技術論文

低分子ヘパリン中の夾雑ムコ多糖類の工業的除去方法

村田浩志^{1,2}, 嶋村英雄², 松久明生², 山本啓一², 杉山幸司², 川上隆生²,
余田 光², 植村英俊², 戸田隆雄², 六車三治男³, 河原 聡^{3*}

¹ 宮崎大学大学院農学工学総合研究科

² 扶桑薬品工業株式会社

³ 宮崎大学農学部

Development of an Industrial Processing Method for Removing Contaminating Mucopolysaccharides from Low Molecular Weight Heparin Preparations

Hiroshi Murata^{1,2}, Hideo Shimamura², Akio Matsuhisa², Keiichi Yamamoto²,
Kouji Sugiyama², Takao Kawakami², Hikaru Yoden², Hidetoshi Uemura²,
Takao Toda², Michio Muguruma³ and Satoshi Kawahara^{3*}

¹ Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki,
1-1 Gakuenkibanadai Nishi, Miyazaki, Miyazaki 889-2192

² Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd., 2-3-30, Morinomiya, Joto-ku, Osaka, Osaka 536-8523

³ Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai Nishi, Miyazaki, Miyazaki 889-2192

We have developed a simple method for removing mucopolysaccharide (MS) impurities from low molecular weight heparin (LMWH) preparations. Crude dalteparin sodium (DN-C) containing high molecular weight impurities such as sodium salts of over-sulfated chondroitin sulfate (OSH) and dermatan sulfate (DSH) was used as a model of LMWH preparations. In preliminary experiments, the sensitivities of OSH and DSH to ethanol were quite different, even though their molecular weights are similar. A two-step ethanol precipitation was used to remove these contaminants. Upon the first treatment, OSH was removed as a precipitate, and upon the second treatment, DSH was recovered in the supernatant. LMWH was concentrated in the precipitate following the second treatment. The contaminants were detected easily by nitrous acid de-polymerization followed by gel permeation HPLC. In contrast, it was difficult to detect small amounts of impurities by ¹H-NMR. We also tried purifying commercial DN products (DNG 1-3) to confirm the efficacy of this methodology and concluded that the two-step ethanol precipitation of LMWH, followed by purity analysis by gel permeation HPLC after nitrous acid de-polymerization of MSs, holds promise for the manufacture of high-quality LMWH preparations. (Received Aug. 1, 2013; Accepted Nov. 11, 2013)

Keywords : ethanol precipitation, low molecular weight heparin, dermatan sulfate, over-sulfated chondroitin sulfate

キーワード : エタノール沈殿, 低分子ヘパリン, デルマタン硫酸, 過硫酸化コンドロイチン硫酸

ヘパリン (heparin, HP) は, 工業的には主に食用獣の屠畜後の副生物から製造される多分散の酸性ムコ多糖 (mucopolysaccharide, MS) である。医療分野で世界的に広く普及し, 血液透析時の血液凝固防止および血栓塞栓症予防等の目的で使用される有用な生理活性物質のひとつである¹⁾。豚腸粘膜由来の HP 原薬は, コンドロイチン硫酸ファミリー (chondroitin sulfate family, CSF) およびヘパラン硫酸 (heparan sulfate, HS) を含有する粗 HP (crude heparin, CHP) から精製, 製造されることが多い。そのため, HP は未分画 HP (unfractionated heparin, UFH) とも呼称される。

抽出方法により変動するものの, 通常 CHP 中には CSF が含まれており, 特に高分子 MS であるデルマタン硫酸 (dermatan sulfate, DS) が 5~20% 程度含有されている場合が多い。そのため, しばしば DS 含量は HP の精製度の指標となる。しかし, CSF の残留に起因する重篤な副作用の報告例は少なく, これまで特別な対策が取られることなく使用されてきた経緯がある。

2008 年初頭, 米国, ドイツなどで発生した UFH 製剤の急速静注投与による死亡事故において¹⁾, 使用された製剤および原薬中に過硫酸化コンドロイチン硫酸 (over-

¹ 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1, ² 〒536-8523 大阪府大阪市城東区森之宮 2-3-30,

³ 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1

*連絡先 (Corresponding author), a04206u@cc.miyazaki-u.ac.jp

sulfated chondroitin sulfate, OSCS) が確認され^{2)~4)}、またいくつかの薬理試験の結果から、最終的に有害事象の原因はOSCSによるものと判断された。日本国内ではHPの安全性確保のため、HPの純度試験法および確認試験法が検討され^{5)~11)}、混入物質であるOSCSとDSの確認/純度試験として^{1H-NMR}、イオン交換および逆相クロマトグラフィー等の実施が薬事法で法令化されている¹²⁾¹³⁾。

HPの臨床上の副作用として、出血時間の延長、血小板減少、および血栓症等があり¹⁾、それらを低減する目的で低分子HP (Low molecular weight heparin, LMWH) が開発された。LMWHはHPを解重合して製造される¹⁴⁾。現在、日本国内で流通している血液透析適応のLMWHは、ダルテパリンナトリウム (dalteparin sodium, DN)、レビパリンナトリウム (reviparin sodium)、パルナパリンナトリウム (parnaparin sodium) の3品目である。一般に、HPやLMWHは他のMS製品と同一製造所で調製され、また設備上の理由から、製造ラインが共用されている場合が多い。そのため、各MS製品の粗原料の管理不足 (保管場所/ラベリング等) あるいは調製ラインや破碎粉体機の洗浄不良等、あらゆる工程でMS最終製品へ他のMS製品が混入する可能性が存在する。したがって、OSCSおよびDSの限度値が規格として設定されていないLMWHの場合、安全性を担保するため、製造工程管理の徹底がより必要不可欠である。

