

- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364–377.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230–240.
- Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gáge, F.H., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10294–10299.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007a). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2, 3081–3089.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007b). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Thrasher, A.J. and Gaspar, B. (2007). Severe adverse event in clinical trial of gene therapy for X-SCID. <http://www.wasg.org/UserFiles/XSCIDstatementpdf>.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* 122, 3502–3510.
- Vallier, L., Mendjan, S., Brown, S., Chng, Z., Teo, A., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Cho, C.H., Martinez, A., Rugg-Gunn, P., et al. (2009). Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 136, 1339–1349.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.
- Xu, R.H., Sampell-Barron, T.L., Gu, F., Root, S., Peck, R.M., Pan, G., Yu, J., Antosiewicz-Bourget, J., Tian, S., Stewart, R., et al. (2008). NANOG is a direct target of TGF β /activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 3, 196–206.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281–292.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

ヒト由来フィーダー細胞の確立

Generating xeno-free human feeder cells for human ES cell culture

Keywords

多能性幹細胞
フィーダーレイヤー
線維芽細胞
ES細胞
iPS細胞

阿久津 英憲 梅澤 明弘

国立成育医療センター研究所 生殖・細胞医療研究部

Summary

Human embryonic stem cells (hESCs) culture is routinely performed using inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEF) as a feeder layer. The culture of hESCs might be limited, both technically and with respect to clinical potential, by using MEF as a feeder layer. The concern over xenogeneic contaminants from the animal samples may restrict transplantation to humans. FDA has recently approved the first clinical trial of hESCs derived oligodendrocytes for spinal cord injured patients by the Geron. To enable the use of hESCs in cell transplantation in human, it is necessary to eliminate the risk of infection transmitted by retroviruses and other animal pathogens, and immunoreactions caused by animal substances in cell cultures. In this short review, we describe the classical concept of "feeder layer" applying for the recent pluripotent stem cell research, and the methods to derive human feeder layers in eliminating xenogeneic products from the culture system.

はじめに

幹細胞を自在に扱うことが可能となることで、生命科学の基礎研究は大きく進展し、特に創薬や細胞治療など社会が身近に恩恵を受けることができる領域の研究開発が活発になってきている。特に、ヒトES細胞やiPS細胞などの多能性幹(PS)細胞研究の進展による社会貢献は大変期待されている。PS細胞を樹立し、適切に培養維持するための培養環境ではフィーダーレイヤーがPS細胞の足場と培地の"conditioning"として重要な役割を果たし、PS細胞の安定的な増殖と未分化維持に機能する。本稿では、フィーダーレイヤーとしての概念から機能について解説し、ヒトPS細胞培養に必要な性質と使用時の具体的な注意点を述べ、ヒトPS細胞研究の発展に寄与したい。

Akutsu, Hidenori / Umezawa, Akihiro

Department of Reproductive Biology, National Institute for Child Health and Development

E-mail : hakutsu@nch.go.jp

フィーダー細胞の基本

現在、ES細胞やiPS細胞の標準的な培養方法では、増殖を停止させた線維芽細胞をフィーダーレイヤーとして、幹細胞の特性を保持したまま増殖させる共培養システムが一般化している。再生医療応用に対しては、培養システムからウシ胎児血清成分などの異種由来成分を排除するゼノフリー (Xeno-Free) 条件とフィーダー細胞を使用しないフィーダーフリー条件の培養環境が求められているが、PS細胞培養の安定した培養方法として確立されてきたフィーダーレイヤーとの共培養システムを再考し、発展させていくために、本稿ではフィーダー細胞の目的意義からヒトフィーダー細胞の確立方法について述べていきたい。

フィーダー細胞の主な役割は、幹細胞の足場を提供し幹細胞の未分化性を維持したまま増殖させる培地の環境を調整することにある。このフィーダー細胞の概念は、PuckとMarcusが1950年代に初めてフィーダー細胞の有用性を報告した時と未分化性維持機能以外ほとんど変わらない。1940年代の細胞培養系におけるチャレンジの一つには、より均一な集団としての細胞群を樹立し培養維持することがあった。しかし、たった1つの細胞からサブクローン化するために細胞を増殖させていくことは不可能であり、培養液中には細胞増殖のための何らかの成分が不足しているためではないかという仮説

のもと、よく増殖している細胞の培養液上清 (“conditioned medium”) を使って培養したところ、単一細胞からの増殖が可能となり、細胞のクローン化が初めて可能となった¹⁾。細胞からの産生と代謝により細胞増殖に適した培地に調整されていく。しかし、conditioned medium だけでは増殖不可能な細胞種もあり、培養できにくい細胞が存在していたが、PuckとMarcusは細胞間相互作用の必要性もあると考え、フィーダー細胞の概念を構築し、X線照射により増殖を停止させたフィーダーレイヤーと共培養するシステムが非常に有用であることを初めて報告した²⁾。1950年代には、増殖を停止させた線維芽細胞をフィーダーレイヤーとして細胞間相互作用と培地のconditioning効果を応用し、増殖しにくい細胞を増殖維持させる共培養システムが構築された。

増殖を停止させた線維芽細胞をフィーダーレイヤーとして共培養系に使用することで、増殖、培養維持が難しい細胞も効果的に培養することが可能となってきた。フィーダーレイヤーは対象となる細胞との細胞間相互作用や適切な細胞外マトリックスを提供すること³⁾、そしてフィーダー細胞からの産生因子が直接または間接的に細胞間に作用し、培地を細胞増殖に適切なコンディションにもっていく作用も有する。

フィーダーレイヤーと幹細胞

フィーダーレイヤーは多能性幹細胞であるES細胞やiPS細胞の未分化性を保持したまま維持する現在のルーチン化した幹細胞培養系^{4) 5)}に必要であるが、ここではPS細胞に対するフィーダー細胞の機能について再確認して、ヒトPS細胞の安定的な培養維持そして基礎および応用研究の推進に貢献したい。多能性幹細胞の研究は1950年代にEC細胞が樹立され培養維持されることで本格的に始まり、後のES細胞研究へと展開していった。フィーダーレイヤーはマウスEC細胞のクローナルな増殖と未分化維持の目的で使用され、当初よりX線照射またはマイトマイシンC処理による増殖を停止させて共培養するシステムがとられた⁶⁾。EC細胞で確立されてきたフィーダーレイヤーによる培養システムによって、胚盤胞からマウスES細胞の樹立培養が初めて報告され⁷⁾、ヒトES細胞でも樹立と安定培養に貢献してきている⁸⁾。PS細胞培養に対してフィーダー細胞としての機能的役割としては、①未分化性の維持、②増殖性の担保、③分化阻止、④ゲノムの安定、が求められる。MartinとEvansによってフィーダー化したマウス線維芽細胞のSTO細胞によってマウスEC細胞がシングル細胞レベルからクローン化でき、さらに多分化能も保持していることが示された⁹⁾。Evansらは、同様にSTO細胞を用いて胚盤胞内部細

胞塊からES細胞を樹立することで⁷⁾、2007年にノーベル医学・生理学賞を受賞することになる。Puckらがフィーダー細胞の概念を構築し、有用性を示したのは共培養する細胞の増殖性を示したものであり(増殖性の担保)、70年代のEvansらによるEC細胞とES細胞を用いた研究によって未分化性の保持機能が示されてきた(未分化性の維持)。未分化性の保持と分化阻止機能とは同様な意味合いをもつが、共培養系に使用する細胞の種類によっては幹細胞を積極的に特定の分化系列へ分化誘導することが知られており、フィーダー細胞の機能として未分化性の保持と分化阻止機能は分けて捉えるべきと考える。分化誘導系へのフィーダーレイヤー応用例としては、SasaiらによるPA6間質細胞を用いたSDIA法が神経細胞分化で汎用されている⁹⁾。SDIA法によりマウスES細胞は短期間(5日以内)に高効率(90%以上)よく神経系細胞への誘導が可能である。さらに、マウスES細胞のみならずヒトES細胞に対してもドーパミン産生神経細胞や運動神経など疾患特異的な神経細胞へも高率に分化誘導可能である。フィーダーレイヤーの機能としてゲノムの安定性に作用することが予想される。ヒトケラチノサイトとフィーダーレイヤーとの共培養系による実験では、培養によるp16^{INK4}の発現を遅延させることで細胞老化(senescence)を抑制している¹⁰⁾。幹細胞に関するフィーダーレイヤーとゲノムの安定性についての直接的な報告は

ないが、ゲノムの安定性について疑わせる例として、Thomsonらがフィーダーレイヤーなしの条件で2細胞株のヒトES細胞の樹立に成功したものの、2つとも染色体異常をきたしていた¹¹⁾。

ヒトPS細胞培養でもマウスECやES細胞と同様に、フィーダーレイヤーの役割は①未分化性の維持、②増殖性の担保、③分化阻止、④ゲノムの安定が担保されることであり、このすべてが満たされることが良質なフィーダー細胞の条件である。PS細胞に対して一般的に汎用されているフィーダー細胞はマウスSTO細胞とmouse embryonic fibroblast (MEF)であるが、マウスPS細胞培養では、フィーダーレイヤーの質により培養の安定性が大きく影響されることは少ない。言い換えると、マウスES/iPS細胞はフィーダーレイヤーの質に対して許容範囲が大きいことになる。しかし、ヒトPS細胞であるES/iPS細胞培養では、フィーダーレイヤーの質に対して敏感であり、未分化-分化のバランスが破綻しやすい。フィーダー細胞の管理には慎重になるべきである。

ヒトES/iPS細胞培養時の フィーダーレイヤー調整の 注意点

今回は、一般的にも汎用され、筆者らの研究室でも使用しているMEFの取り扱いについて実際的な注意点を述べたい。MEF作製や使用のプロトコルに関しては成書に詳しいので参

