



図 8 4種のPEIビーズのPrP^C吸着能の比較. 分子量及び構造が異なる4種類のPEIビーズ, MW 1800, MW 10000, MW 70000, MW 70000 Br に, 培養細胞由来の組成精したPrP^Cを荷した. レーンの内訳は以下の通りである. Cell-PrP^C; 荷したPrP^C, 1; Flow through, 2; 200 mM NaCl 溶出画分, 3; 400 mM NaCl 溶出画分, 4; 600 mM NaCl 溶出画分, 5; 800 mM NaCl 溶出画分, 6; 1 M NaCl 溶出画分, 7; PEI ビーズ sample buffer 処理画分.

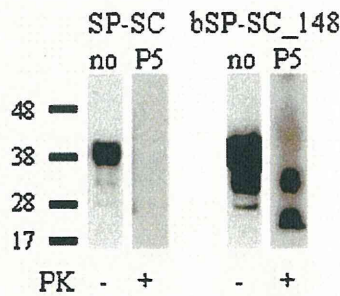


図 9 クローン間のPrP^C発現量とmo-vCJDへの感染効率. クローン化する前のSP-SCと単クローン化したbSP-SC_148について, (no)はmo-vCJD感染前にPK未処理で, (P5)はmo-vCJDに細胞を感染させてから5回経代したものをPK処理して, それぞれWB法によりPrP^CとPrP^{Sc}を検出した. 1レーンあたりの細胞数は(no), (P5)でそれぞれ 3×10^3 , 1.5×10^5 個となっている.

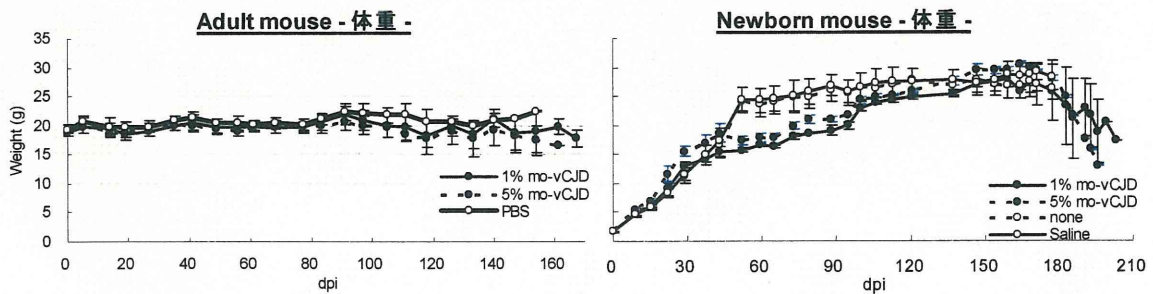


図 10 接種時30日齢マウス (Adult mouse) と1日齢マウス (Newborn mouse) の体重

の推移。

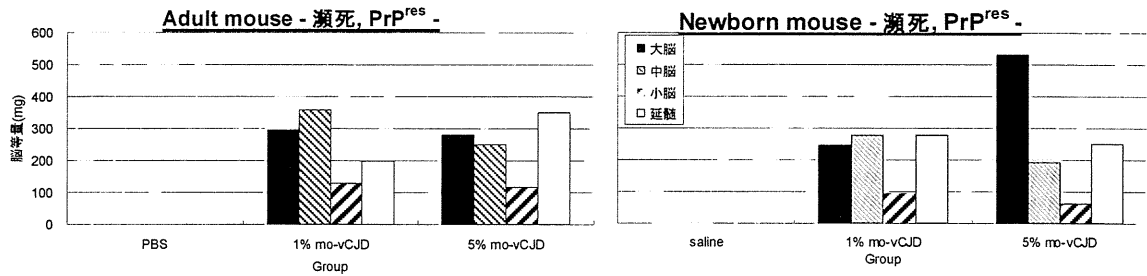


図 11 接種時 30 日齢マウス (Adult mouse) と 1 日齢マウス (Newborn mouse) の脳内における PrP^{Sc} の量. 採取した脳は大脳, 中脳, 小脳, 延髄に分け, WB 法により PrP^{Sc} 量を測定した. Y 軸は測定した 1.6%脳乳剤の, 接種に用いた瀕死状態の Adult mouse に対する脳等量となっている.

