

宮 崎 大 学 大 学 院

博 士 学 位 論 文

屠畜副産物の持続的利用に資するヘパリン原薬製造における
精製工程および分析方法の至適化に関する研究

Study on Optimization of Purification Process and an
Analytical Method for Manufacturing of Heparin Products
Aiming for Sustainable Utilization of
By-products Derived from Animal Carcass

2014 年 3 月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

資源環境科学専攻

村 田 浩 志

目 次

	Page
第 1 章 緒論	1
1. はじめに	1
2. 血液透析療法で使用するヘパリン	3
● 未分画 HP (unfractionated heparin, UFH)	4
● 低分子 HP (Low molecular weight heparin, LMWH)	6
3. HP 製剤中に混入した不純物による有害事象	7
4. 本研究の目的	9
第 2 章 各ムコ多糖の分子量分布および亜硝酸分解に対する反応性の確認	12
緒言	12
実験材料と方法	14
1. 供試材料	14
2. ムコ多糖の亜硝酸分解処理	14
3. ゲルろ過 HPLC による分子量分布の確認	14
結果と考察	16
要約	29
第 3 章 エタノール分画処理によるヘパリンの精製、および亜硝酸分解とゲルろ過 HPLC を組み合わせた純度確認試験の検討	31
緒言	31
実験材料と方法	33
1. 供試材料	33
2. ムコ多糖の亜硝酸分解処理	33
3. ゲルろ過 HPLC による分子量分布の確認	34
4. ^1H -NMR 法によるムコ多糖の確認	34
5. エタノール分画処理	35
結果と考察	37

要約	50
第 4 章 エタノール分画処理による低分子ヘパリンの精製、および 亜硝酸分解とゲルろ過 HPLC を組み合わせた純度確認試験 の検討	51
緒言	51
実験材料と方法	53
1. 供試材料	53
2. ゲルろ過 HPLC によるムコ多糖の分子量分布の確認	53
3. ^1H -NMR 法によるムコ多糖の確認	54
4. エタノール分画処理によるダルテパリンナトリウム精製 (予備検討)	54
5. エタノール分画処理によるダルテパリンナトリウム精製 (本検討)	55
6. ダルテパリンナトリウムのエタノール分画物の亜硝酸分 解処理	56
結果と考察	59
要約	76
第 5 章 総括	77
Summary	81
謝辞	85
参考文献	86

略語一覧

略語	英語	日本語
ATIII	Antithrombin III	アンチトロンビン III
BSE	Bovine spongiform encephalopathy	牛海綿状脳症
CHP	Crude heparin	粗ヘパリン
CS	Chondroitin sulfate	コンドロイチン硫酸
CS-A	Chondroitin sulfate type-A	コンドロイチン硫酸 A
CS-B	Chondroitin sulfate type-B	コンドロイチン硫酸 B (DS)
CS-C	Chondroitin sulfate type-C	コンドロイチン硫酸 C
CS-D	Chondroitin sulfate type-D	コンドロイチン硫酸 D
CS-E	Chondroitin sulfate type-E	コンドロイチン硫酸 E
CSF	Chondroitin sulfate family	コンドロイチン硫酸ファミリー
CS-H	Chondroitin sulfate type-H	コンドロイチン硫酸 H
CS-K	Chondroitin sulfate type-K	コンドロイチン硫酸 K
DN	Dalteparin sodium	ダルテパリンナトリウム
DS	Dermatan sulfate	デルマタン硫酸 (CS-B)
EN	Enoxaparin sodium	エノキサパリンナトリウム
EtOH	Ethanol	エタノール
FDA	U.S Food and Drug Administration	アメリカ食品医薬局
GAG	Glycosaminoglycan	グリコサミノグリカン
Gal	D-Galactose	D-ガラクトース
GalN	D-Galactosamine	D-ガラクトサミン
GalNAc	N-acetyl-D-Galactosamine	N-アセチル-D-ガラクトサミン
GlcN	D-Glucosamine	D-グルコサミン
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine	N-アセチル-D-グルコサミン
GlcNS	N-sulfate-D-glucosamine	N-スルフェート-D-グルコサミン
GluA	D-Glucuronic acid	D-グルクロン酸
HA	Hyaluronic acid	ヒアルロン酸
HP	Heparin	ヘパリン
HS	Heparan sulfate	ヘパラン硫酸

ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IdoA	L-Iduronic acid	L-イズロン酸
KS	Keratan sulfate	ケラタン硫酸
LMWH	Low molecular weight heparin	低分子ヘパリン
MeOH	Methanol	メタノール
MHRA	U.K Medicines and Healthcare products Regulatory Agency	イギリス医薬品庁
MS	Mucopolysaccharide	ムコ多糖
OSCS	Over-sulfated chondroitin sulfate	過硫酸化コンドロイチン硫酸
PG	Proteoglycan	プロテオグリカン
PN	Parnaparin sodium	パルナパリンナトリウム
RI	Refractive index	示差屈折
RN	Reviparin sodium	レビパリンナトリウム
UA	Uronic acid	ウロン酸
UFH	Unfractionated heparin	未分画ヘパリン
UV	Ultra violet	紫外吸収

第 1 章 緒論

1. はじめに

生体成分であるムコ多糖 (mucopolysaccharide, MS) は、グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, GAG) とも呼称され、動物の結合組織を中心にあらゆる組織中、特に結合組織中ではタンパク質と結合した状態であるプロテオグリカン (proteoglycan, PG) として存在する。MS はその分子内に保水作用を有することから、組織構造の維持あるいは関節間の潤滑作用を有する。MS の呼称 (Meyer 1938) は本来、ラテン語の *muco* (生体粘膜中の粘質性分泌物の意) に由来するが、現在ではアミノ糖を含有する多糖類と定義されている。

MS の構造は一部を除き、二糖単位の繰り返し構造からなる枝分れのない長鎖であり、その二糖単位の基本となる組み合わせとして、アミノ糖とウロン酸 (uronic acid, UA)、またアミノ糖と D-ガラクトース (D-galactose, Gal) の 2 種類が多く認められる。前者の場合、アミノ糖には D-グルコサミン (D-glucosamine, GlcN) あるいは D-ガラクトサミン (D-galactosamine, GalN)、UA としては D-グルクロン酸 (D-glucuronic acid, GluA) あるいは L-イズロン酸 (L-iduronic acid, IdoA) または Gal がアミノ糖に結合する。一方、後者の場合、アミノ糖は GlcN であり、Gal と GlcN の二糖単位の糖鎖骨格のみを有する MS として、角膜/軟骨等の組織に含有されるケラタン硫酸 (keratan sulfate, KS) が知られている。これらの基本構造に加え、各糖に結合するアセチル基あるいは硫酸基の数、結合部位等の相違により各 MS の特性は変化し、それぞれ特徴のある生理活性を呈している。

工業的あるいは商業的な MS の用途は多岐にわたり、健康食品、化粧品、研

究用試薬および医薬品等、多くの分野において世界中で流通している。後述するように、MS の種類は様々であり、それらを抽出/精製するための粗原料もまた多様である。あまり知られていないが、粗原料の起源を遡ると、畜産資源である牛、豚、羊では軟骨あるいは腸粘膜、また家鶏では鶏冠等、そして、水産資源である鮫、イカでは軟骨等、という具合に、それぞれの食品加工時に生じる副産物に由来するものが大多数を占めている。

しかし、2000 年代初頭に発生した牛海綿状脳症（bovine spongiform encephalopathy, BSE）問題以降、牛由来の副生成物の利用は大きく制限され、牛由来の MS の流通も同様に厳しく制限されている。近年では甲殻類（Kitagawa ら 1997）や微生物（Matsuda ら 1992）由来の MS についても、糖鎖構造あるいは生理活性や有効利用等に関する研究等が報告されており、MS 粗原料の新規開拓も期待されている。健康増進を目的とする健康食品の素材、あるいは表皮保湿を目的とする化粧品の素材となる MS として、N-アセチル-D-ガラクトサミン（N-acetyl-D-galactosamine, GalNAc）と UA の二糖を基本骨格としたコンドロイチン硫酸（chondroitin sulfate, CS）、そして GlcNAc と GluA の二糖を基本骨格としたヒアルロン酸（hyaluronic acid, HA）が挙げられる。工業的には、前者は豚、鮫およびイカの軟骨、後者は鶏冠から製造されることが多い。

食品あるいは化粧品の分野における MS の認知度は高いが、実は医療分野において生物由来の医薬品原料として流通している MS も多い。例えば、前述した CS は、外科領域では腰痛症、関節痛および感音性難聴等の疾患の治療薬として、また、眼科領域では角膜表層保護を目的とした治療薬として使用されている。一方、HA は、外科領域では変形性膝関節症および関節リウマチにおける膝関節痛等の治療に使用され、眼科領域では角結膜上皮障害等の疾患における

治療薬として使用されている。特に、日本国内での CS の歴史は古く、すでに昭和初期から CS 分解酵素の研究成果も報告されており (Soda と Egami 1938)、後に頭痛薬として研究が進められ、医薬品として販売された経緯は興味深い。

2. 血液透析療法で使用されるヘパリン

ヘパリン (heparin, HP) は、主に GlcN と UA の二糖を基本骨格とした MS であり、その血液凝固阻止作用が良く知られている。また、BSE 問題が発生する以前は、その粗原料として、牛、豚および羊腸を用いた天然ケーシング製造の初期段階において、残留する内容物を洗浄した後に削ぎ落とされる腸内粘膜が利用されてきたが、現在ではほぼ豚腸粘膜のみが利用されている。HP は、CS や HA とは異なり、食品や化粧品としての利用例はほとんど無いが、医療分野において血液透析療法などの体外循環装置使用時における血液凝固の防止のために使用される。血液透析とは腎機能の低下に伴って血液中に蓄積する老廃物および過剰水分等を人工的に除去する臨床医療のひとつであり、具体的にはダイアライザと呼ばれる透析膜を充填した人工腎臓内に血液を送り込み、透析膜外に老廃物や過剰水分を排出する治療方法である。血液透析療法の際には、体外循環時に血液が凝固しないように、合成品あるいは HP のような生物由来の血液凝固阻止剤が使用される。

日本透析医学会による「慢性透析患者数の推移に関する調査 (日本透析医学会 2013)」によれば、日本国内の慢性透析患者数は 2005 年頃まで年間約 1 万人ずつ増加し、2011 年末に 30 万人を超え (304,856 人)、また、「治療方法別抗凝固薬の種類に関する調査 (日本透析医学会 2004)」によれば、血液透析、血液濾過透析および血液吸着透析等の透析療法の種類によらず、HP 製品の使用例

が過半数を超えている。重度の腎不全の場合、透析は月当たり 10～15 回前後行われ、その毎に血液凝固阻止剤の使用が必須であることから、血液透析における血液凝固阻止剤として、HP 製品はかなり高頻度で使用されていることになる。HP 製品の主原料となる HP 原薬には、以下に述べる未分画 HP と低分子 HP がある。

● 未分画 HP (unfractionated heparin, UFH)

HP は、1916 年にイヌ肝臓から、血液凝固阻害作用をもつ物質として発見され (McLean 1916)、その後、哺乳動物の種によらず、また肝臓以外の器官にも存在 (Charles と Scott 1933) することが報告された。血液循環に関する疾患等で、HP の臨床使用 (Murray ら 1937, Murray 1940) がなされて以来、医療分野で世界的に広く普及し、血液透析時の血液凝固阻止および血栓塞栓症予防等の目的で使用されている。

HP 糖鎖の基本骨格は GlcNAc あるいは N-スルフェート-D-グルコサミン (N-sulfate-D-glucosamine, GlcNS) と UA (GluA あるいは IdoA) の繰り返しの二糖で構成されている。HP は、血中の血液凝固インヒビターのひとつであるアンチトロンビン III (antithrombin III, ATIII) と結合することにより、元来 ATIII が有する血液凝固阻害作用を著しく増強する作用があることが報告された (Damus ら 1973)。この阻害作用の本質は、血中の血液凝固因子の一連の連鎖反応 (凝固カスケード) によって引き起こされる血液凝固反応の中で、その下流に位置する Xa および IIa (トロンビン) 因子の両者を強く阻害することにより、I (フィブリノーゲン) 因子のフィブリン化を抑制することである。

工業的には、HP は食用獣である牛、豚および羊等の屠畜後の副生物から製造される生理活性物質であり、主に肺、肝および腸組織から抽出される (Pearce

ら 1968)。基本的には、各組織を破碎して調製した懸濁液の酵素処理を行い、吸着剤処理 (Rodén と Dorfman 1959) によって得られた粗 HP (crude heparin, CHP) を用いて、いくつかの精製工程を経た後に最終製品となる。しかし厳密には、製造メーカーによって HP の製造方法は異なっており、その製造方法の相違により、化学構造や生理活性が変動することも指摘されている (Coyne 1977)。前述のとおり、BSE 問題以降、医薬品原料としての HP 製造において、その粗原料として用いられる CHP は、ほぼ豚腸粘膜由来である。CHP は、HP に加え、主にヘパラン硫酸 (heparan sulfate, HS) およびコンドロイチン硫酸ファミリー (chondroitin sulfate family, CSF) を含有している (Griffin ら 1995)。各製造メーカー、また個々の製造ロットによって若干の差異はあるものの、HP 最終製品中には CHP に由来するこれらの MS が不純物として残留している場合もあったため、HP は未分画 HP (unfractionated heparin, UFH) とも呼称されてきた。HS 糖鎖の基本骨格は GlcNAc あるいは GlcNS と UA (GluA あるいは IdoA) の繰り返し二糖で構成され、HP と似た構造であるが硫酸基の数や結合位置が HP とは異なり (Toida と Linhardt 1998)、血液凝固阻害作用は HP よりも弱いことが知られている (Ishihara と Ono 1998)。また、CSF は、その天然型として、主に五つの型 (CS-A, CS-B, CS-C, CS-D および CS-E) に分類されてきた (Bernardi ら 1957, Meyer と Chaffee 1941, Meyer ら 1936, Suzuki 1960, Kawai ら 1966)。また、CS-B はデルマタン硫酸 (dermatan sulfate, DS) とも呼称されている。これ以外の CSF として、近年ではヌタウナギ由来の CS-H (Akiyama と Seno 1973) およびカブトガニ由来の CS-K (Seno と Murakami 1982) も注目されてきている。CSF 糖鎖の基本骨格は GalNAc と UA の繰り返し二糖で構成されており、特にアミノ糖が GalNAc であること

が HP や HS とは大きく異なっている。豚腸粘膜中の HP 以外の MS は、主に HS、CS-B (DS) および CS-C である。抽出方法により変動するものの、通常 CHP 中には、特に高分子 MS として CS-B (DS) が 5~20% 程度含有されている場合が多い。そのため、CS-B (DS) 含量はしばしば HP の精製度の指標となる。これら CHP 中に含有される HP 以外の MS もまた、分画あるいは化学修飾されて食品、研究用試薬、あるいは医薬品などとして有効利用されている (奥山ら 1979)。HP と同様にそのアミノ糖組成が主に GlcNAc あるいは GlcNS である HS と異なり、アミノ糖組成が主に GalNAc である CSF は、UFH 中におよそ 0~5% 前後が残留していることはこれまでも確認されていた。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臨床使用されてきた経緯がある。

● 低分子 HP (Low molecular weight heparin, LMWH)

HP の臨床使用時における副作用として、その血液凝固阻害作用という生理活性上の特性により、出血時間の延長、すなわち出血傾向の助長が挙げられる。これは HP が結合した ATⅢにより、血液凝固因子である第 X a 因子および第 II a 因子が強力に阻害されることにより惹き起されるものである。通常、組織から抽出された HP は単一物質ではなく、不均一な分子量分布を有する多分散の混合物質であるが、高分子領域に分布する HP は第 X a 因子活性・第 II a 因子活性のいずれも阻害するのに対して、低分子領域に分布する HP は第 X a 因子をより選択的に阻害し、第 II a 因子を阻害する作用は前者より弱いことが明らかになった (Andersson ら 1976)。さらに精査が進み、ATⅢと結合するために必要な HP 糖鎖の最少単位は五糖であることが報告された (Thunberg ら 1982)。また、出血傾向の助長を含めた多くの副作用が HP の分子量の低下に伴って低

減されることが注目されて以来、HP を化学的、あるいは酵素的に分解する方法の研究が進み、低分子 HP (Low molecular weight heparin, LMWH) が開発された。その種類、また解重合の方法は多様であるが (Linhardt ら 1990) 現在、日本国内で流通している血液透析適応の LMWH について、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, RN) は亜硝酸分解、パルナパリンナトリウム (parnaparin sodium, PN) は過酸化水素等を用いたラジカル分解によって HP を低分子化することにより製造されている。

3. HP 製剤中に混入した不純物による有害事象

このように、その組成や製造原料に由来する不純物についても既知であり、また、重篤な副作用の報告も僅かで、世界中で古くから使用されてきた HP であるが、2008 年初頭、米国、ドイツなどで HP 製剤の急速静注投与が原因と思われる死亡および他の副作用について、アメリカ食品医薬局から緊急報告がなされた (U.S. Food and Drug Administration, FDA 2008)。使用された HP 製剤および原薬について、分析調査した結果、本来原薬中に大量に混入する可能性がない過硫酸化コンドロイチン硫酸 (over-sulfated chondroitin sulfate, OSCS) が確認された (Guerrini ら 2008, Beyer ら 2008, Kishimoto ら 2008)。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。日本国内において HP 製剤の原薬は、すべて海外から輸入されており、国内生産は行われていない。速やかに安全性確保のため、HP の純度試験法および確認試験法が検討され (橋井ら 2008a, 橋井ら 2008b, 掛樋ら 2008, 川崎ら 2008, 梶ら 2009, 橋井ら 2010)、混入物質である OSCS と CS-B

