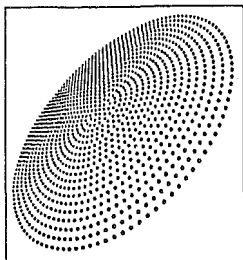


特集●Vol.34 No.4 微量糖鎖分析の現状と将来



LC/MSを用いた グライコーム解析

川崎ナナ^{*,**} 橋井則貴^{*,**}伊藤さつき^{*} 原園 景^{*} 川西 徹^{*}

Key words : LC/MS、グライコーム、グライコミクス、糖タンパク質、糖ペプチド、糖鎖

はじめに

細胞・組織に発現している全タンパク質(プロテオーム)を系統的・網羅的に解析することによって生命現象を解き明かそうとするプロテオミクスに高い関心が集まっている¹⁾。さらに最近では、細胞内タンパク質の主な翻訳後修飾の一つである糖鎖が、タンパク質の機能調節等を介して様々な疾患や発生・分化等に深く関わっていることが明らかになってきたことから²⁻⁸⁾、細胞・組織発現糖タンパク質やその糖鎖部分の構造・機能を解析しようとするグライコミクスへの関心も高まっている^{9,10)}。

プロテオミクスの基盤的技術である質量分析法(MS)は、グライコミクスにおいても、糖タンパク質や糖鎖の構造特性解析のための有用なツールとして期待されている^{11,12)}。しかし、糖タンパク質は複数の糖鎖結合部位に

様々な糖鎖が結合した不均一な集合体であることや、糖鎖が結合することによってMSにおけるイオン化効率が低下するなどの問題があるため、プロテオミクスの手法をそのまま利用できない場合が多い。そこで、レクチンや各種液体クロマトグラフィー(LC)など、糖鎖生物学分野で従来から利用されてきた糖鎖構造解析技術と、MSやデータベースを中心としたプロテオミクスの技術を組み合わせた様々なグライコーム解析技術の開発が進められている^{13,14)}。中でもLCとMSをオンラインで結んだLC/MSは、イオン化を妨害する物質を除去したり、不均一な糖鎖混合物を分離しながら、直接質量分析を行うことが可能な分析技術で、簡便・迅速なグライコーム解析法として優れている。本稿では、LC/MSを利用したグライコーム解析例をいくつか紹介する。

1. LC/MSによる細胞糖鎖の解析

疾患や発生・分化等に伴う糖鎖構造や糖鎖分布の微細な変化を見つけ出すには、糖タン

*国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

**独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業(CREST)

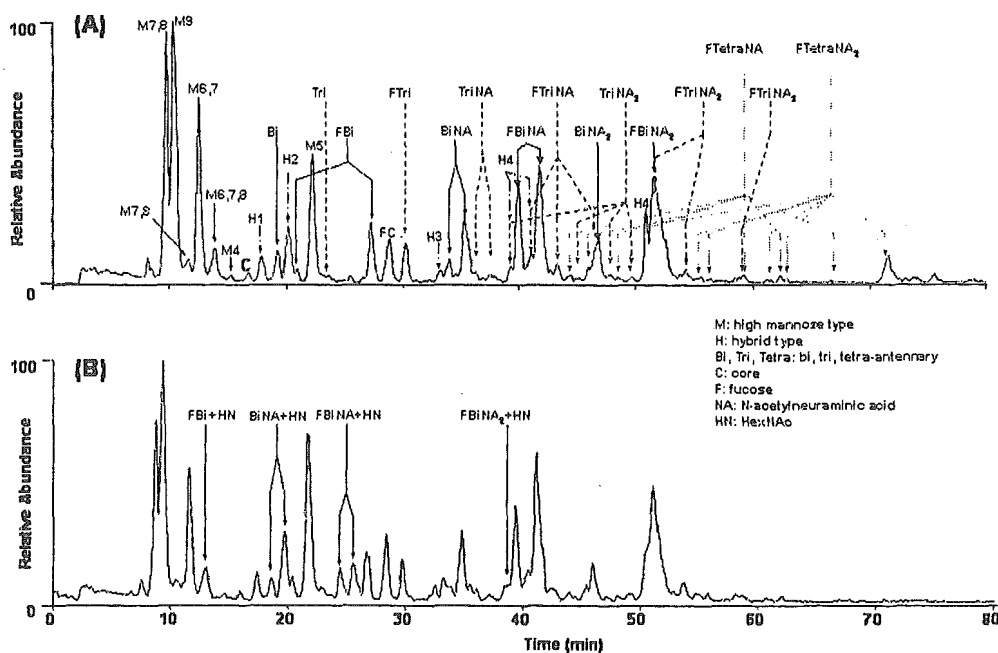


図1 (A) CHO細胞、及び(B) GnT-III遺伝子導入CHO細胞の糖鎖プロファイル

サンプル：CHO細胞(1×10^7) 膜画分からN-グリコナーゼによって切り出した糖鎖を NaBH_4 で還元した
 LC/MS：カラム，グラファイトカーボンカラム(0.2 x 150 mm)；溶離液A, 5 mM 酢酸アンモニウム/2 %
 アセトニトリル；溶離液B, 5 mM 酢酸アンモニウム/80 %アセトニトリル；グラジエント, B液 10-45 %
 (90分)；流速, $2 \mu\text{l}/\text{min}$ ；MS, TSQ-7000(サーモエレクトロン)

パク質から切り出した糖鎖を LC/MS を用いて解析する糖鎖プロファイリングが適している。構造糖鎖生物学分野ではこれまでに、糖鎖誘導体化とLCを組み合わせた様々な分離技術が開発されている¹⁵⁻¹⁷⁾。これらをオンライン MS と組み合わせることによって、糖鎖不均一性の高い試料の解析が容易になる^{18, 19)}。筆者らは、糖タンパク質からN結合型糖鎖を酵素的に切り出し、還元末端を NaBH_4 で還元した後、親水性物質に対する吸着能の高いグラファイトカーボンカラムを用いて LC/MS (GCC-LC/MS) を行う糖鎖プロファイリング法を開発している²⁰⁻²³⁾。以下に GCC-LC/MS を用いて細胞発現糖タンパク質の糖鎖を解析した例を2つ紹介する。

1.1 糖鎖プロファイリング

図1A は CHO 細胞の膜画分からN結合型糖鎖を酵素的に切り出した後、 NaBH_4 で還元し、GCC-LC/MS 操置で分析して得られた結果をトータルイオンクロマトグラム (TIC) として表したもので、糖鎖の分布 (プロファイ

ル) を示している。各ピークの糖鎖構造は、MS によって測定された質量を基に推定された単糖組成より、高マンノース型、及び2本鎖を中心とした複合型シアロ糖鎖であると推定された²⁴⁾。図1B は、CHO細胞に N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) 遺伝子を導入した CHO 細胞の糖鎖プロファイルである。GnT-III はトリマンノシルコアの β 1-4Man に GlcNAc を付加させる酵素である。GnT-III が導入された細胞には複数の新しい糖鎖が出現していることがわかる。これらは質量から、CHO 細胞に結合している 2本鎖糖鎖に N-アセチルヘキソサミン (HexNAc) が1分子 (203Da) 付加した糖鎖であることが確認され、GnT-III によって生じた GlcNAc 付加糖鎖と推定された。このように糖鎖プロファイリングは、サンプル間の糖鎖の構造や分布を比較する方法として優れ、糖鎖生合成経路に起きた変化や、その変化に伴って生じた糖鎖の構造解析に利用できると期待される。

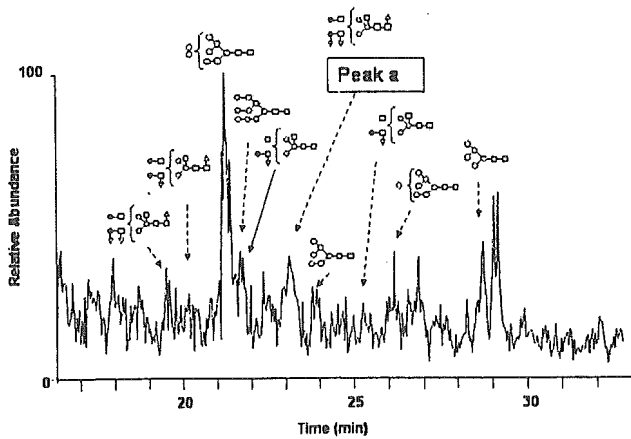


図2 マウス腎臓の糖鎖プロファイル

サンプル：腎臓 (20 μ gタンパク質) の膜を含む画分から *N*-グリコナーゼによって切り出した糖鎖を NaBH_4 で還元した

LC/MS：カラム及び溶離液，図1に準ずる；グラジエント，B液 5-45 % (60分)；流速，2 μ l/min；MS，LTQ (サーモエレクトロン)

