液1 mLを加えた。以下に示した条件でマイクロ波分解を行い、還元剤溶液(チオ尿素1 g/L)で希釈して50 mLとした。また、金属を添加していない錠剤サンプルについても同様の方法で調製した。

#### ○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

#### 標準溶液の調製

Table 7に示した濃度となるように標準原液を希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように

表5 オスミウムの回収率

還元剤溶液	還元剤溶液① (チオ尿素)	還元剤溶液② (アスコルビン酸)	還元剤溶液③ (チオ尿素+アスコルビン酸)	水
Osの回収率 (%)	77	78	74	200

表6 錠剤サンプルの成分組成(1錠あたり 約0.3 g)

成分名	成分比率(%)
D-マンニトール	77
結晶セルロース	10
コーンスターチ	7
アスコルビン酸	3
スクラロース	0.07
黄色4号	0.003
ヒドロキシプロピルセルロース	3

表7 標準溶液の元素濃度

元 素	レベル 単位 [ppb]						
	1	2	3	4	5	6	7
Cd, Pb, Tl	0	0.25	1.5	5	15	25	50
As	0	0.75	4.5	15	45	75	150
上記以外の元素	0	1.5	9	30	90	150	300

調製した。

### 内標準溶液の調製

内標準原液を超純水で100倍希釈し、酸の最終濃度が硝酸4.2%、塩酸0.7%となるように調製した。

### 測定時の留意点

コリジョンリアクションセルに充填するガスはセレンの測定時のみ水素を用い、それ以外の元素の測定時にはヘリウムを用いた<sup>3)</sup>。また、Au及びHgにおいてはキャリアオーバーが確認されているため、試料の測定の前に洗浄目的でブランク溶液の測定を行った。

## 結 果

金属含有錠剤サンプルの測定値から錠剤サンプルの測定値を引き、添加された金属量を算出した(図3)。結果、添加した金属量とほぼ同等の値で検出することができ、回収率は100%前後であった(図4)。

## 考 察

ICP-MSでの測定の最適化を行い、ICH Q3Dガイドラインで規定された金属元素を100%前後の回収率で測定することができた。オスミウムの測定において、還元剤の添加が有効であることも明らかとなった。Au及びHgのキャリアオーバーにおいてはブランク溶液での洗浄で対応したが、一度に多くのサンプルを測る必要がある場合、洗浄を入れるとサンプル数及

び測定時間は倍となってしまうため、Au及びHgキャリアオーバーについては対策の検討が必要になると考えられる。

## 参考文献

- 1) 上本道久：検出限界と定量下限の考え方，ぶんせき，5，216~221 (2010)
- 2) International Labour Organization：Chemical Properties and Toxicity, Osmium, Encyclopaedia of occupational health and safety, 9, ジュネーブ (2011)
- 3) Peter, H. and Ed, M.：オクタポールリアクションセルICP-MSによる迅速で信頼性の高い尿のルーチン分析, Agilent Technologies, USA, (2005)

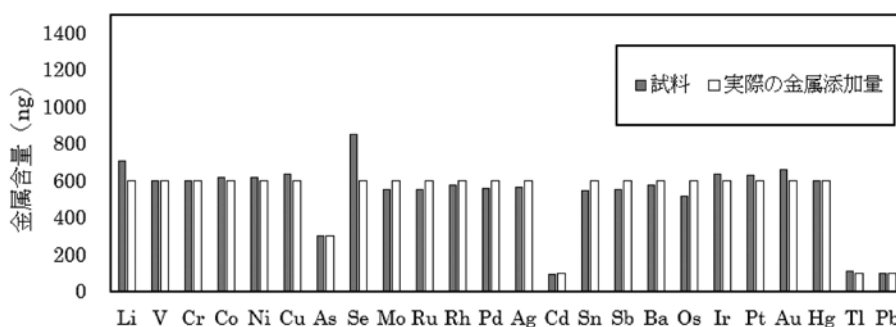


図3 金属含有錠剤サンプル中の金属含量

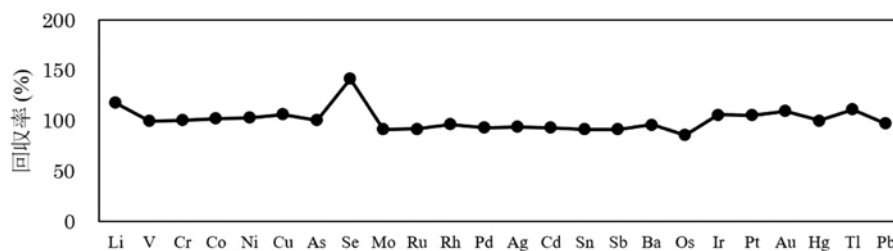


図4 金属含有錠剤サンプルの回収率



# 液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置および 液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置を活用した薬物分析

小木曾英夫, 薬事研究会分析部会

## Drug chemical analysis using the tandem quadrupole and time-of-flight mass spectrometry coupled with liquid chromatography

Ogiso H, The Chemical 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化合物の構造推定が可能な装置であることから、医薬品開発においてしばしば直面する含有未知成分の構造推定や成分含有量の変動解析などに威力を発揮する。一方、液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS) は、MS/MS測定により特定化合物の微量定量が可能な装置であることから、医薬品開発において薬物動態測定や微量不純物の定量などに威力を発揮する。

本研究は、LC-TOF/MSおよびLC-MS/MSを用いた低分子医薬品分析をテーマとして実施した。LC-TOF/MSを用いて構造推定を行う課題として、プレドニゾロン吉草酸エステル・酢酸エステル (PVA) の強制劣化物の測定を実施した。LC-MS/MSを用いて微量定量を行う課題として、パクリタキセルの細胞内取り込み量の測定を実施した。これら分析手法を確立することを通して、医薬品の品質管理における質量分析装置の有用性を確認した。

### Summary

A mass spectrometer is a very useful tool in the component analysis, because it enables structural elucidation or identification of unknown molecules, which is required for drug development process. The liquid chromatograph time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS) enables to effectively estimate the molecular structure by measuring the exact mass of molecule. On the other hand, liquid chromatography tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) enables to quantitatively determine trace amounts of specific compounds by their MS/MS measurements.

The major theme in this study is quality assessment of the low-molecular-weight drugs, using LC-TOF/MS and LC-MS/MS. First, we performed the forced degradation study of prednisolone valerate acetate (PVA) for the purpose of structural estimation. Second, the intracellular uptake of paclitaxel was monitored for the purpose of micro-quantitative analysis. It was thus demonstrated that the mass spectrometry analysis was useful for quality control of pharmaceutical products, through the development of these analytical methods.

### 緒 元

医薬品開発において必要となる成分分析や不純物分析において、質量分析法は特異性が高く、かつ高感度測定が可能であるとともに、分子構造に由来する情報が得られることから、極めて有益な分析手段である。県内製薬企業における医薬品分析の支援を目的に、創薬研究開発センターに導入された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化合物の構造推定が可能な装置であることから、医薬品開発においてしばしば直面する含有未知成分の構造推定や成分含有量の変動解析などに威力を発揮する。一方、液体クロマトグラフ・タンデム四重極型質量分析装置 (LC-MS/MS) は、MS/MS

測定により特定化合物の微量定量が可能な装置であることから、医薬品開発において薬物動態測定や微量不純物の定量などに威力を発揮する。

本研究は、LC-TOF/MSおよびLC-MS/MSを用いた低分子医薬品分析をテーマとして実施した。具体的には、構造推定を目的としてプレドニゾロン吉草酸エステル・酢酸エステル (PVA) の強制劣化物の測定および、微量定量を目的としてパクリタキセルの細胞内取り込み量の測定等の検討を通して、医薬品の品質管理における質量分析装置の有用性を評価したので報告する。

## 方法及び結果

### 1. プレドニゾン吉草酸エステル・酢酸エステル (PVA) の強制劣化物のLC-TOF/MSによる分析

PVAをエタノール・緩衝液 (1:1) 中に溶解し、60℃または4℃で10日間保存することにより強制劣化物を得た。緩衝液の種類は、酸性 (pH2.7~3.1) および中性 (pH6.0~7.0) とし、20 mMリン酸緩衝液 (pH2.7とpH7.0) と20 mMクエン酸緩衝液 (pH3.1とpH6.0) の4種類を用いた。合計13種類の試料液を測定したところ、中性、60℃において8種類の分解物の

