

試料	固定	染色	脱色液	抽出液	回収率
3 μ g ↓	+	CBB	-	I	N.D.
	+	CBB	①	I	N.D.
	+	CBB	②	I	N.D.
	+	CBB	-	II	30%
	+	CBB	①	II	43%
	+	CBB	②	II	33%
	+	CBB	-	III	10%
	+	CBB	①	III	10%
	+	CBB	②	III	N.D.
2 μ g ↓	+	CBB	①	II	30%
	+	CBB	①	III	15%
	+	CBB	①	I	10%
	+	SYPRO	③	II	40%
	-	SYPRO	③	II	55%

脱色液①：30% アセトニトリル/5% 酢酸

脱色液②：30% メタノール/5% 酢酸

脱色液③：50% メタノール

抽出液 I：50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)

抽出液 II：ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)

抽出液 III：0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

表 1. アクリルアミドゲルからの抽出条件とフェツインの回収率

RT:41-45(min)

CTSQHLLN⁴⁴⁸R

(Theoretical Mass: 1129.54)

[M+H] ⁺	糖鎖組成
①2897.19	Fuc ₁ Man ₅ GlcNAc ₄
②3188.28	Fuc ₁ Man ₅ GlcNAc ₄ NA ₁
③3479.40	Fuc ₁ Man ₅ GlcNAc ₄ NA ₂
④4135.62	Fuc ₁ Man ₆ GlcNAc ₅ NA ₃

RT: 61-62(min)

GTWSTAESGAECTNWN¹¹⁷SSALAQKPYSGR

(Theoretical Mass: 3016.33)

[M+H] ⁺	糖鎖組成
①4231.77	Man ₅ GlcNAc ₂
②4393.83	Man ₆ GlcNAc ₂
③4556.88	Man ₇ GlcNAc ₂
④4718.94	Man ₈ GlcNAc ₂

dHex : Fucose
 Man : Mannose
 GlcNAc : N-Acetylglucosamine
 NA : Sialic acid

表 2. LC/MS 解析で同定された t-PA 糖ペプチドの糖鎖組成

表 3 各種ろ過膜による PBS 中の vCJD 除去 (WB 法による評価)

プリオン株	プリオン材料	Planova 15N (孔径約 15nm)	Mustang E (孔径約 220nm)	Zetaplus 90LA (孔径約 220nm)
vCJD	sMF ¹⁾	2.8	≥3.5	2.8
Scrapie 263K	sMF ¹⁾	≥3.2	Effective ²⁾	≥2.4

除去能は Log Reduction Factor として示した。

1) : 感染動物脳由来 MF を超音波処理したもの。

2) : 定性評価の為数値は示していない

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

研究分担者：川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部部长

研究協力者：橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第一室長

研究要旨我々は、遺伝子組換え医薬品等の開発における異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入／迷入の低減、および製造工程における PrP^{Sc} の除去・不活化能評価のための PrP^{Sc} の特異的検出法を開発することを目的として、PrP^{Sc} と正常プリオン (PrP^C) の糖鎖構造の違いを明らかにすることを検討している。本年度は、微量糖タンパク質 PrP^C を効率的に回収する方法として、SDS-PAGE 後、クーマシーブルーまたはゲルを固定せずに SYPRO Ruby で染色し、ギ酸/水/2-プロパノール溶液を用いて抽出することにより、シアル酸を遊離させることなく、高い収率で糖タンパク質を回収できることを見出した。

A. 研究目的

遺伝子組換え医薬品等の開発における異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入／迷入の低減、および製造工程における PrP^{Sc} の除去・不活化能を評価するためには、PrP^{Sc} の高感度かつ高特異的検出法の開発が不可欠である。PrP^{Sc} を特異的に検出するためには、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) との構造の違いを明確にして、PrP^{Sc} に特異的な構造を標的とした検出技術を開発することが重要である。PrP^{Sc} および PrP^C は、209 個のアミノ酸残基からなる同一配列を持つ GPI アンカー型の糖タンパク質であり、βシートおよびαヘリックス構造の割合が異なること、さらに PrP^{Sc} は protease K に抵抗性を示すが PrP^C は感受性を示すことなどが明らかにされている。PrP^{Sc} および PrP^C には 2 つの N 結合型糖鎖が結合しており、PrP^{Sc} の糖鎖構造については、protease

