

細胞培養技術を用いた
日本脳炎ウイルス及びインフルエンザウイルスの
感染防御に関する研究
2008年9月

熊本大学大学院自然科学研究科

複合新領域科学専攻

生命環境科学講座

西山清人

目 次

要旨	1
第1章 緒言	
1-1 人類の進歩と科学技術	5
1-2 バイオテクノロジー応用医薬品の変遷	6
1-3 細胞培養技術を用いた新しいワクチンの研究	10
1-4 参考文献	14
第2章 細胞培養技術を用いた日本脳炎ウイルスワクチンの大量調製と性状解析	
2-1 はじめに	15
2-2 材料と方法	20
2-2-1 セルバンク	20
2-2-2 ウイルスバンク	24
2-2-3 Vero 細胞の大量培養と JEV の生産	24
2-2-4 培養中の工程分析	29
2-2-5 日本脳炎ウイルスの精製	30
2-2-6 不純物の測定	32
2-2-7 Vero 細胞由来及びマウス脳由来ウイルスの性状比較	33
2-3 結果	36
2-3-1 セルバンクの細胞特性・安全性試験	36
2-3-2 ウイルスバンクの性状	36
2-3-3 Vero 細胞由来日本脳炎ワクチンの調製	36
2-3-4 ウイルスの物理化学的・免疫学的性状比較	46
2-4 考察	56
2-5 参考文献	58
第3章 MDCK 細胞由来の新規なプロテアーゼ阻害因子の精製と遺伝子単離	
3-1 はじめに	61
3-2 材料と方法	63
3-2-1 細胞培養とウイルス培養	63
3-2-2 限外ろ過(UF)膜を用いた阻害因子の分画	64
3-2-3 培養上清画分のインフルエンザウイルス増殖阻害活性	64
3-2-4 HA 抗原 ELISA	64
3-2-5 スキムミルクを用いた一元拡散法による阻害活性測定	65
3-2-6 ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)	67
3-2-7 タンパク質含量測定	67

3-2-8	ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィー	67
3-2-9	リバーズザイモグラフィー	69
3-2-10	アミノ酸配列分析のためのウェスタン・ブロット	69
3-2-11	N 末端アミノ酸配列分析	70
3-2-12	逆相カラムクロマトグラフィーによる精製	70
3-2-13	質量分析	70
3-2-14	トリプシン阻害因子;TF B のペプチドマップ	71
3-2-15	トリプシン阻害因子のデータベース検索	71
3-2-16	TF B の遺伝子クローニング	72
3-2-17	精製した阻害因子のウイルス増殖阻害活性の測定	72
3-3	結果と考察	74
3-3-1	培養上清からのウイルス阻害活性の検出	74
3-3-2	限外ろ過膜による培養上清の分画	76
3-3-3	トリプシン活性阻害因子の精製	78
3-3-4	リバーズザイモグラフィー	83
3-3-5	N 末端アミノ酸配列の分析	85
3-3-6	トリプシン阻害因子 (TF B) のペプチドマップ	85
3-3-7	TF B (CKPI) 遺伝子の単離と同定	87
3-3-8	アミノ酸配列比較	93
3-3-9	低分子プロテアーゼ阻害因子のまとめ	93
3-3-10	精製阻害因子のウイルス増殖阻害活性	97
3-4	プロテアーゼ阻害因子開発の意義	98
3-5	参考文献	103
第4章	位相差電子顕微鏡による氷包埋したインフルエンザウイルスの粒子構造解析	
4-1	はじめに	109
4-2	技術的背景	110
4-2-1	ネガティブ染色法と低温電子顕微鏡(氷包埋法)	110
4-2-2	位相差電子顕微鏡	111
4-3	材料と方法	114
4-3-1	ウイルスの増殖と精製	114
4-3-2	ゼルニケ位相差クライオ電子顕微鏡観察	114
4-3-3	ウイルス粒子の計測	115
4-4	結果	115
4-4-1	ウイルス粒子の多形性	115
4-4-2	RNA 分節(リボヌクレオタンパク質複合体)の配置	122

4-4-3	ウイルススパイク	122
4-5	考察	122
4-5-1	ウイルス粒子の多形性	122
4-5-2	ウイルススパイク	123
4-5-3	RNA 分節(リボヌクレオタンパク質複合体)の配置	124
4-6	参考文献	126
第5章 総括		
5-1	細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの開発	129
5-2	インフルエンザウイルスの増殖を阻害する新規プロテアーゼ阻害因子	129
5-3	位相差電子顕微鏡による氷包埋したインフルエンザウイルスの粒子構造解析	131
	謝辞	133

要旨

地球温暖化により、疾病媒介生物がこれまで生息していなかった地域に活動範囲を広げ、その生物が媒介する病気は深刻な問題となっている。また、気候変動との関連性は明らかではないが、新型インフルエンザウイルスの予兆も人類の脅威となっている。本論文では、細胞培養技術を用い、特に培養細胞とウイルスの相互関係に着目した、新しい医薬品の開発研究について論述する。

細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの開発（第2章）

第2章では日本脳炎ウイルスワクチンの製造技術を取上げる。日本脳炎ウイルスは、蚊によって媒介され、ヒトに脳炎を起こすウイルスである。ワクチン接種の普及により、近年国内の発症患者は非常に少なくなった。しかし、依然として飼育豚において抗体上昇が認められ、発展途上国においては、発症者も多い。

従来の日本脳炎ワクチンは、マウス脳内にワクチン製造株を接種して増殖させ、ホルマリンで不活化処理、精製したものである。最近の潮流は、生物学的製剤も技術的に可能ならば外来性感染性因子のリスクを低減した製剤の開発が望まれている。この期待に応えるため、株化細胞（Vero細胞、アフリカミドリザル腎臓由来）を宿主とし、大量培養技術を開発し、感染性因子のリスクを大幅に軽減したワクチンを開発した。その結果、Vero細胞を用いた製造方法で得られたワクチン抗原は、従来製法よりも高純度に精製されていた。さらに、物理学的化学的性状および免疫学的性状について従来製法のマウス脳由来ワクチン抗原と比較検討を行なった結果、従来の抗原と同等の性状を示した。本製造法は簡便なシステムであり、容易に従来品と同等品質で、ワクチン製造をスケールアップできることが示唆された。

インフルエンザウイルスの増殖を阻害する新規のプロテアーゼ阻害因子（第3章）

第3章では、同じく細胞培養技術を用いたインフルエンザワクチンの開発過程におい

て、ウイルスを増殖させる宿主細胞株である MDCK (Madin-Darby Canine Kidney;イヌ腎臓由来) 細胞が培養上清中に分泌するインフルエンザウイルスの増殖阻害を起こす因子を偶然発見した。この因子の精製、遺伝子クローニング、分子性状およびインフルエンザウイルスの増殖阻害作用について論述する。

インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染は、ヘマグルチニン (HA) と呼ばれるウイルス表面の糖タンパク質の活性化に依存しているため、ウイルスの増殖は、培養上清中のトリプシン活性の不活化によって阻害されると推定した。著者らは、培養上清からトリプシンの阻害活性を精製することによって、この阻害活性は 2 種類のトリプシンを不活化する因子により起こることを見出した。各分子の N 末端アミノ酸配列分析の結果、TF A (Trypsin inactivating factor A ; 分子量約 1.5 万) は、イヌの唾液に分泌される顎下腺由来プロテアーゼ (SPI) と呼ばれる既知のプロテアーゼ阻害因子であると同定した。一方、TF B (Trypsin inactivating factor B ; 分子量約 1.1 万) は、これまでに報告のない新規のポリペプチド (CKPI ; canine kidney protease inhibitor と命名) であることが判明した。そこで CKPI について遺伝子単離を行なった結果、酸性プロテアーゼ、whey acidic proteins (WAP) に共通してみられる WAP モチーフ構造を 2 つ保有することから、ヒト SLPI のイヌ類似物質ではないかと推定した。

以上の結果から、MDCK 細胞が分泌するプロテアーゼ阻害因子がインフルエンザウイルスの活性化を阻害することから、この因子を除去、あるいは中和することによって、ワクチンの製造量を改善することが可能で、また、ウイルス感染から宿主細胞を防御するのに適用できることが示唆された。

位相差電子顕微鏡による氷包埋したインフルエンザウイルスの粒子構造解析 (第 4 章)

これまで細胞培養技術や遺伝子組換え技術を用いて生体分子レベルでの各因子の分子間相互作用を見てきたが、様々な局面で分子間の位置関係を直接検討し、その作用を立証するためにはナノレベルの粒子構造解析も重要な手段である。構造解析の結果と物

理的化学的な性状が結びつくことにより、分子レベルの現象が検証されると考えられる。第 4 章では新しい観察手法であるゼルニケ位相差電子顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの粒子構造の解析について論述する。

この新しい電子顕微鏡検査法を用いて、凍結水和状態の A 型インフルエンザ・ウイルスを観察したところ、細胞膜の脂質二重層だけでなく、ウイルス・エンベロープ上の個々の糖タンパク質スパイクも、高コントラストで解像された。ゼルニケ位相差電子顕微鏡観察法は、従来のクライオ電子顕微鏡観察で問題となり得るコントラスト伝達関数による影響のない氷包埋粒子の高コントラスト画像の取得を可能にするため、ウイルスの微細構造を解明する強力なツールであることが示唆された。

第1章 緒言

1-1 人類の進歩と科学技術

科学技術の役割は、人類の情熱とたゆまぬ努力によって得られた自然法則を利用して人類の幸福に役立てることである。これまでに科学技術が人類の物質的幸福を増してきた。例えば農業技術の発展によって、世界的にみると充分ではないが多くの人々に食料の供給が可能となり、飢えは減少した。また医療技術の進歩によって病気で死亡する人は著しく減少するなど学問と科学技術の進展は人類に恩恵をもたらしてきた。

高度な情報化社会となった今日では学術分野において基礎的な学問、物理学、生物学、化学に留まらず、幾つかの基礎学問を融合し、応用的な学問の創出へと伸展した。更に近年では、異種分野の技術吸収、あるいは融合が加速し、多様な新研究領域と新技術が創出されている。人類は独創的なひらめき、またはインスピレーションにより、新たな発見や革新的技術を生み出すことで様々な難題を解決してきた。新たな発見や技術革新というものは、膨大な情報の中から独立した要素を抽出し、それらの要素が意図的あるいは無意識に組み合わせられることによって創出される。また独創とは、新しくて有用な組合せの発見であるとも考えられる¹⁾。技術開発や研究に携わる者は、人類の進歩と発展のため、多くのテーマを独立した断片(要素)に分解し、分析・評価し、多様な組合せの中から、最も有用で美しい組合せを選別する使命がある。独創的な組み合わせの発見によって社会に貢献し、使命感と情熱を持って行動することが出来る。

マクロ的な視点に立って学問する環境科学と分子生物学、生化学といったミクロ的視点に立った学問は異種分野であり、これまで相容れないものであった。しかし、近年においては、一見すると異種分野である組み合わせから、多くの新規な分野が生まれている。今や異種の専門分野を相互に理解し、関連性を模索し、深めることで新領域を創出する時代となった。

私たちにとって、地球環境問題は、まさに国際政治から毎日の衣食住まで、あらゆる人間活動に関わる大きな共通課題となっている²⁾。 筆者は、生物圏の構成員である動物や人間等の有機体レベル、または細胞レベルや分子レベルのようなマイクロな生体環境の中に特有の構造や仕組み（ネットワーク）を解析することが本来の専門分野である。これらマイクロの生体環境の構成要素間の相互作用について理解を深めながら、直接目的としては医療・健康分野に貢献し、間接的には、いま人類が抱えているグローバルな環境問題を解決するヒントが潜んでいないか、また、グローバルに循環する物質³⁾（水、窒素、炭素など）と生物との係わり合いを理解することから、環境を改善する新規な研究分野が創出できないかと考えている。 まず筆者の携わる医薬品の研究開発業務について、社会的意義やその背景を論述する。

1-2 バイオテクノロジー応用医薬品の変遷

1970年代後半からバイオテクノロジー産業の黎明期であると考えられ、多くの基礎的技術の確立が起こった。 分子生物学、生化学分野の目ざましい進展により遺伝子工学や細胞の大量培養技術を用いた創薬が1980年代から始まり、従来生体内にはごく微量しか存在せず、物質として入手が極めて困難であった天然型のホルモン、サイトカイン、酵素などが医薬品のターゲットとなり、天然型分子から遺伝子組換え型分子へと次々に開発競争が起こった。 1970年代半ばにサンガーとギルバートにより開発された遺伝子配列決定法の確立に始まり、1980年代には遺伝子工学は頂点を迎えていた。 またその頃、細胞培養技術においては、古典的な組織培養法から脱却し、培養液の改良技術や細胞の育種技術の確立が進んだ。 また、免疫学という新しい学問の台頭とともにマウスの骨髄腫瘍細胞を用いた雑種細胞の作製技術（細胞融合法）が普及しつつあった。 しかし1990年代に入って、これらの技術の普及がなされたにも拘らず、ごく一部の成功例（EPO、G-CSF、インターフェロン、試薬関係等）を除けば、技術が未成熟

なため課題を解決出来ずに、または技術伝承のみ行われ、応用分野の標的が定まらずに失速していった研究開発テーマも多々あった。殆どのバイオテクノロジー応用医薬品と呼ばれる分野は、この時代に開発の低迷期に入った。多くのアイデアと事業化の構想（例えば RNA のアンチセンス医薬品、抗体のミサイル療法など）が続々と生まれたが、最終的に医薬品として結実したものは少なく、期待はずれの状況が続いていた。

2000 年代に入ると、新しい知見が数多く集まり、安全性のデータも揃ってきた。また、分子生物学ではヒトゲノムの完全解読が終了し、全ての生命現象が説明できるかのように思われたが、ゲノム DNA だけでは説明できない生命現象（例えばエピジェネティクス⁴⁾）が存在することが明らかとなった。さらに最近、この方面では非翻訳領域の RNA 分子に関して注目が集まり、再び RNA の時代が到来した。同様に抗体というものが比較的安全であることが判り、抗体医薬品においてもヒト型化技術を中心としたバイオ医薬品の再活性化も始まっている⁵⁾。あたかも技術革新の波のあとに、少し遅れて産業化の波が訪れるという典型的パターンを描き始めている。最近の医療の創薬分野においては遺伝子操作技術および細胞培養技術によって抗体医薬品の開発が一気に進展した。これまでは低分子の薬剤が中心を担ってきたが、ここ 20 年足らずのうちに抗体医薬品⁶⁾が牽引となって高分子たん白質の医薬品開発へ目が向けられていくだろうと期待されている。

限られた研究室しか実施出来なかった新しい技術が、いまや設備が整っていれば、ルーチンの作業としてどこでも実施可能となった。また、他の技術と結びついて更に進化した技術も出てきた。しかし、技術開発において、私たちが考えておかなければならないことは、あくまで技術は手段であって、新しくても産業化の流れと共に変化していくということ、そして、これらの技術を用いてどのような価値を生み出すのか、私たちがどんな生き方をしようとしているのかを常に考えることである。私たち自らの人生の生き方や価値観を持つことによって、学問や技術が活かされ、技術が私たちに実現

化の手段を与えてくれると考えられる¹⁾。

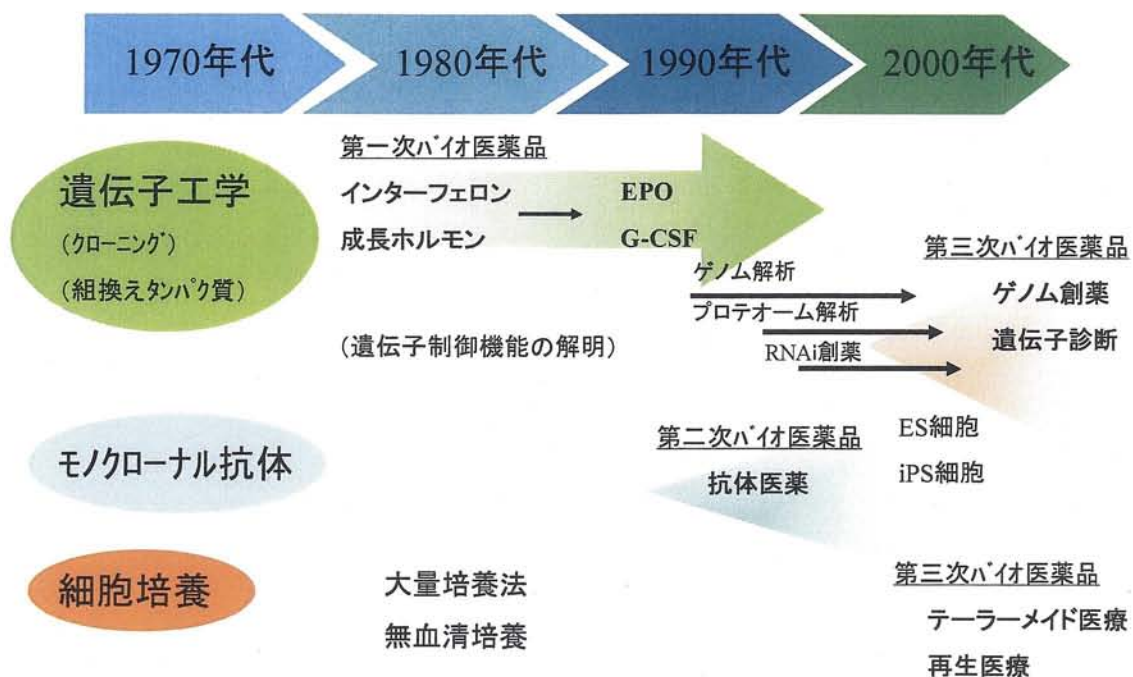


図1. バイオ医薬品開発の変遷

1970年代後半に確立した遺伝子操作技術、免疫学から始まった細胞操作技術（モノクローナル抗体作製法）及び株化細胞の培養技術により、第一次バイオ医薬品が開花した。1990年代より抗体医薬品が牽引となって、第二次バイオ医薬品が開花した。今後は新たな分野として、ゲノム創薬、テラーメイド医療、再生医療、遺伝子診断などが期待されている。

ワクチン開発についても動物を用いた製造方法から脱却し、遺伝子操作技術や細胞培養技術によるワクチン製造へと移行しつつある。

1-3 細胞培養技術を用いた新しいワクチンの研究

前に述べたバイオ産業の中に、ワクチン分野も属するが、少し特異的である。何故なら、多くのバイオテクノロジー応用医薬品が、微生物や細胞を生産の場として利用する点では同じだが、ワクチンの目的は、生体の免疫機構を応用して、病原微生物に対して高等動物に本来備わっている感染防御能を誘導することであるから、複雑な高次構造が必要な場合もある。特に技術的にウイルス培養が困難な場面や危険度が高いウイルスの場合、遺伝子組換え技術を用いたワクチンの開発が行われるが、天然のウイルス抗原に比べ、免疫原性が劣る場合にしばしば遭遇する。一方、多くの古典的なワクチンの場合、大量製造のため動物や鶏卵を用いた製造方法が用いられてきた。もし技術的に培養可能で、危険度が低い場合、生産面でダイレクトに目的のウイルス自体を増殖させた方が、むしろ有効で、生産効率の良い場合が多い。本論文では、筆者がこれまで経験したテーマに基づき、得られた知見や技術を紹介し、様々な性状解析及び有用性探索等、特に動物細胞とウイルスに着目し、予防薬の技術開発、応用研究について論述する。

グローバルな環境問題である地球温暖化により、藻、蚊、ダニなどの疾病媒介生物がこれまで生息していなかった地域にその活動範囲を広げ、新たな感染症が問題となっている。そして人間に接触する確率が高くなり、その生物が増幅する病気はより深刻な脅威となっている。実際この30年間で30ほどの新興感染症が出現していると言われており、また一度撲滅したはずの過去の病原体の中にも、いま再び猛威を振るい始めているものもある⁷⁾。例えば、日本脳炎ウイルスと同じフラビウイルス科の西ナイルウイルスと呼ばれるウイルスは、節足動物(蚊)が媒介し、鳥が増幅動物となって伝播し、ヒトに脳炎を引起すウイルスだが、このウイルスは日本脳炎ウイルスと同様、元々温帯から熱帯を原産とする脳炎ウイルスであったが、地球温暖化により媒介生物と共に活動範囲を広げ、環境に適合し、米国に上陸した。そして、このウイルスは瞬く間に米国

全土に広がり、大きな社会問題となった⁸⁾。

その他にも熱帯に潜んでいたウイルスが温暖化に伴って、私たちの生活圏へ逼り、将来感染症の増加が懸念されている。このような背景から、世界的に見ても、新たな治療薬やワクチン開発の需要が高まっている。

温暖化とは直接的な関連があるかどうかは判らないが、わが国でも毎年冬場に流行する通常のインフルエンザウイルス（シーズン型）は渡り鳥とともに飛来し、季節的な流行を繰り返していることから類推すると、全く関連がないともいいきれない。更に、シーズン型のインフルエンザウイルスとは別に、突発的に人類を襲い、大流行する新型インフルエンザウイルスも地球環境の変動との関連性は否定できない。現在、プレパンデミックと位置づけられる鳥類由来の新型インフルエンザ H5N1 型ウイルスが東南アジアで依然としてくすぶり続けており、鳥からヒトへ感染し、多くの犠牲者を出している。

何時、ヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザウイルスに生まれ変わるのかが懸念され、今や非常に危険な状態にある（WHO はレベル3 のアラート状態と位置付ける⁹⁾）と考えられている。今後、私たちを取り巻く地球環境の変化が引金となって感染症が大流行を引起す可能性は充分考えられる。

第2章では新しい日本脳炎ウイルスワクチンの製造技術について取上げる¹⁰⁾。日本脳炎ウイルスは、西ナイルウイルス同様にヒトに脳炎を起こすことで知られるウイルスである。現在、長年の予防接種が功を奏し、国内では発症患者は非常に少なくなっている。しかし、増幅動物であるブタの抗体保有率は依然として高く、発展途上国においては、まだまだ感染者や死亡例も多い。従来の日本脳炎ワクチンはマウス脳内に日本脳炎ウイルス株を接種して、脳内でウイルスを増殖させ、培養したウイルスをホルマリンで不活化処理して製造したものである。しかし、最近の流れでは、生物学的製剤も、技術的に可能ならば、動物に由来する外来性の感染性因子のリスクを低減した、より安全な生物学的製剤の開発が望まれている。このような期待に応えるため、1997

年頃から鋭意努力し、長年の細胞培養技術の検討を行なった結果、株化細胞（アフリカミドリザル腎臓由来、Vero 細胞）を用いた製造方法でも、日本脳炎ウイルスを大量に増殖可能であることが判ってきた。マウスを用いなくて、株化細胞を宿主として使用することで、ステンレス製大型タンクによる大量培養が可能となり、感染性因子のリスクを大幅に軽減した安全なワクチンを多くの人々に供給できるようになった。この新しい日本脳炎ワクチン製造方法について一連の開発過程を論述する。このワクチンは一度臨床試験を終了し、製造承認申請を行なったが、製剤の安定性に問題があって、継続審査中である。そして、改良型のワクチンで 2008 年より臨床試験が再開される見込みである。

第 3 章および第 4 章はインフルエンザウイルスに関連するもので、第 3 章では、同じく細胞培養技術を用いて作製される新しいインフルエンザワクチンの開発過程において、ウイルスを増殖させる宿主細胞株である MDCK (Madin-Darby Canine Kidney; イヌ腎臓由来) 細胞が培養上清中に分泌するインフルエンザウイルスの増殖阻害を起こす因子を偶然発見した¹¹⁾。この因子の精製、遺伝子クローニング、分子性状およびインフルエンザウイルスの増殖阻害作用について論述する。

これまで哺乳類動物細胞の培養技術や遺伝子組換え技術を用いて生体分子レベルでの各因子の分子間の相互作用を見てきたが、様々な局面で、分子間の位置関係を直接的に比較検討し、その作用を立証するためにはナノレベルの粒子構造解析も重要な手段である。構造解析の結果と物理的・化学的な性状がうまく結びつくことによって、分子レベルの現象が検証されるものと考えられる。第 4 章では世界でも珍しいゼルニケ位相差電子顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの粒子構造の観察について論述する。光学顕微鏡の開発では、1932 年に Zernike により位相差顕微鏡が発明され、1952 年には Nomarski により微分干渉顕微鏡が発明されていたが、電子顕微鏡の世界では位相差板の作製および帯電問題のため、長い間この難題は解決されなかった。しかし自然科学

研究機構、岡崎総合バイオサイエンスセンターの永山國昭博士らはこの難題を解決し、2001年にゼルニケ位相差法¹²⁾を、2002年にはヒルベルト微分干渉法^{13)、14)}をそれぞれ開発した。これらの画期的な技術開発により世界で初めて位相差法による電子顕微鏡観察が可能となった。縁あって、千葉大学真菌医学研究センターの山口正視博士と共同で、氷包埋で固定化したインフルエンザウイルスについて位相差電子顕微鏡による観察¹⁵⁾を行なったので、これについて論述する。

ウイルスから高等生物の細胞に至るまで、多くの生体に多種多様な分子機構、分子間ネットワークが存在する。1990年代までは、自然界に存在する原理原則を理解し、それらの法則に従った医薬品作りが行なわれてきた。当初は限りなく天然型の分子に近づくように設計され、医薬品として応用してきたが、この日進月歩の中で私たちは自然界に存在しない改変分子や希少な生理活性物質を大量に創出し始めている。これは新たな領域に踏み込んだと言えるかもしれない。これらのチャレンジが、人類に本当の幸福をもたらすのかどうか未だ判らないが、過去の遺産を大切に引継ぎながらも、新しい知見と技術を取り入れて前進するほかはないであろう。

ウイルスは太古の昔から、時には宿主に猛威を振るい、時には宿主と共におとなしく振る舞い、人類と共存してきた。近年様々な角度から、ウイルスに関して得られた知見から、感染の防御のみならず、ウイルスの性状や構造を応用したウイルスをナノ粒子の道具として利用する試みも始まっている。

1-4 参考文献

- 1) 竹内均 竹内均の科学的人生論 株式会社同文書院 ISBN4-8103-4059-7
- 2) 門脇仁 環境問題の基本がわかる本 株式会社秀和システム ISBN4-7980-1238-6
- 3) バイオサイエンス研究会 バイオサイエンス オーム社 ISBN978-4-274-20392-3
- 4) Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: Regulation through repression Science 1999; 286(5439): 481-486
- 5) 永山治 (中外製薬) 日本における創薬環境の国際化 バイオサイエンスとインダストリー 2007; 65(5): 36-43
- 6) Yamashita M, Katakura Y, Shirahata S. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody. Cytotechnology 2007; 55:55-60
- 7) アル・ゴア 不都合な真実 ランダムハウス講談社 2007: 172-175 ISBN978-4-270-00181-3
- 8) Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York city area in 1999. The New England Journal of Medicine 2001; 344: 1807-1814.
- 9) WHO による情報・ガイドライン 国立感染症研究所 感染症情報センター ; ホームページ <http://idsc.nih.go.jp/disease/influenza/05pandemic.html>
- 10) Sugawara K, Nishiyama K, Ishikawa Y, Abe M, Sonoda K, Komatsu K, et.al. Development of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine. Biologicals 2002; 30, 4: 303-314
- 11) Nishiyama K, Sugawara K, Nouchi T, Kawano N, Soejima K, Abe S, et al. Purification and cDNA cloning of a novel protease inhibitor secreted into culture supernatant by MDCK cells. Biologicals 2008; 36: 122-133
- 12) Danev R, Nagayama K. Transmission electron microscopy with Zernike phase plate. Ultramicroscopy 2001; 88, 4:243-252
- 13) Danev R, Okawara H, Usuda N, Nagayama K. A novel phase-contrast transmission electron microscopy producing high-contrast topographic images of weak objects. J Biol Phys. 2002; 28: 627-635
- 14) Kaneko Y, Danev R, Nitta K, Nagayama K. *In vivo* subcellular ultrastructures recognized with Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. Journal of Electron Microscopy 2005; 54(1): 79-84
- 15) Yamaguchi M, Danev R, Nishiyama K, Sugawara K, Nagayama K. Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. Journal of Structural Biology 2005; 162: 271-276

第2章 細胞培養技術を用いた日本脳炎ウイルスワクチンの大量調製と性状解析

2-1 はじめに

日本脳炎ウイルス (JEV; Japanese Encephalitis Virus) は、エンベロープを有し、直径 50nm の球状粒子であり、フラビウイルス科のフラビウイルス属に分類される。日本脳炎ウイルスは、1935年に単離された。日本脳炎ウイルスはマウス脳内でよく増殖し、マウス当り 10^9 TCID₅₀ のウイルスが得られる。そのゲノム構造は、約 11 kb の一本鎖+鎖 RNA を持ち、約 100 塩基の 5'非コード領域 - 約 10,000 塩基の一続きのコード領域 (ORF) - 約 500 塩基の 3'非コード領域からなり、ORF 上には 3 種類の構造タンパク質 (C タンパク質; 分子量 13,000、M タンパク質; 分子量約 8,000、E タンパク質 (外被糖タンパク質) ; 分子量 53,000) と 7 種類の非構造タンパク質がコードされている¹⁾。約 3,400 アミノ酸のポリペプチドは、合成される過程で細胞由来の 3 種類のタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) とウイルスタンパク質の 2 種類のタンパク質分解酵素によってプロセッシングを受け、少なくとも 10 種類のタンパク質が完成する (図 1)²⁾。この内、日本脳炎の感染防御で主な役割を演ずる中和抗体の抗原エпитープはウイルスの外被膜中の E タンパク質に存在する^{3),4)}。

このウイルスが引起す日本脳炎は、わが国だけではなく、東アジア、東南アジア、オーストラリア北部⁵⁾など広く分布し、蚊が媒介する感染症である。これらの地域で年間約5万人の感染者があると報告されている。日本ではコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) が媒介し、ブタが増幅動物となっている。この感染症は文字通り、中枢神経系に炎症をもたらす病気であり、大多数の患者では急激な発熱と頭痛を主訴とする。この熱は2、3日で39~40℃或いはそれ以上となる。その他の初発症状としては、食欲不振、全身の違和感、嘔吐、下痢各部位の痛み等がある。第2病日には髄膜刺激症状が強くなり、その後まもなく軽いものでは無欲症状の程度から昏睡に至るまで

の意識障害、筋強剛等の脳症状へと移行する。また項部強直、ケルニツヒ症候が著明になる。発熱1週間ぐらいが病気の極期で、この頃死亡する例が多い。発症した場合、致死率は約30%で、回復した人の50%は神経性の後遺症が残るといわれている⁵⁾。

1967年以降、農業環境の変化（都市近郊の水田の消滅、稲作慣行の変化、稲作用害虫防除剤散布によるコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) の減少、ブタ多頭飼育に伴う立地としての山間部への飼育場の移転など)及び日本脳炎ワクチンの普及に伴って、患者数は急速に減少した⁶⁾。1990年以降、わが国における日本脳炎の発症者数は僅かであるが、中間宿主(増幅動物)である養豚のウイルス抗体保有率は、依然として高い。このことは公衆衛生の観点からワクチン接種の有用性を示唆している。本ウイルスは、蚊の吸血によって伝搬する疾病であり、ヒト-ヒトの感染は起こりえない。保毒蚊に接触しない、あるいは媒介蚊の撲滅が対策として考えられるが、実際的ではない。取り得る唯一の対策はワクチン接種である⁵⁾。

これまで日本脳炎ワクチンはマウスを用いて製造されてきたが、1954年に認可されて以来、改良が重ねられ、その安全性と有効性は確立されている。ワクチンの現製法⁵⁾は、次のようにして行われている。即ち、3~5週のマウスの脳内にウイルスを接種し、脳炎症状を示した死亡直前の脳を採取する。これを緩衝生理食塩水で20%脳乳剤として、その上清をアルコール沈殿法、硫酸プロタミン処理法、高速遠心法等でウイルスを精製し、ウイルス浮遊液とする。ウイルスの不活化にはホルマリンが使用され、不活化が完了したウイルス浮遊液を原液とする。原液を希釈して得た最終バルクには保存剤、安定剤を添加してワクチンが製造される。

しかしマウス脳を用いることに起因したいくつかの問題点を有している。マウス由来の感染性因子の混入を否定できない、マウス脳由来不純物とごく稀に起こる重篤な副反応である急性散在性脳脊髄炎 (ADEM; Acute Disseminated Encephalo-Myelitis) との因果関係を否定できないなどである。一方、原材料採取工程 (マウスへのウイルス接種→発症したマウスの選別→屠殺と脳の吸引)のほとんどが熟練作業員による手作業で

あり大量処理が困難であること、作業員の確保が難しく技術の継承が困難であること、健康マウスの安定供給が将来的に不透明であること、マウス価格の上昇による採算性の悪化、製造に使用したマウスの焼却に伴う環境への負荷など、製造・供給面での問題もある⁷⁾。さらに動物福祉の観点からも、長い間動物を必要としない製造方法の開発が望まれてきた。

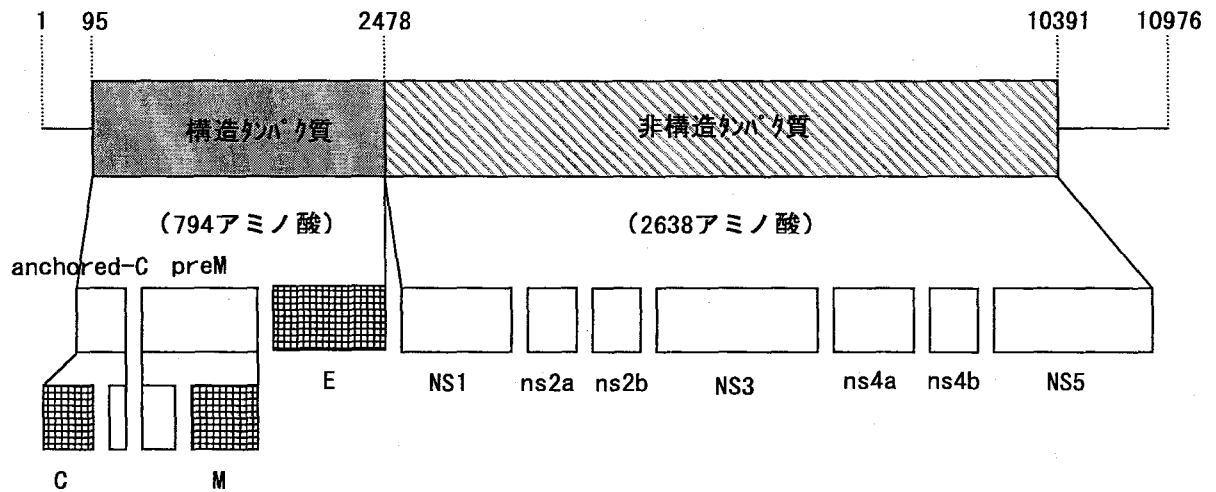


図1. 日本脳炎ウイルスのRNAゲノム構造とタンパク質のプロセッシング
 上段の数字は、RNAゲノムの塩基数を示す。()内は、アミノ酸残基数を示している。日本
 脳炎ウイルスのゲノムは、ウイルス粒子を構成する3つの構造タンパク質として、C (コア)
 タンパク質、M (マトリックス) タンパク質、E (エンベロープ) タンパク質と7つの非構造
 タンパク質 (NS) をコードする。