生成が、クロマトグラム上のピークとして確認された (図1)。このうち1種類はクエン酸緩衝液使用時のみ生成するピークであり、他の7種類は、緩衝液の種類によらず中性pHにおいて生成する分解物ピークであった。

次に13種類の試料液の測定結果について、ブルカー製Metaboscape<sup>®</sup> ソフトウェアを用いて成分ごとの比較を行うことによって、強制劣化処理後に生成した成分を明らかにした。Metaboscape<sup>®</sup> によると上記8成分に加えて、新たに1成分の強制劣化物が検出された。この1成分はクロマトグラム上では、未分解物で

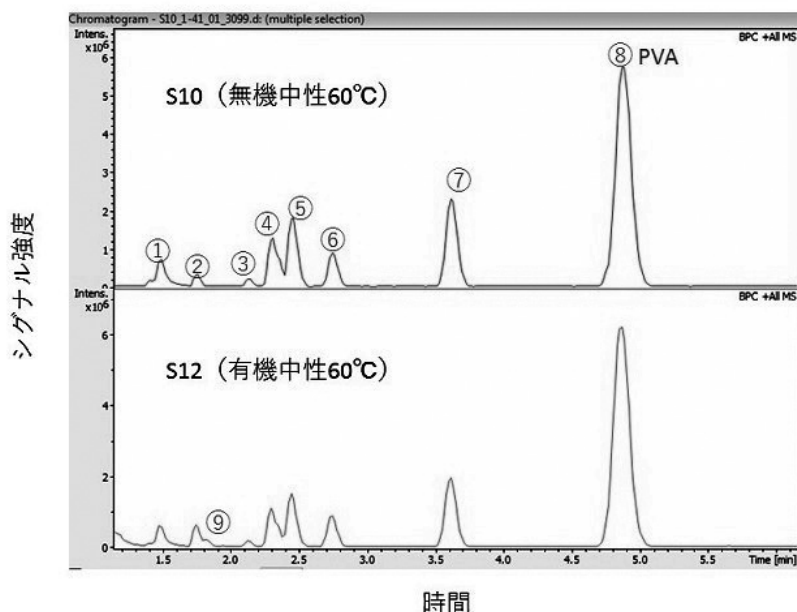


図1. PVA強制劣化物のLC-TOF/MS測定によるベースピーククロマトグラム (BPC)

PVAのピークは⑧, その他強制劣化により①~⑨のピークが検出された。その他の強制劣化条件では、これら以外のピークは観察されなかった。

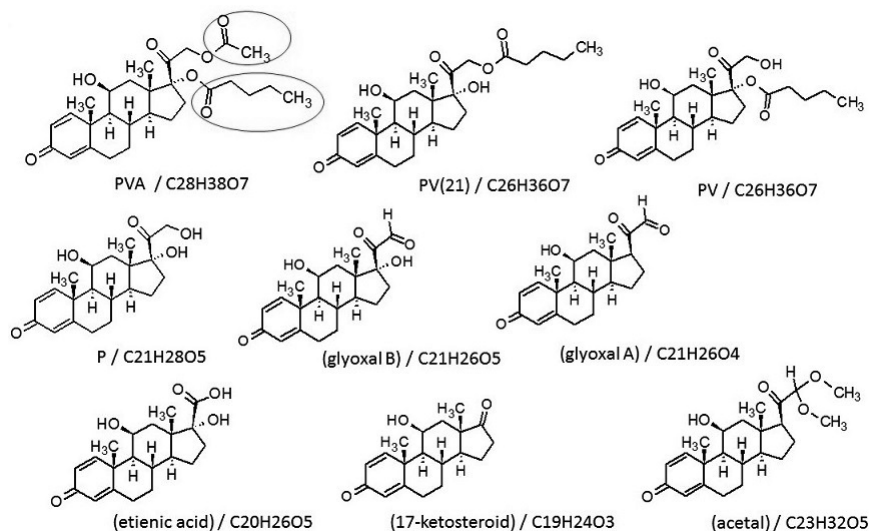


図2. これまでに報告されているPVAの強制劣化処理による分解物の構造

(医薬品研究11(2), 216-227(1980)より引用)

あるPVAのピークと重なっていたことから認識できていなかった。こうして捉えた合計9成分の分解物と未分解物PVAについて、精密質量から求めた化学組成式を表1に示した。PVAの分解物について、これまで8種類が明らかにされており(図2)、これら化合物の組成式と一致した7種類を、既知分解物として同定した(表1)。一方、他の3種類については、組成式とMS/MSスペクトルから構造推定を試みた。MS/MSスペクトルはいずれもプレドニゾロンのスペクトルと一致しており、プレドニゾン骨格は維持されているものと仮定し、側鎖の構造変化に絞って化学

構造を推定した(図3)。

なお、これら強制劣化物の同一試料液について、タンデム四重極型質量分析装置をシングル四重極質量分析計として用いることにより、分解物の推定がどの程度可能か検証した。その結果、①~⑧の成分については、 $m/z$ の値から分解物を推定することが可能であった。しかしながら⑨と⑩について、分解物として検出することができなかったか、もしくは、検出はできても正確に $m/z$ を求めることはできなかった。このことから、微量成分を含めた正確な質量測定には、分解能の高いTOF/MSが有効であることが確認された。

表1. LC-TOF/MS測定により推定されたPVA分解物

ピーク	Rt (min)	化合物名	組成式	[M]	PDAでのピーク面積比 (%)	
					S10 (無機中性)	S12 (有機中性)
①	1.41	P	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360.194	3.94	3.45
②	1.66	未知化合物 (etienic acidのデオキシ体?)	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	330.183	1.15	2.62
③	2.02	(glyoxal A)	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	342.183	3.40	2.69
④	2.21	(acetal)/(hemiacetal)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	388.225	14.02	11.58
⑤	2.32	(acetal)/(hemiacetal)	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	388.225	9.55	7.10
⑥	2.59	PV	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	444.251	3.84	4.22
⑦	3.38	PV(21)	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	444.251	15.17	12.67
⑧	4.57	PVA	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	486.261	48.11	53.67
⑨	1.74	未知化合物 (有機酸との反応生成物?)	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	400.225		1.43
⑩	⑧PVAと ほぼ同じ	未知化合物	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	416.256		

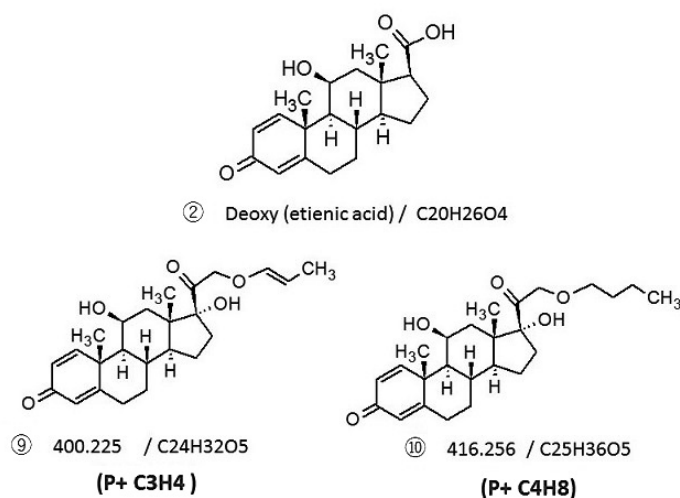


図3. 新たに検出されたPVA分解物の推定構造

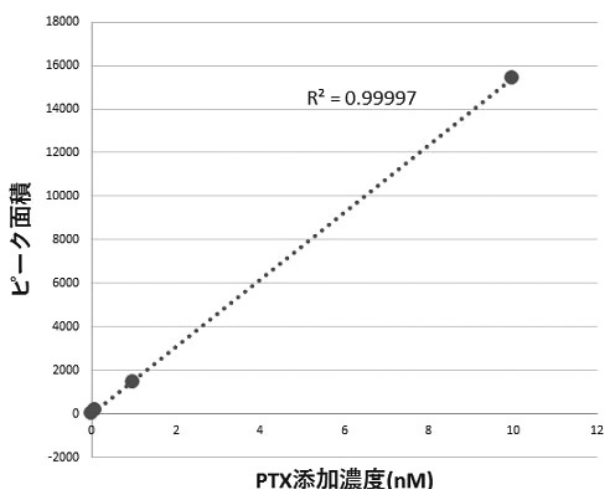
## 2. パクリタキセルの細胞内取り込み量の測定

タンデム四重極型のLC-MS/MSは、特定化合物をターゲットとする場合、複雑なマトリクス中の微量定量に適した測定装置である。この有用性を明らかにすることを目的として、抗がん剤パクリタキセルが、がん細胞内に取り込まれる経時変化をモニターすることを試みた。