K 消化により調製された変異型 CJD モデル 263K 株を用いた研究により、複合型 2 本鎖、3 本鎖および 4 本鎖糖鎖が結合していること、さらに一部の糖鎖の側鎖にはルイス x やシアリルルイス x 構造が付加していることが報告されている。これに対して PrP^C の糖鎖構造は、タンパク質部分が protease K に対して感受性であり精製が困難であることから、未だに十分に明らかにされていない。PrP^{Sc} 特異的糖鎖構造を見出すためには、PrP^C の糖鎖構造を明らかにする必要がある。プリオンタンパク質のような微量タンパク質の分画・濃縮には、一般に、ゲル電気泳動が有用であるが、糖タンパク質の場合、ゲル片からの回収率がよくないこともあり、ゲル電気泳動を用いた方法はあまり用いられていない。そこで本研究では、モデル糖タンパク質を用いて、電気泳動ゲルから糖タンパク質を回収する方法の最適化を検討した。

B. 研究方法

アクリルアミドゲルからの糖タンパク質回収法の最適化

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 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、表 1 に示す抽出液を各チューブに 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。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 μ l 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。

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 μ g アプライし、Laemmli 法により 20 mA・80 min 分離した。

2)-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)-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×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×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 µl 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。

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ゲンアクトチベータ (t-PA) (Wako, Cat. No. 205-15201) を使用した。2 µg 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 µl 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 µl の 500 mM DTT 溶液を加え、60°C ⑥45 min インキュベートした。4.8 µl の 1 M モ⑦ヨード酢酸ナトリウムを加え、暗所で 30 m⑧インキュベートした後、1.2 µl 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 µl の修飾トリプシン溶液 (0.1 µg/µl) 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×長さ 150 mm、粒子径 3µ)

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: 2~45% B (100 min)

流速 : 0.3 µl/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

C. 結果と考察

(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 μ g 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 μ g 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。

(2) SYPRO Ruby 染色ゲルからの回収

1 レーンあたり 2 μ g のフェツインを 5~20% グラジェ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。

(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、モノシアリル複合型 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 μ g) 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/z*366) 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。

D. 結論

シアル酸結合糖鎖を含む様々な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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)。

2. 学会発表

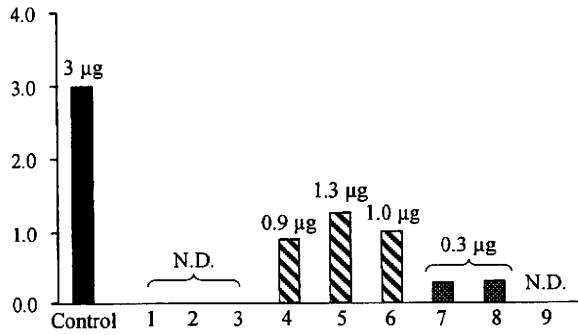
なし

H-1.

実用新案登録 なし

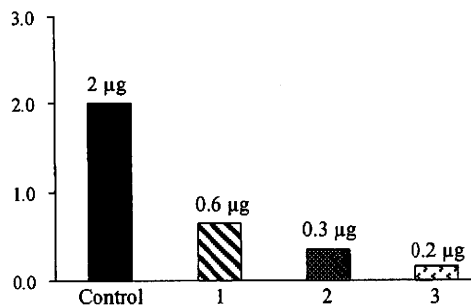
H-2.

