

表 2. Number of appendix samples tested for disease-associated prion protein (PrPCJD) in England by birth cohorts, gender and area as at July 2011 (Positive/total, rate per million with 95% confidence intervals)*†

geographic area	Individuals born between 1941 and 1960			Individuals born between 1961 and 1985			Total from both birth cohorts
	Female	Male	Total including unknown gender	Female	Male	Total including unknown gender	
North East and North West	0/334	1/317	1/860	0/107	0/1176	0/3015	1/3875
South East Coast and South West	1/917	0/748	1/2062	0/3026	2/2841	2/7067	3/9129
West Midlands	0/109	0/89	0/198	0/318	0/357	0/676	0/874
Total	1/1360	1/1154	2/3120	0/4415	2/4374	2/10758	4/13878‡
Rate per million (95% confidence intervals)			641 (78-2314)			186 (23-671)	288 (79-738)

* The Appendix Study is an unlinked anonymous survey coordinated by the Health Protection Agency with immunohistochemical testing being conducted at two collaborating laboratories: the Department of Neurodegenerative Diseases at the UCL Institute of Neurology and the Animal Health and Veterinary Laboratories Agency. Approximately 20,000 samples will be from individuals born between 1961 and 1985 and 10,000 from those born between 1941 and 1960.

† Archived specimens from appendectomies which took place between 2000 and the present day are being included in the study. The previous IHC screening study of samples taken between 1995 and 1999 gave a prevalence estimate of 3 in 12,674 tested (237 infections per million population -- 95% CI 49-692) [4].

‡ Using the information collected by the National CJD Research and Surveillance Unit on the 175 vCJD cases to date, it is possible to conclude that the four appendices found positive in the current survey have NOT come from known vCJD cases.

持続感染細胞クローンを用いた多様な異常型プリオンの検出・評価系の確立

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 一般社団法人日本血液製剤機構 柚木 幹弘、坂井 薫、久保 純

研究要旨：

- ① Fibrinogen 製剤の製造工程に導入されている 19 nm の孔径を有するウイルス除去膜の mo-vCJD の除去能力について工程評価試験を行ったところ、効果的な vCJD 除去能力を示した。
- ② mo-vCJD 除去デバイスの探索として、Qyu Speed D (陰イオン交換能を有するフィルター)について検討した。競合阻害が発生しない条件である蛋白を含まない条件で mo-vCJD 除去能力を示した。
- ③ Fibrinogen を共存蛋白として用いて Qyu Speed D の mo-vCJD 除去能力を評価したところ、効果的な vCJD 除去能力を示した。

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 Fibrinogen 製剤に導入されている平均孔径 19 nm ウイルスろ過 (Planova20N, 旭化成メディカル製) 工程の評価をウエスタンブロット (WB) 法により行った。対象として 35 nm のウイルスろ過膜を使用した。②mo-vCJD 除去デバイスの探索として、Qyu Speed D (陰イオン交換体、QSD) について検討した。③蛋白質との相互作用を確認するためにフィブリノゲンを用いて QSD の mo-vCJD 除去効果の検討を行った。

B. 研究方法

①Fibrinogen 製剤の Planova 工程直前液に mo-vCJD 感染マウス脳から調製した *supersonicated microsomal fraction* (sMF) を添加し、Planova20N でろ過した。WB 法で工程の PrP^{res} 除去効果を評価した。比較対象として Planova 35N を用いた検討を合わせて実施した。
②PBS に mo-vCJD sMF を添加し、QSD でろ過した。ろ過前後の PrP^{res} 量を比較し除去性能を WB 法にて評価した。
③mo-vCJD の PBS 溶液を用いて QSD への吸着性を検討した。続いて Fibrinogen 溶液に mo-vCJD を添加し、QSD でろ過を行い、ろ過前後の PrPres 量を比較する事によりプリオン除去効果を確認した。QSD (bed volume, 0.6 mL) に対し 60mL の試料を

通液し、溶出液は 15 mL ずつ 4 画分に分画し測定した (F1~F4 サンプル)。

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

①Fibrinogen 製剤において Planova35N は異常プリオンの除去に効果は少なく (LRF; 1.2)、Planova20N は大きい (LRF; ≥ 3.5) ことが分かった (Fig. 1A & B, Table 1)。
②QSD はこれまでに検討した、デプスフィルターや PEI ビーズと同様に PBS 条件で mo-vCJD を吸着する事を確認した (LRF; 3.5) (Fig. 1C, Table 1)。
③Fibrinogen は QSD に対するアフィニティが低いことから、QSD に適用可能な蛋白質である事を確認した。Fibrinogen 製剤を用いた QSD の mo-vCJD 除去能力は効果が大きかった (LRF; ≥ 3.5) (Fig. 1D, Table 1) ことから、実用性が高いデバイスであると考えられた。

D. 考察

これまでに報告した工程評価試験の結果から Planova15N (膜孔径 15 nm)、Planova20N がプリオ

ン除去に有効であることが示せた。263K を用いた過去の評価試験では WB 法で PrP^{res} が検出できない場合にも感染性プリオンが確認された事例がある。今後 WB 法で感染性プリオンが検出限界以下であった工程について、*in vivo* 法 (BA 法) による評価を行う予定である。

Planova フィルターはサイズ依存的除去であり、静電相互作用による吸着などによる異なる機作の除去デバイスと組み合わせることができれば、工程の堅牢性は格段に向上する。今回、QSD もプリオン除去に効果を有する事が明らかになったことから、サイズろ過と静電相互作用による吸着除去を組み合わせたプロセスデザインの実用性が高くなった。

E. 結論

本研究から、バイオ医薬品の製造工程におけるプリオンリスク低減対策としてサイズろ過と静電相互作用による吸着除去の有用性が確認できた。しかしながら、その特性については解明すべき点が多く、様々な蛋白質を用いた更なる機作検討が必要である。

現時点では感染動物の脳由来 sMF を用いた、WB レベルでの検討であるので、培養細胞由来の PrP^{res} を用いた評価系や感染性を指標とした手法による検討・確認も必要である。また、現在は動物を用いた感染性評価手法に代わる、細胞を用いた mo-vCJD の感染性評価手法については感度向上が課題であるので、この課題の克服が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

1. 論文発表

1. Yasugi, M., Kubota-Koketsu, R., Yamashita, A., Kawashita, N., Du, A., Sasaki, T., Nishimura, M., Misaki, R., Kuhara, M., Boonsathorn, N., Fujiyama, K., Okuno, Y., Nakaya, T., and Ikuta, K.: Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. PLoS Pathogens, in press.
2. Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., and Ikuta, K.: Evolution and control of H5N1. A better understanding of the evolution and diversity of H5N1 flu virus and its host species in endemic areas could inform more efficient vaccination and control strategies. 14 : 117-122, 2013
3. 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.
4. Urayama, T., Cameron, R., Sato, T., Yunoki, M., and Ikuta, K.: Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV). Biologicals, in press.
5. Sasaki, T., Kubota-Koketsu, R., Takei, M., Hagihara, T., Iwamoto, S., Muraio, T., Sawani, K., Fukae, D., Nakamura, M., Nagata, E., Kawakami, A., Mitsubayashi, Y., Ohno, M., Uehara, Y., Fukukawa, T., Kanai, Y., Kosaka, M., and Ikuta, K.: Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: Implications for drug administration. PLoS One, in press.
6. Noda, M., Masrinoul, P., Pipattanaboon, C., Ramasoota, P., Setthapramote, C., Sasaki, T., Sasayama, M., Yamashita, A., Kurosu, T., Ikuta, K., and Okabayashi, T.: Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against dengue virus capsid protein among four serotypes. Biologics 6, 409-416, 2012.
7. Kubota-Koketsu, R., Yunoki, M., Okuno, Y., and Ikuta, K.: Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010. Biologics 6, 245-247, 2012.
8. Sakudo, A., Baba, K., and Ikuta, K.: Analysis of Vis-NIR spectra changes to measure the inflammatory response in the nasal mucosal region of influenza A and B virus-infected patients. J. Clin. Virol. 55, 334-338, 2012.
9. Sakudo, A., Baba, K., and Ikuta, K.: Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy. Clin. Chim. Acta 414C, 130-134, 2012.
10. Tian, Y.S., Verathamjamras, C., Kawashita, N., Okamoto, K., Yasunaga, T., Ikuta, K., Kameoka, M., and Takagi, T.: Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations. J. Mol. Model, in press.

