

201034027A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成23(2011)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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 23 (2011) 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	22
	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	33
	石 井 明 子	
	参考資料	
	1) 血液製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の導入に係る検討の経緯 （平成 21 年 12 月 10 日 薬事・食品衛生審議会資料）	
	2) 血小板製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の導入準備について （平成 21 年 12 月 10 日 薬事・食品衛生審議会資料）	
	3) 血小板製剤に対する感染性因子低減化（不活化）技術の導入準備について （平成 22 年 11 月 24 日 薬事・食品衛生審議会資料）	
	3. ウイルス不活化・不活化能の評価法の開発	77
	遊 佐 敬 介	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	82
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

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 客員研究員

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に関する解析を進めると共に、製剤成分への影響評価、ならびに、病原体不活化能の評価に用いるモデルウイルスの作製を行い、不活化技術の安全性や有用性確保に向けた下記の成果を得た。

- 1) 病原体不活化処理が血液凝固因子の活性低下を引き起こすことが知られているが、その原因は明らかでない。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明らかにすることを目的に、遺伝子組換え血液凝固第八因子を試料として LC/MS を用いたペプチドマッピングを行い、19 カ所分の *N*結合型糖鎖及び 22 カ所分の *O*結合型糖鎖付加したペプチドを含め、約 85% のアミノ酸配列を確認した。モデルペプチドに光増感剤及び光照射をしたところ、酸素の付加が推定され、その修飾部位として、メチオニンが最も修飾を受けやすく、Tyr, Lys, His 等も酸化を受けること、ペプチド鎖の切断はほとんど起きないことが確認された。
- 2) 輸血用血液製剤投与後に生じる有害作用には、製剤成分に含まれる IgG が関与する可能性があることが知られている。そこで、リボフラビン添加 - 紫外線照射による病原体不活化処理が、ヒト IgG の機能に与える影響を検討した。ヒト血清にリボフラビンを添加して紫外線を照射し、血清に含まれる IgG の Fc 受容体への結合を評価したところ、FcγRIIa への結合性が亢進する傾向が示され、病原体不活化処理により製剤中 IgG の機能変化を伴う構造変化が生じる可能性が示唆された。
- 3) ウイルス表面タンパク質の構造と不活化処理に対する反応性／耐性の関連を明らかにするための被験試料として、エンベロープタンパク質に多様な変異を導入したレトロウイルスポピュレーションを作製した。そのサイズは、 $>10^7$ と変異の組み合わせを十分カバーする大きさであり、薬剤等の淘汰圧に対し、耐性をもつウイルスを比較的容易に選択できることが示された。得られたウイルス試料は、薬剤耐性ウイルスを含む様々なウイルスに対する不活化処理の有効性評価において、利用可能であると考えられる。

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

遊佐敬介 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部
ウイルス安全性研究室長

協力研究者

原園 景 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第1室主任研究官

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部第2室研究員

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、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や抗体検査等により、安全性向上が図られてきた。また、皮膚常在菌による汚染対策として、皮膚消毒と初流血除去法も採用されている。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た。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策として、病原体不活化技術の導入の是非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、日本赤十字社でもこの3つの不活化法を中心に比較検討が進められてきた。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、照射される紫外線単独による核酸損傷や、光励起された不活化剤と核酸塩基間での電子移動反応による核酸損傷が考えられており、反応に伴い生じる活性酸素が核酸損傷に関与している可能性もある。一方、病原体不活化処理のための操作は、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と推測される。

導入が検討されている病原体不活化処理は、ウイルスや寄生虫等の種々の病原体に対する不活化能を有している一方で、血漿製剤の有効成分である血液凝固因子の活性を15%前後低下させることが報告されている。不活化技術導入の検討に際しては、不活化処理により生じる有効成分の構造変化を解析して、活性低下の原因を明らかにするとともに、構造変化が製剤の安全性に影響する可能性についても考える必要がある。また、輸血用血液製剤の副作用発現に関連する可能性のある白血球やIgG等の製剤成分についても、病原体不活化処理の影響を明らかにする必要がある。さらに、輸血用血液製剤に混入する可能性のある病原体は、構造面でも多岐にわたることを踏まえ、病原体不活化処理が、薬剤耐性を持つような新規ウイルスの出現にも対応可能であるかの検証も必要と考えられる。

本年度は、1)LC/MSを用いた遺伝子組換え血液凝固第八因子のアミノ酸配列及び糖鎖構造の解析、及び、不活化処理がモデルペプチドの構造に及ぼす影響の解析、2)リボフラビン添加・紫外線照射処理が製剤成分(IgG)の機能に及ぼす影響の評

価, 3)病原体不活化能の評価に有用なモデルウイルスの作製, を実施し, 病原体不活化技術の有用性評価に必要な要件を考察した。

B. 方法

B.1. 病原体不活化処理がタンパク質の一次構造及び翻訳後修飾に与える影響の解析

B.1.1. 試薬

組換えヒト FVIII は, コーゼネイト 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, PNGaseA はロッシュ社より購入した。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

不活化処理と同じ処理をしたコーゼネイト FS は, PD10 カラム (GE ヘルスケア) で脱塩し, 凍結乾燥した。水に溶解後, アセトン沈殿により界面活性剤を除去した。8 M 塩酸グアニジン, 5 mM EDTA 及び 500 mM Tris を含む pH 8.5 の緩衝液 100 μ L に溶解し, 1 M DTT を 4 μ L 加え, 37°C, 1 時間反応させ, その後, 1 M 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. PNGase A 及びエキソグリコシダーゼ消化

トリプシン消化物を 100°C, 5 分加熱した後, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中, 37°C, 12 時間 PNGase A 消化及び/もしくは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. 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

ーエルサイエンス) 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 300-2100, 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.1.5. 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*-アセチルヘキソサミン付加 (+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.1.6. モデルペプチドのウイルス不活化処理

β -エンドルフィン (MW 3465.0) 及びアドレノメデュリン (MW 6028.7) を, 10 μ M のメチレンブルーまたはリボフラビンを含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し, 室温で 27W の白色蛍光灯から約 5 cm の距離に 30 分間放置した。処理後のペプチドは, そのまま, もしくはトリプシンで部分分解後 LC/MS/MS にて分析した。

B.2. リボフラビン法の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

B.2.1 リボフラビン存在下での UV 照射による白血球細胞 (Jurkat 細胞) の不活化

ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞は RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清 (ニチレイ, 終濃度 10%) を添加した培地を用い, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した. 文献に記載されている条件を参考に¹⁾, 細胞を 50 μM のリン酸リボフラビンナトリウム (以下, リボフラビン) (SIGMA) を含むヒト血清 (SIGMA) に 1×10^5 cells/ml とするよう懸濁した後, 24 穴プレートに分注し (1 ml/well), UV クロスリンカー (Funakoshi, FS-800, 312 nm) を用いて UV 照射を行った (5.3 J/cm²). UV 照射した細胞は遠心後, RPMI1640/10% FCS に懸濁し 96 well プレートで培養を行った. 培養後 24, 48, 72 時間の細胞数を CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて測定した.

