

ある。受入基準の規格幅を設定するための理論的根拠を明らかにしておくこと。各受入基準は、非臨床試験もしくは臨床試験、またはその両方の試験で使用したロットから得たデータに基づいて確立し、妥当性を示すこと。また、製造の一貫性を立証するために用いたロットのデータ、安定性試験のデータ、関連する開発中に得られたデータ、コンパラビリティ評価(品質、安全、有効性)で得たデータ等を総合して受入基準を確立し、その妥当性を示すこと。

申請者のバイオシミラー医薬品の品質、安全性、有効性に関する試験成績や経験および、参照医薬品との比較試験から得られた実験結果に基づき、国際的に容認される論拠によって規格設定の適切性を裏付けること。十分な証拠を示すことができる場合を除いて、可能であれば、このようにして得られたデータにより、設定した規格値幅が、目的とする参照医薬品の変動幅ほど広くないことを立証すべきである。

「有効成分としてバイオテクノロジーを応用して製造されるタンパク質を含有するバイオシミラー医薬品に関するガイドライン：非臨床・臨床試験」(2006年2月22日、EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005) 要旨

「有効成分としてバイオテクノロジーを応用して製造されるタンパク質を含有するバイオシミラー医薬品に関するガイドライン：非臨床・臨床試験 (EMEA/CHMP/42832/05/)」は、市販されている既承認医薬品に類似性の高い医薬品として開発されるバイオ医薬品の非臨床・臨床要件を規定する。

非臨床に関するセクションでは、薬理毒性評価について言及する。臨床に関するセクションでは、薬物動態試験、薬力学試験、有効性試験の要件について言及する。临床上の安全性とファーマコビジランスのセクションでは、バイオシミラー医薬品の免疫原性の評価を特に重要視したリスク管理計画と共に臨床安全性試験について考察する。

## 1. 序論

品質、安全性、有効性に関して、既承認医薬品に類似性が高いとする新しいバイオ医薬品(バイオシミラー医薬品)を開発することが可能である。この既承認医薬品(参照医薬品)は、EU共同体において販売承認が認可されているものに限定される(「バイオシミラー医薬品に関するガイドライン(Guideline on Similar Biological Medicinal Products, CHMP/437/2004)」を参照)。

バイオシミラー医薬品は、独自に開発された製法と品質管理に基づいて製造される。バイオシミラー医薬品と参照医薬品が、品質特性、安全性、および有効性に関して、類似したプロフィールを持つことを立証するためには、適切なコンパラビリティ評価が必要となる。組換え型DNA由来タンパク質を含有するバイオシミラー医薬品のコンパラビリティ評価に関連する品質関連事項については、「有効成分としてバイオテクノロジー技術を応用して製造されるタンパク質を含有するバイオシミラー医薬品に関するガイドライン：品質問題 (EMEA/CHMP/49348/05)」を参照すること。

EU共同体内での承認されている医薬品

に類似性を有しているとするバイオ医薬品の販売承認(MA)申請書類は、品質特性に関する全てのデータを提出することが必要である。臨床効果および安全性に関して類似性が高い (comparable) ことを立証しなければならない。本ガイドラインでは、非臨床試験や臨床試験での類似性評価に当たっての原則を明らかにする。必要に応じて (または、その必要があれば)、各種製品ごとの要件を示した付属文書が本ガイドラインに追加文書として公開される。

承認審査がスムーズに行えるように、非臨床・臨床の全概要は、申請書の適切な個々のセクションの必要な関連データを相互に参照することにより、個々のセクションにおけるコンパラビリティ評価が理解しやすいように引用されていることが望ましい。

申請書類の品質特性、安全性、有効性の3箇所すべてのデータは、同じ参照医薬品を用いて得られたものでなければならない。

バイオシミラー医薬品の参照医薬品に複数の適応症がある場合、必要に応じてそれぞれの適応症に関して個別に有効性と安全性について十分な根拠を示さなければならない。場合によっては、1つの適応症で示される治療上の同等性・同質性を参照医薬品の別の適応症に外挿することが可能である場合もある。それぞれの適応症に関して同一の作用機序、または、同一のレセプターが関連しているか否かにかかわらず、外挿が可能かどうかは、臨床経験など、入手可能な文献データ等によって異なる。また、特定の患者小集

団に起こり得る安全上の問題についても検討しておくこと。どのような場合でも、企業は、バイオシミラー製剤の開発中に採用したアプローチについてその妥当性について十分な根拠を示さなければならない。開発を始める前に、科学的アドバイスおよび規制上アドバイスを得るために、EMAに相談することが推奨される。

## 2. 範囲

本ガイドラインでは、有効成分として組換えタンパク質を含有するバイオシミラー医薬品の販売承認申請書の非臨床・臨床開発および評価に対する一般原則について考え方を示したものである。本ガイドラインでは、目的とする製品の製造工程で導入される変更(つまり、開発中の変更および承認後の変更)に関するコンパラビリティ評価については対応していない。

本ガイドラインは、有効成分としてバイオテクノロジー応用技術を用いて製造されるタンパク質を含有する医薬品に係る現行のガイドラインおよび今後出されるガイドライン (セクション7を参照)、ならびに、修正版指令2001/83/ECの付属文書IパートIIを参照しながら読むこと。

## 3. 法的基盤

修正版指令2001/83/ECおよび、修正版指令2001/83/ECの付属IパートII。

## 4. 本文

### 4.1 非臨床データ

臨床開発を開始する前までに、非臨床試験を実施すること。これらの試験は、同等性/同質性を評価できるような内容の試験であるべきで、バイオシミラー医

薬品と参照医薬品間の反応性の有無のみならず、反応の差異を検出できるように設計された試験であること。

重要なのは、適切な非臨床試験プログラムのデザインには、製品特性を十分に解析しておく必要がある点である。特性試験から得られた物理化学的および生物学的特性が、有効性と安全性に潜在的にどのような影響を与えるかという観点から考察しておくこと。関連ガイダンス文書、特に、「バイオ由来医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン (CPMP/ICH/302/95)」を考慮に入れること。

非臨床試験においては最先端技術の使用を検討すること。(例：「リアルタイムで」の結合分析などのインビトロ試験が有用であるかもしれない。開発が進んでいる動物を用いたゲノム/プロテオミクス・マイクロアレイ技術が、今後、有効成分の薬理的な生体反応における軽微な変化を検出できるような系となる可能性もある。)

