

(1) 新規項目

① 一般試験法

微量熱量分析 Microcalorimetry :
G-16 Thermal Analysis で提案された調和案のうち、解説的な部分について切り分け、新たに作成された試験法である。JP は不参可を表明したため、EP/USP の二局間調和が進められ、JP は全項目を(-)として、合意署名された。

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)
- ・ Gelatin, gelling type and non-belling type (ゼラチン (ゲル化タイプ・非ゲル化タイプ)) :
2012.6 ゲル化タイプ (JP16 一部改正(2013.5)収載予定), 非ゲル化タイプは JP 不参加。
- ・ D-Mannitol (マンニトール) :
2012.6 (JP16 第二追補 (2014.3) 収載予定)

(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))

- ・ Bacterial Endotoxins (エンドトキシン試験法) Revision 2 : 2011.6
(JP16 (2011.3) および JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : レフェリー試験等の改定)
- ・ Bulk and Tapped Density (かさ密度及びタップ密度測定法) Revision 2 : 2011.6 (JP16 (2011.3) および JP16 第一追補 (2012.9) 収載予定)
(改訂内容 : 2 箇所目の「cubic」の修正)

② 医薬品添加物

- ・ Butyl Parahydroxybenzoate (パラオキシ安息香酸ブチル) Revision1 : 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)
 - Benzyl Alcohol, (ベンジルアルコール) Corr. 1 : 2011.6 (JP16 第二追補(2012.9) 収載予定)
(改定内容: 定量法の試薬ピロジンの規格を変更)
 - Calcium Phosphate Dibasic (リン酸水素カルシウム) Revision 1 : 2011.6 (JP16 第二追補(2012.9) 収載予定)
(改定内容:改正箇所:純度試験(塩化物, 硫化物), 定量法, 試薬試液)
 - Starch, Potato (バレイショデンプン) Revision 2 : 2011.6 (JP16 第二追補(2012.9) 収載予定)
(改定内容: 純度試験 二酸化イオウ, 微生物限度)
 - Starch, Wheat (コムギデンプン) Revision 2 : 2011.6 (P16 第二追補(2012.9) 収載予定)
(改定内容: 純度試験 二酸化イオウ, 微生物限度)
 - Carmellose (カルメロース) Revision 1 : 2011.11 (P16 第一追補(2012.9) 収載予定)
(改定内容: 化学名と確認試験 IR の記載)
 - Hydroxypropylmethylcellulose (ヒドロキシプロピルメチルセルロース) Revision 1 : 2012.6 (JP16 第二追補(2014.3) 収載予定)
(改定内容: 粘度, 定量法)
 - Methylcellulose (メチルセルロース) Revision 2 : 2012.6 (JP16 第二追補(2014.3) 収載予定)
(改定内容: 粘度, 定量法)
 - Starch, Corn (トウモロコシデンプン) Revision 3 : 2012.6 (JP16 第二追補(2014.3) 収載予定)
(改定内容: 純度試験(塩化物, 硫化物), 定量法, 試薬試液)
 - Ethanol (エタノール) Revision 2 : 2012.11 (JP16 第二追補(2014.3) 収載予定)
(改定内容: 純度試験 吸光度, 試薬試液)
 - Ethanol, Anhydrous (無水エタノール) Revision 2 : 2012.11 (JP16 第二追補(2014.3) 収載予定)
(改定内容: 純度試験 吸光度, 試薬試液)
 - Cellulose Acetate (酢酸セルロース) Revision 2 : 2012.11 (JP 不参加)
- (3) 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

- ・ Methyl paraben (Rev 1) (メチルパラベン) Correction1: : 2011.11 (JP16 第二追補 (2012.9) 収載予定)
(訂正内容: 確認試験法 IR)
- ・ Ethyl paraben (Rev 1) (エチルパラベン) Correction1: : 2011.11 (JP16 第二追補 (2012.9) 収載予定)
(訂正内容: 確認試験法 IR)
- ・ Propyl paraben (Rev 1) (プロピルパラベン) Correction1: : 2011.11 (JP16 第二追補 (2012.9) 収載予定)
(訂正内容: 確認試験法 IR)
- ・ Cellulose Acetate Phthalate, (酢酸セルロースフタル酸エステル) Revision1.Corr. 1: : 2012.6 (JP16 第一追補 (2012.9) 収載済)
(訂正内容: 確認試験 IR)
- ・ Magnesium Stearate (ステアリン酸マグネシウム) Correction2: : 2012.6 (JP16 第一追補 (2012.9) 収載済)
(訂正内容: 純度試験 硫酸塩)
- ・ Gelatin (ゼラチン) Correction1: : 2012.11 (JP16 一部改正(2013.5) 収載予定)
(訂正内容: 純度試験 過酸化物)

(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)

- ・ Uniformity of Dosage Units (製剤均一性試験法): 2011.6 (改訂内容: 2%exemption の規定に関して, 署名ページの改定 (EP が Local requirement を記載) 本文の改定はない)

(5) 国際調和した総計項目数/全項目数

- ① 一般試験法: 28 項目/35 項目
- ② 医薬品添加物: 43 項目/62 項目

2. 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

2010年11月の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規則な活動を残して、定期的なQ4B専門家会議は終了した。その後の進捗は以下の通りである。

(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 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。
- ③ 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。

- ④ 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を採用できる)についてはUSPからは削除することとなった。この方向についてはQ4Bの了解がえられており、各局への取り込みを確認するため各局方への取載を待っているところである。
- ⑤ Bacterial Endotoxins (エンドトキシン試験法)： 各局への取り込みを確認し、2012年10月18日にStep 4合意署名を行った。日本国内では2013年3月21日に施行した。
- ⑥ Bulk and Tapped Density (かさ密度及びタップ密度測定法)： Step 4合意署名を2012年6月8日に行った。日本国内では2012年11月8日に施行した。

3. PDG 調和文書の改定の状況

(1) 一般試験法

- ① Uniformity of Dosage Units (製剤均一性試験)： EPから提案された製剤均一性試験の適用除外とされる外用の皮膚適用製剤に「別に規定するものの他、液剤」を加えることについては3局で合意は得られているが、EPからはさらに半固形製剤でOne-doseあるいはmetered doseの容器に入れたsystematicな効果を期待する経皮吸収製剤について、製剤均一試験法を適用することを明示するための(表6.01-1を補う)表を作成するという追加的な改正が提示された。これに対してUSPは、製剤均一性試験法の表1の「その

他」について、より具体的な製剤名を入れることの提案を行った。これらの改正提案について検討を行うため、取りまとめをしているUSPが三局の専門家間の電話会議の開催を提案しており、調整を行っているところである。

