

201132012B

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 21-23 年度 総合研究報告書

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 21-23 年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I.	総合研究報告	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（総合）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	35
	原 園 景	
	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	47
	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	73
	遊 佐 敬 介	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	85
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

輸血用血液製剤の安全性向上のために開発されたウイルス等病原体不活化技術の有用性評価に資する研究として、不活化処理が有効成分及びその他の製剤成分に及ぼす影響の評価、ならびに、ウイルス不活化能の評価に有用なモデルウイルスの作成と特性解析を行った。

1. 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血漿製剤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。本研究の目的は、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である。LC/MSを用いて遺伝子組換え血液凝固第八因子の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90%のアミノ酸配列を確認した。次に、モデルペプチドを用いて、メチレンブルー／光照射及びリボフラビン／照射を行ったところ、認められた主な影響は、メチオニンの酸化体の形成であった。また、血液凝固第八因子で酸化を受けやすいメチオニン残基を確認した。

2. 製剤成分 IgG への影響評価

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が関与する場合があることが知られているため、リボフラビン・UV処理がヒトIgGの機能に与える影響を検討した。リボフラビン・UV処理した血清中IgGのFcγ受容体への結合を評価したところ、FcγRIIIa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の機能変化が生じる可能性が示唆された。次に、この機能変化がリボフラビン・UV処理に伴い生じ得る酸化が関与している可能性を考え、IgGの酸化がその機能に及ぼす影響について検討した。酸化剤処理を施したモデルIgGでは、抗原結合能に変化は認められなかったが、エフェクター細胞の活性化に関与するFcγ受容体活性化能の低下が認められ、酸化によりIgGによる免疫応答が減弱する可能性が示唆された。これらの結果から、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と考えられた。また、リボフラビン・UV処理では、酸化とは異なるIgG機能変化が認められていることから、酸化以外の構造変化が生じている可能性が示唆された。

3. ウイルス不活化能の評価に有用なモデルウイルスの作成と特性解析

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を用いた評価が必要である。H22年度はヒトレトロウイルスをモデルウイルスとして、その感染侵入に関与するエンベロープタンパク質に多様な変異を導入したウイルスポピュレーションを作製し、ウイルス不活化に必要な条件について検討した。そのために多様な組み合わせのアミノ酸変異をエンベロープタンパク質の特定のアミノ酸部位に導入したウイルスライブラリーを作製した。H23年度は非エンベロープウイルスである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。本研究によって、ウイルスの不活化・不活化能の評価法の開発につながるウイルスの

性状を明らかにすることができた。

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、本研究では、1) 光増感剤及び光照射により血液凝固第Ⅷ因子に生じる構造変化のペプチドマップ法による分析、2) リボフラビン-UV処理、及び、酸化剤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作製と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、α2-3,6,8,9ノイラミニダーゼ、β1-4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

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。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 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、モデルペプチドとして、 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、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.1.5 LC MS

LC 装置には、Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)、カラムには、MonoCap 0.1 X 250 mm (ジーエルサイエンス)、質量分析装置に Qstar Elite (Applied Biosystem 社) を用いて、LC/MS/MS を行った。もしくは LC 装置には、Acquity UPLC システム (Waters 社)、カラムには、BEH300 C18 2.1 X 150 mm, 1.7 μ m (Waters 社) を、質量分析計に Synapt G2 HDMS (Waters 社) を用いて C/MS^E を

行った。

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.1.7 LC/MS クロマトグラムの比較

LC/MS^E により得られたデータは、データ解析ソフトウェア Biopharmalynx を用いて解析及びクロマトグラム間の比較を行った。各ピークは 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、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 結合型糖鎖付加及び O 結合型糖鎖付加を適宜設定した。

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 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、細胞を 50 μ M 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 となるように懸濁した後, 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/cm^2). 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 Fc γ 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.3.1 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. Fc γ RIIa あるいは Fc γ RIIIa 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% NaN_3) 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.2.3 酸化剤処理抗体の機能評価に用いた抗体および細胞

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°C, 5% CO_2 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°C, 5% CO_2 条件下で培養した.

B.2.4 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°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 回を行い, tBHP を除去した.

