

を自動化した装置を作製し、さらに本法が血液試料にも適用可能であることを示した（引用文献 4）。彼らの報告では、スクレイパー強制感染ハムスター（ $n = 18$ ）の血液各 20 μL を試料として、PMCA 法 140 サイクル（所要時間は約 3 日）を 2 回連続実施することによって 50 % の感度で、6 回連続実施することによって 89 % の感度で PrP^{Sc} を検出することが可能であった。一方、健康なハムスター（ $n = 12$ ）の血液を用いた場合には、陽性の結果は得られなかった。本法による PrP^{Sc} の検出感度は 20 fg/mL (4×10^5 分子/mL) であった。

Fujita らは、ヒト血漿にスパイクした PrP^{Sc} (263K 株) のウェスタンブロットでの検出に関して、試料の前処理方法を工夫することにより大量に共存する血漿蛋白質由来の非特異的妨害を大幅に減らして高感度化することに成功している（引用文献 5）。それによると、263K 株感染ハムスター脳から超遠心及び超音波処理して調製したスパイク用 PrP^{Sc} ミクロソーム画分をヒト血漿にスパイクしたものをウェスタンブロット検出用試料とする場合、プロテナーゼ K (PK) 処理の前に熱処理 (80 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間) を実施することによって PrP^{Sc} が特異的に検出できた。これは、試料中に大量に含まれる血漿蛋白質が熱処理により変性し、PK 感受性が高まるためと考えられている。従来の方法による検出感度は 670 LD_{50}/mL であったが、熱処理を行うことによって感度は約 5 倍向上し、133 LD_{50}/mL でも検出可能となった。

Grosset、Orser (米国 Adlyfe 社) らは、Soto らと同様に PrP^{Sc} が PrP^{C} を PrP^{Sc} に変換する性質、すなわち蛋白

質中の α -ヘリックス構造を β -シート構造に変換する性質を利用して、ハムスター脳乳剤中の微量の PrP^{Sc} を増幅して検出する方法を開発した (Grosset, A., *et al.* "Rapid presymptomatic detection of PrP^{Sc} via conformationally responsive palindromic PrP peptides." *Peptides* 26: 2193-2200 (2005))。この方法 (MPD 法; Misfolded Protein Diagnostic 法) の PMCA 法との相違点は、①試料に添加するものは PrP^{C} ではなく、 α -ヘリックス構造をもつ人工ペプチド (PrP アミノ酸配列のうち、動物種を超えて共通性が保存されている部分を基に合成) であること、②この人工ペプチドは両端に蛍光色素が結合されており、 PrP^{Sc} によってこのペプチドの α -ヘリックス構造が β -シート構造に変化すると、両端の蛍光色素が接近して励起 (試験液の色が緑から赤に変化) すること (なお、 β -シート構造をとった人工ペプチドには $\text{PrP}^{\text{Sc}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ 変換活性はない)、③このため、最終的な検出にはウェスタンブロットを用いず、蛍光定量によること、の 3 点である (図 4)。PMCA 法に対して本法では、①新たに PrP^{Sc} が生じることはないので、サイクルごとに PrP^{Sc} を分離し解離させる操作が省けること、②このため検査時間も 30 分~3 時間にまで短縮できること、③ウェスタンブロットを実施しないので PK 処理が不要であり、PK 処理による精度低下 (PrP^{Sc} が必ずしも完全に消化されないおそれがあること) が生じ得ないこと、のメリットがある。263K 株感染ハムスター脳乳剤を用いた検討では、従来の ELISA 及びウェスタンブロットで陽性となるのは感染 9 週以後であった一方、MPD 法では感染 3 週後 (臨床症状の発現前)

から PrP^{Sc} の検出が可能であった。

本法を利用した自動検査装置を開発中の米国 Adlyfe 社によれば、本法を用いて BSE 感染ウシ、スクレイピー感染ヒツジ及び強制感染ハムスター・サル・マウスの血清／血漿／白血球、並びに散発型クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の血漿からの PrP^{Sc} の検出に既に成功しているとのことである (引用文献 6、Adlyfe 社ホームページ)。また、同社によると、本法による検出感度は、市販されている従前の EILSA 等の 100 倍以上であり (2005 年 6 月 17 日付け「日経バイオテクノオンライン」記事)、BSE ウシ血液由来の試料を用いた検討では、偽陰性は 20 検体中 1 検体であった。

D. 考察

1. PrP^{Sc} クリアランス評価で使用するスパイク用病原体試料における PrP^{Sc} の重合度

ろ過による PrP^{Sc} の除去に関して、Silveira らの報告内容 (引用文献 2) も含めて公表文献に示されている除去効率を一覧にまとめて表 2 に示す。これによると、ろ過による PrP^{Sc} の除去効率には概ね次のような傾向が認められる。

- ① 蛋白質濃度が非常に高く、ろ過膜の目詰まりが起りやすいと考えられる場合 (表 2 中 引用文献 a) を除いては、孔径 100 nm 以上のろ過膜によるろ過では PrP^{Sc} の除去は期待できない。但し、精製 PrP^{Sc} をスパイク用病原体試料として高エタノール条件下でろ過を実施した場合には、精製 PrP^{Sc} が変性・凝集しやすいためか、他のスパイク用病原体試料を用いた場

合と比べて過大な RF が見積もられる (表 2 中 引用文献 b)。

- ② 孔径 40 ~ 75 nm のろ過膜によるろ過では、若干の PrP^{Sc} 除去効果が認められる。但し、ろ過時に界面活性剤 (1 % Sarkosyl) が共存する場合には、ろ過による除去効果は著しく低下する (引用文献 3、表 2 中 引用文献 f、h)。
- ③ ヒト PrP^{Sc}1 型に比べて、ヒト PrP^{Sc}2 型 (蛋白質の立体構造が 1 型とは異なり、PK 処理による切断部位が異なるもの) では蛋白質の重合度が高く、大きな重合体を形成していることから、ろ過による除去が 1 型より容易である (引用文献 3)。
- ④ 孔径 35 nm 以下のろ過膜によるろ過は PrP^{Sc} の除去に有効である。特に孔径 15 nm 以下のろ過膜を用いてのろ過は、1 % Sarkosyl 共存下でも PrP^{Sc} を有効に除去することが可能である (表 2 中 引用文献 h)。
- ⑤ 界面活性剤非共存の条件下、分画分子量 300 kDa のろ過膜を用いたろ過では PrP^{Sc} の除去効率は低いが (引用文献 2)、180 kDa 以下のろ過膜を用いる場合、有効な除去が期待できる (表 2 中 引用文献 c、i)。

