

（課題名）アミノ酸固定化カラムと神経筋接合部に対する病原性自己抗体

研究分担者 本村 政勝¹ ¹長崎総合科学大学工学部工学科医療工学コース教授
共同研究者 赤石 哲也^{2,3}、池 浩司¹、清水 悦郎¹、吉村 俊祐⁴、青木 正志³、
松尾 秀徳⁵

²東北大学病院 総合診療科、³東北大学大学院 神経内科、⁴長崎大学病院脳神経内科、

⁵国立病院機構長崎病院脳神経内科

研究要旨

グリシン(Gly)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、及び、Protein Aを固定化し、それぞれ1mlカラムを作成して、健常者の血清(n=3)でアフィニティークロマトグラフィー法による溶出実験を行った。その結果、血清5ml (IgG総量約50mg)から、Protein Aカラムの溶出量の平均±標準誤差は24.17±0.70 mg、Trpカラムでは18.31±0.50 mgの順で、IgGが溶出された。免疫電気泳動法(n=3)では、Trp溶出液でProtein A溶出液より薄いIgGバンドが検出され、IgG以外の夾雑タンパク質は検出されなかった。これらの結果より、Trp固定化カラムは、Protein A固定化カラムの約75%の収率で、血清からIgGを精製できることが示された。

A. 研究目的

本研究は、アミノ酸を固定化したアガロース担体カラムと神経筋接合部に対する病原性自己抗体を用いた in vitro・基礎的研究を行い、アミノ酸固定化カラムがどのようにして病原性自己抗体を除去するかを解明する。今日、20種類のアミノ酸のなかでL-トリプトファン(Trp)固定化カラムである選択的血漿成分吸着器イムソバ TR350 が、重症筋無力症 (MG) 患者の血漿交換治療に臨床応用されている (Hirata et al, *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2003)。その作用機序は、Trp が有する疎水性がアセチルコリン受容体 (AChR) 抗体を選択的に吸着すると推測されてきた (Sato et al, *Progress in Artificial Organs*, 1983)。昨年は、20種類のアミノ酸のなかで、Trp 固定化カラムが最も免疫グロブリンを吸着できることが分かった。本年度は、フェニルアラニン(Phe)と Trp, Protein A などの抗体結合たんぱく質で固定化カラムを作成し、健常者の血清を用いて、アフィニティークロマトグラフィー法で免疫グロブリン (Ig) の吸着・溶出実験を行った。

B. 研究方法

本研究は、長崎総合科学大学の倫理委員会の承認を得て行われた。以下に研究方法を簡潔に説明する。

1) アミノ酸固定化カラム作成: グリシン (Gly)、Phe、Trp、及び、Protein A (富士フイルム和光純薬工業株式会社) をアガロース担体、CNBr-activated sepharose 4B (Cytiva) に固定化させて、容量1mlのミニカラムを作成した。
2) アミノ酸固定化カラムの評価: グリシン (Gly)、Phe、Trp、及び、組み換えProtein A (富士フイルム和光純薬工業株式会社) をアガロース担体、CNBr-activated sepharose 4B (Cytiva) に固定化させて、容量1mlのミニカラムを作成した。上記のミニカラムでアフィニティークロマトグラフィー法を行い、IgG/IgA/IgMの溶出能力を評価した。アフィニティー精製の様々な条件を最適化した。その結果、健常者血清 (A) サンプル1mlずつをセファロース担体カラムに5回通して (B1, B2, B3, B4, B5)、その後、洗浄液1mlで5回洗い (C1, C2, C3, C4, C5)、最後に、溶出液1mlで5回溶出した (D1, D2, D3, D4, D5)。それぞれの分画液でIgG・IgA・IgMの濃度を免疫比濁法で測定した。4種類のカラムの吸着量と溶出量を以下の式で求めた。

$$\text{Absorbed IgG/IgA/IgM amount (mg)} = [A] \times 5 - \sum_{i=1}^5 [B_i] - \sum_{i=1}^5 [C_i]$$

$$\text{Eluted IgG amount (mg)} = \sum_{i=1}^5 [D_i]$$

（倫理面への配慮）本研究は、長崎総合科学大学における倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1) アフィニティークロマトグラフィーの結果では、血清 5ml (IgG 総量約 50mg) から、Protein A カラム (吸着量の平均±標準誤差: 21.52±2.66 mg, 溶出量の平均±標準誤差: 24.17±0.70 mg) > Trp カラム (吸着量の平均±標準誤差: 17.23±1.38 mg, 溶出量の平均±標準誤差: 18.31±0.50 mg) > Phe カラム (吸着量の平均±標準誤差: 4.81±1.37mg, 溶出量の平均±標準誤差: 6.37±0.30 mg) の順で、IgG が 1ml カラムあたり吸着され、ほぼ同じ量が溶出された。一方、Gly カラムは、全く吸着・溶出されなかった (表 1)。図 1 からは、Trp 固定化カラムの IgG 吸着・溶出様式 (図 3 の赤線) は、Protein A (図 3 の緑線) より右にずれ、ゆっくりと IgG を吸着し、時間をかけてゆっくり溶出することが判明した。