約3,400アミノ酸のポリペプチドは、合成される過程で細胞由来の3種類のタンパク質分解酵素
 (プロテアーゼ) とウイルス由来の2種類のタンパク質分解酵素によってプロセッシングを受け、
 少なくとも10種類のタンパク質が完成する。このうちE抗原タンパク質はウイルス粒子の外被
 タンパク質であり、重要な感染防御抗原である。

マウスを用いないワクチン開発は、当初、遺伝子組換え技術を用いた方法が期待を集めた。Eタンパク質を大腸菌⁸⁾、酵母⁹⁾、昆虫細胞¹⁰⁾あるいは動物培養細胞で発現させる方法¹¹⁾、さらには組換えワクシニアウイルスを用いる方法¹²⁾などが試みられ、動物実験では有効性が示唆されたが、ウイルスの中和抗体エピトープを形成するのはアミノ酸一次配列ではなく、立体構造で複数のエピトープ¹³⁾が存在することから、前述の抗原製造方法では天然型の抗原性が得られず、具体的な開発には結びついていない。DNAワクチン¹⁴⁾も報告されているが、動物実験に留まっているのが現状であった。これらに対して、米国Acambis社はキメラ弱毒生ウイルスワクチン（ChimeriVax-JE、黄熱病ウイルス17D株のゲノムの一部をJEVのpreM-E領域と置換）¹⁵⁾、¹⁶⁾を開発している。

一方、細胞培養によるワクチン開発については、わが国で1965年に「日本脳炎ワクチン研究会」が結成され検討されたが、当時はワクチン製造用の培養基材として初代培養細胞しか認められず実用化には至らなかった。一方、フランスのPasteur Merieux Connaught社は、1982年にアフリカミドリザルの腎臓由来のVero細胞¹⁷⁾を用いた不活化ポリオワクチンを実用化した。ここで使用したVero細胞は、1962年に千葉大学の安村博士と川喜多博士がアフリカミドリザルの腎臓から樹立した株化細胞である。

同社は、その後、Vero細胞を用いて、生ポリオワクチンと不活化狂犬病ワクチンも実用化し¹⁸⁾、現在までにそれぞれ1億ドーズ、1,000万ドーズ、2,000万ドーズを生産している。これらワクチンの使用実績で、Vero細胞に由来すると思われる副作用の報告はなく、また、1987年にはWHOよりワクチン製造用培養細胞の基準が示され¹⁹⁾、細胞培養によるワクチン開発の環境が整った。国内においてVero細胞を用いた日本脳炎ワクチンの開発については、すでに阪大微生物研究会の石川ら²⁰⁾やSrivastavaら²¹⁾による報告がある。

筆者らは、1997年よりVero細胞での日本脳炎ウイルスの増殖条件などの基礎的な検討を開始し、1999年からは本格的なワクチン開発に着手した。500 Lスケールでの大量製法を確立し²²⁾、²³⁾、動物を用いた毒性試験で安全性を確認した後、2001年12月に第I

相臨床試験を終了し²⁴⁾、2003年から2004年にかけて第Ⅲ相臨床試験を実施した。2005年には製造承認申請を行ったが、液状製剤の安定性が問題となったため、継続審査となった。その後この問題を解決すべく、剤形を凍結乾燥に変更し、2008年より検証的臨床試験を再開予定である。

本章では、マイクロキャリア（微小担体）を用いたVero細胞の大量培養、日本脳炎ウイルスの大量培養と精製及びVero細胞由来日本脳炎ウイルスとマウス脳由来日本脳炎ウイルスとの物理化学的・免疫学的性状の比較について述べる。

2-2 材料と方法

2-2-1 セルバンク

Vero細胞は、ATCC（American Type Culture Collection、米国）より購入し、購入時点での継代数は123代であった。継代と拡張は、5%ウシ血清（FBS, Life Technologies Oriental, Inc.；現インビトロジェン社）を含む199培地（Life Technologies Oriental, Inc.）を用いて行った。150 cm²の培養Tフラスコ（Falcon、ベクトンディキンソン社）30個より、トリプシン消化を行って約10⁹個の細胞を回収した。5% FBSを含む199培地で洗浄後、凍結保存用培地（5% FBSと10% ジメチルスルフォキシドを含むMEM培地）に懸濁した（5×10⁶ cells/mL）。バイアル（Nunc CryoTubes、ナルジェヌンク社）に1 mLずつ分注・凍結し、これをマスター・セルバンク（MCB）とした。凍結時の継代数は、127代であった。

MCB 1本を取り出し、同様の方法で継代・拡張後、継代数130代で凍結した。これをワーキング・セルバンク（WCB）とした。

MCB及びWCBの細胞特性・安全性試験は、米国Tektagen社及び英国Q-One Biotech社にて実施した。

【特性試験】

(1) アイソザイム分析

被験細胞抽出液をサンプルとして、オーセンティキーキットを用いて、Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD), Malate Dehydrogenase (MD), Lactate Dehydrogenase (LD), Nucleoside Phosphorylase (NP)及び Aspartate Amino transferase (AST)の各酵素について電気泳動後の易動度を測定。

(2) 核型分析

細胞をスライドガラス上に固定後、100個の細胞について染色体数を測定。50個の細胞について染色体異常の有無を観察した。また3個の細胞について、核型を分析。

(3) 腫瘍原性試験

4週齢の雌のヌードマウス10匹の皮下に 10^7 個の被験細胞を接種後84日間飼育し、観察。観察期間終了後、接種部位、肺、肩甲骨リンパ節及び肉眼的病変について、剖検と組織病理学的検索を行い、転移の有無を確認。

(4) 形態観察

サンプルを 1×10^5 cells/wellで6 wellプレートに播種し、3-4日後に形態を観察。

(5) 増殖性試験

サンプルを 1×10^5 cells/wellで6 wellプレートに播種し、4日後の細胞数を計測。

(6) 生存率確認試験

WCB調製用に凍結保存チューブを1本取出し、融解時の総細胞数及び生細胞数を血球計算盤で測定し、生存率を求めた。

(7) 日本脳炎ウイルス感受性試験

25cm²のフラスコで培養されたVero細胞にmoi 0.01で日本脳炎ウイルスを接種し、4日後に培養上清中に産生されるウイルス量を測定。

【安全性試験】

(8) 無菌試験

液体チオグリコール酸 (FT) 培地及びSoybean-Casein Digest (SCD)培地にサンプルを接種後、FT培地は30~35°Cで14日間、SCD培地は20~25°Cで14日間培養し、菌の増殖の有無を確認。陽性対照には*S.aureus*、*P.aeruginosa*、*C.sporogenes*、*B.subtilis*、*C.albicans*、*A.niger*を使用。

(9) 結核菌否定試験

Dubos培地及びMiddlebrook 7H10寒天培地にサンプルを接種後、56日間培養し、菌の増殖の有無を確認。

(10) マイコプラズマ否定試験

培養法 (液体培地及び寒天培地 (好気、嫌気)) 及び染色法によりマイコプラズマの有無を確認。陽性対照には*M. orale*、*M. pneumoniae*、*M. hyorhinae*を使用。

(11) 電子顕微鏡観察

細胞をグルタルアルデヒドで固定後、ネガティブ染色を行って透過電子顕微鏡で観察。

(12) 逆転写酵素活性否定試験

①サンプルに鋳型 (poly [rA]・p[dT]又はpoly [dA]・p[dT]) を加え、Mg⁺⁺、Mn⁺⁺及び³²PラベルdTTPの存在下、1時間反応させ、³²PラベルcDNAの合成の有無を確認。陰性対照は鋳型なしを用い、陽性対照にはTEK-1、SMRV及びDNA polymeraseを添加したものを使用。

②サンプルを遠心後、沈殿にdisruption bufferを加えて逆転写酵素 (RT) を抽出し、RNAを鋳型としてRT反応を行なわせる。次いで、鋳型特異的なprimerを加えてPCR反応を行い、経時的に蛍光強度をモニターし、特異産物の増幅の有無を確認 (FPERT法)。陰性対照は逆転写酵素なしを用い、陽性対照にはMLVを添加したものを使用。

(13) *In vitro* ウイルス否定試験

サンプルをMRC-5、RK13、FRhL2及びVero細胞に接種後14日間培養し、細胞変性の有無を観察。Vero細胞の培養上清を更にVero細胞に接種して14日間培養し、細胞変性の有無を観察。培養後の各インジケータ細胞について、鶏、モルモット及びアカゲザル血球との凝集反応を確認。陰性対照は培地を用い、陽性対照にはParainfluenza type 3 virus(ATCC VR281)を使用。

(14) *In vivo* ウイルス否定試験

①動物接種試験

サンプルを乳のみマウスの頭蓋内、腹腔内及び経口接種を行い、14日間観察。生存マウスをホモジネート後、その上清を同様に別の乳のみマウスに接種し、更に14日間観察。

サンプルを離乳マウス及びモルモットの頭蓋内、腹腔内に、更に離乳マウスには鼻内および経口接種を行い、28日間観察。

②発育鶏卵接種試験

サンプルを10~11日齢のSPF発育鶏卵の尿膜腔液内に接種し、3日間ふ卵後、尿膜液について鶏、モルモット及びO型ヒト血球での血球凝集反応を確認した。また、この尿膜液を同様に別の6~7日齢発育鶏卵の尿膜腔液内に接種し、3日間ふ卵後、血球凝集反応を確認。陰性対照は培地を用い、陽性対照にはInfluenza A virus(ATCC)を発育鶏卵に接種して調製した尿膜腔液を使用。

サンプルを卵黄のう内に接種後9日間以上ふ卵し、生存率を確認。また、この卵黄のうを同様に別の発育鶏卵の卵黄のう内に接種し、9日間以上ふ卵後、生存率を確認。

(15) ウシ由来ウイルス否定試験

サンプルをウシ睾丸細胞、ウシ鼻甲介細胞及びVero細胞に接種後21日間培養(7日目、14日目に継代)し、細胞変性の有無を確認。培養後の細胞について、さらに鶏、モルモット及びO型ヒト血球との凝集反応を確認。

サンプルをウシ睾丸細胞及びウシ鼻甲介細胞に接種後21日間培養(7日目、14日目に継

代) し、培養7日目、14日目及び21日目に蛍光抗体法により、Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)、Bovine viral diarrhea virus (BVDV)、Rabies virus、Blue tongue virus type 17、Reovirus type 3、Bovine Parvovirus (BPV) 及びBovine adenovirus (BAV) type 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9の感染の有無を確認。

(16) ブタパルボウイルス否定試験

サンプルをブタ臏丸細胞に接種後21日間培養（7日目、14日目に継代）し、培養7日目、14日目及び21日目に細胞変性の有無を確認し、蛍光抗体法により Porcine parvovirus (PPV) の感染の有無を確認。

(17) PCR試験

①Q-PCR

サンプルより抽出したDNAを鋳型として下記に示すウイルス特異的なプライマーを加えてPCR反応を行い、経時的に蛍光強度をモニターして特異産物増幅の有無を確認。Human immunodeficiency virus Type I and Type II, Human T cell lymphotropic virus 1 and 2, Bovine polyomavirus, Bovine circovirus, Porcine circovirus

②PCR

サンプルより抽出したDNAを鋳型としてSimian immunodeficiency virus (SIV) 特異的なプライマーを加えてPCR反応を行い、特異産物増幅の有無をゲル電気泳動で確認後、さらに³²Pラベルプローブを用いたハイブリダイズ法で特異性を確認。

2-2-2 ウイルスバンク

無血清培地（VP-SFM、Life Technologies Oriental；現Invitrogen社）を用いて、Vero細胞をローラーボトル（850 cm²、Falcon、ベクトンディキンソン社）で培養した。これに現行の Maus 脳由来日本脳炎ワクチンの製造に用いられている JEV 北京-1 株を moi 0.001 で感染させた。感染から 5 日後に培養上清を集め、バイアル（Nunc CryoLine System-CryoTubes、ナルジェヌンク社）に分注後 -70℃ で凍結保存した。次いでこの 1 本を融解し、2-2-4 の 2) に示す方法により感染価を測定した。感染→培養上清ハーベスト→分注・凍結→感染価測定のカイクルを 9 回繰返し、2 サイクル目と 4 サイクル目をそれぞれマスター・ウイルスバンク (MVB) 及びワーキング・ウイルスバンク (WVB) とした。9 サイクル目についても、継代によるウイルスの性状変化を調べる目的で、過継代したウイルス；イクスパンディッド・ウイルスバンク (EVB) として保存した。

MVB と WVB の無菌試験と迷入ウイルス否定試験については、生物学的製剤基準に則って自家で行った。PCR による迷入ウイルス否定試験については、英国 Q-One Biotech 社にて実施した。

C-M-E 領域の塩基配列解析は、日本製粉株式会社にて実施した。シードウイルス、MVB、WVB 及び EVB より、C-M-E に対応する領域を、RT-PCR キット (TaKaRa RNA LA PCR Kit Ver1.1, 宝酒造) と PCR 装置 (PE9700、PE バイオシステムズ社) を用いて調製した。塩基配列の解析は、シーケンシングキット (BigDye Terminator Cycle Sequencing kit、アプライドバイオシステムズ社) と自動シーケンサー (ABI PRISM 377 DNA sequencer、アプライドバイオシステムズ社) を用いて行った。

2-2-3 Vero細胞の大量培養とJEVの生産

1) マイクロキャリア培養技術

現在利用可能なマイクロキャリア培養用のビーズは様々なものが市販されている (表 1) が、過去の多くの使用実績があることから、GE ヘルスケア社の Cytodex1 を選定し

た。 基本的な培養方法については、Cytodex1 の技術資料 「Microcarrier Cell Culture principles & methods」に基づき決定した。 図2 に典型的な培養の流れを示した。 使用した Cytodex1 は架橋デキストランから成る直径 130~200 μm の透明な球状粒子であり、デキストラン基材にはN,N,N-ジメチルアミノメチル基が修飾されており、ビーズ全体が正荷電を帯びている。

このため、細胞とマイクロキャリアを混合すると、まず細胞のマイクロキャリアへの付着が促進される。 付着した細胞は伸展し、やがて分裂・増殖するようになる。 この時、細胞の種類によっては荷電だけでは付着できないものもあり、血清を必要とする。 本研究で用いた Vero 細胞は、血清成分必要とするタイプの細胞であった。

細胞を新たな培養基材へ継代する場合は、トリプシンとEDTAを用いて細胞を剥がし、分散させる。 そして新たな基材を加えて、培養を開始する。

細胞が充分伸展・増殖してから、一旦細胞とマイクロキャリアを血清フリーの培地もしくは緩衝液で洗浄し、無血清培地 (VP-SFM) に切换え、ウイルス接種を行うというのが一連の流れである。

商品名	メーカー	材質	比重 (g/cm ³)	粒子サイズ (μ m)	表面積 (cm ² /g/dry)
Cytodex-1,3 Cytopore-1,2 Cytoline-1,2	GEヘルスケア	架橋デキストラン 多孔性セルロース 多孔性PEシカ	1.03,1.04	131-198	6,000
Biosilon/Nunclon	Nalge Nunc	Nunclone処理 ポリスチレン	1.05	160-300	255
2D MicroHex	Nalge Nunc	ポリスチレン	1.05	125×正六角形	750
SoloHill Microcarriers	SoloHill	ポリスチレン	1.02-1.12	90-212	360-480
CultiSpher-G CultiSpher-S	Percell Biolytica	多孔性セラチン	1.02-1.04	130-380	
HyQSphere	Hyclone SoloHill	ポリスチレン	1.02-1.12	90-212	
ImmobaSil FS,D,HD	Cellon	多孔性シリコン	1.06-1.16	Disk (mm) (0.8×0.3)	50,000
CELL YARD beads	PENTAX	ナイロン+HTP	1.03	200-500	

表1. 現在市販されているマイクロキャリア（微小担体）一覧

現在、入手可能な付着性細胞の培養用マイクロキャリアの一覧を示す。商品名、製造元、マイクロキャリアの材質、比重、粒子サイズ、表面積を示す。斜線欄は情報がないものを示す。使用実績はGEヘルスケア社（旧ファルマシア社）のCytodexシリーズが長く、多くの企業、研究者が使用している。

本研究ではCytodex-1を使用した。Cytodex1は架橋デキストランから成り、マイクロキャリア全体が正の荷電を持っており、細胞を付着しやすい。

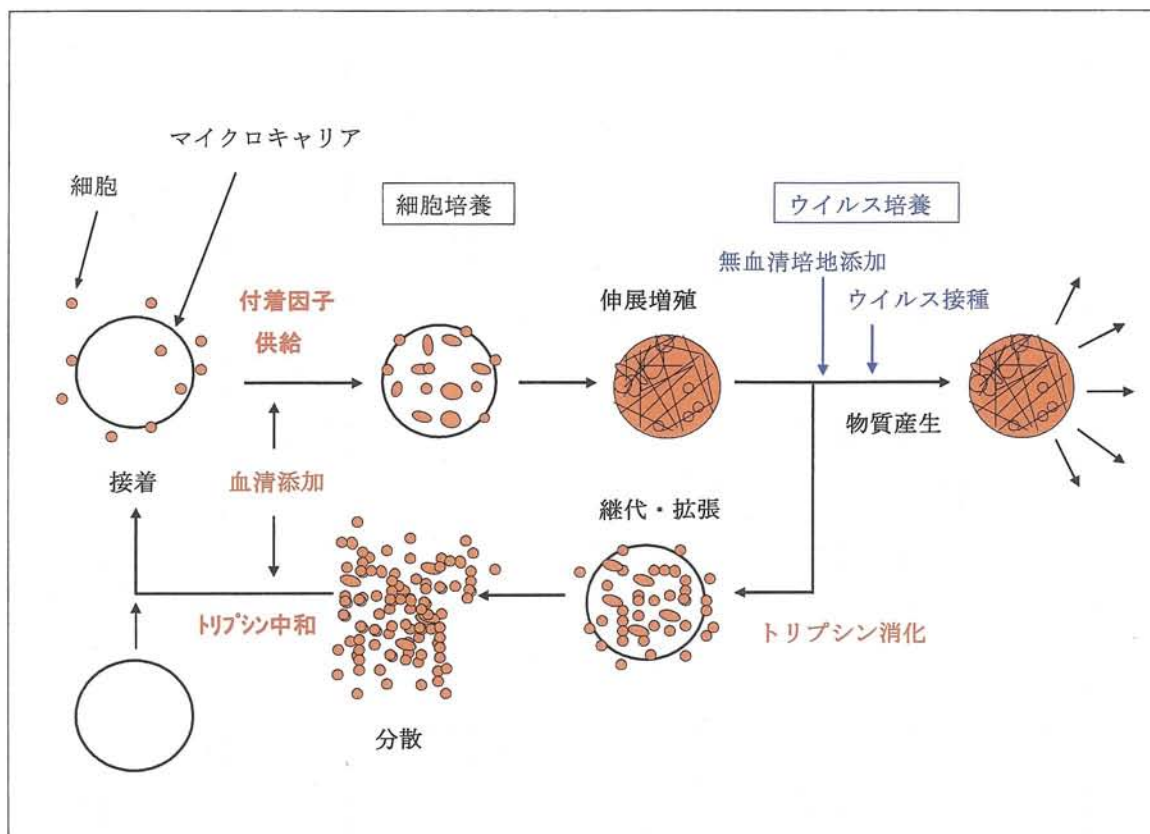


図2. 典型的なマイクロキャリア培養の流れ

細胞とマイクロキャリア混合すると、Vero細胞は約6時間以内にマイクロキャリアに接着するがこの際に血清由来の付着因子必要とする。マイクロキャリアに付着したVero細胞は伸展し、細胞分裂を始めて、増殖する。細胞をフル増殖させ、更に継代・拡張が必要な場合は、トリプシン/EDTAを用いてマイクロキャリアから細胞を剥がし、新たにマイクロキャリアを増量して、再び新しいマイクロキャリアへ付着させて培養する（血清を添加することで、トリプシン活性は中和され、付着因子が供給される）。ウイルス培養を行う場合は、細胞を剥がさず、血清なしの培地または緩衝液で洗浄した後、無血清培地に交換してウイルスを接種する。感染したウイルスは増殖し、接種後3～4日で増殖のピークを迎える。

WCB から拡張・継代する本工程においては培養液に 2~5%の牛血清の添加を行った。培地組成は Vero 細胞の培養に関して一般的な D-MEM 培地をベースとし、2~5%の牛胎児血清を含有する。Vero 細胞は付着依存性の細胞で、単独では浮遊培養できず、ビーズ担体（マイクロキャリア）に付着することから分裂増殖が始まる。Vero 細胞がマイクロキャリアに付着し、増殖を開始する為には、血清由来の成分を必要とし、現在の技術では、必要とされる具体的な血清成分が現在明らかにされていないので、牛胎児血清の添加は必須である。Cytodex 1 の添加量は、製造元の技術資料「Microcarrier Cell Culture principles & methods」に記載の条件に従って設定した（0.2~0.3 w/v% ; 2~3 g/L）。

2) Vero細胞の大量培養とJEVの生産

WCBの1本を融解後、5%FBSを含む199培地を用いて培養フラスコ（25 cm²、Falcon）で培養した。細胞がコンフルエントになったところでトリプシン/EDTA処理により細胞を剥がし、5%FBSを含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Life Technologies Oriental, Inc. ; 現インビトロジェン社）に懸濁し、ローラーボトル（850 cm²、Falcon、ベクトンディキンソン社）に播種した。更にローラーボトル10本に拡張後、同様の方法で細胞を回収し、3 g/Lのマイクロキャリア（Cytodex-1、GEヘルスケア社）を入れた6 L培養槽（BCP-07、エイブル株式会社）に播種した。培地は2%FBSを含むDMEMを用い、培養条件は攪拌数20~40 rpm、温度37°C、pH 7.2-7.5、溶存酸素（DO）は 2 ppmとした。

Vero細胞は約6時間でCytodex-1の表面に接着し、5日後には 2×10^6 cells/mLに達した。拡張の際は、攪拌を止めてマイクロキャリアを沈降させ、培養上清を除いた後トリプシン/EDTA処理により細胞をマイクロキャリアから脱離した。続いて、細胞とマイクロキャリアの混合液を50 L培養槽（村山工業）へ移送し、同様の条件下で培養した。細胞密度を高く保ち、マイクロキャリアへの接着を促進するために、初期の培養は1/2量（25 L）で行い、培養開始後2日目に25 Lの培地を追加した。培養開始後6日目に、

同様の方法により500 L培養槽（村山工業）へ拡張した。細胞密度が $1-2 \times 10^6$ cells/mLに達したところで（通常6日目）、攪拌を止めてマイクロキャリアを沈降させ、培養上清450 Lを除いた後、500 L（250 L \times 2）のDMEMでマイクロキャリアを洗浄した。次いで、WVB 1本を融解後VP-SFMで希釈し、m.o.i. 0.01となるようにウイルス液を培養槽に添加した。1.5時間ゆっくり攪拌してJEVをVero細胞に感染させた後、VP-SFM 500 Lを加えて4日間培養した。

2-2-4 培養中の工程分析

1) 核数計測

培養槽中の細胞数の計測は、核数の計測により行った。培養槽より採取した培養液を静置してマイクロキャリアを沈降させ、上清を除いた後、核抽出液（0.1% Crystalviolet, 0.1% Tween 20 in 0.1 Mクエン酸）を加えて37°C, 30分間インキュベートした。核数は血球計算盤を用いて測定した。

2) 感染価の測定

感染価の測定は、Vero細胞を用いたプラーク法により行った。あらかじめ56°C、30分間非働化した5%FBSを含むDMEMを用いて6-wellプレート（Falcon）でフルシートになるまで培養したVero細胞に、連続希釈した試料を加えて（100 μ L/well）、37°C、1.5時間インキュベートした。次いで、1%メチルセルロース、2%FBSを含むDMEM 3 mLを加えた後、CO₂インキュベーター中で5日間培養した。最後に各wellに10%ホルマリン1.5 mLを加えて室温に1時間放置（不活化）後、細胞を0.0375%メチレンブルー液で染色し、ウイルスのプラーク数を計測した。

3) ELISAによるE抗原の測定

E抗原量は、抗JEVモルモット抗体と中和活性を有する抗JEVモノクローナル抗体 #503²⁵⁾を用いたELISA法により測定した。

モルモットへの免疫は、現行ワクチンを水酸化アルミゲルと共に1週間間隔で5回皮下

投与した後、5回目の接種から4週間後に静注によるブースターを行った。ブースターから2週間後に全採血し、得られた抗血清よりプロテインAアフィニティーカラム (MAPS II、日本バイオラッド社) を用いてIgGを精製した。

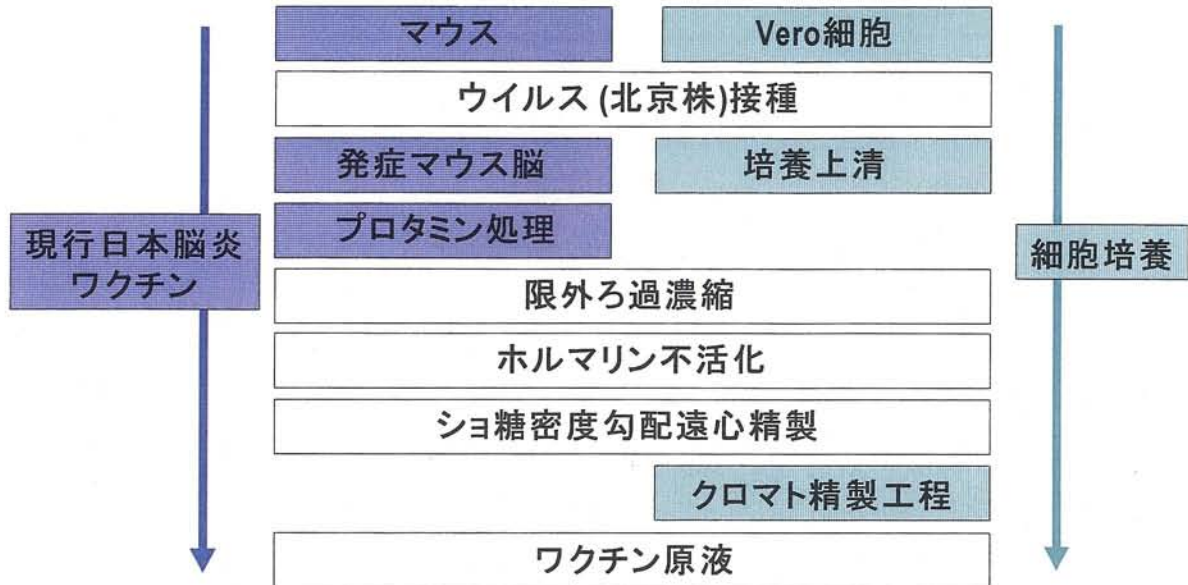
まず、抗JEVモルモットIgG (1 μ g/mL in PBS) をELISAプレート (Nunc Immuno Plate I) にwell当たり100 μ L分注し、室温で一晩放置した。各wellを洗浄液 (0.05% Tween 20 in PBS) で4回洗浄後、1%BSAを含むPBSを分注し (250 μ L/well)、37 $^{\circ}$ C、2時間インキュベートした。次いで、JEVスタンダード (凍乾日本脳炎ワクチン、化血研製) とサンプルを希釈し (希釈液: 0.05% Tween 20, 1% BSA in PBS)、各wellに100 μ L分注して37 $^{\circ}$ C、2時間インキュベートした。4回洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗JEVモノクローナル抗体#503を分注し (100 μ L/well)、室温、2時間インキュベートした。5回洗浄後、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (TMBZ、フナコシ) 溶液を分注し (100 μ L/well)、室温にて発色した。0.3 N硫酸溶液を分注して (100 μ L/well) 反応を停止後、M-Tmaxマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation) を用いて、450 nmにて測定した。

2-2-5 日本脳炎ウイルスの精製

日本脳炎ウイルスの不活化および精製工程は、図3に示す方法で行った。ハーベスト液は、細胞と細胞由来の大きな夾雑物を除くために、1.2 μ mのフィルター (Sartopure PP2, Sartorius AG) でろ過を行った。ろ液は排除限界500 kDaの膜 (Biomax-500, Millipore) と濃縮装置 (Pellicon 2システム, Millipore Corporation) を用いて1/10量まで濃縮した。次いでPBSによる希釈と濃縮を数回繰り返して低分子量の夾雑物を除去した。濃縮液を0.22 μ mのフィルター (Sartobran P, Sartorius AG) でろ過後、ホルマリンを最終濃度0.08%添加して冷房中に3~4ヶ月間静置し、不活化を行った。不活化後のウイルス液は、ゾーナル遠心機 (日立工機株式会社) を用いて30,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、4時間の条件でショ糖密度勾配遠心を行い、ウイルス画分を採取した。次いで10 mM炭酸緩衝液 (pH 9.0) に対して透析後、同緩衝液で平衡化した硫酸化セルロファイブ (生化学工業

株式会社) カラムにアプライした。緩衝液のpHについては、予備的に実施したE抗原ELISAによる安定性試験の結果から、酸性側でELISA値が著しく低下し、アルカリ側の9.0が至適(データは示していない。)と思われたので、炭酸緩衝液を用いた。同緩衝液で洗浄後、吸着したウイルスを0.2 M NaClを含む同緩衝液で溶出した。

A)



B)

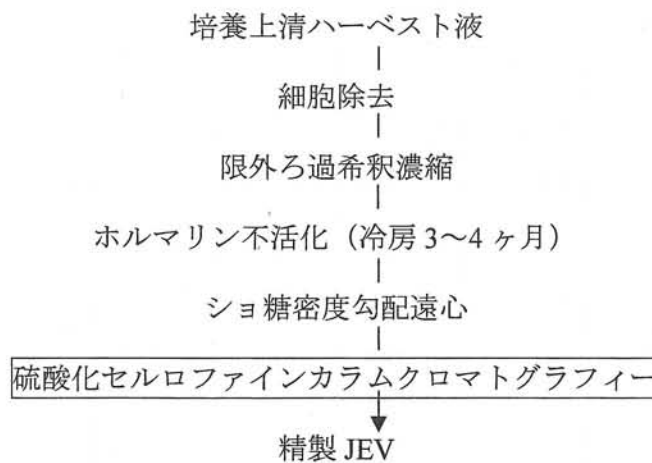


図3. 日本脳炎ウイルス (JEV) の精製

A) に現行のマウス脳を用いる現行日本脳炎ワクチンの製造方法(左)とVero細胞を用いた製造方法(右)の比較を示した。現行法はウイルスの培養基材としてマウスの脳を用いるが、細胞培養法ではVero細胞を使用する。下流の精製工程は、現行法では限外ろ過濃縮及びシヨ糖密度勾配遠心により行われるが、細胞培養法ではこれらに加えて、硫酸化セルロファイナカラムク

ロマトグラフィーを実施している。

B) は、細胞培養法の詳細を示す。培養上清のハーベスト液はポアサイズ $1.2\mu\text{m}$ 程度のMF膜でろ過し、細胞を除去した後、限外ろ過膜による希釈・濃縮を行い、夾雑物を排除した。0.08%ホルマリン（冷房、3~4ヶ月）で不活化した後、ショ糖密度勾配遠心（30,000rpm、 4°C 、4時間）、硫酸化セルロファイナカラムで精製してワクチン原薬を調製した。

2-2-6 不純物の測定

1) ELISAによる宿主細胞由来蛋白（HCP）の測定

精製ウイルス液中のHCPの測定は、抗HCPウサギ抗体と抗HCPモルモット抗体を用いたELISA法により行った。

免疫原としたHCPは、Vero細胞の培養上清を排除限界50 kDaの膜（Biomax-50、日本ミリポア社）で濃縮して調製した。ウサギの免疫は、HCPをFreund's完全アジュバントと共に1回接種後、2回目からはFreund's不完全アジュバントと共に2週間間隔で4回接種した。最後の基礎免疫から4週間後に全採血し、得られた抗血清よりプロテインAアフィニティーカラムを用いてIgGを精製した。モルモットの免疫も同様に行った。

ELISA法による測定は、まず、抗HCPモルモットIgG（ $5\mu\text{g}/\text{mL}$ in TBS）をELISAプレートにwell当たり $100\mu\text{L}$ 分注し、室温で一晩放置した。各wellを洗浄液（0.05% Tween 20 in PBS）で5回洗浄後、5%スキムミルクを含むPBSを分注し（ $300\mu\text{L}/\text{well}$ ）、 4°C 、1晩インキュベートした。次いで、希釈液（5%スキムミルク、0.05% Tween 20 in PBS）で希釈したHCPスタンダードとサンプルを各wellに分注し（ $100\mu\text{L}/\text{well}$ ）、 37°C 、2時間インキュベートした。5回洗浄後、希釈液で $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した抗HCPウサギIgGを分注し（ $100\mu\text{L}/\text{well}$ ）、 37°C 、1時間インキュベートした。5回洗浄後、希釈液で3,000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ウサギIgG（ZYMED Laboratories, Inc.）を分注し（ $100\mu\text{L}/\text{well}$ ）、 37°C 、1時間インキュベートした。最後に、5回洗浄した各wellに、オルトフェニレンジアミン（OPD）溶液（和光、OPD錠を0.006% H_2O_2 in 50 mMクエン酸、pH 5.0に用事溶解して調製）を分注した（ $100\mu\text{L}/\text{well}$ ）。 37°C でインキュベートして発色させた後、 $100\mu\text{L}/\text{well}$ の0.3 N硫酸を分注して反応を停止させ、M-Tmaxマイクロプレ

