

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発 「バイオナノ粒子精製技術の開発」

分担研究者 中島俊洋、長澤鉄二、矢野高広、天満昭子、宮地和恵、鈴木七保
アンジェス MG 株式会社

- (1) 研究要旨 バイオナノ粒子を医用材料として臨床応用するためには、安全性が確保される品質レベルまで、不純物の除去と精製を行う必要がある。従来型のウイルスベクター粒子と比較して、空粒子であるバイオナノ粒子の精製にはよりマイルドな条件の精製法の確立が必要であると考えられる。そこで、本分担研究では変異型センダイウイルスより産生されるバイオナノ粒子を材料として、種々の精製法の検討を行って最終的に精製されたバイオナノ粒子の性状についての検討を、粒度分布計による解析と電子顕微鏡撮影により行った。

B. 研究目的

作製されたバイオナノ粒子を実際にヒトの治療に臨床応用するためには、医用材料レベルの安全性が確保されている必要がある。安全性を確保するためには、導入対象となる医薬品の封入前にベクターそのものを十分に精製して純度を高めることと、封入処理や修飾処理の後に精製を行い、処理に用いる界面活性剤等の混入を防止する必要がある。医用材料として使用するためには、高度な精製技術が必要となるため、本研究ではヒトへの使用が出来るレベルの安全性を持つベクターを製造するために、精製技術の確立を行う。また、最終的には2種類以上の実験動物を用いて安全性試験を行ない、確立された技術でヒトに使用するために十分な安全性が確保されていることを確認する。

C. 研究方法

(1) バイオナノ粒子の調製

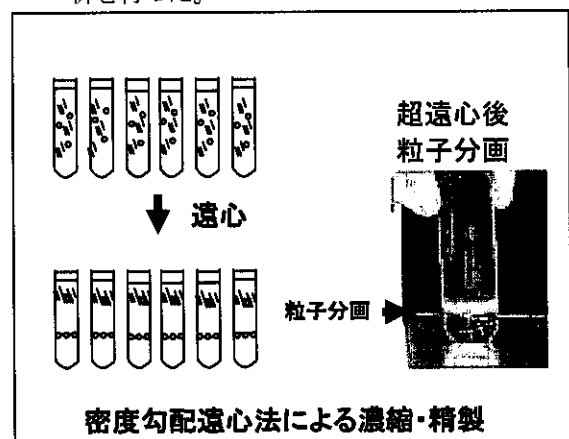
現在ヒト培養細胞に組換えタンパクを発現させてバイオナノ粒子を生産する技術を開発中であるが、本年度の研究では、バイオナノ粒子の調製法としては、センダイウイルスを増殖するために一般に用いられている鶏卵を利用した方法で行った。また、バイオナノ粒子の生産に利用する種センダイウイルスとしては、広島大学で分離されたセンダイウイルスを用いた。本株を用いた場合には、産生される粒子の50%程度がバイオナノ粒子(空粒子)となることが示唆されている。バイオナノ粒子産生のために、先ず受精鶏卵100個を36.5度の孵卵器内で10日間孵卵した後に、鶏卵一

り 1.3×10^4 FFU の種ウイルスを接種した。接種後に孵卵器内で更に3日間培養を行ってバイオナノ粒子の産生を行い、漿尿液の採液を行う前に血液の混入を防止するために冷蔵庫に移動して、4度で14時間インキュベートした。バイオナノ粒子を含む漿尿液の採液は、安全キャビネット中で吸引法により行った。得られた漿尿液には、バイオナノ粒子の他に種に使用したウイルス粒子も含まれるため、その不活性化を行うためにアルキル化剤であるベータプロピオラクトンにより処理を行った。混入しているウイルス粒子を完全に不活性化した後に、熱処理によりベータプロピオラクトンを分解して無毒化してから、フィルター処理を行った。漿尿液に混入している細胞や脂質等の残渣を除去するために、ウイルスを完全に不活性化した後のサンプル液を $2,000 \times g$ で20分間、4度の温度条件で遠心して、その上清を精製用のサンプル液として使用した。