我々は前報¹⁵⁾において、糖鎖の基本骨格がHPと異なるOSCSやCSFについて、亜硝酸分解に対する反応性の違いを利用したMS残留量の簡便な確認方法と、高純度HPの調製方法について検討した。本研究では、前回の検討結果をLMWH製造工程に応用し、DN中に確認されることがある高分子物質をOSCSおよびDSと仮設定して、これらが製造工程で残留した場合の工業的除去方法および確認試験法について検討を行った。

実験方法

1. 試薬

DN標準品 (DN-W; 亜硝酸分解抵抗性物質の含量が0.01%以下) は、豚腸粘膜由来HPを亜硝酸分解したものを粗原料として、抽出/精製したものを用いた。精製検討用に用いた高分子DSのNa塩 (DSH) は、豚小腸粘膜由来のMS混合物から抽出/精製したものを用いた。精製検討用高分子OSCSのNa塩 (OSH) は、今成らの方法¹⁶⁾を一部改変し、三酸化硫黄化合物を用いて鯨軟骨由来のCSFを過硫酸化処理して調製した。さらに、精製検討用DN (DN-C) はDN-Wに、DSH、OSHをDN-W:DSH:OSH=98.5:1.0:0.5 (重量比) となるように混合調製した。他のDN検体 (DNG 1~3) は市販DN製剤に使用されている商業用DN原薬を用いた。注射用水は日本薬局方適合品を、また、塩類、有機溶媒等のその他の試薬は試薬特級品、あるいはそれ以上のもの (和光純薬(株)) を用いた。

2. EtOH分画処理の条件検討

各検液の調製は、まずDN-W、DSHおよびOSHを終濃度が10% (w/v) になるように0.2mol/L NaCl溶液に溶解した。次にDN-W/DSH混合液は、DN-Wに対してDSHが重量比で5% (DN-W:DSH=95.0:5.0)、1.0% (DN-W:DSH=99.0:1.0) および0.1% (DN-W:DSH=99.9:0.1) になるように、それぞれ混合調製した。また、DN-W/OSH混合液は、DN-Wに対してOSHが重量比で0.5% (DN-W:OSH=99.5:0.5)、0.1% (DN-W:OSH=99.9:0.1) および0.01% (DN-W:OSH=99.99:0.01) になるように、それぞれ混合調製した。そして、これら溶液量の0.5等量 (v/v) になるようにEtOHを添加し、激しく攪拌したものを検液として、その性状を確認した。

さらに、EtOH添加量の増加がDN-W/DSH混合液のEtOHによるDNあるいはDSの分画に及ぼす影響を確認するため、DN-Wに対してDSHが重量比 (w/w) で1.0% (DN-W:DSH=99.0:1.0) になるように調製したDN-W/DSH混合液について、最終的なEtOH添加量が0.525、0.575、0.625および0.675等量 (v/v) になるようEtOHを更に添加して、激しく攪拌後、室温および4℃でそれぞれ24時間静置したものを検液として、その性状を確認した。

3. EtOH分画によるDN精製および分析試料の調製

DN-CのEtOH分画処理は、八藤後らの方法¹⁷⁾を一部改変し、2段階の処理を行った。第1段階として、DN-C 50gを1000mLストレージボトルに量り取り、0.2mol/L NaCl溶液を加えて500mLとした後、EtOH 250mLを加えて激しく攪拌した。白濁したことを確認した後 (Fig. 1, 写真A)、遠沈管に移して室温で24時間静置した後、遠心分離 (2000×g, 10min) により、上層 (S1) および下層のコロイド状沈殿物 (P1) の二層に分配した (Fig. 1, 写真B)。S1は別の1000mLストレージボトルに回収した。

第2段階の分画では、回収したS1に対し、最終的なEtOH添加量が0.625等量になるように、61.5mLのEtOHをさらに加え、激しく攪拌した (Fig. 1, 写真C)。白濁したことを確認した後、遠沈管に移し、4℃で24時間静置した。その後、遠心分離 (2000×g, 10min) により上層 (S2) および下層のコロイド状沈殿物 (P2) の二層に分配した (Fig. 1, 写真D)。

各画分についてのHPLCおよびNMR分析試料の調製は以下のように行った。P1については、コロイド状沈殿物を0.2mol/L NaCl溶液10mLに再溶解した後、90mLのEtOHを加えて激しく攪拌して室温で24時間静置し、白色沈殿物を再沈殿させた。S1については、ストレージボトルから7mLを50mL遠沈管に採取し、43mLのEtOHを加えて激しく攪拌、室温で24時間静置し、白色析出物を沈殿させた。S2については、5Lのガラス製ビーカーに移し、4LのEtOHを加え、激しく攪拌して室温で24時間静置し、白色沈殿物を沈殿させた。また、P2は0.2mol/L

Fig. 1 Schematic diagram for remove and analysis of impurities in DN-C by means of EtOH precipitation.

Photographs : (A) appearances of DN-C solution at 1st EtOH precipitation, (B) separated fraction after centrifugation, (C) appearances of S1 fraction at 2nd EtOH precipitation and (D) separated fraction after centrifugation.

