

製造工程における遺伝子組換えシガ毒素2e (rStx2e)の性状評価

Mallorquí^{*1}, J.; Ferrer-Soler¹, L.; Panosa¹, C.; Bau¹, M.; Moreno¹, A.; Ruiz¹, M.; Sitjà¹, M.

HIPRA, Amer (Girona), Spain

出典：IPVS of 2018

^{*}Corresponding author (joaquin.mallorqui@hipra.com)

背景と目的

ベピュード[®]は子豚の浮腫病に対するワクチンである。ベピュード[®]では抗原として、精製された遺伝子組換えシガ毒素2e(rStx2e)が使用されており、そしてこの精製がベピュード[®]の有効性を実現している。

本試験は、rStx2eの製造工程における精製の必要性を明らかにすることを目的として行われたものである。

背景と目的

rStx2eの製造はまず初めに、rStx2eを産生する大腸菌を培養することから始まる。その後、培養液から培養上清液を分離し、菌体のみを採取する。そして採取した菌体を破碎し、有効成分であるrStx2eを菌体から取り出す。取り出したrStx2eはクロマトグラフィー、透析ろ過、さらにろ過滅菌を行うことで精製される。

本試験では①細胞破碎後(細胞破碎液) ②精製後(精製rStx2e液) ③ろ過滅菌後(最終rStx2e液)の各過程で検体を採取し、各検体のrStx2eの純度とエンドトキシン含有量についてそれぞれ評価を行った。なお、rStx2e純度の評価にはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を、エンドトキシン含有量測定にはライセート試薬 (LAL) を、各々用いた。

結果

細胞破碎後の検体中には少量のrStx2eと多量の大腸菌由来のタンパク質が含まれており、rStx2e量は全タンパク量の1%にも満たなかった。さらにエンドトキシン含有量は 1×10^6 EU/mLを超えていた(表1)。

検体	純度 (%)	エンドトキシン (EU/mL)
①細胞破碎液	0.5	$>1 \times 10^6$
②精製rStx2e液	93.3	500
③最終rStx2e液	95.9	<10

表1. 各製造工程で採取した検体のrStx2e純度及びエンドトキシン含有量

しかし精製工程後は検体のrStx2e純度は90%を超え、エンドトキシンのほとんどが除去されていた。このことから、クロマトグラフィーと透析ろ過による精製工程は純度の

高いrStx2eを得るために不可欠な工程であることが確認できた(図1)。

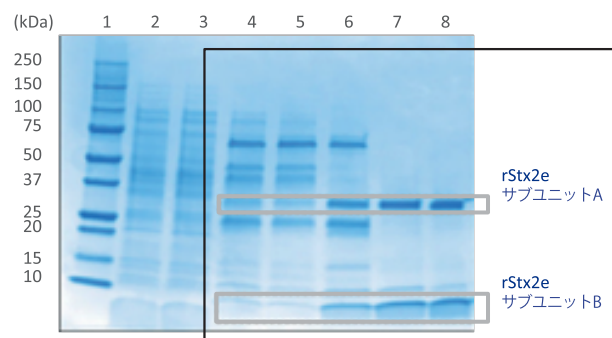


図1. 各製造工程の検体の電気泳動像

1) 分子量マーカー 2) 細胞破碎液 3) クロマトグラフィー: 通過画分 4-6) クロマトグラフィー: 洗浄画分 7) 精製: 精製rStx2e液 8) 最終rStx2e液

最終的にろ過滅菌段階が終了した検体におけるrStx2e純度は95%以上に達し、エンドトキシン含有量は10 EU/mL以下にまで減少した(表1)。

今回試験に用いた検体は4つのロットからそれぞれ採取されたものであったが、いずれのロットにおいてもろ過滅菌終了段階の検体のrStx2e純度は90%以上に達していた。このことからベピュード[®]の製造工程は、ロットの均一化に重要な役割を果たすものであると考えられる(図2)。

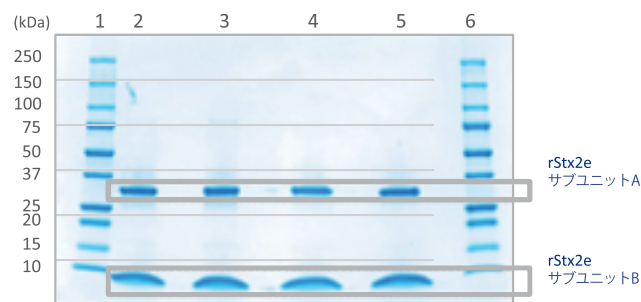


図2. 各ロットにおけるろ過滅菌終了段階の検体の電気泳動像

1,6) 分子量マーカー 2) rStx2e ロット15/001, 3) rStx2e ロット15/002, 4) rStx2e ロット15/003, 5) rStx2e ロット15/004.

結論

本試験の結果から、ベピュード[®]の製造工程で行われている精製は製品に含まれるrStx2eの純度を90%以上に高め、なおかつ製品中のエンドトキシン含有量を低下させるために不可欠な工程であることが確認できた。