

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

遺伝子組換え医薬品等の
プリオン安全性確保のための検出手法の標準化
及びプリオン除去工程評価への適用に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 照英

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法の標準化
及びプリオン除去工程評価への適用に関する研究 1
山口 照英

II. 分担研究報告

1. 異常型プリオンの検出のための処理方法に関する試験／調査研究 21
川崎 ナナ
2. 遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法の標準化
及びプリオン除去工程評価への適用に関する研究
異常型プリオンの検出及び工程評価に関する試験研究 28
生田 和良
3. 培養細胞由来医薬品のプリオン汚染検査法に関する研究
－培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状の解析－ 34
堀内 基広
4. 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究 40
菊池 裕

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 44

IV. 研究成果の刊行物・別刷

平成19年度総括研究報告書

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法の標準化 及びプリオン除去工程評価への適用に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長 山口 照英

研究要旨 遺伝子組換え医薬品等の異常プリオン(PrP^{Sc})の混入/迷入リスクを低減化するための試料調製法を含む検出手法の最適化、並びにPrP^{Sc}除去/不活能評価法の標準化を目的として、次のような成果を得た。1) 最新のPrP^{Sc}検出手法や除去/不活能評価に関する調査研究を行い、PrP^{Sc}のリスク評価のための高感度な検出手法に関して急速な技術進歩が認められるが、PrP^{Sc}の感染性の検出における実証は未だ十分とは言えず、今後ともPrP^{Sc}検出手法の十分なバリデーションが不可欠であることが明らかになった。2) PrP^{Sc}を選択的に検出するための基盤技術としてPrP^{Sc}及びプリオン(PrP)構造特性解析のためのPrP分画法の構築を行った。3) マウスを用いたPrP^{Sc}感染性の迅速測定系の開発を目指して、プリオン病発症の生前診断法としての近赤外分光法の有用性を明らかにした。4) 高度超音波処理によって粒子系分布をコントロールしたPrP^{Sc}のクリアランス評価用スパイク検体の有用性を明らかにするとともに、これを用いた平均孔径15nmのナノフィルターによるPrP^{Sc}除去評価を行い、その有用性の評価した。一方で15nmでも素通りするPrP^{Sc}の存在を明らかになった。5) PrP^{Sc}易伝達性細胞を用いた検出手法の開発を目的として、プリオンを持続感染させたScN2a-3細胞は、継代培養を行っても上清中にPrP^{Sc}が放出されることより、感染モデルとしての有用性を明らかにした。また、培養細胞から放出されるPrP^{Sc}の物理化学的性状の解析を行った。6) 競合的EIAによる高感度ウシPrP^{Sc}検出手法の開発を目的として、6H4抗体を用いた競合的EIAを構築した。7) PrP^{Sc}検出手法への応用が期待できるウシスプライス変異型PrP mRNA検出手法の開発を行い、スプライス変異型PrP mRNAを特異的に検出する手法を確立した。

研究組織 分担研究者

川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
生田和良 大阪大学微生物病研究所
堀内基広 北海道大学大学院獣医学
菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者

楠木幹弘 (株)ベネシス研究開発本部
伊藤さつき 国立医薬品食品衛生研究所
高倉大輔 国立医薬品食品衛生研究所
遊佐精一 国立医薬品食品衛生研究所
中島 治 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

我が国では、BSEを主とする伝達性海綿状脳症(TSE)のリスク評価に関して、ウシ等由来原材料の原産国の地理的リスク及び原材料部位のリスクを基本に、原則として予防的な伝達性ウシ海綿状脳症(BSE)対策を進めている。さらに、ウシ等由来製品については、①「原材料原産国の地理的リスク及び部位のリスク」、②「製造工程で用いる原材料のリスク」、③リスク低減のため

の原材料管理に係る措置等を踏まえた安全対策を行ってきている。

一方、カナダや米国でもBSE発症が続いているように、ウシ等由来原材料の地理的分類に基づくリスク評価は、新たな知見の集積を踏まえて常に見直さざるを得ない状況が生まれている。特に、培養細胞を用いた多くのバイオ医薬品では、シード細胞の樹立やセルバンクの確立、さらには製造工程の一部あるいは全工程にわたって、ウシ胎仔血清やウシ由来添加剤が用いられている。従って、細胞培養医薬品等のPrP^{Sc}安全性確保を目的として医薬品原材料や製造中間工程性品等のPrP^{Sc}検出手法の開発が望まれている。しかし、*in vivo*、*in vitro*の様々な系を用いたPrP^{Sc}検出手法の開発が試みられているが、定量性、検出に要する期間、検出の頑健性等多くの問題が残っており、一般的手法といえるものは確立されていない。また、検出のための試料調製法についても同様である。したがって、血清等を用いる細胞培養医薬品の製造に用いられる原料/原材料や製造中間工程製品等のPrP^{Sc}安全性を確保するための検査のあり方や、検査を行うための試料の調製法について最適化や標準化を行うことは製造工程を含めたTSEの安全性確保において非常に重要である。さらに、最適化された検出手法は原料/原材料、中間工程製品等の試験ばかりでなく、製造工程バリデーションに

も有用である。また、得られた成果に基づきプリオン安全性確保の方策を明らかにしていくことができれば細胞培養等を用いて生産される遺伝子組換え医薬品等の安全性確保の上では極めて重要である。

本研究では、遺伝子組換え医薬品等のPrP^{Sc}の混入/迷入リスクを低減化するための試料調製法を含めた検出法の最適化を行うと共に、製造工程のPrP^{Sc}除去/不活能評価法の標準化をめざす。本年度は、1) PrP^{Sc}の検出法や除去/不活能評価に関する調査研究、2) 高い選択性のあるPrP^{Sc}の検出法開発のためのPrP分画法PrP・構造特性解析の検討、3) マウスを用いたPrP^{Sc}感染性の迅速測定計の開発を目指し、プリオン病の生前診断法としての近赤外分光法の有用性評価、4) 高度超音波処理によって粒子系分布をコントロールしたスパイク用PrP^{Sc}検体の有用性評価、及びこれを用いた平均孔径15nmのナノフィルターによるプリオン除去評価、5) 培養細胞から放出されるPrP^{Sc}の物理化学的性状の解析、6) 競合的EIAによる高感度ウシPrP^{Sc}検出法の開発、7) PrP^{Sc}易伝達性細胞を用いた検出法の開発を目的としたウシPrP高発現細胞株の樹立、並びに、8) PrP^{Sc}検出法への応用が期待できるウシスプライス変異型PrP mRNAの検出手法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1 調査研究

以下の資料を参考にした。

1) クリアランス試験及び検出法

Castilla, J., Saá, P. & Soto, C. Detection of prions in blood. *Nature Medicine* 11: 982-985 (2005).

Gregori, L., Gurgel, P. V., Lathrop, J. T., Edwardson, P., Lambert, B. C., Carbonell, R. G., Burton, S. J., Hammond, D. J. & Rohwer R. G. Reduction in infectivity of endogenous transmissible spongiform encephalopathies present in blood by adsorption to selective affinity resins. *The Lancet* 368 (9554): 2226-2230 (2006).

European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); Guideline on the Investigation of Manufacturing Processes for Plasma-Derived Medicinal Products with Regard to VCJD risk. (2004).

Klöhn, P.-C., Stoltze, L., Flechsig, E., Enari, M. & Weissmann, C. A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11666-11671 (2003).

Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F. & Caughey, B. The most infectious prion protein particles. *Nature* 437: 257-261 (2005).

Vorberg, I., Raines, A., Story, B. & Priola, S. A. Susceptibility of Common Fibroblast Cell Lines to Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 431-439 (2004).

Yunoki, M., Tanaka, H., Urayama, T., Hattori, S., Ohtani, M., Ohkubo, Y., Kawabata, Y., Miyatake, Y.,

Nanjo, A., Iwao, E., Morita, M., Wilson, E., MacLean, C. & Ikuta, K. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals* 36 (1): 27-36 (2008).

Yunoki, M., Urayama, T. & Ikuta, K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virology* 1 (5): 659-674 (2006).

2) 構造特性

Stahl, N. et. al., *Biochemistry*, 1990, 29, 8879

Stahl, N. et. al., *Biochemistry*, 1990, 29, 5405

Stahl, N. et al., *FASEB J.*, 1991, 5, 2799

Rudd, PM. et al., *Biochemistry*, 2001, 40, 3759

Ermonval, M. et al., *Biochimie.*, 2003, 85, 33

Lawson, VA. et al., *J. Neurochem.* 2005, 93, 793

Baldwin, M. et al., *Method in Enzymol.*, 2005, 405, 172

Haraguchi, T. et. al., *Arch Biochem Biophys.*, 1989, 274, 1

Endo, T. et al., *Biochemistry*, 1989, 28, 8380

Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1993, 32, 1991

Stimon, E. et al., *Biochemistry*, 1999, 38, 4885

Rudd, PM. et al., *PNAS*, 1999, 96, 13044

Stahl, N. et al., *Cell*, 1987, 51, 229

Baldwin, MA. et al., *Anal Biochem.*, 1990, 191, 174

Stahl, N. et al., *Biochemistry*, 1992, 31, 5043

B-2 PrPの分画

1) ラット脳内タンパク質の分画

市販のラット脳アセトン粉末, 250 mg (Sigma) にクロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v), 30 ml を加え, ポリドロンを用いて1分間均質化後, 室温で1時間放置した. 遠心分離後 (3000 rpm, 室温, 10分), 上清を除去し, 沈殿をメタノールで2回洗浄した. 洗浄した沈殿に0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び1 mM PMSF を含む10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4 (均質化用緩衝液), 30 ml を加え, 懸濁した. 遠心分離後 (10,000×g, 4°C, 20分), 沈殿に均質化用緩衝液20 ml を加え, 懸濁した後, 10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液5 ml を加え, 4°C で一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った. 可溶化溶液を遠心分離し (10,000×g, 4°C, 20分), 沈殿 (画分 P) と上清 (画分 S) を得た.

