

な位置が変化している。

これらの結果を利用することにより、未知の混合比のインスリンについてもスコアプロットから PC1 または PC2 での相対的な位置を解析することによって混合比の予測が可能となる。アミド領域のみのスコアプロット (図 5A) でも、スペクトル全体 (図 3A) および脂肪族領域 (図 4A) と同様の傾向を示していることは特筆すべきであり、アミド領域を PCA で統計解析することによって3種のインスリン種差の区別が可能であることが示された。

以上、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを PCA で統計解析して明らかとなった主成分は、インスリンの種差に伴うアミノ酸残基の一次構造を反映しており、 $^1\text{H-NMR}$ と PCA を組み合わせた手法が医薬品の品質評価法として利用できる可能性が明らかにされた。

高分子医薬品の薬理活性は分子の高次構造に大きく依存しているが、高次構造は従来の分析方法で評価することは難しい。しかし、タンパク質の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルには、アミノ酸残基の一次構造情報に加えて溶液中の高次構造を含む分子の立体構造に関わる情報が多く含まれていることから、医薬品の品質に関わる高次構造の解析には $^1\text{H-NMR}$ が有用な手法として考えられる。

本実験では、種差に伴うインスリンの一次構造の違いが PCA の結果に大きく反映したが、主成分の変動に起因するシグナルの中で、種差に特徴的なアミノ酸の一次構造に帰属できないシグナルも複数存在し、高次構造の違いも主成分に反映されていることが推測された。この結果は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いた統計解析手法が高分子の高次構造の評価にも有効であることを示唆している。現在、3種のインスリンの高次構造の違いを検討するために、空間的に近い水素原子の相対配置を帰属する NOESY 測定法を実施することにより、本実験の PCA 解析結果がインスリンの高次構造の違いにつ

いてどのように反映しているか検討中である。

E. 結論

我々は NMR の新たな分析応用を目指して研究を実施している。近年、メタボロミクスは主として代謝物の網羅的解析法として生体内あるいは細胞内の薬物代謝物の毒性予測や毒性のバイオマーカーの同定に応用されており、安全性予測性研究の評価手法としての利用が検討されている。一方で、メタボロミクスに用いられた解析手法は、医薬品の物理化学的特性に基づいた品質評価手法への応用にも期待される。本研究では、複雑な分子構造をもつ高分子医薬品に着目し、その一例として、異なる動物種に由来し、アミノ酸配列の異なる3種のインスリンを用いて、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルと統計解析手法を組み合わせた新たな特性解析手法の有用性について検討した。その結果、PCA による多変量解析がインスリン種差の違いをパターン認識できることが明らかとなった。また、ローディングプロットで主成分軸の変動に伴う数値 (ppm) を解析した結果、各種インスリンに特徴的なアミノ酸残基に由来するピークを抽出することができた。

以上、本解析手法はアミノ酸の一次配列の違いを認識できることから、タンパク性高分子化合物の種差の違いを評価できる品質評価手法としての可能性が示された。今後は、本手法を用いてインスリンの分解に伴う経時的変化について網羅的解析を行い、インスリンの安定性についての評価手法を検討する予定である。

F. 参考文献

1. (a) Coen, M.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K., NMR-based metabolic profiling and metabonomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem Res*

- Toxicol* **2008**, *21* (1), 9-27; (b) Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E., Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (2), 153-61.
2. Van Gorkom, L. C. M.; Hancewicz, T. M., Analysis of DOSY and GPC-NMR Experiments on Polymers by Multivariate Curve Resolution. *J Magn Reson* **1998**, *130* (1), 125-30.
3. Sivonen, H.; Nuopponen, M.; Maunu, S. L.; Sundholm, F.; Vuorinen, T., Carbon-thirteen cross-polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared studies of thermally modified wood exposed to brown and soft rot fungi. *Appl Spectrosc* **2003**, *57* (3), 266-73.
4. Strachan, C. J.; Rades, T.; Gordon, K. C.; Rantanen, J., Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. *J Pharm Pharmacol* **2007**, *59* (2), 179-92.
5. Muehlethaler, C.; Massonnet, G.; Esseiva, P., The application of chemometrics on Infrared and Raman spectra as a tool for the forensic analysis of paints. *Forensic Sci Int* **2011**.
6. Ohno, A.; Kawasaki, N.; Fukuhara, K.; Okuda, H.; Yamaguchi, T., 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 (Tokyo)* **2009**, *57* (12), 1396-9.

G. 健康危険情報

なし。

H. 研究発表

1. 論文発表

A. Ohno, N. Kawasaki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Yamaguchi, Complete NMR analysis of oxytocin in phosphate buffer, *Magn. Reson. Chem.*, **48**, 168-172 (2010).

2. 学会発表

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).

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).

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).

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).

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).

