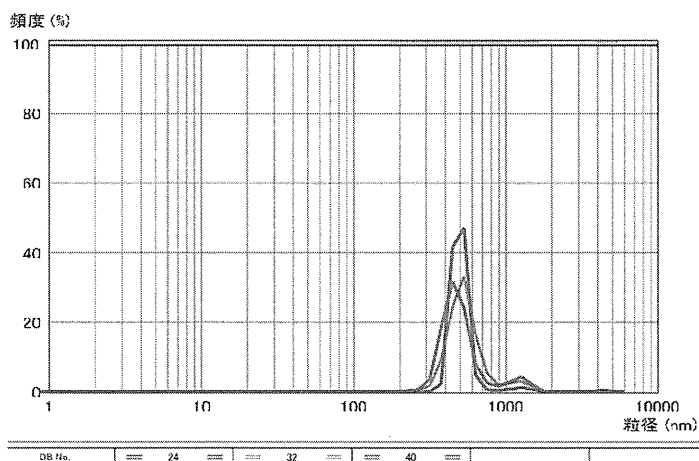


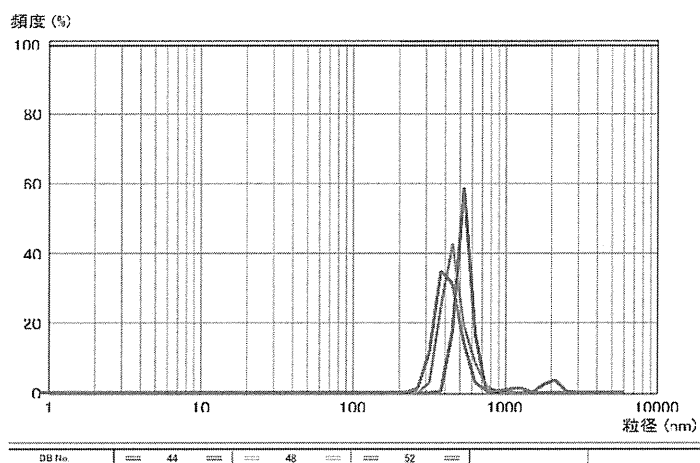
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.141	559.15	432.74	513.05	11.69	166.54	531.40
No.2	0.438	562.58	481.97	531.19	11.30	136.46	530.60
No.3	0.564	514.48	449.07	490.99	12.22	75.75	482.20
平均	0.381	545.40	454.59	511.74	11.74	126.25	514.73
標準偏差	0.22	26.84	25.08	20.13	0.46	46.25	28.18
CV%	57.00	4.92	5.52	3.93	3.93	36.63	5.47

図 11 粒子径 500 nm, 試料濃度 0.001%の測定結果



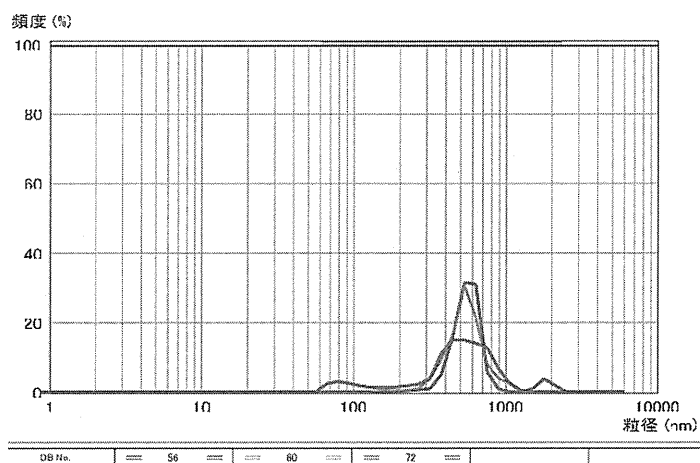
	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.318	540.82	480.69	501.79	11.96	59.33	495.70
No.2	0.465	571.68	452.41	520.91	11.52	120.76	521.20
No.3	0.233	550.32	427.48	486.95	12.32	120.52	474.30
平均	0.339	554.27	453.53	503.22	11.93	100.20	497.07
標準偏差	0.12	15.81	26.62	17.02	0.40	35.40	23.48
CV%	34.62	2.85	5.87	3.38	3.36	35.33	4.72

図 12 粒子径 500 nm, 試料濃度 0.0005%の測定結果



	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.172	626.57	517.28	552.22	10.87	60.59	533.90
No.2	0.003	461.98	425.50	448.31	13.38	78.38	446.90
No.3	0.001	442.55	385.76	416.10	14.42	78.20	413.10
平均	0.059	510.37	442.85	472.21	12.89	72.39	464.63
標準偏差	0.10	101.10	67.45	71.14	1.83	10.22	62.32
CV%	166.36	19.81	15.23	15.06	14.16	14.12	13.41

図 13 粒子径 500 nm, 試料濃度 0.00025%の測定結果

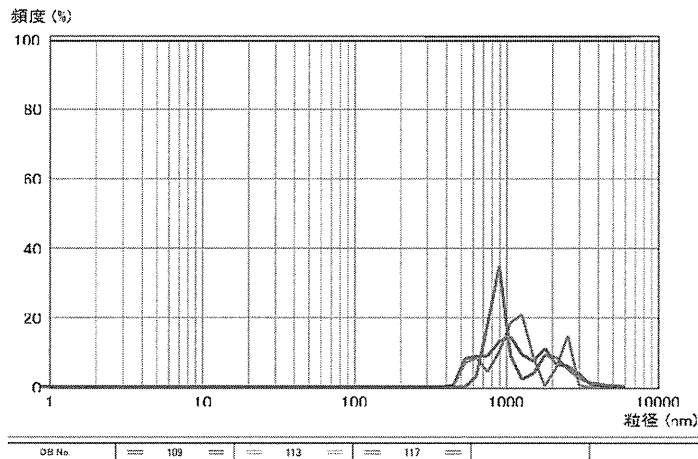


	ローディングイ ンデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.083	637.26	462.94	553.97	10.83	109.91	563.40
No.2	0.042	555.02	379.22	505.15	11.88	136.11	537.40
No.3	0.006	501.33	96.61	314.84	19.06	250.86	494.40
平均	0.044	564.54	312.92	457.99	13.92	165.63	531.73
標準偏差	0.04	68.46	191.95	126.35	4.48	74.97	34.85
CV%	87.56	12.13	61.34	27.59	32.18	45.26	6.55

図 14 粒子径 500 nm, 試料濃度 0.0001%の測定結果

表 3 粒子径 500 nm の測定結果 (平均値)

