

200838027A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成21(2009)年 4月

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 照 英

平成21 (2009) 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試験研究 .....	28
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 .....	35
生田 和良	
3. PMAC 法を用いたプロセスバリデーションに適した PrP <sup>Sc</sup> 画分の検討 .....	36
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 .....	42
菊池 裕	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	



平成20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

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部長

**研究要旨** 遺伝子組換え医薬品等の異常プリオン(PrP<sup>Sc</sup>)の混入/迷入リスクを低減化するための検出法や試料調製法の最適化と、製造工程のPrP<sup>Sc</sup>除去/不活能評価法の標準化を目的として、1) PrP<sup>Sc</sup>検出手法に関する研究及び従来の検出手法の評価に関する研究、2) PrP<sup>Sc</sup>高選択的検出法の開発を目指したPrP<sup>Sc</sup>及び正常プリオン(PrP<sup>C</sup>)構造解析のためのPrP<sup>C</sup>濃縮法の構築、3) 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) 孔径15nmのウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析、5) Protein misfolding cyclic amplification (PMAC)法を用いたプロセスバリデーションに適したPrP<sup>Sc</sup>画分の検出、並びに6) PrP<sup>Sc</sup>検出法への応用が期待できるウシスプライス変異型プリオンタンパク質(PrPSV)の発現系構築、ウシ血液中のPrPSVの検出及びヒツジPrPSV mRNAの検索を行った。

研究組織

研究分担者

川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所  
生物薬品部 室長  
生田 和良 大阪大学 微生物病研究所教授  
堀内 基広 北海道大学大学院獣医学研究科教授  
菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所  
衛生微生物部 主任研究官

研究協力者

伊藤さつき 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
高倉 大輔 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
中島 治 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部 主任研究官  
柚木 幹弘 (株)ベネシス研究開発本部枚方研究所  
浦山 健 (株)ベネシス研究開発本部枚方研究所  
田中 宏幸 (株)ベネシス研究開発本部枚方研究所  
前野 英毅 日本赤十字社  
血漿分画センター研究部

A. 研究目的

我が国では、伝達性ウシ海綿状脳症(BSE)を主とする伝達性海綿状脳症(TSE)のリスク対策として、原則的にウシ等由来原材料の原産国の地理的なリスク及び原材料部位のリスクを基本とした予防的な対策が進められている。特に、ウシ等由来製品については、①「原材料原産国の地理的な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」、及び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が行われている。しかし、カナダや米国において依然としてBSEが発症しているように、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に置かれている。従って、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細胞培養医薬品等多くのバイオ医薬品の製造において、製品の安全性確保の観点から、医薬品原材料や製造中間工程製品等に対するPrP<sup>Sc</sup>の混入を否定する試験の実施

が不可欠である。しかし、これまでに *in vivo* あるいは *in vitro* 等様々な系を用いた PrP<sup>Sc</sup> 検出法の開発が試みられてきたが、いずれの方法にも試料調製法、定量性、検出に要する期間、あるいは検出の頑健性等に多くの課題が残されており、未だ標準的方法といえる方法が確立されていないのが現状である。そのため、血清等を用いる細胞培養医薬品や遺伝子組換え医薬品の安全性を確保するために、製造に用いられる原料/原材料や製造中間工程製品等における PrP<sup>Sc</sup> の有無の確認、あるいは製造工程バリデーションを行うための高選択的高感度 PrP<sup>Sc</sup> 検査法、並びに効率的 PrP<sup>Sc</sup> 試料調製法の開発が望まれている。

本研究は、遺伝子組換え医薬品等の PrP<sup>Sc</sup> の混入/迷入リスクを低減化するための 検出法や試料調製法の最適化を行うと共に、製造工程の PrP<sup>Sc</sup> 除去/不活能評価法の標準化をめざすものである。本年度は、

1) 従来の検出手法を含め PrP<sup>Sc</sup> の検出手法に関する調査研究、2) PrP<sup>Sc</sup> 高選択的検出法開発を目指した PrP<sup>C</sup> 構造特性解析のための PrP<sup>C</sup> 分画法の検討、3) 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) 孔径15nmのウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析、5) Protein misfolding cyclic amplification (PMAC)法を用いたプロセスバリデーションに適した PrP<sup>Sc</sup> 画分の検討、並びに6) PrP<sup>Sc</sup> 検出法への応用が期待できるウシスプライズ変異型プリオンタンパク質(PrPSV)の発現系構築、ウシ血液中の PrPSV の検出及びヒツジ PrPSV mRNA の検索を行った。

## B. 研究方法

### B-1 PrP<sup>Sc</sup> 除去/不活能評価に関する調査研究

各種文献や学会からの情報、さらには海外の規制当局からのガイダンスやコンセプトペーパー等を調査対象とした。

### B-2 PrP<sup>C</sup> 構造特性解析のための PrP<sup>C</sup> 分画法の検討

#### 1) 正常ハムスター脳からの PrP<sup>C</sup> の精製

正常ハムスター脳を10倍量の0.25 M ショ糖を含む20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で、氷冷しながらホモ

ジナイズした。遠心分離後(2,000×g, 室温, 7分)

(沈殿:P1, 上清 S1), 得られた上清 S1 を再度遠心分離し(2,000×g, 室温, 7分)(沈殿:P2, 上清 S2), 得られた沈殿 P2 を先に得られた沈殿 P1 と合わせ、先の半量の0.25 M ショ糖を含む20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で氷冷しながらホモジナイズした。遠心分離後(2,000×g, 室温, 7分)(沈殿:P3, 上清 S3), 得られた上清 S3 と S2 を合わせ、遠心分離(150,000×g, 4°C, 60分)した(沈殿:P4, 上清 S4)。得られた沈殿 P4 に、Octyl β-glucoside, 及び CHAPS をそれぞれ最終濃度1.4%, 及び0.5%になるように添加し、超音波照射を行った(45 kHz, 氷中, 5分×2回)。4°Cで1時間放置後、遠心分離し(200,000×g, 4°C, 60分)(沈殿:P5, 上清 S5), 得られた上清 S5 を陽イオン吸着メンブレンでろ過した。素通り画分を Lysis buffer (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10mM imidazole, pH8.0) を用いて4°C下で一晩透析した。回収した透析内液を遠心分離し(10,000×g, 4°C, 30分)(沈殿:P6, 上清 S6), 得られた上清 S6 を、ニッケルスピンカラムに加えて遠心分離した(700×g, 2分間)。Wash buffer (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH8.0) を加えて遠心分離し(700×g, 2分間), さらに Wash buffer を加えて同じ操作を繰り返した。同様に Elute buffer (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH8.0) を加えて遠心分離し(700×g, 2分間)(溶出液:E1), 得られた E1 を Polyethyleneimine (PEI) コーティングメンブレンに通過させ、ろ過後のフィルターを回収した。回収したフィルターに1×SDS buffer (60mM Tris-HCl, 3%SDS, 5%Glycerol, 5%β-ME, 0.005%BPB) を加えて100°Cで3分間 boil し, Spin down した上清を回収した (Fig. 1)。

#### 2) PrP<sup>C</sup> 画分の SDS-PAGE

回収された PrP<sup>C</sup> 画分は、12.5%アクリルアミドゲルを用いて、25 mM Tris, 0.192mM Glycine, 0.1%SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中でゲル1枚あたり30 mA で泳動した。泳動後のゲルはクマシー染色を行い、分離されたタンパク質を検出した。



