

201034050A

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
検出法及びプリオン除去工程評価に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成23(2011)年 5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
検出法及びプリオン除去工程評価に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 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法及びプリオン除去
工程評価に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
山口 照英

II. 分担研究報告書

1. 異常型プリオンの検出のための処理方法に関する試験／調査研究・・・・・・・・ 2 1
川崎 ナナ
2. 持続感染細胞クローンを用いた多様な vCJD 検出評価系の確立・・・・・・・・ 3 1
生田 和良
3. 異常型プリオンの in vivo 検出系の評価に関する研究・・・・・・・・・・・・ 3 5
萩原 克郎
4. 異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究・・・・・・・・・・・・・・ 3 9
菊池 裕

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 5

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法及び プリオン除去工程評価に関する研究

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 客員研究員
研究分担者 川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部部長
生田 和良 大阪大学 微生物病研究所 教授
萩原 克郎 酪農学園大学 獣医学部 教授
菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 室長
研究協力者 橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
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
遊佐 精一 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
柚木 幹弘 (株) ベネシス研究所開発本部枚方研究所
坂井 薫 (株) ベネシス研究所開発本部枚方研究所
久保 純 (株) ベネシス研究所開発本部枚方研究所

研究要旨 遺伝子組換え医薬品等の原料を含む製造工程における異常プリオン (PrP^{Sc}) の混入/迷入リスクを低減するための高感度、選択的かつ効率的 PrP^{Sc} 検出法、及び PrP^{Sc} 試料調製法の確立、並びに除去/不活能評価法の標準化を目的として、1) PrP^{Sc} の特異的検出法を開発する一環として、微量糖タンパク質の効率的回収法の検討、2) 製造工程のバリデーション用 PrP^{Sc} 試料調製法の開発を目的とした PrP^{Sc} マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染マウス脳由来プリオン (PrP^{res}) 材料の調製法の確立、及び PrP^{res} を検出するための WB 法条件の最適化、3) WB 法によるウイルス除去膜 (15nm) 及び電氣的吸着特性を有するろ過膜を用いたプリオン除去能の評価、4) WB 法による mo-vCJD 株感染マウスの脳内 PrP^{res} 蓄積量の評価、及び 5) PrP^{Sc} の高感度検出法を開発する一環として、PrP^{Sc} の特異抗体の作製を検討した。

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のリスク評価に関して、ウシ等由来原材料の原産国の地理的なリスク及び原材料部位のリスクを基本に、予防的な BSE 対策を進めている。さらに、ウシ等

由来製品については、①「原材料原産国の地理的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」、③リスク低減のための原材料管理に係る措置等を踏まえた安全対策を行ってきている。従って、ウシ胎仔血清等を製造工程の一部あるいは全行程で用いる

バイオ医薬品等の製造においては、製品の安全性確保の観点から、異常プリオン (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、これまでに検討されたインビボ及びインビトロ PrP^{Sc} 検出法の多くは、試験期間、感度及び特異性等に課題が残されており、未だに標準的試験法は確立されていない。そのため、医薬品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、並びに製造工程バリデーションを行うための高感度、選択的且つ効率的 PrP^{Sc} 検出法、及び PrP^{Sc} 試料調製法の開発が望まれている。本研究では、遺伝子組換え医薬品等の製造における高感度、選択的且つ効率的 PrP^{Sc} 検出法、及び PrP^{Sc} 試料調製法を確立すると共に、除去/不活能評価法の標準化をめざした検討を行っている。

本年度は、1) PrP^{Sc} の特異的検出法を開発する一環として、微量糖タンパク質の効率的回収法の検討、2) 製造工程のバリデーション用のための異常プリオン試料調製法の開発を目的とした PrP^{Sc} マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染マウス脳由来プリオン (PrP^{res}) 材料の調製法の確立を行うと共に、PrP^{res} を検出するための 6D11 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティング (WB) 法条件の最適化、3) WB 法によるウイルス除去膜 (15nm) 及び電気的吸着特性を有するろ過膜を用いたプリオン除去能の評価、4) WB 法による mo-vCJD 株感染マウスの脳内 PrP^{res} 蓄積量の評価、及び 5) PrP^{Sc} の高感度検出法を開発する一環として、PrP^{Sc} の特異抗体の作製を検討した。

B. 研究方法

B-1 微量糖タンパク質の効率的回収法の検討

B-1-1 クーマシーブルー染色ゲルからの糖タンパク質回収法

モデル試料としてフェツイン (SIGMA, Cat.

No. F3004) を使用した。フェツインを還元処理した後、5~20%グラジエントゲル (ATTO) に表 1 に示すタンパク質量をアプライし、Laemmli 法により 20 mA・80 min 分離した。固定化試薬を含むクーマシーブルー染色液 (SimplyBlue™ SafeStain, invitrogen) で染色した後、目的とするフェツインのバンド部分を切り出して数 mm 程度の角片とし、タンパク低吸着マイクロチューブに回収した。次に、表 1 に示す脱色液を各チューブに 500 µl 加え、マイクロチューブ攪拌機を用いて 15min 室温で振盪した。脱色液を取り除き、再び等量の脱色液を加えて 15 min 室温で振盪した。脱色済みのゲル片をミリ Q 水で軽く洗浄した後、キムワイプを用いてゲル片より水分を取り除き、再びタンパク低吸着マイクロチューブに回収した。ミキサーを用いてゲル片を粉砕した後、表 1 に示す抽出液を各チューブに 50 µl 加え、マイクロチューブ攪拌機を用いて一晚室温で振盪した。10,000×g で 5 min 遠心した後、上清を新たなタンパク低吸着マイクロチューブに回収した。再びゲル粉砕物に等量の抽出液を加え、攪拌した後、10,000×g で 1 min 遠心した。上清を同じチューブに回収し、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて乾燥させた。尚、抽出液 II (ギ酸/水/2-プロパノール) を用いた回収液については、Speed Vac による乾燥後、さらに 500 µl のミリ Q 水を加えて攪拌し、凍結乾燥機を用いて乾燥させて、ギ酸を完全に除去した。

B-1-2 SYPRO Ruby 染色ゲルからの糖タンパク質回収法

モデル試料として使用したフェツインを還元処理した後、5~20%グラジエントゲル (ATTO) に 1 レーンあたり 2 µg アプライし、Laemmli 法により 20 mA・80 min 分離した。

(1) 固定化ゲルの SYPRO Ruby 染色

泳動後のゲルを、固定液 (50% メタノール, 7% 酢酸) に浸し, 30 min 毎に固定液を交換しながら 1 h 穏やかに振盪した. 固定液を捨て, SYPRO Ruby 染色液 (Molecular Probes™) を加え, 暗所で一晩穏やかに振盪した.

