

D. 考察

SF+細胞を用いて発現培養を行い、得られた培養液から rHA の精製を行った。ウイルス播種後から経時的に細胞を回収し、WB を行った結果、rHA たん白の発現は、ウイルス播種後 24 時間からみられ、48 時間以降は同程度の発現量であった。培養液量に関わらず、単位培養液量あたりの rHA たん白発現量は、ほぼ一定であった。精製後の rHA たん白の純度は PSC 社と同等で 98%以上であった。BEVS は再現性の高いたん白生産系であり、本検討においても、100L までのスケールでそれが確認できたことから、小スケールでの rHA たん白の原薬製造方法が確立できた。

次に rHA たん白の収量向上の目的で、発現培養時の細胞密度を検討した。培地及び各培養パラメーターなどの培養条件を変化させずに、細胞密度を現行の 1.25 倍まで上げて、rHA の生産量は同等であった。しかし、細胞密度を 2 倍以上の高密度にすると、rHA 発現量が著しく低下した。この原因については、培地中の栄養素の枯渇などが考えられるが、現時点では不明である。高密度培養における細胞膨化の程度や細胞内の構造変化についても、現行の場合と差が認められ、細胞の構造変化と rHA 生産に高い相関性があると考えられた。

E. 結論

100 L レベルまでの小スケールで rHA 発現培養及び精製方法を確立することができた。培養液 1L あたり 10 mg 以上 (最高 13mg/L) の精製 rHA たん白を得ることができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

第2章 A/Indonesia/05/2005 株の rHA の発現培養と精製

A. 研究目的

A/Vietnam/1203/2004 株とは別クレードの H5N1 型株である A/Indonesia/05/2005 株の rHA の発現培養と精製を検討する。小スケールでの発現培養及び精製の条件をもとに 15 L スケールで rHA を製造する。

B. 研究方法

1. 宿主細胞

前述のとおり。

2. 組換えバキュロウイルス

A/Indonesia/05/2005 rHA の発現培養に使用した rBV は、A/Vietnam/1203/2004 と同様の方法で構築したものを PSC より入手した。インフルエンザウイルス A/Indonesia/05/2005 のヘマグルチニン遺伝子は、米国 CDC から提供された A/Indonesia/05/2005 の vRNA を用いた。

3. 抗血清

A/Vietnam/1203/2004 rHA に対する抗血清 S-7826L1 を用いた。予め WB で S-7826L1 が A/Indonesia/05/2005 rHA と交差反応することを確認した。

4. 発現培養

発現培養は、200mL/500mL、500mL/3L のスピナーフラスコまたは 15 L の培養装置を使用した。細胞濃度 0.5×10^6 個/mL で SF+細胞の培養を開始し、細胞濃度が目的の細胞濃度に達した時に、rBV を播種し、発現培養を開始した。前培養・発現培養中の生細胞数、生細胞率、平均細胞径を計測し、A/Vietnam/1203/2004 株の発現培養と同様に回収時間を決定した。

5. 精製

A/Vietnam/1203/2004 rHA の精製と同じ工程で、洗浄や溶出などの詳細な条件を最適化することで

A/Indonesia/05/2005 rHA を精製した。小スケールで精製方法を検討し、15 L にスケールアップした。

6. 分析

SDS-PAGE 及び WB により精製工程の各サンプルを分析した。

C. 研究結果

rBV 播種前後の各種細胞培養パラメーターの推移を図 2-1 に示す。A/Vietnam/1203/2004 と同様に、rBV 播種後、生細胞数及び生細胞率が低下し、平均細胞径が増大した。

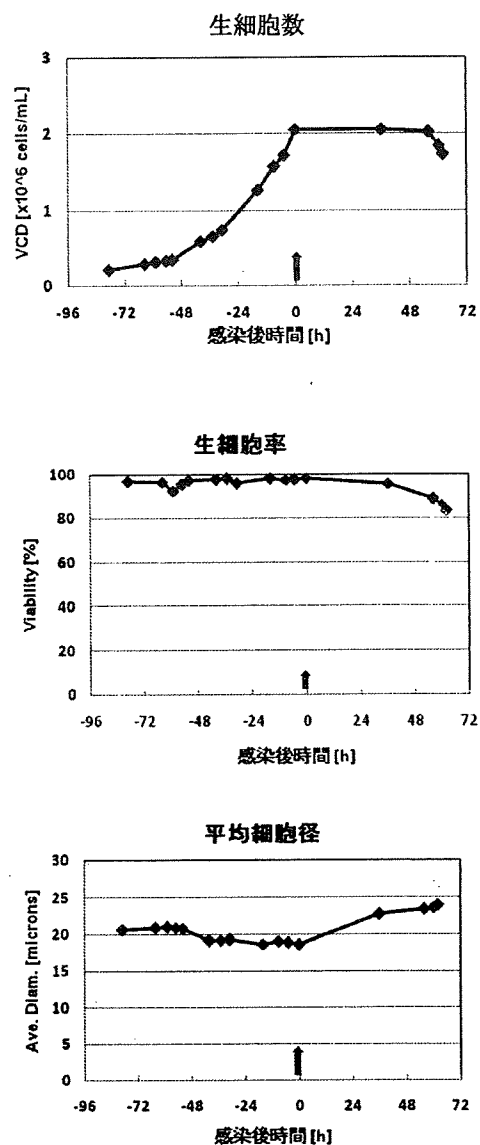


図 2-1 rHA 発現培養の各種パラメーターの推移

また、rBV 播種前後の細胞の形態変化を図 2-2 に示す。A/Vietnam/1203/2004 と同様に、培養 2 日目よりストローマ構造が明確となり、培養 3 日目には蛇状構造が確認された。

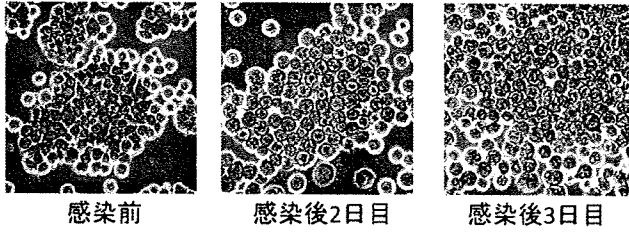


図 2-2 rHA 発現培養の細胞形態の変化

小スケールのスピナーボトル (200mL/500mL 及び 500mL/3L) で発現・培養したサンプルを用いて rHA の精製を検討した。図 2-3 に rHA のクロマト I 工程溶出画分の SDS-PAGE 像 (CBB 染色及び WB) を示す。