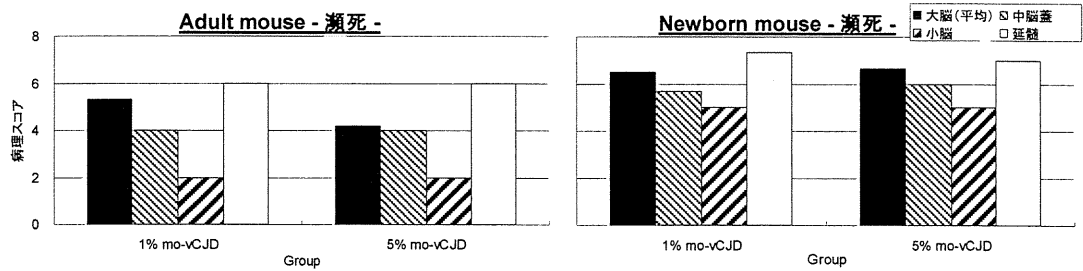
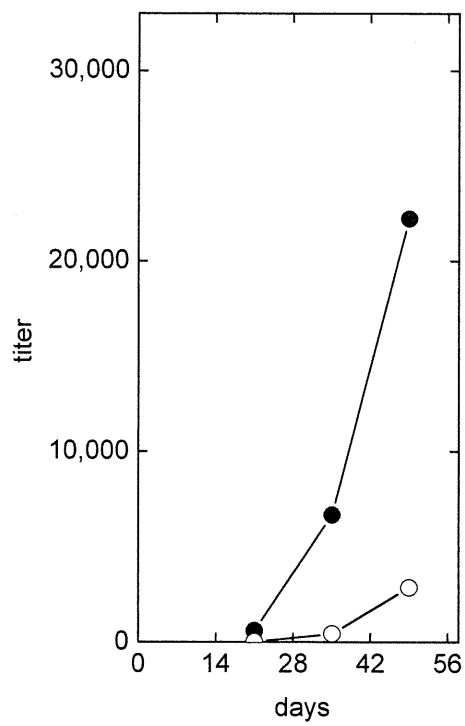
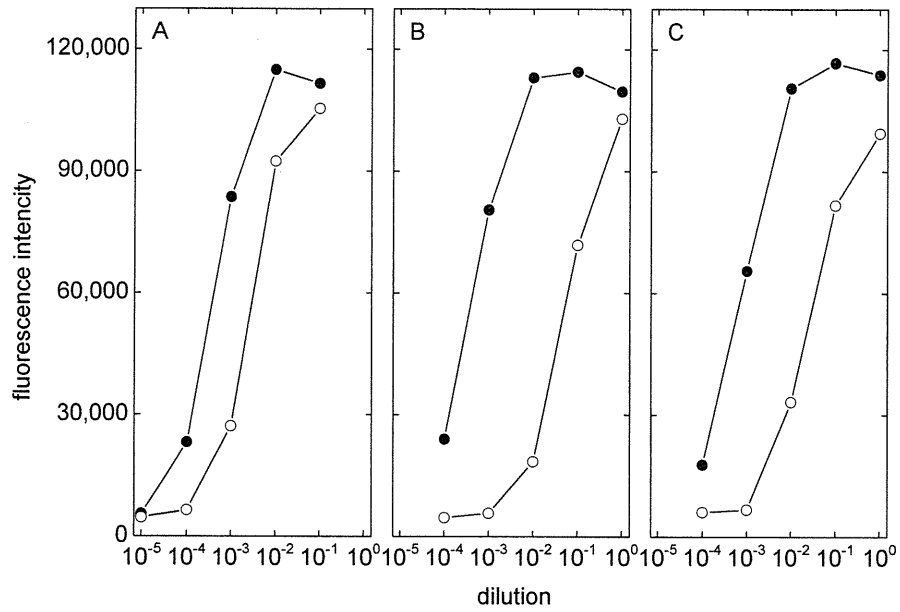


図 12 接種時 30 日齢マウス (Adult mouse) と 1 日齢マウス (Newborn mouse) の脳の病理学的所見. 採取した脳について GFAP, HE 染色を施し, 大脳, 中脳, 小脳, 延髄についてそれぞれスコア化した.