(2) シュークローズ密度勾配遠心法による濃縮・精製

上記のようにして得られたサンプル液500 mL を用いて、バイオナノ粒子の精製を行った。混入したウイルスの不活性化処理を行った溶液30mLを、40mLの容量の遠心チューブで10mLの50%シュークローズ/TBS (pH7.4) に重層して、 $103,800 \times g$ (ローター:JS24.38)、90分、4度の温度条件で遠心した。遠心後にサンプル溶液と50%シュークローズとの界面の上に認めら

れた白濁したバンドをそれぞれの遠心チューブから採取して混合した後に、不連続のシュークローズ密度勾配遠心法により精製を行った。このステップにより500mLのサンプル液を約100mLの容量に濃縮した(5倍濃縮)。得られた溶液をTFF buffer 中で、4度の温度条件で60分透析処理を行う事でシュークローズの除去を行った後に、2回目のシュークローズ密度勾配遠心処理を行った。透析後のサンプル溶液6mLを、40mLの容量の遠心チューブ内で、20mLの50%シュークローズ/TBS (pH7.4) に重層した20mLの20%シュークローズ/TBS (pH7.4) 溶液の上に重層して、 $103,800 \times g$ (ローター:JS24.38)、18時間、4度の温度条件で遠心した。遠心後に、サンプル液と50%シュークローズとの界面と、50%シュークローズと20%シュークローズの界面にそれぞれ形成された白濁したバンドを採取した。各サンプル液は、シュークローズの除去を行なうために、TFF buffer 中で、4度の温度条件で60分透析処理した後に、サンプルに含まれる粒子の性状解析を行った。



