

国立研究開発法人 産業技術総合研究所  
計量標準総合センター 標準物質分析成績書

標準物質

NMIJ RM 6208-a

No. +++

モノクローナル抗体溶液、AIST-MAB  
Monoclonal Antibody Solution, AIST-MAB

本標準物質（モノクローナル抗体溶液、AIST-MAB）は、ISO 17034 及び ISO/IEC 17025 の要求事項に適合したマネジメントシステムに基づいて生産された、チャイニーズハムスター卵巣細胞由来細胞株より製造された遺伝子組換え体モノクローナル抗体（ヒト化 IgG1κ）のりん酸緩衝液である。本標準物質はモノクローナル抗体の定量分析における分析法や分析装置の妥当性確認に用いることができる。また、モノクローナル抗体の各種特性解析における分析法の開発、評価、及び測定の内外部精度管理に用いることができる。

## 【参考値】

本標準物質の参考値は N-結合型糖鎖を有するヘテロ四量体構造のモノクローナル抗体（ヒト化 IgG1κ）としての 20℃における質量濃度であり、以下の通りである。参考値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数  $k=2$  から決定された拡張不確かさであり、約 95%の信頼の水準をもつと推定される区間の半分の幅を示す。本抗体分子のアミノ酸配列は参考情報 1)、糖鎖構造に関する情報は 2)、電荷異性体の分布は 3)、凝集体及び切断体の含量は 4)に示されている。

物質名	参考値 質量濃度 (g/L)	拡張不確かさ 質量濃度 (g/L)
モノクローナル抗体 (ヒト化IgG1κ)	5.00	0.19

## 【参考値の決定方法】

本標準物質の参考値は、同位体希釈質量分析法を用いたアミノ酸分析により得られた測定結果に、参考情報 1)のアミノ酸配列及び 2)に示した糖鎖修飾の中で最も多かった構造から得られる分子量 (148056)、及び 5)の密度を用いて決定した。アミノ酸分析は、試料溶液に安定同位体標識アミノ酸を添加したのち、下記の 2つの方法により行った。

- 1) マイクロ波加熱液相加水分解とプレカラム誘導体化法による逆相クロマトグラフィー/質量分析法：  
マイクロ波加熱により 160℃ 3 時間塩酸による液相加水分解を行ったのち、N-ブチルニコチン酸スクシンイミドエステルをプレカラム誘導体化試薬として用い、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニンを定量した。
- 2) 気相加水分解と親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法：  
気相による 150℃ 48 時間塩酸加水分解を行ったのち、誘導体化を行うことなく、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、アラニンを定量した。

## 【計量計測トレーサビリティ】

本標準物質の参考値は、L-アスパラギン酸認証標準物質 (NMIJ CRM 6027-a)、L-グルタミン酸認証標準物質 (NMIJ CRM 6026-a)、L-プロリン認証標準物質 (NMIJ CRM 6016-a)、L-バリン認証標準物質 (NMIJ CRM 6015-a)、L-イソロイシン認証標準物質 (NMIJ CRM 6013-a)、L-ロイシン認証標準物質 (NMIJ CRM 6012-a)、L-フェニルアラニン認証標準物質 (NMIJ CRM 6014-a)、L-アラニン認証標準物質 (NMIJ CRM 6011-a) を用いて調製した標準液を用い、同位体希釈質量分析法によるアミノ酸分析により求めた。試料の密度は密度標準液 (JCSS) で校正した振動式密度計を用いて求めた。

**【有効期間】**

本標準物質が下記の【保存に関する注意事項】の条件で保存された場合、本分析成績書は出荷日から1年間有効である。

**【物質に関する情報】**

本標準物質は無色透明の液体で、10mmol/L リン酸カリウム緩衝溶液 (pH7.0) に溶解したモノクローナル抗体溶液である。約1mL がポリプロピレンバイアルに封入され、さらにアルミニウムラミネート袋に密封されている。

