

2010J4047A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応した
日本薬局方の改正のための研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川 西 徹

平成23(2011)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応し
た日本薬局方の改正のための研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川西 徹

平成 23 (2011) 年 4 月

目 次

I.	総括研究報告	1
	医薬品製造・品質管理の高度化と国際化に対応した日本薬局方の改正のための研究 川 西 徹	
II.	分担研究報告	
	1. 局方国際調和の促進に関する研究	45
	早 川 堯 夫	
	2. 化学合成医薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究	53
	－NMR法によるペプチドの解析手法開発－ 奥 田 晴 宏	
	3. 生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究	79
	川 崎 ナ ナ	
	4. 生薬に関する試験法及び各条規格の改正に関する研究	101
	－生薬、アキョウの生産地の現地調査について－ 丸 山 卓 郎	
	5. 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	109
	阿 曾 幸 男	
	6. 理化学試験法の改正に関する研究	129
	四 方 田 千 佳 子	
	7. 製剤ならびに製剤試験法の改正に関する研究	137
	川 西 徹	
	9. 医薬品の名称、化学名及び構造式の改正に関する研究	145
	宮 田 直 樹	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	155
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

医薬品の製造・品質管理の高度化と国際化に対応した日本薬局方の改正のための研究

主任研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 部長

医薬品の製造・品質管理の高度化、および原料供給・製造・流通の国際化は著しく、我が国の公的医薬品規格基準書である日本薬局方はこのような医薬品を巡る環境の変化に対応した改正が必要である。本研究は局方改正原案の作成に中心的に係わっている専門家から研究班を構成し、適宜分野横断的な協力を取り入れながら薬局方関連の各分野の課題解決のための研究をおこなった。その結果、

1. 局方国際調和： 第16改正日本薬局方（日局16）告示時点（平成22年度末）での日米欧三薬局方調和検討会議（PDG）における局方の国際調和の進捗状況、および調和にむけての課題をまとめた。主要な局方一般試験法の国際調和および規制当局による相互受入条件の確認は一段落つきつつあるが、それぞれ部分調和部分が散見され、引き続き更なる国際調和に向けた努力が必要である。
2. 化学合成医薬品関連： 主成分分析と組み合わせた¹H-NMR測定により、今後局方医薬品の分析にも応用可能アミノ酸のわずかな置換が検出可能なペプチド性医薬品の特性解析手法を開発した。
3. 生物薬品関連： LC-MSを用いたタンパク質性医薬品の確認試験の開発と標準化を目的とし、モデル糖タンパク質のLC/MSを実施し、糖鎖のLC/MSの要件を明らかにするとともに、米国薬局方や欧州薬局方の改正動向などを調査することによって、日局医薬品各条多糖類の試験見直し及び新規収載における課題を抽出した。
4. 生薬関連： 一般用漢方210処方の見直しに合わせ、局方未収載のものについて局方収載による規格化を図るための研究を行い、生薬、アキョウの理化学試験法の条件を検討するとともに、規格基準値を設定した。
5. 医薬品添加物関連： 異なる複数の起原を有する二酸化ケイ素と炭酸カルシウムについて、調和を行う上での問題点の整理、および問題点の克服にむけた考察を行った。これら医薬品添加剤中の金属性不純物の中で、鉄などの遷移金属イオンが製剤の保存安定性に及ぼす潜在的影響について調査した。
6. 理化学試験法関連： 国際調和課題候補である色調の判定の試験法を検討した。色差の測定に通常用いられる積分球方式の分光光度計と分光光度計に色の解析用ソフトを組み合わせ測定する方法を比較し、色の機器測定は后者で十分対応可能との結論を得た。
7. 製剤および製剤試験法関連： 日局16での製剤総則の大改正後に残された課題である、非無菌製剤に関する微生物混入への配慮の考え方をまとめた。すなわち製剤が製造あるいは保管中に微生物に汚染されるリスク、また微生物汚染人体に与える影響を考慮して、各製品について限度試験の適用の方法や程度を判断すべきである。
8. 医薬品名称関連： 日局収載医薬品の化学名および構造式について、日局16にむけて、国際調和の観点から局方全体の整合性を検討し、修正の必要な項目をまとめた。

分担研究者

早川堯夫	近畿大学 薬学総合研究所長
奥田晴宏	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長
川崎ナナ	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長
丸山卓郎	国立医薬品食品衛生研究所 生薬部第一室 室長
阿曾幸男	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室 室長
四方田千佳子	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第一室 室長
宮田直樹	名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授

研究協力者

掛樋一晃	近畿大学薬学部 教授
濱本博幸	独立行政法人 医薬品医療機 器総合機構 医薬品基準課長
高山一成	独立行政法人 医薬品医療機 器総合機構 医薬品基準課
丸山良亮	独立行政法人 医薬品医療機 器総合機構 医薬品基準課
福原 潔	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 室長
大野彰子	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 主任研究官
橋井則貴	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
石井明子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
蔡 少青	北京大学 教授
保立仁美	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第一室
加藤くみ子	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長
大島裕希	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第四室
山崎 壮	国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 室長

A. 研究目的

医薬品を巡る環境は時々刻々と変化をしており、医薬品の製造・品質管理の環境も変化を遂げている。製造面でみると、医薬品原料の供給先や製造場所は、国内企業の製品の場合でも国外にあるというケースは少なくない。一方医薬品の品質管理の面では、使用される分析技術の進歩は著しく、また品質管理の方法としても、最終製品の規格試験にかわり、製造工程管理あるいは試験を導入する製品が増えている。このような背景の中、我が国の医薬品の規格規準公定書である日本薬局方においても、時代に即応する改正が求められており、第16改正日本薬局方作成の基本方針では、(1)最新の学問・技術の積極的導入による通則、製剤総則、一般試験法等の改正；(2)国際調和の推進と日本薬局方の国際化の推進が最重要課題として謳われており、この方針は第17改正日本薬局方でも引き継がれるものと考えられる。

局方の一般試験法は、普遍性が高く評価が定まった方法が採用されている。各条収載にあたって、新しい試験法があるにも関わらず、その試験法が一般試験法に採用されていない場合、古い試験法のままに各条試験が設定されることも多い。また、新しい医薬品では、局方一般試験法に未採用の新しい分析法による品質管理が行われている場合も少なくなく、そのような場合は医薬品の各条収載審議は長時間が必要となる。そこで本研究は信頼性の高い新しい試験法の局方一般試験法への導入、さらには一般試験法の問題点の解決に第一の焦点をあてる。第二の焦点としては、時代に即応した通則、名称命名法、参考情報等の改正である。第三の焦点は、医薬品原料の供給や製造の国際化への対応としても重要な局方国際調和を阻害する要因の解析およびその解決法の策定である。

研究班は局方改正原案の作成に中心的に係わっている専門家から構成され、(1)国際調和の検討、(2)化学薬品各条ならびに試験法の検討、(3)生物薬品関連の試験法の検討、(4)生薬に適した試験法の検討、(5)医薬品添加剤に関する検討、(6)理化学試験法の検討、(7)製剤総則および製剤試験法の検討、

(8) 医薬品名称原則の改正, の各分野の課題について, 適宜横断的な協力を行いながら, 以上の目的を達成するための研究を実施する。

B. 研究方法

B-1 : 局方国際調和の促進に関する研究

国際的動向も踏まえながら, 局方において国際調和すべき項目を選定し, 日米欧三薬局方による検討会議 (PDG : Pharmacopoeia Discussion Group) 活動を通じて三薬局方国際調和を進めるとともに, ICHQ4B における活動をベースに薬局方国際調和案の各極規制当局による国際間受入れの推進に必要な事項と方策について検討した。

B-2 : 化学合成医薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

各種インスリン(7mg) を 0.1 N HCl 溶液に溶解し酸性条件下にした後, 5 mM TSP / D₂O 溶液を 70 μ l 添加, 0.1N NaOH 溶液にて pH 3.6 になるように調製した。最後に CD₃CN 溶液を 245 μ l 添加し 700 μ l (1.7 mM, pH 3.6) になるように ¹H-NMR 用サンプルを調製した。NMR 測定は, ¹H-NMR 専用コールドプローブを装備した Varian 600 MHz NMR spectrometer を使用し, Presaturation NOESY 法 (one-dimensional ¹H-NOESY spectra, 298 K) によって行い, その際, TSP のシグナルを-0.016 ppm としてケミカルシフトの補正を行った。¹H-NMR データの多変量解析は解析用ソフトウェア: Chemomix NMR SUITE 6.0 software, Multivariate statistical analysis software (SIMCA-P+, version 12.0)を用いて行ったが, Chemomix 社製 NMR SUITE で軽水の観測領域 (4.2-4.6 ppm) を除いた ¹H-NMR スペクトルの 0.04-10.0 ppm を 0.04 ppm の幅でバケット積分を行い, ピークエリアリスト (Microsoft Excel format, *.xlt) を作成, この Excel データシートについて Umetrix 社製 SIMCA-P+で主成分分析を行った。