11. Li, Y.G., Siripanyaphinyo, U., Tumkosit, U., Noranate, N., A-Nuegoonpipat, A., Kurosu, T., Ikuta, K., Takeda, N., and Anantapreecha, S.: Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology*. 56, 6-12, 2013.
12. Kubota-Koketsu, R., Yunoki, M., Okuno, Y., and Ikuta, K.: Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010. *Biologics* 6: 245-247, 2012.
13. Hirai, I., Ebara, M., Nakanishi, S., Yamamoto, C., Sasaki, T., Ikuta, K., and Yamamoto, Y.: Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydophila) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K. *Immunobiology* 2012 Jun. 26, in press.
14. Watanabe, Y., Ibrahim, M.S., Ellakany, H.F., Kawashita, N., Daidoji, T., Takagi, T., Yasunaga, T., Nakaya, T., and Ikuta, K.: Antigenic analysis of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 sublineage co-circulating in Egypt. *J. Gen. Virol.* 2012 Jul. 12, in press.
15. Settapramote, C., Sasaki, T., Puiprom, O., Limkittikul, K., Pitaksajakul, P., Pipattanaboon, C., Sasayama, M., Leuangwutiwong, P., Phumratanaprapin, W., Chamnachanan, S., Kusolsuk, T., Jittmittraphap, A., Asai, A., Arias, J.F., Hirai, I., Kuhara, M., Okuno, Y., Kurosu, T., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423: 867-872, 2012.
16. Li, Y.G., Siripanyaphinyo, U., Tumkosit, U., Noranate, N., A-Nuegoonpipat, A., Pan, Y., Kameoka, M., Takeshi, K., Ikuta, K., Takeda, N., and Anantapreecha, S.: Poly(I:C), an agonist of toll-like receptor-3, inhibits replication of the Chikungunya virus in BEAS-2B cells. *Virol. J.* 9: 114, 2012.
17. Sakudo, A., and Ikuta, K.: A technique for capturing broad subtypes and circulating recombinant forms of HIV-1 based on anionic polymer-coated magnetic beads. *Int. J. Mol. Med.* 30: 437-442, 2012.
18. Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Omori, H., Honda, T., Horie, M., Ikuta, K., Fujino, K., Nakamura, S., Schneider, U., Chase, G., Yoshimori, T., Schwemmler, M., and Tomonaga, K.: Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* 11: 492-503, 2012.
19. Sakudo, A., Kuratsune, H., Kato, Y.H., and Ikuta, K.: Visible and near-infrared spectra collected from the thumbs of patients with chronic fatigue syndrome for diagnosis. *Clin. Chim. Acta* 413:1629-1632, 2012.
20. Ramadhany, R., Yasugi, M., Nakamura, S., Daidoji, T., Watanabe, Y., Takahashi, K., Ikuta, K., and Nakaya, T.: Tropism of pandemic 2009 H1N1 influenza A virus. *Front. Microbiol.* 3: 128, 2012.
21. Nagatani, N., Yamanaka, K., Ushijima, H., Koketsu, R., Sasaki, T., Ikuta, K., Saito, M., Miyahara, T., and Tamiya, E.: Detection of influenza virus using a lateral flow immunoassay for amplified DNA by a microfluidic RT-PCR chip. *Analyst* 137: 3422-3426, 2012.
22. Boonsathorn, N., Kanai, Y., Punjampa, J., Bai, G., Chittaganpitch, M., Petphuwadee, U., Jampangern, W., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., and Teerasut, C.: Neutralization titers against influenza A (H3N2) and influenza B viruses among a non-vaccinated population from Thailand. *Southeastern Asian J. Trop. Med. Public Health* 43, 674-679, 2012.
23. 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.
24. 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 in Japan between 2009-2010. *PLoS One* 7, e30946, 2012.
25. Sakudo, A., Sukanuma, 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* 413, 467-472, 2012.

26. Sakudo, A., Onodera, T., Shitani, H., and Ikuta, K.: Dengue virus presence and surveillance in Okinawa. *Exp. Ther. Med.* 3, 15-17, 2012.

2. 学会発表

1. ○久保 純、高橋 一恵、古木 理恵、上平 崇、大久保 祐士、浦山 健、服部 眞次、坂井 薫、柚木 幹弘. アルブミン製剤の製造工程におけるウイルス・プリオンの不活化／除去効果の評価. 第36回血液事業学会(2012.10.17-19, 仙台)
2. ○坂井 薫、服部 眞次、高橋 一恵、古木 理恵、大久保 祐士、上平 崇、久保 純、浦山 健、柚木 幹弘. フィブリノゲン製剤の製造工程における各種感染性病原体の不活化／除去の評価. 第36回血液事業学会(2012.10.17-19, 仙台)
3. ○久保 純、上平 崇、坂井 薫、Larisa

Cervenakova、柚木 幹弘、萩原 克郎、生田 和良. バイオ医薬品の製造工程におけるマウス馴化型 vCJD 株とハムスター馴化型 Scrapie 株の挙動. 第60回日本ウイルス学会学術集会 (2012.11.13-15, 大阪)

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：

本研究の一部は一般社団法人日本血液製剤機構 (旧 株式会社ベネシス) との共同研究として実施した。本研究に用いた mo-vCJD は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。

