

生労働科学研究「日本薬局方「製薬用水」の在り方に関する研究」（主任研究者：棚元憲一国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長）が行われた。

研究班では、下記の観点で日局の製薬用水に関する諸規定の見直し作業が進められた。

- ①日米欧3薬局方の製薬用水の区分、規格及び試験方法ならびに規格値を比較し、国際調和の観点から、日局の製薬用水の各条のあるべき姿を提言する。
- ②「超ろ過法」により製した製薬用水の規格について提言する。
- ③日局参考情報に「製薬用水の製造管理と品質管理」に関する規定を導入するよう提言を行うため、そのドラフトを作成する。
- ④国内製薬企業に対して製薬用水の製造管理および品質管理に関する現状調査を行い、調査結果を製薬用水各条の規格及び試験方法ならびに規格値を見直すベースとするとともに、国際調和に反映させる。

棚元班の報告書¹⁾には、日局参考情報に導入すべき「製薬用水の製造管理と品質管理」の規定の案とともに、日局の製薬用水各条および関連試験法の改正の方向が提示された。

3. 日本薬局方調査会製薬用水委員会の発足と参考情報収載案ならびに各条改正案の審議
棚元班の報告を承けて、平成15年10月、日本薬局方調査会に製薬用水委員会が設けられ、以後、参考情報に製薬用水の管理に関する規定を設けるとともに、医薬品各条の水の規格を見直す作業が進められてきた。

3-1. 日局15での参考情報「製薬用水の品質管理」の新収載

その結果、第15改正日本薬局方（日局15）において、参考情報に「製薬用水の品質管理」に関する規定が新しく収載されるとともに、水の各条についても一部改正が行われる見込みとなっている。

3-1-1. 参考情報案「製薬用水の品質管理」の抜粋

製薬用水の種類

③注射用水

「注射用水」の規格は、日本薬局方医薬品各条に収載されている。注射用水は、原水として常水又は精製水を用い、蒸留、逆浸透、分子量6000以上の物質を除去できる限外ろ過又はこれらの組合せによる処理を経て、最終的に蒸留法、又は長期間にわたるバリデーションと綿密な日常管理により、蒸留法により製した水と同等の品質が恒常的に実現できることを保証された超ろ過法により製造する。注射用水には微生物の発育を阻止する成分が含まれていないので、微生物及びエンドトキシンに関する厳密な管理が必要である。エンドトキシンについては規格値として0.25EU/mL未満であることが要求される。

3-1-2. 各条「注射用水」改正案

基原の項と純度試験の「ただし、…」以下の(8)項が次のように改められた。下線を付したところが超ろ過により製した水に関連する記載である。

(基原)

本品は、常水又は「精製水」の蒸留、又は「精製水」の超ろ過（逆浸透膜、限外ろ過膜又はこれらの膜を組み合わせた製造システム）により製して注射剤の調製に用いるもの、又はこれを容器に入れて滅菌したものである。

本品を超ろ過法により製する場合、微生物による製造システムの汚染に特に注意し、蒸留により製したものと同等の品質をもつ必要がある。

本品を注射剤の調製に用いる場合、製造後、速やかに用いる。ただし、汚染を避け、かつ微生物の増殖が抑制されるシステムが構築されている場合、一定時間（期間）保存することができる。

本品を容器に入れて滅菌したものは、主として用時溶解又は懸濁して用いる注射剤の溶解剤に用いる。

本品を蒸留法により製した場合、その容器入り滅菌製品に対しては、別名として注射用蒸留水と表示することができる。

(純度試験)

「ただし、…」以下の(8)有機体炭素 試験を行うとき、有機体炭素は0.50 mg/L以下である。ただし、本試験は、超ろ過法により製して注射剤の調製に用いるものに適用する。

3-2. 膜法により製した水の扱いを巡る意見の

相違

上記の作業を行う上での課題の一つに、超ろ過法（膜法）により製した水の扱い（注射用水として認めるかどうか）がある。日局では、第12改正日本薬局方（日局12）から、膜法による水も注射用水として認める方針を採っているが、欧州薬局方（EP）は蒸留法による水のみを注射用水として認める方針である。一方、USPは蒸留法による水、あるいはそれと同等の品質をもつ水を注射用水として認めるとしている。このように、膜法による水の扱いについては、3薬局方間で大きな違いがあるのが現状である。

これは、国内においても、膜法で製した水については微生物汚染の可能性について懸念があるとする意見が聞かれるように、膜法による水への信頼性が確立されていないことによるものと考えられる。

製薬用水委員会では、製剤総則 17. 注射剤の項の(2)にある「超ろ過で製した注射用水は、あらかじめ加熱により滅菌して用いる。ただし、本剤及び本剤に添付する溶剤を加熱法により滅菌する場合は、この限りではない。」との記載については、超ろ過で製した水のみを対象にこうした要求を行うのは、超ろ過により製した水を注射用水として用いてもよいとする方針と矛盾するのではないかと、また、「あらかじめ加熱」は「滅菌」と同義ではなく、注射用水の製造後に菌の増殖を抑えるための 80℃以上での加熱循環を意味するのではないかと、その意味でこの記載自体にも矛盾があるなどの点を指摘して、製剤委員会に再検討を依頼しているところである。

しかしながら、超ろ過により製した水には、加熱操作が加えられておらず、微生物汚染の可能性がないとは言えないので、この規定を削除するには躊躇せざるを得ないとの意見があり、日局 15 の段階ではこの記載の削除あるいは変更は行われないこととなった。

これまでのように、日局に製薬用水の管理に関する規定がなかった状態では、こうした矛盾する規定も杜撰な管理の水を注射剤の製造に使わせないためのガードとなってきた側面があったと思われるが、日局15で新しく参考情報に収載される予定の「製薬用水の品質管理」には、3-1-1項で示したように、「注射用水は、・・・最終的に蒸留法、または長期間にわたるバリデーションと綿密な日常管理により、蒸留法により製した水と同等の品質が恒常

的に実現できることを保証された超ろ過法によって製造する。」との規定が設けられることになっており、製薬用水の製造管理と品質管理がこの参考情報ならびにGMP関連通知に基づいてきちんと行われるようになれば、こうした矛盾した規定を残す必要はなくなるものと思われる。

4. 「膜法により製した水の信頼性に関する検討」（小嶋班）

4-1. 研究班の発足と検討のポイント

こうした現状に鑑み、本研究においては、平成16-17年度の2年計画で、わが国における膜法による製薬用水製造システムの長期にわたる運用の実績をとりまとめて評価すること、ならびに製薬用水の製造に用いられる膜が蒸留法により製した水と同等の品質をもつ水を長期にわたって製造するのに適した性能を持つことを示す情報を集めることなどにより、膜法による水への信頼性の確立を目指す。

1-1-1項で述べたように、膜法は蒸留法と比較してエネルギー消費量が低い優れた水の精製方法であるが、注射用水の製法に関しては日米欧3薬局方で考え方が異なっており、膜法により製した水を注射剤の仕込み水に使用することを直接的に認めているのは日局のみである。

