

200940009A

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21年度 **総括**・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成22(2010)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	24
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. プロセスバリデーションに適した PrP ^{Sc} 画分を用いた血液製剤製造工程の プロセスバリデーション	38
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	43
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	

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科学研究科教授
	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
	前野 英毅	日本赤十字社血漿分画センター研究部
	萩原 克郎	酪農学園大学獣医学部 教授
	作道 章一	琉球大学医学部保健学科 准教授

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PrP^{Sc}検出法の開発や試料調製法の最適化と、製造工程のPrP^{Sc}除去/不活化評価法の標準化を目的として、1) PrP^{Sc}高選択的検出法の開発を目指したPrP^{Sc}及び正常プリオン(PrP^C)構造解析のためのPrP^C濃縮法の構築、2)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、3)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、4)Protein misfolding cyclic amplification (PMAC)法と粒子径35nm以下のプリオン粒子を用いたプロセスバリデーション、並びに5)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プリオンタンパク質(PrPSV)の特異抗体の調製及びヒツジPrPSV mRNAの解析を行った。

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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 検査法、並びに効率的 PrP^{Sc} 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^{Sc} 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^{Sc} 除去/不活性評価法の標準化をめざすものである。本年度は、

1) PrP^{Sc} 高選択的検出法開発を目指した PrP 構造特性解析のための PrP^C 分画法の検討、2) 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、3) 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、4) Protein misfolding cyclic amplification (PMAC)法及び粒子径35nm以下のプリオン粒子を用いたプロセスバリデーション、並びに5) 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プリオンタンパク質(PrP^{Sc})の特異抗体の調製及びヒツジ PrP^{Sc} mRNAの解析を行った。

B. 研究方法

B-1 PrP 構造特性解析のための PrP^C 分画法の検討

1) ゲル内消化、及び PVDF 膜消化によるペプチド回収に関する検討

モデル試料として BSA を使用した。BSA を還元カルボキシメチル化後、12.5%アクリルアミドゲル、1レーンあたり 1 µg をアプライし、25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で 20 mA で泳動した。泳動後のゲルをクマシーにより

(Simple Blue Stain, Invitrogen) 染色した。染色された BSA のバンドを切り出し、1 mm 程度の角片とし、30%アセトニトリル水溶液を用いて脱色後、50%アセトニトリル水溶液を加え脱水した。脱水液を除去後、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。表 1 に示すように、ゲルの形状、消化酵素量、消化時間、及び抽出方法等を変えながら、消化及び抽出を行った。また、F 膜に転写されたタンパク質の消化と抽出についても検討する場合は、カルボキシメチル化した BSA を PVDF 膜にブロッキング後、ブロッキングされた部分を切り取り、0.5%ポロビニルピロリドン K30 を含む 100 mM 酢酸でブロッキングした後、検討に用いた。

抽出されたペプチドについて、以下の条件で LC/MS/MS、及びデータベース検索を行い、同定されたペプチドから BSA のアミノ酸配列のカバー率を算出した。

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 µ)

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 µl/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

データベース検索

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

データベース : Swissprot

2) ゲルからのタンパク質回収に関する検討

(アガロースゲルからのタンパク質の回収)

還元カルボキシメチル化した BSA を 5%アガロースゲルにアプライし, 100 V で分離後, クマシー染色 (Simple Blue Stain) を行った. 検出された BSA のバンドを切り取り, DNA 回収用スピンカラム

(Quantum Prep Freeze N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Column, Bio-Rad) を用いて, タンパク質の回収を行った. 回収液を SDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し, クマシー染色により検出した.

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-1)

フェツインを還元カルボキシアミドメチル化した後, Cy5 (GE Healthcare) で蛍光標識した. 12.5%アクリルアミドゲル, 1 レーンあたり 1 μ g をアプライし, 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で 20 mA で泳動した. 蛍光スキャナー (Typhoon9400, GE Healthcare) でフェツインのバンドを検出後, ゲルを切り取り, 回収検討実験に用いた. ゲルからのフェツインの振とう抽出を行い, 抽出条件によっては得られた抽出液のフィルターろ過, 又はゲルろ過 (NAP-5, GE Healthcare) を行った. 回収液を SDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し, 蛍光検出, 及びクマシー染色により検出し, 回収度合いを確認した.

抽出条件⑤で回収したフェツインについては, キモトリプシンを 0.1 μ g を加え, 2 mM 塩化カルシウムを含む 100 mM 重炭酸アンモニウム (pH8.0) 中, 37°C, 24 時間消化した. 消化物について, LC/MSⁿ で分析を行った.

HPLC :

装置, カラム, 溶離液, 流速は, 1) ゲル内消化, 及び PVDF 膜消化によるペプチド回収に関する検討と同じ.

グラジエントプログラム : 2~60%B (0~100 分)

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 : 2.0 kV

スキャン範囲 (m/z) : 700-2000

衝突エネルギー : 35%

測定メソッド :

- ① single mass scan
(m/z 700-2000, FT 分解能 : 50000)
- ② data-dependent MS/MS
- ③ data-dependent MS/MS/MS
- ④ data-dependent MS/MS/MS/MS
- ⑤ data-dependent MS/MS/MS/MS/MS

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-2)

還元カルボキシアミドメチル化したフェツインを 12.5%アクリルアミドゲル, 1 レーンあたり 1 μ g をアプライし, 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%SDS, pH8.3 泳動用緩衝液中で 20 mA で泳動した. マーカー, 及びフェツインの 1 レーン分についてクマシー染色 (Simple Blue Stain) を行い, これを参照レーンとして, 未染色のゲルよりフェツインの泳動位置に相当するゲルを切り出した. ゲルからフェツインの振とう抽出を行い, 回収液を SDS-PAGE (12.5%ゲル) で分離し, クマシー染色により検出し, 回収度合いを確認した.