### 3) PrP<sup>C</sup>の検出 (ウェスタンブロット)

PrP<sup>C</sup>画分をSDS-PAGEで分離後、PVDF膜に20Vで60分間転写した。一次抗体に、Anti-Prion monoclonal Antibody, mouse (3F4) (SIGNET)、2次抗体に Anti-mouse IgG-HRP, sheep (SIGMA) を用いたウェスタンブロットを行い、化学発光法 (ECL-Plus, GE Healthcare) で PrP<sup>C</sup>を検出した。

### 4) PrP<sup>C</sup>画分中の混在タンパク質の同定

SDS-PAGEで分離され、クマシー染色されたタンパク質について、ウェスタンブロットで PrP<sup>C</sup>が検出された分子量範囲の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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ lを加え、室温で30分間振とう後、超音波抽出を10分間行い、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。

### 5) 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: L-column (化学物質評価機構, 0.075×150 mm, 3  $\mu$ )

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: 2~65%B (0~50分)

流速: 0.3  $\mu$ 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

### 6) データベース検索

検索エンジン: Bioworks (Thermo Fisher Scientific)

データベース: NCBIInr, hamster

### B-3 近赤外分光法の有用性評価

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、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、対象と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 孔径15nmのウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析

### 1) スパイク材料の処理方法

263K (Hamster adapted scrapie 263K strain) 感染ハムスター脳ホモジネートを出発材料として界面活性剤存在下又は非存在下で高出力の超音波処理により微細化を行った (Fig. 2A, 2B).

### 2) Planova 15N ろ過実験

血漿分画製剤 (アンチトロンビン製剤) の工程中間体にスパイク材料をスパイクし, Planova 15N (膜孔径  $15 \pm 2$  nm, 0.001m<sup>2</sup>, 旭化成ファーマ) でろ過し, ろ過前後の感染性プリオンを測定した.

### 3) 感染性プリオンの測定方法

#### ①定量的 Bioassay

サンプルを10倍毎の段階希釈し,それぞれ1群6匹のシリアンハムスター (3~8週齢, VAF) に脳内接種 (0.05 mL/head) し, 約1年間飼育観察した. スクレイパー発症時及び観察期間終了時に剖検し, 脳組織についての組織病理学的検査を行った. 臨床症状と組織病理学的検査結果の一致した動物の結果をもとに Spearman-Kärber 法により ID<sub>50</sub> を算出し, ろ過前後の感染価の減少率 (Reduction) を求めた.

#### ②定性的 Bioassay

サンプル原液をシリアンハムスター (4~5週齢, SPF) に脳内接種 (0.02 mL/head) し, 200日間飼育観察した. スクレイパーを発症した時点及び観察期間終了時に剖検し, 脳を摘出した. 摘出した脳について組織病理学的検査並びに Western blot (In house 法) による PrPres の検出を行い, 陽性, 陰性の判定を行った.

## B-5 PMAC法を用いたプロセスバリデーションに適したPrP<sup>Sc</sup>画分の検討

### 1) 細胞

263K 株に感染したハムスターの10%脳乳剤に Sarkosyl を1%となるように添加し, 100,000×g, 30分の超遠心により沈殿画分を得た. 沈殿画分を PBS で溶解後, 1%となるよう Sodium Undecyl

Sulfate(SUS)を加え, 37°Cで1時間放置した. これをプラノバ35N(平均孔径35nm)で濾過し, スパイク用試料とした.

### 2) PMCA

スパイク用試料をプリオン非感染ハムスターの10%脳乳剤で段階希釈し, PMCA装置 (Elektron社製) を用いて PrP<sup>Sc</sup>を増幅した. 一回のPMCA反応は, 30分毎に8秒間5回の超音波処理を1サイクルとして, 42サイクル実施した. 1回目のPMCA反応液をプリオン非感染ハムスターの10%脳乳剤で希釈し, 再度PMCA反応を実施した. 2回目のPMCA反応液を Proteinase K で処理した後に, PrP<sup>Sc</sup>をウェスタンブロットで検出した. 各検体を n = 3回で試験し, 50%の確率で増幅産物を検出できる PrP<sup>Sc</sup>量を PrP<sup>Sc</sup>力価 (PMCA<sub>50</sub>/mL) と定義して, 定量解析を行った (Fig. 3).

## B-6 PrPSVの発現系構築, ウシ血液中のPrPSVの検出並びにヒツジPrPSV mRNAの検索

### 1) 細胞培養

ヒツジ胎児脳由来細胞株 OA1 (ATCC Number: CRL-6538) を 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.

### 2) ウシ血液

北海道畜産試験場で正常ウシから採血し, 3倍量の RNAlater (Ambion) を加え, 使用時まで -20°C 下に保存した.

### 3) RT-PCR

培養した OA1 細胞又は血液から DNase I 消化した total RNA を調製し, スーパースク립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 はウシ又はヒツジ *PRNP* 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、Ex taq polymerase (タカラバイオ株式会社)を用いて行った。

#### 4) ウシPrPSVの発現

ウシPrP又はPrPSV遺伝子エクソン3のORFを組み込んだpET-22bベクターを *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysSに導入し、Overnight Express Autoinduction System I (Novagen)を用いて発現を誘導した。

#### 5) イムノブロット法

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ブロットングを行い、コニカイムノステインHRP-1000 (生化学バイオビジネス株式会社)で検出した。

#### (倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、研究実施機関が定める「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 PrP<sup>Sc</sup> 検出手法の評価に関する調査研究

##### 1) in vitro 異常プリオン検出系の開発

伝達性海綿状脳症の原因物質の検出は、古くは脳内に蓄積される典型的な病変及び異常プリオンを組織科学的、免疫化学的手法を用いて検出するものから、感受性の高い齧歯類を用いて感染性物質を投与し発症を見る手法などが使われていた。しかしより迅速な方法の開発をめざし、異常プリオンのプロテアーゼK耐性を利用したウエスタンブロットング法が迅速法として採用されるようになってきている。一方、ナノフィルトレーションにより異常プリオンがウエスタンブロットング法でも検出されないにも

関わらず感染性を示す事例も報告され、感染性を指標とした方法も開発されてきている。

その一つとしてタンパク質折りたたみ異常反復増幅法 Protein-misfolding cyclic amplification (PMCA) 法が開発され有望視されるようになってきている (Saborio et al (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813)。構造上の培養細胞を用いて in vitro で異常プリオンを検出するための手法開発が精力的に行われている。本法の特異性が必ずしも高くないのではないかという指摘もあり、最適な手法としての確認はされていない (Grassi et al (2008) Progress and limits of TSE diagnostic tool. *Vet Res.* 39, 1-12)。

一方、PMCA法を用いて、ヘラジカに発症する異常プリオン病の一種である慢性消耗性疾患の異常プリオンの伝達性についてPMCA法を用いて検討がされている。特に異種動物のプリオンとの組み合わせの検討がされている。この中で、標準条件(pH4.0)からより強い変性条件(pH3.5)にすることにより、標準条件ではプロテアーゼK耐性のままであったのが、より強い酸性条件にすることによりプロテアーゼK耐性への変換が劇的に向上したことが報告されている。このことから報告者は、異常プリオンの種の壁を越えた伝達性はタンパク質の変性の強さに依存していると報告している(Li et al (2007) Species barriers for chronic wasting disease by in vitro conversion of prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 364, 796-800)。