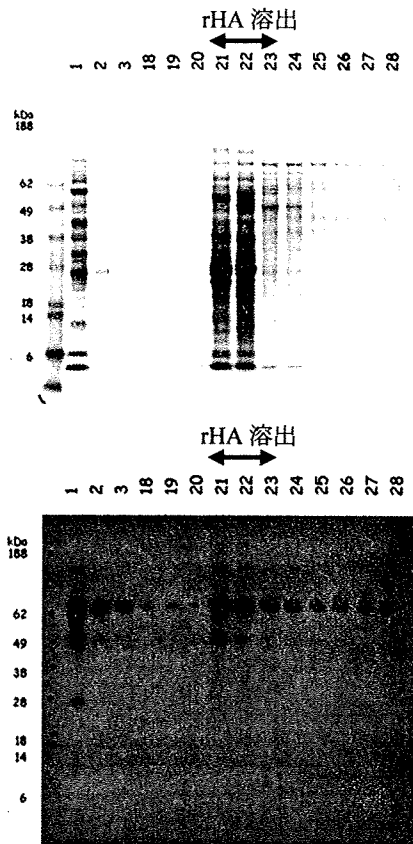


図 2-3 小スケールでの rHA のクロマト I 工程 SDS-PAGE 像 (上: CBB 染色、下: WB)

図 2-4 に rHA のクロマト II 工程の溶出画分の CBB 染色及び WB を示す。WB 像で、フラクション 21~23 に rHA が確認された。

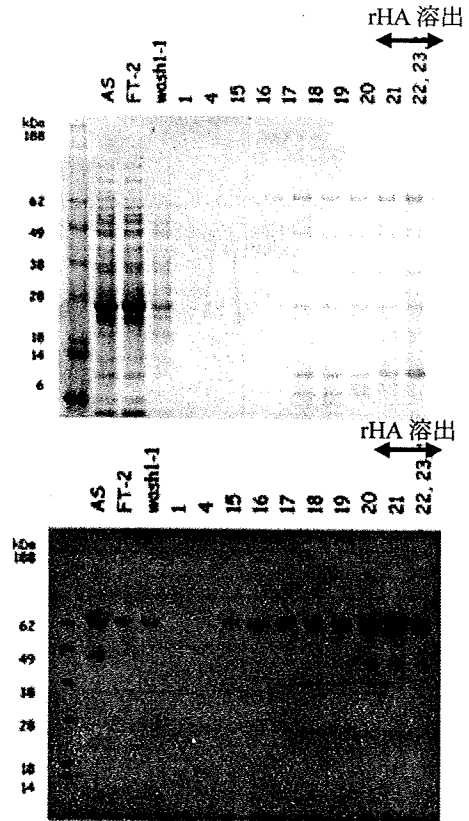


図 2-4 小スケールでの rHA のクロマト II 工程 SDS-PAGE 像 (上: CBB 染色、下: WB)

小スケールで検討した発現培養及び精製条件に基づき、15 L スケールでの rHA 発現培養及び精製を実施した。図 2-5, 2-6 に、クロマト I 及び II 工程における rHA の溶出画分の SDS-PAGE 像 (CBB 染色及び WB) を示す。クロマト I からの rHA 溶出画分をクロマト II 工程でさらに精製し、rHA 溶出画分を得た。このクロマト II 工程の rHA は CBB 染色及び WB により 3 本のバンド (図の矢印、矢頭、星印) が認められた。2 つのクロマト操作によって、夾雑たん白は、ほとんど消失し、rHA の純度が上がった。

クロマト II 工程で溶出した rHA を、DNA 除去、緩

衝液交換工程を行うと、図 2-7 に示すとおり、HA0 のバンド (矢印) が薄くなり、主として HA1 と HA2 のバンド (矢頭と星印) のみになった。

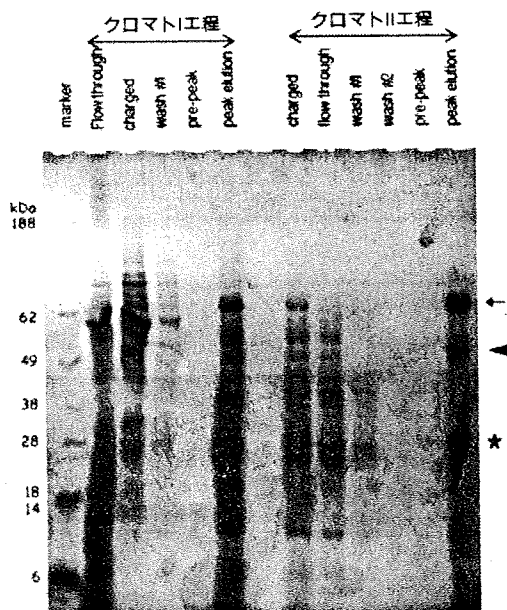


図2-5 rHAの精製工程における画分のCBB染色像

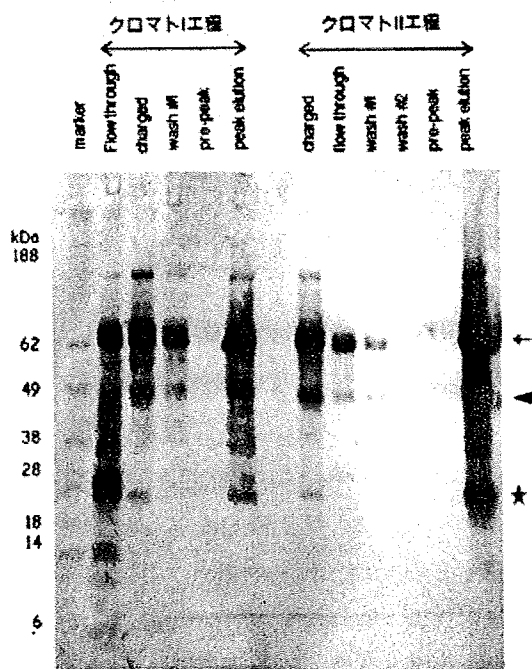


図2-6 rHAの精製工程における画分のWB像

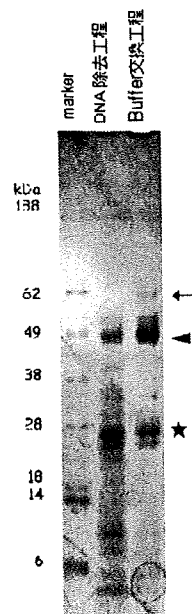


図2-7 最終精製rHAのCBB染色像

D. 考察

培養液 1L あたりから得られる A/Indonesia/05/2005 rHA 量は A/Vietnam/1203/2004 rHA 培養時と同じ収量範囲にあり、H5N1 の 2 種の rHA の培養に BEVS は適応可能であった。

