

200940060A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

輸血用血液製剤に対する副作用を生じない
病原体不活化技術の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口照英

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

輸血用血液製剤に対する副作用を生じない
病原体不活化技術の開発に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口照英

平成22(2010)年 5月

目次

I.	総括研究報告	1
	輸血用血液製剤に対する副作用を生じない病原体不活化技術の開発に関する研究 山口 照 英	
II.	分担研究報告	
	1. ウイルス不活化技術の有効成分への影響評価に関する研究	29
	川 崎 ナ ナ	
	2. ウイルス不活化技術の血小板製剤への影響評価に関する研究	45
	石 井 明 子	
	参考文献	
	1) Prez-Pujol S et al. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirsol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. Transfusion 45, 911, 2005	
	2) Picker SM et al. Cell integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study. Transfusion and Apheresis Science 40, 79, 2009	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	72
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

輸血用血液製剤に対する副作用を生じない病原体不活化技術の開発に関する研究

研究代表者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長

輸血用血液製剤の更なる安全性の向上に向けて導入の検討が進められている病原体不活化技術について、不活化処理がタンパク質の一次構造や翻訳後修飾に与える影響を解析するための検討を進めると共に、病原体不活化能、及び有効成分への影響の観点から、不活化技術導入の可否判断に必要な要件を検討し、下記の成果を得た。

- 1) ウイルス不活化操作に特に影響を受けやすい血液凝固第 VIII 因子を取り上げ、その物性に与える影響を解析した。その解析を容易にするために、遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子を用いる系を確立した。その結果 LC/MS を用いてペプチドマッピングを行い、約 65% のアミノ酸配列並びに 18 カ所の N 結合型糖鎖及び 10 カ所の O 結合型糖鎖を確認した。確認できなかった O 結合糖鎖付加部位は、エキソグリコシダーゼ消化、 β 脱離及びマイケル付加により推定した。
- 2) 血小板製剤への導入が検討されているリボフラビンを用いた病原体不活化技術について、病原体不活化能と血小板への影響に対する調査を行い、当該技術は検査が実施されていない病原体による有害事象発生リスク低減に資するものであると考えられること、また、不活化処理後に生じる血小板の p-セレクトイン陽性率の上昇については、p-セレクトイン陽性の血小板を投与することの安全性を評価すると共に、血小板活性化につながる製剤成分の変化について検討する必要があることを明らかにした。

研究分担者

川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第 1 室長

石井明子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第 2 室長

協力研究者

原園 景 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部主任研究官

A. 研究目的

輸血用血液製剤の安全性確保のためには、ウイルスや細菌等の感染性因子の混入防止と、異常な免疫応答等により生じる有害作用に関する対策が必要となる。これまで感染性因子の混入防止の観点では、NAT 試験による混入ウイルスの検出等により、安全性向上が図られてきた。また、免疫反応に関わる有害作用の防止に関しては、保存前白血球除去や γ 線照射の実施等による安全性向

上が図られてきている。さらに、皮膚常在菌による汚染対策として十分な皮膚消毒と初流血除去法の採用による皮膚常在菌混入の防止も導入されてきている。これらの努力に続き、現在、厚生労働省では、輸血用血液製剤のさらなる安全性の向上を求めて、病原体不活化技術の導入に関する議論が進められている。

輸血用血液製剤の病原体不活化技術のうち、実用化に近い段階まで開発されているものは、血漿製剤あるいは血小板製剤を対象とした技術である。不活化剤として、メチレンブルー、アモトサレン、あるいはリボフラビンが用いた方法の開発が進められており、厚生労働省でもこの3つの不活化法を中心に検討が進められている。これらはいずれも、光化学反応を利用した核酸を標的とする方法であり、病原体不活化の機構としては、光照射による増感剤の活性化、及びそれによって生じた活性酸素による核酸等の傷害が考えられている。これらの操作によって生じるラジカル等は、タンパク質に対しても、切断、酸化、カルボニル化等の修飾を引き起こす可能性がある。実際、これらの光増感剤及び光照射処理により、様々な血液凝固因子の活性が15%前後低下することが報告されている。不活化技術の導入の検討に際しては、このような活性の低下が、操作に伴って高次構造が変化したことによるのか、または、タンパク質や糖鎖部分に何らかの修飾が生じたことによるのかを明らかにし、輸血用血液製剤の品質・有効性・安全性への影響を検討する必要がある。

本研究の目的は、病原体の不活化法導入あたっての評価のポイントを明らかにすることにある。このため、1)血液凝固第VIII因子を用いて、ウイルス不活化法がタンパク質の一次構造や翻訳後修飾に与える影響を明らかにすること、2)病原体不活化技術に関して、①病原体不活化能、②有効

成分への影響、③白血球への影響を検討し、不活化技術導入の可否判断に必要な要件を明らかにすることを目指している。本年度は、1)LC/MSを用いた遺伝子組換え血液凝固第VIII因子のアミノ酸配列及び糖鎖構造の解析、2)リボフラビン法の病原体不活化能および血小板への影響に関する検討を行い、不活化技術導入の可否判断に必要な要件を考察した。

B. 方法

B.1. 血液凝固第VIII因子の構造解析

B.1.1. 試薬

組換えヒトF. VIIIは、コージネイトFS(バイエル薬品社)を使用した。修飾トリプシンはプロメガ社より、 α 2-3, 6, 8, 9ノイラミニダーゼ、 β 1-4ガラクトシダーゼはシグマアルドリッチ社より購入した。その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

B.1.2. 還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化

コージネイトFSは、PD10カラム(GEヘルスケア)で脱塩し、凍結乾燥した。8M塩酸グアニジン、5mMEDTA及び500mMTrisを含むpH8.5の緩衝液100 μ Lに溶解し、1M DTTを4 μ L加え、37 $^{\circ}$ C、1時間反応させ、その後、1Mヨード酢酸ナトリウム9.6 μ Lを加え、45分間、室温で反応させた。PD10カラムで脱塩、凍結乾燥後、修飾トリプシンにて消化を行った。

B.1.3. エキソグリコシダーゼ消化

トリプシン消化物を100 $^{\circ}$ C、5分加熱した後、50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)中、37 $^{\circ}$ C、12時間ノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ

消化を行った。

B.1.4. β 脱離及びマイケル付加

トリプシン消化物を 25 mM NaCl, 0. 1% トリエチルアミン及び 25 mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液中で 50°C で 2hr 加熱した。

B.1.5. LC MS

LC 装置には, Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社) を, カラムには, MonoCap 0. 1 X 250 mm (ジエールサイエンス) を用いた。溶離液には, 0. 1% ギ酸を含む 2% アセトニトリル水溶液 (A) 及び 0. 1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液 (B) を用いた。試料は, 0. 5 μ L/min で 5 分間に 5% B で流した後, 40 分かけて 25% B へ, その後 25 分かけて 45% B となるように溶離液 B の濃度を上昇させ溶出した。質量分析装置には Qstar Elite (Applied Biosystem 社) を用いた。ポジティブイオンモードで, ion spray voltage は 3000~3600 V に設定した。MS の測定範囲を m/z 400-2100, 800-2100, 又は 1000-2100 に, MS/MS の測定範囲を m/z 100-2100 に設定した。