I. 知的財産権の出願・登録状況

登録および登録予定共になし。

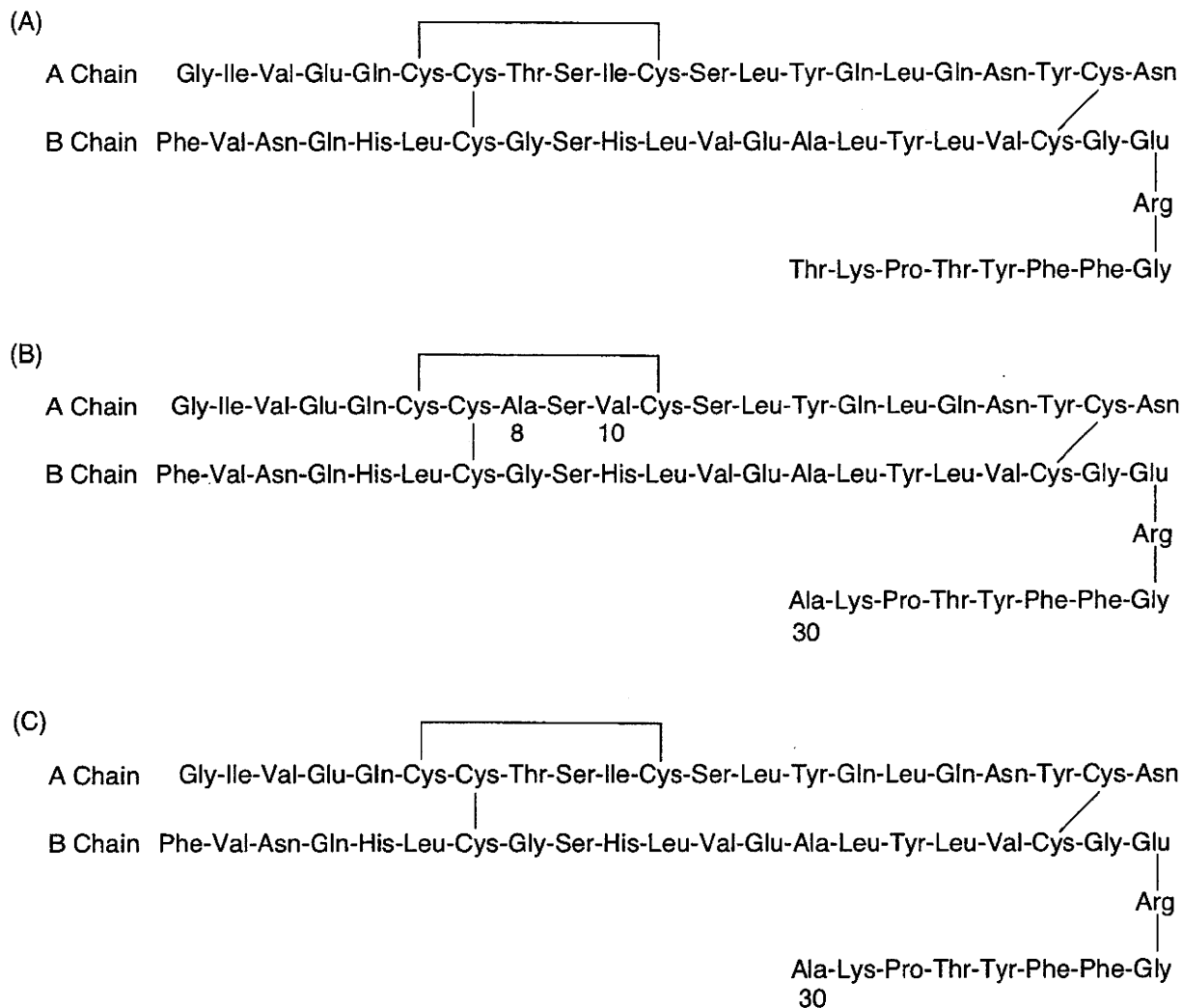


図 1. ヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) のインスリンのアミノ酸配列

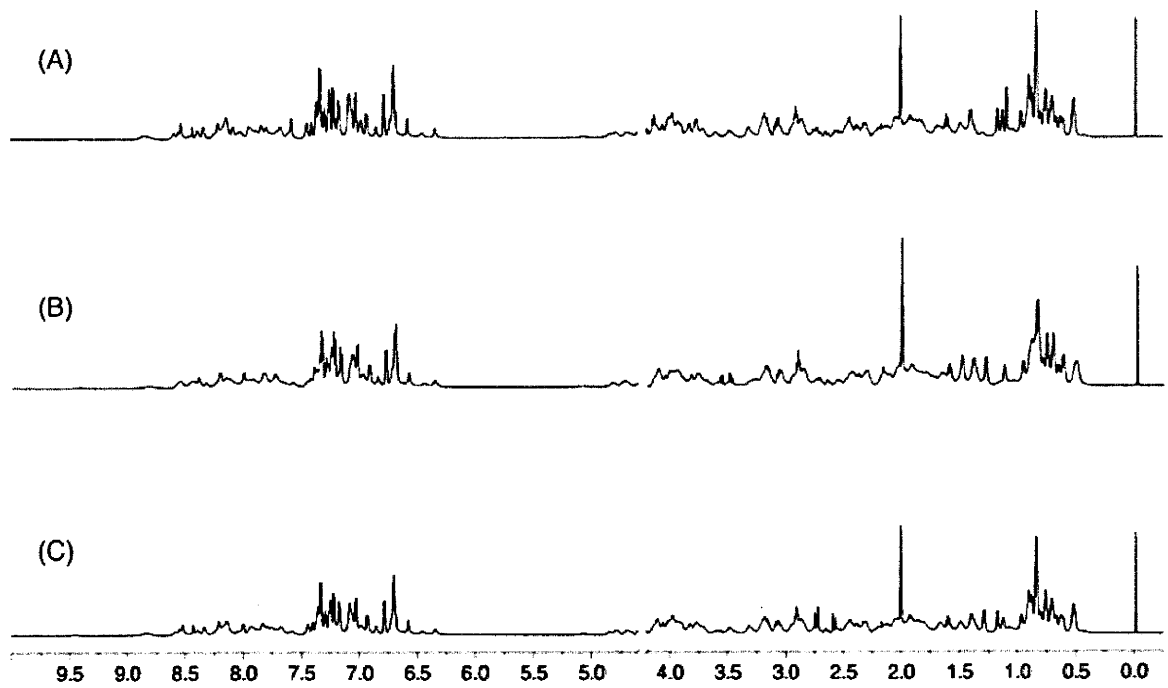


図 2. ヒト (A), ウシ (B), ブタ (C) のインスリンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