培養・精製後の A/Vietnam/1203/2004 rHA は、クロマト工程が終了した時点で、ほぼ全量がゲル電気泳動にて非開裂型 HA0 として確認された。それに対して、A/Indonesia/05/2005 rHA は還元条件下では HA1 及び HA2 として存在する割合が高かった。一方、非還元条件のゲル電気泳動では HA0 として確認された (データ未掲載)。このことから、A/Indonesia/05/2005 rHA では、HA0 の多くが開裂型であることが示唆された。

今後、カラム吸着、洗浄、溶出条件、各工程にかかる時間等の精製条件を最適化する必要がある。また、rHA の開裂型/非開裂型の比率が免疫原性に及ぼす影響を非臨床試験にて確認する必要があると判断された。

E. 結論

A/Indonesia/05/2005 rHA の発現培養時の細胞のパラメーターの経時変化は、A/Vietnam/1203/2004 rHA 発現培養時と同様であり、株が変わっても再現性が高いこ

とが確認された。

A/Vietnam/1203/2004 rHA と同じ精製工程で、
A/Indonesia/05/2005 rHA を得ることが出来た。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

第3章 新型 H1N1 インフルエンザウイルス A/California/04/2009 株の rHA の発現培養と精製

A. 研究目的

H5N1 株以外の rHA として、新型 H1N1 A/California/04/2009 株の rHA の発現培養と精製を検討する。小スケールでの発現培養及び精製をもとに、20 L スケールで rHA を製造する。

B. 研究方法

1. 宿主細胞

前述のとおり。

2. 組換えバキュロウイルス

A/California/04/2009 rHA の発現培養に使用した rBV は、A/Vietnam/1203/2004 と同様の方法で構築したものを PSC より入手した。インフルエンザウイルス A/California/04/2009 のヘマグルチニン遺伝子は、米国 CDC から提供された A/California/04/2009 の vRNA を用いた。

3. 抗血清

A/Brisbane/57/2007 及び A/Solomon Islands/03/2006 株に対する抗血清を用いた。予め WB で本抗血清が A/California/04/2009 rHA と交差反応することを確認した。

4. 発現培養

発現培養は 200mL/500mL スピナーフラスコまたは 20 L の培養装置を用いて rHA 蛋白の発現を検討した。細胞濃度 0.5×10^6 個/mL で SF+細胞の培養を開始し、細胞濃度が 2.0×10^6 個/mL に達した時に、rBV を播種し、発現培養を開始した。前培養・発現培養中の生細胞数、生細胞率、平均細胞径を計測し、A/Vietnam/1203/2004 rHA の発現培養と同様に回収時間を決定した。

5. 精製

A/Vietnam/1203/2004 rHA の精製と同じ工程で、洗浄

や溶出などの詳細な条件を最適化することで A/California/04/2009 rHA を精製した。小スケールで精製方法を検討し、20 L へスケールアップした。

6. 分析

SDS-PAGE 及び WB により、精製工程の各サンプルを分析した。

C. 研究結果

rBV 播種前後の各種細胞培養パラメーターの推移を図 3-1 に示す。A/Vietnam/1203/2004 と同様に、rBV 播種後、生細胞数及び生細胞率が低下し、平均細胞径が増大した。

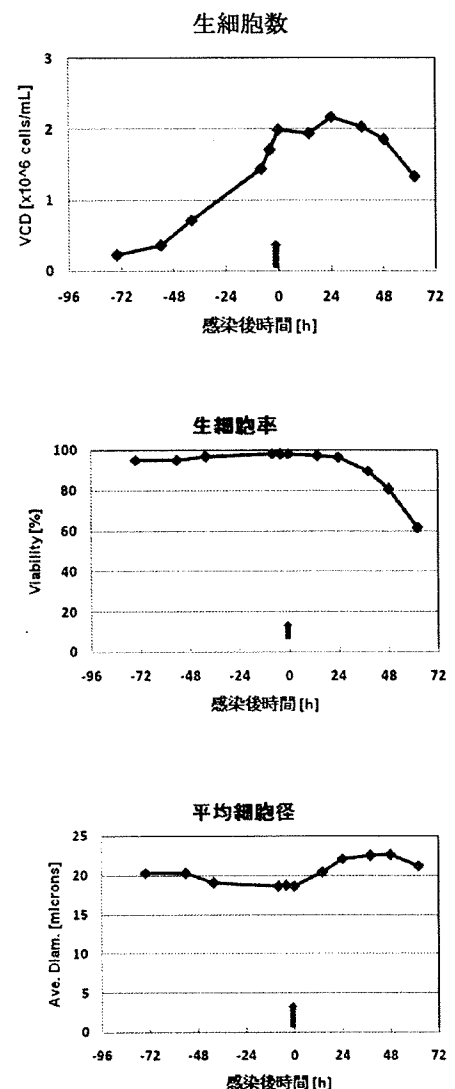


図 3-1 rHA 発現培養の各種パラメーターの推移

また、rBV 播種前後の細胞の形態変化を図 3-2 に示す。A/Vietnam/1203/2004 と同様に、培養 2 日目よりストローマ構造が明確となり、培養 3 日目には蛇状構造が確認された。

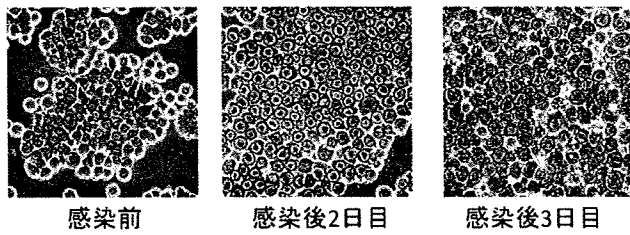


図 3-2 rHA 発現培養の細胞形態の変化

発現培養液中の rHA を WB にて確認した (図 3-3)。用いた抗血清はいずれも rHA に対して交差反応性を示し、抗 H1N1/Brisbane 抗血清の方が幾分反応性は高かった。rBV を播種することにより、ウイルス播種 44 時間後から目的 rHA が発現し、52~62.4 時間で発現量はプラトーに達した。これは A/Vietnam/1203/2004 株で見られた細胞パラメーターの推移及び rHA 発現の経時変化と類似していた。

