

1 ペプチドマップ法〈G3-3-182〉

2 次のように改める。

- 3 本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。
4 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
5 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

6 1. はじめに

7 タンパク質は、大きく複雑な構造を有しており、不適切な会
8 合、分解又は翻訳後修飾により一次構造の不均一性を示す分子
9 もある。タンパク質は分子量が大きく複雑であるため、一つの
10 分析手法を用いてタンパク質のまま化学的に同定することは非
11 常に困難である。試料タンパク質を、十分な質量分解能で同定
12 可能なより小さな断片に切断し、タンパク質の一次構造を決定
13 することが可能である。この手順は、ペプチドマップ法として
14 一般に知られているタンパク質同定技術の原理である。ペプチ
15 ドマップ技術には、タンパク質中の特定のアミノ酸残基間のア
16 ミド結合を選択的に切断し、一連の予測されたペプチドを得る
17 ための酵素消化ステップを伴う。ペプチド混合物のクロマトグ
18 ラフィー分析法による分離、検出及び同定により、タンパク質
19 の一次構造に関する情報を明らかにし、タンパク質の同定が可
20 能である。ペプチドマップ法は、相対比較の手法である。つま
21 り試料タンパク質より得られた結果は、同様に処理した標準品
22 /標準物質の結果と比較して、試料タンパク質を同定する。こ
23 の比較による同定では、試料タンパク質の一次構造が同様に処
24 理した標準品/標準物質(参照タンパク質)の一次構造と一致す
25 ることを確認する。

26 本参考情報では詳細に記載していないが、ペプチドマップ法
27 は一次構造の全体的な変化を検出することが可能であり、タン

28 パク質の品質の決定のために広く応用されている。アミノ酸の
29 誤取込みやジスルフィド結合のかけ違い、翻訳後修飾及び分解
30 などの誤った配列に起因する試料タンパク質の純度は、定量的
31 なペプチドマップ法を用いて決定することができる。スケール
32 アップや製造工程変更時のペプチドマップ法による比較は、プ
33 ロセスの恒常性に関する検討を裏付けることができる。さらに、
34 ペプチドマップ法は、糖鎖付加や意図的修飾(例：PEG化)のよ
35 うな修飾の程度と特定のアミノ酸修飾部位を決定するのに用い
36 ることができる。本参考情報は、タンパク質医薬品の化学的な
37 同定におけるペプチドマップ法の使用に焦点を当てており、特
38 異性が分析法の主要な特性である。

39 2. ペプチドマップ法を用いた確認試験の開発における留意事 40 項

41 確認試験の手順を開発する前に、同一施設で製造される他の
42 タンパク質医薬品と試料タンパク質を区別するために要求され
43 る適用方法や特異性のレベルについて理解することが重要であ
44 る。例えば、構造的に関連するタンパク質試料を区別するため
45 に複数の異なる手法が必要となる。それぞれのタンパク質は固
46 有の特徴を有しているため、それをよく理解し、科学的にアプ
47 ローチすることにより、十分な特異性を有しバリデートされた
48 分析手順の開発が可能となる。分析に適した長さのペプチドを
49 得るための前処理及び切断条件を選択するためには、試料タン
50 パク質のアミノ酸配列を評価すべきである。目的によっては、
51 開発段階ではタンパク質の変化に関する予備的知識がほとんど
52 ないことから、配列カバー率を十分に確保することが重要であ
53 る。ペプチドマップ法の分析技術の開発において、次の事項を
54 考慮すべきである。また、これらの要素を図1に示す。
55

