(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公開特許公報(A)　　(11)公開番号
特開2023-79984
(P2023-79984A)
(43)公開日　令和5年6月8日(2023.6.8)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N	*7/02 (2006.01)*	C12N	7/02	ZNA　4B065
C12N	*15/35 (2006.01)*	C12N	15/35	4H045
C12N	*15/12 (2006.01)*	C12N	15/12	
C07K	*14/705 (2006.01)*	C07K	14/705	

審査請求　未請求　請求項の数　3　　ＯＬ　（全16頁）

(21)出願番号　特願2022-62233(P2022-62233)
(22)出願日　令和4年4月4日(2022.4.4)
(31)優先権主張番号　特願2021-193520(P2021-193520)
(32)優先日　令和3年11月29日(2021.11.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

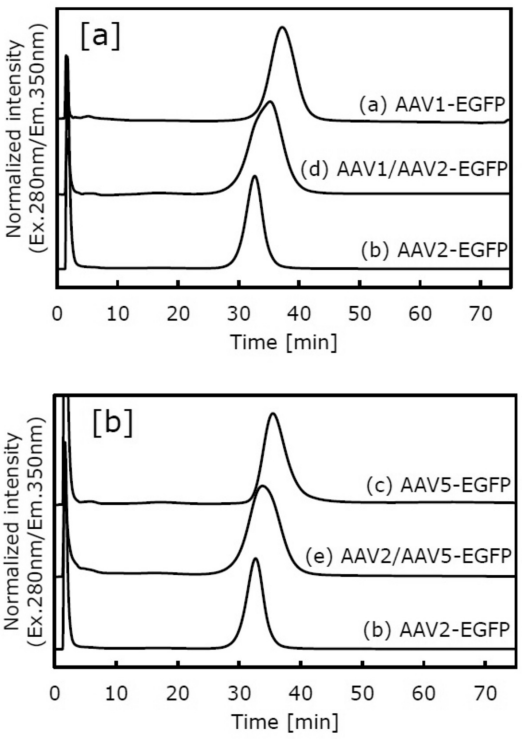
(71)出願人　000003300
東ソー株式会社
山口県周南市開成町４５６０番地
(72)発明者　渡邉 和哉
神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内
(72)発明者　田中 亨
神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内
(72)発明者　牧野 友理子
神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内

Ｆターム（参考）　4B065　AA95X AA95Y AB01 AC14
BA02 BD14 CA44

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　キメラアデノ随伴ウイルスの分析方法

(57)【要約】
【課題】　複数の血清型の特徴を有したキメラアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を、構造を保持したまま分析する方法を提供すること。
【解決手段】　不溶性担体と当該担体に固定化したＫＩＡＡ０３１６Ｌの細胞外ドメイン１およびドメイン２に相当するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む吸着剤に試料中に含まれるキメラＡＡＶを吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したキメラＡＡＶを溶出液を用いて溶出させる工程とを含む、キメラＡＡＶの分析方法により、前記課題を解決する。
【選択図】　図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中に含まれるアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を不溶性担体と当該担体に固定化したＡＡＶ結合性タンパク質とを含む吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したＡＡＶを溶出液を用いて溶出させる工程とを含む、ＡＡＶの分析方法であって、
前記試料が複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶを少なくとも含み、かつ前記ＡＡＶ結合性タンパク質が以下の（ｉ）から（ｉｉｉ）のいずれかから選択されるポリペプチドである、前記方法；
（ｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列のうち、３１２番目のセリンから４０１番目のグルタミン酸までのアミノ酸残基または４０９番目のイソロイシンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含むポリペプチド、
（ｉｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列のうち、３１２番目のセリンから４０１番目のグルタミン酸までのアミノ酸残基または４０９番目のイソロイシンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から４０１番目までのアミノ酸残基または当該４０９番目から５００番目までのアミノ酸残基において、１もしくは数個の位置での１もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド、
（ｉｉｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列のうち、３１２番目のセリンから４０１番目のグルタミン酸までのアミノ酸残基または４０９番目のイソロイシンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から４０１番目までのアミノ酸残基または当該４０９番目から５００番目までのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して７０％以上の相同性を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド。
【請求項２】
ＡＡＶ結合性タンパク質が、以下の（ｉｖ）から（ｖｉ）のいずれかから選択されるポリペプチドである、請求項１に記載の方法；
（ｉｖ）配列番号１に記載のアミノ酸配列のうち３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含むポリペプチド、
（ｖ）配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から５００番目までのアミノ酸残基において、１もしくは数個の位置での１もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド、
（ｖｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から５００番目までのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して７０％以上の相同性を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド。
【請求項３】
試料が複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶと単一の血清型のＡＡＶとを少なくとも含む、請求項１又は２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の分析方法に関する。特に本発明は、試料中に含まれる複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶを分析する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）はパルボウイルス科（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）、ディペンドウイルス属（Ｄｅｐｅｎｄｏｖｉｒｕｓ）に分類される非エンベロープウイルスである。ＡＡＶ外殻粒子は３種類のタンパク質（ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３）で構成さ

れており、約６０のタンパク質分子がおよそＶＰ１：ＶＰ２：ＶＰ３＝１：１：１０の比率で混在し集合することで、直径２０ｎｍから３０ｎｍの正二十面体の形状をしている。

【０００３】

自然界でのＡＡＶは自立性の増殖能を欠き、複製はアデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスに依存する。前記ヘルパーウイルスが存在すると、ＡＡＶゲノムは宿主細胞内で複製され、ＡＡＶゲノムを含む完全なＡＡＶ粒子が形成され、宿主細胞からＡＡＶ粒子が放出される。一方、前記ヘルパーウイルスが存在しない場合、ＡＡＶゲノムはエピソームに維持された状態または宿主染色体に組込まれた状態（潜伏状態）となる。

【０００４】

ＡＡＶはヒトを含む広範な種の細胞に感染可能で、血球、筋、神経細胞などの分化を終えた非分裂細胞にも感染すること、ヒトに対する病原性がないため副作用の心配が低いこと、ウイルス粒子が物理化学的に安定であること、などから、先天性遺伝子疾患の治療を目的とした遺伝子導入用のベクターとしての利用価値が注目されている。

【０００５】

遺伝子組換えＡＡＶベクター（以下、単にＡＡＶベクターとも表記）の製造は、通常、ＡＡＶ粒子形成に必須な要素をコードする核酸を細胞に導入することで、ＡＡＶを産生する能力を有する細胞（以下、ＡＡＶ産生細胞とも表記）を作製し、当該細胞を培養してＡＡＶ粒子形成に必須な要素を発現させることで行なう。製造したＡＡＶベクターはＡＡＶ産生細胞から回収精製し、治療用ＡＡＶベクター製剤を得る。