これらの知見を引用文献 2 の結果 (図 1 ~ 2、表 1) と照らし合わせてみる。①に関して、孔径 100 nm のろ過膜により除去され得る PrP^{Sc} 重合体は、繊維構造をとっている FIFFF 画分 22 以後のものが大半とみられ、これを除くだけではろ液中に感染性は 1 % 以上残存する (ろ過工程における RF が 2 以上を達成するためには、ろ液中

の PrP^{Sc} 量が 1/100 以下となる必要がある)。②及び④に関して、孔径 35 nm のろ過膜によるろ過では FIFFF 画分 16 以後が、孔径 15 nm のろ過膜によるろ過では画分 7 以降がほとんど除去されると考えられる。画分 7 より前 (PrP^{Sc} 単量体～数個程度の重合体) には感染性がほとんどみられないことは、孔径 15 nm のろ過膜によるろ過が PrP^{Sc} の除去に有効であることと矛盾しない。また、孔径 35 nm のろ過膜によるろ過でも高い RF が得られていることは、通常の PrP^{Sc} クリアランス条件下ではろ過前液に Sarkosyl 等の界面活性剤が共存しておらず、1% SUS を含む条件で FIFFF が実施された引用文献 2 に比べて、画分 16 より前に分画されるような PrP^{Sc} 単量体～数十程度の重合体がろ過前液中に含まれている割合が少ないことを示唆しているものと考えられる。⑤に関して、分画分子量 300 kDa のろ過膜を用いたろ過では FIFFF 画分 9 より前の PrP^{Sc} を除去することができず、ろ液に 2% 程度の感染性が残存するが、分画分子量 180 kDa のろ過膜を用いた場合には、画分 7 以降の PrP^{Sc} 重合体を除去することが可能となり、PrP^{Sc} 除去に有効である。

以上のとおり、既に発表されているろ過工程での RF に関する報告内容 ①～⑤は、引用文献 2 で得られた知見と矛盾しておらず、医薬品等製造工程中のろ過工程で通常用いられる条件下 (界面活性剤非含有、超音波処理なし) では、孔径の小さなろ過膜 (例えば、15 nm) によるろ過が PrP^{Sc} 除去に有効である。

2. 実生産規模を適切に反映したクリアランス評価用スケールダウン試験

系の設計

<ろ過工程>

設計したスケールダウン試験系が実生産工程を適切に反映しているかどうかの確認は、PrP^{Sc} クリアランス試験が設計どおり行えたか、得られたろ液が実生産工程と同等の品質のものであるか等を確認することによって行う (表 3)。

<クロマトグラフィー工程>

設計したスケールダウン試験系が実生産工程を適切に反映しているかどうかの確認は、PrP^{Sc} クリアランス試験が設計どおり行えたか、得られた溶出液が実生産工程と同等の品質のものであるか等を確認することによって行う (表 4)。

3. 血液中に存在する PrP^{Sc} の検出方法

現在までに輸血により CJD が感染したと考えられる症例が英国で 3 例報告されているにもかかわらず、血液中に微量存在する PrP^{Sc} を直接検出するための試験方法として、これまでの方法は感度・精度や再現性に欠け、輸血用血液製剤や製造工程で使用されるウシ血清の PrP^{Sc} 否定試験に実際に応用するには実用性の面で問題があった。しかし、本年度相次いで報告された新たな試験方法は (引用文献 4～6)、詳細なデータが現時点では明らかにされていなかったり実用化の段階にはまだ至っていないものの、医薬品等の PrP^{Sc} 安全性を確保する新しい方策の候補として、今後の開発動向に十分注目する必要がある。但し、強制感染動物モデルの血液を試料とした試験系の評価においては、PrP^{Sc} を脳内に接種する際に PrP^{Sc} が血液中に漏出するお

それがあることに注意しなければならない。

E. 結論

① 本年度発表された Silveira ら及び Kobayashi らの報告を踏まえて、既に発表されているろ過工程での RF に関する報告内容を精査した結果、ろ過による PrP^{Sc} の除去効率には概ね次のような傾向が認められた。

(i) 蛋白質濃度が非常に高く、ろ過膜の目詰まりが起りやすいと考えられる場合を除いては、孔径 100 nm 以上のろ過膜によるろ過では PrP^{Sc} の除去は期待できない。但し、精製 PrP^{Sc} をスパイク用病原体試料として高エタノール条件下でろ過を実施した場合には、精製 PrP^{Sc} が変性・凝集しやすいためか、他のスパイク用病原体試料を用いた場合と比べて過大な RF が見積もられる。

(ii) 孔径 40～75 nm のろ過膜によるろ過では、若干の PrP^{Sc} 除去効果が認められる。但し、ろ過時に界面活性剤（1 % Sarkosyl）が共存する場合には、ろ過による除去効果は著しく低下する。

(iii) ヒト PrP^{Sc}1 型に比べて、ヒト PrP^{Sc}2 型では蛋白質の重合度が高く、大きな重合体を形成していることから、ろ過による除去が 1 型より容易である。

(iv) 孔径 35 nm 以下のろ過膜によるろ過は PrP^{Sc} の除去に有効である。特に孔径 15 nm 以下のろ過膜を用いてのろ過は、1 % Sarkosyl 共存下でも PrP^{Sc} を有効に除去することが可能である。

(v) 界面活性剤非共存の条件下、分画分子量 300 kDa のろ過膜を用いたろ

過では PrP^{Sc} の除去効率は低い、180 kDa 以下のろ過膜を用いる場合、有効な除去が期待できる。

(vi) 以上より、医薬品等製造工程中のろ過工程で通常用いられる条件下（界面活性剤非含有、超音波処理なし）では、孔径の小さなろ過膜（例えば、15 nm）によるろ過が PrP^{Sc} 除去に有効である。

② EMEA から平成 16 年 10 月に示された血漿分画製剤の製造における PrP^{Sc} クリアランス評価のための指針に基づき、ウイルス除去膜を用いたろ過工程及びクロマトグラフィー工程を例として、実生産規模を適切に反映したクリアランス評価用スケールダウン試験系を設計した。

③ 現在までに輸血により CJD が感染したと考えられる症例が英国で 3 例報告されているにもかかわらず、血液中に微量存在する PrP^{Sc} を直接検出するための試験方法として、これまでの方法は感度・精度や再現性に欠け、輸血用血液製剤や製造工程で使用されるウシ血清の PrP^{Sc} 否定試験に実際に応用するには実用性の面で問題があった。しかし、本年度 Castilla ら、Fujita ら及び Orser らにより相次いで報告された新たな試験方法は、詳細なデータが現時点では明らかにされていなかったり実用化の段階にはまだ至っていないものの、医薬品等の PrP^{Sc} 安全性を確保する新しい方策の候補として、今後の開発動向に十分注目する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

