

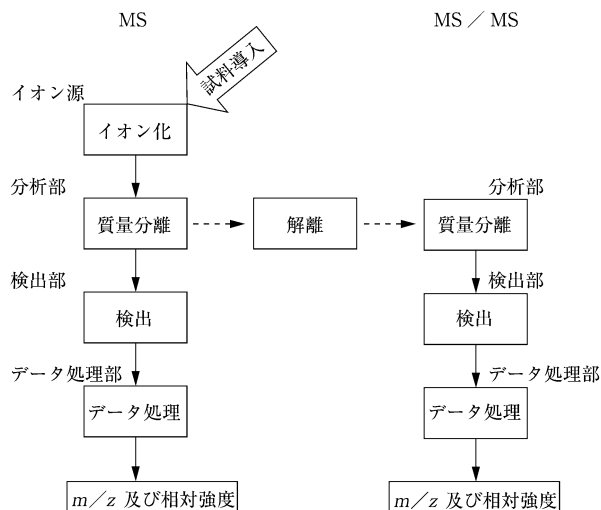
1 ペプチド及びタンパク質の質量分析

2 次のように改める。

3 質量分析(以下「MS」という)は、分子をイオン化させ、統
 4 一原子質量単位に対する比で表したイオンの相対質量(m)をイ
 5 オンの電荷数(z)で割って得られる無次元量の m/z 値に応じて
 6 イオンを分離し、検出する方法である。統一原子質量単位は基
 7 底状態の ^{12}C の12分の1の質量であり、原子、分子及びイオン
 8 の質量を表す際に用いられる。測定結果は、イオンの m/z 値
 9 をx軸に、それに対する信号の相対強度をy軸に示したマスス
 10 펙トルとして示される。イオンの m/z 値と z より、分子の質
 11 量を求めることができる。タンデム質量分析(以下「MS/
 12 MS」という)は、一段階目の分析部で選択したプリカーサーイ
 13 オンを解離させ、生じたプロダクトイオンを二段階目の分析部
 14 で分離し、検出する手法である。観測したプロダクトイオンの
 15 m/z 値により、構造の確認や推定を行うことができる。質量
 16 分析で得られる情報は定性的であるが、定量にも利用される。
 17 MS並びにMS/MSは、ペプチド及びタンパク質分子の質量の
 18 測定並びにアミノ酸配列の確認及び翻訳後修飾の確認などに利
 19 用できることから、ペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試
 20 験などに用いられる。

21 1. 装置

22 質量分析計は、イオン源、分析部、検出部及びデータ処理部
 23 からなる(図1)。イオン源は、導入された試料をイオン化する
 24 部位であり、ペプチド及びタンパク質のイオン化には主に、マ
 25 トリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI: Matrix-
 26 assisted laser desorption/ionization)及びエレクトロスプレ
 27 ーイオン化法(ESI: Electrospray ionization)が用いられる。
 28 分析部は、生成したイオンを m/z 値に応じて分離する部位で
 29 あり、主に四重極型、飛行時間型、イオントラップ型及びフー
 30 リエ変換イオンサイクロトロン共鳴型などが用いられる。検出
 31 部は、分離されたイオンを信号として検出する部位であり、検
 32 出された信号は、データ処理部で処理され、マススペクトルと
 33 して出力される。MS/MS又は多段階MSは、複数の分析部を
 34 連結した分析計並びにイオントラップ型及びフーリエ変換イオ
 35 ンサイクロトロン共鳴型の分析計を用いて行われる。イオンの
 36 解離には、通例、衝突誘起解離(CID: Collision-induced
 37 dissociation)、ポストソース分解(PSD: Post-source decay)及
 38 び電子捕獲解離(ECD: Electron capture dissociation)などが利
 39 用される。



40 41 図1 MS及びMS/MSの概念図

42 2. 各種測定様式

43 2.1. MS

44 MSの測定法には次の方法がある。

45 (1) 全イオンモニタリング

46 選択した m/z 値の範囲のイオンを検出する方法であり、試
 47 料の質量及び同位体に関する情報を得ることができる。

48 (2) 選択イオンモニタリング

49 特定の m/z 値のイオンのみを検出する方法であり、試料の
 50 高感度な検出に利用される。

51 2.2. MS/MS

52 MS/MSの測定法には次の方法がある。

53 (1) プロダクトイオン分析

54 選択した m/z 値のプリカーサーイオンより生じたプロダク
 55 トイオンを検出する方法であり、試料や不純物の定性的な情報
 56 を得ることができる。

57 (2) プリカーサーイオンスキャンモード

58 解離により特定の m/z 値のプロダクトイオンを生ずるプリ
 59 カーサーイオンを走査する測定法であり、特定の部分構造を持
 60 つ試料の特異的検出に利用される。

