

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と担うということに集中して作成しているので、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が、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と言っています。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、道を探っていかな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、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う。

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うということですね。

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していっ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ひます。

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ひます。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ひます。

早川 JPは不純物に対して、今でも譲歩していないと思ひます。

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ひます。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ひます。

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ひます。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薬局方に収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ひます。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場合があります。

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、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 でずっ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合ですから、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と」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 がい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いってよいかもかもしれません。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、更に頑張ってくださいとで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か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はと思います。

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ことが、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。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に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おうほうがいいの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のではないのでしょうか。

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わないですが、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

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ういかもしれません。

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 取載総品目数でいうと最近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を実現しそうです。そういう意味では新規取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を、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などの品質に関係する事柄について、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係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を関係する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)の実践にほかなりません。

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います。

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ろうかと思っています。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。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あたりで、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販業者が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良な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の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き、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う気がします。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、是々非々なんだろうと思います。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のだらうと思います。

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度合い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まれます。

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(株)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(株)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(株)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

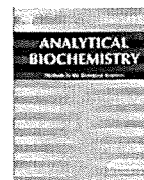
1991年 国立衛生試験所薬品部長

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



Structural characterization of multibranched oligosaccharides from seal milk by a combination of off-line high-performance liquid chromatography–matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry and sequential exoglycosidase digestion

Mitsuhiro Kinoshita^a, Hiroko Ohta^a, Kanata Higaki^a, Yoko Kojima^a, Tadasu Urashima^b, Kazuki Nakajima^c, Minoru Suzuki^c, Kit M. Kovacs^d, Christian Lydersen^d, Takao Hayakawa^e, Kazuaki Kakehi^{a,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-osaka 577-8502, Japan

^b Graduate School of Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro-shi, Hokkaido 080-8555, Japan

^c Sphingolipid Expression Laboratory; Supra-Biomolecular System Research Group, RIKEN Frontier Research System, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan

^d Norwegian Polar Institute, N-9007 Tromsø, Norway

^e Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-osaka 577-8502, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2008

Available online 9 March 2009

Keywords:

Milk oligosaccharide
Multibranched poly(lactosamine)-type oligosaccharide
MALDI-TOF MS
Exoglycosidase digestion
HPLC

ABSTRACT

A complex mixture of diverse oligosaccharides related to the carbohydrates in glycoconjugates involved in various biological events is found in animal milk/colostrum and has been challenging targets for separation and structural studies. In the current study, we isolated oligosaccharides having high molecular masses (MW ~ 3800) from the milk samples of bearded and hooded seals and analyzed their structures by off-line normal-phase–high-performance liquid chromatography–matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (NP-HPLC–MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) by combination with sequential exoglycosidase digestion. Initially, a mixture of oligosaccharides from the seal milk was reductively aminated with 2-aminobenzoic acid and analyzed by a combination of HPLC and MALDI-TOF MS. From MS data, these oligosaccharides contained different numbers of lactosamine units attached to the nonreducing lactose (Galβ1-4Glc) and fucose residue. The isolated oligosaccharides were sequentially digested with exoglycosidases and characterized by MALDI-TOF MS. The data revealed that oligosaccharides from both seal species were composed from lacto-*N*-neohexaose (LNnH, Galβ1-4GlcNAcβ1-6[Galβ1-4GlcNAcβ1-3]Galβ1-4Glc) as the common core structure, and most of them contained Fucα1-2 residues at the nonreducing ends. Furthermore, the oligosaccharides from both samples contained multibranched oligosaccharides having two Galβ1-4GlcNAc (*N*-acetylactosamine, LacNAc) residues on the Galβ1-4GlcNAcβ1-3 branch or both branches of LNnH. Elongation of the chains was observed at 3-OH positions of Gal residues, but most of the internal Gal residues were also substituted with an *N*-acetylactosamine at the 6-OH position.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Specific sequences of monosaccharides occur as important structural elements of oligo- and polysaccharides of glycoproteins and glycolipids, and they comprise recognition motifs for ligand–receptor or cell–cell interactions [1–4]. Oligosaccharides are cooperatively synthesized by actions of various glycosyltransferases and are usually present as a complex mixture of diverse oligosaccharides. In particular, the isomeric/branching structure is the major feature, and their structural determination is essential for understanding the biosynthesis and biological significance.

Mammalian milk/colostrum is a rich source of carbohydrates of diverse structures [5–8]. Although the most dominant carbohydrate in mammalian milk is generally lactose, a small amount of characteristic oligosaccharides are also present [9–13]. The milk oligosaccharides usually have a common lactose (Galβ1-4Glc) core that is extended at the 6- and/or 3-OH positions of the Gal as linear/branched mode [14]. Furthermore, the linear/branched chains are frequently fucosylated and/or sialylated and in a few cases are sulfated.

Due to the similarities and complex structures of milk oligosaccharides, structural determination of them has been a big and challenging work. Urashima and coworkers isolated various oligosaccharides from many mammalian species' milk/colostrum and characterized their structural features by a combination of

* Corresponding author. Fax: +81 6 6721 2353.

E-mail address: k_kakehi@phar.kindai.ac.jp (K. Kakehi).

some preparative chromatographic techniques and ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR)¹ spectrometry [14–21]. They reported that milk oligosaccharides contain blood group-related antigens and that their relative abundances are characteristic among animal species. For example, bear milk contains oligosaccharides having an α -Gal epitope (Gal α 1–3Gal β 1–4GlcNAc-R), A blood antigen (GalNAc α 1–3[Fuc α 1–2]Gal-R), B blood antigen (Gal α 1–3[Fuc α 1–2]Gal-R), and Lewis^x antigen (Gal β 1–4[Fuc α 1–3]GlcNAc-R) [19]. Urashima and coworkers also reported that milk samples from bearded and hooded seals contain a large amount of neutral oligosaccharides, including lactose (Gal β 1–4Glc), 2'-fucosyllactose (Fuc α 1–2Gal β 1–4Glc), and lacto-*N*-fucopentaose (Fuc α 1–2Gal β 1–4GlcNAc β 1–3Gal β 1–4Glc) as major components [17,18]. In addition, both milk samples also contain branched oligosaccharides having lacto-*N*-neohexaose (LNnH, Gal β 1–4GlcNAc β 1–6[Gal β 1–4GlcNAc β 1–3]Gal β 1–4Glc) as a core, and most of them have one or two nonreducing α 1–2 linked Fuc. Although both milk samples contain sialylated oligosaccharides with high molecular masses, structural studies were not done because of the limited performance of the NMR method. It has also been revealed that milk samples in monotremes such as platypus and echidna contain Lewis^x and Lewis^y antigens (Fuc α 1–2Gal β 1–4[Fuc β 1–3]GlcNAc-R) [10,12,22]. In view of these species-specific structural features and distribution of diverse oligosaccharides in milk/colostrum of different animals, detailed structural studies are not only useful for understanding the underlying evolutionary significance but also promising for using these unique features for biomedical applications.

The dominant carbohydrate in mammalian milk is generally the disaccharide lactose, whereas the milk samples of phocid species, including hooded and bearded seals, contain a variety of oligosaccharides other than lactose [17,18]. The oligosaccharides in bearded and hooded seal milk contain lactose, lacto-*N*-neotetraose (LNnT, Gal β 1–4GlcNAc β 1–3Gal β 1–4Glc), and LNnH as core units. Furthermore, it is noteworthy that milk oligosaccharides from both species contain type II chain (Gal β 1–4GlcNAc-R) but not type I chain (Gal β 1–3GlcNAc-R). The presence of α 1–3 linked GlcNAc and type II chain suggests that seal mammary glands contain poly-*N*-acetylglucosamines, which are synthesized by β (1–4)galactosyltransferase as well as β (1–3)*N*-acetylglucosaminyltransferase. A search for higher oligosaccharides having poly-*N*-acetylglucosamine structure is an interesting target for understanding the regulation of biosynthesis because they are further modified to form functional oligosaccharides (e.g., sialyl Le^x) and/or branched structures.