濃度	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
0.001%	0.381	545.40	454.59	511.74	11.74	126.25	514.73
0.0005%	0.339	554.27	453.53	503.22	11.93	100.20	497.07
0.00025%	0.059	510.37	442.85	472.21	12.89	72.39	464.63
0.0001%	0.044	564.54	312.92	457.99	13.92	165.63	531.73
0.00005%	十分な感度が得られなかった						
0.000025%							

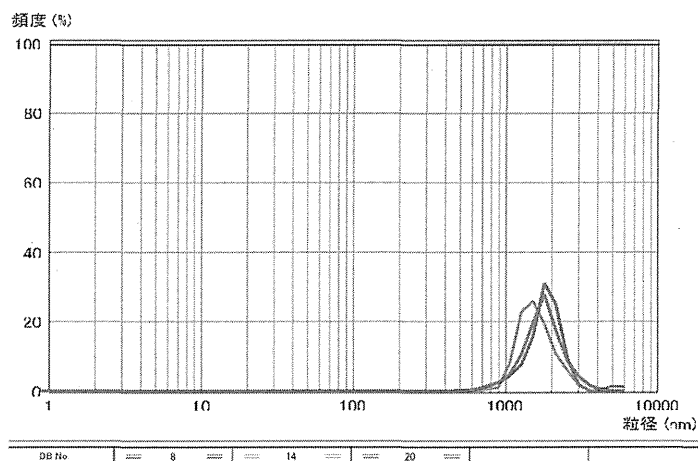


	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.486	1309.10	716.27	1024.30	5.86	670.40	1091.00
No.2	0.083	1325.50	761.02	1070.70	5.60	797.61	1165.00
No.3	0.275	1322.60	864.21	1060.70	5.66	637.14	936.90
平均	0.281	1319.07	780.50	1051.90	5.71	701.72	1064.30
標準偏差	0.20	8.75	75.87	24.42	0.14	84.69	116.37
CV%	71.73	0.66	9.72	2.32	2.38	12.07	10.93

図 15 粒子径 900 nm, 試料濃度 0.001%の測定結果

表 4 粒子径 900 nm の測定結果 (平均値)

濃度	ローディングインデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
0.001%	0.281	1319.07	780.50	1051.90	5.71	701.72	1064.30
0.0005%	十分な感度が得られなかった						
0.00025%	測定未実施						
0.0001%							
0.00005%							
0.000025%							

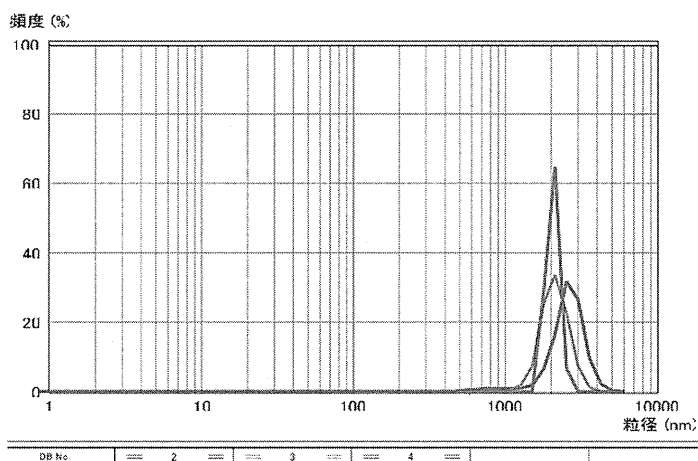


	ローディングインデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.34	1796.90	1268.90	1657.90	3.62	430.30	1810.00
No.2	0.39	1728.00	1335.80	1542.80	3.89	444.36	1539.00
No.3	0.46	1806.10	1308.10	1640.60	3.66	489.59	1745.00
平均	0.40	1777.00	1304.27	1613.77	3.72	454.75	1698.00
標準偏差	0.06	42.68	33.61	62.06	0.15	30.98	141.48
CV%	15.38	2.40	2.58	3.85	3.92	6.81	8.33

図 16 粒子径 1000 nm, 試料濃度 0.001% の測定結果

表 5 粒子径 1000 nm の測定結果 (平均値)

濃度	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
0.001%	0.397	1777.00	1304.27	1613.77	3.72	454.75	1698.00
0.0005%	十分な感度が得られなかった						
0.00025%	測定未実施						
0.0001%							
0.00005%							
0.000025%							



	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
No.1	0.121	2582.50	1365.90	2328.50	2.58	567.03	2595.00
No.2	0.019	2140.60	1884.80	2055.10	2.92	419.49	2099.00
No.3	0.961	2049.80	1998.20	2032.70	2.95	196.17	2056.00
平均	0.367	2257.63	1749.63	2138.77	2.82	394.23	2250.00
標準偏差	0.52	284.98	337.13	164.70	0.21	186.72	299.55
CV%	140.86	12.62	19.27	7.70	7.29	47.36	13.31

図 17 粒子径 2000 nm, 試料濃度 0.001%の測定結果

表 6 粒子径 2000 nm の測定結果 (平均値)

濃度	ローディング インデックス	MV (nm)	MN (nm)	MA (nm)	CS	SD (nm)	50%粒径 (nm)
0.001%	0.367	2257.63	1749.63	2138.77	2.82	394.23	2250.00
0.0005%	十分な感度が得られなかった						
0.00025%	測定未実施						
0.0001%							
0.00005%							
0.000025%							

表 7 粒子径 10um, 測定容量 5 mL の測定結果

試料の濃度			測定結果				
ポリスチレン(PS)			個/mL				%RSD
質量百分率 (%)	μg/mL	個/mL※	n=1	n=2	n=3	平均	
0(water)	0(water)	0(water)	45	46	42	44.6	4.85
0.00000010	0.10	182	230	234	233	232.5	0.80
0.00000025	0.25	455	535	536	534	535.3	0.21
0.00000050	0.50	909	955	983	942	959.9	2.16
0.00000100	1.00	1819	1816	1787	1779	1793.8	1.10
0.00000250	2.50	4547	4278	4341	4265	4294.7	0.95
0.00000500	5.00	9095	8025	8013	7898	7978.6	0.88
0.00001000	10.00	18189	14766	14669	14594	14676.2	0.59

