

バイオ/次世代モダリティ品質の 番人としてのキャピラリー 電気泳動



木下 充弘

1 はじめに

バイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）の研究開発の進展に呼応するように、1980年代半ばから研究室レベルでの自作のキャピラリー電気泳動（CE）装置やプロトタイプ機の試作を経て、1989年にオートサンプラーを備え、コンピュータ制御でデータ取得できるキャピラリー電気泳動装置が市販された¹⁾。1990年代後半から2000年代初頭になると、CEがバイオ医薬品の品質管理において本格的に利用され始めた。それまで、タンパク質分子の評価は、SDS-PAGEなどのスラブゲル電気泳動が主流であったが、CEの登場と進化が新規モダリティ開発のスピードを劇的に向上させた²⁾。

本稿では、新規モダリティ開発と重要品質特性評価における「品質の番人」としてのCEの役割について紹介する。

2 バイオモダリティにおけるキャピラリー電気泳動の利用

2.1 抗体医薬品と CE

バイオ医薬品は“DNA配列から期待されるタンパク質でかつ然るべき翻訳後修飾を受けたタンパク質である「目的物質」、目的物質の分子変化体のうち生物活性、有効性及び安全性の点で「目的物質」に匹敵する「目的物質関連物質」、これら以外の「目的物質由来不純物」からなる³⁾。バイオ医薬品の有効成分は「目的物質」と「目的物質関連物質」から構成され、タンパク質という高分子上に生じるわずかな違いを識別できる分析手法が求められる”。

バイオ医薬品は、化学合成により製造される医薬品に比べはるかに大きな不均一性を有する。厳密な製造プロセス下で製造された抗体であっても、抗体の断片化、重

鎖および軽鎖N末端におけるピログルタル化や重鎖C末端におけるリシンクリッピング、重鎖上のアスパラギン残基に結合する糖鎖自体の不均一性は避けられない⁴⁾。これらの評価を行うにあたりCEを用いることができる²⁾⁴⁾。

抗体は約50kDaの重鎖（HC）と約25kDaの軽鎖（LC）がそれぞれ2本ずつジスルフィド結合で繋がった約145～150kDaのタンパク質であるが、不完全な断片化体も生じる。また、原薬には抗体産生に用いた細胞由来のタンパク質も含まれる。抗体の純度や断片化を精密に測定するためには従来のSDS-PAGEの原理をキャピラリー内で行うSDS-キャピラリー電気泳動（CE-SDS）が用いられる。CE-SDSの利点は、オンカラム検出による定量性の高さと、相対分子量測定の精度の高さにある。

重鎖および軽鎖N末端におけるピログルタル化や重鎖C末端におけるリシンクリッピングに伴う電荷不均一性の評価には、キャピラリー等電点電気泳動（cIEF）が用いられる。cIEFはキャピラリー内にpH勾配を形成できるキャリアアンフォライト、等電点マーカーおよびタンパク質の混合液を充填して高電圧を印加してフォーカシングする手法である。cIEFはスラブゲル等電点電気泳動法のような煩雑な操作を必要とせず、0.05～0.10pI程度の差があれば独立したピークとして識別できる。また、pI値の再現性は0.02pIユニット以下であり、抗体中の電荷不均一性分子種を高い精度で評価可能である。

重鎖のアスパラギン残基に結合するN-結合型糖鎖の解析にはキャピラリーゲル電気泳動（CGE）が用いられる。タンパク質から遊離させた糖鎖は電気泳動に有効な負電荷を持つ発蛍光性物質を用いて安定な誘導体へと導き分析試料とする。検出にはレーザー励起蛍光検出器を用いるため、微量糖鎖の検出も可能である。また、CGEによる糖鎖分析では、中性糖鎖と酸性糖鎖の一斉分析が可能であり、糖鎖特有の異性体の分離が可能であるなど、高速液体クロマトグラフィーを凌ぐ優位性がある。

2.2 核酸医薬品と CE

核酸医薬品はバイオ医薬品に続く「第3の創薬モダリティ」として注目されている。従来の医薬品が、疾患の原因となる「タンパク質」を標的とするのに対し、核酸医薬品は「遺伝子情報（mRNAなど）」に直接作用する。これにより、創薬ハードルの高い疾患へのアプローチが可能となる。核酸医薬品はその実体がヌクレオチド鎖であるため、多くの低分子医薬品と比べ極性が高く負電荷を有するためクロマトグラフィー手段では分離が難しい。一方、CEは1塩基の違いを識別できる分解能を有し、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、

mRNA 医薬品、特定の遺伝子の働きを抑えることのできる短い 2 本鎖 RNA である siRNA などの品質管理において強力なツールとなる⁵⁾⁶⁾。具体的には、 $n-1$ 体 (1 塩基短い不純物) や $n+1$ 体 (1 塩基長い不純物)、不完全脱保護体の検出、siRNA の二本鎖形成率の評価などに利用できる。

