

日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験への
キャピラリー電気泳動法の適用について梶 直孝,^a 木下充弘,^a 川崎ナナ,^b 山口照英,^b 早川堯夫,^c 掛樋一晃^{*,a}Capillary Electrophoresis Analysis of Contaminants in Heparin Sodium
for the Japanese Pharmacopoeia Purity TestNaotaka KAKOI,^a Mitsuhiro KINOSHITA,^a Nana KAWASAKI,^b
Teruhide YAMAGUCHI,^b Takao HAYAKAWA,^c and Kazuaki KAKEHI^{*,a}

^aDepartment of Biopharmaco Informatics, School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan, ^bDivision on Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, and ^cPharmaceutical Research and Technology, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

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

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

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

緒 言

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

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

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

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

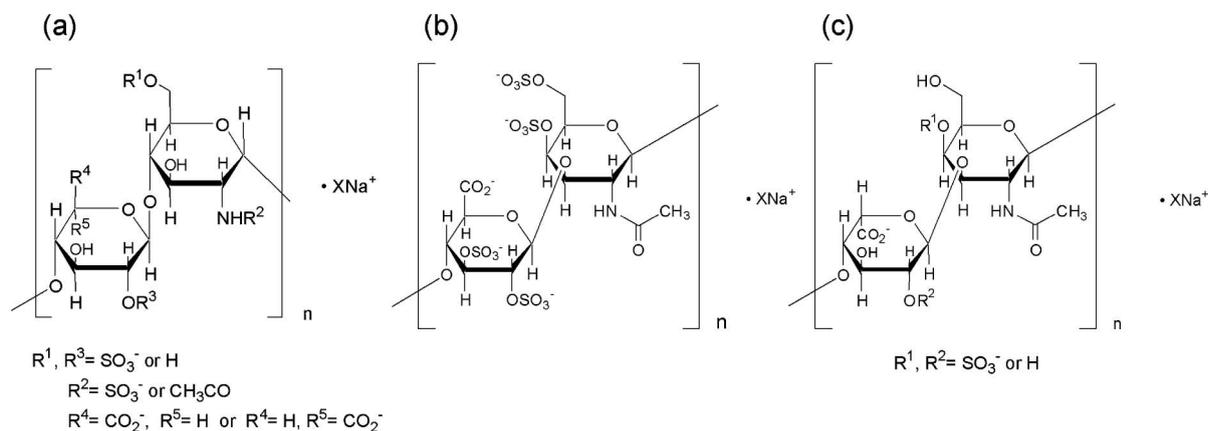


Fig. 1. Structures of the Disaccharide Unit of Glycosaminoglycans Tested in the Present Study
(a) Heparin sodium, (b) oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) and (c) dermatan sulfate (DS).

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

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

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

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

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

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

実験方法

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

結 果

1. OSCS

1-1. OSCS の分析条件 FDA がホームページ上に公開したキャピラリー電気泳動法による OSCS のスクリーニング方法 (FDA method) を参考にし, ⁸⁾ 10% (w/w) の濃度で OSCS を添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した. その結果, ヘパ

