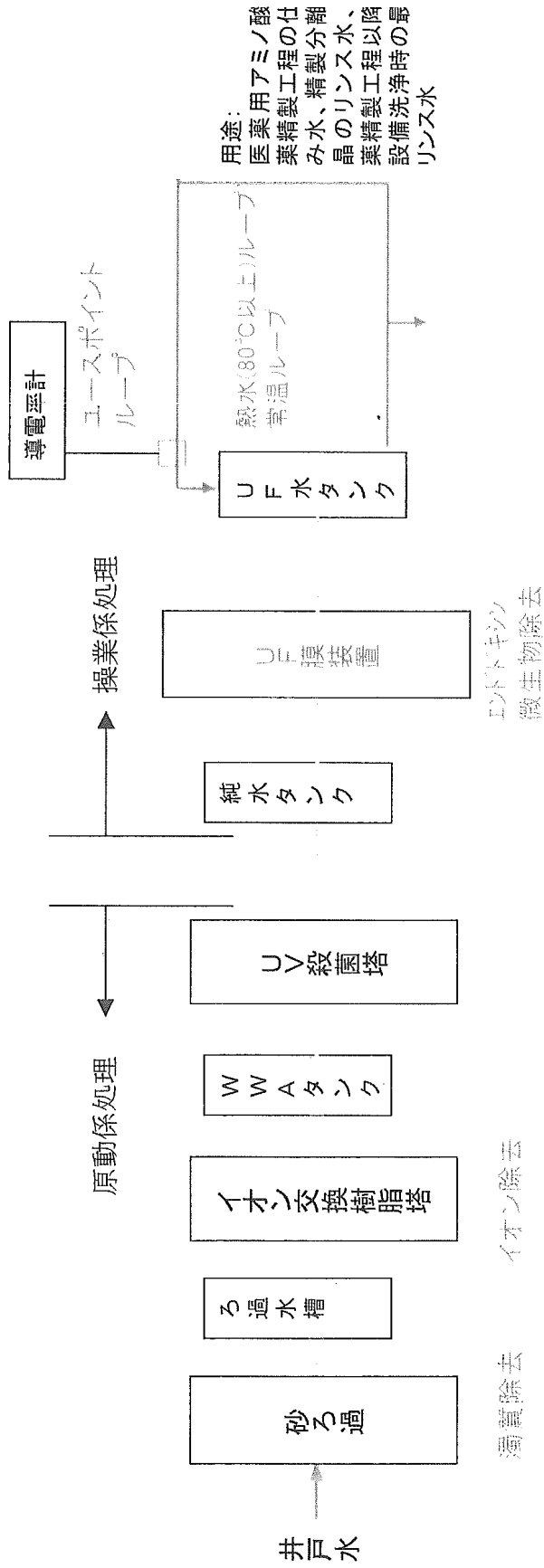


水質管理表

採水場 所	UF膜入口 (処理井水#2)	UF膜出口	脱Py水ユースポイント
項目			
導電率	適合(USP)(月)	適合(USP)(週)	適合(USP)(週)
TOC	500ppb以下(月)	500ppb以下(週)	500ppb以下(週)
エンドキシン	—	0.25EU/mL未満(週)	0.25EU/mL未満(週~6ヶ月)
一般細菌	10 ³ cfu/mL以下(月)	10 ³ cfu/100mL以下(週)	10 ³ cfu/100mL以下(週~6ヶ月)
大腸菌群	陰性/50mL(3ヶ月)	—	—

()内は分析頻度を示す ○印は管理値不明

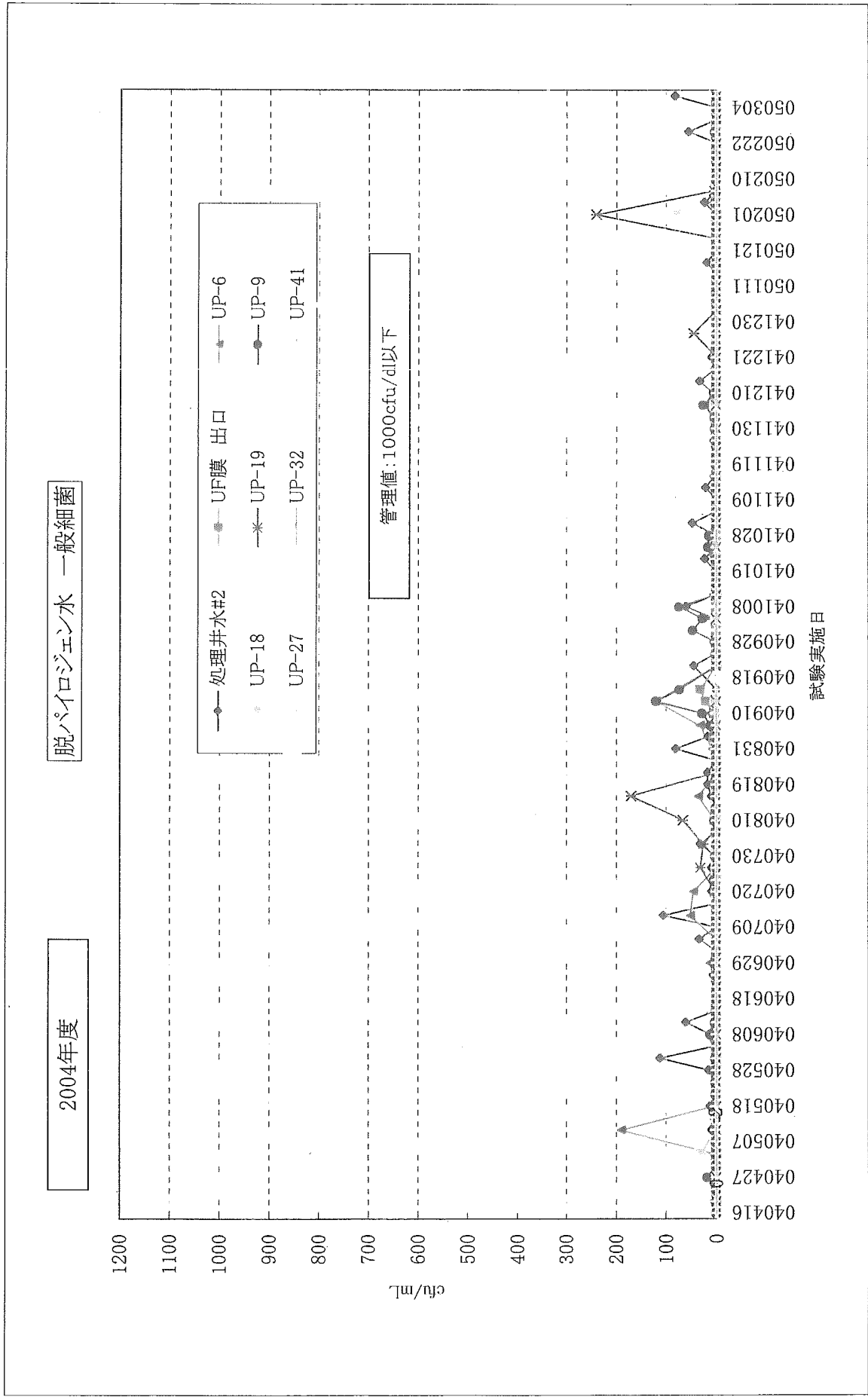


水質実績表(2004年4月～2005年3月)