核酸医薬品における CE の利用では CGE が用いられることが多い。一般的なヌクレオチド鎖は塩基数にかかわらず質量電荷比が一定であり、ポリマーゲルによる分子ふるい効果により、ヌクレオチド鎖サイズによる分離を達成でき、ASO や siRNA の長さを確認できるほか、純度なども評価することが可能である。CE は、ワクチンが機能するために重要な mRNA サイズとインテグリティを評価するためのゴールドスタンダードとなっている。CE を用いるこれらの評価は、微量サンプル (1 mg 以下) でも高感度な検出が可能であり、マルチキャピラリー電気泳動システムなどを用いれば劇的にスループットを向上させることが可能である。

CE は核酸アプタマーを作り出すための基盤技術としても威力を発揮する⁷⁾。特に、膨大な核酸ライブラリーの中から、標的分子と結合するアプタマーを選抜する SELEX 法との組み合わせ (CE-SELEX 法) は、アプタマー開発を加速させる重要な技術である。CE-SELEX 法は自由溶液中でアプタマーと標的分子との相互作用を評価でき、標的分子と結合する核酸の親和性 (K_d 値) の評価も可能などの利点とが多い。

3 日本薬局方におけるキャピラリー電気泳動の位置づけ

日本薬局方 (JP) において CE は、参考情報〈G3-7-180〉として、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法として収載されている⁸⁾。収載項目は基本原理から各種分離モード、システム適合性からなり、低分子からタンパク質などの高分子の分析も想定した内容となっている。また、最新の JP においては、腎性貧血治療薬であり、高度にグリコシル化された糖タンパク質であるエポエチンベータ (遺伝子組換え) の確認試験として CE が設定されているほか、一般試験法の「2.64 糖鎖試験法」、参考情報中の「バイオテクノロジー応用医薬品 (バイオ医薬品) の品質確保の基本的考え方〈G3-1-180〉」などの中に“CE”が登場する。現在、CE 自体は「参考情報」への掲載に留まっているが、バイオ医薬品や核酸医薬品に関連する高度な分析技術として、多くの医薬品の品質管理で「標準的」に用いられ、医薬品各条での引用が増加すれば、一般試験法へ移行していくかもしれない。

4 今後の展望

医薬品開発パイプラインのうち、バイオ医薬品が占め

る割合は年々増加しており、バイオ医薬品が開発全体の約 4~5 割の規模に達している。バイオ後続品についても 2010 年にエポエチンのバイオ後続品であるエポエチンカップ、2014 年に体内の炎症を引き起こす腫瘍壊死因子 α (TNF α) の働きを抑え、関節リウマチ、クローン病など治療に用いられるインフリキシマブが承認を受けた後、多くのバイオ後続品が上市されている。エタネルセプトに代表される融合タンパク質の承認、上市も続いている。バイオ医薬品の公開されている審査報告書内にも“キャピラリー電気泳動”が散見され、バイオ医薬品の特性解析において不可欠な手段でありつづけるとともに、次世代モダリティの品質確保においても重要性が高まっていくであろう。

文 献

- 1) L. Suntornsuk : *J. Chromatogr. Sci.*, **45**, 559 (2007).
- 2) S. I. Kaya, A. Cetinkaya, M. G. Caglayan, S. A. Ozkan : *Electrophoresis*, **43**, 1035 (2022).
- 3) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline Q6B : Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. 1999. Available from : <<https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B%20Guideline.pdf>>, [Accessed 24th February 2026].
- 4) A. Beck., E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianfèrari : *Anal. Chem.*, **85**, 715 (2013).
- 5) I. C. Santos, J. S. Brodbelt : *J. Sep. Sci.*, **44**, 340 (2021).
- 6) B. Wei, A. Goyon, K. Zhang : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **219**, 114928 (2022).
- 7) R. Didarian, H. K. Ozbek, V. C. Ozalp, O. Erel, N. Yildirim-Tirgil : *Mol. Biotechnol.*, **67**, 2962 (2025).
- 8) Ministry of Health, Labour and Welfare. General Information, Capillary Electrophoresis <G3-7-180>. In : The Japanese Pharmacopoeia. 18th ed. (2021).



木下 充弘 (KINOSHITA Mitsuhiko)

近畿大学薬学部創薬科学科 (〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1)。近畿大学大学院薬学研究科修士課程修了。博士 (薬学)。《現在の研究テーマ》複合糖質糖鎖の簡便迅速な分離技術の開発。《趣味》料理、音楽 (ロック) 鑑賞。
E-mail : m-kino@phar.kindai.ac.jp