

(A)

MKSFVLLFCL AQLWGCHSIP LDPVAGYKEP ACDFEDTEQA ALAAVEYINK  
ELPRGYKHTL NQIDSVKWP RRPTGEVYDI **EID<sup>199</sup>LET<sup>199</sup>CH** VLDPTPLAN<sup>199</sup>C  
SVRQQTQHAV EGDCDIHVLK QDGFQSVLET KCDSSPDSAE DVRKLCPCP  
LLAPLN<sup>256</sup>DSRV **VHAVEVALAT FNAESN<sup>277</sup>GSYL QLVEISRAQF** VPL<sup>256</sup>VSVSVE  
FAVAATDCIA KEVVDPTKCN LLAEKQYGF**C** KGSVIQKALG GEDVRVTC<sup>199</sup>L  
EQTQ<sup>256</sup>VIPQF QPDGAEAEAP SAVPDAAG**PT** **PSAAGPPVAS** VVGPSVVAV  
PLPLHRAHYD LRETFSGVAS VESSSGEAFH VGK<sup>256</sup>FIVGQF SIPGGPVRLC  
PGRIRYFKI

(B)

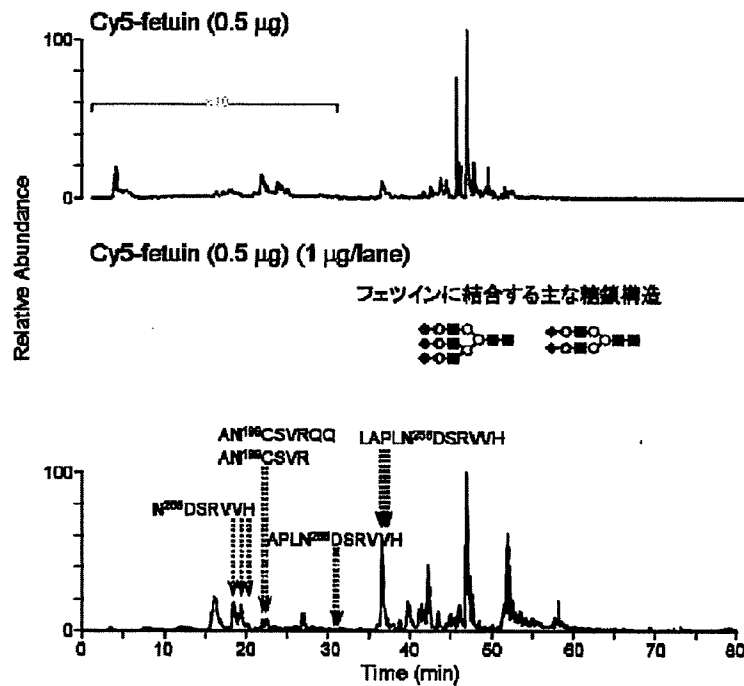


図 8.

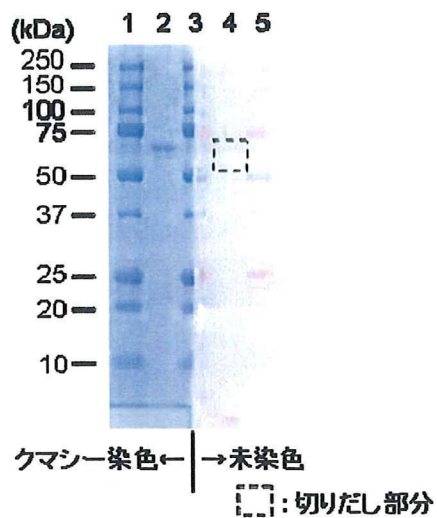
(A) フェツインのアミノ酸配列 (太字は糖鎖結合部位)

(B) Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物の LC/MS の TIC

上: Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物

下: ゲルから回収した Cy5 標識フェツインのキモトリプシン消化物

(A)



(B)

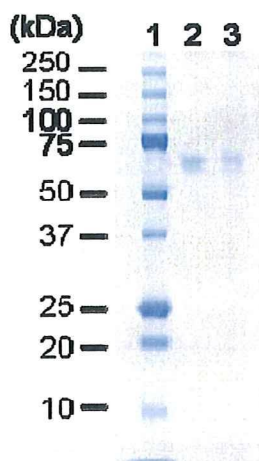


図9. フェツインの回収実験結果 (アクリルアミドゲルからの回収-2)

(A) 回収前の SDS-PAGE

レーン 1, 3, 5: 分子量マーカー

レーン 2 (参照レーン): フェツイン (1 µg, クマシー染色)

