

1 **日本薬局方フォーラム 23(3), 328 に掲載された参考情報を次の**
2 **ように改める。**

3 **単糖分析及びオリゴ糖分析／糖鎖プロファイル** 4 **ル法**

5 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
6 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
7 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
8 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、
9 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
10 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)、
11 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
12 ル法)、3)糖ペプチドとして分析する方法(糖ペプチド分析)、
13 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)
14 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
15 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
16 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
17 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
18 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
19 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
20 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、
21 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
22 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
23 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
24 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
25 分析方法はペプチドマップ法及び質量分析法が、また、グリコ
26 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
27 質量分析法が参考になる。

28 **1. 単糖分析**

29 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
30 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
31 じて蒸発乾固、精製し、液体クロマトグラフィー (2.01)、ガ
32 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
33 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。
34 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
35 示す。

36 **1.1. 糖タンパク質の分離及び精製**

37 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
38 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
39 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
40 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
41 を各条に規定する。

42 **1.2. 単糖の遊離**

43 **1.2.1. 酸加水分解**

44 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
45 一般的な方法である。通例、2~7 mol/Lトリフルオロ酢酸に
46 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
47 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
48 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
49 に溶解し、100℃で加熱するなどの条件で加水分解を行うこと
50 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
51 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

52 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
53 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
54 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
55 酸、0.1 mol/L硫酸又は2 mol/L酢酸中に溶解し、80℃で加熱
56 するなどの条件にて酸加水分解を行い遊離する。

57 **1.2.2. 酵素消化**

58 シアル酸の遊離には、酵素消化も利用される。通常、
59 *Arthrobacter ureafaciens*や*Clostridium perfringens*由来のシ
60 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。
61 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
62 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
63 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
64 ある。

65 **1.2.3. メタノリシス**

66 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
67 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
68 と比べ、遊離した単糖が分解されにくい。

69 **1.3. 単糖の定量**

70 **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** 71 **学検出法**

72 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
73 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／
74 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
75 は12~14であり、強アルカリ条件(pH 12~13)下で水酸基が解
76 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
77 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
78 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
79 元されるときの電流を測定することにより電気化学的に活性化
80 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
81 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
82 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
83 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
84 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
85 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
86 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
87 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。

88 **1.3.2. 誘導体化及び液体クロマトグラフィー**

89 **(1) 中性糖及びアミノ糖**

90 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
91 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
92 エチル-4-アミノ安息香酸などを用いて還元的アミノ化、
93 又は3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロンにより誘導体化
94 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
95 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
96 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
97 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、
98 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
99 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
100 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
101 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
102 などで誘導体化して検出する方法もある。

103 **(2) シアル酸**

104 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、
105 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

106 ジオキシベンゼンや1,2-フェニレンジアミンにより誘導体化
107 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
108 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
109 シアル酸は、逆相液体クロマトグラフィーにより分離し、蛍光
110 光度計で検出する。

111 1.3.3. ガスクロマトグラフィー

112 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
113 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
114 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
115 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
116 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
117 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。

118 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
119 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
120 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
121 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。

122 1.4. 適否の判定基準

123 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
124 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
125 となどにより行われる。規格を適切に設定するには、糖鎖修飾
126 の特徴と有効性及び安全性との関連性を考慮する必要がある。

127 1.5. 標準物質

128 標準物質として測定対象の単糖が用いられることが多く、こ
129 の場合、各単糖を等量ずつ又は試料中の含量と類似した割合で

130 混合して用いる。

131 1.6. システム適合性

132 システム適合性試験用溶液は、単糖標準物質を用いて適切に
133 調製する。単糖は類似した性質を持つため各単糖ピークを完全
134 に分離することが難しいこともある。適切に判定基準を設定す
135 る。

136 2. 糖鎖プロファイル法

137 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
138 を遊離し、液体クロマトグラフィー (2.01)、キャピラリー電
139 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
140 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
141 として取得される。

142 2.1. 糖タンパク質の分離及び精製

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

145 2.2. 糖鎖の遊離及び精製

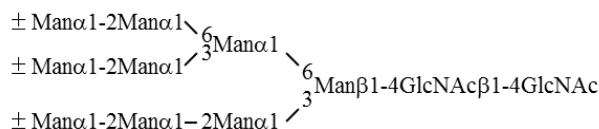
146 糖タンパク質からのN-結合型糖鎖の遊離は、酵素消化又は
147 ヒドラジン分解により行う。O-結合型糖鎖の遊離は、アルカ
148 リによる β 脱離、ヒドラジン分解又はO-グリコナーゼ消化に
149 より行う。結合位置やその構造にかかわらずタンパク質に結合
150 した全ての糖鎖を再現良く回収できるように糖鎖の遊離条件を
151 最適化する。表1に糖鎖の酵素的遊離に一般的に用いられる試
152 薬及びその特異性について示す。遊離した糖鎖は、必要に応じ
153 て適切な方法により精製する。