考にされたい¹²⁾¹³⁾。ここでは、概略的に各ステップを再確認していきたい。まず、用いるマウス系統は、C57BL/6、129/sv、Balb/C、ICRなどで12.5~13.5日目の胚から樹立される。筆者らはICRを使用しているが、純系ラインのほうが安定して質の高いMEFが獲得できるとの報告もある¹²⁾。胚を取り出した後、四肢、頭部、腹腔内および胸腔内臓器を取り除き個体をミンチ・酵素処理するが、処理する酵素によってはフィーダー細胞内でヘテロの割合が高くなる。初代培養に使用するMEF樹立培地でのウシ胎児血清(FBS)によってもその増殖性が左右されるので、筆者らはヒトiPS細胞培養用のMEF培地作製ではFBSの製品チェックを行っている。細胞には、X線照射かマイトマイシンC処理による増殖を停止させて共培養するシステムがとられているが、我々はX線照射処置(30Gy; 1 Gy/min, 30min)を行っている。増殖停止の処置では、各自で選択している方法により細胞の分裂が確実に停止していることを確認することを勧める。たとえば、BrdUの取り込み解析により少なくとも90%以上の細胞が分裂停止状態であることが必要である。不十分な処置により、ヒトESやiPS細胞培養が不安定で実験の再現性に影響を与える場合がある。先にも述べたように、ヒトES細胞やiPS細胞培養はフィーダーレイヤーの質に影響されやすい。これらのヒトPS細胞培養では、通常より“何だか分化しやすい”と感じたら、その

チェック項目にフィーダーレイヤーの質も当然疑うべきであり、疑わしい場合そのストックは躊躇せず廃棄すべきである。新たにMEFを作製あるいは購入した場合、本格的な実験に供する前にPS細胞によるフィーダー細胞のチェックは必須である。最後に、ごくまれではあるがMEF作製時にマイコプラズマ感染をする場合もあり、特定のインキュベーターではなく複数インキュベーターにわたった培養ディッシュでマイコプラズマ感染が確認できる。

50年以上前にPuckとMarcusにより示されたフィーダーレイヤーの概念と応用方法は、ヒトPS細胞研究が盛んになっている現在においてもその根幹は何ら変わっていない。PS細胞培養での4つのフィーダーレイヤーの役割である①未分化性の維持、②増殖性の担保、③分化阻止、④ゲノムの安定、についてフィーダー細胞培養上清を用いたプロテオーム解析による未分化性維持因子の研究⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾やMEFを用いた細胞増殖性担保のメカニズム解析⁽¹⁶⁾など分子レベルで幹細胞培養システムにおけるネットワークが解明されようとしている。ヒトPS細胞研究は、その臨床あるいは創薬などの生命医学応用へと進展している。MEFと培地にウシ胎児血清代替物を用いる現在の標準化した培養方法下でのヒトES細胞では、通常ヒトには存在しない異質な糖鎖(N-グリコシルノイラミン酸; Neu5Gc)の発現が認められ、免疫原性にもなりうることから、幹細胞応用

の先を見据えた場合、Xeno-Free培養系による培養の実現が必要になる。ヒト組織由来のフィーダー細胞やフィーダー細胞を使用しない培養システム開発がますます進んでいる。フィーダー細胞から捉えるヒト幹細胞研究のアプローチは、いまだ重要な戦略であると考えられる。

ヒトES細胞培養におけるヒトフィーダーレイヤー

ThomsonらによりヒトES細胞がMEFを用いて樹立され、その後複数のラボからヒト組織由来のフィーダー細胞が検定され有用性が報告されてきた(表)⁽¹⁷⁾。ヒト組織由来のフィーダー細胞を使用または樹立する際には、少なくとも次の4点が考慮されなければ

ならない。

- ①未分化維持と増殖性のサポート：当然ながら、上記に示したフィーダー細胞としての4つの機能を性質としてもたなければならない。実験動物マウスと異なり遺伝的に均一なサンプルを獲得することは困難であり、未分化維持に関する細胞株ごとの性質チェックは必要不可欠である。
- ②均一な性質：ヒトフィーダー細胞を樹立する際に同じ遺伝情報をもつ個体から樹立組織を得られ続けることは不可能であることから、安定した幹細胞培養のためには、汎用するフィーダー細胞の質をできるだけ均一に保つ必要がある。均一な性質のフィーダー細胞を樹立する方法と検定する評価基準を確立しなければ

ヒトフィーダー由来組織	樹立培地	報告
包皮	FBS/HS	Amit et al. 03
包皮	FBS	Hovatta et al. 03
包皮	FBS	Inzunza et al. 05
包皮	FBS	Ellerstrom et al. 06
胎盤	FBS	Genbacev et al. 05
子宮内膜	FBS	Lee et al. 05
骨髄間質	FBS	Cheng et al. 03
ES細胞由来線維芽細胞	FBS	Xu et al. 04
ES細胞由来線維芽細胞	FBS	Stojkovic et al. 05
ES細胞由来線維芽細胞	HS	Wang et al. 05
胎児筋組織	HS	Richards et al. 02
胎児皮膚	HS	Richards et al. 03
卵管上皮	HS	Richards et al. 03
皮膚	HS	Richards et al. 03
筋組織	HS	Richards et al. 03

FBS：ウシ胎児血清、HS：ヒト血清 (文献17より引用改変)

表 ヒトフィーダー細胞

らない。

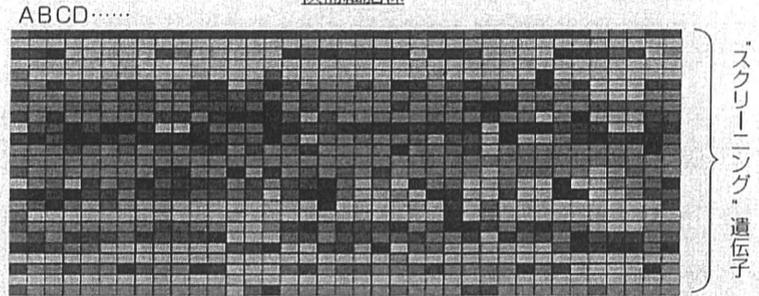
③汎用性：安定したヒトフィーダー細胞を樹立し続けるためには、そのもとなる組織が獲得しやすいものである必要がある。たとえば非常に有用なヒトフィーダー細胞が獲得されたとしてもその由来組織が通常得られにくい場合、汎用性が得られないことになる。

④Xeno-Free：ヒトフィーダー細胞を使用する大きな理由の1つに、培養系から異種由来成分を排除するXeno-Free培養系の確立にある。ウシ胎児血清成分やMEFを使用する現在の一般的な培養系で培養されたヒトES細胞では、通常ヒトには存在しないシアル酸であるNeu5Gcが細胞膜上に発現し、そのNeu5Gcはヒト体内において免疫原性をもつことが示唆された¹⁹⁾。Neu5Gcを発現した細胞を移植する際には、免疫拒絶を引き起こす可能性も示唆される。細胞膜に存在するシアル酸を的確に解析する高感度質量分析法を用いて解析すると、ウシ胎児血清中で培養されたヒト線維芽細胞ではNeu5Gcが発現しており、ヒトフィーダー細胞を樹立する段階からXeno-Freeで樹立する必要がある。

ヒトフィーダー細胞の樹立

既報のヒトES細胞に適したヒトフィーダー細胞の中で、一般に入手でき安定してヒトPS細胞が培養可能なのはヒト包皮由来の線維芽細胞株

候補細胞株



候補となる細胞株の遺伝子発現データに対して、ヒトES細胞未分化維持に関わるシグナル因子やES細胞の適切な足場となる細胞外マトリックス因子などからなる遺伝子群によりふるい分けしていく。

図 ヒトフィーダー細胞の遺伝子発現スクリーニング(→巻頭Color Gravure参照)

(Detroit 551, American Type Culture Collection, Rockville, MD)であろう。ヒトフィーダー細胞の網羅的遺伝子発現解析やプロテオミクス解析からヒトES細胞の未分化維持、増殖促進、分化抑制に寄与する遺伝子群が抽出できる。ここで注意する点は、すべての分子がヒトフィーダー細胞を規定するに値する機能を有していると断定できる段階ではないので、ファーストスクリーニング的にふるい分けする遺伝子群として用いる(図)。これらの遺伝子群は、ヒトフィーダー細胞の機能として必要とするES細胞のシグナル因子と細胞外マトリックスを含まなくてはいけない。たとえば、シグナル因子では、FGF2、TGF β /activin/nodalパスウェイ系やBMPシグナル抑制因子などであり、細胞外マトリックスに関連する因子ではFN1やHSPG2などである¹⁹⁾。ただし、FGF2の発現量は

フィーダー細胞の質に強い関連性はないと思われる。なぜならMEFやSTO細胞では、Fgf2の発現がないか、きわめて低い状態である。選抜された細胞株に対しては、フィーダーレイヤー化(増殖を停止させた状態)し、ヒト多能性幹細胞との共培養により幹細胞の特性を保持し増殖することが可能か検定する。これには、少なくとも5継代以上培養維持し、幹細胞の特性が保持されているかどうか検討をするべきである。現在では、ヒトES細胞が容易に利用できない状況であるならば、ヒトiPS細胞はその代替細胞として最も適している。やはり最も重要なのは、ヒトPS細胞との共培養による検定である。その際には、共培養のみならずヒトフィーダー細胞培養上清培地による無フィーダー培養の検定もすべきである。

フィーダー細胞の樹立、検定そして

機能解析を行うことは、フィーダー細胞のみならず幹細胞の性質について解明することに他ならず、培養の技術的な確立に加えヒト多能性幹細胞研究のアプローチに多様性をもたせる意味でも非常に重要であると考えられる。