●, Gal; ○, Man; □, GalNAc; △, Fuc

1.2 糖鎖配列解析

糖鎖の配列や結合様式は、MS を繰り返す多段階 MS (MS^n) によって、ある程度決定することができる²⁵⁻²⁷。図2は、マウス腎臓の膜画分から切り出した *N*結合型糖鎖を 2-アミノピリジンで誘導体化し、LC/MS による糖鎖プロファイリングを行ったものである。主な糖鎖は質量から、高マンノース型糖鎖、及び複数のフコースが結合した複合型糖鎖と推定された。各糖鎖の配列は、 MS^n により決定した²⁸。一例として、図3 にフコシル糖鎖ピーク a の MS^{2-4} スペクトルを示す。 MS^2 によって [ヘキソース(Hex)-HexNAc-Fuc + Na]⁺ (m/z 534)、及び [Hex-HexNAc-Fuc₂ + Na]⁺ (m/z 680) が生じたことから、ピーク a にはリス b (Le^b, Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc)、またはその異性体リス y (Le^y, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc) 構造が存在することが示唆された(図3A)。そこで、 m/z 534 を前駆イオンとし

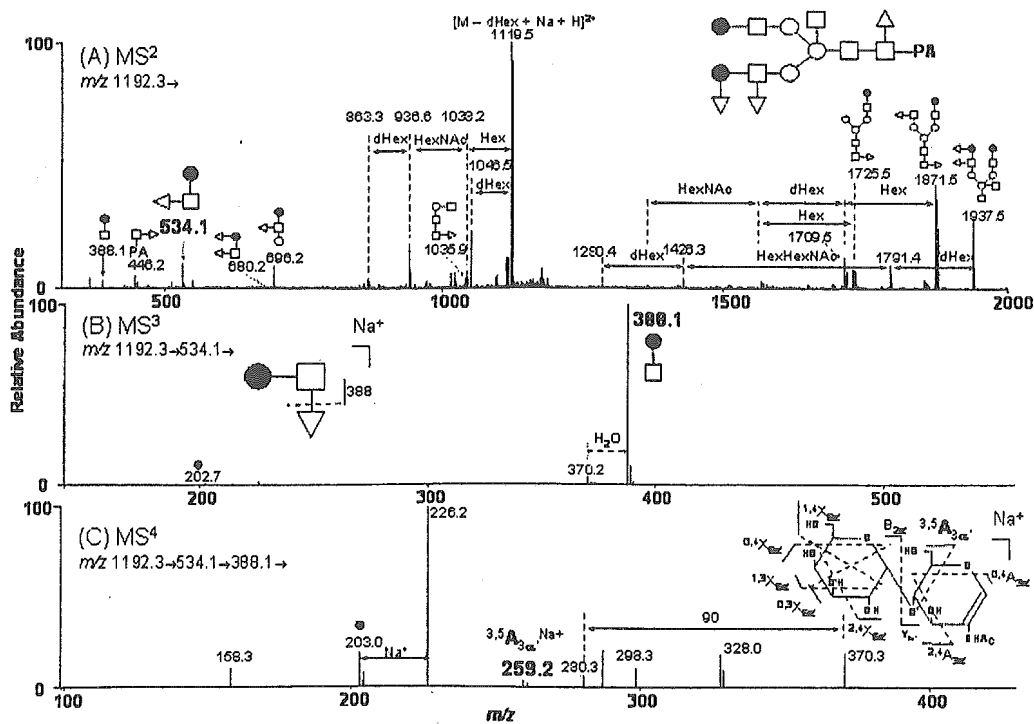


図3 図2中のピークaの (A) MS^2 (前駆イオン： m/z 1192.3)、(B) MS^3 (前駆イオン： m/z 534)、及び (C) MS^4 (前駆イオン： m/z 388) スペクトル

て MS³ を行ったところ、フコースが開裂した [Hex-HexNAc + Na]⁺ (*m/z* 388) が検出された (図3B)。つぎに *m/z* 388 を前駆イオンとして MS⁴ を行ったところ、環開裂した GlcNAc の 4 位炭素原子に Gal が結合したイオン (*m/z* 259) が検出されたことから、この部分構造は Le^y と決定された (図3C)。さらに、他の糖鎖のプロダクトイオンを解析した結果、マウス腎臓に結合しているフコシル糖鎖は Le^x 及び Le^y 糖鎖であることが明らかとなった。Le^x は SSEA-1 糖鎖としても知られる糖鎖エピソードで、マウス ES 細胞に多く発現していることが知られ、ES 細胞の分化状態のモニタリングに利用されている糖鎖である²⁹⁾。また、シアル酸が結合したシアリル Le^x はヒト腫瘍マーカーとして利用されており³⁰⁾、マウス腎臓の主な糖鎖が Le^x 糖鎖であったことは興味深い。

2. LC/MSによる糖ペプチド解析

タンパク質から糖鎖を切り離すと、糖鎖とタンパク質間の結合に関する情報が失われてしまうので、細胞・組織中の任意の糖タンパク質糖鎖の構造特性解析は糖鎖を切り離さずに行う。膜糖タンパク質などは不溶性または高分子量タンパク質であることが多いので、還元アルキル化した後、トリプシン、Lys-C、Glu-C、または Asp-N 等で消化してから分析するのが一般的である。MS において、ペプチドに比べて糖ペプチドのイオン化効率が悪いために、ペプチドが混在すると糖ペプチドのマススペクトルが得られにくいという問題があるが、LC/MS によってペプチドを除きながら質量測定を行えば、良好な糖ペプチドのマススペクトルを得ることができる³¹⁻³³⁾。糖タンパク質消化物の LC/MS では複雑なクロマトグラムが得られることが多いが、MSⁿ や インソースフラグメンテーションによって生じた糖鎖に特徴的なイオン、例えば、HexNAc⁺ (*m/z* 204) や Hex-HexNAc⁺ (*m/z* 366) などを利用することによって、糖ペプチドの MS² スペクトルを選び出すことができる

^{32, 34)}。選び出した糖ペプチドの MS² スペクトルには、ペプチドやペプチドに GlcNAc が結合したイオンが検出されている場合が多く、これらのイオンを基にペプチドと糖鎖部分の構造を決定する^{32, 33)}。

2.1 糖タンパク質の網羅的解析

図4A は、アルブミンをある程度除去したヒト血清のトリプシン消化物 0.02 μ l 相当を、C18カラムを用いた LC/MS² 装置で分析して得られた MS¹ の TIC である。血清は様々なタンパク質の混合物であるので、非常に多くのペプチドが検出されているが、MS² によって生じた HexNAc⁺ (*m/z* 204) を指標として、糖ペプチドの MS² スペクトルを選び出した (図4B)。選び出した糖ペプチドのペプチド配列と糖鎖構造は、MS² スペクトルを基に決定した。一例として図5 にピーク b の MS² スペクトルを示す。*m/z* 1442 に検出されている [ペプチド + GlcNAc + 2H]²⁺、及びペプチド由来のフラグメント (b, yイオン) から、この糖ペプチドはハ

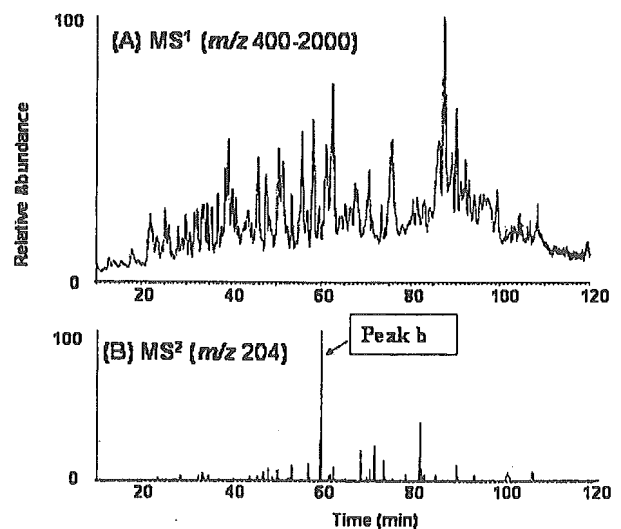


図4 (A) アルブミン除去ヒト血清トリプシン消化物の LC/MS によって得られた TIC、(B) LC/MS/MS によって生じた *m/z* 204 イオンのマスクロマトグラム
LC/MS: カラム, C18 (0.2 x 50 mm); 溶離液 A, 0.1 % ギ酸-2 % アセトニトリル; 溶離液 B, 0.1 % ギ酸-90 % アセトニトリル; グラジエント, B 液 5-50% (120 分); 流速, 2 μ l/min; MS, QSTAR (アプライドバイオシステムズ)

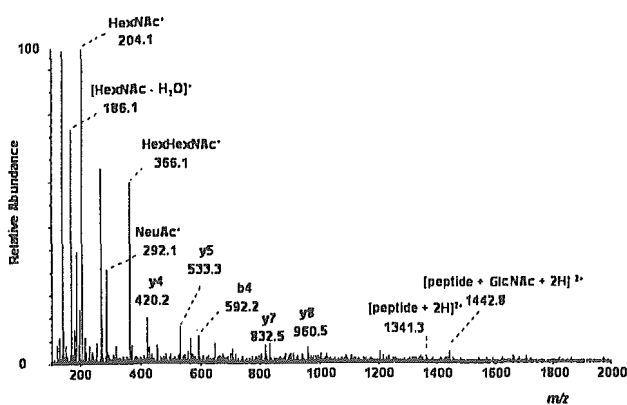


図5 図4B中のピークbのMS²スペクトル

プトグロビンの Met120-Lys143 と推定された。また、糖鎖構造は、糖ペプチドの分子量とペプチド部分の分子量の差からジシアロ 2 本鎖糖鎖と推定された。この方法により、ハプトグロビンの他、血清中のトランスフェリン由来糖ペプチドなども解析することができた。