製薬業界で実際の使用状況について調査した結果によれば、米国においては膜法で製した水を注射用水に使用している企業はない。

一方、日本国内では、製薬用水を多量に使用する大手血液製剤メーカー2社が膜法により製した水を注射剤の仕込み水に使用していることが分かっているが、その2社の運用実績に関してはまったく問題がないと判断できる状況である。

前記2社以外の製薬会社が膜法により製した水を注射剤の仕込み水に採用してこなかったのは、膜の堅牢性に対する不安が大きいためと思われる。しかしながら、前記2社において、限外ろ過膜あるいは逆浸透膜を用いた製薬用水製造システムはまったく問題なく長期間にわたり運用されているので、これら2社を含む数社の製薬用水製造システムの長期にわたる運用実績ならびに管理手法を精査することにより、多くの情報が得られるものと考えられる。

また、膜メーカーが膜モジュールの製造管理をどのように行って、製薬用水の製造に用いら

れる膜モジュールが要求される品質の水を長期にわたって供給できる性能を持つことを保証しているかを示すことも重要である。

関連事項として、従来、超ろ過という名称で逆浸透膜処理と限外ろ過膜処理を一括して表現してきたが、両者の違いを考慮すると、逆浸透膜処理と限外ろ過膜処理とを区別した形で記載していくように改めることも必要である。

4-2. 平成17年度に訪問調査を行うためのプロトコルの概略

1. 訪問調査対象企業

- a. 以前の厚生科学研究（佐々木班）のアンケートに回答してもらった企業
- b. なるべく長期間運転している企業
- c. 超ろ過法により製した水を仕込み水に使用している企業と最終リンス水に使用している企業

の中から選ぶ。

- d. 回答者の所属（希望）
 - i. 品質管理、運転管理、製造
- e. 訪問者
 - i. 訪問先別に別途検討

2. 準備する内容

- a. 訪問調査依頼文
- b. 訪問するとき準備を依頼する内容
 - i. 一般情報
 - 1) 生産している製品と製薬用水の使用目的
 - 2) 製品の出荷先（国内のみか、輸出もしているか？）
 - ii. 装置情報
 - 1) 装置メーカー
 - 2) システムフロー（原水～超ろ過法）：ブロックフロー
 - 3) 超ろ過装置のエンジニアリングフロー
 - 4) 使用膜銘柄・本数（型式、スペック）
 - 5) 装置使用期間
 - iii. 運転情報
 - 1) 運転データ（採水量、温度、運転圧力）
 - 2) 稼働時間・稼働率
 - 3) 非稼働時の管理方法
 - 4) 殺菌（洗浄）方法・頻度

- 5) 膜健全性チェック方法・頻度
- 6) 膜交換頻度・交換基準（指標）
- 7) 膜の解析データ

iv. 水質情報

- 1) 超ろ過装置の供給・処理水・ユースポイントの水質管理項目・基準値・測定方法／頻度
- 2) 超ろ過装置の供給・処理水の水質データ（長期、数年間あると良い）

v. その他

- 1) 査察経験（FDA、EU等）の有無
- 2) 超ろ過膜購入時・設置時の受け入れ品質確認方法
- 3) 現場見学

D. 結論

日本薬局方調査会の製薬用水委員会で製薬用水に関する諸規定を整備する作業を行う上での課題の一つに、膜法により製した水の扱いがある。

この点に関しては、日米欧3薬局方で考え方が異なっており、膜法により製した水を注射剤の仕込み水に使用することを直接的に認めているのは日局のみである。しかしながら、国内においても膜法により製した水については微生物汚染の可能性について懸念があるとする意見がかなりある。

このように、日局12において膜法により製した水を注射用水に用いることが許容されて以来、既に20年が経とうとしているにもかかわらず、膜法による水への信頼性は確立されたとはいえない状況にある。

こうした現状に鑑み、本研究においては、平成16-17年度の2年計画で、わが国における膜法による製薬用水製造システムの長期にわたる運用の実績をとりまとめて評価すること、ならびに製薬用水の製造に用いられる膜が蒸留法により製した水と同等の品質をもつ水を長期にわたって製造するのに適した性能を持つことを示す情報を集めることなどにより、膜法による水への信頼性の確立を目指す。

E. 参考資料

- 1) 平成14年度厚生労働科学研究「日本薬局方「製薬用水」の在り方に関する研究」（主任研究者：棚元憲一国立医薬品食品衛生研究所）

- 食品添加物部長) 報告書, 2002.
- 2) 昭和58-60年度厚生科学研究「高分子膜分離の方法による注射用原料水の製造について」(主任研究者: 鈴木郁生国立衛生試験所所長) 報告書, 高分子膜分離技術振興協会(現膜分離技術振興協会), 東京医薬品工業協会, 大阪医薬品協会, 国立衛生試験所編, 1987.
- 3) 厚生省薬務局監視指導課監修: GMPテクニカルレポート4 注射用水の製造に関するバリデーション, 薬業時報, 1988.

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

生物医薬品の試験法及び各条規格の改正と国際調和に関する研究

－ウリナスタチン注射用製剤の品質評価法－

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 掛樋 一晃 近畿大学薬学部医薬品情報学研究室教授

研究要旨

生物由来医薬品、特にペプチド或いはタンパク質性医薬品の場合、その成分が不安定であることならびに、高度に精製して医薬品として利用するという特徴から、製造方法の妥当性を検証し、かつ医薬品の恒常性を図るために必要な試験法・評価法の開発が必要となる。特に生物由来医薬品中の成分が糖タンパク質である場合、糖鎖に基づく不均一性を生じるとともに、糖鎖が医薬品のクリアランスや活性発現に重要な役割を担っている場合が多く、糖鎖を含めた形での糖タンパク質の評価は糖タンパク質性医薬品の品質評価において不可欠である。このような背景のもと、生物由来医薬品の試験に適したキャピラリー電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などのいくつかの試験法が日本薬局方フォーラムに収載された。

本研究では生物由来の糖タンパク質性医薬品の評価法について、ヒト尿より抽出、精製される糖タンパク質であるウリナスタチンの注射用製剤を材料に、その品質評価法について、日本薬局方収載の試験方法ならびにキャピラリー電気泳動法をはじめとする各種電気泳動法の適用について検討した。

A. 研究目的

1983年に遺伝子組換え医薬品として世界で初めてヒトインスリンが米国で認可され、引き続き1985年にヒト成長ホルモンが承認された。それまでヒトや動物組織から抽出・精製されていたこれらのホルモン性医薬品はバイオテクノロジーの目覚ましい進歩により、大量生産が可能となり、その後もエリスロポエチンやインターフェロン、現在では種々の疾患に関わる標的分子に特異的に作用する抗体医薬品がバイオ医薬品のフロンティアとして市場を賑わ

している。

生物医薬品の研究開発及び製品化における重要事項として、品質、安全性及び有効性に関する適切な試験方法や評価方法を開発することであり、製造技術の開発と並んで試験法・評価法を開発し、評価方法に関する適切な指針を提示する必要がある。また医薬品開発段階で明らかとなった物理的な特性と品質面での解析結果を、製造ロット毎の品質評価試験にも反映させることのできる方法により試験を行い、定められた規格との適合性を評価しなけれ