※…粒子を, 球形と仮定して, 濃度から算出した理論値

赤字…装置の定格粒子個数濃度(10000 個/mL)を超過したデータ

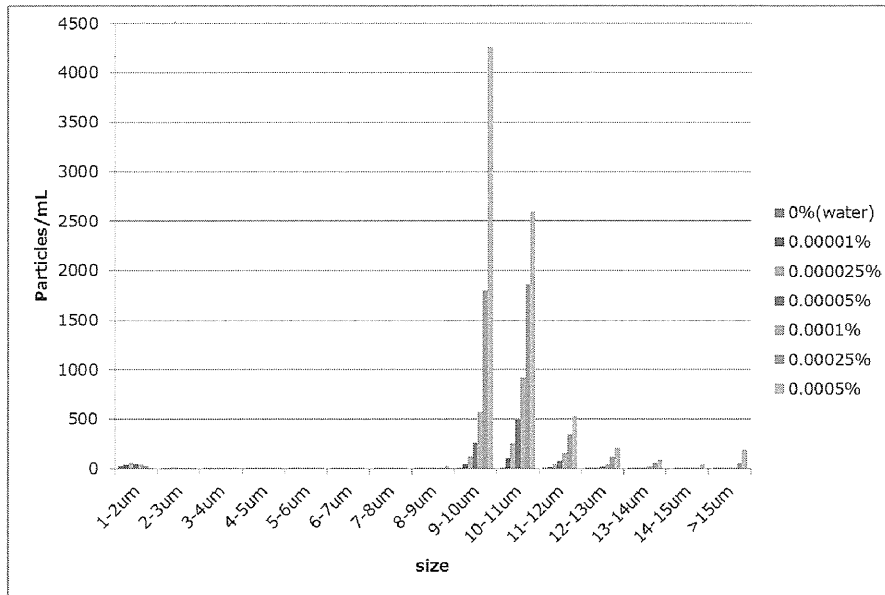


図 18 粒子径 10um, 測定容量 5 mL の粒子径分布

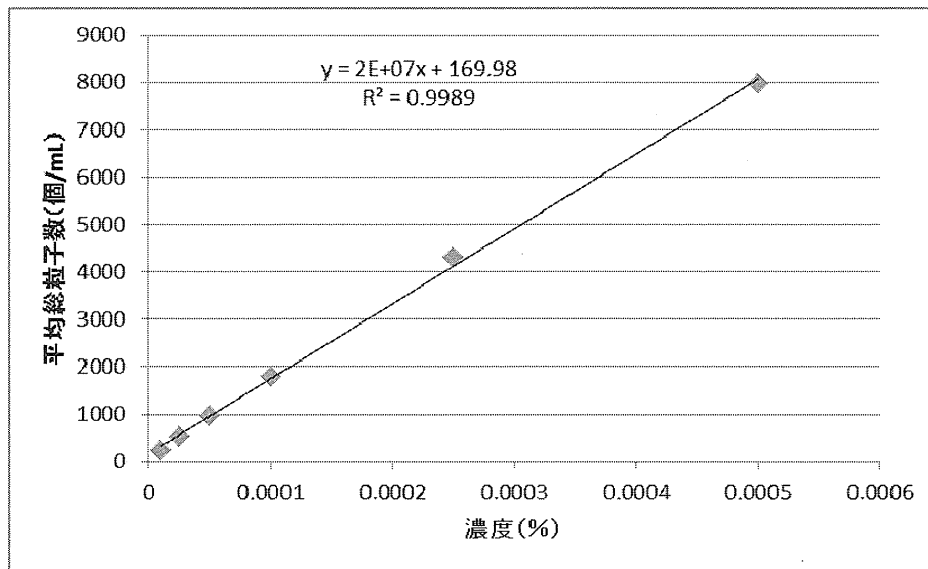


図 19 粒子径 10um, 測定容量 5 mL の直線性

表 8 粒子径 10 μ m, 測定容量 1 mL の測定結果

試料の濃度			測定結果				
ポリスチレン(PS)			個/mL				%RSD
質量百分率(%)	μ g/mL	個/mL*	n=1	n=2	n=3	平均	
0(water)	0(water)	0(water)	41	45	55	47.0	15.34
0.000010	0.10	182	261	259	241	253.7	4.34
0.000025	0.25	455	575	506	589	556.7	7.98
0.000050	0.50	909	955	969	906	943.3	3.51
0.000100	1.00	1819	1777	1687	1834	1766.0	4.20
0.000250	2.50	4547	4298	4229	4208	4245.0	1.11
0.000500	5.00	9095	8003	8054	8077	8044.7	0.47
0.001000	10.00	18189	14845	14779	14897	14840.3	0.40