2) ラット脳画分の SDS-PAGE

得られた画分 P, 及び S に含まれるタンパク質を12.5%ゲルを用いて, 25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中, 20 mA で泳動した (画分 P は得られた量の1/1000, 画分 S は4/100 をアプライした). 分離されたタンパク質は, Simply Blue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて検出した.

3) タンパク質の同定

画分 P, 及び S について SDS-PAGE を行い, 分離された主なバンドを切り出し, 30%アセトニトリルを含む25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用

いて脱色後、アセトニトリルを加え脱水した。アセトニトリルを除去後、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100-150 μ l を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除いた後、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 100-150 μ l を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除いた後、洗浄用溶液を用いてゲル片を洗浄し、50%アセトニトリルを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 (脱水用溶液) を用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。

ゲル内アルキル化を行った乾燥ゲル片にトリプシン溶液 (20 μ g/ml, 25 mM 重炭酸アンモニウム) を加え、氷上で 30 分間放置し、ゲル片にトリプシン溶液を染み込ませた。余分なトリプシン溶液を取り除き、37°C で一晩反応させた。50%アセトニトリル及び 1%トリフルオロ酢酸水溶液 (抽出溶液) 100 μ l を加え、室温で 30 分間振とうし、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度抽出操作を行った後、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。

4) LC/MS

抽出された消化物を用いて、以下の条件で LC/MS/MS を行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource)
カラム : Magic C18 (Michrom BioResource, 0.2 \times 50 mm, 3 μ , 100+)
溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液
溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液
グラジエントプログラム : 5~65%B (0~20 分)
流速 : 3 μ l/min

MS :

装置 : Finnigan LTQ (Thermo Fisher Scientific)
イオン源 : nanoESI
キャピラリー温度 : 200°C
キャピラリー電圧 : 1.8 kV
スキャン範囲 (*m/z*) : 450-2000
衝突エネルギー : 35%
測定メソッド :

- ① single mass scan (*m/z* 450-2000)
- ② data-dependent MS/MS

5) データベース検索

検索エンジン : Mascot (Matrix Science 社)
データベース : NCBIInr, Rattus

略語

GPI, glycosylphosphatidylinositol; PIPLC, phosphatidylinositol-specific phospholipase C; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; Endo H, Endoglycosidase H; Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; NeuAc, N-アセチルノイラミン酸; 2-AB, 2-aminobenzamide; Man, マンノース; Ino, inositol; GalNAc, N-アセチルガラクトサミン;

B-3 近赤外分光法

スクレイピープリオン (chandler および Obihiro) をマウスへ脳内接種し、体表からの近赤外分光測定 (600-1100nm) を行い (図 1), プリオン感染を Western blotting もしくは免疫組織化学染色で確認後、近赤外スペクトルの多変量解析を行い、プリオン感染によるスペクトル変化を調べた。また、スクレイピープリオン (Hamster adopted 263K) を接種し、発症したハムスターの剖検脳を直接近赤外分光法による解析と平行してウェスタンブロット法によるプリオン出現の確認を行った。

B-4 平均孔径15nmのナノフィルターによる除去

Hamster adopted 263K が感染した脳由来のマイクロゾーム画分を超音波装置で約 100nm の平均粒子径にしたものを調製しこれをスパイク試料候補とした。この高度に超音波処理を行った検体をバイオ製剤に添加し、平均孔径 15nm のナノフィルターを用いてろ過した。ろ液の中の 263K について Western blotting 法と動物接種 (BA) 法により検討した。

B-5 培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状の解析

1) 細胞

マウス神経芽細胞 N2a のサブクローン N2a-3 および、N2a-3 にプリオン Chandler 株が持続感染した ScN2a-3 を使用した (Uryu, M., *et al. Microbiol. Immunol.* 51: 661-667 (2007))。

2) 培養上清の分画及びプリオン感染性評価

ScN2a-3 の培養上清を回収し、2,000 \times g, 10 分間遠心した。得られた上清を、10,000 \times g, 30 分間遠心した。このとき得られた画分を 10p として実験に用いた。10,000 \times g の遠心上清をさらに 100,000 \times g, 45 分間遠心して沈殿を回収した (100p)。10p および 100p 画分は、出発材料の 1/10 量の DMEM に懸濁し、これらを N2a-3 に接種した。N2a-3 を 4~8 代連続継代した後、PrP^{Sc} を検出することでプリオンの感染性を評価した。

PrP^{Sc} および α -tubulin の検出はドットプロットにより行なった。細胞を 200 μ l の lysis buffer に溶解し、低速遠心により除核した。上清を DNase I で処理した後、 α -tubulin の検出用に、100 μ l の lysate を Bio-dot (Bio-Rad 社) にて吸引しながら PVDF 膜

にドットした。残りの 80 μ l の lysate は Proteinase K (20 μ g/ml) で 37°C, 1 時間処理した。これを Bio-dot にて吸引しながら PVDF 膜にドットした。 α -tubulin は抗 α -tubulin モノクローナル抗体(mAb)により検出した。PrP^{Sc} の検出には、PVDF 膜を 3 mol/L GdnSCN で処理した後、mAb 31C6 により検出した。抗原抗体複合体は ECL Western blotting detection system (Amersham bioscience)を用いて化学発光法により検出した。検出には LAS-3000 (富士写真フィルム社)を使用し、定量解析を行なった。

3) 分離培養によるプリオンの粒子サイズの推定
孔径 8 μ m~20 nm のトランスウエルインサート (Nunc 社)を用いて、ScN2a-3 と N2a-3 の分離培養を行った。インサートに ScN2a-3 を、外側 (シャーレ)には N2a-3 を巻き込み、72 時培養した。インサートを取り除いた後、N2a-3 を 4~8 代連続継代した。N2a-3 へのプリオンの伝達は、PrP^{Sc} をドットプロットで検出することにより判定した。

B-6 競合的EIAによる高感度ウシPrP^{Sc}検出法の開発

1) 細胞培養

ウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b (JCRB9129)は T75 組織培養用フラスコで培養し、1 週間に 1 度の継代を行った。長期間の培養は 9-cm 組織培養用シャーレで行い、4 日ごとに培地を交換した。

PrP 欠損マウス脳由来細胞株 HpL3-4 は、東京大学東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学小野寺節教授より供与された。

2) イムノプロット法

試料を SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜へ転写し、第 1 抗体として抗 PrP 抗体 6H4 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を、第 2 抗体に HRP 標識抗 IgG 抗体を用いたイムノプロットを行い、化学発光法で検出した。

3) 競合的 ELISA

固相抗原に組換えウシ・プリオン蛋白質 (rBoPrP) を、第 1 抗体に 6H4 抗体を用いて競合的 ELISA を行い、阻害実験には標準物質として rBoPrP を用いた。

4) 競合的 EIA

6H4 抗体が認識するエピトープ DYEDRYRE を含むペプチドを β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) で標識し、酵素標識抗原 β -Gal-hPrP (142-160) を調製した。抗体と酵素標識抗原による抗原-抗体複合体を形成させ、96 穴プレートの固相に結合させた抗マウス IgG 抗体で捕捉し、固相に結合した酵素の活性を基質として 4-MUG を用いて蛍光強度を測定した。阻害実験には、標準物質として rBoPrP を用いた。

B-7 ウシPrP産生細胞の樹立

モロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV) 由来のレトロウイルスベクターにウシ PrP 遺伝子エクソン 3 の ORF を組み込み、当ベクターを導入したヒト HEK 細胞由来パッケージング細胞の培養上清からウイルス粒子を調製し、プリオンノックアウトマウス (*prnp* ^{-/-}) 脳から樹立された培養細胞株 HpL3-4 に感染させ、ウシ PrP 産生細胞株を樹立した。

B-8 PrP^{Sc}検出法への応用が期待できるウシブライズ変異型 PrP mRNA の検索

BCE-C/D-1b 細胞を培養後、DNase I 消化した total RNA を調製し、スーパースクリプト III RNase H-逆転写酵素 (インビトロジェン株式会社) を用いて fs-cDNA を合成し、RT-PCR に用いた。同時にゲノム DNA を調製し、陽性対象として PCR に用いた。PCR はウシ PrP 遺伝子 (AJ298878) のエクソン 3 にコードされているオープンリーディングフレーム (ORF) の mRNA を検出する各種プライマーと、Pwo SuperYield DNA Polymerase (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) 又は Ex taq polymerase (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