NaCl 溶液に溶かして 500 mL とした溶液に 4.5 L の EtOH を加え、激しく攪拌して室温で 24 時間静置し、白色沈殿物を再沈殿させた。これらの白色沈殿物を遠心分離 (2000×g, 10 min) でそれぞれ回収し、EtOH で洗浄した後、五酸化二リン存在下、室温にて減圧乾燥した。乾燥後に得られた白色粉末を HPLC および NMR 分析に供した。一連の工程の概略および分析の流れを Fig. 1 に示す。

DNG 1~3 についても、同様にして EtOH 分画処理を行い、白色粉末を回収した。なお DNG 1~3 については 1 g の出発物質から分画を行い、全工程を 1/50 にスケールダウンして実施した。

4. 亜硝酸分解処理

DN-W と、DN-C、DNG 1~3 およびこれらの EtOH 処理画分の亜硝酸分解処理は、村田らの方法¹⁵⁾を一部改変して行った。すなわち、注射用水に溶かした各検体溶液に、25 % NaNO₂ 溶液 (w/v) を 100 μL/g 検体となるように加えて攪拌した後、1 mol/L HCl で pH を約 1.5 に調整し、さらに 60 分間攪拌した。その後、1 mol/L NaOH を用い約 5.0 へ pH 調整を行った。この試料溶液に 2 mol/L Na₂SO₄ (pH 5.0) を 100 μL 加え、HPLC に供した。なお、亜硝酸分解処

理は全て氷冷下で行った。

5. HPLC による確認試験

HPLC 法による各試験物質の分子量分布の確認は、第 16 改正日本薬局方¹⁸⁾に記載されている方法のカラム本数、試料濃度および試料導入量等を一部改変して次の条件で行った。分析試料は、各検体 50 mg を量り取り、それぞれを移動相 1.0 mL に溶解して調製し、島津製作所(株)製の分析機器を使用し、以下の条件で分析を行った。管理システム、LC solution；ポンプ、LC-10AV vp；検出器、紫外吸光光度計 (SPD-10AV vp；測定波長、234 nm)、示差屈折計 (RID-10A)；カラムおよびガードカラム (TOSO 製(株))、TSKgel G-2000SWXL (5 μm, 7.8 mm I. D. × 300 mm)、TSKgel guardcolumn SWXL (5 μm, 6.0 mm I.D. × 40 mm)；カラム温度、40℃；移動相、0.2 mol/L Na₂SO₄ (pH 5.0)；流速、0.5 mL/min；試料導入量、25 μL。

6. ¹H-NMR による確認試験

¹H-NMR 法による各試験物質の確認は、第 16 改正日本薬局方¹⁹⁾に記載されている方法に準じて行った。分析試料は、各検体 20 mg を、3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム (TSP)-d₄の重水溶液 (1 → 10000) 0.60 mL に溶

解して調製し、アジレントテクノロジー(株)の分析機器を使用して0~8ppmのシグナルを以下の条件で測定した。NMR本体(VNMRS-500PS)、分析ソフト(VnmrJ2.2C); 温度, 25°C; スピニング, オフ; データポイント数, 32768; スペクトル範囲, DHOのシグナルを中心に±6.0ppm; パルス角, 90°; 繰り返しパルス待ち時間, 20秒; ダミースキャン, 4回; 積算回数, HPのN-アセチル基のプロトンのシグナルのSN比が1000以上得られる回数; ウインドウ関数, 指数関数 (Line broadening factor=0.2Hz)

実験結果および考察

1. DN-W, DSHおよびOSHのHPLCとNMR分析結果

今回, DN中に残留する可能性がある高分子不純物としてDSおよびOSCSを想定して各検討を行った。はじめにDN-W, DSHおよびOSHのHPLCとNMR分析を行った。

各MSのHPLC分析の結果, 全ての試料で約24分に塩類に由来するピークが検出された。さらに, 保持時間10~23分にMS骨格に由来する主要ピークが検出された。DN-Wでは, 保持時間19.8分付近にピーク頂点をもつピーク(以後, ピークA)のみが確認され, DSHおよびOSHでは, 保持時間12.5分から13分付近にピーク頂点をもつピーク(以後, ピークB)のみが確認された(Fig. 2上段)。よって, HPLCによる確認では, これら2つのピークの比較を行うこととした。

MSのNMR分析では, 2.05ppm付近にHPに由来するシグナルが得られ, 2.08ppm付近にはDSに由来するシグナル, そして2.15ppm付近にはOSCSに由来するシグナルが得られることが報告されている⁵⁾。今回, ¹H-NMRで1.9~2.2ppm間のシグナルを測定した結果, DN-W, DSHおよびOSHでも同様に, それぞれ特徴的な2.052ppm, 2.077ppmおよび2.153ppmのシグナルを確認することが出来た(Fig. 2下段)。以上の結果から, DN-C精製の確認には, 2.05ppm, 2.08ppmおよび2.15ppm付近の3シグナルの比較を行うこととした。

2. EtOH分画によるDN精製の検討

DNに含まれる不純物を簡便かつ効率良く除去する手法を開発するため, EtOH分画処理の予備検討を行った。はじめに, DN-W, およびDN-W中のDSHおよびOSHのEtOHに対する反応性を確認した。

