

特に、不純物プロファイルが大きく異なっている場合や、精製に用いるアフィニティクロマトグラフィーを独自に導入した場合のように先行バイオ医薬品に含まれていない新たな不純物（アフィニティクロマトグラフィー用担体に用いられる抗体等）が存在する場合には、不純物に着目した毒性試験の実施を考慮する。また、目的物質由来不純物のプロファイルが先行バイオ医薬品とは大きく異なる場合には、非臨床・臨床開発を通じて、その違いに着目した試験の実施が必要となる場合がある。

毒性プロファイルを直接比較するために動物で抗体産生を評価する場合、産生された抗体が中和抗体かどうか、あるいは薬物動態に影響を及ぼすかどうかを明らかにしておくことは、臨床における有用な情報となろう。

反復投与毒性試験の結果や先行バイオ医薬品において得られた有効成分の特性に関する情報から、特に必要と判断されない限り、バイオ後続品の非臨床試験として、安全性薬理試験、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験等、その他の通常の非臨床安全性試験の必要性は低いと考えられる。

7. 2. 薬理試験

薬理試験として、先行バイオ医薬品とバイオ後続品との薬理作用が同等／同質であることを直接比較する。なお、品質の特性解析試験として臨床効果と密接に関連する *in vitro* での生物活性試験（細胞を用いた試験や受容体結合活性等）を実施し、先行バイオ医薬品とバイオ後続品の比較がなされている場合には、これを薬理試験として準用できる場合も

ある。しかし、ある種の糖タンパク質のように *in vitro* の活性が臨床効果と相関しない場合には、*in vivo* 薬理試験によって薬効や薬力学における先行バイオ医薬品との同等性／同質性を確認することが必要となる。

In vitro 生物活性等の同等性／同質性試験で十分な評価が可能な場合には、必ずしも *in vivo* での薬力学的効果に関する比較試験が求められるわけではないが、*in vivo* 薬理試験を実施することにより臨床試験の前段階として有用な情報が得られることが多い。したがって、バイオ後続品と先行バイオ医薬品との同等性／同質性を確認するために、必要に応じて *in vivo* での薬効試験や薬力学試験の実施を考慮する。

8. 臨床試験

バイオ後続品では、一般に、品質特性及び非臨床試験結果のみによって、先行バイオ医薬品との同等性／同質性を検証することは困難であり、基本的には、臨床試験により同等性／同質性を評価する必要がある。

なお、臨床試験で用いる製剤は、確立された製法で製造されたものを用いることが基本的に求められるが、開発途上で製法変更があった場合には必要に応じて ICH Q5E ガイドラインにしたがって同等性／同質性を評価する。

後述する臨床薬物動態(PK)試験、薬力学(PD)試験又は PK/PD 試験により目的とする臨床エンドポイントにおける同等性／同質性を保証できる十分なデータが得られた場合には、有効性に関する臨床試験を省略できる場合がある。

臨床試験による同等性／同質性評価は、得

られたデータに基づき次の試験をデザインし、ステップ・バイ・ステップで実施すべきものであり、必要とされる臨床試験の種類と内容は先行バイオ医薬品に関する情報やその特性によっても大きく異なる。各々の製品について必要とされる臨床試験の範囲については、開発ステージで得られているデータに基づいてケース・バイ・ケースの対応が必要であるので、規制当局と相談することが望ましい。

8. 1. 臨床薬物動態(PK)試験、薬力学(PD)試験 及び PK/PD 試験

原則的に、バイオ後続品と先行バイオ医薬品の薬物動態の同等性/同質性を適切にデザインされたクロスオーバー試験により確認する必要があるが、消失半減期が長い薬剤（抗体、PEG 結合タンパク質等）やヒトで抗体産生が起こる医薬品については必ずしもクロスオーバー試験が適切でないこともあるので、特性を考慮した試験デザインを検討する。その際、先行バイオ医薬品や対象疾患によって、健常人を対象とすることが適切な場合と患者を対象とする方が適切な場合がある。また、先行バイオ医薬品の目的とする効能における投与経路と同様の投与経路で検討を行う必要があり、複数の投与経路を有する場合には原則的にはそれぞれについて検討する必要がある。原則的には、先行バイオ医薬品の推奨用量で検討すべきであるが、先行バイオ医薬品の用量の範囲内で科学的に妥当な用量を選択することも可能である。主要な薬物動態パラメータとしては血中濃度曲線下面積（AUC）、最高血中濃度（C_{max}）等が考えられるが、事前に同等性/同質性の許容域（同等性/同質性のマージン）を規定しておく必要がある。その際、設定した許容域の妥当性

について十分な説明が必要である。

また、可能であれば製品の臨床効果を反映する PD マーカーを選択し、PD を指標にした比較を行うことが必要である。特に、技術的な問題で薬物動態試験が困難な場合においては PD マーカーによる比較が有用である。さらに、PK/PD 関係の解析により同等性/同質性の検討を行うことが望ましい。

8. 2. 臨床的有効性の比較

品質特性の同等性/同質性評価試験等によって品質面での高い類似性が示されたものの、PK、PD 若しくは PK/PD 試験の結果をあわせても、臨床有効性の同等性/同質性の結論が下せない場合は、承認を得ようとする効能について、バイオ後続品と先行バイオ医薬品の有効性が同等/同質であることを確認するための臨床試験を実施することが必須となる。

臨床試験の実施に際しては、バイオ後続品と先行バイオ医薬品の有効性に関する同等性/同質性を確認するために、適切な比較試験をデザインし、その妥当性を説明する必要がある。具体的には、必要かつ妥当な症例数を設定するとともに、臨床的に確立されたエンドポイントを用い、事前に同等性/同質性の許容域（同等/同質性のマージン）を規定しておく必要がある。適切な代替エンドポイントがある場合には、必ずしも真のエンドポイントを用いる必要はないが、その妥当性を裏付けるデータや文献等により十分な説明が必要とされる。

先行バイオ医薬品が複数の効能・効果を有する場合、ある効能・効果において先行バイ

バイオ医薬品と有効性が同等／同質であり、他の効能・効果においても薬理学的に同様の作用が期待できることが説明できるのであれば、対照薬として用いた先行バイオ医薬品が承認を取得している他の効能・効果をバイオ後続品に外挿することが可能となる場合もある。効能・効果の外挿が可能となるのは、対照薬として用いた先行バイオ医薬品の効能に限られ、先行バイオ医薬品以外の同種・同効の他の既承認組換えタンパク質医薬品の効能・効果は含まれない。

