

試薬・試液

ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動用固定液 5-スルホサリチル酸二水和物 35 g 及びトリクロロ酢酸 100 g に水を加えて溶かし、1000 mL とする。

クーマシー染色試液 クーマシーブリリアントブルー R-250 125 mg を水/メタノール/酢酸 (100) 混液 (5:4:1) 100 mL に溶かし、ろ過する。

脱色液 水/メタノール/酢酸 (100) 混液 (5:4:1)

26. ペプチドマップ法

目的と範囲

ペプチドマップ法はたん白質医薬品、特にバイオテクノロジー応用医薬品の確認試験の一方法である。本法はたん白質を化学的又は酵素的に処理してペプチド断片とし、その断片を再現性よく分離確認するもので、相補的 DNA 配列の読み違いあるいは点変異などによって生じる一個のアミノ酸の変化をも確認できる試験法である。標準品/標準物質について同様に処理したものと比較することで、たん白質の一次構造の確認、構造上の変化の有無の検出、製造工程の恒常性及び遺伝子安定性の評価を行うことが可能である。たん白質はそれぞれ固有の特性を有しており、化学的、分析学的アプローチによってじゅうぶんに特異性のあるペプチドマップが可能になるように、当該たん白質の特性についてよく理解しておかなければならない。

ここでは、目的たん白質の特性解析、組換えたん白質生産のための遺伝子発現構成体の安定性及び製造工程全体の恒常性の評価、たん白質の同一性や安定性の評価、あるいはたん白質の変異の検出を目的として、本法を適用する際の手引きを記す。

ペプチドマップ

ペプチドマップ法にはどのようなたん白質にも適用可能な一般的な操作法はない。しかし、個々のたん白質に応じた特異的なマップの設定は可能である。ペプチドマップに関する解析技術は現在でも急速に進歩しつつあるが、広く認められている常法がいくつか存在する。各条においては、目的に応じてこれらの方法の変法が規定されることもある。

ペプチドマップはたん白質の指紋（フィンガープリント）とみなすことができ、酵素的あるいは化学的処理を受けた結果生成した最終分解産物であり、当該たん白質に関する包括的な情報を与える。本法は以下の主な 4 段階の操作からなる：たん白質が製剤成分の一部である場合には分離精製；ペプチド結合の選択的切断；得られたペプチドのクロマトグラフ法による分離；各ペプチドの分析と確認。試料は標準品/標準物質と同様に消化、分析する。化学的切断剤に比べてエンドプロテアーゼ（例えばトリプシン）のような酵素を用いればより完全な切断が可能である。ペプチドマップはたん白質を識別するのにじゅうぶんな種類のペプチド断片を得るべきである。断片の数が多すぎると多くのたん白質が類似したプロフィールを示してしまい、かえってその特異性が失われる場合もある。

分離と精製

たん白質の分離及び精製は、試験を妨害する添加剤やたん白質賦形剤を含む原薬及び製剤を分析する場合に必要であり、必要に応じて各条で規定する。製剤からたん白質を分離・生成した場合は回収率の定量性を検証しておく必要がある。

ペプチド結合の選択的切断

ペプチド結合を切断する手段はたん白質試料の種類により異なる。用いる切断剤は切断のタイプ（酵素的あるいは化学的）、及びそれぞれのタイプに存在する切断剤の種類に応じて選択される。いくつかの切断剤とその特異性を表 1 に示す。この表は、切断剤すべてを網羅しているということではなく、他の切断剤が適切と認められた時には追加される。

表 1 切断剤の例

種類	試薬	特異性
酵素法	トリプシン (EC 3.4.21.4)	アルギニン、リジンの C 末端側
	キモトリプシン (EC 3.4.21.1)	疎水性アミノ酸(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 (EC 3.4.23.1 & 2)	非特異的消化
	リジルエンドペプチダーゼ (Lys-C エンドペプチダーゼ) (EC 3.4.21.50)	リジンの C 末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ (<i>S. aureus</i> 株 V8 由来) (EC 3.4.21.19)	グルタミン酸、アスパラギン酸の C 末端側
	ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ (エンドプロテアーゼ Asp-N) (EC 3.4.24.33)	アスパラギン酸の N 末端側
化学法	クロストリパイン (EC 3.4.22.8)	アルギニンの C 末端側
	臭化シアン	メチオニンの C 末端側
	2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸	システインの N 末端側
	o-ヨードソ安息香酸	トリプトファン、チロシンの C 末端側
	希酸	アスパラギン酸、プロリン
	BNPS-スカトール	トリプトファン

