

201132030A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 24 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

細胞培養医薬品の異常型プリオンの検出・リスク評価に関する研究・・・・・・・・・・ 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・・・・・・・・・・ 24

橋井 則貴

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・・・・・・・・・・ 34

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・・・・・・・・・・ 39

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・・・・・・・・・・ 43

菊池 裕

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 49

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 橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
生田 和良 大阪大学 微生物病研究所 教授
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 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
青笹 正義 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
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

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型プリオンタンパク質 (Proteinase K 抵抗性プリオンタンパク質, PrP^{Sc}) の混入/迷入リスクを低減するための高感度及び効率的 PrP^{Sc} 検出法の開発, 除去/不活化評価法の標準化を目指すと共に, プリオン病の早期診断法への応用も検討することを目的として, 1) 糖鎖を指標としたプリオンタンパク質の特異的検出法を開発する一環として, 微量の酸性糖鎖付加糖タンパク質及びその糖鎖の効率的回収法の検討, 2) ウエスタンブロット法による変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) 由来 PrP^{Sc} 除去能力評価方法及び除去に有効なデバイスの確立, 3) マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いた *in vivo* 評価手法の確立を目的とした vCJD 感染モデルマウス作成の検討, 及び 4) プリオン病早期診断法の開発を目的としたリン酸化プリオンペプチド抗原を特異的に認識する抗体の調製検討を行った。

A. 研究目的

我が国では, 伝達性ウシ海綿状脳症 (BSE) を主とする伝達性海綿状脳症 (TSE) のリスク評価に関して, 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。英

国等での BSE の発症は沈静化してきているが, 一方で非定型 BSE が EU, カナダ, 米国, 日本等で発生が相次いで報告されている。このような非定型 BSE の発生が, 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の増加につながることを懸念されている。非定型 BSE の発生

は、これまで非発生国として一定の安全性が担保されているとされたオーストラリ等でも vCJD の発生が起こる可能性が指摘されている。従って、BSE 発生が沈静化してきているとはいえ、血清や生物由来原料等を用いる医薬品製造において vCJD の原因物質となりうる異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入／迷入リスクを可能な限り低減化するための試験の実施は、医薬品の安全性を確保するために不可欠となっている。しかし、これまでに検討された PrP^{Sc} 検出法及び除去／不活能評価法等は、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} の高感度及び効率的 PrP^{Sc} 検出法、並びに標準的 PrP^{Sc} 除去／不活能評価法の開発が急務となっている。

本研究では、遺伝子組換え医薬品等の原料を含む製造工程における PrP^{Sc} の混入／迷入リスクを低減するための高感度及び効率的 PrP^{Sc} 検出法の開発、除去／不活能評価法の標準化、並びにプリオン病の早期診断法の開発を目指している。本年度は、1) 糖鎖を指標としたプリオンタンパク質の特異的検出法を開発する一環として、微量の酸性糖鎖付加糖タンパク質及びその糖鎖の効率的回収法の検討、2) ウェスタンブロット (WB) 法による vCJD 由来 PrP^{Sc} 除去能力評価方法及び除去に有効なデバイスの確立、3) マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いた *in vivo* 評価手法の確立を目的とした vCJD 感染モデルマウス作成の検討、4) プリオン病早期診断法の開発の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 微量糖タンパク質及び糖鎖の効率的回収法の検討

B-1-1. 還元アルキル化タンパク質の調製

モデル試料としてフェツイン (SIGMA, Cat. No. F3004) を使用した。乾燥フェツインを 50 μ l の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた後、2 μ l の 1 M dithiothreitol (DTT, 終末 40 mM) を加えて 65 $^{\circ}$ C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、4.8 μ l の 1 M モノヨード酢酸ナトリウムを加えて室温下、暗所で 40 分間反応させてカルボキシメチル化した。反応終了後、PD MiniTrap G-25 desalting column (GE Healthcare) を用いて脱塩し、還元アルキル (RCM) 化タンパク質とした。

B-1-2. アクリルアミドゲルからの糖タンパク質回収

フェツインを RCM 処理した後、PD-MiniTrap G25 desalting column (GE Healthcare) を用いて脱塩し、凍結乾燥した。0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 中で Cy5 (Cy5 monofunctional reactive dye, GE Healthcare) による標識を行った後、5–20% のグラジェントゲル (ATTO) を用いて、Laemmli 法により 20 mA で 80 min 分離した。目的とするフェツインのバンド部分を切り出し、水分をよく取り除いた後、マイクロチューブに回収した。次に、表 1 に示す抽出用緩衝液を各チューブに 100 μ l 加え、パワーマッシャーを用いてゲル片を粉碎した後、マイクロチューブ攪拌機を用いて一晩冷暗所で振盪した。15,000 \times g で 15 min 遠心した後、上清を新たなマイクロチューブに回収した。ゲル粉砕物に 100 μ l のミリ Q 水を加え、攪拌した後、15,000 \times g で 5 min 遠心し、上清を同じマイクロチューブに回収した。この操作を 3 回繰り返した後、さらに 100 μ l のアセトニトリルを加えて攪拌した後、15,000 \times g で 5 min 遠心し、上清を同じマイクロチューブに回収した。回収産物

は、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、1 mL のミリ Q 水で再溶解させ、0.45 μm フィルターを用いてゲル片を完全に除去した後、凍結乾燥させた。

抽出効率を確認するために、回収したフェツインを Laemmli 法により再泳動し、Typhoon image scanner (GE Healthcare) 及び画像解析ソフト ImageQuant TL (GE Healthcare) を用いてフェツインを含むバンド部分のピーク強度を算出した。