ートリーダーを用いて、490 nmにて測定した。

2) スロットブロットハイブリダイゼーション法による宿主細胞由来DNAの測定

Vero細胞由来染色体DNAは、Maniatisらの方法により調製した²⁶⁾。

約 10^7 個のVero細胞をProteinase K - SDS処理により溶解後、フェノール-クロロホルム混液により抽出した。染色体DNAをエタノール沈殿で回収後、RNase A（日本ジーン株式会社）処理し、さらに制限酵素Pst I及びEcoR I（宝酒造）で消化した。反応液を再度フェノール-クロロホルム混液により抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収した。このようにして調製したDNAは、スタンダード及びプローブ調製用の鋳型として使用した。ハイブリダイゼーション用のプローブは、市販のキット（Gene Images Random Prime Labeling Module、GEヘルスケア）を用いて調製した。試料からのDNAの抽出は市販のキット（DNA extractor kit、和光純薬）を用いて行った。

ナイロン膜（Biodyne A、日本ポール）にスロットブロッター（Bio-Dot SF、日本ポール）を用いて、スタンダードDNAとサンプルをブロッティング後、前述のプローブを用いてハイブリダイゼーション反応を行った。次に、市販のキット（Gene Images CDP-Star Detection Module、GEヘルスケア）を用いて化学発光反応を行い、発光強度を蛍光イメージアナライザー（LAS-1000 plus、富士フィルム）で測定した。最後に、スタンダードから作成した検量線により、サンプル中の混入DNA量を計算した。

2-2-7 Vero細胞由来及びマウス脳由来ウイルスの性状比較

1) 電子顕微鏡観察

精製JEV溶液を200メッシュの銅網グリッドに乗せ、1%酢酸ウラニルで染色後、電子顕微鏡（JEM 100 CX、JEOL Ltd.；日本電子）で観察・撮影した。

2) ショ糖密度勾配遠心分析

1 mLの精製JEV溶液を20から60%のショ糖密度勾配上に重層し、RPS-40TローターとSCP55H 超遠心機（日立工機株式会社）を用いて、30,000 rpm、4℃、16 時間遠心した。

フラクションを回収し、シヨ糖濃度とE抗原量を測定した。

3) SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析

SDS-PAGEはLaemmli²⁷⁾の方法に従った。

ウェスタンブロットは、SDS-PAGE後ゲル中のタンパク質をPVDF膜（日本ミリポア社）に転写して行った。転写後の膜は、5%スキムミルクを含むPBS（ブロッキング液）で処理した後、ブロッキング液で希釈した抗JEVモノクローナル抗体#503（5 μ g/mL）を1晩反応させた。次いで、膜を洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgG（Bio-Rad）を室温で1時間反応させた。最後に、膜を洗浄後、市販のキット（Immunostain HRP-1000、コニカ）を用いてバンドの検出を行った。

4) 二重免疫拡散法による抗原性の分析

二重免疫拡散法による抗原性の分析は、Ouchterlonyの方法²⁸⁾に従った。

加熱溶解した0.5%アガロース溶液（0.5% アガロース、0.05% NaN₃、3% PEG 6000 in Veronal buffer、pH 7.0）5 mLをスライドガラス（50×75 mm、マツナミガラス）に重層後、静置して固化させた。中心間の距離を1 cmとして直径4 mmの穴を4個空け、それぞれの穴にVero細胞由来JEV及びマウス脳由来JEVとそれぞれに対するモルモット抗体を添加した。湿箱中で37°C、3日間放置し、沈降線を形成させた。抗原及び抗体の添加量はいずれも15 μ Lとした。

5) 力価試験

組織培養日本脳炎ワクチン及び現行ワクチンの力価試験は、生物学的製剤基準²⁹⁾に従った。

4-5週齢、雌、ddyマウスの背部皮下に、PBSで希釈した組織培養日本脳炎ワクチン、現行ワクチン及び参照ワクチン0.5 mLを1週間間隔で2回免疫した。2回免疫1週間後に全採血し、血清は群毎にプール後、56°C、30分間非働化处理した。これらの血清について、2-2-7の6) に示す方法で中和抗体価を測定した。

6) ウイルス中和スペクトル解析

日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるので、CTL等の細胞性免疫の誘導はあまり期待できず、液性免疫による中和抗体価の誘導がウイルス感染の防御に主たる役割を持つ。大谷らの報告では、1回の蚊の吸血により $10^3 \sim 10^4$ マウスLD₅₀/mlのウイルスが体内に入るといわれるが、1:10の中和抗体価があればウイルスの感染を防御できたことから、これが最少有効抗体価だと考えられている³⁰⁾。そこで我々は、長崎大熱帯医学研究所・五十嵐先生より日本、タイ、中国など国内外で分離された種々の野外株および蚊由来の細胞株（クローンC6/36）³¹⁾を分与して頂き、試作ワクチンのマウス免疫血清を用い各ウイルスに対する中和能を検討した。ウイルス中和スペクトルの解析は、Vero細胞由来日本脳炎ワクチン及び現行ワクチンを免疫して得た抗血清の中和能を、患者や感染蚊から分離された様々なJEV株について調べることで行った。

約100 pfu (pfu : plaque forming unit) に希釈したウイルス液を等量の4倍段階希釈した抗血清と混ぜ、37°C、90分間インキュベートした。これをあらかじめ調製したVero細胞に接種後、4-2)に示す方法でプラーク数を計測し、50%プラーク減少法により中和価を計算した。

7) レクチンブロット分析

マウス脳由来ウイルス粒子と Vero 細胞由来ウイルス粒子の構造タンパク質の糖鎖修飾の違いについて比較検討するためにレクチンブロット分析を実施した。ウイルス粒子を SDS 処理後、10-20%勾配のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行った。電気泳動後、ゲルを回収し、エレクトロブロッティング法により PVDF 膜にタンパク質バンドを写し取り、ペルオキシダーゼ標識した各種レクチン（ホーネン社、日本）を反応させ、染色はコニカイムノステイン・キット（コニカ株式会社、日本）に従って行った。

2-3 結果

2-3-1 セルバンクの細胞特性・安全性試験

本研究で使用した MCB 及び WCB については、表 2 に示す項目について試験を行い、ウイルス様粒子、レトロウイルス、ウシ由来ウイルス、ブタ由来ウイルス、細菌・真菌、結核菌、マイコプラズマが陰性であることを確認した。更に MCB については造腫瘍性試験も行い、陰性であることを確認した。迷入ウイルスについては、培養細胞 (Vero cells, MRC-5 cells, RK-13 cells, FRhL2 細胞) 及び動物[マウス (乳飲みマウスと幼弱マウス)、モルモット、発育鶏卵]を用いた試験に加えて、PCR による試験[Simian immunodeficiency virus (SIV) , Human immunodeficiency virus (HIV)-1, HLV-2, Human T cell lymphotropic virus (HTLV)-1, HTLV-2, Bovine polyomavirus, Bovine and Porcine circovirus)]を行い、全て陰性であることを確認した。

2-3-2 ウイルスバンクの性状

シードウイルス、MVB、WVB、EVB に由来する C-M-E 領域の塩基配列は全て一致し、Vero 細胞での継代中の変化はなかった (データ省略)。

表 3 に示す通り、MVB と WVB の無菌試験 (細菌、真菌) 及びマイコプラズマ否定試験については自家で実施し、いずれも陰性であった。迷入ウイルスについては、動物を用いた試験を自家で、PCR による試験 [Simian immunodeficiency virus (SIV)、Human immunodeficiency virus (HIV)-1、HLV-2、Human T cell lymphotropic virus (HTLV)-1、HTLV-2、Bovine polyomavirus、Bovine and Porcine circovirus)] を Q-One Biotech 社で行い、全て陰性であった。

2-3-3 Vero 細胞由来日本脳炎ワクチンの調製

図 4 に、5 L、50 L 及び 500 L 培養槽での Vero 細胞の増殖パターンと 500 L 培養槽での JEV の産生パターンを示す。核密度はウイルス感染後 2 日目まで増加し、その後減少した。

培養液中の感染価及び E 抗原量 (E-ELISA 値) は、それぞれ感染後 3 日目及び 4 日目で最高値を示した。培養液は、感染 4 日後にハーベストした。

試料	試験項目	試験結果
MCB	細菌・真菌否定試験	陰性
	結核菌否定試験	陰性
	マイコプラズマ否定試験	陰性
	電子顕微鏡観察	ウイルス様粒子検出されず
	迷入ウイルス否定試験	
	細胞接種試験 (4 cell lines)	陰性
	動物接種試験	陰性
	PCR	陰性
	ウシ由来ウイルス否定試験	陰性
	ブタパルボウイルス否定試験	陰性
逆転写酵素活性	陰性 (PERT 法においても陰性)	
造腫瘍性試験	陰性	
核型/アイソエンザイム分析	アフリカミドリザル由来であることを確認	
WCB	細菌・真菌否定試験	陰性
	マイコプラズマ否定試験	陰性
	迷入ウイルス否定試験	
	細胞接種試験 (4 cell lines)	陰性
	動物接種試験	陰性

表2. MCB及びWCBの細胞特性・安全性試験

マスター・セルバンク (MCB) 及びワーキング・セルバンク (WCB) の細胞特性試験、安全性試験の試験項目及びその試験結果を示す。細菌・真菌否定試験、結核菌否定試験は培養法によって細菌、真菌、結核菌を検出する方法。マイコプラズマ否定試験培養法による検出系である。電子顕微鏡観察、迷入ウイルス否定試験、逆転写酵素活性はレトロウイルス、不特定のウイルスを検出する試験である。ウシ由来ウイルス及びブタパルボウイルスは培養法による特定ウイルスを検出する試験である。造腫瘍性試験は免疫不全マウスに細胞を接種して造腫原性をみる試験である。核型/アイソエンザイム分析は細胞特性試験 (アフリカミドリザル由来の細胞) に相当するすることを示す試験である。

いずれの試験においても陰性であった。

試料	試験項目	試験結果
MVB	細菌・真菌否定試験	陰性
	マイコプラズマ否定試験	陰性
	迷入ウイルス否定試験	
	細胞接種試験 (4 cell lines)	陰性
	動物接種試験	陰性
	PCR	陰性
WVB	細菌・真菌否定試験	陰性
	マイコプラズマ否定試験	陰性
	迷入ウイルス否定試験	
	細胞接種試験 (4 cell lines)	陰性
	動物接種試験	陰性

表3. MVB及びWVBの安全性試験

マスター・ウイルスバンク (MVB) 及びワーキング・ウイルスバンク (WVB) の試験項目及びその試験結果を示す。細菌・真菌否定試験、マイコプラズマ否定試験はセルバンクの試験と同様。迷入ウイルス否定については、抗体で日本脳炎ウイルスを特異的に中和してから行われた。

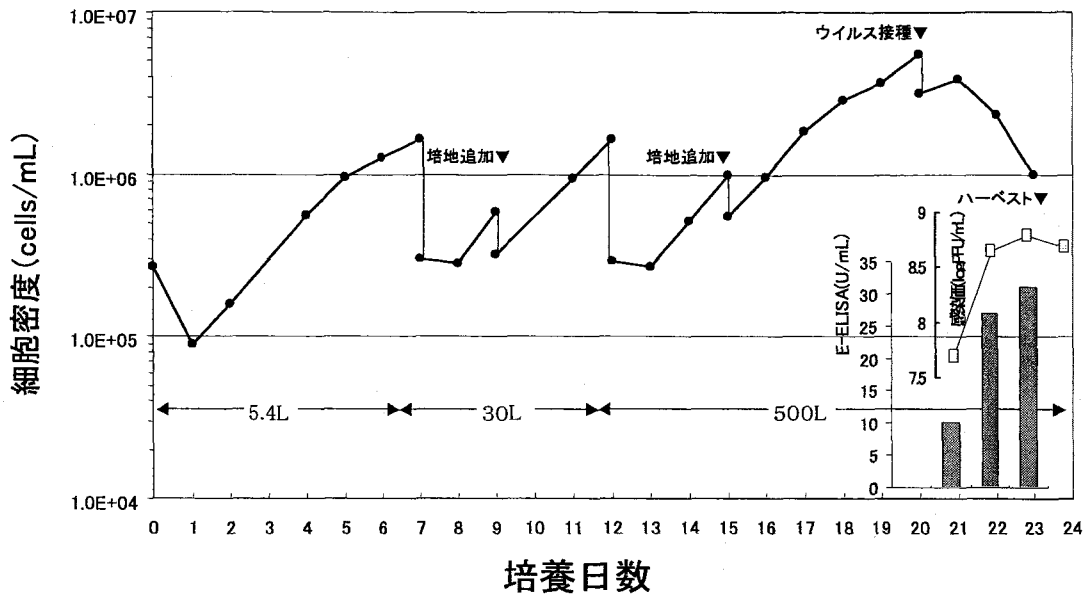


図4. Vero細胞及びJEVの培養

左縦軸は細胞密度を示し、横軸は培養日数を示す。培養は5.4L、30L、500Lの3継代の増殖性を示している。グラフ中の右下の棒グラフにはE-ELISA測定によるE抗原量（ウイルス量；U/mL）を示し、折れ線グラフはウイルス感染価（LogPFU/mL）をプロットしている。培養20日目にウイルスを接種し、23日目に培養上清を回収（ハーベスト）した。

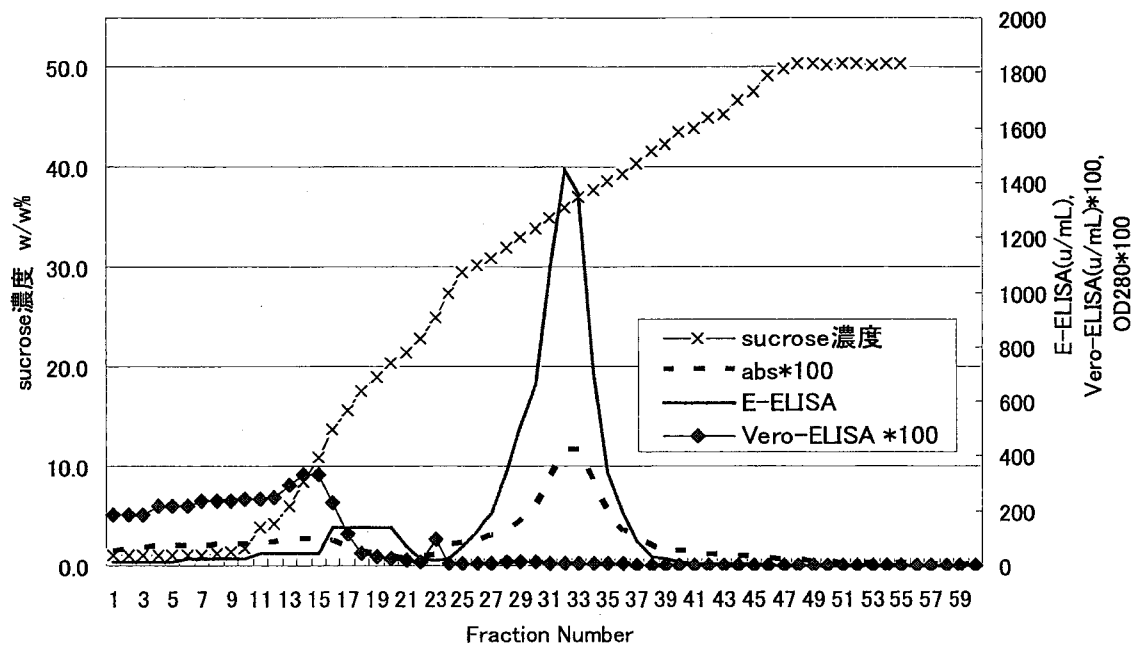


図5. ショ糖密度勾配遠心工程

典型的なショ糖密度勾配遠心の分画パターンを示す。横軸は遠心後の分画した各フラクションの番を示す。太い実線はE-ELISA測定によるE抗原量(右軸; $\mu\text{g/mL}$)を示し、太い破線はOD280nmの吸収値を100倍した値を示す(右軸)。×印プロットはショ糖の濃度(左軸; %, リフラクトメーター測定)を示す。ウイルス粒子のピークはショ糖濃度約38%の画分に集積する。◆印プロットはVero-ELISAによる宿主由来タンパク質含量を100倍した値(右軸; $\mu\text{g/mL}$)を示す。

図5 にシヨ糖密度勾配遠心パターンを示す。 JEVはシヨ糖濃度35%付近に濃縮され、HCPの大部分はシヨ糖濃度の低い部分に浮遊し、JEVから分離された。

図6 には、硫酸化セルロフィンカラムクロマトグラフィーの溶出パターン (A) と各精製工程サンプルのゲルろ過分析 (B) による純度の結果を示す。 ゲルろ過分析の結果から、大部分の低分子夾雑物がシヨ糖密度勾配遠心工程で除去されていること、わずかに残った夾雑物が次精製工程の硫酸化セルロフィンカラムクロマトグラフィーで除去されることが判った。

ここでは、10mM炭酸バッファー (pH9.0) を用いた分離条件でクロマトグラフィーを実施することにより、殆どの宿主細胞由来不純物は硫酸化セルロフィンゲルに吸着せず、一方ウイルス粒子は、選択的にゲルに吸着することで効率よく分離された。

表4 にVero細胞由来精製JEV 3バッチ (A、B、C) について行った含有不純物の測定結果を示す。 精製JEV 1 mg当たりのHCP及びDNA含量は、それぞれ159.7±19.60 pg/mg 及び223.0±41.39 ng/mgであった (3バッチの平均値)。

不純物	バッチ番号			平均±SD
	A	B	C	
DNA (pg/mg)	176	254	239	223.0±41.39
HCP (ng/mg)	162	139	178	159.7±19.60

表4. 精製JEV中の宿主由来不純物含量

宿主Vero細胞由来DNA含量の測定はスロットプロットハイブリダイゼーション法により行った。また宿主Vero細胞由来タンパク質 (HCP; Host Cell Proteins) の測定は、抗HCPウサギ抗体と抗HCPモルモット抗体を用いたELISA法により行った。

A.

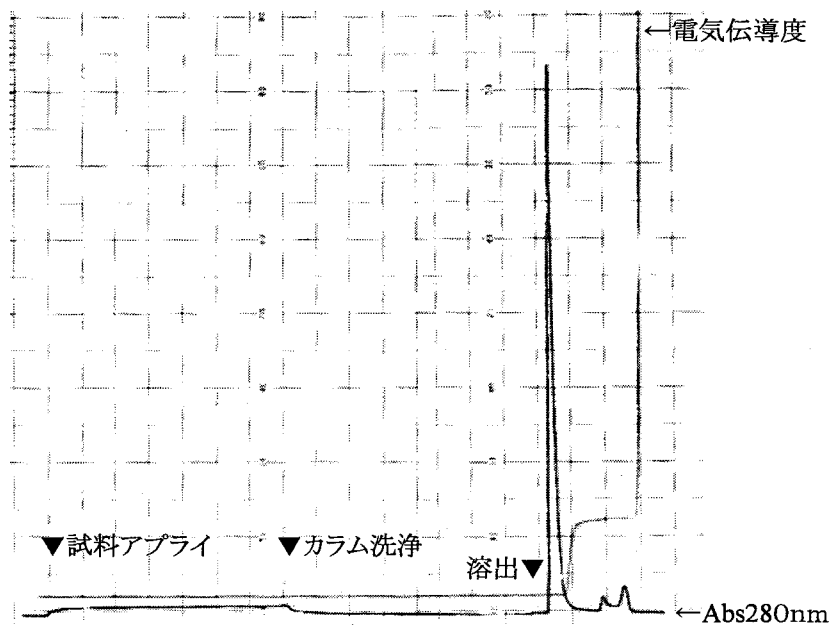


図6. 硫酸化セルロファインカラムクロマトグラフィー
(A) 硫酸化セルロファインクロマトグラフィー精製工程

B.

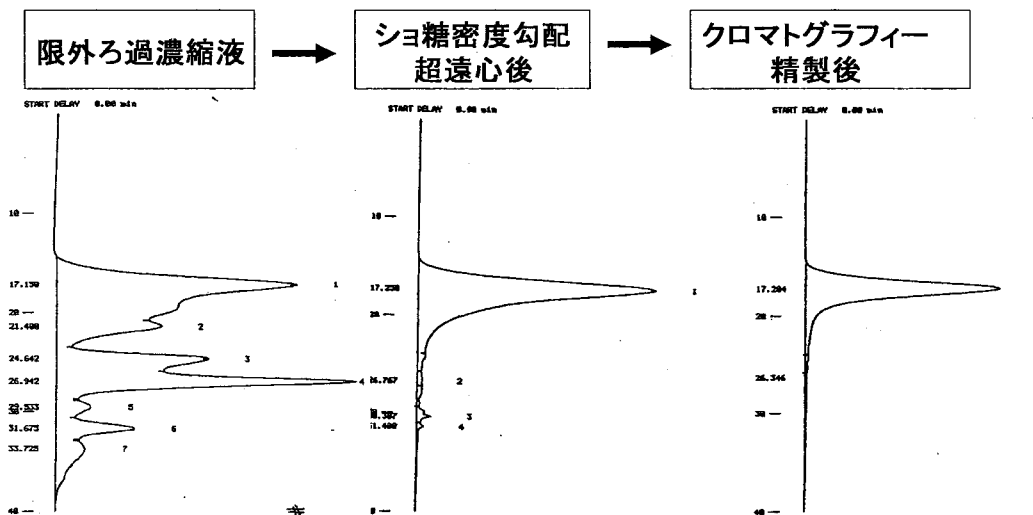


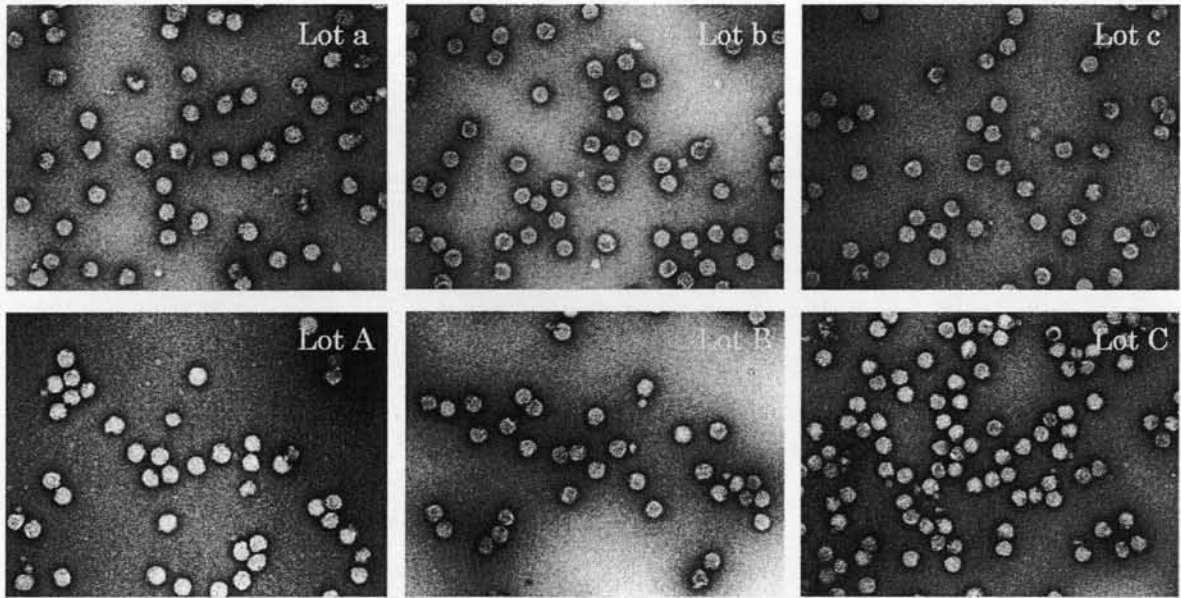
図6. 硫酸化セルロファインカラムクロマトグラフィー
(B) 硫酸化セルロファインクロマトグラフィーを用いた精製工程の効果(HPLC)

シヨ糖密度勾配遠後の試料を硫酸化セルロファインカラムにアプライした結果を示す。Aはクロマトグラフィーの溶出パターンを示したものである。横軸は時間経過を示し、試料アプライからカラム洗浄までが素通り画分を示している。吸着ウイルスは僅か0.2M塩化ナトリウム含有炭酸緩衝液で溶出する。

Bは限外ろ過濃縮工程試料、シヨ糖密度勾配遠心後試料、硫酸化セルロファインカラムクロマト

後試料の3つの試料をゲルろ過HPLC分析の結果を示した。クロマトグラフィー精製後単一ピークとなった。

マウス脳由来抗原



Vero細胞由来抗原

図7. 電子顕微鏡観察

1%酢酸ウラニルで染色後、電子顕微鏡 (JEM 100 CX, JEOL Ltd.; 日本電子) で観察・撮影した。上段Lot a～cは、マウス脳由来のウイルス粒子の異なる3ロットの電子顕微鏡写真を示す。下段Lot A～Cは、Vero細胞由来のウイルス粒子、異なる3ロットの電子顕微鏡写真を示す。いずれも直径約47nmの球状の粒子として観察され、形状、大きさについて現行ワクチンと細胞培養ワクチンに差は認められない。

2-3-4 ウイルスの物理化学的・免疫学的性状比較

Vero細胞由来JEV (A, B, C) 及びマウス脳由来JEV (a, b, c)、3バッチずつについて、電子顕微鏡観察、シヨ糖密度勾配遠心分析、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析及び二重免疫拡散法による抗原性の比較を行った。また、Vero細胞由来及びマウス脳由来ワクチンについては、力価試験及びウイルス中和スペクトルの比較を行った。

1) 電子顕微鏡観察

図7 に透過型電子顕微鏡像を示す。Vero細胞由来JEV及びマウス脳由来JEVはいずれも均一な球状であり、それぞれの直径は 46.7 ± 0.19 nmと 46.7 ± 0.43 nmであった。

2) シヨ糖密度勾配遠心分析

図8 にシヨ糖密度勾配遠心パターンを示す。分析した全てのJEVはシヨ糖濃度43%付近にピークを形成した。この結果はこれらのJEVの形と密度が同様であることを示している。

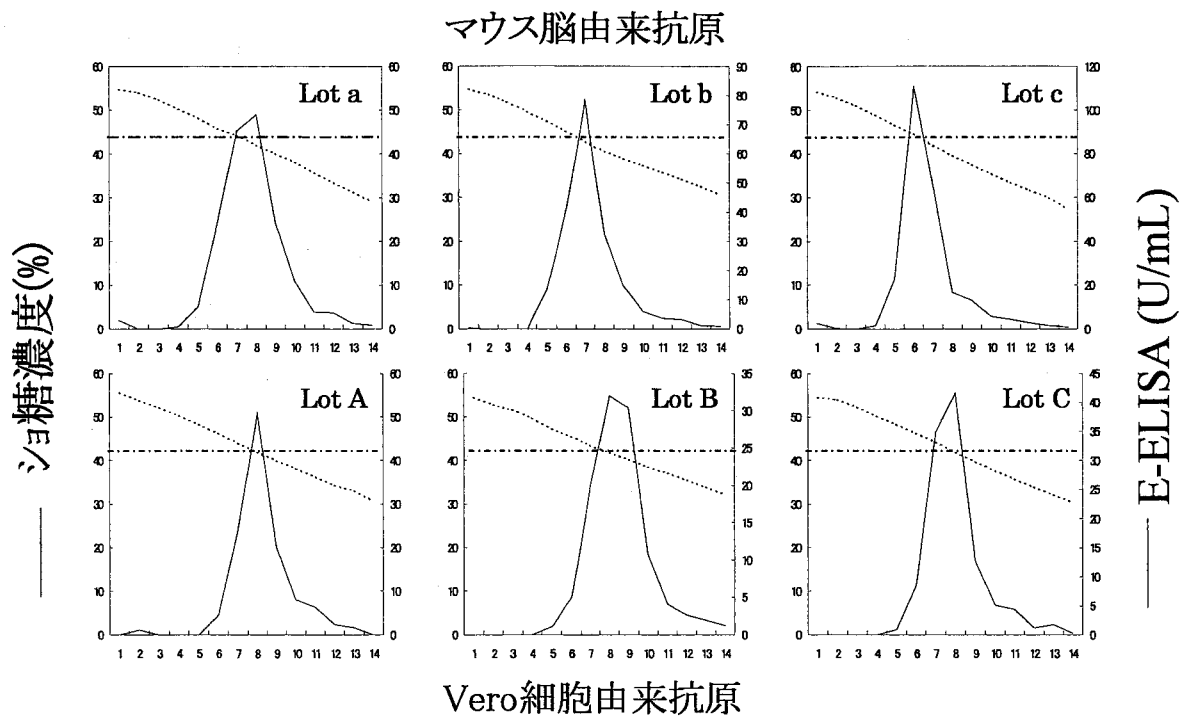


図8. ショ糖密度勾配遠心分析

分析的ショ糖密度勾配遠心分析の結果を示す。1 mLの精製JEV溶液を20から60%のショ糖密度勾配上に重層し、RPS-40TローターとSCP55H 超遠心機を用いて、30,000 rpm、4°C、16 時間遠心した。フラクション（横軸、No.1~14）を回収し、ショ糖濃度（左軸、点線）とE抗原量（右軸、実線）を測定した。上段Lot a~cは、マウス脳由来のウイルス粒子の異なる3ロットを示す。下段Lot A~Cは、Vero細胞由来のウイルス粒子、異なる3ロットを示す。いずれもショ糖濃度が約43%に集積し、ピークを形成した。

3) SDS-PAGE分析

図9 にSDS-PAGEパターンを示す。バンドの同定は、各バンドのN末端アミノ酸配列分析及び測定分子量と理論分子量（Eタンパク質: 53 kDa, Cタンパク質: 12 kDa, Mタンパク質: 8 kDa）との比較で行った。11.6 kDa、23.2 kDa及び34.8 kDaのバンドは、それぞれCの単量体、二量体、三量体と考えられた。29 kDaのバンドはE蛋白の分解物のN末側断片（En）と考えられた。17 kDaのバンドは、N末端アミノ酸配列分析ではCに相当する配列が検出されるものの、分子量が理論値に合わないことより未同定バンドXとした。

Vero細胞由来JEVとマウス脳由来JEVとで、主なバンドについては同様のパターンであったが、マイナーなバンドについては違いが見られた。マウス脳由来JEVにはVero細胞由来JEVでは見られない数本のマイナーバンドが見られた。

4) ウェスタンブロット分析

図10 にウェスタンブロット像を示す。泳動は5-20%ゲルを用いて非還元条件下で行った。抗体は抗JEVモノクローナル抗体#503を用いた。#503はE蛋白上のconformational epitopeを認識する。Vero細胞由来JEVとマウス脳由来JEVは#503に対して同様の反応性を示した。詳細に観察すると、E蛋白は両方とも近接した2本のバンドで構成されている。これらの相違は糖鎖のheterogeneityに由来するものと考えられる。

5) 二重免疫拡散法による抗原性の分析

図11 に二重免疫拡散法によるゲル内沈降反応像を示す。

Vero細胞由来JEV（V）と抗V抗体及びマウス脳由来JEV（M）と抗M抗体との間に形成された沈降線が完全に融合したことから、両抗原の抗原性及び免疫原性に違いのないことが示された。

6) 力価

表5 に力価試験の結果を示す。Vero細胞由来日本脳炎ワクチン及び現行ワクチンは、いずれも参照ワクチンを上回る力価を示し、生物学的製剤基準に適合した。

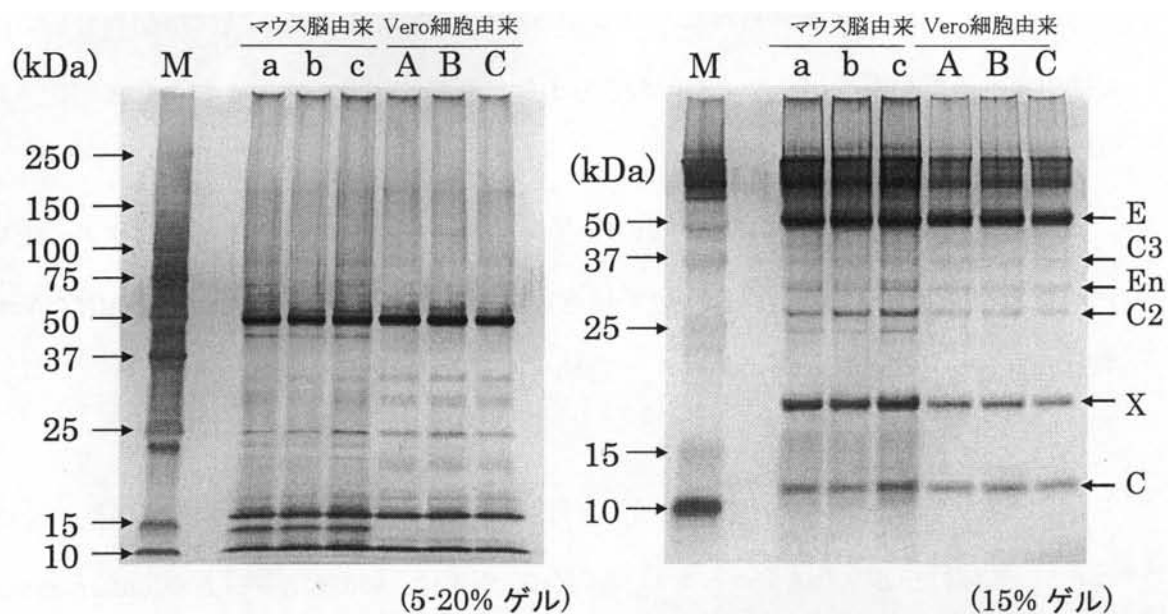


図9. SDS-PAGE分析

Mは分子量マーカー、a, b, c はマウス脳由来のウイルス粒子、異なる3Lotを示し、A, B, C は細胞培養由来のウイルス粒子、異なる3Lotを示す。E; E抗原タンパク質、C; C (コア) タンパク質、C2、C3はそれぞれ、Cタンパク質の2量体、3量体と考えられた。En; E抗原タンパク質の分解物、X; 未同定のバンドを示す。

