

201132012A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 24 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 24 (2012) 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	20
	原 園 景	
	2. ウイルス不活化技術の血小板製剤成分への影響評価に関する研究	26
	石 井 明 子	
	参考資料	
	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 24 年 3 月 14 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	41
	遊 佐 敬 介	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	50
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 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宿主域の解析を行い、不活化技術の安全性や有用性確保に資する下記の成果を得た。

1) 病原体不活化処理の有効成分への影響評価

光化学反応を利用した新規ウイルス不活化法が一部の血液凝固因子活性の低下を引き起こすことが知られている。今年度は、血液凝固第八因子を用いて、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を目的に、光増感剤及び光照射により血液凝固第Ⅷ因子に生じるメチオニンの酸化をペプチドマップ法により分析した。アミノ酸配列90%以上を確認できる条件で、複数の酸化を生じやすい部位を特定することができた。しかし、対照においても酸化が認められることから、分析操作中に生じる酸化を十分に抑制できる手法の必要性が示唆された。

2) 病原体不活化処理の血小板製剤成分への影響評価

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が関与する場合があることが知られている。また、病原体不活化に際して、活性酸素種によりタンパク質の酸化等が生じる可能性が指摘されている。今年度は、IgGの酸化がその機能に及ぼす影響について検討し、酸化剤処理を施したIgGでは、抗原結合能に変化は認められないが、FcRnとの結合能、及び、エフェクター細胞の活性化に関与するFcγ受容体活性化能が低下することを明らかにした。したがって、病原体不活化に伴い生じ得る酸化により、IgGの機能が変化するものの、免疫細胞活性化能は減弱する傾向となるため、IgGによる免疫応答を介して生じる血液製剤の有害作用発現リスクが増大する可能性は高くないと考えられた。

3) ウイルス不活化能評価法の開発

輸血用血液製剤におけるウイルス安全性を確保していくためには特異性の高いウイルス不活化技術の開発と適切なモデルウイルス用いた評価が不可欠である。今年度は、有機溶剤/界面活性剤、低pH、加熱処理などの物理・化学的な処理に比較的抵抗性である非エンベロープウイルスのモデルとしてネコカリシウイルスを取り上げ、そのウイルスの感染宿主域について、またヒト細胞に対して感染性を獲得する可能性について調べた。ネコカリシウイルスは、2008年、2009年に欧米で医薬品製造リアクターを汚染し、一時医薬品製造中止の原因となったベシウイルス2117と同属のウイルスである。本研究によって、非エンベロープウイルスの不活化・不活化能の評価法の開発につながる基礎的なデータが得られた。

研究分担者

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
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

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ウイルスのモデルとなるウイルスの調製とその特性解析により、病原体不活化能の評価法を確立していく必要があると考えられる。これらの背景を踏まえ、本年度は、1) 光増感剤及び光照射により血液凝固第Ⅷ因子に生じるメチオニンの酸化のペプチドマップ法による分析、2) 酸化処理が血小板製剤成分(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宿主域の解析を実施した。

B. 方法

B.1 病原体不活化処理の有効成分への影響評価

B.1.1 試薬

組換えヒトFVIII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 光増感剤及び光照射処理

ゲルろ過にて脱塩したコージネイト FS を、5 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。

B.1.3 還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化

未処理又は光増感剤及び光照射処理したコージネイト FS は、アセトン沈殿により脱塩・脱試薬を行った。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 $^{\circ}$ 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.1.4 LC MS

LC 装置には、Acquity UPLC システム (Waters 社) を、カラムには、BEH300 C18 2.1 X 150 mm, 1.7 μ m (Waters 社) を用いた。溶離液には、0.1% ギ酸水溶液 (A) 及び 0.1% ギ酸を含むアセトニトリル (B) を用いた。カラム温度 40 $^{\circ}$ C、流速 0.2 μ L/min で、0 分から 90 分の間に 0% B から 65% B となるように溶離液 B の濃度を上昇させ、試料を溶出した。質量分析計には Synapt G2 HDMS (Waters 社) を用いた。イオン化は、ESI イオンソースをポジティブイオンモードで用い、キャピラリー電圧は 3,500 V に設定した。コリジョンエネルギーを low: 6 eV 及び high: 15-45 eV に、MS の測定範囲を m/z 100-2,000 に設定し、MS^E モードで測定を行った。

B.1.5 データベース検索

LC/MS^E により得られた MS データを、データ解析ソフトウェア Biopharmalynx を用いて、SwissProt より得たヒト FVIII のアミノ酸配列 (FA8_HUMAN) に対して検索を行い、ペプチドを帰属した。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)、N 結合型糖鎖付加 (NeuAc₀₋₃Hex₃₋₇HexNAc₂₋₄Fuc₀₋₁, Hex₅₋₉NexNAc₂ など) 及び O 結合型糖鎖付加 (NeuAc1-2HexHex1NAc1) を適宜設定した。

B.2 病原体不活化処理の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

B.2.1 抗体および細胞

ヒト IgG (抗 EGFR 抗体セツキシマブおよびパニツムマブ) は医薬品として販売されているものを購入して使用した。Fc γ 受容体発現細胞株 (Jurkat/Fc γ R あるいは Jurkat/Fc γ R/Luc) は RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清 (ニチレイ、終濃度 10%)、G418 (ナカライテスク、終濃度 1 mg/ml) およびハイグロマイシン (ナカライテスク、終濃度 0.5 mg/ml) を添加した培地を用い、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で培養した。ヒト扁平上皮癌細胞株である A431 細胞は DMEM/High Glucose (Invitrogen) にウシ胎児血清を添加した培地を用い、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で培養した。

B.2.2 ヒト IgG の酸化処理

ヒト IgG (抗 EGFR 抗体セツキシマブおよびパニツムマブ) を 5 mg/ml になるようリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に希釈し、tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) (和光純薬) を終濃度 5% で添加した。37 $^{\circ}$ C で 3 時間インキュベーションし、PD Spin Trap (GE Healthcare) を用いた遠心による脱塩操作を 2 回行い、tBHP を除去した。

B.2.3 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によるヒト IgG の結合活性測定

B.2.3.1 FcRn 結合親和性の測定

組換えヒト FcRn 細胞外ドメイン原液を酢酸ナトリウム緩衝液 (10 mM, pH 5.0) で希釈して、アミンカップリングによりセンサーチップ CM5 のフローセル (Fc) 2,3,4 に固定化した。ランニングバッファーは、50 mM sodium phosphate / 150 mM

NaCl [pH 6.0], 再生バッファーは, 100 mM Tris / 200 mM NaCl [pH 8.0]を用いた. アナライト (ヒト IgG) は, ランニングバッファーを用いて各 5 濃度の 2 倍系列希釈液を調製し, 670, 335, 168, 84, 42 nM とした. 流速は 30 μ l/min とし, 各フェーズの時間は, 結合 2 分, 解離 2 分 30 秒とした. データは BIA evaluation software を用い, bivalent analyte RI=0 モデルにより解析した.

B.2.3.2 抗原結合親和性の測定

ヒト抗体キャプチャーキット (GE healthcare) を用い, アミンカップリングにより抗ヒト IgG 抗体をセンサーチップ CM5 に固定化した. ランニングバッファーには HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20, pH7.4) を用いた. 抗 EGFR 抗体は 0.1 μ g/ml, EGFR (Prospec) は, 2.5, 5, 10, 20, 40 nM に希釈した. 再生バッファーは 3 M の $MgCl_2$ を用いた. 流速は 30 μ l/min, 各フェーズの時間は, キャプチャー 1 分, 結合 5 分, 解離 10 分とした. データは BIA evaluation software を用い, 1:1 モデルにより解析した.