2.2 糖鎖構造選択的糖タンパク質解析

ペプチド混合物の中からすべての糖ペプチドを選び出す場合は、糖鎖にほぼ共通して存在する HexNAc⁺ を利用するが、任意の糖鎖を有する糖ペプチドのみを選び出す場合は、その構造に特徴的なイオンを利用する。例えば、マウス腎臓から前述した Le^x 結合ペプチドを見つけだす場合は、Le^x に相当する Hex-(Fuc)HexNAc⁺ (m/z 512) 及び Hex-HexNAc⁺ (m/z 366) を指標とすればよい。図6は、マウス腎臓膜画分をトリプシン消化し、フコースを認識する AAL レクチンアフィニティークロマトグラフィーによりフコシル糖ペプチドを回収した後、C18 カラムを用いて LC/MS^{2,3} を行った結果である。MS¹ では複雑なクロマトグラムが得られたが (図6A)、MS² によって Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc⁺ を生じ (図6B)、さらに MS³ によって Gal β 1-4GlcNAc⁺ を生じたペプチドを Le^x 結合糖ペプチドとして選別した (図6C)。選び出した糖ペプチドの糖鎖構造は、別途、強度の高いイオンを前駆イオンとして自動的に MSⁿ を行うデータ依存的 MSⁿ

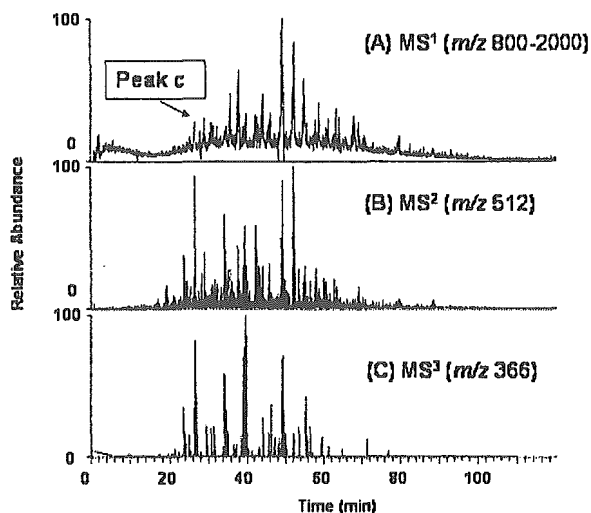


図6 (A) マウス腎臓トリプシン消化由来フコシル糖ペプチドのTIC、(B) データ依存的MS²によって生じた m/z 512 イオンのマスクロマトグラム、(C) MS³ (前駆イオン: m/z 512) によって生じた m/z 366 イオンのマスクロマトグラム

サンプル: マウス腎臓膜画分トリプシン消化物の AAL アフィニティークロマトグラフィー吸着画分 LC/MS: カラム及び溶離液, 図4に準ずる; MS, LTQ

によって解析した。図7はピーク c に溶出された Le^x 結合糖ペプチドのデータ依存的 MS² 及び MS³ スペクトルである。フラグメントパターンからこの糖ペプチドは、図7に示すような Le^x 部分構造を 2 分子有する糖鎖であることが明らかになった。さらに、MS² で生じた [peptide + GlcNAc + 2H]²⁺ (m/z 906) を前駆イオンとして MS³ を行った後、プロテオミクスで利用されているデータベース検索を行ったところ、この糖ペプチドはガンマーグルトamilトランスフェラーゼの LHNQLLPN*TTTVEK (*糖鎖結合位置) と推定された。マウスガンマーグルトamilトランスフェラーゼに Le^x 糖鎖が結合していることは、木幡らによって報告されている³⁵⁾。このように、これまでは糖タンパク質を特定してから糖鎖を解析するのが一般的であったが、LC/MSⁿ とタンパク質データベース検索を利用することによって、任意の糖鎖構造からタンパク質を特定することが可能となってきた。

臨床化学 第34巻第4号 2005年11月

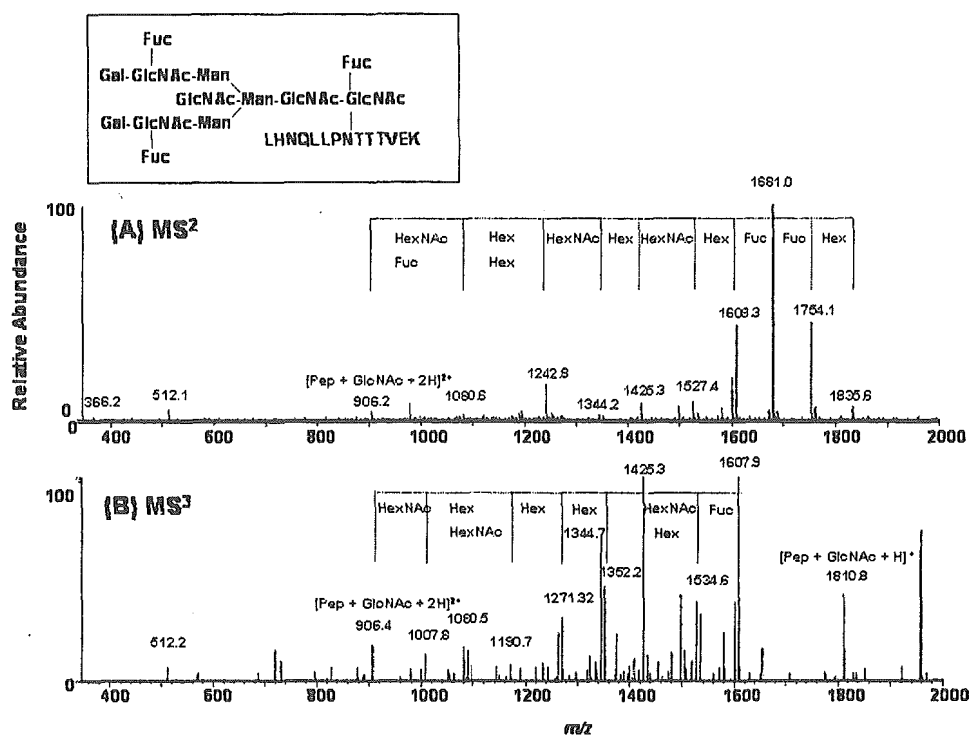


図7 図6中のピークcの位置に溶出された糖ペプチドの (A) データ依存的MS²、及び (B) データ依存的MS³スペクトル

3. 電気泳動法とLC/MSを用いた糖タンパク質の構造特性解析

細胞内糖タンパク質をインタクトのまま扱う場合は、不溶性糖タンパク質や、複雑な混合物中の糖タンパク質の分離に優れた電気泳動を利用するのが効果的である^{36, 37)}。電気泳動を利用したグライコム解析例を2つ示す。

3.1 レクチンブロットとLC/MSによる糖タンパク質の同定

はじめに2次元電気泳動とレクチンを利用することによって、任意の糖鎖構造を持つコアタンパク質を特定した例を示す。図8Aは、前述のGnT-III遺伝子導入CHO細胞の2次元電気泳動図である。PHA-E₄レクチン染色を行い、GnT-IIIによってGlcNAcが付加されたタンパク質の位置を特定した(図8B)。別に展開した泳動ゲルからレクチンで染まった位置に相当するスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化、ペプチド抽出、LC/MS、及びタンパク質データベース検索を行った結果、こ

のタンパク質はインテグリン α 3と同定された²⁴⁾。GnT-IIIは癌細胞転移抑制に関与していることが知られている酵素で³⁸⁻⁴⁰⁾、そのターゲットタンパク質として細胞接着に関与しているインテグリンが同定されたのは興味深い⁴¹⁾。

3.2 LC/MSⁿによるゲル内糖タンパク質の構造特性解析

つぎに、LC/MSを利用してゲル内糖タンパク質の同定、及び部位特異的糖鎖解析を行った例を示す。図9Aはマウス脳の膜画分から調製したGPIアンカー型タンパク質群をSDS-PAGEで展開し、クーマシー染色したものである。20-23kDaに表れているタンパク質は、SDSによる抽出、トリプシン消化、LC/MSⁿ(図9B)、及びデータベース検索の結果、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するThy-1と同定された。図9Cはインソースフラグメンテーションによって生じたm/z 204のイオンのマスクロマトグラムで、糖ペプチドの溶出位置を示している。各糖ペプチドの糖鎖と