以下のアプローチを考慮してもよいが、目的とする製品の特性に応じてケースバイケースの判断をする必要がある。これらのアプローチを採用する場合には、非臨床試験概要においてその妥当性を十分に説明する必要がある。

#### インビトロ試験

原則的に受容体結合実験や細胞を用いた試験法などのアッセイを実施し、反応性のコンパラビリティを確認することが求められる。これらの試験により、コンパラビリティが立証できない場合には、推定される要因を明らかにすること。このようなインビトロアッセイ系の多くは

品質特性解析で実施されるバイオアッセイを準用することが可能かもしれない。

#### インビボ試験

得られた情報を最大限に生かし、臨床試験で使用する予定の参照医薬品とバイオシミラー医薬品を比較するための動物を用いた試験を設計すること。目的とするバイオシミラー医薬品との反応性が確認されている動物種を用い、また最新技術を用いて試験を実施すること。動物モデルに適用可能であれば、多くのエンドポイントをモニターするのに、以下のことを検討する必要がある。

- 臨床応用に関連する薬力学的効果/薬力学的作用。
- TK測定を含む、少なくとも一つの反復投与毒性試験で判断する非臨床毒性。TK測定には、抗体価、産生された抗体の交差反応性、および中和抗体であるか否かの解析を含むこと。試験の所要期間は、バイオシミラー医薬品と参照医薬品間の毒性または、免疫応答において、該当する差異を検出できるほど十分に長いこと。
- 具体的な安全上の懸念がある場合、同じ反復投与毒性試験に、関連性のある観測(局所耐性)を含むことで、それらの懸念に対応すること。

通常、反復投与試験結果によって必要性が示されない限り、安全性薬理学試験、生殖発生毒性試験、変異原性試験、発癌性試験など、その他の通常の毒性試験は、バイオシミラー医薬品には必要ない。

#### 4.2臨床試験

臨床試験の要件は、参照バイオ医薬品に関する既存の知識、および、目的とさ

れる治療適応症によって異なる。適切であれば、製剤/疾病ごとのガイドラインに従うこと。

製造工程は初期では必ずしも最適化されていなくても開発中に最適化されることは許容されれば良いと考えられる。最終的に確立した製造工程により生産された試験製品(つまり、商品化されるバッチの品質プロフィールを示している製品)を用いて、必要とされる同等性比較臨床試験データを作成することが望ましい。この勧告から逸脱する場合は必ず、適切な追加データで妥当性を裏付けること。

臨床コンパラビリティ試験の評価は、薬物動態 (PK) 試験と薬力学的 (PD) 試験から始まり、次に、臨床効果および安全性試験という段階的な手続きである。場合によっては、臨床コンパラビリティを立証するためのPK/PD試験を実施することもありうる。

#### 薬物動態試験

主要なPKパラメータに関して、バイオシミラー医薬品と参照医薬品間の臨床上のコンパラビリティを立証するように設計されたPK比較試験は、コンパラビリティ評価の重要な一部である。

個々のたんぱく質製品の特性に関連する具体的な検討事項は、治療用たんぱく質の薬物動態に関する臨床調査のガイドライン(EMEACHMP/89249/2004/in prep)に記載している。それらの検討事項を考慮に入れること。

吸収/バイオアベイラビリティにおける類似性が、目的とする唯一のパラメータというわけではないので、PK比較試験のデザインは、必ずしも標準的な「臨床

のコンパラビリティ」のデザイン(CHMP/EWP/QWP/1401/98)に準ずる必要はない。試験では、製剤間の消失特性の違い(例えば、クリアランスおよび血中半減期)を探索するべきである。

単回投与試験、定常状態試験、PKパラメータの繰り返し測定試験で選択したデザインについて、申請者はその妥当性を示すこと。通常の比較試験デザインは、長期的な半減期の治療用タンパク質

(例: 医療用抗体、ペグ化タンパク質)、あるいは、抗薬物抗体が形成されそうなタンパク質には適切でない。いかなる薬物動態パラメータに関しても、臨床での同等性・同質性を結論するための受入範囲は、臨床データに基づいて設定すべきである。その際、参照医薬品と試験製品に関する、有効性および安全性の情報すべてを考慮に入れること。したがって、化学由来の経口投与される製剤用に初めに開発された、標準的な臨床コンパラビリティ試験で使用される基準は、適切でない可能性がある。試験を実施する前に、臨床上のコンパラビリティがあると判断する限界を定義し、その正当性を示すこと。

#### 薬力学試験

薬力学的 (PD) マーカーは、製剤の治療効果を示すことができるかを基準に選択すること。試験を行うバイオシミラー医薬品と参照医薬品の薬力学的効果は、相異が最も良く観測できる集団で比較すること。試験のデザインと試験期間の妥当性を示すこと。PKとPDを同時に実施するPK/PD試験は、薬剤への暴露と効果の関係に関して有用な情報を提供できるかもし

れない。選択線量は、線量応答曲線の最も勾配の急な部分にあるべきである。複数の用量での試験が有用かもしれない。

#### 薬物動態/薬力学(PK/PD)確認試験

通常、臨床コンパラビリティの立証には、比較臨床試験が必要である。しかし、場合によっては、以下の条件をすべて満たしていれば、臨床コンパラビリティを立証するには、バイオシミラー医薬品と参照医薬品間のPK/PD比較試験で十分であることもある。

- 参照医薬品のPKでの特性が十分に解明されている。
- 標的受容体との結合および内因活性を含め、参照医薬品の薬力学的性質に関して十分な知識がある。生物学的製剤の有効性の機作は、疾病特有の作用機序に基づいていることが多い。
- 参照医薬品の投与量/投与暴露量および反応性/有効性の間の関係が（治療の「濃度反応」曲線）、十分に解明されている。
- 少なくとも一つのPDマーカーが有効性の代用マーカーとして受入れられる。製剤に対する投与量/暴露量とこの代用マーカー間の関係がよく知られている。そのマーカーの治療による変化が、臨床成果における変化について、かなりの程度まで説明できるなら、PDマーカーは有効性の代用マーカーとみなされるかもしれない。例として、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）の効果を評価する好中球絶対数、 $\alpha$ インターフェロンの効果を評価する慢性C型肝炎における早期

のウイルス負荷軽減が挙げられる。

PK/PD試験で使用する代用マーカーの選択は、徹底的に十分な根拠を示すこと。

バイオ医薬品のコンパラビリティを立証するためにPK/PD試験を使用する場合、アッセイの感度を立証するため、関連性のある用量範囲を調査することに注意を払う必要がある（ICHトピックE10を参照）。