B.1.6. データベース検索

LC/MS/MS により得られた MS データを, マスコット検索エンジンを用いて, ヒト SwissProt データベース (ver. 51. 3) に対して検索し, ペプチドを帰属した。MS の許容範囲を 1. 2 Da, MS/MS の許容範囲を 0. 6 Da に設定した。アミノ酸の可変修飾として, メチオニンの酸化 (+16. 00), チロシンの硫酸化 (+79. 96) を設定した。シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ消化物の MS データの検索の際には, セリン及びスレオニン残基に可変修飾として N-アセチルヘキサミン付加 (+203. 08) を設定した。 β 脱離及びマイケル付加した試

料の MS データの検索の際には, セリン及びスレオニン残基に可変修飾として脱水 (-18. 01) と 2-メルカプトエタノール付加 (+60. 00) を設定した。

B.2. 文献調査

厚生労働省より公表されている薬事・食品衛生審議会の議事録及び配布資料, 科学雑誌に掲載された論文, 開発企業からの公開情報から情報を収集した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないため, 倫理面での問題はない。

C. 結果

C.1. 血液凝固第 VIII 因子の構造解析

C.1.1. ペプチドマップ

FAVIII は, アミノ酸 2332 個からなる糖タンパク質である。還元アルキル化及びトリプシン消化して得られたペプチド及び糖ペプチド混合物を LC/MS/MS により分析したところ, 図 1A のようなクロマトグラムが得られた。検索条件として, 酵素: トリプシン, 許容切断部位数: 2, 可変修飾: システインのカルボキシメチル化, 修飾: メチオニンの酸化及びチロシンの硫酸化を設定し, マスコット検索エンジンを用いて検索を行ったところ, 全体の 65% の一次配列が確認された (図 1B)。酵素の条件をあらゆる切断条件を推定できる No enzyme として同様に検索したところ, 70% の一次配列が確認された (データ非表示)。尚, トリプシンの特異性とは異なるいくつかのペプチドが観測された (データ非表示)。帰属されたペプチドのうち, リジン及びアルギニン残基の C 末側で

切断されたペプチドのみを表 1 に示す。FAVIII には 6 カ所のチロシン硫酸化が報告されているが、本研究ではそのうち 3 カ所の硫酸化 (Y346:ペプチド 339-359, Y1664:ペプチド 1653-1673, Y1680:ペプチド 1674-1689) が確認された。Y1680 に関しては硫酸化されていないペプチドも観測され、一部のチロシンは硫酸化を受けていないことが示唆された。残りの 3 カ所 (Y737, Y738 及び Y742) は同一ペプチド上 (ペプチド 708-733) にあるため、複数の硫酸化によるイオン化効率の低下により検出されなかったと推測される。

C.1.2. N 結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

糖ペプチドイオンの帰属は、データ依存的に測定したプロダクトイオンスペクトル中に観測される m/z 204. 1 の N-アセチルヘキソサミンに由来するイオンを指標に選択し、FAVIII の N 結合型糖鎖に関する既報のデータを参照する方法により行った。MS の測定範囲を m/z 400-2100, 800-2100 及び 1000-2100 として分析したときに検出された糖ペプチドを表 2 にまとめる。

FAVIII には、25 カ所の推定 N 結合型糖鎖結合部位 (Asn42, 239, 582, 757, 784, 828, 900, 943, 963, 1001, 1005, 1055, 1066, 1185, 1255, 1259, 1282, 1384, 1412, 1442, 1512, 1685, 1810 及び 2118) が存在する。このうち Asn42, 239, 757, 784, 828, 963, 1005, 1055, 1066, 1185, 1412, 1442, 及び 2118 に関しては、糖鎖が結合したペプチドのみが観測された。Asn1255 及び 1259 の両方を含むペプチドについては、糖鎖が 1 個及び 2 個結合した糖ペプチドとして検出された。Asn1282, 1300 及び 1810 を含むペプチドは、糖ペプチド及び糖鎖の結合していないペプチドの両方として観測された。Asn582, 943, 1384, 及び 1685 は、ペプチドとしては観測されたが、糖ペ

チドとしては観測されなかった。Asn900, 1001, 及び 1512 はペプチドとしても糖ペプチドとしても観測されなかった。

C.1.3. O 結合型糖鎖結合ペプチドの推定及び O 結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

MS/MS によって、比較的短い簡単な組成の糖鎖 (HexNAc1Hex1NeuAc1 など) の結合が示唆されたペプチドは、O 結合型糖鎖結合ペプチドと推定された。図 2A に、一例として、ある二価イオン (m/z 1170. 5) を前駆イオンとして得られたプロダクトイオンスペクトルを示す。ペプチド IIVDDTSTQWSK 及び GalNAc が結合したペプチドに相当するイオンが観測されていること、また、糖鎖に特徴的な m/z 204. 1 (HexNAc), 292. 1 (NeuAc) 並びに 366. 1 (HexHexNAc) 等のプロダクトイオンが観測されていることから、NeuAc-Hex-HexNAc が結合したペプチド IIVDDTSTQWSK であることが示唆された。ペプチド部分の配列は、IIVDDTSTQWSK より生じる y シリーズのフラグメントイオンがいくつか観測されていたことから確認された。しかしながら、CID-MS/MS において糖鎖は壊れやすく、またセリン及びスレオニンに結合した HexNAc は開裂しやすいため、糖が結合したペプチド由来のフラグメントは観測されておらず、結合位置は不明であった。

一般に、糖ペプチドはイオン化効率が低いこと、MS/MS で得られるフラグメントが少ないこと、並びに、O 結合型糖鎖結合のコンセンサス配列ははっきりしていないことから、O 結合型糖鎖結合糖ペプチドの検出と帰属は容易でない。ペプチドマッピングでは同定されなかった O 結合糖鎖が存在する可能性を否定できなかったため、1) シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ消化により糖鎖をトリミングし、O 結合型糖鎖の還元末端の GalNAc