(2) 医薬品添加物

調和作業を行っている添加物の中で、代表的なものについて進捗状況をまとめた

- ① Glucose Monohydrate/Anhydrous (グルコース水和物/非水和物)： Stage 4rev提案がEPからされているが、JPの最大の懸案事項は、類縁物質の規格値であり、日本国内のメーカーからEPが提案する規格値には対応不可との意見が届いた。ただし、規格外となる多くは血液透析剤の原料として用いられている製品であった。JPは、国際調和規格を「精製ブドウ糖」として新規取載各条として取り入れる方針案について説明したが、引き続き三局での意見交換が継続している。
- ② Silicon Dioxide/Colloidal (二酸化ケイ素/コロイド状二酸化ケイ素)： 残された一番大きな課題は、強熱残分試験におけるマッフル炉の温度条件であり、USPが規定している1000℃では日本国内のQCラボでの実験が困難なため、850~900℃のJP規格を再度提案する予定でいたが、EPから、この温度領域では875℃という設定はコントロールが難しいので、50℃刻み(850や900℃)で良いのではないかとのコメントがあった。USPはすでに1000℃を設定しているため、JPから提供されたサンプルで850℃と1000℃と比較したところ、強熱残分に差が見いだされた。以上のデータをもとにさらに意見交換を継続

している。

③Propylene Glycol (プロピレングリコール)： EP は IPEC America から提案されていた含量下限の 99.7% を認める方向で、さらに異図的混入物である EG, DEG の規格について USP と調和することを望んでおり、試験法のバリデーションデータなどの提供を USP に要請していた。JP はこれまで異図的混入物の規格は調和文書に取り込まない方針を主張してきた。本品目については、独自の純度試験の規格を国内向けに検討しており、2011 年 12 月に意見公募を実施していた（第一追補掲載は見送りとされ、第二追補に向けて継続審議中）。EP の専門家委員会は、本品目について EP の Potential Adulteration として EG, DEG の純度試験を各条に設定することを了承し、さらに国際調和された試験の設定を目指す方針を採択し、EP から USP に対して、試験法のバリデーションデータを含めた提供が改めて要請され、USP は応じる方向で検討を進める旨が回答された。JP からは、現在、独自に EG, DEG の純度試験の設定を検討している旨を説明し、情報交換に参加する旨を申し出た。ただし JP では、異図的混入物への対応として、薬局方の規格試験だけでは不十分であることから、これらの規格試験を PDG で調和する方針が了解されていないため、今後、JP 内部での議論を進める旨を説明した。本品目は stage3 に戻して、検討を進めることとされた。

④Lactose Monohydrate (乳酸一水和物)： USP から、非調和事項とされている溶状について、調和モノグラフに含める提案がなされているが、提案の溶状の規格試験について、日本国内の製品について実施したところ、ロッ

トアウトとなる製品や、試験の再現性が得られないなどの問題が発生し、JP 専門委員が試験条件・操作の改良も含めて、検討を継続していることを報告した。これに対し、EP は調査、回答することとしている。

⑤Sodium Chloride (塩化ナトリウム) Revision3： EP から、非調和事項とされている溶状について、調和モノグラフに含める提案がなされている。JP は、提案の溶状試験では、比較液の色が濃すぎるため、少し着色のある粗悪品まで許容してしまう可能性が示唆した。日本の業界からは、比較液を立てずに無色を確認する「現行の日局の規格」の維持が希望されている。USP からは、注射剤用途以外では、色の規格は重要ではないのではないかとの意見が示された。引き続き検討を継続している。

4. 国際調和の候補課題について

(1) 保存効力試験

JP 生物試験法委員会において、保存効力試験について調和再開が提案された。本試験法は 1996 年ごろ PDG で検討されており、stage5 の提案もなされていたが、その後の検討で、JP と EP では出荷試験として使われていないこと、評価方法が大きく異なることから、ペンディングとなり、その後、立ち消えとなっていた。そこで、調和再開に関して EP、USP に意見を求めた。

EP から、位置づけが異なる試験法の調和は、現在でも困難が伴うのではないかとの個人的見解があった。ただし、最終的な判断は専門家委員会で決定するため、JP から正式なコンセプトペーパーが送付されれば、各局の専門家委員会での検討を実施すると結論に至った。

(2) バイオ医薬品宿主由来タンパク質の試験

USP のバイオ医薬品の担当者から、現在改訂中の試験法に加えて、EP が取り組んでいる「宿主由来タンパク質の試験法」に USP は興味を持っており、今後、USP は EP と密に連絡をとって検討を進めていきたいとの提案があった。JP では、提案の内容について専門家委員会に持ち帰り、検討すると回答した。また、糖鎖試験法についても、USP と EP の試験法が近い内容であるため、将来的な調和試験法の候補となりうるのではないかとのコメントがあった。

5. 薬局方の国際調和に関する話題

(1) 調和文書の公開について

東京会議で JP から stage 6 の調和文書を公開可能な文書として、各薬局方の web 上に掲載することを提案した。ただし、その掲載時期や公開範囲については、PDG で議論する必要があるとの見解を示した。それに対し、EP から、調和文書は 3 局関係者の内部文書であり、外部者がこの文書を理解するためには補足情報が必要であるとの指摘がなされた。そのため、調和文書の無制限の公開は、関係者の誤解や混乱を招くことになり控えるべきであるとの意見が述べられた。また、調和文書の公開よりも、EP 5.8 Pharmacopoeial Harmonisation のように、調和文とローカルテキストの違いについて十分説明することの方が大切だという意見もあった。そのため、今回の会議では Web 上での公開については、3 局の同意が得られなかった。しかしながら、3 局以外の薬局方や規制当局者から、調和文書の公開を求められた場合には、関係者限りでの利用を前提に、十分な説明を補足して、調和文書を提供することが了解された。

ロックビル会議では、EP から、EP 参考情報 5.8 の国際調和の章に掲載予定のドラフトが送付された。内容は調和文書のカバ

ーレーターとほとんど同じ内容で、原本と比べて、直筆サインや Revision ナンバーなどがないため、少し見やすくなっている程度であった。日局としては、比較表を本体には入れることは難しいので、USP と同様に Web サイトなどを活用して、情報提供は可能である旨を回答した。この点に加えて、EP は 2010 年に改訂された新しい Working Procedure に沿って、非調和事項：ブラックダイヤモンド、ローカル規定：ホワイトダイヤモンドの各条記載の運用を開始するとの連絡を事前に送付していた。ホワイトダイヤモンドの運用開始については、各局の事情があることから、USP も具体的な施行時期を明示しなかった。議論の結果、3 薬局方において、ダイヤモンドによる調和文書との齟齬部分を明示し、調和文書の透明性を各地域の特性に配慮しながら各薬局方で各々対応を進めることが確認された。

(2) 金属不純物の純度試験

EP の要望により、ICH Q3D の Step2 達成まで、PDG での検討を保留している。USP としては、ICH Q3D と平行して作業を進めることは可能ではないかとの意見が述べられたが、EP の意見を尊重し、step2 の合意を待つこととされた。現在、3 局ともに微量の重金属を測定する試験法 (ICP-AES/MS) が記載されたが、USP の重金属測定法では代替法のバリデーション要件が記載されている点に特徴がある。