NMR spectroscopy is the most important technique that provides sequence information including linkage and α/β -anomeric configurations. However, due to the complexity of extremely overlapping signals of the monosaccharide residues in similar environments, especially in the case of oligosaccharides having poly-Gal β 1–4GlcNAc (*N*-acetylglucosamine), it is often difficult to assign the branching pattern by only the NMR technique. In contrast, mass spectrometry (MS) has been an indispensable technique for structural analysis of oligosaccharides and useful for the analysis of higher oligosaccharides with high sensitivity. Finke and coworkers reported a method for the analysis of higher oligosaccharides (MW ~ 3000) by a combination of chromatographic

separation and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) MS [23,24]. Recently, tandem mass spectrometry (MS/MS) with collision-induced dissociation (CID) has been applied to structural analysis of various oligosaccharides [25,26]. Chai and coworkers reported a method for the analysis of a complex mixture of isomeric neutral oligosaccharides in human urine and milk samples by nano-liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap (LC-ESI-IT) mass spectrometer and identified three novel isomeric fucosylated lacto-*N*-hexaoses (LNHs) based on the studies using CID-MS/MS experiments [27,28]. However, the MS method often cannot differentiate isomeric branched or linear oligosaccharides such as LNnH and *para*-lacto-*N*-hexaose (pLNH, Gal β 1–4GlcNAc β 1–3Gal β 1–4GlcNAc β 1–3Gal β 1–4Glc). Thus, it is still difficult to characterize anomeric configurations, branching configurations, and epimeric forms. This information is often obtained by the analysis of the digestion products with specific exoglycosidases. The molecular mass obtained from MS analysis after digestion with well-defined exoglycosidases reveals the sequence of oligosaccharides and information on the branching pattern.

In this study, we isolated higher oligosaccharides (MW ~ 3800) from bearded and hooded seal milk samples and analyzed their structural characteristics by normal-phase (NP)-HPLC after desialylation with neuraminidase and also by MALDI-TOF MS. Furthermore, we confirmed the branching pattern of the oligosaccharides by a combination of sequential exoglycosidase digestions and MALDI-TOF MS and MALDI-quadrupole ion trap (QIT)-TOF MS.

Materials and methods

Materials

Milk samples from bearded seal (BS) and hooded seal (HS) were collected from a lactating female in Svalbard, Norway, and from animals on the drifting pack ice in the southern part of the Gulf of St. Lawrence, Canada, respectively. Both milk samples were stored at -20°C until use. α 1–2 Fucosidase derived from *Corynebacterium* sp. and α 1–3,4 fucosidase from *Streptomyces* sp. 142 were purchased from Takara Biochemicals (Kusatsu, Japan). α 2,3,6,8 Neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* was kindly donated by Yasuhiro Ohta (Marukin Bio, Kyoto, Japan). β -Galactosidase and β -*N*-acetylhexosaminidase (both from jack beans) were obtained from Seikagaku Kogyo (Tokyo, Japan). All other reagents were analytical or HPLC grade.

Fractions containing acidic oligosaccharides from BS and HS milk samples

Samples of BS and HS milk (40 and 20 ml, respectively) were obtained after delipidation and protein precipitation according to the reported method [17,18]. Briefly, the milk samples were diluted with 4 volumes of distilled water and shaken vigorously with 4 volumes of chloroform/methanol (2:1, v/v). The chloroform layer and denatured protein were discarded. The methanol was removed from the upper layer by a rotary evaporator, and the resulting carbohydrate-containing solution was freeze-dried. Carbohydrate-containing fractions were fractionated on a Biogel P-2 column (2.5 \times 100 cm) previously equilibrated with water. An aliquot (0.5 ml) of each fraction was analyzed for hexose by phenol-sulfuric acid assay and for sialic acids by resorcinol assay [29]. Fractions eluted earlier were pooled and lyophilized to dryness (see Fig. 1 in Ref. [17] and Fig. 1 in Ref. [18]). The neutral oligosaccharides of both milk samples and a part of acidic oligosaccharides of bearded seal milk were already characterized in Urashima and coworkers' previous studies [17,18]. The fraction (1.7 mg), which was eluted

¹ Abbreviations used: NMR, nuclear magnetic resonance; LNnH, lacto-*N*-neohexaose; LNnT, lacto-*N*-neotetraose; MS, mass spectrometry; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight; MS/MS, tandem mass spectrometry; CID, collision-induced dissociation; LC-ESI-IT, liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap; LNH, lacto-*N*-hexaose; pLNH, *para*-lacto-*N*-hexaose; NP, normal-phase; QIT, quadrupole ion trap; BS, bearded seal; HS, hooded seal; 2AA, 2-aminobenzoic acid; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; mw, molecular mass; LNnTD, lacto-*N*-neotetradecaose; LNnD, lacto-*N*-neodecaose; LNnDD, lacto-*N*-neododecaose; LNnOD, lacto-*N*-neooctadecaose; GnT, β -*N*-acetylglucosaminyltransferase; iGnT, β 3-*N*-acetylglucosaminyltransferase; iGnT, β (1–6)*N*-acetylglucosaminyltransferase.

at void volumes, from the HS milk sample was used in the following preparations and characterization of each oligosaccharide.

The fraction from the BS milk sample was further separated by ion exchange chromatography, as indicated in the previous study [18]. The lyophilized material was dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.7, 2.0 ml) and subjected to anion exchange chromatography on a DEAE Sephadex A-50 (1.5 × 35 cm). The unadsorbed oligosaccharide fractions were used for structural study of the oligosaccharides in the previous study [18]. The adsorbed oligosaccharides were eluted by linear gradient elution with changing NaCl concentrations from 0 to 0.25 M in the same buffer. Two fractions (BS1 and BS2) obtained by linear gradient elution were pooled and lyophilized to dryness. The lyophilized material was dissolved in water and passed through a Biogel P-2 column (2.5 × 100 cm). The fractions eluted at the void volume were pooled and lyophilized to dryness to yield a mixture of acidic oligosaccharides (2.0 and 2.3 mg of BS1 and BS2, respectively).

Fluorescent labeling of oligosaccharides with 2AA

Fluorescent labeling of oligosaccharides was performed according to the method reported previously [30,31]. Briefly, a solution (250 μ l) of 2-aminobenzoic acid (2AA) and NaBH₃CN, prepared by dissolution of both reagents (30 mg each) in methanol (1 ml) containing 4% CH₃COONa and 2% boric acid, was added to a mixture of oligosaccharides (100 μ g). The mixture was kept at 80 °C for 60 min. After cooling, water (250 μ l) was added, and the mixture was applied to a small column (1 × 50 cm) of Sephadex LH-20 previously equilibrated with 50% aqueous methanol. The earlier eluted fluorescent fractions that contained labeled oligosaccharides were collected and evaporated to dryness. The residue was dissolved in water (1 ml), and the solution was stored at -20 °C until analysis.

Preparation of asialo-oligosaccharides

A mixture of 2AA-labeled acidic oligosaccharides (~10 μ g) was dissolved in 20 mM acetate buffer (pH 5.0, 50 μ l), and neuraminidase (10 mU, 10 μ l) was added to the mixture. After incubation at 37 °C for 24 h, the reaction mixture was kept in the boiling water bath for 5 min. After centrifugation of the mixture at 10,000g for 10 min, a portion of the supernatant was used for the analysis.

α -Fucosidase digestion

A mixture of 2AA-labeled asialo-oligosaccharides (~2 μ g), as described above, was dissolved in 20 mM phosphate buffer (pH 7.5, 50 μ l) for α 1-2 fucosidase digestion or in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0, 50 μ l) for α 1-3,4 fucosidase. α 1-2 Fucosidase (40 μ U, 2 μ l) or α 1-3,4 fucosidase (10 μ U, 10 μ l) was added to the mixture. After incubation at 37 °C for 24 h, the reaction mixture was kept in the boiling water bath for 5 min, and centrifuged at 10,000g for 10 min. The supernatant was diluted with water to adjust the volume of 200 μ l. A portion of each solution (5 μ l) was used for NP-HPLC analysis.