(2) 未固定ゲルの SYPRO Ruby 染色

泳動後のゲルに SYPRO Ruby 染色液を加え, 以下の条件で染色操作を行った.

電子レンジ (30 sec) → 振盪 (室温・30 sec)

電子レンジ (15 sec) → 振盪 (室温・30 sec)

電子レンジ (15 sec) → 振盪 (室温・23 min)

染色後のゲルをミリ Q 水で軽く洗浄し, 264 nm の波長で観察しながら目的とするフェツインのバンド部分を切り出した. 切り出したバンド部分は, 数 mm 程度の角片とし, タンパク低吸着マイクロチューブに回収した. 脱色液 (50% メタノール) を各チューブに 500 μ l 加え, マイクロチューブ攪拌機を用いて 15min 室温で振盪した. 脱色液を取り除き, 再び等量の脱色液を加えて 15 min 室温で振盪した. 脱色済みのゲル片をミリ Q 水で軽く洗浄した後, キムワイプを用いてゲル片より水分を取り除き, 再びタンパク低吸着マイクロチューブに回収した. ミキサーを用いてゲル片を粉碎した後, ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2 (v/v/v)) を各チューブに 50 μ l 加え, マイクロチューブ攪拌機を用いて一晩室温で振盪した. 10, 000 \times g で 5 min 遠心した後, 上清を新たなタンパク低吸着マイクロチューブに回収した. 再びゲル粉碎物に等量の抽出液を加え, 攪拌した後, 10, 000 \times g で 1 min 遠心した. 上清を同じチューブに回収し, 減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて乾燥させた後, さらに 500 μ l のミリ Q

水を加えて攪拌し, 凍結乾燥機を用いて再び乾燥させた.

B-1-3 部位特異的糖鎖構造解析

モデル試料として組織プラスミノージェンアクチベータ (t-PA) (Wako, Cat. No. 205-15201) を使用した. 2 μ g の t-PA を還元処理した後, 5~20%グラジエントゲル (ATTO) を用いて, Laemmli 法により 20 mA・80 min 分離した. クーマシーブルー染色の後, 目的とする t-PA バンド部分を切り出し, ギ酸/水/2-プロパノールを用いて t-PA を抽出した. 凍結乾燥済みの試料を 30 μ l の消化バッファー (100 mM 重炭酸アンモニウム, pH 8.0) に溶解し, 1 μ l の 500 mM DTT 溶液を加え, 60°C で 45 min インキュベートした. 4.8 μ l の 1 M モノヨード酢酸ナトリウムを加え, 暗所で 30 min インキュベートした後, 1.2 μ l の 500 mM DTT を加えて攪拌した. カルボキシメチル化済みの t-PA 試料に対し, 0.5 μ l の修飾トリプシン溶液 (0.1 μ g/ μ l) を加え, 37°C で一晩反応させた. Speed Vac を用いて乾燥させた後, PepClean™ C18 Spin Columns (PIERCE) のプロトコールに準拠してペプチドを精製した.

精製された t-PA のトリプシン消化物を用いて, 以下の条件で液体クロマトグラフィー/多段階質量分析 (LC/MS~MS/MS/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, 内径 0.075 \times 長さ 150 mm, 粒子径 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

グラジェント: 2~45% B (100 min)

流速 : 0.3 μ l/min

MS:

装置 : Finnigan LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)

イオン源: nanoESI (AMR)

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) : 400-2,000

衝突エネルギー: 35%

測定メソッド:

single mass scan (FT 分解能 : 100,000)

data dependent MS/MS

data dependent MS/MS/MS

data dependent MS/MS/MS/MS

B-2 PrP^{res} 材料の調製法の確立及び PrP^{res} を検出するための WB 法条件の最適化

(1) mo-vCJD 株感染マウス脳よりマイクロソーマル画分 (MF) を得た後, 超音波処理を行い PrP^{res} 材料の調製を行った. コントロールとして非感染マウス脳より同様にプリオン材料 (PrP^c 材料) を調製し, 粒子径分布を測定した.

(2) mo-vCJD 株感染マウス脳由来プリオン材料中の PrP^{res} を検出する WB 法条件の最適化を行った. 更にシグナル強度を指標とした定量性評価手法の確立を試みた.

B-3 WB 法によるろ過膜を用いたプリオン除去能の評価

(1) 上記のプリオン材料を PBS に懸濁し, 15nm の孔径を持つウイルス除去膜によるろ過を行い, WB 法を用いて実施した.

(2) 上記のプリオン材料を PBS に懸濁し, 電荷をもつろ過膜であるデプスフィルター (Zeta

plus 90LA) およびエンドトキシン吸着フィルター (Mustung E) を用いてろ過実験を行った.

B-4 WB 法による mo-vCJD 株感染マウスの脳内 PrP^{res} 蓄積量の評価

mo-vCJD 株感染マウス脳ホモジネート (1%及び 5%) を FVB/n マウス (30 日齢メス) に脳内接種した. 接種後, 臨床所見 (異常行動などの有無) を経時的に観察するとともに, 一部のマウスについては計画殺により脳を採取した. 採取した脳は大腦, 中脳, 小脳, 延髄に分け, それぞれの PrP^{res} を測定した.

B-5 PrP^{Sc} の特異抗体の作製及び評価

B-5-1 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体の作製

ペプチド抗原としてヒト PrP のアミノ酸配列 43 残基にリン酸化 Ser を含む 39-50 残基の C 末端に Cys を付したペプチド [pS43-hPrP (39-50)-Cys] 及びリン酸化 Ser を含まないペプチド [hPrP (39-50)-Cys] を合成した. 架橋剤として MBS を用い, 免疫原として水溶性キャリア蛋白質 Blue Carrier Immunogenic Protein (BCIP) に結合させた pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP を調製した. 宿主として BALB/c マウスを用い, 免疫後に脾細胞とマウス・ミエローマ細胞 NS-1 又は PAI と細胞融合を行った. 固相抗原としてウシ血清アルブミン (BSA) に結合させた pS43-hPrP (39-50)-Cys-BSA 及び hPrP (39-50)-Cys-BSA を用いた ELISA を行い, 培養上清をスクリーニングした. 同様にニワトリ (日本白色レグホン) を pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP で免疫し, 抗血清を得た.

