

表3 日局の比較液のCIELAB L* a* b* 値の測定機器による比較

比較液	分析用分光光度計			積分球方式の分光光度		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
A	98.5	-1.28	5.22	98.5	-0.95	4.32
B	96.0	-3.42	14	95.9	-2.78	12.38
C	98.4	-3.02	8.6	98.4	-2.52	7.37
D	96.0	-1.22	7.68	96.1	-0.78	6.26
E	95.0	-4.55	20.87	95.0	-3.96	18.89
F	96.6	-4.7	22.9	96.6	-3.93	20.08
G	94.3	-2.4	22.66	94.9	-1.88	20.35
H	97.4	-8.53	27.16	97.6	-7.83	25.01
I	94.7	-9.84	41.16	95.5	-9.13	37.23
J	94.3	-13.97	58.92	94.6	-14.02	56.93
K	93.1	-12.45	72.25	93.4	-12.61	69.96
L	90.7	-6.95	66.23	91.0	-7.03	63.36
M	98.1	-13.85	33.22	97.8	-13.04	30.74

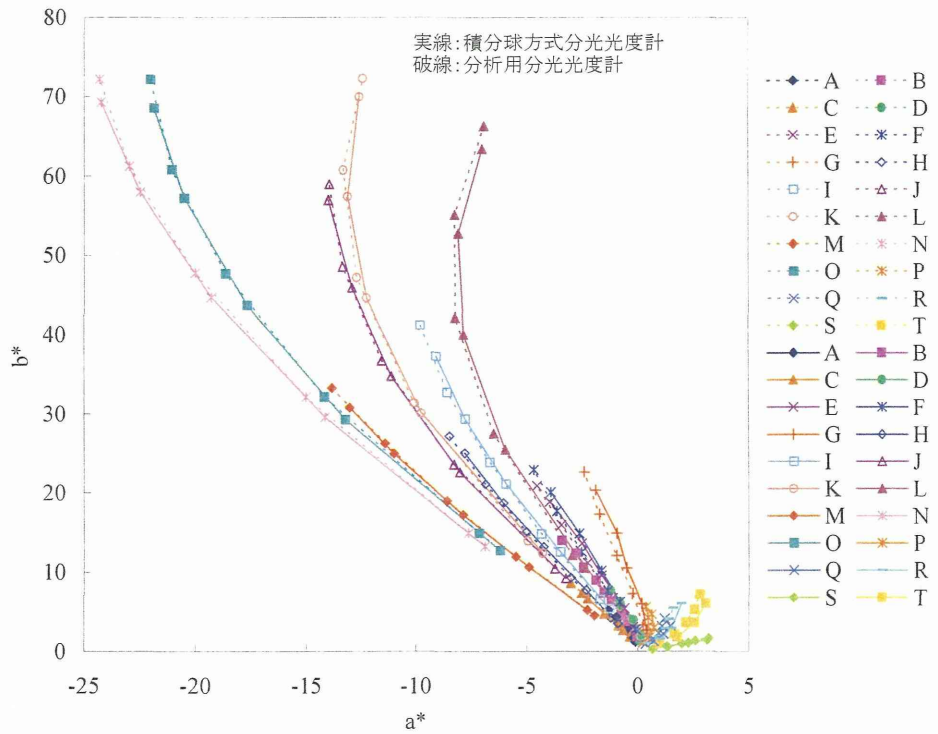


図1 日局色の比較液の希釈による a*b* 値の変化

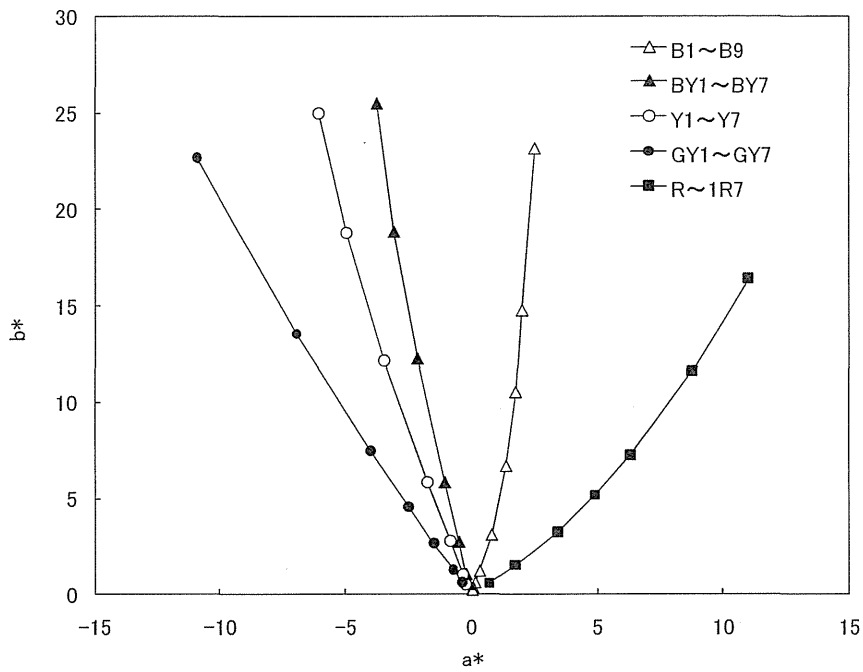


図2 EP標準溶液の分析用分光光度計による測定結果

表4 測定結果(μg/g)