【０００６】

ＡＡＶベクターには、複数の血清型（セロタイプ）が存在し、各血清型の細胞指向性や感染能が異なる（非特許文献１）。また近年、複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶベクターも知られており、一例として、血清型１（ＡＡＶ１）と血清型２（ＡＡＶ２）とのキメラＡＡＶベクター（非特許文献２）や、血清型２（ＡＡＶ２）と血清型５（ＡＡＶ５）とのキメラＡＡＶベクター（非特許文献３）があげられる。キメラＡＡＶベクターは数種類の血清型の性質を有することができ、各血清型の細胞指向性や感染能の特徴を踏襲できる点で有用であり、当該ベクターを、構造を保持したまま分析することは、ＡＡＶベクターの性質を把握するために必須である。

【０００７】

従来より、構造を維持したままＡＡＶベクターを分析する方法として、透過型電子顕微鏡法、ゲルろ過分析法、動的光散乱法などが用いられている。しかしながらこれらの方法はいずれも、大きさや形状などの情報は得られるものの、キメラＡＡＶベクターの分析は困難であった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００８】

【非特許文献１】Ｅｌｌｉｓ Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｖｉｒｏｌ Ｊ，７４，１０，２０１３
【非特許文献２】Ｈａｕｃｋ Ｂ．ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｔｈｅｒ，７，４１９，２００３
【非特許文献３】Ｅｘｃｏｆｆｏｎ Ｋ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，１０６，３８６５，２００９

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

本発明の目的は、複数の血清型の特徴を有したキメラアデノ随伴ウイルスを、構造を保持したまま分析する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明者らは鋭意検討した結果、不溶性担体と当該担体に固定化したＡＡＶ結合性タンパク質とを含む吸着剤を用いて分析することで、試料中に含まれるキメラＡＡＶを分析で

きることを見出し、本発明を完成するに至った。
【００１１】
すなわち、本発明は以下に示す態様を包含する。
【００１２】
［１］試料中に含まれるアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を不溶性担体と当該担体に固定化したＡＡＶ結合性タンパク質とを含む吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したＡＡＶを溶出液を用いて溶出させる工程とを含む、ＡＡＶの分析方法であって、
前記試料が複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶを少なくとも含み、かつ前記ＡＡＶ結合性タンパク質が以下の（ｉ）から（ｉｉｉ）のいずれかから選択されるポリペプチドである、前記方法；
（ｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列のうち３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含むポリペプチド、
（ｉｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から５００番目までのアミノ酸残基において、１もしくは数個の位置での１もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド、
（ｉｉｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から５００番目までのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して７０％以上の相同性を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド。
【００１３】
［２］試料が複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶと単一の血清型のＡＡＶとを少なくとも含む、［１］に記載の方法。
【００１４】
以下、本発明を詳細に説明する。
【００１５】
本発明でＡＡＶの分析に用いる吸着剤（以下、「ＡＡＶ吸着剤」とも表記）のリガンドタンパク質（不溶性担体に固定化させるタンパク質）であるＡＡＶ結合性タンパク質は、ＡＡＶ受容体（ＡＡＶＲ）の一態様であるＫＩＡＡ０３１９Ｌ（ＵｎｉＰｒｏｔアクセッションナンバー：Ｑ８ＩＺＡ０、配列番号１）の細胞外領域ドメイン１（ＰＫＤ１）およびドメイン２（ＰＫＤ２）（配列番号１の３１２番目のセリン（Ｓｅｒ）から５００番目のアスパラギン酸（Ａｓｐ）までのアミノ酸残基）に相当する領域を少なくとも含むポリペプチドである。具体的には、以下の（ｉ）から（ｉｉｉ）のいずれかに示すポリペプチドがあげられる。
（ｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列のうち３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含むポリペプチド、
（ｉｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から５００番目までのアミノ酸残基において、１もしくは数個の位置での１もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加を含むアミノ酸配列を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド、
（ｉｉｉ）配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含み、ただし当該３１２番目から５００番目までのアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して７０％以上の相同性を有し、かつＡＡＶ結合活性を有するポリペプチド。
【００１６】
なお配列番号１に記載のアミノ酸配列は、ＡＡＶＲの一態様であるＫＩＡＡ０３１９Ｌ（公式データベース：ＵｎｉＰｒｏｔ、アクセッションナンバー：Ｑ８ＩＺＡ０）のアミノ酸配列であり、配列番号１に記載のアミノ酸配列の３１２番目のセリン（Ｓｅｒ）から

５００番目のアスパラギン酸（Ａｓｐ）までのアミノ酸残基は、ＫＩＡＡ０３１９Ｌの細胞外領域ドメイン１（ＰＫＤ１）およびドメイン２（ＰＫＤ２）に相当する領域である。

【００１７】

前記（ｉ）から（ｉｉｉ）のいずれかに示すポリペプチドは、前述したＫＩＡＡ０３１９ＬのＰＫＤ１およびＰＫＤ２に相当する領域を少なくとも含んでいればよく、例えば、ＰＫＤ２のＣ末端側にある他の細胞外領域ドメイン（ドメイン３（ＰＫＤ３）、ドメイン４（ＰＫＤ４）およびドメイン５（ＰＫＤ５））に相当する領域の全てまたは一部を含んでもよいし、ＰＫＤ１のＮ末端側にあるＭＡＮＳＣ（Ｍｏｔｉｆ Ａｔ Ｎ ｔｅｒｍｉｎｕｓ ｗｉｔｈ Ｓｅｖｅｎ Ｃｙｓｔｅｉｎｅｓ）ドメインなどのシグナル配列に相当する領域やシステインリッチな領域の全てまたは一部を含んでもよいし、細胞外領域のＮ末端側および／またはＣ末端側にある膜貫通領域ならびに細胞内領域の全てまたは一部を含んでもよい。

【００１８】

前記（ｉｉ）の一例として、配列番号４に記載のアミノ酸配列のうち２５番目のセリンから２１３番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基を少なくとも含むポリペプチドや、ＷＯ２０２１／１０６８８２号で開示のＡＡＶ結合性タンパク質、があげられる。また前記（ｉｉ）に記載の置換、欠失、挿入、または付加の例として、ＷＯ２０２１／１０６８８２号で開示しているアミノ酸残基の置換があげられる。

【００１９】

前記（ｉｉ）における、「１もしくは数個」とは、ＡＡＶＲの立体構造におけるアミノ酸置換の位置やアミノ酸残基の種類によっても異なるが、一例として、１個以上５０個以下、１個以上３０個以下、１個以上２０個以下、１個以上１０個以下、１個以上９個以下、１個以上８個以下、１個以上７個以下、１個以上６個以下、１個以上５個以下、１個以上４個以下、１個以上３個以下、１個以上２個以下、１個のいずれかを意味する。「１もしくは数個」のアミノ酸残基の置換は、例えば、ＡＡＶ結合活性を有する限り、ＷＯ２０２１／１０６８８２号で開示のアミノ酸残基の置換以外の位置に生じてよい。