Fig. 1

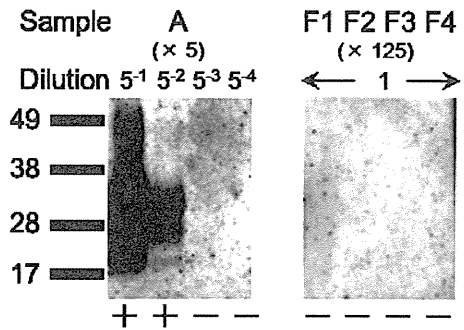
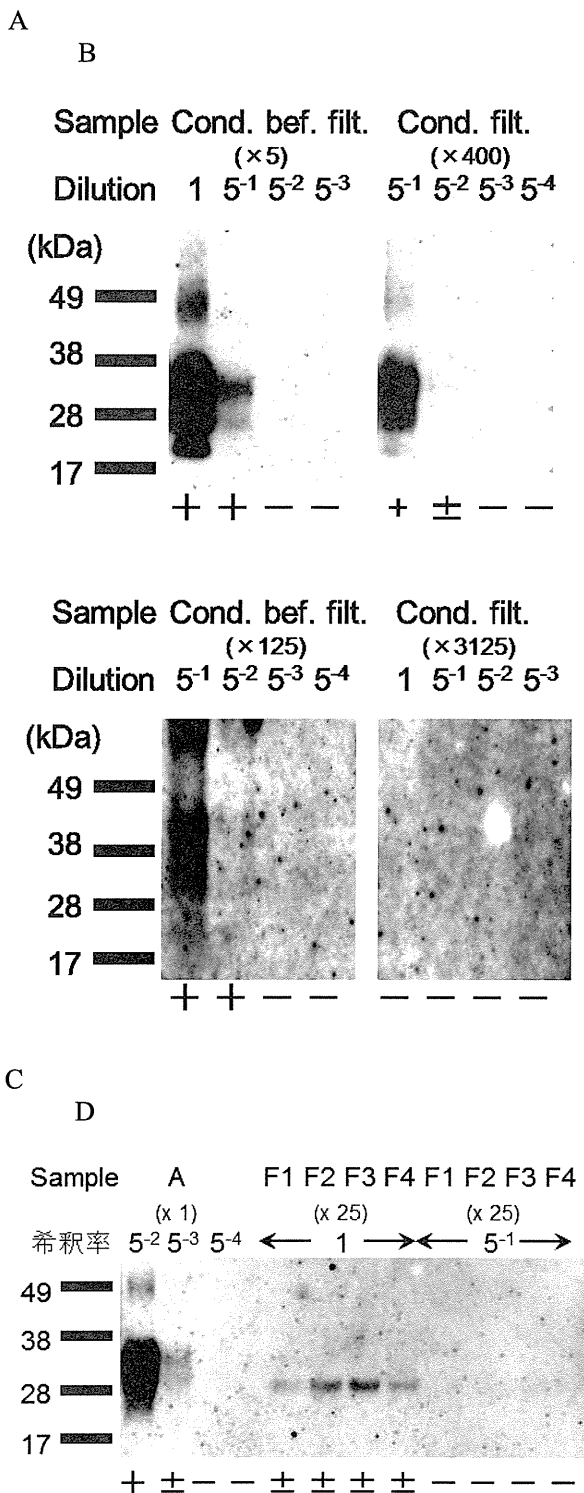


Fig. 1 サイズ依存型と静電相互型フィルターによる工程評価の WB 測定結果。A; Fibrinogen、Planova35N の結果。B; Fibrinogen、Planova20N の結果。C; PBS、QSD の結果。D; Fibrinogen、QSD の結果。

工程前液 (A サンプル) と工程後液 (F サンプル) の PrP^{res} の Western Blotting。QSD (bed volume、0.6 mL) については試料 60mL を通液し、その溶出液 15 mL ずつを 4 画分に分画し測定した (F1~F4 サンプル)。

Table 1 サイズ依存型と静電相互型フィルターによるプリオン除去効果

Filter	P35 N	P2 0N	QSD	
	Fibrinogen	PBS	Fibrinogen	
Preparation				
Before filtration	2.7	2.6	5.2	3.2
Filtrate	1.5	<0.9	1.7	<0.3
LRF	1.2	≥ 3.5	3.5	≥ 3.5

サイズ依存型フィルターとして Planova 35N (孔径 35 nm) と Planova 20N (孔径 19 nm) を評価した。静電相互型フィルターとしては QSD を用いて、それぞれ評価した。数値は LRF: Log reduction factor, 除去係数を示し、WB 法 (半定量法) による minimum detectable dilution から算出した。

異常型プリオンの *in vivo* 検出系の評価に関する研究

分担研究者 酪農学園大学獣医学群獣医学類 教授 萩原 克郎

研究協力者 一般社団法人日本血液製剤機構 柚木 幹弘、坂井 薫、久保 純、大久保 祐士

研究要旨：

- ① マウス馴化型 vCJD 感染細胞よりプリオン材料を抽出したプリオン材料を 1 日齢マウスの脳内接種し、体重の変化を観察した。接種後約 150 日から体重減少が観察され、発症（異常行動）が認められたマウス脳からは異常型プリオン蛋白が検出され、脳組織には空胞変性が観察された。
- ② これらのことから、マウス馴化型 vCJD 感染細胞由来のプリオン材料も脳乳剤由来材料と同様に *in vivo* 評価系に適用可能であることが明らかになった。

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。これまでに、マウス馴化 vCJD (mo-vCJD) 株を用いた *in vivo* 評価手法について検討したが、今年度は mo-vCJD に感染した培養細胞由来の PrP^{res} を用いた *in vivo* 評価手法を確立するために①培養細胞からの PrP^{res} 調製法の検討、②調製した培養細胞由来 PrP^{res} を用いたモデルマウスの発症期間の検討を行った。

B. 研究方法

(1) 培養細胞からの PrP^{res} 調製法の検討：

細胞はこれまでに株化した mo-vCJD の持続感染細胞 MV63 を用いた。また、対照細胞は正常 PrP を発現した bSP-SC_148 を用いた。細胞培養は 5% CO₂、37°C 条件下、10%FBS/BLGM 培地 (2 mM L-Glutamine, Antibiotic-antimycotic, 2-mercapto ethanol 含有 IMDM) にて約 1 週間 Confluent まで培養した。得られた細胞について、細胞破碎を目的とした凍結融解を 2 回繰り返し、超音波処理を行ったのち、PBS を用いて 5 x 10⁷ cells/ml 相当となるように調整し、細胞抽出画分とした。

(2) 培養細胞由来 PrP^{res} のマウス脳内接種と発症期間の検討：

培養細胞由来 vCJD 感染モデルの作出は、mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤 (1%及び 5%) に相当する細胞抽出画分を、生後 1 日齢の FVB/n

mouse に上記乳剤を脳内接種 (10 µL/head) した。接種後 29 dpi (day post infection) に発症前の動物を各群 n=1 で剖検した後、残りの個体はすべて瀕死状態 (Terminal ill、以下 TI) まで観察した。

①発症時サンプル：接種後、臨床所見 (異常行動、体重減少) を観察し、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^{res} を WB 法で検出した。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、空胞変性について病理学的評価を実施し、それぞれ (-) から (++) 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 1 日齢マウスに脳乳剤を接種した実験結果と比較した。

倫理面への配慮。倫理面への配慮。プリオン感染サンプルは酪農学園大学病原体等安全管理委員会の規定 (共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定) に従い取り扱った。動物実験は酪農学園大学動物実験指針の規定 (共同研究先での実施に当たってはその施設の委員会の規定) に従い実施した。

C. 研究成果

(1) 感染実験に用いた細胞抽出画分の PrP^{res} 量を半定量的 WB 法で確認した結果、5 x 10⁷ cell/ml 相当の PrP^{res} 量は 1% mo-vCJD と同等であった (図 1)。

(2) 培養細胞由来 PrP^{res} のマウス脳内接種と発症期間の検討：

1% mo-vCJD 感染マウス由来の脳乳剤及びこれに相当するを細胞抽出画分(5×10^7 cells/ml)をそれぞれ 30 μ l 接種した動物の TI までの期間はそれぞれ 173 dpi 及び 191 dpi であった。また、5%相当の結果はそれぞれ 166 dpi 及び 196 dpi であり、細胞抽出画分を接種された動物の方が 20~30 日 TI までの期間が短かった。

細胞抽出画分及び脳乳剤を接種した動物の体重を観察したところ、細胞画分を接種した動物は 140 dpi 付近から体重減少が認められ、脳乳剤を接種した動物は 170 dpi 付近から体重減少が認められた(図 2)。