試料番号	ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
1	0.0024	0.0020	0.0024	0.0473
2	0.0007	0.0032	0.0026	0
3	0.0005	0.0017	0.0034	0
4	0.0371	0	0.1024	0.1980
5	0.0698	0.0014	0.0084	0.1485
6	0.0759	0.0004	0.0122	0.1346
7	0.0178	0	0	0
8	0.0204	0	0	0
9	0.0156	0	0	0

表5 各試料の限度値および定量下限(μg/g)

試料番号		ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
1~3	限度値	1.5	0.5	0.5	5
	定量下限	<0.75	<0.25	<0.25	<2.5
4~6	限度値	10	3	3	30
	定量下限	<5	<1.5	<1.5	<15
7~9	限度値	1.5	0.5	0.5	0.5
	定量下限	<0.75	<0.25	<0.25	<0.25

限度値：J

定量下限：0.5J

表6 添加回収率(%)

試料番号	ヒ素	カドミウム	鉛	水銀
1	111	100	100	103
4	100	106	101	96
7	108	105	101	89

製剤および製剤試験法の改正に関する研究

研究分担者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨 日局16での製剤総則の大改正後に残された課題である、(1)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；(2)容器・包装関連事項について、分類、用語、および試験法等、今後解決を図るべき問題点をまとめた；(3)動的光散乱はヒト抗体医薬品の凝集体の相対含量の推定に有用であることを示した。

研究協力者

加藤くみ子 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部第四室長
大島裕希 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部
新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第三室長
遠藤素子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部

連事項については、製剤総則改正後の課題とした。また製剤通則8の非無菌製剤に関する微生物混入への配慮については、適用すべき微生物限度試験についての具体的な記述を求める意見が寄せられていた。

そこで本研究では、初年度は非無菌製剤に関する微生物混入への配慮の基本的考え方をまとめ、次年度は容器・包装関連事項の問題点を整理した。最終年度はヒト化モノクローナル抗体製剤の凝集体の試験法について検討を行った。

A. 研究目的

平成23年3月23日に告示された第16改正日本薬局方（日局16）における改正ポイントの中で、最も大きなものの一つが製剤総則の全面改正である。日本薬局方の製剤総則は医療現場で使用されている有用な製剤を合理的に分類、定義し、品質を保証するに必要な試験法、容器・包装、貯法等を示すものである。日進月歩の医療技術の中で製剤技術についても革新が著しいにもかかわらず、日本薬局方は法律に準じる公定規格基準書であり改正の影響が大きい。そのため、製剤総則は個別の追加・訂正以外は本格的な整備をしないままに長時間が経過してきた。そこで7年にわたる検討期間を経て、第16改正にあわせ全面改正を行った。製剤総則の改正にあたっては、製剤の品質に密接に関わる容器・包装関連事項についても同様に整備をすることが望まれたが、まずは製剤に直接関わる事項の改正を行うこととし、容器・包装関

B. 試験方法

日本薬局方、ICH品質ガイドライン、薬事法、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、次に現行薬局方の容器・包装に関する記載内容、および問題点を整理した。最終年度はヒト化モノクローナル製剤中の単量体、凝集体、単量体と凝集体との様々な非の混合物の粒子径および相対光散乱強度をMalvern社のZetasizer Nano-ZSにより測定した。

C. 研究結果

C-1 非無菌製剤の微生物管理に関する一般的な考え方

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、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、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、繁殖が起こりにくく、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。また日局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。

C-2 日局 16 における容器包装の記載

日局16での容器・包装に関する総論としての記載は以下の通りである。

1. 通則

37. 容器とは、医薬品を入れるもので、栓、ふたなども容器の一部である。容器は内容医薬品に規定された性状及び品質に対して影響を与える物理的、化学的作用を及ぼさない。
38. 密閉容器とは、通常の見取り、運搬又は保存状態において、固形の異物が混入することを防ぎ、内容医薬品の損失を防ぐことができる容器をいう。密閉容器の規定がある場合には、気密容器を用いることができる。
39. 気密容器とは、通常の見取り、運搬又は保存状態において、固形又は液状の異物が侵入せず、内容医薬品の損失、風解、潮解又は蒸発を防ぐことができる容器をいう。気密容器の規定がある場合には、密封容器を用いることができる。
40. 密封容器とは、通常の見取り、運搬又は保存状態において、気体の侵入しない容器をいう。
41. 遮光とは、通常の見取り、運搬又は保存状態において、内容医薬品に規定された性状及び品質に対して影響を与える光の透過を防ぎ、内容医薬品を光の影響から保護することができることをいう。
42. 日本薬局方の医薬品で、医薬品各条において表示量、表示単位又は有効期限の規定があるものについては、その含量、含有単位又は最終有効年月を、直接の容器又は直接の被包に記載しなければならない。
43. 日本薬局方の医薬品で、医薬品各条において基原、数値、物性等、特に表示するよう定められているものについては、その表示を、直接の容器又は直接の被包に記載しなければならない。

2. 製剤通則

(10) 製剤の容器・包装は、製剤の品質確保と共に、適正な使用及び投与時の安全確保に適したものとする。空気中の酸素などから製剤の品質を保護するために、脱酸素剤を装てんすることや、容器などに低気体透過性の材料を用いることができる。

