

学会創立20周年記念特集

クロマトグラフィーと出会って

西 博行

(安田女子大学 薬学部薬学科)

1. はじめに

クロマトグラフィー科学会 (Society of Chromatographic Sciences, SCS) は、本年で学会創立20周年を迎える。SCS の設立に関係されました、多くの諸先生、諸先輩方に心よりお祝い申し上げます。私が大学 (工学部工業化学科) 4 年生で (1979年)、講座選択の時分は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) がまさにこれから進展する「発展期」といってもよい頃で、京都大学では、理学部の波多野博行先生、六鹿宗治先生、山本文子先生らが、工学部では、小島次男先生、藤村一美先生、寺部 茂先生ら、多くの先生方がクロマト関連の研究に邁進されていた。なお、1980年には、SCS の前身母体による第1回液体クロマトグラフィー討論会が開催されている。

また、当時は、波多野先生主宰の液体クロマトグラフィー研究会が毎年1月末の寒さ厳しい折に開催 (ほとんど、かんばんで京都) されており、京都はクロマトグラフィー研究の一大中心地といった感があった。ご縁あって、寺部 茂先生の指導の下、卒業および修論研究という、研究の第一歩を歩み始めた私は、特にこれといった理由もなく、クロマトグラフィーと出会うことになり、現在までつきあいが続いている。今回、特集号に寄稿するにあたり、これまでの私を振り返り、また、これからのクロマトグラフィーについて考えてみたい。

2. クロマトグラフィーとの出会い

(1979年~1981年: 学生)

配属した工業分析化学講座 (第8講座) では、シオノギから寺部先生が助手として着任されたばかりであり、第1期生として2名の学生が指導を受けた。テーマは、「新規 HPLC 検出器 (流動電流検出器) の開発と応用 (山本潔君、現住友化学) と「タンパク質の精密分析用逆相充填剤の開発」(西) であった。また、1981年には、山本、西、大塚 (現京都大学教授)、市川 (現原子力安全システム研究所) の学生、それに先生を加えた5人で、単行本 Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Ed., L. R. Snyder, J. J. Kirkland を用いた輪読会を行った。配属直後に、先生からペプチド類の微細な違い、例えばインシュリンの種別 (ブタ、ウシなど…

…) 分離が ODS カラムで良好になされている論文 (シオノギ小中盛隆博士ら) を渡され、分離性能の高さに感心した記憶がある。この延長として、当時逆相 HPLC では不得手であったタンパク質を対象として、微細な違いも識別 (分離) できる新規逆相充填剤の設計・開発を行うことになった。当時の HPLC 装置の性能と信頼性 (再現性) は、それなりに満足のおくレベルであり、分離モードとしては逆相 HPLC が汎用となりつつあった。

ちょうどその頃、東ソーからサイズ排除クロマトグラフィー用の優れた充填剤 TSKGEL3000SW (だったと記憶する) が世に発表され、六鹿先生たちのグループが多くの成果を報告されていた。これにヒントを得て、シリカゲル表面をジオール修飾し、さらにそれにオクチル基などの疎水性置換基を導入した充填剤を設計・試作した。研究室に備え付けのパッカーでステンレス空カラムに充填し、設計性能がどうか、わくわく (びくびく) しながらチャートを覗き込んでいた当時の姿を思い出す。成果は乏しかったが、ともかくチトクローム C の種別分離が逆相モードで達成されたので、J. Chromatogr. に投稿し、採用された[1]。これが私の最初の論文である。

3. クロマトグラフィーを駆使して

(1982年~1998年: 田辺製薬研究員)