条件;5-20% ゲル, 非還元, anti-E MoAb #503 (中和モノクローナル抗体)

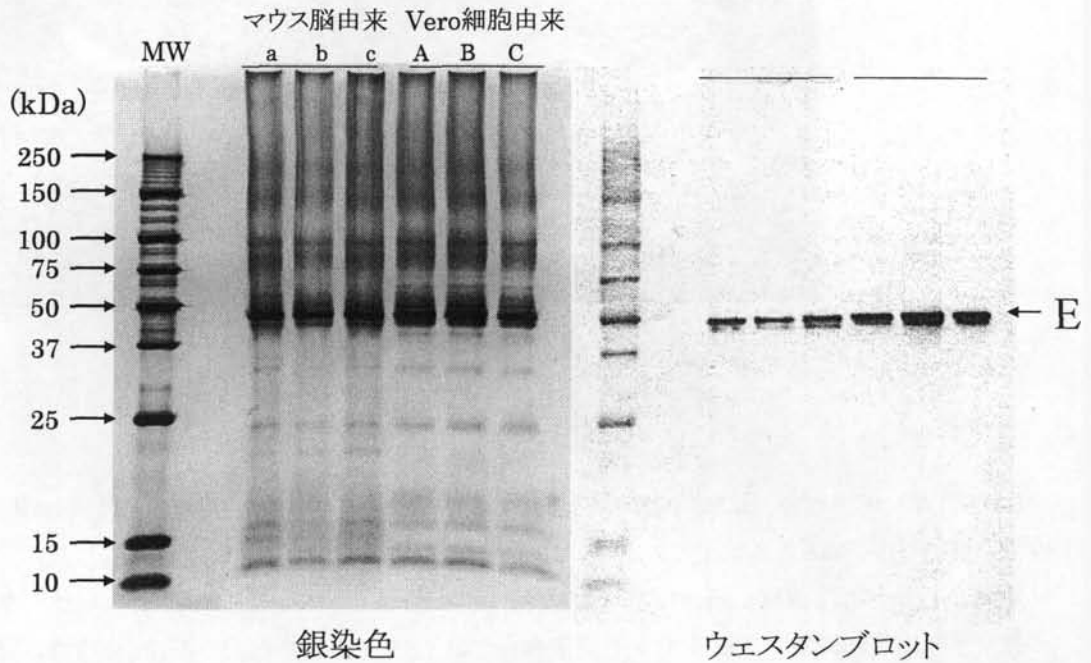


図10. ウェスタンブロット分析

MWは分子量マーカー、a, b, c はマウス脳由来のウイルス粒子、異なる3 Lotを示し、A, B, C は細胞培養由来のウイルス粒子、異なる3 Lotを示す。抗E抗体 (#503) は中和モノクローナル抗体であり、立体構造エピトープを認識するため、非還元でSDS-PAGEを行い、電気泳動後PVDF膜にタンパク質を転写して、抗体を反応させた。E; E抗原タンパク質バンドの位置を示す。バンドは僅かに2重に見えるが、糖鎖構造の違いで分子量が異なるものが存在すると考えられた。

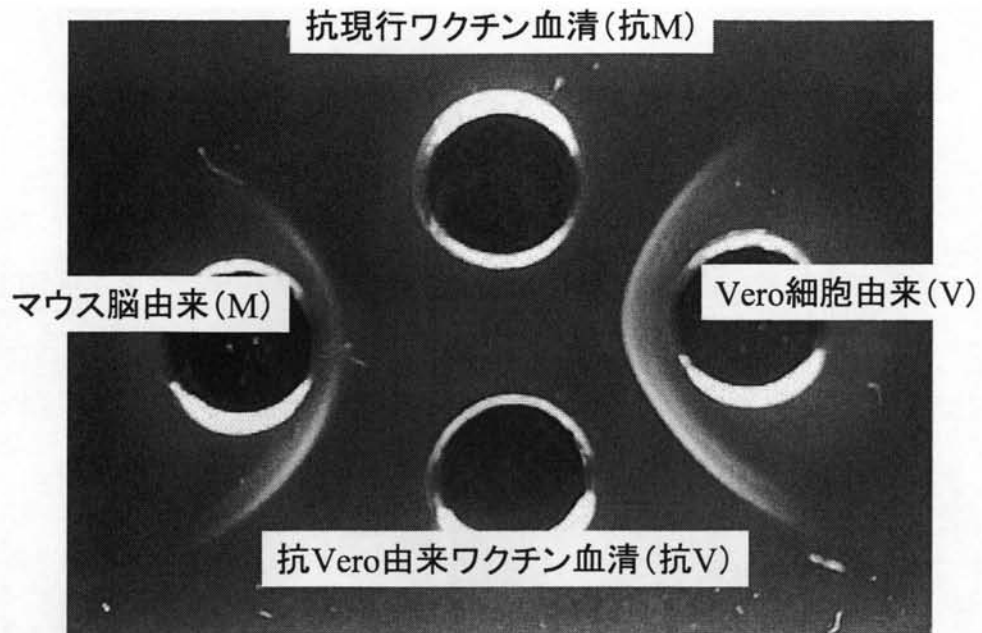


図11. 二重免疫拡散法

0.5%アガロースゲル (0.5% アガロース、0.05% NaN_3 、3% PEG 6000 を含むペロナール緩衝液 (pH 7.0)) 5 mLをスライドガラス (50×75 mm、マツナミガラス) 上に作製した。中心間の距離を1 cmとして直径4 mmの穴を4個空け、それぞれの穴にVero細胞由来JEV及びマウス脳由来JEVとそれぞれに対するモルモット抗体をいずれも15 μL 添加した。湿箱中で37°C、3日間放置し、免疫沈降線を形成させた。抗MとVの間に形成される免疫沈降線と抗VとVの間に形成される免疫沈降線は融合している (右)。同様に、抗MとM及び抗VとMの間の免疫沈降線も融合している (左)。

ワクチン		ウイルス中和価 (log10)	
Vero 細胞由来	#004	2.85	[2.25]
	#005	2.87	[2.31]
マウス脳由来	#038	2.74	[2.25]
	#039	2.33	[2.31]

[]: 参照ワクチン

チン

表5. Vero細胞由来及びマウス脳由来JEワクチンの力価

現行ワクチンの力価試験は、生物学的製剤基準²⁹⁾に従った。各ワクチンをマウスに免疫し、得られた抗血清を用いて50%プラーク減少法でウイルス中和価を測定した。各ワクチン2ロットず

つ比較しているが、Vero細胞由来ワクチンの方がやや高い傾向が示された。

7) ウイルス中和スペクトル解析

図12 にウイルス中和スペクトルの解析結果を示す。 Vero細胞由来日本脳炎ワクチンを免疫して得た抗血清及び現行ワクチンを免疫して得た抗血清は、何れの野外株に対しても 10^2 以上のウイルス中和価を示し、広い中和スペクトルを有することがわかった。すなわち両ワクチンで惹起される抗体の中和スペクトルは同等であった。

8) レクチン反応性

表6にレクチンプロットの結果を示す。DBA、PNA、UEA-Iについては、両方とも反応性がなく、ConA、LCA、PHA-E4では反応性に差異はみられなかった。RCA120とWGAにおいて反応性に差異が認められた。RCA120は非還元末端のGal β 1-4GlcNAc構造を認識し、WGAは3~4分子のGlcNAcを認識することから、この糖鎖末端の分岐数に若干の差があり、Vero細胞由来の方が、糖鎖分岐の多いことが推察された。

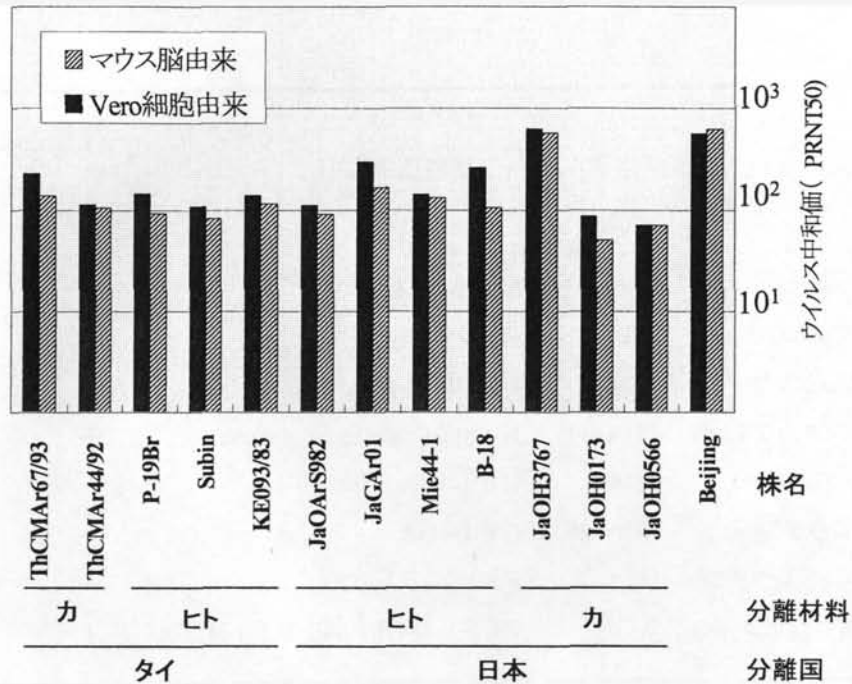


図12. 野外株に対する中和能の比較試験

ウイルス中和スペクトルの解析は、Vero細胞由来日本脳炎ワクチン及び現行ワクチンを免疫して得た抗血清の中和能を、患者（ヒト）や感染蚊（カ）から分離された様々なJEV株について調べることで行った。日本、タイ、国内外で分離された種々の野外株および蚊由来の細胞株（クローンC6/36）を用いて、試作ワクチンのマウス免疫血清を用い各ウイルスに対する中和能を検討した。Beijing（北京）はわが国のワクチン製造株である。

約100 pfu（pfu：plaque forming unit）に希釈したウイルス液を等量の4倍段階希釈した抗血清と混ぜ、37℃、90分間インキュベートした。これをあらかじめ調製したVero細胞に接種後、プラーク数を計測し、50%プラーク減少法により中和価を計算した。

レクチン	略称	糖鎖認識部位	レクチン反応性	
			マウス脳由来	Vero細胞由来
コンカナバリンA	ConA	M α 1-6(M α 1-3)M	±	±
ドリコスマメレクチン	DBA	GA α 1-3GA	—	—
レンチルレクチン	LCA	F α 1-6GL-Asn, α -D-M	+	+
インゲンマメレクチン	PHA-E4	N-linked bi-antennary sugars	+	+
ピーナッツレクチン	PNA	G β 1-3GA	—	—
ヒママメレクチン	RCA120	G β 1-4GA	+	++
ハリエニシダレクチン I	UEA- I	F α 1-2G β 1-4GL	—	—
小麦胚芽レクチン	WGA	GL β 1-4M β 1-4GL β 1-4GL,Sia	++	+

表6. レクチンブロットにおけるレクチン反応性

ウイルス粒子をSDS処理後、10～20%濃度勾配のポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動後、ゲルを回収し、エレクトロブロットティング法によりPVDF膜にタンパク質バンドを写し取り、ペルオキシダーゼ標識した上記8種類のレクチン（ホーネン社）を反応させ、染色はコニカイムノステイン・キット（コニカ株式会社）に従って行った。

表中には、レクチンの一般名称、略称、糖鎖の認識部位、マウス脳由来ウイルス及びVero細胞由来ウイルスとレクチンとの相対的反応の強さを示した（—；殆ど反応しない、±；やや反応する、+；反応する、++；強く反応する）。

F；フコース、G；ガラクトース、M；マンノース、GA；N-アセチルガラクトサミン、GL；N-アセチルグルコサミン、Sia；シアル酸（N-アセチルノイラミン酸）

2-4 考 察

現行ワクチンは50年の使用実績があり、その安全性と有効性は歴史的にも証明されている。しかしながら冒頭でも述べた通り、マウス脳を用いることに起因した様々な問題を有していることも事実である。この問題を克服するために、筆者らは組織培養という方法でアプローチし、500 Lスケールでの製法を確立した。また、Vero細胞由来JEVとマウス脳由来JEVとの物理化学的及び免疫学的性状を様々な方法で比較し、その同等性を検証した。

本製法で得られたVero細胞由来JEVは高度に精製されており、HCP及びDNAの混入量はそれぞれ 159.7 ± 19.60 ng/mg および 223.0 ± 41.39 pg/mgであった。DNAの混入量は1投与量当たり数pgに相当し、WHOの勧告(10 ng/dose)³²⁾を十分に満たしている。HCP含量については統一された見解はないが、1投与量当たり数ngに相当し、安全性上十分に許容できるレベルと考えられる。

Vero細胞由来JEVの形状、大きさ、密度は、電子顕微鏡観察及びショ糖密度勾配遠心分析で示されたようにマウス脳由来JEVと同等であった。ウイルス構成蛋白の組成については、SDS-PAGE分析で示された通り、マウス脳由来JEVに見られる数本のマイナーバンド以外はほぼ同等であった。これらマイナーバンドについては、抗JEV抗体及び抗マウス脳抗体のいずれにも反応せず同定には至っていない(データは示していない)。本研究で用いたJEVはホルマリンによる不活化処理を経ている。ホルマリンは蛋白同士のクロスリンクを起こすことが報告されており³³⁾、これがC蛋白の二量体、三量体生成の原因と推測される。E蛋白の抗原性については、ウェスタンブロットとゲル内沈降反応で示されたように、Vero細胞由来JEVとマウス脳由来JEVとで同等であった。力価とウイルス中和スペクトルについても、両ワクチンで差異は見られなかった。

以上のように、分析した全ての項目でVero細胞由来JEVとマウス脳由来JEVの性状は同等であることが示されたが、糖鎖構造については、各種レクチンによるレクチンプロ

ットの結果から両ウイルス間で若干異なることが示唆されている(表6)。糖鎖構造は由来組織あるいは宿主細胞特異的であり、両ウイルス間で差異があることは予想された。しかしながら、これまで示した通り糖鎖構造の差異は、ワクチンの抗原性、免疫原性、力価、安定性に大きな影響を与えるものではなかった。

本ワクチンは2001年に臨床薬理試験(Phase I)²⁴⁾を実施し、2003年から2004年に掛けて従来製法のワクチンとの比較臨床；検証的試験(Phase III)を終了し、2005年の5月20日に製造承認申請を行なったが、審査において液状製剤の安定性に問題があり、継続審査扱いとなった。その後、剤形を凍結乾燥製剤に変更し、2008年より臨床試験を再開した。

2-5 参考文献

- 1) Sumiyoshi H, Mori C, Fuke I, Morita K, Kuhara S, Kondou J, Kikuchi Y, Nagamatu H, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA. *Virology* 1987; 161: 497-510.
- 2) 保井孝太郎. フラビウイルス蛋白質のプロセッシング. *蛋白質 核酸 酵素* 1992; 37: 2766-2773.
- 3) Kimura-Kuroda J, Yasui T. Topographical analysis of antigenic determinants on envelope glycoprotein V3 (E) of Japanese encephalitis virus, using monoclonal antibodies. *J Virol* 1983; 45: 124-132.
- 4) Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, et al. Japanese encephalitis in north Queensland, Australia, 1988. *Med J Aust* 1999; 170: 533-536.
- 5) 日本脳炎ワクチン ワクチンハンドブック 国立予防衛生研究所学友会 丸善株式会社 平成11年(第3版) ; 21: 142-152
- 6) 北野忠彦 日本脳炎ワクチンの効果と接種率 *小児科診療* 1993; 11: 2165-2170
- 7) 堀内清, 渡辺邦子, 窪谷弘子, 小島朝人, 安田幹司. 新しい日本脳炎ワクチンの開発. *臨床とウイルス* 1995; 23: 296-300.
- 8) Mason PW, McAda PC, Dalrymple JM, Fournier MJ, Mason TL. Expression of Japanese encephalitis virus antigens in *Escherichia coli*. *Virology* 1987; 158:361-372.
- 9) Fujita H, Sumiyoshi H, Mori C, et al. Studies in the development of Japanese encephalitis vaccine; expression of virus envelope glycoprotein: V3 gene in yeast. *Bull WHO* 1987; 65: 303-308.
- 10) Matsuura Y, Miyamoto M, Sato T, Morita C, Yasui K. Characterization of Japanese encephalitis virus envelope protein expressed by recombinant baculoviruses. *Virology* 1989; 173: 674-682.
- 11) Konishi E, Pincus S, Paoletti E, Shope RE, Burrage T, Mason PW. Mice immunized with a subviral particle containing the Japanese encephalitis virus preM/M and E proteins are protected from lethal JEV infection. *Virology* 1992; 188: 714-720.
- 12) Yasuda A, Kimura-Kuroda J, Ogimoto M, Miyamoto M, Sata T, Sato T, Takamura C, Kurata T, Kojima A, Yasui K. Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express preM and E glycoproteins of Japanese encephalitis virus. *J. Virology* 1990; 64: 2788-2795.
- 13) 保井孝太郎 日本脳炎ウイルスのレセプター *免疫薬理* 1991; 9: 33-41
- 14) Konishi E, Yamaoka M, Khin-Sane-Win, Kurane I, Mason PW. Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding

- Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J Virology* 1998; 72: 4925-4930.
- 15) Guirakhoo F, Zhang Z-X, Chambers TJ, Delagrave S, Arroyo J, Barrett AD, Monath TP
Immunogenicity, genetic stability, and protective efficacy of a recombinant, chimeric Yellow fever-Japanese encephalitis virus (ChimeriVax-JE) as a live, attenuated vaccine candidate against Japanese encephalitis. *Virology* 1999; 257: 363-372.
 - 16) Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, Marchesani R, Knauber M, Wells KH, Arroyo J, Guirakhoo F. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* 2002; 20: 1004-10018.
 - 17) 安村美博, 川喜田愛郎. 組織培養によるSV40の研究 ガラス器内における癌研究の予備段階. *日本臨床* 1963; 21: 1201-1215.
 - 18) Montagnon BJ, Vincent-Falquet CJ and Saluzzo JF. Experience with Vero cells at Pasteur Merieux Connaught. *Dev Biol Stand* 1999; 98: 137-140.
 - 19) Requirements for continuous cell lines used for biologicals production. WHO Technical Report Series 1987; 745: 93-107.
 - 20) 石川豊数, 吉井洋紀, 大西敏之, 石橋正英, 今川 忠. 継代培養細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発. *臨床とウイルス* 1998; 26: 340-350.
 - 21) Srivastava AK, Putnak JR, Lee SH, Hong SP, Moon SB, Barvir DA, Zhao B, Olson RA, Kim SO, Yoo WD, Towle AC, Vaughn DW, Innis BL, Eckels KH. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine* 2001; 19: 4557-4565.
 - 22) 葛原祥二. 組織培養不活化日本脳炎ワクチンの開発. *化血研所報 黎明* 2000; 9: 71-75.
 - 23) Sugawara K, Nishiyama K, Ishikawa Y, Abe M, Sonoda K, Komatsu K, Horikawa Y, Takeda K, Honda T, Kuzuhara S, Kino Y, Mizokami H, Mizuno K, Oka T, Honda K. Development of Vero cell-derived inactivated Japanese encephalitis vaccine. *2002 Biologicals*; 30: 303-314.
 - 24) Kuzuhara S, Nakamura H, Hayashida K, Obata J, Abe M, Sonoda K, et al. Non-clinical and Phase I Clinical Trials of a Vero Cell-Derived Inactivated Japanese Encephalitis Vaccine. *Vaccine* 2003;21, 31: 4519-4526.
 - 25) Kimura-Kuroda J and Yasui K. Antigenic comparison of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J gen Virol* 1986; 67: 2663-2672.
 - 26) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Isolation of DNA from mammalian cells. In: *Molecular Cloning* (Edited by Ford N., Nolan C., Ferguson M.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York) 1989; pp. 9.16-9.23.
 - 27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

- 28) Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr Allergy* 1958; 5: 1-78.
- 29) 日本脳炎ワクチン、生物学的製剤基準, 細菌製剤協会 1993; pp.99-101.
- 30) Oya A. Japanese encephalitis vaccine. *Acta Paediatr.Jpn.* 1988 ; 30: 175-184
- 31) Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J. gen. Virol.* 1978; 40: 531-544.
- 32) WHO requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. *Biologicals.* 1998; 26: 175-193.
- 33) Petre J, Pizza M, Nencioni L, Podda A., De Magistris M.T., Rappuoli R. The reaction of bacterial toxins with formaldehyde and its use for antigen stabilization. *Dev Biol Stand* 1996; 87: 125-134.

第3章 MDCK 細胞由来の新規なプロテアーゼ阻害因子の精製と遺伝子単離

3-1 はじめに

細胞にはウイルスの感染を防御する機構が本来備わっている。ウイルス受容体を有する細胞培養系にウイルスを接種した場合でも、しばしばウイルスの増殖阻害が起こることがある。インフルエンザウイルスの場合、増殖阻害様式には2つの阻害モデルが考えられた。一つはウイルス複製を阻害する働きを誘導する細胞間で作用するインターフェロンによる阻害であり、もう一つは、ウイルスの感染性を減少させ、細胞外で作用する細胞が作り出すプロテアーゼ阻害因子の存在である。

インフルエンザウイルスの宿主細胞として用いられる MDCK (Madin Darby canine kidney) 細胞では、インフルエンザウイルスの持続感染系ではインターフェロンが分泌されており、インターフェロンがウイルスの増幅に関わっていることが報告されている^{1),2)}。

同様にインフルエンザウイルスの宿主細胞への感染性はウイルス表面の糖タンパク質、ヘマグルチニン (HA) の活性化に依存し、プロテアーゼ消化によるウイルスの活性化が重要であることは、細胞外に分泌されるプロテアーゼ阻害因子の存在によって示唆される。例えば、気道粘膜に存在するヒト粘膜プロテアーゼ阻害因子は、インフルエンザウイルスの *in vivo* での感染を防御する働きを有している^{3),4)}。

インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染は、ウイルス表面の糖タンパク質、ヘマグルチニン (HA) と宿主由来のプロテアーゼの相互作用がウイルスの感染過程で重要である^{5),6)}。75kDa の前駆 HA (HA0) 分子は、プロテアーゼにより分子内の特定の切断部位で解裂を受け、55kDa の HA1 分子及び 25kDa の HA2 分子に分断される。そして酸性下で HA1 分子が構造変化を起し、HA2 分子の N 末端の疎水性領域が露出することで、ウイルス膜と細胞膜の融合を促進する⁶⁾。

ヒト呼吸器上皮においては、インフルエンザウイルスの HA 分子は、上皮由来のセリ

ンプロテアーゼによって処理され、活性化される。 実際のウイルスの複製は、幾つかの特異的プロテアーゼ阻害因子によって阻害を受けるが、大量の高分子プロテアーゼ阻害因子を含むようなウシ胎児血清を添加した培養系においては、ヒト咽頭扁桃の上皮細胞ではインフルエンザウイルスを阻害しないことが知られている⁷⁾。 従って上皮組織においてインフルエンザウイルスの HA 分子を活性化する酵素を阻害できるのは高分子プロテアーゼ阻害因子ではなく、ペプチド性低分子プロテアーゼ阻害因子であると推定される。 一方、セリンプロテアーゼであるトリプシン (EC 3.4.21.4) を培養系に添加することによりウイルスの増殖が誘導されることから、トリプシン活性を上げることでインフルエンザウイルスの生産量を改善することができる⁸⁾。

過去にウイルスの増殖を阻害するプロテアーゼ阻害因子は、トリプシン不活化因子 (Trypsin-inactivating Factors) として、アカゲザルの腎細胞 (LLC-MK₂)、ブタ腎細胞 (SwK)、イヌ腎細胞 (MDCK)、及びアフリカミドリザル腎細胞 (Vero) の培養上清中に見出だされており、これらの阻害因子は、ウイルス活性化のため添加されたトリプシンを不活化することが報告されている^{9),10)}。 Vero 細胞由来のトリプシン不活化因子は、限外ろ過膜を用いた透過実験の結果、約 100kDa の分子量であったことが報告されているが、それ以上の詳細な記載は見当たらない⁹⁾。

著者らは、イヌ腎臓由来の MDCK 細胞を用いたインフルエンザウイルスの増殖実験において、ウイルス接種前に培地交換を行うことにより、この阻害活性が消失することから、MDCK 細胞の培養上清中にインフルエンザウイルスの増殖を阻害する活性を確認した。 さらに、この阻害因子が、MDCK 細胞の培養上清中に分泌・蓄積され、この増殖阻害活性の作用機序が、トリプシン阻害因子によるトリプシンの不活化であると推定し、MDCK 細胞による無血清のコンディション培地を調製し、トリプシン阻害活性を指標としてタンパク質の精製、アミノ酸配列分析および遺伝子単離を試みた¹¹⁾。

3-2 材料と方法

3-2-1 細胞培養とウイルス培養

本研究で用いた株化細胞は、イヌ腎臓由来の MDCK 細胞、アフリカミドリザル腎臓由来の Vero 細胞、ヒト腎臓由来の SK-NEP-1 細胞であった。これらの細胞は ATCC (American Type Culture Collection) 登録名は、それぞれ CCL-34、CCL-81、HTB-48 である。

通常使用した培養液は無血清培養 (EXCELL293、JRH Bioscience Inc. Lenexa、米国) を用いた。これは、トリプシンを用いる培養系において、動物由来血清中には通常高濃度レベルのプロテアーゼ阻害因子を含んでいるため、細胞由来の阻害因子の活性を検出できないためである。

培養上清中に分泌されるこのプロテアーゼ阻害因子は比較的安定であり、細胞を高密度に維持して培養する方法 (培養日数 12~14 日間) であっても、活性は充分維持されていた。50L スケールの Cytodex 1 (5g/L、Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd Little Chalfont, 英国) を用いたマイクロキャリア培養 (第 2 章参照) を行なった。細胞密度が 1×10^6 cells/mL を越えるまで、pH7.2~7.5、5%CO₂、37°C で 6~10 日間培養した。培養上清は 0.45 μm でろ過して、次の UF 膜分画工程へ用いた。

MDCK 細胞、Vero 細胞、及び SK-NEP-1 細胞を用いた小スケール実験は、6well プレート (Corning Inc., NY, USA) の静置培養 (7~14 日間) で行った。培養上清中のウイルス増殖は HA-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays for HA) で定量し、トリプシン活性及びトリプシン阻害活性は、合成基質法では培地成分の影響を受けて測定が不可能であったため、スキムミルクを用いたゲル内拡散法にて定量した。

培地交換の影響を確認するために、MDCK 細胞をスピナーフラスコ (Techne) による培養を行なった。細胞密度が 4×10^6 cells/mL してから、培養上清の一部又は全量を新鮮培地 (0%、50%、75%、100%) に交換し、インフルエンザワクチン製造株である A/NewCaledonia/20/99 IVR-116 株を Multiplicity of Infection (M.O.I.) = 0.001 で 1.8 U/mL

のブタ・トリプシン(Becton Dickinson Co., Difco, 米国)と共に接種し、更に培養を3～4日間継続した。その培養上清をサンプリングし、HA-ELISAによりHA抗原量(ウイルス増殖)を測定した。

3-2-2 限外ろ過(UF)膜を用いた阻害因子の分画

まず細胞培養上清を分画分子量約100 kDaのUF膜(305-14668-01-E--SG PESU 100K, Sartorius AG, Goettingen, ドイツ)を備えた限外ろ過濃縮装置(Sartocon slice, Sartorius)で濃縮した。次に、そのろ過液を分画分子量約10 kDaのUF膜(304-14439-E--SG HYDRO 10K, Sartorius AG, Goettingen, ドイツ)で濃縮液とろ過液を取り、トリプシン阻害活性を指標として分析を行い、活性画分を分取した。

3-2-3 培養上清画分のインフルエンザウイルス増殖阻害活性

1×10^6 cells/mLを越えたMDCK細胞培養に0.11U/mLのブタ・トリプシン(Sigma-Aldrich Japan K.K., 東京, 日本)と共にウイルス株 A/NewCaledonia/20/99 IVR-116をM.O.I.=0.001で接種した。4つの培養上清限外ろ過膜画分(100kDa濃縮液、100kDa通液、10kDa濃縮液、10kDa通液)及び培養上清(50%, 25%)を上記のウイルス培養系に添加して、ウイルス増殖に与える影響を調べた。37°Cで培養7日間後、ウイルス接種して4日後に、HA-ELISAを用いてウイルス増殖性を測定した。同時にトリプシンの阻害活性は、後述のスキムミルクを用いた一元ゲル拡散阻害法(single radial diffusion inhibition : SRDi)にて測定した。

3-2-4 ELISAによるHA抗原定量

卵由来の不活化HA抗原(A/NewCaledonia/20/99 IVR-116)をウサギとモルモットの皮下に週間隔で3回接種し、ブースター接種2週後に全採血して、得られた血清からProtein Aアフィニティクロマトグラフィー(MAPS II, Nippon Bio-Rad Lab. K.K., 東京、

日本)により抗 HAIgG を精製した。得られた抗 HA ウサギ IgG (5 μ g/mL in 0.1 M 炭酸バッファー、pH 9.5)を ELISA プレート(Nalge-Nunc Immuno Plate I)に分注(100 μ L/well)し、プレートは 4 $^{\circ}$ C で一晩置いた。プレートをバッファー (50mM トリス、50mM クエン酸、10% Sucrose、pH 7.5)で洗浄した後、2% (w/v) BSA(Bovine Serum Albumin、Fr. V、生化学工業株式会社、東京、日本)を含む洗浄バッファーをプレートに分注 (100 μ L/well) した。プレートを 37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。準備したプレートに検体又は HA 標準抗原は希釈バッファー(0.1% (v/v) BSA を含む洗浄バッファー)で希釈し、プレートに分注(100 μ L/well)した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した後、洗浄バッファーで 5 回洗浄し、抗 HA モルモット血清の 1:10,000 希釈液を分注(100 μ L/well)し、更に 37 $^{\circ}$ C.で 1 時間インキュベートした。その後プレートを 5 回洗浄し、二次抗体 HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) 標識 Donkey 抗モルモット IgG (CHEMICON Co.、CA、米国)の 1:10,000 希釈液を分注(100 μ L/well)した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させたプレートを回収し、洗浄バッファーで 4 回、水で 2 回洗浄後、TMB Substrate-Chromogen (DAKO Japan Inc.、Kyoto、JAPAN)をプレートの各ウェルに分注(100 μ L/well)した。室温で適当な時間発色させ、0.5 M H₂SO₄ 溶液を分注(100 μ L/well)して発色を停止した。プレートリーダー、Elx808 microplate reader (BioTeck Instruments, Inc.、VT、米国)を用いて検出波長 450/650 nm で吸光度を測定した。

3-2-5 スキムミルクを用いた一元ゲル拡散阻害法による阻害活性測定 (SRDi)

スキムミルクゲル一元拡散阻害法 (single radial diffusion inhibiton test : SRDi) は、スキムミルクを基質とすることができるプロテアーゼならば如何なる種類のプロテアーゼに対しても応用できる。また合成基質法のように培養液などの影響を受けないので、プロテアーゼ阻害因子の特異性を調べることができる。スキムミルクを分解できるプロテアーゼとして、キモトリプシン、カリクレイン、トロンピン及び凝固第 X 因子などが挙げられる。さらに、スキムミルクゲル分解法は、プロテアーゼ阻害因子のプロテ

アーゼ阻害活性や特異性を見るだけでなく、未知のタンパク質分解活性及びその特異性を調べることも可能である。

1% (w/v)アガロース(Bio-Rad Japan、東京、日本)と 2% (w/v)粉末スキムミルク(Wako Pure Chemical Industries Ltd.、大阪、日本)を含有するアガロースプレート(25mM トリス塩酸 pH7.4, 150mM 塩化ナトリウム)を調製し、ボーラーを用いて、プレート上にサンプルを投入する試料孔(内径 2~5 mm)を作製した。TPCK-トリプシンを加えた2つの希釈系列、培養上清サンプルを含む希釈系列と含まない希釈系列(1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100 又は 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 U/mL; TPCK トリプシン、Worthington Biochemical Corp.、Lakewood、NJ、米国、または Trypsin、Sigma-Aldrich、St.Louis、NJ、米国)を作製し、試料孔に 15 μ L ずつ投入した。検体を投入したアガロースプレートは湿箱に入れて、35~37 °C で 2 時間インキュベートした。

トリプシン活性は、図 9 に示すように消化リングの大きさ(トリプシンの拡散面積: 直径の縦 \times 横で表す。)をマイクロビューワー(PEAK SCALE LUPE (\times 10)、SPI Supplies、West Chester、PA、米国)で測定して、定量化した。プロテアーゼの阻害活性は、トリプシンを検体で希釈した系列とバッファー又は培地(阻害因子なし)で希釈した系列を作製して阻害の程度を比較判定する方法で評価した。相対的な阻害活性は、阻害活性が全くみられない場合を“-”、2 点の希釈点で完全に阻害した場合を“+++”、1 点を完全に阻害した場合を“++”、部分的に阻害した場合を“+”として定性的に判定した。活性の定量化は、消化リングが計測可能な部分を用いて、阻害因子を含むバッファーと含まないバッファーで調製した希釈系列で形成される消化リングの面積の差から計算した。TPCK トリプシンの表示値の 1 単位を阻害するのに必要な阻害活性を 1 単位と定義した。阻害活性は以下の式により算出した。

$$(\text{プロテアーゼ阻害活性}) = (\text{投入したトリプシン活性}) - (\text{検出されたトリプシン活性})$$

3-2-6 ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、1%(w/v) アクリルアミドスタッキングゲルを付した 4~12%(w/v) アクリルアミド濃度勾配ゲル (Daiichi Pure Chemicals co. Ltd.、東京、日本)を用いて、Laemmli らの定法に従って行なった¹²⁾。タンパク質サンプルはサンプルバッファー(0.15M トリス塩酸 pH 6.8、5.7% (w/v) SDS、30% (v/v)グリセロール、14% (v/v) β -メルカプトエタノール、0.005% (w/v) ブロモフェノールブルー)を加え、煮沸して調製した。ゲルは 50 V で 15 時間電気泳動した。低分子量マーカー(Amersham Pharmacia Bioscience)を全ての泳動で使用した。泳動後、ゲルを 50% (v/v) メタノール、12% (v/v) 酢酸で 90 分間固定し、10% (v/v) グルタルアルデヒドで還元し、銀染色法 (Silver Stain Kit、Daiichi Pure Chemicals co.Ltd、東京、日本)によりタンパク質バンドを染色した。

