

海外の薬局方の動向を調査することにより、多糖類の各条改正や新規収載における課題を抽出した。

2. 研究方法

2.1. 糖タンパク質の糖鎖試験

2.1.1. 酵素を用いた N-結合型糖鎖の調製

糖タンパク質のモデルとして、イデュルスルファーゼを用いた。糖タンパク質 (100 μ g) を 8 M グアニジン塩酸及び 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl (pH8.6) 50 μ L に溶解した後、1 M dithiothreitol 2 μ L を加えて (終末 40 mM), 65 °C で 30 分間還元した。4.8 μ L の 1M モノヨード酢酸ナトリウムを加えて (終末 96 mM), 暗所に室温で 40 分間放置した。反応溶液をセファデックス G-25 充填カラムに負荷し、超純水を用いてタンパク質画分を回収した後、凍結乾燥した。凍結乾燥物を 100 μ l の 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶かし、2 unit の PNGase F を加えて 37°C で 16 時間反応させた。反応溶液に冷エタノール (最終濃度 70%) を加えてタンパク質を沈殿させ、8,000 \times g, 4°C で 5 分遠心分離後、遊離オリゴ糖鎖を含む上清を回収し、減圧下、蒸発乾固した。オリゴ糖を 250 μ L の超純水に溶かし、250 μ L の 1 M NaBH₄ を加えて室温で 16 時間放置した。稀酢酸を少量加えて過剰の試薬を分解した。反応溶液をグラファイトカーボン充填固相抽出管に負荷し、超純水で洗浄した。アセトニトリル (45%) を含む pH8.5 の 5mM 酢酸アンモニウム緩衝液でオリゴ糖を溶出し、凍結乾燥した。

2.1.2. LC/MS 及び LC/MS/MS

nanoLC は Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。2% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (移動層 A), 及び 80% アセトニトリルを含む 5mM 重炭酸アンモニウム緩衝液 (移動層 B) を用意し、

グラファイトカーボンを充填したカラム (HyperCarb, 0.075 \times 150 mm, 粒子径 5 μ m, Thermo Fisher Scientific) を A 及び B の混液 (98 : 2) で 30 分間平衡化した。流速は、300nL/min に設定した。カラムの出口側に電圧を印加するキャピラリーを接続し、ナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を用いて、質量分析計との距離や角度を調節した。質量分析 (MS) 装置は Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS, LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用した。質量分析計の印加電圧、マルチプライヤー、キャピラリー温度などを適切な値に設定し、質量校正標準物質を用いて質量校正を行ったのち、予め標準物質を用いて装置の質量真度を確認した。また、スプレーの安定性を確認するため、移動層を溶出しながらキャピラリーに電圧を印加し、スプレーが安定していること、及びバックグラウンドが低く保たれていることを確認した。分析に使用したトラップカラム、グラジュエント条件、シングル MS 及び衝突誘起解離 (CID) を用いたタンデム質量分析 (MS/MS) の測定条件は、以下の通りであった。

トラップカラム：グラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.3 \times 5.0 mm, 粒子径 7 μ m, Thermo Fisher Scientific)

グラジュエント条件：5–65%B 溶媒 (リニアグラジュエント, 60 分間)

シングル MS スキャンモード：FT-MS
MS/MS スキャンモード：IT-MS

スキャン範囲：m/z 700-2,000

キャピラリー温度：200°C

スプレー電圧：2.5kV

2.2. 多糖類の試験法に関する国際的動向調査

4th workshop on the characterization

of heparin products (第4回ヘパリン製剤の品質評価に関するワークショップ) 7月ロンドン開催に参加し、講演を聴講した。また、口頭発表及びポスター発表等を通じて、各国の関係者と意見交換した。

3. 結果

3.1. 糖タンパク質の糖鎖試験

3.1.1. モデル糖タンパク質の LC/MS

質量分析法や LC/MS は、多くの遺伝子組換えタンパク質医薬品の糖鎖解析に利用されている。我々が 2000 年 *Anal. Biochem.* に発表したグラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS は、現在では糖タンパク質糖鎖の解析法として、最もよく用いられている方法の一つになっている。実際、最近公開された USP や EP の糖鎖試験法でも、グラファイトカーボンカラムと LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングが取り上げられている。日局糖鎖試験法をまとめるにあたって、糖タンパク質糖鎖の LC/MS を実施する際の要件をまとめておく必要があると思われる。そこで、モデル糖タンパク質としてイデュルスルファターゼを用いて、LC/MS による糖鎖分析を行い、課題の抽出を行った。

イデュルスルファターゼは、ヒト線維肉腫細胞株由来の細胞株により産生される糖タンパク質で、ヒトイズロン酸-2-スルファターゼと同じアミノ酸配列を持ち、2007 年にムコ多糖症 II 型治療薬として承認されている。ムコ多糖症 II 型は、リソソーム内でムコ多糖の代謝に関係する酵素 イズロン酸-2-スルファターゼの欠損によって起きる疾患で、ヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸エステルがリソソームに蓄積し、細胞腫脹、臓器肥大、細胞死、細胞破壊及びその他臓器機能障害が発現する。イデュルスルファターゼは、リソソーム内のヘパラン硫酸及びデルマタン硫酸エステルの非還元末端 2-スルホ-イズロン酸の硫酸基を分解することによって、ムコ多糖の蓄積を抑える。イデュ

ルスルファターゼには、8つの N-結合型結合部位が存在する。マンノース 6 リン酸が付加した糖鎖及びシアル酸結合糖鎖は、生物活性や体内動態に影響するので、N-結合型糖鎖の解析は重要である。

図 1A 及び 1B にそれぞれ、ポジティブ及びネガティブイオンモードによって得られた N-結合型糖鎖の全イオン電流クロマトグラム (TIC) を示す。各ピークの糖鎖構造は、質量及び MS/MS によって得られたフラグメントパターンから推定した。図 2A に代表的マススペクトルとして、ピーク C のマススペクトルを示す。2価 ($[M+2H]^{2+}$) のモノアイソトピックピークの m/z 値 1040.89 から糖鎖の質量を 2079.78 と求めた。この糖鎖の単糖組成は、質量から、 $\text{Fuc}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuNAc}_1$ (主同位体質量から求めた計算質量: 2079.76) と推定された。図 2B は、ピーク C の糖鎖の 2 価イオン (m/z 1040.89) を前駆イオンとして、CID MS/MS を行って得られたプロダクトイオンスペクトルである。この糖鎖の構造は、フラグメントパターンから、図 2B 内に示すような配列をもつものと推定された。同様に、主なピークのマススペクトルを解析することによって、イデュルスルファターゼの糖鎖の構造と分布を推定することができた。表 1 に主なピークの実測値 (m/z 値と質量)、計算質量、及び推定単糖組成を示す。

モデル糖タンパク質の分析を実施することにより、糖鎖試験法の中で質量分析法を解説するときの要点として、試料調製、システムの最適化、データ解析 (質量の求め方、フラグメントの解釈) が挙げられることが示唆された。それを踏まえ、糖鎖の LC/MS の要件として以下を作成した。

3.1.2. 糖鎖の LC/MS の要件

グラファイトカーボンカラムを接続した LC/MS 及び LC/MS/MS を用いて、

糖タンパク質の糖鎖を分析するときは、図3を参考にする。N-結合型糖鎖の遊離に当たっては、糖鎖の切り出しを容易にするため、はじめに、ジスルフィド結合の還元とチオール基のアルキル化を行う。つぎに、酵素処理等により糖鎖を切り出し、LCカラム内でアノマーが分離されることを防ぐために還元末端をNaBH₄で還元する。グラファイトカーボンが充填された固相抽出管を用いて試料を脱塩し、遊離糖鎖を回収する。O-結合型糖鎖はβ脱離法により遊離させる。別に、ヒドラジンを用いてN-結合型糖鎖及びO-結合型糖鎖を切り出す方法がある。

遊離糖鎖をグラファイトカーボンカラムを接続したHPLCに注入し、マススペクトルを取得する。スキャンごとに、もっともピーク強度の高いイオンを前駆イオンとしてMS/MSを行う。ポジティブイオンモードで測定した後、必要に応じてネガティブイオンモードで測定する。装置の仕様によっては、ポジティブイオンモードで検出されない糖鎖、あるいはネガティブイオンモードで検出されない糖鎖があることに注意する。

HPLCによって得られたクロマトグラムが、糖鎖の分布の特徴を表しているときは、糖鎖プロファイルとして扱うことができる。但し、糖鎖のイオン化効率は構造によって異なるので、ピーク面積比は結合比を正確に表していないことに留意する。

MSにより得られたモノアイソトピックピークの m/z 値から、糖鎖の質量を求める。糖鎖構成元素の主同位体質量を加算して得られる計算質量と、実験により得られた質量を照合することにより、単糖組成を推定することができる。表2に糖鎖構成元素の主同位体質量を示す。分子量が大きい糖鎖を質量分解能が十分でない分析計を用いて測定するとき、モノアイソトピックピークが分離されないことがある。そのときは表2の原子量を用いて計算質量