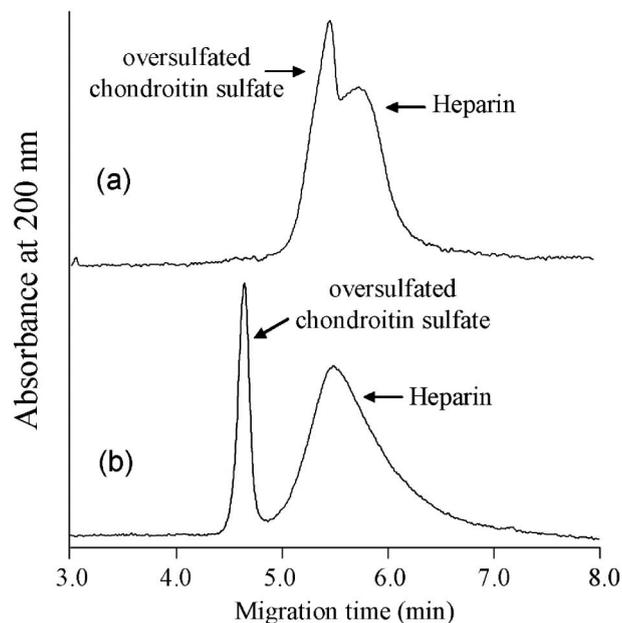


Fig. 2. Capillary Electrophoresis Analysis of 10% (w/w) OSCS Spiked Heparin
(a) FDA method and (b) OSCS method.

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

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

Table 1. Validation Characteristics for OSCS Analysis by Capillary Electrophoresis and ¹H-NMR

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

*1 and *2, from the reports by Hashii *et al.*¹²⁾ and Kakehi *et al.*¹³⁾ respectively.

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

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

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

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

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

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

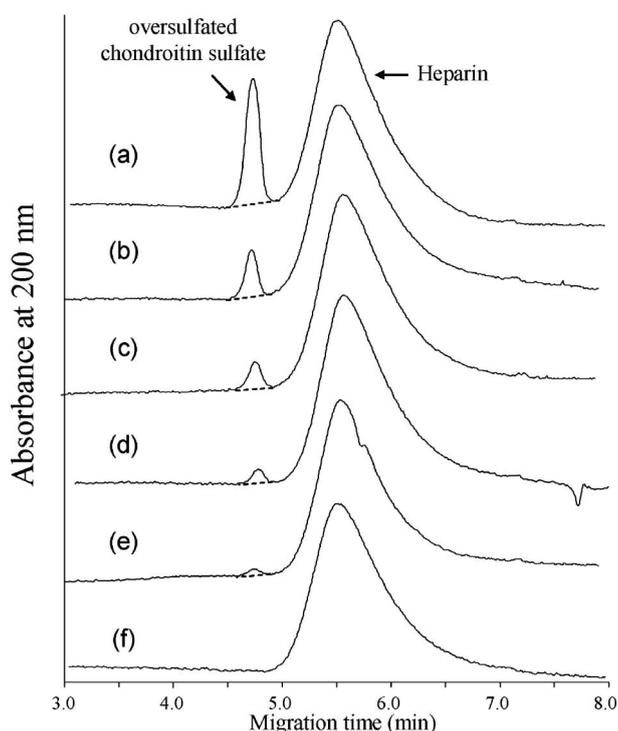


Fig. 3. Lower Limit of Detection of OSCS in the Presence of Heparin

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

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

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

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

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

2. DS

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

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

2-2. DS 試験の分析法バリデーション

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

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

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

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

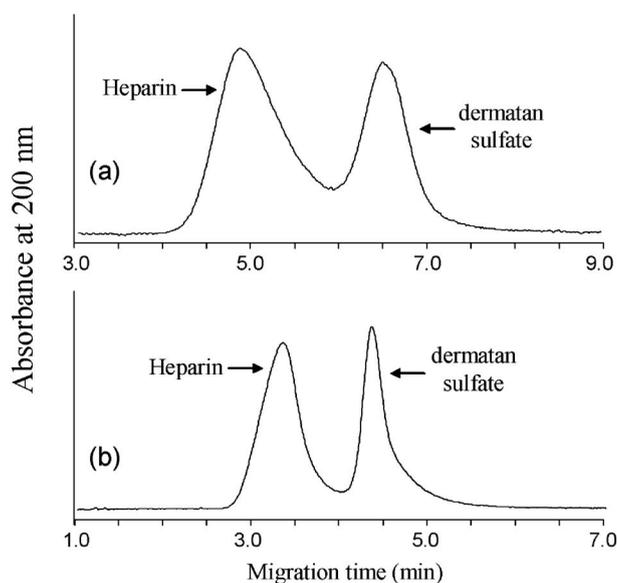


Fig. 4. Capillary Electrophoresis Analysis of 5.0% (w/w) DS Spiked Heparin

(a) OSCS method and (b) DS method.