Sequential exoglycosidase digestion of oligosaccharides

Each oligosaccharide isolated by NP-HPLC was dissolved in 20 mM citrate buffer (pH 3.5, 8 μ l), and β -galactosidase (1 mU, 2 μ l) was added to the mixture. After incubation at 37 °C for 12 h, the reaction mixture was kept in the boiling water bath for 5 min. After centrifugation of the mixture, the supernatant was diluted with water (10 μ l). A portion of the solution (2 μ l) was analyzed by MALDI-TOF MS. Another portion (5 μ l) was mixed with 30 mM citrate buffer (pH 5.0, 5 μ l) containing β -N-acetylhexosaminidase (5 mU), and the reaction mixture was kept at 37 °C for

12 h. The supernatant was diluted with water (10 μ l), and then a portion of the solution (2 μ l) was also analyzed by MALDI-TOF MS.

Separation of the 2AA-labeled oligosaccharides

HPLC was performed with a Shimadzu apparatus equipped with two LC-6ADvp pumps and an FP-920 fluorescence detector (Waters). Separation was done with an Amide 80 column (TOSOH, 4.6 mm i.d. × 250 mm) 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. After 2 min, solvent B was increased to 95% over 80 min and kept for further 20 min [32]. Fluorescence detection was performed at 410 nm by irradiating at 325 nm light.

MALDI-TOF MS

MALDI-TOF mass spectra were acquired with a Voyager DE-PRO mass spectrometer (PE Biosystems, Framingham, MA, USA). A nitrogen laser was used to irradiate samples, and an average shot of 50 times was taken. The instrument was operated in a linear mode at an accelerating voltage of 20 kV. An aqueous sample solution (2 μ l) was mixed with a matrix solution (2 μ l) of 1% 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) in methanol/water (1:1). The mixture was applied to a polished stainless-steel target and then dried in atmosphere for a few hours.

MALDI-QIT-TOF MS

MALDI-QIT-TOF mass spectra were acquired on an AXIMA-QIT-TOF mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). A nitrogen laser was used to irradiate samples, and an average shot of 50 times was taken. Argon was used for CID. The instrument was operated in positive and reflectron mode. An aqueous sample solution (2 μ l) was mixed with a matrix solution (2 μ l) of 1% DHB in ethanol/water (1:1), and the mixture was applied to a polished stainless-steel target and dried in atmosphere for a few hours.

Results

Acidic oligosaccharides having high molecular masses in BS and HS milk samples

The method for the preparation of the oligosaccharide samples used in the current study was reported previously [17,18]. Two fractions (BS1 and BS2, 2.0 and 2.3 mg, respectively) from the BS milk sample (40 ml) and a fraction containing acidic oligosaccharides (HS, 1.7 mg) were used in the current study. Because the oligosaccharides from the HS and BS milk samples contained type II chain (Gal β 1-4GlcNAc-R) but not type I chain (Gal β 1-3GlcNAc-R), we add "neo" to all core oligosaccharide structures.

Oligosaccharides obtained from BS1 and BS2 were fluorescently labeled with 2AA and analyzed by MALDI-TOF MS. As shown in Fig. 1A, a large number of ion signals were observed at the range from m/z 1484.8 to m/z 3530.4. In BS1, two major molecular ions were observed at m/z 2362.3 and 2653.3, which were due to monofucosyl LNnH with one and two NeuAc residues (NAc1H4N2F1-2AA and NAc2H4N2F1-2AA). Ions at m/z 2151.0, 3027.9, and 3318.6 are 80 mass units larger than the m/z values of monofucosyl LNnH (theoretical molecular mass [mw] 2071.2), difucosyl lacto-N-neotetraose (LNnTD, theoretical mw 2946.7), and monosialyl difucosyl LNnTD (theoretical mw 3238.6), respectively. These data indicate that these oligosaccharides are substituted with one SO₃H group. In BS2, we observed two major ions at m/z 2337.2 and

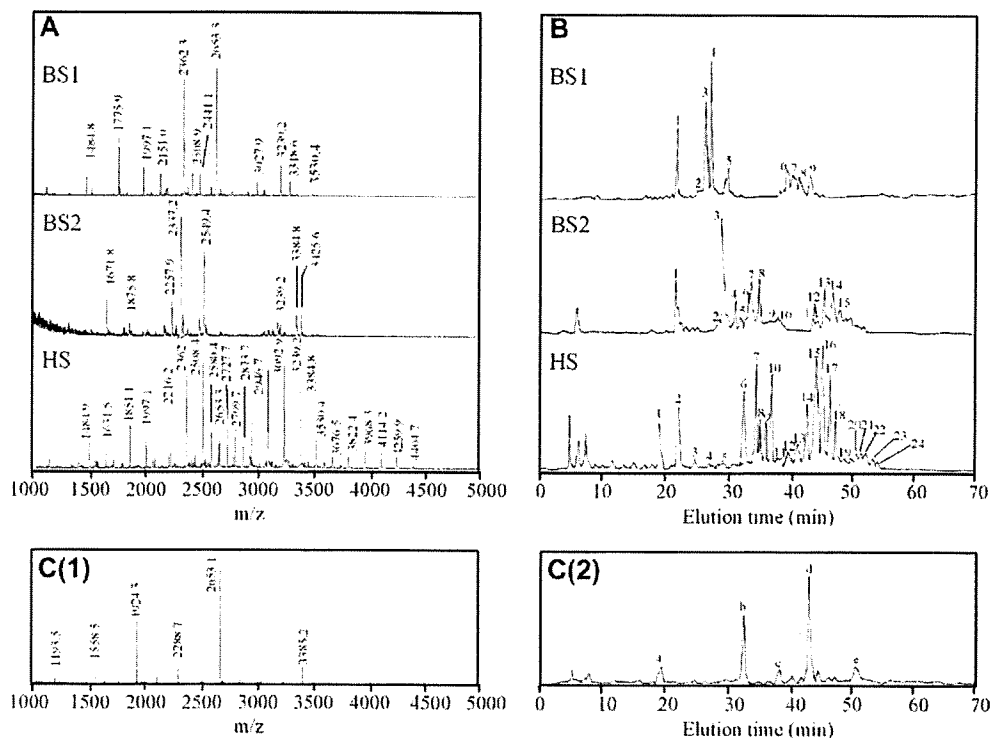


Fig. 1. MALDI-TOF MS and NP-HPLC analysis of higher oligosaccharides from bearded and hooded seal milk. (A) MALDI-TOF MS analysis of sialo-oligosaccharides from bearded and hooded seal milk. (B) NP-HPLC analysis of asialo-oligosaccharides from bearded and hooded seal milk. (C) MALDI-TOF MS and NP-HPLC analysis of defucosylated asialo-oligosaccharides from hooded seal milk. BS1, DEAE-adsorbed fraction 1 in BS milk oligosaccharides; BS2, DEAE-adsorbed fraction 2 in BS milk oligosaccharides; HS, higher oligosaccharide fraction in HS milk oligosaccharides; digestion product of HS with α 1-2 fucosidase. The monosaccharide compositions of asialo-oligosaccharides are summarized in Table 1.

2549.4, which were due to difucosyl decaose with one SO_3H group (H5N5F2- SO_3H -2AA) and monosialo-difucosyl neodecaose with one SO_3H group (Nac1H5N5F2- SO_3H -2AA), respectively. The molecular ion observed at m/z 3384.8 was due to monosialo LNnTD with three Fuc residues (Nac1H8N6F3-2AA).