はじめに、パクリタキセルの測定条件を設定するため、標準溶液を用いて測定パラメータの最適化を行った。次に、実際の試料測定に適用できるか確認する

ために、細胞懸濁液に種々の濃度のパクリタキセルを添加した添加検量線を測定した。その結果、検出下限は約0.1 nMであり、0.1 nMから10 nMの間で良好な直線性が得られた。このとき、10 nMでのパクリタキセルの回収率は99%であった。以上のことから実試料の測定に適用できる方法であることを確認した(図4)。こうして確立したパクリタキセルの微量定量法を用いて、培養がん細胞の培養液に30 nM相当のパクリタキセルを添加したときの、細胞内取り込み量を測定した。添加直後から60分までの経時変化を図5に示

### ●細胞懸濁液にパクリタキセル標準液を添加して作成した検量線 (濃度ポイント4点：0, 0.1, 1, 10 nM)



### ●添加回収率

細胞懸濁液に10 nMパクリタキセル標準液を添加したときの回収率(n=3)は99%であった

### ●検出下限

0.1 nMがほぼ検出下限であった

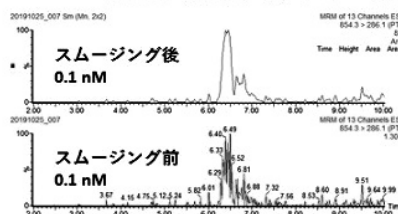


図4. 四重極型LC-MS/MSによるパクリタキセル添加検量線の測定

6 wellプレート上にサブコンフルエントに培養した細胞 (B16F10) を、メタノール1 mLでかきとり細胞懸濁液とした。このうち0.45 mLをとり、パクリタキセル標準液0.05 mLを混合して添加試料とした。14,000 gで遠心後取得した上清をメタノールで10倍希釈して測定に供した。

- ↓A549細胞 (3 cm dish x6, 2 mL/dish)  
接着細胞40~50%コンフルエント
- ↓30 nM PTX添加
- ↓0~60分間, 37°C
- ↓細胞をPBSで洗浄(3回)
- ↓細胞を1 mL MeOHでかきとる
- ↓遠心後上清を回収
- ↓上清をMeOHで10倍希釈
- ↓遠心後上清の2 µLをLC-MS/MSに注入

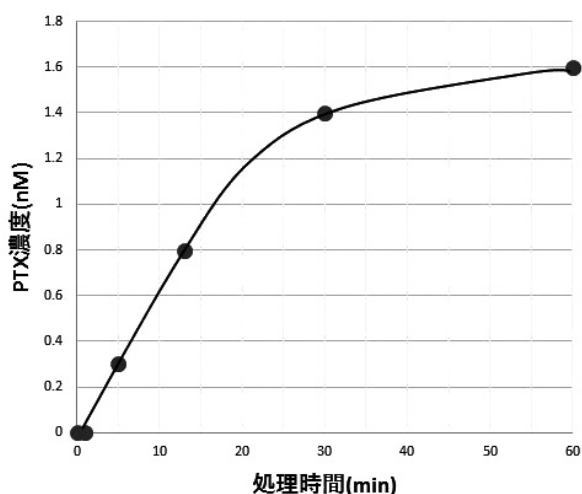


図5. 培地に添加したパクリタキセルの細胞内取り込み量の経時変化

取り込み量は、細胞から抽出した液の濃度として表した。

した。この結果から、パクリタキセルは添加20分後まで、細胞内取り込み量は直線的に増加し、その後は頭打ちになることが明らかとなった。

### 3. LC-TOF/MSを利用したその他の検討事項

#### 3-1. トラメチニブの微量不純物の構造推定

試薬として購入したトラメチニブに含まれる不純物の構造推定を試みた。検出された不純物は1種類であったが、構成元素をC/H/Oに限定したとき組成式はC<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>と推定された。しかしながら、データベース (PubChem) 上でヒットする候補化合物が多すぎて、構造の絞り込みには至らなかった。

#### 3-2. ジクロフェナク・メントール混合液の強制劣化処理により生じた分解物の構造推定

ジクロフェナクとメントールの混合液について、強制劣化処理の結果生成した分解物の構造推定を試みた。Metaboscape<sup>®</sup> ソフトウェアの成分比較から、5種類の分解物が検出されたが、そのうち既知分解物2種類を同定した。その他3種類のうち2種類は組成式を推定できたものの化合物の推定には至らなかった。残り1種類は組成式を推定することはできなかった。

#### 3-3. インドメタシン・メントール混合液の強制劣化処理により生じた分解物の構造推定

インドメタシンとメントールの混合液について、強制劣化処理の結果生成した分解物の構造推定を試みた。Metaboscape<sup>®</sup> ソフトウェアの成分比較から、6種類の分解物が検出されたが、そのうち既知分解物1

種類を同定した。その他5種類のうち2種類は、組成式からインドメタシン+Oとインドメタシン-CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>であることが推定できたが、構造の特定には至らなかった。残り3種類は組成式を推定できたものの化合物の推定には至らなかった。

### 4. 四重極型質量分析計を利用したその他の検討事項

#### ・ホスファチジルチオエタノールのSH基の反応性の検討

ホスファチジルチオエタノール (PtdSH) のSH基と、グルタチオン (GSH) のSH基とを酸化的にSS架橋することのできる反応条件を見つけることを目的として、四重極型質量分析計を用いた。液体クロマトグラフ装置を使わず、シリンジポンプにて反応液を直接質量分析計に導入し、生成物の量をモニターすることにより (図6), 反応条件を最適化することができた。

### まとめと考察

#### 1. LC-TOF/MSを用いて、医薬品に含まれる分解物や不純物の構造を推定する

あらかじめ分解物や不純物の候補がわかっている場合、その化合物が混入しているか否かを特定することは容易であった。また、化合物の構成元素や安定性等の情報がある場合、推定された組成式から、O元素が1つ付加した酸化物であるとか、O元素が1つ脱離したデオキシ体であるとか、または脱炭酸化合物で

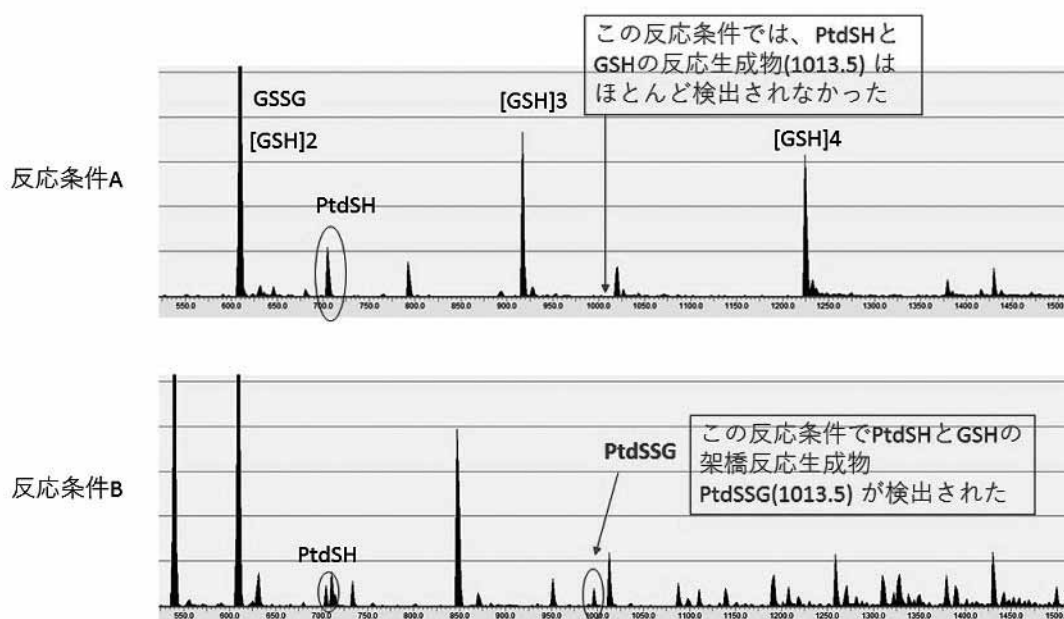


図6. シングル四重極質量分析による溶液中に含まれる化合物群の検出

条件Aの反応液と条件Bの反応液に含まれる成分を比較した。目的とするPtdSSGは条件Bで生成した。  
[GSH] n : GSHのクラスターイオン, PtdSSG : PtdSHとGSHとのSS架橋生成物

