

がおっしゃった製剤です。溶出試験のような製剤機能試験等は、各条で規定すると不都合な場合も出てきます。原薬でも各社によって異なる可能性のある製造工程由来の不純物がそれに当たるでしょう。これらは「別に規定する」として、最近では各社の承認書に委ねていると思います。また、医薬品各条全般に関係する重要な項目ですが、残留溶媒のように、各社の製法によって、「あり」「なし」、ありの場合でも種類がさまざまという場合もあります。残留溶媒はそれぞれの規格値がICHで規定されているので、通則で、可能性のある個別製品での規定の必要性を明示し、それぞれの承認書で対応を求めるやり方も取り入れています。

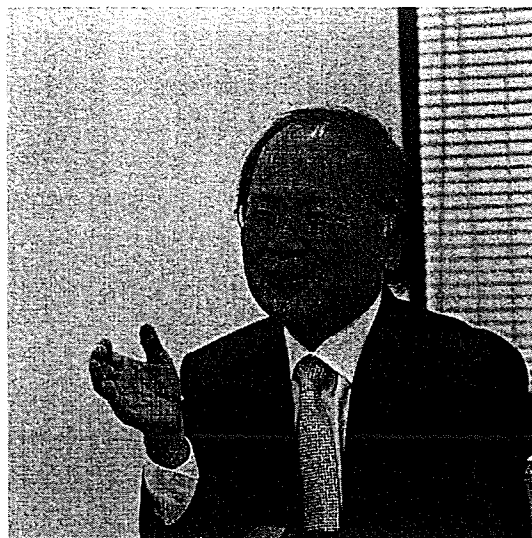
一方で、製品レベルで試験はできるけれども、効果的、合理的に品質確保を図るためには、製品レベルでの試験と製造工程レベルでのバリデーション、あるいは工程管理法を組み合わせた相互補完的な恒常性維持・管理方策が、最近、一般的になっています。JPでも、通則で「製造工程のバリデーション及び適切な工程管理と品質管理の試験検査に関する記録により、その品質がJPに適合することが恒常的に保証される場合には、出荷時の検査等において、必要に応じ各条の規格の一部について試験を省略できる」として合理的な対応を求めています。

というわけで、日局各条はもはや具体的な基準表示という意味では必ずしもフル規格ではありません。しかし、各条で規定できること、規定すべきことはできるだけそうする、また、具体的な数値等は明記できなくとも、必要な事項については、留意するよう、通則で規定したり、参考情報で補完したりとする方策を講じています。つまり、JP全体を通則から参考情報までをとおしてみただく、そして各条の中で当該医薬品の品質を適正に確保し、そこに必要な規格・基準、標準的試験法を示し、かつ、「別に規定すべきこと」を明らかにすることで「これは必要ですよ」と、品質確保のコンセプトを描いているのです。

基準書というには、フル規格を示さなければなりません。合理性も含め、いろいろな背景があり各条にはフルパッケージの規格は必ずしも盛り込んでいません。そこで、JP16からは、フル規格をコンセプトとしては描いているというメッセージを伝えて、全体を読めばその規範が示されているという意味で規範書といっています。

司会 審査の立場から、川西先生からご意見はありますか。

川西 新薬の審査の立場に立つと、局方はある意味ミニマムな規格と考えるようになってきているかと思います。有効成分に関してはJPにフル規格が記載され、それが規範になっています。しかし、不純物や混入物質などは



早川 義夫

製法に依存しますから、製造方法が異なる製品を束ねるフル規格を設定することは難しいでしょう。ただ、JPも、欧州薬局方(EP)のように、「製造に関してはPRODUCTIONの項を設けて、一般的にはこういうことに注意すべき」という方法や主な不純物を測定法とともに記載するという方法は、将来的には考えられる方策かと思っています。

また、たん白性医薬品など有効成分にも製造依存的な部分があります。一般論として、JPもこれからは製法依存的な不純物等々についてもフル規格に近づける方策の検討も必要でしょう。そうしないと、JPはあまりリスペクトされないような存在になってしまうかもしれません。

このところICHの影響もあるのかもしれませんが、ミニマムという考え方で、「別に規定する」というやり方で対応する傾向が強くなっていると思います。ところが一方では、別に規定する形式について見直すべきではないかという意見も出てきています。これは、クラシカルな医薬品に関しては、JPはフル規格としての役割を果たすべきという意見です。

早川 これまでJPは、様々な製法で製造されても、安全性や有効性に特段の問題がない重要な医薬品を収載してきました。だから、全く新しい医薬品に対して一から始めるという話ではなく、品質やさまざまな製法も含めて、風雪に耐えてきた医薬品の品質をなるべくフルパッケージで載せるというJPの方針は、全く揺らいでいないと思います。

ただ、どうしても合理的に処理できない医薬品については、別に規定するとか、通則で規定して、それぞれ承



川西 徹

認事項の中で明確にしてくださいということです。コンセプトとしてはミニマム化しているとは思っていません。

柘植 薬事法が改正されて、医療用医薬品については製薬会社が承認申請書に詳細な製造方法を記述するようになりました。今までは、JPの製剤総則に則って製造すると記載するだけでよかったものが、詳細に記述するようになり、一般薬等審査部でも、医療用医薬品については後発品についても、処方と製造法と規格を一体にして見ることが可能になったかと思います。

早川 新薬の話と風雪に耐えた品目の話、原薬の話と製剤の話、それから原薬でも特徴付けしやすい品目と、そうではないものというふうに、やはり分けて考えざるを得ないのではないのかなと思います。

柘植 ヘパリン事件では、早川先生はご意見をお持ちのように思いますが。

早川 ジエチレングリコールとかエチレングリコールの問題をFDAがUSPに書くようにということで、最近PDG (Pharmacopoeial Discussion Group) で議論があったと聞いております。しかし、EPも本来の薬局方の役割ではないという意見のようです。これはFDA的な、ポリティカルなリアクションだと思います。

◎◎薬局方と想定外事象に対する危機管理

司会 ジエチレングリコールは、グリセリンの製造の過程でできるという話ではありませんね？

早川 まず有効成分の本質をとらえて薬局方に反映させる。次に、製造工程で入る可能性がある重金属などや、乾燥減量とか残留溶媒とかは、製法は違っても一般的に対象とすべきことなので、想定される範囲のターゲット

ですよね。しかし、故意に入れるもの、想定外の事象にいちいち対応することは、どんな規格を作っても間に合いません。これは本来、薬事行政の中でしっかりと監視し、危機管理すべき問題であり、また業者の受入れの問題だと思います。

確かにヘパリンでは虚をつかれたというか、ヘパリンは生物活性を主体に特徴づけをしていましたので、薬局方側から言えばそこは反省点ではあります。しかし、今は一応手当てしました。方向としては、過硫酸化コンドロイチン硫酸に特化して項目設定し、その規格を厳しくしていくというよりも、もう少し一般的な合理性のある対応を考えるべきでしょう。このような事件をきっかけに理化学試験法を充実して、要するに過硫酸化してヘパリンの代替になるようなものは規制するという、薬局方的アプローチに取り組みたいものです。個人的に言えば、そういう感じを持っています。

川西 先ほど触れましたが、EPは生物薬品システムの医薬品について製法にかかわるPRODUCTIONという項目を設けており、意図的な混入物質についてはそこに記載するという方向のようです。EPも本来、意図的な混入物質に関して薬局方で扱うべき内容かという議論では、否という意見ではあるようですが、薬局方のPublic Healthに対する役割の一つとして、そういうものも入れてよいのではないかという意見もあるようです。早川先生がおっしゃったように、この種の問題に対しては規制システム全体がトータルで対応すべきですが、場合によって薬局方がその役割を果たすことについては100%否定するというものでもないのではないかと、私は個人的には思っています。

ただ、今回のグリセリン、ヘパリンのケースにあまり引きずられるのは適当ではないと思っています。まして、日本で起こっていないような混入の可能性に対して、いちいち国際調和ということで他の局方と歩調を合わせるときりがありません。しかし、日本で本当に健康問題として直面する可能性が高いという事例であれば、JPもある部分対応する。それは否定しなくていいのではないかと個人的には思っています。

早川 EPとUSPは組織的にみてJPとは異なる位置づけにあります。EPはEMEAとは別に、ヨーロッパ評議会が設置したEDQM (European Directorate for the Quality of Medicines) 内にあり、そのidentity、ポリシーから言えば、自分たちが品質に関するPublic Healthの砦であるとアピールするという観点から、なるべく取り込みたいのかもしれませんが、USPもそうだと思います。

JPの場合は、日本国政府全体のPublic Health政策の中でその一翼を担いますが、限られたリソースのもとで、

果たすべき役割は、他の方策では為しえないところをしっかり担うということに集中して作成しているのです。そういう意味で必ずしも同一線上には論ぜられない部分があるのかなと思います。なお、局方での対応を考える場合でも、特定のものより可能性があるものを網羅的に押さえる方策の方が、逆に、より効果的に Public Health に適うことになると思います。

柘植 私は30年前にコンドロイチン硫酸の物性研究をやっていました。その当時、高分子科学の研究者達は biomimetic ということを目指していて、いろいろな糖に硫酸基等を修飾する合成技術などを開発していました。そういう意味では過硫酸化コンドロイチン硫酸は、その biomimetic のある意味で悪い例なのでしょう。ただ、まだ科学技術の発展の途中段階かもしれないですね。過硫酸化コンドロイチン硫酸入りのヘパリン投与したときにある程度は薬理効果があって、副作用も、何か特別な臨床投与したときに出て、アメリカで死亡例が出たという話ですから。

そういう意味では過硫酸化コンドロイチン硫酸を薬局方の規格の中に入れて、そういう biomimetic の可能性を否定してしまうのはいかがなものかと思っています。やはりヘパリンというのは、動物から抽出する非常に高価なものですから、他の天然高分子や合成高分子を骨格として利用し模倣して安く作るという可能性を否定してはまずいとは思っております。

早川 もちろん biomimetic なものが、有効性・安全性・品質のしかるべき評価を受けて、新薬として登場する、やがて局方に収載されることは、否定されていないと思います。

◎◎ICH 品質分野の新たな発想は薬局方に なじむのか

司会 新薬の品質に関する国際調和は、ICH の品質分野で議論されています。すでに Q1 から Q6 は合意されてガイドラインが出ています。特に Q2 の分析法のバリデーションガイドライン、Q3A の原薬の不純物ガイドライン、Q3B の製剤の不純物ガイドライン、Q6A の化学合成医薬品の規格・試験法のガイドライン、Q6B のバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品のガイドラインは、JP にも大きな影響する内容です。これらの合意事項は JP にどのように反映されているのでしょうか。

川西 今おっしゃった ICH ガイドライン群については、基本的には現在行われている品質管理の方策を反映したものですので、相当部分は局方の各所に反映されているものと思います。ただし、現在、ICH で調和が進ん

でいる Q8 や Q10 などのテーマは、今までとは少し違う品質管理の考え方が扱われています。医薬品品質管理の最も基本的な部分は変わりませんし、変わるべきではないですが、実際に設定される規格および試験法などは変わってくるでしょう。いずれにしても、大分先ではありますが、JP もこれらの新しい品質管理の考え方を考慮に取り入れないと、これからの新規収載に齟齬をきたします。一方で、同時に日本における後発医薬品や一般用医薬品を、JP はどうやってカバーすればよいのか、今のところ私には良い知恵が浮かびません。いずれにしても、その両方をカバーする必要があると思われますので、ICH の新しい考え方は参考情報などに随時取り入れ、このような考え方もこれから導入されるだろうという方向性は示していくべきだと思います。

いずれにしてもこれから申請される品目については、新規収載医薬品の場合は、やはり ICH ガイドライン抜きには語れない部分があります。取り入れるべきはほとんど取り入れ、追いつけない部分や現状では JP になじまない部分はまずは参考情報等に入れ込んで、将来的には本格的に導入するかたちをとるべきだと思っています。