一方、それぞれの効能・効果で作用機序が異なっている場合、又はその作用機序が明確になっていない場合には、効能・効果ごとに先行バイオ医薬品と有効性が同等／同質であることを示すべきである。

8. 3. 臨床的安全性の確認

バイオ後続品は、有効性の同等性／同質性が示された場合であっても、安全性プロファイルが先行バイオ医薬品と異なる可能性がある。PK、PD 又は PK/PD 試験によって同等性／同質性が示され、有効性を評価するための臨床試験を実施しない場合であっても、必要に応じて免疫原性の検討を含む安全性に関する臨床試験の実施を検討する必要がある。また、有効性を比較するための臨床試験を実施する際に、安全性（有害事象の種類、その頻度）を同時に検討するような試験計画としても差し支えない。

不純物プロファイルの解析結果から安全性について特に懸念がある場合には、十分な検討ができるよう症例数を設定する必要がある。

長期投与される医薬品においては、繰り返し投与試験の実施を考慮する。

なお、臨床開発の適切なステージで、抗体

の出現の有無及びその他の免疫原性について、科学的に妥当な判断が可能な試験を行う。抗体の出現が認められた場合には出現した抗体について解析し、中和抗体であるかどうかを確認し、抗体のクラス、親和性及び特異性についても解析することが望ましい。さらに、抗体の出現による有効性の低下や安全性への影響を確認することも考慮すべきである。また、不純物に対する抗体産生や特定の糖鎖抗原に対する反応性についても十分考慮すべきである。

9. 製造販売後調査

臨床試験の情報は一般に限られており、バイオ後続品にあつては、特に、免疫原性の問題等、後発品と異なる要素があることから、製造販売後に安全性プロファイル等について引き続き調査する必要がある。その際、開発段階の同等性／同質性評価では十分に評価できなかったリスクを予め想定し、それを踏まえ適切にデザインされた製造販売後調査計画を立案する必要がある。製造販売後調査とリスク管理計画の具体的な方法や計画については、規制当局と相談し、承認申請に際して提出することが求められる。なお、製造販売後調査の結果については、バイオ後続品の承認後の適切な時期までに規制当局に報告する必要がある。

当該調査期間においては、有害事象のトレーサビリティを確保することが重要であり、先行バイオ医薬品や同種・同効医薬品とバイオ後続品とを、一連の治療期間内に代替又は混用することは基本的に避ける必要がある。

適宜参考とすべき ICH ガイドライン

1. ICH Q2A ガイドライン 「分析バリデー

ションに関するテキスト（実施項目）」

2. ICH Q2B ガイドライン 「分析法バリデーションに関するテキスト（実施方法）」

3. ICH Q5A ガイドライン 「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」

4. ICH Q5B ガイドライン 「組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析」

5. ICH Q5C ガイドライン 「生物薬品（バイオテクノロジー応用製品／生物起源由来製品）の安定性試験」

6. ICH Q5D ガイドライン 「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」

7. ICH Q5E ガイドライン 「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の製造工程の変更ともなう同等性／同質性評価」

8. ICH Q6B ガイドライン 「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定」

9. ICH S6 ガイドライン 「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」

用語集・定義

1. 品質特性

製品の品質を現すのに相応しいものとして選択された分子特性又は製品特性であり、当該製品の同一性、純度、力価、安定性及び外来性感染性物質の安全性などを併せて規定されるものである。規格及び試験方法で評価されるのは、品質特性から部分的に選択された一連の項目である。品質特性には、目的とす

る有効成分の力価や生物活性、物理的・化学的性質等のみならず、目的物質関連物質、目的物質由来不純物、製造工程由来不純物の種類や存在量も含まれる。

2. 目的物質関連物質

製造中や保存中に生成する目的物質の分子変化体で、生物活性があり、製品の安全性及び有効性に悪影響を及ぼさないもの。これらの分子変化体は目的物質に匹敵する特性を備えており、不純物とは考えない。

3. 不純物

原薬又は製剤中に存在する目的物質、目的物質関連物質及び添加剤以外の成分。製造工程由来のものもあれば目的物質由来のものもある。

4. 目的物質由来不純物

目的物質の分子変化体（例えば、前駆体、製造中や保存中に生成する分解物・変化物）で、目的物質関連物質以外のもの。

5. 製造工程由来不純物

製造工程に由来する不純物。これらには、細胞基材に由来するもの、細胞培養液に由来するもの、あるいは培養以降の工程である目的物質の抽出、分離、加工、精製工程に由来するもの（例えば、細胞培養以降の工程に用いられる試薬・試液類、クロマトグラフィー用担体等からの漏出物）がある。

6. (公的) 標準品

国際標準品及び国内標準品を指す。例えば National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) から配布されている国際標準品、あるいは日本公定書協会から配布されている日本薬局方標準品が該当する。これらの標準品は、力価測定用、あるいは理化学試験用等であり、目的とされている試験以外の適用は不適切である。

7. 許容域（同等性／同質性のマージン）

先行バイオ医薬品との間の同等性／同質性を示すことを目的として、バイオ後続品と先行バイオ医薬品との比較試験を実施する際に、主要なエンドポイントについて二つの製品を比較するための信頼区間を示し、これ以上劣っては許容できないことを予め設定した大きさと、その区間との関係。

なおバイオ後続品関連で発出された通知は以下の通りである

- 1) 「バイオ後続品の承認申請について」（平成 21 年 3 月 4 日付薬食発第 0304004 号）申請区分に関する局長通知（薬食発第 0331015 号）の改正
- 2) 「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」（平成 21 年 3 月 4 日付薬食審査発第 0304007 号）
- 3) 「バイオ後続品に係る一般的名称及び販売名の取扱いについて」（平成 21 年 3 月 4 日付薬食審査発第 0304011 号）
- 4) 「バイオ医薬品の承認申請に際し留意すべき事項について」（平成 21 年 3 月 4 日付薬食審査発第 0304015 号）

D. 考察

本研究を実施する間に、EU では既にエリスロポエチンやヒト成長ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子などのバイオシミラーが承認されており、わが国でも 2009 年にヒト成長ホルモンのバイオ後続品が承認された。また、承認申請中や開発中の製品も多くある。バイオ後続品の開発は、先進国のみならず経済発展が著しいブラジル、インド、中国 などの BRIC s 諸国や開発途上国でも活発化しており、かつグローバル化し