B-5-2 スクレイピー感染脳乳液の調製

スクレイピー (obihiro 株) 感染マウス凍結脳は, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

プリオン病研究センター横山隆チーム長から御供与いただいた。マウスへのPrP^{Sc}感染実験は、広島大学大学院生物圏科学研究科免疫生物学研究室松田治男教授に御教授いただいた。

ICRマウスの脳にスクレイピー(obihiro株)10%脳乳液を投与し、4か月後に安楽死させた。得られたスクレイピー感染脳を左右に二分割し、それぞれを0.32 Mシヨ糖溶液を用いて10%脳乳液を調製し、以降の実験に用いた。

B-5-3 イムノプロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)または抗p43S-hPrP (39-50)-BCIP抗体を、第2抗体にHRP標識抗IgG抗体を用いたイムノプロットングを行い、化学発光法で検出した。

〈倫理面への配慮〉

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

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、及び酪農学園大学病原体等安全管理委員会の規定(共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定)に従い取り扱った。動物実験は、微生物病研究所動物委員会、及び酪農学園大学動物実験指針の規定(共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定)に従い実施した。

C. 結果

C-1 微量糖タンパク質の効率的回収法の検討

C-1-1 クーマシーブルー染色ゲルからの回収

1レーンあたり3 µgのフェツインを5~20%グラジエントゲルにアプライし、Laemmli法により分離した。泳動後のゲルをクーマシーブルー染色液で染色した後、表1に示すように抽出液I~IIIを用いて抽出操作を行った。ゲルより抽出されたフェツインを再び5~20%グラジエントゲルで分離した後、クーマシーブルー染色液で染色した。検出されたバンドのシグナル強度を画像解析ソフトImage Quant TL (GE Healthcare)を用いて測定した(図1)。3種類の抽出液の中で、酸性抽出液II(ギ酸/水/2-プロパノール)を用いたときの回収効率が最も良好であった。これに対して、有機溶媒を含まない中性抽出液I(50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA, pH 7.5)の回収効率は低かった。また、抽出液IIを用いた場合、脱色液①(30% アセトニトリル/5% 酢酸)を使用したときの回収率が43%と最も良好であった(表1)。タンパク質アプライ量と回収率の関係を調べた結果、1レーンあたり2 µgのフェツインを抽出液IIにより抽出したときの回収率は30%であり、3 µgをアプライしたときと比較して、回収率が低いことが確認された(図2・表1)。

以上の結果より、クーマシーブルー染色ゲルから糖タンパク質を回収するとき、脱色液①-抽出液IIの組み合わせが最も有効であることが明らかになった。また、アプライするタンパク質量の減少に伴い回収率の低下がみられたことから、微量タンパク質を取り扱う際には、容器への吸着防止など注意が必要であることが示唆された。

C-1-2 SYPRO Ruby 染色ゲルからの回収

1レーンあたり2 µgのフェツインを5~20%グラジエントゲルにアプライし、Laemmli法に

より分離した。泳動後、固定化ゲルを SYPRO Ruby 染色液で染色し、抽出液 I~III を用いて抽出操作を行った。回収したフェツインを再度電気泳動で分離し、SYPRO Ruby 染色液で染色した後、検出されたバンドのシグナル強度を Image Quant TL を用いて測定した。クーマシーブルー染色からの回収時と同様に、抽出液 II (ギ酸/水/2-プロパノール) を用いたときの回収率が最も高かった(データ示さず)。つぎに、抽出液 II を用いて、回収効率に及ぼす固定化操作の影響について検討した結果、固定化ゲルからの回収率が約 40%であるのに対し、未固定化ゲルからの回収率は約 55%であり、未固定化ゲルからの回収率の方が良好であることが明らかとなった(表 1 および図 3)。また、クーマシーブルー染色ゲルより SYPRO Ruby 染色ゲルからの回収効率の方が優れていた。

以上の結果より、電気泳動ゲルから糖タンパク質を効率的に回収するためには、ゲルを固定化せずに SYPRO Ruby 染色し、抽出液 II を用いることが重要であることが明らかになった。

C-1-3 シアル酸付加糖タンパク質への適用可能性確認

抽出液 II は約 14%のギ酸を含むため、酸に不安定なシアル酸付加糖タンパク質を処理したとき、シアル酸が解離する可能性が否定できない。そこで、抽出液 II を用いたときの糖鎖の安定性を検証することを目的として、シアル酸結合糖鎖を含む多様な糖鎖が付加した t-PA を SDS-PAGE 泳動後のゲル片から回収した後、LC/MS の修理を用いて部位特異的糖鎖構造解析を行った。t-PA の糖鎖構造に関しては、Asn117, 184, および 448 に、それぞれ高マンノース型糖鎖、モノシアル複合型 2 本鎖糖鎖、および 0~3 分子のシアル酸が付加した複合型 2 本鎖および 3 本鎖糖鎖が結合していることが

既に報告されている。

t-PA (2 μg) を還元処理した後、SDS-PAGE で分離した。クーマシーブルーで染色後、脱色液①-抽出液 II の組み合わせによりゲルから t-PA を回収し、トリプシンで消化した。得られたトリプシン消化物の LC/MS ~ MS/MS/MS/MS を行い、MS/MS によって生じた糖鎖由来の特徴的なイオンである HexHexNAc⁺ ($m/z366$) を指標として、糖ペプチドの MS データが取り込まれている位置を特定した。川崎ら (2008, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*) によって報告された糖ペプチドの質量と検出されたイオンの m/z 値から計算された質量を比較した結果、41~45, 61~62 および 63~64 min の位置に Asn448, Asn117 および Asn184 を含む糖ペプチドがそれぞれ検出されていることが確認された(図 4)。また、MS/MS~MS/MS/MS/MS スペクトルで得られた主なフラグメントイオンを帰属して糖鎖構造を確認したところ、Asn448 および Asn117 を含む糖ペプチドには、それぞれシアル酸を 0~3 個含む 2 および 3 本鎖糖鎖、およびマンノースを 5-8 個含む高マンノース型糖鎖がそれぞれ結合していることが明らかとなり、既知の報告とよく一致していた(表 2)。一方、Asn184 を含む糖ペプチドは、single mass scan で得られたイオン強度が低かったため、MS/MS スペクトルに基づく糖鎖構造の帰属には至らなかった。

以上の結果より、抽出液 II は、シアル酸結合糖鎖を含む様々な糖タンパク質に応用可能であることが示唆された。本研究で見出した回収方法は、PrP^Cを効率よく精製する方法としても利用できると思われる。

C-2 PrP^{res}材料の調製法の確立及びPrP^{res}を検出するためのWB法条件の最適化

(1) プリオン材料の調製法は先に確立した、ハムスター馴化スクレイピー263K株（以下263K株）感染ハムスター脳よりの調製法を利用できることが確認できた。

(2) 一次抗体を6D11としたWB法条件を決定した。また、シグナル強度を指標とした定量性評価手法を確立した。

C-3 WB法によるろ過膜を用いたプリオン除去能の評価

(1) mo-vCJD株由来超音波処理MFをPBS組成下において15nmの孔径を持つウイルス除去膜でろ過し、WB法で評価したところ、263K株由来超音波処理MFを用いたろ過と同様のろ過特性を示したが、mo-vCJD株は検出限界以下にまでは除去されなかった（表3）。