(3) Prospective harmonization

東京会議で原薬の Prospective Harmonisation を PDG の枠組みに取り入れること、JP も新しい選定品目からこのプロジェクトに参加することを提案した。さらに先行している 4 品目のうち、JP は「モンテルカストナトリウム」を題材として、国際規格案の受け入れのフィージビリティスタディーを実施することを説明し、

USP/EP から歓迎の意が示された。

これに対して USP/EP では、新たな品目の選定は実施していないこと、また初回改訂作業での調和維持をパイロットフェーズとして延長するため、パイロットフェーズがいつ終了するかを含め、今後の方針は未定との説明があった。ただし、初回改訂作業のうち、モンテルカストナトリウムについては、年内に作業が開始される見込みであることが伝えられた。さらに、USP/EP は、新規有効成分の原案作成の調和を PDG の議題とすると formal な手続きが必要となり、時間を要するため、PDG 枠外の informal な情報交換により実質的な作業を迅速に進めてきたところ。ただし、USP/EP での検討状況について JP への情報提供は引き続き可能とのことであった。これに対して、JP はフィージビリティスタディーで生じた疑問点について、USP/EP に意見を照会したい旨を伝え、了承された。

D. 結論

平成 22-24 年度は 6 回の PDG 会議が開かれた。平成 24 年度末に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 28 項目、医薬品添加物 62 項目中 43 項目となった。

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) についてはメールベースの活動を行ったが、平成 24 年度にかさ密度及びタップ密度測定法、エンドトキシン試験法が step4 合意署名し、残るは製剤均一性試験法のみとなった。

そのほか、三局での歩調を合わせることに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 の場で情報交換は行う）での二局間調和を行っている。

以上のように、日米欧の局方の国際調和を推進する PDG 活動は進捗している。しかし一方では、PDG での国際調和が、局方全体からすれば一部にとどまっており、国際調和のペースが遅いこと、また国際調和結果をみても、部分調和にとどまっていることなど、欧米の局方ユーザー等の関係者から PDG の活動に対する批判が顕在化しつつあり、東京会議で JP は新しい調和項目候補の提案を積極的に行ったものの、合意には至らなかった。

一方、ロックビル会議ではバイオ医薬品の宿主由来タンパク質の試験法を新たな調和項目に挙げることにポジティブな意見が三局から出された。今後各局内で最終的な意見集約が行われる予定であるが、一般試験法の新たな調和項目となる可能性が高い。この要因としては、当該試験法は、(1)製品数が必ずしも多くないバイオ医薬品の試験法であること；(2)バイオ医薬品であるため関係企業が少ないこと；(3)とはいえ今後のバイオ医薬品のほとんどの製品が関係する品質特性の試験法であること等、調和が比較的容易に思われ、かつ調和のメリットが大きいことがあげられる。このことは、今後 PDG の場での調和対象項目を考える上で大きなヒントとなると思われる。

E. 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，北莊一郎，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)
- 7) Sakai-Kato K, Ota S, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Kawanishi T. Size separation and size determination of liposomes. *J.Sep.Sci.* 20, 2861-2865, (2011).
- 8) Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose, *J Pharm Sci.*, 100, 2935-44 (2011)
- 9) Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T., Feasibility of Atomic Force Microscopy for Determining Crystal Growth Rates of Nifedipine at the Surface of Amorphous Solids with and Without Polymers. *J.Pharm.Sci.*, 100, 4413-4420 (2011).
- 10) Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Impact of heat treatment on the physical properties of noncrystalline multisolute systems concentrated in frozen aqueous solutions, *J. Pharmaceut.Sci.*, 100, 5244-53, (2011)
- 11) Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.: Size separation of colloidal dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column., *J Chromatogr A.*, 1218, 5520-6, (2011)
- 12) Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T.: Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP, *Int J Pharm*, 407, 111-8 (2011)
- 13) 川西徹 製剤総則の改正概要とその影響 ファームテックジャパン 27, 15-22 (2011)
- 14) 川西徹 第16改正日本薬局方の主な改正点 日本薬剤師会雑誌 62, 87-91 (2011)
- 15) Sakai-Kato, K., Ishikura, K., Oshima, Y., Tada, M., Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Yamaguchi, T., Nishiyama, N., Kataoka, K., Kawanishi, T., Okuda H.: Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers, *Int J Pharm*, 423, 401-409 (2012)
- 16) Ohno A, Kawanishi T, Okuda H, Fukuhara K: A new approach to characterization of insulin derived from different species using ¹H-NMR

- coupled with multivariate analysis, *Chem Pharm Bull.* **60**, 320-324 (2012)
- 17) Sakai-Kato K, Nanjo K, Kawanishi T, Okuda H: Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites, *Chem. Pharm. Bull.* **60**, 391-396 (2012)
- 18) Shibata H, Saito H, Kawanishi T, Okuda H, Yomota C: Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats, *Chem Pharm Bull.* **60**, 967-975 (2012)
- 19) Shibata H, Saito H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H: Alterations in the detergent-induced membrane permeability and solubilization of saturated phosphatidylcholine/cholesterol liposomes: effects of poly(ethylene glycol)-conjugated lipid, *Chem Pharm Bull.* **60**, 1105-1111 (2012)
- 20) Yamaki T, Ohdate R, Nakadai E, Yoshihashi Y, Yonemochi E, Terada K, Moriyama H, Izutsu K, Yomota C, Okuda H, Kawanishi T: Component crystallization and physical collapse during freeze-drying of L-arginine-citric acid mixtures, *Chem Pharm Bull.* **60**, 1176-1181 (2012)
- 21) Shibata H, Yomota C, Kawanishi T, Okuda H: Polyethylene glycol prevents in vitro aggregation of slightly negatively-charged liposomes induced by heparin in the presence of bivalent ions, *Biol Pharm Bull.* **35**, 2081-2087 (2012)
- 22) Un K, Sakai-Kato K, Oshima Y, Kawanishi T, Okuda H: Intracellular trafficking mechanism, from intracellular uptake to extracellular efflux, for phospholipid/cholesterol liposomes, *Biomaterials.* **33**, 8131-8141 (2012)
- 23) Sakamoto T, Portieri A, Arnone D D, Taday P F, Kawanishi T, Hiyama Y: Coating and Density Distribution Analysis of Commercial Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate Tablets by Terahertz Pulsed Spectroscopy and Imaging, *J Pharm Innov.* **7**, 87-93 (2012)
- 24) 川西 徹: 第16改正日本薬局方製剤総則における「経口投与される製剤」および「口腔内に適用する製剤」—口腔内崩壊錠の位置づけ— *ファームテックジャパン.* **28**, 20-25 (2012)
- 25) 川西 徹: 日本薬局方の今とこれから *ファルマシア* **48**, 119-123 (2012)
- 26) 川西 徹: 医薬品の品質を巡る話題 — 化学合成医薬品に関わるレギュラトリーサイエンス— *レギュラトリーサイエンス誌* **2**, 67-73 (2012)
- 27) Sakamoto T, Fujimaki Y, Takada Y, Aida, K, Terahara T, Kawanishi T, Hiyama Y: Non-destructive analysis of tulobuterol crystal reservoir-type transdermal tapes using near infrared spectroscopy and imaging, *J Pharm Biomed Anal.* **74**, 14-21 (2013)
2. 学会発表
なし