【００２０】

なお前記（ｉｉ）における「１もしくは数個のアミノ酸残基の置換」には、前述した特定位置におけるアミノ酸置換の他に、物理的性質および／または化学的性質が類似したアミノ酸間で置換が生じる保守的置換が生じてもよい。保守的置換は、一般に、置換が生じているものと置換が生じていないものとの間でタンパク質の機能が維持されることが当業者において知られている。保守的置換の一例としては、グリシンとアラニン間、セリンとプロリン間、またはグルタミン酸とアラニン間での置換があげられる（タンパク質の構造と機能，メディカル・サイエンス・インターナショナル社、９、２００５）。また前記（ｉｉ）における「１もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、または付加」には、ＡＡＶＲの由来の違いや、種の違いなどに基づく、天然にも存在する変異（ｍｕｔａｎｔまたはｖａｒｉａｎｔ）も含まれる。

【００２１】

前記（ｉｉｉ）におけるアミノ酸配列の相同性は７０％以上あればよく、それ以上の相同性（例えば、８０％以上、８５％以上、９０％以上または９５％以上）を有してもよい。なお本明細書において「相同性」とは、類似性（ｓｉｍｉｌａｒｉｔｙ）または同一性（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）を意味してよく、特に同一性を意味してもよい。「アミノ酸配列の相同性」とは、アミノ酸配列全体に対する相同性を意味する。アミノ酸配列間の「同一性」とは、それらアミノ酸配列における種類が同一であるアミノ酸残基の比率を意味する（実験医学、３１（３）、羊土社）。アミノ酸配列間の「類似性」とは、それらアミノ酸配列における種類が同一であるアミノ酸残基の比率と側鎖の性質が類似したアミノ酸残基の比率の合計を意味する（実験医学、３１（３）、羊土社）。アミノ酸配列の相同性は、ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）やＦＡＳＴＡ等のアラインメントプログラム（ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｐｒｏｇｒａｍ）を利用して決定できる。

【００２２】
本発明において、前述したＡＡＶ結合性タンパク質の固定化に用いる不溶性担体は、ＡＡＶを含む試料、分析や精製に用いる溶液（溶出液、平衡化液、洗浄液など）に対して不溶性であれば特に制限されない。一例として、アガロース、アルギネート（アルギン酸塩）、カラゲナン、キチン、セルロース、デキストリン、デキストラン、デンプン等の多糖質を原料とした担体や、ポリビニルアルコール、ポリメタクレート、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリウレタン等の合成高分子を原料とした担体や、シリカ等のセラミックスを原料とした担体があげられる。中でも、多糖質を原料とした担体や合成高分子を原料とした担体が不溶性担体として好ましい。前記好ましい担体の一例として、トヨパール（東ソー社製）等のヒドロキシ基を導入したポリメタクリレートゲル、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（サイティバ社製）等のアガロースゲル、セルファイン（ＪＮＣ社製）等のセルロースゲルが挙げられる。不溶性担体の形状は特に制限されないが、カラムに充填できる形状であると好ましい。例えば、粒状物、モノリス状物、膜状物および繊維状物のいずれであってもよく、また多孔性および非多孔性のいずれであってもよい。
【００２３】
不溶性担体へのＡＡＶ結合性タンパク質の固定化は、例えば、共有結合を介して固定化すればよい。具体的には、例えば、不溶性担体が有する活性基を介してＡＡＶ結合性タンパク質と不溶性担体とを共有結合させることで、不溶性担体に固定化し、本発明で用いるＡＡＶ吸着剤を製造すればよい。前記活性基としては、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミド（ＮＨＳ）活性化エステル基、エポキシ基、カルボキシ基、マレイミド基、ハロアセチル基、トレシル基、ホルミル基、ハロアセトアミド基が挙げられる。活性基を有する不溶性担体としては、例えば、活性基を有する市販の不溶性担体をそのまま用いてもよいし、不溶性担体に活性基を導入して用いてもよい。活性基を有する市販の担体としては、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ　ＡＦ－Ｅｐｏｘｙ－６５０Ｍ、ＴＯＹＯＰＥＡＲＬ　ＡＦ－Ｔｒｅｓｙｌ－６５０Ｍ（いずれも東ソー社製）、ＨｉＴｒａｐ　ＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ＨＰ　Ｃｏｌｕｍｎｓ、ＮＨＳ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　４　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ、Ｅｐｏｘｙ－ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　６Ｂ（いずれもサイティバ社製）、ＳｕｌｆｏＬｉｎｋ　Ｃｏｕｐｌｉｎｇ　Ｒｅｓｉｎ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）が例示できる。
【００２４】
担体表面に活性基を導入する方法としては、担体表面に存在するヒドロキシ基、エポキシ基、カルボキシ基、アミノ基等に対して２個以上の活性部位を有する化合物の一方を反応させる方法が例示できる。
【００２５】
担体表面に存在するヒドロキシ基やアミノ基にエポキシ基を導入する化合物としては、エピクロロヒドリン、エタンジオールジグリシジルエーテル、ブタンジオールジグリシジルエーテル、ヘキサンジオールジグリシジルエーテル、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル　が例示できる。ポリエチレングリコールジグリシジルエーテルの具体例として、デナコール　ＥＸ－８１０（ｎ＝１）、デナコール　ＥＸ－８１１（ｎ＝１）、デナコール　ＥＸ－８５０（ｎ＝２）、デナコール　ＥＸ－８５１（ｎ＝２）、デナコール　ＥＸ－８２１（ｎ＝４）、デナコール　ＥＸ－８３０（ｎ＝９）、デナコール　ＥＸ－８３２（ｎ＝９）、デナコールＥＸ－８４１（ｎ＝１３）、デナコール　ＥＸ－８６１（ｎ＝２２）（いずれもナガセケムテックス社製）があげられる。
【００２６】
また担体表面に存在するエポキシ基にカルボキシ基を導入する化合物としては、２－メルカプト酢酸、３－メルカプトプロピオン酸、４－メルカプト酪酸、６－メルカプト酪酸、グリシン、３－アミノプロピオン酸、４－アミノ酪酸、６－アミノヘキサン酸を例示できる。
【００２７】
また担体表面に存在するヒドロキシ基、エポキシ基、カルボキシ基、アミノ基にマレイ

ミド基を導入する化合物としては、Ｎ－（ε－マレイミドカプロン酸）ヒドラジド、Ｎ－（ε－マレイミドプロピオン酸）ヒドラジド、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酢酸ヒドラジド、２－アミノマレイミド、３－アミノマレイミド、４－アミノマレイミド、６－アミノマレイミド、１－（４－アミノフェニル）マレイミド、１－（３－アミノフェニル）マレイミド、４－（マレイミド）フェニルイソシアナート、２－マレイミド酢酸、３－マレイミドプロピオン酸、４－マレイミド酪酸、６－マレイミドヘキサン酸、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）スクシンイミドエステル、（ｍ－マレイミドベンゾイル）Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、スクシンイミジル－４－（マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボニル－（６－アミノヘキサン酸）、スクシンイミジル－４－（マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸、（ｐ－マレイミドベンゾイル）Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、（ｍ－マレイミドベンゾイル）Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルやデキストランを例示できる。