**【均質性】**

均質性の評価は、陽イオン交換クロマトグラフィーの主ピークの面積百分率を用いて行った。均質性由来の不確かさは参考値の拡張不確かさに含まれている。サイズ排除クロマトグラフィーの単量体ピークの面積百分率、280nmにおける吸光度を用いた均質性評価についても実施しており、これらの評価法でも十分均質であることを確認している。

**【保存に関する注意事項】**

本標準物質は到着後、-80℃の清浄な場所に保存すること。

**【使用に関する注意事項】**

使用前に室温に30分程度放置して自然解凍したのち、5回転倒混和し十分均一化してから使用する。室温で保管する場合は溶解後24時間以内に使い切ること。5回以下の凍結融解は、参考値に影響を与えず、陽イオン交換クロマトグラフィーの主ピークの面積百分率、サイズ排除クロマトグラフィーの単量体ピークの面積百分率、280nmにおける吸光度に影響がないことを確認している。

**【取り扱いにおける注意事項】**

本標準物質は試験研究用であり、生体に使用しないこと。安全データシート (SDS) を参考にして取り扱うこと。

**【製造等】**

本標準物質は、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合において、チャイニーズハムスター卵巣細胞由来細胞株を用いて発現、精製されたものである。無血清培地を用いた抗体産生細胞株の培養上清について、GMP (Good Manufacturing Practice) 準拠施設内においてプロテインAアフィニティー、陰イオン交換、陽イオン交換の各種クロマトグラフィーによる精製後、ウイルス除去フィルタ、限外濾過による濃縮、緩衝液置換を行い、分注したものである。

**【参考情報】**

参考値算出に用いた項目 (下記1~5) 及び吸光係数 (下記6) について参考情報に詳細を記載してある。いずれも本標準物質の頒布開始時における測定結果を示した。

1) 本標準物質は、軽鎖及び重鎖各2分子からなるヘテロ四量体構造をとり、2分子のN-結合型糖鎖を有する。軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列は以下の通り設計された。本標準物質のトリプシン、リジルエンドペプチダーゼ及びGlu-C消化によるペプチドマッピングを行った結果、下記の軽鎖及び重鎖の全配列をカバーするペプチドを同定した。

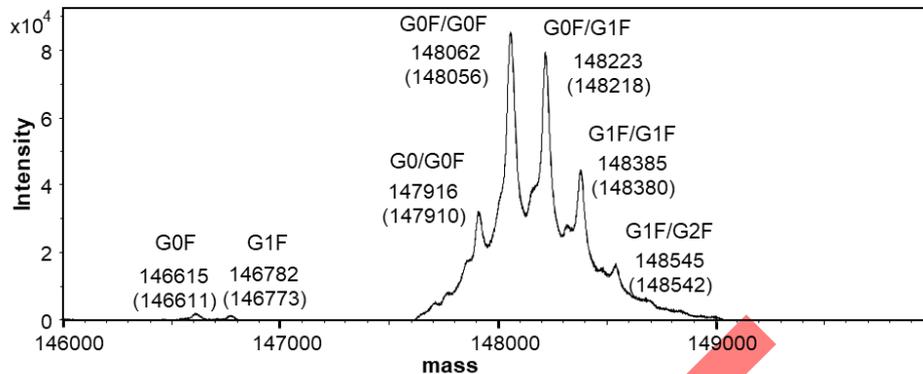
**軽鎖**

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSRSRGTD  
71 FTLTISLQP EDFATYYCQQ HYTPPTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY  
141 PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN  
211 RGE

**重鎖**

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI  
71 SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYV GQGLTLTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG  
141 GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS  
211 NTKVDKKEVP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSD HEDPEVKFNW  
281 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLGQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
351 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW  
421 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