早川 ICH の少なくとも Q1 から Q6 に至る品質ガイドラインの本質的な理念は、実は薬局方などで長年培われてきたコンセプトをベースにしていると私は理解しています。評価されてきた有効性・安全性を品質で継続的に担保していくということです。ただ、新薬における個別の製品に対するアプローチと、JP で標準化して規範にしようというアプローチの違いが出てくることはあると思います。

ICH ガイドラインでは、類縁物質 0.1%以上のものは明確にしてうんぬんと言われていますが、これは新薬の安全性にリンクした考え方から出てきたコンセプトです。すると長年使われてきた薬のなかで、特に目的物質由来で、実態としてそれなりの不純物が入っている場合、これを ICH ガイドラインの考え方そのまま反映することが、是か非かという判断が必要だろうと思います。いずれにしても、ICH と薬局方はおのずとアプローチの違い、役割の違いがあると思います。

ICH Q6A/B では品質確保の全体的戦略として、その原料の管理段階からプロセスコントロール、GMP 等各種要素があり、規格及び試験方法はその一要素であると言われています。新薬の規格設定については、分子特性であるとか、非臨床・臨床試験のデータ、それから何ロットかの分析結果とか安定性、製造工程、プロセス評価・検証、プロセスコントロール、工程内管理試験、製剤設計、製剤機能、分析法、といったことを考慮するようになっています。規格及び試験方法は JP 各条に匹敵す



寺尾 允男

るようなものです。

新薬の場合は、ある会社がある個別製品の品質確保の全体的戦略のなかで規格設定というアプローチをしていますが、これが網羅的標準化を目指す JP とどれだけ重なり合うのかということですね。別に規定するとか、通則、参考情報と補完しながら、やはり JP は JP としての網羅的な規範書として、道を探っていかざるを得ないのではないのでしょうか。

また、ICH Q の最近では、医薬品の有効性・安全性確保のための普遍的な品質のあり方というより、メーカー側からみた効率的・経済的な製品の製造戦略や個別品質管理戦略と関係する品質のあり方、品質のための品質に、より軸足を置いた議論展開をしているように思います。別の側面として、メガファーマが他の会社の追随を許さないようなかたちで自分たちの新しいコンセプトを主張し、それを国際的な規範、基準の一つにしていこうという一面も感じられます。極端に言えば、プロセスコントロールや製造法管理の中で全部やってしまっただけでも、規格及び試験方法がなくても、品質確保は可能だということもあり得る。個別性と普遍性のチョイス、そのとき、薬局方はいったいどうするのかということですね。

◎◎ICH の発想で必要なものは、段階的に導入を目指す

川西 大手先発メーカーが後発品企業を買収して後発品を製造するようですが、どういう申請をしてくるのか、非常に興味があるところです。

早川 逆に言うと、後発品もまたメガファーマによって占有される、先発品の品質確保戦略として、規格の役

割は一部の限定的なものではなく、他はすべて承認書（製法）の中に盛り込まれている場合、他の会社はその規格だけに依拠したのでは、自らの製品が安全で有効であるという証明は果たしてできるのか。できない。一方、メガファーマは子会社を作り、そこへ情報を渡し、その情報のもとに後発品を作る。他の企業はその後発品は作れなくなってしまふ。

司会 そうすると、ある意味では後発品ではなくなってしまふということですね。

柘植 新薬の申請業務で日常的に ICH のガイドラインを使っている会社は、研究開発型の製薬企業、そして外資系の製薬企業などで、その活用は定着していると思います。一方、小さな企業は、突然、JP が ICH 導入の考え方を前面に出すと、設備投資も必要ですし、教育訓練もしなければいけませんので負担を強いることになり、いろいろな意味で大変です。川西先生がおっしゃったように一度参考情報などに入れるプロセスを踏んで、じっくり時間をかけてやっていく必要があるだろうと思います。

最近の例では、ICH Q3C の残留溶媒を局方にどのように取り込むべきか検討中です。もう一つは、製剤総則の改正案で、Q6A の新医薬品の規格及び試験方法の設定の中で製剤試験を考え方として取り込んでいこうかと考えています。しかしいきなりではなく、「本剤は適切な〇〇を有する」ということで、どのように試験を行うかは、個別の企業にお任せして、ワンプロセスおいているのだと思います。

一方、ICH よりも JP が先行しているのは、例えば原薬製造のための水についてです。ICH Q7A の原薬 GMP のガイドラインは飲料水ですが、JP の参考情報は最終プロセスは精製水でとなっています。そういう意味で、今の参考情報はあるべき姿であるので、GMP 監視指導の中で、時間をかけてその方向に進めていただきたいと思います。

早川 私は、一般試験法は国際調和をされていていいだろうと思います。ICH Q6 あたりまでも、適切に活用すればよい。しかし各条について、特に最近の個別新医薬品の作り方をどうするかに力点を置いた ICH のコンセプトを JP に取り込むべきかについてはその普遍性からみて疑問を感じています。品質確保の規範書である薬局方は、まず有効性・安全性に関して評価が定まった医薬品の品質確保のあり方とその改善・改良を追求することを旨とすべきです。医薬品の公的・公共・公開の品質規範書であるという大原則も守るべきでしょう。また、日本型ビジネスモデルの JP として、国際性もにらみながら、日本における後発品産業の育成など、いろいろな

ことを考えながらやっていくべきではないかと思えます。

ICHの対象は世界中の患者さんに向けて販売される新しい画期的な医薬品なので、そういう意味ではもともとの精神が地域を越えています。しかし、JPが担っているのは、国際性もありますが、むしろ、国内地域向けの規範書という面も大きいことを考慮すべきです。

司会 では、USPやEPはどういう考えで各条を設定しているのでしょうか。

川西 新しいことをそのままGeneral Informationに取り込んでいるような印象があります。特に最近のEPは非常に戦略的に行っているように思えます。

一方JPでは、一般用医薬品等に配慮するばかりに、新しいことを取り入れることにブレーキがかかるという側面があることを感じます。一般用医薬品や後発医療用医薬品も含めて、全体に品質管理のレベルを引き上げることに配慮してよいと思えます。例えば不純物に対する見方では、私自身は、後発医療用医薬品に対してもう少し配慮が必要なのではないかと思えます。

早川 JPは不純物に対して、今でも譲歩していないと思えます。

川西 各条の試験法で不純物を設定していない例があります。先発品が設定していないと、後発品も設定せずに、承認されてしまうケースがあると思えます。標準となる局方の不純物に対する設定が不十分ですと、後発品も同様に扱われてしまうことがあるように感じています。局方での製剤の不純物の設定は難しいのですが、製剤に例が多いと思えます。

早川 改正できること、すべきことはしていく必要があると思えます。ただ、一般に製剤の話は薬局方にとって、とても難しいテーマです。

ICHで扱うほとんどの原薬は化学薬品で、その純度は九十何%以上というオーダーですから、今の分析法でいろいろな解析ができ、規格も設定できます。しかし、製剤をこれから薬局方の中でどう設定するのかという問題があります。

柘植 JPの水に関する試験法は化学試験ですが、USPとEPはすでにTOCを導入しています。JPの改正で今度、TOCと導電率に変わります。数年前に日本の水道法の基準はTOCに替わっていて、JPだけが遅れていました。ただ、日本の中小企業にとってはTOCに替えることはすごくインパクトがあります。TOC計は1台500万円ぐらいいたします。導入のために猶予期間に配慮していただくなど時間をかけていただくようお願いいたします。

◎◎理想は試験法等の相互認証だが

司会 日米欧の3薬局方に記載されている一般試験法は、ICH Q4Bで含量均一性、質量偏差など、11の試験法の調和作業が進められています。ICHの品質分野では、薬局方の調和に非常に積極的になってきて、2009年10月に行われたセントルイス会議で、クロマトグラフィーなど試験法の調和をPDGに依頼しているそうです。

それとは別にPDGでも、独自に調和を進めている試験法もあると思えます。調和できたものについてJPでの改正の進捗状況はいかがでしょうか。

早川 PMDAの基準課からのデータによると、ICH Q4B関係では、Q4Bガイドラインと強熱残分試験法の二つがICHのStep 5、つまりJPでももう施行されています。

それから、注射剤の採取容量試験法、注射剤の不溶性微粒子試験法、微生物限度試験法、崩壊試験法、溶出試験法、無菌試験法、錠剤の摩損度試験法、SDSポリアクリルアミド電気泳動法の八つがStep 4に上がり、ICHのSteering Committeeレベルではsign offしていることになります。それからStep 3^{*1}で、パブリックコメントを終了し、Step 4への移行を議論しているのが製剤均一性試験法です。あと、キャピラリー電気泳動法と粒度測定法（ふるい分け法）がStep 2の段階に達しています。試験法でStep 2以上が合計12です。色調試験法はまだPDGで検討中、かさ密度及びタップ密度測定法とエンドトキシン試験法がPDGで評価文書を作成中です。

一方、PDGの調和文書リスト関係では、Q6A関連11のうち、施行中であるPDGのStage 6^{*2}に該当するのが色調試験法を除いた先ほどの10の試験法です。それ以外に、12の物性試験法等と、バイオテクノロジー医薬品に関連する試験法としてアミノ酸分析法等六つがStage 6になっています。これらが次第にQ4Bの検討課

*1 ICHのStep

Step 1: 新しいガイドラインピックの運営委員会における承認。Step 2: 専門家作業部会でのガイドライン案の合意及び運営委員会での承認。Step 3: 各極での意見公募による意見を取り込んだ専門家作業部会でのガイドライン修正案の完成。Step 4: 運営委員会の規制当局代表者によるICHガイドラインの採択。Step 5: 各局におけるガイドラインの施行。

*2 PDG(薬局方国際調和)のStage

Stage 1: 調和項目の選定。Stage 2: 調和項目に関する調査検討及びドラフトの作成。Stage 3: 専門家委員会によるドラフトの審議、コメント交換、意見公募用ドラフトの作成。Stage 4: 意見公募、専門家委員会による公募意見の審議、ドラフトの修正。Stage 5A: 調和合意案の完成に向けた検討。Stage 5B: 合意署名する最終調和案の作成。Stage 6A: 調和テキストの各局方への採用および出版。Stage 6B: 各局方による施行。Stage 6C: 各局方テキストに調和の表示。Stage 7: ICH Q4B評価による各極規制当局の相互受け入れ。

題になっていくのではないかと状況です。

川西 私は JP の製剤委員会にかかわるようになり、Q6A 関係の製剤試験法の Q4B 国際調和に対応してわかったことなのですが、これら試験法は各局それぞれに歴史があることが実感されました。ICH の国際調和は、少なくとも文書上は完全国際調和です。でも、PDG の場合は調和内容が具体的であるので、調和に至る過程で、実は様々に複雑な妥協を行って調和しています。しかも部分調和が少なくありませんし、調和といっても、いろいろな部分で各薬局方は悩みを抱えた状態でサインをしています。

多くは各薬局方において歴史がある基本的な試験法ですので、一朝一夕で同じ内容にというのは極めて難しいので、EP から、今後の調和については、相互に認め合うようなことができないものかという意見が出ることがあります。

柘植 製薬会社の立場からは、実務を考えると細かい部分まで一致してもらわないと困ります。試験法は一緒だけれども、キャリブレーションの方法が違うという、JP と USP の両方やらなければなりません。そこに一番経費がかかります。そういう意味で、USP に合わせるなら USP で結構ですので、試験方法は一つにさせていただきたいという意見もあります。

早川 ICH のガイドラインの多くはハイレベル・ガイドラインと言われ、主にコンセプトや考え方を示しています。あまり細かい技術的なことを規定せずに、基本的な留意事項のようなものが比較的多いのです。特に品質分野では、“対象となる課題を扱う際の科学的な原理・原則と根拠は何か、いかに考え、課題の解決にアプローチすべきか”というコンセプトを示すものが多いのです。