採水場	UF膜入口 (処理井水#2)	UF膜出口	脱Py水ユースポイント
項目			
導電率	0.4～0.9 μ S/cm	0.4～1.0 μ S/cm	0.7～1.7 μ S/cm
TOC	20～96ppb	17～87ppb	16～109ppb
エンドトキシン	—	<0.25EU/mL	<0.25EU/mL
一般細菌	0～113cfu/mL	0～32cfu/100mL	0～600cfu/100mL
大腸菌群	—	—	—

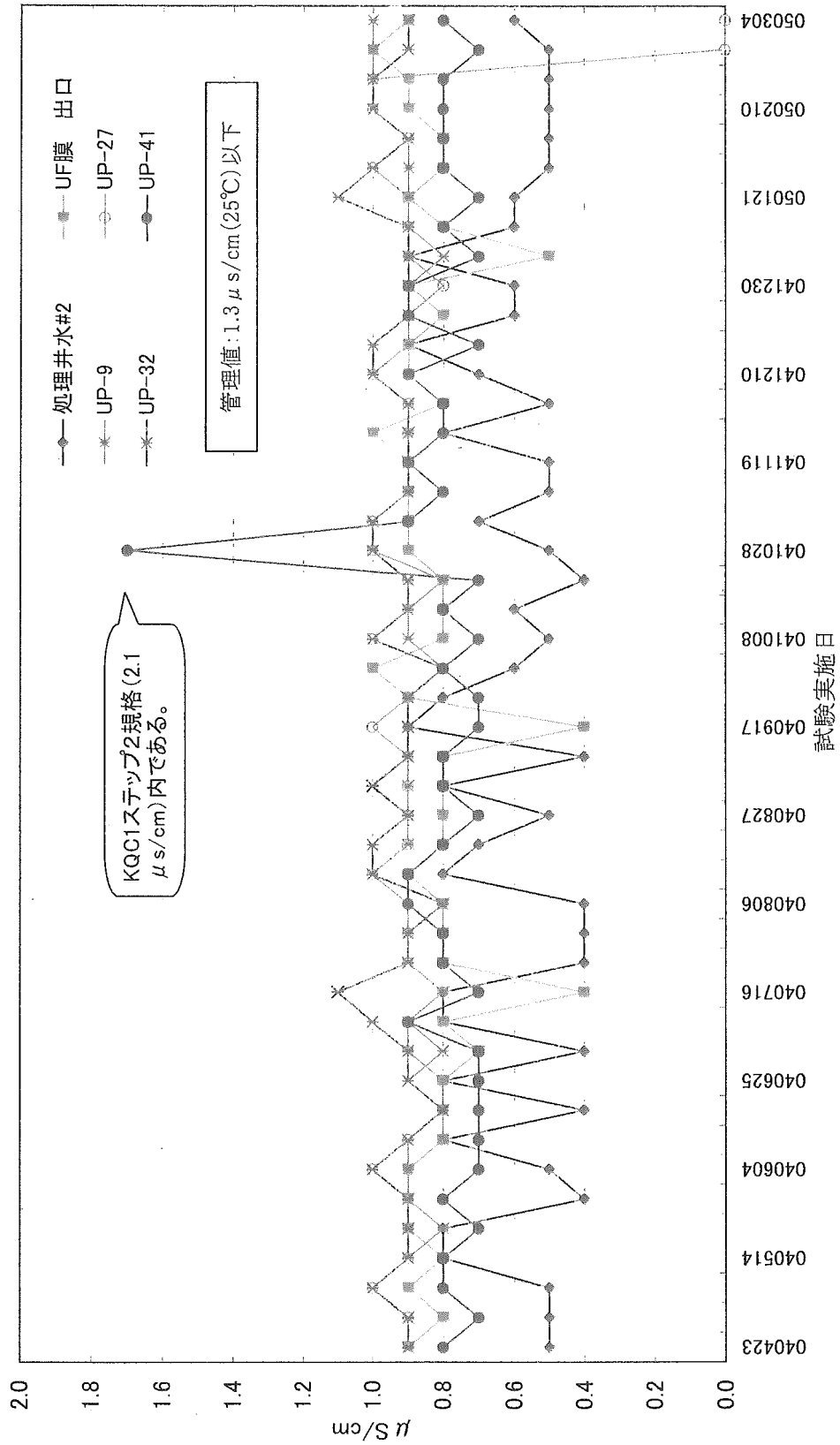
—印はデータ未入手、アラートレベルを超えた結果はアラート逸脱再分析を実施

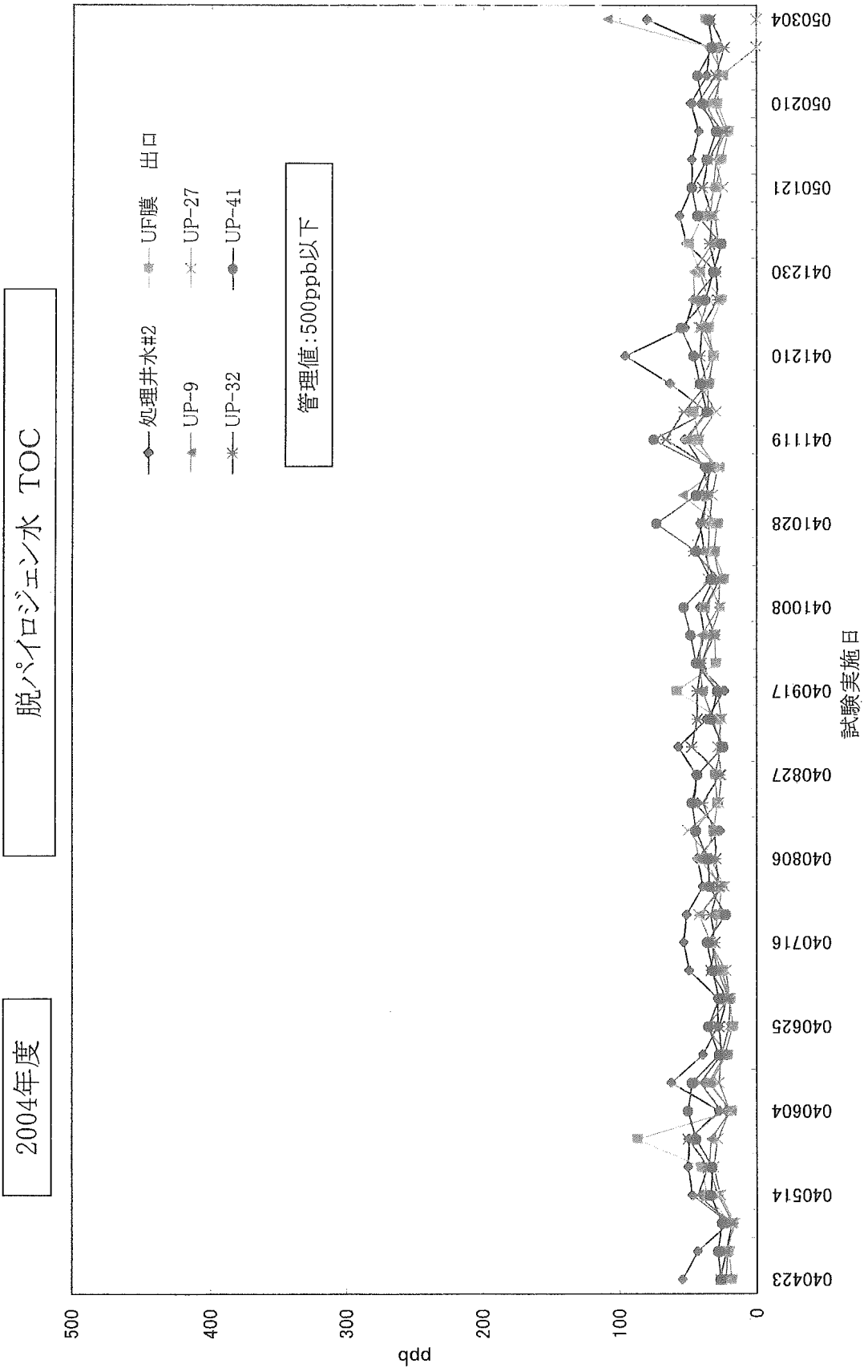
I社工場 水質データ



I社工場 水質データ

2004年度 脱パイロジェン水 導電率





J社 j 工場

1. 超ろ過法製薬用水の用途

生産している製品概要	凍結乾燥注射剤, 点眼剤
超ろ過法で製造している製薬用水の使用目的	① PSG の供給水 ② 凍結乾燥注射剤のバイアル瓶・ゴム栓の洗浄水 (洗浄後乾熱滅菌およびオートクレーブ滅菌実施)
生産している製品の仕向先	日本, 韓国

2. 稼働期間

1999年2月～現在

3. 超ろ過法で使用している膜

用途	エンドトキシン・微生物除去
膜 (UF)	旭化成ケミカルズ(株) SIP-3023
稼働期間	1999年2月～現在
透過水量	1.7 m ³ /h
回収率	90%
膜本数	3本
膜の交換基準・指標	UF膜破損, 採水量低下
実際の膜交換頻度	2.5年
膜の不具合	なし