3) 免疫電気泳動法の結果では、溶出の D2 分画で血清中のタンパク質を同定した (図 2)。その結果、Gly カラムでは検出されるタンパク質はなく、残りのカラムで、Protein A > Trp > Phe の順に、IgG バンドの濃さの程度が検出され、IgG 以外の夾雑タンパク質は検出されなかった (図 4)。これらの結果は、アフィニティークロマトグラフィーの定量結果と一致する。以上の結果より、Trp 固定化カラムは、血清から Protein A 固定化カラムの約 75% の IgG を効率的に精製できることが示された。

D. 考察

1982年に、ポリビニルアルコールを担体としてアミノ酸固定化カラム、IMTR350が臨床開発され (Yamazaki et al, 1982)、その性能が詳細に評価された (Yoshida M, 1998)。Satoらは、IMTR350カラムを用いたバッチ法で、AChR抗体陽性検体の吸着能を検討した (Sato et al, 1983)。その結果、IgGの吸着率 (20-40%) がAChR抗体の吸着率 (60-80%) より低く、AChR抗体が選択的に吸着されると報告した。同時期、欧州では、Protein A固定化カラムの基礎研究が行われた。Protein AとIMTRのin vitro比較実験では、Protein AカラムのIgGおよびAChR抗体の除去は証明されたが、IMTRの有用性は否定された (Somnier, & Langvad, 1989)。2000年以降、日本を中心に、IMTRは、臨床では幾つかの自己抗体病で有用性が報告されてきた (Hirano & Hirata 2017)。しかしながら、その病原性自己抗体を除去するメカニズムは全く解明されていません。その一番の理由は、Trp固定化カラムでの溶出実験が成されてなかったためと我々は考察した。今回、我々は、アガロース担体に直接アミノ酸を固定化し1mlカラムを作成し、アフィニティー

クロマトグラフィー法で、健常者血清で評価した。今回の実験では、Protein A, Phe, Trpの吸着量だけでなく、溶出量も検討し、それぞれの量がほぼ同じ量であった。長年世界中の実験室で使用されているSepharose™ cL-4Bの結合最大容量は16から25mgヒトIgG/ml ゲルとされている。今回の試作のProtein Aカラムの結合最大量は24.17 mgであったことより、実験自体は上手く行っていると考察した。溶出緩衝液に関しても、数種類の緩衝液で検討し、市販されているIgG elution bufferが最も効率よくIgGを溶出できることも分かった。Trp固定化カラムのリガンドTrpが、IgGのどの部位に結合しているのかは、本実験では確認出来ないが、吸着する時間や溶出する時間が、Protein Aよりも緩やかであることが示された。TrpがIgGのどの部位に結合するかは、今後の検討課題と思われる。さらには、免疫電気泳動法によって、IgGバンド以外の他のタンパク質は取り除かれていることが確認できた。最終的には、Trp固定化カラムは、抗体結合蛋白質であるProtein A固定化カラムの約75%のIgGを精製できることを示した。今回の研究成果は、これまでの臨床の有用性を強く支持する結果と思われる。今後は、AChR抗体を始め、各種病原性自己抗体検体を用いて、吸着・溶出実験を行う予定である。

E. 結論

Trp 固定化カラムは、血清から免疫グロブリン G を精製できることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamasaki H, Futamura N, Funakawa I, Kohara N, Yoshimura S, Motomura M. Two Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome Patients with Ameliorated Activities of Daily Living Due to Cholinesterase Inhibitors. Intern Med. 61巻 7号: 1063-1065. 2022.

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | 無し |
| 2. 実用新案登録 | 無し |
| 3. その他 | 無し |

表1 アミノ酸カラムと Protein A カラムにおける免疫グロブリン吸着・溶出能力

IgG	吸着量(mg)の平均±標準誤差	吸着率(%)の平均±標準誤差	溶出量(mg)の平均±標準誤差	溶出率(%)の平均±標準誤差
Gly	-0.53 ± 2.25	-1.51 ± 4.44	0.09 ± 0.02	0.19 ± 0.02
Phe	4.81 ± 1.37	9.87 ± 1.48	6.37 ± 0.3	13.41 ± 1.69
Protein A	21.52 ± 2.66	45.06 ± 3.99	24.17 ± 0.7	51.13 ± 7.77
Trp	17.23 ± 1.38	36.77 ± 6.15	18.31 ± 0.5	38.96 ± 4.52
IgA	吸着量(mg)の平均±標準誤差	吸着率(%)の平均±標準誤差	溶出量(mg)の平均±標準誤差	溶出率(%)の平均±標準誤差
Gly	-0.26 ± 0.18	-2.45 ± 2.04	0.02 ± 0	0.17 ± 0.07
Phe	0.21 ± 0.09	2.22 ± 1.4	0.18 ± 0.06	1.65 ± 0.33
Protein A	1.33 ± 0.44	12.3 ± 1.55	1.32 ± 0.65	11.72 ± 1.17
Trp	0.53 ± 0.39	6.12 ± 4.93	0.7 ± 0.21	6.43 ± 0.93
IgM	吸着量(mg)の平均±標準誤差	吸着率(%)の平均±標準誤差	溶出量(mg)の平均±標準誤差	溶出率(%)の平均±標準誤差
Gly	-0.23 ± 0.24	-7.3 ± 5.24	0.03 ± 0.01	1.58 ± 0.86
Phe	0.47 ± 0.27	18.26 ± 2.07	0.48 ± 0.28	18.87 ± 6.57
Protein A	0.73 ± 0.22	31.78 ± 9.45	0.87 ± 0.42	35.17 ± 4.75
Trp	0.68 ± 0.14	28.65 ± 9.75	0.43 ± 0.22	16.5 ± 3.88