を求め、実験により得られた平均質量と照合する。質量測定中にシアル酸や硫酸基が解離するケースがあることに注意する。

糖鎖をCIDにより開裂させると、通常、グリコシド結合が開裂して、非還元末端側を含むBイオンと、還元末端側を含むYイオンが生じる(図4A)。Bイオンは非還元末端側から順にB_{1,2,...,m}と、またYイオンは還元末端側から順にY_{1,2,...,n}と表記する(図4B)。これらのフラグメントを組み合わせることにより、ある程度糖鎖構造を推定することが可能である。プロダクトイオンスペクトル上のフラグメントのピーク強度から結合様式等を推定する例もみられるが、フラグメンテーションパターンは装置の仕様に依存することに注意する。

MSにより単糖組成が判明しても、可能な組み合わせはたくさんあるので、構造解析においては、MS/MSだけでなく、エキソグリコシダーゼ消化法など他の分析方法とMSを組み合わせるのも一考である。

3.2. 多糖類の試験法に関する国際調査

2010年7月8日～9日、英国ロンドンにおいて第4回ヘパリン製剤の品質評価に関するワークショップ“4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products”が開催された。本ワークショップは、血液凝固の防止等に汎用される医療上重要な生物薬品であるヘパリンの品質・有効性・安全性確保を目的として、欧米の薬局方や国際標準品の策定に関わる機関の主催により、毎年開催されているものである。我が国にとっても、日本薬局方ヘパリン各条改正の現状を中心とした取り組みを紹介すると共に、海外のヘパリン製造業者や規制当局の動向を理解するために、非常に有用な会議である。

本年のワークショップでは、日米欧薬局方ヘパリン各条改正の現状の他、

ヘパリンの製法と品質の関連, 原材料, 品質試験等について, 最新情報が報告された. 2007 年秋から 2008 年春にかけて欧米で死亡例を含む有害事象を生じた OSCS 混入事件を機に, 各局方では試験項目の追加や試験条件の改良, 規格値の厳格化が進められてきた. OSCS の混入検出に関しては $^1\text{H-NMR}$ を用いた試験が三局で採用される等, 試験法がほぼ確立されたと思われる. 継続してヘパリン製剤の品質の一層の向上を目指し, 現在も各局でさらなる改正に向けた検討が行われている.

昨年までのワークショップと比較した今回の特徴は, ヘパリンの品質試験のみでなく, 製法に関する演題や, 製法と品質の関連を明らかにした演題が複数あったことである. 古典的な生物薬品であるヘパリンの品質確保においても, 製造工程の理解と管理により品質確保を図る Quality by Design の考え方を取り入れることの有用性が述べられる等, 近年の医薬品品質管理の潮流が波及していることが伺われた. 本ワークショップの講演スライドは, <http://www.hpa-events.org.uk/hpa/frontend/reg/tOtherPage.csp?pageID=50747&eventID=111&eventID=111> で公開されている. 会議の内容は以下の通りであった.

3.2.1. 日米欧薬局方ヘパリン各条改正の現状と今後の予定

3.2.1.1 米国薬局方

Anita Szajek, USP; USP initiates stage 3 revision of heparin monographs –Are we there yet?

USP ではヘパリン各条の改正 Stage2 を 2009 年 10 月に施行し, 現在, Stage3 の改正に向けた検討を進めている. FDA から, 以下のとおり改正の要望を受けている.

- ・ NMR の感度を上げ, OSCS の検出限界を 0.1% にすること
- ・ タンパク質及び核酸の限度試験の感

度を上げ, タンパク質の限度試験では検出限界を現行の 1.0% から 0.1% にすること

- ・ ヘパリンの分子量はヘパリン起因性血小板減少症の発症と関連するため, 分子量試験を設定すること

- ・ 脂質の純度試験を設定すること

現在, USP では下記の検討を行っている.

- ・ $^1\text{H-NMR}$ の高感度化

- ・ 強塩基性陰イオン交換 HPLC(SAX-HPLC)のカラム変更による分離能向上と分析時間の短縮

- ・ タンパク質限度試験の限度値引き下げ (1.0%→0.1%)

- ・ 核酸限度試験の新規試験法設定

- ・ 分子量試験法の設定

ヘパリンカルシウムは米国で販売されている製品がないため, 原薬製剤ともに各条を削除する予定である. 基原については, 信仰上の理由でブタ由来製品を使えない人がいるため, ブタには限定していない.

3.2.1.2. 欧州薬局方

Laure Taconet, EDQM; European Pharmacopoeia

2010 年 8 月の改正内容は以下のとおり.

本質: 含量規格値を 150 IU/mg 以上から 180 IU/mg 以上に変更 (投与経路別の規格は廃止).

製造: 全ての製造工程は適切な品質マネジメントシステムに基づき管理されるべきこと, 由来する種及び他の種に由来する原料が混入していないことを製造工程において適切な試験により確認すること, を明記.

確認試験:

- ・ 旋光度による試験を $^1\text{H-NMR}$ に変更

- ・ ゴーン電気泳動による試験を SAX-HPLC に変更

純度試験:

- ・ 核酸限度試験の限度値 (OD260) を 0.20 以下から 0.15 以下に引き下げ

- ・ タンパク質限度試験の試験法を吸光

光度法からローリー法に変更し規格値を 0.5%以下に

- ・亜硝酸分解を利用した類縁物質試験 (SAX-HPLC) の設定
- ・窒素含量の下限を設定 (1.5~2.5%)
- ・重金属限度試験の試験法を一般試験法 方法 C から方法 F に変更(重金属試験に関する EP の共通方針を反映)
- ・標準品は, NMR 確認試験用ヘパリンナトリウム, NMR 用確認試験用ヘパリンカルシウム, 理化学試験用ヘパリン, デルマタン硫酸エステル (DS) 及び OSCS を設定

3.2.1.3 日本薬局方

Akiko Ishii, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, NIHS; Revision of heparin sodium and heparin calcium monographs in Japanese Pharmacopoeia

日局では, 2008 年 7 月の一部改正において ¹H-NMR を用いた OSCS 純度試験を収載した。また 2009 年 7 月の第 15 局第二追補において, ヘパリンナトリウムの基原の記載を改正し, ヘパリンカルシウム各条を収載した。さらに 2010 年 7 月一部改正として, ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムの確認試験 (弱塩基性陰イオン交換 HPLC; WAX-HPLC) と類縁物質試験 (WAX-HPLC), 並びにヘパリンナトリウムのガラクトサミン純度試験を収載予定である (注: 2010 年 7 月 30 日に告示された)。新たに開発した WAX-HPLC に関しては, 論文としても公表している (Hashii N. Kawasaki N. et al. *Biologicals*, 38, 539, 2010)。

今後は, ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウム各条に共通して, 純度試験 (タンパク質, 核酸), 抗 IIa 活性試験の設定を予定している。また, 130 単位/mg 以上と規定されている腸粘膜由来ヘパリンナトリウムの含量規格値の見直しが必要であると考えている。

3.2.1.4. ヘパリン事件が規制プロセスと公的基準書に与えた影響

Ali Al-Hakim, FDA; Impact of heparin crisis on regulatory process and public standards

OSCS 混入事件以前の USP ヘパリンナトリウム各条の試験では, OSCS 混入バッチでも規格に適合し, 異物混入を検出することができなかった。事件後に, ¹H-NMR, SAX-HPLC, ガラクトサミン限度値, 残留溶媒, 製造工程の感染性物質除去不活化のバリデーションの必要性, を追加し, 力価の含量規格値, 抗 Xa/抗 IIa 活性比, タンパク質限度値, 核酸限度値を厳格化した。

OSCS 混入事件から得られた教訓として, ヘパリンの公的基準書を最新のものにすること, 及び, 製造や品質管理のプロセスを改善すること, の 2 点があげられる。製造や品質管理のプロセスに関しては, 原材料の適切な管理, 品質に影響する可能性のある製造工程のリスク要因の検討, 重要品質特性の同定, 重要工程パラメータの検討を含む工程管理を実施することにより, 製造工程から品質を規定する Quality by Design アプローチを実践することが推奨される。

3.2.2. ヘパリンの製法と品質の関連

3.2.2.1. ヘパリンの原材料と品質確保のための課題

Yan Wang, Scientific Protein Laboratories; Challenges in sourcing Chinese crude heparin

世界市場におけるブタの生産は, 56%が中国, 22%が EU, 12%が米国及びカナダによるものであり, 中国が半数以上をしめている。ヘパリン製造工程の前半は, 屠殺場における腸の採取, casing workshop における粘膜採取, 粗精製ヘパリン workshop における粗精製ヘパリン原料の調製, 粗精製ヘパリン調製業者における粗精製ヘパリンの調製からなる。屠殺場は食肉加工に関して政府の規制下にあるが, それに続

く工程は政府の監視が限定的である。

粗精製ヘパリン供給体制の特徴として、工程が長く複雑であり多くの業者が関与していること、文書管理が不十分なケースがあること、品質に関する試験が限定的であること、が挙げられる。このため、認められていない原材料の利用によるブタ以外の種のヘパリン混入や、化学合成品の混入といった懸念がある。ヘパリン製造の出発原料は粗精製ヘパリンであると認識されており、これ以前は GMP 管理下でない。これらの懸念を解消するためには、腸粘膜の調達から粗精製ヘパリンの製造までを含む供給体制を、適切に管理することが望まれる。