ばならない。

以上のような背景のもと、我々は急性膵炎、慢性再発膵炎及び急性循環不全の治療薬であるウリナスタチンを材料に用い、タンパク質の分離に基づく分析手段により、糖タンパク質性医薬品の品質評価を行う方法についての検討に着手した。

ウリナスタチンは生物由来医薬品に該当し、日本薬局方においてはその物理化学的及び生化学的性質が詳細に規定されている。しかしながら近年の急速に進歩した分析法による検討がなされた報告は少ない。特にウリナスタチンを構造面から見た場合、コアタンパク質はアミノ酸 143 個の単一のペプチドからなり、分子内にアストラパラギン結合型糖鎖とコンドロイチン硫酸鎖を有する糖含量の高い糖タンパク質であるため、種々のクロマトグラフィーを用いる方法では、分子量など物理化学的性質を評価結果に反映させることは難しいと考えられる。

そこで、我々は日本薬局方収載の試験方法について再検討を行うとともに電気泳動を中心とする分析法により、ウリナスタチン注射用製剤の物理化学的性状の評価ならびに製造元の異なる 2 種のウリナスタチン製剤を比較した。

B. 研究方法

【実験材料】ウリナスタチン注射用製剤(製品 A および製品 B、50,000 単位/アンプル)は市販品を使用した。各製剤のアンプルより 1mL(50,000 単位)を採取し、蒸留水に対し 2 日間透析後、凍結乾燥して使用した。両製剤ともに、各製剤のアンプル 1 mL から約 20 mg の糖タンパク質が得られた。

【ウリナスタチンのグリコシダーゼ消化】ウリナスタチン凍結乾燥品(1 mg)を 20 mM トリス・塩酸緩衝液(pH 8.0, 50 μ L)に溶解し、コンドロイチナーゼ ABC(100 munits, 2 μ L)を加えて、37 $^{\circ}$ C、12 時間反応させた。コンドロイチナーゼ ABC 消化を行ったウリナスタチン(0.5 mg)の凍結乾燥品を、20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0, 50 μ L)に溶解し、N-グリカナーゼ F(5 units, 5 μ L)を加えて、37 $^{\circ}$ C で 12 時間反応した。

【サイズ排除クロマトグラフィー】ウリナスタチン及びそのグリコシダーゼ消化物をそれぞれ 2.5 mg/mL の濃度になるように水に溶解し分析試料とした。またホスホリラーゼ b(分子量: 97,200)、ウシ血清アルブミン(分子量: 66,200)及びリゾチーム(分子量: 14,400)それぞれ 0.5 mg を、水 1 mL に溶解し、分子量校正用標準溶液とした。HPLC は、送液ポンプに東ソー製 SC-8020 HPLC ポンプ、検出器には UV-8020 型紫外可視検出器(東ソー)を用いた。分離用カラムにはシリカ系サイズ排除型カラム(東ソー製 TSKgel G2000SW, 内径 7.5 mm, 長さ 30 cm)を使用し、0.1 M リン酸緩衝液 - 0.1 M NaCl (pH 6.8) を溶離液として流速 1.0 mL/min で分析を行った。検出は 280 nm における紫外吸収を利用し、各試料溶液および分子量標準品溶液 50 μ L(125 μ g 相当)を分析に用いた。

【SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)はアクリルアミド/ビスアクリルアミド(12 % T/2.6% C 及び 18 % T/2.6% C)ゲルを使用し、ウリナスタチン及びそのグリコシダーゼ消化物をそれぞれ 1 mg/mL に調製し、各試料(5 μ g 及び 10

μg)を直接あるいは 2-メルカプトエタノールにより還元後電気泳動を行い、電気泳動後のゲルは Coomassie Brilliant Blue R250 で染色した。

【質量分析】ウリナスタチン及びそのグリコシダーゼ消化物をそれぞれ分析試料とし、Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)により測定した。装置には Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Framingham, MA)を用い、試料溶液(2 μL)と 2, 5-Dihydroxybenzoic acid (以下 DHB と略す) のメタノール溶液(2 μL)を等量混合し、室温で風乾後ネガティブイオンモードにより測定した。

【セルロースアセテート膜電気泳動】ウリナスタチン 2 μg をセルロースアセテート膜上にスポットし、0.4 M ギ酸-0.1 M ピリジン緩衝液(pH 3.0)を泳動用緩衝液として、0.5 mA/cm で 40 分間泳動した。泳動後、0.1 % Alcian blue 溶液で 10 分間染色し、0.1 % 酢酸溶液で脱色した。

【キャピラリー電気泳動】ウリナスタチン及びそのグリコシダーゼ消化物をそれぞれ試料とし、Beckman 社製 P/ACE2200 型装置を使用しキャピラリー電気泳動法により分析した。分離用キャピラリーとして、フェーズシリカキャピラリー(内径 50 μm, 有効長 40 cm)を使用し、泳動用緩衝液として 50 mM ホウ酸緩衝液(pH 9.3) - 100 mM SDS を用いた。検出は 214 nm における紫外吸収検出を利用した。印加電圧

は 20 kV とし、温度は 25 °C とした。また試料導入は加圧法(0.5 psi)により 10 秒間とした。

C. 結果および考察

生物由来医薬品の試験・評価は、対象となる医薬品の同一性、純度、物理化学的性質の変化を検出/測定することができる各種電気泳動法やクロマトグラフィーなどの理化学的試験法により進められる。しかし評価対象が糖タンパク質である場合、糖鎖の不均一性に基づく複数の分子種を生じることと、タンパク質上の糖鎖の存在が各種理化学的手法による検出及び分子量評価等に影響を与えるため、試験法の設定とその試験法に基づいた規格を定めるには十分な検討を要する。本研究では第 13 改正日本薬局方第二追補で新規収載されたウリナスタチンの評価方法について、医薬品各条に規定されているサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定について再検討を行うとともに、ゲル電気泳動、質量分析法を利用する分子量測定法について検討した。また、キャピラリー電気泳動及びセルロースアセテート膜電気泳動法による同等性評価法についても検討した。