B.2.5 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.2.5.1 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 $\mu\text{l/min}$ 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.2.5.2 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 $\mu\text{g/ml}$, 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 $\mu\text{l/min}$, 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.2.6 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.2.7 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

B.3.1 細胞とウイルス

PM1/CCR5細胞は, PM1細胞にpGK1neo-CCR5をトランスフェクションして樹立したCCR5高発現細胞である. 293T細胞, HeLa細胞, CR-FK細胞, Vero細胞, CV-1細胞は, DMEMに10%ウシ胎児血清を加えたもので培養を行った. またNIH-3T3細胞はMEMに10%ウシ胎児血清, PM1/CCR5細胞, とJurkat細胞はRPMIに10%のウシ胎児血清を加えた培地で培養を行った. HIV-1JRF1は京都大学ウイルス研・小柳教授, FCV F9株は, 国立医薬品食品衛生研究所・野田衛博士から分与を受けた. HIV-1の培養および実験は熊本大学大学院・原田教授, 前田準教授, 中国・輸血研究所・苑哲生博士の協力を得た.

B.3.2 ヒトレトロウイルスのgp120 V3 ライブラリーの作製

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 12). 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.

B.3.3 侵入阻害剤 maravirocによる薬剤耐性ウイルスの分離

HIV-1 V3 ライブラリーを293T細胞にトランスフェクションし, 30時間後その上清を回収した. そのウイルスをPM1/CCR5細胞でmaraviroc存在下で継代した. 0.003 μM から培養を開始し, 17代まで培養を行い, 最終0.7 μM まで薬剤濃度を上げた. ここで得られたウイルスをmaraviroc 耐性ウイルスとした.

B.3.4 FCVの調製とウイルス感受性

ネコカリシウイルス(FCK)株F9, 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 µm 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 × 10³ 個ずつ播種した細胞に10倍希釈系列ウイルス液 (100 µl) 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.

B.3.5 FCVのアフリカミドリザル細胞での馴化

アフリカ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 (2.5×10⁶) 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 × 10⁶) に感染させた. 継代をを繰り返し, 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)

本研究で用いたヒト血清や培養細胞は, 試薬として市販されているものであり, 倫理面への配慮を要するものではない.

C. 結果

C.1 病原体不活化処理の有効成分への影響評価

C.1.1 FVIII のペプチドマップ

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 (図 1). 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, 質量分析の測定範囲を変えて, また PNGaseA 処理した試料などを複数回の分析を行った. 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を確認した.

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が観測された. 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。トリプシン消化物において、約 10 カ所分の O 結合型糖鎖が結合した糖ペプチドを検出することができた（データ非表示）。図 1D に、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を示す。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、検出及び帰属できていない O 結合糖鎖が存在していると思われる。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。

PNGaseA 処理及びエキソグリコシダーゼ処理した試料では、MS/MS の m/z 204.1 の EIC クロマトグラムでは O 結合型糖鎖のペプチド側の GalNAc だけが付加した糖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。これらの結果から、22 箇所の O-結合型糖鎖結合ペプチドを確認した（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 90% 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た。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、PNGaseA 処理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帰属することができた。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 モデルペプチドを用いた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の検討

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

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(図 4)。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なため、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.1.5 光化学反応を利用したウイルス不活化操作が FVIII に及ぼす影響の検討

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。例として、図 5 A 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、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アミノ酸配列 90%以上のペプチドを確認することができた(非表示)。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 5 B)。リボフラビン及び光照射処理においても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。ただし、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った。

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 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 μ M のリボフラビン存在下で、312 nm の UV を 5.3 J/cm² 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 6 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、FcγR 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、評価対象とする IgG の機能として、FcγR 結合性を選択した。

ヒト FcγR には、FcγR 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 FcγRIIa 及び FcγRIIIa が関与している。そこで、FcγRIIa あるいは FcγRIIIa を発現させた Jurkat 細胞を用い、ヒト血清中 IgG の FcγR 結合に対するリボフラビン-UV 処理の影響を評価した。図 7 に、結合実験（3 回実施：Exp.1~3）の結果を示す。Exp.1 では、FcγRIIa 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 FcγRIIIa 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.2.3 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