血液を介した異常プリオンの伝達性についてヒツジを用いた検討からそのリスクが極めて高いことが示された。エジンバラ大学で行われた研究の途中経過報告として、BSE及びスクレイビー由来の血液をヒツジに輸血することにより、高い確率で海綿状脳症を発症することが明らかになっている。また発症前の血液にも感染性があることが示された。しかしこれらの検討には9年という歳月が費やされており、追試するにも多大な時間が必要となる(American Society of Hematology; Press release. 2008.8.28)。しかし、このように高い感染性を揺るすにもかかわらず



これまでの迅速法では異常プリオンを検出することができていない。この理由として、異常プリオンの糖鎖が関与する可能性が指摘されている。すなわち、感染性プリオンを投与されたハムスター血漿からプロテアーゼ K 耐性プリオンに特異性のある抗体を用いて免疫沈降させ検出したプリオンタンパク質がウェスタンブロット法により 2 糖鎖がついたのと同定での移動度を示すこと、また血液を糖鎖を除去する条件の処理を行うことにより異常プリオンの検出がされなくなったことから、このような糖鎖のついたプリオンタンパク質が血中の多くのタンパク質と結合している可能性を推定している(sukui et al (2007) A potential blood test for Transmissible spongiform encephalopathies by detecting carbohydrate-dependent aggregates of PrPres-like proteins in scrapie-infected hamster plasma. *Microbiol Immunol.* 51, 1221-1231)。

一方、弧発型クロイツフェルト病と同様の生化学的特徴を示す非定型型ウシ海綿状脳症プリオン株 (BASE あるいは BSE-L) についてマウスへの感染実験での検討から、BASE は BSE に比べ接種されたマウスの発症率が極めて高いことが示された。また、BSE に比べて、脾臓で異常プリオンが高いことが明らかにされている。このことから BASE は、高い感染性とリンパ指向性があることが示され、医薬品製造における血清の使用において BASE のリスクを十分に考慮することが必要と考えられる(Kong et al (2008) Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *J Virology* 82, 3697-3701)。

また異常プリオンの検出に *in vitro* 細胞培養系を用いる検討が多くされており、今後感染性の評価を迅速に行える十分なバリデーションがなされた培養細胞系が開発できれば、異常プリオンの伝達性を評価する上で非常に有用であろう。

## C-2 PrP 構造特性解析のための PrP<sup>C</sup>分画法の検討

### 1) 正常ハムスター脳 PrP<sup>C</sup>の精製

正常ハムスター脳を 0.25 M ショ糖を含む 20 mM Tris-HCl (pH7.4) 中で繰り返しホモジネートし、Octyl

$\beta$ -glucoside, 及び CHAPS によって PrP<sup>C</sup>画分を可溶化した後、超遠心分離で不溶化画分を除去した。さらに、ニッケルカラムと PEI コーティングメンブレンを併用することによって、PrP<sup>C</sup>を効率よく濃縮することができた。

### 2) SDS-PAGE において PrP<sup>C</sup>泳動位置に混在するタンパク質の同定

PrP<sup>C</sup>画分のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロットを行った。その結果、分子量 27-34 kDa の範囲で PrP<sup>C</sup>が検出され (泳動図: Fig. 4, レーン 1: ウェスタンブロット検出, 2: クマシー染色), 本精製方法を用いて PrP<sup>C</sup>が分画されていることが確認された。また、検出された分子量範囲が広いことから、複数の構造の糖鎖、及び GPI アンカーの結合による多数の分子種の存在が示唆された。PrP<sup>C</sup>の精製度合いを確認するために、SDS-PAGE 上で PrP<sup>C</sup>泳動位置に混在するタンパク質を同定した。PrP<sup>C</sup>が検出されたバンド (Fig. 4, レーン 2, バンド 5, 7, 9, 10) を切り出し、ゲル内消化後、抽出されたペプチドについて LC/MS/MS を行った。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、混在するタンパク質を同定した (Table 1)。

LC/MS/MS、及びデータベース検索では、PrP<sup>C</sup>は、バンド 5, 7, 及び 10 に含まれることが確認された。また、タンパク質の同定順位、Protein probability (P(pro)) や Score の値から、各バンドには、PrP<sup>C</sup>より上位に同定されるタンパク質も複数の含まれることが判った (Protein probability は、あるデータベースに対しての同定結果の偶然性の確率。値が低いほど、結果の確実性は高くなる。Score は、タンパク質の同定する根拠となったペプチドの理論的 b, y イオンに対して、実際のスペクトルがどの程度一致しているかを数値化し、同定されたすべてのペプチドについて積算した値)。これらのことから、SDS-PAGE で分離された PrP<sup>C</sup>について、LC/MS<sup>n</sup>を用いて糖鎖構造や GPI 構造を解析するためには、さらに精製を進めると共にタンパク質量も確保する必要があると考えられた。

### C-3 近赤外分光法の有用性評価

スクレイパ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を行い、感染により変化している近赤外波長を調べると、酸化ヘモグロビンや Cytochrome c オキシダーゼに関連する波長が変化していることが明らかになった。

### C-4 孔径 15nm のウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析

#### 1) 定量的 Bioassay 法による Planova 15N のプリオン除去能の評価

界面活性剤および高出力超音波処理したスパイク材料(詳細は Fig. 2A 参照)を血漿分画製剤(アンチトロンビン製剤)の Planova 15N ろ過前液に 1/50 量スパイクし、Planova 15N でろ過した(50kPa, 2~8°C)。

ろ過前後の液に関して、Western blot 及び定量的 Bioassay で分析した結果を Table 2 に示す。Western blot ではろ液に異常型プリオンは検出されなかったが、Bioassay では 2 回の実験のうち 1 回で微量の感染性プリオンタンパク質がろ液に検出された。なお、膜の能力としては Bioassay においても効果的な除去率(4Log を超える Reduction)を示した。

#### 2) 定性的 Bioassay による Planova 15N ろ液の特性解析

高出力超音波処理したスパイク材料(詳細は図 2B 参照)を血漿分画製剤(アンチトロンビン製剤)の Planova 15N ろ過前液に 1/21 量スパイクし、Planova 15N でろ過した(50kPa, 2~8°C)。

ろ過前後の液について、Western blot 及び定性的 Bioassay で分析した結果を Table 3 に示す。Western blot ではろ液に異常型プリオンは検出されなかったが、定性的 Bioassay ではろ液に感染性プリオンタンパク質が検出された。

そこで、Planova 15N のろ液中の感染性プリオンについて、Protease K による影響及び超遠心による挙動を解析した。その結果を Fig. 5 に示す。ろ液を Protease K 処理したサンプル及び超遠心処理した

上清並びに沈殿の再懸濁液のいずれにおいても感染性が観察された。また、ハムスターの脳の組織病理学的検査において、発症した何れのハムスターにおいても脳組織は Fig. 6 に示す神経細胞の変性・壊死、空胞化及びグリアの増生等のスクレイパーに特徴的な所見が観察された。

### C-5 PMAC法を用いたプロセスバリデーションに適した PrP<sup>Sc</sup>画分の検討

プラノバ 35N を通過した画分(スパイク用試料)を 10 倍段階希釈して、PMCA 反応を行い、スパイク用試料の PrP<sup>Sc</sup> 力価を求めたところ、力価は  $10^{11.3}$  PMCA<sub>50</sub>/mL であった。プラノバ 35N を通過する画分の粒子径は 35 nm 以下と考えられる。このような粒子径の小さな PrP<sup>Sc</sup> 凝集体でも、2 回の PMCA を実施することで、 $10^5$ ~ $10^6$  のレンジのプロセスバリデーションが実施可能な力価のスパイク用試料が得られることが判った。スパイク用試料をプラノバ 20N(平均孔径 19 nm)で濾過した画分中の PrP<sup>Sc</sup> 力価は  $10^{9.9}$  PMCA<sub>50</sub>/mL であった(Table 4)。

