

ture of oligosaccharides in both milk samples is that multi-branched oligosaccharides were present and linear oligosaccharides were not detected in the current study.

BS milk contained characteristic oligosaccharides having monosaccharide compositions of H3N3F1 (G in Table 2), H5N5F1 (H), and H7N7F3 (I), and these oligosaccharides were confirmed as Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3[Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6]Gal $\beta$ 1–4GlcNAc and Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3[Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6]GlcNAc $\beta$ 1–3[Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6]Gal $\beta$ 1–4GlcNAc. Free oligosaccharides having LacNAc at the reducing end have been reported in bovine and caprine colostrum [33–35]. In mammary glands, lactose is synthesized by lactose synthase, a complex of  $\beta$ 4 galactosyltransferase I ( $\beta$ GalT-I) and  $\alpha$ -lactalbumin [36].  $\beta$ GalT-I is also involved in the synthesis of Gal $\beta$ 1–4GlcNAc in the case of the absence of  $\alpha$ -lactalbumin. However,  $\alpha$ -lactalbumin in lactating mammary glands changes the preferred acceptor of  $\beta$ GalT-I from GlcNAc to Glc [37]. Interestingly, bovine colostrum contains oligosaccharides such as NeuAc $\alpha$ 2–6Gal $\beta$ 1–4GlcNAc, Gal $\beta$ 1–4(Fuc $\alpha$ 1–3)GlcNAc, and Gal $\beta$ 1–3(Fuc $\alpha$ 1–4)GlcNAc, but their concentrations decrease dramatically to the trace level 7 days after parturition [38,39]. The presence of large oligosaccharides such as H, HS, I, and Is in BS milk strongly suggests that biosynthesis starts from LacNAc as the core structure.

HS milk contained varieties of oligosaccharides having multi-branched core structures (i.e., cores E and F in Table 2). In addition, most oligosaccharides were substituted with different numbers of  $\alpha$ 1–2 Fuc residues at the nonreducing terminal Gal residues. All oligosaccharides in HS milk have LNnH (Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3[Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6]Gal $\beta$ 1–4GlcNAc) as a common core. They are preferentially elongated at the Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3 branch of the LNnH core unit. For example, the core structure having monosaccharide compositions of H6N4 (C in Table 2) has two LacNAc residues on the Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3 branch of LNnH (see Fig. 4B), in contrast to the branching of lacto-*N*-decaose in human milk [40]. Among the  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminyltransferase (GnT) family,  $\beta$ 3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (iGnT), which is a key enzyme for the elongation of LacNAc sequence, prefers type II chain (Gal $\beta$ 1–4Glc/GlcNAc) [41–43]. Urashima and coworkers analyzed small oligosaccharides in HS milk by  $^1$ H NMR spectroscopy and revealed that major oligosaccharides contained only type II chains [14]. The addition of Gal $\beta$ 1–4 residue to terminal GlcNAc provides the preferable acceptor for iGnT enzyme. In contrast, HS milk contains multiantennary oligosaccharides (E in Table 2), which have two LacNAc residues on both branches of LNnH, indicating that the Gal residue on the  $\beta$ 1–6 branch of LNnH was substituted followed by modification of the  $\beta$ 1–3 branch of LNnH. iGnT was considered to be less efficient to the longer LacNAc repeats as the acceptors [44]. Furthermore, the efficiency of iGnT may be decreased by the presence of the Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6 branch to the Gal residue of Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3Gal $\beta$ 1–4GlcNAc. In general, the sequence of Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–3Gal $\beta$ 1–4Glc/GlcNAc provides the preferred acceptor for  $\beta$ (1–6)*N*-acetylglucosaminyltransferase (IGnT), which is thought to be a key enzyme for the branching of oligosaccharides [45–47]. It is likely that human milk oligosaccharides preferentially is elongated at the Gal $\beta$ 1–4GlcNAc $\beta$ 1–6 branch of LNnH, and the Gal $\beta$ 1–3GlcNAc $\beta$ 1–3 branch of LNnH does not receive further modification with LacNAc [6]. The presence of multi-branched oligosaccharides in seal milk suggests that enzyme activities of iGnT and  $\beta$ 4GalTs in seal mammary glands are higher than those in other eutherian mammals.

In this article, we have focused on characterization of the branching pattern of oligosaccharides of high molecular masses in seal milk samples by means of the combination of MALDI-TOF MS and sequential exoglycosidase digestion. Branching is one of the major structural features of carbohydrates, and a relatively simple set of monosaccharides can form various branching configurations. Techniques based on MS/MS were used for the structural

characterization of oligosaccharides. Special emphasis was made so that the combined use of MALDI-TOF MS and sequential exoglycosidase digestion gave unambiguous structural details of multi-branched oligosaccharides, including linkage positions and anomeric configurations.

## Acknowledgment

We thank M.O. Hammill of the Department of Fisheries and Oceans, Canada, for his help with collecting the hooded seal milk.

## References

- [1] T. Feizi, Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens, *Nature* 314 (1985) 53–57.
- [2] T. Osanai, T. Feizi, W. Chai, A.M. Lawson, M.L. Gustavsson, K. Sudo, M. Araki, K. Araki, C.T. Yuen, Two families of murine carbohydrate ligands for E-selectin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 (1996) 610–615.
- [3] T. Feizi, Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity, *Immunol. Rev.* 173 (2000) 79–88.
- [4] M. Podbielska, S.A. Fredriksson, B. Nilsson, E. Lisowska, H. Krotkiewski, ABH blood group antigens in *O*-glycans of human glycoprotein A, *Arch. Biochem. Biophys.* 429 (2004) 145–153.
- [5] A. Kobata, K. Yamashita, Y. Tachibana, Oligosaccharides from human milk, *Methods Enzymol.* 50 (1978) 216–220.
- [6] D.S. Newburgh, S.H. Neubauer, *Handbook of Milk Composition*, Academic Press, San Diego, 1995.
- [7] H. Kogelberg, V.E. Piskarev, Y. Zhang, A.M. Lawson, W. Chai, Determination by electrospray mass spectrometry and  $^1$ H-NMR spectroscopy of primary structures of variously fucosylated neutral oligosaccharides based on the iso-lacto-*N*-octaose core, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1172–1186.
- [8] T. Urashima, S. Asakuma, M. Messer, *Comprehensive Glycoscience*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [9] R. Jenness, E.A. Regehr, R.E. Sloan, Comparative biochemical studies of milk: II. Dialyzable carbohydrates, *Comp. Biochem. Physiol.* 13 (1964) 339–352.
- [10] M. Messer, Identification of *N*-acetyl-4-*O*-acetylneuraminyl-lactose in echidna milk, *Biochem. J.* 139 (1974) 415–420.
- [11] M. Messer, B. Green, Milk carbohydrates of marsupials: II. Quantitative and qualitative changes in milk carbohydrates during lactation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*), *Austral. J. Biol. Sci.* 32 (1979) 519–531.
- [12] J.P. Kamerling, L. Dorland, H. van Halbeek, J.F. Vliegthart, M. Messer, R. Schauer, Structural studies of 4-*O*-acetyl- $\alpha$ -*N*-acetylneuraminyl-(2–3)-lactose, the main oligosaccharide in echidna milk, *Carbohydr. Res.* 100 (1982) 331–340.
- [13] T. Urashima, T. Saito, Y. Tsuji, Y. Taneda, T. Takasawa, M. Messer, Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from tammar wallaby (*Macropus eugenii*) milk, *Biochim. Biophys. Acta* 1200 (1994) 64–72.
- [14] T. Urashima, T. Saito, T. Nakamura, M. Messer, Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals, *Glycoconj. J.* 18 (2001) 357–371.
- [15] T. Urashima, M. Yamamoto, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Namiki, K. Yamaoka, K. Kawahara, Chemical characterization of the oligosaccharides in a sample of milk of a white-nosed coati, *Nasua narica* (Procyonidae: Carnivora), *Comp. Biochem. Physiol. A* 123 (1999) 187–193.
- [16] T. Nakamura, T. Urashima, T. Mizukami, M. Fukushima, I. Arai, T. Senshu, K. Imazu, T. Nakao, T. Saito, Z. Ye, H. Zuo, K. Wu, Composition and oligosaccharides of a milk sample of the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 135 (2003) 439–448.
- [17] T. Urashima, M. Arita, M. Yoshida, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, J.P. Arnould, K.M. Kovacs, C. Lydersen, Chemical characterisation of the oligosaccharides in hooded seal (*Cystophora cristata*) and Australian fur seal (*Arctocephalus pusillus doriferus*) milk, *Comp. Biochem. Physiol. B* 128 (2001) 307–323.
- [18] T. Urashima, T. Nakamura, D. Nakagawa, M. Noda, I. Arai, T. Saito, C. Lydersen, K.M. Kovacs, Characterization of oligosaccharides in milk of bearded seal (*Erignathus barbatus*), *Comp. Biochem. Physiol. B* 138 (2004) 1–18.
- [19] T. Urashima, T. Nakamura, K. Teramoto, I. Arai, T. Saito, T. Komatsu, T. Tsubota, Chemical characterization of sialyl oligosaccharides in milk of the Japanese black bear, *Ursus thibetanus japonicus*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 139 (2004) 587–595.
- [20] T. Urashima, T. Nakamura, K. Yamaguchi, J. Munakata, I. Arai, T. Saito, C. Lydersen, K.M. Kovacs, Chemical characterization of the oligosaccharides in milk of high Arctic harbour seal (*Phoca vitulina vitulina*), *Comp. Biochem. Physiol. A* 135 (2003) 549–563.
- [21] T. Urashima, H. Sato, J. Munakata, T. Nakamura, I. Arai, T. Saito, M. Tetsuka, Y. Fukui, H. Ishikawa, C. Lydersen, K.M. Kovacs, Chemical characterization of the oligosaccharides in beluga (*Delphinapterus leucas*) and Minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) milk, *Comp. Biochem. Physiol. B* 132 (2002) 611–624.
- [22] J. Amano, M. Messer, K. Kobata, Structures of the oligosaccharides isolated from milk of the platypus, *Glycoconj. J.* 2 (1985) 121–135.