B.2.2 リボフラビン存在下で UV 照射した IgG の Fcγ受容体結合実験

ヒト血清に終濃度 50 μM でリボフラビンを添加し, B.1 と同様の条件で UV 照射を行った後, PBS を用いて希釈系列を作製した. FcγRIIIa あるいは FcγRIIIa を安定発現する Jurkat 細胞 (一点あたり 2×10^5 個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN₃) で洗浄した後, ヒト血清の希釈系列を添加し, 4°C で 30 分間結合させた. 細胞を染色バッファーにより 2 回洗浄した後, DyLight488 標識した F(ab')₂ Fragment Goat anti-human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch) を添加し, さらに 4°C で 30 分間結合させた. その後, 染色バッファ

ーを用いて 2 回洗浄を行い, 7-AAD (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) で解析を行った. 前方散乱光 (FSC), 側方散乱光 (SSC) および 7-AAD の染色強度によりゲートを指定した生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出し結合の指標とした.

B.3. ウイルス不活化能評価法の開発

モデルウイルスとしてレトロウイルス変異株を取り上げるために, gp120 V3 領域 (35 アミノ酸残基) に臨床分離株から得られた 18 種類のアミノ酸変異をランダムに導入した V3 変異ライブラリーを作製した (図 7). その組み合わせは $>2 \times 10^4$ となる. このウイルスライブラリーから, 45 個のクローンを分離して, V3 への複数の変異導入により, 感染性を失っているかどうかを検討した.

(倫理面への配慮)

本研究では, 倫理面への配慮を要する試薬, 試料, 動物等は使用していない.

C. 結果

C.1. 病原体不活化処理がタンパク質の一次構造及び翻訳後修飾に与える影響の解析

C.1.1. ペプチドマップ

FVIII 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消化物を LC/MS/MS により分析した. ペプチド及び糖ペプチドをできるだけ多く検出・帰属するために, m/z 300~2100 範囲について, 質量分析の測定範囲を変えて複数回の解析を行った. ペプチドは, 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, メチオニンの酸化, チロシンの硫酸化, 並びに PNGase A 処理した試料においては,

N の D への変換 (+ 1 Da) を設定し、マスコット検索エンジンを用いたマスデータ解析により帰属した。通常、トリプシンは、K 及び R の C 末側が P である場合切断しないとされているが、一部切断される場合があることから、検索に当たってはその可能性も考慮した。その結果、複数のクロマトグラムのデータをあわせて、図 2 に示す一次配列を含むペプチドが確認された。

C.1.2. N結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

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糖ペプチドイオンを選択し、FVIII の N 結合型糖鎖に関する既報のデータを参照して帰属した。MS の測定範囲を m/z 400-2100, 800-2100 及び 1000-2100 として分析した複数のクロマトグラムのデータを元に、検出された N 結合型糖鎖結合ペプチドを表 1 にまとめる。

FVIII 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, 900, 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, 1685 は、ペプチドとしては観測されたが、糖ペプチドとしては観測されなかった。Asn1001, 及び 1512 はペプチドとしても糖ペプチドとしても観測することはできなかった。

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

O 結合型糖鎖結合は、コンセンサス配列が十分明らかになっておらず、また、結合の有無は高次構造に左右されるため、実際に分析することにより確認する必要がある。前年度の分析では、約 10 カ所に O 結合型糖鎖が結合していることが示唆された。しかし、糖ペプチドはイオン化効率が低いこと及び MS/MS で得られるフラグメントが少ないことから、これまでのペプチドマッピングでは検出されていない O 結合糖鎖が存在する可能性がある。また、N 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドにも O 結合型糖鎖が結合している可能性もある。そこで、1) PNGase A による N 結合型糖鎖の除去、並びに 2) シアリダーゼ及びガラクトシダーゼによる O 結合型糖鎖の還元末端の GalNAc 残基へのトリミングを単独もしくは組み合わせて行い、更なる O 結合型糖鎖結合部位を含むペプチドの帰属を試みた。図 1A に、PNGase A 及びグリコシダーゼ消化物を m/z 300-2100 の範囲で分析したときの代表的なベースピーククロマトグラムを示す。図 1B には、データ依存的に測定した MS/MS の TIC クロマトグラムを、図 1C には、MS/MS の m/z 204.1 の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示す。糖ペプチドイオンの MS/MS では、糖鎖由来のオキシニウムイオンが強く観測される。本試料は N 結合型糖鎖除去と O 結合型糖鎖トリミング処理を行ったものなので、MS/MS の m/z 204.1 の EIC クロマトグラムのピークは、多くの場合、O 結合型糖鎖のペプチド側の GalNAc だけが付加したペプチドイオンのプロダクトイオンスペクトルが取得されたことを示している。図 1D に一例として GalNAc 付加ペプチド m/z 613.9, 4 価イオンのプロダクトイオンスペクトルを示す。GalNAc 由来のオキシニウムイオン及びその脱水イオン (それぞれ m/z 204.1 及び 186.1) 並びにペプチド配列 PQLHHSMDMVFTPEGLQLR 由来の b-及び y-シリーズのプロダクトイオンが観測されていた。Ser 残基や Thr 残基に結合している HexNAc は解離しやすい

