

Fig. 10. Rate of percentage change in d_0/d_4 -glycans (59). Each value is the average from three biological repeats. The error bars correspond to the standard deviation. LC, Magic 2002 HPLC system; Column, Hypercarb (150 × 0.2 mm, 5 μ m); flow rate, 2 μ l/min; A buffer, 5 mM ammonium acetate/2% acetonitrile (pH 9.6); B buffer, 5 mM ammonium acetate/80% acetonitrile (pH 9.6); gradient condition, 5–45% B (90 min); MS, LTQ-FT; electrospray voltage, 2.0 kV (positive ion mode); resolution of FTMS, 50,000.

d_0 -PA glycans and d_4 -PA glycans that was prepared from the kidneys of the control mice (MRL-+/+) was subjected to quantitative glycan profiling. The peak-area ratios of the d_0 - and d_4 -glycans are shown in Fig. 10. The differential analysis performed for the SLE-model mice revealed an increase in the number of low-molecular-mass glycans exhibiting a simple structure, such as pauci-mannose-type oligosaccharides (60–62), and of complex oligosaccharides lacking Gal residues, accompanied by a decrease in the number of complex glycans containing multiple Fuc and Gal residues. These results suggest that the number of N-glycans synthesized during the early stage of the N-glycan biosynthetic pathway increases, while that of N-glycans synthesized during the late stage decreases in mice with SLE. Our present findings may be attributed to some alteration in the biosynthetic pathway of N-glycans. Such changes in the degree of glycosylation may induce an aber-

をもつ糖鎖は減少していることが明らかになった。このことは、N結合型糖鎖合成過程の後期に生成される成熟した糖鎖は減少し、合成初期の未成熟な糖鎖が増えていることを示している。これらの結果は、糖鎖生成過程に変化が生じていることを示唆している。このような糖鎖の変化は、SLEモデルマウスにおける異常な免疫反応や腎臓障害に関係があるのかもしれない。

rant immune response and kidney disorders in mice with SLE.

F. Issues to be addressed in future

We have outlined the glycosylation analysis-related issues that should be considered for the manufacture of glycoprotein products, and we have discussed the potential applications of MS for the characterization, quality testing, and comparative assessment of glycoprotein-based products. For accurate evaluation of glycoprotein products by MS, it is necessary to clarify the applicability of MS to glycosylation analysis and to establish relevant methods for the MS-based analysis of glycosylation. In particular, a general glycosylation analysis protocol that is not influenced by the type of mass spectrometer and software used is required. Furthermore, the harmonization of methodologies adopted for MS-based glycosylation analysis among the United States, European Union, and Japan would aid drug-discovery research worldwide.

Acknowledgment

The present study was supported in part by a Grant-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

1. <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/new/h19pharmaceutical.html> (Accessed 4, F., 2008). 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ.
2. 宮田直樹 (2006) 第1回 Pharm. Tech. Japan. **22**, 39-43
3. Hase, S. (1994) *Methods Enzymol.* **230**, 225-237
4. Jackson, P. (1991) *Anal Biochem.* **196**, 238-244
5. Hardy, M. R. and Townsend, R. R. (1994) *Methods Enzymol.* **230**, 208-225
6. Zaia, J. (2004) *Mass Spectrom Rev.* **23**, 161-227
7. Harazono, A., Kawasaki, N., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2005) *Glycobiology.* **15**, 447-462
8. Sandra, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., Stals, I. and Claeysens, M. (2004) *J Am Soc Mass Spectrom.* **15**, 413-423
9. Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Harazono, A., Matsui, Y., Hayakawa, T. and Kawanishi, T. (2006) *J Chromatogr A.* **1103**, 296-306
10. Wührer, M., Koeleman, C. A., Hokke, C. H. and Deelder, A. M. (2005) *Anal Chem.* **77**, 886-894
11. Itoh, S., Takakura, D., Kawasaki, N. and Yamaguchi, T. (in press) *The Protein Protocols Handbook*
12. 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英 (2007) 抗体医薬の最前線.
13. Harris, R. J., Leonard, C. K., Guzzetta, A. W. and Spellman, M. W. (1991) *Biochemistry.* **30**, 2311-2314
14. Pohl, G., Kenne, L., Nilsson, B. and Einarsson, M. (1987) *Eur J Biochem.* **170**, 69-75
15. 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイード, 徳永裕司, 春日井勲, 早川堯夫 (1994) *医薬品研究* **25**, 405-425
16. 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイード, 徳永裕司, 春日井勲, 早川堯夫 (1994) *医薬品研究* **25**, 501-523
17. 一瀬白帝 (血栓・止血・血管学, 血栓症抑圧のために), 中外医学社
18. Domon, B. and Costello, C. E. (1988) *Glycoconjugate J.* **5**, 397-409
19. Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. and Presta, L. G. (2002) *J Biol Chem.* **277**, 26733-26740
20. Wada, Y., Azadi, P., Costello, C. E., Dell, A., Dwek, R. A., Geyer, H., Geyer, R., Kakehi, K., Karlsson, N. G., Kato, K., Kawasaki, N., Khoo, K. H., Kim, S., Kondo, A., Lattova, E., Mechref, Y., Miyoshi, E., Nakamura, K., Narimatsu, H., Novotny, M. V., Packer, N. H., Perreault, H., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G., Reinhold, V. N., Rudd, P. M., Suzuki, A. and Taniguchi, N. (2007) *Glycobiology.* **17**, 411-422
21. Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T. (2002) *J Chromatogr A.* **968**, 89-100
22. Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M. and Hayakawa, T. (2003) *Anal Biochem.* **316**, 15-22
23. Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T. (2000) *Anal Biochem.* **285**, 82-91
24. Yuan, J., Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2005) *J Chromatogr A.* **1067**, 145-152

F. 今後の課題

本稿では、糖タンパク質医薬品開発における重要課題の中から糖鎖関連事項を取り上げて概説するとともに、構造特性解析、糖鎖確認試験及び同源性・同質性評価におけるMSの可能性を示した。MSを糖タンパク質医薬品評価により幅広く活用していくためには、MSが糖鎖解析にどこまで適用可能なかを明確にし、開発メーカー、装置のタイプ、あるいは解析ソフト等に影響されない標準的分析方法を整備する必要がある。さらに、米国、EU及び我が国の間で糖鎖解析法をハーモナイズしていくことは、世界規模での創薬研究推進に大きく寄与することになるだろう。

