

## 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 掛樋一晃 近畿大学薬学部生物情報薬学研究室 教授  
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

生物薬品の一般試験法に関する国際調和の推進と各条試験法としての有用性の検討を目的として、分子量試験法としてのサイズ排除クロマトグラフィー法、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、質量分析法、および、糖たん白質の品質評価法としてのセルロースアセテート膜電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動-イムノプロット法、について、有用性と問題点を検討した。

その結果、（１）局方収載品であるウリナスタチンを試料とした分子量試験法の検討により、各条に収載されているサイズ排除クロマトグラフィー法では理論分子量と比較して高分子量に測定されること、質量分析（MALDI-TOF MS）法では理論分子量を反映した結果が得られることを示し、分子量試験法としての質量分析法の有用性を明らかにした。また、MALDI-TOF MS 分析用試料中の共存物質が、質量分析のシグナル強度に影響を与えることを見出した。（２）糖たん白質の品質評価法として、ウリナスタチンを用いた解析により、セルロースアセテート膜電気泳動法、キャピラリー電気泳動法が製剤の品質評価法として応用できる可能性を示した。さらに、ヨーロッパ医薬品品質管理部門（EDQM）が提供するエリスロポエチン標準品の次期ロット移行に伴う”Collaborative study for the replacement of erythropoietin BRP”に参加して、新旧ロットの比較を行い、糖たん白質の品質評価におけるキャピラリー電気泳動法の有用性を明らかにした。

### 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（SDS-PAGE）法が第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、生物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、糖たん白質の糖鎖試験法等があげられる。加えて、例えば、国際調和試験法の一つである SDS-PAGE 法は、分子量の違いに基いた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、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もあるなど、それぞれの試験法について、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。

そこで、本研究では、（１）分子量試験法としてのサイズ排除クロマトグラフィー法、SDS-PAGE 法、質量分析法、（２）糖たん白質の品質

評価法としてのセルロースアセテート膜電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGE-イムノブロット法について、日本薬局方収載品であるウリナスタチン、あるいは、欧州薬局方収載品であるエリスロポエチン等を試料として、各試験法の有用性と問題点を検討した。

## B. 研究方法

### B-1. 分子量試験法に関する検討

市販のウリナスタチン注射用製剤を試料として、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE、および、質量分析 (MALDI-TOF MS) により分子量を測定した。また、MALDI-TOF MS 分析に用いるマトリックス溶液にポリリジンやデキストラン等の高分子を添加してたん白質の質量分析を行い、シグナル強度とスペクトル形状への影響を解析した。

### B-2. 糖たん白質の品質評価法に関する検討

市販のウリナスタチン注射用製剤を用いて、セルロースアセテート膜電気泳動法、キャピラリー電気泳動法により2種類の製剤の同等性を評価した。さらに、ヨーロッパ医薬品品質管理部門 (EDQM) から提供されたエリスロポエチン標準品 (BRP2 及び cBRP3) について、キャピラリー電気泳動、および、SDS-PAGE-イムノブロットによる比較を行った。

## C. 研究結果および考察

### C-1. 分子量試験法に関する検討

#### C-1-1. ウリナスタチンを試料とした分子量試験法の検討

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を試料として、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試験法について再検討を行い、さらに、SDS-PAGE、あるいは、質量分析を利用する分子量試験法について検討した。

##### C-1-1-1. サイズ排除クロマトグラフィーによる

### 分子量測定

ウリナスタチンの医薬品各条に設定された分子量試験を参考に、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。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と算出された。測定された分子量は、日本薬局方の判定基準(62,000~72,000)に適合しているものの、理論値(タンパク質部分が15,457、糖部分が約8,500)と比較して著しく高分子量となっていることが分かった。

#### C-1-1-2. 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

先と同じ試料を用い、SDS-PAGEにより分子量測定を行った。メルカプトエタノールによる還元後、電気泳動を行い、クーマシーブルーで染色した結果、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た。

#### C-1-1-3. 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により製剤中のウリナスタチンを分析した。2種類のウリナスタチン製剤いずれにおいても、m/z 24,000にブロードな分子イオン(M+H)<sup>+</sup>が観察され、理論分子量を反映した結果が得られた。

#### C-1-2. 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

上記の結果から、理論分子量を反映した測定結果の得られる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た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場合があることを見出し、報告した(*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1156-1160, (2004))。

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、ポリエチレングリコール (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した。その結果、MALDI-TOF MS においては、今回試験した糖鎖などの修飾構造を持たない医薬品の場合、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された。ただし、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。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。

## C-2. 糖たん白質の品質評価法に関する検討

糖たん白質性医薬品では構造上の不均一性が避けられないことから、その品質特性について製造ロット間で恒常性を確保するための規格を設定し、一定性を確保する必要がある。そこで、糖たん白質性医薬品の同等性評価法として、セルロースアセテート膜電気泳動法、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-イムノブロットング法の有用性を検討した。

### C-2-1. ウリナスタチンを試料とした同等性評価法

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に基づき不均一性の高い糖タンパク質分子として存在する。2 種類のウリナスタチン製剤を用い、糖たん白質の同等性評価法として、セルロースアセテート膜電気泳動法およびキャピラリー電気泳動法の有用性を検討した。

#### C-2-1-1. セルロースアセテート膜電気泳動法

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後、Alcian blue 或いは Toluidine blue により染色する方法がしばしば用いられる。そこで、ウリナスタチン中のコンドロイチン硫酸鎖を指標とした同等性評価法として、セルロースアセテート膜電気泳動法による評価を行ったところ、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唆された。これらの結果から、セルロースアセテート膜電気泳動法はウリナスタチン製剤間の品質比較に有用な方法であると考えられた。

#### C-2-1-2. 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  $\alpha 1$  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おり、ウリナスタチンの同等性評価法としても有用であると考えた。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) を用いてウリナスタチン製剤 2 種類を

分析した。その結果、2 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 2 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製剤間の品質比較に有用な方法であると考えられた。