B.2.4 Cell-based Binding Assay

Jurkat/ Fc γ R 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% NaN_3) で洗浄した後, セツキシマブあるいはパニツムマブを各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた. 細胞を染色バッファーにより洗浄した後, DyLight488 標識した F(ab')₂ anti-human IgG F(ab')₂ (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二回洗浄を行い, 7-AAD (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) による解析を行った. 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, 生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent

Intensity: MFI) を算出した.

B.2.5 Bridging-Luciferase Assay

A431 細胞を 96 穴プレートに播種し (一点あたり 2×10^4 個), 24 時間培養後, 培地を取り除き, OPTI-MEM (Invitrogen) に懸濁した Jurkat/Fc γ R/Luc 細胞 (一点あたり 1×10^5 個) を添加した. 各ウェルにセツキシマブあるいはパニツムマブを各濃度で添加後, 37°C で 5 時間培養した. その後, 各ウェルにルシフェラーゼの発光基質である ONE-Glo Reagent (Promega) を加えて懸濁し, 発光プレートリーダーを用いてルシフェラーゼ活性を測定した.

B.3 ウイルス不活化能評価法の開発

ネコカリシウイルス (FCK) F9 株, またウイルスストックは, ネコ腎由来の CR-FK 細胞株を用いて調製した. FCK F9 を CR-FK 細胞に 1 時間感染させた後, 37°C, 5% CO₂ で培養した. 培養開始後, 36 時間後に上清を回収し, 2,400 r.p.m. で遠心した後 0.45 μ m のフィルターで濾過し, ウイルスストックとして -80°C で保存した.

TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) は, 96 穴プレートに 3×10^3 個ずつ播種した細胞に 10 倍希釈系列ウイルス液 (100 μ l) を加え, 5 日後に CPE (cytopathic effect) の有無を顕微鏡下で判定した. F9 株の感染感受性は, HeLa, CV-1, Vero, CR-FK, NIH-3T3 細胞を用いて調べた.

ミドリザル細胞に馴化した FCV ウイルスの分離は, CV-1, Vero, HeLa 細胞を用いた. 25-cm² の培養フラスコに細胞 (2.5×10^6) を播種し, 12 時間後, FCV F9 を感染させた (100 TCID₅₀). 37°C, 5% CO₂ で 3 日ないし 4 日培養後, 感染細胞の上清 1 ml を非感染細胞 (2.5×10^6) に感染させた. これを繰り返し, 複製能が向上した 5 回 継代ウイルスを CV-1 細胞馴化ウイルス FCV_{CV} と名付けた.

(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 病原体不活化処理の有効成分への影響評価

FVIII は、アミノ酸 2332 個からなる糖タンパク質である。未処理試料、メチレンブルー及び光照射処理試料、並びにリボフラビン及び光照射試料を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^E により分析した。図 1A に対照とメチレンブルー及び光照射試料の液体クロマトグラムを、図 1B に対照とリボフラビン及び光照射試料の液体クロマトグラムをミラー表示にて示す。クロマトグラムは非常に複雑であることから、マニュアルでの比較は不可能であり、ソフトウェアにより溶出時間の補正を行い比較を行った。紫の線は、未処理試料と処理試料のクロマトグラムの差分を示す。各試料のクロマトグラムは類似したパターンを示した。差分のクロマトグラムにおいて正のピークに見られているが、これは LC/MS へ導入された試料量が対照の方が多かったためと思われる。得られた MS データをヒト FVIII の配列に対してデータベース検索を行ったところコードするアミノ酸配列の 90% 以上のペプチドを確認することができた (図 2)。

次に、メチオニン残基の酸化が起きたペプチドをデータベース検索により帰属した。擬陽性を避けるため、フラグメントイオンが 5 個以上観察されたペプチドのみを示した (図 3A 及び B)。メチレンブルー及び光照射処理及びリボフラビン及び光照射処理において、同様なペプチドが酸化されていることが確認された。これらのメチオニン残基は、酸化を受けやすい部位であることが示唆された。しかし、対照においても対応する酸化ペプチドのピークが認められることから、処理により特異的に酸化されたのか分析操作中に酸化されたのか不明確であり、操作中に生じる酸化を十分に抑制できる条件の開発が必要である。また、

生じた酸化の程度を適切に比較・評価できるコンピュータツールが必要であろう。

C.2. 病原体不活化処理の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

C.2.1 酸化処理がヒト IgG の抗原結合および FcRn 結合能に及ぼす影響

モデル IgG として、抗原結合や体内動態制御に関わる受容体 FcRn との結合に加えて、エフェクター細胞活性化能の評価が可能な抗 EGFR 抗体 (セツキシマブおよびパニツムマブ) を選択し、酸化剤 tBHP で処理した試料を調製した。

抗原および FcRn への結合を SPR 法により解析した結果を図 4 に示す。セツキシマブ、パニツムマブともに、酸化剤処理による抗原 (EGFR) 結合親和性の変化は認められなかった。一方、FcRn 結合親和性は、セツキシマブ、パニツムマブともに顕著に低下していた。

C.2.2 酸化処理がヒト IgG の Fcγ 受容体結合能に及ぼす影響

抗 EGFR 抗体セツキシマブ (ヒト IgG1) あるいはパニツムマブ (ヒト IgG2) を tBHP 処理により強制酸化した試料を用いて、Fcγ 受容体発現細胞に対する結合能を検討した。セツキシマブは FcγRIIIa および FcγRIIa 発現細胞に対して添加濃度に依存した結合を示し、その結合能に対する酸化処理の影響は認められなかった (図 5)。一方、パニツムマブは FcγRIIIa に対しては結合能を示さず、FcγRIIa に対してのみ添加濃度に依存した結合を示したが、セツキシマブと同様に酸化処理による結合能の変化は認められなかった (図 5)。

C.2.3 酸化処理がヒト IgG の Fcγ 受容体活性化能に及ぼす影響

酸化処理がヒト IgG による Fcγ 受容体を介したエフェクター細胞の活性化に及ぼす影響を検討するため、Fcγ 受容体およびカルシウムシグナル

応答性のレポーター遺伝子を発現する細胞株 (Jurkat/FcγR/Luc) を用いた Bridging-Luc Assay を実施した。標的細胞として EGFR を高発現する A431 細胞を、エフェクター細胞として Jurkat/FcγR/Luc 細胞を用いて、セツキシマブあるいはパニツムマブによるエフェクター細胞の活性化を、ルシフェラーゼ活性を指標に検討した。FcγRIIIa を発現するエフェクター細胞を用いた際には、セツキシマブの添加によるエフェクター細胞の活性化が観察され、酸化処理による影響は認められなかった (図 6)。また、パニツムマブによる FcγRIIIa 発現エフェクター細胞の活性化は検出されなかった (図 6)。一方、FcγRIIIa を発現するエフェクター細胞を用いた場合には、セツキシマブおよびパニツムマブの添加によるエフェクター細胞の活性化が観察された。この際、セツキシマブによるエフェクター細胞の活性化は酸化処理により著しい減少が認められ、パニツムマブに関しても酸化処理による活性化能の低下が観察された (図 6)。

C.3. ウイルス不活化能評価法の開発

C.3.1 FCV の宿主域

FCV はエンベロープを持たない+鎖の RNA ウイルスであり、直径 30~38nm の正二十面体構造をもつ (図 7)。FCV はネコ腎由来 CR-FK 細胞に感染し、よく複製する。FCV, poliovirus, sindbis virus の宿主域を調べてみたのが表 1 である。poliovirus はピコルナウイルス科のエンテロウイルスに属する RNA ウイルスである。poliovirus は、ヒト細胞である HeLa, 293T 細胞によく感染する。またアフリカミドリザル細胞である Vero, CV-1 細胞にもよく感染することがわかる。sindbis virus は、トガウイルス科アルファウイルス属に分類される(+)鎖 RNA ウイルスである。sindbis virus はヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞以外のものによく感染することがわかった。これに対し、FCV はヒト由来細胞である HeLa, 293T 細胞、マウス由来細胞であ

