

副作用を引き起こす可能性があるオリゴマーの性状を明らかにし、グロブリン製剤の重合体否定試験法および規格値を見直す必要があると考えられる。製造メーカーおよび国立感染症研究所が行う重合体否定試験における重合体検出感度を統一して試験法を標準化し、現在の分析技術レベルに見合った品質管理を実施する。

## B. 研究方法

### 1) 至適分析条件の検討

高速液体クロマトグラフィーとして日立-2000 シリーズ (Column Oven L-2350, Diode Array Detector L-2455, Autosampler L-2200, Pump L-2130) を用いて分析を実施した。ゲルろ過カラムとしては東ソー G3000SWXL、G4000SWXL、および G3000SW を用いた。流速は 0.3mL/min~1.0mL/min で行った。

2) 生理条件下および高速液体クロマトグラフ法による至適条件下 (SEC 至適条件) における超遠心分析法による解析

超遠心分析は、ベックマン・コールター社製 XL-1 を用いて超遠心沈降速度法により実施し、各成分の分布状態および形状の解析を実施した。測定温度は 20°C、回転数は 40000 回転で行った。グロブリン製剤は以下の 6 種類を用いた。各製剤は、リン酸緩衝液 (生理条件を反映) および SEC 溶離液で希釈して 1mg/mL に調整し、超遠心分析を行った。

- 乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン
- 乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン
- 乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン
- pH4 処理人免疫グロブリン
- ポリエチレングリコール処理人免疫

## グロブリン

• 抗破傷風人免疫グロブリン  
3) 新規格値検討のための基礎データの収集

人への投与実績があり、かつ、健康被害の報告のなかった製剤 8 種類の重合体含量を SEC 至適分析条件で分析を行った。分析は各血液製剤製造メーカーの品質管理部において実施した。静注用グロブリン製剤は以下の 8 種類を用いた。

- 乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン
- 乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン
- 乾燥イオン交換樹脂処理人免疫グロブリン
- pH4 処理人免疫グロブリン
- ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン
- ポリエチレングリコール処理抗 HBs 人免疫グロブリン
- ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン
- 乾燥スルホ化人免疫グロブリン

## C. 研究結果

1) 至適条件検討とグロブリン製剤中の重合体含量の測定 (国立感染症研究所実施)

静注グロブリンの重合体を分析する至適条件として以下の条件を定めた。

カラム: G3000SWXLx2 本

流速: 0.5mL/min

溶離液組成: 0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% NaN<sub>3</sub> in 1/7.5 M Phosphate buffer pH7.0

昨年度は pH6.4 で分析を実施していたが、pH6.4 で分析するとカラムのロットにより検出感度に差が認められたため、より安定して凝集体を分離できる条件として、pH7.0 を至適条件として決定した。また、ガードカラムは製造の際にロット管理を実施していな

いことが判明したこと、また、ガードカラムへグロブリン凝集体の吸着が認められたことの2つの理由によりガードカラムは使用しないこととした。

決定した SEC 至適条件で市販されている静注用グロブリン製剤中の重合体含量を測定した結果、調べた5種類のグロブリン製剤中の3種類において、三量体を含むオリゴマーが分離され、そのうち2種類においてオリゴマーを含む重合体含量が 1.0%を超えていた (1.83%, 2.94%)。

## 2) 生理条件下および SEC 至適条件下における超遠心分析法による解析

生理条件と SEC 至適条件の2条件で分析した超遠心分析結果はほぼ一致した。

## 3) 超遠心分析と SEC 分析の分析結果の比較

SEC 分析は超遠心分析よりグロブリンモノマー含量が少なく、ダイマー含量が多くなる傾向が認められた。またこの2つの方法を比較すると、超遠心分析の方が、三量体以上のオリゴマーをより分離することが出来ることが確認された。

## 4) 新規規格値検討のための基礎データの収集について

人への投与実績があり、かつ、健康被害の報告のなかった製剤8種類の重合体含量を SEC 至適分析条件測定した。一番重合体含量の低いものは、0.001%であり、一番高いものは2.76%であった。

## D. 考察

生理条件と SEC 至適条件の2条件で分析した超遠心分析結果がほぼ一致したことから、グロブリン製剤が SEC

溶離液で希釈されることにより新たに凝集体が形成される可能性は低いと考えられた。また、SEC 分析は超遠心分析よりモノマー含量が低く、ダイマー含量が高くなる傾向が認められたが、これは SEC の解析の際にピークを縦に切り解析していることによりダイマーが多く見積もられることに起因する可能性が考えられた。ピークをどのように切って解析すれば真値に近い解析結果が得られるのかを今度検討する必要があると考えられる。

超遠心分析法の方が SEC 解析よりも三量体以上をより分離することが出来たが、これは、抗体医薬などの研究開発および品質管理において蓄積されてきたデータと矛盾しないものである。SEC による品質管理では、重合体含量を過小評価してしまう可能性があるが、SEC 分析は汎用性、多検体を解析できる点、再現性、簡便性などから品質管理では多く用いられており、一方、超遠心分析は解析の難しさ等の理由で通常の品質管理では用いられていない。しかし、超遠心分析は一番真値に近い分析結果が得られると考えられており、その解析値はゴールドスタンダードとして用いられることが多い。SEC で品質管理を実施する場合は、その分析条件が至適であるかどうか超遠心分析法を用いて裏付けるデータを取得しておくことが望ましい。

新規規格値を決定する為の基礎データの取得を目的として、これまでに市販されかつ、健康被害の報告されていないグロブリン製剤の重合体含量の上限値を各メーカーの品質管理部の協力のもとで測定を実施した。調べた8製剤のうち、2製剤はすべてのロットで 1.0%を超えており、なかには

3.0%を超えるものも含まれた。一方で、0.001%程度の重合物した認められない製剤も存在した。いずれも製剤もこれまでに副作用の報告があがっておきていない点を考慮し、今後各社と協力して、新しい規定値をどのように設定すべきであるか、慎重に協議して行く予定である。

#### E 結論

現在の分析技術レベルで品質管理を実施するためには、生物学的製剤基準の見直しが必要である。今後は新しい規格値を慎重に決定していく。各社の分析感度を統一して試験法を標準化し、品質管理を実施し、製剤の安全性を担保していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Momose H, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Masumi A, Maeyama J-I, Takizawa K, Kuramitsu M, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. Jpn J Infect Dis, 63, 25-30, 2010

##### 2. 学会発表

なし

##### 3. 知的所有権の取得状況

なし

## グロブリン製剤の麻疹抗体価測定の見直しについて

分担研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第3部 室長  
研究協力者 長谷紳一郎 血液製剤協会 技術委員会座長  
(株式会社ベネシス 保証本部)