ため、CID-MS/MS によって結合部位を確認することはできなかったが、HexNAc 付加ペプチドは MS データの検索により容易に同定することができた。その結果、22 箇所 HexNAc が結合していたと推定された (表 2)。同定された推定 *O* 結合型糖ペプチドのうち、ペプチド I782-R795, Y813-R838 については、*N* 結合型糖鎖も結合すること、I1297-R1310 については、*N* 結合型糖鎖が結合する場合と結合しない場合があることが確認された。また、D1504-K1534 については、これまでの報告では検出できていなかったが、*N* 及び *O* 結合型糖鎖が結合していることが示唆された。ペプチド、*N* 結合型糖鎖結合ペプチド並びに *O* 結合型糖鎖ペプチドをあわせて、全体の約 85% の一次構造が確認された (図 2)。以上のことから、確認された 22 個の糖鎖結合は、FVIII のほとんどの *O* 結合型糖鎖結合を網羅していると思われる。これらの結果に、保持時間、MS/MS スペクトルなどの情報を加味し、*N* 結合型糖鎖を除去した試料で検出された糖ペプチドイオンを帰属することによって、表 2 右列に示すような糖組成をもつ *O* 結合型糖鎖結合ペプチドを同定することができた。ペプチド D1504-K1534 については、糖ペプチドとしては検出することができなかった。

以上の操作によって 22 箇所の *O* 結合型糖鎖が結合した 19 個のペプチドを検出することができた。観測された *O* 結合型糖鎖の組成は、HexNAcHexNeuAc または HexNAcHexNeuAc₂ であった。確認された *O* 結合型糖鎖が結合したペプチドは、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.1.4. 光化学反応を利用したウイルス不活化操作がペプチドに及ぼす影響について

光化学反応を利用したウイルス不活化操作がペプチドに及ぼす影響を、 β -エンドルフィン (MW 3465.0 Da) 及びアドレノメデュリン (MW 6028.7)

を用いて検討した。 β -エンドルフィン及びアドレノメデュリンをメチレンブルー/光照射もしくはリボフラビン/光照射したときの処理前及び処理後の試料のデコンボリューションスペクトルを図 3 に示す。 β -エンドルフィンにおいては、メチレンブルー/光照射処理により、最大強度質量が 3463.6 Da から 3479.6 及び 3495.6 へと変化し、質量が 16 及び 32 増加することが確認された (図 3)。リボフラビン/光照射処理においては、質量が 32, 48 及び 64 増加した。このことから、ペプチドにそれぞれ酸素が 1~2 個, 2~4 個付加したことが推測された。また、アドレノメデュリンにおいても同様に、16 単位の質量の増加が認められ、メチレンブルー/光照射では 2~5 個, リボフラビン/光照射では 2~8 個酸素が付加したことが推測された。また、リボフラビン/光照射においてはメチレンブルー/光照射と比べてピーク幅の変化が認められ、酸素付加以外の変化が起きていることが推測された。なお、これほど酸化が認められたにもかかわらず、ペプチド鎖の切断は観測されていなかったことから、本条件ではペプチド鎖の切断はほとんど起こらないことが推測された。

次に、修飾を受けたアミノ酸を明らかにするために β -エンドルフィン由来のイオン m/z 866.0 (+4) のプロダクトイオンスペクトルと質量が 16 増加した β -エンドルフィン由来のイオン m/z 871.0 (+4) のプロダクトイオンスペクトルを比較したところ、b₅ イオンの m/z 値が 16 増加していることが示唆され、Met5 が酸化されていることが示唆された。次に、質量が 32 増加した m/z 875.0 (+4) のプロダクトイオンスペクトルを比較したところ、b₃, b₄, y₄ で m/z 値の 16 増加が観測された。この結果は、Met5 以外に Tyr1 及び Lys28 が酸化されたことを示唆している。同様に、アドレノメデュリンにおいては、プロダクトイオンスペクトル (データ非表示) 及びトリプシン消化物のプロダクトイオンスペクトル (データ非表示) から、酸化され得るアミノ酸として Tyr1, Met5,

His28, Tyr31 が示唆された。尚、修飾部位の違いによるプロダクトイオンスペクトルの変化はわずかであるため、これら以外の部位も修飾されている可能性も否定できないと思われた。

C.2. リボフラビン法の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

C.2.1. 白血球増殖抑制を指標としたリボフラビン-UV 処理条件設定の確認

輸血用血液製剤の製造工程で用いられる病原体不活化処理には、専用のバッグや専用の照射装置が用いられる。本実験ではそれらの使用ができないため、リボフラビン-UV 処理が IgG の機能に与える影響を評価するための予備検討として、白血球の増殖抑制を指標に、本実験での処理条件設定が適切であることの確認を行った。

まず、ヒト T 細胞系株化培養細胞 Jurkat を試料として、終濃度 50 μM のリボフラビン存在下で、312 nm の UV を 5.3 J/cm^2 照射した。次に、照射後の細胞を培地に懸濁して培養し、リボフラビン-UV 処理 24, 48, 72 時間後に ATP 量を指標として細胞数を測定したところ、図 5 に示すように、24 時間後で既に照射直後より細胞数が減少しており、リボフラビン-UV 処理により白血球が不活化されたことが確認された。リボフラビン-UV 処理を行わなかった対照群では、細胞増殖が認められ、白血球不活化効果が明確であったことから、本処理条件は適切であると考えられた。

C.2.2. ヒト IgG の機能に対するリボフラビン-UV 照射の影響

輸血用血液製剤の免疫学的副作用には、Fc γ R を介した製剤中 IgG による患者血液中白血球の活性化が関与する場合があることが知られているため²⁾、評価対象とする IgG の機能として、Fc γ R 結合

性を選択した。

ヒト Fc γ R には、Fc γ R I, IIa, IIb, IIc, IIIa, IIIb のサブクラスが存在し、炎症性の反応には主として Fc γ RIIa 及び Fc γ RIIIa が関与している。そこで、Fc γ RIIa あるいは Fc γ RIIIa を発現させた Jurkat 細胞を用い、ヒト血清中 IgG の Fc γ R 結合に対するリボフラビン-UV 処理の影響を評価した。図 6 に、結合実験 (3 回実施: Exp.1~3) の結果を示す。Exp.1 では、Fc γ RIIa への結合に関して、非線形回帰により求められる見かけ上の親和性 (Kd) が対照で 24 nM であるのに対して、リボフラビン-UV 処理群では 12 nM となり、結合性親和性が上昇していることを示す結果となった。また、Exp.3 でも同様の傾向が確認された。一方、同条件で検討した Fc γ RIIIa との結合については、有意差はないものの、リボフラビン-UV 処理により低下する傾向があり、リボフラビン-UV 処理により、IgG の構造上特定の部位に影響が生じる可能性が示唆された。