る NIH-3T3 細胞には感染しない。ところがアフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞と CV-1 細胞には、ネコ腎由来細胞である CR-FK 細胞に比べてわずかであるが、感染することができた (表 1)。

C.3.2 CV-1 細胞馴化株の分離

FCV F9 株はわずかではあるが、アフリカミドリザル細胞である Vero 細胞と CV-1 細胞に感染することができた。そこで次に FCV が、ミドリザル由来の細胞に馴化できるかどうかを検討した (図 8)。Vero 細胞では、感染はするもののウイルスが上清に十分産生されず、ウイルスを継代することはできなかった (data not shown)。またヒト由来の HeLa 細胞でも FCV は感染せず、そのため継代はできなかった。これに対して CV-1 細胞では FCV F9 株を継代することができたが、1-2 代目までは、ウイルス複製はするものの上清には CR-FK 細胞で継代した場合に比べて極めて低いウイルス量しか産生されなかった。ところが3回の継代後は、CR-FK 細胞に匹敵するほどのウイルス量を産生するようになった。これは継代 1 から継代 3 の間に CV-1 細胞へのウイルスの馴化が起きていたことを示している。CV-1 細胞で FCV F9 株を 5 回継代したものを CV-1 細胞馴化分離株として FCV_{CV} と名づけた (図 8)。

この分離株をそれぞれの細胞に対して同じ感染条件下で感染させ、細胞変性効果 (CPE) を比較してみると野生株である FCV F9 は CV-1 細胞死を十分誘導できなかった。これに対し、CV-1 細胞に馴化した FCV_{CV} は CV-1 細胞内で激しく複製し、ほとんどの細胞に CPE を引き起こすことができることが明らかとなった (図 9, 図 10)。ところが FCV_{CV} は、Vero 細胞では CV-1 細胞で見られるような激しいウイルス複製は見られなかった。またヒト細胞である HeLa, 283T 細胞でも CPE は見られなかった。従って FCV_{CV} は、CV-1 細胞で継代することによって、CV-1 細胞にのみ馴化したといえることができる。

C.3.3 ヒト細胞への馴化の試み

ウイルスは進化の過程で変異を起こし、宿主域を広げてきた。たとえば、イヌパルボウイルスは、1976年以前に感染の報告はなかったが、その後数年間で全世界に爆発的に広がった。イヌパルボウイルスのゲノムは、以前から知られていたネコパルボウイルスとよく似ていることからネコパルボウイルスの突然変異であると考えられている。カリシウイルスの一種である FCV はネコのかかる代表的な呼吸器感染症を引き起こすウイルスである。ウイルスの感染力は強く、感染したネコと直接触れ合ったことによる感染、感染したネコのくしゃみ等による空気感染、感染したネコと人間との接触を介しての感染など多岐にわたる。もしアフリカミドリザルのように、容易にウイルス馴化が起きる動物種がネコとヒトに同時に接触する機会が多いと、ネコからヒトへ感染可能なウイルスの出現を仲立ちする可能性がある。そこで CV-1 細胞と HeLa 細胞を共培養し、そこに FCV_{CV} 分離株を感染させ、HeLa 細胞に感染可能なウイルスが出現するかどうか調べた。その結果 30 代まで継代したが、HeLa 細胞に感染可能なウイルスは出現しなかった (data not shown)

D. 考察

D.1 病原体不活化処理の有効成分への影響評価

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、血液凝固因子のうちフィブリンゲン及びFVIIIが比較的影響を受けやすく、15%程度活性が低下するがあ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、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。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。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、最終的に、アミノ酸配列で 90%以上の一次構造を確認し、酸化を受けやすいメチオニン残基を特定することができた。光化学反応が有効成分へ及ぼす影響を評価するためには、分析操作中に生じる酸化を十分に抑制できる手法、並びに変化の程度を適切に評価するための手法の開発の必要性が示唆された。

D.2 病原体不活化処理の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

輸血用血液製剤の病原体不活化技術のうち我が国で導入の検討が進められているリボフラビン-UV 処理は、核酸を標的とする技術であり、スクリーニングが実施されていない病原体混入に対する備えとして有用な手法の一つである。また、本手法は有核細胞である白血球も不活化するため、輸血用血液製剤投与後に生じうる重篤な副作用の一つである移植片対宿主病 (GVHD) の発症抑制にも有用である可能性が考えられている。一方、血小板製剤中には細胞成分の他に血漿が含まれ、その主要な構成成分の一つである IgG は輸血関連急性肺障害 (TRALI) の発症に関与する可能性が報告されているが、これに対してリボフラビン-UV 処理が与える影響については十分な検討がなされていない。本研究では、リボフラビン-UV 処理時に生じうる IgG の構造変化のうち特に酸化修飾に着目し、ヒト IgG の酸化がその機能に及ぼす影響について検討を行った。

ヒト血清中の IgG のサブクラスの割合は IgG1 が 65~70%, IgG2 が 20~30%, IgG3 が約 8%, IgG4 が約 2%とされているが、各々 IgG サブクラスの酸化がその機能に及ぼす影響については詳細な

報告はない。そこで本研究では主要な IgG サブクラスである IgG1 および IgG2 の酸化が Fcγ 受容体結合能および Fcγ 受容体活性化能に及ぼす影響を検討するため、市販されている抗 EGFR 抗体医薬品であるセツキシマブ (IgG1) およびパニツムマブ (IgG2) をモデルとして実験を行った。

tBHP 処理により強制酸化したセツキシマブあるいはパニツムマブの抗原 (EGFR) 結合能を SPR 法により解析した結果、両者の抗原結合能に関しては酸化処理の有無による顕著な差は認められなかった。一方、血中 IgG の動態制御に関与するとされる新生児性 Fc 受容体 FcRn 結合能は過去の報告と同様に酸化処理により著しく減少したことから、本研究で実施した tBHP による強制酸化により、IgG の Fc 領域に構造的な変化が生じていると考えられた。FcRn 結合親和性は、血中半減期に関連することが知られているため、酸化により IgG の血中半減期が短縮される可能性が考えられる。

次に、Fcγ 受容体結合能について検討を行った。ヒト IgG1 は FcγRIIIa, FcγRIIa のどちらにも結合するのに対し、ヒト IgG2 は FcγRIIIa に対する親和性が低く、FcγRIIa と強く結合することが知られており、本実験においてもセツキシマブは FcγRIIIa, FcγRIIa に対する結合能を示したのに対し、パニツムマブは FcγRIIa に対してのみ結合能を示した。この際、何れの結合においても酸化処理による有意な差は認められなかったことから、ヒト IgG1 および IgG2 の酸化修飾は Fcγ 受容体結合能に影響を及ぼさないと考えられた。

一般に、抗原に結合していない IgG の FcγRIIIa あるいは FcγRIIa に対する結合親和性は低く、抗原結合によりこれら受容体との親和性が増大することにより Fcγ 受容体を介したエフェクター活性が発揮される。輸血用血液製剤の投与時にドナー由来の抗 MHC 抗体がレシピエントの MHC を認識することで免疫エフェクター細胞上の Fcγ 受容体を活性化し、細胞傷害活性を発揮することが

TRALI の発症メカニズムの一因であるという報告もあり、抗原結合に依存した IgG による Fcγ 受容体の活性化が輸血用血液製剤の副作用発現に関与する可能性が考えられる。

Fcγ 受容体を発現するレポーター細胞を用いてセツキシマブおよびパニツムマブの Fcγ 受容体活性化能について検討した結果、結合実験と同様にセツキシマブでは FcγRIIIa および FcγRIIa, パニツムマブでは FcγRIIa の活性化が検出された。この際、酸化処理はセツキシマブによる FcγRIIIa の活性化には影響を及ぼさなかったのに対し、FcγRIIa の活性化を著しく低下させた。またパニツムマブによる FcγRIIa の活性化に関しても酸化処理による有意な低下が認められ、IgG の酸化が FcγRIIa を介したエフェクター細胞の活性化を低下させる可能性が明らかとなった。酸化により IgG の FcγRIIa 活性化能が低下することは、これまでに報告がなく、本研究により初めて明らかになった知見である。