3.2.2.2.ヘパリンの製造工程

Kristian B Johansen, USP; Overview of heparin manufacture and process control

ヘパリンの製造工程は、抽出、分離、精製の工程からなる。抽出工程では、*alcalase* 等の酵素を用いてタンパク質を分解する。次にアルカリ性水性環境下で、高温、高塩素濃度にし、加水分解する。分離工程では、アンモニウム塩と複合体を形成、またはアンモニウム基をもつ樹脂に結合させ、溶出後、沈殿させる。これを乾燥し、粗精製ヘパリンとする。複合体形成あるいは樹脂への結合、溶出および沈殿の工程は、類縁物質や不純物の含量に影響する。重要な工程パラメータは、複合体形成または樹脂結合と溶出の際の塩素イオン濃度、pH 及び温度、ならびに、沈殿の際の溶媒の種類と量、および塩素イオン濃度である。精製工程は、酸化、沈殿、乾燥からなり、エンドトキシン、バイオバーデン、ウイルス、および色の管理にも重要である。酸化工程の酸化剤の種類によってはシュウ酸のような不純物が生じ、ヘパリンの部分的な分解により平均分子量が小さくなることがある。重要な工程パラメータは、酸化工程における酸化剤の種類と量、

pH、温度、及び反応時間、ならびに、沈殿の際の溶媒と塩素イオンの種類と量である。

3.2.3. ヘパリンの製造工程と品質の関連：酸化剤の種類と NMR 解析結果

3.2.3.1. Ishan Capila, Momenta

Pharmaceuticals; Characterization

and control of unfractionated heparins

ヘパリンの精製工程において、酸化処理は脱色及びエンドトキシンの除去等を目的として実施されるが、過マンガン酸カリウムを用いて酸化処理した未分画ヘパリンの $^1\text{H-NMR}$ を測定したとき、 $\delta 2.10$ ppm 付近にシグナルが検出されることが確認された。このシグナルを、異核種間一量子コヒーレンス分光法 (HSQC) 及び異核種間遠隔相関分光法 (HMBC) 等の二次元 NMR により帰属した結果、*N*-アセチルグルコサミン酸の *N*-アセチル基由来のシグナルであることが明らかとなった。*N*-アセチルグルコサミン酸は、ヘパリン還元末端の *N*-アセチルグルコサミンの1位のアルデヒド基が過マンガン酸カリウムにより酸化されることで生じるものと考えられる。二次元 NMR は *N*-アセチルグルコサミン酸等のヘパリン製造工程由来不純物の同定及び構造解析に有用であることが示唆された。

参考文献：Beccati D., et al.

Carbohydrate Polymers 82, 699, 2010

3.2.3.2. Christian Viskov,

Sanofi-Aventis; Consequences of OSCS Crisis on Heparin Compliance to USP Proposed Monograph

USP 各条ヘパリンナトリウムの $^1\text{H-NMR}$ による確認試験では、 $\delta 0.10 \sim 2.00$ ppm, $\delta 2.10 \sim 3.20$ ppm 及び $\delta 5.70 \sim 8.00$ ppm に観測される未同定シグナルの高さの合計が基準シグナルの高さの平均値の 4%以下になることを確認する必要がある。昨年度のワークショップでは、 $\delta 2.18$ ppm に 3-*O*-アセチルイブロン酸に由来するシグナルが観

測されるヘパリン原薬があることを報告した。今回新たに、 $\delta 2.10$ ppm にシグナルが観測されるヘパリン原薬があることが確認された。二次元 NMR によりこのシグナルを帰属した結果、*N*-アセチルグルコサミン酸の *N*-アセチル基由来のシグナルであった。*N*-アセチルグルコサミン酸は、ヘパリンの酸化工程において、過マンガン酸カリウムを用いたときに生じる。 $\delta 2.18$ 及び 2.10 ppm のシグナルはいずれも製造工程由来不純物由来のシグナルであること（未同定のシグナルではないこと）が確認されたことから、これらのシグナルが検出されるヘパリンについては、USP の規格に適合したヘパリンとして扱うべきである。

3.2.4. ヘパリン原材料の管理（基原動物種の確認）

3.2.4.1. ウシ由来ヘパリン

Giuseppe Mascellani, EDQM; Heparin: strengthend specifications, shortage and high selling prices: should bovine mucosal heparin be reconsidered?

OSCS 事件後、欧米薬局方においてヘパリン各条の試験が見直され、ガラクトサミン限度値が EP では 2%、USP では 1% に設定され、比活性は EP では 180 IU/mg、USP でも 180 U/mg に厳格化された。これらを背景に、ヘパリン製造工程が見直されている。また、ブタ由来ヘパリンが品薄となり、価格が高騰している。

ヘパリンが医薬品として用いられるようになった 60 年前から、ブタあるいはウシ由来ヘパリンが使われていたが、BSE 発生を機に、欧州および米国ではブタ由来ヘパリンのみが使われるようになった。現在、ウシ由来ヘパリンは南アメリカで使用されているが、ウシ由来ヘパリンとブタ由来ヘパリンは構造や活性が異なっている。特定のヘパリン製剤バッチとの相関は追跡調査できないが、2007-2008 年にブラジルで生じたヘパリン投与に伴う出血傾向や

手術前後の悪液質の増加は、ウシ由来ヘパリンの使用と関連している可能性がある。

3.2.4.2. ウシ由来ヘパリンとブタ由来ヘパリンの構造及び活性に関する差異

Paulo Mourao, University of Rio de Janeiro; Structural and functional differences between bovine and porcine mucosal heparin

2008 年にブラジルからロシュ社のヘパリン製剤が撤退した際に、主として心血管手術の際のヘパリン使用に伴う出血が増加した。アナフィラキシー様の症状を呈する OSCS 混入による副作用とは明らかに違っていた。ウシ由来ヘパリンが使用されていたことが背景にあると考えられる。

ウシ由来ヘパリンとブタ由来ヘパリンは、構造、抗凝固活性、出血傾向、実験血栓の阻害に要する用量、プロタミン中和曲線において違いがあり、両者は同等の医薬品ではない。ブタ由来ヘパリンはイズロン酸とグルコサミンからなる 2 糖あたり 3 個の硫酸基を含み、イズロン酸の 2 位及びグルコサミンの 2 位と 6 位に硫酸基を有している。これに対してウシ由来ヘパリンでは、グルコサミンの 50% はブタヘパリンと同様に 2 位と 6 位が硫酸化されているが、6 位が硫酸化されていないグルコサミンが 36%、2 位が硫酸化でなくアセチル化されているグルコサミンが 14% 含まれている。総じてウシ由来ヘパリンの方が硫酸化度が低い。

生物活性の点では、ウシ由来ヘパリンの抗凝固活性および抗 Xa 活性はブタ由来ヘパリンの約 50%、抗 IIa 活性は約 25% である。陰性荷電が低いためにトロンビンとの結合が弱いと考えられている。しかしながら、ヘパリンを投与したラットにおける出血傾向の用量依存性はブタ由来ヘパリンとウシ由来ヘパリンで差がなく、ウシ由来ヘパリンはブタ由来ヘパリンと比較して抗

凝固活性が低いものの、出血を起こし易いと考えられた。

参考文献：Aquino RS et al. *Thrombosis Haemostasis* 103, 1005, 2010

3.2.4.3.ヘパリンの品質管理に適用可能な qPCR 法の開発：異種動物由来原料の検出と残存 DNA の定量的検出

Pascal Anger, Sanofi-Aventis; New developments in qPCR applied to control of heparin quality

EP ヘパリン各条では製造の項において由来する種の確認が求められ、USP ヘパリン各条ではラベリングの項において由来する種を記載することが求められている。過去にはウシあるいはヒツジ由来のヘパリンの混入が起こったことが知られている (Houiste C. et al. *Clin Appl Thromb Hemost.* 15, 50, 2009)。サノフィ社では、粗精製ヘパリンの出荷試験において定量的 PCR (qPCR) による種の確認と混入物質の検出を行っている。また、精製ヘパリンの DNA 残存量の評価にも qPCR を用いている。

異種由来 DNA の検出に用いている qPCR の検出感度は、ブタ DNA がヘパリン中に 0.1 µg/mg 含まれているとき、ウシ DNA では 70 ppm、ヒツジ DNA では 700 ppm である。ヘパリナーゼ処理をしたサンプルを鋳型として Taq ポリメラーゼにより DNA を増幅するが、過硫酸化物はヘパリナーゼで分解されずに PCR 反応を阻害する。そのため、内部標準を添加して 2 つのプライマーセットを同時に適用することにより、内部標準の増幅阻害を指標に過硫酸化多糖類の混入も検知することができる。USP ヘパリン各条に規定されている DNA 限度値は、2 µg/mg に相当する。USP 一般試験法 <1130> にも記載されているように、バイオ医薬品では 100 ng/dose が DNA 残存量の上限とされており、ヘパリンの投与量を 100 mg とすると、DNA 限度値は 0.1 ng/mg となる。これらのことから、FDA より核酸