(2) 電気的な吸着特性を有するろ過膜については15nmの孔径を有する膜と同様のろ過傾向を示した。

C-4 WB法による mo-vCJD 株感染マウスの脳内 PrP^{res}蓄積量の評価

(1) mo-vCJD感染後のマウスを観察したところ、リアリング（後肢のみでの起立）頻度の低下や歩行異常などが早期（約120日前後）に観察された。脳内PrP^{res}はこれより約1ヵ月早い約90日目にWB定性法で検出された。ただし、PrP^{res}量はWB定量評価法の定量範囲外であった（図5）。

(2) mo-vCJD感染マウス脳の大脳、中脳、小脳、延髄中のPrP^{res}について評価したところ、部位間でPrP^{res}のシグナル強度が異なり、大脳・中脳・延髄に早期に蓄積することが明らかになった（図6）。

C-5 PrP^{Sc}の特異抗体の作製及び評価

C-5-1 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクロ

ーナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

先に報告されたヒトPrPの43残基近傍のアミノ酸配列はほ乳類で高度に保存されており、本研究ではリン酸化セリンを含むヒトPrP (39-50)ペプチドを用いてマウスを免疫した。抗体価の測定はELISAで行い、固相抗原のリン酸化セリンを含まないhPrP (39-50)ペプチドを認識せず、リン酸化セリンを含むpS43-hPrP (39-50)を特異的に認識するマウスをスクリーニングした。21匹のマウスを4回免疫し、リン酸化セリンを特異的に認識するマウスを得た。最も抗体価が上昇した1匹のマウス(図7)を最終免疫し、3日後に安楽死させたマウスから全採血して抗血清を調製、併せて摘出した脾臓を用いて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。

ハイブリドーマが産生する抗体はELISAで固相抗原のペプチドを認識したが、数度のクローニングを繰り返しても安定したクローンが得られなかった。抗体価が上昇した他のマウスを用いて数度の細胞融合を繰り返したが、同様に安定したクローンを樹立できなかったことから、以降の実験には抗血清を用いた。

最終免疫後に調製した抗血清は、ELISAで固相抗原pS43-hPrP (39-50)-Cys-BSAに対して抗体価100,000、hPrP (39-50)-Cys-BSAに対して抗体価50,000を示した(図8)。

C-5-2 イムノプロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出

調製した抗血清を用い、PrP^{Sc}感染マウス脳乳液中のpS43-PrPに対する反応性を調べた。脳内にスクレイピー(obihiro株)を接種されたマウスは、その脳内にPrP^{Sc}を蓄積し、4-5か月後に死亡する。本研究ではエンドポイント直前の4か月でマウスを安楽死させ、PrP^{Sc}感染脳及び溶液のみを投与した対照脳(mock)を調製し、イ

ムノブロット法に用いた(図9)。PrP^{Sc}感染脳及び対照脳ともに、6H4抗体が認識する糖鎖2本及び1本のPrPに相当するバンドを示した(図9, upper panel)。細胞融合に用いたマウス由来抗血清は、ELISAと同様に、免疫原に用いたリン酸化セリンを含むpS43-PrPをイムノブロット法で認識し、35 kDaのバンドを示した(図9, lower panel)。抗血清が認識するこのバンドは、糖鎖2本のバンドと同じ泳動位置に認められるが、6H4抗体に比較してより明確なバンドを示し、糖鎖1本差の泳動位置には認識するバンドが示されなかった。また、対照脳(lanes 1 and 2)に比較して、PrP^{Sc}感染脳では濃いバンドを示した(lanes 3 and 4)。

C-5-3 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPニワトリ抗体の調製

マウスと同様に、pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPでニワトリ2羽を免疫し、ELISAおよびイムノブロット法で、調製した抗血清の反応性を調べた。

免疫したニワトリは、1羽だけが顕著な抗体価の上昇を示し、3回免疫後に調製した抗血清は、ELISAで固相抗原 pS43-hPrP (39-50)-Cys-BSAに対して抗体価77,000、hPrP (39-50)-Cys-BSAに対して抗体価63,000を示した。また、イムノブロット法では、3回免疫時の抗血清では明確なバンドが得られなかった。

D. 考察

D-1 微量糖タンパク質の効率的回収法の検討

まず、クーマシーブルー染色ゲルから糖タンパク質を回収するとき、脱色液①-抽出液Ⅱの組み合わせが最も有効であることが明らかになった。また、アプライするタンパク質量の減少に伴い回収率の低下がみられたことから、微量タンパク質を取り扱う際には、容器への吸着

防止など注意が必要であることが示唆された。つぎに、SYPRO Ruby 染色ゲルからの回収について検討した結果、電気泳動ゲルから糖タンパク質を効率的に回収するためには、ゲルを固定化せずに SYPRO Ruby 染色し、抽出液Ⅱを用いることが重要であることが明らかになった。さらに、抽出液Ⅱは、シアル酸結合糖鎖を含む様々な糖タンパク質に応用可能であることが示唆された。本研究で見出した回収方法は、PrP^Cや PrP^{Sc}を効率よく精製する方法としても利用できると思われる。

D-2 PrP^{res}材料の調製法の確立及びPrP^{res}を検出するためのWB法条件の最適化

バイオ医薬品の製造工程におけるvCJD除去/不活性化評価におけるプリオン材料の調製法及びWB法の標準化のために留意すべきポイントが明らかになった。

D-3 WB法によるろ過膜を用いたプリオン除去能の評価

バイオ医薬品の製造工程に導入可能な種々のろ過膜を評価したが、機作の異なるフィルターを組み合わせることでバイオ医薬品の安全性が向上することが示唆された。

D-4 WB法による mo-vCJD 株感染マウスの脳内 PrP^{res}蓄積量の評価

バイオ医薬品の製造工程におけるvCJD除去/不活性化評価における動物接種実験の標準化のために留意すべきポイントが明らかになり、標準的な動物実験法確立に向けた基礎データが取得できた。

D-5 PrP^{Sc}の特異抗体の作製及び評価

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、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の開発に関する研究を行った。

PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリンをリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告されている(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743–8751)。ヒトPrPのN端側43残基に位置するセリン近傍のアミノ酸配列はほ乳類間で高度に保存されており、リン酸化された43残基セリン(pS43)を特異的に認識する抗体は、ウシ、ヒツジ、マウス等のPrP^{Sc}を特異的に認識することが予想される。現在、リン酸化チロシンを特異的に認識する多くの抗体が知られているが、リン酸化セリンを認識する有効な抗体はいまだ得られていない。本研究ではpS43を含むヒトPrPペプチドを合成し、pS43近傍のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体の作製を試みた。