のみを残したペプチド試料，並びに 2) β 脱離及びマイケル付加により，糖鎖結合部位を脱水または結合部位に 2-メルカプトエタノールを付加したペプチド試料を調製し，LC/MS/MS とデータベース検索による O 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドの同定を試みた．前者の分析の結果，HexNAc が結合していたと推定されるペプチドをいくつか同定することができた (表 3)．一例として，図 2B にある二価イオン (m/z 894. 0) を前駆イオンとして得られたプロダクトイオンスペクトルを示す．プロダクトイオン m/z 204. 1 (HexNAc)，並びに b 及び y シリーズのフラグメントイオンから，ペプチド TDPWFAHRTMPK に HexNAc が結合していることが推定された．尚，全てのスペクトルで HexNAc がニュートラルロスされていたため，結合部位を示すフラグメントを確認できなかった．つぎに，後者のサンプルの LC/MS データを取得した後で，セリン及びスレオニンにおける脱水または 2-メルカプトエタノールの付加 (OH 基 \rightarrow CH₂OH) の可能性を設定し，データベース検索を行ったところ，いくつかのペプチドが推定された (表 3)．図 2C に， β 脱離したペプチドの例として，ある三価イオン (m/z 575. 3) のプロダクトイオンスペクトルを示す．観測された b 及び y シリーズイオンから，ペプチド EVGSLGTSATNSVTYKK の中の 4 番目セリンで β 脱離が生じたことが確認され，S1461 に O 結合型糖鎖が付加していたことが推測された．ただし，脱水したセリン残基で断片化した y イオン (この例では y14) は検出されにくい傾向があった．図 2D に，マイケル付加の例として，ある二価イオン (m/z 726. 9) のプロダクトイオンスペクトルを示す．スペクトルから，ペプチド IIVDDTSTQWSK の 8 番目スレオニンにメルカプトエタノールが付加していることが示唆され，T1338 に O 結合型糖鎖が付加していたこと

が示された．

以上の操作によって帰属された 10 箇所 の O 結合型糖鎖に関する情報を表 3 にまとめた．観測された糖鎖の組成は，HexNAcHexNeuAc または HexNAcHexNeuAc₂ であった．ペプチド Q796-K812 を除き，確認された O 結合型糖鎖結合ペプチドは，糖鎖が結合していないペプチドとしても検出されていたことから，これらの結合部位の糖鎖付加は部分的であることが示された．

C.2. リボフラビンを用いた病原体不活化技術に関する検討

病原体不活化技術の導入に関して，厚生労働省薬事・食品衛生審議会血液事業部会を中心に検討が重ねられ，平成 20 年度には血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会において，日赤が血小板製剤への不活化技術の導入に向けて準備を開始することが了承された．さらに同年，血液事業部会において，不活化剤の安全性及び我が国の血小板製剤への適合性等の観点から，リボフラビンを用いた技術を重点的に評価することが表明されている (平成 21 年 12 月 10 日血液事業部会運営委員会資料)．このことを踏まえ，血小板製剤へのリボフラビン法の適用に関する課題について検討を行った．

C.2.1. リボフラビンを用いた病原体不活化技術の概略

Stramer らの総説¹⁾を参考に，リボフラビンを用いた病原体不活化技術の概略を述べる (図 3)．リボフラビンを用いた不活化システム (Mirasol システム) は，紫外線照射用バッグ，リボフラビン溶液，紫外線照射装置から構成される．不活化のための操作としては，まず，血液製剤を紫外線照射用のバッグに移し，500 μ M のリボフラビ

ン溶液 35 mL を添加する。次に、バッグを紫外線照射装置に入れ、265～370 nm の紫外線 (6.2 J/cm²) を 6～10 分間照射する。リボフラビンはビタミン B であり、その代謝物も血中に存在するものであること²⁾、リボフラビンやその代謝物に毒性はないと考えられていることから³⁾、照射後にリボフラビンを除去する工程は設けられておらず、不活化処理後にそのまま製剤として用いられる。

リボフラビン法による病原体不活化には、紫外線による核酸損傷効果と、光励起リボフラビンと核酸塩基対の接触による電子移動反応に基づく核酸 (主としてグアニン) 損傷の 2 つの機構が関与しているとされている⁴⁾。リボフラビンの光照射により活性酸素種が発生する可能性もあるが⁵⁾、Mirasol システムでは処理前に袋を真空状態にし、核酸に結合した状態のリボフラビンを活性化させる波長の光を選択することで、活性酸素種の発生を防ぐ仕組みになっているとされている。また、血小板製剤に含まれ、免疫応答の原因となる白血球は有核細胞であることから、リボフラビンおよび紫外線照射により不活化されるとされている。

リボフラビンを用いる不活化法に関しては、上記の第一世代に続き、血漿除去により高濃縮した血小板にリボフラビンを添加して不活化処理を行い、処理後に血小板用添加液 (PAS) を加える第二世代、さらに、採血時に PAS 置換してリボフラビンを添加し不活化処理を行う第三世代の方法も開発されている。これら第二世代、第三世代の方法では血漿を別に多く確保できる利点があるが、現在我が国の献血事業で用いられている採血機器とは異なる機器が必要である。そのため、我が国に血液事業に採用する場合は、新たな採血機器を導入せずに実施が可能な第一世代が現実的であるとされている⁶⁾。

C.2.2. リボフラビンの病原体不活化能

輸血用血液製剤に混入する可能性がある病原体には、ウイルス、細菌、寄生虫が考えられる^{1) 7-10)}。これらのうち、献血時に全ての検体について検査が実施されているのはウイルスの一部であり、無菌試験は血清生化学検査で規格外となった製品を利用して実施されている。

C.2.2.1. ウイルス不活化

リボフラビン法のウイルス不活化能に関しては、製剤に混入する可能性のあるウイルスを念頭に、試験するウイルスが選択され不活化が可能か調べられている。部会参考資料¹¹⁾として報告されている不活化能の試験結果を、バイオ医薬品のウイルス安全性確保の考え方と同様に、関連ウイルス、特異的モデルウイルス、及び非特異的モデルウイルスに分類して記す。

(*はノンエンベロープウイルス。数字はクリアランス指数 (log) を示す。)

・関連ウイルス

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) : 5.9

西ナイルウイルス (WNV) : 5.2

*A 型肝炎ウイルス (HAV) : 2.0

B 型肝炎ウイルス (HBV) : 2.5

インフルエンザウイルス : >5.3

・特異的モデルウイルス

*豚パルボウイルス : >5.0

シンドビスウイルス : 3.2

・非特異的モデルウイルス

脳心筋炎ウイルス (EMCV) : 3.2

牛エンテロウイルス (BEV) : 3.0

これらの結果から、リボフラビン法により、輸血用血液製剤に混入する可能性のあるウイルスを不活化できることが分かる。また、HAV やパル

ボウイルス等、不活化が難しい小型ノンエンベロープウイルスを不活化できる点がリボフラビン法の特徴の一つであるとされている。パルボウイルスのクリアランス指数はエンベロープウイルスに匹敵するレベルであり、同様の結果が文献でも報告されている⁸⁾。わが国で実施されている献血サンプルのウイルス検査は、HBV, HCV, HIV, HTLV-1, ヒトパルボウイルス B19 で計 5 分類であるが、ウイルス検査での検出が困難なウィンドウ期があることや、これらのウイルス以外の混入の可能性を考えると、リボフラビンによる不活化は、ウイルス混入リスクの低減に有効であると考えられる。

