

国立衛生試験所ヒト成長ホルモン標準品 (Control 951)

四方田千佳子・岡田敏史・内田恵理子・森本和滋・早川堯夫

The Somatropin Reference Standard (Control 951) of the
National Institute of Health SciencesChikako Yomota, Satoshi Okada, Eriko Uchida,
Kazushige Morimoto and Takao Hayakawa

Somatropin material was examined for preparation of the "Somatropin Reference Standard". The candidate material was evaluated by a domestic collaborative study in which eight laboratories participated. The protein content was determined to be 4.5 mg/Vial based on amino acid analysis.

Because of the possibility of application as a chemical reference standard for assay by the HPLC method, a physico-chemical evaluation of the candidate material was also performed. By SE-HPLC, the content of polymer, dimer were determined to be 0.54%, 0.98%, respectively. By RP-HPLC, the early peak area ascribed to desamido and sulfoxide form was 1.07% of the total peak area. And for informational data, the potency of the candidate material, being estimated by three different biological methods, weight gain assay, tibia test and adipose conversion assay is 14.8 IU/vial.

Based on the above results, the candidate was authorized as the Somatropin Reference Standard of the National Institute of Health Sciences.

Keywords : somatropin, quality evaluation, NIHS reference standard

(Received May 31, 1996)

ヒト成長ホルモンは、従来はヒト下垂体より抽出されたが、現在は高純度の製品が大量に供給可能な遺伝子組み換え製品に移行している。ヒト成長ホルモンの生物活性（力価）は、下垂体摘出ラットを用いた体重増加法（Weight gain assay）、頸骨骨端軟骨幅増加試験（Tibia test）が用いられてきた。しかし、これらの方法は低感度、低精度で、繰り返し実験が必要なため多大の時間と労力を要し、動物愛護の観点からも化学的定量法への変更が望まれている¹⁾。すでに、ヨーロッパ薬局方（EP）では、1994年に Somatropin および Somatropin for injection のモノグラフで、定量法として size-exclusion chromatography を採用している²⁾。また、USP も Forum において、HPLC 法の定量法への採用を提案している³⁾。わが国においても、医薬品の国際的調和の観点から、これらの製剤における定量法を生物検定法から化学的定量法へと変更する必要がある、化学的定量法へ変更するための前提条件として、ヒト成長ホルモン標準品を設定した。

標準品候補品の品質評価にあたり、住友製薬(株)、セローノジャパン(株)、日本イーライリリー(株)、日本ケミカルリサーチ(株)、ノボノルディスクファーマ(株)および山之内製薬(株)との共同実験を行った。

実験材料および実験方法

1. 候補標準品の調製

候補品用のヒト成長ホルモンは、Novo Nordisk A/S 社 (Denmark) において、遺伝子組換え法により調製されたものであり、凍結乾燥品として供給された。1 バイアル中の組成は、ヒト成長ホルモン約 4 mg, グリシン 9.3 mg, マンニトール 46.7 mg, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.3 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg とされていた。

2. 参照物質および試薬・試液

生物活性測定用および HPLC 法による定量用標準物質として、WHO 国際参照品 (Code 88/624) を用いた。そのほか、理化学的試験に用いた試薬類は、JIS 特級品または特級相当品を用いた。

3. 理化学的品質試験法

候補品につき、RP-HPLC 法、SE-HPLC 法、IE-HPLC 法、キャピラリー電気泳動、ペプチドマッピング、Native-PAGE、SDS-PAGE、等電点電気泳動、による理化学的評価試験を行った。

3.1 HPLC

HPLC の試料溶液は候補品 1 バイアルを、水 4 ml に溶解し、それぞれ以下の操作条件にしたがって試験を行った。

(1) RP-HPLC 操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：220 nm）
 カラム：Vydac 214TP54（または、Develosil ODS-UG-5）（4.6 mm I.D.×250 mm）
 カラム温度：45℃
 移動相：0.05M Tris-塩酸緩衝液（pH 7.5）/n-プロパノール（71：29）
 流量：0.5 ml/min
 注入量：50 μl
 検出感度：試料溶液を25倍希釈した液100 μlにつき、上記の条件で操作するとき、得られる主ピークの高さがフルスケールの50～70%になるように調整する。ただし、試料溶液を1000倍希釈した液25 μlにつき、上記の条件で操作するとき、主ピークが検出できるように検出器およびデータ処理装置等の条件を設定する。
 面積測定範囲：溶媒のピークの後から主ピークの保持時間の約2倍の範囲