3) 溶解性ゲルからのタンパク質回収に関する検討

Hansen らの報告 (Hansen, JN. et al., Analytical Biochemistry, **105**, 192, 1980) を参考に, アクリルアミドゲルを作成する際に, N,N'-メチレンビスアクリルアミド (BIS) の代わりに N,N'-ビス(アクリロイル)シスタミン (BAC, (CH₂CHCONHCH₂CH₂S)₂) を使用し, ゲルを作成した. アクリルアミドは Bio-Rad 社製, BAC は Sigma 社製を使用し, 溶解溶媒にホルムアミドを用いて, 10%BAC-ポリアクリルアミドゲルを作成した. ゲルに還元カルボキシメチ

ル化したフェツインを1レーンあたり1, 3, 5 μg をアプライし, 89 mM Tris, 2.5 mM EDTA- NA_2 , 89 mM ホウ酸の泳動用緩衝液中で20 mAで泳動し, ゲルはクマシー染色 (Simple Blue Stain) を行った。

ゲルの溶解には, 還元剤ジチオスレイトール (DTT), 又はトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィン (TCEP) を用い, タンパク質を回収することを試みた。フェツインを含むゲルを切り出し, 30% アセトニトリル水溶液で脱色後, 1.25 M DTT, 又は0.5 M TCEP (Bond-Breaker TCEP solution, Neutral pH, PIERCE) を500 μL 加え, ゲルを粉碎した後, 室温で一晩振とうした。

溶解したゲル溶液からフェツインの回収するために, Sulfo Link Coupling Resin (PIERCE 社製), 及び強イオン交換体カラム (Accell Plus QMA, Waters 社製) を利用する方法を検討した。Sulfo Link Coupling Resin を利用する方法では, 溶解したゲル溶液, Sulfo Link Coupling Resin と Coupling buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH8.5) を一晩混合し, 還元によりゲル内の S-S 結合の開裂で生成した SH 基を Sulfo Link Coupling Resin に結合させることによってゲルの分解物を除いた後, さらにゲルろ過 (NAP-5, GE Healthcare) によって還元剤を除いた。強イオン交換体カラムを利用する方法では, フェツインを含むゲルに1.25 M DTT を含む50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 μL を加えて粉碎し, 一晩振とうしながら溶解した後, 強イオン交換体カラムにアプライしフェツインを吸着させ。カラムを50 mM Tris-HCl, pH8.0 で洗浄後, 1 M NaCl を含む50 mM Tris-HCl, pH8.0 でフェツインを溶出し, さらに溶出液をゲルろ過 (NAP-10, GE Healthcare) で脱塩した。また, 強イオン交換体カラムの回収度合いの確認のため, フェツイン, 1 μg を50 mM Tris-HCl, pH8.0, 500 μL に加え, 同様に操作した。回収液は, それぞれ濃縮乾固した後, SDS-PAGE で分離し, クマシー染色により検出し, 回収度合いを確認した。

B-2 近赤外分光法の有用性評価

新しいプリオン感染診断法として, 近赤外分光法の可能性について検討を行った。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の近赤外領域における吸収パターンを多変量解析することにより, その存在を非破壊的に検出する新しい手法 (近赤外分光法) 等について検討を行った。更に, いくつかのプリオン株についてPMCA法を用いたプリオン検出の高感度化について検討した。

B-3 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

Hamster adopted 263K が感染した脳由来の microsomal fraction (MF) を超音波装置又は界面活性剤処理で平均粒子径を約100nmにしたもの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 (WB)法と動物接種(BA)法により膜による除去能力を定量的に検討した。さらに, ろ液を超遠心処理 (150,000G, 1時間) し, 沈殿・上清画分中の感染性について検討した。

B-4 PMAC法を用いたプロセスバリデーション

1) スパイク試料の調整

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 \times 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 $^{\circ}\text{C}$ 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

PMCA 装置 (Elekon 社製) を用いてPrP^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}量をPrP^{Sc}力価(PMCA₅₀/mL)と定義して、定量解析を行った。

3) スパイク試験

FVIII溶液に1/20量のスパイク用試料を添加し、30分間攪拌した後、プラノバ20Nにより濾過した。また、HBIG溶液に1/100量のスパイク用試料を添加し、30分間攪拌した後、プラノバ35Nにより濾過した。濾過前後の試料を回収し、PMCA法を行った。

B-5 PrPSVの特異抗体の調製とヒツジPrPSV mRNAの検索

1) 抗スプライス変異型プリオン蛋白質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

ペプチド抗原としてウシPrPSVのアミノ酸配列241-260残基のC末端ペプチドにMBSを架橋剤としてBSAに結合させた免疫原BoPrPSV(241-260)-BSAを調製した。昨年度に構築したウシPrPSV組換え蛋白質を発現する大腸菌を培養し、その菌体から粗精製画分を調製した。これらを抗原としてBALB/cマウスを免疫後に脾細胞とマウス・ミエローマ細胞NS-1又はPAIと細胞融合を行い、固相抗原としてBoPrPSV(241-260)-OVAを用いたELISAで培養上清をスクリーニングした。