湿気が品質に影響を与えるおそれのある製剤では、乾燥剤を装てんすることや、容器などに水分透過の少ない材料を用いるなどの防湿包装とすることができる。

また、水分の蒸散により品質が変化するおそれのある製剤では、容器などに低水蒸気透過性の材料を用いることができる。

一回使用量ずつ包装したものは分包品と称する。

(11) 製剤は、別に規定するもののほか、室温で保存する。製剤の品質に光が影響を与える場合、遮光して保存する。

C-3 薬事法における容器・包装の記載

1) 薬事法関係(第50. 51. 52. 53. 54条)

① 医薬品は、その直接の容器または直接の被包に、次に掲げる事項が記載されていなければならない。(第50条直接の容器等の記載事項)

② 直接の容器または直接の被包には内袋は含まれない。

③ 外部の容器または外部の被包(第51条)

・直接の容器：医薬品がじかに収められている容器（缶、びん、箱等、アンプル、ピアル、チューブ、点眼剤用ユニット、ドーズ容器）

・直接の被包：医薬品がじかに収められている容器（紙、布、ビニール等）

・内袋：例えば単に防湿等を目的として被包の下に用いるビニール袋、散剤を1回分の服用量ずつ収めた薬袋等である（ポリ袋、SPパツタ、PTP、坐剤、プラスチックコンテナ）。

・外部の容器または外部の被包：直接の容器（被包）がさらに包装されている場合の包装

C-4 その他通知、ガイドラインでの記載

① 容器/施栓系

・新製剤中に認められる医薬品添加物由来の不純物、あるいは容器/施栓系から溶出する不純物については、本ガイドラインの対象としない。

（新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン；ICHQ3B侃、）

② 直接容器/施栓系

・本ガイドラインは、新製剤中の不純物のうち原薬の分解生成物又は原薬と医薬品添加物若しくは直接容器/施栓系との反応による生成物のみを対象としている。(ICHQ3B(R))

③ 一次包装：

・一次包装材料、一次包装工程

④ 二次包装：

・ただし、二次包装が安定性確保等の機能を持つ場合は二次包装も含める。

（化学薬品原薬の製造方法の承認申請書記載要領：製造方法の記載内容）

⑤ 最終包装：

・最終包装形態（殺虫剤・殺菌消毒剤の取扱い）

・最終包装行為

⑥ 直接包装(一次包装)：(新原薬及び新製剤の光安定性ガイドライン)・

原薬や製剤が直接接触する包装であり、それに貼付されているラベルを含めたものをいう。

⑦ 市販包装：(新原薬及び新製剤の光安定性ガイドライン)

直接包装及び紙箱などの直接包装以外の包装を合わせた全体をいう。

C-5 日局 16 における容器・包装関係の一般試験法

7. 容器・包装材料試験法

・7.01注射剤用ガラス容器試験法

注射剤用ガラス容器は、内容医薬品と物理的又は化学的に作用してその性状又は品質に影響を与えないもので、完全に融封できるか、又は他の適当な方法によって微生物が侵入しな

いようにし、内容医薬品を保護できるものであり、次の規格に適合する。(以下略)

・7.02 プラスチック製医薬品容器試験法

本試験法は、プラスチック製医薬品容器の設計及び品質評価に用いることができる。常に、どのような医薬品容器についても、ここに記述したすべての試験を行うことが必要なわけではない。他方、本試験法はプラスチック製医薬品容器の設計・品質評価に必要なすべての試験方法を示すものではない。したがって、必要に応じて他の試験を追加すべきである。(以下略)

・7.03 輸液用ゴム栓試験法

輸液用ゴム栓は、輸液として用いる注射剤に使用する内容100mL以上の容器に用いるゴム栓(プラスチック等の材料でコーティング又はラミネートしたものを含む。)をいう。使用するゴム栓は内容医薬品と物理的又は化学的に作用してその性状又は品質に影響を与えないもので、また、微生物の侵入を防止し、内容輸液の使用に支障を与えないものであり、次の規格に適合する。(以下略)

C-6 日局 16 における容器包装関連の参考情報

・24 プラスチック製医薬品容器

種々のプラスチックが医薬品の容器に使われている。しかし、それが医薬品の有効性と安全性、安定性を損なうものであってはならない。容器の選択にあたっては、添加された物質などを含むプラスチック容器の製造過程に関するすべての情報を得ることが望ましい。個々のプラスチックはその特有の性質を持ち、容器に充てんされる医薬品の性質も様々であるので、プラスチック製医薬品容器の適合性は個別のプラスチックの性質と医薬品の性質の組合せの中で判断されるべきである。(以下略)

C-7 ヒト化抗体の凝集体に関する粒子径と相対光散乱強度測定

単量体、凝集体及び凝集体と単量体の 1 対 4 の混合物の粒子径と相対光散乱強度を測定したところ、単量体は粒子径約 5nm の位置に単一の

ピークを示し、一方凝集体は粒子径約 500nm の位置に単一のピークを示した。凝集体と単量体の 1 対 4 の混合物における凝集体及び単量体の相対光散乱強度はそれぞれ 61%及び 39%であった。

