

1 単糖分析及びオリゴ糖分析／糖鎖プロファイリング法

糖鎖試験法は、糖タンパク質医薬品等に結合している糖鎖の恒常性を確認する方法である。糖タンパク質に結合した糖鎖が有効性及び安全性に影響を及ぼす場合や、その可能性を否定できない場合は、糖鎖を管理すべき重要な品質特性と位置づけ、恒常性を確認するための方策を講じる必要がある。その一つが糖鎖試験法であり、1)単糖に分解して分析する方法(単糖分析)、2)遊離糖鎖として分析する方法(オリゴ糖分析・糖鎖プロファイリング)、3)糖ペプチドとして分析する方法(糖ペプチド分析)、及び4)糖タンパク質として分析する方法(グリコフォーム分析)がある。それぞれ単糖の組成、タンパク質全体に結合している糖鎖の種類とその分布、特定の部位に結合した糖鎖の種類とその分布、及び糖タンパク質の糖鎖修飾の全体的な特徴とその分布を確認することができる。糖鎖試験策定に当たっては、糖鎖の構造と生物活性又は薬理作用、体内動態、免疫原性、安定性及び溶解性などの関係を考慮し、適切な方法を選択、若しくは組み合わせて用いる。糖鎖の恒常性は、糖鎖試験法だけでなく、製造工程段階で管理されることもある。糖鎖試験法は工程内管理試験として、また、工程開発過程における糖鎖の恒常性を確認する方法として利用可能である。以下に、単糖分析及びオリゴ糖分析について分析方法と一般的な要件を示す。糖ペプチド分析方法はペプチドマップ法及び質量分析法を、また、グリコフォーム分析法は等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動及び質量分析法が参考になる。

1. 単糖分析

酸加水分解、酵素消化又はメタノリシスなどによりグリコシド結合を切断し、単糖を遊離する。遊離した単糖は、必要に応じて蒸発乾固、精製し、液体クロマトグラフィー (2.01)、ガスクロマトグラフィー (2.02) 及びキャピラリー電気泳動などにより分析を行い、内標準法又は絶対検量線法により定量する。測定結果は、通例、タンパク質当たりの各単糖のモル比として示す。

1.1. 糖タンパク質の分離及び精製

添加物や塩は、加水分解、単糖の誘導体化及び単糖のクロマトグラフィーによる分離に影響を及ぼすことがあるので、単糖分析は、一般に、適切な方法で糖タンパク質をあらかじめ分離・精製してから行われる。精製が必要な場合には、その方法を各条に規定する。

1.2. 単糖の遊離

1.2.1. 酸加水分解

酸加水分解は、中性糖及びアミノ糖の遊離に用いられる最も一般的な方法である。通例、2~7 mol/Lトリフルオロ酢酸に溶解し、100℃で加熱するなどによりグリコシド結合を加水分解し遊離する。タンパク質に直接結合したアミノ糖は遊離しにくいいため、アミノ糖の正確な定量には、別途2~6 mol/L塩酸に溶解し、100℃で加熱するなど条件で加水分解を行うことが望ましい。糖の種類及び結合様式により加水分解速度が異なることから、加水分解の経時変化をとり、単糖の生成と分解を確認することが推奨される。酸加水分解によりアミノ糖に結合したN-アセチル基が脱離するので、必要に応じて再N-アセチル化する。シアル酸は分解しやすいため、別途0.1 mol/L塩

酸、0.1 mol/L硫酸又は2 mol/L酢酸中に溶解し、80℃で加熱するなどの条件にて酸加水分解を行い遊離する。

1.2.2. 酵素消化

シアル酸の遊離には、酵素消化も利用される。通常、*Arthrobacter ureafaciens*や*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼなど対象となる基質の範囲が広い酵素が使用される。試料に含まれるシアル酸の種類、結合様式及びO-アセチル化等を考慮して酵素消化の条件を最適化する。結合様式の異なるシアル酸を区別するために、特異性の高い酵素を用いる場合もある。