ていくことが予測される。このようなバイオ後続品の品質・安全性・有効性を担保していくために各国ではガイドラインの作成や規制的枠組み作りが行われている。特に EU は品質、非臨床試験、臨床試験のガイドラインに加えて、個々の製品の非臨床試験や臨床試験に関する個別ガイドライも作成し、その開発を積極的に進めている。また WHO は、2009 年秋にバイオ後続品／バイオシミラー製品のガイドラインを発表しており、米国においては議会でバイオ後続品の承認要件に関する議論が続けられている。我が国のバイオ後続品ガイドラインは、(1)バイオ後続品は化学薬品の後発品とは異なるコンセプトに基づいて開発されること、(2)また先行バイオ医薬品の経験を生かすことにより非臨床試験や臨床試験のデータの一部が代用できるとされる点など、各国のガイドラインで共通する点もある一方で、参照する先行バイオ医薬品の要件などでは違いが見られる。

E. 結論

バイオ後続品の指針に盛り込むべき項目として、1) バイオ後続品の開発に当たっては、国内で既に承認を受けている製品を対照として開発されるべきであること、2) 製法開発に当たっては、独自に新薬と同等の恒常性と頑健性を確立すること、3) 特性解析では、まず新薬と同様に徹底した評価を行い、その上で対照とする先行バイオ医薬品との類似性を実証データに基づきまた公知の知識などを参考に明らかにすること、4) 非臨床試験では独自に得られた特性解析データや対照とする先行バイオ医薬品との類似性などのデータに基づき適切な

試験をデザインすること、また、非臨床試験では先行バイオ医薬品との比較試験を行う場合と、不純物の安全性のように独自に評価することが可能な試験があること、5) 臨床試験では、品質、非臨床試験等で得られたデータ等を総合して、先行バイオ医薬品との同等性・同質性を示すこと、などを明らかにした。

本研究によるバイオ後続品案に基づき発出されたバイオ後続品ガイドラインが、今後我が国におけるバイオ後続品の品質・有効性・安全性確保に寄与することを祈念する。

F. 研究発表

論文発表

- 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) 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)
- 3) 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)
- 4) Kanayasu-Toyoda, T, Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi T : Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promotes The Translocation of Protein Kinase C α in Neutrophilic Differentiation Cells, *Journal of Cellular Physiology*. 211, 189-196 (2007)
- 5) 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)
- 6) Yamaguchi, T. Uchida, E. : Regulatory Aspects of Oncolytic Virus Products. *CCDT Journal*, 7, 203-208 (2007)
- 7) 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)
- 8) 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)

- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) Niimi,S., Harashima,, Yamguchi,T.: Study of hepatocytes using RNA interference. *Journal of Organ Dysfunction*, 3, 164-182 (2007)
- 12) 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-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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 山口照英: Gene Therapy Discussion Group の動向について. *医薬品研究*, 38, 50-59, (2007)
- 16) 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)
- 17) 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・臨床試験についてー 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)
- 18) Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko, Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp. Cell Res.* 314:430-440, 2008
- 19) 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(3) 過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品の品質評価. *医薬品研究*, (印刷中)
- 20) 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究(4) 過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品の品質評価. *医薬品研究* (印刷中)
- 21) 掛樋一晃, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英: ヘパリンナトリウム純度試験に関する研究 (第3報) キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不

- 純物の分析. *医薬品研究* (印刷中)
- 22) K. Satoh, A. Iwata-Takakura, A. Yoshikawa, Y. Gotanda, T. Tanaka, T. Yamaguchi & H. Mizoguchi, A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection, *Vox Sanguinis*, 95, 174-180, (2008)
- 23) Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi T. and Yamaguchi, T.: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr. B* 869: 20-30 (2008)
- 24) Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation Analysis of IgLON Family Proteins in Rat Brain by Liquid Chromatography and Multiple-Stage Mass Spectrometry, *Biochemistry*, 47, 10132-10154, (2008)
- 25) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* 20, 97-116 (2008)
- 26) Takuo Suzuki, Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Tetsu Kobayashi, Akiko Ishii-Watabe, Youichi Shinozaki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi, and Toru Kawanishi: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J. Pharmacol. Sci.* 107(3), 285-294 (2008)
- 27) Mizuho Harashima, Kayo Harada, Yoshimasa Ito, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Teruhide Yamaguchi, Shingo Niimi. Annexin A3 Expression Increases in Hepatocytes and is Regulated by Hepatocyte Growth Factor in Rat Liver Regeneration, *J. Biochem.* 143, 537-545 (2008)
- 28) Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Suzuki K, Nagao T, Yamaguchi T. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of novel markers in early- and late-stage cell culture. *J Biochem.* 144,399-408, (2008)
- 29) 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 (2008)
- 30) 山口照英, 石井明子: 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 *PHARMASTAGE*, 7, 1-6 (2008)

- 31) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 小林 哲, 石川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之, 窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 島 圭介, 山田真希, 山口照英: 質量分析法を用いたペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験法に関する研究. *医薬品研究* 39(10), 627-646 (2008)
- 32) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. *蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性*. 53, 1690-1696 (2008)
- 33) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 齋島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸広, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究 (第 1 報) $^1\text{H-NMR}$ によるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究. *医薬品研究*, 39, 651-659 (2008)
- 34) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 有村雅敏, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英: ヘパリン純度試験に関する研究 (第 2 報) $^1\text{H-NMR}$ によるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究, *医薬品研究*, 39, 660-664 (2008).
- 35) 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫, 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その 1). *医薬品研究*, 39(1), 1-37 (2008)
- 36) 新見伸吾, 原島瑞, 日向昌司, 山口照英, 早川堯夫, 癌に対する抗血管新生療法の現状と展望(その 2). *医薬品研究*, 39(6), 359-387 (2008)
- 37) 山口照英, 石井明子: 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保. *臨床評価*, 36, 611-627 (2009)
- 38) 山口照英, 川崎ナナ: 抗体医薬品の品質・安全性確保. *ファルマシア*, 45(7) 677 - 682, (2009)
- 39) 山口照英, 内田恵理子: 核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保. *Pharma Stage*, 9(2), 1-5, 2009
- 40) 山口照英: バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保の観点. *Pharm Tech Japan*, 25, 2009
- 41) Kawasaki N, Itoh S, Yamaguchi T.: LC/MSn for glycoprotein analysis: N-linked glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides. *Methods Mol Biol.* 534, 239-248. (2009)
- 42) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Akira Harazono, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry: Identification of Lewis x-conjugated glycopeptides in mouse kidney. *J. Proteome Res.* 8, 3415-3429 (2009)
- 43) Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Minoru Tada, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the