このスパイク用試料には 1% SUS が含まれる。界面活性剤の濃度が粒子径の小さな PrP<sup>Sc</sup> 凝集体の維持に必要であるかを検討するために、スパイク用試料を PBS で 100 倍に希釈して、プラノバ 35N で濾過し、濾過前後の PrP<sup>Sc</sup> 力価を調べた。濾過前の希釈試料の PrP<sup>Sc</sup> 力価は  $10^{8.6}$  PMCA<sub>50</sub>/mL であり、濾液中の PrP<sup>Sc</sup> 力価は  $10^{6.9}$  PMCA<sub>50</sub>/mL であった。SUS の濃度が 0.01% になった場合、プラノバ 35N の濾過により試料中の PrP<sup>Sc</sup> 力価は約 1/50 に低下したことになる(Table 5)。

### C-6 PrPSV の発現系構築、ウシ血液中の PrPSV の検出並びにヒツジ PrPSV mRNA の検索

#### 1) ウシ PrPSV 発現系の構築

大腸菌のタンパク質発現系を用い、ウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b からクローニングした PrPSV 遺伝子を導入し、イムノプロット法で PrPSV の産生を調べた(Fig. 7)。ウシ PrP 遺伝子を導入した全細胞溶解液では、25 kDa 付近に抗 PrP モノクローナル抗体 6H4 が認識するバンドを検出した(Fig. 7. lower panel,



lane 1). 同様に, ウシPrPSV遺伝子を導入した全細胞溶解液では, 6H4が認識する25 kDaのバンドを検出した(Fig. 7. lower panel, lane 2). 構築した発現系は, 6H4抗体が認識するPrPSVを産生することが確認された.

## 2) ウシ血液中からPrPSV mRNAの検出

ウシ血液から total RNA を調製し, exon-exon junction primer を用いた RT-PCR 法で PrPSV mRNA の産生を調べた. RNeasy 中で長期間保存していたウシ血液の白血球を含む画分から vanadyl ribonucleoside complex を用いて total RNA を調製し, 同じ画分から定法にしたがってゲノム DNA を調製した. PrP 全長を検出するプライマー (BoE3U1/BoE3L7) ではゲノム DNA 及び total RNA から調製した cDNA では 1,347 bp のバンドを示し (Fig. 8, lanes 3 and 7), コントロールとして用いた PrPSV 遺伝子を含むプラスミドでは 511 bp を欠失した 836 bp のバンドが検出された (Fig. 8, lane 11). PrPSV を特異的に検出する exon-exon junction primer (BoE3SV5/BoE3L4) ではプラスミドと同様な 130 bp のバンドがわずかながら cDNA で検出されたが (Fig. 8, lanes 5 and 9), ゲノム DNA では検出されなかった (Fig. 8, lane 1). しかし, 744 bp のバンドを検出する exon-exon junction primer (BoE3U1/BoE3SV6) では, cDNA でバンドは検出されなかった (Fig. 8, lanes 6 and 10).

## 3) ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質 mRNA の解析

ヒツジPrP mRNA の発現様式を調べるため, 市販のヒツジ脳から調製した total RNA (Zyagen Laboratories) から合成した fs-cDNA を鋳型とした RT-PCR を行った. cDNA を測定した RT-PCR 法では, PrP に相当する 1,323 bp と 886 bp のバンドの他に, 発現量は少ないが 375 bp のバンドを検出した (Fig. 9A, lanes 1 and 2). 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, 1,323 bp の塩基配列は ORF を含むヒツジ *PRNP* 遺伝子エクソン 3 をコードし, 886 bp の塩基配列では PrP 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 (Fig. 9C). 一方, ヒツジ骨格筋から調製したゲノム DNA を測定した PCR 法では全長 1,323 bp の PrP に相当するバンドを示し (Fig. 9A, lane 4), その塩基配列は total RNA 由来の 1,323 bp のバンドと一致したが, 886 bp のバンドは検出されなかった (Fig. 9A, lane 5). 以上の結果から, ヒツジ脳では *PRNP* 遺伝子エクソン 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 716 bp のバンドを示したが (Fig. 9B, lanes 9-10), genomic DNA ではバンドが検出されなかった (Fig. 9B, lanes 13-14). また, 切り出した 130 及び 716 bp のバンドの塩基配列は, エクソン 3 のそれぞれ 641 及び 1,227 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.

次に, 長期間培養したヒツジ胎児脳由来細胞株 OA1 から total RNA 及びゲノム DNA を調製し, 同様の実験を行った. 5回の継代後に 40日間培養した OA1 細胞 (P5D40) の total RNA から合成した fs-cDNA を鋳型とした RT-PCR では, 130 及び 716 bp のバンドを示したが (Fig. 9B, lanes 1-2), ゲノム DNA ではバンドが検出されなかった (Fig. 9B, lane 5-6).

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された.

## D. 考察

### D-1 PrP<sup>Sc</sup> 除去/不活性評価に関する調査研究

PrP<sup>Sc</sup> の検出手法についてはこれまでのところ迅速性を持つ汎用性のあるものは知られていない. しかし, いくつかの PrP<sup>Sc</sup> 検出手法を用いて新たな知見や改良すべき点が明らかになりつつある. また,

血液中に異常プリオンと結合しているタンパク質の存在を示唆する結果も得られており、もしこのようなタンパク質が存在するのであれば、異常プリオン検出の新たなツールとなる可能性もある。さらに、PMCA 法に関しては未だ評価が定まっているとはいえないが、異常プリオンの伝達性の種差の壁を説明できるような報告もあり、今後の発展が期待される。さらに *in vitro* 細胞培養系を用いた検討が多く、研究室で進められており、今後の発展によって大きく検出手法の改良が行われる可能性がある。

#### D-2 PrP<sup>Sc</sup> 構造特性解析のための PrP<sup>C</sup> 分画法の検討

PrP<sup>Sc</sup> の特異的検出法を開発するためには、PrP<sup>Sc</sup> と PrP<sup>C</sup> の構造上の違いを明らかにする必要がある。プリオンタンパク質は、分子内に2本のN結合型糖鎖及び GPI アンカーを有する糖タンパク質であり、PrP<sup>Sc</sup> の糖鎖や GPI 部分の構造は、Proteinase K 処理により夾雑タンパク質を除去して得られた PrP<sup>Sc</sup> を用いた研究により明らかにされている。しかし、PrP<sup>C</sup> は、Proteinase K に対して感受性であるため同じ方法による精製が困難であり、構造に関する報告例は少ない。そこで本年度は、正常ハムスター脳を用いて PrP<sup>C</sup> の精製法について検討を行った。その結果、Octyl  $\beta$ -glucoside、及び CHAPS による PrP<sup>C</sup> 画分の可溶化と超遠心分離による不溶化画分の除去、並びに、ニッケルカラムと PEI コーティングメンブレンの併用によって、PrP<sup>Sc</sup> が効率的に濃縮されることが明らかになった。しかし、タンパク質同定により、依然として夾雑タンパク質が混在していることが確認されたことから、今後、LC/MS による構造解析を進めるためには、PrP<sup>C</sup> 抗体カラムや、等電点が高い PrP<sup>C</sup> の特性を利用したクロマトフォーカシングなどが有用であろうと考えられた。