(3) 平膜型限外濾過膜法による濃縮・部

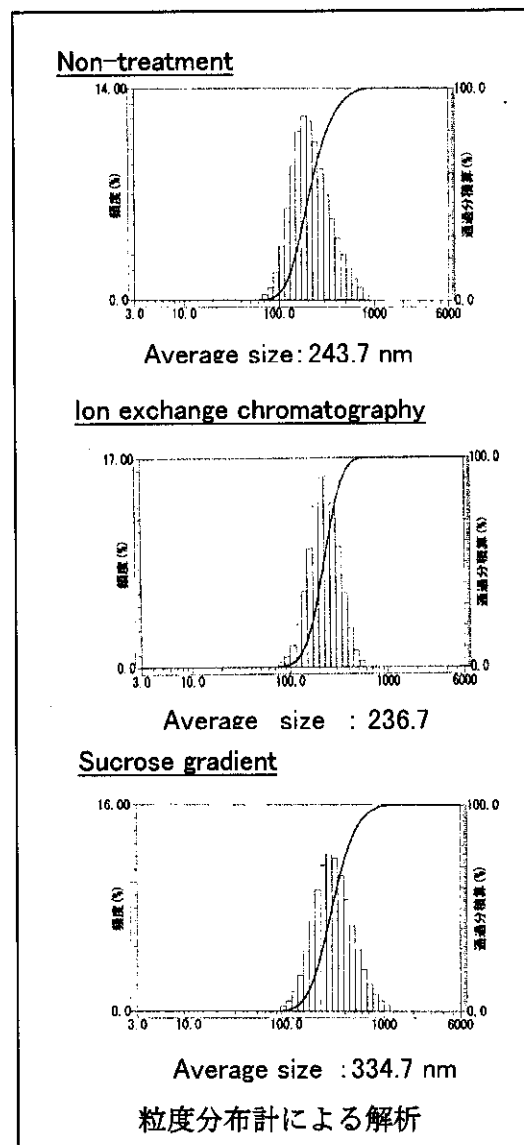
分精製

混入したウイルスの不活性化処理を行った後の漿尿液から、バイオナノ粒子の濃縮・精製を行うために、シュクロース密度勾配遠心法と並行して、平膜型の限外濾過膜を利用した方法も試みた。ベータプロピオラクトンによる混入ウイルス不活性化処理後のサンプル溶液500mLを、平膜型の限外濾過膜モジュールを用いて、80mLに濃縮した(6.25倍濃縮)。限外濾過膜で濃縮した後のサンプルは、50%シュクロースで濃縮・部分精製したサンプルと同様に、50%シュクロースと20%シュクロースを用いた、不連続密度勾配遠心法により分離・精製を行った。遠心処理後は、サンプル液と50%シュクロースとの界面と、50%シュクロースと20%シュクロースの界面にそれぞれ形成された白濁したバンドを同様に採取して、TFF buffer 中で、4度の温度条件で60分透析処理することでシュクロースの除去した後に、サンプルに含まれる粒子の性状解析を行った。

(4) 樹脂による精製

シュクロースによる、不連続密度勾配遠心法による精製法と並行して、平膜型限外濾過膜法と樹脂による精製を組み合わせた精製方法についても検討を行った。混入したウイルスの不活性化処理を行った後のサンプル溶液を、平膜型の限外濾過膜を利用して濃縮・部分精製した後にバッファ交換を行い、イオン交換樹脂により精製した。イオン交換樹脂に、サンプルを添加

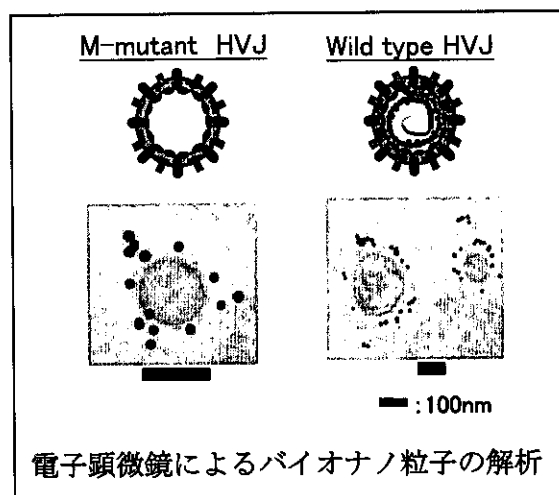
して、150 mMと350 mMの塩を含むバッファで樹脂の洗浄を行った後に、バイオナノ粒子を含む分画の溶出を行った。バイオナノ粒子を含む分画については、含まれる粒子の性状を粒度分布計による解析と電子顕微鏡による撮影で検討した。



(5) 粒度分布計による解析と電子顕微鏡によるバイオナノ粒子の観察

サンプルに含まれる、バイオナノ粒子の粒子サイズを解析するために、粒度分布計による解析を行った。サンプルをPBSで希釈

した後に、石英キュベット内に移して動的
光拡散型の粒度分布計(堀場製作所製)
を用いて解析を行った。また、サンプルに
含まれるバイオナノ粒子の電子顕微鏡観
察は以下のようにして行った。サンプルとし
ては、平膜型限外濾過膜法と樹脂による精
製を組み合わせた精製方法により得られた
サンプルを用いて観察を行った。サンプル
はニワトリ保存血と氷上で 5 分間反応
させた後 1/2 Karnovsky's で 4℃一晩固
定した。固定後 PBS (-) で洗浄して F
タンパクを認識する一次抗体で 37℃ 1
時間反応させた。さらに、金コロイド標
識した二次抗体で 37℃ 1 時間反応させ、
2%OsO₄ で後固定した。固定後のサンプ
ルを 2%Agarose 内に包埋しておよそ
1mm 角に細断したものを、2%酢酸ウラ
ニウム溶液で 1 時間前染色した。染色後
エタノール及び酸化プロピレンにて脱
水作業を行い、エポキシ樹脂で包埋した。
包埋サンプルをウルトラミクロトーム
によって 70~80nm に薄切したものを
Cu グリッド上で後染色(2%酢酸ウラン
10 分、クエン酸鉛 10 分)した後、透過
型電子顕微鏡を用いて観察した。



