

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19560763  
 研究課題名 (和文) ソフト水熱プロセスによる RNase の不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究  
 研究課題名 (英文) Irreversible thermoinactivation of ribonuclease-A by soft-hydrothermal processing  
 研究代表者  
 宮本 徹 (MIYAMOTO TORU)  
 東北大学・大学院医学系研究科・教育研究支援者  
 研究者番号:10443988

研究成果の概要：分子生物学的コンタミネーションである RNase (リボヌクレアーゼ, RNA 分解酵素)は、熱などに対して非常に安定で破壊されず、雑菌混入を防ぐために行われる通常のオートクレーブ滅菌 (121°C、0.2MPa、20min) 処理では、器具や溶液中の RNase を完全に除くことはできない。本研究の成果は、ソフト水熱プロセスにより水蒸気密度を変化させ、121°C、0.2MPa、20min でも不可逆的に失活することを示しそのメカニズムを解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・反応工学・プロセスシステム

キーワード：新規反応場・ソフト水熱プロセス

#### 1. 研究開始当初の背景

分子生物学的コンタミネーションである RNase (ribonuclease: RNA 分解酵素)は、熱などに対して非常に安定で破壊されにくく、各種微生物の混入を防ぐために行われる通常のオートクレーブ滅菌 (飽和蒸気、120°C、0.2MPa、15min) 処理では、器具や溶液中の RNase を完全に除くことはできないとされている。著者らは、温度、圧力、および蒸気飽和度 $\uparrow$ を変えることにより多彩な反応系を制御できる水熱プロセスの研究により、130°C以下の非常にマイルドな水熱プロセス (以下、ソフト水熱プロセスと記す。)により、RNase の不活化ができる可能性を示唆し

た。

また、エンドトキシン (細胞内毒素) は、複雑で多岐にわたる生理活性を示す物質であり、極めて微量で強い発熱活性を示す。人工透析治療および医薬品等の製造過程などでは、エンドトキシンの混入はあってはならないことであり、品質管理上、その検出と除去に厳重な注意が払われている。エンドトキシンは、強い耐熱性を有しその不活性化には過酷な条件下での加熱処理 (Dry-heat, 250°C、30min) が必要である。乾熱法は確実に脱パイロジェン処理を行うことが可能であるが、この処理法では金属やガラス製等の耐熱性容器・器具類にしか適用できない。

申請者らはエンドトキシンの不活化条件として高飽和水蒸気条件下で処理を行うことに着目し、従来の方法では不活化に強力な加熱処理が必要であったのに比べて、圧力や温度に関してマイルドな条件下（以下、「ソフト水熱プロセス」という。）において、十分に耐熱性酵素やエンドトキシンを不活化しうることを示唆した。

## 2. 研究の目的

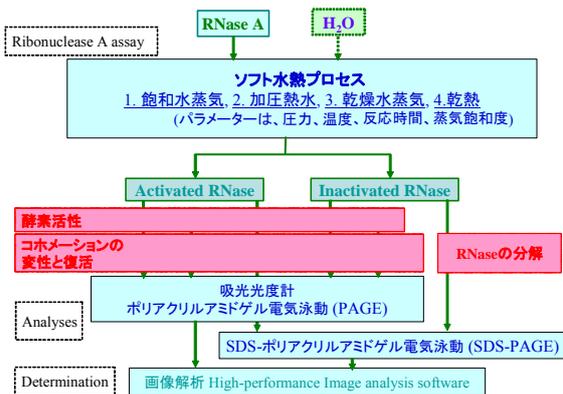
本研究の目的は、ソフト水熱プロセスによる新たなオートクレーブ滅菌処理のメカニズムを明らかにし、140°C以下の比較的低温領域で器具や溶液中の混入微生物の滅菌はもとより RNase の不活化の可能性を示し、さらに器具や溶液中の Endotoxin を不活性化できる新しい滅菌法を開発することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) RNase の不活化

予備実験として通常のオートクレーブ滅菌（飽和蒸気、121°C、0.2MPa、20min）と乾熱滅菌（乾熱、180°C、常圧、60min）処理での RNase の不活化の評価を行う。次に基礎実験として、バッチ式ミニオートクレーブによる平衡系により、それぞれ温度、圧力、蒸気飽和度を変化させることにより、RNase の不活化を考察し、これらの反応メカニズムを解明した。

ソフト水熱プロセス領域での RNase の不活化の評価は、SDS-PAGE、PAGE 電気泳動および分光光度計で分析を行い、RNase の不活化の効果を明らかにした。



実験手順を図 1 に示す。

図 1 実験方法

RNase A (10mg/ml) 10 $\mu$ l をスクリュウキャップ付のバイアル(5ml)に滴下し、自然乾燥させた後に所定条件の水熱処理を行った。水熱処理後の RNase は 200 $\mu$ l (0.5mg/ml)になるように蒸留水を加え、よく攪拌し、10 $\mu$ l (RNase A 5 $\mu$ g) を蒸留水

