

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

ペプチドマップ法の国際調和に関する研究

分担研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所副所長

協力研究者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第二室長

協力研究者 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第一室長

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)
分担研究報告書

ペプチドマップ法の国際調和に関する研究

分担研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所副所長
協力研究者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室長
協力研究者 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室長

研究要旨 ペプチドマップ法はタンパク質の一次構造の確認等において有用な試験法であり、現在国際調和の取り組みがなされている。そこで現在までの経緯と主な問題点について調査研究を行った。USPにより最初のドラフトが stage 4 の段階として 1995 年に作成され、日本及び EU に提示された。日本薬局方の生物薬品委員会で国際調和の観点から妥当ではないと問題となった主な点は①USP 標準品を用いる等全体として USP の一部分として記載されていること②システム適格性及びバリデーションに関する記載が詳細であること③遺伝的安定性評価に用いることであった。また、EU から同様な点が本ドラフトを局方として収載する上において妥当ではないとの主張がなされた。それらの問題点に対する意見交換が数回にわたってなされ、バリデーションに関する項目を除いて日本及び EU の案に即した修正がなされた。しかし、バリデーションについては日本及び EU 版のドラフトでは削除してもかまわないが、USP 版のドラフトでは追加の項目として収載するという主張が USP によりなされた。これに対し日本は追加の項目においても収載は適切ではないと主張した。最終的な調和文書においてバリデーションは収載しない。収載する場合は調和されていない旨の記載を付け加えることで三極の合意がなされ、現在 stage 5B の段階に至っている。今後、本調和文書の日本語版は日本薬局方へ参考情報として収載されることになっている。

A. 研究目的

ペプチドマップはタンパク質医薬品、特にバイオテクノロジー応用医薬品の確認試験の一方法である。本法はタンパク質を化学的又は酵素的に処理してペプチド断片とし、その断片を再現性よく分離確認するもので、相補的 DNA 配列の読み違いあるいは点変異などによって生じる一個のアミノ

酸の変化をも確認できる試験法である。このような変化はサンプルを標準品あるいは標準物質について同様に処理したものと比較することで確認され、タンパク質の一次構造の確認、構造上の変化の有無の検出、製造工程の恒常性及び遺伝的安定性の証明などが可能となる。このような有用性によりペプチドマップ法の国際調和を目指した

取り組みが日米欧の三極によりなされるに至った。各極との数々の意見交換を基に6年以上もの歳月を経て現在stage 5Bの調和案が作成された。そこで本研究においてはその経緯及び意見交換の過程で問題となった事項について調査研究を行った。

B. 研究方法

現在までに提示された第7版までのペプチドマップ法の調和案及び各極からのそれらに対するコメントについて整理し主な問題点について考察を行った。

C. 研究結果

1. 第1版ドラフトについて

最初 USP によりペプチドマップ法のドラフトが作成されそのドラフトが1995年9月25日にEP及びJPに送られ、EPからそのUSPのドラフトに関するコメントがJPおよびUSPに1996年4月23日に送られた。その中身は以下に示す項目から構成されていた。

USP により提示された第1版ドラフトの項目

1. 目的と適応範囲
2. ペプチドマップのシステム適格性における重要な因子
3. 試験法のバリデーションにおける再評価
4. 試験の限界
5. 試験法
 - ① 分離と精製
 - ② ペプチド結合の選択的な切断
 - ③ サンプルの前処理

- ④ 至適消化条件の確立
6. 消化物のクロマトグラフ法による分離
 - ① クロマトグラフ用カラムの選択
 - ② 溶媒の選択
 - ③ 移動相の選択
 - ④ 勾配の選択
 - ⑤ 他のパラメーターの選択
7. クロマトグラフのシステム適格性
8. ピークの特性解析
9. ペプチドマップ試験の適格性において必要な事項
10. ペプチドマップ試験のバリデーションにおいて必要な事項
 11. 精度
 - ① 外部試験精度
 - ② 内部試験精度
 12. 頑健性
 - ① 移動相のパラメーター
 - ② プロテアーゼの品質/化学物質の純度
 - ③ カラム
 - ④ 消化物の安定性
 - ⑤ 再現性
 13. 遺伝的安定性評価におけるペプチドマップの適合性

これに対しEPは以下のコメントを行った。

第1版ドラフトに関するEPの主なコメント

1. 一般的原理について
ペプチドマップ法が適用できるタンパク質の大まかな最低の分子量について記載す

ることは有用である。

ペプチドマップは純度試験として使用可能であると一般的に考えられている。その場合マイナーなピークの存在あるいは非存在により不純物の存在が示される。これは例外的な場合にのみ可能である。局方の目的において試験は同定の目的にのみ使用されることを明確にすべきである。

ペプチドマップは比較に基づく操作法であることを明確にすべきである。試験操作においてサンプルで得られたピークのパターンは標準品のパターンと比較される。従って試験においてサンプルと標準物質の消化物は全く同じ条件で同時に調製し、同様な一連の解析においてクロマトグラフを行わなければいけない。

2. 至適消化条件について

トリプシンはペプチドマップにおいて最も共通に用いられる酵素であるので、ペプチドマップにおける使用についてより詳細に記載する必要がある。次のような記載を改定版に収載することを提案する。

時間：トリプティックマップを妨害しない酸を添加するか凍結により反応は止める。

試験において経験しうる事項：トリプシン消化において消化反応の間副反応(非特異的な切断、脱アミド化、ジスルフィドの異性化、メチオニン残基の酸化、ペプチドのN末端グルタミンの脱アミド化から生じるピログルタミン酸の形成など)によりトリプティックマップが不明瞭になる場合がある。さらに、トリプシンの自己分解によりピークが生じる場合がある。その強さはトリプシンとタンパク質の比に依存する。自己分解を避けるためプロテアーゼ溶液は至適とは離れた pH で調製し、消化緩衝液で