限度試験の感度改善が求められている。qPCR は、USP 一般試験法 <1125>, <1127>, <1130> で推奨されている方法でもある。現在用いている qPCR の検出限界は 1.5 ng/mg である。ミトコンドリア DNA を鋳型とする qPCR により、0.02 ng/mg を検出限界とする方法を開発中である。

3.2.4.4. qPCR を用いたウシ由来原料検出法のバリデーション

Sean Concannon, Pfizer; Validation of a qPCR method for remnant containment of crude heparin

TSE 伝播防止のため、反芻動物由来原料の混入を防止する方策が求められている。ウシ、ヒツジおよびヤギ由来原料の検出法として、感度、特異性、精度の点で、qPCR が優れている。反芻動物 Bov-A2 SINE 遺伝子座に対応するプライマープローブセットは、ウシ、ヒツジ及びヤギの当該 DNA に同程度の親和性を持つ一方、ブタ DNA に交差反応しない。ブタ PRE1-SINE 配列に対応するプライマープローブセットを同時に適用することにより、ブタ由来 DNA の残存量も測定することができる。試料の希釈とヘパリナーゼ処理は必要であるが、DNA の抽出・精製操作は不要である。粗精製ヘパリンを試料として qPCR のバリデーションを実施したところ、反芻動物由来 DNA は 0.3~3000 ppm の範囲で、ブタ由来 DNA は 0.3~6000 ppm の範囲で定量可能であった。本法は、GMP 出荷試験において用いられている。

3.2.5. ヘパリンの品質試験各論

3.2.5.1. NMR

3.2.5.1.1. Ian McEwen, Medical Products Agency; Heparin and NMR, a reticent love affair

NMR の感度は、装置のプロトン核の共鳴周波数に依存する。共鳴周波数を 300 MHz から 500 MHz に変更すると、感度は約 2.1 倍に増加する。300 MHz

の装置を用いて 500 MHz と同程度の S/N のスペクトルを得るためには、積算回数を約 4 倍に増加する必要がある。また、測定した ^1H データはウインドウ関数処理を実施するが、パラメータとして設定する line broadening factor (LB) の値によりスペクトルの S/N が変化するので留意する必要がある。一般に、LB を 0.2 Hz から 0.4 Hz に変更したとき、S/N は 1.2 倍に向上することが知られている。

日局、EP 及び USP の各条へパリンでは、確認試験又は純度試験の試験法として ^1H -NMR 法が採用されているが、各局により測定条件が異なる。試料濃度は、日局、EP 及び USP は 33.3、28.6 及び 20 mg/ml 以上にそれぞれ設定している。NMR 装置は、日局、EP 及び USP でそれぞれプロトン核の共鳴周波数が 400、300 及び 500 MHz 以上の装置を採用している。LB は、日局では 0.2 Hz、EP では 0.3 Hz である。USP は LB を設定していない。各条へパリンは、適正且つ一般的な NMR 測定手法に基づいて調和及び改正されるべきである。

3.2.5.1.2. Bernd Diehl, Spectral Service; Harmonisation of heparin and low molecular weight heparin analysis by 600 MHz cryoprobe NMR

クライオプローブを用いた 600 MHz の NMR は、未分画へパリン及び低分子量へパリンの確認試験として利用可能である。 ^1H -NMR を測定したとき、①グルコサミンの 1 位、②2-硫酸化イズロン酸の 1 位、③N-硫酸化グルコサミンの 2 位及び④N-アセチルグルコサミンの N-アセチル基のプロトンは、それぞれ① 85.42 ± 0.03 、② 85.21 ± 0.03 、③ 83.28 ± 0.03 及び④ 82.05 ± 0.02 ppm に観測された。また、溶媒除去法を用いることで最終製剤であっても、軽水測定により直接測定可能であった。OSCS (82.15 ppm) 及びデルマタン硫酸エステル (82.08 ppm) に対する検出限界は、それぞれ 0.025% 及び 0.05% であった。

また、酢酸 (81.93 ppm)、エタノール (81.19 ppm)、メタノール (83.36 ppm) 及びイソプロパノール (81.15 ppm) 等の残留溶媒の検出限界は 40 ppm であった。クライオプローブを用いた 600 MHz の NMR を用いると、パルス待ち時間を 20 秒に設定した場合であっても、S/N が 2000 以上のスペクトルを得るのに要する時間は僅か 6 分であり、高感度且つ短時間測定が可能である。

3.2.5.2. キャピラリー電気泳動 Edwin Moore, Baxter Healthcare Corporation; The case for capillary electrophoresis of heparin

キャピラリー電気泳動 (CE) は、2008 年に発生したへパリン有害事象において、OSCS をスクリーニングする方法の一つとして利用されてきた。しかし、当時の方法は十分に最適化されておらず、感度及び migration time の再現性等が悪いことが指摘されていた。2009 年、二つの改良 CE 法が報告され、高濃度のリン酸溶液を緩衝液として用いることにより、従来法よりも測定時間、分離能、精度及び感度が改善されることが示された^{1,2)}。リン酸リチウム緩衝液 (pH2.5) を用いた改良 CE 法についてバリデーションを実施した結果、OSCS の検出限界は 0.04% であり、NMR 法の約 10 倍の感度となることが確認された。また、migration time の相対標準偏差 (RSD) は約 2% であり、従来から指摘されてきた再現性も改善されることが示された。さらに、OSCS、へパリン及び DS をベースラインで分離させることが可能であり特異性が高いこと、また 1 回の測定時間は 10 分程度であり、高スループットであることが確認された。また、多機関共同検定により、改良 CE 法の頑健性が確認された。リン酸リチウム緩衝液を用いた改良 CE 法は、デルマタン硫酸エステル及び OSCS 純度試験として利用できる可能性が示唆された。

1) Wielogs, T et al. J. Pharm. Biomed.

Anal. 49, 319, 2009.

2) Somsen, G et al. J. Chromatogr. A. 1216, 4107, 2009.

3.2.5.3. 誘起円二色性

Apryll Salcup, University of Cincinnati; Induced circular dichroism (ICD) for determination of heparin adulteration

ヘパリンは、螺旋構造を有するグリコサミノグリカン (GAG) であり、包接錯体を形成する。この特性を利用して、ヘパリンをキラル添加剤として用いることにより、CEにおいて、エナンチオマー分離が可能となることが報告されている。ヘパリンがキラル添加剤としての特性を有することは、ある種の化合物 (プローブ) との包接錯体の円二色性 (CD) を測定したときに、その包接錯体に特徴的なキラル光学的 (chiroptical) シグナル (ICD シグナル) が誘起される可能性があることを示唆している。種々な化合物について検討した結果、chloroquine、*N*-methyl-*N'*-(7-chloro-[4]quinoyl)-1,3-diaminopropane (QD)、quinacrine 等がプローブとして有用であることが明らかとなった。また、これらのプローブとヘパリンの包接錯体から誘起されるシグナルの強度とヘパリン濃度の間には相関性があること、HPLC を組み合わせることによりフローインジェクション分析 (FIA) が可能となることが確認された。さらに ICD スペクトルは、GAG の基原及び種類により異なることが示唆され、本分析法は特異性が高いことが確認された。本分析法は、DS 等の不純物が存在する試料中においても、ヘパリンの定量分析に利用できる可能性があるものと思われる。

3.2.5.4. 分子量試験

3.2.5.4.1. Barbara Mulloy, NIBSC; Molecular weights of unfractionated heparin

未分画ヘパリン (UFH) の分子量分

布は、一般に光散乱検出器を接続したゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により測定されている。この分析法は校正マーカを必要としないが、高価な装置と専門的な測定技術を要する。現在、NIBSC/USP の共同プロジェクトでは、HPLC 装置及び分子量校正マーカを用いた汎用性の高い分子量分布測定法の開発を目的として、分子量校正マーカ標準品の選定を実施しており、9 機関による共同検定によって標準候補品の利用可能性を評価している。この候補品は、示差屈折率検出器を接続した GPC あるいは GPC/光散乱検出器を用いた分子量分布測定法の分子量校正マーカとしてだけでなく、システム適合性を評価するための標準品としても適用可能であると考えられる。

3.2.5.4.2. Lin Rao, Scientific Protein Laboratories; Molecular weight determination of heparin sodium by SEC/MALS

未分画ヘパリンの分子量は、多角度光散乱検出器 (MALS) を接続したサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により測定されている。SEC/MALS 法は、カラムのキャリブレーションのための分子量標準品を必要とせず、直接、光散乱強度から絶対分子量を得ることができる。SEC/MALS は、特異性、正確性、頑健性が高く、ヘパリンの分子量測定に適した方法である。

3.2.5.5. タンパク質限度試験と水分含量

Rene fan Herpen, MSD; Protein content and volatile constituents of heparin

USP 及び EP は、タンパク質純度試験法を紫外吸収法 ($A_{280\text{nm}}$) から、Lowry 法に変更した。Lowry 法は、希釈した Folin-C. Phenol 試薬、及び Lowry 試薬と試料を混合した後、波長 750 nm における吸光度を測定する方法である。EP 及び USP の規格値は、それぞれへ