(DW) 990 $\mu$ l に加え RNase A 濃度 5 $\mu$ g/ml として、10 $\mu$ l (0.05 $\mu$ g) を 1mg/ml RNA 10 $\mu$ l (10 $\mu$ g) と混合した。37°C で 60 分間インキュベート後、同量の変性 GLB と混合して 99°C、2 分間加熱し、水中に 2 分置き、それらの試料 10 $\mu$ l を Polyacrylamide gel にアプライし、電気泳動 (PAGE) し、その後多機能ゲル分析装置で定量した。水熱処理条件は、下記の通りである。

1. 通常のオートクレーブ滅菌 121°C, 0.2MPa, 20min.
2. 乾熱滅菌 180°C, 60min.
3. 加圧熱水 (蒸気飽和度 100%). 110°C (0.14MPa -30min), 120°C (0.2MPa-30min, 60min, 90min, 120min)
4. 飽和水蒸気 (蒸気飽和度 100%). 110°C (0.14MPa -30min), 120°C (0.2MPa-30min, 60min, 90min, 120min)
5. 乾燥水蒸気 (蒸気飽和度 50%). 110°C (0.14MPa -30min), 120°C (0.2MPa-30min, 60min, 90min, 120min)
6. それぞれの乾熱処理 (蒸気飽和度 0%).
7. 流通式実証機(蒸気飽和度 100%). 105°C (0.12MPa), 110°C (0.14MPa), 121°C (0.2MPa) -20min

蒸気飽和度: Steam saturation ratio (%) は次式による。

$$\text{Steam saturation ratio (\%)} = \{ \text{Steam density (kg/m}^3\text{)} / \text{Saturated steam density (kg/m}^3\text{)} \} \times 100$$

### (2) エンドトキシンの不活化

USP RSE Escherichia coli O113:H10 (2000EU/ml) 10 $\mu$ l をスクリュウキャップ付のバイアル(5ml)に滴下し、安全キャビネット内で 24 時間自然乾燥させた後に蒸留水 (Endotoxin Free Water) を滴下し vial 内を所定の蒸気飽和度として、所定条件の水熱処理を行った。水熱処理後の Endotoxin は分析範囲になるように蒸留水 (Endotoxin Free Water) で希釈し vortex mixer でよく攪拌した後に、200 $\mu$ l を Endotoxin Buffer 200 $\mu$ l で溶解した ES-24S (Seikagaku Biobusiness) に添加し 2sec 攪拌後、EG Reader SV-12 (Seikagaku Biobusiness) で定量した。

## 4. 研究成果

### (1) RNase の不活化

図 2, 3 に示す様に RNase は、オートクレーブ滅菌 (121°C, 20min) で直後は失活しているが、時間経過と共に酵素活性を回復した。また、乾熱滅菌 (180°C, 60min) でも直後は失活するが、時間経過と共に酵素活性を回復した。そして、RNase の酵素活性の不活化は、温度が低く滅菌時間の短いオートクレーブ滅菌のほうが乾熱滅菌より効果が高い事が判った。

これは、水の関与が重要なことを表している。次に図4に示す様にRNaseの酵素活性は、オートクレーブ滅菌(121°C, 20min)の条件下でも蒸気飽和度を高くする事により不可逆的に失活する。また、RNaseの酵素活性の可逆的熱失活と不可逆的熱失活のしきい値は、蒸気飽和度100%で、110°C, 20minと言える。さらに図5に示す様にRNaseの重量は、処理温度の上昇と共に減少することが判った。以上より、RNase不活化のメカニズムは、蒸気飽和度の変化により、RNaseが立体配座において、蒸気飽和度が低いときはスクランブルな折りたたみとS-S結合の組替による修復ができる可逆的熱失活が起こり、一方蒸気飽和度が高くなるとペプチド結合の加水分解による不可逆的熱失活が起ることを明らかにした。

つぎに、プロトタイプの流れ式実証機によるRNaseの酵素活性を調べた。

図6, 7に示す様に、このメカニズムによる流れ式実証機により、110°C, 0.14MPa, 20minでも不可逆的に熱失活することをRNaseの酵素活性とRNaseの分解の両面から証明した。

本研究成果のソフト水熱プロセスによる新しい滅菌法は、RNaseの不活化はもとよりエンドトキシンやプリオン等の異型蛋白質の不活化にも応用することが期待できる。

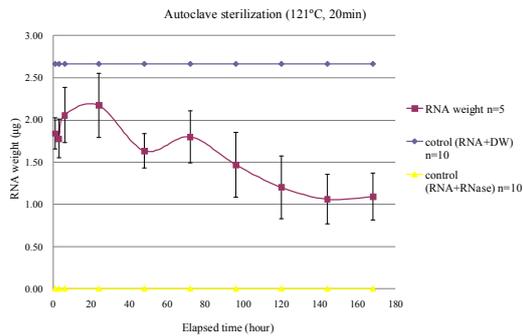


図2 RNase-Aの不活化(Autoclave)