希釈するまでは活性化されないようにする。

3. 試験のシステム適格性

試験におけるサンプルと標準物質のクロマトグラムは視覚的な比較がシステム適格性におけるピークの同定及び確認の最初のステップとして述べられている。局方の目的として実施する試験は見本及び標準のクロマトグラムの同一性に基づくべきである。見本のクロマトグラムは標準物質で与えられる。この点は本文で述べるべきである。ピークを同定し試験の性能を確認するためにどのように見本のクロマトグラムと実際のクロマトグラムを比較したらよいかそのアドバイスも含むべきである。見本のクロマトグラムのみとの比較は同定の目的に用いるべきではない。

以下の文を付け加えるべきである。ペプチドマップで正確に同定された当該選択ピークでピークの保持時間、面積、高さの数値に基づいた比較をすることができる。ピーク面積は内標準として比較的小さな変動を示す一つのピークを用いて計算できる。その際、ピーク面積の積分値はベースラインの変動により影響され解析において誤差を生じることがある。代わりに全てのピーク高さの合計に対する各ピークの割合は試験においてサンプルで計算でき、その割合は標準物質において相当するピークの割合と比較する。

4. ペプチドマップ試験のバリデーションにおいて必要な事項に関する記載について

この項目は承認申請のサポートとしてペプチドマップを扱っている。記載された試験はバリデートされた方法である。従って、この項は薬局方の目的に関連していない。

本項目全体を次のような一般的な記載に書き改める必要がある。ペプチドマップは原薬及び混入しうる不純物の構造に関連させてバリデートしなければならない。選択した当該ピークのグループの定量（ピーク面積あるいは高さ）及び同定（保持時間）に関して設定の限界は経験的な知見に基づくべきである。その限界はペプチドマップの一連の解析においてサンプルと標準品の間で有意な違いを検出できる範囲で設定されるべきである。

この USP から提示された第1版ドラフトについて日本薬局方生物薬品委員会において検討がなされつつあったが、コメントを送付する以前の段階で1997年5月19日に USP から第2版ドラフトが送付された。生物委員会におけるコメントが反映されない状況で再度ドラフトが出されたことについて USP に対する遺憾の意並びに本ドラフトを調和案として認めないことを表明した。また、調和のプロセスを進めるためには日本の専門家と直接意見交換をするほうが望ましいことも主張した。また、その際最初のドラフトについて誤記と思われる箇所の指摘を行うと共に主に以下のコメントを送付した。

第1版ドラフトに関する JP の主なコメント

1. 全体的なコメント

本項は USP の一部分として記載されている。USP としてはこの形式で問題はないが、調和文書とするならその記載は全ての極が含まれるよう適切に修正すべきである。

例 ①開発段階の各ステップにおけるペプチドマップのバリデーションの必要性についての記載

②USP に記載の項目番号の引用

様々な目的の標準品として USP 標準品しか使用されない。USP 標準品の引用は調和文書において適切ではないので、削除あるいは必要に応じて他のものに置き換えるべきである。標準物質については国/極あるいは他の妥当性が認められた標準品を含むより柔軟な対応が採用されるべきである。

2. 個別のコメント

化合物のクロマトグラフによる分離において溶媒及び移動相の純度に関し以下の記載を付け加える。

溶媒と移動相の純度は HPLC の良好な分離を行う上で重要な因子である。HPLC グレードの溶媒及び水は購入可能なので、その使用を RP-HPLC に推奨する。

溶存ガスはその溶解性が単一溶媒に比べ混合物で低下するのでグラジエントの系では特に問題となる。この問題を避けるため、真空及び超音波による攪拌がガス抜き操作としてしばしば有用である。

溶媒において不溶物が HPLC 系に注入されると、ポンプバルブのシールあるいはカラムの先端を詰まらせることになる。プレ及びポストカラムろ過の推奨を記載する。

濃度勾配による分離にアイソクラティックによる分離を付け加え、以下の記載を提案する。単一の移動相を用いるアイソクラティック HPLC 系はその簡便性と改良された検出感度からしばしば好んで用いられている。場合によっては個々のピークを明瞭に分離するための至適移動相の組成を確立するのは容易ではない。移動相によっては

組成比及び pH の若干の変化によりペプチドマップのピークの保持時間がかなり影響を受ける場合がある。そのような移動相は用いるべきではない。もっともイソクラティック HPLC 系は濃度勾配 HPLC に比べ未知のサンプル及び複数の成分から構成されるサンプルの分析においてはあまり有用ではない。

提案された測定波長（210～220nm）は実際問題として狭いので、（200～230nm）のほうが良いように思われる。

クロマトグラフのシステム適格性において消化の終了時間を決める際 USP 標準品を用いる有用性について記載されているが、その後以下の記載を付け加える。適切に処理した標準品は明瞭な分離及び個々のピークの適切な比を得るために必要なサンプルの注入量を調べる上においても有用である。

ピークの特性格解析の項において以下の文章を付け加える。カルボキシペプチダーゼと MALDITOF・MS を組み合わせた C-末端配列分析も特性格解析において有用である。

ピークの特性格解析の項において以下の文章が記載されているが意味が理解困難である。“一次構造がペプチドマップにより明らかとならない場合は新たなペプチドマップの改良を行うことが必要である。ペプチドマップによる特性格解析のバリデートされた方法の目標として理論的なタンパク質構造の少なくとも 95% が合意あるいは適否の判断基準となる。”

2. 第2版ドラフトについて

日本の主張に対し、1997年7月3日 USP から返事が来た。その内容はペプチドマッ

プ法の国際調和を目指した取り組みの在り方について JP の考えに理解を示すと共に送られたコメントについては専門家会議で検討するというものであった。JP としては第2版について検討を始めたが、第2版は以下に示す項目から構成されていた。