寺部先生との出会いから、必然的に医薬品業界に関心を持ち、修士課程終了後1982年、田辺製薬(株) (現田辺三菱製薬(株)) に就職することになった。田辺製薬では、GMP (Good Manufacturing Practice) の関係で、工場品質管理部門と試験法研究部門が分離して、後者が分析化学研究所 (現 CMC 研究センター分析研究部) として設立されたときにあたり、その研究所の第1期の入所となった。当時の田辺製薬は、固定化酵素研究で世界をリードしており、千畑一郎博士 (元社長) 以下、そうそうたる研究者が多く在籍し、研究に夢膨らませたが、現実には甘くなかった。入社前に先生からも言われていたのだが、分析分野は80%以上がルーチンであり、入社後数年間は、医薬品開発における分析業務のイロハを見習うのが精一杯であった。ただ、大学に行っては、研究のできない不満 (愚痴) をよく、先生にぶつけていたように思う。

医薬品の国際展開は、当時の国内製薬メーカーでは珍しいことであったが、入社した当時、田辺製薬ではジルチアゼム塩酸塩（ヘルベッサー：2S3S 体が活性体）[2]の米国開発に関連して、光学異性体の分離評価法の開発が研究所ミッションとして急浮上していた。規制当局 FDA の光学純度に関する要求は厳しく、その対応のため、研究所は当時新しい分野であった、HPLC 法による光学純度測定法に取り組んだ。それは、今で言う間接法、いわゆるキラル誘導体化法によるものである。合成部門の協力を得て、キラル試薬としてアミノ酸をキラル部位、芳香族環を UV 吸収部位とする様々な化合物を創製し、医薬品の光学純度測定法に応用した[3,4]。図 1 に用いたキラル試薬と 4 つに分離されたジルチアゼム誘導体類のクロマトグラムを示す。シリカゲルカラムを用いる順相モードでの分離であった。なお、ジルチアゼム塩酸塩の開発研究は、1988年に初めて設けられた第 1 回日本薬学会技術賞を、製薬メーカーとして初めて受賞することになる[5]。

会社での研究は、上記のような状況であったため、必然的に HPLC による医薬品の光学異性体の分離法開発となった。ニーズに呼応するかのように、キラル試薬の開発やオボムコイドのようなキラルカラムが登場したのも 1980年代後半であったように思う。なお、ジルチアゼムはオボムコイドカラムで、初めて逆相モードでの分離が達成された[6]。その後は、ダイセル社に代表されるように、様々なキラルカラムが開発・市販されるようになり、低分子の合成医薬品（前述のジルチアゼム塩酸塩も含む）の多くの、直接光学異性体分離が可能となっている。このような状況のもと、1989年には、日本化学会編の季刊化学総説としてキラル分離[7]が、1990年にはクロマトグラフィー[8]が取り上げられている。また、1989年には、第10回記念液体クロマトグラフィー討論会が、国際大会（CIS'89）として東京で開催され、翌年1990年には、SCS が設立された。

少し遡るが、寺部研では、当初のクロマト関連の研究に代

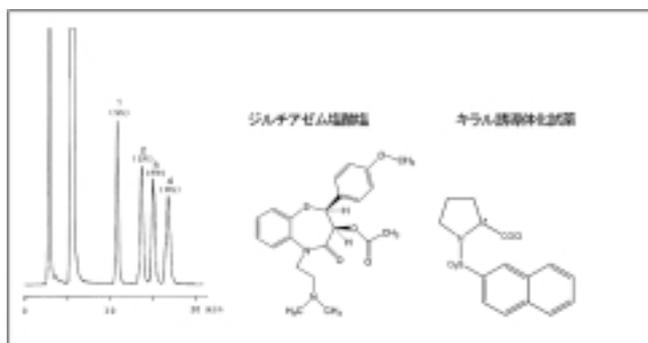


図 1 キラル誘導体化試薬を用いたジルチアゼム塩酸塩 4 種類の光学異性体分離[3]

1 : 2S3S 誘導体 (ジルチアゼム)、2 : 2S3R 誘導体、3 : 2R3R 誘導体、4 : 2R3S 誘導体。カラム：Zorbax Sil (4.6 mm I. D.、15cm)。移動相：CH₃Cl/CH₂Cl₂/CH₃OH/ジエチルアミン=200/50/30/0.1。254nm。