マウスをpS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPで免疫し、抗体価が上昇したマウスの脾細胞を用いて細胞融合を行ったが、安定したクローンを樹立できなかった。顕著な抗体価の上昇は21匹中数匹にとどまり、その免疫原性の低さが示唆された。しかし、得られた抗血清は極めて高い抗体価を示し、イムノブロット法でpS43近傍のアミノ酸配列を認識し、PrP^{Sc}及びPrP^Cに特異的なバンドを示した。また、PrP^{Sc}感染脳に対してより濃いバンドを示し、PrP^{Sc}検出法への有用性が示唆された。pS43を含むPrPは糖鎖2本を含む画分で、糖鎖1本及び糖鎖がない画分にはバンドが認められなかった。PrPの糖鎖構造とpS43に何らかの相関性がある可能性が示唆され、病態との関連を含めて、今後の研究の進展が期待される。

本研究ではマウス抗血清を用いてPrP^{Sc}を検

出した。しかし、PrP^{Sc}感染脳の例数が少ないことから、さらに多くの例数を検証する必要がある。その他、脱リン酸化したPrP^{Sc}感染脳のイムノブロット法や免疫蛍光法による脳切片の染色による比較等が必要である。

ニワトリをpS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPで免疫して得られた抗血清の特異性を調べたが、イムノブロット法ではマウス抗血清と同等の結果を得られなかった。マウスでは21匹中1匹のみで有効な抗血清が得られたが、今回免疫したニワトリは2羽と例数が少なく、免疫回数も3回で、十分に抗体価が上昇しなかった可能性が高い。ニワトリPrPではすべてのほ乳類で保存されているヒトpS43残基に相当するアミノ酸はアルギニンで、免疫原と1次構造が異なることから、ニワトリは特異性の高い抗体を産生することが推測される。ニワトリの個体数を増やし、3回以上免疫を繰り返すことによって、マウスと同様な特異性の高い抗血清の取得が期待される。次年度は十分に抗体価が上昇したニワトリ脾細胞を用い、モノクローナル抗体の作製も試みる。

本研究ではマウス抗血清をイムノブロット法に用いたが、得意抗体産生ハイブリドーマを樹立できなかった。限界希釈法によるクローニングで安定なクローンが得られなかったことから、次年度はメチルセルロースを用いたコロニー形成法によるクローニングを試みる予定である。また、ラットリンパ節免疫法も試み、ラットモノクローナル抗体の作製を行う。

本年度は多くのPrP^{Sc}感染マウス脳を得たことから、次年度はPrP^{Sc}感染脳を免疫原として用い、PrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の作製を試みる。また、本年度行った固相抗原としてpS43-hPrP (39-50)を用いたELISAに加え、固相抗原にPrP^{Sc}感染マウス脳を用い、より効率的な検出法の確立を予定している。

今後はスクレイピーの Maus 脳内投与による伝達実験を行い、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) PrP^{Sc}の特異的検出法を開発することを目的としたPrP^{Sc}及びPrP^Cの部位特異的糖鎖構造解析を行う一環として、微量糖タンパク質の効率的回収法を検討した。その結果、シアル酸結合糖鎖を含む様々糖鎖が結合したタンパク質を電気泳動ゲルから効率的に回収する方法として、固定化せずにゲルをSyproRubyで染色し、ギ酸/水/2-プロパノールで抽出法する方法を見出した。本方法は、PrP^Cの効率的回収法としても利用できることが期待される。

(2) mo-vCJD株感染マウス脳由来マイクロソーム画分の超音波処理により調製したPrP^{res}及びPrP^{res}を検出するために最適化されたWB法は、製造工程バリデーションのためのPrP^{Sc}試料及び評価手法として利用可能であることを実証した。

(3) WB法によるろ過膜を用いたプリオン除去能評価を実施した結果、バイオ医薬品製造工程の異常プリオン除去能評価における留意点が明らかになり、vCJD評価手法の標準化とプロセスデザインの最適化のための第一歩となる重要な情報が得られた。

(4) WB法による mo-vCJD 株感染マウスの脳内 PrP^{res}蓄積量評価を実施した結果、バイオ医薬品製造工程のvCJD除去/不活化能評価における動物接種実験の標準化のために留意すべきポイントが明らかになり、標準的な動物実験法確立に向けた基礎データが取得できた。

(5) 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ヒトpS43-PrP免疫原

の作製、マウス抗血清の調製、マウスハイブリドーマの作製、ニワトリ抗血清の調製を行い、PrP^{Sc}感染マウス脳を用いたイムノブロット法で検証を行った。得られたマウス抗血清は、糖鎖を2本有するPrPを特異的に検出した。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

G-1 論文発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

- (1) ○ 柚木幹弘, 萩原克郎, 生田和良. バイオ医薬品におけるプリオンの問題ーヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題ー. 人工血液 (In press)
- (2) Mizuike, R., Sasaki, T., Baba, K., Iwamoto, H., Shibai, Y., Kosaka, M., Kubota-Koketsu, R., Yang, C.-S., Du, A., Sakudo, A., Tsujikawa, M., Yunoki, M., and Ikuta, K.: Development of two types of rapid diagnostic test kits to detect the hemagglutinin or nucleoprotein of the swine-origin pandemic influenza A virus H1N1 Clin. Vaccine Immunol., in press.
- (3) ○ Sakudo, A., Ano, Y., Onodera, T., Nitta, K., Shintani, H., Ikuta, K., and Tanaka, Y.: Fundamentals of prions and their inactivation. Int. J. Mol. Med., in press.
- (4) ○ Sakudo, A., Xue, G., Kawashita, N., Ano, Y., Takagi, T., Shintani, H., Tanaka, Y., Onodera, T., and Ikuta, K.: Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation. Curr. Protein Pept. Sci. 11, 166-179, 2010.
- (5) Bala, M., Arias, J.F., Deb, M., and Ikuta, K.: Immunofluorescence assay in India for confirmation of HIV-1 infection using a T-cell line infected with defective HIV-1. Int. J. Infect. Dis. 14, e1093-1098, 2010.