リボフラビン-UV 処理時に生じる IgG の酸化が Fcγ 受容体を介した免疫エフェクター細胞の活性化を低下させるという本研究の結果から、IgG の酸化は TRALI の発症の危険性を高めるものではないと考えられた。しかしながら、これらの結果は IgG の酸化が何らかの高次構造変化を引き起こしていることを示唆するものであり、IgG の構造変化に起因する有害事象 (新生抗原の出現による免疫原性の増大など) のリスクについてはさらなる検討が必要であると考えられた。また、平成 22 年度に実施した研究では、ヒト血清に対してリボフラビン-UV 処理を行った際に、血清中の IgG の Fcγ 受容体結合能が亢進する可能性について報告しており、実際の病原体不活化処理時にはタンパク質成分に対して酸化以外の修飾が起こっている可能性も考慮する必要がある。輸血用血液製剤の病原体不活化処理の有用性の評価においては IgG をはじめとするタンパク質成分に及ぼす影響についても引き続き検討が必要であると考え

られる。

D.3 ウイルス不活化能評価法の開発

FCV は本来の宿主であるネコ細胞 CR-FK 細胞以外にアフリカミドリザル細胞 CV-1, Vero 細胞で感染性を示した。FCV は細胞表面の JAM1 を感染レセプターとして細胞内に侵入する。そこでネコ, アフリカミドリザル, ヒトの JAM1 のアミノ酸配列を比較した(図 11)。ネコとアフリカミドリザルの JAM1 の相同性は 79.2%, アフリカミドリザルとヒトは 96.3%, ヒトとネコは 79.6% である。アフリカミドリザルとヒトの JAM1 はアミノ酸残基が 4 つ異なっていることから, FCV がアフリカミドリザル細胞に感染の可否がレセプターの JAM1 に依存するのだとすると, ウイルス複製に重要なアミノ酸残基は, アフリカミドリザルの Ala7, Ser90, Lys154, Ile253 であろうと推定される。どのアミノ酸残基が, FCV が CV-1 や Vero 細胞への侵入に関与しているのかは, 組み換えウイルスを使った実験によって明らかになると考えられる。

FCV は同じアフリカミドリザルの腎由来の細胞である CV-1, Vero 細胞に感染可能であったが, Vero 細胞ではウイルスの継代はできなかった。この違いは, Vero 細胞表面の JAM1 の発現レベルが低いからであるという可能性と, Vero 細胞では感染侵入後の細胞内での複製過程に阻害因子がある可能性, あるいは複製に必要な因子を欠いている可能性, あるいは必要な因子が十分に発現していない可能性が考えられる。この点を解析するためには, CV-1 と Vero 細胞表面の JAM1 分子の発現レベルを比較する必要がある。また細胞侵入後に Vero 細胞に必要な因子がないのか, 阻害因子があるかは, CV-1 細胞と Vero 細胞の融合細胞に FCV が感染複製するかどうかを調べる必要がある。

FCV は CV-1 細胞により継代することにより, わずか 3 回の継代で CV-1 細胞に馴化し, CR-FK 細胞並みに複製能を高めることがわかった。これはカリシウイルスが, いかに宿主に馴化し易いか

を示したものである。この変化が感染侵入時のレセプターとの相互作用に起きているとすると, FCV のカプシドタンパク質である VP1 にアミノ酸変異を起こしている可能性が高く, この解析も今後必要である。

RNA ウイルスはそのポリメラーゼの fidelity が低いため, 変異ウイルスが出現し易いことが知られている。2008, 2009 年に医薬品製造リアクター汚染を引き起こした vesivirus 2117 は, FCV と近縁のウイルスであるが, このウイルスの自然宿主は不明なままである。本来 vesivirus 2117 はヒトと接触のある自然宿主から医薬品製造に関わるヒトを介して CHO 細胞を汚染したものと考えられているが, 今回の実験によって FCV も医薬品製造用細胞を汚染する可能性がある。これを明らかにするためには, 薬品製造用細胞に感染可能な変異ウイルスがどのような頻度で出現するのかについて実験的に推定する必要がある。

一方, アフリカミドリザルのレセプターの構造はヒトのものと 96.3% の相同性をもつことから, アフリカミドリザルに馴化したウイルスはヒト細胞に感染可能である可能性が考えられた。しかしアフリカミドリザル細胞とヒト細胞の共培養によって, ヒト感染カリシウイルスの出現は起きなかった。このことはヒト細胞への感染にはアフリカミドリザルに比べて高い種の壁が存在することを示唆している。

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 90% に相当するペプチド部分を確認した。FVIII に光増感剤及び光照射処理を行い, ペプチドマップで解析し, メチオニンの酸化が起りやすい部位を確認した。光化学反応が有効成分へ及ぼす影響を評価するためには, 分析操作中に生じる酸化を十分に抑制できる手法, 並びに変化の程度を適切に

評価する手法を開発することが必要である。

- 2) 輸血用血液製剤の病原体不活化処理への導入が検討されているリボフラビン-UV 処理時に生じる IgG の酸化が、抗原および Fc 受容体結合能、ならびに Fc γ 受容体活性化能に及ぼす影響について検討し、酸化により IgG の Fc γ IIa 活性化能が低下することを明らかにした。
- 3) 非エンベロープウイルス FCV の宿主域を調べ、アフリカミドリザル腎由来細胞にも感染することを明らかにした。アフリカミドリザルの腎由来細胞はワクチン製造などにも多用される細胞であり、その点からもモデルウイルスの宿主域の解析は重要であると考えられる。FCV はノロウイルスと近縁であるため、ノロウイルスの代替ウイルスとして使われることがあるが、血液製剤や組み換えタンパク質製造におけるモデルウイルスとしても有用であると考えられる。

F. 健康被害状況 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ (第1回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, *ファームテクニシャン*, 27(13), 99(2633)-104(2638) (2011)
- 2) Takao Hayakawa, Akiko Ishii-Watabe: Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations. II-Regulatory requirements, Published by John Wiley & Sons Inc., USA New Jersey, Edited by Michael Tovey. pp.57-80 (2011)

- 3) Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K. In vitro and In vivo Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors. *J. AIDS Clin. Res.* S2-004, 2011.
- 4) 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ. ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 42: 444-447, 2011.
- 5) 遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴. バイオ医薬品の外来性感染物質について *Pharm. Tech. Jpn.* in press.