しかし、一般試験法や添加物の国際調和を進めていて、まさに各条になると、例えば無菌試験法ですと、細部にわたって操作法や試験用菌株の選択、培地の選択をどうするかとか、一つひとつ違います。私は最初から、各国の薬局方が保証している無菌試験法はその意味ではそれぞれの国、地域で目的を達しているの、それを相互に認めればいいのではないかと考えています。10 年以上前に Q5D で細胞基材のガイドラインを作っているときに、マイコプラズマ試験法や無菌試験法については各極のやり方を相互承認をする、薬局方に規定がある場合はそれによるという合意で Step 4 寸前まで行けたんです。ところが、署名時に FDA と EU の Steering Committee メンバーから「それはだめだ」ということで却下されました。その主な理由の一つは、薬局方、特に他極の薬局方は自らの管理下になく、内容が改正される際にもコン

トロールできないから、ということでした。

今も PDG で薬局方の国際調和はやっています。ところが PDG でやった Harmonized Text ですら、FDA や EU はそのまま受け取らない。その限界を克服するために ICH Q4B を作って、FDA を入れて、EU の規制側代表を入れたのが Q4B です。つまり ICH ベースに乗せるといけるだろうという期待からなのです。実は無菌試験法も PDG の調和案では違いがあったのですが、それは当時可能なぎりぎりまで詰めたもので、PDG 調和文書になりました。ところが Q4B ではそれはだめだということになりました。例えば FDA は USP の試験法を最優先するので、それ以外のものは受け取れない。EU も同じで、域内では EP を最優先するとのこと。そうしますと、結局、PDG レベルでぎちぎちに調和しても、EU に行ったときには EP に従い、FDA に行ったときに USP に従っていないと、各規制当局は受け取らないということなのです。

もっと大きな問題はどんなに調和しても、EU もそうなのですが、FDA は特に、最後に採否を決めるのは審査官であるというのが FDA のポリシーです。

司会 それは個人個人の審査官 (Reviewer) ですね。

早川 そうですね。審査官が最終決定権を持っています。せっかく国際調和しても、そのまま受け入れずに、Reviewer が最終判断する。例えばその試験法をある何かに当てはめたときに、本当にフィットしているかどうかはわからないので、そこを判断するんだという話です。それも一つの理屈かと思いますが、現実はそのような状態です。

そこで Q4B 調和文書 (Annex) には、ICH で調和したが、FDA では最後には Reviewer が判断しますという意味のことが必ず書いてあります。EU も必ず、EU の域内では EP がベースになるということを明確に書いています。つまり、相互承認が非常に難しい状況にあるということです。PDG が国際調和をしても、もう 1 回 Q4B で評価する。評価して、完全に調和されていないと PDG にもう 1 度返される。PDG で完全調和ができれば Q4B での調和につながる。それでもなおかつ、まだ最後の関門が待っているということです。

司会 そうですね。最後に Reviewer の判断という話になったら、すべてをぶち壊すという感じがしないでもないですね。

柘植 日本の製薬会社がワールドワイドに医薬品を売ろうとするとき、最初の臨床試験を実施するのは、おそらく USA や EU でしょう。FDA 審査官の判断の問題があるので、どうしても USP でやらざるを得ないんです。まず日本でフェーズ I を最初に開始することはなかなか

ないです。ある時期、USAが最初、その後EUが最初という流れでしたが、最近ではシンガポールあたりで最初にやりましょうという話もあります。そういう意味で最初に治験をやる地域の薬局方に合わせますし、最終を考えるとやはりUSPですとやっていかざるを得ないように思います。日本のグローバル展開している研究開発型の企業も、海外の企業も、結果的にはこの国際調和は最終的にJPではなく、USPやEPの規格及び試験法でやったものを、日本当局が認めてくださいという話になってくると思います。

司会 相互承認の話は、前から非常に難しい話と伺っていましたが、そうなんですね。

柘植 日本にとって、ドラッグラグという問題がありますから、海外で売っているものを日本国内でUSPの試験方法で認めてもらえるということであれば、非常に早く開発できることになります。

早川 それから、PDG調和文書だけでなくいろいろな関連情報も入れてPDGからQ4Bに送らないと、Q4Bが評価しないんですよ。本来、Q4Bは3極の行政的合意の場ですから、PDG文書で非調和部分があるような場合に、ベストは相互承認することです。次善の策はQ4Bが自ら調和を図り「これでよし」としたものを、「これが国際スタンダードだ。局方もそれを反映してほしい」というふうにやってくると、もう少し効率的だと思うので、日本側はずっとそれを主張してきました。しかし、FDAとEUには全くその気はないんです。すべてお仕事はPDGで、詰めるだけ詰めて完全調和文書になってからICH Q4Bで評価するという感じなんですかね。

司会 そうしますと、PDGとICHはどういう関係なんですか。本来は独立したものだったんですよね。

早川 それぞれ独立しています。出身母体がそれぞれ違いますから、今でも独立しています。しかし、PDG調和文書の出口が各極の規制当局に受け入れてもらうということだとすると、Q4Bに依頼せざるを得ない。

今の構図はこうです。部分的相違点が残っているが、調和して問題がありませんという内容をPDG調和文書としてQ4Bに提出したとする。するとQ4Bが「それは困る。もうちょっと詰めないか」というのですが、全く調和に向けて自ら一歩踏み出そうとはしません。私はQ4Bで、「ここが最終的に決めて、規制上の世界のスタンダードにすればいいじゃないか」とずっと主張してきましたが、「ここはそんなことをする場所ではない」と言われました。作業はPDGに依存なので、ひたすらPDGは汗をかかなければなりません。

そういうやりとりの後、Q4Bで固まったら、最終的に調和したものを3薬局方が収載して、規制当局がこれを

相互受け入れの参考として尊重するというパターンです。

司会 初めのところは結構、ICHも柔軟だったですよ。PDGで決めたことを向こうに持って行って報告して、FDAあたりが反対することもありましたが、もっと柔軟だった。

早川 以前、ICHは「薬局方は我々の管轄外です、PDGで調和したならそれは結構なことですね」というような立場だったと思います。

しかし、薬局方をいくら調和しても限界がある。FDAやEUに行ったときには、Q4Bが優先されます。そこでむしろQ4Bがイニシアティブをとって調和を進める体制であれば、期待がより大きく持てるのですが、もちろん、Q4Bがないよりはあった方が良いには違いありません。

柘植 ICHの品質実施作業部会(QトリオのIWG(Implementation Working Group))がおそらく2010年秋にトレーニングを実施し、その後終了すると思います。また、Q4B AnnexとQ11は2010年秋の福岡会議でStep 2に上がり、Q3D 金属不純物が新トピックとして活動をはじめると、この先、3年くらいには、ICH品質分野は薬局方関連の話が中心になってしまうと思われれます。

川西 Q4Bは今国際調和に対するモチベーションが一番強いとあってよいかもしれません。ただ、PDG側としては、ICHとの関係でフラストレーションがあります。Q4Bからこれからの調和試験法候補が提案されましたが、一部の試験については、PDGからみると文書上の違いに過ぎず、既に添加物各条の中に試験を取り入れており、実際には調和しているとみなせる。Q4Bには、三局の試験法をそのまま提出して、非調和部分がどこかを考えてもらおうという意見も出ているぐらいです。

◎◎JPの国際化推進には、海外でJP普及の努力を

司会 規制の国際調和はまだ道のりがありますね。JPの国際化はいかがでしょうか。

早川 PDGの調和文書リストでは、既に39の添加物が調和されています。一部はJPに反映するために審議中です。まだ審議もしていないものが1点あります。

川西 セントルイスでのPDG会議(2009年11月)以前から、添加物についても調和候補品目を追加するという検討がされていますが、結局、追加しないで予備調査を継続することとなりました。

柘植 日本の製薬会社として、どうしても入れてほしいという品目(例えば、カルナバワックス、デキストリン、ソルビトールなど)がいくつかあるのですが、どうも製剤の処方設計の思想が違うのでしょうか、なかなか

3 薬局方での優先順位が一致しません。

司会 薬事法の改正で、医薬品原薬や添加物を海外、特に中国やインドなどの国々に依存する流れの中で、日本の医薬品の品質を守るためには、JP をアジアの国にもっとよく知ってもらうことが重要であると思います。

USP は中国、インド、ブラジルなどの国に事務所を置いて、その影響力の増加を図っています。EP も中国とマレーシアがオブザーバーという資格を手にして関与しているということです。

日本では JP16 の作成基本方針で、アジア諸国を念頭に置いた JP の国際化を推進するための方策の検討がうたわれています。具体的には英文版の早期発行と、生薬調和フォーラムを通じた生薬分野のアジア地域での調和の活動を支援していく、ということぐらいしか書いていません。JP がアジアに普及するにはどうしたらよいもののでしょうか。

早川 いい考えというのではないのですが、かつて JICA のプロジェクトでフィリピンの薬局方制定に協力しました。JP がお手本になっています。また、インドネシアや中国の天津では品質安全性関係のサポートをすることもありました。しかし JP は自前の予算がないので、組織的で大規模な支援を継続的に行う体制がありません。

インターネット上で JP 英文版を公表していますが、そのタイミングは遅い。海外に対して JP を知ってもらうためには、なお一層いろいろな努力が必要でしょう。JP が中心になってアジアで薬局方に関するフォーラムのようなものを定期的に開催して連携を深めるというのも 1 つの試みとして考えて良いと思います。

川西 海外では JP に英語版があることがあまり知られていないように思います。今は、厚労省や PMDA のホームページに掲載され、認知されるようになりました。ただし、「英語版はあくまで参考である」という姿勢は、国際化を本気で考えるのだったら正しくないと思います。日英版を並立という扱いにしないと、まずいと思います。

ただ、JP にはアドバンテージがあります。USP も EP も有料ですが、JP は誰でも無料で見られます。この点を大いに活用すべきだと思います。本気になってやろうとするなら、英語版の位置づけを見直し、体制を作り、予算をつけないとならないでしょう。英語版も並行して作成するようなフレキシブルな体制はとれないものなのでしょうか。

早川 ボランティアベースが大半では、更に頑張っていたくとしても自ずと限界があります。機構等の関連組織、体制の強化や人員、予算の充実が求められます。もちろん、JP の政策決定に係わる行政担当部門が動か

ない限りは、なかなか難しい。USP がなぜ強いのか。それは FDA をバックにして、USP を介さないと FDA にアプローチできませんよ、あるいは受け入れられませんよというポジションがあると思います。そういうかたちで、JP もアジアに向けてメッセージを発信してほしいと思います。

柘植 監視指導麻薬対策課が 2008 年 9 月から 2009 年 3 月まで、外国の医薬品製造所に関する調査を行い、その結果が GMP 関係の講演会で発表されています。日本の製造販売業者（製販）が GQP 管理をしなければいけない海外製造所総数は 1605 か所。内訳は、ヨーロッパが 716、アジア・中東が 615 で、その他が 274 です。国別では中国が 1 位で 328、アメリカが 184、インドが 3 番目で 125、7 番目に韓国で 79 です。したがって、日本へ輸出するなら基本的に JP でやってくださいという話のターゲットはヨーロッパです。次に、アジアでは中国、インド、韓国への普及をどうするかということです。

やはり経済的な結びつきが強い地域に対しての対策が一番重要だと思います。

早川 ヨーロッパ薬局方は European Commission の中であって、約 60 か国が正式メンバー及びオブザーバーとして参加しています。注目すべきは、ロシアや中国など重要な地域を、オブザーバーとして傘下に取り込んでいることです。このような手法は、JP でももしかしたらあるのかもしれないと思います。

司会 注目の製剤総則について伺います。JP16 での、改正作業の進捗状況はどんな具合ですか。

川西 いま現在、原案を 2 回目のパブリックコメントにかけたところです。製剤総則の改正の方向としては、近年の製剤の発展を反映させて、収載する剤形を増やし、製剤について、まず適用部位、投与部位、次に形状、更に機能等を指標に分類しました。更に分類した製剤について、どのように品質管理をしたらよいかというところが、一つのスキームとして見えてくるような方向に整理を試みました。

