

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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

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  $\mu$ g アプライし、Laemmli 法により 20 mA  $\cdot$  80 min 分離した。

### ① 固定化ゲルの SYPRO Ruby 染色

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

### ② 未固定ゲルの SYPRO Ruby 染色

泳動後のゲルに SYPRO Ruby 染色液を加え、

以下の条件で染色操作を行った。

電子レンジ (30 sec)  $\rightarrow$  振盪 (室温  $\cdot$  30 sec)

電子レンジ (15 sec)  $\rightarrow$  振盪 (室温  $\cdot$  30 sec)

電子レンジ (15 sec)  $\rightarrow$  振盪 (室温  $\cdot$  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  $\mu$ 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  $\mu$ l 加え、マイクロチューブ攪拌機を用いて一晩室温で振盪した。10,000 $\times$ g で 5 min 遠心した後、上清を新たなタンパク低吸着マイクロチューブに回収した。再びゲル粉碎物に等量の抽出液を加え、攪拌した後、10,000 $\times$ g で 1 min 遠心した。上清を同じチューブに回収し、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて乾燥させた後、さらに 500  $\mu$ l のミリ Q 水を加えて攪拌し、凍結乾燥機を用いて再び乾燥させた。

## 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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°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。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。

### 4. 還元化糖鎖の調製

回収した糖鎖に、水 100  $\mu$ l、及び 0.5 M NaBH<sub>4</sub> 100  $\mu$ l を加え、室温で 2 時間放置した。氷冷下、4 M AcOH 30  $\mu$ l 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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)

組織プラスミノージェンアクチベータ (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 3 $\mu$ )

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  $\mu$ 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 $\mu$ )

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  $\mu$ 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%

### 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) 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  $\mu$ g 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. 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 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、アプライン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  $\mu\text{g}$  のフェツインを 5-20% グラジエントゲルにアプラインし、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 3 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。

## 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 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  $\mu\text{g}$  を 5-20% グラジエントゲルにアプラインし、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 4)。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 5)。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  $\mu\text{g}$  および 5  $\mu\text{g}$  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6)。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7)。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。

### 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る。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<sub>4</sub>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8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9)。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8とほぼ同様の糖鎖プロファイルを得ることができた。

刷り

#### D. 結論

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。

#### 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.
- 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)

##### 2. 学会発表

- 14) 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
- 15) 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
- 16) 中澤志織, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナ

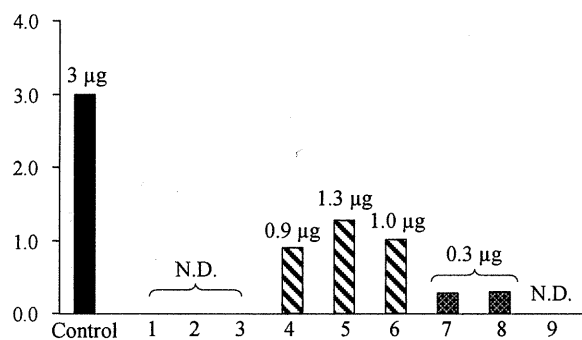
ナ: ヒトインスリンアナログ製剤の水素/重  
水素交換反応性と薬物動態の相関性.  
第 11 回 日本蛋白質科学会年会 (2011.  
6) 大阪