1.2.3. メタノリシス

十分に乾燥させた試料を塩酸を含むメタノール中で加熱することにより、単糖をメチル配糖体として遊離する。酸加水分解と比べ、遊離した単糖が分解されにくい。

1.3. 単糖の定量

1.3.1. 高pHイオン交換クロマトグラフィー／パルス式電気化学検出法

酸加水分解した試料から必要に応じて酸を除去する。単糖は誘導体化することなく高pHイオン交換クロマトグラフィー／パルス式電気化学検出により分離及び検出できる。単糖のpKaは12~14であり、強アルカリ条件(pH 12~13)で水酸基が解離することを利用して、四級アミンを含むポリマー担体を充填したカラムなどを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離する。電気化学検出は、作用電極において物質が酸化還元される際の電流を測定することにより電気化学的に活性な物質を検出する方法である。糖は強アルカリ条件下で陰イオンとなり、電気化学検出により検出することができる。糖の酸化物は電極の反応性を抑制するため、データ取込み後、電位を正及び負に変化させることにより電極表面の洗浄を行うパルス式電気化学検出が用いられる。アミノ酸も電気化学検出で検出されるため、糖含量の少ない糖タンパク質試料では妨害を受ける場合があることに留意する。本法は、中性糖、アミノ糖及びシアル酸などの単糖だけでなく、オリゴ糖の分析にも用いられる。

1.3.2. 誘導体化及び液体クロマトグラフィー

(1) 中性糖及びアミノ糖

酸加水分解により得た単糖は酸を除去し、必要ならばN-アセチル化した後、2-アミノ安息香酸、2-アミノピリジン又はエチル-4-アミノ安息香酸などを用いて還元的アミノ化、又は1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンにより誘導体化を行う。試薬由来の不純物のピークにより分析が妨害されることがあるので、使用する試薬の純度に留意する必要がある。誘導体化に用いた過剰の試薬が試験結果に影響を及ぼさないように、必要に応じて誘導体化単糖の精製を行う。誘導体化単糖は、逆相クロマトグラフィーやホウ酸錯体の形成を利用した陰イオン交換クロマトグラフィーなどにより分離する。分離された単糖は蛍光光度計若しくは紫外吸光度計を用いて検出する。イオン交換クロマトグラフィーで単糖を分離した後、アルギニンなどで誘導体化して検出する方法もある。

(2) シアル酸

酸加水分解若しくはシアリダーゼで遊離したシアル酸を、 α -ケト酸と特異的に反応する1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼンやo-フェニレンジアミンにより誘導体化する。酸性条件下で誘導体化反応が進むので、酸加水分解した溶液をそのまま誘導体化に用いることができる。誘導体化したシ

107 アル酸は、逆相液体クロマトグラフィーにより分離し、蛍光光
108 度計で検出する。

109 1.3.3. ガスクロマトグラフィー

110 メタノリシスで遊離した単糖をN-アセチル化及びトリメチ
111 ルシリル化して分析する方法、及び酸加水分解により遊離した
112 糖を還元及び全アセチル化して分析する方法などがある。前者
113 はシアル酸も分解せずに定量することができるが、メタノリシ
114 スの際に α -及び β -のアノマー構造などに由来する複数の
115 メチル配糖体が生成するのでクロマトグラムが複雑となる。

116 糖鎖の全ての遊離水酸基をメチル化後、酸加水分解し、得ら
117 れた部分O-メチル化単糖を還元及び全アセチル化しガスクロ
118 マトグラフィーで分離し定量することにより、各単糖の糖結合
119 部位推定することができ、糖鎖の構造情報を得ることができる。

120 1.4. 適否の判定基準

121 検体が規格に適合するかの評価は、通例、タンパク質当たり
122 の各単糖の含量などが規定した範囲内であることを確認するこ
123 となどにより行われる。規格を適切に設定するには、各単糖の
124 含量と有効性及び安全性との関連を考慮する必要がある。