- Fc domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn. *J Immunology*, 184, 1968-1976. (2010)
- 44) Akiko Ohno, Nana Kawasaki, Kiyoshi Fukuhara, Haruhiro Okuda, Teruhide Yamaguchi: Time-dependent changes of oxytocin using ¹H NMR coupled with multivariate analysis: a new approach for quality evaluation of protein/peptide biologic drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, 57, 1396-1399 (2009)
- 45) 内田恵理子、山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保: 核酸増幅検査 (NAT) による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、*YAKUGAKU ZASSHI* 130, 163-169 (2010)
- 46) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英: 治療用タンパク質の免疫原性 その 1 医薬品研究 2009 vol. 40 No.11 (印刷中)
- 47) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (5) 796-800 (2009)
- 48) 山口照英: バイオ後続品(バイオシミラー医薬品)の概要. 「バイオ後続品/バイオシミラー医薬品」情報機構 (2009)
- 49) 山口照英: バイオ後続品の「指針」について. 「バイオ後続品/バイオシミラー医薬品」情報機構 (2009)
- 50) 山口照英: 開発戦略と研究の流れ、考えか方. 「先端バイオ医薬品の評価技術」シーエムシー出版 (2010)
- 51) 山口照英: バイオ後続品の開発における品質・安全性・有効性評価の留意点と承認申請. 「先端バイオ医薬品の評価技術」シーエムシー出版 (2010)

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）
総合分担研究報告書

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 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター長

—チンピ、サンシュユ、ソヨウ、ショウキョウ及びカンキョウの
成分含量測定法の新規設定、ハトムギ及びソヨウの確認試験法設
定並びにヤクモソウの品質評価に関する研究—

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、ヘスペリジンの含量を測定した。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。サンシュユの成分含量測定法設定に関しては、各種市場品 65 検体を収集し、ロガニンの含量を測定した。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、本試験法はサンシュユの成分含量測定法として設定可能と考えられた。また、ソヨウに関しては、ペリルアルデヒドを成分含量測定法で、ロスマリン酸を確認試験法で規定することにより、近年市場で散見される粗悪な中国産ソヨウの流通を防ぐことが可能となると考えられた。さらに一部の中国産ではペリルアルデヒドをほとんど含まず、変異原性を有する (*E*)-アサロンを多く含有することが明らかとなった。ショウキョウ及びカンキョウの成分含量測定法設定に関しては、ショウキョウ各種市場品 64 検体、ショウキョウ末各種市場品 29 検体及びカンキョウ各種市場品 45 検体を収集し、[6]-ギングロール（ショウキョウ及びショウキョウ末） [6]-ショーガオール（カンキョウ）の含量を測定した。この結果、理論段数、シンメトリー係数及び相対標準偏差とも良好なデータが得られ、本試験法はショウキョウ、ショウキョウ末及びカンキョウの成分含量測定法として設定可能と考えられた。また、ヤクモソウの品質評価に関しては、収穫後の乾燥温度条件における成分の変化の検討を行った。

協力研究者

関田節子 徳島文理大学香川薬学部 教授
淵野裕之 独立行政法人医薬基盤研薬用植物資源研究センター筑波研究部栽培研究室長
寺林 進 横浜薬科大学 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

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。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

A. 研究目的

2006 年 4 月に施行された第十五改正日本薬局

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。

また、第十五改正日本薬局方第二追補に記載された牛車腎気丸エキス及び八味地黄丸エキスにおいて構成生薬サンシュユの指標成分であるロガニンの定量法が設定された。しかし、生薬サンシュユ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、薬用に用いるシソは、葉が赤紫色で、ペリルアルデヒド臭が強いものが良品とされているが、近年中国産のソヨウにペリルアルデヒド臭のしない粗悪なものが紛れ込んでいる。現在第十五改正日本薬局方ではその確認試験法に無水酢酸と硫酸を用いたテルペン類の呈色反応を採用しているが、本確認試験法のみでは粗悪な生薬の流入を防ぐことができない状況である。

さらに第十五改正日本薬局方では、生薬ショウキョウ、ショウキョウ末及びカンキョウにTLCを用いた確認試験法が設定された。しかし、これら生薬類に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、生薬は特に収穫後の加工調整の段階での加熱や乾燥方法などによっても大きく成分が変化するため、当センターで栽培した植物の収穫直後からの各種乾燥条件などによる成分の違いなどを詳しく検討し、生薬ごとの最適な加工条件を検討することにより、国内流通生薬の品質保持と管理に役立つものと考えられる。

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、ヘスペリジンの含量を測定した。同時に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。サンシュユの成分含量測定法設定に関しては、各種市場品 65 検体を収集し、ロガニンの含量を測定した。同時に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。シソに関しては新たな規格設定の必要性に対応すべく今回、薄層クロマトグラフィー法を用いた確認試験法並びに高速液体クロマトグラフィー法を用いた成

分含量測定法の検討を行った。さらに、ショウキョウ及びショウキョウ末の成分含量測定法設定に関しては、ショウキョウ各種市場品 64 検体及びショウキョウ末各種市場品 29 検体を収集し、[6]-ギンゲロールの含量を測定した。またカンキョウの成分含量測定法設定に関しては、カンキョウ各種市場品 45 検体を収集し、[6]-ショールールの含量を測定した。同時に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、生薬の調整、加工条件による含有成分パターンの変化については、変化第十五改正日本薬局方第一追補に記載されたヤクモソウに関して検討を行った。今回、メハジキの地上部を収穫後に各温度にて乾燥し、成分の変化を調べたので報告する。

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 μ 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 μ 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°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 μ 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 μ 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 \rightarrow 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。