(DS) の確認/純度試験として $^1\text{H-NMR}$ 、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（厚生労働省 2008, 厚生労働省 2010）、最終的な原薬の規格試験として義務づけられた。各原薬メーカーはこの規格試験に適合する原薬を製造するために、今まで以上に製造/分画方法の至適化、また各工程での品質管理の徹底が喫緊の課題となった。

安全性の高い HP 原薬を製造するためには、「各工程で目的外物質の基準値を設定し、上述の試験によって検査を行い、適合した中間体を次工程に移行する」ことが最も確実な方法であると考えられるが、上述の各試験法は煩雑である上、外注試験を行った場合はコストが高くなり、ひいては原薬価格の高騰にも繋がることが懸念される。そのため、各原薬メーカーで、粗原料である CHP の受入から最終的な HP 原薬の粉体充填までの各工程において、これらの試験をすべて実施することは事実上困難であるといえる。また、Figure 1 に示すとおり、MS 製造メーカー、特に CHP のような粗原料から製造するメーカーにおいては、1 種類の MS のみを製造することは稀であり、基本的に、1) 異種生物由来の粗原料から特定の MS を個別に製造する (Figure 1A)、あるいは 2) 粗原料中の MS を分画して何種類かの MS を製造する場合 (Figure 1B) が多い。そのため、粗原料あるいは中間体の取り違い、また製造工程におけるラインおよび各機器の洗浄不良等によっては、目的とする MS 中に目的外の MS が混入する可能性が常にあることを理解しなければならない。特に、HP と同種同効薬である LMWH には、現在上述の試験、あるいはそれに代わる確認/純度試験は義務づけられていない。このことから、HP と同一工場、すなわち同一生産ラインを使用する頻度が高い LMWH については、HP と同様に安全性を担保、あるいは向上させるための何らかの工程管理の手段が必要である。そして、HP および

LMWH 中に目的外の MS の残留を低減するような精製/分画方法を製造工程に導入することにより、高純度の HP および LMWH を安定供給できる製造管理法を確立することが喫緊の課題である。

4. 本研究の目的

本論文では、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用いられている HP および LMWH 製品の安全性確保と安定供給を目的として、より簡便な純度確認法およびエタノール (EtOH) 分画による効率的な原薬の精製法について研究を行った。

まず、第 2 章では、各種 MS の純度試験を確立する目的で、CHP、HP、LMWH、および HP と同様に、天然物から抽出して調製される MS である CSF、KS および HS について、ゲルろ過 HPLC 法を用いて、各 MS 溶液の示差屈折 (refractive index, RI) と紫外吸収 (ultra violet, UV) 測定を行い、その分子量分布の確認、また、RI と UV のクロマトグラム形状の比較を行った。また、それらの亜硝酸分解処理に対する反応性、すなわち分解処理前後での分子量分布の変化を確認した。

第 3 章では、高純度 HP の工業的製造法を確立する目的で、試験用および商業用 HP 原薬の EtOH 分画処理による高純度化について検討した。また、EtOH 分画により得られた各画分について、亜硝酸分解処理/ゲルろ過 HPLC および ^1H -NMR 分析を行って、それらの純度を確認した。

第 4 章では、高純度 LMWH の工業的製造法を確立する目的で、汚染モデル LMWH として高分子 DS および高分子 OSCS を添加した試験用 DN および商業用 DN 原薬の EtOH 分画処理による高純度化について検討した。また、得られ

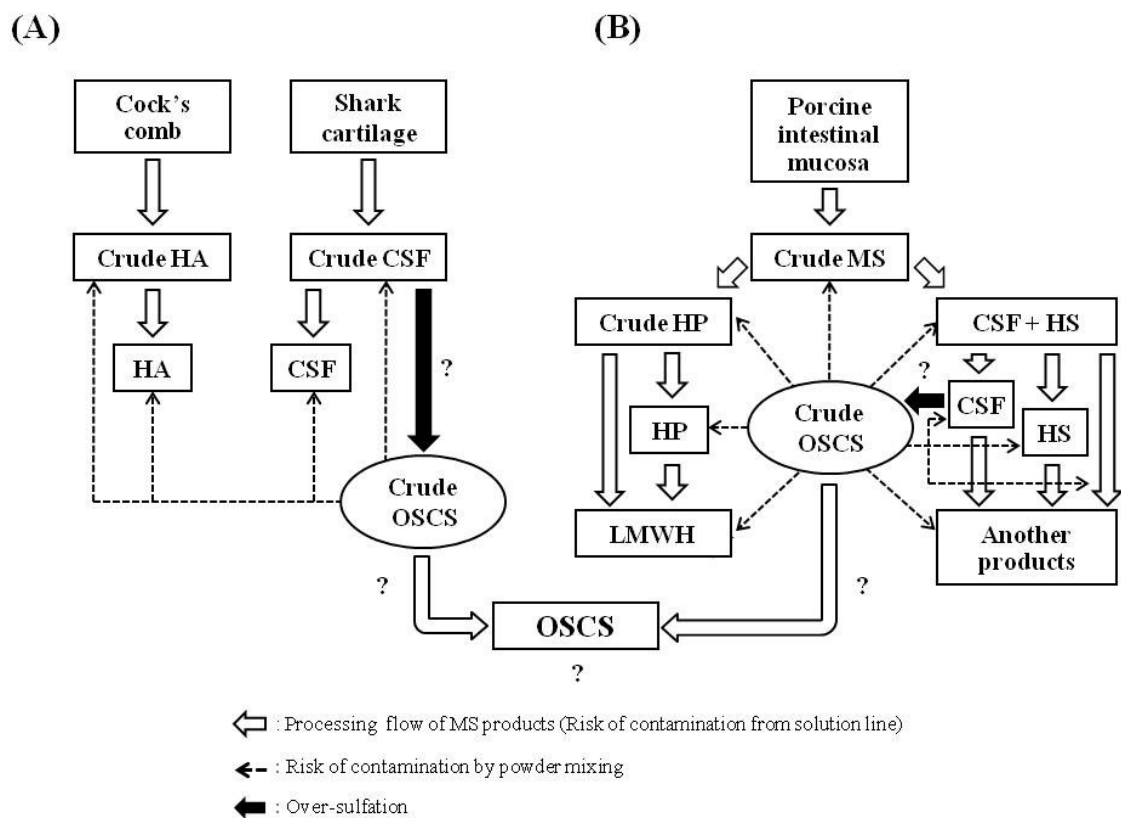


Figure 1. Processing flow of MS products and OSCS contamination pathway to MS products.
 (A), Products from specific raw-material. ; (B), Products from porcine intestinal mucosa.

た各画分を亜硝酸分解処理/ゲルろ過 HPLC および ^1H -NMR 分析により、LMWH の確認/純度試験を実施した。

第 2 章 各ムコ多糖の分子量分布および亜硝酸分解に対する 反応性の確認

緒言

MS は、基本的に生物由来の多糖類であり、その多くは各生物の体液、または器官/組織中に存在する。製造される MS により、その工業的生産に用いられる粗原料は異なり、哺乳類である牛、豚、羊や家鶏等の家畜および鮫、イカ等の水産物、そして甲殻類、微生物由来のものまで多岐に亘っている。それらの粗原料から抽出/製造された MS の用途も、また様々で、健康食品用のサプリメント、化粧品の添加剤、研究試薬、そして医薬品等で広範囲に利用されている。研究目的で、個別あるいはその対照として数種類の MS を混合したものを検体として、糖鎖構造あるいは構成糖の確認を、NMR、COSY 等を用いて分析を行った報告例は多い。しかしながら、各 MS 製造工程時の品質管理、すなわち、製造する MS 製品における他の MS の残留の度合いを確認する目的での分析方法に関する報告はほとんどされていない。各 MS 最終製品の純度を上述の試験で確認することは可能であるが、製造工程毎にこれらの試験を実施することは極めて煩雑であり、また各製品の高コスト化に繋がる懸念がある。しかし Figure 1 に示したとおり、多くの MS は同一工場で処理、また精製されている場合が多く、目的とする MS 製品への他の MS の混入に対するリスク管理は必須であり、これはすべての MS 原料製造メーカー、また、MS 原料を用いた最終製品を製造/販売するメーカーにとって重要であると考えられる。

MS の酸性条件下での亜硝酸処理に対する挙動について、特に、HP は分解されて低分子化し、CSF は分解されないことが知られている。そこで、上述の分析方法よりも、簡便かつ効果的な製造工程時の純度確認として、1) 各 MS の酸

性条件下での亜硝酸処理、そして、2) ゲルろ過 HPLC 法によるそれらの分子量分布推移の分析を組み合わせることにより、各 MS 間に残留する他の MS あるいは不純物を確認する方法が構築できるのではと考えられた。

そこで本研究では、HP 群 (HP 粗原料である CHP および HP) とその低分子化 MS である LMWH 群 (DN, PN および RN)、さらに、健康食品、化粧品、試薬および医薬品原料として使用される、主に哺乳動物と水産動物に由来する 7 種類の MS 高純度品 (CSF, KS および HS)、そして、異なる MS からなる 2 種類の MS 混合品 (MS-I および MS-II) について、ゲルろ過 HPLC 法を用いて、それらの分子量分布を確認した。また、LMWH 群を除く各 MS について、ゲルろ過 HPLC 法を用いて、それぞれの亜硝酸分解に対する反応性の確認を行った。

実験材料と方法

1. 供試材料

HP 群の CHP-T (豚腸粘膜由来、主な夾雑 MS として、CS-B (DS) を約 17.8% 前後含有) および HP-T (豚腸粘膜由来、高純度精製品) は扶桑薬品工業株式会社より供与されたものを使用した。また、LMWH 群である DN、PN および RN は試験用 LMWH 原薬 (いずれも豚腸粘膜由来) を使用した。CSF の A、B、C、D および E 型 (CS-A, CS-B (DS), CS-C, CS-D, CS-E) の 5 種類 (それぞれ、クジラ軟骨、豚皮、鯨軟骨、鯨軟骨、イカ軟骨由来)、KS (牛角膜由来) および HS (牛腎臓由来) は、生化学工業 (株) から購入した (生物由来、試薬特級品)。また、MS 参照物質 I (MS-I) は、豚小腸粘膜由来の低分子 MS を、HS : CS-B (DS) : CS-C = 約 8:1.5:0.5 (重量比) となるように調製し、MS 参照物質 II (MS-II) は牛気管軟骨由来の MS 混合物 (CS-A : CS-C = 約 7:3) を用いた。その他の試薬は試薬特級品、あるいはそれ以上のもの (和光純薬工業 (株) 製) を用いた。

2. ムコ多糖の亜硝酸分解処理

あらかじめ注射用水に溶かした各検体溶液に、検体と NaNO_2 の重量比が 1 : 0.06 となるように NaNO_2 を加えて攪拌した後、4mol/L HCl で pH を約 1.5 に調整した。30 分間攪拌した後、2mol/L NaOH で pH を 5.0 に調整し、ゲルろ過 HPLC の試料とした。これらの処理はすべて氷冷下で行った。

3. ゲルろ過 HPLC による分子量分布の確認

HPLC 法による各試験物質の分子量分布の確認は、第 15 改正日本薬局方 (厚

生労働省 2006) に記載されている方法のカラム本数、試料を秤量する量および試料導入量等を一部改変した方法で行った。各分析試料は、移動相に溶解した各検体の終濃度が 1% (w/v) になるように調製し、島津製作所 (株) 製の分析機器を使用して RI および UV シグナルを測定した。使用した機器および分析条件は以下の通りである。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, 234nm) および示差屈折計 (RID-10A) ; カラムおよびガードカラム, TSKgel G-2000SWXL (5 μ m, 7.8mm I.D.×300mm, TOSO 製 (株)) , TSKgel guardcolumn SWXL (5 μ m, 6.0mm I.D.×40mm, TOSO 製 (株)) ; カラム温度, 40℃ ; 移動相, 0.2mol/L Na₂SO₄ (pH5.0) ; 流速, 0.5mL/min ; 試料導入量, 25 μ L。

結果と考察

はじめに、各検体の RI と UV 測定による HPLC クロマトグラムのピーク形状を比較した。分析結果について、HP 群および LMWH 群を Figure 2 に、CSF を Figure 3 に、そして HS、KS、MS-I および MS-II を Figure 4 にそれぞれ示した。

HP 群および LMWH 群の RI クロマトグラムの結果 (Figure 2)、すべての試料で 24.0 分付近に塩類に由来するピークが検出された。また、HP 群の CHP-T および HP-T では保持時間 10.0～23.0 分に MS 糖鎖に由来する主要ピークが検出された。しかし HP-T では 15.1 分付近にピーク頂点をもつピークのみが確認されたのに対して、CHP-T では、10.8 分付近にピーク頂点をもつ小ピークが 1 つ、主要ピークとして、13.0 分付近および 14.7 分付近にピーク頂点をもつ 2 ピークが重なり合って確認された。高純度に精製された HP-T のピーク頂点が 15.0 分付近であることから、10.8 分および 13.0 分付近にピーク頂点を有する物質は HP-T より高分子の MS 由来の物質であり、特に、その RI 面積値から、CHP-T 中に約 17.8%存在する CS-B (DS) および他の夾雑 MS に由来するものであると推測した。

各 LMWH のピーク頂点については、DN は 19.5 分付近、PN は 20.4 分付近、そして RN は 20.7 分付近であった。その分子量分布はいずれも異なっており、各保持時間から DN、PN、RN の順に低分子領域に移行していることが確認された。これは各 LMWH の出発物質、あるいは製造方法の違いによるものと考えられた。また、DN では 12.7 分付近にピーク頂点を有する小ピークを確認した。また、DN と RN では鋭い形状のピークが 10 前後確認されたが、PN では比較的ブロードなピーク形状であった。これは DN と RN が亜硝酸分解法によって

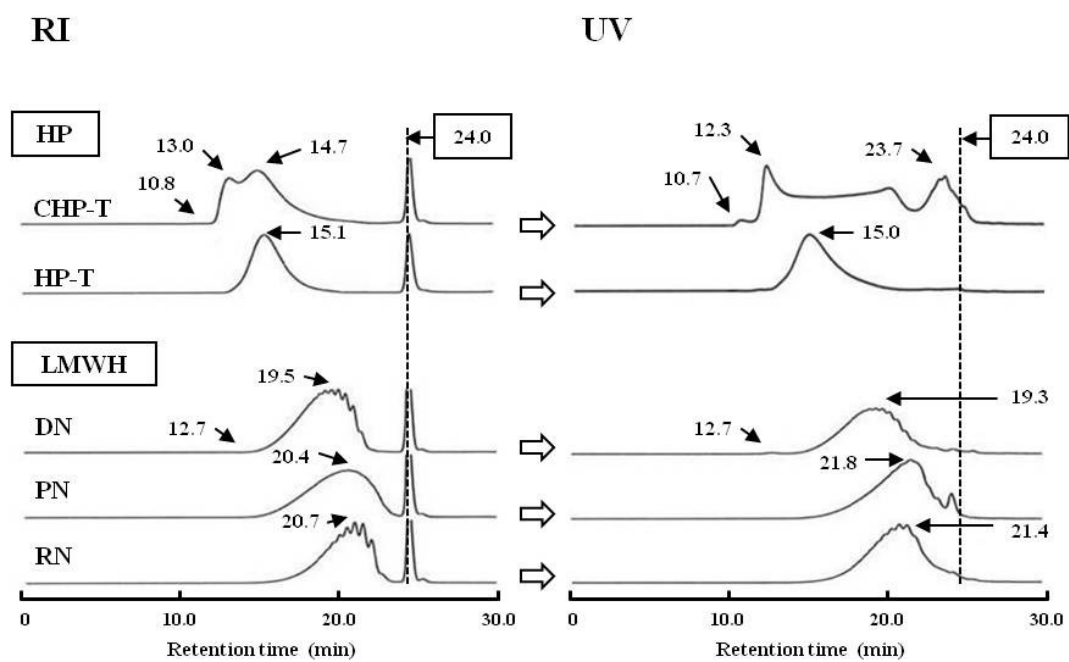


Figure 2. Chromatograms of HP and LMWH analyzed on HPLC equipped with RI and UV detectors.