B-3 : 生物薬品の試験法及び各条規格の改正に

関する研究

B-3-1: 糖タンパク質の糖鎖試験

イデュルスルファーゼを糖タンパク質のモデルとし, その100 μ gを8 M グアニジン塩酸及び 5 mM EDTA を含む0.5 M Tris-HCl (pH8.6) 50 μ L に溶解した後, 1 M dithiothreitol 2 μ Lを加えて (最終 40 mM), 65 °C で 30 分間還元した。4.8 μ L の 1M モノヨード酢酸ナトリウムを加え(終末 96 mM), 暗所に室温で40分間放置した。反応溶液をセファデックスG-25充填カラムに負荷し, 超純水を用いてタンパク質画分を回収した後, 凍結乾燥した。凍結乾燥物を100 μ l の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かし, 2 unit のPNGase Fを加えて37°C で 16時間反応させた。反応溶液に冷エタノール (最終濃度70%) を加えてタンパク質を沈殿させ, 8,000 \times g, 4°Cで5分遠心分離後, 遊離オリゴ糖鎖を含む上清を回収し, 減圧下, 蒸発乾固した。オリゴ糖を250 μ Lの超純水に溶かし, 250 μ L の 1 M NaBH₄ を加えて室温で 16時間放置した。稀酢酸を少量加えて過剰の試薬を分解した。反応溶液をグラファイトカーボン充填固相抽出管に負荷し, 超純水で洗浄した。アセトニトリル (45%) を含むpH8.5の5mM酢酸アンモニウム緩衝液でオリゴ糖を溶出し, 凍結乾燥した。

この試料を Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を nanoLC 分析した。2% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (移動層 A), 及び 80% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (移動層 B) を用意し, グラファイトカーボンを充填したカラム (HyperCarb, 0.075 \times 150 mm, 粒子径 5 μ m, Thermo Fisher Scientific) を A 及び B の混液 (98 : 2) で 30 分間平衡化した。流速は, 300nL/min に設定した。カラムの出口側に電圧を印加するキャピラリーを接続し, ナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を用いて, 質量分析計との距離や角度を調節した。質量分析 (MS) 装置は Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用した。

B-3-2: 多糖類の試験法に関する国際的動向調査

第 4 回ヘパリン製剤の品質評価に関するワー

クショッブ（7月ロンドン開催）に参加し、口頭発表及びポスター発表等を通じて、各国の関係者と意見交換した。

B-4：生薬に関する試験法及び各条規格の改正に関する研究

日局各条へ未収録のアキョウについて、製造工程、品質管理の実態を調査はするために山東省東阿県を訪問し、原産地中国における実態を調査した。

B-5：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

日局、医薬品添加物規格(薬添基)、EP、USPの二酸化ケイ素、炭酸カルシウムの各条を比較した。添加剤メーカー等のWebページ等を参考にし、製造法等を調査した。医薬品製剤の安定性及び不純物の影響について文献調査を行った。

B-6：理化学試験法の改正に関する研究

色の比較液は、日局色の比較液（USPの色の比較液と同じ）とEPの2.2.2 Degree of coloration of Liquid 記載の比較液を、関東化学（株）製塩化コバルト(II)の色の比較原液 0891-23、塩化鉄(III)の色の比較原液 20317-23、硫酸銅(II)の色の比較原液 08192-23を混合、調製した。日局色の比較液は原液を蒸留水で希釈調製した。EP比較原液及び、EP比較液は、JP色の比較原液を用いて標準液を作成し、塩酸溶液(10g/L)で希釈した。さらに、各日局の比較液を水で希釈し、希釈による色のパラメーターの変化についても検討した。

積分球方式の分光光度計(spectrocolorimeter)として、日立製分光光度計C2000（JIS Z8722の2度視野C光源使用）を用い、精製水の透過光を基準として測定した。通常分析用の分光光度計(spectrophotometer)として、島津製作所製分光光度計UV-2450及びUVPC用カラー測定ソフトウェアにより測定した。いずれの装置の場合も、光路長10mmのセルを使用し、色のパラメーターL*, a*, b*を測定した。

B-7：製剤および製剤試験法の改正に関する研究

日本薬局方、EPおよびUSP、ICH品質ガイドラインおよびこれらの解説、さらにはウェブ等における情報を調査し、非無菌製剤に関する微生物混入への配慮の基本的な考え方をまとめた。

B-8：医薬品の名称、化学名及び構造式の改正に関する研究

JP16 記載予定の医薬品（JP15 既収載品目およびJP16 新規収載品目）の化学名および構造式について、米国薬局方（USP）および欧州薬局方（EP）の記載内容と比較検討するとともに、JP 収載品目間での不整合を調べ、修正が必要な品目を調査した。

（倫理面への配慮）

動物、あるいは特定個人のヒト試料、ヒト情報は研究に使用せず、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

C-1: 局方国際調和の促進に関する研究

C-1-1: 局方国際調和のための専門家会議の開催について

日米欧三薬局方調和検討会議(PDG)及びICHQ4B 専門家会議は、下記の2度開催。会議の間は、電話会議やメール等でのやりとりを通じて活動。

- (1) PDG タリン会議：2010年6月7日～10日、タリン、エストニア
- (2) PDG 福岡会議：2010年11月8日～11日、福岡、日本

C-1-2: PDG における国際調和項目の合意年月（日局収載予定年月）

PDG において国際調和の署名がなされた新規項目、改定項目、誤記訂正、PDG 調和手順書の改定及び調和対象とされた全項目数に対する現時点までに国際調和した総計項目数は以下のとおり。なお新規項目、改定項目等については、署名年月及び日局収載予定年月を示し、後者は括弧内に記載。

- (1) 新規項目
- ① 一般試験法
- ・ なし
- ② 医薬品添加物
- ・ Crospovidone (クロスポビドン) : 2010.11 (JP16 第二追補 2014.3 予定)
- (2) 改定項目
- ① 一般試験法
- ・ Dissolution (溶出試験法) : 2010.6 (JP16 (2011.3) および JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : 回転バスケットの網の鋼線の直径及びシンカーの図を変更)
 - ・ Uniformity of Dosage Units (製剤均一性試験法) : 2010.11 (JP16 (2011.3) および JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : 2% exemption (25 mg / 25% の閾値に達しない場合でも、有効成分の濃度の RSD が 2% 以下であれば質量偏差試験を採用できる) は、調和テキストの該当段落に [FOLLOWING PARAGRAPH NOT ACCEPTED BY THE UNITED STATES PHARMACOPEIA] と前書きし、USP テキストから該当段落を削除し、EP 及び JP は当該の相違について参考情報の章に記載するように調整してみることで最終合意され、Q4B (FDA) でも受け入れることが確認された。その他の改定 (W Bar 及び T の定義、2 項目の Minor issues、2 箇所の訂正)
- ② 医薬品添加物
- ・ Butyl Parahydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸ブチル) Revision 1 : 2010.6 (JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : 純度試験(類縁物質)の TLC 法を HPLC 法に変更、定量法の滴定法を HPLC 法に変更)
 - ・ Citric Acid, Anhydrous (無水クエン酸) Revision 2 : 2010.6 (JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : 純度試験 (硫酸呈色物) の変更、純度試験 (アルミニウム) の追加)
 - ・ Citric Acid, Monohydrate (クエン酸水和物) Revision 2 : 2010.6 (JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : 純度試験 (硫酸呈色物) の変更、純度試験 (アルミニウム) の追加)
- (3) 誤記訂正項目
- ① 一般試験法
- ・ Capillary Electrophoresis (キャピラリー電気泳動法) : 2010.6 (JP16 (2011.3) 収載)
(訂正内容 : 用語の訂正)
- ② 医薬品添加物
- ・ なし
- (4) 署名ページの改定項目
- ・ Extractable Volume (注射剤の採取容量試験法) : 2010.1.11 (改正内容 : 署名ページの改定 (USP の Local Requirements を記載)、調和テキストに変更はない)
 - ・ Particulate Contamination (注射剤の不溶性微粒子試験法) : 2010.11 (改正内容 : 署名ページの改定 (USP の Local Requirements を記載)、調和テキストに変更はない)
- (5) 国際調和した総計項目数 / 全項目数
- ① 一般試験法 : 27 項目 / 35 項目
- ③ 医薬品添加物 : 41 項目 / 62 項目