ある等を推定することは可能であった。一方で、何の情報もない不純物の場合、CHON以外の元素（S, P, I, F, Si, Cl等）を含むのか含まないのか不明なため、精密質量情報のみから組成式を推定することは不可能であった。すなわち、LC-TOF/MS測定から構造を推定できるのは、構成元素が明らかであること、原薬由来の分解物情報など、何らかの情報がある場合に限られることがわかった。

## **2. 四重極型LC-MS/MSを用いて、原薬や不純物等の特定化合物の微量定量を行う**

特定化合物の標準品を用いて、あらかじめMS/MS測定パラメータを最適化し、測定方法を確立する。次に、実試料を想定し添加検量線を作成し定量範囲を決める。その後、実試料に含まれる特定化合物の定量を行う。この一連のステップを踏むことにより、複雑なマトリクス中に含まれるターゲット化合物の微量定量を行うことができた。

## **3. 質量分析計を用いて、合成化合物や誘導体化等の反応条件を決める**

薄層クロマトグラフィの代わりに、シングル四重極質量分析計を用いて、反応生成物をモニターすることにより、反応条件を最適化することができた。

# バイオ医薬品の品質特性解析法の検討 —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—

小島 理恵子, 小木曾 英夫

## Characterization of the NIST monoclonal antibody using liquid chromatography time - of - flight mass spectrometry

Rieko KOJIMA, Hideo OGISO

### 要 約

近年国内外において精力的にバイオ医薬品の研究開発が進んでおり、今後ますますの発展が期待される。なかでも抗体医薬品は、現在までに承認されている約70品目のうち、過半数がここ10年の間に開発されており、急速に研究開発が進められていることが伺える。本研究では、バイオ医薬品に関する富山県内製薬企業からの新たなニーズを見据えて、バイオ医薬品の解析技術を当センターにおいて確立することを目的とした。

本研究では、液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) を用いてNISTmAb (モノクローナル抗体の標準品 RM8671) の解析法の検討を行い、一連の基本的な解析手法を確立した。

### Summary

The biopharmaceutical industry has increased significantly over recent years and is believed to have great potential for further development. The majority of approved antibody drugs have been developed in the last 10 years, suggesting the rapid growth of their development. In this study, we aimed to establish the analytical methods of antibody drugs for technical support of pharmaceutical companies in Toyama.

We investigated the analytical method of NISTmAb (standard monoclonal antibody RM8671) using a liquid chromatograph / time-of-flight mass spectrometer (LC-TOF/MS) and established a series of basic analytical 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を用いて生産されるため、糖鎖修飾等の様々な翻訳後修飾を受けることにより、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。バイオ医薬品の品質評価に関するガイドラインは医薬品規制調和国際会議 (ICH) から公示され (1)、日本においても抗体医薬品に関するガイドライン (2) が公示されており、従来の化学合成医薬品と比べて多角的で複雑な解析が必要である。本研究では、富山県内製薬企業への技術的な支援を行うことを目的として、創薬研究開発センターに設置の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た。解析対象として、NIST (アメリカ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) を選出し、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、遊離糖鎖解析の4つの基本的な解析手法を確立した。

### 方法及び結果

#### 1. インタクト解析

バイオ医薬品の品質管理では、目的タンパク質の分子量を決定することが求められる。インタクト解析では、タンパク質をそのままの状態ですべての質量分析計を用いて解析することにより、タンパク質全体の分子量に加えて、糖鎖やアミノ酸修飾の一部についておおまかな情報を得ることができ、ある程度の不均一性を評価できる。図1に、インタクトのNISTmAbをLC-TOF/MSを用いて解析した結果を示す。デコン

ポリマー化\*後の質量スペクトルから、インタクトのNISTmAbからは18成分がピークとして観測され、そのうちG0F/G0F, G0F/G1F, G1F/G1F\*\*の組み合わせでN型糖鎖修飾されたものがメジャーな成分であることが分かった(図1B及び表1のピーク番号7, 9, 11). NISTmAbの分子量は約150 kDaであるが、

インタクト解析から得られた平均質量(Observed Mass)は、いずれも理論上の平均質量(Theoretical Mass)と10 Da以内の誤差に収まっており、高い質量精度で測定できることが確認できた(表1). また、今回我々が取得したデータ並びに解析結果は、報告されているデータ(3)と同等であることが確認できた。

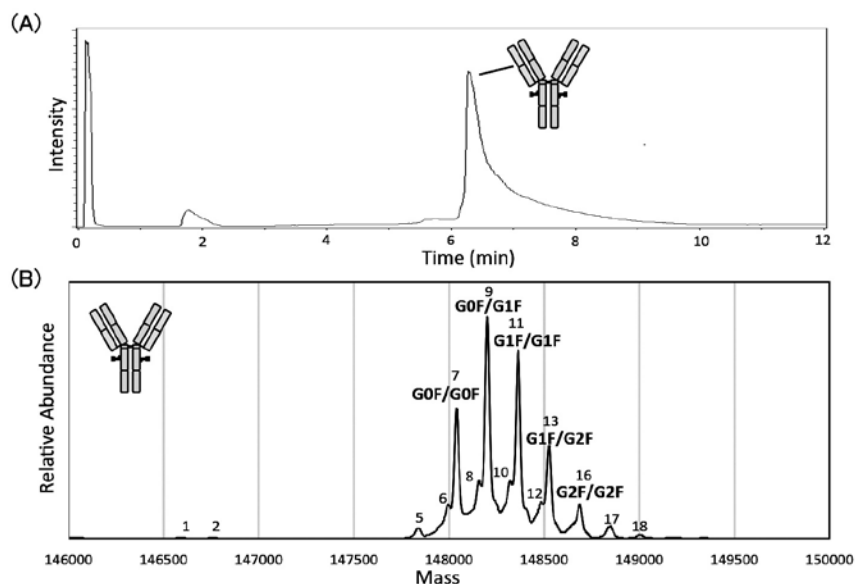


図1 LC-TOF/MSを使ったNISTmAbのインタクト解析

- (A) インタクトNISTmAbのトータルイオンクロマトグラム. 1 µgのNISTmAb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% Formic acid, 移動相B: 0.1% Formic acid in acetonitrile.  
 (B) (A)の6.3 minの溶出ピークをデコンポリマー化処理した0価の質量スペクトル. 18のピークが観測された.

表1. LC-TOF/MSを用いて測定したNISTmAbの平均質量

Peak#	Proteoform	Theoretical Mass (Da)	Observed Mass (Da)	Relative abundance
1	G0F/Aglycosylated	146591.8	146592.2	t
2	G1F/Aglycosylated	146754.0	146759.5	t
3	G2F/Aglycosylated	146916.1	ND	-
4	G0F/G0F · 2GlcNAc	147630.8	ND	-
5	G0F/G0F · GlcNAc	147834.0	147837.3	mn
6	G0F/G1F · GlcNAc	147996.1	147996.8	mn
7	G0F/G0F	148037.2	148039.7	M
8	G0F/G0F + K	148165.3	148158.8	mn
9	G0F/G1F	148199.3	148201.6	M
10	G0F/G1F + K	148327.5	148323.3	mn
11	G1F/G1F	148361.4	148363.5	M
12	G1F/G1F + K	148489.6	148487.3	mn
13	G1F/G2F	148523.6	148525.4	mn
14	G1F/G1F + 2K	148617.8	ND	-
15	G1F/G2F + K	148651.8	ND	-
16	G2F/G2F	148685.7	148686.7	mn
17	G2F/G2F + Hex	148847.7	148845.8	mn
18	G2F/G2F + 2Hex	149010.0	149004.0	t

ND: Not Detected, M: Major (>40% of maximum peak height),  
 mn: minor (3%–40% of maximum peak height), t: trace (<3% of maximum peak height)  
 Peak#は図1Bに示したピーク番号に相当する.