3) サンシュユの成分含量測定法に関する検討

試料

生薬試料：2001 年から 2008 年にかけて韓国及び中国で収集した市場品サンシュユ 65 検体を用いた。

試験方法

本品の粉末約 1 g を精密に量り、共栓遠沈管に入れ、薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) 30 mL を加え、20 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) 30 mL を加えて、更に 2 回同様に操作する。全抽出液を合わせ、薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) 30 mL を加えて正確に 100 mL とし、試料溶液とする。別ロガニンをデシケーター (シリカゲル) で 24 時間乾燥し、その約 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) を加えて溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグ

ラフィー<2.01>により試験を行い、それぞれの液のロガニンのピーク面積 A_T 及び A_R を測定する。

ロガニンの量 (mg) = $W_S \times (A_T / A_R)$

W_S ：成分含量測定用ロガニンの秤取量 (mg)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：238 nm)

カラム：内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 5 μ 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：50 $^{\circ}$ C 付近の一定温度。

移動相：水/アセトニトリル/メタノール混液 (55:4:1)

流量：ロガニンの保持時間約 25 分となるように調整する。

システム適合性

システムの性能：成分含量測定用ロガニン 1 mg 及び *p*-ヒドロキシアセトフェノン 1 mg を薄めたメタノール (1 \rightarrow 2) 20 mL に溶かす。この液 10 μ L につき、上記の条件で操作する時、*p*-ヒドロキシアセトフェノン、ロガニンの順に溶出し、その分離度は 7 以上である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき、試験を 6 回繰り返すとき、ロガニンのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

4) ソヨウの確認試験に関する検討

試料

検討用試料として、日本産流通品 (栃木県産) 3 種類、筑波研究部産 2 種を用いた。ソヨウの指標性分として、精油成分ペリルアルデヒド及び芳香族化合物ロスマリン酸についてそれぞれ検討した。

(1) ペリルアルデヒドを指標物質とした場合

ペリルアルデヒドはその分子内に α, β -不飽和カルボニルを有することから UV 254 nm での検出が可能と考えられた。また効率よくペリルアルデヒドを抽出するための最適溶媒を検討するために、ソヨウをヘキササン、酢酸エチル、エタノールで抽出し、それぞれの TLC を比較した。

(2) ロスマリン酸を指標物質とした場合

ソヨウの特徴的成分にロスマリン酸があるが、本化合物についても TLC による確認試験での指標成分となりうると考え、以下の方法を検討した。ロスマリン酸はその分子内にカフェー酸を有するため、UV 365 nm での観察が可能と考えられ、微量な場合にも有効と考えられた。

5) ソヨウの成分含量測定法に関する検討

(1) ペリルアルデヒドの分析

試験方法

本品の粉末約 0.2 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、メタノール 20 mL 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。残

留物はメタノール 20 mL を加えて、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 50 mL とし試料溶液とする。試料溶液 20 μ L を正確にとり、以下の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行う。

HPLC 試験条件

検出器：UV 検出器 230 nm

カラム：オクタデシルシリカゲルカラム C-18 (4.6 x 150 mm)

カラム温度：30°C 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液 (3:2)

流速：1.0 mL/min

(2) ロスマリン酸の分析

試験方法

本品の粉末約 0.2 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、メタノール 20 mL 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。残留物はメタノール 20 mL を加えて、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 50 mL とし試料溶液とする。試料溶液 10 μ L を正確にとり、以下の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。

HPLC 試験条件 1

検出器：UV 検出器 340 nm

カラム：オクタデシルシリカゲルカラム C-18 (4.6 x 150 mm)

カラム温度：30°C 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル/リン酸混液 (1600:400:1)

流速：1.0 mL/min

HPLC 試験条件 2

検出器：UV 検出器 340 nm

カラム：オクタデシルシリカゲルカラム C-18 (4.6x150 mm)

カラム温度：40°C 付近の一定温度

移動相：水/メタノール/TFA (63:35:0.1)

流速：1.0 mL/min

6) ペリルアルデヒドの安定性に関する検討

(1) UV 及び NMR による検討

ペリルアルデヒドは精油成分であるため、成分含量測定法などの分析において精密に量り取ることが困難であるが、もう 1 つの問題にその安定性が挙げられる。ペリルアルデヒドはその分子内にアルデヒドを有するためにアルコール存在下において容易にアセタールへと変化してしまう。アセタールに変化すると UV における極大吸収が変化してしまうため、正確な定量ができなくなる。そこで経時によるペリルアルデヒドの安定性を検討した。

(2) HPLC による検討

先に記載した HPLC 条件によってペリルアルデヒドの安定性を検討した。ペリルアルデヒドの原液をアンプル密封、サンプル管と保存容器を替え、保存温度を -20°C、5°C、室温（遮光、非遮光）に分けて、それぞれの減少率を検討した。また、ソヨウメタノール抽出液の安定性を調べるために、抽出液を同様に各保存容器、保存温度で検討した。

7) ショウキョウの成分含量測定法に関する検討

試料

生薬試料：2003 年から 2009 年にかけて日本、中国、インド及びナイジェリアで収集した市場品 ショウキョウ 64 検体及びショウキョウ末 29 検体を用いた。

試験方法

本品の粉末約 1g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、メタノール/水混液 (3:1) 30mL を加え、20 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物はメタノール/水混液 (3:1) 30mL を加えて、更に 2 回、同様に操作する。全抽出液を合わせ、メタノール/水混液 (3:1) を加えて正確に 100mL とし、試料溶液とする。別に成分含量測定用 [6]-ギンゲロール 5mg を精密に量り、メタノール/水混液 (3:1) を加えて正確に 100mL とし標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、それぞれの液の [6]-ギンゲロールのピーク面積 A_T 及び A_S を測定する。

$$[6]\text{-ギンゲロールの量 (mg)} = W_S \times A_T / A_S$$

$$W_S: [6]\text{-ギンゲロールの秤取量 (mg)}$$

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長:205nm)

カラム：内径 4.6mm、長さ 15cm のステンレス管に 5 μ 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°C 付近の一定温度。

移動相：水/アセトニトリル/リン酸混液 (3800:2200:1)

流量：[6]-ギンゲロールの保持時間が約 19 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：システムの性能：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、[6]-ギンゲロールのピークの理論段数及びシンメトリー係数は、それぞれ 5000 段以上、1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、[6]-ギンゲロールのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

