

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

キャピラリー電気泳動法に関する研究
—糖タンパク質性医薬品中の糖鎖の評価—

分担研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所副所長
協力研究者 掛樋 一晃 近畿大学薬学部医薬品情報学研究室教授

研究要旨

糖タンパク質性医薬品中の糖鎖は、生産細胞や培養条件を敏感に反映してその組成が微妙に変化すると考えられるため、医薬品のレギュレーションには特に有力な手段となることが期待されるが、糖タンパク質中の糖鎖の分析は比較的煩雑である。今回、生物製品の試験に適したキャピラリー電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法や等電点電気泳動法などのいくつかの試験法が日本薬局方フォーラムに掲載された。本研究では糖タンパク質製医薬品の評価について、（１）グライコフォーム解析および（２）糖鎖分析へのキャピラリー電気泳動法の適用について検討を行った。

A. 研究目的

Jorgenson および Lukacs が 100 万段以上の驚異的な理論段数でアミノ酸混合物の分離 (Anal. Chem. 1981) に成功して以来、各国の研究者によりキャピラリー電気泳動に関する研究が精力的に行われ、キャピラリーゾーン電気泳動法、キャピラリーゲル電気泳動法、キャピラリー等電点電気泳動法あるいはミセル動電クロマトグラフ法などの多くの優れた分離モードが開発され、低分子化合物からタンパク質などの高分子成分の分析にも対応できる汎用性の高い分析法として評価されつつある。糖タンパク質性医薬品の評価については、1993 年に Watson および Yao はゾーン電気泳動

法を利用するエリスロポエチンのグライコフォーム分離について検討した結果を *Analytical Biochemistry* 誌に報告した。その分離能は従来利用されていたスラブゲル等電点電気泳動法に匹敵するかあるいは凌駕するものであった。

以上のような背景を元に、1998 年～1999 年にかけて我々はエリスロポエチンを材料として日米欧の複数の研究室と共同でエリスロポエチンのグライコフォーム分析について、キャピラリー電気泳動とスラブゲル等電点電気泳動との比較研究を行い、エリスロポエチンのモノグラフ中のスラブゲル等電点電気泳動法による試験をキャピラリー電気泳動法に代替し

うるかどうかを検討した。その結果、両法ともエリスロポエチンのグライコフォームをシアル酸残基の数に基づいて良好に分離することを示した。しかし、再現性のよい結果を得るためには試薬や泳動用緩衝液の厳密な調製が必要であったが、それでもなお分析の再現性は不十分であった(掛樋&早川ら、J. Chromatogr. 2000)。

一方、糖たんぱく質性医薬品の品質評価法として、糖鎖は培養条件などの生産環境の微妙な変化を反映するために糖タンパク質の品質評価法として重要である。特に糖鎖改変を伴う次世代糖タンパク質医薬品の品質評価には、糖鎖の分析は必須項目となることが予想され、優れた糖鎖解析法の開発が望まれている。

現在市販されている糖タンパク質性医薬品は、エリスロポエチンなどのサイトカイン類に由来する糖含量の高い糖タンパク質性医薬品と最近急速に多くの製品が市販されるようになった抗体医薬品などの比較的糖含量の低い糖たんぱく質性医薬品に大別される。エリスロポエチンなどの糖含量の高い製品の評価では、糖鎖の不均一性に基づくタンパク質の不均一性、すなわちグライコフォーム分離および構成糖鎖分析の両方を適用することができる。一方、抗体医薬品のように糖含量の低い製品の場合には糖鎖の不均一性がタンパク質の分離に及ぼす影響は小さいため、グライコフォーム分析の適用が難しく、糖鎖解析が重要な役割を果たすことになる。

今回、第14改正日本薬局方フォーラムに参考情報として「キャピラリー電気泳動法」が収載されたのを機に、糖タンパク質性医薬品へのキャピラリー電気泳動法の適用について、糖たんぱく質の不均一性の評価法についてこれまでの成果をまとめ、同時にタンパク質から切り離された糖鎖を蛍光標識化後キャピラリー電気泳動法により分析する手法について、最近の研究成果を比較する研究を実施した。

B. 研究方法

【材料】 2種類のヒトリコンビナントエリスロポエチン(rhEPO)はヨーロッパ薬局方標準品を使用した。ヒト化抗体医薬品トラスツマブ(ハーセプチン)、リツキシマブ(リツキサン)は注射用製剤を近畿大学医学部附属病院薬剤部より供与いただき、水溶液として透析後、凍結乾燥して使用した。その他の糖タンパク質(IgG、 α 1-酸性糖タンパク質)はSigma社製の試薬を使用した。

【糖たんぱく質のグライコフォーム分析】 糖たんぱく質のグライコフォームはBeckman社製P/ACE5010型装置を使用しキャピラリー電気泳動法により分析した。分離用キャピラリーとしては、フューズドシリカキャピラリーまたはDB-1キャピラリー(キャピラリーガスクロマトグラフィー用)を使用した。検出は214 nmにおける紫外吸収検出を利用した。

【ポリアクリルアミドゲル電気泳動】
ヒト化抗体のポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動は Acrylamide/Bis-acrylamide (10% T / 2.6% C)ゲルを使用し、非還元および 2-mercaptoethanol により還元後泳動し、Coomassie Brilliant Blue R250 で染色した。

【糖タンパク質糖鎖の蛍光標識】

ヒト化抗体の糖鎖は、N-glycoamidase F を使用して糖鎖を切り離した後、8-amino-pyrene-1,3,6-trisulfonate (APTS)または 3-アミノ安息香酸(3-AA)を用いて蛍光標識したのちキャピラリー電気泳動により分析した。すなわち、糖タンパク質(1 mg)を 20 mM リン酸緩衝液(pH7.0, 50 μ l)に溶かし、N-glycoamidase F (5 units, 5 μ l)を加えて、37°C で 24 時間反応した。沸騰水中で 3 分間保って酵素反応を止め、凍結乾燥した。残さに APTS (200 mM, 2 μ l/15%酢酸)または 3-AA (0.7 M, 50 μ l/酢酸-DMSO)を加え、さらに 1M シアノ水素化ホウ素ナトリウム/テトラヒドロフラン(2 μ l)を加えて混合し、55°C で 90 分間反応させた。反応混合物に水 100 μ l を加えて希釈し、Sephadex G-25 の小カラム (0.6 x 12 cm)を用いて水で溶出し、最初に溶出される蛍光性の糖鎖を含むフラクションを集めた。このフラクションを濃縮後、水(1 ml)に溶かし、一部をキャピラリー電気泳動法により分析した。