1) 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。

2) 本研究の遂行にあたり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」、「同病原体等安全管理規程」、「同動物実験に関する指針」及び「同遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

C. 研究結果

C-1 調査研究

1) 製造工程の PrP^{Sc} 除去/不活化評価法

培養細胞を用いた多くのバイオ医薬品では、シード細胞の樹立やセルバンクの確立、さらには製造工程の一部あるいは全工程にわたってウシ胎仔血清やウシ由来添加剤が用いられていること、またバイオ医薬品の精製工程に用いられる抗体等の製造や培養工程に添加される添加剤等の製造にもウシ由来製品が用いられている場合があることなどより、PrP^{Sc} の混入/迷入の低減は、医薬品の安全性を確保するための大きな課題となっている。一方で、PrP^{Sc} が血液を介して伝播するリスクが言われていることから、添加剤として使用されることが多いヒト血清アルブミン等についても懸念が指摘されている場合がある。そのため、製造工程における PrP^{Sc} の高感度検出法の開発や除去及び不活化方法の確立、並びに PrP^{Sc} の除去/不活化評価法の確立が望まれている。

現在、PrP^{Sc} の除去及び不活化が期待されている工程として、冷エタノール分画、ポリエチレングリコール沈殿、クロマトグラフィー、及びフィル

ターを用いたろ過などがある。特に、冷エタノール分画、ポリエチレングリコール沈殿は、プリオン除去効果が高いとされている除去工程である。これに対して、クロマトグラフィーは、分離原理の異なるいくつかの方法が検討されているものの、実行可能性は明らかではなく、現段階ではプリオン除去のための2次的手法と位置づけられている。フィルターを用いたろ過工程は、プリオンの粒子サイズと感染性を調べた研究により、粒子径17-27nmのプリオンの感染性が最も高いことが報告されていることから、PrP^{Sc}の効果的除去が期待されている工程の一つある。実際、スクレイパープリオンを15nmフィルターでろ過することによって、Western blottingでは検出できなくなる程度にPrP^{Sc}が低減することが報告されており、PrP^{Sc}除去工程としてのフィルター使用の有用が示唆されている。しかし、15nmフィルターを用いて、タンパク質レベルでは異常プリオンタンパク質は検出されないにもかかわらず、高感度検出法である*in vivo*アッセイを用いた場合に、PrP^{Sc}が検出されることが報告されている。このことは、上記した粒子径17-27nmのプリオンの感染性が最も高いこととする報告とことなる形態の感染性PrP^{Sc}が存在することを示唆しており、PrP^{Sc}の検出やクリアランスを考える上で非常に重要である。

PrP^{Sc}の除去/不活化評価法として、PrP^{Sc}をスパイクし、各工程のクリアランス指標を求めるクリアランス評価が検討されている。スパイクするPrP^{Sc}としては、脳ホモジネート、脳ホモジネートから調製したマイクロゾーム画分、及びカベオラ様ドメインなどがある。脳ホモジネートから調製したプリオン粒子サイズは800nm程度であること、また、超音波処理や界面活性剤処理により調製したマイクロゾーム画分の粒子サイズは220nm程度であることが報告されており、現在では、超音波処理や界面活性剤処理を施したPrP^{Sc}をスパイクすることが多い。

クリアランス評価においては、工程ごとにプリオンの分配を定量する必要がある。現在のところ、PrP^{Sc}定量法として利用されている方法は、プロテアーゼ抵抗性をWestern blottingで確認する方法、PrPを発現する培養細胞(N2a, GT1など)を用いた*in vitro*試験法、動物モデルに投与して神経系疾患発症までの潜伏期間を測定する*in vivo*アッセイ、脳や脾臓の病理切片を用いた免疫染色法、脳乳液を試料としたイムノブロット法やELISA、周期的に超音波処理をくり返して試料中のPrP^{Sc}を増幅して検出感度を向上させるprotein misfolding cyclic amplification(PMCA)などである。この中で最も高感度な測定法は*in vivo*アッセイであるが、検出に数か月間を要するという問題を抱えている。プリオン除去/不活化評価法の標準化において、PrP^{Sc}を迅速かつ高感度・高選択的に検出する方法の開発が不可欠であることが明らかとなった。

2) PrP^C及びPrP^{Sc}の構造特性

PrP^{Sc}高い選択性をもって高感度に検出可能な手法を開発するには、PrP^{Sc}と正常プリオン(PrP^C)の構造特性の違いを明らかにする必要がある。そこで、PrP^{Sc}、及びPrP^Cの構造特性、特に糖鎖とGPIアンカーの構造に関する調査研究を行った。

構造全体

PrPは、アミノ酸209残基からなるGPIアンカー型の糖タンパク質である。一次構造はPrP^C、及びPrP^{Sc}で変わらず、ラット、マウス、ハムスター、ヒトで約90%の相同性を持つ。Asn181(マウス:Asn180)、及びAsn196(ヒト:Asn197)はN-型糖鎖結合可能位置であり、Asn231にはGPIアンカーが結合している。三次構造は、PrP^Cにおいて α -ヘリックス構造の割合が、PrP^{Sc}では、 β -シート構造の割合が高くなっており、PrP^{Sc}は、宿主PrP^Cの三次構造の変化によって生じると考えられている。また、PrP^C、及びPrP^{Sc}のPIPLCに対する感受性(PrP^C:+, PrP^{Sc}: -)、及びProteinase Kへの抵抗性(PrP^C: -, PrP^{Sc}: +)は異なる(変性させた場合、PrP^C、及びPrP^{Sc}共に、PIPLC、及びProteinase Kの両方に対して感受性となる)。PrPは、SDS-PAGEで分子量約33-35 kDa付近に検出されるが、Proteinase K消化されたPrP^{Sc}

(PrP27-30)は、分子量約27-30 kDa付近で検出される。この他に、PrPには、Asn228までの長さのGPIアンカーが結合していないものや、N末端側から約90残基が切断されたもの、PrP^Cでは、膜貫通型が存在する。糖タンパク質の糖鎖には結合部位特異的不均一性があるため、これらの長さの異なるPrPに対して、それぞれ複数のグライコフォームを持ち、PrP^{Sc}のグライコフォームの多様性は、PrP^{Sc}株種によって異なる。

糖鎖構造

ハムスター脳より調製したマイクロゾーム画分、及びホモジネートについて、PNGase F、及びEndo-H消化前後のSDS-PAGE上のPrP^C、及びPrP^{Sc}の泳動パターンを比較することによって、PrP^C、及びPrP^{Sc}には、コンプレックス型糖鎖が結合していることが示された。PrP^{Sc}より精製したPrP27-30については、シアリダーゼ消化前後のレクチンとの結合を調べることによって、コンプレックス型糖鎖には非還元末端からNeuAc、Galが、還元末端側のGlcNAcにFucが結合していることが示されている。さらに、精製されたハムスター脳PrP27-30の糖鎖について、ヒドラジンをういて糖鎖を遊離後、トリチウム標識し、カラムクロマトグラフィー、逐次エキソグリコシダーゼ消化、メチル化分析等を組み合わせて構造が解析された。PrP^{Sc}には、2本鎖、3本鎖、及び4本鎖のコンプレックス型糖鎖が結合しており、400以上のグライコフォームが存在することが報告されている。また、PrP^C、及びPrP^{Sc}に結合する糖鎖構造の違いについて、ハムスター脳のPrP^C、及びPrP27-30よりヒドラジンで切り出された糖鎖のMSや、還

元末端を 2-AB で標識された糖鎖の HPLC 溶出位置が比較され、PrP^{Sc}では bisecting GlcNAc が結合した糖鎖の割合が減少し、3 本鎖、及び 4 本鎖糖鎖の割合が増加していることが報告されている。

結合部位ごとの糖鎖構造については、精製されたマウス PrP^{Sc}を還元アルキル化後、トリプシン消化し、逐次エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた LC/MS、及び LC/MS/MS によって解析されている。Asn180 には、2 本鎖、及び 3 本鎖のコンプレックス型糖鎖が、Asn196 には、3 本鎖、及び 4 本鎖のコンプレックス型糖鎖が主に結合しており、Asn180 では、Lewis X 構造、Asn196 では、Lewis X 構造、及び sialyl Lewis X 構造を非還元末端に持つ糖鎖の割合が高いことが示されている。

GPI アンカー構造

ハムスター脳 PrP27-30 を加水分解後、トリメチルシリル化し、GC/MS を行うことによって、GPI アンカーは、エタノールアミン、イノシトール、リン酸、ステアリン酸で構成されることが示された。

GPI アンカーの糖鎖構造は、ハムスター脳 PrP27-30 について、PIPLC、及びエンドプロテイナーゼ Lys-C 消化で得られた GPI 結合ペプチドを単離し、HF 処理、メチル化後、MS/MS によって、また、単離された GPI 結合ペプチドについて、エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた MS によって解析されている。糖鎖部分の主な構造は、Man-Man-Man-(GalNAc-)Man-GlcN-Ino、又は Man-Man-(Gal-GalNAc-)Man-GlcN-Ino であることが示された他、NeuAc を含む構造±Man-Man-Man-(NeuAc-Gal-GalNAc-)Man-GlcN-Ino が示された。GPI の糖鎖部分に Gal を含む構造は哺乳類で、NeuAc を含む構造はすべての種において初めての構造であり、PrP^Cについても、NeuAc を含む GPI 構造を持つことが示されている。