#### D-3 近赤外分光法の有用性評価

遺伝子組換え医薬品等の PrP<sup>Sc</sup> の混入/迷入リスクを低減化するための PrP<sup>Sc</sup> 検出手法の一つとして昨年に引き続き近赤外スペクトル測定の有用性を評価し、近赤外スペクトル測定は有用な情報を与えることが確認された。今後、類似疾患で同様な近赤外

スペクトル変化が観察されないかどうかの詳細な検討が必要であると考えられた。

#### D-4 孔径 15nm のウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性解析

ウイルス除去膜は感染性病原体を粒子径依存的に除去する手段であり、中でも孔径 15nm の膜は市販製品の中では最小孔径のフィルターである。これまでに我々は、PrP<sup>Sc</sup> をサンプルに意図的に加えて除去効果を評価するスパイク実験において、Western Blot 法による測定ではろ過後液には PrP<sup>Sc</sup> は検出限界以下まで除去できるが、定性的ではあるものの感染性は観察されることを見出している。本年度は、この孔径 15nm のウイルス除去膜を通過した感染性プリオンタンパク質の定量及び特性についての解明を試みた。

孔径 15nm のウイルス除去膜は、感染性プリオンタンパク質の除去に効果的であり、4Log を超える除去効果が認められた。しかしながら、一部微量の感染性プリオンタンパク質が孔径 15nm の膜を通過した。また、孔径 15nm の膜を通過した感染性プリオンタンパク質の一部は超遠心で沈殿しない画分にも存在することが判明した。これらのことから、孔径 15nm の膜を通過し、超遠心で沈殿しないような微細な感染性プリオンタンパク質の存在を意識して評価を進めることが、より適切な評価に結びつくと考えられる。

#### D-5 PMAC法を用いたプロセスバリデーションに適したPrP<sup>Sc</sup>画分の検討

医薬品の製造工程におけるプリオン除去効率を評価するプロセスバリデーションが、医薬品のプリオン汚染リスクを検証する方法の一つとして用いられている。医薬品やその原材料の製造工程に PrP<sup>Sc</sup> を添加して、実験的に除去効果が検討されているが、これまでの報告の多くは、プリオン感染動物の脳乳剤あるいはマクロソーム画分を添加した試料を用いて、プリオン除去効果を評価している。脳乳剤やマクロソーム画分に存在する PrP<sup>Sc</sup> は、遠心操作により容易に沈殿するような粒子サイズの大きい PrP<sup>Sc</sup> 凝



集体が多く含まれている。一方、血液等に存在する可能性があるプリオンを構成する PrP<sup>Sc</sup> の粒子サイズは小さいことが予想される。従って、使用するスパイク用試料によっては、適切なプロセスバリデーションが実施できていない可能性がある。我々は、粒子サイズの小さい PrP<sup>Sc</sup> オリゴマーをプロセスバリデーションのスパイク用試料として用いることを検討してきた。しかし、粒子サイズの小さな PrP<sup>Sc</sup> を大量に回収することは容易ではない。そこで、粒子サイズの小さい PrP<sup>Sc</sup> オリゴマーを、PrP<sup>Sc</sup> を高感度に検出可能な Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) 法により検出することで、実用に耐えうるプロセスバリデーションが実施可能か否かを検討した。1% SUS 存在下では、広範なレンジでプロセスバリデーションを実施可能なスパイク用試料が得られた。実際のプロセスバリデーションを考慮した場合、被検試料に SUS で処理したスパイク用試料を添加した場合、SUS 濃度は低下する。そこで、SUS 濃度の低下が、PrP<sup>Sc</sup> 力価に及ぼす影響を検討したところ、SUS の濃度低下により、プラノバ 35N を通過する画分の PrP<sup>Sc</sup> 力価は低下した。PrP<sup>Sc</sup> 力価の低下が、PrP<sup>Sc</sup> がより大きな凝集体を形成したためか、あるいは PrP<sup>Sc</sup> プラノバ膜に吸着しやすくなったためであるかは判らない。しかし、それでも  $10^3$ – $10^4$  のレンジでのプロセスバリデーションが可能な PrP<sup>Sc</sup> 力価を有するスパイク用試料が得られたことになる。

今後、このような試料を用いてプロセスバリデーションのモデル実験を進める一方、界面活性剤を含まないスパイク用試料の調整法についても検討する必要があると思われる。

#### D-6 PrPSVの発現系構築、ウシ血液中のPrPSVの検出並びにヒツジPrPSV mRNAの検索

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性CJD、プリオンタンパク質遺伝子(*PRNP*)にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝型CJD及び*PRNP*に変異のない散発型CJDが知られ、約85-90%を散発型CJDが占めている。一方、1996年に英国で発症が確認された変異型CJDは、従

来の散発型CJDとは異なって若年性の患者で発症し、PrP<sup>Sc</sup>の生化学的研究及び英国で多発していたBSEに関する疫学研究から、ウシPrP<sup>Sc</sup>の人への伝達によって発症すると考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例が報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。多くの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ることから、医薬品へのPrP<sup>Sc</sup>汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP<sup>Sc</sup>測定法の確立が望まれている。

昨年の本研究ではウシ角膜細胞株BCE C/D-1b及びウシ脳から調製したtotal RNAを用い、PrPのGPIアンカーシグナルペプチドを欠損したPrPSV mRNAの発現について報告した。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、C末端の241-260残基は異なったアミノ酸配列を有している。

本年度は、大腸菌を用いたウシPrPSV発現系の構築、ウシ血液から調製したtotal RNAを用いたPrPSV mRNAの検出及びヒツジPrPSV mRNAの同定を行った。まず、標準品及びマウスの免疫原及び検出用の抗原として用いる組換えタンパク質を調製した。大量にタンパク質を得るために大腸菌を用いた発現系を構築し、抗PrP抗体6H4が認識する組換え端確執の画分を調製した。現在、これらの精製を行っており、来年度はこれらを用いてマウスを免役して新たなモノクローナル抗体の作製を予定している。

つぎに、プリオン病のバイオマーカーとしてPrPSVを利用することを目的とし、PrPSV mRNAを特異的に検出するexon-exon junction primerを用いたRT-PCR法で血液中の白血球由来total RNAを測定した。測定にはRNAlaterで長期間保存していたウシ血液を検体として用いたところ、わずかながらPrPSV mRNAの発現を確認した。しかし、同じ試料を用いて行った定量RT-PCRでは、その発現量は検出感度以下であった。一般にRNAlater中では、

-20°C以下ではRNAは半永久的に安定とされているが、今回用いた試料からは質の良いRNAを得ることができず、定性はできたものの、定量値を出すことができなかった。今後は、新鮮なウシ血液の測定やバフィーコートによる白血球画分の調製を試みて正常なウシ血中を用いたPrPSV mRNAの定量法を確立した上で、プリオン病罹患牛への適応を考えている。

さらに、本年度は、ウシと同じ反芻動物であるヒツジ脳及びヒツジ培養細胞を対象として、PrPSV mRNAの有無を解析した。ヒツジに自然発症するプリオン病としクレイビーが知られており、日本国内でも数例の発症が報告されている。ウシのプリオン病であるBSEは、スケレイビーに罹患したヒツジから動物性飼料を通じて伝達された可能性も指摘されており、スケレイビーの研究も精力的に行われている。最近、スケレイビー又はBSEに罹患したヒツジの血液を輸血した研究から、43%の確率でスケレイビーが、36%の確率でBSEがそれぞれ伝達されることが報告され、その高い確率から変異型CJD伝達のモデル動物としてヒツジが利用できる可能性が指摘された [Houston *et al.*, *Blood* 112: 4739-4745 (2008)]. ヒツジを輸血によるCJDやBSEの伝達実験のモデル動物として利用が可能であれば、本研究で報告した exon-exon junction primer を用いた RT-PCR法によるPrPSV mRNAの測定を通じて、それらのバイオマーカーとしての可能性の検証が期待される。