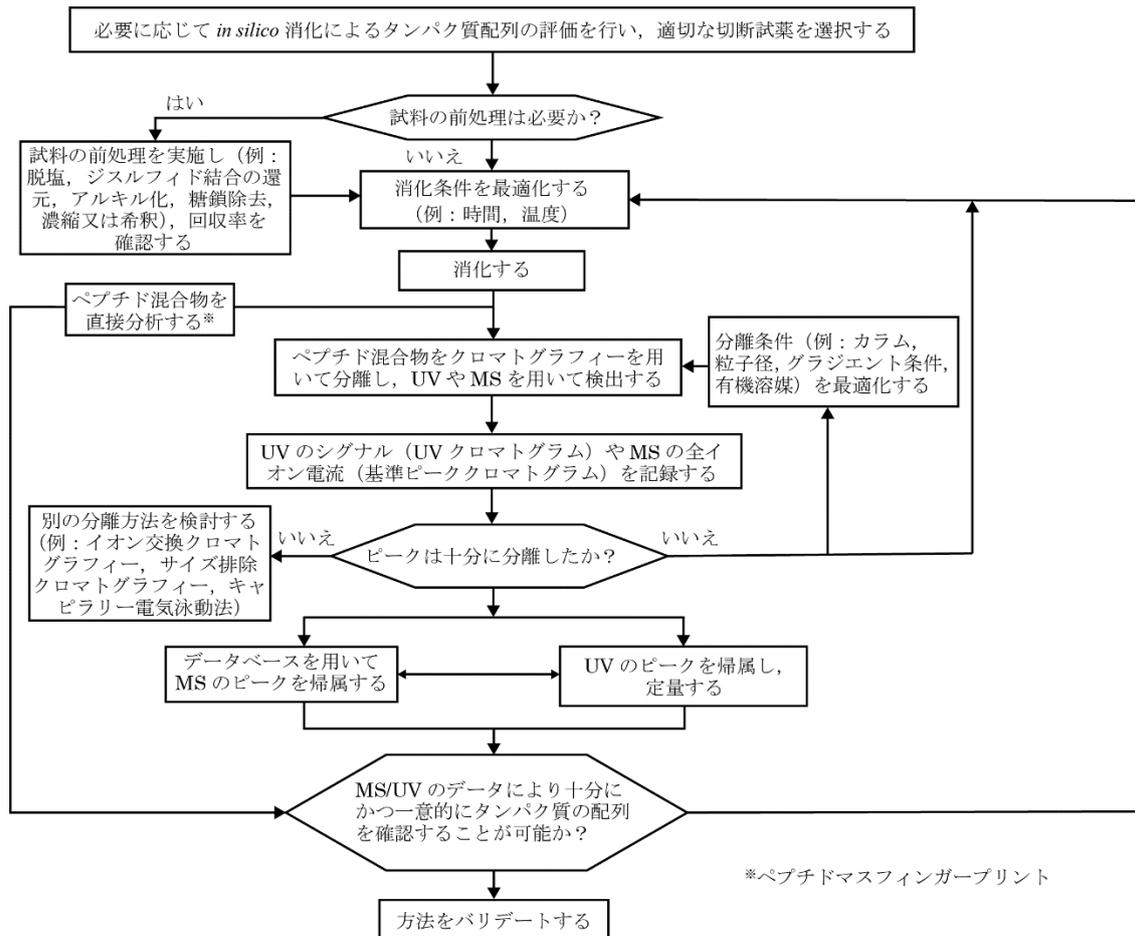


図1 ペプチドマップ法における分析手順と目標性能パラメーターの確定

56
57
58

59 3. 前処理

60 原薬、製剤又は標準品/標準物質を分析する際、分析の妨害
61 となる添加剤やキャリアタンパク質を含む場合は分離・精製が
62 必要なことがある。残存する妨害物質は、酵素的切断の効率や
63 ペプチドマップの見た目に影響を与える場合がある。残存する
64 物質や試料精製過程が最終的なペプチドマップに及ぼす影響は、
65 開発過程において評価する必要がある。

66 タンパク質の三次構造により、切断酵素が全ての切断部位に
67 完全に作用するのを妨げることににより、配列カバー率が不十分
68 となる場合がある。タンパク質のカオトロピック試薬(例: 塩
69 化グアニジニウム, 尿素)及び界面活性剤(例: ドデシル硫酸ナ
70 トリウム)による処理は消化前にタンパク質の折りたたみをほ
71 どくために使用できる。変性試薬は酵素活性に影響を及ぼし
72 ため、追加の精製(例: 透析ろ過)や希釈操作が消化前に必要
73 になる場合がある。酵素が切断部位に完全に作用できるように、
74 消化前にジスルフィド結合の還元及びアルキル化が必要なこと
75 もある。しかし、システイン-システイン結合の情報はその際
76 に失われてしまう。ジスルフィド結合の還元に一般的に使用さ
77 れる試薬には、ジチオスレイトール及びトリス(2-カルボキシ
78 エチル)ホスフィンのようなトリアルキルホスフィン化合物が
79 ある。還元されたシステインをアルキル化する試薬には、ヨー
80 ドアセトアミド、ヨード酢酸及び4-ビニルピリジンがある。
81 アルキル化試薬の使用によりペプチドの付加体が生じる可能性
82 があり、影響を受けたペプチドはクロマトグラフィーの分離に
83 影響を与え、分子量が変化する。