### C-2-2. エリスロポエチンを試料とした同等性評価法

エリスロポエチンは、アミノ酸 165 残基からなる酸性糖タンパク質であり、腎性貧血等の治療薬として世界各国で使用されている。ヨーロッパ医薬品品質管理部門 (EDQM) は ICH のガイドラインに準じた試験法により、欧州薬局方の標準品として供給するエリスロポエチンの規格を設定し、世界各国の研究機関との共同作業により設定した規格と試験法の妥当性について評価を行っている。我々は、エリスロポエチン標準品の次期ロット移行に伴う EDQM との共同作業として、“Collaborative study for the replacement of erythropoietin BRP(BSP091 study)” に参加し、キャピラリー電気泳動法と SDS-PAGE-イムノブロット法により現ロットおよび次期ロットの特性解析を行い、両分析法の同等性評価法としての有用性を検討した。

#### C-2-2-1. キャピラリー電気泳動法

“BSP091 FINAL STUDY PROTOCOL” に従い、キャピラリー電気泳動法によりエリスロポエチン BRP2 及び cBRP3 の分析を行った。いずれのクロマトグラムにおいても 7 本のピーク (isoform 2-8) が 50 分から 60 分の間に観察され、 $R_s > 1.5$  で良好に分離することができた。観察された各アイソフォームの相対比は EDQM の規格値

に適合した。また、isoform 5 と isoform 6 の分離度 ( $R_s$ ) は  $R_s > 1$  であり、isoform 2 の泳動時間の相対標準偏差が 2% 以下となり規格値を満たした。これらの結果から、キャピラリー電気泳動法によるエリスロポエチンのグライコフォーム評価は、高い分離能と定量性を兼ね備えた方法であり、同等性評価法として有用であると考えられた。

#### C-2-2-2. SDS-PAGE-イムノブロット法

約 1 mg/mL のエリスロポエチン BRP2 および cBRP3 を SDS-PAGE 後クーマシーブルーにより染色したところ、BRP2 および cBRP3 ともに、34kDa 付近にブロードなバンドが同程度の強度で観察され、他のバンドは確認されなかった。抗エリスロポエチン抗体を用いたイムノブロットを行った結果、BRP2 および cBRP3 ともに分子量 33kDa のブロードなバンドが同程度の強度で観察され、他にバンドは検出されなかった。

エリスロポエチンが単純タンパク質に比べブロードなバンドとして観察されたことから、試料を SDS-PAGE により分離し、クーマシーブルー染色ならびにイムノブロット法により検出する試験法は、エリスロポエチンが不均一性を持つことの確認に有効であることが示された。また、純度や不純物の試験としても有効と考えられた。しかし、不均一性を示す目的たん白質のグライコフォームの比較を行うには、キャピラリー電気泳動など、他の方法を用いる必要があると考えられた。

## D. 考察

### D-1. 分子量試験法に関する検討

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 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るため、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。

## D-2. 糖たん白質の品質評価法に関する検討

欧州薬局方エリスロポエチン標準品の評価を行う BSP091 study では、エリスロポエチンの物

理化学的特性解析法として、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGE-イムノブロッティング法の他、ペプチドマッピング法、サイズ排除クロマトグラフィー法が採用されている。いずれの方法も汎用性の高い分析方法であり、単純タンパク質のみからなる医薬品の特性解析法として有用であるといえる。一方、エリスロポエチンのように不可避免的な不均一性を持つ医薬品の場合、製品の同等性を保証するための成分の解析法としては、キャピラリー電気泳動法を除く 3 種の方法では十分ではない。特にタンパク質の翻訳後に付加される糖鎖の構造については生産条件の微細な変化などに伴って変動し、さらにそれらの変化が医薬品の活性等にも影響を及ぼすことが知られているが、タンパク質に付加する糖鎖の解析に関する試験法ならびに規格についてはヨーロッパ薬局方、日本薬局方のいずれにも規定されていない。糖タンパク質糖鎖の解析については、質量分析法やキャピラリー電気泳動法などによる解析技術が精度・感度・迅速性の点において目覚しく進歩しており、今後それらの技術を糖タンパク質性医薬品の特性解析へと応用し、医薬品の品質と恒常性を確保するための試験方法や規格を積極的に提言していくことが必要であると考えられる。

## E. まとめ

生物薬品の理化学試験法に関する国際調和の推進と各条試験法としての有用性の検討を目的として、分子量試験法および糖たん白質の品質評価法に関する検討を行い、以下の結果を得た。

### (1) 分子量試験法

局方収載品であるウリナスタチンを試料とした分子量試験法の検討により、各条に収載されているサイズ排除クロマトグラフィー法では理論分子量と比較して高分子量に測定されること、MALDI-TOF MS 法では理論分子量を反映した結果が得られることを示し、分子量試験法としての質量分析法の有用性を明らかにした。また、試料

中の共存物質が質量分析のシグナル強度に影響を与えることを見出した。

## (2) 糖たん白質の品質評価法

局方収載品であるウリナスタチンを用いた解析により、セルロースアセテート膜電気泳動法、キャピラリー電気泳動法が製剤の同等性評価法として応用できる可能性を示した。また、ヨーロッパ医薬品品質管理部門が提供するエリスロポエチン標準品の次期ロット移行に伴う” Collaborative study for the replacement of erythropoietin BRP” に参加して、新旧ロットの比較を行い、糖たん白質の品質評価におけるキャピラリー電気泳動法の有用性を明らかにした。

