

ム」と大きく異なる可能性があるので、天然物を起原とする炭酸カルシウムの別の各条にすることが望ましいと思われる。

D-6： 理化学試験法の改正に関する研究

日局 16 で溶状に色の比較液を用いているのは 39 品目であり、USP では数品目と少なく、EP の 100 品目程度と比較すると、日局や USP では規格試験法の中でそれほど大きな意味合いを持たせているとは考えられない。しかし、日局で、新たに溶状を採用しているものでは、日局の比較液を採用しているものは無く、今後の方針転換が必要であると思われる。実際の医薬品各条に EP の標準液を適用するためには、ブチルスポコラミン臭化物の溶状の例に見られるように、色の比較液 F 0.5mL を薄めた塩酸で 20mL にすることにより EP の標準液 Y7 を調製している。しかし、色の比較液の組成比が大きく違う場合には、困難が予想される。

今回の検討から、色の機器測定では、必ずしも専用の測定機器でなくとも、分光光度計と付属の色測定用ソフトを用いることで測定可能と考えられた。ただし、薄い色の測定時にはやや測定値に差が見られることがあるため、注意が必要である。従来色の標準液を用いた規格を、機器測定の規格に置き換えるためには、規格限度付近の不純物等の着色物質を含む試料があることが望ましく、試料溶液を希釈した場合の色の測定値の変化などを検討し、規格設定を試みる必要がある。従って、すでに承認申請時に、各局の色の比較（標準）液を使用している場合には、機器測定へ移行するのは容易なことではないとおもわれる。現在、EP が色の機器分析法の規格設定法を検討中であり、その結果を待って、機器測定法そのものの調和は前にすすめるとして、同時に色の標準（比較）液を各極で相互の取り込むことが調和の早道であると考えられる。

D-7： 製剤総則ならびに製剤試験法の改正に関する研究

無菌製剤における微生物混入への配慮について、以下考察することとする。

局方製剤通則では、注射剤、点眼剤、眼軟膏剤

は無菌製剤とされ、日局 16 無菌試験<4.06> による品質保証、あるいは滅菌工程の重要管理項目を適正に管理することによって無菌性を保証するパラメトリックリリースによる管理が必要になる。ただし、これら製剤以外の非無菌製剤であっても、微生物による汚染や増殖を避けて、製剤を製造、保管することの重要性を示し、必要に応じて、日局 16 微生物限度試験<4.05> を適用すべきである。

微生物限度試験を適用するのはどのような場合かについては、(1)製剤が微生物に汚染されるリスク、および(2)微生物汚染の人体に与える影響を考慮して判断すべきである。

例えば、経口固形製剤では微生物の汚染、繁殖が起りにくく、人体への影響が少ないと考えられるので、原材料、製造環境の微生物管理が適切に行われている限り、微生物限度試験は一般に不要と考えられよう。しかし、微生物汚染のリスクが高いような液剤、適用後に人体への影響が大きい吸入剤の場合などは、微生物限度試験の適用を検討する必要がある。

ただし、微生物限度試験を適用する場合でも、当該試験をスキップ試験とすることも含めて、微生物管理をどのように実施するのが効率的で効果的であるかを個別の製剤ごとに検討すればよい。

なお、平成13年5月1日発出の“新医薬品の規格及び試験方法の設定について”（医薬審発第568号）のフローチャート#8「非無菌製剤の微生物学的試験」に非無菌製剤の微生物試験試験設定の考え方が示されている。これは新有効成分医薬品を対象として作成されたものであるが、局方医薬品においても当てはまるものである。また非無菌製剤の微生物管理試験に関する一般的な考え方は、日局16参考情報「非無菌医薬品の微生物学品質特性」に示されており、試料の採取方法、試験の実施頻度、微生物管理計画、剤形ごとの許容基準値が示されている。さらに日局16参考情報「保存効力試験法」には、多回投与容器中に充てんされた製剤自体又は製剤に添加された保存剤の効力を微生物学的に評価する方法が示されている。

D-8： 医薬品の名称、化学名及び構造式の改正に関する研究

今回は、JP16 収載予定の医薬品の構造式と化学名の記載方法について調査した。その結果、化学名については、methane 置換体の化学名、クロメン構造を持つ医薬品の化学名、トシル酸塩の化学名、ステロイド類のリン酸エステルの化学名、ステロイド類のうち「スピロノラクトン」および「エチルエストラジオール」の化学名に、IUPAC の命名法に合致しない事項および JP 収載品目間での不整合を見いだした。また、構造式については、ペプチド系の医薬品の構造式、医薬品の構造式の側鎖 R の表記法、フルラン類の構造式、硫酸エステルの構造式などについて、JP 収載品目間での不整合および WHO の医薬品構造式記載のガイドラインに合致しない事項を見いだした。これらについては、修正案が速やかに JP に採用されることを期待する。