もう一つ、剤形によっては日本独自の歴史があって、これから製剤試験の国際調和などを考えると、定義や名称が欧米と違うといろいろと不都合があります。国際調和を図るため、極力日本独自の定義、名称はなるべく避けたいと考えていますが、そこが今、非常に大きなネックになっています。

柘植 私も製剤委員会にかかわっていますが、造粒散剤を細粒剤の中に入れる話が一番大きいと思います。

川西 そうです。それに加えて軟膏剤とクリーム剤の整理などは、まだ依然として業界から要望等が出されています。これらの問題を最終的に詰めて、製剤総則で分

類、整理しますが、今後継続的に検討すべき課題としては、分類した剤形のもつべき特性として、「適切に製剤特性を有する」という表現を行っておりますので、これらの特性を調べるための局方製剤試験法などを補っていくことが、将来的には必要になると思います。JP16の改正はこのような方向性で進んでいます。

◎◎試験法も動物を使用から機器利用へ

司会 一般試験法はいかがですか。JPの一般試験法は非常にコンパクトに書かれていますが、実際に一般試験法に則って試験をやろうと思うと、具体的にどういふふうで試験をしていいかわからないという声をよく聞きます。日本公定書協会では大阪事業所で、JPの一般試験法に則った実習形式の研修を行っています。なかなか好評で、大勢の方に参加していただいています。

一般試験法は、試験が実施できるような具体的な記述をしたほうがよいのか、あるいは従来のまま、技術研修などの手段で一般の方に勉強してもらうほうがいいのか、何かお考えはありますか。

早川 試験法によりますね。無菌試験法などは具体的なほうがいいですし、液体クロマトグラフィー（HPLC）などは細かい規定はむしろよくないので、現行のやり方で合理的なのではないかと思います。

あとは、特にフレキシビリティのために、原理・原則を書いてあって、細かい規定がない試験法は、参考情報を大いに活用していただき、それに加えて、技術研修などで補完するということではないでしょうか。

柘植 企業の立場からすると、日本公定書協会に実施していただけるならば、一つは特にクロマトグラフィーなどを中心に、新入社員とか、新たに分析にかかわった方の導入教育。もう一つは微生物関係というか、あるいは細胞や動物の扱いのように各企業とも研究者が非常に少なくなっている専門家教育の二つをコアの技術研修としていただけるとありがたいです。

司会 確かにJPには各条を含め動物を使う試験がまだありますが、物質によっては動物を使わず、HPLCなど他の試験法に代替できるものもあると思います。このような新しい方法に切り替えていくことも必要だと思います。

日本公定書協会では毎年、日本薬局方の新しい試験法の確立あるいは改正について、わずかですが研究費を補助しています。動物代替法を含めて、試験法の改正の研究を行う方がおいででしたら、申請していただければ検討します。

早川 動物を用いる試験には、現在、一般試験法では発熱性物質試験法と輸液用ゴム栓試験法中の急性毒性試

験があります。医薬品各条から発熱性物質試験法を減らして、エンドトキシン試験法に替えようとしています。現在、発熱性物質試験法が残っているのは5品目です。抗原性試験がデキストランや天然抽出のたん白製剤の3品目、毒性試験も天然抽出たん白製剤1品目に設定されています。また、異常毒性否定試験が天然由来の抽出物で3品目あります。純度試験には天然由来のホルモン3品目で動物を使うバイオアッセイが残っています。それからインスリンは、豚・牛由来をJP16で削除する予定で、新たな組換え体はHPLC法で定量を行うことになっています。まだホルモン関係の定量法に動物を用いるバイオアッセイが7品目ほど残っていますが、これはなかなか難しいです。

司会 USPやEPでは、すでにHPLCに替わったものがあると聞いていますが。

早川 残っているのが、バソプレシン注射液、エルカトニン、カルシトニン（サケ）と性腺刺激ホルモン関係です。低分子のペプチドホルモン類は、比較的可変しやすいかもかもしれませんが、性腺刺激ホルモン関係はなかなか難しいと思っています。

◎◎一般試験法の研究事業に費用支援

柘植 輸液用ゴム栓試験法の見直しについては平成20年度から、日本公定書協会に「日局の試験法に関する研究」の研究費をいただき、東京医薬品工業協会の局方委員会と大阪医薬品協会の技術研究委員会共同で、国立医薬品食品衛生研究所の先生からアドバイスをいただいて進めております。もう少しすると研究成果が出てくると思います。輸液用ゴム栓試験法をいつまでも放っておくわけにはいかないので始めましたが、業界団体が高額の研究費をいただいて、研究をすることは極めて異例なことだと思います。研究成果はできるだけ早く生物試験法委員会か、理化学試験法委員会に報告しますので、できれば来年度は局方原案審議委員会の先生方が中心になって進めていただきたいと思います。

輸液用プラスチック製容器試験法は1996年にプラスチック製医薬品容器試験法に替わっています。動物愛護法の関連もありますので、できるだけ早く進めなければいけないと思います。

司会 その他、改正を検討したほうがよい試験法がありましたら、申請してください。

川西 製剤総則の改正に伴って、分類した製剤の試験などを局方試験法として整備したほうがよいと思っています。今回の製剤総則には間に合いませんが、提案したほうがよい候補がいくつかあると思います。

早川 国際調和したものはレベルがまちまちで、操作

条件や手順が非常に詳しく書かれていたり、使用機器や試薬に偏りがあるので、JPの一般試験法にするには、JPのポリシーに沿ったかたちで移行していかなければなりません。わが国の一般試験法として整備することが必要であると思います。

柘植 今、国際調和で一般試験法が課題に挙げられますが、そのベースはISOとJISです。JIS化は経済産業省と日本規格協会がやっている仕事です。ISOで“pharmaceutical”と検索すると、十数件が該当し、その多くは医薬品包装容器に関する内容です。それらをどこでJIS化するのかという仕組みが、どうも決まっていないうちに思います。我々が関与しないところで、“pharmaceutical”に関する事柄がだんだん溜まっているのではないかと心配しています。

製剤委員会でも、「製剤総則の後、次は包装容器ですね」という大きいテーマは決まっています。

司会 医薬品各条の収載品目や収載時期は、今、どのようなルールになっていますか。

早川 特に書いてあるということではないですが、実態として、JP15はPMDAの基準課と厚生労働省医薬食品局審査管理課で原案を作り総合委員会に提出、審議をして、部会で更に審議、了承するという流れになっています。基準課と審査管理課で案を作るのは、改正の基本的作成方針にそって、保健医療上の重要性に関係するいろいろなクライテリアをもとに、また行政当局がマーケットリサーチなどを行ったうえで、案を提出してきています。

司会 JPへの収載時期は、既承認の医薬品については可能な限り速やかに、特に後発医薬品の規格の統一を図る観点から、可能な限り速やかに収載するように検討することとされています。これはUSPやEPと比べて、どのくらい速やかになっていますか。

早川 JPは厚生労働省が出している官版であるため、三つほど大きな制約があります。最も大きいのは、新薬の場合、再審査期間が過ぎないと収載は難しいということです。再審査期間はその新薬の有効性・安全性について見定める期間でもありますから、それが過ぎないと、今のJPの性格・役割からすると収載は難しい。そしてその間は、先発メーカーの規格及び試験方法はオープンになっていない状態なので、それをオープンに審議することはできない。再審査期間制度が一つ大きな収載時期の制約ファクターになっています。

もうひとつが、改正版を出す頻度です。5年ごとの大改正と2回の追補は定着し、あとは部分改正で緊急を要する事例には対応していますが、再審査期間の切れ目と収載のタイミングがどううまくかみ合うかに関わってい

るところがあります。

あと一つの制約要素は、JPの非常に大きな特徴ですが、全ての実質審議が外部専門家のボランティアな参画、努力で行われていることにあります。そこに飛躍的な多くを望むのは難しい。事務局は本省と機構ですが、人員や予算上の制約は明らかで、大幅な拡充がないと画期的な改善は望めないと思います。更に、今のJPの作り方は、機構の基準課が原案作成事務を担当していますから、大いに人員、予算を拡大するとともに、国際化、英文版発行などを含めて、もっとフレキシブルに進められるようになると思います。

司会 それでも再審査の期間を過ぎてからの収載になりますか。

早川 かつては期間をはるかに過ぎていたように思います。日本薬局方外医薬品規格等に一旦収載して、いわばインキュベーションして、それから局方収載というのが1つのパターンでした。しかし今は、再審査の期間を過ぎてからというのは変わりませんが、直接局方に収載となっているのは進歩だと思います。ちなみにバイオ医薬品などは取り上げが欧米に比較して早いぐらいです。1980年代から90年代にかけての品目が多いですが、この辺りはかなり網羅的にリストアップされています。リストアップは素早く、審議にもすぐ入って、その時点では日本が先頭を走っていました。しかし、問題は必ずしも順調に進捗しないことです。JPの審議中に、例えば企業が一変するとなると、そこで審議ストップになります。一変の審議か、JPの審議かということですが、JPは大勢の専門家を集めているので、一変申請内容をベースにJPで審議することでも良いのではないかと思います。一応、JPとして作り上げてから一変を出していただく方法もありますが、一変で規格はまた変わってしまうという不都合があります。これは審査部門及び業界との調整やご協力を得ないと前に進まない話です。

司会 普通の化学薬品ですと、USPやEPでは承認されて2,3年後に収載されるという話ですが。

早川 そこは再審査期間を、行政府として責任を持つということの違いかなと思います。

柘植 ある製薬会社では、原案作成依頼があった後、USPやEPはパブコメまで1.5年ぐらいで、収載を含めると2.5年ぐらいのようです。日本の例でいくと、2009年は臨時に化学薬品小委員会を設けて対応したこともあり、審査期間が1年かからなかった品目もあります。途中の審議でそれほど大きな問題がなければ、2年かからず収載した品目もあるようです。そういう意味では、審議の時間は決してUSPやEPに劣っていません。

ですから、再審査期間や他の事情によって、承認から

原案作成依頼を受けるタイミングが違っているということでしょうか。

早川 収載総品目数でいうと最近ではスピードアップしていると思います。JP10が1016品目で、JP11が1066品目ですから、5年間で約50品目の増でした。JP12では160近く伸びて1221品目です。JP13で1292品目、JP14で1328品目、そこからJP15では1483品目と約160品目増えています。JP15の第2追補までで1673品目ですから、JP16では相当な積み増しが実現しそうです。そういう意味では新規収載数とそのスピードは上がっていると思います。

柘植 東西の局方委員会も多大な貢献をしているということ、ぜひご理解いただけるとありがたいです(笑)。

◎◎製造管理や品質管理の考え方を如何に取り込むべきか

司会 最後に、医薬品の品質という観点から、欧米の薬局方はGMPなどの品質に関する事柄について、幅広く記述しています。また、パラメトリックリリースや製造工程において品質管理するという考え方も議論されています。

JPもGMPや、ICHのQトリオの考え方を取り入れ、広く医薬品の品質に関する記述も積極的に取り入れていくべきなのか、あるいは従来のように、厳格に範囲を守っていくべきなのか、ご意見がありますか。

早川 医薬品各条そのものに、取り込むのは難しいと思います。

あとは通則や参考情報をどう活用してそれらの考え方を盛り込むかということですが、具体的にJPでも、通則にパラメトリックリリースの考え方を適用し、製造工程中でコントロールでき、品質がJPに適合することを恒常的に保証される場合には最終規格の一部は必ずしも実施しなくてもいいとしています。あるいは、製薬用水の管理など、参考情報でGMP関連の話徐徐に取り込んできております。

先ほどEPのPRODUCTIONの項の紹介がありました。が、このように製造上留意すべき点と関係するICHガイドラインなどを引用しながら示すというのはどうでしょうか。