感染動物の脳中 PrP^{res} 量を定量したところ、細胞抽出画分を接種した動物においても脳乳剤を接種した動物と同様の PrP^{res} が脳内に蓄積し、その蓄積量は 大脳 > 中脳・延髄 > 小脳の順であった。

この脳の各部位における空胞変性について観察したところ、異常行動を示した個体は全て脳中から PrP^{res} の検出及び空胞変性が確認された(表 1、図 3)。

D. 考察

バイオ医薬品や血漿分画製剤の製造工程におけるプリオンの安全性評価は感染した動物の脳から調製したマイクロソーム画分を使用するのが一般的である。これは高力価のプリオン材料を得るためには脳組織が最適な部位であることに由来する。これらの製剤は培養細胞や血漿が発原原料であり、そこに混入する可能性のある性状を伴ったプリオン材料を用いるのが理想的である。これまでにスクレイパー株に代る mo-vCJD 株を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 評価系を検討、確立した。

今年度はこの細胞由来のプリオン材料を用いた *in vivo* 評価手法の確立を試みたところ、脳乳剤接種と同様に観察しやすい項目として体重減少、剖検後の項目として脳中 PrP^{res} 検出、空胞変性観察が指標として利用できることが確認できた。

E. 結論

細胞由来の PrP^{res} 材料を用いた *in vivo* 評価手法の確立を試みたところ、脳乳剤接種と同様の所見を示すことが確認できた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表 (○は本科研費に直接関係する論文)

1. 論文発表

1. Hagiwara K, Ando T, Koiwa M. The Influence

of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. J Vet Med Sci. 2012 29; 74(4): 419-421.

2. Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around pig farm. BMC Res Notes. 2012 Jan 5; 5(1): 4.

3. Hagiwara K, Kawami S., Kato-Mori Y., Kubota-Koketsu R., Tsujikawa M., Urayama T., Yunoki M., Takahashi K., Ikuta K. Protective Role of Human Intravenous Immunoglobulin from Influenza A Virus Infection in Mice. The Open Hematology Journal, 2012, 6, 8-11

2. 学会発表

1. ○久保 純、高橋 一恵、古木 理恵、上平 崇、大久保 祐士、浦山 健、服部 眞次、坂井 薫、柚木 幹弘. アルブミン製剤の製造工程におけるウイルス・プリオンの不活化/除去効果の評価. 第 36 回血液事業学会 (2012.10.17-19, 仙台)

2. ○坂井 薫、服部 眞次、高橋 一恵、古木 理恵、大久保 祐士、上平 崇、久保 純、浦山 健、柚木 幹弘. フィブリノゲン製剤の製造工程における各種感染性病原体の不活化/除去の評価. 第 36 回血液事業学会 (2012.10.17-19, 仙台)

3. ○久保 純、上平 崇、坂井 薫、Larisa Cervenakova、柚木 幹弘、萩原 克郎、生田 和良. バイオ医薬品の製造工程におけるマウス馴化型 vCJD 株とハムスター馴化型 Scrapie 株の挙動. 第 60 回日本ウイルス学会 学術集会 (2012.11.13-15, 大阪)

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：

本研究の細胞培養に関する一部の研究は一般社団法人日本血液製剤機構 (旧 株式会社ベネシス) との共同研究として実施した。本研究に用いた細胞株 (MV63 及び bSP-SC_148) は米国赤十字社 Dr. Larisa Cervenakova より分与された。

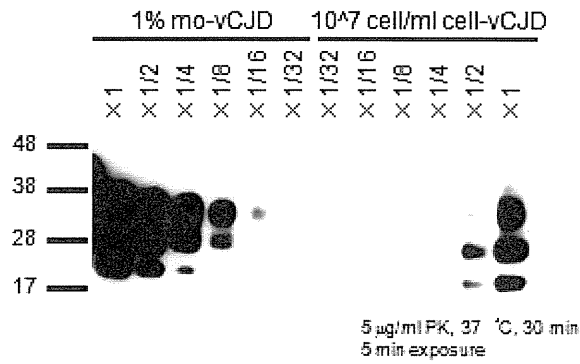


図1. 細胞抽出画分と1%脳乳剤の PrP^{res} 量の相関

接種実験に用いた細胞抽出画分の1%脳乳剤のWB法によるシグナル強度を比較したところ、16倍希釈した1%脳乳剤と、4倍希釈した細胞抽出画分の強度がほぼ同じであり、1%脳乳剤1 mLに相当する細胞数は 5×10^7 cell/ml = 1% mo-vCJD であった。

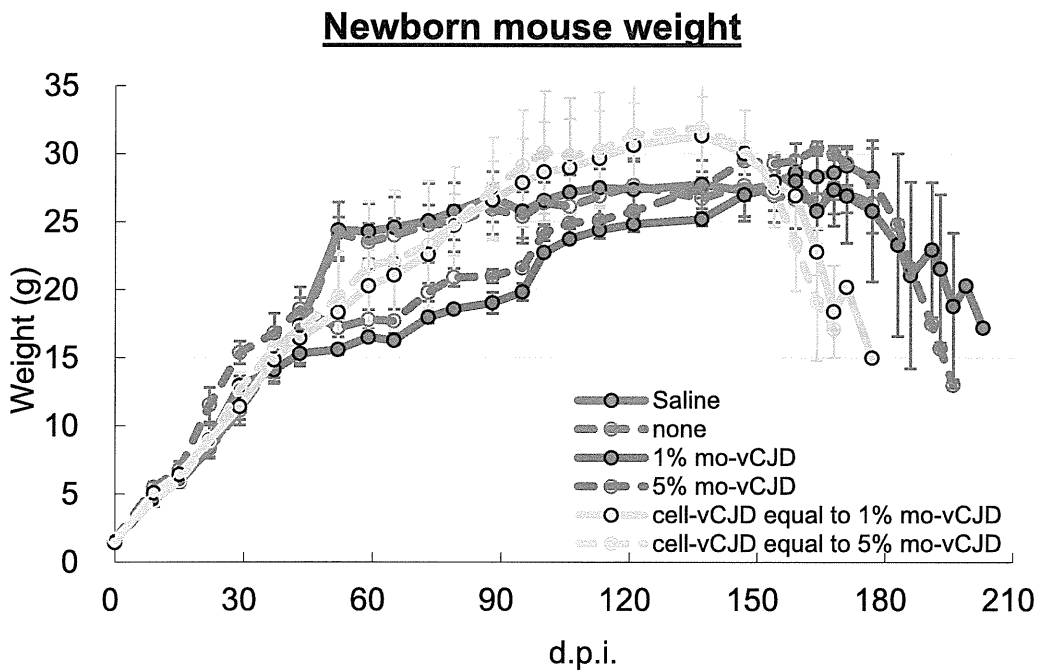


図2. 細胞抽出画分と脳乳剤を接種した動物の体重変化

表1. 細胞抽出画分と脳乳剤を接種した動物における脳の空胞変性、臨床症状発現及びウェスタンブロット測定結果

1% mo-vCJD接種群における結果

	接種群		1% mo-vCJD			
	dpi	29	187	197	204	
空胞変性の発現	動物No.	#2-1	#2-2	#2-3	#2-4	
傍終末体		-	++	++	++	
大脳皮質(前正中線)		-	+	+	+	
視床下部		-	+	++	+	
視床		-	+	+	+	
海馬		-	+	+	+	
大脳皮質(後正中線)		-	+	+	+	
中脳蓋		-	+	+	+	
延髄		-	+	++	+	
小脳		-	+	+	+	
行動異常*の発現日(dpi)		ND	171	191	203	
ウェスタンブロット測定		Negative	Positive	Positive	Positive	