謝辞

本稿で紹介した内容は、厚生労働科学研究費補助金の研究成果の一部である。

25. Alvarez-Manilla, G., Warren, N. L., Abney, T., Atwood, J., 3rd, Azadi, P., York, W. S., Pierce, M. and Orlando, R. (2007) *Glycobiology*. **17**, 677–687
26. Kang, P., Mechref, Y., Kyselova, Z., Goetz, J. A. and Novotny, M. V. (2007) *Anal Chem.* **79**, 6064–6073
27. Bowman, M. J. and Zaia, J. (2007) *Anal Chem.* **79**, 5777–5784
28. Kobata, A. (1988) *J Cell Biochem.* **37**, 79–90
29. Gervais, A., Hammel, Y. A., Pelloux, S., Lepage, P., Baer, G., Carte, N., Sorokine, O., Strub, J. M., Koerner, R., Leize, E. and Van Dorsselaer, A. (2003) *Glycobiology*. **13**, 179–189
30. Wada, Y. (2007) *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. **13**, 101–103
31. Faid, V., Chirat, F., Seta, N., Foulquier, F. and Morelle, W. (2007) *Proteomics*. **7**, 1800–1813
32. Miyamoto, S. (2006) *Curr Opin Mol Ther.* **8**, 507–513
33. Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K. and et al. (1985) *Nature*. **316**, 452–457
34. Parekh, R. B., Roitt, I. M., Isenberg, D. A., Dwek, R. A., Ansell, B. M. and Rademacher, T. W. (1988) *Lancet*. **1**, 966–969
35. Omtvedt, L. A., Royle, L., Husby, G., Sletten, K., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Dwek, R. A. and Rudd, P. M. (2006) *Arthritis Rheum.* **54**, 3433–3440
36. Dube, R., Rook, G. A., Steele, J., Brealey, R., Dwek, R., Rademacher, T. and Lennard-Jones, J. (1990) *Gut*. **31**, 431–434
37. Thompson, S., Dargan, E. and Turner, G. A. (1992) *Cancer Lett.* **66**, 43–48
38. Turner, G. A. (1995) *Adv Exp Med Biol.* **376**, 231–238
39. Otake, Y., Fujimoto, I., Tanaka, F., Nakagawa, T., Ikeda, T., Menon, K. K., Hase, S., Wada, H. and Ikenaka, K. (2001) *J Biochem (Tokyo)* **129**, 537–542
40. Kossowska, B., Ferens-Sieczkowska, M., Gancarz, R., Passowicz-Muszynska, E. and Jankowska, R. (2005) *Clin Chem Lab Med.* **43**, 361–369
41. Comunale, M. A., Lowman, M., Long, R. E., Krakover, J., Philip, R., Seeholzer, S., Evans, A. A., Hann, H. W., Block, T. M. and Mehta, A. S. (2006) *J Proteome Res.* **5**, 308–315
42. Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., Murata, K., Ohigashi, H., Yokoyama, S., Eguchi, H., Ishikawa, O., Ito, T., Kato, M., Kasahara, A., Kawano, S., Gu, J., Taniguchi, N. and Miyoshi, E. (2006) *Int J Cancer.* **118**, 2803–2808
43. Aoyagi, Y. (1995) *Glycoconj J.* **12**, 194–199
44. Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Kiriya, S., Sone, Y., Hayashi, K., Katoh, H., Endoh, T., Sassa, T. and Satomura, S. (1999) *J Hepatol.* **30**, 125–130
45. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Matsuishi-Nakajima, Y., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. (2008) *J. Chromatogr. B* **869**, 20–30
46. Carr, S. A., Huddleston, M. J. and Bean, M. F. (1993) *Protein Sci.* **2**, 183–196
47. Huddleston, M. J., Bean, M. F. and Carr, S. A. (1993) *Anal Chem.* **65**, 877–884
48. Harazono, A., Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Ishii-Watabe, A., Kawanishi, T. and Hayakawa, T. (2006) *Anal Biochem.* **348**, 259–268
49. Fujii, S., Nishiura, T., Nishikawa, A., Miura, R. and Taniguchi, N. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6009–6018
50. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1992) *Nature*. **356**, 314–317
51. Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R. and Nagata, S. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**, 1756–1760
52. Merino, R., Iwamoto, M., Fossati, L. and Izui, S. (1993) *J Immunol.* **151**, 6509–6516
53. Mizuochi, T., Hamako, J., Nose, M. and Titani, K. (1990) *J Immunol.* **145**, 1794–1798
54. Chui, D., Sellakumar, G., Green, R., Sutton-Smith, M., McQuistan, T., Marek, K., Morris, H., Dell, A. and Marth, J. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 1142–1147
55. Green, R. S., Stone, E. L., Tenno, M., Lehtonen, E., Farquhar, M. G. and Marth, J. D. (2007) *Immunity.* **27**, 308–320
56. Trouw, L. A., Seelen, M. A., Duijs, J. M., Wagner, S., Loos, M., Bajema, I. M., van Kooten, C., Roos, A. and Daha, M. R. (2005) *Mol Immunol.* **42**, 731–740
57. Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R. B. and Jensenius, J. C. (1994) *Immunol Today.* **15**, 67–74
58. Lhotta, K., Wurzner, R. and Konig, P. (1999) *Nephrol Dial Transplant.* **14**, 881–886
59. Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Nakajima, Y., Kawanishi, T. and Yamaguchi, T. *Immunology* (in press)
60. Hase, S., Okawa, K. and Ikenaka, T. (1982) *J Biochem.* **91**, 735–737
61. Kubelka, V., Altmann, F., Kornfeld, G. and Marz, L. (1994) *Arch Biochem Biophys.* **308**, 148–157
62. Natsuka, S., Adachi, J., Kawaguchi, M., Nakakita, S., Hase, S., Ichikawa, A. and Ikura, K. (2002) *J Biochem.* **131**, 807–813

Received on February 24, 2008, accepted on May 7, 2008

Profile of the Authors



Nana Kawasaki graduated from the department of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University in 1984. She is a member of the division of Biological Chemistry and Biologicals at National Institute of Health Sciences. Her current research focuses on a development of evaluation methods for glycoprotein products by mass spectrometry.



Satsuki Itoh graduated from the Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University in 1995 (MS). She has worked at the Division of Biological Chemistry & Biologicals, the National Institute of the Health Sciences since 2000. She received her Ph.D. degree from Osaka University in 2007. She investigates the glycosylation of glycoproteins by mass spectrometry.



Noritaka Hashii is a research scientist of National Institute of Health Sciences (NIHS). He received his Ph.D. from Josai University under the supervision of Prof. Seiichi Kondo in 2003. His current research interests are structural analyses of carbohydrates such as N-, O-linked oligosaccharides and glycosaminoglycans by mass spectrometry.



Akira Harazono graduated from the department of Physiological Chemistry, Kyoto University in 1995 and received a Ph.D. at Kyoto University in 2002. His recent research focuses on study of quality test for peptide/protein products.



Daisuke Takakura graduated in the Bioscience Course in 2002 at the Azabu University and received his PhD in 2007 from the same university. From 2007, he held a post-doctoral position at the Division of Biological Chemistry Biologicals in National Institute of Health Sciences.

Profile of the Authors



Dr. Teruhide Yamaguchi graduated from Biology at Kobe University in 1976. He is the director of the division of Biological Chemistry and Biologicals at National Institute of Health Sciences, and is engaged in investigating the safety, quality and efficacy of biologics. He is member of the Pharmaceutical and Food Affairs Council in Japan and is contributing to review quality aspects of registration applications of new drugs. He is also contributing to ICH activity as the member of Gene Therapy EWG.

ヘパリン不純物問題とその対応

川崎ナナ

Nana KAWASAKI

国立医薬品食品衛生研究所室長

1 はじめに

ヘパリンナトリウムは健康な食肉獣、主にブタの腸から得られるグリコサミノグリカン硫酸化エステルナトリウム塩で、ウロン酸(L-イズロン酸またはD-グルクロン酸)及びグルコサミンの2糖繰り返し構造からなり、2糖あたり平均2~2.5個の硫酸エステル基が結合している(図1A)。¹⁾ヘパリンナトリウムは、アンチトロンビンⅢと結合することによって第Ⅱa因子(トロンピン)や第Xa因子などの凝固因子を阻害し、血液凝固阻止作用を示す。そのため、血液透析その他の体外循環装置使用時の抗凝固剤として、世界各国で用いられている。ヘパリンナトリウムは医療上極めて重要な医薬品であり、日本薬局方(日局)をはじめ米国薬局方や欧州薬局方にも収載されている。またヘパリンナトリウムは、低分子量ヘパリンの原料としても用いられている。2007年秋から2008年にかけて、主に米国において、ヘパリンナトリウムを投与された患者に死亡例を含む深刻な有害事象が頻発した。本稿ではヘパリン有害事象の概略、原因物質の特性、並びにヘパリンナトリウムの安全性確保と安定供給を目指した日本の対応について概説する。

2 ヘパリンナトリウム不純物による有害事象

2007年11月以降米国において、バクスター社製造ヘパリンナトリウムの静脈急速大量投与

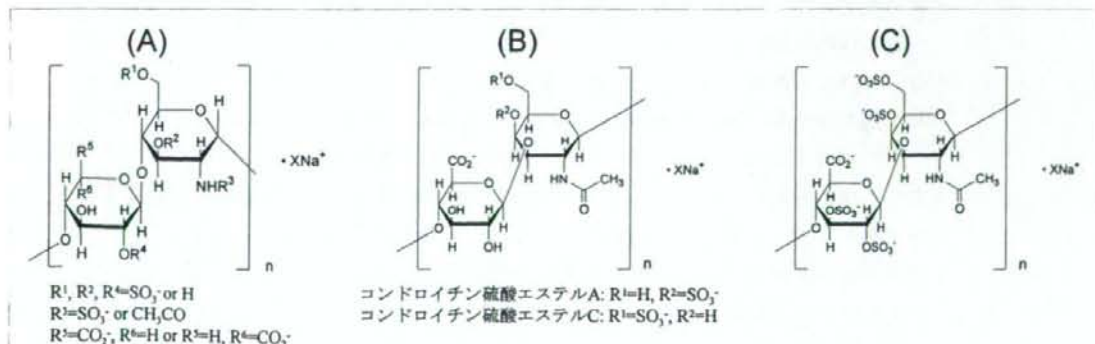


図1 ヘパリンナトリウム(A)、コンドロイチン硫酸エステルA及びC(B)並びにOCS(C)の構造

表1 ヘパリンナトリウム製剤による有害事象の発生から日局一部改正まで^{2,3)}

2007年	11/19	米国で最初の有害事象報告
2008年	1/17	バクスター社9ロットリコール
	2/28	バクスター社全製品リコール
	3/5	FDAがヘパリン様物質の混入を発表
	3/6	FDAがNMRとCEを用いたスクリーニング法をWebsiteに公開 ドイツRotexMedica社が有害事象に関連するヘパリンをリコール
	3/8	予防的措置として国内ヘパリンメーカー3社が自主回収
	3/10	厚労省「ヘパリンナトリウム製剤等の品質の確保の徹底等について」事務連絡
	3/19	FDAが混入物がOSCSであることを公表
	4/14	厚労省「医薬品等の品質の確保及び安定供給について」医政局長・医薬食品局長通知
	4/17, 18	国際ヘパリン会議(ワシントン市郊外)
	4/22	安全対策調査会 日局試験法作成のための研究班立ち上げ
	5/8	ヘパリン対応会議(参加:厚労省, 国立衛研, 総合機構, ヘパリン製造販売業者)
	6/4	PDG(ポートランド市)
	6/19, 20	ヘパリンワークショップ(ストラズブル市)
	7/1	日局部会
	7/31	日局一部改正告示 厚労省「日本薬局方外医薬品規格2002の一部改正について」医薬食品局長通知