【蛍光標識糖鎖の分析】 APTS により蛍光標識された糖鎖は Beckman 社製 MDQ Glycoprotein System により分析した。分離用キャピラリーとしては、DB-1 キャピラリー(内径 50 μ m、

有効長 40 cm)を使用しアルゴンレーザー励起蛍光検出法(励起波長、488 nm;蛍光波長 520 nm)により分析した。3-AA により標識された糖鎖は、分離用キャピラリーとして同様に DB-1 キャピラリー(有効長 20 cm、内径 100 μ m)を使用し、He-Cd レーザー励起蛍光検出法(励起波長 330 nm、蛍光波長 405 nm)により分析した。

C. 結果および考察

糖タンパク質性医薬品として、糖含量の極めて高いエリスロポエチン (30 %以上)あるいは抗体医薬品のような比較的糖含量の低い (5%またはそれ以下) ものがある。シアル酸が結合した複合型糖鎖を多く含む糖含量の高い医薬品はキャピラリー電気泳動により直接グライコフォームの解析が可能である。一方、分子内にわずかに 2 箇所しか糖鎖結合部位を持たない抗体医薬品では直接グライコフォーム分析を行うことは困難な場合が多く、糖鎖の分析が特に重要である。本研究では、エリスロポエチンおよび抗体医薬品を利用してキャピラリー電気泳動によるグライコフォーム分析ならびに糖鎖解析について検討した。

エリスロポエチンのグライコフォーム分析

Yao らの方法にしたがってキャピラリー電気泳動法を利用してエリスロポエチンを分析した結果を Figure 1 に示す。

Figure 1a に示すように、エリスロ

ポエチンの7本のグリコフォームピークが明瞭にベースライン分離され高い分離能を示した。キャピラリー電気泳動装置は自動化が容易であり、分析はおよそ70分で完了するため多検体を分析する必要があるルーチン分析法として有用な手段となることが期待されるが、Yaoらの方法ではFigure 1に示すように分析の再現性に大きな問題がみられた。すなわち、Figure 1bに示すように、分析を4回繰り返すと泳動時間が著しく短くな

りピーク間の分離が劣化した。さらに分析を12回繰り返すと、グリコフォームの分離は全く観察されず、45分付近に1本のブロードなピークが観察されるのみであった。観察された分離の劣化は、キャピラリーの洗浄(アルカリ、酸、界面活性剤など)では回復しなかった。分離が回復しなかった原因はキャピラリー内壁のシラノール基が永続的に変質したためではないかと考えられる。

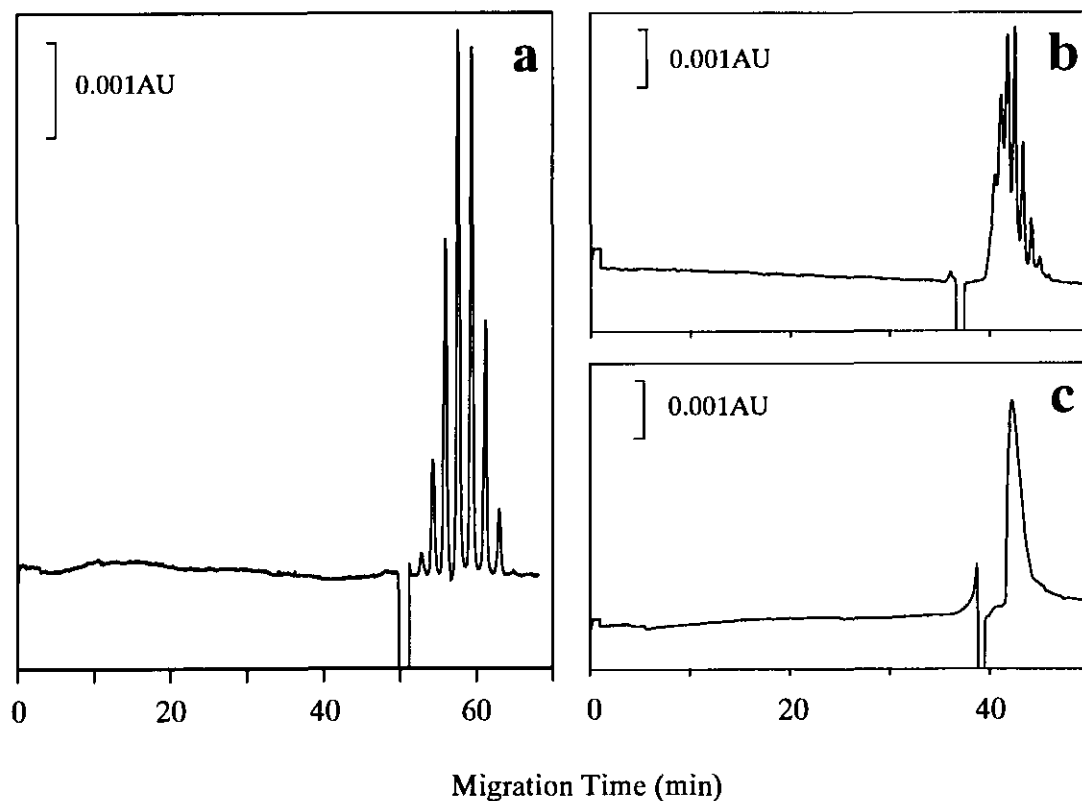


Figure 1. Repetitive analysis of rhEPO using a fused-silica capillary in a buffer containing 1,4-diaminobutane and urea. Analytical conditions: capillary, fused-silica capillary [107 cm (effective length 100 cm) x 50 μm i.d.]; running buffer, 0.01 *M* tricine-0.01 *M* NaCl-0.01 *M* sodium acetate-7 *M* urea-0.025 *mM* 1,4-diaminobutane (pH 5.5); applied potential, 15.4 kV; detection, UV absorption at 214 nm. (a) First analysis, (b) Fourth analysis, (c) twelfth analysis.