本年度は該当なし。

本年度は該当なし。

2. 学会発表

本年度は該当なし。

2. 実用新案登録

本年度は該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

3. その他

本年度は該当なし。

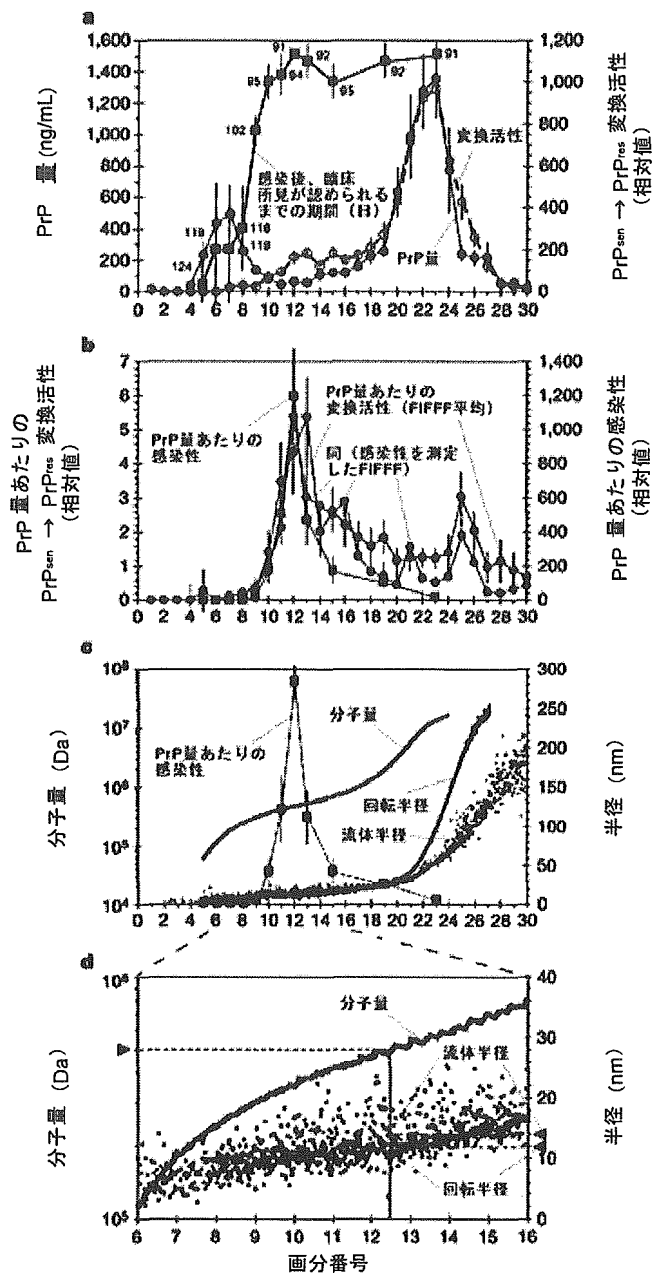


図1 PrP^{sc}単量体/重合体混合物のFIFFF分析結果(引用文献2の図1を改変)

- (a) 抗PrPモノクローナル抗体3F4を用いたドットイムノブロット法により各画分1 mLあたりのPrP量を測定した(4回のFIFFFから $n = 3 \sim 16$)。また、固相法により各画分のPrP^{sen} → PrP^{res}変換活性を(4回のFIFFFから $n = 9$)、ハムスターの脳に感染させてから臨床所見が認められるまでの期間を観察することにより各画分の感染性を測定した(1回のFIFFFから $n = 4$ (動物数))。
- (b) PrP量あたりで換算した各画分のPrP^{sen} → PrP^{res}変換活性(4回のFIFFFでの平均、感染性を測定した1回のFIFFFでのデータ)及び感染性。
- (c) 流路の光散乱をモニターした結果から得られた分子量($n = 3$)、回転半径(Radius of gyration; r_g , $n = 4$)及び流体半径(Hydrodynamic radius; r_h , $n = 4$)。(b)で示したPrP量あたりの感染性を追記した。
- (d) (c)の画分番号6~16の範囲の拡大図。

FIFFF 画分番号	分子量 (kDa) [PrP 数換算] *	回転半径 (z 平均) (nm)	流体半径 (z 平均) (nm)	回転半径 / 流体半径	流体半径 / 流体半径 ρ
6 (単量体～数個程度の PrP の重合体)	155 ± 62 [4 ~ 7 量体]	N.D.	5.0 ± 1.7	N.D.	N.D.
12 (球状粒子～小さな非晶質構造、 PrP 量あたりの感染性 / 変換活性が最大の画分)	620 ± 331 [14 ~ 28 量体]	12.1 ± 2.0	13.5 ± 0.9	0.90	
21 (短い小繊維構造)	7,770 ± 4,270 [170 ~ 361 量体]	51.9 ± 11.5	37.4 ± 6.7	1.38	
26 (長い小繊維構造)	15,220 ± 9,210 [333 ~ 707 量体]	230.1 ± 46.3	90.4 ± 8.1	2.35	

表 1 FIFFF で分画した PrP^{Sc} 単量体 / 重合体画分の生物物理学的パラメータ (引用文献 2 の表 1 を改変)

4 回の FIFFF での平均値 ± 標準偏差を示す。N.D. = not determined.

* 分子量 (平均値) の 47 ~ 100 % が PrP に由来するという仮定の下、PrP 単量体の分子量を 21.5 kDa として求めた値。

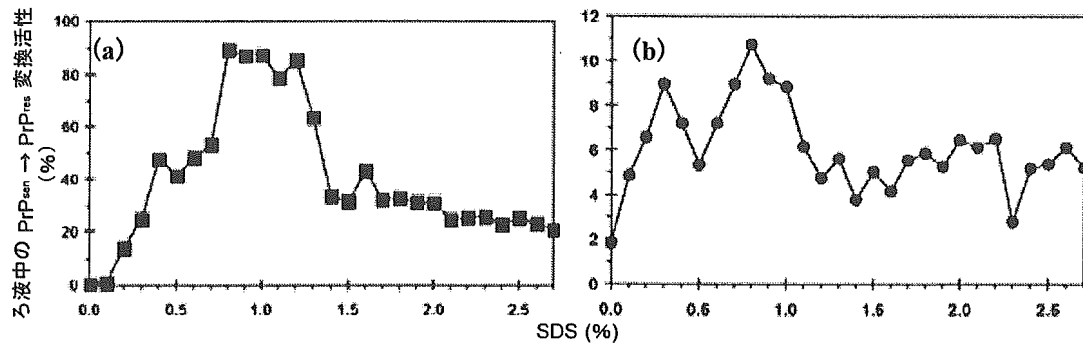


図2 0～2.7% SDS処理を行った精製 PrP^{sen} のろ過 (引用文献2の補遺図1を改変)

(a)・(b)

精製 PrP^{sen} を0～2.7% SDSで37℃、1時間処理し(超音波処理は実施せず)、(a)孔径0.2 μm又は(b)分画分子量300 kDaのろ過膜でろ過した。そのろ液について固相法により PrP^{sen} → PrP^{res} 変換活性を測定した。