- [23] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, G. Sawatzki, Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3755–3762.
- [24] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, G. Sawatzki, Mass spectrometric investigations of human milk oligosaccharides, *Adv. Exp. Med. Biol.* 501 (2001) 279–284.
- [25] V.N. Reinhold, B.B. Reinhold, C.E. Costello, Carbohydrate molecular weight profiling, sequence, linkage, and branching data: ES-MS and CID, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1772–1784.
- [26] W. Morelle, J.C. Michalski, Glycomics and mass spectrometry, *Curr. Pharm. Des.* 11 (2005) 2615–2645.
- [27] W. Chai, V. Piskarev, A.M. Lawson, Negative-ion electrospray mass spectrometry of neutral underivatized oligosaccharides, *Anal. Chem.* 73 (2001) 651–657.
- [28] W. Chai, V. Piskarev, A.M. Lawson, Branching pattern and sequence analysis of underivatized oligosaccharides by combined MS/MS of singly and doubly charged molecular ions in negative-ion electrospray mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 670–679.
- [29] J.E. Hodge, B.T. Hofreiter, Determination of reducing sugars and carbohydrates, *Methods Carbohydr. Chem.* 1 (1962) 308–394.
- [30] K.R. Anumula, S.T. Dume, High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid, *Glycobiology* 8 (1998) 685–694.
- [31] M. Nakano, K. Kakehi, M.H. Tsai, Y.C. Lee, , Detailed structural features of glycan chains derived from  $\alpha$ 1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues, *Glycobiology* 14 (2004) 431–441.
- [32] R. Naka, S. Kamoda, A. Ishizuka, M. Kinoshita, K. Kakehi, Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 88–97.
- [33] T. Saito, T. Itoh, S. Adachi, Presence of two neutral disaccharides containing N-acetylhexosamine in bovine colostrum as free forms, *Biochim. Biophys. Acta* 801 (1984) 147–150.
- [34] T. Saito, T. Itoh, S. Adachi, Chemical structure of three neutral trisaccharides isolated in free form from bovine colostrum, *Carbohydr. Res.* 165 (1987) 43–51.
- [35] T. Urashima, Y. Kusaka, T. Nakamura, T. Saito, N. Maeda, M. Messer, Chemical characterization of milk oligosaccharides of the brown bear, *Ursus arctos yesoensis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1334 (1997) 247–255.
- [36] K. Brew, T.C. Vanaman, R.L. Hill, The role of  $\alpha$ -lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59 (1968) 491–497.
- [37] B. Rajput, N.L. Shaper, J.H. Shaper, Transcriptional regulation of murine  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase in somatic cells: analysis of a gene that serves both a housekeeping and a mammary gland-specific function, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5131–5142.
- [38] D.T. Davis, C. Holt, W.W. Christie, *Biochemistry of Lactation*, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- [39] P.K. Gopal, H.S. Gill, Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrums, *Br. J. Nutr.* 84 (Suppl. 1) (2000) S69–S74.
- [40] S. Haeuw-Fievre, J.M. Wieruszkeski, Y. Plancke, J.C. Michalski, J. Montreuil, G. Strecker, Primary structure of human milk octa-, dodeca-, and tridecasaccharides determined by a combination of  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry: Evidence for a new core structure, the *para*-lacto-N-octaose, *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 361–371.
- [41] H. Kawashima, K. Yamamoto, T. Osawa, T. Irimura, Purification and characterization of UDP-GlcNAc:Gal $\beta$ 1–4Glc(NAc)  $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (poly-N-acetyllactosamine extension enzyme) from calf serum, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 27118–27126.
- [42] F. Piiller, J.P. Cartron, UDP-GlcNAc:Gal $\beta$ 1–4Glc(NAc)  $\beta$ 1–3-N-acetylglucosaminyltransferase: identification and characterization in human serum, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 12293–12299.
- [43] D.H. van den Eijnden, A.H. Koenderman, W.E. Schiphorst, Biosynthesis of blood group i-active polylectosaminoglycans: partial purification and properties of an UDP-GlcNAc:N-acetyllactosaminide  $\beta$ 1–3-N-acetylglucosaminyltransferase from Novikoff tumor cell ascites fluid, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 12461–12471.
- [44] M. Ujita, A.K. Misra, J. McAuliffe, O. Hindsgaul, M. Fukuda, Poly-N-acetyllactosamine extension in N-glycans and core 2- and core 4-branched O-glycans is differentially controlled by i-extension enzyme and different members of the  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase gene family, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15868–15875.
- [45] G.Y. Chen, N. Kurosawa, T. Muramatsu, A novel variant form of murine  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase forming branches in poly-N-acetyllactosamines, *Glycobiology* 10 (2000) 1001–1011.
- [46] N. Inaba, T. Hiruma, A. Togayachi, H. Iwasaki, X.H. Wang, Y. Furukawa, R. Sumi, T. Kudo, K. Fujimura, T. Iwai, M. Gotoh, M. Nakamura, H. Narimatsu, A novel i-branching  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase involved in human blood group I antigen expression, *Blood* 101 (2003) 2870–2876.
- [47] A.D. Magnet, M. Fukuda, Expression of the large I antigen forming  $\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in various tissues of adult mice, *Glycobiology* 7 (1997) 285–295.
- [48] B. Domon, C.E. Costello, Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry, *Biochemistry* 27 (1988) 1534–1543.

日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験への  
キャピラリー電気泳動法の適用について梶 直孝,<sup>a</sup> 木下充弘,<sup>a</sup> 川崎ナナ,<sup>b</sup> 山口照英,<sup>b</sup> 早川堯夫,<sup>c</sup> 掛樋一晁\*,<sup>a</sup>Capillary Electrophoresis Analysis of Contaminants in Heparin Sodium  
for the Japanese Pharmacopoeia Purity TestNaotaka KAKOI,<sup>a</sup> Mitsuhiro KINOSHITA,<sup>a</sup> Nana KAWASAKI,<sup>b</sup>  
Teruhide YAMAGUCHI,<sup>b</sup> Takao HAYAKAWA,<sup>c</sup> and Kazuaki KAKEHI\*,<sup>a</sup><sup>a</sup>Department of Biopharmaco Informatics, School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan, <sup>b</sup>Division on Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, and <sup>c</sup>Pharmaceutical Research and Technology, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

(Received June 6, 2009; Accepted July 6, 2009; Published online July 7, 2009)

Heparin is widely used as an anticoagulant for the treatment and prevention of thrombotic disorders. Recently, hundreds of cases of anaphylactic reaction as adverse effects were reported by the presence of contaminating oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) in some heparin preparations. In addition, these heparin preparations often contaminated dermatan sulfate (DS). Unfortunately, the Japanese Pharmacopoeia (JP) does not include appropriate purity tests. In the present paper, we show that capillary electrophoresis (CE) is a powerful tool for the analysis of OSCS and DS in heparin preparations. CE method shows high resolution and good quantification of OSCS in heparin preparations. This method (OSCS method) was evaluated for accuracy (93.7%), repeatability (R.S.D.=2.11), linearity ( $R^2=0.9996$ ), detection limit (0.1% OSCS) and specificity. In contrast, DS was not able to be detected in high sensitivity by OSCS method. However, a modified CE method (DS method) using the buffer at lower pHs showed good parameters for accuracy (88.1%), repeatability (R.S.D.=1.99), linearity ( $R^2=0.9998$ ), detection limit (0.25% DS) and specificity. In conclusion, CE will be an alternative to the NMR method which is being adopted for purification test of heparin sodium in the present version of JP.

**Key words**—capillary electrophoresis; heparin sodium; oversulfated chondroitin sulfate; dermatan sulfate

## 緒 言

ヘパリンナトリウムは、ウロン酸 (L-イズロン酸または D-グルクロン酸) と D-グルコサミンの 2 糖単位の繰り返し構造に、2 糖あたり平均 2-3 個の硫酸基を持つ構造からなる硫酸化グリコサミノグリカンのナトリウム塩である [Fig. 1(a)]. ヘパリンナトリウムは、アンチトロンビンⅢと特異的に結合することにより、第Ⅱa 因子や第Ⅹa 因子などの血液凝固因子を阻害し血液凝固防止作用を示す。<sup>1,2)</sup> そのため、血液透析などの体外循環装置使用時の血液凝固防止剤として世界中で汎用されるなど、臨床上

極めて重要な医薬品であり、第 15 改正日本薬局方に収載されている。また、低分子量ヘパリン製剤の原料としても使用されている。<sup>3)</sup>

2007 年 12 月米国において、Baxter 社製ヘパリンナトリウム製剤の静脈内急速大量投与を受けた患者に、血圧低下や頻脈等を伴うアレルギー反応が頻発し、80 名以上の死亡例が報告された。<sup>4)</sup> これまでヘパリン関連製剤に関して、血小板減少症などの副作用が知られていたが、今回発生した副作用はこれまでの報告例とは明らかに異なるものであった。さらに、ドイツでも別メーカーが製造したヘパリンナトリウム製剤の投与を受けた患者に同様のアレルギー反応がみられたことから国際的な問題へと発展した。2008 年 3 月、米国食品医薬品局 (FDA) は有害事象が多発したロットにヘパリン様物質が混入してい

<sup>a</sup>近畿大学薬学部生物情報薬学研究室, <sup>b</sup>国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部, <sup>c</sup>近畿大学薬学総合研究所  
\*e-mail: k\_kakehi@phar.kindai.ac.jp

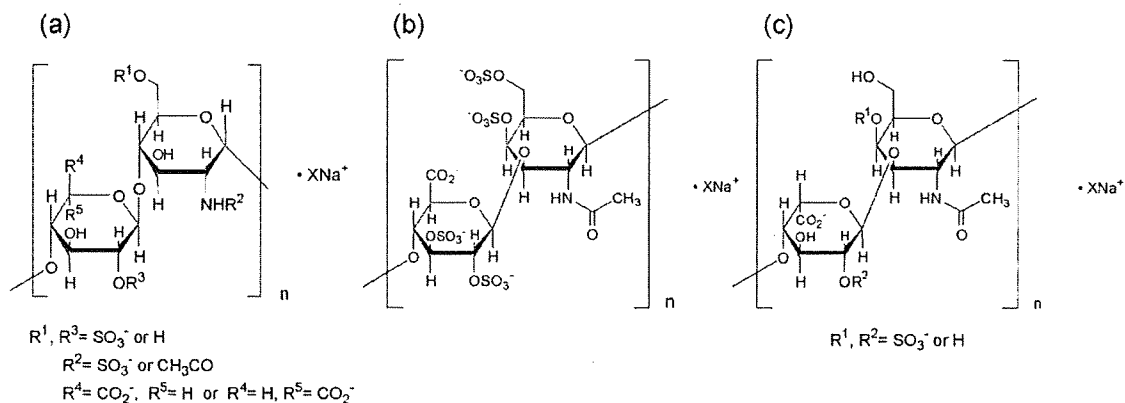


Fig. 1. Structures of the Disaccharide Unit of Glycosaminoglycans Tested in the Present Study  
(a) Heparin sodium, (b) oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) and (c) dermatan sulfate (DS).

ることを発表し,<sup>5)</sup>のちに Guerrini らによる 2 次元 NMR などを用いる構造解析によって、このヘパリン様物質は過硫酸化コンドロイチン硫酸 (oversulfated chondroitin sulfate; OSCS) であることが明らかにされた。<sup>6)</sup> 通常、天然に存在するコンドロイチン硫酸は、D-グルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンの 2 糖単位に、硫酸基が 1–3 個結合している。しかし、問題のヘパリンナトリウム製剤に混入していた OSCS は、コンドロイチン硫酸中のすべての水酸基が硫酸化され、2 糖単位中に硫酸基が 4 個結合した構造であった [Fig. 1(b)]。また、有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウム中には、OSCS に加えて、同じ硫酸化グリコサミノグリカン類の一種であるデルマタン硫酸 (dermatan sulfate; DS, 別名; コンドロイチン硫酸 B) [Fig. 1(c)] も、従来の製品よりも多量に含まれていることが明らかにされた。

FDA は、有害事象の原因物質として OSCS を特定したことを発表するとほぼ同時に、<sup>1)H</sup>-核磁気共鳴スペクトル測定法 (<sup>1)H</sup>-NMR) とキャピラリー電気泳動法を用いる OSCS の検出法をインターネット上に公開した。<sup>7,8)</sup> <sup>1)H</sup>-NMR は、ヘパリンナトリウム中の N-アセチルグルコサミンの N-アセチル基と、OSCS 中の N-アセチルガラクトサミンの N-アセチル基の化学シフトが異なることを利用する検出法である。また、キャピラリー電気泳動法はヘパリンナトリウムと OSCS の硫酸基の結合数の違いを利用する分離分析をもとにする検出法である。さらに、陰イオン交換カラムを用いる HPLC 法や、単糖組成分析法、Inhibition of Taq polymerase 法など