E. まとめ

E-1： 局方国際調和の促進に関する研究

局方国際調和の進捗状況と課題をまとめた。平成 22 年度は 2 回の PDG 会議及び ICHQ4B 会議が開かれ、(1) PDG では、各条品目「クロスポビドン」が新規に国際調和し、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、一般試験法 35 項目中 27 項目、医薬品添加物 62 項目中 41 項目となった；(2) 改定項目数は一般試験法が 2、医薬品添加物が 5 であった；(3) 新規調和項目の一般試験法としてクロマトグラフィーが採択され、調和作業が開始された；(4) 既存の国際調和文書に関する改定については、一般試験法ではポリアクリルアミド電気泳動法、溶出試験法、エンドトキシン試験法、ペプチドマップ法の 4 項目について検討が開始され、このうち、溶出試験法は改定が合意に至った。一方、医薬品添加物では、エチルセルロースの改定が採択された；(5) Q4B 活動については、Q6A 関連 11 項目のうち、溶出試験法 Rev.2 が step4 として合意に達した。なお Q6A 関連に追加して取り上げられた 5 項目の試験法のうち、粒

度測定法（ふるい分け法）、キャピラリー電気泳動法が step4 としてそれぞれ合意に達した；(6) Q4B での規制当局の受け入れのための活動については、当初の目標はほぼ達成したということと理由に、ICH 運営委員会において残された課題の処理およびメンテナンスのための Ad-hoc な活動を除いて Q4B 活動の終了が決定された。

E-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

新しい医薬品の品質評価手法の開発を目的として、¹H-NMR法に多変量解析法を組み合わせたペプチド性医薬品の品質解析手法の検討を行った。アミノ酸配列の異なる3種のインスリン（ヒト、ウシ、ブタ）について、それぞれ単一および2種と3種混合物を軽水中に混合した試料を調製して¹H-NMRを測定した後、スペクトル全体を規格化して主成分分析を実施した。その結果、3種のインスリンのアミノ酸配列の相違によるスペクトル変化を第一および第二主成分で特徴づける事に成功した。また、2種および3種インスリンの混合比を主成分分析から予測できることがわかった。本法は、僅かにアミノ酸配列の異なるインスリンを正確に識別でき、ペプチド性医薬品の確認試験、純度試験への応用も考えられる。

E-3： 生物医薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

糖タンパク質医薬品の糖鎖試験法策定のため、モデル糖タンパク質の LC/MS を実施し、グラファイトカーボンを接続した糖鎖の LC/MS 及び LC/MS/MS を用いた分析方法を示すとともに、分析にあたっての注意点をまとめた。さらに、ヘパリンへの過硫酸化コンドロイチン硫酸混入事件を契機とした米国薬局方や欧州薬局方のヘパリン各条の改正動向などを調査することによって、日局多糖類各条の確認試験、純度試験、示性値、力価試験法等の定量法の見直し及び新規収載における課題をまとめた。

E-4： 生薬の試験法及び各条規格の改正に関する研究

アキョウの局方収載に備え、主産地である中国の大手メーカーを現地視察した。その結果、想像以上に大規模な生産が行われ、懸案であった基原動物の管理についても、今回訪問したメーカーでは中国国内に保有する飼育基地と連携が図られている様子が窺えた。一方で、偽物の流通に対して多くの対策が取られている事から、局方収載に際しては、確認試験法及び純度試験法の整備が必須であると思われた。中国では、将来的に DNA を用いた試験法のCP（中国薬局方）への導入を検討している事から、日本においても同様の検討を急ぐべきである。

E-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

国際調和が進められている医薬品添加剤のなかで、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を考察した。また、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。その結果、(1)日局あるいは日局添規の二酸化ケイ素類とUSP（米国薬局方）あるいはEP（欧州薬局方）の二酸化ケイ素との対応については、注意が必要である；(2)天然物を起原とする炭酸カルシウムは、不純物プロファイルが日局「沈降炭酸カルシウム」と大きく異なる可能性があるため、別の各条にすることが望ましいと思われた。

E-6： 理化学試験法の改正に関する研究

色の判定に関しては、PDGにおいて調和の対象とされ、USPがすでに参考情報として採用しているCIE（国際照明委員会）の方法による色差計を採用する方向で検討が進められている。色差の測定には通常、積分球方式の分光光度計(spectrocolorimeter)などが用いられるが、通常の実験用の分光光度計(spectrophotometer)に色の解析用ソフトを使用して測定することもできる。そこで、色の機器分析が導入される可能性を考えて、両測定方法の比較検討を行った。その結果、(1)色の機器測定は、通常の実験用分光光度計と色測定用ソフトを使用することで十分対応可能と考えられた；(2)各条の機器測定による規格設定に関しては、今後の課題であるが、既収載品については困難が予想された；(3)