- (6) Kayamuro, H., Yoshioka, Y., Abe, Y., Arita, S., Katayama, K., Nomura, T., Yoshikawa, T., Kubota-Koketsu, R., Ikuta, K., Okamoto, S., Mori, Y., Kunisawa, J., Kiyono, H., Itoh, N., Nagano, K., Kamada, H., Tsutsumi, Y., and Tsunoda, S.: Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus. *J. Virol.* 84, 12703-12712, 2010.
- (7) Isarangkura-Na-Ayuthaya, P., Kaewnoo, W., Auwanit, W., de Silva, U.C., Ikuta, K., Sawanpanyalert, P., and Kameoka, M.: Appearance of Drug Resistance-Associated Mutations in Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01_AE Integrase Derived from Drug-Naive Thai Patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 1341-1323, 2010.
- (8) Kanai, Y., Chittaganpitch, M., Nakamura, I., Li, G.M., Bai, G.R., Li, Y.G., Ikuta, K., and Sawanpanyalert, P.: Distinct propagation efficiencies of H5N1 influenza virus Thai isolates in newly established murine respiratory region-derived cell clones. *Virus Res.* 153, 218-225, 2010.
- (9) Soonthornsata, B., Tian, Y.S., Utachee, P., Sapsutthipas, S., Isarangkura-na-Ayuthaya, P., Auwanit, W., Takagi, T., Ikuta, K., Sawanpanyalert, P., Kawashita, N., and Kameoka, M.: Design and evaluation of antiretroviral peptides corresponding to the C-terminal heptad repeat region (C-HR) of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Virology* 405, 157-164, 2010.
- (10) Jullaksorn, D., Boonchawalit, S., Uttiyoung, J., Soonthornsata, B., Yowang, A., Krathong, N., Chautrakul, S., Ikuta, K., Roobsoong, A., Kanitvittaya, S., Sawanpanyalert, P., and Kameoka M.: Sustained appearance of drug resistance-associated mutations in HIV-1 CRF01_AE protease and reverse transcriptase derived from protease inhibitor-naive Thai patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 41, 347-357, 2010.
- (11) Soonthornsata, B., Tian, Y.S., Utachee, P., Sapsutthipas, S., Isarangkura-na-Ayuthaya, P., Auwanit, W., Takagi, T., Ikuta, K., Sawanpanyalert, P., Kawashita, N., and Kameoka, M.: Design and evaluation of antiretroviral peptides corresponding to the C-terminal heptad repeat region (C-HR) of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Virology* 405, 157-164, 2010.
- (12) Pitaksajjakul, P., Lekcharoensuk, P., Uparagarin, N., Barbas, C.F., 3rd, Ibrahim, M.S., Ikuta, K., and Ramasoota, P.: Fab MAbs specific to HA of influenza virus with H5N1 neutralizing activity selected from immunized chicken phage library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 496-501, 2010.
- (13) Kanai, Y., Boonsathorn, N., Chittaganpitch, M., Bai, G., Li, Y., Kase, T., Takahashi, K., Okuno, Y., Jampangern, W., Ikuta, K., and Sawanpanyalert, P.: The impact of antigenic drift of influenza A virus on human herd immunity: Sero-epidemiological study of H1N1 in healthy Thai population in 2009. *Vaccine* 28, 5437-5444, 2010.
- (14) Kameoka, M., Isarangkura-na-Ayuthaya, P., Kameoka, Y., Sapsutthipas, S., Soonthornsata, B., Nakamura, S., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., and Auwanit, W.: The role of lysine residue at amino acid position 165 of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE Gag in reducing viral drug susceptibility to protease inhibitors. *Virology* 405, 129-138, 2010.
- (15) Kanai, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., and Hagiwara, K.: Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J. Med. Virol.* 82, 69-76, 2010.
- (16) Li, Y.G., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Kanai, Y., Bai, G.R., Kameoka, M., Takeda, N., Ikuta, K., and Sawanpanyalert, P.: Characterization of H5N1 influenza viruses isolated from humans in vitro. *Virological J.* 7, 112, 2010.
- (17) Hosmillo, M., Jeong, Y.J., Kim, H.J., Park, J.G., Nayak, M.K., Alfajaro, M.M., Collantes, T.M., Park, S.J., Ikuta, K., Yunoki, M., Kang, M.I., Park, S.I., and Cho, K.O.: Molecular detection of genotype 3 porcine hepatitis E virus in aborted fetuses and their sows. *Arch. Virol.* 155, 1157-1161, 2010.
- (18) Kanai, Y., Chittaganpitch, M., Nakamura, I.,

- Li, G., Bai, G., Li, Y., Ikuta, K., and Sawanpanyalert, P.: Distinct propagation efficiencies of H5N1 influenza virus Thai isolates in newly established murine respiratory region-derived cell clones. *Virus Res.* 153, 218-225, 2010.
- (19) Urayama, T., Sapsutthipas, S., Tsujikawa, M., Yamashita, A., Nishigaki, H., Ibrahim, M.S., Hagiwara, K., Yunoki, M., Yasunaga, T., Yamaguchi, T., and Ikuta, K.: Full-length sequences of one genotype 4 and three genotype 3 hepatitis E viruses in fecal samples from domestic swine in Japan. *OpenVet.* 4, 11-19, 2010.
- (20) Kurosu, T., Khamlert, C., Phanthanawiboon, S., Ikuta, K., and Anantapreecha, S.: Highly efficient rescue of dengue virus using a co-culture system with mosquito/mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 398-404, 2010.
- (21) Arias, J.F., Nishihara, R., Bala, M., and Ikuta, K.: High systemic levels of interleukin-10, interleukin-22 and C-reactive protein in Indian patients are associated with low in vitro replication of HIV-1 subtype C viruses. *Retrovirology* 7, 15, 2010.
- (22) Utachee, P., Nakamura, S., Isarangkura-Na-Ayuthaya, P., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M.: Two N-linked glycosylation sites in V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for CD4 binding domain. *J. Virol.* 84, 4311-4320, 2010.
- (23) Yamashita, A., Kawashita, N., Kubota-Koketsu, R., Inoue, Y., Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ideno, S., Yunoki, M., Okuno, Y., Takagi, T., Yasunaga, T., and Ikuta, K.: Highly conserved sequences for human neutralization epitope on hemagglutinin of influenza A viruses H3N2, H1N1 and H5N1: Implication for human monoclonal antibody recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 614-618, 2010.
- (24) Horie, M., Honda, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Daito, T., Oshida, T., Ikuta, K., Jem, P., Gojobori, T., Coffin, J. M., and Tomonaga, K.: Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463, 84-87, 2010.
- (25) Ueda, M., Daidoji, T., Du, A., Yang, C.S., Ibrahim, M.S., Ikuta, K., and Nakaya, T.: Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca²⁺ influx, leading to apoptosis in avian cells. *J. Virol.* 84, 3068-3078, 2010.
- (26) Sakudo, A., Xue, G., Kawashita, N., Ano, Y., Takagi, T., Shintani, H., Tanaka, Y., Onodera, T., and Ikuta, K.: Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 166-179, 2010.
- (27) ○ Yunoki, M., Tanaka, H., Urayama, T., Kanai, Y., Nishida, A., Yoshikawa, M., Ohkubo, Y., Kawabata, Y., Hagiwara, K., and Ikuta, K.: Infectious prion protein in the filtrate even after 15 nm filtration. *Biologicals* 38, 311-313, 2010.
- (28) Kanai, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., and Hagiwara, K.: Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J. Med. Virol.* 82, 69-76, 2010.
- (29) de Silva, U.C., Warachit, J., Sattagowit, N., Jirapongwattana, C., Panthong, S., Utachee, P., Yasunaga, T., Ikuta, K., Kameoka, M., and Boonsathorn, N.: Genotypic characterization of HIV-1 env gp160 sequences from three regions in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 223-227, 2010.
- (30) Yunoki, M., Kubota-Koketsu, R., Urayama, T., Sasaki, T., Du, A., Konoshima, Y., Ideno, S., Fukunaga, Y., Morikawa, S., Hiroi, S., Takahashi, K., Okuno, Y., Hagiwara, K., and Ikuta, K.: Significant neutralizing activity of human immunoglobulin preparations against pandemic 2009 H1N1. *Br. J. Haematol.* 148, 953-955, 2010.
- (31) Kato-Mori Y, Orihashi T, Kanai Y, Sato M, Sera K, Hagiwara K. Fermentation Metabolites from *Lactobacillus gasseri* and *Propionibacterium freudenreichii* Exert Bacteriocidal Effects in Mice. *J Med Food.* 13, 1460-1467, 2010
- (32) Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K.

Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res.*, 77, 1-4, 2010

- (33) 橋井則貴, 小林 哲, 川崎ナナ: 先端バイオ医薬品の評価技術, 株式会社シーエムシー出版, 東京, 171-182, 2010

G-2 学会発表

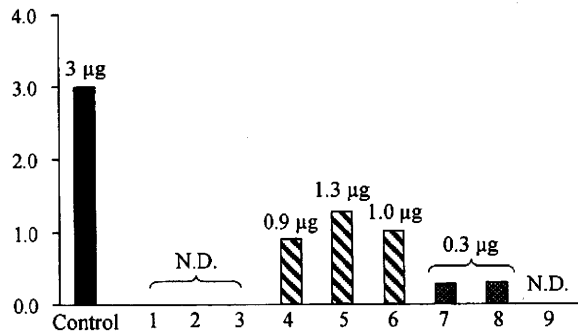
- (1) 久保純, 大久保祐士, 中川典子, 佐々木祐子, 柚木幹弘, Larisa Cervenakova, 萩原克郎, 生田和良. vCJDを用いた血漿分画製剤の工程評価 (O1-4-15). 第58回日本ウイルス学会学術集会 平成22年11月7日-9日, 徳島市
- (2) 菊池裕, 豊田淑江, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 小西良子, 山口照英: 低酸素条件下で誘導されるGPIアンカー欠損型プリオン蛋白質の発現に関与する因子の解析, 第83回日本生化学会大会, 平成22年12月7-10日, 神戸市
- (3) 東原知宏, 菊池裕, 中島治, 手島玲子, 辻勉*, 小西良子, 山口照英: ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質mRNA の

発現解析, 第83回日本生化学会大会, 平成22年12月7-10日, 神戸市

- (4) Y. Kikuchi, T. Kanayasu-Toyoda, O. Nakajima, S. Yusa, T. Higashihara, T. Tsuji, R. Teshima, Y. Sugita-Konishi, T. Yamaguchi: Identification of a splice variant of prion protein mRNA lacking the GPI anchor signal sequence in bovine and sheep brain, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Neurodegenerative Diseases: The Molecular and Cellular Basis for Neurodegeneration, Feb. 21-26, 2011, Taos, New Mexico, USA
- (5) 東原知宏, 菊池裕, 中島治, 手島玲子, 辻勉, 小西良子, 山口照英: ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質mRNAの解析, 日本薬学会第131年会, 平成23年3月28-31日, 静岡市

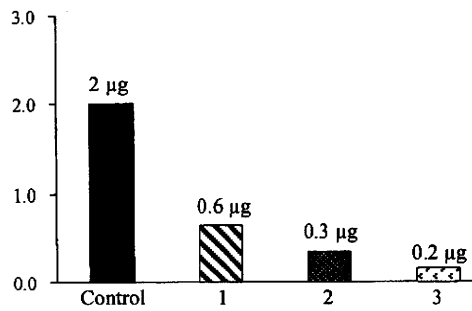
H. 知的財産権の出願・登録状況

- H-1 特許取得 なし
H-2 実用新案登録 なし
H-3 その他 なし



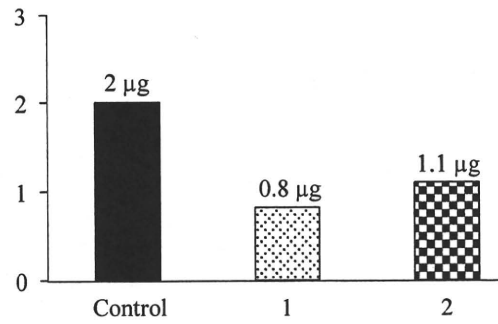
Lane	脱色液	抽出液
1	—	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
2	30% アセトニトリル/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
3	30% メタノール/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
4	—	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
5	30% アセトニトリル/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
6	30% メタノール/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
7	—	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル
8	30% アセトニトリル/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル
9	30% メタノール/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

図 1. クーマシーブルー染色ゲルからのフェツイン (3 µg) 回収率



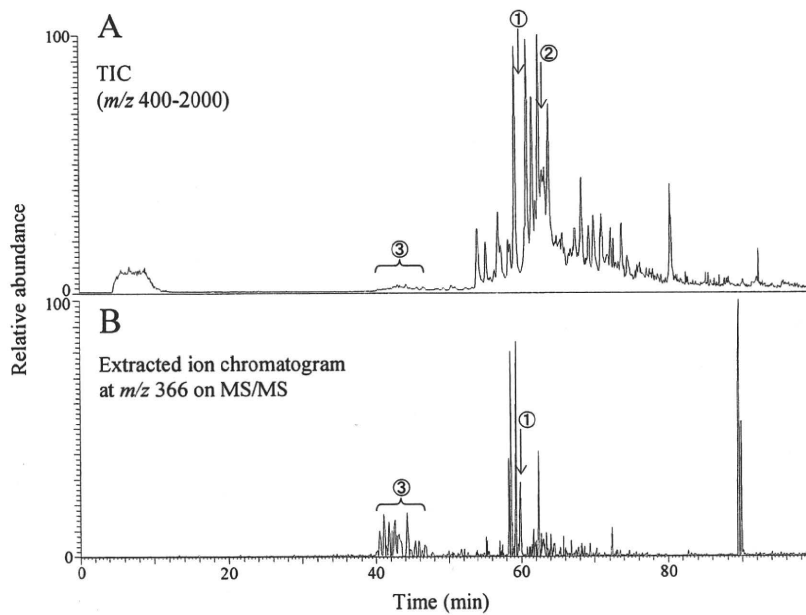
Lane	脱色液	抽出液
1	30% アセトニトリル/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
2	30% アセトニトリル/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
3	30% アセトニトリル/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