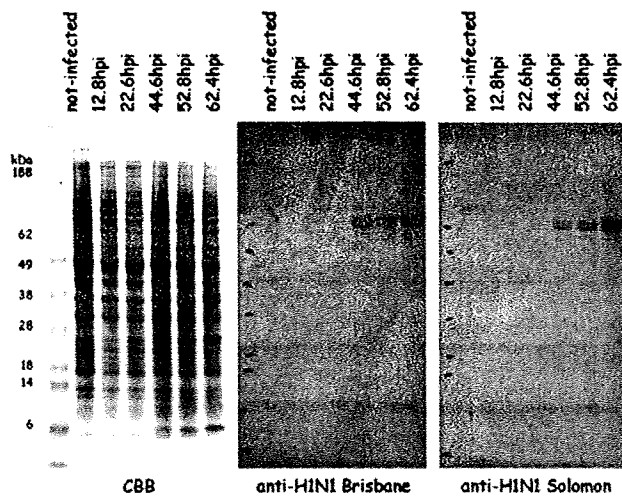


図 3-3 ウイルス播種後の rHA 発現の経時変化 (左 : CBB 染色、中、右 : WB)

上記発現培養とは別に、小スケールで rHA の発現と精製を検討した。図 3-4 に rHA のクロマト I 工程の溶出画分の SDS-PAGE 像 (CBB 染色及び WB) を示す。

本 WB では、抗 H1N1/Brisbane 抗血清を用いた。クロマト I 工程の画分 20~28 (ピークはフラクション 23) に rHA は溶出された。画分 20~24 を集め、クロマト II 工程に供した。

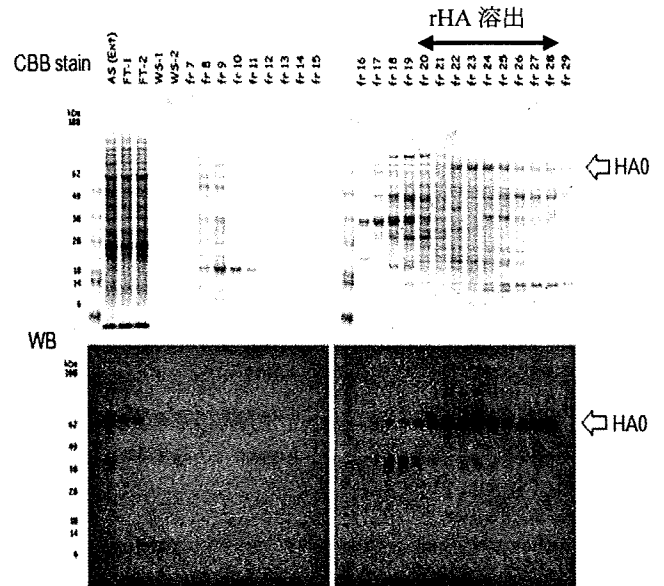


図 3-4 小スケールでの rHA のクロマト I 工程 SDS-PAGE 像 (上 : CBB 染色、下 : WB)

図 3-5 に rHA のクロマト II 工程の溶出画分の SDS-PAGE 像 (CBB 染色及び WB) を示す。本条件では画分 11~16 に rHA が溶出された。

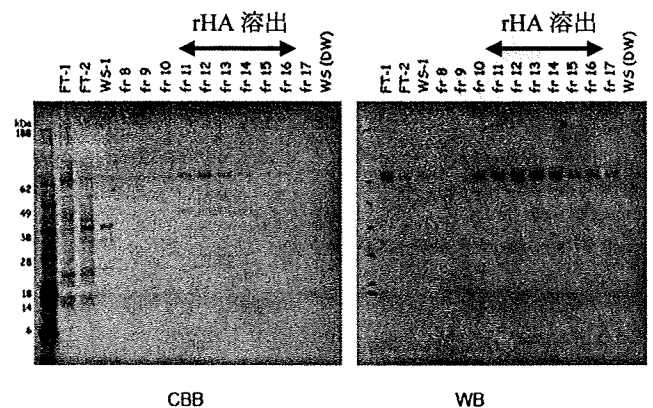


図 3-5 小スケールでの rHA のクロマト II 工程 SDS-PAGE 像 (左 : CBB 染色、右 : WB)

小スケールでの検討をもとに、20L スケールでの精製を試みた。図 3-6 及び 3-7 に、それぞれクロマト I

工程とクロマト II 工程の SDS-PAGE 像 (上: CBB 染色、下: WB) を示す。クロマト I 工程の溶出画分をクロマト II 工程に供して、分子量 62kDa 付近の rHA を得ることができた (図 3-7 上、Lane #8,9,10)。SDS-PAGE 及び WB の解析結果より、2つのクロマト工程によって、細胞から抽出したサンプルに含まれている夾雑たん白が除去され、純度の高い rHA が得られた。一方、WB の結果より、細胞からの抽出操作直後は HA0 に相当するバンドが 1本であったが、クロマト I 工程以降、2本のバンドとして検出された (図 3-6 下 レーン 2 及びレーン 6; 図 3-7 下レーン 8, 9, 10)。

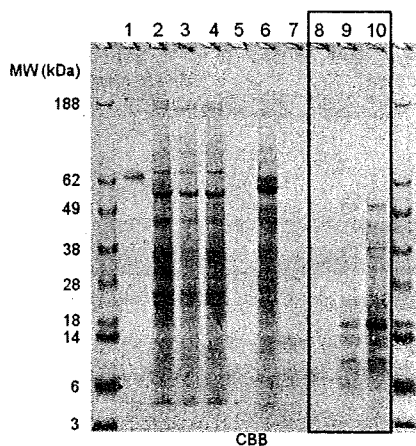


図 3-6 クロマト I 工程溶出画分の SDS-PAGE 像 (上: CBB 染色、下: WB)