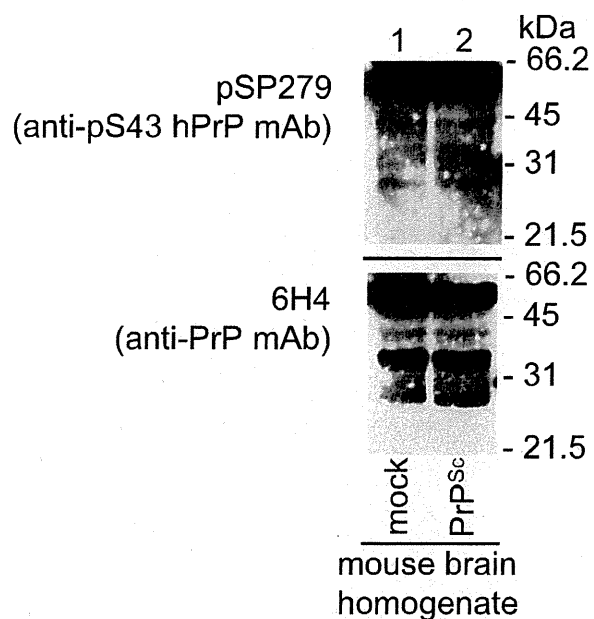


☒ 13 Time course curve of mouse serum-titer.

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



⊠ 14 Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.



☒ 15 Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}.
 The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1) and PrP^{Sc} (lane 2) were detected with anti-pS43 hPrP mAb pSP249 (upper panel) and anti-PrP mAb 6H4 (lower panel).

表1 アクリルアミドゲルからの抽出用緩衝液

抽出液	組成
①	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
②	33 % 2-プロパノール
③	50 % アセトニトリル
④	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA, pH 7.5

表2 プリオン除去効果

Condition	Antithrombin	Albumin	PBS
Filter	Planova15N	Planova15N	MW 70000 Br
Log Reduction Factor	≥ 3.5	≥ 3.1	Effective

表3 mo-vCJD 接種から主要な病態発症までの期間 (dpi: days post-infection)

	30日齢マウス		新生仔マウス(1日齢)	
	1% mo-vCJD	5% mo-vCJD	1% mo-vCJD	5% mo-vCJD
Terminal illnessに至るまでの期間	158 dpi	153 dpi	191 dpi	196 dpi
体重減少開始	90 dpi	90 dpi	159 dpi	164 dpi
異常行動開始*	約100 dpi	約100 dpi	188 dpi	191 dpi

*成熟マウスと幼弱マウスでは評価項目が異なる

表4 抗リン酸化プリオン蛋白質抗体の特異性

抗体	アイソタイプ	抗体価		
		固相抗原		比率
		リン酸化プリオンペプチド	プリオンペプチド	
pSP240	κ , γ 2b	2, 222	333	7
pSP279	κ , γ 2b	2, 500	18	138
pSP289	κ , γ 2b	1, 429	31	46

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：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 異常型プリオン (PrP^{Sc}) の除去工程の開発, 及び不活性化評価法を確立するためには, 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. プリオンタンパク質は糖タンパク質であり, PrP^{Sc} と正常プリオンタンパク質 (PrP^C) の糖鎖構造が異なることが示唆されている. PrP^{Sc} に特異的な糖鎖構造を見出すことで, PrP^{Sc} 特異的検出法の開発に繋がる可能性がある. そこで本年度は, 微量プリオンタンパク質及びその糖鎖の効率的回収法の確立を目的として, モデル糖タンパク質を用いて中性付近の抽出溶液を用いたアクリルアミドゲルからの微量糖タンパク質抽出法について検討するとともに, 微量糖タンパク質からの糖鎖調製法について最適化を行った.