低分子化されて二糖単位の糖鎖が段階的に蓄積したこと、一方、PN が過酸化水素等を用いた分解法によって比較的ランダムに分解/低分子化された糖鎖が蓄積したことに起因すると推測した。

UV クロマトグラムでは、CHP-T では 10.7 分付近にピーク頂点をもつ小ピーク、主要なピークとして 12.3 分付近にピーク頂点をもつブロードなピーク、そして 23.7 分付近に比較的高いピーク頂点をもつピークが、それぞれ 1 つずつ確認された (Figure 2)。RI と UV クロマトグラムを全体的に比較した場合、RI と UV のピーク面積値およびピーク高さに相関性はないと考えられた。検出法の違いによるこのピーク形状の差異については、CHP-T の原料である豚腸粘膜に由来するプロテオグリカンにより UV の吸収が増加しているものと考えられた。特に、保持時間 15.0～24.0 分付近のピークについては、本来 MS の重量を反映する RI の面積値およびピーク形状と全く相関性が確認できないことから、「HP に結合、あるいは単体で夾雑していた粗原料由来の低分子のペプチドグリカン断片」、あるいはペプチド、核酸、その他の成分により、UV の吸収が増加したと考えられた。

HP-T について、保持時間 10.0～20.0 分に MS 糖鎖に由来する主要ピークが検出され、そのピーク頂点は 15.0 分付近であり、RI の場合とかなり近いピーク形状を得た。これは HP-T 中に共雑物が極めて少ないこと、またその精製工程において糖鎖の酸化還元処理等が均等に行われているためと考えられた。

各 LMWH の UV クロマトグラムにおける主なピーク頂点は、DN は 19.3 分付近、PN は 21.8 分付近、そして RN は 21.4 分付近に確認された。これらは RI クロマトグラムでの各 LMWH のピーク頂点に比較的近い位置であったことから、製造過程において均等に各分子量域の酸化還元処理等が行われたものと

考えられた。しかし、DN については RI で確認されたように、12.7 分付近にピークが確認されたことから、MS に由来する物質が存在すると考えられた。この夾雑物質は、DN の原料である HP に由来する高分子のペプチドグリカン、低分子化されなかった HP、あるいは CSF 等の HP 以外の MS であると推測された。また、いずれの LMWH においても RI と UV のピーク面積値およびピーク高さの相関性が低いこと、また、RI で MS 糖鎖が確認されない保持時間においても UV 吸収を有するピークが確認されることから、CHP-T と同様に MS 糖鎖およびその糖鎖骨格に由来しない物質も検出されることが考えられた。すなわち、比較的純度の低い MS について、MS 糖鎖以外の共雑物を検出する場合には、物質質量（数）を示す UV は有効であるが、HP 群あるいは LMWH 群のような精製された MS について他の MS 共雑物を確認しようとする場合、UV 検出法で得られるピーク面積値は必ずしも夾雑する MS 糖鎖本体の質量を反映するものではないと考えられ、UV での MS 糖鎖本体の確認は困難であると考えられた。

CSF の RI クロマトグラムについては、すべての試料で 24.0 分付近に塩類に由来するピークが検出された（Figure 3）。CS-A、CS-B（DS）、CS-C、CS-D および CS-E のいずれも保持時間 10.0～15.0 分に MS 糖鎖に由来する主要ピークが検出され、それぞれの主なピーク頂点は、それぞれ 13.1、13.5、12.4、12.4 および 12.1 分付近であり、ピーク形状も比較的均質であった。しかし、CS-B（DS）および CS-E については、主ピークとは別に、CS-B（DS）は 11.5 分、CS-E は 11.0 分付近に僅かなピークが確認された。また、UV クロマトグラム（Figure 3）では、CS-A、CS-B（DS）、CS-C、CS-D および CS-E のいずれも保持時間 10.0～15.0 分に MS 糖鎖に由来すると思われる主要ピークが検出され、それぞれの主なピーク頂点は、それぞれ 13.1、13.7、12.4、12.5 および 12.1

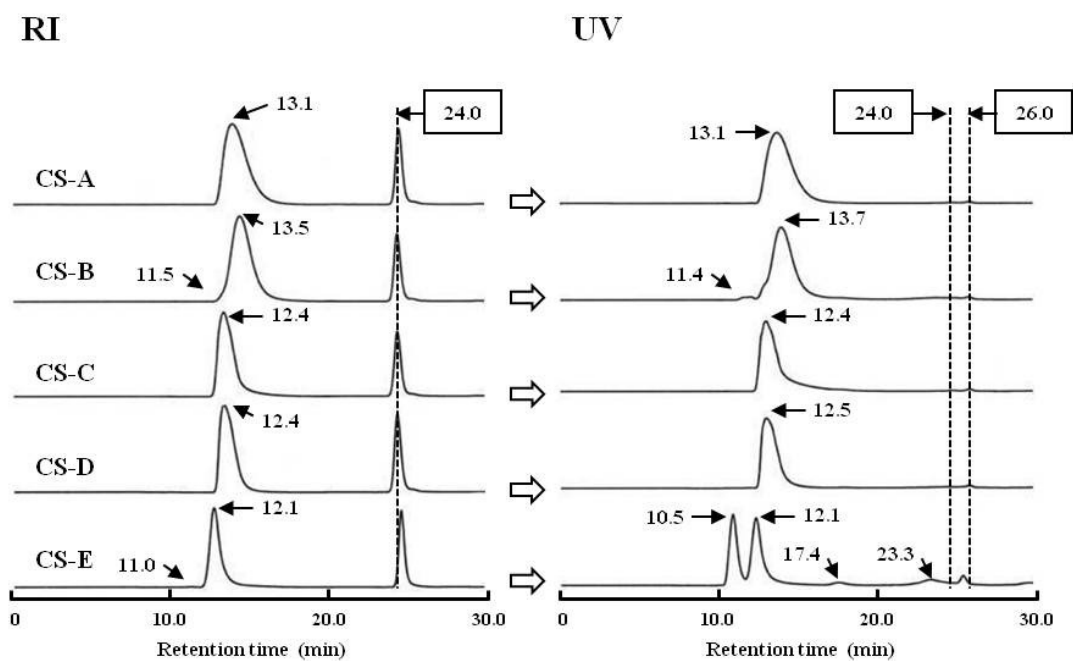


Figure 3. Chromatograms of CSF analyzed on HPLC equipped with RI and UV detectors.

分付近であった。しかし CS-B (DS) については 11.4 分に僅かなピークを、CS-E については 10.5 分付近に主要ピークとほぼ同様のピーク面積値およびピーク高さをもつピークが確認され、さらに 15.0 分以降にもブロードな 2 ピーク (17.4 分および 23.3 分付近) が確認された。CS-B (DS) および CS-E それぞれの、保持時間 11.4 分および 10.5 分付近のピークについては、いずれも RI クロマトグラムで確認された保持時間 11.5 分および 11.0 分付近のピークに相当するものであると考えられ、これらは高分子の MS 由来の物質であり、CS-B (DS) については豚皮、CS-E についてはイカ軟骨のプロテオグリカンの残留に起因するものと考えられた。したがって、CSF においても、CSF 中の他の MS の確認という目的において、UV で得られる値は必ずしも MS 糖鎖本体の質量を反映するものではないと考えられ、UV での MS 糖鎖本体の確認は困難であると判断した。

KS、HS、MS-I および MS-II の RI クロマトグラムについても、すべての試料で 24.0 分付近に塩類に由来するピークが確認された (Figure 4, RI)。KS、HS、MS-I および MS-II のいずれも保持時間 10.0~23.0 分に MS 糖鎖に由来する主要ピークが検出され、主なピーク頂点は、それぞれ 13.8、13.0、21.7 および 13.5 分付近であった。そして MS-II については、主要ピークとは別に、22.8 分付近にピーク頂点を有するブロードなピークが確認された。UV クロマトグラム (Figure 4, UV) については、各主要ピーク以外に、KS では主要ピークと重なるブロードなピークを、HS では 22.4 分付近にピーク頂点をもつ鋭いピークを、MS-I では 23.8 分付近にピーク頂点をもつ、主要ピークと重なるブロードなピークを、そして MS-II については 22.4 分付近に主要ピークとほぼ同様のピーク面積値およびピーク高さをもつピークが重なって確認された。これら MS の場合、HP 群や LMWH 群の場合とは異なり、主要ピークより前の保持時間で

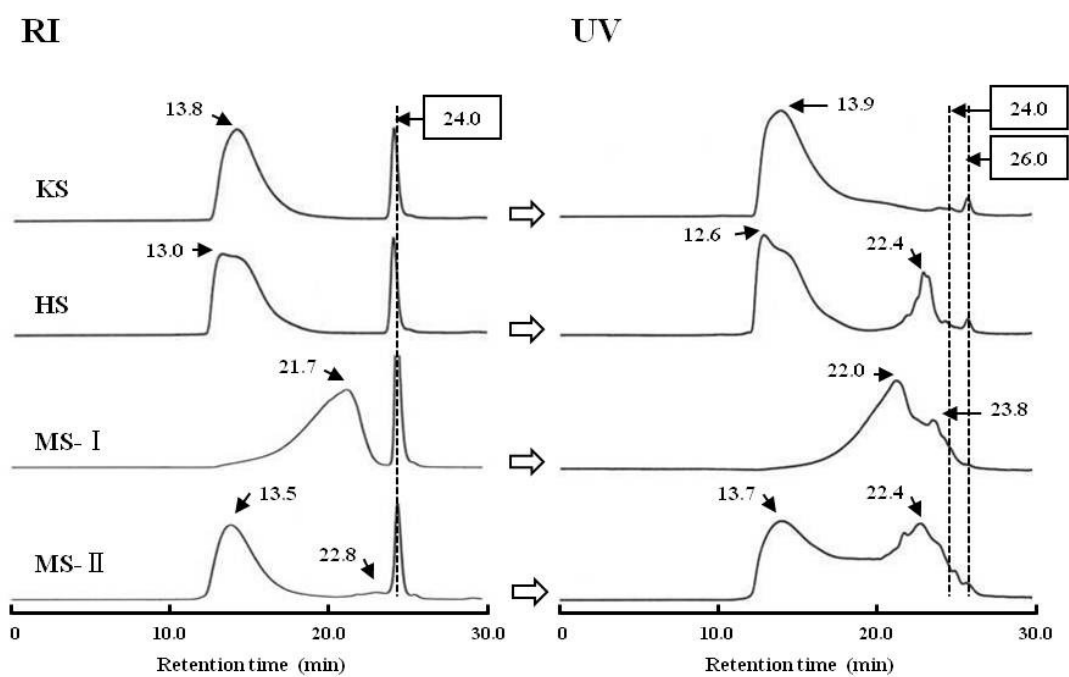


Figure 4. Chromatograms of HS, KS and MS analyzed on HPLC equipped with RI and UV detectors.

顕著な UV 吸収をもつ物質が確認されなかったことから、高分子プロテオグリカンの夾雑は少ないが、低分子のペプチドグリカン断片、あるいはペプチド、核酸、その他の成分が各 MS に結合、あるいは単体で夾雑していたことにより、低分子領域の UV の吸収が増加したと推測された。したがって、KS、HS、MS-I および MS-II においても、試料中に夾雑する MS の確認という目的において、UV で得られる値は必ずしも MS 糖鎖本体の質量を反映するものではないと考えられ、UV での MS 糖鎖本体の確認は困難であると考えられた。また、CSF、KS および HS の UV クロマトグラムにおいて、保持時間 26.0 分付近に小さなピークを確認したが、これらは各 MS 調製時に用いた有機溶媒に由来するものと推測された。

次に、LMWH 群を除く各検体の亜硝酸分解処理を行った後、HPLC 分析を行った。分解処理後は、さらに、UV での MS 確認が困難になると予想されることから、RI クロマトグラムのピーク形状を分解処理前後で比較した。分析結果について、HP 群を Figure 5 に、CSF、KS および HS を Figure 6 に、そして MS-I と MS-II について Figure 7 に示した。CHP-T、HP-T のいずれも分解処理前に確認された保持時間 10.0～23.0 分の MS 糖鎖に由来する主要ピークが減少した (Figure 5)。すなわち、CHP-T の主要 2 ピークであった 13.0 分付近および 14.7 分付近にピーク頂点をもつ重なり合った 2 ピークのうち、14.7 分付近のピークはほぼ消失した。また、13.0 分付近のピークは分解されず、そのピーク頂点が分解処理後に 13.1 分付近にシフトしたものと考えられた。また、分解処理前に確認された 10.8 分付近のピークも分解処理後に 10.9 分付近に確認された。これら未分解のピークは、CHP-T 中に約 17.8% 存在する CS-B (DS) および他の夾雑 MS に由来するものであると推測された。一方、HP-T について

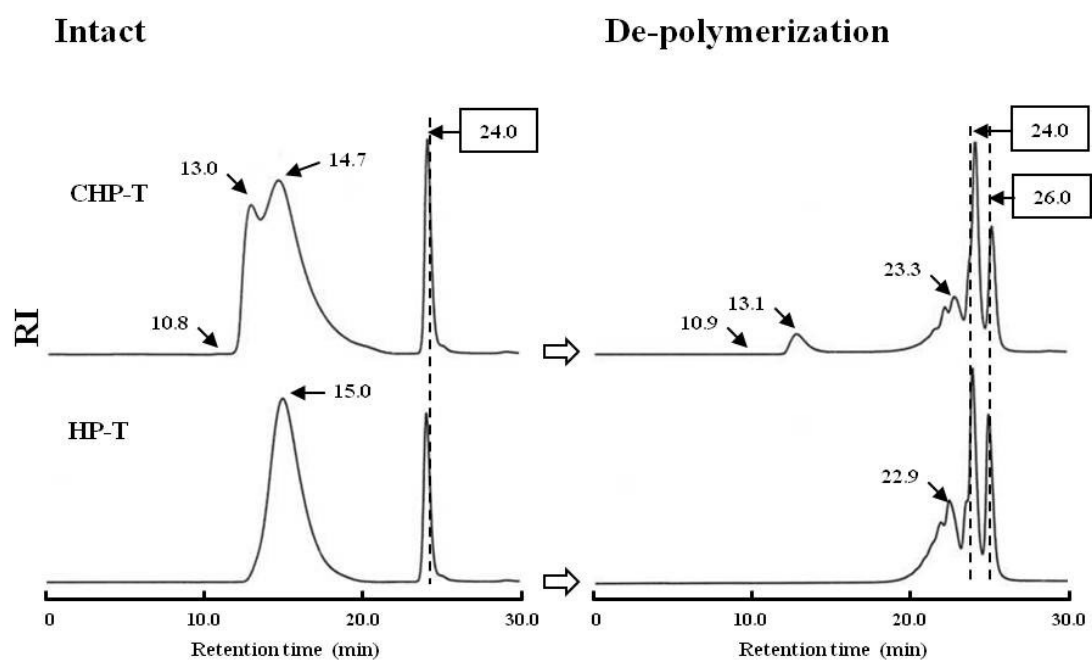


Figure 5. Molecular weight shift of HP preparations de-polymerized with nitrous acid.

は CHP-T と異なり、13.0 分付近にピークは確認されなかった。また、保持時間 18.0～24.0 分の間に、CHP-T および HP-T で、それぞれ 23.3 分、および 22.9 分付近にそれぞれピーク頂点を有するに二糖単位のピークシフトを伴う分解により低分子化された HP の蓄積が確認された。このことから、CS-B (DS) の存在によらず、HP は亜硝酸分解処理によって低分子化されと考えられた。また、24.0 分付近に塩類に由来するピーク以外に、26.0 分付近に新たなピークが確認されたが、これは未反応の NaNO_2 等に由来するピークと考えられた。

CSF および KS の RI クロマトグラムの結果 (Figure 6)、いずれの試料でも分解処理前に確認された保持時間 10.0～15.0 分にピーク頂点を有する主要ピークのピーク形状は、ほぼ変動せず、CHP-T および HP-T の場合のように二糖単位のピークシフトは確認されなかった。よって、CSF および KS は亜硝酸分解抵抗性であることが確認された。また、CS-B (DS) および CS-E の主要ピークの前に確認された小ピークについては、保持時間については CS-B (DS) では 11.5 分から 11.2 分付近に、CS-E は 11.0 分付近で変化なく、そのピーク形状にも大きな変動は確認されなかった。分解処理前の UV クロマトグラムの結果を併せて考えると、これらのピーク成分はプロテオグリカンの状態で CS-B (DS) および CS-E 中に残存している、亜硝酸分解抵抗性の MS であると推測された。また HS では、分解処理前のピーク頂点は 13.0 分であったが、分解処理後のピーク頂点は 19.5 分にシフトし、また、保持時間 12.0～24.0 分に二糖単位のピークシフトを伴う分解により低分子化された HS の蓄積が確認された (Figure 6)。このことから、HP と同様に、HS は亜硝酸分解処理によって低分子化されと考えられた。

また、MS 混合物である MS-I および MS-II について、MS-I の RI クロマト

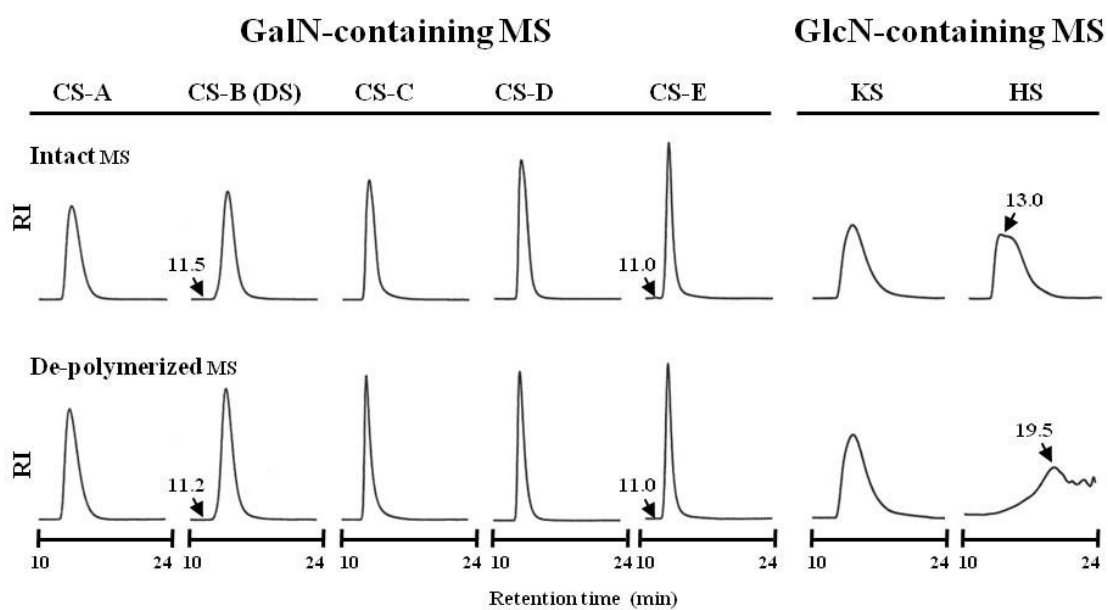


Figure 6. Molecular weight shift of CSF, KS and HS de-polymerized with nitrous acid.
Upper charts show molecular distribution of intact MS and lower ones show that of de-polymerized MS.

