

be a valuable supplement [12]. Thus, it is important to conduct a site-specific glycosylation analysis of normal human CP.

One of the most effective techniques for determining the site-specific carbohydrate heterogeneity of glycoproteins is the mass spectrometric peptide mapping of proteolytic fragments of glycoproteins by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) [14–19]. The specific detection of glycopeptides in a complex peptide mixture is generally achieved by monitoring specific carbohydrate fragment ions such as m/z 204 (HexNAc) and m/z 366 (HexHexNAc) produced by cone voltage fragmentation or by precursor ion scanning [15–19]. Because product ion spectra of glycopeptides show high abundant carbohydrate fragment ions and low abundant b- and y-series fragment ions derived from the peptide backbone [20,21], product ion spectra acquired data-dependently in liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) can be used for both the selection from the peptides and the identification of the glycopeptides [22]. MS in combination with specific exoglycosidase digestions allows us to obtain the site-specific information on anomericity and linkage of glycans [23]. In the current study, we conducted a site-specific glycosylation analysis of human CP and successfully determined glycosylation status and glycosylation profile at each N-glycosylation site.

Materials and methods

Materials

Acetonitrile, formic acid, and guanidine hydrochloride were purchased from Wako Pure Chemicals Industries (Osaka, Japan). Purified human CP was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Modified trypsin was purchased from Promega (Madison, WI, USA). α 2–3 Neuraminidase (EC 3.2.1.18) of *Macrobodella decora*, a recombinant form, and α 1–3,4 fucosidase (EC 3.2.1.51) from *Xanthomonas* sp. were purchased from Calbiochem. α 2–3,6,8,9 Neuraminidase (EC 3.2.1.18) of *Arthrobacter ureafaciens*, a recombinant form, and β 1–4 galactosidase (EC 3.2.1.23) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). The water used was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Bedford, MA, USA). All other reagents were of the highest quality available.

Reduction and S-carboxymethylation of CP

CP (100 μ g) was dissolved in 270 μ l of 0.5 M Tris–HCl buffer (pH 8.5) that contained 8 M guanidine hydrochloride and 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). After the addition of 2 μ l of 2-mercaptoethanol, the mixture was incubated for 2 h at 40 °C. Then 5.67 mg of monoiodoacetic acid was added, and the resulting mixture was incubated for 2 h at 40 °C in the dark. The reaction mixture was applied to a PD-10 column (Amersham Biosciences, Upp-

sala, Sweden) to remove the reagents, and the eluate was lyophilized.

Trypsin digestion of CP

Reduced and carboxymethylated CP was redissolved in 100 μ l of 0.1 M Tris–HCl buffer (pH 8.0). An aliquot of 1 μ l of trypsin prepared as 1 μ g/ μ l was added to 50 μ l of CP solution (1:50, w/w), and the mixture was incubated for 16 h at 37 °C. The enzyme digestion was stopped by storing at –20 °C before analysis.

HPLC of tryptic digest of CP

Tryptic digests (0.2 and 0.4 μ g) of human CP were analyzed by LC-ESI-MS/MS to identify the peptides and glycopeptides, respectively. HPLC was performed on a Paradigm MS 4 (Michrome BioResources, Auburn, CA, USA) equipped with a Magic C18 column (0.2 μ , 50 mm, Michrome BioResources). The eluents consisted of water containing 2% (v/v) acetonitrile and 0.1% (v/v) formic acid (pump A) and 90% acetonitrile and 0.1% formic acid (pump B). Trypsin-digested samples were loaded onto a microtrap (peptide captrap, Michrom BioResources). After a wash with 15 μ l H₂O/CH₃CN (98:2) with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), the trapping column was switched into line with the column. Samples were eluted with 5% of B for 10 min, followed by a linear gradient from 5 to 65% of B in 60 min at a flow rate of 2 μ l/min.

ESI-Q-TOF-MS/MS

Mass spectrometric analyses were performed using a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (QSTAR Pulsar, MDS Sciex, Toronto, Canada) equipped with a nano-electrospray ion source. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. The nanospray voltage was set at 2500 V. Mass spectra were acquired at m/z 400–2000 or m/z 1000–2000 for MS analysis and at m/z 100–2000 for MS/MS analysis. After every regular MS acquisition, two MS/MS acquisitions against top two of the multiply charged molecular ions were performed (data-dependent acquisition). The precursor ions with the same m/z as acquired previously were excluded for 120 s. The collision energy was varied between 30 and 80 eV depending on the size and charge of the molecular ion. Accumulation times for the spectra were 1.0 and 2.0 s for MS and MS/MS, respectively. All peaks were resolved monoisotopically.

Tandem MS/MS data from LC-ESI-MS/MS runs were submitted to the search engine Mascot to identify the tryptic peptides of CP. One missed cleavage was allowed, and tolerances of 2.0 and 0.8 u mass were used for precursor and product ions, respectively. From the data for LC-ESI-MS/MS at m/z 1000–2000, glycopeptide precursor ions were selected manually based on the presence of oligosaccharide oxonium ions such as m/z 204 (HexNAc) and m/z 366 (HexHexNAc). The glycopeptide ions were assigned based on

the presence of b- and y-series fragment ions of peptides of putative glycopeptides or molecular weight difference of sugar unit. The molecular weight of the carbohydrate in the glycopeptide was calculated from the molecular weights of the glycopeptide and the suggested peptide. The oligosaccharide composition and type were deduced from the molecular weight of the carbohydrate.

Oligosaccharide sequencing by exoglycosidase digestions

Trypsin in the digest of human CP was inactivated by boiling for 5 min at 100 °C. Aliquots of the digest (4 µg) were digested in a volume of 20 µl for 12 h at 37 °C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.0) using the following exoglycosidases alone or in combination: α2–3 neuraminidase, 20 mU/ml; α2–3,6,8,9 neuraminidase, 100 mU/ml; α1–3,4 fucosidase, 20 mU/ml; and β1–4 galactosidase, 30 mU/ml. Aliquots (0.08 µg) before and after exoglycosidase digestions were subjected to LC-ESI-MS at *m/z* 700 to 2000 in which MS/MS acquisition was not performed.

Results

Peptide mapping of tryptic digest of human CP (LC-ESI-MS/MS in *m/z* range of 400–2000)

The amino acid sequence of human CP (National Center for Biotechnology Information protein database: P00450) is shown in Fig. 1. The tryptic peptides, including potential N-glycosylation sites, are shown in bold type. Trypsin can digest human CP into seven glycopeptides containing only one potential N-glycosylation site. To determine the glycosylation state at each glycosylation site, we performed mass spectrometric peptide mapping of the tryptic digest of CP. An aliquot of 0.2 µg of the tryptic digest was analyzed by

LC-ESI-MS/MS in the *m/z* range of 400–2000 (data not shown). When molecular ions with more than a single charge were detected, the product ion spectrum was acquired automatically. Peptide identification of each product ion spectrum was done using the Mascot search engine. More than 70% of the amino acid sequence was identified; identified amino acids of CP are underlined in Fig. 1. Three peptides containing the potential N-glycosylation site (Asn208, Asn569, and Asn907 [residues 197–218, 558–579, and 895–917, respectively]) were detected, whereas peptides containing the other N-glycosylation sites were not detected. Thus, Asn119, Asn339, Asn378, and Asn743 might be glycosylated.

Glycosylation analysis of human CP (LC-ESI-MS/MS in the *m/z* range of 1000–2000)

N-glycosylated peptides have relatively high molecular weights due to their oligosaccharide moiety. Because ions at lower *m/z* values can be detected in the *m/z* range of 400–2000, glycopeptide ions with higher *m/z* values might be missed to obtain product ion spectra. To detect glycopeptide ions preferentially, another LC-ESI-MS/MS analysis was carried out in the *m/z* range of 1000–2000 using an aliquot of 0.4 µg of the tryptic digest. Fig. 2A shows a total ion chromatogram (TIC) of a TOF-MS scan for the full scan *m/z* 1000–2000. Fig. 2B shows a TIC of the product ion scan. Because product ion spectra of glycopeptide precursor ions have abundant carbohydrate B-ions, *m/z* 204 (HexNAc), *m/z* 186 (HexNAc-H₂O), *m/z* 366 (HexHexNAc), and *m/z* 292 (NeuAc), the extracted ion chromatogram at *m/z* 204.05–204.15 (HexNAc, 204.08) of the product ion scan is illustrated in Fig. 2C. The extracted ion chromatogram at *m/z* 204.05–204.15 of product ion spectra provides a useful indication of the selection of glycopeptide precursor ions. The glycopeptide ions were assigned based on an examination of product ion spectra using the information on amino acid sequences of the peptides containing a putative N-glycosylation site.

Identification of Asn119 glycopeptide

The product ion spectrum of 1366.6 (+3) at 26 min, labeled by A in Fig. 2C, is shown in Fig. 3A. There were abundant oligosaccharide oxonium ions such as *m/z* 204 (HexNAc), *m/z* 366 (HexHexNAc), *m/z* 186 (HexNAc-H₂O), *m/z* 168 (HexNAc-2H₂O), *m/z* 274 (NeuAc-H₂O), and *m/z* 292 (NeuAc). Thus, this precursor ion was assigned as a glycopeptide. Several fragment ions consistent with b- and y-series fragment ions [24] derived from the peptide EHEGAIYPDNTTDFQR (residues 110–125) were detected together with several deamidated (–17) or dehydrogenated (–18) b- and y-series ions and y-series ions with the GlcNAc residue. Thus, the peptide moiety EHEGAIYPDNTTDFQR was suggested. The carbohydrate's molecular weight, 2223.0, was calculated by subtracting the theoretical molecular weight of the peptide (1891.8) from

```

KEKHVYIGII ETTWDYASDH GEKKLISVDT EHSNLYLQNG PDRIGRLYKK ALYLOYTDET
FRITTEKPVW LGFLGPIIKA ETGDKVYVHL KNLASRPYTF HSHGITYYKE HEGAIYPDNT
TDFQRADDKV YPGEQYTYML LATEEQSPGE GDGNCVTRII HSHIDAPKDI ASGLIGLII
CKKDSLDKEK EKIHIDREFVV MFSVVDEKFS WYLEDNIKTY CSEPEKVDKD NEDFOESNRM
YSVNGYTFGS LPGLSMCAED RVKWLFGMG NEVDVHAAPF HGOALTNKNY RIDTINLPPA
TLFDAYMVAQ NPGEWMLSCQ NLNHLKAGLQ AFFQVQCKNR SSSKDNIRGK HVRHYIIAAE
EIIWNYAPSG IDIFTKENLT APGSDSAVFF EQGTRIGGS YKKLVYREYT DASFTNKRER
GPEEHLGIL GPVIAEVDG TIRVTFHNKG AYPLSIEPIG VRFNKNEGT YYSPEYNYPOS
RSVPPSASHV APTETFTYEW TVPKEVGPIN ADPVCLAKMY YSAVDPTKDI FTGLIGPMKI
CKKGLSHANG RQKDVDFEY LFPTVDFENE SLLLEDNIRM FTTAPDQVDK EDEDFOESNK
MHSNMGFMYG NQPLGTMCKG DSVVWYLFSA GNEADVHGII FSGNTYLWRG ERRDTANLFP
QTSLLTHMWP DTEGTFNVEC LITDHYTGGM KQKYTVNQCR ROSEDSTFYL GERTYIIAAV
EVEWDYSPQR EWEKELHHLQ EQNVSNAPLD KGEFYIGSKY KKVYRYQYTD SIFRVPVERK
AEEHLGILG POLHADVDGK VKIIFKNMAT RPYSHAHGV QTESSTVYPT LPGETLTYVW
KIPERSGAGT EDSACIPWAY YSTVDQVKDL YSGLIGLIV CRRPYLVFN PRKLEFALL
FLVDFDENES YLDDNKTYS DHPEKYNKDD EEFIESNKMH AINGRMFENL OGLTMHVGDG
VNWYLMGMGN EIDLHTVHFH GHSFQVQKRG VYSSDVDFIF PGTYOTLEMF PRTPGIWLLH
CHVTDHIHAG METTYTVLQN EDTKSG

```

Fig. 1. Primary amino acid sequence of human CP (P00450). The tryptic peptides, including potential N-glycosylation sites, are shown in bold type. Tryptic peptides identified in the LC-ESI-MS/MS analysis are underlined. Cysteine residues are carboxymethylated. Identified N-glycosylation sites are indicated by arrow.