電子顕微鏡によるバイオナノ粒子の解析

(6) 倫理上の配慮

本研究を実施するにあたり、アンジェス MG
株式会社は、研究所の所在地である独立
行法人 産業総合技術研究所の規定に従
い、国で定められている、組換え DNA 実
験、動物取り扱いに関する指針に従い、産
業総合技術研究所で開催される各委員会
で実験許可を受けてから実験を行って
おります。また、実験に従事するものの安全確
保についても、産業総合技術研究所の規
定に従い、年に 1 回行われる実験の安全
講習に参加し、健康診断も受けて実験従
事者の健康管理も確保しております。以上
のように、本研究は倫理面の配慮をしたう
えで実施されております。

D. 研究結果

(1) バイオナノ粒子の調製

バイオナノ粒子を新規の高性能ドラッグデ
リバリーシステム(DDS)としてヒトへ臨床応
用するためには、最終的にヒト培養細胞を
用いてバイオリクターシステムで粒子産
生を行う必要がある。現在までに、野生型

のセンダイウイルスを用いたベクター製造技術と、GMP基準に準拠したベクター製造を行う事が出来るパイロットプラントの整備を並行して進めているが、本年度の研究においては、従来からワクチンの製造や医薬品製造用材料の生産に利用されている、ニワトリ胚を用いた製造法により材料となるバイオナノ粒子の調製を行った。広島大学で単離されたセンダイウイルス株は、ウイルス粒子の他に、同レベルの量の空粒子（すなわちバイオナノ粒子）を産生することが知られており、このウイルス株を10日間孵卵した受精鶏卵に接種して材料となるバイオナノ粒子を含むサンプル溶液を調製した。その結果、通常のセンダイウイルスをニワトリ胚を用いて産生した場合と同レベルの、粒子量を得ることが出来ることが明らかとなった。ウイルス粒子は直径300～600ナノメートルであるが、変異型ウイルスにより産生されるバイオナノ粒子はゲノムRNAを含まないため、粒子サイズが小さくなることが示唆されている。そこで、調製したサンプル溶液中にバイオナノ粒子が含まれているかを、粒度分布計を用いて解析した結果、実際に粒子径が100～200ナノメートル程度のサイズが小さい粒子が含まれることが明らかとなった。そこで、調製したサンプル溶液を用いて、バイオナノ粒子の濃縮・精製方法と性状の検討を行うことにした。

(2) シュークロス密度勾配遠心法によるバイオナノ粒子精製の検討

バイオナノ粒子の性状解析や、バイオナノ粒子の臨床応用には、産生された粒子を精製する必要がある。最終的にはウイルスの構成蛋白質を組換え蛋白質としてヒト培養細胞株に発現して、空のバイオナノ粒子のみをバイオリクターを用いて産生する技術を開発するが、今回の研究に用いたサンプル溶液には、不活性化されたウイルス粒子など、性状の異なる他の粒子も含まれているため、目的のバイオナノ粒子を分離・精製する必要がある。それらの混入している粒子には、不活性化されたウイルスゲノムが含まれているため、空のバイオナノ粒子と比較して粒子密度が異なると考えられた。そのため、粒子の分離を行う方法としては、ウイルスなどの微小粒子を精製する方法として一般に使用されているシュークロス密度勾配遠心法が最適であると考えられた。そこで、得られたサンプル液を用いて、シュークロス密度勾配遠心法によるバイオナノ粒子の分離精製を試みた。センダイウイルスの粒子密度は、50%シュークロス溶液よりは低いながら20%シュークロス溶液よりは高いことが知られている。一方空のバイオナノ粒子は、その構成成分のほとんどが脂質であると推測されるため、粒子密度は20%シュークロス溶液よりも低いと予測された。そこで、50%シュークロスに重層して遠心分離する方法と、20%シュークロスと50%シュークロスとを重層した上層に更にサン