84 ペプチドマップ法は相対比較の手法であるため、試料タンパ
85 ク質に対して行われるいかなる精製や前処理ステップも、標準
86 品/標準物質に対しても同様に実施する必要がある。残存する
87 物質、精製手順、又はタンパク質の前処理が分析法の特異性及
88 び精度に及ぼす影響は、開発段階で精査し、分析法バリデー
89 ションにおいて実施される頑健性の検討に組み入れることを考慮
90 すべきである。

91 4. 消化

92 切断技術の選択は、タンパク質により異なる。酵素的及び化
93 学的手法において汎用される切断試薬とその特異性を表1に示
94 す。必要な場合には、他の切断試薬を使用することや方法を組
95 み合わせることもある。

表1 切断試薬の例

種類	試薬	特異性
酵素的 手法	トリプシン(EC 3.4.21.4)	アルギニン及びリシ ン残基のC末端側
	キモトリプシン (EC 3.4.21.1)	疎水性アミノ酸残基 (例: ロイシン, メチ オニン, アラニン, 芳香族アミノ酸)のC 末端側
	ペプシン A (ペプシン) (EC 3.4.23.1)	特異性の低い消化
	リシルエンドペプチダー	リシン残基のC末端側

	ゼ(Lys-Cエンドペプチダーゼ)(EC 3.4.21.50)	
	グルタミルエンドペプチダーゼ(Glu-Cエンドプロテアーゼ V8プロテアーゼ)(<i>S. aureus</i> V8株由来)(EC 3.4.21.19)	グルタミン酸及びアスパラギン酸残基のC末端側
	ペプチジル-Aspメタロエンドペプチダーゼ(Asp-N エンドプロテアーゼ)(EC 3.4.24.33)	アスパラギン酸残基のN末端側
	クロストリパイン(Arg-C エンドペプチダーゼ)(EC 3.4.22.8)	アルギニン残基のC末端側
化学的手法	臭化シアン	メチオニン残基のC末端側
	2-ニトロ-5-チオシアン安息香酸	システイン残基のN末端側
	O-ヨードソ安息香酸	トリプトファン及びチロシン残基のC末端側
	希酸	アスパラギン酸及びプロリン残基
	3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルチオ)-3H-インドル(BNPS-スカトール)	トリプトファン残基

97 タンパク質消化の効率及び再現性に影響を与える因子には、
98 pH、消化用緩衝液、温度、時間及びタンパク質に対する酵素
99 /試薬の比率などが含まれる。

100 最適な消化混合液のpHは、一般に酵素又は試薬により決定
101 される。選択されたpHでのアミノ酸の側鎖及びタンパク質の
102 修飾を含むペプチドの化学的安定性を考慮しなければならない。
103 例えば、臭化シアンを切断試薬として用いる場合は、強酸性条
104 件(例：pH 2、ギ酸)が必要である。一方、トリプシンを切断試
105 薬として用いる場合は、弱アルカリ性条件(pH 8)が適切である。
106 適切な温度は、切断試薬により異なる。例えば、ほとんどの
107 酵素は25～37℃の範囲内に最適な活性を持つ。温度は、酵素
108 の特異性のある程度決定することがある。このような場合、温
109 度を調整することによりある種のタンパク質に対する消化条件
110 を最適化することができる。理想的には、脱アミドのような試
111 料に関連する化学的副反応やタンパク質凝集を最小化し、一方
112 で、切断試薬の活性を維持しつつ試料タンパク質の消化に対す
113 る感受性を最大化するように消化温度を設定する。

114 実用的な時間内(例：2～20時間)で望ましいレベルの消化が
115 得られるように十分な切断試薬を用いるべきであるが、試薬が
116 ペプチドマップに影響を与えることを避けるため切断試薬の量
117 は最小限にする。酵素消化においては、タンパク質とプロテア
118 ーゼの質量比は20：1から200：1が一般的である。切断試薬が
119 不安定な場合、複数回に分けて切断試薬を添加することにより
120 切断効率が改善されるかもしれない。酵素は、固相支持体に結
121 合させることで、相対的に多量のプロテアーゼを用いることが
122 でき、更に、酵素の自己消化物の混入及び酵素断片のペプチド