2) 高分解能質量分析装置により測定された本標準物質のマススペクトル（インタクト質量分析）は以下の通りである。

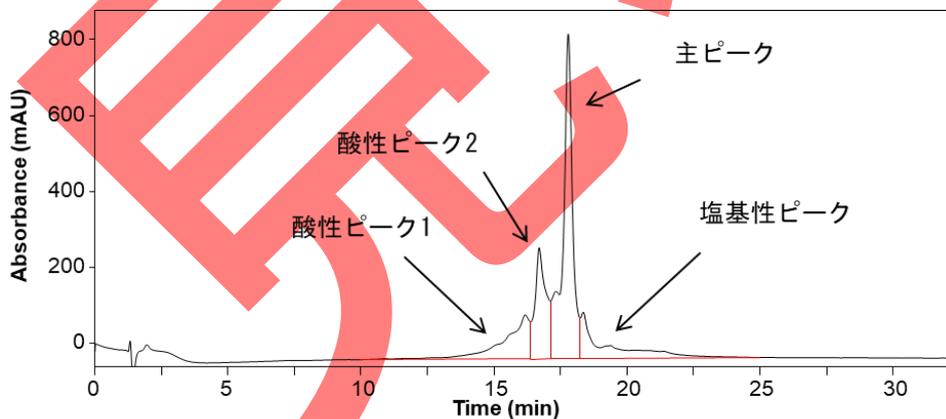


本標準物質3  $\mu$ LをLC-MSを用いて測定し、多価イオンをデコンボリューションしたマススペクトルを表示した。本標準物質は1分子中にN-結合型糖鎖を2分子もつ糖タンパク質であり、測定質量と糖鎖構造の帰属を表示し、括弧内に分子量を示した。最も多い構造はG0Fが2分子結合した糖鎖修飾体（分子量 148056）であった。

\* G0Fの構造:  $\text{GlcNAc}\beta(1-2)\text{Man}\alpha(1-3)[\text{GlcNAc}\beta(1-2)\text{Man}\alpha(1-6)]\text{Man}\beta(1-4)\text{GlcNAc}\beta(1-4)[\text{Fuc}\alpha(1-6)]\text{GlcNAc}$   
 GlcNAc: N-アセチルグルコサミン、Man: マンノース、Fuc: フコース

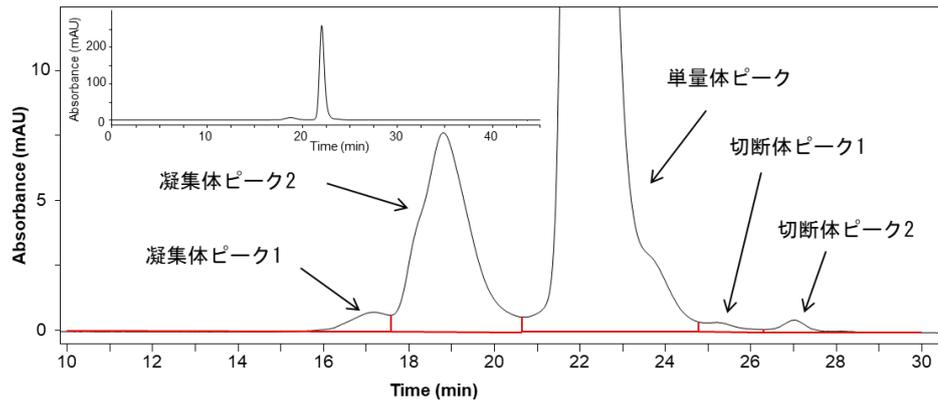
3)本標準物質の電荷異性体の分布について、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー紫外検出装置（LC-UV）により測定したクロマトグラムは以下のとおりである。主ピークに対し、酸性ピーク（1, 2）、塩基性ピークからなる主に4種類の電荷異性体ピークがみられた。電荷異性体の比率をピークの面積百分率によって求めた結果は以下の通りである。

酸性ピーク1：（ $17.5 \pm 0.1$ ）%、酸性ピーク2：（ $18.4 \pm 0.1$ ）%、主ピーク：（ $47.8 \pm 0.2$ ）%、塩基性ピーク：（ $16.4 \pm 0.1$ ）%（ $\pm$ 以下の数値は測定の標準偏差を示す）



使用した陽イオン交換クロマトグラフィーカラムは、BioPro IEX SF（ワイエムシ社製、4.6 mm内径  $\times$  100 mm長、5  $\mu$ m粒子径）である。本標準物質5  $\mu$ LをLC-UV装置に注入し、流量0.5 mL/minで直線グラジエント（10-80% B、30分）で溶出し[移動相A: 20 mmol/L 2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）（pH 6.0）、B: 20 mmol/L MES, 200 mmol/L NaCl（pH 6.0）]、215 nmの波長で検出した。

