



Title	Pichia pastoris 酵母由来組換えヒト血清アルブミンの開発研究 : 安全性評価を中心として
Author(s)	大谷, 渡
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41222">https://hdl.handle.net/11094/41222</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	おお 谷 渡 わたる
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 4 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 1 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	<i>Pichia pastoris</i> 酵母由来組換えヒト血清アルブミンの開発研究 —安全性評価を中心として—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 原 力 (副査) 教 授 溝 口 正 教 授 山 元 弘 教 授 東 純一

## 論 文 内 容 の 要 旨

臨床的に大量投与される遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) が開発された例はなく、その用途・用量から特に高い安全性が求められる医薬品である。宿主は、rHSA の高産生が期待できる酵母 *Pichia pastoris* を選択し、rHSA を医薬品として開発する際の精製法と最終精製品の安全性評価についての研究を行うと共に、最終精製品の安全性を確認した。

まず、プロテアーゼインヒビターを使用しない加熱処理によるプロテアーゼ不活化を始めとして、リークする可能性のある抗原性を有する蛋白質 (例えば、抗体) 等をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーは使用しない医薬品の安全性を重視した精製方法を構築した。更に、精製 rHSA の純度分析に際し、酵母由来成分 (PPC) を検出する目的で高感度な EIA 法を応用した。まず、rHSA 非産生株から PPC を調製し、これをウサギに免疫して抗 PPC 抗体を調製した。PPC は高分子から低分子まで幅広い成分の集まりであり、免疫して得られた抗体はこの PPC と幅広く反応し、酵母マンナンに対する抗体も含まれていることが示された。この抗体を用いてアビジン-ビオチン系 EIA 法による PPC 測定系を確立した。本法の検出限界は 1 ng/ml であり、精製 rHSA 中の PPC 量は検出限界 (1 ng protein/250 mg rHSA) 以下であった。単糖の分析法である AE-PAD 法を用いて、有害な作用を有する酵母マンナンの分析法を構築した。酵母マンナンの分析は、酸加水分解して生成したマンノースを HPLC により分離後、金電極式電気化学検出器を用いることにより行った。精製 rHSA 中の酵母マンナンは、検出限界 (0.18  $\mu$ g mannose/mg rHSA) 以下であった。この検出限界量は、ウサギに対して発熱作用を示す量の約 1/270 量に相当していた。この結果を確認するために、精製 rHSA 2.5 g/kg をウサギの耳介静脈内に投与したが、有意な体温の上昇は認めなかった。

精製 rHSA の一次構造解析は、主に修飾の種類に関係なく迅速に分析できる質量分析計を用いた。高次構造解析は、ヒト血漿由来血清アルブミン (pHSA) とパターンを比較することによって行った。その結果、一次構造は pHSA と同じであり、予期しない post-translational modification 等が無いことを確認した。精製 rHSA と pHSA の非還元ペプチドマッピングと CD スペクトルの比較結果から、17本のジスルフィド結合の位置と二次構造に両者の差は認めなかった。同様に、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルと 2 次元 DQF-COSY スペクトルの比較でも、両者のピークパターン及びクロ

スピーク・パターンは極めて類似していた。更に、免疫化学的分析による構造解析を試みた。平行線定量法を用いて、ヤギ抗 pHSA ポリクローナル抗体に対する pHSA と精製 rHSA の反応性を統計学的に解析し、この抗体に対する pHSA と精製 rHSA の免疫化学的同等性を確認した。この抗体は、主にジスルフィド結合を有する Site IV : VESK-DVC-CAAA (310-316+361-364) と Site V : ADDKETC-CKEV (561-567+558-555) を認識していると推測され、本法はこの領域の構造解析に有用であると考えられた。

HSA の特性に応じた精製 rHSA の安全性評価として精製 rHSA の脂肪酸分析を行い、pHSA と比較検討した。9-anthryldiazomethane を用いた脂肪酸分析法を確立し、精製 rHSA 中の脂肪酸と pHSA 中の脂肪酸は同種であることを確認した。各脂肪酸量は pHSA と精製 rHSA との間で異なっていたが、pHSA に結合している脂肪酸量は食習慣の影響を受けて大きく変動し、その変動範囲内に精製 rHSA 中の各脂肪酸量が含まれることから問題ないと判断した。

正常ヒト血清中の抗 PPC 抗体を分析することは、アレルギー等の副作用を想定する上で重要なことであった。そこで、ヒト抗 PPC 抗体測定系を組み立て、正常ヒト血清中の抗 PPC 抗体を分析した。その結果、正常ヒト血清中に *P. pastoris* 由来のマンナンに対する高力価の IgG 抗体を確認した。その抗体価は、最大で1000倍以上の個人差を認め、年齢との間に相関関係はなかった。また、この抗体と反応する成分が精製 rHSA 中に含まれていないことを確認した。マウス抗 PPC IgE 抗体を陽性コントロールとしてヒト抗 PPC IgE 抗体測定系を構築したが、検体として供した正常ヒト血清中には抗 PPC IgE 抗体は検出しなかった。本法は、I 型アレルギー反応を確認する有用な手段になるものであった。

結論として、1. PPC EIA 法と AE-PAD 法を用いた酵母マンナン分析法は、純度分析の重要な手段として有用であり、これらの方法で精製 rHSA 中に PPC と酵母マンナンを検出できなかった。2. 精製 rHSA の一次及び高次構造は pHSA と差異がないことを、各種機器分析及び免疫化学的方法を用いて迅速に確認できることを示した。3. 精製 rHSA に結合している脂肪酸を分析した結果、精製 rHSA に結合している脂肪酸の種類は、pHSA に結合しているものと同じであることを確認した。4. 正常ヒト血清中には高力価の抗 PPC IgG 抗体が存在していることを明らかにし、この抗体と精製 rHSA とは反応しないことを確認した。

rHSA が臨床的に安全性が高いことを各種分析法を用いて評価できることを示し、本研究が今後の各種酵母由来組換え蛋白質医薬品を開発する上で安全性評価に関する考え方とその方法の一つの例を示したものと言える。

## 論文審査の結果の要旨

ヒト血清アルブミン (HSA) は臨床的に静脈内に大量投与される重要な医薬品である。大谷君は遺伝子組換えメタノール発酵酵母により作られたこのタンパク質 (rHSA) の精製法を考案し、機器分析および免疫学的手法による一次・高次構造解析および脂肪酸分析を行い、HSA と差異のないことを示した。さらに酵母由来のマンナンの高感度定量法を開発し、精製 rHSA では検出下限以下であることを示すとともに、ヒト血清中にあるマンナンを中心とする酵母由来成分に対する抗体とは反応しないことを確認した。これにより、精製 rHSA が高い安全性を示すことを各種 *in vitro* 試験により臨床試験前に評価できる可能性を示した。

これらの成果は、酵母由来の各種組換えタンパク医薬品を開発する上での安全性について臨床試験前評価の考え方と *in vitro* 手法をはじめて示したものであり、学術的にも、実用的にも高く評価され、博士 (薬学) 学位論文として充分価値あるものと認められる。