**G-1.**

実用新案登録 なし

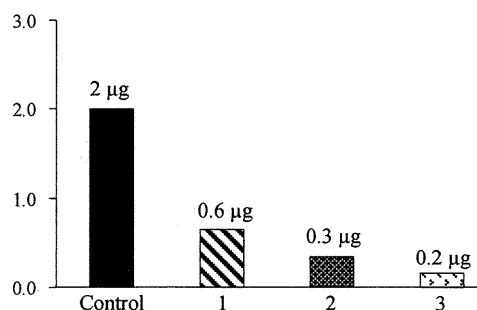
**G-2.**

その他 該当事項なし



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

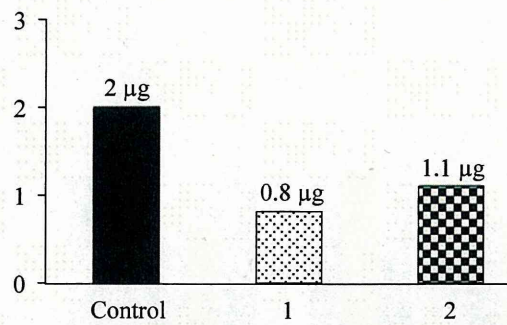
図1 クーマシーブルー染色ゲルからのフェツイン (3 µg) 回収率



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

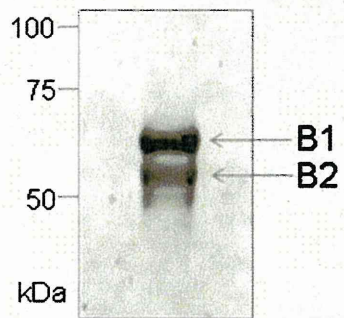


図 4 フェツインの SDS-PAGE 像

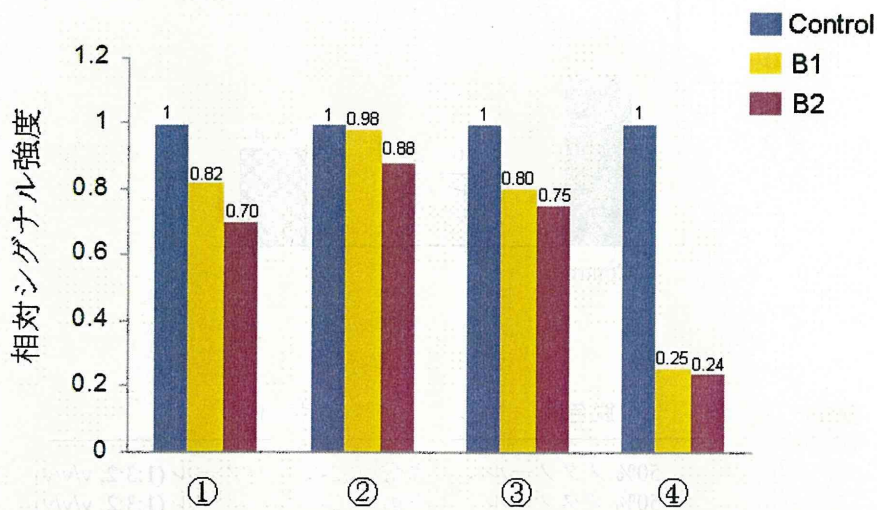


図5 抽出用緩衝液の最適化.

①~④: 抽出用緩衝液; Cy5 標識した 5  $\mu$ g/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.

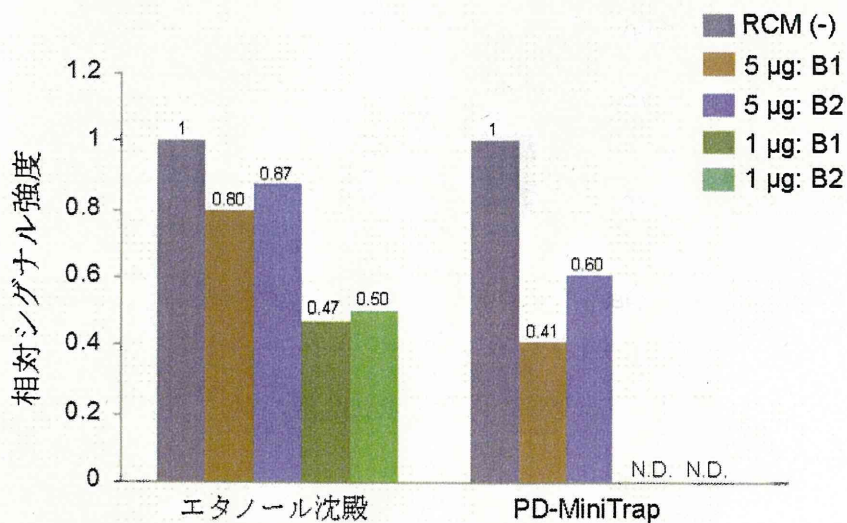


図6 RCM 後脱塩操作の影響.