●文献

- 1) Sanford KK, Earle WR, Likely GD : The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* **9** : 229-246, 1948
- 2) Puck TT, Marcus PI : A RAPID METHOD FOR VIABLE CELL TITRATION AND CLONE PRODUCTION WITH HELA CELLS IN TISSUE CULTURE : THE USE OF X-IRRADIATED CELLS TO SUPPLY CONDITIONING FACTORS. *Proc Nat Acad Sci U S A* **41** : 432-437, 1955
- 3) Ehmann UK, Stevenson MA, Calderwood SK, et al : Physical connection between feeder cells and recipient normal mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* **243** : 76-86, 1998
- 4) Akutsu H, Cowan CA, Melton D : Human Embryonic Stem Cells. *Methods Enzymol* **418** : 78-92, 2006
- 5) Park IH, Lerou PH, Zhao R, et al : Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **3** : 1180-1186, 2008
- 6) Martin GR, Evans MJ : Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells : Formation of embryoid bodies *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci U S A* **72** : 1441-1445, 1975
- 7) Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292** : 154-156, 1981
- 8) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282** : 1145-1147, 1998
- 9) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al : Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28** : 31-40, 2000
- 10) Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, et al : Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* **15** : 398-403, 2001
- 11) Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al : Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* **24** : 185-187, 2006
- 12) Crook JM, Horne R, Colman A : Standard Culture of Human Embryonic Stem Cells, In : *Human Embryonic Stem Cells : The Practical Handbook*; ed. Sullivan S, Cowan C & Eggen K, John Wiley & Sons, Ltd. pp53-79, 2007
- 13) Stubbán C, Wesselschmidt RL : Mouse embryonic fibroblast feeder cells. *Human Stem Cell Manual*, edited by Loring JF, Wesselschmidt RL, Schwartz PH. pp34-46, 2000
- 14) Lim JW, Bodnar A : Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* **2** : 1187-1203, 2002
- 15) Prowse AB, McQuade LR, Bryant KJ, et al : Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J Proteome Res* **6** : 3796-3807, 2007
- 16) Artero-Castro A, Callejas FB, Castellvi J, et al : Cold-inducible RNA-binding protein bypasses replicative senescence in primary cells through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation. *Mol Cell Biol* **29** : 1855-1868, 2009
- 17) Skottman H, Hovatta O : Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction* **132** : 691-698, 2006
- 18) Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al : Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* **11** : 228-232, 2005
- 19) Xu RH, Peck RM, Li DS, et al : Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* **2** : 185-190, 2005

日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験への
キャピラリー電気泳動法の適用について梶 直孝,^a 木下充弘,^a 川崎ナナ,^b 山口照英,^b 早川堯夫,^c 掛樋一晃^{*,a}Capillary Electrophoresis Analysis of Contaminants in Heparin Sodium
for the Japanese Pharmacopoeia Purity TestNaotaka KAKOI,^a Mitsuhiro KINOSHITA,^a Nana KAWASAKI,^b
Teruhide YAMAGUCHI,^b Takao HAYAKAWA,^c and Kazuaki KAKEHI^{*,a}^aDepartment of Biopharmaco Informatics, School of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan, ^bDivision on Biological Chemistry & Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan, and ^cPharmaceutical Research and Technology, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

(Received June 6, 2009; Accepted July 6, 2009; Published online July 7, 2009)

Heparin is widely used as an anticoagulant for the treatment and prevention of thrombotic disorders. Recently, hundreds of cases of anaphylactic reaction as adverse effects were reported by the presence of contaminating oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) in some heparin preparations. In addition, these heparin preparations often contaminated dermatan sulfate (DS). Unfortunately, the Japanese Pharmacopoeia (JP) does not include appropriate purity tests. In the present paper, we show that capillary electrophoresis (CE) is a powerful tool for the analysis of OSCS and DS in heparin preparations. CE method shows high resolution and good quantification of OSCS in heparin preparations. This method (OSCS method) was evaluated for accuracy (93.7%), repeatability (R.S.D.=2.11), linearity ($R^2=0.9996$), detection limit (0.1% OSCS) and specificity. In contrast, DS was not able to be detected in high sensitivity by OSCS method. However, a modified CE method (DS method) using the buffer at lower pHs showed good parameters for accuracy (88.1%), repeatability (R.S.D.=1.99), linearity ($R^2=0.9998$), detection limit (0.25% DS) and specificity. In conclusion, CE will be an alternative to the NMR method which is being adopted for purification test of heparin sodium in the present version of JP.

Key words—capillary electrophoresis; heparin sodium; oversulfated chondroitin sulfate; dermatan sulfate

緒 言

ヘパリンナトリウムは、ウロン酸 (L-イズロン酸または D-グルクロン酸) と D-グルコサミンの 2 糖単位の繰り返し構造に、2 糖あたり平均 2-3 個の硫酸基を持つ構造からなる硫酸化グリコサミノグリカンのナトリウム塩である [Fig. 1(a)]. ヘパリンナトリウムは、アンチトロンピンⅢと特異的に結合することにより、第Ⅱa 因子や第Ⅹa 因子などの血液凝固因子を阻害し血液凝固防止作用を示す。^{1,2)} そのため、血液透析などの体外循環装置使用時の血液凝固防止剤として世界中で汎用されるなど、臨床上

極めて重要な医薬品であり、第 15 改正日本薬局方に記載されている。また、低分子量ヘパリン製剤の原料としても使用されている。³⁾

2007 年 12 月米国において、Baxter 社製ヘパリンナトリウム製剤の静脈内急速大量投与を受けた患者に、血圧低下や頻脈等を伴うアレルギー反応が頻発し、80 名以上の死亡例が報告された。⁴⁾ これまでヘパリン関連製剤に関して、血小板減少症などの副作用が知られていたが、今回発生した副作用はこれまでの報告例とは明らかに異なるものであった。さらに、ドイツでも別メーカーが製造したヘパリンナトリウム製剤の投与を受けた患者に同様のアレルギー反応がみられたことから国際的な問題へと発展した。2008 年 3 月、米国食品医薬品局 (FDA) は有害事象が多発したロットにヘパリン様物質が混入してい

^a近畿大学薬学部生物情報薬学研究室, ^b国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部, ^c近畿大学薬学総合研究所
*e-mail: k_kakehi@phar.kindai.ac.jp

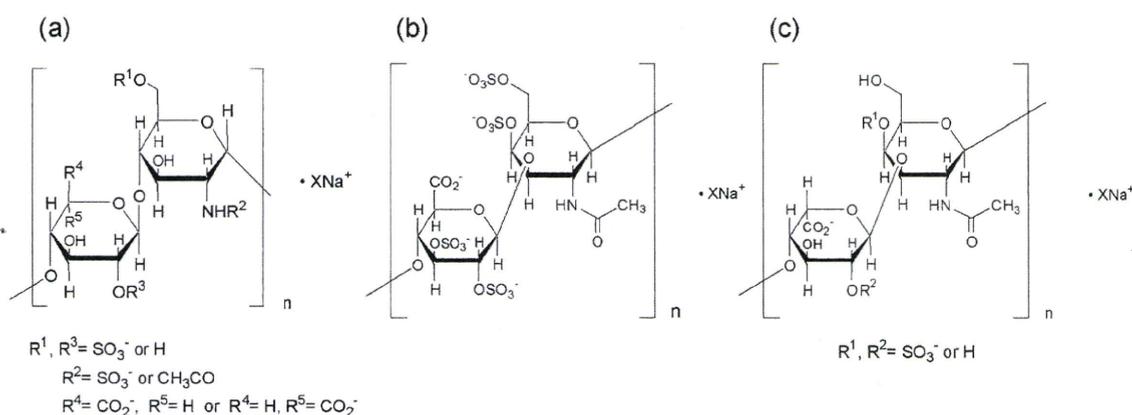


Fig. 1. Structures of the Disaccharide Unit of Glycosaminoglycans Tested in the Present Study

(a) Heparin sodium, (b) oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) and (c) dermatan sulfate (DS).

ることを発表し,⁵⁾ のちに Guerrini らによる 2 次元 NMR などを用いる構造解析によって、このヘパリン様物質は過硫酸化コンドロイチン硫酸 (oversulfated chondroitin sulfate; OSCS) であることが明らかにされた。⁶⁾ 通常、天然に存在するコンドロイチン硫酸は、D-グルクロン酸と N-アセチルガラクトサミンの 2 糖単位に、硫酸基が 1—3 個結合している。しかし、問題のヘパリンナトリウム製剤に混入していた OSCS は、コンドロイチン硫酸中のすべての水酸基が硫酸化され、2 糖単位中に硫酸基が 4 個結合した構造であった [Fig. 1(b)]。また、有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウム中には、OSCS に加えて、同じ硫酸化グリコサミノグリカン類の一種であるデルマトン硫酸 (dermatan sulfate; DS, 別名; コンドロイチン硫酸 B) [Fig. 1(c)] も、従来の製品よりも多量に含まれていることが明らかにされた。

FDA は、有害事象の原因物質として OSCS を特定したことを発表するとほぼ同時に、¹H-核磁気共鳴スペクトル測定法 (¹H-NMR) とキャピラリー電気泳動法を用いる OSCS の検出法をインターネット上に公開した。^{7,8)} ¹H-NMR は、ヘパリンナトリウム中の N-アセチルグルコサミンの N-アセチル基と、OSCS 中の N-アセチルガラクトサミンの N-アセチル基の化学シフトが異なることを利用する検出法である。また、キャピラリー電気泳動法はヘパリンナトリウムと OSCS の硫酸基の結合数の違いを利用する分離分析をもとにする検出法である。さらに、陰イオン交換カラムを用いる HPLC 法や、単糖組成分析法、Inhibition of Taq polymerase 法など

による OSCS 検出法が次々に報告された。⁹⁻¹¹⁾ 各国は、これらの検出法を用いてヘパリンナトリウム製剤の分析を行うとともに、OSCS の存在が確認されたヘパリンナトリウム製剤の回収を行う等の対応をとった。わが国でも、問題のヘパリンナトリウム製剤と同じ SPL 社の原薬を使用した国内 3 社が予防的措置として自主回収を行った。そのため、世界的にヘパリン関連医薬品の供給不足への懸念が広がり、ヘパリンナトリウム製剤の安定供給のために、ヘパリンナトリウム原料中の OSCS 及び DS の試験法の整備が緊急課題となった。