HS showed characteristic ladder ions between m/z 1400 and m/z 4500. These ladder ions were classified into five groups based on the number of lactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) units. The ions observed at m/z 1484.9 and 1631.5 have the composition of Nac1H4N2-2AA and Nac1H4N2F1-2AA, respectively, and are due to mono- and difucosyl LNnH with one NeuAc residue. Molecular ions at m/z 1851.1 and 1997.1 are due to the oligosaccharides having compositions of Nac1H5N3-2AA and Nac1H5N3F1-2AA, respectively. A series of the ions at m/z 2216.2, 2362.3, 2508.4, and 2653.3 were observed abundantly in HS and are due to the oligosaccharides having monosialo lacto-*N*-neodecaose (LNnD) core (Nac1H6N4-2AA) to which 0, 1, 2, and 3 Fuc residues are attached. Five signals from m/z 2946.4 to m/z 3530.4 were consistent with oligosaccharides of Nac1H8N6-2AA having 0 to 4 Fuc residues. In addition, we found characteristic glycans having extremely large molecular masses, as observed for the series of ions observed from m/z 3676.5 to m/z 4404.7. These oligosaccharides are considered to have the core of LNnTD to which 0 to 5 Fuc residues are attached.

To determine linkages of Fuc residues in HS oligosaccharides, we carried out specific fucosidase digestion. A mixture of HS asialo-oligosaccharides was digested with α 1-3/4 fucosidase and α 1-2 fucosidase, respectively, and the products were analyzed with MALDI-TOF MS. We found that α 1-3/4 fucosidase did not act on these oligosaccharides, whereas digestion with α 1-2 fucosidase (*Corynebacterium* sp.) caused disappearance of most ions, and six ions were observed at m/z 1193.5, 1558.5, 1924.3, 2288.7,

2653.1, and 3385.2 (Fig. 1C(1)). These ions are consistent with the theoretical m/z values of H4N2-2AA, H5N3-2AA, H6N4-2AA, H7N5-2AA, H8N6-2AA, and H10N8-2AA, respectively.

The oligosaccharides obtained from milk samples were also analyzed by HPLC using a TSK-Gel Amide-80 column after removing sialic acids with neuraminidase to improve resolution (Fig. 1B) [32]. We collected the major peaks and observed the molecular ions by MALDI-TOF MS. The results are summarized in Table 1.

BS1-1 obtained from the BS1 fraction was assigned as LNnH having two LacNAc units and core Gal β 1-4Glc unit from its molecular ion (m/z 1193.5) (Fig. 1B, top panel). Molecular ions (m/z 2071.8) of BS1-3 and BS1-4 are consistent with the theoretical m/z values of H6N4F1-2AA, suggesting the presence of isomers of monofucosyl LNnD. The peak observed at 30 min (BS1-5) gave two molecular ions (m/z 2802.6 and 2949.0). The molecular ion at m/z 2802.6 is consistent with the theoretical m/z value of H8N6F1, suggesting the structure of monofucosyl LNnTD. Likewise, the molecular ion at m/z 2949.0 was assigned as difucosyl LNnTD. Minor peaks (BS1-6 to BS1-9) were due to the oligosaccharides having a core structure of LNnD or LNnTD to which a sulfate group is attached (for confirmation of the structure, see the following section).

In the BS2 fraction, BS2-1 and BS2-3 are composed of H3N3F1-2AA and H5N5F2-2AA, respectively. Digestion of BS2-1 and BS2-3 with α 1-2 fucosidase caused the loss of one and two fucose residues, respectively. The defucosylated oligosaccharides gave molecular ions corresponding to the theoretical m/z values of H3N3-2AA and H5N5-2AA. From the monosaccharide compositions, these oligosaccharides are considered to be hexa- and decasaccharide, having LacNAc units at the reducing end (for confirmation of the structure, see the following section). Oligosaccharides observed be-

Table 1
List of asialo-oligosaccharides observed in bearded and hooded seal milk.

Peak number	Observed mass	Calculated mass	Composition
(a) BS1			
-1	1193.5	1194.1	H4N2-2AA
-2	2110.8	2111.9	H5N5F1-2AA
-3	2071.8	2071.2	H6N4F1-2AA
-4	2071.8	2071.2	H6N4F1-2AA
-5	2802.6	2801.7	H8N6F1-2AA
	2949.0	2947.9	H8N6F2-2AA
-6	2151.0	2151.2	H6N4F1-SO ₃ H-2AA
	3027.0	3027.9	H8N6F2-SO ₃ H-2AA
-7	2150.8	2151.2	H6N4F1-SO ₃ H-2AA
	3026.9	3027.9	H8N6F2-SO ₃ H-2AA
-8	2150.5	2151.2	H8N6F2-SO ₃ H-2AA
	3026.6	3027.9	H6N4F1-SO ₃ H-2AA
-9	2151.2	2151.2	H6N4F1-SO ₃ H-2AA
(b) BS2			
-1	1381.6	1381.3	H3N3F1-2AA
-2	2111.6	2111.9	H5N5F1-2AA
-3	2259.5	2258.2	H5N5F2-2AA
-4	2217.7	2217.7	H6N4F2-2AA
-5	2217.2	2217.7	H6N4F2-2AA
	2363.5	2363.7	H6N4F3-2AA
-6	2988.7	2988.0	H7N7F2-2AA
	3134.6	3134.1	H7N7F3-2AA
-7	3134.0	3134.1	H7N7F3-2AA
-8	2948.7	2947.9	H8N6F2-2AA
-9	3094.4	3093.5	H8N6F3-2AA
-10	3240.5	3239.2	H8N6F4-2AA
-11	2338.1	2338.2	H5N5F2-SO ₃ H-2AA
-12	2338.2	2338.2	H5N5F2-SO ₃ H-2AA
-13	2337.8	2338.2	H5N5F2-SO ₃ H-2AA
-14	2337.5	2338.2	H5N5F2-SO ₃ H-2AA
-15	3215.5	3215.1	H7N7F3-SO ₃ H-2AA
(c) HS			
-1	1193.2	1194.1	H4N2-2AA
-2	1339.3	1340.4	H4N2F1-2AA
-3	1558.6	1559.0	H5N3-2AA
-4	1704.9	1705.4	H5N3F1-2AA
-5	1761.9	1762.8	H5N4-2AA
-6	1923.9	1924.4	H6N4-2AA
-7	2068.7	2070.0	H6N4F1-2AA
-8	2069.5	2070.0	H6N4F1-2AA
-9	2215.2	2216.3	H6N4F2-2AA
-10	2215.5	2216.3	H6N4F2-2AA
-11	2288.8	2289.4	H7N5-2AA
	2363.5	2362.3	H6N4F3-2AA
-12	2435.6	2435.5	H7N5F1-2AA
	2492.7	2492.4	H7N6-2AA
-13	2580.9	2581.5	H7N5F2-2AA
	2637.0	2638.5	H7N6F1-2AA
-14	2652.7	2654.0	H8N6-2AA
-15	2798.6	2799.7	H8N6F1-2AA
-16	2944.5	2945.7	H8N6F2-2AA
-17	3089.9	3091.7	H8N6F3-2AA
-18	3236.4	3237.7	H8N6F4-2AA
-19	3236.7	3237.7	H8N6F4-2AA
-20	3382.8	3384.1	H10N8-2AA
-21	3528.8	3530.0	H10N8F1-2AA
-22	3674.6	3676.3	H10N8F2-2AA
-23	3819.8	3822.0	H10N8F3-2AA
-24	3820.0	3822.0	H10N8F3-2AA
(d) Defucosyl HS			
a	1193.5	1194.1	H4N2-2AA (lacto-N-neohexaose)
b	1924.2	1924.4	H6N4-2AA (lacto-N-neodecaose)
c	2288.4	2289.4	H7N5-2AA (lacto-N-neododecaose)
d	2653.1	2654.0	H8N6-2AA (lacto-N-neotetradecaose)
e	3382.5	3384.1	H10N8-2AA (lacto-N-neooctadecaose)

tween 30 and 38 min (BS2-4 to BS2-10) are considered to have multi-Fuc residues. BS2-4 and BS2-5 have the core structure of

the LNnH unit and contain Fuc α 1-2 residues at the nonreducing ends because these fucose residues were specifically released by digestion with α 1-2 fucosidase (data not shown). BS2-6 and BS2-7 showed molecular ions at m/z 2988.7 and 3134.6, respectively, which correspond to the compositions of H7N7F2-2AA and H7N7F3-2AA. Peaks BS2-8 to BS2-10 were LNnTD containing multiple Fuc α 1-2 residues. As a group of characteristic oligosaccharides in BS2, oligosaccharides having 80 mass units larger than BS2-3 were observed between 42 and 49 min. Oligosaccharides (BS2-11 to BS2-14) showed molecular ions at m/z 2338.2, indicating the composition of H5N5F2-SO₃H-2AA. These oligosaccharides are considered to be isomers having both Fuc and sulfate groups at different positions.