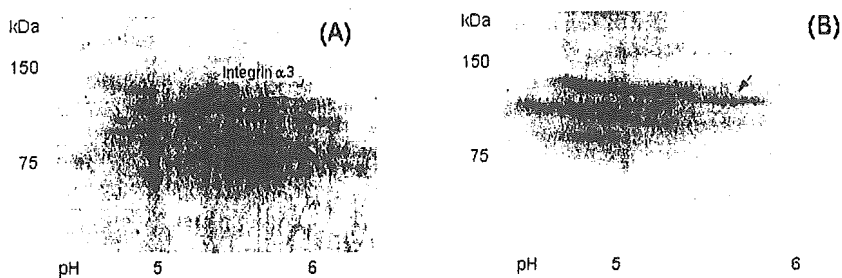


図8 GnT-III 遺伝子導入CHO 細胞の膜を含む画分の2次元電気泳動図
(A)CYPRO Orange 染色、(B)PHA-E₄レクチン染色

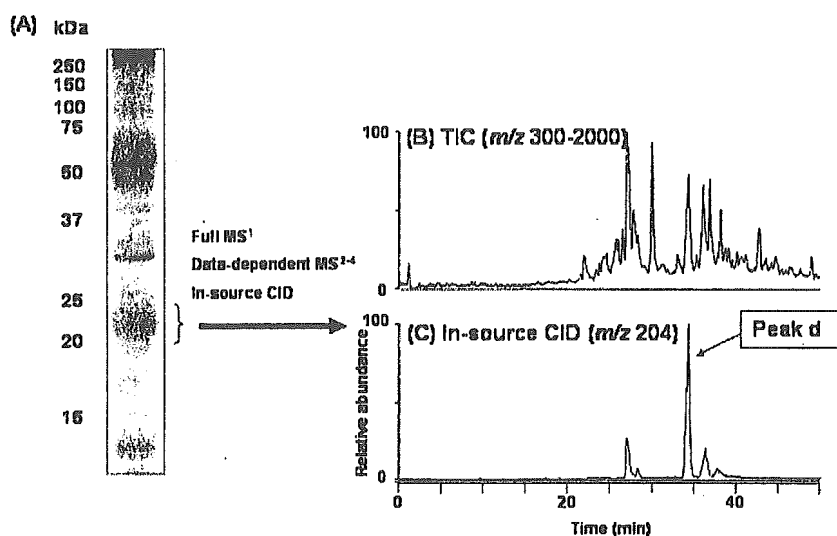


図9 (A) マウス脳由来GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE、(B) 20-23kDaタンパク質トリプシン消化物のLC/MS、及び(C) インソースフラグメンテーションによって生じた m/z 204イオンのマスクロマトグラム

サンプル：20-23kDaに泳動されたタンパク質を1% SDSで抽出しトリプシン消化した
LC/MS：図6に準ずる

ペプチドは MS² 及び MS³ により決定した。一例として図10 に、図9C のピークd のデータ依存的 MS² 及び MS³ スペクトルを示す。フラグメントパターンからそれぞれ糖鎖配列、及びペプチド配列を図のように推定することができた。同様にすべての糖ペプチドの MS^{2,3}

スペクトルを解析することによって、Thy-1 の Asn23, 74, 及び 94 に結合しているN結合型糖鎖の構造を明らかにすることができた³³⁾。現在では、クーマシー染色される程度の糖タンパク質から、かなりの糖鎖構造情報を得ることが可能となってきた。

臨床化学 第34巻第4号 2005年11月

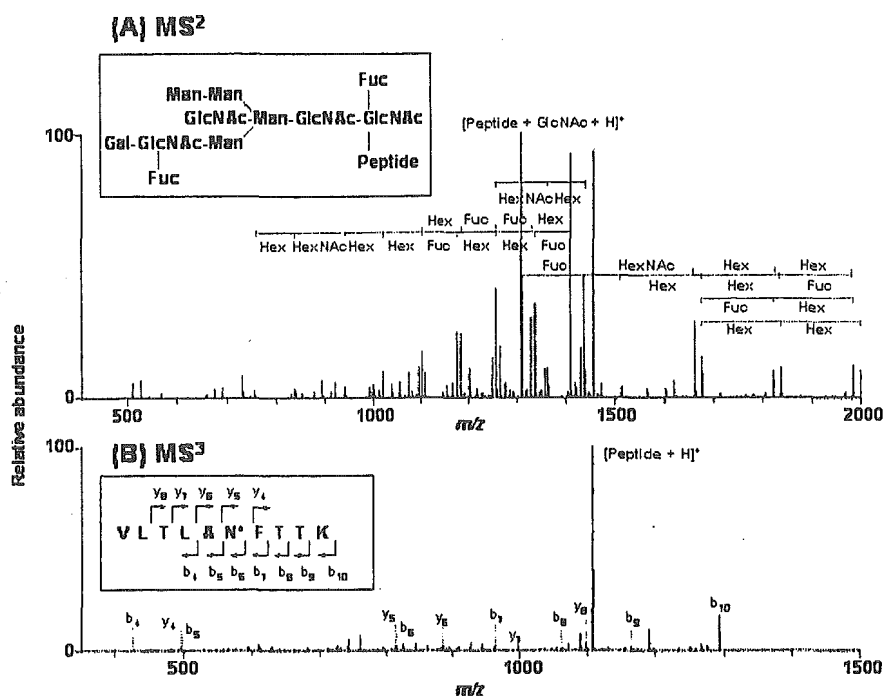


図10 図9中のピークdの(A) データ依存的MS²スペクトル、及び(B) データ依存的MS³スペクトル

おわりに

LC/MS とデータベース検索を基盤技術とするプロテオミクス的手法を糖鎖生物学分野に導入することによって、これまで「解析困難」と考えられていた細胞内糖タンパク質の構造特性が、誰にでも簡単に明らかにできるようになってきた。今後、これらのグリコーム解析技術が、診断や治療法の開発を目的とした疾患関連糖鎖・糖タンパク質の研究に貢献できるようになるものと期待される。

謝辞

本稿で紹介した内容は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業、日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金、並びに CREST の支援を受けて実施した研究成果をまとめたものである。

文献

- 1) Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Bader G, Wojcik J, Salwinski L, Ceol A, Moore S, Orchard S, Sarkans U, von Mering C, Roechert B, Poux S, Jung E, Mersch H, Kersey P, Lappe M, Li Y, Zeng R, Rana D, Nikolski M, Husi H, Brun C, Shanker K, Grant SG, Sander C, Bork P, Zhu W, Pandey A, Brazma A, Jacq B, Vidal M, Sherman D, Legrain P, Cesareni G, Xenarios I, Eisenberg D, Steipe B, Hogue C, Apweiler R: The HUPO PSI's molecular interaction format--a community standard for the representation of protein interaction data, *Nat Biotechnol*, **22**: 177-183, 2004.
- 2) Schachter H: Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins, *Cell Mol Life Sci*, **58**: 1085-1104, 2001.
- 3) Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM: ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA, *Cell*, **63**: 475-484, 1990.
- 4) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC: ELAM-1

- mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex, *Science*, **250**: 1130-1132, 1990.
- 5) Dennis JW, Granovsky M, Warren CE: Glycoprotein glycosylation and cancer progression, *Biochim Biophys Acta*, **1473**: 21-34, 1999.
 - 6) Delves PJ: The role of glycosylation in autoimmune disease, *Autoimmunity*, **27**: 239-253, 1998.
 - 7) Gleeson PA: Glycoconjugates in autoimmunity, *Biochim Biophys Acta*, **1197**: 237-255, 1994.
 - 8) Chui D, Sellakumar G, Green R, Sutton-Smith M, McQuistan T, Marek K, Morris H, Dell A, Marth J: Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 1142-1147, 2001.
 - 9) 三善英知, 谷口直之: プロテオミクスから機能グライコミクスへ: 糖鎖の機能解明の重要性、*生化学*, **76**: 1337-1343, 2004.
 - 10) Taniguchi N, Ekuni A, Ko JH, Miyoshi E, Ikeda Y, Ihara Y, Nishikawa A, Honke K, Takahashi M: A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes, *Proteomics*, **1**: 239-247, 2001.
 - 11) Morelle W, Michalski JC: Glycomics and mass spectrometry, *Curr Pharm Des*, **11**: 2615-2645, 2005.
 - 12) Dell A, Morris HR: Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science*, **291**: 2351-2356, 2001.
 - 13) Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Hirabayashi J, Kasai K, Takahashi N, Isobe T: Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins, *Nat Biotechnol*, **21**: 667-672, 2003.
 - 14) Qiu R, Regnier FE: Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics, *Anal Chem*, **77**: 2802-2809, 2005.
 - 15) Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y: A highly sensitive method for analyses of sugar moieties of glycoproteins by fluorescence labeling, *J Biochem (Tokyo)*, **90**: 407-414, 1981.
 - 16) Tomiya N, Awaya J, Kurono M, Endo S, Arata Y, Takahashi N: Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique, *Anal Biochem*, **171**: 73-90, 1988.
 - 17) Takahashi N, Nakagawa H, Fujikawa K, Kawamura Y, Tomiya N: Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides, *Anal Biochem*, **226**: 139-146, 1995.
 - 18) Suzuki-Sawada J, Umeda Y, Kondo A, Kato I: Analysis of oligosaccharides by on-line high-performance liquid chromatography and ion-spray mass spectrometry, *Anal Biochem*, **207**: 203-207, 1992.
 - 19) Lattova E, Perreault H: Profiling of N-linked oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization and mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **1016**: 71-87, 2003.
 - 20) Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T: Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal Biochem*, **269**: 297-303, 1999.
 - 21) Kawasaki N, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**: 113-123, 2002.
 - 22) Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **968**: 89-100, 2002.
 - 23) Kawasaki N, Haishima Y, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin, *Glycobiology*, **11**: 1043-1049, 2001.
 - 24) Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Hyuga M, Kawanishi T, Hayakawa T: Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: Analysis of glycan structural alteration in cells *Proteomics*, In press.
 - 25) Takegawa Y, Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Nakagawa H, Nishimura S: Structural assignment of isomeric 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides using negative-ion MSn spectral matching, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**: 937-946, 2005.
 - 26) Takegawa Y, Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Sano A, Yoshinari K, Kobayashi K, Nakagawa H, Monde K, Nishimura S: Assignment and quantification of 2-aminopyridine derivatized oligosaccharide isomers coeluted on reversed-phase HPLC/MS by MSn spectral library, *Anal Chem*, **76**: 7294-7303, 2004.
 - 27) Domon B, Costello CE: Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry,