リボフラビン-UV 処理の際に、活性酸素種が発

生し、製剤成分の酸化が生じる可能性があることを踏まえ、酸化による IgG 機能変化に関する検討を進めた。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 8 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.2.4 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 9）。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 9）。

C.2.5 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10)。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10)。一方、FcγRIIa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10)。

C.3 ウイルス不活化能評価法の開発

C.3.1 ヒトレトロウイルスにおけるエンベロープタンパク質変異の影響。

不活化能評価のためのモデルウイルスとして調製した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。

C.3.2 エンベロープタンパク質変異ライブラリーを使った薬剤耐性ウイルスの分離。

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13)。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。

C.3.3 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14)。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4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。

C.3.4 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15)。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15)。

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16, 図17)。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.3.5 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、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。光化学反応が有効成分や他の製剤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90%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もので、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、検出されなかった残りの部分について、その他の修飾が起きている可能性も含めて検討する必要がある。

次に、不活化処理がペプチド・タンパク質に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。

不活化処理により引き起こされる修飾は主に Met の酸化であったことから、FVIII において Met の酸化の生じるペプチドを調べた。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より、同様のメチオニン残基が酸化されることが確認された。これらの部位は酸化を受けやすいと考えられるが、対照においても酸化ペプチドのピークが認められたことから、不活化処理により生じたのかどうか不明確であり、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ーツールが必要であろう。

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

D.2.1 リボフラビン-UV 処理が Fcγ受容体結合性に及ぼす影響

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 11 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。

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。これに対して、リボフラビン

-UV 処理が IgG の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。

図 7 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。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、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考慮する必要があるだろう。

D.2.2 酸化処理が抗原結合および Fc 受容体結合性に及ぼす影響

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進めた。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。図 7 に示すように、ヒト血清に対してリボフラビン-UV 処理を行った際には、血清中の IgG の Fcγ受容体結合能が亢進する可能性があるため、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

D.3.1 ヒトレトロウイルスのエンベロープ変異ウイルス

導入した変異は、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ポピ

ュレーション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。

D.3.2 FCV の感染感受性と宿主域

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 18)。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。

D.3.3 FCVの他種動物細胞への馴化

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、この解析も必要になってくる。

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

E.1 病原体不活化処理の有効成分への影響評価

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90%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こ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。

E.2 病原体不活化処理の血小板製剤成分(IgG)への影響評価

輸血用血液製剤の有害作用に関わる可能性がある製剤成分としてIgGに着目し、リボフラビン・UV処理がその機能に与える影響を検討した。リボフラビン・UV処理した血清中IgGのFcγ受容体への結合を評価したところ、FcγRIIIa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の機能変化が生じる可能性が示唆された。

次に、この機能変化がリボフラビン・UV処理に伴い生じ得る酸化が関与している可能性を考え、IgGの酸化がその機能に及ぼす影響について検討した。酸化剤処理を施したモデルIgGでは、抗原結合能に変化は認められなかったが、エフェクタ

一細胞の活性化に關与する Fc γ 受容体活性化能の低下が認められ、酸化により IgG の機能が変化すること、免疫細胞活性化能は減弱する傾向となると考えられた。

リボフラビン・UV 処理では、酸化とは異なる IgG 機能変化が認められていることから、酸化以外の構造変化が生じている可能性が示唆される。病原体不活化処理を施した製剤の安全性評価では、製剤成分の構造及び機能が変化している可能性を踏まえた評価が必要である。

E.3 ウイルス不活化能評価法の開発

今回得られたウイルス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。

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。本研究では 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が明らかになった。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。

F. 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, *ファームテグジャパン*, 27(13), 99(2633)-104(2638) (2011)

- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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.
- 5) 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*, 413:293-299, 2011.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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, 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) 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)
- 4) 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.
- 5) 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回日本ウイルス学会学術集会 徳島; 11.9.2010.
- 6) 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回日本ウイルス学会学術集会 徳島; 11.9.2010.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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.*
- 10) 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 11.30.2011.
- 11) 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 増強に關与するCCR5領域の解析. 第25回日本エイズ学会学術総会 東京 11.30.2011.

G. 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

謝辞

分析にご協力頂いた日本ウォーターズ株式会社
廣瀬賢治氏及び川瀬 泰司氏に感謝致します。