レーン 4: フェツイン (1 µg, 未染色)

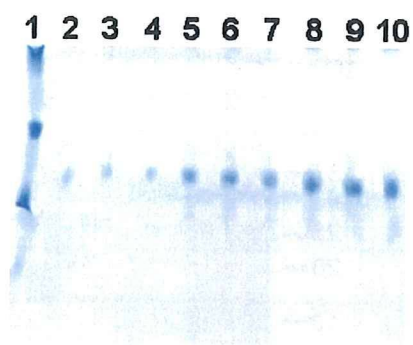
(B) 抽出回収液の SDS-PAGE

レーン 1: 分子量マーカー,

レーン 2: 回収前のフェツイン (1 µg) (Control)

レーン 3: 回収後フェツイン

(A)



(B)

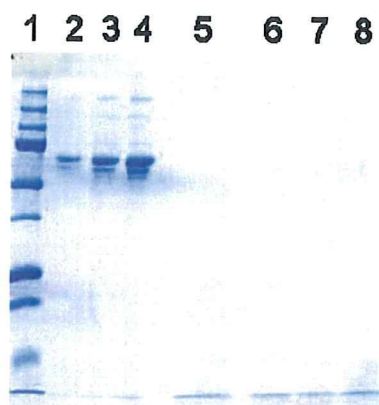


図 10. フェツインの回収実験結果 (10%BAC-ポリアクリルアミドゲルからの回収)

(A) 回収前の泳動図

レーン 1: マーカー

レーン 2, 3, 4: フェツイン (1  $\mu\text{g}$ )

レーン 5, 6, 7: フェツイン (3  $\mu\text{g}$ )

レーン 8, 9, 10: フェツイン (5  $\mu\text{g}$ )

(B) 強イオン交換体カラムで処理した回収液

レーン 1: マーカー

レーン 2, 3, 4: 回収前のフェツイン (1, 3, 5  $\mu\text{g}$ )

レーン 5: フェツイン (1  $\mu\text{g}$ ) (Control)

レーン 6, 7, 8: 回収後のフェツイン (1, 3, 5  $\mu\text{g}$ )