USP により提示された第2版ドラフトの項目

1. 目的と適応範囲
2. 背景
3. 分離と精製
4. ペプチド結合の選択的な切断
 - ① サンプルの前処理
 - ② ペプチド結合の切断に用いる薬品の前処理
 - ③ タンパク質の前処理
 - ④ 至適消化条件の確立（pH、温度、時間、ペプチドの切断に用いる薬品の量）
6. クロマトグラフィによる分離
 - ① クロマトグラフィ用カラム
 - ② 溶媒
 - ③ 移動相
 - ④ 濃度勾配の選択
 - ⑤ 他のパラメーターの選択
 - ⑥ システム適格性
7. ペプチドの分離と同定
8. 遺伝的安定性評価におけるペプチドマップの使用
10. 適格性に必要な事項
11. バリデーション
 - ① 重要な因子
 - ② 必要とされる事項
精度（外部試験精度、内部試

験精度)

③ 頑健性

移動相、プロテアーゼの品質及び化学薬品の純度、カラム、消化物の安定性

④ 再現性

USP から提示された第2版ドラフトについて日本薬局方生物薬品委員会において再検討がなされ、コメントが1998年1月28日に送付された。以下に第1版に対するコメントと重複していない主なものを示す。

第2版ドラフトに関する JP の主なコメント

1. 全体的なコメント

構成がドラフト全体を通じて複雑であり部分的に重複している。

“タンパク質の前処理”の項においてサンプルと切断酵素の記載が混在しているため理解しにくい。

“タンパク質の前処理”は“他の前処理”とすること。

“タンパク質の前処理”においてトリプシンを用いた場合における問題点の記載があるが、本記載はこの項目の内容として適当ではない。

“システム適格性”という言葉はその項に記載してある内容を全体的に含んでおらず又内容を反映するものではないと思われる。各内容に適切なタイトルを付け加えることが望ましい。

2. 個別のコメント

4. “ペプチド結合の選択的切断”の序に

おける以下の記載は意味が不明であり、有益な情報をもたらさないため削除すること。

“各切断剤は特異性を有しており、その特異性により用いる切断方法（酵素的あるいは化学的）だけでなくこれら二種類における各切断方法が規定される。”

4. ペプチド結合の選択的切断④至適条件の確立：時間とペプチドの切断に用いる薬品の量の項で消化に要する時間の記載が異なっている理由が不明である。

4. ペプチド結合の選択的切断④至適条件の確立：ペプチドの切断に用いる薬品の量の項で切断に用いる薬品は2段階に加えると記載されているが、必ずしも2回に規定する必要はない。“2回以上の複数の段階に加える”との記載を付け加えることを推奨する。

6. “クロマトグラフによる分離”の序論において RP-HPLC が最も広く用いられていることを付け加えること。

6. “クロマトグラフによる分離”クロマトグラフ用カラムの記載においてカラム樹脂パッキングの強さを示すと思われる“L”という言葉が記載されている。“L”は一般的に用いられるのか、何を意味するのか明らかになること。

6. “クロマトグラフによる分離”②“溶媒”において“溶媒”の定義をすること。切断反応が終了後消化混合物は直接 HPLC 系に注入する場合もあるので、“溶媒”が HPLC のサンプル調製に用いる溶液を意味するなら削除を要求する。

6. “クロマトグラフによる分離”⑥“システム適格性”において以下の記載の意味が理解困難である。わかりやすい言葉に書き直すこと。“望ましい消化のエンドポイント

トは試験品と同様に処理した特異タンパク質の標準品との比較によりわかる”

6. クロマトグラフによる分離⑥システム適格性において“変異体”の解析についての記載があるが“変異体”とは何を意味するか明らかにすること。

6. クロマトグラフによる分離⑥システム適格性において、“精度”“ピークレスポンス比”という記載があるがそれぞれ具体的に何を意味するのか明らかにすること。

6. クロマトグラフによる分離⑥システム適格性において、標準品とサンプルにおいて得られたデータは数値的で比較する以外に視覚的な比較も可能であることを付け加えること。ピークベースラインの変動などにより誤差が生じやすく、必ずしも数値による有効な規格を設定できない場合もあるからである。

7. ペプチドの分離と同定において“スケールアップにより分離度が低下しないことを実験的に確かめておく”という記載があるが削除すること。スケールアップにより分離度が低下していても、分取したペプチドの構造確認ができ、後にペプチドマップ上のピークとの一致が確認できれば問題はないと考えるからである。

7. ペプチドの分離と同定において“タンパク質を確認するためのペプチドマップの検証目標は理論的構造の少なくとも95%以上”という記載があるが、何故95%なのか。可能なら削除すること。

7. ペプチドの分離と同定において“定量と同定の限界はその条件でサンプルと標準品において有意な差を検出できることである”という記載があるが、“有意な差”の意味が曖昧である。

11. バリデーション②必要とされる事項、精度（内部試験精度）において“相対的な保持時間は対象とするピークと参照ピークの絶対的な保持時間の差として表される”とある。本記載において“絶対的な”より“実測の”のほうが妥当と思われる。

11. バリデーション③頑健性、プロテアーゼの品質及び化学薬品の純度において“各消化物のクロマトグラムはピーク面積、形状、数の観点で比較される”とある。本記載に“保持時間”を付け加えること。

11. バリデーション④頑健性、カラムにおいてクロマトグラムに影響を及ぼすカラムにおける因子が列挙されているが、その中に“カラムサイズ”を付け加えること。

11. バリデーション④再現性において“各種パラメーターについて二つの異なる施設で標準品及び試験サンプルで繰り返すべきである。”との記載がある。“二つの異なる施設”は削除すること。あるいは“当該品目についてペプチドマップ操作法が局方に収載された場合”を付け加える。複数の施設による再現性データの評価は承認申請の時点では必要ないと考えるからである。