(2) SE-HPLC 操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：214 nm）
 カラム：TSKG 2000SW_{XL}（7.8 mm I.D.×300 mm）+ TSK guard Column SW_{XL}（6.0 mm I.D.×40 mm）
 カラム温度：25℃付近の一定温度
 移動相：0.05 M 炭酸水素アンモニウム溶液
 流量：0.5 ml/min
 注入量：25 μl
 検出感度：(1)を準用
 面積測定範囲：ヒト成長ホルモンの単量体が溶出するまでの範囲

(3) IE-HPLC 操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：280 nm）
 カラム：Mono QHR（7.8 mm I.D.×300 mm）
 カラム温度：25℃付近の一定温度
 移動相A：25 mM Bistris-塩酸緩衝液（pH 7.0）
 移動相B：0.25 M NaClを含む移動相A
 流量：1.5 ml/min
 注入量：100 μl
 感度：(1)を準用

3.2 キャピラリー電気泳動

キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）は、以下のA、B 2つの系で測定した。

	A	B
使用機器	大塚電子 CAPI-3100	ベックマン P/ACE5510
キャピラリー	50 μm I.D. ×37.8 mm	50 μm I.D. ×50 mm
測定波長	220 nm	200 nm
泳動温度	25℃	23℃
試料注入法	重力注入法 (25 cm, 20 sec)	加圧法 (0.5 Psi, 2 sec)

泳動緩衝液	50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) + エチレンジグリコール (85：15)	100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) + 100 mM ホスファチジル エタノールアミン
印加電圧	212 V/cm	439 V/cm

3.3 その他の操作

ペプチドマッピング、Native-PAGE、SDS-PAGE、等電点電気泳動はEP法²⁾、USPFforum法³⁾、あるいはそれらに準じる方法でそれぞれ試験を行った。

4. たん白質量（アミノ酸分析）

アミノ酸分析法により、本候補品中のたん白質含量を求めた。候補品1バイアルに水4 mlを加えて溶かし、その500 μlを正確に量り、2.5 μmol/mlのノルロイシン溶液50 μlを加え、加水分解用試料溶液とする。加水分解用試料溶液50 μlを正確に量り、加水分解用ガラス容器の中に入れ、減圧下で蒸発乾固し、0.1%チオグリコール酸含有低沸点塩酸200 μlをガラス容器の底部に、50 μlを試験管内に加える。容器内を窒素置換後、減圧下（1 mmHg以下）で密封し、110±2℃で48時間加熱する。冷後開封し、減圧下で塩酸を除去後、残留物に0.02 N塩酸0.25 mlを加えて溶かし、試料溶液とする。別に、アミノ酸標準溶液4 mlおよび2.5 μmol/mlのノルロイシン溶液4 mlを正確に量り、0.02 N塩酸試液を加えて正確に250 mlとシアミノ酸標準溶液とする。試料溶液および標準溶液5 μlにつき、アミノ酸クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液5 μl中のアミノ酸残基の含量 M₁ (mg) を式 (1) により算出する。M₁ と式 (2) より、候補品1バイアル中の成長ホルモン含量 M₂ (mg) を計算する。

$$M_1(\text{mg}) = \frac{AA_{SA}}{AA_{ST}} \times \frac{AN_{ST}}{AN_{SA}} \times AM \times R \quad (1)$$

$$M_2(\text{mg}) = M_1 \times \frac{22,124}{NA} \times \frac{0.55}{0.05} \times \frac{4}{0.5} \times 50 \times 10^{-9} \quad (2)$$

AA_{ST}: 標準溶液のそれぞれのアミノ酸のピーク面積

AA_{SA}: 試料溶液のそれぞれのアミノ酸のピーク面積

AN_{ST}: 標準溶液のノルロイシンのピーク面積

AN_{SA}: 試料溶液のノルロイシンのピーク面積

AM: 注入したアミノ酸量 (mg)