パリン (5 mg/ml) に対して 0.5%及び 1.0%以下である。

EP 及び USP で設定された試験法では、希釈した Folin-C. Phenol 試薬及び Lowry 試薬を添加した試料溶液の pH が 10.00 ± 0.25 になるように Folin-C. Phenol 試薬を 2~4 倍に希釈することとされている。しかし、希釈倍率を変更した Folin-C. Phenol 試薬を用いて pH を検討した結果、試料溶液の pH を 10.00 ± 0.25 にするためには、Folin-C. Phenol 試薬を 1.5~2 倍に希釈する必要があることが明らかとなり、希釈倍率の範囲が適切ではない可能性が示唆された。Folin-C. Phenol 試薬は、希釈倍率に関係なく試料溶液の pH が 10.00 ± 0.25 になるように希釈するべきである。

ヘパリンの乾燥減量試験 (LOD) では、主に水分含量を測定する。USP 法を用いたとき、水分含量は減圧条件により異なることが明らかとなった。また、現行の LOD 法とカールフィッシャー法及びガスクロマトグラフィー法 (KF+GC 法) 間の相違は、質量百分率に換算して 1.4%であった。KF+GC 法は、LOD 法よりも正確に揮発性成分を測定することができる。

3.2.5.6.核酸限度試験

**Pearle Torralba, APP
Pharmaceuticals; Quantitative
enzymatic and chromatographic
determination of nucleotidic
impurities**

酵素消化法及び逆相クロマトグラフィーを組み合わせた方法は、DNA 及び RNA の定量法として有用である (定量限界、ヘパリンナトリウム含量の 0.05%)。酵素消化には、加水分解酵素として、DNA 及び RNA をヌクレオシドに変換するベンゾナーゼエンドヌクレアーゼ (BE)、ホスホジエステラーゼ (PDE) 及びアルカリホスファターゼ (AP) を用いた。試料の消化は、温度を制御したオートサンプラーを用い

て HPLC バイアル中で行った。塩化アンモニウム/アセトニトリル系溶離液及び逆相カラムを用いた HPLC システムにより酵素消化物を分析した結果、9 種類の全てのヌクレオシドをベースラインで分離することができた。また、試料濃度 10 mg/ml のヘパリン溶液を用いたが、分析への影響は確認されなかった。本分析法は、核酸限度試験法として利用できる可能性が示唆された。

3.2.4. 力価試験

3.2.1.1. 欧米薬局方改正後の含量規格値への対応

**Pascal Anger, Sanofi-Aventis;
Bioassays and new specifications in the
control of heparin**

OSCS 事件後、ヘパリンの含量規格値が EP では 150 IU/mg から 180 IU/mg に、USP では 140 U/mg から 180 U/mg に厳格化された。また USP では、力価試験法がヒツジ血漿を用いた APTT 測定から発色性合成基質を用いた抗 IIa 活性試験に変更されると共に、抗 Xa / 抗 IIa 活性比が 0.8~1.2 から 0.9~1.1 に改正された。

抗 IIa 活性と抗凝固活性の測定結果は、抗 IIa 活性 / 抗凝固活性で表すと 0.88~0.99 であり、両試験は同等ではない。このため、抗凝固活性試験では規格 (180 U/mg 以上) に適合しても、抗 IIa 活性試験では規格外 (<180 U/mg) となるバッチが生じ、107 バッチ中 21 バッチが規格外となった。規格外バッチは特定の原薬製造業者のバッチに集中している傾向があるため、一部の原薬製造業者では製造工程の見直しが必要である。

ヘパリンに OSCS をスパイクすると、抗凝固活性は変わらないが、抗 IIa 活性、抗 Xa 活性は低下する。抗 IIa 活性の低下の方が顕著であるため、抗 Xa / 抗 IIa 活性比は上昇する。OSCS 混入の影響がみられるのは OSCS を 10% 以上添加したときであるが、抗 Xa / IIa 活性比はヘパリンの品質指標として適

したものであり，異物混入の対策として，粗精製ヘパリンにおける qPCR，出荷試験における NMR，SAX-HPLC と並ぶ safeguard である。

3.2.4.2. ヘパリンおよび OSCS の抗凝固活性

John Hogwood, NIBSC; Influence of OSCS on anticoagulant and inflammatory activities of heparin

ヘパリンの力価試験法として用いられているヒツジ血漿あるいはヒト血漿を用いた抗凝固活性測定法，及び，精製タンパク質と発色性合成基質を用いた酵素活性測定法について，ヘパリン，DS，及び OSCS を試料として比活性測定を行い，得られた測定結果に基づき，試験法の特徴を比較した。

OSCS の比活性は，ヒツジ血漿を用いた試験ではヘパリンの 80%程度となったが，ヒト血漿を用いた試験ではヘパリンの 23%程度となり，OSCS の比活性は，ヒツジ血漿を用いるとヒト血漿を用いる場合の 3 倍程度の値として得られることが分かった。DS の比活性はいずれもヘパリンの 1%程度であった。また，抗凝固因子としてアンチトロンビンあるいはヘパリンコファクター II (HCII) を用い，抗 Xa 活性および抗 IIa 活性測定を行ったところ，OSCS の比活性はヘパリンコファクター II を用いた場合にヘパリンの 90%という高い測定値となることが分かった。したがって，ヒツジ血漿を用いた抗凝固活性試験において OSCS の比活性が高く測定される理由として，OSCS が HCII を介して抗凝固活性を発揮すること，ヒツジ血漿では HCII 活性がヒト血漿の約 5 倍と高いことが考えられた。また，ヒツジ血漿を用いた抗凝固活性試験法では，OSCS が混入していても OSCS の混入がないヘパリンと同等の活性値が得られた。

3.4.4.3. 活性測定による OSCS 混入の検出

Susanne Alban, University of Kiel; Sensitive quantification of heparin falsifications and process-related glycosaminoglycans by anti-FXa and anti FIIa assays

OSCS や GAG が heparinase に耐性であることを利用し，活性測定によりこれらの不純物を検出する方法を開発した。まず，試料を heparinase I で処理してヘパリンを分解し，次に抗 Xa 活性を測定する。ここで検出される活性は，OSCS や過硫酸化グリコサミノグリカン等の混入物質によるものである。OSCS の検出限界は 0.3%であった。Heparinase I 処理後に抗 Xa 活性が検出されない場合は，抗凝固因子として HCII を用いて抗 IIa 活性を測定し，製造工程由来不純物である GAG を検出する。GAG の検出限界は 1.0%であった。この方法により，高価な分析機器を用いなくとも，混入物質を高感度に検出できると考えられる。

3.2.5.低分子量ヘパリン

3.2.5.1.USP の低分子量ヘパリン各条および一般試験法

Kristian Johansen, USP; USP is developing new chapters and reference standards for LMWH analyses

USP では 2009 年 12 月に，エノキサパリンナトリウム各条，エノキサパリンナトリウム注射液各条，ならびに一般試験法<207>としてエノキサパリンナトリウムの 1,6-anhydro 体の含量試験を施行した。エノキサパリンナトリウム各条では今後，基原，確認試験，重金属，pH，エンドトキシンに関して改正を検討する予定である。

さらに，一般試験法<208>として低分子量ヘパリンの抗 IIa 及び抗 Xa 活性試験，及び，一般試験法<209>として低分子量ヘパリンの分子量試験の策定を計画している。一般試験法<207>はエノキサパリンナトリウムに限られるが，<208>と<209>は全ての低分子量へ

パリン各条から参照されることになる。今後、バイオアッセイ用の低分子量ヘパリン標準品、および、分子量試験における検量線作成用標準品 (Calibrant) についても、全ての低分子量ヘパリンに共通して使用できるものを設定する予定である。

3.2.5.2. 低分子量ヘパリン国際標準品の更新

Elaine Gray, NIBSC; Replacement of the LMWH international standard

現在の低分子量ヘパリン国際標準品は 2003 年に設定されたものであり、2012 年 10 月までに更新する必要がある。NIBSC では三段階からなる方策により、低分子量ヘパリン国際標準品の更新を予定している。第一段階として既承認製品と入手可能な開発中製品の活性を NIBSC で測定し、第二段階として低分子量ヘパリンの製造企業との共同研究により、NIBSC において標準品候補品として 5 サンプルを選択する。さらに第三段階として、2~3 種類の候補品について、低分子量ヘパリン国際標準品策定のための共同検定を実施する。2010 年 10 月に、第二段階の検討を開始する予定である。

3.2.5.3. エノキサパリンの確認試験

Lino Liverani, Opocrin SpA; Identity tests for enoxaparin

EP 及び USP エノキサパリンナトリウム各条において確認試験として設定されている分子量試験と抗 Xa/抗 IIa 活性試験について、同一試料を用いて両局方の試験を実施し、結果を比較した。

分子量に関する両局方の規格値は同様 (EP: 質量平均相対分子量 3800~5000, 分子量 2000 以下 12.0~20.0%, 分子量 2000~8000 68.0~82.0%; USP: 重量平均分子量 3800~5000, 分子量 2000 以下 12.0~20.0%, 分子量 2000~8000 68.0~82.0%, 分子量 8000 以上 18.0% 以下) である。いずれ