による OSCS 検出法が次々に報告された。<sup>9-11)</sup> 各国は、これらの検出法を用いてヘパリンナトリウム製剤の分析を行うとともに、OSCS の存在が確認されたヘパリンナトリウム製剤の回収を行う等の対応をとった。わが国でも、問題のヘパリンナトリウム製剤と同じ SPL 社の原薬を使用した国内 3 社が予防的措置として自主回収を行った。そのため、世界的にヘパリン関連医薬品の供給不足への懸念が広がり、ヘパリンナトリウム製剤の安定供給のために、ヘパリンナトリウム原料中の OSCS 及び DS の試験法の整備が緊急課題となった。

問題発生時、第 15 改正日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウムの項には、バリウムやタンパク質などに関する純度試験が規定されていたが、記載されている試験法では OSCS 混入の有無を評価することができない。そこでわが国においても FDA が公開した試験法を参考に、<sup>1)H</sup>-NMR 及びキャピラリー電気泳動法による日本薬局方への適用を目的とした分析法バリデーションが行われた。<sup>12,13)</sup> その結果、官報号外第 166 号 (平成 20 年 7 月 31 日) において、「ヘパリンナトリウムに関する日本薬局方の一部改正に伴う取り扱いについて」として、<sup>1)H</sup>-NMR を用いる OSCS の限度試験が導入されることとなった。なお、今回の改正では、キャピラリー電気泳動法による試験の導入は見送られた。その理由として、FDA が公開したキャピラリー電気泳動法の条件は、ヘパリンナトリウムと OSCS のピーク分離が不十分であり、OSCS 検出の特異性や検出感度に問題があったためである。<sup>13)</sup> しかし、キャピラリー電気泳動法はルーチン分析に適した分

析法であり、またヘパリンナトリウム中の OSCS や DS を検出できる数少ない分析法の 1 つであることなどからその価値は高く、米国薬局方ではヘパリンナトリウム確認試験に、また、欧州薬局方ではヘパリンナトリウムの製造部分の試験法に採用されている。

本研究では、ヘパリンナトリウム製剤の品質・安全性確保を目的として、キャピラリー電気泳動法による試験法を確立すると共に、分析法バリデーションを実施し、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験としての適用可能性を検証した。

## 実験方法

1. 試料及び試薬 ヘパリンナトリウムは日本薬局方ヘパリンナトリウム標準品を使用した。OSCS は日本薬局方過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品を使用した。なお、分析条件の検討には、生化学用ヘパリン (Sigma 社製、ブタ腸粘膜由来) を使用した。DS (ブタ皮膚由来) は生化学工業㈱から購入した。OSCS を含有するヘパリンナトリウム製剤原料は日本バルク薬品㈱より供与を受けた。その他の試薬は特級品、あるいは HPLC グレードを使用した。本試験に用いた水は、MILLIPORE Direct-Q により調製後、直ちに使用した。

2. 試験標準溶液 ヘパリンナトリウムを水に溶解し、ヘパリンナトリウム標準溶液 (20 mg/ml) とした。また、OSCS 及び DS は水に溶解し、それぞれ OSCS 標準溶液 (4 mg/ml) 及び DS 標準溶液 (4 mg/ml) を調製した。各試験ではこれらの標準溶液を用い、分析能パラメーター評価用試験溶液の濃度に調整後試験に用いた。なお、これらの標準溶液はあらかじめポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$  の酢酸セルロース製メンブランフィルターによりろ過した後、試験に供した。

3. 分析条件 キャピラリー電気泳動装置として Beckman P/ACE MDQ Glycoprotein System を用いた。キャピラリーカラムは 0.1 M 水酸化ナトリウムで 10 分間、続いて 10 分間水で洗浄し、3 回の空試験を行った後に試験に使用した。キャピラリーカラムは分析毎に、水で 4 分間、泳動用緩衝液で 4 分間洗浄した。

1) FDA method: キャピラリーカラムはフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences 社製、内径 50

$\mu\text{m}$ 、有効長 56 cm) を用いた。電気泳動用緩衝液 [36 mM Sodium phosphate buffer (pH3.5)] は、リン酸二水素一ナトリウム一水和物 1.0 g を水 195 ml に溶解し、リン酸で pH を 3.5 に調整した後、水を加えて 200 ml とし、ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$  の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過後、脱気して用いた。検出は、紫外部吸収検出 (200 nm) により行った。印加電圧は 30 kV で、試料導入側を陰極、廃液側を陽極として電気泳動した。分析温度は 25°C とした。試料は加圧法 (0.7 psi) により 30 秒間導入した。

2) OSCS method: キャピラリーカラムはフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences 社製、内径 25  $\mu\text{m}$ 、有効長 20 cm) を用いた。電気泳動用緩衝液 [1000 mM Tris-phosphate buffer (pH3.5)] は、トリス 30 g を水 200 ml に溶解し、リン酸で pH を 3.5 に調整した後、水を加えて 250 ml とし、ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$  の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過後、脱気して用いた。検出は紫外部吸収検出 (200 nm) により行った。電流値を 50  $\mu\text{A}$  に設定し、試料導入側を陰極、廃液側を陽極として電気泳動した。分析温度は 25°C とした。試料注入は加圧法 (3.0 psi) により 30 秒間導入した。

3) DS method: キャピラリーカラムはフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences 社製、内径 50  $\mu\text{m}$ 、有効長 20 cm) を用いた。電気泳動用緩衝液 [100 mM Tris-phosphate buffer (pH2.5)] は、トリス 3.0 g を水 200 ml に溶解し、リン酸で pH を 2.5 に調整した後、水を加えて 250 ml とし、ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$  の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過後、脱気して用いた。検出は紫外部吸収検出 (200 nm) により行った。電流値を 80  $\mu\text{A}$  に設定し、試料導入側を陰極、廃液側を陽極として電気泳動した。分析温度は 25°C とした。試料注入は加圧法 (0.7 psi) により 30 秒間導入した。

4. 分析能パラメーターの評価 キャピラリー電気泳動装置として Beckman P/ACE MDQ Glycoprotein System を用いて試験を実施し、Beckman 32 Karat Gold Software Version 7.0 を用いてピーク面積値を算出した。ピーク面積値は最小ピーク幅設定値を 2 秒とし、OSCS 及び DS のピーク開始点とピーク終了点を結ぶ傾斜線をベースラインとして検出されるピークの積算値から求めた。

**4-1. OSCS** ヘパリンナトリウム標準溶液 (20 mg/ml) 0.8 ml に、OSCS 標準溶液 (4 mg/ml) をそれぞれ 0.004, 0.01, 0.02, 0.04, 0.2 及び 0.4 ml を添加し、ついで水を 0.796, 0.79, 0.78, 0.76, 0.6 及び 0.4 ml 加えて混和し、ヘパリンナトリウムに対して OSCS がそれぞれ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 及び 10.0% (w/w) 含む溶液とした。これらの溶液を分析能パラメーター評価用試験溶液とし、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。

真度、併行精度及び室内再現精度は、5.0% OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて各 6 回分析を行い、OSCS のピーク面積値を用いて算出した。特異性は 10% OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた。検出限界及び定量限界は 0.1–5.0% の OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を、直線性及び範囲は 0.1–10.0% の OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた。

**4-2. DS** ヘパリンナトリウム標準溶液 (20 mg/ml) 0.4 ml に、DS 標準溶液 (4 mg/ml) をそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 及び 0.2 ml を添加し、ついで水を 0.395, 0.39, 0.38, 0.35, 0.3 及び 0.2 ml 加えて混和し、ヘパリンナトリウムに対して DS がそれぞれ 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 及び 10.0% (w/w) 含む溶液とした。これらの溶液を分析能パラメーター評価用試験溶液とし、キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。

真度、併行精度及び室内再現精度は、5.0% DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて各 6 回分析を行い、DS のピーク面積値を用いて算出した。特異性は 5.0% DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた。検出限界及び定量限界は 0.25–5.0% の DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を、直線性及び範囲は 0.25–10.0% の DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた。

## 結 果

### 1. OSCS

**1-1. OSCS の分析条件** FDA がホームページ上に公開したキャピラリー電気泳動法による OSCS のスクリーニング方法 (FDA method) を参考にして、<sup>9)</sup> 10% (w/w) の濃度で OSCS を添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した。その結果、ヘパリ

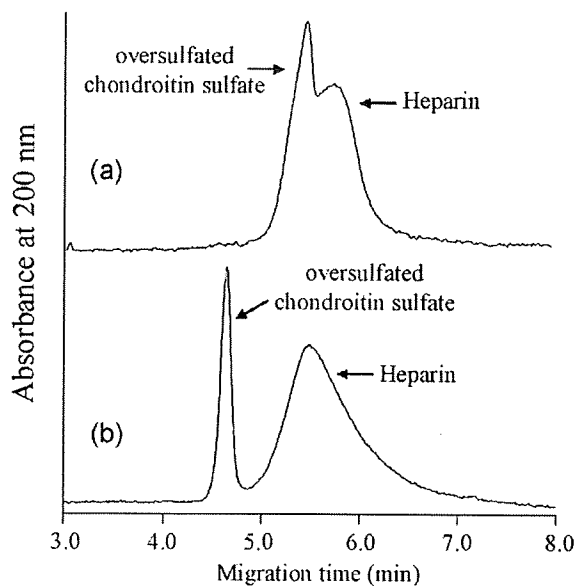


Fig. 2. Capillary Electrophoresis Analysis of 10% (w/w) OSCS Spiked Heparin  
(a) FDA method and (b) OSCS method.

ンナトリウムに由来するピークは 5.8 分に泳動され、OSCS に由来するピークは 5.5 分に観察された [Fig. 2(a)]。両者を識別することは可能であったが、ヘパリンナトリウム由来のピークと OSCS 由来のピークの分離は不完全であり、OSCS 検出に対する特異性は低かった。したがって、FDA method を用いる試験法の分析能パラメーターは、真度 (添加回収率) が 41% (R.S.D.=2.18%) であった。検出限界は 1.5% であり、<sup>1)H-NMR</sup> による OSCS 分析の分析能パラメーターと比べ低い値を示した (Table 1)。<sup>12,13)</sup> なお、FDA method の併行精度は 1.36% となり、室内再現精度は 2.17% となったことから、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離を改善できれば、日本薬局方の純度試験として十分に採用できると考えられた。そこで、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離の向上を目指し分析条件を検討した。

最近、Somsen らや Wielgos らは、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離の改善例として、高い塩濃度の泳動緩衝液を用いる方法を紹介しており、高濃度緩衝液中では試料イオンがスタッキング効果により濃縮され、ピーク幅が縮小するためヘパリンナトリウムと OSCS の分離が向上することを報告している。<sup>14,15)</sup> 一方、緩衝液中の塩濃度が高くなると、泳動時の電流値が高値になり分析が安定せず、発熱

Table 1. Validation Characteristics for OSCS Analysis by Capillary Electrophoresis and <sup>1</sup>H-NMR

Validation characteristics	Capillary electrophoresis		<sup>1</sup> H-NMR*2
	OSCS method	FDA method*1	
Accuracy	93.7% (R.S.D.=3.83%)	41% (R.S.D.=2.18%)	98.3% (R.S.D.=4.63%)
Precision			
Repeatability	2.11%	1.36%	1.6%
Intermed. precision	2.45%	2.17%	—
Specificity		Fig. 2b	High
Detection limit	0.1% (w/w)	1.5% (w/w)	0.35% (w/w)
Quantification limit	0.25% (w/w)	1.5% (w/w)	0.4% (w/w)
Linearity	$y=16992x+3601.6$ ( $R^2=0.9996$ )	$y=36663x-367.14$ ( $R^2=0.9758$ )	$y=0.0909x-0.064$ ( $R^2=0.9991$ )
Range	0.1–10.0% (w/w)	1.5–10.0% (w/w)	0.4–10.0% (w/w)

\*1 and \*2, from the reports by Hashii *et al.*<sup>12)</sup> and Kakehi *et al.*<sup>13)</sup> respectively.