B-1-3. 糖鎖切り出し

RCM 化タンパク質を 50 μl の 10 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた後、2 unit の PNGase F (Roche) を加えて、37°C で 16 時間反応させて *N*-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、 C_2 エタノール (終末 60%(v/v)) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 15,000 $\times g$, 5 分間) によりタンパク質を除去した。遊離した *N*-結合型糖鎖を含む上清を Speed Vac. により乾燥させて、糖鎖を回収した。

尚、RCM 化を行わない場合は、タンパク質を 40 mM DTT 及び 10 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解させた後、PNGase F 処理を行った。

B-1-4. 還元化糖鎖の調製

回収した糖鎖に、水 100 μl 、及び 0.5 M NaBH_4 100 μl を加え、室温で 2 時間放置した。氷冷下、4 M AcOH 30 μl を加えて中和した後、グラファイトカーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて還元化糖鎖の回収と精製を行った。カートリッジは 1 mL の 100% アセトニトリル、45% アセトニトリルを含む 5mM NaHCO_3 溶液及び精製水で、それぞれ洗浄した。反応溶液を注入して、糖鎖

を樹脂に吸着させた。1 mL の精製水で樹脂を洗浄した後、1 mL の 45% アセトニトリルを含む 5mM NaHCO_3 溶液で還元化糖鎖を溶出させた。回収液につき Speed Vac 及び凍結乾燥を行い、還元化糖鎖試料を調製した。

B-1-5. 液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS)

フェツインの酵素消化物及びフェツイン由来 *N*-型糖鎖について、以下の条件で LC/MS 分析を行った。

LC 装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource)

MS 装置 : LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific)

〈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

① 酵素消化物の解析条件

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

グラジエント: 5-45% B (50 min)

流速 : 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$

キャピラリー電圧: 2.0 kV (positive ion mode)

スキャン範囲 (m/z) : 400-2,000

衝突エネルギー: 35%

② 糖鎖解析条件

カラム: graphitized carbon column (Thermo Fisher Scientific, 内径 0.1 \times 長さ 150 mm, 粒子

径 5 μ)

溶離液 A: 5 mM 重炭酸アンモニウムを含む
2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B: 5 mM 重炭酸アンモニウムを含む
80% アセトニトリル水溶液

グラジェント: 5–70% B (50 min)

流 速 : 0.5 μ l/min

キャピラリー電圧: 2.5 kV (positive ion modes)

スキャン範囲 (m/z) : 700–2,000

衝突エネルギー: 35%

B-2 vCJD 由来 PrP^{Sc} 除去能力評価方法及び 除去に有効なデバイスの確立

①超遠心(150,000 \times g), TCA 沈殿, メタノール
沈殿法を組み合わせて PrP の濃縮を検討した。

②Antithrombin 及び Albumin 製剤の工程直前液
にマウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 感染マウス脳
から調製した PrP^{Sc} を添加し, Planova15N ろ過
前後の PrP^{Sc} 量を WB 法により測定し PrP^{Sc} 除
去能力を評価した。

③MW 1,800, MW 10,000, MW 70,000 及び MW
70,000 側鎖型 (Br) PEI ビーズの PrP 吸着能力
について, PBS に添加した培養細胞由来の正常
プリオンタンパク質 (PrP^C) を用いて WB 法に
より比較検討した。続いて, mo-vCJD 感染マ
ウス脳から調製した PrP^{Sc} を PBS に添加し, PEI
ビーズ処理前後液での PrP^{Sc} 量を WB 法により
測定し PrP^{Sc} 除去効果を評価した。

④マウス脾臓幹細胞由来 PrP^C 発現細胞
(SP-SC) をモノクローン化し PrP^C 高発現株の
スクリーニングを行った。

⑤スクリーニングした PrP^C 高発現株に
mo-vCJD を感染させ 5 回継代後の PrP^{Sc} 発現を
WB 法で確認した。

B-3 vCJD 感染モデルマウス作成の検討

vCJD 感染モデルの作出は, マウスに馴化さ

せた mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤 (1%及
び 5%) を用い, 生後 1 日齢の FVB/n mouse に
上記乳剤を脳内接種し, 発病まで観察した。

①発病時サンプル: 接種後, 臨床所見 (行動所
見) を確認し, 瀕死状態 (Terminal ill, 以下 TI)
に至った時点で剖検して脳を採取した。

②採取した脳 (右) は大脳, 中脳, 小脳, 延髄
に分け, それぞれの PrP^{tes} をウエスタンブロッ
ト (WB) 法で測定した。

③左脳は, 組織解析用にホルマリン固定し, 定
法に従い組織切片を作成し, 免疫染色 (PrP^{tes}),
GFAP, HE 染色を行った。GFAP 及び HE 染色
におけるグリアの増生, 空砲変性及び神経変性
について病理学的評価を実施し, それぞれ 0 か
ら 3 迄の 4 段階でスコア化した。

以上①~③の内容を前年度実施した 30 日
齢マウスでの接種実験の結果と比較した。

B-4 リン酸化プリオンペプチド抗原を特異的 に認識する抗体の調製

B-4-1. 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体 の作製

ヒト PrP のアミノ酸配列 39-50 残基を抗原と
し, その 43 残基の Ser がリン酸化されたリン
酸化プリオンペプチド [pS43-hPrP (39-50)-Cys]
及び通常のプリオンペプチド [hPrP
(39-50)-Cys] を合成した。架橋剤として SPDP
を用い, 水溶性キャリア蛋白質 Blue Carrier
Immunogenic Protein (BCIP) に結合させた免疫
原 pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP (図 1A) を
調製した。マウス (BALB/c) を数回免疫後, 脾臓
から調製した脾細胞とマウス・ミエローマ細胞
PAI の細胞融合を行った。培養上清のスクリー
ニングは, 架橋剤の MBS でウシ血清アルブミ
ン (BSA) とペプチドを結合させた pS43-hPrP
(39-50)-Cys-MBS-BSA (図 1B) 又は hPrP
(39-50)-Cys-MBS-BSA を固相抗原として用い

