平成11年度　地域コンソーシアム研究開発事業

「ベンチャー企業支援型地域コンソーシアム研究開発(中小企業創造基盤型)」

「簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製法の開発」

成 果 報 告 書

平成13年３月

新エネルギー・産業技術総合開発機構
先　財団法人南西地域産業活性化センター

NEDO 図書・資料室
010018550-3

本報告書の内容を公表する際はあらかじめ

新エネルギー・産業技術総合開発機構

研究開発業務部　研究業務室

の許可を受けてください。

TEL 03-3987-9419

FAX 03-3981-1536

地域コンソーシアム研究開発事業（ベンチャー企業支援型地域コンソーシアム研究開発）
（中小企業創造基盤型）
「簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製法の開発」

目　次

第１章　概要

１.目的と目標 …… 1
２.研究成果概要 …… 2
３.事業化に向けた調査等の概要 …… 2
４.今後の課題 …… 3
５.研究開発スケジュールと主な設備内容 …… 4
６.研究開発体制図・研究実施場所一覧 …… 4
７.研究開発担当者一覧 …… 5
８.工業所有権等の取得状況 …… 6
９.外部発表等の状況 …… 6
１０.英文要約 …… 7

第２章　本論

１.序論 …… 9

２.大型プラスミド抽出法の開発 …… 13

３.大型プラスミド精製用カラムの開発 …… 25

４.研究室レベルで行われているプラスミド精製法との比較検討 …… 49

５.総合調査研究 …… 55

図表一覧

図 1－1　プラスミド ……12
図 1－2　遺伝子治療 ……12
図 2－1　超遠心後のプラスミド DNA の回収 ……14
図 2－2　カラムによる DNA の精製 ……14
図 2－3　β Gal ベクター図 ……15
図 2－4　ファーメンター ……16
図 2－5　概念図 ……16
図 2－6　プロスッタク ……16
図 2－7　M12 ……16
図 2－8　ペリコン ……16
図 2－9　５２ ……18
図 2－10　５３／５４ ……19
図 2－11　界面活性剤によるプラスミド DNA 抽出量 ……20
図 2－12　１９／２０／３５ ……22
図 2－13　４８／５６ ……23
図 2－14　菌体培養液、濃縮液 ……23
図 2－15　菌体濃縮液、バッファー交換 ……23
図 3－1　pH6.0 ～ 7.4 ……28
図 3－2　pH6.0 ～ 7.4 ……28
図 3－3　pH7.4 ～ 8.8 ……29
図 3－4　pH7.4 ……29
図 3－5　pH7.6 ……30
図 3－6　pH7.8 ……30
図 3－7　pH8.0 ……31
図 3－8　pH8.2 ……31
図 3－9　pH8.4 ……32
図 3－10　pH8.6 ……32
図 3－11　pH8.8 ……33
図 3－12　pH6.8 ～ 8.2 ……33
図 3－13　pH6.8 ～ pH8.2 ……34
図 3－14　HQ linear pH8.1 ……34
図 3－15　HQ step ……35
図 3－16　POROS DM linear ……35
図 3－17　POROS DM step ……36
図 3－18　MOPS with tritonx100 ……36
図 3－19　MOPS eith tritonx100 ……37
図 3－20　HQ MOPS linear ……37
図 3－21　HQ MOPS step ……38

図 3 － 22　DM MOPS linear ……38
図 3 － 23　DM MOPS step ……39
図 3 － 24　HQ Tris linear ……39
図 3 － 25　HQ Tris step ……40
図 3 － 26　HQ Mops linear ……40
図 3 － 27　HQ MOPS step ……41
図 3 － 28　HQ linear ……41
図 3 － 29　HQ step ……42
図 3 － 30　POROS DM linear ……42
図 3 － 31　POROS DM step ……43
図 3 － 32　HQ linear ……43
図 3 － 33　HQ step ……44
図 3 － 34　ＲＩ疎水カラム ……44
図 3 － 35　東ソ HEXYL　リン酸 buffer ＋ 2 μ 硫酸 ……45
図 3 － 36　TOSO Hexyl crude ……45
図 3 － 37　Tween20 treat crude : 200ml ……46
図 3 － 38　TOSO Hexyl pure ……46
図 3 － 39　TOSO Hexyl crude ……47
図 3 － 40　TOSO Hexyl crude ……47
図 4 － 1　プラスミド DNA の塩基配列 ……50
図 4 － 2　原理 ……51
図 4 － 3　エンドトキシン含有量 ……51

第1章　概要

1.目的と目標

(1)目的

本プロジェクトは沖縄県中頭郡地域に集積している産（株式会社　先端医学生物科学研究所)、学（琉球大学)、官（沖縄県工業技術センター）の技術を結集し、今後大きな需要が期待できる遺伝子工学で使用される大型プラスミドの簡便化高純度抽出・精製法を確立する。

遺伝子工学の発展に伴い、大型で高純度なプラスミドを操作する必要のある研究が増加している。

現在、大型の高純度プラスミドを得るためにはクロマトグラフィー等特別な装置を使用して精製を行なっているが時間がかかり、操作が繁雑で安定した回収率を得るためには技術的な熟練が必要である。

高純度な大型プラスミドが安価に特別な装置を必要とせずに短時間で入手することができるようにするために、プラスミドの細胞からの溶出液、精製するためのカラム及び溶出液のセットをキット化して製品化を図ることにより、沖縄県地域にバイオテクノロジー産業を創設して沖縄県の産業の振興を図る。

(2)目標

①大型プラスミド抽出法の開発

大型プラスミド（20Kbp 以上）が形質転換されている大腸菌から、大腸菌細胞壁を破壊して大型プラスミドを安定した形状で溶出する方法を、アルカリ法を基本に用いて行なう。アルカリ法で用いる大腸菌細胞壁溶解液の組成を様々に変えて大型プラスミドが安定した状態で抽出できる至適な抽出液を作成する。

②大型プラスミド精製用カラムの開発

大型プラスミドと他の大腸菌由来の DNA、RNA、蛋白等が分離できる担体の選定を行なう。既製の空のカラムに候補となる担体を充填して、大型プラスミドを含む抽出液をカラムを通過させることにより大型プラスミドのみが分離して精製できる担体を充填した精製用カラムを作成する。さらにその精製用カラムからの大型プラスミド DNA の溶出条件を決定する。

③既製のプラスミド精製キットとの比較検討

既存のプラスミド精製キット及び本事業で作成する精製キットを用いて大型プラスミドの抽出・精製を行ない、その純度を HPLC を用いて解析する。

本精製キットで精製された大型プラスミド DNA のシークエンス解析を行なうことで精製による遺伝子の変化が無いこと、さらにアデノウイルス発現系をはじめとする大型プラスミドを材料として用いる発現系を使用して精製したプラスミド DNA が、安定性に優れており、哺乳動物細胞への遺伝子導入に際しても何ら支障のないことを確認をする。

2.研究成果概要

本プロジェクトを推進するに当っては、プラスミド DNA の取り扱いに豊富な経験を有する琉球大学遺伝子実験施設と株式会社先端医学生物科学研究所が共同で研究開発に取り組み、これまで培った遺伝子工学に対するノウハウと技術を用いて「簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製法」を開発するのに成功した。

また、このシステムの開発を進める中で、次のような新たな技術や精製法等を開発した。

①閉鎖系大量培養装置で培養した大腸菌体の遠心濃縮操作を用いない濃縮法を開発した。

②大腸菌体の濃縮から連続した抽出液への閉鎖系でのバッファー交換法を開発した

③短時間で行えるプラスミド DNA のカラム精製法を確立した。

④上記の組み合わせにより、完全な閉鎖系で大腸菌体内から連続した操作によりプラスミド DNA 溶出を行う、溶出液及び分離精製用カラムを含めた簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製装置の開発を完了した。

3.事業化に向けた調査等の概要

プラスミド抽出・精製法システムの精製工程確立によって、遺伝子治療・遺伝子研究に使用できる「高純度プラスミド」の大量精製が可能となったことから、「ヒトゲノム」解析終了後、国内でも「遺伝子治療」は、治研レベルから実用化レベルにまで達するものと見込まれる。そのため、各大学、研究機関、病院では遺伝子治療に欠くことのできない高品質の「プラスミド DNA」が必要となる。今後の戦略的事業展開は、これらの研究・開発に応じたプロセスと事業プロジェクトを考えている。

①高純度大型プラスミドの精製と販売（大学・研究機関・病院へのプラスミドの販売）

②簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製装置の製作・販売（実験室・研究室レベルの装置販売とメンテナンス）

③簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製プラントの販売（大型生産プラント向けのシステム販売とメンテナンス）

ターゲットとなる市場は、当面、大学、研究機関、医療機関に設定するが、「遺伝子治療」の研究成果を獲得した大学・研究機関においては、「プラスミド DNA」の需要度が急増するものとの予測が成り立つことから、企業内体制としては、プラスミド DNA を即時供給できる体制を確立する必要があるものとの想定で「企業協力」「特許流通」をも視野に入れた展開策を講じていく。

4.今後の課題

本事業では「高純度大型プラスミド DNA」の生産工程において、TFF（Tangential Flow Filtration）を用いることによって、従来の遠心分離器を用いた生産方法よりも、はるかに高品質で、生産効率の良い生産システムの開発に成功した。

当初目標は、高純度大型プラスミドの生産を実験室レベルでも使用可能なキット化を目指していたが、実験を重ねていくうちに、生産の効率的観点から精製装置は、①実験室供給レベル、②大学・病院・企業（継続性を持たない単位発注）供給レベル、③プラント化のレベルにまで進めていくことが可能となることが明らかとなり、生産レベルの効率及び SOP（標準作業手順書）を考慮した場合、装置そのものは大型プラントで用いることがより望ましいとの結論に達し、GMP（Good Manufacturing Practice）対応を目指すことが次期研究テーマとなる。

本研究の実用化を目指して継続すべき課題は、高純度大型プラスミド DNA を生産する工程において、

①生産ラインのバリデーションを向上させるための GMP 対応

②生産ラインの省力化を目指した IT 制御の確立

③ TFF 濾過で用いる濾過膜の再生利用方法（リサイクル）の確立

等が考えられる。

先ず GMP 対応は、生産ラインをより安全で最適に稼働させるために、ラインの定期的なチェックを必要とする。

本研究において、ラボレベルで、最もチェックを必要とする箇所は、既に明らかとなっており、研究データから製造装置内の、どの箇所を重点的に点検する必要があるのかを確認することができ、GMP 対応化に向けて有益な資料となる。その実用化に向けての研究継続が必要である。

第二に、製造ラインを効率よく稼働させるためには、省力化を図る必要性のあることから、IT 制御による製造ラインの稼働が望ましいと考えられる。特に SOP にも関連するが、定期的点検を人力のみに委ねた場合、人為的ミスの発生によって、衛生・安全面の管理が著しく損なわれる可能性のあることから、部品や機器の洗浄等、衛生・安全面を含めた管理においては、極力、IT 制御を用いることが望まれる。

したがって、IT 制御は効率の良い製造品の供給にもつながり、製造物の品質管理を効率よく行うことを可能にするため、大型製造ラインを構築する場合は、製造ラインの IT 制御は不可欠と考えられる。

第三に、「家電リサイクル法」（施行平成 13 年 4 月 1 日）等施行にもみられるように、昨今は環境に配慮した企業運営が必要不可欠であることから、本研究で開発された最重要部分である「濾過膜」を再生利用（リサイクル）できる研究も必要である。

本研究で採用した「濾過膜」は、カートリッジ式になっており、簡易に取り外しが可能であり、各オーダーによって、製造物が異なることが想定されるため、「使い捨て方式」になっているが、リサイクルの方法が確立されれば、昨今の環境問題に配慮した事業運営が可能となるばかりでなく、生産コストを低減化することが可能となる。

5.研究開発スケジュールと主な設備内容

(1)研究開発スケジュール

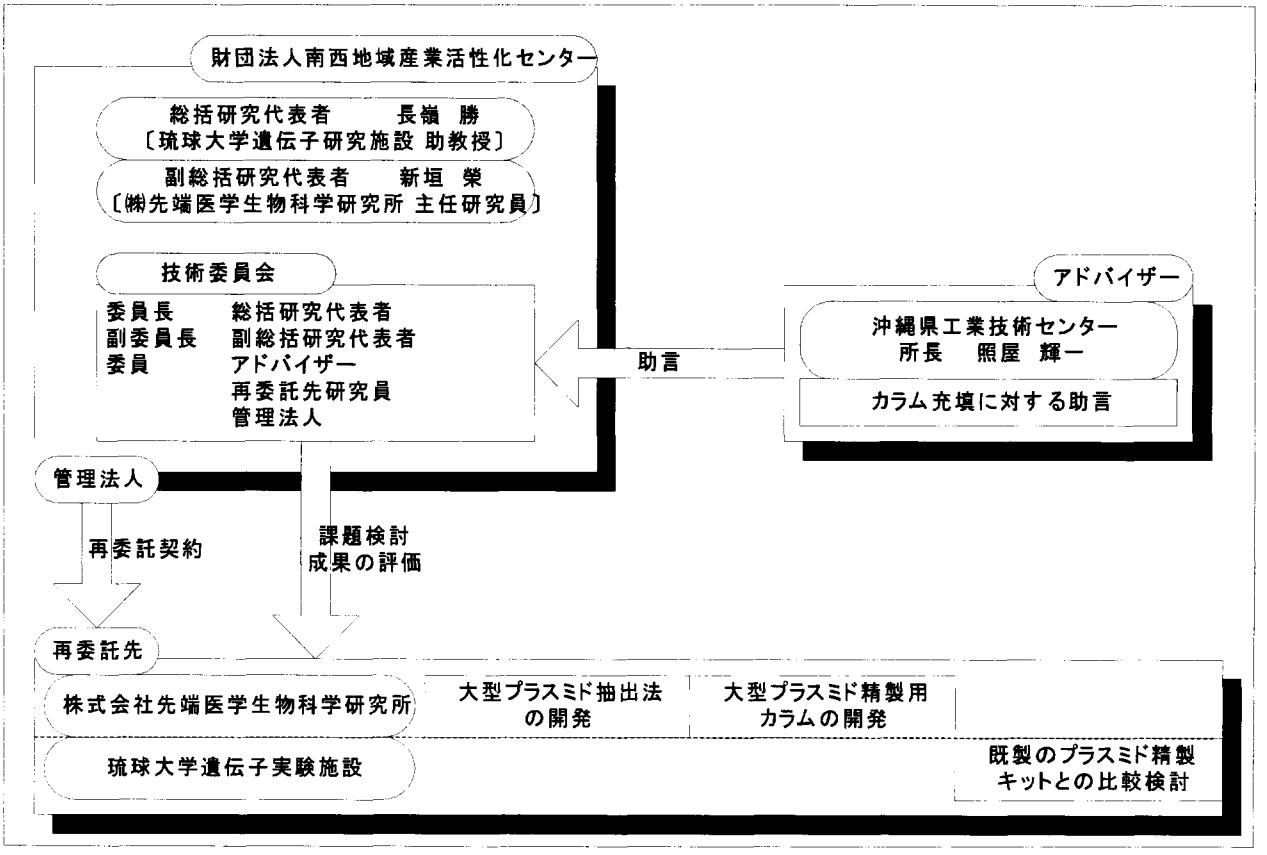
研究開発項目／年月	平成12年										平成13年		
	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
大型プラスミド抽出法の開発													
大型プラスミド精製用カラムの開発													
既製のプラスミド精製キットとの比較検討													
技術委員会の開催			○				○			○		○	○

(2)主な設備内容

なし

6.研究開発体制図・研究実施場所一覧

(1)研究開発体制図



(2)研究実施場所一覧表

団体名		住所
財団法人南西地域産業活性化センター		沖縄県那覇市久茂地３丁目 15 番９号
琉球大学遺伝子実験施設		沖縄県中頭郡西原町字千原１番地
株式会社先端医学生物科学研究所	本社	沖縄県中頭郡西原町字森川 244 番地
	研究室	沖縄県島尻郡大里村字大里 2013

7.研究開発担当者一覧

(1)研究総括者

	氏　名	所属・役職
総括研究代表者	長嶺　勝	琉球大学遺伝子研究施設 助教授
副総括研究代表者	新垣　榮	㈱先端医学生物科学研究所 主任研究員

(2)研究員

研究項目一覧表

No.	研　究　項　目
①	大型プラスミド抽出法の開発
②	大型プラスミド精製用カラムの開発
③	既製のプラスミド精製キットとの比較検討
④	総合調査研究

①財団法人南西地域産業活性化センター(管理法人)

No.	氏　名	役　　職	研究項目
1	緑川　義行	調査第１部長	④
2	原國　政人	調査第１部　研究員	④

②琉球大学遺伝子研究施設(受託研究)

No.	氏　名	役　　職	研究項目
1	長嶺　　勝	遺伝子実験施設助教授	研究総括　③④
2	許　　春影	研究補助員	③

③株式会社先端医学生物科学研究所(再委託)

No.	氏　名	役　　職	研究項目
1	新垣　　榮	主任研究員	研究総括　①②④
2	喜久川政直	取締役社長	②④
2	陳　　文	研究員	②
3	関口　恵史	研究員	①
4	青山みさ子	補助研究員	①
5	我那覇早苗	補助研究員	①
6	宮良　梨加	補助研究員	①
7	黄　　集前	補助研究員	②
8	顔　　瑾	補助研究員	②

(3)技術委員会

	氏　名	所　属　・　役　職
委員長	長嶺　　勝	琉球大学遺伝子研究施設 助教授
副委員長	新垣　　榮	㈱先端医学生物科学研究所 主任研究員
委　員	照屋　輝一	沖縄県工業技術センター　所長
〃	石田　昭彦	琉球大学　助手
〃	喜久川政直	㈱先端医学生物科学研究所 取締役社長
〃	緑川　義行	（財）南西地域産業活性化センター 調査第１部長
〃	原國　政人	（財）南西地域産業活性化センター 調査第１部 研究員

8.工業所有権等の取得状況

特許出願中　１件

・出願番号：特願 2001 － 62404（出願日：平成 13 年 3 月 6 日）

9.外部発表等の状況

なし

10.英文要約

Development of Lapid Purification Method for Large Size Plasmid

Introduction

The study of gene technology has made remarkable in recent years; various conditions of DNA have been treated. As the study has developed, large size and quantities of DNA had been treated in the field of gene therapy and genome analysis. Especially, it has been remarkable to study large size and quantities of plasmid DNA, which is mainly used as material for the research in these regions. In the field of medicine, such as gene therapy, safer material of the research and purer plasmid DNA are required. It is difficult to deal with the DNA size which is

becoming larger, and quality control which is getting severe, in the traditional way of the plasmid DNA. Therefore, it is necessary to figure out the way to get the larger and purer plasmid DNA which meets the needs of those two things. In the case of plasmid DNA extracted from a large scale of cultivated bacteria, there is the problem that the operation for the extraction is complicated because it should be solved only by dividing it into the small scale of extractions.

In consideration of the need for gene technology, in the future, it will surely bring great benefit in this field to develop a simple and easy way of purer and larger size and quantities of plasmid DNA. In the purpose of developing the way to obtain such the plasmid DNA, we considered a new system, which is extracting plasmid DNA from bacteria with membranes not with centrifugation and in which line processes are adopted and column chromatographs are improved.

Results and Discussion:

A process, Extraction and Purification of plasmid DNA in large quntity and high quality, has been developed. The process involves concentration of cultative bacteria using Tangential Flow Filtaration(TFF) system, buffer exchange with TFF system, alkaline extraction of plasmid DNA, clarification by TFF system, concentration of clarified plasmid DNA by TFF system, buffer exchange by TFF system, capture and purification by anion exchange chromatography.

Cultative bacteria concentrations routinely requires centrification process, alteRNAtive to centrifugation we applied TFF system for bacteria concentration. The resulting concentrated bacterial culture, free of pellet, is buffer exchanged directely, without pellet resuspension process.

Plasmid extractions routinely employ alkaline detergent cell lysis, followed by precipitations. We applied TFF system to separate plasmid DNA from the precipitated debris. The primary

recoverd plasmid DNA were purified and buffer exchanged by TFF system for anion exchange chromatography.

Conclution

The extraction and purification of plasmid DNA process has been shown to deliver both the quality and quantity for the commercial manufacture of therapeutic grade plasmid DNA. This process is easy for industrial scale up. Cultative bacterial concentration by TFF filtration overcomes the issues which arise with manufacturing processes. This process is efficient alteRNAtives to current approaches of extraction and purification of plasmid DNA. Purified plasmid DNA produced by this process were suitable for therapeutic administration for gene theraphy.

第2章　本論

1.序論

遺伝子工学が 1970 年代初めに誕生してから 30 年近く経過し、これまでに様々な遺伝子工学の技術が開発されてきた。これらの技術を用いた研究は多くの分野で行われているが、特に医学生物学領域では遺伝子工学の技術を用いた研究が多数を占めている。これらの研究に用いられる遺伝子工学の技術は目的に応じて、大きく分けて①遺伝子クローニング、②遺伝子の構造と機能の解析、③遺伝子産物の構造と機能の解析の 3 つに分けられる。

遺伝子クローニングであるが、cDNA のクローニングとゲノム遺伝子クローニングとがある。cDNA とは試験管内で逆転写酵素を用いて合成した mRNA に相補的な DNA の事である。最初にクローニングに成功した哺乳動物の遺伝子は、家兎のヘモグロビン一β鎖の cDNA であった。これは赤芽球中ではヘモグロビン mRNA が細胞内 mRNA の 6 割近くを占めるため、クローンの同定が容易であったためである。大多数の遺伝子ではヘモグロビンほど細胞内発現が高くないために、cDNA を用いることはクローンの同定を容易にするとは限らないが、多くの高等動物遺伝子に、イントロンの存在が判明した現在では、遺伝子の構造を解析する上で、cDNA のクローニングが不可欠となっている。また構造が簡単でそれほど長くないためにクローニングに適していること、クローニングベクターに適切な転写シグナルを配置して挿入することにより発現がほとんど全ての生物の中で可能なこととことなどにより、クローニングの対象として優れているばかりでなく、遺伝子素材としても中心的な位置を占めている。

これらの理由により、通常、未知の遺伝子をクローン化する場合は cDNA のクローニングをまず初めに行っている。従来目的の cDNA クローンを探すためには、まず、目的となる遺伝子の産生する蛋白質を精製して純化して、その蛋白質のアミノ酸配列をまず決定して、そのアミノ酸配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成して、合成オリゴヌクレオチドをプローブとして用いたハイブリダイゼーションによって cDNA クローンを探す手法が取られてきた。この方法は遺伝子産物が同定純化されている遺伝子に限定してしか使用できなかったが、近年この点を克服する新しいいくつかの技術が開発されている。大腸菌中で cDNA バンクより発現させ発現蛋白質と抗体との結合を利用する方法[1)]、転写調整因子の場合、特定の塩基配列との結合を指標として同定単離する方法[2)]、cDNA バンクを in vitro で転写し mRNA を作成してカエル卵に注入して、翻訳された蛋白質の機能をアッセイすることで目的の cDNA クローンを得る方法[3)]、動物細胞を宿主にして行う一過性発現クローニング[4)]、適切な変異細胞を宿主として、遺伝子相補によって目的遺伝子を単離する方法[5)]などがある。

1.1 ゲノム遺伝子クローニング

ゲノム遺伝子クローニングには、cDNA が最初に単離されている場合が多いため、cDNA をプローブにしてハイブリダイゼーションを行いスクリーニングして、目的の遺伝子クローンの単離を行うのが一般的である。ゲノム遺伝子クローニングの場合、挿入する遺伝子の長さが長いためλファージやコスミドベクターを用いて、ゲノムライブラリーを作成してハイブリダイゼーションにより目的のクローンを単離する。この方法の改良がプローブ

を固定化して目的の遺伝子断片を濃縮し、そのライブラリーを作成することによりスクリーニングを簡略する方法が開発されている[6]。両端の塩基配列が判明していると、PCR 法により目的のゲノム遺伝子断片を増幅してクローニングする方法も開発されている。

1.2 遺伝子の構造と機能の解析

1.2.1 塩基配列の決定

遺伝子をクローニング後塩基配列の決定を行う。酵素合成反応を用いた Sanger 法と化学分解反応を用いた Maxam-Gilbert 法があるが、長大な DNA の塩基配列を効率よく短期間にできるため酵素法が良く用いられている。

1.2.2 サザン法、ノーザン法

mRNA の長さの測定、ゲノム遺伝子の簡単な制限酵素マッピングや類似遺伝子の存在を検討するのに用いる。

1.2.3 変異遺伝子の作成

塩基配列が決定されると、遺伝子産生蛋白質の機能中心の部位やプロモーター領域の転写調整部位を探るために、遺伝子の改変を行う場合がある。

1.2.4 発現

単離された遺伝子の機能や遺伝子産生蛋白質の機能を調べるために、適切な細胞内で発現させる必要がある。遺伝子を発現させて細胞に及ぼす効果を調べる場合と、コードされている蛋白質を大量に作り生化学的性質を調べる場合とがある。

1.2.5 トランスジェニックマウス

受精卵に外来遺伝子を導入してトランスジェニックマウスを作成する。固体内での遺伝子の機能を調べるために遺伝子のプロモーターを変えたり、遺伝子を変異させ本来の組織以外のところで発現させたり、人工的に活性化した遺伝子を発現させたりしている。

1.3 遺伝子産物の構造と機能の解析

遺伝子を単離して塩基配列を決定し、さらにその遺伝子の構造解析を行い、最終的には大腸菌や真核細胞内に cDNA を導入して直接物質産生させその構造と機能を解析する。

以上述べてきた遺伝子工学の技術を用いた研究には、組換え DNA 技術が基本となっている。

組換え DNA のベクターとしてはプラスミドが広く用いられている。プラスミドは大腸菌や枯草菌などの核にある染色体とは異なり、細胞質中にある自律増殖可能な二本鎖環状 DNA である。そのプラスミドの中に、インスリン、成長因子、インターフェロンなど特殊な物質を作る基となる遺伝子を組み込ませて、菌を培養することにより、目的とする物質を大量に産生することができる。

医療の分野では近年、組換え DNA 技術を用いて治療を行う、遺伝子治療が欧米を中心に多数行われている。これは既存の治療法では有効性が期待できない疾患に対して、遺伝子自身もしくは遺伝子を導入した細胞を投与することで症状の改善や治癒をめざす治療法である。

1.4 遺伝子治療に用いられるベクター

遺伝子治療に用いられるベクターには大きく分けてウイルスベクターと非ウイルスベクターとがある。

①ウイルスベクター

1)レトロウイルスベクター

2)アデノウイルスベクター

3)アデノ随伴ウイルス

②非ウイルスベクター

1)ネイキッドDNA(プラスミドベクター)

ウイルスベクターは遺伝子導入効率が高い反面、安全性の面で解決されていない問題を抱えている。

特に、1999 年 9 月に米国ペンシルバニア大学が行った先天性酵素欠損症の患者に対するアデノウイルスベクターによる遺伝子治療中に、アデノウイルスベクターが直接の原因で死亡した事件が発生して以来、遺伝子治療に用いられるベクターの安全性が重要視されている。