※…粒子を, 真球と仮定して, 濃度から算出した理論値
 赤字…装置の定格粒子個数濃度(10000 個/mL)を超過したデータ

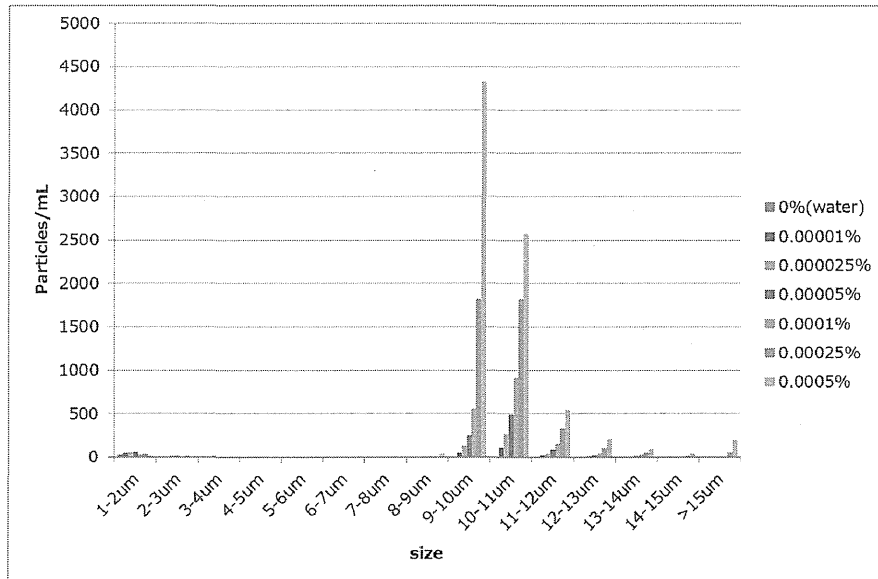


図 20 粒子径 10 μ m, 測定容量 1 mL の粒子径分布

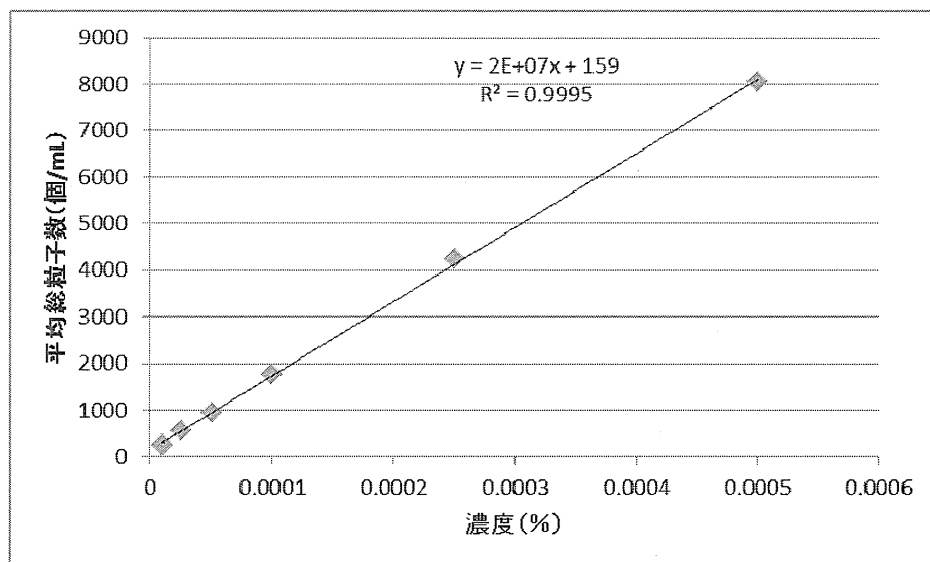


図 21 粒子径 10µm, 測定容量 1 mL の直線性

表 9 粒子径 5µm, 測定容量 5 mL の測定結果

試料の濃度			測定結果				%RSD
ポリスチレン(PS)			個/mL				
質量百分率(%)	µg/mL	個/mL*	n=1	n=2	n=3	平均	
0(water)	0(water)	0(water)	9	11	15	11.7	23.40
0.000010	0.10	1455	1402	1421	1386	1402.9	1.26
0.000025	0.25	3638	3402	3392	3380	3391.0	0.33
0.000050	0.50	7276	6553	6514	6460	6509.3	0.72
0.000100	1.00	14551	12042	12118	12225	12128.7	0.76
0.000250	2.50	36378	24646	24633	24603	24627.1	0.09
0.000500	5.00	72757	36801	36935	36905	36880.3	0.19
0.001000	10.00	145513	46840	47009	46954	46934.3	0.18

※…粒子を, 真球と仮定して, 濃度から算出した理論値

赤字…装置の定格粒子個数濃度(10000 個/mL)を超過したデータ

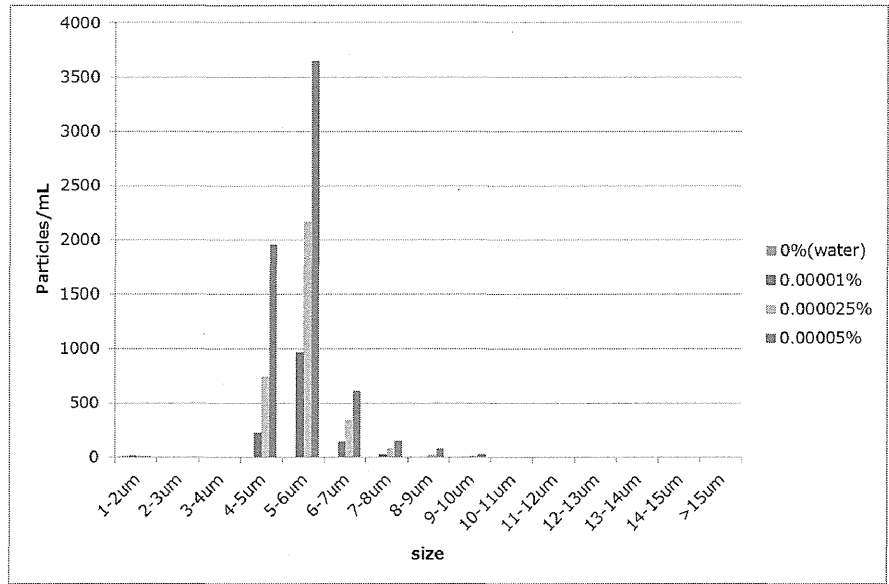


図 22 粒子径 5um, 測定容量 5 mL の直線性

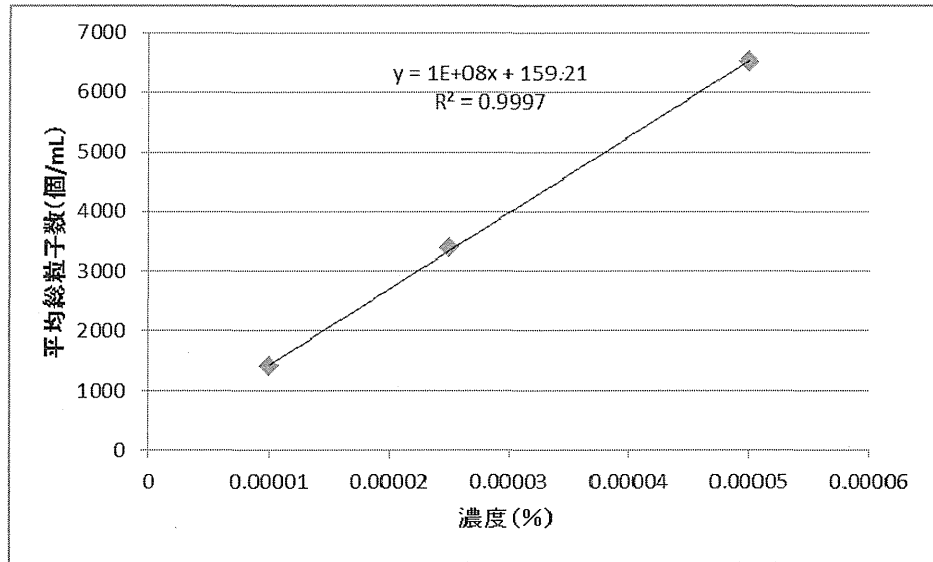


図 23 粒子径 5um, 測定容量 5 mL の直線性

表 10 粒子径 5 μ m, 測定容量 1 mL の測定結果

試料の濃度			測定結果				%RSD
ポリスチレン(PS)			個/mL				
質量百分率(%)	μ g/mL	個/mL*	n=1	n=2	n=3	平均	
0(water)	0(water)	0(water)	19	12	20	17.0	25.64
0.000010	0.10	1455	1437	1441	1325	1401.0	4.70
0.000025	0.25	3638	3456	3451	3435	3447.3	0.32
0.000050	0.50	7276	6555	6594	6607	6585.3	0.41
0.000100	1.00	14551	12132	12262	12042	12145.3	0.91
0.000250	2.50	36378	24581	24642	24919	24714.0	0.73
0.000500	5.00	72757	37267	37164	37186	37205.7	0.15
0.001000	10.00	145513	47233	47230	47370	47277.7	0.17