EP標準液の日局試験試液への採用が最も有効で迅速な調和の道であると考えられた。

E-7： 製剤総則ならびに製剤試験法の改正に関する研究

日局16製剤総則に書き込まれる「非無菌製剤に関する微生物混入への配慮」について、以下のような解説をまとめた：(1)医薬品製剤では、非無菌製剤であっても、微生物による汚染や増殖を避けて、製剤を製造、保管することが重要であり、必要に応じて微生物限度試験を適用すべきである；(2)微生物限度試験を適用すべきケースについては、製剤が微生物に汚染されるリスク、微生物汚染の人体に与える影響を考慮して判断すべきである；(3)例えば微生物の汚染、繁殖が起こりにくく、人体への影響が少ないと考えられる経口固形製剤では、原材料や製造時の微生物管理が適切に行われている限り、微生物限度試験は一般に不要である一方、微生物汚染のリスクが高い液剤、人体への影響が大きい吸入剤は微生物限度試験の適用を検討する必要がある；(4)ただし、微生物限度試験の適用については、スキップ試験とすることも含めて、個別の製剤ごとに効率的、効果的な微生物管理の方策をたてればよい。

E-8： 医薬品の名称、化学名及び構造式の改正に関する研究

日局収載医薬品の化学名および構造式について、第16改正にむけて、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明らかにした。これらの検討結果は、日局16に反映されたが、医薬品の名称関連事項は医薬品の本質を規定するものであり、その記載内容は、科学的に正しく、また、国際的にも調和している必要があるため、今後も継続的に検討し修正を提案できる体制が必要である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1.論文および総説

- 1) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, **389**, 107-113, (2010)
- 2) Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR 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 neonatal FcR, *J Immunol*, **184**, 1968-76 (2010)
- 3) H.Shibata, C.Saito, C.Yomota, T.Kawanishi, Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie*, **651**, 251-253 (2010)
- 4) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **878**, 1466-1470 (2010)
- 5) Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T., Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP., *In J.Pharm*, **407**, 111-118 (2011)
- 6) 川西 徹： バイオ後続品の開発状況とその評価, *ジェネリック研究*, **4**, 5-18 (2010)
- 7) 川西 徹： 製剤総則の改正, *薬局* **62**, 2598-2605 (2011)
- 8) 川西 徹： 製剤試験法, *薬局* **62**, 2654-2657 (2011)
- 9) Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K : Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. *Anal Chem*. 2010 **82**(17):7436-7443.
- 10) Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.: Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Biomed Chromatogr*. 2010 Jul 26. [Epub ahead of print] PMID:2066-2112,
- 11) Takao HAYAKAWA and Akiko Ishii: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals : *Practical and Applied Considerations* (ed. by Michael G. Tovey), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA (in press)
- 12) 早川 堯夫：日本薬局方におけるバイオ医薬品の現状と今後, *ヒューマンサイエンス*, **21**(1), 28-32 (2010)
- 13) 早川 堯夫：最近の局方における生物薬品各条及び生物薬品関連試験法の改正について. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **41**, 378-387 (2010)
- 14) 前田 瑛起, 北 荘一郎, 中 世古みなみ, 木下 充弘, 田邊 豊重, 大庭 澄明, 早川 堯夫, 掛 樋一晃：日本薬局方一般試験法収載へ向けた S D S - P A G E 法及びキャピラリー電気泳動法に関する研究. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, **41**, 477-489 (2010)
- 15) A. Ohno, N. Kawasaki, K. Fukuahra, H.Okuda, T.Yamaguchi, Complete NMR analysis of oxytocin in phosphate buffer, *Magn. Reson. Chem.*, **48**, 168-172 (2010).
- 16) 中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ：遊離糖鎖の LC/MS. 試料分析講座. 印刷中
- 17) 川崎ナナ：医薬品各条へパリンカルシウム. *日本薬局方技術情報*(2011) (財)日本公定書協会編. じほう(東京) 印刷中
- 18) 川崎ナナ：医薬品各条へパリンナトリウム.