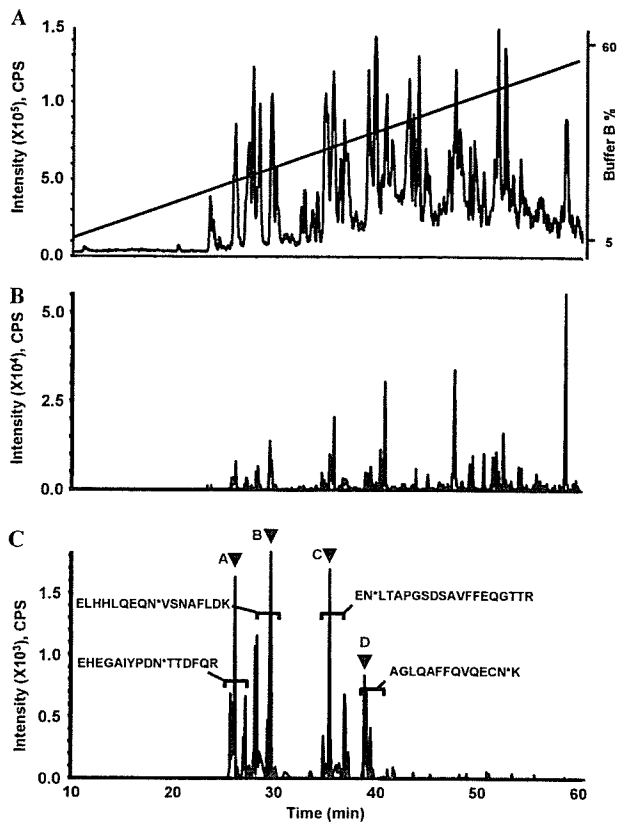


Fig. 2. LC-ESI-MS/MS in the m/z range of 1000–2000 of the tryptic digest of human CP. (A) TIC of the TOF-MS scan for the full-scan m/z 1000–2000 and the HPLC gradient. (B) TIC of the product ion scan acquired data-dependently. (C) Extracted ion chromatograph at m/z 204.05–204.15 of the product ion spectra. Brackets denote glycopeptide fraction and peptide sequences of the glycopeptides. Product ion spectra indicated by A–D are shown in Fig. 3.

the calculated molecular weight of the glycopeptide (4096.7) and adding the molecular weight of H₂O (18.0). The presence of product ions at m/z 274 (NeuAc-H₂O) and m/z 292 (NeuAc) suggested sialylation of the oligosaccharide. Thus, the carbohydrate's composition, [HexNAc]₄[Hex]₅[NeuAc]₂, was deduced.

Identification of Asn743 glycopeptide

The product ion spectrum of 1628.4 (+3) at 29 min, labeled by B in Fig. 2C, is shown in Fig. 3B. This precursor ion was assigned as a glycopeptide due to the presence of abundant oligosaccharide oxonium ions such as m/z 204 (HexNAc), m/z 366 (HexHexNAc), and m/z 292 (NeuAc) in the product ion spectrum. Several fragment ions were consistent with theoretical b- and y-series fragment ions derived from the peptide ELHHLQEQN⁷⁴³VSNAFLDK (residues 735–751). Doubly charged ions of peptide (m/z 1011.7), peptide + HexNAc (m/z 1113.1), peptide + 2HexNAc (m/z 1214.6), peptide + 2HexNAc + Hex (m/z 1295.5), peptide + 2HexNAc + 2Hex (m/z 1376.7), and peptide + 2HexNAc + 3Hex (m/z 1457.5) showed the sequential fragmentation of the pentasaccharide carbohydrate core. The

carbohydrate's molecular weight, 2879.1, was calculated from the theoretical molecular weight of the peptide (2021.0) and the calculated molecular weight of the glycopeptide (4882.1). The carbohydrate's composition, [HexNAc]₅[Hex]₆[NeuAc]₃, was deduced from the molecular weight.

Identification of Asn378 glycopeptide

The product ion spectrum of 1444.6 (+3) at 35 min, labeled by C in Fig. 2C, is shown in Fig. 3C. Abundant oligosaccharide oxonium ions were detected, as were several fragment ions consistent with b- and y-series fragment ions derived from the peptide EN³⁷⁸LTAPGSDSAVFFEQGTTR (residues 377–391). The carbohydrate's molecular weight, 2222.9, was calculated from the theoretical molecular weight of the peptide (2126.0) and the calculated molecular weight of the glycopeptide (4330.9). Thus, the peptide moiety ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR and the carbohydrate's composition, [HexNAc]₄[Hex]₅[NeuAc]₂, were suggested.

Identification of Asn339 glycopeptide

The product ion spectrum of 1282.6 (+3) at 39 min, labeled by D in Fig. 2C, is shown in Fig. 3C. The spectrum contains abundant oligosaccharide oxonium ions, and several fragment ions consistent with b- and y-series fragment ions derived from the peptide AGLQAFFQVQECN³³⁹K (residues 327–340) were detected. The product ion spectrum contains the ions of the peptide (m/z 1640.8) and peptide + HexNAc (m/z 1843.9) and several y-series fragment ions of the peptide with a GlcNAc residue. The carbohydrate's molecular weight, 2223.0, was calculated from the theoretical molecular weight of the peptide (1639.7) and the calculated molecular weight of the glycopeptide (3844.7). Thus, the peptide moiety AGLQAFFQVQECNK and the carbohydrate's composition, [HexNAc]₄[Hex]₅[NeuAc]₂, were suggested.

Heterogeneity of oligosaccharides at each glycosylation site

Glycopeptides with the potential N-glycosylation sites Asn119, Asn339, Asn378, and Asn743 were detected, whereas no glycopeptides containing the other sites (Asn208, Asn569, and Asn907) could be detected in this LC-ESI-MS/MS analysis. These findings suggest that Asn119, Asn339, Asn378, and Asn743 of human CP are glycosylated and that Asn208, Asn569, and Asn907 are not. Once a glycopeptide was identified, the other glycopeptides with the same peptide could be easily assigned because they were eluted at a similar retention time in the order of the number of NeuAc and had similar product ion spectra and molecular weight difference of sugar units. The oligosaccharide heterogeneity at each four N-glycosylation sites was determined by mass spectrum. For a representative example, the mass spectrum of the glycopeptides containing

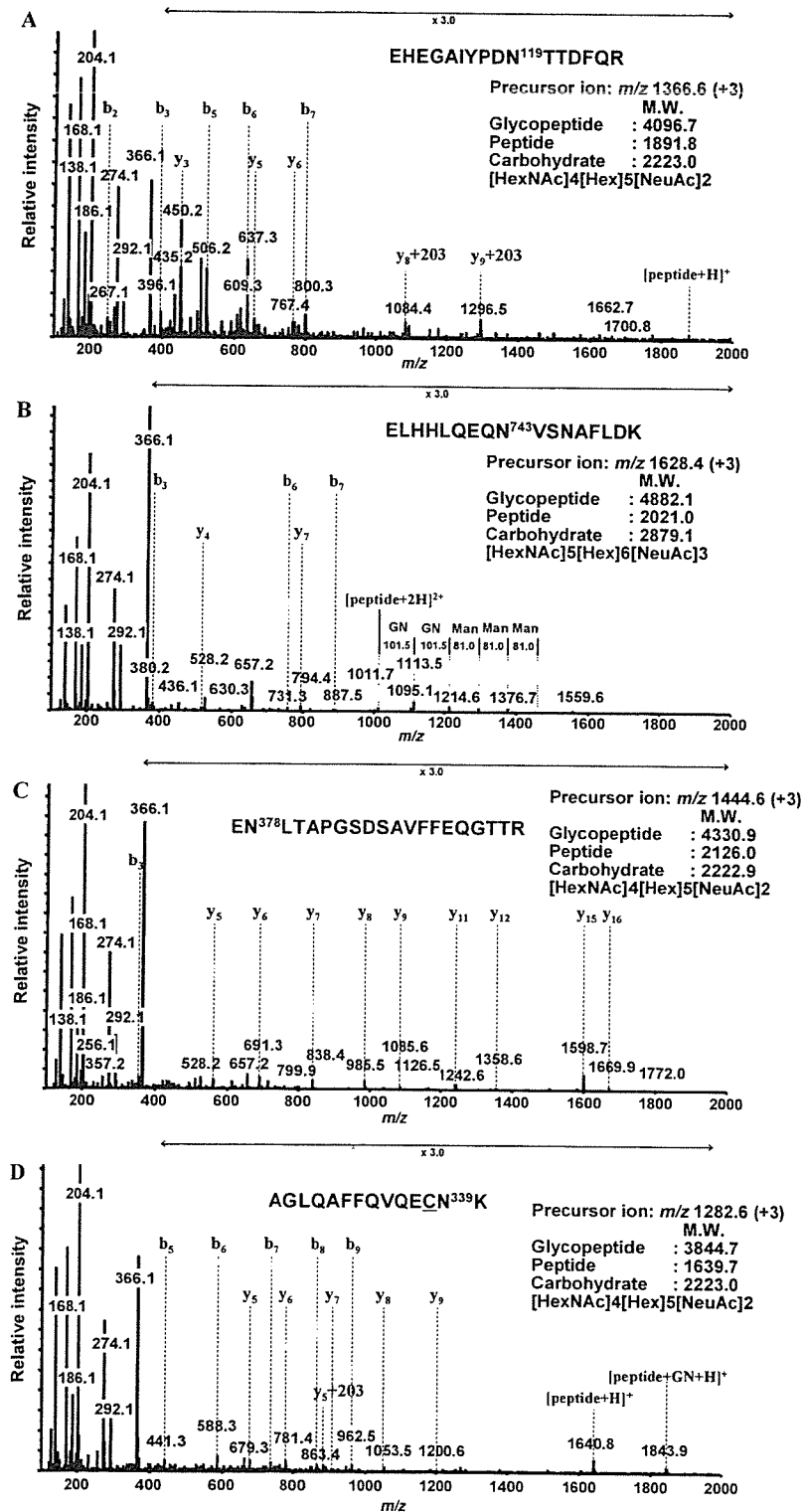


Fig. 3. Product ion spectra of m/z 1366.6 (+3) at 26 min (A), m/z 1628.4 (+3) at 29 min (B), m/z 1444.6 (+3) at 35 min (C), and m/z 1282.6 (+3) at 39 min (D) labeled by A, B, C, and D, respectively, in Fig. 2C. These spectra show abundant carbohydrate-derived ions at m/z 168 (HexNAc-2H₂O), m/z 186 (HexNAc-H₂O), m/z 204 (HexNAc), m/z 366 (HexHexNAc), m/z 274 (NeuAc-H₂O), and m/z 292 (NeuAc). The b- and y-series fragment ions [24] derived from the peptide moiety were observed. The molecular weights of the oligosaccharide were calculated from the molecular weights of the glycopeptide and peptide, and the deduced oligosaccharide composition is presented. Cysteine residue was carboxymethylated.