PKおよびPDパラメータの臨床上のコンパラビリティがあると判断する有効幅を、あらかじめ設定しておくとともに、その妥当性を示さなければならない。

#### 有効性試験

通常、バイオシミラー医薬品と参照医薬品間の臨床上のコンパラビリティを立証するには、臨床比較試験が必要である。しかし、臨床上のコンパラビリティがあると判断するデータの幅を前もって設定しておく必要がある。そのデータのばらつきの範囲は主に臨床上の根拠に基づいていることが必要であり、その妥当性を示すこと。すべての臨床コンパラビリティ試験デザインに関して、アッセイ感度（ICHトピック10E参照）を確実にしなければならない。

臨床コンパラビリティ試験デザインの実施が可能でなければ、他の試験デザインを探求し、採用しようとするデザインについて関係当局と話し合うこと。

#### 4.3 臨床上の安全要件およびファーマコビジランス要件

例え有効性が同等・同質であると示されても、バイオシミラー医薬品は、安全性プロフィールにおいて違いを示すことがある（有害反応の性質、重症度、または

発生率について)。試験医薬品と参照医薬品の有害反応プロフィールを検討できるほど十分な数の患者において、認可前に安全性データを入手すること。バイオシミラー医薬品と参照バイオ医薬品間の有害反応のタイプ、重症度、頻度の比較に注意すること。

通常、認可前の臨床試験からのデータでは、すべての相違点を明かにするには不十分である。したがって、継続的なベネフィットリスク評価を含め、承認後にも、バイオシミラー医薬品の臨床上の安全を継続的にしっかりとモニターしなければならない。

申請者は、審査される医薬品の申請書類に、リスクに関して記述すること。これには、オリジナル医薬品とは異なる製造工程により製造されることに由来する種々の懸念、特に認容性に関する安全性問題への記述が含まれる。

承認申請の手続きで、申請者は、現行のEU法及びファーマコビジランスガイドラインに従って、リスク管理プログラム/ファーマコビジランス計画を提出するものとする。この計画では、製剤開発中に特定されたリスク及び潜在的リスクを考慮するものとする。

販売承認が認可された場合には、想定されるリスクや洗剤リスクをモニタリングするための（現行のEU法で定義されている）ファーマコビジランスシステム、および（現行のEUガイドラインに記載されているトレーサビリティを含む）実施のための具体的手順を準備しておくこと。参照医薬品や他の同種同効製品に求められている全ての安全性モニタリング

を、リスク管理計画で実施することを考慮すべきである。

必要に応じて、ファーマコビジランス義務が課せられた製造販売責任者の法令順守についても十分にモニタリングを行うこと。

現行のEU法に従って提出された定期的安全性最新報告（PSUR）に関して、製造販売承認者は、企業が受けた認容性に関する報告およびその他のいかなる情報も十分に検討すること。製造販売承認者は、これらの報告または情報について、有害事象または有害薬物反応と関連性の有無やその因果関係に関して、科学的に評価しなければならない。

#### 4.4免疫原性

##### *免疫原性に影響を及ぼす要因*

多くの患者で、投与を受けたたんぱく質やペプチドに対して、臨床的に影響を与えるような抗薬物抗体が発現されることがある。免疫原性は多くの要因（有効成分の特性、目的物質由来不純物および工程由来不純物、製品の賦形剤および安定性、投与経路、投与方法、標的患者母集団など）によって影響されるので、投与を受けたタンパク質に対する免疫応答は製剤間で異なる。患者自身の個性差に関連する要因としては、遺伝的な背景によることもある（例えば、正常な内因性たんぱく質に対する耐性の欠如、疾病または併用薬による免疫抑制など後天性のもの）。発現した抗体のサブクラス、親和性、特異性に関して、抗体反応にはかなりの個体間で差変がある。したがって、十分な数の患者からデータを収集して、抗体反応の差異を明らかにするべきであ

る。

### 免疫応答の影響

治療効果に影響を与えない場合から、重篤かつ生命に危険を及ぼすケースまで、免疫原性の応答は大きく異なる可能性がある。したがって、免疫原性は、生物医薬品の開発および承認における重大な懸案事項の一つである。免疫応答により、臨床上安全および有効性に重要な影響を製剤に与える可能性がある。薬力学的効果に直接影響を与えるのは中和抗体だけであるが、いずれの結合抗体も薬物動態に影響を与える可能性がある。したがって、抗薬物抗体形成が原因で、製剤の有効性が影響を受ける場合、薬物動態の変化、薬理学的な変化、安全性の変化が複合した結果となって現れる。抗体形成によって、治療用タンパク質のクリアランスが増加することが一般的であるが、場合によってはクリアランスが低下することもある。

### 免疫原性の評価に関する基本原則

バイオシミラー医薬品の免疫原性を常にモニタリングすることが求められる。一般的に、動物実験からはヒトにおける抗体反応を予測することはできない。免疫原性の評価には、臨床上の安全性と有効性に関連したあらゆる面から検討を行うべきである。さらに、抗体と薬物動態または薬理学との相関関係の評価はもちろん、最適な抗体検査戦略、検出された抗体の免疫応答の特性を明らかにすることが必要である。臨床上の適応症が異なる場合、それぞれの適応症ごとに免疫原性のリスクを個別に評価することが重要である。

### 検査

申請者は、抗体検査戦略のデザインに妥当性に関する理論的根拠を示すこと。免疫原性に関する検査は、適切な特異性及び感度が担保された最先端の試験法を用いて実施すること。スクリーニングアッセイはバリデーションが行われていること。そして、低力価抗体や低親和性抗体を検出できるほどの感度をもっていること。中和抗体のアッセイは、スクリーニングアッセイによって検出された抗体について詳細な特性解析が可能な方法を採用すること。可能であれば、標準手法により国際標準品を用いて試験を行うこと。採取した血液に含まれる抗原（投与医薬品）が抗体アッセイを妨害する可能性も考慮すること。抗体検査用の試料採取のタイミングとどの程度の間隔を置いて行うのかを明らかにし、その妥当性を示すこと。

免疫原性の発現および出現率を予測することは不可能であることから、長期的に一定の間隔での抗体モニタリングを行うことを予定することが必要だろう。慢性投与の場合には、承認前までに1年間の追跡データが必要とされる。