グラムの結果、HP 同様、塩類および未反応の NaNO_2 等に由来するピークが確認された (Figure 7)。また、分解処理前に確認された保持時間 21.7 分付近にピーク頂点を有する主要ピークが減少し、保持時間 12.0~24.0 分に、23.6 分付近にピーク頂点を有する二糖単位のピークシフトを伴う分解により低分子化された HS の蓄積が確認された。また、18.5 分付近に、MS-I 調製時に添加した CS-B (DS) および CS-C が未分解の状態で確認された。このことから、HS は他の MS 存在下においても、HS 単体の場合と同様に亜硝酸分解処理によって低分子化されることが考えられた。また、牛気管軟骨由来の CS-A および CS-C 混合物である MS-II の RI クロマトグラムでは、塩および NaNO_2 に由来するピークを除き、ピーク頂点 (13.0 分付近) およびピーク形状に変動が確認されなかった。これらのことから、ムコ多糖の起源である動物種は亜硝酸分解の感受性に大きく影響しないことが示唆された。

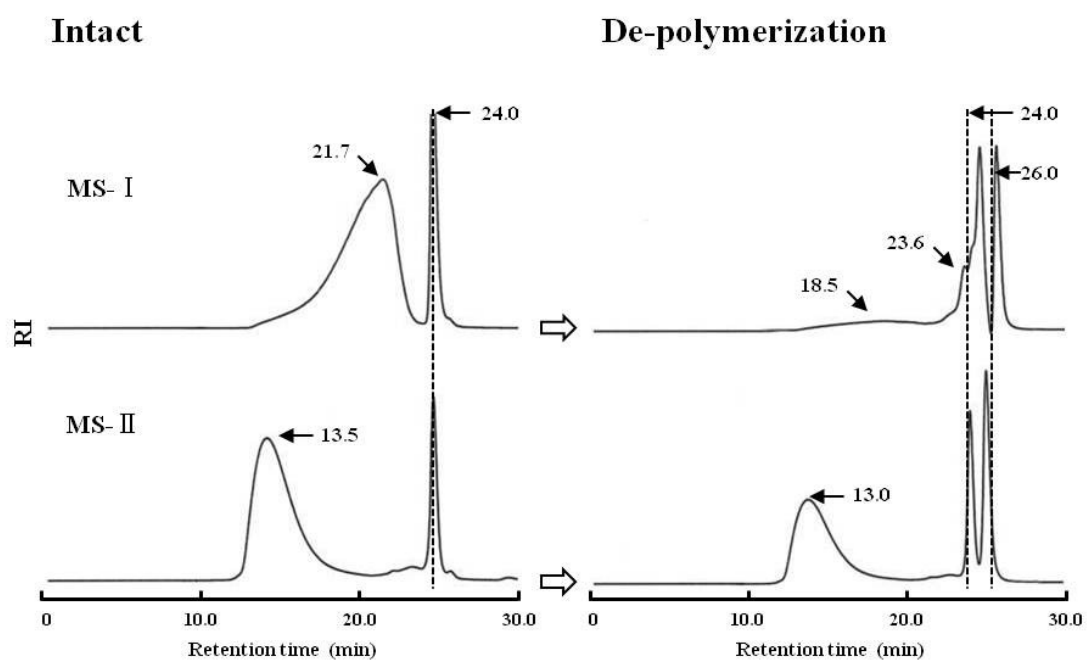


Figure 7. Molecular weight shift of reference substances of MS de-polymerized with nitrous acid.

要約

HP 群 (CHP-T および HP-T) と LMWH 群 (DN, PN および RN)、また、由来の異なる 5 種類の CSF (CS-A, CS-B (DS), CS-C, CS-D, CS-E) と KS および HS、さらに MS 参照物質である MS-I (HS:CS-B : CS-C=約 8:1.5:0.5)、MS-II (CS-A : CS-C=約 7:3) についてゲルろ過 HPLC 法により、その分子量分布を RI および UV 測定により確認した。HP-T を除くすべての検体で、RI と UV クロマトグラム間に明確な相関性は認められなかった。ゲルろ過 HPLC 法において、UV 測定により MS 中のその他の MS 夾雑物を確認する場合、精製が不十分あるいは MS 以外の UV 吸収物質の共存下の場合、UV 測定では MS 糖鎖本体の確認は困難であり、MS 糖鎖本体の重量を効率良く反映する RI 測定による確認が有効であると考えられた。LMWH 群を除く各検体の亜硝酸分解処理を行った後、HPLC 分析を行い、RI クロマトグラムのピーク形状を分解処理前後で比較した。

亜硝酸分解処理により、高純度精製品である HP-T 中の HP はすべて分解された。亜硝酸分解抵抗性 MS は確認されなかった。また、夾雑物質として、CS-B (DS) を約 17.8%含有する CHP-T では、分解処理によって HP のみが分解され、亜硝酸分解抵抗性 MS である CS-B (DS) は分解されず、ピークとして検出可能であった。このことから、HP は、単体あるいは他の MS 存在下においても、亜硝酸分解処理によって低分子化され、二糖単位のピークシフトを伴った低分子化 HP を蓄積することが確認された。CSF のすべての型および KS は亜硝酸分解処理により分解しなかったのに対し、HS では二糖単位のピークシフトを伴う分解と低分子化が確認された。また、MS 混合物である MS-I および MS-II について、MS-I 中に含有される HS は、亜硝酸分解処理により、二糖単位の

ピークシフトを伴う分解と低分子化が確認されたが、他の CS-B (DS) および CS-C は分解されなかった。このことから、HS は他の MS 混在下においても亜硝酸分解により分解され、その反応性は HS 単体の場合と変わらないことが示された。さらに、牛気管軟骨由来の CS-A および CS-C 混合物の MS-II については、ピーク形状は変動せず、亜硝酸分解抵抗性が確認された。これらのことから、ムコ多糖の起源である動物種は亜硝酸分解の感受性に大きく影響しないことが示唆された。

以上のことから、HP 中の MS 不純物、例えば CSF あるいは KS 等を確認する場合、亜硝酸分解処理した検体について、ゲルろ過 HPLC 法を用いて RI 測定を行い、分子量分布の推移、すなわち亜硝酸分解抵抗性 MS の有無を確認することが有効であると考えられた。

第 3 章 エタノール分画処理によるヘパリンの精製、および 亜硝酸分解とゲルろ過 HPLC を組み合わせた純度確 認試験の検討

緒言

第 2 章での検討において、CHP 中の HP と HP 単体、また、HS/CSF 混合物と HS 単体は亜硝酸分解処理によって二糖単位で分解され、それと相反して CSF、また KS は亜硝酸分解に対して高い抵抗性を示すことが確認された。また、精製前の CHP でも確認されたように、ゲルろ過 HPLC 法により、亜硝酸分解抵抗性 MS を簡便に検出できることも確認された。

2008 年に報告された OSCS 混入 HP による有害事象の発生以降、医薬品として使用される HP 製剤の原料となる HP 原薬中の不純物に関する規定は厳格化され、その他の MS の残存量の確認を $^1\text{H-NMR}$ 法、イオン交換および逆相クロマトグラフィー法等によって行い、各基準値をクリアすることが義務づけられた。

これまで、HP 中不純物の分析方法に関しては数多く報告されているが、実際の製造工程における HP の純度を向上させるための検討について、ほとんど報告されていない。その理由として、基本的に HP 製品の製造方法は製造メーカー間で異なっており、その製造方法は各メーカーの秘匿事項となっている場合が多い。したがって、共通の製造方法として基準化することが困難であり、各製造メーカーが個別で対応しなければならないことが挙げられる。また、前述の各試験は、あくまで最終的な HP 原薬での試験設定であり、HP の製造工程毎、すなわち粗原料から各中間体の各段階で検査する場合には極めて煩雑であり、

また、工程管理上のコスト上昇にも繋がる。したがって、何らかの理由で HP 製造工程時に不純物が混入した場合でも、最終製品へのキャリーオーバーが低減できる HP の調製方法、また各製造工程において簡便に不純物の確認ができる試験方法の確立が必要であると考えられる。

そこで本章では、HP 中の不純物を効率良く除去する方法として、エタノール（以下 EtOH）分画処理による精製について検討した。さらに、その簡便な評価方法として、第 2 章で確認した各 MS の亜硝酸分解に対する反応性の違いを利用した方法、すなわちと亜硝酸分解とゲルろ過 HPLC を組み合わせた方法の応用の可否についても検討した。

実験材料と方法

1. 供試材料

OSCS 標準品 (OSCS-STD) は (財) 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンスより購入した。OSCS と CSF の混合物である粗 OSCS (CSMS-CE1 および CSMS-CE2) は、日本バルク (株) から供与された試験用 OSCS 含有 UFH Na 塩を酸加水分解後に (EtOH) で再結晶化し、HP および HS を除去したものを使用した。また、HP、HS、CS-B (DS) および約 12.5 % の OSCS を含有する試験用 UFH Na 塩 (OSHP-SH) は、CBC (株) より供与されたものを使用した。また、高分子 CS-B (DS) 標準品 (CS-B (DS) -STD) は、自家調製した豚小腸粘膜由来の MS 混合物を精製したものを用いた。分画試験で用いた各 UFH については、500g スケールでの処理に供した試験用 UFH Na 塩 (UFN-SP; 主成分として HP を、また他の MS として HS、CS-B (DS) および CS-C を含有) は CBC (株) からの供与品を用いた。また、1g スケールでの処理に供した Na 塩 5 検体 (UFN1, UFN2, UFN3, UFN4, UFN5) および Ca 塩 1 検体 (UFC) は市販 HP 製剤に使用されている商業用 HP 原薬を用いた。なお、これらの商業用 HP 原薬はすべて ^1H -HMR 法による純度確認試験において OSCS が未検出であった。注射用水および生理食塩水は日本薬局方適合品を、また、EtOH を含むその他の試薬は試薬特級品、あるいはそれ以上のもの (和光純薬工業 (株) 製) を用いた。

2. ムコ多糖の亜硝酸分解処理

あらかじめ注射用水に溶かした各検体溶液に、検体と NaNO_2 の重量比が 1 : 0.06 となるように NaNO_2 を加えて攪拌した後、4mol/L HCl で pH を約 1.5 に

調整した。30 分間攪拌した後、2mol/L NaOH で pH を 5.0 に調整し、ゲルろ過 HPLC の試料とした。これらの処理はすべて氷冷下で行った。

3. ゲルろ過 HPLC による分子量分布の確認

HPLC 法による各試験物質の分子量分布の確認は、第 15 改正日本薬局方（厚生労働省 2006）に記載されている方法のカラム本数、試料を秤量する量および試料導入量等を一部改変した方法で行った。各分析試料は、移動相に溶解した各検体の終濃度が 1%（w/v）になるように調製し、島津製作所（株）製の分析機器を使用して RI および UV シグナルを測定した。使用した機器および分析条件は以下の通りである。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, 234nm）および示差屈折計（RID-10A）；カラムおよびガードカラム, TSKgel G-2000SWXL（5 μ m, 7.8mm I.D.×300mm, TOSO 製（株））, TSKgel guardcolumn SWXL（5 μ m, 6.0mm I.D.×40mm, TOSO 製（株））；カラム温度, 40℃；移動相, 0.2mol/L Na₂SO₄（pH5.0）；流速, 0.5mL/min；試料導入量, 25 μ L。

4. ¹H-NMR 法によるムコ多糖の確認

¹H-NMR法による各試験物質の確認は、厚生労働省告知第417号（厚生労働省 2008）に記載されている方法の、試料濃度等を一部改変して次の条件で行った。分析試料は、各検体（25mg）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）0.50mL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のシグナルを測定した。使用した機器および分析条件は以下のとおりである。NMR 本体

(VNMRS-500PS)，分析ソフトウェア (VnmrJ2.2C)；温度，25℃；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 ± 6.0 ppm；パルス角，90°；繰り返しパルス待ち時間，20秒；ダミーキャン，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)。

5. エタノール分画処理

UFN-SP の EtOH 分画処理は、(八藤後と村田 2002) の方法の変法により行った。UFN-SP 500g を 10L ホーロータンクに量り取り、生理食塩水を加えて 5L とした後、EtOH 2.5Lを加えて激しく攪拌した。白濁したことを確認した後、室温で 24 時間静置して上層 (S1) および下層のコロイド状沈殿物 (P1) の二層に分配した (Figure 8A, B)。回収した S1 を別の 30L ホーロータンクに移し、さらに EtOH 20Lを加え、激しく攪拌した。一方、P1 は別の 30L ホーロータンクに移し、生理食塩水 3Lを加えて攪拌した後、再度、EtOH 20Lを加えて激しく攪拌した。いずれの画分についても 24 時間静置した後、タンク底に沈殿した白色沈殿物をそれぞれブフナーロート上で回収し、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。

UFN1～5 および UFC 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 (Figure 8C)。なお、UFN1～5 および UFC については 1g の出発物質から分画を行い、全工程を 1/500 にスケールダウンして実施した。

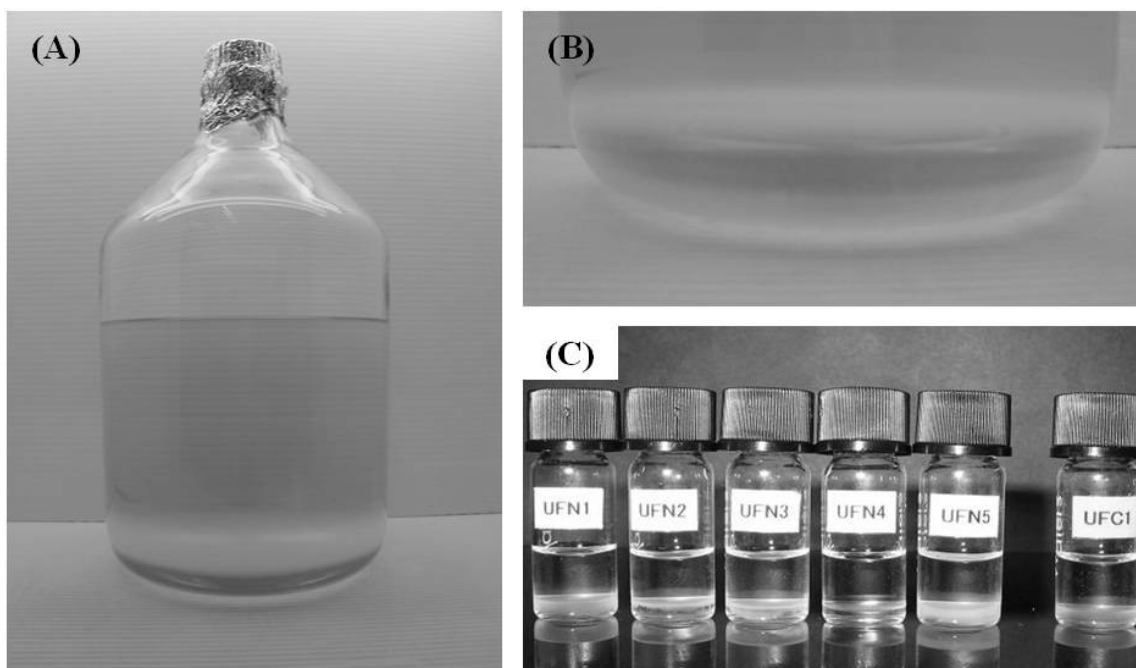


Figure 8. Fractionation of UFH by means of EtOH precipitation.

(A), appearance of UFN-SP after EtOH precipitation ; (B), magnified view of the interface between the supernatant and the precipitate ; (C), appearances of UFN1-5 and UFC after EtOH precipitation.