4. 送水及び殺菌方法

	UF 膜	UF 水タンク・ユース配管
通水温度	25～80℃	80℃以上
殺菌滅菌方法		
薬液殺菌	0.2N-NaOH	
殺菌頻度	水質異常発見時	
熱水殺菌	70℃以上/4hrs 以上	タンク: 80℃以上, 配管: 70℃以上 (4hrs 以上)
殺菌頻度	毎日 (夜間)	毎日 (夜間)
蒸気滅菌		
滅菌頻度		

5. 新品膜の受入

膜の保管	
受入検査	膜メーカー発行の検査成績書確認

水質に関する事項

管理基準値（上段：管理基準値、下段：工程管理値）

	精製水	UF水
導電率 (サンプリング)	—	1.3 μ S/cm 以下 1.0 μ S/cm 以下
導電率 (インライン)	1.0 μ S/cm 以下 0.8 μ S/cm 以下	—
TOC (サンプリング)	300ppb 以下	300ppb 以下
エンドトキシン	0.1EU/mL 以下	0.1EU/mL 以下
生菌数	100cfu/mL 以下	10cfu/1000mL 以下

水質モニタリング及び日常管理

	管理項目	測定方法	測定頻度
精製水	pH	サンプリング	2週間毎
	生菌数		
	エンドトキシン		
	TOC		
	導電率	インライン	連続
UF水	pH	サンプリング	2週間毎
	生菌数		
	エンドトキシン		
	TOC		
	導電率		

<各水質の年間平均値・最大値・最小値>

1. 導電率

期間	単位		精製水タンク	UF水タンク
2002年5月～ 2005年9月	μS/cm	平均値	0.50	0.52
		最大値	0.59	0.69
		最小値	0.42	0.32