申請者は、目的物質由来不純物を認識する抗体の出現の可能性を考慮すること。**観測された免疫応答の臨床的な意義の評価**

オリジナル医薬品と比べて、製剤に対して異なる免疫応答が観測される場合には、出現した抗体の特性解析を実施するとともに、抗体による臨床上の安全性、有効性、薬物動態のパラメーターに対する影響を分析することが必要である。免

疫応答が内因性タンパク質の量やその生物学的機能に重大な影響を与える可能性がある製剤には特に注意すること。抗体試験は全臨床試験プロトコルの一環としてとらえること。申請者は、過敏症の発症、自己免疫症の発症、有効性の喪失といった、特定の有害事象における免疫原性の役割を考慮しておくこと。申請者は、有効性の喪失に関連する事象を含め、関連有害事象の報告を推奨するようにすべきか議論しておく必要がある。

\*\*\*\*\*

EMEA のガイドラインは、これ以外に、各臨床適用/医薬品ごとの臨床をまとめたガイドラインと、これらのガイドラインの全体の規制上の枠組みについてまとめられた上位ガイドラインが出されている。

多くの点で、前述の品質と非臨床・臨床試験の2つの EMEA のガイドラインはカナダ医薬品長のガイドラインと共通した要求事項が記されている。時期的な点から言えば、カナダ医薬品庁が、EMEA のガイドラインを参考にしたといえる。しかし、いくつかの点で、規制上の取り扱いや強調されている点が記されていると思われる。

一つは、EMEA では、免疫原性について非常に詳細な記載がある。特に、抗体産生が認められた場合に、その分析をどこまでやるべきか詳しく書かれている。すなわち、免疫応答の影響、免疫原性の評価に関してモニタリングのあり方、検査の方法や手法、観測された免疫応答の臨床的な意義についての評価などを明らかにするように求めている。

一方、カナダから出されたガイドライン

では、市販後に従来使用されている先行品との互換性について記載されている。すなわち、先行品から後続バイオ医薬品への互換性は認めるものの、一連の医療行為の中で混在して使用することは認めていない。この点は、何らかの有害事象が起きた際のトレーサビリティの確保を目的としたものと考えられる。

#### D. 考察

##### D-1. わが国でのバイオ後続品開発のためにどのような指針が必要とされるか

EMEA やカナダ医薬品庁ではバイオシミラー/バイオ後続品医薬品を開発するための指針や指針案が相次いで発出されている。わが国でも、多くの企業でバイオ後続品開発の動きがあり、医療経済的な要望もあり、バイオ後続品の開発とその審査において、品質・安全性・有効性をどのように確保していくのかを明らかにしていく必要がある。本研究では、EMEA 及びカナダ医薬品庁の指針や指針案を中心に文献も含めてバイオ医薬品開発のために必要な要素について調査研究を行った。これらの調査研究に基づいて、次のような要素が、わが国の指針案に取り込まれるべきと考えられた。

対象とするバイオ後続品のガイドライン適用対象の候補として、1) 組換えタンパク質、2) 高度に精製されたタンパク質（細胞培養医薬品：t-PA やインターフェロン）、3) 高分子多糖（低分子ヘパリン等）が考えられるが、当面ガイドラインとして必要な要素を明確にしやすい、組換えタンパク質及び高度に精製されたタンパク質を対象とすべきであろうと考えられる。ただ、後者については、精製の程度で枠に入れるかど



うかを決めるのは困難かも知れない。よって、前者を主目的として作成し、後者の高度に精製されたタンパク質製品については、適用可能な場合には準用できるような指針が望ましいと考えられる。

すなわち、高度に精製された製品については、細胞基材の扱い（細胞種の違いを許容するか）とも関連し、また、高度に精製されていて特性解析できるものとして、尿由来ウロキナーゼのような製品も含まれる、とも解釈できる。

製法変更に関するICHガイドラインを引用し、「組織及び体液から分離されるタンパク質のような上記の範疇以外の製品にも適用できる場合がある。ただし、適用できるかどうかについて、製造販売業者は規制当局に相談すること。」として、高度に精製された製品が適用対象になるかどうかは個別の判断による、とする方法も考えられる。

高分子多糖については、欧米のガイドラインでも取り扱われてはおらず、その特殊性から今回のガイドラインの適用対象とはしないことが妥当と考えられる。すなわち、低分子ヘパリン、ウロキナーゼ、血液製剤では、既に後発品として臨床試験データもなく承認された製品もある。これらの製品の一部はヒト由来原料を用いた製品であることから、原料には新たな抗原性等の問題が生じないであろうとの判断があったものと推定される。ただ、現時点では、製法等の違いに基づく同等性・同質性の懸念から臨床試験を求めている。また、血液製剤については、基本的には適用対象外とすべきであろう。

合成ペプチド製品では製法や特性解析の容易さから原則的に後発品が可能と考えら

れていることもあり、ペプチドについては、遺伝子組換えにより製造されたもののみを適用対象とする。

バイオ後続品の要件として、目的とするアミノ酸配列が同じものに限るべきであろう。しかし、翻訳後の修飾により N 末端、C 末端アミノ酸の除去、修飾は目的物関連物質や目的物由来不純物としての取り扱いの中で整理をすべきであろう。

もう一つの大きな要件として、国内で承認された先行品がないものは認めない。また、品質や安全性、有効性の比較評価では、国内で承認された医薬品を参照医薬品として選び、試験を行う必要がある。

一般名が異なっても、バイオ後続品になることはありえる。バイオ後続品であるかどうかは規制当局の判断であり、INN の申請のタイミングにもよる。結果として、WHO とは異なる判断もありえる。この場合、後続品であることが承認された場合、名称等について何らかの行政的手続きが必要と思われる。すなわち、すでに JAN や INN の取得が行われていた場合には、再度 JAN 委員会にかかる必要があると思われる。

添加剤を含めた製剤設計は必ずしも先行既承認製品と同一でなくてもよい。特に、安全性の観点から、特定生物由来製品や生物由来製品を用いないという選択は推奨される場合もありえる。すなわち、バイオ後続品の開発において、製剤処方改良される場合も多いと考えられる。宿主細胞の種類が異なるものを認めるかについては、2つの要素が考えられる。1つは、単純タンパク質のように、糖鎖のような翻訳後修飾による目的とする有効成分の不均一性が無い場合には、主細胞の種類が異なっても、

大きな懸念が生じないと考えられる。しかし、単純タンパク質であっても、E.coli で製造されたものと CHO で製造されたものでは、工程由来不純物プロファイルは大きく異なることから、品質や安全性、あるいは抗体産生などに特別な配慮が必要な場合がある。また、糖タンパク質でも、糖鎖の heterogeneity が低く、構造上の同等性を明確に示すことができる場合は、宿主細胞の種類が異なってもよいという考え方もありえる。