【００２８】

また担体表面に存在するヒドロキシ基やアミノ基にハロアセチル基を導入する化合物としては、クロロ酢酸、ブロモ酢酸、ヨード酢酸、クロロ酢酸クロリド、ブロモ酢酸クロリド、ブロモ酢酸ブロミド、クロロ酢酸無水物、ブロモ酢酸無水物、ヨード酢酸無水物、２－（ヨードアセトアミド）酢酸－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、３－（ブロモアセトアミド）プロピオン酸－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル、４－（ヨードアセチル）アミノ安息香酸－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルを例示できる。

【００２９】

また担体表面に活性基を導入する方法としては、担体表面に存在するヒドロキシ基やアミノ基にω－アルケニルアルカングリシジルエーテルを反応させた後、ハロゲン化剤でω－アルケニル部位をハロゲン化することで活性化する方法も例示できる。ω－アルケニルアルカングリシジルエーテルとしては、アリルグリシジルエーテル、３－ブテニルグリシジルエーテル、４－ペンテニルグリシジルエーテルを例示できる。ハロゲン化剤としては、Ｎ－クロロスクシンイミド、Ｎ－ブロモスクシンイミド、Ｎ－ヨードスクシンイミドを例示できる。

【００３０】

また担体表面に活性基を導入する方法としては、担体表面に存在するカルボキシ基に対して縮合剤と添加剤を用いて活性基を導入する方法も例示できる。縮合剤としては１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＣ）、ジシクロヘキシルカルボジアミド、カルボニルジイミダゾールを例示できる。添加剤としては、ＮＨＳ、４－ニトロフェノール、１－ヒドロキシベンズトリアゾールを例示できる。

【００３１】

ＡＡＶ結合性タンパク質の不溶性担体への固定化は、例えば、緩衝液中で実施できる。緩衝液としては、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ＭＥＳ（２－ＭｏｒｐｈｏｌｉｎｏＥｔｈａｎｅＳｕｌｆｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）緩衝液、ＨＥＰＥＳ（４－（２－ＨｙｄｒｏｘｙＥｔｈｙｌ）－１－ＰｉｐｅｒａｚｉｎｅＥｔｈａｎｅＳｕｌｆｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）緩衝液、トリス（Ｔｒｉｓ（ｈｙｄｒｏｘｙｍｅｔｈｙｌ）ａｍｉｎｏｍｅｔｈａｎｅ）緩衝液、ホウ酸緩衝液を例示できる。固定化させるときの反応温度は、例えば、活性基の反応性やＡＡＶ結合性タンパク質の安定性等の諸条件に応じて適宜設定できる。固定化させるときの反応温度は、例えば、４℃以上５０℃以下であってよく、好ましくは１０℃以上３５℃以下であってよい。

【００３２】

本発明は、試料中に含まれる、複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶを、前述した方法で作製したＡＡＶ吸着剤に吸着させる工程（以下、単に「吸着工程」とも表記）と、前記吸着剤に吸着したＡＡＶを、溶出液を用いて溶出させる工程（以下、単に「溶出工程」とも表記）と、を含む方法で分析することを特徴としている。

【００３３】

本発明の分析対象であるキメラＡＡＶは、複数の血清型の特徴を有したＡＡＶのことを

指す。前記特徴の一例として各血清型の細胞指向性や感染能があげられる。キメラＡＡＶは、例えば、各血清型を構成するカプシドをコードするプラスミドを混合し、宿主にトランスフェクションすることで得られる。前記カプシドの種類は２種類以上であればよく、トランスフェクションするプラスミドの比率は任意に選択できる。キメラＡＡＶの一例として、血清型１（ＡＡＶ１）と血清型２（ＡＡＶ２）とのキメラＡＡＶ（以下、「ＡＡ１／ＡＡＶ２」とも表記）や、ＡＡＶ２と血清型５（ＡＡＶ５）とのキメラＡＡＶ（以下、「ＡＡＶ２／ＡＡＶ５」とも表記）があげられる。

【００３４】

本発明において、試料中には前述したキメラＡＡＶを少なくとも一種類含んでいればよく、単一の血清型のＡＡＶおよび／または前記キメラＡＡＶ以外の種類のキメラＡＡＶをさらに含んでもよい。

【００３５】

本発明のキメラＡＡＶの分析を行なう際、前記吸着工程および前記溶出工程に用いるＡＡＶ吸着剤は、カラムに充填した態様（以下、「ＡＶＲカラム」とも表記）とすると、これら工程を簡便に行なえる点で好ましい。以下、ＡＶＲカラムを用いた態様を例に、詳細に説明する。

【００３６】

キメラＡＡＶを含む試料は、例えば、ポンプ等の送液手段を用いてＡＶＲカラムに添加できる。なお本明細書では、液体をカラムに添加することを、「液体をカラムに送液する」ともいう。なおキメラＡＡＶを含む試料は、ＡＶＲカラムに添加する前に予め適切な緩衝液を用いて溶媒置換してよい。また、キメラＡＡＶを含む試料をＡＶＲカラムに添加する前（すなわち吸着工程前）に、適切な緩衝液（平衡化液）を用いてＡＶＲカラムを平衡化してよい。前記平衡化により、例えば、キメラＡＡＶをより高精度に分析できると期待される。溶媒置換や平衡化に用いる緩衝液としては、中性領域（本明細書ではｐＨ４．０以上９．０以下の領域を指す）で緩衝能を有する、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、ＭＥＳ緩衝液が例示できる。そのような緩衝液には、例えば、さらに、１０ｍＭ以上６００ｍＭ以下の塩化ナトリウムや塩化カルシウム等の無機塩を添加してもよい。溶媒置換に用いる緩衝液と平衡化液は、同一であってもよく、同一でなくてもよい。また、キメラＡＡＶを含む試料のＡＶＲカラムへの通液後に夾雑物質等のＡＡＶ以外の成分がＡＶＲカラムに残存している場合、ＡＡＶ吸着剤に吸着したキメラＡＡＶを溶出液で溶出させる前（すなわち溶出工程前）に、そのような成分をＡＶＲカラムから除去（洗浄）してよい。キメラＡＡＶ以外の成分は、例えば、適切な緩衝液を洗浄液として用いることでＡＶＲカラムから除去できる。当該洗浄液については、例えば、溶媒置換や平衡化に用いる緩衝液についての記載を準用できる。