61 (3) コンスタントニュートラルロススキャンモード

62 解離により特定の質量の減少(中性種の脱離)が起こるプリ
 63 カーサーイオンを走査する測定法であり、特定の部分構造を持つ
 64 試料の特異的検出に利用される。

65 (4) 選択反応モニタリング

66 特定の m/z 値のプリカーサーイオンを解離させて生じる特
 67 定の m/z 値のプロダクトイオンを検出する方法であり、複雑
 68 なマトリックス中の低レベルの試料の定量的検出に利用される。

69 3. 操作法

70 3.1. MS

71 あらかじめ医薬品各条のシステム適合性で規定した試験溶液
 72 を用いて質量測定を行い、検出感度及び理論質量と測定質量の
 73 差などが医薬品各条に定める基準値に適合していることを確認
 74 する。基準値を満たしていない場合は、イオン源、分析部又は
 75 検出部の電圧などの調整や、適切な質量校正標準物質を用いた
 76 質量校正を行う。基準値を満たしていることを確認した後、医
 77 薬品各条に規定した方法で試料を調製し、試験条件に従い質量
 78 測定を行う。通例、イオン化法に応じて以下の方法で操作する。

79 (1) マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI)
 80 脱塩した試料ペプチド及びタンパク質を適切な溶媒に溶解し
 81 て試料溶液とする。通例、溶媒にはトリフルオロ酢酸を含む水
 82 溶液などを用いる。別に試料ペプチド及びタンパク質の構造特
 83 性に応じて適切なマトリックスを選び、トリフルオロ酢酸を含
 84 む水とアセトニトリルなどの混合液に溶かしてマトリックス溶
 85 液とする。通例、ペプチド及びタンパク質の測定には、 α -
 86 シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸
 87 又はシナピン酸などを用いる。試料溶液とマトリックス溶液を
 88 混合し、サンプルプレートに滴下し、乾燥させる。サンプルプ
 89 レートをイオン源に設置し、適切な強度のレーザーを照射して
 90 試料をイオン化し、マスペクトルを得る。

91 (2) エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
 92 脱塩した試料ペプチド及びタンパク質を適切な溶媒に溶解し
 93 て試料溶液とする。通例、溶媒には酢酸などを含む水及びメタ
 94 ノール又はアセトニトリルの混合液を用いる。シリンジ又は液
 95 体クロマトグラフィーなどにより、試料溶液をキャピラリーに
 96 導入する。キャピラリーに電圧をかけて試料をイオン化し、マ
 97 ススペクトルを得る。

98 3.2. MS/MS
 99 あらかじめ医薬品各条のシステム適合性で規定した試験溶液
 100 を用いてMS/MSを行い、規定されたプロダクトイオンが検
 101 出されることを確認する。MSと同様に試料ペプチドを適切な
 102 溶媒に溶解して試料溶液とし、イオン源に導入してイオン化す
 103 る。医薬品各条で規定されたプリカーサーイオンを選択し、試
 104 験条件に従い適切な解離条件を設定して解離させ、マスペク
 105 トルを得る。分子内にジスルフィド結合を含むペプチドのMS
 106 /MSを行う場合は、通例、試料を還元アルキル化する。還元
 107 試薬として、通例、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタ
 108 ノール及びトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィンなどが
 109 用いられる。また、アルキル化試薬として、通例、ヨード酢酸、
 110 ヨードアセトアミド及び4-ビニルピリジンなどが用いられる。

111 4. 確認試験への応用例

112 4.1. 分子の質量の確認
 113 MSにより試料ペプチド及びタンパク質分子の質量を測定す
 114 る。モノアイソトピックピークが確認できる場合には、そのピ
 115 ークよりモノアイソトピック質量を求める。モノアイソトピック
 116 ピークが確認できない場合は、ピークの頂点より平均質量を
 117 求める。試料タンパク質が多数の多価イオンとして観測される
 118 場合には、デコンボリューション処理により平均質量を求める。
 119 測定値が医薬品各条で規定した値の範囲内であることを確認す
 120 る。