R: 注入した試料溶液と、注入した標準溶液のノルロイシンの比 (1.136)

NA: ヒト成長ホルモンのアミノ酸残基数

5. モル吸光係数

候補品およびWHO国際参照品を約1 mg/mlとなるように水に溶かし、276 nmにおける吸光度を測定する。光散乱の影響は、250 nmから400 nmの吸光度を0.2～0.4 nmおきに分光光度計で測定し、350～400 nmにおける波長-吸光度の両対数グラフから276 nmへの外挿値を求めて補正する。

6. 生物活性測定法

体重増加法 (Weight gain test), 頸骨骨端軟骨幅増加試験 (Tibia test) および脂肪細胞分化活性測定法 (Adipose conversion assay) により, WHO ヒト成長ホルモン国際参照品 (Code No. 88/624) の活性値 6.7 IU/amp. を標準として測定した。

6.1 体重増加法

生後 35 日目に脳下垂体を摘出した 5 週齢のウィスター系ラット雌を用い, 一群 12 匹とした。候補品および WHO 国際参照品を 0.25% ウシ血清アルブミン含有生理食塩液に溶解し, 0.16 IU/ml 溶液およびその 4 倍希釈溶液を作り, 投与開始日に体重を測定した各ラットに 0.5 ml を 1 日 2 回, 約 7 時間間隔で皮下投与し, これを 4 回繰り返す。最終投与時から約 16 時間後に体重を測定し, 投与開始日との体重差を体重増加として平行線定量法により相対力価を求めた。

6.2 頸骨骨端軟骨幅増加試験

候補品および WHO 国際参照品の高濃度 (0.01 IU/ml) および低濃度 (0.05 IU/ml) の 2 用量について 1 群 10 匹の脳下垂体摘出ラットに 1 日 1 回 500 μ l ずつ 4 日連続で皮下投与し, 摘出した頸骨骨端軟骨部分の幅を測定して平行線定量法により力価を求めた。

6.3 脂肪細胞分化活性測定法

マウス脂肪前駆細胞 3T3-F442A 細胞は, 成長ホルモンにより濃度依存的に脂肪細胞へ分化することが知られ, 分化マーカー酵素である Glycerophosphate dehydrogenase (GPDH) 活性を指標とすることにより成長ホルモンの *in vitro bioassay* 法として有用であることが報告されている⁴⁾。候補品および WHO 国際参照品をそれぞれ最終濃度が 20, 40, 80 μ IU/ml となるように細胞へ添加した場合の GPDH 活性値を測定し, 平行線定量法により力価を求めた。

結果および考察

1. 理化学的品質試験

1. 確認試験

(1) ポリアクリルアミドゲル (PAGE) 電気泳動

Native-PAGE により, 候補品のバンドは, WHO 国際参照品と一致した。

SDS-PAGE により, 候補品の分子量は 22,000 であった (アミノ酸組成より 22,121)。

(2) 等電点電気泳動

等電点電気泳動により, 候補品の等電点 pI は 5.1 と求められ, 文献値 4.9⁵⁾ とほぼ一致した。

(3) ペプチドマッピング

3 機関において候補品のペプチドマッピングを行い, いずれも WHO 国際参照品のクロマトグラムのパターンとよく一致した。

2. 純度試験

(1) 液体クロマトグラフィー

A. RP-HPLC

候補品中のデアミド体およびスルホキシド体の含量を, EP に採用されている方法, USP で提案されている方法に準じた RP-HPLC 操作条件により測定した。8 機関による測定結果を Table 1 に, クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。成長ホルモンの主ピークの前に溶出するピークの和を early peak とし, そのうち主ピークのすぐ前のピークをスルホキシド体, さらに前をデアミド体ピークとし, 主ピークの後を late peak として各測定値を Table 1 にまとめた。ただし, D の測定値は異常値として平均値の算出から除外した。ここで, 機関 H は ODS カラムを, その他の機関は C4 カラムにより測定したが, Fig. 1 の ODS カラムによるクロマトグラムと類似する結果が得られた。7 機関による測定値の平均値は early peak $1.07 \pm 0.21\%$, late peak $0.15 \pm 0.18\%$ であった。