を受けた患者に、血圧低下や頻脈等を伴うアレルギー反応が頻発した。^{2,3)} 2008年1月17日バクスター社はヘパリンナトリウム9ロットを回収したが、ヘパリンによるアレルギー反応の発生は治まらなかった(表1)。2月28日、バクスター社はすべての製品をリコールし、3月以降、米国における副作用の発生頻度は減少した(2008年4月13日までに米国では81名の患者の死亡が報告された)。しかし、ドイツでも別のメーカーが製造したヘパリンを投与された患者にアレルギー反応が発生したことから、ヘパリンによる副作用は国際的な問題へと発展した。ヘパリンの副作用として、これまでも血小板減少症などが知られていたが、今回発生した副作用はそれらとは明らかに異なるものであった。

2008年3月、米国食品医薬品局(FDA)は問題となったヘパリンにはヘパリン様物質が混入されていることを発表し、同時に¹H核磁気共鳴スペクトル測定法(¹H NMR)とキャピラリー電気泳動法を用いたヘパリン様物質スクリーニング法をホームページに公開した。⁴⁾ 各国の規制当局やヘパリン製造販売業者等によって、この方法を用いたヘパリンナトリウムの分析が実施された結果、ヘパリン様物質が混入した原薬は少なくとも世界12か国に広がっていることが判明した。⁵⁾ 後にこのヘパリン様物質は、高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(over-sulfated chondroitin sulfate; OSCS)であることが明らかにされた。⁶⁾ 各国が混入が認められた製品を回収するなどの措置をとったことから、ヘパリン供給不足への懸念が広がり、ヘパリンの安定供給が国際的な課題となった。

我が国では当初、米国で回収の対象となった製品は中国SPL社が製造した原薬を使用したものとの情報があり、国内では中国SPL社製原薬は使用されていなかったことから対応はとられていなかった。³⁾ しかし、3月に米国SPL社製原薬を使用した製品も対象とされていることが判明し、国内3社が自主回収を行った。ヘパリンは医療現場で欠くことのできない医薬品であり、各方面からヘパリン製剤の安全性の確保と安定供給に関する要望が相次いだ。4月22日、安全対策調査会が開催され、①米国で多発したヘパリン製剤投与による有害事象は、OSCSが原因物質ではないかと強く疑われていること、②詳細な有害事象発生の機構は不明であるが、FDAが公表している試験検査法を参考として、ロット毎に適切な検査によってOSCSが含ま

Wachter

れていないことを確認すること、③厚生労働省は欧米の規制当局と連携しつつ、国立医薬品食品衛生研究所(国立衛研)の協力も得て、OSCSの試験検査方法について製造販売業者に対し適切な指導を行うこと、などの結論が出された。

3 非天然物 OSCS の混入

イタリア G. Ronzoni 研究所, Momenta Pharmaceuticals 社, マサチューセッツ工科大 Sasisekharan 教授, レンセラー工科大学 Linhardt 教授及び FDA のグループは, 有害事象が多発したロットの NMR スペクトルの 2 ppm 付近に通常のヘパリンナトリウムからは検出されないシグナルの存在を認めた。また通常のヘパリンは, ヘパリナーゼによってウロン酸とグルコサミンからなるオリゴ糖に分解されるが, 問題のヘパリンナトリウムから生じたオリゴ糖の量は通常のヘパリンを消化して生じるオリゴ糖の量より少ないことに気づいた。彼らはヘパリンに未知の物質が混入されていると考え, 問題のヘパリンからエタノール沈澱やヘパリンの亜硝酸分解によって, ヘパリン様物質を単離した。さらに, 各種 2 次元 NMR スペクトルを測定することによって, このヘパリン様物質は高度に硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸エステル(OSCS)であることをつきとめた。⁵⁾

天然に存在するコンドロイチン硫酸エステルは, グルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンの 2 糖繰り返し構造からなり, 2 糖あたり 1~3 個の水酸基が硫酸エステル化されている。コンドロイチン硫酸エステルは, 硫酸エステル基の位置と数によって A, B, C, D, E, H 及び K に分類されている。⁶⁾ 我が国において, 眼の充血, 感音性難聴及び関節痛に適応されているコンドロイチン硫酸エステルは, A 及び C である(図 1 B)。また, コンドロイチン硫酸エステル B はデルマトン硫酸エステルとも呼ばれ, プタ皮膚に存在することからヘパリンに不純物として混入していることが古くから知られていた。しかしながら, 有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウムに混入していた OSCS は, 2 糖単位に 4 つ存在する水酸基がすべて硫酸エステル化された非天然型のコンドロイチン硫酸エステルであった(図 1 C)。^{1,5)}

OSCS は千葉大学薬学部で既に研究されていた物質で, ヘパリンと同様に凝固因子 IIa 及び Xa を阻害する活性を持つことは 1998 年に丸山らによって報告されていた。⁷⁾ FDA らのグループは, 高度に硫酸エステル化されたコンドロイチンを合成し(合成 OSCS), ヘパリンに混入していた OSCS と各種 NMR スペクトルが一致することを確認した。また, あらかじめ OSCS の硫酸エステル基を除去した後, コンドロイチナーゼを作用させてオリゴ糖に分解し LC/MS を行うことにより, OSCS はコンドロイチン構成 2 糖単位であるグルクロン酸($\beta 1 \rightarrow 3$)N-アセチルガラクトサミンからなっていることを確認した。

つぎに, 彼らは OSCS が有害事象の原因物質であるかどうかを検証した。⁸⁾ ヒト血漿及び第 XII 因子欠失血漿を用いた実験やモデル動物を用いた検討により, OSCS は第 XII 因子の活性化を通してカリクレインを活性化すること(その結果, 血管作用物質ブラジキニンが遊離され, 血圧が低下する), また補体由来ペプチド(アナフィラトキシン)C3a と C5a を産生すること(その結果, アナフィラキシーが誘導される)が明らかとなった。さらに, 合成 OSCS を投与されたブタでは, 血圧低下や心拍数増加などの有害事象と関連する症状が誘発されることが確認された。

高度に硫酸エステル化された多糖類が免疫反応を誘発することは, 以前から知られていた。ヘパリン有害事象が発生する以前に欧州では, 変形性関節疾患治療薬として Arteparon が使用されていたが, 合併症を引き起こすことから販売中止になっていた。Arteparon は, 構造的には OSCS と一致する。こうして OSCS は, 有害事象を誘発した原因物質であると結論づけられた。

4 日局一部改正

4月17, 18日, ワシントン市郊外においてFDA主催国際ヘパリン会議が開催された。日本, 中国, オーストラリア, 欧州数カ国等, 世界13か国から査察関係者及び分析科学者が集まり, 今後の対応について話し合われた。分析セッションでは, OSCSのスクリーニング法として¹H NMRが最も有用であること, またキャピラリー電気泳動やHPLC等他の分析法も利用可能であることが確認された。さらに今後各国の薬局方は連携して, ヘパリン不純物問題に対応していくことが確認された。厚生労働省も直ちに日局各条ヘパリンナトリウム改正に向けて動き出し, 厚生労働省, 国立衛研, 医薬品医療機器総合機構(総合機構), 近畿大学, 名古屋市立大学からなる日局試験法案作成のための研究班を立ち上げた。

国立衛研は, OSCS混入ヘパリンナトリウムから陰イオン交換HPLCにより, 試験法作成のためのOSCSを単離した(図2A)。そして, 精製OSCSとFDAより供与されたOSCS標準物質の2次元NMRスペクトルが一致することを確認した。つぎに, FDAが提案したスクリーニング法を基に試験法案が作成され, 国立衛研及び近畿大学薬学部掛樋一晃教授の研究室において精製OSCSを用いた分析法バリデーションが実施された。さらに, 試験法案作成研究班と国内ヘパリン製造販売業者により試験法案が議論され, 国立衛研, 近畿大学及び製造販売業者により試験法案に対する共同検定が実施されることとなった。^{1, 2)}

試験法案の実行には, システム適合性に用いる日局OSCS標準品が不可欠だった。OSCS混入ヘパリンからOSCSを精製し供給し続けることは量的に限界があることから, 合成OSCSを用いる案が浮上し, 国立衛研と千葉大学大学院薬学研究院戸井田敏彦教授の研究室との共同研究により, 精製OSCSと合成OSCSの品質特性の比較が行われた。システム適合性確認のための分析条件において両者は同様な結果を与えることから, 合成OSCSは日局標準品として使用可能であることが確認された。³⁾

産官学による共同研究が実施される一方で, 厚生労働省及び総合機構は欧米の規制当局や米国薬局方及び欧州薬局方との連携に努めた。日本の提案によりPharmacopoeial Discussion Group(PDG)においてヘパリン試験が議題に取り上げられ, その後も引き続き各国の規制当局