C-2 PrP の分画

PrP の糖鎖構造解明のための基礎的検討として、糖鎖構造解析に最適な PrP の調製方法を検討した。PrP は、主として脳に存在する GPI アンカー型の膜タンパク質である。脳には、脂質類が多く、タンパク質と混在した状態では、分画への影響が懸念された。そこで、クロロホルム/メタノール混液中で試料の均質化を行うことによって脱脂した後、分画を行うこととした。モデル試料として、ラット脳アセトン粉末を用い、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて膜タンパク質の可溶化を行い、PrP^Cを分画することを試みた。図 2 に示すような手順に従って分画を行い、得られた沈殿 (画分 P)、及び上清 (画分 S) に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離した (泳動図: 図 3, レーン 1: 分子量マーカー, 2: 画分 P(1/1000), 3: 画分 S(4/100))。

SDS-PAGE で分離・検出された主なバンド中に含まれるタンパク質は (画分 P: バンド 1-18, 画

分 S: バンド 1-21)、ゲル内消化後、抽出されたペプチドについて LC/MS/MS を行い、得られたすべてのプロダクトイオンを用いたデータベース検索によって同定した。筆頭に同定されたタンパク質を表 1 に示す。PrP は筆頭に同定されなかったが、画分 S のバンド 2, 3, 7, 8, 及び 11 に含まれることが判った。バンド 2, 及び 3 で検出された PrP については、PrP のタンパク質部分の分子量が約 22,300 Da であることから、分解物であると推定された。また、PrP がバンド 7, 8, 及び 11 の広範囲に検出されたのは、複数の構造を有する糖鎖、及び GPI アンカーの結合により多数の分子種が存在するためと考えられた。以上のことから、脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて可溶化し、PrP を分画できることが判った。

C-3 近赤外分光法

PrP^{Sc}をマウス脳内に接種する in vivo 検出手法は、最も高感度な PrP^{Sc}の検出法であり、EMEA の PrP^{Sc}のクリアランス評価においても基本的には in vivo 試験での結果に基づいてリスクを評価すべきとされている。しかし、試験期間が長期に渡ることから、迅速性のある方法の開発・改良が望まれている。そこで、PrP^{Sc}の in vivo アッセイ法の迅速化を目的として、プリオン病の生前診断法としての近赤外分光法の有用性を検討した。

スクレイピー脳内接種マウス体表から得た近赤外スペクトルの多変量解析によりプリオン感染による酸素化ヘモグロビンおよび Cytochrome c oxidase の変化が観察され、プリオン感染生前診断への本法の有効性が確認された。スクレイピープリオン接種ハムスターの剖検脳の近赤外分光法解析により、ウェスタンブロット法によるプリオン出現の確認結果と一部一致しない結果はあるものの、かなりのサンプルで一致する結果が得られた (表 2)。

C-4 平均孔径 15nm のナノフィルターによるプリオン除去評価

高度超音波処理によって粒子系分布をコントロールしたプリオンサンプルを用いて、平均孔径 15nm のナノフィルターによるプリオン除去評価を行い、クリアランス評価への応用を検討した。

15nm の平均孔径をもつフィルターであっても WB 法ではろ液に 263K は認められないが、in vivo アッセイ法では感染性が認められることが判明した。更にそのろ液中の感染性プリオン蛋白について検討を行ったところ、ろ液の超遠心操作 (150,000 × g, 1 時間, 2 回) の沈殿画分のみならず上清画分にも感染性プリオン因子が存在していることがわかった (表 3, 図 4)。

C-5 培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状の解析

培養細胞由来医薬品等のプリオン汚染の検出、プロセスバリデーション、あるいはリスク評価の

ためには、培養細胞中に存在するプリオンの物理化学的性状を知る必要がある。プリオン感染動物の脳由来の PrP^{Sc} を界面活性剤処理することで、PrP 分子 10 数個の凝集体からなるプリオンが産生されるように (Silveira, J. R., *et al.* Nature 437: 257-261 (2005))、プリオンの感染性を担う PrP^{Sc} 凝集体の粒子サイズは小さいと考えられる。また、我々は過去 3 年間の本研究班における研究で、プリオン感染動物脳乳剤を Sarkosyl (*N*-ラウロイルサルコシンナトリウム) 処理することで、孔径 35nm 以下のプリオンが抽出可能であることを示した。このように、人工的な処理を加えて得たプリオンの粒子サイズに関する知見は集積しつつある。一方、培養細胞から放出されるプリオンは、PrP^{Sc} 凝集体単独で存在するのではなく、エクソソームなどの小胞に付随した形で放出されることが示唆されているが (Fevrier, B., *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 101: 9683-9688 (2004))、その詳細な物理化学的性状は不明である。そこで、本研究では、培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状について解析した。

ScN2a-3細胞の培養上清中のプリオン感染性は 10p および 100p 画分に存在した (結果は示さず)。そこで、10p および 100p 画分におけるプリオン感染性の比較定量解析を実施した (図5)。その結果、10p 画分に存在するプリオン感染性は 100p 画分の 4-8 倍であった。10p および 100p にプリオン感染性が存在したことから、これらの画分からの PK 抵抗性 PrP^{Sc} の検出を試みた。10p および 100p 画分をショ糖密度勾配を用いて分画し、各々の画分から、PK 処理を行わずに総 PrP、および PK 抵抗性 PrP^{Sc} の検出を行った (図6)。総 PrP は脂質ラフトのマーカーである GM1 と同じ画分から検出されたが、PK 抵抗性 PrP^{Sc} のバンド強度は非常に弱く、PrP^{Sc} の存在を確認するには至らなかった。従って、培養上清中に放出されるプリオン感染性は、PK 抵抗性が弱い PrP^{Sc} に付随する可能性が示唆された。

100p 画分にもプリオン感染性が検出された (図5)。培養細胞から放出されるプリオンの一部は、既報のように、エクソソームのような粒子径の小さい膜小胞に付随している可能性が示唆されたことから、孔径の異なるトランスウエルを用いて分離培養を行い、粒子サイズの推定を行った。その結果、プリオン感染性のうち最も小さいものは、200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しないことが判明した (図7)。

C-6 競合的 EIA による高感度ウシ PrP^{Sc} 検出法の開発

遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いた細胞培養を行うものが多く、医薬品に PrP^{Sc} が混入するおそれから、ウシ由来原材料中の高感度 PrP^{Sc} 測定法の確立が望まれている。そこで、製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とした PrP^{Sc} の検出法の開発に資する基礎研究として、競合的 EIA によるウシ

PrP^{Sc} 測定法の構築を検討した。

抗体として市販の抗 PrP モノクローナル抗体 6H4 を用いた。この抗体が認識するペプチドに β -ガラクトシダーゼを結合させて酵素抗原複合体 β -Gal-hPrP (142-160) を作製した。また、阻害物質として組換えウシ PrP を用いた。50% 最大結合量を示した抗体量で競合的 EIA を行った結果を図8に示す。rBoPrP は 6H4 抗体に対して 10^{-14} - 10^{-11} mole で阻害活性を示し、その IC₅₀ は 6.5×10^{-13} mole であった。一方、従来の競合的 ELISA では 10^{-15} - 10^{-11} mole で阻害活性を示し、その IC₅₀ (1.0×10^{-13} mole) は競合的 EIA の 1/6.5 だった。本方法は従来の競合的 ELISA と同様にウシ PrP を測定可能であり、測定時間の短縮への寄与が期待できた。

C-7 ウシ PrP 産生細胞株の樹立

プリオン病のバイオアッセイにはマウスやハムスターへの脳内接種が用いられているが、発病までに長期間を要することから、培養細胞へ PrP^{Sc} を伝達する迅速化が試みられている。PrP^{Sc} を持続的に維持する培養細胞として、本研究の C-5 でも使用している ScN2a 細胞等があるが、本細胞はマウス神経系の細胞であり、動物種のバリアが存在するため、動物種が異なる脳乳液を接種したマウスでは発病が遅れる例が知られている。本研究ではウシ PrP^{Sc} の検出を行うことから、バイオアッセイにウシ型の PrP を発現する細胞の樹立を目的として、プリオン欠損マウス脳由来細胞株 HpL3-4 細胞でウシ PrP 遺伝子の導入を試みた。また、安定した発現細胞を得るために、導入には持続的に蛋白質を発現させるレトロウイルスベクターを検討した。

レトロウイルスベクターを用いてプリオンノックアウトマウス (*prnp* ^{-/-}) 脳由来の PrP 欠損細胞株 HpL3-4 にウシ PrP 遺伝子の ORF を導入し、免疫ブロット法で BoPrP の産生を調べた (図9)。親株の HpL3-4 細胞 (lane 1) 及びレトロウイルスベクターを導入した細胞 (lane 2) から調製した全細胞溶解液では、6H4 抗体が認識するバンドは検出されなかったが、ウシ PrP 遺伝子の ORF を導入した細胞から調製した全細胞溶解液では、6H4 が認識する 35 及び 31 kDa のバンドが検出された (lane 3)。数回の継代後にも BoPrP の産生が確認され、PrP の安定的な産生が期待できた。樹立した本細胞株は、BoPrP 産生細胞株として今後、*in vitro* アッセイへの有用性を評価する予定である。