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.

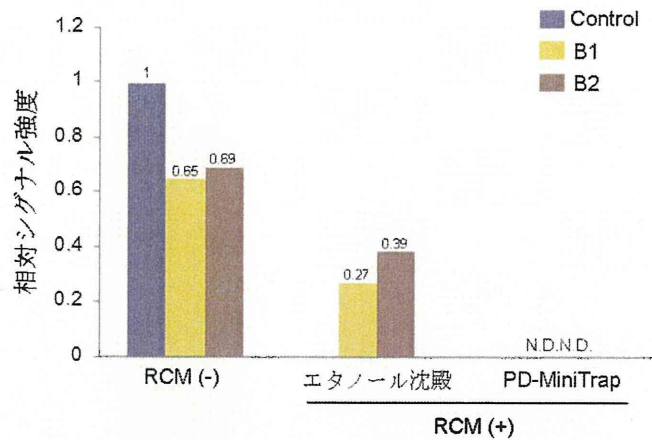


図7 抽出法の最適化.

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  $\mu$ g/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

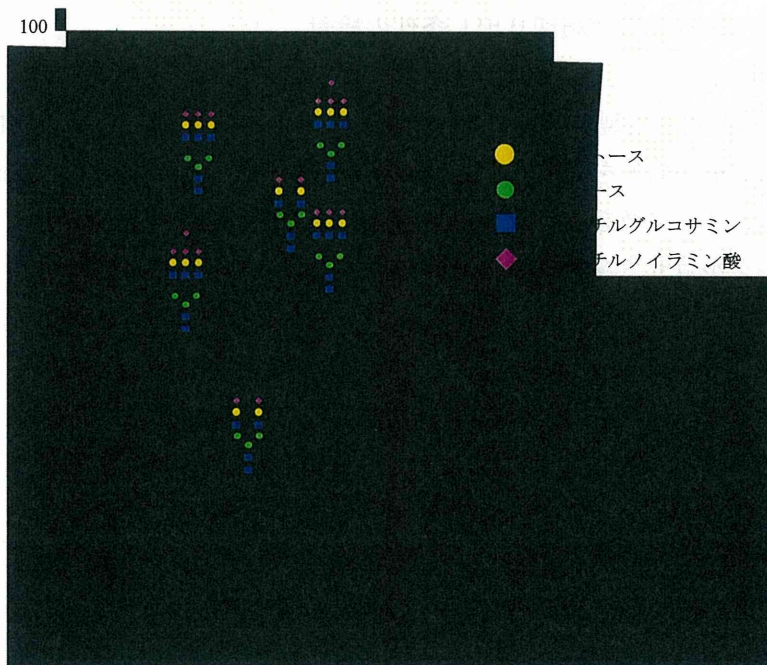


図8 LC/MSにより得られた還元アルキル化フェツイン由来 N-結合型糖鎖のプロファイル(ポジティブイオンモード)

糖鎖

図9 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

試料	固定	染色	脱色液	抽出液	回収率
3 $\mu$ 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 $\mu$ 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

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. アクリルアミドゲルからの抽出用緩衝液



厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）  
（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手法及び  
プリオン除去工程評価に関する研究（H22（H23）-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  
研究協力者 株式会社ベネシス 柚木 幹弘、坂井 薫、久保 純