**研究要旨：**人免疫グロブリン製剤の多くは、生物学的製剤基準（生物基）によって製剤中に含有される麻疹抗体価が規定されている。また、その測定法は生物基の一般試験法で中和試験法、赤血球凝集抑制試験法、受身赤血球凝集試験法とされている。しかしこの3つの測定法はそれぞれが問題があり、免疫グロブリン製剤の製造所ではELISA法等の新たな麻疹抗体価測定法の導入を希望している。本研究では、WHO標準品(3IU/ml)と同時に製剤4種の中和抗体価を測定することで各製剤の相対中和抗体価を算出し、また平行して標準品と各製剤をELISA法、PA法で測定する事で相対ELISA価、相対PA価を算出し、各試験法で測定された抗体価の傾向が同様であることを検討した。その結果、ELISA法、PA法での測定では、ともに中和抗体価と異なる傾向を示す製剤があり、現状のままで一般測定法として用いる事は難しいと思われた。今後は製剤の特徴と抗体価の関係を調べ、生物基に導入できるかを検討する必要があると思われた。

### A. 研究目的

人免疫グロブリン製剤は、抗麻疹ウイルス抗体価をガンマグロブリン150mg(ペプシン処理ガンマグロブリンは100mg)あたり5単位以上含まなければならないと生物学的製剤基準(生物基)に定められている。またその測定法は中和法、赤血球凝集抑制試験法(HI法)、受身赤血球凝集試験法(PHA法)とされている。しかしこれらの試験法は後述のような問題があり、将来は製造所において人免疫グロブリン製剤を安定して供給する事が困難になる可能性が考えられる。1) 中和試験法は実際に生きた

ウイルスを用いるのでグロブリン製剤の製造所では施設等の規制を受け、実施できる製造所は少ない。2) HI法はアフリカミドリザルの赤血球を用いるため、将来的にますます入手が困難になり安定的に実施できなくなる。3) PHA法は試験法として用いられる事が少なく需要が多くない事から、PHAキットの製造が中止される事が予想される。上記のような状況から人グロブリン製剤の製造所からはELISA法、あるいはゼラチン粒子凝集法(PA法)等を新たな試験法の生物基、一般試験法への掲載の希望がある。本研究は人免疫グロブリン製剤の麻疹抗体測定試験において、

ELISA 法、PA 法が抗体測定法として妥当であるかを検討する事を目的としている。

## B. 方法

WHO 標準麻疹抗体 (WHO International standard, 3<sup>rd</sup> International standard for anti-Measles; 3IU) 並びにグロブリン製剤(表1)を入手し、Vero 細胞、麻疹ウイルスワクチン株を用いてプラーク減少法によって麻疹中和抗体力価を測定し、平行線定量法によって各グロブリン製剤の標準品に対する相対中和力価を算出した。また標準品、ならびにグロブリン製剤の麻疹抗体価を麻疹 IgG ELISA kit (デンカ生研) を用いて測定し、各製剤の ELISA 法による相対力価を算出し、相対中和力価と比較し麻疹抗体価測定法としての妥当性を検討した。また PA kit (セロディア麻疹、富士レビオ) を用いて標準品、グロブリン製剤の PA 価を測定し、各グロブリン製剤の相対力価を算出し、相対中和力価と比較した。

## C. 研究結果

### 1) 中和抗体価の測定

WHO 標準品と 4 種のグロブリン製剤 (表 1) の中和抗体価を 4 名で測定し、標準品の力価(3IU)に対する各グロブリン製剤の相対中和力価を算出した。各グロブリン製剤の標準血清に対する相対中和力価は製剤 A: 4.3、製剤 B: 5.7、製剤 C: 7.6、製剤 D: 6.8 であった (表 2)。

### 2) ELISA 法による麻疹抗体価の測定、並びに中和抗体価との比較

ELISA 法で定量できる希釈率をあらかじめ検討した上で、WHO 標準品、並びに各グロブリン製剤をその希釈

率からさらに 2 倍階段希釈を 2 回行い、合計 3 階段希釈液を作製し、それぞれの ELISA 抗体価(EIA 価)を平行線定量法で算出し、各グロブリン製剤の標準品に対する相対 ELISA 力価を算出した。相対 ELISA 力価は製剤 A: 7.53、製剤 B: 27.0、製剤 C: 6.86、製剤 D: 11.26 を得た。また相対中和抗体価に対する相対 ELISA 力価は、製剤 A: 1.75 倍、製剤 B: 4.74 倍、製剤 C: 0.90 倍、製剤 D: 1.66 倍であった。(表 3-1、表 3-2)。

### 3) PA 法による麻疹抗体価の測定、ならびに中和抗体価との比較

WHO 標準品、並びに各グロブリン製剤をキットの説明書に従って PA 抗体価を測定した。3 回測定を実施し、幾何平均値をそれぞれの PA 抗体価とした。標準品と各製剤の相対力価を算出したところ製剤 A: 7.53、製剤 B: 12、製剤 C: 24、製剤 D: 24 であった。また相対中和抗体価に対する PA の相対力価は、製剤 A: 1.75 倍、製剤 B: 2.11 倍、製剤 C: 3.16 倍、製剤 D: 3.53 倍であった。(表 4)。

## D. 考察

現在の生物基、一般試験法の麻疹抗体価測定法には、中和試験法、赤血球凝集抑制試験法、受身赤血球凝集試験法が記載されているが、HI 法、PHA 法では血球や kit の供給が将来的に困難になる事が予想されている。また、中和法は生きたウイルスを使用する事から施設面での制約があり一部の製造所では実施が困難である。今後も現在の生物基に従ってグロブリン製剤を安定的に供給するためには ELISA 法、PA 法等の新規の麻疹抗体価測定法の採用する必要がある。ELISA 法は血清を用いた場合では

HI 法、中和法とよく相関する事が知られている。また、抗原抗体反応を利用して抗体量を直接定量できる上、比較的簡便で感度が高い。また HI 法や PHA 法と違い、OD 値で結果が表示されるので比較的感が入りにくく、機械による自動化ができる可能性がある。一方、PA 法の基本原理は PHA 法と同じで、感作赤血球の代わりに麻疹抗原を吸着させたゼラチン粒子を用いるが、操作が簡単で短時間で結果が測定でき感度が高い事が知られている。現在、わが国が実施している流行予測事業で使用されている方法である。ELISA 法の妥当性は、中和法と ELISA 法によって算出された WHO 国際標準品に対する相対力価を比較する事で考察した。表 3-1、3-2 に示すように、ELISA 法で得られた各グロブリン製剤の WHO 国際標準品に対する相対力価は、3 製剤においては中和法による相対力価とほぼ同等の相対力価を示したが、製剤 B においてはやや乖離した結果が得られた。これらの乖離した理由としては、グロブリン製剤はその副作用に関連する凝集素を除去するために酸性処理、スルホ化処理、ポリエチレングリコール処理などが施されており、その処理の過程、あるいは最終製剤の形態(pH 値、塩濃度等)によって ELISA 法の測定原理である抗原抗体結合反応に影響があった可能性が考えられた。一方、PA 法においては、各製剤と中和法との乖離はやや大きかった。またその乖離の程度は PHA 法で測定された結果の傾向とも異なっていた。ELISA 法で測定した時と同様、抗体