## 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) 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 Ovomucoid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136(1):23-32. (2005)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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（2005）
- 6) 早川堯夫、永田龍二：バイオリ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
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 早川堯夫：バイオリジクスの将来展望と課題、バイオリジクス：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
- 11) 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)
- 12) Gao Y, Eguchi A, Kakehi K, Lee YC Efficient preparation of glycoclusters from silsesquioxanes *Org Lett*. 6(20), 3457-3460 (2004)
- 13) 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)
- 14) 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)
  - 15) 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)
  - 16) 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)
  - 17) 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)
  - 18) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa, And Toru Kawanishi: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* 17 (97), 193-203 (2005)
  - 19) 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* 13(6), 401-411 (2006)
  - 20) 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)
  - 21) 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)
  - 22) 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)
  - 23) 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)
  - 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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 Spectrom.*, **19**(22), 3315-3321 (2005)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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
- 32) Nakajima K, Kinoshita M, Matsushita N, Urashima T, Suzuki M, Suzuki A, Kakehi K. Capillary affinity electrophoresis using lectins for the analysis of milk oligosaccharide structure and its application to bovine colostrum oligosaccharides. *Anal Biochem.* 2006 **348**(1), 105-114.
- 33) Naka R, Kamoda S, Ishizuka A, Kinoshita M, Kakehi K. Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography. *J Proteome Res.* 2006 **5**(1), 88-97.
- 34) Kamoda S, Nakanishi Y, Kinoshita M, Ishikawa R, Kakehi K. Analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides in glycoproteins detected on two-dimensional gel by capillary electrophoresis using on-line concentration method. *J Chromatogr A.* 2006 **1106**(1-2), 67-74.
- 35) Kamoda S, Kakehi K. Capillary electrophoresis for the analysis of glycoprotein pharmaceuticals. *Electrophoresis.* 2006 **27**(12), 2495-2504.
- 36) Matsuno YK, Nakamura H, Kakehi K. Comparative studies on the analysis of urinary trypsin inhibitor (ulinastatin) preparations. *Electrophoresis.* 2006 **27**(12), 2486-2494.
- 37) Kamoda S, Ishikawa R, Kakehi K. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for detailed studies on N-linked oligosaccharide profile of therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *J*



*Chromatogr A.* 2006 1133(1-2), 332-339.

- 38) Matsuno YK, Yamada K, Tanabe A, Kinoshita M, Maruyama SZ, Osaka YS, Masuko T, Kakehi K. Development of an apparatus for rapid release of oligosaccharides at the glycosaminoglycan-protein linkage region in chondroitin sulfate-type proteoglycans. *Anal Biochem.* 2007 362(2), 245-257.
- 39) 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.* 2006 1103, 296-306.
- 40) 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.* 2006 348, 259-68
- 41) 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，2006 37, 27-41.
- 42) 早川堯夫：局方の国際調和と日本薬局方の今後の動向，医薬品研究，2006 37(10), 676-696.
- 43) 早川堯夫：第十五改正日本薬局方の概要、医薬品各条(生物薬品)及び今後の動向，医薬品研究，2006 37(10), 769-788.
- 44) 早川堯夫：Biotechnology(品質)に関するガイドラインの動向について，医薬品研究，2007 38(1), 14-23.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

研究要旨 日本薬局方（JP）収載の生薬に関する国際ハーモナイゼーションを目的に新規収載品目「ブシ」「ブシ末」を共通の生薬を利用する中国、韓国、ヴェトナム等の国々に紹介し、試験法の比較を行い、香港市場品の調査研究に協力した。また、JPに指導を求めるキューバに協力し、試験法の普及を図った。

A. 研究目的

世界各国の薬局方における生薬は、それぞれの国の医薬品の歴史を反映している。ICHの構成国であるヨーロッパは、伝統的に薬用植物の利用が盛んで各々の国の薬局方及びヨーロッパ薬局方（EP）に収載されている品目も多い。もう一方のアメリカ薬局方（AP）は合成薬中心で、数年前までは生薬の収載品目は少なかったがサプリメント政策に呼応して生薬類が収載されるようになった。収載生薬に関しては、EPは草本性のハーブ類が多く地上部が多く使用されている。APの従来品目はヨーロッパ生薬が10品目程度であったが最近では主に地下部を使用するニンジン、トウキ等アジア産生薬が収載されている。JPの生薬を考える

と、使用する生薬が共通する東アジア各国との薬局方の共通認識（調和）が重要であることから中国、韓国それぞれと二国間での薬局方相互理解の交流を計ってきた。現在この交流は東アジアと環太平洋を加えたFHHに発展している。

JP第14改正第二追補は新規に「ブシ」（PROCESSI ACONITI RADIX）、「ブシ末」（PROCESSI ACONITI RADIX PULVERATA）を収載した。収穫したままの附子はアコニチン系アルカロイド、強心アルカロイド等活性の強い成分を含んでいて、それらの新陳代謝機能促進、強心、利尿、鎮痛、止瀉など多彩な活性を示す重要生薬である。また、Aconitineはヨーロッパではホメオパシー薬として長い歴史を持っている。中国では毒性の強

い附子を用いる処方と加熱などの調製加工を施すことにより毒性を弱めて使用する処方がある。J Pは、基原植物の *Aconitum* 属植物は種類が多くアルカロイド含量に差があること、また、毒性を軽減する調製加工法が様々であること等々の要因により慎重に調査を進めてきたが、詳細な検討の結果、各試験法が整い必要な規格値を設定することが可能となり、調製加工した「ブシ」(PROCESSI ACONITI RADIX)、 「ブシ末」(PROCESSI ACONITI RADIX PULVERATA) を第14改正第二追補に収載した。

そこでJ P新規収載品目のひとつとして「ブシ」「ブシ末」をF H H参加各国に紹介し、既に収載済みの中国(C P)、韓国(K P)、ヴェトナム(V P)との比較を行った。また、香港は独自の薬局方を作成していて、香港市場の生薬について調査を進めている。そこで香港市場の加工附子の調査に協力して加工法の異なる附子片のアルカロイドについて測定を行った。

J Pの生薬及び生薬試験法は他地域の国々から関心が深く、フィリピン、キューバ両国からの指導要請はJ I C Aプロジェクトに発展し、5年間の準備期間を経て、平成15年3月に The Philippines Pharmacopoeia として公布された。キューバについては平成16年に予備調査を行い、平成18年に研修生を受け入れ指導した。