日本薬局方技術情報(2011) (財)日本公定書協会編. じほう(東京) 印刷中

- 19) 石井明子, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: ヘパリン製剤の品質確保に関する国際的動向—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報告— 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 印刷中
 - 20) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids, *J. Pharm. Sci.*, **99**: 4710-4719 (2010)
 - 21) 伊豆津健一, 四方田千佳子, 川西徹, 凍結によりリポソームからの脱水と内部の氷晶形成に対するトレハロースの影響, *低温生物工学会誌* **56** (2): 159-162 (2010).
 - 22) 宮田直樹, 他: ステムを知れば薬がわかる *PharmTechJapan*, vol **26** (4,6,7,8,9,10), 611,947,1171,1495,1695,1927, (2010)
- ## 2. 学会発表
- 1) 大野彰子, 川西徹, 奥田晴宏, 福原潔, NMR法によるインスリンの種差の解析手法開発, 日本薬学会第 131 年会, 静岡 (2011. 3).
 - 2) 福原潔, 大野彰子, 岩浪直子, 安藤洋介, 矢本敬, 奥田晴宏, ^1H NMR によるメタボロミクス: 薬物代謝酵素阻害による APAP 誘発肝障害の軽減, 日本薬学会第 131 年会, 静岡 (2011)
 - 3) A. Ohno, N. Kawasaki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Yamaguchi, Application of a multivariate analysis based on ^1H -NMR to new approach for quality evaluation of the protein/peptide biological drugs, PACIFICHEM 2010, Honolulu, USA (2010.12).
 - 4) K. Fukuhara, A. Ohno, W. Hori, T. Yamoto, H. Okuda, ^1H NMR-based metabolomics approach for analysis of APAP hepatotoxicity, PACIFICHEM 2010, Honolulu, USA (2010.12).
 - 5) 福原潔, 大野彰子, 矢本敬, 奥田晴宏, ^1H NMR を利用した APAP による肝障害のメタボロミクス, 第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会, 横浜 (2010. 6).
 - 6) Akiko Ishii, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki: Revision of Heparin Monographs in Japanese Pharmacopoeia 4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products, Jul. 8-9th, 2010 (London)
 - 7) Noritaka Hashii, Akiko Ishii, Nana Kawasaki: Revision of Heparin Monographs in Japanese Pharmacopoeia: heparin identification test and purity tests for OSCS, related substances and galactosamine, 4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products, Jul. 8-9th, 2010 (London)
 - 8) 四方田千佳子, 保立仁美, 吉田寛幸, 川西徹, 球形吸着炭製剤の吸着特性評価について, 日本薬剤学会第 24 年会 (2010.5)
 - 9) 伊豆津健一, 四方田千佳子, 川西徹, 凍結溶液における脂質ベジクル内の氷晶形成と糖類による脱水促進, 日本薬剤学会第 24 年会 (2010.5)
 - 10) 柴田寛子, 齋藤はる奈, 川西徹, 四方田千佳子, シクロスポリンカプセルの先発品と後発品における物理化学的性質と体内動態の比較評価, 日本薬剤学会第 25 年会 (2010.5)
 - 11) 伊豆津健一, 四方田千佳子, 川西徹, 凍結によるリポソームからの脱水と内部の氷晶形成に対するトレハロースの影響, 低温生物工学会第 55 年会 (2010.6)
 - 12) K. Izutsu, C. Yomota, T. Kawanishi, K. Fujii, E. Yonemochi, K. Terada, Thermal Analysis of Multi-component Frozen Solutions for Lyophilized Formulation Development, 21st IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics (2010.8)
 - 13) K. Izutsu, C. Yomota, T. Kawanishi, Control of Liposome Freezing Behavior for Structural and Functional Stabilization, Freeze-drying of Pharmaceuticals and

Biologicals Conference (2010.9)

- 14) Hiroko Shibata, Chikako Yomota, Toru Kawanishi: Basic examination for in vitro release test of drug-encapsulated liposome
- 15) Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition (2010.11)
- 16) K. Izutsu, C. Yomota, T. Kawanishi: Varied effects of cryoprotectants on freeze-induced dehydration and intraliposomal ice formation, FIP Pharmaceutical Sciences World Conference (2010.11)
- 17) 四方田千佳子, 保立仁美, 吉田寛幸, 川西徹, 市販イトラコナゾール製剤の溶出挙動に及ぼす界面活性剤の影響, 日本薬学会第131年会
- 18) 齋藤 はる奈, 柴田 寛子, 吉田 寛幸, 川西 徹, 四方田 千佳子, HPLC 質量分析計を用いたイオパミドール注射剤の不純物解析,
- 19) 八巻 琢哉, 吉橋 泰生, 米持 悦生, 寺田 勝英, 森山 広思, 伊豆津 健一, 四方田 千佳子, 川西 徹, 凍結乾燥製剤における凍結保護剤のコラプス現象評価, 日本薬学会第131年会 (2011.3)
- 20) 柴田寛子, 四方田千佳子, 川西徹 細胞培養液中におけるリボソーム製剤の凝集物形成に関する検討, 日本薬学会第 131 年会 (2011.3)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生科学研究費補助金（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）
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

分担研究報告書

局方国際調和の促進に関する研究

分担研究者 早川堯夫（近畿大学薬学総合研究所長）
協力研究者 掛樋一晃（近畿大学薬学部 教授）
協力研究者 濱本博幸（医薬品医療機器総合機構医薬品基準課長）
協力研究者 高山一成（医薬品医療機器総合機構）
協力研究者 丸山良亮（医薬品医療機器総合機構）

研究要旨

薬局方の国際調和及び規制当局による薬局方の国際間の受入れを推進することを目的に研究を行った。すなわち、国際的な動向をふまえつつ、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薬局方検討会議（PDG：Pharmacopoeial Discussion Group）活動を通じて三薬局方間の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け入れの推進に必要な事項と方策について検討した。成果・結果は以下の通りである：