Asn743 at 27.5 to 31.5 min is shown Fig. 4. The results of glycosylation analysis are summarized in Table 1. Deduced compositions of the oligosaccharides are estimated based on the calculated molecular weights of the oligosaccharides. Relative peak intensity was calculated by comparing triply charged glycopeptide ions. All glycosylation sites were occupied by at least three kinds of oligosaccharides, namely disialobiantennary structures ($[\text{HexNAc}]_4[\text{Hex}]_5[\text{NeuAc}]_2$), disialobiantennary structures with fucose ($[\text{HexNAc}]_4[\text{Hex}]_5[\text{NeuAc}]_2[\text{Fuc}]_1$), and trisialotriantennary structures ($[\text{HexNAc}]_5[\text{Hex}]_6[\text{NeuAc}]_3$). Trisialotriantennary structures with one fucose or two fucoses ($[\text{HexNAc}]_5[\text{Hex}]_6[\text{NeuAc}]_3[\text{Fuc}]_{1-2}$) were also detected at Asn119 and Asn743; furthermore, tetrasialotetraantennary structures with no fucose or one fucose ($[\text{HexNAc}]_6[\text{Hex}]_7[\text{NeuAc}]_4[\text{Fuc}]_{0-1}$) were detected at Asn743.

Linkage analysis of oligosaccharides by exoglycosidase digestion

To elucidate the oligosaccharide structure in terms of sequence and linkage, aliquots of the tryptic digest were further digested with exoglycosidases. As a representative example, Fig. 5 shows integrated mass spectra during the periods at which Asn119 glycopeptides were eluted in LC-ESI-MS analyses before and after digestion with exoglycosidase arrays. Treatment with α 2–3 neuraminidase removed one NeuAc residue from most of the triantennary structures ($[\text{HexNAc}]_5[\text{Hex}]_6[\text{NeuAc}]_3[\text{Fuc}]_{0-2}$) and a small amount of biantennary structures ($[\text{HexNAc}]_4[\text{Hex}]_5[\text{NeuAc}]_2[\text{Fuc}]_{0-1}$) (Fig. 5B). A minor amount of triantennary structures removed two NeuAc residues. Thus, it appears that most triantennary structures contain one α 2–3-linked NeuAc. Treat-

ment with α 2–3 neuraminidase + β 1–4 galactosidase removed all terminal galactose residues from the desialylated glycans without fucose residues but only partially digested terminal galactoses from the desialylated glycans with fucoses (Fig. 5C). The addition of α 1–3,4 fucosidase to α 2–3 neuraminidase + β 1–4 galactosidase treatment completely digested the remaining terminal galactose by releasing one fucose and one galactose (Fig. 5D). Thus, galactose residues are linked β 1–4 to GlcNAc, and undigestion of terminal galactose by β 1–4 galactosidase is due to attachment of fucose [25,26]. Because galactose was linked to GlcNAc in the β 1–4 position, the fucose removed with α 1–3,4 fucosidase may be linked α 1–3 to GlcNAc but not α 1–4 to GlcNAc. These data strongly suggested that sialyl Lewis X structure was present in human CP. Sialyl Lewis X structure was present predominantly in triantennary oligosaccharides, but a small amount seemed to be present in biantennary oligosaccharides as well. The remaining fucose residue may be linked α 1–6 to reducing end GlcNAc (core fucose).

Fig. 6 shows integrated mass spectra of Asn119, Asn743, Asn378, and Asn339 glycopeptides in LC-ESI-MS analysis following digestion with α 2–3,6,8,9 neuraminidase + β 1–4 galactosidase. Treatment with α 2–3,6,8,9 neuraminidase + β 1–4 galactosidase removed all NeuAc and then removed terminal galactoses in the outer arms without fucose. Thus, this treatment could differentiate glycoforms based on the location of fucose residues. Fucosylation occurred predominantly at reducing end GlcNAc in biantennary oligosaccharides and occurred at reducing end GlcNAc and/or outer arm GlcNAc in triantennary oligosaccharides. Mass spectra of Asn119 and Asn743 glycopeptides showed higher oligosaccharide heterogeneity, and a minor amount of tetraantennary glycans could be detected. The glycosylation profile

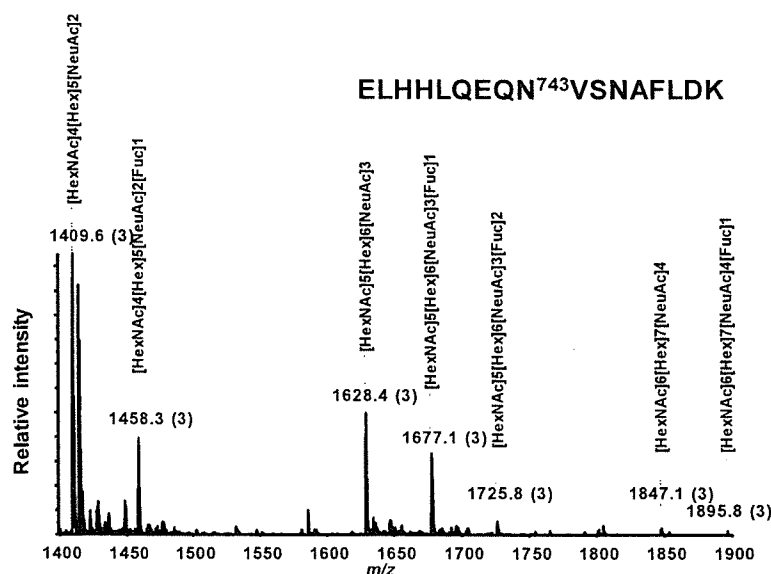


Fig. 4. Mass spectrum of the glycopeptides containing Asn743 eluting at 27.5–31.5 min from Fig. 2A. Deduced composition of the oligosaccharides is indicated based on the molecular weights of the oligosaccharides.

Table 1
Results of site-specific glycosylation analysis of human CP

| Retention time (min) | Glycopeptides | | Relative peak intensity ^a (%) | Peptide Sequence | Theoretical MW | Oligosaccharide | | Composition ^{b,c} |
|----------------------|---------------|--------|--|--------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------------------|
| | <i>m/z</i> | Charge | | | | Calculated MW | Theoretical MW | |
| 26 | 1415.3 | +3 | 52 | EHEGAIYPDN ¹¹⁹ TTDFQR | 1891.8 | 2369.0 | 2368.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1 |
| 26 | 1366.6 | +3 | 100 | EHEGAIYPDN ¹¹⁹ TTDFQR | 1891.8 | 2223.0 | 2222.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2 |
| 27 | 1682.7 | +3 | 6 | EHEGAIYPDN ¹¹⁹ TTDFQR | 1891.8 | 3171.3 | 3171.1 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]2 |
| 27 | 1634.0 | +3 | 21 | EHEGAIYPDN ¹¹⁹ TTDFQR | 1891.8 | 3025.2 | 3025.1 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1 |
| 27 | 1225.8 | +4 | | | | | | |
| 27 | 1585.3 | +3 | 24 | EHEGAIYPDN ¹¹⁹ TTDFQR | 1891.8 | 2879.2 | 2879.0 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3 |
| 27 | 1189.3 | +4 | | | | | | |
| 28 | 1458.3 | +3 | 35 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 2369.0 | 2368.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1 |
| 28 | 1409.6 | +3 | 100 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 2222.9 | 2222.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2 |
| 28 | 1057.5 | +4 | | | | | | |
| 28 | 1725.8 | +3 | 5 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 3171.5 | 3171.1 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]2 |
| 29 | 1294.6 | +4 | | | | | | |
| 29 | 1677.1 | +3 | 29 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 3025.3 | 3025.1 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1 |
| 29 | 1258.1 | +4 | | | | | | |
| 29 | 1628.4 | +3 | 43 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 2879.1 | 2879.0 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3 |
| 29 | 1221.5 | +4 | | | | | | |
| 31 ^d | 1895.8 | +3 | | | | | | |
| 31 ^d | 1422.1 | +4 | | | | | | |
| 31 ^d | 1847.1 | +3 | 2 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 3681.4 | 3681.3 | [HexNAc]6[Hex]7[NeuAc]4[Fuc]1 |
| 31 | 1385.6 | +4 | 3 | ELHHLQEQN ⁷⁴³ VSNAFLDK | 2021.0 | 3535.4 | 3535.2 | [HexNAc]6[Hex]7[NeuAc]4 |
| 35 ^d | 1493.3 | +3 | 6 | EN ³⁷⁸ LTAPGSDSAVFPEQGTTR | 2126.0 | 2369.0 | 2368.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1 |
| 35 | 1444.6 | +3 | 100 | EN ³⁷⁸ LTAPGSDSAVFPEQGTTR | 2126.0 | 2222.9 | 2222.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2 |
| 37 | 1712.1 | +3 | 8 | EN ³⁷⁸ LTAPGSDSAVFPEQGTTR | 2126.0 | 3025.2 | 3025.1 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3[Fuc]1 |
| 37 | 1284.3 | +4 | | | | | | |
| 37 | 1663.4 | +3 | 23 | EN ³⁷⁸ LTAPGSDSAVFPEQGTTR | 2126.0 | 2879.2 | 2879.0 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3 |
| 37 | 1247.8 | +4 | | | | | | |
| 39 | 1331.3 | +3 | 14 | AGLQAFFVQECN ³³⁹ K | 1639.7 | 2369.1 | 2368.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2[Fuc]1 |
| 39 | 1923.4 | +2 | | | | | | |
| 39 | 1282.6 | +3 | 100 | AGLQAFFVQECN ³³⁹ K | 1639.7 | 2223.0 | 2222.8 | [HexNAc]4[Hex]5[NeuAc]2 |
| 41 | 1501.3 | +3 | 6 | AGLQAFFVQECN ³³⁹ K | 1639.7 | 2879.2 | 2879.0 | [HexNAc]5[Hex]6[NeuAc]3 |

Note. All masses are monoisotopic. Cysteine residue was carboxymethylated.

^a Relative peak intensity was calculated by comparing same charge state glycopeptide ions. The intensity of the glycoform with maximum at each glycosylation site was taken as 100%.

^b The oligosaccharide composition was deduced from the molecular weight of the oligosaccharide.

^c The glycopeptide ions adducted by NH₄⁺ or Na⁺ were excluded.

^d Product ion spectra of these molecular ions were not acquired. However, these were considered glycopeptides because of a molecular weight difference of 146 (Fuc) and the same retention time as other glycopeptides.