切断剤の種類において記載されているエンドプロテアーゼの名称は一般的に用いられているものか。

第2版について EP から1998年6月4日付けでコメントが送付された。以下にその主なものを示す。

第2版ドラフトに関する EP の主なコメント

ペプチドマップ法に用いるタンパク質を

組換え DNA 技術応用タンパク質に限定しない。

7. ペプチドの分離と同定において本項は開発の段階にのみ適応される規制当局に要求される事項から成り立っていることを明確にすべきである。

13. 遺伝的安定性評価におけるペプチドマップの使用については削除を要求する。

10. 適格性において必要な事項、11. バリデーションは新しいタイトル“バリデーション”とし6. クロマトグラフィーによる分離⑥システム適合性の前に入れたほうがよい。

バリデーションの基準は同定方法の分析バリデーションにおいてICHが要求しているものと矛盾する。この矛盾を解決すべきである。欧州局方におけるペプチドマップの使用は標準物質に対する定性的な評価のみである。従ってバリデーションに関する全ての部分は削除したほうがよい。

3. 第3版ドラフトについて

1999年10月18日に USP から第3版が送られ、それと共に以下の内容の手紙が添付されていた。なお第3版の構成は第2版とほとんど変更がなかった。また、この第3版について EP より以前から主張している内容が含まれていないとして、再度改定の要求がなされた。

第3版に添付された USP からの手紙の主な内容

一般的なコメント

USP、USP 関連標準品、USP の項目に対する引用は削除した。また、特異的な規制過程（例 US-FDA）に対する引用も除去

し、調和のフォーマットに置き換えた。

システム適格性における USP 標準品に対する引用は削除した。各局方は固有の標準品を使うことができる。

構成が全体的に複雑であるとの指摘であるが、USP 小委員会は各局が使用者に最も適切な構成を用いることを提案している。調和の観点からは許容しないが、各使用者により読みやすいように型にすることは可能であろう。

個別のコメント（USP として同意できない点及び JP として回答が問題と考えている点）

1. 目的と適応範囲における“バイオテクノロジー由来品”を“精製したバイオテクノロジー/生物学的製品”への変更について：この項目はバイオテクノロジー由来品を対象としたものである。生物学的製品への拡大は最初の計画には入っていない。従って、USP は最初の“バイオテクノロジー由来品”を推奨する。“目的と範囲”の項目における書き換えについては現状の記載が適切であると考えている。

“タンパク質の前処理”について：サンプルの前処理、切断剤の前処理、タンパク質の前処理の三つに分けることは、全体としてこれら前処理が必要であり、それを保障するための合理的なアプローチについて分析者に注意を喚起することになる。

“タンパク質の前処理”におけるトリプシンの記載について：この項はトリプシンの使用とトリプシンを他のタンパク質と混合した場合における挙動について言及しているので本記載はこの項目に適応可能である。

6. “クロマトグラフによる分離”②“溶媒”における“溶媒”の定義並びに“溶媒”がHPLCのサンプル調製に用いる溶液を意味するなら削除を要求していることについて：5. クロマトグラフによる分離、②溶媒において消化混合物を溶かすため恐らくはトリフルオロ酢酸、イソプロピルアルコール、n-プロピルアルコールを添加した“水とアセトニトリル”の使用を規定している。

“システム適格性”という言葉と内容の不一致及び各内容に対する適切なタイトルの必要性について：“システム適格性”の項はタイトルに全て関連した多くの問題をカバーしている。このドラフトは国際調和のフォーマットの中にあり、システム適格性の項を含むクロマトグラフの USP の章を引用していないので本ドラフトに記載された情報は適切であると考えられる。

6. クロマトグラフによる分離⑥システム適格性にける“変異体”の意味について：“システム適合性”の項の文脈における“変異体解析”はペプチドマップがタンパク質の同定だけでなく変異タンパク質の同定にも用いることを示している。このことは段落の中ではっきり説明されている。即ち、変異体解析とは特異的なタンパク質の標準品/標準物質と変異タンパク質のペプチドマップを比較することにより変異体を同定することである。

6. クロマトグラフによる分離⑥システム適格性において、“精度”“ピークレスポンス比”の意味するところについて：局方における“精度”とは試験が均一なサンプルの複数のサンプルに対して繰り返し行われた場合各試験結果のなかで合意できる程度として規定されている。それは一連の測定

における標準偏差あるいは相対標準偏差と通常表される。標準品あるいは測定品のピークレスポンス比は内部標準のピークレスポンスに対する標準品あるいは測定品どちらかのピークレスポンスの比である。

遺伝的安定性におけるペプチドマップ使用の削除要求について：“遺伝的安定性”は先の文で規定されているが、“遺伝的安定性におけるペプチドマップ使用”と名付けた項目の目的である。我々は特にこの項との関連で“遺伝的安定性”という言葉の他の解釈についてはよく知らない。

10. “適格性に必要な事項に関する項目”の名称変更及び6. クロマトグラフによる分離⑥システム適格性の前への移動の要求について：“適格性に必要な事項に関する項目”は製品の試験管理及び製品の開発段階で用いられる重要な情報を含んでいる。従って、我々はこの項目を現状のまま変更しないことを推奨する。

4. 第4版のドラフトについて

その後1999年11月8日にEPの主張を一部取り入れた第4版が送付された。その中身は以下に示す項目から構成されていた。なお、第4版において目的と適応範囲についての本記載及び遺伝的安定性評価におけるペプチドマップの使用及びバリデーションの項目はEPでは含まないことが記載されていた。

USPにより提示された第4版ドラフトの項目

1. 目的と適応範囲
2. ペプチドマップ

- 2. 1 分離と精製
- 2. 2 ペプチド結合の選択的な切断
 - 2. 2. 1 サンプルの前処理
 - 2. 2. 2 ペプチド結合の切断に用いる薬品の前処理
 - 2. 2. 3 タンパク質の前処理
 - 2. 2. 4 至適消化条件の確立 (pH、温度、時間、ペプチドの解裂に用いる薬品の量)
- 2. 3 クロマトグラフによる分離
 - 2. 3. 1 クロマトグラフ用カラム
 - 2. 3. 2 溶媒
 - 2. 3. 3 移動相
 - 2. 3. 4 濃度勾配の選択
 - 2. 3. 5 アイソクラテックの選択
 - 2. 3. 6 他のパラメーターの選択
 - 2. 3. 7 バリデーション
- 2. 4. ペプチドの分析と同定
 - 遺伝的安定性評価におけるペプチドマップの使用