- Biochemistry, **27**: 1534-1543, 1988.
- 28) Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Harazono A, Matsuishi Y, Hayakawa T, Kawanishi T: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**:3315-3321, 2005.
 - 29) Brown DG, Warren VN, Pahlsson P, Kimber SJ: Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stem cells and embryos. I. Lacto and neo-lacto determinants, *Histochem J*, **25**: 452-463, 1993.
 - 30) Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N: Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Sci*, **95**: 377-384, 2004.
 - 31) Satomi Y, Shimonishi Y, Hase T, Takao T: Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography /electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**: 2983-2988, 2004.
 - 32) Harazono A, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS, *Glycobiology*, **15**: 447-462, 2005.
 - 33) Itoh S, Kawasaki N, Harazono A, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T, Hayakawa T: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry: Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J.Chromatogr A*, **1194**:105-117,2005.
 - 34) Huddleston MJ, Bean MF, Carr SA: Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests, *Anal Chem*, **65**: 877-884, 1993.
 - 35) Yamashita K, Hitoi A, Tateishi N, Higashi T, Sakamoto Y, Kobata A: The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney gamma-glutamyltranspeptidase: occurrence of X-antigenic determinants and bisecting N-acetylglucosamine residues, *Arch Biochem Biophys*, **240**: 573-582, 1985.
 - 36) Itoh S, Harazono A, Kawasaki N, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T, Hayakawa T: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J Electrophoresis*, **48**: 163-168, 2004.
 - 37) Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH: Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins, *J Proteome Res*, **1**: 521-529, 2002.
 - 38) Taniguchi N, Miyoshi E, Ko JH, Ikeda Y, Ihara Y: Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism, *Biochim Biophys Acta*, **1455**: 287-300, 1999.
 - 39) Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi S, Taniguchi N: Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 8754-8758, 1995.
 - 40) Bhaumik M, Harris T, Sundaram S, Johnson L, Guttenplan J, Rogler C, Stanley P: Progression of hepatic neoplasms is severely retarded in mice lacking the bisecting N-acetylglucosamine on N-glycans: evidence for a glycoprotein factor that facilitates hepatic tumor progression, *Cancer Res*, **58**: 2881-2887, 1998.
 - 41) Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, Zhao Y, Takahashi M, Miyoshi E, Honke K, Sekiguchi K, Taniguchi N: Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha5beta1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration, *J Biol Chem*, **279**: 19747-19754, 2004.

LC/MS in glycomics

Nana Kawasaki^{*,**}, Noritaka Hashii^{*,**},
Satsuki Itoh^{*}, Akira Harazono^{*},
Toru Kawanishi ^{*}

^{*}*National Institute of Health Sciences*

^{**}*Core Research for Evolutional Science and
Technology (CREST) of Japan Science and
Technology Agency (JST)*

Key words

LC/MS, Glycome, Glycomics, glycoprotein, glycopeptide, oligosaccharide

バイオリジクスのトランスレーショナルリサーチ (TR) (その2)

前号でタンパク質性医薬品のTR実施の参考となると思われる医薬品開発関連のガイドラインを紹介したが、その他のガイドラインとして、「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期について（厚生省医薬安全局審査管理課長通知 別添 医薬審第1019号 平成10年11月13日発、医薬審第1831号 平成12年12月27日改正）」があげられる。これは主として化学合成医薬品を対象として、臨床試験実施までに非臨床安全性試験で確認しておくべき事項をまとめたものであり、タンパク質性医薬品のTR実施の条件を考える上で参考となろう。また臨床試験の実施要領に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準（GCP）（厚生省令第28号 平成9年3月27日付）」があり、(1)インフォームドコンセントの徹底、(2)治験審査委員会（IRB）における臨床試験実施計画や患者説明文書の審議の必須化、(3)研究資金提供先と研究者との関係の十分な開示、(4)臨床試験で発生する有害事象・副作用に関する情報の国あるいはIRBなどへの報告の義務化、(5)第三者機関などへの臨床試験の進捗状況のモニタリング・監査の義務化、など臨床試験が備えるべき条件がまとめられている。なおGCPは、さらに医師主導型治験を可能にするための改正がなされている（厚生労働省令第106号 平成15年6月12日付）。

タンパク質性医薬品以外に、近年ヒト由来細胞あるいは組織を疾病治療に用いる細胞治療が活発に試みられるようになってきている。この細胞治療に関するガイドラインとしては、細胞治療用医薬品の開発を目指して臨床研究や治験を行うにあたっての科学のおよび倫理的妥当性を示す上での基本的考え方、必要とされるデータや留意事項を扱った、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方（厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第266号 昭和13年3月28日発）」があり、製品の品質、安全性確保に関する技術的要件の他、細胞・組織採取段階における医療機関の倫理委員会での審査、ドナーに対する説明・同意、ドナーの選択基準や適格性に関する事項、また使用段階における患者に対する説明と適用についての同意、患者などに関する情報の把握、個人情報の保護に関する事項などが上げられている。また我が国ではヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療用具に係る治験を依頼しようとする場合、厚生労働大臣にその安全性及び品質の確認を求める必要がある（確認申

請）。その際の提出資料の内容については「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針（厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第1314号 平成12年12月26日発）」にまとめられている。

細胞治療とならんで先端的医療の代表ともいえる遺伝子治療では、治療行為として行う場合（遺伝子臨床研究）と、製薬企業等が遺伝子治療用医薬品を開発する場合（遺伝子治療用医薬品の治験）とで参照すべきガイドラインが異なる。前者では「遺伝子治療臨床研究に関する指針（13文科振第1144号科発第0327001号 平成14年3月27日）」があり、適用対象疾患の規定、治療に用いるベクター等の品質等の確認、インフォームドコンセントの明確化、実施機関の責任者の業務、審査委員会、厚生労働大臣へ意見を求める確認申請、記録の保存、秘密保護等などについて述べられている。この指針は一部改正され（16文科振第931号科発第1228003号 平成16年12月28日）、研究実施主体の責任、個人情報の取り扱いを含めた倫理面で手続き等がさらに明確化された。また後者の遺伝子治療薬の治験では「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について（通知）（厚生省薬務局通知 薬発第1062号 平成7年11月15日）」、および「遺伝子治療臨床研究に関する指針（厚生省告示第23号 平成6年2月8日厚生大臣）」があり、さらにその改正版（厚生労働省通知医薬発第0329004号 平成14年3月29日）が出されている。以上の細胞治療や遺伝子治療に関するガイドラインは、バイオリジクスのTR実施の際の、特に倫理面での考え方の参考になるとと思われる。

なお、バイオリジクスは生体由来材料を製造に用いることから、特に感染症への配慮が求められる。「生体由来原料基準（厚生労働省告示210号 平成15年5月20日）」には医薬品製造に用いる生物由来原料に関する基準が定められているが、TR実施においても、検討対象とする物質の製造に用いる原料に関して参考になろう。

以上、2回にわたってバイオリジクスのTR実施に際し、参考となる我が国の医薬品開発関連ガイドラインを紹介した。以上のガイドラインについては、そのほとんどは国立医薬品食品衛生研究所のホームページ（<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>）の厚生労働省関連情報より検索／ダウンロードが可能である。

（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 川西 徹 Toru Kawanishi）

キーワード：トランスレーショナルリサーチ、バイオリジクス、創薬 e-mail: kawanish@nihs.go.jp



Regulatory perspectives from Japan – Comparability of biopharmaceuticals[☆]

Toru Kawanishi*

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Accepted 22 August 2005

Abstract

In Japan there is no official guideline about comparability assessment of biotechnological products at present. However, there is some notifications which should be referred to, when the manufacturer changes the manufacturing process. Here, regulatory perspectives from Japan on the comparability assessment are presented. When establishing the comparability of biotechnological products derived from different manufacturing processes and the validity of modified manufacturing process, rational step-by-step approaches based on both product and process aspects would be useful. At first, relevant physicochemical and biological properties of products including purity, impurity profiles and stability should be compared before and after the manufacturing change, depending on the type and nature of the desired products. It is also necessary to examine the capacities of the new manufacturing process for ensuring the consistent production of the active protein product as well as the anticipated elimination of potential impurities and contaminants. Further relevant assessment of preclinical and clinical comparability of product may be necessary in some cases.