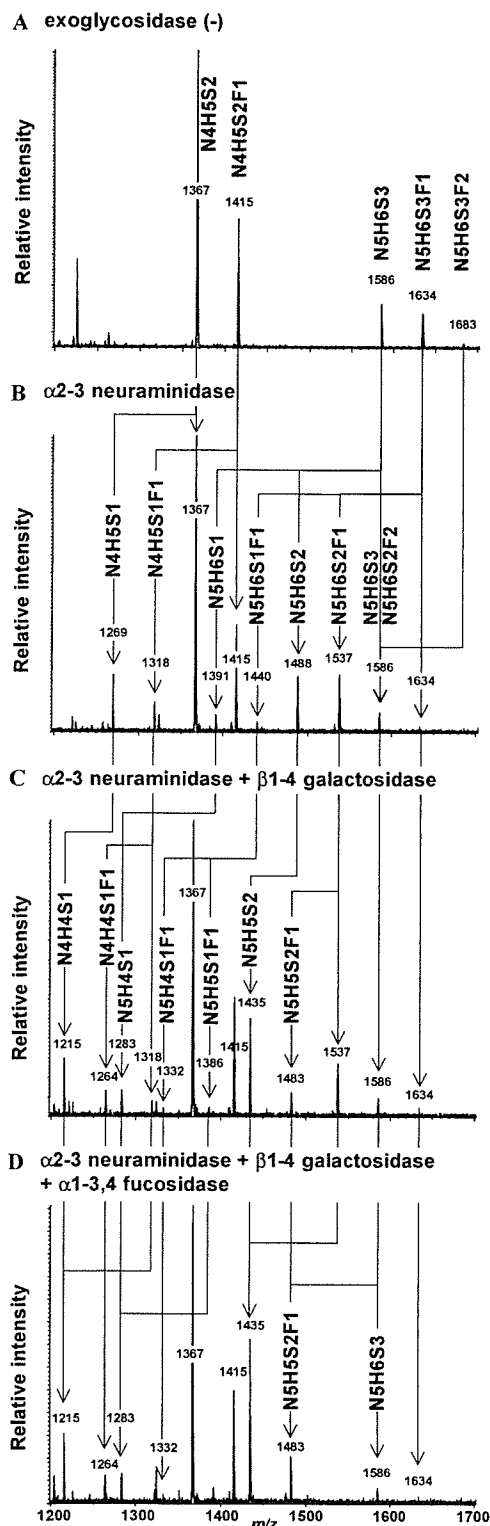


Fig. 5. LC-ESI mass spectra of the glycopeptides containing Asn119 digested with the following exoglycosidases: (A) exoglycosidase (-); (B) α 2-3 neuraminidase; (C) α 2-3 neuraminidase + β 1-4 galactosidase; (D) α 2-3 neuraminidase + β 1-4 galactosidase + α 1-3,4 fucosidase. Arrows between panels A and B, panels B and C, and panels C and D correspond to the digestion of NeuAc, Gal, and Gal+Fuc, respectively. H, hexose; N, *N*-acetylhexosamine; F, fucose; S, *N*-acetylneuraminic acid.

of Asn378 glycopeptides showed lower core fucosylation, and that of Asn339 glycopeptides showed lower branching. These glycosylation profiles provided the heterogeneity of fucose linkage and the number of arms at each glycosylation site in human CP.

Discussion

A site-specific glycosylation analysis of human CP was conducted using LC-ESI-MS/MS, where product ion spectra were acquired in a data-dependent manner. The collision energy for the product ion scan was adjusted from 30 to 80 eV depending on the size and charge of the precursor ion. Under these conditions, peptide precursor ions were degraded and produced b- and y-series fragment ions derived from the amino acid sequence. Glycopeptide precursor ions produced abundant carbohydrate ions (m/z 204, 186, 168, and 366) together with several low intensity b- and y-series fragment ions derived from the amino acid sequence [20,21]. Thus, product ion spectra of glycopeptides are readily distinguishable from those of peptides by such carbohydrate marker ions, and the peptide moiety in the glycopeptide could be deduced from the product ions that were consistent with the expected fragment ions derived from the peptide containing the N-glycosylation site. It is known that the glycopeptide ions are more labile than peptide ions and produce consecutive monosaccharide/polysaccharide losses at much lower collision energy, and this would provide information about branching and fucose location [18]. However, we used relatively high collision energy in this site-specific glycosylation analysis to identify the peptide ions in parallel with the detection and identification of the glycopeptide ions.

Protein coverage of more than 70% in human CP was obtained in the LC-ESI-MS/MS analysis with the m/z range of 400–2000 (for peptide mapping). The heterogeneity at four potential N-glycosylation sites was determined in the m/z range of 1000–2000 (glycosylation analysis). We could detect all of the potential glycosylation sites as either glycopeptides or nonglycosylated peptides. Peptides containing the potential N-glycosylation site Asn208, Asn569, or Asn907 were detected in nonglycosylated but not glycosylated forms. Peptides with the potential N-glycosylation site Asn119, Asn339, Asn378 or Asn743 were detected in glycosylated but not nonglycosylated forms. These findings indicate that Asn119, Asn339, Asn378, and Asn743 of human CP are glycosylated and that Asn208, Asn569, and Asn907 are not. Human CP was reported to have no O-linked glycosylation [8]. No information on O-glycosylation was obtained from this analysis. These results are consistent with a previous study determining the glycosylation sites of human CP [9].

Heterogeneity of oligosaccharides was determined at each of four glycosylation sites. Disialobiantennary structures with no fucose or one fucose ($[\text{HexNAc}]_4 [\text{Hex}]_5 [\text{NeuAc}]_2 [\text{Fuc}]_{0-1}$) and trisialotriantennary structures

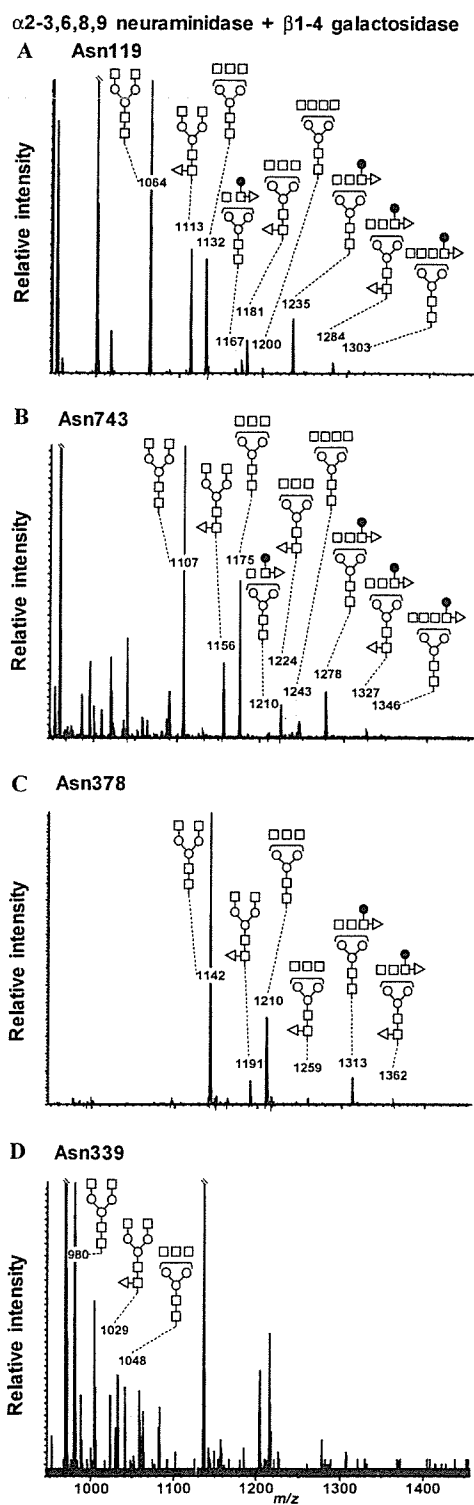


Fig. 6. LC-ESI mass spectra of the glycopeptides containing Asn119 (A), Asn743 (B), Asn378 (C), and Asn339 (D) after digestion with α 2-3,6,8,9 neuraminidase + β 1-4 galactosidase. Glycosylation profiles showed different degrees of branching and fucosylation at core GlcNAc and outer arm GlcNAc between glycosylation sites. Open circles, mannose; closed circles, galactose; open squares, *N*-acetyl glucosamine; open triangles, fucose.

([HexNAc]₅[Hex]₆[NeuAc]₃) were observed at all sites. These dominant oligosaccharides were consistent with structures published previously [7,8]. Furthermore, we detected trisialotriantennary structures with one fucose ([HexNAc]₅[Hex]₆[NeuAc]₃[Fuc]₁) at Asn119, Asn378, and Asn743, trisialotriantennary structures with two fucoses ([HexNAc]₅[Hex]₆[NeuAc]₃[Fuc]₂) at Asn119 and Asn743, and tetrasialotetraantennary structures with no fucose or one fucose ([HexNAc]₆[Hex]₇[NeuAc]₄[Fuc]₀₋₁) at Asn743.

To determine the linkage of fucose and NeuAc, exoglycosidase digestions were performed. Treatment with α 2-3 neuraminidase suggested that roughly one antenna of triantennary glycans was linked by NeuAc in the α 2-3 position. This is consistent with the previous findings that NeuAc is linked α 2-3 to the Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc group in the triantennary glycan in human CP [7,8]. Results from α 2-3 neuraminidase + β 1-4 galactosidase treatments with or without α 1-3,4 fucosidase suggested that fucose residues were linked to reducing end GlcNAc and/or outer arm GlcNAc in the α 1-3 position in the antenna where NeuAc is linked to galactose in the α 2-3 position. These findings indicated that human CP contains a certain amount of sialyl Lewis X structure in triantennary glycans. Treatment with α 2-3,6,8,9 neuraminidase + β 1-4 galactosidase reveals the heterogeneity of the location of fucosylation as well as the number of arms. Although relative peak intensity does not express the relative amount of each glycan due to the different ionization efficiencies, the mass spectra showed the difference in fucosylation pattern and number of arms among sites.

No asialo oligosaccharides were detected in this analysis. It is known that desialylated CP is rapidly cleared from the circulation by the asialoglycoprotein receptor within the parenchymal cells of liver [27,28]. It is possible that desialylated CP might be cleared immediately by the liver.

Although the *N*-linked carbohydrate structures linked to human CP have been studied, only a few carbohydrate structures have been reported and site-specific characterization of these oligosaccharides has not been described. To determine the glycosylation state at each glycosylation site, the tryptic digest was examined by LC-ESI-MS/MS, where product ion spectra were acquired data-dependently. Glycopeptide ions were assigned based on the product ion spectra. Fucose and NeuAc linkages were determined by exoglycosidase digestions. Our data successfully provided comprehensive information on the site-specific *N*-linked oligosaccharides in human CP. This method is a powerful technique for elucidating the glycosylation of a biological sample.

Acknowledgments

This study was supported by a Grant-in-Aid for Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation.