8) カンキョウの成分含量測定法に関する検討

試料

生薬試料：2004年から2009年にかけて日本及び中国で収集した市場品ショウキョウ 45 検体を用いた。

試験方法

本品の粉末約 1.0 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、移動相 30mL を加え、20 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物は移動相 30mL を加えて、更に 2 回、同様に操作する。全抽出液を合わせ、移動相を加えて正確に 100mL とし、試料溶液とする。別に成分含量測定用 [6]-ショウガオール 5mg を精密に量り、移動相を加えて正確に 100mL とし標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 10 μ L ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い、それぞれの液の [6]-ショウガオールのピーク面積 A_T 及び A_S を測定する。

$$[6]\text{-ショウガオールの量 (mg)} = W_S \times A_T / A_S$$

$$W_S : [6]\text{-ショウガオールの秤取量 (mg)}$$

試験条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長:225nm)

カラム：内径 4.6mm、長さ 15cm のステンレス管に 5 μ 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°C 付近の一定温度。

移動相：アセトニトリル/水 (3 : 2)

流量：[6]-ショウガオールの保持時間が約 14 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：システムの性能：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で操作するとき、[6]-ギンゲロールのピークの理論段数及びシンメトリー係数は、それぞれ 5000 段以上、1.5 以下である。

システムの再現性：標準溶液 10 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、[6]-ギンゲロールのピーク面積の相対標準偏差は 1.5% 以下である。

9) ヤクモソウの加工調製法に関する検討

試料

生薬試料：筑波研究部実験圃場にて栽培を行ったメハジキ (*Leonurus sibiricus*) を用いた。

収穫日：2009年7月1日

乾燥条件：15, 40, 50, 70, 90°C の 5 段階、4 日間

抽出方法：約 1g の本品粉末にメタノール 10mL を加えて 10 分間振り混ぜる。その後遠心分離し、上澄み液を試料溶液とし、10 μ L をスポットした。

TLC 条件

展開溶媒：①CHCl₃/MeOH 混液 (5:1)

②CHCl₃/MeOH/H₂O 混液 (6 : 4 : 0.8)

検出：254nm, 366nm, 10% H₂SO₄/△, 10% H₂SO₄/△+366nm

HPLC 条件

Column : TSK-gel 80T_M (150 mmx4.6 mm) Solvent system: 0.1% TFA/CH₃CN-0.1% TFA/H₂O 混合溶液 (75:25)

Flow rate: 1.0 mL/min

Detector: PDA max plot (190-400 nm)

GCMS 条件

カラム温度 90 °C (15min) → 120 °C (30min) →

150 °C (35min) → 220 °C (40min) → 275 °C (40min)。カ

ラム SLB-5ms 0.32 mm I.D. x 30 m (SUPELCO)

日本薬局方確認試験法による TLC 条件

2009 年に圃場において栽培を行ったメハジキの葉と花と国内市場品ヤクモソウ 4 種類に関して日本薬局方に従い TLC の検討を行った。抽出条件は同上。

展開溶媒：水/メタノール混液 (1 : 1)

展開終了後に風乾し噴霧用ドラージェンドルフ試液を噴霧し、さらに亜硝酸ナトリウム試液を噴霧し R_f 値 0.5 に灰緑色のスポット (スタキドリン) を検出する。

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。

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。

3) サンシュユの成分含量測定法に関する検討

サンシュユ市場品65検体にはロガニンが0.36%~0.97%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7.2~13.0であり、相対標準偏差は0.08~0.67%であった。

4) ソヨウの確認試験に関する検討

TLCを用いた各種条件検討の結果、ペリルアルデヒドはヘキサン抽出後にヘキサン/酢酸エチル混液で展開後、254 nm 照射下で carousel して確認は可能であった。また、希硫酸噴霧後加熱してもあまり明確には発色せず、他の検出試薬の検討も必要と考えられた。一方、ロスマリン酸は365 nm で検出すると明確に確認できることが明らかとなった。

5) ソヨウの成分含量測定法に関する検討

HPLCによる各種条件検討の結果、ペリルアルデヒド及びロスマリン酸どちらの化合物においてもHPLCにて検出は容易であり、ピークは分離することが明らかとなった。

6) ペリルアルデヒドの安定性に関する検討

安定性に関する検討を行った結果、メタノール中ではアルデヒド基がジメトキシ体に変化していることが予想された。続いて重水素化メタノール中での変化についてNMRを用いて検討した。一方、HPLCによる検討では、ペリルアルデヒドはメタノール中で最も不安定であり、その安定性は温度依存的事であることが明らかとなった。またソヨウの試料溶液中におけるペリルアルデヒドは非遮光、室温の条件下では減少率が大きくなることも確認された。

7) 一部中国産ソヨウのペリルアルデヒド含量と(E)-アサロンの含有結果を受けてのHPLCの条件変更について

今回のソヨウにおけるペリルアルデヒド成分含量測定法の方法を使用し、さらに市場品の含量を調べたところ、一部の中国産にペリルアルデヒド臭が全くしない試料において、本分析条件にて検討した結果、高いペリルアルデヒド含量を示すという矛盾した結果を示した。そこでPDAを用いた分析を行ったところ、ペリルアルデヒドと同じ保持時間上にペリルアルデヒドと全く異なる紫外線吸収スペクトルを示す化合物が重なっていることが明らかとなった。一部中国産ソヨウで認められた重複ピークはGC/MS及び、単離後のNMR解析により、(E)-アサロンであると決定した。

8) ショウキョウの成分含量測定法に関する検討

ショウキョウ市場品64検体の乾燥物換算した[6]-ギンゲロール含量を表1にショウキョウ末市場品29検体の乾燥物換算した[6]-ギンゲロール含量を表2に示す。また、[6]-ギンゲロール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4に示す。

ショウキョウ中の[6]-ギンゲロール含量(乾燥減量換算後)は、0.20~0.93%(平均0.49%)、ショウキョウ末中の[6]-ギンゲロール含量(乾燥減量換算後)は0.12~0.92%(平均0.38%)であった。また、システム適合性試験における理論段数は5187~16141、シンメトリー係数は0.51~1.14であり、相対標準偏差は0.17~0.88であった。

9) カンキョウの成分含量測定法に関する検討

カンキョウ市場品45検体の[6]-シヨーガオール含量(乾燥減量換算後)は、0.09~0.59%(平均0.20%)であった。また、システム適合性試験における理論段数は9240~21043、シンメトリー係数は0.88~1.12であり、相対標準偏差は0.02~0.88であった。