プラスミドベクターは遺伝子導入効率がウイルスベクターに比べて低い欠点があるが、安全性の面では最も安全なベクターであり、遺伝子導入効率が低くても症状の改善が期待できる疾患に対する治療法として近年増加傾向にある。

これまで大多数を占めていたウイルスベクターによる遺伝子治療件数が横ばいであるのに対し非ウイルスベクターを用いた遺伝子治療件数は年々増加している。

遺伝子治療のために使用するプラスミド DNA はその性格上、極めて高純度なものが大量に必要となる。

現在、我が国においては、遺伝子治療に使用できる高純度なプラスミド DNA を大量に精製できるシステムは構築されておらず、研究機関がプラスミドベクターを用いた遺伝子治療を計画した場合、その供給を海外に依存せざる得なくなっている。

本研究は遺伝子治療に用いることができる品質のプラスミド DNA を高純度で大量に大腸菌体から抽出・精製するシステムを構築することを目標に研究開発を行った。

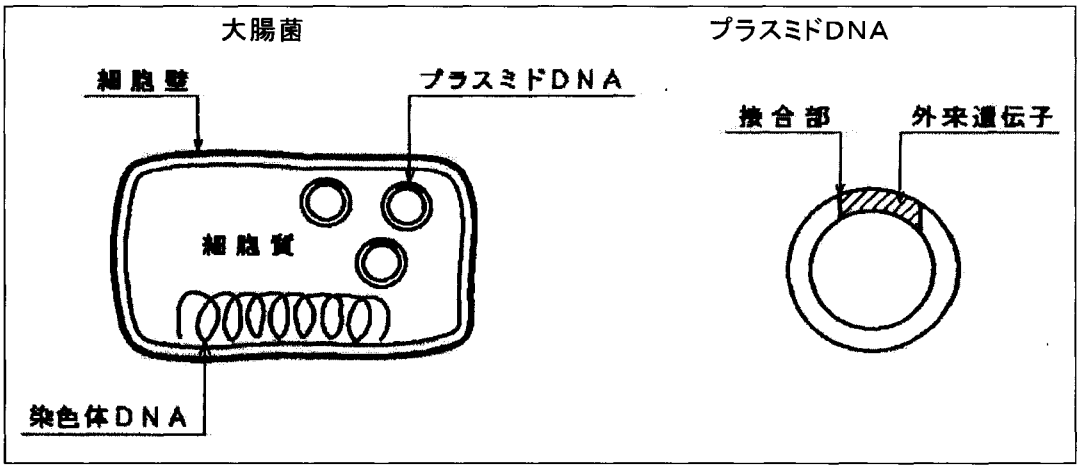


図 1－1　プラスミド

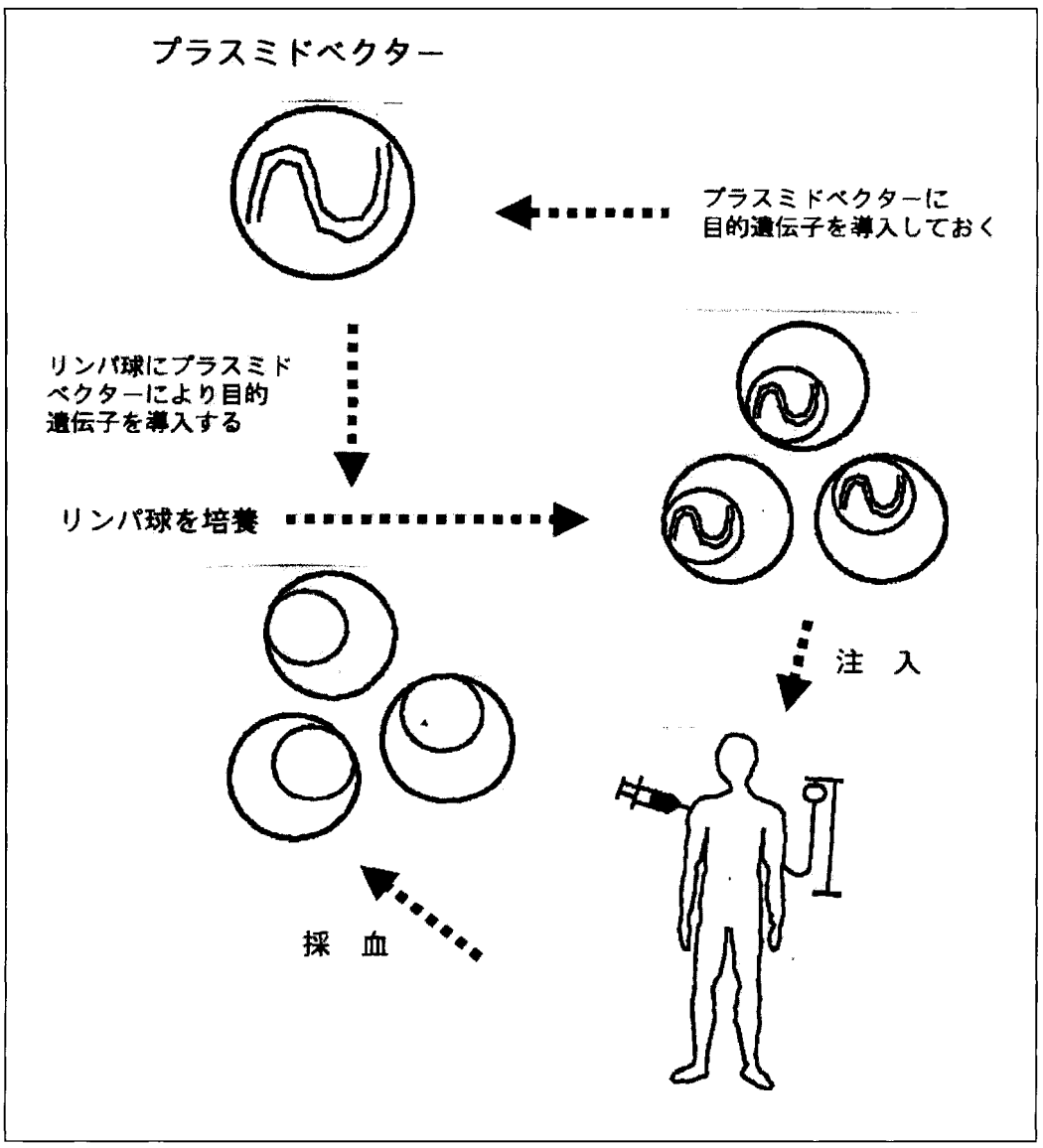


図 1－2　遺伝子治療

2.大型プラスミド抽出法の開発

2.1 はじめに

2.1.1 現在の研究室レベルでのプラスミドDNA抽出

各研究室において各々の所有している機材の状況に合致する方法を用いてプラスミドの抽出を行っているのが現状である。以下一般的なプラスミド DNA 抽出法について説明して問題点を述べる。

①プラスミド DNA が組み込まれている菌体（一般的には大腸菌）を振盪培養装置に三角フラスコ中に培養液（LB Broth）を容器の 15 %程度入れて 37 ℃で 14 時間程度培養する。（大量のプラスミド DNA が必要な場合、菌体の培養が複数の三角フラスコに分けて行われるためフラスコ間の増殖の差が出る。振盪培養装置には滅菌された空気を送る装置が装備されていない。）

②遠心装置に合った遠心管に培養菌体を分注して遠心して上清液を捨てる。（安全キャビネット内で手作業で培養液の分注を行わなければならない。遠心機への遠心管の装着及び遠心後の管の取り出しも手作業で行う。遠心上清液を捨てる場合も手作業で行う以外に方法が無く、沈澱した菌体と上清の分離を均一化する事は不可能である。）

③沈澱した菌体をプラスミド DNA 抽出用バッファー液に懸濁する。（懸濁するにはボルテクッスミキサーなどにより撹拌するが、遠心管 1 本づつ行うため沈澱した菌体を均一に混濁するのは難しく、大量処理には向かない。）

④界面活性剤とアルカリ液の含まれている細胞溶解液で細胞壁を破壊する。細胞溶解液と混和する。（細胞溶解液を入れるときは安全キャビネット内で行う。混和のためには手作業で容器を上下さかさまに 2 ～ 3 回振る。）

⑤酸にて中和する。よく混ぜる。（中和用の酸を加えるときは安全キャビネット内で行う。混和のためには手作業で容器を上下さかさまに 2 ～ 3 回ふる。）

⑥遠心機で遠心して、上層を別の遠心管に取る。（遠心機に遠心管をセットすることと、遠心後の遠心管の取り出しは手作業で行う。手作業で上層と沈澱物を分けなければならない）

⑦塩化セシウム一臭化エチジウムを加えて超遠心用シールチューブに移す。（発癌物質である臭化エチジウムを手作業で超遠心用チューブに移さなければならない。シールチューブはバランスを合わさなければならない。）

⑧超遠心機にて遠心（60,000rpm、6 時間以上）

⑨超遠心後に、紫外線ランプを照射してバンドを目視できる様にしてチューブに注射針をさしてプラスミド DNA を回収する。（発癌物質である臭化エチジウムが含まれている溶液から手作業で注射針で回収する煩雑な作業行程で熟練を要し、危険な作業である。）

⑩カラムを用いたプラスミド DNA の精製

塩化セシウム密度勾配遠心法により回収した分画をゲル濾過カラムにかけて、RNA、塩化セシウム、遊離の臭化エチジウムを除き、プラスミド DNA の精製を行う。

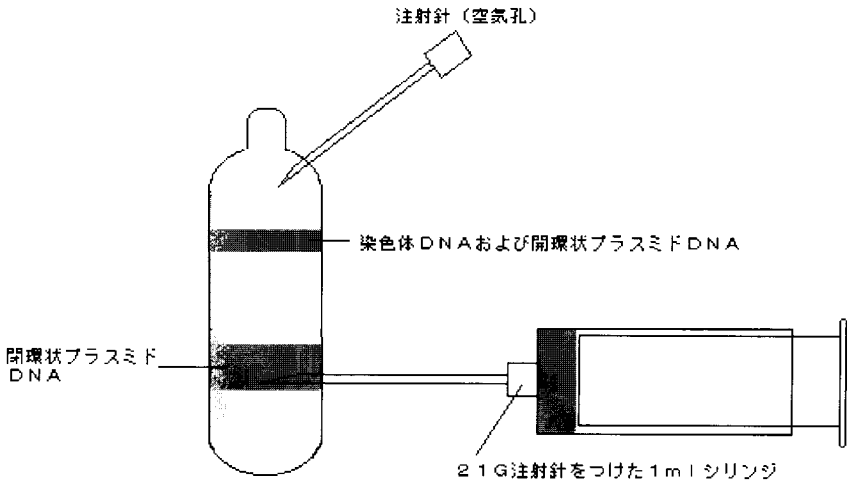


図 2－1　超遠心後のプラスミド DNA の回収

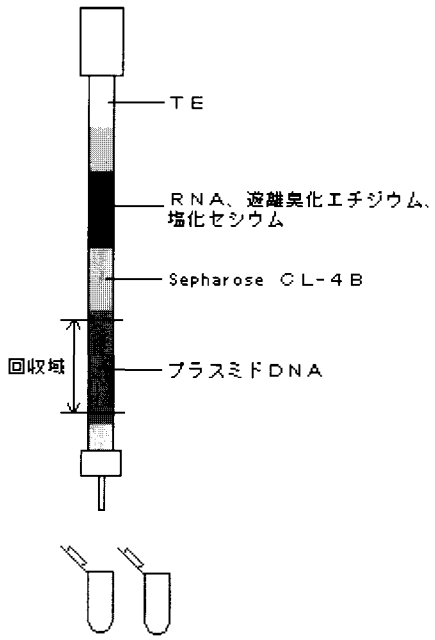


図 2－2　カラムによる DNA の精製

2.1.2 目的と目標

当研究ではこれまで実験室レベルでは手作業で遠心機を用いて大量に生産するのには不向きな方法により得られていたプラスミド DNA の粗精製を、簡便に大量に作成するシステムの構築を目的として、大量培養装置で培養した菌体を連続した閉鎖系で濃縮、バッファー交換、アルカリによる溶菌、酸による中和、デブリスの除去、宿主由来の蛋白除去などの粗精製（前記の①から⑩までの操作に該当）の方法を確立することを開発目標に研究

開発を行う。

2.1.3 宿主およびモデルプラスミドDNAの選定

(1)モデルプラスミドDNAの選定

本研究を進める上で精製をおこなうプラスミド DNA モデルを選定した。選定の条件として、精製による変化が無いことを確認することが出来る事、他の精製法により得られたプラスミド DNA と比較検討出来る事とし、これらに合致したβガラクトシダーゼコントロールベクターをモデルプラスミドとして開発を進める事とした。

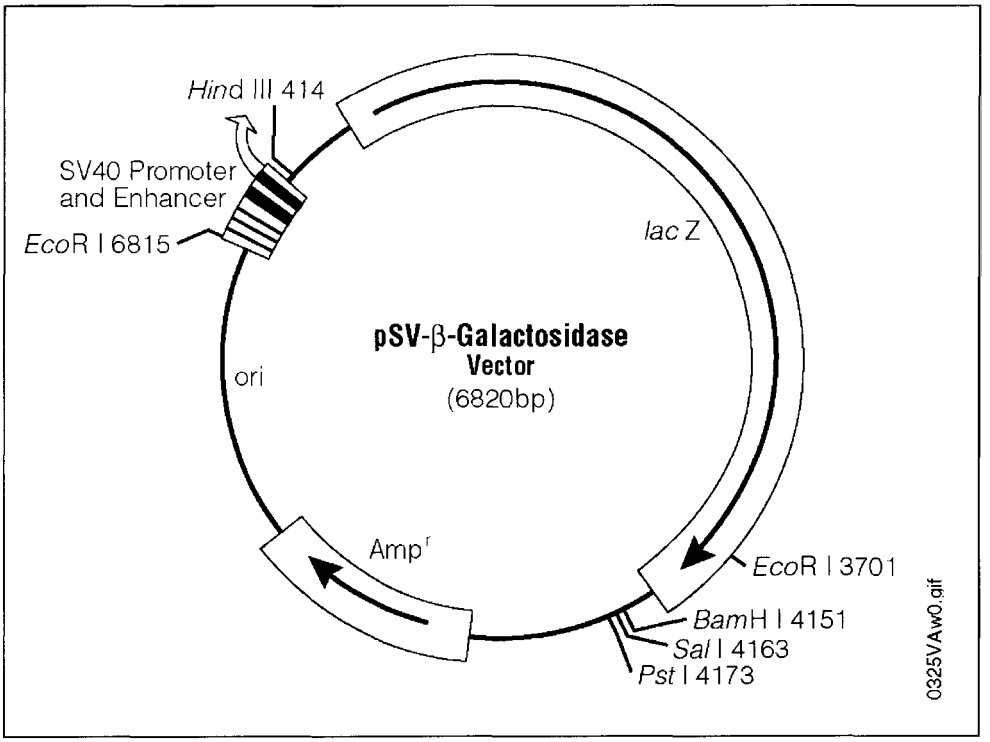


図 2－3　β Gal ベクター図

(2)宿主大腸菌株の選定

プラスミドベクターを増殖させるための宿主としてその遺伝的性質が解明されている K12 株由来の JM109 を使用する事とした。

2.1.4 使用機器

(1)使用設備

大量培養装置：琉球大学遺伝子実験施設に設置されている三ツワバイオシステムのファーメンタープロセスコントローラーを装備したファーメンター KMJ-301MGU-FPM II を使用する。この装置は温度制御、回転数制御、通気量制御が行え、培養中の pH のモニターが可能である。

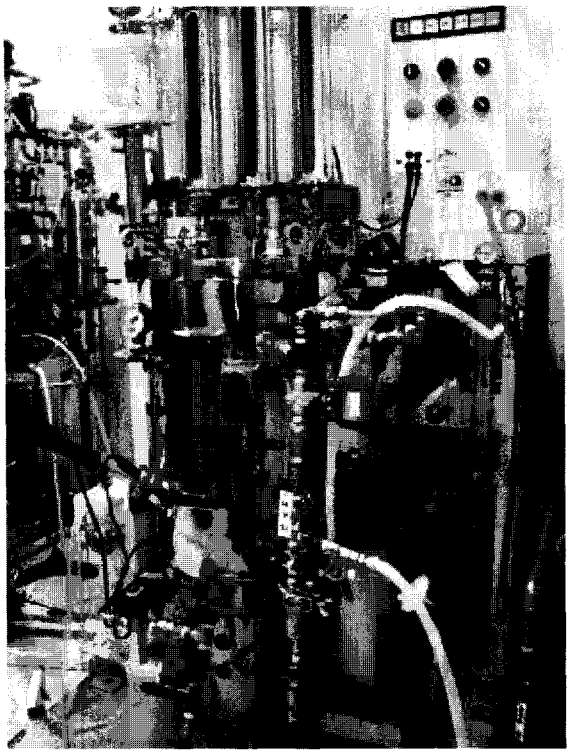


図 2－4　ファーメンター

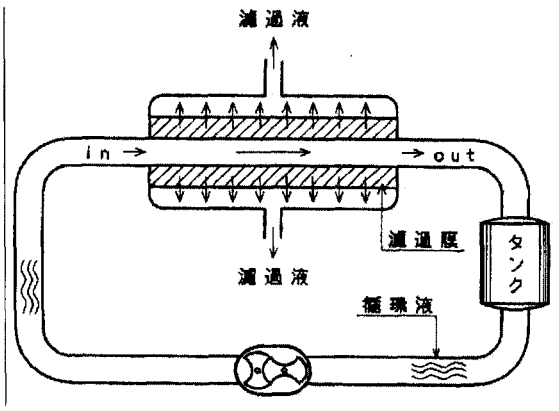
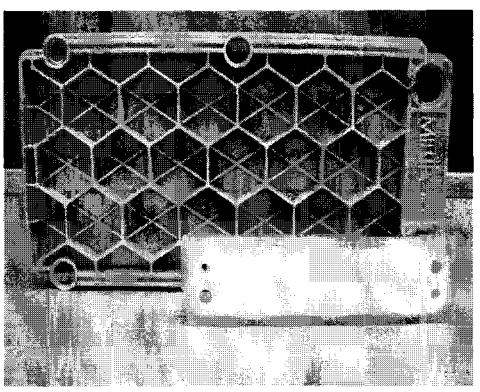


図 2－5　概念図

クロスフロー濾過ともいわれ、膜面に平行に液を流し、不純物を取り除きながら濾過を行うシステム。



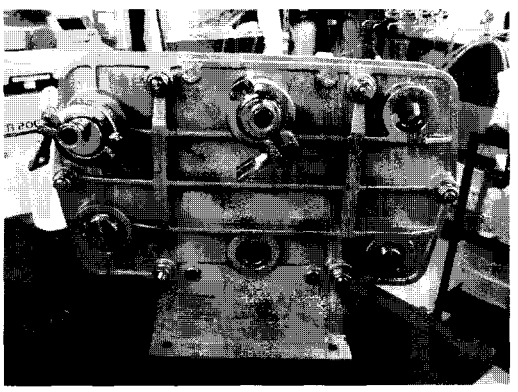


図 2－6　プロスッタク

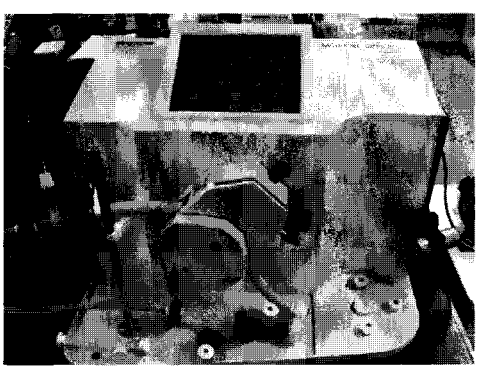


図 2－7　M12

図 2－8　ペリコン

(2)濃縮およびバッファー交換に使用する機器

タンジェンシャルフローフィルタレーションシステム（TFF）ミリポア社製のコントロールユニットM12とプロスタックホルダー、ペリコンホルダー

M12 コントロールユニットはポンプスピードの制御による送り流量調節、独立した二次ポンプによる透過流量調節、さらに送り側圧、戻り側圧、透過側圧のモニターリングが可能である。

2.1.5 研究開発体制

先端医学生物科学研究所

新垣榮	研究員
関口恵史	研究員
青山みさ子	研究補助員
我那覇早苗	研究補助員
宮良梨加	研究補助員

2.2 培養条件の検討

前記の大量培養装置でプラスミド DNA が組み込まれている大腸菌体を培養液（LB Broth）中で様々な条件で培養して増殖させ培養条件の検討をおこなった。

(1)温度

温度に関しては 30 ～ 37 ℃の間で菌体増殖試験を行い、その結果より一般的な大腸菌の培養温度 37 ℃に設定した。

(2)回転速度

回転速度は 50 ～ 500rpm の間でテストした結果、あまり速めると泡立ちが激しく培養液の減少につながる事が判明したので菌体の増殖が良く、発泡による液量減少を防ぐことができる 150rpm に設定した。

(3)通気量

通気量は増やすことにより培養液の p H が上昇するため菌体の増殖に悪影響を与えない範囲での pH 上昇（8 以下）にするため 0 ～ 5L/分の間でテストした結果 0.4L/分に設定することにした。

(4)培養時間

培養時間により菌体の増殖に差が認められた。8 ～ 20 時間培養して OD による培養液の懸濁度を調べて 14 時間以降あまり増加が認められないので培養時間は 14 時間とした。

2.3 菌体濃縮法の研究開発

2.3.1 大腸菌体が増殖した培養液の濃縮

遠心装置を使用しないで培養液を濃縮する方法の開発のために、連続して培養液を濾過濃縮できる TFF システムの導入を考案した。

2.3.2 使用する膜の検討

濃縮するものは大腸菌体であるので親水化処理したポリビニリデンフロライド（デュラポア）を用いることが妥当であると推測されたので膜素材は親水化デュラポアを用いて下記の諸条件の範囲で培養液の濃縮を行った。

①条件

1)膜材質：親水化処理したポリビニリデンフロライド（デュラポア）
2)膜径：0.1 ～ 0.45 μ M
3)膜面積：0.18 ～ 0.36m^2
4)流速：6 ～ 10L/min
5)濃縮量　15L から 1L への濃縮（15 倍）
6)膜圧　1.2 － 1.8kg/cm^2
7)プロセス設計
　透過流速、プロセス時間
　高分子溶液を UF で濃縮した場合、透過流速は次式のようになる。

$$J = k\ln\left(\frac{Cg}{C}\right)$$

ここに、

J：透過流速
k：定数
Cg：ゲル濃度
C：高分子濃度

濃度 C は濃縮倍率に比例するので上式は次式となる。

$$J = J_0 \quad 1 - \left(\frac{\ln X}{\ln Xg}\right)$$

ここに、

J_0：初期透過流速
X：濃縮倍率
Xg：ゲル化濃縮倍率

ステムを用いることを考案した。

2.5.1 フィルタレーション条件

①条件

1)膜材質：親水化処理したポリビニリデンフロライド（デュラポア）

2)膜径：0.1 ～ 0.45 μ M

3)膜面積：0.18 ～ 0.36m

4)流速:6 ～ 10L/min

5)膜圧:1.2 ～ 1.8kg/cm^2

これらの範囲の諸条件により濃縮培養液を TFF フィルタレーションにより TE バッファー液を用いてバッファー交換した。

②結果

濃縮菌体の抽出用バッファー液への交換が TFF システムにより簡便に行われることが確認された。

2.6 菌体溶菌法の研究開発

2.6.1 界面活性剤の比較検討

アルカリ法による菌体溶菌に用いる界面活性剤を各種用いて溶菌を行い検討した。

①方法

ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、Octylphenoxypolyethoxyetnanol（TritonX114）、t-Octylphenoxypolyethoxyethanol（TritonX110）、Polyoxyetheylenesorbitan monooleate（Tween80）、Polyoxyetheylene － sorbitan monolaurate（Tween20）の界面活性剤を 200mM NaOH に其々 1 %加えて大腸菌体の溶菌作用を調べた。

②結果

大腸菌 SDS が一番溶菌作用が強く SDS を界面活性剤として 1 %の濃度で使用する事にした。

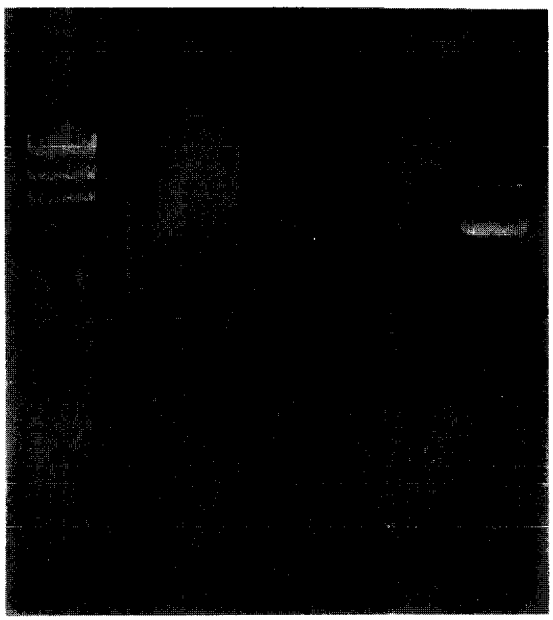


図 2－11　界面活性剤によるプラスミドDNA抽出量
左よりマーカー、TritonX114、TritonX110、Tween80、Tween20、SDS

2.6.2 溶菌液量

TEバッファー液中の大腸菌を1Lのアルカリ液（NaOH、SDS　pH12）にて溶菌させる。反応温度および反応時間25℃、5分

アルカリ液による処理は菌体液と等量で行うことが一般的であり、今回の研究でも等量のアルカリ液を加えることでpH8であった菌体液がpH12まで上昇し溶菌が行われることが確認された。また撹拌装置にて50rpmの回転速度で撹拌を行うことにより、菌体液とアルカリ液の混合が良く行われる結果となっている。

2.6.3 中和

中和液（酢酸カリウムpH5.5）1Lを加えて中和、25℃、5分。中和液は一般的に用いられている酢酸カリウムを使用した。

中和液量はアルカリ液量と等量とした。中和液添加後、撹拌装置にて50rpmの回転速度で撹拌を行うことによりアルカリ処理によりpH12であった菌体液のpHは6になった。

2.7 溶菌液粗精製に関する研究開発

2.7.1 TFFシステムペリコン膜によるデブリスの除去

2.6により溶菌された3Lのプラスミド DNA液をTFF膜を用いて濾過し、デブリス（菌体由来蛋白、クロモソマルDNA、等）の除去を行う。

①条件

1)膜材質：親水化処理したポリビニリデンフロライド（デュラポア）
2)膜径：0.1 ～ 0.45 μ M
3)膜面積：0.18 ～ 0.36m
4)流速:6 ～ 10L/min
5)膜圧:1.2 ～ 1.8kg/cm^2