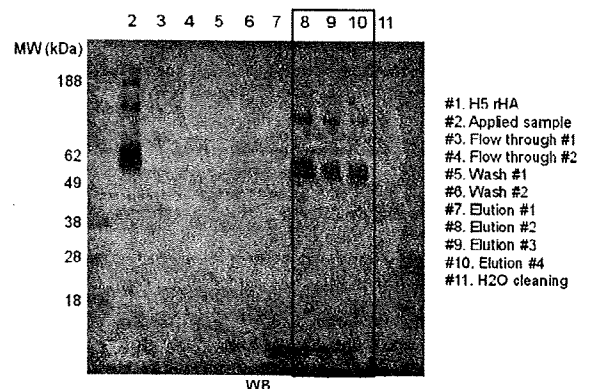
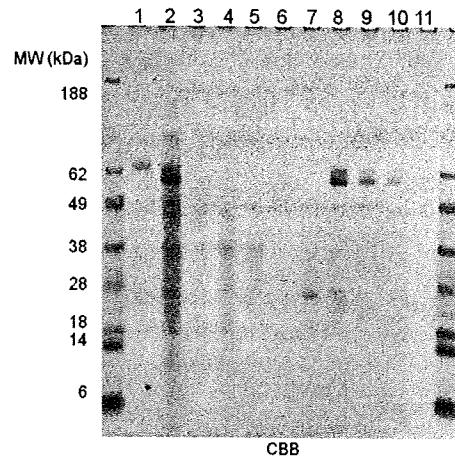


図 3-7 クロマト II 工程溶出画分の SDS-PAGE 像 (上: CBB 染色、下: WB)

D. 考察

20Lスケールでの精製において、抽出直後に rHA の HA0 のバンドが 1本のバンドとして検出された原因は判明していないが、他の株の rHA では 2本のバンドが認められており、SDS-PAGE に供したサンプル量が泳動パターンに影響を及ぼしていることが考えられた。

E. 結論

A/Vietnam/1203/2004 と同様の条件で、H5N1 株以外の rHA である A/California/04/2009 rHA の発現培養に成功した。また、A/Vietnam/1203/2004 rHA の精製と同じ工程で、A/California/04/2009 rHA を精製することに成功した。

本検討を通じて、BEVS を用いて H5N1 とは異なる株の rHA 製造に応用できることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

第4章 一元放射免疫拡散法 (Single Radial Immunodiffusion Assay, SRID 法) の確立

A. 研究目的

SRID 法によるインフルエンザ rHA ワクチンの力価測定法を確立する。

B. 研究方法

1. 抗原及び抗血清

rHA 抗原として研究用社内標準物質 (以下 R-0901) を用いた。R-0901 は、A/Vietnam/1203/2004 の野生型アミノ酸配列を有する rHA であり、PSC において GMP レベルで製造した原薬 (Lot # 45-08002, 2008 年 2 月製造) から調製した (表 4-1)。CBER が標準抗原として供給している Reference #50 (以下 Ref. #50) を入手し、HA 抗原として用いた。Ref. #50 は、インフルエンザウイルス A/Vietnam/1203/2004 株をリバースジェネティクス (以下 Rg) で作製し得られたウイルスをホルマリンで不活化した抗原である。

表 4-1 試験に使用した抗原

抗原	略号	供給元
rHA/A/VN/1203/2004 rHA	R-0901	自社
Rg A/VN/1203/2004 不活化全粒子	Ref. #50	CBER

ヒツジ抗 rHA 抗血清 (S-7826L1) とヒツジ抗 Rg A/Vietnam/1203/2004 抗血清 (S-124L1) は CBER より入手した (表 4-2)。ブタ抗 rHA 抗血清 (JL-P-001) は rHA 抗原 (lot# 45-08002) をフロイント完全アジュバントと混ぜてブタ皮内に 5 回免疫して作製した。予備検討の結果、ブタ抗 rHA 抗血清は R-0901 及び Ref. #50 の両方の抗原に対して沈降輪を形成した。フェレットに A/Vietnam/1203/2004 野生型不活化ウイルスを免疫して得られた抗血清は米国 Southern Research Institute (以下 SRI ; Ferret-050107) より入手した。

表 4-2 試験に使用した A/Vietnam/1203/2004 株に対する抗血清

抗血清	略号	免疫抗原	供給元
ヒツジ抗 rHA 抗血清	S-7826L1	rHA (野生型)	CBER
ヒツジ抗 Rg 抗血清	S-124 L1	全粒子 (Rg)	CBER
フェレット抗 rHA 抗血清	H5N1-VN- BPL	不活化全粒子 (野生型)	SRI
ブタ抗 rHA 抗血清	JL-P-001	rHA (野生型)	自社

2. SRID 法

抗原の希釈には SRID 用緩衝液 (171 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 2 mM Na₂HPO₄ 12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄)、またはダルベッコの phosphate buffered saline (以下 PBS) を用いた。SRID アッセイは CBER の標準法に従って実施した。

3. 抗原の β-メルカプトエタノール/EDTA/Triton X-100 処理

抗原に、最終濃度として 4.3 mM β-ME、0.8% EDTA、0.005% Triton X-100 (以下 β-MET) を添加して室温で 30 分間以上反応し、SRID 法に供した。

4. 界面活性剤の検討

Zwittergent 3-14、Triton X-100、Tween 20、Tween 80 及び deoxycholate をそれぞれ最終濃度として 1% になるように添加し、室温で 30 分間以上インキュベートし、SRID 法に供した。

C. 研究結果

1. 標準抗原を用いた SRID 法の条件検討

R-0901 と Ref. #50 を用いて、標準抗血清 S-124L1 及び S-7826L1 による沈降輪形成について検討した (図 4-1)。S-7826L1 を用いたアッセイでは、R-0901 は明瞭な沈降輪を形成したが、Ref. #50 は明瞭な沈降輪の形成がみられなかった。一方、Ref. #50 は S-124L1 を用いた場合、明瞭な沈降輪を形成したが、R-0901 は極めて不明瞭な沈降輪しか形成せず、沈降輪の大きさを定量的に計測することは困難であった。