4) 本標準物質の凝集体及び切断体の含量について、サイズ排除クロマトグラフィーカラムを用いたLC-UVにより測定したクロマトグラム、及びこれらの比率をピーク面積百分率によって求めた結果は以下の通りである。凝集体ピーク1：（ $0.42 \pm 0.02$ ）%、凝集体ピーク2：（ $5.72 \pm 0.14$ ）%、単量体ピーク：（ $93.7 \pm 0.2$ ）%、切断体ピーク1及び切断体ピーク2：（ $0.16 \pm 0.01$ ）%（ $\pm$ 以下の数値は測定の標準偏差を示す）



使用したサイズ排除クロマトグラフィーカラムは、TSK gel G3000SW<sub>XL</sub>（東ソー社製、7.8 mm内径 × 300 mm 長、5 μm粒子径）である。本標準物質10 μLを注入し、流量0.4 mL/minで移動相[100 mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む100 mmol/Lりん酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）]を用い、280 nmの波長で検出した。

5) 振動式密度計により測定した本標準物質の4 °C及び20 °Cにおける密度はそれぞれ1.0027 g/cm<sup>3</sup>、1.0008 g/cm<sup>3</sup>であった。

6) 本標準物質の280 nmにおける吸光係数について、抗体濃度、及び光路長を評価した光学セル（Starna Scientific社製 1/Q/1, 1 mm光路長石英セル）を用いて吸光光度計（島津製作所製 UV-2550, バンドパス1 nm）により測定した吸光度を用いて求めた。散乱光による影響については、日本薬局方の参考情報\*にしたがって補正を行った。これによって得られた吸光係数は (1.41±0.03) L/(g・cm)であった（±以下の数値は標準不確かさを示す）。散乱光の補正を行わない場合の吸光係数は (1.43±0.03) L/(g・cm)であった（±以下の数値は標準不確かさを示す）。

\* 第十七改正日本薬局方 参考情報、タンパク質定量法（2375）

#### 【生産担当者】

本標準物質の生産に関する技術管理者は加藤愛、生産責任者は絹見朋也、値付け担当者は絹見朋也、七種和美、水野亮子、恵山栄である。

#### 【情報の入手】

本標準物質に関して参考値の変更等、重要な改訂があった場合、下記ホームページから「標準物質ユーザー登録」を行った購入者に通知する。なお、本標準物質に関する技術情報は、下記連絡先より入手できる。

#### 【分析成績書の複製について】

本分析成績書を複製する場合は、複製であることが明瞭にわかるようにしなければならない。

#### 【付記】

本標準物質は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（JP17ac0101003, JP18ac0101056, JP19ac0101056）」の研究成果に基づくものであり、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の協力により開発された。

2021年2月25日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所  
理事長 石村 和彦

本標準物質に関する質問等は以下にお問い合わせをお願いします。

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 計量標準総合センター  
計量標準普及センター 標準物質認証管理室  
〒305-8563 茨城県つくば市梅園 1-1-1

電話：029-861-4059、ファックス：029-861-4009、ホームページ：<https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refinate/>



## NMIJ RM 6208-a モノクローナル抗体溶液 (AIST-MAB)

### 補足情報

モノクローナル抗体溶液（NMIJ RM 6208-a, AIST-MAB）について、一次構造解析を含む各種測定結果を参考技術資料（測定事例）A, Bとしてとりまとめている。下記に示したURLからダウンロードが可能である。

<https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refimate/>

参考技術資料（測定事例）Aには産業技術総合研究所 計量標準総合センターで取得された主に一次構造に関する測定結果、Bには次世代バイオ医薬品技術研究組合で取得された測定結果を掲載している。参考技術資料（測定事例）A, Bに掲載した測定結果は各種分析の参考のための測定事例であり、本標準物質の分析成績書の範囲には含まれない。