C-8 スプライス変異型 PrP mRNA の解析

先の厚生労働科学研究費補助金で、遺伝子組換え医薬品等の製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とし、PrP^{Sc} の検出法の開発に資する基礎研究として、PrP^C を高発現しているヒトグリオブラストーマ細胞株 T98G を対象とした研究を行ってきた。T98G 細胞は継代を重ねた後の長期間培養で、プリオン蛋白質 (PrP) の C 末端と GPI アンカーシグナル配列が欠落したスプ

ライス変異型PrP mRNAの発現することを確認し、そのC末端部位を認識するモノクローナル抗体HPSV178を用いてスプライス変異型GPI欠損プリオン蛋白質(GPI⁻PrP^{Sc})を同定した(投稿中)。以上の知見をもとに、平成19年度は異常型プリオン蛋白質の新規検出法として以下の研究を行った。

ヒトGPI⁻PrP^{Sc}のC末端は通常のスプライシングによるPrPと異なり、特異的に認識する抗体によって異常型プリオン蛋白質検出法への応用が期待できることから、同様な手法を用いてウシスプライス変異型PrP mRNAの検索を行った。ウシPrP mRNAの発現様式を調べるため、長期間培養したウシ角膜細胞株BCE C/D-1bから調製したtotal RNAを鋳型として、RT-PCRを行った。13回の継代後に40日間培養したBCE C/E-1b細胞(P13D40)のtotal RNAから合成したfs-cDNAを鋳型としたRT-PCRでは、1,347 bpのバンドのほかに、産生量は少ないが836 bpのバンドを検出した(図10, lane 3)。それぞれのバンドをゲルから切り出して塩基配列を解析したところ、1,347 bpの塩基配列はORFを含むウシPrPエクソン3をコードし、836 bpの塩基配列ではBoPrPのC末端に位置するGPIアンカーシグナル配列を含む511 bpが欠落していた(図11)。同時に調製したBCE C/E-1b細胞(P13D40)のゲノムDNAを鋳型としたPCRでは1,347 bpのバンドが検出され、その塩基配列はtotal RNA由来の1,347 bpのバンドと一致したが、836 bpのバンドは検出されなかった(図10, lane 7)。以上の結果から、BCE C/D-1b細胞はウシPrPエクソン3のスプライス変異型mRNAを発現することが示唆された。

次に、エクソン結合部位に結合するプライマー(exon-exon junction primer)を設計し、スプライス変異型PrPのmRNAを特異的に検出するRT-PCRを構築した。スプライシングで欠落する部位(511 bp)を挟み、その両端の配列を結合させたプライマーを用いたPCRは、fs-cDNAに130及び744 bpのバンドを示したが(図10, lanes 1-2)、genomic DNAではバンドが検出されなかった(図10, lanes 5-6)。また、切り出した130及び744 bpのバンドの塩基配列は、エクソン3のそれぞれ641及び1,255 bpに相当する部位から511 bpの配列が欠失したものと一致した。以上の結果から、設計したexon-exon junction primerはエクソン結合部位と結合し、構築したRT-PCRでスプライス変異型PrPのmRNAを特異的に検出可能なことが示唆された。

D. 考察

D-1 調査研究

1) PrP^{Sc}除去/不活化法の標準化

異常プリオンの高感度検出法や検出のための試料調製法、さらにはPrP^{Sc}除去/不活化法の標準化に向けた調査研究の結果、PrP^{Sc}クリアランス評価試験整備の必要性、さらにクリアランス評価におけるPrP^{Sc}の迅速かつ高感度・高選択的検出法の開発が不可欠であることが明らかとなった。そこで、

本研究では、PrP^{Sc}の迅速かつ高感度高選択的検出法の開発を目的として、PrP^{Sc}高選択的検出法の開発を目指したPrP/PrP^{Sc}構造特性解析のためのPrP/PrP^{Sc}分画法の構築、in vivo PrP^{Sc}アッセイ法の迅速化を目的としてプリオン病の生前診断法としての近赤外分光法の有用性評価、高度超音波処理によって粒子系分布をコントロールしたPrP^{Sc}を用いた平均孔径15nmのナノフィルターによるPrP^{Sc}除去評価、培養細胞から放出されるPrP^{Sc}の物理化学的性状の解析、競合的EIAによる高感度ウシPrP^{Sc}検出法の開発、培養細胞を用いたPrP^{Sc}の感染性検出法の開発を目的としたPrP^{Sc}易伝達性細胞を用いた検出法の開発を目的としたウシPrP高発現細胞株の樹立、並びにPrP^{Sc}検出法への応用が期待できるウシスプライス変異型PrP mRNAの検索を行った。

2) PrP^C及びPrP^{Sc}の構造特性

PrP^{Sc}の迅速かつ高感度高選択的検出法の開発を目的とした構造特性に関する調査研究の結果、PrP^Cは、2箇所の糖鎖結合可能部位(Asn181, Asn196)を持つ糖タンパク質であり、PrP^Cと比べるとPrP^{Sc}には3本鎖、及び4本鎖のコンプレックス型糖鎖が多いこと、また、これらの糖鎖は主にAsn196に結合していることが分かった。これまでに解析されたすべての種のPrP^C及びPrP^{Sc}のGPIアンカー糖鎖は、NeuAcが結合したユニークな構造であったが、PrP^C及びPrP^{Sc}の差異は明らかにされていなかった。以上の調査結果から、PrP^C及びPrP^{Sc}の部位特異的糖鎖構造はまだ十分に解析されていないこと、また、GPIアンカー構造については差異が不明であることが確認され、PrP^{Sc}選択的検出法の開発には、PrP^C及びPrP^{Sc}の部位特異的糖鎖構造、及びGPIアンカーの糖鎖構造の差異を明らかにする必要があると考えられた。

D-2 PrPの分画

PrP^C及びPrP^{Sc}の構造解析を行うために、モデル試料として、ラット脳粉末を用いて、PrP^Cの分画を検討した。その結果、脱脂後、非イオン性界面活性剤Triton X-114を用いてPrP^Cを可溶化し、分画できることが判った。しかし、PrP^CがSDS-PAGEで分離されたゲル中の主なタンパク質でないことから、ゲル中のPrP^Cを用いて構造解析を進めるには、PrP^Cを高純度、高回収率で生体試料より分画する必要があると考えられた。来年度は、生体試料からのPrP^Cの可溶化、混在するタンパク質の除去等の試料分画法の検討や、ゲル中の微量PrP^Cを用いて、糖鎖構造、及びGPIアンカー構造を解析するための試料調製方法、及びMSの分析条件の検討を行っていく予定である。また、PrP^{Sc}については、PrP^C分画の検討を踏まえ、界面活性剤の選択や、Proteinase K消化を組み合わせた分画方法を検討していく。

D-3 近赤外分光法

マウス脳内接種による発症までの時間は2つのストレインでほぼ同じである。すなわち、本実験条件におけるマウスのincubation timeはchandlerで197.3±5.6, Obihiroで193.7±6.5日であった。近赤外分光法により、プリオン感染を識別可能な時期は、耳部と腹部のどちらの近赤外スペクトルを用いた場合もincubation timeよりも早期であったため(表1)、本法は生前診断法として有用であると考えられ、本手法を用いてマウス脳内接種in vivoアッセイ法の迅速化が期待される。しかし、生前診断法として用いる場合、様々な類似の疾患で同様の変化が観察されないか、詳細に検討を行う必要がある。また、ハムスターの結果から一部ウェスタンプロット法の結果と一致しない場合があったことから、今後、感度等について検討していく必要がある。

D-4 平均孔径15nmのナノフィルターによるプリオン除去評価

感染性のプリオン因子は少なくとも15nmの平均孔径を有するフィルターでそのほとんどが捕捉されるものの、その一部は通過することが可能であり、その性状は超遠心操作の沈殿及び上清画分の両方に存在することが明らかになった。このことはWestern blotting時の感度向上やバッファー交換を目的とした超遠心操作でプリオンを濃縮するときの留意点を提議しており、プリオン除去の完全性を確認するには感染実験が必要であることを示唆している。また、これまで指摘されているPrP^{Sc}の感性的の重合体の大きさは異なるところにも感染性が認められることを示しており、PrP^{Sc}の検出法の開発においても重要な情報となる。

D-5 培養細胞から放出されるプリオンの物理化学的性状の解析

培養細胞由来医薬品等のプリオン汚染の検出、あるいはプロセスバリデーションのためには、培養細胞中に存在するプリオンの物理化学的性状を知る必要がある。当研究室で樹立したN2a-3細胞にプリオンが持続感染したScN2a-3細胞は、培養上清中に、細胞を用いたアッセイで容易に検出できる量のプリオン感染性を放出することから、ScN2a-3の培養上清中に放出されるプリオンの物理化学的性状について解析した。

培養上清中に存在するプリオンの80%以上は10p画分に検出されることから、比較的大きな粒子サイズであると考えられる。しかし、PK抵抗性PrP^{Sc}は容易に検出されないことから、PrP^{Sc}分子のみで大きな凝集体を形成しているのではなく、PK抵抗性が弱いPrP^{Sc}凝集体が比較的大きな膜小胞に付随して存在する可能性が示唆された。