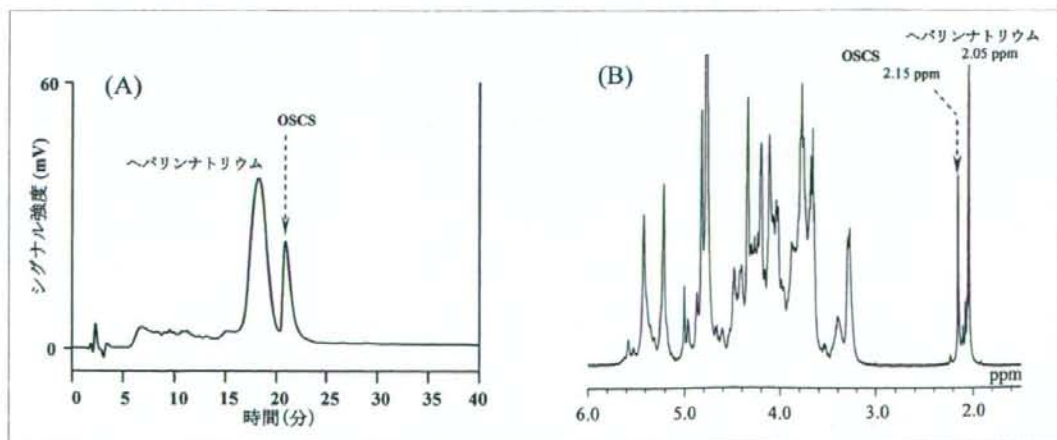


図2 イオン交換HPLC(A)と¹H NMR(B)によるヘパリンナトリウム中のOSCSの検出

Pharmaceutical

及び薬局方との間で情報交換が行われた。最終的に、米国薬局方はヘパリンナトリウムの確認試験として¹H NMR及びキャピラリー電気泳動法を実施することとなり、欧州薬局方は製造過程において¹H NMRまたはキャピラリー電気泳動法による試験を実施することとなった。

分析法バリデーション及び共同検定の結果から、日局試験法案作成研究班は特異性及び検出限界ともに優れている¹H NMRを日局純度試験として採用することとし、ヘパリン製造販売業者の協力を得ながら試験法最終案を作成した(図2B)。7月1日、薬事・食品衛生審議会日本薬局方部会が開催され、試験法最終案が承認された。意見公募を経て、7月31日、日局が一部改正され、各条ヘパリンナトリウムに純度試験(5)OSCSが追加された。¹⁰⁾同時に局方外医薬品規格2002が改正され、ヘパリンカルシウムの純度試験に¹H-NMRによるOSCSの分析が追加された。^{11,12)}

5 おわりに

厚生労働省、国内大学薬学部研究者及びヘパリン製造販売業者の迅速な対応により、日局が一部改正され、OSCS含量がNMRによる検出限界以下であることが保証されたヘパリン製剤が供給されるようになった。こうして、医療の場を巻き込んだヘパリン問題は収束に向かった。今回の問題は、日局、米国薬局方、及び欧州薬局方の各条の部ヘパリンナトリウムに抗Xa活性測定や抗凝固活性等の生物活性試験が採用され、構造を確認する規格及び試験法が設定されていなかったこと、そしてその規格をすりぬけることによって生じた例であった。今回の問題を契機に、各薬局方は構造確認のための試験法の重要性を再認識することとなった。しかし一方で、薬局方の純度試験は環境から混入する物質、製造工程由来不純物もしくは目的物質関連不純物に対して設定するものであり、本来混入しないはずの非天然物に対して設定するべきものではないとの意見も一部にはある。それでも、各国の薬局方及びヘパリン製造販売業者はヘパリンの安全性確保と安定供給を目指し、¹H NMRやキャピラリー電気泳動法よりも簡便かつ頑健な試験法として、また他のグリコサミノグリカン硫酸エステルを包括的に検出できる試験法として、陰イオン交換HPLC、単糖組成分析、抗IIaと抗Xa活性の割合を求める活性試験、オリゴ糖分析等の可能性を検討している。今後もグリコサミノグリカン硫酸エステルの構造解析、活性及び毒性に関する研究の進展や、試験法に関する世界の動向に目を向けていく必要があるだろう。

引用文献

- 1) 橋井剛貴ほか、医薬品研究、39、651-659(2008)。
- 2) Kishimoto T. K. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 358, 2457-2467(2008)。
- 3) 松田 勉, 日下部哲也, 医薬品研究、39、607-612(2008)。
- 4) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>。
- 5) Guerrini M. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 26, 669-675(2008)。
- 6) Sugahara K., Yamada S., *Trends Glycosci. Glycorechnol.*, 12, 321-349(2000)。
- 7) Maruyama T. *et al.*, *Carbohydr Res.*, 306, 35-43(1998)。
- 8) 掛樋一見ほか、医薬品研究、39、印刷中(2008)。
- 9) 川崎ナナほか、医薬品研究、39、印刷中(2008)。
- 10) 官報号外第166号、厚生労働省告示第417号。
- 11) 薬食発第0731015号厚生労働省医薬食品局長通知、日本薬局方外医薬品規格2002の一部改正について。
- 12) 橋井剛貴ほか、医薬品研究、39、660-664(2008)。



薬の名前

ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

第18回

国立医薬品食品衛生研究所

川崎ナナ, 内田恵理子

NANA KAWASAKI, ERIKO UCHIDA

National Institute of Health Sciences

名古屋市立大学大学院薬学研究所

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

はじめに

本連載第17回(本誌2007年12月号)では, 抗悪性腫瘍薬のステムとして,

「-sulfan」: メタンスルホネート系抗悪性腫瘍薬

「-mustine」: β -クロロエチルアミノ構造を持つ抗悪性腫瘍薬

「-tepa」: チオテパ系誘導体

「-ribine」: ピラゾフリン系リボフラニル誘導体

「-trexate」: 葉酸類縁化合物

「-trexed」: チミジル酸合成酵素阻害薬

「mito」: 細胞核に対して毒性を有する抗悪性腫瘍薬を紹介した。

今回は, 生物薬品の第6回目として, 酵素性医薬品のステムを紹介する。

「-ase」: 酵素

「-ase」は, 酵素(Enzyme)を示すステムである。

「-ase」は, さらに「-uplase」(ウロキナーゼ型プラス

ミノゲンアクチベーター), 「-teplase」(組織プラスミノゲンアクチベーター), 「-diplase」(プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質), 「-lipase」(リパーゼ活性を持つ酵素), 「-dismase」(スーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素)などのサブステムに分けられる。

(1)「-ase」: タンパク質分解酵素

「-ase」は, タンパク質分解酵素(proteinase)の(サブ)ステムとしても使用される。タンパク質分解酵素を示すサブステム「-ase」を持ち, わが国で承認されている医薬品にKallidinogenase(カリジノゲナーゼ), Serrapeptase(セラペプターゼ), L-Asparaginase(L-アスパラギナーゼ), Pronase(プロナーゼ), Urokinase(ウロキナーゼ)およびTisokinase(チソキナーゼ)がある。このうち, カリジノゲナーゼ, セラペプターゼおよびウロキナーゼは日局収載品目である。

カリジノゲナーゼは, 血液中のキニノーゲンに特異的に作用してキニンを遊離するキニノーゲン(カリクレイン)の1種で, ブタ膵臓由来のものが医薬品として使用されている。遊離したキニンは, 末梢血管の拡張なら

びに微小循環速度の亢進を介して血流増加作用を示す。わが国でカリジノゲナーゼは、高血圧症、メニエール症候群、閉塞性血栓血管炎(ビュルガー病)における末梢循環障害の改善および更年期障害、網脈絡膜の循環障害改善薬として適用されている。

セラバプターゼは、セラチア(*Serratia*)属細菌から精製したタンパク質分解酵素である。わが国では、手術後および外傷後、慢性副鼻腔炎、乳汁うっ滞における腫脹の緩解、ならびに気管支炎、肺結核、気管支喘息の喀痰咯出困難および麻酔後の喀痰咯出困難に適用される。

L-アスパラギナーゼは、321個のアミノ酸残基からなるサブユニット4つで構成されるタンパク質である。血中のL-アスパラギンを分解し、アスパラギン要求性腫瘍細胞を栄養欠乏状態にすることによって抗腫瘍作用を発揮する。日本および米国では急性白血病(慢性白血病の急性転化を含む)および悪性リンパ腫の治療に用いられている。

プロナーゼは、放線菌*Streptomyces griseus*が産生するタンパク質分解酵素である。わが国では、胃内視鏡検査における胃内粘液の溶解除去や消化異常症状の改善を目的に使用されている。また、イソプロテレノールとの混合剤が持続性気管支拡張・粘液溶解剤に適用されている。

その他「-ase」を持つ品目で、海外で承認されている医薬品にRasburicase(ラスブリカーゼ)、Streptokinase(ストレプトキナーゼ)、Pegaspargaseがある。

ラスブリカーゼは、*Saccharomyces cerevisiae*から産生される遺伝子組換え尿酸オキシダーゼである。悪性腫瘍あるいは化学療法に起因して発現する高尿酸血症治療薬として欧米で使用されている。わが国では2007年にJANに収載された。