Band No.	Protein	P (mol)	Score	IPW	Accession	FW (kDa)	PI
6	1 integrin-linked kinase complex subunit 2 (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.32E-09	30.24	26593.4	Q95740.10	65	5.95
	2 GTP-binding protein alpha o (Rattus norvegicus)	6.14E-09	10.20	40072.0	G59419.2	11	3.23
	3 GNAO2_C19L0 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	6.14E-09	10.20	40072.0	120877	11	3.23
	4 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.78E-09	10.15	53972.0	100822822	55	5.60
	5 RAB33B_MESAU Rab-related protein Rab-33B	2.89E-09	10.15	24709.2	87870701	11	4.70
	6 A-Chain A, Substrate for Structure CF Reconstituted System Hamster Prian Protein (Pppp32-327), 2S Structure	4.80E-09	10.18	42222.0	6726691	22	6.07
	7 prian protein (Muscarinic acetylcholine receptor)	4.80E-09	10.18	25713.8	110449330	11	6.65
	8 beta-actin (Homo sapiens)	6.34E-09	10.17	41703.7	4501885	11	5.10
	9 beta-actin (Muscarinic acetylcholine receptor)	6.34E-09	10.17	18217.4	77677990	11	6.48
7	1 complement protein C1qB (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.59E-09	10.19	6333.9	66142970	11	3.65
	2 prian protein (Muscarinic acetylcholine receptor)	4.79E-07	10.18	25713.8	110449330	11	6.65
	3 A-Chain A, Substrate for Structure CF Reconstituted System Hamster Prian Protein (Pppp32-327), 2S Structure	4.79E-07	10.18	42222.0	6726691	22	6.07
	4 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Muscarinic acetylcholine receptor)	4.27E-09	10.15	53972.0	100822822	55	5.60
	5 beta-actin (Muscarinic acetylcholine receptor)	5.19E-09	10.17	18217.4	77677990	11	6.48
	6 beta-actin (Homo sapiens)	5.19E-09	10.17	41703.7	4501885	11	5.10
	7 GNAO2_C19L0 GTP-binding protein G(o) subunit alpha 2	7.77E-09	10.09	40072.0	G59419.2	11	3.23
	8 PRK2_C19L0 Major prian protein precursor (PrP) (Pp32-327) (Pp32-327) (CDS38 antigen)	2.89E-05	10.12	27817.4	8183194	11	6.61
	9 pleckstrin-related kinase 1 (Muscarinic acetylcholine receptor)	6.22E-05	10.09	10300.2	64510844	11	4.33
8	1 succinate dehydrogenase complex subunit B (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.73E-11	30.21	20965.8	80573610	68	6.14
	2 GTP-binding protein alpha o (Rattus norvegicus)	5.20E-10	10.20	40072.0	G59419.2	11	3.23
	3 GNAO2_C19L0 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	5.20E-10	10.20	40072.0	120877	11	3.23
	4 beta-actin (Homo sapiens)	2.14E-09	10.26	41703.7	4501885	11	5.10
	5 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Muscarinic acetylcholine receptor)	3.71E-09	10.19	53972.0	100822822	55	5.60
	6 beta-actin (Muscarinic acetylcholine receptor)	2.05E-05	10.17	18217.4	77677990	11	6.48
10	1 RAB33B_MESAU Rab-related protein Rab-33B	3.40E-18	30.26	24709.2	87870701	65	4.70
	2 succinate dehydrogenase complex subunit B (Muscarinic acetylcholine receptor)	4.99E-11	30.17	20965.8	80573610	68	6.14
	3 beta-actin (Homo sapiens)	1.30E-10	10.24	41703.7	4501885	11	5.10
	4 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.30E-10	10.26	18217.4	21070320	11	6.48
	5 beta-actin (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.30E-10	10.24	15333.6	8777091	11	4.33
	6 GTP-binding protein alpha o (Rattus norvegicus)	1.00E-09	10.22	40072.0	G59419.2	11	3.23
	7 GNAO2_C19L0 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 2	1.00E-09	10.22	40072.0	120877	11	3.23
	8 cytochrome c oxidase subunit II (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.24E-09	10.25	23985.2	2381791	22	4.94
	9 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Muscarinic acetylcholine receptor)	2.01E-07	10.17	53972.0	100822822	55	5.60
	10 APDA1_MESAU Apoptoprotein A-1 precursor (Apo-A1) (ApoA-1)	2.07E-07	10.18	30716.7	62863688	11	6.61
	11 lipocalin lipocalin (Muscarinic acetylcholine receptor)	1.93E-09	10.10	93305.4	53700448	11	7.73
	12 A-Chain A, Substrate for Structure CF Reconstituted System Hamster Prian Protein (Pppp32-327), 2S Structure	0.80E-09	10.18	42222.0	6726691	22	6.07
	13 prian protein (Muscarinic acetylcholine receptor)	0.80E-09	10.18	25713.8	110449330	11	6.65
	14 cytochrome c oxidase subunit II (Muscarinic acetylcholine receptor)	7.81E-05	6.06	11225.6	37682635	10	6.24