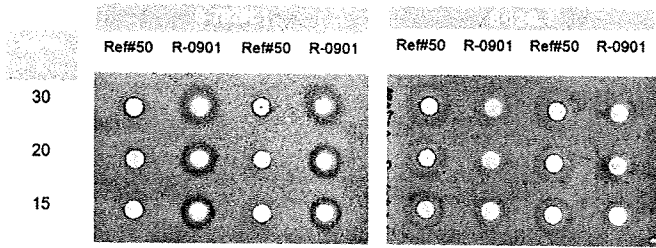


図 4-1 標準抗血清を用いた SRID 法

フェレット抗rHA抗血清 (Ferret-050107) を用いて沈降輪形成を検討した。形成される沈降輪の大きさは、血清添加量に依存し、添加量が多いほど沈降輪は小さくなった。いずれの抗原 (Ref#50及びR-0901) でも沈降輪を形成した。R-0901を抗原とした場合は明瞭な沈降輪を形成したが、Ref.#50では血清添加量を2.5µL/mLにすると、沈降輪が認められなかった。

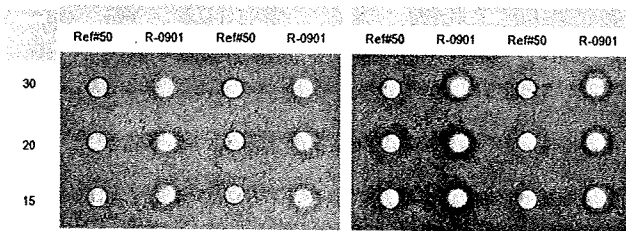


図 4-2 ブタ抗 rHA 抗血清を用いた SRID 法

2. β-MET による沈降輪形成に対する効果

自社で作製したブタ抗 rHA 抗血清を用いて、β-MET 処理による沈降輪形成について検討した。R-0901 を抗原とした場合、沈降輪が小さいために力価の計測が難しかった。計測を容易にするために、抗原の前処理方法を検討した。

表 4-3 β-MET 処理による SRID 力価

抗原	溶媒	相対力価
R-0901	SRID バッファー (SB)	1.00
	PBS	1.12
	β-MET SRID バッファー	1.85
	β-MET PBS	1.93
Ref. #50	SRID バッファー (SB)	1.00
	PBS	0.95
	β-MET SRID バッファー	0.90
	β-MET PBS	0.97

沈降輪の形成に対する β-MET の影響を検討した。β-MET で前処理した R-0901 は、未処理に比べて有意に大きな沈降輪を形成した (図 4-3)。

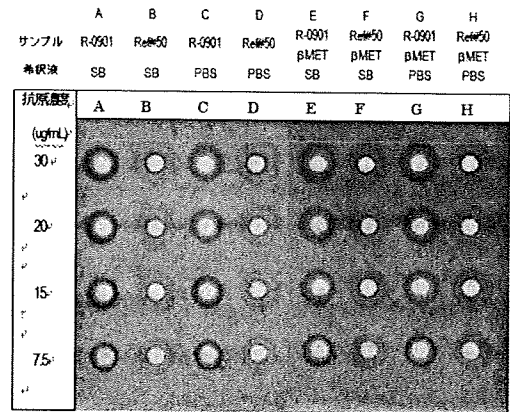


図 4-3 β-MET 処理した標準物質及び標準抗原の沈降輪

沈降輪をもとに相対値を求めたところ、β-MET で前処理した R-0901 は未処理に比べて力価が 1.85~1.93 倍増加した (図 4-4 左及び表 4-3)。標準抗原 Ref. #50 は β-MET 処理によって力価の変化が認められなかった (図 4-4 右及び表 4-3)。

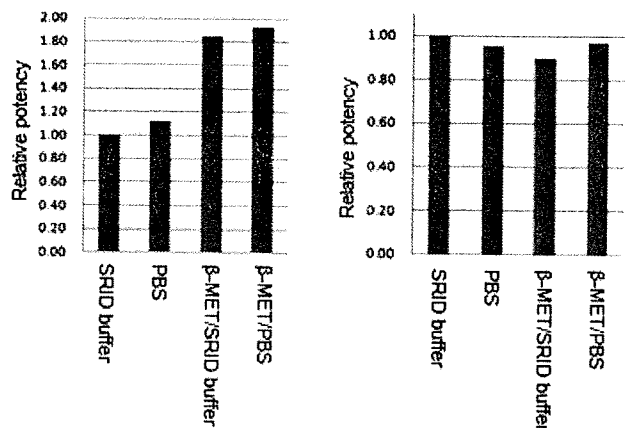


図 4-4 β-MET 処理後の R-0901 の SRID 力価変化 (左) 及び Ref. #50 の SRID 力価変化 (右)

図 4-1 で示したとおり、抗血清と抗原との組み合わせにより沈降輪の形成に違いがみられた。その結果は以下のとおりであった (図 4-5)。

β-MET で前処理した rHA 抗原 (R-0901) を用いてヒツジ抗 rHA 抗血清による沈降輪形成に与える影響を調

べたところ、図 4-1 と同様に沈降輪は大きくなった。
β-MET 前処理した R-0901 を用いてもヒツジ抗 Rg 抗血清とでは明瞭な沈降輪は形成されなかった。同様に、β-MET で前処理した Ref. #50 は S-7826L1 とでは明瞭な沈降輪は形成しなかった。

β-MET で前処理した Rg 抗原 (Ref. #50) は、S-124L1 と沈降輪を形成したが、β-MET で前処理しない Rg 抗原と比べ沈降輪の大きさは変わらなかった。

以上より、沈降輪形成がみられなかった Ref. #50 と S-7826L1 の組み合わせ、R-0901 と S-124L1 の組み合わせは、β-MET で前処理したあとも沈降輪の形成はみられなかった。

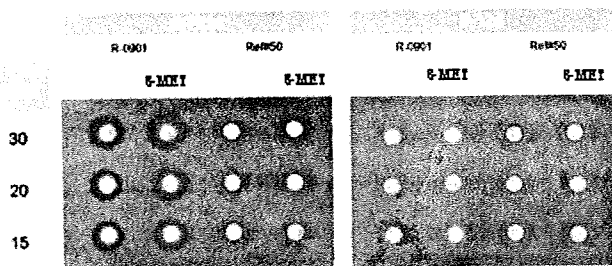


図 4-5 β-MET 処理後の抗原と CBER 抗血清による沈降輪の形成

3. 界面活性剤の種類と沈降輪形成への影響

Triton X-100、Tween 20、Tween 80 及び deoxycholate を Zwittergent 3-14 に代わる界面活性剤として使い、rHA 抗原を前処理して、SRID 法における沈降輪の形成に対する効果を検討した。その結果、Zwittergent 3-14 処理が最も明瞭な沈降輪を形成した (図 4-6)。また、0~3.0%までの Zwittergent 3-14 で rHA 抗原を処理して沈降輪形成に与える影響を検討した。その結果、0.5 及び 1.0%の濃度の Zwittergent 3-14 で処理した時が最も沈降輪が大きく、2.0%以上の濃度では逆に沈降輪が小さくなった (図 4-7)。