123 マップへの影響を避けることができる。化学的切断試薬は、
124 通常、大過剰で用いられ、消化終了時に除去する必要がある。
125 消化中の試料タンパク質の最適な濃度は、経験的に決定され
126 る。タンパク質及び部分消化されたタンパク質の凝集が起こら
127 ないよう濃度は低くすべきであるが、続くクロマトグラフィー
128 分離及び選択した検出法において、十分な検出感度で検出され
129 なければならない。試料の希釈又は遠心ろ過のような技術によ
130 る試料の濃縮が必要な場合もある。試料タンパク質に行われる
131 希釈又は濃縮ステップは、タンパク質医薬品の標準品/標準物
132 質にも同様に実施しなければならない。タンパク質の回収率は
133 どのような濃縮ステップにおいても評価する必要があり、希釈又は
134 濃縮の分析法の特異性及び精度に及ぼす影響は、開発段階で精
135 査し、分析法バリデーションにおいて実施される頑健性の検討
136 に組み入れることを考慮すべきである。

137 消化ステップにおいて、非特異的切断、脱アミド化、ジスル
138 フィド結合の異性化、メチオニン残基の酸化、リシン残基のカル
139 バモイル化又はペプチドのN末端におけるグルタミンの脱ア
140 ミド化により生じたピログルタミル基の形成のような副反応の
141 結果、ペプチドマップが不明瞭になる可能性がある。自己消化
142 は、タンパク質消化酵素が酵素自体を消化することにより生じ
143 た無関係なピークをもたらす。自己消化により生じたペプチド
144 のピーク強度は、基質に対する酵素の比率及び使用した酵素の
145 修飾と品質によって異なる。自己消化を避けるため、タンパク
146 質消化酵素試液は、酵素活性を抑制するpHで調製するか、使
147 用直前に調製する。自己消化を防ぐようにプロテアーゼを改変
148 した修飾酵素が使用されることもある。酵素のリシン残基をメ
149 チル化又はアセチル化して自己消化部位の数を減少させた、市
150 販のトリプシン試薬(しばしばプロテオミクスグレードと呼ば
151 れる)も利用可能である。消化により生じたアーティファクト
152 を同定するために、試料タンパク質以外の全ての試薬を用いた
153 ブランクの消化試料を用いて空試験を行う。

154 5. 分離

155 消化ステップにより得られたペプチド混合物のクロマトグラ
156 フィー分離は、その複雑さを解明し、データの適切な解釈が有
157 意義で再現性のあるものとなるようにしなければならない。ペ
158 プチドマップの複雑さにより、最終的に、最適なクロマトグラ
159 フィー条件、カラム及び移動相の組み合わせが求められる。分
160 析法の最適化試験は、最も質が高く再現性のあるクロマトグラ
161 ムを得るために必要となる。試料タンパク質の分子量もまた、
162 マップの複雑さと最適な分離に影響を及ぼす。

163 多くの技術(例：イオン交換高速液体クロマトグラフィー
164 [HPLC]、疎水性相互作用HPLC、及びキャピラリー電気泳動)
165 はこれまでペプチドマップ分析におけるペプチド分離に用いら
166 れてきたが、本参考情報ではペプチドマップ法の分離ステップ
167 において最も一般的に用いられている方法である逆相HPLC
168 (RP-HPLC)に重点を置く。

169 クロマトグラフィーにおけるカラムは、それぞれのタンパク
170 質に応じて経験的に選択される。シリカ、ポリマー又はハイブ
171 リッド担体を基にした種々の孔径(8～100 nm)又は無細孔のカ
172 ラムは、十分な分離を与えることが示されてきた。粒子径が2
173 μm未満のカラムが利用でき、一般的に3～5 μmの粒子径のカ
174 ラムよりも分離効率がよい。一般に、オクチル又はオクタデシ
175 ルシリル基を結合させた固定相がペプチドには最適である。
176 30 nm又はそれより小さな細孔を持つオクタデシルシラン