-: 変化なし (no remarkable changes) ±: 軽微 (slight)
 +: 軽度 (mild) ++: 中等度 (moderate) ND: 発現せず
 *: 粗毛、うずくまり(沈鬱状態)、歩行異常(主に軽度で後肢に発現)

5% mo-vCJD接種群における結果

	接種群		5% mo-vCJD		
	dpi	29	197	197	
空胞変性の発現	動物No.	#2-5	#2-6	#2-8	
傍終末体		-	NT	++	
大脳皮質(前正中線)		-	NT	+	
視床下部		-	NT	+	
視床		-	NT	+	
海馬		NT	NT	+	
大脳皮質(後正中線)		-	NT	+	
中脳蓋		-	NT	+	
延髄		-	NT	+	
小脳		-	NT	+	
行動異常*の発現日(dpi)		ND	191	191	
ウェスタンブロット測定		Negative	Positive	Positive	

-: 変化なし (no remarkable changes) ±: 軽微 (slight)
 +: 軽度 (mild) ++: 中等度 (moderate) NT: 観察エリアが確認できない、あるいは自己融解のため検査できず
 ND: 発現せず *: 粗毛、うずくまり(沈鬱状態)、歩行異常(主に軽度で後肢に発現)

1% cell-vCJD接種群における結果

	接種群		1% cell-vCJD			
	dpi	29	168	170	180	
空胞変性の発現	動物No.	#3-1	#3-2	#3-3	#3-4	
傍終末体		-	++	++	++	
大脳皮質(前正中線)		-	+	+	+	
視床下部		-	+	+	+	
視床		-	+	+	+	
海馬		-	+	+	+	
大脳皮質(後正中線)		-	+	+	+	
中脳蓋		-	+	+	+	
延髄		-	+	+	+	
小脳		-	+	+	+	
行動異常*の発現日(dpi)		ND	164	154	171	
ウェスタンブロット測定		Negative	Positive	Positive	Positive	

-: 変化なし (no remarkable changes) ±: 軽微 (slight)
 +: 軽度 (mild) ++: 中等度 (moderate) ND: 発現せず
 *: 粗毛、うずくまり(沈鬱状態)、歩行異常(主に軽度で後肢に発現)

5% cell-vCJD接種群における結果

	接種群		5% cell-vCJD		
	dpi	29	168	164	
空胞変性の発現	動物No.	#3-7	#3-5	#3-6	
傍終末体		-	++	++	
大脳皮質(前正中線)		-	+	+	
視床下部		-	+	+	
視床		-	+	+	
海馬		-	+	+	
大脳皮質(後正中線)		-	+	+	
中脳蓋		-	+	+	
延髄		-	+	+	
小脳		-	+	+	
行動異常*の発現日(dpi)		ND	154	154	
ウェスタンブロット測定		Negative	Positive	Positive	

-: 変化なし (no remarkable changes) ±: 軽微 (slight)
 +: 軽度 (mild) ++: 中等度 (moderate)
 ND: 発現せず *: 粗毛、うずくまり(沈鬱状態)、歩行異常(主に軽度で後肢に発現)

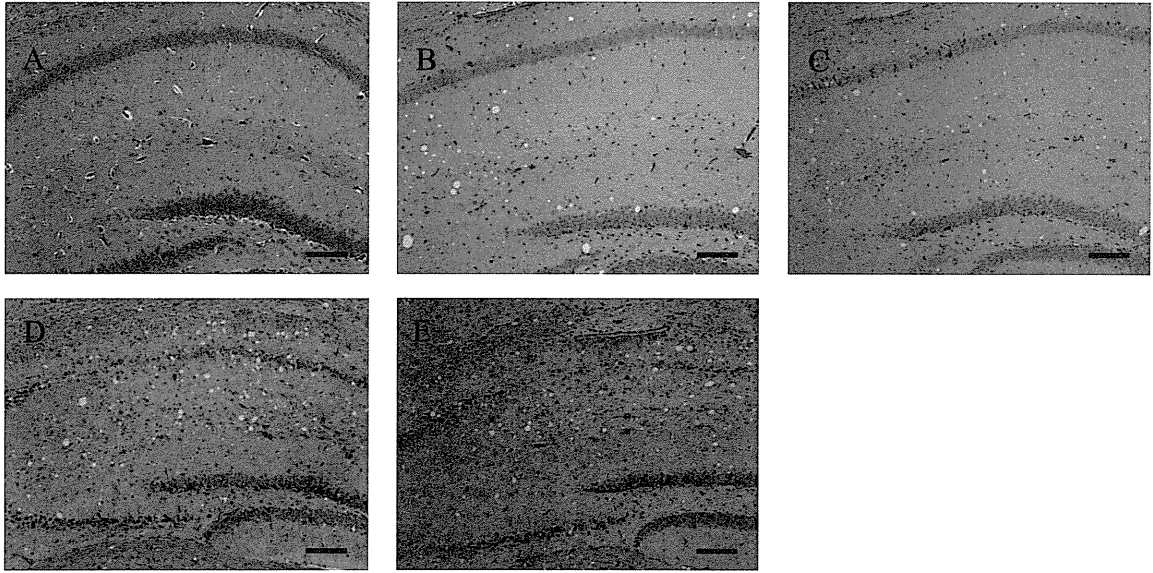


図3. 細胞抽出画分あるいは脳乳剤を接種したマウス脳における病理組織像 (HE 染色, Bar=100µm)

B, C, D, E の海馬領域に空胞変性が認められる

A; Saline 接種 (#1-1, Control), B; 1% mo-vCJD 接種 (#2-3), C; 5% mo-vCJD 接種 (#2-8)

D; 1% cell-vCJD 接種 (#3-2), E; 5% cell-vCJD 接種 (#3-6)

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 菊池裕

研究要旨

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

ヒトPrPのN端側43残基のセリン(S43)がPrP^{Sc}形成の初期段階にリン酸化S43 (pS43)に変化する知見から、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を認識する抗体産生ハイブリドーマ3株を樹立した。調製したマウス腹水からプロテインAで精製して得られたIgG画分を用いてイムノプロット法を行うと、抗プリオン蛋白質抗体6H4が認識する二量体の正常型プリオン蛋白質(PrP^C)に相当するバンドを示したが、単量体のPrP^Cは認識しなかった。一方、PrP^{Sc}に対する反応性はPrP^Cに比較して低く、これらの抗体は両者を見分けることができた。

これらの研究成果はPrP^{Sc}やBSE罹患ヒツジ試料を用いた解析等への応用が期待され、今後はPrP^{Sc}のマウス脳内投与による伝達実験を行い、感染初期でのPrP^{Sc}検出法確立等への利用を試みる。

A. 研究目的

人のプリオン病には硬膜移植等によって発症した感染性CJD、プリオン(PrP)遺伝子(PRNP)にコードされた253残基のアミノ酸に変異がある遺伝型CJD及びPRNPに変異のない散発型CJDが知られ、約85-90%を散発型CJDが占めている。一方、1996年に英国で発症が確認された変異型CJDは、従来の散発型CJDとは異なって若年性の患者で発症し、異常型プリオン蛋白質(PrP^{Sc})の生化学的研究及び英国で多発していた牛海綿状脳症(BSE)に関する疫学研究から、ウシPrP^{Sc}が人へ伝達して発症すると考えられている。また、輸血によって変異型CJDを発症したと推定される症例が報告されており、血液を介したCJDの伝達が注目を集めている。多くの遺伝子組換え医薬品等の製造工程ではウシ胎児血清を用いることから、医薬品へのPrP^{Sc}汚染を防ぐために、ウシ由来原材料中のPrP^{Sc}測定法の確立が望まれている。