DN-W, DSHおよびOSHについて, 終濃度が10%(w/v)になるように0.2mol/L NaCl溶液に溶かし, それぞれ調製した。DN-W溶液をコントロールとして, DN-WにDSHの濃度が5.0, 1.0および0.1%(w/v)になるように混合した溶液, そしてDN-WにOSHの濃度が0.5, 0.1および0.01%(w/v)になるように混合した溶液を調製し, これら溶液量の0.5等量(v/v)になるようにEtOHを添加して, 激しく攪拌したものを検液として, その性状を確認した(Fig. 3)。

DN-Wコントロール溶液では, 白色析出物およびコロイ

Fig. 2 Typical HPLC chromatogram and NMR chart of DN-W and references of DSH and OSH

ド状沈殿物は生じなかった。DSH添加検液についても同様に, 0.1~5%(w/v)のいずれの濃度においても白色析出物およびコロイド状沈殿物は生じなかった。一方, OSH添加検液では今回実験を行った最小濃度0.01%(w/v)においても白色析出物が生じた(Fig. 3A)。この白色析出物は, 濃度依存的に増加していることが目視で確認出来た。したがって, 0.5等量のEtOHを加えて攪拌した際にDN原薬に白色析出物が生じた場合は, OSHすなわち高分子OSCSの残留と判定できると考えた。比較的似た分子量およびHPLCクロマトグラムを有するDSHとOSH(Fig. 2)においてEtOHに対する挙動が異なる理由は, それぞれの糖鎖に結合する硫酸基数の違いによるものではないかと推測した。以上の結果から, DN原薬中に高分子OSCSが混入した場合は, 目視による確認および比較的容易な除去が可能と考えられた。

次にDN-WとDSHの分離について更なる検討を行った。DN-Wコントロール溶液およびDN-WにDSHの濃度が1.0%(w/v)になるように混合した溶液(1%DSH添加検液)について, 検液量の0.525, 0.575, 0.625および0.675等量(v/v)になるようにEtOHを添加して, 激しく攪拌した後, それぞれの検液の性状を確認した(Fig. 3B)。DN-Wコントロール溶液および1%DSH添加検液のいずれについても, 0.525等量では変化は見られなかったが, 0.575等

Fig. 3 Appearances of DN-W contaminated with several ratio of DSH or OSH after EtOH precipitation

(A) DN-W treated at room temperature. (B) DN-W+DSH treated with different concentrations of EtOH at room temperature. (C) DN-W+DSH treated at 4°C.

量以上の EtOH 濃度では白色析出物およびコロイド状沈殿物が生じた。そこで、0.525, 0.575 および 0.625 等量で生じた各コロイド状沈殿物を回収してそれぞれ再結晶し、得られた白色粉末について HPLC による確認を行った。EtOH 添加量が 0.575 および 0.625 等量ではピーク A のみが確認され、0.675 等量ではピーク A およびピーク B が確認された（データ示さず）。これらの結果から、DN-W は EtOH 添加量が 0.525～0.575 等量で析出を開始し、DSH は EtOH 添加量が 0.625～0.675 等量で析出を開始すると考えられた。また、0.625 等量の EtOH を添加して処理した 1% DSH 添加検液 2mL（DN-W 含有量は 198.0mg）から回収した白色粉末の重量は 55.7mg（回収率：28.1%）であり、0.675 等量の EtOH を添加して処理した場合、同様にして回収した白色粉末の重量は 115.5mg であった（回収率：53.3%）。これらの条件下では DN-W の析出量が不十分であり、かつ、DSH も析出していることから、より効率的な分離条件を検討する必要性が認められた。

一般的に、水/有機溶媒系中の MS の溶解度は、液温の低下に伴って低くなることが知られている。そこで、DN-W と DSH の分離に及ぼす分離温度の影響について検討した。先の場合と同様に、0.525～0.675 等量の EtOH を添加した 1% DSH 添加検液を激しく攪拌した後、4°C で 24 時

間静置した。この条件下においては、コロイド状沈殿物の生成を確認できた（Fig. 3C）ため、沈殿物を回収、再結晶し、得られた白色粉末について HPLC による確認を行った。その結果、EtOH 添加量が 0.525～0.625 等量ではピーク A のみが確認され、DSH で確認されたピーク B は確認されなかった（データ示さず）。また、0.625 等量の EtOH を添加して処理した 1% DSH 添加検液 2mL（DN-W 含有量は 198.0mg）から回収した白色粉末の重量は、163.2mg（回収率：82.4%）であったことから、DN-W と DSH を分離する場合は 4°C での EtOH 分画処理が有効であると考えられた。このことから、DN-W 中の DSH および OSH を除去する調製方法として、まず室温下の EtOH 処理で OSH をコロイド状沈殿物として除去し、次いで、得られた上清に EtOH を追加して 4°C で静置後に DSH が存在する上清を除き、コロイド状沈殿物として DN-W を回収する 2 段階の調製方法が望ましいと考えられた。

以上の結果から、Fig. 1 に示した通り、DN-C について 2 段階の EtOH 分画処理を実施する事とした。それぞれの段階で得られた上清（S1, S2）およびコロイド状沈殿物（P1, P2）を再結晶し得られた白色粉末と分画前の DN-C についての HPLC および NMR 分析結果を Fig. 4 に示す。

DN-W と OSH, DSH の混合品である DN-C について、

Fig. 4 HPLC and NMR analyses of DN-C fractionated with EtOH precipitation

Charts in each figure show the results of DN-W, DN-C, P1, S1, S2 and P2.