バリデーション

重要な因子

必要とされる事項

精度 (外部試験精度)

頑強性 移動相、プロテアーゼの品質及び化学薬品の純度、カラム、消化物の安定性、メモ、消化物の安定性

再現性

JP によりその内容について検討がなされ、コメントが 2000 年 3 月 28 日 USP に送付された。以下にその主な内容を示す。

第 4 版に対する JP の主なコメント

- 1. 目的と適応範囲における以下の記載

について：“この項目は組換え DNA 由来製品に用いる発現構成体の安定性並びに全ての工程の一貫性を評価するためのペプチドマップの適応とそのバリデーションに関する詳細な手引きである。”

本記載はペプチドマップの全ての面について取り扱っている。従って本記載に以下の目的を付け加えたほうがよいと思われる。
①望ましいタンパク質製品の特性解析②製品の安定性の評価③タンパク質製品の各ロットの同定に基づいた保証④望ましい製品におけるタンパク質変異体の存在の検出

1. 目的と適応範囲における以下の記載について：“バリデーションに関する記載は規制過程の初期の段階における方法に関する適格性と規制過程の後期における十分なバリデーションの違いについて示した。記載したバリデーションの概念は局方のバリデーションガイドライン及び分析法バリデーションの ICH 文書と一致している。”

日本においてはこの項目で記載されている二つの規制過程はないので、バリデーションを初期と後期の過程に分けることは調和文書において適当ではないことを JP は主張する。また、全体を通じて、一定の条件で与えられた分析操作に適応するバリデーションの範囲は常に受入が可能というわけではない。従って、JP は本文書においてこの記載を含まない。

2. 2. 3 タンパク質の前処理における前半部分の記載は“2. 2. 1 サンプルの前処理”に含んだほうがよいと思われる。何故なら記載はサンプルの前処理に関するものであるため。

2. 2. 3 タンパク質の前処理における後半部のトリプシンに関する記載は 2. 2.

2の項の最後に移すか、“2. 2. 3トリプシンの前処理”という項目を新たに設定し記載すべきである。

2. 3. 3移動相：トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルは非常に一般的で有用な移動相であるので付け加えたほうがよい。

2. 3. 7バリデーションにおける“ピークレスポンス”とは“ピーク面積”“ピークの高さ”あるいはその両方のどちらを意味するのか。

2. 3. 7バリデーションについて：ペプチドマップは①望ましいタンパク質製品の特性解析②遺伝的安定性の評価③製品の安定性の評価④タンパク質製品の各ロットの同定④製品の安定性評価のような様々なタンパク質の同定の目的に用いられる。バリデーションの範囲、バリデーションの操作法、各ペプチドマップの方法は意図した分析目的に応じて適正化すべきである。バリデーションは製品産生の異なった段階における異なった分析目的あるいはロットの施設内同定試験あるいは局方の方法のような分析法を発展させる目的に従っても変わりうる。バリデーションにおけるこの項目はペプチドマップのバリデーションにおける全ての面を含むことを意図している。しかしながら、適応するバリデーションの範囲は与えられた分析目的あるいは状況において変わりうる。これにより我々読者が不必要な混乱を引き起こされる可能性がある。JPの枠組みのなかでペプチドマップは問題となる製品のロットの同定試験として用いられる。しかしながら、バリデーションの項目は承認申請に必要な製品の開発段階における遺伝的安定性及び望ましい製品の厳密な同定試験にペプチドマップの使用を

適応する場合技術的な要求される事項について主に記載されている。我々はこの点に関し大変危惧している。なぜなら日本においてJPの声明は法律的に拘束されたものとみなされ、JPのユーザーは本文書における記載を同定試験に要求されるものとして解釈しうる。次のコメントから理解できるように、ユーザーに対し誤解を生むと共に混乱させることになる。

一般的にJPのモノグラフの観点から個々の一般的な試験モノグラフにおいて“バリデーション”に関する詳細な記載は必要としない。この点は“日本薬局方技術情報”と呼ばれる出版物においても扱われるべきことがらである。なお、“日本薬局方技術情報”は法律的に拘束力はなくJPのユーザーに対しさらなる技術情報を提供することのみを意図している。また、この項目において要求されている記載と“分析操作法のバリデーション”のICH文書において要求されている記載では一致していない箇所が幾つかある。例えば、“再現性”の意味はこの項目とICH文書では異なる。ICH文書において“再現性”は施設間における試験により評価すべきであると規定されている。しかしながら、現在の記載ではこの言葉はもっと一般的に用いられる意味として用いられている。これにより読者が困惑することになる。

JPは“バリデーション”においてこの項目を含まない。我々はこの項目をEPも同様に含まないことを承知している。一方、USPはこの項目をUSP版に対して特異的なものとして残してもかまわない。しかしながら、その場合新タンパク性医薬品の承認申請においてFDAの審査官はJPのユー

ザーを含む申請者が USP ペプチドマップの項目を参照することを提案するかもしれない。そういうことになれば我々のユーザーに不都合が生じ、調和による利益はないと感じるようになるかもしれない。従って、我々は現在の“バリデーション”の項目に関する記載はこの調和において障害になると考えている。従って、我々は調和文書からこの項目を除去したほうがよいと考えている。