わって、さらに高性能を有するキャピラリー電気泳動 (CE)、また、新分離モードであるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) に関する基礎研究が展開されており、大塚先生が MEKC での初めての博士論文 (1986年) を発表されていた。私も刺激を受け、寺部先生から検出器のパーツやスリットを頂戴して CE 装置を試作し、医薬品分析への MEKC 応用研究を開始した。初めて目にした何十万段というピークのシャープさに感動したのを先日のように思い出す。成果のうち 2 題 (MEKC によるヒト血漿直接注入法による血漿中アスポキシシリンの定量[9]と胆汁酸ミセルを用いた MEKC による医薬品の光学異性体の分離[10]) は、初の国際学会 (といっても国内開催の上記 CIS'89) で発表を行った。その後も会社業務の隙間を探りつつ、継続して MEKC による医薬品分析に関する研究を推し進め、薬学部の中川照眞先生の指導下、学位を 1991年に取得した。CE 法 (あるいは MEKC 法) による医薬品分析のうち、光学異性体の分離法開発は、現在のテーマでもある。本法はもっと利用されてもよいと考えるが、これは後で触れたい。なお、2002年には、SCS 学会設立 10 周年記念事業の一環として、キラル分離に関する単行本が出版されている[11]。

4. CMC とクロマトグラフィー

(1999年～2007年：田辺製薬管理職)

会社では、その後も一貫して CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) の品質評価部門に籍を置き、1999年に管理職 (主任研究員) となった。CMC とは、原薬プロセス研究、製剤開発研究、および原薬と製剤の品質評価研究の 3 部門が連携を密にするために統合した開発系の研究部門である。欧米の医薬品メーカーが用いている形態であるが、今では国内製薬メーカーも採用している。また、CMC 開発、あるいは CMC 薬事といった、CMC が冠されている部署も増えてきた。医薬品開発業務における CMC のミッションは、開発計画に基づき、タイムリーに非臨床あるいは臨床試験に必要な原薬、製剤 (治験薬) を供給することにある。

CMC の品質評価部門では、原薬合成部門、製剤開発部門で製造された医薬品候補 (治験原薬、治験薬) の品質評価を担当する。原薬関連では、原料、中間体 (各ステップ毎)、最終原薬 (以下、原薬類) の品質を評価することになる。当然だが、各試験法には分析法バリデーションといった作業が必要であり、また、試験項目も合理的に選択しなければいけない。さらに、自社品質保証部門 (QA と呼ぶ監査部門) の承認を得る必要があるなど、研究部門の勝手は許されないシステムが機能する。原薬類の品質評価では、主として純度、含量および結晶形の確認が要求される。純度では、類縁物質 (いわゆる不純物類)、揮発性不純物 (残留溶媒、水分量など)、また、場合によっては、触媒や無機塩といった無機性不純物の評価を行う。ここでの主役はクロマトグラフィーで、もっぱら GC と HPLC が用いられる。

多くの場合で、製法が確立されていないことが普通であり、より一層の製法効率化や純度向上、原価低減を目指して、原薬プロセス研究部門では製法改良が実施される。そのため品質担当部門では、そのたびごとに試験法を設定することになる。そこで、多様な対象物質に対応すべく GC 分析では、ヘッドスペース法を用いた残留溶媒の一斉分析法が、HPLC 分析では、トリフルオロ酢酸 (例えば0.1%) とアセトニトリル混液によるグラジエント溶出での類縁物質評価法がよく採用される (メタノールに変更されつつあるかもしれない)。対象医薬品の製法が固まり、製法由来の類縁物質や分解物の素性が判明すれば、よりシンプルなイソクラティック溶出による純度試験法を検討することになる。一方、製剤の品質評価でも同じく、HPLC による定量 (含量や溶出率) や純度試験が評価項目の中心となる。