【００３７】

溶出工程において、溶出液の送液形式は、グラジエントであってもよく、イソクラティックであってもよいが、試料中に複数種類のキメラＡＡＶが含まれている場合や、キメラＡＡＶおよび単一の血清型のＡＡＶが含まれている場合は、グラジエントで溶出させるとよい。グラジエントは、二以上の段階に分けて（ステップワイズに）変化させてもよく（ステップグラジエント）、直線的（リニア）な勾配をつけて変化させてもよい（リニアグラジエント）。グラジエント溶出の例として、ｐＨを前述した中性領域から酸性領域（前述した中性領域よりも酸性側の領域）に下げるグラジエントがあげられる。開始時の溶出液のｐＨは前述した中性領域すなわちｐＨ４．０以上９．０以下であればよく、ｐＨ４．５以上ｐＨ６．０以下であれば好ましい。グラジエント後の溶出液のｐＨである酸性領域はｐＨ３．５以下であればよく、ｐＨ２．０以上ｐＨ２．５以下が好ましい。流速の下限は特に制限はなく、上限はＡＡＶ吸着剤で使用している不溶性担体の背圧に依存する。標準的には、０．５ｍＬ／分以上２．０ｍＬ／分以下が好ましい。グラジエントの時間は、血清型の違いが溶出時間の違いとして識別できればよい。具体的には５分以上が好ましく、より好ましくは２０分以上、さらに好ましくは４５分以上である。

【発明の効果】
【００３８】
本発明は、試料中に含まれる、複数の血清型の特徴を有したキメラアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）の分析を、不溶性担体と当該担体に固定化したＡＡＶ結合性タンパク質とを含む吸着剤に吸着させる工程と、前記吸着剤に吸着したＡＡＶを溶出液を用いて溶出させる工程とを含む方法で行なうことを特徴としている。本発明により、従来の方法はできなかった、試料中に含まれるキメラＡＡＶを、構造を維持したまま、分析できる。
【図面の簡単な説明】
【００３９】
【図１】ＡＶＲ１０ｓカラムを用い、単一の血清型のＡＡＶおよびキメラＡＡＶを分析した結果（クロマトパターン）を示した図である。［ａ］は（Ａ）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰ溶液、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液および（Ｄ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液をそれぞれ分析した結果をまとめた図であり、［ｂ］は（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液、（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液をそれぞれ分析した結果をまとめた図である。
【図２】ゲルろ過カラムを用い、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液、（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液を分析した結果（クロマトパターン）を示した図である。
【図３】動的光散乱法を用い、（Ａ）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰ溶液、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液、（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液、（Ｄ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液を分析した結果（粒径分布）を示した図である。
【図４】ＡＶＲ１０ｓカラムを用い、単一血清型のＡＡＶ、キメラＡＡＶ、および異なる単一血清型のＡＡＶの混合物を分析した結果（クロマトパターン）を示した図である。
【実施例】
【００４０】
以下、実施例および比較例を用いて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら例に限定されるものではない。
【００４１】
実施例１　アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターの調製
（１）配列番号２に記載のアミノ酸配列からなるＥＧＦＰ（Ｅｎｈａｎｃｅｄ　Ｇｒｅｅｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）をコードするポリヌクレオチドの５’末端側に制限酵素ＥｃｏＲＩ認識配列（ＧＡＡＴＴＣ）を、３’末端側に終止コドン（ＴＡＧ）およびＢａｍＨＩ認識配列（ＧＧＡＴＴＣ）を、それぞれ付加したヌクレオチド配列（配列番号３）を設計した。
【００４２】
（２）配列番号３に記載の配列からなるポリヌクレオチドを全合成しプラスミドにクローニングした（ＦＡＳＭＡＣ社に委託、ｐＵＣ－ＥＧＦＰと命名）。ｐＵＣ－ＥＧＦＰで大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、得られた形質転換体を培養した。培養液からＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いてｐＵＣ－ＥＧＦＰを抽出した。
【００４３】
（３）（２）で得られたｐＵＣ－ＥＧＦＰを制限酵素ＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで消化後、あらかじめ制限酵素ＥｃｏＲＩとＢａｍＨＩで消化した発現ベクターｐＡＡＶ－ＣＭＶ（タカラバイオ社製）にライゲーションし、当該ライゲーション産物を用いて大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。
【００４４】
（４）（３）で得られた形質転換体を、１００μｇ／ｍＬのカルベニシリンを含む２ＹＴ培地（１．６％（ｗ／ｖ）Ｔｒｙｐｔｏｎｅ、１％（ｗ／ｖ）Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ、０．５％（ｗ／ｖ）塩化ナトリウム）１Ｌが入った、５Ｌバッフルフラスコにて、

３７℃で一晩振とう培養した。培養終了後、遠心分離することで菌体を回収した。Ｐｌａｓｍｉｄ　Ｍｅｇａ　Ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いて、回収した菌体からＥＧＦＰを発現するベクターｐＡＡＶ－ＥＧＦＰを大量に調製した。

【００４５】

（５）ｐＲＣ１－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒ、ｐＲＣ２－ｍｉ３４２　ＶｅｃｔｏｒおよびｐＲＣ５－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒ（いずれもタカラバイオ社製）のうちいずれかのプラスミド（以下、総称して「ｐＲＣＸ－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒ」とも表記」）ならびにｐＨｅｌｐｅｒ　Ｖｅｃｔｏｒ（タカラバイオ社製）で大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。得られた形質転換体を用いて（４）と同様の操作を行なうことで、ｐＲＣＸ－ｍｉ３４２　ＶｅｃｔｏｒおよびｐＨｅｌｐｅｒを大量に調製した。

【００４６】

（６）５％（ｖ／ｖ）のウシ血清を含むＤ－ＭＥＭ培地（富士フイルム和光純薬社製）５００ｍＬが入ったセルスタック細胞培養表面処理済み５チャンバー（コーニング社製）８枚でＨＥＫ２９３Ｔ細胞を培養した。そこへ（４）で調製したｐＡＡＶ－ＥＧＦＰ、（５）で調製したｐＲＣＸ－ｍｉ３４２　ＶｅｃｔｏｒおよびｐＨｅｌｐｅｒ、ならびにポリエチレンイミン（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）の複合体を添加することで遺伝子導入し、５％（ｖ／ｖ）の二酸化炭素、３７℃の条件で３日間静置培養した。なお遺伝子導入したｐＲＣＸ－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒは、以下の（Ａ）から（Ｅ）のいずれかの組み合わせとした。

（Ａ）ｐＲＣ１－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒのみ
（Ｂ）ｐＲＣ２－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒのみ
（Ｃ）ｐＲＣ５－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒのみ
（Ｄ）ｐＲＣ１－ｍｉ３４２　ＶｅｃｔｏｒおよびｐＲＣ２－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒ
（Ｅ）ｐＲＣ２－ｍｉ３４２　ＶｅｃｔｏｒおよびｐＲＣ５－ｍｉ３４２　Ｖｅｃｔｏｒ