②結果

上記の諸条件により溶菌後の菌体由来のデブリスを除去を行い膜に負担が少なく効率的にデブリス除去できる条件を決定することが出来た。

2.7.2 溶菌液中のプラスミドDNA溶液のTFFによる濃縮、粗精製

上記によりデブリスの除去されたプラスミド DNA溶液をTFFシステムにより濃縮しながら低分子タンパク質等の除去を行う。

①条件

1)膜材質：再製セルロース
2)膜径：0.01 ～ 0.10 μ M
3)膜面積：0.1m^2
4)流速：1 ～ 2L/min
5)膜圧:1.2 ～ 1.8kg/cm^2

②結果

これらの諸条件によりプラスミド DNA 溶液を効率的に濃縮することが出来る条件を決定することが出来た。

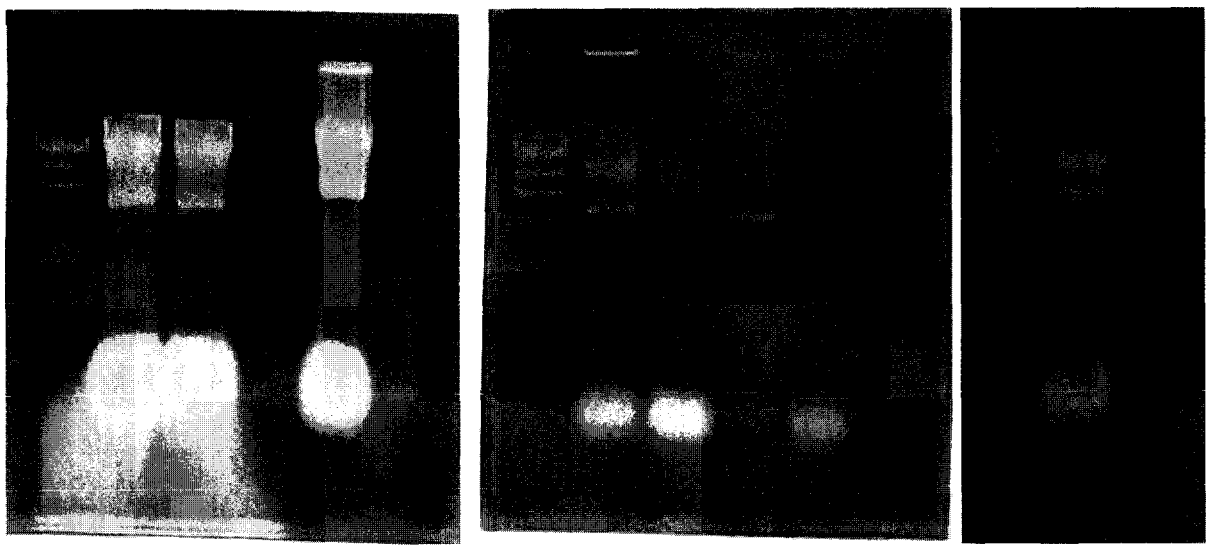


図 2 － 12　抽出プラスミド電気泳動

2.7.3 カラムワーク用バッファー液への交換

濃縮されたプラスミド DNA 溶液をカラム精製に適したバッファーに交換するために TFF システムを用いてバッファー交換を行う。

①フィルタレーション条件

1)膜材質：再製セルロース

2)膜径：0.01 ～ 0.10 μ M

3)膜面積：0.1m^2

4)流速：1 ～ 2L/min

5)膜圧:1.2 ～ 1.8kg/cm^2

6)バッファー液量　5L

②結果

これらの諸条件でバッファー交換を行い効率的にバッファー交換を行う諸条件の決定を行うことが出来た。

2.7.4 バッファー交換後の再濃縮

バッファー交換したプラスミド DNA 溶液をカラムワークのために濃縮を行う。

①濃縮条件

1)膜材質：再製セルロース

2)膜径：0.01 ～ 0.10 μ M

3)膜面積：0.1m^2

4)流速：1 ～ 2L/min

5)膜圧:1.2 ～ 1.8kg/cm^2

②結果

これらの諸条件で濃縮を効率的に行う諸条件を決定することが出来た。

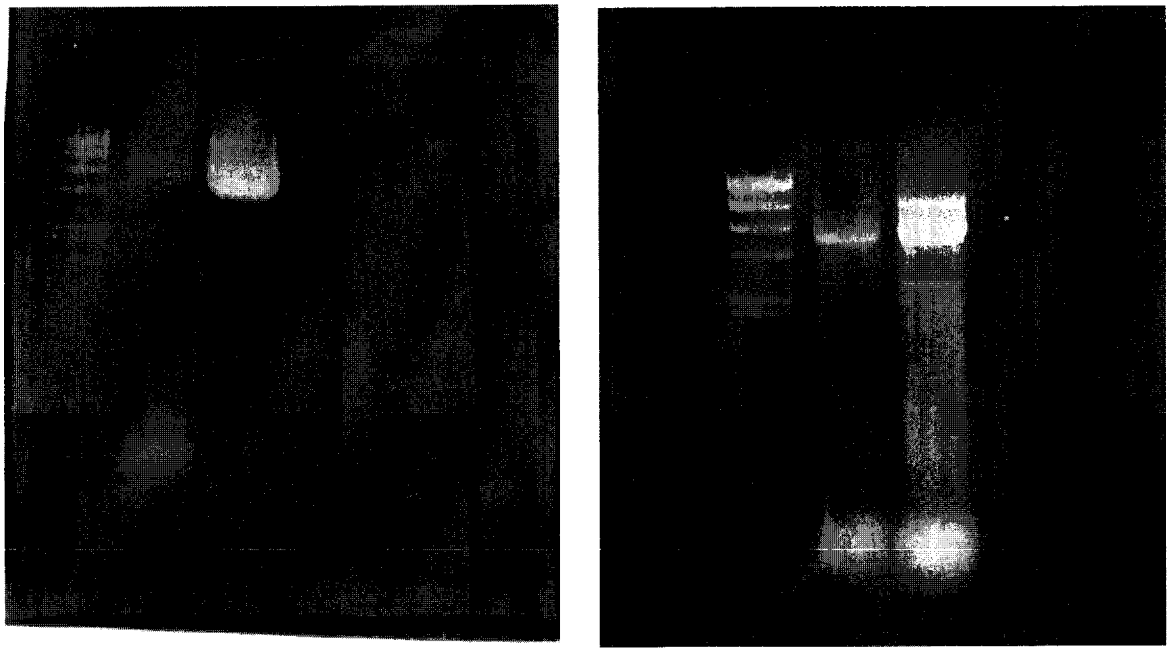


図 2 － 13　粗精製プラスミド電気泳動

2.8 研究開発成果等

遠心装置を用いないで、大量培養された菌体を濃縮、バッファー交換するシステムを閉鎖系で効率的に短時間に行える方法を開発した。

2.9 今後の課題

膜の再生法の確立：TFF に使用する膜を再生することによりコストの低減を図ることを試みる。

3.大型プラスミド精製用カラムの開発

3.1 本研究に使用した機器

琉球大学遺伝子実験施設に設置されているパーセプティブバイオシステム社製のバイオカド 700E を使用した。

3.2 研究体制

先端医学生物科学研究所

新垣榮　　研究員
喜久川政直　研究員
陳文　　研究員
黄集前　　研究補助員
顔瑾　　研究補助員

3.3 カラム

3.3.1 ポロスHQ(イオン交換)カラム、官能基:第四級ポリエチルイミン

(1)プラスミドDNA分離を行う至摘pH域の検討

バッファー　アニオン　バッファーA：　50 mM Tris pH6.0
B：　50mM Tris pH9.0
3M　NaCl

①方法

サンプル DNA: β Gal コントロールベクター DNA

パーフュジョンの定法によるカラムワーク

1)平衡化
2)サンプルのロード
3) pH マップモードによる溶出
4)吸光度計 A260 によるモニター
a. pH6.0 ～ pH7.4
b. pH7.4 ～ pH8.8
c. pH6.8 ～ pH8.2

②結果

グラフ No1、No2、No3 ～ No13

③結論

至摘 pH 域は pH7.8 ～ pH8.2 であった。

(2)バァッファーの条件検討

①至摘バッファーの設定

カラム：Poros HQ

②バッファー

1) Tris-HCl

Buffer A : 25mM Tris-HCl pH8.1
1 m M EDTA

Buffer B : 25mM Tris-HCl pH8.1
1 m M EDTA
2M NaCl

2) MOPS

Buffer A : 50mM MOPS pH7.0

Buffer B : 50 m M MOPS pH7.0
2M NaCl

3) MOPS (with TritonX-100 and isopropanol)

Buffer A : 50mM MOPS pH7.0
750mM NaCL
15% Isopropanol
0.15% TritonX-100

Buffer B : 50 m M MOPS pH7.0
2M NaCl
15% Isopropanol

③方法

サンプル DNA : β Gal コントロールベクター

パーフュジョンの定法によるカラムワーク

1)平衡化

2)サンプルロード

3)溶出

4)フラクション分析

a.アガロースゲル電気泳動

b. 2 吸光度計による A260

④結果

グラフ No14、15、16、17、18、19 ～ 23

⑤結論

Tris-Hcl と MOPS バッファーが同程度に適していると判断された。

(3)溶出条件の検討

①方法

サンプル DNA : β Gal コントロールベクター

直線およびステップワイズ法での溶出

パーフュジョンの定法によるカラムワーク

1)平衡化

2)サンプルロード

3)溶出

4)フラクション分析

a.アガロースゲル電気泳動

b.吸光度計による A260

②結果

グラフ No24,No25

③結論

ステップワイズ法によりプラスミド DNA と RNA が分離できた。

(4)カラムの比較

①方法

Poros HQ、Poros50D、TOSOH DEAE650S,

Poros R1, TOSOH Hexyl650C

サンプル DNA：β Gal コントロールベクター

パーフュジョンの定法によるカラムワーク

1)平衡化

2)サンプルロード

3)溶出

4)フラクション分析

a.アガロースゲル電気泳動

b.吸光度計による A260

②結果

グラフ No25,26,27 ～ 35

③結論

PorosHQ による分離精製が適していると判断された。

3.3.2 疎水カラムによるエンドトキシン及び宿主たんぱく質除去

①条件

使用カラム　：東ソー、トヨパール 650Hexyl カラム

バァッファー：リン酸バッファー

硫酸アンモニウム

②結果

疎水性カラムにより祖精製プラスミド DNA 溶液中の宿主由来のたんぱく質及びエンドトキシン濃度をそれぞれの目標値以内に除去することが出来た。

③結論

イオン交換カラムと疎水カラムの組み合わせにより粗精製プラスミド DNA 溶液から宿主由来の混在物を、遺伝子治療に用いることの出来る精製プラスミド DNA に要求されるレベルで、除去することが出来、極めて純度の高いプラスミド DNA を精製することができた。