C.3. ウイルス不活化能評価法の開発

作製したレトロウイルスクローンのうち 36% は変異導入によって感染性を失っていた。野生株と比較すると 38% がその 90% 感染性が低下しており、18% が 50% 以上その感染性を失っていることがわかった。導入した変異はどれも臨床分離株から選択したものだが、組み合わせによっては、gp120 の機能を失わせるのに十分であることがわかった。

このウイルスライブラリーの有用性を調べるために、R5 HIV の侵入阻害剤である maraviroc を用いてこの薬剤に感受性の低いウイルスの選択をおこなった。実際には maraviroc によってウイルス複製が 50% 抑制がかかる薬剤濃度である 0.3 nM

から継代とともに薬剤濃度を上げていき、17回継代したところでウイルスの培養を中止した(図8)。最終的に maraviroc の濃度は 700 nM となり、2300 倍もの感受性の低いウイルスクローンが選択されたことになる(表3)。また選択されたウイルスの V3 は 5 つの変異 (I304V/F312W/T314A/E317D/I318V) を含んでおり多様な変異の組み合わせをもつウイルス集団は、薬剤による選択によって単一のクローンに絞られたことになる。また V3 領域以外に T199K, T275M も見つかった。

D. 考察

D.1. 病原体不活化処理がタンパク質の一次構造及び翻訳後修飾に与える影響の解析

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欧米で既に導入されている。しかし、これらの処理により、15%程度活性が低下する血液凝固因子があることが報告されている。中でも、フィブリノーゲン及び FVIII が比較的影響を受けやすいといわれている。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、タンパク質構造の変化により、凝集体を形成したり、免疫応答を惹起する可能性があるため、光化学反応が有効成分へ及ぼす影響を評価する必要がある。本研究は、光化学反応を利用したウイルス不活化処理が血液凝固因子の一つである FVIII に与える影響を明らかにすることを目的としている。まず、不活化処理前の FVIII 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) を可能な範囲で調べた。

ペプチドマッピングにより、約 85%の配列をトリプシン切断ペプチド及び糖ペプチドとして確認

することができた。FVIII 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。今回の検討において、19 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、3 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について、1 カ所については PNGase A 処理した試料から *N* 結合型糖鎖が結合する可能性が示唆されたが結合している糖鎖については情報が得られていない。残りの 2 カ所については確認できなかったため、更なる検討が必要である。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又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 CHO 細胞で産生された FVIII 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。BHK 細胞で産生された組換えタンパク質の糖鎖には、硫酸化が起きる場合があるが、本研究では観測されておらず、その含量は少ないものと考えられた。

本研究では、PNGase A 消化及びエキソグリコシダーゼ消化試料を用いて、*O* 結合型糖鎖結合ペプチドの推定を行い、25 カ所の *O* 結合糖鎖結合部位を含む 20 個のペプチドを推定した。そのうち、22 カ所分の 19 個の *O* 結合型糖鎖結合ペプチドの糖鎖組成を明らかにした。今後、残りの部分についても糖ペプチドとして確認する必要がある。

次に、不活化処理が起こす影響を調べるため、モデルペプチドによる検討を行った。その結果、Met, Tyr, Lys 及び His 等に酸化が認められ、Met が最も酸化されやすいこと、並びにペプチド鎖の断片化は起こりにくいことを確認した。同じ濃度では、光増感剤としてメチレンブルーを用いたときよりもリボフラビンの方がより強い酸化作用を

示した。なお、このように著しい修飾が起きたのは、ペプチドの濃度が非常に低いため、生じた活性酸素種の量がペプチドに対して大過剰となったことが原因であると考えられる。

これまでにウイルス不活化処理前の FVIII について LC/MS による詳細なペプチドマッピングを行っている。来年度は、ウイルス不活化処理が一次構造に及ぼす影響をペプチドマップを比較することにより調べる予定である。また、光増感剤及び光照射によるペプチド及びタンパク質の酸化体の形成を評価する方法の検討を行う。

D.2. リボフラビン法の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

輸血用血液製剤投与後におこる重篤副作用には、感染症の他、移植片対宿主病 (GVHD) や、輸血関連急性肺障害 (Transfusion-related Acute Lung Injury : TRALI) 等の免疫学的な副作用が知られている。GVHD は製剤中の白血球が宿主を攻撃することにより生じるため、有核細胞である白血球も不活化することのできる病原体不活化処理は、GVHD の発症抑制にも有用である可能性がある。TRALI は、輸血中もしくは輸血後 6 時間以内に起こる非心原性の肺水腫を伴う呼吸困難を呈する重篤な非溶血性輸血副作用である。その発症機序は十分明らかでないが、製剤中の IgG (抗 HLA 抗体) や、脂質等の好中球活性化成分が関与する可能性が示唆されており、図 9 のように、活性化された好中球が肺に浸潤することが原因となっている可能性が考えられている²⁾。

輸血用血液製剤中に存在し、TRALI の原因ともなり得る好中球活性化成分については、リボフラビン・UV 処理の有無により活性に違いは生じないと報告されている³⁾。これに対して、リボフラビン・UV 処理が IgG の構造や機能に与える影響につ

いては、これまでに報告がなかった。TRALI の発症頻度は輸血血液 1 単位あたり 0.014~0.08%とされており、その発生は稀であるが、死亡率は十数%と高い^{4,5)}。