121 4.2. アミノ酸配列などの確認

122 試料ペプチド分子の質量を確認した後、MS/MSにより医
 123 薬品各条で規定したプリカーサーイオンを選択して解離させ、
 124 医薬品各条で規定したプロダクトイオンが検出されることを確
 125 認する。分子量が大きく有用なプロダクトイオンが観測できな
 126 い場合、試料ペプチド及びタンパク質を酵素などにより断片化
 127 し、生じたペプチド断片のMS/MSによりアミノ酸配列など
 128 を確認できることがある。ペプチド及びタンパク質の断片化方
 129 法は、「ペプチドマップ法」におけるペプチド結合の選択的切
 130 断を参照する。

131 5. 用語解説

132 イオントラップ型(IT: Ion trap): 狭義には四重極イオントラ

133 ップを指し、四重極型と同様の原理を利用して、高周波電圧に
 134 よりイオンを閉じこめ、イオンを m/z 値別にセルから追い出
 135 すことによりイオンを分離する方法。特定の m/z 値のイオン
 136 をトラップし、解離及びイオン放出を繰り返すことにより、多
 137 段階MS(MSⁿ)を行うことができる。

138 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI: Electrospray
 139 ionization): 大気圧下、試料溶液を高電圧をかけたキャピラ
 140 リーより噴霧し、帯電液滴を形成させ、試料イオンを生成する
 141 方法。ペプチド及びタンパク質などの高分子化合物では多価イ
 142 オンが生成する。液体クロマトグラフィーと接続して用いるこ
 143 とができる。

144 四重極型(Q: Quadrupole): 直流と高周波を重ね合わせた電圧
 145 を、双曲線又はそれに相当する断面を持つ平行な4本の電極柱
 146 に印加し、電圧を変化させることによって通過できるイオンの
 147 m/z 値を変化させて、イオンを分離する方法。

148 衝突誘起解離 (CID: Collision-induced dissociation): 加速
 149 されたイオンと中性の衝突ガス(He, Ar, N₂など)との衝突に
 150 よって衝突エネルギーの一部がイオンの内部エネルギーに変換
 151 され、イオンが励起し、解離すること。衝突ガスと衝突させる
 152 際のイオンの加速電圧により低エネルギーCID(約1000V以下
 153 の電圧で加速されたイオンの衝突)と高エネルギーCID(1000V
 154 以上の電圧で加速されたイオンの衝突)に分けられる。

155 電子捕獲解離 (ECD: Electron capture dissociation): 多価の
 156 プロトン付加分子が、低エネルギーの電子と反応し、ラジカル
 157 イオンとなった後、解離すること。フーリエ変換イオンサイク
 158 ロトロン共鳴質量分析計やイオントラップ型質量分析計でイオ
 159 ンの解離に利用される。

160 飛行時間型 (TOF: Time-of-flight): イオン化した試料を高電
 161 圧で加速した後、一定距離を飛行するのに要した時間の違いに
 162 よりイオンを分離する方法。イオン源から検出器までイオンを
 163 直線的に飛行させるリニア型と、静電界ミラー(リフレクトロ
 164 ン)を用いて反転させるリフレクトロン型がある。リフレクト
 165 ロンを利用した場合、イオンの初期運動エネルギーのばらつき
 166 を補正することにより質量分解能が向上する。

167 フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型 (FT-ICR: Fourier
 168 transform ion cyclotron resonance): 一様な磁場中で、磁場
 169 に垂直な平面内で回転運動(サイクロトロン運動)するイオンの
 170 周期が m/z 値に反比例することを利用して、 m/z 値の異なる
 171 イオンを検出する方法。高周波電圧を印加してイオンを共鳴励
 172 起させた後、検出電極で検出した誘導電流信号をフーリエ変換
 173 により解析し、マスペクトルを得る。

174 ポストソース分解 (PSD: Post-source decay): MALDIにおい
 175 て、イオン源で生じたイオンが加速場領域を出てから検出器に
 176 到達するまでに、イオン自身の過剰内部エネルギー又は残留ガ
 177 スとの衝突によって解離すること。リフレクトロン飛行時間型
 178 質量分析計を用いたMS/MSに利用される。

179 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI: Matrix-
 180 assisted laser desorption/ionization): 試料とマトリッ
 181 クスを混合し、ナノ秒オーダーの短時間のレーザー光を照射す
 182 ることにより試料イオンを生成する方法。タンパク質や糖質、オ
 183 リゴヌクレオチド、脂質などの生体高分子をほとんど分解せず
 184 にイオン化することができる。主に一価イオンが生成する。