表 1. 混在するタンパク質の同定結果

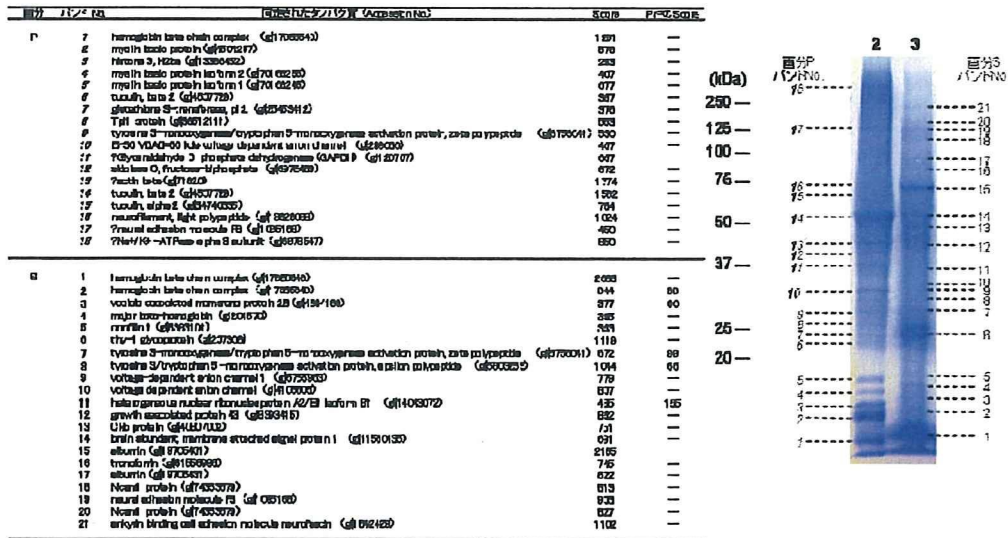


表 2. ラット脳画分の SDS-PAGE 及びタンパク質同定結果

Band No.	Protein	Score	FW (kDa)	PI
7	1 integrin-linked kinase complex (Gf170094)	259	—	—
	2 integrin-linked kinase complex (Gf170094)	259	—	—
	3 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Gf191100)	259	—	—
	4 major histocompatibility complex class II alpha chain (Gf191100)	259	—	—
	5 major histocompatibility complex class II beta chain (Gf191100)	259	—	—
	6 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	7 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	8 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	9 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	10 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	11 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	12 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	13 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	14 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	15 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	16 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	17 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	18 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
8	1 integrin-linked kinase complex (Gf170094)	259	—	—
	2 integrin-linked kinase complex (Gf170094)	259	—	—
	3 unknown translation initiation factor 2 alpha Hmwa 2 (Gf191100)	259	—	—
	4 major histocompatibility complex class II alpha chain (Gf191100)	259	—	—
	5 major histocompatibility complex class II beta chain (Gf191100)	259	—	—
	6 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	7 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	8 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	9 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—
	10 cytochrome c oxidase subunit II (Gf191100)	259	—	—

検体	ゲル形状(消化時)	キモトリプシン量 (BSA:キモトリプシン)	液量 ( $\mu$ L)	消化時間 (h)	ゲル形状(抽出時)	抽出溶媒	抽出方法	回収率 (%)
1	—	20:1	95	18	—	—	—	0.0
2	角片	20:1	95	18	角片	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	振とう後、超音波照射(タンパク両液と同じ)	1.8
3	角片	20:1	95	18	角片	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	18.1
4	角片	10:1	70	18	粉砕	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	29.9
5	粉砕	10:1	70	18	粉砕	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	26.9
6	粉砕(ミキサー使用)	10:1	70.1	18	粉砕(ミキサー使用)	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出後、フィルターでゲルを除く	7.8
7	粉砕(ミキサー使用)	10:1	70.1	42	粉砕(ミキサー使用)	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出後、フィルターでゲルを除く	18.1
8	PVDF膜	10:1	70.1	18	PVDF膜	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	3.8
9	PVDF膜	10:1	70.1	42	PVDF膜	1%TFA/50%CH <sub>3</sub> CN	超音波抽出	0

\*: 還元カルボキシアメドメチル化したBSA、1  $\mu$ mを溶液の状態で消化した。

表 3. ゲル内消化、及びPVDF膜消化の検討結果

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（H19-医薬-一般-011）

分担研究者 生田 和良 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：

- ① プリオン検出高度化のため、近赤外スペクトル法と PMCA 法の検討を行い、それらの有用性と共に、製造工程評価に用いる際の留意点が明らかとなった。
- ② スクレイピー263K 株由来の microsomal fraction を粒子径約 100nm に調整し、孔径 15nm のウイルス除去フィルターを用いたろ過実験を 2 回行い、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。しかしながら、一部は膜を通過し、超遠心操作でも沈殿しなかった。

A. 研究目的

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／不活化評価法の標準化をめざす。このために、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<sup>Sc</sup> 検出手法の最適化に関する試験研究を行う。また、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について検討する。

B. 研究方法

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、Protein Misfolding Cyclic Amplification (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。

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。

なお、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. 研究成果

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。スクレイパ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素化ヘモグロビンおよび Cytochrome oxidase の変化が観察された。スクレイパ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<sup>Res</sup>（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 1、図 2）。

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<sup>Res</sup> 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 2、図 3）。

### D. 考察

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。

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<sup>Sc</sup> 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。

### E. 結論

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。

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。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

##### 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. PrPSc 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.