2. TOC

期間	単位		精製水タンク	UF水タンク
2002年5月～ 2005年9月	ppb	平均値	90.93	97
		最大値	148	149
		最小値	59	64

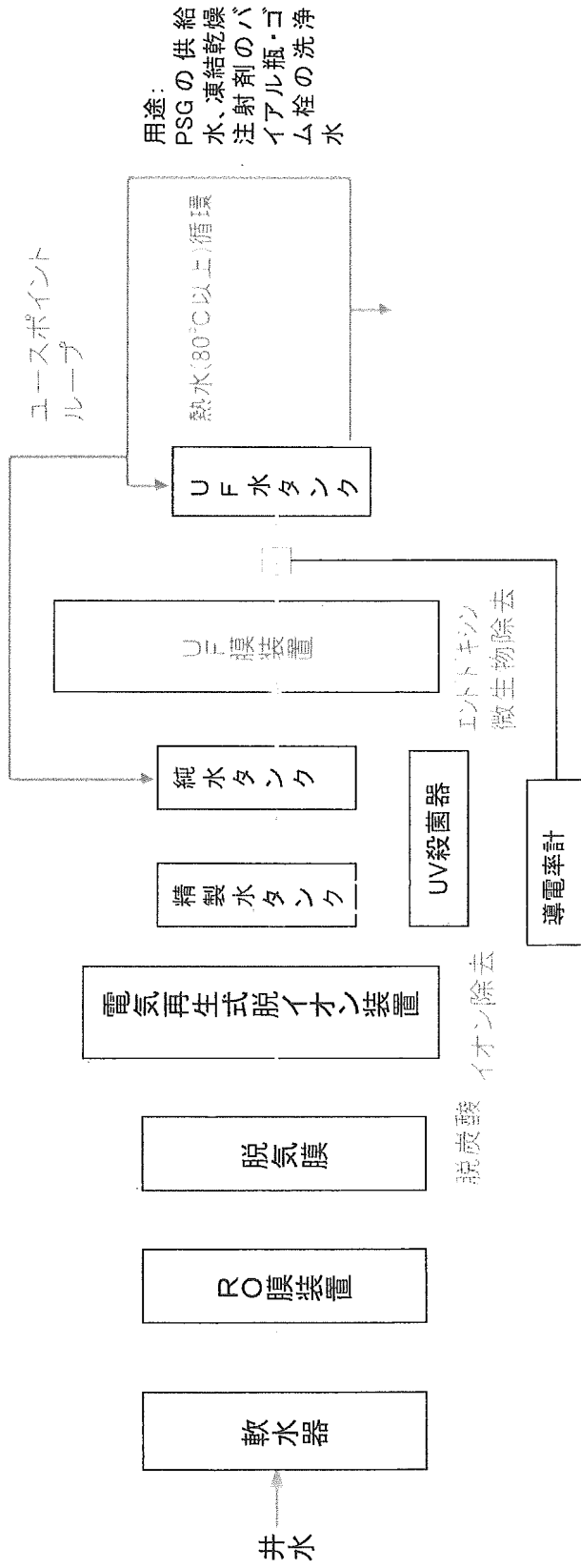
3. エンドトキシン

期間	単位		精製水タンク	UF水タンク
2002年5月～ 2005年9月	EU/mL	平均値	<0.1	<0.1
		最大値	<0.1	<0.1
		最小値	<0.1	<0.1

4. 生菌数

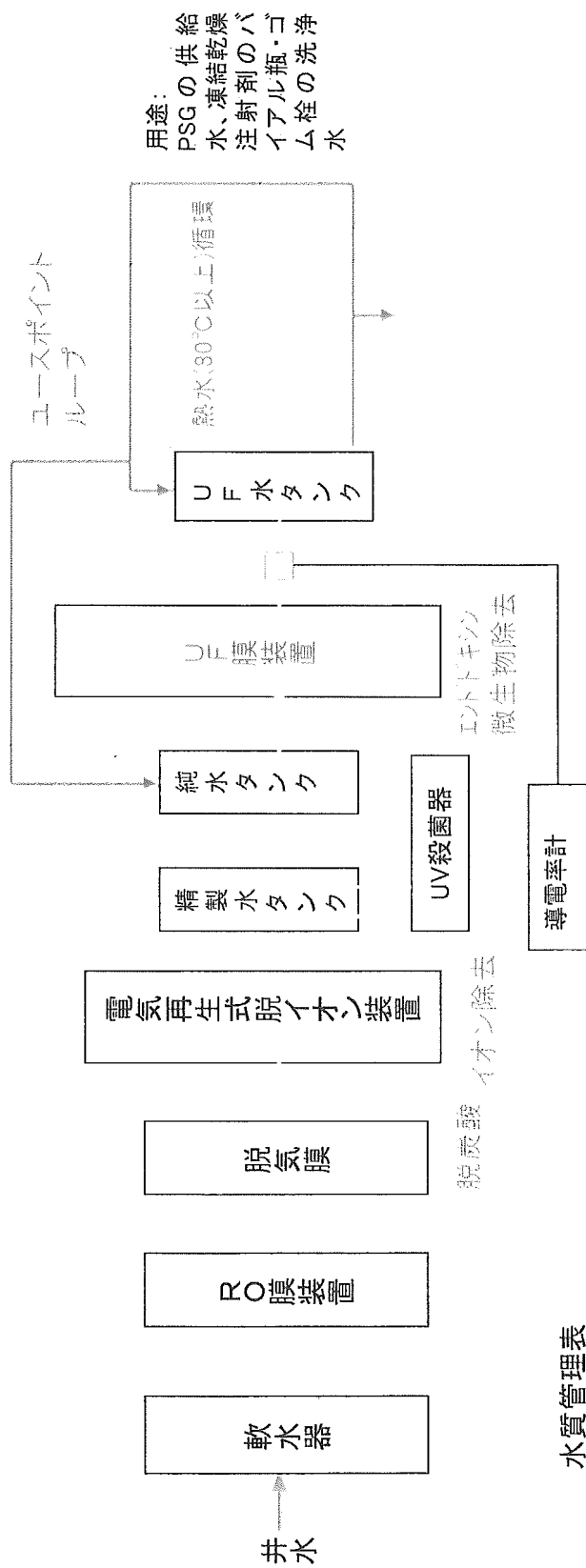
期間	単位		精製水タンク	UF水タンク
2002年5月～ 2005年9月	cfu	平均値	16/mL	0/1000mL
		最大値	98/mL	0/1000mL
		最小値	1/mL	0/1000mL

J社 J 工場 製薬用水製造システム



膜概要

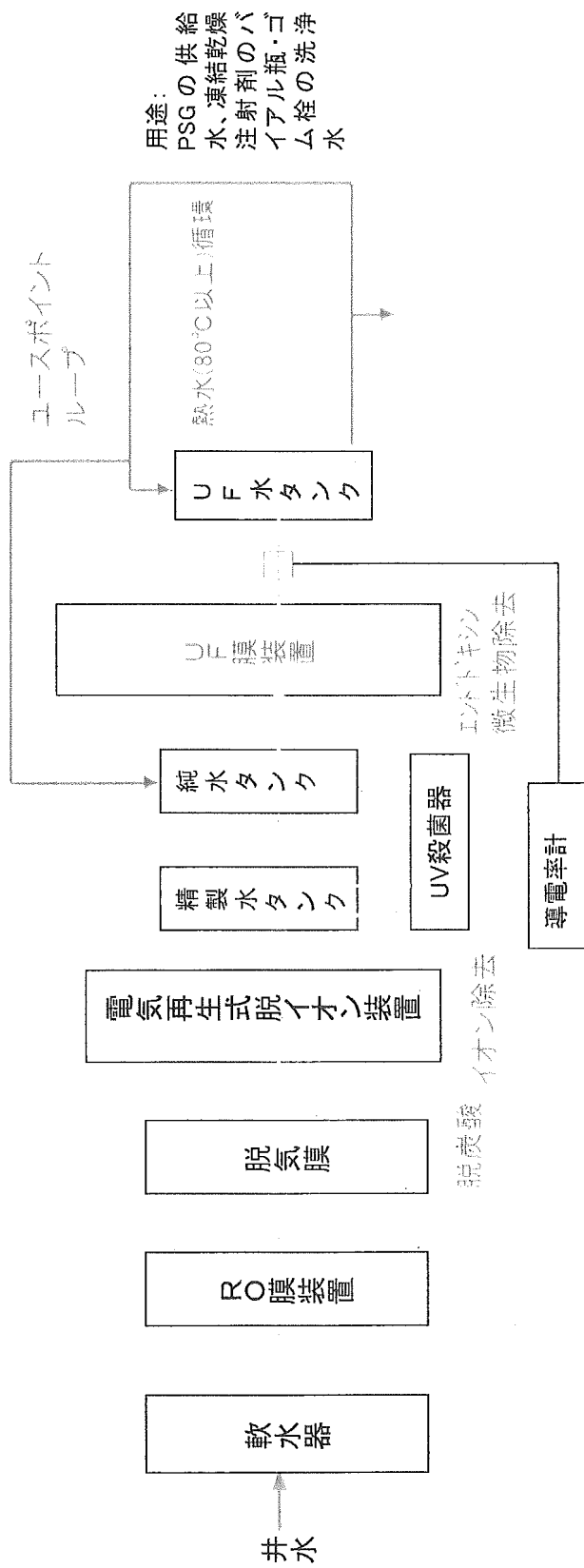
膜	メーカー	型式	本数	殺菌	交換頻度
UF膜	旭化成 ケミカルズ	SIP-3023	3本 (25~80°C)	毎日 70°C以上/4hr以上	2.5年毎 (破損、採水量低下)