177 (C18)がペプチドマップの分離ステップで最もよく利用される
178 結合相である。

179 ペプチドのRP-HPLC分離に最も一般的な移動相は、有機溶
180 媒としてアセトニトリルを含む水である。しかし、メタノール、
181 2-プロパノール、又は1-プロパノールなどの他の有機溶媒
182 も用いることができる。移動相にプロパノールなどの溶媒を用
183 いることは、疎水性の高いペプチドを多く含む試料の分離に有
184 用である。しかし、親水性又は短いペプチドはカラムのポイド
185 容量を示す時間に溶出する可能性があることに留意する。酸、
186 塩基、緩衝塩及びイオンペア試薬のような移動相の添加剤は、
187 一般に、ペプチドの良好なクロマトグラフィー分離のために必
188 要である。最も一般的な移動相の添加剤はトリフルオロ酢酸
189 (TFA)であり、一般的には0.05~0.2%の濃度で用いられる。添
190 加剤としてリン酸の使用はあまり一般的ではないが、UV検出
191 器を用いる場合に有用である。揮発性の酸や塩は、質量分析計
192 による検出との親和性を改善するために移動相に用いることが
193 できる。TFAはペプチドの分離の質に非常に良い影響を及ぼ
194 すが、質量分析計による検出の感度は、イオンサプレッション
195 効果により悪影響を受ける。乙酸、酢酸又はTFAとこれらの
196 組み合わせは、イオンサプレッションを抑制することにより質
197 量分析計の感度を向上することができる。クロマトグラフィー
198 カラムの温度調節は、良好な再現性を得るために必要である。
199 逆相カラムにおいて分離は一般に温度と共に上昇するため、カ
200 ラム温度は、ペプチド分離の最適化やある種のペプチドの保持
201 や溶出を改善するために用いられることがある。

202 6. 検出

203 RP-HPLCは、確認試験としてのペプチドマップ法で用いら
204 れる最も一般的な分離方法であり、最も一般的な検出方法は、
205 214 nmでの紫外(UV)光吸収である。タンパク質の消化により
206 生じたペプチドは、より高波長(例: 280 nm)の光を吸収する
207 芳香族側鎖を持つアミノ酸を含まない場合があるので、タンパ
208 ク質の配列カバー率を確保するには、移動相によるバックグラ
209 ウンドを最小化するように注意し、214 nm(ペプチド結合が吸
210 収する光の波長)での検出が不可欠である。また、その他の検
211 出方法も適切である。

212 UV検出の限界は、ペプチドの構造に関する情報が得られな
213 いことである。質量分析は、ペプチドが同時に溶出した場合の
214 選択性に加えて、ペプチドの同定に役立つ質量情報を提供する
215 有用な検出方法である。ほとんどの分析目的において、RP-
216 HPLCからの溶出液は、移動相が質量分析計に適している場合
217 には、直接質量分析計に導入することができる。移動相に特有
218 の留意事項は、選択したイオン化方法による。エレクトロスブ
219 レーイオン化法(ESI)は、タンパク質やペプチドを質量分析計
220 に導入する最も一般的な方法であり、揮発性の水溶媒混合液を
221 用いた際に最もよいイオン化効率が得られる。ESI-MSを用い
222 たペプチドマップ法では、ポジティブイオンモードが用いられ
223 ることが多い。pHを下げ、それによりペプチドのプロトン化
224 を促進する目的で、一般に乙酸や酢酸が移動相に添加される。
225 緩衝液や塩は、シグナルを減少させることに加え、不揮発性の
226 塩がイオン源に付着するため、使用は最小限にすべきである。
227 前述のように、TFAは、マトリックス干渉の一種であるイオ
228 ンサプレッションを引き起こし特にESIを用いた場合にペプチ
229 ドのシグナルを抑制する可能性があるため、避けるべきである。
230 また、イオンサプレッションは糖ペプチドのイオン化効率を抑

231 制し、感度を低下させる。したがって、UVとMSの両方にお
232 いて最適な結果を得るためには、条件を最適化することが重要
233 である。

234 7. データ解析

235 ペプチドマップ法は相対比較の手法である。試料タンパク質
236 が意図するタンパク質であるかを確認するために、試料タンパ
237 ク質のペプチドマップを標準品/標準物質を同様な前処理、分
238 離及び検出方法を用いて得られたペプチドマップと比較しなけ
239 ればならない。保持時間、ピークレスポンス(ピーク面積又は
240 ピーク高さ)、ピーク数及び全体的な溶出パターン(視覚的な
241 比較は、手順の最初のステップである。重要なピークのピーク
242 レスポンス比及びピークの保持時間について、更に客観的解析
243 を行うことが最良の方法である。もし試料タンパク質消化物及
244 び標準品/標準物質の消化物の全ての重要なピークが同じ保持
245 時間及びピークレスポンス比を示したなら、試料タンパク質の
246 同一性が確認される。例えば、モノクローナル抗体試料は、共
247 通のFcペプチドを含んでおり、ペプチドマップ試験の際には
248 参照ピークとして用いられている。参照ペプチドを試料消化物
249 に添加し、重要なピークのピークレスポンス比と保持時間をあ
250 らかじめ設定された判定基準と比較することが可能である。選
251 択される比較方法は、得られるペプチドマップの複雑さと個々
252 の確認試験の目的(例: 同一施設で製造される別のタンパク質
253 医薬品との区別や同じタンパク質医薬品の変異体との区別)に
254 において求められる特異性によって異なる。