により安定した電気泳動が困難となる。これらの問題を解決するために、キャピラリーの内径を 50 μm から 25 μm に変更して電気泳動中に流れる電流量を抑制し、さらに用いる塩を比較的電気伝導度が低いトリスに変更することで電流値を抑制した。本条件では、高濃度塩、低 pH の緩衝液を使用するため、緩衝能の低下の恐れがあるが、繰り返し分析でも高い再現性を与え分析上問題はなかった (data not shown)。加えて、安定に電気泳動するために定電流モード (50 μA) で泳動することとした。また検出に関しては、ヘパリンナトリウムはアセチル基の含有率が低いため紫外外部吸収では高い感度を示さないことが知られている。しかし、200 nm の紫外外部吸収で検討したところ、ヘパリンナトリウムはオンカラム検出により特に問題はなく検出できた。さらにアセチル基を有する OSCS や DS などの不純物を高感度で検出できるため、純度試験として十分適用できる。以上のことから、本試験では 200 nm の紫外外部検出を用いることとした。

以上の検討により設定した条件 (OSCS method) を用いて、OSCS を 10% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した。その結果、ヘパリンナトリウム由来するピークは 5.5 分に観察され、OSCS に由来するピークは 4.6 分に観察された [Fig. 2 (b)]。FDA method により測定した結果 [Fig. 2 (a)] と比較すると、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離が格段に向上した。分離が向上した要因として、Somsen らや Wielgos らが報告した高濃度緩衝液中での試料イオンのスタッキング効果

や、<sup>14,15)</sup> 泳動緩衝液に用いたトリスが、カウンターイオンとして試料イオンと良好な相互作用を示したことなどが考えられる。また、キャピラリーの有効長を 20 cm に短縮しても十分な分離を達成でき、Somsen らの報告の半分の時間で分析が完了した。<sup>14)</sup>

**1-2. OSCS 試験の分析法バリデーション** 前項において設定した OSCS method を用いて、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験への適用を検討した。分析法バリデーションは、日本薬局方「参考情報」に記載されている方法にしたがい、7つの分析能パラメーター (真度、精度、特異性、検出限界、定量限界、直線性、範囲) を求めることで試験法の妥当性を評価した。

**1-2-1. 特異性** OSCS を 10% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を試験溶液として測定した結果、ヘパリンナトリウム由来するピークは 5.5 分をピーク頂点とし 5.0–7.0 分に泳動され、OSCS に由来するピークが 4.6 分をピーク頂点として泳動された [Fig. 2 (b)]。ヘパリンナトリウム由来のピークと OSCS 由来のピークは良好な分離を示し (分離度  $R_s=1.2$ )、両者を容易に識別できた。

**1-2-2. 検出限界及び定量限界** 0.1–5.0% (w/w) になるように OSCS の濃度を調製したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、OSCS method の検出限界及び定量限界を求めた。その結果、Fig. 3 に示すように 0.1% の OSCS を含む試験溶液でも、S/N 比 5 以上の感度で OSCS 由来のピークを検出できた。よって OSCS method は、ヘパリンナトリウ

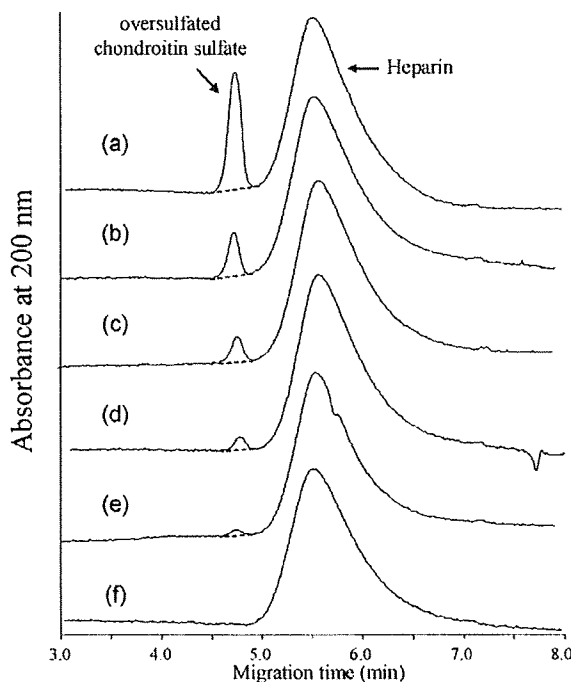


Fig. 3. Lower Limit of Detection of OSCS in the Presence of Heparin

Samples were analyzed at (a) 5.0%, (b) 1.0%, (c) 0.5%, (d) 0.25%, (e) 0.1% and (f) 0% OSCS spiked heparin. OSCS method was used for all analyses.

中に混入した 0.1% (w/w) の OSCS を検出できる試験法であることがわかった。また、ヘパリンナトリウム中の 0.25% (w/w) の OSCS を含む試験溶液において、OSCS 由来のピークを S/N 比 10 以上の感度で検出できたため、本試験法の定量限界とした。

**1-2-3. 直線性、範囲** 0.1–10.0% (w/w) になるように OSCS の濃度を調整したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、OSCS method の直線性を評価した。その結果、OSCS のピーク面積値は、0.1–10.0% (w/w) の範囲で優れた直線性が確認され、その相関係数は 0.9996 であった (Table 1)。

**1-2-4. 真度及び精度** 5.0% (w/w) の OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、添加回収実験を行い OSCS method における真度を評価した。その結果、添加回収率は 93.7% (R.S.D.=3.83%) であった。FDA method での真度は、41% (R.S.D.=2.18%) であったことから (Table 1)、著しい回収率の向上がみられた。よって OSCS method は高い真度を有する試験法であると言える。

また、同じ試験溶液を用いて OSCS method の精度の評価を行った。OSCS ピーク面積値の併行精度 (1 試験日、6 回測定) の R.S.D. は 2.11% であった。一方、室内再現精度 (3 試験日、各 6 回測定) の R.S.D. は 2.45% であった (Table 1)。併行精度並びに室内再現精度ともに、優れた R.S.D. 値を示した。

## 2. DS

**2-1. DS の分析条件** 前節で設定した OSCS method を用いて、5.0% (w/w) の DS を添加したヘパリンナトリウム溶液を分析したところ、DS に由来するピークは、6.4 分をピーク頂点とし、6.0–7.0 分にかけてブロードなピークとして観察された [Fig. 4(a)]。DS 由来のピークは広がって観察されるため、検出限界は 1.0% (w/w) と <sup>1</sup>H-NMR による試験法や、FDA method を用いるキャピラリー電気泳動法による試験法と比べても、十分な感度を有する試験法とは言えず (Table 2)、OSCS 検出を目的に最適化したキャピラリー電気泳動法の条件では、DS を高感度に検出することは難しい。

そこで、泳動緩衝液の pH について検討したところ、pH2.5 の緩衝液を用いることにより、DS 由来のピークを高い理論段数 (N=1190) で観察することができ、OSCS method の結果 (N=470) と比較して良好な分離能を示した。以上の検討により設定した DS method により、DS を 5.0% (w/w) の濃度で添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した結果、DS は 4.4 分をピーク頂点とした、シャープなピークとして観察され、3.2 分に観察されたヘパリンナトリウムのピークと良好に分離された [Fig. 4(b)]。

## 2-2. DS 試験の分析法バリデーション

**2-2-1. 特異性** DS を 5.0% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を試験溶液として測定した結果、ヘパリンナトリウムに由来するピークは 3.2 分をピーク頂点とし 2.7–4.3 分に泳動され、DS に由来するピークが 4.4 分をピーク頂点として泳動された [Fig. 4(b)]。ヘパリンナトリウム由来のピークと DS 由来のピークは良好な分離を示し (分離度  $R_s=1.3$ )、両者を容易に識別できた。

**2-2-2. 検出限界及び定量限界** 0.25–5.0% (w/w) になるように DS を添加したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、DS method の検出限界及



び定量限界を確認した。その結果, Fig. 5 に示すように 0.25% の DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液において S/N 比 5 以上の感度で DS 由来のピークを検出できた。また, ヘパリンナトリウム中の 0.5% (w/w) の DS を含む試験溶液において, DS 由来のピークを S/N 比 10 以上の感度で検出できたため, 本試験法の定量限界とした。

**2-2-3. 直線性, 範囲** 0.25–10.0% (w/w) になるように DS を添加したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて, DS method の直線性を評価した。その結果, DS のピーク面積は, 0.25–10.0% (w/

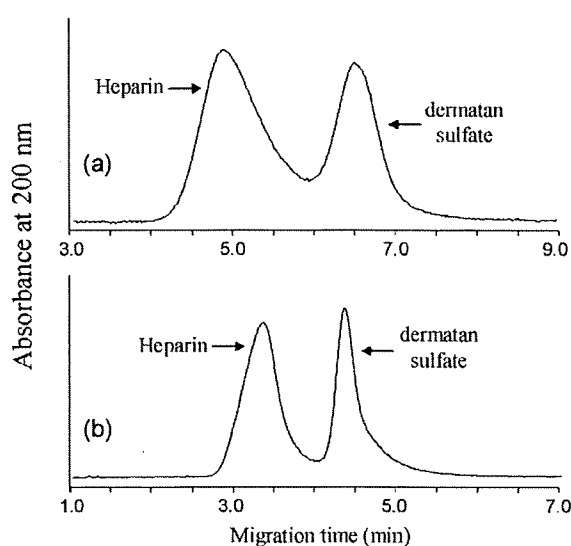


Fig. 4. Capillary Electrophoresis Analysis of 5.0% (w/w) DS Spiked Heparin  
(a) OSCS method and (b) DS method.

w) の範囲で優れた直線性が確認され, その相関係数は 0.9998 であった (Table 2)。

**2-2-4. 真度及び精度** 5.0% (w/w) の濃度になるように DS を添加したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて, 添加回収実験により真度を評価した。その結果, 添加回収率は 88.1% (R.S.D.=2.13

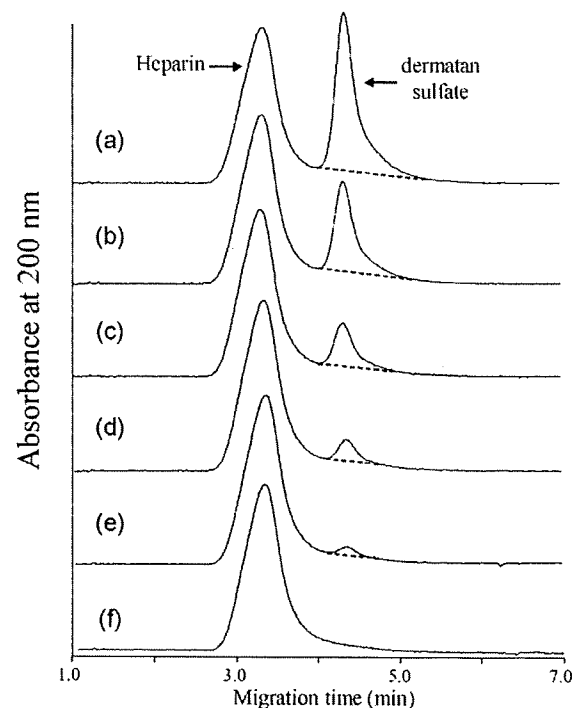


Fig. 5. Lower Limit of Detection of DS in the Presence of Heparin

Samples were analyzed at (a) 5.0%, (b) 2.5%, (c) 1.0%, (d) 0.5%, (e) 0.25% and (f) 0% DS spiked heparin. DS method was used for all analyses.