A. 研究目的

異常型プリオン (PrP^{Sc}) は, 細菌, 真菌, マイコプラズマ及びウイルス等と同様に外来性感染物質の一つであり, バイオ医薬品の開発において, PrP^{Sc} の混入／迷入の低減は, 医薬品の安全性を確保するための課題となっている. PrP^{Sc} の除去工程の開発, 及び不活性化評価法を確立するためには, 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. 正常プリオンタンパク質 (PrP^C) は, 209 個のアミノ酸残基からなるホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型糖タンパク質である. PrP^{Sc} は PrP^C が二次構造の変化を起こしたものとされており, PrP^C と比較して β -シート構造の割合が高いことが特徴である. また, PrP^{Sc} は

protease K に抵抗性を示すが PrP^C は感受性を示すこと, PrP^{Sc} は難溶性で凝集体を形成しやすいが PrP^C は可溶性であることなどが明らかにされている. プリオンタンパク質は 2 箇所の *N*-結合型結合部位を有しており, 糖鎖が二次構造の変化に影響を及ぼすことが報告されている (Zhong L *et al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 26, 525-533, 2009). 即ち, PrP^{Sc} と PrP^C の糖鎖構造が異なることが示唆されており, PrP^{Sc} に特異的な糖鎖構造を見出すことで, 糖鎖を指標とした特異的検出法の開発に繋がる可能性がある.

昨年度は, PrP^{Sc} と PrP^C の糖鎖構造の違いを明らかにする一環として, SDS-PAGE で分離したモデル糖タンパク質をアクリルアミドゲル片から効率的に回収する方法につ

いて検討し、ギ酸/水/2-プロパノール溶液を用いてゲル片から抽出することで、高収率で糖タンパク質を回収できることを報告した。一方、この抽出法は酸性条件下で実施するために、シアル酸等の解離しやすい糖を含む糖タンパク質への応用に課題が残されていた。そこで本年度は、より中性付近の抽出溶液を用いた糖タンパク質抽出法について検討するとともに、微量糖タンパク質からの糖鎖調製法について最適化を行った。

B. 研究方法

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。

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 %のグラジエントゲル (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。ゲル粉碎物に 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 μ m フィルターを用いてゲル片を完全に取り除いた後、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。

3. 糖鎖切り出し

RCM 化タンパク質を 50 μ l 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 $^{\circ}$ 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、冷エタノール (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⑥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⑧。

尚、RCM 化を行わない⑨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。

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。

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 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: 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 5μ)

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

グラジエント: 5–70% B (50 min)

流速 : 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$

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%

C. 結果及び考察

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% グラジエ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 1)。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エントゲルで分離、染色した後、バンドのシグナル強度を測定した (図 2)。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 3)。特に、1 μg 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 μg) 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 4)。その結果、1 μg 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。

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 μg) 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 5 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 6)。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。

D. 結 論

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Nakazawa, N. Hashii, A. Harazono, N. Kawasaki: Analysis of oligomeric stability of insulin analogs using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 2012; 420, 61-67.
- 2) N. Hashii, S. Nakazawa, N. Kawasaki: Glycomics in Quality Control of Tissue-engineered Medical Products, *Yakugaku Zasshi*, 2012; 132, 489-497.

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

G-1.

実用新案登録 なし

G-2.

