2.64　糖鎖試験法

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ている糖鎖には，主に，アスパラギン残基に結合するN－結合型糖鎖及びセリン又はスレオニン残基に結合するO－結合型糖鎖がある．糖鎖の構造は多様であり，同一タンパク質や同一糖鎖付加部位において均一ではないことが多い．糖タンパク質の多くは，糖鎖の違いにより生じた多様な分子種(グリコフォーム)からなる不均一な集合体である．糖鎖の中には，タンパク質の構造の安定化，プロテアーゼによる分解の防止，生物活性の調節，血中からのクリアランスや細胞への取り込み，及び免疫原性に関与するものがある．遺伝子組換え技術を利用して製造された糖タンパク質医薬品においては，使用する細胞株及び培養条件などにより糖鎖の構造と分布が変化する可能性があるため，糖タンパク質医薬品の有効性及び安全性を確保するためには，糖鎖の恒常性を確保することが重要である．糖鎖を評価する方法には，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．規格及び試験方法として設定する場合は，当該医薬品の有効性及び安全性に影響を及ぼす糖鎖の特徴を考慮して，適切に選択又は組み合わせて用いる．

1.　単糖分析

単糖分析は，糖タンパク質医薬品等に結合している糖鎖を構成している単糖の種類及び含量を調べる方法である．糖鎖を構成する単糖の種類は限られており，主に，*N*－アセチルグルコサミン及び*N*－アセチルガラクトサミンなどのアミノ糖，ガラクトース，マンノース，グルコース及びフコースなどの中性糖，並びに*N*－アセチルノイラミン酸や*N*－グリコリルノイラミン酸などのシアル酸が分析対象となる．単糖分析は，単糖の遊離，及び単糖の定量的分析からなる．添加物や塩の影響を受けやすいことから，一般に，適切な方法で，試料中の糖タンパク質を分離・精製してから行う．

1.1.　単糖の遊離

1.1.1.　中性糖及びアミノ糖

中性糖及びアミノ糖は，一般に酸加水分解により遊離する．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，及び遊離された単糖の種類により分解速度が異なることから，単糖を高収率で遊離・回収されるように酸加水分解の条件を最適化する．中性糖及びアミノ糖の標準物質は，試料と同様に処理することが望ましい．

1.1.2.　シアル酸

シアル酸は分解しやすいため，緩和な条件を用いた酸加水分解，若しくはシアリダーゼ消化により遊離させる．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．

1.2.　単糖の定量的試験

単糖の定量的試験法として，遊離した単糖をそのまま高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により分析する方法，及び誘導体化した後，蛍光検出又はUV検出法を用いた液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により分析する方法などがあり，いずれも内標準法又は絶対検量線法により各単糖の含量を求める．誘導体化には，中性糖及びアミノ糖の分析では，2－アミノ安息香酸，2－アミノピリジン，エチル－4－アミノ安息香酸，及び1－フェニル－3－メチル－5－ピラゾロンなどが用いられる．シアル酸分析では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などが用いられる．誘導体化した単糖は，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析される．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され，設定された範囲内であることを確認する．

2.　糖鎖プロファイル法

オリゴ糖分析は，糖鎖の種類及びその分布の恒常性を調べる方法である．糖タンパク質に結合した糖鎖は，酵素的又は化学的に遊離し，遊離糖鎖は，そのまま，又は感度及び分離の向上を目的として誘導体化し，液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉，キャピラリー電気泳動，及び質量分析法〈*2.62*〉又はこれらの組み合わせにより分析する．試験結果はそれぞれクロマトグラム，エレクトロフェログラム，及びマススペクトルとして取得され，これらは糖鎖の種類と分布を表す糖鎖プロファイルと呼ばれる．糖鎖の不均一性が高く十分にピークが分離しないなどの理由により，エキソグリコシダーゼ消化し，不均一性を減じて分析する場合は，有効性や安全性と糖鎖の構造との関係を考慮し，評価すべき糖鎖構造が失われないように酵素を選択する．

2.1.　糖鎖の遊離及び精製

糖タンパク質からの糖鎖の遊離には，酵素的又は化学的切断法が用いられる．N－結合型糖鎖は，ペプチド*N*－グリコシダーゼ(PNGase)消化又はヒドラジン分解などにより，また，O－結合型糖鎖は，アルカリによるβ脱離，ヒドラジン分解及びエンド型O－グリカナーゼなどにより遊離する．糖鎖の遊離は，タンパク質及び結合糖鎖の位置や種類の影響を受けることから，糖タンパク質ごとに最適化する必要がある．シアル酸の脱離，還元末端単糖の異性化や逐次分解(ピーリング反応)などのような糖鎖構造の変化が生じる可能性があることに留意する．

遊離後，反応混合物から糖鎖を回収する方法として，冷エタノールを加えてタンパク質を沈殿により除去した後，上清から回収する方法，及び糖鎖の吸着性の高い樹脂等を用いた固相抽出法などがある．糖鎖回収の再現性を調べ，糖鎖間で差がないことを確認する．