そこで、我々はより再現性の高い方法を検討し、内面修飾キャピラリーを使用する方法を案出した(Figure 2)。その結果、キャピラリーガスクロマトグラフィーに使用される DB-1 または DB-17 キャピラリー(内径 100 μm)を使用し、タンパク質の等電点とおよそ

1~1.5 異なる緩衝液(本分析では酢酸緩衝液、pH5.7) 中で分析することにより、ベースライン分離には至らなかったが、従来の方法に比べてさらに多くのグライコフォームピーク(9種類)が観察された。

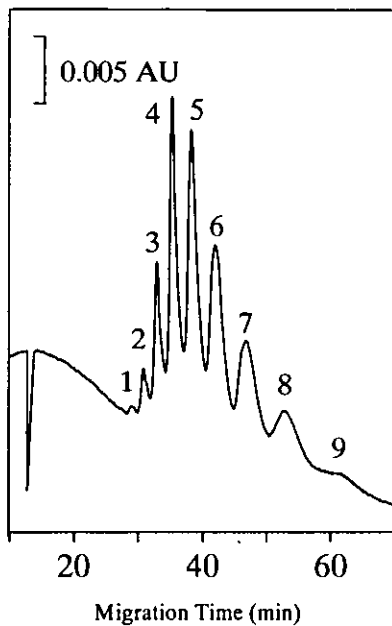


Figure 2. Analysis of rhEPO glycoforms. Analytical conditions: Capillary, DB-1 capillary [57 cm (effective length 50 cm)x100 μm i.d.]; running buffer, 10 mM acetate buffer (pH 5.7) containing 0.5% (w/v) of HPMC; applied potential, 12.5 kV; detection, UV absorption at 200 nm.

なお、この分析では緩衝液に 0.5% の濃度でヒドロキシメチルプロピルセルロースを添加しているため、電気浸透流は殆ど発生しない。したがって、この条件ではシアル酸残基の数に基づいてグライコフォームが分離され、速く泳動する分子種ほどシアル酸残

基を多く含むと考えられる。

各グライコフォームの泳動時間の再現性は Table 1 に示すように、run-to-run および day-to-day における分析で良い再現性(2%以下)を示した。

Table 1. Reproducibilities of migration times in glycoform analysis of r-HuEPO

Peak number	Migration time (min) ^a	Run to run ^b RSD (%)	Day to day ^b RSD (%)
1	28.1	1.05	1.01
2	29.9	1.19	1.12
3	31.8	1.04	1.23
4	34.0	1.21	1.29
5	36.7	1.29	1.34
6	40.0	1.67	1.64
7	44.4	1.54	1.99
8	49.8	1.57	1.95

^aAnalytical conditions; Capillary, DB-1 (50 cm, 100 μ m i.d.); buffer, 10 mM acetate buffer (pH 5.7) containing 0.5 % HPMC50; applied potential, 12.5 kV; injection, pressure method, 5 sec; detection, UV absorption at 200 nm. ^bNumber of determinations was 5. Peak 9 was not determined because the integrator did not detect the peak in every analysis.

糖タンパク質性医薬品の品質評価法として、糖タンパク質中の糖鎖の不均一性に基づくグライコフォーム分析法について、等電点電気泳動法およびキャピラリー電気泳動を比較し、等電点電気泳動法は一枚のスラブゲルで多数検体を同時に分析できる利点をもつが、一連の操作を自動化することは難しく長時間を要することを示した (掛樋&早川、 J. Chromatogr. 2000)。一方、自動化が容易なキャピラリー電気泳動法については、これまでに開発された多くのグライコフォーム分離法のうち、最も優れた分離例を示した Yao らの方法を試験したが、優れた分離を示すものの分析の再現

性に問題がみられた。そこで我々は内面修飾キャピラリーを利用する分析法を検討し、糖タンパク質の等電点からわずかに pH をずらせた緩衝液を用いることにより、ベースライン分離には至らなかったが、再現性が良くより多くのグライコフォームピークを分析できる方法を開発することができた。

抗体医薬品中の糖鎖分析

ハーセプチンのスラブゲル電気泳動

既に述べたように、抗体医薬品などの糖含量の低い糖タンパク質性医薬品では、糖鎖の不均一性に基づくグライコフォーム分析が難しい場合が多い。Figure 3 に 3 ロットのハーセプチ

ン製品(a, b および c)をポリアクリル
アミドゲル電気泳動により分析した

結果を示す。

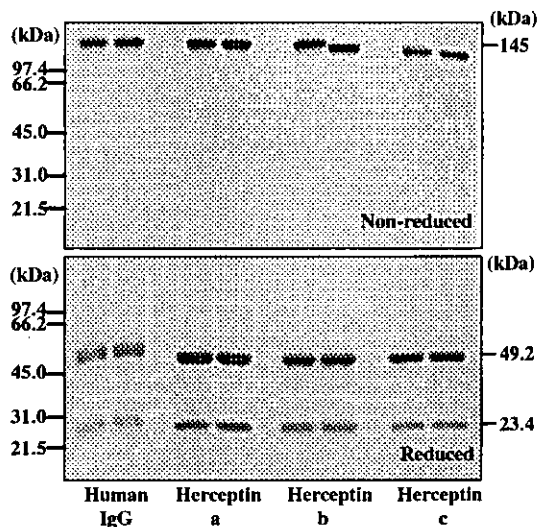


Figure 3. Analysis of Herceptin preparations by SDS acrylamide gel electrophoresis. Upper panel: non-reduced conditions. Lower panel, reduced conditions.

よく知られているように、ハーセプチンはIgG医薬品であり、軽鎖と重鎖からなるたんぱく質分子である。非還元条件では145 kDa、還元条件では49.2 kDaおよび23.4 kDaに2本のバンドが観察される。総たんぱく質に対して糖鎖が占める割合が小さいために、糖たんぱく質のスラブゲル電気泳動でしばしば観察されるいわゆるスメア状のバンドとしては観察されず、非還元条件では明瞭な1本のバンドとして観察された。また、還元条件でも糖鎖に基づくと考えら得る複数のバンドは全く観察されなかった。したがって、抗体医薬品のような糖含量の低い糖タンパク質性医薬品については糖鎖分析が重要な手段になると考えられ

る。

糖含量の低い糖タンパク質性医薬品の糖鎖分析において、キャピラリー電気泳動法を用いる場合、あらかじめ糖たんぱく質から糖鎖を切り離し、切り離された糖鎖を分析する必要がある。以下、抗体医薬品の糖鎖をキャピラリー電気泳動法により分析した結果について述べる