Table 2. Validation Characteristics for DS Analysis by Capillary Electrophoresis and  $^1\text{H-NMR}$

Validation characteristics	Capillary electrophoresis		$^1\text{H-NMR}^{*2}$
	DS method	FDA method <sup>*1</sup>	
Accuracy	88.1% (R.S.D.=2.13%)	82% (R.S.D.=1.78%)	102.6% (R.S.D.=3.99%)
Precision			
Repeatability	1.99%	2.15%	1.5%
Intermed. precision	2.43%	2.48%	—
Specificity	Fig. 4b		fair
Detection limit	0.25% (w/w)	1.0% (w/w)	0.35% (w/w)
Quantification limit	0.5% (w/w)	1.0% (w/w)	0.6% (w/w)
Linearity	$y=135944x-2904.9$ ( $R^2=0.9998$ )	$y=16938x-9357.2$ ( $R^2=0.9991$ )	$y=0.08534x-0.0113$ ( $R^2=0.9991$ )
Range	0.25–10.0% (w/w)	1.0–10.0% (w/w)	0.6–18.7% (w/w)

<sup>\*1</sup> and <sup>\*2</sup>, from the reports by Hashii *et al.*<sup>12)</sup> and Kakehi *et al.*<sup>13)</sup> respectively.

%)であった。

また、同じ試験溶液を用いて精度の評価を行った。DSピーク面積値の併行精度(1試験日、6回測定)のR.S.D.は1.99%であった。一方、室内再現精度(3試験日、各6回測定)のR.S.D.は2.43%であった。併行精度並びに室内再現精度ともに、優れたR.S.D.値を示した。

3. 有害ロットのヘパリンナトリウム製剤原料の分析 前節までに検討した3種類の条件で、実際に有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウム製剤原料の分析を行った。FDA methodでは、6.2分にヘパリンナトリウムのピークが、6.0分にOSCSのピークが観察された[Fig. 6(a)]。両者の識別は可能であったが分離は不十分であった。次に、OSCS methodにて分析した結果、ヘパリンナトリウムのピークは5.7分付近に、OSCSのピークは4.3分付近に観察され良好な分離を示した[Fig. 6(b)]。また、DS methodで分析した結果、ヘパリンナトリウムのピークは3.2分付近に、OSCSのピークは2.6分付近に観察された[Fig. 6(c)]。このヘパリンナトリウム製剤原料中にOSCSが8.6% (w/w) 混入していると算出された。一方、本製剤原料中にはDS由来のピークは観察されなかった。

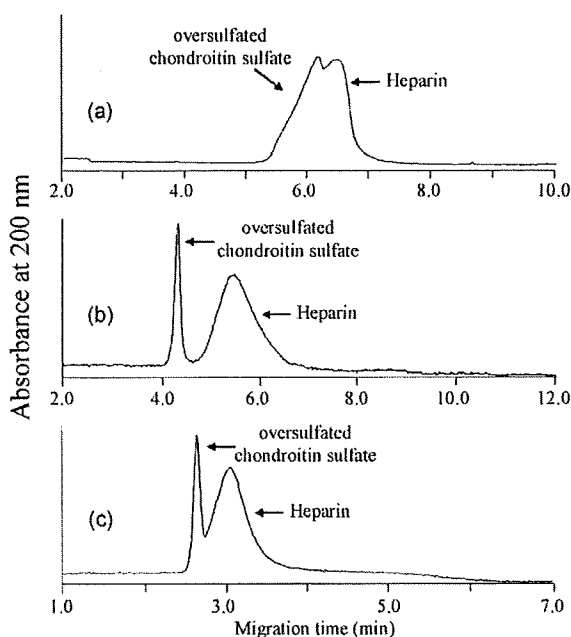


Fig. 6. Capillary Electrophoresis Analysis of Contaminated Heparin Sodium Preparation  
(a) FDA method, (b) OSCS method and (c) DS method.

## 考 察

1. OSCS キャピラリー電気泳動法を日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験に用いるためには、OSCSを特異的に検出できる分析条件を設定する必要がある。高濃度の塩を含有する泳動緩衝液(1000 mM Tris-phosphate buffer)を用いる条件を検討し(OSCS method)、ヘパリンナトリウムとOSCSを良好に分離できた(Fig. 2)。さらにOSCS methodは、キャピラリーの有効長を短縮しても十分な分離を達成できたことから、これまでに報告されたキャピラリー電気泳動法によるOSCS検出や、<sup>14)</sup> Trehyらの報告した陰イオン交換カラムを用いるHPLC法によるOSCS検出と比べても、<sup>9)</sup> 高いスループットを備えた分析法といえる。

本分析法はOSCS検出に対して高い特異性を有し[Fig. 2(b)]、ヘパリンナトリウム中に混入した0.1% (w/w)のOSCSを検出できた(Fig. 3)。また、真度(添加回収率: 93.7%)や併行精度(R.S.D.=2.11%)、室内再現精度(R.S.D.=2.45%)も良好であり、優れた直線性( $R^2=0.9996$ )を示した(Table 1)。これらの結果から、OSCS methodは、ヘパリンナトリウム中のOSCS含量が0.1% (w/w)以下であることを保証する限度試験として、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験に適用できる試験法であると判断される。

OSCSは今回の有害事象の原因物質であり、また製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム製剤中に検出されるべきではない。したがって、ヘパリンナトリウム中に混入したOSCSの検出感度ができる限り高い試験法を用いることが望ましい。今回の事件を受けて、日本薬局方に規定された<sup>1)</sup>H-NMRによるOSCS試験の検出限界は0.35% (w/w)である。<sup>12)</sup> OSCS methodによるキャピラリー電気泳動法は、<sup>1)</sup>H-NMRによる試験法を上回る検出感度を有している。そのため、キャピラリー電気泳動法によるOSCS試験は日本薬局方各条純度試験として有用であると評価できる。

2. DS OSCS methodでは、DS由来のピークがブロードに観察されることから、ヘパリンナトリウム中の微量のDSを高い特異性で検出することが難しい[Fig. 4(a)]。そこでDSの感度向上を目

的とした条件 (DS method) を検討した。その結果、DS とヘパリンナトリウムを良好に分離でき、併行精度 (R.S.D.=1.99%)、室内再現精度 (R.S.D.=2.45%)、真度 (添加回収率: 88.1%) を与える分析条件を設定することができた (Table 2)。DS method は 0.25—10.0% (w/w) の範囲で高い直線性 ( $R^2=0.9998$ ) が確認されたことから、DS 検出に高い特異性と定量性を有した試験法であることがわかった。以上の結果から、キャピラリー電気泳動法による DS 分析は、ヘパリンナトリウム中の DS の混入が 0.25% 以下であることを保証する限度試験として日本薬局方の純度試験法に採用可能であると判断される。

今回の問題を受けて、米国薬局方に規定された  $^1\text{H-NMR}$  による試験法では、500 MHz の装置を用いている。この際の DS の検出限界は 0.35% である。一方で、国内の多くの製薬企業が設置している 400 MHz 以下の NMR 装置を用いる DS 試験では、特異性や検出限界などに問題が残されている。<sup>12)</sup> よって、DS に関して高い特異性と検出限界を有するキャピラリー電気泳動法は有用な試験法であり、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験に適した試験法と言える。

現在、臨床で使用されているヘパリン関連製剤や、同じグリコサミノグリカン類を原料とするヒアルロン酸製剤中に、一定量の DS が混入しているという報告がみられる。<sup>16,17)</sup> そのため製剤中への DS 混入の規制の必要性については、DS はヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制すべきとする意見と、これまでに毒性等の報告がなく純度試験等により規制する必要はないとする意見があり、国際的にも見解が分かれている。DS はヘパリンを調製する際の原料に含まれるため、ヘパリンの精製の指標として有用であるとも考えられ、今後は国内ヘパリンナトリウム中への DS の含有量の実態を正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。

## 結 論

本研究における分析法バリデーションの結果、キャピラリー電気泳動法は日本薬局方各条ヘパリンナトリウム純度試験として適用可能であることがわかった。

今後は他機関と連携した共同検定を行い、その他の規格を設定していく必要がある。特に検出限界に関しては、他機関においても同程度の値を得るため、分析試料の濃度や試料導入法、試料導入量などを規定しなければならない。

謝辞 ヘパリンナトリウム製剤原料をご供与いただきました日本バルク薬品㈱に深く御礼申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Petitou M., Casu B., Lindahl U., *Biochimie*, **85**, 83–89 (2003).
- 2) Fischer K. G., *Hemodial. Int.*, **11**, 178–189 (2007).
- 3) Hirsh J., Levine M. N., *Blood*, **79**, 1–17 (1992).
- 4) Kishimoto T. K., Viswanathan K., Ganguly T., Elankumaran S., Smith S., Pelzer K., Lansing J. C., Sriranganathan N., Zhao G., Galcheva-Gargova Z., Al-Hakim A., Bailey G. S., Fraser B., Roy S., Rogers-Cotrone T., Buhse L., Whary M., Fox J., Nasr M., Dal Pan G. J., Shriver Z., Langer R. S., Venkataraman G., Austen K. F., Woodcock J., Sasisekharan R., *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2457–2467 (2008).
- 5) [http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/adverse\\_events.htm](http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/adverse_events.htm)., 6 June, 2009
- 6) Guerrini M., Beccati D., Shriver Z., Naggi A., Viswanathan K., Bisio A., Capila I., Lansing J. C., Guglieri S., Fraser B., Al-Hakim A., Gunay N. S., Zhang Z., Robinson L., Buhse L., Nasr M., Woodcock J., Langer R., Venkataraman G., Linhardt R. J., Casu B., Torri G., Sasisekharan R., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 669–675 (2008).
- 7) [http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin\\_NM\\_method.pdf](http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_NM_method.pdf)., 6 June, 2009.
- 8) [http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin\\_CE\\_method.pdf](http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_CE_method.pdf)., 6 June, 2009.
- 9) Trehy M. L., Reepmeyer J. C., Kolinski R. E., Westenberger B. J., Buhse L. F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 670–673 (2009).
- 10) Volpi N., Maccari F., Linhardt R. J., *Anal.*

- Biochem.*, **388**, 140–145 (2009).
- 11) Tami C., Puig M., Reepmeyer J. C., Ye H., D'Avignon D. A., Buhse L., Verthelyi D., *Biomaterials*, **29**, 4808–4814 (2008).
  - 12) Hashii N., Kawasaki N., Takakura D., Itoh S., Kawahara N., Shoda T., Sugimoto N., Haishima Y., Shinagawa M., Shimba N., Miyata K., Tsukamoto H., Senshu K., Hasegawa T., Kawai K., Yoden H., Kinoshita M., Kakehi K., Goda Y., Okuda H., Tanamoto K., Yamaguchi T., *Pharm. Regul. Sci.*, **39**, 651–659 (2008).
  - 13) Kakehi K., Kakoi N., Kinoshita M., Hashii N., Kawasaki N., Terao T., Kawai K., Yoden H., Yamaguchi T., *Pharm. Regul. Sci.*, **39**, 713–720 (2008).
  - 14) Somsen G. W., Tak Y. H., Torano J. S., Jongen P. M., de Jong G. J., *J. Chromatogr. A.*, **1216**, 4107–4112 (2009).
  - 15) Wielgos T., Havel K., Ivanova N., Weinberger R., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 319–326 (2009).
  - 16) Neville G. A., Mori F., Holme K. R., Perlin A. S., *J. Pharm. Sci.*, **78**, 101–104 (1989).
  - 17) Matsuno Y. K., Kakoi N., Kinoshita M., Matsuzaki Y., Kumada J., Kakehi K., *Electrophoresis*, **29**, 3628–3635 (2008).