問題発生時、第 15 改正日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウムの項には、バリウムやタンパク質などに関する純度試験が規定されていたが、記載されている試験法では OSCS 混入の有無を評価することができない。そこでわが国においても FDA が公開した試験法を参考に、¹H-NMR 及びキャピラリー電気泳動法による日本薬局方への適用を目的とした分析法バリデーションが行われた。^{12,13)} その結果、官報号外第 166 号 (平成 20 年 7 月 31 日) において、「ヘパリンナトリウムに関する日本薬局方の一部改正に伴う取り扱いについて」として、¹H-NMR を用いる OSCS の限度試験が導入されることとなった。なお、今回の改正では、キャピラリー電気泳動法による試験の導入は見送られた。その理由として、FDA が公開したキャピラリー電気泳動法の条件は、ヘパリンナトリウムと OSCS のピークの分離が不十分であり、OSCS 検出の特異性や検出感度に問題があったためである。¹³⁾ しかし、キャピラリー電気泳動法はルーチン分析に適した分

析法であり、またヘパリンナトリウム中の OSCS や DS を検出できる数少ない分析法の 1 つであることなどからその価値は高く、米国薬局方ではヘパリンナトリウム確認試験に、また、欧州薬局方ではヘパリンナトリウムの製造部分の試験法に採用されている。

本研究では、ヘパリンナトリウム製剤の品質・安全性確保を目的として、キャピラリー電気泳動法による試験法を確立すると共に、分析法バリデーションを実施し、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験としての適用可能性を検証した。

実験方法

1. 試料及び試薬 ヘパリンナトリウムは日本薬局方ヘパリンナトリウム標準品を使用した。OSCS は日本薬局方過硫酸化コンドロイチン硫酸標準品を使用した。なお、分析条件の検討には、生化学用ヘパリン (Sigma 社製、ブタ腸粘膜由来) を使用した。DS (ブタ皮膚由来) は生化学工業㈱から購入した。OSCS を含有するヘパリンナトリウム製剤原料は日本バルク薬品㈱より供与を受けた。その他の試薬は特級品、あるいは HPLC グレードを使用した。本試験に用いた水は、MILLIPORE Direct-Q により調製後、直ちに使用した。

2. 試験標準溶液 ヘパリンナトリウムを水に溶解し、ヘパリンナトリウム標準溶液 (20 mg/ml) とした。また、OSCS 及び DS は水に溶解し、それぞれ OSCS 標準溶液 (4 mg/ml) 及び DS 標準溶液 (4 mg/ml) を調製した。各試験ではこれらの標準溶液を用い、分析能パラメーター評価用試験溶液の濃度に調整後試験に用いた。なお、これらの標準溶液はあらかじめポアサイズ 0.45 μm の酢酸セルロース製メンブランフィルターによりろ過した後、試験に供した。

3. 分析条件 キャピラリー電気泳動装置として Beckman P/ACE MDQ Glycoprotein System を用いた。キャピラリーカラムは 0.1 M 水酸化ナトリウムで 10 分間、続いて 10 分間水で洗浄し、3 回の空試験を行った後に試験に使用した。キャピラリーカラムは分析毎に、水で 4 分間、泳動用緩衝液で 4 分間洗浄した。

1) FDA method: キャピラリーカラムはフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences 社製、内径 50

μm , 有効長 56 cm) を用いた。電気泳動用緩衝液 [36 mM Sodium phosphate buffer (pH3.5)] は、リン酸二水素一ナトリウム一水和物 1.0 g を水 195 ml に溶解し、リン酸で pH を 3.5 に調整した後、水を加えて 200 ml とし、ポアサイズ 0.45 μm の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過後、脱気して用いた。検出は、紫外外部吸収検出 (200 nm) により行った。印加電圧は 30 kV で、試料導入側を陰極、廃液側を陽極として電気泳動した。分析温度は 25°C とした。試料は加圧法 (0.7 psi) により 30 秒間導入した。

2) OSCS method: キャピラリーカラムはフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences 社製、内径 25 μm , 有効長 20 cm) を用いた。電気泳動用緩衝液 [1000 mM Tris-phosphate buffer (pH3.5)] は、トリス 30 g を水 200 ml に溶解し、リン酸で pH を 3.5 に調整した後、水を加えて 250 ml とし、ポアサイズ 0.45 μm の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過後、脱気して用いた。検出は紫外外部吸収検出 (200 nm) により行った。電流値を 50 μA に設定し、試料導入側を陰極、廃液側を陽極として電気泳動した。分析温度は 25°C とした。試料注入は加圧法 (3.0 psi) により 30 秒間導入した。

3) DS method: キャピラリーカラムはフューズドシリカキャピラリー (GL Sciences 社製、内径 50 μm , 有効長 20 cm) を用いた。電気泳動用緩衝液 [100 mM Tris-phosphate buffer (pH2.5)] は、トリス 3.0 g を水 200 ml に溶解し、リン酸で pH を 2.5 に調整した後、水を加えて 250 ml とし、ポアサイズ 0.45 μm の酢酸セルロース製メンブランフィルターでろ過後、脱気して用いた。検出は紫外外部吸収検出 (200 nm) により行った。電流値を 80 μA に設定し、試料導入側を陰極、廃液側を陽極として電気泳動した。分析温度は 25°C とした。試料注入は加圧法 (0.7 psi) により 30 秒間導入した。

4. 分析能パラメーターの評価 キャピラリー電気泳動装置として Beckman P/ACE MDQ Glycoprotein System を用いて試験を実施し、Beckman 32 Karat Gold Software Version 7.0 を用いてピーク面積値を算出した。ピーク面積値は最小ピーク幅設定値を 2 秒とし、OSCS 及び DS のピーク開始点とピーク終了点を結ぶ傾斜線をベースラインとして検出されるピークの積算値から求めた。

4-1. OSCS ヘパリンナトリウム標準溶液 (20 mg/ml) 0.8 ml に, OSCS 標準溶液 (4 mg/ml) をそれぞれ 0.004, 0.01, 0.02, 0.04, 0.2 及び 0.4 ml を添加し, ついで水を 0.796, 0.79, 0.78, 0.76, 0.6 及び 0.4 ml 加えて混和し, ヘパリンナトリウムに対して OSCS がそれぞれ 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 及び 10.0% (w/w) 含む溶液とした. これらの溶液を分析能パラメーター評価用試験溶液とし, キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した.

真度, 併行精度及び室内再現精度は, 5.0% OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて各 6 回分析を行い, OSCS のピーク面積値を用いて算出した. 特異性は 10% OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた. 検出限界及び定量限界は 0.1–5.0% の OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を, 直線性及び範囲は 0.1–10.0% の OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた.

4-2. DS ヘパリンナトリウム標準溶液 (20 mg/ml) 0.4 ml に, DS 標準溶液 (4 mg/ml) をそれぞれ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 及び 0.2 ml を添加し, ついで水を 0.395, 0.39, 0.38, 0.35, 0.3 及び 0.2 ml 加えて混和し, ヘパリンナトリウムに対して DS がそれぞれ 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 及び 10.0% (w/w) 含む溶液とした. これらの溶液を分析能パラメーター評価用試験溶液とし, キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した.

真度, 併行精度及び室内再現精度は, 5.0% DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて各 6 回分析を行い, DS のピーク面積値を用いて算出した. 特異性は 5.0% DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた. 検出限界及び定量限界は 0.25–5.0% の DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を, 直線性及び範囲は 0.25–10.0% の DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて求めた.

結 果

1. OSCS

1-1. OSCS の分析条件 FDA がホームページ上に公開したキャピラリー電気泳動法による OSCS のスクリーニング方法 (FDA method) を参考にし, ⁸⁾ 10% (w/w) の濃度で OSCS を添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した. その結果, ヘパリ

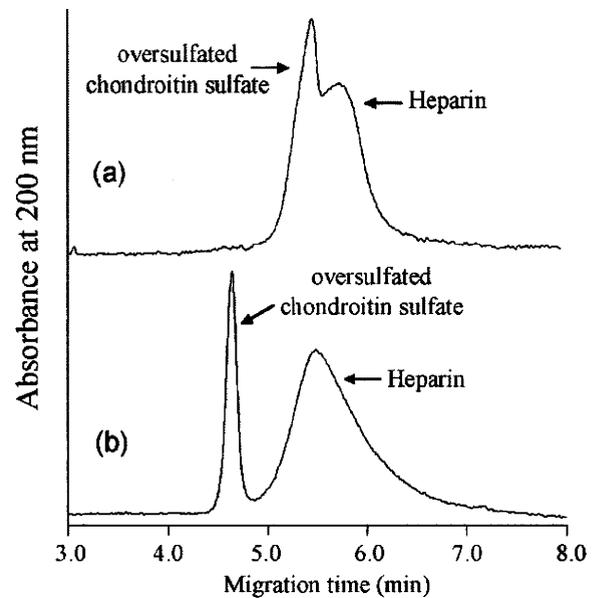


Fig. 2. Capillary Electrophoresis Analysis of 10% (w/w) OSCS Spiked Heparin
(a) FDA method and (b) OSCS method.

ンナトリウムに由来するピークは 5.8 分に泳動され, OSCS に由来するピークは 5.5 分に観察された [Fig. 2 (a)]. 両者を識別することは可能であったが, ヘパリンナトリウム由来のピークと OSCS 由来のピークの分離は不完全であり, OSCS 検出に対する特異性は低かった. したがって, FDA method を用いる試験法の分析能パラメーターは, 真度 (添加回収率) が 41% (R.S.D.=2.18%) であった. 検出限界は 1.5% であり, ¹H-NMR による OSCS 分析の分析能パラメーターと比べ低い値を示した (Table 1).^{12,13)} なお, FDA method の併行精度は 1.36% となり, 室内再現精度は 2.17% となったことから, ヘパリンナトリウムと OSCS の分離を改善できれば, 日本薬局方の純度試験として十分に採用できると考えられた. そこで, ヘパリンナトリウムと OSCS の分離の向上を目指し分析条件を検討した.