た ELISA で行った。

B-4-2. 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ショ糖溶液を用いて10%脳乳液を調製し、以降の実験に用いた。

B-4-3. 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 微量糖タンパク質及び糖鎖の効率的回収法の検討

C-1-1. 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) 抽出用緩衝液の最適化

RCM 化処理を行ったフェツインを Cy5 で標識した後、1 レーンあたり 5 µg を 5~20% グラジェントゲルにアプライし、電気泳動を行った結果、55~70 kDa 付近に 2 本のメジャーバンドが検出された(図 2)。それぞれ B1, B2 とし、表 1 に示す抽出液①~④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グラジェントゲルで分離、染色した後、バンドのシグナル強度を測定した(図 3)。その結果、B1, B2 共に、抽出液①~③を用いたときの回収効率がすべて 70 %以上となり良好であった。その中でも、抽出液②(2-プロパノール)を用いたときの回収効率が、B1 で 98 %, B2 で 88 % と最も良好であった。これらに対して、有機溶媒を含まない抽出液④(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 B1, B2 でそれぞれ 25 %, 24 % と低かった。以上の結果より、未固定アクリルアミドゲルから Cy5 標識糖タンパク質を回収するとき、抽出液②(2-プロパノール)が最も有効であることが明らかになった。

2) RCM 化後脱塩操作の影響

RCM 化後に行う脱塩操作のタンパク質回収率への影響について検討した。1 µg および 5 µg のフェツインを RCM 化後、ゲルろ過(PD-MiniTrap G25 desalting column)及びエタノール沈殿により脱塩した。それぞれの RCM

化フェツインを Laemmli 法により分離し、クーマシーブルーで染色した。RCM (-) フェツインをコントロールとして、バンドの相対シグナル強度を算出した。その結果、RCM 化後の脱塩操作を行わない試料と比較して、RCM 化後に PD-MiniTrap 及びエタノール沈殿を行った試料において顕著なサンプルの損失が確認された (図 4)。特に、1 μ g のフェツインを用いた場合、エタノール沈殿で約 50 %、PD-MiniTrap による脱塩に至っては、その大部分が消失した。

3) 回収効率の検討

抽出液②を用いたアクリルアミドゲルからの抽出効率を RCM 化後の脱塩操作の有無による影響と併せて検討した。フェツイン (1 μ g) を RCM 化後、PD-MiniTrap G25 desalting column 及びエタノール沈殿により脱塩した。それぞれの RCM 化フェツインを Cy5 で標識後、Laemmli 法により分離した。また、RCM 化を行わずに Cy5 で標識したフェツインについても同様に泳動を行った。泳動後、抽出液②を用いてアクリルアミドゲルより抽出した。回収したフェツインを Laemmli 法により再泳動し、クーマシーブルーで染色後、ゲル抽出前の RCM (-) フェツインをコントロールとして、バンドの相対シグナル強度を算出した (図 5)。その結果、1 μ g のフェツインを用いた場合においても、RCM (-) フェツインの回収効率は 65~70 % と良好であった。また、その回収したフェツインの 1/10 量について LC/MS 及びデータベース検索を行った結果、約 40% のカバー率で同定することができた。一方、RCM (+) フェツインの回収効率は、エタノール沈殿による脱塩操作を行った場合に 30~40 % と低く、PD-MiniTrap の場合ではバンドが検出できなかった。

以上の結果より、アクリルアミドゲルから糖タンパク質を効率的に回収するためには、①電気泳動前に RCM 化を行わずに Cy5 で糖タンパク質を標識すること、②2-プロパノールを用いた抽出液によりゲルから回収することが有用であると考えられた。

C-1-2. 糖鎖切り出し条件の最適化

糖タンパク質から糖鎖を切り出す方法の一つとして PNGase F を用いた酵素消化法がある。酵素消化法では、RCM 化によりジスルフィド結合を切断した後に、PNGase F 等の酵素を反応させるのが一般的である。しかし、上述したように、RCM 化はグアニジン塩酸バッファー等の変性剤存在下で行う必要があり、反応終了後にゲルろ過等により脱塩する必要がある。そのために微量糖タンパク質を処理すると回収率が低くなる。そこで、RCM 化反応を行わずに効率良く糖鎖を切り出すことを目的として、PNGase F 処理用リン酸緩衝液に DTT を添加して、ジスルフィド結合の切断と糖鎖の切り出しを同一緩衝液中で行うことを検討した。モデル糖タンパク質としてフェツイン (5 μ g) を用いて、RCM 化フェツインから切り出した糖鎖、並びに 0, 5, 10, 20 及び 40 mM DTT を含むリン酸緩衝液中で切り出した糖鎖をそれぞれ NaBH_4 で還元化した後、LC/MS による糖鎖プロファイリングを行った。図 6 は、LC/MS により得られた RCM 化フェツイン由来 N-結合型糖鎖のトータルイオンカレントクロマトグラム (TICC) である。主要糖鎖として、2 種類ずつのジシアロ複合型 2 本鎖糖鎖、トリシアロ複合型 3 本鎖糖鎖及びテトラシアロ複合型 3 本鎖糖鎖と推定される糖鎖が検出された。DTT 添加緩衝液中で切り出した糖鎖についても同様にプロファイリングを行ったが、主要糖鎖の種類に差はみられなかった。次に、それらの

主要糖鎖のピーク強度を比較した(図7). その結果, 各試料の糖鎖分布に大きな違いは見られなかったが, ピーク強度については顕著な差がみられた. 即ち, ①脱塩操作を含む還元アルキル化を行うと, 同操作を行わない場合と比較して, 各糖鎖のピーク強度が5~50%程度まで減少すること, ②DTT を添加することにより糖鎖の回収率が向上することが明らかとなった. 本研究の結果から, 20~40 mM 程度の DTT を添加したリン酸緩衝液中で糖鎖を切り出すことにより, RCM 化を行うよりも高収率で糖鎖を回収できることが示された. 尚, 5 µg のフェツインを SDS-PAGE 後, 上述した 2-プロパノールを用いる抽出方法, 及び本糖鎖切り出し法により糖鎖を回収した後, LC/MS により糖鎖解析を行った結果, 図5 とほぼ同様の糖鎖プロファイルを得ることができた.