## B. 研究方法

### 1. 基原植物の比較

J Pでは、基原植物 *Aconitum carmochaeli* Debxaux 及び *Aconitum japonicum* Thunberg に対し、加工法を下記の3通りに規定し、ジエステルアルカロイドであるアコニチン、ヒパコニチン、メサコニチンの量をHPLC法で測定し、加工法別に純度を規定している。

- 1 高圧蒸気処理により加工する。
- 2 食塩、岩塩又は塩化カルシウムの水溶液に浸せきした後、加熱又は高圧蒸気処理により加工する。
- 3 食塩の水溶液に浸せきした後、石灰を塗布することにより加工する。

### 2. 確認試験法

J Pの確認試験法は次のように規定している。

本品の粉末3gを共栓遠心沈殿管に入れ、ジエチルエーテル20mL及びアンモニア試液2mLを加え、10分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取する。この上澄液を蒸発乾固し、残留物をジエチルエーテル1mLに溶かし、試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフ用塩酸ベンゾイルメサコニン1mgをエタノール(99.5)10mL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 mL 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。次に酢酸エチル/エタノール (99.5) /アンモニア水 (28) 混液 (40:3:2) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用ドラージェンドルフ試液を均等に噴霧し、風乾後、亜硝酸ナトリウム試液を均等に噴霧するとき、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、標準溶液から得た黄褐色のスポットと色調及び  $R_f$  値が等しい。

### 3. 純度試験法

J P の純度試験法は次のように規定している。

ブシジエステルアルカロイド (アコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン及びメサコニチン) 本品の粉末約 0.5 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、水 3.0 mL を加えてよく振り混ぜた後、アンモニア試液 1.0 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を加えて 30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物はアンモニア試液 1.0 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を用いて、更にこの操作を 2 回行う。全抽出液を合わせ 40°C 以下で溶媒を減圧留去した後、残留物にブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液 (1:1) 10 mL を正確に加えて溶かし、この液を遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。試料溶液及び純度試験用ブシジエステ

ルアルカロイド混合標準溶液 20 mL につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液のアコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン及びメサコニチンに対応する各ピーク高さ、 $H_{TA}$  及び  $H_{SA}$ 、 $H_{TJ}$  及び  $H_{SJ}$ 、 $H_{TH}$  及び  $H_{SH}$ 、 $H_{TM}$  及び  $H_{SM}$  を測定し、次式により換算した生薬の乾燥物 1 g に対し、アコニチン、ジェサコニチン、ヒパコニチン及びメサコニチンの量を求めるとき、それぞれ 60 mg 以下、60 mg 以下、280 mg 以下及び 140 mg 以下で、更にこれら 4 成分の総量は 450 mg 以下である。

アコニチン ( $C_{34}H_{47}NO_{11}$ ) の量 (mg)

$$= \frac{CSA}{W} \times \frac{HTA}{CSA} \times 10$$

ジェサコニチン ( $C_{35}H_{49}NO_{12}$ ) の量 (mg)

$$= \frac{CSJ}{W} \times \frac{HTAJ}{CSJ} \times 10$$

ヒパコニチン ( $C_{33}H_{45}NO_{10}$ ) の量 (mg)

$$= \frac{CSH}{W} \times \frac{HTH}{CSH} \times 10$$

メサコニチン ( $C_{33}H_{45}NO_{11}$ ) の量 (mg)

$$= \frac{CSM}{W} \times \frac{HTM}{CSM} \times 10$$

$C_{SA}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用アコニチンの濃度 (mg/mL)

$C_{SJ}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用ジェサコニチンの濃度 (mg/mL)

$C_{SH}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用ヒパコニチンの濃度 (mg/mL)

$C_{SM}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用メサコニチンの濃度 (mg/mL)

$W$  : 乾燥物に換算した本品の秤取量 (g)

#### 試験条件

検出器 : 紫外吸光光度計 (測定波長 : アコニチン, ヒパコニチン及びメサコニチンは 231 nm, ジェサコニチンは 254 nm)

カラム : 内径 4.6 mm, 長さ 15 cm のステンレス管に 5 mm 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 : 40°C 付近の一定温度  
移動相 : ブシ用リン酸塩緩衝液/テトラヒドロフラン混液 (183 : 17)

流量 : メサコニチンの保持時間が約 31 分になるように調整する。

#### システム適合性

システムの性能 : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液 20 mL につき, 検出器の測定波長を 254 nm とし, 上記の条件で操作するとき, メサコニチン, ヒパコニチン, アコニチ

ン, ジェサコニチンの順に溶出し, それぞれの分離度は 1.5 以上である。

システムの再現性 : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液 1 mL をとり, ブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液 (1 : 1) を加えて 10 mL とする。この液 20 mL につき, 検出器の測定波長を 231 nm とし, 上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき, メサコニチンのピーク高さの相対標準偏差は 1.5% 以下である。

#### 4. 定量法

J P の定量法は次のように規定している。

本品の粉末約 2 g を精密に量り, 共栓遠心沈殿管に入れ, アンモニア試液 1.6 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を加えて 30 分間振り混ぜ, 遠心分離し, 上澄液を分取する。残留物は, アンモニア試液 0.8 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を用いて, 更にこの操作を 3 回行う。全抽出液を合わせ, 減圧で蒸発乾固する。残留物をエタノール (99.5) 5 mL に溶かし, 新たに煮沸し冷却した水 30 mL を加え, 0.01 mol/L 塩酸で滴定する (指示薬 : メチルレッド・メチレンブルー試液 3 滴)。ただし, 滴定の終点は液の緑色が青緑色を経て, 灰青色に変わるときとする。同様の方法で空試験を行い, 補正する。

0.01 mol/L 塩酸 1 mL = 6.037 mg  
総アルカロイド〔ベンゾイルアコ  
ニン ( $C_{32}H_{45}NO_{10}$ : 603.70) として〕