図 6 に示したように、今後さらに再現性を確認する必要はあるが、リボフラビン・UV 処理により、FcγRIIa に対する IgG の結合性が亢進する可能性が示唆された。IgG の修飾構造により、FcγR サブクラスごとの結合性が異なる例はこれまでも知られており、Fc 領域の糖鎖のフコシル化の有無により、FcγRIIIa 結合性が変化すること、その際、FcγRIIa 結合性には影響がないことが報告されている⁶⁾。リボフラビン・UV 処理により生じる可能性のある IgG の構造ならびに機能変化についても、受容体サブクラス特異的に結合性の変化をもたらすような影響が生じている可能性が考えられる。FcγRIIa は好中球にも発現しており、IgG を介した炎症反応に関わる受容体である。病原体不活化処理により TRALI の発生頻度が上昇したという報告はないが、不活化処理の有用性を考える際に、IgG の機能に与える影響についても今後検討を進める必要があると考えられる。

D.3. ウイルス不活化能評価法の開発

レトロウイルスに導入された変異は、効率よく各クローンに見いだされ、そのサイズも $>10^7$ と変異の組み合わせを十分カバーする大きさであった。このことから実験系においては十分多様性に富んだウイルス変異株を扱うことができるものと考えられた。また V3 に変異をいれることで、薬剤という淘汰圧に対し、耐性をもつウイルスを比較的容易に選択することができることが示された。従ってここで用いた薬剤をウイルス不活化のための物理化学的淘汰圧と置き換えることにより、不活化

に抵抗性のウイルスを分離し、その抵抗性を解析することでウイルス不活化のための条件を解明することができることが期待される。それによって不活化技術の開発につなげていけるものと考えられた。

E. 結論

- 1) モデル血漿タンパク質として FVIII を用い、還元アルキル化及びトリプシン消化後 LC/MS を行い、アミノ酸配列のうち約 85% 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、19 カ所の N結合型糖鎖を確認した。更に、22 カ所分の O結合型糖鎖が結合した 19 個の糖ペプチドを明らかにした。

モデルペプチドに光増感剤及び光照射をしたところ、酸素の付加が推定され、その修飾部位として、メチオニンが最も修飾を受けやすく、Tyr, Lys, His 等も酸化を受けること、ペプチド鎖の切断はほとんど起きないこと確認した。今後、未検出の糖ペプチドを探索すると共に、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に及ぼす影響を検出する予定である。また、酸化体の形成を評価する方法の検討を行う予定である。

- 2) 製剤中の血漿成分に含まれる IgG が有害作用発症に関与する可能性を踏まえ、病原体不活化処理による IgG の機能変化について検討した。ヒト血漿にリボフラビンを添加し、紫外線を照射したところ、FcγRIIa に対する結合性が亢進する傾向が認められ、病原体不活化処理により血漿中 IgG の機能変化が生じる可能性が示唆された。
- 3) 今回得られたレトロウイルス変異株からなる

クローンからなるウイルス集団は、gp120 の V3 領域のみに多様な変異をもつ他は均一のウイルスライブラリーである。V3 に多様な変異の組み合わせをもつウイルス集団であり、ウイルス不活化に対し、異なる反応性を持つことが予想される。今後は、温度、界面活性剤、pH などのウイルス不活化過程に多様な変異 gp120 がどのような影響をもつのかを明らかにする予定である。

F. 健康被害状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Maeda, Y., Yusa, K., Nakano, Y., Harada, S. Involvement of inhibitory factors in the inefficient entry of HIV-1 into the human CD4 positive HUT78 cell line. *Virus Res.* 155: 368-371, 2011.
- 2) Yuan, Y., Maeda, Y., Terasawa, H., Monde, K., Harada, S., Yusa, K. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. *Virology*, in press.
- 3) Akiko Ishii-Watabe, Yoshiro Saito, Takuo Suzuki, Minoru Tada, Maho Ukaji, Keiko Maekawa, Kouichi Kurose, Nahoko Kaniwa, Jun-ichi Sawada, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi, Takako Eguchi Nakajima, Ken Kato, Yasuhide Yamada, Yasuhiro Shimada, Teruhiko Yoshida, Takashi Ura, Miyuki Saito, Kei Muro, Toshihiko Doi, Nozomu Fuse, Takayuki Yoshino, Atsushi Ohtsu, Nagahiro Saijo, Tetsuya Hamaguchi,

Haruhiro Okuda, Yasuhiro Matsumura: Genetic polymorphisms of *FCGRT* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab. Pharmacokine* 25(6), 578-587 (2010)

2. 学会発表

- 1) A. Harazono, N. Kawasaki, N. Hashii, S. Itoh, T. Yamaguchi : Glycosylation analysis of recombinant human coagulation factor VIII by LC MS/MS. Pacificchem 2010 conference, Honolulu (2010, 12, 15-20)
- 2) A. Harazono, N. Kawasaki, N. Hashii, S. Itoh, T. Yamaguchi : N- and O-glycosylation analysis of recombinant human coagulation factor VIII by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry . The 25th International Carbohydrate Symposium Chiba (2010, 8, 6-9)
- 3) 多田稔, 石井明子, 鈴木琢雄, 斎藤嘉朗, 川崎ナナ : FCGRT 遺伝子多型解析により見出された Neonatal Fc receptor (FcRn)変異体の機能解析 BMB2010 2010年12月 神戸
- 4) 多田稔, 石井明子, 鈴木琢雄, 豊田淑江, 川崎ナナ : 複合体形成能に着目した抗 TNF α 抗体医薬品の生物活性評価に関する研究 日本薬学会第131年会 2010年3月 静岡
- 5) Yuan, Y., Maeda, Y., Hiromi, T., Monde, K., Yusa, K., Harada, S. Complete resistance to maraviroc in R5 HIV-1 with gp120 V3 loop mutations is affected by T199K and/or T275M in Env. 11th KUMAMOTO AIDS Seminar - GCOE Joint International Symposium, Aso, 10.6.2010.
- 6) 前田洋助, 中野雄介, 遊佐敬介, 原田信志. HIV-1 侵入過程のビリオン動態の可視化. 第

58回に本ウイルス学会学術集会 徳島; 11.9.2010.