Pegaspargaseは、大腸菌で産生されたL-アスパラギナーゼに、分子量約5,000のポリエチレングリコールを共有結合させたPEG化タンパク質で、米国で承認されている。なお、「Peg-」はポリエチレングリコール(PEG)が結合していることを意味する接頭語である(本連載第5回(本誌2006年12月号)参照)。

その他タンパク質分解酵素を示すサブシステム「-ase」を持つ医薬品としてINNには、Brinase, Ocrase, Promelase, Sfericaseが収載されている。

INNには「-ase」を持たないタンパク質分解酵素もいくつか収載されている。わが国で承認されている医薬品

ではBromelain(プロメライン)がある。プロメラインは、パイナップルの果汁、または葉茎の搾汁より調製したタンパク質分解酵素で、手術後および外傷の腫脹の緩解、慢性気管支炎や気管支喘息の喀痰困難の改善、熱傷や化膿創などの創傷面の壊死組織の分解除去・洗浄およびそれに伴う治癒促進に用いられている。

「-ase」を持たないタンパク質分解酵素性医薬品としては、欧州で承認され、JAN収載品目でもあるChymotrypsin(キモトリプシン)や、米国で承認されているChymopapainもある。その他、INNにはBatroxobin, Defibrotide, Fibrinolysin(human), Sutilainsが収載されている。

タンパク質分解酵素には血栓溶解系に関するものもある。循環血液中には血栓溶解作用を持つプラスミンの前駆体であるプラスミノゲンが存在する。循環血液中のプラスミノゲンは、プラスミノゲンアクチベーターによって560番目のアルギニンと561番目のバリンの間が切断されて、活性型のプラスミンとなる(図1)。プラスミンは、血栓の主成分であるフィブリンを分解することにより血栓を溶解する。哺乳類のプラスミノゲンアクチベーターは、ウロキナーゼ型のプラスミノゲンアクチベーターと組織型のプラスミノゲンアクチベーターに大別される。前者は古くは尿中に見出されたことから、現在でも単にウロキナーゼと呼ばれる。

ウロキナーゼは、セリンプロテアーゼの1つで、411個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質である。ウロキナーゼは、プロウロキナーゼ(411個のアミノ酸残基からなる1本鎖糖タンパク質、分子量約55,000)として産生された後に、プラスミンやカリクレインによって158番目のリジンと159番目のイソロイシンの間が限定分解されることによって生じるA鎖(N末端側ペプチド、分子量約22,000)およびB鎖(C末端側ペプチド、分子量33,000)からなる2量体タンパク質である。ウロキナーゼは、活



図1 血栓溶解機構
t-PA:組織プラスミノゲンアクチベーター
UK:ウロキナーゼ

性型高分子量ウロキナーゼ(分子量約55,000)または、さらに分解された低分子量ウロキナーゼ(分子量約31,500)として存在する。

INNに収載されているウロキナーゼは、「A plasminogen activator isolated from human sources」とあるようにヒト由来である。わが国で承認され、日局に収載されているウロキナーゼは、ヒト尿から精製した高分子量型ウロキナーゼである。わが国では、急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解剤として適用されている。ヒト尿由来ウロキナーゼは欧州でも承認されており、EPに収載されている。EP収載ウロキナーゼは高分子量および低分子量ウロキナーゼを含むものである。

米国で承認されているウロキナーゼは、尿由来ではなく、組織培養(新生児腎細胞)由来のもので、分子量約32,000の低分子量ウロキナーゼである。また、INNにはUrokinase Alfaが収載されており、これは遺伝子組換え型糖タンパク質で、非ヒト哺乳動物由来細胞で産生された高分子量ウロキナーゼである。

欧米で血栓溶解剤として使用されているストレプトキナーゼも、プラスミノゲンアクチベーターである。ストレプトキナーゼは、黄色ブドウ球菌由来のタンパク質分解酵素で、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する。わが国では販売されていない。

(2)「-uplase」：ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター

「-uplase」はウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(urokinase-type plasminogen activator)に共通のサブシステムで、JANにはNasaruplase(ナサルブラーゼ(細胞培養))が収載されている。

ナサルブラーゼは、ヒトプロウロキナーゼと同一のアミノ酸配列を持つ糖タンパク質である。ナサルブラーゼは、ヒト腎臓に由来する2倍体細胞の培養により繊維芽細胞をクローン化し、株化した細胞で産生される。急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解を効能とした血栓溶解剤として承認されている。

ナサルブラーゼと同一のアミノ酸配列を持ち、糖鎖が異なる品目として、INNにNasaruplase Betaが収載されている。これは、マウス細胞で産生される遺伝子組換え糖タンパク質である。Nasaruplaseは、Alfaが収載されず、Betaが収載されている唯一の例である。その他、「-uplase」を持つ品目としてINNにはSaruplaseが収載されている。

(3)「-teplase」：組織プラスミノゲンアクチベーター類

「-teplase」は、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)類(tissue-type-plasminogen activator)に共通のサブシステムである。t-PAは、ウロキナーゼと同様にプラスミノゲンの560番目のアルギニンと561番目のバリンの間を切断することによって、プラスミノゲンをプラスミンに活性化する(図1)。t-PAは、主に血管内皮細胞で産生される527個のアミノ酸残基からなる分子量約70,000の1本鎖糖タンパク質で、分子内の3カ所(Asn117, 184, 448)に糖鎖が結合している。N末端側から、フィンガードメイン、EGFドメイン、クリングル1ドメイン、クリングル2ドメイン、Catalyticドメインから構成されている(図2)。t-PAは、プラスミンによりCatalyticドメイン上の275番目のアルギニンと276番目のインロイシンの間が切断されると、重鎖(N末端側)と軽鎖(C末端側)からなる2本鎖t-PAになる。2本鎖t-PAになると十分な活性を発揮するが、1本鎖でも2本鎖t-PAの約1/10の酵素活性を有する。t-PAがウロキナーゼと大きく異なる点は、フィブリン親和性を有する点である。t-PAは血栓に特異的に結合してプラスミノゲンを活性化するので、血栓溶解効率が高い。これに対してウロキナーゼは、循環血液中のプラスミノゲンを活性化するために、生じたプラスミンが特異的インヒビター(α_2 -プラスミンインヒビター等)で失活したり、出血傾向を引き起こしたりする。t-PAの高いフィブリン親和性には、フィンガードメインとクリングル2ドメインが関与しているといわれている。