125 1.5. 標準物質

126 標準物質として測定対象の単糖が用いられることが多い。各
127 単糖を等量ずつ又は試料中の含量と類似した割合で混合して用
128 いる。標準物質は試料と同様に処理することが望ましい。

129 1.6. システム適合性

130 システム適合性溶液は、単糖標準物質を用いて適切に調製す

131 る。単糖は類似した性質を持つため各単糖ピークを完全に分離
132 することが難しいこともある。それぞれの単糖の含量が有効性
133 及び安全性へ及ぼす影響を考慮し、適切にシステムの性能、シ
134 ステムの再現性、検出の確認などの項目を設定する。

135 2. 糖鎖プロファイル法

136 糖タンパク質から酵素的遊離法又は化学的遊離法により糖鎖
137 を遊離し、液体クロマトグラフィー (2.01)、キャピラリー電
138 気泳動、質量分析法 (2.62) 若しくはこれらの組み合わせによ
139 り分析する。結果は糖鎖の種類と分布を表す糖鎖プロファイル
140 として取得される。

141 2.1. 糖タンパク質の分離及び精製

142 必要に応じて、添加物、塩及び界面活性剤などを取り除く。
143 精製が必要な場合には、その方法を各条に規定する。

144 2.2. 糖鎖の遊離及び精製

145 糖タンパク質からのN-結合型糖鎖の遊離は、酵素消化又は
146 ヒドラジン分解により行う。O-結合型糖鎖の遊離は、アルカ
147 リによる β 脱離、ヒドラジン分解又はO-グリコナーゼ消化に
148 より行う。結合位置やその構造にかかわらずタンパク質に結合
149 した全ての糖鎖を再現良く回収できるように糖鎖の遊離条件を
150 最適化する。表1に糖鎖の酵素的遊離に一般的に用いられる試
151 薬及びその特異性について示す。遊離した糖鎖は、必要に応じ
152 て適切な方法により精製する。

表 1. 糖鎖遊離酵素の例

酵素	特異性
N-結合型糖鎖の遊離	
ペプチド-N ⁴ -(N-アセチル- β -D-グルコサミニル)-アスパ ラギンアミダーゼ(EC 3.5.1.52)	ペプチド-N ⁴ -(N-アセチル- β -D-グルコサミニル)アスパラギン残基(グルコサミン 残基はさらに糖残基が付加されている)を加水分解し、(糖残基が付加された)N-アセチル - β -D-グルコサミニルアミンとアスパラギン酸残基を含むペプチドに加水分解する。
-ペプチドN-グリコシダーゼ F (PNGase F)	N-結合型糖鎖を遊離する。ただし、(α 1,3)-結合したコアフコースを含むN-結合型糖 鎖は遊離しない。
-ペプチドN-グリコシダーゼ A (PNGase A)	N-結合型糖鎖を遊離する。(α 1,3)-結合したコアフコースを含むN-結合型糖鎖も遊離 する。
マンノシル糖タンパク質エンド- β -N-アセチルグルコサ ミニダーゼ(EC 3.2.1.96)	[Man(GlcNAc) ₂ Asn 構造を含む高マンノース型糖ペプチド/糖鎖の N,N'-ジアセチルキ トピオースの間を加水分解する。N-アセチルグルコサミン残基がタンパク質に残る。残 りの部分の糖鎖が遊離する。
-エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ F (endo F)	高マンノース型、ハイブリッド型及び複合型糖鎖を遊離する。
-エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ H (endo H)	高マンノース型及びハイブリッド型糖鎖を遊離する。
O-結合型糖鎖の遊離	
グリコペプチド α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(EC 3.2.1.97)*	セリン/スレオニン残基に α -結合したD-ガラクトース-(β 1,3)-N-アセチルガラク トサミンを遊離させる。