C-2 vCJD由来PrP^{Sc}除去能力評価方法及び除去に有効なデバイスの確立

①従来の超遠心法では約10倍の濃縮倍率であったが, 今回新たに確立した超遠心濃縮法では5,000倍の濃縮倍率を達成し, 工程の安全性評価に応用できる感度であることをWB法で確認した.

②①の濃縮法を応用し Antithrombin 及び Albumin 製剤の Planova15N 工程における mo-vCJD由来PrP^{Sc}の除去能力を評価したところ, それぞれ ≥ 3.5 , $\geq 3.1 \log_{10}$ のリダクション値となった(表2).

③分子量が大きく側鎖が多い MW 70,000 Br PEIビーズが最もPrP^C吸着能力が高かった(図8). 更にmo-vCJD由来PrP^{Sc}を用いて検討したところ, MW 70,000 Br PEIビーズにPrP^{res}吸着効果が認められた(表2).

④PrP^C高発現株のスクリーニングから元株の SP-SCよりも発現量が5~10倍高いbSP-SC_148

を樹立した(図9左).

⑤SP-SCと④で得られたbSP-SC_148に1% mo-vCJD脳ホモジェネートを感染させたところ, 前者では感染成立が困難な場合でも後者では感染が成立し, 強いPrP^{Sc}の発現が認められた(図9右).

C-3 vCJD 感染モデルマウス作成の検討

①1日齢マウスへの接種では, 対照個体に対して体重増加率が低く, 約180 dpiまで緩やかに増加した. その後, 発症しTI状態に至るまで急激な体重減少が見られた. なおTIに至るまでの平均日数は1%, 5% mo-vCJD接種群でそれぞれ196, 197日であった. TIにいたるまでの期間は30日齢マウスの場合よりも30~40日長かった(図10, 表3).

②上記発症マウスにおいては小脳以外の脳部位でPrP^{res}の蓄積が多く見られ, その部位毎のPrP^{res}の蓄積量は30日齢マウスに接種した所見と類似していた(図11).

③病理学的所見のスコアは延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であり, この傾向は両接種群間で同様であったが, スコアの平均値は1日齢接種マウスが高かった(図12).

C-4 リン酸化プリオンペプチド抗原を特異的に認識する抗体の調製

C-4-1. 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pS43-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2週間毎に4回免疫し、リン酸化プリオンペプチド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13)を最終免疫し、3日後に安楽死させたマウスから摘出した脾臓をマウスミエローマ細胞PAIと細胞融合させ、ハイブリドーマ産生抗体をELISAでスクリーニングし、数度の限界希釈法によるクローニング後、特異抗体を産生するハイブリドーマ3株、pSP240、pSP279及びpSP289を樹立した。

樹立したハイブリドーマを大量培養し、得られた培養上清に含まれる抗体の特異性をELISAで確認した。産生する抗体のアイソタイプピングの結果、サブクラスは3株ともIgG(κ , γ 2b)だった(表4)。

次に、リン酸化プリオンペプチド[pS43-hPrP(39-50)-Cys-MBS-BSA]又はプリオンペプチド[hPrP(39-50)-Cys-MBS-BSA]を固相抗原としたELISAで、抗体の特異性を調べた(図14, 表4)。pSP279の抗体価の比率(リン酸化プリオンペプチドの抗体価/プリオンペプチドの抗体価)は138を示し、pS43を含む配列に対する特異性が最も高かった。pSP289の比率も46と比較的高かった。一方、pSP240は高い抗体価を示したが、その比率は7で、特異性は最も低かった。

C-4-2. イムノブロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出

ハイブリドーマの培養上清を用い、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15)。抗プリオン蛋白質抗体6H4を用いたイムノブ

ロット法は、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 2)とともに、二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した(図15, lower panel)。一方、pSP279抗体を用いたイムノブロット法では、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 2)とともに、6H4抗体と同様な二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示した(図15, upper panel)。pSP240抗体及びpSP289抗体を用いたイムノブロット法でも、pSP279と同様なバンドを示した。

D. 考察

D-1 微量糖タンパク質及び糖鎖の効率的回収法の検討

まず、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を検討した結果、効率的に回収するためには、電気泳動前にRCM化を行わずにCy5で糖タンパク質を標識すること、及び2-プロパノールを用いた抽出液によりゲルから回収することが有用であることを明らかにした。一方、本法により回収した試料中には、電気泳動バッファーに由来するSDS等が高濃度で残存する可能性がある。今後は、回収した微量糖タンパク質の糖鎖及び糖ペプチドを分析するための試料調製法について最適化する必要があると思われる。次に、微量糖タンパク質から糖鎖を切り出すための条件について検討した結果、20~40 mM程度のDTTを添加したリン酸緩衝液中で糖鎖を切り出すことにより、RCM化を行うよりも高収率で糖鎖を回収できることが示された。今後は、RCM化が糖鎖の回収率に影響を与えることが示唆されているHGF等を用いて、本法の応用可能性について検討する予定である。