\*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。

\*\*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。NISTmAbはCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を用いて生合成されており、G0F、G1F、G2Fの3種類のN型糖鎖が主に修飾されることが分かっている。また、抗体1分子につき2カ所のN型糖鎖修飾部位があるため、この3種類を組み合わせた糖鎖が修飾される。

## 2. サブユニット解析

サブユニット解析は、抗体を3つのサブユニットに分解して質量分析計による解析を行う手法である。抗体を分子量約25 kDaのサブユニットに分解して解析することにより、モノアイソトピック質量（各元素の最も存在比の高い同位体から構成される分子の精密質量）を得られるため、インタクト解析と比べてより詳細な翻訳後修飾の情報を得ることができる。NISTmAbのサブユニットは、IdeS (IgGのヒンジ領域の下で特異的に切断する酵素、Genovis社) による消化と、還元変性処理により調製した。

図2に、LC-TOF/MSを使ったNISTmAbサブユ

ニット解析の結果を示す。3つのサブユニットはLCにより分離され、Fc/2、Lc、Fdの順に溶出された(図2A)。図2BにFc/2サブユニットのデコンボリューション後の質量スペクトルを示す。Fc/2サブユニットには、G0F、G1FのN型糖鎖が修飾されたものが多く存在し、G2Fが修飾されたものはマイナー成分であることが分かった。これはインタクト解析とも一致する結果であった。今回我々が行ったNISTmAbのサブユニット解析では、0.1 Da程度の誤差でサブユニットのモノアイソトピック質量を算出できることを確認した。加えて、微量成分であるハイマンノース型N型糖鎖やシアル酸含有糖鎖が付加したFc/2サブユニットが検出可能であることを確認できたことから、本手法が抗体医薬品の品質特性解析に有益であることが改めて確認できた。

## 3. ペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、プロテアーゼ処理によりタンパク質をペプチドに分解し、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である。NISTmAbのペプチドマッピングには、NISTmAbを還元変性させ、トリプシン (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, Promega社) によ

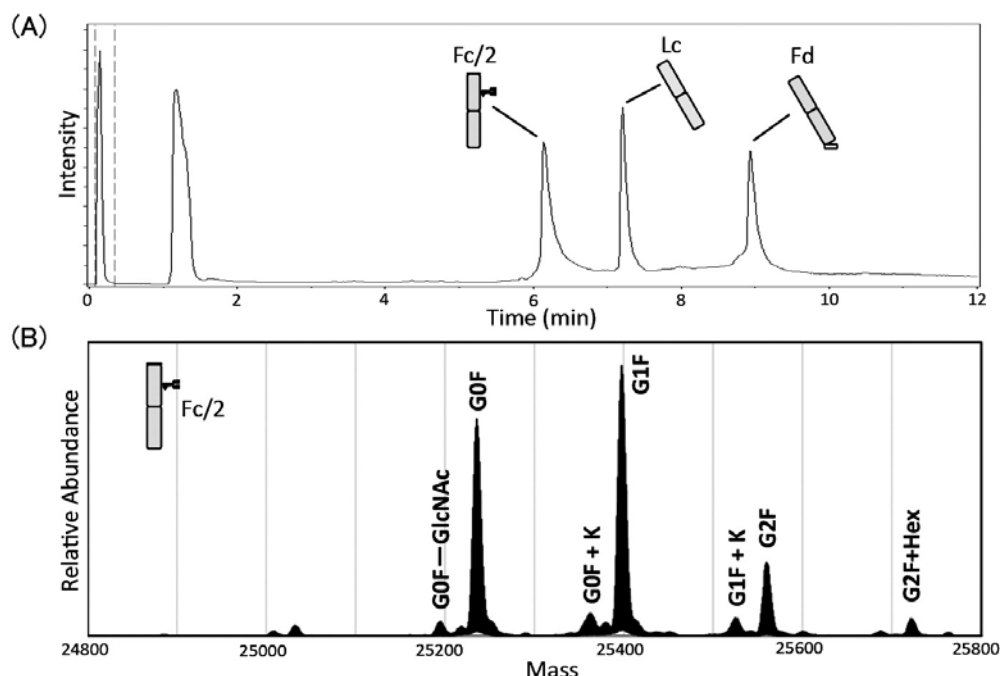


図2 LC-TOF/MSを使ったNISTmAbのサブユニット解析

- (A) 還元処理、IdeS消化後のNISTmAbのトータルイオンクロマトグラム。リニアグラジエントにより、サブユニットはFc/2、Lc、Fdの順に溶出された。使用カラム: BioResolve RP mAb Polyphenyl 2.1x150 mm (Waters), 移動相A: 0.1% Formic acid, 移動相B: 0.1% Formic acid in acetonitrile。
- (B) Fc/2サブユニットのデコンボリューション後の0価の質量スペクトル。G0F、G1FのN型糖鎖が修飾されたものがmajor peakとして観測された。

り一晚消化し、脱塩カラム (Zeba Spin Desalting Columns 7K MWCO, Thermo Scientific社) を用いて脱塩処理を行ったものを試料とした。試料はC18カラム (AQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m 1.0x100mm, Waters社) を用いてLC分離を行った後、TOF/MSによりMS及びMS/MS測定を行い、BioPharma Compassソフトウェアを用いて解析した (図3)。トリプシン消化を行ったNISTmAbは、Heavy Chain,

Light Chainともにシーケンスカバー率の目標値 (>95%) を達成したが、フラグメントカバー率は目標値 (>92%) に到達しなかった (図3Bトリプシン)。そこで、キモトリプシン (Chymotrypsin Endoproteinase, TLCK treated, MS Grade, Thermo Scientific社) により消化した試料を調製して同様に測定を行い、トリプシンのデータと合わせて解析したところ、フラグメントカバー率についても目標値を達成

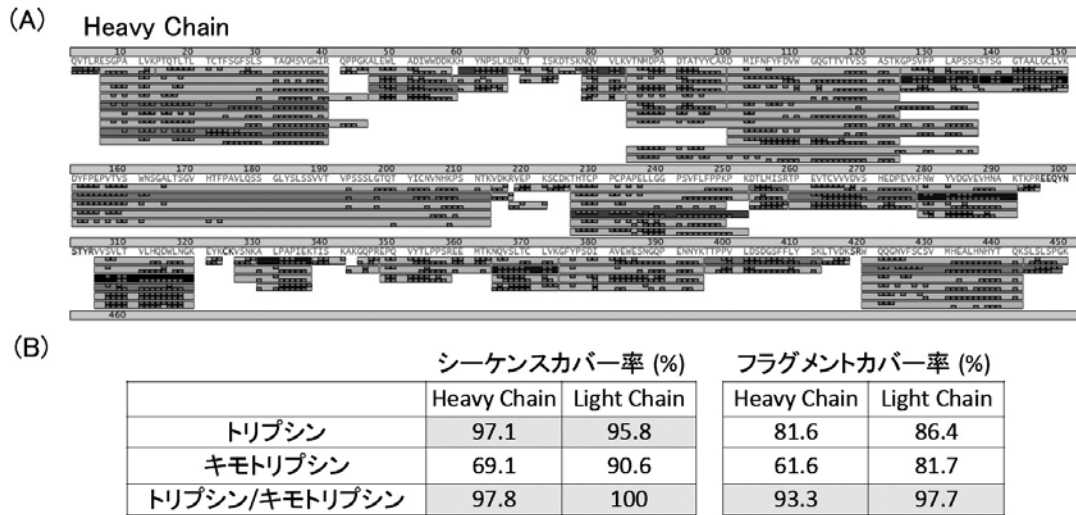


図3 ペプチドマッピングによるNISTmAbのアミノ酸配列の解析

- (A) 還元処理、トリプシン消化を施したNISTmAbのペプチドマッピング結果 (Heavy Chain) のイメージ図 (BioPharma Compassソフトウェアによる解析)。灰色のバーはMS測定により観測されたペプチド配列を示し、灰色の小さな四角はMS/MS測定により観測されたフラグメントイオンを示す。
- (B) トリプシンおよびキモトリプシンにより消化したNISTmAbのシーケンスカバー率a)、フラグメントカバー率b)を示す。最下段には、トリプシンとキモトリプシンのデータを合わせた解析結果を示す。目標値を達成したカバー率をハイライトで示す。
- a) 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。  
b) 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。