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）
分担研究総合報告書

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 法による品質評価手法の開発 －

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 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、タンパク質のアミノ酸配列と高次構造の解析および不純物検出への NMR 法の有用性について検討を行った。起源の異なるインスリン（ヒト、ウシ、ブタ）のアミノ酸配列の違いは $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルを主成分分析することで識別が可能であることがわかった。また、高次構造の違いは比較する 2 種類のインスリンの NOESY スペクトルの差を検出することで判別することができた。一方、不純物の検出に関しては、スペクトルのシグナルの積分値を利用することで原薬に対して不純物濃度が 0.01%～0.05%まで定量的な解析ができることがわかった。この結果より、類縁物質とともに簡便な残留溶媒の同定および定量法として NMR 法が使用可能であることが考えられた。以上、NMR 法は低分子医薬品からペプチド医薬品や高分子医薬品の品質評価手法として有効であることが示された。

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

A. 研究目的

近年、創薬研究の進歩によって、低分子医薬品に加えペプチド性医薬品や、抗体と化学合成医薬品が結合した抗体コンジュゲート医薬品、DDS 医薬品など様々な構造を有する分子が医薬品として開発されつつある。それとともに、医薬品の品質管理においても従来の低分子医薬品の評価手法をそのまま適用することが難しくなってきた。一方、近年の分析技術の進歩は著しく、それに伴った医薬品の製造・品質管理の急速な高度化が進んできている。日本薬局

方においてもこのような医薬品を巡る環境の変化に応じた改正が求められている。

核磁気共鳴スペクトル測定法(NMR 法)はスピン量子数が 1 以上の ^1H や ^{13}C , ^{15}N を検出する方法であり、有機化学や天然物化学の分野で未知の化学物質の構造決定や同定に主に利用されている。また、NMR は原子間の結合の連続性および空間的相対配置を検出できることから、タンパク質などの高分子の構造解析において有用な情報を提供する。

本研究では、医薬品の製造・品質管理への NMR 法の有用性を明らかにすることを目的として、NMR 技術を用いた新しい高分子医薬品の品質評価手法と医薬品の純度試験法の開発を試みた。高分子医薬品の品質評価については、3 種類のインスリン（ヒト、ウシ、ブタ）を医薬品のモデルとして NMR 測定を行い、アミノ

酸配列の違いについては $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを統計解析処理することで評価できないか検討した。また、高次構造の違いについては NOESY スペクトルを測定し、比較する2種類のインスリンの NOESY 差スペクトルからの解析を試みた。一方、不純物の解析手法への応用については、原薬と不純物の代用としてメタノールとトルエンを利用して $^1\text{H-NMR}$ 測定を行い、ピークの積分値から定量性および検出限界を求めて、NMR 法の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

1. インスリンの一次構造および高次構造の解析

1-1. 試薬およびサンプル調整法

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。

サンプル調整：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 μl 添加、0.1N NaOH 溶液にて pH 3.6 になるように調整した。最後に CD_3CN 溶液を 245 μl 添加し final 700 μl (1.7 mM, pH 3.6) になるように $^1\text{H-NMR}$ 用サンプルを調整した。

1-2. $^1\text{H-NMR}$ 測定

NMR 測定装置：Varian 600 MHz NMR spectrometer に $^1\text{H-NMR}$ 専用コールドプローブを装備。

測定モード： $^1\text{H-NMR}$ スペクトルおよび NOESY スペクトルの測定は、Presaturation NOESY 法

(one-dimensional $^1\text{H-NOESY}$ spectra, 298 K) を用いて一次元測定法 ($^1\text{H-NMR}$) および二次元測定法 (NOESY) にて実施した。両スペクトルのケミカルシフトの補正は、TSP のシグナルを -0.016 ppm とした。

1-3. $^1\text{H-NMR}$ 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 $^1\text{H-NMR}$ 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。

1-4. NOESY スペクトルの差スペクトルの作成
3種のインスリン (ヒト, ウシ, ブタ) の NOESY スペクトルの FID (Free Induction Decay, 自由誘導減衰) の差を算出しフーリエ変換することで作成した。

2. 不純物の分析

0.03 vol % の TSP を含む CDCl_3 溶液を用いて、100mM のメタノールと 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 10mM のトルエンの両方を含む溶液を調整した。各溶液 700 μl を NMR のサンプルチューブに導入して、 $^1\text{H-NMR}$ を積算回数 1, 4, 16, 64, 128, 256 回で測定した。NMR の測定は Varian 社製 400MHzNMR を用いた。

スペクトルは位相調整した後、メタノールのメチル基(3.49ppm)のシグナルおよびトルエンのメチル基(2.36ppm)のシグナルについてピーク面積と S/N 比を求めた。

C. 研究結果

1. インスリンの一次構造の解析

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。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。そこで、各試料の¹H-NMR のスペクトルについて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。その結果、3種類のインスリンはそれぞれ別の集合体としてスコアプロット上に分布し、統計学的に異なるスペクトルであることが示された。また、2種類および3種類のインスリンを混合したサンプルも別々の集合体として分布した。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、それぞれのスコアプロット上の位置と混合比率には相関がみられた。さらにインスリンの分布に寄与しているスペクトルのシグナルをローディングプロットで解析したところ、スコアプロットでの各インスリンの特徴的な分布は、インスリン間のアミノ酸の違いに依存していることがわかった。以上、3種類のインスリンの一次構造の違いについてNMR スペクトルをPCAで解析することによって特徴づけることができた。

2. インスリンの高次構造の解析

NOESY スペクトルは、空間的に近い(直線距離が近く、その距離は5 Å以内である)¹H 同士の相互作用を非対角ピーク(以下、NOE ピーク)として観測できる。そこで、ヒト、ウシ、ブタの3種のインスリン分子種について¹H-NMR スペクトル及びNOESY スペクトルを各々測定した。各々のNOESY スペクトルは、

多くのNOE ピークが観測されることから、スペクトル同士を並べて比較し、区別する事は大変困難である。そこで、それぞれのスペクトルを重ね合わせてNOESY 差スペクトルを作成した。NOESY 差スペクトルでは、単独で測定されたNOESY スペクトルが同一強度で重なり合うNOE ピーク部分は消去され、一方、どちらかでNOE が観測される場合、またはNOE の強度が異なる場合は、NOE ピークとして残って観測される。本方法により、それぞれのインスリンに特徴的な高次構造がNOE ピークとして抽出することができた。ヒトインスリンではA鎖のアスパラギン(A18N)とA鎖のチロシン(A14Y)とのNOE、ウシインスリンではB鎖のアラニン(B14A)とB鎖のロイシン(B11L)とのNOE、ブタインスリンではA鎖のイソロイシン(A2I)とA鎖のチロシン(A19Y)およびB鎖のロイシン(B11L)とのNOE が各インスリンに固有の立体構造であることが明らかとなった。