水質管理表

採水場	精製水	UF水
項目		
導電率	1.0 μ S/cm 以下(常)	1.3 μ S/cm 以下 (2週間)
TOC	300ppb 以下 (2週間)	300ppb 以下 (2週間)
エンドキシン	0.1EU/mL未滿 (2週間)	0.1EU/mL未滿 (2週間)
生菌数	100cfu/mL以下 (2週間)	10cfu/1000mL以下 (2週間)

()内は分析頻度を示す ○印は管理値不明

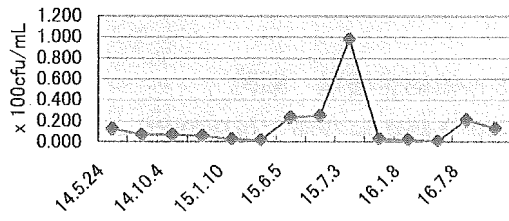


水質実績表(2002年5月～2005年9月)

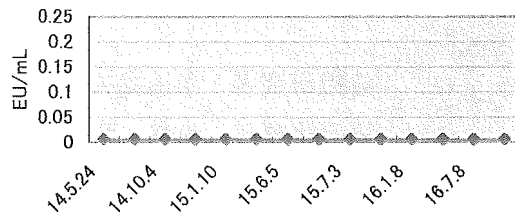
採水場 所	精製水	UF水
項目		
導電率	0.42～0.59 μ S/cm	0.32～0.69 μ S/cm
TOC	59～148ppb	64～149ppb
エンドキシン	<0.1EU/mL	<0.1EU/mL
生菌数	1～98cfu/mL	0 cfu/1000mL

J社工場 水質データ

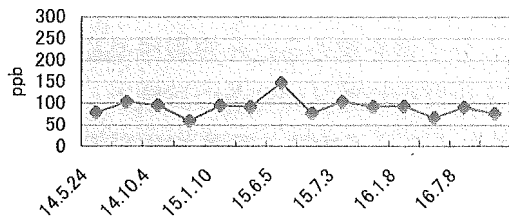
精製水・一般細菌



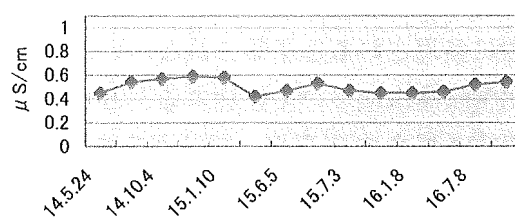
精製水・エンドトキシン



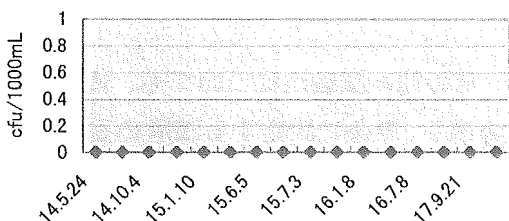
精製水・TOC



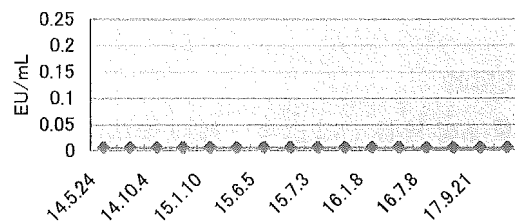
精製水・導電率



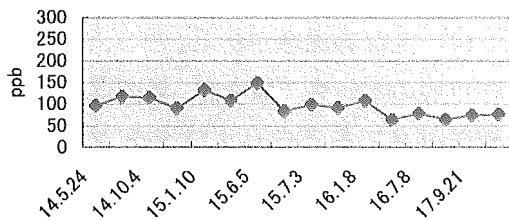
UF水・一般細菌数



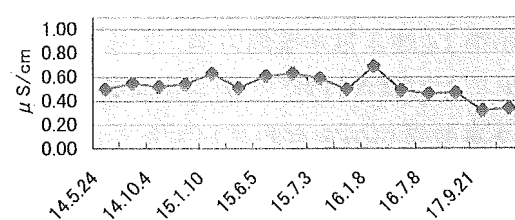
UF水・エンドトキシン



UF水・TOC



UF水・導電率



生物薬品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
—分子量測定を原理としたタンパク質性医薬品の局方試験法に関する検討—

分担研究者 早川堯夫 医薬品医療機器総合機構 顧問

協力研究者 小林 哲 国立医薬品食品衛生研究所主任研究官

第 14 改正日本薬局方追補では、たん白質性医薬品の理化学試験に汎用される国際調和試験法の整備が飛躍的に進んだ。これにより第 15 改正以降に予定されているたん白質性医薬品の各条収載が促進されることが考えられるが、今後分子量を求める試験が、局方たん白質性医薬品各条の確認試験、示性値としての分子量試験、あるいは純度試験に多用されると予想される。そこで本年度は、分子量を求めるたん白質性医薬品の理化学試験法について整理するとともに、局方たん白質性医薬品の各条の試験として利用する場合の注意点、問題点等をまとめた。また、高分子物質の質量測定が可能な MALDI-TOF MS 法は、たん白質の絶対分子量を求める方法として優れているため、示性値としての分子量を求める手段としては最適であると考えられる一方で、シグナル強度が共存物質により影響をうけるので試験法の設定には注意が必要となることを、実験データに基づいて考察した。

A. 研究目的

生物薬品の分野では近年一般試験法の国際調和が進み、国際調和試験法として、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）が第 14 改正日本薬局方第一追補に、アミノ酸分析法、キャピラリー電気泳動法、たん白質定量法、等電点電気泳動法、ペプチドマップ法が第 14 改正日本薬局方第二追補に、参考情報として収載された。これらの試験は、いずれも今後収載が予定される局方たん白質性医薬品の理化学試験として汎用されるものであり、これら医薬品の日局収載を促進するものと考えられる。