We found 24 oligosaccharide peaks in total in the HS milk sample. These oligosaccharides had LNnH, LNnD, lacto-N-neododecaose (LNnDD), LNnTD, and lacto-N-neooctadecaose (LNnOD) as core structures (Table 1, part c). HS-1 and HS-2 observed at 20.0 and 21.5 min, respectively, gave molecular ions at m/z 1193.2 and 1339.3, which correspond to H4N2-2AA and H4N2F1-2AA, respectively. HS-6, -7, -8, -9, and -10 showed molecular ions at m/z 1923.9, 2068.7, 2069.5, 2215.2, and 2215.5, respectively. The molecular ion of HS-6 is consistent with the theoretical mw of H6N4-2AA, suggesting the structure of LNnD. HS-7/8 (m/z 2068.7/2069.5) and HS-9/10 (m/z 2215.2/2215.5) showed larger molecular ions than those of HS-6 by one Fuc (146 mass units) and two Fuc (292 mass units), respectively. From these results, we concluded that these oligosaccharides had the core structure of LNnD to which different numbers of Fuc residues were attached (for confirmation of the structures, see below). The most abundant group of peaks (HS-14 to HS-19) commonly contains LNnTD (HS-14 at m/z 2652.7) as the core structure. HS-15, -16, -17, and -18/19 showed m/z values larger than LNnTD by one (146 mass units) to four (584 mass units) Fuc residues. These results indicate that HS-14 to HS-19 have LNnTD unit to which different numbers of Fuc residues are attached. The peaks (HS-20 to HS-24) having high molecular weights (m/z 3382.8 to 3820.0) were also observed between 50 and 54 min. These ladder peaks contained LNnOD (theoretical mw 3384.1) as the core structure to which one to four fucose residues are attached.

Urahama and coworkers reported that GlcNAc residues of LNnT and LNnH units in BS and HS oligosaccharides are not fucosylated. In contrast, most GlcNAc residues in bear milk oligosaccharides are fucosylated at OH-3 [17,18]. After digestion of asialo-oligosaccharides derived from HS with α 1-3,4 fucosidase from *Streptomyces* sp. 142 or α 1-2 fucosidase from *Corynebacterium* sp., the digestion products were analyzed by NP-HPLC. α 1-3,4 Fucosidase did not act on the HS oligosaccharides, indicating that the oligosaccharides were not substituted at OH-3/4 on GlcNAc residues with fucose residues (data not shown). In contrast, most peaks disappeared on digestion with α 1-2 fucosidase, and five peaks were observed at 19 min (peak a), 32 min (peak b), 38 min (peak c), 43 min (peak d), and 51 min (peak e) (Fig. 1C and Table 1, part d). These data indicated that all core oligosaccharides observed in Fig. 1C(2) were composed of one reducing terminal lactose and 2 to 8 LacNAc units. Peaks a and b showed molecular ions at m/z 1193.5 and 1924.2, which correspond to the molecular masses of LNnH and LNnD, respectively. Peak c showed a molecular ion at m/z 2288.4 of LNnDD. Peak d was the most abundant one in HS and showed the molecular ion of LNnTD at m/z 2653.1. In a similar manner, we confirmed that peak e was due to LNnOD.

Characterization of the branching pattern of BS oligosaccharides

The structures of dominant oligosaccharides in BS1 (BS1-1, -3, and -4 in Fig. 1B) were easily assigned. Digestion of BS1-1 with β -galactosidase from jack beans caused loss of two galactose res-

idues ($\Delta m/z$ 324). Further digestion with β -*N*-acetylhexosaminidase gave a molecular ion at m/z 461 corresponding to lactose with 2AA (data not shown). From the data, we concluded that BS1-1 was substituted with two Gal-GlcNAc residues at Gal OH-6 and Gal OH-3 of lactose. The BS1-3 and BS1-4 were digested with α 1-2 fucosidase to afford an ion at m/z 1923.5 corresponding to LNnD. Digestion of the defucosylated oligosaccharide with β -galactosidase caused the loss of three galactose residues ($\Delta m/z$ 486), and the product showed a molecular ion at m/z 1435. From these results, we concluded that the core oligosaccharide of BS1-3 and BS1-4 is substituted with two LacNAc units on either branch of LNnH (data not shown). Oligosaccharides observed between 38 and 42 min gave molecular ions H6N4F1-SO₃H-2AA and H8N6F1-SO₃H-2AA (m/z 2151.2 and 3026.6, respectively). Among these oligosaccharides, we obtained BS1-9 as nearly pure state (Fig. 2). Digestion of the BS1-9 with α 1-2 fucosidase caused the loss of one fucose residue and gave a molecular ion corresponding to LNnD (m/z 2005.1) with a sulfate group. Serial digestions of the defucosylated oligosaccharide with β -galactosidase and β -*N*-acetylhexosaminidase caused the loss of two LacNAc units and gave a molecular ion corresponding to the composition of H4N2-SO₃H-2AA (m/z 1275.6). These results indicated that the defucosylated oligosaccharide has two nonsubstituted Gal residues at the nonreducing ends. Further digestion of the oligosaccharide with β -galactosidase gave a molecular ion, H3N2-SO₃H-2AA (m/z 1113.3). Urashima and coworkers reported that some oligosaccharides in BS milk were sulfated at the nonreducing terminal Gal OH-3 [18]. From this report and our observations, we concluded that the oligosaccharides from BS1-6 to BS1-9 were due to LNnD and LNnTD substituted with one sulfate group at the OH-3 position of the nonreducing terminal Gal residue.

Structures of dominant oligosaccharides in BS2 (BS2-1 and BS2-3) were confirmed in a similar manner. Digestion of BS2-1 with α 1-2 fucosidase caused the loss of one fucose residue (Fig. 3A). Further digestion with β -galactosidase gave a molecular ion (m/z 911.4) corresponding to H3N3-2AA. Finally, digestion with β -*N*-acetylhexosaminidase gave a molecular ion at m/z 505.1 corresponding to H1N1-2AA. Accordingly, we concluded that the core disaccharide at the reducing end in BS2-1 was Gal-GlcNAc and that BS2-1 was a hexasaccharide substituted with two LacNAc units at OH-6 and OH-3 of Gal residue of the terminal Gal-GlcNAc. Oligosaccharide BS2-3 was also digested with α 1-2 fucosidase to give a glycan showing the molecular ion at m/z 1966.5 corresponding to H5N5-2AA (Fig. 3B). Digestion of the core oligosaccharide with β -galactosidase caused the loss of three galactose residues ($\Delta m/z$ 486). Further digestion with β -*N*-acetylhexosaminidase gave a molecular ion (m/z 869.9) corresponding to H2N2-2AA. Thus, we concluded that one of the branched units on BS2-1 was further substituted with two LacNAc residues. The characteristic oligosaccharides from BS2-11 to BS2-14 showed molecular ions at m/z 2238.1, which are consistent with the composition of H5N5F2-SO₃H-2AA. These oligosaccharides were digested with α 1-2 fucosidase to produce a signal at m/z 2046.3 corresponding to H5N5-SO₃H-2AA. Further digestion of the defucosylated oligosaccharide with β -galactosidase caused the loss of two Gal residues. These observations indicated that the oligosaccharides from BS2-11 to BS2-14 have two LacNAc branches substituted with α 1-2 Fuc residue (data not shown).