3-2-7 タンパク質含量測定

タンパク質含量は、ビスシニクロニック酸 (BCA)アッセイ・キット (Pierce Milwaukee LLC、Milwaukee、米国)¹³⁾ を使用し、標準品としてウシアルブミンを用いた。

3-2-8 ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィー

すべてのクロマト操作は、低圧クロマトシステム (BioLogic LP system、Bio-Rad Japan、東京、日本)を用いて、2~8 °C で実施した。限外ろ過膜の分画で得られた画分は 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、最終濃度 10mM リン酸となるように調製し、予めバッファーA(10mM リン酸緩衝液、pH 7.5)で平衡化した 5mL のヘパリンカラム(HiTrap Heparin HP、Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.、Little Chalfont、英国)へ、流速 1.5mL/min で通液した。カラムはバッファーA の 25 - 50 mL で洗浄後、吸着タンパク質は、0 ~ 0.6 M 塩化ナトリウムの塩濃度勾配 (流速 1.5 mL/min、バッファーA : 10mM リン酸緩衝液、バッファーB : 0.6 M 塩化ナトリウムを含むバッファーA)で溶出した。溶出画

分は SRDi によってトリプシン阻害活性を測定し、阻害活性を有する画分をプールした。

ヘパリンカラム素通り画分は、280nm の吸光度および電気伝導度(EC)を測定した。

3-2-9 リバースザイモグラフィー

リバースザイモグラフィー¹⁴⁾とは、0.2%ゼラチンを含む SDS-PAGE ゲルに検体を重層し、Native 電気泳動したのち、ゲルをトリプシン溶液で処理し、染色する方法である。検体中にプロテアーゼ阻害因子が存在すると、阻害因子が存在する部分のゼラチンがトリプシン消化から保護されるため、残存ゼラチンがバンドとして検出される。そのバンドの分子量は、ネイティブ（非還元）状態でのプロテアーゼ阻害因子の分子量をほぼ反映する。ゼラチンの濃度は、0.1~0.5%、SDS-PAGE 濃度は、通常のタンパク質やポリペプチドを分析するとき使用する濃度が使用される。回収したゲルのトリプシン処理に使用するトリプシンの濃度としては、10~50U/mL を使用するのが適当である。反応時間、反応温度は、上記のスキムミルク分解と同様の条件で行った。また市販キット（YU-68028；Serine-protease Reverse Zymo Electrophoresis kit、(株)ヤガイ、日本）を用いることもできる。

ポリアクリルアミドゲルは、上述のように最終濃度 0.2 % (v/v) となる様にゼラチン (Sigma-Aldrich、St.Louis、NJ、米国) を添加して調製した。通常の Native 電気泳動（非還元）と同様に、TF A 及び TF B を含むヘパリンクロマトグラフィー精製画分の 5 μ L を通液した。電気泳動終了後、ゲルを取出し、0.1 % (w/v) トリプシン溶液 (BD-Difco, NJ, 米国) に室温で 1~3 時間浸潤した。トリプシン消化後の残存ゼラチンはクマジーブリリアントブルー染色 (Comassie Brilliant Blue R250；ナカライテスク株式会社、東京、日本) で染色、脱色・水洗後、ゲルを乾燥させた。

3-2-10 アミノ酸配列分析のためのウェスタン・ブロット

SDS-PAGE 分析後、ゲルを取出し、ポリアクリルアミドゲルを転写バッファー (10mM CAPS、和光純薬、Osaka, JAPAN、10% (v/v) Methanol) に浸した。一方、PVDF 膜 (日本 Millipore K.K.、Tokyo, JAPAN) もゲルと合わせる前にメタノール (30 秒)、蒸留水 (2 分)、転写バッファー (3 分) の順番に処理した。泳動ゲルと PVDF 膜を重ね合せて、

エレクトロ・ブロッター (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Little Chalfont, 英国)にセットして、4°Cの電圧30V、4時間以上転写を行なった。

3-2-11 N末端アミノ酸配列分析

ヘパリンカラムクロマトグラフィーで部分精製したサンプルをさらに SDS-PAGE で分離し、ウェスタン・ブロット法により PVDF 膜に転写した。タンパク質を転写した PVDF 膜はクマシーブリリアント・ブルー染色を行ない、TF A および TF B に相当するタンパク質バンド (15kDa および 11kDa) を PVDF 膜より切出し、プロテイン・シーケンサー (Auto Protein Sequencer PROCISE 492cLC, Applied Biosystems, Foster City, 米国) で N 末端アミノ酸配列を解析した。

3-2-12 逆相カラムクロマトグラフィーによる精製

質量分析を行なうため、C8 逆相カラム (UG120, 4.6mm x 250mm、資生堂、東京、日本) による精製を行なった。サンプルを緩衝液 (50mM トリス pH 7.0、50mM 塩化ナトリウム) で透析した後、予め 0.1% (v/v) ギ酸 (バッファーA) で平衡化した C8 カラムに通液した。そしてバッファーA で充分洗浄し、バッファーA とバッファーB (70% アセトニトリル) の直線濃度勾配 (A から B ; 0% から 60% で 40 分間) により、吸着画分を溶出した。

3-2-13 質量分析

上述の精製画分由来の TF A および TF B の完全分子の分子量測定は、(株) 東レ・リサーチセンターにおいて、質量分析装置 MALDI-TOF/MS (BIFLEX III, Bruker Daltonics, Bremen, ドイツ) を用いて行った。

3-2-14 トリプシン阻害因子；TF B のペプチドマップ

更に TF B については還元後、トリプシンで消化し、ペプチドマップ解析を実施した。C8 逆相カラムクロマトグラフィーで精製した試料の 100~200 µg 相当を最終濃度 6 M グアニジン塩酸、0.5M トリス塩酸 pH 8.0、2mM EDTA、5mM DTT となるようにバッファーに溶解した。サンプルはアルミホイルで遮光し、37°C で 75 分間反応させた。これに 100mM のヨードアセトアミドを 10µL 添加し、更に 75 分間反応させた。次に反応産物は予め 10mM リン酸緩衝液で平衡化しておいたマイクロスピニン G-25 カラム (Amersham Biotech UK Ltd.、Little Chalfont、英国) でろ過した。得られた還元アルキル化サンプルはトリプシン (Trypsin Gold; MS analytical grade、Promega Corp.、Madison、米国) で消化した。最初の一晩の消化は 1mg/mL Trypsin Gold を 10 µL 添加し、37°C で行なった。翌日更に 1mg/mL の Trypsin Gold を 10µL 添加し、更に 37°C で 7 時間消化反応を継続した。得られた反応産物を ODS カラム (TSK-gel ODS-80Ts、東ソー、東京、日本) に通液し、波長 214 nm の吸光度で消化ペプチドを検出した。通液容量は 40 µL、流速 0.8 mL/min [移動相 A; 0.1%TFA、 B; 0.1%TFA/80%ACN、 0%(0min.)→ 0%(5min.)→ 70%(75min.)→ 70%(80min.)]、アセトニトリルの直線濃度勾配 (0~80%、0.1%トリフルオロ酢酸) で溶出した。溶出された全 16 本のピークは、(株) 東レリサーチセンター (東レ・リサーチセンター、神奈川、東京) において、質量分析、および N 末端アミノ酸配列分析 (1000 GA、HEWLETT PACKARD Inc.、米国) を実施した。

3-2-15 トリプシン阻害因子のデータベース検索

N 末端一次アミノ酸配列部分情報より、米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI : the National Centre for Biotechnology Informatics) のウェブサイト (all non-redundant GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF、MSDB 20040106、nr.fasta) を利用し、Gapped BLAST/PSI-BLAST 検索を実施した。

3-2-16 TF B の遺伝子のクローニング

RACE 法および TA クローニング法を用いて、MDCK 細胞の RNA から TF A および TF B の cDNA を単離した。 5.6×10^6 個の MDCK 細胞から定法により RNA を抽出し、5'Full-RACE 並びに 3'Full-RACE キット (タカラ酒造、東京、日本) を用いて逆転写反応を行い、BLAST 検索で得られた核酸配列をもとに、特に TF B に関しては、以下に述べる合成プライマー (Operon Biotechnologies Inc.、東京、日本) を作製し、RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法を行った。 アンチセンス・プライマー: 5'AS1, atccagaaaggcaccgatca、5'AS2, agaagggcagagtccagctt、5'PAS1, aacgggatccaagca、センス・プライマー: 5'S1, aatttgagtgccggagtgc、5'S2, tgttgctctcatgcttgg、3'S1 cgagccacacgacgtctc。 RACE の反応産物は、アガロースゲル電気泳動で精製し、続いて TA クローニングキット (インビトロジェン、Tokyo, JAPAN) を用いてクローニングした。 定法に従ってコロニーより DNA を抽出し¹⁵⁾、TA クローニングベクター (M13RV primer, caggaaacagctatgac; T7 primer, taatacagactcactataggg) 内の配列に特異的なプライマーを用いて自動シーケンサー (Applied Biosystems、 Model310, Foster City, 米国) により、全塩基配列を解読した。

3-2-17 精製した阻害因子のウイルス増殖阻害活性の測定

C8 逆相カラムで精製分取したフラクションプールをエッペンドルフ・チューブに分注し、回転式真空濃縮装置を用いて乾燥した。 回収された乾燥固形物を PBS に溶解したものを評価サンプルとした。 評価サンプルについて、SDS-PAGE、活性検出 (スキムミルクゲル分解法; SRDi) を行い、品質を評価した。

指示細胞として MDCK 細胞を復元し、T-25 フラスコで培養・継代し、アッセイに十分な細胞数が確保できたら細胞培養用 96 穴プレートに 1×10^5 cells/mL で細胞を播種し、4 日間培養した。 4 日後に培養上清を除去し、滅菌 PBS で 2 回洗浄して、最終濃度が 100TCID₅₀/well となるようにウイルスを希釈して接種した。

試料の希釈については、阻害因子画分と Mock（逆相クロマトの移動相；溶媒）を用意した。希釈用 96 穴プレートで 2 倍段階希釈（A 列に 120 μ L のサンプルを入れ、B 列から H 列まで 10 μ g/mL のアセチルトリプシン（Sigma、T6763）を含有したウイルス希釈液を調製して、60 μ L/well で入れ、A 列から H 列まで 100 μ L 送りで希釈）を作成した。

ウイルス接種については、凍結保存してあるウイルスバイアル（A/NewCaledonia/20/99； $10^{8.9}$ TCID₅₀、A/Wyoming/3/3000； $10^{8.5}$ TCID₅₀）を氷上で溶解し、ウイルス希釈液を用いて、最終濃度が 100TCID₅₀/well となるように希釈した。次に細胞培養用 96 穴プレートに 1×10^5 cells/mL で細胞を播種しておいた MDCK 細胞を滅菌 PBS で洗浄し（アスピレーターで培地を吸引除去し、200 μ L/well 加え、この操作を 2 回繰返した。）、最終濃度が 100TCID₅₀/well となるようにウイルスを希釈して接種した。

ウイルス培養及び CPE（CytoPathic Effect）観察については、試料とトリプシンの希釈混合（100 μ L）に希釈したウイルス液（100 μ L）を接種して、4～6 日間培養し、CPE を観察した。必要に応じて、10%ホルマリンで固定化、不活化し NB 染色液（Naphthol blue black、Sigma、N3393）で生細胞を染色し、UV 照射後プレートを洗浄して、余分な染色液を除去し、乾燥させた。乾燥後、50 μ L/ウェルの 0.1M 水酸化ナトリウムを添加し、染色液を溶解して 630nm の吸光度を測定した。50%増殖を阻害する希釈倍数を最小阻害濃度として測定した。

50%阻害の OD 値は、次の計算式を用い、

$$50\% \text{阻害の OD 値} = 0.5 \times (\text{細胞対照} + \text{ウイルス対照})$$

プレートごとに計算し、この値より高い値を示す試料の最大希釈倍数を最小阻害濃度とした。

3-3 結果と考察

3-3-1 培養上清からのウイルス阻害活性の検出

本研究では3種類の株化細胞を調べたが、イヌ腎臓由来の MDCK 細胞及びアフリカミドリザル腎臓由来の Vero 細胞でトリプシン不活化活性が認められ、ヒト腎臓由来の SK-NEP-1 細胞にはトリプシン不活化活性は検出されなかった。

Vero 細胞では文献報告があることから、以後 MDCK 細胞のトリプシン不活化因子について検討した。

まず MDCK 細胞が培養された培養上清中にウイルスの活性化を阻害する活性の存在を調べるため、ウイルス接種前に培養上清を部分的に新鮮培地に交換して、その影響をみた (図 1)。 培養上清を新鮮培地に交換する比率が高いほどウイルス増殖 (HA 抗原量) は高くなる現象を確認した (図 1a)。 例えば、培養上清の約半分を新鮮培地に交換して4日間培養した場合、培地交換を行わない場合と比べて HA 抗原量は約 30 倍増大した。 これらの結果から MDCK 細胞の培養上清中にはウイルスの増殖を阻害する因子の存在が示唆された。 しかし、図 1a の実験では、培地の栄養枯渇によってウイルス増殖が阻害されたとも考えられるため、図 1b の実験では、新鮮培地に限外ろ過濃縮液もしくは通液を 12.5% 添加して、培養液の栄養成分の枯渇の影響が少ない培養条件でウイルス接種を行った。 その結果、新鮮培地に 10kDa 膜濃縮液の添加場合でも著しいウイルスの増殖阻害が観察され、ウイルス増殖阻害因子の存在が示唆された。 更に、インフルエンザウイルスの増殖が HA 分子を活性化するプロテアーゼ活性に依存することを鑑みると、この MDCK 細胞の培養上清中に存在するウイルス増殖阻害因子はプロテアーゼ阻害因子である可能性が高いと推察した¹⁾。

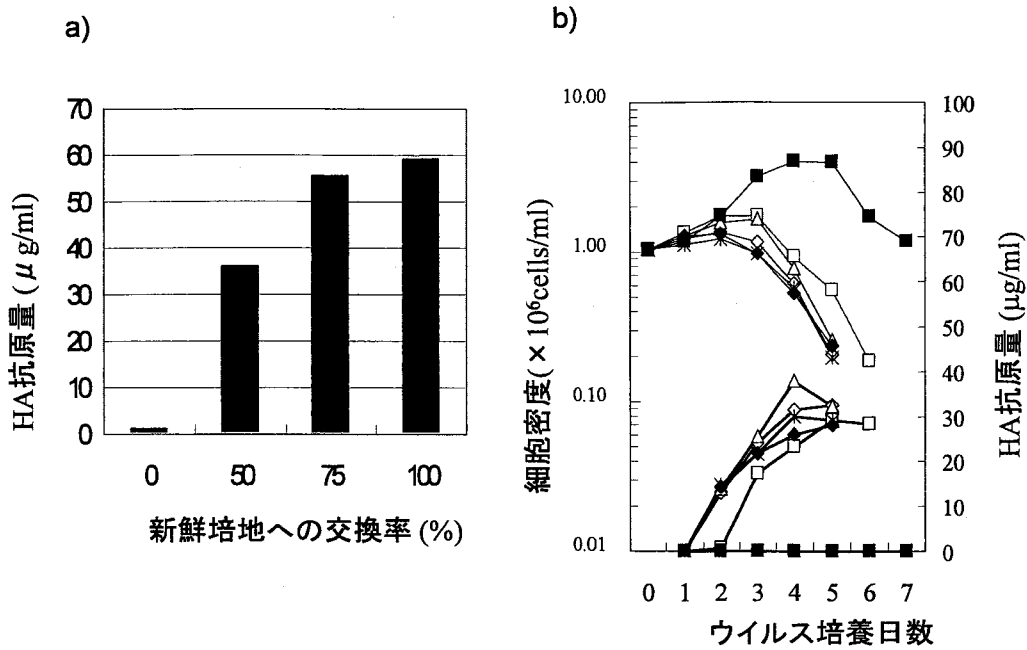


図 1. MDCK 細胞培養上清によるインフルエンザウイルス増殖阻害

a) シェーカーフラスコ (100mL) を用いた MDCK 細胞の浮遊培養で、細胞密度が 4×10^6 cells/mL に達した時点で、交換率 (0%, 50%, 75% or 100%) を変えて、培養上清を新鮮培地に交換した。インフルエンザウイルス、A/NewCaledonia/20/99 IVR-116 株が M.O.I. = 0.001 で接種され、最終濃度 1.8 U/ml となるようにトリプシンが添加された。ウイルス接種後 4 日目に培養上清中の HA 抗原量を HA-ELISA により測定した。

b) 同様に MDCK 細胞の浮遊培養系で、細胞密度が 1×10^6 cells/mL に到達した時点で、培地の栄養成分枯渇による影響を少なくするため、新鮮培地への交換率を 75%、87.5%、100% とし、培養上清の UF 膜ろ過画分を 25%、12.5% の比率で添加した (上部折れ線グラフが細胞密度：細胞増殖を示し、下部折れ線グラフがウイルス HA 抗原量：ウイルス増殖を示す)。 □; 培養上清画分 25% 添加、◇; 培養上清画分 12.5% 添加、△; 100kDa 膜濃縮液を 12.5% 添加、■; 10kDa 膜濃縮液を 12.5% 添加 (×10)、◆; 10kDa 膜透過液を 12.5% 添加、※ ; 100% 新鮮培地交換(対照)

3-3-2 限外ろ過膜による培養上清の分画

Vero 細胞由来のインフルエンザウイルス増殖阻害因子が報告されているが、分子量が約 100kDa の大きな分子としか報告されておらず、詳細は不明である^{9),10)}。

MDCK 細胞から分泌される阻害因子の分子サイズを見積もるため、分画分子量が 10kDa および 100kDa の限外ろ過膜による培養上清の濃縮、ろ過を行った。各区分についてトリプシンに対する阻害活性の測定を行ない、ウイルス培養培地へ添加してウイルス阻害活性を調べた。表 1 は限外ろ過膜の各分画がウイルス増殖に影響を与えるかどうかを HA-ELISA で調べ、またトリプシンに対する阻害活性がどの程度あるかを一元ゲル拡散阻害法 (SRDi) で調べた。その結果、100kDa 膜では濃縮されず、10 kDa 膜で濃縮されることが判った。完全にウイルス増殖を阻害する画分には、同時に強いトリプシン阻害活性が認められることから、ウイルス増殖阻害活性は、直接プロテアーゼ阻害活性と関係していることを示唆し、その阻害因子の分子サイズは 10 kDa から 100 kDa の範囲にあると推定した。

	細胞増殖性 ($\times 10^6$ cells/ml)	ウイルス増殖性 *1 (HA μ g/ml)	トリプシン阻害活性*2 (U/ml)
培養上清 (50%交換)	0.94	23.21	0.17
培養上清 (25%交換)	0.62	31.66	0.09
100kDa UF膜濃縮	0.79	37.98	0
10kDa UF膜濃縮	4.04	0.00	1.25
10kDa UF膜ろ液	0.54	26.08	0
無添加	0.59	30.16	0

表 1. 限外ろ過膜により得られた画分のインフルエンザウイルスの阻害活性
 培養上清は分画分子量 100 kDa の UF 膜で透過液と濃縮液に分画した。次に 100kDa 膜の透過液は、更に分画分子量 10 kDa の UF 膜で 透過液と濃縮液に分画した。それらのサンプルについてウイルス増殖性及びトリプシン阻害活性を測定した。

シェーカーフラスコ (100ml) で培養した MDCK 細胞の培養上清を細胞密度が 1×10^6 cells/mL に到達してから、新鮮培地で 50%、75%交換し、また 3 つの UF 膜画分を添加した。インフルエンザウイルスは A/NewCaledonia/20/99 IVR-116 を M.O.I.=0.001 で、最終濃度 0.11U/mL となる様にトリプシンを同時に添加した。培養上清(50 %, 25 %) 添加と 3 つの UF 膜画分(100 kDa UF 膜濃縮液 10 kDa UF 膜濃縮液、10 kDa UF 膜透過液) を添加し、37°C で 7 日間培養した。ウイルス接種後 4 日目に、培養上清中のウイルス産生量 (*1)を HA-ELISA で測定した。同時にトリプシン阻害活性は (*2) は、基質としてスキムミルクを用いた single radial diffusion inhibiton test (SRDi) で測定した。

3-3-3 トリプシン活性阻害因子の精製

ウイルス増殖阻害およびトリプシン阻害活性が確認された因子を単離・同定するため、10 kDa と 100 kDa の限外ろ過膜による分画の後、ヘパリンセファロースカラム によるクロマトグラフィーを実施した。 図2 は典型的なクロマト溶出パターンを示し、各フラクションのトリプシン阻害活性 (SRDi) および SDS-PAGE の結果を示している。トリプシン阻害活性はヘパリンカラムの素通り画分には阻害活性は認められず、ヘパリンカラムの溶出 (吸着) 画分に検出された。 また阻害活性は、2つのピークとして現われ、それぞれの電気伝導度 (EC) および塩化ナトリウム塩濃度が、それぞれ 3-5 mS/cm、130~230 mM に相当する画分 (プール A と命名)、並びに、7~9 mS/cm および 280~370 mM に相当する画分 (プール B と命名)に検出され、2つのピーク部分を別々にプールした。 これら2つのピークは SRDi でも阻害活性が検出され、プール A の阻害活性は 1.88 U/mL で、プール B は 6.69 U/mL であり、プール B の方がトリプシン阻害活性は強かった。 タンパク質濃度は、プール A が 17.8 $\mu\text{g/mL}$ で、プール B が 22.1 $\mu\text{g/mL}$ であったことからタンパク質当りの阻害活性は、プール A が 0.11 U/ μg 、一方、プール B が 0.30 U/ μg であった。 これらの結果から、便宜上プール A に含まれる阻害因子をイヌ腎細胞由来のトリプシン不活化因子 (canine kidney Trypsin-inactivating Factor (TF) A)、プール B に含まれる阻害因子を TF B と命名した。

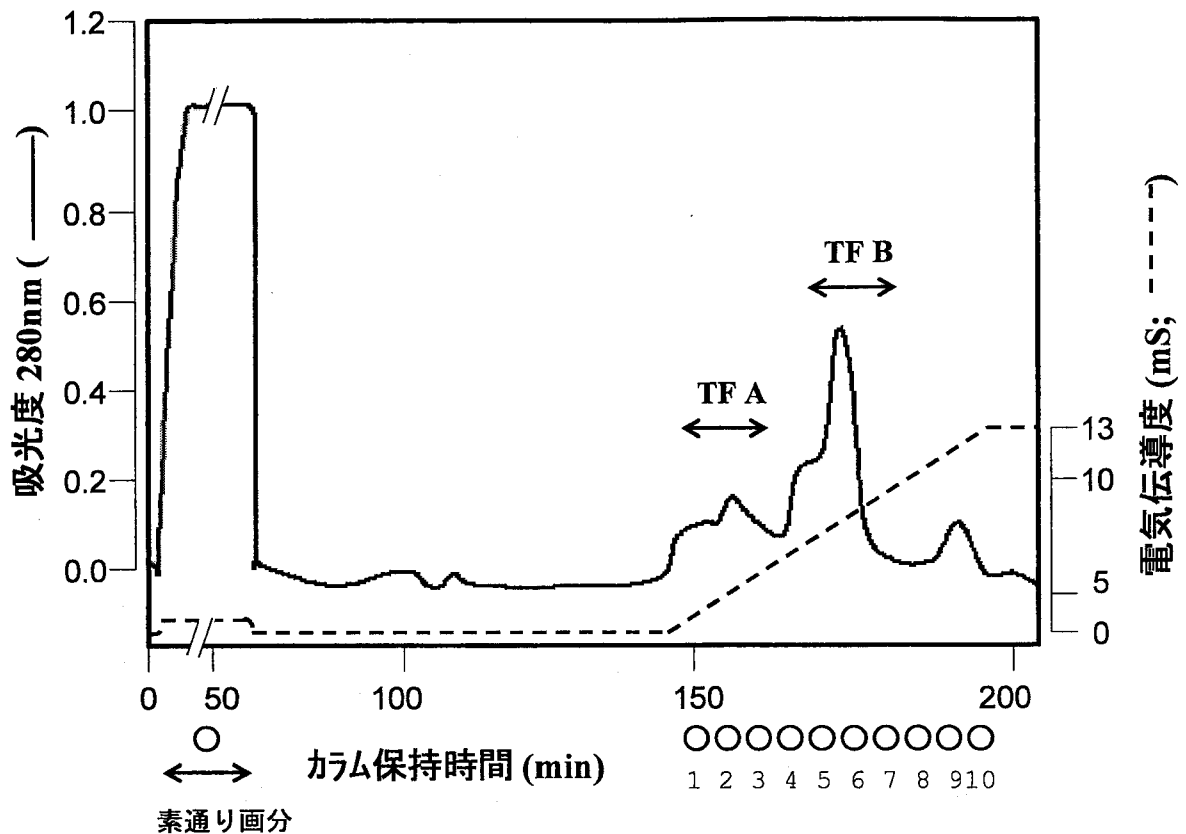


図 2. MDCK 細胞培養上清のヘパリンアフィニティクロマトグラフィー

UF 膜分画で得られた画分は、20mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、最終濃度 10mM リン酸となる様に調製した。予め低圧クロマトグラフィーシステム (BioLogic LP system) に設置し、バッファーA (10mM リン酸緩衝液、pH 7.5) で平衡化したヘパリンカラム 5mL (HiTrap Heparin HP) に通液した。クロマトグラフィーは 2~8°C で流速 1.5mL/min で行った。通液後、カラムをバッファーA の 25~50 ml で洗浄した。

カラムに吸着したタンパク質は、バッファーB (10mM リン酸緩衝液、0.6 M 塩化ナトリウム) の直線濃度勾配にて、流速 1.5 mL/min で溶出した。縦軸は時間経過を示し、横軸は、280nm の吸光度(左軸) と電気伝導度 ((EC; electro conductivity、右軸)を示す。

素通り画分と溶出画分は、SRDi によるトリプシン阻害活性を測定し、図 3 に示すように SDS-PAGE (還元) 分析を実施した。○はサンプリングの位置を示している。

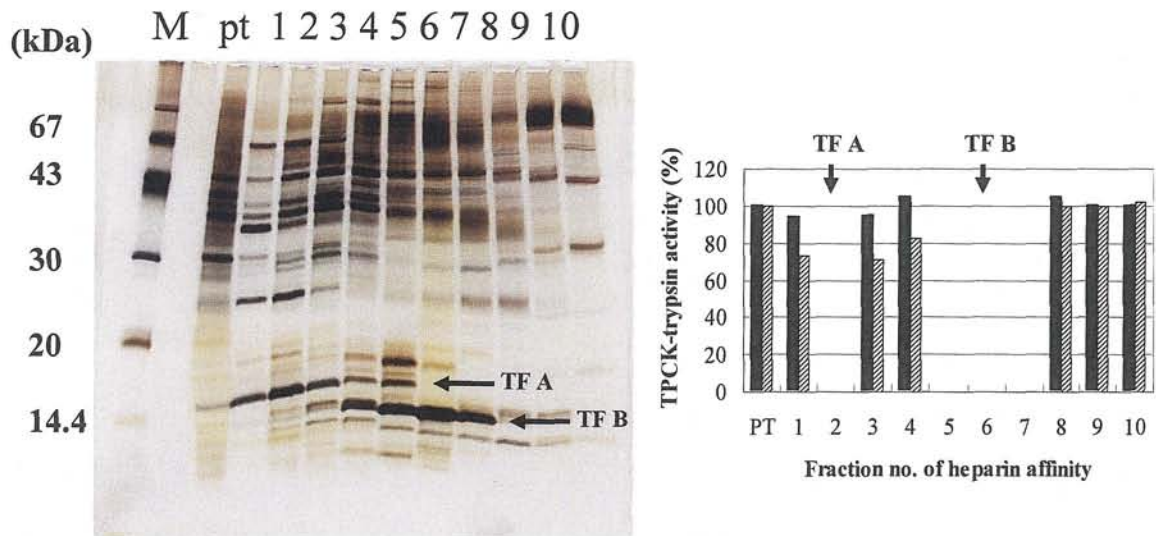


図3. ヘパリンカラムクロマトの SDS-PAGE 解析およびトリプシン阻害活性素通り画分 (PT)と溶出画分は、SRDi によるトリプシン阻害活性測定と還元 SDS-PAGE/銀染色 (左)を行った。トリプシン阻害活性は、SDS-PAGE の右側のグラフに示し、6.25U/mL (黒の棒グラフ) と 3.13U/mL (斜線の棒グラフ) のトリプシンを 100%阻害する画分 (No.2、5、6、7) が存在した。ヘパリンアフィニティクロマトグラフィーにより、トリプシン阻害活性は少なくとも 2 つのピーク(矢印; No.2 と No.6)に分離された。一つは TF A と命名したもので、分子量約 15 kDa、電気伝導度が 3~5 mS/cm で溶出される。他の一つは、電気伝導度 7~9 mS/cm で溶出され、分子量約 11kDa の TF B と名付けた。

TF B のアミノ酸一次配列を解読するため、C8 逆相カラムによる精製を行ない、不純物を除去した。その分析結果を図 4 に示した。図 4 は、還元条件の SDS-PAGE を示す。逆相カラム精製後、還元型分子のバンド(約 11 kDa)よりやや大きな分子が見える。このバンドは有機溶媒を飛ばし、乾燥させる工程で、一部の分子で架橋や凝集のような変性が起こり、非還元型(約 15 kDa)から還元型(約 11 kDa)にならない分子が混在していることによるものと推測した。蟻酸を用いた場合、単一ピークの保持時間は約 20 分を示すが、蟻酸の代わりにトリフルオロ酢酸を用いて溶出した場合は、このピークの保持時間は約 30 分となった(データ未記載)。この精製方法では有機溶媒を用いているにも拘らず、TF B の阻害活性は充分保持され、90%以上の純度を示した。

新規プロテアーゼ阻害因子は、SDS-PAGE 法による分子量が還元下で約 11kDa、非還元下で約 15kDa であることを特徴とするが、他の要素として、ジチオスレイトール(DDH)や 2-メルカプトエタノールなどの還元剤及び/又は加熱に対する安定性等が挙げられる。2% (v/v) 以上の 2-メルカプトエタノール処理でトリプシン阻害活性を消失するが、60°C、30 分間の加熱処理に対してはその活性は維持された(データ未記載)。

同様にプール A についても逆相カラムによる精製を行った。これらの結果より TF A の分子量は還元状態で 15 kDa、非還元状態で 11 kDa であった。一方、TF B の分子量は還元状態で 11 kDa、非還元状態で 15 kDa であった。

また精製したタンパク質の質量分析(MALDI-TOF/MS)の結果は、TF A が 12,730.96 を示し、TF B が 11,564.74 を示した。

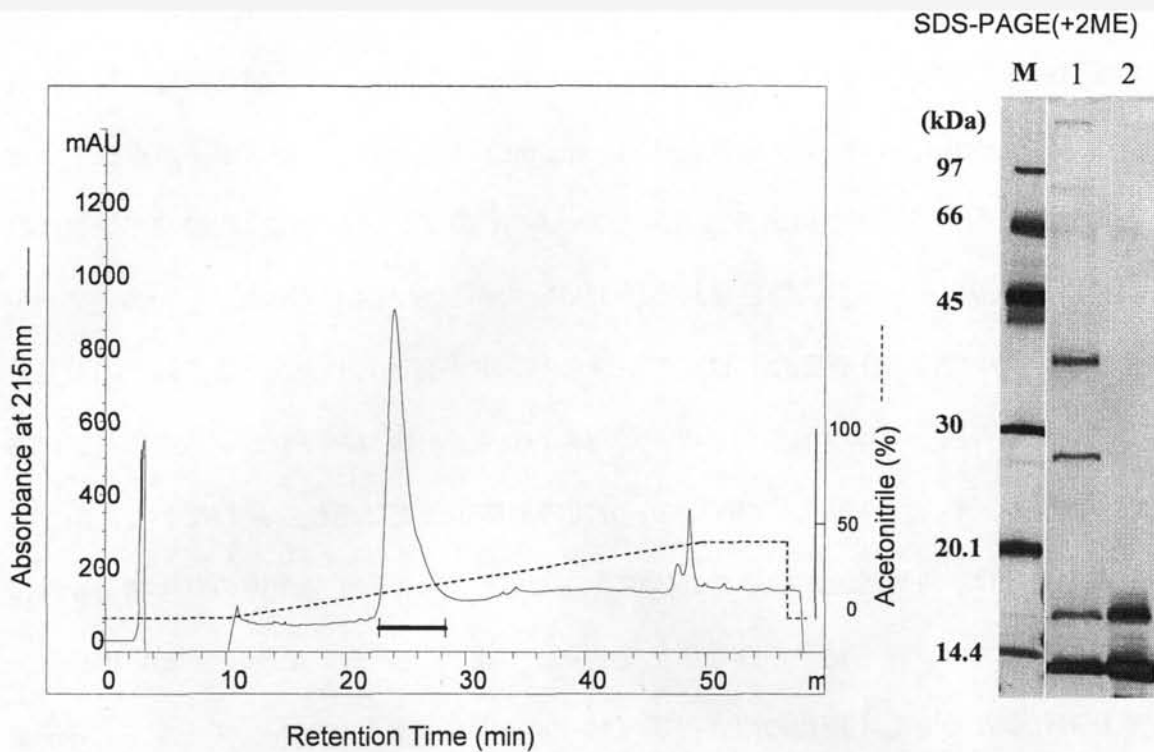


図 4. TF B の逆相クロマトグラフィーおよびその SDS-PAGE 解析

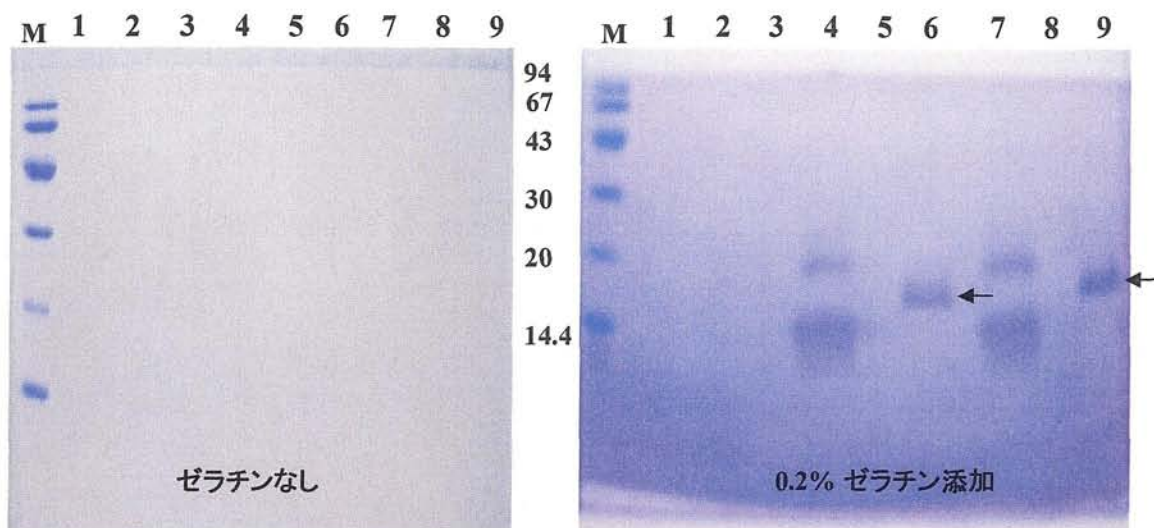
TF B のヘパリンカラムで精製した標品 100~200 μg を C8 逆相カラム (UG120, 4.6mm x 250mm) に通液した。アセトニトリルの濃度直線勾配で溶出されたピーク (下線部分) をプールして分取した。精製前後のサンプルを SDS-PAGE 分析 (図右) した。レーン 1 が逆相カラム精製前、レーン 2 が精製後を示す。TF B のヘパリンアフィニティクロマト画分プールの 100~200 μg を質量分析の目的で更に精製を行った。