その他 該当事項なし

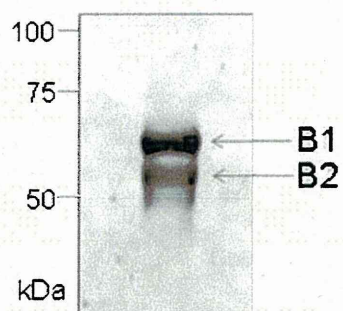


図 1 フェツインの SDS-PAGE 像

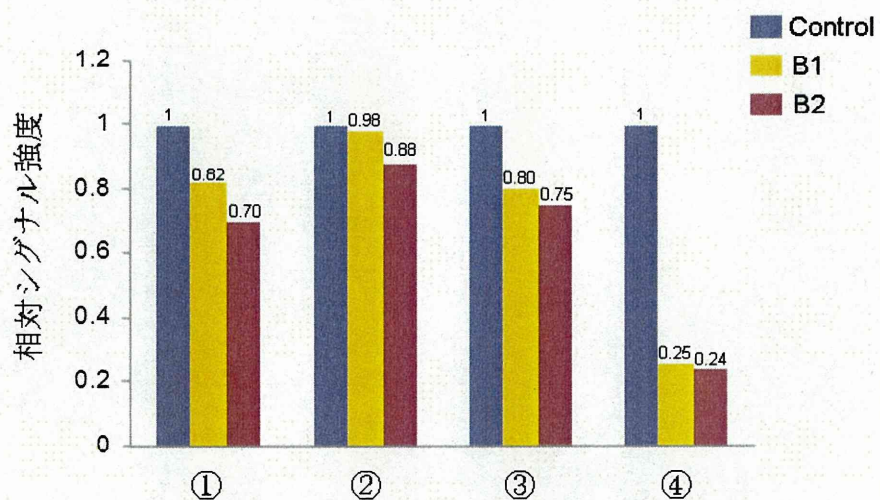


図 2 抽出用緩衝液の最適化.

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.

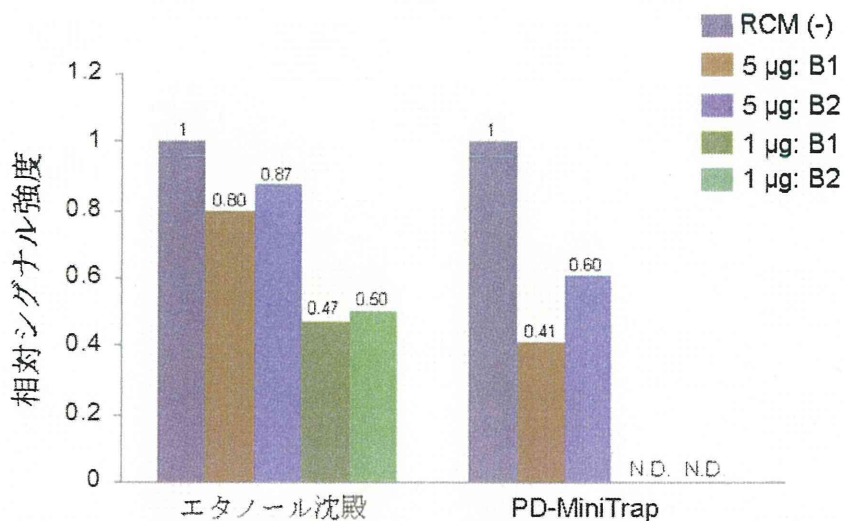


図3 RCM 後脱塩操作の影響.

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。

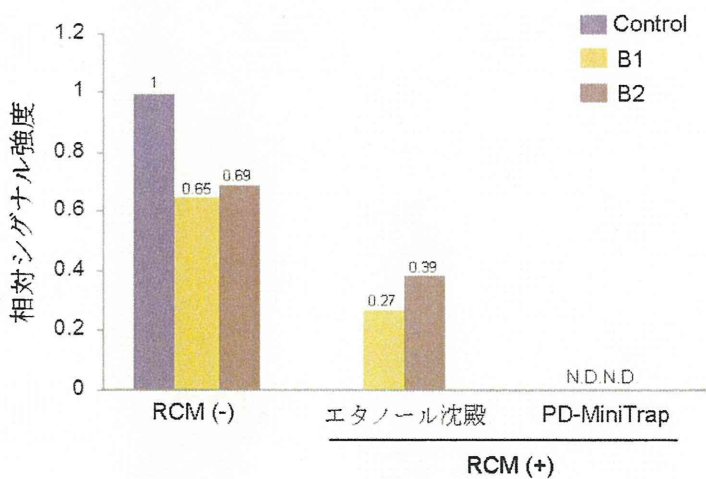


図4 抽出法の最適化.