試料の前処理 たん白質の大きさや形状によっては特別な前処理を行う必要がある。モノクローナル抗体についてはあらかじめ H 鎖と L 鎖に分離する必要がある。分子量が 100000 ダルトン以上のたん白質の切断剤としてトリプシンを用いる場合には、リジン残基をあらかじめシトラコニル化あるいはマレイル化しておかないと多種類のペプチド断片が生成してしまう。

切断剤の前処理 特に酵素系の切断剤については、マップの再現性を維持するために精製を目的とした前処理を行う必要がある場合がある。例えばトリプシンを用いる際には、混在するキモトリプシンを不活化するためにトシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトンで処理する必要がある。高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) によるトリプシンの精製、あるいはゲル支持体上への酵素の固定化などの方法も、たん白質試料が少量の場合に効果的である。

たん白質の前処理 試料濃度が低い場合など試料の濃縮が必要な場合があり、また製剤の処方用いる添加剤や安定化剤がマッピングの操作を妨害する場合、妨害物質をたん白質から分離する操作が必要な場合がある。前処理に用いる物理的方法として限外ろ過、カラムクロマトグラフ法、凍結乾燥があげられる。また、酵素がたん白質の切断部位に接近できるようにするため、たん白質の折りたたみ構造を解きほぐす目的で、例えば変性剤（例えば尿素）を添加したり、あらかじめジスルフィド

結合を還元し、アルキル化することがしばしば必要となる。

トリプシンを用いる場合に、非特異的切断、脱アミド化、ジスルフィド結合の異性化、メチオニン残基の酸化、ペプチドのN末端グルタミンの脱アミド化によるピログルタミル基の生成、などの酵素反応中に起こる副反応によりマップが不明瞭になることがある。更に、トリプシンの自己消化によりピークが生じることもあるが、自己消化に起因するピークのピーク強度(ピーク面積又はピーク高さ)は用いるトリプシンと試料たん白質の比率に依存する。酵素の自己加水分解を避けるには、酵素が活性を示さないように、至適 pH とは異なる pH (例えばトリプシンでは pH 5) で酵素溶液を調製し、使用時に切断反応に用いる緩衝液で更に希釈調製するとよい。

至適消化条件の設定 たん白質の消化の程度と効率に影響を及ぼす因子は、化学的あるいは酵素的切断に影響する因子そのものである。

pH 消化反応液の pH は用いる切断剤が働くのに最適と考えられる値に調整する。例えば、臭化シアンを切断剤に用いる場合は、強酸性条件 (pH 2, ギ酸) が必要であるが、トリプシンを用いる場合は弱アルカリ条件 (pH 8) が最適である。一般に、反応液の pH は、反応中に試料たん白質の化学的特性を変化させるものであってはならないし、切断反応の過程で変動してはならない。

温度 ほとんどの切断反応は 25 ~ 37°C が適当であるが、副化学反応が最も少ない反応温度を選択する。反応温度が上昇するとたん白質によっては変性を受けやすいものもあるので、反応液の温度はたん白質の種類によって決定する必要がある。例えば、組換えウシソマトロピンは高温では消化反応中に沈殿するため、消化は 4°C で行う。

反応時間 じゅうぶん量の試料たん白質が入手可能な場合には、再現性のあるマップを得るため、かつ不完全な消化を避けるため、至適反応時間を検討する。消化の時間を 2 ~ 30 時間の間で変化させ、例えばトリプシン処理の場合は、生じたマップを妨害しない酸の添加か凍結により反応を止める。