- 7) 遊佐敬介, Yuan Yuzhe, 前田洋助, 寺沢広美, 門出和精, 原田信志. HIV-1 の gp120 V3 ループ変異による侵入阻害剤 Maraviroc 高度耐性の獲得. 第58回に本ウイルス学会学術集会 徳島; 11.9.2010.
- 8) 中野雄介, 前田洋助, 遊佐敬介, 原田信志. コレセプター阻害剤によるコレセプター間 oligomerization 修飾. 第24回日本エイズ学会学術総会 東京 11.24.2010; 2010.
- 9) 遊佐敬介, Yuan Yuzhe, 前田洋助, 寺沢広美, 門出和精, 原田信志. HIV-1 の gp120 V3 ループ変異による侵入阻害剤 Maraviroc 高度耐性の獲得. 第24回日本エイズ学会学術集会 東京 11.25.2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

I. 参考文献

- 1) Jackman RP, Heitman JW, Marschner S, Goodrich RP, Norris PJ. Understanding loss of donor white blood cell immunogenicity after pathogen reduction: mechanisms of action in ultraviolet illumination and riboflavin treatment. *Transfusion*. 49(12), 2686-99, 2009
- 2) Gilliss BM, Looney MR. Experimental models of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*. 25(1), 1-11, 2011
- 3) Ambruso DR, Thurman G, Tran K,

Marschner S, Gathof B, Janetzko K, Goodrich RP. Generation of neutrophil priming activity by cell-containing blood components treated with pathogen reduction technology and stored in platelet additive solutions. *Transfusion*. 2010

4)岡崎仁. 輸血関連急性肺障害. 検査と技術. 33(13), 1536-9, 2005

5)厚生労働省医薬食品局血液対策課. 輸血療法の実施に関する指針 (改訂版) . 2005

6)Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Yokoi H, Nakamura K, Shitara K. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 Is independent of FcγRIIIa functional polymorphism. *Clin Cancer Res*. 10(18 Pt 1), 6248-55, 2004

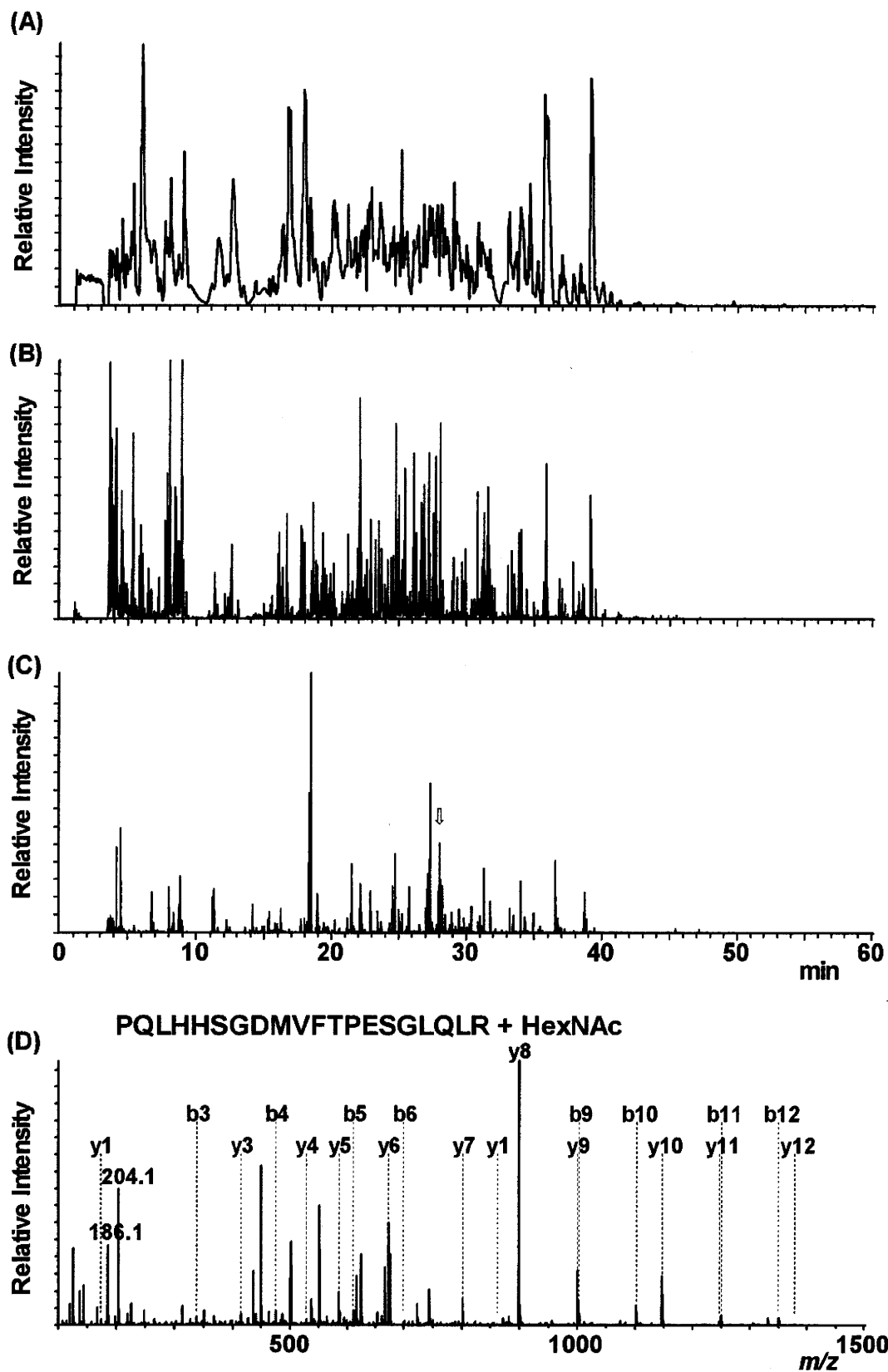


図1. (A) ヒト血液凝固第 VIII 因子を還元カルボキシル化及びトリプシン消化後、PNGase A, シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ処理した試料の LC/MS のベースピーククロマトグラム, (B) MS/MS のトータルイオンクロマトグラム, (C) MS/MS の m/z 204.1 の抽出イオンクロマトグラム, (D) 28 分に検出された m/z 613.9 (+4) の GalNAc 付加ペプチドのプロダクトイオンスペクトル