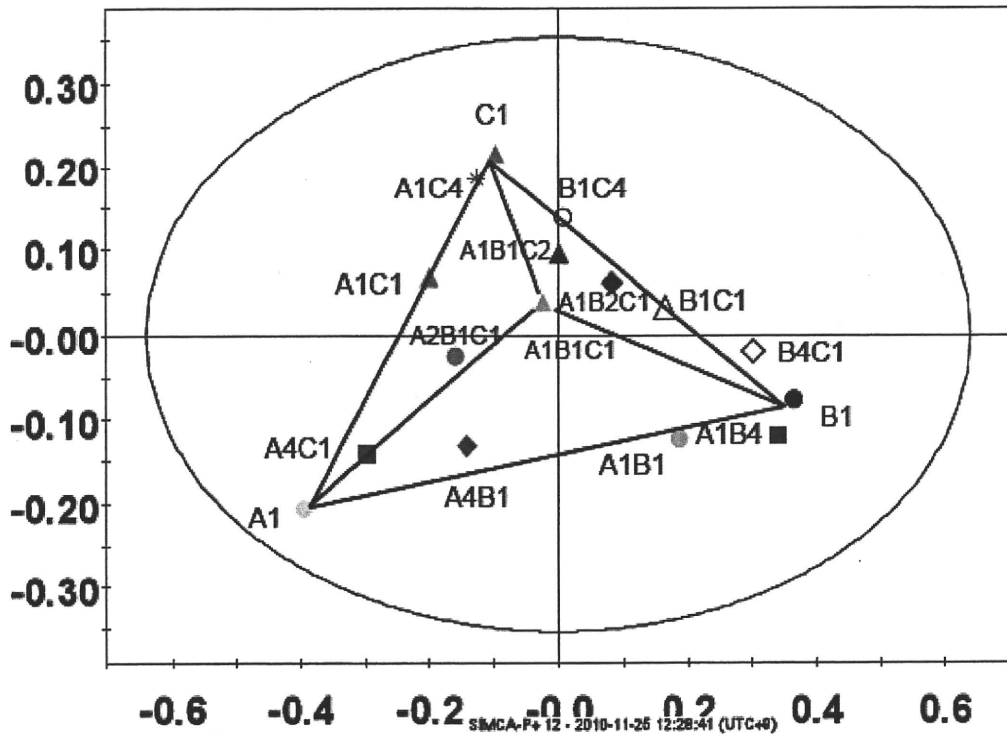
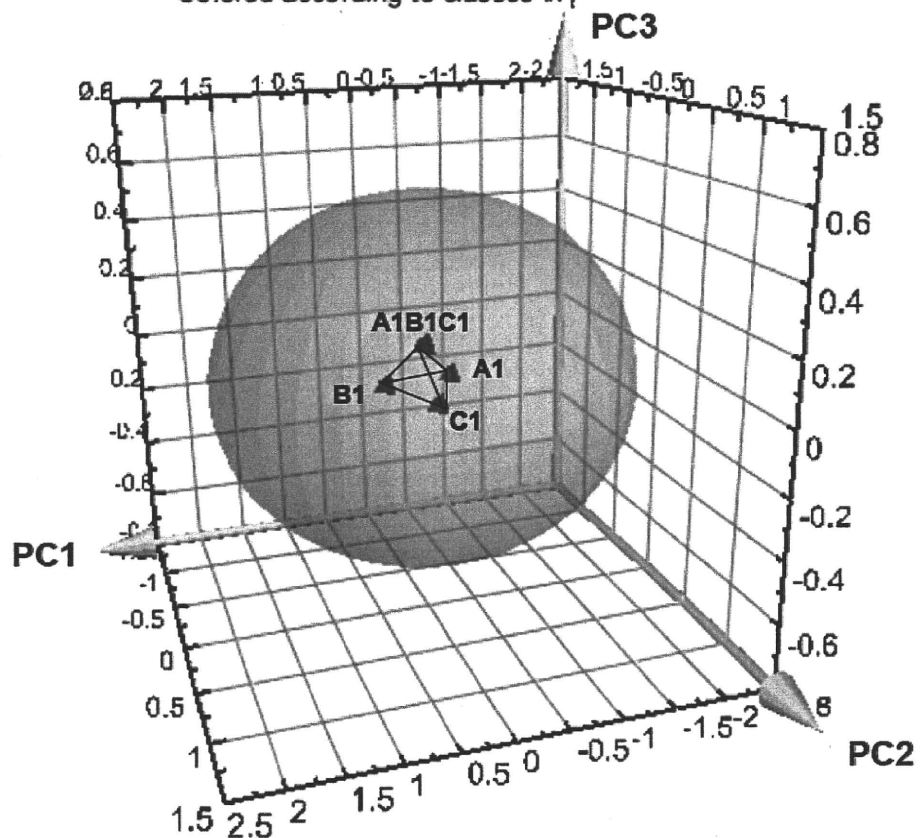


図 3A. スペクトル全領域のスコアプロット (PC1/2)

Insulin abc BinningResults1.M2 (PCA-X)
 t[Comp. 1]/t[Comp. 2]/t[Comp. 3]
 Colored according to classes in M2



R2X[1] = 0.714916 R2X[2] = 0.229551 R2X[3] = 0.0555329

図 3B-1. スペクトル全領域の三次元スコアプロット (PC1/2/3)