凝集体に対する単量体の比率を増加させると、凝集体の相対光散乱強度は低下し、1 対 6 の比率で約 50%に低下した。従って、凝集体の相対光散乱強度は単量体に比べ約 7 倍高いことが示された。

D. 考察

D-1 非無菌製剤に関する微生物混入への配慮

非無菌製剤に関する微生物混入への配慮については、JP16 の製剤総則改正原案のパブリックコメントにおいて、適用すべき微生物限度試験を適用すべきケースについて、具体的な記述を求める意見が寄せられた。そこで本研究の結果にケースに分けて説明を試みた。いずれにせよ、製剤の種類やその製造工程によって適用はフレキシブルであり、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、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。

D-2 容器・包装に関する用語についての課題

現在、局方で用いている容器・包装関係の用語については、概ね薬事法で用いられている用語に準じている。一方新有効成分医薬品を対象とする ICH-品質ガイドラインでは、欧米での用語を取り入れており、さらにこれらガイドラインに基づいた国内通知や医薬品ガイドラインでの用語では、多くの違いが生じている。表 1 にその差をまとめた。このような違いは、これら新薬を今後日局に収載をはかる際に、問題を生じることとなる。したがって、用語の整理、統一が必要となろう。その際には (1) 簡潔な用語、(2) 誤解を生じない用語とその定義、(3) 継続性のある用語、(4) 国内外の法律、公定書、ガイドラインとの整合性を念頭に付ける

必要があると考えられる。

D-3 容器・包装に関する規定に関する課題

医薬品の容器・包装の役割、特に医薬品の品質確保における役割（内容物の保護、医薬品の品質保持、医薬品の使用上の過誤防止、利便性（保管、持ち運び、投与）、その他（商品価値の保持等））の観点からの規定が必要と考えられる。

医薬品の品質保持の観点からは、製品ごとの差を考慮すると、製品ごとに適切な容器を柔軟に選択のできるようにすることが重要であり、このことが、優れた容器の開発の促進に結びつく。その意味で、旧来の製剤ごとの一律な規定ではなく、日局 16 の製剤総則における容器の規定の方針（最小限の要求を満たす容器（例：密閉容器）に加え、必要に応じて対応すべき事項（防湿性等）の記載）に沿った整理が妥当であろう。

D-4 容器・包装に関する試験法の課題

容器・包装の試験についての欧米の薬局方では日局に比較して整備が充実している。これら薬局方の容器の試験法との国際的整合性を考慮しつつ、整備することが必要であろう。

特に注射剤のゴム栓試験法については、科学的な情報の進展に応じた理化学試験の見直し、特に容器からの溶出物の試験法の見直しが重要である。さらに安全性評価においては、必ずしもヒトへの予測性が高くないインビボ動物試験から、インビトロ試験への代替をはかるべきであろう。

D-5 ヒト化抗体製剤の凝集体の評価の検討

凝集体が球状と仮定して算出された粒子径に基づくと、凝集体の相対光散乱強度は単量体に比べて約 10^6 高い値が計算される¹⁴⁾。しかし、結果は約 7 倍であったことから、凝集体は球状ではないことが示唆された。攪拌により誘導されるモノクローナル抗体の凝集体の形状のマイクロ・フロー・イメージングによる解析では、細長い形状が

観察されている¹⁶⁾。本実験で同様な攪拌により誘導された凝集体も細長い形状をしているため、相対光散乱強度が弱いのかもかもしれない。

したがって、球状である場合を除き、濃度が未知の単量体と凝集体のタンパク質混合溶液において、動的相散乱により求めた粒子径と相対光散乱強度から凝集体の含量を推定することはできないことが再確認された。

E. 健康危機情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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) 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)
- 5) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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).
 - 10) 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)
 - 11) 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).
 - 12) 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)
 - 13) Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.: Size separation of colloiddally dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column., *J Chromatogr A.*, **1218**, 5520-6, (2011)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) 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)
 - 17) 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)
 - 18) Endo M, Niimi S, Determination of the relative light scattering intensity of aggregates induced by stirring of humanized monoclonal antibody product using dynamic light scattering. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyuusho Hokoku.* 2012;(130):43-45
 - 19) 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)
 - 20) 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)
2. 学会発表
- 1) 新見伸吾 バイオ医薬品の免疫原性のリスク因子の予測・評価方法, 有効性及び安全性に及ぼす影響, リスクを低下させるための実践的開発・市販後調査を探る 薬事エキスパート研修会 第6回 品質/科学技術特別研修 平成24年9月19, 20日 (大阪, 東京)
 - 2) Shingo Niimi Risk factors, clinical consequence and mitigation of immunogenicity. Immunogenicity for

Biopharmaceuticals & Biosimilars Asia
(16 October 2012 Singapore)

- 3) 新見伸吾 抗体医薬品（バイオシミラーを含む）の品質評価について レギュラトリーサイエンス エキスパート研修会 第8回 品質／科学技術特別研修 平成25年3月19日（東京）

医薬品の名称、化学名及び構造式の改正に関する研究

研究分担者 宮田直樹 名古屋市立大学 大学院薬学研究科 教授（平成22-23年度）
研究分担者 栗原正明 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長（平成24年度）