結果と考察

はじめに、OSCS を含有する各種標準品および参照物質の亜硝酸分解処理前後の HPLC クロマトグラムのピーク形状を比較した。分解処理に対する挙動を確認した結果を Figure 9 に示した。OSCS-STD の亜硝酸分解処理前後のピーク頂点は、それぞれ保持時間 14.5 分付近および 14.6 分付近であった。また、分解前後で、そのピーク形状はほぼ変動していないことから、本分解条件では、OSCS-STD は低分子化せず、亜硝酸分解に対して抵抗性であることが示された (Figure 9, OSCS-STD)。それに対し、約 12.5 %の OSCS を含有する OSHP-SH について (Figure 9, OSHP-SH)、分解処理前は、第 2 章で確認した HP-T と比較した場合、そのピーク形状とピーク頂点の保持時間は、ほぼ同様であった。

分解処理後、保持時間 22.5 分付近にピーク頂点を有する二糖単位のピークシフトを伴う分解された HP の蓄積が確認された。しかしながら、このピークとは別に、保持時間 11.8 分、および 14.8 分付近にピーク頂点を有する 2 ピークを確認した。この未分解のピークのうち、前者は、第 2 章の CHP-T 同様、UFH 中にしばしば残存する CS-B (DS) と推測した。また、後者のピーク形状は OSCS-STD のそれと似ており、未分解物のピークの RI 面積値は分解前の約 12.1%であったことから、OSHP-SH 中に残存する OSCS であると考えられた。それゆえ、OSCS は、CSF や KS と同様に、他の MS 混在下でも亜硝酸分解抵抗性を示し、ある程度定量的に検出可能であると考えられた。この結果は、分解方法の相異なる低分子ヘパリン中 OSCS の残存度について検討した報告 (Zhang ら 2008) と一致した。

また、粗 OSCS について、CSMS-CE1 および CSMS-CE2 のいずれも亜硝酸分解抵抗性であることが確認されたが、HPLC における未分解物のピークは

CS-B (DS) -STD に近い分子量をもち、分子量分布もそれと似ていた (Figure 9, CS-B (DS) -STD)。これらのことから、粗 OSCS 中の未分解物ピークの主成分は、しばしば UFH に多く残存する、豚腸粘膜由来の高分子 CS-B (DS) であると推測された。また、これらの粗 OSCS 中に残存する OSCS は CS-B (DS) と比較して極微量であったため、ピークとして確認できなかったと推測された。

EtOH分画未処理のUFN-SP、処理後に得られた上清 (S1) およびコロイド状沈殿物 (P1)、またS1を再度EtOH分画して得た沈殿物 (P2) をそれぞれ再結晶して得た白色粉末についてのHPLCおよびNMR分析結果をFigure 10に示した。各検体のHPLC分析の結果 (Figure 10, HPLC)、すべての試料で保持時間24.0分付近に塩類に由来するピークが検出された。保持時間10～20分にピーク頂点を有するMS糖鎖由来のピークが検出された。未処理のUFN-SPと比較して、P1画分ではピーク頂点より高分子側でのピークの立ち上がりとテーリングの減少が確認された。一方、S1画分では、保持時間13.5分および16.0分付近に2つのピークが確認された。また、P2画分では、保持時間12.9分付近のピークのみが確認された。UFN-SPのNMR分析の結果 (Figure 10, NMR)、2.04ppmと2.08ppmの2シグナルを確認した。P1画分では2.04ppmの1シグナルのみが確認された。また、S1では2.04ppmと2.08ppmの2シグナルを確認したが、UFN-SPと比較して、2.04ppmのシグナルに対する2.08ppmのシグナル強度が増加した。さらに、P2画分では、2.04ppmのシグナルが大きく減少し、2.08ppmが主要なシグナルとなった。今回のNMR分析条件では、2.04ppm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 (橋井ら 2008a)。このことから、UFN-SPのEtOH分画処理により、HP以外の物質の多くはS1に

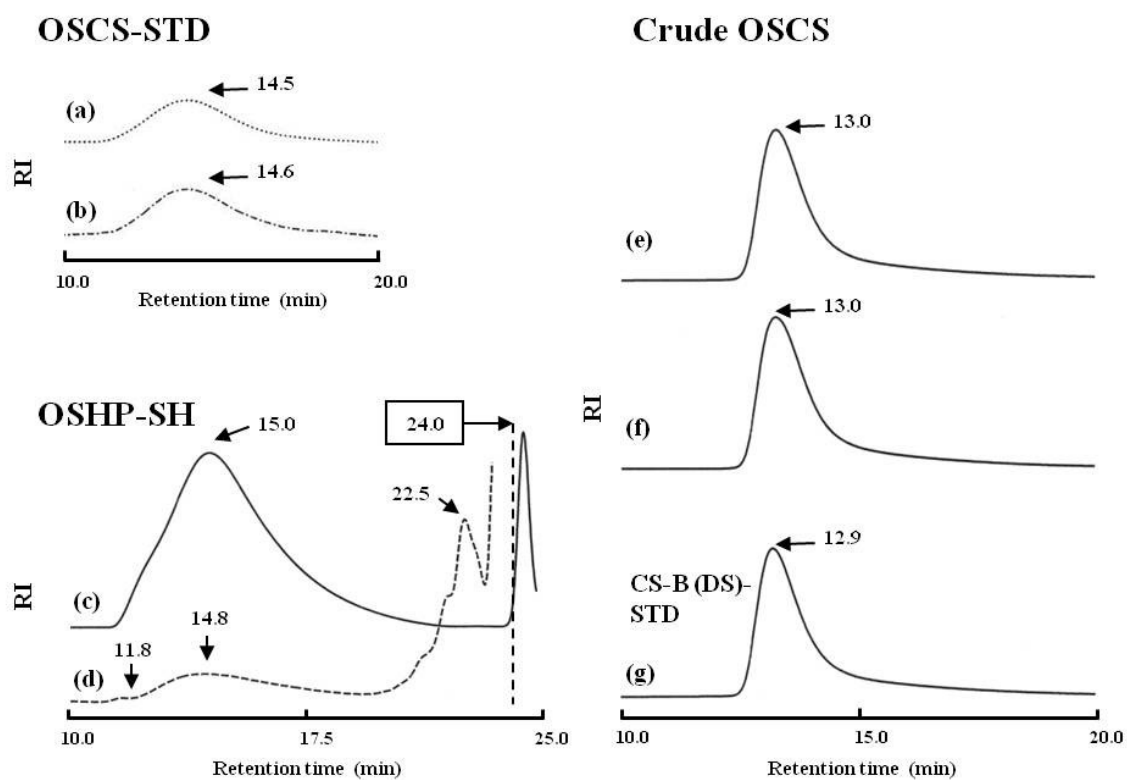


Figure 9. Molecular weight shift of OSCS standard, OSCS-containing UFH and crude OSCS resulting from nitrous acid de-polymerization.

(a), OSCS-STD ; (b), de-polymerized OSCS-STD ; (c), OSHP-SH ; (d), de-polymerized OSHP-SH ; (e), de-polymerized CSMS-CE1 ; (f), de-polymerized CSMS-CE2 ; (g), CS-B (DS) -STD.

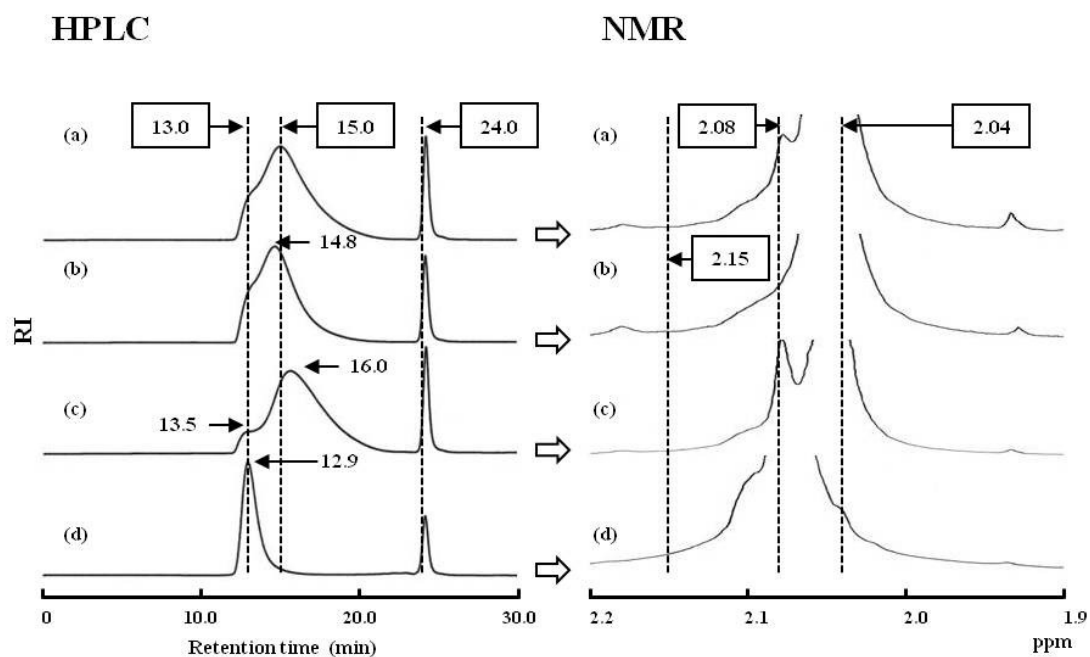


Figure 10. HPLC and NMR analysis of UFN-SP fractionated with EtOH precipitation.
 (a), UFN-SP ; (b), colloidal precipitate (P1) ; (c), supernatant (S1) ; (d), purified supernatant after re-fractionation using EtOH of the supernatant fraction shown in (c).

移行し、P1への残留は僅かであると考えられた。

さらに、EtOH分画未処理のUFN-SP、処理後に得られた上清（S1）およびコロイド状沈殿物（P1）、またS1を再度EtOH分画して得た沈殿物（P2）をそれぞれ再結晶して得た白色粉末をそれぞれ亜硝酸分解処理した検体についてのHPLCおよびNMR分析結果をFigure 11に示した。すべての試料で、保持時間の約13.0分付近に分解抵抗性MSのピークが確認された（Figure 11, HPLC）。しかし、UFN-SPと比較して、P1画分におけるそのピークは些少であったのに対し、S1画分ではピーク面積の増加が確認された。P2画分では、分解抵抗性MSのピークが、より明確に確認された。これら試料のNMRシグナルは2.04ppmおよび2.08ppmが主であり、亜硝酸分解未処理の各画分のデータ（Figure 10）と類似していた。これらの結果から、亜硝酸分解処理の前後で、各MSのNMR分析におけるメインシグナルには大きな変動はないと推測された。また、S1画分に含まれる亜硝酸分解抵抗性MSの、0～6ppmにおけるNMRシグナルは、CS-B（DS）-STDと同様のシグナル形状を示した（データ示さず）。このことから、UFN-SP中の亜硝酸分解抵抗性物質は高分子CS-B（DS）であると推測された。

全MSに占める亜硝酸分解抵抗性MSのピークのRI面積値は、UFN-SPでは分解前の面積値の1.16%であったのに対し、EtOH分画処理後に得られたP1中の分解抵抗性MSピークのRI面積値は、分解前の面積値の約0.09%であった（Table 1）。このことから、EtOH分画処理によりHPの純度が大幅に高まったことが確認された。また、500gのUFN-SPをEtOH分画処理して回収したP1画分を再結晶化/乾燥して得られた白色粉末の重量は418.2g（回収率 83.6%）であったことも含め、今回検討したHPのEtOH分画処理は、実製造においても有効な精製方法であると推測された。

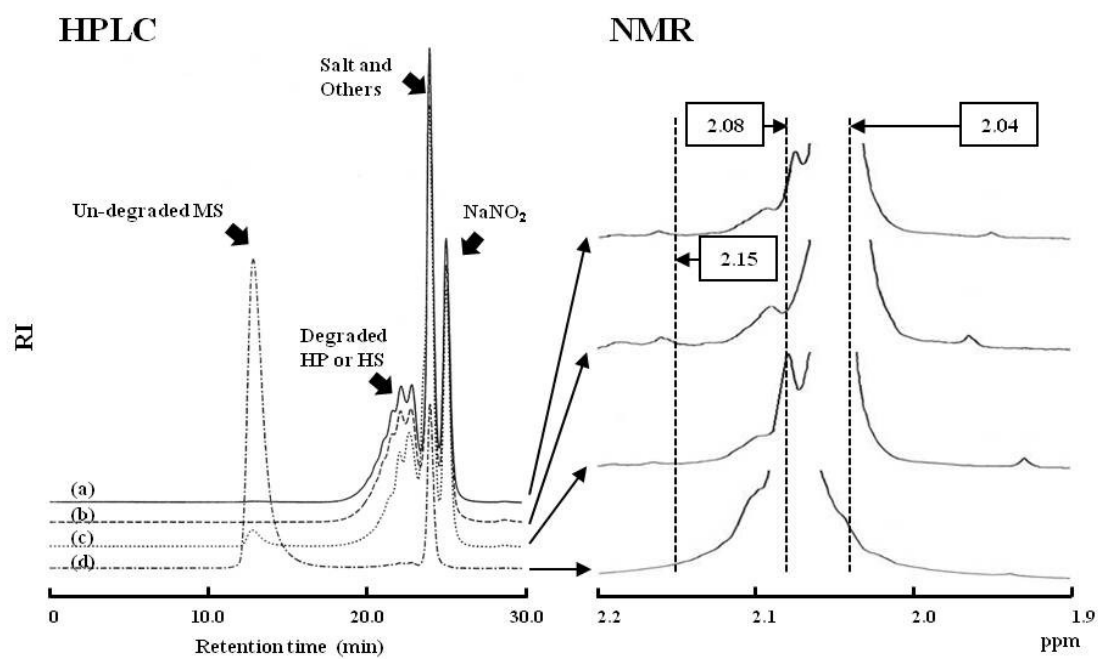


Figure 11. HPLC and NMR analysis of nitrous acid de-polymerized fractions of UFN-SP.
 (a), UFN-SP ; (b), colloidal precipitate (P1) ; (c), supernatant (S1) ; (d), purified supernatant after re-fractionation using EtOH of the supernatant fraction shown in (c).

Table 1. Changes of RI area of MS[†] contained in the UFN-SP 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)	2,942,810 ± 1,624	34,064 ± 711	1.16×10 ⁻²	1.00
Supernatant	3,145,815 ± 1,954	152,882 ± 260	4.86×10 ⁻²	4.20
Colloidal precipitate	3,056,740 ± 1,647	2,831 ± 137	9.26×10 ⁻⁴	8.00×10 ⁻²

Values are means ± SD (n=6).

[†]MS, mucopolysaccharides.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

c, Ratio of un-degraded MS in fractionated UFN-SP to that in the intact material.

UFN1～5 および UFC について、各検体の亜硝酸分解物を比較した HPLC 分析結果を Figure 12 に示した。EtOH 分画処理前の各 UFH を亜硝酸分解すると、いずれの試料でも、亜硝酸分解抵抗性 MS のピークが確認された。上清およびコロイド状沈殿物に含有される MS の分子量分布のパターンは、ともに UFN-SP の場合と良く似ていた（データ示さず）。また、コロイド状沈殿物を亜硝酸分解処理すると、主要なピーク成分は分解した。しかし、保持時間 13.0 分付近の亜硝酸分解抵抗性 MS のピークも、僅かながら確認された。

EtOH 分画処理前後での各検体の NMR 分析結果を Figure 13 に示した。EtOH 分画処理後にすべての検体において、2.08ppm 付近のシグナル強度が減少した。また、UFN4 において、2.09ppm 付近に大きくシグナルが確認されたが、これは製造工程において添加された過マンガン酸カリウムによる影響と推測された。

HPLC クロマトグラムにおけるピーク面積の計算結果から、UFN1～5 および UFC には亜硝酸分解抵抗性の不純物が、およそ 0.01%～0.35% 含有されていることが示された（Table 2）。また、それらピーク成分の RI 面積値は、分画前の原料 UFH の RI 面積値の 10%～30% 程度まで減少していた（Table 3）。

製造方法がそれぞれ異なる 6 原薬すべてにおいて、亜硝酸分解抵抗性物質の含量が低下していたことから、今回検討した EtOH 分画は HP の純度向上に有効であると考えられた。

以上のように、本研究では HP 製造工程において HP 以外の MS 共雑物質を除去する方法として、EtOH 分画処理が有効であることを確認した。この方法で得られた精製 HP は、HP 製剤のみならず、不純物による副反応および最終製品へのコンタミネーションを低減した、付加価値の高い新規 HP 化合物や LMWH の原料となり得ると考えられた。この方法は室温付近での操作でも十分な分離能を

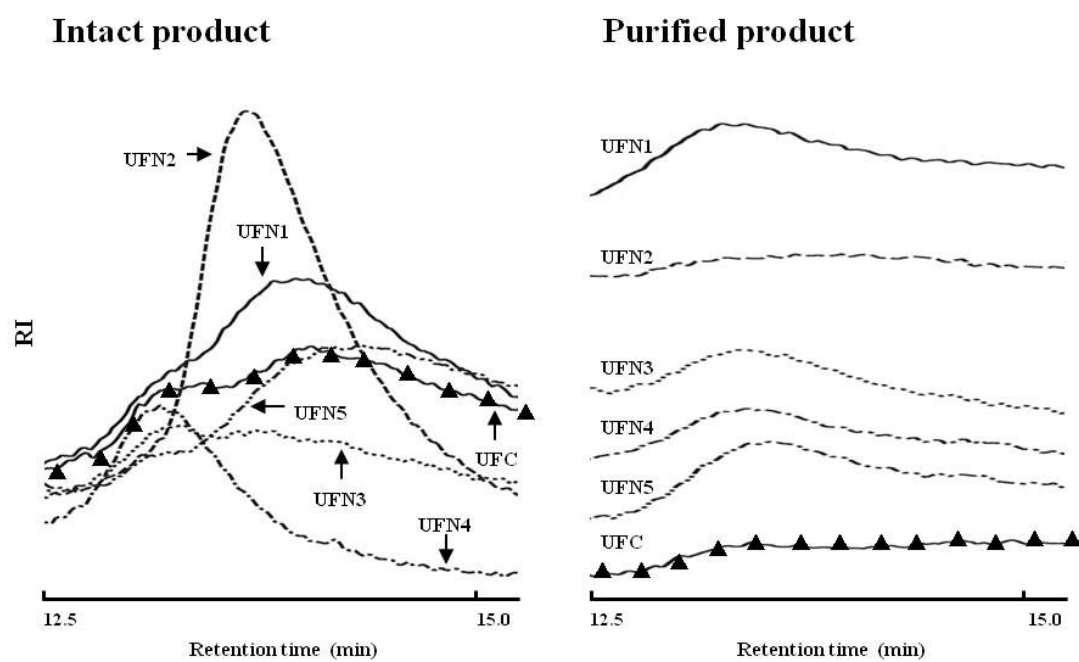


Figure 12. HPLC chromatogram of nitrous acid de-polymerized colloidal precipitate from the sodium and calcium salts of UFH products.

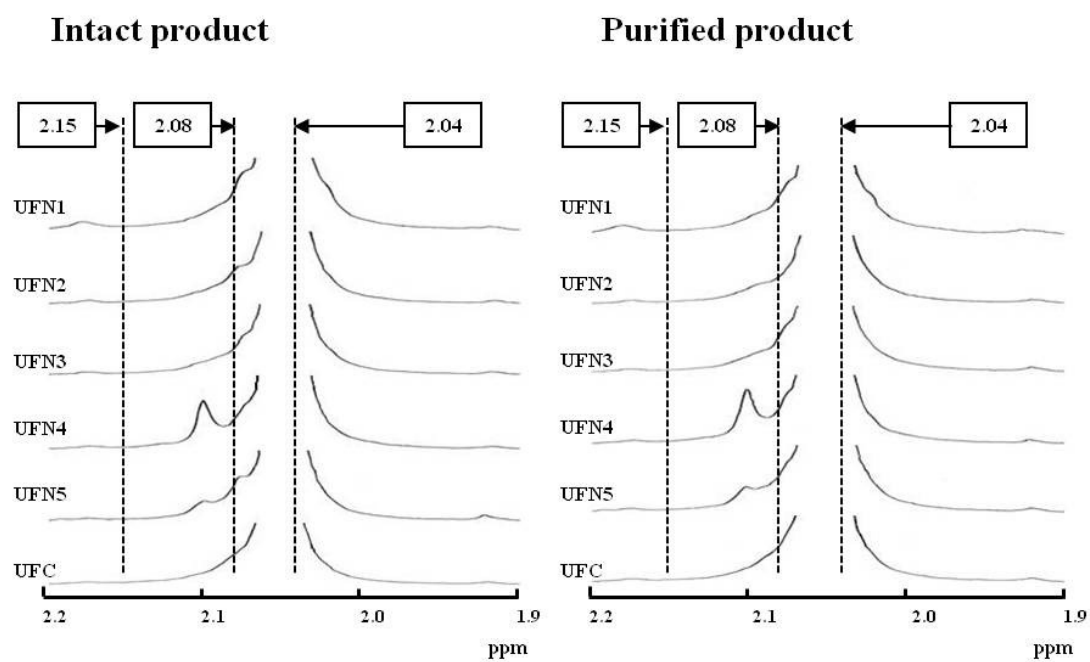


Figure 13. NMR spectrum of sodium and calcium salts of UFH products purified by EtOH precipitation.