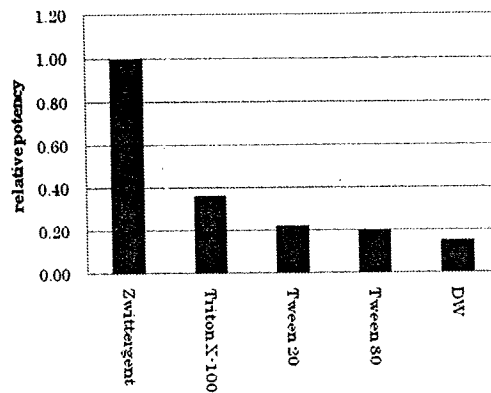


図 4-6 界面活性剤の違いによる力価への影響

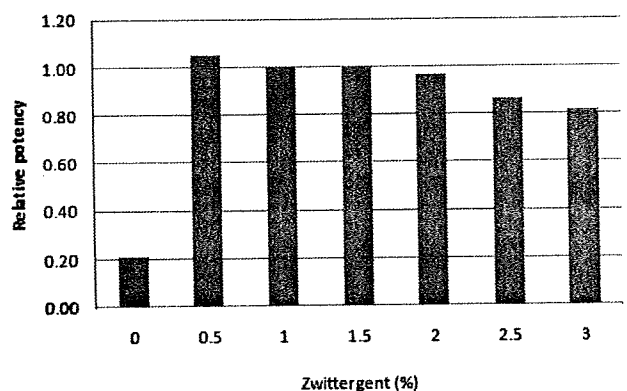


図 4-7 Zwittergent 3-14 濃度の違いによる力価への影響

D. 考察

β-MET で処理された社内標準物質 R-0901 の力価低下が回復したことから、rHA 抗原の分解や変性による不可逆的变化ではなく、rHA 抗原が酸化によって分子構造が変化し、ゲル内で効率よく拡散できなかったものと考えられた。

rHA 抗原とヒツジ抗 Rg 抗血清の組合せでは、β-MET 処理に関係なく沈降輪を形成しなかったことから、酸化による抗原の変化ではなく、低い反応性の組合せであると示唆された。

E. 結論

自社研究用 rHA 標準抗原 (R-0901) 及び自社で作製した抗 rHA 抗血清を用いて SRID アッセイの実験系を確立した。

沈降輪の形成が抗血清と抗原の組み合わせにより異な

り、rHA 抗原(野生型)と Rg 抗原で反応性が異なることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

第5章 組換えバキュロウイルスの構築

A. 研究目的

BEVS システムを用いたワクチン製造における rBV の構築法を確立する。

B. 研究方法

1. HA 遺伝子

A/Vietnam/1203/2004 の HA 遺伝子は、現在 rHA 発現培養用に使用している rBV 構築に使用したのと同じ cDNA を PSC より入手した。また、同配列を有する DNA を人工合成した HA 遺伝子も用いる。

2. 組換え体作製用試薬

GENEXPRESS BaculoKIT™には直鎖状 AcNPV E2 バキュロウイルスゲノム DNA、ベクター、ベクター増幅用のプライマー及び遺伝子導入試薬が含まれており、PSC から入手した。

3. 宿主細胞

Sf9 細胞を用いる。

4. 組換え方法

4.1 cDNA の構築

新型 H1N1 インフルエンザウイルスの細胞培養上清を材料として、RNA 抽出から逆転写反応による cDNA 合成および 4 種のプライマーを組み合わせた PCR により、HA 遺伝子の HA1 領域、HA2 領域、HA0 (HA1+HA2) 領域の増幅を試みた (図 5-1)。

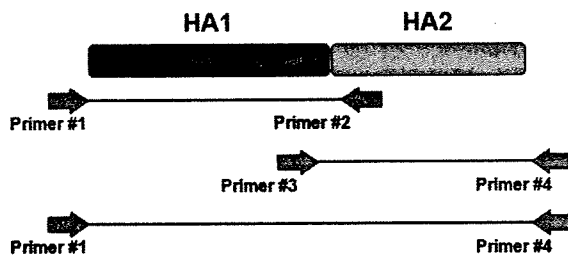


図 5-1 新型 H1N1 インフルエンザウイルス分離株 HA 遺伝子のクローニングとそのプライマー

4.2 トランスファーベクターの構築

HA 遺伝子を組換えトランスファーベクター (pPSC12) のマルチクローニング部位へ挿入する (図 5-2)。プライマー #1 と #2 を用い、PCR 法で HA 遺伝子を増幅する (図 5-2 右側)。プライマー #3 と #4 を使いバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター部位を含む配列を増幅する (図 5-2 左側)。増幅させた HA 遺伝子とバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター部位を含む産物を連結させるために、プライマー #2 と #3 を用いて、オーバーラップ PCR 法で増幅産物を作製する。この増幅産物を、pPSC12 ベクターに導入し、トランスファーベクターを完成させる (図 5-2、下側)。その後、DNA シーケンサーでトランスファーベクターとの連結部及び HA 遺伝子配列が目的とするものであることを確認する。

4.3 Sf9 細胞へのトランスフェクション

HA 遺伝子を導入したトランスファーベクターと直鎖状のバキュロウイルスゲノム DNA を Sf9 細胞にコトランスフェクションする。28°C でインキュベートし、出現した組換え型プラークをピックアップして、新たな Sf9 細胞に感染させてバキュロウイルスを増殖させる。上清を回収して 1 次バキュロウイルス液とする。HA 遺伝子が正しく挿入されていることを確認して、これを vP1 とする。