#### 学会発表

・ 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

・ 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。

・ 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

・ 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

・ 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

・ 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：

研究協力者：

・ 酪農学園大学獣医学部 教授 萩原 克郎

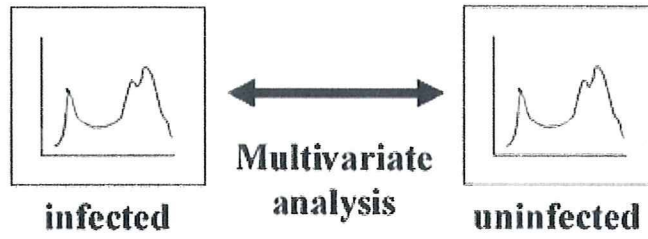
・ 琉球大学医学部保健学科 准教授 作道 章一

・ ㈱ベネシス 柚木 幹弘

#### I.

図 1

**NIRS for diagnosis of infectious diseases**



**NIRS (head)**



**NIRS (abdomen)**

表 1

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	*	*	*	*

图 2 *In vitro* amplification of PrP<sup>res</sup>

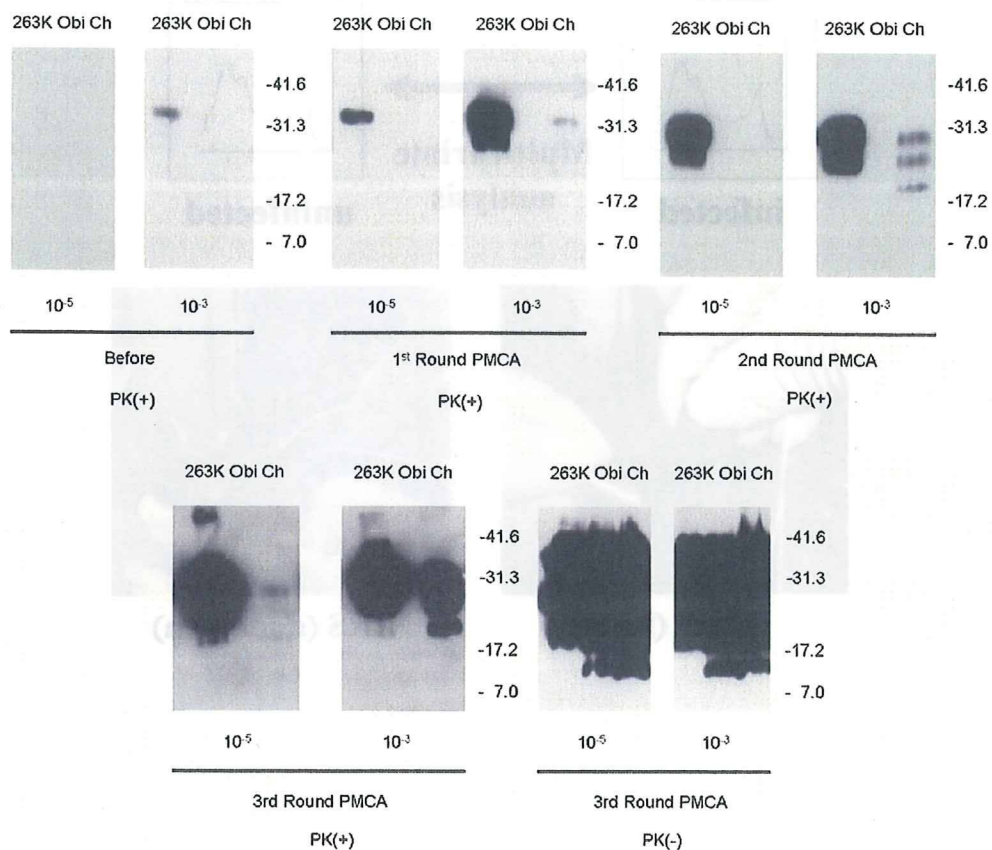


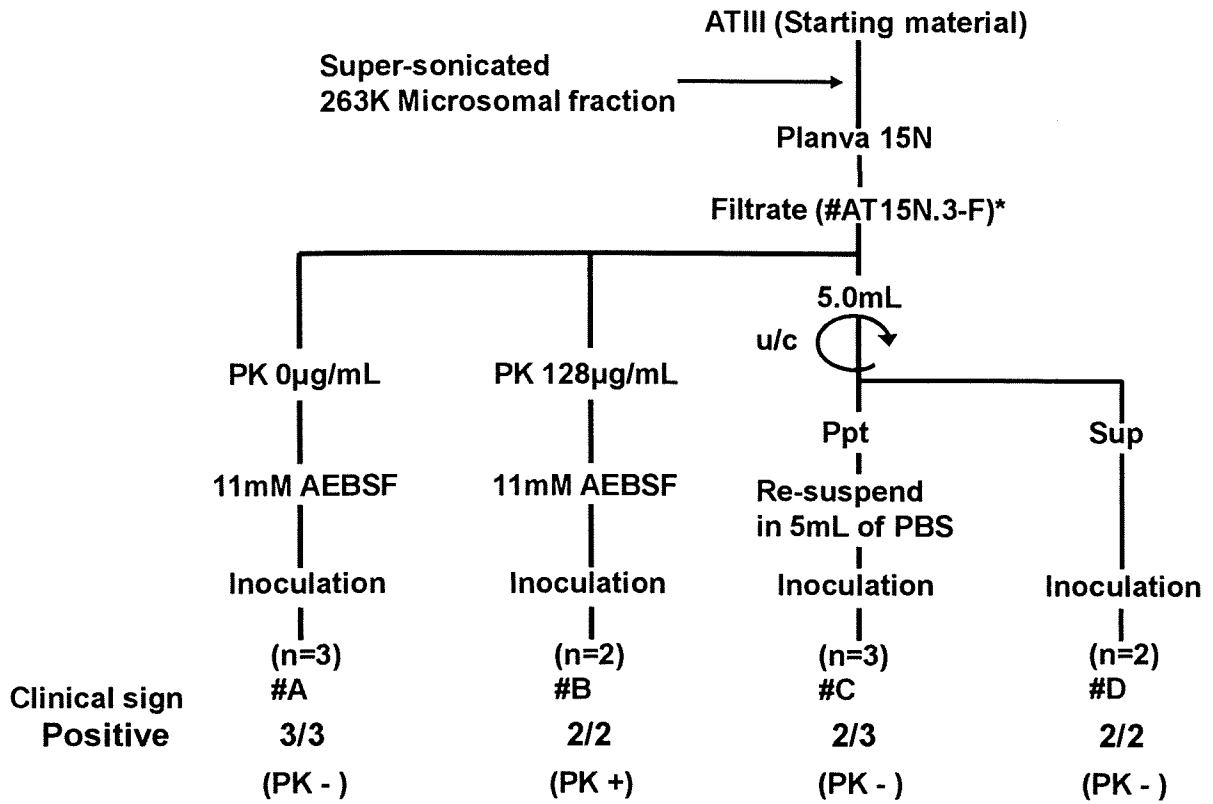
表 2 PrP<sup>Sc</sup> removal using Planova 15N

Sample	Spiking agent	Preparation	Detection	LRF
PBS	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	MF	WB	≥2.5/≥3.2
		sMF	WB	≥3.2/≥3.2
		lsMF	WB	≥3.5/≥3.5
Antithrombin	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	sMF*	BA	≥4.7/4.0
		(0.22 μm)	WB	≥2.8
			BA	+ve
Factor IX	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	sMF* (0.22 μm)	WB	≥2.9
Thrombin	Hamster PrP <sup>Sc</sup> 263K	dsMF	WB	≥3.5/≥3.5

LRF: Log reduction factor; MF: Microsomal fraction; BH: Brain homogenate; sMF: "Super-sonicated" MF;  
 dBH: BH including sarcosyl; dMF: MF including sarcosyl; sMF\*: 0.22 μm filtered sMF;  