Characterization of the branching pattern of HS oligosaccharides

Digestion of the core oligosaccharide (A, peak a in Fig. 1C(2)) with β -galactosidase caused the loss of two galactose residues

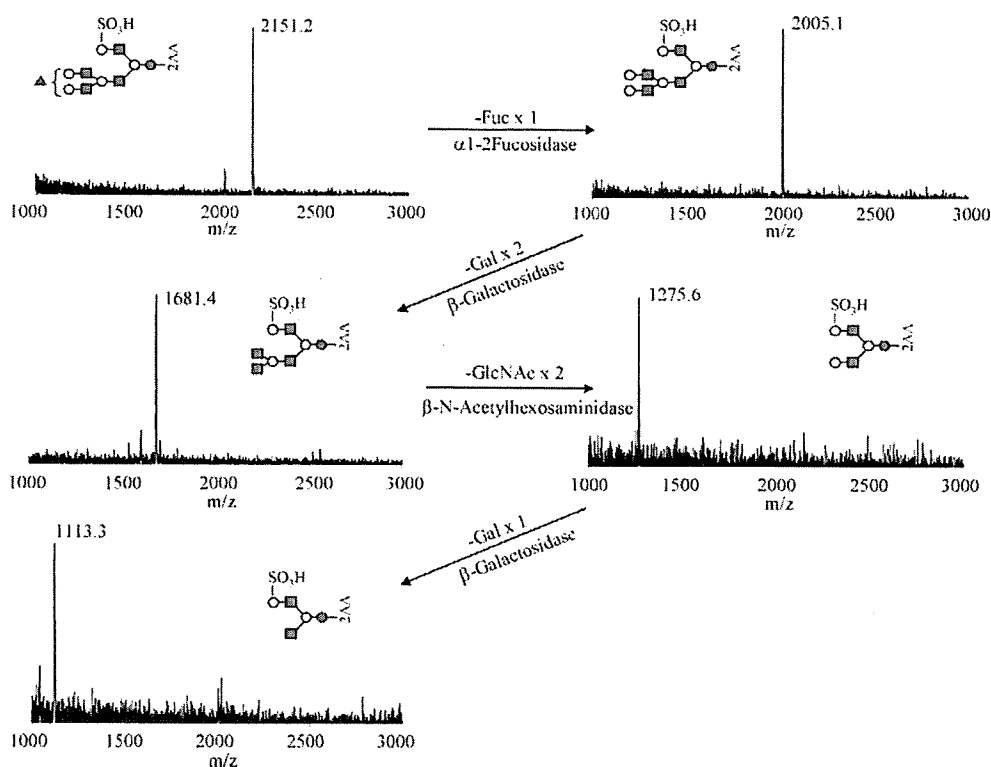


Fig. 2. Stepwise exoglycosidase digestion of characteristic oligosaccharide BS1-9 observed in Fig. 1B. Conditions for the enzymatic reaction with exoglycosidases are shown in Materials and methods. Symbols: open circles; Gal; filled circles, Glc; filled squares, GlcNAc; filled triangles, Fuc. Linkage positions are assigned tentatively.

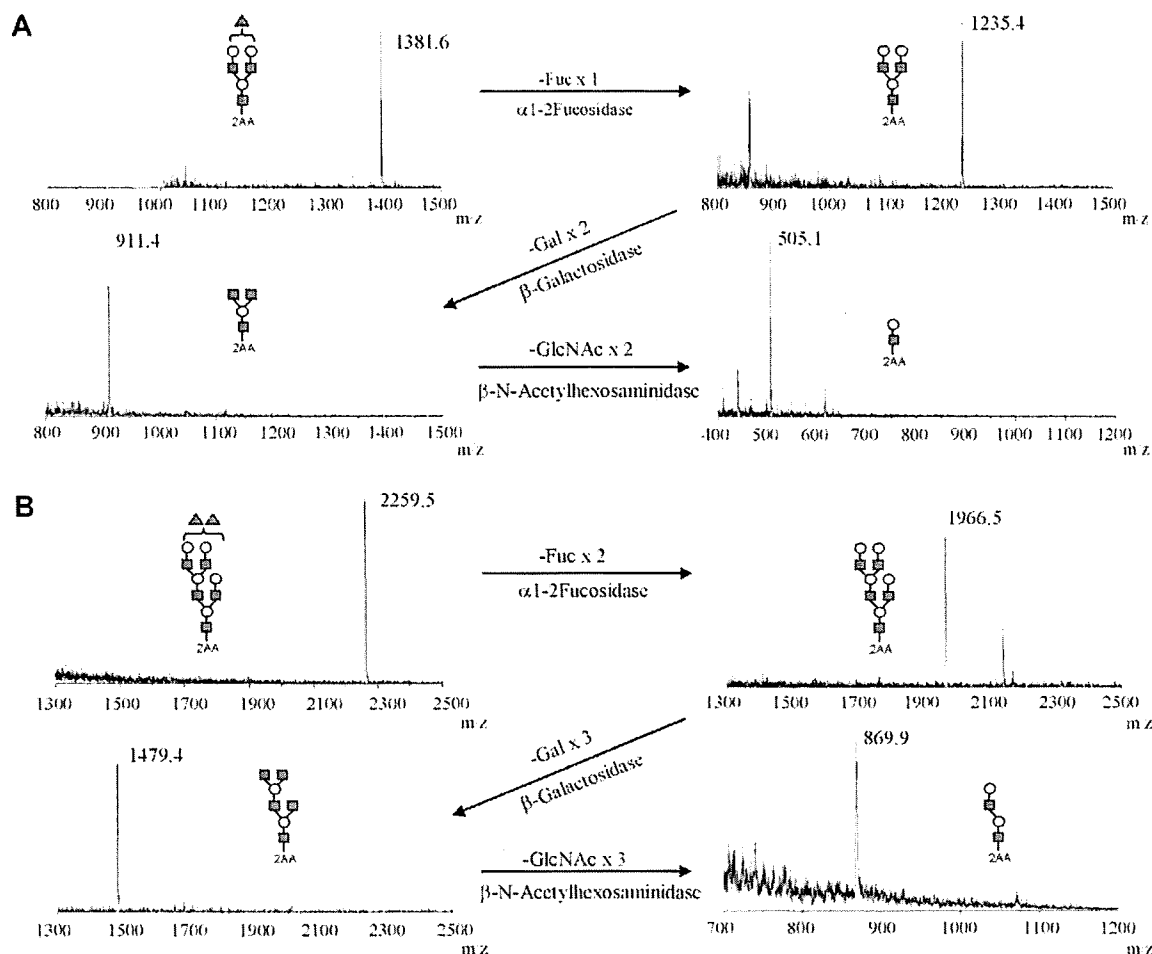


Fig. 3. Stepwise exoglycosidase digestion of characteristic oligosaccharides BS2-1 (A) and BS2-3 (B) observed in Fig. 1B. Symbols: open circles, Gal; filled circles, Glc; filled squares, GlcNAc; filled triangles, Fuc. Linkage positions are assigned tentatively.