D-2 vCJD由来PrP^{Sc}除去能力評価方法及び除去に有効なデバイスの確立

バイオ医薬品の製造工程におけるPrP除去効果の評価において、従来の263K株と同等の感度を有するmo-vCJD株の評価系を確立した。

また、昨年報告した電荷を有する膜デバイス以外にもPrP^{Sc}の除去に有効なデバイスを新たに見いだした。これらのデバイスについてはタンパク質共存下における性能の評価が今後の課題となる。

SP-SCを用いたin vitro感染価評価において、その感度は1% mo-vCJD 脳ホモジェネート相当が限界であり、バイオ医薬品の工程評価に応用するには更に100倍以上の感度向上が必要となる。今回取得したbSP-SC_148細胞株についてもさらなる感度向上を試みたい。

D-3 vCJD 感染モデルマウス作成の検討

vCJD感染マウスモデルを検討するには、発症までの期間と再現性、病変の特徴等の評価しやすいものであることが望ましい。一般的にプリオン感染症は、発症までの期間が長く実験条件が難しい面を有していた。ヒトのvCJD発症例では、平均26歳で発症し、その潜伏期間は約10年と考えられている。本研究では、発症までの期間がマウスの接種日齢に影響するか否かを検討した。

その結果、1日齢マウスにmo-vCJDを接種した方が潜伏期間は長期化傾向を示した。末期の個体間では脳内のPrP^{res}の蓄積量に有意な差はないが、病理学的所見のスコアは1日齢マウスの方が大きくなったことから、脳の発達段階におけるvCJD感染は、脳の変性に影響を及ぼすことが推察された。

D-4 リン酸化プリオンペプチド抗原を特異的に認識する抗体の調製

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}の生成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。

昨年度はマウスをpS43-hPrP(39-50)-Cys-MBS-BCIPで免疫し、血清の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。抗血清はイムノブロット法でPrP^{Sc}感染脳を特異的に認識したが、ペプチドとキャリア蛋白質の架橋剤として用いたMBSを認識する抗体を多く含んでいた。樹立したハイブリドーマも、PrPでは無く、MBSを認識した。MBSはSH基を含む低分子化合物とキャリア蛋白質の結合に多用され、多くの抗体産生ハイブリドーマが樹立されているが、その構造に芳香環を含むことから、抗原性が低い免疫原ではスペーサー部分に対する抗体を誘導する。

今年度は架橋剤の免疫原性を下げるため、免疫原の調製には直鎖のSPDPを架橋剤として用いた。免疫したマウスの抗血清は、MBSを含

む免疫原で得られた抗血清より抗体価は低かったが、スパーサー部分のSPDPではなく、pS43-hPrP (39-50)を特異的に認識した。

リン酸化プリオンペプチドに対する抗体価がプリオンペプチドに対する抗体価より高いマウスの脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞株PAIと細胞融合を行い、3株の特異抗体産生ハイブリドーマを樹立した。その培養上清はELISAで極めて高い抗体価を示し、イムノプロット法でpS43近傍のアミノ酸配列を認識し、市販の抗プリオン蛋白質抗体6H4と同様に、PrP^{Sc}及びPrP^Cに特異的なバンドを検出した。

樹立した3株のハイブリドーマは、それぞれ異なった特異性を示した。pSP279はELISAで固相のリン酸化プリオンペプチドに対する高い特異性を示し、一方でpSP240の特異性は低かった。これらpS43近傍のアミノ酸配列に対する反応性が異なる抗体を用いた検出法の構築は、リン酸化又は非リン酸化プリオン蛋白質それぞれの検出に有用と考えられる。

樹立したハイブリドーマが産生する抗体は、6H4と同様にイムノプロット法でPrP^{Sc}及びPrP^Cを認識した。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}感染脳のイムノプ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。

今年度はリン酸化プリオンペプチドに対する抗体産生ハイブリドーマを樹立したが、今後は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、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マウス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) 電気泳動ゲルから微量糖タンパク質を高収率で回収する方法として、Cy5標識した糖タンパク質を電気泳動後、固定化せずに2-プロパノール水溶液で抽出する方法が有用であることを見出した。また、微量糖タンパク質から糖鎖を回収する方法として、還元アルキル化せずにDTTを添加したリン酸緩衝液中でPNGase Fにより糖鎖を切り出す方法が有用であることを明らかにした。これらの糖タンパク質及び糖鎖回収法は、微量プリオンタンパク質の糖鎖解析に応用可能であると考えられる。

(2) mo-vCJD由来PrP^{Sc}を用いたWBによるバイオ医薬品の製造工程におけるvCJD除去能力評価方法を確立した。また、タンパク質を含まない条件ではあるがmo-vCJD除去に有効なデバイスも新たに見いだした。今後これらのデバイスをバイオ医薬品の製造工程に応用する研究・評価が必要である。細胞を用いたmo-vCJDの感染価評価については感度向上が今後の課題となった。

(3) バイオ医薬品の製造工程においてPrP除去効果を評価する動物試験では、実験手技の簡便性、実験期間、組織病変所見等を考慮すると30日齢マウスへの接種が感染マウスモデルとして適当であると考えられる。

(4) 本研究では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、ハイブリドーマの樹立、産生するモノクローナル抗体の特異性をELISAおよびPrP^{Sc}感染マウス脳を用いたイムノプロット法で行った。これらの結果は、新たなPrP^{Sc}バイオアッセイ系の構築、プリオン病のバイオマーカー測定法開発への寄与が期待

できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表(○は本科研費に直接関係する論文)