エクソソームは、粒子径はおおよそ30 - 100 nmであり、ウイルス粒子と同様に100p画分に回収される。100p画分に存在するプリオン感染性は、10p画分と比較して明らかに少なかったことか

ら、培養上清中のプリオンの多くはエクソソームには付随していないと思われる。

一方、プリオン感染性の一部は、ウイルス粒子と同様に100p画分に回収され、かつ、孔径200 nmを通過することが明らかとなった。これらの性状はエクソソームと一致すること、また、エクソソームの形成に関与するAlixやTsg101の発現をsiRNAで抑制することにより、200 nmを通過する画分の感染性は著しく低下したことから(結果は示さず)、プリオン感染性の少なくとも一部は、既報のように(Fevrier, B., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2004)、エクソソームに付随すると考えられる。

D-6 競合的EIAによる高感度ウシPrP^{Sc}検出法の開発

高感度ウシPrP^{Sc}検出法の開発を目的として、市販の6H4抗体を用い、その認識するエピトープを含むペプチドを酵素標識した競合的EIAを構築した。本方法は主に低分子のハプテンの測定に利用されているが、本研究ではペプチドを酵素標識した測定系を構築した。競合的EIAは、通常2抗体法による競合的ELISAに比較して抗原抗体反応に要する時間を短縮できる利点があり、本研究でも測定時間の大幅な短縮が可能となった。しかし、その検出感度は競合的ELISAに比較すると、若干低い値を示した。今回は酵素としてβ-Galを化学的にペプチドに結合させて用いたが、エピトープとして認識するアミノ酸配列をタグとしてβ-Galやルシフェラーゼ等の酵素に付加した組換え蛋白質発現系の利用によって酵素の比活性を上げることにより、検出感度の上昇が期待できる。この手法はPrP^{Sc}だけではなく、蛋白質の1次配列をエピトープとして認識する抗ペプチド抗体に適用が可能で、様々な蛋白質を検出する競合的EIAの構築への利用が見込まれる。

D-7 ウシPrP^{Sc}産生細胞株の樹立

樹立した細胞株は6H4抗体が認識するウシ型のPrP^{Sc}を発現し、その発現は数回の継代後も維持されていた。今後は、この細胞株を用いたPrP^{Sc}の伝達実験を予定している。

D-8 スプライス変異型プリオン蛋白質mRNAの解析

プリオン病の診断法として、脳内のPrP^{Sc}を直接測定する代わりに、罹患状態で特異的に増減するバイオマーカーを検出して生前診断に利用する試みとして、脳脊髄液中の蛋白質の7種類アイソフォームやtau蛋白質の測定や、血液又は尿中の蛋白質の検索が行われている。しかし、これらは代理マーカーであり、すべてのプリオン病における共通指標にするには注意が必要である。先の厚生労働科学研究費補助金で我々は、培養細胞及びヒト各種臓器由来のtotal RNA中でスプライス変異型

PrP mRNAを検出し、抗体を用いて、ヒト培養細胞中におけるPrPSVの産生を確認した(投稿中)。ヒトPrPSVはGPI欠損型のPrPで、細胞外への放出が予想される。本研究ではプリオン病のバイオマーカーとしてスプライス変異型PrPを利用することを目的とし、ウシ培養細胞から調製したtotal RNAを用いて検索を行った。ヒトPrPSVの検索と同様の手法を用い、ウシ角膜細胞株BCE C/D-1bからスプライス変異型PrP mRNAを同定し、その塩基配列からタンパク質のアミノ酸配列を推定した(図11)。ウシPrPは264残基のアミノ酸配列を有し、242-264残基はGPIアンカーシグナル配列と推定され、241残基のAlaを介して細胞膜上に結合している。一方、ウシPrPSV mRNAから推定されるアミノ酸配列は260残基からなり、1-240残基はPrPと共通であったが、241-260残基は異なったアミノ酸配列を有していた。予想されるウシPrPSVの構造は、ヒトと同様にそのC末端がPrPと異なっており、現在、241-260残基のアミノ酸を認識する抗体の作製を進めている。今後はウシPrPSVの産生を確認し、プリオン病のバイオマーカーとしての利用の可能性を調べる予定である。

E. 結論

- 1) プリオン除去/不活能評価において、高感度高選択的PrP^{Sc}検出法の開発が不可欠であることが明らかになった。
- 2) PrP^{Sc}/PrPの糖鎖構造解析法確立のために、脱脂及び非イオン性界面活性剤Triton X-114を用いたPrPの効率的分画法を構築した。
- 3) *In vivo*PrP^{Sc}アッセイ法の迅速化を目的として、近赤外スペクトル法はプリオン病発症の生前診断法として有用であることが判明した。
- 4) プリオンクリアランス試験用のスパイク材料の調製法としての高度超音波処理と15nmフィルターによる除去は有効性を確認した。一方で、15nmフィルターを通過す感染性プリオンの一部は超遠心操作で沈殿しないことから、従来報告されていたよりもより少ないPrP^{Sc}重合体に感染性があることが示唆された。
- 5) 培養細胞の上清中に放出されるプリオンの感染性は、10,000×gで沈殿する画分(10p)で最も高く、100,000×gで沈殿する画分(100p)にも確認された。しかし、培養上清中に放出されるプリオンを構成するPrP^{Sc}のPK抵抗性は弱いこと、また、粒子サイズの小さいものは200 nmの孔径は通過するが20 nmの孔径は通過しないことが分かった。
- 6) 6H4抗体、及びその抗体が認識するエピトープを含むペプチドとβ-Galを結合させた酵素抗原複合体を用いた競合的EIAを構築した。
- 7) *In vitro*PrP^{Sc}感染系の確立を目的として、PrP産生細胞株を樹立した。
- 8) スプライス変異型ウシPrP mRNAを検出するRT-PCRを確立した。

これらの結果は、製造工程におけるPrP^{Sc}除去/不活能評価法の標準化や高感度PrP^{Sc}検出法の開発につながる成果である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井 則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 2007, 25, 1127-1136
- 2) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, and Teruhide Yamaguchi: Glycopeptide analysis using LC/MS and LC/MS/MS, in *The Protein Protocols Handbook* (John Walker, ed.) Humana, Totowa, NJ. *in press*
- 3) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* *In press*
- 4) Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Onodera T, Ikuta K. Normal cytochrome c oxidase activity in prion protein gene-deficient mice. *Protein Peptide Lett* (*in press*)
- 5) Sakudo A, Nakamura I, Tsuji S, Ikuta K. GPI-anchor-less human prion protein is secreted and glycosylated but lacks SOD activity. *Int J Mol Med.* 2008, 21:217-222.
- 6) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. PrP^{Sc} level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection. *Neurosci Lett.* 2008, 431:81-85.
- 7) Sakudo A, Wu G, Onodera T, Ikuta K. Octapeptide repeat region of prion protein (PrP) is required at an early stage for production of abnormal prion protein in PrP-deficient neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 365: 164-169.
- 8) Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C and Ikuta K. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals.* 2008; 36: 27-36.
- 9) Nojima J, Sakudo A, Hakariya Y, Kuratsune H, Watanabe Y, Kanakura Y, Ikuta K. Spectroscopic diagnosis of anti-phospholipid antibodies by visible and near-infrared spectroscopy in SLE patients' plasma samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007: 362, 522-524.