香港は中国薬典 (CP) とは別に  
独自の薬局方を作成していて、香港  
市場の生薬について調査を進めてい  
る。そこで香港市場の加工附子の調  
査に協力して加工法の異なる附子片  
のアルカロイドについて測定を行っ  
た。

香港市場の生薬は、黄附片、黒附  
片、淡附片、生附片、白附片、ほう  
附片各 3 試料を用いた。

キューバで薬局方を作成する際に  
候補となる生薬の情報収集を行い、  
それらの内の数品目の確認試験法の  
作成要領を指導した (JICA 事業)。

### C. 研究結果

基原植物の一つ、ハナトリカブト  
は共通しているが JP, CP 共にそ  
れぞれの国の *Aconitum* 属植物を用い  
ていて調製加工法も異なっている。

CP, KP, VP いずれも確認試験を設  
けていない。JP の確認試験において  
は呈色試薬として噴霧用ドラージェン  
ドルフ試液を噴霧し、風乾後に亜硝  
酸ナトリウム試液を噴霧すること  
により検出感度が約 10 倍向上してい  
る。

日本薬局方 (JP) では、「ブシ」  
「ブシ末」の収載にあたり、基原植  
物 *Aconitum carmochaeli* Debxau 及  
び *Aconitum japonicum* Thunberg に  
対し、加工法を下記の 3 通りに規定

し、ジエステルアルカロイドである  
アコニン、ヒパコニン、メサコ  
ニチンの量を HPLC 法で測定し、加工  
法別に純度を規定した。

- 1 高圧蒸気処理により加工す  
る。
- 2 食塩、岩塩又は塩化カルシウ  
ムの水溶液に浸せきした後、  
加熱又は高圧蒸気処理により  
加工する。
- 3 食塩の水溶液に浸せきした後、  
石灰を塗布することにより加  
工する。

定量法は、JP, CP, KP, VP いずれ  
も滴定法で行っている。試料採取量、  
抽出溶媒、指示薬などが異なる。

香港市場品の各附片についてはア  
コニン含量が最も高いのは黄附片  
で最も少ないのが黒附片で、その差  
は 200 倍であった。ヒパコニン、  
メサコニンについても同様で前者  
の差は 6 倍、後者の差は 700 倍以  
上であった。ベンゾイルアコニン量  
は白、黒両附片に多く、ほう附片に  
は少なかった。

キューバ薬局方に収載予定の生薬  
の一部はヨーロッパ生薬、また、残  
りはフィリピン等熱帯地域共通の薬  
用植物であった。これらの確認試験  
法として TLC 法の適用及びその際  
の指標化合物の同定を指導した。

### D. 考察

アコニン系ジエステルアルカロ  
イドは毒性が強いと同時に重要な生  
理活性を有している。そこで、調製

加工することにより減毒して用いる工夫がされている。JPで規定した試験法により品質の確認が可能であることからそれぞれの国で用いている「ブシ」類について詳細に検討し、実態を把握することが重要であると思われる。

キューバの薬局方委員会に生薬類の試験法の技術指導を行った。今後は収載予定の生薬類についてデータを揃え内容を充実することが必要である。他国の薬局方にJPが生かされ、国際的な調和が図れることは望ましいことである。

#### 結論

JP「ブシ」とCP, KP, VPの比較を行った。また、香港市場の附子加工片についてJP第14改正第二追補収載の「ブシ」試験法を適用してアコニチンジエステル類、モノエステル類の測定を行った。

JICA事業に発展したキューバ薬局方作成のための技術指導を行った。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表   なし.
2. 学会発表

Setsuko Sekita: Official Monographs of Processed Aconite Root and Powdered Processed Aconite Root in Japanese

Pharmacopoeia, FHH 3<sup>rd</sup> Standing Committee Meeting, June 29-July 1, 2005, Tokyo

関田節子: 日本生薬学会関東支部シンポジウム, 平成18年12月9日, 東京

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

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

薬局方の各条規格において医薬品添加剤のみに特異的な問題として、機能性関連の物性、添加剤中に添加された添加物、および水分関連物性について調査研究を行い、医薬品添加剤の国際調和の議論を加速させるための科学的基盤を整備するとともにJPの今後の方針について提言をまとめた。

## A 研究目的

医薬品添加剤は、生理活性物質を投与可能な医薬品製剤とする役割を全面的に担っている。そして、製剤の評価が、単なる含量から生物学的利用性へと変化しさらに特徴ある薬物送達システムの開発が進むにつれて、医薬品添加剤の持つ特異的な物性（機能性関連物性、functionality related characteristics）と、それを利用した製剤の高度な機能性への注目が高まっている。

また医薬品添加剤は、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ことから、先進諸国の薬局方に添加剤の品質に関する情報を規格として収載する意義は極めて大きく、また国際調和が強く望まれている。

本研究ではこれまで、薬局方の各条規格において医薬品添加剤のみに特異的な問題として、平成16年度は機能性関連の物性

(functionality related characteristics, FRC) について、平成17年度は添加剤中に添加された微量成分（ここではこれらの成分を『添加物』と呼び、上記『添加剤』と区別する）について、平成18年度は性状としての吸湿性、潮解性、風解性等の記載および乾燥減量と水分の規格など水分関連の物性について調査研究を行い、医薬品添加剤の国際調和の議論を加速させるための科学的基盤を整備した。

## B 研究方法

実態調査、文献調査および国内外の関係諸団体から公表された見解等の調査を行い、問題点の整理と国際調和に向けての最善の対応策を

検討した。USP および EP の記載内容の精査のほか、高分子添加剤のユーザー、メーカーおよび、日、米、欧の医薬品添加剤協会関係者からの意見聴取等の協力を得た。

## C 研究結果と考察

### 1. 機能性関連の物性について

#### 1.1. 添加剤の規格における FRC の意義

添加剤は原則として治療効果を持たないが、添加剤無くして医薬品製剤は成り立たない。添加剤は、製剤の持つ機能性、たとえば崩壊性、溶解性、溶出挙動、安定性、付着性、送達性、摂取利便性などを左右する働きがあり、その働きを生み出す物理的性質が添加剤の FRC である。FRC としては、分子量、分子量分布、結晶形／非晶質状態、粘度、粉体粒度、粒子径分布、粒子形、比表面積、かさ密度、タップ密度などがある。