C-1-3: PDG プロセスの改善

- (1) 毎月の電話会議で作業課題の進捗確認を行っており、JP も 7 月より PMDA の Web 装置を利用した Web 会議は定常化した。今後は、進捗確認だけでなく、議論の内容を高めるこ

と、そのために専門的な議論ができる者の参加もありうることで合意し、専門的な議論を予定する場合は、事前に連絡することとされた。

- (2) PDG 関連文書を、共通の Web site に保管して利用する SharePoint System について、まず、EP と USP が共同で開発し、JP も福岡で講習を受けた。JP は、今後の開発に参加する。
- (3) 国際調和の一層の進捗をはかるため、各局方の専門家会議の開催日程を月次電話会議で公開することとなり、実施している。

C-1-4: 薬局方間で国際調和した項目を各極規制当局が受入れるための活動 (ICHQ4B)

薬局方間で国際調和した項目を各極規制当局が受入れるための活動 (ICHQ4B) では、ICHQ4B ガイドラインに示された手順によって各極規制当局が PDG での個別の試験法等に関する調和国際文書を受入れるかどうか検討する。受入れ可能となれば、Q4B ガイドラインの Annex として添付されることになるが、条件がつく場合は Annex に書き込むこととなる。ICHQ4B の検討対象は Q6A で示された 11 項目の一般試験法であったが、その後新たに 5 項目が Q4B 評価対象とされた。その結果、Q6A 関連 11 項目のうち 7 項目は 2009 年までにステップ 4 に達し、製剤均一性試験法 (含量均一性試験法及び質量偏差試験法が製剤均一性試験法に統一)、エンドトキシン試験法についても各局方での改正の確認をもってステップ 4 の合意署名がされる予定である。残りの Colour については、PDG で漸く具体的な進捗がみられるようになったが、調和までにはまだ時間が必要であるため、Q4B の評価対象項目から削除することとなった。また Q4B 検討対象に拡大された 5 項目のうち 4 項目については Q4B 評価が行われ既にステップ 4 の合意署名がされている。残りのかさ密度及びタップ密度測定法については、各局方での改正の確認をもってステップ 4 の合意署名がされる予定である。

Q4B 評価対象についてはさらなる拡大も検討され、選定作業も行われていたが、ICH 福岡会議の運営委員会で PhRMA および FDA から Q4B

の活動終了の提案がされ、未完了の課題およびメンテナンス作業のための不定期な活動を残して、定期的な Q4B 専門家会議は終了することとなった。

(1) 調和済み項目の Q4B 評価

- ① Dissolution (溶出試験法): Q4B は、2009.10 に 2005.11 調和文書 (Rev.1) について step 4 の sign-off をしたが、2009.10 調和文書 (Rev. 2) (フロースルーセル法で脈流のない装置の使用を追加規定) についても step 4 の合意がえられた (2010.11)。
- ② Uniformity of Dosage Units (製剤均一性試験法): Q4B で step 4 合意されるために、PDG は、既に T 及び W-bar の定義については合意していたが、2% exemption (25 mg/25% の閾値に達しない場合でも、有効成分の濃度の RSD が 2% 以下であれば質量偏差試験法を採用できる) については USP から削除することとなり、この方向については Q4B の了解がえられている。
- ③ Bacterial Endotoxins (エンドトキシン試験法): PDG と Q4B とのやりとりの結果、Q4B において、Step 4 合意の文書案が作成され、各局への取り込みの確認をもって合意署名の予定である。
- ④ Analytical Sieving (粒度測定法 (ふるい分け法)): Rev.1 の改正テキストが収載された日局 15 第二追補の英語版の事務連絡が 2010 年 6 月 4 日に発出されたので、Q4B で step 4 合意された。
- ⑤ Bulk and Tapped Density (かさ密度及びタップ密度測定法): PDG と Q4B とのやりとりの結果、Q4B において、Step 4 合意の文書案が作成され、各局への取り込みの確認をもって合意署名の予定である。
- ⑥ Capillary Electrophoresis (キャピラリー電気泳動法): 日局 15 英語版の正誤表が 2010 年 5 月 28 日に公開され、調和文書の Correction 2 も合意署名されたので、Q4B で step 4 合意された。
- ⑦ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (ポリアクリルアミド電気泳動法): Q4B (FDA) の求めに応じて、USP から調和テキストの改正

提案があり、PDG での改正作業を開始することが合意された。

(2) 残りの Q4B 評価対象項目

Colour (Instrumental method) (一) : Lab 表色系を溶状試験 (色調) に適用する Stage 3 rev 案作成にむけた資料を EP が準備したが、この資料は Lab 表色系の有用性 (色の比較液に代わる色の測定法) を解説するものであったので、JP から、純度試験としての溶状試験 (色調) を規格設定する場合の可能性について説明した。EP が、CIE Lab 表色系による溶状試験 (色調) の規格化を提案することとされた。また、具体的な目標日程 (3 年後) が初めて提示された。しかし、PDG で Colour が調和されるまで、Q4B 専門家会議を維持することは認められず、Colour は Q4B の評価対象から除外することとされた。

C-1-5: PDG 調和文書の改定

(1) 一般試験法

① Polyacrylamide Gel Electrophoresis (ポリアクリルアミドゲル電気泳動法) : Q4B (FDA) の求めに応じて、USP から調和テキスト (1999 年 10 月署名) を全面的に改正する提案があり、改正作業を開始することとなり、EP が CP 役に指名された。

② Dissolution (溶出試験法) : 回転バスケットの網の鋼線の直径及びシンカーの図を変更する Revision 3 の改正提案が採択され、USP が CP 役に指名され、合意署名に至った。

③ Bacterial Endotoxins (エンドトキシン試験法) : 調和テキスト (Revision 1) に対する Q4B コメントのうち、レフリー試験、試験の繰り返し数、医療機器の記載及び用語 regression に関する指摘については、優先して改定することが JP より提案され、Revision 2 とすることが採択され、JP が CP 役に指名された。

④ Peptide Mapping (ペプチドマップ法) : USP から、調和テキストの改定提案がなされ、採択され、USP が CP 役に指名された。

(2) 医薬品添加物

① Ethylcellulose (エチルセルロース) : USP

から提出された調和テキストの改定提案 (抗酸化剤の添加を認める記載) は採択され、EP が CP 役に指名された。JP は、日局に収載する方針で、本改定の調和作業に参加することを表明した。

C-1-6: PDG における新規調和項目に関する進捗

(1) 一般試験法

① Chromatography: 福岡会議にあわせて、三局の専門家による「一般試験法 Chromatography を調和項目とするかどうか」の協議が行われた。協議結果は、PDG 会議の席で報告され、Chromatography を PDG 調和項目とするように提案された。専門家による協議結果の報告を受けて、PDG は、Chromatography を新規調和項目 (G19) として採択し、CP 役は EP となった。

② Glycan Analysis : PDG 国際調和の新規項目候補とすることに三局方とも賛成したが、JP からの「EP 案を調和の出発点とし、EP が CP 役となる」の意見表明に対し、USP は「EP と USP は、いずれも新規に本試験法テキストを作成したところであるので、当面は調和を進めることに賛成しない」との見解表明を行い、当面調和項目とすることの回答を保留した。

(2) 医薬品添加物

引き続き、当面の調和品目に集中することとしている。

C-1-7: 薬局方の国際調和に関する検討事項

(1) 添加物各条における微生物限度の設定について

JP から、微生物限度試験法 (Rev.1) の調和 (2008.6) に伴い、医薬品添加物の調和において、微生物限度も調和の対象となったが、日局では該当品目に微生物限度を設定する必要性の判断基準を明確化することが先決問題となっていること、EP 及び USP での判断基準も参照して、JP の判断基準を確立するためにワーキンググループを新設したことを説明した。

(2) 金属不純物の純度試験

ICH-Q3Dへ各局方の代表も参加し、その進捗をみながら、USP提案の<233>Elemental Impurities-Limitsに相当する測定法についても、PDGでの協議を継続することとしている。