※…粒子を, 真球と仮定して, 濃度から算出した理論値

赤字…装置の定格粒子個数濃度(10000 個/mL)を超過したデータ

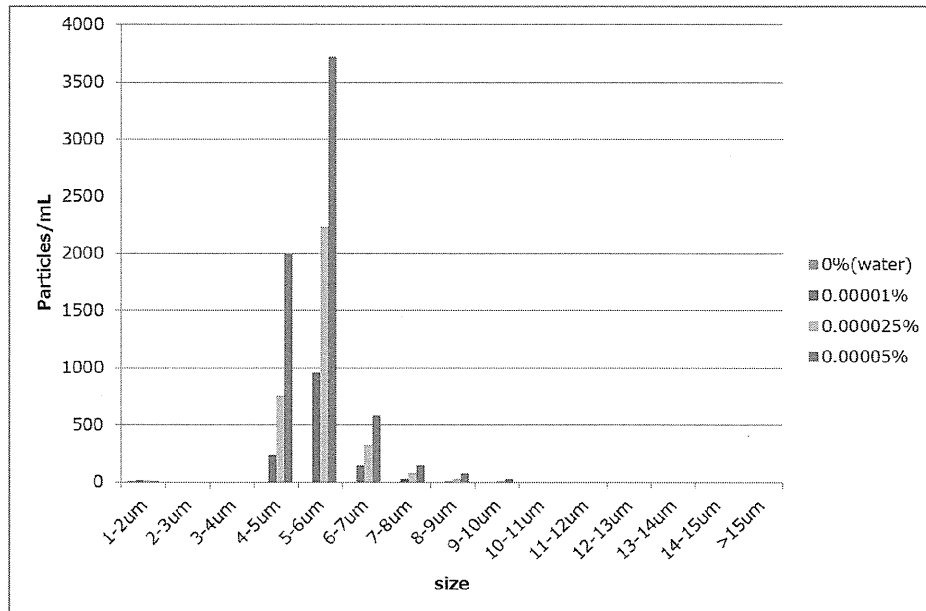


図 24 粒子径 5 μ m, 測定容量 1 mL の粒子径分布

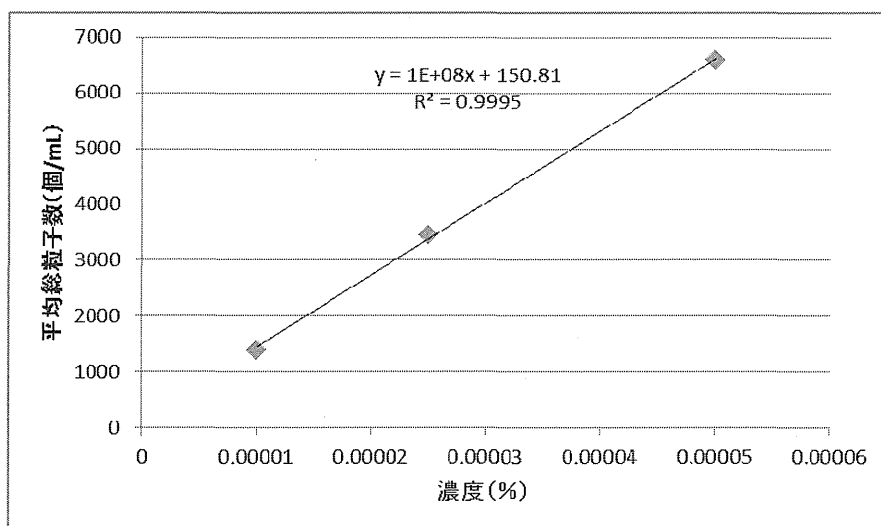


図 25 粒子径 5μm, 測定容量 1 mL の直線性

表 11 粒子径 2μm, 測定容量 5 mL の測定結果

試料の濃度			測定結果				
ポリスチレン(PS)			個/mL				%RSD
質量百分率 (%)	μg/mL	個/mL [※]	n=1	n=2	n=3	平均	
0(water)	0(water)		9	11	15	11.7	23.40
0.000050	0.50	113682	43441	43445	43656	43514.0	0.28
0.000100	1.00	227364	41735	41579	41564	41626.0	0.23
0.000250	2.50	568411	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.000500	5.00	1136821	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.001000	10.00	2273642	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

※…粒子を, 真球と仮定して, 濃度から算出した理論値
 赤字…装置の定格粒子個数濃度(10000 個/mL)を超過したデータ

表 12 粒子径 2μm, 測定容量 1 mL の測定結果

試料の濃度			測定結果				
ポリスチレン(PS)			個/mL				%RSD
質量百分率 (%)	μg/mL	個/mL [※]	n=1	n=2	n=3	平均	
0(water)	0(water)		19	12	20	17.0	25.64
0.000050	0.50	113682	44081	43979	43896	43985.3	0.21
0.000100	1.00	227364	41937	42116	42046	42033.0	0.21
0.000250	2.50	568411	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.000500	5.00	1136821	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
0.001000	10.00	2273642	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

※…粒子を, 真球と仮定して, 濃度から算出した理論値
 赤字…装置の定格粒子個数濃度(10000 個/mL)を超過したデータ

第二部 0-結合型糖鎖試験法

研究協力者

古木 健一朗 アステラス製薬バイオ技術研究所主任研究員

A. 目的

バイオ医薬品の開発が活発化しており，糖鎖の恒常性を評価する試験法の整備が急務となっている。

本研究では，標準的な糖鎖試験法の設定を目指し，今年度は特に0型糖鎖の糖鎖分析法を取り上げ，試験法の検討を行った。

B. 研究方法

(1) 試料及び試薬

アバタセプトは国立衛研から配布されたものを使用した。糖タンパク質フェツインは，シグマアルドリッチ社より，PNGase F は，NEB社より，糖鎖精製キット BlotGlyco は，住友ベークライト社より，2-AB Glucose Homopolymer Ladder および Fetuin 0-Glycan は Ludger 社より，その他の試薬は，高純度なものを購入し，使用した。

(2) 2AB 誘導体化糖鎖の調製・分析

1) 糖鎖の遊離

以下の方法（非還元的β脱離法）で糖鎖を遊離した。本法はMiuraらの先行研究(Anal. Chem. 82 (2010) 10021-10029)で報告されている方法を参考に，一部改変して用いた。