References

- [1] S. Osaki, D.A. Johnson, E. Frieden, The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 2746–2751.
- [2] K. Yoshida, K. Furihata, S. Takeda, A. Nakamura, K. Yamamoto, H. Morita, S. Hiyamuta, S. Ikeda, N. Shimizu, N. Yanagisawa, A mutation in the ceruloplasmin gene is associated with systemic hemosiderosis in humans, *Nat. Genet.* 9 (1995) 267–272.
- [3] Z.L. Harris, Y. Takahashi, H. Miyajima, M. Serizawa, R.T. MacGillivray, J.D. Gitlin, Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 2539–2543.
- [4] Z.L. Harris, A.P. Durley, T.K. Man, J.D. Gitlin, Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1996) 10812–10817.
- [5] N. Takahashi, T.L. Ortel, F.W. Putnam, Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 390–394.
- [6] M.L. Koschinsky, W.D. Funk, B.A. van Oost, R.T. MacGillivray, Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5086–5090.
- [7] K. Yamashita, C.J. Liang, S. Funakoshi, A. Kobata, Structural studies of asparagine-linked sugar chains of human ceruloplasmin. Structural characteristics of the triantennary complex type sugar chains of human plasma glycoproteins, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 1283–1289.
- [8] M. Endo, K. Suzuki, K. Schmid, B. Fournet, Y. Karamanos, J. Montreuil, L. Dorland, H. van Halbeek, J.F. Vliegthart, The structures and microheterogeneity of the carbohydrate chains of human plasma ceruloplasmin: a study employing 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 8755–8760.
- [9] N. Takahashi, Y. Takahashi, T.L. Ortel, J.N. Lozier, N. Ishioka, F.W. Putnam, Purification of glycopeptides of human plasma proteins by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 11–26.
- [10] R.J. Cousins, Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin, *Physiol. Rev.* 65 (1985) 238–309.
- [11] A. Mackiewicz, M.K. Ganapathi, D. Schultz, I. Kushner, Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins, *J. Exp. Med.* 166 (1987) 253–258.
- [12] J.E. Hansen, J. Iversen, A. Lihme, T.C. Bog-Hansen, Acute phase reaction, heterogeneity, and microheterogeneity of serum proteins as nonspecific tumor markers in lung cancer, *Cancer* 60 (1987) 1630–1635.
- [13] A. Senra Varela, J.J. Lopez Saez, D. Quintela Senra, Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer, *Cancer Lett.* 121 (1997) 139–145.
- [14] V. Ling, A.W. Guzzetta, E. Canova-Davis, J.T. Stults, W.S. Hancock, T.R. Covey, B.I. Shushan, Characterization of the tryptic map of recombinant DNA derived tissue plasminogen activator by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2909–2915.
- [15] S.A. Carr, M.J. Huddleston, M.F. Bean, Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography–mass spectrometry, *Protein Sci.* 2 (1993) 183–196.
- [16] M.J. Huddleston, M.F. Bean, S.A. Carr, Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests, *Anal. Chem.* 65 (1993) 877–884.
- [17] P.A. Schindler, C.A. Settineri, X. Collet, C.J. Fielding, A.L. Burlingame, Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion, *Protein Sci.* 4 (1995) 791–803.
- [18] M.A. Ritchie, A.C. Gill, M.J. Deery, K. Lilley, Precursor ion scanning for detection and structural characterization of heterogeneous glycopeptide mixtures, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 1065–1077.
- [19] F. Wang, A. Nakouzi, R.H. Angeletti, A. Casadevall, Site-specific characterization of the N-linked oligosaccharides of a murine immunoglobulin M by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 314 (2003) 266–280.
- [20] J.F. Nemeth, G.P. Hochgesang Jr., L.J. Marnett, R.M. Caprioli, Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry, *Biochemistry* 40 (2001) 3109–3116.
- [21] O. Krokhin, W. Ens, K.G. Standing, J. Wilkins, H. Perreault, Site-specific N-glycosylation analysis: matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole–quadrupole time-of-flight tandem mass spectral signatures for recognition and identification of glycopeptides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2020–2030.
- [22] A. Harazono, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Hayakawa, Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS, *Glycobiology* 15 (2005) 447–462.
- [23] C.W. Sutton, J.A. O'Neill, J.S. Cottrell, Site-specific characterization of glycoprotein carbohydrates by exoglycosidase digestion and laser desorption mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 34–46.
- [24] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.* 11 (1984) 601.
- [25] K. Maemura, M. Fukuda, Poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans attached to leukosialin: the presence of sialyl Le(x) structures in O-glycans, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 24379–24386.
- [26] S. Hemmerich, S.D. Rosen, 6'-Sulfated sialyl Lewis X is a major capping group of GlyCAM-1, *Biochemistry* 33 (1994) 4830–4835.
- [27] C.J. Van Den Hamer, A.G. Morell, I.H. Scheinberg, J. Hickman, G. Ashwell, Physical and chemical studies on ceruloplasmin: IX. The role of galactosyl residues in the clearance of ceruloplasmin from the circulation, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4397–4402.
- [28] A.G. Morell, G. Gregoriadis, I.H. Scheinberg, J. Hickman, G. Ashwell, The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1461–1467.

バイオリジクスのトランスレーショナルリサーチ (TR) (その2)

前号でタンパク質性医薬品の TR 実施の参考となると思われる医薬品開発関連のガイドラインを紹介したが、その他のガイドラインとして、「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期について (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 別添 医薬審第 1019 号 平成 10 年 11 月 13 日発, 医薬審第 1831 号 平成 12 年 12 月 27 日改正)」があげられる。これは主として化学合成医薬品を対象として、臨床試験実施までに非臨床安全性試験で確認しておくべき事項をまとめたものであるが、タンパク質性医薬品の TR 実施の条件を考える上でも参考となろう。また臨床試験の実施要領に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準 (GCP) (厚生省令第 28 号 平成 9 年 3 月 27 日付)」があり、(1)インフォームドコンセントの徹底、(2)治験審査委員会 (IRB) における臨床試験実施計画や患者説明文書の審議の必須化、(3)研究資金提供先と研究者との関係の十分な開示、(4)臨床試験で発生する有害事象・副作用に関する情報の開示あるいは IRB などへの報告の義務化、(5)第三者機関などへの臨床試験の進捗状況のモニタリング・監査の義務化、など臨床試験が備えるべき条件がまとめられている。なお GCP は、さらに医師主導型治験を可能にするための改訂がなされている (厚生労働省令第 106 号 平成 15 年 6 月 12 日付)。

タンパク質性医薬品以外に、近年ヒト由来細胞あるいは組織を疾病治療に用いる細胞治療が活発に試みられるようになってきている。この細胞治療に関するガイドラインとしては、細胞治療用医薬品の開発を目指して臨床研究や治験を行うにあたっての科学のおよび倫理的妥当性を示す上での基本的考え方、必要とされるデータや留意事項を扱った、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方 (厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第 266 号 昭和 13 年 3 月 28 日発)」があり、製品の品質、安全性確保に関する技術的要件の他、細胞・組織採取段階における医療機関の倫理委員会での審査、ドナーに対する説明・同意、ドナーの選択基準や適格性に関する事項、また使用段階における患者に対する説明と適用についての同意、患者などに関する情報の把握、個人情報の保護に関する事項などが上げられている。また我が国ではヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療用具に係る治験を依頼しようとする場合、厚生労働大臣にその安全性及び品質の確認を求める必要がある (確認申

請)。その際の提出資料の内容については「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針 (厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第 1314 号 平成 12 年 12 月 26 日発)」にまとめられている。

細胞治療とならんで先端的医療の代表ともいえる遺伝子治療では、治療行為として行う場合 (遺伝子臨床研究) と、製薬企業等が遺伝子治療用医薬品を開発する場合 (遺伝子治療用医薬品の治験) とで参照すべきガイドラインが異なる。前者では「遺伝子治療臨床研究に関する指針 (13 文科振第 1144 号科発第 0327001 号 平成 14 年 3 月 27 日)」があり、適用対象疾患の規定、治療に用いるベクター等の品質等の確認、インフォームドコンセントの明確化、実施機関の責任者の業務、審査委員会、厚生労働大臣へ意見を求める確認申請、記録の保存、秘密保護等などについて述べられている。この指針は一部改訂され (16 文科振第 931 号科発第 1228003 号 平成 16 年 12 月 28 日)、研究実施主体の責任、個人情報の取り扱いを含めた倫理面での手続き等がさらに明確化された。また後者の遺伝子治療薬の治験では「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について (通知) (厚生省薬務局通知 薬発第 1062 号 平成 7 年 11 月 15 日)」、および「遺伝子治療臨床研究に関する指針 (厚生省告示第 23 号 平成 6 年 2 月 8 日厚生大臣)」があり、さらにその改訂版 (厚生労働省通知 医薬発第 0329004 号 平成 14 年 3 月 29 日) が出されている。以上の細胞治療や遺伝子治療に関するガイドラインは、バイオリジクスの TR 実施の際の、特に倫理面での考え方の参考になるとと思われる。

なお、バイオリジクスは生体由来材料を製造に用いることから、特に感染症への特別な配慮が求められる。「生物由来原料基準 (厚生労働省告示 210 号 平成 15 年 5 月 20 日)」には医薬品製造に用いる生物由来原料に関する基準が定められているが、TR 実施においても、検討対象とする物質の製造に用いる原料に関して参考となろう。

以上、2 回にわたってバイオリジクスの TR 実施に際し、参考となる我が国の医薬品開発関連ガイドラインを紹介した。以上のガイドラインについては、そのほとんどは国立医薬品食品衛生研究所のホームページ (<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>) の厚生労働省関連情報より検索 ダウンロードが可能である。

(国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 川西 徹 Toru Kawanishi)

キーワード: トランスレーショナルリサーチ, バイオリジクス, 創薬 e-mail: kawanish@nihs.go.jp

第十四改正日本薬局方第二追補について**

早川 堯 夫*

本稿は日本薬局方部会を担当している審議会委員の立場から第二追補について紹介します。

1. 第十四改正日本薬局方第二追補の位置づけ

Table 1 に示すように平成 13 年 4 月に第十四改正日本薬局方が施行され、その後第一、第二追補の施行と続きますが、これらは単に第十四改正の延長線上というだけでなく、第十五改正に向けた一種のマイルストーンという位置づけとなります。

2. 作成の経緯

第二追補の作成の経緯を Table 2 に示します。平成 15 年 1 月に第一追補が施行された後も科学技術の進展と国際調和に対応するために審議を継続し、平成 14 年 3 月から 15 年 12 月の間の審議終了分である生薬総則、一般試験法、医薬品各条について第二追補として取りまとめました。その後平成 16 年 9 月に局方部会で審議し、更に薬事食品衛生審議会を経て、厚生労働大臣に答申を行った結果、平成 16 年末に大臣告示され、平成 17 年 1 月 1 日に施行となりました。この間、Table 2 に示すような各委員会で複数回審議されました。

第二追補の施行内容の詳細を Table 3 に示します。前述のように第二追補の施行は、一般には平成 17 年 1 月 1 日ですが、衛生材料等の削除については、4 月 1 日の施行となります。なお、「既承認の医薬品」、「承認を要しない医薬品」については、平成 18 年 6 月 30 日までの経過措置があり、また衛生材料等については、平成 18 年 9 月 30 日までは従前の例によることができる、いわゆるトランジット状態にあります。

3. 日本薬局方作成基本方針（薬食審答申）

第二追補は、第十四局制定後に薬食審から平成 13 年と平成 14 年に出された「日本薬局方作成基本方針」と、「今後の日本薬局方のあり方について」という答申に沿って改正作業がなされてきたものです。答申は、もともと第十五局に向けてのあり方を示したものでしたが、先ほど説明したように第二追補が第十五改正に向けたマイルストーンであることから、追補作成にあたって当然その考え方がとり込まれています。参考までに平成 13 年薬食審答申内容の一部概略を Table 4 に示します。

答申は、第十四改正局方公布後の医薬、薬学の進歩に対応するために日本薬局方の役割と性格、作成方針、基本方針達成のための第十五改正に向けての具体的な方策、施行時期、局方の組織に関する事項を内容とする作成基本方針を定めたものです。

それにはまず、役割と性格として、端的にいえば公的、公共、公開ということが謳われています。すなわち、日本薬局方はその時点でのわが国の医薬品の品質を確保するために必要な公的基準を示すものであり、医療上重要とされた医薬品の品質等にかかわる判断基準を明確にする役割を有しています。また薬局方は、関係者に広く活用されるべき公共の規格書としての性格を有するとともに、国民に医薬品に関する情報を公開し、説明責任を果たす役割を持っています。更に医薬品の品質に関する薬事行政の円滑かつ効率的推進及び国際的整合性の維持確保に役立てるものであるということです。

また、日本薬局方作成方針として、「5本の柱」というのが示されています。具体的には、①保健医療上重要な医薬品の全般的収載による充実化、②必要

* 独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問 東京都千代田区霞ヶ関 3-3-2 (〒100-0013)

** 当協会主催の「医薬品の品質確保をめぐる諸問題」(平成 17 年 2 月 18 日：東京、2 月 24 日：大阪)における講演による。

Table 1 第十四改正日本薬局方第二追補の位置づけ

第十四改正：平成 13 年 4 月施行
 同第一追補：平成 15 年 1 月施行
 同第二追補：平成 17 年 1 月施行
 第十五改正：平成 18 年 4 月施行（予定）

Table 2 第十四改正日本薬局方第二追補の作成の経緯

- 第一追補後の科学技術の進展と国際調和に対応するため、審議を継続
 - 審議事項のうち、生薬総則、一般試験法及び医薬品各条については、平成 14 年 3 月から平成 15 年 12 月の間の審議終了分を一部改正としてとりまとめ
 - 平成 16 年 9 月：一部改正の調査会原案を日本薬局方部会で審議
 - 平成 16 年 12 月薬事・食品衛生審議会に上程・報告、厚生労働大臣に答申
 - 平成 16 年 12 月 28 日厚生労働大臣告示
 - 平成 17 年 1 月 1 日施行
- 各委員会での審議
- | | |
|-------------|-----------------------------|
| ・総合委員会 | 9 回 |
| ・医薬品名称調査会 | 10 回 |
| ・医薬品添加物調査会 | 11 回 |
| ・理化学試験法委員会 | 30 回（うち物性 11 回、 製剤 11 回） |
| ・化学薬品委員会 | 24 回 |
| ・生物薬品委員会 | 11 回 |
| ・生物試験法委員会 | 10 回 |
| ・抗生物質委員会 | 19 回 |
| ・生薬等委員会 | 19 回 |
| ・総合小委員会 | 12 回 |
| ・PDG 関連調整会議 | 9 回 |
| ・製薬用水委員会 | 2 回 |
| ・日局標準品委員会 | 3 回 |