最近, Somsen らや Wielgos らは, ヘパリンナトリウムと OSCS の分離の改善例として, 高い塩濃度の泳動緩衝液を用いる方法を紹介しており, 高濃度緩衝液中では試料イオンがスタッキング効果により濃縮され, ピーク幅が縮小するためヘパリンナトリウムと OSCS の分離が向上することを報告している.^{14,15)} 一方, 緩衝液中の塩濃度が高くなると, 泳動時の電流値が高値になり分析が安定せず, 発熱

Table 1. Validation Characteristics for OSCS Analysis by Capillary Electrophoresis and ¹H-NMR

Validation characteristics	Capillary electrophoresis		¹ H-NMR*2
	OSCS method	FDA method*1	
Accuracy	93.7% (R.S.D.=3.83%)	41% (R.S.D.=2.18%)	98.3% (R.S.D.=4.63%)
Precision			
Repeatability	2.11%	1.36%	1.6%
Intermed. precision	2.45%	2.17%	—
Specificity	Fig. 2b		High
Detection limit	0.1% (w/w)	1.5% (w/w)	0.35% (w/w)
Quantification limit	0.25% (w/w)	1.5% (w/w)	0.4% (w/w)
Linearity	$y=16992x+3601.6$ ($R^2=0.9996$)	$y=36663x-367.14$ ($R^2=0.9758$)	$y=0.0909x-0.064$ ($R^2=0.9991$)
Range	0.1–10.0% (w/w)	1.5–10.0% (w/w)	0.4–10.0% (w/w)

*1 and *2, from the reports by Hashii *et al.*¹²⁾ and Kakehi *et al.*¹³⁾ respectively.

により安定した電気泳動が困難となる。これらの問題を解決するために、キャピラリーの内径を 50 μm から 25 μm に変更して電気泳動中に流れる電流量を抑制し、さらに用いる塩を比較的電気伝導度が低いトリスに変更することで電流値を抑制した。本条件では、高濃度塩、低 pH の緩衝液を使用するため、緩衝能の低下の恐れがあるが、繰り返し分析でも高い再現性を与え分析上問題はなかった (data not shown)。加えて、安定に電気泳動するために定電流モード (50 μA) で泳動することとした。また検出に関しては、ヘパリンナトリウムはアセチル基の含有率が低いため紫外外部吸収では高い感度を示さないことが知られている。しかし、200 nm の紫外外部吸収で検討したところ、ヘパリンナトリウムはオンカラム検出により特に問題はなく検出できた。さらにアセチル基を有する OSCS や DS などの不純物を高感度で検出できるため、純度試験として十分適用できる。以上のことから、本試験では 200 nm の紫外外部検出を用いることとした。

以上の検討により設定した条件 (OSCS method) を用いて、OSCS を 10% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した。その結果、ヘパリンナトリウムに由来するピークは 5.5 分に観察され、OSCS に由来するピークは 4.6 分に観察された [Fig. 2 (b)]。FDA method により測定した結果 [Fig. 2 (a)] と比較すると、ヘパリンナトリウムと OSCS の分離が格段に向上した。分離が向上した要因として、Somsen らや Wielgos らが報告した高濃度緩衝液中での試料イオンのスタッキング効果

や、^{14,15)} 泳動緩衝液に用いたトリスが、カウンターイオンとして試料イオンと良好な相互作用を示したことなどが考えられる。また、キャピラリーの有効長を 20 cm に短縮しても十分な分離を達成でき、Somsen らの報告の半分の時間で分析が完了した。¹⁴⁾

1-2. OSCS 試験の分析法バリデーション 前項において設定した OSCS method を用いて、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験への適用を検討した。分析法バリデーションは、日本薬局方「参考情報」に記載されている方法にしたがい、7つの分析能パラメーター (真度, 精度, 特異性, 検出限界, 定量限界, 直線性, 範囲) を求めることで試験法の妥当性を評価した。

1-2-1. 特異性 OSCS を 10% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を試験溶液として測定した結果、ヘパリンナトリウムに由来するピークは 5.5 分をピーク頂点とし 5.0–7.0 分に泳動され、OSCS に由来するピークが 4.6 分をピーク頂点として泳動された [Fig. 2 (b)]。ヘパリンナトリウム由来のピークと OSCS 由来のピークは良好な分離を示し (分離度 $R_s=1.2$)、両者を容易に識別できた。

1-2-2. 検出限界及び定量限界 0.1–5.0% (w/w) になるように OSCS の濃度を調製したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、OSCS method の検出限界及び定量限界を求めた。その結果、Fig. 3 に示すように 0.1% の OSCS を含む試験溶液でも、S/N 比 5 以上の感度で OSCS 由来のピークを検出できた。よって OSCS method は、ヘパリンナトリウ

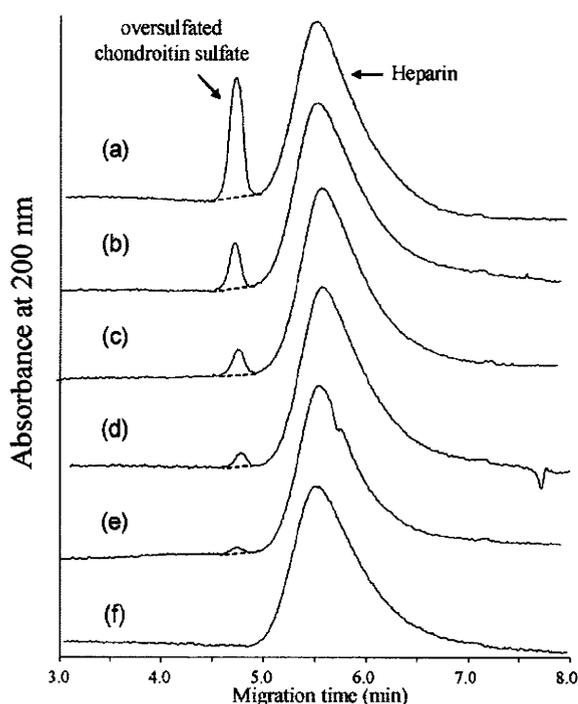


Fig. 3. Lower Limit of Detection of OSCS in the Presence of Heparin

Samples were analyzed at (a) 5.0%, (b) 1.0%, (c) 0.5%, (d) 0.25%, (e) 0.1% and (f) 0% OSCS spiked heparin. OSCS method was used for all analyses.

ム中に混入した 0.1% (w/w) の OSCS を検出できる試験法であることがわかった。また、ヘパリンナトリウム中の 0.25% (w/w) の OSCS を含む試験溶液において、OSCS 由来のピークを S/N 比 10 以上の感度で検出できたため、本試験法の定量限界とした。

1-2-3. 直線性、範囲 0.1–10.0% (w/w) になるように OSCS の濃度を調整したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、OSCS method の直線性を評価した。その結果、OSCS のピーク面積値は、0.1–10.0% (w/w) の範囲で優れた直線性が確認され、その相関係数は 0.9996 であった (Table 1)。

1-2-4. 真度及び精度 5.0% (w/w) の OSCS を含むヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、添加回収実験を行い OSCS method における真度を評価した。その結果、添加回収率は 93.7% (R.S.D. = 3.83%) であった。FDA method での真度は、41% (R.S.D. = 2.18%) であったことから (Table 1)、著しい回収率の向上がみられた。よって OSCS method は高い真度を有する試験法であると言える。

また、同じ試験溶液を用いて OSCS method の精度の評価を行った。OSCS ピーク面積値の併行精度 (1 試験日, 6 回測定) の R.S.D. は 2.11% であった。一方、室内再現精度 (3 試験日, 各 6 回測定) の R.S.D. は 2.45% であった (Table 1)。併行精度並びに室内再現精度ともに、優れた R.S.D. 値を示した。

2. DS

2-1. DS の分析条件 前節で設定した OSCS method を用いて、5.0% (w/w) の DS を添加したヘパリンナトリウム溶液を分析したところ、DS に由来するピークは、6.4 分をピーク頂点とし、6.0–7.0 分にかけてブロードなピークとして観察された [Fig. 4(a)]。DS 由来のピークは広がって観察されるため、検出限界は 1.0% (w/w) と ¹H-NMR による試験法や、FDA method を用いるキャピラリー電気泳動法による試験法と比べても、十分な感度を有する試験法とは言えず (Table 2)、OSCS 検出を目的に最適化したキャピラリー電気泳動法の条件では、DS を高感度に検出することは難しい。

そこで、泳動緩衝液の pH について検討したところ、pH2.5 の緩衝液を用いることにより、DS 由来のピークを高い理論段数 (N=1190) で観察することができ、OSCS method の結果 (N=470) と比較して良好な分離能を示した。以上の検討により設定した DS method により、DS を 5.0% (w/w) の濃度で添加したヘパリンナトリウム溶液を分析した結果、DS は 4.4 分をピーク頂点とした、シャープなピークとして観察され、3.2 分に観察されたヘパリンナトリウムのピークと良好に分離された [Fig. 4(b)]。

2-2. DS 試験の分析法バリデーション

2-2-1. 特異性 DS を 5.0% (w/w) 添加したヘパリンナトリウム溶液を試験溶液として測定した結果、ヘパリンナトリウムに由来するピークは 3.2 分をピーク頂点とし 2.7–4.3 分に泳動され、DS に由来するピークが 4.4 分をピーク頂点として泳動された [Fig. 4(b)]。ヘパリンナトリウム由来のピークと DS 由来のピークは良好な分離を示し (分離度 $R_s=1.3$)、両者を容易に識別できた。

2-2-2. 検出限界及び定量限界 0.25–5.0% (w/w) になるように DS を添加したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、DS method の検出限界及

び定量限界を確認した。その結果、Fig. 5 に示すように 0.25% の DS を含むヘパリンナトリウム試験溶液において S/N 比 5 以上の感度で DS 由来のピークを検出できた。また、ヘパリンナトリウム中の 0.5% (w/w) の DS を含む試験溶液において、DS 由来のピークを S/N 比 10 以上の感度で検出できたため、本試験法の定量限界とした。

2-2-3. 直線性、範囲 0.25–10.0% (w/w) になるように DS を添加したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、DS method の直線性を評価した。その結果、DS のピーク面積は、0.25–10.0% (w/w)

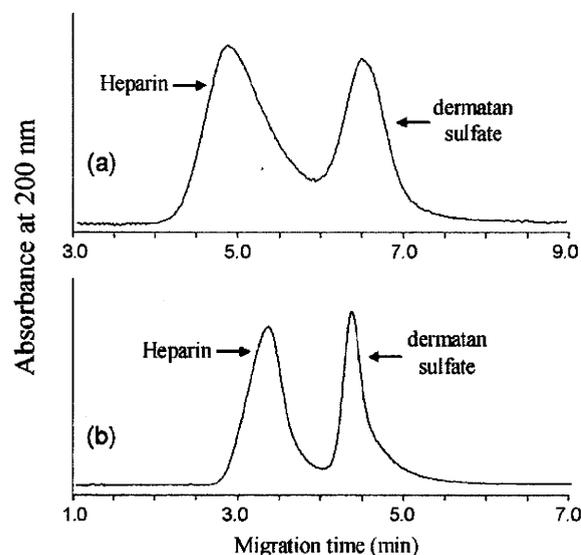


Fig. 4. Capillary Electrophoresis Analysis of 5.0% (w/w) DS Spiked Heparin
(a) OSCS method and (b) DS method.

w) の範囲で優れた直線性が確認され、その相関係数は 0.9998 であった (Table 2).

