

201132030B

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 ～ 23 年度 総合研究報告書

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 22～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照英

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書

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. 分担総合研究報告書

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・・・・・・・・・・・・	3 6
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・・・・・・・・・・・・	5 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	6 1
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	6 8
菊池 裕	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	7 7
---	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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）

平成 22～23 年度 総合研究報告書

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

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 (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／不活性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目指すものとして, 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の開発を目的とした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) マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いた *in vitro* 評価手法の確立を目的とした mo-vCJD 感染マウス脳由来 PrP^{Sc} 材料調製法, ウエスタンブロット (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開発, 3) mo-vCJD 株を用いた *in vivo* 評価手法の確立を目的とした mo-vCJD 感染マウス脳乳剤をマウスに接種する発症モデルの検討, 並びに 4) プリオン病早期診断法の開発の検討を行った。

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で懸念されている。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すものとして、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の開発を目的とした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) マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いた *in vitro* 評価手法の確立を目的とした mo-vCJD 感染マウス脳由来 PrP^{Sc} 材料調製法、ウエスタンブロット (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開発、3) mo-vCJD 株を用いた *in vivo* 評価手法の確立を目的とした mo-vCJD 感染マウス脳乳剤をマウスに接種する発症モデルの検討、並びに 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)を使用した。乾燥フェツインを 50 µl の 8 M グアニジン塩酸 / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた後、2 µl の 1 M dithiothreitol (DTT, 終末 40 mM) を加えて 65 °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 µl 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

1) クーマシーブルー染色ゲルからの糖タンパク質回収

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 15 分間室温で振盪した。脱色液を取り除き、再び等量の脱色液を加えて 15 分間室温で振盪した。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 µl 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分間遠心した後、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分間、遠心分離した。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。

2) SYPRO Ruby 染色ゲルからの糖タンパク質回収

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分ごとに固定液を交換しながら1時間、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 秒) → 振盪 (室温・30 秒)

電子レンジ (15 秒) → 振盪 (室温・30 秒)

電子レンジ (15 秒) → 振盪 (室温・23 分間)

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 μl 加え、マイクロチューブ攪拌機を用いて1分間室温で振盪した。脱色液を取り除き、再び等量の脱色液を加えて15分間室温で振盪した。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 μl 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分間、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分間遠心した。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) 未染色ゲルからの蛍光標識糖タンパク質回収

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2に示す抽出用緩衝液を各チューブに100 μl 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 ×g で 15 分間、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 μl のミリ Q 水を加え、攪拌した後、15,000 ×g で 5 分間の遠心の後、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 μl のアセトニトリルを加えて攪拌した後、15,000 ×g で 5 分間遠心し、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、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 ×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 NaBH₄ 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 NaHCO₃ 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 NaHCO₃ 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)

組織プラスミノーゲンアクチベータ (t-PA) 及びフェツインの酵素消化物、並びにフェツイン由来 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×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

ル水溶液

グラジェント: 5–45% B (50 分間)

流 速 : 0.3 μ l/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×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 分間)

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. プリオン除去評価に用いるプリオン材料の調製

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, 超音波処理を行いプリオン材料 (PrP^{Sc}材料) の調製を行った (Fig. 1). 濃縮法として, 超遠心 (150,000 \times 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. また, 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. 更に, mo-vCJD 株感染マウス脳由来プリオン材料中の PrP^{Sc}を検出する Western blotting (WB) 法条件の最適化を行った.

B-3. ウェスタンブロット (WB) 法による vCJD 由来 PrP^{Sc} 除去能力評価方法の開発

上記のプリオン材料を PBS, Antithrombin 及び Albumin 製剤の工程直前液に懸濁し, 15nm ウイルスろ過 (Planova15N, 旭化成メディカル製; 平均孔径 15 nm) よろ過前後の PrP^{Sc} 量を WB 法により測定して PrP^{Sc} 除去能力を評価した.

B-4. vCJD 由来 PrP^{Sc} 除去に有効なデバイスの開発

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) 及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. また, MW 1,800, MW 10,000, MW 70,000 及び MW 70,000 側鎖型 (Br) Poly-ethylene-imine (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^{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.

また, SJL/OlaHsd (Ola) 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. 更に, 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-5. 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 日齢及び 30 日齢の FVB/n マウスに上記乳剤を脳内接種し, 臨床所見 (異常行動などの有無) を観察した. 発症した個体は瀕死状態 (Terminal ill, 以下 TI) に至った時点で剖検して脳を採取した.