C.2.2.2. 細菌不活化

細菌感染症は輸血用血液製剤の使用に伴って生じる有害事象の中でも最も重大なものであり、海外での汚染の発生頻度は 0.08~0.22% (1:1230 ~ 1:454) との報告もある¹²⁾。特に、血小板は 20~24℃で浸とうしながら貯蔵するため、細菌が増殖しやすいという問題がある。我が国では、輸血用血液製剤の無菌試験は、生化学検査で規格外となった製品を利用して実施されているが、GMP 適合条件下で出発原料から製造される一般の医薬品と比較すると、輸血用血液製剤の原料である血液の採取状況は個々の採血の状況により異なるため、一部の製品の検査で全製品の無菌性を保証することは困難である。また、白血球除去フィルター導入前は、製剤中に含まれる白血球の殺菌作用により細菌の増殖が抑えられていたが、現在では免疫反応による有害事象発生を低減するため白血球除去フィルターを用いた白血球除去が行われており、白血球による細菌の増殖抑制が望めなくなっている。これらのことを考えると、不活化技術の導入は、輸血用血液製剤からの細菌感

染リスクの低減のために一定の有効性があると期待されている。

リボフラビン法に関して文献では、製剤に混入するリスクのある黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、セレウス菌等のグラム陽性菌、及び大腸菌等のグラム陰性菌、計 13 種類 20 系統について、実際に起こりえる汚染レベルを考慮し、製剤あたり 20CFU 以下をスパイクして不活化効果を調べた結果が報告されている⁹⁾。リボフラビン法による各細菌の不活化試験結果 (%) に、これまでの血液安全監視により報告されている各細菌の汚染発生頻度を乗じた値を合計して算出した overall effectiveness は 98%とされている。

全ての検体での無菌試験の実施が困難であることを考えると、リボフラビン法による細菌不活化は輸血用血液製剤の安全性向上に貢献可能であり、無菌性の向上の観点からは血小板製剤では有効期間の延長が可能になることも考えられる。

C.2.2.3. 寄生虫不活化

寄生虫感染したヒトからの献血により、輸血用血液製剤を介して患者が寄生虫に感染するリスクがあるとされているが、寄生虫のスクリーニングは行われておらず、これまでに、トリパノゾーマ、リーシュマニア、ファルシパルム (マラリア) などの感染例があるとされている¹¹⁾。リボフラビンによる寄生虫不活化のログリダクション係数として、リーシュマニアの原因となるドノヴァン・リーシュマニアでは 5.0 以上、マラリアの原因となるプラスモディウム・ファルシパルムでは 2.0 以上、シャーガス病の原因となるクルーズ・トリパノソーマでは 6.0 以上、ツツガ虫病の原因となるオリエンティア・ツツガでは 6.0 以上、バベシア病の原因となるバベシア・マイクロディでは 5.0 以上という試験結果が報告されている^{7, 10)}

¹³⁻¹⁵⁾ 現在、献血時に寄生虫に関する検査は実施されていないため、不活化工程の導入は安全性の向上に有効であると考えられる。

C.2.3. リボフラビンによる不活化工程の血小板への影響

血小板は機械的な刺激や温度変化により活性化され、粘着や凝集を起こしやすくなるため、血小板製剤調製時には活性化を最小限にとどめる配慮が必要である。しかし、リボフラビンを用いた不活性化処理を施された血小板製剤では、保存期間中に血小板が活性化されることが報告されている。

Perez-Pujol らの論文¹⁶⁾では、リボフラビンによる不活性化処理をした血小板を用いて、保存3日目および5日目に血小板表面分子発現と血小板機能（血管への接着・粘着・凝集）が検討されている。不活性化処理を施した血小板では、血小板活性化マーカーである p-selectin, lysosomal integral membrane protein(LIMP)の血小板表面発現が経時的に上昇し、annexin V の結合も上昇している。紫外線照射量が高い方がその上昇は顕著である。しかし摘出ウサギ大動脈を用いた灌流実験により、血小板製剤中の血小板機能を調べた結果では、不活性化処理による内皮下層への血小板の接着、粘着、凝集の上昇は観察されていない。高エネルギー紫外線照射群で5日目に接着、粘着、凝集の低下が認められたが、その他では血小板機能がほぼ保たれていることを示す結果となっている。文献上は、保存期間中に低下することが知られている血小板機能が、不活性化操作により維持されている可能性が考察されており、血小板活性化が良い影響を与えていると考えられているようである。

上記文献では、対照群が“unilluminated”と記載されており、未処理検体であるのか紫外線照射を

しない対照であるのかが明確でない。一方、本不活化技術を評価するための日本赤十字社の検討では、未処理検体を対照とした実験が行われている。図4は、平成21年12月24日血液事業部会資料4-6として、日本赤十字社より報告されたデータをグラフ化したものである。図4(A)のデータでは、p-セレクトリン陽性率の経時的な上昇が確認されているが、これは、初期活性化型 GPIIb/IIIa 陽性率の上昇が一過的であるのと好対照である(図4(B))。図4(A)と(B)は、別ロットの検体について実施された試験結果であると考えられ、比較対象として適していない可能性もあるが、GPIIb/IIIa の活性化が不活性化処理の際の物理的刺激による可能性が考えられる一方で、不活性化処理後一定時間を経て上昇する p-セレクトリン陽性率は、不活性化処理後に生じる製剤中の環境変化を反映している可能性がある。

p-セレクトリン陽性率上昇の他に、不活性化処理した血小板の保存中には、グルコース消費量の増加、乳酸産生量の増加がおこることも報告されている¹⁷⁾。不活性化処理後の保存期間中に ATP 含量の低下も認められたことから、 α 顆粒の放出等が原因となり ATP 消費が増加することが、グルコース消費や乳酸産生の増加の一因と考えられている^{18) 19)}。一方で、2-deoxyglucose の添加により解糖系の亢進を抑制しても、p-セレクトリン陽性率の上昇は抑制されなかったことから、解糖系の亢進は p-セレクトリン陽性率上昇の原因にはなっていないとされており²⁰⁾、p-セレクトリン陽性率上昇の原因究明が不活性化処理後の製剤中で起こっている変化を究明する上での重要事項と考えられる。これらの変化は不活化直後ではなく、保存期間中に生じているものである。保存期間中の pH 変動に関しては、文献により結果が異なっており、一定の見解が得られていない。

また、日本赤十字社からの報告⁶⁾によると、リボフラビン処理した血小板製剤中に凝集塊が検出されている。凝集塊はフィルターにより除去可能とされているが、凝集に至らずともp-セレクトイン陽性となった血小板は、患者の白血球活性化に関与する可能性も考えられるため、安全性に関しては十分な検討が必要であると考えられる。