本研究は PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体を作製し、新たな検出法の開発を目的とする。スクレイピー(Obihiro 株)を ICR マウスの脳内に投与して増幅された PrP^{Sc} を抗原とし、マウスを免疫し、正常型ではなく PrP^{Sc} を特異的に認識する抗体の作製を行う。

最近、PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のセリン(S43)をリン酸化すると、PrP^{Sc}への立体構造変化が促進されることが報告された(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。PrP^{Sc}が形成される初期にリン酸化S43 (pS43)への変換が予測され、pS43を含む周辺のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体は、プリオン病の早期診断への利用が

期待される。

これらの知見をもとに、ヒトPrPのN端側43残基Serがリン酸化されたプリオンペプチドを架橋剤SPDPを用いて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を調製し、免疫したマウス(BALB/c)から調製した脾細胞を用いて細胞融合を行い、リン酸化プリオンペプチドを特異的に認識する3種類のモノクローナル抗体(mAb)を得た。

本年度はこれらの抗体の特異性をELISAやイムノプロット法で調べ、正常マウス脳及びPrP^{Sc}感染マウス脳に対する反応性を比較した。

B. 研究方法

1. 抗リン酸化セリンプリオン蛋白質抗体の調製
プリオン蛋白質の43残基リン酸化セリン(pS43)を認識する抗体産生ハイブリドーマ3株をBALB/cマウスに移植して得られた腹水を硫酸分画後、プロテインAカラムで精製し、IgG画分を得た。pS43に対する反応性の比較は、ペプチドを架橋剤MBSでウシ血清アルブミン(BSA)に結合させたpS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 1A)又はhPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (Fig. 1B)を固相抗原として用いたELISAで行った。

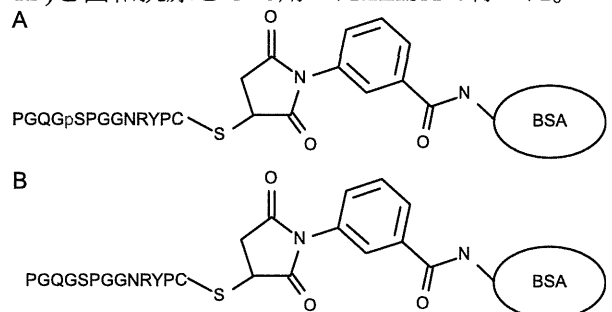


Fig. 1. Schematic diagram of antigens.

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。

3. Proteinase K処理

脳乳液(蛋白質50 µg相当)に4倍量のメタノールを加えて-20°C下に保存し、遠心分離で得られた画分を溶解後、Proteinase K (PK)で消化(50 µg/ml, 37°C, 30分間)した。

4. PNGase F処理

脳乳液(蛋白質50 µg相当)を1.25% NP-40で変性後、PNGase Fで処理(0.77 mU, 37°C, 3時間)で糖鎖を除去した。

5. イムノブロット法

試料をSDS-PAGEで分離後にPVDF膜へ転写し、第1抗体として抗PrP抗体6H4 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)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・遺伝子解析に関する倫理指針」、「国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会規定」、「同病原体等安全管理規程」、「同動物実験に関する指針」及び「同遺伝子組換え実験安全管理規則」を遵守した。

C. 研究結果

1. 抗pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIPモノクローナル抗体の比較

先に樹立したハイブリドーマ3株から腹水を

Table 1. 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*		比率
		リン酸化プリオンペプチド	プリオンペプチド	
pSP240	κ, γ2b	2,941	2,000	1.5
pSP279	κ, γ2b	2,500	294	8.5
pSP289	κ, γ2b	1,111	233	4.8

*IgG 200µg/ml

調製後、プロテインAカラムでIgG画分を精製し、pS43を特異的に認識する抗体pSP240、pSP279及びpSP289を得た。抗体のアイソタイプは、3株ともIgG (κ, γ2b)だった(Table 1)。

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(Fig. 2, Table 1)。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8.5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4.8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1.5で、特異性は低かった。

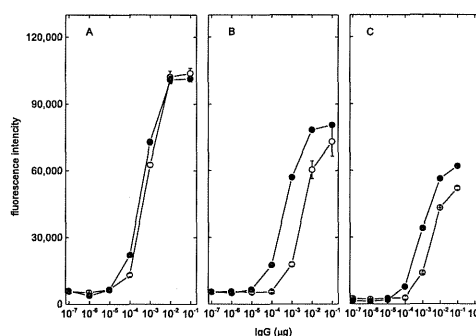


Fig. 2. Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.

2. イムノブロット法によるpS43-PrP^{Sc}の検出

抗体のリン酸化PrPに対する特異性は、正常及びPrP^{Sc}感染マウス脳乳液を用いたイムノブロット法で調べた。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(Fig. 3)。抗プリオン蛋白質抗体6H4を用いたイムノブロット法(Fig. 3A-C., upper panel)は、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 3)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。脳乳液をPK処理すると、対象脳ではバンドが消失するが(lane 2)、PrP^{Sc}感染脳ではPrPのN端側が消化されたPK処理耐性のPrP^{Sc}が低分子側にバンドを示した(lane 3)。一方、抗pS43-hPrP mAbのイムノブロット法(Fig. 3A-C., upper panel)では、対象脳の単量体を認識せず、2量体PrPに相当するバンドを認識した(lane 1)。PrP^{Sc}の認識は対象脳より弱く(lane 3)、N端側が消化される