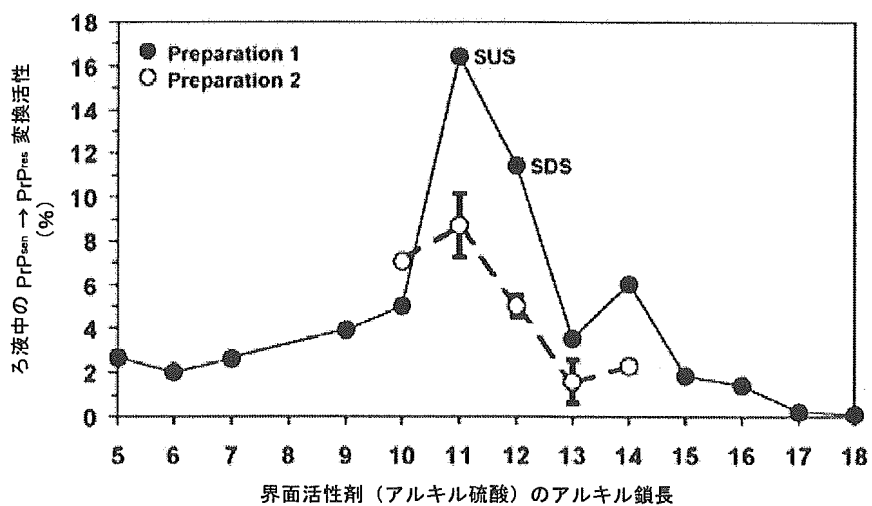


図3 1%アルキル硫酸処理を行った精製 PrP^{sen} のろ過 (引用文献2の補遺図2を改変)

精製 PrP^{sen} を1%アルキル硫酸で37℃、1時間処理し(超音波処理は実施せず)、分画分子量300 kDaのろ過膜でろ過した。そのろ液について固相法により PrP^{sen} → PrP^{res} 変換活性を測定した。

表 2 ろ過による PrP^{sc} の除去効率 (公表文献に基づく)

スパイク用病原体試料の種類	超音波処理	スパイク用病原体溶液中の蛋白質	スパイク用病原体溶液中の可溶化剤*	ろ過膜の種類 (概略の孔径)	クリアランス指数 RF	アッセイ方法	引用文献番号
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	Cohn 分画 Sup. I + III (12% エタノール)	-	AP20 (8.0 ~ 0.8 μm)	< 1	抗体	a
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	60 mg/mL Cohn 分画 Fr. II 再懸濁液	-	K200P (2 μm)	> 2.8	抗体	a
Sc237K 株感染ハムスター 脳乳剤	-	Cohn 分画 Sup. I (8% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0.1	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター 脳乳剤	-	Cohn 分画 Sup. V (38% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0.9	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	Cohn 分画 Sup. I (8% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	Cohn 分画 Sup. V (38% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	1.1	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター脳 カベオラ様ドメイン (CLDs)	-	Cohn 分画 Sup. I (8% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター脳 CLDs	-	Cohn 分画 Sup. V (38% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0.9	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{sc}	-	Cohn 分画 Sup. I (8% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	0	抗体	b
Sc237K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{sc}	-	Cohn 分画 Sup. V (38% エタノール)	-	Supra P80 (3.0 ~ 1.0 μm)	2.4	抗体	b
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	85 mg/mL Cohn 分画 Fr. V 再懸濁液	-	KS80P (0.8 μm)	> 4.9	抗体	a
263K 株感染ハムスター脳乳剤 (孔径 0.22 μm 膜ろ過)	+	0.5 % Rh 免疫グロブリン	< 1/500 × 0.1 % リゾレン チン**、20 μg/g Tween 80	Millex (0.22 μm)	0	抗体	c
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	45 mg/mL 人血清アルブミン	-	Sterivex (0.22 μm)	< 1	抗体	a
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	-	-	PVDF 膜 (0.22 μm)	< 1	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	+	-	-	PVDF 膜 (0.22 μm)	< 1	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	0.43 mg/mL 血液凝固第 VIII 因子	-	Durapore (0.45 μm) → Durapore (0.22 μm)	1.0	抗体	a
263K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{sc}	-	-	-	Nanosep (0.2 μm)	> 1	変換 活性	2
263K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{sc}	-	-	1 % SDS	Nanosep 膜 (0.2 μm)	< 1	変換 活性	2
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	-	-	PVDF 膜 (100 nm)	1.1	抗体	d

ME7 株感染マウス脳乳剤	-	2% 人乾燥アルブミン	-	Planova35N (35 nm)	4.93	感染	h
ME7 株感染マウス脳乳剤	-	2% 人乾燥アルブミン	1% Sarkosyl	Planova35N	1.61	感染	h
263K 株感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 μm 膜ろ過)	+	-	< 0.1% リゾレシチン	Planova75 → Planova35N	3.2 ~ 3.7	抗体 感染	i
CJD 感染マウス脳乳剤	-	-	-	不明 (25 nm)	有効*	感染	e
界面活性剤処理ハムスター 脳乳剤	-	10 mg/mL ウシ血清アルブミン	抽出時の 25 倍希釈	Ultipor VF DV20 (20 nm)	> 2.8	不明	g
界面活性剤処理ハムスター 脳乳剤	-	10 mg/mL ウシ血清アルブミン	抽出時の 25 倍希釈	Ultipor VF DV50 → Ultipor VF DV20 DVD (100 nm)	> 2.8	不明	g
CJD 感染ヒト精製 PrP ^{Sc} 1 型	-	2% ウマ抗ヒト胸腺細胞 細胞グロブリン	-	→ DVD50 (50 nm) → DVD20 (20 nm)	3 ~ 3.3	抗体	j
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	-	-	Planova (15 nm)	> 2.5	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	+	-	-	Planova (15 nm)	> 3.2	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	+	-	Planova (15 nm)	> 2.3	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	+	1/10 × 0.3% TNBP**、 1/10 × 1% Tween 80**	Planova (15 nm)	> 2.3	抗体	d
263K 株感染ハムスター脳 ミクロソーム画分	-	+	1/50 × 0.1% Sarkosyl**	Planova (15 nm)	> 3.1	抗体	d
263K 株感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 μm 膜ろ過)	+	-	< 0.1% リゾレシチン	Planova15 (15 nm)	> 4.8	抗体	i
ME7 株感染マウス脳乳剤	-	2% 人乾燥アルブミン	-	Planova15N (15 nm)	> 5.87	感染	h
ME7 株感染マウス脳乳剤	-	2% 人乾燥アルブミン	1% Sarkosyl	Planova15N	> 4.21	感染	h
ME7 株感染マウス脳乳剤	-	2% 人乾燥アルブミン	1% Sarkosyl	Planova10N (10 nm)	> 3.80	感染	h
263K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{Sc}	-	-	-	Nanosep (分画分子量 300 kDa)	1.7	変換 活性	2
263K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{Sc}	-	-	1% SUS	Nanosep (分画分子量 300 kDa)	< 1	変換 活性	2
263K 株感染ハムスター脳 精製 PrP ^{Sc}	-	-	1% SDS	Nanosep (分画分子量 300 kDa)	< 1 ~ 1.3	変換 活性	2
263K 株感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 μm 膜ろ過)	+	-	< 0.1% リゾレシチン	Viresolve180 (分画分子量 180 kDa)	> 2.5	抗体	i