精製の過程による処理との関係が考えられほか、PA 法では含まれる抗体の avidity によっても値が変動する事が知られており、それらが結果に反映された可能性も考えられた。ELISA 法、PA 法ともに製剤によっては中和抗体価と異なる傾向をしたため生物基の一般試験法として導入するにはさらなる検討が必要であると思われた。一方、現在、WHO は麻疹排除を目指しており、日本を含む西太平洋地区では 2012 年を達成の目標年としている。今後、麻疹罹患患者が減少し、人が保持する麻疹抗体価が低下する可能性があり、製剤の品質に関係なく、生物基の基準値を維持できなくなる事が予想される。麻疹抗体価測定以外の方法でグロブリン製剤の品質を確認する方法も検討していく必要があると思われた。

#### E. 結果

ELISA 法、PA 法を新規の麻疹抗体測定法として生物基に導入するにはさらに検討が必要である事が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. その他

なし

【表 1】 グロブリン製剤の種類

凝集体除去の方法	乾燥スルホ化処理	pH4 処理 (酸性処理)	乾燥ポリエチレン グリコール処理	ポリエチレング リコール処理
----------	----------	------------------	---------------------	-------------------

【表 2】 各グロブリン製剤の国際標準品に対する相対中和力価

	製剤 A	製剤 B	製剤 C	製剤 D
平均相対値	1.43	1.90	2.52	2.27
標準偏差	0.27	0.46	0.95	0.54
相対中和力価	4.3	5.7	7.6	6.8

【表 3-1】 グロブリン製剤の国際標準品に対する相対力価 (ELISA 法)

製剤	平均 EIA 価	標準品に 対する 相対価	相対 ELISA 力価(IU)	相対中和 力価	相対 ELIA 力価/ 相対中和力価
製剤 A	84.74	2.52	$2.52 \times 3 = 7.53$	4.3	$7.53 / 4.3 = 1.75$
製剤 B	303.65	9.00	$9.00 \times 3 = 27.0$	5.7	$27 / 5.7 = 4.74$
製剤 C	71.57	2.28	$2.28 \times 3 = 6.86$	7.6	$6.86 / 7.6 = 0.90$
WHO 標準 品	38.56	1	$1 \times 3 = 3$	3	1

【表 3-2】 グロブリン製剤の国際標準品に対する相対力価 (ELISA 法)

製剤	平均 EIA 価	標準品に 対する 相対価	相対 ELISA 力価(IU)	相対中和 力価	相対 ELIA 力価/ 相対中和力価
製剤 D	149.68	3.75	$3.75 \times 3 = 11.26$	6.8	$11.26 / 6.8 = 1.66$
WHO 標準 品	49.87	1	$1 \times 3 = 3$	3	1

【表 4】

製劑	PA 抗体 価	幾何平均 PA 抗体価	相对 PA 力価 (IU)	相对中和 力価	相对 PA 力価/ 相对中和力価
製劑 A	1024	1287.2	2.51x3=7.53	4.3	7.53/4.3=1.75
	2048				
	1024				
製劑 B	2048	2048	4x3=12	5.7	12/5.7=2.11
	2048				
	2048				
製劑 C	4096	4096	8x3=24	7.6	24/7.6=3.16
	4096				
	4096				
製劑 D	4096	4096	8x3=24	6.8	24/6.8=3.53
	4096				
	4096				
WHO 標準 品	38.56	1	1x3=3	3	1



## 医薬品を巡る環境の変化等に対応した生物学的製剤基準改正のための研究 動物を用いた安全性試験について

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部・部長  
研究協力者 益見厚子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
倉光 球 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
検討グループ：GSK、サノフィ・パスツール、武田薬品、MSD、北里研、化血研、デンカ生研、阪大微研、ノバルティスファーマ

**研究要旨：**ワクチン製剤の異常毒性否定試験の検定実施について、日本における当該試験の意義や設定の考え方やについての理解を深めるとともに、現状に即した検定の実施を目指す。本研究課題では、B型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止および試験で動物に接種する用量の見直し、加えて異常毒性否定試験の今後のあり方について検討した。

### A. 研究背景と目的

異常毒性否定試験は、ワクチンの品質管理のために、モルモットを用いて製剤の均一性を確認するための試験である。

また近年、海外で安全性・有効性が高く評価された様々なワクチンが国内で承認され、販売が開始されつつある。これらのワクチンについて海外での実績から日本国内での異常毒性否定試験の実施の廃止を求める要望が出されており、試験の設定あるいは廃止について、異常毒性否定試験の試験実施機関である国立感染症研究所での検討が求められている。

しかしながら、これまで異常毒性否定試験をどのような条件のもと国家検定として設定し、どのような条件が整えば廃止するかについての基準が確立されていなかった。そこで当研究班において、異常毒性否定試験を今後はどのように実施して行くかについて、国内外のワクチンメーカーと国立感染症研究所で意見交換を行い、これからの試験のあり方について双方が一定の共通見解を持つための議論を進める。

### B. 研究結果

#### ① B型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について

B型肝炎ワクチンは、化血研（ビームゲン®：

組換え沈降B型肝炎ワクチン）および万有製薬（メルク）（ヘプタバックス®-II：組換え沈降B型肝炎ワクチン）より出検されているが、メーカーより異常毒性否定試験の廃止を求める要望が提出されている。本製剤は、平成3年の試験開始以来、不合格となった試験品はなく、日本における異常毒性否定試験の考え方の観点からも均質性は担保されていると考えられる。現在、廃止に向けた検討を行っている。

#### ② 肺炎球菌ワクチンの異常毒性否定試験廃止の検討について

肺炎球菌ワクチンは、平成17年に異常毒性否定試験において均質性に問題があるとして試験不合格になった経緯があるため、海外の実績から試験廃止の要望が提出されているが、今後も注意深く製品を観察しなければならないと考えられる。ただし、肺炎球菌ワクチン接種によるモルモットの体重減少は、他の製剤と比べても著しく、近年はある一定の割合以上の体重減少を示す場合は動物愛護の観点から試験続行は望ましくないとの考え方があることから、現行投与量の見直しを検討する。