PK処理ではバンドが消失した(lanes 2 and 4)。

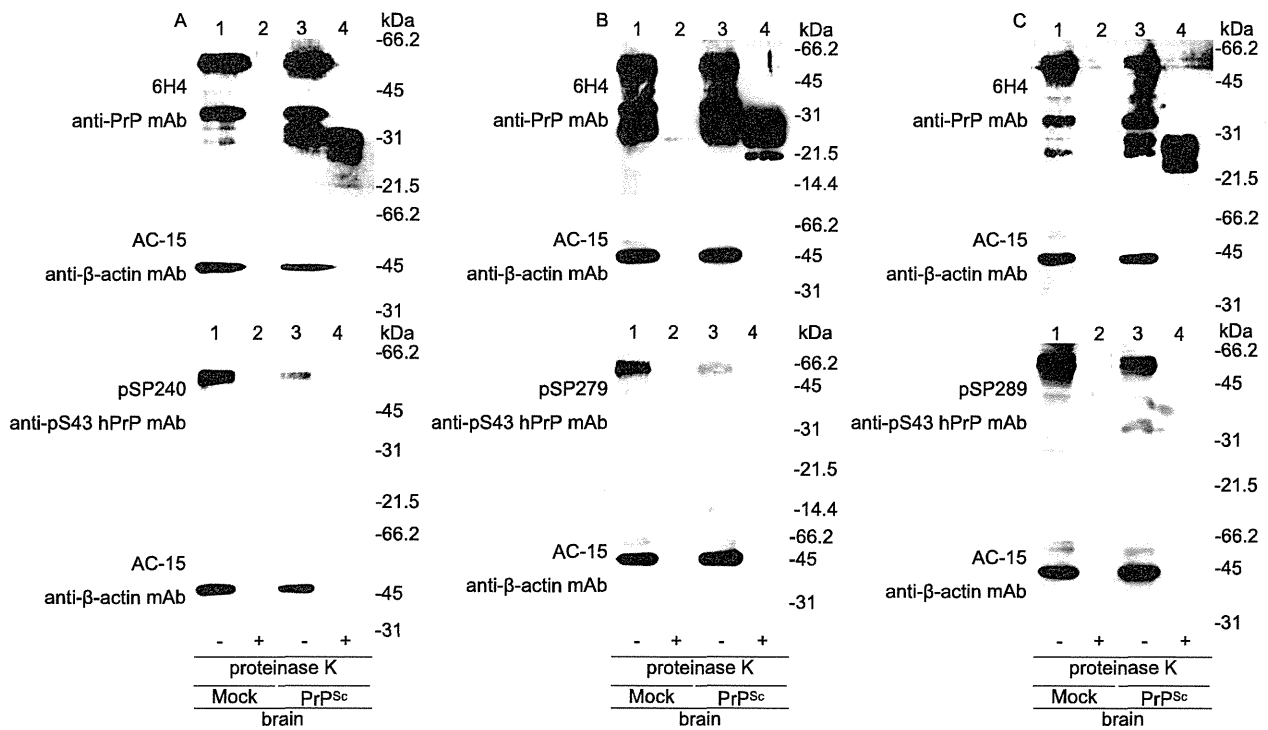


Fig. 3. Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. (A) Formation of a protease-resistant form of PrP in mouse brain. Methanol-precipitated brain lysates (50 µg protein) were treated with proteinase K (50 µg/ml) at for 30 min at 37°C. (lanes 2 and 4) or left undigested (lanes 1 and 3). All lysates were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or anti-pS43 hPrP mAbs (A, pSP240; B, pSP 279; C, pSP289).

抗プリオン蛋白質抗体6H4を用いたイムノブロット法で(Fig. 4., upper panel)、対象脳(lane 1)及びPrP^{Sc}感染脳(lane 3)は二量体及び単量体のPrP^{Sc}に相当するバンドを示し、PNGase F処理に

よる糖鎖除去で2量体及び単量体のPrPは低分子側に移動した(lanes 2 and 4)。同様に、pS279抗体は対象脳で糖鎖を有する2量体PrPのバンドを認識し(lower panel, lane 1)、PNGase F処理によりバンドは低分子側に移動した(lower panel, lane 2)。

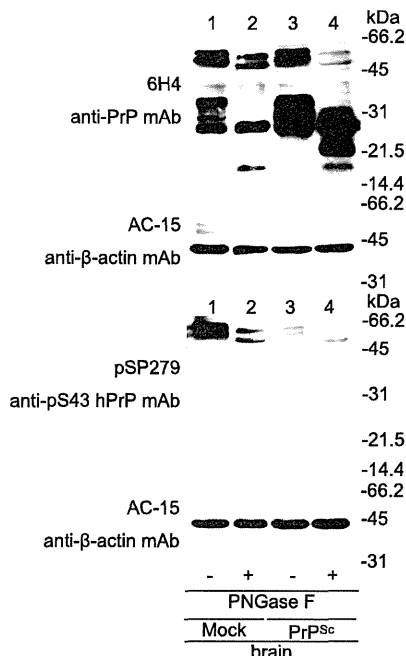


Fig. 4. Analysis of deglycosylated forms of PrP in mouse brain. Brain lysates were incubated with (lanes 2 and 4) or without (lanes 1 and 3) PNGase F for 180 min. All lysates were subjected to immunoblot with the 6H4 (upper panel) or pSP279 (lower panel) antibodies.

D. 考察

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を行った。

PrP^{Sc}の産生にはセリン残基のリン酸化が関与し、cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5)がヒトPrP^CのN端側43残基のSer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Ser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、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、いまだリン酸化セリンを認識する有効な抗体は得られていない。本研究ではPrP^{Sc}を特異的に認識する抗体の候補として、リン酸化プリオンペプチドを免疫して得られた抗体の解析を

行った。

マウスをpS43-hPrP (39-50)-Cys-SPDD-BCIPで免疫し、3種類のmAb (pS240、pS279、pSP289) 産生ハイブリドーマを樹立した。それらの腹水を用いたELISAによる解析では、抗体価はpSP240が最も高い値を示したが、固相抗原に対する抗体価の比[pS43-hPrP (39-50)/hPrP (39-50)]はpSP279が最も高く、次いでpSP289、pSP240の順だった。これらの結果は、pS43-hPrPのリン酸基に対する特異性はpSP279が最も高く、pSP240はpS43とS43を識別しないことを示唆している。イムノブロット法による解析では、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示した。しかし、これらの抗pS43-hPrP mAbは二量体のPrPに相当するバンドを示したが、6H4が認識する単量体のPrPは認識しなかった。長時間の露光時間によるイムノブロット法でも単量体のPrPに相当するバンドは得られず、これらの抗体は多量体のPrPを特異的に認識すると推定される。

pS43に対して最も高い特異性を示したpSP279抗体は、イムノブロット法で対象脳のPrPを認識したが、PrP^{Sc}に対する反応性は弱かった(Fig. 3B)。6H4抗体はPrP^{Sc}感染脳を対象脳と同様に認識し、PrP^{Sc}感染脳はPK処理耐性であること、PNGase F処理で糖鎖を除去すると抗体が認識するバンドが低分子側に移動することから(Fig. 4)、pSP279は二量体のPrP^Cを特異的に認識することが示された。先の論文ではウサギポリクローナル抗体を用いた研究で、PrP^{Sc}感染脳では正常脳に比較してpS43が多いと報告されている(Giannopoulos, P.N. *et al.*, 2009, *J. Neurosci.* **29**, 8743-8751)。しかし、本研究ではイムノブロット法でpSP279抗体が認識するpS43を含むPrPは対象脳に多く、逆の結果となった。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し、pS43の経時的変化を調べる必要がある。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。

イムノブロット法でpSP289抗体とpSP279抗体は異なる反応性を示し、pSP289抗体は対象脳とPrP^{Sc}感染脳を認識し、pSP279抗体は対象脳に高い特異性を示した。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。

今年度はPrP^{Sc}感染脳を用い、イムノブロット法でリン酸化プリオンペプチドに対する抗体の特異性を調べた。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。

E. 結論

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を認識する抗体の特異性を解析した。イムノブロット法でpSP289抗体は対象脳とPrP^{Sc}感染脳を同様に認識し、pSP279抗体は対象脳に高い特異性を示した。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

1. 論文発表

Sei-ichi Yusa, José B. Oliveira-Martins, Yoshiko Sugita-Konishi, Yutaka Kikuchi: Cellular Prion Protein: From Physiology to Pathology, 2012, *Viruses* **4**, 3109-3131.