柘植 二つの事例があります。まずは製剤総則の改正案で、今まで散剤と顆粒剤の定義を粒度で分けていましたが、今改正では、散剤は粉末状、顆粒剤は粒状に変更して、散剤・顆粒剤の承認規格にあった粒度規定を削除しています。すなわち、ふるいでふるう承認規格を削除しましたから、今度は、顆粒剤の造粒工程をオンラインのレーザー回折で工程管理しても製品出荷できるという

ことです。これはICH Q8のPAT(Process Analytical Technology)の実践にはかなりません。

もう一つは悩ましい話ですが、非無菌製剤の微生物学試験について、製剤通則の中に「無菌でない製剤であっても微生物による汚染を避け、必要に応じて微生物限度試験を適用する」という文章が入っています。この意味合いは、例えば吸入剤、あるいは液剤の一部で、製剤開発段階で検討し、規格及び試験方法の中にこの内容を入れてくださいと言い、一方でGMPの管理をきちんとしていけば、規格設定しなくてもいいだろうということも含んでいます。ところがこれでは企業から考えると、GMPで管理するのか、製剤開発の段階で規格に入れるのか、入れないのか分かりません。悩ましいところです。製剤総則の改正案でパブリックコメントを求めると、必ずこの話が出てきます。

川西 一般論として参考情報などに取り入れるという方法、もう一つは一般試験法にそのような記述を入れるなど、いろいろな方法はあるかと思えます。

しかし、あくまで規格及び試験法だけという書き方だと、品質管理の考え方ではかえって不自由になるケースもあるかと思えます。そのへんはこれから知恵を働かせなくてはならないところです。

柘植 今の微生物限度試験の話、実はICH Q6Aに書いてあります。結果としては、ICHをどうやってJPに取り込んでいくかという話です。

早川 これからとてもたいへんだと思うのは、製造販売承認の時代になったので、製剤を薬局方にどうやって載せていくかということが非常に大きな課題になるということです。製剤は、有効成分は同じでも各社それぞれの工夫によって製造されるものなので、果たして同じ各条の中に、どこまで何を織り込むのかというのは、これからの大きな課題で、かつ難しい問題だと思います。

先ほど出ていたICHが新しい方向でいこうとしているのは、必ずしも原薬の問題ではなくて、最終的には製造販売承認の中にある製剤をどう見るかということですから、これから相当知恵を絞らないといけません。

本来は、原薬だと今のJPの作り方、すなわちフル規格に近いかたちで、原薬として何を留意して、どうアプローチすればいいかというのは結構わかるような仕掛けになっています。しかし製剤は、どうやってJPの中に標準化していくのか、規範を示していくのか、大きな課題だと思います。

柘植 先ほどもお話ししましたように日本の製薬業がGQP管理をする必要のある外国製造業者は1600を超えています。JPを使う必要のある人は日本語がわかる人たちばかりではないので、JP和文版と英文版を同時に

出すという工夫もしていただきたいです。できればパブリックコメントも英文を出せば、海外からいろいろな意見がきてよいと思います。

◎◎利用者の視点や国際的な視点も考慮したJPへ

司会 最後に、JPの将来展望について、一言ずつお願いします。

早川 JPが目指すところは、どの時代においても優れた医薬品を医療の場に供給することを目的にして、品質を適正に確保するための公的な規範書として、科学的に高水準で公共性に優れ、各方面に広く活用され、かつ世界に通用する薬局方だと思います。

その活用の状況、目指すべき活用法に関しては、行政側では承認審査での品質審査の基準、また監視指導での品質確保の標準書として、製薬企業では、医薬品開発における品質規格の科学的、技術的水準を示すものとして活用されることが、期待されると思います。

また教育現場では、薬学教育の品質に関する基本書、医療現場では医薬品の品質に関する情報集として、一層利用されることが期待されます。

今後の役割の一つですが、後発医薬品の利用促進の観点から、後発医薬品の品質確保のための公的基準書としての役割が、ますます重要になってくると思います。それから、保健医療上重要な医薬品を収載することで、保健医療上重要な医薬品を規定するものとの位置づけを、更に確立していくことが必要になるのだらうと思います。

今回は第十六改正ですが、厚生労働省、PMDA、研究者、教育関係者、企業関係者、医療従事者、公的法人、その他の専門家にご協力していただき、目的の実現を目指して、多くの英知と献身的努力の結晶として作成されようとしています。関係者の皆様に心からの敬意と感謝の意を表したいと思います。

しかし、JPは絶えず進化し続ける必要があります。より優れたJPに向けての新たな歩みがすでに開始されていると思います。今後とも、最初述べました5本の柱は変わらないだらうと思いますが、それを堅持しつつ、それを基本にしながら、各方面の変わらないご尽力をいただいで、前に向かって進みたいというのが、私の立場からのメッセージです。

川西 私がJPを見て感じていることは、ユーザーの立場に立つという発想が少し欠けていると思う部分があることです。法律に準じた薬の規範書であるために、それが制約になって、いざJPを座右において参照しようと思うと、これだけではわからないことが色々とあると思います。これからJPの国際的なポジションなどを本

気になって考えるならば、使う側にとって使いやすくなるという要素を入れることについて、もう少し積極的になってはどうかと思います。

柘植 PDGの国際調和が進展したときに、International Pharmacopoeiaとして共通化できる部分、例えば概念や一般試験法、添加物といった部分と、もう一つは日本の文化を反映した医薬品という部分などが明確に区別できるようになってくると思います。

その場合、International PharmacopoeiaにJP全部が吸収されるのではなく、現在のブラックダイヤモンド部分のように、日本の文化を反映している部分は残るといふ気がします。そういう意味で次のステップは、そういうことを意識しながら区分けしていくことが非常に大事な作業なのではないかと思っています。

早川 国際化について、一言で言えば、是々非々なんだらうと思います。もう一つは単に合わせていくということではなくて、日本のほうから自分たちの、たとえば一般試験法、Methodologyなりを持って行って、それがPDGの中で認知され、利用されるというかたちの一種の国際貢献というか、JPの国際化という方向もあるべきだと思います。

一方、ユーザーフレンドリーを考えると、先ほど私が申し上げたすべての関係者がユーザーなんです。そのなかでコンセプトがわかりやすいということがすごく大事だと思うし、書いているスタイルもわかりやすいということが大事だと思います。たとえば一般試験法の並べ方を変更し、一部二部の組み直しなど、それなりの努力はしてきました。

だからもう一度、JPの基本コンセプトを明確にし、再確認しながら、更に改善策があればむしろ指摘していただき、そこが改善目標になるだらうと思います。

川西 例えば国際的な視点では、PDGなどで海外のメンバーからよく質問をうけるJPの作成要領の英語バージョンを作成してはどうでしょうか。JP独特の方針を理解するのによいですし、国際的にみたらユーザーフレンドリーなことかと思っています。

それから、余裕があればJPTIのような書籍も充実させるとよいですね。言うはやさしいけれどもなかなか苦しいところですけど。

早川 なかなかどうしても個人的なボランティアの都合が増えていくみたいな話になりますね。機構の基準課にもっと人を増やして、予算を増やして(笑)、そういう体制強化が望めます。

司会 本日は貴重なご意見をありがとうございました。

《出席者紹介》

川西 徹：国立医薬品食品衛生研究所薬品部長

1978年 東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了（1986年薬学博士）

1978年 国立衛生試験所安全性生物試験研究センター薬理部研究員

1991年 国立衛生試験所安全性生物試験研究センター病理部室長

1995年 国立衛生試験所生物薬品部室長

2002年 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

2006年 国立医薬品食品衛生研究所薬品部長

柘植 英哉：日本製薬団体連合会薬局方委員会委員長

1980年 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士課程修了、薬学博士

1980年 旧第一製薬㈱総合研究所製剤研究センター

1987年 米国ユタ大学薬学部留学

2000年 旧第一製薬㈱製剤技術研究所大阪製剤技術センターセンター長

2006年 日本製薬工業協会・品質委員会 GMP 部会副部会長

2007年 (株)東京医薬品工業協会・局方委員会委員長

2007年 現職（第一三共㈱品質保証部）

早川 堯夫：近畿大学薬学総合研究所長

1974年 大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了、薬学博士

1991年 国立衛生試験所生物薬品部部長

2002年 国立医薬品食品衛生研究所副所長

2003年 薬事食品衛生審議会委員、日本薬局方部会部会長など（現在に至る）

2005年 (独)医薬品医療機器総合機構顧問

2007年 大阪大学医学部未来医療センター招聘教授（現在に至る）

2007年 近畿大学薬学総合研究所特任教授

2008年 現職

寺尾 允男：財団法人日本公定書協会会長

1964年 東京大学大学院化学系研究科薬学専門課程博士終了、薬学博士

1971年 東京大学助教授

1979年 国立衛生試験所放射線化学部長

1989年 国立衛生試験所機能生化学部長

1991年 国立衛生試験所薬品部長

1995年 国立衛生試験所（国立医薬品食品衛生研究所）所長

2000年 財団法人日本公定書協会会長

2003年 内閣府食品安全委員会委員

2006年 現職

Comparative Studies on the Structural Features of O-Glycans between Leukemia and Epithelial Cell Lines

Keita Yamada,[†] Mitsuhiro Kinoshita,[†] Takao Hayakawa,[‡] Shuuichi Nakaya,[§] and Kazuaki Kakehi^{*†}

School of Pharmacy, Pharmaceutical Research and Technology, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-Osaka, 577-8502 Japan, and Koichi Tanaka Mass Spectrometry Research Laboratory and Life Science Research Laboratory, Shimadzu Corp. 1, Nishinokyo-Kuwaharacho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511 Japan

Received September 5, 2008

Recently, we developed an automated apparatus for rapid releasing of O-glycans from mucin-type glycoproteins and proteoglycans (*Anal. Biochem.* 2007, 362, 245–251; 2007, 371, 52–61). In the present paper, we released O-glycans from some leukemia and epithelial cells using the apparatus, and compared the profiles of O-glycans among these cells after fluorescent labeling of the released glycans with 2-aminobenzoic acid. The fluorescent labeled glycans were analyzed using a combination of HPLC and off-line MALDI-(QIT)TOF mass spectrometry. We found that leukemia cells generally showed simple glycan profiles and commonly contained sialyl-T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc) and disialyl-T (NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc) antigens as major O-glycans. In contrast, epithelial cancer cell lines usually showed extremely complex profiles. We found that polylactosamine-type O-glycans were abundantly present in MKN45 cells. Especially, we found characteristic glycans, of which Gal β 1-3 residue of core1 structure is modified with biantennary polylactosamine units. In contrast, this cell line did not contain polylactosamine-type N-glycans (*J. Proteome Res.* 2006, 5, 88–97). These results suggest that the different biosynthetic pathways for N- and O-glycans are proposed. The method presented here will accelerate the speed for comprehensive analysis of O-glycans in biological samples and will be a powerful tool for clinical/biochemical analysis in cancer biology.

Keywords: O-Glycan • Leukemia cells • Epithelial cancer cells • serotonin-affinity chromatography • MALDI-TOF MS • MSⁿ technique • Glycomics

Introduction

Most of the glycans attached to glycoproteins are classified into N-linked and O-linked glycans. Chitobiose (GlcNAc β 1-4GlcNAc) residue at the reducing end of N-linked glycans is attached to Asn residue through the amide-linkage. In contrast, N-acetylgalactosamine (GalNAc) of the O-linked glycans is attached to Ser/Thr residue through the O-glycosidic linkage.