2) イムノブロットイング

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)又は抗ウシPrPSV抗体を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノブロットイングを行い、化学発光法で検出した。

3) 細胞培養

ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1(ATCC Number:

CRL-6538)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。

4) RT-PCR

培養したOA1細胞からDNase I消化したtotal RNAを調製し、スーパークリプト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。

(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。

また、プリオン感染サンプルは大阪大学微生物病研究所バイオセイフティー委員会の規定、DNA実験は遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)および大阪大学組換えDNA実験実施規則に従い行った。動物実験は微生物病研究所動物委員会の規定に従い行った。

C. 結果

C-1 PrP構造特性解析のためのPrP^C分画法の検討

これまでの研究により、PrP^Cの効率的濃縮方法を見出してきた。そこで本年度は、濃縮された画分から、PrP^Cを単離する方法として、SDS-PAGE後、ゲルから効率的にペプチド、又は糖タンパク質を回収する方法について検討した。

1) ゲル内消化、及びPVDF膜消化によるペプチド

回収に関する検討

ゲル内消化、及びPVDF膜消化の検討条件、及び結果について表1に示す。ゲル内消化効率については、データベース検索で同定されたBSAのペプチドから算出したアミノ酸配列のカバー率を指標とした。検討1, 2, 及び3の結果から、消化後のペプチドの抽出には、超音波抽出が有効であるが、溶液状態での消化効率(カバー率: 52.8%)に及ばないことが判った。検討4の結果から、酵素量は基質BSAに対して10:1の割合で加えたほうが消化効率は良く(カバー率: 23.2%)、検討5の結果から、ゲル内消化時、ゲルを粉碎したほうが消化効率は上がることが判った(カバー率: 29.3%)。さらに、消化時のゲル形状について、ミキサーを用いて粉碎し、消化時間についても検討したが(検討6, 及び7)、カバー率は上がらなかった。原因として、抽出後にゲル片を除くために行ったフィルターろ過の際に、ペプチドがフィルターに吸着し回収できなかったことが考えられた。また、PVDF膜にブロッティングしたBSAの消化効率(検討8, 及び9)についてもカバー率は上がらなかった。原因として、PVDF膜のブロッキングが不十分でキモトリプシンが膜に吸着し、十分に消化できなかったこと、消化後の抽出の際にブロッキングが剥がれ、生成したペプチドが吸着してしまったこと等が考えられた。以上の結果から、ゲルよりペプチドを回収する場合は、ゲル内消化を用い、消化及び抽出時にゲルは粉碎し、超音波抽出すると回収率は上がることが判った。

2) ゲルからのタンパク質回収に関する検討

(アガロースゲルからのタンパク質の回収)

5%アガロースゲルで分離する前のBSAと、分離後(図2)、DNA回収用スピニングカラムを用いて回収したタンパク質回収液を、SDS-PAGE(12.5%)で分離し、クマシー染色により検出した。その結果、アガロースゲルからは、全くBSAは回収されていないことが判った(図3)。原因としては、アガロースゲルの濃度が高すぎることや、タンパク質のゲルへの固定化が強固であることが考えられた。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-1)

Cy5で蛍光標識したフェツインをSDS-PAGEで分離し、図4に示した抽出条件でゲルからの回収を試みた。抽出溶媒には、従来、多量のゲル内タンパク質の抽出に使用していたトリス緩衝液系溶液(条件①, ②, ③)や、高塩濃度溶液(条件④, ⑤)(参考文献: PIERCE, Technical Resource, TR0051.0)を検討した。回収液をSDS-PAGEで分離後、検出されたフェツインのバンドを比較した結果、条件⑤が最もよく抽出されており、回収前のフェツインとほぼ同じ濃さを示し(図4B)、タンパク質を固定化しないこと、及び抽出溶液が効果的であることが示された。また、本条件で抽出されたCy5標識フェツインについて、キモトリプシン消化を行い、LC/MSⁿで分析した結果、ゲルにアプライしなかったCy5標識フェツインの消化物のクロマトグラムと同様のパターンを示した(図5)。フェツインには、N-型糖鎖結合部位が3箇所、及びO-型糖鎖結合部位が2箇所存在するが、糖ペプチドの解析を行ったところ、N-型糖鎖結合部位のうち2箇所(Asn199, Asn256)について、糖鎖構造を解析することができた。いずれの結合部位にも、すでに報告されているような、主にコアフコースが結合していない3本鎖、及び2本鎖のコンプレックス型糖鎖が結合していた(Green, ED. et. al., *J. Biol. Chem.*, **263**, 18253)(図5)。また、これらの結果は、ゲルにアプライしなかったCy5標識フェツインの消化物のLC/MSⁿから解析された結果と一致していた。

(アクリルアミドゲルからのタンパク質の回収-2)

フェツインをSDS-PAGEで分離後、マーカー、及びフェツインの各1レーンを含むゲルを分割し、クマシー染色(Simple Blue Stain)を行った。これを参照レーンとして、未染色のゲルより、フェツインの泳動位置に相当するゲルを切り出した(図6A, レーン4, 破線で囲んだ部分)。図4Aの抽出条件⑤を用いて、ゲルからフェツインの振とう抽出を行った。抽出液をゲルろ過(NAP-5, GE Healthcare)後、SDS-PAGEで分離し、クマシー染色により検出した(図6B)。検出されたフェツインのバンドの濃さを