C.1.分子量測定に基づく評価法

サイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定

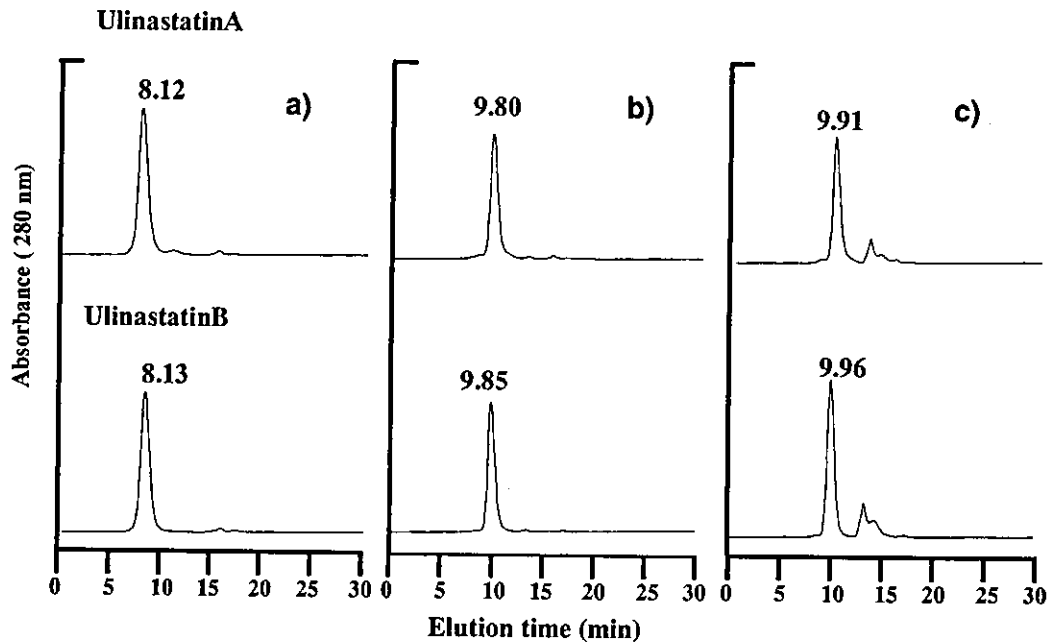


Fig. 1 Size exclusion chromatography of ulinastatin from different commercial preparations.

Analytical conditions: column, TSKgel 2000SW (7.5 mm i.d., 30 cm); eluent, 0.1 M phosphate buffer—0.1 M NaCl (pH 6.8); flow rate, 1 mL/min; detection, UV absorption at 280 nm. Panel a) native ulinastatin, panel b) ulinastatin digested with chondroitinase ABC, panel c) ulinastatin digested with chondroitinase ABC/N-glycanase-F

第14改正日本薬局方、ウリナスタチンの医薬品各条に規定される分子量測定法を参考に、サイズ排除クロマトグラフィーによりウリナスタチンの分子量測定を行った結果をFig.1に示す。Fig.1aに示したように、調べた2製品ともに約8.1分に単一のピークとして観察され、分子量標準品による検量線からその分子量は約70,000と算出され、日本薬局方の規格である分子量62,000~72,000に適合した。次にウリナスタチンをコンドロイチナーゼABCにより処理し、同様に分析した結果、Fig.1bに示すように、コンドロイチン硫酸鎖を除くことにより、低分子化され約9.8分に溶出された。またその分子量は53,000と算出された。さらに、コンドロイチナーゼABCで処理したウリナスタチンをN-グリカナーゼFによりアスパラギン型糖

鎖を切断し同様に分析した。結果をFig.1cに示したが、約9.9分に溶出され、その分子量は約52,000と算出され、原料のウリナスタチン及びそのグリコシダーゼ消化物ともに、溶出時間、算出された分子量ともに両製剤間において差はみられなかった。また両製剤中のウリナスタチンはグリコシダーゼ処理することにより、極めて類似した挙動を示し、分子量は約20,000低下した。これらの結果から、両製剤中のウリナスタチンは同じ分子量ならびに同様の糖鎖を有するものと判断された。

ウリナスタチンは既にタンパク質部分の1次構造が明らかにされており、143個のアミノ酸からなるタンパク質部分の分子量が15,457、糖部分の分子量が約8,500と推定されている。コンドロイチン硫酸鎖

およびアスパラギン型糖鎖の不均一性のために、単一の分子ではないが、ウリナスタチンの理論上の分子量は、平均分子量として約 24,000 とされている。しかし上述の日本薬局方試験法であるサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量測定

12%および18%の両者の分析結果から、30~40kDa 付近に不鮮明かつブロードなバンドとして観察され、ウリナスタチンが極めて不均一性の高い分子であることがわかった。一方、コンドロイチナーゼ ABC 処理したウリナスタチンは 25kDa 付

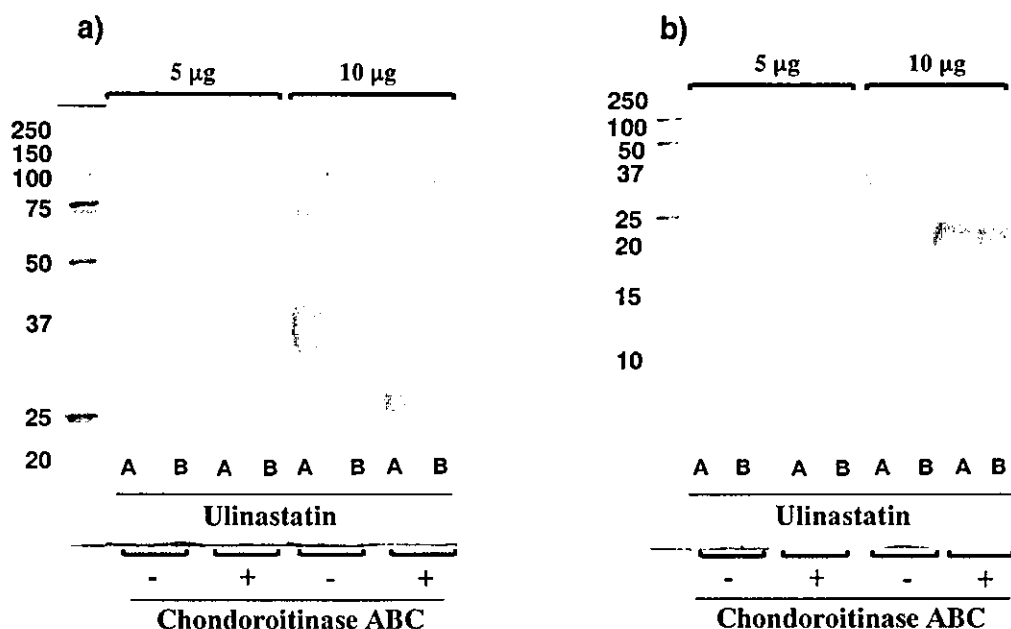


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of ulinastatin from different commercial preparations. Gel concentration is: a) 12% T/2.6% C, b) 18% T/2.6% C.