(3) 添加物中の意図的な混入物への対応について

USPでは、意図的な混入物としてのDEG及びEGについて以下のように対応している。

- ① 1990年代後期のHaitiでの死亡事故が発端となり、USPは、GlycerinにDEG試験を規定した。
- ② その後、試験の対象が拡大され、現在、FDAは、液剤に甘味剤として混入されるDEG及びEGを最高リスクと考えている。
- ③ EGは、糖アルコールの製造工程で触媒として使用されていることも規制の要因である。
- ④ DEG及びEG試験が規定される優先品目：Glycerin; Sorbitol Solution; Sorbitol Sorbitan Solution; Noncrystallizing Sorbitol Solution; Maltitol Solution; Propylene Glycol; Hydrogenated Starch Hydrolysate
またUSPはメラミンについてFDA/USP Working Groupを設置した。
JPとEPは状況を注視している。

(4) Prospective harmonization

EPとUSPはPDGの枠外で試行的に原薬各条の国際調和を行っている。その進捗は以下の通りである。

- ① EP及びUSPで試行している4品目は、Montelukast Sodium, Rizatriptan Benzoate, Celecoxib, Sildenafil Citrate
Montelukast Sodiumは、EPには2010.11に出版され、USPもUSP35-NF30第一追補(2012.8)に収載される予定である。
- ② Rizatriptan Benzoateは、EPには2010.11、USPにもUSP34-NF29(2011.8)に出版された。
- ③ Celecoxibは、Ph Eur 22.4(2010.10.)及びPF 36(6)(2010.11-12)で意見公募を予定している

④ Sildenafil Citrateは、最終案が合意され、2011年春にPh Eur及びPFで意見公募を予定している。

⑤ 標準品は、共同評価して、EPおよびUSPで共用される。

C-2：化学合成医薬品等の各条の改正に関する研究

NMRは化学物質の水素や炭素の特性から詳細な構造情報を入手できる唯一の手法であり、有機化学や天然物化学の分野において未知の化学物質の構造決定や同定に利用されている。通常は単一化学物質の構造解析に利用されており、複数の成分が混ざっている場合は、測定スペクトルが複雑になってしまうため、混合成分の解析には従来は用いられていなかった。しかし、近年、スペクトルデータを統計学的手法で解析することによって、微妙なスペクトル変化を解析することが可能となり、生体成分などの混合成分の解析にもNMRは利用されるようになってきた。

そこでペプチド性医薬品の物理化学的特性解析へのNMRの応用を目的として、アミノ酸配列が異なるペプチド性医薬品の分光学的特性をNMR法により検討した。

即ち、起原の異なるインスリンを検討対象とし、¹H-NMRスペクトルを多変量解析と組み合わせることによって、ヒト、ウシ、ブタ由来のインスリンを判別することを試みた。これらのインスリンは全て51個のアミノ酸から構成されている。ヒトインスリン(Insulin human recombinant expressed in yeast)の分子構造に対するウシ脾臓由来インスリン(Insulin Bovine pancreas)のアミノ酸配列の違いは3箇所あり、A8(A鎖の8番目)のスレオニン(Thr)残基がアラニン(Ala)残基に、A10のイソロイシン(Ile)残基がバリン(Val)残基に、B30(B鎖のカルボキシル末端)のスレオニン(Thr)残基がアラニン(Ala)残基に置換されている。ブタ脾臓由来インスリン(Insulin porcine pancreas)のアミノ酸配列は1箇所異なり、B30のスレオニン(Thr)残基がアラニン(Ala)残基に置換されている。(奥田分担報告書添付図参照)

本研究では、上記3種のインスリン単独および2種類と3種類のインスリンが一定の比率で混合したサンプルについて¹H-NMRを測定後、スペクトルの多変量解析を行った。さらに、多変量解析結果からアミノ酸配列の違いに起因するスペクトル変化の特定を試みた。

C-2-1 : ¹H-NMR 測定

ヒト、ウシ、ブタのインスリンおよび、そのうち2種類と3種類を一定の比率で混合したサンプルの¹H-NMRスペクトルを測定したところ、一見3つのスペクトルの違いを区別することは難しかった。

C-2-2 : 主成分分析法を用いた統計解析

各試料の¹H-NMRのスペクトルを解析用ソフトウェア (NMR SUITE) で軽水領域を削除した後、バケット積分を行い、0.04 ppm 毎の積分値とピークエリアリストを作成後、多変量解析ソフト (SIMCA-P+) を利用して、本データの主成分分析 (PCA) を実施した。PCA は、スペクトル全体 (0.04 - 10.0 ppm) と高磁場 (脂肪族領域 : 0.04 - 4.20 ppm) および低磁場領域 (アミド領域 : 6.00 - 10.0 ppm) の3つのスペクトル領域に分けてそれぞれ行った。各スペクトル領域の積分強度を規格化した後、全試料のデータについてPCAを実施した結果のスコアプロットを奥田分担報告図 3A, 4A, 5A に示す。また、奥田分担報告図 3C, 4C, 5C のローディングプロットは、スコアプロットの変動に寄与している¹H-NMRのケミカルシフト (ppm) をスコアプロットと同じ主成分軸で表しており (各ポイントに付された数値はケミカルシフトを表す)、中心の群から外側へ大きく離れているケミカルシフトほど当該ケミカルシフトにおける積分値の変動が大きいことを示している。さらに、ケミカルシフト (ppm) に対する各試料の積分値の変動が、どのように変動しているのかを解析した結果をトレンドプロットで示す (奥田分担報告図 3D, 4D, 5D)。

C-2-3 : スペクトル全体 (0.04 - 10.0 ppm) の PCA 解析

スコアプロットより第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) までの累積寄与率はそれぞれ 63.8 および 83.3 % であり、インスリンの種差によるスペクトル変動を PC1 と PC2 によって高い寄与率で特徴づけることができた。PC1-PC2 平面上では、全ての試料が3種類の単独のインスリンを各頂点とした三角相図上に表され、PC1 のマイナス方向にヒト、プラス方向にウシを、また、PC2 のプラス方向にブタ、マイナス方向にヒトとウシをそれぞれ特徴づけることができた。インスリン2種類の混合物は対応する2つのインスリンを頂点とした各辺の上に示され、その位置は混合物の組成比と相関した。さらに、3種類の1:1:1混合物は三角相図のほぼ中央に位置し、そこから各頂点に向かって組成比の異なったインスリン混合物が示された。単独および2種類のインスリン混合物は第三主成分 (PC3) への寄与は見られず PC1 と PC2 でほぼ全ての変動が特徴づけられた。一方、PC1-PC2 平面上で示された3種類混合物は PC3 軸に対してはプラス方向に位置しており、1:1:1混合物を PC3 軸上の頂点として PC1-PC2 平面から形成される三角錐上に分布した (奥田分担報告図 3B-1, 3B-2)。

PC1 と PC2 のローディングプロットと、変動を特徴づける代表的な数値のトレンドプロットを (奥田分担報告図 3C) をスコアプロット (奥田分担報告図 3A) と比較することにより、ヒト (A)、ウシ (B)、ブタ (C) にそれぞれ特徴的なピークとして、1.1 ppm (A)、0.86 ppm (B)、2.58 ppm (C) が明らかとなった。また、ウシとブタに共通のピークとして 1.3 ppm (B, C)、ヒトとブタに共通なピークとして 1.18 ppm (A, C) が明らかとなった。これらのピークはサンプル毎の積分値の変動を示した奥田分担報告図 3D より、各ピークに特徴づけられたインスリン種が単独または、その割合の多い試料では積分値が高くなり、他の種が主な試料では低くなることから、これらのピークはインスリンの種特異性を示すピークであることが示された。

C-2-4 : 脂肪族領域 (0.04 - 4.20 ppm) の PCA 解析

スコアプロット (奥田分担報告図 4A) より第

一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) までの累積寄与率はそれぞれ 65.0 および 88.1 % であり、インスリンの種差によるスペクトル変動を PC1 と PC2 によって高い寄与率で特徴づけることができた。PC1-PC2 平面上では、スペクトル全体の PCA 解析と同様に全ての試料が 3 種類の単独のインスリンを各頂点とした三角相図上に表された。インスリン 2 種類の混合物は対応する 2 つの単独のインスリンを頂点とした各辺の上に示され、その位置は混合物の組成比と関連した。一方、3 種類の 1:1:1 混合物は PC1-PC2 平面上では三角相図のほぼ中央に位置しているが、さらに PC3 軸上にも変動していることが示された。