比較した結果、回収されたフェツインは回収前のフェツインとほぼ同様の濃さを示し、Cy-5 標識したフェツインと同様、タンパク質を固定化しないこと、及び高塩濃度の抽出溶液が効果的であることが示された。

3) 溶解性ゲルからのタンパク質回収に関する検討

BAC の溶解溶媒にホルムアミドを使用して 10% BAC-ポリアクリルアミドゲルを作成し、還元カルボキシメチル化したフェツインを泳動後、クマシー染色を行った (図 7A)。フェツインを含むゲルを切り出し、30%アセトニトリル水溶液で脱色後、フェツインを含むゲルにそれぞれ 1.25 M DTT, 又は 0.5 M TCEP を 500 μ L 加え、ゲルを粉碎した後、室温で一晩振とうした。DTT, 及び TCEP のいずれの還元剤を用いた場合も、ゲルが溶解していることが目視で確認できた。DTT, 及び TCEP で溶解したゲル溶液を Sulfo Link Coupling Resin と一晩混合し、還元によって生成したゲル内の SH 基を Sulfo Link Coupling Resin に結合させた。ゲル溶解液を回収し、凍結乾燥後、ゲルろ過を行った後、SDS-PAGE で分離し、回収度合いを確認した。その結果、DTT, 及び TCEP のいずれの還元剤を用いた場合も、SDS-PAGE 用サンプリングバッファーに溶解した回収物は粘度が高く、また、泳動は乱れ、フェツインの回収も確認できなかった (データ示さず)。回収できなかった原因としては、ゲルの溶解が完全でなかった、吸着等によって微量のフェツインが回収できなかったことが考えられた。泳動の乱れについては、ゲルの溶解物がゲルろ過で除ききれなかったためと考えられた。

強イオン交換体カラムを利用する方法では、回収した液を SDS-PAGE で分離し、クマシー染色により検出した結果、フェツインは検出されなかった (図 7B, レーン 6-8)。回収できなかった原因としては、Sulfo Link Coupling Resin と同様、ゲルの溶解が完全でなかった、吸着等によって微量のフェツインが回収できなかったこと、また、参照実験として行ったフェツイン、1 μ g についても検出されなかったことから (図 7B, レーン 4)、強イオン交換体カラムの使用条件がフェツインには適していないことが考え

られた。

C-2 近赤外分光法の有用性評価

細胞培養技術応用医薬品の製造原料/原材料や中間工程製品に用いることができる PrP^{Sc} 検出法としての近赤外分光法の有用性を評価した。本実験条件におけるマウスの incubation time は Chandler で 197.3 \pm 5.6, Obihiro で 193.7 \pm 6.5 日であった。スクレイピーを脳内接種した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化ヘモグロビンおよび Cytochrome oxidase の変化が観察された。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、プリオン感染生前診断への本法の可能性が示された。また、PMCA 法により、ハムスター 263K 株、マウス Obihiro 株、マウス Chandler 株の試験管内増幅による比較を行ったところ、263K 株と Chandler 株は既存の条件 (1% TritonX-100, 4mM EDTA 含 PBS, 40 cycle) での PrP^{Res} (蛋白質分解酵素抵抗性 PrP) の増幅が可能であったが、Obihiro 株では同条件では増幅がされなかったことから、株ごとに条件設定が必要であることが明らかになった (表 2, 図 8)。

C-3 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

バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン蛋白除去能力の評価手法の最適化として、15nm の平均孔径をもつフィルターの有用性を評価した。粒子径を約 100nm に調整した Hamster adopted 263K 感染脳由来の MF (MF) を 15nm の平均孔径をもつフィルターでろ過したところ、ろ液中に PrP^{Res} は WB 法で認められなかった。また、ほとんどの感染性のプリオンは除去され、その除去係数 (Log reduction factor) は \geq 4.72 と 4.00 であったが、一部は膜を通過した。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 (150,000g, 1 時間) 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明らかとなった。(表 3, 図 9)。

C-4 PMAC法と粒子径35nm以下のプリオン粒子を用いたプロセスバリデーション

医薬品やその原材料の製造工程にPrP^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}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^{Sc}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。我々は昨年度の研究で、263K株感染ハムスターの脳をSUS処理後に、プラノバ35Nを通過する粒子サイズの小さいPrP^{Sc}オリゴマーを用いること、およびPrP^{Sc}を高感度に検出可能なPMCA法を用いることで、 10^3 – 10^4 のレンジのプロセスバリデーションが可能になることを報告した。そこで今年度は、この方法を用いて、血液凝固第VIII因子製剤[VIII]および人免疫グロブリン製剤[HBIG]製造工程のウイルス除去工程をモデルとして、プリオン除去のプロセスバリデーションを実施した。

スパイク用試料を添加した濾過前後のFVIII溶液を10倍段階希釈してPMCAを行い、PrP^{Sc}のPMCA力価を算出したところ、濾過前の試料の総PMCA力価は $10.6\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ であったが、濾過後の試料からはPrP^{Sc}は増幅されなかったことから、PrP^{Sc}のPMCA力価は $<5.3\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ と推定された。従ってPrP^{Sc}の減少率は >5.3 であった(表 4)。