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。

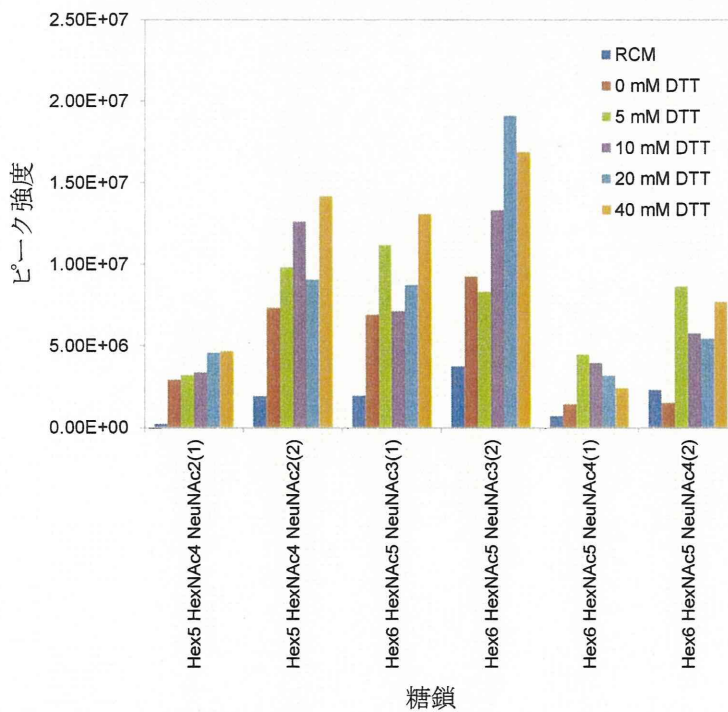
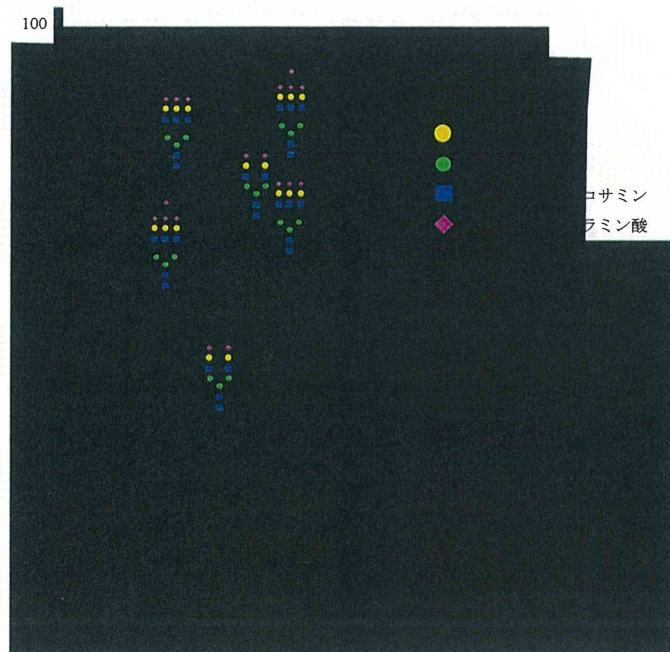


図6 PNGase Fによる糖鎖切り出し条件の検討。モデル糖タンパク質としてフェツインを用いた。RCM,還元アルキル化した後、ゲルろ過により精製したフェツインから切り出した糖鎖; 0 – 40 mM DTT, 0 – 40 mM DTTを添加したリン酸緩衝液中で切り出した糖鎖。Hex, ヘキソース(マンノース及びガラクトース); HexNAc, N-アセチルヘキソサミン(N-アセチルグルコサミン); NeuNAc, N-アセチルノイラミン酸