各 3 種類混合物のスコアは 1:1:1 混合物を PC3 軸の頂点として PC1-PC2 平面から形成される三角錐上に分布した(奥田分担報告図 4B-1, 4B-2)。

奥田分担報告図 4C よりヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) に特徴的なピークとしては、1.1 ppm (A), 0.86 ppm (B), 2.58 ppm (C) がそれぞれ明らかになった。また、ウシとブタに共通のピークとして 1.3 ppm (B, C), ヒトとブタに共通なピークとして 1.18 ppm (A, C) が明らかとなった。これらのピークは各ピークに特徴づけられたインスリン種が単独または、その割合の多い試料では積分値が高くなり、他の種が主な試料では低くなることから、インスリンの種特異性を示すピークであることが示された。以上、脂肪族領域の解析結果はスペクトル全体の解析結果と一致した。

C-2-5 : アミド領域 (6.00 - 10.0 ppm) の PCA 解析

スコアプロット (奥田分担報告図 5A) より第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) までの累積寄与率はそれぞれ 63.8 および 79.1 % であり、インスリンの種差によるスペクトル変動を PC1 と PC2 によって高い寄与率で特徴づけることができた。PC1-PC2 平面上では、スペクトル全体及び脂肪族領域の PCA と同様に全ての試料が 3 種類の単独のインスリンを各頂点とした三角相図上に表された。また、インスリン 2 種類および 3 種類混合物も同様の相関性でスコアされた(奥田分担報告図 5B-1, 5B-2)。しかし、PC1 ではインスリン分子種に対して逆方向の相関を示し、

マイナス方向にウシ、プラス方向にヒトが特徴づけられた。PC2 に対してはスペクトル全体および脂肪族領域の PCA と同様の方向性を示し、プラス方向にブタ、マイナス方向にヒトとウシが特徴づけられた。

PC1 と PC2 のローディングプロットと、変動を特徴づける代表的な数値のトレンドプロットを奥田分担報告図 5C および図 5D に示す。その結果、図 5C をスコアプロット (図 5A) と比較することによりヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) にそれぞれ特徴的なピークとして、7.58 ppm (A), 8.46 ppm (B), 7.78 ppm (C) が明らかとなった。また、ヒトとブタに共通なピークとして 7.10 ppm (A, C) が明らかとなった。これらのピークは各ピークに特徴づけられたインスリン種が単独または、その割合の多い試料では積分値が高くなり、他の種が主な試料では低くなることから、これらのピークはインスリンの種特異性を示すピークであることが示された。アミド領域の解析結果はスペクトル全体および脂肪族領域の解析結果と同様の傾向を示し、解析結果より、アミド領域でも全ての試料を区別することができた。

C-2-6 : 種特異性の解析

ローディングプロットの解析結果よりそれぞれの分子種を特徴づける変動の大きな数値がどのアミノ酸残基に由来しているかを検討した。まず、第一主成分の変動に対して大きく寄与している数値 (ppm) について、対応するアミノ酸残基の解析を行った。第一主成分はヒトとウシの特徴的な一群のピークに区別され、全スペクトル領域の解析結果から、ヒトの一群で大きな変動が見られる 1.1 ppm は、ヒトの配列に特徴的な A10 Ile の $C\gamma H_2$ 及び B30 Thr の $C\gamma H_3$ に相当し、さらに、アミド領域の解析結果から、8.06, 8.10 ppm は、A8 Thr の NH に相当すると推測された。一方、ウシの一群で大きな変動がみられる 0.86 ppm は、ウシの配列に特徴的な A10 Val の $CH\gamma$ に相当し、1.5 ppm は A8 Ala の $H^{B1}H^{B2}$ 及び B30 Ala の $H^{B1}H^{B2}$ 及に相当し、さらに、アミド領域の解析結果から、8.46 は、A10 Val の NH に相当すると推測された。次に、第二主成分の変動に対して大きく寄与している数値 (ppm) に対応するア

ミノ酸残基について検討した。その結果、第二主成分は大きくヒトとウシの一群に対して、ブタの一群に区別され、全スペクトル領域の解析結果からブタの一群で大きな変動が見られる 7.78 ppm, 4.06 ppm は、ブタの配列に特徴的な B30 Ala の NH 及び B30 Ala の H α に相当し、さらに、アミド領域の解析結果から、7.78 ppm は、B30 Ala の NH に相当すると推測された。以上、3 種類のインスリンの一次構造の違いは、NMR スペクトルを PCA で解析することによって特徴づけられた。

C-3：生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

糖タンパク質や多糖類など、糖を構成成分の一部とした様々な生体関連分子が医薬品として利用されている。遺伝子組換えタンパク質医薬品の多くは糖タンパク質であり、第十七改正医薬品各条にもエポエチンアルファ、エポエチンベータ、レノグラスチムが新規記載される予定である。また、多糖類としては、古くからヘパリンナトリウムが記載されている。さらに最近では、パルナパリンナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム及びヘパリンカルシウムが記載されている。

これらの糖鎖関連医薬品は、糖組成、配列、結合様式、分岐構造などが異なる様々な分子種からなる不均一な集合体であり、糖鎖の不均一性は安定性、溶解性、生物活性、体内動態等に関係することから、一定性を担保するための方策が必要である。そのため、遺伝子組換え糖タンパク質医薬品の場合、糖鎖不均一性に関する規格及び試験法が設定されることが多い。糖鎖構造は複雑で多様なため、糖鎖の特徴に合わせて適切な方法を選択する必要があること、また、規格設定の考え方が明確にされていないことから、標準的糖鎖試験法の策定が望まれている。多糖類の場合、ヘパリンナトリウムについては、2007～2008 年の過硫酸化コンドロイチン硫酸(OSCS)混入事件を契機に、確認試験や一部の純度試験が改正された。しかし、それ以外の試験項目については、ウシ由来試薬の入手が困難となって第十四局第二追加補で改正された定量法を除き、第八改正から見直しがなさ

れておらず、検討の時期にきている。また、低分子量ヘパリンについても、ヘパリンナトリウムに合わせて、いくつかの試験法の見直しを検討する必要があると思われる。

局方試験の見直しにおいては、最近の高度な分析技術に対応すること、また、国際的動向に配慮することが目標とされている。糖鎖関連医薬品においても、MS, LC/MS, キャピラリー電気泳動、二次元 NMR などの導入を検討すること、また、USP や EP などの動向を調査しておくことが重要である。そこで、本研究では、第一に、遺伝子組換え糖タンパク質の糖鎖試験法の一つとして LC/MS を採用するときの要件を、モデル糖タンパク質の LC/MS を実施することにより明らかにした。第二に、海外の薬局方の動向を調査することにより、多糖類の各条改正や新規記載における課題を抽出した。

C-3-1：糖タンパク質の糖鎖試験

グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS は、現在では糖タンパク質糖鎖の解析法として最もよく用いられている方法の一つになっている。実際、最近公開された USP や EP の糖鎖試験法でも、グラファイトカーボンカラムと LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングが取り上げられている。日局糖鎖試験法をまとめるにあたっては、糖タンパク質糖鎖の LC/MS を実施する際の要件をまとめておく必要があると思われる。そこで、モデル糖タンパク質としてイデュルスルファターゼを用いて、LC/MS による糖鎖分析を行い、課題を抽出した。

イデュルスルファターゼは、ヒト線維肉腫細胞株由来の細胞株により産生される糖タンパク質で、ヒトイズロン酸-2-スルファターゼと同じアミノ酸配列を持ち、2007 年にムコ多糖症 II 型治療薬として承認されている。ムコ多糖症 II 型は、リソソーム内でムコ多糖の代謝に関係する酵素 イズロン酸-2-スルファターゼ の欠損によって起きる疾患で、ヘパリン硫酸及びデルマタン硫酸エステルがリソソームに蓄積し、細胞腫脹、臓器肥大、細胞死、細胞破壊及びその他臓器機能障害が発現する。イデュルスルファターゼは、リソソーム内のヘパリン硫酸及びデルマタン硫酸エステルの非

還元末端 2-スルホ-イズロン酸の硫酸基を分解することによって、ムコ多糖の蓄積を抑える。イデュルスルファーズには、8つのN結合型結合部位が存在する。マンノース6リン酸が付加した糖鎖及びシアル酸結合糖鎖は、生物活性や体内動態に影響するので、N結合型糖鎖の解析は重要である。