同様にスパイク用試料を添加した濾過前後のHBIG溶液を10倍段階希釈してPMCAを行い、PrP^{Sc}のPMCA力価を算出したところ、濾過前の試料は $10.4\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ であったが、濾過後の試料からは、 10^4 希釈までPrP^{Sc}が増幅されたことから、PrP^{Sc}のPMCA力価は $8.9\text{Log}(\text{PMCA}_{50})$ と推定された。従って

PrP^{Sc}の減少率は1.5と推定された(表5)。

C-5 PrPSVの特異抗体の調製とヒツジ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、プリオン蛋白質遺伝子(*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*に変異のない散发型CJDが知られ、約85-90%を散发型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、従来の散发型CJDとは異なって若年性の患者で発症し、PrP^{Sc}の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシPrP^{Sc}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^{Sc}汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP^{Sc}測定法の確立が望まれている。

昨年の本研究では大腸菌を用いたウシPrPSV発現系の構築およびヒツジPrPSV mRNAの同定について報告した。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。本年度はウシPrPと一次構造が異なるPrPSVのC末端部位に相当するペプチド及びウシ組換え蛋白質を抗原としてマウスを免疫し、PrPSVを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの樹立を行った。また、ヒツジ胎児脳由来培養細胞株OA1が発現するmRNAを解析し、その塩基配列からヒツジPrPSVの一次構造を調べた。

1) 抗ウシPrPSVモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に確認したウシPrPSVのORFは260アミノ酸を

コードし、1-240残基まではPrPと同じ一次構造を有している。PrPSVの蛋白質発現を確認するため、C末端に相当するペプチドに対するマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立を行った。ウシPrPSVの241-260残基に相当するペプチドでマウスを免疫し、脾細胞からハイブリドーマ2株を樹立した。産生するIgMクラスの抗体はELISAで固相抗原のペプチドを認識した。しかし、ハイブリドーマのクローニングを数回繰り返しても、それらの特異性は低く、十分な反応性を有する抗体は得られなかった。

次に、ウシPrPSV組換え蛋白質でマウスを免疫し、固相抗原としてウシPrPSVの241-260残基に相当するペプチド及びウシPrPSV組換え蛋白質を用いたELISAで抗体価を測定した。5回免疫後のマウスの抗血清は、免疫原のrBoPrPSVに対して高い抗体価を示した(Fig. 10A)。抗血清中には免疫原のrBoPrPSVのC末端を特異的に認識する抗体も存在し、固相抗原のBoPrPSV (241-260)-OVAにも弱いながら反応性を示した(Fig. 10A)。そこで、このマウスから脾臓を摘出し細胞融合を行った。固相抗原としてBoPrPSV (241-260)-OVAを用いたELISAで培養上清を測定し、BoPrPSVのC末端を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ1株を樹立した。ハイブリドーマが産生する抗体(BPSV7)はIgMクラスの抗体で、rBoPrPSVとBoPrPSV (241-260)-OVAを同様に認識した(Fig. 10B)。

2) イムノプロット法によるウシPrPSV組換え蛋白質の検出

大腸菌の蛋白質発現系を用い、導入したウシPrP及びPrPSV組換え蛋白質を調製し、イムノプロット法で抗体の反応性を調べた(Fig. 11)。細胞融合に用いたマウス由来抗血清は、免疫原中に含まれるrBoPrPSV以外の菌体由来蛋白質に対する反応性を示した(middle panel, lanes 1-3)。抗PrPモノクローナル抗体6H4は、ウシPrP遺伝子を導入した全細胞溶解液の31 kDa付近にバンドを検出した(upper panel, lane 2)。同様に、ウシPrPSV遺伝子を導入

した全細胞溶解液でバンドを検出した(upper panel, lane 3)が、プラスミドのみを導入した全細胞溶解液ではバンドが検出されなかった(upper panel, lane 1)。構築した発現系では、6H4抗体が認識するPrPSVを産生することが確認された。しかし、抗ウシPrPSVモノクローナル抗体BPSV6は、実験に用いたハイブリドーマの培養上清中の抗体濃度では、PrPSV組換え蛋白質を認識しなかった(lower panel, lane 3)。

3) ヒツジスプライス変異型プリオン蛋白質 mRNAの解析

長期間培養したヒツジ胎児脳由来細胞株OA1からmRNAを調製し、ヒツジPrP及びPrPSV遺伝子の解析を行った。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で遺伝子を増幅し、pBluescript II KS(+)にそれぞれの遺伝子をクローニングした。それらの塩基配列は、コドン136がV、コドン156がR、コドン171はQ/Rで、PrP (ARQ/ARR)及びPrPSV (ARQ/ARR)のヘテロ接合型だった。

D. 考察

D-1 PrP 構造特性解析のための PrP^C 分画法の検討

PrP^{Sc}の特異的検出法を開発するためには、PrP^{Sc}とPrP^C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^C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^{Sc}を用いた研究により明らかにされている。しかし、PrP^C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。そこで前年度は、正常ハムスター脳を用いてPrP^Cの濃縮法について検討を行った。その結果、Octyl β -glucoside、及びCHAPSによるPrP^C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^{Sc}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、今年度は SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、ゲルからペプチド又は糖タンパク質を効率的に回収する方法を検討した。その結果、ゲルからの糖タンパク質の回収については、アクリルアミドゲルで分離した糖タンパク質を固定化せずに切り出し、ゲルを粉碎後、高塩濃度溶液で抽出することによって、良好な回収率が得られることが明らかになった。これにより、正常脳組織より純度の高い PrP^C を効率よく回収することが可能になった。