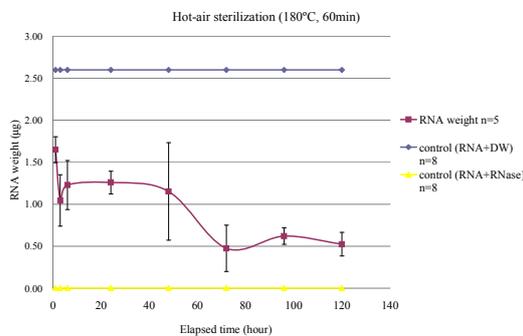


図3 RNase-Aの不活化(Hot-air sterilization)

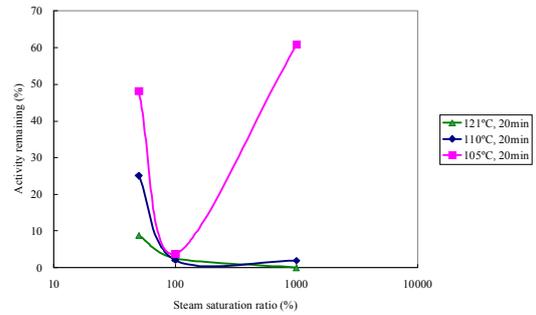


図4 RNase-Aの不活化(Soft-hydrothermal processing)

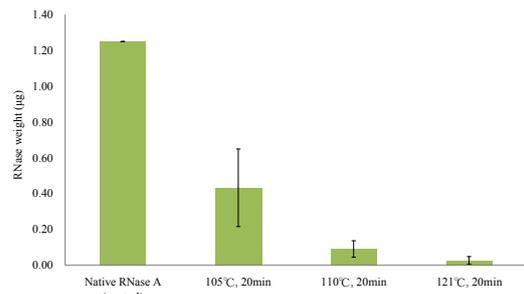


図5 RNase-Aの重量変化 (Soft-hydrothermal processing)

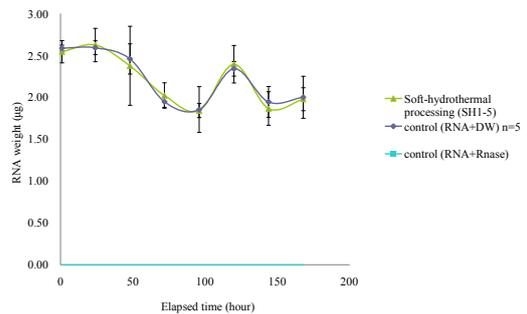


図6 RNase-Aの不活化(Flow-type RNase inactivation apparatus)



図7 RNase-AのSDS-PAGE (Flow-type RNase inactivation apparatus)

(2) エンドトキシンの不活化

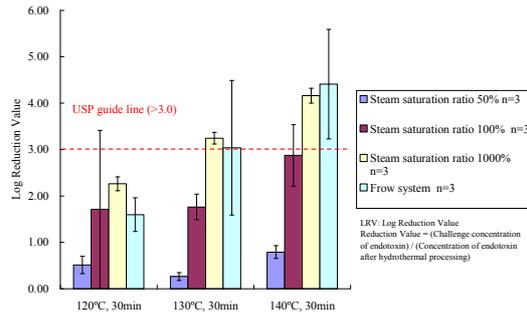


図 8 Endotoxin の不活化(Soft-hydrothermal processing 120-140°C, 30min)

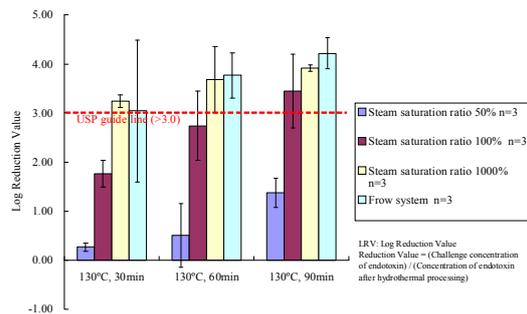


図 9 Endotoxin の不活化(Soft-hydrothermal processing 130°C, 30-90 min)