* 本酵素は特異性が限られているため使用は限られる。

2.2.2. 化学的遊離

2.2.2.1. ヒドラジン分解法

よく乾燥させた糖タンパク質に無水ヒドラジンを加えて加熱する。ペプチド結合の切断と共に、糖鎖とペプチド間の結合も切断される。反応条件を調節することにより、N-結合型糖鎖及びO-結合型糖鎖を遊離させることができる。糖鎖中に含まれるアミノ糖やシアル酸の脱アシル化が起こるので、ヒドラジンを除去した後、アミノ基をアセチル化する。シアル酸の脱離、及び遊離したO-結合型糖鎖の還元末端からの逐次分解(ペーリング反応)が起きる可能性があることに留意する。

2.2.2.2. アルカリによるβ脱離法

糖タンパク質をアルカリ条件下加熱すると、β脱離によりO-

結合型糖鎖が遊離する。ペーリング反応を防ぐため、水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤存在下で行う。得られた糖鎖は還元末端が還元されているので、還元末端の誘導体化は利用できないことに留意する。その他の方法として、遊離と同時に1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンと反応させて誘導体化する方法もある。

2.3. 遊離糖鎖の分析

糖鎖は、直接、又は誘導体化した後分析される。表2に一般的な誘導体化剤及びその利用される分析法を示す。糖鎖の分離に用いる方法は、個々の糖鎖若しくは有効性・安全性に大きな影響を与える構造を持つ糖鎖群を分離及び検出できる必要がある。

表2 誘導体化剤と適した分析法の例

試薬名	頭文字	分析法	蛍光又はUV検出の条件
2-アミノ安息香酸	2-AA	LC, CE, MS	Ex:360 nm, Em:425 nm Ex:325 nm, Em:405 nm
2-アミノベンズアミド	2-AB	LC, MS	Ex:330 nm, Em:420 nm
2-アミノピリジン	2-AP	LC, MS	Ex:310 nm, Em:380 nm Ex:320 nm, Em:400 nm
8-アミノピレン-1,3,6-三硫酸	APTS	CE	Ex:488 nm, Em:520 nm
1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン	PMP	LC, MS	UV 245 nm

2.3.1. 液体クロマトグラフィー (2.01)

2.3.1.1. 誘導体化及び液体クロマトグラフィー/蛍光又は紫外吸収検出法

誘導体化糖鎖の液体クロマトグラフィーによるプロファイリングは最も一般的である。2-アミノベンズアミド、2-アミノ安息香酸又は2-アミノピリジンなどで誘導体化した糖鎖を、順相、逆相、イオン交換、又はこれらの混合モードのクロマトグラフィーにより分離し、蛍光光度計などを用いて検出する方法、並びに1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンで誘導体化した糖鎖を逆相クロマトグラフィーで分離し、紫外吸収検出する方法などがある。親水性相互作用クロマトグラフィーにおいては、糖鎖は親水性(糖鎖のサイズやシアル酸結合数など)に応じて分離される。逆相クロマトグラフィーでは、糖鎖は疎水性(糖鎖の種類、分岐、シアル酸結合数など)に応じて分離される。イオン交換クロマトグラフィーでは、電荷に応じて糖鎖が分離される。イオン交換と順相クロマトグラフィーの混合モ-

ドでは、糖鎖は電荷の違いだけでなく構造の違いに応じて分離される。

2.3.1.2. 高pH陰イオン交換クロマトグラフィー/パルス式電気化学検出法

遊離した糖鎖をそのまま、四級アミンを含むポリマー担体を充填したカラムなどを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離し、パルス式電気化学検出器を用いて糖鎖を検出する。本方法は、シアル酸結合数の異なる糖鎖及び異性体を分離して検出することができる。誘導体化及び精製に伴うシアル酸の脱離や糖鎖の損失のリスクがないこと、並びにシアロ糖鎖の分離がよいことから、シアロ糖鎖の試験に用いられることが多い。個々の糖鎖の検出器に対する感度が異なることから、ピーク面積比は糖鎖のモル比と対応しないことに留意する。

2.3.2. キャピラリー電気泳動

誘導体化糖鎖を、適切な緩衝液を用いてキャピラリーゾーン電気泳動により分離し、レーザー誘起蛍光光度計などにより検出する。糖鎖は、電荷、サイズ及び形状などに応じて分離され