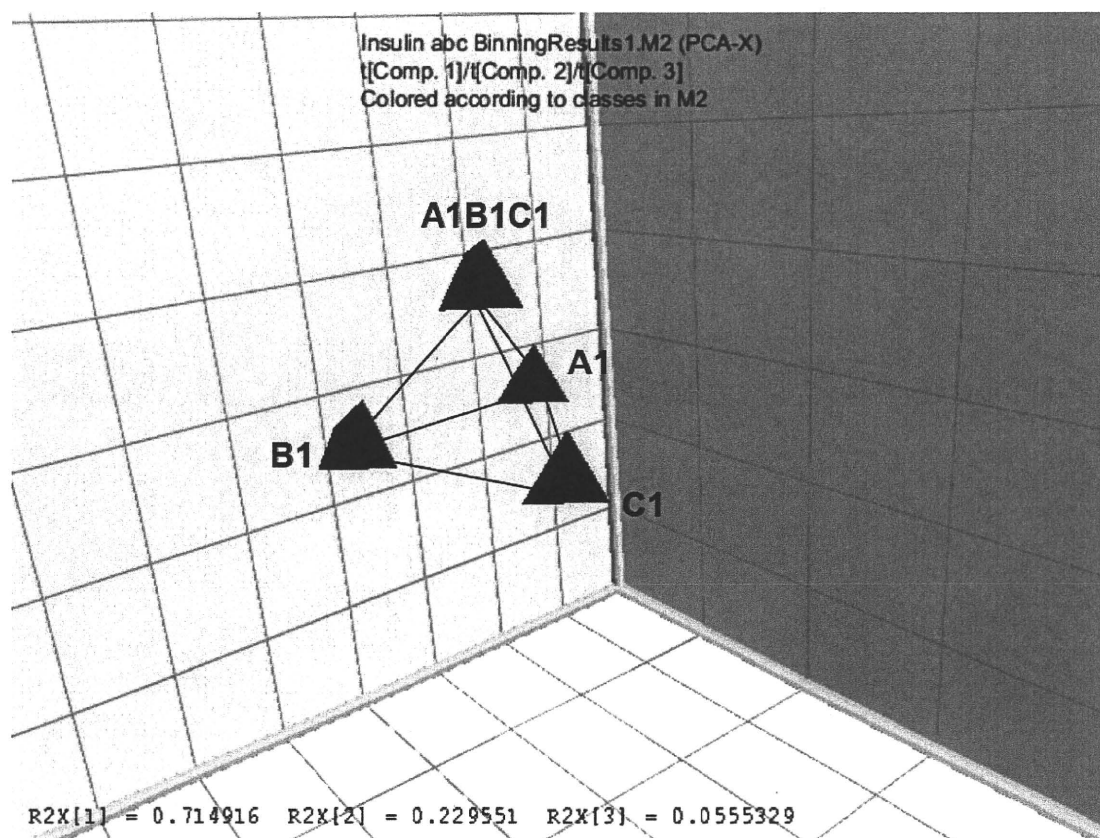


図 3B-2. スペクトル全領域の三次元スコアプロット (PC1/2/3) : 拡大図

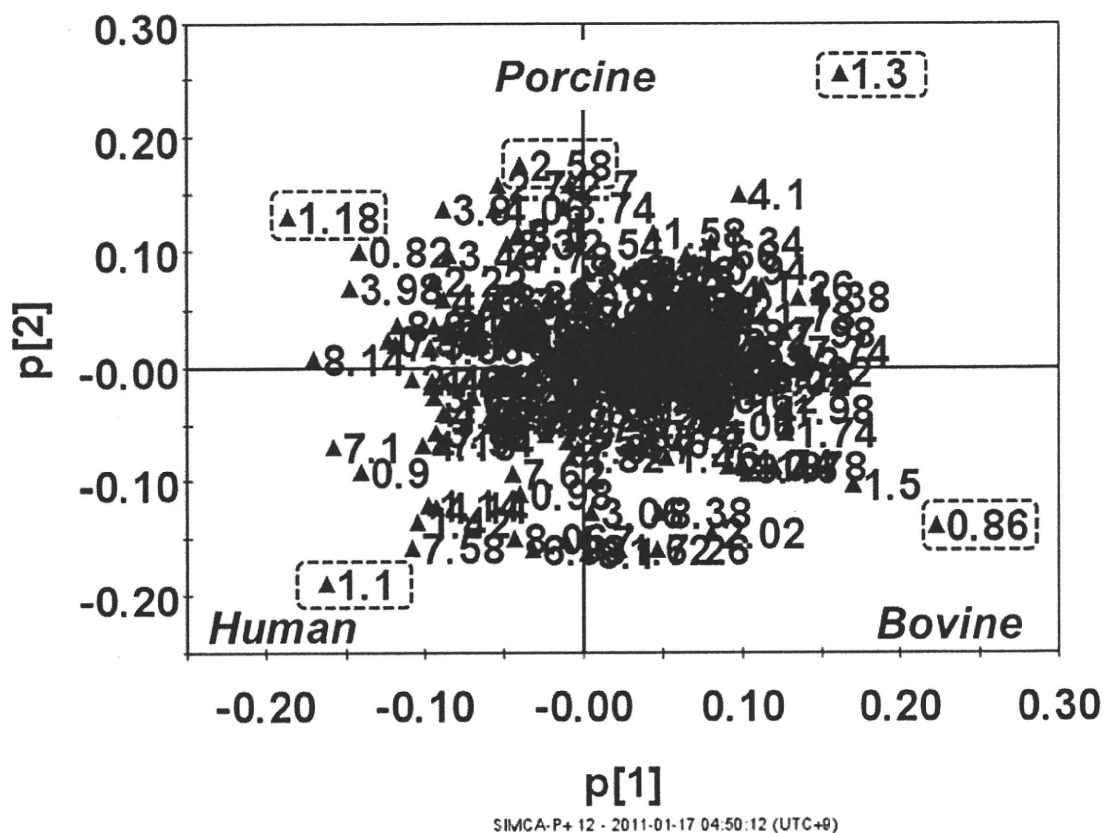


図 3C. スペクトル全領域のローディングプロット (PC1/2)