Endotoxin の毒素活性は、高温高压水蒸気 130°C, 60min ないし 140°C, 30min の条件下の密閉系で蒸気飽和度を充分高くすることにより不活性化する(図 8, 9)。また、同条件下の流通系でも不活性化する。さらに、Endotoxin フリー水は、同条件下の高温高压反応器で製造することが出来ることを示した。すなわち、Endotoxin の不活性化の境界条件は、高蒸気飽和度下で 130°C, 60min ないし 140°C, 30min であり、ソフト水熱プロセスのもとで蒸気飽和度を制御することにより劇的に変化することを示した(表 1)。これは、蒸気飽和度の変化により、リポド A の乖離分散が進行し、リポド A の加水分解により、完全にエンドトキシンが不活性化すると考えられる。ソフト水熱プロセスにより従来不活化処理が十分でなかったエンドトキシンを効果的に不活化することができる。また、反応媒体は、水のみであり環境に負荷をもたらす化学物質を一切使用しておらず、安全かつ簡便な不活化方法である。

表 1 ソフト水熱プロセスによる Endotoxin の不活化

Steam saturation ratio	Concentration of endotoxin (EU/ml)			
	50%	100%	1000%	Flow system
120°C, 30min	616.0 ± 321.2 <sup>a</sup>	289.5 ± 368.2	10.7 ± 4.6	57.1 ± 38.8
130°C, 30min	1013.3 ± 164.8	37.6 ± 28.1	1.1 ± 0.2	10.5 ± 14.6
130°C, 60min	677.3 ± 534.9	4.4 ± 4.2	0.6 ± 0.9	0.3 ± 0.4
130°C, 90min	66.7 ± 46.9	1.3 ± 2.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1
140°C, 30min	309.3 ± 100.0	5.6 ± 8.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.4

<sup>a</sup> The challenge concentration of endotoxin from E. coli O113:H10 was 2000 EU/ml. Results are given as means ± SD (n = 3).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Toru Miyamoto, Shinya Okano, Noriyuki Kasai, Irreversible thermoinactivation of ribonuclease-A by soft-hydrothermal processing, Biotechnology Progress, (accept), 2009 査読有
- ② Toru Miyamoto, Shinya Okano, Noriyuki Kasai, Inactivation of E. coli endotoxin by soft-hydrothermal processing, Applied and Environmental Microbiology, (accept), 2009 査読有
- ③ 宮本 徹, 岡野 伸哉, 笠井 憲雪, ソフト水熱プロセスによるエンドトキシンの不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究、医療機器学、79(4)、72-72、2009. 査読無
- ④ 宮本 徹, 岡野 伸哉, 笠井 憲雪, ソフト水熱プロセスによる RNase の不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究、第 56 回日本実験動物学会総会 講演要旨集、242-242、2009. 査読無
- ⑤ 宮本 徹, 岡野 伸哉, 笠井 憲雪, ソフト水熱プロセスによる RNase の不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究、医療機器学、78(10)、692-694、2008. 査読無
- ⑥ 宮本 徹, 岡野 伸哉, 笠井 憲雪, ソフト水熱プロセスによる RNase の不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究、医療機器学、78(4)、299-299、2008. 査読無
- ⑦ 宮本 徹, 岡野 伸哉, 笠井 憲雪, ソフト水熱プロセスによる RNase の不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究、日本実験動物科学技術 2008 講演要旨集、184-184、2008. 査読無

[学会発表] (計 4 件)

- ① 第 56 回日本実験動物学会総会、平成 21 年 5 月 15 日、大宮ソニックホール、発表者: 宮本徹、発表課題: ソフト水熱プロセスによるエンドトキシンの不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究
- ② 第 83 回日本医療機器学会大会、平成 21

年5月15日、パシフィコ横浜アネックスホール、発表者:宮本徹、発表課題:ソフト水熱プロセスによるエンドトキシンの不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究

- ③ 第83回日本医療機器学会大会、平成20年5月30日、東京国際フォーラム、発表者:宮本徹、発表課題:ソフト水熱プロセスによるRNaseの不活化と新しい滅菌法に関する研究
- ④ 第55回日本実験動物学会総会、平成20年5月15日、仙台国際センター、発表者:宮本徹、発表課題:ソフト水熱プロセスによるRNaseの不活化と新しい滅菌法の開発に関する研究

[産業財産権]

○出願状況(計 2件)

名称: タンパク質の不活化方法および不活化処理装置

発明者: 宮本 徹、笠井憲雪、岡野伸哉

権利者: 東北大学、前田製作所

種類: 特許

番号: 特願2008-089825

出願年月日: 平成20年3月31日

国内外の別: 国内

名称: エンドトキシンの不活化方法および不活化処理装置

発明者: 宮本 徹、笠井憲雪、岡野伸哉

権利者: 東北大学、前田製作所

種類: 特許

番号: 特願2008-250264

出願年月日: 平成20年9月29日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮本 徹(MIYAMOTO TORU)

東北大学・大学院医学系研究科・教育研究支援者

研究者番号:10443988

### (2) 連携研究者

笠井 憲雪(KASAI NORIYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:60001947

### (3) 連携研究者

岡野伸哉(OKANO SHINYA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号:20399992