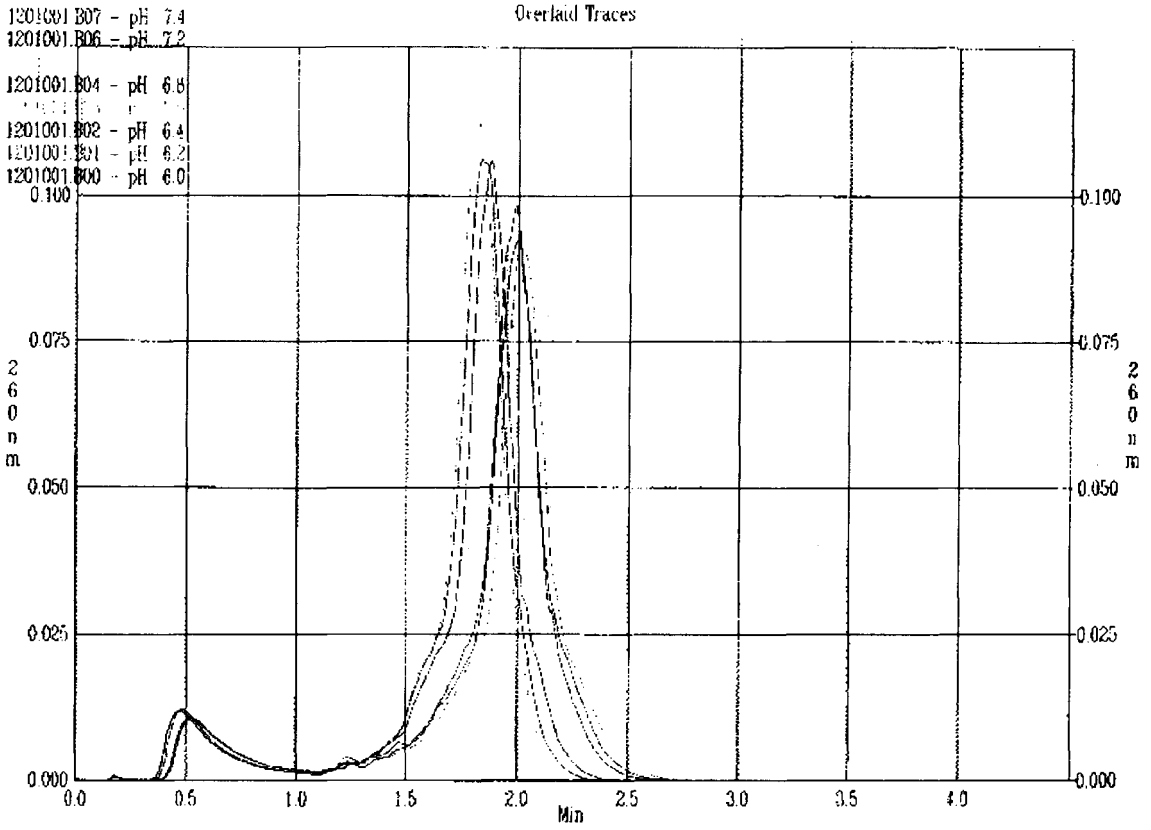


図 3－1　pH6.0～7.4

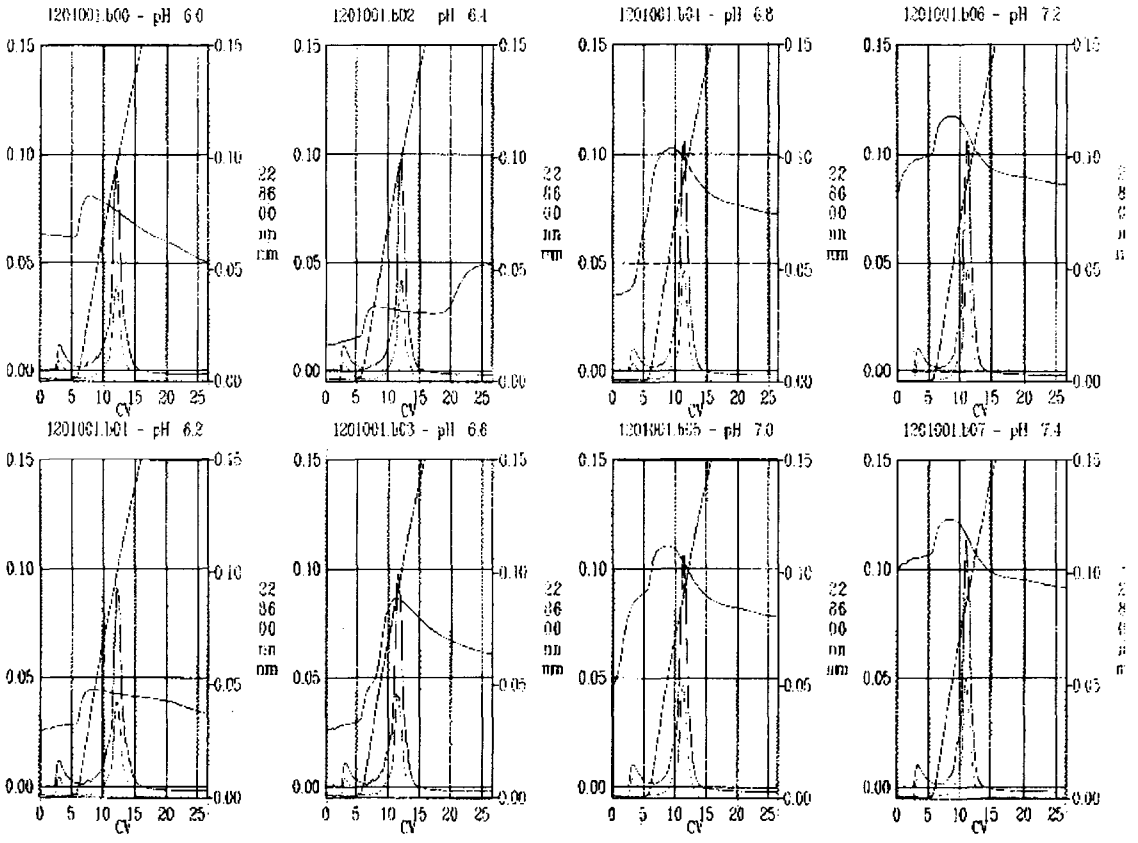


図 3－2　pH6.0～7.4

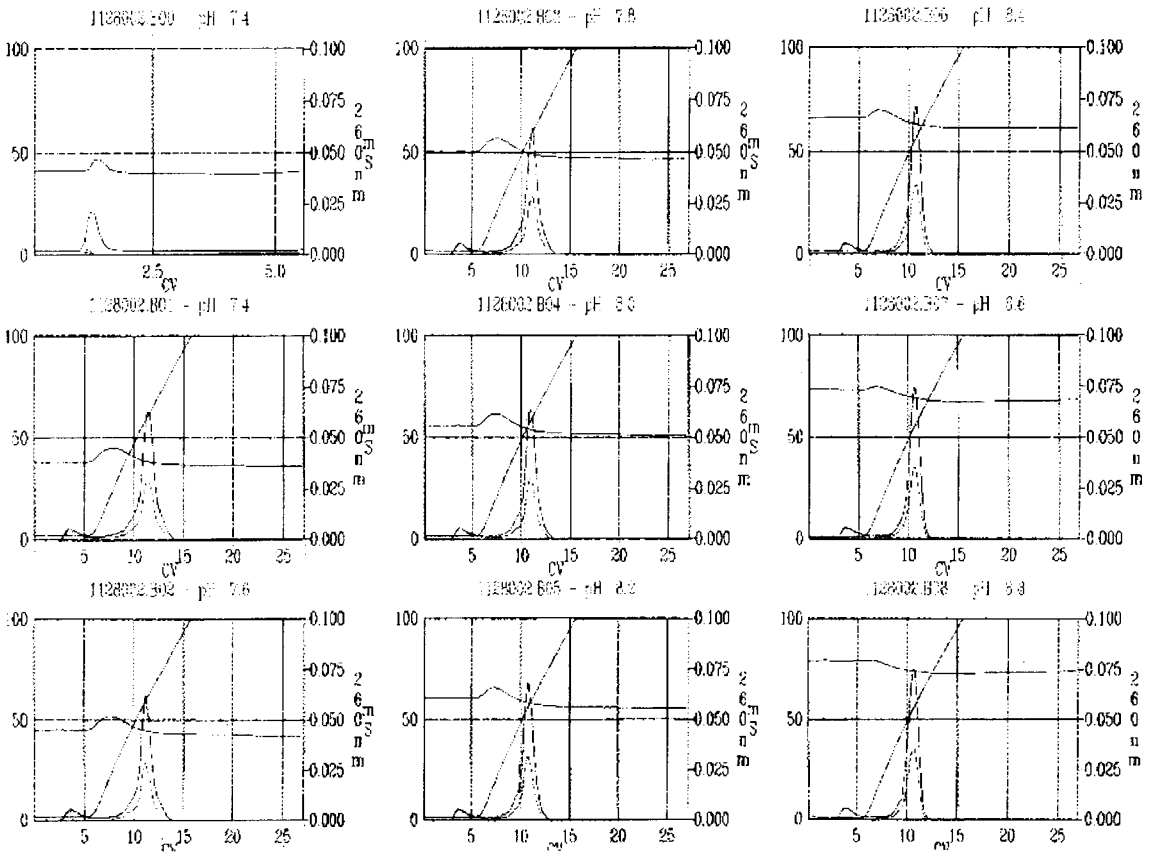


図 3－3　pH7.4～8.8

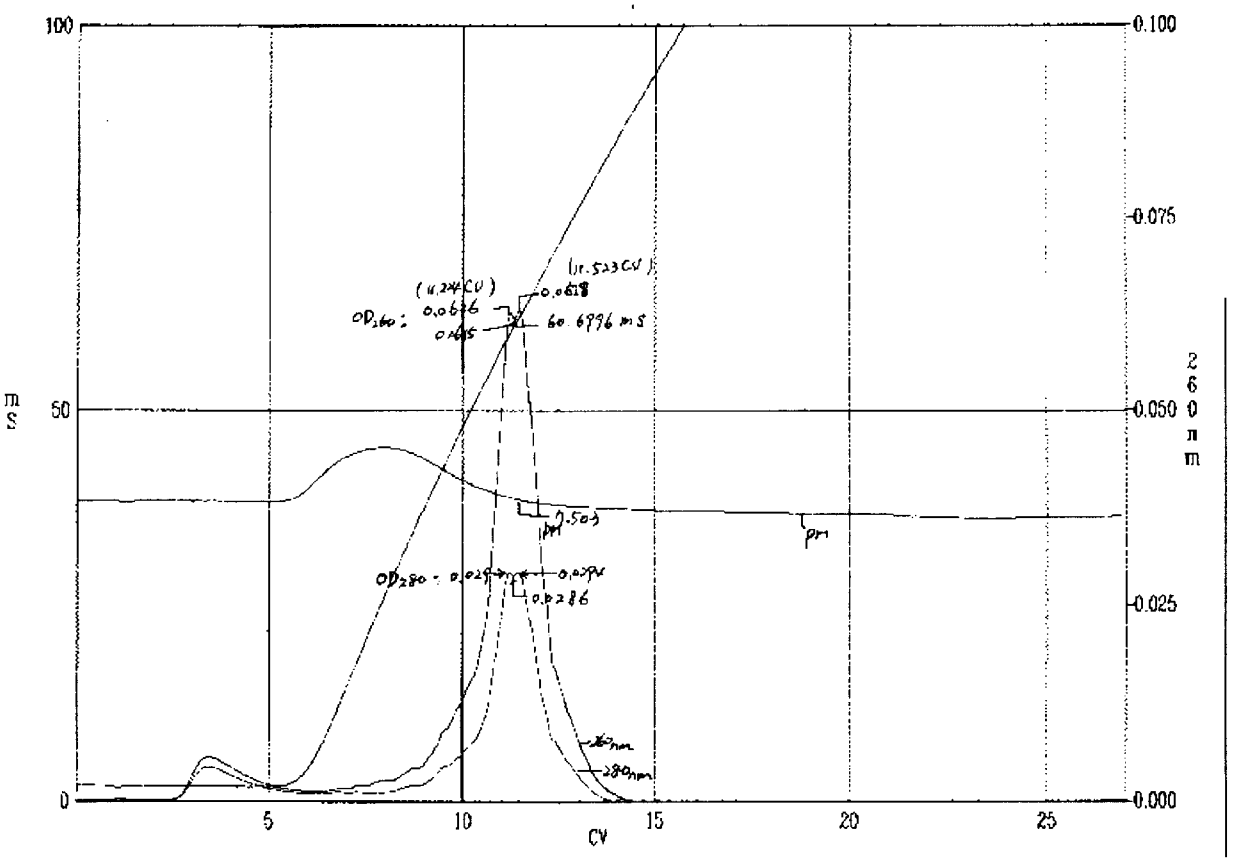


図 3－4　pH7.4

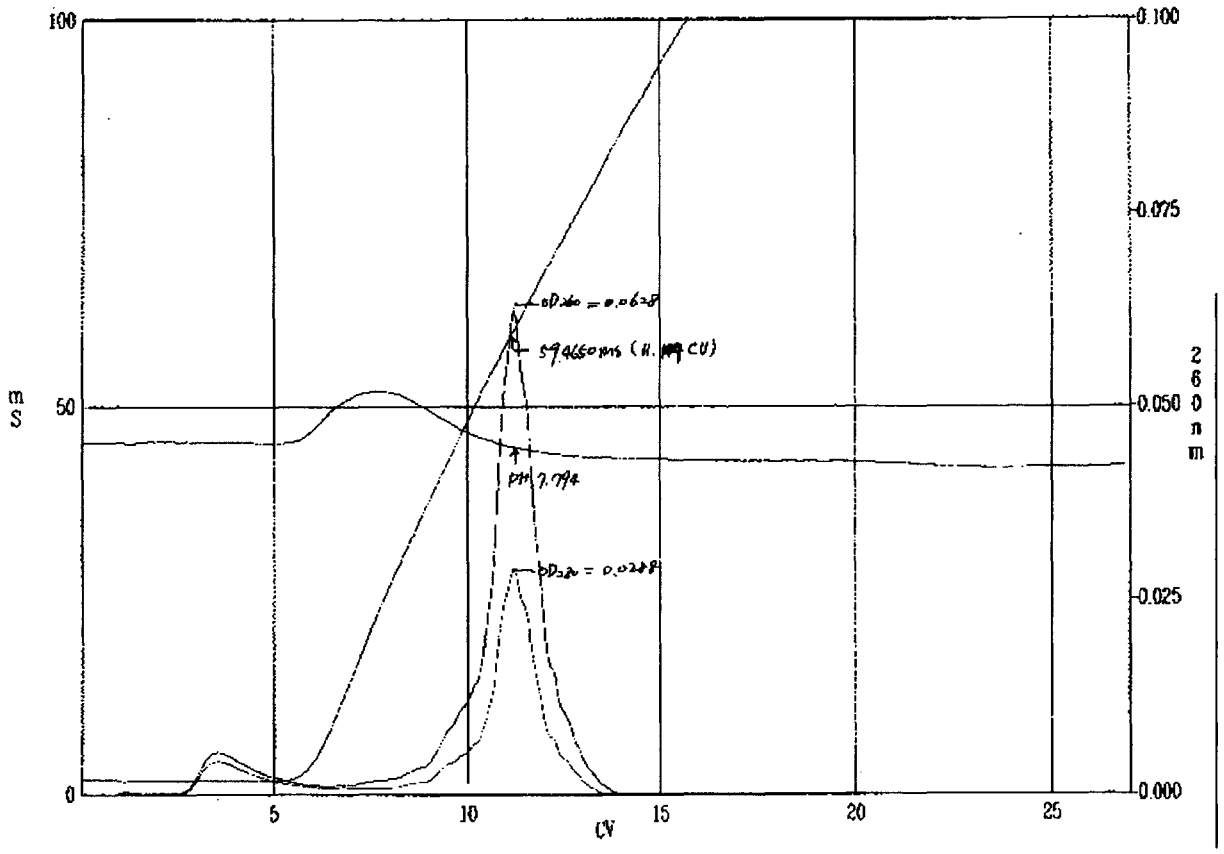


図 3－5　pH7.6

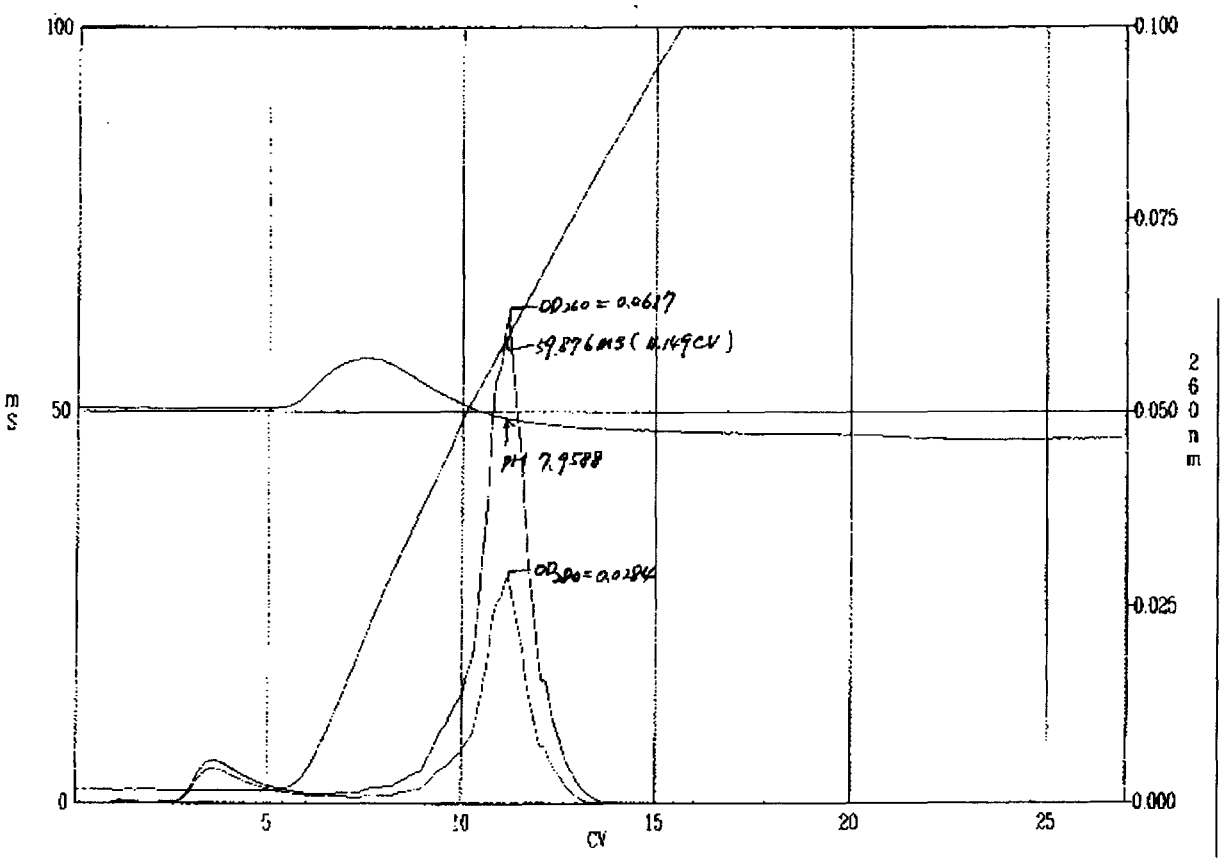


図 3－6　pH7.8

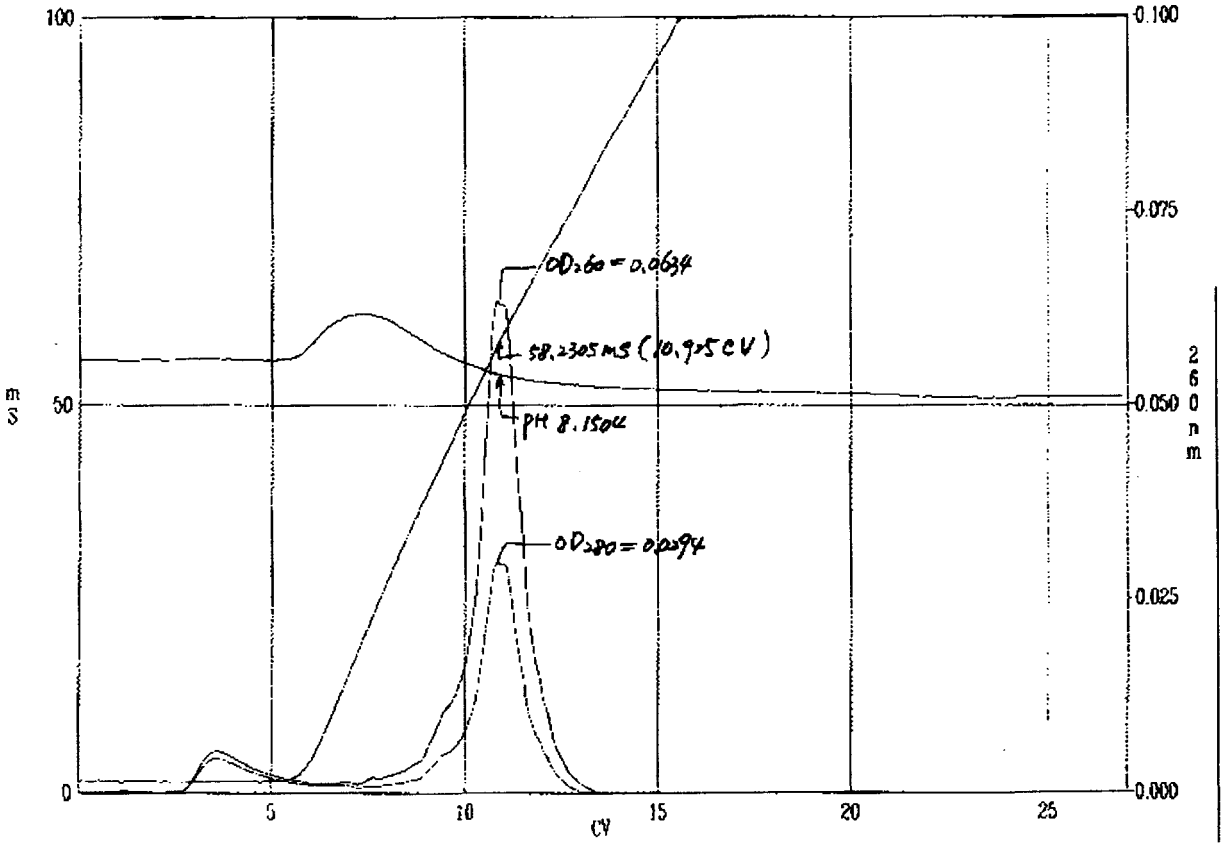


図 3－7　pH8.0

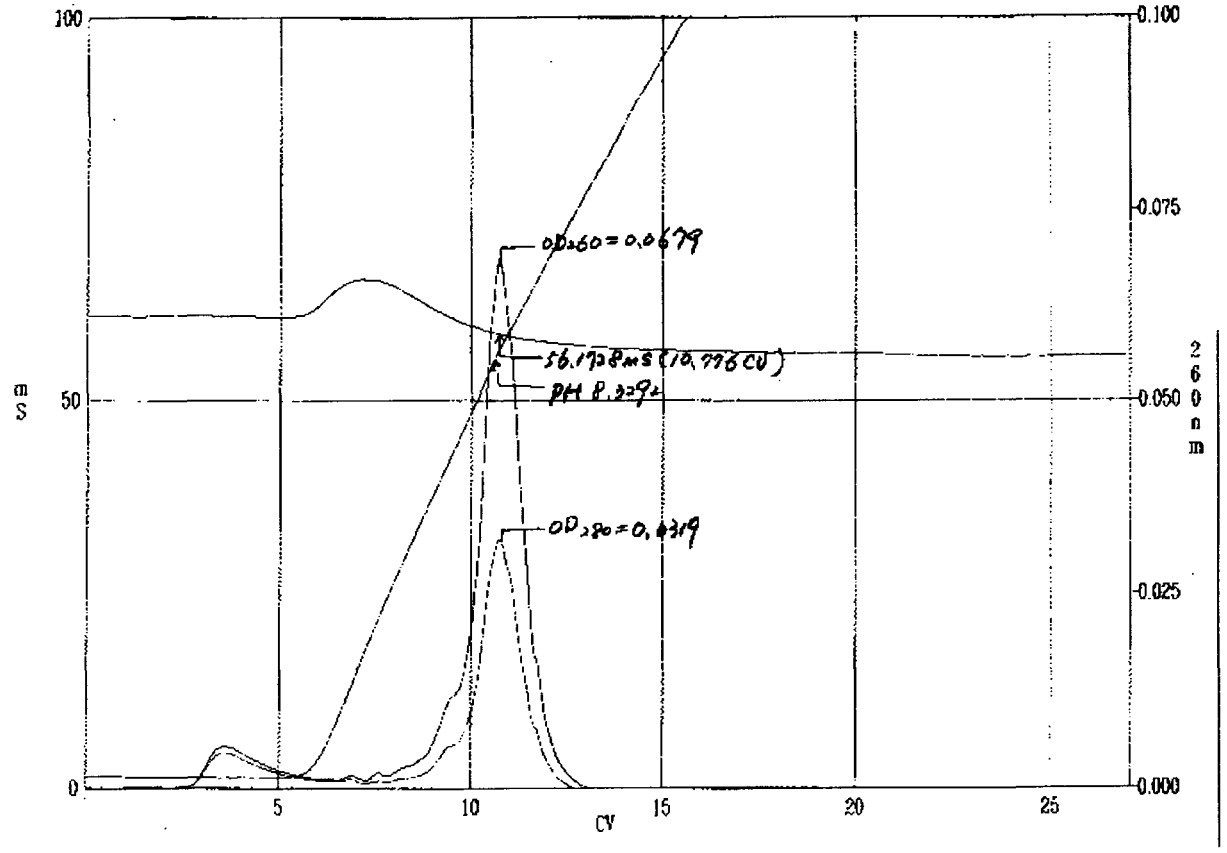


図 3－8　pH8.2

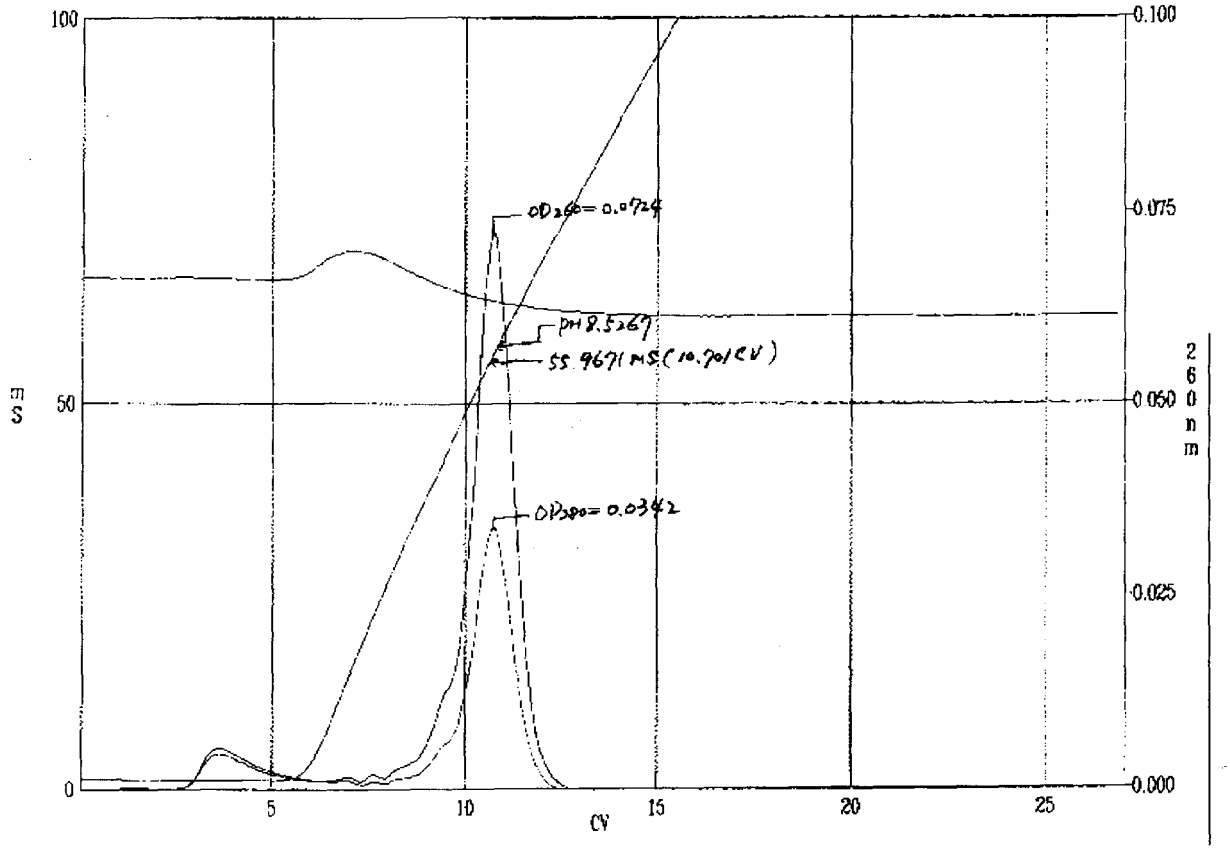


図 3－9　pH8.4

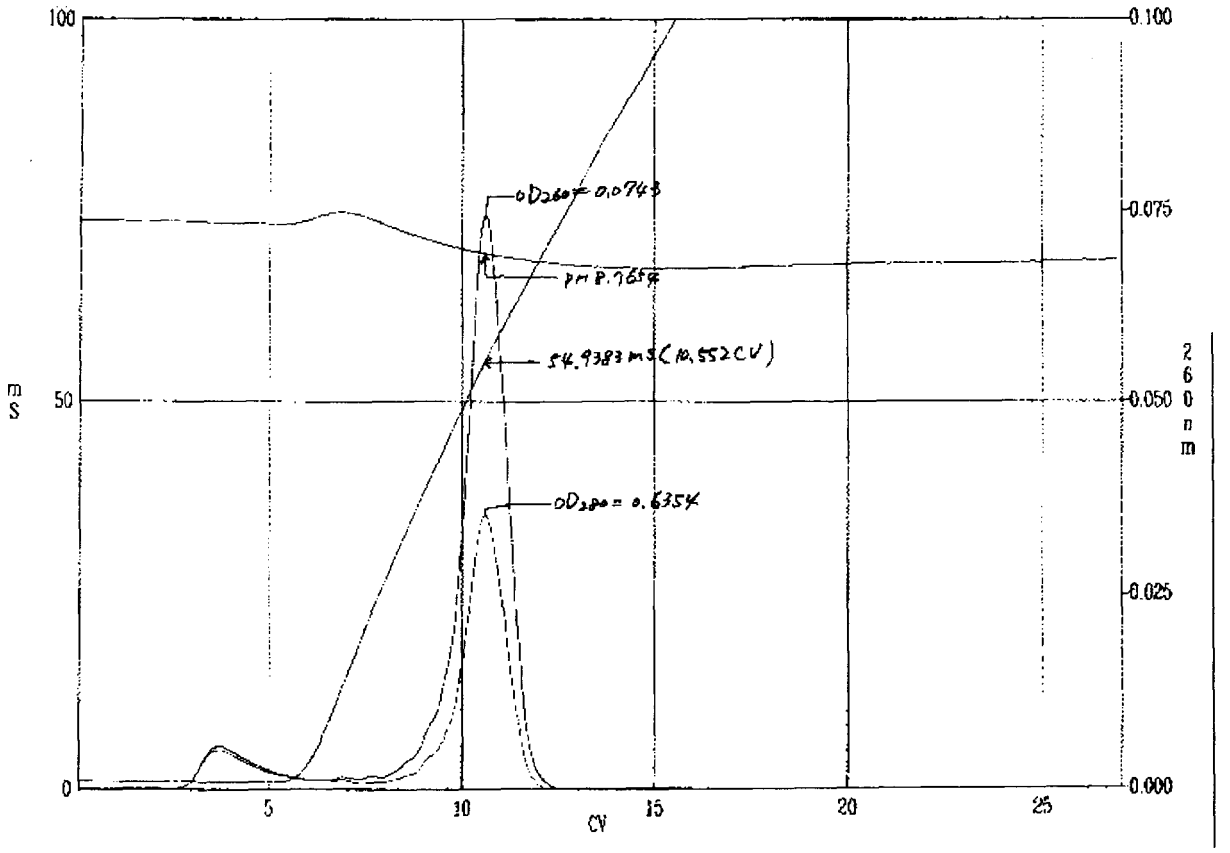


図 3－10　pH8.6

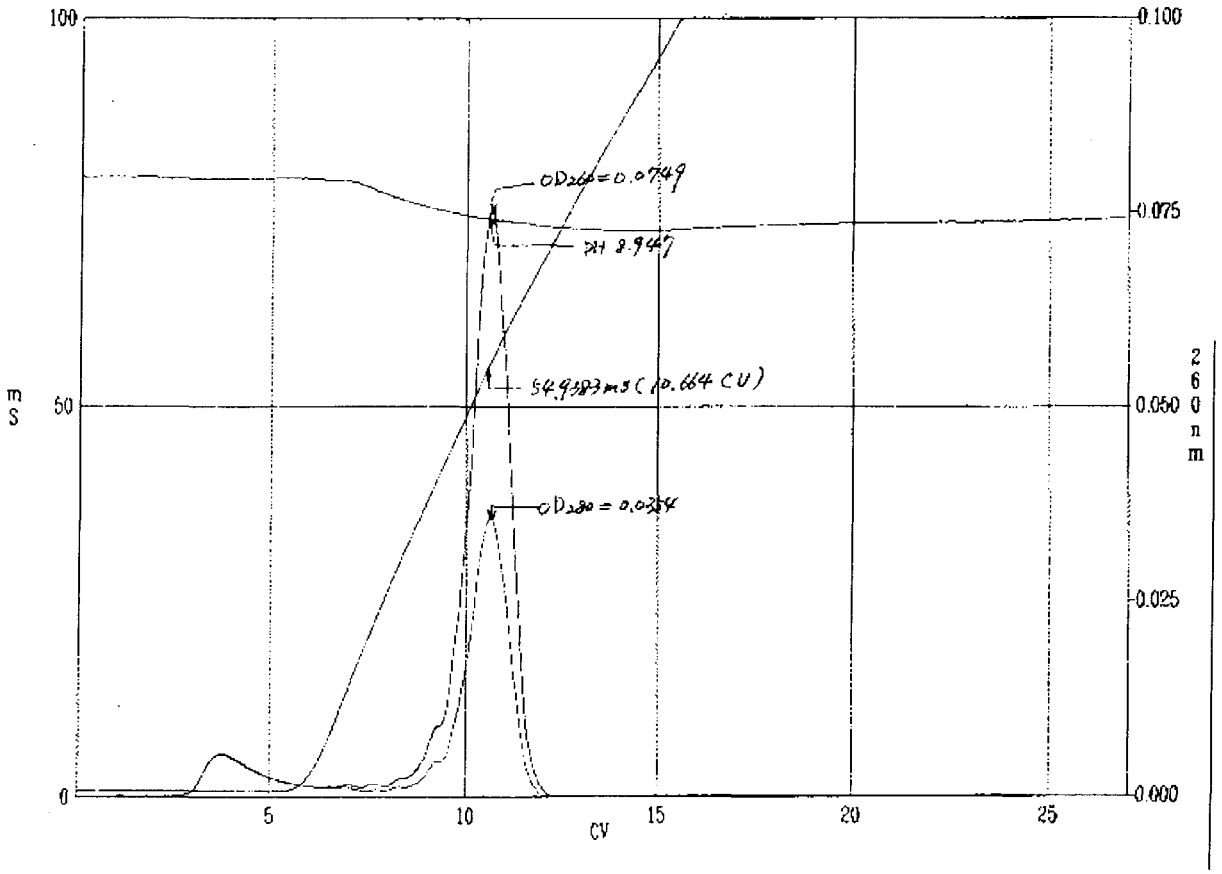


図 3－11　pH8.8

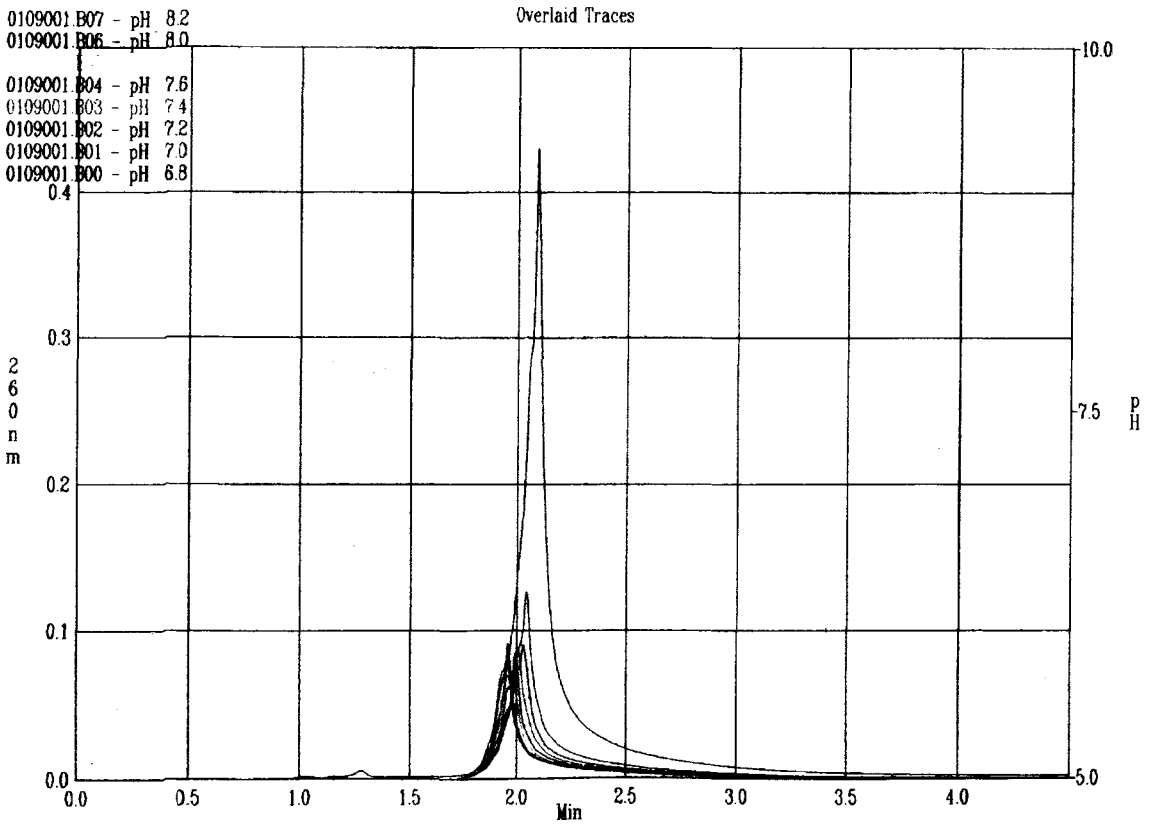


図 3－12　pH6.8～8.2

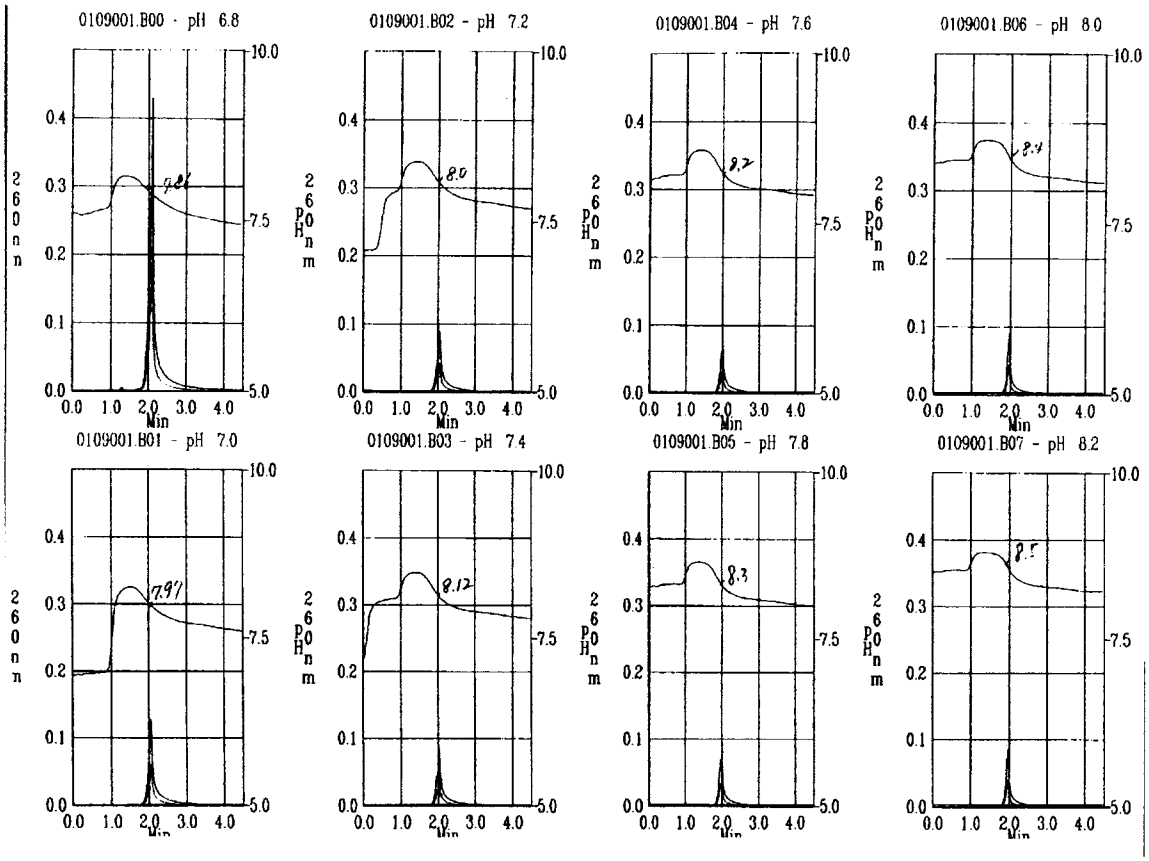


図 3－13　pH6.8～pH8.2

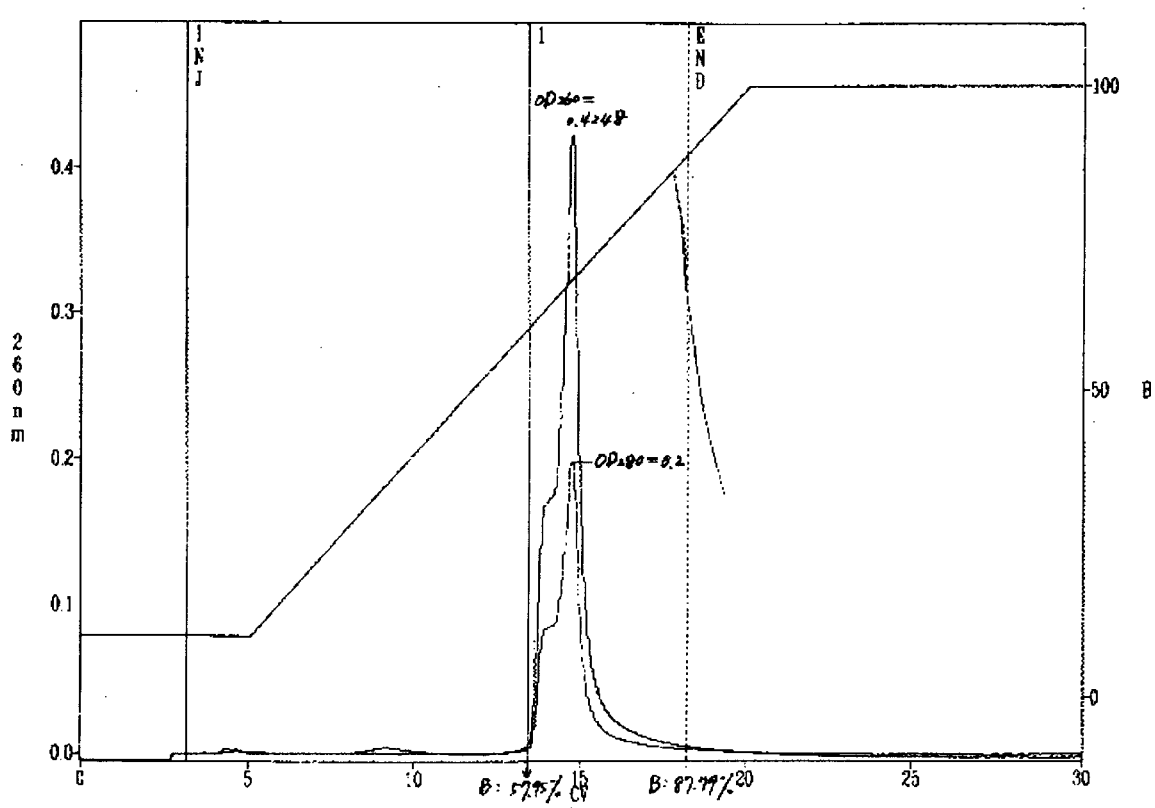


図 3－14　HQ linear pH8.1

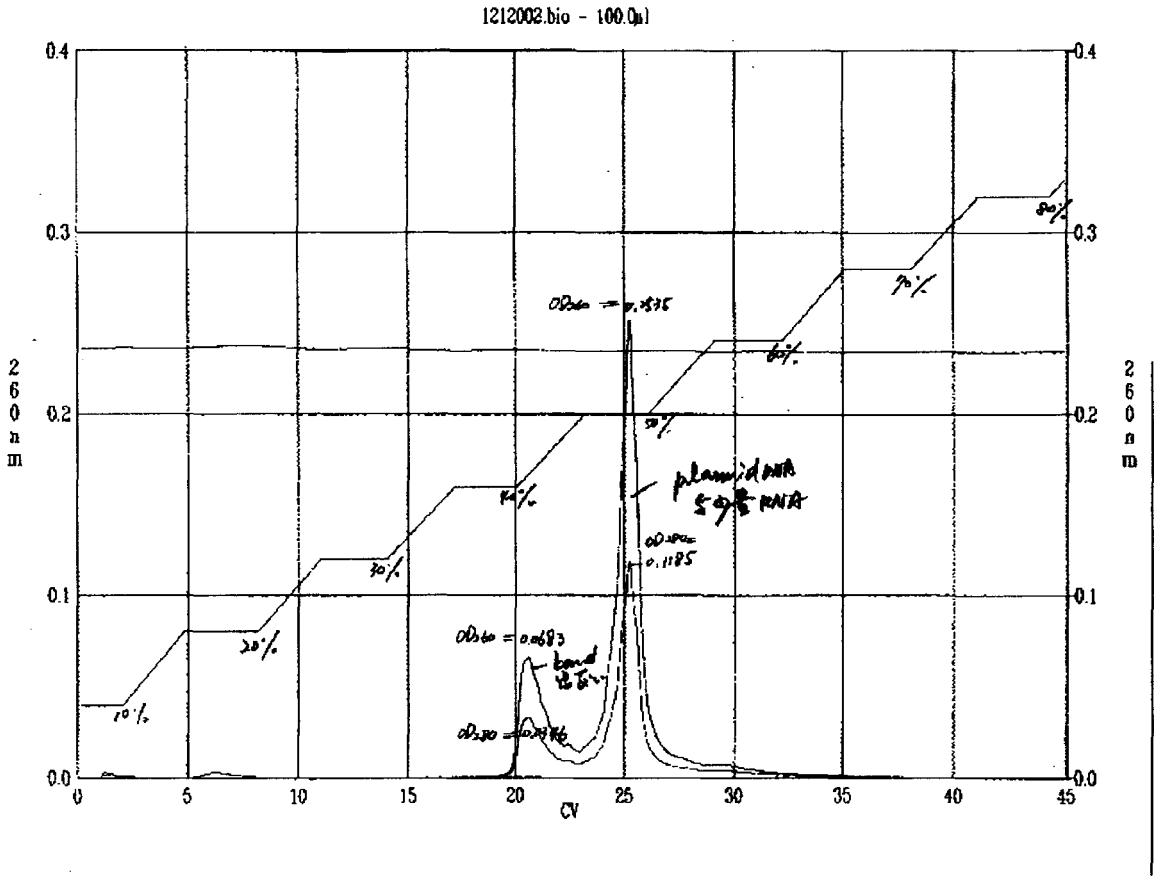


図 3－15　HQ step

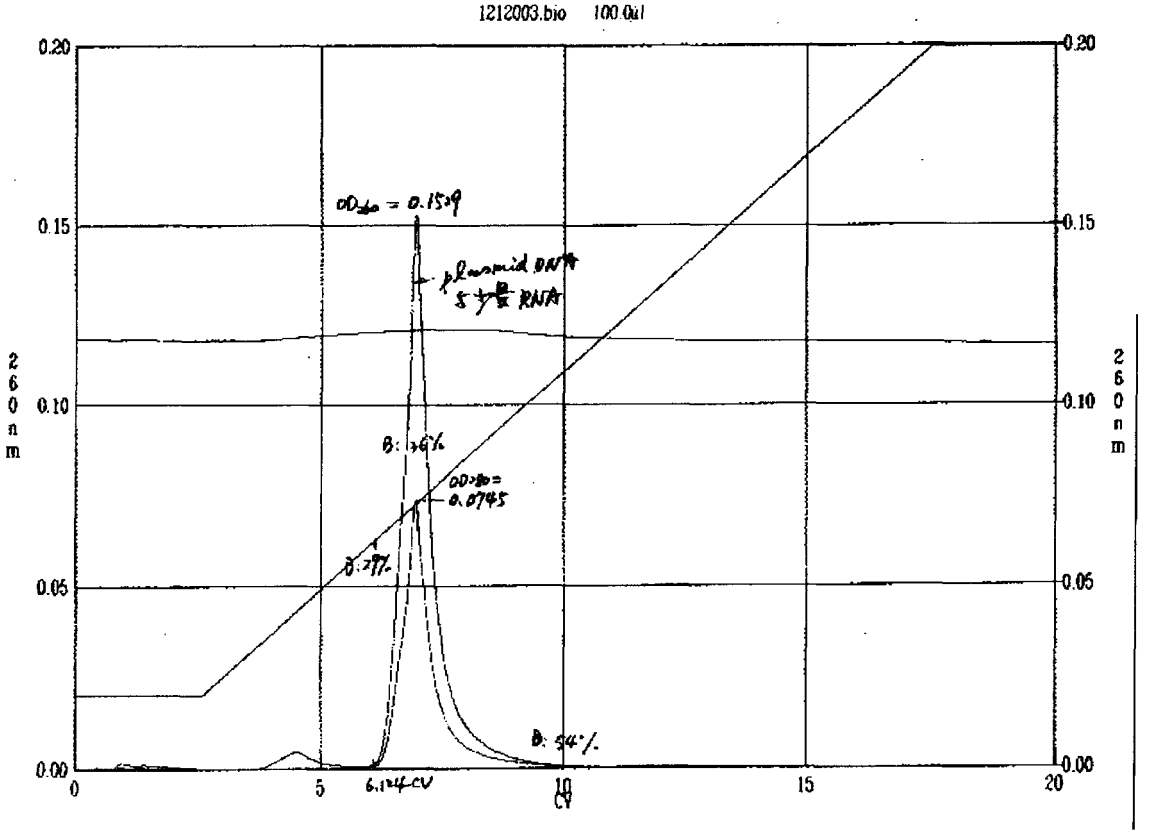


図 3－16　POROS DM linear

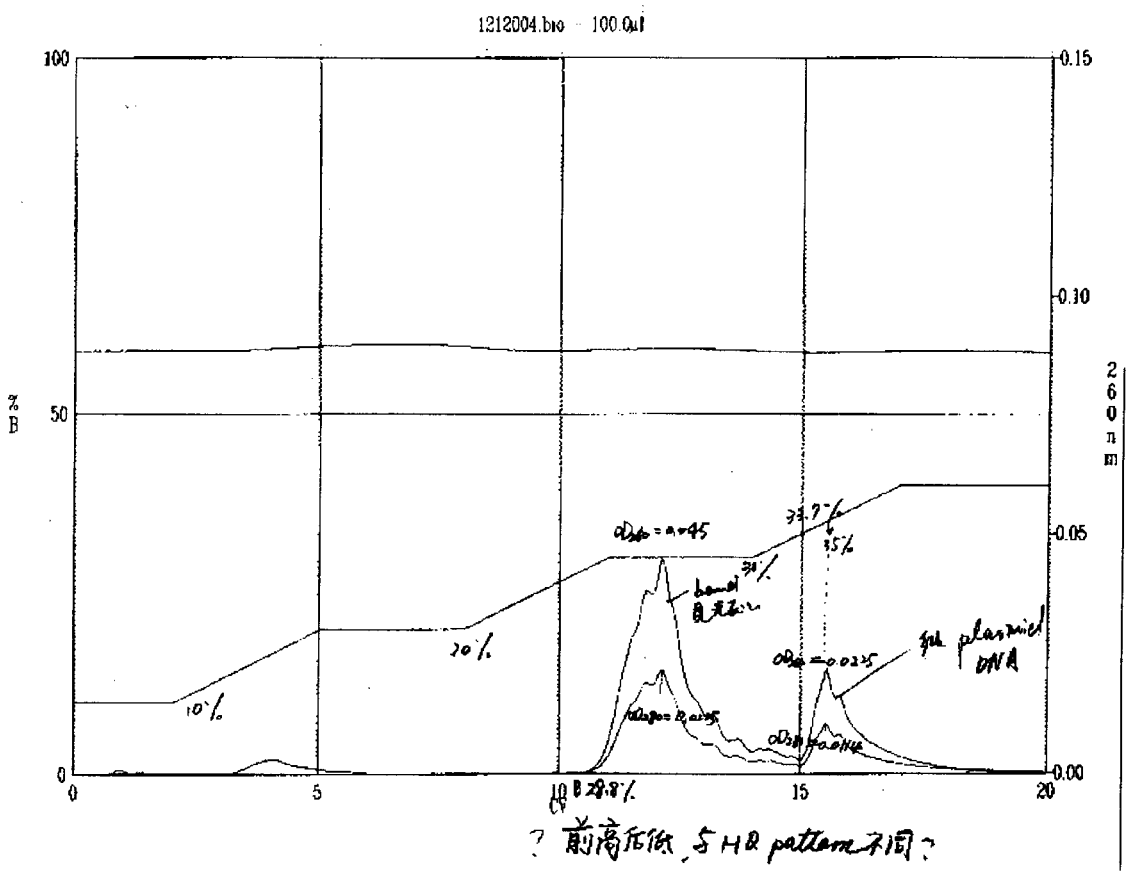


図 3－17　POROS DM step

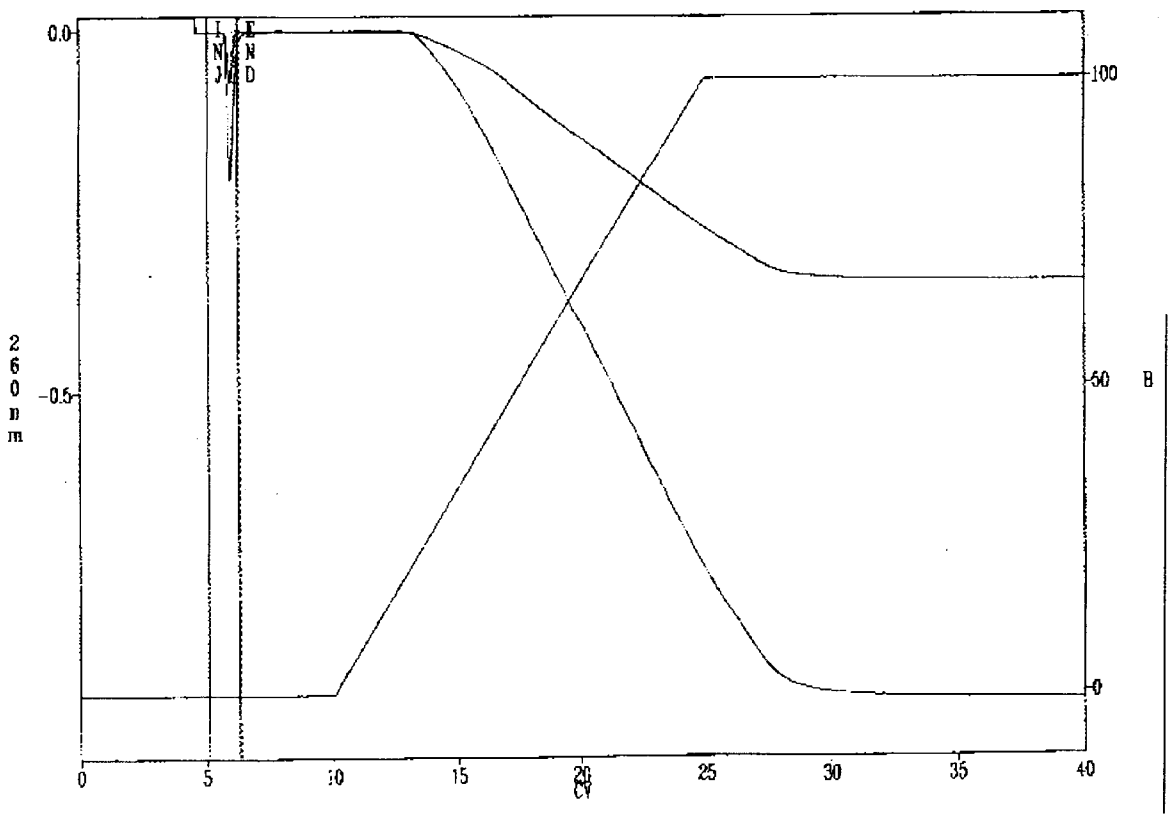


図 3－18　MOPS with tritonx100

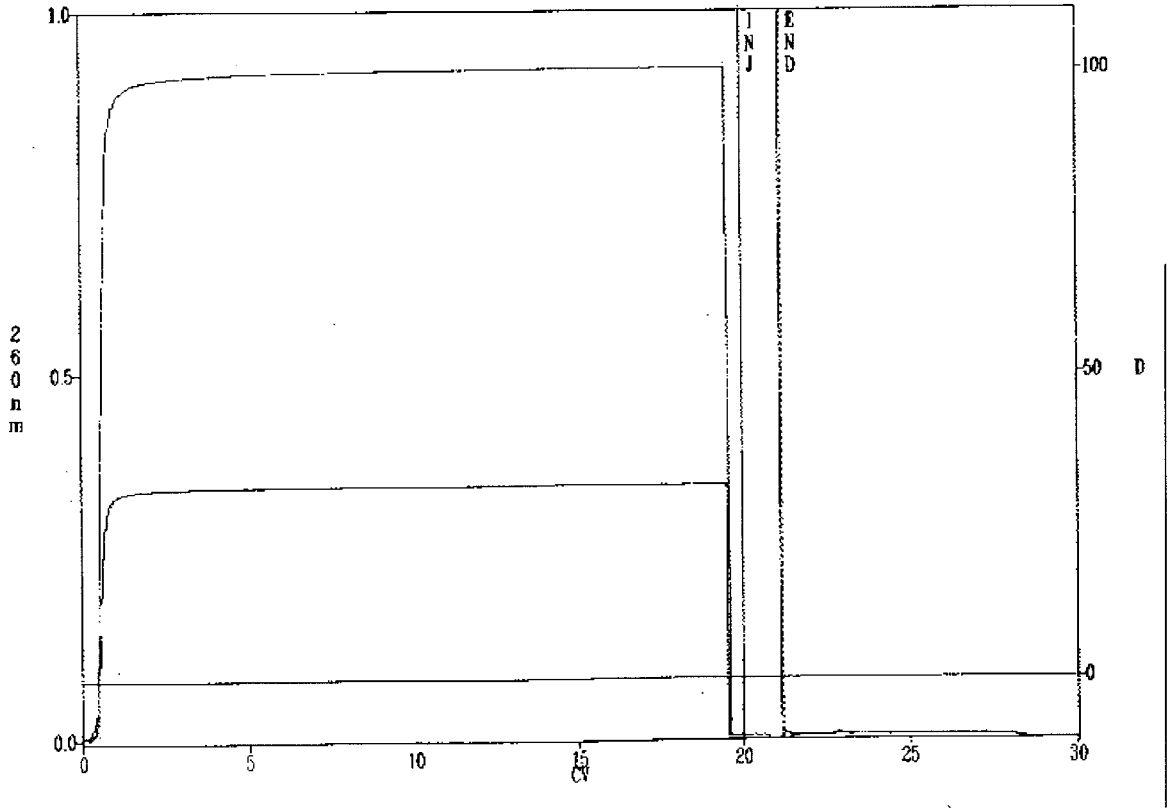


図 3－19　MOPS eith tritonx100

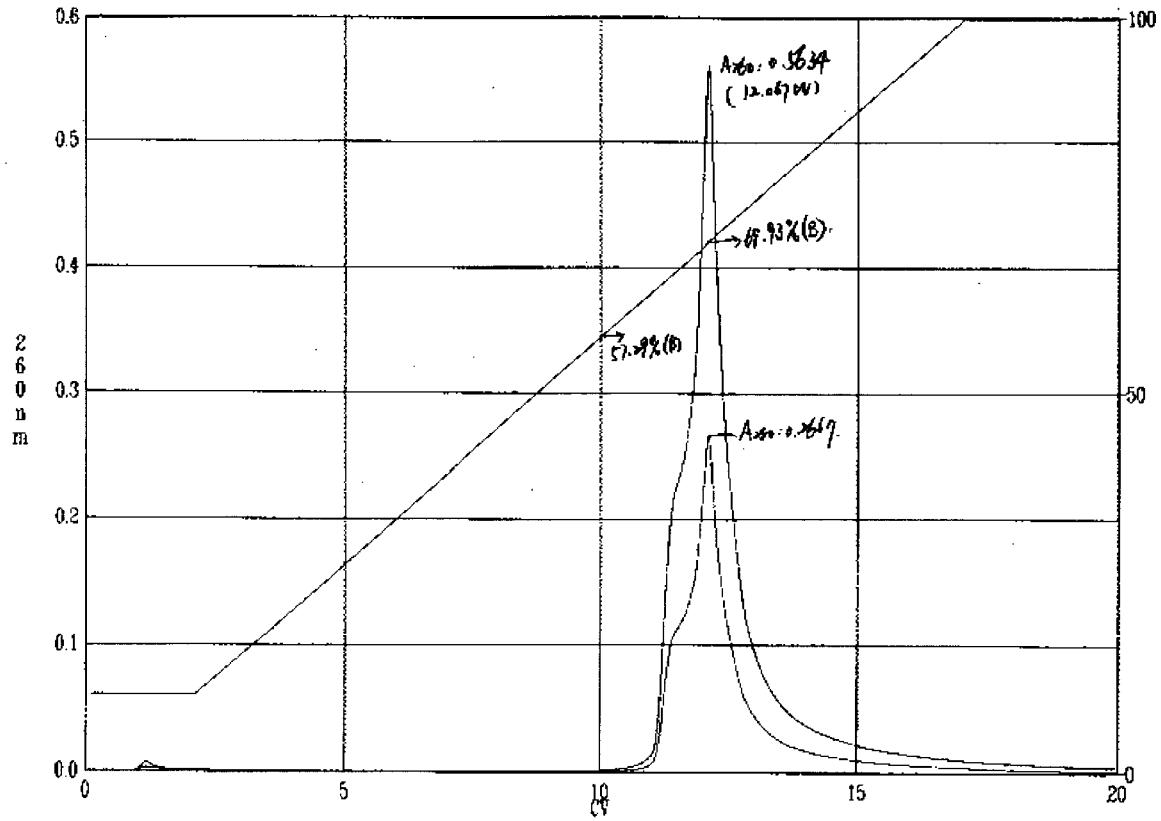


図 3－20　HQ MOPS linear

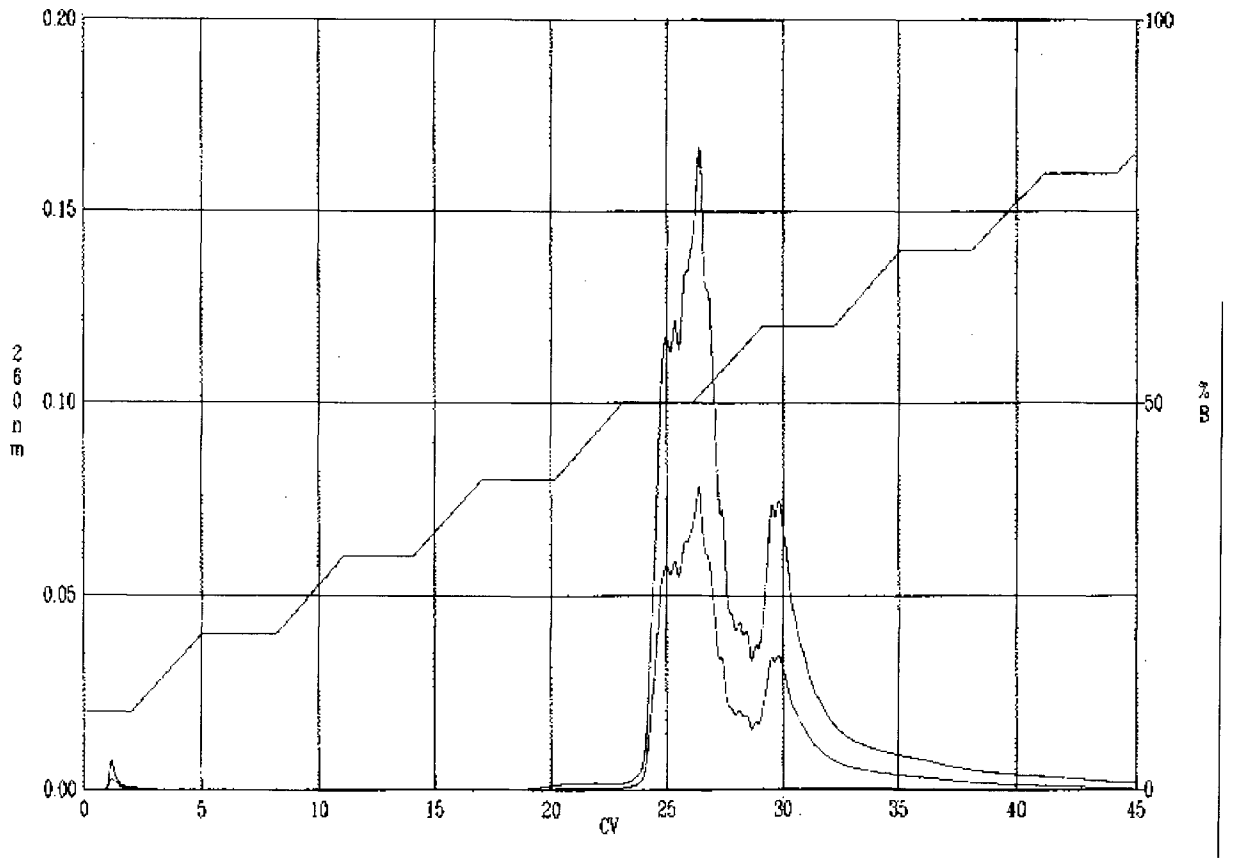


図 3－21　HQ MOPS step

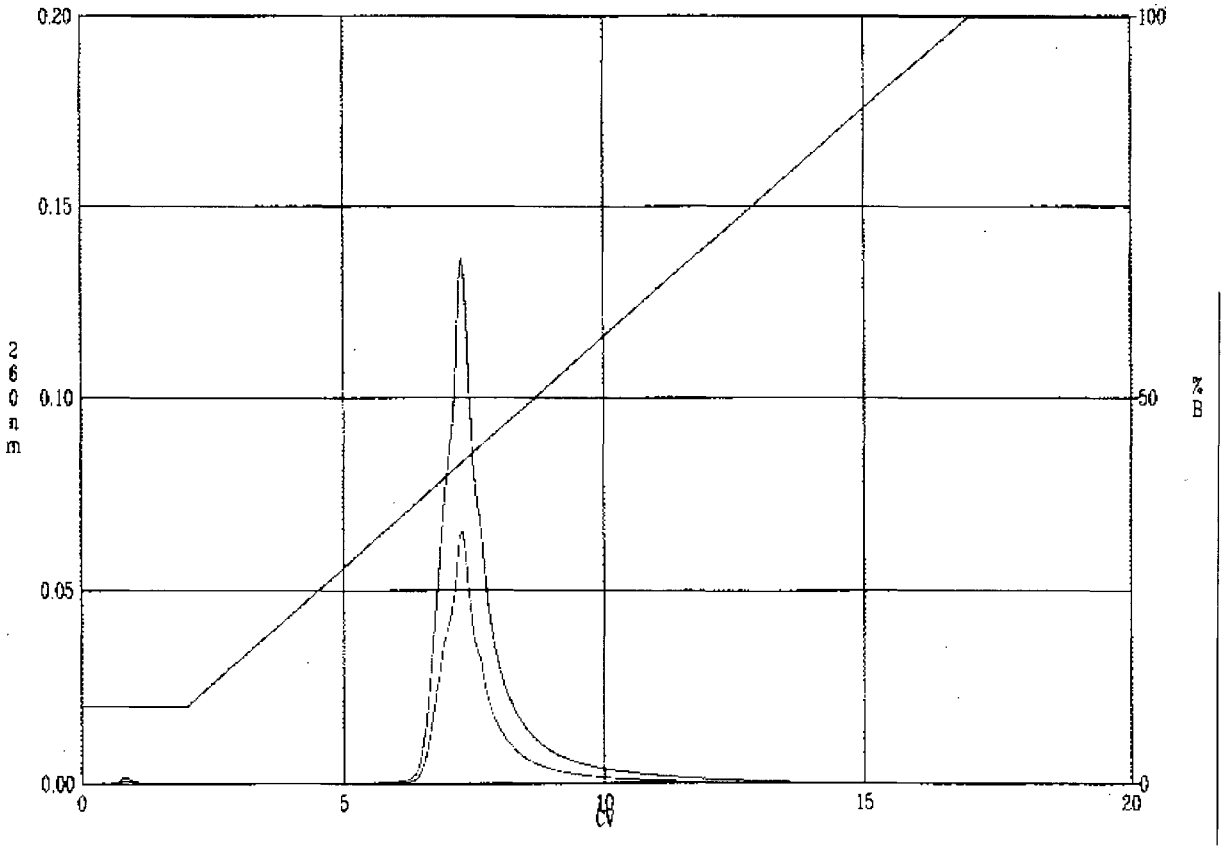


図 3－22　DM MOPS linear

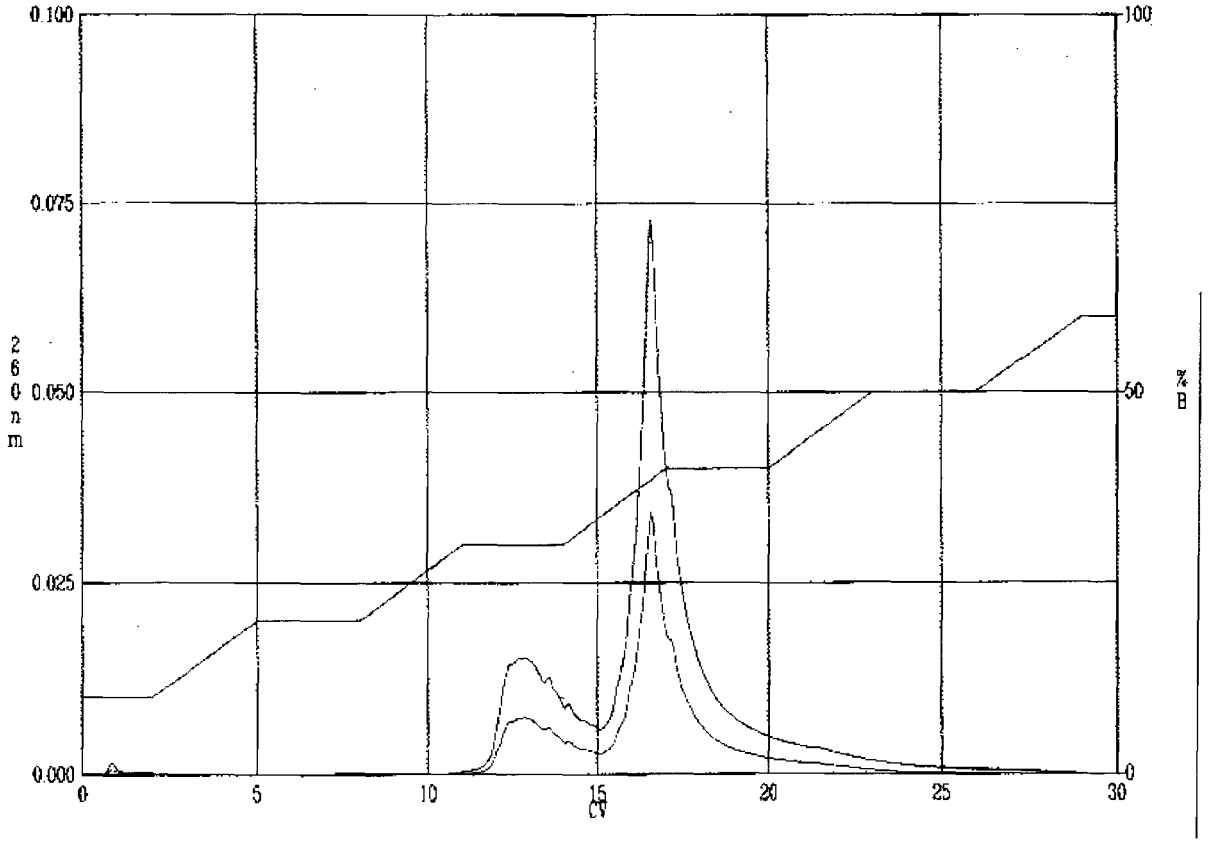


図 3－23　DM MOPS step

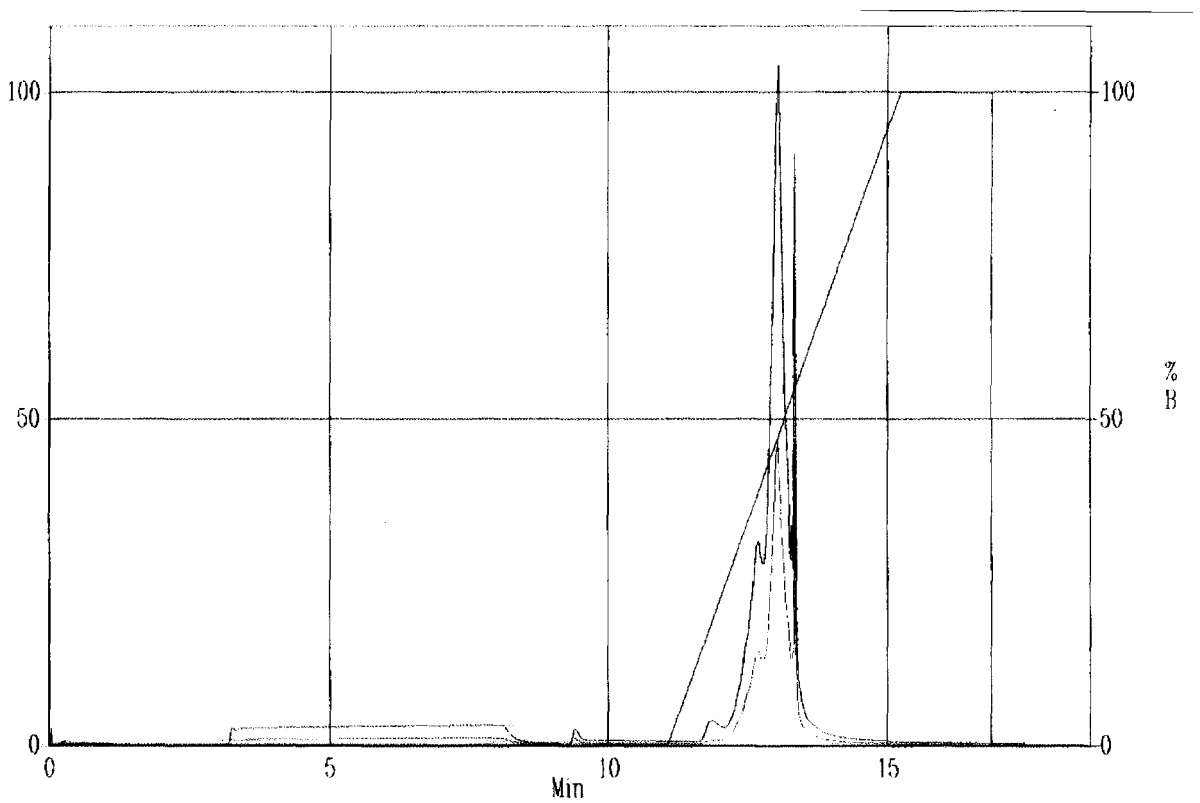


図 3－24　HQ Tris linear

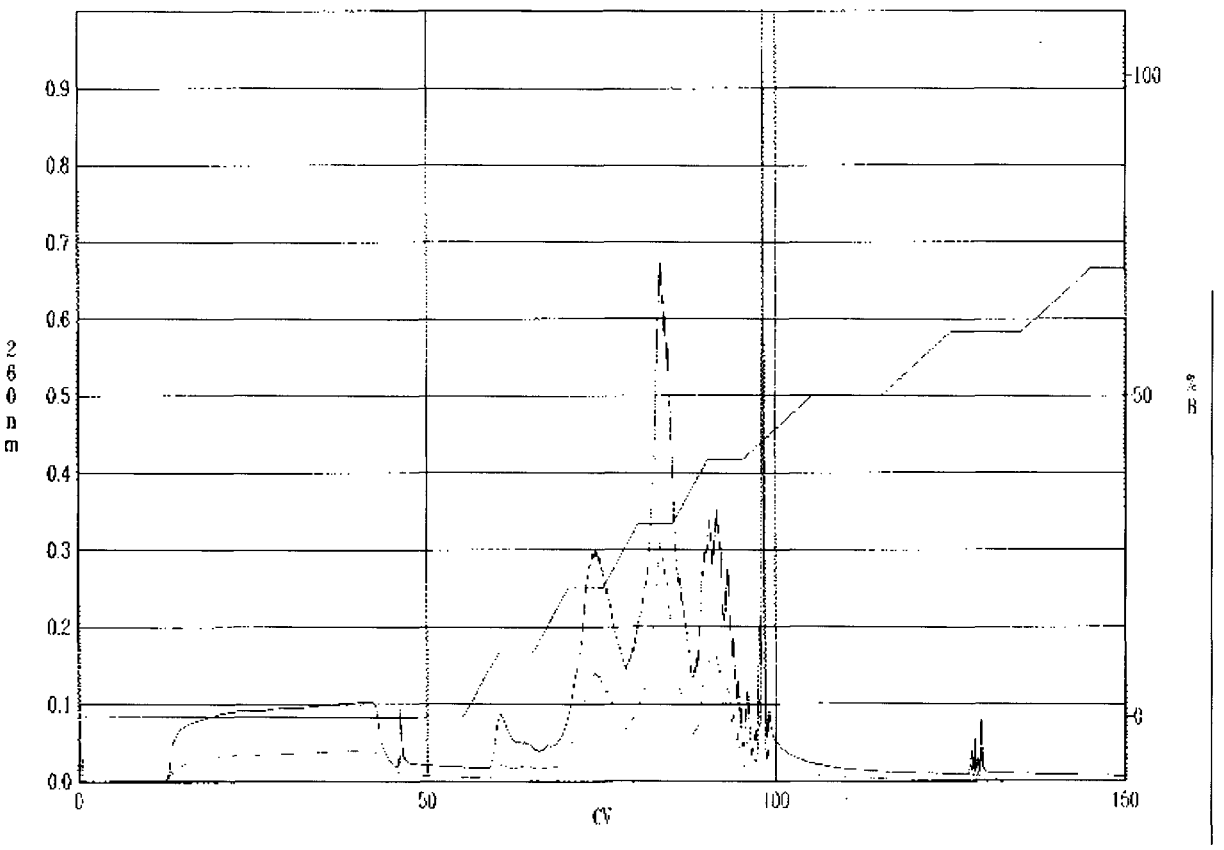


図 3－25　HQ Tris step

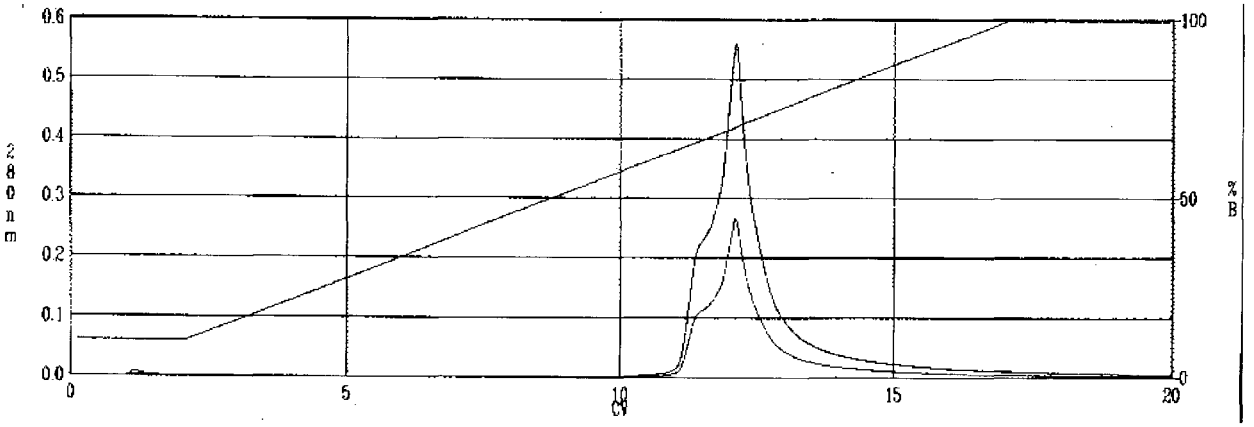


図 3－26　HQ Mops linear

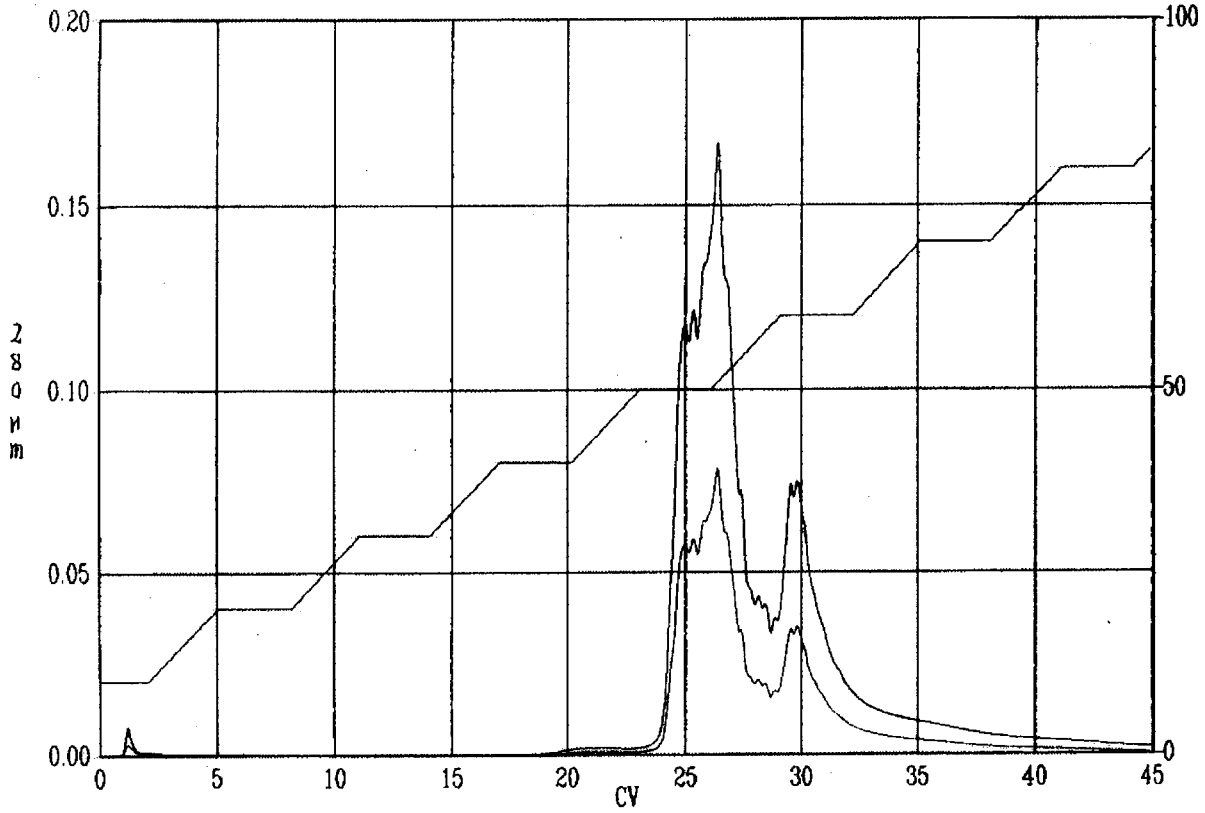


図 3－27　HQ MOPS step

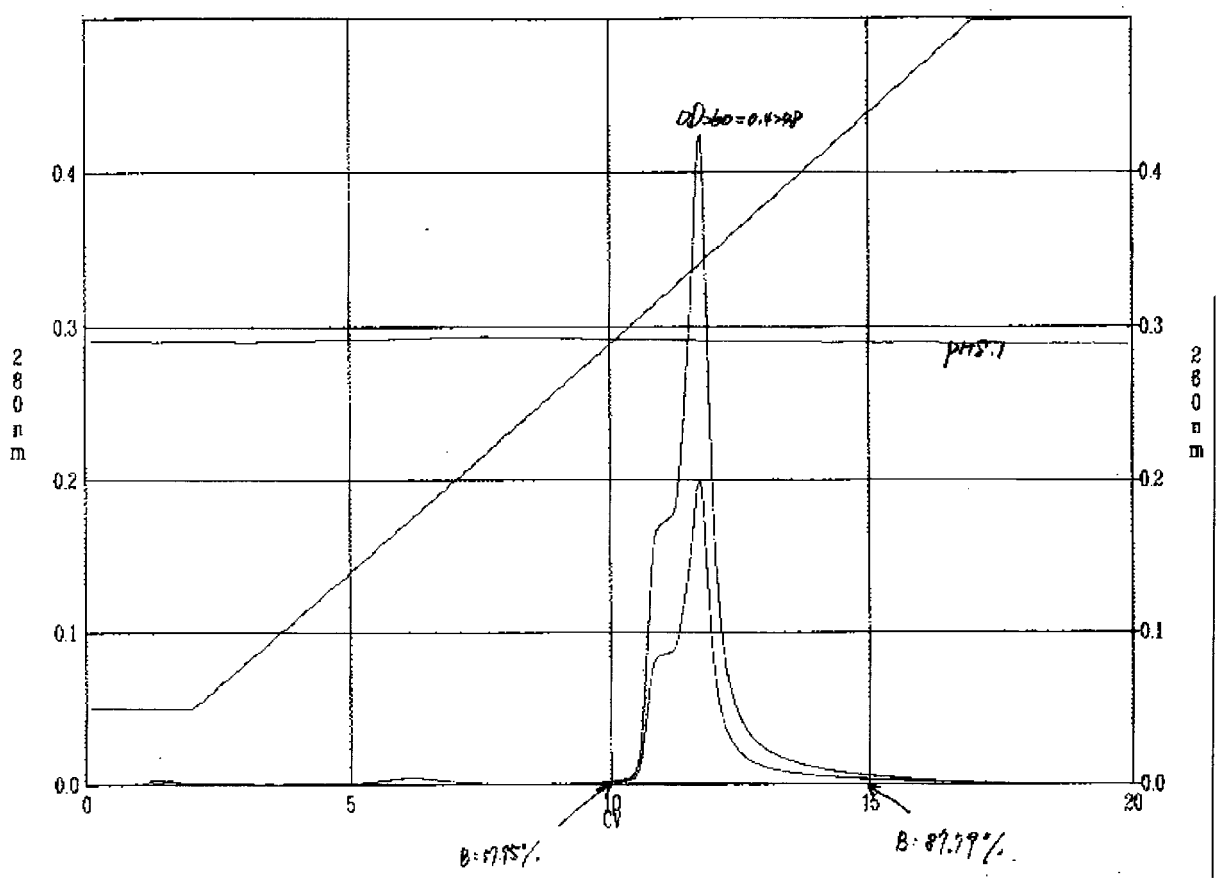


図 3－28　HQ linear

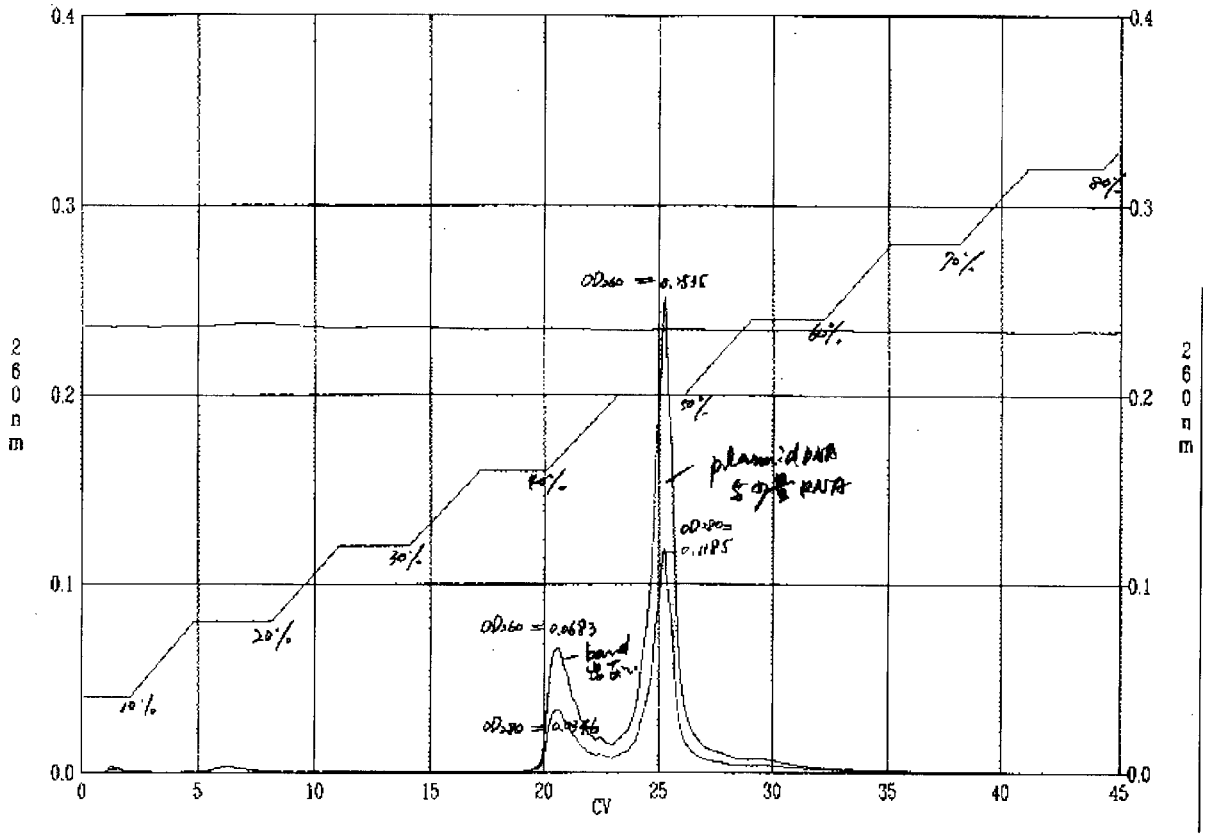


図 3－29　HQ step

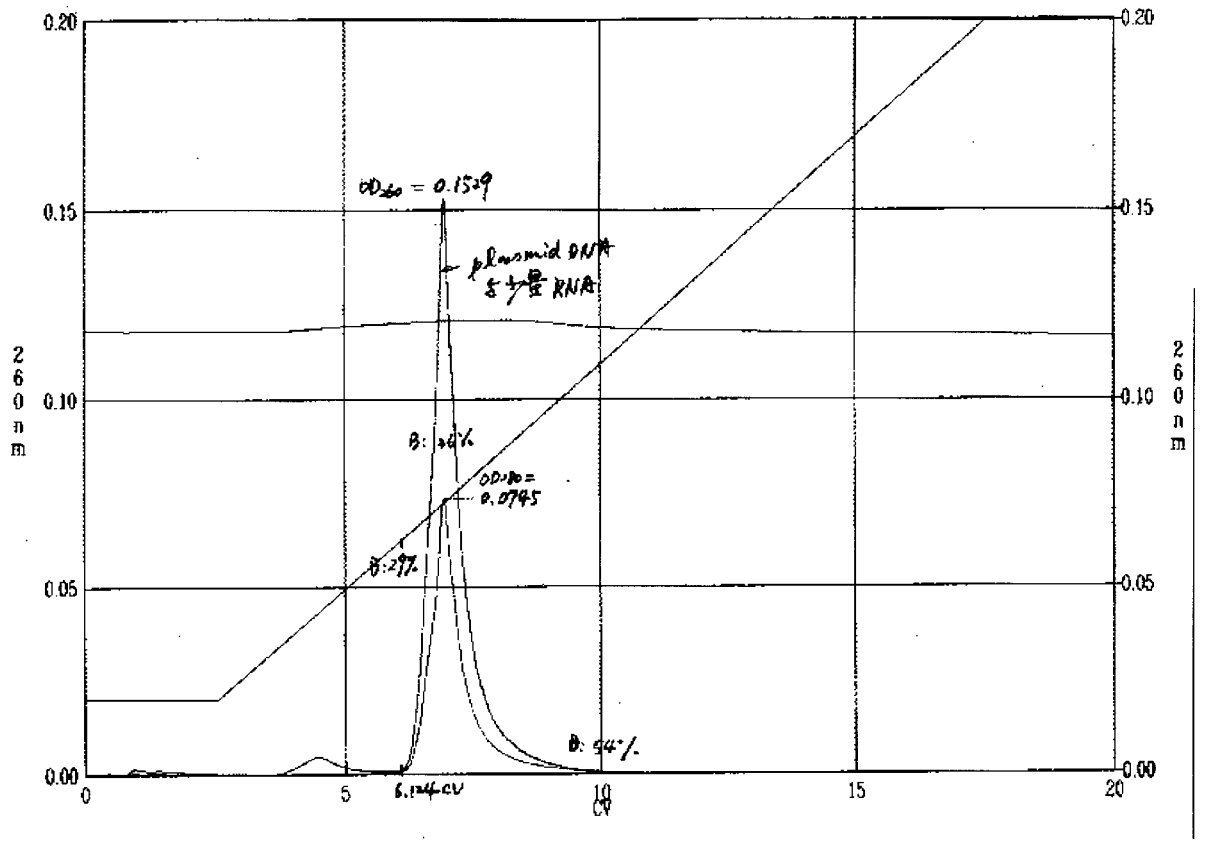


図 3－30　POROS DM linear

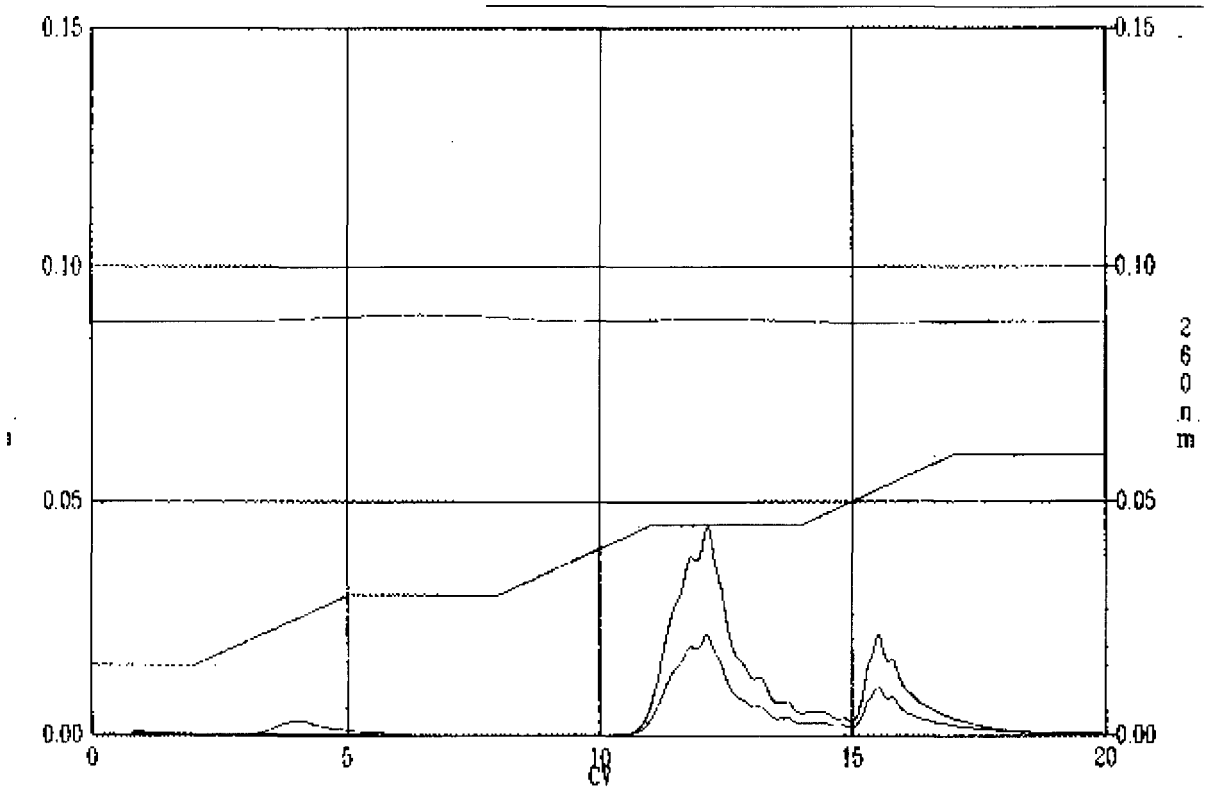


図 3－31　POROS DM step

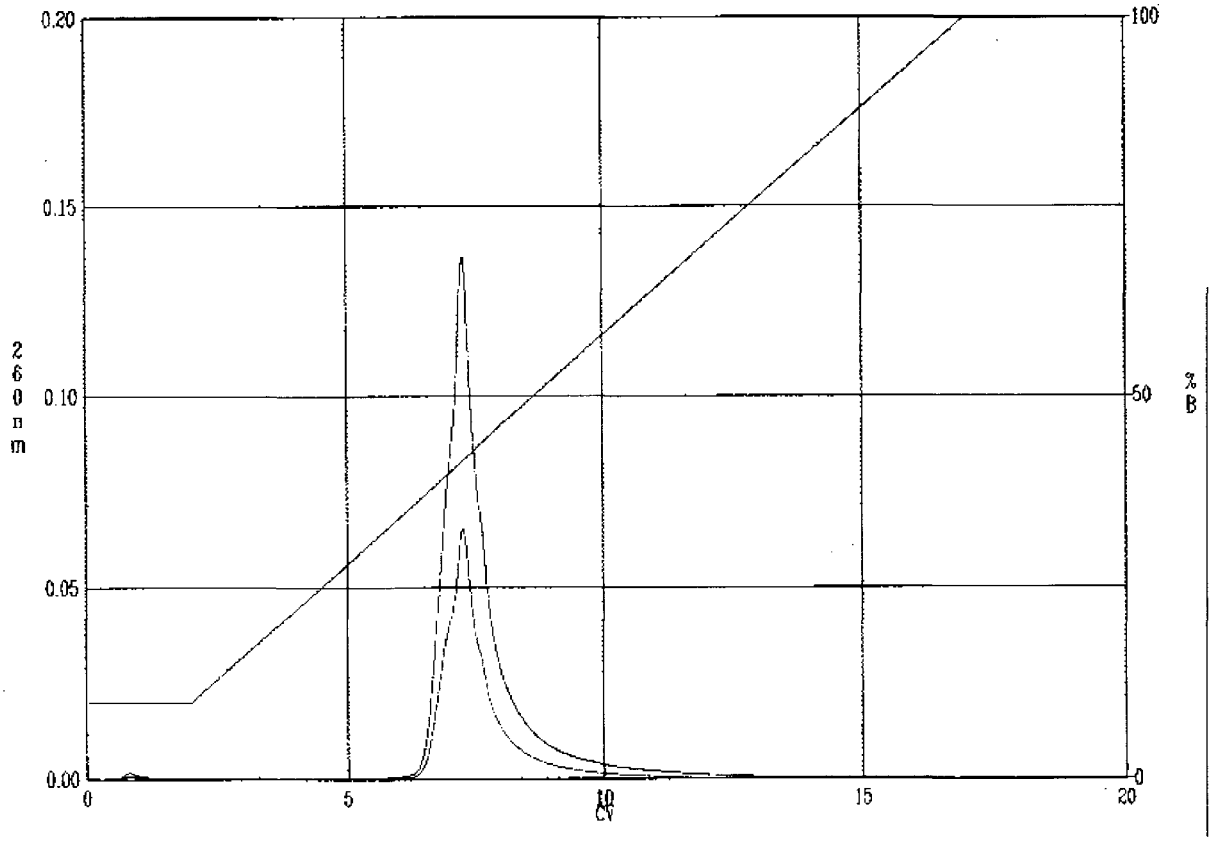


図 3－32　HQ linear

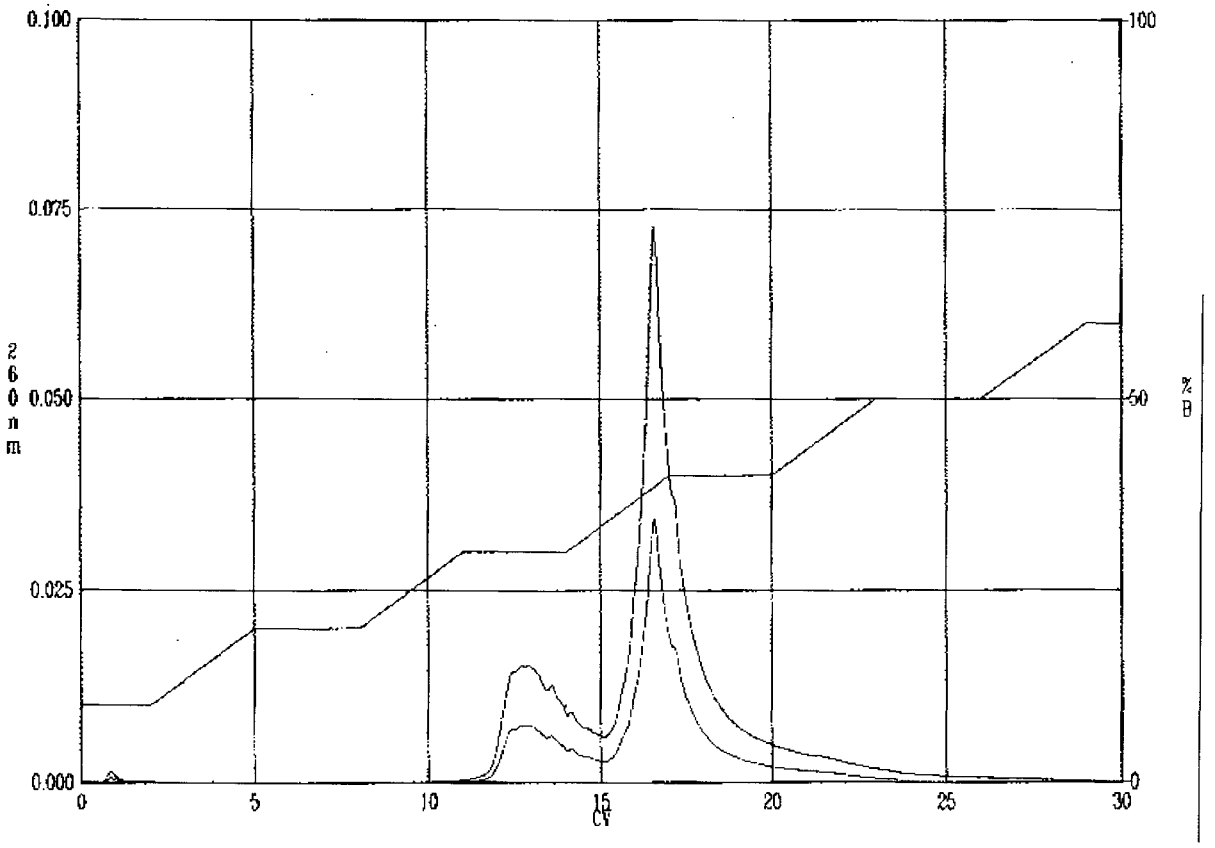


図 3－33　HQ step

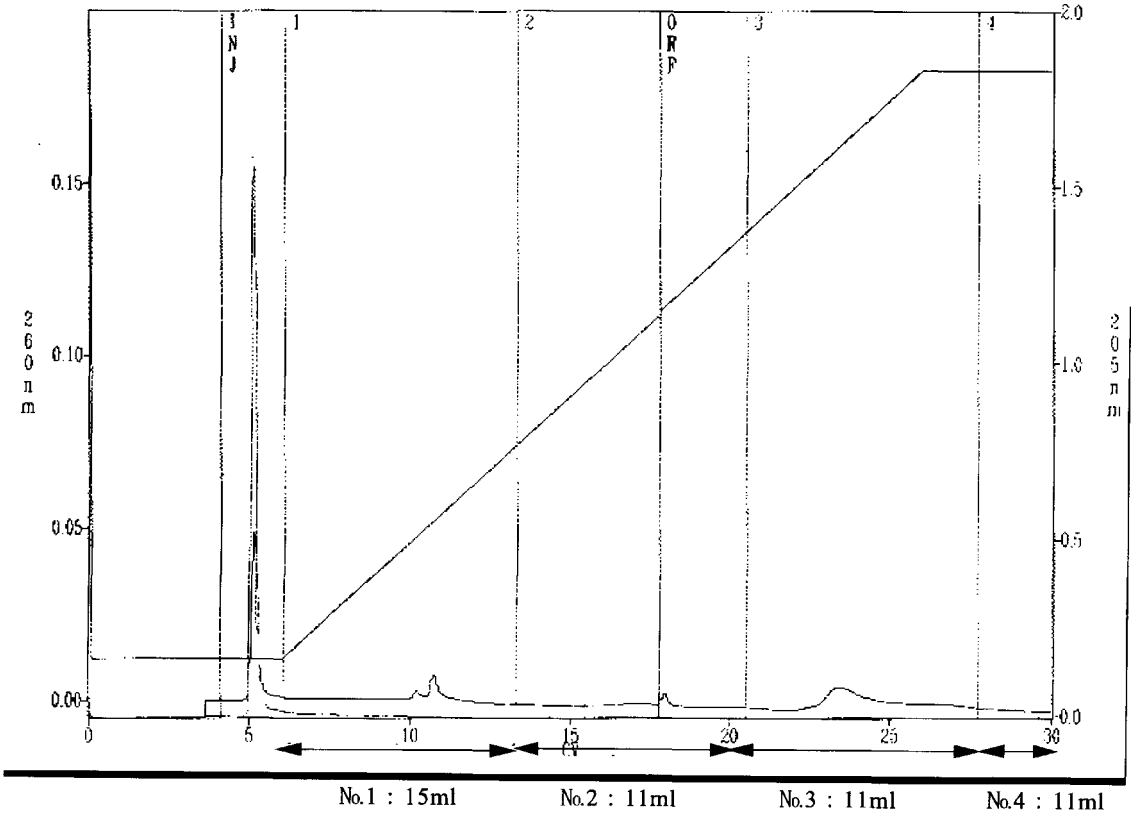


図 3－34　RI疎水カラム

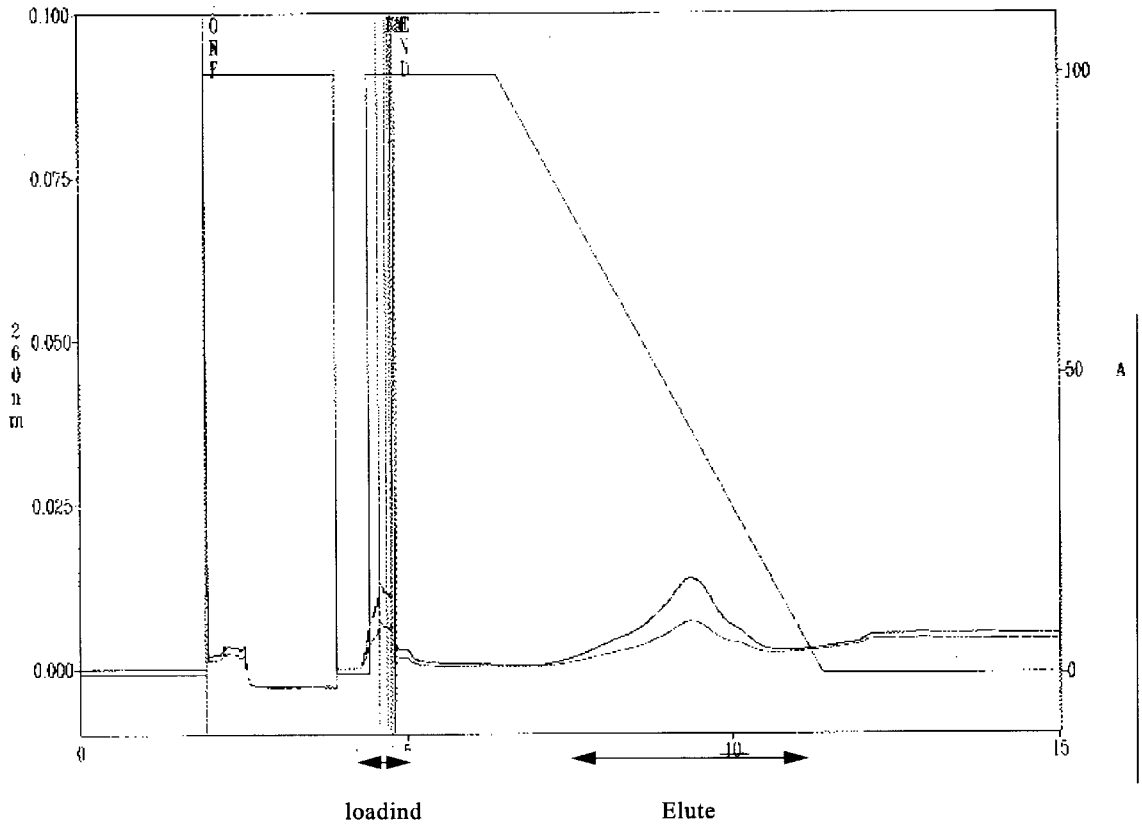


図 3－35　東ソHEXYL　リン酸buffer＋2μ硫酸

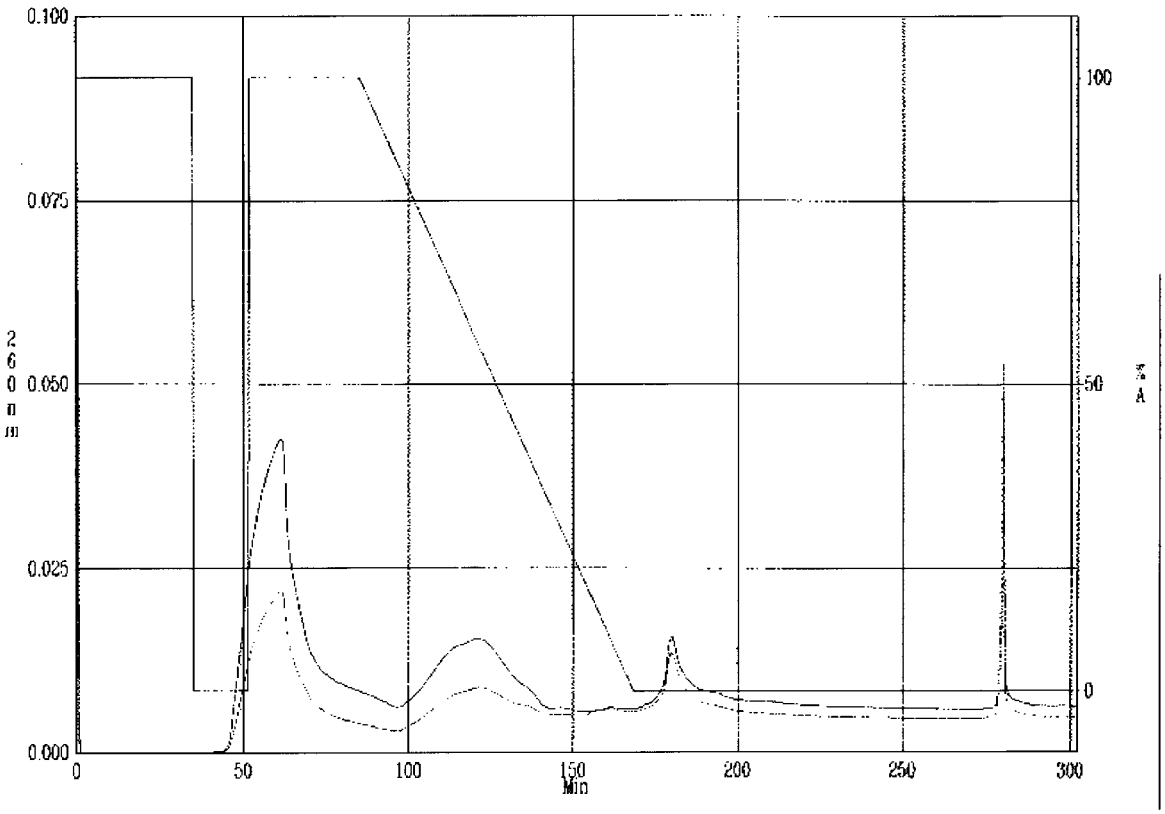


図 3－36　TOSO Hexyl crude

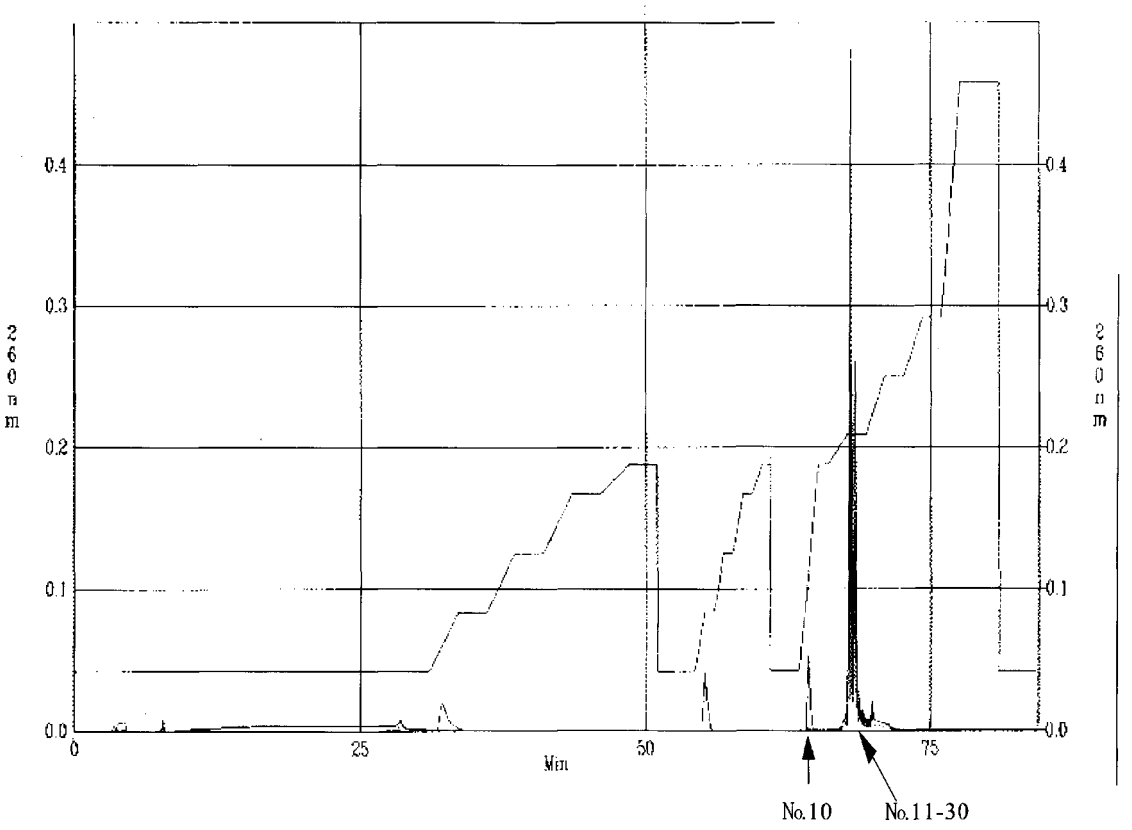


図 3－37　Tween20 treat crude : 200ml

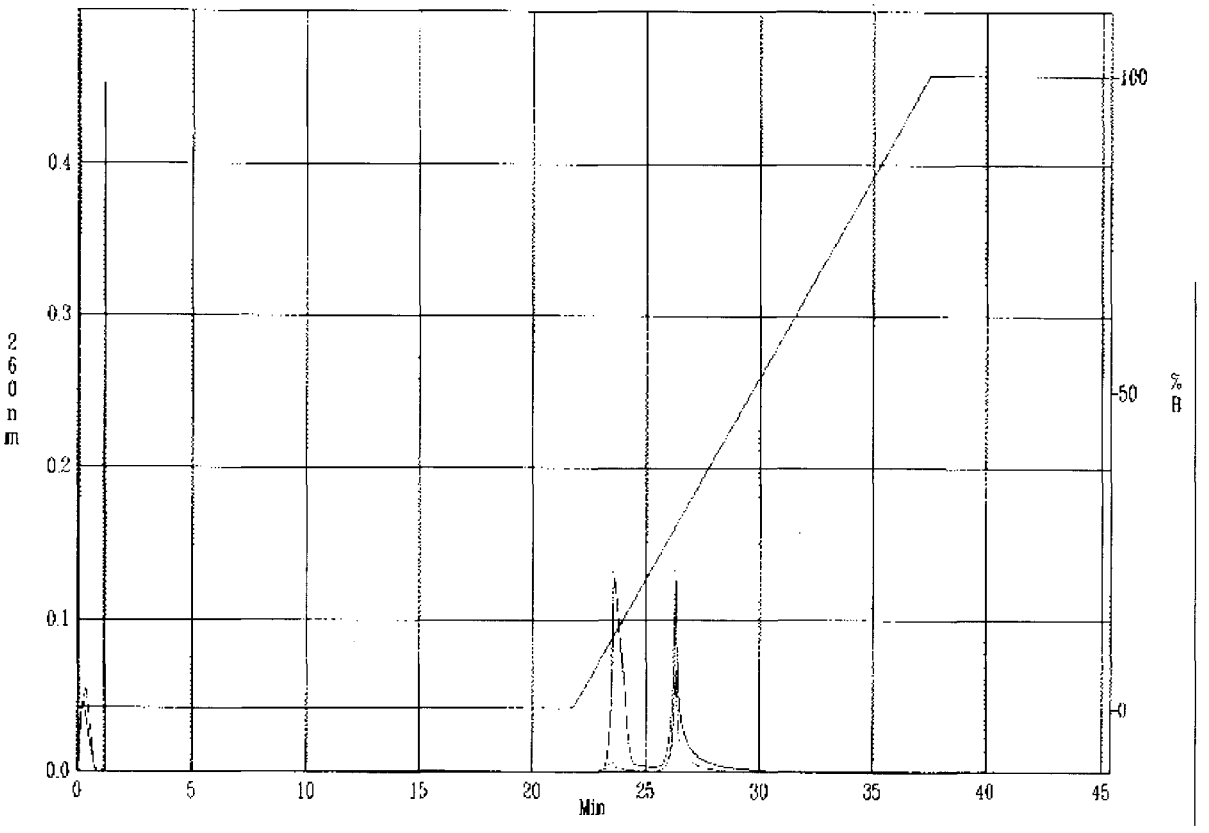


図 3－38　TOSO Hexyl pure

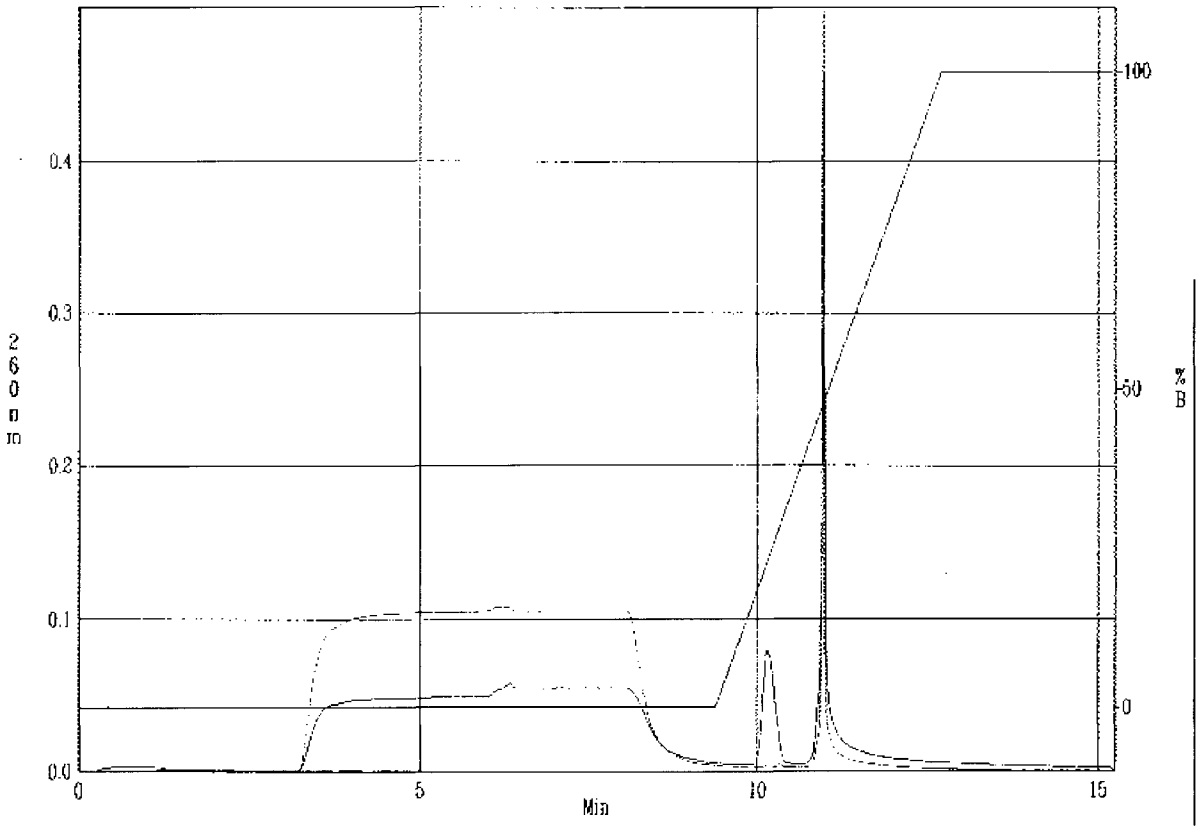


図 3－39　TOSO Hexyl crude

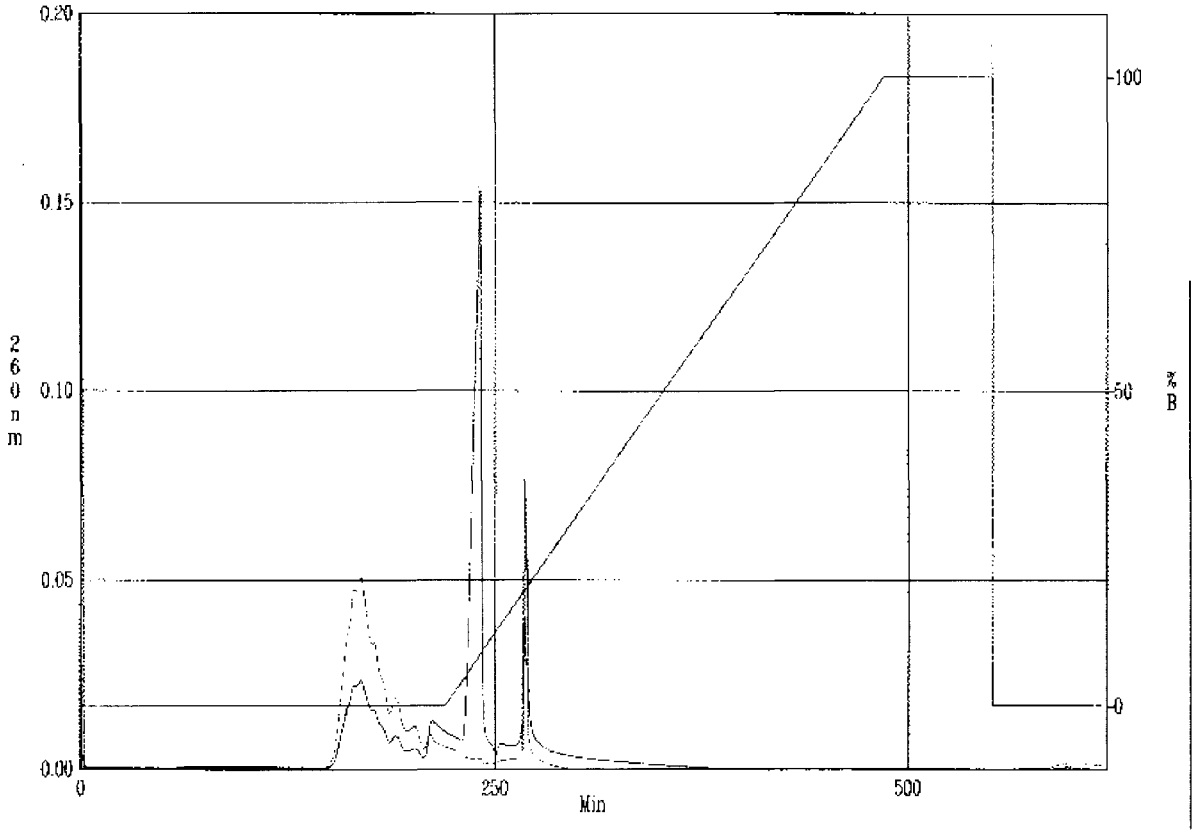


図 3－40　TOSO Hexyl crude