このように、生物薬品関連の局方一般試験法は飛躍的に整備されたが、さらに今後収載を検討すべき試験法としては、たん白質質量分析法、粘たん白質の糖鎖試験法等が上げられる。加え

て、その他の試験法についても、試験法の原理を考慮し、各条に設定する試験の妥当性について検討を行い整理すべきと考えられる。例えば、国際調和試験法の一つである SDS-PAGE 法は、分子量の違いによる分離分析法であるが、分子量測定試験の試験法とした場合には、後述するように、目的物質によっては必ずしも適当な方法とはいえない場合がある。

昨年度の本研究で我々は、局方既収載のたん白質性医薬品であるウリナスタチンの注射用製剤の分子量試験として設定されているサイズ排除クロマトグラフィーの妥当性を、SDS-PAGE、および、MALDI-TOF MS（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry：マトリックス支援レーザー脱離によるイオン化法 MALDI と、飛行時間型の

質量分離法 TOF を組み合わせた質量分析法)と比較して論じた。その際、上記3種類の方法を用いてウリナスタチンの分子量を測定したところ、サイズ排除クロマトグラフィーでは約70,000、SDS-PAGEでは約37,000、MALDI-TOF MSでは24,000と、測定法により著しく異なる結果が得られることが明らかとなった。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。一方、ウリナスタチンの分子量試験としてサイズ排除クロマトグラフィーを採用している医薬品各条には、「これに本品の保持時間をあてて分子量を求めるとき、分子量は $67,000 \pm 500$ である」と記載されている。我々の実験結果は局方の記載内容を再確認するものではあったが、理論分子量と乖離の大きい値を示性値としての分子量試験に用いることは適当でないとも考えられる。

そこで本年度は、分子量を求めたたん白質医薬品の理化学試験について整理するとともに、局方たん白質性医薬品の各条の試験として利用する場合の注意点、問題点等をまとめた。

B. 研究方法

B-1. MALDI-TOF MS による質量分析

分析試料 $2\mu\text{l}$ をスチール製ターゲットプレート各ウェルに滴下し、室温で乾燥後、MALDI-TOF MS 装置 AB4700 (アプライドバイオシステム社)にて質量分析を行った。レーザーは neodymium: yttrium aluminum garnet (Nd-YAG; 355nm)を使用し、リニアモードで、ポジティブイオンを検出した。50回のレーザーショットの平均を取ってスペクトルを生成した。得られたスペクトルはデータプロセッサアプリケーション(アプライドバイオシステム社)によってバックグラウンド補正とノイズ低減化をかけてからシグナル強度を得た。

B-2. シグナル増強作用の検討

シグナル増強剤として、トランスフェリンその他の高分子をミリ Q 水(脱イオン水)に溶解希釈し、 $2\mu\text{l}$ を $10\mu\text{l}$ のマトリックス溶液と混合後、さらにインスリン溶液またはその他の試料溶液 $2\mu\text{l}$ を添加、混合した。このうち $2\mu\text{l}$ を質量分析の試料として、シグナル強度を測定した。

C. 研究結果および考察

C-1. 医薬品各条における分子量試験の現状

局方既収載のたん白質性医薬品の各条の中で、試験法として分子量測定が取り入れられている医薬品は今現在ウリナスタチンのみであり、サイズ排除クロマトグラフィーが試験法として採用されている。一方、最近新たに申請されているたん白質性医薬品においては、分子量試験として MALDI-TOF MS による測定が採用されるケースが多く、将来、日局に収載される場合も、採用される可能性が高い。

その他、第15改正日本薬局方に収載予定で、日本薬局方フォーラムに掲載されているセルモロイキン(遺伝子組換え)、および、テセロイキン(遺伝子組換え)では、確認試験として SDS-PAGE による分子量測定が採用されている。

また、14局収載ヒトインスリン(遺伝子組換え)、15局収載予定のセルモロイキン(遺伝子組換え)およびテセロイキン(遺伝子組換え)では、純度試験(重合体)にサイズ排除クロマトグラフィーが採用されており、その他今後収載が予定されている多くのたん白質性医薬品の収載案でも重合体の測定に採用されている。

C-2. 局方試験法としての分子量測定を原理とする試験の位置づけ

局方収載たん白質性医薬品の各条において、

主に分子量の違いの識別を原理とする試験を設定する場合、(1) 確認試験、(2) 示性値としての分子量試験、または(3) 純度試験のいずれかの試験であると考えられる。またその際の一般的な試験方法としては主に、(1) サイズ排除クロマトグラフィー、(2) SDS-PAGE、そして(3) 質量分析法の3つがある。

このうちサイズ排除クロマトグラフィーは、近年充填剤の進歩もあり高速液体クロマトグラフィーとして応用する場合、操作の簡便性において極めて優れた方法となる。その際標準品との比較を判定基準にするならば、確認試験に適しており、また重合体等の純度試験にも汎用されている。しかし一方、分子量と溶出時間は必ずしも一対一の関係にはなく、分子量標準との比較で実際の分子量を求めることは困難であり、通常みかけの分子量を求めるにすぎない。また、カラム担体が代われば、分子量と溶出時間の関係は同じになるとは限らない。したがって、示性値としての分子量試験の試験法としては、必ずしも適していないと思われる。

SDS-PAGE は、SDS とたん白質複合体の電気泳動による移動度が、すべての複合体分子について分子量に対して同じ関数関係にあれば、相対移動度から分子量が求められることになる。実際単純たん白質においては、通常この原理は成り立つ。しかし N-または O-糖鎖のようにたん白質のポリペプチド骨格が修飾されている場合、SDS は糖に対してはポリペプチドと同じ様には結合しないため、電荷-分子量比は一定にならず、分子量標準との比較により SDS-PAGE で求めたみかけの分子量は、実際の分子量とは異なる。したがって SDS-PAGE は、標準物質との比較による確認試験、あるいは類縁物質や不純物に関する純度試験には適しているが、糖たん白質の分子量試験では、必ずしも適切な方法といえない。

一方、質量分析法は分子のイオンの質量と電

荷の比 (m/z) から絶対分子量を知ることができ、分子量を求める手段として非常に優れている。特に近年測定機器の進歩が著しい MALDI-TOF MS は高分子量たん白質の分子量測定をも可能としており、示性値としての分子量測定試験の試験法として適していると思われる。昨年度の当研究報告書に記した通り、糖たん白質であるウリナスタチン注射剤でも、MALDI-TOF MS により平均分子量として理論分子量と一致する値を測定することができた。