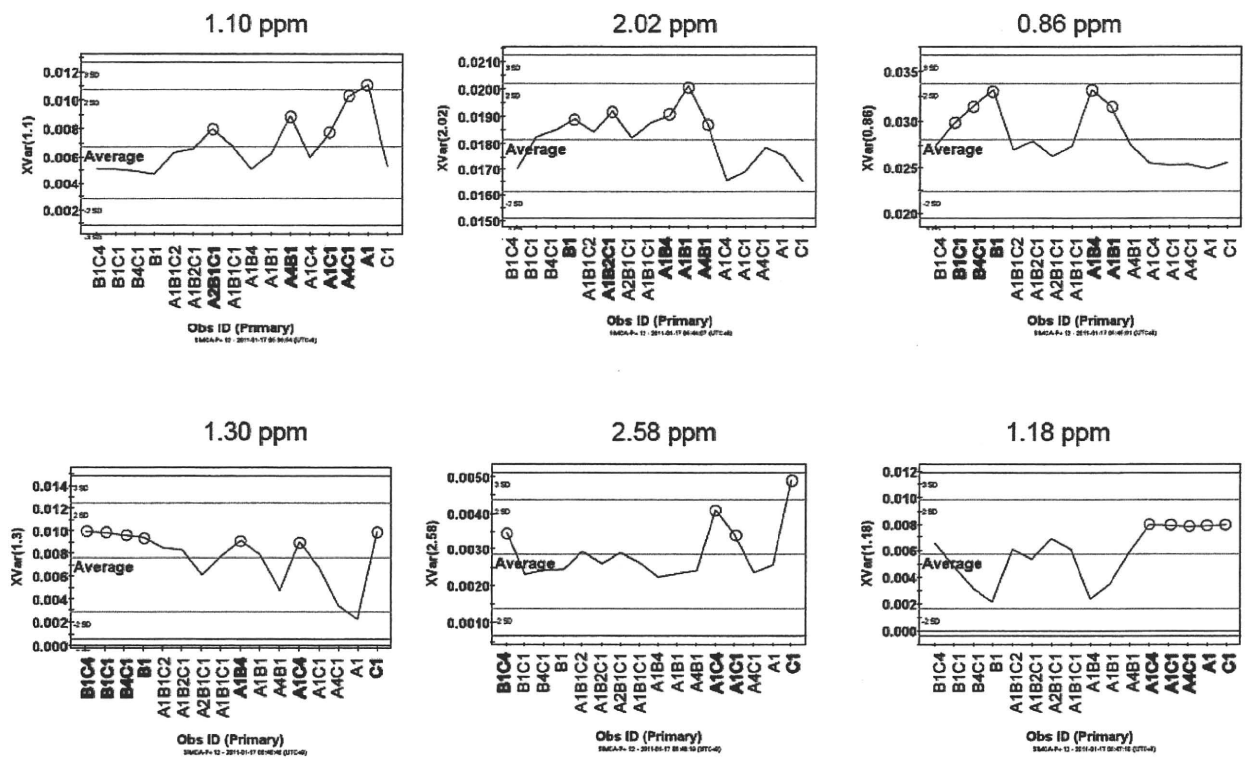


図 3D. スペクトル全領域の主な変動成分のトレンドプロット

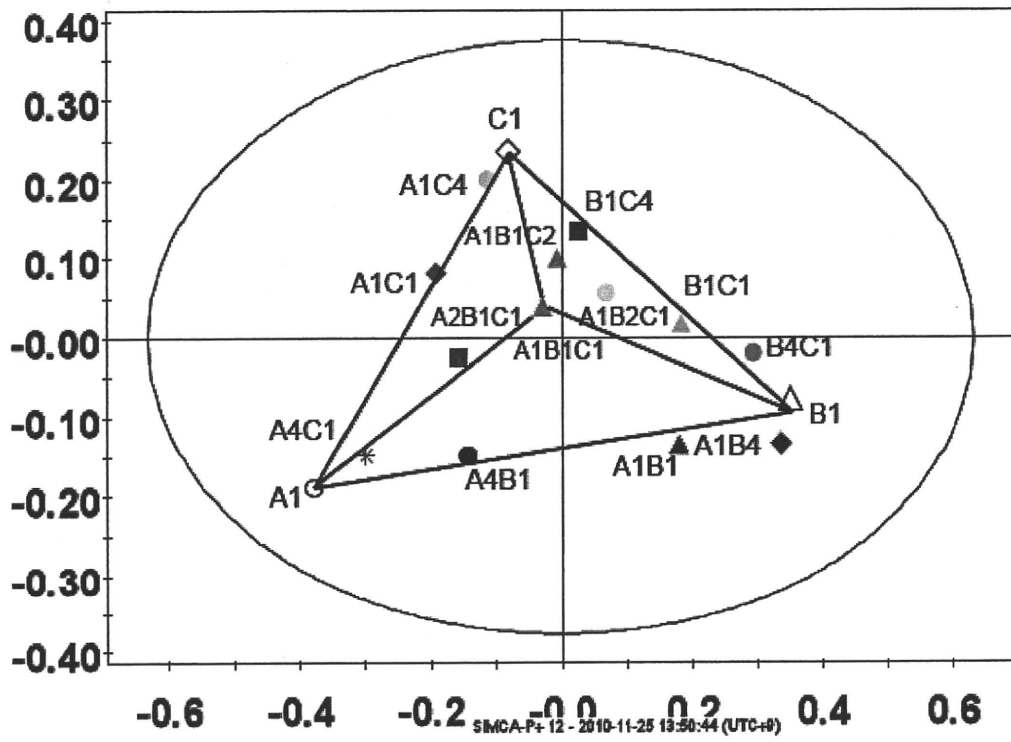
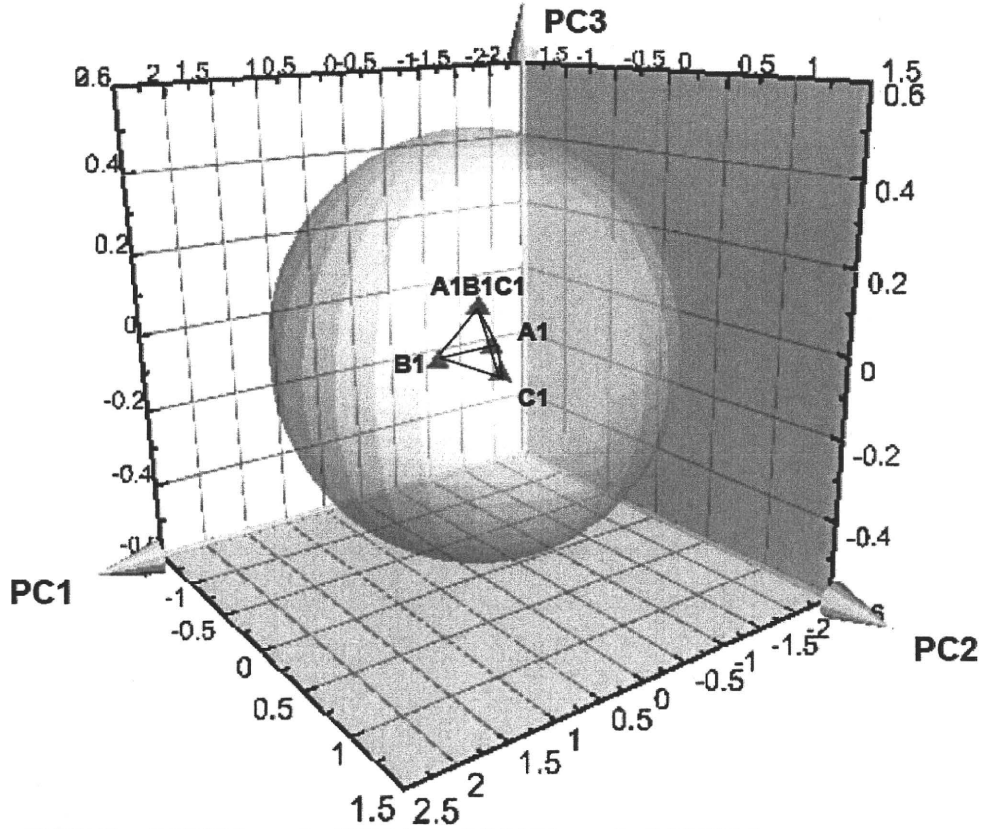


図 4A. 脂肪族領域のスコアプロット (PC1/2)

Insulin BinningResults aliphatic2.M2 (PCA-X)
 t[Comp. 1]/t[Comp. 2]/t[Comp. 3]
 Colored according to classes in M2



R2X[1] = 0.705379 R2X[2] = 0.25004 R2X[3] = 0.0445806

図 4B-1. 脂肪族全領域の三次元スコアプロット (PC1/2/3)