B. SE-HPLC

EP 法²⁾ あるいは USP Forum 法³⁾ に準じた SE-HPLC

Table 1. Content of desamido and sulfoxide body in the candidate material for NHS Somatropin Reference Standard

Laboratory	Content (%)		
	Early peak (desamido, sulfoxide)	Main	Late peak
A	0.99 (0.60, 0.38)	98.49	0.52
B	1.02 (0.80, 0.22)	98.99	N.D
C	1.20 (0.91, 0.26)	98.40	0.20
D*	0.09 (? , ?)	99.91	N.D
E	1.26 (1.09, 0.17)	98.74	N.D
F	0.64 (0.47, 0.17)	99.29	0.07
G	1.30 (1.10, 0.19)	98.70	N.D
H	1.05 (0.82, 0.23)	98.72	0.23
Average	$1.07 \pm 0.21 (0.83 \pm 0.22, 0.23 \pm 0.07)$	98.76 ± 0.28	0.15 ± 0.18

*This value was excluded in calculating the average.

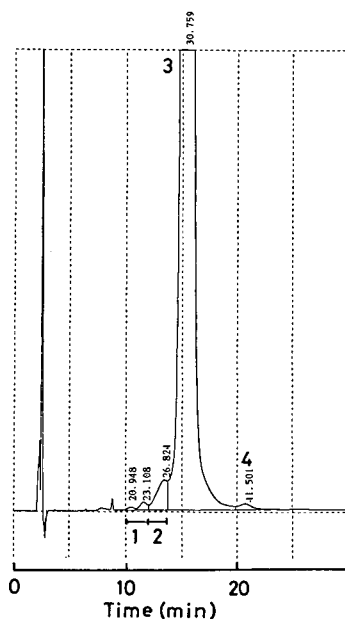


Fig. 1. RP-HPLC chromatogram of the candidate material for NIHS Somatropin Reference Standard
Peaks: 1=sulfoxide somatropin; 2=desamido somatropin; 3=somatropin; 4=late peak

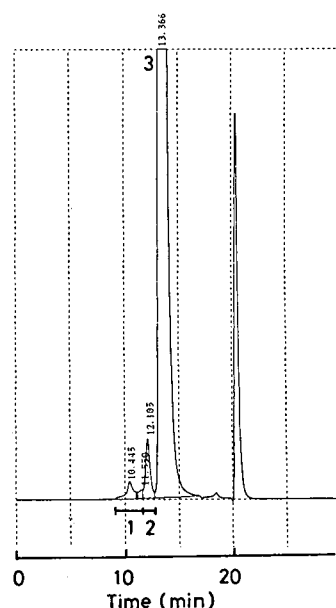


Fig. 2. SE-HPLC chromatogram of the candidate material for NIHS Somatropin Reference Standard
Peaks: 1=polymer; 2=dimer; 3=somatropin

により、候補品中のダイマー、ポリマー含量を測定した。この結果を Table 2 に、クロマトグラムの一列を Fig. 2 に示した。8 機関による測定値の平均はダイマー 0.98 ± 0.22%，ポリマー 0.54 ± 0.14% であった。

C. IE-HPLC

さらに、イオン交換カラムを用いた IE-HPLC による純度試験を行った。主に主ピークの後に溶出するデアミド体等の類縁物質ピークの総面積は主ピークの 0.79 ±

Table 2. Content of polymer and dimer in the candidate material for NHS Somatropin Reference Standard

Laboratory	Content (%)		
	Polymer	Dimer	Monomer
A	0.70	1.02	98.28
B	0.70	0.88	98.43
C	0.50	1.20	98.20
D	0.43	0.95	98.63
E	0.60	1.41	97.99
F	0.28	0.69	99.03
G	0.49	0.71	98.81
H	0.63	1.01	98.36
Average	0.54 ± 0.14	0.98 ± 0.22	98.47 ± 0.32

Table 3. Purity test of the candidate by capillary electrophoresis

Laboratory	Content (%)		
	Main	Desamido	Unknown
A	98.40	1.20	0.30
H	98.59	1.41	N.D.
Average	98.50 ± 0.09	1.31 ± 0.11	0.15