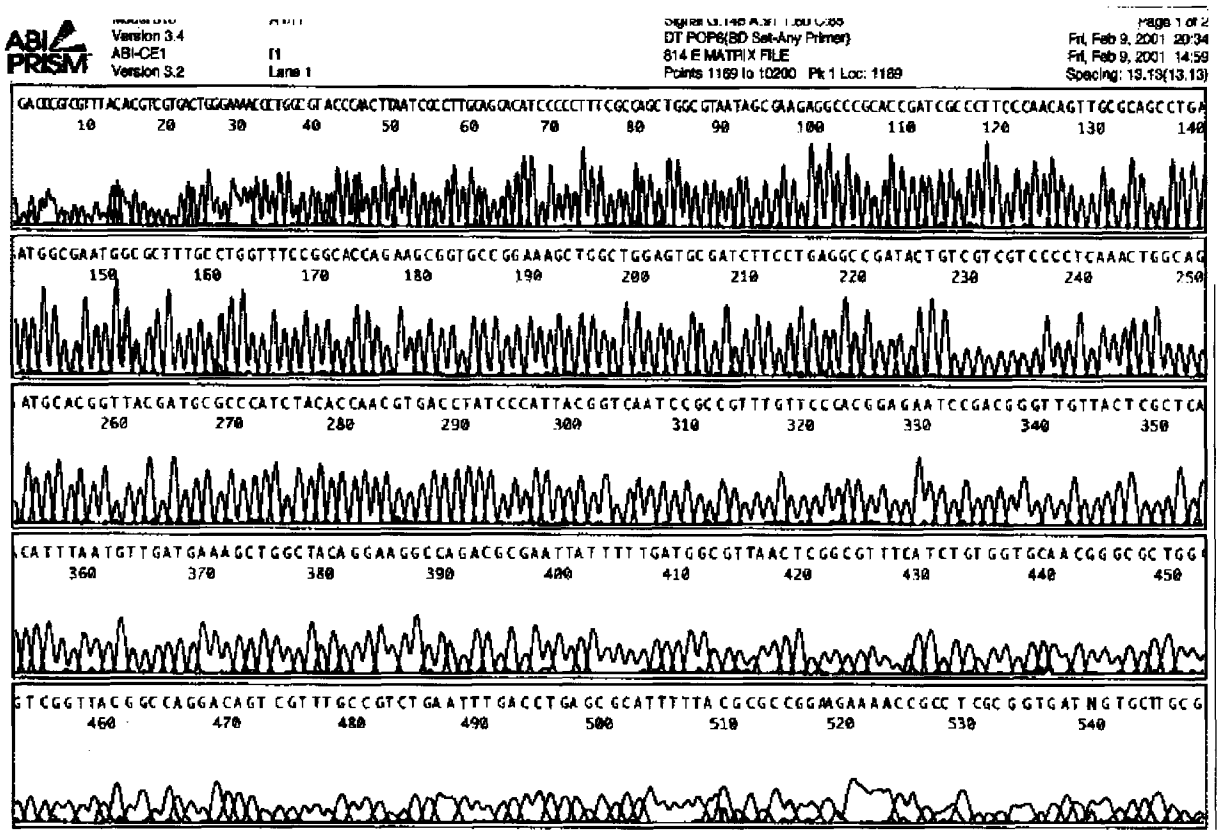

ABI PRISM
Version 3.4
ABI-CE1
Version 3.2
DT POP6(BD Set-Any Primer)
814 E MATRIX FILE
Points 1169 to 10200 Pk 1 Loc: 1169
Fri, Feb 9, 2001 20:34
Fri, Feb 9, 2001 14:59

図 3－41

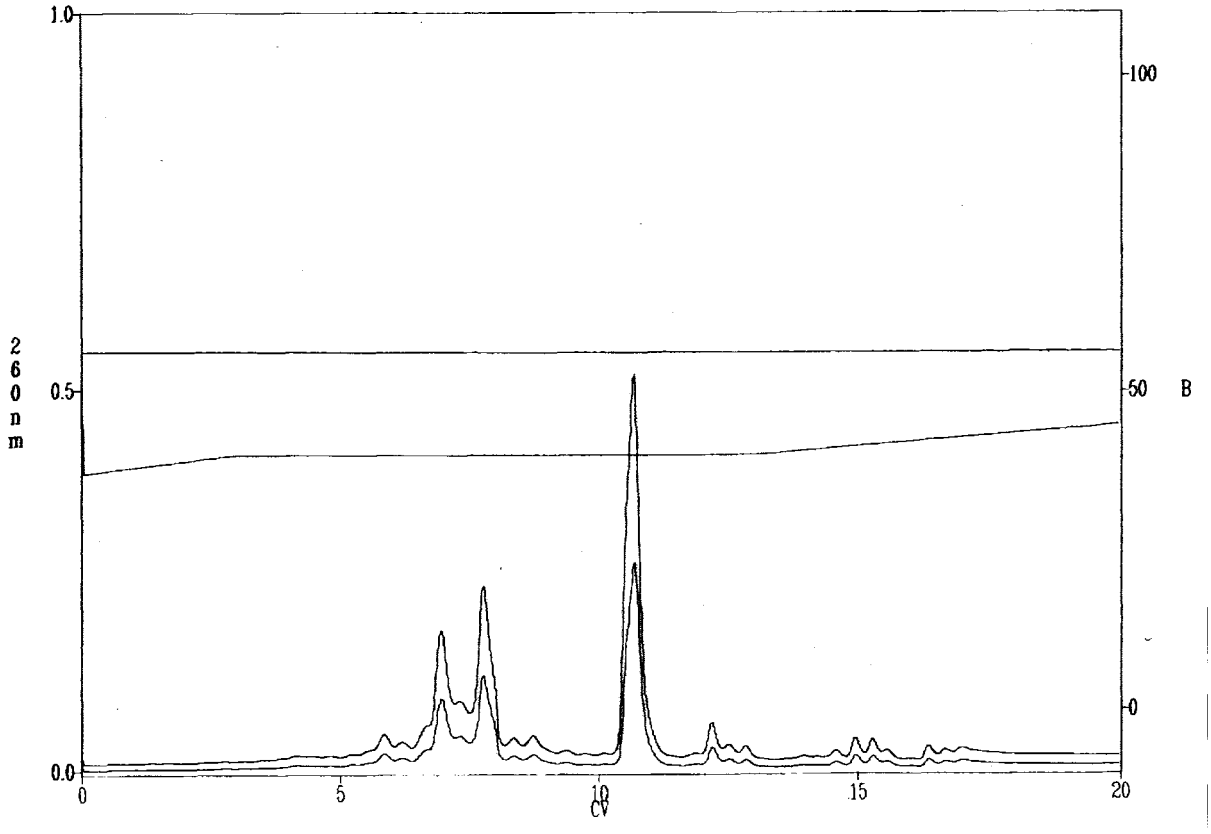

1.0
0.5
0.0
260nm
100
50
0
B
0
5
10
15
20
CV

図 3－42

4.研究室レベルで行われているプラスミド精製法との比較検討

4.1 研究体制

琉球大学遺伝子実験施設

長嶺勝　助教授

許春影　研究補助員

4.2 精製したプラスミドDNAの形状

4.2.1 目視による形状の確認

無色透明、混在物が無いことを確認した。

4.2.2 精製したプラスミドDNAの均一性

アガロースゲルによる電気泳動：0.8 %アガロースゲルにて定法により電気泳動を行い、臭化ブロマイドにより染色して紫外線ランプにより視認し均一性の確認を行った。

4.3 精製したプラスミドDNAのシークエンス

4.3.1 使用した装置

琉球大学遺伝子実験施設に設置されているアプライドバイオシステムズ社のオートシクエンサー ABI PRISM310 を使用した。

4.4 精製したプラスミドDNA中のエンドトキシン濃度

精製プラスミド DNA 溶液中のエンドトキシン量を Limulus Amebocyte Lysate（LAL）と発色基質を用いたエンドトキシン定量キット QCL-1000（第一化学薬品株式会社）により測定した。

①方法

カブトガニの血球抽出液（ライセート）のゲル化反応が、エンドトキシンの仲介によって酵素反応的に始まることから、リムラスライセートゲル化反応の機序が確立された。QCL-1000 はエンドトキシンによって活性化された酵素が発色基質に働き、p-ニトロアニリン（pNA）を遊離する。

遊離される p-ニトロアニリンの量は活性化された酵素の量に比例するため、これによりエンドトキシン量を比色定量することが出来る。

精製プラスミド DNA を階段希釈して LAL 溶液と混和して 10 分後に発色基質溶液を加えて混和して 6 分間反応させ 50 %酢酸を加えて混和して反応を止めて吸光度を吸光度計（415nm）にて測定して、同時に行ったエンドトキシン陽性コントロールの検量線から検体中のエンドトキシン濃度を求めた。

```
Maximum  Matching  [B-gal1  V>  A1/f1.Seq¢ÃÉRÉsÃ[]

File1: B-gal1
Mode: Normal              600 -    1500
File2: A1/f1.Seq¢ÃÉRÉsÃ[
Mode: Normal                1 -     757

Matching Percentage (Total Window: 76%, Alignment Window: 87%)

     600 CCGTAAGCCCGTGGCGGTCTGGTACCGGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCAC     649

    -103 ..................................................     -54

     650 CTCGAACTGAGCCGCGATATTGCCCAGCGTTTCAACGCGCTGTATGGCGA     699

     -53 ..................................................      -4

     700 GATCGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTA     749
             || |||||||||| ||| |||||||||||||||||||||||||||| |
      -3 ....GA-CCCGTCGTTT-ACA-CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGT-A      46

     750 CCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT     799
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      47 CCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT      96

     800 AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA     849
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
      97 AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA     146

     850 TGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAA     899
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     147 TGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAA     196