O-Glycans on cell membranes have been considered to play various important roles as the markers for controlling information trafficking. In the early studies, Piller et al. discovered that native T lymphocytes in human peripheral blood express characteristic O-glycans (i.e., Gal β 1-3GalNAc: core1 type glycan) almost exclusively. In contrast, once T lymphocytes are activated by IL-2 and anti-CD3, they acquire a core2-type O-glycan (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc) due to the increase of the activity of core2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (Core2GlcNAcT: the core2 branching enzyme).¹ Introduction of N-acetyl lactosamine residues to such core2 glycans leads to the biosynthesis of functional O-glycans such as those

containing sialyl Lewis^x residues. Therefore, core2 structures allow blood cells such as T lymphocytes to interact with other biomolecules. O-Glycans also play important roles in invasion/metastasis of cancer cells and their survival in the blood stream, and those of glycoproteins which show blood group antigenicity such as Lewis antigens have been reported to alter qualitatively and quantitatively during malignancy.² It was also reported that cancer-associated O-glycans were highly sialylated but less sulfated and were often truncated and commonly contained Tn (GalNAc-) and T (Gal β 1-3GalNAc) antigens as well as their sialylated analogues (sialyl-Tn and sialyl-T).^{3,4} Therefore, both Tn and T antigens have been exploited to develop cancer vaccines.⁵ Tn and sialyl-Tn (NeuAc α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr) antigens are also markers for poorly differentiated adenocarcinomas and mucinous carcinomas. Their increased occurrence was reported to be associated with advanced cancer, invasive and highly proliferative tumors, metastasis and a poor clinical outcome.⁶ And experimental therapies and immunization approaches to cancer were exploited.^{7,8}

Because of the extremely complex structures and heterogeneity of both N- and O-linked glycans, we often have to analyze their structures after releasing them from the core protein. To achieve releasing reaction in high efficiency, a number of methods have been developed. In the analysis of N-linked

* To whom correspondence should be addressed. E-mail, k_kakehi@phar.kindai.ac.jp; tel, +80-6-6721-2332; fax, +80-6-6721-2353.

[†] School of Pharmacy, Kinki University.

[‡] Pharmaceutical Research and Technology, Kinki University.

[§] Shimadzu Corp. 1.

glycans, *N*-glycoamidase having broad specificity is generally used to release *N*-glycans from the peptide backbone,⁹ and the released *N*-glycans as glycosylamine form are conveniently labeled with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). The FMOC-labeled *N*-glycans are easily and sensitively analyzed by HPLC and CE.¹⁰ We also achieved comprehensive analysis of *N*-glycans in some cancer cells released by *N*-glycoamidase followed by labeling with 2-aminobenzoic acid.¹¹

In contrast, there is no enzyme capable of releasing a wide variety of mucin-type glycans (i.e., *O*-glycans). And *O*-glycans are still being released from the core proteins by chemical methods. NaOH-catalyzed β -elimination in the presence of sodium borohydride under mild conditions is the most common method for routine analysis of *O*-glycans.¹² However, alkali-borohydride releasing method affords the released *O*-glycans as the reduced form (i.e., alditol form). Consequently, the original reducing terminal is no longer available for modification via the hemiacetal group, which is essential for derivatization to achieve sensitive and high-resolution analysis. This has been a big problem for the structural and functional analysis of *O*-glycans. In addition, mild conditions employed for the release of *O*-glycans require the long reaction time. Lebrilla et al. reported MALDI-FTIR-MS analysis of *O*-glycans which were released from a small amount of serum and biopsy samples,^{13–15} but the method employed for carbohydrate releasing reaction was based on β -elimination with alkali-borohydride. Royle et al. employed mild hydrazinolysis to afford *O*-glycans as intact form from microgram quantities of glycoproteins. The method, however, requires a lengthy reaction time (6 h) and reacylation step.¹⁶ Karlsson and Packer reported an in-line flow releasing system employing alkaline β -elimination.¹⁷ The *O*-glycans were released as intact form from the column to which glycoproteins were previously immobilized. Novotny group reported a method for microscale nonreductive releasing of *O*-glycans in the presence of amines.¹⁸

Recently, we developed an automated glycan-releasing apparatus for proteoglycans and mucin-type glycoproteins.^{19,20} The apparatus enables the release of *O*-glycans having the intact reducing end within only 3 min using an aqueous 0.5 M LiOH solution as the releasing reagent, although partial degradation is observed. The released *O*-glycans are conveniently labeled with 2-aminobenzoic acid, and analyzed by HPLC or CE.

In the present paper, we performed comparative studies on the distribution of *O*-glycans in some cancer cell membrane fractions of leukemia and epithelial cancer cells, and found specific distribution of *O*-glycans. The information in the present paper will be a starting point for biological/clinical studies on the new aspect of cancer biology.

Material and Methods

Pronase (*Streptomyces griseus*) was obtained from Calbiochem (San Diego, CA). 2-Aminobenzoic acid (2-AA) and sodium cyanoborohydride for fluorescent labeling of the released glycans were obtained from Tokyo Kasei (Chuo-ku, Tokyo, Japan) and Sigma-Aldrich Japan (Shinagawa-ku, Tokyo, Japan), respectively. Sephadex LH-20 was from GE Health Care (Sinyuku-ku, Tokyo, Japan). Triton-X100, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and sodium borohydride (NaBH₄) were also from Sigma-Aldrich, Japan. Neuraminidase (*Arthrobacter ureafaciens*) was kindly donated from Dr. Ohta (Marukin-Bio, Uji, Kyoto, Japan). β -Galactosidase (Jack bean) was obtained from Seika-

gaku Kogyo (Chuo-ku, Tokyo, Japan). Protein inhibitor cocktail for animal cells was obtained from Nakarai Tesque (Nakagyo-ku, Kyoto, Japan). A serotonin-immobilized column for the separation of sialo-glycans was obtained from Seikagaku Kogyo. Other reagents and solvents were of the highest grade commercially available or HPLC grade. All aqueous solutions were prepared using water purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA). BxPC3 and PANC1 cells were kindly donated by Dr. Yonezawa of Kagoshima University, School of Medicine and Dental Sciences. MKN7 cells were donated by Dr. Masuko, School of Pharmacy, Kinki University.

Cell Culture. In the present study, we used human derived cell lines: U937 (histiocytic lymphoma), K-562 (chronic myelogenous leukemia), Jurkat (acute T cell leukemia), HL-60 (acute promyelocytic leukemia), LS174T (colorectal adenocarcinoma), HCT-15 (colorectal adenocarcinoma), BxPC3 (pancreatic adenocarcinoma), PANC1 (pancreatic carcinoma), MKN7 and MKN45 (gastric adenocarcinoma). The cells except for LS174T were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) penicillin–streptomycin mixed solution (10 000 U penicillin and 10 mg streptomycin/mL; Nacalai Tesque). LS174T cells were cultured in EME medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Fetal calf serum was previously kept at 56 °C for 30 min. The cells were cultured at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere, and harvested at 80% confluent state. Collected cells (1 × 10⁷ cells) were washed with phosphate buffered saline (PBS), and collected by centrifugation at 1000 rpm for 20 min.

Glycopeptide Pool from the Whole Cells. Cancer cells (1.0 × 10⁷ cells) were suspended in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 500 μ L), and mixed with an equal volume of 2% Triton-X 100 in the same buffer in an ice bath. After homogenizing the cells for 7 min with a glass homogenizer, the mixture was centrifuged at 8000g for 30 min. The supernatant layer was collected and boiled for 7 min at 100 °C, and evaporated to dryness by a centrifugal evaporator (SpeedVac, Servant, Sunnydale, CA). The lyophilized material was suspended in water (200 μ L), and ethanol (800 μ L) was added to the mixture to 80% concentration. The precipitate was collected by centrifugation and washed with ethanol (1 mL × 3) and then with acetone (1 mL × 2). The residue was dried *in vacuo*, and digested with pronase (50 μ g) in 5 mM Tris-HCl (pH 8.0, 200 μ L), and kept at 37 °C for 24 h. The reaction mixture was boiled for 10 min, and the supernatant was collected after centrifugation. Because cancer cells often contain relatively large amounts of free glycans in cytosol,²¹ free glycans were previously reduced to alditol form with sodium borohydride. By this procedure, we can analyze the released *O*-glycans without interference. Briefly, an aqueous solution of 2 M NaBH₄ (500 μ L) was added to the supernatant, and kept at room temperature for 30 min. Glacial acetic acid was carefully added to the mixture to decompose excess NaBH₄, and the mixture was passed through an ultrafiltration membrane (MW 5000 cutoff, Ultrafree-MC, Millipore) at 10 000g. The mixture of glycopeptides on the membrane was dissolved in water (250 μ L) and used for releasing reaction of *O*-glycans.

Releasing Reactions of *O*-Glycans. The releasing reaction of *O*-glycans using the automated glycan releasing system was performed according to the method reported previously.¹⁹ The procedure is as follows. An aqueous solution of 0.5 M LiOH was used as both the releasing reagent and eluent. To the flow of the eluent at 1.0 mL/min, an aqueous solution of the mixture of glycopeptides from each cell line (2.0 × 10⁶ cells/50 μ L) obtained as described above was injected. After the sample

solution was mixed with the eluent in the mixing device, the mixed solution was moved to the reactor kept at 60 °C, in which a reaction tube (0.25 mm i.d., 10 m length; 700 μ L volume) was set. During passing through the reaction tube in the reactor, O-glycans were released from the peptide. The eluate containing the reaction mixture from the reactor was immediately introduced to a cartridge (0.7 mL volume) packed with cation exchange resin, and collected to a fraction collector installed in the system with monitoring the absorbance at 230 nm. The overall procedure from the sample injection to collection of the released O-glycans was completed within 3 min. After the run, the cartridge packed with cation exchange resin was regenerated with 0.25 M H₂SO₄ at a flow rate of 1.2 mL/min for 5 min, followed by washing the cartridge with water at the same flow rate for 5 min.

The collected solution containing the released O-glycans was evaporated to dryness by a centrifugal evaporator, and the dried material was used for fluorescent labeling with 2-aminobenzoic acid (2-AA).

Fluorescent Labeling of the Released O-Glycans with 2-AA. The mixture of the released O-glycans was dissolved in 2-AA solution (200 μ L) which was freshly prepared by dissolution of 2-AA (30 mg) and sodium cyanoborohydride (30 mg) in methanol (1 mL) containing 4% sodium acetate and 2% boric acid. The mixture was kept at 80 °C for 1 h. After cooling, water (100 μ L) was added, and the mixture was applied to a column of Sephadex LH-20 (1.0 cm i.d., 30 cm length) previously equilibrated with 50% aqueous methanol. The earlier eluted fluorescent fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure. The dried residue was dissolved in water (100 μ L), and a portion (10 μ L) was injected to analyze by serotonin-affinity chromatography.

Serotonin-Affinity Chromatography for Separation of O-Glycans Based on the Number of Sialic Acid Residues. Serotonin affinity chromatography was performed with a Jasco HPLC apparatus equipped with two PU-980 pumps and a Jasco FP-920 fluorescence detector (Hachio-ji, Tokyo, Japan). The O-glycan pool obtained from cancer cells as described above was initially separated based on the number of sialic acid residues using a serotonin-immobilized column (4.6 \times 150 mm) with linear gradient from water (solvent A) to 50 mM ammonium acetate (solvent B) at a flow rate of 0.5 mL/min. Initially, solvent B was used at 5% concentration for 2 min, and then linear gradient elution was performed to 75% B for 35 min, and finally the eluent was changed to solvent B (50 mM ammonium acetate) during the following 10 min. The observed peaks were collected and lyophilized to dryness for the analysis by MALDI-TOF MS.

Analysis of 2-AA Labeled O-Glycans on a Polymer-Based Amino Column. The apparatus was the same as described for the analysis of 2-AA labeled glycans by serotonin affinity chromatography. Separation was done with a polymer-based Asahi Shodex NH2P-50 4E column (Showa Denko, Hachio-ji, Tokyo; 4.6 mm i.d., 250 mm length) using a linear gradient formed by 2% acetic acid in acetonitrile (solvent A) and 5% acetic acid in water containing 3% triethylamine (solvent B). The column was initially equilibrated and eluted with 70% solvent A for 2 min, then solvent B was increased to 95% over 80 min and kept at this composition for further 100 min.