- (1) Nakazawa, S., Hashii, N., Harazono, A., Kawasaki, N.: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 420, 61-67, 2012.
- (2) N. Hashii, S. Nakazawa, N. Kawasaki: Glycomics in Quality Control of Tissue-engineered Medical Products, *Yakugaku Zasshi*, 132, 489-497, 2012.
- (3) Kanai, Y., Miyasaka, S., Uyama, S., Kawami, S., Kato-Mori, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., and Hagiwara K.: Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. *BMC Res. Notes* 5, 4, 2012.
- (4) Yasugi, M., Nakamura, S., Daidoji, T., Ramadhany R., Yang, C.-S., Yasunaga, T., Iida, T., Horii, T., Ikuta, K., Takahashi, K., and Nakaya, T.: Frequency of D222G and Q223R hemagglutinin mutants of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus I Japan between 2009-2010. *PLoS One*, in press.
- (5) Sakudo, A., Suganuma, Y., Sakima, R., and Ikuta, K.: Diagnosis of HIV-1 infection by near-infrared spectroscopy: Analysis using molecular clones of various HIV-1 subtypes. *Clin. Chim. Acta*, in press
- (6) Boonchawalit, S., Jullaksorn, D., Uttiyoung, J., Yowang, A., Krathong, N., Chautrakul, S., Yamashita, A., Ikuta, K., Roobsoong, A., Kanitvittaya, S., Sawanpanyalert, P., and Kameoka, M.: Molecular evolution of HIV-1 CRF01_AE Env in Thai patients. *PLoS One* 6, e27098, 2011.
- (7) Nagatani, N., Yamanaka, K., Saito, M., Koketsu, R., Sasaki, T., Ikuta, K., Miyahara, T., and Tamiya, E.: Semi-real time electrochemical monitoring for influenza virus RNA by reverser transcription loop-mediated isothermal amplification using a USB powered portable potentiostat. *Analyst* 135, 5143-5150, 2011.
- (8) Puiprom, O., Yamashita, A., Sasayama, M., Limkittikul, K., Jittmitraphap, A., Leungwutiwong, P., Kurosu, T., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Coexistence of major and minor viral population from two different origins in patients secondarily infected with dengue virus serotype 2 in Bangkok. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 136-142, 2011.
- (9) Tsujikawa, M., Ohkubo Y., Masuda, M., Tanaka, H., Takahashi, K., Sasaki, Y., Yunoki, M., and Ikuta, K.: Caution in evaluation of removal of virus by filtration: Misinterpretation due to detection of viral genome fragments by PCR. *J. Virol. Methods* 178, 39-43, 2011.
- (10) Tsujikawa, M., Nishigaki, H., Yoshikawa, M., Furukim R., Takahashi, K., Adan-Kubo, J., Shimamura, Y., Urayama, T., Hattori, S., Sakai, K., Yunoki, M., and Ikuta, K.: Variability of parvovirus B19 genotype 2 in plasma products with different

- compositions in the inactivation sensitivity in liquid-heating. *Vox Sang.* in press.
- (11) Sakudo, K., Masrinoul, P., Tanaka, Y., and Ikuta, K.: Capture of dengue virus type 3 using anionic polymer-coated magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* 28, 625-628, 2011.
- (12) Sapsutthipas, S., Kitagawa, Y., Tokunaga, K., Ikuta, K., and Kameoka, M.: Viral factors involved in adaptor-related protein complex 2 alpha 1 subunit-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Southeastern Asian J. Trop. Med. Public Health* 42, 311-319, 2011.
- (13) Watanabe, Y., Ibrahim, M. S., Ellakany, H. F., Abd El-Hamid, H. S., and Ikuta, K.: Genetic diversification of H5N1 highly pathogenic avian influenza A virus during replication in wild ducks. *J. Gen. Virol.* 92, 2105-2110, 2011.
- (14) Masrinoul, P., Diata, M. O., Pambudi, S., Limkittikul, K., Ikuta, K., and Kurosu, T.: Highly conserved region 141-168 of the NS1 protein is a new common epitope region of dengue virus. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 109-115, 2011.
- (15) Daito, T., Fujino, K., Watanabe, Y., Ikuta, K., and Tomonaga, K.: Analysis of intracellular distribution of Borna disease virus glycoprotein fused with fluorescent markers in living cells. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1243-1247, 2011.
- (16) Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ellakany, H.F., Kawashita, N., Mizuike, R., Hiramatsu, H., Sriwilaijaroen, N., Takagi, T., Suzuki, Y., and Ikuta K.: Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog.* 7, e1002068, 2011.
- (17) Yamanaka, K., Saito, M., Kondoh, K., Hossain, M.M., Koketsu, R., Sasaki, T., Nagatani, N., Ikuta K., and Tamiya, E.: Rapid detection for primary screening of influenza A virus: microfluidic RT-PCR chip and electrochemical DNA sensor. *Analyst* 136, 2064-2068, 2011.
- (18) Sakudo, A., Tanaka, Y., and Ikuta, K.: Capture of infectious borna disease virus using anionic polymer-coated magnetic beads. *Neurosci. Lett.* 494, 237-239, 2011.
- (19) Ibrahim, M.S. Watanabae, Y., Ellakany, H.F., Yamagishi, A., Sapsutthipas, S., Toyoda, T., Abd El-Hamied, H. S., and Ikuta, K.: Host-specific genetic variation of highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1). *Virus Genes* 42, 363-368, 2011.
- (20) 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.* 18, 494-499, 2011.
- (21) Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Suzuki, Y., and Ikuta, K.: The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends Microbiol.* 2011 Dec 5, in press.
- (22) Sakudo, A., Onodera, T., Shitani, H., and Ikuta, K.: Dengue virus presence and surveillance in Okinawa. *Exp. Ther. Med.*,