C-3. MALDI-TOF MS における共存物質によるシグナル増強現象

以上のように、MALDI-TOF MS は日局たん白質性医薬品の分子量試験として、最も適している試験法と考えられる。しかし最近我々は、MALDI-TOF MS を用いたたん白質検出に関する研究を行う中で、共存する目的たん白質以外のたん白質や合成高分子などが、目的たん白質のシグナルピークを増強する可能性があることを以下のような経緯で見出した。

MALDI-TOF MS でたん白質を分析する際に用いられるマトリックスとしては、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)、 α -cyano 4-hydroxycinnamic acid (CHCA)、3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (シナピン酸)などが主に用いられる。そこで、まず、低濃度のヒトインスリンを MALDI-TOF MS で検出、定量する目的で、これに最適なマトリックスの種類、濃度、およびレーザー強度などを検討した。その結果、CHCA をマトリックスとして用いたときはシナピン酸や DHB を用いたときよりも強いインスリンのシグナルが得られ、検出感度も高かったため、CHCA の 10mg/ml 溶液 (0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリル) をマトリックス溶液として使い、ブタインスリンを定量用の内部標準として添加してみたところ、条件によってはヒト

インスリンのシグナルを増強する場合があった。そこで、ブタインスリンのかわりに各種のたん白質を添加して、ヒトインスリンのシグナルに対する影響を検討した。その結果、ウシ血清アルブミン (BSA) やトランスフェリン (Tf) を添加した場合に、最も強くヒトインスリンのシグナルが増強されること、ヒトインスリン以外にシトクロム C やアポミオグロビンなどのシグナルも増強されることを見出し、これを報告した (Fig 1, および *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1156-1160, (2004))。

しかし、高分子のたん白質を解析する場合には、BSA や Tf を添加すると、添加した BSA や Tf のシグナルが大きなピークとして観察され、目的たん白質のシグナルを妨害することが考えられた。そこで、各種の合成高分子を、BSA や Tf のかわりにマトリックスへ添加して、スペクトルの変化を検討した。その結果、ポリリジンなどを添加した場合には、添加物質のシグナルを検出することなく、目的物質のシグナルを増強することが出来た (Fig.1)。

ついで、CHCA をマトリックスとして、BSA、Tf、および様々な分子量の合成高分子を添加した場合における、フェリチン (Ft)、BSA、Tf、免疫グロブリン (IgG) など、高分子たん白質のシグナル強度の変化を検討した。その結果、Ft、BSA、および Tf のシグナルは、デキストランなど、多くの合成高分子によって増強された。ただし、IgG のシグナルを増強したのは BSA、Tf と低分子のポリエチレングリコール、(PEG) および高分子のポリリジンのみだった (Table 1)。

このように高分子はさまざまなたん白質のシグナルを増強し、その程度は添加した高分子の種類や分子量と、目的たん白質の種類によって、大きく異なることが明らかになった。同様なシグナル増強は、シナピン酸をマトリックスとして用いた場合にも観察された。これは、シナピン酸が CHCA と近い化学構造をもってい

るためと考えられる。

ここで観察されたシグナル増強のメカニズムはまだ明らかにされていないが、Tf やポリリジンを CHCA やシナピン酸に添加すると、測定の際にターゲットプレート上で析出する結晶が小さくなることから、結晶の微細化による結晶表面積の増大とイオン化の促進が、シグナル増強の原因のひとつと考えられる。なお、CHCA やシナピン酸とは化学構造の類似性が低い DHB をマトリックスとした場合には、このようなシグナル増強や結晶の変化は観察されなかった。

C-4. MALDI-TOF MS を用いたペプチド及びたん白質性医薬品の分子量測定における共存物質の影響

医薬品として用いられるたん白質は、インスリンや成長ホルモンのような単純たん白質の場合もあるが、糖たん白質や、PEG 化インターフェロンのように、分子量が均一でないたん白質の混合物であることも少なくない。このような混合物からなるたん白質性医薬品を MALDI-TOF MS で測定した場合、ヒト血清アルブミンなどの添加物が、混合物の各成分のイオン化などに異なる影響を与える結果、分析対象となる有効成分たん白質の質量分析スペクトル全体の形状や、分子量の測定値に影響を与える可能性が考えられた。

そこで、市販のペプチド及びたん白質性医薬品製剤を 2 倍ずつ 7 段階に 128 倍まで系列希釈して、その原液または希釈溶液を試料溶液として、添加物が分子量測定に及ぼす影響を検討することとした。代表的な糖たん白質性医薬品である組織プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) やモノクローナル抗体などを MALDI-TOF MS で解析する場合のマトリックスとしてはシナピン酸が最適であるため、以下の実験ではシナピン酸の 10mg/ml 溶液 (0.05%トリフルオロ酢酸、50%アセトニトリ

ル) をマトリックス溶液として用いた。試料溶液と Tf または ポリリジンの 1mg/ml 溶液をマトリックスに添加して質量分析を行い、8 段階の濃度に希釈したサンプルのうち、3 種類以上の濃度のサンプルでシグナルが検出された試料について、 m/z の平均と標準偏差をまとめた (Table 2)。ペプチド及び単純たん白質製剤の m/z に比べて、PEG 化たん白質や糖たん白質性医薬品の m/z は標準偏差が大きく、目的物質に分子多様性があることが伺われた。また、Tf やポリリジンを添加することによって m/z の変化、あるいはマススペクトルのパターンの変化は観察されなかった (Fig 2 および Fig 3)。インターフェロン α と成長ホルモンについては、市販の試薬を 1mg/ml 溶液となるように水に溶解してから系列希釈して Tf またはポリリジンの影響を同様に検討したが、 m/z およびマススペクトルのパターンには変化はみられなかった。その他、いくつかの製剤について、原液または 2 倍、4 倍希釈液とヒト血清アルブミンの系列希釈溶液 (2.5-0.04mg/ml) をマトリックスに添加して検討した場合にも、 m/z やスペクトルのパターンに変化は観察されなかった。

以上の結果から、MALDI-TOF MS においては、今回試験した医薬品の場合、目的たん白質の m/z の測定については、共存する高分子によって統計的に有意なレベルまでの影響は受けないことが確認できた。ただし、今回試験した医薬品では、マススペクトルのピークは比較的明瞭なものがほとんどであったが、ピークがブロードになるような多くの糖鎖を有する糖たん白質の場合は、共存する高分子物質によってマススペクトルのパターンが変化することもありえよう。

分子量試験は通常原薬について行われるが、たん白質性医薬品の場合、安定化等の目的で原薬にも高分子化合物を添加する場合もある。今後エリスロポエチン等のように複雑な糖鎖修

飾をうけたたん白質についても分析を進める予定であるが、MALDI-TOF MS の測定においてさえ、共存する高分子物質によってマススペクトルのパターンは変わりうることを考慮する必要があると考える。