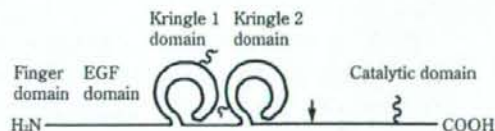


図2 t-PAの構造

- フィンガードメイン：1～43番目
- EGFドメイン：44～91番目
- クリングル1ドメイン：92～173番目
- クリングル2ドメイン：180～261番目
- Catalyticドメイン：276～527番目
- ~~~~~：糖鎖
- ↓：プラスミン限定分解部位

サブシステム「-teplase」を持ちわが国で承認されている医薬品として、Alteplase(アルテプララーゼ)、Monteplase(モンテプララーゼ)およびPamiteplase(パミテプララーゼ)がある。

STEMを知られば薬がわかる

1010

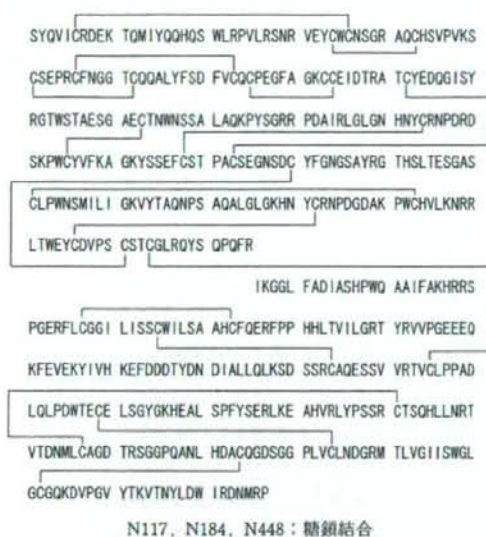


図3 アルテプラゼの一次構造、ジスルフィド結合と糖鎖結合部位

アルテプラゼは、遺伝子組換えヒト組織プラスミノゲンアクチベーターで、CHO細胞によって産生される(図3)。虚血性脳血管障害急性期に伴う機能障害の改善(発症後3時間以内)および急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解(発症6時間以内)に適用される。アルテプラゼは、海外でも承認されており、EPおよびUSPにも記載されている。わが国では日局記載候補品目になっている。

t-PAは、血中からの消失が速く、静脈投与する場合は点滴投与が必要とされている。t-PAの肝臓での代謝には、クリングル1ドメイン上のAsn117に結合している高マンノース型糖鎖やEGFドメインが関与していると考えられている。そこで、血中での滞留時間を延長させるために、遺伝子工学的にt-PAを改変する研究が進められた。現在ではさまざまな改変型t-PAが血栓溶解薬として使用されている。

モンテプラゼは、t-PAの84番目のシステインをセリンに変換した改変型t-PAで、ベビーハムスター腎細胞により産生される。わが国では急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解(発症後6時間以内)および不安定な血行動態を伴う急性肺塞栓症における肺動脈血栓の溶解に適用されている。

パミテプラゼは、t-PAのクリングル1ドメインを欠失させることによって血中半減期を延長し、かつt-PAが2本鎖に解離しないように天然型t-PAのN末端から275番目のアルギニンをグルタミン酸に変換してフィブリン親和性を回復させた改変型t-PAで、CHO細胞によって産生される。パミテプラゼは、急性心筋梗塞における冠動脈血栓の溶解(発症後6時間以内)に適用されている。

サブシステム「-teplase」を持つその他の品目としてJANには、Duteplase(デュテプラゼ)、Lanoteplase(ラノテプラゼ)、Sileteplase(シルテプラゼ)、Nateplase(ナテプラゼ)、およびEcolteplase(エコルテプラゼ)が記載されている。欧米では、Tenecteplaseと Reteplaseが承認されているが、いずれもJAN未記載である。

Tenecteplaseは、CHO細胞で産生されるt-PA改変体で、103番目および117番目のアミノ酸残基がそれぞれアスパラギンおよびグルタミンに変換され、さらに296~299番目のアミノ酸残基がアラニンに変換されている。Reteplaseは、クリングル2ドメインとCatalyticドメインからなる改変体で、大腸菌で産生される糖鎖非結合タンパク質である。

その他サブシステム「-teplase」を持つ医薬品として、INNにはAnistreplaseおよびDesmotepaseが記載されている。

「-ase」の項で述べたTisokinase(チソキナーゼ)は、t-PAを示すサブシステム「-teplase」を持たないが、天然型t-PAである。チソキナーゼは、527個のアミノ酸残基からなる糖タンパク質で、ヒト肺由来する2倍体繊維芽細胞で産生される。血栓溶解剤として承認されている。

(4)「-diplase」:プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質

「-diplase」はプラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質に与えられたサブシステムである。サブシステム「-diplase」を持つ品目として、AmediplaseがINNに記載されている。Amediplaseは、t-PAのクリングル2ドメインとプロウロキナーゼのC末端側ドメインから構成される遺伝子組換えキメラ型プラスミノゲンアクチベーターである。

(5)「-lipase」:リパーゼ活性を持つ酵素

リパーゼ(lipase)活性を持つ酵素にはサブシステム

「-lipase」が与えられている。リパーゼはグリセロールエステルを加水分解し、脂肪酸を遊離する酵素である。サブシステム「-lipase」を持ちINNに収載されている品目として、遺伝子組換えヒト胆汁酸塩活性化リパーゼであるBucelipase Alfaや、*Rhizopus arrhizus*が産生するリパーゼRizolipaseがある。

(6)「-dismase」：スーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素

「-dismase」は、スーパーオキシドジスムターゼ(Superoxide dismutase)活性を持つ酵素に共通のサブシステムである。スーパーオキシドジスムターゼは、異性化酵素(isomerase)の1種で、スーパーオキシドアニオンラジカルの不均化反応(下式)を触媒する。



スーパーオキシドジスムターゼは、細胞内に発生したスーパーオキシドアニオンラジカル濃度を低下させることにより、DNA、膜脂質、タンパク質、炭水化物の酸化的損傷を抑制し、酸素障害を防御している。サブシステム「-dismase」を持ちINNに収載されている品目として、LedismaseとSudismaseがある。また、「-dismase」

を持たないが、INNに収載されているOrgoteinは赤血球由来スーパーオキシドジスムターゼである。そのPEG化体PegorgoteinもINNに収載されている。

システム「-ase」を持つその他の酵索性医薬品として、INNやJANには多くの糖分解酵素も収載されている。それらは本連載の第21回で紹介する予定である。

以上、今回は、酵素を示すシステム「-ase」を持つ医薬品の中から、タンパク質分解酵素、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター類、組織プラスミノゲンアクチベーター類、プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質、リパーゼおよびスーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素を紹介した。

■参考文献

本稿作成に使用した参考文献は、本連載第5回(本誌2006年12月号)に記載している。また、以下の文献を参考にした。

- 1) 一瀬白帝編著：図説、血栓・止血・血管学，血栓症制圧のために，中外医学社，2005
- 2) 池田康夫編著：血栓症治療ハンドブック改訂第3版，メディカルレビュー社，1999
- 3) 鈴木宏治，松田道生編：止血・血栓・線溶，中外医学社，1994



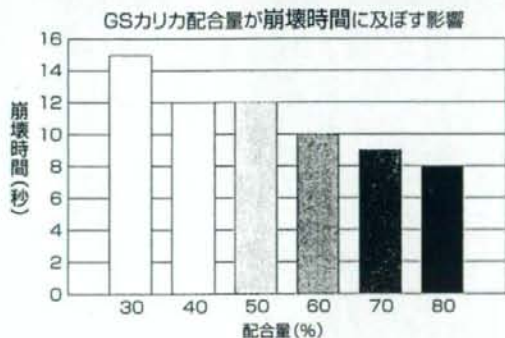
直打用賦形薬 無水リン酸水素カルシウムGS(GSカリカ)

特長

- 崩壊時間 — “極めて早い崩壊”(速崩壊)
- 混合均一性 — 良好
- 直打 — 連続打錠可能
- 小型の錠剤 — 可能
- JP/USP/EP — 3局対応

錠剤1錠中(200mg)の成分	
成分名	配合量(%)
アセトアミノフェン	5
GSカリカ	30 40 50 60 70 80
結晶セルロース	61 51 41 31 21 11
クロスカルメロースナトリウム	3
ステアリン酸マグネシウム	1

打錠条件：φ8 200mg錠 打錠圧力：10KN



コメント：GSカリカ30%配合処方では崩壊時間15秒の早い崩壊を示す。GSカリカ配合量の増加に伴い、崩壊時間はより短くなる。

大 協和化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町3-9-4 TEL.03-3667-8037

DM資料請求カーF-No.13



薬の名前

ステムを知れば薬がわかる

Stems used in drug names : For the better understanding of pharmacological actions of drugs

第21回

国立医薬品食品衛生研究所

川崎ナナ, 内田恵理子

NANA KAWASAKI, ERIKO UCHIDA

National Institute of Health Sciences

名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮田直樹