2. 学会発表

- 1) A. Harazono: 糖タンパク質医薬品の品質評価. 第38回 BMS コンファレンス (グループディスカッション), 箱根 (2011, 7, 10)
- 2) Yusa, K., Yuan, Y., Maeda, Y., Hiromi, T., Monde, K., Harada, S. A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc. International Union of Microbiological Societies, XV, International Congress of Virology, Sapporo, September 2011.
- 3) 原田恵嘉, 濱治有希, 遊佐敬介, 松下修三, 吉村和久. 抗 HIV 剤が Env 多様性に与える影響. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 (2011, 11, 30)
- 4) 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 CCR5 の oligomerization 増強に関与する CCR5 領域の解析. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 (2011, 11, 30)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

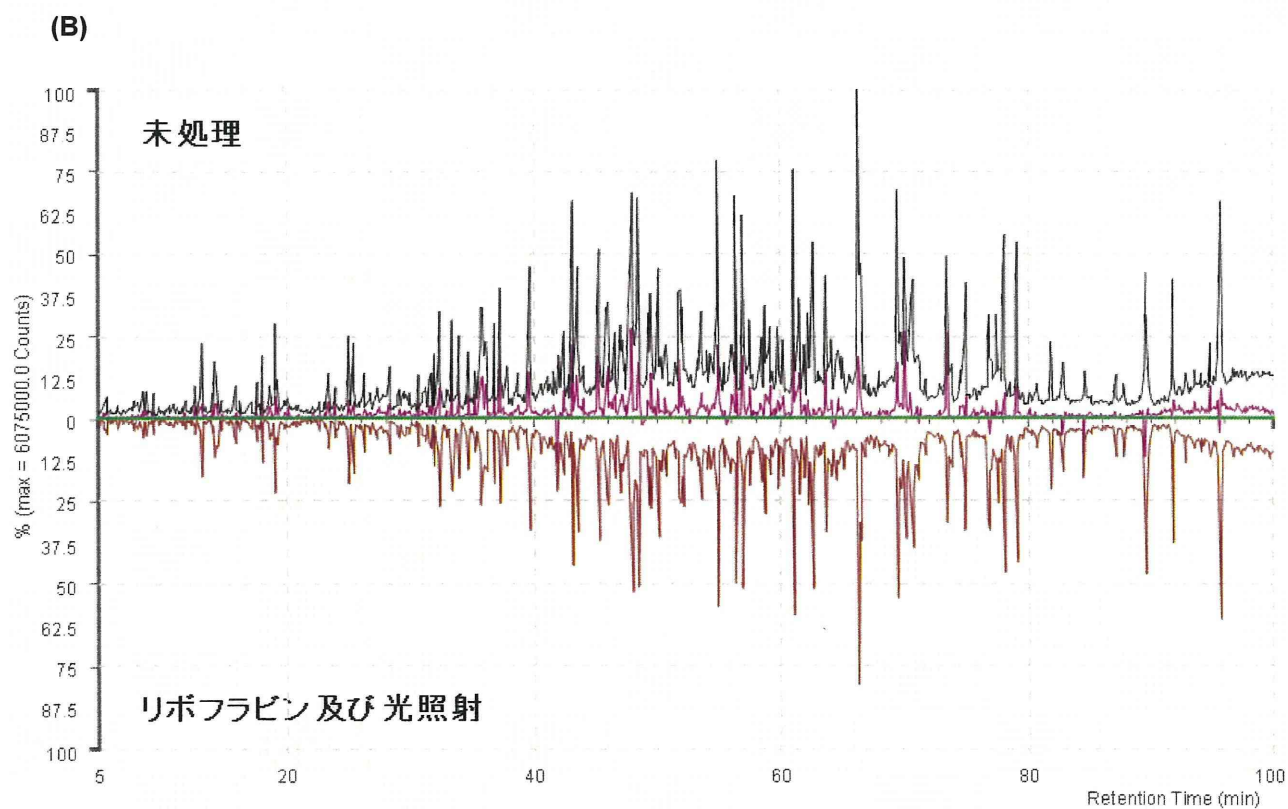
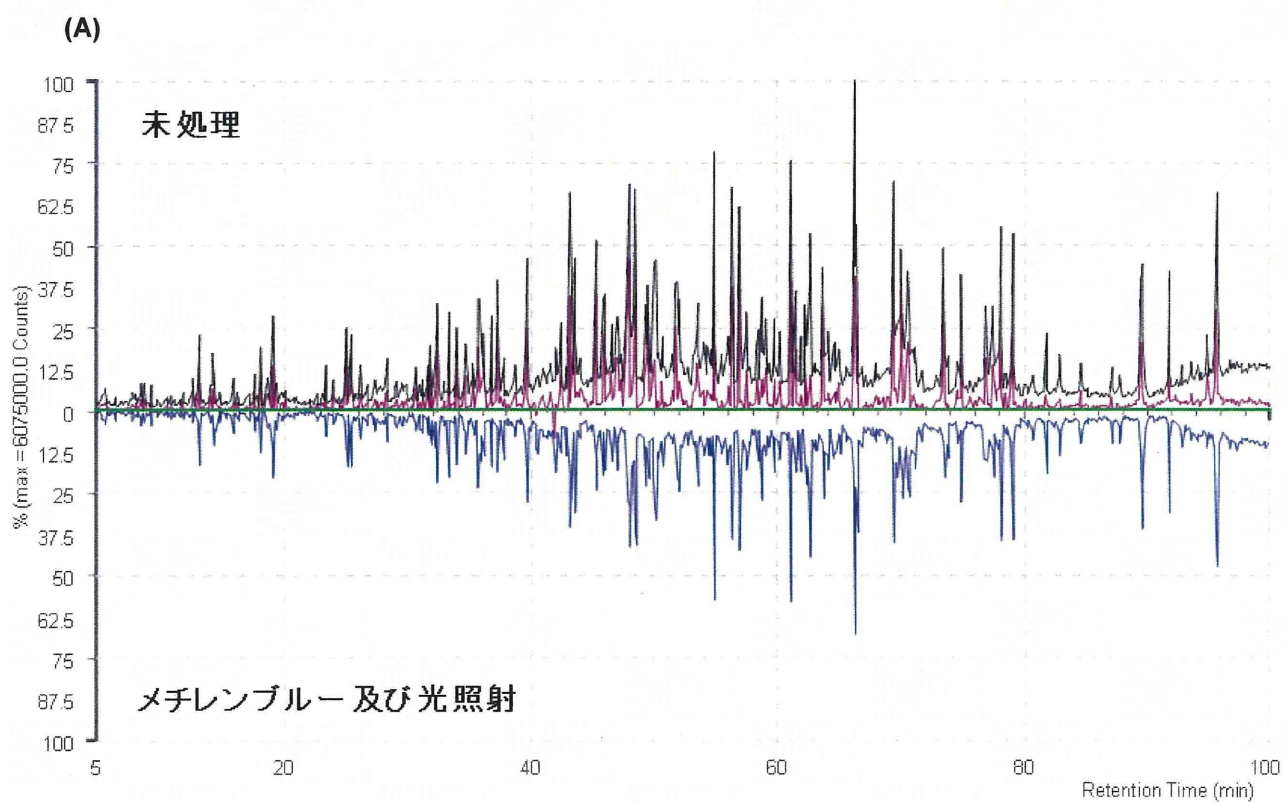