3. 不純物の解析

NMR 法の純度試験法としての有用性を検証する為には原薬の¹H-NMR スペクトルに対する不純物のスペクトルの定量限界および検出限界を求める必要がある。そこで、本研究では原薬と不純物の代わりにメタノールとトルエンをそれぞれ用い、CDCl₃ 溶液中に100mM のメタノールとメタノールに対して0.01%~10%のトルエン(0.01mM~10mM)を含んだ溶液を調整してNMR を測定した。メタノールとトルエンのメチル基のピーク面積を比較することで濃度との相関を解析した結果、ピーク面積に対する濃度の定量性は比較的良好な直線性がみられた。また、積算回数を増やすことによって定量限界が広がることがわかった。積算回数を256回に増やすとメタノールに対して0.01%のトルエンが定量可能なことが示された。

D. 考察

NMR は化学物質の構造に由来する水素や炭素の特性を得る方法であり、化合物の構造解析手法の一つとして日本薬局方においては標準品の確認試験に利用されている。一方、近年、NMR の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た。そこで本研究では、新しい高分子医薬品の品質評価手法や医薬品の純度試験法の開発を目指して、NMR を利用した評価手法について検討を行った。

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、¹H-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。本解析手法はアミノ酸の一次配列のわずかな違いを認識できることから、高分子化合物の品質・構造特性を評価できる手法としての有用性が示された。

本実験で用いた 3 種類のインスリンは全て 51 個のアミノ酸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。アミノ酸配列の違いは立体構造にも影響することが考えられる。立体構造は NMR では NOE を測定することによって解析可能であるが、NOESY スペクトルからは多くの NOE ピークが観測され、その違いについて判別をすることは難しい。しかし、NOESY 差スペクトルを求めることによってインスリン間の NOE ピークの違いを特定することが可能となり、アミノ酸配列の違いに特徴的な立体構造を明らかにすることができた。以上、各分子種の NOESY

スペクトルについて差スペクトルを求めることにより、幾つかの種に特徴的な NOE ピークが検出され、これらを同定することによって立体構造の違いを区別することができた。高分子医薬品は、異なる製造方法で製造された場合あるいは製法変更が行われた場合においても、高次構造が異なる医薬品が製造される場合があり、本手法は高分子医薬品の高次構造評価に有用であることが期待される。

医薬品に含まれる有機不純物と残留溶媒は、その殆どが化合物中に水素原子を含む有機化合物であることから、NMR による定性・定量が可能となる。しかしながら、NMR は他の分析手法と比べて感度が低いことから、純度試験の試験法としては未だ確立されていない。本研究では、医薬品の純度試験の分析法として NMR 法の有用性について検討を行った。その結果、不純物の検出限界および定量限界を 0.01% 以下に設定が可能であり、純度試験法として NMR が有効であることが明らかとなった。医薬品中の残留溶媒に関しては ICH の基準(ICH Q3C)があり、残留量を規制すべき溶媒(クラス 2)は 29 種類のうち 23 種の濃度限度値が 100ppm~3880ppm に設定されている。本法によりこれらの溶媒が測定対象となりうると考えられ、簡便な残留溶媒の同定および定量法として NMR 法は使用可能であると考えられた。

E. 結論

NMR 法はペプチド医薬品や高分子医薬品の品質評価手法および純度試験や残留溶媒の試験法として有効であることが示された。純度試験と残留溶媒の試験法については、実際の医薬品を用いて NMR 法の検出能力について実証を行い、本分析法の局方一般試験法としての有用性について評価を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

A. Ohno, T. Kawanishi, H. Okuda, K. Fukuhara, A New Approach to Characterization of Insulin Derived from Different Species Using $^1\text{H-NMR}$ Coupled with Multivariate Analysis, *Chem. Pharm. Bull.* **60** (3) 320—324 (2012).

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

Ohno, A., Kawanishi, T., Okuda, H., Kurihara, M., Fukuhara, K., New approach to qualify evaluation for a difference of the high-order structure of peptide/protein drugs, 244th American Chemical Society National Meeting & Exposition, (2012.8) (Philadelphia, PA, USA)

Ohno, A., Kawanishi, T., Okuda, H., Fukuhara, K., New approach for quality evaluation for insulins derived from different species using $^1\text{H NMR}$ coupled with multivariate analysis, 242th American Chemical Society National Meeting & Exposition, (2011.8) (Denver, CO, USA)

Ohno, A., Kawanishi, T., Okuda, H., Fukuhara, K., A New NMR-based Quality Evaluation of

Biopolymer Drugs, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (2011.11) (Shinjyuku-ku, Tokyo)

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).

A. Ohno, N. Kawasaki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Yamaguchi, Application of a multivariate analysis based on $^1\text{H-NMR}$ 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, $^1\text{H NMR}$ -based metabolomics approach for analysis of APAP hepatotoxicity, PACIFICHEM 2010, Honolulu, USA (2010.12).

G. 健康危険情報

なし

H. 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。

生物薬品の試験法及び各条規格の改正に関する研究

研究分担者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

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、1) モデル糖タンパク質由来糖鎖の LC/MS を実施し、糖鎖の LC/MS の要件を明らかにした。2) LC/MS を用いたグライコフォーム分析は糖鎖不均一性の類似性評価法として有用であることを確認した。日局医薬品各条多糖類の試験見直し及び新規収載を目的に、米国薬局方や欧州薬局方の改正動向などを調査した。日局バソプレシン注射液の適切な純度試験及び定量試験を策定することを目的とし、日局バソプレシン標準品の HPLC プロファイル、並びに合成バソプレシンに混入し得る目的物質由来不純物を明らかにした。

研究分担者

川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

研究協力者

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

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

原園 景 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

高久明美 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員

中川ゆかり 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団

高橋知子 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団

A. 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る。第十六改正第一追補においては、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ことになった。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る。糖タンパク質医薬品の場合には、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場合があることから、一定性を担保するための方策が必要であり、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いない。そこで、ヘパリンナトリウムさらに低分子量ヘパリンについても、いくつかの試験法の見直しを検討する必要がある。

また、生物薬品においては、局方収載後、製造環境が変わったにもかかわらず試験法の改正が適切になされていないケースもある。日局各条バソプレシン注射液では、純度試験として子宮収縮成分を対象としたモルモットを用いたバイオアッセイが、また、定量法として、血圧上昇作用を指標とした雄のシロネズミを用いたバイオアッセイが設定されている（表2）。前者は、脳下垂体由来バソプレシンが用いられていた当時、製造工程由来不純物であるオキシトシンの混入を調べる目的で設定されたものと推察されるが、現在のバソプレシン原薬はペプチド合成により製造されているので、オキシトシンの混入ではなく、ペプチド合成により生じる可能性のある目的物質由来不純物を対象とした純度試験を設定すべきである。また、定量法として設定されている動物を用いたバイオ