2-2-4. 真度及び精度 5.0% (w/w) の濃度になるように DS を添加したヘパリンナトリウム試験溶液を用いて、添加回収実験により真度を評価した。その結果、添加回収率は 88.1% (R.S.D.=2.13

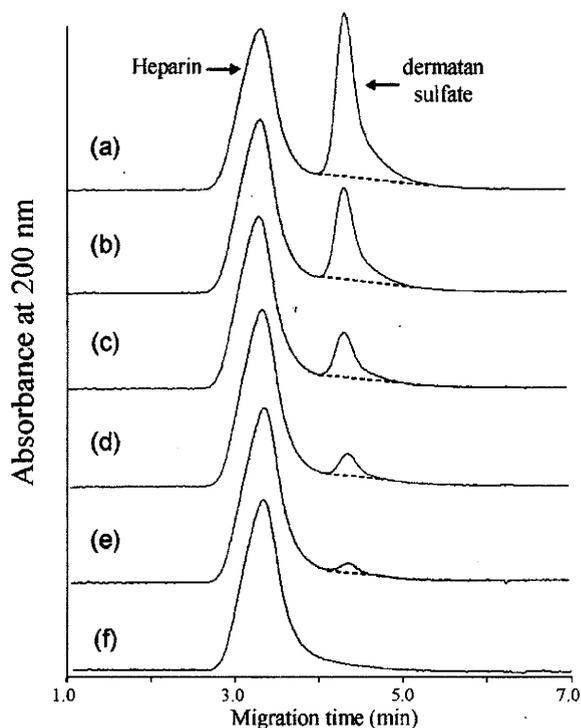


Fig. 5. Lower Limit of Detection of DS in the Presence of Heparin

Samples were analyzed at (a) 5.0%, (b) 2.5%, (c) 1.0%, (d) 0.5%, (e) 0.25% and (f) 0% DS spiked heparin. DS method was used for all analyses.

Table 2. Validation Characteristics for DS Analysis by Capillary Electrophoresis and $^1\text{H-NMR}$

Validation characteristics	Capillary electrophoresis		$^1\text{H-NMR}^{*2}$
	DS method	FDA method ^{*1}	
Accuracy	88.1% (R.S.D.=2.13%)	82% (R.S.D.=1.78%)	102.6% (R.S.D.=3.99%)
Precision			
Repeatability	1.99%	2.15%	1.5%
Intermed. precision	2.43%	2.48%	—
Specificity	Fig. 4b		fair
Detection limit	0.25% (w/w)	1.0% (w/w)	0.35% (w/w)
Quantification limit	0.5% (w/w)	1.0% (w/w)	0.6% (w/w)
Linearity	$y=135944x-2904.9$ ($R^2=0.9998$)	$y=16938x-9357.2$ ($R^2=0.9991$)	$y=0.08534x-0.0113$ ($R^2=0.9991$)
Range	0.25–10.0% (w/w)	1.0–10.0% (w/w)	0.6–18.7% (w/w)

*1 and *2, from the reports by Hashii *et al.*¹²⁾ and Kakehi *et al.*¹³⁾ respectively.

%)であった。

また、同じ試験溶液を用いて精度の評価を行った。DSピーク面積値の併行精度（1試験日、6回測定）のR.S.D.は1.99%であった。一方、室内再現精度（3試験日、各6回測定）のR.S.D.は2.43%であった。併行精度並びに室内再現精度ともに、優れたR.S.D.値を示した。

3. 有害ロットのヘパリンナトリウム製剤原料の分析 前節までに検討した3種類の条件で、実際に有害事象を引き起こしたヘパリンナトリウム製剤原料の分析を行った。FDA methodでは、6.2分にヘパリンナトリウムのピークが、6.0分にOSCSのピークが観察された [Fig. 6(a)]。両者の識別は可能であったが分離は不十分であった。次に、OSCS methodにて分析した結果、ヘパリンナトリウムのピークは5.7分付近に、OSCSのピークは4.3分付近に観察され良好な分離を示した [Fig. 6(b)]。また、DS methodで分析した結果、ヘパリンナトリウムのピークは3.2分付近に、OSCSのピークは2.6分付近に観察された [Fig. 6(c)]。このヘパリンナトリウム製剤原料中にOSCSが8.6% (w/w) 混入していると算出された。一方、本製剤原料中にはDS由来のピークは観察されなかった。

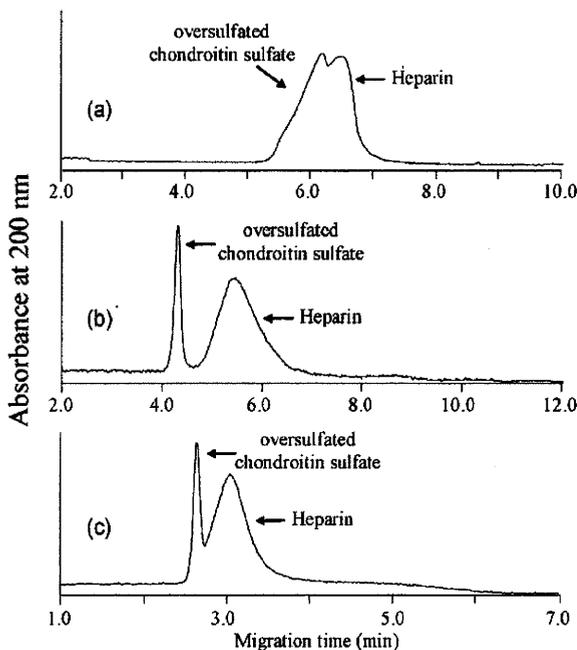


Fig. 6. Capillary Electrophoresis Analysis of Contaminated Heparin Sodium Preparation
(a) FDA method, (b) OSCS method and (c) DS method.

考 察

1. OSCS キャピラリー電気泳動法を日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験に用いるためには、OSCSを特異的に検出できる分析条件を設定する必要がある。高濃度の塩を含有する泳動緩衝液（1000 mM Tris-phosphate buffer）を用いる条件を検討し（OSCS method）、ヘパリンナトリウムとOSCSを良好に分離できた（Fig. 2）。さらにOSCS methodは、キャピラリーの有効長を短縮しても十分な分離を達成できたことから、これまでに報告されたキャピラリー電気泳動法によるOSCS検出や、¹⁴Trehyらの報告した陰イオン交換カラムを用いるHPLC法によるOSCS検出と比べても、⁹高いスループットを備えた分析法といえる。

本分析法はOSCS検出に対して高い特異性を有し [Fig. 2(b)]、ヘパリンナトリウム中に混入した0.1% (w/w) のOSCSを検出できた（Fig. 3）。また、真度（添加回収率：93.7%）や併行精度（R.S.D.=2.11%）、室内再現精度（R.S.D.=2.45%）も良好であり、優れた直線性（ $R^2=0.9996$ ）を示した（Table 1）。これらの結果から、OSCS methodは、ヘパリンナトリウム中のOSCS含量が0.1% (w/w) 以下であることを保証する限度試験として、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験に適用できる試験法であると判断される。

OSCSは今回の有害事象の原因物質であり、また製造工程由来物質や目的物質関連物質として混入する可能性がないことから、ヘパリンナトリウム製剤中に検出されるべきではない。したがって、ヘパリンナトリウム中に混入したOSCSの検出感度ができる限り高い試験法を用いることが望ましい。今回の事件を受けて、日本薬局方に規定された¹H-NMRによるOSCS試験の検出限界は0.35% (w/w) である。¹² OSCS methodによるキャピラリー電気泳動法は、¹H-NMRによる試験法を上回る検出感度を有している。そのため、キャピラリー電気泳動法によるOSCS試験は日本薬局方各条純度試験として有用であると評価できる。

2. DS OSCS methodでは、DS由来のピークがブロードに観察されることから、ヘパリンナトリウム中の微量のDSを高い特異性で検出することが難しい [Fig. 4(a)]。そこでDSの感度向上を目

的とした条件 (DS method) を検討した。その結果、DS とヘパリンナトリウムを良好に分離でき、併行精度 (R.S.D.=1.99%)、室内再現精度 (R.S.D.=2.45%)、真度 (添加回収率: 88.1%) を与える分析条件を設定することができた (Table 2)。DS method は 0.25—10.0% (w/w) の範囲で高い直線性 ($R^2=0.9998$) が確認されたことから、DS 検出に高い特異性と定量性を有した試験法であることがわかった。以上の結果から、キャピラリー電気泳動法による DS 分析は、ヘパリンナトリウム中の DS の混入が 0.25% 以下であることを保証する限度試験として日本薬局方の純度試験法に採用可能であると判断される。

今回の問題を受けて、米国薬局方に規定された $^1\text{H-NMR}$ による試験法では、500 MHz の装置を用いている。この際の DS の検出限界は 0.35% である。一方で、国内の多くの製薬企業が設置している 400 MHz 以下の NMR 装置を用いる DS 試験では、特異性や検出限界などに問題が残されている。¹²⁾ よって、DS に関して高い特異性と検出限界を有するキャピラリー電気泳動法は有用な試験法であり、日本薬局方医薬品各条ヘパリンナトリウム純度試験に適した試験法と言える。