もサイズ排除クロマトグラフィーを用いた試験であるが、方法は異なっており、EP 法ではカラムを 1 本用い、硫酸ナトリウム緩衝液を使用、検出器として紫外可視吸光光度計と示差屈折計を接続する。各保持時間における分子量は、234nm の吸光度と示差屈折率及び分子量校正用低分子量ヘパリン標準品の平均分子量から算出する。USP 法では 2 本のカラムを用い、硝酸リチウム緩衝液を使用、検出器として示差屈折計を接続する。分子量は、エノキサパリンナトリウム分子量校正用物質 A 及び B から得られた分子量校正曲線をもとに算出する。同じ試料を EP 法及び USP 法で試験したところ、分子量 2000 以下の分子種の含量について異なる結果となり ($p < 0.01$)、両局方の試験では異なる測定結果が得られることが明らかになった。

抗 Xa/抗 IIa 活性比の規格値は、EP 及び USP いずれも 3.3~5.3 で同一である。試験法は両局方とも発色性合成基質を用いた方法であり類似している。同じ試料を EP 法及び USP 法で試験したところ、抗 Xa 活性は EP 法及び USP 法で同様の結果となった。しかし、抗 IIa 活性は EP 法を用いた場合に高い測定値が得られ、抗 Xa/抗 IIa 活性比は規格値の範囲ではあるものの、EP 法を用いた場合に低い値が得られる結果となった。

エノキサパリンは、ヘパリンベンジルエステルのアルカリ分解により得られるが、そのアルカリ処理工程において、還元末端に 1,6-アンヒドロ体 (2-N,6-O-ジスルホ-D-グルコサミン (1,6-an.Glc) 及びマンノサミン (1,6-an.Man)) が生じる。USP は、2009 年 12 月に告示された第二追補において、各条エノキサパリンナトリウムに heparinase 消化法と SAX-HPLC を組み合わせた方法による 1,6-アンヒドロ体の試験法 (一般試験法 (207) Test for 1,6-Anhydro derivative for enoxaparin sodium) を追加している。Opocrin 社

が独自に開発した HSQC-NMR 法と USP 法を比較したところ、測定結果に大きな差は認められなかった。EP では 1,6-アンヒドロ体に関する試験法は設定されていない。

分子量及び活性に関する試験法の国際調和や、1,6-アンヒドロ体試験用標準品の設定が望まれる。

3.2.6 国際調査から明らかになった日局の課題

3.2.6.1 ヘパリンナトリウム各条改正の現状

日米欧薬局方ヘパリンナトリウム改正の現状を表 3 に示した。各局とも OSCS を検出可能な試験を設定しており、USP では $^1\text{H-NMR}$ を用いた確認試験、 $^1\text{H-NMR}$ あるいは SAX-HPLC を用いた OSCS 純度試験、及び、高性能陰イオン交換クロマトグラフィー/パルスドアンペロメトリー検出器 (HPAEC/PAD) を用いたガラクトサミン純度試験により OSCS の混入が検出される。EP では、 $^1\text{H-NMR}$ を用いた確認試験、及び、亜硝酸分解と SAX-HPLC を用いた類縁物質純度試験により OSCS の混入が検出される。日局では、 $^1\text{H-NMR}$ を用いた OSCS 純度試験、WAX-HPLC を用いた類縁物質純度試験、及び HPLC/FD を用いたガラクトサミン純度試験により OSCS が検出される。日局の OSCS 純度試験における OSCS 限度値は 0.1% である。

OSCS はコンドロイチン硫酸 (CS) の誘導体であるが、DS や CS 等のガラクトサミノグリカンは製造工程由来不純物としてヘパリン原薬中に残存している。そのため、各局ともにガラクトサミノグリカンの純度試験を設定しており、USP では HPAEC/PAD、EP では亜硝酸分解 SAX-HPLC、日局では HPLC/FD を採用している。日局法では、試料を酸加水分解した後に、4-aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE) で蛍光標識し、標識されたガラクトサミンを HPLC/FD で分離定量する。こ

の方法の特徴は、DS や CS 等のガラクトサミノグリカンの標準物質が不要であること、HPAEC/PAD のような特殊な装置を必要としないことである。日局におけるガラクトサミン含有多糖の限度値は 1% であり、USP と同じであるが、EP では 2% である。

理化学試験法を用いた確認試験および純度試験の拡充に加えて、EP では含量規格値の改正、USP では力価試験法と含量規格値の改正が行われている。EP では、力価試験法はヒツジ血漿を用いた抗凝固活性試験のまま変更されていないが、含量規格値が 150 IU/mg から 180 IU/mg に厳格化された。USP では、力価試験法を抗凝固活性試験から発色性合成基質を用いた抗 IIa 活性試験に変更すると共に、含量規格値を 140 U/mg から 180 IU/mg に厳格化した。さらに、確認試験として設定されている抗 Xa/抗 IIa 活性比を 0.9~1.1 に厳格化した。USP では USP 単位、日局では日局単位を用いているが、いずれも標準品は国際標準品を参照して値付けされており、EP では国際単位が用いられている。日局では力価試験法として抗 Xa 活性試験を用いており、力価試験法が各局により異なっていることは考慮する必要があるが、180 U/mg と設定されている欧米の含量規格値に比べ、日局の規格値は 130 U/mg と低い値となっている。日局の規格値は、1971 年に告示された第 8 改正から変更されておらず、現在の国際的水準を参考に見直す必要があると考えられる。また、抗 Xa/抗 IIa 活性比がヘパリンの品質特性の指標として有用であると考えられるため、日局でも抗 IIa 活性の設定が必要と考えられる。力価試験および含量規格値の見直しの他、タンパク質や核酸の限度試験についても、見直す必要があると考えられる。

3.2.6.2. ヘパリン製剤の品質確保

ヘパリンは不均一性の高い多糖類であり、抗凝固因子アンチトロンビンと

の結合部位である5糖構造の含量などを人工的に制御することは困難である。したがって、ヘパリン製剤の品質の一定性確保のためには、原料や製造工程の管理と品質試験の双方を適切に実施する必要がある。

我が国で市販されているヘパリン製剤は、製造販売業者が海外から原薬を輸入し、製剤化しているものが少なくない。製造販売業者は原薬の製造工程管理や品質確保においても責任を負うが、自らが原薬の製造を行う場合と比較して、その製造工程や品質に関する理解が限定的になるのはやむを得ないと考えられる。また、製造工程と品質の関連解析に基づき、原薬の品質管理手法を自ら構築していくことは不可能である。このようなケースでは、第一に、原薬の品質試験により品質確保を図ることが重要であり、局方収載品であるヘパリンナトリウムおよびヘパリンカルシウムでは日本薬局方各条が果たす役割が大きい。今後も、国際的動向を見極めながら、我が国に流通するヘパリン製剤の品質確保のために、日本薬局方ヘパリン各条試験法の改正を進めていく必要があると考えられる。EPのように Definition に続き、Production の項を設けて、原材料や製造工程の管理に関する留意事項を書くことも一案かと思われる。

品質試験が最重要である一方で、ヘパリン製剤の製造に関わる製造販売業者が、原材料や製造工程の管理に関する最新の情報を原薬製造業者等から適切に入手し、知識管理や品質リスクマネジメントを含む品質システムを適切に実践していくことも、製品の品質確保に重要であることは言うまでもない。ヘパリン製剤では、原材料の調達や品質に国際的な情勢が大きく影響し、粗精製品の調製までも多くのステップがある。また、原薬輸入及び製剤の製造販売を行っている会社が多数ある。

このようなケースでは、最新の国際動向に基づく知識管理を効率よく行い、各社が品質システムを確実に実践していくために、規制側からの情報提供も有用であると考えられる。

D.研究業績 誌上発表

- 1) 中澤志織, 橋井則貴, 川崎ナナ: 遊離糖鎖の LC/MS. 試料分析講座. 印刷中
- 2) 川崎ナナ: 医薬品各条ヘパリンカルシウム. 日本薬局方技術情報(2011) (財)日本公定書協会編. じほう(東京) 印刷中
- 3) 川崎ナナ: 医薬品各条ヘパリンナトリウム. 日本薬局方技術情報(2011) (財)日本公定書協会編. じほう(東京) 印刷中
- 4) 石井明子, 橋井則貴, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: ヘパリン製剤の品質確保に関する国際的動向 - 第4回ヘパリン製剤の品質評価に関するワークショップ報告 - 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 印刷中

学会発表

- 1) Akiko Ishii, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki: Revision of Heparin Monographs in Japanese Pharmacopoeia 4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products, Jul. 8-9th, 2010 (London)
- 2) Noritaka Hashii, Akiko Ishii, Nana Kawasaki: Revision of Heparin Monographs in Japanese Pharmacopoeia: heparin identification test and purity tests for OSCS, related substances and galactosamine, 4th Workshop on the Characterisation of Heparin Products, Jul. 8-9th, 2010 (London)