     900 GCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCA     949
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     197 GCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCA     246

     950 AACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTA     999
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     247 AACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTA     296

    1000 TCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTT    1049
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     297 TCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTT     346

    1050 GTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAG    1099
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     347 GTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAG     396

    1100 ACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAA    1149
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     397 ACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAA     446

    1150 CGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTG    1199
         ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
     447 CGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTG     496

    1200 ACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGA-GAAAACCGCCTCGCGGTGATGGT    1249
         ||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||| ||
     497 ACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAAGAAAACCGCCTCGCGGTGATNGT     546
```

図 4－1　プラスミド DNA の塩基配列

LAL Pro-clot enzyme + Endotoxin

↓ Ca^{++}

Activated LAL Enzyme

Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA	Ac-Ile-Glu-Ala-Arg+pNA
Chromogenic substrate	Read at 415nm

図 4－2 原理

②結果

今回、開発目標として設定したエンドトキシン含有量は 10 ～ 100U/mg の範囲である。イオン交換カラムだけでの精製ではエンドトキシン含有量が高く、疎水カラム処理後、或いは界面活性 TritonX-114 処理を行うことにより精製プラスミド DNA 溶液中のエンドトキシン量は 10EU/mg にまで低下した。

この値は精製プラスミド DNA はエンドトキシン含有量において遺伝子治療の使用に問題の無いレベルまで低下していることを示している。

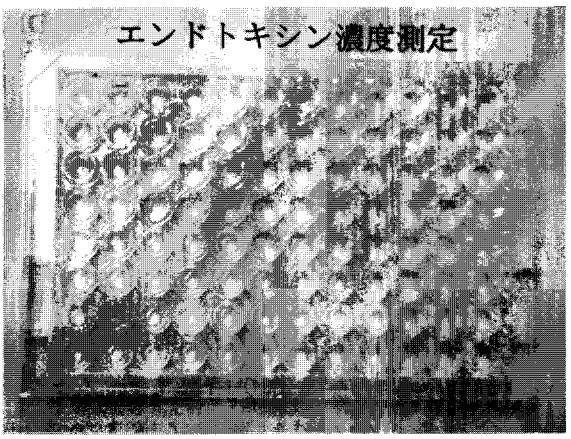


図 4－3 エンドトキシン含有量

4.5 精製したプラスミドDNA中の蛋白濃度

精製プラスミド DNA 溶液中の蛋白定量を BCA Protein Assay キットを用いて測定した。

①方法

Pierce 社の BCA タンパク質定量用試薬は、アルカリ溶液中で Cu_2 ＋がタンパク質と反応して Cu^+を生じる反応（ビウレット法）に、Cu^+に高感度で選択性の高い検出試薬、Bicinchronic Acid（BCA）を組み合わせたものである。

タンパク質により還元されて生じた Cu^+が 1 個と 2 分子の BCA の反応により、562nm に強い吸収性を示す水溶性の紫色の反応生成体が生じ、分光光度計により定量する。

1) タンパク質 ＋ Ｃｕ２＋ $\xrightarrow{OH-}$ tetradenate-Ｃｕ＋ cmplex

2) Ｃｕ$^+$ ＋ 2 Bicinchronic Acid(BCA) → BCA-Cu+complex

（紫色、562nm にて測定）

②結果

精製プラスミドDNA溶液中のタンパク質量は5ug/mgであった。

この値は精製プラスミド DNA が遺伝子治療目的に使用できるタンパク質含有量であることを示している。