D-2 近赤外分光法の有用性評価

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、本法は生前診断法として有用であると考えられた。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 WB 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-3 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

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、そのプリオン因子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 WB 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際に留意点する必要があることを提議しており、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しており、製造工程の PrP^{Sc} 除去/不活化能評価法の標準化および高度化のために留意すべき重要なポイントが明らかになった。

また、動物を用いないプリオン検出系として、広範なプリオン株に適応可能な PMCA 条件の構築が

必要であることも示唆された。

D-4 PMAC法と粒子径35nm以下のプリオン粒子を用いたプロセスバリデーション

昨年度 1% SUS 処理により、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ることを報告した。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 濃度は低下し、これに伴い PrP^{Sc} 力価も低下するが、それでも 10³ 程度のレンジでプロセスバリデーションが実施可能であることを報告した。

今年度は昨年度確立したスパイク用試料を用いて、FVIII 製造工程および HBIG 製造工程のウイルス除去行程をモデルとして、プリオン除去効率を検討した。その結果、プリオンの減少率は FVIII 製造工程では >5.3、HBIG 製造工程では 1.5 と推定された。FVIII 製造工程のモデルとしてプラノバ 20N を用いたが、スパイク試料中の SUS 濃度が低下すると、試料中のプリオンはプラノバ 15N や 20N など濾過サイズの小さい膜を通過しなくなる傾向があることから、異なる溶媒中でのプリオンの存在状態など、より詳細にスパイク試料中のプリオンの生化学的および物理学的性状を検討して、プロセスバリデーションの評価結果に反映させる必要がある。

D-5 PrPSVの特異抗体の調製とヒツジPrPSV mRNAの検索

本研究では遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、ウシ血清などの動物由来製造原料を汚染する恐れのある PrP^{Sc} の新規検出法の確立を目的とし、その基礎研究として PrP の発現機構に関する研究を行った。

先に、ヒト脳では GPI 欠損型 PrPSV mRNA が発現しており、その予想されるアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体を作製し、ヒトグリオブラストマ細胞株 T98G が蛋白質として産生していることを報告した [Kikuchi *et al.*, *FEBS J.* 275: 2995-2976 (2008)]。また、昨年度の本研究ではウシ脳及びウシ角膜細胞株 BCE C/D-1b が PrPSV mRNA を発現していることを報告した。

今年度はヒトPrPSVを認識するモノクローナル抗体作製と同様な手法を用いてウシPrPSVを認識する抗ペプチド抗体の作製を試みた。合計63匹のマウスをBoPrPSV (241-260)-BSAで免疫し、抗体価が上昇したマウスから脾臓を摘出し、8回の細胞融合を行い、IgMクラスの抗体を産生するハイブリドーマ2株を樹立した。しかし、産生する抗体の特異性は低かった。そこで、新たに大腸菌の菌体から粗精製したBoPrPSV組換え蛋白質で21匹のマウスを免疫し、固相抗原としてBoPrPSV (241-260)-OVAを用いたELISAでスクリーニングを行った。粗精製した免疫原は大腸菌由来の蛋白質を含んでいたが、固相抗原にPrPSVの特異的なC末端ペプチドを用いたELISAで血清中の抗体価が高いマウスを選択し、細胞融合後、BoPrPSV (241-260)及びPrPSV組換え蛋白質を同様に認識するIgMクラスの特異抗体BPSV6を産生するハイブリドーマを樹立した。この抗体を用いてイムノブロット法を行ったが、今回の実験に用いた抗体の濃度ではrBoPrPSVの検出できなかった。マウス抗血清中の特異抗体はIgG ($\gamma 2a, \lambda$)で、細胞融合に十分な抗体価を有していた。先に樹立したヒトPrPSVのC末端を認識するHPSV178はIgGクラスの抗体で、イムノブロット法でヒト培養細胞全抽出液中のPrPSVを検出可能であった。同様の手法でウシPrPSV検出法の開発を試みたが、合計84匹のマウスを免疫し、9回の細胞融合を行ったが、IgGクラスの特異抗体を産生するハイブリドーマは樹立できなかった。今後はIgGクラスの特異抗体を産生するハイブリドーマを樹立するために、ウシPrPSV組換え蛋白質を大量に調製して高度に精製した免疫原の確保し、マウスの他にもニワトリを免疫し、脾細胞を用いてハイブリドーマの樹立およびファージディスプレイ法による特異抗体の調製を予定している。

ヒツジ胎児脳由来細胞株OA1のmRNAを解析し、PrP (ARQ/ARR)及びPrPSV (ARQ/ARR)遺伝子を発現していることを明らかにした。ヒツジのスクレイピーに対する感受性は主にPrP遺伝子(*prnp*)のコドン136, 154及び171の多型により制御され、V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹/VRQ, ARQ/VRQ及びARQ/ARQの遺伝

子を持つヒツジがスクレイピーに最も感受性が高く、ARQ/ARRの感受性は中程度とされている。OA1はARQ/ARRのヘテロ接合*prnp*のヒツジ由来の培養細胞で、スクレイピー易感染培養細胞としての利用できる可能性があり、PrPSVのスクレイピー感染に対する関与の解明に利用が期待される。