255 高い特異性が求められる場合、質量分析を日常的な分析にお
256 いて用いることで、ペプチドの修飾、切断、切断ミス、不純物
257 及び分離されずに一つのピークとして共溶出したピークに関す
258 る知見を得ることができる。

259 8. バリデーション実施前の留意事項

260 ペプチドマップ法の手順の開発の間に、システム適合性の基
261 準及び分析法バリデーションの判定基準の選択につながる知識
262 や経験が得られる。バリデーション実施前の最終レビューによ
263 り、手順がバリデーションの準備ができていていることを確認し、
264 基準を満たさないリスクを減らすことができる。一般的な手順
265 として、ペプチドマップ法は、広範囲な試験デザイン、試験目
266 的及び性能に関する要求を含んでいる。したがって、一般的な
267 文書にて、特定のシステム適合性やバリデーション基準を規定
268 することは不可能である。バリデーション開始前に次の要素に
269 ついて評価することが推奨される。

270 ペプチドマップ法の日常的な測定における質量分析の利用は
271 本参考情報には記載していないが、ペプチドマップ法の開発段
272 階におけるペプチドの構造同定に質量分析を適用することは最
273 良の方法である。質量分析による検出は、性能に関する以下の
274 パラメーターを評価するために利用される。

275 8.1. 配列カバー率

276 配列カバー率は、目的のタンパク質配列について、ペプチド
277 マップ法を用いて同定されたアミノ酸配列の割合を指す。全て
278 の分析目的に対応する特定の数値は存在しないが、多くの場合
279 95%程度の配列カバー率がペプチドマップ法において許容で
280 ける性能の目標である。

281 8.2. 特異的な結合切断

282 選択した酵素又は化学的消化手順により切断される特異的結
283 合は、同定し、記録する。

284 8.3. 主なピーク

285 特異的な結合の切断により回収された主なペプチドは、同定
286 し、記録する。

287 8.4. 部分的切断

288 部分的又は不完全な切断を生じやすいペプチド結合及び関連
289 するクロマトグラム上のピークやシグナルは同定する必要があ
290 る。

291 8.5. マイナー／非特異的切断

292 非特異的な結合の切断の程度は同定し、制限又は管理する必
293 要がある。

294 8.6. プロテアーゼ由来のピーク

295 プロテアーゼが試料タンパク質の消化に用いられる場合は、
296 バックグラウンドに認められるプロテアーゼ由来のピークを同
297 定し、適切に制限する必要がある。

298 8.7. 未消化の「コア」タンパク質

299 未消化又は部分的に消化されたタンパク質(しばしば「コア」
300 と呼ばれる)は同定し、制限する必要がある。

301 8.8. 平均ペプチド長

302 選択したプロテアーゼ又は化学的切断試薬と試料タンパク質
303 の組み合わせにより生成する一連のペプチドを記述する。小さ
304 なペプチドと大きなペプチドはトレードオフの関係にある。小
305 さなペプチドは、ペプチドマップ法において高い構造選択性を
306 示すが、多くのピークを示す複雑なマップとなる。一方で、長
307 いペプチドは構造変異体を分離する能力は低くなるが単純なマ
308 ヱップが得られる。全ての分析目的に適切な特定のペプチド長は
309 存在しないが、一般的には平均ペプチド長は10~20残基が適
310 切と考えられる。

311 8.9. 分解能

312 分解能は、プロテアーゼ又は化学的切断試薬により生成した
313 一連のペプチドを分離するシステムの能力のことをいう。例え
314 ば、消化により30種類のペプチドを生じるが共溶出又は非回
315 収により20個のピークしか検出されないかもしれない。不十
316 分な分離を同定し、適切なクロマトグラフィー手順により解決
317 する必要がある。必要に応じて、ペプチド標準品／標準物質の
318 使用や、若しくはシステム性能の基準により管理する。

319 8.10. システム適合性の基準の選択

320 システム適合性の基準は、試料タンパク質の消化、分離及び
321 検出の手順が、分析目的に応じて求められるレベルの構造同定
322 が可能な能力を有することを確認できるように設定すべきであ
323 る。確認試験として日常的な分析で評価されるシステム適合性
324 の基準については、一般的に参照タンパク質消化物のクロマト
325 グラムの評価が実施されることに加え、次のような性能特性が
326 評価されることもある。