その他 該当事項なし



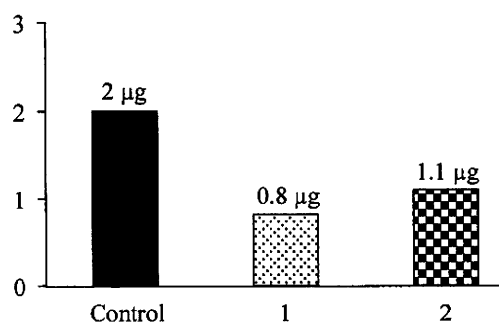
Lane	脱色液	抽出液
1	—	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
2	30% アセトニトリル/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
3	30% メタノール/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
4	—	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
5	30% アセトニトリル/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
6	30% メタノール/5% 酢酸	ギ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



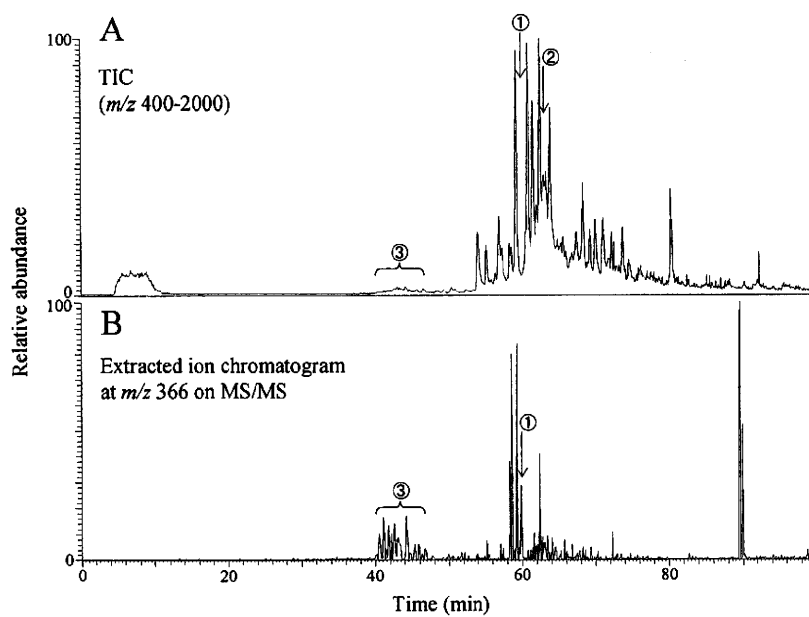
Lane	脱色液	抽出液
1	30% アセトニトリル/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
2	30% アセトニトリル/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
3	30% アセトニトリル/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

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 : YSSEFCSTPACSEGN¹⁸⁴SDCYFGN¹⁸⁴GSAYR
 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)

試料	固定	染色	脱色液	抽出液	回収率
3 μ g ↓	+	CBB	-	I	N.D.
	+	CBB	①	I	N.D.
	+	CBB	②	I	N.D.
	+	CBB	-	II	30%
	+	CBB	①	II	43%
	+	CBB	②	II	33%
	+	CBB	-	III	10%
	+	CBB	①	III	10%
	+	CBB	②	III	N.D.
2 μ g ↓	+	CBB	①	II	30%
	+	CBB	①	III	15%
	+	CBB	①	I	10%
	+	SYPRO	③	II	40%
	-	SYPRO	③	II	55%

脱色液① : 30% アセトニトリル/5% 酢酸

脱色液② : 30% メタノール/5% 酢酸

脱色液③ : 50% メタノール

抽出液 I : 50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)

抽出液 II : ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)

抽出液 III : 0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

表 1. アクリルアミドゲルからの抽出条件とフェツインの回収率

RT:41-45(min)

CTSQHLLN⁴⁴⁸R

(Theoretical Mass: 1129.54)

[M+H] ⁺	糖鎖組成
①2897.19	Fuc1Man5GlcNAc4
②3188.28	Fuc1Man5GlcNAc4NA1
③3479.40	Fuc1Man5GlcNAc4NA2
④4135.62	Fuc1Man6GlcNAc5NA3

RT: 61-62(min)