表 1 図 1 の主なピークの質量及び単糖組成

ピーク	推定単糖組成	電荷	m/z	実測質量	計算質量	
A	1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	[M + 2H] ²⁺	1150.437	2298.858	2298.835
	2	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	[M + 2H] ²⁺	967.857	1933.698	1933.703
	3	[Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₁	[M + 2H] ²⁺	1332.997	2663.978	2663.967
B	1	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₁	[M + 2H] ²⁺	1223.447	2444.878	2444.893
	2	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₁	[M + 2H] ²⁺	1406.017	2810.018	2810.025
C	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₁	[M + 2H] ²⁺	1040.877	2079.738	2079.761	
D	[Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₂	[M - 2H] ²⁻	1476.530	2955.076	2955.062	
E	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂ [PO ₃] ₂	[M - 2H] ²⁻	859.240	1720.496	1720.487	
F	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	[M + 2H] ²⁺	1295.967	2589.918	2589.930	
G	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	[M - 2H] ²⁻	1111.390	2224.796	2224.798	
H	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	[M - 2H] ²⁻	1366.990	2735.996	2735.988	
I	[dHex] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	[M + 2H] ²⁺	1186.427	2370.838	2370.856	
J	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₂	[M - 2H] ²⁻	1549.550	3101.116	3101.120	
K	1	[Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₃	[M - 3H] ³⁻	1081.040	3246.143	3246.157
	2	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₃	[M - 3H] ³⁻	1129.730	3392.213	3392.215
L	[Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	[M + 2H] ²⁺	1441.507	2880.998	2881.025	
M	[dHex] ₁ [Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	[M - 3H] ³⁻	1008.020	3027.083	3027.083	
N	[Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₄	[M - 3H] ³⁻	1178.070	3537.233	3537.252	
O	[dHex] ₁ [Hex] ₇ [HexNAc] ₆ [NeuAc] ₄	[M - 3H] ³⁻	1226.750	3683.273	3683.310	

略号：Hex, ヘキソース; HexNAc, *N*-アセチルヘキソサミン; dHex, デオキシヘキソース; H₂PO₃, リン酸エステル基

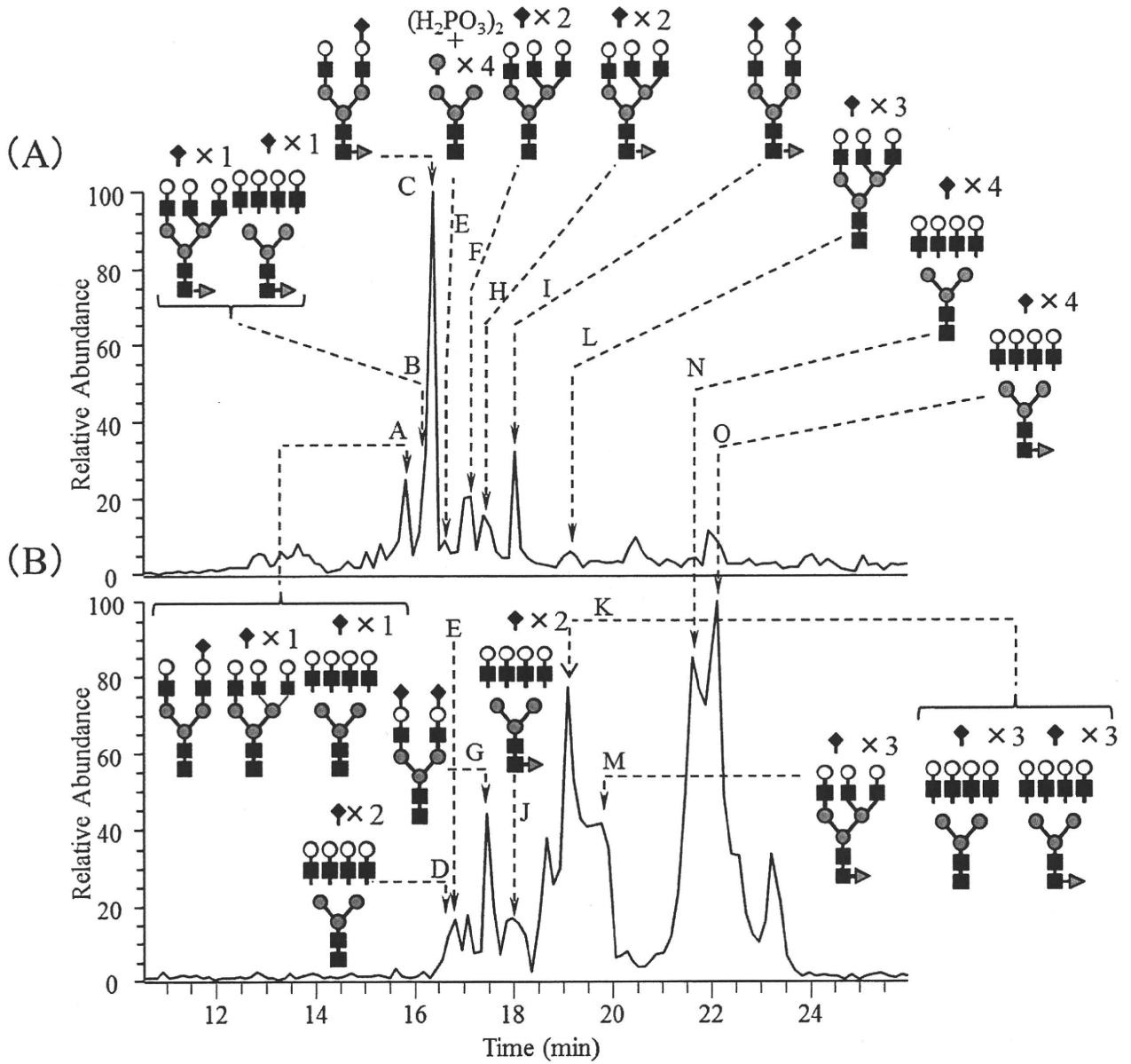


図 1 LC/MS を用いてポジティブイオンモード (A) 及びネガティブイオンモード (B) で取得されたイデユルスルファゼ由来 *N*-結合型糖鎖の TIC, 並びに各ピークの糖鎖の推定構造. 略号: ●, マンノース; ○, ガラクトース; ■, *N*-アセチルグルコサミン; ▲, フコース; ◆, *N*-アセチルノイラミン酸; H_2PO_3 , リン酸エステル基.