一方、糖タンパク質で、糖鎖の heterogeneity が高く、構造上の同等性を示すことができない場合は、宿主細胞の種類が異なるものは、製造細胞の違いによる糖鎖に不均一性の評価が重要になる可能性が高い。しかし、宿主による糖鎖の違いと、製造工程や生産基材としての細胞の違いによる糖鎖の違いで、どちらの差異が大きいかは未だに十分なコンセンサスが得られているわけではない。従って、バイオ後続品開発メーカーがどのようなデータを提出できるかにより、バイオ後続品としての可否が判断されるべきと思われる。

「バイオ後続品」の定義づけとして、品質について高い類似性が認められ、あるいは類似性にいくつかの違いが認められたとしても、有効性・安全性は同等/同質であればよいとすべきと考えられる。

臨床現場での混乱を考慮すると、用法・用量の違うバイオ後続品は認めにくいと考えられる。比活性が高い製品では、活性で投与量を規定する場合には用法・用量は同じになると想定されるが、重量で投与量が規定されている場合には、投与量が異なることになってしまうため、バイオ後続品と

しての開発が困難になる可能性が高い。

作成すべきガイドラインとしては、まずは、包括的なガイドライン(製法、品質・特性解析、非臨床、臨床)を作成するのが望ましいと考えられる。特に、品質・特性解析については、Q5E に準じた評価を行うことを基本とするべきであろう。

また、糖鎖の問題を整理して記載する必要がある。

非臨床試験・臨床試験をどの程度実施すればよいかについて、ある程度の目標を明確にすることが開発側にとっては有用と思われる。ただし、糖鎖の不均一性の程度が、直接必要な非臨床試験・臨床試験の程度を意味するわけではないので、糖鎖等を含めた特性・品質に関する同等性/同質性のデータや製品に関するこれまでの情報を考慮して、必要な非臨床試験・臨床試験の程度が異なること銘記する必要があるであろう。

将来的には、EMEA から公表されているような製品ごとのガイドラインの作成は、包括的ガイドライン作成後の課題とすべきであろう。

## D-2 品質・臨床・非臨床で記載すべき重要事項/全体的な課題

品質・特性解析に関しては、製法を独自に確立すると共に、全ての特性解析の実施が必要と考えられる。また、製造方法の一貫性(恒常性)と頑健性を独自に確立することが必須であろう。その上で先行バイオ医薬品との同等性/同質性評価は、製剤あるいは製剤から抽出した原薬を用いて実施する。

純度について、先行既承認製品との差が大きい場合は、免疫原性などの問題が生じ

る懸念もある。製剤処方は先行既承認製品と必ずしも同一でなくてもよいのではないか。

安定性に関しても、新規バイオ医薬品等と同様に、実測でのデータや加速試験、過酷試験を行うことが必要である。また、製剤処方の違いにより、保存条件や有効期間が先行品と異なることも考えられる。しかし、著しく有効期間が異なる場合には、バイオ後続品としての開発は困難であろう。

#### D-2. 非臨床

十分に品質特性解析ができていているという前提で、特に不純物の問題等がなければ、非臨床試験の重要性は高くないであろう。ただし、非臨床試験を実施しないという選択はあり得ないのではないか。

薬力学的効果は、*in vitro* 生物活性などの品質評価試験で十分な評価がされていれば、非臨床試験で評価しなくてよい場合もある。

#### D-3. 臨床

安全性を確認する目的で、認容性試験を実施する必要性については、製品の特性によると考えられ、ケースバイケースの判断が必要であろう。また、用法・用量は先行品と同じということが前提と考えられ、基本的には用量設定試験は必要ないと考えられる。

先発品と PK を比較することが必要であり、また、comparability の評価の一環として PK あるいは PD を比較する。これらの試験のエンドポイントの選択により、バイオ後続品としての同等性・同質性が示される場合も想定される。そのためには、有効性を比較するのは適切なサロゲートマーカーがなければ現実的ではないであろう。

免疫原性は EMEA では非常に重視され

ているが、我が国のガイドラインでも免疫原性に関する記載が必要であろう。しかし、どこまでの解析を求めるのか、バイオ後続品の特性ゆえに特別な配慮が必要なのかを指針に示す必要が出てくる。また、免疫原性の評価を、一定数の臨床試験を実施して評価、とするか、市販後調査も含めて評価、とするか、検討が必要であろう。また、先発品でも免疫原性は市販後調査を含めて評価することになっているので、免疫原性評価に十分な例数の臨床試験を後続品に要求するのは、難しいのではないと思われる。

基本的にバイオ医薬品は、新薬と異なり承認時まで全てが解明されているわけではないと想定され、市販後調査の重要性は高い。したがって、市販後調査の中に抗体産生についての検討を盛り込むべきであろう。

#### E. 結論

バイオシミラー／バイオ後続品の開発に関する欧米のガイドラインや文献情報を調査した。ヨーロッパ医薬品庁 (EMA) やカナダ医薬品庁からガイドラインやその案が示されている。また、Nature 等の学術誌にも、バイオシミラー／バイオ後続品をめぐる動きが解説され、また、企業や規制側の取り組みについてもさまざまな角度から解析が行われている。

さまざまな議論の中から、規制的枠組みや必要とされるデータに関して、いくつかの点で差異があるものの多くの点でコンセンサスが得られつつある。特に、品質特性に関しては、独自に新薬と同等の恒常性と頑健性を確立し、その上で、目的とする既

承認バイオ医薬品との同等性／同質性の比較試験を求めている。また、非臨床試験での安全性や薬理作用に関して、比較試験を要求しているが、不純物についての安全性に関しては必ずしも比較試験が必要ではないであろう。一方、臨床試験では、基本的にはPK、PDあるいはPK/PD試験での先発品との同等性／同質性の比較試験が必要とされている。さらに、PK、PD試験及び品質特性でのデータ等から、有効性に関して同等性／同質性が充分推察される場合には、有効性の比較臨床試験の実施が不要の場合もあるとされている。しかし、こういった場合でも安全性に関しては、担保されているわけではないので、必要に応じて臨床試験や市販後調査での綿密な調査が必要となるであろう。