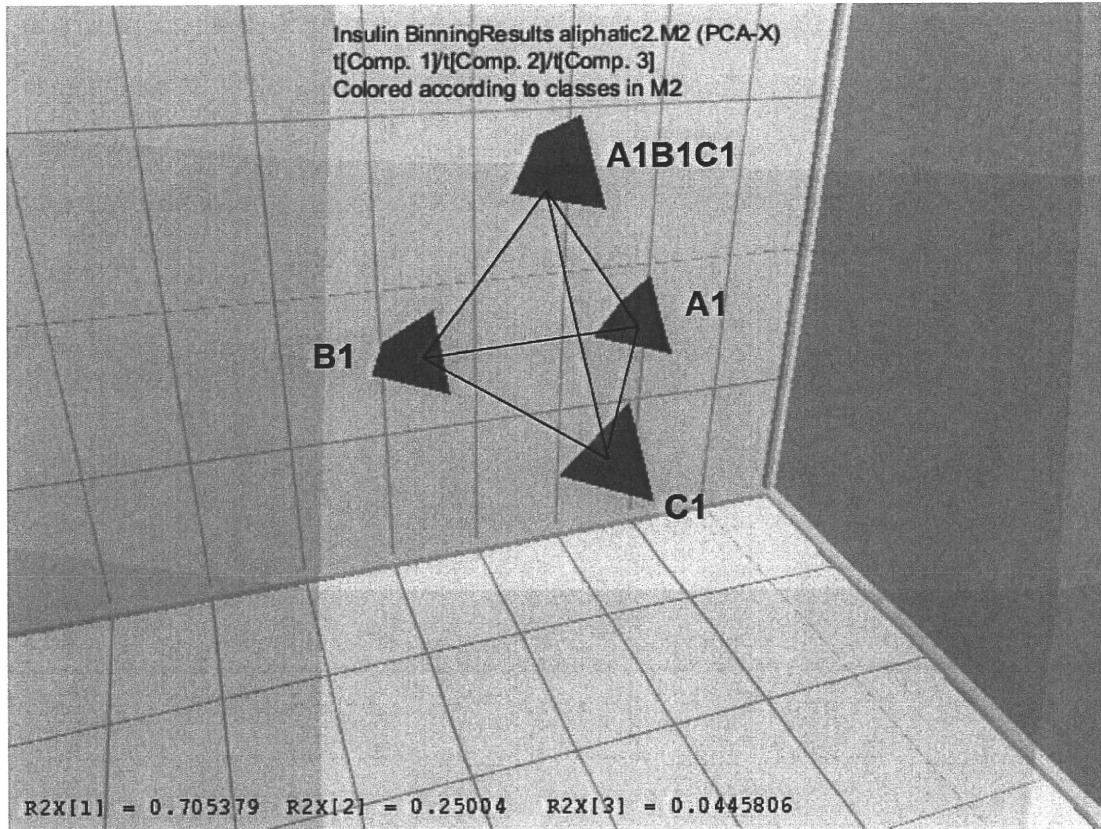


図 4B-2. 脂肪族領域の三次元スコアプロット (PC1/2/3) : 拡大図

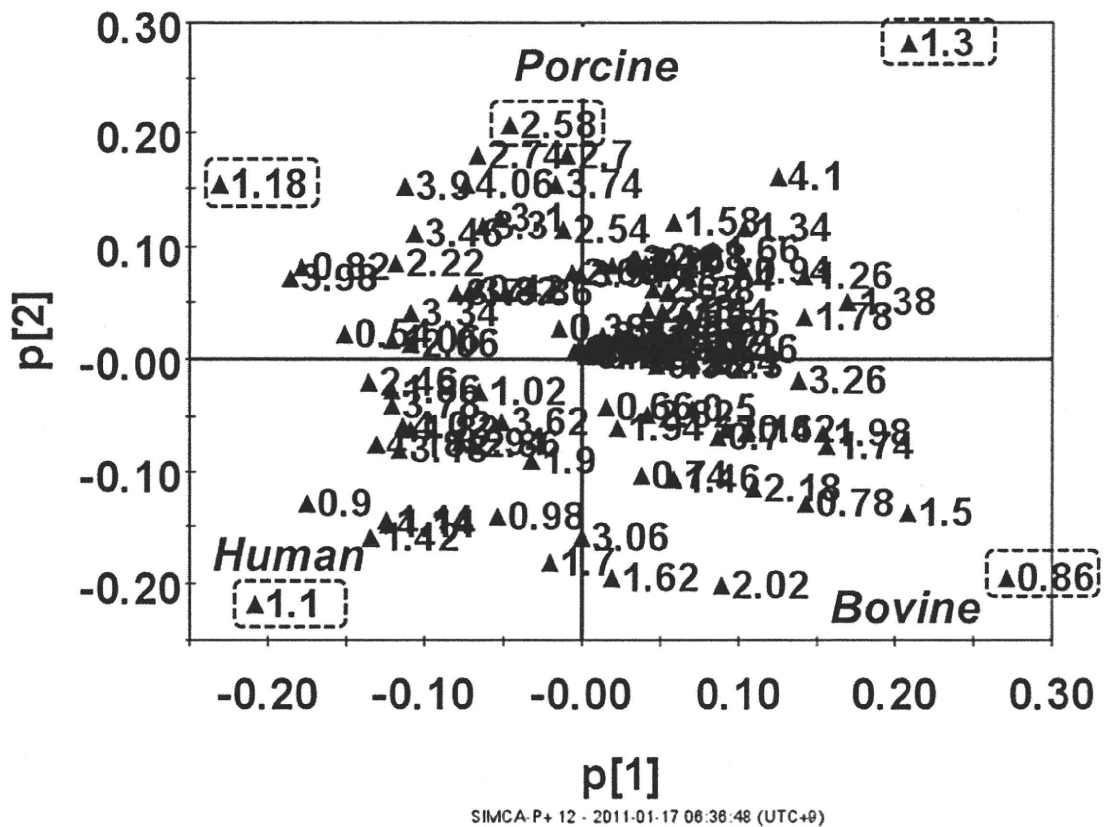


図 4C. 脂肪族領域のローディングプロット (PC1/2)