© 2005 The International Association for Biologicals. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biotechnological product; Comparability; Japan; ICH-guideline; Regulatory perspectives; Harmonization

1. Introduction

Biotechnological products were developed and produced based on many innovative technologies, which are always advancing by themselves. The products are, therefore, often subject to change in the manufacturing process for improvement of the product quality and production economy, increase in production yield, and so on. It is not reasonable that the manufacturers are required to submit the same full data to obtain the authorization of the manufacturing change as to obtain the new drug authorization. USA-FDA and EU-CPMA have already set each guideline for comparability assessment of biotechnological/biological products. We had also started the discussion about the comparability guideline in Japan. However, we stopped developing it, because comparability

assessment of biotechnological products was nominated as a candidate of the new topic in the ICH-Quality. Drafting of the harmonized guideline has just started in the ICH-EWG. Here, I would like to give the regulatory perspectives about the comparability assessment of biopharmaceuticals from Japan.

2. Present official notifications relating with comparability assessment of biotechnological products before and after manufacturing changes in Japan

In Japan, we do not have any official guideline for the comparability assessment of biotechnological/biological products whose manufacturing processes are changed, yet. However, there is a notification, which should be referred to, when the manufacturer changes the manufacturing process of biotechnology-derived drugs which have already been approved. That is the Notification No. 243 from the Pharmaceutical Affairs Bureau, MHW of 1984. However, nearly 20 years have already passed since the Notification was made and some parts

[☆] The perspectives are before the discussion in the ICH-EWG.

* Tel./fax: +81 3 3700 9064.

E-mail address: kawanish@nihs.go.jp

of the requirement are assumed to be too strict. At present we usually treat each case as summarized below.

The following recombinant drugs would be treated as “not new drugs”, which are categorized as “1-(8) other drugs” in the Pharmaceutical Affairs Bureau Notification No. 698: the first is the product which contains identical active ingredient although the culture method is different from the approved drug; the second is that which contains identical active ingredient although the purification process is different from the approved drug; and the third is the other drug in which difference is not specified. The followings are also usually treated as “not new drugs” but decided on a case-by-case basis: the product which contains identical active ingredient but its structure gene is identified by different process; and the product which contains identical active ingredient but host cell/vector system is different from the approved drug. In the case of the category 1-(8) other drugs as “not new drug”, the data on specification and test methods, stability, and bioequivalence are required to be submitted for the registration as the pharmaceuticals, and a list of literature references concerning toxicity, pharmacological action, absorption, distribution, metabolism and excretion, and clinical trials for active ingredients concerned, as well as an outline of the list contents and the results of evaluation test are also required. In addition, in the case of the biotechnology-derived drugs, the following data are also needed on a case-by-case basis:

- data on the manufacturing process, physicochemical analysis, specifications and test methods, stability;
- data on single dose administration toxicity in one species of animals;
- data on bioequivalency study;
- data on clinical study for safety, etc.

The present notifications relating with the comparability of the products between before and after the changes in the manufacturing process in Japan are very simple, as summarized above. However, we have discussed much how to assess comparability of biotechnological products to draft the guideline, within Japanese experts. The following is the perspectives obtained from the discussion.

3. Regulatory perspectives from Japan: “how should we assess comparability of biotechnological products before and after the manufacturing change?”

To date, various topics related to the characterization and quality assessment as well as the manufacturing process for biotechnological products have been the subject of ICH harmonized guidelines and have proven very useful, in allowing manufacturers to develop a global approach to these issues. However, there is no specific international guideline on comparability of biotechnological products subject to changes in the manufacturing process. The subject we are facing is how to develop and establish rational concepts and approaches for establishing comparability of protein products derived from different biopharmaceutical manufacturing processes.

3.1. When is comparability assessment needed?

A comparability assessment is needed when a manufacturer wants to claim that the product of new manufacturing process Y is comparable to the already existing product of manufacturing process X with respect to quality, safety and efficacy (Fig. 1). The new process Y would be employed by either the same manufacturer, innovator or by different subsequent-entry manufacturer(s). The existing product from process X may be either an already licensed one or one under development for new drug application for approval. In case where there is an already licensed drug, subsequent-entry product(s) from different manufacturer(s) will be dealt with as a so-called generic product(s). On the other hand, the application from the innovator will be handled as a partial variation from already licensed conditions for the drug with respect to the manufacturing process. In the case of manufacturing variation of the product under development, the issue becomes the verification of such change within a single manufacturer at various stages of product development from early stage research to pre-approval. Here, the followings should be mentioned: it has been already decided that the generic products are excluded from the scope of the ICH-Q5E comparability guideline, but in Japan we still think that the comparability of the generic products could be evaluated following the same scientific approach.

3.2. General principles of comparability assessment

When establishing the comparability of biotechnological products derived from different manufacturing processes and the validity of modified manufacturing process, rational step-by-step approaches based on both product and process aspects would be useful. In this approach, the following parameters should be considered as key points:

- (1) physicochemical and biological characterizations;
- (2) impurities profile and the presence of potential contaminants;
- (3) batch analysis;
- (4) product stability;
- (5) manufacturing process evaluation/validation studies; and in wider perspective
- (6) preclinical and clinical studies.

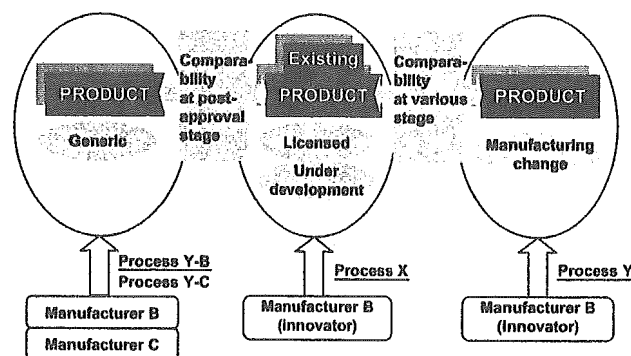


Fig. 1. Various cases of comparability assessment.

3.3. Strategies for comparability assessment

From the viewpoint of product aspects, the essential and critical first step is to establish whether the new candidate product in question is comparable to the existing product in terms of molecular and quality attributes. This is because whatever changes (minor or major) in the manufacturing process are made, if the new candidate product in question is not comparable to the existing product in terms of molecular and quality attributes, the new one will rather be regarded as a novel molecular entity for new drug application, but not as a qualified candidate for further comparability studies. The candidate product should be, therefore, the subject of extensive identification and characterization, as well as quality assessments including tests on impurities profile and the presence of potential contaminants. If these attributes of the candidate product and process are found to be comparable to those of the previous ones, further assessment of preclinical and clinical comparability would be performed, where necessary and appropriate.

3.4. Comparability from product aspects

Before going into some details about the need for further assessment of preclinical and clinical comparability, however, one should ask the following key question: “what is the identity or comparability of the biosynthetic protein product which possesses the inherent degree of structural heterogeneity?” In other words, what kind of criteria should be applied for establishing the identity or comparability of the candidate product(s) compared to the previous product with respect to molecular and quality attributes?

To answer this question, we should remind new concepts in the ICH-Q6B document. In the document we have introduced the concept, which has defined the desired product and variants, so that an inherent degree of structural and quality heterogeneity can be dealt within a relevant way. Desired product is defined as: (1) the protein which has the expected structure, or (2) the protein which is expected from the DNA sequence and anticipated post-translational modification (including glyco-forms), and from the intended downstream modification to produce an active biological molecule. When molecular variants of the desired product are formed during manufacture and/or storage and have properties comparable to the desired product, they are considered to be product-related substances and incorporated into active ingredient. When molecular variants of the desired product do not have properties comparable to those of the desired product, they are considered to be product-related impurities. In the concept, active ingredient may be composed of the desired product and multiple product-related substances; the desired product can be a mixture of several molecular entities derived from anticipated post-translational modification. Impurities may be either process-related or product-related (Fig. 2).

Various cases are considered for minimum qualification for further comparability assessments depending on each following specific type of desired product (A–D):

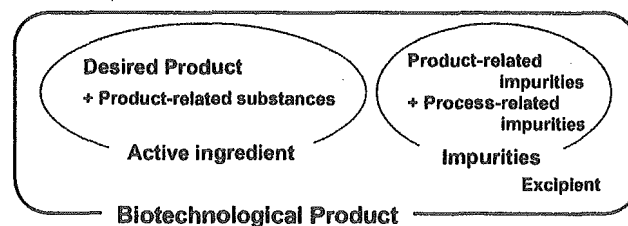


Fig. 2. New concept about biotechnological product in the ICH-Q6B.

- (A) the protein which has the expected structure (e.g., monoclonal antibodies);
- (B) the protein which is expected from the DNA sequence (simple protein);
- (C) the protein which is expected from the DNA sequence and anticipated post-translational modification; and
- (D) the protein which is expected from the intended downstream modification to produce an active biological molecule.

In the case of the “Desired product” being defined as the protein which has the expected structure, like monoclonal antibodies, minimum qualification for a candidate product for further comparability assessments should be that the product is derived from the same initial cell clone as a previous one and has comparable molecular and quality attributes compared to a previous one with respect to: (1) structural features, (2) physicochemical, (3) immunological properties, and (4) impurities profile. Variation of carbohydrate heterogeneity due to changes in culture conditions should be considered on a case-by-case basis.

In the case of the “Desired product” being defined as the protein which is expected from the DNA sequence, like recombinant insulin, minimum qualification for a candidate (product) for further comparability assessments should be that the product is the same as an already existing one with respect to protein structure, physicochemical and biological properties, as well as comparable impurities profiles.