ポジティブ及びネガティブイオンモードによって得られたN結合型糖鎖の全イオン電流クロマトグラム(TIC)の各ピークの糖鎖構造を、質量及びMS/MSによって得られたフラグメントパターンから推定した。その結果、2価($[M+2H]^{2+}$)のモノアイソトピックピーク(m/z 値 1040.89)から糖鎖の質量を2079.78と求めた。この糖鎖の単糖組成は、質量から、Fuc₁Hex₅HexNAc₄NeuNAc₁(主同位体質量から求めた計算質量:2079.76)と推定された。さらにCID MS/MSを行って得られたプロダクトイオンスペクトルのフラグメントパターンからイデュルスルファーズの糖鎖の構造と分布を推定することができた。川崎分担報告表1に主なピークの実測値(m/z 値と質量)、計算質量、及び推定単糖組成を示す。

モデル糖タンパク質の分析を実施することにより、糖鎖試験法の中で質量分析法を解説するときの要点として、試料調製、システムの最適化、データ解析(質量の求め方、フラグメントの解釈)が挙げられることが示唆された。

C-3-2: 多糖類の試験法に関する調査

2010年7月8日~9日、英国ロンドンにおいて第4回ヘパリン製剤の品質評価に関するワークショップが開催された。本ワークショップは、血液凝固の防止等に汎用される医療上重要な生物薬品であるヘパリンの品質・有効性・安全性確保を目的として、欧米の薬局方や国際標準品の策定に関わる機関の主催により、毎年開催されているものである。我が国にとっても、日本薬局方ヘパリン各条改正の現状を中心とした取り組みを紹介すると共に、海外のヘパリン製造業者や規制当局の動向を理解するために、非常に有用な会議である。

本年のワークショップでは、日米欧薬局方ヘパリン各条改正の現状の他、ヘパリンの製法と品質

の関連、原材料、品質試験等について、最新情報が報告された。2007年秋から2008年春にかけて欧米で死亡例を含む有害事象を生じたOSCS混入事件を機に、各局方では試験項目の追加や試験条件の改良、規格値の厳格化が進められてきた。OSCSの混入検出に関しては¹H-NMRを用いた試験が三局で採用される等、試験法がほぼ確立されたと思われる。継続してヘパリン製剤の品質の一層の向上を目指し、現在も各局でさらなる改正に向けた検討が行われている。

昨年までのワークショップと比較した今回の特徴は、ヘパリンの品質試験のみでなく、製法に関する演題や、製法と品質の関連を明らかにした演題が複数あったことである。古典的な生物薬品であるヘパリンの品質確保においても、製造工程の理解と管理により品質確保を図るQuality by Designの考え方を取り入れることの有用性が述べられる等、近年の医薬品品質管理の潮流が波及していることが伺われた。本ワークショップの講演スライドは、

<http://www.hpa-events.org.uk/hpa/frontend/reg/tOtherPage.csp?pageID=50747&eventID=111&eventID=111>で公開されている。

会議の内容は以下の通りであった。

C-3-2-1: 日米欧薬局方ヘパリン各条改正の現状と今後の予定

C-3-2-1-1: 米国薬局方(Anita Szajek, USP)

USPではヘパリン各条の改正Stage2を2009年10月に施行し、現在、Stage3の改正に向けた検討を進めている。FDAから、以下のとおり改正の要望を受けている。

- ・NMRの感度を上げ、OSCSの検出限界を0.1%にすること
 - ・タンパク質及び核酸の限度試験の感度を上げ、タンパク質の限度試験では検出限界を現行の1.0%から0.1%にすること
 - ・ヘパリンの分子量はヘパリン起因性血小板減少症の発症と関連するため、分子量試験を設定すること
 - ・脂質の純度試験を設定すること
- 現在、USPでは下記の検討を行っている。

- ・¹H-NMR の高感度化
- ・強塩基性陰イオン交換 HPLC(SAX-HPLC)のカラム変更による分離能向上と分析時間の短縮
- ・タンパク質限度試験の限度値引き下げ (1.0%→0.1%)
- ・核酸限度試験の新規試験法設定
- ・分子量試験法の設定

ヘパリンカルシウムは米国で販売されている製品がないため、原薬製剤ともに各条を削除する予定である。基原については、信仰上の理由でブタ由来製品を使えない人がいるため、ブタには限定していない。

C-3-2-1-2： 欧州薬局方 (Laure Taconet, EDQM; European Pharmacopoeia)

2010年8月の改正内容は以下のとおり。

本質：含量規格値を 150 IU/mg 以上から 180 IU/mg 以上に変更（投与経路別の規格は廃止）。
製造：全ての製造工程は適切な品質マネジメントシステムに基づき管理されるべきこと、由来する種及び他の種に由来する原料が混入していないことを製造工程において適切な試験により確認すること、を明記。

確認試験：

- ・旋光度による試験を ¹H-NMR に変更
- ・ゾーン電気泳動による試験を SAX-HPLC に変更

純度試験：

- ・核酸限度試験の限度値 (OD260) を 0.20 以下から 0.15 以下に引き下げ
- ・タンパク質限度試験の試験法を吸光光度法からローリー法に変更し規格値を 0.5%以下に
- ・亜硝酸分解を利用した類縁物質試験 (SAX-HPLC) の設定
- ・窒素含量の下限を設定 (1.5~2.5%)
- ・重金属限度試験の試験法を一般試験法 方法 C から方法 F に変更（重金属試験に関する EP の共通方針を反映）
- ・標準品は、NMR 確認試験用ヘパリンナトリウム、NMR 用確認試験用ヘパリンカルシウム、理化学試験用ヘパリン、デルマトン硫酸エステル (DS) 及び OSCS を設定

C-3-2-1-3： 日本薬局方 (Akiko Ishii, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, NIHS)

日局では、2008年7月の一部改正において¹H-NMRを用いたOSCS純度試験を収載した。また2009年7月の第15局第二追補において、ヘパリンナトリウムの基原の記載を改正し、ヘパリンカルシウム各条を収載した。さらに2010年7月一部改正として、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムの確認試験（弱塩基性陰イオン交換 HPLC; WAX-HPLC）と類縁物質試験（WAX-HPLC）、並びにヘパリンナトリウムのガラクトサミン純度試験を収載予定である（注：2010年7月30日に告示された）。新たに開発したWAX-HPLCに関しては、論文としても公表している（Hashii N. Kawasaki N. et al. *Biologicals*, 38, 539, 2010）。

今後は、ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム各条に共通して、純度試験（タンパク質、核酸）、抗 IIa 活性試験の設定を予定している。また、130 単位/mg 以上と規定されている腸粘膜由来ヘパリンナトリウムの含量規格値の見直しが必要であると考えている。

C-3-2-1-4：ヘパリン事件が規制プロセスと公的基準書に与えた影響 (Ali Al-Hakim, FDA)

OSCS 混入事件以前の USP ヘパリンナトリウム各条の試験では、OSCS 混入バッチでも規格に適合し、異物混入を検出することができなかった。事件後に、¹H-NMR、SAX-HPLC、ガラクトサミン限度値、残留溶媒、製造工程の感染性物質除去不活化のバリデーションの必要性、を追加工、力価の含量規格値、抗 Xa/抗 IIa 活性比、タンパク質限度値、核酸限度値を厳格化した。

OSCS 混入事件から得られた教訓として、ヘパリンの公的基準書を最新のものにすること、及び、製造や品質管理のプロセスを改善すること、の2点があげられる。製造や品質管理のプロセスに関しては、原材料の適切な管理、品質に影響する可能性のある製造工程のリスク要因の検討、重要品質特性の同定、重要工程パラメータの検討を含む工程管理を実施することにより、製造工程から品質を規定する Quality by Design アプローチを実践することが推奨される。

C-3-2-2: ヘパリンの製法と品質の関連

C-3-2-2-1: ヘパリンの原材料と品質確保のための課題 (Yan Wang, Scientific Protein Laboratories)

世界市場におけるブタの生産は、56%が中国、22%がEU、12%が米国及びカナダによるものであり、中国が半数以上をしめている。ヘパリン製造工程の前半は、屠殺場における腸の採取、casing workshopにおける粘膜採取、粗精製ヘパリン workshopにおける粗精製ヘパリン原料の調製、粗精製ヘパリン調製業者における粗精製ヘパリンの調製からなる。屠殺場は食肉加工に関して政府の規制下にあるが、それに続く工程は政府の監視が限定的である。