試料に精製水を加え濃度4mg/mLに調製した。この液100μLを採取し，300mg/mLカルバミン酸アンモニウム溶液400μLを添加，混合し

た。ヒートブロックにて60°Cで20時間インキュベートした。これに精製水500μLを添加，混合し，60°Cに設定した遠心濃縮乾燥機(SpeedVac)で乾固した。同じ条件で再溶解と乾固をさらに1回繰り返した。150mmol/L酢酸水溶液500μLを添加して再溶解し，60°Cに設定した遠心濃縮乾燥機(SpeedVac)で乾固した。同じ条件で再溶解と乾固をさらに1回繰り返した。精製水30μLを添加し，再溶解した。

2) 遊離糖鎖の精製及び2AB誘導体化

Fetuin 0-Glycan および遊離糖鎖を含む溶液全量を用い，BlotGlyco法のプロトコールに従って，精製，2AB誘導体化及び過剰試薬の除去を行った。精製後の2AB誘導体化糖鎖溶液10μLに70%アセトニトリル90μLを加えて溶かし，試料溶液とした。

3) 糖鎖の分離・検出

調製した各試料溶液を10μL採取し，次の条件で測定した。同様に，2-AB Glucose Homopolymer Ladder (Ludger社)も分析に供し，試料由来ピークのグルコースユニット(G.U.)値を算出した。

装置：UFLC，島津製作所

検出器：蛍光光度計 (Ex: 330 nm, Em: 420 nm)

カラム：TSKgel Amide 80 (2.0 mmI.D × 150 mm, 3 μm)

カラム温度：40°C 付近の一定温度

移動相A：100 mmol/L ギ酸アンモニウム (pH 4.5)

移動相B：アセトニトリル

流量：毎分0.2 mL

移動相の送液：

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～2	90	10
2～92	90→60	10→40

<倫理面への配慮>

市販品を試料として用いていることから、特に配慮を必要としない。

C. 結果と考察

試料について非還元的アルカリ触媒β脱離および 2-AB ラベル化を行い、HILIC モードの HPLC にて分離を行った。

アバタセプトおよびフェツイン由来の 2-AB ラベル化試料を分析して得られたクロマトグラムを図 1 および図 2 に示す。いずれも 0 型糖鎖由来と推定されるピークを得た。

得られたピークについて糖鎖構造に帰属した。帰属には、NIBRT が公開しているデータベース (https://glycobase.nibrt.ie/glycobase/show_nibrt.action) および Bongers らの先行研究 (Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 8140- 8149), 市販 Fetuin 0-Glycan の分析結果などを参考にした。帰属結果は、図 1, 図 2, 表 1, 表 2 にそれぞれ記載した。構造に帰属されたピークの面積割合は、アバタセプトで 90.7%, フェツインで 86.7%であった。

E. まとめ

0 型糖鎖試験法策定の一環として 2AB HILIC/FL を用いた糖鎖プロファイリング法の適用可能性を、2 種の糖タンパク質 (アバタセプト, フェツイン) 由来の糖鎖をモデルとして用い検討した。非還元的β脱離法にて 0 型糖鎖

を遊離し、BlotGlyco (住友ベークライト) を用いて 2-AB ラベル化を行った。得られた試料を HPLC 分析し、糖鎖構造を推定した。いずれの試料とも、既知の 0 型糖鎖が確認された。