結果では、ウリナスタチン及びそのグリコシダーゼ消化物ともに、理論値と比較して著しく高分子量として見積もられることがわかった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量測定

先と同試料を用い、SDS-PAGE により分子量測定を行った。SDS-PAGE において使用するゲルとして、ゲル濃度 12%ならびにゲル濃度 18%のものを使用した。結果を Fig.2 に示す。メルカプトエタノールにより還元後分析した結果、ゲル濃度

近に鮮明なバンドを与え、コンドロイチナーゼ ABC 処理前と比較して、明らかに不均一性が低下していることがわかった。ウリナスタチン分子量測定結果におけるサイズ排除クロマトグラフィーと SDS-PAGE における違いは、ウリナスタチン中のコンドロイチン硫酸鎖の高い負電荷と糖鎖による見かけ分子サイズへの影響のためと考えられた。

質量分析による分子量測定

絶対分子量を求めるために、MALDI-TOF MS により両製剤中のウリナ

スタチンを分析した。結果を Fig.3 に示す。いずれの試料も共通して m/z 24,000 にブロードな分子イオン ($M+H$)⁺ が観察され、サイズ排除クロマトグラフィー及び SDS-PAGE による分子量測定法と比較し、

量は測定方法により異なり、特にサイズ排除クロマトグラフィー法では分子量約 70,000 と理論分子量と比べ著しく高分子量に見積もられることがわかった。一方、ウリナスタチンの不均一性の評価につい

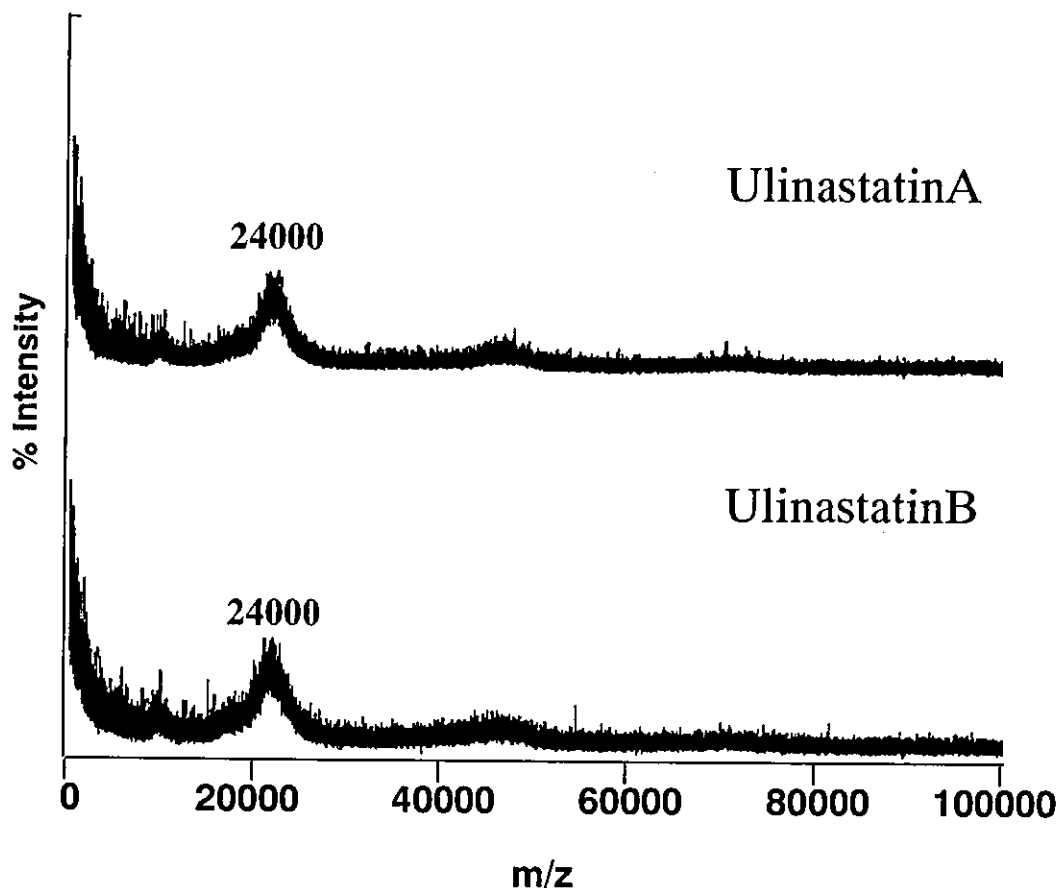


Fig. 3 MALDI-TOF MS analysis of ulinastatin from different commercial preparations
Analytical conditions: apparatus, Voyager DE-PRO (Applied Biosystems); mode of operation, linear mode; mode of polarity, negative ion mode; accelerating voltage, 20 kV; laser intensity, 3200; matrix, 2,5-dihydroxybenzoic acid.

最も理論分子量を反映した結果が得られた。また、 m/z 48,000 に二量体 ($2M+H$)⁺ と考えられるブロードなピークも観察されたが、その詳細について不明であった。

以上 3 種類の分子量測定法の結果、いずれの方法においてもウリナスタチン製剤 A と製剤 B の間で、分子量に大きな差は見られなかった。また、同一試料について観察されるウリナスタチンの分子

では、SDS-PAGE を用いる方法がその物理化学的性質を最もよく反映することがわかった。

以上のように、ウリナスタチンは測定法の違いにより分子量が著しく異なり、特に局方において規定されているサイズ排除クロマトグラフィーを使用する方法が、ウリナスタチンの絶対分子量と著しく異なる点については、今後検討すべき課題で

あると考えられる。

C.2.電気泳動法による同等性評価法 セルロースアセテート膜電気泳動法

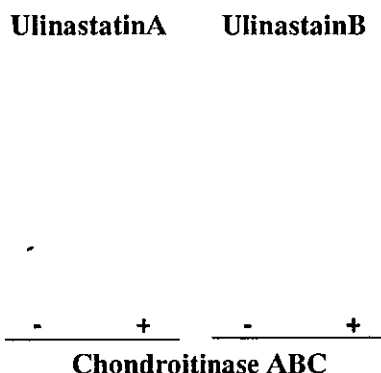


Fig. 4 Cellulose acetate membrane electrophoresis

Analytical conditions: running buffer, 0.1 M pyridine, 0.4M formic acid buffer (pH 3.0); current, 5 mA/10 cm; stain, 0.1 % alcian blue.

ウリナスタチンはグルタミン酸やアスパラギン酸などの酸性アミノ酸を多く含み、かつ糖鎖としてコンドロイチン硫酸様のグリコサミノグリカン鎖(GAG)を含む酸性糖タンパク質である。古くからグリコサミノグリカンやプロテオグリカンなどのポリアニオンの分析法として、セルロースアセテート膜電気泳動により分離し、Alcian blue 或いは Toluidine blue により染色される方法がしばしば用いられる。したがって、ウリナスタチン中のコンドロイチン硫酸鎖を指標とする評価が可能であると考え、セルロースアセテート膜電気泳動法による評価法を検討した。結果を Fig.4 に示す。

セルロースアセテート膜電気泳動の結果、ウリナスタチン製剤 A と製剤 B はともに、原点から約 1 cm 泳動された位置に単一のスポットを与えた。一方、コンドロイチナーゼ ABC 処理を行った各試料につ

いても比較をした結果、スポットは認められず、両製品中のウリナスタチン中のコンドロイチン硫酸鎖が同等であることが示された。また、これらの試料が同じ挙動を示したことから、セルロースアセテート膜電気泳動法は製剤間の品質比較に有用な方法であること、ならびに両製剤中のコンドロイチン硫酸鎖を利用する分析法は同等性評価に有効であることがわかった。