研究要旨

本研究は、日本薬局方（JP）収載医薬品など、我が国で承認されている医薬品の名称（日本名、英名、別名）、構造式、分子式、分子量、化学名、ケミカル・アブストラクツ・サービス(CAS)登録番号、および、基原の項に含まれる構造情報などの医薬品の本質を規定する項目（以上を、名称関連事項と略す）について、医薬品の構造・品質管理の高度化と国際化に対応するために必要な検討事項を抽出し、今後のJPの改正作業に資することを目的とする。初年度は、JP収載医薬品の化学名および構造式について、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。次年度は、医薬品の名称、特に日本名別名について検討し、削除の必要性を明らかにした。最終年度は、日本薬局方名称データベース(JPDB)の構築、管理に関する検討を行った。

A. 研究目的

日本薬局方(JP)には我が国で使用されている主要な医薬品が収載され、法律すなわち規格書としての役割を果たしている。加えてJPは、我が国の医薬品の規範書としての役割も負っている。JP収載医薬品の医薬品各条は、医薬品の情報記載の規範を示しており、その波及効果は大きい。このような観点から、JPの記載内容は（1）科学的に正しいこと、（2）整合性があること、（3）国際的に調和していること、（4）情報の電子化に対応していることなどが必要条件である。本研究では、JPに収載されている医薬品を中心に我が国で承認されている医薬品の名称（日本名、英名、別名）、構造式、分子式、分子量、化学名、ケミカル・アブストラクツ・サービス(CAS)登録番号（CAS番号）、および、基原の項に含まれる構造情報など、医薬品の本質を規定する項目（以上を、名称関連事項と略す）について、先に示した観点から記載内容を精査し、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に

資するための調査研究を行う。

B. 研究方法

【化学名、構造式の検討】

JP16収載の医薬品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。

【別名修正の検討】

JP16に収載されている医薬品（生薬を除く）721品目の名称（日本名および別名）について、精査するとともに、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。

【データベースの構築、管理の検討】

新規収載品のデータベース上への収載、既収載品の訂正、公開データの拡充、アクセス状況の把握等を行った。

<http://jpd.db.nihs.go.jp/jp/>に第十六改正日本薬局方名称データベースとして公開している。

C. 研究結果

【化学名、構造式の検討】

(1) methane 置換体の化学名に関する調査
methane 置換体の化学名は methane に置換するすべての置換基を括弧で囲んだ化学名のほうが望ましい。

(2) クロメン構造を有する医薬品の化学名の調査

chromene を用いる場合と 1-benzopyran を用いる場合が混在している。chromene を用いることが望ましい。

(3) トシル酸塩の化学名の調査

IUPAC の勧告 (2003) で、トシル酸塩の慣用名である「tosylate」は、酸の名前を命名するのには使用しない、となっている。それで「tosylate」は「4-toluenesulfonate」にかえる。

(4) ステロイド類のリン酸エステルナトリウムの化学名の調査

ステロイド類のリン酸エステルナトリウムの化学名は「sodium」を「phosphate」の直前に置いて「○○(sodium phosphate)」としたほうが適切である。

(5) ステロイド類の化学名の調査

「スピロノラクトン」の化学名において、17位の置換基の位置番号が17βとなっているが、17α-pregnane 骨格をもつ「スピロノラクトン」では17位の置換基に「β」は不要である。

(6) ペプチド系の医薬品の構造式の調査

JPでは、アミノ酸残基の数が概ね20までのペプチド系の医薬品の構造式はアミノ酸の3文字表記を用いてペプチド構造を記載し、21以上の場合は1文字表記を用いてペプチド構造を記載する。

(7) 医薬品の構造式の側鎖 R の表記法の調査

側鎖 R の結合枝は水平な標記で統一する。

(8) フルラン類の構造式の調査

フルラン類の構造式はWHOの医薬品構造式標記のガイドラインに従い、アルキル主鎖(長い方のアルキル鎖)の位置番号が右から左に大きくなるような構造式で表記することが望ましい。

(9) 硫酸エステルの構造式の調査

硫酸基を「-SO₄⁻」と表記している。しかし、WHOの医薬品構造式表記のガイドラインでは、炭素原子から非炭素原子に結合が伸びる場合には結合する原子を結合枝の先に明示することを提案しているため、硫酸基は「-OSO₃⁻」と表記することが望ましい。

【別名修正の検討】

JP16 収載の医薬品(生薬を除く)721品目を調査した結果、710品目(98.5%)に別名が存在した。また、105品目(14.6%)が2個以上の別名を、23品目(3.2%)が3個の別名を持つことがわかった。4個以上の別名を持つ医薬品はなかった。721品目の医薬品の別名の総数は、838である。なお、別名がない13品目は、アヘン末、オレンジ油、カカオ脂、カルナウバロウ、牛脂などすべて化学構造式がない天然由来の医薬品であり、いわゆる一般的な化学薬品は全て別名が付いている。

表1 JP16 に収載された別名をもつ医薬品(生薬を除く)

	数	%
別名なし	13	1.8
別名1個	603	83.6
別名2個	82	11.4
別名3個	23	3.2
別名4個	0	0
計	721	100

JP16収載医薬品の全別名838について分類

を下に示す。

- (1) 従来からの別名
- (2) 医薬品名の変更（日本語訳の変更を含む）に伴って生じた別名
- (3) 科学的な理由で生じた別名
- (4) 日本名の命名ルールの変更によって生じた別名であった。