あるいは記載が改定され、テキストに記載の推奨/要求される事項が受入可能となり、与えられた分析目的あるいは状況に対し適応できるようになるかもしれない。

JP は“バリデーション”におけるこの項目を含まないけれども参考のため JP 小委員会及び JP ユーザーからのコメントを以下に記載する。

バリデーションの重要な因子における以下の記載について：“マップ受入の判定基準には検出限界、特異性、直線性、範囲、真度、精度、試薬の安定性が含まれる。”本記載が適切であるかどうかはペプチドマップの意図する目的及び使う状況に依存していると我々は考えている。局方のモノグラフにおいて我々はペプチドマップを定量的な解析ではない出荷ロットの同定試験として使用する。我々はそのような目的にペプチドマップを使用する場合において検出限界、特異性、直線性、範囲、真度、精度、試薬の安定性はさほど重要な因子ではないと考えている。我々は特異性に関してはペプチドマップ受入において最も重要な判定基準であると考えている。ところで我々はペプチドマップの真度をどのように決めるのかについて知りたい。

バリデーションの重要な因子における以下の記載について：“ペプチドマップの再現性は同定の試験としてマップを用いるような場合、遺伝的安定性を確認する場合において重要な因子である。”ICH 文書において再現性は施設間試験により評価されると規定されている。この意味において我々はそのような再現性の概念が遺伝的安定性の確認に適応できるとは考えていない。一方、複数の異なった会社から製造される特異的なタンパク質製品において局方のモノグラフの同定試験としてペプチドマップを標準化するには提案された分析法の施設間試験による評価は非常に重要である。現在のテキストで用いられている“再現性”という言葉が ICH 文書より一般的な意味を含む場合、我々はマップの再現性は遺伝的安定性を確認する上で重要であると考え。しかし、この場合定量的な分析の観点におけるマップの再現性は同定の試験に必須とは考えない。また、テキストの“同定試験”という言葉の意味が曖昧である。

バリデーションの重要な因子における以下の記載について：“他の重要な問題はペプチドの回収率、そのピーク面積測定における影響、再現性、その許容判定基準の確立である。回収率の判定基準は消化からクロマトグラフィーの条件に至る試験法の全ての面で取り扱われる。ペプチドの回収率の測定として定量的なアミノ酸分析、スパイク添加、ラジオラベリング、UV の総和があげられる。全体として約 80% の回収率は充分と考えられる。各ペプチドの回収率はより不確かでありケースバイケースで取り扱われる。” “全体として約 80% の回収率は充分と考えられる。”との記載の理論

的根拠は何か。この行は80%以下の回収率は不十分であるような印象を与える。全体の回収率は不確かでありケースバイケースで取り扱われる。少なくとも我々は回収率試験が局方のモノグラフにおける同定試験としてペプチドマップにおいて必須とは考えていない。従って、最後の行を除いた段落はモノグラフに必要ではない。

バリデーションの重要な因子において記載の各“重要な因子”について：局方のモノグラフの同定試験としてのペプチドマップにおいて、ここに記載のいくつかの重要な因子は詳細すぎるためその全てを受け入れることは困難である。これらの因子は局方の文書で明確に取り扱うべきものではなく各製造業者による適切な運用に任されるべきである。

2. 4. ペプチドの分析と同定の“必要とされる事項”について：1) JPのモノグラフにおいて“必要とされる事項”は法律的に拘束されるので、そのタイトルを“バリデーションにおける特性”に変更することを提案する。2) 本項の記載はペプチドマップの全てのケースに適用できるかどうか明確ではない。

2. 4. ペプチドの分析と同定“必要とされる事項”精度、室間精度における許容できる精度が見られる条件に関する記載で相対ピーク面積の恒常性だけでなく“ピーク高さの恒常性”についても付け加えること。同様に本項目に記載されている“ピーク面積”を“ピーク面積あるいは高さ”に書き換えること。

2. 4. ペプチドの分析と同定“必要とされる事項”精度、室間精度における許容できる精度が見られる条件に関する記載で

“ピークの保持時間の平均的変動を選択した内標準ピークと比較する”とあるがその意義は何か説明すること。また、“ピークの保持時間の平均的変動が選択した内標準ピークより小さい”とあるがその理由を説明すること。

2. 4. ペプチドの分析と同定“必要とされる事項”精度、室間精度に記載の“再現性”の定義がICHガイドラインと一致していない。しかしながら、少なくとも室間再現性に関するデータはマーケティングにおける許認可書類の一部とはならないことを明確にすべきである。室間再現性は局方におけるペプチドマップ操作のある特定の場合の標準化において考慮しうる。

2. 4. ペプチドの分析と同定“必要とされる事項”精度、室間精度で“ペプチドマップの再現性を異なるメーカーからの酵素並びにカラム、同じメーカーからの異なるロットの酵素並びにカラムを用いて行う”などの記載があるが、多くの場合これらの変動における効果を評価することは実用的ではない。従って、問題となるペプチドマップの分析目的が適切な分析手法により行われると共に標準品あるいは標準物質を用いて行われる限り実用的なアプローチをより奨励すべきである。そのような変動の評価はペプチドマップのバリデーションの一部となりうるが、それ自身は主な目的ではない。

2. 4. ペプチドの分析と同定“必要とされる事項”精度、室間精度で“相対ピーク面積は内標準ピークのピーク面積の比として表される”とあるが“ピーク面積”に“ピーク高さ”を加えると共に以下の記載を付け加える。“あるいは個々のピークの合

計に対するピーク面積あるいは高さの比として表される。”

2. 4. ペプチドの分析と同定“必要とされる事項”頑健性“”再現性“。”頑健性“”再現性“というタイトルで記載された内容は必要とされる事項ではなく再現性のある一定の結果が出せるペプチドマップ分析操作並びに系を改良する際手助けになる単なる考慮あるいは注意すべき点である。異なるロットの切断剤、異なるロットのカラム、異なる製造業者からのカラムの使用における再現性及び頑健性の評価はマーケティングにおける許認可書類あるいは局方のモノグラフとは必ずしもならない。場合によってはそのような変動を用いて再現性及び頑強性を評価することは実用的ではない。また、多くの場合そのような変動を用いることにより再現性及び頑強性を保障することは不可能である。それを望んでも、結局それらは変わり得るし元のものとは製造が中止され入手できなくなる。従って、問題となるペプチドマップの目的が適切な分析手法により行われると共に標準品あるいは標準物質を用いて行われる限り実用的なアプローチが通常の出荷ロットの試験においてより奨励すべきである。