HPLCではDN-Wで確認されたピークAに加え、OSHおよびDSHで確認されたピークBも確認された。ピークAとピークBのおよそのピーク面積比(B/A)は約 1.30×10^{-2} であった。NMR分析でも、それぞれに特徴的な2.05 ppm, 2.08 ppmおよび2.15 ppm付近の3シグナルが確認出来た。またDN-Cおよび全ての画分のNMR分析では2.10 ppm付近にシグナルが確認されたが、これは製造工程における酸化還元処理による影響と推測した。P1画分では、DN-Cと同様に、HPLCにおいてピークAとピークBが確認されたが、そのピーク面積比は約1.03と、ピークBの面積が大幅に増加していた。また、ピークAの頂点は高分子側にシフトしており、DN-Wの高分子部分がP1画分に回収されたものと考えられた。またNMRでは、2.15 ppm付近に最大シグナルが確認され、2.05 ppm付近にわずかなシグナルが確認された。以上の結果から、P1画分の主成分はOSHであり、わずかに高分子のDN-Wが含まれていると考えられた。S1画分では、HPLCではピークAとピークBが確認され、その面積比は約 9.08×10^{-3} であり、DN-Cに比べ、ピークBがわずかに減少していた。また、NMRでは2.05 ppm, 2.08 ppm付近に2シグナルを確認したが、OSHに特徴的な2.15 ppmのシグナルは確認出来なかった。以上の結果から、第一段階のEtOH処理で得られるコロイド状沈殿画分(P1)にOSHが移行/濃縮されており、上清(S1)にはDN-WとDSHが含まれていることが確認された。

S2画分については、HPLCにおいてピークAとピークBが確認された。しかしピークAの頂点の保持時間は20.5

分とDN-Wの保持時間19.8分よりも長く、低分子側にシフトしていた。このことから、S2画分ではDN-Wの低分子部分が回収されたと推測された。ピークAとBの面積比は約 2.36×10^{-1} であり、S1に比較してピークBが増加していた。また、NMRでは2.05 ppmおよび2.08 ppm付近の2シグナルが確認出来た。一方、P2画分では、HPLCではピークBのピークはほとんど確認出来ず、NMRにおいても2.05 ppm付近が主要なシグナルとなり、2.08 ppm付近のピークは確認出来なかった。以上の結果から、第2段階のEtOH処理で得られる上清(S2)にDSHが残留し、コロイド状沈殿画分(P2)にDN-Wが高純度で濃縮されたと考えられた。最終的に、DN-C 50 g (DN-W 49.25 g)をEtOH分画して得られたP1, P2およびS2画分を再結晶して得た白色粉末の重量は、それぞれ0.54 gと43.62 gおよび3.15 gであった。最も純度が高いP2画分における回収率は87.2%であったことから、DN原薬の実製造への応用も十分可能であると考えられた。

3. 亜硝酸分解/HPLC法によるLMWHの純度確認試験

我々は前報¹⁵⁾において、DSやOSCSは亜硝酸分解に対して抵抗性を示すのに対し、HPは亜硝酸分解により2糖単位のピークシフトを伴う分解と低分子化を示すことに基づき、亜硝酸分解に引き続くHPLC分析により、MSの純度確認が可能であることを報告した。そこで、本研究では亜硝酸分解/HPLC法をLMWHに適用し、不純物確認法としての有用性を検討した。

DN-C, S1およびP2それぞれの亜硝酸分解処理を行い、HPLC分析およびNMR分析を行った。得られたHPLC

Fig. 5 HPLC and NMR analyses of fractions of DN-C de-polymerized with nitrous acid

Charts in each figure show the results of DN-W, DN-C, S1, and P2. Charts of "Peak B (RT : 10.5~15.5 min)" are magnified to show the peak clearly.

Table 1 Changes of RI area of MS[†] contained in the DN-C fractionated with ethanol

Ethanol precipitation	Nitrous acid de-polymerization		Composition of un-degraded MS (B/A)	Ratio of un-degraded MS ^c
	Un-treated ^a (A)	Treated ^b (B)		
Un-treatment (intact)	15 465 799±4 561	235 567±395	1.52×10^{-2}	1.00
1st supernatant (S1)	15 835 359±6 530	167 362±96	1.06×10^{-2}	0.69
2nd precipitant (P2)	15 296 567±4 821	6 388±82	4.18×10^{-4}	2.71×10^{-2}

Values are means±SD ($n=3$).

[†]MS, mucopolysaccharides.

^aTotal area of MS without nitrous acid de-polymerization.

^bRI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

^cRatio of un-degraded MS in fractionated DN-C to that in the intact material.