アッセイは、精度が低いこと、実施には高い技術が必要であることから、より精度が高く簡便な試験法の設定が望まれる。実際、USP では、HPLC を用いた純度試験及び定量法が採用されている。バイオアッセイを理化学的分析に切り替えることができれば、精度を高めること、試験に必要な試料、労力及び費用を減らすこと、並びに動物の使用を中止できることが期待される。

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。糖鎖試験法において、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、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、並びにバイオアッセイの理化学的試験法への切り替えの検討は重要である。そこで、本研究では、遺伝子組換え糖タンパク質の糖鎖試験法の検討として、1) モデル糖タンパク質から遊離した糖鎖を用いて、糖鎖試験法として LC/MS を用いたオリゴ糖分析を採用する場合の要件を明らかにする。2) LC/MS を用いた糖タンパク質のグラジュエント分析の糖鎖不均一性評価法としての有用性を検討する。3) 糖鎖関連医薬品の USP 及び EP の動向を調査する。4) 日局バソプレシン注射剤に適切な試験法を設定することを目的に、バソプレシン標準品の HPLC プロファイリングを行い、さらに市販の合成バソプレシン製剤に含まれる不純物の同定、並びに USP 収載の試験法の検証を行う。

B. 研究方法

1. 糖鎖試験法として LC/MS を採用する場合の要件の検討

1.1. 試料

糖タンパク質のモデルとして、イデュルスルファーズを用いた。糖タンパク質 (100 µg) を 8 M グアニジン塩酸及び mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl (pH8.6) 50 µL に溶解した後、1 M dithiothreitol 2 µL を加えて、65 °C で 30 分間還元した。4.8 µL の 1M モノヨード酢酸ナトリウムを加え、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 µl の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かし、2 U の PNGase F (ロッシュ社製、1 ユニットは至適条件で毎分 1 µmol の基質を変化させる酵素量とする。) 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×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 µL の超純水に溶かし、250 µL の 1 M NaBH₄ を加えて室温で 16 時間放置した。希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。

1.2. LC/MS 及び LC/MS/MS

nanoLC には Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。溶離液に 2% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (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 (B) を用い、グラファイトカーボンを充填したカラム (HyperCarb, 0.075×150 mm, 5µm, 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) 装置には LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific) を使用した。質量分析計の印加電圧、マルチプライヤー、キャピラリー温度などを適切な値に設定し、質量校正標準物質を用いて質量校正を行ったのち、予め標準物質を用いて装置の質量真度を確認した。また、スプレーの安定性を確認するため、移動層を溶出しながらキャピラリーに電圧を印加し、スプレーが安定していること、及びバックグラウンドが低く保たれていることを確認した。分析に使用したトラップカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び衝突誘起解離 (CID) を用いたタンデム質量分析 (MS/MS) の測定条件は、以下の通りであった。

トラップカラム：グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.3×5.0 mm, 7 µm, Thermo Fisher Scientific)

グラジュエント条件：5–65%B, 60 分間

シングル MS スキャンモード：FT-MS

MS/MS スキャンモード：IT-MS

スキャン範囲：*m/z* 700-2,000

キャピラリー温度：200°C

スプレー電圧：2.5kV

2. LC/MS を用いたグライコフォーム分析の糖鎖不均一性評価法としての有用性の検討

2.1. 試料

エポエチン製剤として, Espo (*epoetin alfa*, 協和発酵キリン株式会社, 日本), Espo の後続品である Epoetin alfa BS injection [JCR] (*epoetin kappa*, 日本ケミカルリサーチ株式会社, 日本), Epogin (*epoetin beta*, 中外製薬株式会社, 日本), Eprex (*epoetin alfa*, Ortho BioTech Product, L.P. (Janssen-Cilag Ltd), 英国), 並びに Eprex の後続品である Epoetin alfa Hexal (*no INN*, Hexal Biotech, ドイツ)及び Silapo (Epoetin zeta, Standa Arzneimittel, ドイツ)を用いた. 各製剤は, そのまま, もしくは 10 mM 酢酸アンモニウム溶液で希釈し 1500 IU/ml とした後, 4 倍量の冷アセトンを加え, -20°C で 2 時間放置した後, 12000 x g で 20 分遠心し, 上清を除去し, 水に溶解した. 400 IU 相当量を LC/MS 分析にかけた. また, エポエチン 300 IU 相当量を 50 μl の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.2, 5 mM EDTA, 2.5 mM メチオニンを含む緩衝液中で 0.5 U の PNGase F と 37°C で 14 時間反応させ, N-結合型糖鎖を除去した.

2.2. LC/MS

液体クロマトグラフィーには Paradigm MS4 (Michrome BioResources), 質量分析計には Q-TOF 型の Qstar Elite (AB Sciex), イオン源にはナノエレクトロスプレーを使用した. 溶離液には, 0.1% ギ酸 (A), 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル (B) 及び 0.1% 3,3,3-トリフルオロプロピオン酸 (C) を用いた. カラムには, MonoCap C18 fast flow (0.1 x 250 mm, GL Sciences)を用いた. 試料は, MonoCap C18 Trap に吸着させた後, 0.1% TFA 40 μl で脱塩し, 反転させてカラムに流し, 流速 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 0-5 min, 15% B 及び 10% C, 5-135 min, 15-80% B 及び 10% C のグラジエント条件にて溶出した. 質量分析の m/z 範囲は, 1,000-4,000 とした.

2.3. グライコフォームプロファイル

グライコフォームを示すため, エポエチン溶出範囲のマススペクトルを積算し, 質量分析計付属のソフトウェアを用いて, 次の条件でデコンボリューションを行った. 質量範囲: 25,000-50,000, S/N = 1; m/z 範囲: 1,600-3,600, 反復数: 20 回 (N-結合型糖鎖を除去した試料では, 質量範囲: 15,000-30,000; S/N = 1; m/z 範囲: 1,100-2,400). 各グライコフォームの質量の計算には, 次の原子量値, H: 1.00794, C: 12.0108, N: 14.00674, O: 15.9994, S: 32.066 を用いた.

3. 多糖類の試験法に関する国際的動向調査

4th workshop on the characterization of heparin products (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, 2010.7, London) に参加し, 講演を聴講した. また, 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.

4. 日局バソプレシン注射剤試験法改訂のための予備検討

4.1. 試料

バソプレシンとして, 日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01), バソプレシン原薬 A 並びにピトレスシン注射液 20 (第一三共株式会社)を用いた.