試料は 50mM トリス緩衝液 (pH 7.0)、50mM 塩化ナトリウムで一晩透析し、0.1% (v/v) 蟻酸 (バッファー A) で予め平衡化したカラムへ通液した。通液後、バッファー A で洗浄し、バッファー B (70% (v/v) アセトニトリル) の直線濃度勾配 (0-60%、40 分) で溶出した。C8 逆相カラム精製の前後を左側に示し、SDS-PAGE を右側に示した。

レーン 1 はヘパリンアフィニティ精製フラクションプールを、レーン 2 が C8 逆相カラム画分のプールを示している。太いバーは C8 カラムの溶出ピークのプール範囲を示す。

3-3-4 リバースザイモグラフィー

ヘパリンカラム精製した2つのプールサンプルについてリバースザイモグラフィー (RZ) による分析を行った (図 5)。SRDi によるトリプシン阻害活性はプール A が 1.88 (U/mL)、プール B が 6.69 (U/mL) であった。またタンパク質含量は、プール A が 17.8 ($\mu\text{g/mL}$)、一方プール B が 22.1 ($\mu\text{g/mL}$) であった。阻害因子が存在する分子量のところにバンドが検出されるが、プール A のサンプルでは、明瞭なバンドは検出されなかったが、僅かに染色される約 11kDa のバンドが認められた。一方、プール B のサンプルでは、分子量約 15kDa の明瞭なバンドが認められた。陽性対照の大豆トリプシン阻害因子では複数のシグナルが認められた。大豆トリプシン阻害因子、TF B いずれも還元処理で失活し、60°C、30 分間の加熱処理では活性を失わなかった。これらの結果は、阻害活性が分子の立体構造に依存し、阻害因子分子内の立体構造を保持しているジスルフィド結合の存在を示唆した。また、プール A 及びプール B には、それぞれ少なくとも 1 種類の阻害因子 (プール A ; 分子量約 11kDa、プール B ; 分子量約 15kDa) を含んでいると推定した。



【試料名】
 レーン1, 4, 7; 大豆トリプシンインヒビター
 レーン2, 5, 8; TF A (ヘパリンカラムFr.2; 15/11kDa)
 レーン3, 6, 9; TF B (ヘパリンカラム Fr.6; 11/15kDa)

【試料の前処理方法】
 レーン1-3; 還元
 レーン4-6; 加熱(60°C, 30分間)
 レーン7-9; 未処理

図 5. ヘパリンカラム精製画分のリバースザイモグラフィ

リバースザイモグラフィは、基質（この場合、ゼラチン）を固定化した SDS-PAGE ゲルに検体を重層し、電気泳動後回収したゲルを酵素（この場合、トリプシン）処理することで、その酵素の阻害因子を検出する方法である。検体のレーン番号はゼラチンあり、なしのゲルで同一である。レーン 1、4、7 は陽性対照として大豆トリプシン阻害因子を入れたもの、レーン 2、5、8 はヘパリンクロマトの TF A 画分 (Fr.2)、レーン 3、6、9 はヘパリンクロマトの TF B 画分 (Fr.6) を入れたものをそれぞれ示す。レーン 1、2、3 は、各検体を 2-メルカプトエタノールで還元処理したもの、レーン 4、5、6 は各検体を 60°C、30 分間の加熱処理を施したものを示す。レーン 7、8、9 は未処理の検体を示す。この分析で検出されたバンドはトリプシン消化から保護されたゼラチンのバンドであって、阻害因子自体のバンドではない。

3-3-5 N末端アミノ酸配列分析

逆相カラムクロマトグラフィーによって高純度に精製した TF A および TF B の N 末端アミノ酸配列をアミノ酸配列分析装置を用いて、解読したところ、それぞれ、GPPPAIGREVDXSNYKKGKGSQIIAP、および VGNAWKAGLYPSVPPDRYLSGFEKF であった。これらの配列について、Gapped BLAST/PSI-BLAST 検索を行なったところ、TF A は、既知のプロテアーゼ阻害因子、イヌの顎下腺由来プロテアーゼ阻害因子 (canine Submandibular Protease Inhibitor (SPI))^{16), 17), 18)} のアミノ酸配列と完全に一致した。この阻害因子は、膵臓から分泌されるトリプシン阻害因子 (Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (PSTI)) のファミリーに属し、bikazin (2つの Kazal 型ドメイン) と呼ばれている¹⁸⁾。Hochstrasser らは、SPI (115 個) の全アミノ酸を解読し、イヌの唾液に分泌されるダブルヘッド構造のプロテアーゼ阻害因子であることを報告した^{16), 17), 18)}。この阻害因子はネコ科の哺乳類動物 (ネコ、ユキヒョウ、ライオン¹⁸⁾) とイヌ科の哺乳類動物 (キツネ²⁰⁾、badger²¹⁾) で報告されている。

しかしながら TF B の N 末端アミノ酸配列は、既知のタンパク質データベース或いは翻訳した DNA データベースにも一致するものが見出されず、TF B は、新規なタンパク質であると考えられた。

3-3-6 トリプシン阻害因子 B (TF B) のペプチドマップ

TF B について、更に性状解析を進めるため、トリプシン消化産物 (ペプチド混合物) を調製し、MALDI-TOF/MS による解析を行うとともに、ペプチドマップ解析を実施した。TF B のペプチドマップ解析の結果を図 6 に示した。トリプシン消化で得られた全 16 本のピークは、アミノ酸配列を解析し、図 7 に示した。このうち 16 番のピークのアミノ酸配列はペプチド断片を調製するために使用したトリプシンに由来するものであった。またピーク 13 番と 15 番、9 番と 12 番、11 番と 14 番の 3 ペアが同一アミノ酸配列であった。

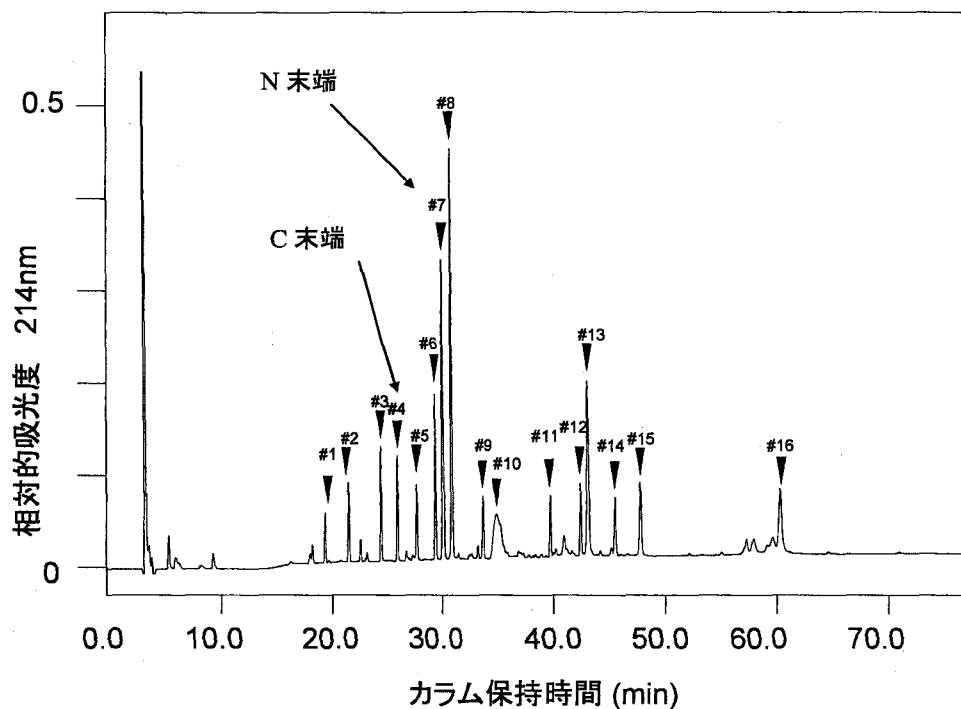


図 6. TF B のペプチドマッピング

還元アルキル化した TF B サンプルをトリプシンで消化し、逆相カラム (C18) で分離し、分離された全ピークを自動アミノ酸配列分析装置 (G1000A、HEWLETT PACKARD 社) および質量分析装置 (BIFLEX III、Bruker 社) で解析した。ピーク #16 は消化に用いたトリプシンのピークを示す。詳細な配列は図 6 に示した。逆相 C8 カラムで精製した TF B サンプルの 100 ~ 200 μg 相当をバッファー (6 M グアニジン塩酸、0.5M トリス塩酸 pH 8.0、2mM EDTA、5mMDTT) で希釈して、約 100 μL とした。サンプルは 37 $^{\circ}\text{C}$ で 75 分間処理し、更に 100mM ヨードアセトアミドを加え、更に 75 分間、37 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。反応液は、予めリン酸緩衝液で平衡化した MicroSpin G-25 ゲルろ過カラムに通液した。還元アルキル化したサンプルはトリプシンゴールド(質量分析用)で消化した。1mg/mL のトリプシンゴールドの 10 μL を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。翌日更に 1mg/mL のトリプシンゴールドの 10 μL を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で更に 7 時間反応させた。反応液は ODS カラム (TSK-gel ODS-80Ts) で分離した。

3-3-7 TF B (CKPI) 遺伝子の単離と同定

TF B のアミノ酸配列から予測される塩基配列のデータベース検索を行なったところ、本配列は、機能が不明だが、Genebank に AAEX01031134.1.として登録されているイヌ由来の 24 番染色体のショットガンクローニングのゲノムクローン、gi|54126067|ref|NW_139896.1|Cfa24_WGA61_1 の塩基配列と一致することが判明した。

TF B のゲノム塩基配列の長さは、約 1.6 kb と見積もられ、3つのエクソンと2つのイントロンから成っている。著者らがクローニングした cDNA 塩基配列の全長(図7)は、このゲノムクローンのエクソンを接続した全長と一致した。我々は、この配列を Gene bank に登録した (accession number : AB266058)。メチオニン (Met) から始まり、グルタミン酸 (Glu) で終わるオープンリーディングフレームは、130 個のアミノ酸から成っていたが、成熟型プロテアーゼ阻害因子の N 末端配列は、25 番目のアミノ酸、バリンから始まり、106 個のアミノ酸から成っていた。図7にはペプチドマッピングによって同定されたアミノ酸配列を cDNA 塩基配列上に相当するアミノ酸配列に下線を引いて示した。このことから Met から 24 番目 Gly までは分泌シグナルと推定した。また、N 末端アミノ酸配列分析で 5 番目はグルタミン酸 (Glu) であるが、cDNA 塩基配列上からはグルタミン (Gln) であった。

5.6×10^6 個の MDCK 細胞から抽出キット ISOGEN を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA をテンプレートとして宝酒造の 5' Full-RACE キット及び 3' Full-RACE キットで遺伝子増幅を試みた。プライマーは、Operon Biotechnologies Inc.より合成した DNA を用いた。具体的に用いたプライマーは、antisense 5'AS1; atccagaaaggcaccgatca、5'AS2; agaagggcagagtccagctt、5'PAS1; aacgggatccaagca、sense primers 5'S1; aatttgagtgccggagtgac; 5'S2; tgttgctctcatgcttgg、3' S1; cgagccacacgactctc であった。



————— ; トリプシン消化したTF Bから検出されたポリペプチド鎖

図 7. 単離された TF B の cDNA 塩基配列およびアミノ酸配列

実線下線部は、ペプチドマッピングで検出されたポリペプチド、下線番号はピークの番号を示す。破線下部はペプチドマッピングで検出されなかった部分を示す。最後の'*'はストップコドン (TAA) を示す。

5' 並びに 3' RACE PCR 反応はメーカーの説明書に従った。RACE の増幅産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、TA クローニングキットにより単離した。プラスミド DNA は陽性コロニーから抽出し、TA クローニングベクター内の特異的塩基配列 (M13RV primer, caggaacagctatgac; T7 primer, taatacgaactcactataggg) を持つプライマーを用いて自動シーケンサーにより塩基配列を解読した。cDNA の塩基配列を上段に示し、オープンリーディングフレームを大文字で示した。ORF 塩基配列から推定されるアミノ酸配列を下段に示した。アミノ酸配列の実線下線部は図 6 のペプチドマッピングで得られたポリペプチドを示す。破線下線部はペプチドマッピングで確認できなかったアミノ酸配列を示す。○印は N 型糖鎖の結合が推定されるアスパラギンを示す。本塩基配列はジーンバンク・データベースに登録した (accession no. AB266058)。

c DNA の塩基数は 390bps であり、シグナルペプチド部分を除いた成熟ポリペプチド部分の塩基数は、318bps であった。 また、全アミノ酸残基数は 130 個であり、成熟ポリペプチドのアミノ酸残基数は 106 個であった。

また、SLPI 分子のジスルフィド結合の配置から推定した TF B 分子の構造を図 9 に示す。

a) TF B と SLPI の種間アミノ酸配列比較

	1	11	21	31	41	50
Human	; mkssglfpfl	vllaalgtlap	wavegsgksf	kagvcppkks	aqcl-rykkpe	
Rat	; mkssglfpflm	vllaalgvlap	wsveg-gkndaikigacparkp	aqclkr-ekpe		
Mouse	; mkscgllpft	vllaalgi lap	wtveg-gkndaikigacpakkp	aqclkl-ekpq		
Sheep	; mkfsglfpfl	-llaalgtlal	waveg-aenea lkagacpprks	aqcfn-ekpr		
TF B	; mqssslfpflm	-llvlgtlvp	wtvegvg-naw-kaglcpsvpp	drclsgfekfe		
	←	signal	→			

	51	61	71	81	91	100
Human	; cqsdwqcpqk	krccpdtcgi	kcldpvdtpn	ptrrkpgkcp	vtygacimln	
Rat	; cstdwgcpqk	qrccqdtcgf	kcldpvpirg	pvk-kpgrcl	kfqgkclmln	
Mouse	; crtdwecpqq	q-ccqdaqcs	kcvnpvpirk	pvwrkpgrcv	ktqarcmimln	
Sheep	; cssdwqcpqk	kkccldtcgt	ecldpvnitn	pvkkkpqtcv	vihgacimlk	
TF B	; crsdwqcpqr	qicsshacgi	kcldpvnvsn	silrmpgrcv	vvygacimln	

	101	111	121	131
Human	; ppnfcemdga	ckrdlkccmg	mcgkscvspv	ka
Rat	; ppnkcaqndga	cdgkykcccg	mcgkvc lppv	
Mouse	; ppnvcqardga	cdgkykcccg	icgkvc lppm	
Sheep	; plnhcetddg	cigalkccka	mcgkvc l s--	ka
TF B	; ppnhcetdre	cvsnlkckq	mcgkacvdpe	

b) TF B、ヒト SLPI、およびヒト Elafin のアミノ酸配列比較



図 8. TF B およびヒト低分子タンパク性プロテアーゼ阻害因子、SLPI と Elafin とのアミノ酸配列比較

a) 各種 SLPI (Secretory Leukocyte Protease Inhibitor) 分子のアミノ酸配列比較

b) ヒト由来 SLPI、Elafin と新規プロテアーゼ阻害因子 TF B のアミノ酸配列比較を示す。ヒト SLPI 分子のアミノ酸配列に対して相同な配列は黒背景にハイライトで示した。また保存されたシステイン残基は灰色背景にハイライトで示した。太線下線部は C 末端に位置するエラスターゼ阻害ドメイン (WAP/WFDC domain) を示した。破線下線部は SLPI の N 末端トリプシン阻害ドメインの位置を示す。

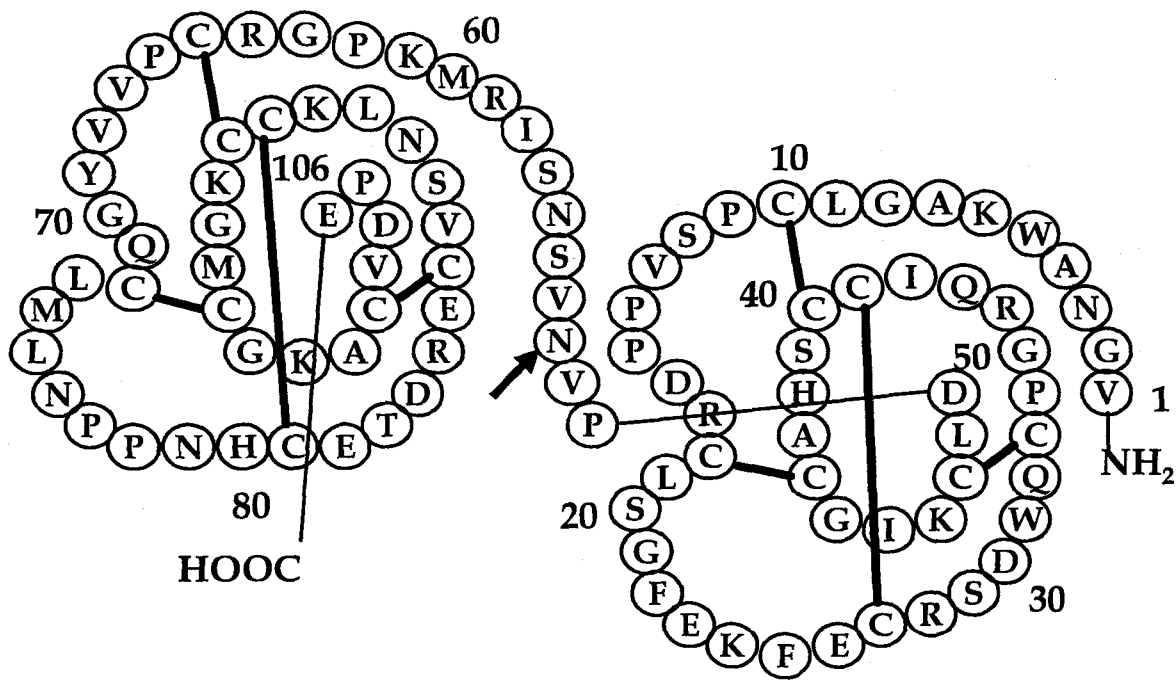


図9. SLPI分子構造から推定されるTF Bの構造

太線の C-C はジスルフィド (SS) 結合の位置を示す。1~55 番のアミノ酸が N 末端ドメイン、56~106 番のアミノ酸が C 末端ドメインを形成し、各ドメインに SS 結合が 4 箇所存在すると推定される。矢印のアスパラギンは N 型糖鎖の結合が推定される。

3-3-8 アミノ酸配列比較

TF B 分子の全アミノ酸配列解読の結果から、この分子がダブルヘッド様構造を持っており、ウリナスタチン²²⁾、²³⁾や SLPI²⁴⁾のような低分子プロテアーゼ阻害因子と同じファミリーに属することが示唆された。これらアミノ酸配列をもとにモチーフ検索を行ったところ、TF B 分子は SLPI のように4つのジスルフィドコア (Whey Acidic Protein (WAP) の four-disulfide core ; WFDC) から成るドメイン²⁵⁾を2つ持っていることが示唆された。

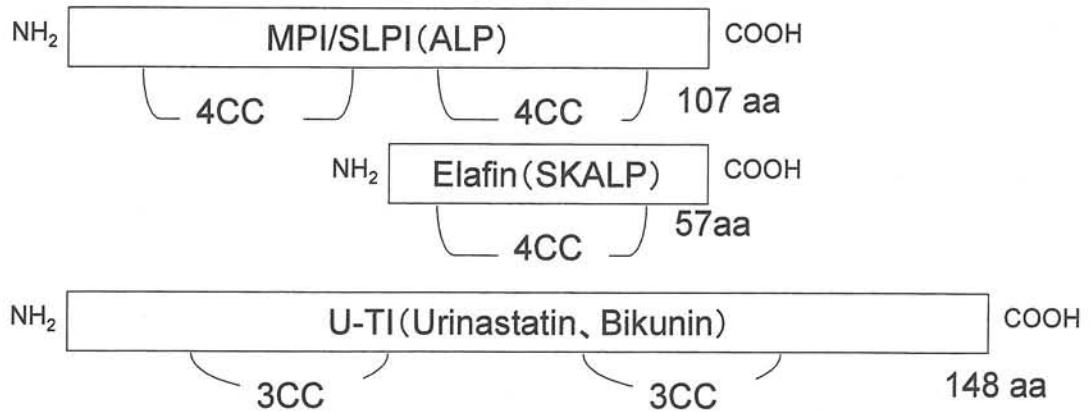
著者らはTF Bのアミノ酸配列とヒトSLPI分子に対する他の既知の動物由来のホモログ分子のアミノ酸配列を比較した(図8a)。TF Bのアミノ酸配列はヒトSLPIのアミノ酸配列と63.8%相同であった。またラット²⁶⁾、マウス²⁷⁾、ヒツジ²⁸⁾は、それぞれ39%、46%、70%のホモロジーであった。機能的なドメイン構造を形成するシステイン残基近傍は高度に保存されていた。これらの保存されたドメイン構造から、TF BはSLPIと同様に2つのWAPドメインを持った低分子プロテアーゼ阻害因子のWFDCファミリー²⁹⁾のメンバーであると考えられた。図8bに示すように、SLPIとElafin²⁹⁾のC末端にあるエラスターゼ阻害領域とTF BのC末端のWFDCには、システイン残基と共に保存されたモチーフ(WAPモチーフ²⁹⁾)、C-X-{C}-[DN]-X(2)-C-X(5)-C-Cを持ち、ある程度の相同性が認められた。これらの良く保存されたドメインの存在はTF B分子がヒトSLPIのイヌ・アナログの可能性を示唆する。更にSLPIは白血球だけではなく、腎臓でも発現、分泌されていることが最近報告されているが³¹⁾、ヒト腎細胞株(SK-NEP-1細胞:HTB-48)では、阻害活性は検出されなかった。これらの阻害因子が通常の生理学的環境でも分泌されているかどうか、またその生理学的な意義は不明である。

3-3-9 低分子プロテアーゼ阻害因子におけるドメイン構造比較

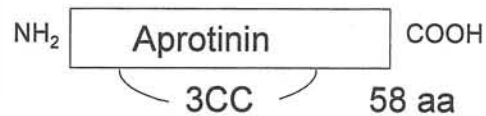
SLPI (MPI/ALP/HUSI-I)を含むヒト低分子プロテアーゼ阻害因子に類似の分子として

Elafin (SKALP)と U-TI (Ulinastatin/Bikunin)が報告されている。 またウシ由来アプロチニン/BPTI³²⁾ は Elafin 様の約 60 アミノ酸から成るドメイン構造^{33), 34)}を一つ有している (図 10)。 この阻害因子は WFDC (ホエー酸性タンパク質 4 ジスルフィドコア) 領域というよりもむしろ、BPTI/Kuniz ドメイン構造を有している。 図 10 では CKPI、SLPI、Elafin の保存された WFDC 領域の比較結果をまとめたものである。 ここで、2 つの BPTI/Kuniz (3 ジスルフィド結合) ドメイン構造を持つウリナスタチン (U-TI) および一つのみ Kuniz ドメインを有するアプロチニンは、WFDC 領域を持っていないので、直接比較しなかった。 SLPI は Elafin (57 アミノ酸残基, 分子量 6kDa) と同一のファミリーに属するエラスターゼの阻害因子でもある³⁵⁾。 SLPI 分子の N 末端の保存された領域はトリプシンの阻害領域³⁶⁾と考えられ、一方、エラスターゼの阻害領域は C 末端の保存された領域にあると考えられている³⁷⁾。 従って、著者らはトリプシンの代わりにブタ由来エラスターゼ[EC 3.4.21.36]を用いた SRDi を用いて、TF B のエラスターゼ活性の測定を試みた。 しかしこの方法では TF B のエラスターゼ阻害活性は検出されなかった (図 11)。 この原因は用いたエラスターゼがブタ由来であるため阻害されなかったか、或いは、CKPI の C 末端側の WFDC ドメインにエラスターゼ阻害活性がないかと考えられるが、N 末端 WFDC ドメインの SLPI との相同性と比べると、C 末端側の WFDC ドメインの相同性は、SLPI や Elafin と異なるため、著者らは、この新規のプロテアーゼ阻害因子 (TF B) をイヌ SLPI ではなく、CKPI (Canine Kidney Protease Inhibitor) と命名した。

ヒト由来の低分子プロテアーゼ阻害因子



ウシ由来の低分子プロテアーゼ阻害因子



MDCK細胞由来プロテアーゼ阻害因子

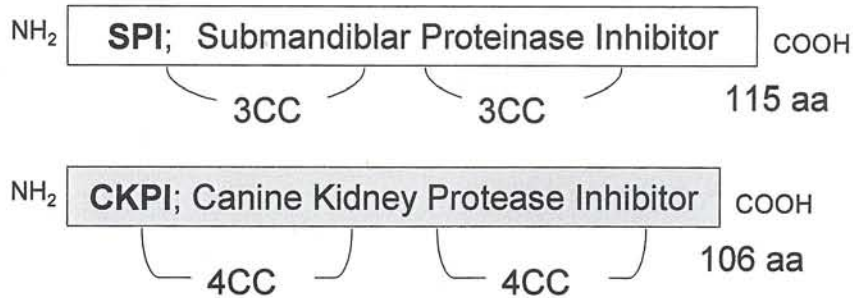


図 10. ポリペプチド性低分子プロテアーゼ阻害因子のまとめ

囲みはポリペプチド性低分子プロテアーゼ阻害因子分子を示し、その下の枠 (3CC、4CC) は分子内のドメイン構造の位置を示している。囲みの後ろに分子を構成するアミノ酸残基数を示した。4CC はホエー酸性タンパク質の WAP four-disulfide core (WFDC)ドメイン構造位置を示し、3CC は three-disulfide core (Kazal 型および Kuniz 型)ドメイン構造位置を示す。ヒト由来 MPI/SLPI と Elafin は エラスターゼを阻害する WAP モチーフを有している。ヒト U-TI (ウリナスタチン) とウシ由来アプロチニン は BPTI/Kuniz ドメインを持つ。今回の研究で見出した MDCK 由来の TF A/SPI は Kazal 型ドメインを持ち、新規な TF B/CKPI はヒト MPI/SLPI および Elafin に共通した WAP four-disulfide core ドメインを有していた。

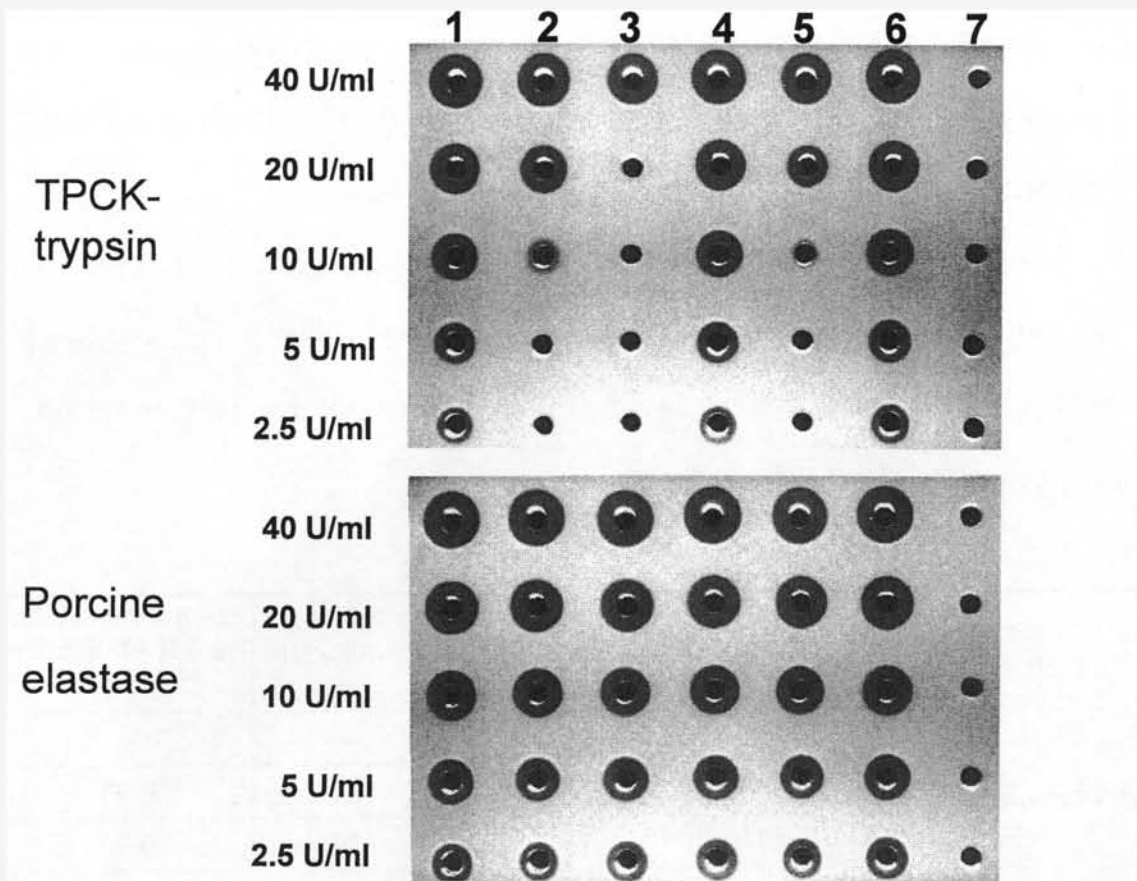


図 11. トリプシン阻害活性とエラスターゼ阻害活性の比較

トリプシンに替えてブタ由来エラスターゼ[EC 3.4.21.36]を用いた SRDi で、TF B のエラスターゼ阻害活性を測定した。試験条件の詳細は、材料と方法に記載した。

1% (w/v) アガロース、25mM トリス塩酸 (pH7.4)、150mM 塩化ナトリウム、2% (w/v) スキムミルクを含むアガロースゲルプレートに直径 2-5 mm の試料孔をあけ、試料を添加した。

ヘパリンカラムで精製した試料 (レーン ; 2,3,5)、培養上清 (レーン ; 4,5)、PBS (レーン ; 1) で TPCK-トリプシン (上部)及びブタエラスターゼ (下部) の希釈系列 (40, 20, 10, 5, 2.5 U/ml) を作製した。各希釈系列から約 15 μ L ずつ試料孔に添加した。レーン ; 7 は、サンプルなし。

ロードしたゲルプレートは湿箱に入れて、35~37 $^{\circ}$ C で 3 時間静置した後、消化リングを観察した。

3-3-10 精製阻害因子のウイルス増殖阻害活性

C8 逆相カラムで精製した TF A 及び TF B を用いて、100TCID₅₀ の A/NewCaledonia/20/99 株及び A/Wyoming/3/3000 株について、50%ウイルスを中和する最小阻害活性を以下の表2 に示す。MDCK 細胞培養上清中には、2 種類のトリプシン阻害活性が存在し、同時にインフルエンザウイルスの増殖を阻害する。精製収量の結果から、産生量は TFA よりも TFB の方が多かった(データは示していない)。また、表2 に示すように、A/Wyoming 株の場合、ウイルス増殖阻害活性に関しても TF A (3.09 U/mL) より TF B (0.37、0.35 U/mL) の方が高いことが示唆された。

ウイルス株 (100TCID ₅₀)	阻害因子	SRDiによる ウイルス阻害活性 (U/mL)	希釈の エンドポイント (倍)	ウイルスを50%阻害 する最小阻害活性 (U/mL)
A/NewCaledonia/20/99	TF A	—	—	—
	TF B(#1)	46.9	64	0.73
	TF B(#2)	11.3	16	0.70
A/Wyoming/3/3000	TF A	12.3	4	3.09
	TF B(#1)	46.9	128	0.37
	TF B(#2)	11.3	32	0.35

表 2. 精製した阻害因子のウイルス増殖阻害活性

阻害因子 TFA は 1 バッチ、TF B については 2 バッチを測定した。“—”は未測定。
希釈のエンドポイントは、100TCID₅₀ のウイルス量で接種したウェルの 100%増殖阻害する試料の希釈倍数を示し、この濃度を 50%増殖阻害する最小濃度(活性)とした。

3-4 プロテアーゼ阻害因子開発の意義

低分子のポリペプチド性プロテアーゼ阻害因子（アプロチニン、SLPI）を用いたインフルエンザウイルス感染症や呼吸器疾患の治療の試みがなされている。^{38), 39), 40), 41)}