発症しなかった個体は予定飼育期間終了まで観察した後に剖検し脳を採取した。採取した右脳は大脳，中脳，小脳，延髄に分け，それぞれの部位における PrP^{Sc} の蓄積を WB 法で測定した。左脳については，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^{Sc})，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。これらの結果を用いて，接種日齢差による発症期間の比較を検討した。

B-6. プリオン病早期診断法の開発

B-6-1. 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。架橋剤として芳香環を含む MBS 又は直鎖状の 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-MBS-BCIP (図 2A) 又は pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP (Fig. 1B) 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 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-6-2. 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-6-3. 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ブロッティングを行い，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。

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. 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

C-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

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 3). 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. 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 4 及び表 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 (図 5 及び表 1). 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. 未染色ゲルからの蛍光標識糖タンパク質回収

① 抽出用緩衝液の最適化

RCM 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 6). 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 7). 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 μ g および 5 μ g 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 8). 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 9). 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-1-4. 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 NaBH₄ 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 10 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 11)。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 μ g 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 10 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. プリオン除去評価に用いるプリオン材料の調製

プリオン除去評価に用いるプリオン材料 (mo-vCJD 株感染マウス脳由来超音波処理 MF, 以下 mo-vCJD MF) の調製法は、これまでに確立したハムスター馴化スクレイパー-263K 株感染ハムスター脳より超音波処理 MF (以下 263K MF) の調製法を利用できることを粒子径分布による評価により確認した (図 12)。また、一次抗体を 6D11 とした WB 法条件を決定し、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ことを WB 法で確認した。

C-3. ウェスタンブロット (WB) 法による vCJD 由来 PrP^{Sc} 除去能力評価方法の開発

mo-vCJD 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 PrP^{Sc} 除去能力を評価したところ、263K MF を用いたろ過と同様のろ過 (除去) 特性を示したが、mo-vCJD PrP^{Sc} は検出限界以下にまで除去されなかった(表 3)。更に、①の濃縮法を応用し Antithrombin 及び Albumin 製剤の Planova15N 工程における mo-vCJD PrP^{Sc} の除去能力を評価したところ、それぞれ ≥ 3.5 , $\geq 3.1 \log_{10}$ の除去能力 (リダクション値) を示した(表 4)。

C-4. vCJD 由来 PrP^{Sc} 除去に有効なデバイスの開発

電気的な吸着特性を有するろ過膜 (Zeta plus 90LA および Mustang E) については 15 nm の孔径を有する膜と同様の PrP^{Sc} ろ過傾向を示したが、その除去能力は溶液の組成により大きく変化することが明らかとなった。更に、PEI

ビーズによる PrP^C 除去能力の評価を実施したところ、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 13). 更に mo-vCJD PrP^{Sc} を用いて検討したところ、MW 70,000 Br PEI ビーズに PrP^{Sc} 吸着効果が認められた。

SJL/OlaHsd (Ola)マウス脾臓由来 PrP^C 発現株である SP-SC 株を用いて、高発現株のスクリーニングを実施し、発現量が 5~10 倍高い bSP-SC_148 株を樹立した(図 14). SP-SC 株と bSP-SC_148 株に mo-vCJD 株感染マウス脳の 1%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 PrPres の発現が認められた。しかしながら、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 倍以上の感度向上と方法の最適化が必要となる。

C-5. vCJD 感染モデルマウス作成の検討

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てマウス脳由来 PrPres 定量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、1 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(図 15 右図)。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 191、196 日であった(表 5)。

30 日齢マウスではリアリング(後肢のみでの起立)頻度の低下や歩行異常などの異常行動などの所見が約 100 日前後に一項目以上観察され(表 5)、120 日目には 2 項目以上観察された(後述④)。TI にいたるまでの期間は 30 日齢

マウスの方が 1 日齢マウスに比べて 30~40 日短く 1%、5% mo-vCJD 接種群でそれぞれ 158、153 日であった(表 5)。

③ 1 日齢マウスに接種し、発症したマウスの TI においては小脳に比べ、延髄、大脳、中脳で PrP^{Sc} の蓄積が多く見られた(図 16 右図)。病理学的所見のスコアでは延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であった(図 16 右図)。30 日齢マウスに接種した場合の TI も同様に小脳に比べ、延髄、大脳、中脳で PrP^{Sc} の蓄積が多く見られた(図 16 左図)。病理学的所見のスコアでも延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であった(図 17 左図)。この 2 種類の接種条件を比較すると、脳部位毎の PrP^{Sc} の蓄積量は両者とも類似しており、脳部位毎の病理学的所見スコアの傾向も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 17)。