10) ヤクモソウの加工調製法に関する検討

メハジキのTLC上で葉の成分において、一部10%硫酸加熱で濃く呈色するスポットに明確な差が認められた。HPLCにおける検討では、PDAにおいて一部差違が認められた。さらに筑波研究部の圃場にて栽培されたメハジキ収穫物について日本薬局方の確認試験法を適用した結果、指標成分であるスタキドリンが確認された。

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。

3) サンシュユの成分含量測定法に関する検討

今回の測定の結果、市場品のサンシュユ65検体には、ロガニンが0.36%~0.97%の範囲で含有されており、その平均は0.73%であることが明らか

かとなった。また、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。従って本試験法はサンシュユの成分含量測定法として設定可能であると考えられた。

4) ソヨウの確認試験及び成分含量測定法に関する検討

今回の検討結果から、薄層クロマトグラフィーにおいて、ロスマリン酸は 365 nm の長波長の紫外線照射において蛍光を発生し、微量な場合も検出できると考えられることから、確認試験においてはロスマリン酸を指標物質とすることが望ましいと考えられた。一方、HPLC による成分含量測定法では揮発性であるために TLC では検出しにくいペリルアルデヒドの含量を測定するのが良いと考えられた。また、その後の検討で、一部の中国産ソヨウにペリルアルデヒド臭の全くしない試料が HPLC 分析により高いペリルアルデヒド含量を示したことから、ペリルアルデヒド保持時間上に重なりがあると予想され、その後 PDA、GC/MS、NMR による分析に (E)-アサロンであると決定した。

以上の結果より、ソヨウの確認試験法に関しては前述のロスマリン酸を指標物質とした TLC 法、成分含量測定法についてはペリルアルデヒドの含量を規定し、最終的な分析方法は、(E)-アサロンの重なりを防ぐため、移動相を 35%アセトニトリル/水混液とすることが望ましいと考えられた。

5) ショウキョウの成分含量測定法に関する検討

今回の測定の結果、市場品のショウキョウ 64 検体には、[6]-ギンゲロールが 0.20~0.93% の範囲で含有されており、その平均は 0.45% であり、標準偏差は 0.151% であることが明らかとなった。また、市場品のショウキョウ末 29 検体には、[6]-ギンゲロールが 0.09~0.59% の範囲で含有されており、その平均は 0.38% であり、標準偏差は 0.184% であることが明らかとなった。[6]-ギンゲロール含量に関して、ショウキョウ末の方が有意に低い結果 ($p < 0.05$) であったが、この原因として、粉碎加工時の影響や粉末加工後の経時的な減少が考えられた。また、システム適合性試験の結果において、何れも良好な理論段数、シンメトリー係数及び相対標準偏差を示された。従って本試験法はショウキョウの成分含量測定法として設定可能であると考えられた。

6) カンキョウの成分含量測定法に関する検討

今回の測定の結果、市場品のショウキョウ 45 検体には、[6]-ショーガオールが 0.20~0.93% の範囲で含有されており、その平均は 0.20% であり、標準偏差は 0.087% であることが明らかとなった。また、システム適合性試験の結果において、何れも

良好な理論段数、シンメトリー係数及び相対標準偏差を示された。従って本試験法はショウキョウの成分含量測定法として設定可能であると考えられた。カンキョウはショウキョウを湯通し又は蒸して調製されるため、これらの加工処理の方法や程度が含量のばらつきにどの程度影響を与えているかも今後の検討が必要と思われる

7) ヤクモソウの加工調製法に関する検討

メハジキの TLC 上で葉の成分において、10%硫酸加熱で濃く呈色するスポットは、UV 吸収が確認されず呈色の色調から本植物種から多く報告のある Labdane 系 diterpenoid と推定される。HPLC では PDA において一部差違が認められたが、Labdane 系 diterpenoid を分析するためにはさらに ESLD を用いた分析が必要と考えられる。

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、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。サンシュユの成分含量測定法設定に関しては、各種市場品 65 検体を収集し、ロガニ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、本試験法はサンシュユの成分含量測定法として設定可能と考えられた。また、ソヨウに関しては、シソ特有の精油成分であるペリルアルデヒドを成分含量測定法にて、ロスマリン酸を確認試験法にて規定することにより、近年市場で散見される粗悪な中国産ソヨウの流通を防ぐことが可能となると考えられた。さらに一部の中国産ではペリルアルデヒドをほとんど含まず、変異原性を有する (E)-アサロンを多く含有することが明らかとなった。ショウキョウの成分含量測定法設定に関しては、各種ショウキョウ市場品 64 検体及びショウキョウ末 29 検体を収集し、[6]-ギンゲロールの含量を測定した。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、本試験法はショウキョウの成分含量測定法として設定可能と考えられた。また、カンキョウの成分含量測定法設定に関しては、各種カンキョウ市場品 45 検体を収集し、[6]-ショーガオールを測定した。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、本試験法はカンキョウの成分含量測定法として設定可能と考えられた。一方、ヤクモソウの加工調製法に関する検討では、メハジキの葉に含まれる TLC 上で紫色に呈色するスポットはクロマトグラフィーによる精製中に損失してしまうことが明らかとなり、精油成分と推定されたが未だに構造は確認できていない。今後メハジキの成分検索を行い、市場品との比較をすることにより、より簡便な確認試験法の開発も可能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

1) 寺林進、酒井英二、山路弘樹、近藤健児、川原信夫、合田幸広：ハトムギの“日本薬局方”収載のための基原と生薬の性状の規格. 植物研究雑誌, **84** (2), 77-84 (2009).

2) 淵野裕之、川原信夫、木内文之：ソヨウの成分含量測定法とペリルアルデヒドの安定性の検討について. 生薬学雑誌, **64** (1) 7-14 (2010).