抗体医薬品からの糖鎖切り離し

抗体医薬品のように、アスパラギン型糖鎖を含む糖タンパク質性医薬品からの糖鎖切り離しは、無水ヒドラジンを使用する化学的な方法と、エンド型のグリコアミダーゼ類を用いる酵素法の2種類の糖鎖切り離し法を利用することができる。ルーチン分析法

として多数検体を扱わなければならない場合、化学的糖鎖切り離し法を利用するとき、かなりの量の猛毒かつ易爆発性の無水ヒドラジンを取り扱わなければならない、安全上問題が多いと考えられる。したがってルーチン分析法としてはエンド型のグライコアミダーゼを用いる方法が適切であると考えられる。

糖タンパク質から、グライコアミダーゼ類を用いて糖鎖を切り離すとき、最も大きな問題となるのは糖タンパク質からの糖鎖切り離しの定量性である。糖タンパク質から糖鎖を定量的に切り離す方法として、高単位の酵素を使用するか、あらかじめトリプシンなどのプロテアーゼ類を用いて低分子化してから酵素を使用する方法が提案されている。プロテアーゼ類により低分子化することにより、糖鎖の切り離しは定量的に行われるが、例えば高性能陰イオン交換クロマトグラフィー—パルス電気化学検出器 (HPAEC-PAD) を用いる分析などにおいて、混在するペプチド類が糖鎖の分析を著しく妨害することがある。我々は共存するペプチドを除くために、グライコアミダーゼで消化した酵素反応液をクリーンアップする方法について検討した。その結果、pH7.4でグライコアミダーゼを用いて糖鎖切り離し反応を行った後、直ちにトリニトロベンゼンスルホン酸と反応させて共存するペプチド中の遊離アミノ基を疎水性の高いトリニトロベンゼンで修飾し、活性炭を充填した小カ

ラムで前処理する方法を考案した。この前処理法により、HPAEC-PADを用いる糖鎖分析法にも対応できる効率のよい酵素反応の後処理を行うことができるようになった (掛樋ら、J. Chromatogr. 2003)。

一方、分析中の共存アミノ酸などの影響を除く方法として、糖鎖をあらかじめ蛍光標識して分析する方法がしばしば用いられる。通常、蛍光性官能基は還元末端のヘミアセタールに1残基だけ導入されるため、糖タンパク質中に存在する糖鎖間の1分子当たりの蛍光強度は等しいため、定量も容易である。

切り離された糖鎖の誘導体化

酵素反応により切り離された糖鎖は、上述のように HPAEC-PAD により直接分析することも可能であるが、通常紫外あるいは蛍光標識後、キャピラリー電気泳動あるいは HPLC により分析される。

キャピラリー電気泳動法を糖鎖分析に適用する場合、シアロ糖鎖を除いて糖鎖は電荷を持たないので、電荷をもつ蛍光性基で標識される。なお、糖鎖の HPLC でしばしば使用される 2-アミノピリジンや 2-アミノベンズアミドはキャピラリー電気泳動法でしばしば使用される中性ないし弱アルカリ性の条件下では電荷をもたず、キャピラリー電気泳動法で誘導体化された糖鎖を分離することが難しいため、糖鎖標識試薬としては必ずしも適切ではない。

以上の理由から、我々は、キャピラ

リー電気泳動用糖鎖標識試薬として
8-アミノピレン・1,3,6-トリスルホン酸
(APTS) および 3-アミノ安息香酸

(3-AA)による抗体医薬品糖鎖の標識
法について検討した (Figure 4)。

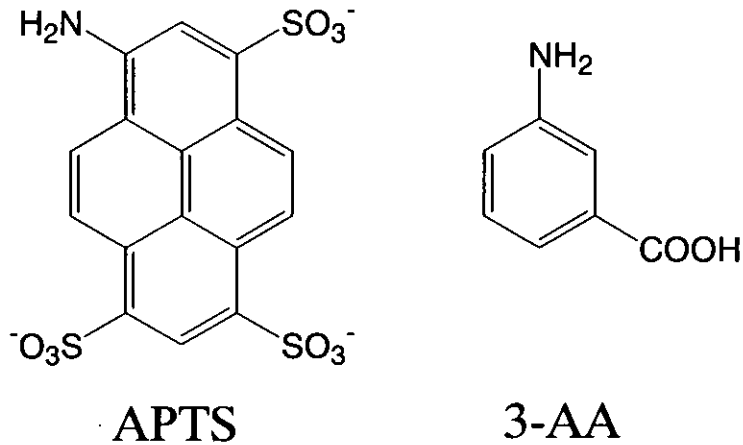


Figure 4. Fluorescent labeling reagents for carbohydrates in capillary electrophoresis.

APTS, 8-aminopyrene-1,3,6- trisulfonate; 3-AA, 3-aminobenzoic acid.

APTS 蛍光標識を利用する抗体医薬品糖鎖の分析

本研究では、N-グリコアミダーゼ F を使用して糖鎖を切り離し、切り離された糖鎖をさらにノイラミニダーゼ

により消化し、アシアロ糖鎖とした後、APTS を用いて蛍光標識した。APTS による蛍光標識は下記の反応式に従って進行する (Figure 5)。

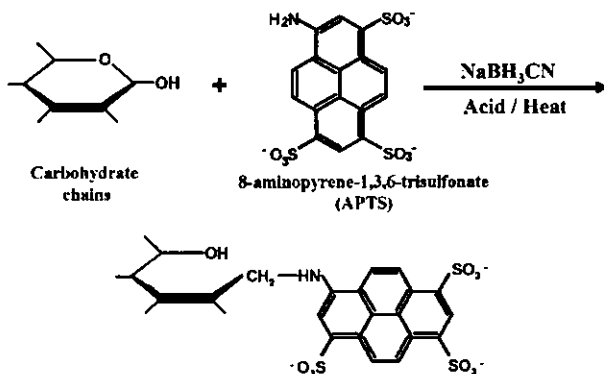


Figure 5. Fluorescent labeling of carbohydrate chains with APTS

APTS で標識された糖鎖は、アルゴン励起レーザー蛍光検出 (励起波長

488 nm : 蛍光波長 520 nm) により極めて高感度で分析することができる。さらに、APTS 分子中に存在する3個のスルホン酸残基は糖鎖の高速高分解能分離に好都合である。