NAOKI MIYATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

はじめに

本連載第20回(本誌2008年3月号)では、抗悪性腫瘍作用を有する医薬品および代謝・栄養系に作用する医薬品を示すステムとして、

「vin-」: ビンカルカロイド

「-orex」: 食欲抑制剤

「-imibe」: アシルCoA-コレステロールアシル転移酵素阻害作用を有する高脂血症薬

「-begron」: β_2 アドレナリン受容体作動薬

「bol-, -bol-, -bol」: 同化ステロイド

「-thiouracil」: 甲状腺阻害作用を有するチオウラシル誘導体

を紹介した。

今回は、生物薬品の第7回目として、酵素性医薬品のステムのつづきを紹介する。



「-ase」: 酵素 その2

本連載第18回(本誌2008年1月号)では、酵素(Enzyme)に対して一般的に用いられるステム「-ase」を持つ医

薬品の中から、サブステム(1)「-ase」(タンパク質分解酵素)、(2)「-uplase」(ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター活性を持つ酵素)、(3)「-teplase」(組織プラスミノゲンアクチベーター活性を持つ酵素)、(4)「-diplase」(プラスミノゲンアクチベーターと他の酵素との融合タンパク質)、(5)「-lipase」(リパーゼ活性を持つ酵素)、ならびに(6)「-dismase」(スーパーオキシドジスムターゼ活性を持つ酵素)を持つ医薬品を取り上げて紹介した。今回は、サブステムを持たないその他の酵素を紹介する。

(7)サブステムを持たない酵素

①糖加水分解酵素

糖質および複合糖質の代謝に係わるさまざまな糖分解酵素が医薬品に利用されている。わが国で承認されている糖分解酵素医薬品は、消化不良改善薬およびリソソーム病治療薬に大別される。

(i)消化不良改善薬

消化不良改善薬の多くはINN未収載品目であるが、わが国では古くから使用されている。「-ase」をステムに持ち、わが国で消化不良改善薬として用いられている品

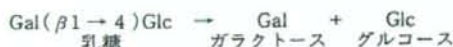
薬の名前

ステムを知らば薬がわかる

薬の目録

目に、 β -Galactosidase (*Aspergillus*) (β -ガラクトシダーゼ (アスペルギルス)), β -Galactosidase (*Penicillium*) (β -ガラクトシダーゼ (ペニシリウム)), Diastase (ジアスターゼ), Sanactase (サナクターゼ) および Tilactase (チラクターゼ) などがある。

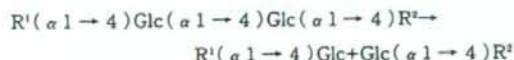
β -ガラクトシダーゼは、非還元末端のガラクトースを分解するエキソグリコシダーゼで、乳糖分解作用を持つ。



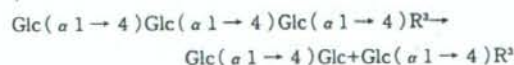
Aspergillus oryzae および *Penicillium multicolor* が産生する β -ガラクトシダーゼは、それぞれ β -ガラクトシダーゼ (アスペルギルス) および β -ガラクトシダーゼ (ペニシリウム) と命名され、日局にも収載されている (JAN, INN 未収載)。JAN および INN 収載品目であるチラクターゼも、本質は β -ガラクトシダーゼである。わが国ではいずれも、乳児の乳糖不耐により生じる消化不良の改善、ならびに経管栄養食および経口流動食等摂取時の乳糖不耐により生じる下痢等の改善薬として適応されている。

ジアスターゼは、デンプンを加水分解する酵素の総称で、アミラーゼとも呼ばれる。日局に収載され、医薬品として用いられているジアスターゼは、主に麦芽から精製したデンプン分解酵素で、 $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ グリコシド結合をエンド型にランダムに加水分解する α -アミラーゼ活性と、非還元末端からエキソ型にマルトースを遊離する β -アミラーゼ活性を有している。

α -アミラーゼ活性



β -アミラーゼ活性



サナクターゼは、*Aspergillus niger* が産生する耐酸性 α -アミラーゼを主とする酵素で、同じくデンプン分解活性を示す。わが国ではどちらも、炭水化物の消化異常症状の改善に適応されている (ジアスターゼ、サナクターゼとも INN 未収載)。

表1 リンソーム病, 原因酵素および治療薬

疾患	欠損酵素	治療薬	備考
ムコ多糖症 I 型	α -L-Iduronidase (α -L-イズロニダーゼ)	ラロニダーゼ	2006
ムコ多糖症 II 型	Iduronate-2-sulfatase (イズロン酸-2-スルファターゼ)	イデュルスルファターゼ	2007
ムコ多糖症 VI 型	N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase (N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ)	ガルスルファターゼ	承認申請中
糖原病 II 型 (ポンペ病)	α -Glucosidase (α -グルコシダーゼ)	アルグルコシダーゼ アルファ	2007
ファブリー病	α -Galactosidase (α -ガラクトシダーゼ)	アガルシダーゼ アルファ アガルシダーゼ ベータ	2006 2004
ゴーシェ病	β -D-Glucocerebrosidase (β -D-グルコセラブロシダーゼ)	アルグルセララーゼ イミグルセララーゼ	1996 1998

(ii) リンソーム病治療薬

細胞内小器官の1つであるリンソームには、複合糖質や脂質代謝に係わるさまざまな加水分解酵素が存在している。その中の1つの酵素が欠損すると、その基質である複合糖質や脂質が蓄積しリンソーム病を発症する。現在、30種類以上のリンソーム病が知られている。

治療法には酵素補充療法と遺伝子治療がある。近年、酵素補充療法を目的とした遺伝子組換えリンソーム酵素が開発されている。わが国では、Agalsidase Alfa (アガルシダーゼ アルファ), Agalsidase Beta (アガルシダーゼ ベータ), Alglucosidase Alfa (アルグルコシダーゼ アルファ), Alglucerase (アルグルセララーゼ), Idursulfase (イデュルスルファターゼ), Imiglucerase (イミグルセララーゼ), および Laronidase (ラロニダーゼ) が承認されている。Galsulfase (ガルスルファターゼ) は、承認申請中である。表1に疾患と原因酵素および酵素補充療法用医薬品をまとめる。

・ムコ多糖症治療薬

ムコ多糖症とは、グリコサミノグリカン、すなわち、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、およびコンドロイチン硫酸の分解に係わる酵素の活性が低下し、グリコサミノグリカンが組織中に蓄積される病気である。活性が低下する酵素の種類に応じて I-VII 型 (V 型欠番) に分類され、主に骨、内臓、心臓血管、神経系などに多様な臨床症状が現れる。図1はグリコサミノグリカンの代謝経路、ムコ多糖症と原因酵素、および酵素補充療法に用いられる医薬品を示したものである。

デルマトン硫酸とヘパラン硫酸は、硫酸化ウロン酸

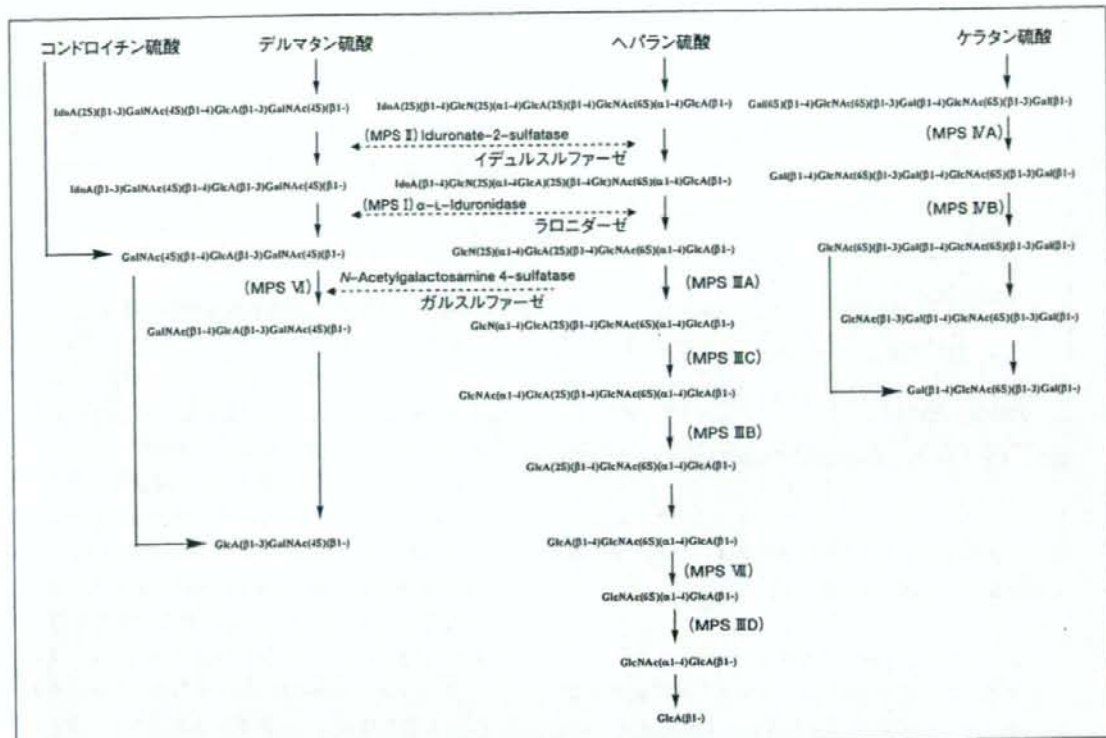


図1 グリコサミノグリカン代謝経路, ムコ多糖症 I ~ VI 型と原因酵素, および治療薬 (太字)
 MPS: ムコ多糖症, GalNAc: N-アセチルガラクトサミン, GlcA: グルクロン酸, GlcN: グルコサミン, GlcNAc: N-アセチルグルコサミン, IdoA: イズロン酸, S: 硫酸基

(イズロン酸およびグルクロン酸)と硫酸化N-アセチルヘキソサミンもしくは硫酸化ヘキソサミンの繰り返し構造からなる多糖である。イズロン酸の硫酸基を加水分解するイズロン酸-2-スルファターゼが欠損するとムコ多糖症 II 型を発症する。この酵素と同一のアミノ酸配列を持ち、ムコ多糖症 II 型治療薬として開発された遺伝子組換え医薬品がイデュルスルファターゼである(2007年承認)。

硫酸基の加水分解に引き続き、 α -L-イズロニダーゼの作用によって、デルマタン硫酸とヘパラン硫酸からイズロン酸が解離される。この酵素が欠損するとムコ多糖症 I 型を発症する。ラロニダーゼは、 α -L-イズロニダーゼと同じアミノ酸配列を持つ遺伝子組換え糖タンパク質で、ムコ多糖症 I 型治療薬として承認されている(2006年)。

さらに、デルマタン硫酸およびコンドロイチン硫酸の非還元末端硫酸化N-アセチルガラクトサミンから、N-アセチルガラクトサミン4-スルファターゼの作用により、硫酸基が加水分解される。この酵素の欠損が原因で発症