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。15nm の孔径を有するウイルス除去フィルターは、mo-vCJD においても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、高いプリオン除去能を示した。
- ③ 上記プリオン材料を用いてプリオン吸着担体の探索を行った。電気的な吸着特性を有するフィルターや樹脂は溶液の組成に依存するものの、ハムスター馴化スクレイピー263K 株と同様に mo-vCJD の除去（吸着）傾向を示した。これにより、孔径依存型のウイルス除去膜に加え、異なる機作を有するプリオン除去に有効なデバイスを見いだした。

A. 研究目的

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は、安全な医薬品製造において重要な課題である。本研究では、マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いた in vitro 評価手法を確立する為に、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（除去）実験、③電気的吸着特性をもつデバイスを用いた除去実験をウエスタンブロット (WB) 法により実施した。更に培養細胞を用いた感染価測定法確立の為に④正常 PrP (PrP<sup>C</sup>) 高発現細胞のスクリーニングと、この細胞への mo-vCJD 感染実験を実施した。

B. 研究方法(2010)

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 (PrP<sup>res</sup> 材料) の調製を行った (Fig. 1)。濃縮法として、超遠心(150,000×g)、TCA 沈殿、メタノール沈殿法を組み合わせると 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<sup>c</sup> 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<sup>res</sup> を検出する Western blotting (WB)法条件の最適化を行った。

② 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 ウィルスろ過 (Planova15N、

旭化成メディカル製；平均孔径 15 nm) よるろ過前後の PrPres 量を WB 法により測定して PrPres 除去能力を評価した。

③上記のプリオン材料を PBS に懸濁し、電荷をもつろ過膜であるデプスフィルター (Zeta plus 90LA) およびエンドトキシン吸着フィルター (Mustung E) を用いてろ過実験を行った。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<sup>C</sup> 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 PrPres を PBS に添加し、PEI ビーズ処理前後液での PrPres 量を WB 法により測定し PrPres 除去効果を評価した。

④SjL/OlaHsd (Ola) マウス脾臓幹細胞由来 PrP<sup>C</sup> 発現細胞 (SP-SC) をモノクローン化し PrP<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 高発現株に mo-vCJD を感染させ 5 回継代後の PrPres 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 (Fig. 2)。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。

②mo-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 PrPres 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 PrPres は検出限界以下にまで除去されなかった (Table 1)。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 PrPres の除去能力を評価したところ、それぞれ  $\geq 3.5$ 、 $\geq 3.1 \log_{10}$  の除去能力 (リダクション値) を示した (Table 2)。

③電気的な吸着特性を有するろ過膜 (Zeta plus 90LA および Mustung E) については 15nm の孔径を有する膜と同様の PrPres 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<sup>C</sup> 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<sup>C</sup> 吸着能力が高かった (Fig. 3)。更に mo-vCJD PrPres を用いて検討したところ、MW 70,000 Br PEI ビーズに PrPres 吸着効果が認められた (Table 3)。

④SjL/OlaHsd (Ola) マウス脾臓由来 PrP<sup>C</sup> 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 (Fig. 4)。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 Pr<sup>Pres</sup> 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。

#### D. 考察

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 Pr<sup>Pres</sup> 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の評価したが、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。

#### E. 結論

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 Pr<sup>Pres</sup> 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。

#### F. 健康危険情報

特筆する情報なし

#### G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

##### 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 2011; 18(4): 142-150.

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.

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

Sakudo, A., Onodera, T., Shitani, H., and Ikuta, K.: Dengue virus presence and surveillance in Okinawa. Exp. Ther. Med., in press.

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.



- 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).
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ellakany, H.F., Kawashita, N., Mizuike, R., Hiramatsu, H., Sriwilajaroen, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

○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.

Pitaksajjakul, P., Lekcharoensuk, P., Uparagarin, N., Barbas, C.F., 3<sup>rd</sup>., 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., Isarangura-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<sub>AE</sub> 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 Ca<sup>2+</sup> 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

◎Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE Safety Forum. June 2011, Barcelona, Spain.

○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)。

◎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。