切断剤の量 反応時間を適度に短く (すなわち 6 ~ 20 時間) するために、通常は過剰量の切断剤を用いるが、マップのクロマトグラフパターンへの影響を避けるために、切断剤の使用は最小量に留める。たん白質とプロテアーゼの比率は 20 : 1 から 200 : 1 が一般的である。切断剤は最適な切断を得るため 2 回あるいはそれ以上の回数に分けて加えることもある。ただし、最終反応液量はペプチドマップ法におけるその後の操作 (分離操作) を容易にするため、できるだけ小さくする。後の分析に障害となる分解生成物を区別するために、試料たん白質以外のすべての使用試薬を用いて空試験を行う。

クロマトグラフ法による分離

多くの方法がマッピングにおけるペプチド分離に利用される。分離法は試験するたん白質に応じて選択する。ペプチドの分離に利用される効果的な方法を表 2 に示す。ここでは最も広く用いられている逆相分配型高速液体クロマトグラフ法 (RP-HPLC) をクロマトグラフ法による分離手法の例として示す。

表 2 ペプチドの分離方法

逆相分配型高速液体クロマトグラフ法 (RP-HPLC)
イオン交換クロマトグラフ法 (IEC)
疎水的相互作用クロマトグラフ法 (HIC)
ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE), 非変性
ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)
キャピラリー電気泳動 (CE)
高圧ろ紙クロマトグラフ法 (PCHV)
高電圧ろ紙電気泳動 (HVPE)

溶媒や移動相の純度は HPLC による分離において極めて重要な因子である。RP-HPLC では入手可能な市販の HPLC 用溶媒や水が推奨される。グラジエント法を用いて分離する場合、単一溶媒より混合溶媒において溶存ガスの溶解性が低いと、ガスが酸化し問題を生じる場合がある。このような場合は、減圧や超音波による攪拌が溶存ガスを除去する有効な操作法として汎用される。溶媒中の固形物が HPLC 系に入ると、ポンプのバルブシールの損傷、分離用カラムの先端の詰まりの原因になる。ポンプの前及び後のろ過も推奨される。

分離用カラム 分離用カラムは個々のたん白質に応じて経験に基づき選択する。孔径 10 nm あるいは 30 nm のシリカ担体のカラムが分離に適している。小さなペプチドの分離には、直径 3 ~ 10 μm の全多孔性シリカ粒子にオクタデシルシランが化学的に結合した充てん剤又は直径 3 ~ 10 μm の多孔性シリカ粒子あるいはセラミックの微粒子にオクタデシルシランが化学的に結合した充てん剤は、直径 5 ~ 10 μm の全多孔性シリカ粒子にブチルシランが化学的に結合した充てん剤より有効である。

溶媒 最も一般的に用いられる溶媒は水とアセトニトリルの混液に 0.1 % 未満のトリフルオロ酢酸を加えた溶液である。粘度が過度に上昇しない限り、必要に応じてペプチドの溶解性を高めるために 2-プロパノール又は 1-プロパノールを加えてもよい。

移動相 pH を 3.0 ~ 5.0 の範囲で変えることにより、酸性アミノ酸残基 (例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸) を含むペプチドの分離を改善できるので、pH の選択において適応範囲の広いリン酸塩緩衝液が移動相によく用いられる。リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸の pH 2 ~ 7 (ポリマー担体のカラム充てん剤ではそれ以上の pH でも使用できる) の溶液もアセトニトリルによるグラジエント法と組み合わせて用いられる。トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルも非常によく使用される。

グラジエント法の選択 直線、非直線あるいは段階的グラジエントを用いることができる。複雑な混合物を分離するには濃度勾配の緩やかなグラジエントが推奨される。マーカーピークとなる 1 ~ 2 個のピークを明確に分離するのに最適なグラジエントを選択する。

アイソクラティック法の選択 単一の移動相を用いるアイソクラティック HPLC システムは、簡便でありかつ検出器の感度の向上が期待できるためによく用いられる。ピーク一つ一つについて明瞭な分離を得るよう移動相の組成を決めることは、時として困難なことがある。移動相の組成比や pH のわずかな変化がペプチドマップのピークの保持時間に大きく影響する