に応じた速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用，③国際調和の推進，④局方改正に係る透明性の確保及び日本薬局方の普及，⑤最新の分析法の積極的導入及び標準品の整備等の推進ということです。

4. 審議会答申に対する第二追補での対応

上述の審議会の日局作成基本方針や平成 14 年の薬食審答申「今後の日本薬局方のあり方について」に対して第二追補がどのように対応してきたかの例を Table 5 に示します。

第 1 に、保健医療上重要な医薬品の全面的収載に

Table 3 第十四改正日本薬局方第二追補施行内容の詳細

- 第二追補：平成 17 年 1 月 1 日施行
- 衛生材料（ガーゼ、滅菌ガーゼ、脱脂綿、精製脱脂綿、滅菌脱脂綿、滅菌精製脱脂綿、絆創膏）の削除は、平成 17 年 4 月 1 日施行
- 「既承認医薬品」及び「承認を要しない医薬品」についての平成 18 年 6 月 30 日までの経過措置：
 - 改正前の薬局方（旧薬局方）で定める基準は改正後の薬局方（新薬局方）で定める基準とみなすことができる
 - 新薬局方に収められている医薬品であっても新薬局方に収められていない医薬品とみなすことができる
- 衛生材料については、平成 18 年 9 月 30 日までは、なお従前の例によることができる。

よる充実化との方針に対応して 28 品目を他の規格書から移行して新規収載し、更に 11 品目を直接新規収載しました。第 2 番目の、必要に応じた速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用については、追補による 2 回の改正以外に 2 回の部分改正を行っています。1 回目の部分改正は平成 14 年 3 月で、医薬品の安全性に関わることに関連して、通則 40 に健康な動物について規定し、また安全性上の問題から供給停止になったフェナセチン製剤を削除しました。2 回目の部分改正は注射剤の採取容量試験法の新規収載とそれに伴う通則及び製剤総則の改正で、2005 年 6 月に告示を予定しています（平成 17 年 7 月 21 日に告示された）。これは国際調和に伴う部分改正になります。第 3 番目の国際調和の推進については、9 つの試験法と 9 添加物の各条を第二追補までに取り込みました。第 4 番目の透明性の確保及び普及については、2005 年の夏までに第二追補の英文版を作成したいと思っています。また、ホームページでは 2005 年 5 月を目指して公開する予定です。第 5 番目として、4 つの試験法、70 の各条及び 2 つの参考情報に対して最新の分析法を積極的に導入して改正を行いました。標準品の整備については、局方標準品委員会を設置し、標準品品質標準原案の提出資料とその作成方法及び記載例を作成して標準品の整備を図るという措置を講じています。また、今後の日本薬局方のあり方についての答申が平成 14 年 12 月に出ています。これによれば、従

Table 4 日本薬局方作成基本方針

- 平成 13 年 11 月薬食審答申
 - 第十四改正日本薬局方公布後、医学・薬学の進歩に対応するため、日本薬局方の役割と性格、作成方針、基本方針達成のための第十五改正に向けての具体的な方策、施行時期、日本薬局方の組織に関する事項を内容とする作成基本方針を定めた
- 答申に示された日本薬局方の役割と性格：公的、公共、公開
 - 日本薬局方は、その時点での学問・技術の進歩と医療需要に応じて、わが国の医薬品の品質を確保するために必要な公的基準を示すものであり、医薬品全般の品質を総合的に保証するための規格及び試験方法の標準を示すとともに医療上重要とされた医薬品の品質等に係る判断基準を明確にする役割を有する
 - 日本薬局方は、その作成に当たって、多くの医薬品関係者の知識と経験が結集されており、関係者に広く活用されるべき公共の規格書としての性格を有するとともに、国民に医薬品に関する情報を公開し、説明責任を果たす役割をもつ。
 - 更に医薬品の品質に関する薬事行政の円滑かつ効率的推進及び国際的整合性の維持・確保に資するものである
- 答申に示された日本薬局方作成方針「5本の柱」
 - 保健医療上重要な医薬品の全面的収載による充実化：医療上の必要性、繁用度又は使用経験等を指標に、保健医療上重要な医薬品は市販後可及的速やかな収載を目指す
 - 必要に応じた速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用
 - 国際調和の推進（欧州薬局方：EP 及び米国薬局方：USP と）
 - 日本薬局方改正に係る透明性の確保及び日本薬局方の普及
 - 最新の分析法の積極的導入及び標準品の整備等の推進

Table 5 審議会答申への第二追補での対応

日本薬局方作成基本方針（平成 13 年 11 月薬食審答申）への対応

- 保健医療上重要な医薬品の全面的収載により充実化
 - 他の規格書からの移行に伴い新規収載されたもの（28 品目）
 - 直接局方に新規収載されたもの（11 品目）
- 必要に応じた速やかな部分改正及びそれによる行政の円滑な運用
 - 2 回の追補改正以外に 2 回の部分改正
 - ・ 医薬品の安全性に係る情報に対応した部分改正
 - ・ 国際調和に伴う部分改正（平成 17 年 6 月告示予定）
 - 「注射剤の採取容量試験法」新規収載と、それに伴う通則及び製剤総則の改正
- 国際調和の推進（欧州薬局方：EP 及び米国薬局方：USP と）
 - 調和事項の取込み（第二追補までに 9 試験法、9 各条（医薬品添加物））
- 日本薬局方改正に係る透明性の確保及び日本薬局方の普及
 - 英文版の作成（第二追補は今夏完成予定）
 - インターネットによる公開（第二追補は平成 17 年 5 月公開予定）
- 最新の分析法の積極的導入及び標準品の整備等の推進
 - 見直しに伴う改正（4 試験法、70 各条、2 参考情報：調和に伴う改正を除く）
 - 標準品の整備（日局標準品委員会の設置、日本薬局方標準品品質標準原案の提出資料とその作成方法並びに記載例を作成）

今後の日本薬局方のあり方について（平成 14 年 12 月薬食審答申）への対応

- 医薬品各条規格の策定方針に従い、通則 30 による「別に規定する」を適用したもの

| | |
|--------------|------------------------|
| アジシロマイシン水和物 | 純度試験 (1) 類縁物質 (2) 残留溶媒 |
| トランネキサム酸カプセル | 溶出性 |
| トランネキサム酸錠 | 溶出性 |
| フロプロピオンカプセル | 溶出性 |
- 通則 30 医薬品各条の試験において、「別に規定する」とあり、日本薬局方にその規定が定められていない場合は、薬事法に基づく承認の際に規定するものとする。

来局方品とは承認不要，すなわち承認に必要なすべての規格を設定することが各条規格の策定方法でしたが，これをより柔軟に考え，必要に応じて品質確保の目的を達成することのできるような策定方法を採用することとし，さまざまな種類の医薬品，あるいは製造技術の多様化，知的所有権の保護という時代の推移に対応できるようにすべきとしています。これをルールとして示したのが通則 30 による「別に規定する」という項目で，この部分はメーカーごとの個々の承認事項として規定するという扱いです。

第二追補ではアジスロマイシン水和物の純度試験の類縁物質及び残留溶媒，トラネキサム酸カプセルと錠剤，及びフロプロピオンカプセルの溶出性がそれぞれ別に規定するものに当てはまる品目として適用されています。

5. 第二追補の概要

第十四改正日本薬局方第二追補全体の概要を Table 6 に示します。一般試験法では新規は 1 項目，改正が 6 項目です。医薬品各条では第一部は新規品目が 27，改正品目が 53，削除品目が 1 品目，第二部は新規品目が 12，改正品目が 22，削除品目が 9 品目です。生薬総則では，改正が 1 項目あります。また，Table 7 は第二追補作成に係る審議に要した期間等を示しています。その期間は平成 14 年 3 月から平成 15 年 12 月で，延べ 154 名の委員に作成のご協力をいただき，委員会の数は 19 で，その開催総数は 169 回です。1 回当たりの開催時間を 3 時間とすると延べ 500 時間以上を審議に費やしたことになります。それだけでなく，もちろんこの間にいろいろな調査や検討もありましたので，実際にはもっと多くの時間がかかっています。

Table 6 第十四改正日本薬局方第二追補について－概要－

| | | |
|--------|----------|----------|
| 一般試験法： | 新規 1 項目 | 改正 6 項目 |
| 医薬品各条 | | |
| 第一部： | 新規 27 品目 | 改正 53 品目 |
| | 削除 1 品目 | |
| 第二部： | 新規 12 品目 | 改正 22 品目 |
| | 削除 9 品目 | |
| 生薬総則： | 改正 1 項目 | |

Table 7 第二追補作成に係る審議について

| | |
|----------|---|
| 審議期間： | 平成 14 年 3 月～平成 15 年 12 月 (薬事分科会報告及び日本薬局方部会審議を除く) |
| 委員数： | 154 名 (第二追補の作成に従事した専門家の数) |
| 委員会数： | 19 (日本薬局方部会の下に設置された審議組織の数) |
| 委員会開催総数： | 169 回 (1 回開催あたりの審議時間は約 3 時間，延べ 500 時間以上) |

6. 日本薬局方の審議組織

現在の日本薬局方審議の組織図を Fig. 1 に示します。破線から右側が医薬品医療機器総合機構が事務局として扱う委員会の構成で，破線から左側の調査会と部会が審査管理課の所轄になります。そして，第十四局以降新しくできた委員会は網掛けで示します。化学薬品委員会についてはワーキンググループを 3 つ作りまし。また，これ以外に，局方収載各条原案の整備を行うための検討会も運営しております。

7. 一般試験法について

一般試験法については，Table 6 で示したように 6 つの試験法の改正と 1 つの試験法を新規に収載しました。このうち 2 つ（無菌試験法，強熱残分試験法）の改正は，JP・EP・USP による国際調和に伴うものです。

7.1 生物試験法関係について

生物試験法関係については，Table 8 に示すように 3 つの試験法（エンドトキシン試験法，発熱性物質試験法，無菌試験法）を改正しました。まず，「エンドトキシン試験法」については国際調和上の誤解を招かないようにゲル化法の限度試験について表記を改正しました。「発熱性物質試験法」については，生物製剤基準との国内での統一及び EP 等との国際的整合性を視野に入れ，試験動物，装置及び器具，操作法，判定の改正を行いました。特に判定基準が大きく改正されています。判定基準は，従来，日局，USP，EP 及び IP の国際間，更に国内的にも「生物学的製剤基準」との間に大きな相違がありました。すなわち，従来の日局の判定法は，試料注射