D. 結論

分子量を指標とする試験は、局方たん白質性医薬品各条の確認試験法、示性値としての分子量試験、あるいは純度試験に今後多用されると予想される。なかでも、MALDI-TOF MS はたん白質の絶対分子量を求める方法として優れているため、示性値としての分子試験の方法としては最適であると考えられる。また、標準物質と比較することにより、確認試験法としての有用性も期待できる。ただし、シグナル強度は共存する高分子化合物により影響をうけるので、マススペクトルも変化する可能性がある。試験法の設定には注意が必要と考えられる。

E. 健康危険情報

該当事項なし

F. 研究発表

論文および総説

- 1) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa, And Toru Kawanishi: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* (in press)
- 2) Takuo Suzuki, Tomoko Mogami, Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao

- Hayakawa and Toru Kawanishi: Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives, *Phytomedicine* (in press)
- 3) Itoh S, Kawasaki N, Hashii N, Harazono A, Matsuishi Y, Hayakawa T, Kawanishi T. N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes. *J Chromatogr A*. 1103, 296-306, (2006)
 - 4) Harazono A, Kawasaki N, Itoh S, Hashii N, Ishii-Watabe A, Kawanishi T, Hayakawa T. Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 348, 259-68 (2006)
 - 5) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS. *Glycobiology*. 15, 447-462, (2005)
 - 6) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Mashashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alteration in the cells, *Proteomics*, 5, 4665-72. (2005)
 - 7) Jin 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*, 1067(1-2):145-52 (2005)
 - 8) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. : Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem (Tokyo)*., 137(5):579-586 (2005)
 - 9) Niimi, S., Harashima, M., Gamou, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 using RNA interference. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 424-428 (2005)
 - 10) Kawai H., Suzuki T., Kobayashi T., Sakurai H., Ohata H., Honda K., Momose K., Namekata I., Tanaka H., Shigenobu K., Hayakawa T., Kawanishi T.: Simultaneous real-time detection of initiator and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol. Sci.*, 97(3), 361-368 (2005)
 - 11) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography / multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, 19(22), 3315-3321 (2005)
 - 12) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Toru Kawanishi And Takao

Hayakawa: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1094(1-2), 105-117 (2005)

- 13) 早川堯夫：ICH 品質に関するトピックの動向 -Q5E-、医薬品研究（印刷中）
- 14) 早川堯夫：第十四改正日本薬局方第二追補について、医薬品研究 37, 27-41, (2006)
- 15) 新見 伸吾, 原島 瑞、川西 徹, 早川堯夫：抗体医薬の現状と展望、医薬品研究、36, 163-193 (2005)
- 16) 新見 伸吾, 原島 瑞、日向昌司、野間誠司、川西 徹, 早川 堯夫：肝幹細胞に関する研究の現状と肝疾患の細胞治療への応用の展望、医薬品研究、36, 481-496 (2005)
- 17) 川崎ナナ、伊藤さつき、早川堯夫：糖たん白質の質量分析、糖鎖科学の新展開 伊藤幸成監修、エヌ・ティー・エス、東京 pp69-75, (2005)
- 18) 早川堯夫、永田龍二：安全性評価の国内規制と技術商品化のための規制、医薬品、遺伝子組換え体安全性評価システムガイドブック、矢木修身、日野明寛、田部井豊編、pp.309-330(2005) エヌ・ティー・エス、東京

学会発表

- 1) MALDI-TOF MS におけるたん白質シグナルの増強 Part 2 小林哲、河合洋、鈴木琢雄、石井明子、早川堯夫、川西徹 質量分析総合討論会 2005年5月 埼玉
- 2) MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強 Part3 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹 日本薬学会 第 126 年会 2006年3月 仙台

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Table 1. Fold intensities for several proteins obtained using a matrix premixed with macromolecules

macromolecule	[Ft] +	[BSA] +	[Tf] +	[IgG] 2+
bovine serum albumin	2.38 ± 1.43	nd	9.74 ± 1.40	2.03 ± 1.15
transferrin	14.65 ± 4.07	4.77 ± 1.49	nd	6.58 ± 0.64
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	4.60 ± 3.27	11.13 ± 2.09	7.72 ± 4.97	1.13 ± 0.49
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	7.62 ± 0.32	10.20 ± 1.68	7.89 ± 1.73	1.44 ± 0.33
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	4.89 ± 0.83	12.41 ± 1.22	9.87 ± 4.22	2.55 ± 0.55
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	7.25 ± 4.05	13.54 ± 2.13	11.08 ± 3.23	1.08 ± 0.40
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	4.65 ± 0.99	10.64 ± 3.20	13.11 ± 2.97	2.47 ± 0.20
poly-L-lysine (MW >300,000)	5.15 ± 2.38	9.79 ± 0.53	6.99 ± 2.05	3.50 ± 1.68
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	3.62 ± 0.86	1.55 ± 0.87	5.20 ± 2.88	0.22 ± 0.13
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	4.91 ± 1.80	2.90 ± 0.48	8.60 ± 2.31	0.88 ± 0.11
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	4.30 ± 1.38	6.03 ± 2.85	14.35 ± 2.10	1.84 ± 0.38
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	1.09 ± 0.62	0.70 ± 0.46	1.30 ± 1.27	0.84 ± 0.16
polyethylenglycol (average MW 3,350)	8.51 ± 3.76	13.33 ± 4.50	42.59 ± 19.36	4.73 ± 1.73
polyethylenglycol (average MW 8,000)	1.17 ± 0.69	3.17 ± 1.58	24.34 ± 9.77	2.82 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	2.73 ± 0.40	3.41 ± 1.23	13.74 ± 4.26	2.00 ± 1.09
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.73 ± 0.36	3.38 ± 1.76	6.99 ± 1.87	1.19 ± 0.47
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.90 ± 0.34	4.14 ± 2.28	11.21 ± 2.85	0.60 ± 0.16
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.88 ± 0.50	5.17 ± 2.19	2.43 ± 0.51	0.19 ± 0.06
dextran (average MW 10,000)	5.27 ± 1.50	8.67 ± 1.61	11.45 ± 4.41	1.12 ± 0.15
dextran (average MW 40,000)	2.66 ± 1.18	16.25 ± 4.60	11.87 ± 3.34	1.33 ± 0.25
dextran (average MW 70,000)	5.01 ± 0.91	10.75 ± 2.65	13.08 ± 4.85	1.53 ± 0.22
dextran (average MW 200,000)	9.89 ± 4.03	12.98 ± 4.05	17.27 ± 2.38	0.98 ± 0.36
dextran (average MW 500,000)	2.93 ± 0.73	11.73 ± 1.26	16.37 ± 1.73	0.79 ± 0.24
dextran (average MW 20,000,000)	11.24 ± 3.84	19.32 ± 8.11	5.43 ± 0.93	1.14 ± 0.14

Each entry is the average of the most intense signal from three samples.