- 327 (1)参照クロマトグラムとの定性的な類似性
- 328 (2)消化の程度
- 329 (3)部分的な切断
- 330 (4)非特異的な切断
- 331 (5)ピーク高さ／シグナルノイズ比
- 332 (6)ピーク形状
- 333 (7)ピークの保持時間
- 334 (8)特定のピークの分解能

335 試料の分離、精製又は濃縮を必要とする試験方法の手順に対
336 しては、試料の回収率の基準を設定すべきであり、システム適
337 合性の評価の一部として設定すべきである。消化により生じ

338 たアーティファクトが認められる場合には、妨害のないことを
339 実証するためにブランク消化試料を評価することが必要となる。

340 9. バリデーション

341 ペプチドマップ法の手順のバリデーションを実施する前に、
342 試験操作手順は最終化しシステム適合性の基準と一緒に文書化
343 すべきである。試験を行うたびに、結果をシステム適合性の基
344 準で評価し、過去の試験結果と一致する再現性のある結果が得
345 られているかを判断する。最終化する前は、判定基準がシステ
346 ム適合性の基準によってしばしば変化することがある。分析バ
347 リデーションにおけるプロトコールの要素は次のとおりである。

348 9.1. 特異性

349 分析性能の要件は、確認試験の目的により異なり、リスクア
350 セスメントを行うことにより同一施設で製造されるタンパク質
351 医薬品と試料タンパク質を区別するためにどの程度の特異性が
352 必要かを理解する必要がある。ペプチドマップ法は、試料の一
353 次構造が参照タンパク質と一致することを確認する相対比較の
354 手法である。特異性は適切な標準品／標準物質と構造の類似し
355 たタンパク質試料のペプチドマップと比較することにより確認
356 される。比較試料は、同一施設で製造される他のタンパク質医
357 薬品に関するリスクアセスメントに基づき選択し、バリデーシ
358 ョンのプロトコールとして文書化するべきである。試験の本質
359 的なばらつきを最小化するために、試験時には標準品／標準物
360 質及び試料タンパク質に対して試験操作を実施する。特異性の
361 バリデーション試験として試料タンパク質消化物、標準品／標
362 準物質の消化物及び検体並びに標準品／標準物質の消化物の
363 1:1(v/v)混合液を分析することはペプチドマップ法の試験デ
364 ザインとして有用といえる。試料タンパク質のペプチドマップ
365 における試料タンパク質のピークと、標準品／標準物質の対応
366 するピークの保持時間が僅かに異なることにより、分析者がピ
367 ークは同一ではないと判断することがある。特異性のバリデー
368 ション試験において、混合物試料を試験しペプチドマップで共
369 溶出することにより二つのピークが同一であることを実証でき
370 れば、同一性を確認することができる。化学的に修飾された標
371 準品／標準物質は、pHや温度の条件や一次構造に変化を起こ
372 すことが知られる化学試薬への曝露により作成できる。これら
373 の変化として、アスパラギン及びグルタミン残基の脱アミド化、
374 メチオニン、ヒスチジン又はトリプトファン残基の酸化、並び
375 に酸触媒によるペプチド結合の切断などが挙げられる。化学的
376 に修飾された標準品／標準物質及び標準品／標準物質のペプチ
377 ドマップをあらかじめ決めておいた判定基準に基づいて比較す
378 ることにより、アミノ酸の側鎖の修飾がペプチドマップ法の特
379 異性に影響を及ぼすか否かを示すことができる。

380 9.2. 精度

381 ペプチドマップ法の手順の精度(併行精度、室内再現精度)の
382 測定を容易にするために、経験的に用いられているピークレス
383 ポンス(ピーク面積又はピーク高さ)及びピーク保持係数の数値
384 化の方法を手順に含むべきである。一つのアプローチとしては、
385 ピークレスポンス及びピーク保持時間を、同一のクロマトグラ
386 ム内の再現性の高い参照ピークとの相対値として比較すること
387 が挙げられる。分析手順のバリデーションで得られた精度の結果
388 は、報告の上、バリデーションの判定基準を満たすか確認を
389 行う。精度の結果が判定基準を満たさなかった場合、分析者は
390 手順中の消化や分離ステップの再評価を行う。