（７）（６）で得られた培養液に、終濃度０．１％となるようにＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（シグマ社製）（終濃度０．１％）およびＢｅｎｚｏｎａｓｅ（メルクミリポア社製）（終濃度１Ｕ／ｍＬ）を培養液中に添加して３７℃の条件で３時間静置後、遠心分離した後の上清を回収し、３００ｋＤ－ｃｕｔｏｆｆのタンジェンシャルフローシステム用メンブレンカセット（ポール社製）を用いて濃縮および０．５Ｍの塩化ナトリウムを含む２０ｍＭのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）（以下、「平衡化液Ａ」とも表記）への置換を行った。得られた濃縮液を孔径０．２２μｍのフィルターに供し、浮遊物を除去した。

【００４７】

（８）浮遊物を除去した溶液を、７ｍＬのＡＶＢ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅカラム（サイティバ社製）またはＰＯＲＯＳ　ＡＡＶＸカラム（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）にアプライした。

【００４８】

（９）平衡化液Ａで洗浄後、０．５Ｍの塩化ナトリウムを含む０．１Ｍの酢酸緩衝液（ｐＨ２．５）で溶出した。得られたＡＡＶベクターを含む溶出画分に、２０ｍＭの塩化マグネシウムを含む１Ｍのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．５）を１／４量加えて中和することで、各血清型のＡＡＶベクターである（Ａ）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰ、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰおよび（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ、ならびに複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶベクターである（Ｄ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ（ＡＡＶ１とＡＡＶ２とのキメラＡＡＶベクター）および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ（ＡＡＶ２とＡＡＶ５とのキメラＡＡＶベクター）を得た（以下、総称して「ＡＡＶＸ－ＥＧＦＰ」とも表記）。

【００４９】

（１０）（９）で得られた溶液中のＡＡＶＸ－ＥＧＦＰ濃度を、ゼータサイザーＵｌｔｒａ（マルバーン社製）を用いて定量した。また前記溶液をＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｓｉｌｖｅｒ　Ｓｔａｉｎ　Ｋｉｔ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて銀染色することで前記溶液中に含まれるＡＡＶベクターの純度を確認した結果、全ての溶液でＡＡＶベクターを構成する３種類の外殻タンパク質（ＶＰ１、Ｖ

Ｐ２、ＶＰ３）に相当するバンドのみが観測され、純度に問題ないことを確認した。
【００５０】
実施例２　ＡＡＶ結合性タンパク質の調製
（１）配列番号４に記載のアミノ酸配列からなるＡＡＶ結合性タンパク質ＡＶＲ１０ｓを含むポリペプチド、をコードするポリヌクレオチド（配列番号５）を含むプラスミドｐＥＴ－ＡＶＲ１０ｓで大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）株を形質転換し得られた、ＡＶＲ１０ｓを発現可能な形質転換体を、５０μｇ／ｍＬのカナマイシンを含む３ｍＬの２ＹＴ液体培地に接種し、３７℃で一晩、好気的に振とう培養することで前培養を行なった。なお配列番号４において、１番目のメチオニン（Ｍｅｔ）から２２番目のアラニン（Ａｌａ）までがＰｅｌＢシグナルペプチドであり、２５番目のセリン（Ｓｅｒ）から２１３番目のアスパラギン酸（Ａｓｐ）までがＡＡＶ結合性タンパク質ＡＶＲ１０ｓであり、２２０番目のシステイン（Ｃｙｓ）から２２６番目のグリシン（Ｇｌｙ）までが固定化用のタグであるシステインタグ配列である。またＡＶＲ１０ｓは、ＡＡＶ受容体ＫＩＡＡ０３１９Ｌの細胞外ドメイン１（ＰＫＤ１）およびドメイン２（ＰＫＤ２）（配列番号１の３１２番目のセリンから５００番目のアスパラギン酸までのアミノ酸残基）に対して、以下の（Ｉ）から（Ｘ）に示すアミノ酸置換が生じたポリペプチドである。
（Ｉ）配列番号１の３１７番目（配列番号４では３０番目）のバリンがアスパラギン酸に置換
（ＩＩ）配列番号１の３４２番目（配列番号４では５５番目）のチロシンがセリンに置換
（ＩＩＩ）配列番号１の３６２番目（配列番号４では７５番目）のリジンがグルタミン酸に置換
（ＩＶ）配列番号１の３７１番目（配列番号４では８４番目）のリジンがアスパラギンに置換
（Ｖ）配列番号１の３８１番目（配列番号４では９４番目）のバリンがアラニンに置換
（ＶＩ）配列番号１の３８２番目（配列番号４では９５番目）のイソロイシンがバリンに置換
（ＶＩＩ）配列番号１の３９０番目（配列番号４では１０３番目）のグリシンがセリンに置換
（ＶＩＩＩ）配列番号１の３９９番目（配列番号４では１１２番目）のリジンがグルタミン酸に置換
（ＩＸ）配列番号１の４７６番目（配列番号４では１８９番目）のセリンがアルギニンに置換
（Ｘ）配列番号１の４８７番目（配列番号４では２００番目）のアスパラギンがアスパラギン酸に置換
（２）１Ｌのバッフルフラスコに５０μｇ／ｍＬのカナマイシンを添加した２００ｍＬの２ＹＴ液体培地に（１）の前培養液を２ｍＬ接種し、３７℃で好気的に振とう培養を行なった。
【００５１】
（３）培養開始２．０時間後、終濃度０．１ｍＭとなるようＩＰＴＧ（ＩｓｏＰｒｏｐｙｌ－β－Ｄ－ＴｈｉｏＧａｌａｃｔｏｐｙｒａｎｏｓｉｄｅ）を添加後、引き続き３７℃で３．０時間、好気的に振とう培養した。
【００５２】
（４）培養終了後、培養液を４℃、８０００ｒｐｍで２０分間遠心分離することで菌体を回収した。
【００５３】
（５）（４）で回収した菌体を１５０ｍＭの塩化ナトリウム、２０ｍＭのイミダゾールを含む２０ｍＭのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）に５ｍＬ／１ｇ（菌体）となるように懸濁後、超音波発生装置（インソネーター２０１Ｍ［久保田商事社製］）を用いて、８℃で約１０分間、約１５０Ｗの出力で菌体を破砕した。菌体破砕液は４℃で２０分間、８０００ｒｐｍの遠心分離を２回行ない、上清を回収した。