図1 未処理及び光増感剤及び光照射処理血液第八因子のペプチドマップの比較

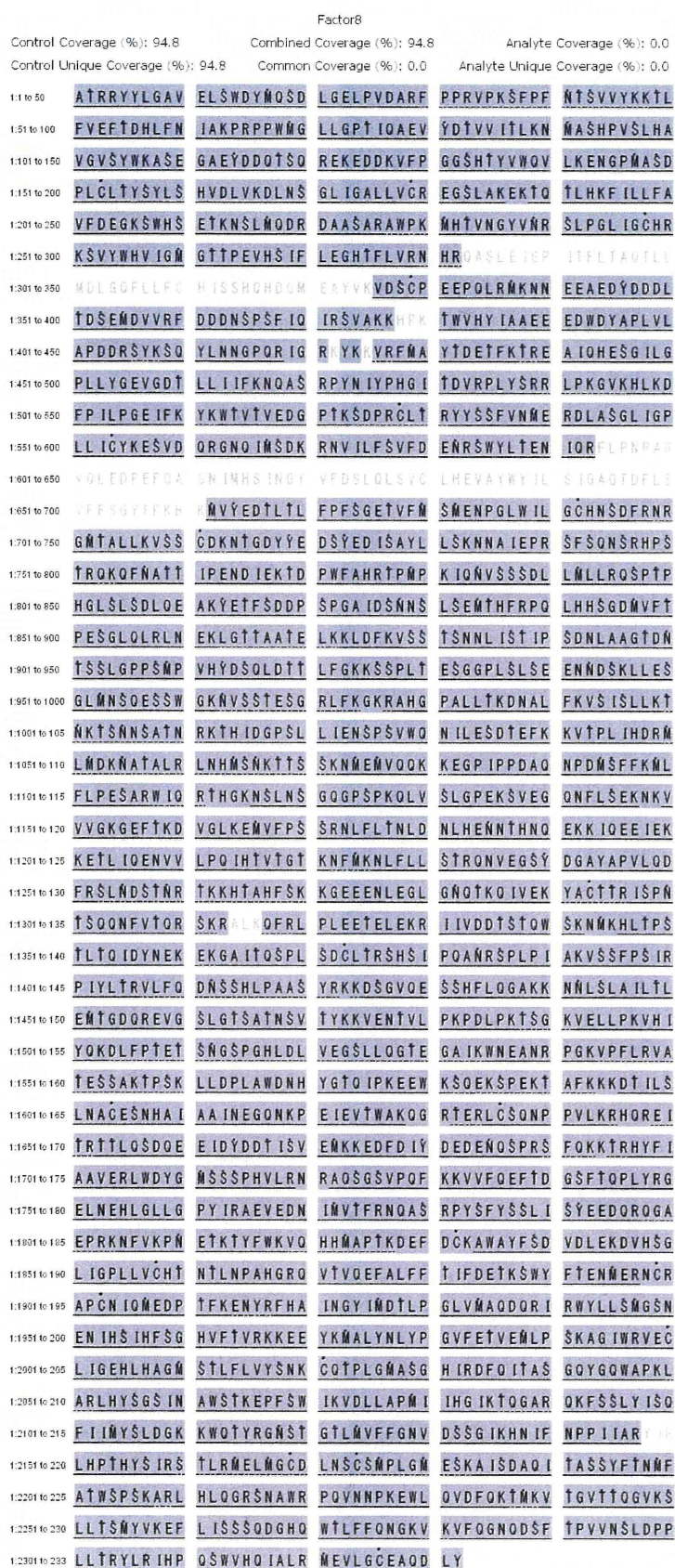


図2 LC/MSEにより帰属されたアミノ酸配列のカバレッジマップ

(A)

1 ATRRYYLGA^V ELSWDYMQSD LGELPVDAR^F PPRVPKSPFF NTSVYKKTLL
51 FVEFTDHLFN IAKPRPFWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
101 VGVSYWKASE GAEDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGQFLLFC HISSHQHDM EAYVKVDSCP EEPQLRMKN^{NN} EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVR^F DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RYKVKVRFMA YTDFTFKTRE AIQHESGILG
451 PLYGEGVGD^T LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSR^R LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSFVNME^R RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL^{TEN} IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMVEDITLTL PFFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDYEE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS
751 TRQKQFNATT IPENDIEKTD PWFARHTPMP KIQNVSSDL LMLLRQSPTP
801 HGLSLSDLQE AKYETFSDDP SPGAIDSNNS LSEMTHFRPQ LHSGDMVFT
851 PESGLQLRLN EKLGTAAATE LKCLDFKVSS TSNNLISTIP SDNLAAGTDN
901 TSSLGPPSMP VHYDSQLD^{TT} LFGKKSSPLT ESGGPLSLSE ENNDSKLLES
951 GLMNSQESSW GKNVSS^{TESG} RLFGKGRAHG PALLTKDNAL FKVISL^{LKT}
1001 NKTSNNSATN RKTHIDGPSL LIENSPSVWQ NILESDETEK KVTPLIHDRM
1051 LMDKNATALR LNHMSNK^{TTS} SKNMEMVQK KEGPIPPDAQ NPDM^{SFFKML}
1101 FLPE^{SARWIQ} RTHGKNSLNS GQGSPKQLV SLGPEKSVEG QNFLSEKNKV
1151 VVGKG^{EFTK} VGLKEMVFP^S SRNLFLTNLD NLHENNTHNQ EKKIQEEIEK

1201 KETLIQENVV LPQIHTVTGT KNFMKNLFL^L STRQNEGSY DGAYAPVLQD
1251 FRS^{LNDSTNR} TKKHTAHFSK KGEENLEGL GNQTKQIVEK YACTTRISP^N
1301 TSQQNFVTQR SKRALKQFRL PLEETELEKR IIVDDTSTQW SKNMKHLTPS
1351 TLTQIDYNEK EKGAITQSPL SDCLTRSHSI PQANRSPLPI AKVSSFPSIR
1401 PIYLTRVL^{FQ} DNSSHLPAAS YRK^{KDSGVQE} SSHFLQGA^{KK} NNLSLAILTL
1451 EMTGDQREVG SLGTSATNSV TYKKVENTVL PKPDL^{PKTSG} KVELLPKVHI
1501 YQKDLFPTET SNGSPGHDL^L VEGSLLQGT^E GAIKWNEANR PGKV^{PFLRVA}
1551 TESSAKTPSK LLDPLAWDNH YGTQIPKEEW KSQEK^{SPEKT} AFKK^{KDTILS}
1601 LNACESNHAI AAINEGQNK^P EIEVTWAKQG RTERLCSQNP PVLKR^{HQREI}
1651 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMK^{KEDFDIY} DEDENQSPRS FQK^{KTRHYFI}
1701 AAVERLWDY^G MSSSPHVL^{RN} RAQSGSV^{PQF} KKVVFQ^{EFTD} GSFTQPL^{YRG}
1751 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTF^{RN}QAS RPYSFYSSLI SYEEDQ^{RQGA}
1801 EPRKNFVKPN ETKTYFWK^{VQ} HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
1851 LIGPLL^{VCHT} NTLNPAHGRQ VTVQE^{FALFF} TIFDETKSWY FTE^{NMERNCR}
1901 APCNIQMEDP TFKENYR^{FHA} INGYIMDTLP GLVMAQDQRI^I RWYLLSMGSN
1951 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YK^{MALYNLYP} GVFE^{TVEMLP} SKAGI^{WRVEC}
2001 LIG^{EHLHAGM} STLFLVYSNK CQTP^{LGMA}SG HIRDFQITAS GYGQWAP^{KL}
2051 ARLHYS^{GSIN} AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
2101 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMV^{FNGV} DSSGIKHNIF NPPIIARYIR
2151 LHP^{THYSIRS} TLRMELMGCD LNSC^{SPLMG} ESKAISDAQI^I TASSYFTNME^I
2201 ATWSPSK^{ARL} HLQGRSN^{AWR} PQVNNPKEWL QVDFQK^{TMKV} TGVTTQGV^{KS}
2251 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPV^{VNSLDPP}
2301 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

(B)

1 ATRRYYLGA^V ELSWDYMQSD LGELPVDAR^F PPRVPKSPFF NTSVYKKTLL
51 FVEFTDHLFN IAKPRPFWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
101 VGVSYWKASE GAEDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGQFLLFC HISSHQHDM EAYVKVDSCP EEPQLRMKN^{NN} EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVR^F DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RYKVKVRFMA YTDFTFKTRE AIQHESGILG
451 PLYGEGVGD^T LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSR^R LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSFVNME^R RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL^{TEN} IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMVEDITLTL PFFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDYEE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNSRHPS
751 TRQKQFNATT IPENDIEKTD PWFARHTPMP KIQNVSSDL LMLLRQSPTP
801 HGLSLSDLQE AKYETFSDDP SPGAIDSNNS LSEMTHFRPQ LHSGDMVFT
851 PESGLQLRLN EKLGTAAATE LKCLDFKVSS TSNNLISTIP SDNLAAGTDN
901 TSSLGPPSMP VHYDSQLD^{TT} LFGKKSSPLT ESGGPLSLSE ENNDSKLLES
951 GLMNSQESSW GKNVSS^{TESG} RLFGKGRAHG PALLTKDNAL FKVISL^{LKT}
1001 NKTSNNSATN RKTHIDGPSL LIENSPSVWQ NILESDETEK KVTPLIHDRM
1051 LMDKNATALR LNHMSNK^{TTS} SKNMEMVQK KEGPIPPDAQ NPDM^{SFFKML}
1101 FLPE^{SARWIQ} RTHGKNSLNS GQGSPKQLV SLGPEKSVEG QNFLSEKNKV
1151 VVGKG^{EFTK} VGLKEMVFP^S SRNLFLTNLD NLHENNTHNQ EKKIQEEIEK