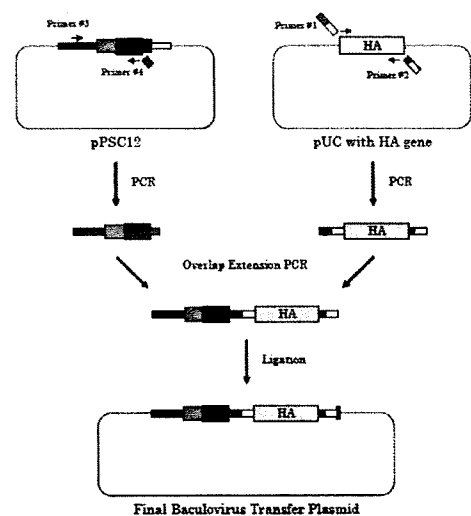


図 5-2 トランスファーベクターの構築

C. 研究結果

HA2 領域は、プライマー#3 と#4 の組み合わせで効率よく増幅したが、プライマー#1 と#2 を組み合わせた HA1 領域は増幅の効率が悪かった。プライマー#1 と#4 を組み合わせ HA0 領域の増幅は、目的とする大きさの DNA 断片がみられなかった (図 5-3)。

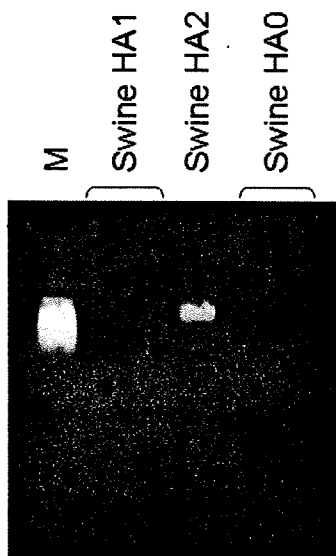


図 5-3 新型 H1N1 インフルエンザウイルス株 HA 遺伝子の増幅

HA2 領域の遺伝情報解読のために 6 種のプライマーを組み合わせ、DNA シーケンスをおこない、HA1 領域の 3' 側の一部を含む 700bp 以上の配列を決定した。HA1 領域は DNA 断片の増幅が少なかつたため、一部信頼性の低い配列情報が混入した。

さらに別のインフルエンザウイルス株として、季節性インフルエンザウイルス株 A/Brisbane/59/2007 のウイルス粒子より、同様の方法で HA0 領域の増幅を試みた。PCR の結果、約 1700bp の DNA 断片が増幅した。

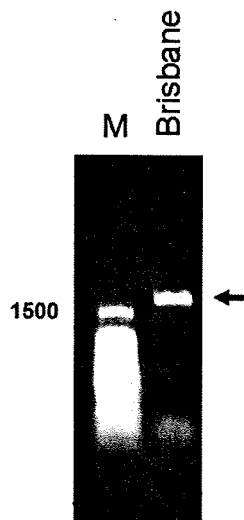


図 5-4 A/Brisbane/59/2007 株 HA 遺伝子の増幅

新型インフルエンザウイルス分離株の HA2 領域は PCR により効率よく増幅したが、HA1 領域は非常に効率が悪かった。プライマーを組み合わせ PCR をおこない、原因を探ったところ、分離株の HA1 領域の増幅には Primer #1 が適していないことが示唆された。

現在、cDNA とトランスファーベクターの準備をおこなっている。A/Vietnam/1203/2004 株の HA 遺伝子を鋳型にした HA 遺伝子の増幅と、pPSC12 ベクターを鋳型にしてポリヘドリンプロモーターを含む部位の増幅を PCR で試みている。

組換えバキュロウイルスのクローニングには、プラークアッセイが必須であるが、図 5-5 に示すとおり、弊社はこの技術に関してすでに習得している。

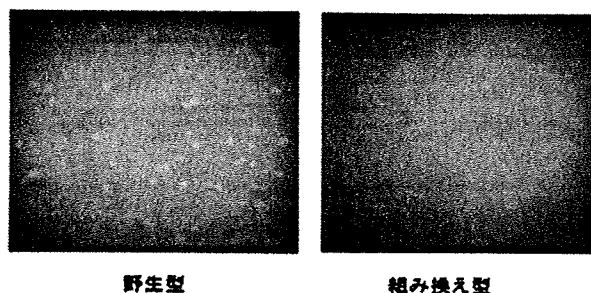


図 5-5 プラークアッセイ

D. 考察

RT-PCR 法による cDNA 構築を試みた。HA1 領域の配列情報が得られていないため、Primer #1 と分離株 HA1 領域のミスマッチ部分が不明である。このような場合は、ベクターに導入してクローニングした後、DNA 配列を決定し、HA 遺伝子の増幅に適したプライマーを選定する必要がある。A/Brisbane/59/2007 株 HA 遺伝子のように、プライマーが HA 遺伝子に適した場合には、一回の PCR で全長をクローニングすることが可能であると考えられた。

E. 結論

ウイルス粒子から得られる HA 遺伝子を用いた cDNA 構築以外の方法として、人工合成により HA 遺伝子を作製することが必要である。プライマーと HA 遺伝子のミスマッチが起こった場合でも対応が可能となるように、人工合成により HA 遺伝子のライブラリーを構築する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

【今後の取り組みについて】

1. 発現細胞培養及び精製について

GMP 製造をバックアップするデータとして、各種の培養及び精製の規格幅を設定する。クロマト I 工程及び II 工程における精製条件を最適化し、rHA の収量向上を目指す。また、医薬品としての品質を担保するため、製造工程で使用される試薬の残存や宿主細胞由来の夾雑物をプロファイリングする。

2. 一元放射免疫拡散法

SRID アッセイにおいて、現行の社内標準物質に代えて、最適化した処方及び保存法による rHA を社内標準物質として新たに作る必要がある。新規標準物質を設定するにあたり、長期保存が可能な状態で力価の安定性を検討する。

3. 組換えバキュロウイルスの構築

パンデミック発生時の国内での迅速な対応を可能とするためには、遺伝子構築から rBV 作製までを自社内で行うことが必須である。現在、HA 遺伝子が導入された cDNA を用いて rBV 構築を実施している。

遺伝子情報を基に HA 遺伝子の全合成を計画している。National Center for Biotechnology Information (NCBI) が公開しているインフルエンザウイルスの HA 遺伝子の情報を収集し、遺伝子ライブラリーを構築するとともに、A/Vietnam/1203/2004 株の HA 遺伝子を人工的に合成し、rBV の作製を行う予定である。