平成22年度は、2回の PDG 会議及び ICHQ4B 会議が開かれ、

- (1) PDG では、各条目「クロスポビドン」が新規に国際調和に至った。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、一般試験法 35 項目中 27 項目、医薬品添加物 62 項目中 41 項目となった。
- (2) 改定項目数は、一般試験法が2、医薬品添加物が5であった。
- (3) 新規調和項目の一般試験法としてクロマトグラフィーが採択され、調和作業が開始された。
- (4) 既存の国際調和文書に関する改定については、一般試験法では、ポリアクリルアミド電気泳動法、溶出試験法、エンドトキシン試験法、ペプチドマップ法の4項目について検討が開始された。このうち、溶出試験法は改定が合意に至った。一方、医薬品添加物では、エチルセルロースの改定が採択された。
- (5) ICHQ4B 活動については、Q6A 関連11項目のうち、溶出試験法 Rev.2 が step4 として合意に達した。なお Q6A 関連に追加して取り上げられた 5 項目の試験法のうち、粒度測定法（ふるい分け法）、キャピラリー電気泳動法が step4 としてそれぞれ合意に達した。
- (6) ICHQ4B での規制当局の受け入れのための活動については、Q4B/PDG 間のプロセスを改善するための方策やさらなる Q4B 評価対象品目の拡大の提案がなされてきた

が、ICH の専門家会議は常設的なものではなく、当初の目標はほぼ達成したということとを理由に、ICH 運営委員会において残された課題の処理およびメンテナンスのための Ad-hoc な活動を除いて Q4B 活動の終了が決定された。

A. 研究目的

医薬品原料供給、医薬品生産、医薬品流通のグローバル化に対応した医薬品の基準の国際化の推進がうたわれているところから、薬局方の国際調和及び規制当局による薬局方の国際間の受入れを推進するための研究を目的とする。

B. 研究方法

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: Pharmacopoeial 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する。

C. 研究結果

1. 薬局方検討会議 (PDG) 及び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) に関する専門家会議の開催について

日米欧三薬局方による検討会議 (PDG) 及び ICHQ4B 専門家会議は、下記の2度開催された。こうした会議の間には、電話会議や普段のメール等でのやりとりを通じて活動を続けている。

- (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

2. PDG における国際調和の合意署名: 署名年月 (日局収載予定年月) について

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、誤記訂正項目、署名ページの改定項目及び調和対象とされた全項目の現時点での総計項目数は以下のとおりである。

なお、新規項目、改定項目、誤記訂正項目については、署名年月及び日局収載予定年月を示した。後者は括弧内に記載している。

この他、PDG 調和手順書の改定にも合意署名した。

(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、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)
(改定内容: 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)
(改定内容: 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)
(改定内容: 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)
 - ・ Cellulose Acetate Phthalate (セラセフェート) Revision 1: 2010.11 (P16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改定内容: 貯法、粘度、水分、定量法(カルボキシベンゾイル基)、定量法(アセチル基))
 - ・ Lactose Anhydrous (無水乳糖) Revision 4: 2010.11 (P16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改定内容: IR 確認試験、溶状、異性体比、微生物限度、試薬)
- (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): 2010.11 (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
3. PDG プロセス改善
- (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。

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)について

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 の漸く具体的な進捗がみられるようになったが、PDG での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

①Dissolution (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)。

- ②Uniformity 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を採用できる)については USP からは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。
- ③Bacterial 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。
- ④Analytical Sieving (粒度測定法(ふるい分け法)): Rev.1 の改正テキストが記載された日局 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。
- ⑤Bulk 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。
- ⑥Capillary 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。
- ⑦Polyacrylamide 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。

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が採択された。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。

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 を指名した。
- 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。

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。

D. 結論

平成22年度は2回のPDG会議及びICHQ4B会議が開かれた。PDG会議では、1項目の医薬品添加物各条が新規に国際調和に至った。改定項目数は、一般試験法2、医薬品添加物が5であった。これらは、JP16、2012年9月のJP16第一追補、2014年9月のJP16第二追補に収載予定である。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、一般試験法35項目中27項目、医薬品添加物62項目中41項目となった。

新規の調和項目候補としては、Q4Bから提案された一般試験法の中で、Chromatographyを調和項目とするか否かの検討を行い、福岡における専門家におけるface-to-face会議を経て、正式項目として採択した。あわせてColourについても漸く試験法に関する技術的な議論が開始された。一方、Tri-PEC(現在のIPEC)から提案された医薬品添加物の新規調和候補に関しては、将来の調和品目として保留し、現在は、当面の調和品目に集中すると結論された。

科学技術等の進歩を受けて既存のPDG国際調和文書に関する改定については、新

たにポリアクリルアミド電気泳動法、溶出試験法、エンドトキシン試験法、ペプチドマップ法の4項目について検討が開始され、CPが指名された。一方医薬品添加物の改正項目として、エチルセルロースが採択された。

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)については、Q6A 関連11項目のうち、平成22年度においては、溶出試験法 Rev.2 が step4 として合意に達した。なお、製剤均一性試験法、エンドトキシン試験法については内容的には step4 に合意済みとなったが、各国への取り込みの確認を待っている状況にある。Colour については、Q4B の評価対象から削除された。なお追加的に Q4B 取り上げられた 5 項目の試験法のうち、粒度測定法(ふるい分け法)、キャピラリー電気泳動法が step4としてそれぞれ合意に達した。