# 抗体医薬品の品質・安全性確保

山口照英

Teruhide YAMAGUCHI  
国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

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

21世紀に入り、バイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)のなかで、特にモノクローナル抗体医薬品(抗体医薬品)の開発が急速に進んでいる。国内で承認される多くのバイオ医薬品が抗体医薬品であり、海外先進国でも同様の状況である。これには、ハイブリドーマ作製技術やフェージディスプレイシステムなどのモノクローナル抗体作製技術と、組換えDNA技術などを利用したヒト化/ヒト抗体作製技術の進展が大きく寄与していると考えられる。

開発が進められている抗体医薬品に求められる要件について、米国食品医薬品局(FDA)やヨーロッパ医薬品庁(EMA)では抗体医薬品に関するガイドラインを発出している。<sup>1-4)</sup> 我が国では抗体医薬品に関する指針などは出されていないが、基本的には日米EU医薬品規制調和会議(ICH)バイオ医薬品のガイドラインに示されている指針に準じて評価を行うことが求められる。<sup>5-9)</sup> しかし、抗体医薬品は、構造や製法に由来する不純物などの品質特性に関して共通する特徴を有しており、抗体医薬品に求められる要件を明らかにしておくことは新規抗体医薬品開発のための有用な参考情報となるばかりでなく、承認審査の迅速化にもつながると期待できる。本稿では、モノクローナル抗体を有効成分とする抗体医薬品の品質や安全性確保において求められる要件について議論してみたい。

## 2 抗体医薬品の構造的特徴

日欧米で承認されているモノクローナル抗体医薬品を表1に示すが、抗体医薬品の開発のスピードは非常に速く、開発途中にある製品は更に膨大なものになるといわれている。表1で示された製品には、抗腫瘍効果を増強するために放射性同位元素やトキシンを結合させた製品、Fab断片やPEG化修飾を行った製品など、幾つかの改変型製品も含まれている。

今後有効性の更なる増強や安全性確保などの観点から様々な改変を加えたり、さらには修飾したりす

る製品が開発されてくると考えられる。また2価抗体のように同時に2つの標的分子に結合する能力を有し、複数の機能を持つというこれまでにないコンセプトを持つ製品の開発も進められている。

品質・安全性を考える上での抗体医薬品の大きな特徴は、他のバイオ医薬品と異なり、共通する基本骨格構造を持つ製品であるということである。このようなコンセプトは、すべての抗体医薬品に適用できるものではないが、基本的には培養工程や精製工程などの製造方法、不純物の除去やウイルス安全性評価、さらにはそのバリデーションを含めて共通した基盤技術を利用できると考えられる。

## 3 製造工程

### 1. モノクローナル抗体産生細胞株の樹立

抗体医薬品は、キメラ抗体、ヒト化抗体さらにはヒト抗体と、ヒトでの抗原性をできる限り低減化する方向で開発が進められてきている。例外的に、マウス抗体などの開発も続けられているが、短期的な使用に限定されている。現在承認申請されるほとんどの抗体医薬品は、組換えDNA技術を用いて製造されたものである。組換えDNA技術を用いて製造される抗体医薬品に関しては、ICH Q5 A, ICH Q5 B, ICH Q5 D ガイドラインを参照し、<sup>5,6,9)</sup> 細胞の樹立、ウイルス安全性評価、導入遺伝子の特性など安定性評価することが求められる。

多くの抗体医薬品において、標的抗原に結合する超可変領域や可変領域を得るためにハイブリドーマ作製技術や関連技術が用いられているが、抗体医薬品の臨床開発初期段階でも、ハイブリドーマ技術などを用いて製造されたモノクローナル抗体(ヒト化あるいはヒト抗体を産生する先端技術が用いられている)が用いられる場合がある。このような場合、臨床開発の進展に伴って組換えDNA技術を用いた製造へと変更が行われており、製法変更に当たっては後述するICH Q5 E ガイドライン<sup>10)</sup>にしたがって、旧製法で得られた製品との同源性・同一性評価が必要となる。

表1 これまでに世界で認可された抗体医薬品及び融合タンパク質医薬品

分類/名称	構造	標的	主な適応疾患	承認年		
				US	EU	日本
マウス抗体						
Muromonab-CD 3	IgG 2 a	CD 3	腎移植後の急性拒絶反応	1986	NA	1991
Ibritumomab tiuxetan	IgG 1 κ (Y-90 標識) IgG 1 κ (I-111 標識)	CD 20	B 細胞性非ホジキンリンパ腫	2002	2004	2008 2008
Iodine 131 Tositumomab	IgG 2 a λ (I-131 標識)	CD 20	非ホジキンリンパ腫	2003	NA	NA
キメラ抗体						
Abciximab	IgG 1 (Fab)	GPIIb/IIIa	心筋虚血	1994	NA	NA
Rituximab	IgG 1 κ	CD 20	B 細胞性非ホジキンリンパ腫	1997	1998	2001
Basiliximab	IgG 1 κ	CD 25	腎移植後の急性拒絶反応	1998	1998	2002
Infliximab	IgG 1 κ	TNF α	関節リウマチ	1998	1999	2002
Cetuximab	IgG 1 κ	EGFR	頭頸部がん, 結腸・直腸がん	2004	2004	2008
ヒト化抗体						
Daclizumab	IgG 1 κ	CD 25	腎移植後の急性拒絶反応	1997	1999	NA
Palivizumab	IgG 1 κ	RSV F	RS ウイルス感染	1998	1999	2002
Trastuzumab	IgG 1 κ	HER 2	転移性乳がん	1998	2000	2001
Gemtuzumab ozogamicin	IgG 4 κ (標識化)	CD 33	急性骨髄性白血病	2000	NA	2005
Alemtuzumab	IgG 1 κ	CD 52	B 細胞性慢性リンパ性白血病	2001	2001	NA
Omalizumab	IgG 1 κ	IgE	喘息	2003	2005	2009
Efalizumab	IgG 1 κ	CD 11	尋常性乾癬	2003	2004	NA
Bevacizumab	IgG 1	VEGF	結腸・直腸がん	2004	2005	2007
Natalizumab	IgG 4 κ	α 4 integrin	多発性硬化症	2004	2006	NA
Tocilizumab	IgG 1	IL-6 R	キャッスルマン病	NA	NA	2005
Ranibizumab	IgG 1 κ (48 K)	VEGF-A	加齢黄斑変性	2006	2007	2009
Eculizumab	IgG 2/4 κ	C 5 a	発作性夜間血色素尿症	2007	2007	NA
Certolizumab pegol	Fab' + PEG	TNF α	重症クローン病	2008	NA	NA
ヒト抗体						
Adalimumab	IgG 1 κ	TNF α	関節リウマチ	2002	2003	2008
Panitumumab	IgG 2 κ	EGFR	結腸・直腸がん	2006	NA	申請中

## 2. 抗体医薬品製造に用いられる組換え DNA 技術及び細胞バンクの樹立

抗体産生に用いる遺伝子発現ベクターの構造や特性は、宿主細胞に関する情報を含めて明らかにしておくことが求められる。

目的遺伝子入手のために、細胞融合やウイルスによる形質転換、さらには遺伝子ライブラリーやファージディスプレイなどの特殊な技術を用いた場合には、目的遺伝子の由来やクローニング法などについて理解可能な程度の情報を明らかにするとともに、製造期間にわたっての安定性に関するデータを示す必要がある。

## 3. 抗体医薬品の製造

抗体医薬品原薬の製造工程(細胞培養や精製工程)の確立及びその恒常性を示すために、①製品の不均一性に関して恒常性のある製造が担保されていること、並びに②製造工程由来不純物(例えば宿主由来タンパク質, DNA, プロテイン A, 細胞培養に用いる成長因子など)を十分に除去する能力を持つことなどを明らかにする必要がある。生産細胞基材の

開発や培養技術の飛躍的な進展から、最近はほとんどのケースで無血清条件下での培養工程が採用されており、工程由来不純物として宿主由来タンパク質や DNA が想定されることが多い。しかし、無血清培養であっても、細胞培養で用いる増殖因子や種々の添加剤に関する除去状況の評価や、必要に応じ最終製品などでの規格設定を考慮すべきであろう。

## 4. 抗体医薬品に共通する製造工程

最初に述べたように、抗体医薬品の構造や物理的・化学的特性には共通点が多いことや、長年の製造経験から、異なるモノクローナル抗体であっても、共通の精製工程などを適用できるというコンセプトが確立されてきている。また、精製工程を試行錯誤の上に設計するのではなく、あらかじめ最適な工程を設計可能であるとも考えられている。

多くの抗体医薬品の共通する製法としては、図 1 に示すように、バルクハーベスト以降のカラム工程などに導入するためのろ過、限外濃縮、及び緩衝液の調製アフィニティークロマトグラフィー工程やクロマトグラフィー各種カラムクロマトグラフィー工程、

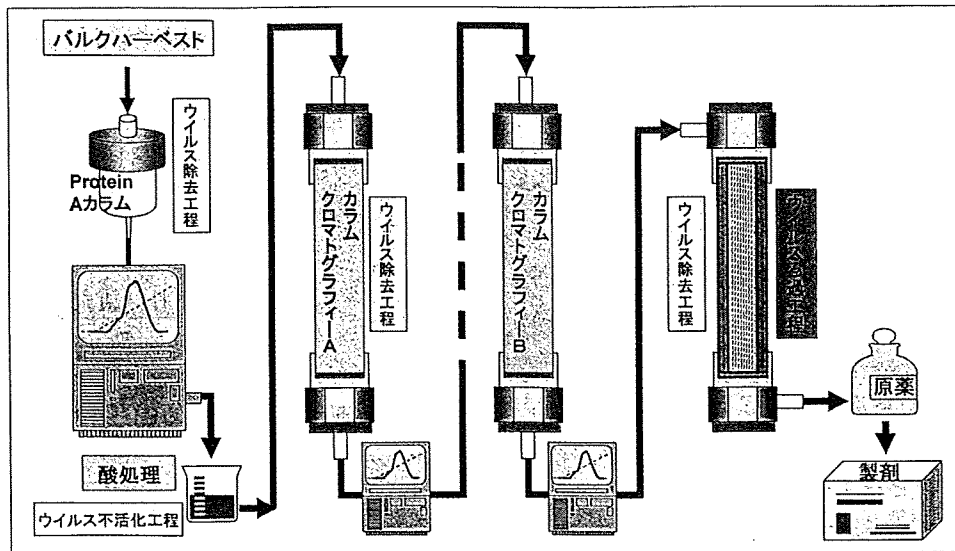


図1 代表的な抗体医薬品の精製工程とウイルスクリアランス

並びにウイルス除去膜工程が挙げられる。各工程には様々なバリエーションがあり、必ずしもすべての工程において同様の工程が採用されているわけではないが、欧米のモノクローナル抗体製品に関するガイドラインは、このような製法の共通性を前提に記載されている。

また、ウイルスクリアランス工程についても、共通する評価工程があると考えられているが、必ずしも同一の精製工程が適用可能であることを意味しているわけではない。製造業者は、それぞれ製品の特徴に応じて製造工程を最適化しておくことが求められる。