1 ATRRYLGVAV ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFFP NTSVVYKKTLL FVEFTDHLFN IAKPRPPWVG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
 101 VGVSYWKASE GAIEDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTO TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETRNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYINR SLPGLIGCHR KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLQQLLFC HISSHQHDMG EAYVKVDSQP EEPQLRMKNN EAAELTDDDL TDSEMDVVRV DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKSO YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDFTFKTRE AIQHESGILG PLYYGEVGDV LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRLPYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPIIPGGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSSFVME RDLASGLIGP LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD NRSWYLLEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDLSLQSLVC LHEVAYWYIL SIGAQDFLS VFFSGYTFKH KMYEDTLLT FFFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYIE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS TRQKQENATT IPENDIEKTD PWFARHTPMP NQNVSSSDL LMLLRQSPFP
 801 HGLSLSLDQE AKYETFSDDP SPGAIDSNYS LSEMTHERPQ LHSGDMVFT PESGLQLRLN EKLGTAAATE LKLDKFKVSS TSNNLISTIP SDNLAAGTEN
 901 TSSLGPPSMP VHYDSQLDIT LFGKSSPLT ESGGPLSLSE ENNDSLLES GLMNSQESSW GNNYSSTESG RLFKGRKRAH PALLTKDNAL FKVSISLLKT
 1001 NKTSNNSATN RKTHIDGPSL LIENSFVWQ NILESDFEK NVTPLIHDM LMDKNTALR LNHSNKTTS SKNMEMVQOK KEGPIPPDAQ NPDMSFFKML
 1101 FLPEARWIQ RTHGKNLSNS GQGPSRQLV SLGPEK/VEG QNFLSEKNKV VVGKGEFTKD VGLKEMVFP S RNLELTNLD NLHENNTHNQ EKKIQEEIEK
 1201 KETLIQENVV LPQIHTVTGT KNFMKNLFLI STRQNVESY DGAYAPVLDQ FRSLNDSINR TKKHTAHSK KGEENLEGL GNDTKQIVEK YACTTRISHN
 1301 TSQQNFVTR SKRALKQFRL PLEETELEKR LIVDDTSTQW SKNMKHLTPS TLTQIDYNEK EKGAITQSP L SDCLTRSHSI PQANRSP LPI AKVSSFP SIR
 1401 PIYLTVLFLQ INESHLPAA S YRKKDSGVQE SSHFLQGAKK NNLSLAILTL EMTGDQREVG SLGTSATNSV TYKQVNTVL PKPDLPKTSG KVLLPKVHI
 1501 YQKDLFPTET SSGSPGHLDL VEGSLLQGTE GAIKANEANR PGKVPFLRVA TESSAKTIPSK LLDPLAWDNH YGTQIPKEEW KSQEKSP EKT AFKKKDTILS
 1601 LNACESNHAI AAINEGQNKP EIEVTWAKQG RTERLCSQNP PVLKRHRQEI TRTTLQSDQE EIDEDTISV EMKEDFDIY DEDENQSPRS FQKTRHYFI
 1701 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQF KKVVFQEFVD GSFTQPLYRG ELNEHLGLL PYIRAEVDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEDQRQGA
 1801 EPRKNEVKEN ETKTYFWKQV HMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG LIGPLLCHVT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETSWY FTEMNERNCR
 1901 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMTLP GLVMAQDQRI RYLLSMGNS ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFTVEMLP SKAGIWRVEC
 2001 LIGELHAGM STFLVYSNK CQTPGLMASG HIRDFQITAS GQYQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
 2101 FIIMYSLDGK KWQTYRGNBT GTLMVFFGNV DSSGIKHNI F NPPIIARYIR LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
 2201 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
 2301 LLTRYLRHP QSVWHQIALR MEVLGCEAQD LY