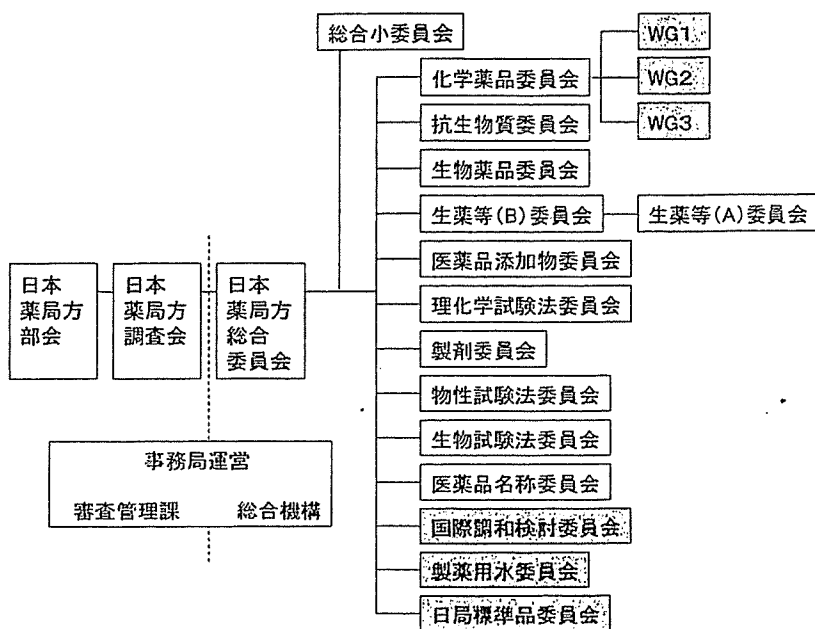


Fig. 1 日本薬局方の審議組織

Table 8 一般試験法について -生物試験法-

改正

- 7. 「エンドトキシン試験法」 (国際調和上誤解を招かないよう)
→ 「ゲル化法の (2) 限度試験法」 について表記改正
- 47. 「発熱性物質試験法」 (生物製剤基準及びEPとの整合性)
→ 試験動物, 装置及び器具, 操作法, 判定法の改正
- 59. 「無菌試験法」 (国際調和)
→ 全面的な改正: 培地性能試験用菌株, ロット当たりの抜き取り個数, 各培地当たりの最少試料採取量など
(なお 11 項目の不整合: 部分調和)

後体温上昇 0.6℃ 以上を示す試験動物 (ウサギ) の数が第 1 回試験では 3 匹のうち 2 匹以上のとき陽性、0.6℃ 以上を示すウサギが 1 匹であるとき又は 3 匹の体温上昇の合計が 1.4℃ を超えたときは第 2 回試験を行って 5 匹のうち 2 匹が 0.6℃ 以上を示すとき陽性として「不適」という判定を下すものであり、USP, EP 及び「生物学的製剤基準」のように「適合」を判定する方法ではありませんでした。そこで今回の改正では、「生物学的製剤基準」と判定法を同じにしました。Table 9 に改正された発熱性物質試験法の合否判定法を示しますが、3 匹の動物を使って、体温上昇度の和が 1.3℃ 以下であれば適、

Table 9 発熱性物質試験法合否判定法の改正

EP 3rd Ed. :

| 試験回数 | 累積動物数 | 体温上昇度の和 | |
|------|-------|---------|---------|
| | | 「適」 | 「不適」 |
| 1 | 3 | 1.15℃以下 | 2.65℃以上 |
| 2 | 6 | 2.80℃以下 | 4.30℃以上 |
| 3 | 9 | 4.45℃以下 | 5.95℃以上 |
| 4 | 12 | 6.60℃未満 | 6.60℃以上 |

生物学的製剤基準(1993/2004) :

| 試験回数 | 累積動物数 | 体温上昇度の和 | |
|------|-------|---------|--------|
| | | 「適」 | 「不適」 |
| 1 | 3 | 1.3℃以下 | 2.5℃以上 |
| 2 | 6 | 3.0℃以下 | 4.2℃以上 |
| 3 | 9 | 5.0℃未満 | 5.0℃以上 |

日局 14 第二追補改正: 生物学的製剤基準(1993/2004)と同じ

2.5℃ 以上であれば不適。値がこの間にあるものは、あと 3 匹追加し、累計 3.0℃ 以下であれば適、4.2℃ 以上であれば不適、値がこの間にあるものは、更に 3 匹追加し、累計 5.0℃ 未満であれば適、5.0℃ 以上であれば不適との規定にしました。細かい数字は異なりますが、これは EP 等の考え方とも同じです。しかし、発熱性物質試験法について 3 局間を比較しますと、Table 10 に示すような相違点がまだ残っています。

Table 10 発熱性物質試験法 3 局間の相違点

| | EP | USP | JP |
|---------|--------------------------------|---|----------------------------|
| 試験時の室温 | 飼育室の温度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ | 20 - 23 $^{\circ}\text{C}$ の一定温度 $< \pm 3^{\circ}\text{C}$ | 20 - 27 $^{\circ}\text{C}$ |
| ウサギ体重 | $> 1.5 \text{ kg}$ | 規定なし | $> 1.5 \text{ Kg}$ |
| 温度計の精度 | 0.1 $^{\circ}\text{C}$ | 0.1 $^{\circ}\text{C}$ | 規定なし |
| 温度計挿入深さ | 約 5 cm | $> 7.5 \text{ cm}$ | 60 ~ 90 mm |
| 予備試験 | 本試験 1 ~ 3 日前に生食を i.v. 投与 | 7 日前に疑似試験 | 1 ~ 3 日前に直腸温度を測定 |
| 投与量 | 0.5 ~ 10 mL/kg | 10 mL/kg | 10 mL/kg |
| 投与速度 | < 4 分間 | < 10 分間 | 規定なし |

「無菌試験法」は国際調和案件で、重要な一般試験法の一つであり、長く三局間で検討してきました。今回、調和の結果を反映し、全面的な改正を行いました。なお Table 11 に示すような 11 項目の不調和点が残し、部分調和に止まっています。エンドトキシン、発熱性物質試験、及び無菌試験のような各局方で長年不都合なく使われている一般試験法の国際調和は、歴史を背負い、変更に伴う波及効果も広範に及ぶため、全面的に調和されることはなかなか難しく、必ずしも平坦な道のりではありません。

7.2 理化学試験法関係について

理化学試験法関係については、Table 12 に示すように、2 つの改正があります。1 つ目は核磁気共鳴スペクトル測定法で、測定対象とする核を ^1H のみから ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{19}F 及び ^{31}P に拡大しました。その他装置、装置及び測定条件の記載、確認方法、 ^1H 及び ^{13}C NMR の各種測定法の改正を行いました。

2 つ目の強熱残分試験法は、歴史のある試験法で、有機物中に不純物として含まれる無機物の含量を知るための方法です。国際調和案件としての対応で、

Table 11 無菌試験の不調和点 (11項目)

- 1) 使用培地 (JP : SCD)
- 2) 寒天の含湿度
- 3) 培地保存期間のバリデーション
- 4) 密封容器の培地の使用期間
- 5) 水銀防腐剤を含む製剤用培地 (SCD→FTG)
- 6) 培地性能試験の実施頻度
- 7) メンブランフィルター法の洗浄量
- 8) 混濁判定の移植量
- 9) 再試験要件
- 10) ロット抜き取り試験の表記
- 11) 大容量製品の抜き取り個数 (2% or 10 容器)

Table 12 一般試験法について -理化学試験法-
改正

8. 「核磁気共鳴スペクトル測定法」
→核種の拡大、装置、装置及び測定条件の記載、確認方法、 ^1H NMR 及び ^{13}C NMR の各種測定法の改正
16. 「強熱残分試験法」 (国際調和)
→るつぼの材質、デシケータの乾燥剤、残分の量での規定から残分の百分率での規定に、強熱の操作をどこまで続けるか (恒量に達するか各条に規定された残分の百分率の限度値に適合するまで) などの改正

従来るつぼの材質で、日本で使用せず、外国では使用していたシリカ製等の材質を取り入れるように「適切なるつぼ」を使用できることとしました。乾燥剤についても同様に従来のシリカゲルに加えて適切な乾燥剤を使用できることとしました。また、従来は「残分の量」という用語を用い、「残分の量を計算する」、あるいは「残分の量が各条中に規定された……」、と表記していたものを、計算結果や規定が%であることの実態をふまえて「残分の百分率」という用語に代え、表記するようにしました。更に、強熱の操作をどこまで続けるかについて、従来は「恒量に達するまで」と規定していましたが、これを「残分が恒量に達するか、残分の百分率が各条中に規定された限度値に適合するまで続ける」というように改正し、国際調和を図りました。

7.3 物性試験法関係について

物性試験法関係については、新規が 1 つ、改正が 1 つあります (Table 13)。新規の試験法は、「粉体の粒子密度測定法」で、粉末状医薬品等の粒子密度を気体置換型ピクノメータを用いて測定する方法で

Table 13 一般試験法について—物性試験法—

新規

74. 「粉体の粒子密度測定法」(EP, USP にあり)
→粉末状医薬品等の粒子密度を, 気体置換型
ピクノメータを用いて測定する方法

改正

53. 「比表面積測定法」
→試験法の説明, 定数等の整備

す。EP, USP には既に収載され, 現在国際調和案件として検討中ですが, 今回それに先がけて一般試験法として収載しました。調和の結果によっては更に改正が必要となるかも知れません。なお, 国際調和案では「固体の密度測定法」となっていますが, 日局では国際調和案の内容について検討した結果, 前文の解説的な記述が一般試験法にはなじまないとの結論に達したため, その解説的な部分は後述の「参考情報」に「固体又は粉体の密度」として項目を設定し, 本文に当たる部分を「粉体の粒子密度測定法」として他の一般試験法と整合性がとれるようにして収載しました。

また, 「比表面積測定法」について, 本試験法の定義を明確にし, 式中に各パラメータの数値を併記するなどの一部改正を行いました。

8. 医薬品各条について (Table 14)

8.1 収載品目数

医薬品各条については, 品目数は, 第一部が新規 27, 改正 53, 削除 1 品目で, 従来 881 品目であったのが 907 品目になり, 第二部は新規 12, 改正 22, 削除 9 品目で, 481 品目から 484 品目となり, 総収載品目数が 1362 から 1391 品目になりました。

8.2 国際調和に伴う改正

国際調和に伴う改正が行われた医薬品各条については医薬品添加物が 6 品目あります (Table 14)。このうち, カルメロースカルシウムは 2003 年 7 月にサインオフして, 第二追補に収載されたように順当に日局に取り込まれていますが, それ以外の品目は, 収載されるまでにかなりの時間を要しました。特にベンジルアルコール (2000 年の 7 月にサインオフ) で顕著ですが, これは, 当時の国際調和では, 日局への収載を必ずしも意識しない状態で調和案にサインオフしてしまっていたためであります。今後はその教訓を生かし, できるだけ日局収載を意識し

ながら国際調和を図っていくことが重要だと考えています。

8.3 他の規格書からの移行に伴う新規収載品目

他の規格書からの移行に伴う新規収載品目は, 局外規 2002 から第一部が 11 品目, 第二部が 5 品目移行され, 局外生規から 8 品目, 局外規第三部から 6 品目, 局外規第四部から 3 品目となります。

8.4 局方に直接新規収載された品目

局方に直接新規収載された品目は, 第一部では塩酸ペニジピン等 6 品目, 第二部はブシ等 4 品目です。

8.5 削除品目

削除された品目のうち第一部のサントニン錠, 第二部のジキタリス, ジキタリス末は, 承認整理されて市場流通がないために削除されました。またガーゼ類などの 5 品目は医療機器への移行のために局方からは削除されました。更に絆創膏は雑品へ移行したために削除となりました。

9. 参考情報の改正について (Table 15)

参考情報については, 「8. 第十四改正日本薬局方における国際調和」という 1 項目を改正しました。この項目は, 日本薬局方が EP 及び USP と調和合意した試験法及び医薬品各条の日局への反映状況を示しています。すなわち, 第一追補までに対応した 2 つの試験法と 3 つの各条に加えて無菌試験法及びカルメロースカルシウムなど新規医薬品添加物の 6 品目, 更に後述する 5 つの新規収載参考情報についても, 生物学的製剤基準や既存のごく一部の試薬等との整合性が残るたん白定量法を除いては調和事項がそのまま反映されています。