ような移動相は、アイソクラティック HPLC システムでは用いてはならない。

その他のパラメーター 良好な再現性を得るためには、通常カラムの温度を制御する必要がある。移動相の流速は毎分 0.1 ~ 2.0 mL, ペプチドの検出は UV 検出器を用いて 200 ~ 230 nm の測定波長で行う。その他の検出法も利用されている(例えば、ポストカラム誘導体化法)が、UV 検出法より頑健性の点で劣り、また適用範囲も狭い。

システム適合性 この項には試験法の全体にわたる性能を評価する方法を記述する。システム適合性の判定基準は、得られるデータの解釈と適否の決定に影響を及ぼす重要な試験パラメーターの特定に基づく。これらの重要なパラメーターはペプチドの消化とペプチド断片の分析をモニターする基準でもある。試料と全く同一に処理した標準品/標準物質との比較は、消化反応の終了を知る指標になる。システム適合性の判定基準を設定するために、試料と併行して標準品/標準物質を使用することが重要である。更に、比較のために標準品/標準物質から得たクロマトグラムの実例を付けるべきである。その他の指標として、目視によるたん白質あるいはペプチドの溶解性の検査、未切断たん白質が存在しないことの確認、消化の程度に依存して生成するペプチド断片の測定などがある。ペプチド分析のシステム適合性として重要なパラメーターは、ペプチドの分離方法及び検出方法並びにデータ解析に関する要求に依存する。

ペプチドマップ法を確認試験として用いる場合、システム適合性として選択性及び精度が重要である。たん白質の同一性の確認試験においては、変異たん白質の存在の確認の場合と同様に、試料たん白質のペプチドマップのペプチド断片を標準品/標準物質のペプチドマップのそれと比較することにより、既知の一次構造との一致を証明したり、変異たん白質の存在を確認する。ペプチドの分離度を測定するためには、試料たん白質の代わりに標準品/標準物質の消化物を利用することができる。変異たん白質の検討には、変異を生じたペプチド部分が特にマップ上で分離が不じゅうぶんな領域に存在する場合、変異たん白質と標準品/標準物質との一定混合物の比較分析が有効である。パターンの一致度の指標としては、検出される主要ペプチド断片の数が用いられる。各ペプチド断片のパターンの一致度はペプチド断片のピークの分離度から最もよく判定できる。クロマトグラフ法で使用される各種のパラメーター(例えばピーク間の分離度、ピークの最大幅、ピーク面積、テーリングファクター、カラム効率)がペプチドの分離度の決定に利用できる。試験するたん白質及び用いる分離法によっては、一つあるいは複数のペプチドの分離を適合性の条件としてもよい。

標準品/標準物質の消化物について試料と同一の条件で繰り返し分析することによって、試験精度の基準値が得られると共にペプチドの回収率を求めることができる。一般に試料たん白質のペプチド断片の回収率は、内標準物質又は外標準物質として添加したペプチドを用いて得られる。精度は相対標準偏差(RSD)で表される。回収率や精度は常に一定ではないので、システム適合性ではその両者についての限度値を設定しなければならない。これらの限度値は、試料たん白質に特有なものであり、各条ごとに規定されることになる。

判定方法 まず、相対保持時間、ピーク強度、ピークの数、全体の溶出パターンなどを視覚的に比較する。次に、ピーク強度比の数学的分析、更に試料の消化物及び標準品/標準物質の

消化物の 1:1 (v/v) 混合液のクロマトグラムのプロフィールを比較して、一致することを確認する。試料と標準品/標準物質のそれぞれの消化物のすべてのピークが同じ相対保持時間及び同じピーク強度比を示すことにより、試料と標準品/標準物質との同一性が確認される。