MDCK 細胞から分泌される因子も、インフルエンザウイルスの増殖を阻害し、宿主細胞のウイルス感染を防御する薬剤候補となりうることを示唆している。

プロテアーゼはタンパク質分解作用を持つ酵素であり、多くの生命現象に深く関わっているが、その作用を阻害する阻害因子も重要な役割を担っている。プロテアーゼ阻害因子の中で、トリプシンに対して強い阻害活性を有するものがトリプシン阻害因子である。トリプシン阻害因子大きく2つに分けられる。1つは、スルホンアミド、メシル酸ガベキセートやメシル酸ナファモスタットのような非タンパク性の化合物であり、もう1つは、アプロチニンやウリナスタチンのようなタンパク性のトリプシン阻害因子である。前者は、広範な酵素阻害スペクトルを特徴とし、後者は、トリプシン阻害因子としての作用の他に、細胞膜の安定化等、生体の恒常性を回復させるなど生理学的な意味を持つものが多い。これらは、臨床の場においてそれぞれの特徴を生かした医薬品として使用されている。例えば、アプロチニンやウリナスタチンは、実際に膵の自己消化が原因とされる急性膵炎をはじめ、川崎病、肝移植、早産、手術やエンドトキシンショック等の治療に用いられている。

現在、医薬品として使用されているアプロチニンやウリナスタチンは、ウシの肺やヒト尿中より精製されている生物起源の原材料が用いられている。そのために、大量に生産する場合には原材料の確保が難しく、原材料が不均一であるため一定の成分からなる製剤を製造することも容易ではない。更に、生体成分由来の製剤に一般に共通した問題である、未知成分やヒト感染性ウイルスの混入が懸念される。このような問題を解決するための一つの方法として、遺伝子工学的手法による組換え型のウリナスタチンの開発が試みられている。ウリナスタチンは、Kniz 型ドメイン構造を2つ持つ Double-headed inhibitor であり、それぞれのドメインで異なる活性を有することが明らか

にされている。すなわち、Kniz ドメイン1は、好中球エラスターゼ及びキモトリプシンの阻害活性を有し、その活性はヘパリン添加により上昇する。一方、Kniz ドメイン2は、トリプシン、キモトリプシン及びプラスミンの阻害活性を有し、その活性はヘパリン添加により低下する。これらの知見に基づき、ピキア属酵母を宿主細胞としてウリナスタチンやその各ドメインの製造方法、更には、ウリナスタチンの一部のアミノ酸を置換してなるアミノ酸置換型ウリナスタチンや活性ドメインのみからなる短縮型ウリナスタチンの製造方法が報告されている⁴²⁾。

ウリナスタチンやアプロチニン以外のタンパク性のトリプシン阻害因子としては、これまでに、ウシ膵臓由来の塩基性トリプシン阻害因子⁴³⁾、牛乳及び清乳由来の酸性トリプシン阻害因子 (60~70kDa)⁴⁴⁾、大豆由来のトリプシン阻害因子⁴⁵⁾、藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) 由来のトリプシン阻害因子⁴⁶⁾、シロナタマメ (*Canavalia gladiata*) 由来のトリプシン阻害因子 (分子量 7~8kDa)⁴⁷⁾などが報告されているが、その性状、生理的意義、代謝経路等、まだ不明な部分が多い。

ウイルスによる感染および関連疾患の診断、コントロール、予防および治療に対するアプローチに関しては、そのようなアプローチに利用することができるウイルス特異的機能を同定することがしばしば望まれる。特にウイルスにコードされるポリペプチドの酵素活性は有用な知見となる。これらのウイルス特異的機能を担う成分は、ウイルスの増殖にしばしば不可欠のものであり、抗ウイルス薬物開発にふさわしいターゲットであり得る。このような観点から、プロテアーゼ阻害因子を利用した種々の抗ウイルス剤の開発が行われている。例えば、ウリナスタチンを用いた哺乳動物におけるロタウイルス感染症の予防及び/又は治療薬の開発⁴⁸⁾、プロテアーゼ阻害因子と HIV 及びレトロウイルスのウイルス複製阻害のための薬学的組成物との組み合わせによる、HIV 及びレトロウイルス関連障害の処置又は予防薬の開発⁴⁹⁾、C型肝炎NS3プロテアーゼ阻害因子を用いた抗C型肝炎ウイルス薬剤の開発⁵⁰⁾、アスパルチルプロテアーゼ阻害因子であるスルホンアミドを用いた HIV-1 および HIV-2 ウイルスに対する抗ウイルス性薬

剤の開発^{51), 52)}などが報告されている。

インフルエンザウイルス治療薬に関して言えば、1998年我が国でも抗A型インフルエンザ薬としてアマンタジン (Amantadine) を使用することが認可された。アマンタジンは、A型インフルエンザの予防に対しては70~90%の効果を示すが、B型ウイルスには無効であり、神経系や消化器系の副作用を生じやすく、また、患者に使用すると比較的早期に薬剤耐性ウイルスが出現するため、注意して使用する必要がある。その後開発されたノイラミニダーゼ阻害薬 (ザナミビル、オセルタミビル) は、A型にもB型インフルエンザにも有効で、耐性も比較的できにくく、副作用もほとんどないとされていた。しかしながら、最近では、小児における耐性株の出現や精神症状の副作用が問題となっている。

このような問題に対処していくには、タンパク性、非タンパク性を問わず、既存の治療薬の改良や作用機序の異なる新たなメカニズムを有する抗インフルエンザウイルス剤の開発が重要である。例えば、インフルエンザウイルスはウイルス粒子表面に存在する赤血球凝集素 (HA) の HA1+HA2 への開裂により感染力を獲得し、その感染は多段階に進行することが知られている。このHAの開裂は、鳥では、標的臓器である腸や気道から分泌されるトリプシン様のプロテアーゼにより行われる。HAが開裂し、活性化されることで、その臓器におけるウイルス感染が成立する。このトリプシン様のプロテアーゼは、上述したように、ウイルス特異的機能を担う成分の一つであり、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤の開発の魅力的なターゲットと考えられる。事実、木戸博士らは、ラットを用いたインフルエンザウイルスの感染メカニズムの研究から、感染成立には宿主由来のプロテアーゼ (トリプターゼクララ) によるウイルス表面のHA抗原の解裂活性化が重要であること、更に、その感染は、ヒト上部気道から分泌されるヒト粘液プロテアーゼ阻害因子 (Human Mucosal Protease Inhibitor; MPI) と肺サーファクタントがトリプターゼクララの活性を阻害することによって防御されることを示した⁵³⁾。

インフルエンザウイルス粒子表面の赤血球凝集素 (HA) の HA1+HA2 への開裂に関与するプロテアーゼは、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス剤開発の魅力的なターゲットと考えられ、そのプロテアーゼに対して阻害活性を有する生体内の物質は、インフルエンザの予防又は治療薬の有望な候補となる可能性がある。しかしながら、大量生産のための材料確保、製剤の均一性の保証、未知ウイルスの混入といった問題を解決する必要があり、これを達成することは決して容易ではない。

本プロテアーゼの発見は、このような問題の解決の必要性に鑑みてなされたものであって、細胞培養物由来のプロテアーゼ阻害活性を有する新規ポリペプチド及びその精製方法、該新規ポリペプチドを主成分として含有する、インフルエンザウイルスの増殖を抑制するための医薬組成物を提供することを目的とする。

また、他のもう一つの目的は、該新規ポリペプチド又はその一部をコードする塩基配列からなる核酸断片、該核酸断片を有する発現カセット及び該発現カセットが組み込まれた形質転換体、該新規ポリペプチドを認識する抗体、並びにスキムミルクゲル分解法によるプロテアーゼ及びプロテアーゼ阻害活性を有する新規ポリペプチドの検出方法を提供することにある。

著者らは、上記の目的を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、イヌ腎由来細胞の培養液中にインフルエンザウイルスの増殖を阻害する物質が分泌されることを見出し、この物質を、一連の精製工程、すなわち、限外濾過膜処理工程、ヘパリンカラムクロマトグラフィー工程、及び場合によっては、逆相カラムクロマトグラフィー工程に供することにより単離することに成功した。こうして単離された物質は、プロテアーゼ阻害活性を有する新規なポリペプチドであり、またポリペプチドが SDS-PAGE 法による分子量が還元下で約 11kDa および非還元下で約 15kDa である、また 60°C、30 分間の加熱処理によりトリプシン阻害活性を消失しないが、還元剤の処理によりトリプシン阻害活性を消失することが判明した。

インフルエンザウイルスの増殖を抑制するための医薬組成物、哺乳動物細胞の培養液

から上記のポリペプチドを精製する方法、上記のポリペプチドをコードする塩基配列からなる核酸断片、該核酸断片を有する発現カセット及び該発現カセットが組み込まれた形質転換体、上記のポリペプチドを認識する抗体、並びにスキムミルクゲル分解法によるプロテアーゼ及びプロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドの検出方法を提供するものである。

本研究によれば、プロテアーゼ阻害活性を有する新規なポリペプチド及びその調製方法が提供される。この新規ポリペプチドは、トリプシン阻害活性を有するため、インフルエンザ感染の初期段階である、該ウイルス表面のHAをHA1とHA2に開裂するトリプシン活性を抑えることができ、これによりインフルエンザウイルス感染を阻止することが期待できる。従って、この新規ポリペプチドは、インフルエンザウイルス感染の予防薬又は治療薬の材料を提供する。

また、既存の方法に従って、新規ポリペプチドに対する抗体を容易に入手することができるので、これらを用いた抗原抗体反応に基づくインフルエンザウイルス感染の診断、感染メカニズムに関する研究等に利用できる。

この新規ポリペプチドは、侵襲、多臓器不全、ショック、膵炎、播種性血管内凝固症候群、虚血性心疾患、腎炎、川崎病、早産、肝硬変、再開塞、血管透過性昂進による浮腫、呼吸困難症候群、慢性間接リュウマチ、関節炎、アレルギー等トリプシンが関与する疾患の治療剤の開発にも利用できる可能性を示唆している。

本研究の新規ポリペプチドの精製方法は、イヌ腎細胞に限らず種々の培養細胞由来のプロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドを調製する方法として利用できる。また、本発明のスキムミルク分解法は、種々のプロテアーゼ及びプロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドの活性測定や検出に利用できる。培養細胞におけるウイルス増殖において、プロテアーゼ阻害活性を有するポリペプチドの量を制御することによりウイルス産生量を上げることができ、結果として、ワクチン製造における生産性を高めることも可能である。

3-5 参考文献

- 1) Goshima FY, Maeno K. Persistent infection of MDCK cells by influenza C virus: initiation and characterization. *J Gen Virol* 1989; 70:3481-3485.
- 2) Medvedeva MN, Aron RA, Golubev DB. Persistent influenza virus infection in a MDCK cell culture. *Vopr Virusol* 1984; 29:536-539.
- 3) Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H. Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. *J Biochem* 1997; 121:309-316.
- 4) Kido H, Beppu Y, Imamura Y, Chen Y, Murakami M, Oba K, et al. The human mucus protease Inhibitor and its Mutants are novel defensive compounds against infection with influenza A and sendai viruses. *Biopolymers (Peptide Science)* 1999; 51:79-86.
- 5) Skehel JJ, Waterfield MD. Studies on the primary structure of influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:93-97.
- 6) Tashiro K. The role of cleavage activation of the hemagglutinin by host and bacterial proteases in the pathogenesis of influenza viruses. *Nippon Rinsho* 1997; 55:135-141.
- 7) Zhirnov OP, Ikizler MR, Wright PF. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J Virology* 2002; 76: 8682-8689.
- 8) Brown KK, Stewart RC. Influenza vaccine production in liquid cell culture. US patent 1985; 4,500,513.
- 9) Kaverin NV, Webster RG. Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity. *J Virology* 1995; 69:2700-2703.
- 10) Webster RG, Kaverin NV. Influenza virus replicated in mammalian cell culture and vaccine production. US patent 2002; 6,344,354 B1.
- 11) Nishiyama K, Sugawara K, Nouchi T, Kawano N, Soejima K, Abe S, et al. Purification and

- cDNA cloning of a novel protease inhibitor secreted into culture supernatant by MDCK cells. *Biologicals* 2008; 36: 122-133.
- 12) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 13) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano EK, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
- 14) 勝沼信彦 プロテアーゼインヒビターの新検出法 Reverse zymography 臨床検査 2003; 47, 8: 871-874
- 15) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989, chapter 1.25-1.28
- 16) Hochstrasser K, Fritz H. Die Aminosäuresequenz des doppelkopfigen Proteinase Inhibitors aus der Glandula submandibularis des Hundes, I. *Hopper-Seyler's Z Physiol Chem Bd* 1975; 356: S1659-1662.
- 17) Hochstrasser K, Fritz H. Die Aminosäuresequenz des doppelkopfigen Proteinase-Inhibitors aus der Glandula submandibularis des Hundes, II. *Hopper-Seyler's Z Physiol Chem Bd* 1975; 356: S1859-1863.
- 18) Hochstrasser K, Bretzel G, Wachter E, Heidl S. The amino acids sequence of the double-headed proteinase inhibitor from canine submandibular glands, III. *Hopper-Seyler's Z Physiol Chem Bd* 1975; 356: S1865-1877.
- 19) Reisinger PW, Hochstrasser K, Gottlicher I, Eulitz M, Wachter E. The amino acids sequence of the double-headed proteinase inhibitor from cat, lion and dog submandibular glands. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1987 Jun; 368: 717-726.
- 20) PW, Hochstrasser K, Wachter E. The amino acids sequence of the double-headed proteinase inhibitor from fox (*Vulpes vulpes*) submandibular glands. *Protein Seq Data Anal* 1988; 26: 942-943.

- 21) Hochstrasser K, Paulus M, Wachter E, Reisinger PW. The amino acids sequence of the double-headed proteinase inhibitor from badger (*Meles meles*) submandibular glands. *Protein Seq Data Anal* 1989; 1: 453-456.
- 22) Odum L, Halkier T, Hojrup P, Schousboe I. Characterization of urinary proteinase inhibitors with segments amino acids sequences identical to sequences of pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Int J Biochem* 1989; 21: 1319-1327.
- 23) Proksch GJ, Routh JI. The purification of the trypsin inhibitor from human pregnancy urine. *J Lab Clin Med* 1972; 79: 491-499.
- 24) Thompson RC, Ohlsson K. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leucocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leucocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6692-6696.
- 25) Seemuller U, Arnhold M, Fritz H, Wiedenmann K, Macheidt W, Heinzl R, et al. The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoproteinase). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. *FEBS Lett* 1986; 199: 43-48.
- 26) Chen D, Xu X, Cheon YP, Bagchi MK, Bagchi IC. Estrogen induces expression of secretory leucocyte protease inhibitor in rat uterus. *Biol Reprod* 2004; 71: 508-514.
- 27) Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16899-16903.
- 28) Brown TI, Mistry R, Collie DD, Tate S, Sallenave J-M. Trappin ovine molecule(TOM), the ovine ortholog of elafin, is an acute phase reactant in the lung. *Physiol Genomics* 2004; 19: 11-21.
- 29) Richardson RT, Sivashanmugam P, Hall SH, Hamil KG, Moore PA, Ruben SM, et al.

- Cloning and sequencing of human eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene* 2001; 270:93-102.
- 30) Wiedow O, Schroder J, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1990; 265: 14791-14795.
- 31) Ohlsson S, Ljungkrantz I, Ohlsson K, Segelmark M, Wieslander J. Novel distribution of the secretory leukocyte proteinase inhibitor in kidney. *Mediators Inflamm* 2001 Dec; 10: 347-350.
- 32) Creighton TE, Charles IG. Biosynthesis, processing, and evolution of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 1987; 194:11-22.
- 33) Molhuizen HO, Alkemade HA, Zeeuwen PL, de Jongh G.J, Wieringa B, Schalkwijk J. SKALP/erafin: an elastase inhibitor from cultured human keratinocytes. Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase cross-linking. *J Biol Chem* 1993; 268: 12028-12032.
- 34) Sallenave, J-M, Silva A. Characterization and gene sequence of the precursor of elafin, an elastase-specific inhibitor in bronchial secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 439-445.
- 35) Sallenave J-M. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoproteinase) as alarm antiproteinase in inflammatory lung disease. *Respir Res* 2000; 1: 87-92.
- 36) Ying QL, Kemme M, Simon SR. Function of the N-terminal domain of secretory leukoprotease inhibitor. *Biochemistry* 1994; 33: 5445-5450.
- 37) Masuda K, Kamimura T, Watanabe K, Suga T, Kanesaki M, Takeuchi A, et al. Pharmacological activity of the C-terminal and N-terminal domains of secretory leukoprotease inhibitor in vitro. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 883-888.

- 38) Zhirnov OP, Ovcharenko AV, Bukrinskaya AG. Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. J Gen Virol 1984; 65:191-196.
- 39) Ovcharenko AV, Zhirnov OP. Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. Antivir Res 1994; 23: 107-118.
- 40) Zhirnov OP. High protection of animals lethally infected with influenza virus by aprotinin-rimantadine combination. J Med Virol 1987; 21: 161-167.
- 41) Vogelmeier C, Buhl R, Hoyt RF, Wilson E, Fells GA, Hubbard RC, et al. Aerosolization of recombinant SLPI to augment antineutrophil elastase protection of pulmonary epithelium. J Appl Physiol 1990; 69: 843-1848.
- 42) 森下英昭、金森利至、延原正弘 新規ポリペプチド、新規 DNA、医薬組成物及びポリペプチドの精製方法 持田製薬株式会社 特許公開平 6-25289 号
- 43) J.Gen. Physiol. 1936; 19, 991-
- 44) 内田智子、桐原修、谷久典、大石一二三、渡辺正利 牛乳由来セリンプロテアーゼインヒビター及びその製造法 協同乳業株式会社 公開 3/28/1995 特許公開平 7-82296 号
- 45) J.Gen.Physiol 1946; 29, 149-
- 46) 山口勝巳、村上昌弘 微細藻類から得られるトリプシンインヒビター 伊藤ハム株式会社 公開 12/14/1993 特許公開平 5-331189 号
- 47) 大庭英樹、朴晟秀、中村修、シャライ・イムレ、墨利久 新規トリプシンインヒビター 工業技術院長 公開 3/28/2000 特許公開 2000-86530 号
- 48) 柚木幹弘、後藤節 ロタウイルス感染症の予防治療剤 株式会社ミドリ十字 公開 5/12/1995 特許公開平 7-316073 号
- 49) 楊繼江、蔡修賢、蔡修仁 HIV およびレトロウイルスに関する障害の処置または予防のための薬学的組成物および組み合わせ 1/23/2002 特許公開 2002-20283 号
- 50) パート・ロバート、コート・ジョン、オマリー・イーサン、ビーセッティ・ゴビン

ダ・ラオ セリンプロテアーゼ、特に C 型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼのインヒビター バーテックス・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
11/10/2001 特許公表 2003-529583 号

51) ヘイル・マイケル・ロビン、チュン・ロジャー、プライス・スティーブン、ウィルクス・ロビン・デイビッド、スカイラー・ウェイン・カール、ジャービス・アシュレイ・ニコラスら アスパルチルプロテアーゼのインヒビター バーテックス・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 12/21/2000 特許公表 2003-502309 号

52) ヘイル・マイケル・アール、ベイカー・クリストファー・ティー、スタマーズ・テイモシー・エイ、シェリル・ロナルド・ジー、スパルティスティン・アンドリュウ、ファーファイン・エリック・エスら アスパルチルプロテアーゼのインヒビター バーテックス・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド 8/17/2000 特許公表 2002-536430 号)

53) Kido H, Sakai K, Kishino Y, Tashiro M. Pulmonary surfactant is a potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza A virus. FEBS Lett. 1993 10;322(2):115-119.

第4章 位相差電子顕微鏡による氷包埋したインフルエンザウイルスの粒子構造解析

4-1 はじめに

これまで細胞培養技術や遺伝子組換え技術を用いて生体分子レベルでの各因子の分子間相互作用をみてきたが、様々な局面で分子間の位置関係を直接検討し、その生体现象を理解するためにはナノレベルの粒子構造解析も重要な手段であると考えられる。構造解析の結果と物理的・化学的な性状が結びつくことにより、よりナノ分子レベルの現象が立証されると考えられる。第4章では新しい手法であるゼルニケ位相差電子顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの粒子構造の解析について論述する。

氷包埋標本の凍結電子顕微鏡観察は、様々なウイルス構造の解明に大きく貢献している。この手法では、高度に精製した浮遊ウイルスが急速凍結され、ガラス状の非常に薄い氷膜が形成されるため、ウイルス構造が自然な水和状態に保たれる^{1)~3)}。顕微鏡写真は、電子線照射によるダメージを防ぐため、最小線量のシステムを用いて低温で撮影される。それらは、二十面体粒子の3次元構造を作成するためにコンピュータで処理され、多くのウイルス構造が高分解能で3次元的に解析できる⁴⁾。しかし、ほとんどのエンベロープ・ウイルスは、多形態 (pleiomorphy) を取るため、多数の同じような粒子を平均化する手順を妨げるため、3次元解析が困難である。

永山博士らは、2005年に新しい位相差電子顕微鏡の実現に成功した^{5)~7)}。位相差光学顕微鏡と同様に、位相差の電子顕微鏡は氷包埋標本に高コントラストをもたらし、よりクリアな画像を作り出した。この手法により、氷包埋バクテリアの微細構造が、より大きな標本を観察するために発明された位相差顕微鏡の一種、すなわちヒルベルト微分干渉 (Hilbert differential contrast) 電子顕微鏡を用いて、明瞭に視覚化された^{8),9)}。

インフルエンザウイルスは、マイナスセンスの一本鎖 RNA ゲノムを持つエンベロープ・ウイルスであり、オルソミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae family) に属する^{10)~13)}。

凍結水和状態での生のインフルエンザウイルスの構造は、クライオ電子顕微鏡検査^{14),15)}及びクライオ電子線断層写真法¹⁶⁾で研究されてきた。これらの研究によって、ウイルスの構造に関する多くの情報が得られたが、完全なビリオンの3次元構造を理解するにはまだ不十分である。

著者らは氷包埋A型インフルエンザウイルスの観察に、バクテリアより小さい標本の観察により適したゼルニケ位相差電子顕微鏡検査を用いた^{17),18)}。新しい位相差画像から得られた新しいウイルス構造が、以前の報告における画像と比較されている。これは、ゼルニケ位相差電子顕微鏡検査をインフルエンザウイルス微細構造の研究に応用した初めての報告である。

4-2 技術的背景

4-2-1 ネガティブ染色法と低温電子顕微鏡（氷包埋法）

電子顕微鏡のネガティブ染色法は、精製したウイルス懸濁液を支持膜にのせ、重金属溶液（酢酸ウラニル、燐タングステン、モリブデン酸アンモニウム）を滴下し、余分な液を吸い取り、自然乾燥させる方法である。重金属が試料の周辺や間隙に入り込み、電子の散乱を大きくすることによってコントラストを得る手法である。ウイルス粒子は白く、周囲が黒くなり、ネガフィルムの様な逆コントラストで見えるようになる。ネガティブ染色法は有用であるが、支持膜への吸着や乾燥によるアーティファクトは避けられない。また表面構造は観察可能だが、ウイルスの内部構造までは見る事が出来ない。

氷包埋法は、予め親水化したマイクログリットにウイルス懸濁液を一滴のせ、余分な液を吸い取り、液体エタンに急速投入することで試料を凍結する方法である。凍結した試料はクライオトランスファー・システムを用いて電子顕微鏡に挿入し、液体窒素又は液体ヘリウム温度で最小電子線照射法により撮影する。ウイルス粒子は水分を含んだ状態でガラス状の氷に包埋されるため、ウイルス粒子の自然な形態が保持されると考えられる。

球状ウイルスの多くは正二十面体構造を示すため、コンピュータを用いて更に詳細な解

析を行うことが可能である。同一方向から撮影された像を重ね合わせることで解像度を上げることも可能で、X線結晶回折で得られたウイルス部品の原子レベルの情報と組み合わせることで、ウイルスのナノメートルレベルでの三次元構造を解明できるようになった。

4-2-2 位相差電子顕微鏡

光の吸収を見る通常法では、コントラストを付けるため必ず染色する必要がある。暗視野法では、強い背景光を消し暗視野とし、無染色細胞の僅かな光吸収を検出する方法である。しかし細胞のような透明試料の本来の観察法は、1930年代から1940年代にかけて Zernike により提案された位相差顕微鏡である。

光学顕微鏡では、位相差法が早くから実現され、細胞形態学に絶大な貢献をしたが、透過型電子顕微鏡では、位相板作製と位相板帯電の2つの難問のため、先駆的試みはあったが、発明以来60年間確立されてこなかった。しかし2001年に永山博士らは、これらの難問を解決し、ゼルニケ位相差電子顕微鏡の実現に成功した¹⁷⁾。

位相差法は、位相板を用いて、電子波の散乱波（複素波動）と透過波による干渉現象に基づいて高コントラストを得る方法である。レンズによる収差やデフォーカス（ボケ）によってもコントラストを得ることが出来るが、位相板を入れることで散乱波を1/4波長遅らせ、最大コントラストを得ることが出来る。

今回用いたゼルニケ位相差電子顕微鏡の構成図を図1に示す。通常の電子顕微鏡と異なるところは、対物レンズ後方の焦点面に中心孔を持つ位相板を装着している点である。位相板は、対物絞りに直径約1マイクロメートルの孔のあいた薄いカーボン膜を貼ったもので、その機能は、電子線の位相を90°シフトさせることである。この位相板による電子線の位相のシフト量は、膜の厚さと加速電圧によって変化するため加速電圧に応じて、カーボン膜の厚さを変え、100kVで約20nm、300kVで約30nmのカーボン膜を使用する。試料に当たった電子線がこの位相板を通過する際に、90°の位相のずれが生じ、中心孔を透過した電子線と干渉して、通常の電子顕微鏡では殆ど透明な物体に高いコントラストをつ

けることが出来る。このゼルニケ位相差法の最大の特徴は、正焦点の時コントラストが最大化されることである。氷包埋法による通常の電子顕微鏡の観察では、正焦点で撮影しても殆ど何もみえないため、焦点をずらして撮影しなければならず、アーティファクトが入り込む危険があったばかりでなく、電子顕微鏡本来の分解能が得られなかった。従って氷包埋法とゼルニケ位相差法を組み合わせることで、正焦点で高いコントラスト像が得られるようになった。

通常の電子顕微鏡

ゼルニケ位相差電子顕微鏡

(明視野法)

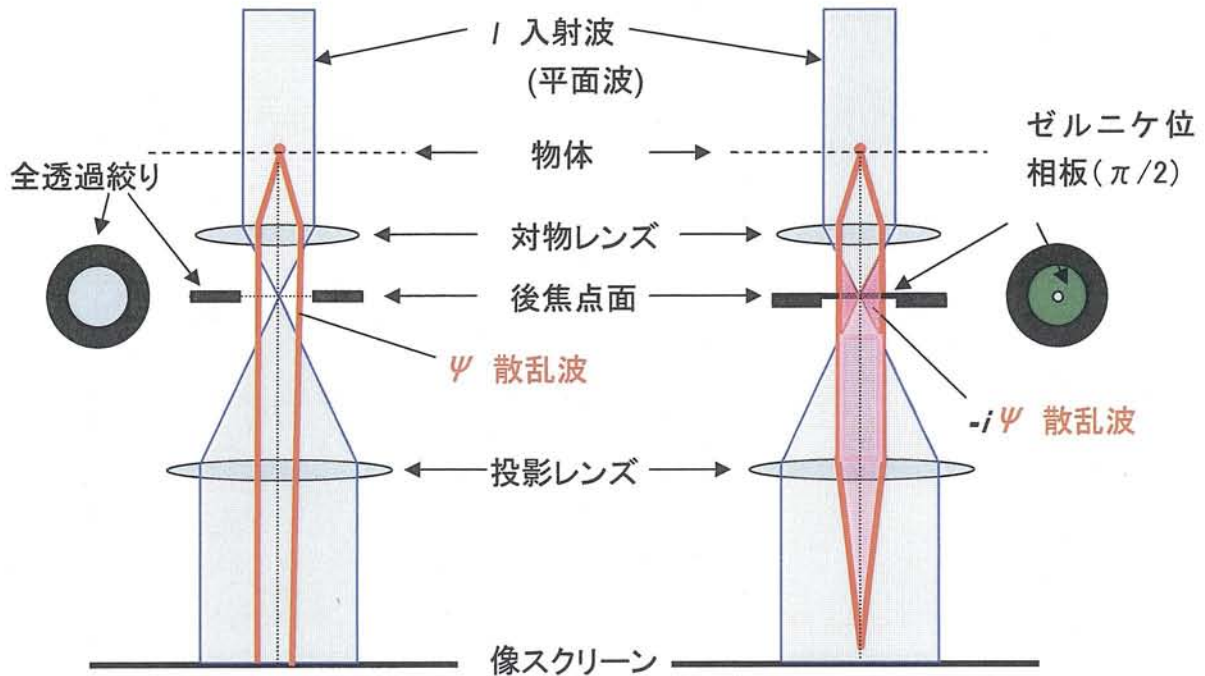


図 1. 通常の電子顕微鏡とゼルニケ位相差電子顕微鏡の構成図

通常の透過型電子顕微鏡（左側）とゼルニケ位相差電子顕微鏡（右側）の構成。ゼルニケ位相差電子顕微鏡は、対物レンズの後方の焦点面に中心孔を持つ位相板を装着している。

通常法（明視野法）では、後焦点面における絞りのみで散乱電子量を調節する。絞りとの協調によるデフォーカスコントラストで観察する（意識的に収差又はボケを入れて、その代償としてコントラストを得ている）。

位相差法では、中心孔のある位相板を後焦点面に入れ、散乱光のみを $1/4$ 波長ずらす。薄い物体（平面波； $I \gg |\psi|$ ）の場合、 $|\psi| \gg |\psi|^2$ なので、 ψ を観測する位相差法は、 $|\psi|^2$ を観測する暗視野法に比べ高コントラストとなる。

4-3 材料と方法

4-3-1 ウイルスの増殖と精製

インフルエンザ・ウイルス、A/NewCaledonia/20/99(H1N1)株を使用した。生後 11 日の孵化鶏卵 (embryonated chicken eggs) に浮遊ウイルスを接種し、34°C で 3 日間培養した後、4°C で一晩冷却した。次に、ウイルスが増殖した尿膜腔液 (allantoic fluid) を採取し、限外ろ過膜カートリッジ (ultrafiltration membrane cartridge) を使って濃縮した。ウイルスは超遠心法によってペレット化され、0.14 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.0) に再度浮遊した。ウイルスは 0%~50% のサッカロース濃度勾配を用いた密度勾配遠心法によって精製し、1:4,000 に希釈したホルムアルデヒドで、4°C で 2~4 日間不活化処理した。最後に、不活性化された精製ウイルスは、ホルムアルデヒドを取り除くために、PBS で透析した。

4-3-2 ゼルニケ位相差クライオ電子顕微鏡観察

まず 2 μ L の浮遊ウイルスを予めグロー放電によって親水性にした Quantifoil[®] R 1.2/1.3 多孔炭素グリッド (Quantifoil Micro Tools GmbH、イエナ市、ドイツ) の上に置いた。グリッド上の余分の水分を取り除くためにフィルター紙で水気を吸い取り、Leica EPCPC 冷凍装置 (Leica Microsystems AG、ヴェツラー市、ドイツ) を用いて、液体窒素に保存された液体エタンの中にくぐらせることによって急速冷凍した。この手順を用いて、ガラス状の凍結浮遊ウイルスの薄い膜を形成させた^{1), 3)}。電界放出銃、クライオステージ、ゼルニケ位相プレート、およびオメガフィルターを装備した JEM-3100FFC 透過電子顕微鏡 (JEOL Ltd., 東京、日本)¹⁷⁾ にグリッドを取り付けた。顕微鏡写真は、Gatan MegaScan 795 2Kx2K CCD カメラ (Nippon Gatan、東京) を使用し、焦点を合わせた 40,000 倍の直接倍率と 300 kV の加速電圧で、最小線量システムを用いて -269°C で撮影した。また比較のために、ゼルニケ位相プレートを用いない顕微鏡写真 (従来の透過電子顕微鏡) も、2 μ m の不焦点下で撮影した。

4-3-3 ウイルス粒子の計測

ゼルニケ位相プレートの「あり」または「なし」で撮影した 220,000~440,000 倍の顕微鏡写真で、ウイルス粒子のサイズ、スパイクの長さ、および細胞膜と基質層の厚さを測定した。ここで位相プレートの「あり」または「なし」で撮影した顕微鏡写真から得られた値の間に、有意な差は見られなかった。各ウイルス粒子について、粒子の長径と短径を測定した。軸率が 1.2 未満のビリオンは球形と分類し、軸率が 1.2 以上のビリオンは細長い形に分類した¹⁶⁾。個々のスパイクは、位相プレートなしでは解像が困難であったため、ビリオン表面の糖タンパク質スパイクの密度は、位相プレートを用いて撮影された顕微鏡写真のみの、倍率 440,000 倍で測定した。

4-4 結果

4-4-1 ウイルス粒子の多形性

ゼルニケ位相差画像においては、A 型インフルエンザ・ビリオンは、多くの糖タンパク質スパイク、ウイルス・エンベロップ、および内核 (inner core) から成る球形または細長い形の粒子として現れる (図 2A)。顕微鏡写真は焦点を合わせて撮られたにもかかわらず、画像は高コントラストでクリアであった。従来のクライオ電子顕微鏡では、焦点を合わせて撮影された場合は、さらなる解析に適した十分なコントラストを持つ画像を得ることが不可能であった。2 μm の不焦点で顕微鏡写真を撮ることによって、ビリオンの構造の明瞭度は相対的に低くなり、個々の糖タンパク質スパイクは解像が難しかったものの、コントラストの良いウイルス画像が得られた (図 2B)。

位相差電子顕微鏡で撮られた個々のビリオンの画像シリーズを、図 3 に示している。91 個のビリオンを精査した。ビリオンは形状によって、球形と細長の 2 つのグループに分類した (表 1)。球形のビリオンは直径の範囲が 73~177 nm、直径の平均は 121 nm、それらは全体数の 65% を占めた。一方、細長いビリオンは直径の範囲が 91~118 nm、直径