#### ③ 異常毒性否定試験設定と廃止の考え方について

ほぼ同時に承認された2つの海外メーカーのワクチンのプレベナー®とサーバリックス®について、プレベナー®は異常毒性否定試験が削除され、サーバリックス®は、試験が実施されることになっている。これに対して国立感染症研究所の見解として、プレベナー®は、これまでの出荷量が2億ショットを越え、世界的に極めて高い安全性・均質性が担保された背景があり、さらに約千ロットについての異常毒性否定試験が行われていた。日本でのロットリリースのあり方は最終小分け製品で試験をして始めて安全性・均質性が担保されるシステムとなっているものの、プレベナー®に関してはこれまでの海外での実績から極めて高い均質性・安全性が認められると判断されたため異常毒性否定試験が設定されなかった。しかしながら、試験が削除された際に明確な基準が設けられていた訳ではなく、今後の設定基準を明確にするため、各ワクチンメーカーでコンセンサスの取れる方法で試験の導入基準を設定しておく必要があることが課題として挙げられた。

これらの点を踏まえ、今後の異常毒性否定試験のあり方についてメーカーと感染症研究所で意見交換を行った。

メーカーからは、

- 新規製剤に対する規格試験として設定すべき、現行実施製剤については10年間不合格がない場合は検定基準から削除する。
- 新規製剤に対する規格試験としては海外と同じく設定の必要なし、現行実施製剤については海外での実績が乏しいものには2年間（または2ロット以上）実施する。
- 新規製剤については工程開発中に収集されたデータにより同質性が確認された場合には設定の必要なし。
- 新規製剤については初期3ロット3回の試験結果をもって試験を設定しない、現行実施製剤については、試験に連続20ロット以上合格し、母集団が安定している場合は検定基準から削除する。
- 本来、毒性物質検出の試験で、適切に製造された製品には設定不要である。

などの意見が出された。

これに対して、WHO が認識している GST

(General Safety Test)と日本で実施されている異常毒性否定試験は大きく異なる。特に、日本においては製剤毎の母集団を作成し、これと比較することにより、試験が行われる検体が過去の製剤と均一であるかが確認できていること。体重のみならず、接種動物における病理学的解析、血液学的解析がなされていること。さらに、日本においては、過去15年にわたってシステム化された異常毒性否定試験がじっしされており、ロットリリースにおいて非常に重要な役割を果たしていることが国立感染症研究所から示された。

これらの議論をふまえて、今後の日本における異常毒性否定試験について、以下の点が国立感染症研究所の試験担当者と製造者間で確認された。

1. 製剤の安定した均一性を把握するための異常毒性否定試験の評価項目は、サマリーロットプロトコールでの確認が可能になると思われる。安定した均一性の確保が確認できたところで、異常毒性否定試験の国家検定項目から削除可能と考える。

2. しかしながら、特に新規製剤の均一性の確認は重要な項目であるので、特殊な事情を除き、製造販売承認後一定の期間、母集団作成の上異常毒性否定試験を国家試験として実施する。

3. 異常毒性否定試験に用いる接種サンプル量は3Rの考え方に基づき、動物への負担を考慮し設定することを検討する。

4. 異常毒性否定試験に取って代わる、より効果的な安全性試験法が確立され、導入が可能ならば検討する。

5. SLP 導入一定期間後、上記の考え方について検討を行う。

#### D. 考察・結論

本研究課題では、B型肝炎ワクチンの異常毒性否定試験廃止および試験で動物に接種する用量の見直し、加えて異常毒性否定試験の今後のあり方について検討した。海外メーカーの異常毒性否定試験の考え方は、製造工程の間に混入する毒性物質を検出する試験であるというGST(General Safety Test)との位置付けである。当研究班において本邦の異常毒性否定試験に対するメーカーからの要望と現在の異常毒性否定試験の問題点を相互

に意見交換する中で、本邦の異常毒性否定試験についての理解が深まり、今後の異常毒性否定試験のあり方について、一定の考え方に合意を持てた意義は大きい。

## E. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Momose H, Mizukami T, Ochiai M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A new method

for the evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis. J Biomed Biotechnol., 2010:361841., 2010

### 2) 学会発表

無し

## F. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得なし。

## V. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
R. Kusumoto-Matsuo, T. Kanda, and <u>I. Kukimoto</u> .	Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts.	Genes to Cells	16	23-33	2011
Ikeno D, Kimachi K, Kino Y, Harada S, Yoshida K, Tochiwara S, Itamura S, Odagiri T, Tashiro M, Okada K, Miyazaki C, Ueda K	Immunogenicity of an inactivated adjuvanted whole-virion influenza A (H5N1, NIBRG-14) vaccine administered by intramuscular or subcutaneous injection.	Microbiol Immunol	54	81-88	2010
Y. Iwai, H. Takahashi, D. Hatakeyama, K. Motoshima, M. Ishikawa, K. Sugita, Y. Hashimoto, Y. Harada, S. Itamura, T. Odagiri, M. Tashiro, Y. Sei, K. Yamaguchi, T. Kuzuhara	Anti-influenza activity of phenethyl-phenylphthalimide analogs derived from Thalidomide.	Bioorganic Med Chem	18	5379-5390	2010
Momose, H., Imai, J-I, <u>Hamaguchi, I.</u> , Kawamura, M., Mizukami, T., Naito, S., Masumi, A., Maeyama, J-I., Takizawa, K., Kuramitsu, M., Nomura, N., Watanabe, S., Yamaguchi, K.	Induction of indistinguishable gene expression patterns in rats by Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines.	Jpn. J. Infect. Dis.	63	25-30	2010
Momose H, Mizukami T, Ochiai M, <u>Hamaguchi I</u> , Yamaguchi K.	A new method for the evaluation of vaccine safety based on comprehensive gene expression analysis.	J Biomed Biotechnol.,	2010	ID:361841	2010

## VI. 研究成果の刊行物

## Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts

Rika Kusumoto-Matsuo, Tadahito Kanda and Iwao Kukimoto\*

Pathogen Genomics Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-murayama, Tokyo 208-0011, Japan

Replication of human papillomavirus (HPV) genomes requires an origin of replication and two viral proteins: the DNA helicase E1 and the auxiliary factor E2. To dissect the profile of HPV replication in the epithelium, we analyzed replication of an HPV16 origin-containing plasmid in human epithelial cell extracts supplemented with purified E1 and E2. We found that in addition to well-defined circular replication products, high-molecular-weight DNA was synthesized in a manner that depended on the origin, E1 and E2. The high-molecular-weight DNA was converted to a unit-length linear DNA by treatment with restriction enzymes that cleave the plasmid once, implying that a concatemeric DNA was generated by rolling circle replication. Nicking or relaxing the template plasmid enhanced the level of HPV rolling circle replication. In contrast, the addition of an extract from non-epithelial cells diminished the generation of the rolling circle replication product in the epithelial cell extract, indicating factors that counteract HPV rolling circle replication. These results suggest a rolling circle replication mechanism for the HPV genome in cervical epithelial cells, which may have physiological implications for generation of the tandem-repeated HPV genomes occasionally found integrated into the chromosome of cervical cancer cells.