このように CMC の品質評価部門でのクロマトグラフィーは、まさに主力の評価機器であり、設置されている HPLC、また、GC 装置の数は、会社内のどの研究部門よりも多い (筆者のいた田辺製薬ではそうであったと思う)。研究員は、自分が関与する医薬品候補のプロジェクトにおいて、一人数台のクロマトグラフィーを駆使して、品質評価を行っている。一方、薬物動態研究部門では、もっぱら LC-MS 装置による血中・尿中の薬物濃度測定や代謝物の濃度測定が行われている。以上のように医薬品の開発研究部門では、クロマトグラフィーによる評価が中心となっている[12]。しかし、それに逆行するかのように、SCS 主宰の学会、春開催のクロマトグラフィーシンポジウムおよび秋開催のクロマトグラフィー科学会議での、企業 (現場) からの発表がめっきり少なくなってきた。基礎、原理、新規性の高い研究に加え、実際に使用している現場からの情報・報告は重要である。是非、SCS の会員諸氏、特に、企業研究員からの積極的な発表 (話題提供) を期待したい。

数年前から、ヤクルトの相山氏、シオノギの岡林氏、味の素の宮野氏らといった企業メンバを中心として、様々なテーマでのワークショップ (WS) が企画され、上記学会に付設して開催されている。こちらの WS のほうにも参加いただければ大変うれしい。

5. これからのクロマトグラフィー

(2008年～現在：大学教員)

さて、昨年3月に26年勤めた会社を退職し、ご縁あって郷里広島的女子大に新設された薬学部で、教育と研究をすることになった。これまでの CMC でのクロマトグラフィー実務経験をベースとして、これからのクロマトグラフィーを考えてみたい。

品質評価部門では、現時点においても通常の分析サイズ (HPLC では4.6mm×15cm) のカラムを用いる評価法が一般的である (日本薬局方はじめ、新薬の製造承認申請資料においても)。しかし、省エネ、あるいは環境重視の観点から、

再度、クロマト分析でのスケールダウン化を推し進める必要があると思われる。今年に入って不況のあおりで、アセトニトリルの安定供給が危ぶまれている。過去にも分析用溶媒に関するリスクは起こった。そこで、あらためてマイクロ HPLC、あるいは UPLC (UFLC) による品質管理法のスタンダード化、あるいは、CE の適用[13,14]が期待される。

従来の低分子合成化合物は、相変わらず医薬品の主流であるが、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の開発も盛んである。リウマチ薬では第一選択薬といってもよい。これらバイオ医薬品では糖鎖分析が必須となるが、エリスロポイエチンの糖鎖中のシアル酸の数に基づく多様性の確認や IgG モノクローナル抗体の糖鎖の有無等に、CE が評価法として採用されている。マイクロ HPLC あるいは CE を用いることで劇的な溶媒の消費低減化が達成されよう。図2に緩衝液のみを用いた (溶媒フリー) CE 法による、ジルチアゼム塩酸塩の光学異性体の分離例を示す[15]。キラルセクターとしてデキストリンを泳動液に添加しているだけである。今後はこの分野に関連する研究をさらに進めてみたいと考えている。一方、GC では、早くからキャピラリーカラムが汎用されている。CMC では、HPLC 検出では吸収を持たないものや揮発性の製造原料等の品質管理として採用されており、未知不純物等の検討のために GC-MS 装置も普及してきている。LC-MS は品質管理用としては高価であるが、やはり未知な分解物や不純物探索のためには CMC では必須の機器である。更なる低価格化を期待する。

最後に、昨年から大学で教育としての分析化学 (医薬品分析) を教えているが、違和感を感じた。それは、CMC を含む医薬品メーカーの開発・研究部門でよく用いられている、いわゆる現場の分析法・評価法と、教科書の中身が随分と違うことである。基礎・原理 (ある程度は歴史も) を教える「基礎教育」といった部分を大学教育は持つのであろうが、現実