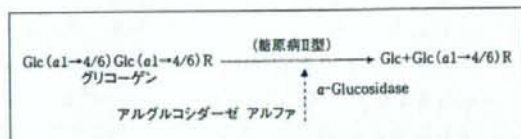


図2 リソソーム内グリコゲン代謝, 糖原病 II 型と原因酵素および治療薬 (太字)

する疾患がムコ多糖症 VI 型である。現在、ムコ多糖症 VI 型治療薬としてガルスルファターゼが承認申請中である。

・糖原病 II 型治療薬

糖原病 II 型は、グリコゲン分解に係わる α -グルコシダーゼの欠損によって、リソソーム内にグリコゲンが蓄積するために発症する(図2)。別名ポンペ病、もしくは酸性マルターゼ欠損症とも呼ばれる。アルグルコシダーゼ アルファは、CHO細胞で産生される遺伝子組換えヒト酸性 α -グルコシダーゼで、リソソーム内のグリコゲンの($\alpha 1 \rightarrow 4$)および($\alpha 1 \rightarrow 6$)グリコシド結合を加水分解することによって、糖原病患者におけるグ

薬の名前

ステムを知れば薬がわかる

第21回

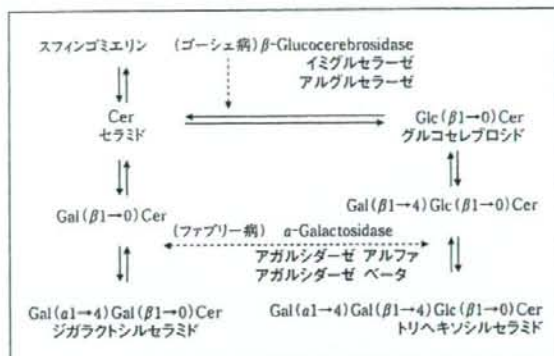


図3 ファブリー病、ゴーシェ病と原因酵素および治療薬(太字)

リコーゲンを低下させる。わが国では2007年に糖尿病Ⅱ型治療薬として承認されている。

・スフィンゴリピドーシス治療薬

スフィンゴリピドーシスは、スフィンゴ脂質代謝に関係するリソソーム酵素の障害によって発症する。現在、ファブリー病とゴーシェ病の治療薬が承認されている。

ファブリー病は、 α -ガラクトシダーゼの欠損によって起きる疾患で、リソソーム内にジガラクトシルセラミドおよびトリヘキシシルセラミド(別名:グロボトリアオシルセラミド)が蓄積し、皮膚症状、腎障害、末梢神経障害を呈する(図3)。ファブリー病治療薬として開発されたのが α -ガラクトシダーゼAと同じアミノ酸配列を持つアガルシダーゼ アルファおよびアガルシダーゼ ベータで、リソソーム内のジガラクトシルセラミドおよびトリヘキシシルセラミドの非還元末端のガラクトースを分解する。アガルシダーゼ アルファは、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、2006年に承認されている。アガルシダーゼ ベータは、CHO細胞で産生される糖タンパク質で、アガルシダーゼ アルファとは糖鎖構造が異なる(2004年承認)。

ゴーシェ病は、 β -グルコセラブロシダーゼが欠損することによって、グルコセラブロシドが蓄積し、肝臓や脾臓が腫大する疾患である(図3)。国内では、ゴーシェ病治療薬としてアルグルセララーゼおよびイミグルセララーゼが承認されている。アルグルセララーゼは、ヒト胎盤から精製された β -グルコセラブロシダーゼで、N-結合型糖鎖をトリミングすることによって非還元末端をマンノ

ースとし、マクロファージ上のマンノース受容体との親和性を高めている(1996年承認)。イミグルセララーゼはCHO細胞によって産生される遺伝子組換え β -グルコセラブロシダーゼ類縁体で、糖鎖の非還元末端は同じくマンノースにトリミングされている(1998年承認)。ゴーシェ病治療薬として現在国内では、イミグルセララーゼが販売されている。

(iii) その他の症例に適應される糖分解酵素

ヒアルロン酸は、グリコサミノグリカンの1種で、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の2糖繰り返し構造[→4)GlcA(β1→3)GlcNAc(β1)]からなり、糖鎖間質物質として皮膚や関節など生体内に広く分布している。ヒアルロン酸を分解すると、結合組織の透過性が増すため、皮下に注入した薬剤の吸収や拡散が促進される。ヒアルロン酸を分解する酵素には、GlcNAc(β1→4)GlcAの結合を分解する酵素とGlcA(β1→3)GlcNAcの結合を分解する酵素がある。前者の活性を持つ酵素はHyalosidaseとしてINNに収載されている。また、INN収載Hyaluronidaseは、種々の組織に由来するヒアルロン酸分解活性を有する酵素と定義されている。米国では、ウシ精巣由来のHyaluronidaseやヒトヒアルロニダーゼと同じ配列を持つ遺伝子組換えHyaluronidaseが、皮下注射された薬剤の吸収拡散促進剤として販売されている。

Sacrosidaseは、酵母由来の β -フルクトフラノシダーゼ(サッカラーゼ)で、非還元末端のフルクトフラノシド残基を加水分解する作用をもち、ショ糖を β -D-フルクトースと α -D-グルコースとに分解する。米国では、先天的スクラーゼ・イソマルターゼ欠乏症(CSID)に適應されている。CSIDは、内在性スクラーゼ活性の欠乏によって小腸が障害される常染色体劣性遺伝病で、北米で頻度の高い疾患である。

ステム「-ase」を持たないが、Lysozyme(リゾチーム)も糖分解酵素の1つである。リゾチームは、ムコ多糖類分解酵素の1つでペプチドグリカンのN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミン間の(β1→4)結合を分解する。ヒトでは涙や唾液などに存在する。ニワトリ卵白に由来するリゾチームは、129個のアミノ酸残基からなるタンパク質で、作用機構には解明されていない点が多いが、気管支炎、気管支喘息、気管支拡張症の喀痰喀出困難、慢性副鼻腔炎、小手術時の術中術後出血(歯科、泌尿器科領域)に適應されている。ニワトリ卵白由来リゾチームは、日局にリゾチーム塩酸塩として収

載されている。

②核酸分解酵素

核酸を分解する作用を持つ医薬品として、Dornase Alfa, Streptodornase(ストレプトドルナーゼ), Ranpirnase およびPegademase が開発されている。

Dornase Alfaは、遺伝子組換え型ヒトデオキシリボスクレアーゼI (DNA分解酵素)である。Dornase Alfaは米国において、嚢胞性線維症患者の肺に存在する白血球由来DNAを分解することにより、痰の粘着性及び粘度を下げる効果があるとして承認されている。嚢胞性線維症は、白人に高頻度に発症する常染色体劣性遺伝である。患者は、塩化物イオンとナトリウムイオンの膜輸送に携わる嚢胞性線維症膜貫通調節(CFTR)タンパク質の遺伝子異常によって脱水症に陥る。その結果、粘液の粘度が高くなり、気管支、肺、すい臓、小腸、肝臓などに分泌物が蓄積し、機能が低下する。

ストレプトドルナーゼは、化膿連鎖球菌が産生するDNA分解酵素である。わが国では、ストレプトキナーゼとの配合剤が使用されていたが、現在は販売中止になっている(後述)。

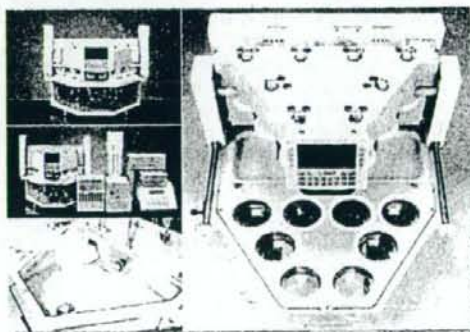
Ranpirnaseは、*Rana pipiens*(ヒョウガエル)由来のRNA

ポリヌクレアーゼ(RNA分解酵素)である。Ranpirnaseは細胞表面に結合するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、tRNAを分解する。その結果、アポトーシスのシグナルが誘導されたり、細胞増殖が抑制されたりする。Ranpirnaseは米国において、切除不能悪性中皮腫の治療薬として希少医薬品に指定されている(2007年1月)。中皮腫(Mesothelioma)は、主に石棉(アスベスト)が原因で発症するといわれている胸部癌の一種である。

Pegademaseは、ウシ由来アデノシンデアミナーゼに平均分子量5,000のモノメトキシポリエチレングリコールを結合させた修飾タンパク質である。アデノシンデアミナーゼは、プリンヌクレオチドの分解経路に属する酵素の1つで、アデノシンや2'-デオキシアデノシンをイノシンおよびデオキイノシンに分解する。この酵素が欠損すると、アデノシンや2'-デオキシアデノシンが蓄積し、リンパ球が障害される。その結果、免疫不全に陥り、重症感染症を繰り返す(アデノシンデアミナーゼ欠損症)。治療法として遺伝子治療と酵素補充療法があり、Pegademaseは米国において酵素補充療法薬として承認されている。

究極の溶出試験グローバルスタンダード

VK7025 溶出試験器は世界標準の溶出試験器です



USP キャリブレーターでお困りではありませんか？
溶出試験器間誤差の問題はありませんか？

- VK7025 の特長
- ① フルオープンアクセス
- ② 調整不要のトゥルーセンターベッセル
- ③ 最短ロッドで極小のバドル偏心
- ④ メンテナンス性抜群

バリアン社の溶出試験器なら
問題解決できます

信頼をお届けする

UNIFLEX 株式会社 ユニフレックス

ホームページ: <http://www.uniflex.co.jp>

東京営業部 〒277-0861 千葉県柏市高田 537-1

TEL.04-7147-3751 FAX.04-7144-8242

大阪営業所 〒533-0033 大阪市東淀川区東中島 1-17-18 新大阪ビル東館 2F

TEL.06-6323-8344 FAX.06-6323-8257

本社 〒113-0033 東京都文京区本郷 3-26-4 ドルミ本郷 7F

TEL.03-3816-1004 FAX.03-3816-1392

DM資料請求カードNo.103