クロマトチャートをフルスケールで記載した場合、ピーク B を確認することが困難である。そこで、Fig. 5 ではフルスケール表記に加えて、各 HPLC クロマトチャート上に、ピーク B を確認しやすい保持時間 (10.5~15.5 分) の拡大クロマトチャートを追記する。HPLC では、すべての検体でピーク A は分解、消失し、ピーク B は亜硝酸分解抵抗性 MS として検出された。しかし、DN-C、S1 と比較して、P2 のピーク B は僅少であった。一方、NMR 分析の結果において、DN-C では 2.04 ppm, 2.08 ppm および 2.15 ppm 付近のシグナルが明確に確認されたが、OSH が除去された S1 では 2.15 ppm, DSH が除去された P2 では 2.08 ppm のシグナルが非常に弱くなった (Fig. 5)。HPLC 分析の結果から、全 MS に占める亜硝酸分解抵抗性 MS のピークの RI 面積値の割合を算出したところ、DN-C では分解前の面積値の 1.52% であったのに対し、S1 中の分解抵抗性 MS ピー

クの RI 面積値は 1.06%, P2 中の分解抵抗性 MS ピークの RI 面積値は 0.04% と、段階的に減少していた (Table 1)。これらの結果から、2 段階の EtOH 分画処理により、DN-C から高分子の MS 不純物が除去され、純度が大幅に高まったことが確認された。また、亜硝酸分解/HPLC 法は LMWH 中の高分子 MS や OSCS の存在を感度良く検出していることから、本法は LMWH の各製造工程の品質管理における純度確認試験法として適用可能であることが示された。

一方で、OSH が除去されている S1 および P2 画分の何れにおいても、亜硝酸分解処理前には認められなかった 2.15 ppm 付近のシグナル (Fig. 4) が、亜硝酸分解処理後に確認された。また、そのシグナルの発生と共に、近接した 2.18 ppm 付近にみられる未同定シグナルの強度の減少も確認された。これは前報¹⁵⁾で報告した、UFH の亜硝酸分

Fig. 6 HPLC and NMR analyses of commercial DN products (above) and the purified DN with EtOH precipitation (below)

Samples of HPLC are de-polymerized with nitrous acid. Charts in each figure show the results of DNG1, DNG2, and DNG3 respectively.

解前後のシグナル推移と同様の挙動であった。精製した OSH および DSH ではこの現象は確認されなかった（データ示さず）ことから、このシグナル推移は HP 糖鎖、あるいは、その糖鎖に結合した他の物質に由来するものと考えられ、HP に何らかの科学処理をした場合、その条件、例えば pH、温度、試薬あるいは処理後に残留する物質によって生じるものと考えられた。以上のことから化学処理の内容によっては、HP/LMWH を NMR 分析した場合、2.15 ppm 付近のシグナルは必ずしも OSH に特異的ではない可能性が示された。これについては、今後詳細な検討が必要であると考えられた。

4. 商業用 DN 原薬の試験的精製

DNG 1～3 について 2 段階の EtOH 分画処理を行い、分画処理前および 2 段階目の EtOH 分画処理後に得られた P2 画分を再結晶して得られた白色粉末について、それぞれ亜硝酸分解し、HPLC 分析および NMR 分析で純度を確認した (Fig. 6)。なお、精製の進行にともない、HPLC クロマトのフルスケール表記は、着目すべきピーク（ピーク B）を確認することが困難であるため、以降はピーク B を確認しやすい保持時間（10.5～15.5 分）のみで記載する。

HPLC による分析の結果、EtOH 分画処理前の各 DNG を亜硝酸分解すると、DN-C の場合と同様に、いずれの試料でもピーク B に相当するピーク成分は分解されなかった。これらピークの立ち上がり部分のスロー形状は分解前後で変化していなかったことから、これらのピークは DN の原料に由来する未分解の HP ではなく、亜硝酸分解抵抗性 MS のピークであると考えられた。

一方、NMR による分析の結果、EtOH 分画処理前の全ての検体において DN に由来する 2.05 ppm のシグナルが確認され、DNG 1 では 2.08 ppm 付近のシグナルが確認できた。しかし、DNG 2 および DNG 3 については DN 由来の GlcNAc のシグナルと重なり、2.08 ppm のシグナルを明確に確認できなかった。また、2.10 ppm 付近にシグナルが確認されたが、これは製造工程における酸化還元処理による影響と推測された。

EtOH 分画処理前の DNG についての HPLC クロマトグラムにおける各 MS のピーク面積の計算結果から、これらの原薬には亜硝酸分解抵抗性の不純物が 0.2%～0.8% 程度含有されていることが確認された (Table 2)。そして、EtOH 分画処理後では、それらピーク成分の RI 面積値は、分画前の RI 面積値の 4%～10% (DN 中の含量として 0.02～0.04% 程度) まで減少していた (Table 3)。DNG 1～3 の原薬粉末 1 g から白色粉末として得られた P2 画分の重量は、それぞれ 0.834、0.852 および 0.827 g であり、製造方法がそれぞれ異なる 3 原薬で、すべて 80% 以上の高い収量が得られた。これらのことから、今回検討した EtOH 分画は LMWH の純度向上に有効であることが確認された。

以上の結果より、DN 製造工程において、DN 以外の MS 夾雑物質を除去する方法として、室温および 4℃での 2 段階の EtOH 分画処理が有効であることが示された。EtOH 分画処理を加えることにより製造工程数が増加するものの、イオン交換/ゲルろ過カラムを含む他の MS の製造ラインとの共用頻度も抑えられることから、よりコンタミネーションを低減した、高品質な DN を供給することが可

Table 2 RI area of nitrous acid de-polymerization-resistant MS[†] in drug substances

Products	Nitrous acid de-polymerization		Composition of un-degraded MS (B/A)
	Un-treated ^a (A)	Treated ^b (B)	
DNG 1	15 267 154±7 415	108 920±739	7.13×10^{-3}
DNG 2	15 318 865±1 015	34 722±645	2.27×10^{-3}
DNG 3	15 585 305±2 178	120 381±1 231	7.72×10^{-3}

Values are means±SD ($n=3$).