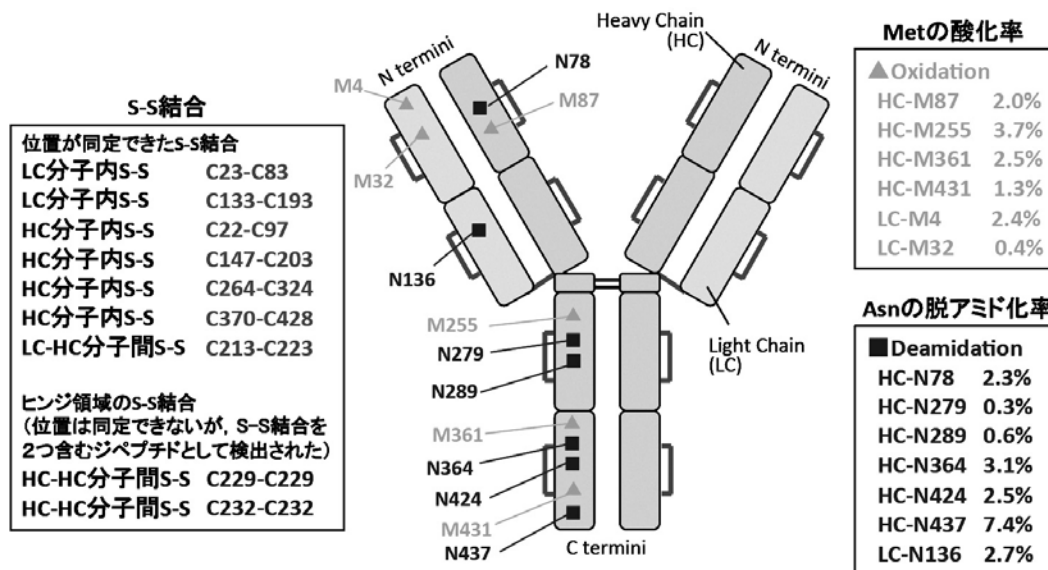


図4 ペプチドマッピングによるNISTmAbアミノ酸修飾の分析

することができた（図3Bトリプシン/キモトリプシン）。また、NISTmAbにおけるアミノ酸修飾の分析結果を図4に示す。タンパク質の安定性や活性に影響を与えることが知られているメチオニン残基の酸化やアスパラギン残基の脱アミド化など、不均一性の要因となるアミノ酸修飾について評価できることが確認できた。また、非還元下においてトリプシンとキモトリプシンによる同時消化を行うことで、ジスルフィド結合（S-S結合）の位置解析を行う手法を確立した。ただし、ヒンジ領域のS-S結合については本手法では正確な位置決定は困難であるため、別の手法（N末端アミノ酸配列解析等）を用いる必要がある。

#### 4. 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タンパク質の生物活性に影響を与えることが知られており、特に、抗体医薬品においては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遊離糖鎖解析には、GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit（Waters社）を使用し、グリコシダーゼPNGaseFによる糖鎖切断と遊離糖鎖の精製を行い、試料とした。LC-TOF/MSを使った解析では、メジャーな糖鎖の検出と解析は可能であったが、十分な感度が得られなかったため、試料の調製や測定条件等について更に検討する必要がある。また、TOF/MS解析では糖鎖構造の推定は可能であるが、決定することはできないため、将来的には他の質量分析計やキャピラリー電気泳動装置を用いた解析手法を検討する必要があると考えられる。

### まとめ

本研究ではNISTmAbを用いて、質量分析計を使った抗体分子の基本的な解析手法を確立した。今後、富山県内の製薬企業がバイオ医薬品あるいはバイオ後続品の研究開発に取り組む機会があれば、本研究により得た解析技術やノウハウを積極的に活用し、支援につなげたいと考えている。

### 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) Formolo T, Ly M, Levy M, et al., Determination of the NISTmAb Primary Structure, 2015, ACS Symposium Series, Vol. 1201.



# V 資 料



# 「令和元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 2019

小笠原勝，米田哲也，竹林憲司

Masaru OGASAWARA, Tetsuya YONEDA, Kenji TAKEBAYASHI

富山県における医薬品生産金額は近年順調な伸びを示しており，2015及び2016年は全国第1位，2017年は2位，2018年も2位となったが，生産金額は前年比4.5%減の6246億円であった。今後，生産金額1兆円の達成を目指し，さらなる躍進が期待されている。その躍進のために取り組むべき戦略の1つとして，平成25年富山県医薬品産業活性化懇話会では「製造技術力等の強化」（品質管理技術力の向上など）が提言されており，県内製薬企業の技術力を向上させるため，様々な施策を実施しているところである。その一環として，一般社団法人富山県薬業連合会との共同で，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，県内製薬企業の試験検査能力の調査及び技術指導を行う本事業を平成21年度から実施している<sup>1-7)</sup>。

令和元年度は，要望の多い試験項目を中心にpH測定，定量（電位差滴定法），定量（UV法），定量（HPLC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，L-トリプトファンのpH測定，L-アスパラギン酸の定量（電位差滴定法），メチルヘスペリジンの定量（UV法），イブプロフェン含有錠の定量（HPLC法）とした（表）。なお，pH測定，定量（電位差滴定法）及び定量（UV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。

メチルヘスペリジンの定量（UV法）は医薬品添加物規格に準じた試験方法とし，イブプロフェン含有錠の定量試験（HPLC）は「一般用医薬品の試験法Ⅱ-かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法-」（株）じほう発行）を参考にし独自に作成した試験方法とした。その他の試験項目については日本薬局方に準じた試験方法とした。

表：試験項目及び参加企業数等について

試験種別	試験項目	対象品目	主な使用機器	参加企業数
原薬試験	pH測定	L-トリプトファン	pH計	37
	定量（電位差滴定法）	L-アスパラギン酸	電位差滴定装置	26
	定量（UV法）	メチルヘスペリジン	分光光度計，乾燥機	37
製剤試験	定量（HPLC法）	（イブプロフェン含有錠） ブルフェン錠100	高速液体クロマトグラフ， 真空デシケーター （又は減圧乾燥器）	28

#### (2) スケジュール

令和元年11月7日に実施説明会を開催し，参加施設に試験方法等を説明して試料等を配布し，当所への試験結果報告期限を12月24日とした。報告内容をとりまとめて下記（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。また，令和2年2月25日に報告会を開催して参加施設に結果を説明し，改善指導を行った。

なお，実施説明会においては，ザルトリウス・ジャパン(株)の技術担当者を外部講師として，電子天秤の基礎知識と日常点検等に関する講習会も併せて開催した。

### (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」の場合は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) L-トリプトファンのpH測定試験

37施設のうち「疑わしい」は4施設、「不満足」が3施設であったが、再試験により全施設が「満足」と判定される結果を得られた（図1～3参照）。

「疑わしい」あるいは「不満足」の判定となった7施設のうち、2施設では試料溶液の測定ではpH値が不安定である場合もあったが、pH標準液での校正時は安定化が早く再現性も認められていたため測定値に問題があるとは考えていなかったとのことであった。これら施設については実地調査において試料調製には問題がないと考えられたので、電極に異常がある可能性を想定し電極を新品に交換して再試験を実施してもらった。その結果、良好な値が得られた。このことから、これらのケースでは電極に異常があったことが判明した。す