 dsMF: SD (TNBP and Tween80) treated and followed by "super-sonicated" MF.

lsMF: Lysolecithin treated and extensively sonicated MF (without ultracentrifugation). Yunoki M. et al., Future Virol. 2006, 1(5), 659-674  
 Yunoki M. et al., Biologicals. 2008, 36(1), 27-36  
 Yunoki M. et al., Biologicals, 2009, In press

图 3



プロセスバリデーションに適した PrP<sup>Sc</sup> 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

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

研究協力者 前野 英毅 日本赤十字社 血漿分画センター研究部 研究員

研究要旨

培養細胞を用いて生産される医薬品や、血液製剤などの医薬品のプリオン汚染リスクを適切に評価するために、粒子径の小さい PrP<sup>Sc</sup> 凝集体を用いて製造工程における PrP<sup>Sc</sup> の除去効果を調べるのが求められている。しかし、そのような小さな PrP<sup>Sc</sup> 凝集体を大量に得ることは困難である。本研究では、粒子サイズの小さい PrP<sup>Sc</sup> オリゴマーの供給源として、1) プリオン持続感染細胞の培養上清中に放出されるプリオン、および 2) プリオン感染脳から界面活性剤処理により抽出される画分、の 2 つについて検討した。その結果、263K 株感染ハムスター脳を 1% Sodium Undecyl Sulfate(SUS)で処理した後、プラノバ 35N で濾過した画分が目的の PrP<sup>Sc</sup> オリゴマーの供給源として利用できることを見出した。そこで、プラノバ 35N を通過する画分をスパイク試料として使用し、Protein misfolding cyclic amplification(PMCA)法を PrP<sup>Sc</sup> の検出系に用いて、血液凝固第 VIII 因子製剤(FVIII)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。FVIII 製造工程のプラノバ 20N 濾過におけるプリオンの減少率は  $>5.3\text{Log}_{10}$  であった。一方、HBIG 製造工程のプラノバ 35N 濾過におけるプリオンの減少率は  $1.5\text{Log}_{10}$  であった。今後、異なる溶液中での PrP<sup>Sc</sup> 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の実施が可能になると考えられる。