263K 株感染ハムスター脳乳剤 (孔径 0.22 μm 膜ろ過)	+	0.5 % Rh 免疫グロブリン	< 1/300 × 0.1 % リゾレシチン**、20 μg/g Tween 80	Viresolve180	> 2.5	抗体	c
263K 株感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 μm 膜ろ過)	+	-	< 0.1 % リゾレシチン	不明 (分画分子量 100 kDa)	3.7	感染	i
263K 株感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 μm 膜ろ過)	+	-	< 0.1 % リゾレシチン	不明 (分画分子量 10 kDa)	> 3.5	抗体、 感染	i
263K 株感染マウス脳乳剤 (孔径 0.1 μm 膜ろ過)	+	-	< 0.1 % リゾレシチン	不明 (分画分子量 5 kDa)	> 4.5	抗体	i
263K 株感染ハムスター脳乳剤	-	AS3 加人赤血球 (白血球非除去)		BPF4 (白血球除去フィルター)	3.7	感染	k
263K 株感染ハムスター脳 ミクログローム画分	-	85 mg/mL Coon 分画 Fr. V 再懸濁液 (孔径 0.8 μm 膜ろ過)	-	Delpid-1 mini (脂質除去フィルター)	2.3	抗体	a
263K 株感染ハムスター脳乳剤	-	人赤血球	-	Leukotrap (プリオン除去フィルター)	2.75	抗体	l
スクレイピー感染ハムスター 脳乳剤	-	人赤血球濃厚液	-	Leukotrap	2.9	抗体	m

* Tween80：ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート。SDS：ドデシル硫酸ナトリウム。Sarkosyl：N-ラウロイルサルコシンナトリウム。TNBP：トリ(n-ブチル)リン酸。

SUS：ウンデシル硫酸ナトリウム。

** 「○×△%」の表記は、「スパイク用病原体試料調製時には△%の濃度。これを用いてスパイク用病原体溶液を調製する際に○倍希釈」の意。

† RFは求めておらず、ろ液を感染させたマウスが死亡するまでの日数で評価。

‡ RFは求めておらず、ウェスタンブロットの結果から評価。

<引用文献>

- Foster, P. R., et al. "Studies on the Removal of Abnormal Prion Protein by Processes Used in the Manufacture of Human Plasma Products." *Vox Sang.* 78: 86-95 (2000)
- Vey, M., et al. "Purity of Spiking Agent Affects Partitioning of Prions in Plasma Protein Purification." *Biologicals* 30: 187-196 (2002)
- Van Holten, R. W., et al. "Removal of prion challenge from an immune globulin preparation by use of a size-exclusion filter." *Transfusion* 42: 999-1004 (2002)
- ベネシス社. 発表資料 "Today's presentation -1. Design of the spiking agent for prion clearance studies. 2. Removal of Parvovirus B19 by Planova filters."
- Tateishi, J., et al. "Properties of transmissible agent derived from chronic spongiform encephalopathy." *Ann. Neurol.* 7: 390-391 (1980)
- Tateishi, J., et al. "REMOVAL OF CAUSATIVE AGENT OF CREUTZFELD-JAKOB DISEASE (CJD) THROUGH MEMBRANE FILTRATION METHOD." *膜* 18: 357-362 (1983)
- Arenha, H., et al. "Potential Prion Risks & Clearance by Filtration." *Genetic Engineering News* 21(11) (1 Jun. 2001)
- Tateishi, J., et al. "Scrapie Removal using Planova Virus Removal Filters." *Biologicals* 29: 17-25 (2001)
- BioReliance 社. 発表資料 "TSE Clearance."
- Truchot, L., et al. "CJD PrP^{sc} removal by nanofiltration process: Application to a therapeutic immunoglobulin solution (Lymphoglobuline)." *Biologicals (in press)*, 2006
- Coker, S. S., et al. "Removal of exogenous (spiked) and endogenous prion infectivity from red cells with a new prototype of leukoreduction filter." *Transfusion* 45: 1839-1844 (2005)
- Girolamo, A., et al. Pall 社ホームページ公表資料 "Characterization of the Performance of the Pall Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter System for Blood."
- Pall 社. Pall 社ホームページ公表資料 "Leukotrap Affinity Prion Reduction Filter System."

<ろ過条件> (全量・定流速ろ過の場合)

項目	実生産工程	スケールダウン試験系
ろ過膜面積	1 m ²	0.01 m ²
ろ過液量	10 L	90 mL*
スパイク用 PrP ^{Sc} 試料	—	10 mL
総通液量	10 L	100 mL
流速	200 mL/min	2 mL/min
ろ過圧	1.0 kg/cm ² 以下	1.0 kg/cm ² 以下
ろ過温度	室温	室温

* 実生産工程で得られるろ過前液を使用することが望ましい。

<評価項目の例>

項目	確認内容
ろ過液量	設定した量を問題なくろ過できたか
流速	設定した流速でろ過できたか
ろ過温度	設定した温度管理ができたか
ろ過圧力	ろ過圧力が実生産工程での管理幅内で制御できたか
ろ液の品質	蛋白質の組成・性状等の特性が実生産工程でのものと同等か
ろ過前後の収率	ろ過前後の蛋白質収率、活性収率等が実生産工程でのものと同等か

表3 ろ過工程のスケールダウン試験系における実施条件及び評価項目例

<クロマトグラフィー条件>

項目	実生産工程	スケールダウン試験系
カラム内径	1,000 mm	10 mm
ゲル高	100 mm	100 mm
充填ゲル容量	78.5 L	7.85 mL
アプライ液量	10 L	90 mL
スパイク用 PrP ^{Sc} 試料	—	10 mL
線流速	60 cm/h	60 cm/h
温度	室温	室温
クロマトグラフ用緩衝液組成	同一	

* 実生産工程で得られるアプライ液を使用することが望ましい。

<評価項目の例>

項目	確認内容
線流速	設定した線流速で通液できたか
温度	設定した温度管理ができたか
溶出液の品質	蛋白質の組成・性状等の特性が実生産工程でのものと同等か
クロマトグラフ	クロマトグラフィー前後の蛋白質収率、活性収率等が イー前後の収率 実生産工程でのものと同等か