391 9.3. 頑健性

392 頑健性は分析手順の開発段階で評価する。繰り返して実施す
393 る必要はないが、バリデーション手順に組み込むこともある。
394 移動相の組成、プロテアーゼの品質又は化学試薬の純度、カラム
395 のばらつき及び劣化、消化温度並びに消化物の安定性は全体的
396 的な試験の性能と再現性に影響を及ぼしやすい。試験が日常的
397 なロットリリースの目的に使用される場合は、それぞれの重要な
398 パラメーターの許容範囲を評価し、基準値を定める。タンパク
399 質試料の精製、前処理、希釈又は濃縮手順の僅かな変動が回収
400 率や試験システム及びクロマトグラムに影響を及ぼすため、
401 その影響を試験法開発の時点で同定し管理する必要がある。試
402 料調製後に残存する物質の分析法の特異性及び精度に及ぼす影
403 響を考慮しなければならない。開発の際に特定された重要パラ
404 メーターは、分析法バリデーションにおいて実施される頑健性
405 の検討に含めるべきである。

406 多くのタンパク質の断片化方法では、タンパク質切断酵素が
407 用いられる。結果としてペプチドマップ法の操作における消化
408 手順は本質的に試験パラメーターの僅かな変動に影響を受けや
409 すい。これらのパラメーターとして、消化pH、緩衝液、緩衝
410 液濃度、イオン強度、消化温度、消化の反応速度、試料タンパ
411 ク質濃度、プロテアーゼの量、プロテアーゼの品質及び消化物
412 の安定性が挙げられる。実験計画法アプローチを用いて同定さ
413 れた重要パラメーターは、その分析におけるばらつきに及ぼす
414 影響を理解するために体系的に検討される。消化手順において、
415 僅かな変動がペプチドマップ手順の精度に影響を与えることが
416 示されたパラメーターは、これらの検討により確立されてバリ
417 デートされた操作範囲内で注意深く管理すべきである。

418 プロテアーゼの品質や化学試薬の純度を評価するため、標準
419 品/標準物質の試料を準備し、異なるロットの切断試薬で消化
420 する。それぞれの消化物に対するクロマトグラムは、ピーク面
421 積、ピーク形状及びピーク数の観点から比較する。その他の重
422 要な化学物質や、試料調製に用いられる還元剤及びS-カルボ
423 キシメチル化試薬などの前処理手順にも同様の手順を適用する
424 ことができる。

425 分離ステップに進む前に消化物を保管する時間や消化物を分
426 離前に保管する条件も評価する。単一の消化物を分注し異なる
427 保存条件で保管した後にクロマトグラフィー法で分離する。こ
428 れらのマップに有意な違いがないか評価する。

429 分離ステップにおいて、カラム間のばらつきは、単一のカラ
430 ムロット内でさえもペプチドマップ法の手順の性能に影響を与
431 える。カラムのロット差を評価するため、対象タンパク質の標
432 準品/標準物質を消化し、消化物を単一製造業者からの異なる
433 ロットのカラムを用いて分析する。得られたペプチドマップは、
434 全体的な溶出プロファイル、保持時間及び分離度の観点からあ
435 らかじめ決めておいた判定基準に従い評価する。

436 頑健性の観点からカラムの寿命を評価するため、標準品/標
437 準物質の単一の消化物を注入回数(例：カラム当たり10～
438 250注入)の異なるカラムを用い、ペプチドマップ法の手順に
439 従い分析する。得られたペプチドマップについて、ピークの広
440 がりや全体的な分離に有意な違いがないか比較する。カラムが
441 劣化するにつれて背圧が増加し、ペプチドマップに影響を与
442 える可能性がある。システム適合性や試験の妥当性の基準は、カ
443 ラムの劣化やその他のペプチドマップ試験の結果に影響を与
444 える事象の診断に用いられる。

445 10. まとめ

446 ペプチドマップ手順は、タンパク質の分離、変性、必要に応
447 じて化学的修飾(例：スルフヒドリル基のブロックリング)、タン
448 パク質消化、ペプチドの分離及び検出、並びにデータ解析を含
449 む複数のステップからなる。それぞれのステップを開発段階で
450 最適化することにより、ペプチドマップ法を用いた確認試験と
451 して適切な分析手順を開発することができる。システム適合性
452 基準は、適切な標準品/標準物質と組み合わせることにより手
453 順中の全てのステップが適切に実施され、分析手順のバリデー
454 ションと一貫性のあるペプチドマップが得られるかを評価でき
455 るように選択すべきである。ペプチドマップの分析手順が適切
456 に開発され、バリデーションされ、実施されていれば、タンパ
457 ク質医薬品の重要品質特性である試料タンパク質の確認に用い
458 ることが可能である。

459
460