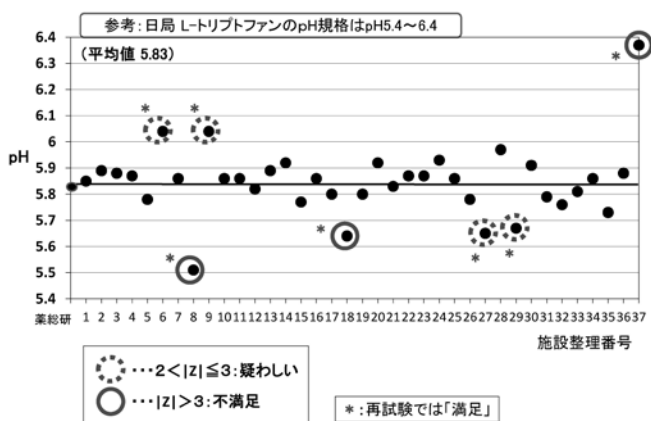


図1 L-トリプトファンのpH測定の報告値

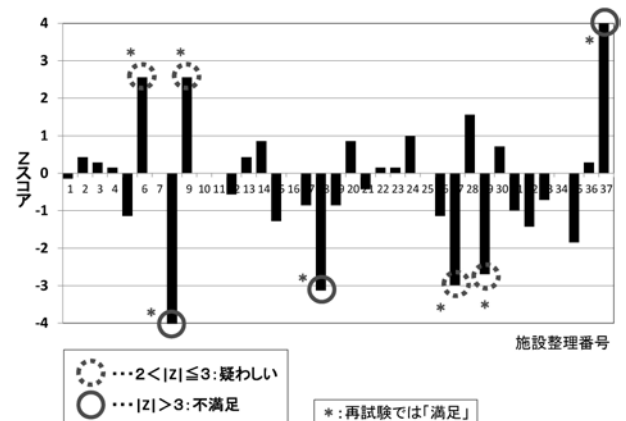


図2 L-トリプトファンのpH測定のZスコア

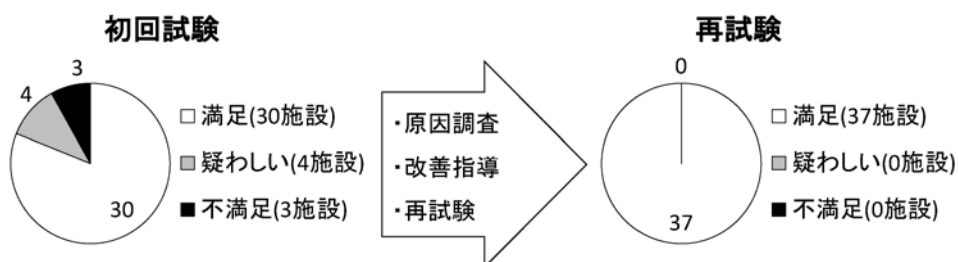


図3 L-トリプトファンのpH測定の評価結果



なわち、pH標準液での校正時に問題が発見されない場合でも、電極に異常が発生している場合があることが分かった。その他、pH値の安定化までの待ち時間が不足している（電極を浸し、1分以内に自動判定）ケースが認められた。pH値が安定化するまでに時間を要した施設は電極等の異常により良好な結果が得られないことが比較的多い。このことから、安定化までにかかる時間に注意して測定することが重要であると考えられた。

(2) L-アスパラギン酸の定量試験（電位差滴定法）

26施設のすべてにおいて「満足」と判定される結果が得られた（図4参照）。ただし「平均値±1.0%以内」の場合はZスコアの値に関わらず「満足」と判定した。

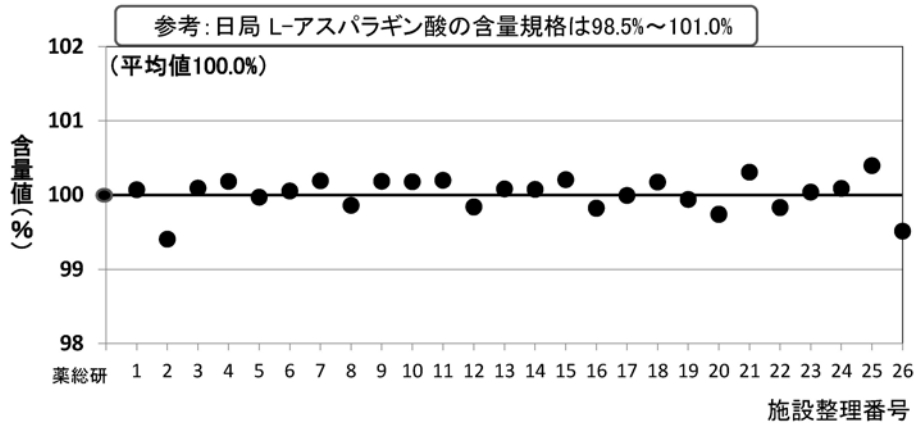


図4 L-アスパラギン酸の定量試験（電位差滴定法）の報告値

(3) メチルヘスペリジンの定量試験（UV法）

37施設のうち「疑わしい」が1施設であり、「不満足」は1施設あったが、再試験により全ての施設が「満足」と判定される結果が得られた（図5～7参照）。

原因としては、測定時のセルの汚れ、ゼロ点補正、試料の乾燥操作などに問題があった可能性が考えられた。

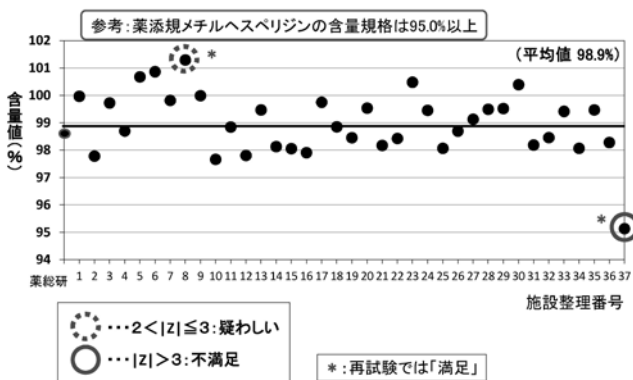


図5 メチルヘスペリジンの定量試験（UV法）の報告値

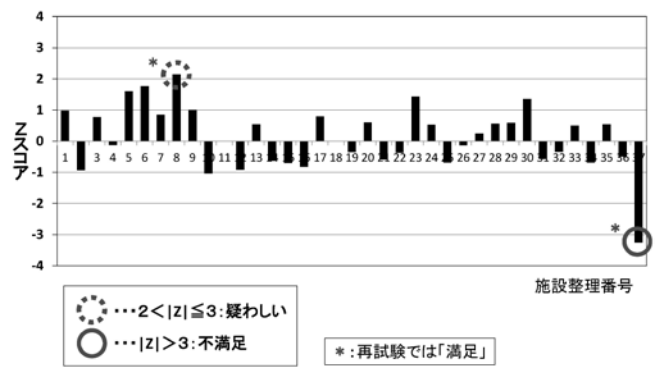


図6 メチルヘスペリジンの定量試験（UV法）のZスコア

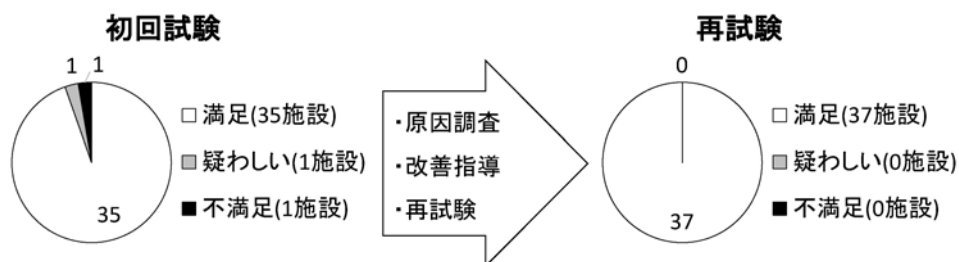


図7 メチルヘスペリジンの定量試験（UV法）の評価結果

(4) イブプロフェン含有錠（ブルフェン錠100）の定量試験（HPLC法）

28施設のうち「疑わしい」が1施設、「不満足」が4施設であったが、これらの施設は再試験において「満足」と判定される結果が得られた（図8～10参照）。なお、28施設のうち2施設は試験操作に誤りが認められたため、統計処理から除外した。