FRC は添加剤にとっては、有効成分にとっての有効性に相当するきわめて重要な特性である。しかし、医薬品製剤のもつ特殊な機能性が製剤成分の中のどの成分から生み出されているかメカニズムの解明がまだ十分ではないために、これまで FRC が添加剤の各条規格の中に品質規格として取り上げられにくかったと考えられる。

活性成分の有効性は、それが品質規格に適合することで保証されるが、添加剤の FRC は、化学的パラメータである規格に適合するのみでは保証されない。また、同一品目の添加剤でも、FRC の異なるものはそれぞれ異なる目的で製剤の構成成分として処方されることなどを考え



ると、添加剤の品質規格の一部として FRC が示されていることが、製剤の処方設計の観点から見ても極めて重要かつ必要であると考えられる。以上の理由からも、添加剤各条規格への FRC 取り込みが国際的にも急がれている。

### 1.2. 各条における FRC 記載の原則

添加剤の FRC が製剤の機能性に対して重要な働きをすることは明らかであるが、最終製剤の示す機能性と添加剤の FRC の相関関係は必ずしも明らかではない。製剤設計において添加剤の選択を行うときに、添加剤の製品に FRC が表示されていることは極めて望ましいことではあるが、FRC をある製品の規格として、一定の数値あるいは数値幅に指定することは現実に即さない。なぜなら、同一添加剤であっても配合目的により使用量に大きな差があったり、求められる FRC が大きく異なったりすることがあるからである。

これらの考察の結果、製剤設計における添加剤選択の有力な指標となる FRC は、薬局方各条においては規格値を定めるのではなく、製品に FRC の値をラベル表示することの義務付けを基原 (Definition) の部分に記載することが望ましいという結論に到達する。すなわち、FRC 値を適否判定には用いないが、製品のラベルに記載し、表示した FRC 値に許容範囲内で適合することを求めることが望ましいと考える。

以上が添加剤各条での FRC 取り扱いの原則に関する提案であり、これまですでに国内外での議論の合意点でもある。ここで、FRC は一定の数値を示した規格としないことが望ましいとしたが、例外として数値を決めたほうが適切と考えられる場合もある。たとえば、添加剤の FRC 値の違いによって添加剤自体に安全性の差が生じる恐れのある場合には、ラベル表示にとどまらず一定の数値あるいは範囲を示した mandatory の (適否判断に使われる) 規格とし、記載場所は示性値とするなど行政判断にゆだねたい。

### 1.3. FRC の試験法の記載について

FRC の試験法は、①各条およびラベルの両方に記載する、②各条のみに記載する、あるいは③各条には記載せず、ラベルに FRC 値とともに適用した試験法名を表示させるのいずれかが考えられる。

試験法が JP の一般試験法にある場合には、

①を適用し、各条の基原あるいは示性値の部分および製品のラベルに一般試験法を引用する旨を記載すればよいと思われる。一般試験法に未だ収載されていない方法の場合には、②および③のいずれかをケースバイケースで採用すべきであると考えられる。すなわち、一般試験法に未収載であるが、広く普及している幾つかの試験法がある場合には、上記③のラベルに試験法名を FRC 値とともに表示する方法を選ぶ方が望ましい。②の、各条への試験法の記載は示性値の部分になると思われるが、目的の FRC を得るための試験法が、あまり普遍的でない場合に限るのが良いと考える。なぜなら、幾つかの良く知られた試験法がある場合に、そのうちの一つを各条で採用するのは、社会的公平を欠き、適切とはいえないからである。試験方法を各条で特定する場合には、その試験法を選定する合理的理由をはっきりと説明できることが必要である。

十分にバリデートされた方法を一般試験法として採用することができれば、上記の①が適用でき、何ら問題が無くなくなると思われる。この意味から、FRC 関連試験法の一般試験法への収載が増えることが望ましいと考える。FRC 値の製品間の比較のためにも、各条に一般試験法を引用できることが望ましいと考える。

### 1.4. FRC のラベル表示にデメリットはあるか

FRC の表示が義務付けられることがマイナスになるという意見があると聞いている。添加剤のユーザー側はそのような意見を持つことはないと思われるので、これは添加剤の供給側の意見であり、全ての製品に実測値を表示しなければならないことに対する反対論であろうと考えられる。しかし、添加剤製品に FRC 値が示されることで不都合が生じる理由は思い当たらない。測定に余計な手数がかかることはあり得るが、これは近年の情報開示の趨勢から見て、薬局方の規定の有無に関わらず表示は行うべきであるともいえる。

元来、有効性 (効能・効果) 以外の記載については、書かなければならない事項が定められていることはあっても、書いてはいけないものは原則として無いと思われる。また、薬局方としてできるだけ使用者に便利な内容にするのが JP の方針でもある。したがって、FRC の表示による何らかのデメリットがあるとしても、メリットの方を優先して考えるべきものであ

ると考える。

### 1.5. 各国の薬局方における FRC に関連する動向の調査結果

これまで述べた FRC の取り扱いに関する提案は、国外での議論の動向を参考にしているところが多い。その主なものを紹介する。

**Tri-PEC:** 2002年初めに日・米・欧3極のIPEC(医薬品添加剤協会)から、添加剤各条の作成方針についてのポジションペーパーが公表された。これは公的な取り決めではないが考えを整理するのに良い機会であるということで、JPでも内容につき検討が行われた。ポジションペーパーの中でFRCに関しては、添加剤の特色を表す重要な項目であり、差別化、用途別選択、品質の保証にも必要であるが、いずれも最終的には製剤における機能性が求められるものである。添加剤のプロバイダーとユーザーとの間での確認事項にすぎない。したがって数値化した規格は各条には必要ないが、ラベルに表示することは必要であるという立場をとっている。