粗精製ヘパリン供給体制の特徴として、工程が長く複雑であり多くの業者が関与していること、文書管理が不十分なケースがあること、品質に関する試験が限定的であること、が挙げられる。このため、認められていない原材料の利用によるブタ以外の種のヘパリン混入や、化学合成品の混入といった懸念がある。ヘパリン製造の出発原料は粗精製ヘパリンであると認識されており、これ以前はGMP管理下でない。これらの懸念を解消するためには、腸粘膜の調達から粗精製ヘパリンの製造までを含む供給体制を、適切に管理することが望まれる。

C-3-2-2-2: ヘパリンの製造工程 (Kristian B Johansen, USP)

ヘパリンの製造工程は、抽出、分離、精製の工程からなる。抽出工程では、alcalase等の酵素を用いてタンパク質を分解する。次にアルカリ性水性環境下で、高温、高塩素濃度にし、加水分解する。分離工程では、アンモニウム塩と複合体を形成、またはアンモニウム基をもつ樹脂に結合させ、溶出後、沈殿させる。これを乾燥し、粗精製ヘパリンとする。複合体形成あるいは樹脂への結合、溶出および沈殿の工程は、類縁物質や不純物の含量に影響する。重要な工程パラメータは、複合体形成または樹脂結合と溶出の際の塩素イオン濃度、pH及び温度、ならびに、沈殿の際の溶媒の種類と量、および塩素イオン濃度である。精製工

程は、酸化、沈殿、乾燥からなり、エンドトキシン、バイオバーデン、ウイルス、および色の管理にも重要である。酸化工程の酸化剤の種類によってはシュウ酸のような不純物が生じ、ヘパリンの部分的な分解により平均分子量が小さくなることがある。重要な工程パラメータは、酸化工程における酸化剤の種類と量、pH、温度、及び反応時間、ならびに、沈殿の際の溶媒と塩素イオンの種類と量である。

C-3-2-3: ヘパリンの製造工程と品質の関連: 酸化剤の種類とNMR解析結果

C-3-2-3-1: その1 (Ishan Capila, Momenta Pharmaceuticals)

ヘパリンの精製工程において、酸化処理は脱色及びエンドトキシンの除去等を目的として実施されるが、過マンガン酸カリウムを用いて酸化処理した未分画ヘパリンの¹H-NMRを測定したとき、82.10 ppm付近にシグナルが検出されることが確認された。このシグナルを、異核種間一量子コヒーレンス分光法(HSQC)及び異核種間遠隔相関分光法(HMBC)等の二次元NMRにより帰属した結果、*N*-アセチルグルコサミン酸の*N*-アセチル基由来のシグナルであることが明らかとなった。*N*-アセチルグルコサミン酸は、ヘパリン還元末端の*N*-アセチルグルコサミンの1位のアルデヒド基が過マンガン酸カリウムにより酸化されることで生じるものと考えられる。二次元NMRは*N*-アセチルグルコサミン酸等のヘパリン製造工程由来不純物の同定及び構造解析に有用であることが示唆された。

参考文献: Beccati D., et al. Carbohydrate Polymers 82, 699, 2010

C-3-2-3-2: その2 (Christian Viskov, Sanofi-Aventis)

USP各条ヘパリンナトリウムの¹H-NMRによる確認試験では、80.10~2.00 ppm, 82.10~3.20 ppm及び85.70~8.00 ppmに観測される未同定シグナルの高さの合計が基準シグナルの高さの平均値の4%以下になることを確認する必要がある。昨年度のワークショップでは、82.18 ppmに3-*O*-アセチルイズロン酸に由来するシグナルが

観測されるヘパリン原薬があることを報告した。今回新たに、82.10 ppm にシグナルが観測されるヘパリン原薬があることが確認された。二次元 NMR によりこのシグナルを帰属した結果、*N*-アセチルグルコサミン酸の *N*-アセチル基由来のシグナルであった。*N*-アセチルグルコサミン酸は、ヘパリンの酸化工程において、過マンガン酸カリウムを用いたときに生じる。82.18 及び 2.10 ppm のシグナルはいずれも製造工程由来不純物由来のシグナルであること(未同定のシグナルではないこと)が確認されたことから、これらのシグナルが検出されるヘパリンについては、USP の規格に適合したヘパリンとして扱うべきである。

C-3-2-4 : ヘパリン原材料の管理 (基原動物種の確認)

C-3-2-4-1 : ウシ由来ヘパリン (Giuseppe Mascellani, EDQM)

OSCS 事件後、欧米薬局方においてヘパリン各条の試験が見直され、ガラクトサミン限度値が EP では 2%、USP では 1% に設定され、比活性は EP では 180 IU/mg、USP でも 180 U/mg に厳格化された。これらを背景に、ヘパリン製造工程が見直されている。また、ブタ由来ヘパリンが品薄となり、価格が高騰している。

ヘパリンが医薬品として用いられるようになった 60 年前から、ブタあるいはウシ由来ヘパリンが使われていたが、BSE 発生を機に、欧州および米国ではブタ由来ヘパリンのみが使われるようになった。現在、ウシ由来ヘパリンは南アメリカで使用されているが、ウシ由来ヘパリンとブタ由来ヘパリンは構造や活性が異なっている。特定のヘパリン製剤バッチとの相関は追跡調査できないが、2007-2008 年にブラジルで生じたヘパリン投与に伴う出血傾向や手術前後の悪液質の増加は、ウシ由来ヘパリンの使用と関連している可能性がある。

C-3-2-4-2 : ウシ由来ヘパリンとブタ由来ヘパリンの構造及び活性に関する差異 (Paulo Mourao, University of Rio de Janeiro)

2008 年にブラジルからロシュ社のヘパリン製

剤が撤退した際に、主として心血管手術の際のヘパリン使用に伴う出血が増加した。アナフィラキシー様の症状を呈する OSCS 混入による副作用とは明らかに違っていた。ウシ由来ヘパリンが使用されていたことが背景にあると考えられる。

ウシ由来ヘパリンとブタ由来ヘパリンは、構造、抗凝固活性、出血傾向、実験血栓の阻害に要する用量、プロタミン中和曲線において違いがあり、両者は同等の医薬品ではない。ブタ由来ヘパリンはイズロン酸とグルコサミンからなる 2 糖あたり 3 個の硫酸基を含み、イズロン酸の 2 位及びグルコサミンの 2 位と 6 位に硫酸基を有している。これに対してウシ由来ヘパリンでは、グルコサミンの 50% はブタヘパリンと同様に 2 位と 6 位が硫酸化されているが、6 位が硫酸化されていないグルコサミンが 36%、2 位が硫酸化でなくアセチル化されているグルコサミンが 14% 含まれている。総じてウシ由来ヘパリンの方が硫酸化度が低い。

生物活性の点では、ウシ由来ヘパリンの抗凝固活性および抗 Xa 活性はブタ由来ヘパリンの約 50%、抗 IIa 活性は約 25% である。陰性荷電が低いためにトロンビンとの結合が弱いと考えられている。しかしながら、ヘパリンを投与したラットにおける出血傾向の用量依存性はブタ由来ヘパリンとウシ由来ヘパリンで差がなく、ウシ由来ヘパリンはブタ由来ヘパリンと比較して抗凝固活性が低いものの、出血を起こし易いと考えられた。

参考文献 : Aquino RS et al. Thrombosis Haemostasis 103, 1005, 2010

C-3-2-4-3 : ヘパリンの品質管理に適用可能な qPCR 法の開発 : 異種動物由来原料の検出と残存 DNA の定量的検出 (Pascal Anger, Sanofi-Aventis)

EP ヘパリン各条では製造の項において由来する種の確認が求められ、USP ヘパリン各条ではラベリングの項において由来する種を記載することが求められている。過去にはウシあるいはヒツジ由来のヘパリンの混入が起こったことが知られている (Houiste C. et al. Clin Appl Thromb Hemost. 15, 50, 2009)。サノフィ社では、粗精

製ヘパリンの出荷試験において定量的 PCR (qPCR) による種の確認と混入物質の検出を行っている。また、精製ヘパリンの DNA 残存量の評価にも qPCR を用いている。