これらの知見から、リボフラビンによる不活化処理導入の可否判断のためには、p-セレクトイン陽性血小板を投与することの安全性を検討する必要があると共に、p-セレクトイン陽性率上昇につながる要因を解明し、品質の一定性確保の対策を講じる必要があると考えられる。また、血小板活性化の問題が解決されなければ、有効期間の延長は難しいと考えられる。

D. 考察

D.1. 血液凝固第 VIII 因子の構造解析

新しいウイルス不活化技術として、光化学反応を利用した技術が開発され、そのうちいくつかの手法は一部の国で導入されている。しかし、これらの処理により、フィブリノーゲンや FAVIII などのいくつかの血液凝固因子の活性は 15%程度低下することが報告されている。現在までに、光化学反応を利用したウイルス不活化処理に由来する有害事象発症例は報告されていないが、光化学反応の有効成分への影響を評価する必要がある。本研究では、光化学反応を利用したウイルス不活化処理が FAVIII に与える影響を明らかにすることを目指しており、本年度は、その基礎的検討としてウイルス不活化処理前の FAVIII について LC/MS によるペプチドマッピングを行い、その一次構造並びに翻訳後修飾 (N 及び O 結合型糖鎖) を可能な限り帰属した。

ペプチドマッピングにより、約 65%の配列をトリプシン切断ペプチドとして確認することができた。FAVIII には、25 カ所の推定 N 結合型糖鎖結合部位があり、そのうち 20 カ所に糖鎖が結合していることが報告されているが、今回、18 カ所について糖鎖が結合していること、そのうち 3 カ所は糖鎖が結合していない場合があることを確認した。また、4 カ所には糖鎖が結合していないことを確認した。しかしながら、残りの 3 カ所分の糖鎖結合部位を確認できなかったため、今後、分析条件を変えて検討を行う予定である。結合していた糖鎖は、ほとんどの部位においてフコシル化されたシアリル二本鎖または三本鎖糖鎖であったが、Asn239 には、高マンノース型糖鎖、ハイブリッド型糖鎖並びにフコース及びシアル酸が 0 から 1 個結合した二本鎖糖鎖が、Asn2118 には、高マンノース型糖鎖のみが結合していた。これらは、過去の報告とほぼ同じであったが、Asn239 についてはより多くの糖鎖が検出された。

本研究では、エキソグリコシダーゼ消化並びにβ脱離及びマイケル付加を行った試料を用いて、O 結合型糖鎖結合ペプチドの推定を行い、18 個の O 結合糖鎖結合部位を含むペプチドを推定した。そのうち、10 カ所の O 結合型糖鎖結合部位の糖組成を明らかにすることができたが、残り 8 カ所については、まだ実際に糖鎖が結合していることを確認できていない。β脱離及びマイケル付加は、糖鎖が付加していないセリン及びスレオニン残基においても起こりうることから、今後、糖ペプチドとして確認する必要がある。

本年度は、ウイルス不活化処理前の FAVIII について LC/MS によるペプチドマッピングを行った。来年度は、ウイルス不活化処理がペプチドマップに及ぼす影響を調べる予定である。光化学反応で起きうる修飾として、糖鎖への影響、ペプチド鎖

の切断、メチオニンの酸化、カルボニルの生成等が考えられることから、これらの検出に加えて、N 末修飾法及びカルボニルの誘導體化を利用した検出法を検討する予定である。

D.2. リボフラビンによる病原体不活化

リボフラビンによる病原体不活化技術を導入することの利点は、病原体混入に関する安全性向上であり、欠点は、不活化処理により製剤成分に変化が生じる可能性があること、及び、これまでの製剤には含まれていないリボフラビンやその代謝物が不活化処理製剤に含まれることである。

D.2.1. 病原体不活性化

輸血用血液製剤の安全性確保の対策に関しては、感染性因子混入の検出感度や精度の向上を目的とした試験法の改良を含め、継続的に改善が図られてきている。現在我が国では、献血された血液について下記の検査が実施されている。

- ・血液型検査
- ・生化学検査
- ・血球計数検査
- ・抗原・抗体検査：化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法)

梅毒血清学的検査

HBV (HBs 抗原, HBs 抗体, HBc 抗体)

HCV (HCV 抗体)

HIV (HIV-1, 2 抗体)

HTLV-1 (HTLV-1 抗体)

ヒトパルボウイルス B19 (ヒトパルボウイルス B19 抗体)

- ・ウイルス検査：核酸増幅法 (NAT 法)

HBV

HCV

HIV

核酸増幅検査の導入とその後の改良 (プールサイズの変更, 試薬や機器の変更等) により, 感染したウイルスが検出されないウインドウ期が短縮されるなど, 安全性確保の対策は向上してきているが, 依然としてウインドウ期は存在し, 検査による安全性確保は完全なものではない。また, 検査により検出できる病原体は特定のものに限られている。さらに, 無菌性試験が実施されるのは一部の検体に限られており, 寄生虫の検査は実施されていない。特に, 血小板は製剤では保存条件が室温であるため細菌が増殖しやすいとされている。このような状況を考えると, 病原体不活化技術の導入は輸血用血液製剤の安全性向上に有用性をもっていると考えられる。

しかし, 病原体の不活化が安全性向上に貢献することは確かと考えられる一方で, 輸血用血液製剤の安全性確保に関するこれまでの努力により, 我が国の輸血用血液製剤の安全性は, 実際には極めて高くなっているという事実もある。平成 20 年 2 月 27 日血液事業部会運営委員会・安全技術調査会合同委員会資料 2-1 によると, 現在, ウイルス残存リスクは, HBV に関して 100 万件に対して 7 件 (0.0007%), HCV 及び HIV ではないずれも 100 万件に対して 0.09 件 (0.000009%) である。また, 細菌の残存リスクは症例がわずかであるためリスクの推定が困難とされるレベルとなっている。ちなみに FDA は現在検討されている不活化技術に対して, 現在高感度に検査が実施されているウイルス等についてウインドウ期等の理由により残存しているリスクを低減化するために導入することはリスクベネフィットの観点からは否定的であると報告している。

感染性因子混入のリスクを完全に回避できる不活可能の程度を定めることは困難であり, リボ

フラビンの不活化能が十分であることを判断することは難しいが、製造工程中にウイルス不活化処理が導入されている血漿分画製剤の場合は、ウイルスに関して 9 log のクリアランスがあればよいとされていること²¹⁾、ウイルス血症の最大値がパルボウイルスでは $10^8 \sim 10^{12}$ gEq/mL に達する可能性がある¹¹⁾ことを考えると、リボフラビンによる不活可能として報告されているクリアランス（例えば、ブタパルボウイルスに対して 5 log 以上）で十分であるとは言い難い。すなわち、リボフラビン法による不活化により病原体混入リスクは低下し、安全性向上が期待できるものの、不活化能は完全ではなく、依然として感染性因子混入のリスクはなくなるならない。したがって、現状では極めて低い病原体混入リスクをさらに低下させるために、製剤中に新たな成分を添加する不活化技術を導入することに関しては慎重な対応が必要である。