In cases where the *in vivo* biological activity is closely related to the intended clinical effectiveness, further preclinical and clinical assessments with respect to efficacy may be omitted.

In the case of the “Desired product” being defined as the protein which is expected from the DNA sequence structure and anticipated post-translational modification, typically like glycoproteins, minimum qualification for a candidate product for further comparability assessments should be that the product is derived from the same initial cell clone as a previous product and has the same protein structure, comparable physicochemical properties, comparable carbohydrate patterns compared to a previous product with respect to the types of sialic acids and their contents, and antennary profile. Here, comparable biological properties, especially ensuring higher-order structure, *in vivo* activity and representing the clinical effectiveness, if any, is a critical factor for the qualification.

In the case of the protein which is expected from the intended downstream modification to produce an active

biological molecule, qualification for further comparability assessment of this type of products should be considered as a case-by-case issue, taking into account of types of modification and process change. Where necessary and appropriate, manufacturers should refer to the above cases A–C.

In this way, each specific type of candidate product can be qualified to be comparable to the pre-existing product with respect to molecular and quality attributes including impurity profile. The quality and extent of data obtained from studies on the molecular and quality attributes of the candidate would become one of the crucial elements for determining the necessity and extent of further comparability assessments, as well as for establishing the entire comparability to the pre-existing product.

3.5. Comparability from process aspect

As another aspect of quality comparability assessments, it is necessary to examine the capacities of a new manufacturing process for ensuring the consistent production of the active protein product as well as the anticipated elimination of potential impurities and contaminants. The capacities of the new process should not be less potent than those of the old process.

Changes in the manufacturing process used to make a particular product can be made in a variety of stages or steps of the process. Examples of such changes include: (1) method for generating cell substrate; (2) cell culture methods; (3) isolation and purification procedure; and (4) final product formulation. For changes in a certain stage of manufacturing process including cell substrate matters, relevant and complementary use of the ICH-guidelines (Q5A, Q5B, Q5EC, 5D, Q6B, and S6) would be encouraged.

Whatever changes in the manufacturing process are made, the effects of the changes, both direct and indirect, on the consistent production of the product should be considered and the modified process should be re-evaluated or re-validated as needed. The appropriate process re-evaluation or re-validation programs and criteria will vary depending on the nature and extent of the change. According to the results of process re-evaluation/re-validation studies on the new process, sometimes applicants may need to modify in-process controls including in-process testing and specifications of critical intermediates or final product (Fig. 3). The applicant should provide justification of such modification, if any.

3.6. Suitability of analytical method

As another dimension to comparability study, it is necessary to consider suitability of available analytical methods. Manufacturers should provide assurance that an appropriate set of

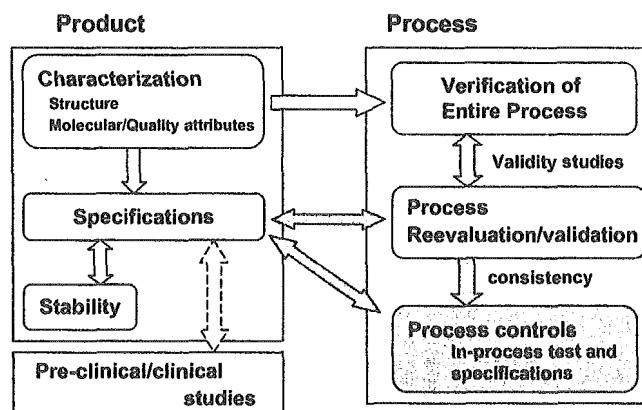


Fig. 3. Elements for ensuring product quality and consistency.

analytical methods has been selected in order to assess the comparability of the product and to what extent the analytical methods used are suitable for comparability studies. The validation of the analytical methods used should be appropriate.

New analytical technology and modifications to existing technology are continually being developed and should be utilized when appropriate.

3.7. Preclinical and clinical studies

Further relevant assessment of preclinical and clinical comparability of product may be necessary, when it cannot be determined if the pre-existing product and the candidate product are comparable or not from the quality studies. The extent and nature of preclinical and clinical studies should be determined on a case-by-case basis in consideration of various factors. These include the followings:

- the nature of the product;
- intended clinical use;
- the extent of comparability of the candidate product to the existing counterpart with respect to molecular and quality attributes including impurity profile;
- the nature and extent of changes in manufacturing process;
- the results of the evaluation/validation studies on the new process including the results of relevant in-process tests;
- the capabilities and limitations of tests used for any comparability study;
- availability of existing preclinical and clinical data;
- the extent of existing information and experiences pertaining to the product in question; and
- stage of the product development.

CHANGES IN JAPANESE PHARMACEUTICAL AFFAIR LAW AND QUALITY REGULATIONS

by Yukio Hiyama

The revised Pharmaceutical Affairs Law (rPAL) was passed by the Diet in July 2002 and its implementation is due in April 2005. The major changes include revision of the approval system and enhancement of post-marketing safety measures, especially for medical devices and biologics.

Under the changes, revisions of Quality Regulations will have impact on:

- 1) Market Approval Holder's responsibility for the quality management;
- 2) Drug Master File system to support Common Technical Document (CTD) based applications (*CTD based application became effective in July 2003);
- 3) Consolidation of the legal positioning of GMP;
- 4) Revision of GMP standards.

Under the old pharmaceutical product approval system, approval (Manufacturing or Importation) was granted to manufacturers if the product was made domestically or to importers if made overseas. That meant that Japanese pharmaceutical companies had to manufacture their own products while foreign pharmaceutical companies did not have to do so. This was seen as a huge discrimination against the domestic industry. For importers, there was a quality assurance system called Good Import Practices (GMPI), which required foreign pharmaceutical companies to comply with GMP. However, under GMPI, Japanese inspectors did not normally inspect foreign manufacturing facilities.

Under the new law, the two-tier system will disappear and become one system, Market Authorization. The new law allows all parties to subcontract manufacturing activities and requires market approval holders to ensure product quality no matter where products are made.

In order for market authorization holders to ensure product quality, the new law requires applicants to

YUKIO HIYAMA PhD, is chief, Third Section, Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, MHLW, Japan.
email: hiyama@nihs.go.jp

provide full details of product design and manufacturing processes which could be developed and manufactured by others. The Common Technical Document (CTD) based application, which became mandatory in July 2003, gives guidance to applicants on what should be described in pharmaceutical development and in manufacturing processes. Those areas were poorly described in old non-CTD based applications. The reason why they were not described well is that most manufacturing processes were not subject to assessment/review in the old system and so this is not part of the new approval system. In order to promote CTD based applications, a Master File system will be created. Manufacturers will probably register master files for active pharmaceutical ingredients, new kinds of additives and specialized processes.

Approval matters are provided in the approval document, which is generally 10 to 20 pages long. Specifications and test methods occupy the majority of the document whilst manufacturing processes are described in less than one page. To change the approval matters, partial changes of applications must be submitted and reviewed. Partial change review currently takes one year.

However, much more detailed description about the manufacturing process is desperately needed under the new law, with the help of a CTD based application. In order to make the new review/regulatory system effective, a notification system for non-critical approval matters has been established. To change those non-critical approval matters, the Market Authorization holder notifies the government with the required information within a month or so. Although no assessment will be done at the time of notification, rationale and data for the changes will be subject to GMP inspection at a later date. Active discussion is taking place to determine what portion of the manufacturing processes should be approval matters and what should be notification items. Probably principles and end points of the critical manufacturing steps with key operational parameters will become approval matters. Only principal and quality end points for each manufacturing step would be subject to pre-approval review. (see Figure).

GMP compliance becomes a core requirement for the Market Authorization system. GMP compliance checks

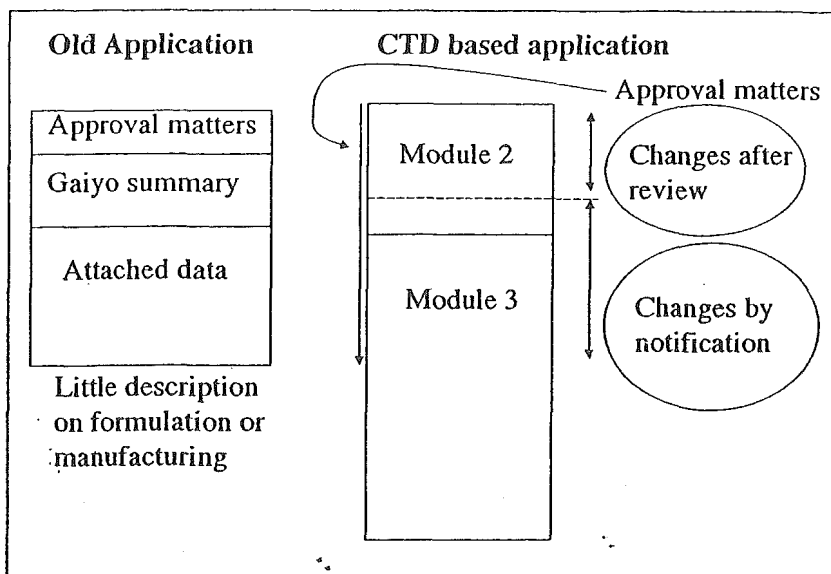


Figure. Structure of CMC portion of drug application. In the old system, specifications and test methods occupy the majority of the portion. Changing approval matters currently takes one year. In the new CTD based application, the portion of approval matters is expanded to include core information on the manufacturing process. To change non-critical approval matters, companies need only submit a notification.

document for approval matters. In 2002-2003, the GMP guidance study group focused on quality systems, regulatory system issues, technology transfer and laboratory control. The quality system subgroup for example, recommended that Market Authorization holders should have a declaration statement of responsibilities/authorities, organization, and resources in their quality system.