#### F.参考文献

- 1) Guideline on Similar Biological Medicinal Products containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues; 22 Feb. 2007  
EMA/CHMP/BWP/49348/2005
- 2) Guideline on similar biological medicinal products biotechnology-derived proteins as active substance; non-clinical and clinical issues; 22 Feb. 2006  
EMA/CHMP/BWP/42832/2005
- 3) Draft guidance for sponsor: Information and Submission Requirements for Subsequent Entry Biologics (SEBs); Minister of Public Works and Government Services

Canada 2008

#### G.業績

- 1) 山口照英: ヒト細胞治療薬の品質と安全性確保について. *Bio Clinica*, 27, 67-74 (2007)
- 2) N. Kawasaki, S. Itoh, T. Yamaguchi: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, (in press)
- 3) S. Itoh, D. Takakura, N. Kawasaki, T. Yamaguchi: Glycopeptide analysis using LC/MS and LC/MS/MS, in *The Protein Protocols Handbook* (John Walker, ed.) Humana, Totowa, NJ. (in press)
- 4) N. Kawasaki, S. Itoh, T. Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)
- 5) N. Mukai, T. Akahori, M. Komaki, T. Kanayasu-Toyoda, A. Ishii-Watabe, A. Kobayashi, T. Yamaguchi, M. Abe, T. Amagasa, I. Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp. Cell Res.* (in press)
- 6) 石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫: 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保. バイオ医薬品の品質・安全性評価 (増補改訂版) 印刷中
- 7) 山口照英、内田恵理子: 日米 EU 医薬品規制調和国際会議遺伝子治療専門家会議の活動と遺伝子治療薬の規制に於

- ける国際動向. *Drug Delivery System* 22, 651-659 (2007)
- 8) Uchida E, Kogi M, Oshizawa T, Furuta B, Satoh K, Iwata A, Murata M, Hikata M, Yamaguchi T. Optimization of the virus concentration method using polyethyleneimine-conjugated magnetic beads and its application to the detection of human hepatitis A, B and C viruses. *J Virol Methods*. Jul;143(1):95-103. (2007)
- 9) Kanayasu-Toyoda T, Suzuki T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T, Yamaguchi T: Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C $\alpha$  in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*. 211, 189-196 (2007)
- 10) N. Hashii, N. Kawasaki, Y. Matsuishi, M. Toyoda, Y. Katagiri, S. Itoh, A. Harazono, A. Umezawa, T. Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1160, 263-269 (2007)
- 11) Yamaguchi, T. Uchida, E.: Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*, 7, 203-208 (2007)
- 12) Mizuguchi H., Funakoshi N., Hosono T., Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T. Rapid construction of small interfering RNA-expressing adenovirus vectors on the basis of direct cloning of short hairpin RNA-coding DNAs. *Hum. Gene Ther.*, 18, 74-80 (2007)
- 13) Koizumi N., Yamaguchi T., Kawabata K., Sakurai F., Sasaki T., Watanabe Y., Hayakawa T., Mizuguchi H. Fiber-modified adenovirus vectors decrease liver toxicity through reduced interleukin 6 production, *J. Immunol.*, 178, 1767-1773 (2007)
- 14) Ishii-Watabe, A., Kobayashi, T., Suzuki, T. Yamaguchi, T., Kawanishi, T.: Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals*, 35, 247-257 (2007)
- 15) Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Suzuki T, Oshizawa T, and Yamaguchi T. A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J Biol Chem.*, 282, 33507-33514 (2007)
- 16) Niimi, S., Harashima, Y., Yamaguchi, T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, 3, 164-182 (2007)
- 17) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井

- 則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 25, 1127-1136 (2007)
- 18) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 山口照英: 細胞治療薬の品質・安全性評価における糖鎖解析の重要性とLC/MSの応用可能性. News Letter 糖鎖フラッシュ号, Functional Glycomics, 9, 35-41 (2007)
- 19) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体医薬品のLC/MS. 「抗体医薬品の最前線」植田充美監修, シーエムシー出版, 東京, (2007)
- 20) 山口照英: Gene Therapy Discussion Group の動向について. 医薬品研究, 38, 50-59, (2007)
- 21) 内田恵理子, 石井(渡部)明子, 山口照英: 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保. 臨床ウイルス学会誌, 35, 278-290 (2007)
- 22) 山口照英, 石井明子: 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について - TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト. 「谷本学校毒性質問箱」, サイエンティスト社, 東京, 10, 1-34, (2007)

表 1. 代表的なバイオ医薬品の欧米での特許期間

製 品	商 品 名	EU での 特許有効期間	米国での 特許有効期間
エポエチン $\alpha$	エポジン	消滅	2012 年
エポエチン $\beta$	NeoRecormon	消滅	消滅
インターフェロン $\cdot\beta$ 1-a	Avonex	2012 年	2008、2013 年
インターフェロン $\cdot\beta$ 1-b	ベタフェロン	消滅	消滅
G-CSF	Neopogen	消滅	2013 年
インターフェロン $\cdot\alpha$ 2b	イントロン	消滅	消滅
インターフェロン $\cdot\alpha$ 2a	Roferon-A	消滅	NA
IL-2	Proleukin	消滅(2007)	2012 年
可溶性 TNF $\cdot\alpha$ 受容体	エンブレル	2010 年	2009 年
抗 TNF $\cdot\alpha$ 抗体	レミケード	2010、2011、2012 年	2011 年
抗 CD20 抗体	リツキサンの	2013 年	2015 年
抗 Erb2 受容体抗体	ハーセプチン	2014 年	2014 年
抗 EGF 受容体抗体	Erbitux	2010 年	2015 年
抗 VEGF 抗体	アバスタチン	2019 年	2017 年

厚生労働科学研究補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題 生薬に関する試験法及び各条規格の改正に関する研究

分担研究者 川原 信夫 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長

—チンピの成分含量測定法の新規設定並びに局方新規収載  
予定生薬ハトムギの確認試験法設定に関する研究—

日本薬局方の改正に関する研究の一環として、チンピの成分含量測定法設定に関しては、各種市場品 47 検体を収集し、現在検討中の試験法を用いて指標成分であるヘスペリジンの含量を測定した。同時に数種のカラムを使用し、システム適合性試験を実施した。この結果、分離度及び相対標準偏差とも良好なデータが得られ、本試験法はチンピの成分含量測定法として設定可能と考えられた。また、ハトムギの確認試験法設定に関しては、基原の明確な 5 品種を含めた 8 検体についてヨウ素でんぷん反応による検討を行った。この結果、モチ性とウルチ性の混在が認められ、現在の市場状況を許容するのであればモチ性の比率、及びそれに従った試験法の設定が必要であると考えられた。