1201 KETLIQENVV LPQIHTVTGT KNFMKNLFL^L STRQNEGSY DGAYAPVLQD
1251 FRS^{LNDSTNR} TKKHTAHFSK KGEENLEGL GNQTKQIVEK YACTTRISP^N
1301 TSQQNFVTQR SKRALKQFRL PLEETELEKR IIVDDTSTQW SKNMKHLTPS
1351 TLTQIDYNEK EKGAITQSPL SDCLTRSHSI PQANRSPLPI AKVSSFPSIR
1401 PIYLTRVL^{FQ} DNSSHLPAAS YRK^{KDSGVQE} SSHFLQGA^{KK} NNLSLAILTL
1451 EMTGDQREVG SLGTSATNSV TYKKVENTVL PKPDL^{PKTSG} KVELLPKVHI
1501 YQKDLFPTET SNGSPGHDL^L VEGSLLQGT^E GAIKWNEANR PGKV^{PFLRVA}
1551 TESSAKTPSK LLDPLAWDNH YGTQIPKEEW KSQEK^{SPEKT} AFKK^{KDTILS}
1601 LNACESNHAI AAINEGQNK^P EIEVTWAKQG RTERLCSQNP PVLKR^{HQREI}
1651 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMK^{KEDFDIY} DEDENQSPRS FQK^{KTRHYFI}
1701 AAVERLWDY^G MSSSPHVL^{RN} RAQSGSV^{PQF} KKVVFQ^{EFTD} GSFTQPL^{YRG}
1751 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTF^{RN}QAS RPYSFYSSLI SYEEDQ^{RQGA}
1801 EPRKNFVKPN ETKTYFWK^{VQ} HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
1851 LIGPLL^{VCHT} NTLNPAHGRQ VTVQE^{FALFF} TIFDETKSWY FTE^{NMERNCR}
1901 APCNIQMEDP TFKENYR^{FHA} INGYIMDTLP GLVMAQDQRI^I RWYLLSMGSN
1951 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YK^{MALYNLYP} GVFE^{TVEMLP} SKAGI^{WRVEC}
2001 LIG^{EHLHAGM} STLFLVYSNK CQTP^{LGMA}SG HIRDFQITAS GYGQWAP^{KL}
2051 ARLHYS^{GSIN} AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
2101 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMV^{FNGV} DSSGIKHNIF NPPIIARYIR
2151 LHP^{THYSIRS} TLRMELMGCD LNSC^{SPLMG} ESKAISDAQI^I TASSYFTNME^I
2201 ATWSPSK^{ARL} HLQGRSN^{AWR} PQVNNPKEWL QVDFQK^{TMKV} TGVTTQGV^{KS}
2251 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPV^{VNSLDPP}
2301 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