プル溶液を重層して遠心分離する不連続密度勾配遠心法を組み合わせた濃縮・分離・精製法により、バイオナノ粒子の精製が可能であるかを検討した。精製したサンプルを粒度分布計で解析した結果、シュークロースによる密度勾配遠心法を行うと、サンプル中に含まれるサイズの小さいバイオナノ粒子が消失する事が明らかとなった。この結果から、バイオナノ粒子の濃縮・精製には、シュークロースによる密度勾配遠心法は適していないことが明らかとなった。

(3) 平膜型限外濾過膜によるバイオナノ粒子の濃縮・精製の検討

上記の結果から、バイオナノ粒子の精製にはシュークロースによる密度勾配遠心法などの従来法とは異なる濃縮・精製法を開発する必要があることが明らかとなった。そこで、使用する溶液の浸透圧の変化が急激に起こらないマイルドな条件で濃縮・精製出来る方法を検討することにした。限外濾過膜を用いて、タンパク質を含むサンプルを濃縮・精製する方法は、溶液の浸透圧の急激な変化を伴わない方法であるため、バイオナノ粒子を濃縮・精製するのに適した方法であると考えられた。ラボレベルのサンプル調製ではディスク型の限外濾過膜が使用されるが、膜の目詰まりにより処理できる液量が小さい上に、濃縮効率が低いことが知られている。また、今後バイオナノ粒子を臨床応用するために実製造を開始する場合には、医用材料レベルのバイオナノ粒子を大量

に生産する必要があるため、工業レベルまでスケールアップが可能な技術を開発する必要がある。そこで、組換え蛋白質製剤などの医薬品製造に使用実績があり、スケールアップが容易な平膜型の限外濾過膜モジュールを用いた、濃縮・精製の検討を行った。混入ウイルスの不活性化処理を行った後のサンプル溶液を、50%シュークロースによる密度勾配遠心処理を行わずに、直接平膜型の限外濾過膜モジュールで濃縮と不純物の除去を行なったところ、50%シュークロースによる密度勾配遠心による処理の場合と異なり、濃縮処理後もバイオナノ粒子のサイズに相当する粒子が認められることが明らかとなった。濃縮したサンプルを、更に20%シュークロースと50%シュークロースによる不連続密度勾配遠心法で精製したところ、バイオナノ粒子のサイズに相当する粒子の消失が認められた。これらの結果から、バイオナノ粒子の濃縮・精製には、シュークロースによる密度勾配遠心法ではなく、平膜型の限外濾過膜モジュールを用いた方法が適していることが明らかとなった。更に、精製を行うために樹脂による精製法の検討も試みた。樹脂による精製も、平膜型の限外濾過膜モジュールによる方法と同様に工業レベルまでスケールアップが可能な技術であり、組換え蛋白質製剤などの医薬品製造にも使用実績があるため、バイオナノ粒子の精製に適していると考えられる。そこで、限外濾過膜モジュールを用いて濃縮・精製したサンプルを、イオン交換樹脂に添加してバイオナノ

粒子の吸着を行った後に、サンプル中に含まれる不純物を2回のバッファー洗浄により除去した。樹脂洗浄後に、バッファーの塩濃度を上げることで目的の粒子の溶出を行ない、精製純度の高いバイオナノ粒子を回収した。粒度分布計による解析の結果、得られたサンプル中には、バイオナノ粒子のサイズに相当する粒子が認められることが明らかとなった。この結果から、樹脂による精製法も、バイオナノ粒子の精製に有効であることが明らかとなった。