今後はスクレイピーのマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染へのPrPSVの関与、スクレイピー感染脳を抗原としたニワトリへの免疫による異常プリオン蛋白質特異的ニワトリ抗体の調製を予定している。

E. 結論

- 1) 濃縮後、電気泳動で分離された PrP^C を高収率で回収する方法を検討した。モデル糖タンパク質を用いた実験により、アクリルアミドゲルから糖タンパク質を固定化せずに、高塩濃度溶液で抽出することによって、高収率で回収できることが判った。
- 2) 近赤外スペクトル法はプリオン病の生前診断法として有用であることが明らかになった。更に、PMCA 法による異常型プリオンの増幅条件はプリオン株ごとに最適化する必要があることが示唆された。
- 3) ウイルス除去膜などバイオ医薬品の製造工程によるプリオン除去能の評価に MF 等を使用するには、スパイク材料の調製法としての超音波処理や界面活性剤処理は有効であるが、サンプル調製に超遠心操作を導入するには留意する必要がある。また、平均孔径 15nm のウイルスろ過膜は感染性プリオン因子が漏出するものの、4 Log 以上の除去能を有し、効果的な除去手段であった。
- 4) 本研究では粒子径 35 nm 以下の PrP^{Sc} 画分をスパイク試料とした、プリオン除去の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。異なる溶液中での PrP^{Sc} の存在状態、膜への非特異的吸着等より詳細な検討は必要であるが、本研究で使用したスパイク試料を用いることで、より厳密なプリオン除去のプロセスバリデーション

ンの実施が可能になると考えられる。

- 5) 本研究ではウシ PrP^{Sc} の新規検出法確立を目的とし、それらに資する基礎研究としてウシ PrPSV 組換え蛋白質発現系の構築、ウシ PrPSV 特異抗体の調製、ヒツジ胎児脳由来細胞株 OAI が発現する PrPSV mRNA の解析を行った。これらの結果は、新たな PrP^{Sc} 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への寄与が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals*. In press.
- 2) Hirata Y, Ito H, Furuta T, Ikuta K, Sakudo A. Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases. *Int J Mol Med*. 25, 267-270, 2010.
- 3) Sakudo A, Ikuta K. Fundamentals of prion diseases and their involvement in the loss of function of cellular prion protein. *Protein Pept Lett*. 16, 217-229, 2009.
- 4) Sakudo A, Ikuta K. Prion protein functions and dysfunction in prion diseases. *Curr Med Chem*. 16, 380-389, 2009.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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
- 9) 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* 431, 81-85, 2008.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Nakamura I, Xue G, Sakudo A, Saeki K, Matsumoto Y, Ikuta K, and Onodera T. Novel single nucleotide polymorphisms in SP1-binding site of Bovine PRNP promoter in Japanese Black cattle: Impairment of its activity. *Intervirology* 2007; 50, 190-196.
- 16) 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.
- 17) 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
- 18) Sakudo A, Onodera T, Ikuta K. Prion protein gene-deficient cell lines: Powerful tools for prion biology (Review) *Microbiol Immunol*. 2007: 51, 1-13.
Shindoh R, Kim C-L, Song C-H, Hasebe R, Horiuchi M. The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. *J Virol*. 2009: 83; 3852-3860.
- 19) Song C-H, Honmou O, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of immortalized human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions *J Virol*. 2009: 83; 5918-5927.
- 20) Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP^{Sc} from PrP^C and neutralizes prion infectivity. *Virology*. 2009: 394; 200-207.
- 21) Nakamitsu S, Kurokawa A, Yamasaki T, Uryu M, Hasebe R, Horiuchi M. Cell-density dependent increase of the amount of protease-resistant PrP in prion-infected Neuro2a mouse neuroblastoma cells. *J Gen Virol*. 2010: 91; 563-569.
- 22) Sakata, H., Horiuchi, M., Takahashi, I., and Kinjo, M. Conformational Analysis of Soluble Oligomers of GFP Tagged Prion Protein by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* in press.
2. 学会発表
- 1) 作道章一, 阿野泰久, 小林孝徳, 小野寺節, 生田和良. 可視・近赤外分光法によるマウススクレイピー感染病態解析, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008年9月, 宮崎
- 2) 田中宏幸, 浦山健, 大久保祐士, 柚木幹弘, 金井祐太, 萩原克郎, 生田和良. 感染性プリオン蛋白は孔径15nmのウイルス除去膜を有価する. 第56回ウイルス学会. 2008年, 岡山.
- 3) 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
- 4) 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54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
- 5) 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54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, 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
- 7) Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Identification of chemotactic factors for migration of mesenchymal stem cell to brain lesions of mice infected with prions. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 8) Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. Recycling of PrP^{Sc} via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 9) Sakata H, Horiuchi M, Kinjo M. Characterization of soluble oligomers of prion protein by fluorescence correlation spectroscopy. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 10) Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi, M., Inoshima, Y., and Ishiguro, N. PrP^{Sc} degradation pathway in macrophages. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
- 11) Horiuchi, M. Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion and Virus Infections" BSJ & ABA Joint Symposium,