GTWSTAESGAECTNWN¹¹⁷SSALAQKPYSGR

(Theoretical Mass: 3016.33)

[M+H] ⁺	糖鎖組成
①4231.77	Man5GlcNAc2
②4393.83	Man6GlcNAc2
③4556.88	Man7GlcNAc2
④4718.94	Man8GlcNAc2

dHex : Fucose

Man : Mannose

GlcNAc : N-Acetylglucosamine

NA : Sialic acid

表 2. LC/MS 解析で同定された t-PA 糖ペプチドの糖鎖組成

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及び
プリオン除去工程評価に関する研究（H22-医薬-一般-006）

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 マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株感染マウス脳よりマイクロソーム画分を調製し、これに超音波処理を行ったプリオン材料を検出する Western Blotting (WB)法の条件を最適化した。
- ② 上記プリオン材料を用いて孔径 15nm のフィルターを用いたろ過実験を実施したところ、ハムスター馴化スクレイピー263K 株と同様のろ過傾向を示した。
- ③ 上記プリオン材料を用いて電気的な吸着特性を有するフィルターを用いたろ過実験を実施したところ、ハムスター馴化スクレイピー263K 株と同様のろ過傾向を示した。

A. 研究目的

今年度は生物由来製品の工程評価に用いるマウス馴化 vCJD (以下 mo-vCJD) 株を用いた in vitro 評価手法を確立するために、①mo-vCJD 感染マウス脳からのプリオン材料調製法を確立するとともに、vCJD 株を検出する Western Blotting (WB)法条件の最適化、②孔径 15nm のウイルス除去膜を用いたろ過実験、③さらに、電気的吸着特性をもつろ過膜を用いたろ過実験を実施した。

B. 研究方法

- ①mo-vCJD 株感染マウス脳よりマイクロソーム画分 (MF) を得た後、超音波処理を行いプリオン材料 (PrPres 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 (PrPc 材料) を調製し、粒子径分布を測定した。
- ②mo-vCJD 株感染マウス脳由来プリオン材料中の PrPres を検出する Western blotting (WB)法条件の最適化を行った。
- ③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。
- ④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

いたろ過実験を行った。

⑤倫理面への配慮。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（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. 研究成果

- 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。
- ③mo-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除去されなかった (表 1)。
- ④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。

D. 考察

バイオ医薬品の製造工程における vCJD 除

去／不活化能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。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。

E. 結論

本研究から、バイオ医薬品の製造工程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。

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. 論文発表

○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－ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題－。人工血液 (In press)

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.

○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.

○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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.
- Pitaksajakul, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

○ 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.

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.

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.

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.

2. 学会発表

○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 2010 年 (徳島)。

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

I. その他：研究協力者：
・(株)ベネシス柚木幹弘、坂井薫、久保純

表 1 各種ろ過膜による PBS 中の vCJD 除去 (WB 法による評価)

プリオン株	プリオン材料	Planova 15N (孔径約 15nm)	Mustang E (孔径約 220nm)	Zetaplus 90LA (孔径約 220nm)
vCJD	sMF ¹⁾	2.8	≥3.5	2.8
Scrapie 263K	sMF ¹⁾	≥3.2	Effective ²⁾	≥2.4

除去能は Log Reduction Factor として示した。

1) : 感染動物脳由来 MF を超音波処理したもの。

2) : 定性評価の為数値は示していない

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等リギョトリーサイエンス総合研究事業）
（分担研究報告書）