表 4 クロマトグラフィー工程のスケールダウン試験系における実施条件及び評価項目例

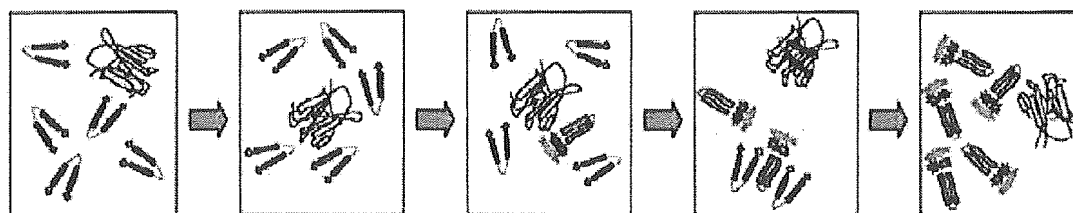





図 4 MPD 法の原理の概略 (Grosset, A., et al. *Peptides* 26: 2193-2200 (2005) 図 1 を改変)

凡例：
 試料中の PrP^{Sc}
  人工ペプチド (α-ヘリックス構造；非励起状態)
  人工ペプチド (β-シート構造；励起状態)

プロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 画分の調製法 及び膜ろ過試験によるプリオン除去効果に関する研究

分担研究者 堀内 基広 北海道大学大学院獣医科学研究科 プリオン病学講座 教授

研究要旨

医薬品等のプリオン汚染を評価するためのプロセスバリデーションでは、使用するプリオンの性状、すなわちプリオンの構成要素である異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) の物理化学的性状によって除去効率が変わり、結果を過大評価するおそれがある。本研究では、プロセスバリデーションに適した PrP^{Sc} 画分の調製について検討し、その有用性を検証した。スクレイピー Obihiro 株感染マウス及び 263K 株感染ハムスターの各脳乳剤を陰イオン界面活性剤 Sarkosyl (*N*-ラウロイルサルコシンナトリウム) で処理することで、粒子サイズが小さく、100,000 × *g* の遠心でも沈殿しない PrP^{Sc} 凝集体が抽出できた。また、マイクロソーム画分からも同様の PrP^{Sc} 凝集体の抽出が可能であった。そこで、マイクロソーム画分から 3.0 % Sarkosyl により抽出された PrP^{Sc} 画分について、プロセスバリデーションにおけるスパイク用試料としての有用性を検証した。人免疫グロブリン製剤製造工程における孔径 0.22 μm のろ過膜によるろ過工程をモデルとして、マイクロソーム画分、1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分及び 3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分をそれぞれスパイク用病原体試料としてリン酸塩緩衝液 (PBS) に添加し、これらを PrP^{Sc} クリアランス試験用の病原体溶液としたところ、ろ過膜による PrP^{Sc} の除去効率はいずれも同程度であり (クリアランス指数 (RF) が 0.6 ~ 0.8)、PrP^{Sc} はろ過膜を通過した。3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液でもろ過膜による PrP^{Sc} の除去効率は同程度であったが、マイクロソーム画分及び 1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液では RF が 2.4 に増大、すなわちろ液中の PrP^{Sc} が約 250 分の 1 に減少した。以上の結果から、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 凝集体を使用することによって、より厳密なプロセスバリデーションが可能となることが示唆された。また、スパイク用 PrP^{Sc} 試料の種類と添加する試料溶液の組成との組合せによって除去効果の評価結果が変化し得ることを実証した。

A. 研究目的

製造工程でのプリオン除去率を求めるプロセスバリデーションにより、医薬品やその原材料のプリオン汚染リスクを理論的に評価することが可能である。しか

しながら、プロセスバリデーションにおいては、スパイクするプリオンの性状によって結果が異なることが予想される。脳に蓄積したプリオンは大きな異常型プリオン蛋白質 (PrP^{Sc}) 凝集体を形成する

ため、脳乳剤を直接スパイクした場合、PrP^{Sc} が工程中で容易に沈殿したり物理的に排除されることが予想される。一方、Silveira らの報告が示すように、PrP 分子 10 数個の大きさに相当する PrP^{Sc} オリゴマーが最も強力な感染性をもつことが明らかとなったことから (Silveira, J. R., *et al.* Nature 437: 257-261 (2005))、より適切な評価を実施するためには、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} オリゴマーをスパイク用病原体試料としたプロセスバリデーションを実施する必要がある。昨年度、プリオン感染マウス脳乳剤を Sarkosyl (N-ラウロイルサルコシンナトリウム) で抽出することで、100,000 × g の超遠心の上清中にプロテナーゼ K (PK) 抵抗性のプリオン蛋白質 (PrP^{res}) が回収できることを見出した。そこで、本年度は、血液製剤製造の最終工程で使用される膜ろ過工程をモデルとして、プロセスバリデーションにおける Sarkosyl 抽出 PrP^{Sc} 画分の有用性について検討した。

B. 研究方法

1. スクレイピー株

ハムスター順化スクレイピー 263K 株 (Kimberlin, R. H., *et al.* J. Gen. Virol. 34: 295-304 (1977)) 及びマウス順化スクレイピー Obihiro 株 (Shinagawa, M., *et al.* Microbiol. Immunol. 29: 543-551 (1985)) を用いた。263K 株感染シリアンハムスターの 2.5 % 脳乳剤 50 μL を、シリアンハムスター (4 週齢、雌) の脳内に接種した。また、Obihiro 株 263K 株感染 Jcl:ICR マウスの 2.5 % 脳乳剤 20 μL を、Jcl:ICR マウス (4 ~ 6 週齢、雌) に脳内接種した。病末期の動物をジエチルエーテル麻酔下で安楽殺し、脳を採材した。脳は使用時まで -30 °C で保管した。

2. ミクロソーム画分の調製

スクレイピー感染脳を秤量した後、ハサミで細切した。約 10 倍量 (w/w) のショ糖緩衝液 [0.32 mol/L ショ糖、5 mmol/L トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (Tris) -塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 mmol/L エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム (EDTA)、1 μg/mL ロイペプチン、1 μg/mL アプロチニン、1 μg/mL ペプスタチン、2 μmol/L トランス-エポキシサクシニル-L-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)ブタン(E-64)、2 μmol/L ベスタチン] を加え、ホモジナイザーでホモジナイズした。得られた乳剤を遠心管に移し、4 °C で 6,000 × g の遠心を 12 分間行い、上清は別の遠心管に回収した。沈殿に少量のショ糖緩衝液を加え、ホモジナイザーで再度ホモジナイズ後、4 °C で 6,000 × g の遠心を 12 分間行った。この上清を先に行った遠心上清と合わせてから、4 °C で 100,000 × g の遠心を 1 時間行った。得られた沈殿にショ糖緩衝液を加えて懸濁した後、塊がなくなるまで超音波処理を行なった。得られたミクロソーム画分は分注して、-20 °C で保存した。