4.2. LC/UV

日局バソプレシン標準品の純度の試験では, USP 法に準じて行った. すなわち, ODS C18 (Beckman, 4.6 x 250 mm, 5 μm) カラムにて, 溶離液にリン酸二水素アンモニウム (6.6 g/l) : アセトニトリル = 87 : 13 (pH 3.0) を用いて, カラム温度 40°C , 流速 1.0 ml/min のイソクラティック条件にて分離し, 220 nm の吸光度を測定した. また, 不純物の分析では, 液体クロマトグラフには, H-class (Waters), カラムには, BEH130 C18 (Waters, 2.1 x 150 mm, 1.7 μm), 溶離液には, A : 57 mM リン酸アンモニウム (pH 3.0), B : 50% アセトニトリルを用いた. 試料は, カラム温度 40°C , 流速 0.20 ml/min, 26%B のイソクラティック条件で溶出し, 220 nm の吸光度を測定した.

4.3. LC/MS

液体クロマトグラフには Paradigm MS4, 質量分析計には, Qstar Elite, イオン源にはナノエレクトロスプレーを使用した. カラムには, L-Column L2-C18 (, 0.1 x 150 mm, 3 μm , CERI), 溶離液には, .1% ギ酸 (A) 及び 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル (B) を用いた. 5 mU 相当量の試料を, 同カートリッジ式トラップカラムに吸着させ, 0.1% TFA で脱塩した後, 流路を反転させ, 室温, 流速 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ で, 0-2 min, 5% B, 2-22 min, 5-80% B のグラジエント条件にて溶出した. 質量分析の m/z 範囲は, 400-2,100 とした.

C. 研究結果及び考察

1. 糖鎖試験法として LC/MS を採用する場合の要件の検討

1.1. モデル糖タンパク質由来糖鎖の LC/MS

質量分析法や LC/MS は、多くの遺伝子組換えタンパク質医薬品の糖鎖解析に利用されている。我々が 2000 年 *Anal. Biochem.* に発表した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ーゼを用いて、LC/MS による糖鎖分析を行い、課題の抽出を行った。

イデュルスルファーゼは、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、ヒトイブロン酸-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 イブロン酸-2-スルファターゼの欠損によって起きる疾患で、ヘパラ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。イデュルスルファーゼは、リソソーム内のヘパラ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-イブ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ゼには、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。

図 1A 及び 1B にそれぞれ、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) を示す。各ピークの糖鎖構造は、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。図 2A に代表的マススペクトルとして、ピーク C のマススペクトルを示す。2 価 ($[M+2H]^{2+}$) のモノアイソトピックピークの 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。図 2B は、ピーク C の糖鎖の 2 価イオン (m/z 1040.89) を前駆イオンとして、CID MS/MS を行って得られたプロダクトイオンスペクトルである。この糖鎖の構造は、フラグメント

パターンから、図 2B 内に示すような配列をもつものと推定された。同様に、主なピークのマススペクトルを解析することによって、イデュルスルファーゼの糖鎖の構造と分布を推定することができた。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。それを踏まえ、糖鎖の LC/MS の要件として以下を作成した。

1.2. 糖鎖の LC/MS の要件

グラファイトカーボンカラムを接続した LC/MS 及び LC/MS/MS を用いて、糖タンパク質の糖鎖を分析するときは、図 3 を参考にする。*N*-結合型糖鎖の遊離に当たっては、糖鎖の切り出しを容易にするため、はじめに、ジスルフィド結合の還元とチオール基のアルキル化を行う。つぎに、酵素処理等により糖鎖を切り出し、LC カラム内でアノマーが分離されることを防ぐために還元末端を NaBH₄ で還元する。グラファイトカーボンが充填された固相抽出管を用いて試料を脱塩し、遊離糖鎖を回収する。*O*-結合型糖鎖はβ脱離法により遊離させる。別に、ヒドラジンを用いて *N*-結合型糖鎖及び *O*-結合型糖鎖を切り出す方法がある。

遊離糖鎖をグラファイトカーボンカラムを接続した HPLC に注入し、マススペクトルを取得する。スキャンごとに、もっともピーク強度の高いイオンを前駆イオンとして MS/MS を行う。ポジティブイオンモードで測定した後、必要に応じてネガティブイオンモードで測定する。装置の仕様によっては、ポジティブイオンモードで検出されない糖鎖、あるいはネガティブイオンモードで検出されない糖鎖があることに注意する。

HPLC によって得られたクロマトグラムが、糖鎖の分布の特徴を表しているときは、糖鎖プロファイルとして扱うことができる。但し、糖鎖のイオン化効率は構造によって異なるので、ピーク面積比は結合比を正確に表していないことに留意する。

MS により得られたモノアイソトピックピークの m/z 値から、糖鎖の質量を求める。糖鎖構成元素の主同位体質量を加算して得られる計算質量と、実験により得られた質量を照合することにより、単糖組成を推定することができる。表 2 に糖鎖構成元素の主同位体質量を示す。分子量が大きい糖

鎖を質量分解能が十分でない分析計を用いて測定するとき、モノアイソトピックピークが分離されないことがある。そのときは原子量を用いて計算質量を求め、実験により得られた平均質量と照合する。質量測定中にシアル酸や硫酸基が解離するケースがあることに注意する。

糖鎖をCIDにより開裂させると、通常、グリコシド結合が開裂して、非還元末端側を含むBイオンと、還元末端側を含むYイオンが生じる(図4A)。Bイオンは非還元末端側から順に $B_{1,2,\dots,m}$ と、またYイオンは還元末端側から順に $Y_{1,2,\dots,n}$ と表記する(図4B)。これらのフラグメントを組み合わせることにより、ある程度糖鎖構造を推定することが可能である。プロダクトイオンスペクトル上のフラグメントのピーク強度から結合様式等を推定する例もみられるが、フラグメンテーションパターンは装置の仕様に依存することに注意する。

MSにより単糖組成が判明しても、可能な組み合わせはたくさんあるので、構造解析においては、MS/MSだけでなく、エキソグリコシダーゼ消化法など他の分析方法とMSを組み合わせるのも一考である。

2. LC/MSを用いたグライコフォーム分析の糖鎖不均一性評価法としての有用性の検討

2.1. LC/MSを用いたエポエチン製剤のグライコフォーム分析

エポエチン製剤は、界面活性剤や塩の分析への影響を除くため、アセトン沈殿を行った後、逆相LC/MSにより分析し、得られたマスペクトルをデコンボリューションすることでグライコフォームプロファイルを得た。代表例として、エポエチン先行品AのLC/MSデータを図5に示す。エポエチンは65.5~74.5分に溶出し、約1,600~3,600の m/z 範囲に観測された。1,700~3,600の m/z 範囲のエキストラクトイオンクロマトグラムを図5Aに、溶出画分(65.5-74.5分)のマスペクトルを積算したスペクトルを図5Bに、デコンボリューションスペクトルを図5Cに示す。質量約28,000~32,000 Daにピークが認められ、各ピークの質量から、ペプチド骨格($C_{809}H_{1301}N_{229}O_{240}S_5$: 18,235.7 Da)に、主に組成がNeuAc₁₀~14Hex_n+3HexNAc_nFuc₃ (n = 16~24)に相当する糖鎖が結合していることが推測された。このことは、報告されているエポエチンに結合するN結合型糖鎖は、シアル酸が付加したコアフコシル化された2から4本鎖の複合型糖鎖で、Nアセチルラクトサミン構造を持つ場合が