現在、臨床で使用されているヘパリン関連製剤や、同じグリコサミノグリカン類を原料とするヒアルロン酸製剤中に、一定量の DS が混入しているという報告がみられる。^{16,17)} そのため製剤中への DS 混入の規制の必要性については、DS はヘパリンとは異なる物質であるので、純度試験として適切に規制すべきとする意見と、これまでに毒性等の報告がなく純度試験等により規制する必要はないとする意見があり、国際的にも見解が分かれている。DS はヘパリンを調製する際の原料に含まれるため、ヘパリンの精製の指標として有用であるとも考えられ、今後は国内ヘパリンナトリウム中への DS の含有量の実態を正確に把握した上で、規制が必要か否か検討していく必要がある。

結 論

本研究における分析法バリデーションの結果、キャピラリー電気泳動法は日本薬局方各条ヘパリンナトリウム純度試験として適用可能であることがわかった。

今後は他機関と連携した共同検定を行い、その他の規格を設定していく必要がある。特に検出限界に関しては、他機関においても同程度の値を得るため、分析試料の濃度や試料導入法、試料導入量などを規定しなければならない。

謝辞 ヘパリンナトリウム製剤原料をご供与いただきました日本バルク薬品㈱に深く御礼申し上げます。

REFERENCES

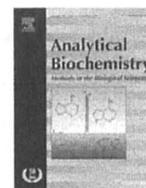
- 1) Petitou M., Casu B., Lindahl U., *Biochimie*, **85**, 83–89 (2003).
- 2) Fischer K. G., *Hemodial. Int.*, **11**, 178–189 (2007).
- 3) Hirsh J., Levine M. N., *Blood*, **79**, 1–17 (1992).
- 4) Kishimoto T. K., Viswanathan K., Ganguly T., Elankumaran S., Smith S., Pelzer K., Lansing J. C., Sriranganathan N., Zhao G., Galcheva-Gargova Z., Al-Hakim A., Bailey G. S., Fraser B., Roy S., Rogers-Cotrone T., Buhse L., Whary M., Fox J., Nasr M., Dal Pan G. J., Shriver Z., Langer R. S., Venkataraman G., Austen K. F., Woodcock J., Sasisekharan R., *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2457–2467 (2008).
- 5) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/adverse_events.htm>, 6 June, 2009
- 6) Guerrini M., Beccati D., Shriver Z., Naggi A., Viswanathan K., Bisio A., Capila I., Lansing J. C., Guglieri S., Fraser B., Al-Hakim A., Gunay N. S., Zhang Z., Robinson L., Buhse L., Nasr M., Woodcock J., Langer R., Venkataraman G., Linhardt R. J., Casu B., Torri G., Sasisekharan R., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 669–675 (2008).
- 7) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_NM_method.pdf>, 6 June, 2009.
- 8) <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_CE_method.pdf>, 6 June, 2009.
- 9) Trehy M. L., Reepmeyer J. C., Kolinski R. E., Westenberger B. J., Buhse L. F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 670–673 (2009).
- 10) Volpi N., Maccari F., Linhardt R. J., *Anal.*

- Biochem.*, **388**, 140–145 (2009).
- 11) Tami C., Puig M., Reepmeyer J. C., Ye H., D'Avignon D. A., Buhse L., Verthelyi D., *Biomaterials*, **29**, 4808–4814 (2008).
 - 12) Hashii N., Kawasaki N., Takakura D., Itoh S., Kawahara N., Shoda T., Sugimoto N., Haishima Y., Shinagawa M., Shimba N., Miyata K., Tsukamoto H., Senshu K., Hasegawa T., Kawai K., Yoden H., Kinoshita M., Kakehi K., Goda Y., Okuda H., Tanamoto K., Yamaguchi T., *Pharm. Regul. Sci.*, **39**, 651–659 (2008).
 - 13) Kakehi K., Kakoi N., Kinoshita M., Hashii N., Kawasaki N., Terao T., Kawai K., Yoden H., Yamaguchi T., *Pharm. Regul. Sci.*, **39**, 713–720 (2008).
 - 14) Somsen G. W., Tak Y. H., Torano J. S., Jongen P. M., de Jong G. J., *J. Chromatogr. A.*, **1216**, 4107–4112 (2009).
 - 15) Wielgos T., Havel K., Ivanova N., Weinberger R., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 319–326 (2009).
 - 16) Neville G. A., Mori F., Holme K. R., Perlin A. S., *J. Pharm. Sci.*, **78**, 101–104 (1989).
 - 17) Matsuno Y. K., Kakoi N., Kinoshita M., Matsuzaki Y., Kumada J., Kakehi K., *Electrophoresis*, **29**, 3628–3635 (2008).



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Notes & Tips

Determination of Tn antigen released from cultured cancer cells by capillary electrophoresis

Keita Yamada^a, Sakie Watanabe^a, Soichiro Kita^a, Mitsuhiro Kinoshita^a, Takao Hayakawa^b, Kazuaki Kakehi^{a,*}

^a School of Pharmacy, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

^b Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2009

Available online 21 August 2009

ABSTRACT

An incomplete elongation of *O*-glycans in mucins has been found in epithelial cancers, leading to the expression of shorter carbohydrate structures such as Tn antigen (GalNAc-O-Ser/Thr), which has been reported to be one of the most specific human cancer-associated structures. However, there have been no appropriate physicochemical methods for the determination of Tn antigen in biological samples. In the present paper, we developed a capillary electrophoresis method for the determination of Tn antigen, and applied the method to the analysis of the expressed Tn antigen on some leukemia and epithelial cancer cells.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Cancer-associated structural alterations in *O*-glycans such as high level sialylation and low-level sulfation are attracting interest in relation to their biological significance [1]. Especially, incomplete elongation of *O*-glycans in mucins has been found in many cancers, leading to the expression of shorter carbohydrate structures, such as Tn antigen (GalNAc-O-Ser/Thr) [2], which is one of the most specific human cancer-associated structures and a possible early biomarker of cancer [3].

Current analytical methods for characterization of *O*-glycans involve the initial release of the oligosaccharides. However, the release of *O*-glycans has been a difficult task due to lack of the enzyme which shows wide specificity as in the case of *N*-glycoamidase for the release of *N*-glycans. Therefore, *O*-glycans still have to be released from the core proteins by chemical methods, and most of the methods require a lengthy reaction time and cumbersome procedures [4]. Recently, we developed an automated glycan-releasing apparatus (Autoglycocutter: AGC)¹ for *O*-glycosylated proteins [5,6]. The apparatus enables the release of *O*-glycans having the intact reducing end within only 3 min, and was applied to the analysis of *O*-glycans from some leukemia and epithelial cancer cells [7].

The released glycans are often labeled with a fluorescent tag, although we have to remove the excess reagents and the accompanying materials [8–11]. The procedures hitherto reported are effective for purification of higher oligosaccharides. Monosaccharides such as Tn antigen released from the samples are often poorly

recovered when the clean-up procedures for higher oligosaccharides are applied.

In the current study, we developed a clean-up method for collection of Tn antigen and the small glycans, and applied the method to the analysis of Tn antigen in some cancer cell lines.

We used human-derived cell lines: Jurkat (acute T cell leukemia), U937 (histiocytic lymphoma), K-562 (chronic myelogenous leukemia), HL-60 (acute promyelocytic leukemia), LS174T and HCT-15 (colorectal adenocarcinoma), BxPC3 (pancreatic adenocarcinoma), PANC1 (pancreatic carcinoma), and MKN7 and MKN45 (gastric adenocarcinoma).

A portion of the glycopeptide fractions obtained from each cancer cell line (1.0×10^7 cells) was injected to the AGC apparatus [6,7], and the collected solution containing the released *O*-glycans was evaporated to dryness followed by labeling with 2-aminobenzoic acid (2-AA) as reported previously [7].

In our previous work using Sephadex LH-20 for clean-up of 2-AA-labeled glycans, we could not recover Tn antigen in good efficiency [7]. We examined several clean-up procedures for the analysis of the 2-AA-labeled GalNAc, and calculated the recovery of GalNAc (Table 1). Most of the reported methods using carbon graphite columns [8], nylon filters [9], polyamide resin (DPA-6S) [10], and acetone precipitation [11] are optimized for the glycans having high molecular masses and not appropriate for clean-up of simple mono and disaccharides. Therefore, we examined an HPLC method using octadecylsilica as the stationary phase. Although a long time (60 min) is required for collection of the fractions containing Tn antigen, we found that higher than 99% of the excess amount of 2-AA was removed and 2-AA-labeled GalNAc was recovered quantitatively.

* Corresponding author.

E-mail address: k_kakehi@phar.kindai.ac.jp (K. Kakehi).

¹ Abbreviations used: 2-AA, 2-aminobenzoic acid; AGC, Autoglycocutter; CAE, capillary affinity electrophoresis.

Table 1

Efficiencies in purification of 2-AA-labeled GalNAc using previously reported methods.

Method	Removal of the reagent (%)	Recovery of GalNAc-2-AA (%)	Run time (min)	Reference [Reference No.]
Sehadex LH-20	–	–	180	J. Proteome Res. 8 (2009) 521–537 [7]
ENVI-carb column	10	34	60	Clin. Chem 44 (1998) 2422–2428 [8]
Nylon filter	99	69	60	Anal. Biochem. 373 (2008) 104–111 [9]
Polyamide resin (DPA-6S)	96	78	60	Anal. Biochem. 369 (2007) 202–209 [10]
Acetone precipitation	5	54	30	Anal. Biochem. 384 (2009) 263–273 [11]
COSMOSIL(R) 5C18-PAQ (ID 4.6 × 150 mm)	99	99	60	Present method

In the analysis of Tn antigen, it is necessary to resolve it from other possible monosaccharides and the accompanying materials. In the present study, we employed capillary electrophoresis and achieved excellent resolution of GalNAc (see Supplemental Fig. 1). During the alkali-catalyzed release of glycans from core peptides using the AGC apparatus, epimerization of the glycans is a big problem. We evaluated the epimerization reaction of Tn antigen. After the solution of the standard GalNAc was passed through AGC, the mixture was labeled with 2-AA and analyzed by CE. A small amount of *N*-acetyl-*D*-talosamine (TaINac) was observed, but the peak area was 4.2% of GalNAc (see Supplemental Fig. 2). These results indicate that the effect of epimerization during the releasing reaction is negligible.