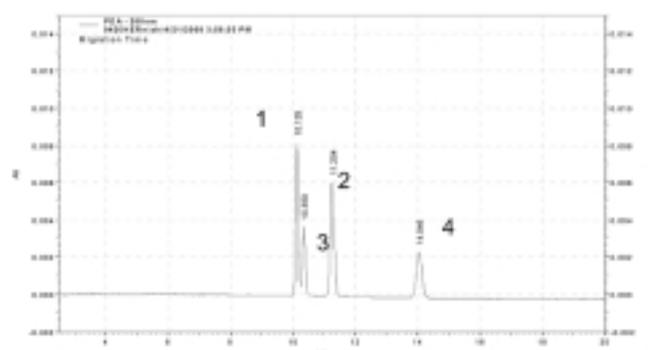


図2 CEによるジルチアゼムとその分解物 (脱アセチル体) の直接光学異性体分離[15]

1: ジルチアゼム (2S3S 体)、2: エナンチオマー (2R3R 体)、3: 脱アセチル体、4: エナンチオマーの脱アセチル体。キャピラリー: 75 μ m I. D.、有効長60cm)。泳動液: 20mM リン酸塩緩衝液 (pH2.5)、15%デキストリン (JP グレード)。214nm。

とあまりかけ離れないようにしなければならない。分析の世界では、動きが激しいのは当たり前であり、少しでも高感度や簡便・堅牢、また、経済的な分析評価法が開発されれば、旧手法は陳腐化し、現場で使用されなくなる。一例だが、教科書にはベンゼンの例が多くある。分析の教科書の中からは、はずしてもよいのではないかと思う。また、薬学の大学教育では、医薬品製造やその品質管理に関する教育、例えば、先に述べた GMP などの話が欠落しているように感じる。どうしたものか。品質の確保が医薬品にとっては最も大切な項目であり、すべて（有効性および安全性）の担保となっていることを再認識してほしい。

謝辞

今回の内容の一部は、筆者が在籍した田辺三菱製薬(株)CMC 研究所（現 CMC 研究センター）での経験を中心に紹介したものです。同社の皆様に感謝いたします。

参考文献

- [1] Terabe S., Nishi H., Ando T., *J. Chromatogr.*, **1981**, 212, 295–304.
- [2] 第十五改正日本薬局方, (財)日本公定書協会編, じほう, **2006**, p. 591–592.
- [3] Shimizu R., Kakimoto T., Ishii K., Fujimoto Y., Nishi H., Tsumagari N., *J. Chromatogr.*, **1986**, 357, 119–125.
- [4] Nishi H., Ishii K., Taku K., Shimizu R., Tsumagari N., *Chromatographia*, **1989**, 27, 301–305.
- [5] 阿部久二, 井上博純, 長尾 拓, 薬学雑誌, **1988**, 108 (8), 716–732.
- [6] Nishi H., Fujimura N., Yamaguchi H., Fukuyama T., *J. Chromatogr.*, **1993**, 633, 89–96.
- [7] 季刊化学総説 No.6 「光学異性体の分離」, 日本化学会編, 学会出版センター, **1989**.
- [8] 季刊化学総説 No.9 「クロマトグラフィーの新展開」, 日本化学会編, 学会出版センター, 1990.
- [9] Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., *J. Chromatogr.*, **1990**, 515, 245–255.
- [10] Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M., Terabe S., *J. Chromatogr.*, **1990**, 515, 233–243.
- [11] 「キラル分離の理論と実際」, 今井一洋, 後藤順一, 津田孝雄編, 学会出版センター, **2002**.
- [12] 西 博行, 「CMC 研究とクロマトグラフィー」, LC talk, **2007**, vo.66.
- [13] 西 博行, 「製薬製剤の品質管理」, 臨床検査, 第49巻 (9号), **2005**, 1021–1026.
- [14] 西 博行, CE アドバンス, **2009**, 印刷中.
- [15] 西 博行, 未発表データ.