[†]MS, mucopolysaccharides ;

^aTotal area of MS without nitrous acid de-polymerization.

^bRI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

Table 3 RI area of nitrous acid de-polymerization-resistant MS[†] in 2nd colloidal precipitate (P2) resulting from ethanol precipitation of drug substances

Products	Nitrous acid de-polymerization		Composition of un-degraded MS (B/A)	Ratio of un-degraded MS ^c
	Un-treated ^a (A)	Treated ^b (B)		
DNG 1	15 492 070±5 294	5 249±195	3.34×10^{-4}	4.82×10^{-2}
DNG 2	15 039 313±17 551	3 143±93	2.09×10^{-4}	9.05×10^{-2}
DNG 3	15 415 894±10 082	5 386±218	3.48×10^{-4}	4.46×10^{-2}

Values are means±SD ($n=3$).

[†]MS, mucopolysaccharides.

^aTotal area of MS without nitrous acid de-polymerization.

^bRI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

^cRatio of un-degraded MS in precipitate to that in each intact material shown in Table 2.

能であると考えられた。

また、亜硝酸分解/HPLC 法による MS 確認試験法については、本法は NMR 法と同等の評価が可能な LMWH 検査方法となり得ることが示された。特に各 DNG の分析において、残留する亜硝酸分解抵抗性物質の不均一性が示されたこと、およびその確認において混入量が微量の場合、HPLC 法では亜硝酸分解抵抗性物質として確認可能であるが、NMR では確認が困難であることを示唆するものである。よって、粗原料から粉体化までの一連の工程管理の要所において、この方法で検査を実施することで、NMR/イオン交換/逆相クロマト法が規格化されている HP と、同等の品質が確保できるものと考えられる。HPLC 法が LMWH の分子量測定法として古くから各国の薬局方に収載され、国内外で多くの原薬/製剤メーカーにも普及している分析手法の 1 つである²⁰⁾ こと、HP と同様に、LMWH 原薬/製剤調製時の工程管理において、本報中の MS 確認方法を適用することは、比較的容易であると考えられる。

今回の研究では、LMWH 中の MS 由来不純物として OSH および DSH を想定し、それらの除去方法について検討した。しかしながら、他の CSF の特性、それらの過硫酸化の程度や化学構造は多様であり、それらの NMR シグナルは OSH とは異なる場合があることが報告されている²¹⁾。HP 中に混入する MS 物質は常に同一である保証は

なく、それらが血中、あるいは経皮で生体内に吸収された場合の副作用も不明である。従って、HP 製品の一層の安全性確保のため、今後、MS 製造において混入する可能性のある不純物、たとえば、塩類/吸着剤/有機溶媒、各 CSF を出発物質とする化学修飾 MS および MS 全般を化学処理した場合に生じる物質等、MS 製造において混入する可能性のある物質のプロファイリング、また、それらを効率的に除去する精製方法の検討が必要であると考えられる。

要 約

低分子ヘパリン (LMWH) であるダルテパリンナトリウム (DN) の純度試験法と、その中の他のムコ多糖類 (MS) 夾雑物の工業的除去方法について検討した。高純度の DN (DN-W) に高分子デルマトン硫酸 (DSH) および高分子過硫酸コンドロイチン硫酸 (OSH) を添加して粗 DN (DN-C) を調製し、2 段階のエタノール (EtOH) 分画処理を行い、各不純物の挙動と DN-C の精製度を確認した。加えて、商業用 DN についても同様の EtOH 分画処理を行い、EtOH 分画処理の有効性を確認した。各分画物を HPLC 法と¹H-NMR (NMR) 法により分析した結果、全ての検体で純度が向上した。また、本試験で用いた商業用 DN 中の高分子 MS 不純物はおもに高分子 DS であることが確認された。以上の結果から、LMWH の調製工程において、亜

硝酸分解抵抗性不純物を高感度で検出できる亜硝酸分解/HPLC 法による純度検査を行い、さらに、2 段階の EtOH 分画処理を実施することで、高品質な LMWH 原料を安定的に調製できると考えられた。