【００５４】
（６）（５）で得られた上清を、あらかじめ１５０ｍＭの塩化ナトリウムおよび２０ｍＭのイミダゾールを含むトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）（以下、「平衡化液Ｂ」とも表記）で平衡化した、Ｎｉ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　６　Ｆａｓｔ　Ｆｌｏｗ（サイティバ社製）５０ｍＬを充填したＸＫ２６／２０カラム（サイティバ社製）にアプライした。平衡化液Ｂで洗浄後、０．５Ｍのイミダゾールおよび１５０ｍＭの塩化ナトリウムを含む２０ｍＭのトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．４）で溶出した。
【００５５】
（７）（６）で得た溶出液を、１５０ｍＭの塩化ナトリウムを含む２０ｍＭのトリス緩衝液（ｐＨ７．４）で透析することで、ＡＡＶ吸着剤作製に必要な量のＡＶＲ１０ｓタンパク質を調製した。
【００５６】
実施例３　ＡＡＶ吸着剤の作製
（１）不溶性担体として分離剤用親水性ビニルポリマー（東ソー社製：トヨパール）を用意し、当該ポリマー表面のヒドロキシ基に化学修飾を施すことでヨードアセトアミド基を導入した担体を調製した。
【００５７】
（２）（１）で調製した担体７ｇ（湿重量）に、実施例２で調製したＡＶＲ１０ｓを１４ｍｇおよび還元剤として終濃度０．３ｍＭのＴＣＥＰ（Ｔｒｉｓ（２－ＣａｒｂｏｘｙＥｔｈｙｌ）Ｐｈｏｓｐｈｉｎｅ）を加え、ｐＨ８．１、２５℃の条件で３時間振とうすることで反応させた。これによりＡＶＲ１０ｓを固定化したＡＡＶ吸着剤であるＡＶＲ１０ｓ固定化ゲルを調製した。
【００５８】
実施例４　ＡＡＶ吸着剤を用いたキメラＡＡＶ分析（その１）
（１）実施例３で調製したＡＶＲ１０ｓ固定化ゲル１．２５ｍＬを、ステンレス製空カラム（φ４．６ｍｍ×７５ｍｍ、東ソー社製）に充填し、カラムを作製した（ＡＶＲ１０ｓカラムと命名）。
【００５９】
（２）（１）で作製したＡＡＶＲカラムを、ＨＰＬＣ　Ｍ４０Ａ（島津製作所社製）に接続し、５０ｍＭの塩化ナトリウムおよび１０ｍＭの酢酸ナトリウムを含む１０ｍＭのグリシン緩衝液（ｐＨ４．５）（以下、「平衡化液Ｃ」とも表記）で平衡化した。
【００６０】
（３）実施例１で得られたＡＡＶＸ－ＥＧＦＰ溶液（（Ａ）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰ溶液、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液、（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液、（Ｄ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液）を、それぞれ１．０×10^{12}ｃｐ／ｍＬ（ｃｐはＡＡＶの粒子数を示す。以下同じ）となるよう希釈した。
【００６１】
（４）（２）で平衡化したカラムに（３）で調製した希釈液を０．１ｍＬアプライした。
【００６２】
（５）平衡化液Ｃを用いて流速０．５ｍＬ／分で１０分間洗浄後、５０ｍＭの塩化カルシウムおよび１０ｍＭの酢酸ナトリウムを含む１０ｍＭのグリシン緩衝液（ｐＨ２．０）（以下、「溶出液Ａ」とも表記）と平衡化液Ｃとを用いて、６０分間で溶出液Ａ濃度が０％から１００％になるリニアグラジエントとなるよう、ＡＶＲ１０ｓカラムに送液した（流速０．５ｍＬ／分）。リニアグラジエント終了後は、溶出液Ａを３分間送液した後、再び平衡化液ＣをＡＶＲ１０ｓカラムに送液し、再平衡化した。
【００６３】
（６）カラムに充填したＡＡＶ吸着剤（ＡＶＲ１０ｓ固定化ゲル）より溶出したＡＡＶＸ－ＥＧＦＰを、２８０ｎｍの励起光に対する３５０ｎｍの蛍光強度で検出した。

【００６４】
得られたクロマトパターンを図１に示す。いずれの溶液のクロマトパターンも単一ピークを示した。さらに（Ｄ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰのピーク溶出時間は（Ａ）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰのピーク溶出時間と（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰのピーク溶出時間との間の時間となり（図１［ａ］）、（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰのピーク溶出時間は（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰのピーク溶出時間と（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰのピーク溶出時間との間の時間となった（図１［ｂ］）。図１に示す結果は、ＡＡＶ１／ＡＡＶ２がＡＡＶ１とＡＡＶ２との中間の性質を有している事実、およびＡＡＶ２／ＡＡＶ５がＡＡＶ２とＡＡＶ５との中間の性質を有している事実をそれぞれ反映した結果である。

【００６５】
比較例１　ゲルろ過カラムによるＡＡＶ分析
（１）ゲルろ過カラムであるＴＳＫｇｅｌ　Ｇ５０００ＰＷＸＬ（東ソー社製）を、ＨＰＬＣ　Ｍ４０Ａ（島津製作所社製）に接続し、０．０１％（ｗ／ｖ）のＴｗｅｅｎ　２０（商品名）、０．０１％（ｗ／ｖ）のＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８（商品名）および５００ｍＭの塩化ナトリウムを含む５０ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．０）（以下、「平衡化液Ｄ」とも表記する）で平衡化した。

【００６６】
（２）実施例１で得られたＡＡＶＸ－ＥＧＦＰ溶液のうち、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液、（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液を、それぞれ１．０×10^{11}ｃｐ／ｍＬとなるよう希釈した。

【００６７】
（３）（１）で平衡化したカラムに（２）で調製した希釈液を０．２ｍＬアプライした。

【００６８】
（４）平衡化液Ｄを用いて流速０．５ｍＬ／分で２２分間、ＡＶＲ１０ｓカラムに送液し、当該カラムから溶出したＡＡＶＸ－ＥＧＦＰを、２８０ｎｍの励起光に対する３５０ｎｍの蛍光強度で検出した。

【００６９】
得られたクロマトパターンを図２に示す。いずれの溶液のクロマトパターンも単一ピーク、かつピーク溶出時間が８分付近にあることから、ゲルろ過分析では、複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶを、単一の血清型のＡＡＶとは異なる性質として分析することが困難なことがわかる。

【００７０】
比較例２　動的光散乱法（ＤＬＳ）によるＡＡＶ分析
（１）実施例１で得られたＡＡＶＸ－ＥＧＦＰ溶液（（Ａ）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰ溶液［濃度：８．７×10^{12}ｃｐ／ｍＬ］、（Ｂ）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液［濃度：１．０×10^{12}ｃｐ／ｍＬ］、（Ｃ）ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液［濃度：１．０×10^{12}ｃｐ／ｍＬ］、（Ｄ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液［濃度：３．６×10^{12}ｃｐ／ｍＬ］および（Ｅ）ＡＡＶ２／ＡＡＶ５－ＥＧＦＰ溶液［濃度：６．９×10^{11}ｃｐ／ｍＬ］）について、ゼータサイザーＵｌｔｒａ（Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｐａｎａｌｙｔｉｃａｌ社製）を用いて動的光散乱を測定することで、各溶液中に含まれるＡＡＶＸ－ＥＧＦＰの粒子径を求めた。