### Introduction

Human papillomaviruses (HPVs) are small icosahedral viruses that contain a double-stranded circular DNA genome of approximately 8000 bp (zur Hausen 1996). Among more than 100 types of HPVs so far identified, nearly 15 types are recognized as high-risk types that are closely linked to the development of cervical cancer, with HPV type 16 (HPV16) the predominant high-risk type worldwide (Parkin *et al.* 2008). HPV infects the basal cells of the epithelium and its genome is maintained as episomal plasmids in the nucleus such that HPV establishes latent infection. When the infected cells leave the basal layer and commence terminal differentiation of the epithelium, the viral genome starts to replicate to yield many thousands of progeny viruses. Thus, replication of the HPV genome is regulated in a strict way that depends on the differentiation status of the host epithelial cells (Longworth & Laimins 2004).

Communicated by: Hiroshi Handa

\*Correspondence: ikuki@nih.go.jp

The replication of the HPV genome requires an origin of replication and two virally encoded proteins: the DNA helicase E1 and the replication/transcription factor E2 (Kadaja *et al.* 2009). To initiate viral DNA replication, E2 binds to a specific binding site at the origin and then recruits E1, leading to the assembly of double E1 hexamers. The resultant E1 hexamer is an active replicative helicase that can induce melting of the DNA at the origin as well as subsequent unwinding of the double helical DNA during replication fork progression. With the exception of continuous DNA unwinding by E1, HPV uses host replication proteins, such as DNA polymerases, proliferating cell nuclear antigen and replication protein A, to accomplish its genome replication (Park *et al.* 1994; Melendy *et al.* 1995).

As two replication forks containing the E1 hexamers progress in opposite directions from the viral origin, bidirectional replication has been considered as a basic mode of HPV DNA replication (Stenlund 2003). Bidirectional replication was clearly demonstrated with an HPV origin-containing plasmid in a crude extract from human embryonic kidney 293

DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01458.x

© 2010 The Authors

Journal compilation © 2010 by the Molecular Biology Society of Japan/Blackwell Publishing Ltd.

(HEK293) cells (Kuo *et al.* 1994; Kasukawa *et al.* 1998), which are not natural host cells for HPVs. However, a previous study using W12 cells, which were isolated from cervical intraepithelial lesion and retain HPV16 genomes as episomes (Stanley *et al.* 1989), reported that replication of the HPV16 genome switches from a bidirectional to a unidirectional mode on cell differentiation, which implies a rolling circle mode of HPV replication (Flores & Lambert 1997). As an extract from HeLa cells was examined for its ability to support HPV replication without success (Lin *et al.* 2000), *in vitro* HPV replication has not been studied using extracts from human epithelial cells.

Here, to examine how HPV replication progresses in epithelial cells, we have employed an *in vitro* replication assay using crude extracts from differentiated epithelial cells. In addition to bidirectional replication, we have demonstrated that an extract from W12 cells induces a substantial level of rolling circle replication of an HPV16 origin-containing plasmid in a manner that depends on the presence of E1 and E2. Possible molecular mechanisms of HPV16 rolling circle replication and its physiological relevance in viral carcinogenesis are presented.

## Results

### Rolling circle replication of the HPV16 origin-containing plasmid in epithelial cell extracts

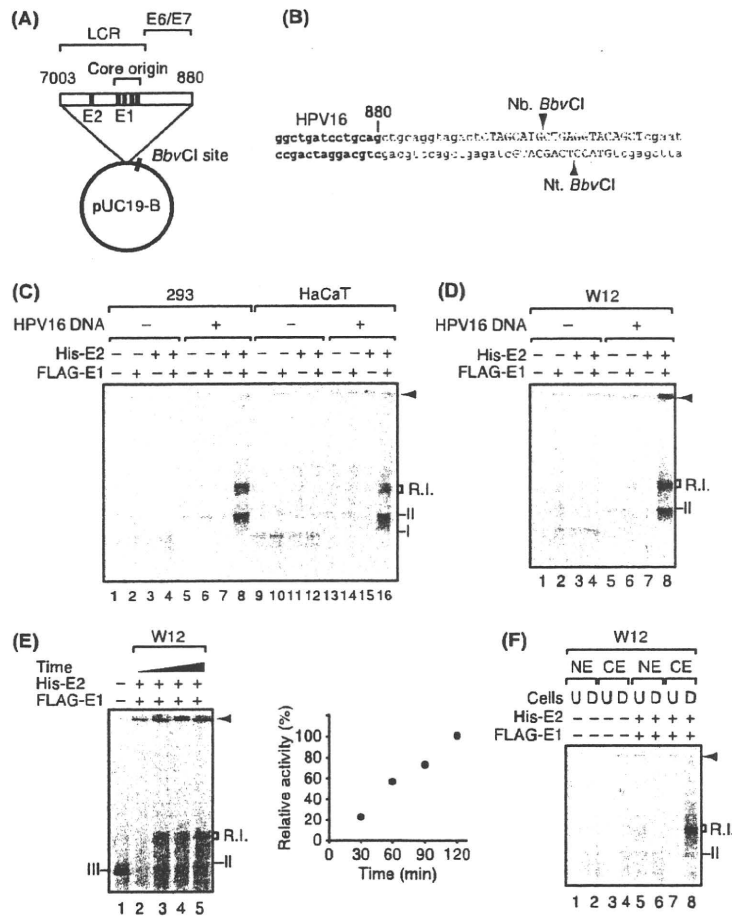
To study HPV DNA replication *in vitro*, we constructed a plasmid, pUC19-B-HPV16, that harbors a DNA fragment from the HPV16 genome (nucleotide positions 7003 to 880), which includes the long control region (LCR), a core origin and the E6/E7 gene (Fig. 1A). We chose this fragment because LCR contains the epithelium-specific enhancer for viral early transcription and the E7 region includes the differentiation-specific promoter for capsid expression, thus we can potentially assign epithelium-specific functions for these regulatory elements in HPV replication (Hubert *et al.* 1999). The resultant plasmid also contains recognition sequences for nicking enzymes (Fig. 1B), which were introduced to examine the effect of a template nick on HPV replication (details are described in the next section). We prepared a crude cytoplasmic extract because it contains a significant quantity of host proteins that have leaked from the nucleus during hypotonic lysis, and when prepared from HEK293 cells, this crude extract has been shown to support efficient cell-free HPV DNA repli-

cation (Kuo *et al.* 1994; Kasukawa *et al.* 1998). In our *in vitro* replication assay, template plasmids were incubated in cell extracts that were supplemented with recombinant E1 and/or E2, after which replicated DNAs that had incorporated [<sup>32</sup>P]-labeled nucleotides were analyzed by agarose gel electrophoresis.