キャピラリー電気泳動法

我々は既に、エリスロポエチンや α 1 酸性糖タンパク質などの酸性糖タンパク質の不均一性評価にキャピラリー電気泳動法が有効であることを報告している。ウリナスタチンには10番目のSerにコンドロイチン硫酸様グリコサミノグリカン鎖ならびに45番目Asnに複合型2本鎖糖鎖の存在が知られており、これらの糖鎖不均一性に基づく、不均一性の高い糖タンパク質分子として存在する。このような理由からも、キャピラリー電気泳動法はウリナスタチンの有力な評価法になりうると考えた。キャピラリーとしてフューズドシリカ素管を用い、泳動用緩衝液として100 mM SDSを含む50 mMホウ酸緩衝液(pH 9.3)を用いて分析した結果をFig.5 に示す。分析の結果、両製剤とも、11分付近にブロードなピークが観察され、ウリナスタチンが高い不均一性を示すことがわかった。一方、両ウリナスタチンをコンドロイチナーゼABCにより処理した結果、2峰性の独特な形状をもつピークが新たに12分付近に観察された。さらに、コンドロイチナーゼABC処理により生成した不飽和糖と考えられるピーク群が5~9分に観察された。以上の結果より、キャピラリー電気泳動を用いる評価法はセルロースアセテート膜電気泳動法と同様にウリナスタチンの同等性評

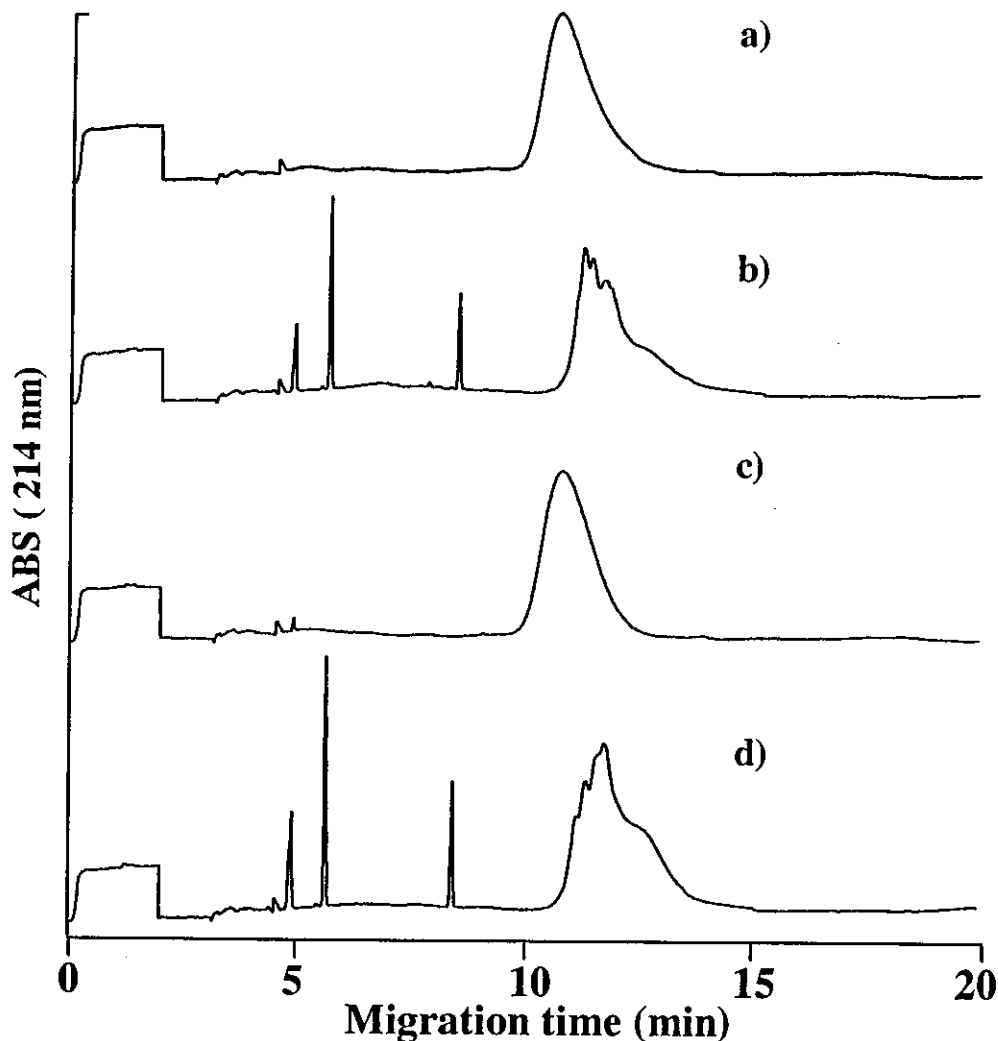


Fig. 5 Capillary electrophoresis of ulinastatin from different commercial preparations Panel a) and c), Ulinastatin A and Ulinastatin B preparation, respectively. Panel b) and d), chondroitinaseABC-treated Ulinastatin A and Ulinastatin B preparation. Analytical conditions: capillary, bare fused silica capillary (50 μm i.d., effective length of 40 cm); running buffer, 50 mM tetraborate (pH 9.3)/100 mM SDS; applied voltage, 20 kV; temperature, 25 $^{\circ}\text{C}$; detection, UV absorption at 214 nm. Samples were introduced into capillary by the pressure method at 1 psi for 10 s.

価法として有効であることがわかった。

D. 結論

本研究では急性膵炎、慢性再発膵炎及び急性循環不全の治療薬であり、糖タンパク質性医薬品であるウリナスタチンを材料に用い、日本薬局方規定の試験方

法ならびに新たに開発された分析法を中心に、製造元の異なる2種類のウリナスタチン注射用製剤の物理化学的性状の評価方法ならびに両製剤の同等性評価方法について検討した。

分子量測定に関して、両製剤中のウリナスタチンは、サイズ排除クロマトグラフィ

一法では分子量約 70,000、SDS-PAGE で約 37 kDa を示し、分析法により異なった結果が得られた。しかし MALDI-TOF MS を用いた絶対分子量測定では、理論値に近い 24,000 が得られた。さらに、セルロースアセテート膜、キャピラリー電気泳動法による同等性評価方法に関する検討の結果、これらの解析法が本薬の評価に有用であることが示されるとともに、解析した両製剤中のウリナスタチンにも差異を認めなかった。一方、今回検討を行ったタンパク質の分離に基づく評価法では、ウリナスタチン中の糖鎖の不均一性を評価することはできず、糖タンパク質より切り離された糖鎖について、含まれる糖鎖の構造とその組成比を評価できる方法と平行してウリナスタチンの品質評価を行う必要があることがわかった。

以上、ウリナスタチン注射用製剤の品質評価法について検討した結果、各手法ともにウリナスタチンの同等性評価法として有効であるものの、日本薬局方に収載されている分子量測定法に関しては、理論分子量と著しく異なることなどから、試験項目名等の再検討が必要であるかもしれない。

E. 研究成果

- 1) Satsuki Itoh, Akira Harazono, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, (in press)
- 2) J. Yuan, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (in press)
- 3) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi and Takao Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology* (in press)
- 4) Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Ito, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Youichi Kohno, Atsuo Urisu and Jun-ichi Sawada: Kinetic Analysis of Pepsin digestion of Chicken Egg White Ovomuroid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, (in press)
- 5) Masashi HYUGA, Satsuki ITO, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Analysis of Site-Specific Glycosylation in Recombinant Human Follistatin Expressed In Chinese Hamster Ovary Cells, *Biologicals*, **32**, 70-77 (2004)
- 6) Tetsu Kobayashi, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **18**, 1156-1160