### 5. ウイルス安全性と伝達性海綿状脳症

ウイルス安全性に関しては、ICH Q5 A ガイドライン<sup>9)</sup>に準拠することが求められる。ICH Q5 A ガイドラインには、生産細胞のウイルス試験やバルクハーベストの試験から、製造工程でのバリデーションに至るまでの評価に必要な要件が記載されている。基本的には抗体医薬品においても他のバイオ医薬品と同様な要件が求められると考えられるが、モノクローナル抗体に共通する特性やそれに基づく製造工程の高い類似性から、開発段階では、より効率的・合理的なアプローチが可能となるであろう。特に同一の宿主細胞を用いる場合などでは、セルバンク試験などにおいて共通の試験が適用できるであろうし、またウイルスバリデーションの設計に当たっても、効率的な試験デザインが可能と考えられる。

ウイルスクリアランス工程として評価の対象とな

るプロテイン A クロマトグラフィー工程や、ウイルスろ過工程における抗体濃度や緩衝液系などの設定では、場合によっては共通化が可能である。また、ウイルスクリアランス評価では、クロマトグラフィー工程によるウイルス除去工程と溶出後の酸性処理について一度十分な評価を行っておくことにより、除去工程と不活化工程を分けて評価することも可能になると思われる。

承認申請にあたって抗体医薬品ごとに十分なウイルスクリアランスのバリデーションを行うことが要求されるが、各カラムクロマトグラフィー工程のウイルスのキャリーオーバーやカラムのサンニテーションなどは、他の製品での経験やデータを利用することも可能と考えられる。

一方、抗体医薬品は従来のバイオ医薬品と異なり、一般的に投与量が多いという特徴を持っており、臨床効果を高めるために更なる大量投与を行うケースも想定される。したがって今後、より生産性の高い細胞基材を用いた抗体医薬品の開発が進む可能性が高いと考えられる。このような細胞基材の使用にあたっては、あらたな情報の入手や経験を積み重ねていくことが必要であろう。このことは、新規有用細胞の使用を避けるべきということではない。より高い生産能を持つ細胞基材の使用は、有効成分含量の高いバルクハーベストが得られることとなり、不純物などの低減化につながる可能性があることから、

むしろ積極的な取り組みが推奨される。

## 4 特性解析

### 1. 一般的要件及び構造

抗体医薬品の品質特性解析では、他のバイオ医薬品と同様にICH Q6Bガイドライン<sup>6)</sup>に従い、抗体の物理的・化学的特性及び生物学的特性/免疫学的特性などについて明らかにすることが求められる。特に抗体医薬品に関連する構造特性解析として、1次構造及び高次構造を明らかにすることが求められる。DNA配列によりコードされる1次構造については、ペプチドマッピングやアミノ酸配列分析により確認しておくことが重要で、また抗体のクラス、サブクラス及び軽鎖の種類、C末端やN末端のプロセッシングの確認も重要である。さらに、IgG4サブクラスに属するモノクローナル抗体では、一本鎖抗体の存在比についても明らかにしておく必要がある。<sup>11)</sup>

### 2. 不均一性

抗体医薬品に共通する特徴として、製品中に翻訳後修飾やプロセッシングの違いによる多様な分子が含まれることが挙げられる。このような抗体医薬品の不均一性は、等電点電気泳動(IEF)、イオン交換クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動(CE)など、できる限り多様な手法を用いてあらゆる角度から解析し、ロット間での不均一性の恒常性について示すことが重要である。分子量が大きいことから、従来の分析手法によりこれらの分子の多くを分離することは困難であるかもしれないが、最新の液体クロマトグラフィーやCEを用いることにより、幾つかの分子を分離することが可能となってきている。すべてのマイナーピークの特長まで明らかにすることは不要と思われるが、可能な限り分子の不均一性を明らかにし、特にメジャーピークについては構造や、可能であれば生物活性についても明らかにすることが望ましい。

モノクローナル抗体に生じる不均一性の原因の1つに、C末端アミノ酸のプロセッシングが挙げられる。H鎖C末端のリシン残基は、カルボキシペプチダーゼB様活性により分解を受けることが知られている。したがって、リシン残基の欠失の程度について明らかにすることが必要である。また、H鎖

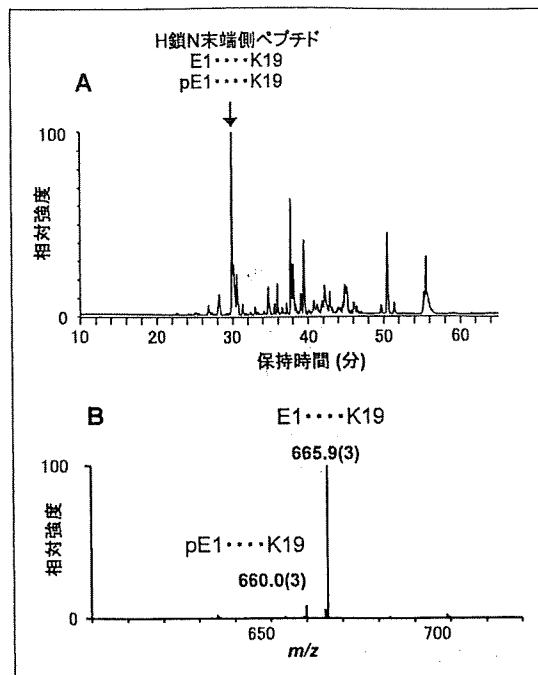


図2 N末端の不均一性

A: ペプチドマップとH鎖N末端側ペプチドの保持時間。  
B: N末端側ペプチドのマスマスペクトル。 pE1: ピログルタミン酸。

N末端のアミノ酸はグルタミンやグルタミン酸であることが多く、その一部が縮合しピログルタミン酸になっていることがあり、この解析にはN末端ペプチドの質量分析が有用である(図2)。

抗体医薬品に不均一性を与えるもう1つの大きな要因として、翻訳後修飾としての糖鎖の不均一性が挙げられる。H鎖Fc部分に1つのN型糖鎖結合のコンセンサス配列があり、可変部にもコンセンサス配列が出現する場合があることが知られている。抗体のFc部分に見いだされる糖鎖構造は基本的に二本鎖構造であり、末端のガラクトース残基の結合数によりG0、G1、G2構造と呼ばれている(図3)。抗体医薬品の糖鎖に関しては、G0~2糖鎖を含むすべての糖鎖の構造を明らかにすると共に、シアル酸の結合の有無についても考慮を払う必要がある。

特に抗体依存性細胞性細胞障害(ADCC)活性を持つ抗体医薬品では、Fcコンセンサス配列に結合する糖鎖へのフコースの結合の有無が活性に大きく影響することが知られており、フコース結合の有無やその他の不均一性の程度とその恒常性についても明らかにしておく必要がある。<sup>12,13)</sup> また、げっ歯類宿



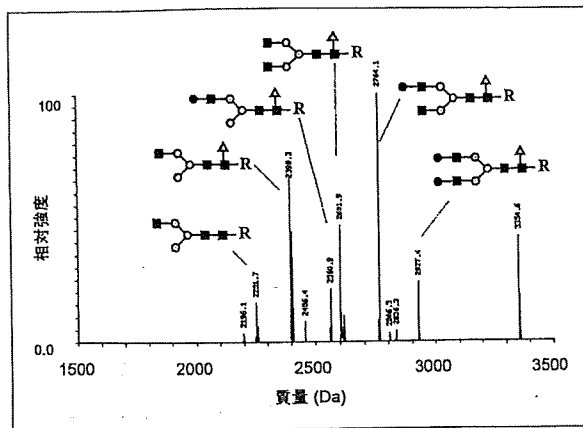


図3 糖鎖の不均一性

コンセンサス糖鎖結合ペプチドのマスペクトルと糖鎖推定構造。  
 ■, GlcNAc; ●, Gal; ○, Man; △, Fuc.

主細胞を用いる場合には、異種糖鎖抗原である Gal  $\alpha$  1-3 Gal が結合しアナフィラキシーを引き起こされるという報告<sup>14)</sup>もあることから、Gal  $\alpha$  1-3 Gal 残基の有無の確認、また存在が確認された場合には、存在量とロットごとの恒常性についても十分に解析しておくことが必要となるであろう。

### 3. 生物活性や免疫学的特性について

抗体医薬品の生物活性や免疫学的特性は、薬理作用と重複することも多いと考えられるが、構造や不均一性との関係なども考慮し、品質特性としても可能な限り様々な角度から評価しておくことが求められる。

また、有効性に及ばず糖鎖の影響を評価するために、可能であれば糖鎖の一部あるいはすべてを除去した抗体分子を用いて、生物活性や体内動態に与える糖鎖構造の影響について評価しておくことが望ましい。糖鎖の有無が体内動態に影響する可能性のあるときには、モデル動物を用いた評価が有用な場合もある。いずれにしても、糖鎖が生物活性や体内動態に重要な役割を担っていることが明らかになった

表2 抗体医薬品の生物活性や免疫学的特性

抗体が認識するエピトープの確認を含む抗原特異性
親和性に関する解離定数 ( $K_d$ )
補体結合活性や補体活性化能、他のエフェクター活性の有無
細胞傷害活性や ADCC の有無
パラトープ (paratope) (抗原結合領域; エピトープを認識し、結合するモノクローナル抗体の領域) の同定
抗体の免疫反応性: 比活性 (活性単位/質量)

場合には、糖鎖に関する規格試験の設定を考慮し、糖鎖の恒常性を担保することが必要になってくる。ただし、糖鎖試験と生物活性試験については相互補完的な面からの合理的な判断も可能である。

### 4. 特異性と交差反応性

上述したように、モノクローナル抗体が認識するエピトープ(アミノ酸配列や相当する構造単位)を明らかにすることが求められる一方で、安全性の観点から、目的外の標的分子との反応性や目的外のヒト組織に対する傷害活性について十分考慮する必要がある。実験動物を用いた交差反応性試験には当然限界があり、また霊長類を用いたとしても必ずしもヒトに外挿できるわけではないなど技術的な限界があることから、交差反応性の解析は容易ではない。しかし免疫組織学的手法を用いて、可能な範囲で各ヒト組織に対する交差反応性についても明らかにすることは、安全性確保の点から不可欠である。

今後様々な技術的進歩—例えば ES 細胞や iPS 細胞の利用により様々なヒト細胞が利用できるようになれば、有用な評価法となってくると期待される。

## 5 規格試験法

抗体医薬品の規格試験法の設定では、ICH Q 6 B ガイドライン<sup>15)</sup>の原則に従って従来のバイオ医薬品と同様の対応が求められる。特に、抗体医薬品では確認試験、力価、糖鎖、不均一性の恒常性に関して特別な考慮が必要と考えられる。

抗体医薬品は、共通の基本構造を持つことから、確認試験設定では、ペプチドマッピングのような非常に特異性の高い試験法を設定するか、例えば ELISA 試験のように高い免疫学的特異性を利用した試験法などを考慮すべきであろう。特に、複数のモノクローナル抗体製品を製造あるいは開発している場合には、このような特性の高い確認試験が有用である。

抗体製品の力価/生物活性の規格設定では、可能な限り臨床効果に密接に関連する指標を用いることが望ましい。抗体医薬品の主作用が単に目的分子との結合や中和活性のみである場合には、目的物質との結合性を規定する ELISA 試験のようなアッセイ法が適切であろう。一方、治療手段としてエフェクター活性などを利用している場合には、細胞を用い

たアッセイ法や他のエフェクター効果に関連するアッセイ法を考慮することが望ましい。また、抗体医薬品であっても、比活性は製造の一定性を担保するための重要なパラメーターとなる。