- in press.
- (23) 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.* 27, 483-489, 2011.
- (24) ◎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* 2011; 18(4): 142-150.
- (25) Hagiwara K, Ando T, Koiwa M. The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. *J Vet Med Sci.* 2011 Nov 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22123302.
- (26) Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res.* 78, 118-121, 2011.
- (27) Hisaeda K, Arima H, Sonobe T, Nasu M, Hagiwara K, Kirisawa R, Takahashi T, Kikuchi N, Nagahata H. Changes in Acute-Phase Proteins and Cytokines in Serum and Milk Whey from Dairy Cows with Naturally Occurring Peracute Mastitis Caused by *Klebsiella pneumoniae* and the Relationship to Clinical Outcome. *J Vet Med Sci.* 73, 1399-1404, 2011.
- G-2 学会発表
- (1) 橋井則貴, 黄 笑宇, 栗林亮佑, 川崎ナナ: 糖鎖プロファイルによる間葉系幹細胞の分化初期における細胞の識別. 第84回日本生化学会大会 (2011. 9) 京都
- (2) 中澤志織, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: 水素/重水素交換質量分析法によるヒトインスリンアナログ製剤の多量体安定性の解析. 第84回日本生化学会大会 (2011. 9) 京都
- (3) 中澤志織, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: ヒトインスリンアナログ製剤の水素/重水素交換反応性と薬物動態の相関性. 第11回日本蛋白質科学会年会 (2011. 6) 大阪
- (4) ◎Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE Safety Forum. (2011. 6), Barcelona, Spain
- (5) ◎久保 純, 大久保 裕士, 中川 典子, 坂井 薫, 柚木 幹弘, 川見 祥代, 萩原 克郎, 生田 和良: バイオ医薬品からのマウス馴化型vCJDの除去の可能性; 作用機序が異なる3種類のろ過膜のプリオン除去能. 第35回日本血液事業学会 (2011. 10) 埼玉
- (6) 遊佐精一, 菊池 裕, 小西良子, 山口照英: Molecular characterization of mouse, human, bovine, and sheep PrP^C in cell lines. Asian Pacific Prion Symposium. (2011. 7) 軽井沢
- (7) 東原知宏, 菊池裕, 中島治, 遊佐精一, 手島玲子, 辻勉, 小西良子, 山口照英: ヒツジOA1細胞が発現するスプライス変異型プリオン蛋白質遺伝子の解析, 第84回日本生化学会大会 (2011. 9) 京都
- (8) Yutaka Kikuchi, Sei-ichi Yusa, Toshie Kanayasu-Toyoda, Osamu Nakajima, Reiko Teshima, Yoshiko Sugita-Konishi, Teruhide Yamaguchi: Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G, Keystone Symposia, Advances in Hypoxic Signaling:

From Bench to Bedside (2012. 2), Alberta,
Canada

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

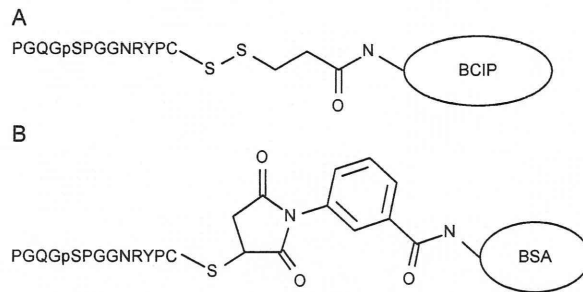


図 1 Schematic diagram of antigens

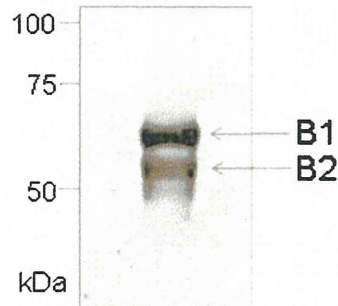


図 2 フェツインの SDS-PAGE 像

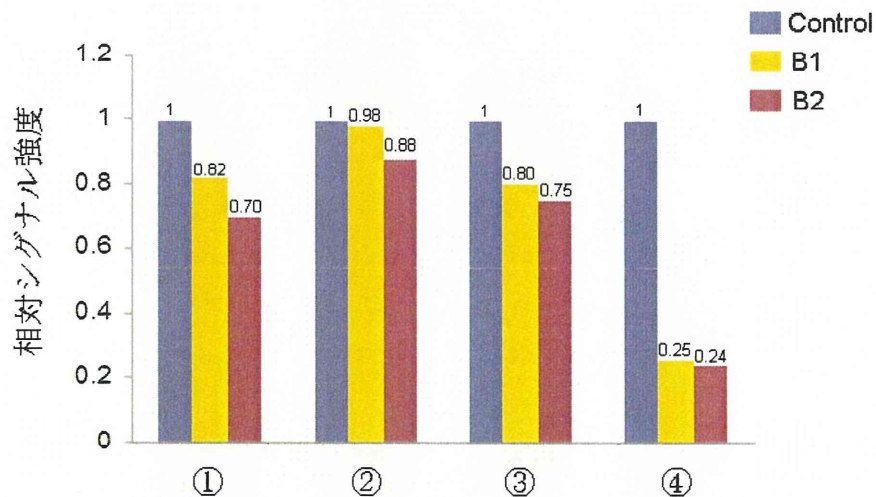


図 3 抽出用緩衝液の最適化.

①~④：抽出用緩衝液; Cy5 標識した 5 μg/レーンのフェツインをアクリルアミドゲルより抽出後, 再泳動し, ゲル抽出前のフェツインをコントロールとしてバンドの相対シグナル強度を算出.