2.2.　遊離糖鎖の分析

遊離された糖鎖の誘導体化は一般に，還元末端アルデヒド基と誘導体化試薬を反応させて行う．糖鎖と誘導体化試薬が一定の割合で反応した場合，ピーク強度比よりタンパク質へ結合した各糖鎖のモル比の推定が可能である．誘導体化においては，十分な反応収率と再現性が得られること，及びシアル酸の脱離などの糖鎖構造の変化が最小限であることを確認する．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，必要に応じて過剰試薬の除去や，誘導体化糖鎖の精製を行う．このとき，糖鎖間の回収率の違いなどにより糖鎖プロファイルが変化しないことを確認する．試験方法は，有効性及び安全性に影響を与える糖鎖の構造や割合を考慮して適切に選択する．

得られた糖鎖プロファイルと，同様に分析して得られた標準物質の糖鎖プロファイルを比較したとき，有効性・安全性の観点から重要と考えられる糖鎖のピークについて，視覚的にピー

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，各糖鎖の割合を，そのピーク面積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として求め，設定された範囲内であることを確認する．

2.2.1.　液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉

2－アミノベンズアミド，2－アミノ安息香酸あるいは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，あるいはこれらの混合モードを利用するクロマトグラフィーにより分離し，蛍光光度計を用いて検出する方法などを利用できる．非誘導体化糖鎖は，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を利用して分析できる．糖鎖の特徴を考慮して適切に分析方法を選択し，試験条件を最適化する．

2.2.2.　キャピラリー電気泳動

シアル酸結合数の少ない糖鎖の分析には，分析時間を短縮するために，8－アミノピレン－1,3,6－三硫酸などの負電荷の多い誘導体化試薬が利用される．シアル酸結合数の多い糖鎖の混合物の分析には，シアル酸結合数の違いによる分離が達成されるように，2－アミノ安息香酸など電荷数の少ない誘導体化試薬が利用される．負電荷の付与及び分離の向上を目的に，ホウ酸を含む泳動液を用いてホウ酸錯体を形成させる場合もある．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などのモードにより分離した後，レーザー誘起蛍光光度計などにより検出する．一般に，電気浸透流を抑制するために，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キャピラリーの内面を修飾して用いられる．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．

2.2.3.　質量分析〈*2.62*〉

誘導体化糖鎖及び非誘導体化糖鎖を，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によりイオン化し，イオンのm/z値の違いに応じて分離し検出する．正及び負のイオン化モードのどちらを利用してもよいが，イオン化効率は糖鎖の構造により異なるので，糖鎖の特性を考慮して選択する．液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動と接続して用いた場合，糖鎖の溶出時間や移動時間に加え，質量情報を得られるので，より特異性の高い糖鎖プロファイルを得ることができる．液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動と比べて，質量分析により得られた糖鎖プロファイルの再現性は低いことや，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し，有効性及び安全性に関与する糖鎖構造の特徴を考慮したうえで選択する．

3.　糖ペプチド分析

糖ペプチド分析は，結合部位ごとの糖鎖修飾の有無，糖鎖の種類及びその分布の確認に有用な方法である．特定の部位に付加している特定の糖鎖が，活性や体内動態に大きな影響を与える場合には，本分析を行う．糖タンパク質を消化酵素等により特異的に切断し，得られたペプチド及び糖ペプチド混合物を液体クロマトグラフィーとオンラインで接続した質量分析計により分析し，糖ペプチドのマススペクトルを取得する．糖ペプチドの帰属は，タンデム質量分析又は多段階質量分析により得られたペプチドの質量やプロダクトイオンの情報を基に行う．液体クロマトグラフィーにより糖ペプチドを分取し，オフラインで糖ペプチドの質量分析を行うことや，糖ペプチドから糖鎖を遊離させ，液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動により遊離糖鎖の分析を行うこともある．

4.　糖タンパク質のグリコフォーム分析

グリコフォーム分析は，糖鎖修飾の特徴及びその恒常性を糖タンパク質として確認する方法である．有効性及び安全性に関与する糖鎖構造の違いを反映したグリコフォームプロファイルを取得することが望ましい．シアル酸結合量が有効性に影響する場合には，等電点電気泳動，キャピラリー等電点電気泳動，キャピラリーゾーン電気泳動，又は液体クロマトグラフィーなどを用いて電荷の違いによりグリコフォームを分離しプロファイルを得る．質量分析法では，質量の違いによるグリコフォームプロファイルを得ることができる．サイズ排除クロマトグラフィー，キャピラリーゲル電気泳動及びSDS－PAGEは，糖鎖修飾の有無の確認に役立つ．試料のグリコフォームプロファイルにおいて，同様に操作して得られた標準物質のプロファイルと同様の位置に同様のピークが認められることやピークの分布が設定された範囲内であることを確認する．分子量が大きい場合や，複数の糖鎖結合部位を含む場合は，十分な分離を得ることが難しいこともあるので，分離及び再現性を十分に検討する必要がある．