協力研究者

関田節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

嶋田康男 日本生薬連合会 技術委員会

山本 豊 日本生薬連合会 技術委員会

A. 研究目的

2006 年 4 月に施行された第十五改正日本薬局方において、生薬関連分野では、漢方処方エキス 6 処方が新規収載された。これら 6 処方のモノグラフにおいて、処方を構成するすべての生薬に関して確認試験が設定されると共に、少なくとも 3 種以上の指標成分に関する定量法が設定された。それら 6 処方中の 1 処方である補中益気湯エキスでは、構成生薬チンピの指標成分であるヘスペリジンの定量法が設定された。しかし、生薬チンピにおいては未だに成分含量測定法が設定されて

おらず、現在、新規測定法の検討を行っているところである。

一方、日本薬局方外生薬規格に収載されているハトムギは、日本薬局方新規収載候補品目であり、第十六局収載を目標として現在、性状並びに各種試験法の検討を行っている。しかしながらその確認試験法の設定に関して、当初ヨウ素でんぷん反応を用いた方法を検討していたが、わずかに存在するウルチ性ハトムギにより呈色が妨害されることが明らかとなった。そこで基原の明確なハトムギを入手し、確認を行う必要性が示された。

本研究では、日本薬局方の改正に関する研究の一環として、チンピの成分含量測定法設定に関しては、各種市場品 47 検体を収集し、現在検討中の試験法を用いて指標成分であるヘスペリジンの含量を測定した。同時に数種のカラムを使用し、

システムの性能並びにシステムの再現性によるシステム適合性試験を実施した。また、ハトムギの確認試験法設定に関しては、基原の明確な5品種並びに市販ハトムギ、局方ヨクイニンを入手し、さらに比較検体としてウルチ性であるジュズダマについてヨウ素でんぷん反応による検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1) チンピの成分含量測定法に関する検討

#### 試料

生薬試料：2004年から2007年にかけて日本及び中国で収集した市場品チンピ 47 検体 (Table 1) を用いた。

成分含量測定用試薬：成分含量測定用ヘスペリジンは、和光純薬株式会社製ロット No. LTK3553 を用いた。

#### 試験方法

本品の粉末約 0.1g を精密に量り、メタノール 30mL を加え、還流冷却器をつけて水浴上で、15 分間加熱し、冷後、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物はメタノール 20mL を加え同様に操作する。全抽出液を合わせ、メタノールを加えて正確に 50mL とする。この液 5mL を正確に量り、水を加えて正確に 10mL とし、試料溶液とする。別に成分含量測定用ヘスペリジンをデシケーター (シリカゲル) で 24 時間乾燥し、その約 10mg を精密に量り、メタノールを加えて溶かして正確に 100mL とする。この液 5mL を正確に量り、水を加えて正確に 10mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 $\mu$ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のヘスペリジンのピーク面積 AT 及び AS を測定する。

$$\text{ヘスペリジンの量 (mg)} = \text{WS} \times (\text{AT} / \text{AS}) \times 1/2$$

WS：成分含量測定用ヘスペリジンの秤取量 (mg)

#### 試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長:285nm)

カラム：内径 4.6mm、長さ 15cm のステンレス管に 5 $\mu$ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：40 $^{\circ}$ C 付近の一定温度。

移動相：水 / アセトニトリル / 酢酸 (100) 混液 (82:18:1)

流量：毎分 1.0mL (ヘスペリジンの保持時間約 15分)

#### システム適合性

システムの性能：成分含量測定用ヘスペリジン及び薄層クロマトグラフィー用ナリンギン 1mg ずつをメタノール 10mL に溶かし、次に水を加えて 20mL とする。この液 10 $\mu$ L につき、上記の条件で操作するとき、ナリンギン、ヘスペリジンの順に溶出し、その分離度は 1.5 以上である。

システムの再現性：標準溶液 10 $\mu$ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、ヘスペリジンのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

### 2) ハトムギの確認試験に関する検討

#### 試料

生薬試料：独立行政法人農業生物資源研究所より購入したハトムギ 4 品種 (中里在来種 Stock No. 206、岡山在来種 Stock No. 204、向江田在来種 Stock No. 90504、インドネシア・スマトラ産 Stock No. 212)、医薬基盤研究所・つくば薬用植物資源研究センター所有ハトムギ 1 種 (北



のはと)、市販ハトムギ(タイ産)、局方ヨクイニン(2003年購入)及び対照品としてジュズダマ(香川県採集、2007年)を用いた。

ヨウ素試液:ヨウ素 14 gをヨウ化カリウム溶液(2→5) 100 mLに溶かし、希塩酸 1 mL及び水を加えて 1,000 mLとする(0.05 mol/L)。

#### 試験方法

各品種 50~60 粒(ジュズダマは 10 粒)の横断面にヨウ素試液を滴下した時の呈色を観察し、赤紫色を呈した粒数を計測する。

### C. 研究結果

#### 1) チンピの成分含量測定法に関する検討

チンピ市場品47検体の乾燥物換算したヘスペリジン含量を表1に示す。また、ヘスペリジン標準品及び代表的な市場品チンピのHPLCチャートを図1に示す。さらにシステム適合性試験に使用したカラム及びそれらの分離度並びに相対標準偏差を表2に示す。

表1に示すように、47検体の市場品のチンピにはヘスペリジンが4.17%~8.08%含有していることが明らかとなった。また、システム適合性試験における分離度は3.06~5.20であり、相対標準偏差は0.21~0.63であった。

#### 2) ハトムギの確認試験に関する検討

各検体のヨウ素試液法による確認試験の結果[全試験供試数、赤紫色を呈した粒数及びその割合(%)]を以下に示す。また、各検体の呈色状況を図2に示す。

中里在来種: 50 粒、39 粒(78.0%)

岡山在来種: 62 粒、56 粒(96.8%)

向江田在来種: 54 粒、40 粒(74.1%)

インドネシア・スマトラ産: 54 粒、54 粒(100%)

医薬基盤研 北のはと: 60 粒、60 粒(100%)

市販ハトムギ(タイ産): 50 粒、38 粒(76.0%)

局方ヨクイニン: 60 粒、42 粒(70.0%)

ジュズダマ(香川県採集): 10 粒、0 粒(0%)

インドネシア・スマトラ産及び医薬基盤研 北のはとは、すべてモチ性を示す赤紫色を呈したのに対し、他の在来種、市販ハトムギ(タイ産)及び局方ヨクイニンではその割合が70~97%であり、一部はウルチ性を示す暗青色を呈した。一方、対照品であるジュズダマでは10粒全て暗青色を呈し、すべてウルチ性であることが確認された。