Figure 6 にヒトおよびウシ IgG の糖鎖を分析した結果ならびに3種類の抗体医薬品(ハーセプチン、リツキサンおよびシナジス)中の糖鎖を分析した結果を示す。

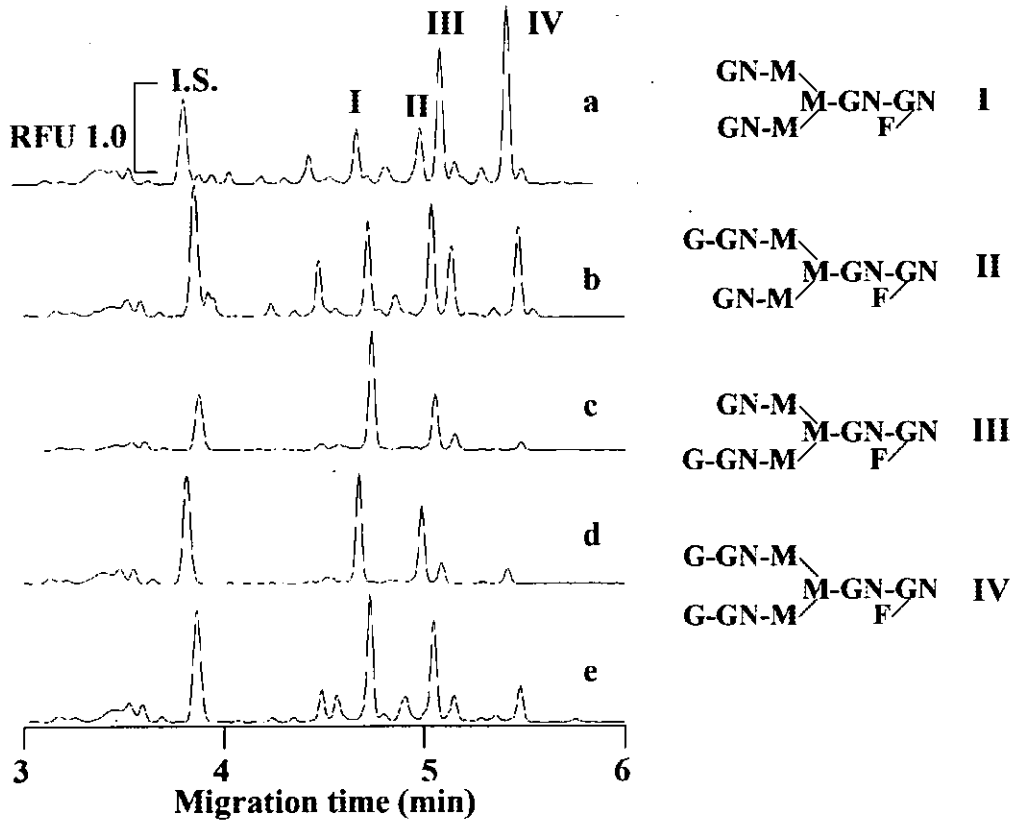


Figure 6. Analysis of APTS derivatives of carbohydrate chains derived from (a) human IgG (b) bovine IgG (c) Herceptin (d) Rituxan and (e) Sinagis. Analytical condition; apparatus, Beckman MDQ; capillary, fused silica (50 μ m i.d., effective length of 40 cm); buffer, 50 mM Phosphate (pH 2.5); applied voltage, 30 kV; temperature, 25 $^{\circ}$ C; injection, pressure (0.5 psi, 5 sec.); detection, Ar-induced fluorescent detection (Ex 488 nm, Em 520 nm).

なお、標準糖鎖との比較から同定した糖鎖の構造を図の右側に示した。ヒトおよびウシのIgGでは主要な糖鎖として、2本鎖糖鎖の還元末端にフコースが結合したいわゆるIgGに特有の4

種類の糖鎖(I~IV)が観察されたがそれらの組成比はIgGの由来により著しく異なった。一方、ハーセプチン、リツキサンおよびシナジス中の糖鎖はコア5糖の還元末端にフコースが結

合しさらに非還元末端のマンノース残基にN-アセチルグルコサミン (GlcNAc)残基が結合した糖鎖(I)が最も多く存在し、次いでIのGlcNAc残基にガラクトースが1残基結合したIIおよびIIIの糖鎖が観察された。これらの抗体医薬品のうち、ハーセプチンはヒト化モノクローナル抗体、リツキサンはマウス-ヒト化キメラ型モノクローナル抗体であるが、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞を用いて製造されているためにその糖鎖組成はヒトIgG由来の糖鎖とは顕著に異なった。

以上の結果から、基原の動物や細胞によって生合成される糖鎖が著しく異なることが判明した。このような著しい相違は、糖鎖の精密な分析を行うことができれば、抗体医薬品の有力な品質評価法となりうることを意味すると思われる。

APTS 標識糖鎖では、Figure 6 で示したように6分~7分ですべての糖鎖を高い分離能で分離することができ

たが、既に報告しているように還元的アミノ化反応は、アミノ化試薬の構造によりその反応効率が著しく異なることが知られている。従って、各成分ピークの定量における再現性も重要である。

3-AA蛍光標識を利用する抗体医薬品糖鎖の分析

N-グリコアミダーゼFを使用して糖鎖を切り離し、切り離された糖鎖をさらにノイラミニダーゼにより消化し、アシアロ糖鎖とした後、3-AAを用いて蛍光標識した。3-AAで標識された糖鎖は、He-Cdレーザー蛍光検出によりAPTS標識と同様に極めて高感度で糖鎖を分析できる。また、3-AA分子内のカルボン酸の電荷に基づいて糖鎖の分離が可能である。さらに、3-AAは糖鎖のHPLC用標識試薬としても有用である。3-AAで標識したリツキサンの糖鎖を繰り返し分析した結果をFigure 7に示す。

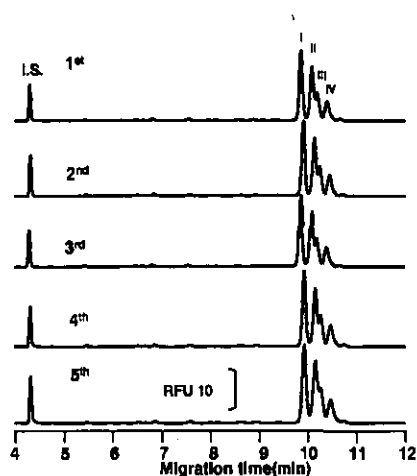


Figure 7. Repetitive analyses of carbohydrate chains derived from Rituxan after derivatization with 3-aminobenzoic acid (3-AA).