3. Sarkosyl 抽出、PrP^{Sc} 検出用試料の調製及び PrP^{Sc} の検出

2 で得られたミクロソーム画分 100 μL に Sarkosyl (最終濃度 0.5 %) を加え、攪拌及び超音波処理を行なった後、4 °C で 100,000 × g の遠心を 10 分間行なった。上清は別の遠心管に回収した。沈殿に 1.0 % Sarkosyl を含むリン酸塩緩衝液 (PBS) を 100 μL 加え、同様に攪拌、超音波処理及び遠心操作を行なった。この操作を Sarkosyl 最終濃度を

0.5 %ずつ上げて 4.0 %まで繰り返して連続抽出を行った。各遠心上清から 40 μ L ずつ 2 本にサンプリングし、一方は 10 μ g/mL PK で 37 $^{\circ}$ C、30 分間処理後、PK 阻害剤である 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩 (Pefabloc) を最終濃度 5 mmol/L になるように加え、PK による消化を停止した (PK 処理(+))。もう一方は PK 処理を行わなかった (PK 処理(-))。

これらにメタノール-ブタノール混合液 (メタノール : 2-ブタノール = 1 : 5) を 25 μ L 加えて攪拌し、4 $^{\circ}$ C で 20,000 \times g の遠心を 10 分間行い、蛋白質を沈殿させた。沈殿に 1 \times 試料用緩衝液 [62.5 mmol/L Tris - 塩酸緩衝液 (pH 6.8)、5 %グリセロール、3 mmol/L EDTA、5 %ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、4 mol/L 尿素、4 % 2-メルカプトエタノール、0.04 %プロモフェノールブルー] を 20 μ L 加え、5 分間煮沸した。また、4.0 % Sarkosyl 連続抽出後の遠心で生じた沈殿には 1 \times 試料用緩衝液を 100 μ L 加え、5 分間煮沸した。

PrP^{Sc} の検出はウェスタンブロット (WB) により行った。化学発光を LAS-3000 ルミノイメージアナライザー (富士写真フィルム社) で取り込み、定量解析を行った。

4. スパイク試験

① 263K 株感染脳から得たマイクロソーム画分、②マイクロソーム画分を直接 1.0 % Sarkosyl で処理して得た 1.0 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分、又は③マイクロソーム画分を直接 3.0 % Sarkosyl で抽出して得た 3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分をスパイク用病

原体試料として、PBS 又は抗 HBs 人免疫グロブリン「日赤」(5 %人免疫グロブリン、0.3 mol/L グリシン) にスパイクした。この病原体溶液の一部はろ過前の試料として遠心管に回収し、残りはプラスチック注射筒を装着した孔径 0.22 μ m のポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (製品名 Millex-GV、ミリポア社) で加圧ろ過した。

(倫理面への配慮)

プリオン感染マウスは北海道大学大学院獣医学研究科動物実験委員会にて承認された実験指針に従って行った。感染性を含む試料の使用は北海道大学大学院獣医学研究科 BSL2 実験施設にて行った。

C. 研究結果

PrP^{Sc} のプロセスバリデーションでは、より高濃度の PrP^{Sc} を含むスパイク用試料の調製が望まれる。しかし、脳乳剤からの Sarkosyl 抽出により超遠心上清中に回収することが可能な PrP^{Sc} は、全体の 20 ~ 30 %であった (平成 16 年度分担研究報告書)。そこで、マイクロソーム画分を調製することによる PrP^{Sc} の濃縮及び部分精製の効果について検討した。その結果、Obihiro 株で 2.6 倍、263K 株で 9.8 倍に濃縮されることが判明した (図 1)。さらに、濃縮効率の高かった 263K 株感染脳マイクロソーム画分から Sarkosyl 抽出を行ったところ、約 30 %の PrP^{Sc} が 100,000 \times g の遠心上清から回収できることが判明した (図 2)。

次に、マイクロソーム画分を直接 3.0 % Sarkosyl で抽出した後に 100,000 \times g の遠心を行って得た遠心上清 (3.0 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分) のプロセスバリデーションにおける有用性を、

人グロブリン製剤製造工程における孔径 0.22 μm のろ過膜によるろ過工程をモデルとして検証した。マイクロソーム画分、1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分（マイクロソーム画分を直接 1.0 % Sarkosyl で処理して得た遠心上清）及び 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分をそれぞれスパイク用 PrP^{Sc} 試料としてろ過試験を行い、ろ過前液及びろ液中に存在する PrP^{Sc} の定量結果から、膜ろ過工程におけるクリアランス指数（RF）を算出した。これら 3 種のスパイク用病原体試料を PBS に添加して病原体溶液とした場合には、RF が 0.6 ~ 0.7 となり、PrP^{Sc} はろ液中に検出された。しかし、スパイク用試料を添加する試料溶液として 5 % 人免疫グロブリン溶液を使用した場合、マイクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分をそれぞれ添加したときの RF は 2.4 に増大したが、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を添加したときの RF は 0.6 ~ 0.8 であった（図 3）。したがって、スパイク用病原体試料の種類とそれを添加する試料溶液の組成との組合せによってプロセスバリデーションの評価結果が異なることが示された。また、今回使用したスパイク試料の中では 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を使用した場合に、膜ろ過という物理的な工程において、より厳密なプロセスバリデーション評価が可能となることが示唆された。

D. 考察

一般的にプロセスバリデーションでは 3 以上のクリアランス指数を評価できる実験系が理想とされていることから、より PrP^{Sc} 濃度の高いスパイク用試料を用いる必要がある。PrP^{Sc} の濃縮率を考慮すると、263K 株感染脳からマイクロソーム画分を調製することで、脳乳剤と比較

して PrP^{Sc} を 9.8 倍濃縮することが可能であった（図 1）。マイクロソーム画分に含まれる PrP^{Sc} は小胞に付随していると考えられ、実際に 100,000 \times g の遠心で沈殿した。マイクロソーム画分を Sarkosyl 抽出することにより 100,000 \times g の遠心上清中に PrP^{Sc} が回収できたことから（図 2）、本研究では PrP^{Sc} 濃度の高いスパイク用試料が調製できる 263K 株をスパイク用試料として使用することとした。しかし、他のプリオン株や界面活性剤の使用についても検討する必要がある。