We first carried out replication assays using extracts from two cell lines: HEK293 cells and HaCaT cells (human immortalized keratinocytes) that had been differentiated in high Ca<sup>2+</sup>-containing medium. In addition to circular replication products, which included replication intermediates (R.I.) generated by bidirectional replication, a small amount of replicated DNA remained near the well position in the gel was detected with the HaCaT extract but not with the HEK293 extract (Fig. 1C). The generation of this presumed high-molecular-weight DNA was dependent on HPV16 DNA having the origin, and the presence of both E1 and E2, fully meeting the minimal requirements for HPV DNA replication. A small amount of DNA products from pUC19-B in the HaCaT extract (Fig. 1C, lanes 9–12) was sensitive to *DpnI* digestion (data not shown), suggesting that they are repair products. We next examined the ability of an extract from another epithelial cell line, W12 cells, to support the production of the high-molecular-weight DNA in the replication reaction. The high-molecular-weight DNA was generated in the extract from differentiated W12 cells more efficiently than in the extract from HaCaT cells (Fig. 1D). The amount of the high-molecular-weight DNA increased linearly with reaction time in the W12 cell extract (Fig. 1E). We further conducted replication reactions with extracts from undifferentiated W12 cells, yet the undifferentiated cell extract did not support efficient HPV16 DNA replication (Fig. 1F).

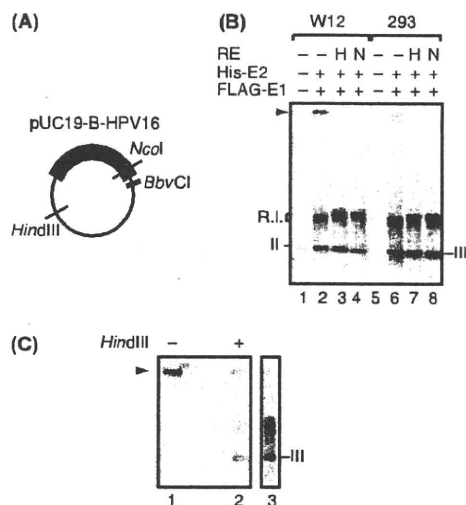
A previous report demonstrated that similar high-molecular-weight replication products were synthesized in an extract from HEK293 cells that had been infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (Skaliter *et al.* 1996), the conclusion being that linear concatemeric DNAs are synthesized by HSV-1 proteins through a rolling circle mechanism. High-molecular-weight replication products by rolling circle replication were also observed in a cell-free replication assay using an extract from HeLa cells with a plasmid containing the origin of simian virus 40 (SV40) and the viral large T antigen (Walther *et al.* 1999). Thus, we examined whether the high-molecular-weight DNA in our replication reactions is a rolling circle replication product.





**Figure 1** Replication of human papillomavirus type 16 (HPV16) origin-containing plasmid in extracts from epithelial cells. (A) A diagram of the plasmid template, pUC19-B-HPV16. An HPV16 genome fragment containing the replication origin was inserted into modified pUC19, pUC19-B, which contains a recognition site for *BbvCI*. Numbers above the inserted fragment indicate nucleotide positions in the HPV16 genome. Binding sites for E1 (open box) and E2 (closed box) are indicated. The bracket shows a core origin region, the long control region and the E6/E7 region in the HPV16 genome. (B) DNA sequences around the *BbvCI* site in pUC19-B-HPV16. DNA sequences inserted into pUC19 are shown in capital letters. DNA sequences of HPV16 and pUC19 are shown in small bold and small plain letters, respectively. Treatment with *Nt.BbvCI* or *Nb.BbvCI* leads to nick introduction at the *BbvCI* site shown by the arrowheads. (C) Replication assay using cytoplasmic extracts from human embryonic kidney 293 and differentiated HaCaT cells. pUC19-B-HPV16 or pUC19-B was incubated in the extracts that were supplemented with FLAG-E1 or His-E2 as indicated. After the reaction, deproteinized DNA products were subjected to agarose gel electrophoresis, and [ $^{32}$ P]-labeled replicated DNAs were visualized. The positions of replication intermediates (R.I.), forms I and II of pUC19-B-HPV16 (I and II) are indicated. The arrowhead indicates a high-molecular-weight DNA product. (D) Replication assay using cytoplasmic extracts from differentiated W12 cells. pUC19-B-HPV16 was incubated for 30, 60, 90 or 120 min (left panel, lanes 2–5, respectively) in the W12 extracts that were supplemented with FLAG-E1 or His-E2 as indicated. pUC19-B-HPV16 was linearized by *HindIII* digestion and [ $^{32}$ P]-end-labeled as a DNA marker (left panel, lane 1). The positions of R.I., forms II and III of pUC19-B-HPV16 are indicated. The arrowhead indicates a high-molecular-weight DNA product. Quantification of the high-molecular-weight DNA product in the left panel (right panel). The relative activity is expressed as the percent incorporation compared with the product with 120-min incubation. (E) Time course of replication reaction using the cytoplasmic extract from differentiated W12 cells. pUC19-B-HPV16 was incubated for 30, 60, 90 or 120 min (left panel, lanes 2–5, respectively) in the W12 extracts that were supplemented with FLAG-E1 or His-E2 as indicated. pUC19-B-HPV16 was linearized by *HindIII* digestion and [ $^{32}$ P]-end-labeled as a DNA marker (left panel, lane 1). The positions of R.I., forms II and III of pUC19-B-HPV16 are indicated. The arrowhead indicates a high-molecular-weight DNA product. (F) Replication assay using cytoplasmic and nuclear extracts from W12 cells. pUC19-B-HPV16 was incubated in nuclear extracts (NE) or cytoplasmic extracts (CE) from undifferentiated (U) or differentiated (D) W12 cells, with or without FLAG-E1 and His-E2 as indicated. The positions of R.I. and form II of the template plasmid are indicated. The arrowhead indicates a high-molecular-weight DNA product.

For this purpose, we treated replication products with restriction enzymes *Hind*III or *Nco*I, which can only cleave the template plasmid once (Fig. 2A), and analyzed the digested DNA on agarose gels. The enzyme treatment completely abolished the appearance of the high-molecular-weight DNA in the W12 cell extract, while leading to a concomitant increase in the level of a linear DNA product (form III) (Fig. 2B, lanes 2–4). Moreover, a gel piece containing the high-molecular-weight DNA (Fig. 2B, lane 2, indicated with the arrowhead) was excised, in which the DNA was treated with *Hind*III (Fig. 2C).