MALDI-TOF MS. MALDI-TOF MS spectra of 2AA-labeled oligosaccharides were acquired on a Voyager DE-Pro mass spectrometer (PE Biosystems, Framingham, MA) in negative or positive ion linear mode. Nitrogen laser (337 nm) was used

for the ionization. Accelerating voltage was set at 20 kV, and delayed extraction was performed after 800 ns. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as a matrix material throughout the work. The mass numbers of the molecular ion peaks were corrected using a mixture of 2AA-labeled dextran oligomers as mass markers. The sample solution (1 μ L) was mixed with 2% DHB (1 μ L) in ethanol on a stainless steel plate, and the mixture was dried under atmosphere at room temperature.

MSⁿ Analysis of the O-Glycans. The structures of the O-glycans were confirmed by MSⁿ technique on a MALDI-QIT TOF mass spectrometer (AXIMA-QIT, Shimadzu, Kyoto, Japan). Acquisition and data processing was controlled by Launchpad software (Kratos Analytical, Manchester, U.K.). For collision-induced dissociation, argon was used as the collision gas. For sample preparation, a 0.5- μ L volume of the matrix solution (DHB; 10 mg/mL in 30% ethanol/0.1% trifluoroacetic acid) was deposited on the stainless steel target plate and allowed to dry. Then, a portion (0.5 μ L) of the appropriately diluted analyte solution (typically ca. 1 pmol/ μ L) was used to cover the matrix on the target plate and allowed to dry.

Results and Discussion

Procedure for the Release of O-Glycans in Cancer Cells. In the present study on the comparative analyses of O-glycans in cancer cells, we used the mixture of glycopeptides obtained by exhaustive proteolytic digestion of delipidated and solubilized materials of cancer cells. In the recent studies on the analysis of N-glycans in cancer cells, we found that significant amount of free glycans are often accumulated in cancer cells.²¹ Therefore, the mixtures of glycopeptides were previously treated with sodium borohydride to reduce the free glycans to alditols prior to the releasing reaction. The reduced glycans are no longer labeled with 2AA, and do not interfere with the determination of 2AA-labeled O-glycans. The mixture of glycopeptides thus obtained was used for O-glycan releasing reaction by the auto glycan releasing system.¹⁹ The system makes it possible to release O-glycans within 3 min in good yield. The released glycans keep the reducing ends as hemiacetal form, and are easily labeled with 2-AA. It should be noted that the linkages between N-glycans and Asn residue are stable and N-glycans are not released at the conditions used for the release of O-glycans (data not shown).¹⁹ Profiles of the released O-glycans showed comparable results with those reported using the conventional alkali-borohydride releasing method.¹²

Comparison of the Amounts of O-Glycans Expressed on Cancer Cells. In relation to the analysis of variations of O-glycans in cancer cells, it is necessary to determine the amounts of the expressed O-glycans as the initial studies. In the present study, we analyzed the mixtures of fluorescent labeled glycans released from each cell line based on the number of sialic acid residues by serotonin affinity chromatography.¹¹ Figure 1 summarizes the amounts of O-glycans expressed on cancer cell lines examined in the present study.

There are obvious differences in the expression level of O-glycans among leukemia cells and epithelial cells. All the leukemia cell lines poorly express O-glycans. In contrast, epithelial cells express large amount of O-glycans. These data clearly indicate the difference between floating blood cells and tissue-forming epithelial cells.

PANCl (pancreas) and MKN45 (stomach) cells are poorly differentiated cell lines, but BXPC3 (pancreas) and MKN7 (stomach) cells are well-differentiated cells. Although these cell lines showed reverse results in relation to the expression level

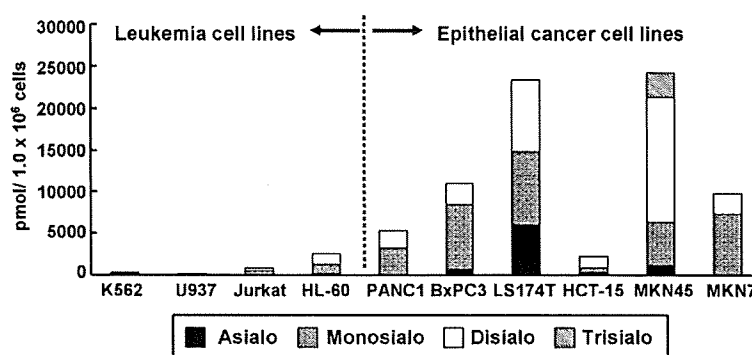


Figure 1. Comparison of the amounts of *O*-glycans expressed on cancer cells. The data were calculated from the peak areas observed by serotonin affinity chromatography (see Figure 4). The fractions with asterisks (*) marks, which did not show glycan peaks on MS spectra, were not included in the data.

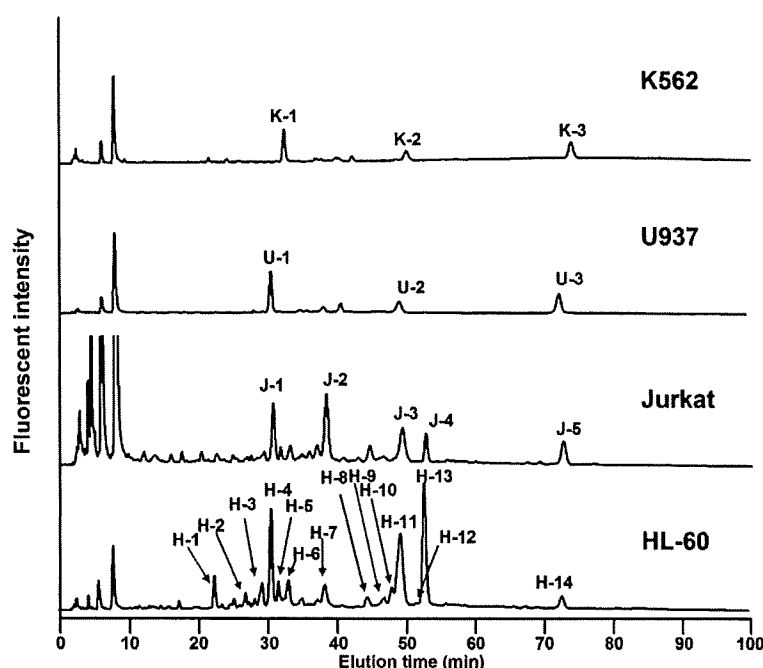


Figure 2. NP-HPLC analysis of 2AA-labeled *O*-glycans derived from leukemia cells. *O*-Glycans derived from K562, U937, Jurkat and HL-60 cells were released by the autoglycan releasing system followed by labeling with 2AA. Analytical conditions: column, Asahi Shodex NH2P-50 4E (4.6 × 250 mm); eluent, solvent A, 2% CH₃COOH in acetonitrile; solvent B, 5% CH₃COOH/3% triethylamine in water; Gradient elution, linear gradient (30–95% solvent B) from 2 to 82 min, maintained for 20 min. Fluorescent detection was performed at 425 nm irradiated with a 350-nm light.

of *O*-glycans, cell differentiation obviously affected the expression of total amount of *O*-glycans as well as the ratios of asialo-, mono-, di- and trisialoglycans. It is also interesting that HCT15 cells are highly tumorigenic, although *O*-glycan expression level is low.²²

***O*-Glycans in Leukemia Cells.** We analyzed *O*-glycans of leukemia cell lines by NP-HPLC. All the cells other than HL-60 cells showed relatively simple chromatograms as shown in Figure 2. The peaks observed in each chromatogram were collected and analyzed by MALDI TOF MS and MALDI QIT-TOF MSⁿ techniques. The MS data were analyzed by Glycopeakfinder in EUROCarbDB (<http://www.eurocarbodb.org/applications/ms-tools>). Their structures are assigned as shown in Table 1. In the table, the peaks with # marks were analyzed by MSⁿ techniques (see Supporting Information). Relative abundances in each cell line are also shown in Table 1.

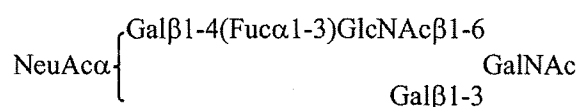
All leukemia cell lines commonly contained sialyl T (#MS1) and disialyl T (#DS1) antigens as major *O*-glycans. Especially, K562 and U937 cells contained these two glycans almost exclusively (K-1 and U-1, and K-3 and U-3, respectively). Jurkat cells contained some additional glycans (J2 and J4) with those observed in U937 and K562 cells.²³ J-2 at ca. 38 min showed a molecular ion at *m/z* 633, which corresponds to HexNAc modified with NeuAc, and is easily assigned as sialyl Tn antigen (NeuAcα2-6GalNAc). Peak J-4 at 53 min showed a molecular ion at *m/z* 1450, which corresponds to a hexasaccharide containing two sialic acid residues. HL-60 cells also contained the same hexasaccharide (H-13) as J-4, and H-13 was reported to be the major mucin-type glycan in HL-60.²³ From the elution time and molecular masses of both peaks (J-4 and H-13), we confirmed the structure of J-4 as disialyl core2 tetrasaccharide (NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)-

Table 1. O-Glycans Found in Leukemia Cell Lines^a

Structure and monosaccharide compositions	Molecular ions	Peak ID	Relative abundance (%)			
			K562	U937	Jurkat	HL-60
Asialo glycan						
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#A2}	869(+)	H-1				4.44
Monosialo glycans						
NeuAcα2-3Galβ1-3GalNAc-2AA ^{#MS1} (Sialyl T antigen)	795(+)	K-1, U1, J-1, H-4	32.3	36.6	20.5	15.2
NeuAcα2-6GalNAc-2AA (Sialyl Tn antigen)	633(+)	H-7, J-2			28.9	1.16
NeuAcα2-3Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#MS2}	997(+)	H-3				4.24
Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS3}	1159(-)	H-6				4.26
NeuAcα2-3Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + Fuc	1143(-)	H-2				2.08
Galβ1-3(Gal-(Fuc)-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS4}	1305(-)	H-5				2.26
Disialo glycans						
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAc-2AA ^{#MS1} (Disialyl T antigen)	1085(-)	K-3, U-3, J-5, H-14	30.7	30.1	12.9	2.97
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#MS2}	1450(-)	J-4, H-13			10.7	25.9
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	1596(-)	H-12				0.14
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#MS3}	1815(-)	H-10				1.49
NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#MS4}	1961(-)	H-10				1.49
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#MS6}	2180(-)	H-9				1.11
NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₃ -Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#MS9}	2545(-)	H-8				2.13
Degradation product						
NeuAcα2-3Gal-2AA	592(+)	K-2, U-2, J-3, H-11	17.3	21.2	20.6	23.7

^a We showed MS/MS data for the glycan with # marks in Supporting Information. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher/lower series of O-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MSⁿ data.

GalNAc). The assignment was also confirmed by MSⁿ analyses (#DS2). The monosialo-core2 trisaccharide, H-3 at *m/z* 997 analogous to H-13, was also observed, and assigned as NeuAcα2-3Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc (#MS2). H-10 contained two species of O-glycans. The one having a molecular ion at *m/z* 1815 is assigned as NeuAc₂Hex₃HexNAc₃-2AA, which has poly-lactosamine structure of NeuAcα2-3Galβ1-3(NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc by the analogous consideration for the assignment of H-13 (#DS3). The other gave a molecular ion at *m/z* 1961, and was assigned as the one having an additional fucose residue (#DS4). We also found a glycan (H-12) showing a molecular ion at *m/z* 1596, which is assigned as the one with a fucose residue. Another characteristic peak (H-5) which contains a fucose residue was also observed at 31 min (Figure 2). H-5 showed a molecular ion at *m/z* 1305, which corresponds to NeuAc₁Hex₂HexNAc₂dHex₁-2AA (#MS4). The fragment ion at *m/z* 1014 caused by the release of NeuAc gave the fragment ion at *m/z* 852 which is formed by the release of Hex residue. It should be noticed that the ion (*m/z* 852) still includes dHex1 residue. In addition, capillary affinity electrophoresis of H-5 in the presence of the lectins (UEA-1 or AAL) indicates that the fucose residue attaches to the interior GlcNAc residue to form LewisX structure (data not shown).²⁴ These data indicate that H-5 has the following structure.