- 10) Sakudo A, Yoshimura E, Tsenkova R, Ikuta K, Onodera T. Native State of Metals in Non-digested Tissues by Partial Least Squares Regression Analysis of Visible and Near-infrared Spectra. *J Toxicol Sci.* 2007; 32, 135-141.
 - 11) Sakudo A, Nakamura I, Lee DC, Saeki K, Ikuta K, Onodera T. Neurotoxic prion protein (PrP) fragment 106-126 requires the N-terminal half of hydrophobic region of PrP in the PrP-deficient neuronal cell line. *Protein & Peptide Lett* 2007; 14, 1-6.
 - 12) Nakamura I, Xue G, Sakudo A, Saeki K, Matsumoto Y, Ikuta K, and Onodera T. Novel single nucleotide polymorphisms in SPI-binding site of Bovine PRNP promoter in Japanese Black cattle: Impairment of its activity. *Intervirology* 2007; 50, 190-196.
 - 13) Sakudo A, Nakamura I, Ikuta K, Onodera T. Recent development in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models (Review). *J Vet Med Sci.* 2007; 69, 329-337.
 - 14) Sakudo A, Hakariya Y, Kobayashi T, Ikuta K. Visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy: introduction and perspectives for diagnosis of chronic fatigue syndrome (Review). *J liME.* 2007; 2, 8-18
 - 15) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. Prion protein gene-deficient cell lines: Powerful tools for prion biology (Review) *Microbiol Immunol.* 2007; 51, 1-13.
 - 16) Uryu, M., Karino, A., Kamihara, Y., and Horiuchi, M. Characterization of prion susceptibility in Neuro2a mouse neuroblastoma cell subclones. *Microbiol. Immunol.*, 51: 661-667, 2007.
 - 17) Ohara, J., Tokari, T., Kurokawa, A., Maeda, J., Ishiguro, N., Furuoka, H. and Horiuchi, M. Frequencies of PrP genotypes in meat breeds of Japanese sheep and trail of selective breeding in experimental sheep flock. *J. Vet. Med. Sci.*, 69 : 1325-1329, 2007.
 - 18) Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, and Kinjo M. Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Anal Biochem.*, 370: 131-141, 2007.
 - 19) Watanabe, Y., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Horiuchi, M., and Kuwabara, M. Instability of familial spongiform encephalopathy-related prion mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366: 244-249, 2008.
- 特性解析大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質翻訳後修飾」吹田市(2008. 1. 10,11)
 - 2) 川崎ナナ: LC/MS を用いた糖鎖の微量かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本薬学会第 128 年会一般シンポジウム「グライコサイエンスから創薬へ」. 横浜 (2008. 3. 26-28)
 - 3) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. 日本応用糖質科学会平成 19 年度大会(2007. 8. 30)平塚
 - 4) 作道章一, 小林孝徳, 菅沼嘉一, 佐伯圭一, 小野寺節, 生田和良. プリオン蛋白質 (PrP) 遺伝子欠損細胞株を用いた PrP 機能およびプリオン増殖機構の解析. 第 41 回獣医生化学会学術集会. つくば, 平成 18 年 3 月 20 日
 - 5) Guoying Wu, Akikazu Sakudo, Keiichi Saeki, Kazuyoshi Ikuta, Takashi Onodera. Detection of PrP from murine Prnp-deficient neuronal cell line, transfected with hamster Prnp gene and infected with scrapie agents, 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 平成18年11月19-21日
 - 6) 作道章一, 計屋由紀子, 小林孝徳, 上田真世, 中屋隆明, 馬場宏一, 生田和良. 新しいインフルエンザウイルス感染診断法開発: インフルエンザウイルス感染患者鼻汁の可視—近赤外スペクトル多変量解析, 第 5 4 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 平成18年11月19-21日
 - 7) 作道章一, 小野寺節, 生田和良. RK13細胞発現系を用いた組換え分泌性ヒトプリオンタンパク質の発現および性状解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 平成19年10月21-23日
 - 8) 進藤亮, 山河芳夫, 佐多徹太郎, 横山隆, 古岡秀文, 堀内基広 日本で発生した BSE 由来 PrP^{Sc} の生化学的性状の解析 2007 年プリオン研究会 (2007, 8/25-26, 新潟)
 - 9) Song, C.-H., Furuoka, H., Suzuki, A., Ogino, M., Horiuchi, M. Effect of intraventricular infusion of anti-PrP mAbs on the disease progression in scrapie-infected mice. *NeuroPrion* 2007 (2007, 9/26-28, Edinburg, UK)
 - 10) Nakamitsu, S., Kurokawa, A., Uryu, M., Horiuchi, M. Cell-density-dependent fluctuation of PrP-res in prion-infected Neuro2a cells. *NeuroPrion* 2007 (2007, 9/26-28, Edinburg, UK)
 - 11) Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. The 14th International Symposium for Zoonosis Control. - Prescription for fighting against zoonoses- (2007, 10/31, Sapporo, Japan)
 - 12) 中満智史, 黒川, 彩, 瓜生匡秀, 堀内基

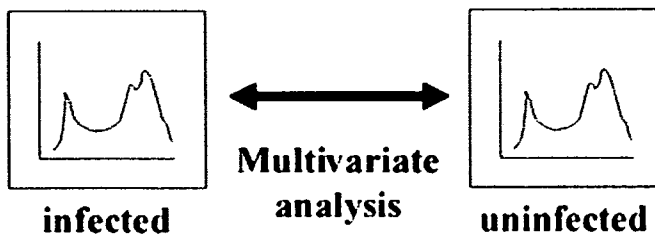
2.学会発表

- 1) 川崎ナナ: LC/MSⁿ を用いた糖蛋白質の

- 広 プリオン持続感染細胞内における異常型プリオン蛋白質の量的変動 第55回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- 13) 宋昌鉉, 古岡秀文, 鈴木章夫, 長谷部理絵, 前田秋彦, 堀内基広 抗PrP抗体の脳室内投与によるプリオン病の治療効果 第55回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- 14) 瓜生匡秀, 堀内基広 神経芽腫細胞Neuro2aサブクローンにおけるプリオンの細胞間伝播 第55回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- 15) 堀内 基広 プリオンの増殖とその抑制 第55回日本ウイルス学会 (2007, 10/21-23, 札幌)
- 16) 菊池裕, 中島治, 掛谷知志, 酒井綾子, 池田喜久子, 山口直人, 山崎壮, 棚元憲一, 松田治男, 澤田純一, 高鳥浩介, 山口照英: GPIアンカー欠損型プリオン蛋白質産生に及ぼす低酸素応答の影響に関する研究, 2007年プリオン研究会, 平成19年8月25-26日, 新潟県津南町
- 17) 中島治, 菊池裕, 手島玲子, 松田治男, 澤田純一: 組換えヒトプリオンタンパクの発現と精製, 2007年プリオン研究会, 平成19年8月25-26日, 新潟県津南町
- 18) 遊佐精一, 菊池裕, 横山隆: 正常型プリオンタンパク質のプロセッシングの意義, 2007年プリオン研究会, 平成19年8月25-26日, 新潟県津南町
- 19) 菊池裕, 中島治, 掛谷知志, 酒井綾子, 池田喜久子, 山口直人, 山崎壮, 棚元憲一, 松田治男, 澤田純一, 高鳥浩介: Hypoxia induces an expression of a GPI-anchorless splice variant of prion protein in a human glioblastoma cell line T98G, 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 平成19年12月11-15日, 横浜市
- 20) 中島治, 菊池裕, 手島玲子, 松田治男, 澤田純一: 組換えプリオンタンパクの発現と精製, 第30回日本分子生物学会年会第80回日本生化学会大会合同大会, 平成19年12月11-15日, 横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

NIRS for diagnosis of infectious diseases



NIRS (head)



NIRS (abdomen)

ラット脳アセトンパウダー

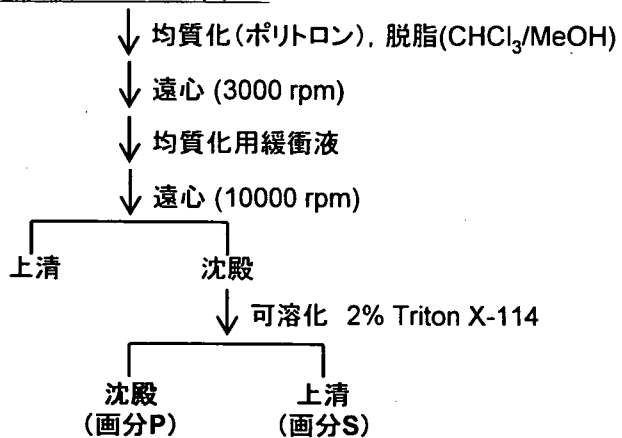


図2 ラット 脳の分画

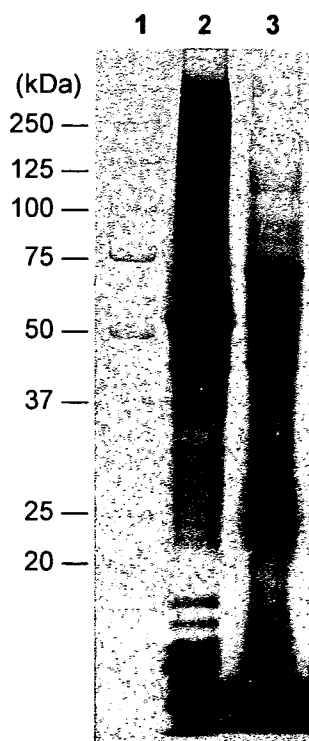
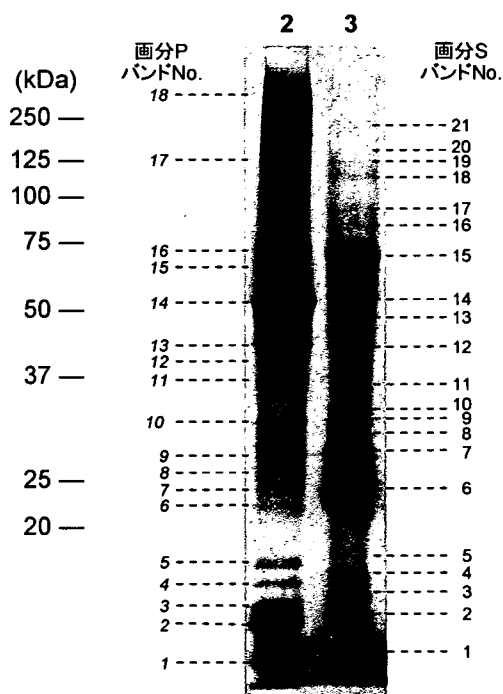


図3 ラット 脳の各画分のSDS-PAGE

- 1: 分子量マーカー
- 2: 画分P (1/1000)
- 3: 画分S (4/100)