遺伝子組換え医薬品等のプリオン安全性確保のための検出手法及び
プリオン除去工程評価に関する研究（H22-医薬-一般-006）

分担研究者 萩原克郎 酪農学園大学獣医学科教授

研究要旨：

- ① マウス馴化 vCJD 株（mo-vCJD）感染マウス脳ホモジネート中の PrP^{res}を検出する Western Blotting (WB)法の条件を最適化し、更に PrP^{res}量を定量的に評価する手法を確立した。
- ② mo-vCJD 株感染マウス脳ホモジネート（1%と5%濃度）を FVB/n マウス（30日齢メス）に脳内接種し、臨床所見の変化と脳内 PrP^{res}蓄積量を経時的に評価したところ、約120日頃に観察所見に変化が認められた。脳内 PrP^{res}はその約30日前に定性 WB法で検出可能であった。
- ③ 脳内 PrP^{res}の蓄積は脳部位により差があり、蓄積量が多かったのは大脳・中脳・延髄であった。

A. 研究目的

今年度は生物由来製品の工程評価に用いるマウス馴化 vCJD（以下 mo-vCJD）株を用いた in vivo 評価手法を確立するために、mo-vCJD 感染マウス脳ホモジネートをマウスに脳内接種し、臨床所見及び脳内のプリオン蓄積を経時的に評価した。

B. 研究方法

①mo-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 Western blotting (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。

②mo-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。

③採取した脳は大脳、中脳、小脳、延髄に分け、それぞれの PrP^{res}を測定した。

④倫理面への配慮。プリオン感染サンプルは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. 研究成果

①一次抗体として 6D11 を利用した WB 法条件を決定した。シグナル強度を指標とした定量性評価手法を確立した。

②mo-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1）。

③mo-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2）。

D. 考察

バイオ医薬品の製造工程における 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。

E. 結論

本研究から、バイオ医薬品の製造工程評価における動物実験を行う上での感染動物における感染動態と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。

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. 論文発表

○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)

○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* 2010 38(2):311-313.

Yunoki M, Kubota-Koketsu R, Urayama T, Sasaki T, Analiwa D, Konoshima Y, Ideno S, Fukunaga Y, Morikawa S, Hiroi S, Takahashi K, Okuno Y, Hagiwara K, Ikuta K. Significant neutralizing activity of human immunoglobulin preparations against pandemic 2009 H1N1. *British Journal of Haematology*. 2010; 148(6):953-955.

Urayama T, Sapsutthipas S, Tsujikawa M, Yamashita A, Nishigaki H, Ibrahim MS, 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. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010; 72(4), 11-19

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*. 2010 ;13(6):1460-1467

Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res*. 2010; 77: 1-4 (Published online: 07 Dec 2010).

2. 学会発表

○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 2010 年 (徳島)。

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

I. その他：研究協力者：

・(株)ベネシス 柚木幹弘、坂井薫、久保純

図1 mo-vCJD 感染マウスの異常行動

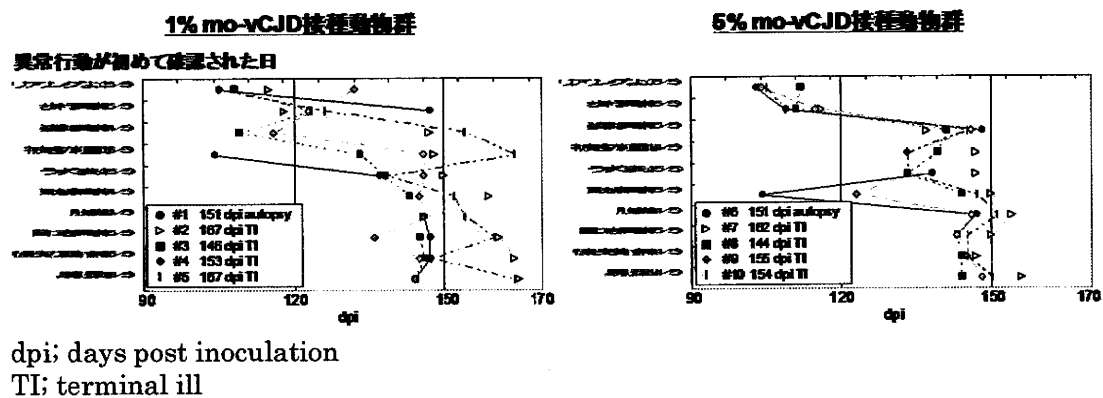


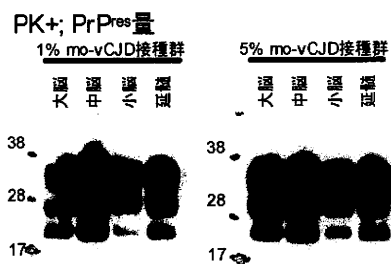
図2 mo-vCJD 感染マウスの PrP^{res} の脳内蓄積の経時変化(定性)(上)及び、瀕死動物の PrP^{res} の脳内分布(下)