- (2004)
- 7) Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/ mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, **48**, 5-10 (2004)
 - 8) 新見 伸吾, 川西 徹, 早川 堯夫: 抗体医薬の現状と展望、**医薬品研究** (in press)
 - 9) 早川堯夫、石井明子: 組換え医薬品、**薬学教科書シリーズ** (日本薬学会編)、東京化学同人、東京 (印刷中)
 - 10) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 日向昌司, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析、**生物物理化学**, **48**, 5-10 (2004)
 - 11) 早川堯夫, 永田龍二: バイオロジクスの品質と安全性評価、**薬の安全性** (長尾 拓編), pp. 33-51 (2004)、南山堂、東京
 - 12) 早川堯夫, 石井明子: バイオ医薬品の現状と将来、**J.Integrated Med.**, **14**(2), 142-143 (2004)
 - 13) 早川堯夫: バイオ創薬の新たな展開と効果的な推進に向けて、**Drug Delivery System**, **19**(2), 18 (2004)
 - 14) 早川堯夫: 米国における新薬開発の動向、**大阪医薬品協会会報**, **662**, 1-18 (2004)
 - 15) 早川堯夫: バイオロジクスの将来展望と課題、**バイオロジクス: 生体由来物質を用いた製品開発**、(社) 高分子学会編, pp. 5-42 (2004), (株) エヌ・ティー・エス、東京
 - 16) Kamoda S, Nomura C, Kinoshita M, Nishiura S, Ishikawa R, Kakehi K, Kawasaki N, Hayakawa T. Profiling analysis of oligosaccharides in antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis *J.Chromatogr A*. **1050**(2), 211-216 (2004)
 - 17) Gao Y, Eguchi A, Kakehi K, Lee YC Efficient preparation of glycoclusters from silsesquioxanes *Org Lett.* **6**(20), 3457-3460 (2004)
 - 18) Matsuno YK, Kinoshita M, Kakehi K Electrophoretic analysis of di- and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans on microchip format *J Pharm Biomed Anal.* **36**(1), 9-15 (2004)
 - 19) Nakajima K, Kinoshita M, Oda Y, Masuko T, Kaku H, Shibuya N, Kakehi K. Screening method of carbohydrate-binding proteins in biological sources by capillary affinity electrophoresis and its application to determination of *Tulipa gesneriana* agglutinin in tulip bulbs *Glycobiology.* **14**(9), 793-804 (2004)
 - 20) Hayashi T, Yasueda S, Nakanishi Y, Ohta H, Kinoshita M, Miki Y, Masuko T, Kakehi K. Capturing of acidic macromolecules from biological samples using a temperature-responsive polymer modified with poly-l-lysine *Analyst.* **129**(5), 421-427 (2004)
 - 21) Nakano M, Kakehi K, Tsai MH, Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from

alpha1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues
Glycobiology. 14(5):431-441 (2004)

- 22) Kawabata A, Nishikawa H, Saitoh H, Nakaya Y, Hiramatsu K, Kubo S, Nishida M, Kawao N, Kuroda R, Sekiguchi F, Kinoshita M, Kakehi K, Arizono N, Yamagishi H, Kawai K. A protective role of protease-activated receptor 1 in rat gastric mucosa
Gastroenterology. 126(1):208-219 (2004)

【特許】

グリコシド結合含有化合物中の糖の分離方法及びそれに用いる糖分離システム、糖分離用試薬キット、並びに糖分離用標準化試料 特願 2003-054732

科学技術振興事業団

掛樋一晃

物質を補足する機能を有する機能性ポリマー、当該ポリマーを含む物質捕捉用キット、及び当該ポリマーを利用しし物質の回収方法 特願 2003-122965

科学技術振興事業団

掛樋一晃、林友典、中西康晴、木下充弘

酸性多糖の分析方法および酸性多糖類分析用キット 特願 2003-188288
科学技術振興事業団
掛樋一晃

アスパラギン型標準糖鎖の製造法 特願 2004-220040
科学技術振興事業団
掛樋一晃、鴨田聡、鈴木茂生、中の三弥子

厚生科学研究費補助金(医薬品医療機器等レギュレトリーサイエンス総合研究事業)

日本薬局方等医薬品基準の国際ハーモナイゼーションに関する研究
分担研究報告書

「生薬に関する試験方法ならびに各条の改正と国際調和に関する研究」

分担研究者 関田節子 徳島文理大学香川薬学部

日欧米間の ICH 会議が進む中で、これらの国の薬局方調和も進展が報告されている。生薬に関しては、中国、韓国など東アジア各国との薬局方の比較検討を行っているが、薬局方制定に助言を求めてきた国々への技術指導の機会も増えている。そこで、本年度はキューバ薬局方制定における予備調査として、基原植物が日本薬局方と同一の生薬と異なる生薬について検討し、日本薬局方の試験法の適用の可能性を確認した。

A. 研究目的

本研究は、日中それぞれの国で用いている生薬の規格に関する共通認識を深めることから出発したが、現在は韓国、香港、ASEAN諸国も加わり、Forum for Hermonaization of Herbal Medicinesとして新たな研究が進んでいる。これらの実績が周知されるにつれてこれまで薬局方が備わっていなかった国からの要請が高まりフィリピンやキューバの薬局方策定の指導的役割を果たすようになっている。前者は JICA プロジェクトに発展し、5年間の準備期間を経て、今年3月に The Philippines Pharmacopoeia として公布されることになった。キューバについては予備調査の段階であるが、数種の薬局方収載品目の候補生薬の選定を指導している。これらの候補生薬のうち一部は日本薬局方収載品目と共通の生薬

があり、また、一部は熱帯地域に生育する共通の植物としてフィリピン薬局方と同種類の生薬があげられている。そこで、これらの生薬に第 14 改正日本薬局方で採用している試験法が適用可能であるか否かについて検討した。

B. 研究方法

日本薬局方と共通の生薬として *Zingiber officinale* Roscoe (*Zingiberaceae*) を、フィリピン薬局方と共通の生薬として *Senna alata* (Linné) Roxburgh (*Leguminosae*) を選び、キューバ国立医薬品管理センターからサンプルを入手した。これらの試料は、ハバナ市内の薬用植物農園で栽培されたもので、病院、薬局で治療に用いられている。尚、日本及び欧米の薬局方では *Cassia angustifolia* Vahl 及び *C. acutifolia* Delile を基原植物とする生

薬を採用している。

[*Zingiber officinale* の確認試験]

試料の粉末 2 g にアセトン 5 mL を加え、3 分間振り混ぜた後、ろ過し、ろ液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフ用[6]-ギンゲロール 1 mg をアセトン 1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にヘキサン/アセトン/酢酸(100)混液(10:7:1)を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに 2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン試液を均等に噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た茶褐色のスポットと色調及び Rf 値が等しい。

[*Senna alata* の定量法]