Table 4. Protein content for the candidate by amino acid analysis

Laboratory	Protein(mg)
A	4.31
B	4.43
C	4.56
H	4.55
Average	4.46 ± 0.1

0.40% であった。なお、スルホキシド体は電荷の変化を起こしていないため、IE-HPLC では主ピークと分離できないことが知られている。

(2) キャピラリー電気泳動

近年、たん白質や核酸の分析に有効であることが示されてきたキャピラリー電気泳動 (CZE) により、候補品の評価試験を行った。Fig. 3 に候補品のフェログラムの例を、Table 3 に 2 機関の試験結果を示した。電気泳動では、スルホキシド体は分離しないため、CZE ではデアミド体含量を求めていることになるが、RP-HPLC より主ピークからの分離が良好であるため、1.31 ± 0.11% とやや大きな測定結果が得られたものと思われる。

3. たん白質量

アミノ酸分析の結果より、候補品 1 バイアル中のたん白量を計算した。4 機関による測定結果を Table 4 に示した。平均値は 4.46 ± 0.10 mg と求められ、これを基に、4.5 mg を候補品含量の表示値とした。また、WHO 国際参照品における、比吸光度 A (276 nm) = 8.18 を用いて、候補品の実測吸光度より計算したたん白量は 4.39 ± 0.08 mg/vial であった。また、アミノ酸分析によるたん白量を基に、候補品の 276 nm におけるモル吸光係数を求めたところ、1.79 ± 0.01 であった。

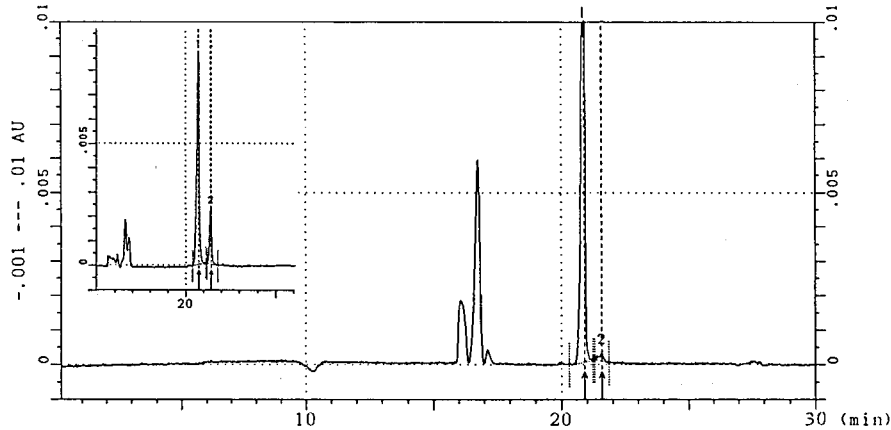


Fig. 3. Electropherogram of the candidate material for NIHS Somatropin Reference Standard by capillary zone electrophoresis
The small electropherogram is that of the somatropin solution stored for three days at 37°C. Peaks: 1=somatropin; 2=monodesamido somatropin

Table 5. Summary of biological assay for the candidate by three methods

Activity(IU/vial)		
Weight gain assay	Tibia test	Adipose conversion assay
17.9 16.6 14.2	11.7 14.6	15.17 14.42 15.16
average 16.2±1.53	average 13.2±1.45	average 14.92±0.35

4. 生物活性測定

候補品の生物活性を、体重増加法、頸骨骨端軟骨幅増加試験および脂肪細胞分化活性測定法により、WHO ヒト成長ホルモン国際参照品 (6.7 IU/amp.) を標準として測定した。結果を Table 5 にまとめて示した。体重増加法では 16.2±1.53 IU/vial, 頸骨骨端軟骨幅増加試験法では 13.2±1.45 IU/vial, 脂肪細胞分化活性測定法では 14.92±0.35 IU/vial の生物活性値が得られた。ただし、国際参照品の力価は正式表示されたものではないため、これらの活性値は参考値として取り扱い、候補品の活性値として表示するものではない。

別に、SE-HPLC 法においてすべての活性が monomer ピークによるものと仮定して、WHO 国際参照品 (6.7 IU/amp.) に対する候補品の活性値を monomer ピーク面積のみを比較して計算したところ、8 機関における平均値として 14.67±0.34 IU/vial の値が得られた。