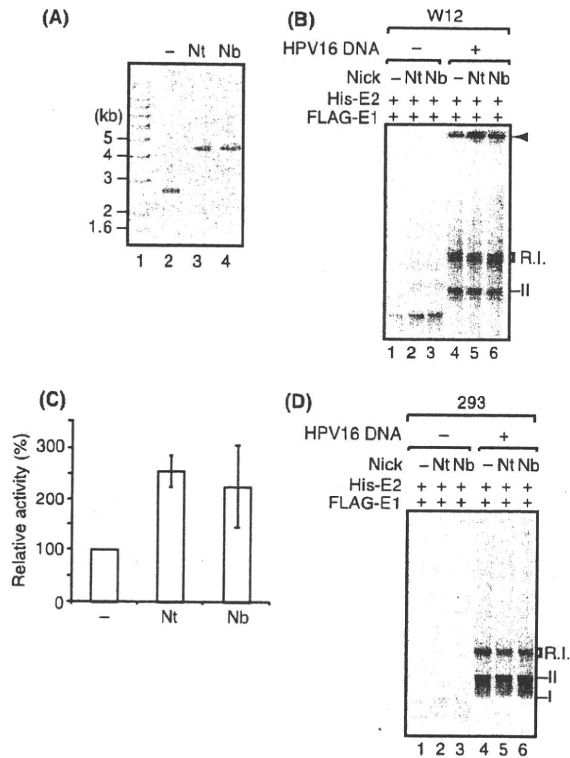
**Figure 2** High-molecular-weight DNA was converted to a unit-length linear template by restriction enzyme treatment. (A) Positions of recognition sites for *Hind*III and *Nco*I in pUC19-B-HPV16. (B) Replication assay using cytoplasmic extracts from W12 and human embryonic kidney 293 cells. pUC19-B-HPV16 was incubated in the extracts supplemented with FLAG-E1 and His-E2 as indicated. After the reaction, deproteinized DNA products were treated with *Hind*III (lanes 3 and 7) or *Nco*I (lanes 4 and 8) and then subjected to agarose gel electrophoresis, followed by visualization of [<sup>32</sup>P]-labeled replicated DNAs. The positions of replication intermediates (R.I.), forms II and III of the template plasmid (II and III) are indicated. The arrowhead indicates a high-molecular-weight DNA product. H, *Hind*III; N, *Nco*I. (C) The high-molecular-weight DNA product in lane 2 of panel B was excised and in-gel treated with or without *Hind*III, then embedded in a 1% agarose gel (lanes 2 and 1), followed by electrophoresis and visualization of [<sup>32</sup>P]-labeled replicated DNAs. The replication products in the W12 extract were digested with *Hind*III (as in lane 3 of panel B) and run in the same gel as a position marker of form III DNA (lane 3).

Subsequently, the *Hind*III-treated gel piece was embedded in another agarose gel, followed by the second electrophoresis. Again, the *Hind*III treatment converted the high-molecular-weight DNA to a unit-length linear DNA (Fig. 2C, lane 2). These results indicate that the high-molecular-weight DNA generated in epithelial cell extracts is composed of tandem repeats of a unit-length pUC19-B-HPV16 DNA, which is a characteristic of replication products synthesized by a rolling circle mechanism.

The structure of the high-molecular-weight DNA generated in the W12 cell extract was further investigated. The high-molecular-weight DNA was purified from a gel, followed by ligation of a short adaptor DNA. The ligated DNA was then digested with *Hind*III and subjected to PCR using primers specific for the adaptor and HPV16 sequences. The result of this experiment revealed amplification of adaptor-ligated DNA fragments having pUC19-B-HPV16 sequences (data not shown), indicating that the high-molecular-weight DNA has a terminal end. Moreover, treatment of the high-molecular-weight DNA with DNA gyrase, which introduces positive supercoils into circular DNA, did not affect its appearance on agarose gels (data not shown). Taken together, these observations strongly suggest that the high-molecular-weight DNA detected in the epithelial cell extracts reflects a linear concatemeric DNA generated by rolling circle replication.

#### Introduction of nick on template enhances HPV16 rolling circle replication *in vitro*

We tested whether a nick on the template affects the rolling circle replication of pUC19-B-HPV16, because template nicking is generally required for initiation of rolling circle replication in other systems, such as  $\phi$ X174 phage (Better & Freifelder 1983), bacterial plasmid pT181 (Noirot *et al.* 1990) and porcine circoviruses (Faurez *et al.* 2009). The plasmid templates were treated with nicking enzymes, Nt. *Bbv*CI or Nb. *Bbv*CI, which can introduce a strand-specific nick at a specific site (Figs 1B and 3A). The nicked or untreated templates were then subjected to the same replication reaction described for the W12 cell extract. Introduction of the nick enhanced the rolling circle replication of pUC19-B-HPV16 approximately twofold compared to the untreated template, regardless of nick orientation (Figs 3B,C), whereas no effect was observed on bidirectional replication products (form II and R.I.). In contrast, nicking did not provoke any rolling circle replication in the HEK293



**Figure 3** Introduction of a nick on the template promotes rolling circle replication. (A) Agarose gel electrophoresis analysis of nicked templates. pUC19-B-HPV16 was untreated (lane 2) or treated with Nt.BbvCI (lane 3) or Nb.BbvCI (lane 4). The DNA products and a size marker (lane 1) were subjected to 0.6% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. (B) Replication assay using cytoplasmic extracts from differentiated W12 cells. Untreated or nicked template (pUC19-B or pUC19-B-HPV16) was incubated in the extract supplemented with FLAG-E1 and His-E2. After the reaction, deproteinized DNA products were subjected to agarose gel electrophoresis, and [ $^{32}$ P]-labeled replicated DNAs were visualized. The positions of replication intermediates (R.I.) and form II of pUC19-B-HPV16 (II) are indicated. The arrowhead indicates rolling circle replication products. (C) Quantification of rolling circle replication products in panel B. The relative activity is expressed as the percent incorporation compared with the product from untreated pUC19-B-HPV16 (panel B, lane 4). Shown are means and standard deviations of seven independent experiments. (D) Replication assay using cytoplasmic extracts from human embryonic kidney 293 cells. The positions of R.I., forms I and II of pUC19-B-HPV16 are indicated.

cell extract (Fig. 3D), suggesting that nicking alone is not sufficient to induce HPV16 rolling circle replication in cell extracts.