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)	
UFN 1	3,139,209 ± 2,372	8,714 ± 228	2.78×10 ⁻³
UFN 2	3,225,737 ± 2,988	11,122 ± 145	3.45×10 ⁻³
UFN 3	3,167,162 ± 3,880	303 ± 48	9.57×10 ⁻⁵
UFN 4	3,191,825 ± 1,933	607 ± 66	1.90×10 ⁻⁴
UFN 5	3,223,922 ± 2,427	2,275 ± 41	7.06×10 ⁻⁴
UFC	3,218,608 ± 1,363	2,528 ± 128	7.85×10 ⁻⁴

Values are means ± SD (n=3).

[†]MS, mucopolysaccharides.

[§] UFN, un-fractionated heparin sodium salt; UFC, un-fractionated heparin calcium salt.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI 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 colloidal precipitate 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)		
UFN 1	3,331,957 ± 3,447	2,723 ± 236	8.17×10^{-4}	2.94×10^{-1}
UFN 2	3,265,393 ± 4,494	1,039 ± 87	3.18×10^{-4}	9.23×10^{-2}
UFN 3	3,248,345 ± 2,006	98 ± 37	3.02×10^{-5}	3.15×10^{-1}
UFN 4	3,341,219 ± 2,229	152 ± 25	4.55×10^{-5}	2.39×10^{-1}
UFN 5	3,437,141 ± 2,585	479 ± 31	1.39×10^{-4}	1.97×10^{-1}
UFC	3,386,020 ± 3,052	486 ± 59	1.44×10^{-4}	1.83×10^{-1}

Values are means ± SD (n=3).

[†]MS, mucopolysaccharides.

[§] Abbreviations are the same as shown in Table 2.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

c, Ratio of un-degraded MS in precipitate to that in each intact material shown in Table 2.

確保できることから、バッチ操作でのHP回収が容易である。したがって、イオン交換あるいはゲルろ過等のカラムクロマトグラフィー操作と比較して、作業効率の向上が見込まれることから、製造コストの低減にも寄与できると推測された。特に、本調製方法を製造工程の最終段階で実施すること、また各製造工程で亜硝酸分解/HPLC法による純度検査を行うことで、高品質なHP原薬を安定的に調製できると予測された。今後、この知見を応用し、様々なHP製品における純度試験を行い、混入MSの除去が可能であることを確認する必要があると考えられた。

要約

未分画ヘパリン（UFH）の純度試験法、および UFH 中のヘパリン（HP）以外のムコ多糖類（MS）夾雑物の工業的除去方法について検討した。まず、エタノール（EtOH）分画による UFN-SP からの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、HP の純度に EtOH 分画処理が及ぼす影響を検討した。過硫酸コンドロイチン硫酸（OSCS）、HP 以外の MS、およびそれらの混合不純物を含有する UFH Na 塩（OSHP-SH）、HP 含量を低減した粗 OSCS（CSMS-CE1 および CSMS-CE2）について亜硝酸分解処理を行い、HPLC 法により分解物の分子量分布を測定した。OSCS-STD は分解処理前後で分子量分布の変動はなく、分解抵抗性であった。OSHP-SH 中の亜硝酸分解抵抗性物質の分子量分布は OSCS-STD と近かったが、粗 OSCS 中の分解抵抗性物質は CSMS-CE1 および CSMS-CE2 の分子量分布はコンドロイチン硫酸 B 標準品（CS-B（DS）-STD）に近かった。一方、UFH Na 塩（UFN-SP）、商業用の UFH Na 塩および Ca 塩について、EtOH 分画処理を行った。各分画物を HPLC 法と ^1H -NMR 法により分析した結果、すべての検体で亜硝酸分解抵抗性物質は上清に移行し、HP はコロイド状沈殿物として濃縮された。以上の結果から、UFH の調製工程において亜硝酸分解/ゲルろ過 HPLC 法による純度検査を行い、さらに、EtOH 分画処理を実施することで、高品質 HP 原料を安定的に調製できると考えられた。

第 4 章 エタノール分画処理による低分子ヘパリンの精製、 および亜硝酸分解とゲルろ過 HPLC を組み合わせた 純度確認試験の検討

緒言

第 3 章での検討において、EtOH 分画処理を用いることにより、HP 中の不純物、特に CS-B (DS) を効率良く除去することが可能であることが確認された。また、その評価方法として、亜硝酸分解/ゲルろ過 HPLC 法が亜硝酸分解抵抗性物質である CS-B (DS) あるいは OSCS を簡便に検出する方法として有効であることも確認された。前述のとおり、HP の純度試験、すなわち HP 中の MS 不純物に関する確認試験として、米国、欧州および日本の各薬局方で ^1H -NMR 法、イオン交換/逆相クロマト法等が設定されている。しかしながら、主に HP を原料として製造される LMWH については、これらの試験は設定されていない。現在までに、HP/LMWH の品質保証に関する日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) においても、HP/LMWH の純度確認のための検討、また今後の検討項目についても議論がなされている (石井ら 2011)。また、OSCS および CSF 等の MS に関する各試験に加え、HP 標準品 (橋井ら 2011)、HP 中の核酸/タンパク質の限度試験等も検討/報告されている (橋井ら 2012)。しかし HP 同様、LMWH においても製品の純度向上を目的とした製造方法の見直し、また、各製造工程の品質管理を目的とした MS 不純物の確認試験に関しては、ほとんど報告されていない。その理由として、基本的に HP および LMWH 製品の製造方法は製造メーカー間で

異なっており、その製造方法は各メーカーの秘匿事項となっている場合が多い。したがって、共通の製造方法として基準化することが困難であり、各製造メーカーが個別で対応しなければならないことが挙げられる。LMWH は基本的に各薬局方の試験に合格した HP を原料として、化学処理あるいは酵素処理後に再精製して製造される場合が多い (Linhardt と Gunay 1999)。そのため、「LMWH に MS 不純物が残留する可能性は低い」と考えられ、他の MS の混入に関する確認試験については規格として設定されていない場合が多い。しかしながら、HP と同様に豚小腸粘膜中に存在する CSF のように同一の出発原料に由来する MS に対する残留リスクと、OSCS のように HP 以外の MS を化学修飾した半合成品の MS の混入リスクは、また別の問題として捉えるべきである。実際、海外において、OSCS 混入 HP のように、死亡事例を含む有害事象の報告は無いが、LMWH の一つであるエノキサパリンナトリウム (enoxaparin sodium, EN) 製剤について、 ^1H -NMR 法による分析の結果、ごく微量の OSCS 様のシグナルが検出されたことが報告されており (U.K. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA 2008)、不純物混入に関するリスク管理は HP と同様に考えるべきである。現状では LMWH 中の MS 不純物が規格試験として設定されていないことも鑑み、その品質管理は LMWH の各製造工程中で確実に行う必要がある。

そこで本章では、LMWH 中の不純物を効率良く除去する方法として、第 3 章で検討した HP の EtOH 分画処理による精製方法、また、その簡便な精製度の評価方法として、第 2 章および第 3 章で検討した HP の亜硝酸分解/ゲルろ過 HPLC 法による純度確認法について、LMWH への応用の可能性について検討した。

実験材料と方法

1. 供試材料

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/精製したものをを用いた。精製検討用高分子 OSCS の Na 塩 (OSH) は、(今成ら 1999) 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 および 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 (和光純薬工業 (株)) をを用いた。

2. ゲルろ過 HPLC によるムコ多糖の分子量分布の確認

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 (厚生労働省 2011) に記載されている方法のカラム本数、試料を秤量する量および試料導入量等を一部改変した方法で行った。分析試料は、各検体 50mg を量り取り、それぞれを移動相 1.0mL に溶解して調製し、島津製作所 (株) 製の分析機器を使用して RI および UV シグナルを測定した。使用した機器および分析条件は以下の通りである。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, 234nm) および示差屈折計 (RID-10A) ; カラムおよびガードカラム, TSKgel G-2000SWXL (5 μ m, 7.8mm

I.D.×300mm, TOSO 製 (株)), TSKgel guardcolumn SWXL (5 μ m, 6.0mm I.D.×40mm, TOSO 製 (株)); カラム温度, 40℃; 移動相, 0.2mol/L Na₂SO₄ (pH5.0); 流速, 0.5mL/min; 試料導入量, 25 μ L。

3. ¹H-NMR 法によるムコ多糖の確認

¹H-NMR法による各試験物質の確認は、第16改正日本薬局方（厚生労働省2011）に記載されている方法の、試料濃度等を一部改変して次の条件で行った。分析試料は、各検体（20mg）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）0.60mL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のシグナルを測定した。使用した機器および分析条件は以下のとおりである。NMR本体（VNMRS-500PS）、分析ソフトウェア（VnmrJ2.2C）；温度，25℃；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± 6.0 ppm；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；ウィンドウ関数，指数関数（Line broadening factor = 0.2Hz）。

4. エタノール分画処理によるダルテパリンナトリウム精製（予備検討）

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°C 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。

5. エタノール分画処理によるダルテパリンナトリウム精製 (本検討)

DN-C の EtOH 分画処理は、(八藤後と村田 2002) 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 (Figure 14, 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 (2,000×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 (Figure 14, 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 (Figure 14, 写真 C)。白濁したことを確認した後、遠沈管に移し、4°C で 24 時間静置した。その後、遠心分離 (2,000×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（Figure 14, 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 7 mL 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 NaCl 溶液に溶かして 500mL とした溶液に 4.5L 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（2,000×g, 10min）でそれぞれ回収し、EtOH で洗浄した後、五酸化ニリン存在下、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 Figure 14 に示した。

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 1g 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。

6. ダルテパリンナトリウムのエタノール分画物の亜硝酸分解処理

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、第 3 章で実施した亜硝酸分解処理の方法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 100μL/g 検体となるように加えて攪拌した後、1mol/L HCl で pH を約 1.5 に調整し、さら

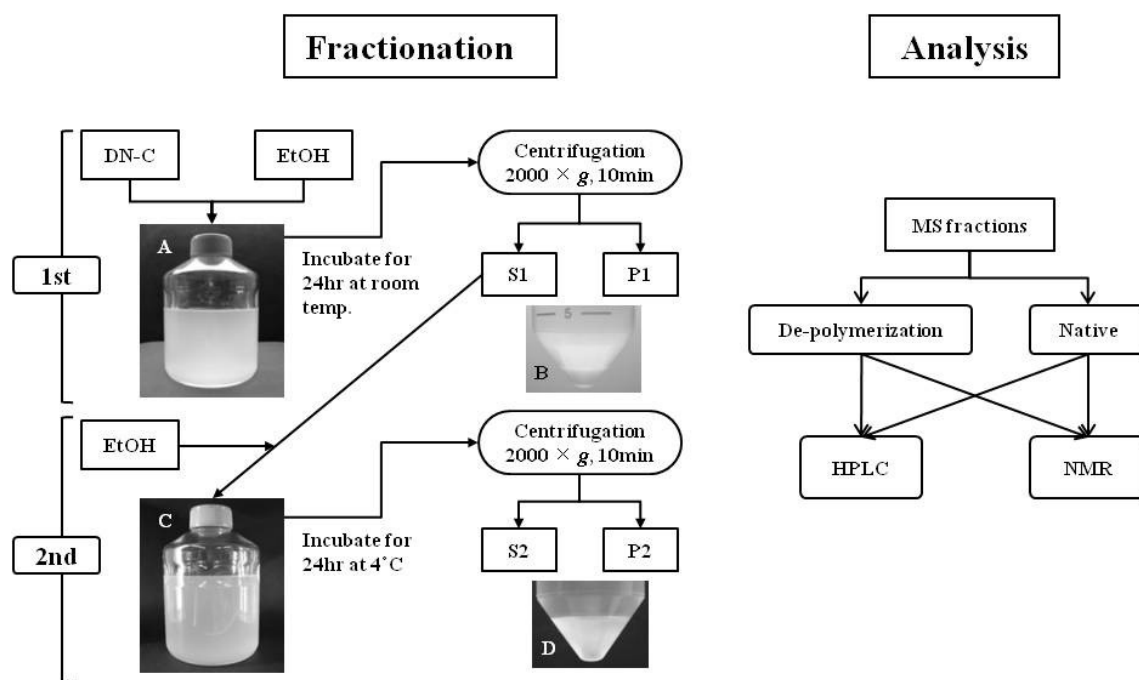


Figure 14. Schematic diagram for remove and analysis of impurities in DN-C by means of EtOH precipitation.

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.

に 60 分間攪拌した。その後、1mol/L NaOH を用い約 5.0 へ pH 調整を行った。

この試料溶液に 2mol/L Na₂SO₄ (pH5.0) を 100μL 加え、HPLC に供した。な

お、亜硝酸分解処理はすべて氷冷下で行った。

結果と考察

DN-W、DSH および OSH の HPLC と NMR 分析結果を (Figure 15, HPLC) に示した。各 MS の HPLC 分析の結果、すべての試料で 24.0 分付近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。今回の NMR 分析条件では、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 (橋井ら 2008a)。各 MS の ^1H -NMR での 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できた (Figure 15, NMR)。

次に DN-W、および DN-W 中の DSH および OSH の EtOH に対する反応性について予備検討を行った結果を Figure 16 および Figure 17 に示した。DN-W コントロール溶液では、白色析出物およびコロイ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 (Figure 16)。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できたことから、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られた。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 (Figure 15,

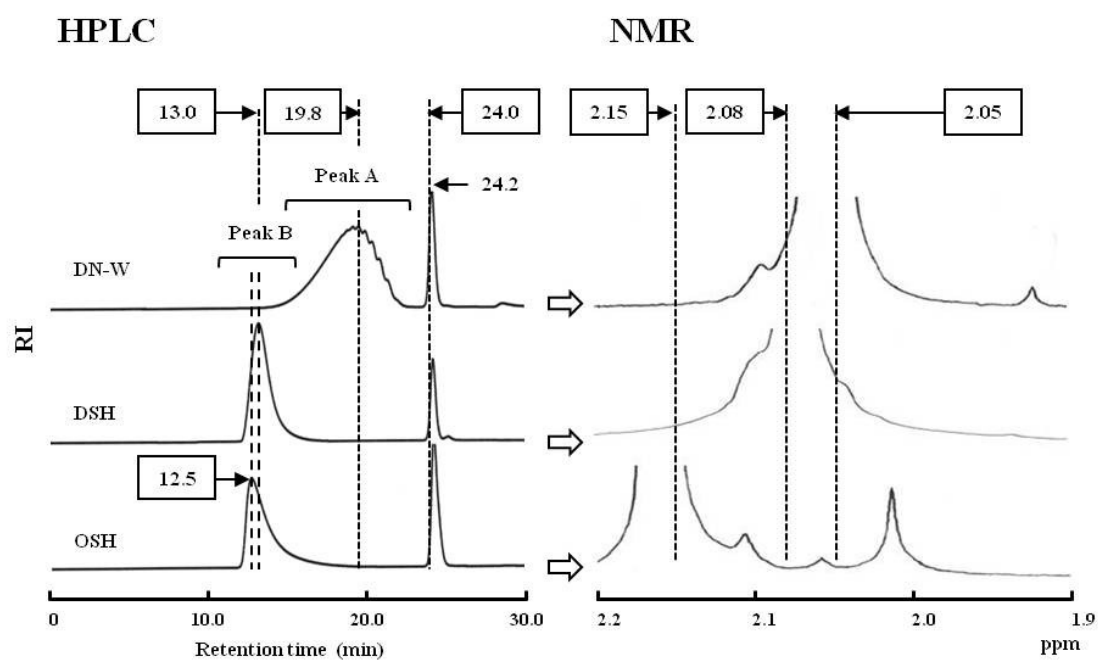


Figure 15. Typical HPLC chromatogram and NMR chart of DN-W and references of DSH and OSH.