2. 学会発表

1. 菊池裕, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 小西良子, 山口照英: リン酸化セリンを含むプリオン蛋白質を認識する抗体に関する研究、第85回日本生化学会大会、平成24年12月14-16日、福岡市
2. 玉川萌笑, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 辻勉, 小西良子, 菊池裕: PrP遺伝子欠損細胞株HpL3-4に導入したヒツジプリオン蛋白質の解析、第85回日本生化学会大会、平成24年12月14-16日、福岡市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 研究協力者

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 青笹正義
国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部 中島治
衛生微生物部 遊佐精一

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
原園 景, 川崎ナナ	第7部第1章品質 評価試験に関する 規制と申請対応		世界への薬事 申請書の書き 方 成功のバイ ブル	技術情報 協会	東京	2012	919-925
橋井則貴, 川崎ナナ	液体クロマトグ ラフィー／質量 分析によるバイ オ医薬品由来不 純物の解析	吉森孝行	バイオ (抗体) 医薬品におけ る不純物／凝 集の評価・試 験と免疫原 性, ウイルス 安全性への対 応	サイエン ス&テク ノロジー	東京	2012	150-168
遊佐敬介	第11章バイオ医 薬品のウイルス 安全性	吉森孝行	バイオ (抗体) 医薬品におけ る不純物／凝 集の評価・試 験と免疫原 性, ウイルス 安全性への対 応	サイエン ス&テク ノロジー	東京	2012	270-279

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川崎ナナ, 石井明子, 奥田晴宏	バイオ医薬品原薬のクオリ ティバイデザイン	PHARM TECH JAPAN	28	2491-2501	2012
石井明子, 原園 景, 川崎ナナ	バイオ後続品／バイオシミ ラーに関する国内外の規制 動向と品質評価	PHARM TECH JAPAN	29	23-42	2012
橋井則貴, 原園 景, 栗林亮佑, 川崎ナナ	液体クロマトグラフィー／ 質量分析による糖タンパク 質医薬品の糖鎖解析	PHARM TECH JAPAN	28	2897-2905	2012
川崎ナナ, 武田伸一, 渡部一人, 津田重城	わが国における今後のバイ オ医薬品の開発について	医薬品医療機 器レギュラト リーサイエン ス	43	884-896	2012

川崎ナナ, 石井明子	抗体医薬品のバイオ後続品の将来展望	臨床と微生物	39	459-465	2012
川崎ナナ, 石井明子	バイオ後続品	日本病院薬剤師誌	48	1079-1086	2012
Yuan Y., Yokoyama M., Maeda Y., Terasawa H., Harada S., Sato H., Yusa, K.	Structure and dynamics of the gp120 V3 loop that confers noncompetitive resistance in R5 HIV-1 _{JR-FL} to maraviroc	PLOS One	<i>in press</i>		
Harada S., Yoshimura K., Yamaguchi A., Boonchawalit S., Yusa K., Matsushita S.	Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro.	J. Gen. Virol.	94	933-943,	2013
遊佐敬介, 前田洋助	ヒト感染が疑われたレトロウイルスの起源とウイルス安全性	PHARM TECH JAPAN	28	2075-2079	2012
遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴	バイオ医薬品の外来性感染性物質について	PHARM TECH JAPAN	28	941-946	2012
日本PDA製薬学会バイオウイルス委員会 SALLY分科会	過去の事例に学ぶウイルス汚染の防止対策 ~血漿分画製剤の感染事例その対策~	PHARM TECH JAPAN	29	印刷中	2013
Toda T., Kuwahara K., Kondo N., Matsuda Z., Maeda Y., Maeda K., Sakaguchi N.	Dynamic appearance of antigenic epitopes effective for viral neutralization during membrane fusion initiated by interactions between HIV-1 envelope proteins and CD4/CXCR4.	Immunobiology	217	864-872	2012
Ogawa M., Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Nakagawa I., Mochizuki M.	Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis.	Jpn J Ophthalmol.	56(6)	529-535	2012.
Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Ogawa M., Maruyama K., Usui N., Mochizuki M.	Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	53(8)	4692-4698	2012
Ogawa M., Sugita S., Watanabe K., Shimizu N., Mochizuki M.	Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	250(12)	1877-1883	2012

Sugita S., Shimizu N., Watanabe K., Ogawa M., Maruyama K., Usui N., Mochizuki M.	Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.	250(3)	391-398	2012
Yamaguchi T., Kanayasu-Toyoda T., Uchida E.	Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases	Chen. Pharm. Bull.	36	176-181	2013
Yasugi M., Kubota-Koketsu R., Yamashita A., Kawashita N., Du A., Sasaki T., Nishimura M., Misaki R., Kuhara M., Boonsathorn N., Fujiyama K., Okuno Y., Nakaya T., Ikuta K.,	Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus.	PLoS One	9	e1003150	2013
Watanabe Y., Ibrahim M.S., Ikuta K.	Evolution and control of H5N1. A better understanding of the evolution and diversity of H5N1 flu virus and its host species in endemic areas could inform more efficient vaccination and control strategies.	EMBO reports	14	117-122	2013
Watanabe Y., Ibrahim M.S., Suzuki Y., Ikuta K.	The changing nature of avian influenza A virus (H5N1).	Trends Microbiol.	20	11-20	2012
Urayama T., Cameron R., Sato T., Yunoki M., Ikuta K.	Misinterpretation in virus clearance studies of biological products due to an uncommon discrepancy between cytopathic effects and infectivity of human immunodeficiency virus (HIV)	Biologicals	41	125-127	2013
Sasaki T., Kubota-Koketsu R., Takei M., Hagihara T., Iwamoto S., Murao T., Sawani K., Fukae D., Nakamura M., Nagata E., Kawakami A., Mitsubayashi Y., Ohno M., Uehara Y., Fukukawa T., Kanai Y., Kosaka M., Ikuta K.	Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: Implications for drug administration.	PLoS One	7	e50670	2012

Noda M., Masrinoul P., Pipattanaboon C., Ramasoota P., Setthapramote C., Sasaki T., Sasayama M., Yamashita A., Kurosu T., Ikuta K., Okabayashi T.	Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against dengue virus capsid protein among four serotypes.	Biologics	6	409-416	2012
Kubota-Koketsu R., Yunoki M., Okuno Y., Ikuta K.	Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010.	Biologics	6	245-247	2012
Sakudo A., Baba K., Ikuta K.	Analysis of Vis-NIR spectra changes to measure the inflammatory response in the nasal mucosal region of influenza A and B virus-infected patients.	J. Clin. Virol.	55	334-338	2012
Sakudo A., Baba K., Ikuta K.	Discrimination of influenza virus-infected nasal fluids by Vis-NIR spectroscopy.	Clin. Chim. Acta	414C	130-134	2012
Tian Y.S., Verathamjamras C., Kawashita N., Okamoto K., Yasunaga T., Ikuta K., Kameoka M., Takagi T.	Discovery of novel low-molecular-weight HIV-1 inhibitors interacting with cyclophilin A using in silico screening and biological evaluations.	J. Mol. Model	19	465-475	2013
Li Y.G., Siripanyaphinyo U., Tumkosit U., Noranate N., A-Nuegoonpipat A., Kurosu T., Ikuta K., Takeda N., Anantapreecha S.	Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells.	Intervirol	56	6-12	2013
Kubota-Koketsu R., Yunoki M., Okuno Y., Ikuta K.	Significant neutralizing activities against H2N2 influenza A viruses in human intravenous immunoglobulin lots manufactured from 1993 to 2010.	Biologics	6	245-247	2012
Hirai I., Ebara M., Nakanishi S., Yamamoto C., Sasaki T., Ikuta K., Yamamoto Y.	Jurkat cell proliferation is suppressed by Chlamydia (Chlamydomonas) pneumonia infection accompanied with attenuation of phosphorylation at Thr389 of host cellular p70S6K.	Immunobiology	218	527-532	2013