本研究の結果、孔径 0.22 μm のろ過膜を用いたろ過工程における PrP^{Sc} 除去効率の評価では、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分と他の 2 つのマイクロソーム画分の間には大きな違いが認められた（図 3）。これら 3 種のスパイク用 PrP^{Sc} 試料を PBS に添加した場合にはいずれも除去効率が同程度であったことから、本来これら 3 種のスパイク用試料中には 0.22 μm の孔径を通過する PrP^{Sc} 凝集体が存在していたと考えられる。しかし、マイクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を人免疫グロブリン溶液にスパイクした場合には、除去効率が増大した。孔径 0.22 μm のろ過膜でのプリオン除去効率がスパイク用病原体試料の種類により異なった原因として、5 % 人免疫グロブリン溶液中での PrP^{Sc} 凝集体の形成促進及び高濃度蛋白質溶液に起因するろ過膜の目詰まりなどが考えられる。しかし、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を用いた場合には除去効率の増大が認められなかったことは、スパイク用 PrP^{Sc} 試料の性質の把握、及び目的に応じたスパイク用試料の適切な選択の重要性を示している。

E. 結論

マイクロソーム画分から 3 % Sarkosyl により抽出された PrP^{Sc} 画分について、プロセスバリデーションにおけるスパイク用病原体試料としての有用性を検証した。

人免疫グロブリン製剤製造工程における孔径 0.22 μm のろ過膜によるろ過工程をモデルとして、マイクロソーム画分、1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分及び 3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分をそれぞれスパイク用病原体試料として PBS に添加し、これらを PrP^{Sc} クリアランス試験用の病原体溶液としたところ、ろ過膜による PrP^{Sc} の除去効率はいずれも同程度であり (RF が 0.6 ~ 0.8)、PrP^{Sc} はろ過膜を通過した。しかし、マイクロソーム画分及び 1 % Sarkosyl 処理マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液では、ろ過膜による PrP^{Sc} の RF が 2.4 に増大、すなわちろ液中の PrP^{Sc} が約 250 分の 1 に減少した。一方、3 % Sarkosyl 抽出マイクロソーム画分を 5 % 人免疫グロブリン溶液に添加した病原体溶液では、PrP^{Sc} の RF は 0.7 であった。

以上の結果から、粒子サイズの小さい PrP^{Sc} 凝集体を使用することによって、より厳密なプロセスバリデーションが可能となることが示唆された。また、スパイク用 PrP^{Sc} 試料の種類と添加する試料溶液の組成との組合せによって除去効果の評価結果が変化し得ることを実証した。

F. 健康危険情報

実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

<平成 17 年>

- 1) Furuoka, H., Yabuzoe, A., Horiuchi, M., Tagawa, Y., Yokoyama, T., Yamakawa, Y., Shinagawa, M., and Sata, T. "Effective antigen-retrieval method for immunohistochemical detection of abnormal isoform of prion proteins in animals." *Acta Neuropathol.* 109: 263-271 (2005)
- 2) Inanami, O., Hashida, S., Iizuka, D., Horiuchi, M., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Nakamura, H., Inagaki, F., and Kuwabara, M. "Conformational change in full-length mouse prion: A site-directed spin-labeling study." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 785-792 (2005)
- 3) Kurosaki, Y., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M. "Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan." *J. Vet. Med. Sci.* 67: 321-323 (2005)
- 4) Kataoka, N., Nishimura, M., Horiuchi, M., and Ishiguro, N. "Surveillance of chronic wasting disease in sika deer, *Cervus nippon*, from Tokachi district in Hokkaido." *J. Vet. Med. Sci.* 67: 349-351 (2005)
- 5) Horiuchi, M., Furuoka, H., Kitamura, N., and Shinagawa, M. "Alymphoplasia mice are resistant to prion infection via oral route." *Jpn. J. Vet. Res. (in press)*
- 6) 堀内 基広. "BSE 診断法の開発と現状." *Virus Report* 2: 20-27 (2005)
- 7) 堀内 基広. "人獣共通感染症としてのプリオン病." *ウイルス* 55: 45-55 (2005)
- 8) 堀内 基広. "動物由来感染症としてのプリオン病." *日本臨牀* 63: 2213-2220 (2005)

- 9) 堀内 基広. "異常型プリオン蛋白質の生合成と伝達." 膜 30: 78-83 (2005)

<平成 16 年>

- 10) Kim, C.-L., Karino, A., Ishiguro, N., Shinagawa, M., Sato, M., and Horiuchi, M. "Cell-surface retention of PrP^c by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." *J. Gen. Virol.* 85: 3473-3482 (2004)
- 11) Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., and Shinagawa, M. "Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds." *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1293-1295 (2004)
- 12) Kim, C.-L., Umetani, A., Matsui, T., Ishiguro, N., Shinagawa, M., and Horiuchi, M. "Antigenic characterization of an abnormal isoform of prion protein using a new diverse panel of monoclonal antibodies." *Virology* 320: 40-51 (2004)

2. 学会発表

<平成 17 年>

- 1) 堀内 基広, 品川 森一. "蛍光相関分光法による未変性条件下での異常型プリオン蛋白質の検出." 第 53 回日本ウイルス学会 (20-22 Nov. 2005, 横浜)
- 2) 瓜生 匡秀, 堀内 基広. "マウス神経芽腫細胞 Neuro-2a のプリオン感受性は PrP^c 以外の因子により規定される." 第 53 回日本ウイルス学会 (20-22 Nov. 2005, 横浜)
- 3) 金 チャンラン, 堀内 基広. "培養細胞における正常プリオン蛋白質の新たな細胞内局在." 2005 年プリオン研究会 (25-26 Aug. 2005, 山形)

<平成 16 年>

- 4) 金 チャンラン, 堀内 基広. "抗 PrP 抗体による培養細胞レベルでの PrP^{Sc} 産生抑制機構の解析." 第 52 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2004, 横浜)
- 5) 山口 聡子, 宮澤 孝幸, 堀内 基広. "人工合成硫酸化糖アナログによる PrP^{Sc} 産生抑制." 第 52 回日本ウイルス学会 (21-23 Nov. 2004, 横浜)
- 6) Horiuchi, M., Kim, C.-L., Ogino, M., Furuoka, H., and Shinagawa, M. "Cell surface retention of PrP^c by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)
- 7) Horiuchi, M., Tamura, Y., and Furuoka, H. "Comparative analyses of three mouse-adapted scrapie strains G1, Obihiro, and I3/I5 and pathogenesis of G1 strain-induced polyuria in ICR mice." International Symposium Prion Disease Food and Drug Safety (31 Oct.- 2 Nov. 2004, Sendai, Japan)
- 8) Horiuchi, M. "BSE screening in Japan." The animal prion disease and USE (14-16 Oct. 2004, Ames, USA)
- 9) Horiuchi, M. "Inhibition of protease-resistant prion protein (PrP) formation by anti-PrP antibodies." The 7th Joint Symposium between Hokkaido University Graduate School of Veterinary Medicine & Seoul University College of Veterinary Medicine, The 6th COE International Symposium for Zoonosis Control (8 Jul. 2004, Sapporo, Japan)