D.2.2. 安全性への影響

血小板製剤の有効成分である血小板機能への影響に関しては、C.2.3 で述べた通りである。不活化技術の安全性に関しては、その他に、リボフラビンやその代謝物の影響も考慮する必要がある。リボフラビンはビタミン B2 であり、生体内に存在する物質であること、光照射により生じる主要な代謝物（2'-ketoflavin, 4'-ketoflavin, formylmethylflavin, lumichrome）についてもリボフラビン処理していない血液中に検出される成分であるとされ²⁾、不活化後の除去操作が不要とされている。ただし、リボフラビンとその代謝物は生体内に元来存在する物質であるとは言え、その含量はリボフラビン処理後には未処理検体の約 1000 倍になるため³⁾、多量に含まれる場合にその代謝産物を含めた安全性への影響は十分

に検討が必要と思われる。

一方、リボフラビンによる不活化を実施した製剤の投与により、ヒトに取り入れられるリボフラビンの量は、リボフラビンの濃度が 500 μ M、リボフラビン溶液の体積が 35 mL リボフラビンのフォトコンバージョンが 18%であるという前提のもとで、ヒトの体重を 70 kg とすると、輸血ごとの暴露量が 0.077 mg/kg になると算出されている¹¹⁾。FAO/WHO により定められた食品中リボフラビンの一日摂取許容量は 0.5mg/ kg / day である³⁾。血液中への投与と、食物としての摂取という違いはあるが、少なくとも、不活化した製剤中に含まれるリボフラビンの量は一日摂取許容量を超えていないとは言える。

これまで、リボフラビン及びその代謝物に問題となる毒性は検出されていない³⁾。しかし、リボフラビン及びルミフラビンの変異原性を調べた Kale らの 2 つの論文 "Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin A. Effect of metabolic enzymes. B. Effect of light"^{5,22)}の一つでは、リボフラビンへの可視光照射により生成される活性酸素種には変異原性があると報告されている⁵⁾。リボフラビンを用いた不活化処理に際して発生する可能性のある活性酸素種に関しては、平成 20 年 5 月 23 日の血液事業部会参考資料 4 の p. 11 に記載があるが、その他には議論されていないようである。紫外線照射により発生する可能性のある活性酸素種と、Kale らの実験で生じていた活性酸素種の異同については明らかでないが、不活化処理の際にリボフラビン由来の活性酸素種が生じる可能性とその安全性への影響については、検討が必要かもしれない。

リボフラビンによる不活化技術では、核酸が標的であることから、病原体の不活化のみならず、

輸血後の免疫反応の原因となる白血球も不活化される。本不活化技術導入の可否判断に必要な要件を明らかにするため、来年度は、リボフラビンによる白血球不活化について検討する予定である。

E. 結論

1. モデル血漿タンパク質として FAVIII を用い、還元アルキル化及びトリプシン消化した後、LC/MS によるペプチドマッピングを行った。データベース検索により、アミノ酸配列のうち約 65% に相当するペプチド部分を確認した。また、既報の N 結合型糖ペプチドの分析データと比較することにより、18 カ所の糖鎖を確認した。更に、新たに 10 カ所の O 結合型糖鎖が結合した糖ペプチドを検出した。今後、残りの O 結合型糖鎖結糖ペプチドを解析するとともに、このペプチドマップのデータを利用し、光化学反応を利用したウイルス不活化法がタンパク質一次構造や翻訳後修飾に及ぼす影響を明らかにする予定である。

2. 不活化技術の導入により病原体混入のリスクが減ることは確かであると考えられるが、リスクが完全になくなるものではない。有効成分である血小板が活性化されることの安全性への影響や、リボフラビンとその代謝物に関する安全性上の問題がないことを、臨床試験を通じて明らかにしていくことが導入の可否判断には必須である。病原体混入が大きな問題となっていない現状も踏まえ、導入の有用性を総合的に考える必要がある。

F. 参考文献

1) Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM,

Kleinman S, Metzger PS, Gregory KR, Dodd RY. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*. 49 Suppl 2, 1S-29S, 2009

2) Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, Ruane PH, Goodrich RP. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochemistry and photobiology*. 80(3), 609-15, 2004

3) Reddy HL, Dayan AD, Cavagnaro J, Gad S, Li J, Goodrich RP. Toxicity testing of a novel riboflavin-based technology for pathogen reduction and white blood cell inactivation. *Transfusion medicine reviews*. 22(2), 133-53, 2008

4) Korycka-Dahl M, Richardson T. Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin, and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochimica et biophysica acta*. 610(2), 229-34, 1980

5) Kale H, Harikumar P, Kulkarni SB, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. B. Effect of light. *Mutation research*. 298(1), 17-23, 1992

6) 平成 21 年 12 月 24 日 血液事業部会 資料 4-6.

7) Cardo LJ, Rentas FJ, Ketchum L, Salata J, Harman R, Melvin W, Weina PJ, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen

- inactivation of *Leishmania donovani* infantum in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox sanguinis*. 90(2), 85-91, 2006
- 8) Goodrich RP, Edrich RA, Li J, Seghatchian J. The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus Apher Sci*. 35(1), 5-17, 2006
- 9) Goodrich RP, Gilmour D, Hovenga N, Keil SD. A laboratory comparison of pathogen reduction technology treatment and culture of platelet products for addressing bacterial contamination concerns. *Transfusion*. 49(6), 1205-16, 2009
- 10) Tonnetti L, Proctor MC, Reddy HL, Goodrich RP, Leiby DA. Evaluation of the Mirasol platelet reduction technology system against *Babesia microti* in apheresis platelets and plasma. *Transfusion*. 2009
- 11) 平成 20 年 5 月 23 日 血液事業部会 参考資料 4.
- 12) Murphy WG, Foley M, Doherty C, Tierney G, Kinsella A, Salami A, Cadden E, Coakley P. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox sanguinis*. 95(1), 13-9, 2008
- 13) Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci*. 37(2), 131-7, 2007
- 14) Rentas F, Harman R, Gomez C, Salata J, Childs J, Silva T, Lippert L, Montgomery J, Richards A, Chan C, Jiang J, Reddy H, Li J, Goodrich R. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. 47(2), 240-7, 2007
- 15) Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion*. 44(6), 877-85, 2004
- 16) Perez-Pujol S, Tonda R, Lozano M, Fuste B, Lopez-Vilchez I, Galan AM, Li J, Goodrich R, Escolar G. Effects of a new pathogen-reduction technology (Mirasol PRT) on functional aspects of platelet concentrates. *Transfusion*. 45(6), 911-9, 2005
- 17) AuBuchon JP, Herschel L, Roger J, Taylor H, Whitley P, Li J, Edrich R, Goodrich RP. Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultraviolet light for pathogen reduction. *Transfusion*. 45(8), 1335-41, 2005
- 18) Li J, Lockerbie O, de Korte D, Rice J, McLean R, Goodrich RP. Evaluation of platelet mitochondria integrity after treatment with Mirasol pathogen reduction technology. *Transfusion*. 45(6), 920-6, 2005
- 19) Picker SM, Steisel A, Gathof BS. Cell

integrity and mitochondrial function after Mirasol-PRT treatment for pathogen reduction of apheresis-derived platelets: Results of a three-arm in vitro study. *Transfus Apher Sci.* 40(2), 79-85, 2009