**USP:** USPの見解は、最近のUSP各条改訂ガイドラインの第3章「添加剤」の中に上記Tri-PECのポジションペーパーの最終版を引用してかなり詳しく示されている([www.usp.org/pdf/standards/revisionGuide/chapter3.pdf](http://www.usp.org/pdf/standards/revisionGuide/chapter3.pdf))。

すなわち、添加剤のFRCは最終製剤に特定の機能性を付与するものだが、それは、有効成分とその物理化学的性質、製剤の投与経路、製造方法、製剤中の配合比、製剤中の他の添加剤、製造工程で成分を加える順序、などにより影響を受ける。製剤の機能評価についての知識がもっと蓄積されない限り、添加剤のFRCによって最終製剤の機能を保証することは難しい。このような状況からFRCは規格として第2義的に見られがちだが、添加剤の各条作成においては重要な情報をもたらす項目であることは確かである。FRCの測定値は単純明瞭だが、製剤の示す機能性ははるかに複雑である。それぞれの製剤の処方と製造方法が明らかになれば、製剤の機能についてある程度確かな予測ができるが、そのような場合には添加剤のFRCがその決定因子であることは間違いない。したがって、FRCは、各条中のnon-mandatory(適否判定に使わない非強制)項目とし情報供与の目的で表示項目とすべきである。そして一般試験法に

ある試験法を使用することが望ましい、という立場である。

**EP:** EPのFRCに対する見解は、2002年の4月にブラッセルで開催されたEP主催のFRC問題その他に関する国際会議での討議内容([www.pheur.org/site/download.php](http://www.pheur.org/site/download.php))を踏まえて、最近公表された。

すなわち、100に及ぶ添加剤各条FRCが採用されるであろう。FRCの収載のために、各条の中に新しいセクションを作る予定であり、それはnon-mandatory部分となるという。FRCの許容基準はラベル表示され供給者はそれを守らねばならない。現在mandatoryになっているいくつもの規格がPharmeuropaのパブリックコメントを経た上でFRC項目になるであろうとのことである。

**JP:** JPの対外的な見解としては、上記の2002年4月のブラッセル会議のプロシーディング([www.pheur.org/site/download.php](http://www.pheur.org/site/download.php), Proceedings of international conference, Excipients, proceedings.pdf)に、当時の内山部会長の考えとして公表されている。すなわち、FRCは特色ある物性と添加剤の利点を示すために必須であり、差別化の助けにもなる。添加剤のFRCが最終製剤の機能性に及ぼす影響については良く知られていないが、FRCは添加剤の有用性を示す上で重要である。これらの有用な性質は企業秘密としてマスターファイルに登録することのほうが適当と思われるので、FRCは添加剤各条の中では一定の数値を規格とする項目にするのは不適當である。本来FRCは、添加剤のユーザーが、所期の目的に基づき評価すべきものであるから、各条では許容範囲を示したラベル表示とすべきであるとし、Tri-PECのポジションペーパーの主旨に賛同すると述べている。さらに、FRCの違いにより、添加剤に安全性あるいは安定性から見て有意な影響がでる恐れがある場合には、FRCを一定の値、あるいは幅に規定しなければならない、と提案している。

上記のように、これまでのUSP、EP、JPの見解の間には基本的に矛盾はなく、ほぼ同様の考え方が示されている。

### 1.6. 調査結果に基づく考察

添加剤の物理的特性のうち、製剤機能をコントロールする特性がFRCとなるが、ほとんどの

添加剤について、製剤に使用された時にどの FRC が製剤のどの機能の働きを行うのかについて詳しくは解明されていない。したがって、各条規格で添加剤の機能性についてどこまで規格を決められるか、決めるべきかということが問題となる。あまり詳しく決めれば添加剤の製造経費が嵩み供給に支障をきたすことになるし、また新しい添加剤の開発も妨げられるであろう。かといってあまり手ぬるい規格では添加剤使用者が標準として参考にできなくなるということが考えられる。

ケースバイケースを原則とすべきであるが、添加剤の FRC は他の規格項目の試験によっては保証できないことを考慮すると、添加剤各条の中にはできるだけ FRC を取り込む必要がある。しかし、各条に取り込むとしてもそれはラベル表示として要求し、規格値として数値では表現しないのが適切な判断といえる。

試験法については、添加剤 FRC に関連した一般試験法の充実が重要であると考えられる。JP には従来、FRC に関連した物性試験法の記載が不足していたが、国際調和の進行に伴い、最近では徐々に充足されつつある。今後も国際調和を介して、FRC 関連の一般試験法が増加することを望みたい。

## 2. 添加剤中に添加される添加物について

### 2.1. 3 局間の差の現状

マクロゴール (Polyethylene glycol) は現在 PDG で各条の国際調和を協議中であるが、現段階では、USP と EP では各条の基原 (definition) に、『適当な安定化剤を加えることができる』と記載している。そしてその場合には、添加された物質名と量をラベル表示することを義務付けている。

JP ではマクロゴールの各条にはその旨の記載は無い。そしてこれまでの一般的な解釈では、マクロゴールに安定化剤を添加することは許されていないと考えられている。この解釈が誤解である可能性については後述する。

### 2.2. 3 局間の対応の差

マクロゴールに抗酸化剤を添加しなければ、共存するホルムアルデヒドの量が経時的に増大しマクロゴールの酸化変性が起こることは良く知られており、古くから製造時および保存時に安定化剤の添加が行われていたと思われる。

この現実に対して、欧米は各条規格で添加物の添加を許容し、その代わりに、添加した物質名と量をラベルに明示して使用者に知らせる方法を選択している。添加物の存在が製剤の処方の中で不都合な作用を及ぼさないかどうかを使用者が予め確認することができるようにしてある。