($\Delta m/z$ 324) and gave a product ion at m/z 868.8 (Fig. 4A). The oligosaccharide at m/z 868.8 was further digested with β -*N*-acetylhexosaminidase, and a new ion corresponding to Gal-Glc-2AA was observed at m/z 462.4. From these observations, we concluded that the oligosaccharide (peak a) has the structure of Gal β 1-4GlcNAc β 1-6[Gal β 1-4GlcNAc β 1-3]Gal β 1-4Glc (LNnH). Digestion of the core oligosaccharide (B, peak b in Fig. 1C(2)) with β -galactosidase caused the loss of three galactose residues ($\Delta m/z$ 486), and the product showed a molecular ion at m/z 1437.5 (Fig. 4B). The oligosaccharide at m/z 1437.5 was further digested with β -*N*-acetylhexosaminidase to release three GlcNAc residues. These observations indicated that the core oligosaccharide (peak b) has a triantennary structure. The produced oligosaccharide corresponding to Gal-GlcNAc-Gal-Glc-2AA (m/z 826.7) was again digested with β -galactosidase to produce a peak at m/z 665.1 (GlcNAc-Gal-Glc-2AA). The structure was confirmed by comparison of the retention time with that of trisaccharide (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-2AA) prepared by digestion of lacto-*N*-tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) with β -galactosidase using HPLC on an ODS column and capillary electrophoresis (data not shown). These observations indicated that the core oligosaccharide (peak b) has two LacNAc units on the α 1-3 LacNAc branch of LNnH. Digestion of the core oligosaccharide (C, peak c in Fig. 1C(2)) with β -galactosidase caused the loss of three Gal residues ($\Delta m/z$ 486), and the

product showed a molecular ion at m/z 1801.9. The oligosaccharide at m/z 1801.9 was further digested with β -*N*-acetylhexosaminidase to produce a molecular ion at m/z 1193.8. The oligosaccharide has the structure of H6N4-2AA. These results indicated that peak c has a triantennary structure. The oligosaccharide (m/z 1193.8) was again digested with β -galactosidase to produce a peak at m/z 869.1 by the loss of two galactose residues. The course of digestion by a combination of exoglycosidases revealed that peak c was a dodecasaccharide having three LacNAc residues at nonreducing ends, and we concluded that the oligosaccharide of peak c has two LacNAc units and one LacNAc unit on both branches of LNnH. Digestion of the core oligosaccharide (D, peak d in Fig. 1C(2)) with β -galactosidase caused the loss of four galactose residues ($\Delta m/z$ 648), and the product showed a molecular ion at m/z 2004.5. The product was further digested with β -*N*-acetylhexosaminidase to produce an ion at m/z 1193.8 corresponding to LNnH. These observations indicated that peak d has a tetraantennary structure. The produced oligosaccharide corresponding to LNnH was again digested with β -galactosidase to produce a molecular ion at m/z 869.1. From these results, we concluded that peak d was a tetradecasaccharide having four LacNAc residues at the nonreducing ends and that both branches of LNnH were substituted with two LacNAc units. The oligosaccharide (E, peak e in Fig. 1C(2)) having the largest molecular mass (m/z 3382.5) present in HS milk caused

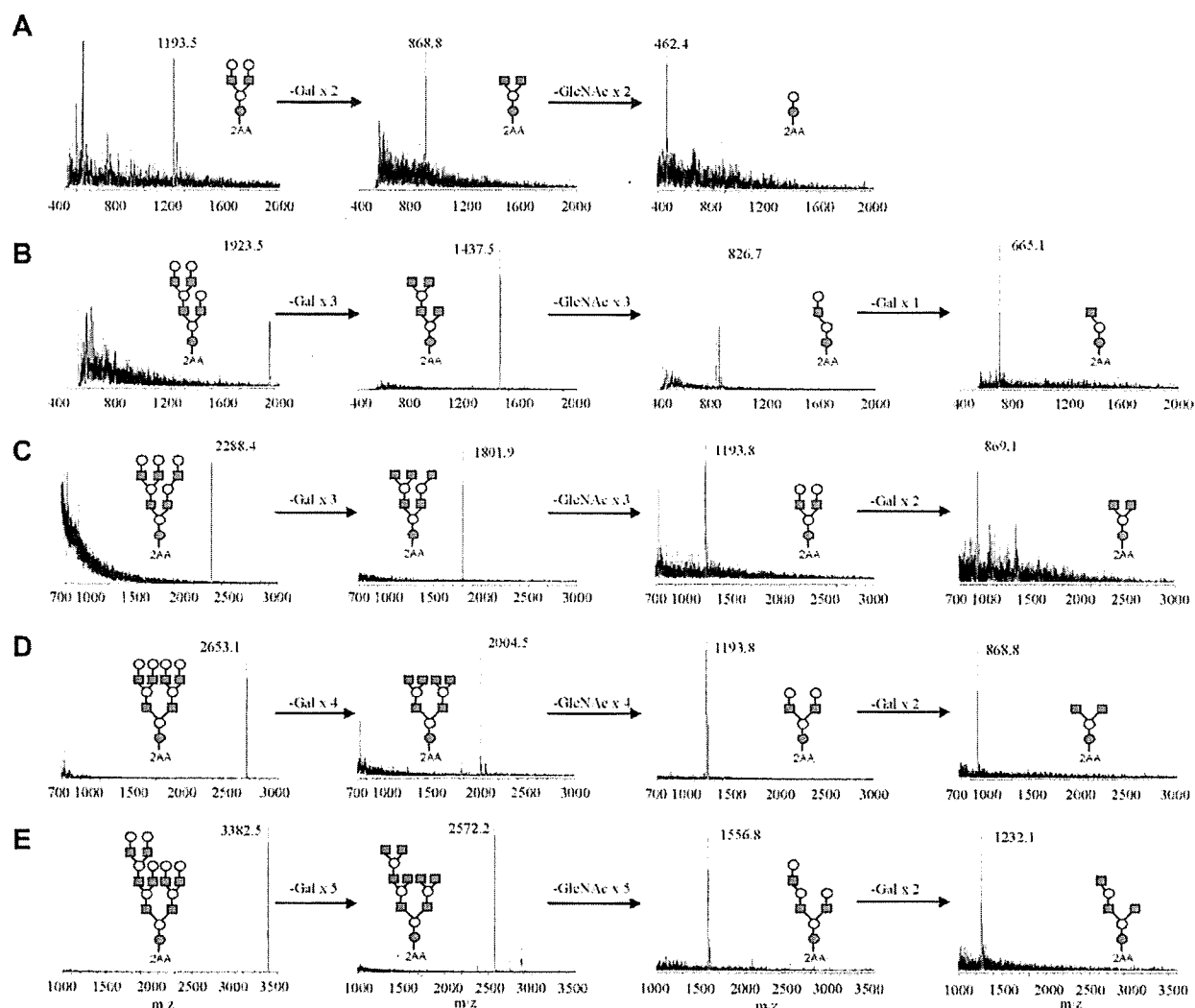


Fig. 4. Stepwise exoglycosidase digestion of core oligosaccharides derived from HS observed in Fig. 1B: (A) lacto-*N*-neohexaose (LNnH); (B) lacto-*N*-neodecaose (LNnD); (C) lacto-*N*-neododecaose (LNnDD); (D) lacto-*N*-neotetradecaose (LNnTD); (E) lacto-*N*-neooctaodecaose (LNnOD). Symbols: open circles, Gal; filled circles, Glc; filled squares, GlcNAc.

the loss of five galactose residues ($\Delta m/z$ 810) by digestion with β -galactosidase, and the product showed a molecular ion at m/z 2572.2. The product was further digested with β -*N*-acetylhexosaminidase to produce a molecular ion at m/z 1556.8. The oligosaccharide was again digested with β -galactosidase to produce a peak at m/z 1232.1. From these results, we concluded that the oligosaccharide derived from peak e was an octadecasaccharide, as shown in Fig. 4E.