(4) 精製後のバイオナノ粒子の性状に関する検討

上記の平膜型の限外濾過膜モジュールと精製用樹脂を組み合わせた方法で精製した分画には、バイオナノ粒子に相当するサイズの粒子が存在することが明らかとなった。しかし、実際に含まれる粒子が、目的の蛋白質を含む空の粒子であるかは不明であった。そこで、電子顕微鏡による解析により、精製した分画中に目的のバイオナノ粒子が含まれているかを検討した。その結果、ウイルスゲノムを含まず粒子径が100～200ナノメートルの空粒子が存在すること、空粒子の表面には膜融合活性に重要なセンダイウイルスのFタンパク（fusion protein）が存在していることが明らかとなった。これらの結果から、上記の方法により精製により得られた分画中には、実際にバイオナノ粒子（膜融合タンパクを持つ空粒子）が存在することが確

認された。

E. 考察

本年の研究により、目的のバイオナノ粒子の濃縮・精製には、ウイルス粒子などで一般的に使用されているシュークロース密度勾配遠心法は適しておらず、平膜型限外濾過膜を用いた方法や、精製用樹脂による方法が適していることが明らかとなった。それらの精製法はいずれも医薬品製造での実績がある上、将来臨床応用を行う場合に必要となるスケールアップにも対応出来る。そのため、本年度の研究で得られた知見は、今後バイオナノ粒子を実際に実用化する際には、重要な技術であると考えられる。シュークロース密度勾配遠心法による精製で、バイオナノ粒子が消失する理由は不明であるが、ウイルス粒子とは異なり、バイオナノ粒子はゲノムRNAやゲノムタンパクを含まない空粒子であるため、浸透圧の変化に弱いことが原因の一つであると考えられる。従って、今後臨床応用を目指して更に精製法の検討を行う場合には、医用材料としての製造を行う場合のスケールアップや品質管理などの観点に加えて、バイオナノ粒子の物理的脆弱性を考慮して技術開発を進める必要がある。また、本年はニワトリ胚に変異体センダイウイルスを接種してバイオナノ粒子を得ることに成功したが、本研究で使用した漿尿液にはウイルス粒子も含まれているため、臨床応用に適しておらず、実際に臨床応用をする場合にはヒト細胞株に目的のセンダイウイルス構成蛋白質を発現させる事で、バイオナノ粒子を産生すると考えられる。ニワトリの細胞膜で構成

されるバイオナノ粒子と、ヒト細胞に由来する細胞膜で構成されるバイオナノ粒子では、粒子の表面電化などの性状が異なる可能性があるため、今後ヒト培養細胞で産生したバイオナノ粒子を使用して、濃縮法、精製法の再検討を行う必要があると考えられる。今後は、分担研究者が研究している、ヒト細胞株によるバイオナノ粒子生産法の開発と並行して、更に不純物除去と精製を行うために技術開発を行う。

F. 結論

本年度の研究で、バイオナノ粒子の製造に適した精製法を確立した。確立した技術は、今後実製造を行う場合の医薬品製造基準や、工業レベルの製造に必要なスケールアップにも対応できる技術であり、今後得られた知見を利用して、バイオナノ粒子の安全性、安定性を確認するために必要な生産を行う。

G. 健康危険情報

特になし。HVJを不活性化して作成したHVJエンベロープベクターは全く感染性がないことが明らかになった。

H. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：

Nakajima, T. et al.: Development and Manufacturing of HVJ (hemagglutinating virus of Japan) - Envelope Vector for Gene Therapy. 5th Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2002年

6月6日, Boston

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

バイオナノ粒子による治療用生体高分子デリバリーシステムの開発

「ベクターの修飾による標的化技術の開発」

分担研究者 金田安史 大阪大学医学系研究科教授

研究要旨 HVJ エンベロープベクターをマウスに静脈投与すると脾臓に、硫酸プロタミンと混合して投与すると肺に遺伝子導入が可能であった。ヘパリンと混合後に局所投与すると遺伝子発現の増強が認められた。