### D. 考察

#### 1) チンピの成分含量測定法に関する検討

今回の測定の結果、市場品のチンピ47検体には、ヘスペリジンが4.17%~8.08%の範囲で含有されており、その平均は6.13%であり、標準偏差は0.94%であることが明らかとなった。また、3社4種類のカラムを用いたシステム適合性試験の結果において、何れも良好な分離度及び相対標準偏差を示された。従って本試験法はチンピの成分含量測定法として設定可能であると考えられた。今後はさらに検体数を増やし検討する予定である。

#### 2) ハトムギの確認試験に関する検討

ジュズダマはウルチ性であり、ハトムギはジュズダマの変種である。薬用に用いられるハトムギはモチ性のものが良品とされ、栽培時あるいは収穫地で選抜されてきたものと考えられる。かつて農林水産省が食用、飼料としてハトムギの栽培を奨励した時には薬用は念頭になかったため、ウルチ性、モチ性を考慮してはいなかったものと推測される。

北のはと、インドネシア・スマトラ産はモチ性100%であった。古来ハトムギがモチ性100%であったとすると、現在ウルチ性が混在するのは交配

による影響と考えられ、選品時の指導により交配種の除去も不可能ではないと考えられる。ただし、現在の市場を許容するのであればモチ性の比率、及びそれに従った試験法の設定が必須であり、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

#### E. 結論

日本薬局方の改正に関する研究の一環として、チンピの成分含量測定法設定に関しては、各種市場品 47 検体を収集し、現在検討中の試験法を用いて指標成分であるヘスペリジンの含量を測定した。同時に数種のカラムを使用し、システム適合性試験を実施した。この結果、分離度及び相対標準偏差とも良好なデータが得られ、本試験法はチンピの成分含量測定法として設定可能と考えられた。また、ハトムギの確認試験法設定に関しては、基原の明確な 5 品種を含めた 8 検体についてヨウ素でんぷん反応による検討を行った。この結果、モチ性とウルチ性の混在が認められ、現在の市場状況を許容するのであればモチ性の比率、及びそれに従った試験法の設定が必要であると

考えられた。

#### F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表1 各種チンピの産地及びヘスペリジン含量

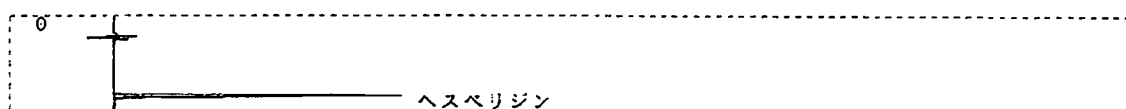
	産地	入手年月	乾燥減量(%)	ヘスペリジン含量(%)
1	中国・浙江省	2005	11.0	4.17
2	中国・浙江	2007.02	8.61	4.62
3	中国・湖北	2006.04	9.9	4.68
4	中国・浙江省	2006	10.1	4.76
5	日本	2006.05	12.7	4.88
6	中国・湖北	2006.12	9.3	4.92
7	中国	2006.02	13.0	4.99
8	中国・浙江省	2005	8.5	5.02
9	中国・浙江省	2005	9.7	5.02
10	日本	2006	12.04	5.02
11	中国・浙江省	2006	8.2	5.16
12	日本	2005	12.35	5.38
13	中国	2007	11.2	5.50
14	中国・浙江	2007.04	12.7	5.70
15	日本	2006	5.5	5.79
16	中国・浙江	2006.03	11.2	5.86
17	日本	2005.02	12.9	5.89
18	中国	2006.02	11.3	5.93
19	日本・香川	2007.02	8.9	6.00
20	日本	2004.11	11.7	6.04
21	中国	2007.03	12.9	6.04
22	日本	2007.03	7.1	6.13
23	日本	2006	5.5	6.15
24	中国・浙江省	2004	9.2	6.19
25	中国・湖南	2005.06	10.0	6.21
26	中国・湖北	2006.06	9.2	6.29
27	中国・湖北	2006.12	10.0	6.29
28	日本・和歌山	2003.07	9.9	6.30
29	日本・愛媛	2005.02	11.0	6.30
30	日本	2006	9.8	6.32
31	中国・浙江	2007.06	11.16	6.46
32	中国	2003.08	12.5	6.56
33	中国・湖北	2005.12	9.5	6.60
34	中国・湖北	2005.12	9.3	6.66
35	日本	2007	9.33	6.72
36	日本	2007	9.9	6.76
37	日本	2006	7.19	6.86
38	中国・湖北	2005.03	9.6	6.95
39	中国・浙江省	2005	9.3	7.06
40	中国・湖南	2006.10	9.0	7.14
41	日本	2007	7.34	7.18
42	中国・湖北	2005.10	9.0	7.30
43	中国・浙江省	2004	10.2	7.32
44	中国・湖北	2005.04	9.0	7.35
45	中国・湖北	2006.11	7.7	7.66
46	日本	2007	8.60	8.06
47	日本	2006	9.43	8.08

(ヘスペリジン含量は乾燥物換算値として算出した)

表2 各種使用カラムとその分離度及び相対標準偏差

使用カラム	分離度	相対標準偏差
TSK-GEL ODS-80TS 4.6 φ 150 mm	4.25	0.32
TSK-GEL ODS-80TS 4.6 φ 150 mm	5.20	0.50
Wakosil-II 5C18 4.6 φ 150 mm	3.06	0.63
Wakosil-II 5C18 6.0 φ 150 mm	4.06	0.38
YMC-Pack ODS-A A-302 4.6 φ 150 mm	3.70	0.21

ヘスペリジン標準品



チンピ市場品

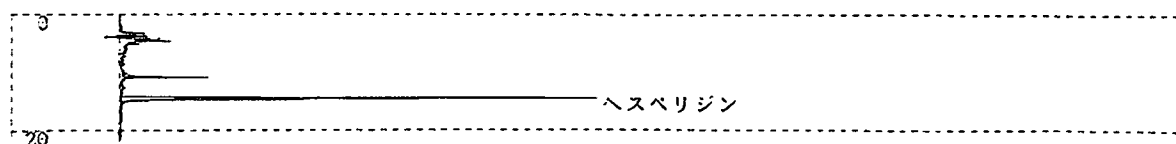


図1 ヘスペリジン標準品とチンピ市場品のHPLCクロマトグラム