PrP^{res}の蓄積(W)

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



平成22年度分担研究報告書
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
・異常型プリオンの新規検出法に関する試験研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

遺伝子組換え医薬品等の安全性を確保するため、その原材料に混入する恐れがあるウシ異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の高感度な検出法の開発が望まれている。動物由来製造原材料の品質確保および種々の製造工程の安全性評価を目的とした特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体の作製を行った。

PrP^{Sc}形成の初期段階に、ヒトPrPのN端側43残基のセリン(S43)がリン酸化S43 (pS43)に変化することから、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を基にペプチド抗原[pS43-hPrP (39-50)·Cys-BCIP]を合成し、マウス及びニワトリを免疫して特異的にPrP^{Sc}を認識する抗体を調製した。

マウス21匹を4回免疫し、抗体価が上昇したマウス脾細胞を用いて細胞融合を行ったが、得意抗体を産生するクローンは樹立できなかった。同時に調製した抗血清はイムノブロット法でPrP^{Sc}を特異的に認識し、糖鎖2本を有するPrPに相当するバンドを示した。一方、ニワトリ2羽を3回免疫して得られた抗血清では、イムノブロット法で特異的なバンドは認められなかった。これらの研究成果はPrP^{Sc}やBSE罹患ヒツジ試料を用いた解析等への応用が期待され、今後はPrP^{Sc}のマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染初期でのPrP^{Sc}検出法確立等への利用を試みる。

A. 研究目的

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(PrP)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%を散发性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、異常型プリオン蛋白質(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。

本研究はPrP^{Sc}を特異的に認識する抗体を作製し、新たな検出法の開発を目的とする。スクレイパー(Obihiro株)をICRマウスの脳内に投

与して増幅されたPrP^{Sc}を抗原とし、マウスまたはニワトリを免疫し、正常型ではなくPrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の作製を行う。

最近、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(S43)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た(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.*29, 8743-8751)。PrP^{Sc}が形成される初期にリン酸化S43 (pS43)への変換が予測され、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、プリオン病の早期診断への利用が期待される。

本年度は、PrP^{Sc}感染マウス脳の作製を行うとともに、pS43-PrPを特異的に認識する抗体の調製を試みた。

B. 研究方法

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。

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。

3. イムノブロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)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ブロッテ

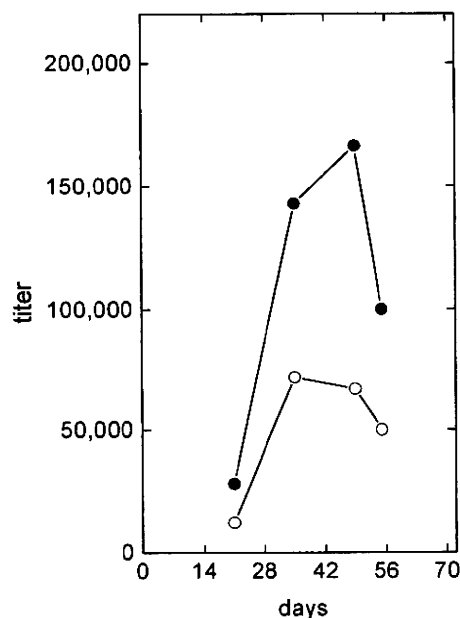


Fig. 1 Time course curve of mouse serum-titer.

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

ィングを行い、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。

C. 研究結果

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