The technology transfer subgroup made the following recommendations: a development report should be written and transferred to the manufacturer; product specifications should be set by reflecting critical functional attributes, which should be clearly defined at the Product Quality Design stage; the specifications with rationale should be in the development report, which should be available for review.

Draft GMP-related guidance documents with an inspection policy will be published and a framework of approval matters set by Summer 2004.

for each new application will be conducted prior to approval. This requires Industry to finalize technology transfer before approval and gives the regulatory authority an opportunity to check on the qualification of the final manufacturing process against the description in the application document.

The rPAL and its regulations are major undertakings both to Authorities and Industry. In order to streamline the review and inspection systems, the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency has been established in April 2004 by combining the review function under NIHS and the inspection function of the Kiko. Several Health Science Grant-sponsored study groups have been formed to establish comprehensive GMP guidance documents, GMP inspection policies and a scope

The regulation changes give opportunities for a complete description of the Quality System in the applications and for better knowledge transfer/management both in the Regulatory Authority and in Industry. Training of reviewers and inspectors would be a challenge for the Authority while most companies will need to change undesirable mindsets, which were presumably created by the old system.

Because expectations created by rPAL have a strong link with the new ICH quality topics, i.e. Pharmaceutical Development and Quality Risk Management, we hope that international collaboration and learning such as discussion at the ICH will be helpful in implementing the new Pharmaceutical Affair Law.



World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2004

64th Congress of FIP

4-9 September 2004

New Orleans, USA

Main theme: The patient and the pharmacist –

The heart of the new healthcare team

Contact: congress@fip.org Tel: +31 70 302 1982

GMP をめぐる動向について**

檜山 行雄, 坂本 知昭*

医薬品研究 Vol. 37, No.1 別刷 (2006年)

財団法人 日本公定書協会

GMPをめぐる動向について**

檜山 行雄, 坂本 知昭*

医薬品のGMPをめぐる動向について、改正薬事法、品質保証のあるべき姿に関する厚生労働科学研究の成果、及び国際動向としてICHの専門家会議における議論について説明します。厳密には本稿中に出てくる承認書の製造法の記載及びICHのQ8、製剤開発ガイドラインは、GMPではありませんが、非常に関連する重要な課題ですので合わせて説明します。

1. 改正薬事法のポイント

改正薬事法のポイントをTable 1に示します。承認・許可制度の中での一番大きな改正点は販売承認制度になることです。いわゆる元売りの業者がすべて責任を負うことになると同時に、全面的な委託製造が実現し、様々なビジネスモデルが誕生することになります。これにより業界全体が活性化し、競争力が上がるという点は非常に喜ばしいことと思えますが、一方で更なる安全性確保及び品質の十分な確保が重要課題となります。

品質の確保に注目しますと、製造法の承認書への記載を援助する体制としてマスターファイル制度の導入があります。これまで承認書に記載された合意事項は規格中心でしたが、今後は本来両輪であるべき規格と製造法から構成されることとなり、品質システム全体を記述することが可能になりました。そして、GMPが承認要件になりましたので承認審査とGMP調査の一体化が図られ、それに従って一貫した品質保証への支援が期待されます。

2. 新医薬品の開発過程

新医薬品の開発過程をFig. 1に示します。開発決

定後、前臨床段階で物性などのデータが取られ、臨床第II相試験あたりで製造法や分析法がほぼ確定されます。その後、技術移転が開始され、工場にその手法が移されるという流れで組み立てられています。

3. 製品開発と実生産

開発段階と実生産段階におけるそれぞれの機能、役割をTable 2に示します。開発段階では基礎的なデータの収集、製品設計、製造プロセス設計及び規格や試験法などの評価法の設計を行い、それによって、許容できる品質の範囲を決めることが開発段階での重要な機能です。一方、実生産段階では開発段階で得られた製造プロセスに従い、恒常的な品質の製品を製造することが重要な機能になります。

この、恒常性の確認のために品質試験を行います。先ほど述べたように、プロセスに従うことが非常に重要な条件ですので、それをもとにして品質試験での確認を行うことは重要なポイントです。一方、プロセスを管理せず、規格試験のみで判断することは、不十分な品質保証となります。

4. 品質保証の技術的三本柱

ICHの規格設定のガイドライン(Q6A)にある技術的三本柱をTable 3に示します。一つ目の柱は、規格は製品の品質並びに恒常性を確保するために用いられる原薬や製剤を管理するための方策の一つであるということです。また、規格は定められた製造プロセスを継続的にしている場合に初めて有効なものだということです。二つ目の柱は開発段階における徹底的な製品特性の解析が必要ということ、三つ目の柱は、GMPの遵守が必要と記載されています。

* 国立医薬品食品衛生研究所薬品部 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)

** 当協会主催の「医薬品の品質確保をめぐる諸問題」(平成17年2月18日:東京, 2月24日:大阪)における講演による。

Table 1 改正薬事法のポイント

承認・許可制度の見直し

- 元売承認制度の創設（製造・輸入承認から販売承認へ）
元売業者（ライセンスホルダー）が医薬品を市場に供給するに当たり最終責任を負う。
- 全面的な委託製造の実現：ビジネスモデルの規制緩和
- 製造法の承認書への記載・マスターファイル制度の導入：‘品質システム’の完全記述、ICH CTD からの必要性
- GMP が承認要件に（承認審査と GMP 調査の一体化）
一貫した品質保証の支援

Table 2 製品開発と実生産

- 開発段階
基礎データ収集、製品設計、プロセス設計、評価法設計を理化学試験、臨床試験、科学的判断に基づき行う。許容品質範囲（Proven Acceptable Range）を決める
- 実生産段階
開発段階できめられた製造プロセスに従い製造し、品質試験（評価法の1部）の結果により恒常性を保証。
（規格に適合だけでは不十分）

Table 3 品質保証の技術的三本柱（ICHガイドラインQ6Aより）

- 規格は、製品の品質ならびに恒常性を確保するために用いられる原薬や製剤を管理するための方策の一つである。この方策としては、この他にも規格を設定する際の基礎とすべき。
- 開発段階における徹底的な製品特性の解析。
- GMP の遵守（例えば、適切な施設、バリデートされた製造工程、バリデートされた試験方法、原料の試験、工程内試験、安定性試験など）がある。

5. 品質保証の現状に対する懸念 (Table 4)

今までのことを踏まえたうえで、品質保証の現状に対する懸念について説明します。1番目は、現在の品質保証体制が、ともすれば規格判定中心になっていることです。2番目は、GMP が品質システムとしての連携体制となっているか、形式的なことになっているのではないかと心配があります。例えば、書類を備えなければならないから備えているというように、本来の手順の機能を無視して形式を先行させるといったことです。3番目は法的な薬事法そのものだけではなく、通知や事務連絡が本当の意味のGMP、すなわち Good Practice の真ん中に Manu-

facturing という言葉が入るだけですが、Good Practice を勧めているのかどうか疑問となるところです。適切なガイドラインの発効ということも、行政側の重要な役割です。ご存じのように、現時点

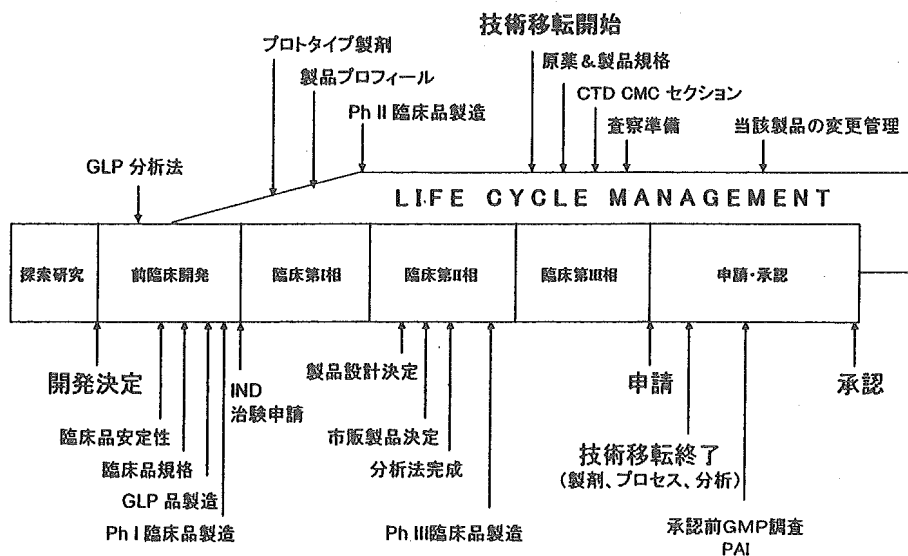


Fig. 1 新医薬品の開発過程