Structural determination of fucosylated decaasaccharides by MALDI-QIT-TOF MS

The core oligosaccharides in HS milk are substituted with a different number of fucose residues, as shown by characteristic ladder patterns (Fig. 1B). We purified monofucosylated LNnD (MFLNnD, HS-7, and HS-8 in Fig. 1B) and difucosylated LNnD (DFLNnD, HS-9, and HS-10 in Fig. 1B) and analyzed them using MALDI-QIT-TOF MS. Fig. 5 shows the MS/MS spectra using $[M + Na]^+$ observed at m/z 2093.1 for the purified MFLNnD (Fig. 5A and B). The Y ion at m/z 1947.5/1947.2 corresponding to the loss of 146 mass units (dHex-18 mass) from $[M + Na]^+$ indicates the presence of a Fuc residue.

The Y ions at m/z 1728.0/1728.1 and 1581.9/1582.0 are due to H5N3F1-2AA and H5N3-2AA, respectively. These fragment ions were commonly observed in HS-7 and HS-8. We also found the set of B ion series, $[H2N2]^+$ at m/z 753.5/754.5, $[H3N3]^+$ at m/z 1118.7/1118.8, $[H3N3F1]^+$ at m/z 1264.8/1264.9, and $[H4N3F1]^+$ at m/z 1791. Characteristic ions observed at m/z 1264.8 (Fig. 5A) and m/z 1118.8 (Fig. 5B) suggested the difference in the linkage positions of Fuc residues at the nonreducing Gal residues. The B ion at m/z 1264.8 ($B_{5\alpha}$) indicates that a Fuc residue is linked to the most outer LacNAc residue. The B ion at m/z 1118.8 corresponding to three LacNAc units suggests that one Fuc is attached to the 6-branch side of the reducing terminal lactose. Urashima and coworkers reported that small oligosaccharides in HS milk contained type II LacNAc (Gal β 1-4GlcNAc-R) but not type I LacNAc (Gal β 1-3GlcNAc-R) [14]. Thus, the oligosaccharides HS-7 and HS-8 are assigned to those as indicated in Fig. 5.

Fig. 6 shows the MS/MS spectra of the ions at m/z 2239.8 for the $[M + Na]^+$ of DFLNnD (HS-9 and HS-10 in Fig. 1B). The Y ions at m/z 2093.3 corresponding to a loss of 146 (dHex-18 mass) from $[M + Na]^+$ indicate the presence of Fuc residue. In a similar manner, in the case of MS/MS of MFLNnD (Fig. 5), the Y ions observed at m/z

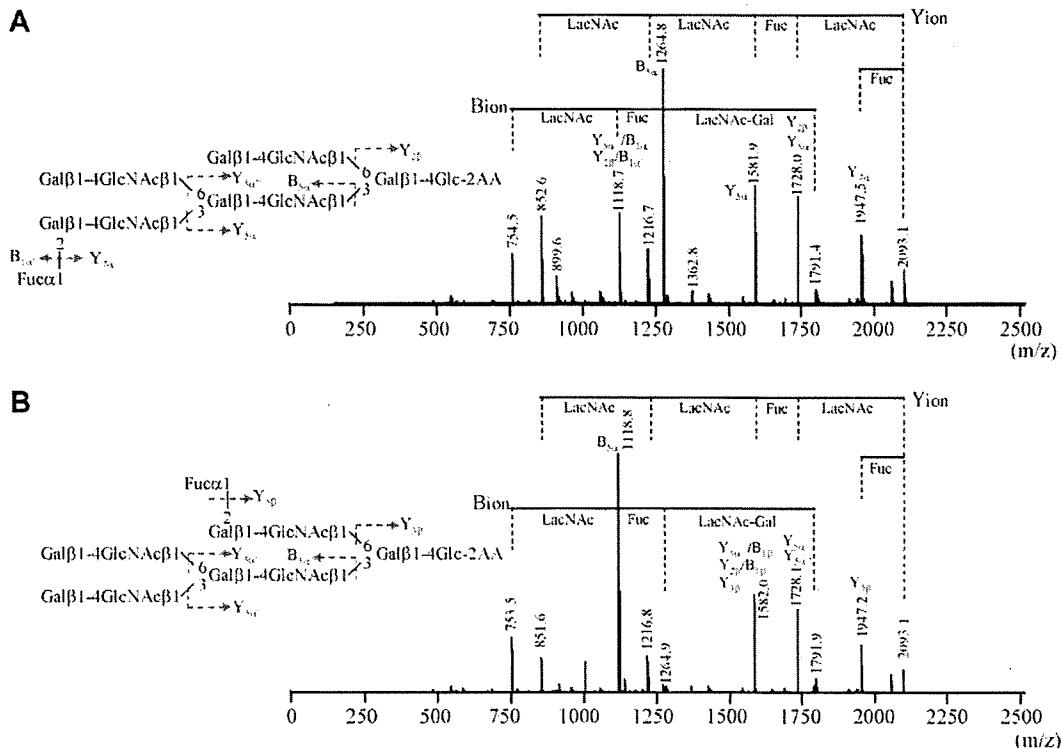


Fig. 5. MS/MS spectra of monofucosyl LNnD HS-7 (A) and HS-8 (B). The dotted lines on the spectra indicate type of cleavage (Y or B ion) according to Domon and Costello's nomenclature [48].

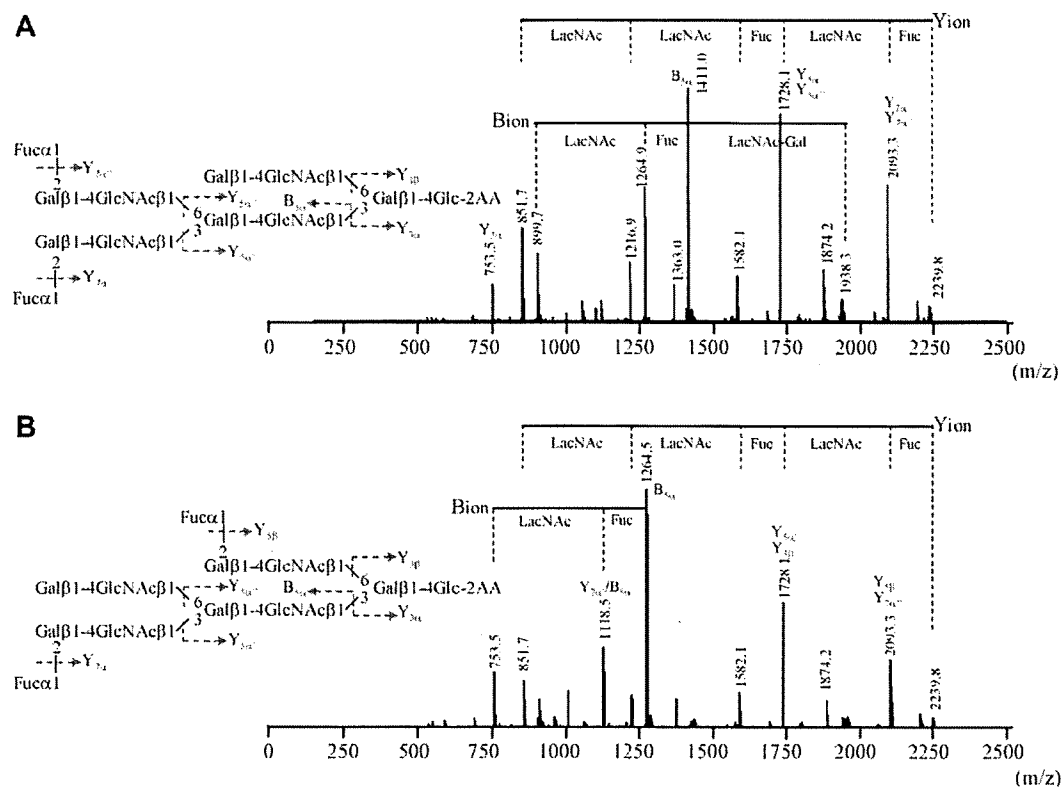


Fig. 6. MS/MS spectra of difucosyl LNnD HS-9 (A) and HS-10 (B). The dotted lines on the spectra indicate type of cleavage (Y or B ion) according to Domon and Costello's nomenclature [48].