そのほか、三局での歩調を合わせることが困難なテーマについては、PDG の枠内(一局は局方取り込みを行わないことを前提)、あるいは枠外(Prospective Harmonization のように、一局は加わらないで調和を行うが、PDG の場で情報交換を行う)での二局間調和を行っている。

ICHQ4B での規制当局の受け入れのための活動については、Q4B/PDG 間のプロセスを改善するための方策やさらなる Q4B 評価対象品目の拡大の提案がなされてきたが、ICH の専門家会議は常設的なものではなく、当初の目標はほぼ達成したということを理由に、ICH 運営委員会において残された課題の処理およびメンテナンスのための Ad-hoc な活動を除いて Q4B 活動の終了が決定された。

以上のように、PDG での調和対象とされている一般試験法および医薬品添加物各条の国際調和は順調に進捗したが、これらの活動をより効率的に行うために実施している作業課題の進捗確認のための電話会議は毎月定常的に実施されており、JP も平

成22年7月よりWebExを利用したWeb会議方式を主催するなど、会議の効率化は著しい。また PDG 関連文書を集約して保管、利用する共通のWeb siteの開発は、EPおよび USP による基盤整備段階をへて、さらに福岡会議の JP への講習を経て JP も参加し、開発も第二段階に入った。

以上のように、日米欧の局方の国際調和を推進する PDG 活動そのものは以前に比べて活発化しており、JPは諸課題に関して項目毎に対応策を検討し、必要に応じて、調査、情報収集、feasibility studyなどをふまえ、国際調和検討委員会で議論し、JPとしての立場、考え方、方向性を定め、これをPDG及びQ4Bで積極的に表明してきた。しかしながら、一方で薬局方の国際調和の環境も変わりつつある。Q4B 活動の事実上の終了(ICH 活動の低下)にも象徴されるように、医薬品の国際化の流れにおける日米欧局方の国際調和体制の比重の低下がみられる。USP および EP は現在世界的規模で国際的交流活動を活発化している。JP の今後の課題は、USP、EP に加えて、その他の国々との国際的交流への対応策を策定することにあると思われる。

E. 健康危機情報

なし

F. 参考文献

1. 原田重徳：国際調和の動向とそれに基づく改正、薬局、62, 2615-2624 (2011)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada K, Hyodo S, Kinoshita M, Hayakawa T, Kakehi K : Hyphenated technique for releasing

- and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. Anal Chem. 2010 82(17):7436-7443.
2. Kinoshita M, Kakoi N, Matsuno YK, Hayakawa T, Kakehi K.: Determination of sulfate ester content in sulfated oligo- and poly-saccharides by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Biomed Chromatogr. 2010 Jul 26. [Epub ahead of print] PMID:20662112,
 3. Takao HAYAKAWA and Akiko Ishii: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals : *Practical and Applied Considerations* (ed. by Michael G. Tovey), John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA (in press)
 4. 早川堯夫：日本薬局方におけるバイオ医薬品の現状と今後、ヒューマンサイエンス、21(1), 28-32 (2010)
 5. 早川堯夫：最近の局方における生物薬品各条及び生物薬品関連試験法の改正について.医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、41, 378-387 (2010)
 6. 前田瑛起、北荘一郎、中世古みなみ、木下充弘、田邊豊重、大庭澄明、早川堯夫、掛樋一晃：日本薬局方一般試験法収載へ向けたSDS-PAGE法及びキャピラリー電気泳動法に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、41, 477-489 (2010)

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）
分担研究報告書

分担研究課題 化学医薬品の試験法及び各条の規格の改正に関する研究
- NMR 法によるインスリンの種差の解析手法開発 -

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 部長 奥田 晴宏

研究要旨 新しい医薬品の品質評価手法の開発を目的として、 $^1\text{H-NMR}$ 法に多変量解析法を組み合わせたタンパク質の品質解析手法の検討を行った。アミノ酸配列の異なる3種のインスリン（ヒト、ウシ、ブタ）について、それぞれ単一および2種と3種混合物を軽水中に混合した試料を調製して $^1\text{H-NMR}$ を測定した後、スペクトル全体を規格化して主成分分析を実施した。その結果、3種のインスリンのアミノ酸配列の相違によるスペクトル変化を第一および第二主成分で特徴づける事に成功した。また、2種および3種インスリンの混合比を主成分分析から予測できることがわかった。従って、本手法は、僅かにアミノ酸配列の異なるインスリンを正確に識別できることを立証し、高分子タンパク質の種差の違いを評価できる新しい品質評価手法としての可能性を示すことができた。

研究協力者

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

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。

A. 研究目的

現在、複雑な高分子医薬品の品質管理を目的として、医薬品原体の生物活性による評価に加えて、SDS-PAGE, CE, MS, HPLC, NMR 等により物理化学的特性が評価されている。しかし、複雑な高分子医薬品の物理化学的特性の変動を、従来の分光学的試験法により検出することは難しく、新しい物理化学的指標や分析手法の開発が要求されている。