バリデーション、必要とされる事項、頑健性、カラムにおいて“頑健性の観点でカラムの全体における寿命を評価するために、異なったカラムでペプチドマップ試験を行い、注入の回数（例えば10～250回）著しく変える”とある。例であったとしても250回は多すぎるので、この例は削除してほしい。

5. 第5版のドラフトについて

2000年7月28日付けで USP より第5版が送付された。EP 及びJP が問題にしていた点はかなりの部分改定されたが、依然残されている点もあった。なお本文の構成は第3版と変化がなかった。以下に USP からの手紙の中で JP が依然問題としている点を記載した。

第5版に添付された USP からの手紙の主な内容（JP が問題としている点）

1. 目的と適応範囲における以下の記載は調和文書において適切ではないとする主張について：“バリデーションに関する記載は規制過程の初期の段階における方法に関する適格性と規制過程の後期における十分なバリデーションの違いについて示した。記載したバリデーションの概念は局方のバリデーションガイドライン及び分析法バリデーションの ICH 文書と一致している。”承認申請の各段階について述べている段落は U.S に特異的であるので、問題となる段落は JP 版では含まないことを提案する。EP はすでにこの段落は EP のテキストでは含まないことを示している。

“2. 3. 7 バリデーションにおける“ピークレスポンス”とは“ピーク面積”“ピークの高さ”あるいはその両方のどちらを意味するのか。“について：本項に以下のように定義されている。”クロマトグラフィーのパラメーター（例、ピークとピークの分離度、最大ピーク幅、テーリングファクター、カラム効率）がペプチドの分離の規定に用いられる。”

2. 3. 7 バリデーションの削除要求に

ついて：我々はバリデーションの項目は JP あるいは EP の文書に含まれないということを理解している。EP の要求でバリデーションの項目を文書の最後に入れた。従って、JP あるいは EP は文書からそれを除くか、除いて局方の他の部分に再び入れることが可能である。USP の章は情報に関するものなので、我々はバリデーションの段落をそのままにする。EP と JP はペプチドマップの一般的な章にバリデーションの項目を含まないので、第 5 版の本文においてこの項目は USP で含む。もちろん、我々はこの項目に関する JP のコメントを検討し適切に変える意思はある。

第 5 版に対し JP は 2000 年 12 月 20 日付けでコメントを送付した。以下にその主な内容を示す。

第 5 版に対する JP の主なコメント

我々は重要な点に関しては USPEPJP の間で少なくとも同じであるべきであると考えている。しかしながら、EP と JP が含むことに同意しない幾つかの項目を USP は含むことを提案している。調和文書がこのような状況で進むと、日本の製造業者から US の規制当局、FDA あるいは EC の国に新タンパク質性医薬品の承認申請がなされた場合、調和の概念の不一致により混乱が起きる可能性がある。そのような場合申請者は困惑すると共に不都合が生じ調和から恩恵を受けるものがないと信じるようになる。ステージ 5A に進む前に以下に示す我々のコメントを考慮に入れて頂くことを希望する。

主要なコメント

1. 目的と適応範囲における以下の記載について削除する。その理由は第 3 版についてのコメントに記載した通りである。“バリデーションに関する記載は規制過程の初期の段階における方法に関する適格性と規制過程の後期における十分なバリデーションの違いについて示した。”

バリデーションの項目を削除する。その理由は第 3 版についてのコメントに記載した通りである。この項目を削除することが困難な場合は我々が合意できるようなより適した型に書き改める。その場合第 3 版についてのコメントを参照すること。

他のコメント

“2. 3. 7 バリデーションにおける“ピークレスポンス”とは“ピーク面積”“ピークの高さ”あるいはその両方のどちらを意味するのか。“に対する回答について。手紙から推察すると”ピークレスポンス“は”ピーク幅“を意味すると理解している。”ピーク幅“は”ピーク面積“を意味するか。

6. 第 6 版のドラフトについて

JP の本コメントに対し 2002 年 2 月 22 日付けで USP からの第 6 版と共に手紙が送付された。以下にその手紙の内容を記すが、若干の改定はなされたものの本質的な問題点については意見の一致に至らなかった。

第 5 版に対する JP のコメントに対する USP からの回答

1 目的と適応範囲における以下の記載についての削除の要望について：“バリデーションに関する記載は規制過程の初期の段階における方法に関する適格性と規制過程の

後期における十分なバリデーションの違いについて示した。”バリデーションに関連する本記載は JP の要望により削除し、バリデーションの項目に入れる。

バリデーションの項目は全体的な調和文書から削除し、追加の項目として入れる。JP は追加の項目を入れることを望むかどうか。

“2.3.7 バリデーションにおける“ピークレスポンス”の意味するところについて：

先の手紙（2000年7月28日付け）で“ピークレスポンス”を規定しようとした。“ピークレスポンス”とは“ピーク幅”を意味するだけではない。ピークレスポンスはクロマトグラフィーのパラメーター（例、ピークとピークの分離度、最大ピーク幅、テーリングファクター、カラム効率）により規定されるもので、ペプチドの分離を規定するために用いられる。記載したクロマトグラフのパラメーターに加え、本文に“ピーク面積”を付け加える。

第6版に対し JP は2002年5月2日付けで USP に対しコメントを送付した。以下にその主な内容を示す。

第6版に対する JP の主なコメント

我々の専門家はドラフトについて依然いくつかの問題点がある。特に EP と JP が入れることに同意していない“バリデーションの項目”である。新しいドラフトにおいては“バリデーションの項目”は単に追加の項目に移動されただけである。我々の専門家は追加においても“バリデーションの項目”を入れることに同意できない。20