## E. 結論

- 1) PrP<sup>Sc</sup> 検出手法の調査及びその有用性の評価に関する調査研究を行った。
- 2) 正常ハムスター脳の PrP<sup>C</sup> を濃縮する方法を検討し、Octyl  $\beta$ -glucoside 及び CHAPS による PrP<sup>C</sup> 画分の可溶化と超遠心分離による不溶性画分の除去、並びに、ニッケルカラムと PEI コーティングメンブレンの併用によって、PrP<sup>C</sup> が効率的に濃縮されることを見出した。
- 3) スケレイビ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、製造工程

標準化とプリオン検出高度化のための第一歩となる重要な情報が得られた。

- 4) 粒子径の小さい PrP<sup>Sc</sup> を大量に回収することは困難であるが、本研究では、PrP<sup>Sc</sup> 検出感度に優れた PMCA を検出に用いることで、粒子径 35 nm 以下の PrP<sup>Sc</sup> 画分をスパイク用試料として用いた場合でも、 $10^3 \sim 10^4$  の範囲でプロセスバリデーションが実施可能であることを示した。今後、粒子径の小さい PrP<sup>Sc</sup> を用いることで、より厳密に医薬品の製造工程における PrP<sup>Sc</sup> 除去効率が評価できるようになると思われる。
- 5) 孔径 15nm のウイルス除去膜は、感染性プリオンタンパク質除去に効果があるが、この膜を通過し超遠心で沈殿しないような微細な感染性プリオンタンパク質が存在する。このような感染性プリオンタンパク質の存在を意識して評価を進めることが、より適切な評価に結びつくと考えられる。
- 6) ウシ PrP<sup>Sc</sup> の新規検出法確立を目的として、ウシ PrPSV 組換えタンパク質発現系の構築、exon-exon junction primer を用いた RT-PCR 法によるウシ血液の測定、ヒツジ PrPSV mRNA の解析を行った。これらの結果は、新たな PrP<sup>Sc</sup> バイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発に寄与するものと期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Takakura, D., Qin, Y., Xiaoyu, H., Yamaguchi, T. The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 2) Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T.: LC/MS of oligosaccharides, Glycoscience Lab. Manual., Ed. Naoyuki Taniguchi, (in press)



- 3) Itoh S., Takakura D., Kawasaki N., Yamaguchi T.: Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein. The protein Protocols Hand-book. Third Edition. Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. (in press)
- 4) Kawasaki N., Itoh S., Yamaguchi T.: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, **534**, 1-10 (2009)
- 5) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, and Teruhide Yamaguchi: Alteration of N-glycosylation in the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus: relative quantification of N-glycans using an isotope-tagging method. *Immunology*, **126**, 336-345(2008)
- 6) Kawasaki, N., Itoh, S., Hashii, N., Harazono, A., Takakura, D., Yamaguchi, T. Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. *Trends in Glycosci. Glycotech.* **20**, 97-116. (2008)
- 7) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi-Nakajima, Toru Kawanishi, and Teruhide Yamaguchi: Simultaneous glycosylation analysis of human serum glycoproteins by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **869**, 20-30, (2008)
- 8) Satsuki Itoh, Akiko Hachisuka, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Reiko Teshima, Takao Hayakawa, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis of IgLON family proteins in rat brain by liquid chromatography and multiple-stage mass spectrometry. *Biochemistry*, **47**, 10132-54, (2008)
- 9) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience*. (印刷中)
- 10) 山口照英, 石井明子: 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保、*臨床評価* 2009 (印刷中)
- 11) 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**, 27-36.(2008)
- 12) Nishimura T, Sakudo A, Xue G, Ikuta K, Yukawa M, Sugiura K, Onodera T. Establishment of a new glial cell line from hippocampus of prion protein gene-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. **377**, 1047-1050 (2008)
- 13) 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*, **365**, 164-169 (2008)
- 14) Sakudo A, Taniuchi Y, Kobayashi T, Onodera T, Ikuta K, Normal cytochrome c oxidase activity in prion protein gene-deficient mice, *Protein Peptide Lett*, **15**, 250-254 (2008)
- 15) 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*, **21**, 217-222 (2008)
- 16) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K, PrP<sup>Sc</sup> level and incubation time in a transgenic mouse model expressing Borna disease virus phosphoprotein after intracerebral prion infection, *Neurosci Lett* **431**, 81-85, (2008)
- 17) Song C-H, Furuoka H, Kim C-L, Ogino M, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi, M. Intraventricular infusion of anti-PrP mAb antagonized PrP<sup>Sc</sup> accumulation and delayed disease progression in prion-infected mice. *J. Gen. Virol.* **89**;1533-1544.(2008)
- 18) Muramatsu Y, Sakemi Y, Horiuchi M, Ogawa T, Suzuki K, Kanameda M, Tran Thi Hanh TT, and

- Tamura Y. Frequencies of PRNP gene polymorphisms in Vietnamese dairy cattle for potential association with BSE. *Zoonoses Public Health*. **55**; 267-273.(2008)
- 19) Takada N, Horiuchi M, Sata T, and Sawada Y. Evaluation of methods for removing central nervous system tissue contamination from the surface of beef carcasses after splitting. *J. Vet. Med. Sci.* **70**; 1225-1230(2008)
- 20) Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, and Watarai M. Heat shock cognate protein 70 contribute Brucella invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol.* **8**; 212.(2008)
- 21) Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, and Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP<sup>Sc</sup> is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J. Virol.* (in press)
- 22) 堀内 基広, プリオン増殖とその抑制. *ウイルス感染症セミナー*. **10**; 13-25. (2008)
- 23) Kikuchi Y, Kakeya T, Nakajima O, Sakai A, Ikeda K, Yamaguchi N, Yamazaki T, Tanamoto K, Matsuda H, Sawada J, Takatori K., Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein. *FEBS J.* **275**, 2965-2976 (2008)
2. 学会発表
- 1) 山口照英: 臨床初期におけるバイオ医薬品の品質・安全性確保～バイオ医薬品の開発初期での品質・安全性確保. 第2回APDDミニシンポジウム (2008. 8. 9. ・東京)
- 2) 山口照英: バイオ後続品の品質、安全性及び有効性の確保方策について. 日本公定書協会第27回新薬審査部門定期説明 (2008. 10. 16 ・大阪、10. 21 ・東京)
- 3) 山口照英: 医薬品及び治験薬の品質保証と開発時のCMC研究・第5回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム (2008. 12. 12 ・東京)
- 4) 山口照英: バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための要件. バイオロジクスフォーラム第5回学術集会 (2009. 2. 3 ・東京)
- 5) 山口照英: Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics. 第3回PMDA国際バイオロジクスシンポジウム (PMDA 3rd International Symposium) (2009. 2. 12 ・東京)
- 6) 山口照英: バイオ後続品に対する日本のアプローチ. 政策研究大学院大学バイオ医薬品の知的財産と評価に関するシンポジウム「セッション4: バイオ医薬品の安全性・有効性確保に関する規制」(2009. 2. 19 ・東京)
- 7) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 篠原 聡, 山口照英: ヒト間葉系幹細胞のThy-1の糖鎖構造解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸
- 8) 橋井則貴, 川崎ナナ, 中島 紫, 伊藤さつき, 山口照英: d<sub>5</sub>-フェニルヒドラジンを用いた同位体標識法及び液体クロマトグラフィー/質量分析による糖鎖の定量解析. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会 (2008, 12, 9-12) 神戸
- 9) 生田ら: 可視・近赤外分光法によるマウススクレイビー感染病態解析, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月, 宮崎
- 10) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, and Horiuchi M. Migration of mesenchymal stem cells to brain lesions of prion disease. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 11) Furuoka H, Horiuchi M, and Sata T. Pathology in guinea pig infected with bovine spongiform encephalopathy. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 12) Shindo R, Kim C-L, Song C-H Hasebe R., and Horiuchi M. Conformational stability and infectivity of protease-resistant prion protein derived from the Chandler strain. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 13) Yamasaki T, Uryu M, Nakamitsu S, and Horiuchi M.