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、

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。本手法は近年、メタボロームの分野において尿や血清の代謝成分の解析に有用な手法として注目されている。例えば、薬物を投与した動物の尿や血清の NMR スペクトルを多変量解析することによって、肝障害などの毒性を代謝物の変動からモニターすることが可能となり、本手法を利用した薬物の毒性

評価が報告されている¹。

合成高分子は、分子量や立体配置、モノマー連鎖等が少しずつ異なる化学種の複雑な混合物の場合が多い。この場合、単一物質に分離精製して解析することは困難であるが、複数の成分の構造解析と定量に DOSY や GPC-NMR 法²、固体 NMR 法³、ラマン⁴および赤外分光法⁵等に統計解析処理を組み合わせた手法が応用できるようになった。

我々は、NMR 法は高分子化合物の一次構造や高次構造の情報をスペクトルとして得られることから、統計解析処理を組み合わせることで、統計解析処理を組み合わせることによってペプチド性医薬品の品質評価に利用できないか検討した。そして、¹H-NMR 法で得られたスペクトルデータを主成分分析で解析することによって立体構造の変化や分解物の生成など、品質のわずかな違いを適切に評価できることを既に立証している。

即ち、9 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであるオキシトシン (OXT) は生物医薬品として利用されている。我々は OXT の分解の経時的変化について、まず、二次元 NMR スペクトルから OXT のリン酸緩衝液中での¹H-NMR スペクトルの全帰属と立体構造の予測を行った後、経時的に測定した OXT の¹H-NMR スペクトルについて主成分分析 (PCA) を行うことによって、分解による分子構造の変化と分解物の生成の網羅的解析ができることを明らかにした⁶。本手法はペプチドやタンパク質の品質の劣化が予測可能な新しい評価手法として期待されている。

タンパク質の中には起原の違いによって数個のアミノ酸配列が異なることが多い。NMR は分子の構造情報を得ることができる唯一の分光学的手法であるが、タンパク質などの高分子化合物のスペクトルは複雑となってしまう為、詳細な解析は困難であった。しかしながら、我々は¹H-NMR のスペクトルを多変量解析することによってタンパク質の種差による微妙な

スペクトル差が解析可能と考えた。

本研究事業では、高分子医薬品の物理化学的特性に基づいた品質評価手法の開発を目的として、起原の異なるタンパク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 (図 1A) 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 (図 1B)。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 (図 1C)。

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種差の違いに起因するスペクトル変化の特定を行い、本手法が高分子化合物の品質評価手法の一つとして種差の違いを評価できる統計学的有意な手法であることを検証した。

B. 研究方法

1. 試薬およびサンプル調製法

試薬 : Insulin, Human, Recombinant, Expressed in yeast (CAS# 11061-68-0), Insulin, From Bovine Pancreas (CAS# 11070-73-8) は SIGM-ALDRICH

から購入し, Insulin Porcine (CAS# 12584-58-6) は MP Biomedicals から購入した. Acetonitrile- d_3 , for NMR (CAS# 2206-26-0)は ACROS から購入し, Sodium 3-(trimethylsilyl)-propionate-2, 2, 3, 3, - d_4 (TSP) (CAS# 24493-21-8)は ALDRICH から購入した. 水酸化ナトリウム (NaOH), 塩酸 (HCl) は和光純薬の特級を購入した.

サンプル調製: 各種インスリンをそれぞれ調製した. Insulin 試薬 (7mg) を 0.1 N HCl 溶液に溶解し酸性条件下にした後, 5 mM TSP / D_2O 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 CD_3CN 溶液を 245 μ l 添加し final 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.

表 1. 実験に調製したサンプル数と混合比.

サンプル	A:ヒト, B:ウシ, C:ブタ					
	A	:	B	:	C	
A1	1	-	-	-	-	
B1	-	-	1	-	-	
C1	-	-	-	-	1	
A4B1	4	-	1	-	-	
A1B1	1	-	1	-	-	
A1B4	1	-	4	-	-	
B4C1	-	-	4	-	1	
B1C1	-	-	1	-	1	
B1C4	-	-	1	-	4	
A1C4	1	-	-	-	4	
A1C1	1	-	-	-	1	
A4C1	4	-	-	-	1	
A1B1C1	1	-	1	-	1	
A2B1C1	2	-	1	-	1	
A1B2C1	1	-	2	-	1	
A1B1C2	1	-	1	-	2	

2. 1H -NMR 測定

NMR 測定装置: Varian 600 MHz NMR spectrometer に 1H -NMR 専用コールドプローブを装備.

測定モード: Presaturation NOESY 法 (one-dimensional 1H -NOESY spectra, 298 K). 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.

3. 1H -NMR データを用いた多変量解析法

解析用ソフトウェア: Chenomix NMR SUITE 6.0 software, Multivariate statistical analysis software (SIMCA-P+, version 12.0).