A. 研究目的

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> オリゴマーの供給源として、1) プリオン持続感染細胞の培養上清中に放出されるプリオン、および 2) プリオン感染脳から界面活性剤処理により抽出される画分の 2 つについて検討した。また、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。さらに、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におけるプリオン除去のプロセスバリデーションを実施した。

## B. 研究方法

### 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。

### 2. 培養上清の分画およびプリオン感染性の評価

ScN2a-3 の培養上清を回収し、2,000 ×g, 10 分間遠心した。得られた上清を、10,000 ×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 ×g の遠心上清をさらに 100,000 ×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<sup>Sc</sup>を検出することでプリオンの感染性を評価した。

PrP<sup>Sc</sup> および α-tublin の検出はドットプロットにより行なった。α-tublin は抗 α-tublin モノクローナル抗体 (mAb) により検出した。PrP<sup>Sc</sup> 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 (富士写真フイルム社) 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 μm-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<sup>Sc</sup> をドットプロットで検出することにより判定した。

### 4. 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 ×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 35 nm) で濾過し、スパイク用試料とした。

### 5. PMCA

PMCA 装置 (Elekon 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> をウェスタンプロットで検出した。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。

### 6. 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。

### (倫理面への配慮)

感染性を含む試料の使用は北海道大学大学院獣医学研究科 BSL2 実験施設にて行った。

## C. 研究結果

### 1. 培養細胞上清中に放出されるプリオンの性状

解析

ScN2a-3 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 1)。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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> の検出を行った (図 2)。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<sup>Sc</sup> のバンド強度は非常に弱く、PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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 1)。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 3)。

## 2. PMCA を用いたプリオン除去のプロセスバリデーションの検討

1%SUS 処理後の 263K 株感染ハムスター脳乳剤をプラノバ 35N で濾過した画分 (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 (表 1、図 4)。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 サイクルの 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。

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 (表 2)。

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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> は増幅されなかったことから、PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 力価は  $<5.3 \text{Log}(\text{PMCA}_{50})$  と推定された。従って PrP<sup>Sc</sup> の減少率は  $>5.3$  であった (表 3)。

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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> が増幅されたことから、PrP<sup>Sc</sup> の PMCA 力価は  $8.9 \text{Log}(\text{PMCA}_{50})$  と推定された。従って PrP<sup>Sc</sup> の減少率は 1.5 と推定された (表 4)。

## D. 考察

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<sup>Sc</sup> は容易に検出されないことから、PrP 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<sup>Sc</sup> 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。その一部は 200 nm を通過する比較的小きな粒子径であったが、その量は少ないことから、プロセ

スパイク用試料として利用することは難しいと考えられた。

一方、プリオン感染ハムスター脳を 1% SUS で処理した試料を用いることで、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。

この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。

## E. 結論

本研究では、プリオン感染ハムスター脳から調整した粒子径 35 nm 以下の PrP<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> 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の実施が可能になると考えられる。

## F. 健康危険情報

実験室内感染、外部への病原体の拡散などの事故は発生していない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

<平成 19 年>

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

<平成20年>

- 5) 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.* 2008; 89:1533-1544.
- 6) 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. 2008; 55; 267-273.

- 7) 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. 2008; 70; 1225-1230.
- 8) 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. 2008; 8; 212.
- 9) 堀内 基広. プリオンの増殖とその抑制. ウイルス感染症セミナー. 2008;10;13-25.

<平成 21 年>

- 10) 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<sup>Sc</sup> is critical for the infectivity of the Chandler prion strain. J Virol. 2009; 83; 3852-3860.
- 11) 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.
- 12) Horiuchi M, Karino A, Furuoka H, Ishiguro N, Kimura K, Shinagawa M. Generation of monoclonal antibody that distinguishes PrP<sup>Sc</sup> from PrP<sup>C</sup> and neutralizes prion infectivity. Virology. 2009; 394; 200-207.
- 13) 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.
- 14) 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

<平成 19 年>

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) Horiuchi, M. Prion propagation and its inhibition. The 14th International Symposium for Zoonosis Control. -Prescription for fighting against zoonoses- (2007, 10/31, Sapporo, Japan)
- 4) 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<sup>Sc</sup> 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)
- 5) 中満智史、黒川、彩、瓜生匡秀、堀内基広 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)

<平成 20 年>

- 9) 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)
- 10) Furuoka H, Horiuchi M, and Sata T.