Localization of disease-specific prion protein in prion-infected cells. Asian-African Research forum on Emergig and Reemerging Infection. (Dec. 15-16, 2008, Sapporo, Japan)

- 14) Horiuchi M and Yamazaki T. Intracellular Localization of Disease-Specific Prion Protein. Symposium on emerging and reemerging infectious diseases (Feb. 17, 2009, Yokyo) 前野英毅, 村井活史, 武田芳於, 鬼塚剛志, 脇坂明美, 沼田芳彰, 堀内基広. ウイルス除去膜濾過による異常型プリオンタンパク質質(PrP<sup>Sc</sup>)の除去. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 15) 宋昌鉉, 本望修, 古岡秀文, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 16) 山崎剛士, 瓜生匡秀, 中満智史, 堀内基広. 間接蛍光抗体法によるプリオン持続感染細胞に存在する PrPSc の検出. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 17) 鈴木章夫, 山崎剛士, 堀内基広. PrP-Fc 融合タンパク質質と PrPSc の結合条件の検討. プリオン研究会 2008 (2008年8月29-30日, 新得)
- 18) 堀内 基広, 瓜生 匡秀, 山崎 剛士, 中満 智史, 長谷部 理絵. マウス神経芽腫細胞 Neuro2a におけるプリオンの細胞間伝播にはエクソソーム以外の因子が関与する. 第 146 回日本獣医学会 (2008年9月24-26日, 宮崎)
- 19) 宋昌鉉, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン感染マウス脳における骨髄由来間葉系幹細胞の動態. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008年10月

26-28日, 岡山)

- 20) 山崎剛士, 瓜生匡秀, 中満智史, 堀内基広. 間接蛍光抗体法によるプリオン持続感染細胞に存在する PrPSc の検出. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 21) 堀内基広, 長谷部理絵. PrPScのaa 81 - aa 137の領域はプリオンの感染性に必須である. 第 56 回日本ウイルス学会 (2008年10月26-28日, 岡山)
- 22) 菊池裕, 中島治, 山崎壯, 手島玲子, 棚元憲一, 石黒直隆, 山口照英: ウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b が発現する スプライス変異型 GPI アンカー欠損プリオンタンパク質質 mRNA の解析, 2008年プリオン研究会, 平成20年8月29-30日, 北海道上川郡新得町
- 23) 菊池裕, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 山口照英: GPI アンカー欠損型プリオンタンパク質質産生に關与する低酸素誘導因子の発現解析, 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会, 平成 20 年 12 月 9-12 日, 神戸市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

Table 1 Summary of protein identification

Band No.	Protein	P (pro)	Score	MW	Accession	Peptide (Hits)	pI
5	1 mitochondrial ATP synthase, H+ transporting F1 complex beta subunit [Mesocricetus auratus]	1.13E-08	30.24	39359.4	89574019	5 (5 0 0 0)	4.98
	2 GTP-binding protein alpha o [Rattus norvegicus]	9.14E-08	10.20	40042.9	8394152	1 (1 0 0 0)	5.23
	3 GNAO2_CR1O Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	9.14E-08	10.20	40072.0	120977	1 (1 0 0 0)	5.51
	4 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	1.18E-06	10.15	53952.6	108802827	5 (5 0 0 0)	8.46
	5 RAB3B_MESAU Ras-related protein Rab-3B	2.85E-06	10.13	24709.2	81870701	1 (1 0 0 0)	4.79
	6 A Chain A, Solution Nmr Structure Of Recombinant Syrian Hamster Prion Rprp(90-231) , 25 Structures	4.40E-06	20.18	16232.6	6729981	2 (2 0 0 0)	9.07
	7 prion protein [Mesocricetus auratus]	4.40E-06	10.18	26791.8	119489920	1 (1 0 0 0)	9.68
	8 beta actin [Homo sapiens]	9.34E-06	10.17	41709.7	4501885	1 (1 0 0 0)	5.18
	9 beta-actin [Mesocricetus auratus]	9.34E-06	10.17	19217.8	77997569	1 (1 0 0 0)	5.43
7	1 complement protein C1qBP [Mesocricetus auratus]	1.59E-09	10.18	6530.9	86142876	1 (1 0 0 0)	3.45
	2 prion protein [Mesocricetus auratus]	4.74E-07	30.18	26791.8	119489920	4 (4 0 0 0)	9.68
	3 A Chain A, Solution Nmr Structure Of Recombinant Syrian Hamster Prion Rprp(90-231) , 25 Structures	4.74E-07	20.18	16232.6	6729981	3 (3 0 0 0)	9.07
	4 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	4.27E-06	10.15	53952.6	108802827	8 (7 1 0 0)	8.46
	5 beta-actin [Mesocricetus auratus]	5.15E-06	20.17	19217.8	77997569	2 (2 0 0 0)	5.43
	6 beta actin [Homo sapiens]	5.15E-06	10.17	41709.7	4501885	1 (1 0 0 0)	5.18
	7 GNAS complex locus gnas1-a [Rattus norvegicus]	7.77E-06	10.09	45635.0	9506737	1 (1 0 0 0)	5.61
	8 PRIO_CRIMI Major prion protein precursor (PrP) (PrP27-30) (PrP33-35C) (CD230 antigen)	2.99E-05	10.12	27837.4	3183139	1 (1 0 0 0)	9.61
	9 placental cathepsin L [Mesocricetus auratus]	6.22E-05	10.09	10900.2	64310849	1 (1 0 0 0)	4.33
9	1 succinate dehydrogenase complex subunit B [Mesocricetus auratus]	1.75E-11	50.21	28085.9	89573819	8 (8 0 0 0)	8.14
	2 GTP-binding protein alpha o [Rattus norvegicus]	5.29E-10	10.20	40042.9	8394152	2 (2 0 0 0)	5.23
	3 GNAO2_CR1O Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	5.29E-10	10.20	40072.0	120977	2 (2 0 0 0)	5.51
	4 beta actin [Homo sapiens]	2.14E-09	20.26	41709.7	4501885	3 (3 0 0 0)	5.18
	5 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	3.71E-06	10.15	53952.6	108802827	34 (31 3 0 0)	8.46
	6 beta-actin [Mesocricetus auratus]	2.58E-05	10.17	19217.8	77997569	2 (2 0 0 0)	5.43
10	1 RAB3B_MESAU Ras-related protein Rab-3B	3.45E-13	30.26	24709.2	81870701	5 (5 0 0 0)	4.79
	2 succinate dehydrogenase complex subunit B [Mesocricetus auratus]	4.49E-11	40.17	28085.9	89573819	6 (6 0 0 0)	8.14
	3 beta actin [Homo sapiens]	1.30E-10	10.24	41709.7	4501885	1 (1 0 0 0)	5.18
	4 smooth muscle alpha actin [Mesocricetus auratus]	1.30E-10	10.24	16621.3	21070328	1 (1 0 0 0)	4.52
	5 beta-actin [Mesocricetus auratus]	1.30E-10	10.24	11326.5	83727901	1 (1 0 0 0)	4.9
	6 GTP-binding protein alpha o [Rattus norvegicus]	1.06E-09	10.22	40042.9	8394152	2 (2 0 0 0)	5.23
	7 GNAO2_CR1O Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	1.06E-09	10.22	40072.0	120977	2 (2 0 0 0)	5.51
	8 cytochrome c oxidase chain II [Mesocricetus auratus]	1.24E-09	10.25	25995.2	2581791	2 (2 0 0 0)	4.54
	9 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2 [Mesocricetus auratus]	2.04E-07	10.17	53952.6	108802827	2 (2 0 0 0)	8.46
	10 APOA1_MESAU Apolipoprotein A-1 precursor (Apo-A1) (ApoA1)	2.07E-07	10.18	30719.7	62899898	1 (1 0 0 0)	5.81
	11 lipoprotein lipase [Mesocricetus auratus]	1.90E-06	10.10	53039.8	55700049	1 (1 0 0 0)	7.73
	12 A Chain A, Solution Nmr Structure Of Recombinant Syrian Hamster Prion Rprp(90-231) , 25 Structures	6.40E-06	10.18	16232.6	6729981	1 (1 0 0 0)	9.07
	13 prion protein [Mesocricetus auratus]	6.40E-06	10.18	26791.8	119489920	1 (1 0 0 0)	9.68
	14 cyclooxygenase 2 [Mesocricetus auratus]	7.41E-05	8.06	11225.5	37992935	1 (0 1 0 0)	8.24