NMR データの集約と前処理: Chenomix 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) を作成した.

多変量解析法: 作成した Excel のデータシートを Umetrix 社製 SIMCA-P+ で主成分分析を行った.

G. 研究結果

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. 代表的な 3 種のインスリン分子種(ヒト, ウシ, ブタ)のスペクトルを図 2 に示す. インスリンの分子にはプロトンの数が 377~383 個あり, 1H -NMR スペクトルでは殆どのシグナルがさらに複雑に分裂している. 従って, 見た目には 3 つのスペクトルの違いを区別することは難しい.

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に, 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を実施した. 主成分分析 (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図 3A, 4A, 5A に示す。また、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が示している。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 (図 3D, 4D, 5D)。

2-1. スペクトル全体 (0.04 - 10.0 ppm) の PCA 解析

図 3A に PCA 解析を実施したスコアプロットの結果を示す。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を示され、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 では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 (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図 3C および図 3D に示す。その結果、図 3C をスコアプロット (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。

2-2. 脂肪族領域 (0.04 - 4.20 ppm) の PCA 解析

図 4A に PCA を実施したスコアプロットの結果を示す。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 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を示され、その位置は混合物の組成比と相関した。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(図4B-1, 4B-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図4Cおよび図4Dに示す。その結果、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。これらのピークは図4D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、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。

2-3. アミド領域(6.00 - 10.0 ppm)のPCA解析

図5AにPCA解析を実施したスコアプロットの結果を示す。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(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。これらのピークはサンプル毎の積分値の変動を示した図6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。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。

2-4. 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 γ H $_2$ 及びB30 ThrのC γ 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 γ に相当し、1.5 ppmはA8 AlaのH $^{\beta 1}$ H $^{\beta 2}$ 及びB30 AlaのH $^{\beta 1}$ H $^{\beta 2}$ 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。

D. 考察

我々は NMR を駆使した新たな分析技術の開発研究をメタボロミクスを含め実施してきた。従来、メタボロームの解析手法として質量分析法が主流であるのは、代謝物質の高感度検出が可能であり、プロファイリングにおいて有用性が広く認められたことが理由の一つと考えられる。しかしながら、質量分析法からの分子構造の決定は困難であることから、近年は NMR を利用したメタボローム解析が注目されており、毒性評価手法の開発およびバイオマーカーの特定に役立っている。我々は、NMR 法によるメタボローム解析手法を高分子医薬品への品質管理に応用すべく研究を行ってきており、あらたな品質評価手法の開発を目指す。

本研究では、3 種のインスリン分子種 (ヒト、ウシ、ブタ) を用いて、僅かにアミノ酸配列が異なる高分子医薬品の解析に NMR 法が有効であるか検討した。

本実験で用いた 3 種のインスリンは、全て 51 個のアミノ酸残基から構成されており、ヒトのアミノ酸配列に対してウシのアミノ酸配列は 3 箇所異なり、ブタのアミノ酸配列は 1 箇所異なっている。通常、分子量 6,000 位の幾つかの高分子化合物の ¹H-NMR を測定しスペクトルを比

較した場合、1~3 個のアミノ酸残基の違いをスペクトルから区別することは極めて困難である。しかしながら、3 種類のインスリンの複雑な ¹H-NMR スペクトルは、統計解析処理をすることによって、数個のアミノ酸残基による種差の違いを判別することに成功した。

これら 3 種類のインスリンは、¹H-NMR スペクトルを PCA で統計処理することによって、数個のアミノ酸残基の違いによる変動を第一主成分 (PC1) と第二主成分 (PC2) で捉えることが可能となり、種差の違いを明確に区別することがわかった。また、スコアプロットでは単独、および 2 種類と 3 種類のインスリン混合物が組成比によって系統的に三角相図に分布することがわかった。このスコアプロットを利用することによって、アミノ酸配列の違いと混合物の組成比の解析が可能となる。

インスリンの ¹H-NMR スペクトルは全領域を縮約したデータの他に、脂肪族領域及び、アミド領域のみの部分的な縮約データについても PCA を実施した。その結果、各スペクトル領域でのスコアプロット (PC1-PC2) の分布はローディングとトレンドプロットによる主成分の解析から、いずれも種に特徴的なアミノ酸の違いを反映しており、3 種のインスリンを明確に区別することができた。さらに、複数の種によるインスリン混合物はスコアプロット上の三角相図に系統的に分布しており、脂肪族領域やアミド領域による部分的なデータを用いても全て判別できることがわかった。例えばスペクトルの全領域、脂肪族領域、およびアミド領域の全ての範囲においてヒトとウシのインスリン (A, C) の混合比は PC1 に大きく依存しており、ヒトとブタのインスリン (A, B) の混合比およびウシとブタのインスリン (B, C) の混合比は主に PC2 に依存している。また、ヒト、ウシ、ブタの 3 種混合物では三角相図のほぼ中心に 1:1:1 混合物が位置し、混合比が変化すると主要な分子種の主成分の影響を受けて相対的