- Tokushima, Japan, Oct. 30, 2009.
- 12) 蜂須賀暁子, 児矢野聡, 菊池裕, 中島治, 青笹正義, 松田治男, 澤田純一, 手島玲子, 抗マウスプリオンペプチドフェージ一本鎖抗体の反応性, 国立衛研報, 127, 26-30 (2009)
 - 13) 中満智史, 黒川彩, 山崎剛士, 瓜生匡秀, 長谷部理絵, 堀内基広. プリオン持続感染細胞における蛋白質分解酵素抵抗性 PrP の量的変動に関与する因子の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009年8月29-30日
 - 14) 坂田啓司, 堀内基広, 高橋泉, 金城政孝. 蛍光相関分光法による可溶性 PrP オリゴマー形成過程の解析. プリオン研究会 2009. 蔵王. 2009年8月29-30日
 - 15) 酒井景子, 長谷部理絵, 宋昌紘, 堀内基広. Cd14 分子のプリオン病病態への関与 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
 - 16) 山崎剛士, 中満智史, 鈴木章夫, 堀内基広. クラスリン被覆構造は PrP^{Sc} のトランスゴルジネットワークへの輸送に関与する. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
 - 17) 宋昌紘, 長谷部理絵, 堀内基広. 骨髄由来間葉系幹細胞のプリオン感染脳病変への走化に関与する因子の解析. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
 - 18) 大澤夏生, 宋昌紘, 鈴木章夫, 堀内基広. 抗 PrP 抗体の末梢投与によるプリオン病の治療効果. 第 57 回日本ウイルス学会. 東京. 2009年10月25-27日
 - 19) 堀内基広. 異常型プリオン蛋白の細胞内局在. 大阪大学蛋白質研究所セミナー2009「蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御」. 大阪. 2009年7月13-14日
 - 20) 堀内基広. 遺伝子を持たないプリオンは変異し得るか? 第 12 回日本進化学会. 札幌. 2009年9月2-4日
 - 21) T. Suzuki, A. Kohara, A. Ramadan, Y. Kikuchi, M. Honma, M. Hayashi: Comparative study on *in vivo* genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for the Balkan Endemic Nephropathy, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), Aug. 20-25, 2009, Firenze, Italy
 - 22) 菊池裕, 中島治, 豊田淑江, 手島玲子, 小西良子, 山口照英: 低酸素条件下で誘導される GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質の発現解析, 第 82 回日本生化学会大会, 平成 21 年 10 月 21-24 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

NIRS for diagnosis of infectious diseases

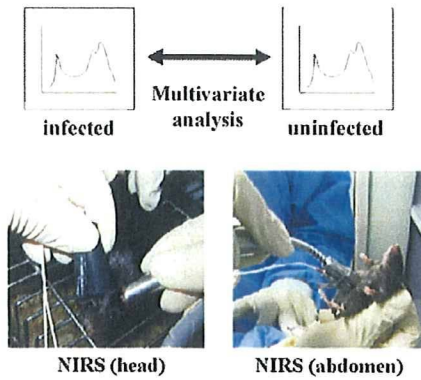


図 1

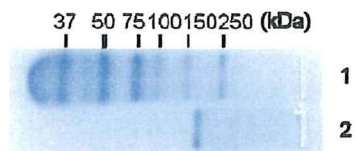


図 2. 5%アガロースゲル電気泳動による BSA の分離

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : BSA



図 3. BSA 回収実験の結果

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : アガロースゲルによる分離前の BSA (Control)

レーン 3 : アガロースゲルより回収した BSA

(A)

抽出条件	ゲル形状	抽出液媒	抽出後の処理
①	角片	20 mM Tris-HCl (pH8.0)	—
②	粉砕(ミキサー使用)	20 mM Tris-HCl (pH8.0)	フィルター過
③	粉砕(ミキサー使用)	20 mM Tris-HCl (pH8.0) + 1% Octylglucoside	ゲルろ過
④	粉砕(ミキサー使用)	150 mM NH ₄ HCO ₂ (pH8.0)	ゲルろ過
⑤	粉砕(ミキサー使用)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (pH7.5)	ゲルろ過

(B)

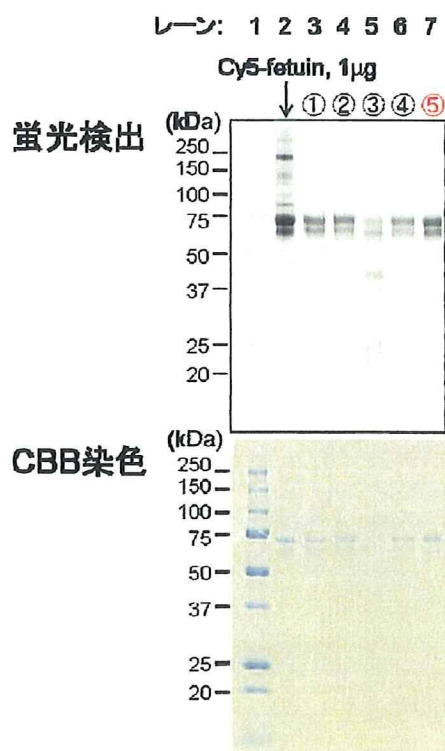


図4. フェツインの回収実験条件と結果 (アクリルアミドゲルからの回収-1)

(A) Cy5 標識したフェツインのゲルからの抽出条件

(B) 抽出回収液の SDS-PAGE (上: 蛍光検出, 下: クマシー染色)

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 回収前のフェツイン (Control)

レーン 3-7 : 抽出条件①-⑤で回収したフェツイン