- 20) Li J, Goodrich L, Hansen E, Edrich R, Gampp D, Goodrich RP. Platelet glycolytic flux increases stimulated by ultraviolet-induced stress is not the direct cause of platelet morphology and activation changes: possible implications for the role of glucose in platelet storage. *Transfusion.* 45(11), 1750-8, 2005

21) 平成 15 年 11 月 7 日 薬食審査発第 1107001 号.

- 22) Kale H, Harikumar P, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin. A. Effect of metabolic enzymes. *Mutation research.* 298(1), 9-16, 1992

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Akira Harazono, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by

liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. Identification of Lewis x-glycoproteins in mouse kidney. *J. Proteome Res.* , 8, 3415-3429 (2009)

- 2) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.* , 32 (5) 796-800 (2009)
- 3) 山口照英, 石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 36, 611-627 (2009)

2. 学会発表:

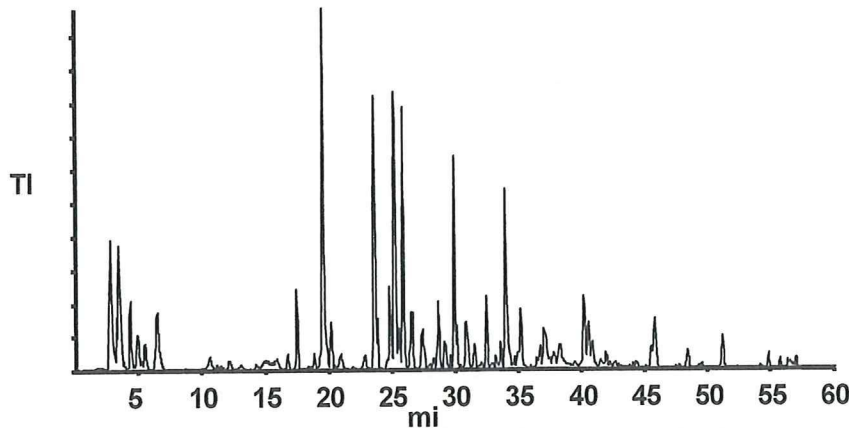
- 1) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第 7 回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム, 大阪(2009, 12, 7, 8)
- 2) 小林哲, 鈴木琢雄, 石井明子, 川崎ナナ, 山口照英: MALDI-TOF MS におけるマトリックスの塩基性アミノ酸残基に対する影響 質量分析討論会 2009 年 5 月 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

図1. (A) ヒト血液凝固第VIII因子のトリプシン消化物のLC/MS (B) データベース検索結果

(A)



(B)