5. 候補品と WHO 国際参照品の純度の比較

候補品と同時に、WHO 国際参照品についても HPLC による純度試験を行い、候補品との比較を試みた。Table

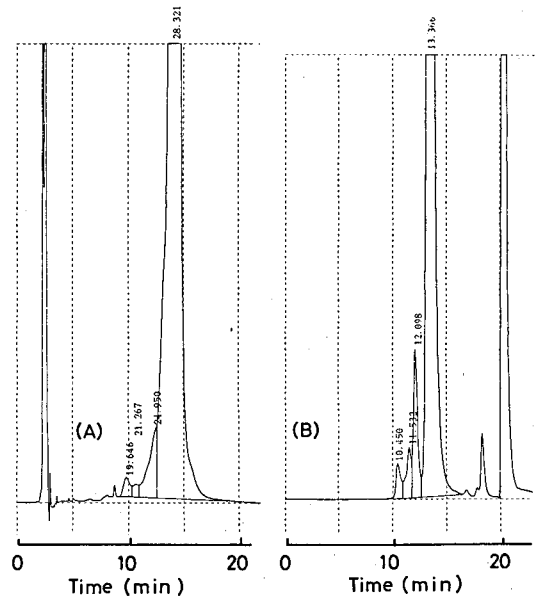


Fig. 4. HPLC chromatograms of WHO Reference Reagent for Somatropin
(A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC

6 に示すように、国際参照品における類縁物質含量はいずれの場合も候補品の 3 倍程度であり、候補品は国際参照品よりかなり高い純度を有していることが明らかであった。国際参照品の HPLC チャートを Fig. 4 に示した。

Table 6. Comparison of the purity between the candidate and WHO Reference Reagent

	Content (%)			
	RP-HPLC	SE-HPLC		IE-HPLC
	Early peak	Polymer	Dimer	Desamido and others
the candidate	1.07±0.21	0.54±0.12	0.98±0.20	0.79±0.40
WHO Reference Reagent	3.19±0.43	1.6±0.51	2.49±0.5	3.43±0.90

結 論

以上の結果、本候補品のたん白質含量は4.46 mgと求められ、表示を4.5 mgとした。参考値としてWHO国際参照品に対する生物活性を異なる3種の方法で評価したところ、13.2~16.2 IU/vialであった。また、HPLC法およびCZE法による純度試験の結果、本候補品の化学的純度は極めて高く、SE-HPLCによる定量用標準品としても十分使用可能な品質を有することが明らかとなった。

終わりに、本候補品の品質評価試験は、以下の方々との共同実験で行われた。

住友製薬(株) 松田 秀 製剤技術研究所主任研究員, 古川明弘 同所 副主任研究員
セローノジャパン(株) 長谷川嘉成 浜松研究所副所長
日本イーライリリー(株) 金田 宣 医薬開発研究所室長, 西野正純 同所 主任研究官
日本ケミカルリサーチ(株) 加藤和夫 開発研究所所長, 辰巳正史 同所 研究員, 井上 桂 同所 研究員

ノボノルディスクファーマ(株) 長南義勝 厚木工場品質管理部部長, 江島伸一 同所 生産部部長, 赤塚真成 開発第一本部薬事部課長
山之内製薬(株) 関野 順 分析科学研究所所長, 湯田真道 同所 研究員, 村田芳美 同所 研究員

文 献

- 1) 早川堯夫, 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, 徳永裕司, 山口照英, 新見伸吾, 押沢 正: タンパク性医薬品の新しい品質評価法の流れ: 遺伝子組換えヒト成長ホルモンの力価測定における *in vivo bioassay* から理化学試験方法への移行のためのバリテーション, 医薬品研究, **25**, 339~347 (1994)
- 2) European Pharmacopeia, Second Edition, 951 (Somatropin), 952 (Somatropin Preparations) (1994)
- 3) US Pharmacopoeia Forum, **17**, 1253~1264 (1990)
- 4) 内田理恵子, 森本和滋, 川崎ナナ, 早川堯夫: 培養細胞を用いたヒト成長ホルモンの *in vivo bioassay* 法の開発に関する研究, 医薬品研究, **25**, 348~353 (1994)
- 5) Li, C. H.: *Fed. Proc.*, **16**, 775 (1957)