4.6 精製したプラスミドDNAの細胞への遺伝子導入効率

β Galベクターシステムによる導入効率の検定

今回プラスミド DNA モデルとして使用したβ―ガラクトシダーゼコントロールベクターの哺乳動物細胞への遺伝子導入効率を従来の実験室レベルでのプラスミド DNA 抽出・精製法で精製されたプラスミドDNAと比較検討した。

①方法

マウス由来の 3T3 細胞の継代後約 40 時間で培養面の 70 ～ 80 %が細胞で覆われている状態のときに、当研究で開発したシステムにより精製されたプラスミド DNA と QIAGEN のカラム法で精製されたプラスミドDNAをリポフェクトアミンを用いて DNA 量 100ug を 6 ウェルプレートに各々 2 ウェルづつトランスフェクトした。トランスフェクト後 48 時間後に細胞をキットの手順どうり洗浄、ライシス液で細胞を底面より剥して、ボルテックスで撹拌後遠心して上清を取り、反応液と混ぜて吸光度計にて吸光度を測りβガラクトシダーゼの活性を測定することにより細胞へのプラスミド DNA の導入を調べる。

②結果

従来の研究室レベルで使用されている精製用カラムで精製されたプラスミド DNA に比較して、当研究で開発されたプラスミド DNA 精製法で精製されたプラスミド DNA は遺伝子導入効率が役 60 %程度高かった。

③結論

今回開発した簡便化高純度大型プラスミド抽出･精製法により抽出・精製したプラスミドDNAは従来の研究室レベルで用いられている方法により精製したプラスミドDNAと比較して高純度であり、エンドトキシン含有量が少なく、遺伝子導入効率は高く、遺伝子治療の目的で使用されるプラスミド DNA に要求される各種条件を満たしていた。

4.7 今後の課題

本研究では「高純度大型プラスミドDNA」の生産工程において、TFF (Tangential Flow Filtration)を用いることによって、従来の遠心分離器を用いた生産方法よりも、はるかに高品質で、生産効率の良い生産システムの開発に成功した。(特許出願中：出願日：平成 13 年 3 月 6 日　出願番号：特願 2001 － 62404)

研究の当初目標は、高純度大型プラスミドの生産を実験室レベルでも使用可能なキット化を目指していたが、実験を重ねていくうちに、生産の効率的観点から精製装置は、①実験室供給レベル、②大学・病院・企業(継続性を持たない単位発注)供給レベル、③プラン

ト化のレベルにまで進めていくことが可能となることが明らかとなり、生産レベルの効率及び SOP（標準作業手順書）を考慮した場合、装置そのものは大型プラントで用いることがより望ましいとの結論に達し、GMP（Good Manufacturing Practice）対応を目指すことが次期研究テーマとなる。

したがって、当初目標のキット化は、ラボ内で装置を構築したことによって立証され、実用化が充分可能なレベルであり、本研究の研究テーマは一定の成果を挙げたものと考える。

本研究の実用化を目指して継続すべき課題は、高純度大型プラスミド DNA を生産する工程において、

① 生産ラインのバリデーションを向上させるための GMP 対応

② 生産ラインの省力化を目指した IT 制御の確立

③ TFF 濾過で用いる濾過膜の再生利用方法（リサイクル）の確立

等が考えられる。

先ず GMP 対応は、生産ラインをより安全で最適に稼働させるために、ラインの定期的なチェックを必要とする。

本研究の研究行程において、ラボレベルで、最もチェックを必要とする箇所は、既に明らかとなっており、研究データから製造装置内の、どの箇所を重点的に点検する必要があるのかを確認することができ、GMP 対応化に向けて有益な資料となる。その実用化に向けての研究継続が必要である。

第二に、製造ラインを効率よく稼働させるためには、省力化を図る必要性のあることから、IT 制御による製造ラインの稼働が望ましいと考えられる。特に SOP にも関連するが、定期的点検を人力のみに委ねた場合、人為的ミスの発生によって、衛生・安全面の管理が著しく損なわれる可能性のあることから、部品や機器の洗浄等、衛生・安全面を含めた管理においては、極力、IT 制御を用いることが望まれる。

したがって、IT 制御は効率の良い製造品の供給にもつながり、製造物の品質管理を効率よく行うことを可能にするため、大型製造ラインを構築する場合は、製造ラインの IT 制御は不可欠と考えられる。

第三に、「家電リサイクル法」（施行平成 13 年 4 月 1 日）等施行にもみられるように、昨今は環境に配慮した企業運営が必要不可欠であることから、本研究で開発された最重要部分である「濾過膜」を再生利用(リサイクル)できる研究も必要である。

本研究で採用した「濾過膜」は、カートリッジ式になっており、簡易に取り外しが可能であり、各オーダーによって、製造物が異なることが想定されるため、「使い捨て方式」になっているが、リサイクルの方法が確立されれば、昨今の環境問題に配慮した事業運営が可能となるばかりでなく、生産コストを低減化することが可能となる。

以上が今回の研究から明らかとなった実用化（プラント化）を目指した次期研究課題である。

5.総合調査研究

今回の研究テーマは、地域（沖縄県）の不利性を打破し、地域ポテンシャルを如何に発揮させるかという点に重視し設定してある。特に、様々な歴史的背景や地域事情によって、産業技術の基盤が立ち遅れた沖縄地域においては、他府県の既存産業が既になし得た産業技術力を用いての産業活動は、地域の独自性の発揮や、商品特化（ブランド化）を目指した市場戦略にまでは至らないことが、これまで沖縄地域の産業振興における課題であった。

加えて、島嶼地域であるという地理的条件から、輸送コストが大きくかかる商品は市場出荷までに相応のコストを見込まなければならない。