表1 糖鎖遊離酵素の例

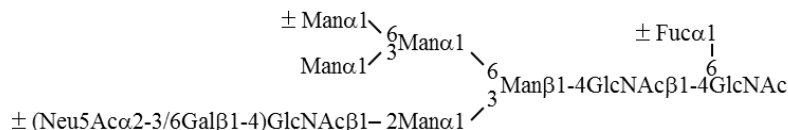
酵素	特異性
N-結合型糖鎖の遊離	
ペプチド-N ⁴ -(N-アセチル- β -D-グルコサミニル)-アスパ ラギンアミダーゼ(EC 3.5.1.52)	ペプチド-N ⁴ -(N-アセチル- β -D-グルコサミニル)アスパラギン残基(グルコサミン 残基はさらに糖残基が付加されている)を加水分解し、(糖残基が付加された)N-アセチル - β -D-グルコサミニルアミンとアスパラギン酸残基を含むペプチドに加水分解する。
・ペプチドN-グリコシダーゼ F (PNGase F)	N-結合型糖鎖を遊離する。ただし、(α 1,3)-結合したコアフコースを含むN-結合型糖 鎖は遊離しない。
・ペプチドN-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。

高マンノース型

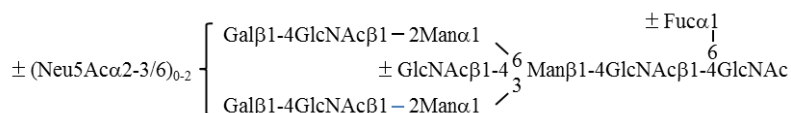


混成型

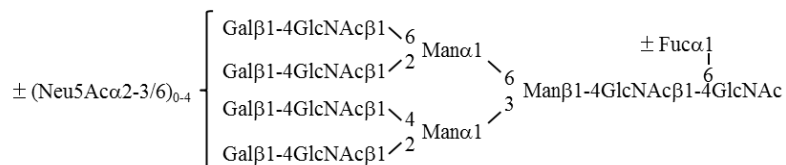


複合型

二本鎖



四本鎖



Fuc : L-フコース

GlcNAc : N-アセチル-D-グルコサミン

Gal : D-ガラクトース

LacNAc : N-アセチルラクトサミン

GalNAc : N-アセチル-D-ガラクトサミン

Man : D-マンノース

Glc : D-グルコース

Neu5Ac : N-アセチルノイラミン酸

図 一般的なN-結合型糖鎖の構造

2.2.1. 酵素的遊離

N-結合型糖鎖の遊離には、*Flavobacterium meningosepticum*由来のペプチドN-グリコシダーゼF (PNGase F)又はアーモンド由来のペプチドN-グリコシダーゼA (PNGase A)などが用いられる。これらの酵素は、糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンとアスパラギン残基の間の結合を切断し、グリコシルアミン誘導体とアスパラギン酸残基にする。グリコシルアミン誘導体は弱酸性条件下で非酵素的に加水分解され、アンモニアと遊離糖鎖に分解する。O-結合型糖鎖を遊離できる酵素として*Diplococcus pneumoniae*由来のO-グリコナーゼがあるが、この酵素の基質特異性は限られている。

2.2.1.1. PNGase F消化

PNGase Fの至適pHは7~9であり、糖タンパク質をそのまま、又は還元剤、界面活性剤及び変性剤などの存在下で反応させる。還元アルキル化した後、又は糖ペプチドにした後、消化する場合もある。ある種の昆虫細胞や植物由来の糖タンパク質はキトビオオスコアにフコースが $\alpha 1,3$ 結合した構造を含む場合があり、この構造を持つN-結合型糖鎖は本酵素では遊離さ

れない。

2.2.1.2. PNGase A消化

PNGase Aの至適pHは4~6である。本酵素は、糖タンパク質に直接作用して糖鎖を遊離させることが難しいので、糖タンパク質試料をエンドペプチダーゼなどにより糖ペプチドとした後、作用させ糖鎖を遊離させる。

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(ピーリング反応)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

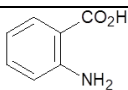
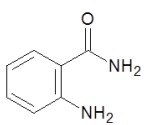
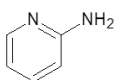
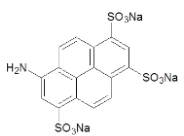
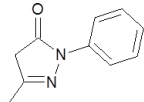
糖タンパク質をアルカリ条件下加熱すると、 β 脱離によりO-結合型糖鎖が遊離する。ピーリング反応を防ぐため、水素化

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3-メチル-1-フェニル-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-トリスルホン酸三ナトリウム塩 	APTS	CE	Ex:488 nm, Em:520 nm
3-メチル-1-フェニル-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ル法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3-メチル-1-フェニル-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ードでは、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>	α 2-3,6,8,9
	<i>Vibrio cholerae</i>	α 2-3,6,8
	<i>Clostridium perfringens</i>	α 2-3,6,8
	Newcastle disease virus	α 2-3
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	α 2-3
β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)	Bovine testes	β 1-3,4
	<i>Streptomyces pneumoniae</i>	β 1-4
α -L-フコシダーゼ (EC 3.2.1.51)	Almond meal	α 1-3
	<i>Xanthomonas sp.</i>	α 1-3,4
	Bovine kidney	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- α - β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.103)	<i>Bacteroides fragilis</i>

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。例えば、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、あらかじ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あらかじめ調製され、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。