HPLC) 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された。したがって、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 の分離について追加して行った検討結果を Figure 17 に示した。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 (Figure 17 A)。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 2 mL (DN-W 含有量は 198.0mg) から回収した白色粉末の重量は 55.7 mg (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 115.5 mg 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%

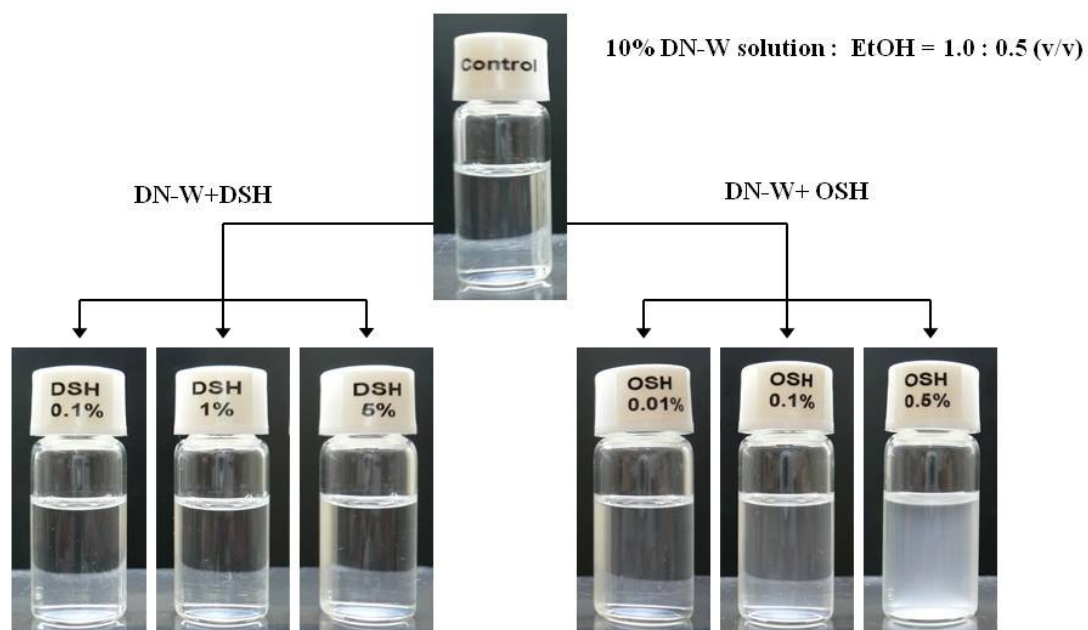


Figure 16. Appearances of DN-W contaminated with several ratio of DSH or OSH after EtOH precipitation.





DN-W + DSH treated with same concentrations of EtOH.

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 (Figure 17 B) 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、163.2 mg (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。これらのことから、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、Figure 14 に示したとおり、DN-C について 2 段階の EtOH 分画処理を実施することとした。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 Figure 18 に示した。

DN-W と OSH、DSH の混合品である DN-C について、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 2.05ppm、2.08ppm および 2.15ppm 付近の 3 シグナルが確認できた。また DN-C およびすべての画分の NMR 分析では 2.10ppm 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

(A)

Ratio of EtOH		0.525	0.575	0.625	0.675
Appearances					
Results of HPLC	DN-W	-	+	+	+
	DSH	-	-	-	+



(B)





Ratio of EtOH		0.525	0.575	0.625	0.675
Appearances					
Results of HPLC	DN-W	+	++	+++	+++
	DSH	-	-	-	++

Figure 17. Appearances of DN-W contaminated with DSH after EtOH precipitation.

DN-W + DSH treated at RT with different concentrations of EtOH. (B) DN-W + DSH treated at 4°C with different concentration of EtOH.

元処理による影響と推測された。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、2.15ppm 付近に最大シグナルが確認され、2.05ppm 付近に僅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、僅かに高分子の 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 が僅かに減少していた。また、NMR では 2.05ppm、2.08ppm 付近に 2 シグナルを確認したが、OSH に特徴的な 2.15ppm 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 2.05ppm および 2.08ppm 付近の 2 シグナルが確認できた。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 2.05ppm 付近が主要なシグナルとなり、2.08ppm 付近のピークは確認できなかった。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 50g (DN-W

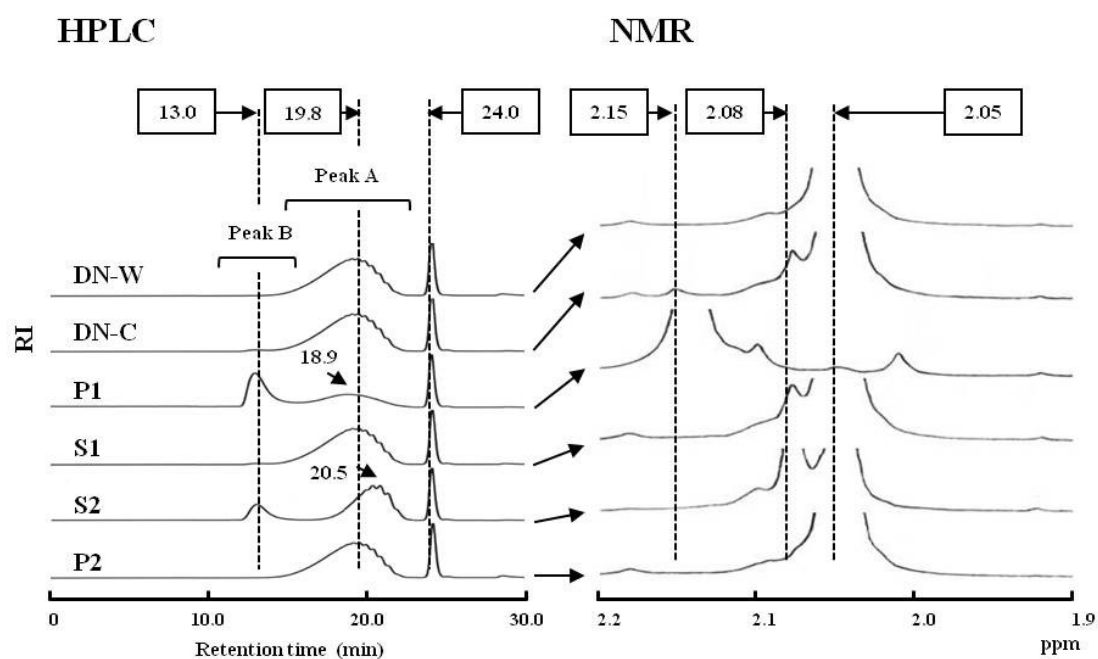


Figure 18. HPLC and NMR analyses of DN-C fractionated with EtOH precipitation.
Charts in each figure show the results of DN-W, DN-C, P1, S1, S2 and P2.

49.25g) 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 0.54g と 43.62g および 3.15g 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。

LMWH の純度確認試験について、第 3 章では、DS や OSH 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二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 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、Figure 19 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 (Figure 19, 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 2.04ppm、2.08ppm および 2.15ppm 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 2.15ppm、DSH が除去された P2 では 2.08ppm のシグナルが非常に弱くなった (Figure 19, NMR)。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%

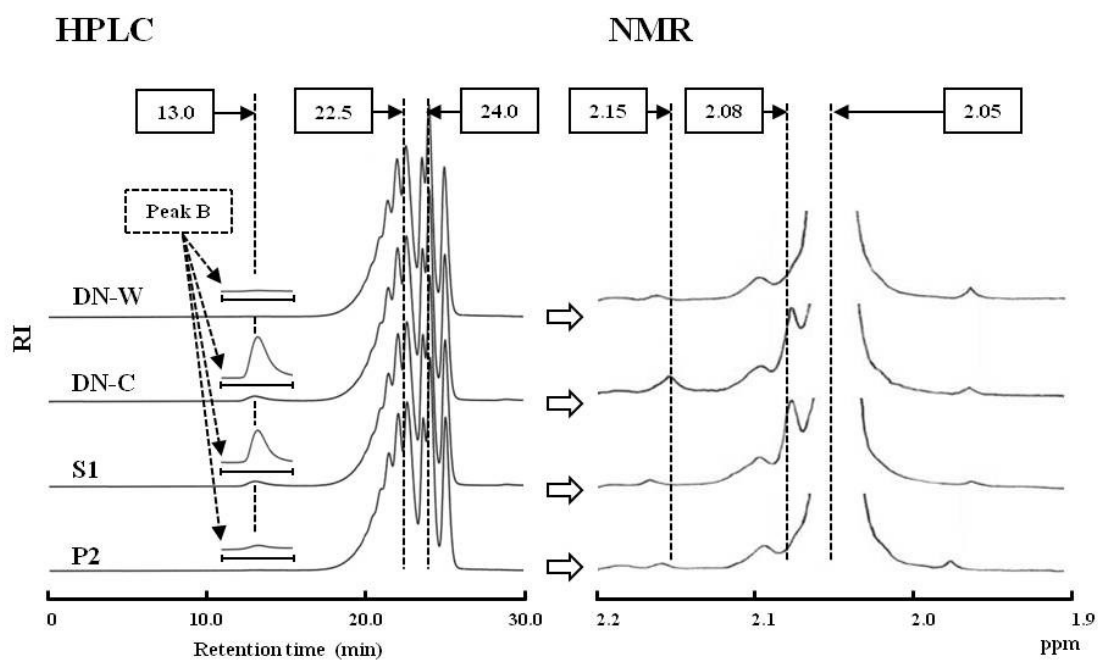


Figure 19. HPLC and NMR analyses of fractions of DN-C de-polymerized with nitrous acid. Charts in each figure show the results of DN-W, DN-C, S1, and P2. Charts of “Peak B (RT: 10.5 ~15.5 min)” are magnified to show the peak clearly.

Table 4. 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.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

c, Ratio of un-degraded MS in fractionated DN-C to that in the intact material.

と、段階的に減少していた (Table 4)。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/ゲルろ過 HPLC 法は LMWH 中の高分子 MS や OPCS 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 2.15ppm 付近のシグナルが、亜硝酸分解処理後に確認された (Figure 19, NMR)。また、そのシグナルの発生とともに、近接した 2.18ppm 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、第 2 章での UFH の亜硝酸分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 に何らかの化学処理をした場合、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、2.15ppm 付近のシグナルは必ずしも OPCS に特異的ではない可能性が示された。HP 原薬の NMR 分析における、2.12~3.00ppm の未同定シグナルの解析報告もふまえ (Lee ら 2011)、これらのシグナル推移の挙動については、今後詳細な検討が必要であると考えられた。

また、商業用 DN 原薬の試験的精製について、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結果を Figure 20 に示した。

HPLC による分析の結果 (Figure 20, HPLC)、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プ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 (Figure 20, NMR)、EtOH 分画処理前のすべての検体において DN に由来する 2.05ppm のシグナルが確認され、DNG 1 では 2.08ppm 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、2.08ppm のシグナルを明確に確認できなかった。また、2.10ppm 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 5)。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 6)。DNG 1~3 の原薬粉末 1g 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 0.827g 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、本研究では DN 製造工程において、DN 以外の MS 夾雑物質を除去する

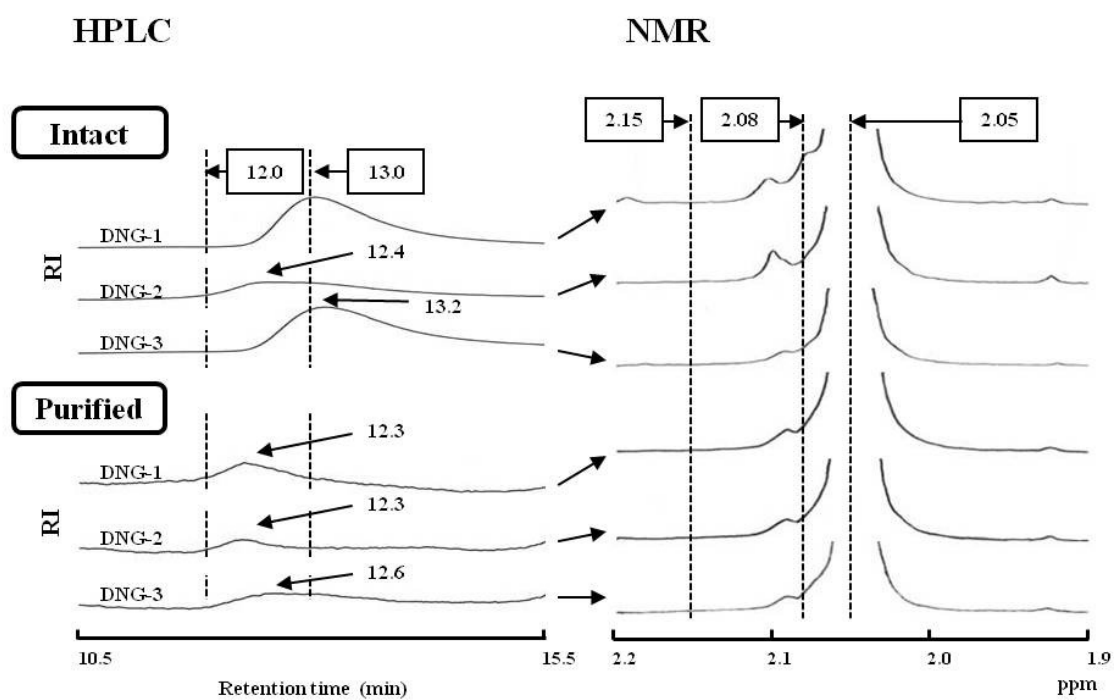


Figure 20. HPLC and NMR analyses of commercial DN products (above) and the purified DN with EtOH precipitation (below).

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

Table 5. 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)	
DNG1	15,267,154 ± 7,415	108,920 ± 739	7.13×10^{-3}
DNG2	15,318,865 ± 1,015	34,722 ± 645	2.27×10^{-3}
DNG3	15,585,305 ± 2,178	120,381 ± 1,231	7.72×10^{-3}

Values are means ± SD (n=3).

[†]MS, mucopolysaccharides.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

Table 6. 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 ± 95	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.

[§] Abbreviations are the same as shown in Table 5.

a, Total area of MS without nitrous acid de-polymerization.

b, RI area of un-degraded MS with NaNO₂ eluted from 10.0 to 20.0 min on HPLC.

c, Ratio of un-degraded MS in precipitate to that in each intact material shown in Table 5.

方法として、室温および 4°C での 2 段階の EtOH 分画処理が有効であることが示唆された。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能であると考えられた。

また、亜硝酸分解/ゲルろ過 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 (Dedem と Nielsen 1991) 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。

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 (デルマタン硫酸 (DS)) および過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) 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 DS (DSH) および高分子 OSCS (OSH) を添加して粗 DN (DN-C) を調製した。次に、DN-C に対し 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 の精製度を確認した。その結果、DN-C では第 1 段階の EtOH 分画で OSH がコロイド状沈殿物中に濃縮/除去された。次に、残った上清画分に対して第 2 段階の EtOH 分画を行うと、コロイド状沈殿物中に高純度の DN-W が濃縮され、DS は上清画分に留まった。加えて、商業用 DN についても同様の EtOH 分画処理を行い、MS 夾雑物質除去における EtOH 分画処理の有効性を確認した。これら分画物の純度を、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、および公定的な確認試験法である $^1\text{H-NMR}$ (NMR) 法により確認した結果、2 段階 EtOH 分画処理を行ったすべての検体で DN の純度が向上した。また、本試験で用いた商業用 DN 中の高分子 MS 不純物は、主に高分子 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/HPLC 法による純度検査を行い、さらに、MS 夾雑物質を含む LMWH 原薬について 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結論した。

第 5 章 総括

生物由来物質である MS の工業的あるいは商業的な利用状況は多岐にわたり、健康食品、化粧品、研究用試薬および医薬品として世界中で流通している。MS の種類は様々であり、それらを抽出/精製するための製造原料もまた多様である。その起源を遡ると、畜産資源および水産資源の食品加工時に生じる、本来ならば廃棄されていた副産物に由来するものが大多数を占めており、これらの利用が長期的かつ持続的に行われることは、限りある資源の有効利用、また環境保護の観点からも極めて有意義であるといえる。

近年の健康食品ブームで注目されている MS としては CS や HA が挙げられるが、食品分野のみならず、医療分野においても、医薬品原料として流通している MS は多い。HP や LMWH については、CS および HA と異なり食品および化粧品の分野での利用例はほとんど無いが、血液凝固阻害作用を有する MS として、医療分野において血液透析その他の体外循環装置使用時の血液凝固の防止の目的で使用されている。日本国内の慢性透析患者数は、2011 年末に日本国内の慢性透析患者数は 30 万人を超えているが、血液透析時に用いる血液凝固阻止剤として、HP および LMWH の使用例は過半数を超え、多くの患者に高頻度で使用されているのである。

2000 年代初頭に発生した BSE (bovine spongiform encephalopathy) 問題は食肉のみならず、MS の流通にも大きな影響を及ぼした。例えば、それまで MS 製造に利用されてきた牛由来の器官/軟骨等の使用が制限されたことにより、そのもの自体の大量廃棄の問題、また、これまでそれらを粗原料として製造されてきた MS については、これまで製造した製品の在庫管理の問題、また代替粗

原料の確保、そして最終製品の同等性の担保等が喫緊の課題となった。特に、CSF については、その粗原料が牛由来のものから豚、鮫およびイカ等由来に、また、HP および LMWH についても、牛由来のものはほぼ豚腸粘膜由来に転換された。HP および LMWH の粗原料である CHP 中には、主に HS、CS-B (DS) および CS-C が含まれ、特に高分子 MS である CS-B (DS) が 5～20% 程度含有されていることが多い。HP 中にもこれらの MS が、およそ 0～5% 前後が残留していることは確認されていたが、その残留に起因する重篤な副作用の報告例は少なく、また、HP の低分子化処理により、出血時間の延長等の副作用を低減した LMWH についても、HP と同様に世界中で古くから使用されてきた。

2008 年初頭、米国、ドイツなどで発生した、HP 製剤の急速静注投与が原因と思われる死亡および他の副作用の事例について、使用された HP 製剤および原薬を分析調査した結果、半合成 MS である OSCS が確認された。日本国内において HP 製剤の原薬はすべて海外から輸入されており、国内生産は行われていない。速やかな安全性確保のため、HP の純度試験法および確認試験法が検討され、混入物質である OSCS と DS の確認/純度試験として $^1\text{H-NMR}$ 、イオン交換および逆相クロマトグラフィー等の実施が義務づけられた（厚生労働省 2011）が、これらの試験は頻雑であること、また、精製された最終製品の試験であることから、粗原料である CHP の受入から最終的な HP 原薬の粉体充填までの一連の工程すべてにおいて実施することは、事実上困難である。特に、多用途/多品目の MS を製造するメーカーにおいては、粗原料の取り違い、また製造工程におけるラインおよび各機器の洗浄不良等によっては、目的とする MS 中に目的外の MS が混入する可能性が常に存在する。また、HP と同種同効薬であり、また、HP と同一の工場で製造されることが多い LMWH については、こ