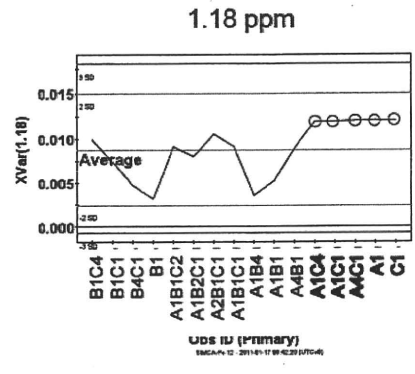
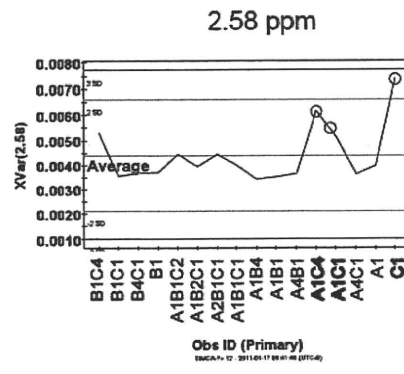
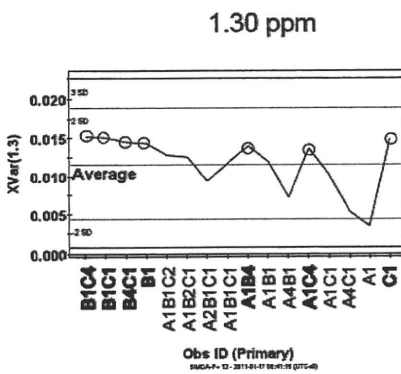
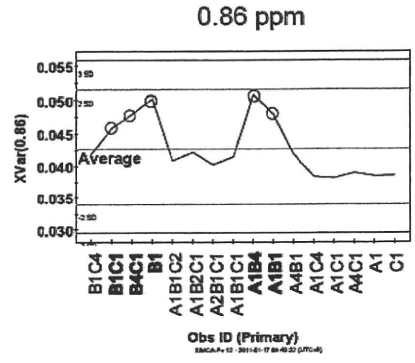
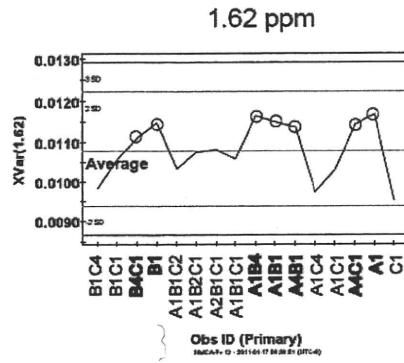
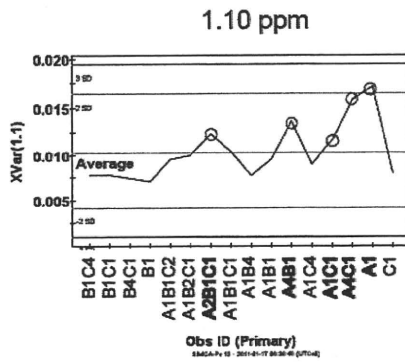


図 4D. 脂肪族領域の主な変動成分のトレンドプロット

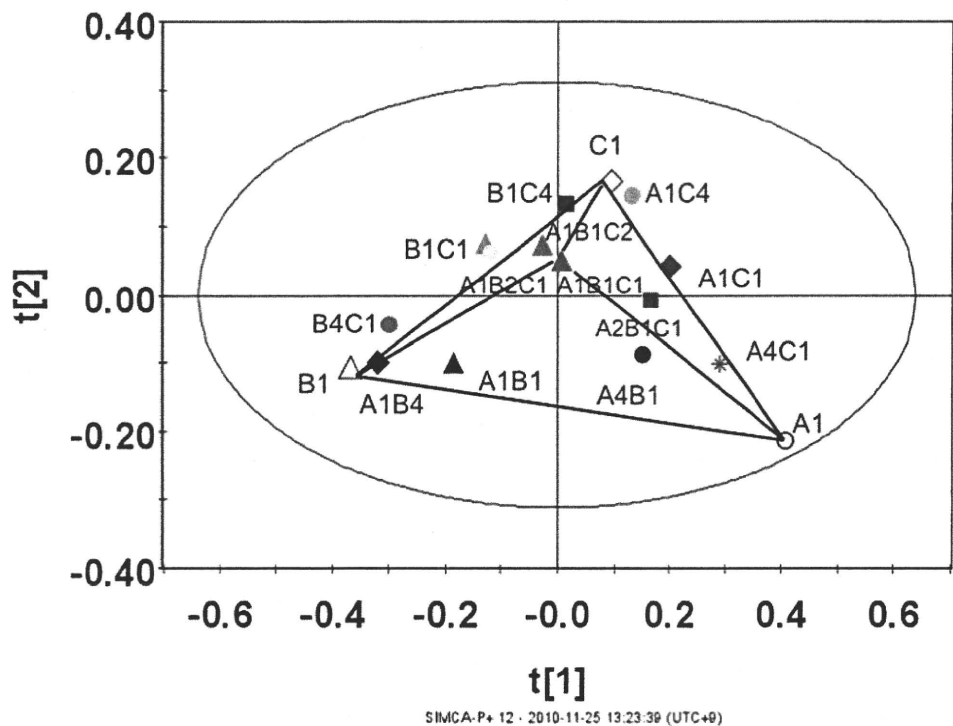
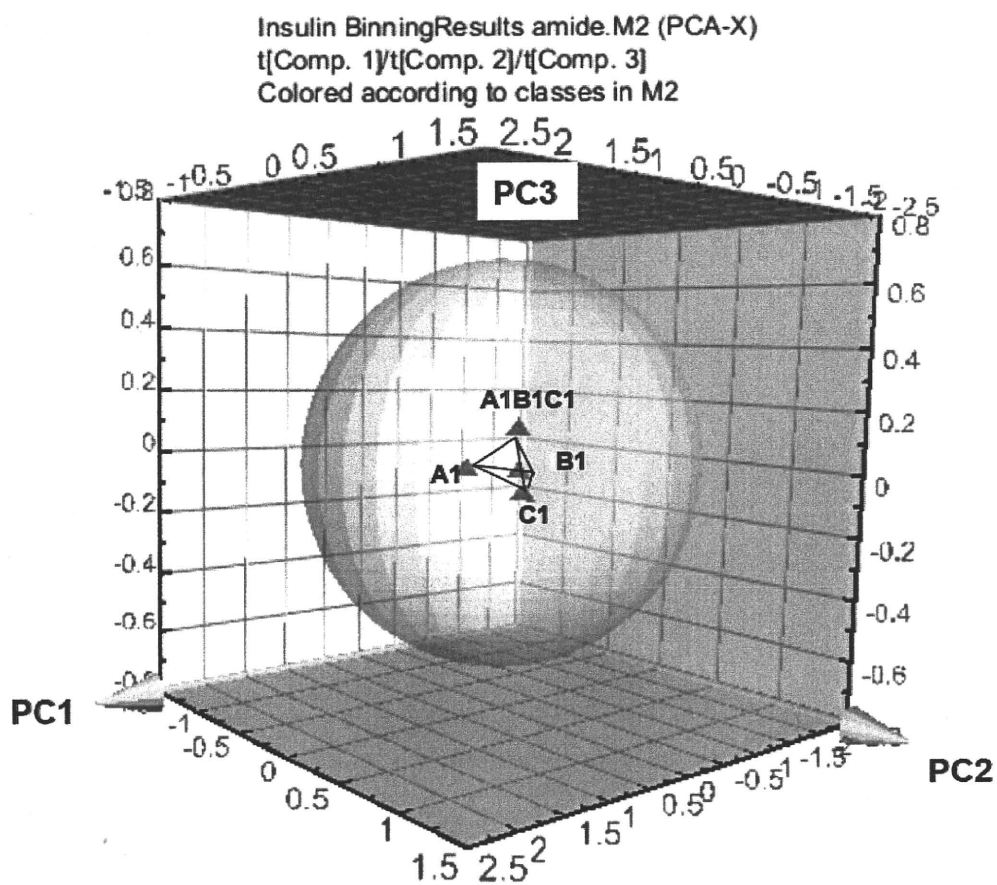