Taxonomy: *Homo sapiens*

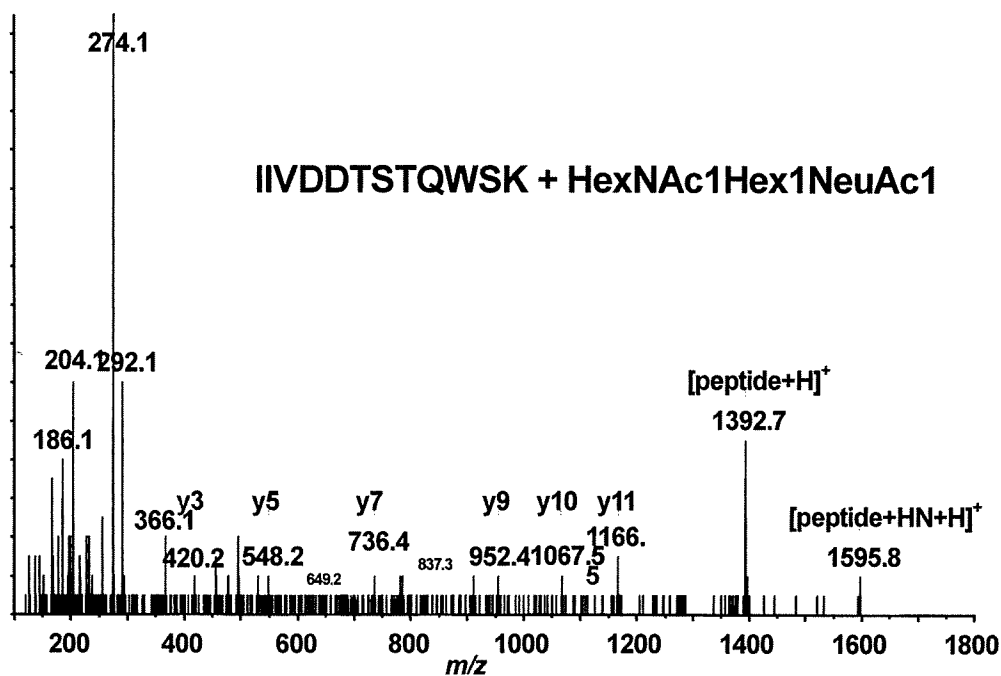
Variable modifications: Carboxymethyl (C), Oxidation (M), Sulfation (Y), Sulphone (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 65%

```

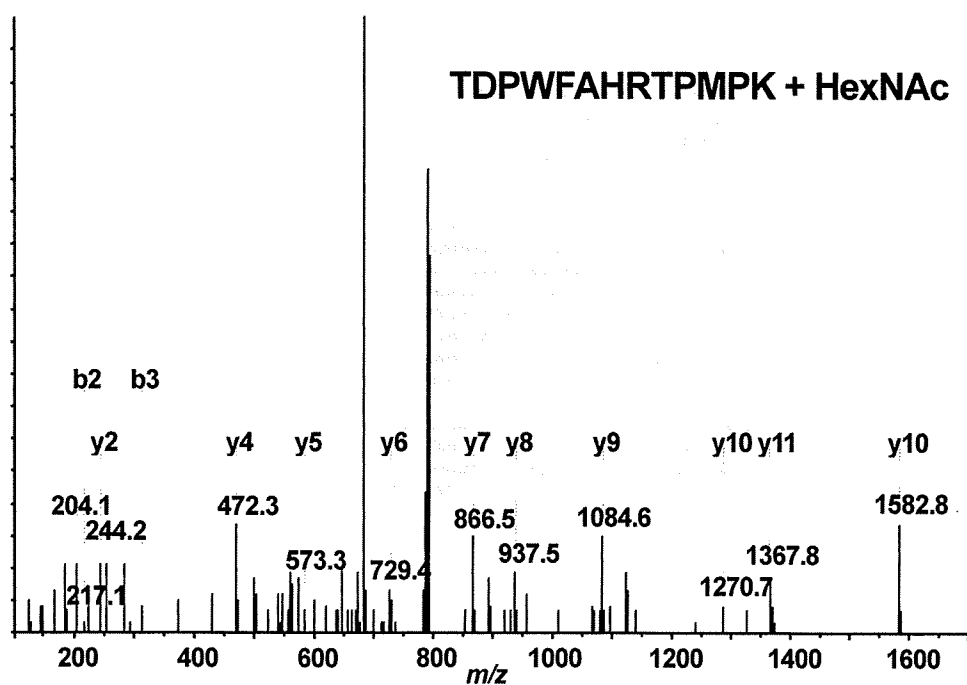
1 MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYLGAIVE LSWDYMQSDL GELFVDARFP
51 PRVFKSFPFN TSVVYKKTLE VEFTHLLENI AKPRPPWML LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGFMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKKTKQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHFTLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
351 EPQLRMKNEE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSPFIQI RSVAKKHPKT
401 WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSOY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFTKREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNLYPHGIT
501 DVRLPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YSSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTEMI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVEMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI PENDIEKTFP WFAHRTMPMK
801 IQNVSSSDDL MLLRQSPFPH GLSLSDLQEA KYETFSDDPS FGAIDSNNSL
851 SEMTHFRPQL HHSGDMVFTP ESGLQLRLNE KLGTTAATEL KKLDFKVSST
901 SNNLISTIPS DNLAAGTDNT SSLGPPSMFV HYDSQLDRTL FGKKSPLTE
951 SGGPLSLSEE NNSDKLLESG LMNSQESSWG KNVSSSTESGR LFKGKRAHGP
1001 ALLTHDNALF KVISILLKTN KTSNNSATNR KTHIDGSPLL IENSPSVWQN
1051 ILESDETFEK VTPLIHDRML MDKNATALRL NHMSNKTSS KNMEMVQQJK
1101 EGPIPEDAQN PDMSFFKMLF LPESARWIQR THGKNSLNSG QGSPKQLVS
1151 LGPEKSVTEG NFLSEKNKVV VKGGEFTKDV GLKEMVFPSS RNLFPLNLDN
1201 LHENNTNQE KKIQEETEK ETLIQENVVL PQIHTVTGK NFMKNLFLS
1251 TRQNVESYD GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSK GEEENLEGLG
1301 NQTKQIVEKY ACTTRISPNT SQQNFVTQRS KRALKQFRLP LEETELEKRI
1351 IVDDTSTQWS KNMKHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS DCLTRSHSIP
1401 QANRSPLEPIA KVSSPFSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES
1451 SHFLQAGAKN NLSLAILTLE MTGDQREVGS LGTSATNSVT YGKVENTVLP
1501 KPDLPKTSKG VELLPKVHIY QKDLFPTETS NGSPGHLDLV EGSLLQGTG
1551 ATKWNEANRP GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK
1601 SQEKSPEKTA FKKKDTILSL NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR
1651 TERLCSQNPV VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1701 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQPFK
1751 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1801 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKQV HMAPTKDEFD
1851 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1901 IFDETSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1951 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
2001 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLVYSNKC QTPLGMASGH
2051 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
2101 HGIKTQGARQ KFSLLYISQF IIMYSLDGK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
2151 SSGIKHNIEN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEIMGCDL NSCSMPLGME
2201 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNARW QVNNPKEWLQ
2251 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQV TLFQNGKVK
2301 VFGNQDSFT PUVNSLDPLP LTRYLRHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
2351 Y
    
```

図2. (A) O結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトル (m/z 1170.5 2⁺) (B) エキソグリコシダーゼ消化後のO結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトル (m/z 894.0 2⁺) (C) β 脱離した糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル (m/z 575.3 3⁺) (D) β 脱離及びマイケル付加 (2-メルカプトエタノール) 糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル (m/z 726.9 2⁺)

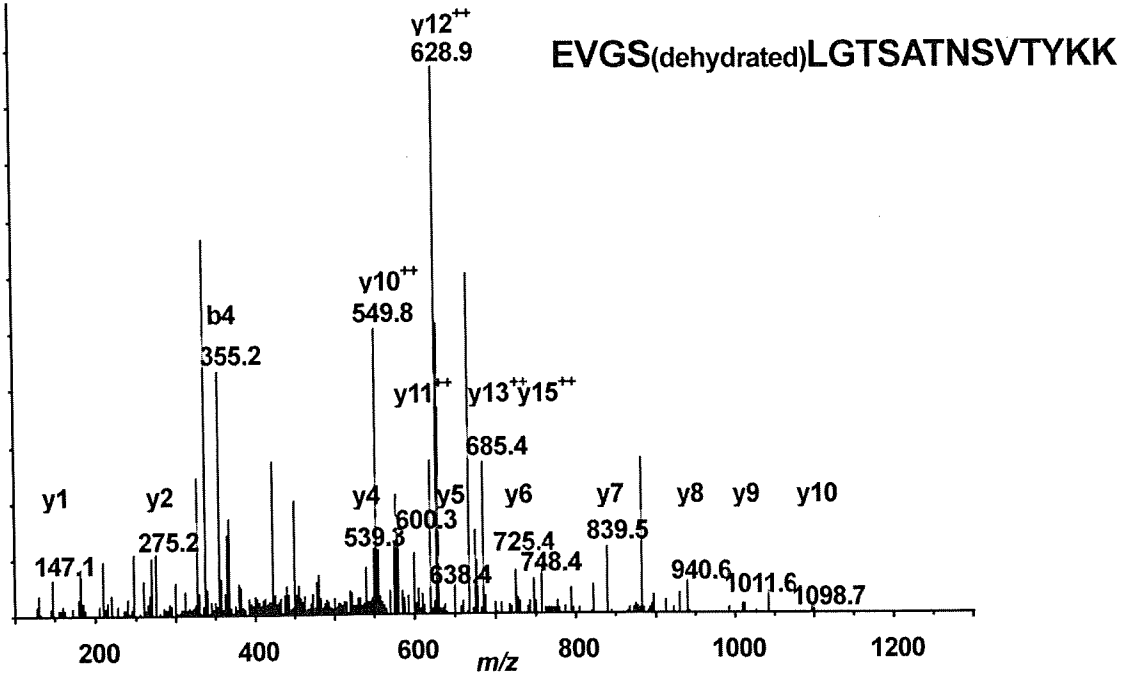
(A)



(B)



(C)



(D)