これらの試験、あるいはそれに代替する試験は義務づけられていない。BSE 問題発生時に生じた牛由来粗原料を用いて製造された MS 製品の大量廃棄問題と同様に、今回の OSCS 問題でも、HP 関連製品に限定的ではあったものの、 $^1\text{H-NMR}$ 分析により 2.15ppm 付近にシグナルが検出された原薬、またそれを用いた製剤が大量廃棄され、また、HP 原薬価格の高騰にも繋がった。このことから、HP および LMWH 中の目的外 MS の残留を効率良く低減するような精製/分画方法、また工程管理における簡便な純度確認方法を確立することは、屠畜副産物の効率的な再資源化を長期的かつ持続的に行う上で必須であると考えられる。

本研究では、医薬品原料として用いられている 2 種類の MS、すなわち HP および LMWH について、他の MS との効率的な分離・精製方法として EtOH 分画法の適用を検討した結果、本法が工業的な製造方法として有効であることを確認した。さらに、その製造工程において、亜硝酸分解とゲルろ過 HPLC を組み合わせた分析方法を検討した結果、簡便な純度確認方法として有効であることも確認した。逆説的に考えれば、これらの精製方法および分析方法は、例えば OSCS、CSF あるいは KS 等の亜硝酸分解抵抗性 MS の精製方法、また分析方法としても有効であると推測された。HP 製品において、その中の他の MS は不純物であるが、他の MS 製品においては HP が不純物となるからである。MS 製品の純度については、例えば、CSF を配合した健康食品についても、表示内容と製品内容との整合性がとれていないケースが報告（戸井田ら 2011）されている。MS 製品の中でも、HP と同様に CSF は医薬品原料として日本薬局方外医薬品規格にも収載されていることから、MS 製品間での安全性基準の整合性をとる意味も含め、HP 以外の MS 製品についても、高純度化および製造工程における簡便な純度確認方法の検討が必要ではないかと考えられた。

本研究では、HP および LMWH 中の MS 不純物を OSCS および CSF と設定して各検討を実施した。特に、OSCS は死亡例を含む重篤な有害事象を惹き起す原因物質であるとされている。しかし、MS 中の不純物は必ずしも特定の MS に限定されるものではない。有害事象の程度、また発生頻度は不明であるが、MS 製造において混入する可能性のある不純物、例えば、1) 由来組織の保存時に用いるチモール等の防腐剤、2) 粗 MS を抽出する際に用いる塩化セチルピリジニウム等の吸着剤、3) MS の分解/修飾時に用いる試薬、4) 溶液から MS を回収する際に用いる EtOH/MeOH 等の有機溶媒等、5) 各種のタンパク質/ペプチド/アミノ酸/塩類等が挙げられる。そしてこれらは、各 MS 製品の粗原料、また製造方法によって変動することから、MS 製造における工程管理において、今後何らかのプロファイリングが必要であると考えられた。すなわち、HP および LMWH を含む MS 製品の安全性の担保、また安定供給の確保のため、MS 以外の物質で製品中に混入する可能性のある物質についても、効率的に除去する精製方法およびそれらの簡便な検出方法を開発することも、今後の検討課題であると考えられた。

以上のことから、本研究では、屠畜副産物である腸粘膜由来 HP 等の安全性向上を目指し、製造工程において実施可能な簡便かつ高感度の純度確認試験法を開発するとともに、実際の製造工場においても実施可能な精製法を提案した。これらの成果は医療現場に高品質な薬剤を持続供給することを可能にし、ひいては食肉製造副産物の円滑な再資源化に資するものであると考えられた。

Summary

From the viewpoint of the resources recycling, it is important to use by-products of meat production and processing such as offal and bone as recycled resources.

MSs (Mucopolysaccharides) are biopolymers that are found in animal tissues and organs, and it is involved in variety biological activities *in vivo*. Specifically, MS would play important roles in cell proliferation, differentiation, and adhesion of cells to matrices. There are various kinds of MS products in market, and those raw materials are also from various kinds of animal carcass. MSs are used as health foods, cosmetics, chemical reagents and pharmaceutical agents all over the world. Heparin (HP) and low molecular weight heparin (LMWH) are made mainly from crude heparin (CHP) prepared from porcine intestinal mucosa. Both HP and LMWH are widely used as injectable anticoagulant agents.

In early 2008, side effects of intravenous HP product, including dead cases, were reported from the United States and Germany. Then, a semi-synthetic oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) was found in the HP products, and it was concluded that the OSCS would cause the side effect of the HP products through the severe anaphylactic reaction. Afterwards, analytical methods of OSCS to confirm identification and purity of HP products were examined in the major countries of the world,

and specification tests using ^1H -NMR and ion exchange chromatography and reversed phase chromatography were made obligatory. However these tests are difficult to do by each step of HP manufacturing because those methods are expensive and troublesome. Moreover there is little information about industrial purification method of HP to remove contaminants from the bulk. Therefore the objective of this study was (1) to establish an analytical method for detecting MS contaminants such as OSCS and chondroitin sulfate family (CSF) in HP and LMWH, and (2) to develop a low-cost purifying processing of bulks of HP and LMWH to enable to supply high-quality HP products continuously. I focused on the reactive property of OSCS and CSF to de-polymerization with nitrous acid and the difference of solubility of each MS in organic solvent to solve these problems.

In the chapter 2, I investigated the reactive property of various MS to de-polymerization with nitrous acid. HP, LMWH, OSCS, CSF (type-A, B, C, D and E), keratan sulfate (KS) and heparin sulfate (HS) were de-polymerized with nitrous acid. Then molecular weight distributions of intact MSs and those degraded products were measured and compared by use of a gel permeation high performance liquid chromatograph equipped with a differential refractive index detector. As a result, HP, LMWH and HS were degraded with the accumulation of disaccharide units. On the other hand, OSCS, all types of CSF and KS were resistant to de-polymerization with nitrous acid. Furthermore the nitrous acid

de-polymerization / gel permeation HPLC method was able to detect contaminants at 0.01% level of HP, whereas the detection limit of ^1H -NMR method was 0.1% or more. This method is quite simple, economical and sensitive. Therefore I concluded that the proposed method, i.e., nitrous acid de-polymerization of MS followed by gel permeation HPLC, is the best method for detecting MS contaminated the bulks of HP and LMWH at each stages of manufacturing process of MS products.

In the chapter 3, I tried to develop a purification method for industrial manufacturing of HP products from HP bulk based on ethanol precipitation (EtOH). Finally, purified HP was precipitated from HP bulk after EtOH precipitation at final EtOH concentration of 33%. The recovery ratio of purified HP was 83.6% of total HP bulk, and the content of impurities decreased to about 0.09% from 1.16% through this purification process.

In the chapter 4, I also tried to develop a purification method for LMWH from model LMWH bulks contaminated with OSCS and dermatan sulfate (DS). It was shown that the two-step processing of EtOH fractionation was necessary to purify LMWH, i.e., OSCS was removed as colloidal precipitate at first EtOH fractionation and DS was removed in supernatant at the second fractionation. The content of impurities in the purified LMWH decreased to about 0.04% from about 1.52% in this process. Moreover, the recovery ratio of the purified LMWH was 87.2%.

The EtOH fractionation processing, followed by purity analysis by gel permeation HPLC after nitrous acid de-polymerization of MSs, is quite simple and low-cost. In addition, this method does not need to install any specialized equipment. Therefore I concluded that the methods developed in this study could be an effective way to produce high-quality HP products from bulks of HP and LMWH in the industrial manufacturing. In addition, this manufacturing process also could be applicable to production of other MS such as CSF. Producing highly purified MS products would result in supplying not only safer medical agents to medical front but also safer cosmetics and health foods to general consumers. Continuous consumption of high-quality MS products could ensure the sustainable utilization of by-products from animal carcass.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り、さらに御高閲の労をお取り戴きました宮崎大学農学部応用生物科学科 河原聡准教授に対し、心より感謝致します。また、本研究を行う間、数々の御指導と御高閲の労をお取り戴きました宮崎大学 六車三治男名誉教授に心より感謝申し上げます。さらに、御高閲の労を戴きました宮崎大学農学部 入江正和教授、森田哲夫教授に心より感謝申し上げます。また、諸便宜をご配慮戴きました農学部 芦澤幸二教授、工学部 鈴木祥広教授に心より感謝申し上げます。そして、本研究の立ち上げに際し、御高閲の労を戴きました伊藤ハム株式会社 前々中央研究所所長 中村豊朗氏に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、扶桑薬品工業株式会社 代表取締役社長 戸田幹雄氏、取締役 研究開発センター所長 戸田隆雄氏、研究開発センター部長 植村英俊氏、研究開発センター課長 山本啓一氏、研究開発センター課長 松久明生氏には大学院入学の機会を与えて戴き、さらに研究上の諸便宜もご配慮戴きました。そして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。

また、御協力・御支援戴きました宮崎大学農学部応用生物科学科畜産食品科学研究室の学生の皆様方、そして、扶桑薬品工業株式会社研究開発センターの皆様方に深く感謝致します。

参考文献

- Akiyama F., Seno N. 1973. Studies on the mucopolysaccharides from hagfish skin. *Natural science report, Ochanomizu University*, 23, 79-100.
- Andersson L.-O., Barrowcliffe T.W., Holmer E., Johnson E.A., Sim G.E.C. 1976. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. *Thrombosis Research*, 9, 575-583.
- Bernardi G., Happey F., Naylor A. 1957. Mucopolysaccharides from cartilage and nucleus pulposus. *Nature*, 180, 1341-1342.
- Beyer T., Diehl B., Randel G., Humpfer E., Schafer H., Spraul M., Schollmayer C., Holzgrabe U. 2008. Quality assessment of unfractionated heparin using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 13-19.
- Charles A.F., Scott D.A. 1933. Studies on heparin II heparin in various tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 102, 431-435.
- Coyne E. 1977. Heparin manufacturing processes. *Federation Proceedings*, 36, 32.
- Damus P.S., Hicks M., Rosenberg R.D. 1973. Anticoagulant action of heparin. *Nature*, 24, 355-357.
- Dedem G.V, Nielsen J.I. 1991. Determination of the molecular mass of

- low molecular mass (LMW) heparin. *Pharmeuropa*, 3, 202-218.
- Griffin C.C., Linhardt R.J., Gorp C.L.V., Toida T., Hileman R.E., Schubert R.L.II., Brown S.E. 1995. Isolation and characterization of heparan sulfate from crude porcine intestinal mucosal peptideglycan heparin. *Carbohydrate Research*, 276, 183-197.
- 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., Sasisekharan R. 2008. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nature Biotechnology*, 26, 669-675.
- 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，齋島由二，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，梅直孝，木下充弘，掛樋一晃，合田幸弘，奥田晴宏，棚元憲一，山口照英．2008a．ヘパリン純度試験に関する研究（第一報） $^1\text{H-NMR}$ 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.
- 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．2008b．ヘパリン純度試験に関する研究（第二報） $^1\text{H-NMR}$ 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.
- 橋井則貴，川崎ナナ，正田卓司，福原潔，品川麻衣，榛葉信久，嶋村英雄，

河合健蔵，余田光，奥田晴宏，山口照英．2010．ヘパリン純度試験に関する研究（第五報） $^1\text{H-NMR}$ 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.

橋井則貴，川崎ナナ，秦艶，山口照英．2011．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.

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．2012．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.

Ishihara M., Ono K. 1998. Structure and Function of Heparin and Heparan Sulfate; Heparinoid Library and Modification of FGF-Activities. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 10, 223-233.

石井明子，橋井則貴，鈴木琢雄，川崎ナナ．2011．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*, 42, 448-464.

今成登志男，戸井田敏彦，Linhardt R.J. 1999. 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.

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. 2008. 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.

梶直孝，木下充弘，川崎ナナ，山口照英，早川堯夫，掛樋一晃. 2009. 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. *薬学雑誌*, 129, 1255-1264.

Kawai Y., Seno N., Anno K. 1966. Chondroitin polysulfate of squid cartilage. *Journal of Biochemistry*, 60 , 317-321.

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. 2008. 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.

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. 2008. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact

- system. *The New England Journal of Medicine*, 358, 2457-2467.
- Kitagawa H., Tanaka Y., Yamada S., Seno N., Stuart M., Haslam S.M., Morris H.R., Dell A., Sugahara K. 1997. A novel pentasaccharide sequence
GlcA(3-sulfate)(beta1-3)GalNAc(4-sulfate)(beta1-4)(Fucalpha1-3)GlcA(beta1-3)GalNAc(4-sulfate) in the oligosaccharides isolated from king crab cartilage chondroitin sulfate K and its differential susceptibility to chondroitinases and hyaluronidase. *Biochemistry*, 36, 3998-4008.
- 厚生労働省. 2008. 厚生労働省告知第 417 号.
- 厚生労働省. 2010. 厚生労働省告示第 322 号.
- 厚生労働省. 2006. パルナパリンナトリウム. 第 15 改正日本薬局方, pp. 855-856.
- 厚生労働省. 2011. パルナパリンナトリウム. 第 16 改正日本薬局方, pp. 1042-1044.
- 厚生労働省. 2011. ヘパリンナトリウム. 第 16 改正日本薬局方, pp. 1247-1249.
- Lee S.E., Chess E.K., Rabinow B., Ray G.J., Szabo C.M., Melnick B., Miller R.L., Nair L.M., Moore E.G. 2011. NMR of heparin API : investigation of unidentified signals in the USP-specified range of 2.12–3.00ppm. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 651-662.
- Linhardt R.J., Loganathan D., Al-Hakim A., Wang H-M., Walenga J.M.,

- Hoppenstead D., Fareed J. 1990. Oligosaccharide mapping of low molecular weight heparins: Structure and activity differences. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33, 1639-1645.
- Linhardt R.J., Gunay N.S. 1999. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 25, suppl, 3, 5-16.
- Matsuda M., Worawattanamateekul W., Okutani K. 1992. Simultaneous production of muco- and sulfated polysaccharides by Marine *Pseudomonas*. *日本水産学会誌*, 58, 1735-1741.
- Meyer K., Palmer J.W. with the assistance of Smyth E M. 1936. On glycoproteins: II. The polysaccharides of vitreous humor and of umbilical cord. *The Journal of Biological Chemistry*, 114, 689-703.
- Meyer K. 1938. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 6, 91-102.
- Meyer K., Chaffee E. 1941. The mucopolysaccharides of skin. *The Journal of Biological Chemistry*, 138, 491-499.
- McLean J. 1916. The thromboplastic action of cephalin. *American Journal of Physiology*, 41, 250-257.
- Murray D.W.G., Jaques L.B., Perrett T.S., Best C.H. 1937. Heparin and the thrombosis of veins following injury. *Surgery*, 2, 163-187.
- Murray G.D.W. 1940. Heparin in thrombosis and embolism. *British Journal of Surgery*, 27, 324-336.

日本透析医学会.:

日本透析医学会統計調査委員会: 図説わが国の慢性透析療法の現況
(2012年12月31日現在). 日本透析医学会, 東京, 2013.

< <http://docs.jsdt.or.jp/overview/pdf2013/p003.pdf> > created on 26
Jun. 2013.

日本透析医学会.:

日本透析医学会統計調査委員会: 図説わが国の慢性透析療法の現況
(2003年12月31日現在). 日本透析医学会, 東京, 2004

< <http://docs.jsdt.or.jp/overview/pdf2004/p38.pdf> > created on 24
Aug. 2004.

奥山隆, 佐々木勸, 村田克己, 吉澤善作監修. 1979. ヘパリノイドの化学と
薬理, 「ヘパリン」, (講談社, 東京), 234-235.

Pearce R.H., Mathieson J.M., Grimmer B.J. 1968. Fractionation of
anionic glycosaminoglycans by ion-exchange chromatography.
Analytical Biochemistry, 24, 141-156.

Roden L., Dorfman A. 1959. The acid mucopolysaccharides of Furth's
mastocytoma in the mouse. *Acta Chemica Scandinavica*, 13, 2121.

Suzuki S. 1960. Isolation of novel disaccharides from chondroitin
sulfates. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 3580-3588.

Seno N., Murakami K. 1982. Structure of disulfated disaccharides from
chondroitin polysulfates, chondroitin sulfate D and K. *Carbohydrate
Research*, 103, 190-194.

Soda T., Egami F. 1938. Glucosulfatase. XX. Separation of

chondrosulfatase coexisting with glucosulfatase in the liver of *Chariona lampas* and on the nature of this enzyme. *Journal of the Chemical Society of Japan*, 59, 1202-1211.

戸井田敏彦. 2011. 日本及び米国の健康食品に配合されたコンドロイチン硫酸の品質評価. *日本食品科学工学会誌*, 18, 35-42 2011.

Toida T., Linhardt R.J. 1998. Structural analysis of heparan sulfate and heparan sulfate oligosaccharides. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 10, 125-136.

Thunberg L., Backstrom G., Lindahl U. 1982. Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydrate Research*, 100, 393-410.

U.K. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA) .: < <http://www.mhra.gov.uk/Publications/Safetywarnings/DrugAlerts/CON017989> > , cited on 06 Jun. 2008.

U.S. Food and Drug Administration (FDA) .: < <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/default.htm> > , cited on 28 Feb. 2008.

八藤後武美, 村田浩志. 2002. 低分子量ヘパリンの製造法, 特開 2002-293804.

Zhang Z., Weiwer M., Li B., Kemp M.M., Daman T.H., Linhardt R.J. 2008. Oversulfated chondroitin sulfate: Impact of a heparin impurity, associated with adverse clinical events, on low-molecular-weight heparin preparation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 5498-5501.