しかし、当該地域は日本で唯一の「海洋性亜熱帯地域」という気候条件、自然条件を持つほか、東南アジア地域と近接した位置関係にある。また、伝統的生活習慣によって平均余命が全国一であり、「世界一の長寿地域」といわれていることなどから、昨今では、「健康・長寿・癒し」といった言葉が、沖縄地域を表現するキーワードにもなっている。

高齢化が進む現代社会において、健康・長寿・癒しは今日的課題であり、特にこれからは、医・薬学領域での産業はますます活性化が図られるものと考えられた。このような社会的状況や沖縄固有の地域ポテンシャルに着目し、琉球大学が有する研究及び技術シーズをもとに、産官学が共同で行う研究事業として、遺伝子工学領域での研究テーマを設定したことが本研究の特徴である。

日本をはじめとする先進国の共同事業によって「ヒトゲノム」解析が進行する中にあって、バイオテクノロジーを用いた医・薬学領域での研究開発は今後、各大学や研究機関を中心に飛躍的に伸びるものと見込まれている。

本研究成果を元にした市場戦略は、段階的に次のように考えている。

(1)簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製法を用いた事業計画

TFF（Tangential Flow Filtration）を用いたプラスミド抽出・精製法システムの精製工程確立によって、遺伝子治療・遺伝子研究に使用できる「高純度プラスミド」の大量精製が可能となったことから、「ヒトゲノム」解析終了後、国内でも「遺伝子治療」は、治研レベルから実用化レベルにまで達するものと見込まれる。そのため、各大学、研究機関、病院では、遺伝子治療に欠くことのできない高品質の「プラスミド DNA」が必要となる。今後の戦略的事業展開は、これらの研究・開発に応じたプロセスと事業プロジェクトを考えている。

Step1 高純度大型プラスミドの精製と販売

（大学・研究機関・病院へのプラスミドの販売）

対象：国内外の大学、各種研究機関、医療機関等

Step2 簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製装置の製作・販売

（実験室・研究室レベルの装置販売とメンテナンス）

対象：国内外の大学、各種研究機関、医療機関等

Step3 簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製プラントの販売

（大型生産プラント向けのシステム販売とメンテナンス）

対象：国内外の企業

以上の事業計画は、企業の採算性を考慮し、かつ、資本力を増大させながら、拡大を図るという方向性をもっているが、前項の「今後の課題」を継続して研究テーマとして据えるほか、市場の具体性を把握するための本格的なマーケティング調査を実施する。

ターゲットとなる市場は、当面、大学、研究機関、医療機関に設定するが、「遺伝子治療」の研究成果を獲得した大学・研究機関においては、「プラスミド DNA」の需要度が急増するものとの予測が成り立つことから、企業内体制としては、プラスミド DNA を即時供給できる体制を確立する必要があるものとの想定で「企業協力」「特許流通」をも視野に入れた展開策を講じていく。

(2)今後の高純度大型プラスミドを用いた遺伝子治療の展望

上記の高純度大型プラスミドの戦略的事業展開の可能性を今後の遺伝子治療の展望を踏まえ、次に示したい。

世界に先駆けて 1990 年米国において ADA 欠損症に対する遺伝子治療が行われたのを皮切りに、フランス、オランダ、イタリア、日本等で数々の遺伝子治療がなされている。

遺伝子治療に用いられるベクターはウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別されるが、近年ウイルスベクターの安全性に対して信頼度が低くなっており、今後は非ウイルスベクターの「プラスミド DNA 」、「リポソーム」が遺伝子治療ベクターの主流になっていくものと思われる。

日本における遺伝子治療は、1995 年に北海道大学が行った ADA 欠損症が最初であり、以後、東京大学医科学研究所、岡山大学、千葉大学など数例にすぎない。「ヒトゲノム」の解析が急速に進行する中にあって、遺伝子治療の可能性は飛躍的に発展する可能性を含んでいることは論をまたない。しかしながら、日本におけるこれまでの遺伝子治療は、ウイルスベクターを用いたものが大部分であり、非ウイルスベクターであるプラスミド DNA を用いた遺伝子治療が今後、本格的に導入されることとなる。

プラスミド DNA は主に米国で生産されているが、日本でプラスミド DNA を用いた遺伝子治療を行うには高価すぎることと、その供給体制がネックとなっている。今回開発に成功した「簡便化高純度大型プラスミド抽出・精製法」は、従来の遠心分離機を用いた生産方法よりも、はるかに高品質で、生産効率が良く、しかも安価で生産できるという大きなメリットがある。そのため、今後の日本及び世界の遺伝子治療の展開を考えた場合、上記の事業計画を積極的に推進し、早い時期に「高純度大型プラスミド」をマーケットに供給する必要がある。

なお、今後遺伝子治療でプラスミド DNA による治療が有効であると思われる疾患は、①脳梗塞、②腎炎、③肝臓疾患（代謝病）、④虚血性心疾患、⑤閉塞性動脈硬化症等が考えられる。これらの適応疾患は一般に慢性病の性格を帯びており患者数はこれまでのウイルスベクターによる遺伝子治療に比べて莫大なものとなり、治療に用いる「高純度

大型プラスミド」の生産及び供給量もかなりの量がマーケットには必要となる。

ちなみに日本における、虚血性心疾患の患者は、PTCA 後の再狭窄で年間 4 万人、閉塞性動脈硬化症の患者数は年間役 10 万人もおり、その治療効果が期待できる遺伝子治療による治療は急務であり、早急に「高純度大型プラスミド」の供給が必要である。