【薬局方名称データベースの構築・管理】

(1) 新規収載品の登録

第一追補収載の 80 品目を追加した。新規収載品を以下に示す。

アシクロビル軟膏、注射用アシクロビル、アゼルニジピン、アムロジピンベシル酸塩口腔内崩壊錠、アルジオキサ顆粒、アルジオキサ錠、イオヘキソール、イオヘキソール注射液、70%一硝酸イソソルビド乳糖末、一硝酸イソソルビド錠、イブプロフェンピコノール、イブプロフェンピコノールクリーム、イブプロフェンピコノール軟膏、エダラボン、エダラボン注射液、エパルレスタット、エパルレスタット錠、エポエチン アルファ(遺伝子組換え)、エポエチン ベータ(遺伝子組換え)、エメダスチンフマル酸塩、エメダスチンフマル酸塩徐放カプセル、オメプラゾール腸溶錠、オーラノフィン、オーラノフィン錠、カルボプラチン、カルボプラチン注射液、クエチアピルフマル酸塩、クエチアピルフマル酸塩細粒、クエチアピルフマル酸塩錠、クロスビドン、コレスチミド、コレスチミド錠、L-シスチン、シンバスタチン錠、セトチアミン塩酸塩水和物、セフポドキシム プロキセチル錠、タカルシトール水和物、タカルシトールローション、タルチレリン水和物、タルチレリン錠、タルチレリン口腔内崩壊錠、トラニラスト、トラニラストカプセル、トラニラスト細粒、トラニラスト点眼液、シロップ用トラニラスト、ドルゾラミド塩酸

塩、ドルゾラミド塩酸塩点眼液、ナルトグラスチム(遺伝子組換え)、注射用ナルトグラスチム(遺伝子組換え)、ニフェジピン細粒、ニフェジピン徐放カプセル、ニフェジピン腸溶細粒、バルサルタン、バルサルタン錠、ヒプロメロース酢酸エステルコハク酸エステル、ピロカルピン塩酸塩錠、フィルグラスチム(遺伝子組換え)、フィルグラスチム(遺伝子組換え)注射液、フェキソフェナジン塩酸塩錠、ブピバカイン塩酸塩水和物、プロチゾラム、ペミロラストカリウム点眼液、モルヒネ硫酸塩水和物、ラフチジン、ラフチジン錠、レノグラスチム(遺伝子組換え)、レボフロキサシン細粒、レボフロキサシン錠、レボフロキサシン点眼液、ロサルタンカリウム錠、ロベンザリットナトリウム。

また、以下の 4 品目を削除した。

注射用アモバルビタールナトリウム、トリメタジオン錠、フルラゼパム、フルラゼパムカプセル。

(2) データベース記載状況

日本語版の検索窓を下に示した。

検索できる項目は(1) 日本名、日本名別名、英語名、cas 登録番号、化学名検索である。名称の部分検索もできる。

● 名称検索

日本名または日本名別名で検索する場合は、日本名または日本名別名を全角文字で入力し、「日本名または日本名別名検索」をクリックしてください。英名で検索する場合は、英名を半角文字で入力し、「英名検索」をクリックしてください。(大文字小文字の区別はありません)。また名称の一部分からも検索できます。

アイウエオ カキクケコ サシスゼソ タチツテト ナニヌネノ
 ハヒフヘホ マミムヅモ ヤユユエヨ リリルロ ワ

注射用アジチクロ 日本名または日本名別名検索

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

化学薬品等リスト
 アイウエオ カキクケコ サシスゼソ タチツテト ナニヌネノ
 ハヒフヘホ マミムヅモ ヤユユエヨ リリルロ ワ

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

生薬等リスト
 アイウエオ カキクケコ サシスゼソ タチツテト ナニヌネノ
 ハヒフヘホ マミムヅモ ヤユユエヨ リリルロ ワ

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

● CAS登録番号検索

CAS登録番号を入力し、「CAS登録番号検索」をクリックしてください。

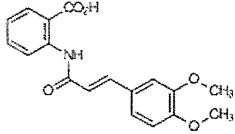
● 化学名検索

化学名を入力し、「化学名検索」をクリックしてください。

日本名で「トラニラスト」を検索した結果を下に示す。

第十六改正日本薬局方 化学薬品等

トラニラスト
 Tranilast



2-((2E)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)prop-2-enyl)amino benzoic acid
 C18H17NO5 : 327.33
 [53902-12-8]
 本品を乾燥したものは定量するとき、トラニラスト(C18H17NO5) 99.0~101.0%を含む。

検索結果で表示される情報は、冊子体とほぼ同じ内容になっている。また、データベースの構造式は ChemDraw のファイルとしてダウンロードできる。

(3) アクセス状況

2013年の1月1日から3月31日までの3ヶ月間の総アクセス数は19,228回であった。1日の最高アクセス数は384件(2013/3/7)であった。

国別のアクセス数を下に示した。

1. 日本国内 18,576
2. 中国 152
3. 米国 98
4. 台湾 89
5. 韓国 58
6. フランス 52
7. シンガポール 27
8. ベトナム 17
9. インドネシア 16