N-glycopeptide , ○ : N-glycosylated , ◯ : Not N-glycosylated , ◌ : Not detected

/O-linked glycopeptide/, ° : O-glycosylation site , Y : Tyrosin sulfation

図2. ヒト血液凝固第八因子の一次配列及び翻訳後修飾

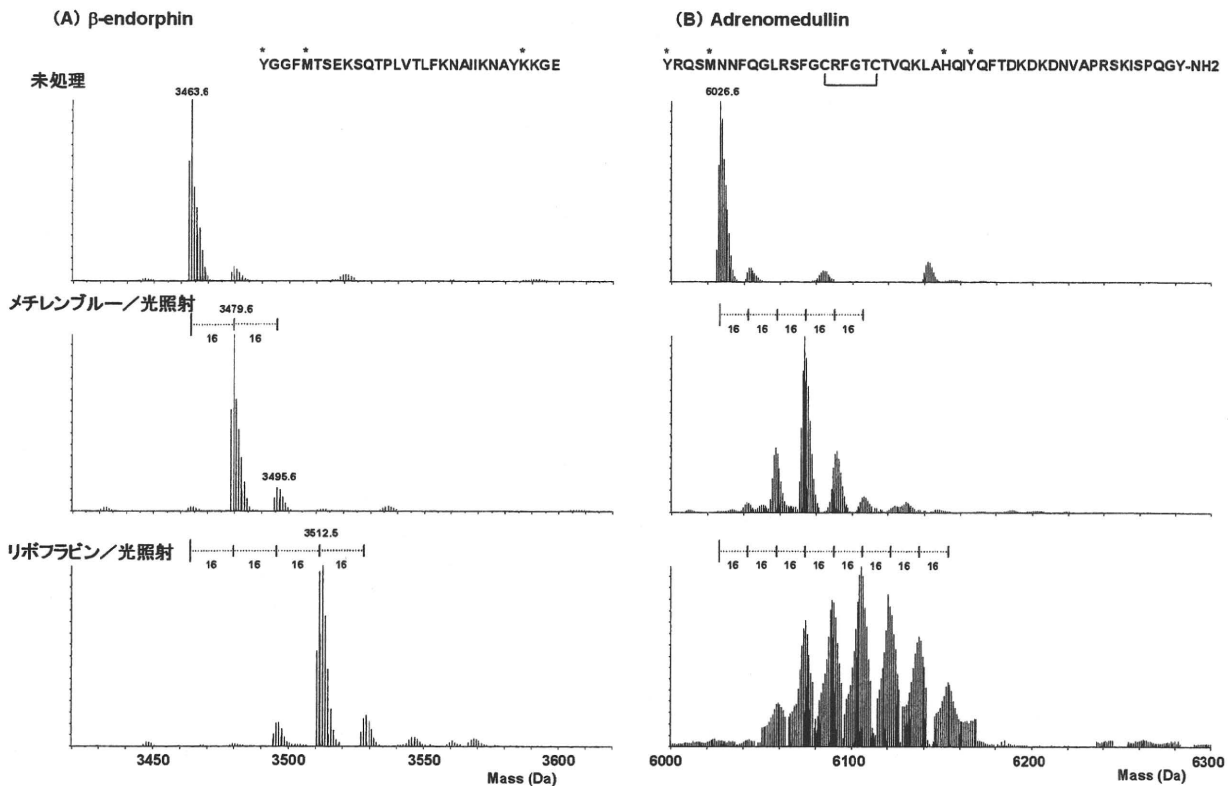


図3. β -エンドルフィン(A)及びアドレノメデュリン(B)をメチレンブルー/光照射またはリポフラビン/光照射処理したときの質量変化

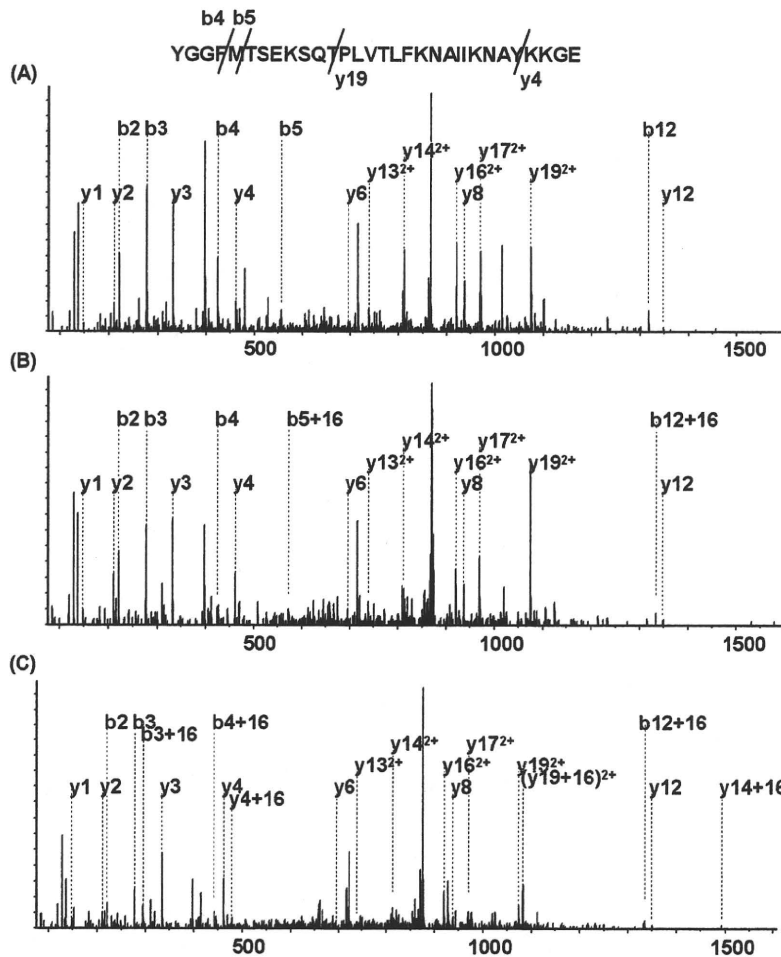


図4. β -エンドルフィン及びメチレンブルー/光照射後質量が16及び32増加した分子種のプロダクトイオンスペクトル(それぞれA, B及びC) 前駆イオンとして, m/z 866.0, 870.0及び874.0 (+4) を用いた

表 2. ヒト血液凝固第 VIII 因子の O 結合型糖鎖結合部位を含むと推定されたペプチド及び実際に検出した糖ペプチド

Domain	Position	Peptide sequence	Mass	Treated with PNGaseA and exoglycosidase	Oligosaccharide compositions (treated with or without PNGase A)	
B domain	769-781	TDPWFAHRTPMPK	1582.77	N	NIH1S1 NIH1S2	
	782-795	IQDVSSDLLMLLR	1588.85	N	NI	NIH1S1 NIH1S2
	796-812	QSPTPHGLSDLQEA	1806.91	N	NIH1S1	(NIH1)2S2 (NIH1)2S3
	813-838	YETFSDDPSPGAIDSDNSLSEMTHFR*	2917.23	N	NIH1S1	
	839-858	PQLHHSGDMVFTPE SGLQLR	2248.11	N	NIH1S1	NIH1S2
	863-872	LGTTAA TELK	1003.55	N	NIH1S1	NIH1S2 (NIH1)2S2 (NIH1)2S3
	947-962	LLEGLMNSQESSWGK	1764.84	N	NIH1S2	
	1041-1049	KVITPLIHDR	1077.63	N	NIH1S3	
	1128-1136	QLVSLGPEK	969.55	N	NIH1S1	NIH1S2
	1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR	1618.81	N	NIH1S1	NIH1S2
	1297-1310	ISPDTSQQNFVTQR*	1619.79	N	NIH1S1	NIH1S2
	1331-1342	IIVDDTSTQWSK	1391.69	N	NIH1S1	NIH1S2
	1346-1360	HLTPSTLTQIDYNEK	1758.88	N	NIH1S1	NIH1S2
	1363-1376	GAITQSP LS DCLTR	1518.73	N	NIH1S1	NIH1S2
	1393-1406	VSSFPSIRPIYLTR	1634.91	N	NIH1S1	NIH1S2 (NIH1)2S2
	1458-1473	EVGSLGTSA TNSVTYK	1612.79	N	NIH1S2	
1474-14987	KVENTVLPKPDLPK	1576.92	N	NIH1S2		
1504-1534	DLFFPTETSDGSPGHLDLVEGSL L QGTGAIK*	3182.56	N	not detected		
1549-1556	VATESSAK	791.40	N	NIH1S1	NIH1S2	
1561-1577	LLDPLA WDNHYGTQIPK	1980.01	N	NIH1S1	NIH1S2	

*, N 結合型糖鎖が結合していた糖ペプチド

T, S, 推定された O 結合型糖鎖結合部位