We applied the method to the analysis of the expressed Tn antigen on Jurkat cells (Fig. 1). After a large peak of the reagent with some artifact peaks, the peak due to Tn antigen was observed at ca. 53 min. It should be noted that a Tn peak at 53 min accompanies some minor components. After collection of this peak, we analyzed it by CE and capillary affinity electrophoresis (CAE), and found that the peak showed the same migration time as that of GalNAc by CE (Fig. 1B). In addition, CAE using the buffer containing VVAB₄ lectin (*Vicia villosa* seed) at 10 μM concentration, which specifically recognizes GalNAc [12], clearly caused disappearance of the peak at 8.9 min. In contrast, the peak of 2-AA maltopentaose (internal standard) at 10.3 min was not changed. These results indicate that the peak observed at 8.9 min was due to Tn antigen.

Based on the methods described above, we analyzed the expression of Tn antigen on some cancer cell lines (Fig. 1C). All cancer cell lines examined in this study expressed significantly different amounts of Tn antigen. Of the examined leukemia cell lines, Jurkat cells express Tn antigen most abundantly. Because Jurkat cells lack a molecular chaperone (cosmc) which is necessary for expression of core 1 beta 3 galactosyl transferase activity [13], Jurkat cells cannot establish the core 1 structure, and the truncated *O*-glycan (i.e., Tn antigen) which is a precursor of core 1 type glycans is abundantly observed. Epithelial cancer cells other than HCT-15 cells expressed Tn antigen more abundantly than Jurkat cells. Especially, LS174T cells expressed about 10 times larger amounts of Tn antigen than other epithelial cancer cells. We reported that poorly differentiated pancreatic cancer cells (PANC1) showed simple *O*-glycan profiles, but moderately differentiated pancreatic cancer cells (BxPC3) showed relatively complex *O*-glycan profiles. In sharp contrast with these results, MKN45 cells (poorly differentiated species) and MKN7 cells

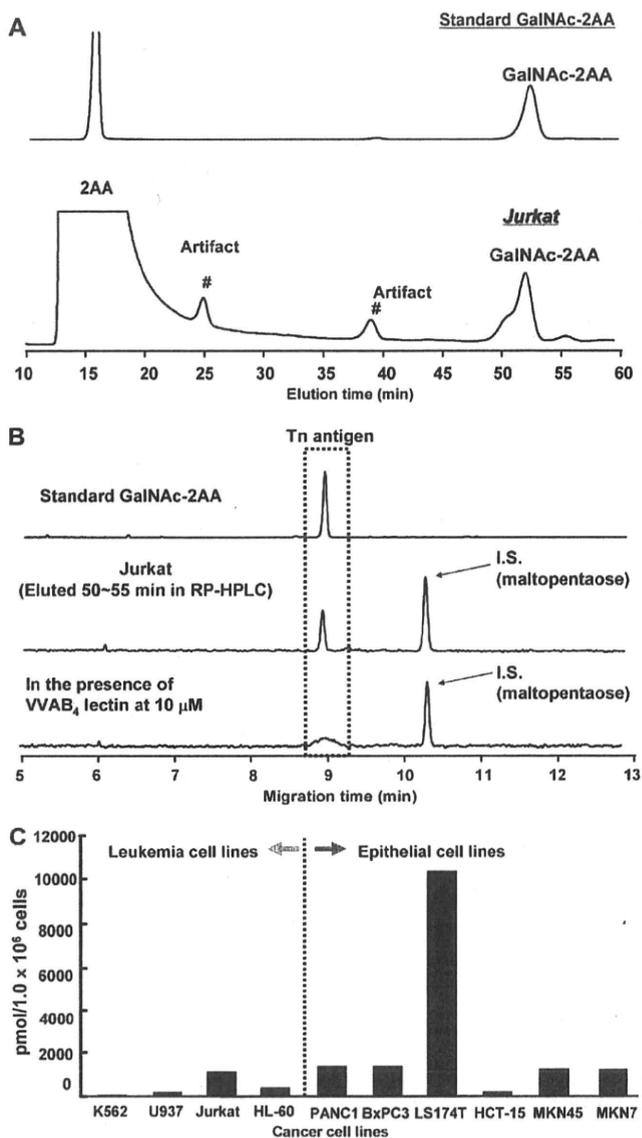


Fig. 1. Determination of Tn antigen in some cancer cells. Purification of 2-AA-labeled Tn antigen derived from Jurkat cells by RP-HPLC (A). Conditions for purification by RP-HPLC. Column, COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); eluent, solvent A, 0.1% HCOOH in water; solvent B, 20% acetonitrile containing 0.1% HCOOH. Gradient elution; a linear gradient (10–20% solvent B) from 0 to 20 min, then followed by a linear gradient (20–22.5% solvent B) from 20 to 70 min. CE and CAE analysis of 2-AA-labeled Tn antigen from Jurkat cells (B). Analytical conditions for CE and CAE. Capillary, DB-1 capillary (100 μm i.d. × 40 cm); running buffer, 100 mM Tris–borate buffer (pH 8.3) containing 5% PEG70000; applied voltage, 25 kV; injection, pressure method (1.0 psi for 10 s); temperature, 25 °C; detection, helium–cadmium laser-induced fluorescence (excitation 325 nm, emission 405 nm). CAE of the Tn antigen from Jurkat cells in the presence of GalNAc-specific lectin (VVAB₄). The peak observed at 10.3 min was due to maltopentaose labeled with 2-AA, which is used as the internal standard for migration times. The migration time of 2-AA-labeled maltopentaose was not changed in the presence/absence of VVAB₄. Expression of Tn antigen in 10 cancer cell lines (C). The amount of Tn antigen was calculated by peak area observed by CE.

(well differentiated species) showed the reverse results [7]. Prior to starting this work, we had expected that expressions of Tn antigen are varied with stages of cancer differentiation. However, significant differences of the expression of Tn antigen were not observed in these four epithelial cancer cells. On the other hand, expression of Tn antigen was quite different between HCT-15 and LS174T, which are colon cancer cell lines. LS174T cells, high metastasis cells [14],

expressed the largest amount of Tn antigen of the examined cancer cells. However, HCT-15 cells, low metastasis cells [14], expressed trace amounts of Tn antigen. Hirao et al. indicated that Tn antigen could be used as a marker for the level of metastasis of uterine cervix cancer cells [15]. Our present results are well correlated with their observations.

In the present study, we developed a method for the analysis of Tn antigen, and found that high metastasis cancer cells expressed Tn antigen extremely abundantly. Although further studies using clinical samples are required, the present method will be a useful tool for characterization of clinical significance of cancer cells.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ab.2009.08.021.

References

- [1] I. Brockhausen, Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1473 (1999) 67–95.
- [2] G.F. Springer, T and Tn, general carcinoma autoantigens, *Science* 224 (1984) 1198–1206.
- [3] S.H. Itzkowitz, E.J. Bloom, T.S. Lau, Y.S. Kim, Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps, *Gut* 33 (1992) 518–523.
- [4] L. Royle, T.S. Mattu, E. Hart, J.I. Langridge, A.H. Merry, N. Murphy, D.J. Harvey, R.A. Dwek, P.M. Rudd, An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins, *Anal. Biochem.* 304 (2002) 70–90.
- [5] Y.K. Matsuno, K. Yamada, A. Tanabe, M. Kinoshita, S.Z. Maruyama, Y.S. Osaka, T. Masuko, K. Kakehi, Development of an apparatus for rapid release of oligosaccharides at the glycosaminoglycan–protein linkage region in chondroitin sulfate-type proteoglycans, *Anal. Biochem.* 362 (2007) 245–257.
- [6] K. Yamada, S. Hyodo, Y.K. Matsuno, M. Kinoshita, S.Z. Maruyama, Y.S. Osaka, E. Casal, Y.C. Lee, K. Kakehi, Rapid and sensitive analysis of mucin-type glycans using an in-line flow glycan-releasing apparatus, *Anal. Biochem.* 371 (2007) 52–61.
- [7] K. Yamada, M. Kinoshita, T. Hayakawa, S. Nakaya, K. Kakehi, Comparative studies on the structural features of O-glycans between leukemia and epithelial cell lines, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 521–537.
- [8] A. Klein, A. Lebreton, J. Lemoine, J.M. Perini, P. Roussel, J.C. Michalski, Identification of urinary oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin. Chem.* 44 (1998) 2422–2428.
- [9] K.R. Anumula, Unique anthranilic acid chemistry facilitates profiling and characterization of Ser/Thr-linked sugar chains following hydrazinolysis, *Anal. Biochem.* 373 (2008) 104–111.
- [10] B.D. Prater, K.R. Anumula, J.T. Hutchins, Automated sample preparation facilitated by PhyNexus MEA purification system for oligosaccharide mapping of glycoproteins, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 202–209.
- [11] M. Pabst, D. Kolarich, G. Poltl, T. Dalik, G. Lubec, A. Hofinger, F. Altmann, Comparison of fluorescent labels for oligosaccharides and introduction of a new postlabeling purification method, *Anal. Biochem.* 384 (2009) 263–273.
- [12] G. Kanska, M. Guerry, F. Caldefie-Chezet, M. De Latour, J. Guillot, Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin, *Oncol. Rep.* 15 (2006) 305–310.
- [13] T. Ju, R.D. Cummings, A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 16613–16618.
- [14] D.L. Trainer, T. Kline, F.L. McCabe, L.F. Faucette, J. Feild, M. Chaikin, M. Anzano, D. Rieman, S. Hoffstein, D.J. Li, et al., Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines, *Int. J. Cancer* 41 (1988) 287–296.
- [15] T. Hirao, Y. Sakamoto, M. Kamada, S. Hamada, T. Aono, Tn antigen, a marker of potential for metastasis of uterine cervix cancer cells, *Cancer* 72 (1993) 154–159.