異種由来 DNA の検出に用いている qPCR の検出感度は、ブタ DNA がヘパリン中に 0.1 ng/mg 含まれているとき、ウシ DNA では 70 ppm、ヒツジ DNA では 700 ppm である。ヘパリナーゼ処理をしたサンプルを鋳型として Taq ポリメラーゼにより DNA を増幅するが、過硫酸化物はヘパリナーゼで分解されずに PCR 反応を阻害する。そのため、内部標準を添加して 2 つのプライマーセットを同時に適用することにより、内部標準の増幅阻害を指標に過硫酸化多糖類の混入も検出することができる。

USP ヘパリン各条に規定されている DNA 限度値は、2 µg/mg に相当する。USP 一般試験法 <1130> にも記載されているように、バイオ医薬品では 100 ng/dose が DNA 残存量の上限とされており、ヘパリンの投与量を 100 mg とすると、DNA 限度値は 0.1 ng/mg となる。これらのことから、FDA より核酸限度試験の感度改善が求められている。qPCR は、USP 一般試験法 <1125>、<1127>、<1130> で推奨されている方法でもある。現在用いている qPCR の検出限界は 1.5 ng/mg である。ミトコンドリア DNA を鋳型とする qPCR により、0.02 ng/mg を検出限界とする方法を開発中である。

C-3-2-4-4: qPCR を用いたウシ由来原料検出法のバリデーション(Sean Concannon, Pfizer)

TSE 伝播防止のため、反芻動物由来原料の混入を防止する方策が求められている。ウシ、ヒツジおよびヤギ由来原料の検出法として、感度、特異性、精度の点で、qPCR が優れている。反芻動物 Bov-A2 SINE 遺伝子座に対応するプライマープローブセットは、ウシ、ヒツジ及びヤギの当該 DNA に同程度の親和性を持つ一方、ブタ DNA に交差反応しない。ブタ PRE1-SINE 配列に対応するプライマープローブセットを同時に適用することにより、ブタ由来 DNA の残存量も測定することができる。試料の希釈とヘパリナーゼ処理は必要であるが、DNA の抽出・精製操作は不要

である。粗精製ヘパリンを試料として qPCR のバリデーションを実施したところ、反芻動物由来 DNA は 0.3~3000 ppm の範囲で、ブタ由来 DNA は 0.3~6000 ppm の範囲で定量可能であった。本法は、GMP 出荷試験において用いられている。

C-3-2-5: ヘパリンの品質試験各論

C-3-2-5-1: NMR

C-3-2-5-1-1: その 1 (Ian McEwen, Medical Products Agency)

NMR の感度は、装置のプロトン核の共鳴周波数に依存する。共鳴周波数を 300 MHz から 500 MHz に変更すると、感度は約 2.1 倍に増加する。300 MHz の装置を用いて 500 MHz と同程度の S/N のスペクトルを得るためには、積算回数を約 4 倍に増加する必要がある。また、測定した ¹H データはウインドウ関数処理を実施するが、パラメータとして設定する line broadning factor (LB) の値によりスペクトルの S/N が変化するので留意する必要がある。一般に、LB を 0.2 Hz から 0.4 Hz に変更したとき、S/N は 1.2 倍に向上することが知られている。

日局、EP 及び USP の各条ヘパリンでは、確認試験又は純度試験の試験法として ¹H-NMR 法が採用されているが、各局により測定条件が異なる。試料濃度は、日局、EP 及び USP は 33.3、28.6 及び 20 mg/ml 以上にそれぞれ設定している。NMR 装置は、日局、EP 及び USP でそれぞれプロトン核の共鳴周波数が 400、300 及び 500 MHz 以上の装置を採用している。LB は、日局では 0.2 Hz、EP では 0.3 Hz である。USP は LB を設定していない。各条ヘパリンは、適正且つ一般的な NMR 測定手法に基づいて調和及び改正されるべきである。

C-3-2-5-1-2: その 2 (Bernd Diehl, Spectral Service)

クライオプローブを用いた 600 MHz の NMR は、未分画ヘパリン及び低分子量ヘパリンの確認試験として利用可能である。¹H-NMR を測定したとき、①グルコサミンの 1 位、②2-硫酸化イズロン酸の 1 位、③N-硫酸化グルコサミンの 2 位

及び④*N*-アセチルグルコサミンの *N*-アセチル基のプロトンは、それぞれ①85.42±0.03，②85.21±0.03，③83.28±0.03 及び④82.05±0.02 ppm に観測された。また、溶媒消去法を用いることで最終製剤であっても、軽水測定により直接測定可能であった。OSCS (82.15 ppm) 及びデルマタン硫酸エステル (82.08 ppm) に対する検出限界は、それぞれ 0.025% 及び 0.05% であった。また、酢酸 (81.93 ppm)，エタノール (81.19 ppm)，メタノール (83.36 ppm) 及びイソプロパノール (81.15 ppm) 等の残留溶媒の検出限界は 40 ppm であった。クライオプローブを用いた 600 MHz の NMR を用いると、パルス待ち時間を 20 秒に設定した場合であっても、S/N が 2000 以上のスペクトルを得るのに要する時間は僅か 6 分であり、高感度且つ短時間測定が可能である。

C-3-2-5-2 : キャピラリー電気泳動 (Edwin Moore, Baxter Healthcare Corporation)

キャピラリー電気泳動 (CE) は、2008 年に発生したヘパリン有害事象において、OSCS をスクリーニングする方法の一つとして利用されてきた。しかし、当時の方法は十分に最適化されておらず、感度及び migration time の再現性等が悪いことが指摘されていた。2009 年、二つの改良 CE 法が報告され、高濃度のリン酸溶液を緩衝液として用いることにより、従来法よりも測定時間、分離能、精度及び感度が改善されることが示された^{1,2)}。リン酸リチウム緩衝液 (pH2.5) を用いた改良 CE 法についてバリデーションを実施した結果、OSCS の検出限界は 0.04% であり、NMR 法の約 10 倍の感度となることが確認された。また、migration time の相対標準偏差 (RSD) は約 2% であり、従来から指摘されてきた再現性も改善されることが示された。さらに、OSCS、ヘパリン及び DS をベースラインで分離させることが可能であり特異性が高いこと、また 1 回の測定時間は 10 分程度であり、高スループットであることが確認された。また、多機関共同検定により、改良 CE 法の頑健性が確認された。リン酸リチウム緩衝液を用いた改良 CE 法は、デルマタン硫酸エステル及び OSCS 純度試験として利用できる可能性が示唆された。

1) Wielogs, T et al. J. Pharm. Biomed. Anal. 49, 319, 2009.

2) Somsen, G et al. J. Chromatogr. A. 1216, 4107, 2009.

C-3-2-5-3 : 誘起円二色性 (Apyll Salcup, University of Cincinnati)

ヘパリンは、螺旋構造を有するグリコサミノグリカン (GAG) であり、包接錯体を形成する。この特性を利用して、ヘパリンをキラル添加剤として用いることにより、CE において、エナンチオマー分離が可能となることが報告されている。ヘパリンがキラル添加剤としての特性を有することは、ある種の化合物 (プローブ) との包接錯体の円二色性 (CD) を測定したときに、その包接錯体に特徴的なキラル光学的 (chiroptical) シグナル (ICD シグナル) が誘起される可能性があることを示唆している。種々な化合物について検討した結果、chloroquine、*N*-methyl-*N*-(7-chloro-[4]quinoyl)-1,3-diaminopropane (QD)、quinacrine 等がプローブとして有用であることが明らかとなった。また、これらのプローブとヘパリンの包接錯体から誘起されるシグナルの強度とヘパリン濃度の間には相関性があること、HPLC を組み合わせることによりフローインジェクション分析 (FIA) が可能となることが確認された。さらに ICD スペクトルは、GAG の基原及び種類により異なることが示唆され、本分析法は特異性が高いことが確認された。本分析法は、DS 等の不純物が存在する試料中においても、ヘパリンの定量分析に利用できる可能性があるものと思われる。

C-3-2-5-4 : 分子量試験

C-3-2-5-4-1 : その 1 (Barbara Mulloy, NIBSC)

未分画ヘパリン (UFH) の分子量分布は、一般に光散乱検出器を接続したゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により測定されている。この分析法は校正マーカを必要としないが、高価な装置と専門的な測定技術を要する。現在、NIBSC/USP の共同プロジェクトでは、HPLC 装置及び分子量校正マーカを用いた汎用性の高い分子量分布測定法の開発を目的として、分子量