Most leukemia cells do not show the activity of core2 enzyme (i.e., β1-6 N-acetylglucosaminyltransferase), while HL-60 cells

express significant activity of this enzyme,²³ and the glycans in HL-60 are considered to have O-glycans having core2 structure (Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc). Therefore, O-glycans of core2 structures having extended chain length (i.e., poly-lactosamine-type glycans) were observed in HL-60 cells. The O-glycan (H-8) having large molecular size was observed at *m/z* 2545, which corresponds to poly-lactosamine-type O-glycan, NeuAc-Galβ1-3(NeuAc(Gal-GlcNAc)₃Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA. MS² studies easily reveal the monosaccharide sequence as shown in #DS9 (see Supporting Information).

O-Glycans in Epithelial Cells. O-Glycans of six epithelial cancer cells (PANC1, BxPC3, LS174T, HCT-15, MKN45 and MKN7 cells) were also analyzed (Figure 3).

As indicated in Figure 1, epithelial cells except for HCT-15 cells express large amounts of O-glycans, and complex glycan profiles characteristic for each cell line were observed as shown in Figure 3. Therefore, we previously separated O-glycans by serotonin affinity chromatography based on the number of bound sialic acid residues for easy structural analysis by MS/MSⁿ techniques. The results on the group separation of O-glycans obtained from epithelial cancer cells are shown in Figure 4.

The peaks were collected and analyzed by MALDI-TOF MS (Tables 2, 3, and 4).

PANC1 cells (from pancreas) are from ductal origin and showed a simple chromatogram, and four groups of peaks were observed (Figure 4). The peak (P-1) at 5 min did not give MS peaks due to O-glycans, and this was considered to be due to the reagents. Monosialo-fraction (P-2) showed a characteristic molecular ion at *m/z* 795 due to sialyl-T (#MS1) (Figure 5 and Table 2).

We confirmed an ion in another monosialo-glycan fraction (P-3). The ion peaks at *m/z* 592 is due to NeuAcα2-3Gal. The

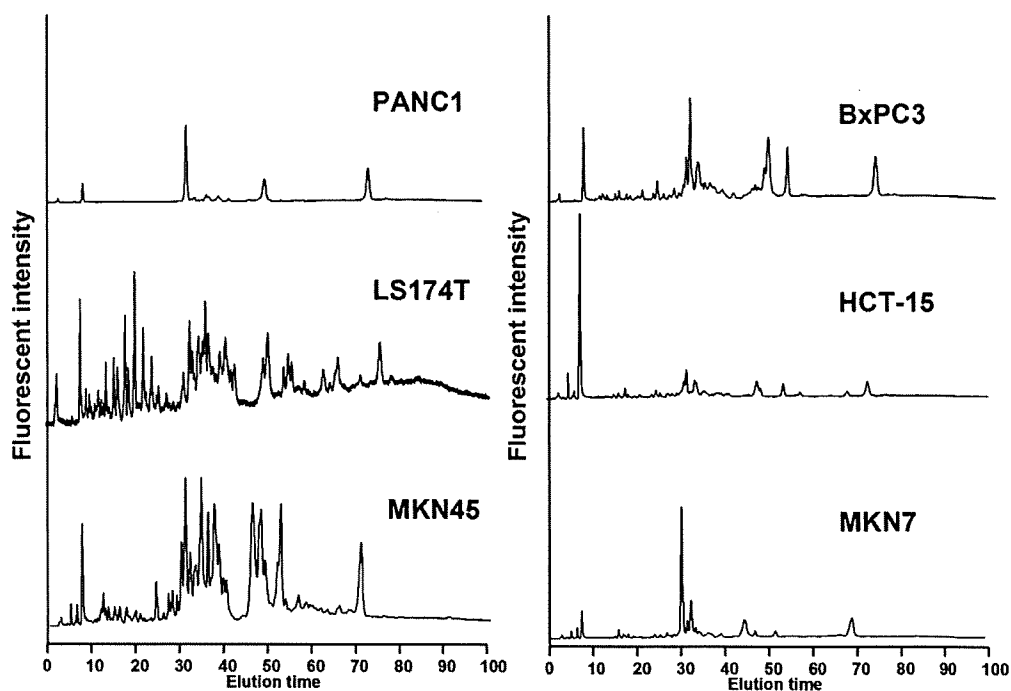


Figure 3. NP-HPLC analysis of 2AA-labeled *O*-glycans derived from epithelial cancer cells. Details in the experimental procedures are the same as described in Figure 1. Analytical conditions are also the same as those in Figure 2.

peak of NeuAc α 2-3Gal observed at m/z 592 is due to peeling reaction during glycan releasing reaction of Gal β 1-3GalNAc structure (i.e., core1 structure). From the disialoglycan fraction (P-4), we found a peak due to disialyl-T antigen at m/z 1085 (#DS1).

In contrast, we found 27 *O*-glycans in BxPC3 cells (also from pancreas, adenocarcinoma). The asialo/neutral fraction (B1) gave three major molecular ion peaks at m/z 504, m/z 707 (#A1) and m/z 869 (#A2). The molecular ion peak at m/z 504 as $[M + H]^+$ was assigned as Gal β 1-3GalNAc-2AA. The molecular ion peak as $[M + H]^+$ at m/z 707 corresponded to core2 structure (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc). The molecular ion peak at m/z 869 $[M + H]^+$ was due to galactosyl core 2 structure, Gal β 1-3(Gal β -GlcNAc β 1-6)GalNAc as observed in HL-60 cells. Minor molecular ions observed at m/z 1093 (#A4) and m/z 1255 (#A5) (both $[M + Na]^+$ ions) were considered to be due to the galactosyl core2 structures observed at m/z 869, to which HexNAc + Na and HexHexNAc + Na are bound, respectively (see Table 2). These peaks were confirmed by MSⁿ techniques (see Supporting Information). Peak B2 (monosialo fraction) gave characteristic ladder peaks at m/z 1159 (#MS3), m/z 1524 (#MS5), m/z 1889 (#MS8), m/z 2254 (#MS10) and m/z 2619 (#MS12) in negative ion mode. The molecular ion at m/z 1159 was due to sialylated core2 oligosaccharide, NeuAc α 2-3Gal β 1-3(Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc or Gal β 1-3(NeuAc α 2-3Gal β -GlcNAc β 1-6)GalNAc. We could easily observe MS² spectra using the ion observed at m/z 868. The ion at m/z 868 produced the fragment ion (Gal-GlcNAc-GalNAc-2AA) at m/z 707 as well as those at m/z 503 and m/z 544. These fragment ions indicate that the glycan has lactosamine units at GlcNAc β 1-6 branch (core2 structure). At present, the position of NeuAc residue is not clear. Other four molecular ions observed at m/z 1524, m/z 1889, m/z 2254 and m/z 2619 are due to poly-lactosamine-type *O*-glycans, NeuAc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_2$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS5),

NeuAc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_3$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS8), NeuAc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_4$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS10) and NeuAc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_5$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS12), respectively. On the basis of the analogous consideration on the glycan observed at m/z 1159 (#MS3), these peaks are considered to have additional lactosamine units at the β 1-6-linked GlcNAc branch. Structure confirmation of these series of ladder peaks was supported by the similar consideration on the analysis of disialo glycans also present in B-3 fractions of BxPC3 cells (see below). Minor ladder peaks observed at m/z 1670, m/z 2035, m/z 2400 and m/z 2765 were also detected among major ions and assigned as monofucosylated and monosialylated poly-lactosamine-type *O*-glycans, NeuAc $_1$ Fuc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_2$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS6), NeuAc $_1$ Fuc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_3$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS9), NeuAc $_1$ Fuc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_4$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS11) and NeuAc $_1$ Fuc $_1$ (Gal-GlcNAc) $_5$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA (#MS13), respectively. These series of ladder peaks which contain a fucose residue were confirmed by analogous considerations on the glycan (H-5) observed in HL-60 cells, because they show the same fragmentations. And the fucose residue is suggested to attach the interior GlcNAc residue. Ladder peaks due to poly-lactosamine-type *O*-glycans were also observed in disialo fraction (B-3). Major peaks observed at m/z 1815, m/z 2180, m/z 2545 and m/z 2910 are due to disialo-poly-lactosamine-type *O*-glycans, NeuAc $_2$ (Gal-GlcNAc) $_2$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA, NeuAc $_2$ (Gal-GlcNAc) $_3$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA, NeuAc $_2$ (Gal-GlcNAc) $_4$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA and NeuAc $_2$ (Gal-GlcNAc) $_5$ Gal $_1$ GalNAc $_1$ -2AA, respectively. These ions were successfully analyzed by MSⁿ techniques (#DS3, #DS6, #DS9 and #DS10). We observed sequential cleavage of Hex and HexNAc. In addition, these glycans commonly gave a characteristic fragment ion at m/z 868 by MS² analysis. MS³ measurement of the ion clearly showed that lactosamine units were elongated at the GlcNAc β 1-6 GalNAc branch as shown below (see also Supporting Information).

Table 2. O-Glycans Found in Pancreatic Cancer Cell Lines^a

O-glycans observed in PANC1	Molecular ions	O-glycans observed in BxPC3	Molecular ions
<u>Asialo fraction(peak P-1): 0%</u>		<u>Asialo fraction (Peak B-1):6.0%</u>	
		Galβ1-3GalNAc-2AA	504 (+)
		Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#A1}	707 (+)
		Galβ1-3(Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#A2}	869 (+)
		Galβ1-3(GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#A4}	1093(+)
		Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Galβ1-4GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#A5}	1255(+)
<u>Monosialo fraction (Peak P2, P3): 63%</u>		<u>Monosialo fraction (Peak B-2): 70%</u>	
NeuAcc2-3Galβ1-3GalNAc-2AA ^{#MS1} (Sialyl T antigen)	795(+)	NeuAcc2-3Galβ1-3GalNAc-2AA ^{#MS1} (Sialyl T antigen)	795(+)
		Galβ1-3(Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS3}	1159(-)
		Galβ1-3(Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS5}	1524(-)
		Galβ1-3 (Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-) GlcNAcβ1-6) -GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS6}	1670(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS8}	1889(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6) -GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS9}	2035(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS10}	2254(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6) GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS11}	2400(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS12}	2619(-)
		Galβ1-3((Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA + NeuAc ₁ ^{#MS13}	2765(-)
<u>Disialo fraction (Peak P4): 37%</u>		<u>Disialo fraction (Peak B3, B4, B5): 24%</u>	
NeuAcc2-3Galβ1-3(NeuAcc2-6)GalNAc-2AA ^{#DS1} (Disialyl T antigen)	1085(-)	NeuAcc2-3Galβ1-3(NeuAcc2-6)GalNAc-2AA ^{#DS1} (Disialyl T antigen)	1085(-)
		NeuAc ₂ Hex ₁ HexNAc ₄ dHex ₁ -2AA	1231(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS2}	1450(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS3}	1815(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS4}	1961(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS6}	2180(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS7}	2326(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS9}	2545(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	2691(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA ^{#DS10}	2910(-)
		NeuAc-Galβ1-3(NeuAc-(Gal-GlcNAc) ₂ -Gal-(Fuc-)GlcNAcβ1-6)GalNAc-2AA	3056(-)
<u>Degradation product</u>		<u>Degradation product</u>	
NeuAcc2-3Gal-2AA	592(+)	NeuAcc2-3Gal-2AA	592(+)

^a We showed MS/MS data for the glycan with # marks in Supporting Information. The structures in blue are confirmed according to the analogous consideration on the structures of higher/lower series of O-glycans. The structures in red are not assigned in the present study, because we could not observe good MSⁿ data.