試料の粉末約 1.0 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、薄めたメタノール(7 \rightarrow 10) 25 mL を加え、30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は薄めたメタノール(7 \rightarrow 10) 10 mL ずつを 2 回加え、それぞれ 10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。全抽出液を合わせ、薄めたメタノール(7 \rightarrow 10)を加えて正確に 50 mL とし、試料溶液とする。別にセンノシド A 標準品をデシケーター(減圧・0,67 kPa 以下、酸化リン(V))で 12 時間以上乾燥試料溶液し、その約 0.01 g を精密に量り、炭酸水素ナトリウム(1 \rightarrow 100)に溶かし、正確に 20 mL とし、標準原液 A

とする。また、センノシド B 標準品をデシケーター(減圧・0,67 kPa 以下、酸化リン(V))で 12 時間以上乾燥し、その約 0.01 g を精密に量り、炭酸水素ナトリウム(1 \rightarrow 100)に溶かし、正確に 20 mL とし、標準原液 B とする。標準原液 A 5 mL 及び標準原液 B 5 mL ずつを正確に量り、メタノールを加えて正確に 50 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準原液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液のセンノシド A 及びセンノシド B のピーク面積 A_{TA} 及び A_{TB} 並びに標準溶液のセンノシド A 及びセンノシド B のピーク面積 A_{SA} 及び A_{SB} を求め、次式によりセンノシド A 及びセンノシド B の量を計算し、それらの合計を総センノシドの量とする。

センノシド A の量(mg)

$$= \text{センノシド A 標準品の量(mg)} \times \frac{A_{TA}}{A_{SA}} \times \frac{1}{4}$$

センノシド B の量(mg)

$$= \text{センノシド A 標準品の量(mg)} \times \frac{A_{TB}}{A_{SB}} \times \frac{1}{4}$$

操作条件

検出器:紫外吸光光度計(測定波長: 340 nm)

カラム:内径 4 ~ 6 mm, 長さ 15 ~ 25 cm のステンレス管に 5 ~ 10 μ m

の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度:50 °C付近の一定温度

移動相:薄めた pH 5.0 の 1 mol/L 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1 → 10)・アセトニトリル混液(17 : 8) 1000 mL に臭化テトラ n-ヘプチルアンモニウム 2.45 g を加えて溶かす。

流量:センノシド A の保持時間が約 26 分になるように調整する。

カラムの選定:標準溶液 10 μL につき、上記の条件で操作するとき、センノシド B,センノシド A の順に溶出し、それぞれのピークが完全に分離し、センノシド A の理論段数が 8000 以上のものを用いる。

試験の再現性:上記の条件で標準溶液につき、試験を 6 回繰り返すとき、センノシド A のピーク面積の相対標準偏差は 1.5 %以下である。

尚、第 1 4 改正日本薬局方は、成分含量測定用センノシド A, 成分含量測定用センノシド B を用いているが、第 1 5 改正版では定量用センノシド A, 定量用センノシド B に改訂している。そこで定量用標準品を用いて測定した。

C. 研究結果

[*Zingiber officinale* の確認試験]

図に示すように、試験の結果は良好であった。

Zingiber officinale

[*Senna alata* の定量法]

日本薬局方に従い測定したところピークは検出されなかった。そこで、試料の採取量を3倍に増やして行った結果、総センノシド量0.08%を認めた。

D. 考察

各国間の薬局方の調和を目的に研究を進めているが、生薬においてはそれぞれの国の使用経験に基づき、基原植物の種類が異なることが多い。また、同じ植物種であっても生産地により含有成分に違いがあり、使用目的もことなることがあ

る。従って薬局方の調和については、それらの違いを認識することが重要である。その場合においても、科学的な判断を行うには、可能な範囲ではあるが、同一の試験法を用いることが望ましいと考えられる。そこで、基原植物が日本薬局方と同一なものとして *Zingiber officinale* を、基原植物が日本や欧米とは異なるがフィリピン薬局方と同一である *Senna alata* を取り上げ検討した。今回はサンプル数が1試料ずつであったので、今後は産地の異なる複数のサンプルについて検討する予定である。

日本薬局方等医薬品基準の国際ハーモナイゼーションに関する研究
－医薬品添加剤の試験法及び各条規格の改正と国際調和に関する研究－

分担研究者 吉岡澄江 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室室長

日本薬局方(JP)医薬品添加剤の各条規格における機能性関連物性（functionality related characteristics, FRC）の考え方を確立することを目的として、欧州薬局方及び米国薬局方の FRC に関する動向を調査し、それに基づき JP としての FRC の取り扱いに関する提言をまとめた。すなわち、①局方をよりユーザーフレンドリーにするために、添加剤各条にはできるだけ多く FRC を取り込むことが望ましいこと、②原則として各条中の規格項目とは別の、適否判定に用いない non-mandatory の部分におき、製品のラベルに実測値と試験法名の表示を義務付けること、③FRC の測定に適用される試験法は一般試験法に記載されるのが望ましいこと等を提言した。

A. 研究目的

医薬品添加剤は、全世界で多くの医薬品に共通に使われ、流通が極めて国際的である。また、承認審査が独立ではなく製剤に従属した審査が行われることから、製剤の設計においては原則的に承認前例のある添加剤が優先的に選択されて用いられる。したがって、薬局方に添加剤の品質規格を収載する意義は極めて大きく、また、添加剤各条規格の国際調和が強く望まれている。

本研究では、添加剤の各条規格の意義を明らかにするとともに、その中で重要な位置を占めながら、これまで日本薬局方での取り扱いが確定していなかった機能性関連の物性（functionality related characteristics, FRC）について、欧州薬局方（EP）及び米国薬局方（USP）の動向を加味しつつ、日本薬局方（JP）への収載に当たっての基本的考え方を提案することを目的とした。

B. 研究方法

調査研究の資料とした主要なものは、専門学術誌の医薬品添加剤関連の論評、USP、EP の各条改正のための記載ガイドライン、欧州及び米国の国際医薬品添加剤協会からのポジションペーパー、及び添加剤特に FRC について議論された国際会議のプロシーディング等である。それらをもとに、JP 添加剤委員会でのこれまでの意見とわ

が国における製剤技術の現状を考慮しつつ、FRC に関する国際的な議論の経過と、同意された点を整理し、JP における FRC の取り扱いを検討した。

（倫理面への配慮）

人、動物は使用せず、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

添加剤各条の国際調和の必要性

薬局方各条規格の国際調和は現在のところ添加剤のみについて行われているが、これにはいくつもの必然的な理由が考えられる。すなわち、①添加剤は国際的に多くの製剤に共通して使われるものであり、承認申請およびその審査において規格が調和されていることによる利点が大きいこと、②規格の調和によって、流通時の品質検査のための試験省略効果が大きくなること、さらに、③有効成分の各条は、各国それぞれが自国で承認された国内流通品の品質規格を「registered standard」のような形で定めて品質の維持を図るものであるが、添加剤の各条は、世界中で共通に適用できる「public standard」の性格を持っていることなどが理由となっている。

PDG（薬局方国際会議）の始まった 1990 年以來現在までに、各条の国際調和が計画された添加剤 60 品目のうち半数以上についてはすでに最終