【００７１】
得られた粒子径分布を図３に示す。いずれの溶液の粒子径分布も単一ピーク、かつピーク粒径が２５ｎｍ付近にあることから、ＤＬＳでは、複数の血清型の特徴を有したキメラＡＡＶを、単一の血清型のＡＡＶとは異なる性質として分析することが困難なことがわかる。

【００７２】
実施例５　ＡＡＶ吸着剤を用いたキメラＡＡＶ分析（その２）
ＡＶＲ１０ｓカラムにアプライするＡＡＶＸ－ＥＧＦＰ溶液を、下記（α）から（η）

に示すいずれかの溶液０．１ｍＬとした他は、実施例４と同様な方法でＡＡＶＸ－ＥＧＦＰを分析した。
（α）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰ溶液（濃度：１．０×１０^{12}ｃｐ／ｍＬ）
（β）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液（濃度：１．０×１０^{12}ｃｐ／ｍＬ）
（γ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰ溶液（濃度：１．０×１０^{12}ｃｐ／ｍＬ）
（δ）（α）８０％と（β）２０％との混合溶液
（ε）（α）６０％と（β）４０％との混合溶液
（ζ）（α）４０％と（β）６０％との混合溶液
（η）（α）２０％と（β）８０％との混合溶液

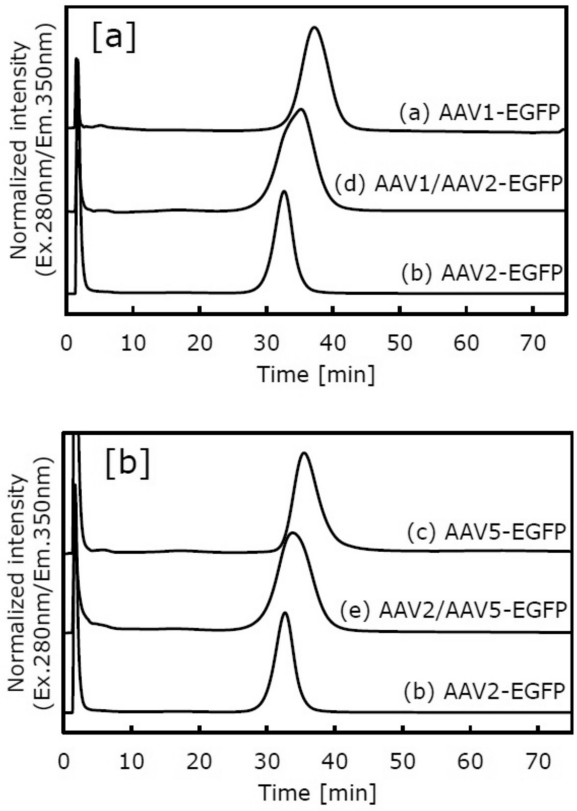
得られたクロマトパターンを図４に示す。（α）、（β）および（γ）の結果は、実施例４と同様、単一ピーク、かつ（γ）ＡＡＶ１／ＡＡＶ２－ＥＧＦＰのピーク溶出時間が（α）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰのピーク溶出時間と（β）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰのピーク溶出時間との間の時間となった。一方、（δ）、（ε）、（ζ）および（η）（すなわちＡＡＶ１－ＥＧＦＰとＡＡＶ２－ＥＧＦＰとの混合物）のクロマトパターンには（α）ＡＡＶ１－ＥＧＦＰに相当するピークと（β）ＡＡＶ２－ＥＧＦＰに相当するピークの計２本現れ、かつこれらピーク高さは混合比をほぼ反映していた。

【００７３】

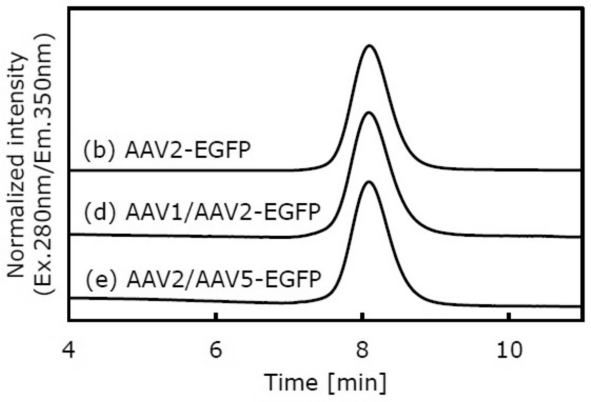
以上の結果から、ＡＡＶ吸着剤を充填したカラムを用いることで、単一血清型のＡＡＶと、異なる単一血清型のＡＡＶの混合物と、キメラＡＡＶとを、それらの性質に基づき分析できることがわかる。

【図面】

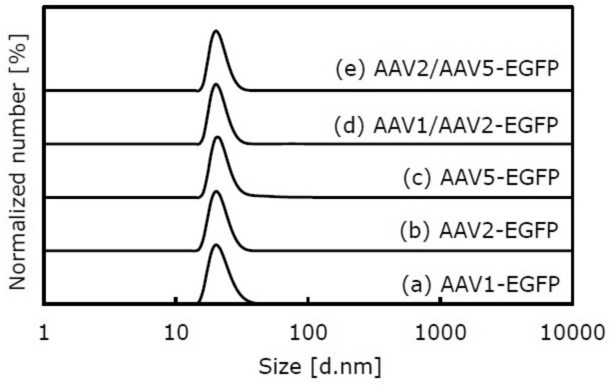
【図１】



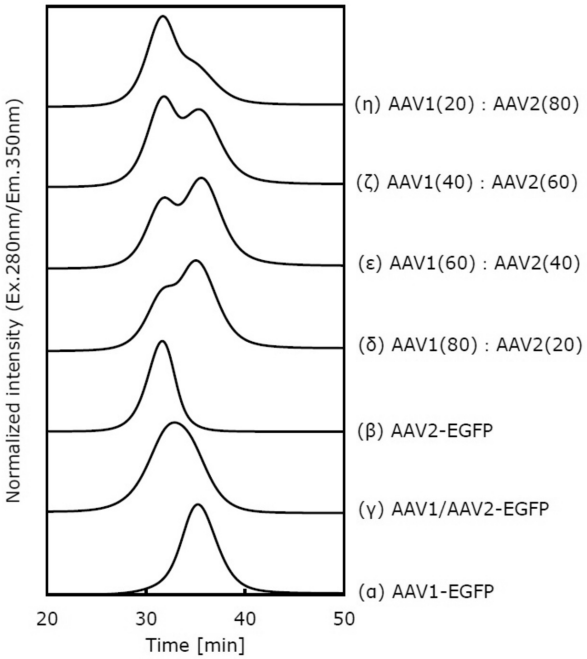
【図２】



【図３】



【図４】



【配列表】

2023079984000001.app

フロントページの続き

Ｆターム（参考）　4H045　AA10 AA30 BA09 CA40 DA50 EA20 FA74