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

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

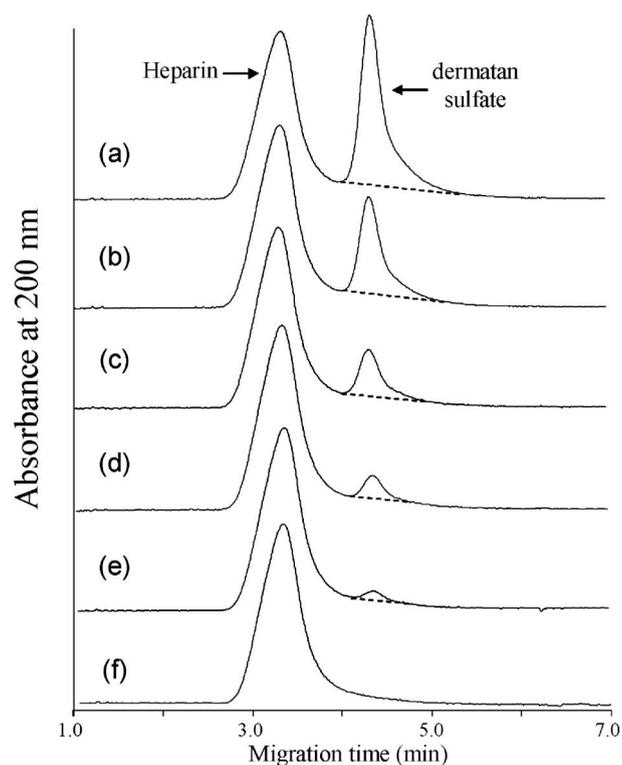


Fig. 5. Lower Limit of Detection of DS in the Presence of Heparin

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

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

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

*1 and *2 , from the reports by Hashii *et al.*¹²⁾ and Kakehi *et al.*¹³⁾ respectively.

%)であった。

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

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

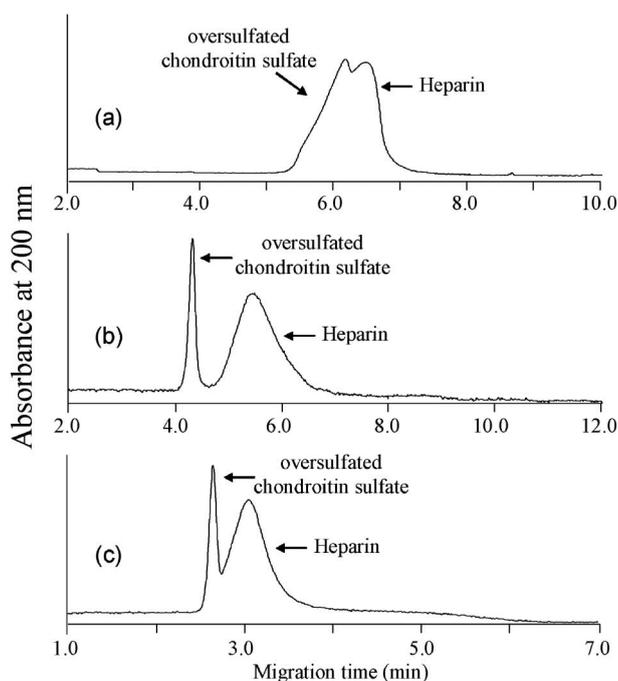


Fig. 6. Capillary Electrophoresis Analysis of Contaminated Heparin Sodium Preparation

(a) FDA method, (b) OSCS method and (c) DS method.

考 察

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

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

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

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

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

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

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

結 論

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

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

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

REFERENCES

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

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