今後、他の手法による分析結果と併せ、0 型糖鎖分析法について更なる議論が必要であると考え。

F. 健康危機情報

特になし。

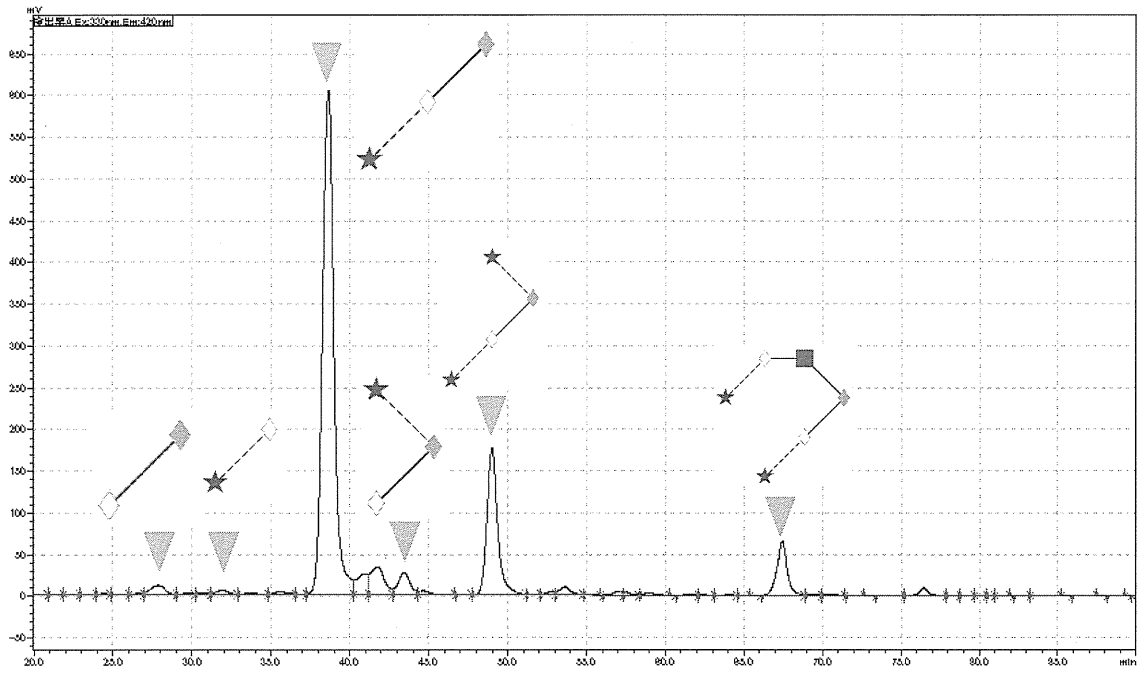


図1 フェツイン由来 2-AB ラベル化 O 型糖鎖のクロマトグラム

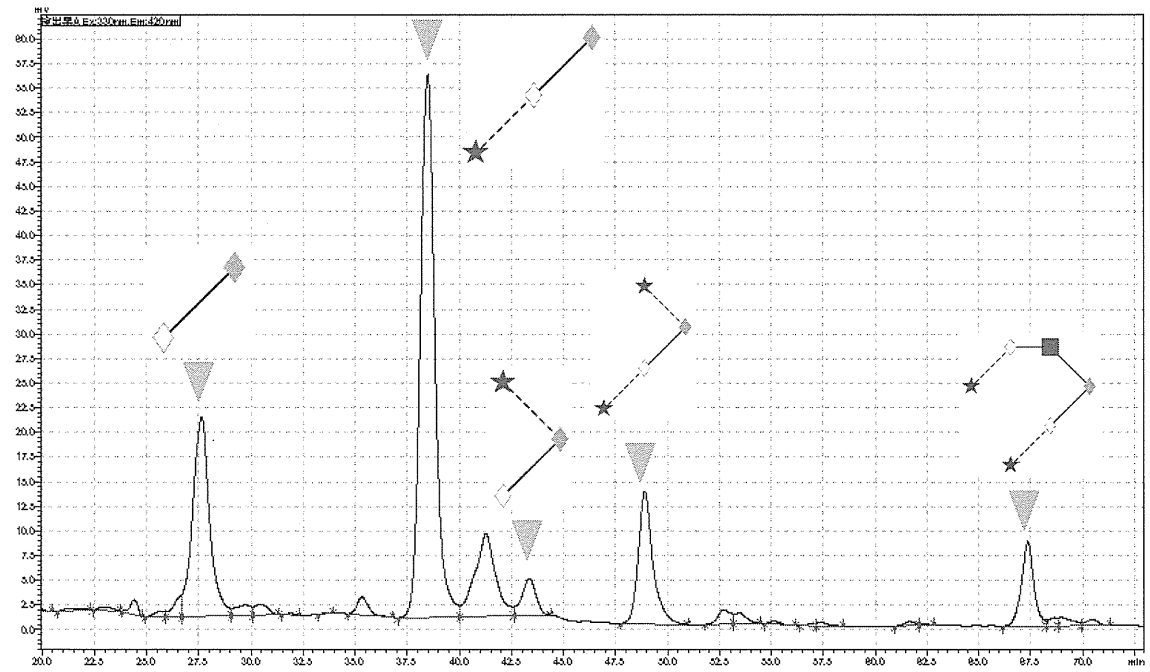




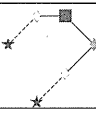


図2 アバタセプト由来 2-AB ラベル化 O 型糖鎖のクロマトグラム

表1 フェツイン由来 2-AB ラベル化 O 型糖鎖の構造帰属と存在割合

保持時間	面積値	面積%	G.U. (実測値)	帰属
27.8	706446	1.4%	1.84	Gal-GalNAc-2AB 
38.6	30678214	60.5%	2.46	NeuAc-Gal-GalNAc-2AB 
40.9	1196650	2.4%	2.60	—
41.8	2057643	4.1%	2.65	—
43.5	1376976	2.7%	2.76	NeuAc-Gal-GalNAc-2AB 
49.0	8280202	16.3%	3.13	2NeuAc-Gal-GalNAc-2AB 
53.6	512513	1.0%	3.51	—
67.4	2939551	5.8%	4.80	2NeuAc-Gal-GlcNAc-GalNAc-2AB 

表2 フェツイン由来 2-AB ラベル化 O 型糖鎖の構造帰属と存在割合

保持時間	面積値	面積%	G.U.(実測値)	帰属
27.6	1128170	18.3%	1.83	Gal-GalNAc-2AB 
35.3	69509	1.1%	2.25	—
38.5	2701277	43.8%	2.45	NeuAc-Gal-GalNAc-2AB 
41.3	577676	9.4%	2.62	1HexNAc 1Hex 1NeuGc -2AB
43.4	175613	2.8%	2.75	NeuAc-Gal-GalNAc-2AB 
48.9	650771	10.6%	3.12	2NeuAc-Gal-GalNAc-2AB 
52.7	62520	1.0%	3.43	—
67.4	355105	5.8%	4.79	2NeuAc-Gal-GlcNAc-GalNAc-2AB 

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 バイオ医薬品の品質試験に関する研究方法

研究分担者 中家修一（株）島津製作所 グローバルアプリケーション開発センター 主任

凝集体評価法選択のための基礎検討およびO-結合型糖鎖評価における最適分析条件検討

要旨

バイオ医薬品の凝集体評価およびO-結合型糖鎖評価を実施する際の最適な分析方法を明らかにするため、凝集体評価についてはレーザー回折式粒子径分布測定装置を用いた標準試料での分析適用範囲について検討した。一方、O-結合型糖鎖評価については還元的アルカリ触媒β脱離法での最適な試料処理条件の検討とPMP標識法を用いた場合の有用な質量分析手法について検討した。凝集体についてはポリスチレンおよびシリカ粒子を標準試料とした測定を実施し、粒子径 $1\mu\text{m}$ 以上では濃度 $25\sim 250\mu\text{g/mL}$ の範囲、粒子径 $1\mu\text{m}$ 以下では、濃度 $1\sim 25\mu\text{g/mL}$ の範囲において一定の精度を満たした測定ができることが確認できた。O-結合型糖鎖については、還元的アルカリ触媒β脱離法の反応温度と反応時間の組み合わせが 80°C で1時間あるいは $40^\circ\text{C}/60^\circ\text{C}$ で4時間と、一般に実施されている条件よりも短時間での反応が適しており、得られた試料はMALDI-TOF MSを用いた分析により定性的な情報を容易に得られることを確認できた。またPMP標識糖鎖がLCMSを用いたMRMによるプロファイリングに有効であることが示唆された。

研究協力者

丸山 充（株）島津製作所 課長
鷲尾 一裕（株）島津製作所 課長
十時 慎一郎（株）島津製作所 主査
洲本 高志（株）島津製作所 主任
前田 裕貴（株）島津製作所

を評価するために、それぞれの分析法において、測定可能粒子径および測定可能濃度範囲を明らかにし、凝集体評価法の指針を作成することを目的とする。

第一部：凝集体

A. 目的

凝集体を評価するための各分析法の特徴と課題を明らかにし、バイオ医薬品の凝集体の全容

B. 研究方法

我々が測定に用いた装置は、レーザー回折法を応用した島津製作所製 Aggregates Sizer で、 1mm 光路長セルを用いて測定した。サンプルはNIST トレーサブルの標準試料であるポリスチレン粒子およびシリカ粒子である。また、評価した試料の粒子径および重量濃度は

次のとおりである。

ポリスチレン粒子は6点で、粒子径はそれぞれ220nm、500nm、900nm、2 μ m、5 μ m、10 μ m、シリカ粒子は1点で粒子径は1 μ mである。重量濃度はポリスチレン粒子およびシリカ粒子ともに0.1、0.25、0.5、1、2、5、10、25、50、100、250 μ g/mlで測定を行った。

<倫理面への配慮>

本研究の研究対象はポリスチレンおよびシリカ粒子であり、これらの人体への投与あるいは実験動物の使用はないため、倫理上の問題は生じない。

C. 結果と考察

ポリスチレン粒子10 μ m、900nm、220nmの粒度分布結果を図1~3に、各試料の重量濃度と公証値に対する比率を表1に、繰り返し測定の相対標準偏差(RSD)の結果を表2に示した。