00年10月20日付けの記載したこの項目についての過去のコメントを参照していただきたい。この問題が解決されなければ調和文書の次の段階に進ませることは難しいと考えている。“バリデーションの項目”は調和文書から削除すべきであることを再度提案したい。

これに対し2002年6月28日付けで USP から手紙が送付された。

第5版に対する JP のコメントに対する USP の返事

追加の項目におけるバリデーションに関する問題は十分に解決可能である。調和の文書には追加の項目を含まない。発行する際 USP では付録は調和されていないという注釈を付けて追加の項目を入れる。EP は望みにより発行する際追加の項目を入れるかどうか決めることができる。USP は追加の項目におけるバリデーションに関する情報が分析者の手助けになることを信じている。

JP はこの記載について検討を行い、USP の主張を受け入れることを決めた。また、第6版について最終的に詳細な点も含めて再度見直し、2002年8月29日付けで以下のコメントを送付した。

第6版に対する JP のコメント

表1 切断剤の例において“Peptidyl-Asp metallo endoproteinase”の後に“Endoproteinase Asp-N”を入れること。また、その IUBMB 酵素名称(EC 3.24.33)を入れること。“clostripain”の IUBMB 酵素

名称は(EC 3.4.28.8)ではなく(EC 3.4.228)である。

2002年2月22日付けの手紙における“ピークレスポンス”という言葉の解釈が困難である。“ピークレスポンス”と“ピーク面積あるいはピーク高さ”において実際上の違いはあるのか。もし違いがないなら“ピークレスポンス”を“ピーク面積あるいはピーク高さ”を意味する日本語に翻訳する。

7. 第7版のドラフトについて

なおこれらのコメントは USP により了承され、三極で合意された第7版のドラフトは調和文書としてStage5Bの段階に至った。なお、この調和文書は日本薬局方フォーラムに掲載されたが、その日本語訳を参考資料として添付した。本調和文書の日本語版は日本薬局方フォーラムに近々掲載予定であり、さらに日本薬局方へ参考情報として掲載されることになっている。

D. 考察

ペプチドマップ法は長年の意見交換の後合意が得られ現在Stage5Bの段階まで調和が進んだ。問題となった主な点はペプチドマップを調和文書の中でどうとらえるかであった。EP及びJPはあくまでも標準品あるいは標準物質と製品を比較することにより、1次構造の確認試験としてとらえ一般的な必要最小限の内容のみ掲載しようとした。その理由はペプチドマップといってもそのシステム適格性及びバリデーションにおいて適応可能な範囲は個別に異なり、調和文書は局方に掲載された場合法的に拘束力を持つことから、一律に詳細な規制を設

けることにより問題が生じることを危惧したからである。従って、各極により運用できる範囲を残し、ケースバイケースで合理的かつ弾力的な対応を求めるほうがより適切と考えた。しかしながら、USPの考え方は両極と異なり、ペプチドマップの適応範囲について開発段階の製品及び遺伝的安定性を含め広げることを目指した。また、システム適格性及びバリデーションにおいても各項目に詳細な基準を設けた。全体的な記載も USP に準拠するような型であった。特に詳細な基準を設けてその縛りにより製品の品質を確保するという USP の考えは本ペプチドマップに限らずこれまでにいろいろな局面で共通するものであった。EP及びJPはこれら USP の主張は受け入れがたいものであり、度重なる意見交換の後削除あるいは改定され、より調和文書としてより望ましいものになった。今後他の試験法においても粘り強い率直的な意見交換を通じ、より望ましい国際調和案が作成されることを希望する。

E. 研究成果

- [1] Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Sumiko Hyuga, Masashi HYUGA, and Takao HAYAKAWA : Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 235-244 (2002)
- [2] Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA: : Usefulness of sugar

- mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, 30, 113-123 (2002)
- [3] Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, and Takao HAYAKAWA: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 968, 89-100 (2002)
- [4] 日米欧三薬局方調和合意文書 (8) Peptide Mapping 日本薬局方フォーラム 11,578-583 (2002)
- [5] Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITO and Takao HAYAKAWA: Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Methods Molecular Biology* (in press)
- [6] Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Masaaki NAOTSUKA, Sumiaki OHBA, Akira YOKOZAWA, Tomoyo MURATA and Takao HAYAKAWA, Establishment of a Standard Assay Method for Human Thrombomodulin and Determination of the Activity of the Japanese Reference Standard, *Biologicals*, 30, 69-76 (2002)
- [7] 早川堯夫、山口照英、押沢 正：日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 ―ウイルス安全性確保の基本要件―、*医薬品研究*, 33, 210-230 (2002)
- [8] 早川堯夫、石井（渡部）明子：生物薬品の開発の現状とトランスレーションリサーチへの条件、*医学のあゆみ*, 200, 539-543 (2002)
- [9] 早川堯夫、石井（渡部）明子：先端的生物学的開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題、*医薬品研究*, 33, 693-729 (2002)
- [10] Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA and Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked Oligosaccharides in a Glycoprotein by Nanospray Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, (In press)
- [11] 太田美矢子、川崎ナナ、伊藤さつき、早川堯夫：糖鎖含有タンパク質製剤の評価試験法に関する研究 (IV) ―エリスロポエチン製剤 その4、*Bull. Natl. Inst. Health Sci.* (in Japanese), 120, 89-97(2002)
- [12] Takao HAYAKAWA: Regulating biotechnology products. -Comparability of biotechnology products and cell substrates. *10th International conference of drug regulatory authorities (ICDRA)*, Hong Kong

2002, WHO, pp. 65-67 (2002)

- [13] 日米欧三薬局方調和合意文書 ペプ
チドマップ法 日本薬局方フォーラ
ム (in press) (2003)