### Relaxing supercoiled template enhances HPV16 rolling circle replication *in vitro*

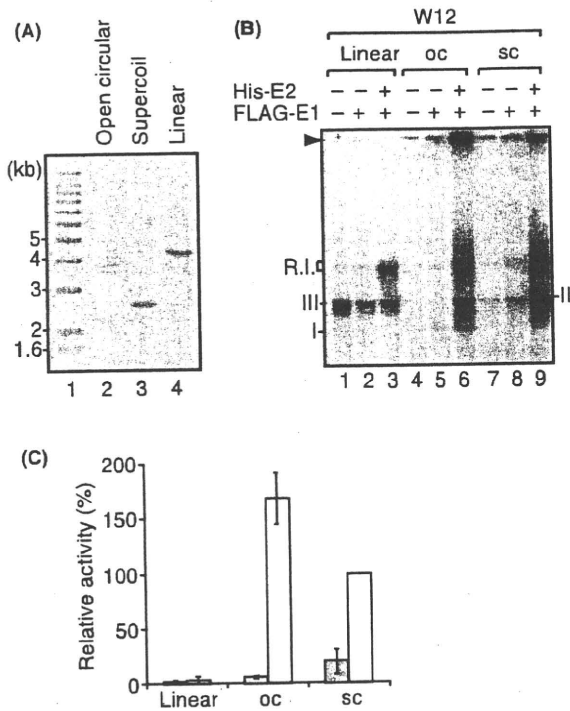
As a nick on a supercoiled plasmid relieves superhelical torsion, we investigated whether relaxation of a supercoiled template is sufficient to enhance the rolling circle replication in the W12 cell extract. To this end, we prepared a relaxed template by pre-treatment of pUC19-B-HPV16 with topoisomerase I (Fig. 4A). Rolling circle replication in the W12 cell extract was enhanced with the relaxed template compared to the supercoiled template (Fig. 4B,C), suggesting that the degree of superhelical torsion in the circular DNA affects rolling circle replication. On the other hand, the high-molecular-weight DNA product was not generated in the reaction with a linear template, indicating that the circular structure of the template is an essential prerequisite for rolling circle replication.

### Inhibition of HPV16 rolling circle replication by the addition of HEK293 extract

By mixing W12 and HEK293 cell extracts in the replication reaction, we sought insights into the mechanisms for the induction of HPV16 rolling circle replication. Increasing amounts of the HEK293 cell extract were added to the replication reaction with the W12 cell extract, and replication products from pUC19-B-HPV16 were analyzed. The rolling circle replication products synthesized in the W12 cell extract were decreased by the addition of the HEK293 cell extract, whereas the level of bidirectional replication products was not changed (Fig. 5A,B). Heat treatment of the HEK293 extract at 95 °C for 10 min abolished its ability to inhibit the rolling circle replication (data not shown), suggesting that heat-sensitive factor(s) are involved in the inhibition. These results imply that the extract from HEK293 cells contains inhibitory factor(s) for the induction of HPV16 rolling circle replication.

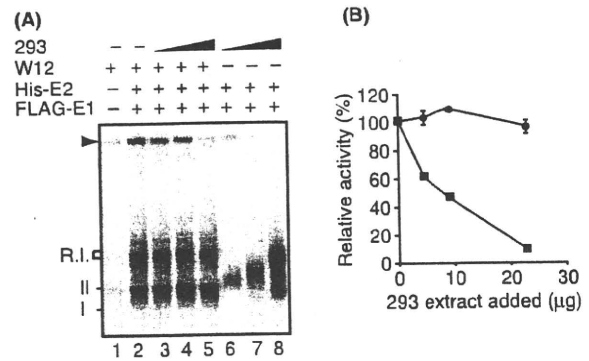
### Core origin is sufficient for inducing HPV16 rolling circle replication

Finally, we examined the contributions of the LCR, the core origin and the E6/E7 region to HPV16 rolling circle replication. Three fragments of the HPV16 genome, nucleotide positions 7003 to 864, 7838 to 100 and 281 to 864, were cloned into pGL3-Basic to produce three plasmids, pGL3-(7003/864), pGL3-(7838/100) and pGL3-(281/864), respectively (Fig. 6A). These plasmids were tested as substrates for the



**Figure 4** Relaxation of the template plasmid enhanced rolling circle replication. (A) Agarose gel electrophoresis analysis of relaxed and linear templates. pUC19-B-HPV16 was treated with topoisomerase I (open circular, lane 2) or *Hind*III (linear, lane 4) or untreated (supercoil, lane 3). The DNA products and a size marker (lane 1) were subjected to 0.6% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. (B) Replication assay using cytoplasmic extracts from differentiated W12 cells. A linear (lanes 1–3), open circular (oc, lanes 4–6) or supercoiled (sc, lanes 7–9) pUC19-B-HPV16 was incubated in the extract supplemented with FLAG-E1 and/or His-E2 as indicated. Deproteinized DNA products were subjected to agarose gel electrophoresis, and [<sup>32</sup>P]-labeled replicated DNAs were visualized. The positions of replication intermediates (R.I.), forms I, II and III of the template plasmid (I, II, and III) are indicated. The arrowhead indicates rolling circle replication products. (C) Quantification of rolling circle replication products in panel B. The relative activity is expressed as the percent incorporation compared with the products from the supercoiled template (lane 9, panel B). Closed bar, FLAG-E1 only; open bar, FLAG-E1 and His-E2. Shown are means and standard errors of two independent experiments.

replication assay in the W12 cell extract. In the presence of E1 and E2, a high-molecular-weight DNA was synthesized from pGL3-(7003/864) and pGL3-(7838/100), both of which had the core origin in common, but not from pGL3-(281/864), which did not



**Figure 5** Inhibition of rolling circle replication in human embryonic kidney 293 (HEK293) extract. (A) Replication assay using a mixture of cytoplasmic extracts from HEK293 and differentiated W12 cells. Increasing amounts of HEK293 extracts (0 μg in lanes 1 and 2, 4.6 μg in lanes 3 and 6, 9.2 μg in lanes 4 and 7, and 23 μg in lanes 5 and 8) were pre-incubated alone (lanes 6–8) or with W12 extract (26 μg in lanes 1–5). pUC19-B-HPV16 was then added to the pre-incubated extracts, followed by the addition of FLAG-E1 and His-E2 as indicated. Deproteinized DNA products were subjected to agarose gel electrophoresis, and [<sup>32</sup>P]-labeled replicated DNAs were visualized. The positions of replication intermediates (R.I.), forms I and II of the template plasmid (I and II) are indicated. The arrowhead indicates rolling circle replication products. (B) Quantification of rolling circle (arrowhead) and bidirectional replication (total of replication intermediates, form II, and DNA between form I and II) products in panel A were quantified. The relative activities are expressed as the incorporation normalized with the products from the reaction without the HEK293 extract (lane 2, panel A). Closed square, rolling circle replication; and closed circle, bidirectional replication. Shown are means and standard errors of two independent experiments.

have it (Fig. 6B). This result suggests a pivotal role of the core origin in inducing HPV16 rolling circle replication.

## Discussion

In the present study, we have demonstrated for the first time that extracts from human epithelial cells induce rolling circle replication of the HPV16 origin-containing plasmid *in vitro*. Rolling circle replication of the HPV16 genome was previously demonstrated in differentiated W12 cells by two-dimensional gel analyses of viral replication (Flores & Lambert 1997). In agreement with this cell-based study, we find that cytoplasmic extracts from differentiated W12 cells support the rolling circle replication of the HPV16