本研究の遂行にご協力戴きました元共立女子大学教授中村豊朗氏、ILS(株)に深く御礼申し上げます。貴重な試験用 MS をご供与戴きましたおよび日本バルク薬品(株)に深く御礼申し上げます。また生物由来生理活性物質の抽出方法、修飾方法および国内外の臨床利用例について多くのご教示ご指導戴きました故奥山隆先生に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) ヘパリンナトリウム、ヘパリンナトリウム注射液、〔第 16 改正日本薬局方解説書〕、(廣川書店、東京)、C4472-4483 (2011)。
- 2) Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., Naggi, A., Viswanathan, K., Bisio, A., Capila, I., Lansing, J.C., Guglieri, S., Fraser, B., Al-Hakim, A., Gunay, N.S., Zhang, Z., Robinson, L., Buhse, L., Nasr, M., Woodcock, J., Langer, R., Venkataraman, G., Linhardt, R.J., Casu, B., Torril, G. and Sasisekharan, R., Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nature Biotech.*, **26**, 669-675 (2008)。
- 3) Beyer, T., Diehl, B., Randel, G., Humpfer, E., Schafer, H., Spraul, M., Schollmayer, C. and Holzgrabe, U., Quality assessment of unfractionated heparin using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 13-19 (2008)。
- 4) Kishimoto, T.K., Viswanathan, K., Ganguly, T., Elankumaran, S., Smith, S., Pelzer, K., Lansing, J.C., Sriranganathan, N., Zhao, G., Galcheva-Gargova, Z., Al-Hakim, A., Bailey, G.S., Fraser, B., Roy, S., Rogers-Cotrone, T., Buhse, L., Whary, M., Fox, J., Nasr, M., Dal Pan, G.J., Shriver, Z., Langer, R.S., Venkataraman, G., Austen, K.F., Woodcock, J. and Sasisekharan, R., Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *New Engl. J. Med.*, **358**, 2457-2467 (2008)。
- 5) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 川原信夫, 正田卓司, 杉本直樹, 薮島由二, 品川麻衣, 榛葉信久, 宮田一義, 塚本秀樹, 千秋和久, 長谷川泰介, 河合健蔵, 余田 光, 木下充弘, 梶 直孝, 木下充弘, 掛樋一晃, 合田幸弘, 奥田晴宏, 棚元憲一, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第一報) ^1H -NMR によるヘパリンナトリウム純度試験に関する研究. 医薬品研究, **39**, 651-659 (2008)。
- 6) 橋井則貴, 川崎ナナ, 高倉大輔, 伊藤さつき, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 有村雅俊, 辰巳昌史, 奥田晴宏, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第二報) ^1H -NMR によるヘパリンカルシウム純度試験に関する研究. 医薬品研究, **39**, 660-664 (2008)。
- 7) 掛樋一晃, 梶 直孝, 木下充弘, 橋井則貴, 川崎ナナ, 寺尾敏光, 河合健蔵, 余田 光, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第三報) キャピラリー電気泳動法によるヘパリンナトリウム不純物の分析. 医薬品研究, **39**, 713-720 (2008)。
- 8) 川崎ナナ, 橋井則貴, 杉本直樹, 高倉大輔, 秦 艶, 細山沙織, 戸井田敏彦, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第四報) 合成過硫酸化コンドロイチン硫酸の日局標準品としての適用性の評価. 医薬品研究, **39**, 721-729 (2008)。
- 9) 橋井則貴, 川崎ナナ, 正田卓司, 福原 潔, 品川麻衣, 榛葉信久, 嶋村健蔵, 河合健蔵, 余田 光, 奥田晴宏, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第五報) ^1H -NMR によるヘパリンナトリウム確認試験及び純度試験に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **41**, 469-476 (2010)。
- 10) 橋井則貴, 川崎ナナ, 秦 艶, 山口照英, ヘパリン純度試験に関する研究 (第六報) 日局医薬品各条ヘパリンナトリウム確認試験及び純度試験の改正に伴うヘパリンナトリウム標準品の品質確保に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**, 827-835 (2011)。
- 11) 橋井則貴, 蛭田葉子, 石井明子, 鈴木琢雄, 夏賀 徹, 鈴木律子, 杉山和喜, 渡部沙木絵, 中川ゆかり, 板東 綾, 関本裕子, 宮田一義, 大津卓磨, 宮澤亜矢子, 近藤 匠, 藤田祐司, 宮永直幸, 嶋田徳彦, 石賀 肇, 余田 光, 嶋村英雄, 川崎ナナ, ヘパリン純度試験に関する研究 (第七報) 日本薬局方各条ヘパリンナトリウム及びヘパリンカルシウムのタンパク質及び核酸純度試験法に関する研究. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **43**, 1050-1058 (2012)。
- 12) 厚生労働省, 厚生労働省告知第 417 号 (2008)。
- 13) 厚生労働省, 厚生労働省告示第 322 号 (2010)。
- 14) Linhardt, R.J., Loganathan, D., Al-Hakim, A., Wang H-M., Walenga, J. M., Hoppenstead, D. and Fareed, J., Oligosaccharide Mapping of low molecular weight heparins : Structure and activity differences. *J. Med. Chem.*, **33**, 1639-1645 (1990)。
- 15) 村田浩志, 松久明生, 山本啓一, 戸田隆雄, 六車三治男, 河原 聡, 未分画ヘパリン中のムコ多糖類の確認方法およびその工業的除去方法. 日本食品科学工学会誌, **59**, 628-636 (2012)。
- 16) 今成登志男, 戸井田敏彦, Linhardt, R.J., 過硫酸化コンドロイチン硫酸, その製造方法及びそれを有効成分として含有する抗血液凝固剤, 特開平 11-166001 (1999)。
- 17) 八藤後武美, 村田浩志, 低分子量ヘパリンの製造法, 特開 2002-293804 (2002)。
- 18) 厚生労働省, パルナバリンナトリウム, 〔第 16 改正日本薬局方〕, pp.1042-1044 (2011)。
- 19) 厚生労働省, ヘパリンナトリウム, 〔第 16 改正日本薬局方〕, pp.1247-1249 (2011)。
- 20) Dedem, G.V. and Nielsen, J.I., Determination of the molecular mass of low molecular mass (LMW) heparin. *Pharm-europa*, **3**, 202-218 (1991)。
- 21) Maruyama, T., Toida, T., Imanari, T., Yu, G. and Linhardt, R. J., Conformational change and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr. Res.*, **306**, 35-43 (1998)。

引用 URL

- 1) U.S. Food and Drug Administration (FDA), FDA Public Health Update : Recall of heparin sodium injection and heparin lock flush solution (Baxter), (2008). <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm>. (2008.2.28).
- (平成 25 年 8 月 1 日受付, 平成 25 年 11 月 11 日受理)