の平均は 102 nm、長さの範囲は 127~202 nm、長さの平均は 155 nm、そして全体数の 35% を占めた (表 1)。

また比較のため、通常の電子顕微鏡でネガティブ染色を行った。細長いウイルス粒子の直径は、ネガティブ染色法では、有意に大きい*³ (1.05 : 1)。スパイクの長さは、ネガティブ染色法では、有意に短い*⁵ (0.71 : 1)。ネガティブ染色法では、ウイルス粒子の変形がおこると考えられ、低温位相差電子顕微鏡法の測定値が正しい値を示すと考えられる (低温位相差電子顕微鏡法と低温電子顕微鏡法とでは、測定値に有意な差は認められなかった)。

また、ビリオンはウイルス・エンベロープに多形態を示した (図 3、表 1)。ほとんどのビリオン (78%) は、細胞膜下に完全な基質層を有し、電子を通さない層で裏打ちされた単一の黒っぽい線を示した (図 3A1~A5、B1~B4、表 1)。基質層は細胞膜と合わせて、厚さが 12.0 ± 0.8 nm (平均 \pm 標準偏差、40 個測定) であった。一部のビリオン (13%) は、電子を通さない層を持つ部分的な黒っぽい単一線を示す部分的基質層と、部分的な二層の細胞膜を有した (図 3C1~C7、表 1)。残りのビリオン (9%) には全く基質層がなく、細胞膜の 2 本の黒っぽい線を示した (図 3D1~D3、表 1)。細胞膜の厚さの平均は 6.0 ± 0.7 nm (平均 \pm 標準偏差、16 個測定) であった。

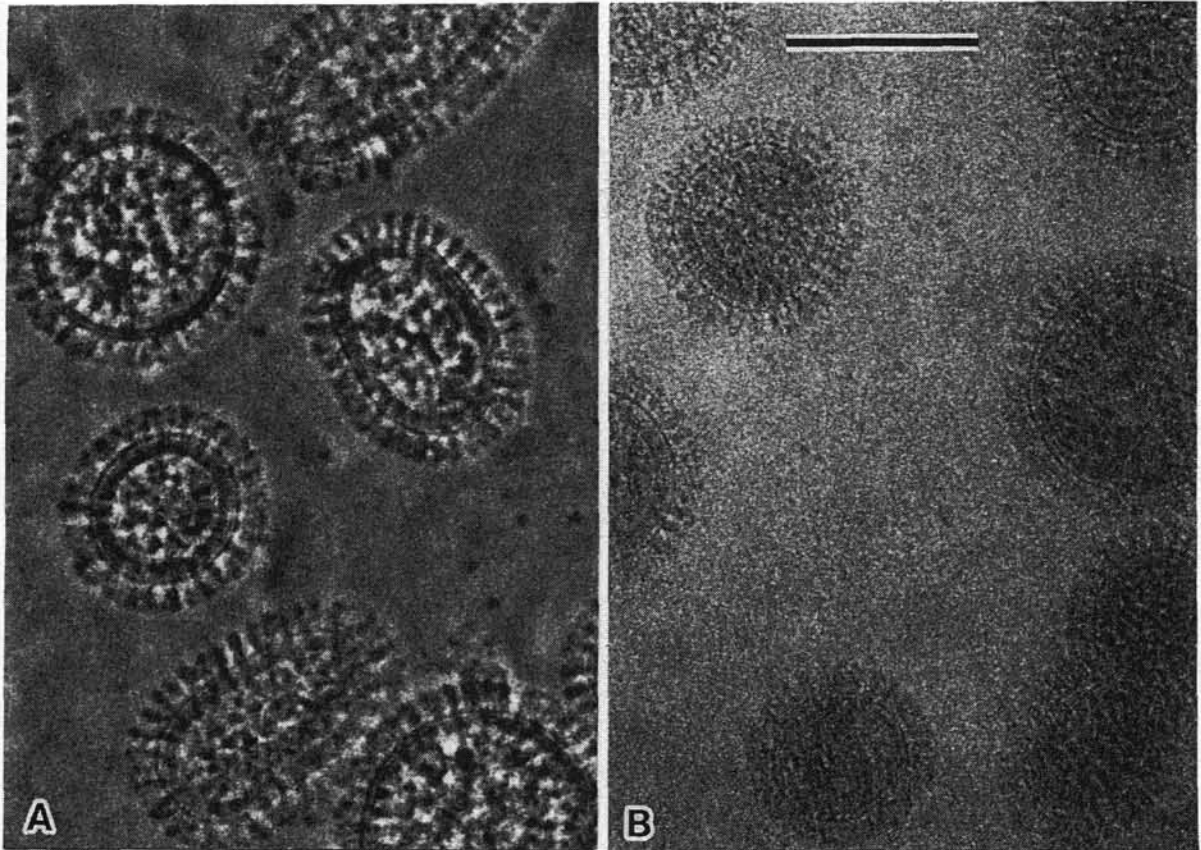


図 2. 氷包埋法による通常電子顕微鏡像とゼルニケ電子位相差顕微鏡像の比較

A は氷包埋した A 型インフルエンザウイルスを正焦点で撮影したゼルニケ位相差電子顕微鏡像、B は $2\mu\text{m}$ のアンダーフォーカスで撮影した通常の電子顕微鏡像を示す。 図中のスケールバーは 100nm の大きさを示す。

方法	ウイルス粒子の形態と大きさ					スパイクの長さ
	形態	計測した数	割合 (%)	直径(d)と長さ(l): 範囲 nm	直径(d)と長さ(l): 平均値±標準偏差 nm	平均値±標準偏差 nm (計測数)
ネガティブ染色法	球状	47	39* ¹	82 – 203 (d)	127±23 (d) * ²	10.1±1.2 (42) * ⁵
	細長い	73	61	88 – 168 (d) 115 – 502 (l)	107±11 (d) * ³ 161±56 (l) * ⁴	
	合計	120	100			
低温位相差電子顕微鏡法	球状	59	65* ¹	73 – 177 (d)	121±19 (d) * ²	14.2±1.2 (42) * ⁵
	細長い	32	35	91 – 118 (d) 127 – 202 (l)	102±7 (d) * ³ 155±19 (l) * ⁴	
	合計	91	100			

*¹ $t = 52.000, P \ll 0.001$; *² $t = 1.440, P > 0.05$; *³ $t = 2.800, P < 0.01$; *⁴ $t = 0.815, P > 0.05$; *⁵ $t = 15.709, P \ll 0.001$

表 1. A 型インフルエンザウイルスの異なる方法によるみかけ上の形態、大きさ、及びスパイクの長さの比較

球状ウイルス粒子の割合は、観察方法により有意に異なる*¹ (39%と 65%。ただし、ウイルス粒子は長径/短径 < 1.2 を球状とした)。

形態	脂質二重膜の内側のマトリックス層の有無			合計
	有 (全周)	有 (部分的)	無	
球状	39 (43%)	12 (13%)	8 (9%)	59 (65%)
細長い	32 (35%)	0	0	32 (35%)
合計	71 (78%)	12 (13%)	8 (9%)	91 (100%)

表 2. A 型インフルエンザウイルスのマトリックス層の有無による多形 (Yamaguchi et al., 2008¹⁸⁾ より、一部改変して転載。)

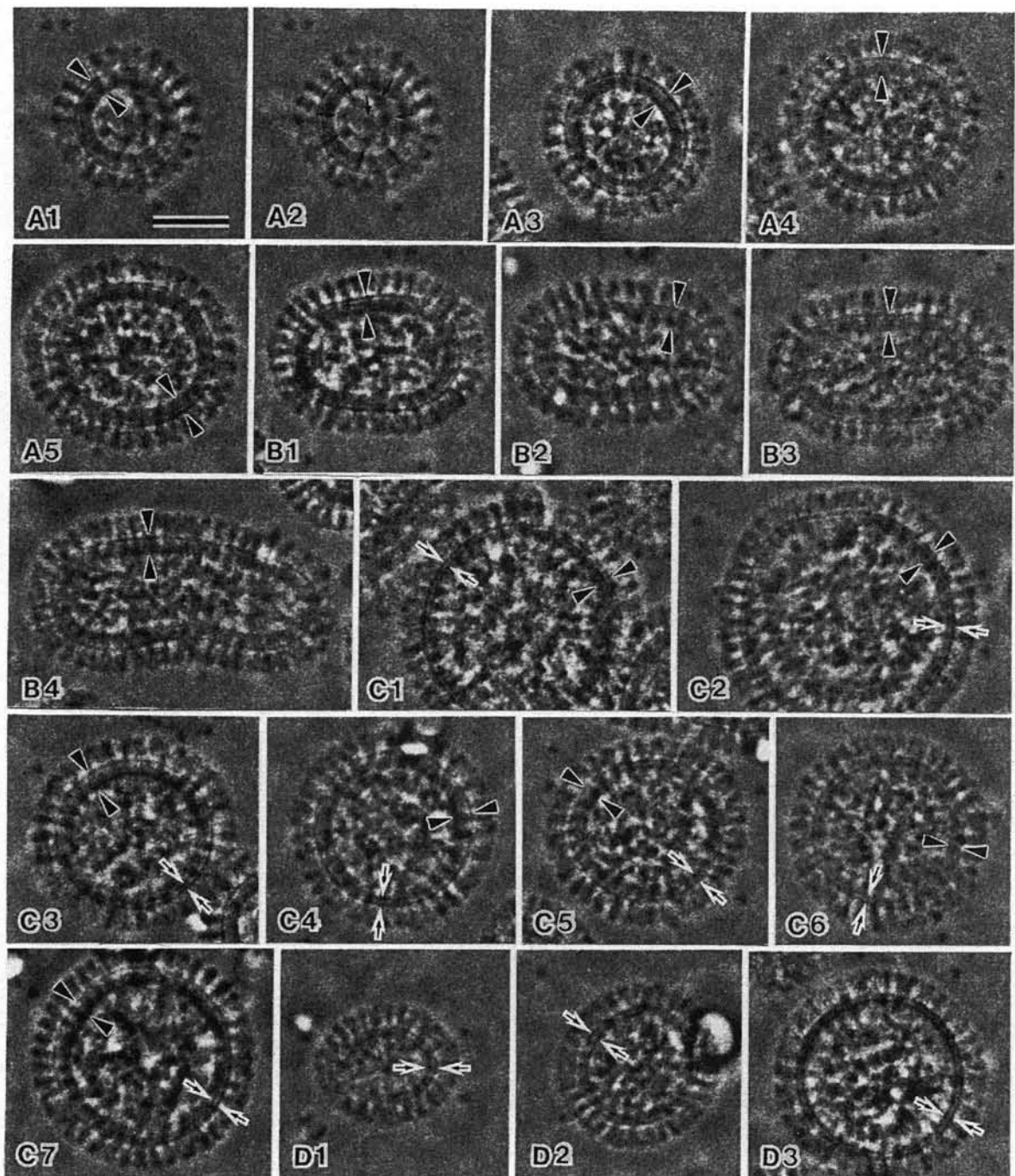


図 3. 低温位相差電子顕微鏡による個々のインフルエンザウイルス像

A1-A5; 脂質二重膜下に完全なマトリックス層を有する球状ウイルス粒子、A1 と A2 は同一画像を示し、A1 は、脂質二重膜を、A2 は内部の RNA/核タンパク質複合体 (RNA 分節) の配置を示す。
 B1-B4; 脂質二重膜下に完全なマトリックス層を有する細長い形状のウイルス粒子を示す。
 C1-C7; 脂質二重膜下に部分的なマトリックス層を有する球状ウイルス粒子を示す。マトリックス層

が薄い。 D1-D3; 脂質二重膜下に明瞭なマトリックス層を持たない球状ウイルス粒子を示す。 A1、A3、C7; マトリックス層と脂質二重膜を示す。 C1 から D3 は脂質二重膜を示す。

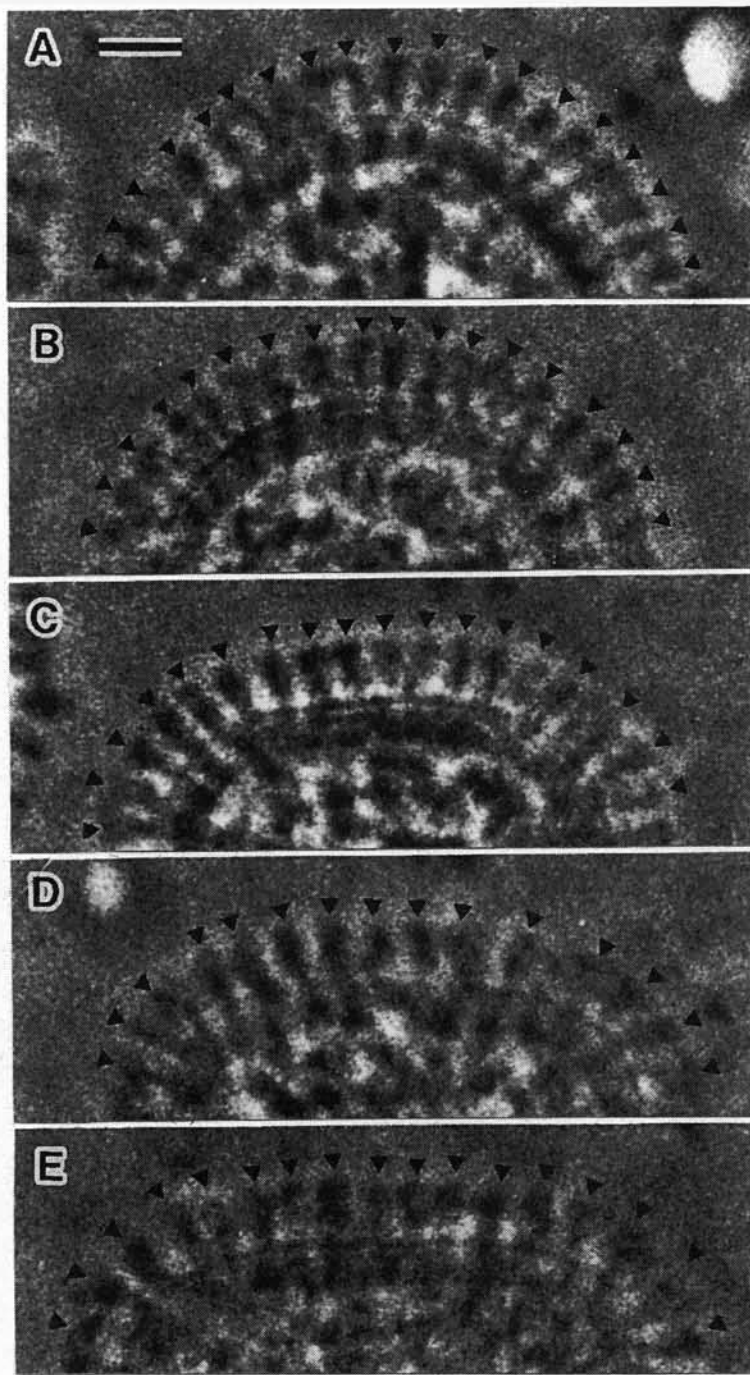


図4. ウイルス表面のスパイクの強拡大像

ウイルス膜表面のスパイク（HA；ヘマグルチニン、NA；ノイラミニダーゼ）を▼印で示す

4-4-2 RNA 分節（リボヌクレオタンパク質複合体）の配置

いくつかのケースでは、8個のリボヌクレオタンパク質複合体（中心の1個と、それを取り囲む他の7個）が、1個のウイルス粒子の中に識別された（図3A1~A2）。各リボヌクレオタンパク質複合体の直径は、 10.7 ± 2.5 nm ($n=8$ 個)であった。

4-4-3 ウイルススパイク

ビリオン上の糖タンパク質スパイク（HA；ヘマグルチニン、NA；ノイラミニダーゼ）は、筆者らの新しい方法によってはっきりと視覚化された（図4）。ビリオン表面に沿った糖タンパク質スパイクの密度は容易に測定され、100 nm当たり 10.2 ± 0.7 スパイク（平均 ± 標準偏差、7個測定）であった。従って、 $10,000$ nm²のウイルス表面に約100個のスパイクが存在し、直径120-nmのビリオンの表面（表面積 $4\pi r^2$ は $45,216$ nm²）に約450個の糖タンパク質スパイクが存在した。この数は、ビリオン1個当たり400~500スパイクという以前の質量解析推定値¹⁹⁾とよく一致した。糖タンパク質スパイクの長さは 14.2 ± 1.2 nm（平均 ± 標準偏差、42個測定）であった。

4-5 考察

4-5-1 ウイルス粒子の多形性

この研究では、以前に報告¹⁶⁾されたように、異なるタイプのA型インフルエンザ・ウイルスは、形状によって2つのグループ、すなわち球形のビリオンと細長いビリオンとに分類できることがわかった。また、球形のビリオンは、ウイルス・エンベロープのマトリックス層の構成の違いにより、さらに以下の3つのグループに分類することができる。即ち脂質二重膜の内側に完全なマトリックス層を持つビリオン、脂質二重膜の内側を部分的なマトリックス層で裏打ちされているビリオン、そしてマトリックス層を欠いているビリオンであった。細長いビリオンのウイルス・エンベロープはすべて、細胞膜下に完全なマトリックス層を有していた。Harrisら（2006）¹⁶⁾は、明確に区別されたマトリックス

層の存在または不在によって、球形ビリオンを2つのグループに分類したが、部分的なマトリックス層を持つビリオンについては説明しなかった。完全なマトリックス層を持つビリオン、部分的なマトリックス層を持つビリオン、およびマトリックス層を全く持たないビリオンの間で、伝染性に何らかの違いがあるのかどうかを判断することは興味深いと思われるが、これを行うには3種類のビリオンをそれぞれ分離する必要がある、今後の課題である。

本試料では、大きな球形のウイルス粒子は観察されなかった。それらは十分に組織立っておらず、Fujiyoshiら(1994)¹⁵⁾によって報告されたように、非伝染性と見なされている。観察されなかった原因は、我々の研究とFujiyoshiらの研究で用いられたウイルス種の相違、または培養・分離手順の相違にあるのかもしれない。

4-5-2 ウイルススパイク

また、観察されたすべてのビリオンが、ウイルス・エンベロープの周辺に均一に密集した糖タンパク質スパイクを有した。Harrisらによって報告された(2006)¹⁶⁾ような、スパイク密度が減少したビリオンは観察されなかった。すなわち、我々の研究では、完全な基質層を持つビリオン、部分的な基質層を持つビリオン、および基質層を全く持たないビリオンの間で、糖タンパク質スパイクの密度に相違は示されなかった。これは、我々の研究とHarrisらの研究で用いられたウイルス種、または分離手順の相違によるものかもしれない。

図2Aと図3のように、様々なスパイクのコントラストと分離には相違が見られる。これは、異なるZ高での画像が時にはぴったり重なり合うが、時には互い違いに組み合わさる場合もあるという事実によるものかもしれない。しかし、糖タンパク質スパイクのクリアな画像は、図4で示された多くのケースで観察された。そして、本研究において示された画像は、Harrisら(2006)による論文の電子線断層写真のスライス画像と似通っていた。

A型インフルエンザ・ウイルスのクリアな画像がゼルニケ位相差電子顕微鏡検査によって得られたことは、強調されるべきである。何故なら、個々の糖タンパク質 (HA、NA) スパイクが視覚化されたからである。これは従来のクライオ電子顕微鏡検査では困難であった^{14), 15)}。また、脂質二重層もはっきりと観察されたが、これはクライオ電子断層写真法では現在不可能である¹⁶⁾。従って、氷包埋ウイルスのゼルニケ位相差電子顕微鏡検査は、コントラスト伝達関数の影響を受けない完全無欠な粒子の高コントラスト画像取得を可能にする。これは解析の質と精度を大幅に向上させる。

4-5-3 RNA 分節 (リボヌクレオタンパク質複合体) の配置

本研究における透過クライオ電子顕微鏡検査の画像は、多数の高分子を映し出したものであり、それらの密度は深度数十ナノメートル、最大 100 nm 超までスーパーインポーズ (画面の重ね合わせ) されている。そのため、顕微鏡写真の画像の判読は注意深く行わなければならない。明確に区別されたリボヌクレオタンパク質複合体として図 3A2 に示された密集体の判読は、Harris ら (2006) によって行われたクライオ電子線断層写真での研究によって裏付けられる。Harris らは、リボヌクレオタンパク質複合体は時には互いに平行な線形構造となり、場合によっては (7+1) 構成を示したと報告した。Noda ら (2006)²⁰⁾ によるプラスチックの超薄切片の研究も、我々の解釈を裏付けているかもしれない。彼らは、リボヌクレオタンパク質複合体は明確に区別されるパターン (長さの異なる 7 個の分節が中央の分節を取り囲む) によって組織化されており、個々のリボヌクレオタンパク質複合体は出芽 (budding) ビリオンの末端でウイルス・エンベロープの内部からぶら下がり、出芽先端に対して垂直に向いていると報告した。本研究では、ほとんどのビリオンが複雑な内核構造を示した。低温位相差電子顕微鏡で得られる像は、百数十ナノメートルの氷の層に含まれる多数の高分子物質の集合体の投影である。従ってコアの部分もリボヌクレオタンパク質複合体だけでなく、上下の糖タンパク質スパイク分子やエンベロープを構成する分子像が重なり合って像が形成されていることになる。1+7 のリボヌ

クレオチドタンパク質複合体の配置は、上下の糖タンパク質スパイク分子が互いに間隙を埋めるように位置して像を打ち消しあっただけでなく、リボヌクレオタンパク質複合体が、電子ビーム軸と平行した位置に置かれていたために、偶然、観察可能となったと考えられる。つまり、明確なリボヌクレオタンパク質複合体のパターンは、リボヌクレオタンパク質複合体が電子ビーム軸と平行に置かれている場合にのみ観察できる（図 3A2 に示している）と考えられる。

最後に、上で論じた透過電子顕微鏡検査における画像の重ね合わせと重複の問題を解決するには、断層写真の使用が有効である。そのため、これまで様々な生物標本の電子線断層写真撮影が行われ、標本の3次元構造が高分解能で解像されてきた²¹⁾。断層写真の技術を位相差クライオ電子顕微鏡検査と組み合わせることができれば、強力なツールとなるだろう。著者らは、次の手段としてインフルエンザ・ウイルスや他のエンベロープ・ウイルスの3次元構造を高分解能で解像するために、位相差クライオ電子線断層写真法の開発を手がけている。

4-6 参考文献

- 1) Adrian M, Dubochet J, Lepault J, and McDowell A. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 1984; 308: 32-36.
- 2) 山口正視、平野正、廣川秀夫、菅原敬信、溝上寛、松原謙一 超低温電子顕微鏡法でみる B 型肝炎ウイルスコア粒子の話 *電子顕微鏡* 1989;24(1):47-51
- 3) Yamaguchi M, Hirano T, Hirokaw H, Sugawara K, Mizokami H and K. Matsubara. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virus core particles produced by transformed yeast: comparison with negative staining and ultrathin sectioning. *J Electron Microsc* 1988; 37: 337-341.
- 4) Baker T S, Olson N H, and Fuller S D. Adding the third dimension to virus life cycles: three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol. Molec. Biol Rev* 1990; 63: 862-922.
- 5) 永山國昭 電子位相顕微鏡の原理と実践 *電子顕微鏡* 2003 ; 38(1) : 29-35
- 6) Nagayama K. Phase contrast enhancement with phase plates in electron microscopy. *Adv. Imaging Electron Physics* 2005; 138: 69-146.
- 7) 永山國昭 位相差電子顕微鏡の主題と変奏 *日本結晶学会誌* 2005 ; 47 : 38-43
- 8) Kaneko Y, Danev R, Nagayama K, and Nakamoto H. Intact carboxysomes in a cyanobacterial cell visualized by Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. *J Bacteriol* 2006; 188: 805-808.
- 9) Kaneko Y, Danev R, Nitta K, and Nagayama K. In vivo subcellular ultrastructures recognized with Hilbert differential contrast transmission electron microscopy. *J Electron Microsc* 2005; 54: 79-84.
- 10) Krug R M. *The Influenza Viruses*. 1989 Plenum Press, New York.
- 11) Nayak D P, Hui E K W, and Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 2006; 106: 147-165.

- 12) Lamb R A, Krug R M. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. :1487-1531. *In* Knipe D M. and Howley P M. (ed.) *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)
- 13) Wright P F and Webster R G. Orthomyxoviruses. *In* *Fields Virology* 4th ed. 2001; 1: 1533-1579.
- 14) Booy F P, Ruigrok R W H, and van Bruggen E F J. Electron microscopy of influenza virus. A comparison of negatively stained and ice-embedded particles. *J Mol Biol* 1985; 184: 667-676.
- 15) Fujiyoshi Y, Kume N P, Sakata K, and Sato S B. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microcopy. *The EMBO Journal* 1994; 13: 318-326.
- 16) Harris A, Cardone G, Winkler D C, Heymann J B, Brecher M, White J M, and Steven A C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 19123-19127.
- 17) Danev R and Nagayama K. Transmission electron microscopy with Zernike phase plate. *Ultramicroscopy* 2001; 88: 243-252.
- 18) Yamaguchi M, Danev R, Nishiyama K, Sugawara K, and Nagayama K. Zernike phase contrast electron microscopy of ice-embedded influenza A virus. *J Structural Biology* 2008; 162: 271-276.
- 19) Ruigrok R W H, Andree P J, van Huysduynen R A M H, and Mellema J E. Characterization of three highly purified influenza virus strains by electron microscopy. *J gen Virol* 1984; 65: 799-802.
- 20) Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng R H, and Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 2006; 439: 490-492.
- 21) Lučić V, Förster F, and Baumeister W. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 833-865.

第5章 総括

5-1 細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの開発

アフリカミドリザル腎臓由来 Vero 細胞を用いた 500L スケールの培養で不活化日本脳炎ワクチンを製造する方法を確立した。この製造方法は、マイクロキャリアを用いた Vero 細胞の拡張培養と日本脳炎ウイルス接種により達成された。追加した精製工程を除くと、下流の精製工程は従来からのマウス脳を用いた製造方法と殆ど同様のステップである。すなわちウイルス培養後、従来法の細胞除去工程、ろ過膜による低分子不純物の除去と濃縮工程、ホルマリン不活化工程、ショ糖密度勾配超遠心工程を行なった。

本製法では新規に硫酸化セルロファイン・カラムによるクロマトグラフィーを追加した。この製造方法により得られたワクチン抗原は従来製法よりも高純度に精製されていた。更に、物理学的化学的性状および免疫学的性状の観点から従来法のマウス脳由来のワクチン抗原と比較検討を行なった。その結果、電子顕微鏡による形態観察、ショ糖密度勾配遠心による移動度、E 抗原ウェスタンブロット、抗原性、ウイルス中和価、中和スペクトルにおいて、マウス脳由来ウイルスと同等の結果であったが、レクチンブロット、SDS-PAGE では宿主の違い、或いは製法の違いに起因する僅かな糖鎖構造の変化が認められた。しかし、有効性を示す試験および安全性試験結果から、基本的なワクチンとしての物性には、全く問題ないと考えられた。

以上のことから、このワクチン製法は簡便で容易に大量製造が可能であることが示唆された。この新規なワクチンは製造販売承認申請中（継続審議中）であり、まもなく臨床試験が再開される。

5-2 インフルエンザウイルスの増殖を阻害する新規のプロテアーゼ阻害因子

インフルエンザウイルスの宿主細胞への感染性はウイルス表面の糖たん白質、ヘマグル

チニン (HA) の活性化に依存している。 MDCK (Madin Darby canine kidney) 細胞を宿主とするインフルエンザウイルスの増殖が、その培養上清中のトリプシン活性の不活化によって阻害される現象を見出した。 著者らは、培養上清からトリプシンの阻害活性を精製することによって、この阻害活性が 2 種類のトリプシンを不活化する因子で起こることを見出した。 便宜上、一つを TF A (Trypsin inactivating factor A; 分子量約 1.5 万) と名付け、もう一つを TF B (Trypsin inactivating factor B; 分子量約 1.1 万) と呼んで区別した。

それぞれの分子の N 末端アミノ酸配列分析の結果、TF A は、イヌの唾液に分泌される顎下腺由来プロテアーゼ (SPI) と呼ばれる既知のプロテアーゼ阻害因子と同定した。 一方、TF B はこれまでに報告のない新規のポリペプチド (CKPI; Canine Kidney Protease Inhibitor と命名) であることが判明した。 また精製した TF A と TF B のウイルス増殖阻害活性を測定したところ、TF B (CKPI) のほうが、ウイルス増殖阻害活性は高かった。

CKPI について、更にペプチドマップや全塩基配列決定を実施したところ、最終的に 130 個のアミノ酸をコードする 390bp の新規 c DNA (成熟型ポリペプチドのアミノ酸残基数 106 個) が得られた。

そのアミノ酸一次配列の比較からヒト分泌性白血球プロテアーゼ阻害因子 (h SLPI; Human Secretory Protease Inhibitor) と 63.8% の相同性を示した。 この分子は清乳に含まれる酸性プロテアーゼインヒビター、Whey Acidic Proteins (WAP) グループに共通してみられる WAP モチーフドメイン構造を 2 つ保有する低分子ポリペプチドであることから、ヒト SLPI のイヌ類似物質ではないかと推定した。 SLPI では、C 末端ドメインにエラスターゼ阻害活性の存在が報告されていることから、CKPI についてはどうかを調べた。 CKPI のトリプシン阻害活性は確認出来たが、エラスターゼの阻害活性は確認することが出来なかった。 従って、C 末ドメインの役割の解明については、今後の課題である。

以上の結果から、MDCK 細胞によって培養液中に分泌される阻害因子が、インフルエンザウイルスの活性化を阻害することから、ワクチン製造においては、阻害因子を除去また

は中和することにより、ワクチンの製造収量を向上することが可能である。また医薬品としてインフルエンザウイルスの感染から細胞を防御するのに適用できることが示唆された。

5-3 位相差電子顕微鏡による氷包埋したインフルエンザウイルスの粒子構造解析

凍結水和状態の A 型インフルエンザ・ウイルスの微細構造をゼルニケ位相差電子顕微鏡で調べた。この新しい電子顕微鏡検査を用いて、細胞膜の脂質二重層だけでなく、ウイルス・エンベロープ上の個々の糖タンパク質スパイクも、焦点を合わせて撮影された顕微鏡写真において高コントラストで解像された。球形と細長い形のビリオン（ウイルス粒子）に加えて、更に 3 種類のビリオンが、ウイルス・エンベロープの特徴によって識別された、すなわち細胞膜下に完全な基質層を持つビリオン（最も多数を占める）、部分的な基質層を持つビリオン、および基質層を全く持たないビリオンの 3 種類に大別された。平均サイズの球形ビリオンに、約 450 本の糖タンパク質スパイク（突起）が存在した。また 8 個のリボヌクレオタンパク質複合体、すなわち中心の 1 個とそれを囲む他の 7 個が、1 個のウイルス粒子の中に識別された。従って、ゼルニケ位相差電子顕微鏡観察法は、従来のクライオ電子顕微鏡観察で問題となり得るコントラスト伝達関数（contrast transfer function）による影響のない氷包埋粒子の高コントラスト画像の取得を可能にするため、ウイルスの微細構造を解明するための強力なツールであることが示唆された。一般に Whole の粒子とコンポーネント化した精製抗原では、Whole の粒子の方が免疫原性は高くなることから、感染防御抗原の立体配置は、ワクチンとしての有効性に影響を与えていると考えられる。従って、新しい観察手法はワクチンの品質評価の手段として期待できる。また、ウイルスの粒子構造を応用したナノデバイスの開発にも有効な手法であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当り、多大なるご支援、指導を頂きました（財）化学及血清療法研究所の溝上寛先生、菅原敬信先生、そして千葉大学真菌医学研究センターの山口正視先生、自然科学研究機構、岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山國昭先生、ダネフ・ラドスティン先生、国立医薬品食品衛生研究所の川崎ナナ先生に深く感謝いたします。

第2章の細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの開発においては、抗日本脳炎ウイルスモノクローナル抗体を分与頂きました東京都神経科学総合研究所の保井孝太郎先生に深く感謝いたします。またウイルス株、蚊細胞株を分与頂いた長崎大学熱帯医学研究所の五十嵐章先生に深く感謝いたします。ワクチン製造に際しては、石川優二研究員、阿部元治研究員、他研究補助員の方々に深く感謝いたします。力価試験、レクチンブロット、ウイルス中和スペクトル試験等の性状分析試験の実施に際し、財団法人化学及血清療法研究所の城野洋一郎先生、葛原祥二先生、園田憲悟研究員、阿部元治研究員に深く感謝いたします。そして日本脳炎ウイルスの電子顕微鏡撮影を行って頂いた西村伸一郎研究員に深く感謝いたします。

第3章インフルエンザウイルスの増殖を阻害する新規のプロテアーゼ阻害因子の研究においては、特に財団法人化学及血清療法研究所の菅原敬信先生に多大なご指導を頂いたことに深謝の意を表します。セルバンク作製について堀川義兼研究員、細胞培養に際して野内俊伸研究員を始め、研究補助員の方々に深く御礼申し上げます。更に阻害因子の活性測定などで加籠六浩俊研究員、河野奈美技術補助員、馬立律子技術補助員に実験の補助を頂きましたことを深く御礼申し上げます。また新規阻害因子の遺伝子クローン化及び検索について絶大な協力を頂いた副島見事研究員に深く感謝いたします。また英語論文校正について財団法人化学及血清療法研究所の Michael Leoncavallo 氏に深謝いたします。

第4章の位相差電子顕微鏡による氷包埋したインフルエンザウイルスの粒子構造解析においては、千葉大学真菌医学研究センターの山口正視先生に絶大なご指導・協力を頂きましたことに深謝の意を表します。また最新の位相差電子顕微鏡の操作及び写真撮影について、自然科学研究機構、岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山國昭先生とダネフ・ラドスティン先生に絶大なご協力を頂きましたことに深謝の意を表します。

更に本論文を作成するに当り、ご助言、ご指導、及び審査頂きました熊本大学大学院自然科学研究科教授 安部眞一先生、瀧尾進先生、斎藤寿仁先生、北野健先生に深く感謝の意を表します。

2008年9月25日