試料と標準品/標準物質との間で明らかに異なる相対保持時間を示したピークが、上記の 1:1 混合液では単一ピークとしてみられた場合は、システムの変動性を示している。1:1 混合液でピークが分離するときは、それぞれのピークのペプチド断片が同一ではないことの証拠となる。1:1 混合液中のあるピークが、試料及び標準品/標準物質消化液中のそれに相当するピークに比べ明らかにブロードならば、異なるペプチドの存在を示している可能性がある。ペプチドマップ分析のためのコンピューター用パターン認識ソフトウェアの利用が提案され、適用されているが、ソフトウェアの検証に問題があり、当面は公定法として採用することはできない。その他、計算式、数学的モデル、又はパターン認識による自動化の試みがすでに行われている。例えば、赤外吸収スペクトルやダイオードアレイ UV スペクトルによるペプチドの確認の自動化が挙げられる。しかしこれらの方法には、分解能が不じゅうぶんな場合、ペプチド断片間の分離が不完全な場合、あるいは標準品/標準物質と試料の消化断片間にピーク強度に差がある場合において、限界が存在する。

ペプチドマップにおいて正確に同定された特定のピークについては、ピークの保持時間とピーク面積あるいはピーク高さに関して数値を比較することができる。ピーク面積は、ピーク面積積分法がベースラインの変動の影響を受けやすく誤差を生じやすいことさえ考慮すれば、変動の比較的小さいピークを内標準として利用して計算することができる。代わりに、試料のすべてのペプチド断片のピーク高さの合計に対する各ピーク高さの比率を算出し、標準品/標準物質で得られる該当ピークの比率と比較することもできる。トリプシンの自己消化の可能性はブランクのペプチドマップ、即ちブランクの溶液をトリプシン処理した際得られるペプチドマップから確認できる。

ペプチドマッピング法の適格性を示すために最低限必要な要件は、試験条件の管理のためのシステム適合性試験を含む試験法が設定され、その適格性が証明されていることである。一般的には開発の初期段階においては、たん白質のペプチドマッピングの適格性を示すことのみでじゅうぶんである。しかし、たん白質性医薬品の開発を進め、規制当局へ承認申請するためには、当該たん白質について意図したとおりにペプチドマップを得ることができることを保証するような、試験操作に関する検証を含めた方法の妥当性に関する追加的資料が必要な場合もある。

ペプチドの分析と確認

この項は、規制当局へ承認申請を行うために医薬品の開発途上においてペプチドマッピングを用いる上での手引きである。

ペプチドマップを定性試験の手段として利用する場合には、個々のペプチドピークを完全に解析する必要はない。しかし、規制当局に承認申請する場合に必要なペプチドマップ法の検証には、個々のペプチドピークについて厳密な確認が必要である。ピークについての確認方法には、各ピークの N 末端アミノ酸配列分析及びアミノ酸組成分析の組み合わせによる方法から質量分析法 (MS) までさまざまである。

N 末端アミノ酸配列分析法とアミノ酸組成分析法の組み合わせを解析に利用する場合には、ペプチドの分離スケールを上げる。スケールアップは時としてペプチドピークの分離能に影響を及ぼすので、その際分離度が低下しないことを実験的に確かめておく必要がある。特定のペプチドのピークに相当する画分を分取し、減圧濃縮し、必要ならば再度クロマトグラフ法で分離する。ペプチド断片のアミノ酸分析はペプチドの大きさによって制限を受ける。N 末端がブロックされている場合にはアミノ酸配列分析を始める前にその除去が必要となる。カルボキシペプチダーゼ処理とMALDITOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight)-MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法) による検出を組み合わせた C 末端アミノ酸配列分析法も各ピークの解析のために利用できる。

質量分析法によるアミノ酸配列分析では、分離したペプチドを直接測定装置に導入するか、又はオンライン液体クロマトグラフ/質量分析法 (LC-MS) を利用して構造を分析する。一般にエレクトロスプレー質量分析法、MALDITOF 質量分析法や FAB (Fast Atom Bombardment) イオン化質量分析法が利用される。修飾たん白質のアミノ酸配列や修飾アミノ酸の決定には、タンデム質量分析法 (MS/MS) も利用されている。

たん白質試料の還元前後における消化物のマススペクトルを比較することにより、ジスルフィド結合の形成にあずかるチオール基を含むペプチドのジスルフィド結合を同定することができる。

ペプチドマップで一次構造が明確に証明できない部分がある場合には、更に詳細なペプチドマップが必要な場合もある。ペプチドマップ法によってたん白質の一次構造を解析する場合、理論たん白質構造と少なくとも 95 % が一致することを目標とする。