C.1. 重量濃度の精度に関して

1 μ m以上については、25~250 μ g/mLにおいて公証値に対して数%~20%程度の誤差、1 μ m以下については、1~25 μ g/mLにおいて公証値に対して数%以内の誤差であったが、重量濃度が高い場合と低い場合にずれが大きくなる傾向を示した。

重量濃度が高い場合には多重散乱の影響を受けたことが考えられ、濃度が低い場合には、得られた信号強度が低いことから、ノイズの影響を受けたと考えられた。

C.2. 測定の繰り返し精度の確認

測定の繰り返し精度については、すべての試料において相対標準偏差(RSD)が1%以下となり非常に良好な結果が得られた。

C.3. ポリスチレンとシリカの比較に関して

ほぼ同じ粒子径である900nmのポリスチレン粒

子と1 μ mのシリカ粒子を比較した場合、適切な屈折率を設定することで適切な公証値および重量濃度を示す結果が得られた。したがって、タンパク質に近い屈折率であるシリカで測定できることを確認できた。

D. 結論

ポリスチレンおよびシリカ粒子をレーザー回折式粒子径分布測定装置で測定した結果、1 μ m以上の粒子については25~250 μ g/mLの範囲で、1 μ m以下の粒子については、1~25 μ g/mLの範囲において一定の精度を満たした測定が可能であることが確認できた。

尚、今後評価を進めるにあたっては、タンパク質の屈折率に近いシリカ粒子での評価を実施する必要があると考える。

第二部：O-結合型糖鎖

A. 目的

O-結合型糖鎖評価を実施する際の最適な分析方法を明らかにするため、還元的アルカリ触媒 β 脱離反応を用いた分析について、その前処理法の最適条件を見出すこと、またアルジトール型やPMP標識化されたO-結合型糖鎖について、質量分析の利用法を提示することを目的とした。

B. 研究方法

・分析試料調製

還元的アルカリ触媒 β 脱離反応の反応温度と反応時間を検討するため、試料にはO-結合型糖鎖をもつFc融合タンパク質製剤オレンシアの乾燥品(国立医薬品食品衛生研究所より提供)を準備した。乾燥試料(5mg)を水(500 μ L)に溶解させた後、試料溶液を10 μ Lずつ200 μ L

容量の PCR チューブ (0.2 ml Hi-Tube Dome Cap、TakaraBio) に分注し、遠心乾燥させたものを検討用試料とした (試料量 : 100 μ g/tube)。これと合わせて、試料量を 1、5、10、50 μ g/tube としたのもも作成した。

一方、PMP 標識 O-結合型糖鎖を調整するため、上述の溶解させた試料 (10 μ L) をガラス製のマイクロチューブに分注した後、遠心乾燥させて検討用試料とした (試料量 : 100 μ g/tube)。

・反応試薬調製

水素化ホウ酸ナトリウム (NaBH_4) (37mg) に 1 M 水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液 (50 μ L) および水 (950 μ L) を加え、よく攪拌したものを還元的アルカリ触媒 β 脱離反応用試薬溶液とした (終濃度 : 1M NaBH_4 、0.05M NaOH)。

一方、PMP (1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone、Sigma-Aldrich) (34.8mg) を 25% アンモニア水 (Wako) (400 μ L) に溶解させ、よく攪拌したものを PMP 標識反応用試薬溶液とした (終濃度 : 0.5M PMP、25% アンモニア)。

・還元的アルカリ触媒 β 脱離反応

検討用試料に試薬溶液 (50 μ L) を加えてよく攪拌した後、サーマルサイクラーにセットして反応を開始させた。この時、反応温度は 40、60、80 $^{\circ}\text{C}$ にそれぞれ設定し、反応時間は 30 分間、1 ~ 7 時間 (1 時間刻み) と設定した。

また、1M 塩酸溶液に浸けた強陽イオン交換樹脂 (Dowex 50 WX8 hydrogen form 200-400 mesh、Dow Chemical) を容量が 500 μ L 程度になるまでスピнкаラム (Micro Bio-spin chromatography column empty, BioRad) に載せ、数秒遠心して溶液を落とした後、水 (500 μ L) を加えて遠心する操作を 3 回繰り返して塩酸溶液を除いた。その後、使用するまで水 (500 μ L) を加えて静置しておいた。

反応が終了した溶液を数秒遠心した後、

1.5mL チューブ (Protein LoBind tube 1.5 ml PCR clean、Eppendorf) に溶液を移し、そこに氷冷した酢酸 (3 滴) を加えて反応溶液を中和した。中和後の溶液に水 (250 μ L) を加え攪拌・遠心した後、準備しておいた強陽イオン交換樹脂を素通りさせ、さらに溶液を完全に乾燥させるために一晩遠心乾燥した。

乾燥した反応試料にメタノール (500 μ L) を加えてよく攪拌し遠心乾燥させる操作を 3 回繰り返してボランを除去した後、0.1% トリフルオロ酢酸 (50 μ L) に再溶解させ、分析試料とした。

・PMP 標識反応

検討用試料に試薬溶液 (100 μ L) を加えてよく攪拌した後、サーマルサイクラーにセットして 50 $^{\circ}\text{C}$ 、15 時間の反応を行い、糖鎖の切り出しと標識を同時に行った。反応後の溶液は、数秒遠心した後に 1.5mL チューブに移して水 (500 μ L) を加えてよく攪拌した後に遠心乾燥した。乾燥した反応試料に再度水 (500 μ L) を加えて遠心乾燥する操作を 2 回繰り返した後、1% 酢酸溶液 (1mL) とクロロホルム (1mL) を加えて強く攪拌し、静置した。溶液が水層とクロロホルム層に分かれた後にクロロホルム層を除き、水層に新たなクロロホルム (1mL) を加えて攪拌・遠心乾燥する操作を 3 回繰り返した。得られた水層を 1.5mL チューブに移して遠心乾燥した後に水 (1mL) に再溶解したものを、C18 固相抽出カートリッジ (Supelclean LC-18 SPE Tube 3mL、Spelco) で精製した。C18 固相抽出カートリッジはあらかじめアセトニトリル (3mL) と水 (3mL) で洗浄したものを使用した。精製に際しては、5% アセトニトリル (3mL) で洗浄した後、20% アセトニトリル (1mL) で PMP 標識糖鎖を溶出した。溶出した溶液は遠心乾燥した後、0.1% ギ酸 (100 μ L) に再溶解して分析試料とした。