表 1 アクリルアミドゲルからの抽出用緩衝液

抽出液	組成
①	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
②	33 % 2-プロパノール
③	50 % アセトニトリル
④	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA, pH 7.5

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）
（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 大阪大学微生物病研究所 教授 生田 和良

研究要旨：

- ① バイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去能力評価を行う為に、マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 感染マウス脳由来超音波処理マイクロソーム画分を用いた Western Blotting (WB) 法による十分な感度を持った評価方法を確立した。
- ② 上記評価法を用いてウイルス除去膜処理工程のプリオン除去能力評価を行ったところ、mo-vCJD においても 15nm の孔径を有するウイルス除去フィルターは高い除去能を示した。
- ③ 上記プリオン材料を用いてリン酸緩衝液 (PBS) 組成でのプリオン吸着担体の探索を行った結果、異常型プリオン蛋白 (PrP^{Res}) の除去に有効なデバイスを見いだした。

研究協力者 株式会社ベネシス 柚木 幹弘、坂井 薫、久保 純

A. 研究目的

今年度はバイオ医薬品の製造工程におけるプリオン除去能力評価に用いるマウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を応用した *in vitro* 評価の為に①プリオン蛋白 (PrP) 濃縮方法を検討し、②Antithrombin 及び Albumin 製剤の 15nm ウイルスろ過 (Planova15N, 旭化成メディカル製；平均孔径 15 nm) 工程の評価をウエスタンブロット (WB) 法により行った。また、Proteinase K 抵抗性プリオン蛋白 (PrP^{Res}) 除去デバイスの探索として、③ Poly-ethylene-imine (PEI) ビーズの PrP^{Res} 除去効果の検討を行った。更に培養細胞を用いた感染価測定感度向上の為に④正常 PrP (PrP^C) 高発現細胞のスクリーニングと、⑤この細胞への mo-vCJD 感染実験を行った。

B. 研究方法

①超遠心(150,000×g)、TCA 沈殿、メタノール沈殿法を組み合わせ PrP の濃縮を検討した。
②Antithrombin 及び Albumin 製剤の工程直前液に mo-vCJD 感染マウス脳から調製した PrP^{Res} を添加し、Planova15N ろ過前後の PrP^{Res} 量を WB 法により測定し PrP^{Res} 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 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^{Res} を PBS に添加し、PEI ビーズ処理前後液での PrP^{Res} 量を WB 法により測定し PrP^{Res} 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^{Res} 発現を WB 法で確認した。

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おい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おい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^{Pres}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 (Table 1)。

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 (Fig. 1)。更に mo-vCJD 由来 PrP^{Pres}を用いて検討したところ、MW 70,000 Br PEI ビーズに PrP^{Pres}吸着効果が認められた (Table 1)。

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 (Fig. 2 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^{Pres} の発現が認められた (Fig. 2 右)。

D. 考察

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^{Pres} 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。

E. 結論

本研究から、mo-vCJD 由来 PrP^{Pres} 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。

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

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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* 2011 Nov 11, in press
- 4) Boonchawalit, S., Jullaksorn, D., Uttiyong, 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.
- 5) 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.
- 6) Puiprom, O., Yamashita, A., Sasayama, M.,

- Limkittikul, K., Jittmitraphap, A., Leaungwutiwong, 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.
- 7) 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.
- 8) 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.* Jul 22, 2011, in press.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Sakudo, A., Onodera, T., Shitani, H., and Ikuta, K.: Dengue virus presence and surveillance in Okinawa. *Exp. Ther. Med.*, in press.
- 21) 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.
- 22) © 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.
2. 学会発表
- 1) © Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE Safety Forum. June 2011, Barcelona, Spain.
- 2) © 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 年 10 月 20-22 日、埼玉.
- 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：
本研究の一部は株式会社ベネシスとの共同研究として実施した。