Analytical conditions: Capillary, DB-1 (effective length of 20 cm, 100 μ m i.d.); electrolyte: 100 mM Tris-Borate (pH 8.3) containing 10% polyethyleneglycol (M.W. 70000); applied voltage: 25 kV; temperature, 25 $^{\circ}$ C; injection, pressure (1 psi, 10 sec); detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex 305 nm; Em 450 nm).

3-AA は APTS に比べて電荷が著しく小さいために、分析に要する時間はおよそ 11 分を要し、糖鎖 II と III (ガラクトースの結合位置異性体) の分離は完全ではなかった。3-AA を用いて APTS 誘導体に匹敵する分離を達成するために、分離条件を種々検討した結果、トリス・ホウ酸緩衝液(pH8.3)を泳動用緩衝液中で 80 cm 長(有効長 70 cm)の DB-1 キャピラリーを使用することにより、Fig. 8 に示すような分離を達成することができた。3-AA は

APTS に比べて負電荷が小さいために電気浸透流がほとんど発生しない条件では、泳動時間はおよそ 2 時間要したが、個々の糖鎖は完全にベースライン分離し、糖鎖のサイズの小さいものから順に泳動された。また、2 本鎖糖鎖の末端の N-アセチルグルコサミンにガラクトースが 1 残基結合した 2 種類の糖鎖の異性体は、Fig. 7 では十分な分離がされなかったが、80 cm のキャピラリーを使用することにより良好に分離された。

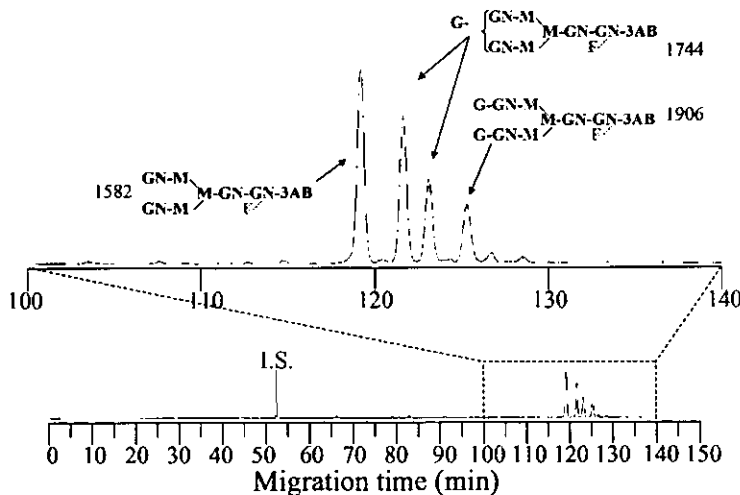


Figure 8. Analysis of carbohydrate chains of Rituxan after derivatization with 3-AA.

Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (100 cm, 100 μ m I.D.); buffer, 100 mM Tris-Borate pH 8.3 containing 10 % PEG 70000; applied voltage, 30 kV; operation temperature, 25 $^{\circ}$ C; injection, 20 s by pressure method; detection, He-Cd laser.

リツキサン中の糖鎖の繰り返し分析

リツキサンをモデルとして、APTS で標識された同一試料タンパク質中

の糖鎖を繰り返し分析した。結果を Table 2 に示す。

Table 2. Reproducibility of peak areas in the analysis of carbohydrate chains after labeling with APTS

Area/Migration time					
No.	I	II	III	IV	Sum
1	58206	50141	13219	11229	132795
2	73190	61612	16240	13038	164080
3	81098	67519	17780	14450	180847
4	92185	66261	17771	14711	190928
5	61424	50477	13003	10373	135278
Ave	73221	59202	15602	12760	160786
SD	14020	8412	2361	1922	26249
CV (%)	19.1	14.2	15.1	15.1	16.3

Table 2に示すように、面積値の再現性は14.2%~19.1%とかなり大きな値となった。ただし、各面積データの

100分比で計算することによりデータの再現性は格段に向上した (Table 3)。

Table 3. Reproducibility in the analysis of carbohydrate chains after labeling with APTS.

Area/Migration time (%)				
No.	I	II	III	IV
1	43.8	37.8	10.0	8.5
2	44.6	37.5	9.9	7.9
3	44.8	37.3	9.8	8.0
4	48.3	34.7	9.3	7.7
5	45.4	37.3	9.6	7.7
Average	45.4	36.9	9.7	8.0
SD	1.7	1.3	0.3	0.3
CV (%)	3.8	3.4	2.7	4.0

The data are expressed as the percent ratio to total peak area.

Table 3に示すように、変動係数として2.7%~4.0%となり、ほぼ満足できる結果が得られた。総ピーク面積に対する百分比で表示することにより

再現性が向上した理由として、注入量にかなりバラツキがあるためと考えられる。すなわち、本装置では注入方式として加圧法を用いているが、試料

バイアルの加圧時の気密性が一定になっていないのではないかと考えられる。

以上の結果をまとめると、APTSで標識化されたマルトテトラオースを内標準として使用した（約3.8分に観察されるピーク）場合、ピークの泳動時間については最も大きな変動係数を示したピークIの泳動時間でも1.58%となり、高い再現性が得られた。ピーク面積の再現性については、注入量のバラツキによるためか、直接ピーク面積の再現性をとると14%~19%とかなり大きな値となった。しかし、ピーク総面積に対する比をとることによって再現性は著しく向上し、変動係数として2.7%~4.0%となり、ほぼ満足できる結果が得られた。

なお、糖鎖のAPTS誘導体は標識後高度に精製しておけば、冷凍保存により比較的安定である。しかし、標識反応液をそのまま冷凍保管するなどの処置では糖鎖は比較的不安定であり、

取り扱いには注意を要することがわかった。また、APTSには、スルホン酸基の位置異性体が存在する。市販のAPTS試薬には、ロットあるいはメーカーにより異性体の混入するものがあり、分析結果を誤まる恐れのある場合があることにも注意すべきである。

同様に、3-AAを用いてリツキサンの糖鎖を誘導体化した場合の繰り返し分析の結果についても検討した。APTS標識の場合にはバラツキは14.2%~19.1%となったが、3-AAの場合には7.0%~10.8%となり、APTSよりもやや改善されたがやはり満足できる再現性を得られるにはいたらなかった。結果をTable 4に示す。

Table 4. Reproducibility of peak areas in the analysis of carbohydrate chains of Rituxan after derivatization with 3-AA.