抗体医薬品の糖鎖は、前述したように、免疫系細胞の活性化など生理活性の制御に重要な役割を果たしていることから、ADCC 活性や補体依存性細胞障害(CDC 活性)を持つことが知られている抗体医薬品では、これらの生物活性や糖鎖に関する規格設定の必要性を考慮するべきである。また、糖鎖が体内動態に影響を与えることが明らかにされている場合にも、糖鎖に関する規格設定が必要である。さらに Gal  $\alpha$  1-3 Gal を持つ場合には、その存在量の規格試験が必要となると考えられる。糖鎖構造に関しては、少なくとも G0, G1, G2 の存在量や存在比に関する試験の設定の必要性を考慮するべきである。

抗体医薬品は極めて高い不均一性を持つことが知られている。したがって、製造工程における不均一性を恒常的に担保するために、IEF, イオン交換クロマトグラフィー, CE などのタンパク質の荷電の不均一性を指標とする規格を設定することが望ましいと考えられる。

## 6 製法変更に伴う同等性・同質性評価

抗体医薬品開発の特徴として、臨床開発中においてもかなりの頻度で製法変更が行われていることが挙げられる。これは、抗体医薬品の開発戦略として標的とする抗原は非常に明確であるが、抗原との親和性や生物活性などを評価するための細胞や動物を用いた非臨床試験からでは、臨床効果を予測することが困難な場合が多く、複数の製品を評価する必要があるためと考えられる。

抗体医薬品の製法変更での同等性・同質性評価では、臨床効果と密接に関連する生物活性特性/免疫学的特性について特に考慮すべきである。また、糖鎖構造を含む製品の不均一性についても特に配慮すべきであろう。

## 7 おわりに

抗体医薬品の開発は今後も拡大し、さらに抗体作製技術を基盤とした多様な製品が開発されてくると

想定される。抗体という極めて共通する特性を有する医薬品であることから、開発における基盤技術の共通性ととも、承認申請を含めた評価においても共通のプラットフォームがあることを前提に、より効率的な開発や承認審査が可能になってくるのではないかと考えられる。

一方、TGN 1412 の開発における重大な有害事象発症やリツキサンによる肝炎ウイルスの再燃など、抗体医薬品にはこれまでのバイオ医薬品とは大きく異なる副作用を引き起こす可能性があることが知られてきており、新規抗体医薬品開発段階や承認後においては、十分な配慮と注意が必要である。<sup>15,16)</sup>

## 参考文献

- 1) Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing and Controls Information for a Therapeutic Recombinant DNA-derived Products or Monoclonal Antibody Products for In Vivo Use, CDER/CBER, FDA, 1995.
- 2) Point to Consider in the Manufacturing and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, CBER, FDA, 1997.
- 3) Guideline; Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies, EMEA, 3AB4A, 1994.
- 4) Draft guideline; Guideline on Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies and Related Substances, EMEA/CHMP/BWP/157653/2007, 2007.
- 5) 医薬審第 329 号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について (ICH ガイドライン Q5A). Cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5a\\_00\\_2\\_22.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5a_00_2_22.pdf)
- 6) 医薬審第 3 号「組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について」(ICH ガイドライン Q5B). Cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5b\\_98\\_1\\_6.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5b_98_1_6.pdf)
- 7) 医薬審第 6 号「生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安定性試験について」(ICH ガイドライン Q5C). Cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5c\\_98\\_1\\_6.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5c_98_1_6.pdf)
- 8) 医薬審第 873 号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来, 調製及び特性解析」について(ICH ガイドライン Q5D). Cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d\\_00\\_7\\_14.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d_00_7_14.pdf)
- 9) 医薬審第 571 号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」(ICH ガイドライン Q6B). Cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b\\_01\\_5\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf)
- 10) 薬食審査第 0426001 号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価について」(ICH ガイドライン Q5E).
- 11) Aalberse R. C., Schuurman J., *Immunology*, 105, 9-19 (2002).
- 12) Natsume A. *et al.*, *J. Biochem.*, 140, 359-368 (2006).
- 13) Greenwood J. *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 23, 1098-1104 (1993).
- 14) Chung H. *et al.*, *New Engl. J. Med.*, 358, 1109-1117 (2008).
- 15) 山口照英, 石井明子, 毒性質問箱, 1-32, 2008.
- 16) Perceau G. *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, 155, 1053-1056 (2006).



# バイオ後続品の 品質・安全性・有効性確保の観点

## Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

山口照英

TERUHIDE YAMAGUCHI

National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologics

### はじめに

1990年代に承認された多くのバイオ医薬品が、ここ数年のうちに特許が切れる(表1)ことを受けて、バイオ後続品/バイオシミラー開発の機運が高まってきている。すなわち、化学薬品の後発品と同様に、特許の消滅した先行バイオ医薬品のコピーを製造可能とする考えから、バイオジェネリック医薬品と提唱されていた。しかし、後述するように化学薬品とバイオ医薬品の本質的な特性の違いから、先発品のコピー(同一製品)を製造するという発想は妥当ではなく、むしろ先発品と類似性の高い医薬品を開発すると考えるのがコンセンサスとなってきた。したがって、バイオ医薬品では「後発品」という言葉を用いるよりも、バイオ後続品/バイオシミラーと表記す

るようになってきている。

現在先進国では、エリスロポエチンやヒト成長ホルモン、顆粒球コロニー刺激因子などのバイオ後続品/バイオシミラー(バイオ後続品と略)が承認(表2)されており、わが国でも複数のバイオ後続品が承認申請中である。開発途上国では、さらに多様なバイオ後続品が承認されているといわれるが、本稿で取り上げる概念に合致しているのかは不明であり、開発途上国でのバイオ後続品の開発状況については本稿では触れない。将来的には抗体医薬品やさらに複雑なタンパク質医薬品のバイオ後続品も開発が進められてくる可能性もあると考えられる。バイオ後続品に関しては、先進国と開発途上国では、それぞれのバイオ医薬品開発状況が異なっており、どのような要件を求めるかに違いが見られる。それぞれ必要とされるデータ類や基本的考え方については、微妙な差異ばか

表1 バイオ医薬品の特許終了状況

製品	商品名	EUでの特許有効期間	米国での特許有効期間
エポエチン $\alpha$	エポジン	消滅	2012年
エポエチン $\beta$	Neo Recormon	消滅	消滅
インターフェロン- $\beta$ -1a	Avonex	2012年	2008, 2013年
インターフェロン- $\beta$ -1b	ベタフェロン	消滅	消滅
G-CSF	Neopogen	消滅	2013年
インターフェロン- $\alpha$ -2b	イントロン	消滅	消滅
インターフェロン- $\alpha$ -2a	Roferon-A	消滅	NA
IL-2	Proleukin	消滅(2007)	2012年
可溶性TNF- $\alpha$ 受容体	エンブレル	2010年	2009年
抗TNF- $\alpha$ 抗体	レミケード	2010, 2011, 2012年	2011年
抗CD20抗体	リツキサン	2013年	2015年
抗Erb2受容体抗体	ハーセプチン	2014年	2014年
抗EGF受容体抗体	Erbbitux	2010年	2015年
抗VEGF抗体	アバスチン	2019年	2017年

Thomson Database of all Pharmaceutical Invention, August 2007

表2 欧米でのバイオシミラー製品の承認状況(2009年1月)

INN	先行品	後続品	EMA	FDA
Somatropin	Genotropin	Omnitrope	2006	2006
Somatropin	Humatrope	Valtropin	2006	2007
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Binocrit	2007	-
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Epoetin alfa hexal	2007	-
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Abseamed	2007	-
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Silapo	2008	-
Epoetin alfa	Eprex/Erypo	Retacrit	2008	-
Filgrastim	Neupogen	Tevagrastim	2008	-
Filgrastim	Neupogen	Ratiograstim	2008	-
Filgrastim	Neupogen	Biograstim	2008	-
Filgrastim	Neupogen	Filgrastim ratiopharm	2008	-

りではなく、先行バイオ医薬品との比較の必要性など、重要な点においても違いがあるように思える。さらには呼称についても、バイオ後続品、バイオシミラー、後続バイオ医薬品などさまざまな言葉が使われているが、どのようなデータを承認時に求めるか、あるいはバイオ後続品開発をどのようにとらえるかにより、その違いがあらわれているように思える。しかし、バイオ後続品開発が可能であるということで、各国の規制当局の認識は共通している。

EUをはじめとして、Health Canada、WHOなどもバイオ後続品開発に関するガイドラインを発出、あるいは案をすでに提示している。米国はこれまでガイドライン作成の検討が行われているようであるが策定にまでは至っていない。しかし、政権の交代とともにバイオ後続品関連ガイドライン作成の動きも活発化してくると予想される。特にEMAは、バイオシミラーの指針に関して、品質、非臨床・臨床試験、複数の製品について臨床開発に関するガイドラインを発出しており、バイオシミラーを積極的に推進しようとしていると考えられる。

わが国においてもバイオ医薬品開発の機運を受け、2007年から指針案作成に関する専門家会議が組織された。1年半に及ぶ議論を経て案を提示し、パブリックコメントでの意見に基づく修正を行い、2009年3月4日に「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(薬食発第0304004号)と関連する通知を発出した。

本稿では、わが国のバイオ後続品に関する指針作成での論点や、さらに、指針の中でこれらの論点がどのように反映されたのかについて概説する。

## 1. バイオ後続品指針の論点

EUでエリスロポエチン、ヒト成長ホルモン(hGH)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などのバイオシミラー(EUではバイオシミラーと称している)がすでに承認されており、先進国の中で最もバイオ後続品の実用化が進んでいる。わが国でも前述したように、バイオ後続品に関する指針案作成のための専門家会議が立ち上げられ、ガイドライン策定に当たってバイオ後続品開発における論点の整理を行った。特にバイオ後続品をどのように捉えるかが最も重要なポイントであった。

EUではバイオ後続品をEU内ですでに承認されている参照バイオ医薬品と類似性(similarity)を持つ医薬品と規定し、類似性を実証するデータとともに承認申請することができるとしている。この類似性を実証するために、品質、非臨床試験、臨床試験を通じて参照バイオ医薬品との比較試験を実施することが求められている。カナダやWHOのバイオシミラー(バイオ後続品)ガイドライン作成においても、国内ですでに承認されている医薬品に対してのみバイオ後続品が開発可能か、既承認バイオ医薬品がなくても開発が可能かが大きな論点となっている。ただ基本的なコンセプトとしては、すでに市場にて十分な経験のある既承認バイオ医薬品に対して品質特性等で類似性のあることを示し、そのデータを利用することにより非臨床試験や臨床試験が簡略化できるとしていることは共通している。また類似性の実証方法としては、製法変更に関するICH Q5Eガイドラインが有用であると考えられているが、自社の製法変更と異なる製造メーカーがICH Q5Eガイドラインの手法を十分に利用できるのかについて疑問も出されている。

### (1) バイオ後続品と後発品の違い

バイオ後続品に求められる要件や評価のポイントとして、まず化学薬品の後発品との違いについて整理してみた(表3)。バイオ医薬品の特徴として、低分子化学薬品と比較して分子量が大きく複雑な構造を持つことがあげられる。さらに、構造の複雑さゆえに、解析に用いる測定技術にも大きな違いと解析技術上の限界が存在している。また、バイオ医薬品の特徴として、翻訳後修飾を含めた不均一性(heterogeneity)や高次構造を持つことや抗原性などを持つことがあげられる。

さらに単に巨大な分子であるというだけでなく、バイ