これに対してわが国では、添加剤の製造技術が高いということもあり、ホルムアルデヒド含量の少ない、分子量分布幅の狭い (低分子部分を少なくした) マクロゴールを製造し、安定化剤の添加無しで一定期間の品質の安定性を保証できる製品が供給されている。たとえばマクロゴール 400 に対するマクロゴール 400R と呼ばれる製品である。これは、化粧品のように特にホルムアルデヒドを嫌う製品に用いられているが、製品の信頼性を重視する企業では油脂性医薬品についてもこれを使用するようになってきているという。

わが国では、安定化剤の含まれたマクロゴールは JP 規格に反するという考えが支配的であるので、メーカーはマクロゴール 400 に抗酸化剤が添加されているとは明言していないが、もし抗酸化剤のないマクロゴール 400 を油脂性製剤に処方してゼラチンカプセルに用いると、空気酸化によりホルムアルデヒドの含量が増加し、ゼラチンの架橋によって溶解性が落ちることが観察される。

現段階でマクロゴールに添加剤が含まれた場合には JP 不適であるという観念は、次項以下に述べるように通則の解釈により微妙でありむしろ誤解といえる。

### 2.3. 3 局間の通則の差

薬局方各条に記載されている医薬品について、その適否を各条規格項目の何に基づいて判断するかは、いずれの局方でも通則に規定されており、各条に記載された規格の中の、適否判断に適用される項目 (mandatory な項目) に適合するかどうかで判断することとされている。

USP では「通則」に「添加物質 (Added Substance)」と言う項目がある。そこには、『有効成分 (製剤ではなく原薬) には、各条に記載されていない限りいかなる添加物質も含んではならない。各条で添加物の添加を認める記載がある場合には、添加される物質名と量をラベル表示しなければならない。製剤には、と

くに指定しない限り抗菌剤、基剤、賦形剤、被服剤、色素、香料、防腐剤、安定剤等を、製剤の安定性、有用性、外観を高めあるいは製剤化を助けるために加えることができる。ただしこれらの物質は、無害な量であり、添加の目的を達成する最少量を超えず、製剤のバイオアベイラビリティ、治療効果、安全性を損なうことなく、規格試験の障害にならないものでなければ認められない』という記載がある。

EP では 1999 年 12 月の FARMEUROPA の Technical Guide で各条（EP には製剤の各条はなく、すべて原薬および添加剤である）中の添加物について USP と同様の見解が示されている。すでにいくつかの各条では Definition に「appropriate anti-oxidant (or preservative, anti-caking agent.....) may be used. Nature and quantity should be indicated on the label」との記載がある。通則としてはまだ取り上げられていない。

USP および EP では、したがって、各条に添加物の添加を許容することの記載がない限り、一切の添加物の添加は許されていない（原薬、添加剤に共通である）。添加物が許される品目には、ラベル表示を前提に添加物の添加を認める旨の記載がなされる。

JP では、上記 USP の記載の後半、すなわち製剤の中の添加物についての考え方は、製剤総則の 1. 製剤通則の（2）に、全く同様の趣旨で記載されている。すなわち、15 局では、『添加剤は製剤に含まれる有効成分以外の物質で、医薬品の有用性を高める、製剤化を容易にする、品質の安定化を図る、または外観を浴するためなどの目的で用いられるものである。必要に応じて賦形剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、矯味剤、懸濁化剤、乳化剤、着香剤、溶解補助剤、着色剤、粘稠剤などの適切な添加剤を加えることができる。ただし、使用される添加剤はその製剤の投与量において薬理作用を示さず、無害でなければならない。また、添加剤は有効成分の治療効果を妨げ、又は試験に支障をきたすものであってはならない』との記載となる。

しかし、USP の記載内容の前半部、すなわち原薬（添加剤を含む）についての各条品目の添加物に関する規定は JP には見当たらない。通則の第 3 項に『日本薬局方の医薬品とは、医薬品各条に規定するものをいう』とのみ記されて

いる。

#### 2.4. JP の通則の記載と解釈は不明確である

JP の通則第 3 項を、現段階では大方の人が「各条に記載されていない成分は含んではない」と解釈しているが、厳密に解釈すれば、各条に規定する含量、確認試験、純度試験等すべての項目に適合すれば局方適であり、各条に規定されていないものについての縛りは、他の法規に触れるもの以外ありえないこととなる。

品質規格における純度試験は、原料由来、製造の助剤の残留、製造時の副産物、分解生成物等を対象にして定められている。全く意図していない成分について規格の中に純度試験として規定することは不可能である。したがって、「各条に記載されていない成分は含んではない」と明確に規定されていない現状では、含量や他の試験に抵触しない限り微量成分の共存は見逃されているという解釈が成り立つ。

JP では、含量規格がたとえば 97~101%であった場合、規格項目に取り上げられていない添加物や混入物が 1%程度存在しても規格試験によっては検知されないの、含量その他の規格値がすべて適合であれば JP 適合品といえることになる。したがって、マクロゴールに抗酸化剤が 0.1%程度添加されていても JP 不適にはならないことになる。微量でも、安全性から見て問題のあるものが検出されれば、別の観点から医薬品として不適といえるが、医薬品あるいは食品の添加物として許可されている成分に関しては、上記のような解釈が成立するために、これまで JP ではあまり厳密に議論されてこなかったものと思われる。

#### 2.5. JP も運用上は USP と同じ解釈

JP 通則には「各条に記載されていない成分は含んではない」という規定はないとしても、運用上はそのような考え方が生かされてきたと考えられる。その証拠として、「ビタミン A 油」には『本品には適当な抗酸化剤を加えることができる』という記載があり、「軽質流動パラフィン」には『本品は安定剤として適当な型のトコフェロール 0.001%以下を加えることができる』という記載がある。

「ビタミン A 油」については「加えることができる」という表現であるにもかかわらず、加えたかどうか、あるいは何を加えたか、どのくらい加えたかについてのラベル表示の義務付