Area/Migration time					
No.	I	II	III	IV	Sum
1	187791	155926	38984	35212	417913
2	185295	159289	38328	34377	417289
3	195840	165532	40503	36075	437950
4	159388	133253	35234	31253	359127
5	152341	136007	34240	29411	351999
Average	176131	150001	37458	33266	396856
SD	19070	14482	2630	2820	38682
CV (%)	10.8	9.7	7.0	8.5	9.7

一方、3-AA 誘導体化糖鎖の分析においても、糖鎖の総面積に対する各糖鎖の面積比を元に再現性を求めることにより再現性は著しく向上し、変動係数は 1.4~3.0%となった(Table 5)。このように、ピーク総面積に対する比

を求めることにより再現性が向上するのは、APTS 標識化においても述べたようにサンプル導入時に加圧法で試料溶液を導入する際の気密性のバラツキではないかと考えられる。

Table 5. Reproducibility of peak areas in the analysis of carbohydrate chains of Rituxan after derivatization with 3-AA.

Area/Migration time (%)				
No.	I	II	III	IV
1	44.9	37.3	9.3	8.4
2	44.4	38.2	9.2	8.2
3	44.7	37.8	9.2	8.2
4	44.4	37.1	9.8	8.7
5	43.3	38.6	9.7	8.4
Average	44.3	37.8	9.5	8.4
SD	0.6	0.6	0.3	0.2
CV (%)	1.4	1.7	3.0	2.3

The data are expressed as the percent ratio to total peak area.

D. 結論

薬効の効果延長などを狙った糖タンパク質性医薬品の糖鎖改変を元にした次世代の糖タンパク質性医薬品の開発が行われている。さらに、抗体医薬の候補が目白押しである現況を考えると、糖タンパク質性医薬品中の糖鎖の分析は今後のレギュレーションにおいて極めて重要である。

本研究ではキャピラリー電気泳動を利用する糖タンパク質性医薬品の糖鎖分析に基づく評価法について検討した。その結果、シアル酸含量の高い糖タンパク質の場合には、糖鎖の不均一性に基づく糖タンパク質分子種

の分離手段と糖タンパク質から切り離された糖鎖の評価の2種類の方法を適用できる。一方、抗体医薬品のように比較的糖含量の低い糖タンパク質性医薬品の場合は、糖鎖の変化がタンパク質に及ぼす影響が小さいためキャピラリー電気泳動のような高分解能分離手段をもってしても糖タンパク質の直接分析では糖鎖を評価することができない。したがって、糖タンパク質から糖鎖を切り離して分析する必要がある。

糖タンパク質から切り離された糖鎖を分析する方法としては、切り離された糖鎖を蛍光標識してキャピラリ

一電気泳動により蛍光検出を利用して分析する方法が選択性が高く最も推奨できる方法であると考えられる。しかし、キャピラリー電気泳動法を用いて糖鎖の分析を行う場合、蛍光標識試薬としては電荷を持っていることが望ましく、HPLCで広く使用されている2-アミノピリジンや2-アミノベンズアミドなどは必ずしも適切ではない。そこで、本研究では糖鎖のキャピラリー電気泳動にしばしば利用されかつ高い分離例が数多く報告されているAPTSと我々が開発した3-AAについて、市販されている抗体医薬品を使用してAPTSまたは3-AAにより誘導体化された糖鎖を用いて、分離能ならびに分離の再現性について評価を行った。その結果、両標識法とも抗体医薬品中の糖鎖を分析した場合、絶対定量法ではかなり大きなバラツキが観察された。一方、ピーク面積の総和に対するパーセント比で再現性を求めると両法ともほぼ満足できる再現性が見られ、特に3-AAではどのピークにおいても変動係数は3%以下となった。3-AAは以前の我々の検討結果から、最も糖鎖に対する反応性が高くシアル酸がまったく脱離することなしにシアロ糖鎖の誘導体化が可能である。さらに、3-AAはキャピラリー電気泳動のみならず高速液体クロマトグラフィー用の糖鎖標識試薬としても優れているため、今後シアル酸を含有する糖タンパク質性糖鎖の評価法への適用が期待される。

以上、キャピラリー電気泳動法の糖

タンパク質性医薬品中の糖鎖の評価への適用について検討した。キャピラリー電気泳動法は、糖タンパク質性医薬品のグリコフォーム解析ならびに糖鎖分析の両者に対応でき、装置は自動化を前提として設計されているために、糖タンパク質性医薬品の品質評価法として有用であることが示された。

E. 研究成果

- 1) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- *Biologics 2000* Brown F, Lubiniecki A, Murano G (eds), *Dev Biol Stand.*, Basel, Karger, 109, 27-40 (2002).
- 2) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA, Takao HAYAKAWA : Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products, *Biologicals*, 30, 235-244 (2002).
- 3) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Takao HAYAKAWA: Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products,

- Biologicals*, 30, 113-123 (2002).
- 4) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Takao HAYAKAWA: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 968, 89-100 (2002).
 - 5) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITO, Takao HAYAKAWA: Analysis of glycopeptides and glycoproteins by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Methods Molecular Biology* (in press).
 - 6) Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Masaaki NAOTSUKA, Sumiaki OHBA, Akira YOKOZAWA, Tomoyo MURATA, Takao HAYAKAWA, Establishment of a Standard Assay Method for Human Thrombomodulin and Determination of the Activity of the Japanese Reference Standard, *Biologicals*, 30, 69-76 (2002).
 - 7) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Takao HAYAKAWA: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin, *J Chromatogr A*, 978, 141-152 (2002)
 - 8) Takao HAYAKAWA: Regulating biotechnology products. -Comparability of biotechnology products and cell substrates. *10th International conference of drug regulatory authorities (ICDRA)*, Hong Kong 2002, WHO, pp.65-67 (2002).
 - 9) 早川堯夫、山口照英、石井(渡部)明子、押沢 正: 核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ、*医薬品研究*、33, 275-284 (2002).
 - 10) 早川堯夫、山口照英、押沢 正: 日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 - ウイルス安全性確保の基本要件 -、*医薬品研究*、33, 210-230 (2002).
 - 11) 早川堯夫、石井(渡部)明子: 生物薬品の開発の現状とトランスレーショナルリサーチへの条件、*医学のあゆみ*、200, 539-543 (2002).
 - 12) 早川堯夫、石井(渡部)明子: 先端的生物学的開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題、*医薬品研究*、33, 693-729 (2002).
 - 13) 太田美矢子、川崎ナナ、伊藤さつき、早川堯夫: 糖鎖含有タンパク質製剤の評価試験法に関する研究 (IV) - エリスロポエチン製剤その4、*衛研報告*、120, 89-97 (2002).
 - 14) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH,