A. 研究目的

HVJ エンベロープベクターを種々の方法で修飾することにより特定組織へのターゲティングを可能にする。

B. 研究方法

今回は HVJ エンベロープベクターを様々なポリマーで修飾することによりマウス尾静脈から注入したときにどのような臓器に遺伝子導入が可能かについて、各臓器でのルシフェラーゼ遺伝子発現と蛍光標識したオリゴヌクレオチドの取り込みを指標に評価した。また局所投与したときの遺伝子発現の増強効果についても検討した。

C. 研究結果

HVJ エンベロープベクター 100 μ l をそのまま修飾せずに静脈内投与すると脾臓に遺伝子導入ができることがわかった。蛍光オリゴを用いた実験から脾臓の marginal zone の細胞に取り込みがあり、その約 30% は CD11c positive で樹状細胞と考えられる細胞集団で

あった。HVJ エンベロープベクターは 6×10^9 個までであればマウスには傷害はみられずに遺伝子発現をおこせることがわかった。

次いで正電荷型ポリマーである硫酸プロタミン 50 μ g/ml と HVJ エンベロープベクター 6×10^9 個を混合した後に静脈注射したところ肺に特異的に遺伝子導入がみられた。脾臓への導入は全く起こらなかった。蛍光オリゴは肺胞細胞と肺の血管壁に認められた。ポリエチレン修飾したカチオン化ゼラチンと HVJ エンベロープベクターを混合後に静脈注入すると全くどの臓器にも遺伝子導入がおこらなかった。

HVJ エンベロープベクターをラットの脳脊髄液内に大漕から投与すると延髄、小脳の細胞や脈絡叢の細胞に遺伝子導入される。このときにベクターを 50 unit/ml のヘパリンと混合して投与すると遺伝子発現が 5 倍増強された。同様な効果は骨格筋内に投与したときにも認められた。

D. 考察

HVJ エンベロープベクターは直径が約 200 nm でゼータポテンシャルが-5~-10 mVであるが、硫酸プロタミン修飾により直径が約 1 μm, ゼータポテンシャルが約-2mVとなる。肺への遺伝子導入は最初の組織でトラップされてしまったと考えられる。脾臓へのターゲティング機構は不明であり、大きさなどから非特異的な網内系への取り込みではなく、融合蛋白に決定基があるのではないかと考えられる。今回はポリマーによる passive targeting であったが、つぎには表面蛋白に抗体などを結合させる active targeting も試みる必要がある。

E. 結論

ポリマーで修飾することにより HVJ エンベロープベクターを特異的な組織に導入したり、遺伝子導入効率を増強させることが可能となった。

F. 健康危険情報

特になし。HVJ を不活性化して作成した HVJ エンベロープベクターは全く感染性がないことが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kaneda, Y., Nakajima, T., Nishikawa, T., Yamamoto, S., Ikegami, H., Suzuki, N., Nakamura, H., Morishita, R., and Kotani, H.: HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Molecular Therapy* 6, 219-226, 2002.

Shimamura, M., Morishita, R., Endoh, M., Oshima, K., Aoki, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., and **Kaneda, Y.:** HVJ-envelope vector for gene transfer into central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 300, 464-471, 2003.

2. 学会発表

Kaneda, Y.: Development of HVJ envelope vector for in vitro and in vivo transfer of plasmid DNA, oligonucleotides and proteins. 5th Annual meeting of the American Society of Gene Therapy 2002年6月7日, Boston

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

“化学療法剤を封入した医薬製剤” 特願
2002-320577

“ゲノムライブラリーの迅速スクリーニングおよび
高効率遺伝子機能解析方法” 特願
2002-337545

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kaneda et. al.	Hemagglutinating Virus of Japan(HVJ)Envelope Vector as a Versatile Gene Delivery System	MOLECULAR THERAPY	Vol.6 No.2	219-226	2002
Shimamura et. al.	HVJ-envelope vector for gene transfer into central nervous system	Biochemical and Biophysical Research Communications	300	464-471	2003