図1 Gly,Phe, Protein A, & Trp 固定化からの溶出実験結果、健常者血清 (n=3)

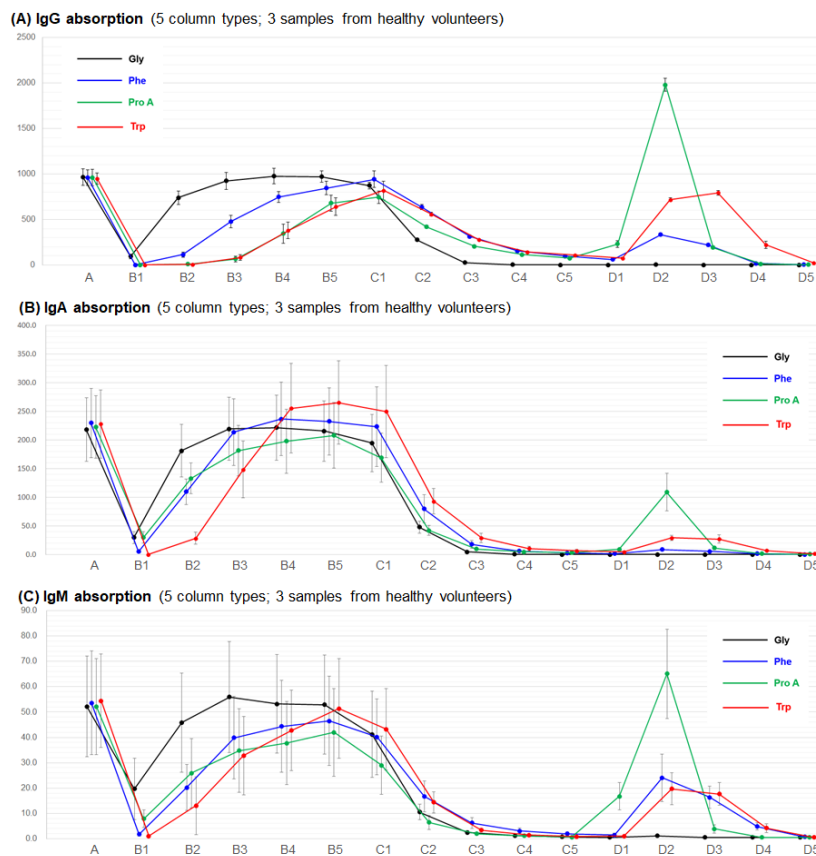


図2 免疫電気泳動検査結果

健常者は3名のA分画と各アミノ酸固定化カラムと protein A 固定化カラムのD2分画で免疫電気泳動法を行った。その結果、Glyカラムでは、全くIgGが精製されず、TrpとPhe固定化カラムでは、Protein A 固定化カラムほど濃くないが、IgGバンドが検出された。

健常者1血清-A



Gly column-D2



Phe column-D2



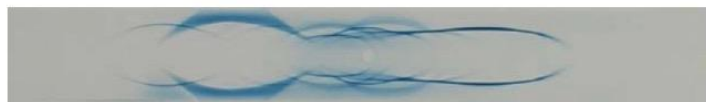
Protein A
column-D2



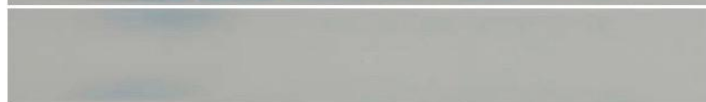
Trp column-D2



健常者2血清-A)



Gly column-D2



Phe column-D2



Protein A
column-D2



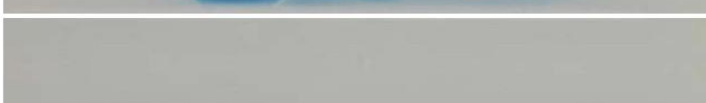
Trp column-D2



健常者3血清-A



Gly column-D2



Phe column-D2



Protein A
column-D2



Trp column-D2