④ 30 日齢マウスではリアリング(後肢のみでの起立)頻度の低下や歩行異常などが前述のように約 100 日前後に観察され始め(表 5)、120 日前後には全ての接種動物で 2 項目以上の異常行動が観察された(図 18)。脳内 PrP^{Sc} は臨床所見が認められる時期よりも早い約 90 日目より WB により定性的に検出され(data not shown)、118 日目には定量的に観察された。脳内 PrP^{Sc} は TI にいたる数日で急激に蓄積する傾向が観察された(図 19)。また、病理変化も異常行動が観察される 118 日目から摂取量に依存して観察され、1%接種群では 151 日目にかけて病理スコアの経時的な増加が見られた。TI 直前の 151 日目には延髄>大脳>中脳>小脳の順位で変性の程度が顕著であった(図 20)。

C-6. プリオン病早期診断法の開発

C-6-1. 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。

架橋剤として MBS を用いたリン酸化プリオンペプチド pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP (図 2 A) で免疫したマウス由来の抗血清は、ELISA で固相抗原のペプチドを認識したが (図 21)、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。一方、架橋剤として SPDP を用いたリン酸化プリオンペプチド pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP (図 2B) で免疫では、最も抗体価が上昇した 1 匹のマウスを最終免疫し、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リングの結果、サブクラスは 3 株とも IgG (κ , γ 2b) だった (表 6)。

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 22, 表 6)。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-6-2. イムノブロット法による pS43-PrP^{Sc} の検出

免疫したマウス由来の抗血清及び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。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 23, 24., upper panel)。

架橋剤として MBS を用いたリン酸化プリオンペプチド pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP (図 2A) で免疫したマウス由来の抗血清は、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 23, 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)。

一方、架橋剤に SPDP を用いたリン酸化プリオンペプチド pS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDP-BCIP で免疫したマウス脾細胞から樹立した pSP279 抗体を用いたイムノブロット法では (図 24)、対照脳 (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 24, 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。次ぎに、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 プリオン除去評価に用いるプリオン材料、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

バイオ医薬品の製造工程における vCJD 除去能力評価において、従来の 263K 株と同等のプリオンサンプル調製法及び感度を有する WB 法を用いた mo-vCJD 評価系を確立した。

ウイルス除去膜を用いた vCJD 除去評価結果はこれまでに得られている 263K を用いた評価結果と同じ傾向を示しており、特に 15nm の膜は効果的な除去能力を示した。現時点では 263K は vCJD のモデルとして応用できることが確認できた。

また、vCJD PrP^{Sc} の除去に有効な電荷を有する膜や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。

バイオ医薬品の製造工程に導入可能な種々のろ過膜やデバイスを評価したが、単独で検出限界以下にまで確実に除去できるものはなかった。バイオ医薬品の安全性を向上させるためには、機作の異なるフィルターやデバイスを組み合わせる必要があることが示唆された。

培養細胞用いた *in vitro* 感染価評価において、検出細胞候補株の樹立はできたものの、バイオ医薬品の工程評価に応用するには更に 100 倍以上の感度向上と方法の最適化が必要であった。

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、病変の特徴等を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どうかを検討した。

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^{Sc} 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. プリオン病早期診断法の開発

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。

平成 22 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。

平成 23 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、スペーサー部分の 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、イムノブロット法で 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と同様にイムノブロット法で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。

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) 電気泳動後、染色した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、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。また、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ことで、より高収率で回収できることを見出した。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) 本研究から、バイオ医薬品の製造工程にお

ける vCJD 除去能力評価について mo-vCJD PrP^{Sc} 及び WB 法を応用した方法を確立した。

これまでに利用してきた 263K 株は vCJD のモデルとして応用できることを確認した。また、タンパク質を含まない条件ではあるが、ウイルス除去膜以外に 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ブロット法で行った。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) Hashii, N., Nakazawa, S., Kawasaki, N.: Glycomics in Quality Control of Tissue-engineered Medical Products, *Yakugaku Zasshi*, 132, 489-497, 2012.
 - 3) 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).
 - 4) 〇柚木 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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
 - 7) Sakudo, A., Onodera, T., Shitani, H., and Ikuta, K.: Dengue virus presence and surveillance in Okinawa. *Exp. Ther. Med.*, in press.
 - 8) 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.
 - 9) 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.* 102, 93-99, 2012 (Jul 22, 2011).
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Puiprom, O., Yamashita, A., Sasayama, M., Limkittikul, K., Jitmitraphap, 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Suzuki, Y., and Ikuta, K.: The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends Microbiol.* 20, 11-20, 2012.
- 25) 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.
- 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) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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-naïve Thai patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 41, 347-357, 2010.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) Yamashita, A., Kawashita, N., Kubota-Koketsu, R., Inoue, Y., Watanabe, Y.,