る。一般に、電気浸透流を抑制するために、キャピラリーは内面を中性のポリマー等を用いて共有結合又は物理的吸着により修飾して用いられる。誘導体化剤の種類、並びに泳動液のpH及び成分は、良好な分離が得られるように選択する。ピークの分離能が高いこと及び一回の分析に必要な試料量が少ないことが特徴である。

2.3.3. 質量分析 (2.62)

質量分析は、誘導体化糖鎖だけでなく非誘導体化糖鎖の分析にも用いられる。得られた糖鎖の質量から単糖組成を推測することが可能である。イオン化には一般的に、ソフトイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化法及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化法が用いられる。シアル酸を含む糖鎖では、シアル酸の脱離が起こりやすいことに留意する。

2.4. ピークの帰属・同定

糖タンパク質に結合している糖鎖の同定は、試験方法の開発及び糖鎖プロファイルの評価のために重要である。通常、質量分析法を用いて決定した分子の質量、タンデム質量分析により得られたプロダクトイオンのパターン、各種のエキソグリコシダーゼ消化に対する感受性、構造が明らかな標準糖鎖とのクロマトグラム又は電気泳動図のパターンの一致、メチル化分析並びに用いた細胞種により生合成される糖鎖のパターンなどの情報を基に帰属する。表3に糖鎖の特性解析に利用されるエキソグリコシダーゼの例を示す。試験においては、標準物質より得られた糖鎖プロファイルとの比較によりピークを帰属する。

表3 糖鎖構造解析に利用されるエキソグリコシダーゼの例

試薬名	由来	基質特異性
エキソ- α -シアリダーゼ (EC 3.2.1.18)	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Newcastle disease virus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	α 2-3,6,8,9 α 2-3,6,8 α 2-3,6,8 α 2-3 α 2-3
β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)	Bovine testes <i>Streptomyces pneumoniae</i>	β 1-3,4 β 1-4
α -L-フコシダーゼ (EC 3.2.1.51)	Almond meal <i>Xanthomonas sp.</i> Bovine kidney	α 1-3 α 1-3,4 α 1-2,3,4,6
α -マンノシダーゼ (EC 3.5.1.24)	Jack Bean	α 1-2,3,6
α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22)	Green coffee beans	α 1-3,4,6
ケラタン硫酸-エンド- β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.103)	<i>Bacteroides fragilis</i>	β 1-3,4/poly LacNAc

2.5. 適否の判定基準

規格に適合するか否かの判定は、一般的に、検体に対する標準物質を用いて並行して得られた糖鎖プロファイルと比較し、ピーク位置や面積の比率等が同等であることを確認する。又は、各糖鎖の全糖鎖のピーク面積の合計に対する百分率(面積百分率法)や相対ピーク面積比が、設定された範囲内であることを確認する。規格を適切に設定するには、糖鎖構造と有効性・安全性の関連を考慮し、管理すべき糖鎖構造を明らかにすることが重要である。

2.6. 標準物質

標準物質は、システム適合性の確認、及び検体が規格を満たしているかの確認に用いられる。医薬品各条に標準物質を使用することを規定する。標準物質は糖鎖分析法への使用の妥当性が検証されていることが重要である。

2.7. システム適合性

システム適合性は、試験の目的に応じて設定する。通例、標準物質、又は、製品と同様な特性を持つ既知のよく特性解析された糖タンパク質を試料と同様に処理して得た糖鎖プロファイルに関して、特定のピークの存在、隣接するピークの分離度、検出されるべきピークの数、予め取得された参照プロファイルとの一致、などを指標とした判定基準を設定する。若しくは、糖鎖標準物質、例えば、試験される製品から予め調製され、適格性が確認された標準糖鎖やシステム適合性糖鎖マーカーなどを試料からの遊離糖鎖と同様に処理して得られた糖鎖プロファイルに関して、上記と同様の判定基準を設定する。