- Miyako OHTA, Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked Oligosaccharides in a Glycoprotein by Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Anal Biochem.*, **316**, 15-22 (2003).
- 15) 早川堯夫：バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開、**衛研報告**、**121** (2003).
- 16) 早川堯夫：バイオテクノロジー応用医薬品、**臨床試験**、内藤周幸編、pp.155-179 (2003)、薬事日報社、東京
- 17) 早川堯夫、永田龍二：細胞・組織加工医薬品・医療機器の品質管理、*Clinical Neuroscience* (in Japanese)、**21**(10), 1195-1197 (2003)
- 18) 川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、日向昌司、川西 徹、早川堯夫：LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析、**生物物理化学**、(印刷中)
- 19) 早川堯夫、永田龍二：バイオロジクスの品質と安全性評価、薬の安全性 (長尾 拓編)、南山堂、東京 (印刷中)
- 20) 早川堯夫、石井明子：バイオ医薬品の現状と将来、*J Integrated Med.*, **14**(2)、(印刷中)
- 21) 早川堯夫、石井明子：組換え医薬品、薬学教科書シリーズ (日本薬学会編)、東京化学同人、東京 (印刷中)
- 22) Nakajima K, Oda Y, Kinoshita M, Masuko T, Kakehi K.: Time-resolved fluorometric analysis of carbohydrates labeled with amino-aromatic compounds by reductive amination, *Analyst*, **127**(7), 972-976(2002).
- 23) Sei K, Nakano M, Kinoshita M, Masuko T, Kakehi K.: Collection of alpha1-acid glycoprotein molecular species by capillary electrophoresis and the analysis of their molecular masses and carbohydrate chains. Basic studies on the analysis of glycoprotein glycoforms, *J Chromatogr A*, **958**(1-2), 273-281 (2002).
- 24) Kawabata A, Kinoshita M, Kuroda R, Kakehi K. Capsazepine partially inhibits neurally mediated gastric mucus secretion following activation of protease-activated receptor 2, *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, **29**(4), 360-361(2002).
- 25) Kinoshita M, Shiraishi H, Muranushi C, Mitsumori N, Ando T, Oda Y, Kakehi K. Determination of molecular mass of acidic polysaccharides by capillary electrophoresis, *Biomed Chromatogr.*, **16**, 141-145(2002).
- 26) Kakehi K, Kinoshita M, Nakano M.: Analysis of glycoproteins and the oligosaccharides thereof by high-performance capillary electrophoresis-significance in regulatory studies on

- biopharmaceutical products. *Biomed Chromatogr.*, 16, 103-115(2002) (Review).
- 27) Kakehi K, Kinoshita M, Oda Y, Abdul-Rahman B.: Lectin from bulbs of *Crocus sativus* recognizing N-linked core glycan: isolation and binding studies using fluorescence polarization, *Methods Enzymol.*, 362, 512-22(2003).
- 28) Nakano M, Kakehi K, Lee YC.: Sample clean-up method for analysis of complex-type N-glycans released from glycopeptides, *J Chromatogr A.*, 1005(1-2), 13-21(2003).
- 29) Akai R, Kinoshita M, Kakehi K, Lee YC. A method for detecting O-glycanase in biological samples using a combination of MALDI-TOF mass spectrometry and time-resolved fluorimetry, *Analyst*, 28(5), 440-6 (2003).
- 30) Oda Y, Senaha T, Matsuno Y, Nakajima K, Naka R, Kinoshita M, Honda E, Furuta I, Kakehi K. A new fungal lectin recognizing alpha(1-6)-linked fucose in the N-glycan. *J Biol Chem.*, 278(34), 32439-47(2003).
- 31) Nakajima K, Oda Y, Kinoshita M, Kakehi K. Capillary affinity electrophoresis for the screening of post-translational modification of proteins with carbohydrates. *J Proteome Res.*, 2(1), 81-8(2003).
- 32) Yasueda S, Kimura M, Ohtori A, Kakehi K. Analysis of an anti-inflammatory steroidal drug, difluprednate, in aqueous humor by combination of semi-micro HPLC and column switching method, *J Pharm Biomed Anal.*, 30(6), 1735-42(2003).
- 33) 掛樋一晃、野村千枝、木下充弘、西浦早織：糖鎖を指標とする糖タンパク質性医薬品のバリデーションに関する基礎検討、*医薬品研究*、34(10), 639-648(2003).

【特許】

- オリゴ糖製造法 特願 2002-153086
 科学技術振興事業団
 掛樋一晃、白石弘之、木下充弘
 糖鎖-糖結合性タンパク質の相互作用の測定法、および当該測定方法を用いた糖鎖および糖結合性タンパク質のスクリーニング方法、当該測定法に用いる測定用試薬、ならびに測定キット
 特願 2002-305086 科学技術振興事業団
 掛樋一晃、中嶋和紀、木下充弘
 グリコシド結合含有化合物中の糖の分離方法及びそれに用いる糖分離システム、糖分離用試薬キット、並びに糖分離用標準化試料 特願
 2003-054732 科学技術振興事業団
 掛樋一晃
 物質を補足する機能を有する機能性ポリマー、当該ポリマーを含む物質捕捉用キット、及び当該ポリマーを利用した物質の回収方法 特願
 2003-122965 科学技術振興事業団

掛樋一晃、林友典、中西康晴、木下充
弘

酸性多糖の分析方法および酸性多糖
類分析用キット 特願 2003-188288

科学技術振興事業団

掛樋一晃