表1 タンパク質同定結果

画分	バンド No.	同定されたタンパク質 (Accession No.)	Score	PrPのScore
P	1	hemoglobin beta chain complex (gi 17985549)	1291	—
	2	myelin basic protein (gi 4504257)	576	—
	3	histone 3, H2ba (gi 13386452)	293	—
	4	myelin basic protein isoform 2 (gi 70166255)	407	—
	5	myelin basic protein isoform 1 (gi 70166245)	677	—
	6	tubulin, beta 2 (gi 4507729)	387	—
	7	glutathione S-transferase, pi 2 (gi 25453412)	376	—
	8	Tpi1 protein (gi 38512111)	553	—
	9	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (gi 675604)	530	—
	10	B-36 VDAC=36 kda voltage dependent anion channel (gi 299036)	467	—
	11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (gi 120707)	667	—
	12	aldolase C, fructose-biphosphate (gi 6978489)	672	—
	13	actin beta (gi 71620)	1774	—
	14	tubulin, beta 2 (gi 4507729)	1562	—
	15	tubulin, alpha 2 (gi 34740335)	784	—
	16	neurofilament, light polypeptide (gi 13929098)	1024	—
	17	neural adhesion molecule F3 (gi 1095168)	450	—
	18	Na+/K+ -ATPase alpha 3 subunit (gi 6978547)	850	—
S	1	hemoglobin beta chain complex (gi 17985949)	2683	—
	2	hemoglobin beta chain complex (gi 17985949)	944	39
	3	vesicle associated membrane protein 2B (gi 4894188)	377	60
	4	major beta-hemoglobin (gi 204570)	365	—
	5	confilin 1 (gi 8393101)	363	—
	6	thy-1 glycoprotein (gi 207308)	1119	—
	7	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (gi 675604)	672	99
	8	tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (gi 5803255)	1044	66
	9	voltage-dependent anion channel 1 (gi 6755963)	779	—
	10	voltage dependent anion channel (gi 4105605)	807	—
	11	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1 (gi 14043072)	485	165
	12	growth associated protein 43 (gi 8393415)	862	—
	13	Ckb protein (gi 40807002)	751	—
	14	brain abundant, membrane attached signal protein 1 (gi 11560135)	691	—
	15	albumin (gi 19705431)	2165	—
	16	transferrin (gi 61556986)	745	—
	17	albumin (gi 19705431)	622	—
	18	Ncam1 protein (gi 74353679)	813	—
	19	neural adhesion molecule F3 (gi 1095168)	903	—
	20	Ncam1 protein (gi 74353679)	827	—
	21	ankyrin binding cell adhesion molecule neurofascin (gi 1842429)	1102	—



ラット脳画分のSDS-PAGE

表 2

近赤外分光法により有意な違いの検出された接種後日数(非感染群との比較; $p < 0.05$)

Day	Chandler		Obihiro	
	Abdomen	Ear	Abdomen	Ear
0				
3				
5				
20				
39		*		
50				
60				*
71		*		
81		*		
90		*	*	
99		*		
124	*	*	*	
140		*		*
160	*	*	*	*
170	*	*	*	*
182	*	*	*	*
189	*	*	*	*
196	*	*	*	*
201	*	*	*	*
208	*	*	*	*
215	*	*	*	*
222	*	*	*	*
242	*	*	*	*
250	*	*	*	*

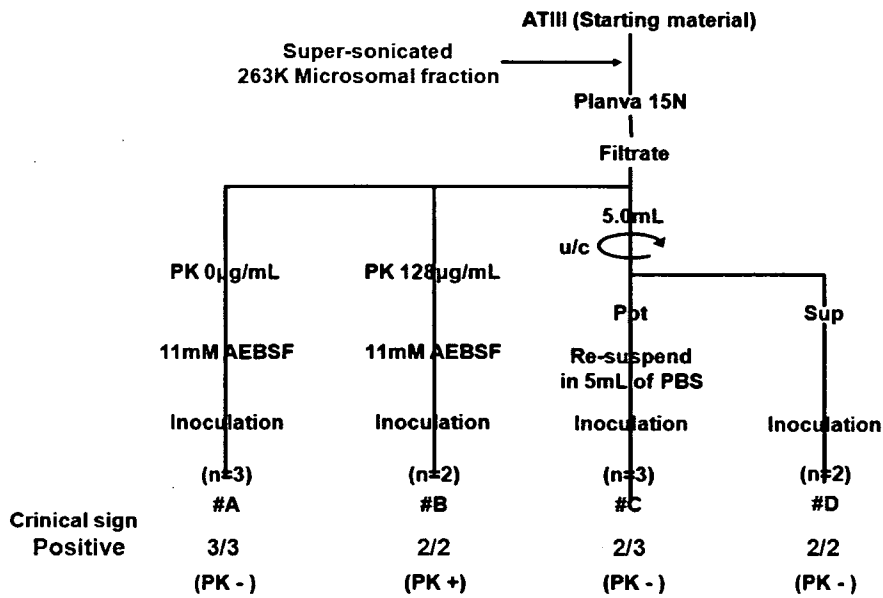
表 3

TSE spiking study for Planova 15N filtration of antitrombin

Spiking material		Detergent treated microsomal fraction	Super sonicated microsomal fraction (sMF)
Treating method for spiking material		263K MF was treated with 0.1% sarkosyl for 30 min at room temperature.	263K MF was "super-sonicated" then 220 nm-filtered prior to spiking.
Spike ratio		1/50	1/21
Facility		BioReliance	Benesis
Western blotting	Load	3.1 / 3.1	3.6
	Filtrate	0.0 / 0.0	<0.8*
	Reduction	≥3.1 / ≥3.1	≥2.8
Bioassay	Load	Not tested	+ve
	Filtrate	Not tested	+ve*
	Reduction	Not tested	Not applicable

☒ 4

Present result of additional study



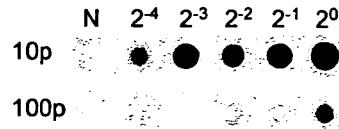


図5 ScN2a-3の培養上清中に存在するプリオン感染性の比較定量解析

培養上清の10pおよび100p画分を2倍段階希釈したものをN2a-3に接種した。8継代後にドットプロットによりPrP^{Sc}を検出した。10p画分では2⁻⁴希釈までPrP^{Sc}が検出されたが、100p画分では2⁻¹~2⁻²希釈までPrP^{Sc}が検出された。従って、10p画分は100p画分の4~8倍のプリオン感染性を含むと考えられる。

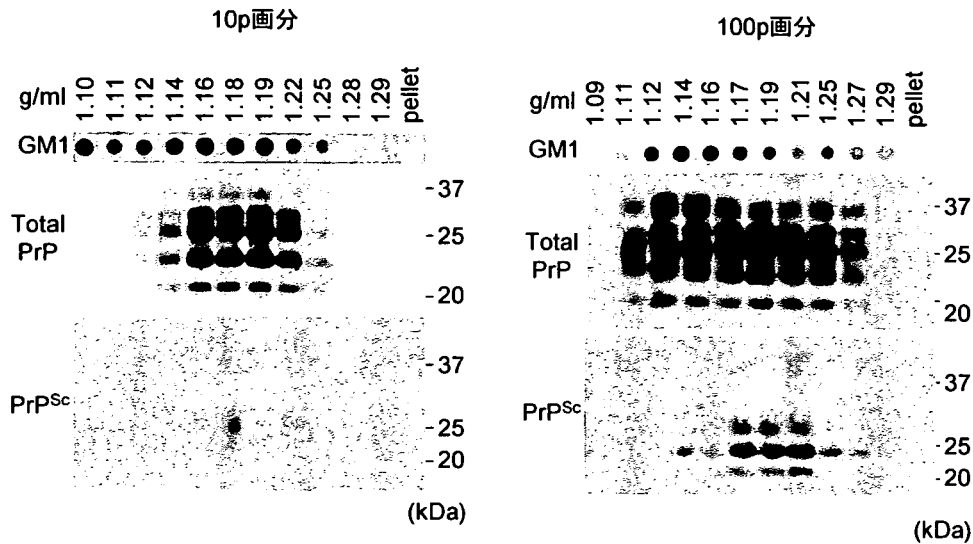


図6 10pおよび100p画分の総PrP(total PrP)およびPK抵抗性PrP^{Sc}

10pおよび100p画分を、シヨ糖密度勾配遠心でさらに分画した。GM1糖脂質はHRP標識コレラトキシンBサブユニットにより検出した。各画分のPK未処理の試料からtotal PrPを検出した。PK処理を行いPK抵抗性PrP^{Sc}の検出に用いた。図上の数値は各画分の比重を示す。Total PrPは明瞭に検出されたが、PK抵抗性PrP^{Sc}の検出は再現性が乏しく、PrP^{Sc}の存在を結論するには至らなかった。

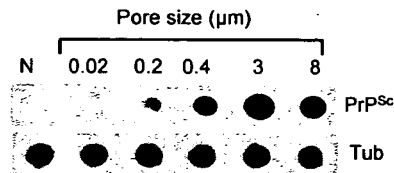


図7 ScN2a-3の培養上清中のプリオン感染性の粒子サイズの推定

ScN2a-3を各種孔径のトランスウェルを用いてN2a-3と分離培養した。N2a-3へのプリオンの伝播をPrP^{Sc}を指標に判定した。プリオン感染性は200nmの孔径は通過するが20nmの孔径は通過しなかった。