**Normal hamster brain**

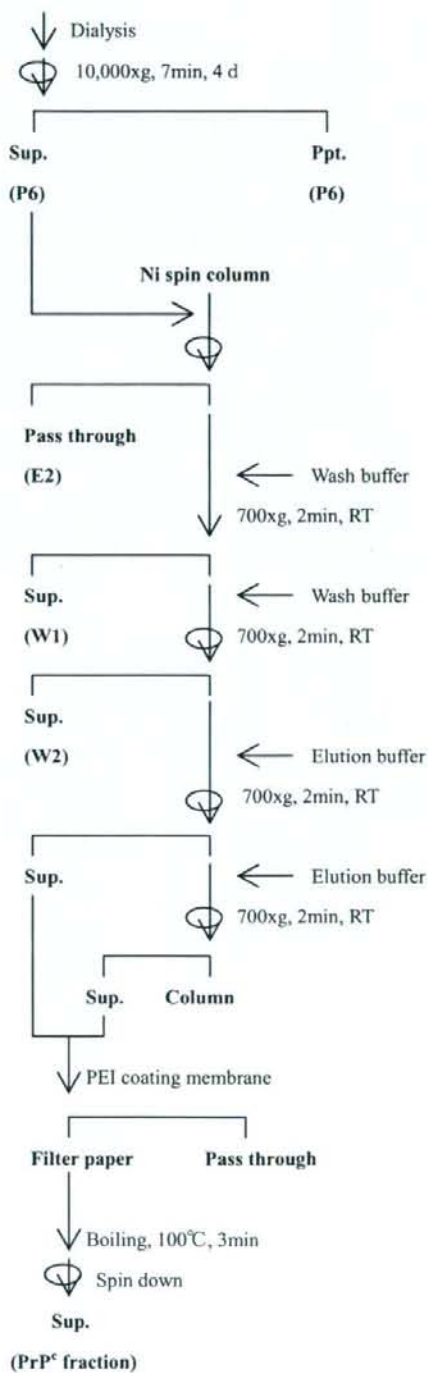
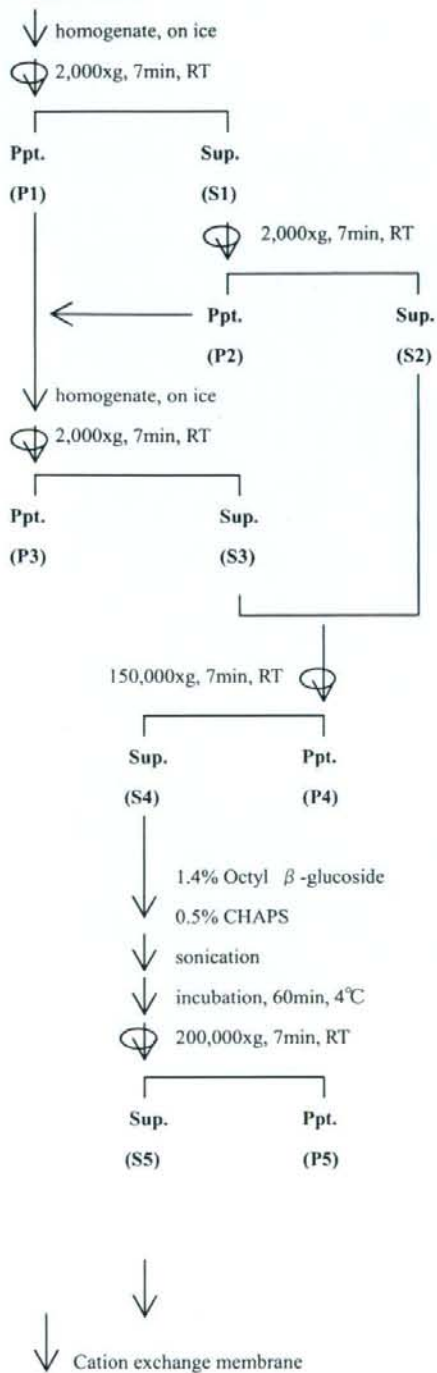


Fig. 1 ハムスター脳からの PrP<sup>c</sup> の精製方法

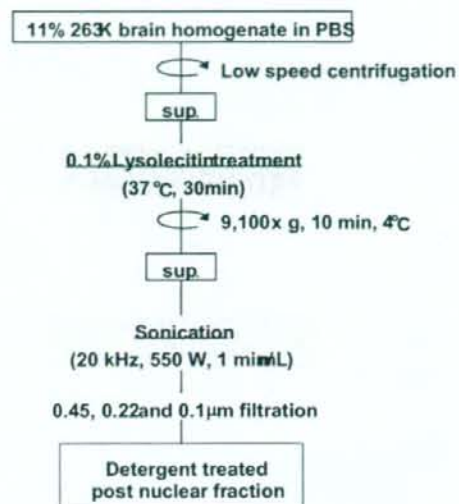


Fig. 2A. スパイク材料の前処理方法(1)

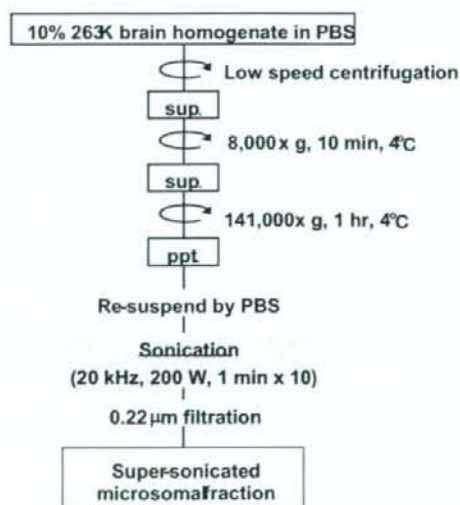


Fig. 2B. スパイク材料の前処理方法(2)