図 5A. アミド領域のスコアプロット (PC1/2)



R2X[1] = 0.7287 R2X[2] = 0.201914 R2X[3] = 0.0693861

図 5B-1. アミド全領域の三次元スコアプロット (PC1/2/3)

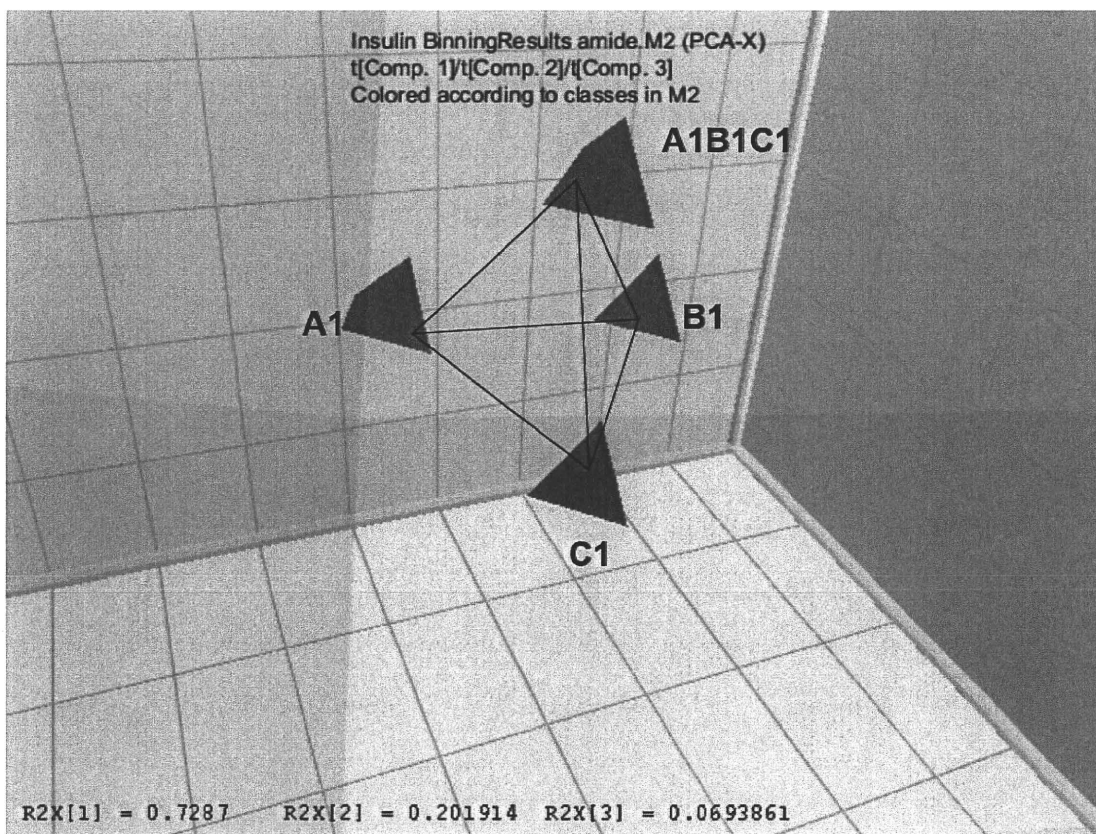


図 5B-2. アミド領域の三次元スコアプロット (PC1/2/3) : 拡大図

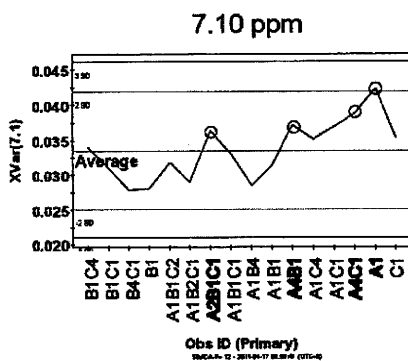
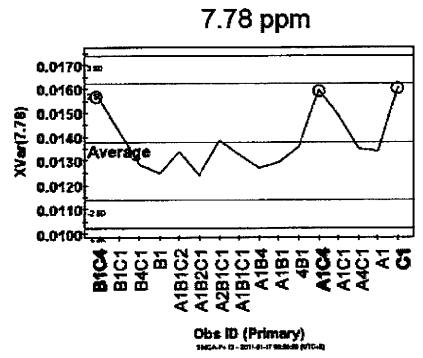
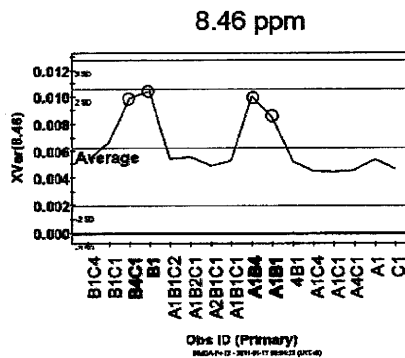
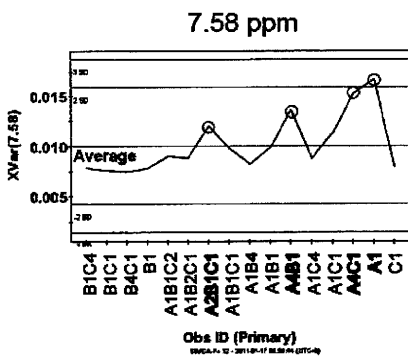


図 5D. アミド領域の主な変動成分のトレンドプロット

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

生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

分担研究者 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部部长
協力研究者 橋井則貴 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室長
協力研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室長

研究要旨 糖タンパク質医薬品の糖鎖試験法策定の一環として、モデル糖タンパク質の LC/MS を実施し、糖鎖の LC/MS の要件を明らかにした。また、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。

1. 研究目的

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収載される予定である。多糖類としては、古くからヘパリンナトリウムが収載されている。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収載されている。

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(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、米国薬局方(USP)や欧州薬局方(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に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、