図3 帰属された酸化メチオニンを含むペプチド

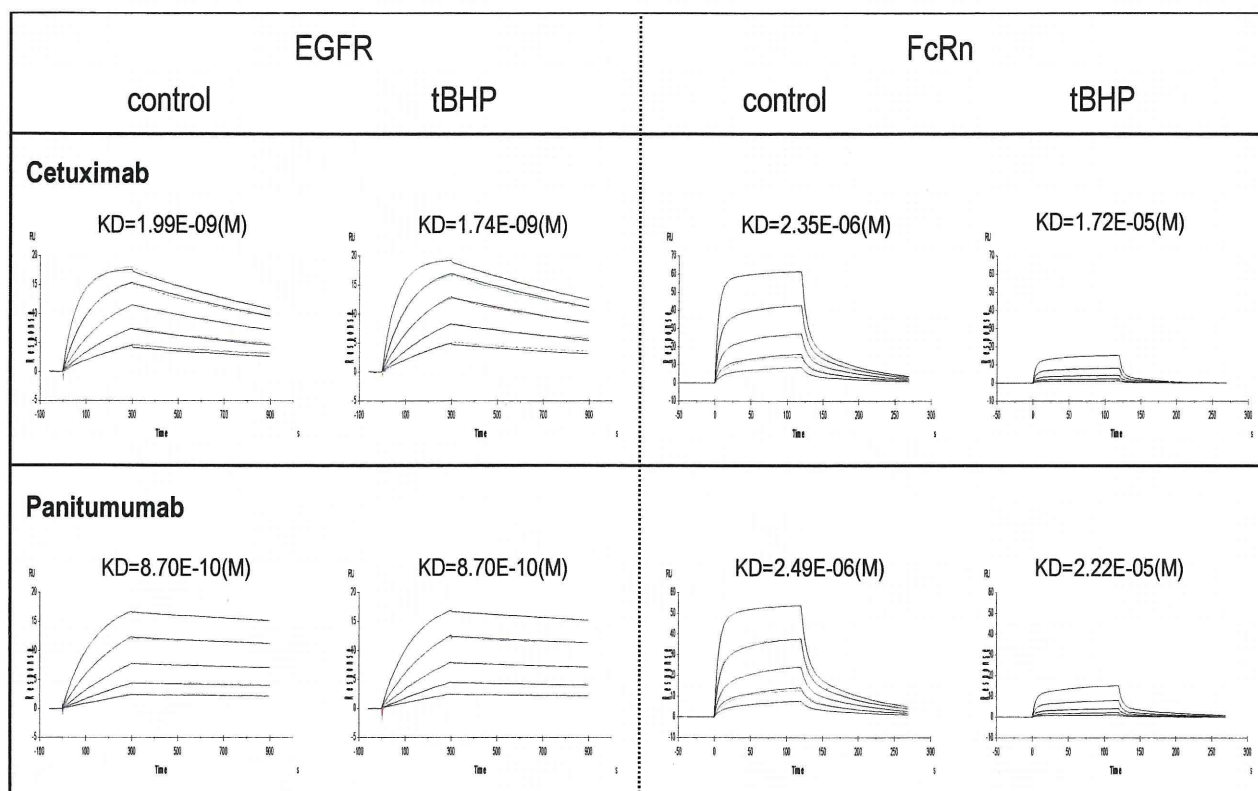


図 4 IgG の酸化が抗原（EGFR）結合、及び、FcRn 結合能に及ぼす影響の検討

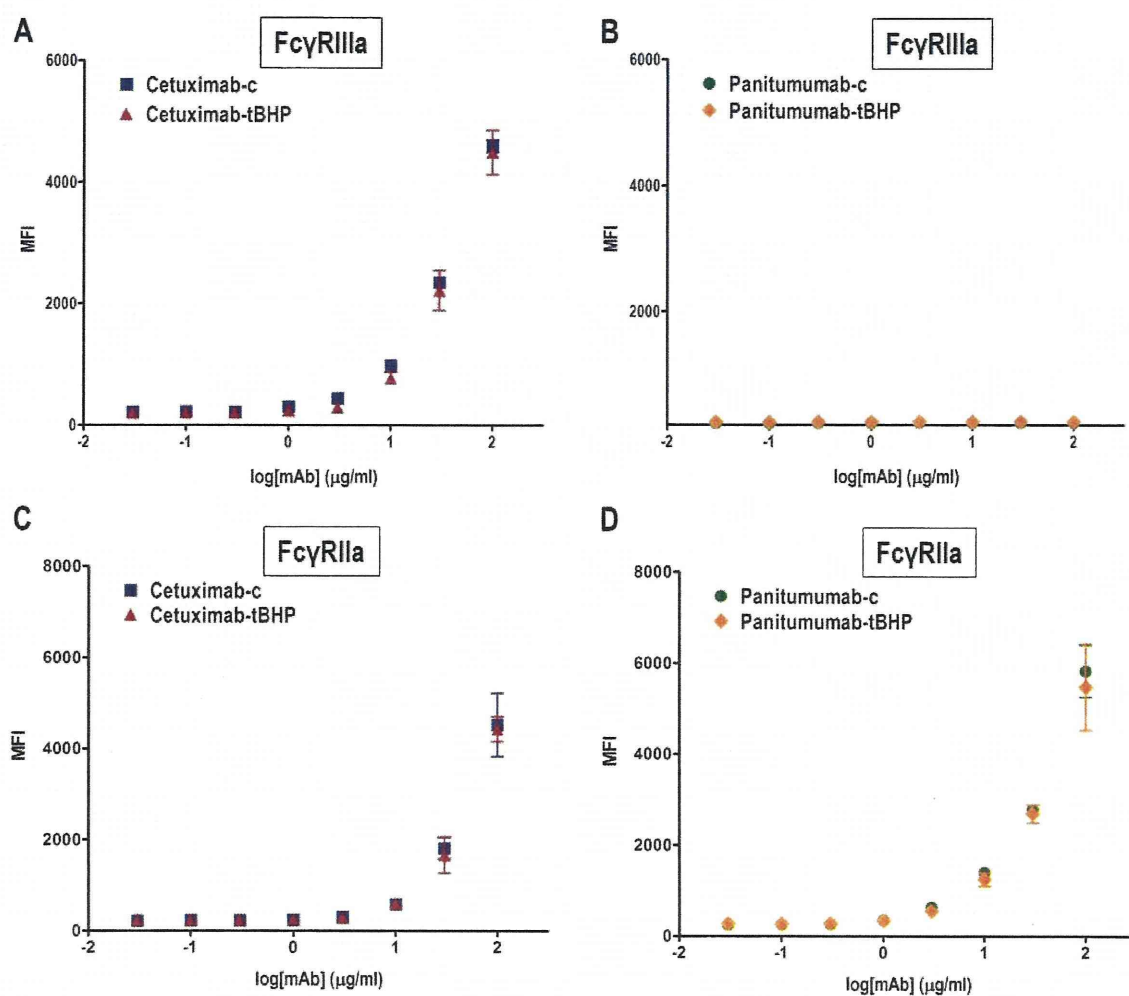


図 5 IgG の酸化が Fcγ 受容体結合能に及ぼす影響の検討

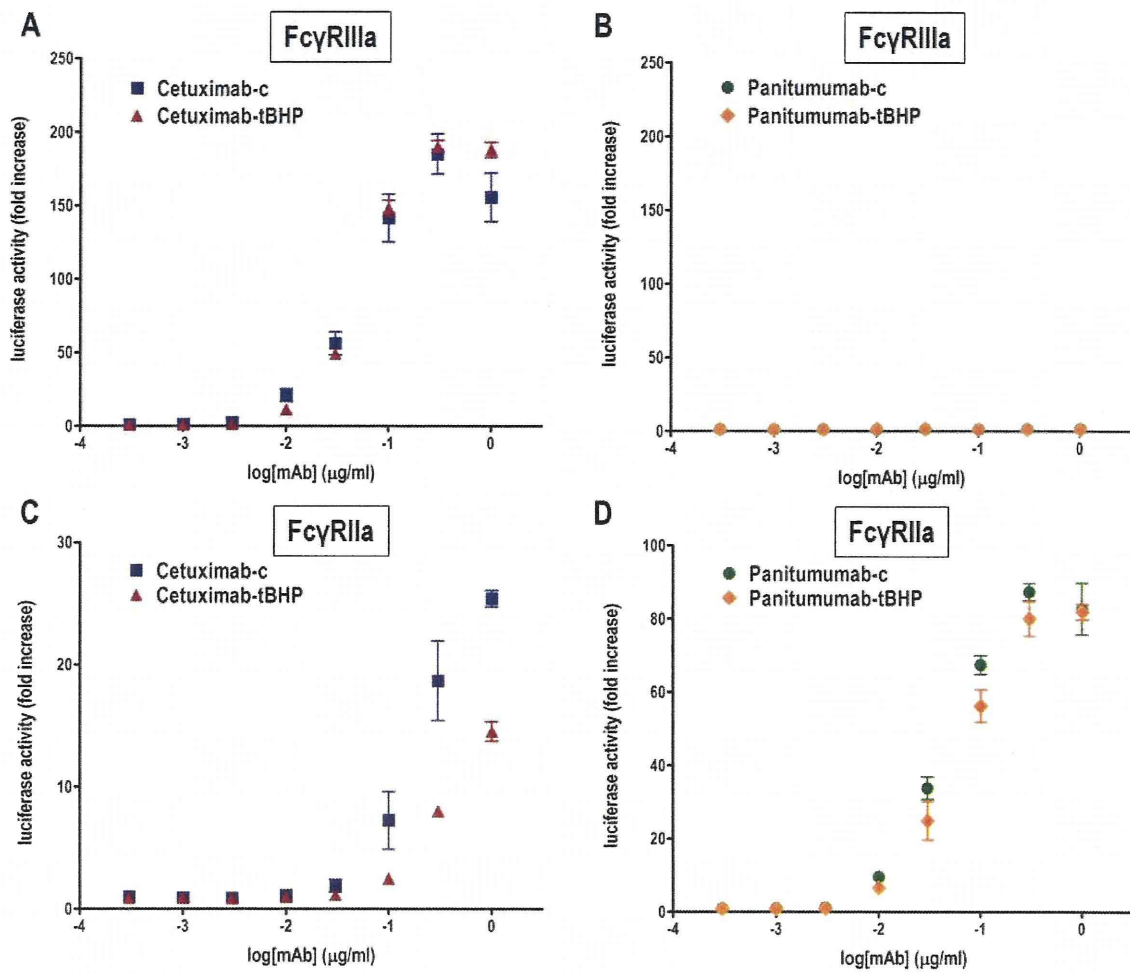


図6 IgGの酸化がFcγ受容体活性化能に及ぼす影響の検討

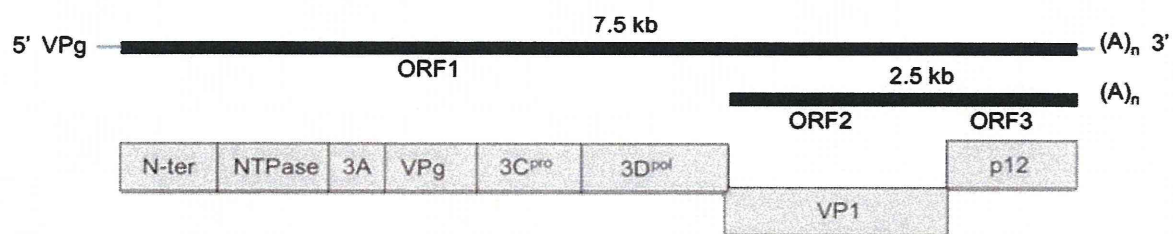


図7 FCV のゲノム構造とウイルスタンパク質

表 1 細胞のウイルス感受性 (TCID₅₀)

cells	HeLa	293T	Jurkat	Vero	CV-1	NIH-3T3	CR-FK
virus							
poliovirus	10 ^{6.7}	10 ^{6.0}	<1	10 ^{7.3}	10 ^{6.0}	<1	<1
sindbis virus	ND	10 ^{6.7}	<1	10 ^{7.5}	10 ^{6.7}	10 ^{5.0}	10 ^{8.1}
FCV	<1	<1	<1	10 ^{4.0}	10 ^{3.7}	<1	10 ^{8.5}

*ND, not determined.