であった。

(4) 医薬品一般名称データベースとの関連
 国立医薬品食品衛生研究所・有機化学部では、日本薬局方名称データベース(JPDB)の他に医薬品一般名称データベース(JANDB)の構築、管理を行っている。ほぼ共通のフォーマットで構築、管理を行っている。日本薬局方(JP)の収載が決まると医薬品一般名称(JAN)は局方に倣って書き換えられる。

D. 考察

【化学名、構造式の検討】

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「スピロラクトン」および「エチニルエスチラジオール」の化学名に、IUPACの命名法に合致しない事項およびJP記載品目間での不整合を見出した。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記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出した。

【別名修正の検討】

JP16 収載医薬品 721 品目の 98%以上に別名が記載されており、別名の総数は 838 に達している。その多くは、JP15 交付時に行われた日本名命名ルールの改正によるものである。

【薬局方名称データベースの構築・管理】

データベースの記載内容の拡充が必要である（収載期日等）。現在、日本薬局方名称データベースであるが、構造、名称等の情報だけでなく、より多くの情報を収載する必要があるか検討する必要がある。また、構造ベースの検索ができるようにする検討を行っている。

E. 結論

【化学名、構造式の検討】

JP16 収載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、化学名では IUPAC の命名法に合致しない事項および JP 記載品目間での不整合を見出した。構造式では JP 記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出した。

【別名修正の検討】

別名というシステムが果たしてきた一定の意義は認められるものの、医薬品の名称が「一物二名」というのは望ましいことではない。少なくとも米国薬局方（USP）や欧州薬局方（EP）にはこのようなシステムはないように思われる。別名は、手順を踏んで削除されることが望ましい。

【薬局方名称データベースの構築・管理】

国内外から多くのアクセスがあることより、十分にその機能を果たしていると考えられる。さらに、システム（ハードウェア及びソフトウェア）の見直し、データベースの収載項目、検索項目の充実を図っていく必要がある。

G. 研究発表

なし

【参考】

第十六改正日本薬局方名称データベース（JPDB）

<http://jpdn.nihs.go.jp/jp/>

医薬品一般名称データベース（JANDB）

<http://jpdn.nihs.go.jp/jan/>

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

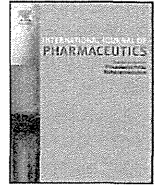
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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,	<i>Int J Pharm</i>	389	107-113	2010
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.	<i>Anal Chem.</i>	82,	7436-7443	2010
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.	<i>Biomed Chromatogr.</i>	24,	2066-2112	2010
A. Ohno, N. Kawasaki, K. Fukuahra, H.Okuda, T.Yamaguchi,	Complete NMR analysis of oxytocin in phosphate buffer	<i>Magn. Reson. Chem.,</i>	48	168-172	2010
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
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
宮田直樹, 他	ステムを知れば薬がわかる	<i>PharmTechJapan</i>	26	611,947,171,1495,1695,1927	2010
Sakai-Kato K, Ota S, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Kawanishi T.	品質に関するトピックの動向 (Quality Strategy Discussion)	<i>J.Sep.Sci.,</i>	20	2861-2865	2011
Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.	Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose	<i>J. Pharmaceut.Sci.</i>	100	2935-44	2011
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.	<i>J. Pharmaceut.Sci.</i>	100	4413-4420	2011

Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.	Impact of heat treatment on the physical properties of noncrystalline multisolute systems concentrated in frozen aqueous solutions,	<i>J. Pharmaceut.Sci.</i>	100	5244-53	2011
Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.	Size separation of colloidally dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column.	<i>J Chromatogr A.</i>	1218	5520-6	2011
Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T.	Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP,	<i>Int J Pharm,</i>	407	111-8	2011
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	2011
川西 徹	製剤総則の改正	薬局	62	2654-2657	2011
川西 徹	製剤試験法	薬局	62	2654-2657	2011
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
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
橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ	バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第 1 回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状	ファームテックジャパン	27	2633-2638	2011
四方田千佳子	一般試験法の改正・理化学試験法	薬局	62	58-64	2011
Ohno A, Kawanishi T, Okuda H, Fukuhara K	A new approach to characterization of insulin derived from different species using ¹ H-NMR coupled with multivariate analysis	<i>Chem. Pharm. Bull</i>	60	320-324	2012
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	<i>Chem Pharm Bull.</i>	60	967-975	2012
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	<i>Chem Pharm Bull.</i>	60	1105-1111	2012

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,	<i>Chem Pharm Bull.</i>	60	1176-1181	2012
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	<i>Biol Pharm Bull.</i>	35	2081-2087	2012
Sakamoto T, Portieri A, Arnone D D, Taday P F, Kawanishi T, Hiyaama Y	Coating and Density Distribution Analysis of Commercial Ciprofloxacin Hydrochloride Monohydrate Tablets by Terahertz Pulsed Spectroscopy and Imaging,	<i>J Pharm Innov.</i>	7,	87-93	2012
Ryosuke Kuribayashi, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Nana Kawasaki	Rapid evaluation for heterogeneities in monoclonal antibodies by liquid chromatography/mass spectrometry with a column-switching system.	<i>J. Pharm. Biomed. Anal.,</i>	56,	821-826	2012
S. Nakazawa, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki	Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry	<i>Anal. Biochem.</i>	420	61-67	2012
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	48	119-123	2012
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
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
新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ	バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第4回) バイオ医薬品の不純物の評価(1)	ファームテックジャパン	28,	43-48	2012
新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ	バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第4回) バイオ医薬品の不純物の評価(2)	ファームテックジャパン	28,	113-119	2012
中澤志織, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ	バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題－特性解析の新しい位置づけと重要性	レギュラトリーサイエンス学会誌	2,	21-30	2012
川崎ナナ, 石井明子	抗体医薬品のバイオ後続品の将来展望	臨床と微生物	39,	459-465	2012
川崎ナナ, 石井明子	バイオ後続品	日本病院薬剤師誌	48,	1079-1086	2012
小椋康光	ICP-AES と ICP-MS の一般試験法への新規掲載	ファームテックジャパン	28,	2791-2794	2012