あること、並びにO結合型糖鎖は、GalGalNAcからなる二糖にNeuAcが1又は2個結合した糖鎖であることと一致した。また、ピークが十分分離されていないが、NeuGcの存在(もしくは、タンパク質の酸化)を示唆するピーク(質量+16)が認められた。さらに、シアル酸のOアセチル化を示唆する質量差42のピークが認められた。ほぼ全てのピークについて結合糖鎖の単糖組成が推測できたことから、ペプチド骨格には不均一性はなく、想定通りの配列を持つことが確認された。以上より、LC/ESI/MSによりエポエチンのグライコフォームプロファイルを示すことができることを確認した。

次に、溶出時間とグライコフォームの関係を示す。各グライコフォームは、糖鎖のサイズ及びシアル酸の数に応じて保持時間が異なっており、65.5-66.7分、66.7-68.0分、68.0-70.0分、70.0-71.4分及び71.4-74.4分においては、それぞれ、主にシアル酸が11, 12, 13, 13から14及び14個結合したグライコフォームが溶出していた(図5D-H)。エポエチンの各グライコフォームは、逆相HPLCにおいてはほぼ同一位置に溶出するが、シアル酸付加数が大きいほど遅く、また、糖鎖のサイズが大きいと僅かに早く溶出することが確認された。溶出画分ごとにグライコフォームを求めたところ、全溶出画分から求めたときよりも微少なグライコフォームまで検出可能であった(図5C-H)。Oアセチル化が2個存在した場合の質量差は84であり、HexHexNAc(365)の単位が一つ増加しNeuAc(291)が一つ減少した場合の質量差は74であることから、これらのピークは十分に分離せず重なってしまう。画分ごとにグライコフォームを求めることでアセチル化の程度を観測することが可能であり、エポエチン一分子に4個のOアセチル化を含むピークも観測することができた(図5F-H)。

なお、データは示していないが、デコンボリューションのパラメータはグライコフォームプロファイルに若干の影響を及ぼした。タンパク質は、ESIマスペクトルにおいては、ある範囲の価数が一ずつ異なる一連のピーク群として観測される。デコンボリューション処理は、マスペクトル上のピークを元の質量に対応させるが、混在物のピークやバックグラウンドのケミカルノイズが偶発的にピークを作る可能性、さらに、ピーク強度比に影響を及ぼす可能性がある。そこで、元のマスペクトルの m/z 範囲をエポエチン由来のピークがはっきりと求められる1,600-3,600とし、また、対応させる質量範囲を20,000から40,000としてデコンボリューション処理を行った。

2.2. 各エポエチン製剤のグライコフォームの比較

エポエチン溶出画分から得られたデコンボリューションスペクトルを用いて、各エポエチン製剤のグライコフォームの比較を行った(図 6)。図 6A, B, C, D, E 及び F は、それぞれ先行品 A, 先行品 A を参照として開発された後続品 A', 先行品 B, 先行品 C, 先行品 C を参照として開発された後続品 C' 及び C'' のグライコフォームプロファイルである。各製品のグライコフォームパターンは異なっており、それぞれ特徴的なグライコフォームプロファイルを示した。グライコフォームの特徴を表 2 にまとめた。先行品 A では、シアル酸付加数は、11 から 14 個で、13 及び 12 個が主要であり、O-アセチル化が比較的多く存在すること、後続品 A' では、シアル酸付加数は 10 から 14 個で、12 及び 13 が主要であり、糖鎖のサイズが大きなグライコフォームが多いこと、先行品 B では、シアル酸付加数は 10 から 14 個で、13 及び 12 個が主要であり、14 個付加したものが比較的多く存在し、また NeuGc が比較的多く存在すること、先行品 C では、シアル酸付加数は 11 から 14 個で、12 及び 11 個が主要であること、並びに O-アセチル化が多いこと、後続品 C' では、シアル酸付加数は 12 から 14 個であり、12 及び 13 個が主要であること、並びに低分子量領域でマンノース・6-リン酸を含む高マンノース型糖鎖が結合していると考えられるグライコフォームが存在すること、後続品 C'' では、シアル酸付加数が 10 から 13 個で、11 及び 12 個が主要であり、14 個のグライコフォームは非常に少なく、また、糖鎖のサイズの分布は広いこと、が示唆された。以上より、遊離糖鎖の糖鎖プロファイリングやタンパク質の等電点電気泳動及びキャピラリー電気泳動では十分にわからなかった各エポエチン製剤のグライコフォームプロファイルの特徴を詳細に示すことに成功した。

2.3. 各エポエチン製剤の O-結合型糖鎖の不均一性の比較

PNGaseF により N-結合型糖鎖を除去し、各エポエチン製剤の O-結合型糖鎖の不均一性を比較した(図 7)。タンパク質部分の質量及びグライコフォームの質量から、結合している O-結合型糖鎖の単糖組成は、いずれの製品も NeuAc1Hex1HexNAc1 及び NeuAc2Hex1HexNAc1 と推定され、これは報告されている糖鎖構造と一致した。質量の 16 単位の増加が認められたが、NeuGc の存在が少ないと推測された製剤でも比較的強く観測されること及び酵素処理時間を延長するとその存在量が増加す

ること(データ非表示)から、この増加の大部分は NeuGc の存在によるものではなく、酵素処理操作中に起きたタンパク質の酸化によると考えられた。糖鎖を除くと容易に酸化される部位があることが推測される。O-アセチル化が認められていた先行品 A 及び C 並びに後発品 C' では、O-結合型糖鎖においても O-アセチル化が認められた。後続品 C' 及び C'' は、参照先行品である先行品 A とは大きく異なるパターンを示した(図 7C-E)。つまり、後続品 C' においては、ほとんどがシアル酸が二個結合した NeuAc2HexHexNAc であること、後続品 C'' においては、シアル酸付加の程度が低いこと、また、O-結合型糖鎖が付加していない分子がわずかに存在することが確認された。以上より、タンパク質の酸化が起きないような酵素処理条件の検討が必要ではあるが、N-結合型糖鎖を除去することにより、各製剤の O-結合型糖鎖結合状況を明らかにした。

以上より、いずれのエポエチン製剤も CHO 細胞により産生されるが、細胞株の違い、培養条件の違い、精製工程の違いなどにより、それぞれ特徴的なグライコフォームプロファイルを示すことを明らかにした。LC/MS によるグライコフォーム分析は、糖鎖不均一性の類似性評価法として有用であることが示された。

3. 多糖類の試験法に関する国際調査

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“4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products”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