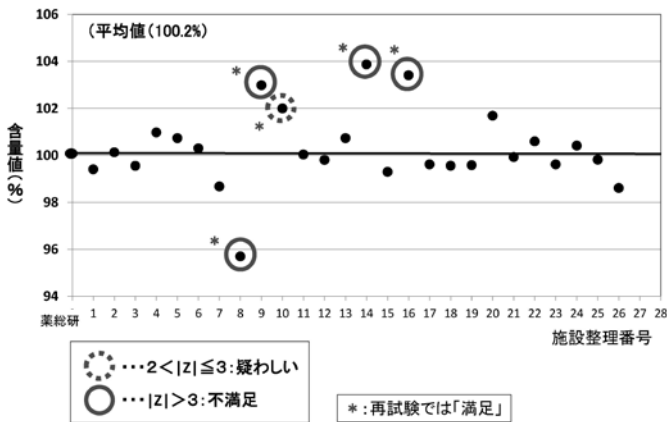


図8 イブプロフェン含有錠の定量試験（HPLC法）の報告値

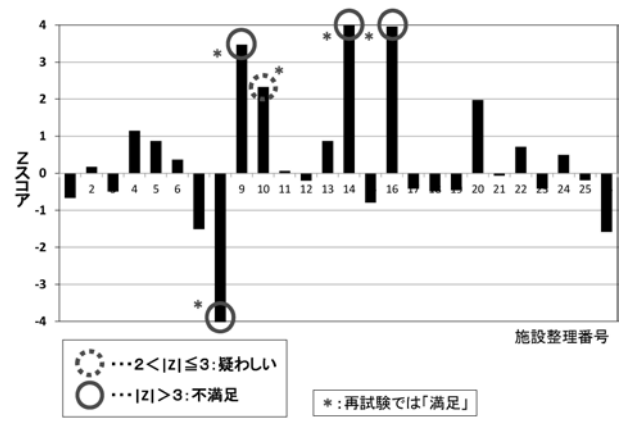


図9 イブプロフェン含有錠の定量試験（HPLC法）のZスコア

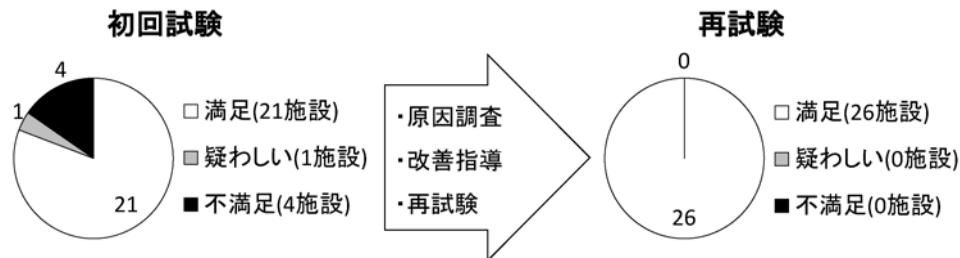


図10 イブプロフェン含有錠の定量試験（HPLC法）の評価結果

測定結果について精査したところ、①試料1～3でイブプロフェンのピーク面積に大きなバラつきが認められたケース、②標準溶液と試料溶液とで内標準物質のピーク面積値が大きく異なっていたケース、③試料溶液に比較して標準溶液のイブプロフェンのピーク面積値が小さいケース、④あるいは逆に大きいケースが認められた。①については、試料溶液の調製に問題があった可能性が高いと考えられた。秤量ミス、メスアップやホールピペット操作（温度により溶液体積が変化しやすいため）などに注意する必要があると考えられた。②については、試験実施者への聞き取り調査の結果から、標準溶液と試料溶液への内標準物質の添加を一連の操作として行っていなかったためであると考えられた。③については、標準溶液の調製ミス（秤量やホールピペット等の操作のミス、標準品の溶解が不十分）であった可能性が高いと考えられた。④については、溶媒の蒸発（内標準物質添加前のメスフラスコを開放状態で放置など）が原因である可能性が考えられた。

### 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94%（のべ126施設中118施設）であり、前年度の95%（のべ128施設中121施設）と同様に良好な結果であった。また、再試験により全施設が「満足」と判定される結果となった。

pH測定試験では、試験実施者が気付かなかった電極の異常を、本事業を通じて見出すことができた。UV法による定量試験では、試料の乾燥操作も試験結果に影響を与える可能性があることが確認された。HPLC法による定量試験では、定量値のバラつきの原因には様々なケースがあることが確認されたが、これらはいずれも基本的なミスによると考えられた。結果説明会では、基本操作を正確に行うことの重要性をあらためて注意喚起した。一方、電位差滴定法による定量法では、参加施設のすべて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、普段の業務では気付き難い問題点を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に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)



## VI 講演・学会発表など



## 1. 講演・学会・誌上发表

「TLRのアダプター分子TRIFを介した摂食調節異常・視床下部炎症の解析」

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志

第40回日本炎症・再生医学会, 2019.7.16-17, 兵庫県神戸市

「内臓脂肪組織炎症における好中球と脂肪細胞のクロストーク」

長井良憲, 渡邊康春, 高津聖志

第40回日本炎症・再生医学会, 2019.7.16-17, 兵庫県神戸市

「好中球と脂肪細胞の相互作用は内臓脂肪組織の炎症を誘導するCrosstalk between neutrophils and adipocytes initiates adipose tissue inflammation」

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志

第92回日本生化学会大会, 2019.9.19-20, 神奈川県横浜市

「薬用植物の栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発（3）本州以南におけるトウキの生育と品質」

甲村浩之, 矢野孝喜, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 大瀧直樹, 川嶋浩樹, 野下俊朗, 菱田敦之, 五十嵐元子, 淵野裕之, 安食菜穂子, 林茂樹, 川原信夫

日本生薬学会 第66年会, 2019.9.22, 東京都港区

「薬用植物の栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発（4）本州以南におけるミシマサイコの生育」

矢野孝喜, 甲村浩之, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 大瀧直樹, 川嶋浩樹, 野下俊朗, 菱田敦之, 五十嵐元子, 淵野裕之, 安食菜穂子, 林茂樹, 川原信夫

日本生薬学会 第66年会, 2019.9.22, 東京都港区

「薬用植物の栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発（5）本州以南で栽培・加工調製された当帰試作品の品質」

淵野裕之, 五十嵐元子, 菱田敦之, 安食菜穂子, 林茂樹, 甲村浩之, 野下俊朗, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 大瀧直樹, 矢野孝喜, 川嶋浩樹, 川原信夫

日本生薬学会 第66年会, 2019.9.22, 東京都港区

「薬用植物の栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発（6）本州以南で栽培・加工調製された柴胡試作品の品質」

菱田敦之, 五十嵐元子, 淵野裕之, 安食菜穂子, 林茂樹, 甲村浩之, 野下俊朗, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 大瀧直樹, 矢野孝喜, 川嶋浩樹, 川原信夫

日本生薬学会 第66年会, 2019.9.22, 東京都港区

「富山県におけるトウキ及びミシマサイコの持続的栽培技術の開発に向けた3年間の栽培評価」

田村隆幸, 大江勇, 東一彦, 川部眞登, 杉山洋行, 西村麻実, 甲村浩之, 大瀧直樹, 川嶋浩樹, 菱田敦之, 五十嵐元子, 川原信夫

薬用植物栽培研究会 第2回研究総会, 2019.11.23, 高知県高知市

「エゾウコギの人工水耕 - 圃場ハイブリッド栽培と作出物の品質評価（2）」

高尾汐織, 朱姝, 村上守一, 田村隆幸, 吉松嘉代, 小松かつ子

薬用植物栽培研究会 第2回研究総会, 2019.11.23, 高知県高知市

「Vitamin A-dependent IL-33 production maintains IL-5-producing ILC2s in the large intestine」

Tsutomu Yanagibashi, Masashi Ikutani, Yoshinori Nagai, Kiyoshi Takatsu

第48回日本免疫学会学術集会, 2019.12.11-13, 静岡県浜松市

「エゾウコギの人工水耕 - 圃場ハイブリッド栽培と作出物の品質評価 (3)」

高尾汐織, 朱姝, 村上守一, 田村隆幸, 吉松嘉代, 小松かつ子

日本薬学会第140年会, 2020.3.5, Web要旨の公開 (発表成立)

「富山県薬事総合研究開発センターの紹介」

永井秀昌

製剤機械技術学会誌 第113号 2020 Vol. 29 (1)

## 2. 共同研究論文リスト

Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, Yamamoto S, Imamura R, Takasaki I, Hara H, Sasahara M, Arita M, Hida S, Taniguchi S, Suda T, Takatsu K : Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation. *FASEB J*. 2019 Nov;33(11):11821-11835.

Yaku K, Okabe K, Gulshan M, Takatsu K, Okamoto H, Nakagawa T. : Metabolism and biochemical properties of nicotinamide adenine dinucleotide(NAD) analogs, nicotinamide guanine dinucleotide(NGD) and nicotinamide hypoxanthine dinucleotide (NHD). *Sci Rep*. 2019 Sep 11;9(1): 13102.

Uchiyama.N, Masumoto N, Maruyama T, Goda Y, Hakamatsuka T, Yamamoto Y, Tamaki T, Nakada T, Yamada S, Ito M, Wakabayashi K, Takeda O, Oguri S, Sasaki T, Oka H, Shiratori M, Akita S, Uemura K, Shiimoto H, Asano T, Higano T, Sudo K, Kondo S, Nishikawa K, Kiuchi F, Tohda C, Takebayashi K, Nakamura T, Nishio K, Nakagawa K, Yokokura T, Kammoto T, Tanabe S, Tsuchiya K, Takao M, Takahashi K, Matsumoto K, Shimada Y, Sasaki H, Kawahara N : Standardization of Newly Listed Single Crude Drug Extracts in Non-JP Crude Drug Standards(Non-JPS), 2018 *Shoyakugaku Zasshi* 2020 Feb;74(1): 20-34.

## 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 ベツリン誘導體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 PCT国際出願 (PCT/JP2014/084076)
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導體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