Endo M, Niimi S,	Determination of the relative light scattering intensity of aggregates induced by stirring of humanized monoclonal antibody product using dynamic light scattering.	衛研報告	130	43-45	2012
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	<i>J Pharm Biomed Anal.</i>	74	14-21	2013
石井 明子, 原園 景, 川崎ナナ	質バイオ後続品／バイオシミラーに関する国内外の規制動向と品質評価	ファームテックジャパン	29	23-42	2013



Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols

Saori Kadoya^a, Kahori Fujii^a, Ken-ichi Izutsu^{b,*}, Etsuo Yonemochi^a, Katsuhide Terada^a, Chikako Yomota^b, Toru Kawanishi^b

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba, 274-8510, Japan

^b National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2009

Received in revised form 6 January 2010

Accepted 15 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

Freeze-drying

Amorphous

Excipients

Stabilization

Sugar alcohol

Glass transition

ABSTRACT

Physical properties and protein-stabilizing effects of sugar alcohols in frozen aqueous solutions and freeze-dried solids were studied. Various frozen sugar alcohol solutions showed a glass transition of the maximally freeze-concentrated phase at temperatures (T_g 's) that depended largely on the solute molecular weights. Some oligosaccharide-derived sugar alcohols (e.g., maltitol, lactitol, maltotriitol) formed glass-state amorphous cake-structure freeze-dried solids. Microscopic observation of frozen maltitol and lactitol solutions under vacuum (FDM) indicated onset of physical collapse at temperatures (T_c) several degrees higher than their T_g 's. Freeze-drying of pentitols (e.g., xylitol) and hexitols (e.g., sorbitol, mannitol) resulted in collapsed or crystallized solids. The glass-forming sugar alcohols prevented activity loss of a model protein (LDH: lactate dehydrogenase) during freeze-drying and subsequent storage at 50 °C. They also protected bovine serum albumin (BSA) from lyophilization-induced secondary structure perturbation. The glass-forming sugar alcohols showed lower susceptibility to Maillard reaction with co-lyophilized L-lysine compared to reducing and non-reducing disaccharides during storage at elevated temperature. Application of the oligosaccharide-derived sugar alcohols as alternative stabilizers in lyophilized protein formulations was discussed.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Freeze-drying is a popular method to ensure long-term stability of therapeutic proteins that are not stable enough in the aqueous solutions during distribution and long-term storage (Manning et al., 1989; Nail et al., 2002). Removal of surrounding water molecules by lyophilization significantly reduces gradual chemical and physical degradation of proteins, whereas the dehydration often induces structural perturbation that leads to misfolding and/or aggregation in the re-hydrated solutions (Arakawa et al., 2001). Protecting the protein conformation in freeze-dried formulations through appropriate process control and ingredient optimization is essential to ensure the pharmacological effects, as well as to reduce the risk of product immunogenicity (Hermeling et al., 2004).

Some non-reducing saccharides (e.g., sucrose, trehalose) are popular stabilizers that protect proteins from the chemical and physical degradations in aqueous solutions, during freeze-drying, and in subsequent storage (Arakawa and Timasheff, 1982; Carpenter and Crowe, 1989; Franks, 1992; Wang, 2000). They

protect protein conformation in the solids thermodynamically through direct interactions (e.g., hydrogen bonds) that substitute surrounding water molecules and reduce protein chemical degradation kinetically by embedding the protein in a glass-state lower molecular mobility environment. High molecular mobility of the glass-state disaccharide solids, however, induces slow but not negligible chemical degradation of embedded proteins over pharmaceutically relevant timescales. Unexpected exposure of the solids to humid or high-temperature environments often induces physical changes of the dried cakes (e.g., shrinkage) (Breen et al., 2001; Tian et al., 2007).

Application of other excipients that stabilize proteins by themselves and/or in combination with disaccharides would provide further choices to improve the formulation quality (Wang, 2000; Costantino, 2004). Some excipients (e.g., polymers, sodium phosphates) raise the glass transition temperature (T_g) of co-lyophilized disaccharide-based solids, which limited molecular mobility should confer robustness against undesirable storage conditions (Ohtake et al., 2004). Some amino acids and their salts (e.g., L-arginine citrate) form glass-state amorphous solids that protect proteins from inactivation during freeze-drying (Tian et al., 2007; Izutsu et al., 2009). In addition to the structural stabilization, varied physicochemical properties of amino acids would provide some unique effects (e.g., reducing the protein aggregation in aque-

* Corresponding author. Tel.: +81 337001141; fax: +81 337076950.
E-mail address: Izutsu@nihs.go.jp (K.-i. Izutsu).