10. 参考情報の新規収載

参考情報に新規に収載された項目は 7 項目あります (Table 16)。これは平成 14 年に答申された「今後の日本薬局方のあり方」の中の参考情報の有効利用という提言を具体的に実現していこうとする一環と捉えることができます。参考情報自体は附録という位置づけですが, 「日本薬局方と一体として運用することにより, 日本薬局方の質的向上や利用者の利便性の向上に資することができる。」とされています。具体的には, ①通則等重要な部分の解説あるいは補足を行うことにより, 利用者が日本薬局方より理解できるものとする, ②バイオテクノロジー

Table 14 医薬品各条について

• 品目数

| 第一部 | | 第二部 | |
|----------|-------|----------|-------|
| 新規 | 27 品目 | 新規 | 12 品目 |
| 改正 | 53 品目 | 改正 | 22 品目 |
| 削除 | 1 品目 | 削除 | 9 品目 |
| (881 品目) | | (481 品目) | |
| ↓ | | ↓ | |
| 907 品目 | | 484 品目 | |

総収載品目数 (1362 品目) → 1391 品目

• 国際調和に伴う改正

医薬品添加物

- ・カルメロースカルシウム (2003/7 sign off)
- ・コムギデンプン (2001/10 sign off)
- ・酢酸フタル酸セルロース (2001/10 sign off)
- ・トウモロコシデンプン (2001/7 sign off)
- ・バレイショデンプン (2001/10 sign off)
- ・ベンジルアルコール (2000/7 sign off)

• 他の規格書からの移行に伴う新規収載品目

日本薬局方外医薬品規格 2002 からの移行

(第一部) アルプロスタジル, エトポシド, 塩酸エペリゾン, 塩酸チザニジン, 塩酸ピレンゼピン, グルタチオン, シスプラチン, セラペプターゼ, ニコランジル, ニルバジピン, ピロキシカム (11 品目)

(第二部) 塩酸チアラミド錠, トリクロルメチアジド錠, フロセミド錠, フロプロピオンカプセル, メトクロプラミド錠 (5 品目)

日本薬局方外生薬規格 (1989) からの移行

ウコン, ウヤク, クコシ, ジコッピ, シツリシ, ジャショウシ, ソボク, ニンドウ (8 品目)

日本薬局方外医薬品規格第三部 [製剤の溶出性] からの移行

塩酸チアラミド錠, 塩酸ベニジピン錠, トリクロルメチアジド錠, ニルバジピン錠, フロセミド錠, メトクロプラミド錠 (6 品目)

日本薬局方外医薬品規格第四部 [抗生物質医薬品] からの移行

アジスロマイシン水和物, 注射用フロモキセフナトリウム, 注射用塩酸セフェピム (3 品目)

• 局方に直接新規収載された品目

- 第一部 塩酸ベニジピン, オキシトシン, コハク酸メチルプレドニゾロン, トラネキサム酸カプセル, トラネキサム酸錠, トラネキサム酸注射液, (6 品目)
- 第二部 インヨウカク, カンキョウ, プシ, プシ末 (4 品目)

• 削除品目

第一部 サントニン錠

第二部 ガーゼ, 滅菌ガーゼ, ジギタリス, ジギタリス末, 脱脂綿, 精製脱脂綿, 滅菌脱脂綿, 滅菌精製脱脂綿, 絆創膏

削除理由

下線 (一重線) : 承認整理がなされ市場流通がないため。

下線 (二重線) : 改正薬事法第 41 条第 3 項に基づく基準 (医療機器の基準) へ移行のため。

下線 (波線) : 雑品へ移行のため。

応用医薬品や高機能賦与製剤などの新しい技術を応用して開発された医薬品の品質評価に必要な新しい試験法, 近い将来日本薬局方に収載予定の試験法など, 一般試験法として収載されていないものを収載することにより, 高度な品質管理を必要とする医薬

品の開発を側面支援するとともに, 医薬品開発における全体的なレベルの向上に寄与する, ③国際調和の結果及びその重要な根拠に関する情報を提供する, ④その他, 医薬品の品質確保に有用な情報を収載することなどが参考情報の目標及び効用として挙げ

Table 15 参考情報の改正について

8. 第十四改正日本薬局方における国際調和
→第一追補までに対応した2試験法（エンドトキシン試験法，強熱残分試験法），3各条（添加物）に加え，改正された無菌試験法及び新規収載されたカルメロースカルシウム，コムギデンプン，酢酸フタル酸セルロース，トウモロコシデンプン，バレイショデンプン，ベンジルアルコール並びに以降のスライドに示す5つの参考情報（遺伝子伝子解析による微生物の迅速同定法，固体又は粉体の密度：調和作業中を除く。）について，調和の状況を示した。

Table 16 参考情報の新規収載

20. アミノ酸分析法（国際調和）
・たん白質，ペプチド，その他の医薬品のアミノ酸組成やアミノ酸含量の測定法
21. 遺伝子解析による微生物の迅速同定法
・医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において検出される微生物（細菌及び真菌）を，遺伝子解析法によって種又は属レベルで同定又は推定する手法
22. キャピラリー電気泳動法（国際調和）
・毛細管内で電荷を持った試料イオンが電場の影響下で移動することを利用して分離を達成する方法
23. 固体又は粉体の密度（国際調和作業中）
・集合体としての固体又は粉体の密度を，結晶密度，粒子密度及びかさ密度の3つのレベルで説明（「粉体の粒子密度測定法」の解説的部分を分離）
24. たん白質定量法（国際調和）
・医薬品に含まれるたん白質の定量法：7種類を例示
25. 等電点電気泳動法（国際調和）
・たん白質の等電点の違いを利用して分離する電気泳動法
26. ペプチドマップ法（国際調和）
・たん白質性医薬品，特に高純度のバイオテクノロジー応用医薬品の確認試験の一方法で，たん白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分析する方法

られています。

10.1 アミノ酸分析方法

国際調和において完全調和したもので，たん白質，ペプチド，その他の医薬品のアミノ酸組成やアミノ酸含量の測定法です。具体的には Table 17 に示す

8つの方法についてその操作法と原理，あるいはデータの計算，解析法について説明されています。ニンヒドリンによるポストカラム検出法や誘導体化してポストカラム，あるいはプレカラムでアミノ酸を分析するという方法が示されています。

10.2 遺伝子解析による微生物の迅速同定法

医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において検出される微生物を，遺伝子解析法によって種又は属レベルで同定又は推定する手法です。従来，微生物の同定法としては，微生物固有の形態，あるいは生理・生化学的性状，菌体成分の解析等を組み合わせる表現形質法が広く用いられてきました。これに対して，遺伝子解析による微生物の迅速同定法は，系統発生的に微生物を分類する手法で，微生物に固有の遺伝子領域，すなわち細菌に対しては，16SのrRNAの高度可変領域の一部，真菌については18SrRNAから5.8SrRNAの間のスペーサー領域（ITS1）を使い，この遺伝子配列を自動解析してデータベースと照合することによって，微生物を迅速に同定又は推定する試験法です（Table 18）。この手法は，従来法と比較すると同定法として客観的にも優れ，簡略化された試験法でもあります。

10.3 キャピラリー電気泳動法

キャピラリー電気泳動法も完全調和したものです。

Table 17 アミノ酸分析法

以下の方法について，操作法と原理，データの計算と解析法について説明

- 方法1：ニンヒドリンによるポストカラム検出法
方法2：OPAによるポストカラム蛍光検出法
方法3：PITCプレカラム法誘導体化法
方法4：AQCプレカラム誘導体化法
方法5：OPAプレカラム誘導体化法
方法6：DABS-Clプレカラム誘導体化法
方法7：FMOC-Clプレカラム誘導体化法
方法8：NBD-Fプレカラム誘導体化法

Table 18 遺伝子解析による微生物の同定法

従来法：表現形質法（形態，生理・生化学的性状，菌体成分）

本法：系統発生的に微生物を分類
微生物に固有の遺伝子領域

- ・細菌：16S rRNAの高度可変領域の一部
- ・真菌：ITS1領域
(18SrRNA-5.8SrRNA)

これは毛細管内で電荷を持った試料イオンが電場の影響下で移動することを利用して分離を達成する方法です。確認試験や純度試験に用いられます。代表的な糖たん白質性医薬品であるエリスロポエチンの分析例を Fig. 2 に示します。この方法を利用すれば、例えば、糖鎖構造の違いに基づき、糖たん白質の不均一性を直接評価することができます。

10.4 固体又は粉体の密度

参考情報の新規記載のうち、国際調和作業中のものとして「固体又は粉体の密度」があります。これは、7.3 物性試験法で述べた「粉体の粒子密度測定法」とセットの試験法で、国際調和の受け入れに当たって、試験法の部分と解説的部分を切り分け、解説的部分を参考情報に記載したものです。

10.5 たん白質定量法

医薬品に含まれるたん白質の定量法を例示したもので、Table 19 に示すように、紫外吸収法から窒素測定法まで7種類の方法が記載されています。このうち Lowry 法については既に生物学的製剤基準に変法が記載され、局方の各条でも変法が記載されたので、日局独自の記載事項として、「公定書に記載されている変法も可」と脚注に記載しています。Biuret 法についても、ピウレット試薬に用いる試薬の溶かし方について我が国で行っている例を日局独自の事項として記載しています。このため、たん白質定量法は完全調和にはなっていません。

10.6 等電点電気泳動法

たん白質の等電点の違いを利用して分離する電気

Table 19 たん白質定量法

1. 紫外吸収法
2. Lowry 法
日局独自の記載事項：
“公定書に記載されている変法も可”として脚注に「生物学的製剤基準及び薬局方医薬品各条」を追加した
3. Bradford 法
4. ビシンコニン酸法
5. Biuret 法
日局独自の記載事項：
「ピウレット試薬に用いる硫酸銅、クエン酸三ナトリウムニ水和物の溶解は熱湯ではなく水（必要ならば温める）」とした操作法に標準溶液の操作を追加
6. 蛍光法
7. 窒素測定法

泳動法です。Fig. 3 に等電点電気泳動法の実例を示します。これは国際標準品の成長ホルモンを分析した例ですが、このように確認試験、純度試験に利用できます。また、Fig. 4 にモノクロナール抗体医薬品の等電点電気泳動法を示します。これは糖鎖の違いを反映した分離をしています。

10.7 ペプチドマップ法

たん白質性医薬品、特に高純度のバイオテクノロジー応用医薬品の確認試験の一方法で、たん白質を化学的あるい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分析する方法です。Fig. 5 にペプチドマップ法の実例を示します。エリスロ

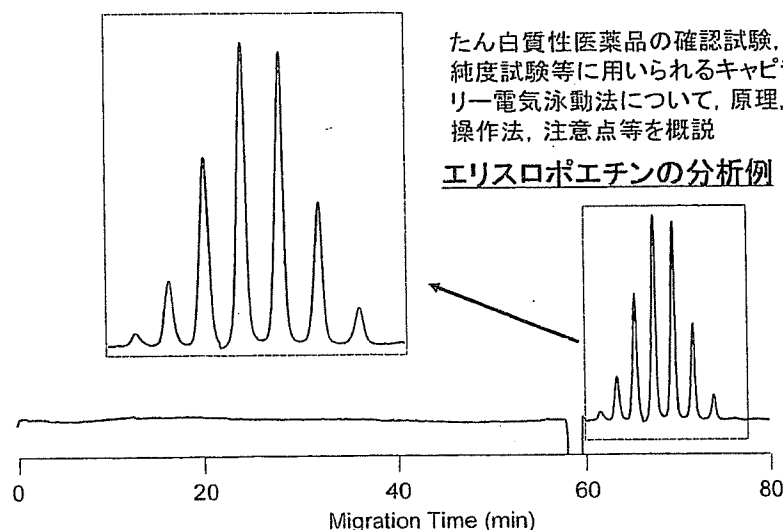


Fig. 2 キャピラリー電気泳動法