2. 学会発表

1) 淵野裕之、木内文之：ソヨウの日本薬局方モノグラフ収載項目の検討. 日本生薬学会第 54 回年会、名古屋 (2007.9)

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

分担研究報告書（総合研究報告書用）

医薬品添加剤の試験法及び各条規格の改正に関する研究

分担研究者 吉岡澄江 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

分担研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

薬局方各条における医薬品添加剤の functionality related characteristics (FRC) の意義と規格化について検討した。FRC は添加剤の品質特性として極めて重要であるが、FRC と製剤の functionality との関連は複雑であり、また同一添加剤でも使用目的の違いにより、品質保証の上で重要あるいは必須の FRC に大きな差が生ずる。これらの事実を踏まえて、①日本薬局方 (JP) としては、製剤の functionality に関連する添加剤の各条には、FRC の試験法を収載する方向を支持するが、②特定の品目以外については基準値を定めず判定基準とはしないこと、③ラベル表示も用途により意味のない場合が生じることを十分考慮すること、④各条に記載された試験も使用目的により実施しないでよいという共通理解を行政及びユーザーが持つことが重要である。また、米国薬局方(USP)の Pharmacopeial Forum Vol. 35 (5) (2009)に提案された General Information <1059> EXCIPIENT PERFORMANCE において、添加剤の機能を試験するのに有用な試験法としてリストされた FRC 関連の試験法について、JP や欧州薬局方(EP)の一般試験法への収載状況を検討したところ、大部分の試験項目は三局に既に収載されていることがわかった。粉体特性に関する試験法など国際調和した試験法もあるが、試験項目として同じであっても試験方法の異なるものもある。添加剤各条の調和に加え、このような FRC 関連の一般試験法の調和も重要と考えられる。

A 研究目的

医薬品添加剤は、全世界で多くの医薬品に共通に使われ、流通が極めて国際的であるため、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、国際調和が強く望まれている。60 余りの添加剤について調和作業が続けられ、日局 15 およびその第一追補において 30 品目近くの添加剤が 3 局で調和された品目として収載されている。

医薬品添加剤は、人体に対する作用が緩和ないしは無害であるという特徴とともに、医薬品製剤の必須の構成成分として、薬物療法におけるコンプライアンスや、有効成分の体内送達を確保するという重要な役割を全面的に担っている。そして、それらの役割を演じているのは、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、FRC) であることから、近年、薬局方国際調和を通じてそれらの FRC の、薬局方各条での取扱い、さらには規格化することの可否などについての議論が盛んに行なわれるようになった。

元来、薬局方における各条規格は、各条品目の有する物理的、化学的特性や純度について使用者に必要な情報を提供し、望ましい品質水準を示すために設定される。それは、製品の中で優れたものを特定し選択するのに役立てるといった目的を有している。

望ましい水準は、生理活性成分ではその有効性と安全性を念頭において設定されるが、医薬品添加剤については安全性とともにその機能性関連物性を考慮して設定される。

ところで、欧州薬局方 (EP) 委員会は、日本

及び米国に先駆けて、数年前より、医薬品添加剤の FRC をその各条に入れようとする作業を開始した。それに対して添加剤メーカー団体から強い反対意見が出された。彼らは、基本的には添加剤の供給元とユーザー間の相互合意の問題である領域に局方が立ち入ることに疑問を呈している。

2008 年に発行された EP6.0 において、国際調和品目である結晶セルロースやヒプロメロースなどの添加剤各条に FRC のセクションが取り込まれ、今まで EP が表明してきた FRC への対する考え方が具体的な形として提示されることとなった。一方、USP は 2007 年の Pharmacopeial Forum において、FRC に関連する General Information Chapter として

「<1059> Excipient Performance」の改定作業の途中経過を公表したのに引き続き、2009 年の Pharmacopeial Forum に最終案に近い形の提案を行っている。

EP6.0 の各条や米国薬局方(USP)が 2009 年に提案した<1059> Excipient Performance について、精査し、FRC に対する EP および USP の対応と比較検討することにより、国際調和作業での日本薬局方 (JP) の取り組みに必要な問題点を明らかにすることを試みた。

B 研究方法

EP が FRC を各条規格の中に、試験の実施が必須ではない non-mandatory section として掲載しようとする計画に対して、現在までに、添加剤メーカーの団体より強い反対が表明されている。USP および JP は、これに対して直接賛否の意見を表明してはいない。本報告ではまず、FRC の意味や特色について各方面の見解を総合して紹介し、EP6.0 の添加剤各条や USP の Pharmacopeial Forum において 2009 年に提案された「<1059> Excipient Performance」の内容や EP の各条規格の FRC のセクションの記載内容を精査するとともに、FRC を評価する上で有用であるとして「<1059> Excipient Performance」にリストされた一般試験法について、JP、EP での掲載状況について比較した。JP における FRC の取り扱い方を考察した。

C 研究結果と考察

1. 医薬品添加剤の Functionality について

添加剤はほとんどの医薬品製剤に使われ、優れた製剤 performance を実現するために不可欠なものである。効率的な製剤の開発や変動の少ない製造工程の実現、そして優れた製剤の performance は添加剤の物理的特性や化学的特性に負うところが大きく、一定の品質の医薬品製剤を製造するためには性質の良くわかった添加剤を使用することが不可欠である。添加剤はさまざまな機能を実現するために使われ（たとえば賦形剤、結合剤、滑沢剤など）、使用目的や製造工程および製剤 performance に依存して必要とされる特性が FRC である。その例として粒子径、粒度分布、比表面積、置換度、分子量、分子量分布、粘度などがある。

添加剤は薬理作用を持たないが、有効成分と多様に相互作用し、*in vitro* および *in vivo* における製剤 performance に影響する。有効成分、添加剤および製造工程ならびにそれらの変動および相互作用を適切に理解することが一定の performance を有する製剤の製造には不可欠であり、理解の不足は、製剤化の断念、不必要なほど多様な製剤の試作、製剤 performance（安定性、溶解性、溶出プロファイル）の悪化を引き起こす。

添加剤の FRC を試験することは添加剤が、製剤の製造やその後の挙動にどのように影響するかを理解するための有用な手段であるということが、これまでの経験からわかってきている。

2 EP における FRC の取り扱い

FRC に対する取り組みをいち早く始めた EP では、2008 年発行の EP6.0 において結晶セルロース、粉末セルロース、ヒプロメロース、ヒプロメロースフタレート、メチルセルロースなどの各条に FRC のセクションを追加した。これらの添加剤は最終製剤の製造性や製剤の performance に影響を与えると考えられる物理的特性をもつ添加剤である。確認試験、純度試験、定量法についての試験法と規格に加え、FRC のセクションにそれらの物理的特性が記載されている。例えば、ヒプロメロースはメチル基とヒドロキシプロポキシ基を有するセルロース誘導体であり、置換度の異なる 4 つタイプがあり、それぞれの各条が規定されていたが、国際調和の際に、4 つの各条をファミリーモノ