図 2. クーマシーブルー染色ゲルからのフェツイン (2 µg) の回収率



Lane	固定	脱色液	抽出液
1	+	50% メタノール	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
2	-	50% メタノール	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)

図 3. SYPRO Ruby 染色ゲルからのフェツイン (2 µg) の回収率



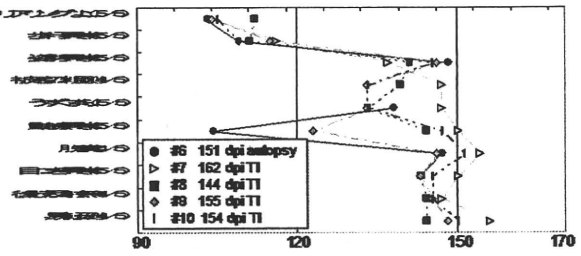
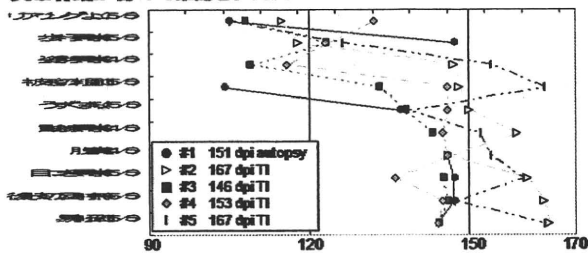
①Asn117 ; GTWSTAESGAECTNWN¹¹⁷SSALAQKPYSGR
 ②Asn184 ; YSSEFCSTPACSEGNSDCYFGN¹⁸⁴GSAYR
 ③Asn448 ; CTSQHLLN⁴⁴⁸R

図 4. (A) t-PA トリプシン消化物の Total ion chromatogram (TIC)、(B) MS/MS で生じた m/z 366 のイオンの extracted ion chromatogram (EIC)

1% mo-vCJD接種動物群

5% mo-vCJD接種動物群

異常行動が初めて確認された日



dpi: days post inoculation
TI: terminal ill

図5 mo-vCJD 感染マウスの異常行動

PrPresの蓄積 (I)

dpi	61	90	118	151	TI	dpi	61	90	118	151	TI
大脳	-/-	±/+	+/+	+/+	+/+	大脳	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+
中脳	-/-	±/+	+/+	+/+	+/+	中脳	-/-	±/+	+/+	+/+	+/+
小脳	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	小脳	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+
延髄	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	延髄	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+

※測定は同一検体について独立して2回行った

dpi: days post inoculation
TI: terminal ill

PK+: PrPres量

1% mo-vCJD接種群

5% mo-vCJD接種群

大 中 小 延
脳 脳 脳 髄

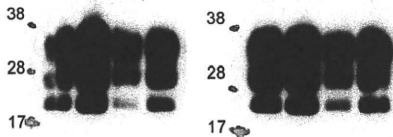


図6 mo-vCJD 感染マウスの PrPres の脳内蓄積の経時変化(定性)(上)及び、瀕死動物の PrPres の脳内分布(下)

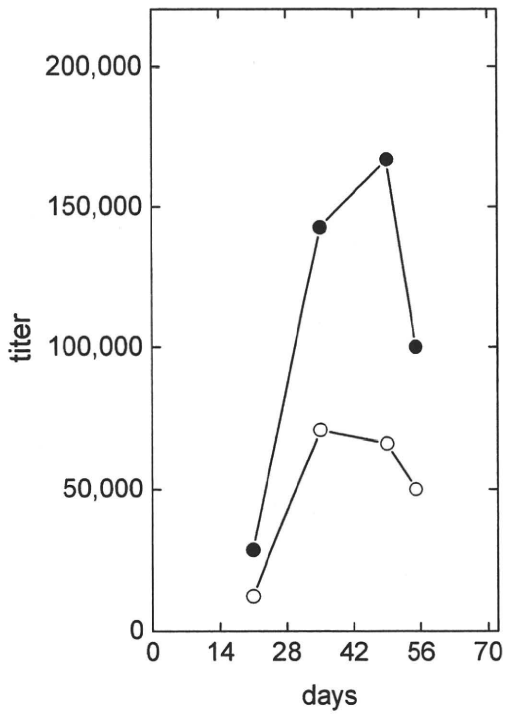


Figure 7 Time course curve of mouse serum-titer.

Titer against pS43-hPrP (39-50)-Cys-BSA and hPrP (39-50)-Cys-BSA were measured in ELISA.

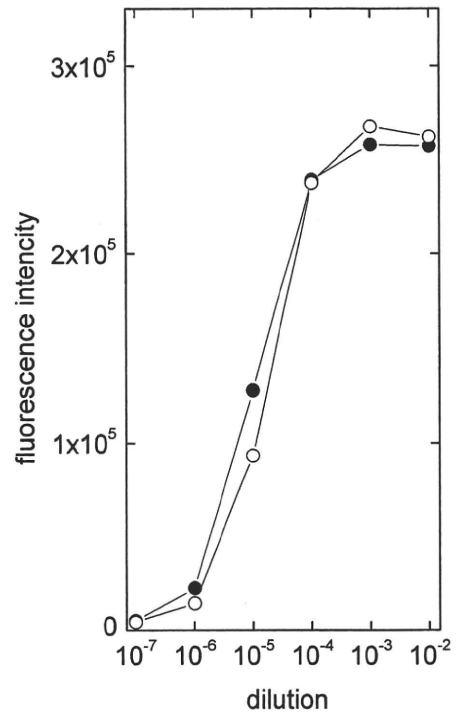


Figure 8 Binding of antibodies to coating antigen in ELISA.

Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP mouse serum were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-BSA (○) as coating antigen

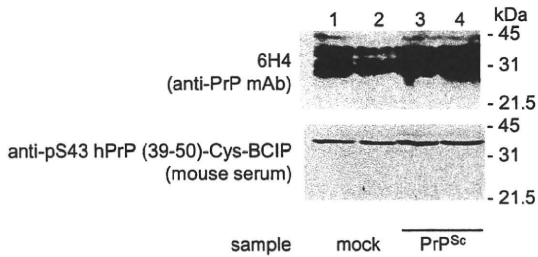


Figure 9 Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lanes 1 and 2) and PrP^{Sc} (lanes 3 and 4) were detected with anti-PrP mAb 6H4 (upper panel) and anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP mouse serum (lower panel).