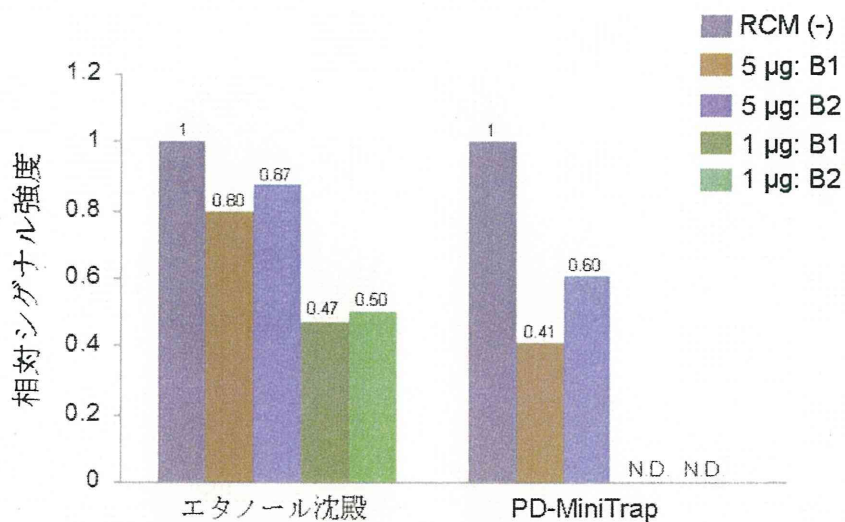


図4 RCM 後脱塩操作の影響.

RCM 操作の後, エタノール沈殿及び PD-MiniTrap を用いて脱塩し, SDS-PAGE で分離. RCM 操作 (-) のフェツインをコントロールとして相対シグナル強度を算出.

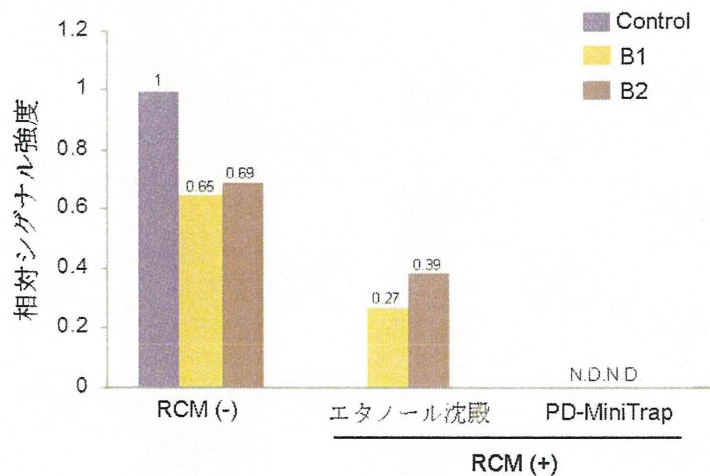


図5 抽出法の最適化.

抽出液②のアクリルアミドゲルからの抽出効率を RCM 後の脱塩操作 (-/+) の影響と併せて検討. Cy5 標識した 1 µg/レーンのフェツインをアクリルアミドゲルより抽出後, 再泳動し, ゲル抽出前の RCM (-) フェツインをコントロールとしてバンドの相対シグナル強度を算出.

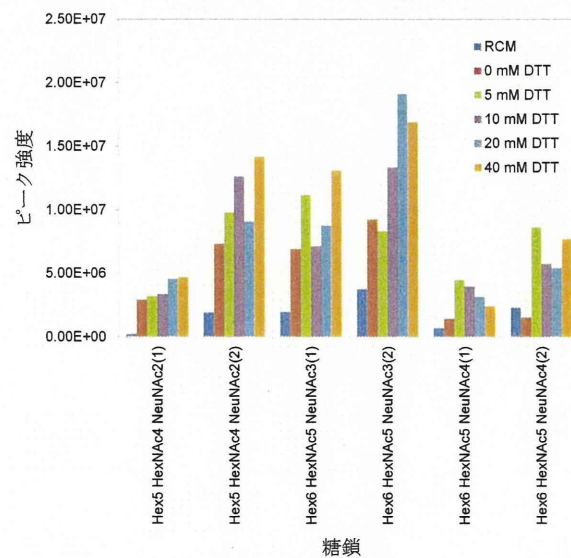
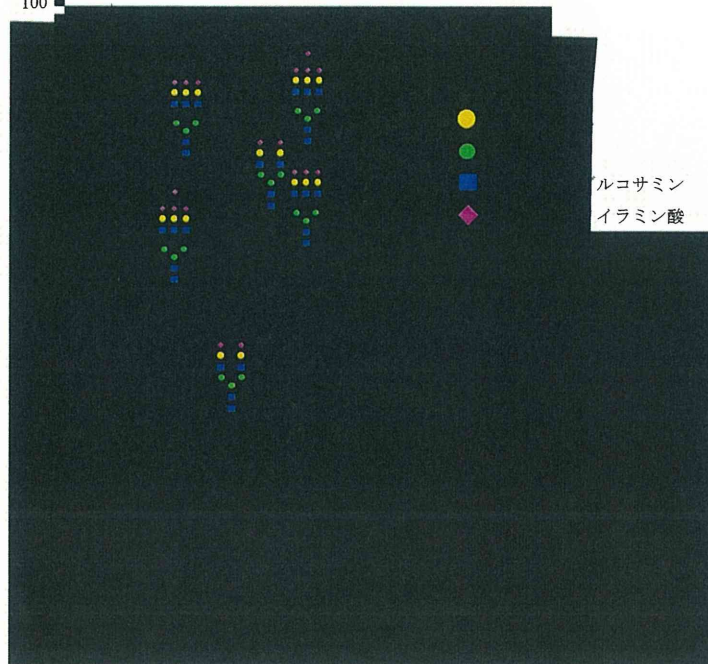


図7 PNGase Fによる糖鎖切り出し条件の検討。モデル糖タンパク質としてフェツインを用いた。RCM,還元アルキル化した後、ゲルろ過により精製したフェツインから切り出した糖鎖,0-40 mM DTT,0-40 mM DTTを添加したリン酸緩衝液中で切り出した糖鎖。Hex,ヘキソース(マンノース及びガラクトース);HexNAc,N-アセチルヘキソサミン(N-アセチルグルコサミン);NeuNAc,N-アセチルノイラミン酸