- Pathology in guinea pig infected with bovine spongiform encephalopathy. Prion2008 (Sept. 26-28, 2008, Madrid, Spain)
- 11) 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)
  - 12) Yamasaki T, Uryu M, Nakamitsu S, and Horiuchi M. Localization of disease-specific prion protein in prion-infected cells. Asian-African Research forum on Emerging and Reemerging Infection. (Dec. 15-16, 2008, Sapporo, Japan)
  - 13) Horiuchi M and Yamazaki T. Intracellular Localization of Disease-Specific Prion Protein. Symposium on emerging and reemerging infectious diseases (Feb. 17, 2009, Yokyo)
  - 14) 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蛋白質(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 融合蛋白質と 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)
- <平成 21 年>
- 22) 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.
  - 23) Yamasaki T, Nakamitsu S, Suzuki A, Horiuchi M. Recycling of PrPSc via retrograde transport pathway from endosome to TGN in Neuro2a mouse neuroblastoma cells. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
  - 24) 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.
  - 25) Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi, M., Inoshima, Y., and Ishiguro, N. PrPSc degradation pathway in macrophages. Prion2009, Porto Carras, Greece, Sept. 23-25, 2009.
  - 26) Horiuchi, M. Intracellular localization of abnormal isoform of prion protein. "Prion

and Virus Infections” BSJ & ABA Joint Symposium, Tokushima, Japan, Oct. 30, 2009.

- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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<sup>Sc</sup> 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

本年度は該当なし。

### 2. 実用新案登録

本年度は該当なし。

### 3. その他

本年度は該当なし

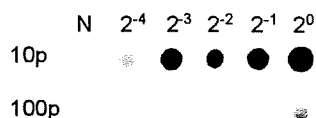


図1. 培養上清中に存在するプリオン感染性の比較定量解析。

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<sup>Sc</sup> を検出した。10p 画分では 2<sup>-4</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが、100p 画分では 2<sup>-1</sup>~2<sup>-2</sup> 希釈まで PrP<sup>Sc</sup> が検出された。従って、10p 画分は 100 p 画分の 4~8 倍のプリオン感染性を含むと考えられる。

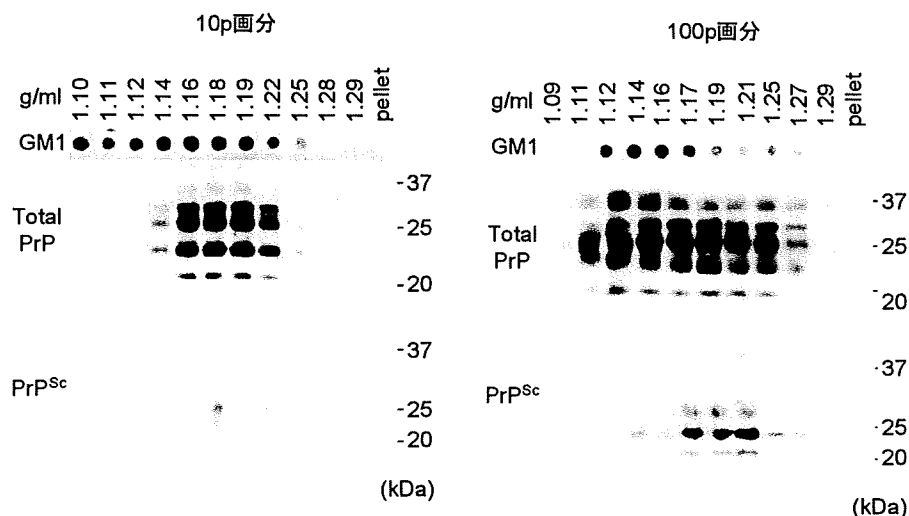


図2. 10p および 100p 画分の総 PrP(total PrP)および PK 抵抗性 PrP<sup>Sc</sup>

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<sup>Sc</sup> 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<sup>Sc</sup> の検出は再現性が乏しく、PrP<sup>Sc</sup> の存在を結論するには至らなかった。

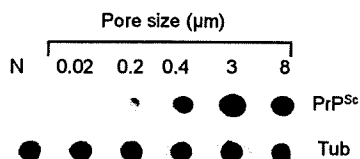


図3. ScN2a-3 の培養上清中のプリオン感染性の粒子サイズの推定

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<sup>Sc</sup> を指標に判定した。プリオン感染性は 200 nm の孔径は通過するが 20 nm の孔径は通過しなかった。