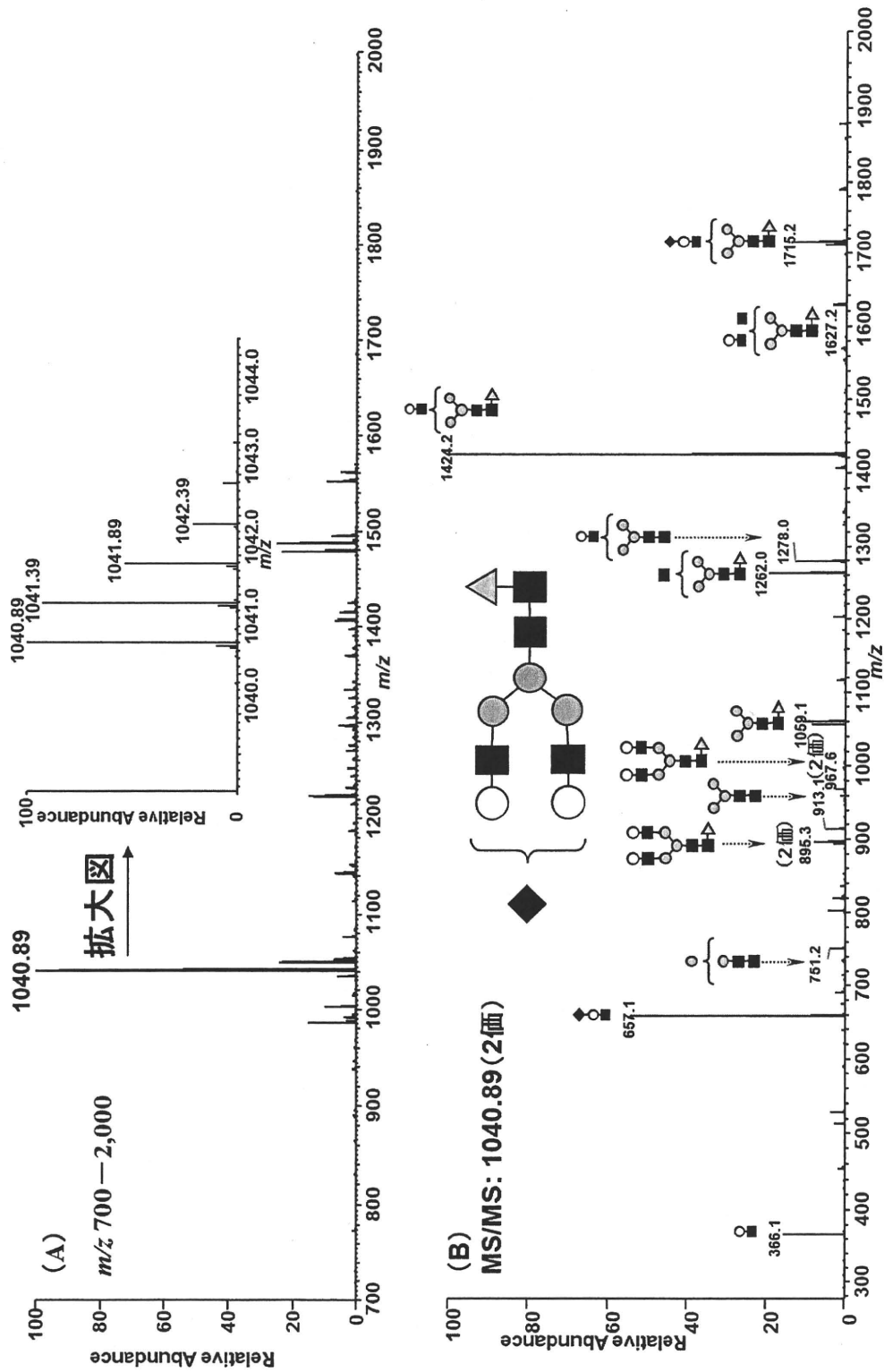
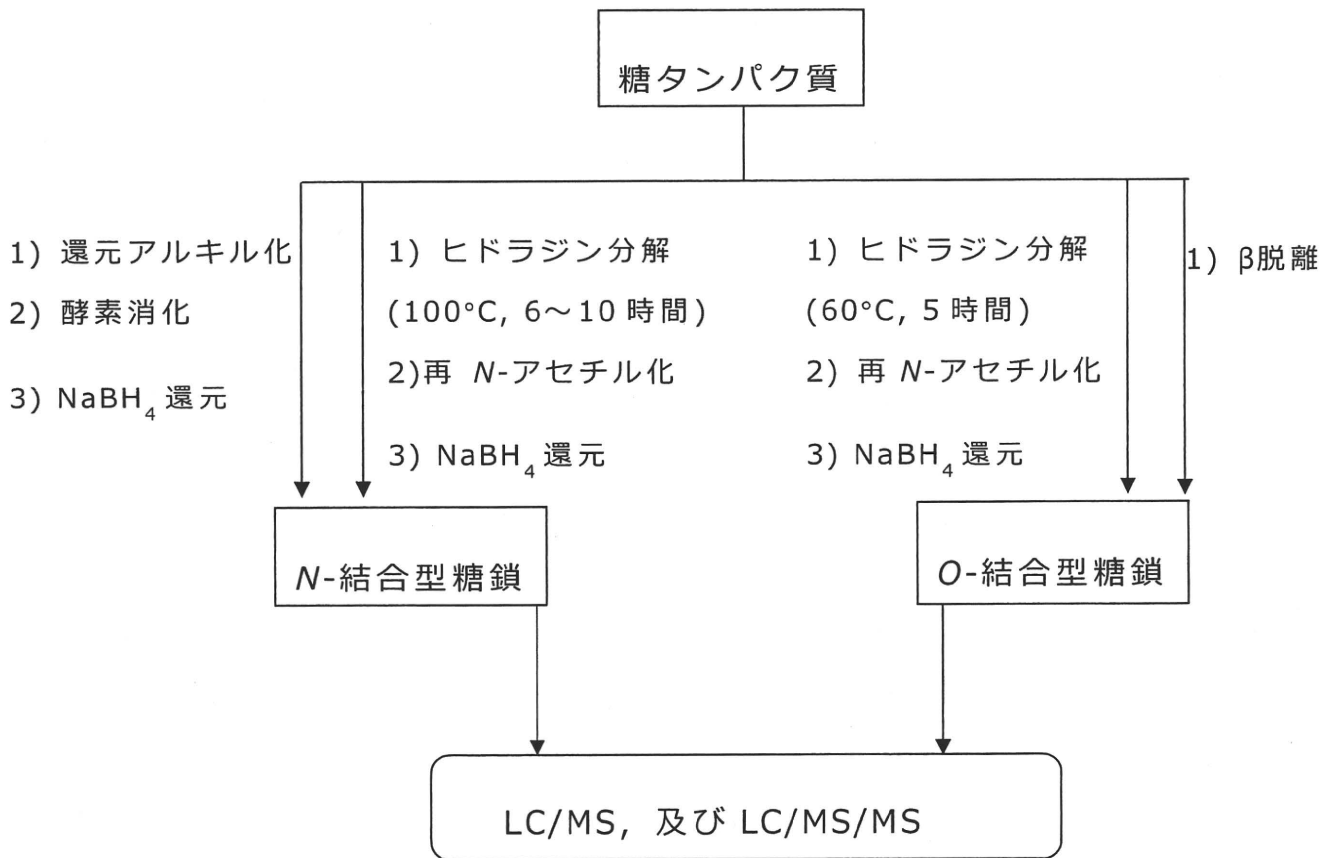


図2 ピーク C の糖鎖 (m/z 1040.89, $[M + 2H]^{2+}$) のマススペクトル (A), 並びにプロダクトイオンスペクトル及びフラグメントの推定糖鎖構造 (B). 略号: ●, マンノース; ○, ガラクトース; ■, N-アセチルグルコサミン; ▲, フコース; ◆, N-アセチルノイラミン酸.

表 2 主同位体の質量及び原子量

	主同位体の質量	原子量
C	12.000000	12.0107
H	1.007825	1.00794
N	14.003074	14.0067
O	15.994915	15.9994
S	31.972071	32.065



LCにより得られたクロマトグラムから糖鎖の分布を、また、MSにより求めた質量及び MS/MSにより得られた配列情報から糖鎖構造を推定する

図3 グラファイトカーボンを接続したLC/MSを用いて糖タンパク質の糖鎖を解析するときの操作の概略

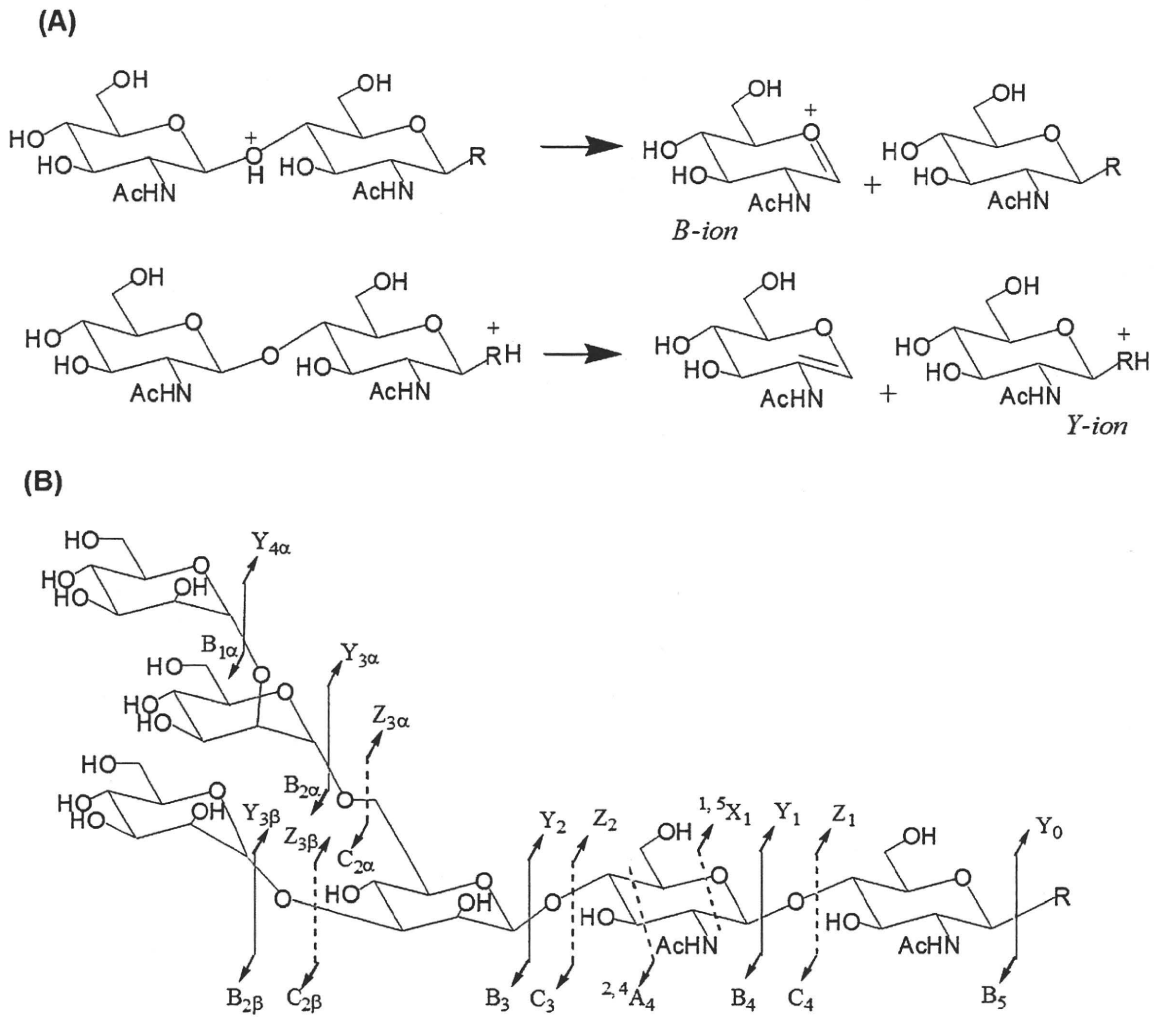


図 4 ポジティブイオンモードにおける B-及び Y-イオンの産生(A), 並びに糖鎖の特徴的な開裂様式(B)